

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291277** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.08

(22) Дата подачи заявки
2020.11.03

(51) Int. Cl. *C07K 16/24* (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО, СПЕЦИФИЧЕСКОЕ В ОТНОШЕНИИ IL-33, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИИ ПОЧЕК

(31) **62/930,179; 63/068,601**

(32) **2019.11.04; 2020.08.21**

(33) **US**

(86) **PCT/EP2020/080837**

(87) **WO 2021/089559 2021.05.14**

(88) **2022.06.09**

(71) Заявитель:
МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:

**Бэйкер Дэвид Джеймс, Морено Куинн
Кэрол Партиция, Вуллард Кевин
Джеймс, Сет Аша, Лиарте Марин
Елена, Мьюзиал Барбара, Коэн Эмма
Сюзанн, Стриксон Сэм, Хауслэй
Кирсти (GB)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Изобретение относится к способу лечения повреждения почек путем введения терапевтического средства, специфического в отношении IL-33, которое обеспечивает подавление как передачи сигнала посредством ST2, так и передачи сигнала посредством RAGE.

A1

202291277

202291277

A1

ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО, СПЕЦИФИЧЕСКОЕ В ОТНОШЕНИИ IL-33, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИИ ПОЧЕК

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/930179, поданной 4 ноября 2019 г. и предварительной заявке на патент США № 63/068601, поданной 21 августа 2020 г. Содержание этих заявок полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к способу лечения повреждения почек, такого как диабетическая болезнь почек.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Хроническое заболевание почек (СКД) представляет собой проблему общественного здравоохранения во всем мире (Ritz et al., 1999; Nwankwo et al., 2005), которая ассоциирована со значительной заболеваемостью и смертностью (Brenner et al., 2001; Lewis et al., 2001; Go et al. 2004). Диабет является причиной примерно 45% случаев развития второй стадии заболевания почек в Соединенных Штатах, причем примерно 90% этих случаев приходится на пациентов с диабетом типа 2 (USRDS 2009). Общепринятым стандартом лечения диабетической болезни почек (DKD) является применение ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (ACEi) или блокаторов рецепторов ангиотензина (ARB). Обнаружилось, что другие пути, такие как передача сигнала посредством RAGE и передача сигнала по оси IL-33/ST2, способствуют прогрессированию заболевания. Эти пути опосредуются иммунной системой за счет инфильтрации иммунных клеток и провоспалительных цитокинов, хемокинов и молекул адгезии (Hickey 2018; Ferhat et al *JASN* **2018** 29:1272-1288). Сложная патофизиология DKD (Brenner et al., 2001; Lewis et al., 2001) означает, что гемодинамические эффекты ACEi и ARB обеспечивают неполную защиту от прогрессирующей потери функции почек.

Таким образом, в этой области техники существует неудовлетворенная медицинская потребность.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Как показано в примерах и по причинам, изложенным ниже, подавление передачи сигналов как посредством рецептора ST2, так и посредством RAGE обеспечивает эффективное лечение повреждения почек. В данном изобретении впервые показано, что IL-33 опосредует патологическую передачу сигналов в различных типах клеток почек посредством различных путей. Более конкретно, показано, что восстановленная форма IL-33 (redIL-33) инициирует передачу сигналов в эндотелиальных клетках клубочков по пути

ST2. Кроме того, описан неизвестный до сих пор путь передачи сигнала, в котором показано, что окисленный IL-33 (oxIL-33) инициирует передачу сигнала посредством RAGE/EGFR в подтипах клеток эпителия почек. Было известно, что передача сигнала посредством RAGE вовлечена в патологический процесс при заболеваниях почек, хотя ранее oxIL-33 не рассматривался в качестве лиганда для RAGE. Таким образом, в настоящем изобретении представлен новый механизм лечения заболевания почек путем подавления передачи сигнала, опосредованной oxIL-33. Однако лечебный эффект может не ограничиваться подавлением oxIL-33, поскольку связывание и нейтрализация IL-33 также может подавлять патологическую активность redIL-33. Дополнительно, в настоящем изобретении указано, что обе изоформы IL-33 обеспечивают дифференциальные, потенциально патологические эффекты в отношении мезангиальных клеток. Показано, что RedIL-33 инициирует выработку воспалительных цитокинов в этом типе клеток, тогда как oxIL-33 индуцирует пролиферацию мезангиальных клеток. Мезангиальная экспансия является патологическим признаком некоторых хронических заболеваний почек, таких как диабетическая болезнь почек (DKD). Таким образом, в настоящем изобретении продемонстрирована возможность блокирования нескольких различных патологических путей, ассоциированных с заболеванием почек, путем воздействия на один цитокин, IL-33, с целью уменьшения или подавления опосредованного IL-33 воспаления в почке, уменьшения или подавления выраженности аномальной физиологии эпителия, ассоциированной с передачей сигнала, опосредованной oxIL-33, и/или уменьшения или подавления мезангиальной экспансии.

Таким образом, в первом аспекте представлен способ лечения повреждения почек, где способ включает введение терапевтического средства, специфического в отношении IL-33, которое подавляет как передачу сигнала посредством ST2, так и передачу сигнала посредством RAGE. В некоторых вариантах осуществления указанный способ обеспечивает ослабление или подавление активности восстановленного белка IL-33 (redIL-33) и таким образом обеспечивает подавление передачи сигнала посредством ST2. В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает ослабление или подавление активности окисленного белка IL-33 (oxIL-33) и таким образом обеспечивает подавление передачи сигнала посредством RAGE.

В некоторых вариантах осуществления повреждение почек включает воспаление. В некоторых вариантах осуществления повреждение почек представляет собой воспаление.

В некоторых вариантах осуществления повреждение почек выбрано из диабетической болезни почек, фиброза, гломерулонефрита (например непролиферативного (такого как

гломерулонефрит с минимальными изменениями, мембранный гломерулонефрит, фокально-сегментарный гломерулосклероз) или пролиферативного (такого как IgA-нефропатия, мембранопротролиферативный гломерулонефрит, постинфекционный гломерулонефрит и быстро прогрессирующий гломерулонефрит [такой как синдром Гудпасчера и нарушения, относящиеся к васкулитам {в том числе гранулематоз Вегенера и микроскопический полиангиит}]), системной красной волчанки, альбуминурии, односторонней обструкции мочеточника, синдрома Альпорта, поликистозной болезни почек (РСКД), гипертонического гломерулосклероза, хронического гломерулосклероза, хронической обструктивной уропатии, хронического тубулоинтерстициального нефрита и ишемической нефропатии. В некоторых вариантах осуществления повреждение почек представляет собой диабетическую болезнь почек.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой химический ингибитор или связывающую молекулу, такую как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления, где терапевтическое средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, оно специфически связывается с IL-33. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с redIL-33 и ослабляют или подавляют активность redIL-33 с обеспечением таким образом подавления передачи сигнала посредством ST2. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с redIL-33 с аффинностью связывания, составляющей 100 пМ или меньше или составляющей 10 пМ или меньше, например составляющей 1 пМ или меньше, такой как 0,5 пМ, в частности 0,05 пМ (например, при измерении с применением KinExA). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с redIL-33 при скорости ассоциации ($k(\text{on})$), превышающей или равной $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с redIL-33 при скорости диссоциации ($k(\text{off})$), составляющей меньше или равной $5 \times 10^{-1} \text{ c}^{-1}$, 10^{-1} c^{-1} , $5 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$, 10^{-2} c^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-3} c^{-1} . Антитела с такими характеристиками связывания являются особенно предпочтительными, поскольку они связываются с восстановленной формой IL-33 и удаляют ее, с обеспечением таким образом подавления или ослабления активности redIL-33. Сила связывания также может быть достаточной для удаления redIL-33 до взаимодействия с мишенью (т. е. до связывания с ST-2). Кроме того, сила связывания может также обеспечивать предупреждение высвобождения redIL-33 из комплекса redIL-

33/связывающая молекула, предупреждая превращение red-IL-33 в окисленную форму. Таким образом, такие связывающие молекулы или их антигенсвязывающие фрагменты обеспечивают подавление или ослабление активности oxIL-33 , с обеспечением таким образом подавления передачи сигнала посредством RAGE. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент обеспечивают ослабление или подавление активности oxIL-33 и обеспечивают таким образом подавление передачи сигнала посредством RAGE.

В некоторых вариантах осуществления указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат VHCDR1, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 37, VHCDR2, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 38, VHCDR3, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 39, VLCDR1, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 40, VLCDR2, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 41, и VLCDR3, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, имеющий последовательность под SEQ ID NO: 1, и VL, имеющий последовательность под SEQ ID NO: 19.

В другом аспекте представлено терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения в способе лечения повреждения почек у субъекта, где терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, предназначено для введения субъекту для ослабления или подавления опосредованной IL-33 передачи сигнала посредством ST2 и опосредованной IL-33 передачи сигнала посредством RAGE.

В некоторых вариантах осуществления опосредованная IL-33 передача сигнала посредством RAGE представляет собой опосредованную IL-33 передачу сигнала посредством RAGE-EGFR. В некоторых вариантах осуществления подавление или ослабление передачи сигнала посредством RAGE-EGFR, обеспечивает ослабление или подавление опосредованных RAGE-EGFR эффектов. В некоторых вариантах осуществления опосредованный RAGE-EGFR эффект предусматривает аномальную физиологию эпителия. В некоторых вариантах осуществления аномальная физиология эпителия представляет собой аномальное ремоделирование эпителия. В некоторых вариантах осуществления опосредованный RAGE-EGFR эффект предусматривает аномальную мезангиальную экспансию. В некоторых вариантах осуществления аномальная мезангиальная экспансия включает аномальную пролиферацию мезангиальных клеток.

В некоторых вариантах осуществления подавление или ослабление передачи сигнала посредством ST2 обеспечивают ослабление или подавление опосредованных ST2 эффектов. В некоторых вариантах осуществления опосредованный ST2 эффект предусматривает аномальное воспаление в почке. В некоторых вариантах осуществления аномальное воспаление предусматривает повышенную секрецию или экспрессию IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α и/или IL1b, необязательно повышенную секрецию или экспрессию IL-4, IL-6, IL-8 и/или IL-12. В некоторых вариантах осуществления аномальное воспаление предусматривает активацию MAP-киназы. В некоторых вариантах осуществления активация MAP-киназы включает активацию киназы p38 или JNK. В некоторых вариантах осуществления воспаление находится в эндотелии, клубочках или и в том, и в другом месте.

В другом аспекте представлено терапевтическое средство, которое обеспечивает подавление или ослабление активности восстановленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством ST2, для применения при лечении повреждения почек, где лечение дополнительно включает подавление или ослабление активности окисленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством RAGE.

В другом аспекте представлено применение терапевтического средства, которое обеспечивает подавление или ослабление активности восстановленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством ST2, в изготовлении лекарственного препарата для лечения повреждения почек, где лечение дополнительно включает подавление или ослабление активности окисленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством RAGE.

В другом аспекте представлено терапевтическое средство, которое обеспечивает подавление или ослабление активности окисленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством RAGE, для применения при лечении повреждения почек, где лечение дополнительно включает подавление или ослабление активности восстановленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством ST2.

В другом аспекте представлено применение терапевтического средства, которое обеспечивает подавление или ослабление активности окисленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством RAGE, в изготовлении лекарственного препарата для лечения повреждения почек, где лечение дополнительно включает подавление или ослабление активности восстановленного IL-33 с

обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством ST2.

В другом аспекте представлено терапевтическое средство, которое обеспечивает подавление или ослабление активности восстановленного IL-33, с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством ST2, и терапевтическое средство, которое обеспечивает подавление или ослабление активности окисленного IL-33, с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством RAGE, для применения при лечении повреждения почек.

В другом аспекте представлено применение терапевтического средства, которое обеспечивает подавление или ослабление активности восстановленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством ST2, и терапевтического средства, которое обеспечивает подавление или ослабление активности окисленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством RAGE, в изготовлении лекарственного препарата для лечения повреждения почек.

В другом аспекте представлено терапевтическое средство, которое обеспечивает подавление или ослабление активности восстановленного IL-33 и окисленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством ST2 и передачи сигнала посредством RAGE, для применения при лечении повреждения почек.

В другом аспекте представлено применение терапевтического средства, которое обеспечивает подавление или ослабление активности восстановленного IL-33 и окисленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством ST2 и передачи сигнала посредством RAGE, в изготовлении лекарственного препарата для лечения повреждения почек.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1. Экспрессия РНК IL33 в интерстиции клубочков и канальцев, проанализированная в когорте ERCB (A), когорте Ju 2013 (B) и когорте Woroniecka (C).

Фигура 2. (A) Экспрессия РНК ST2 в нормальных и диабетических почках и (B) экспрессия РНК ST2 повышена в корковом веществе почки (устойчивое состояние).

Фигура 3. Экспрессия мРНК IL33 в доклинических моделях СКД на мышах.

Фигура 4. Экспрессия мРНК RAGE в доклинических моделях СКД на мышах.

Фигура 5. Дизайн доклинической модели СКД с применением модели db/db UNX с вмешательствами в виде введения средств, специфических в отношении ST2 и в отношении RAGE.

Фигура 6. Изменения UACR в модели СКД на db/db UNX, измеренные через 13 и 15 недель у мышей, обработанных средствами, специфическими в отношении ST2 и в отношении RAGE, по сравнению с таковым при обработке с помощью антитела изотипического контроля (NIP), показанные в виде абсолютных значений.

Фигура 7. Изменения UACR в модели СКД на db/db UNX, измеренные через 13 и 15 недель у мышей, обработанных средствами, специфическими в отношении ST2 и в отношении RAGE, по сравнению с таковым при обработке с помощью антитела изотипического контроля (NIP), показанные в виде процентного изменения в недели 13 и 15 по сравнению с таковыми в неделю 10.

Фигура 8. Оценка повреждения клубочков (GDS) в доклинической модели СКД на db/db UNX при обработке с помощью средства, специфического в отношении ST2, или при обработке с помощью антитела изотипического контроля (NIP).

На **фигуре 9** показана тепловая карта в оттенках серого кратного увеличения уровня фосфорилирования киназ по сравнению с необработанным контролем для каждого из анализов обнаружения в матричном анализе с использованием антител для определения уровня фосфорилирования MAP-киназ. Снижение уровня IL-33 (IL-33-01 и IL-33-16 соответственно) не обуславливало возникновения каких-либо сигналов выше исходного уровня. oxIL-33 (окисленный IL-33-01) обуславливал повышение уровня фосфорилирования нескольких киназ.

На **фигуре 10** показан паттерн сигналов для каждого условия стимуляции в матричном анализе активности рецепторной тирозинкиназы (RTK). oxIL-33, в отличие от восстановленных IL33-01 и IL33-16 соответственно, обуславливал получение положительного сигнала в матричном анализе RTK, соответствующего таковому для рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). Интенсивность точек коррелирует с уровнем фосфорилирования рецепторной тирозинкиназы.

На **фигуре 11A** показана активность pEGFR (Tyr1068) в нормальных эпителиальных клетках бронхов человека (NHBE), стимулированных возрастающими концентрациями лигандов IL-33 или EGFR. oxIL-33, в отличие от восстановленного IL-33 (IL33-01), способствовал фосфорилированию EGFR аналогично EGF, HB-EGF и TGF α .

На **фигуре 11B** показана активность pEGFR (Tyr1068) в клетках A549, стимулированных возрастающими концентрациями лигандов IL-33 или EGFR. oxIL-33 (окисленный IL-33-

01), в отличие от восстановленного IL-33 (IL-33-01), способствовал фосфорилированию EGFR аналогично EGF, HB-EGF и TGF α с паттерном, аналогичным наблюдаемому в клетках NHBE.

На **фигуре 11С** показана активность pEGFR (Tyr1068) в клетках A549, стимулированных возрастающими концентрациями IL-33, лигандов EGFR или лигандов RAGE. oxIL-33, в отличие от IL-33 дикого типа (WT) (IL-33-01), IL-33 с мутацией C->S (mut) (IL-33-16) или лигандов RAGE, способствовал фосфорилированию EGFR аналогично EGF.

На **фигуре 12** показано, что окисленный IL-33 индуцирует фосфорилирование множества молекул, участвующих в пути EGFR (EGFR, PLC, АКТ, JNK, ERK 1/2, p38), согласно вестерн-блот-анализу.

На **фигуре 13** показано, что фосфорилирование STAT5, индуцированное oxIL-33, уменьшается при увеличении доз антитела к EGFR по сравнению с изотипическим контролем.

На **фигуре 14** показана иммунопреципитация посредством антитела к EGFR с последующим обнаружением EGFR, RAGE или IL-33 с помощью вестерн-блот-анализа. IL-33 и RAGE совместно осаждаются с EGFR после стимулирования NHBE с помощью oxIL-33, что позволяет предположить, что они образуют комплекс. RAGE, по-видимому, уникален для сигнального комплекса oxIL-33 по сравнению с EGF.

На **фигуре 15А** показано, что oxIL-33 напрямую связывается с RAGE. HMGB1 является известным лигандом RAGE и выступает в качестве положительного контроля в данном исследовании.

На **фигуре 15В** показано, что oxIL-33 не связывается напрямую с EGFR (но известный лиганд EGFR, EGF, связывается). Однако когда в этот анализ добавляют RAGE в комбинации с oxIL-33, то наблюдается связывание EGFR.

На **фигуре 16** показана иммунопреципитация с помощью средства, специфического в отношении EGFR или RAGE, с последующим вестерн-блот-анализом для EGFR, RAGE и IL-33 в клетках A549 дикого типа и RAGE-дефицитных клетках A549 после активации с помощью oxIL-33 в указанные моменты времени.

На **фигуре 17** показано, что фосфорилирование STAT5, индуцированное oxIL-33-01, уменьшается посредством антитела к RAGE, но не антитела к ST2.

На **фигуре 18** показана (А) секреция IL33 первичными эпителиальными клетками проксимальных канальцев (PTEC) в ответ на медиаторы воспаления. Также показан ответ PTEC на экзогенный IL-1b, но не на экзогенный redIL-33, что обнаруживали по перемещению NF κ B (В). На (С) показано, что PTEC не отвечают на IL-33 дозозависимым

образом, секретируя воспалительные цитокины IL-6, IL8, TNF α и IL1b. На (D) показано, что в PTEC не увеличивается активация p38 или JNK, двух нисходящих медиаторов активации передачи сигнала по оси ST2, выше исходных уровней при обработке посредством redIL-33. На (E) показано, что обнаружение фосфорилированного EGFR (pEGFR) увеличивается в PTEC при обработке экзогенным oxIL33 или EGF, но не redIL-33 или S1001A9 (лиганд RAGE). Повышенный уровень pEGFR в PTEC после обработке посредством oxIL33 уменьшается в присутствии антител к RAGE и к EGFR (F). На (G) показано, что уровень KIM-1 увеличивается в PTEC при воздействии oxIL-33, но не восстановленного IL-33.

Фигура 19. На (A) показано увеличение секреции IL33 первичными эндотелиальными клетками клубочков (GEnC) в ответ на медиаторы воспаления. На (B) показано, что GEnC отвечает на обработку с помощью экзогенного redIL33, увеличивая уровень перемещения NF κ B. Ответ блокируется в присутствии антитела к IL-33 (C). На (D) показано, что GEnC секретируют воспалительные цитокины IL-6 и IL-8 при стимуляции посредством redIL-33, но не oxIL-33. Секреция IL-8, TNF α , IL1b и IL-6 из GEnC при обработке посредством redIL33 увеличивается дозозависимым образом (E).

Фигура 20. На (A) показано, что первичные эндотелиальные клетки клубочков (GEnC) секретируют воспалительные цитокины в ответ на IL33. Секреция блокируется в присутствии антитела к IL33. На (B) показано, что redIL-33 активирует активность киназ p38 и JNK, которая подавляется в присутствии 33-640087_7B.

Фигура 21. На (A) показана передача сигнала посредством IL-33 в первичных мезангиальных клетках человека. В мезангиальных клетках уровень IL-33 повышается при стрессовом воздействии интерферона-гамма и TNF-альфа. Мезангиальные клетки секретируют IL-8 дозозависимым образом при воздействии возрастающих концентраций IL-33 (B). На (C) показано, что секреция IL-8 из мезангиальных клеток подавляется в присутствии 33-640087_7B. На (D) показано, что увеличение концентрации oxIL-33 обеспечивает увеличение уровня пролиферации мезангиальных клеток.

На **фигуре 22A** показана относительная плотность заживления ран для клеток A549 после обработки восстановленным IL-33, oxIL-33 или EGF. На гистограмме показано среднее значение и SEM для 6 технических повторов для каждого условия.

На **фигуре 22B** показана относительная плотность заживления ран для клеток NHBE после обработки восстановленным IL-33, oxIL-33 или EGF. На гистограмме показано среднее значение и SEM для 6 технических повторов для каждого условия.

На **фигуре 23** показана процентная доля зарастания раны в виде царапины для клеток NHBE, обработанных только средой (контроль без стимулирования), восстановленным IL-

33, окисленным IL-33 или окисленным IL-33 в присутствии средств, специфических в отношении ST2, RAGE или EGFR. На гистограмме показано среднее значение и SEM для 6 технических повторов для каждого условия.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Общие определения

"Выделенный", как используется в данном документе, относится к белку в неприродном окружении, в частности, выделенному из природного источника, например, данный термин не включает ни белок *in vivo*, ни белок в образце, взятом из организма человека или животного. Как правило, белки будут находиться в носителе, таком как жидкость или среда, или могут быть составленными, замороженными или лиофилизированными, и все эти формы могут охватываться выражением "выделенный" в соответствующих случаях. В одном варианте осуществления выделенный не относится к белку, находящемуся в геле, например геле, используемом в вестерн-блот-анализе или аналогичных.

Белок "IL-33", как используется в данном документе, относится к интерлейкину 33, в частности к белку, представляющему собой интерлейкин 33 млекопитающих, например белку человека, депонированному в UniProt под номером 095760. Эта структура представляет собой не одну молекулу, а существует в восстановленной и окисленной формах (Cohen et al Nature Comms). С учетом быстрого окисления восстановленной формы *in vivo*, например, за период от 5 минут до 40 минут, и *in vitro*, в большинстве случаев ссылки на IL-33 из предшествующего уровня техники фактически представляют собой ссылки на окисленную форму. Термины "IL-33", и "полипептид IL-33", и "белок IL-33" используются взаимозаменяемо. В определенных вариантах осуществления IL-33 является полноразмерным. В другом варианте осуществления IL-33 представляет собой зрелый усеченный IL-33 (аминокислоты 112-270). Недавние исследования показывают, что полноразмерный IL-33 является активным (Cayrol and Girard, Proc Natl Acad Sci USA 106(22): 9021-6 (2009); Hayakawa et al., Biochem Biophys Res Commun. 387(1):218-22 (2009); Talabot-Ayer et al, J Biol Chem. 284(29): 19420-6 (2009)). Однако, IL-33, подвергнутый процессингу или усеченный на N-конце, содержащий без ограничения аминокислоты 72-270, 79-270, 95-270, 99-270, 107-270, 109-270, 111-270, 112-270, может характеризоваться усиленной активностью (Lefrancais 2012, 2014). В другом варианте осуществления IL-33 может включать полноразмерный IL-33, его фрагмент, или мутантный вариант или вариантный полипептид IL-33, где фрагмент IL-33 или вариантный полипептид IL-33 сохраняют некоторые или все функциональные свойства активного IL-33.

Окисленный IL-33, oxIL-33, IL-33-DSB (с дисульфидными связями) и DSB IL-33 применяют в данном документе взаимозаменяемо. Окисленный IL-33 относится к белку, который можно увидеть в виде отдельной полосы, например, при использовании вестерн-блот-анализа в невозстанавливающих условиях, в частности, масса которого на 4 Да меньше, чем у соответствующей восстановленной формы. В частности, он относится к белку с одной или двумя дисульфидными связями между остатками цистеина, независимо выбранными из остатков цистеина 208, 227, 232 и 259. Окисленный IL-33 относится к форме IL-33, которая связывается с RAGE и запускает опосредованную RAGE передачу сигналов. В одном варианте осуществления окисленный IL-33 не демонстрирует связывания с ST2.

Восстановленный IL-33 и redIL-33 используются в данном документе взаимозаменяемо. Восстановленный IL-33, как используется в данном документе, относится к форме IL-33, которая связывается с ST2 и запускает ST2-зависимую передачу сигнала. В частности, остатки цистеина 208, 227, 232 и 259 восстановленной формы не связаны дисульфидными связями. Активный фрагмент redIL-33, как используется в данном документе, относится к фрагменту, характеризующемуся активностью, сопоставимой с таковой redIL-33, например, аналогичной степенью ST2-зависимой передачи сигнала. В одном варианте осуществления активный фрагмент характеризуется наличием 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% активности полноразмерного redIL-33.

"Передача сигнала посредством ST2", как используется в данном документе, относится к системе IL-33/ST2, где распознавание IL-33 с помощью ST2 способствует димеризации с IL-1RAcP на поверхности клетки и привлечению компонентов рецепторного комплекса MyD88, TRAF6 и IRAK1-4 к внутриклеточному домену TIR внутри клетки. Рецептор ST2 на исходном уровне экспрессируется клетками Th2, тучными клетками и другими типами иммунных клеток, которые также могут находиться в почке. Внеклеточная форма IL-33 стимулирует целевые клетки путем связывания с ST2 и впоследствии активирует пути NFκB и MAP-киназы, что приводит к ряду функциональных ответов, включая выработку цитокинов и хемокинов. Таким образом, ST2-зависимую передачу сигналов можно прерывать путем нарушения взаимодействия IL-33 с ST2 или, альтернативно, путем прерывания взаимодействия с IL-1RAcP. Термин "подавление или ослабление" передачи сигнала посредством ST-2, используемый в данном документе, относится к снижению или блокированию передачи сигнала через систему ST-2/IL-33. Степень передачи сигнала посредством ST-2 (и, следовательно, ее подавление или ослабление) можно определить путем анализа уровней концентрации воспалительных цитокинов, повышающихся в

результате передачи сигнала посредством ST-2 (например, IL-4, IL-6, IL-8 и IL-12). Концентрации цитокинов можно измерить, например, с помощью ELISA-анализов или количественной масс-спектрометрии в биологических образцах, полученных от субъектов, подвергающихся воздействию терапевтических способов, описанных в данном документе.

"Передача сигнала посредством RAGE", также называемая "передача сигнала посредством AGER", относится к системе IL-33/RAGE, в которой IL-33 связывается с рецептором, обуславливая таким образом активацию провоспалительного гена. Подавление или ослабление передачи сигнала посредством RAGE, используемое в данном документе, относится к уменьшению или блокированию патологической передачи сигнала через систему RAGE/IL-33, такой как передача провоспалительного сигнала или передача сигнала, которая индуцирует аномальное ремоделирование эпителия или экспансию мезангиальных клеток в клубочках.

Выражения "связывающая молекула" или "антигенсвязывающая молекула", используемые в настоящем раскрытии, относятся в своем наиболее широком смысле к молекуле, которая специфически связывает антигенную детерминанту. В одном варианте осуществления связывающая молекула или ее антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с IL-33, в частности с redIL-33 и/или oxIL-33. В другом варианте осуществления связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой или его антигенсвязывающий фрагмент.

"Антитело", как используется в данном документе, относится к молекуле иммуноглобулина, обсуждаемой подробнее ниже, в частности, к полноразмерному антителу или молекуле, предусматривающей полноразмерное антитело, например молекуле DVD-Ig и т. п.

"Связывающий фрагмент" или "антигенсвязывающий фрагмент" представляет собой эпитоп/антигенсвязывающий фрагмент фрагмента антитела, например, содержащий связывающий домен, в частности, содержащий 6 CDR, как, например, 3 CDR в переменной области тяжелой цепи и 3 CDR в переменной области легкой цепи.

Если конкретно не ссылаются на антитела полного размера, такие как встречающиеся в природе антитела, термин "антитела к IL-33" охватывает антитела полного размера, а также антигенсвязывающие фрагменты, варианты, аналоги или производные таких антител, например встречающиеся в природе молекулы антител или иммуноглобулинов, или сконструированные молекулы антител, или фрагменты, которые связывают антиген способом, аналогичным молекулам антител.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, использующиеся в данном документе, могут быть описаны или определены с точки зрения эпитопа(эпитопов) или части(частей) антигена, например, целевого полипептида, раскрытого в данном документе (например, полноразмерного или зрелого IL-33), который они распознают или специфически связывают. Часть целевого полипептида, которая специфически взаимодействует с антигенсвязывающим доменом антитела, представляет собой "эпитоп" или "антигенную детерминанту". Целевой полипептид может содержать один эпитоп, но обычно содержит по меньшей мере два эпитопа и может предусматривать любое количество эпитопов, в зависимости от размера, конформации и типа антигена. Дополнительно, следует отметить, что "эпитоп" на целевом полипептиде может представлять собой элементы, отличные от элементов полипептида, или может содержать их, например, эпитоп может содержать углеводную боковую цепь.

Полагают, что минимальный размер пептидного или полипептидного эпитопа для антитела составляет приблизительно четыре-пять аминокислот. Пептидные или полипептидные эпитопы предпочтительно содержат по меньшей мере семь, более предпочтительно по меньшей мере девять и наиболее предпочтительно от по меньшей мере приблизительно 15 до приблизительно 30 аминокислот. Поскольку CDR может распознавать антигенный пептид или полипептид в их третичной форме, аминокислоты, составляющие эпитоп, не должны быть смежными, и в некоторых случаях они могут даже не находиться на одной и той же пептидной цепи. Пептидный или полипептидный эпитоп, распознаваемый антителами к IL-33 по настоящему изобретению, может содержать последовательность, состоящую из по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, более предпочтительно по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или от приблизительно 15 до приблизительно 30 смежных или несмежных аминокислот IL-33.

Используемые в данном документе термины "лечить" или "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и профилактическим или предупреждающим мерам, где целью является предупреждение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или нарушения, такого как прогрессирование воспалительного состояния. Благоприятные или требуемые клинические результаты включают без ограничения уменьшение выраженности симптомов, уменьшение степени тяжести заболевания, стабилизированное (т. е. не ухудшающееся) состояние заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или ослабление болезненного состояния и ремиссию (либо частичную, либо полную), независимо от того,

поддается они обнаружению или нет. "Лечение" может также означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью без получения лечения. К нуждающимся в лечении относят тех, у кого уже есть состояние или нарушение, а также тех, кто предрасположен к состоянию или нарушению, или тех, у кого нужно предупредить развитие состояния или нарушения.

Под "субъектом", или "индивидуумом", или "животным", или "пациентом", или "млекопитающим" подразумевается любой субъект, в частности субъект-млекопитающее, для которого требуется постановка диагноза, прогнозирование или терапия. Субъекты-млекопитающие включают людей, одомашненных животных, сельскохозяйственных и зоопарковых животных, используемых в спорте или домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и т. д. В одном варианте осуществления пациентом является человек.

"Ослабляет активность", как используется в данном документе, относится к снижению соответствующей активности или прекращению соответствующей активности. Как правило, ослабление и подавление используются в данном документе взаимозаменяемо, если из контекста явно не следует иное.

Терапевтические пути применения

Как описано в данном документе, подавление передачи сигнала как посредством ST2, так и посредством RAGE может обеспечить эффективное лечение повреждения почек. Как определено в данном документе, "повреждение почек" относится к длительному или хроническому заболеванию или повреждению почки, например, в результате болезни или травмы (включая физическую или химическую травму). Другими словами, как используется в данном документе, "повреждение почек" относится к заболеванию, при котором функция почек хронически нарушена и/или при котором ткань почки хронически повреждена, например, при котором эти аномалии сохраняются в течение по меньшей мере трех месяцев.

Описанные в данном документе способы относятся к лечению повреждения почек, по меньшей мере частично опосредованного IL-33. Было показано, что уровни IL-33 локально повышаются в почке у субъектов с повреждением почек. Восстановленный IL-33 (redIL-33) стимулирует воспаление в почке, активируя передачу сигнала путем прямого связывания с рецептором ST2. В данном раскрытии указано, что опосредуемый IL-33 ST2 присутствует во многих типах клеток, включая эндотелиальные клетки и мезангиальные клетки. В данном раскрытии также описано существование неизвестного до сих пор пути передачи сигнала посредством IL-33, с помощью которого окисленная форма IL-33 (oxIL-33)

инициирует передачу сигнала посредством RAGE/EGFR. В примерах описано, что в эпителии почек активируется передача сигнала посредством RAGE-EGFR. Неожиданно, настоящее изобретение также указывает на то, что опосредованная oxIL-33 передача сигнала посредством RAGE/EGFR предусматривает увеличение уровня пролиферации мезангиальных клеток, что потенциально способствует мезангиальной экспансии, наблюдаемой при хронических заболеваниях почки, таких как диабетическая болезнь почек. Следовательно, способы, описанные в данном документе, применимы не только для лечения опосредованных IL-33 воспалительных аспектов заболевания почек, таких как опосредованные передачей сигнала посредством ST2, но также и для лечения элементов почечного заболевания, при котором происходит опосредованная oxIL-33 патологическая передача сигнала посредством RAGE/EGFR.

Более конкретно, двойная блокада опосредованной IL-33 ST2-зависимой и RAGE-зависимой передачи сигнала (например, передачи сигнала посредством RAGE-EGFR) может обеспечить улучшение результатов лечения субъектов с повреждением почек. Моделирование заболевания почек *in vivo* показало корреляцию между уровнями IL-33 и повреждением почек. IL-33 в восстановленной форме обеспечивает передачу сигнала по подробно описанному пути передачи сигнала посредством ST2. Передача сигнала по пути ST2 вызывает воспалительные реакции, которые способствуют развитию патологии при повреждении и заболевании почек.

Кроме того, патологическая передача сигнала посредством RAGE была ассоциирована с различными нарушениями почек (D'Agati *et al Nat Rev Nephrol* 2010:352-60). RAGE представляет собой мультилигандный рецептор суперсемейства IgG, который связывается с конечными продуктами гликирования. Таким образом, антагонизм в отношении передачи сигнала посредством RAGE был предложен в качестве терапевтической стратегии для лечения хронического заболевания почек.

Однако из-за того, что RAGE является мультилигандным рецептором (Fritz *Trends in Biochemical Sciences* 2011 36:625-632), прямое подавление RAGE, вероятно, будет иметь нецелевые эффекты и токсичность, превышающие любые показатели эффективности в отношении заболевания почек. Считается, что в контексте биологии эпителия почки раскрытая в данном документе терапевтическая стратегия, предусматривающая подавление неизвестного до сих пор лиганда RAGE, имеет преимущество перед полным подавлением RAGE. Это связано с тем, что он обеспечивает подавление или ослабление патологической передачи сигнала посредством RAGE путем прямого подавления лиганда RAGE, oxIL-33. Уровень экспрессии IL-33 обычно является низким в сыворотке крови пациентов с

повреждением почек (Bao *et al. J Clin Immunol* 2012:587-94; Caner *et al. Renal Failure* 2014:78-80; Musolino *et al. Br. J. Haematol* 2013:709-710 Mok *et al. Rheumatology* 2010:520-527). Таким образом, нацеливание на передачу сигнала, опосредованную охIL-33-RAGE, позволяет подавлять или ослаблять (т. е. приглушать) эти элементы патологического повреждения почек, при этом потенциально снижая нецелевую токсичность, которая может проявиться при прямом подавлении RAGE. Это связано с тем, что настоящее изобретение обеспечивает подавление или ослабление патологической передачи сигнала посредством RAGE избирательным в отношении местоположения образом путем нацеливания на лиганд RAGE, который обнаруживается преимущественно в месте заболевания, т. е. в почках. Кроме того, эту стратегию можно комбинировать с подавлением пути redIL-33 ST2, что обеспечивает подавление и/или ослабление двух важных патологических путей, вовлеченных в повреждение почек.

Как показано в примерах, уровень экспрессии IL-33 в почках является повышенным у нескольких субъектов с диабетической нефропатией, а также в нескольких доклинических моделях заболевания почек. В примерах также продемонстрировано, что пути передачи сигнала IL-33 посредством как ST2, так и RAGE, активируются в эпителии, эндотелии и клубочках почек. В примерах также показано, что подавление активности передачи сигнала посредством IL-33 предупреждает высвобождение медиаторов воспаления. Таким образом, в настоящем изобретении представлена новая терапевтическая стратегия для лечения повреждения почек путем подавления или ослабления как ST2-, так и RAGE-зависимой передачи сигнала, опосредованной IL-33.

Таким образом, представлен способ лечения повреждения почек, где способ включает введение субъекту терапевтического средства, специфического в отношении IL-33, где терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, вводят для подавления как передачи сигнала посредством ST2, так и передачи сигнала посредством RAGE. Терапевтические средства определены в других частях данного документа.

В настоящем изобретении также впервые показано, что окисленный IL-33 связывается с RAGE, который, в свою очередь, образует комплексы с EGFR. Таким образом, в настоящем изобретении представлена возможность применения терапевтических средств, которые могут подавлять передачу сигнала, опосредованную окисленным IL-33, и тем самым подавлять возможную опосредованную охIL-33 патологическую активацию RAGE. Например, терапевтические средства могут подавлять образование комплекса RAGE-EGFR. Представленные в данном документе данные демонстрируют, что предупреждение образования комплексов RAGE-EGFR обеспечивает предупреждение опосредованной IL-

33 передачи сигнала посредством RAGE/EGFR, что может обеспечивать предупреждение нарушения функции эпителия канальцев, индуцированного $\alpha\text{IL-33}$, и/или предупреждение мезангиальной дисфункции, например мезангиальной экспансии, путем подавления опосредованной $\alpha\text{IL-33}$ пролиферации мезангиальных клеток.

Таким образом, способы и терапевтические средства для применения, раскрытые в данном документе, в дополнение к подавлению передачи сигнала посредством ST2 обеспечивают подавление передачи сигнала посредством RAGE-EGFR для лечения повреждения почек.

В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление передачи сигнала посредством EGFR. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление передачи сигнала посредством RAGE-EGFR. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление передачи сигнала посредством окисленного IL33-RAGE-EGFR.

В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление связывания окисленного IL-33 с RAGE. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление образования комплексов RAGE-EGFR. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление образования комплексов окисленный IL33-RAGE-EGFR.

В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление активации EGFR. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление фосфорилирования EGFR.

В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление эффектов, опосредованных RAGE-EGFR. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление эффектов, опосредованных комплексом RAGE-EGFR. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление эффектов, опосредованных комплексом окисленный IL33-RAGE-EGFR.

В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление связывания окисленного IL-33 с RAGE с обеспечением таким образом подавления образования комплекса RAGE-EGFR с обеспечением таким образом подавления опосредованных RAGE-EGFR эффектов, например нисходящего пути передачи сигнала.

В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление опосредованного IL-33 эффекта EGFR. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление опосредованной IL-33 передачи сигнала посредством EGFR. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление опосредованного

окисленным IL-33 эффекта EGFR. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление опосредованной окисленным IL-33 передачи сигнала посредством EGFR. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление опосредованного окисленным IL-33 эффекта RAGE-EGFR. Соответственно, терапевтическое средство обеспечивает подавление опосредованной окисленным IL-33 передачи сигнала посредством RAGE-EGFR.

В некоторых случаях эффект, опосредованный RAGE-EGFR, вызывается комплексом RAGE-EGFR, например окисленным комплексом IL-33-RAGE-EGFR. Такие эффекты как правило могут включать передачу сигнала в нисходящем направлении, которая может упоминаться в данном документе как передача сигнала посредством RAGE, передача сигнала посредством EGFR или передача сигнала посредством RAGE-EGFR. В некоторых случаях такая передача сигнала может включать фосфорилирование и/или высвобождение хемокинов.

"Опосредованный RAGE-EGFR эффект", как указано в данном документе, относится к любому физиологическому эффекту, обусловленному образованием комплекса RAGE с EGFR в клеточных мембранах и возникшей в результате aberrантной активностью EGFR. Такие опосредованные RAGE-EGFR эффекты могут проявляться в виде аномальной физиологии эпителия почки. Аномальная физиология эпителия почки может включать отрицательные эффекты в отношении целостности барьера, регуляции и обмена химических веществ между тканями и полостью, выделения химических веществ в полость, дезадаптивного восстановления тканей и/или ремоделирования ткани (например, фиброз).

В некоторых случаях такая передача сигнала посредством RAGE-EGFR включает фосфорилирование EGFR и последующее фосфорилирование компонентов пути EGFR, таких как EGFR, PLC, JNK, MAPK/ERK 1/2, p38 и STAT5. Соответственно, передача сигнала EGFR включает фосфорилирование тирозинкиназ, таких как JNK, MAPK/ERK, p38.

Следовательно, в некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление фосфорилирования компонентов пути EGFR. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление фосфорилирования любого из EGFR, PLC, JNK, MAPK/ERK 1/2, p38 и STAT5. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление опосредованного EGFR фосфорилирования любого из EGFR, PLC, JNK, MAPK/ERK 1/2, p38 и STAT5. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление фосфорилирования тирозинкиназ. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление фосфорилирования тирозинкиназ,

выбранных из JNK, MAPK/ERK, p38. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление опосредованного EGFR фосфорилирования тирозинкиназ, выбранных из JNK, MAPK/ERK и p38.

Следовательно, в некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление высвобождения хемокинов. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление высвобождения IL-8. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление высвобождения IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α и/или IL1b. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление опосредованного EGFR высвобождения хемокинов. В некоторых случаях терапевтическое средство обеспечивает подавление опосредованного EGFR высвобождения IL-8.

В некоторых случаях опосредованный RAGE-EGFR эффект может проявляться в виде аномальной мезангиальной экспансии. В некоторых случаях аномальная мезангиальная экспансия предусматривает повышенную мезангиальную экспансию. В некоторых случаях мезангиальная экспансия предусматривает аномальную пролиферацию мезангиальных клеток. В некоторых случаях аномальная пролиферация мезангиальных клеток предусматривает повышенную пролиферацию мезангиальных клеток.

Способы и терапевтические средства для применения в лечении или предупреждении повреждения почек.

В настоящем изобретении также представлено применение любого из терапевтических средств, как определено в других частях данного документа, в изготовлении медицинского средства для лечения повреждения почек.

Было показано, что способы по настоящему изобретению обеспечивают уменьшение воспалительной нагрузки на доклинических моделях заболевания почек. Дополнительно, в настоящем изобретении продемонстрировано, что у субъектов с хроническим заболеванием почек экспрессируются повышенные уровни интерлейкина-33. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способ включает лечение повреждения почек, которое является воспалительным. В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение повреждения почек, которое предусматривает воспаление. В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение повреждения почек, которое предусматривает хроническое воспаление. В некоторых вариантах осуществления с помощью способа можно обеспечить лечение или предупреждение воспаления, ассоциированного с повреждением почек. В некоторых вариантах осуществления с помощью способов можно обеспечить лечение или предупреждение острого воспаления, ассоциированного с повреждением почек. В некоторых вариантах осуществления с помощью способов можно

обеспечить лечение или предупреждение хронического воспаления, ассоциированного с повреждением почек. В некоторых вариантах осуществления способ может быть применим для лечения воспалительных состояний, ассоциированных с повреждением почек.

В некоторых случаях способы включают подавление или ослабление опосредованной IL-33 передачи сигнала посредством ST2. В некоторых случаях опосредованная IL-33 передача сигнала посредством ST2, представляет собой опосредованную redIL-33 передачу сигнала посредством ST2. В некоторых случаях подавление или ослабление опосредованной IL-33 передачи сигнала посредством ST2 предусматривает подавление или ослабление опосредованного ST2 эффекта.

В некоторых случаях опосредованный ST2 эффект представляет собой аномальное воспаление в почке. В некоторых случаях аномальное воспаление в почке представляет собой повышенное воспаление в почке. В некоторых случаях аномальное воспаление наблюдается в эндотелии. В некоторых случаях аномальное воспаление находится в клубочках. В некоторых случаях аномальное воспаление в клубочках является результатом стимуляции мезангиальных клеток. В некоторых случаях аномальное воспаление предусматривает повышенную секрецию или экспрессию IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α и/или IL1b, необязательно повышенную секрецию или экспрессию IL-4, IL-6, IL-8 и/или IL-12. В некоторых случаях аномальное воспаление предусматривает повышенную секрецию или экспрессию IL-8. В некоторых случаях аномальное воспаление предусматривает активацию MAP-киназы. В некоторых случаях активация MAP-киназы включает активацию киназы p38 или JNK.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе способ обеспечивает улучшение в отношении одного или нескольких симптомов, ассоциированных с повреждением почек. В некоторых вариантах осуществления способ может обеспечить уменьшение потери веса, отека, одышки, утомляемости, бессонницы, судорог, тошноты, кожного зуда или головных болей. В некоторых вариантах осуществления способ может обеспечивать улучшение аппетита. Многие из этих симптомов могут быть связаны с лежащим в их основе нарушением функции почек, ассоциированным с повреждением почек. Таким образом, улучшение функции почек путем уменьшения повреждения почек с помощью описанных в данном документе способов может обеспечить улучшение в отношении любого одного или нескольких из таких симптомов.

Как определено в данном документе, "улучшать" означает, что чувство дискомфорта у субъекта в отношении одного или нескольких симптомов заболевания уменьшается при

осуществления способа, описанного в данном документе. Улучшение состояния субъекта может быть установлено путем мониторинга, целью которого является оценка количества проявлений симптома у субъекта и наблюдение за тем, как эти явления уменьшаются с течением времени при осуществлении способа.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, обеспечивает уменьшение соотношения альбумин/креатинин в моче (UACR) у субъекта. Например, при осуществлении способа у субъекта может снизиться UACR. UACR представляет собой меру общего количества альбумина в образце мочи, собранном у субъекта, нормализованную по концентрации креатинина. Более высокие значения UACR указывают на то, что у субъекта повышена концентрация альбумина в моче (альбуминурия). Альбумин обычно выделяется с мочой в результате повреждения почек. Таким образом, способ можно применять для снижения значения UACR у субъекта, где "более низкий" означает, что значение UACR снижается во время или после лечения по сравнению со значением UACR до начала терапии. Значение UACR можно измерять в образцах мочи, собранных у пациентов, с применением любого из многочисленных тестов для определения UACR, доступных в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления повреждение почек выбрано из диабетической болезни почек, фиброза, гломерулонефрита (например, непролиферативного (такого как гломерулонефрит с минимальными изменениями, мембранный гломерулонефрит, фокально-сегментарный гломерулосклероз) или пролиферативного (такого как IgA-нефропатия, мембранопротролиферативный гломерулонефрит, постинфекционный гломерулонефрит и быстро прогрессирующий гломерулонефрит [такой как синдром Гудпасчера и нарушения, относящиеся к васкулитам {в том числе гранулематоз Вегенера и микроскопический полиангиит}]), системной красной волчанки, альбуминурии, односторонней обструкции мочеточника, синдрома Альпорта, поликистозной болезни почек (PCKD), гипертонического гломерулосклероза, хронического гломерулосклероза, хронической обструктивной уропатии, хронического тубулоинтерстициального нефрита и ишемической нефропатии. Все эти состояния характеризуются наличием ассоциированного воспалительного компонента и, следовательно, могут получать благоприятный эффект при лечении с применением описанных в данном документе способов или терапевтических средств.

В некоторых вариантах осуществления способ предназначен для лечения диабетической болезни почек. Диабетическая болезнь почек, определенная в данном документе, относится к диагнозу сахарного диабета II типа и расчетной скорости клубочковой фильтрации

(eGFR) 30-75 мл/мин. Как правило, DKD дополнительно определяется как постановка диагноза с соотношением UACR от 100 мг до 3000 мг альбумина на г креатинина.

Тесты для расчета eGFR доступны в данной области техники. В таких тестах как правило учитывают значение содержания креатинина в сыворотке крови, значение содержания цистатина С в сыворотке крови, возраст, пол и расу. При расчете также могут учитываться значения для регулирования в отношении поверхности тела, такие как рост и/или масса. Как правило, и значение креатинина, и значение цистатина С являются стандартизированными значениями. Например, значение креатинина можно проследить с помощью масс-спектрометрии с изотопным разбавлением (IDMS). Значение цистатина С должно прослеживаться до рабочей группы Международной федерации клинической химии и лабораторной медицины (IFCC)/Института эталонных материалов и измерений (IRMM). Как правило, eGFR, составляющая 30-75 мл/мин., свидетельствует о нарушении функции почек от легкой до умеренной и тяжелой степени у субъекта. Как таковые, способы могут быть предназначены для применения в лечении или предупреждении DKD с нарушением функции почек от легкой до умеренной и тяжелой степени. В некоторых вариантах осуществления способы предназначены для улучшения функции почек у субъекта с DKD.

Описанные в данном документе способы можно осуществлять в комбинации с известными способами лечения повреждения почек. Известные способы лечения повреждения почек, в том числе осложнений, ассоциированных с повреждением почек, включают введение 1) ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ), 2) статинов, 3) диуретиков, 4) эритропоэтина, 5) препаратов железа, 6) блокаторов рецептора ангиотензина, 7) стероидов или 8) ингибиторов натрий-глюкозного транспортного белка-2 (SGLT2i, также известных как глифлозины).

Соответственно, способ может быть предназначен для применения у субъекта, прошедшего или проходящего терапию ингибитором АСЕ.

Соответственно, способ может быть предназначен для применения у субъекта, прошедшего или проходящего терапию статином.

Соответственно, способ может быть предназначен для применения у субъекта, прошедшего или проходящего терапию диуретиком.

Соответственно, способ может быть предназначен для применения у субъекта, прошедшего или проходящего терапию с помощью ЕРО.

Соответственно, способ может быть предназначен для применения у субъекта, прошедшего или проходящего терапию препаратами железа.

Соответственно, способ может быть предназначен для применения у субъекта, прошедшего или проходящего терапию с помощью ARB.

Соответственно, способ может быть предназначен для применения у субъекта, прошедшего или проходящего терапию стероидом.

Соответственно, способ может быть предназначен для применения у субъекта, прошедшего или проходящего терапию с помощью SGLT2i. В некоторых случаях SGLT2i представляет собой дапаглифлозин. Если способ предусматривает комбинированное введение с другим средством терапии, способы по настоящему изобретению охватывают совместное введение, применение отдельных составов или единого фармацевтического состава, а также последовательное введение в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтические средства, описанные в данном документе, вводят в комбинации с противовоспалительными лекарственными средствами, где терапевтическое средство (например, антитело к IL-33 или его антигенсвязывающий фрагмент) и дополнительное средство терапии можно вводить последовательно, в любом порядке, или одновременно (т. е., совместно или в пределах одного промежутка времени).

В некоторых вариантах осуществления способ предназначен для лечения субъекта с повышенным уровнем экспрессии IL-33 в почке (также называемым "активированным IL-33"). Как описано в данном документе, субъекты с повреждением почек, например субъекты с диабетической нефропатией, имеют повышенную экспрессию IL-33 в клубочках и тубулоинтерстиции почки. Следовательно, указанные способы могут быть особенно благоприятными для лечения субъекта с повреждением почек с активированным IL-33. Указанные способы могут быть особенно благоприятными для лечения субъекта с повреждением почек с активированным IL-33 в клубочках. Указанные способы могут быть особенно благоприятными для лечения субъекта с повреждением почек с активированным IL-33 в тубулоинтерстиции. Указанные способы могут быть особенно благоприятными для лечения субъекта с повреждением почек с активированным IL-33 в клубочках и в тубулоинтерстиции.

Способы для обнаружения экспрессии IL-33 в клетках хорошо известны из уровня техники и включают без ограничения методики ПЦР, иммуногистохимию, проточную цитометрию, вестерн-блот-анализ, ELISA и т. п. Эти способы можно использовать для выявления пациентов с активированным IL-33.

В одном варианте осуществления способ включает применение или введение терапевтического средства, например антитела к IL-33 или его антигенсвязывающего фрагмента, субъекту или пациенту, или применение антитела к IL-33 или его

антигенсвязывающего фрагмента в отношении выделенной ткани или линии клеток субъекта или пациента, если у субъекта или пациента имеется повреждение почек, симптом повреждения почек или предрасположенность к повреждению почек, или введение в них таковых. В другом варианте осуществления способ также предназначен для включения применения фармацевтической композиции, содержащей терапевтическое средство, например связывающую молекулу, специфическую в отношении ПЛ-33, в отношении субъекта или пациента или введение им таковых, или применение фармацевтической композиции, содержащей связывающую молекулу, специфическую в отношении ПЛ-33, в отношении выделенной ткани или линии клеток субъекта или пациента, имеющего повреждение почек, симптом повреждения почек или предрасположенность к заболеванию, или введение в них таковых.

В соответствии со способами по настоящему изобретению по меньшей мере одно терапевтическое средство, например связывающую молекулу, специфическую в отношении ПЛ-33, или ее антигенсвязывающий фрагмент, как определено в других частях данного документа, применяют для способствования получению положительного терапевтического ответа в отношении воспалительного ответа при повреждении почек. Под "положительным терапевтическим ответом" применительно к лечению воспаления подразумевается улучшение в отношении заболевания на фоне противовоспалительной активности данных связывающих молекул, например антител или их фрагментов, и/или улучшение в отношении симптомов, ассоциированных с заболеванием. То есть может наблюдаться противовоспалительный эффект, предупреждение дальнейшего воспаления, и/или уменьшение выраженности существующего воспаления, и/или снижение выраженности одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием. Таким образом, например, улучшение в отношении заболевания можно охарактеризовать как полный ответ. Под "полным ответом" подразумевается отсутствие клинически обнаруживаемого заболевания при нормализации результатов любых ранее проведенных тестов. В одном варианте осуществления такой ответ должен сохраняться в течение по меньшей мере одного месяца после лечения в соответствии со способами по настоящему изобретению. Альтернативно, улучшение в отношении заболевания может быть классифицировано как представляющее собой частичный ответ.

Способы по настоящему изобретению, включающие введение по меньшей мере одного терапевтического средства, например связывающей молекулы, специфической в отношении ПЛ-33, или ее антигенсвязывающего фрагмента, также могут найти применение в лечении воспалительных заболеваний и дефицитов или нарушений иммунной системы,

которые ассоциированы с клетками, экспрессирующими IL-33, которые проявляются как повреждение почек. Воспалительные заболевания характеризуются воспалением и разрушением ткани или их комбинацией. Под "противовоспалительной активностью" подразумевают уменьшение выраженности или предупреждение возникновения воспаления. "Воспалительное заболевание" включает любой воспалительный, опосредованный иммунной системой процесс, где иницирующее явление или мишень иммунного ответа предусматривают чужеродный антиген(антигены), в том числе, например, аллоантигены, ксеноантигены, вирусные антигены, бактериальные антигены, неизвестные антигены, аллергены или токсины.

В соответствии со способами по настоящему изобретению по меньшей мере одно терапевтическое средство, например связывающую молекулу, специфическую в отношении IL-33, или ее антигенсвязывающий фрагмент, применяют для способствования получению положительного терапевтического ответа при лечении или предупреждении воспалительного повреждения почек. Под "положительным терапевтическим ответом" применительно к повреждению почек подразумевают улучшение в отношении заболевания на фоне противовоспалительной активности и т. п. данных антител и/или улучшение в отношении симптомов, ассоциированных с заболеванием. Это означает, что может наблюдаться уменьшение выраженности воспалительного ответа, в том числе без ограничения уменьшение уровня секреции воспалительных цитокинов, молекул адгезии, протеаз, иммуноглобулинов, их комбинаций и т. п., повышение выработки противовоспалительных белков, уменьшение количества аутореактивных клеток, повышение иммунной толерантности, подавление выживаемости аутореактивных клеток, уменьшение частоты апоптоза, уменьшение миграции эндотелиальных клеток, повышение спонтанной миграции моноцитов, уменьшение и/или снижение выраженности одного или нескольких симптомов, опосредованных стимуляцией клеток, экспрессирующих IL-33. Такие положительные терапевтические ответы не ограничены путем введения.

Клинический ответ можно оценивать с использованием скрининговых методик, таких как сканирование с помощью магнитно-резонансной томографии (MRI), рентгенография, сканирование с помощью компьютерной томографии (СТ), проточная цитометрия или анализ с применением клеточного сортера с активацией флуоресценции (FACS), гистологическое исследование, макропатологическое исследование и биохимический анализ крови, в том числе без ограничения изменения, обнаруживаемые с помощью ELISA, RIA, хроматографии и т. п. В дополнение к этим положительным терапевтическим ответам, субъект, подвергаемый терапии с использованием связывающей молекулы, специфической

в отношении IL-33, например антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, может испытывать благоприятный эффект в виде улучшения в отношении симптомов, ассоциированных с заболеванием.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой применение связывающей молекулы, специфической в отношении IL-33, например антител или их антигенсвязывающих фрагментов, для диагностического мониторинга уровней белка в ткани как части процедуры клинического тестирования, например, для определения эффективности данной схемы лечения. Например, обнаружение можно облегчить путем связывания антитела с обнаруживаемым веществом. Примеры обнаруживаемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества, биолюминесцентные вещества и радиоактивные вещества. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов с простетическими группами включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных веществ включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин-изотиоцианат, родамин, флуоресцеин-дихлортриазиниламин, дансилхлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного вещества включает люминол; примеры биолюминесцентных веществ включают люциферазу, люциферин и экворин; а примеры подходящих радиоактивных веществ включают ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S или ^3H .

Терапевтические средства

"Терапевтическое средство" относится к активному фармацевтическому ингредиенту, который вводят субъекту с целью оказания благоприятного эффекта в отношении болезненного состояния субъекта. Используемое в данном документе терапевтическое средство представляет собой активный ингредиент, предназначенный для введения субъекту для лечения или предупреждения повреждения почек. Повреждение почек определяется в других частях данного документа. Более конкретно, терапевтические средства предназначены для подавления передачи сигнала посредством ST2, передачи сигнала посредством RAGE или того и другого для лечения повреждения почек. В некоторых вариантах осуществления один или несколько активных ингредиентов обеспечивают ослабление или подавление активности восстановленного белка IL-33 (redIL-33) с обеспечением таким образом подавления передачи сигнала посредством ST2. В некоторых вариантах осуществления один или несколько активных ингредиентов обеспечивают ослабление или подавление активности окисленного белка IL-33 (oxIL-33) с обеспечением таким образом передачи сигнала посредством RAGE. Преимущество

подавления обоих этих путей передачи сигнала в контексте лечения повреждения почек описано в других частях данного документа.

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько терапевтических средств предусматривают "химический ингибитор". Как используется в данном документе, "химический ингибитор" относится к синтетической или полусинтетической молекуле с ингибиторной активностью, например, где молекула имеет молекулярную массу 500 или менее.

Химический ингибитор может быть предназначен для подавления передачи сигнала посредством ST-2, передачи сигнала посредством RAGE или того и другого. В некоторых вариантах осуществления химический ингибитор предназначен для подавления передачи сигнала посредством ST-2. Химический ингибитор может подавлять передачу сигнала посредством ST-2 путем прямого связывания с ST-2 и оказания антагонистического воздействия на активность передачи сигнала от ST-2. Это может быть достигнуто путем связывания с ST-2 для предотвращения связывания активирующего ST-2 лиганда redIL-33. Альтернативно, химический ингибитор может связываться непосредственно с redIL-33 и подавлять связывание с ST-2.

В некоторых вариантах осуществления химический ингибитор может подавлять передачу сигнала посредством RAGE. Химический ингибитор может подавлять передачу сигнала посредством RAGE путем прямого связывания с RAGE и оказания антагонистического воздействия на активность передачи сигнала от RAGE. В некоторых вариантах осуществления химический ингибитор может обеспечивать ослабление или подавление активности oxIL-33 и таким образом обеспечивать подавление передачи сигнала посредством RAGE. Альтернативно, химический ингибитор может связываться непосредственно с oxIL-33 и подавлять связывание с RAGE.

В некоторых вариантах осуществления химический ингибитор может подавлять передачу сигнала посредством ST-2 и передачу сигнала посредством RAGE. Это может быть достигнуто, например, путем связывания с поверхностью на IL-33, которая взаимодействует как с ST-2, так и с RAGE для обеспечения активирования передачи сигнала.

В одном варианте осуществления одно или несколько терапевтических средств содержат связывающую молекулу. Соответственно, связывающая молекула представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент являются такими, как описано в других частях данного документа.

Соответственно, связывающая молекула специфически связывается с IL-33. Такая связывающая молекула также называется "молекула, связывающая IL-33" или "связывающая молекула, специфическая в отношении IL-33". Соответственно, связывающая молекула специфически связывается с IL-33 и подавляет или ослабляет активность IL-33, например подавляет или ослабляет активность восстановленного IL-33, активность окисленного IL-33 или активность и того, и другого.

Соответственно молекула, связывающая IL-33, специфически связывается с восстановленным IL-33, окисленным IL-33 или как восстановленным IL-33, так и окисленным IL-33.

Соответственно, связывающая молекула может ослаблять или подавлять активность IL-33 путем связывания IL-33 в восстановленной или окисленной формах. Соответственно, если связывающая молекула подавляет или ослабляет активность восстановленного IL-33 и активность окисленного IL-33, это достигается путем связывания с IL-33 в восстановленной форме (т. е. путем связывания с восстановленным IL-33).

Соответственно, связывающая молекула подавляет или ослабляет активность как redIL-33, так и oxIL-33, с обеспечением таким образом подавления или ослабления как передачи сигнала посредством ST2, так и передачи сигнала посредством RAGE.

Соответственно, подавление активности окисленного IL-33 обеспечивает подавление или выключение RAGE-зависимой передачи сигнала и/или опосредованных RAGE эффектов. Соответственно, подавление обеспечивает подавление или выключение RAGE-EGFR-зависимой передачи сигнала и/или опосредованных RAGE-EGFR эффектов. Соответственно, подавление обеспечивает подавление или выключение EGFR-зависимой передачи сигнала. Соответственно, подавление обеспечивает подавление или выключение опосредованных EGFR эффектов. В частности, было показано, что антагонисты IL33, которые связываются с восстановленным IL-33, могут предотвращать связывание окисленного IL-33 с RAGE с обеспечением таким образом подавления передачи сигнала посредством RAGE-EGFR.

Соответственно, подавление активности окисленного IL-33 подавляет или предупреждает образование комплекса RAGE-EGFR. Соответственно, подавление подавляет или предупреждает активацию EGFR, соответственно, опосредованную RAGE активацию EGFR.

Соответственно, связывающая молекула или ее фрагмент или вариант могут специфически связываться с redIL-33 с аффинностью связывания (K_d), составляющей менее 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M,

10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, или 10^{-15} M. Соответственно, аффинность связывания с redIL-33 составляет менее 5×10^{-14} M (т. е. 0,05 пМ). Соответственно, аффинность связывания измеряют с использованием анализов кинетического исключения (KinExA) или BIACORE™, соответствующим образом с использованием KinExA, с использованием протоколов, таких как описанные в WO 2016/156440 (см., например, пример 11), который полностью включен в данный документ посредством ссылки. Связывающие молекулы, которые связываются с redIL-33 с такой аффинностью связывания, по-видимому, достаточно прочно связываются с redIL-33, чтобы предупредить диссоциацию комплекса связывающая молекула/redIL-33 в пределах биологически релевантных промежутков времени. Без ограничения какой-либо теорией, эта сила связывания обеспечивает предупреждение высвобождения антигена до разрушения комплекса антитело/антиген *in vivo*, таким образом, что redIL-33 не высвобождается и не может преобразовываться из redIL-33 в oхIL-33. Таким образом, при связывании с redIL-33 с такой аффинностью связывания связывающая молекула может подавлять или ослаблять активность oхIL-33 путем предупреждения его образования с обеспечением таким образом подавления передачи сигнала посредством RAGE.

В некоторых случаях связывающая молекула или ее фрагмент могут специфически связываться с redIL-33 при скорости ассоциации ($k(\text{on})$), превышающей или равной $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Например, связывающая молекула по настоящему изобретению может связываться с redIL-33 или его фрагментом или вариантом при скорости ассоциации ($k(\text{on})$), превышающей или равной $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Соответственно, скорость $k(\text{on})$ больше или равна $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

В некоторых случаях связывающая молекула или ее фрагмент могут специфически связываться с redIL-33 при скорости диссоциации ($k(\text{off})$), составляющей меньше или равной $5 \times 10^{-1} \text{ c}^{-1}$, 10^{-1} c^{-1} , $5 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$, 10^{-2} c^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-3} c^{-1} . Например, можно сказать, что связывающая молекула по настоящему изобретению связывается с redIL-33 или его фрагментом или вариантом при скорости диссоциации ($k(\text{off})$), составляющей меньше или равной $5 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, 10^{-4} c^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-5} c^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$, 10^{-6} c^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-7} c^{-1} . Соответственно, скорость $k(\text{off})$ составляет 10^{-3} c^{-1} или меньше. IL-33 представляет собой цитокин алармин, который быстро и в высоких концентрациях высвобождается в ответ на воспалительные стимулы. redIL-33 превращается в окисленный примерно через 5-45 мин. после высвобождения во внеклеточную среду. Таким образом, для предупреждения

превращения redIL-33 в oхIL-33 связывающие молекулы, описанные в данном документе, могут связываться с redIL-33 с такими скоростями k(on) и/или k(off). Без ограничения какой-либо теорией считается, что такие соотношения k(on)/k(off) гарантируют, что связывающая молекула может быстро связываться с redIL-33, прежде чем он превратится в oхIL-33, с обеспечением таким образом снижения уровня образования oхIL-33 с обеспечением таким образом ослабления или подавления передачи сигнала посредством RAGE.

Соответственно, молекула, связывающая IL-33, может конкурентно подавлять связывание IL-33 с любой из связывающих молекул, указанных в таблице 1:

Таблица 1. Примеры пар VH и VL антител к IL-33

Пара	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность HCVR	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность LCVR
1	SEQ ID NO: 1	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSGIS AIDQSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARQKFMQ LWGGGLRYPFGYWGQG TMVTVSS	SEQ ID NO: 19	SYVLTQPPSVSVSPGQ TASITCSGEGMGDKY AAWYQQKPGQSPVL VIYRDTKRPSGIPERFS GSNSGNTATLTISGTQ AMDEADYYCGVIQD NTGVFGGGKLTVL
2	SEQ ID NO: 2	EVQLVES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFRSFAMS WVRQAPGKGLELVSDLR TSGGSTYYADSVKGRLTI SRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKSHYSTS WFGGFDYWGQGLVTV SS	SEQ ID NO: 20	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITICRASQGFSSW LAWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTITNL QPEDFATYYCQQANS FPLTFGGGKVEIK
3	SEQ ID NO: 3	QVQLQESG PGLVKPSET LSLTCTVSGGSISSYYWS WIRQPPGKGLELIGYIYY SGSTNYNPSLKS RVTISV DTSKNHFS LKLS SVTAA	SEQ ID NO: 21	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITICRASQGISTW LAWFQQKPGKAPKLL IYAAS TLQGGVPSRFS GSGSGPEFTLTISLQP

		DTAVYYCARSQYTSSW YGSFDIWGQGMVTVSS		EDFATYYCQQANSFP WTFGQGTKVEIK
4	SEQ ID NO: 4	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSKASGYTFNSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWI SSHNGNSHYVQKFQGRV SMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCARHSYT TSWYGGFDYWGQGLV TVSS	SEQ ID NO: 22	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITICRASQGFSSW LAWYQQKPGKAPQL LIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGSDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQANSF PLTFGGGTKVEIK
5	SEQ ID NO: 5	EVQLVESGGGLVQPGRS LRLSCAASGFTFSSYALT WVRQAPGKGLEWVSFIS GSGGRPFYADSVKGRFTI SRDNSKNMLYLQMNSL RAEDTAIYYCAKSLYTTS WYGGFDSWGQGLVTV SS	SEQ ID NO: 23	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITICRASQGVVS WLAWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSNS FPFTLGPGTKVDIK
6	SEQ ID NO: 6	EVQLVESGGGLVQPGRS LRLSCAASGFTFSNYAM TWVRQAPGKGLEWVSTI SGSGDNTYYADSVQGRF TISRGHSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKPTYS RSWYGAFDFWGQGMV TVSS	SEQ ID NO: 24	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITICRASQGISSW LAWYQQKPGKAPQL LIYAASRLQSGVPSRF WGSFGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQANN FPFTFGPGTKVDIK
7	SEQ ID NO: 7	EVQLVESGGNLEQPGRS LRLSCTASGFTFSRSAMN WVRRAPGKGLEWVSGIS GSGGRTYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLS AEDTAAYYCAKDSYTTS	SEQ ID NO: 25	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITICRASQGIFSW LAWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQ

		WYGGMDVWGHGTTVT VSS		PEDFAIYYCQQANSVP ITFGQGTRLEIK
8	SEQ ID NO: 8	EVQLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFS DYIM NWVRQAPGKGLEWVSSI SRYSSYIYYADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDIGG MDVWGQGT LVTVSS	SEQ ID NO: 26	QSVLTQPPSASGTPGQ RVTISCTGSSSNIGAV YDVHWYQQLPGTAP KLLIYRNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCQTY DSSRWVFGGGTKLTV L
9	SEQ ID NO: 9	EVQLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFS NYIM HWVRQAPGKGLEWVSSI SARSRYHYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARLATR HNAFDIWGQGT LVTVSS	SEQ ID NO: 27	QSVLTQPPSASGTPGQ RVTISCSGSSSNIGNN AVSWYQQLPGTAPKL LIYASNMRVIGVPDRF SGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCGAWD DSQKALVFGGGTKLT VL
10	SEQ ID NO: 10	EVQLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFS NYIM HWVRQAPGKGLEWVSSI SARSSYIYYADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARLATRN NAFDIWGQGT LVTVSS	SEQ ID NO: 28	QSVLTQPPSASGTPGQ RVTISCSGSSSNIGRN AVNWyQQLPGTAPK LLIYASNMRVSGVPD RFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCWA WDDSQKVG VFGGGT KLTVL
11	SEQ ID NO: 11	EVQLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFS RYYM HWVRQAPGKGLEWVSSI SAQSSHIYYADSV EGRFT ISRDN SKNTLYLQMNSL	SEQ ID NO: 29	QSVLTQPPSASGTPGQ RVTISCSGSSSNIGRN AVNWyQQLPGTAPK LLIYASNMR RSGVPD RFSGSKSGTSASLAIS

		RAEDTAVYYCARLATRQ NAFDIWGQGTLVTVSS		GLRSEDEADYYCSAW DDSQKVVVFGGGTKL TVL
12	SEQ ID NO: 12	EVQLLESGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSN YYM HWVRQAPGKGLEWV SSI SARSSYLYADSVKGR F TISRDNKNTLYLQM NS LRAEDTAVYYCARL ATR HVAFDIWGQGTLV TVSS	SEQ ID NO: 30	QSVLTQPPSASGTP GQ RVTISCSGSSSNIG NN AVNWFYQQLPGTAP K LLIYASNMRPGVDP R RFSGSKSGTSASLA IS GLRSEDEADYYCEAW DDSQKAVVFGGGTK L TVL
13	SEQ ID NO: 13	MRAWIFFLLCLAGRA L QVQLMQSGAEVKKPG A SVKVSCKASGYTFTS YW MHWVRQAPGQGLEWM G GTIYPRNSNTDYNQK FK ARVTMTRDTSTSTVY ME LSSLRSEDVAVYYCAR PL YYYLTSPPTLFWGQ GTL VTVSS	SEQ ID NO: 31	MRAWIFFLLCLAGRA L LADIQLTQSPSFLSAS V VGDRVTITCKASQDV G GTAVAWYQKPGKA P PKLLIYWASTRHTGV P PSRFSGSGSGTEFTLI S SSLQPEDFATYYCQQ A AKTYPFTFGSGTKLEI K R
14	SEQ ID NO: 14	EVQLVETGGGLIQPG GSL RLSCAASGFTFSSYAM S WVRQAPGKGLEWVSAIS G GSGGSTYYADSVKGRFT I ISRDNKNTLYLQMNSL R RAEDTAVYYCARTLHGI R RAAYDAFIIWGQGTLV T VSS	SEQ ID NO: 32	EIVLTQSPGTLSSLSP GE RATLSCRASQSVGINL S SWYQKPGQAPRLLI Y YGASHRATGIPDRFSG S SGSGTDFTLISRLEPE D DFAVYYCHQYSQSPP F FTFGGGTKVEIK

15	SEQ ID NO: 15	EVQLVETGGGLIQPGGSL RLSCAASGFTFSFYAMS WVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARTLHGI RAAYDAFIIWGQGLVT VSS	SEQ ID NO: 33	EIVLTQSPGTLSSLSPGE RATLSCRASQSVGINL SWYQQKPGQAPRLLI YGASHRLTGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCHQYSQPPP FTFGGGTKVEIK
16	SEQ ID NO: 16	EVQLVETGGGLIQPGGSL RLSCAASGFTFSFYAMS WVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARTIHI RAAYDAFIIWGQGLVT VSS	SEQ ID NO: 34	EIVLTQSPGTLSSLSPGE RATLSCRASQSVGINL SWYQQKPGQAPRLLI YGASHRLTGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCHQYSQPPP FTFGGGTKVEIK
17	SEQ ID NO: 17	EVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAASGFTFSSYWM YWVRQAPGKGLEWVAA ITPNAGEDYYPESVKGRF TISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGHY YYTSYSLGYWGQGLVT VSS	SEQ ID NO: 35	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITITCKASQNINKH LDWYQQKPGKAPKL LIYFTNNLQTGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCFQYNQG WTFGGGTKVEIK
18	SEQ ID NO: 18	EVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAASGFTFSSFSMS WVRQAPGKGLEWVATIS GGKTFTDYVDSVKGRFT ISRDDSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCTRANYG NWFVEVWGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 36	EIVLTQSPATLSSLSPGE RATLSCRASESVAKY GLSLLNWFQQKPGQP PRLIFAAASNRGSGIPA RFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQSK EVPFTFGQGTKVEIK

Сообщалось, что все эти связывающие молекулы связываются с IL-33 и подавляют или ослабляют передачу сигнала посредством ST-2. Таким образом, связывающая молекула или ее связывающий фрагмент, которые конкурируют за связывание с redIL-33 с любым из

антител, описанных в таблице 1, могут подавлять или ослаблять передачу сигнала посредством ST-2.

Считается, что связывающая молекула или ее фрагмент конкурентно подавляют связывание эталонного антитела с рассматриваемым эпитопом, если она специфически связывается с этим эпитопом в такой степени, что она блокирует до некоторой степени связывание эталонного антитела с эпитопом. Конкурентное подавление может быть определено с помощью любого способа, известного из уровня техники, например, твердофазных анализов, таких как конкурентные ELISA-анализы, усиленные диссоциацией лантанидные флуоресцентные иммунологические анализы (DELFIА[®], Perkin Elmer) и анализы с использованием связывания радиоактивного лиганда. Например, специалист в данной области техники может определить, конкурирует ли связывающая молекула или ее фрагмент за связывание с redIL-33, используя анализ конкурентного связывания *in vitro*, такой как анализ HTRF, подробно описанный ниже в примерах. Например, специалист в данной области техники может пометить рекомбинантное антитело из таблицы 1 донорным флуорофором и смешать несколько концентраций с образцами с фиксированной концентрацией акцепторного флуорофора, меченого красным IL-33. Затем можно измерить резонансный перенос энергии флуоресценции между донорным и акцепторным флуорофором в каждом образце, чтобы установить характеристики связывания. Для выявления молекул конкурентного связывания специалист в данной области техники может сначала смешать различные концентрации тестируемой связывающей молекулы с фиксированной концентрацией меченого антитела из таблицы 1. Уменьшение сигнала FRET при инкубации смеси с меченым IL-33 по сравнению с таковым в случае положительного контроля, содержащего только меченые антитела, указывает на конкурентное связывание с IL-33. Может считаться, что связывающая молекула или ее фрагмент конкурентно подавляют связывание эталонного антитела с рассматриваемым эпитопом на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 60% или на по меньшей мере 50%.

Соответственно, молекула, связывающая IL-33, может конкурентно подавлять связывание IL-33 со связывающей молекулой 33_640087-7B (как описано в WO 2016/156440). Соответственно, в WO 2016/156440 раскрыто, что 33_640087-7B связывается с redIL-33 с особенно высокой аффинностью и ослабляет как ST-2, так и RAGE-зависимую передачу сигнала посредством IL-33. Таким образом, связывающая молекула, которая конкурентно подавляет связывание IL-33 со связывающей молекулой 33_640087-7B, с высокой вероятностью будет подавлять передачу сигнала посредством как redIL-33,

так и охIL-33, и, таким образом, она является особенно подходящей для применения в описанных в данном документе способах.

В некоторых случаях связывающая молекула, которая подавляет или ослабляет активность IL-33, выбрана из любого из следующих антител к IL-33: 33_640087-7B (как описано в WO 2016/156440), ANB020, известного как этокимаб (как описано в WO2015/106080), 9675P (как описано в US2014/0271658), A25-3H04 (ка описано в US2017/0283494), Ab43 (как описано в WO2018/081075), IL33-158 (как описано в US2018/0037644), 10C12.38.H6. 87Y.581 IgG4 (как описано в WO 2016/077381) или их связывающих фрагментов, при этом каждый из документов включен в данный документ посредством ссылки. Все эти антитела указаны в таблице 1.

Соответственно, связывающая молекула или антигенсвязывающий фрагмент содержат определяющие комплементарность области (CDR) из пары переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL), выбранной из таблицы 1. Пара 1 соответствует последовательностям доменов VH и VL 33_640087-7B, описанным в WO 2016/156440. Пары 2-7 соответствуют последовательностям доменов VH и VL антител, описанных в US 2014/0271658. Пары 8-12 соответствуют последовательностям доменов VH и VL антител, описанных в US 2017/0283494. Пара 13 соответствует последовательностям доменов VH и VL ANB020, описанным в WO 2015/106080. Пары 14-16 соответствуют последовательностям доменов VH и VL антител, описанных в WO 2018/081075. Пара 17 соответствует последовательностям доменов VH и VL IL33-158, описанным в US 2018/0037644. Пара 18 соответствует последовательностям доменов VH и VL 10C12.38.H6. 87Y.581 IgG4, описанным в WO 2016/077381.

Соответственно, молекула, связывающая IL-33, представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность области (CDR) переменной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:1, и определяющие комплементарность области (CDR) переменной области легкой цепи (LCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:19. Эти CDR соответствуют таковым, полученным из 33_640087-7B (как описано в WO 2016/156440), которое связывает восстановленный IL-33 и подавляет его превращение в окисленный IL-33. 33_640087-7B полностью описано в WO 2016/156440, которая включена в данный документ посредством ссылки. Таким образом, это антитело может быть особенно применимым в описанных в данном документе способах подавления или ослабления передачи сигнала посредством как ST-2, так и RAGE.

Соответственно, молекула, связывающая IL-33, представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:7, и определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:25. Эти CDR соответствуют таковым, полученным из антитела 9675P. 9675P полностью описано в US 2014/0271658, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Соответственно, молекула, связывающая IL-33, представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:11, и определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:29. Эти CDR соответствуют таковым, полученным из антитела A25-3H04. A25-3H04 полностью описано в US 2017/0283494, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Соответственно, молекула, связывающая IL-33, представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:13, и определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:31. Эти CDR соответствуют таковым, полученным из антитела ANB020. ANB020 полностью описано в WO 2015/106080, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Соответственно, молекула, связывающая IL-33, представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:16, и определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:34. Эти CDR соответствуют таковым, полученным из антитела Ab43. Ab43 полностью описано в WO 2018/081075, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Соответственно, молекула, связывающая IL-33, представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:17, и определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:35. Эти CDR

соответствуют таковым, полученным из антитела IL33-158. IL33-158 полностью описано в US 2018/0037644, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Соответственно, молекула, связывающая IL-33, представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:18, и определяющие комплементарность области (CDR) варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:36. Эти CDR соответствуют таковым, полученным из антитела 10C12.38.H6. 87Y.581 IgG4. 10C12.38.H6. 87Y.581 IgG4 полностью описано в WO 2016/077381, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Соответственно, специалисту в данной области техники известны доступные в данной области техники способы идентификации CDR в варибельных областях тяжелой и легкой цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Соответственно, специалист в данной области техники может, например, выполнить аннотирование на основе последовательности. Области между CDR, как правило, высококонсервативны, поэтому для определения местоположения CDR можно использовать логические правила. Специалист в данной области техники может использовать набор основанных на последовательностях правил для стандартных антител (Pantazes and Maranas, Protein Engineering, Design and Selection, 2010), альтернативно или дополнительно он может уточнить правила на основании множественного выравнивания последовательностей. Альтернативно, специалист в данной области техники может сравнить последовательности антител с общедоступной базой данных, работающей в соответствии со способами по Kabat, Chothia или IMGT, используя команду BLASTP для BLAST+, чтобы идентифицировать наиболее сходную аннотированную последовательность. Каждый из этих способов подразумевает уникальную схему нумерации остатков, в соответствии с которой в нем выполняется нумерация остатков гиперварибельной области, а начало и конец каждой из шести CDR затем определяют в соответствии с определенными ключевыми положениями. Например, при выравнивании с наиболее сходной аннотированной последовательностью CDR можно экстраполировать из аннотированной последовательности в неаннотированную последовательность, с идентификацией таким образом CDR. Подходящие инструменты/базы данных: база данных Kabat, Kabatman, Scaling, IMGT, Abnum, например.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие пару варибельного

домена тяжелой цепи (VH) и вариабельного домена легкой цепи (VL), выбранную из таблицы 1.

Соответственно, антитело к IL33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат домен VH с последовательностью из SEQ ID NO:1 и домен VL с последовательностью из SEQ ID NO:19.

Соответственно, антитело к IL33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат домен VH с последовательностью из SEQ ID NO:7 и домен VL с последовательностью из SEQ ID NO:25.

Соответственно, антитело к IL33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат домен VH с последовательностью из SEQ ID NO:11 и домен VL с последовательностью из SEQ ID NO:29.

Соответственно, антитело к IL33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат домен VH с последовательностью из SEQ ID NO:13 и домен VL с последовательностью из SEQ ID NO:31.

Соответственно, антитело к IL33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат домен VH с последовательностью из SEQ ID NO:16 и домен VL с последовательностью из SEQ ID NO:34.

Соответственно, антитело к IL33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат домен VH с последовательностью из SEQ ID NO:17 и домен VL с последовательностью из SEQ ID NO:35.

Соответственно, антитело к IL33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат домен VH с последовательностью из SEQ ID NO:18 и домен VL с последовательностью из SEQ ID NO:36.

Соответственно, терапевтическое средство представляет собой связывающую молекулу, которая может содержать 3 CDR, например, в вариабельной области тяжелой цепи, независимо выбранные из SEQ ID NO: 1, 7, 11, 13, 16, 17 и 18.

Соответственно, терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, представляет собой связывающую молекулу, содержащую 3 CDR в вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO:1.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой связывающую молекулу, которая может содержать 3 CDR в вариабельной области легкой цепи, независимо выбранные из SEQ ID NO: 19, 25, 29, 31, 34, 35 и 36.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой связывающую молекулу, содержащую 3 CDR в вариабельной области легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO:19.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой связывающую молекулу, которая может содержать 3 CDR, например, в вариабельной области тяжелой цепи, независимо выбранные из SEQ ID NO: 1, 7, 11, 13, 16, 17 и 18, и 3 CDR, например, в вариабельной области легкой цепи, независимо выбранные из SEQ ID NO: 19, 25, 29, 31, 34, 35 и 36.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой связывающую молекулу, которая содержит 3 CDR в вариабельной области тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO:1 и 3 CDR в вариабельной области легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO:19.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой связывающую молекулу, которая может содержать вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющие CDR 1-3 VH с последовательностями под SEQ ID NO: 37, 38 и 39, соответственно, где один или несколько VHCDR содержат 3 или меньше замен, вставок и/или делеций одной аминокислоты.

Следовательно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой связывающую молекулу, содержащую домен VH, который содержит VHCDR 1-3 под SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39 соответственно.

Следовательно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой связывающую молекулу, содержащую домен VH, который содержит VHCDR 1-3, состоящие из SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39 соответственно.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой связывающую молекулу, которая может содержать вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющие CDR 1-3 VL с последовательностями под SEQ ID NO: 40, 41 и 42 соответственно, где один или несколько VLCDR содержат 3 или меньше замен, вставок и/или делеций одной аминокислоты.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой связывающую молекулу, содержащую домен VL, который содержит VLCDR 1-3 под SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42 соответственно.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой связывающую молекулу, содержащую домен VL, который содержит VLCDR 1-3, состоящие из SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42 соответственно.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой связывающую молекулу, которая может содержать VHCDR1, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 37, VHCDR2, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 38, VHCDR3, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 39, VLCDR1, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 40, VLCDR2, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 41, и VLCDR3, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 42.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой антитело или его связывающий фрагмент, содержащие VH и VL, где VH имеет аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, например 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или на 100%, идентичную последовательности VH в соответствии с SEQ ID NO: 1, 7, 11, 13, 16, 17 и 18.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой антитело или его связывающий фрагмент, содержащие VH и VL, где VH имеет аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, например 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или на 100%, идентичную последовательности VH в соответствии с SEQ ID NO: 1.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой антитело или его связывающий фрагмент, содержащие VH и VL, где VH, описанный выше, имеет последовательность с 1, 2, 3 или 4 аминокислотами в каркасной области, которые подверглись делеции, вставке и/или независимому замещению другой аминокислотой.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой антитело или его связывающий фрагмент, содержащие VH и VL, где VL имеет аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, например 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или на 100%, идентичную последовательности VL в соответствии с SEQ ID NO: 19, 25, 29, 31, 34, 35 и 36.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой антитело или его связывающий фрагмент, содержащие VH и VL, где VL имеет аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, например 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или на 100%, идентичную последовательности VL в соответствии с SEQ ID NO: 19.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой антитело или его связывающий фрагмент, содержащие VH и VL, где VL, описанный

выше, имеет последовательность с 1, 2, 3 или 4 аминокислотами в каркасной области, которые подверглись независимой делеции, вставке и/или замещению другой аминокислотой.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой антитело или его связывающий фрагмент, содержащие VH и VL, где VH имеет аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, например 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или на 100%, идентичную последовательности VH в соответствии с SEQ ID NO: 1, 7, 11, 13, 16, 17 и 18, и VL имеет аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, например 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную VL в соответствии с SEQ ID NO: 19, 25, 29, 31, 34, 35 и 36.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой антитело или его связывающий фрагмент, содержащие VH и VL, где VH имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 1, 7, 11, 13, 16, 17 и 18, и VL имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 19, 25, 29, 31, 34, 35 и 36.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой антитело или его связывающий фрагмент, содержащие VH и VL, где VH имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 1, и VL имеет аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 19.

Соответственно, связывающая молекула может быть выбрана из антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, аптамера, по меньшей мере одной CDR тяжелой или легкой цепи молекулы эталонного антитела и по меньшей мере шести CDR из одной или нескольких молекул эталонного антитела.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой антитело или его связывающий фрагмент. Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой антитело к IL-33 или его связывающий фрагмент. Соответственно, антитело к IL-33 или его связывающий фрагмент специфически связывается с IL-33, в частности с восстановленным IL-33 или окисленным IL-33.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, подавляет активность окисленного IL-33, соответственно, путем подавления образования окисленного IL-33. Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, подавляет превращение восстановленного IL-33 в окисленный IL-33.

Соответственно, молекула, связывающая IL-33, или ее антигенсвязывающий фрагмент представляют собой молекулу, связывающую восстановленный IL-33, или ее антигенсвязывающий фрагмент. Другими словами, молекула, связывающая IL-33, или ее антигенсвязывающий фрагмент подавляют или ослабляют активность восстановленного IL-33. Соответственно, ослабление осуществляется путем связывания с восстановленным IL-33. Соответственно, связываясь с восстановленным IL-33, указанная связывающая молекула или ее антигенсвязывающий фрагмент также ослабляют активность окисленного IL-33, соответственно путем предупреждения его превращения в окисленную форму IL-33.

Соответственно, подавление активности окисленного IL-33 обеспечивает подавление или выключение RAGE-зависимой передачи сигнала и/или опосредованных RAGE эффектов.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, характеризуется всеми ингибирующими эффектами, описанными выше. Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на восстановленный IL-33, характеризуется всеми ингибирующими эффектами, описанными выше.

Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой молекулу, связывающую восстановленный IL-33, или ее фрагмент. Соответственно, терапевтическое средство, воздействующее на IL-33, представляет собой антитело к восстановленному IL-33 или его связывающий фрагмент, соответственно, антитело, специфическое к восстановленному IL-33, или его связывающий фрагмент.

Соответственно, терапевтическое средство может подавлять или ослаблять передачу сигнала посредством IL-33 путем связывания с ST-2. Такие терапевтические средства называются в данном документе "ингибиторами ST-2". Ингибитор ST2 может представлять собой любой такой ингибитор, известный в данной области техники, например GSK3772847 (описанный в WO 2013/165894) и RG6149 (WO 2013/173761), оба из которых включены в данный документ посредством ссылки. Ингибитор ST-2 можно использовать в комбинации со вторым терапевтическим средством, которое подавляет или ослабляет передачу сигнала посредством RAGE. Применение различных терапевтических средств для подавления передачи сигнала посредством ST-2 и передачи сигнала посредством RAGE может быть преимущественным для доставки различных доз для подавления обоих путей там, где этого требует лежащая в основе патология.

Составы

Терапевтические средства в вариантах медицинского применения и способах, описанных в данном документе, можно вводить пациенту в форме фармацевтической композиции.

Соответственно, любые ссылки в данном документе на "терапевтическое средство" могут также относиться к фармацевтической композиции, содержащей, например, химический ингибитор или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые обеспечивают ослабление или подавление активности redIL-33 и/или oxIL-33. Соответственно, фармацевтическая композиция может содержать одно или несколько терапевтических средств.

Соответственно, терапевтические средства могут быть введены в фармацевтически эффективном количестве для лечения *in vivo* повреждения почек, соответствующей диабетической болезни почек, в аспектах медицинского применения и способа лечения, приведенных в данном документе.

Соответственно, "фармацевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" указанного одного или нескольких терапевтических средств должно рассматриваться как означающее количество, достаточное для достижения эффективного подавления активности redIL-33 и oxIL-33 и для достижения благоприятного эффекта, например для облегчения симптомов заболевания или состояния, как указано в вариантах медицинского применения/способах в данном документе.

Соответственно, одно или несколько терапевтических средств или фармацевтическая композиция на их основе могут быть введены человеку или другому животному в соответствии с вышеупомянутыми способами лечения/вариантами медицинского применения в количестве, достаточном для получения терапевтического эффекта.

Соответственно, одно или несколько терапевтических средств или фармацевтическая композиция на их основе могут быть введены такому человеку или другому животному в общепринятой лекарственной форме, полученной путем объединения одного или нескольких терапевтических средств с общепринятым фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем в соответствии с известными методиками.

Специалисту в данной области техники понятно, что форму и характер фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя количество активного(активных) ингредиента(ингредиентов), с которым их объединяют, путь введения и другие хорошо известные переменные.

Количество одного или нескольких терапевтических средств, которое может быть объединено с материалом-носителем для получения лекарственной формы для

однократного применения, будет варьировать в зависимости от подвергаемого лечению субъекта и конкретного способа введения. Соответственно фармацевтическую композицию можно вводить в виде однократной дозы, многократных доз или в течение установленного периода времени в виде инфузии. Соответственно, схемы введения доз также можно регулировать для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа).

Соответственно, одно или несколько терапевтических средств будут составлены таким образом, чтобы облегчить введение и способствовать стабильности одного или нескольких терапевтических средств.

Соответственно, фармацевтические композиции составляют таким образом, чтобы они содержали фармацевтически приемлемый, нетоксичный, стерильный носитель, например физиологический раствор, нетоксичные буферы, консерванты и т. п. Соответственно, фармацевтическая композиция может включать стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Подходящие составы для применения в терапевтических способах, раскрытых в данном документе, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980).

Соответственно, фармацевтические композиции для применения путем инъекции могут включать стерильные водные растворы (в случае растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного приема. В таких случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее легко было вводить с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения и будет защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Соответственно, носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц, в случае дисперсии, и путем применения поверхностно-активных веществ. Соответственно, предупреждения действия микроорганизмов можно достигать с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т. п. Во многих случаях будет приемлемо включить в фармацевтическую композицию изотонические средства, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Длительное всасывание инъекционных

композиций может обеспечиваться путем включения в композицию средства, которое задерживает всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

Соответственно, стерильные инъекционные растворы можно получать путем помещения активного соединения (например, одного или нескольких терапевтических средств, определенных в данном документе, отдельно или в комбинации с другими активными средствами) в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, перечисленных в данном документе, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии получают путем помещения активного соединения в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из вышеперечисленных. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов способы получения могут представлять собой вакуумную сушку и сублимационную сушку, которые приводят к получению порошка активного ингредиента и любого дополнительного требуемого ингредиента из их предварительно простерилизованного фильтрованием раствора.

Способы введения одного или нескольких терапевтических средств или фармацевтической композиции на их основе субъекту, нуждающемуся в этом, хорошо известны или могут быть легко определены специалистами в данной области техники.

Соответственно, путь введения одного или нескольких терапевтических средств или фармацевтической композиции на их основе может быть, например, пероральным, парентеральным, ингаляционным или местным. Соответственно, используемый в данном документе термин "парентеральное" включает, например, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение.

Соответственно, одно или несколько терапевтических средств или фармацевтическую композицию на их основе можно вводить перорально в виде приемлемой лекарственной формы, в том числе, например, в виде капсулы, таблетки, водных суспензий или растворов.

Соответственно, одно или несколько терапевтических средств или фармацевтическую композицию на их основе можно вводить в виде назального аэрозоля или ингаляции. Такие композиции можно получать в виде растворов в солевом растворе с использованием бензилового спирта или других подходящих консервантов, стимуляторов абсорбции для повышения биодоступности и/или других общепринятых солюбилизующих или диспергирующих средств.

Соответственно, составы для парентерального введения могут представлять собой однократную болюсную дозу, инфузионную или ударную болюсную дозу, за которой следует поддерживающая доза. Эти композиции можно вводить с конкретным фиксированным или переменным интервалами, например, раз в день или по мере необходимости.

Соответственно, одно или несколько терапевтических средств или фармацевтических композиций на их основе доставляются непосредственно к очагу заболевания или состояния, например к почкам, с обеспечением таким образом увеличения воздействия терапевтического средства на пораженную ткань. Соответственно, одно или несколько терапевтических средств или фармацевтических композиций на их основе вводят непосредственно в очаг заболевания или состояния. Соответственно, одно или несколько терапевтических средств или фармацевтических композиций на их основе целесообразно вводить в очаг повреждения почки.

Соответственно, одно или несколько терапевтических средств или фармацевтическая композиция на их основе должны быть составлены в виде жидкой композиции.

Соответственно, перечисленные выше компоненты для получения описанной в данном документе фармацевтической композиции могут быть упакованы и продаваться в виде набора. Такой набор будет соответственно содержать этикетки или листки-вкладыши, на которых указано, что соответствующие фармацевтические композиции применимы для лечения субъекта, страдающего от заболевания или нарушения или предрасположенного к ним.

Соответственно, компоненты для жидких составов обрабатывают, заполняют ими контейнеры, такие как ампулы, пакеты, бутылки, шприцы или флаконы, и запечатывают в асептических условиях в соответствии со способами, известными из уровня техники. Соответственно, контейнеры могут находиться под давлением, предпочтительно, они могут представлять собой аэрозольные контейнеры. Эти контейнеры могут быть включены в набор, как описано выше. Соответственно, набор может дополнительно содержать устройство для ингаляции. Соответственно, устройство для ингаляции содержит одно или несколько терапевтических средств или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, или выполненный с возможностью включения контейнера, описанного выше, который может содержать одно или несколько терапевтических средств или фармацевтических композиций, описанных в данном документе.

Общие положения

При осуществлении настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, общепринятые методы химии, биохимии, молекулярной биологии, иммунологии и фармакологии, известные специалистам в данной области. Такие методики в полном объеме объясняются в литературе. См., например, ссылки (Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472; *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream *et al.*, eds., 1998, Academic Press; *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press); *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997); Ausubel *et al.* (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5th edition (Current Protocols); *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)).

Термин "содержащий" охватывает "включающий", а также "состоящий", например, композиция, "содержащая" X, может состоять исключительно из X или может содержать что-то дополнительное, например X + Y.

Термин "приблизительно" по отношению к числовому значению x является необязательным и означает, например, $x \pm 10\%$.

Фраза "по сути" не исключает "полностью", например, композиция, которая "по сути не содержит" Y, может вообще не содержать Y. При необходимости фраза "по сути" может быть исключена из определений по настоящему изобретению.

Ссылки на процентную идентичность последовательностей для двух нуклеотидных последовательностей означают, что при выравнивании такой процент нуклеотидов или аминокислот являются одинаковыми при сравнении двух последовательностей. Это выравнивание и процент гомологии или идентичность последовательностей можно определить с помощью программ системы программного обеспечения, известных из уровня техники, например программ, описанных в разделе 7.7.18 в *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987), в дополнении 30. Предпочтительное выравнивание определяют с применением алгоритма поиска гомологии Смита-Уотермана с применением поиска аффинного гэпа со штрафом за открытие гэпа 12 и штрафом за продолжение гэпа 2, матрица BLOSUM 62. Алгоритм поиска гомологии Смита-Уотермана раскрыт в Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.

Если не указано иное, процесс или способ, включающие множество стадий, могут включать дополнительные стадии в начале или в конце способа или могут включать

дополнительные промежуточные стадии. Кроме того, стадии могут быть объединены, пропущены или выполнены в альтернативном порядке, если это необходимо.

В данном документе описаны различные варианты осуществления настоящего изобретения. Следует понимать, что признаки, указанные в каждом варианте осуществления, могут быть объединены с другими указанными признаками для обеспечения дополнительных вариантов осуществления. В частности, варианты осуществления, выделенные в данном документе как подходящие, типичные или предпочтительные, могут быть объединены друг с другом (за исключением случаев, когда они являются взаимоисключающими).

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Вариант осуществления 1 относится к способу лечения повреждения почек, где способ включает введение средства терапии, который обеспечивает подавление как передачи сигнала посредством ST2, так и передачи сигнала посредством RAGE, где указанное средство терапии включает одно или несколько терапевтических средств, например 1 или 2 терапевтических средства.

Вариант осуществления 2 относится к способу в соответствии с вариантом осуществления 1, который обеспечивает ослабление или подавление активности восстановленного белка IL-33 (redIL-33) и таким образом обеспечивает подавление передачи сигнала посредством ST2.

Вариант осуществления 3 относится к способам в соответствии с вариантами осуществления 1 или 2, который обеспечивает ослабление или подавление активности окисленного белка IL-33 (oxIL-33) и таким образом обеспечивает подавление передачи сигнала посредством RAGE.

Вариант осуществления 4 относится к способу в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-3, где повреждение почек предусматривает воспаление.

Вариант осуществления 5 относится к способу в соответствии с вариантом осуществления 4, где повреждение почек является воспалительным.

Вариант осуществления 6 относится к способу в соответствии с вариантом осуществления 4 или 5, где повреждение почек выбрано из диабетической болезни почек, фиброза, гломерулонефрита (например, непролиферативного (такого как гломерулонефрит с минимальными изменениями, мембранный гломерулонефрит, фокально-сегментарный гломерулосклероз) или пролиферативного (такого как IgA-нефропатия, мембранопротролиферативный гломерулонефрит, постинфекционный гломерулонефрит и быстро прогрессирующий гломерулонефрит [такой как синдром Гудпасчера и нарушения,

относящиеся к васкулитам {в том числе гранулематоз Вегенера и микроскопический полиангиит}}, системной красной волчанки, альбуминурии, односторонней обструкции мочеточника, синдрома Альпорта, поликистозной болезни почек (PCKD), гипертонического гломерулосклероза, хронического гломерулосклероза, хронической обструктивной уropатии, хронического тубулоинтерстициального нефрита и ишемической нефропатии.

Вариант осуществления 7 относится к способу в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-6, где повреждение почек представляет собой диабетическую болезнь почек.

Вариант осуществления 8 относится к способу в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-7, где терапевтическое средство или средства независимо выбраны из химического ингибитора и антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Вариант осуществления 9 относится к способу в соответствии с вариантом осуществления 8, где терапевтическое средство или средства содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Вариант осуществления 10 относится к способу в соответствии с вариантом осуществления 8 или 9, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с IL-33.

Вариант осуществления 11 относится к способу в соответствии с вариантом осуществления 10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат определяющие комплементарность области (CDR) из пары переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL), выбранной из таблицы 1.

Вариант осуществления 12 относится к способу в соответствии с вариантом осуществления 10 или 11, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с redIL-33 и обеспечивают ослабление или подавление активности redIL-33 с обеспечением таким образом подавления передачи сигнала посредством ST2.

Вариант осуществления 13 относится к способу в соответствии с любым из вариантов осуществления 10-12, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обеспечивают предотвращение связывания окисленного IL-33 с RAGE с обеспечением таким образом подавления передачи сигнала посредством RAGE-EGFR.

Вариант осуществления 14 относится к способу в соответствии с любым из вариантов осуществления 10-13, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с redIL-33 с аффинностью связывания, составляющей 100 пМ или меньше или составляющей

10 пМ или меньше, например составляющей 1 пМ или меньше, такой как 0,5 пМ, в частности 0,05 пМ (например, при измерении с применением KinExA).

Вариант осуществления 15 относится к способу в соответствии с любым из вариантов осуществления 10-14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с redIL-33 с k(on), превышающей или равной $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, в частности превышающей или равной $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

Вариант осуществления 16 относится к способу в соответствии с любым из вариантов осуществления 10-15, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с redIL-33 с k(off), составляющей меньше или равной $5 \times 10^{-1} \text{ c}^{-1}$, 10^{-1} c^{-1} , $5 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$, 10^{-2} c^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-3} c^{-1} , в частности составляющей меньше или равной 10^{-3} c^{-1} .

Вариант осуществления 17 относится к способу в соответствии с любым из вариантов осуществления 10-16, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент обеспечивают ослабление или подавление активности oхIL-33 и таким образом обеспечивают подавление передачи сигнала посредством RAGE.

Вариант осуществления 18 относится к способу в соответствии с любым из вариантов осуществления 9-17, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VHCDR1, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 37, VHCDR2, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 38, VHCDR3, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 39, VLCDR1, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 40, VLCDR2, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 41, и VLCDR3, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 42.

Вариант осуществления 19 относится к способу в соответствии с любым из вариантов осуществления 9-18, где антитело или антигенсвязывающие VH и VL указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотные последовательности, на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичные SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 19 соответственно.

Вариант осуществления 20 относится к способу в соответствии с вариантом осуществления 19, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, имеющий последовательность под SEQ ID NO: 1, и VL, имеющий последовательность под SEQ ID NO: 19.

Вариант осуществления 21 относится к способу по любому из вариантов осуществления 8-20, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело человека, химерное антитело и гуманизированное антитело.

Вариант осуществления 22 относится к способу по любому из вариантов осуществления 8-21, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой встречающееся в природе антитело, scFv-фрагмент, Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, минитело, диатело, триатело, тетратело или одноцепочечное антитело.

Вариант осуществления 23 относится к способу по любому из вариантов осуществления 8-22, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой моноклональное антитело.

Вариант осуществления 24 относится к способу в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-23, где применяют по меньшей мере два терапевтических средства, например, где одно терапевтическое средство обеспечивает подавление передачи сигнала посредством ST2, и второе терапевтическое средство обеспечивает подавление передачи сигнала посредством RAGE, например, где терапевтическое средство обеспечивает предотвращение связывания лиганда или лигандов с рецептором или рецепторами.

Вариант осуществления 25 относится к способу в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-24, где применяют одно терапевтическое средство, при этом терапевтическое средство обеспечивает подавление передачи сигнала посредством как ST2, так и RAGE, например, при этом средство обеспечивает предотвращение связывания лиганда с обоими рецепторами.

Вариант осуществления 26 относится к способу по любому из предыдущих вариантов осуществления, где передача сигнала посредством RAGE представляет собой передачу сигнала посредством RAGE-EGFR.

Вариант осуществления 27 относится к способу по варианту осуществления 26, где подавление передачи сигнала посредством RAGE-EGFR обеспечивает снижение или подавление опосредованных RAGE-EGFR эффектов.

Вариант осуществления 28 относится к способу по варианту осуществления 27, где опосредованный RAGE-EGFR эффект представляет собой аномальное ремоделирование эпителия.

Вариант осуществления 29 относится к терапевтическому средству, которое обеспечивает подавление или ослабление активности восстановленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством ST2, для применения при лечении повреждения почек или для применения в изготовлении лекарственного препарата для лечения повреждения почек, где лечение дополнительно включает подавление или ослабление активности окисленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством RAGE.

Вариант осуществления 30 относится к терапевтическому средству, которое обеспечивает подавление или ослабление активности окисленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством RAGE, для применения при лечении повреждения почек или для применения в изготовлении лекарственного препарата для лечения повреждения почек, где лечение дополнительно включает подавление или ослабление активности восстановленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством ST2.

Вариант осуществления 31 относится к терапевтическому средству, которое обеспечивает подавление или ослабление активности восстановленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством ST2, и терапевтическому средству, которое обеспечивает подавление или ослабление активности окисленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством RAGE, для применения при лечении повреждения почек или для применения в изготовлении лекарственного препарата для лечения повреждения почек.

Вариант осуществления 32 относится к терапевтическому средству, которое обеспечивает подавление или ослабление активности восстановленного IL-33 и окисленного IL-33 с обеспечением таким образом подавления или ослабления передачи сигнала посредством ST2 и передачи сигнала посредством RAGE, для применения при лечении повреждения почек или для применения в изготовлении лекарственного препарата для лечения повреждения почек.

Вариант осуществления 33 относится к терапевтическому средству для применения или применению по любому из вариантов осуществления 29-32, которое представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Вариант осуществления 34 относится к терапевтическому средству для применения по варианту осуществления 33, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент охарактеризованы в любом из вариантов осуществления 10-23.

Вариант осуществления 35 относится к терапевтическому средству для применения по любому из вариантов осуществления 29-34, где повреждение почек является таким, как охарактеризовано в любом из вариантов осуществления 4-7.

Вариант осуществления 36 относится к терапевтическому средству для применения по любому из вариантов осуществления 29-35, где передача сигнала посредством RAGE представляет собой передачу сигнала посредством RAGE-EGFR.

Вариант осуществления 37 относится к терапевтическому средству для применения по любому из вариантов осуществления 29-36, где подавление или ослабление передачи

сигнала RAGE-EGFR обеспечивает снижение или подавление опосредованных RAGE-EGFR эффектов.

Вариант осуществления 38 относится к терапевтическому средству для применения по варианту осуществления 37, где опосредованный RAGE-EGFR эффект представляет собой аномальное ремоделирование эпителия.

Вариант осуществления 39 относится к способу в соответствии с любым из вариантов осуществления 9-26 или к терапевтическому средству для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 31-38, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют с 33_640087-7B за связывание с redIL-33, например, как определено с помощью гомогенной флуоресценции с временным разрешением.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Оценка роли биологии IL-33 в диабетической болезни почек человека

Было показано, что ряд медиаторов воспаления активируется в контексте заболевания почек (Thomas et al., Nat reviews Dis Primers., 2015). Описанные ниже способы применяли для определения того, какое место занимают уровни экспрессии интерлейкина-33 (IL-33) среди других медиаторов воспаления, о которых известно, что они связаны с заболеванием почек.

Был проанализирован опубликованный материал, касающийся РНК-транскриптома от трех разных когорт пациентов с диабетической нефропатией (фигура 1: когорты Европейского банка кДНК почки (фиг. 1A), когорты Ни 2013 (фиг. 1B) и когорты Woroniecka, 2013 (фиг. 1C)). Уровни экспрессии РНК измеряли в образцах ткани клубочков и тубулоинтерстиция. Анализ транскриптома выполняли на основе подсчетов считываний последовательностей РНК в соответствии со стандартизированной методологией (Ju et al 2013; Woroniecka et al, 2013).

Было обнаружено, что IL-33 относится к цитокинам с наиболее высокой сверхэкспрессией в почках у субъектов с диабетической нефропатией (DN) из всех трех когорт. Экспрессия IL-33 активировалась при DN в почках как в клубочках, так и в тубулоинтерстиции (фиг. 1). Неожиданно было обнаружено, что экспрессия когнатного для IL-33 рецептора ST2 (IL1RL1) была снижена в клубочках по меньшей мере одной когорты пациентов с диабетической нефропатией (фиг. 2B). Ранее было показано, что ST2 экспрессируется на сравнительно высоких уровнях в почке, прежде всего в корковом веществе почек, по сравнению с уровнями в других тканях организма (фиг. 2A). Это позволяет предположить, что может существовать некоторый компенсаторный механизм

для снижения уровня экспрессии ST2 для предупреждения гиперактивности, возникающей под воздействием повышенных уровней IL-33.

Пример 2. Оценка уровня IL-33 в почках на доклинических моделях заболевания почек

Описанные ниже способы применяли для оценки того, повышен ли уровень экспрессии IL-33 в ряде доклинических моделей заболевания почек. Уровни экспрессии мРНК IL-33 количественно определяли в образцах почек, полученных из модели диабетической нефропатии II типа (T2DN) на мышах (мыши db/db, полученные из лаборатории Jackson laboratory, каталожный номер 000697, у которых была удалена одна почка (unx)), модели гипертонической нефропатии (HN) на мышах (5/6 мышей Nrx, полученных путем хирургического вмешательства с обеспечением удаления 5/6 массы нефронов у мышей BL6 (см. Wang et al. J. Vis. Exp., 129; e55825; 2017), модели обструктивной нефропатии (ON) на мышах (полученной с помощью хирургической односторонней обструкции мочеточника у мышей BL6 (см. Hesketh et al. J. Vis. Exp., 94; e52559; 2014)) и модели диабетической нефропатии типа 1 (T1DN) на мышах (с использованием химической абляции с помощью STZ, см. Chow et al 69; 73-80; Kidney International, 2006).

Моделирование заболевания проводили в соответствии с хорошо зарекомендовавшими себя протоколами (см., например, Wang et al J. Vis. Exp., 129; e55825; 2017, Hesketh et al J. Vis. Exp., 94; e52559; 2014, Chow et al 69; 73-80; Kidney International, 2006, Zhou et al Am J Transl Res 8: 1339-54, 2016; Yang et al Drug Discov Today Dis Models, 7; 13-19; 2010).

Для мышей T2DN относительные уровни экспрессии IL-33 в почках анализировали у мышей db/db в возрасте 8 недель или в возрасте 16 недель у мышей db/db, у которых была удалена одна почка (db/db + unx). Для мышей T1DN относительные уровни экспрессии IL-33 в почках анализировали у мышей с STZ и без STZ через 12 недель. Для мышей HN относительные уровни экспрессии IL-33 в почках анализировали у мышей после 5/6 NPX и мышей для имитационного контроля через 6 недель. Для мышей ON относительные уровни экспрессии IL-33 в почках анализировали у мышей UUO и в имитационном контроле через 7 дней. Образцы готовили для анализа транскриптома согласно Zhou et al Am J Transl Res 8: 1339-54, 2016. Относительные уровни экспрессии были нормализованы к относительному уровню экспрессии GAPDH в каждой когорте.

Как показано на фиг. 3, нормализованное значение экспрессии IL-33 является повышенным у (a) мышей T2DN db/db unx, (b) мышей T1DN с STZ, (c) мышей HN с 5/6 NPX и (d) мышей ON с UUO. Уровни экспрессии были нормализованы к GAPDH в каждой когорте. Эти результаты показывают, что уровни экспрессии IL-33 повышены в почке во всех доклинических моделях заболевания почек по сравнению с контролями.

Пример 3. В моделях заболевания почек происходит активация RAGE

Ранее было описано существование двух биологически активных форм IL-33 – redIL-33 и oxIL-33. Как сообщается в WO 2016/156440, восстановленный IL-33 (redIL-33) представляет собой изоформу, которая, как показано, обеспечивает передачу сигнала по пути передачи сигнала посредством ST2. Превращение red-IL33 в окисленную форму (oxIL-33) путем образования дисульфидной связи между нативными остатками цистеина предполагается в качестве механизма выключения передачи сигнала посредством redIL-33. Однако в WO 2016/156440 авторы настоящего изобретения охарактеризовали новый путь передачи сигнала, в котором oxIL-33 стимулирует передачу сигнала посредством RAGE (см., например, фигуру 58 в WO 2016/156440).

Учитывая существование пути передачи сигнала посредством RAGE, определяли изменение профиля экспрессии RAGE в доклинических моделях заболевания почек.

Количественное определение уровня экспрессии RAGE осуществляли с использованием тех же моделей и способов, которые описаны в примере 2. Как показано на фиг. 4, нормализованное значение уровня экспрессии RAGE является повышенным у (a) мышей T2DN db/db unx, (b) мышей T1DN с STZ, (c) мышей HN с 5/6 NPX и (d) мышей ON с UUO. Уровни экспрессии были нормализованы к GAPDH в каждой когорте. Эти результаты показывают, что экспрессия RAGE активируется во всех исследованных доклинических моделях заболевания почек.

Пример 4. Передача сигнала посредством RAGE и ST2 способствует дисфункции почек *in vivo*

Поскольку в доклинических моделях СКД наблюдалось повышение уровней экспрессии как RAGE, так и IL-33, определяли вклад путей передачи сигнала с участием этих молекул в патологии почек.

Вкратце, опосредованные ST2 и RAGE цитотоксические эффекты исследовали в модели на мышях db/db, у которых была удалена одна почка, описанной выше. ST2- и RAGE-зависимая передача сигнала была заблокирована у отдельных мышей. Поражение почек оценивали путем мониторинга концентрации альбумина в моче (альбуминурия). Альбуминурию измеряли как количество альбумина в моче, нормализованное к концентрации креатинина, чтобы компенсировать колебания концентрации мочи. Это значение называется соотношением альбумин:креатинин (UACR).

Исследование проводили, как показано на фиг. 5. Вкратце, мышам проводили удаление одной почки в возрасте 7 недель, чтобы ускорить повреждение почек. Мышам вводили дозу 10 мг/кг антитело человека класса IgG1 к RAGE, антитело мыши класса IgG1 к ST2 или

huNUP228 IgG1, которые служили в качестве отрицательного контроля, 3 раза в неделю. Образцы мочи собирали в дни 10, 13 и 15 и анализировали в отношении уровней альбумина и креатинина с использованием средств иммунохимического анализа Cobas®. Повреждение клубочков также анализировали путем оценки внутренней патологии с использованием показателей мезангиальной экспансии, дефицита ядер и уменьшения просвета капилляров.

Результаты показывают, что блокирование передачи сигнала посредством ST2 и RAGE приводило к значительному уменьшению значения UACR (фиг. 6 и 7). На фиг. 8 также продемонстрировано, что путем блокирования передачи сигнала посредством ST2 достигалось значительное уменьшение повреждения клубочков по сравнению с таковым в случае отрицательного контроля (* указывает на значительно меньший ($P < 0,05$) GDS, чем в случае изотипического контроля).

Пример 5. Окисленный IL-33 способствует образованию сигнального комплекса между RAGE и EGFR

В Cohen, E. S. et al. Nat. Commun. 6:8327 (2015) описано открытие окисленной формы IL-33, связанной дисульфидной связью (oxIL-33). Было показано, что OxIL-33 не связывает ST2 и не активирует ST2-зависимую передачу сигналов. Впоследствии (см. WO 2016156440A1) было показано, что oxIL-33 связывается с рецептором конечных продуктов гликирования (RAGE) и RAGE-зависимым образом передает сигналы для активации STAT5 и воздействия на миграцию эпителия.

Для дальнейшего изучения функции oxIL-33 эпителиальные клетки стимулировали посредством IL-33 в восстановленной или окисленной формах (redIL-33 и oxIL-33) и исследовали сигнальные пути. В данном документе показано, что oxIL-33 является новым лигандом для комплекса рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE) и рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), который приводит к возникновению серьезных эффектов в отношении функции эпителия.

1. Клонирование и экспрессия зрелых и мутированных по цистеину вариантов IL33 человека

Молекулы кДНК, кодирующие зрелый компонент IL-33 человека (112-270); регистрационный номер (UniProt) 095760 (также называемый IL33-01 или IL-33) и вариант с мутацией 4 цистеиновых остатков на серин (также называемый IL33-16 или IL-33[C->S]) синтезировали с помощью ПЦР с достройкой праймера и клонировали в pJexpress 411 (ДНК 2.0). Кодирующие последовательности IL-33 дикого типа (WT) и мутантного IL-33 модифицировали таким образом, чтобы они содержали 10xHis, Avitag и сайт расщепления

для протеазы фактор-Ха (МНННННННННАAGLNDIFEAQKIEWHEAAIEGR SEQ ID NO:43) на N-конце белков. IL33-01 с N-концевой меткой His10/Avitag (WT, SEQ ID NO:44) и IL33-16 с N-концевой меткой His10/Avitag (WT, SEQ ID NO:45) получали путем трансформации клеток BL21(DE3) *E. coli*. Трансформированные клетки культивировали в среде для аутоиндукции (Overnight Express™ Autoinduction System 1, Merck Millipore, 71300-4) при 37°C в течение 18 часов, после чего клетки собирали центрифугированием и хранили при -20°C. Клетки ресуспендировали в 2х DPBS, содержащем таблетки со смесью ингибиторов протеаз, не содержащих ЭДТА (Roche, 11697498001), 50 Ед./мл нуклеазы бензоназы, (Merck Millipore, 70746-3) и лизировали ультразвуком. Лизат клеток осветляли центрифугированием при 50000 x g в течение 30 мин. при 4°C. Белки IL-33 очищали из супернатанта с помощью аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных ионов металла, загружая в колонку HisTrap excel (GE Healthcare, 17371205), уравновешенную в 2х DPBS, 1 mM DTT при 5 мл/мин. Колонку промывали 2х DPBS, 1 mM DTT, 20 mM имидазолом, pH 7,4, для удаления примесей, а затем 2х DPBS, 0,1% Triton X-114 для удаления из иммобилизованного эндотоксина. После дополнительной промывки 2х DPBS, 1 mM DTT, 20 mM имидазола, pH 7,4, образец элюировали 2х DPBS, 1 mM DTT, 400 mM имидазолом, pH 7,4. IL-33 дополнительно очищали с помощью эксклюзионной хроматографии с применением колонки HiLoad Superdex 75 26/600 pg (GE Healthcare, 28989334) в 2х DPBS при 2,5 мл/мин. Пиковые фракции анализировали посредством SDS-PAGE. Фракции, содержащие чистый IL-33, объединяли и определяли концентрацию по поглощению при 280 нм. Конечные образцы анализировали посредством SDS-PAGE.

Для получения IL-33, освобожденного от метки, IL33 с N-концевой меткой His10/Avitag инкубировали с 10 единицами фактора Ха (GE healthcare 27084901) на мг белка в 2х буфера DPBS при к. т. в течение 1 часа. IL-33 без метки очищали с применением SEC-хроматографии в 2х DPBS на колонке HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (GE healthcare 28989333) при скорости потока, составляющей 1 мл/мин.

2. Получение и очистка окисленного IL-33 (oxIL-33)

Восстановленный IL33 окисляли путем разбавления до конечной концентрации 0,5 мг/мл в среде 60% IMDM (без фенолового красного), 40% DPBS и инкубации при 37°C в течение 18 часов. Агрегаты, образовавшиеся в процессе окисления, удаляли из образца путем загрузки его на анионообменную колонку HiTrap Capto Q ImpRes (GE Healthcare, 17547055). Перед загрузкой образец модифицировали путем добавления 1 М Tris, pH 9,0, до достижения pH 8,3 и добавлением 5 М NaCl до конечной концентрации 125 mM – в этих условиях загрузки агрегаты связывались с колонкой и мономеры oxIL-33 протекали без

связывания и подвергались сбору. Метки отщепляли от охIL-33 путем инкубации с фактором Ха (NEB, P8010L) в конечной концентрации 1 мкг фактора Ха на 50 мкг охIL-33 в течение 120 мин. при 22°C. Для удаления из образца восстановленного IL-33, если таковой остается, растворимый внеклеточный домен ST2S человека, слитый с Fc-His6 IgG1 человека, инкубировали с образцом в течение 30 мин. при 22°C и связывали восстановленный IL-33. Образец концентрировали в центрифужном концентраторе с порогом отсечки 3000 Да и загружали на колонку HiLoad Superdex 75 26/600 pg (GE Healthcare, 28989334) при скорости потока 2 мл/мин., что обеспечивало отделение мономерного охIL-33 от других компонентов образца. Фракции, содержащие чистый охIL-33, объединяли и концентрировали, и конечную концентрацию образца определяли с помощью УФ-спектроскопии по поглощению при 280 нм. Качество конечного продукта оценивали с помощью SDS-PAGE, HP-SEC и RP-HPLC.

3. Клонирование, экспрессия и очистка ST2 ECD человека

кДНК, кодирующую встречающуюся в природе растворимую изоформу ST2, представляющую собой ST2S (регистрационный номер в UniProt Q01638-2) без эндогенного сигнального пептида (аминокислотные остатки 19-328), амплифицировали с помощью ПЦР с праймерами, кодирующими удлинения, совместимые со сборкой Гибсона, и сигнальный пептид CD33, слитый с N-концом кодирующей последовательности ST2S. Аналогичным образом амплифицировали кодирующую последовательность Fc IgG1 человека с C-концевой His6-меткой. кДНК ST2S и кДНК IgG1 Fc-His6 собирали с применением сборки Гибсона с pDEST12.2 OriP, вектором экспрессии млекопитающих, управляемым CMV-промотором, несущим точку начала репликации OriP из EBV, что позволяет поддерживать эписомальное состояние в линиях клеток, экспрессирующих белок EBNA-1. Для обеспечения экспрессии белка осуществляли транзистентную трансформацию суспензионной культуры клеток CHO, сверхэкспрессирующих EBNA-1, плазмидой с использованием полиэтиленимин в качестве реагента для трансфекции. Кондиционированную среду, содержащую секретлируемый слитый белок ST2S-Fc-His6, собирали через 7 дней после трансфекции и загружали в колонку для аффинной хроматографии HiTrap MabSelect SuRe (Protein A, GE Healthcare, 11-0034-95) со скоростью 2 мл/мин. Колонку промывали 2х DPBS и белок элюировали 25 мМ ацетатом натрия, pH 3,6. Фракции, содержащие ST2S-Fc-His6, объединяли и загружали в колонку HiLoad Superdex 200 26/600 pg (GE Healthcare, 28989336), уравновешенную в 2х DPBS со скоростью 2 мл/мин. Фракции, содержащие чистый белок ST2S-Fc-His6, объединяли и определяли

концентрацию по поглощению при 280 нм. Конечные образцы анализировали посредством SDS-PAGE.

4. Клонирование, экспрессия и очистка ECD асиалогликопротеинового рецептора (ASGPR) человека

кДНК, кодирующую внеклеточный домен (ECD) асиалогликопротеинового рецептора (регистрационный номер в UniProt P07306) без цитоплазматического и трансмембранного доменов (аминокислотные остатки 62-291), химическим путем синтезировали в Geneart с сигнальным пептидом CD33, за которым следовала последовательность His10_Avi Tag, слитая с N-концом домена ECD. Конструкцию клонировали непосредственно в OriP pDEST12.2, вектор экспрессии млекопитающих, управляемый CMV-промотором, несущий точку начала репликации OriP из EBV, что позволяет поддерживать эписомальное состояние в линиях клеток, экспрессирующих белок EBNA-1. Для обеспечения экспрессии белка осуществляли транзientную трансформацию суспензионной культуры клеток НЕК Freestyle 293F плазмидой с использованием фектина 293 в качестве реагента для трансфекции. Кондиционированную среду, содержащую секретированный слитый белок HisAVi_hASGPR ECD, собирали через 7 дней после трансфекции с помощью аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных ионов металла, загружая в колонку HisTrap excel (GE Healthcare, 17371205), уравновешенную в 2х DPBS, при 4 мл/мин. Колонку промывали 2х DPBS, 40 мМ имидазолом, pH 7,4, для удаления примесей, и образец элюировали 2х DPBS, 400 мМ имидазолом, pH 7,4. ECD ASGPR человека дополнительно очищали с помощью эксклюзионной хроматографии с применением колонки HiLoad Superdex 75 16/600 pg (GE Healthcare, 28-9893-33) в 2х DPBS со скоростью 1 мл/мин. Пиковые фракции анализировали посредством SDS-PAGE. Фракции, содержащие чистый мономерный ASGPR, объединяли и определяли концентрацию по поглощению при 280 нм. Конечные образцы анализировали посредством SDS-PAGE.

5. Окисленная форма IL-33 активирует пути MAP-киназы

Нормальные эпителиальные клетки бронхов человека (NHBE) (CC-2540) получали от Lonza и поддерживали в полной среде BEGM (Lonza) в соответствии с протоколом производителя. NHBE собирали с использованием аккутазы (PAA, №L1 1-007) и высевали в количестве $1 \times 10^6/2$ мл в 6-луночный планшет (Corning Costar, 3516) в среду для культивирования [BEGM (Lonza CC-3171) с набором добавок (Lonza CC -4175)]. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 18-24 часов. По истечении этого времени среду аспирировали и клетки дважды промывали 1 мл PBS перед добавлением истощенной среды

(BEGM (Lonza CC-3171) с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина). Затем планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ еще в течение 18-24 часов перед стимуляцией.

Наборы для матричного анализа с использованием антител для определения фосфорилирования MAP-киназ (ab211061) были приобретены у Abscam, и эксперименты были проведены в соответствии с инструкциями производителя. NHBE в 6-луночном планшете, который подвергали истощению в течение 18-24 ч., оставляли без обработки или обрабатывали с помощью 30 нг/мл либо восстановленного IL-33, IL-33-16, либо окисленного IL-33 перед возвращением в инкубатор с 37°C, 5% CO₂ на 10 мин. (относительно активаторов, используемых в данном анализе, см. таблицу 2). Планшеты извлекали из инкубатора и клетки промывали охлажденным на льду PBS перед добавлением 100 мкл/лунка 1x буфера для лизиса, поставляемого с наборами. Белковые экстракты переносили в пробирки вместимостью 1,5 мл перед осветлением при 14000 об./мин. при 4°C. Концентрацию белка определяли с применением методики BCA (Thermo, 23225) и использовали 250 мкг общего белка на одну мембрану матричного анализа. Все последующие действия выполняли в соответствии с инструкциями производителя. Мембраны визуализировали на LiCor C-digit и количественно определяли с помощью Image Lite studio.

Таблица 2

Агонист	Идентификатор	Восстановитель	Конечная концентрация (мкг/мл)
Окисленный IL33-01 без метки	RD15	PBS	100
IL33-01 без метки	07/24/2015	PBS	100
IL33-16 без метки	11/12/2015	PBS	100
EGF	236-EG-200	PBS	100

В отличие от дикого типа (IL-33) и восстановленных форм IL-33 с C->S (IL-33[C->S]) (IL33-01 и IL33-16 соответственно), окисленный IL33 (oxIL-33) активирует большое количество ключевых сигнальных молекул (фиг. 9), которые вовлечены в те же пути, в которых участвуют рецепторные тирозинкиназы (RTK).

6. Окисленная форма IL-33 активирует рецептор эпидермального фактора роста (EGFR)

Для попытки идентифицировать рецепторные тирозинкиназы (RTK), которые активировались с помощью oxIL-33, проводили скрининг с использованием матричного анализа на 71 RTK. Наборы для матричного анализа с использованием антител для

определения фосфорилирования с помощью RTK (ab193662) были приобретены у Abcam, и эксперименты были проведены в соответствии с инструкциями производителя. NHBE культивировали и высевали в количестве $1 \times 10^6/2$ мл в 6-луночный планшет (Corning Costar, 3516) в среду для культивирования [BEGM (Lonza CC-3171) с набором добавок (Lonza CC-4175)]. Клетки инкубировали при 37°C , 5% CO_2 в течение 18-24 часов. По истечении этого времени среду аспирировали и клетки дважды промывали 1 мл PBS перед добавлением истощенной среды (BEGM (Lonza CC-3171) без набора добавок). Затем планшеты инкубировали при 37°C , 5% CO_2 еще в течение 18-24 часов перед стимуляцией. Выполняя те же стадии, что ранее были описаны для матричного анализа MAP-киназ, клетки активировали (активаторы, указанные в таблице 2), лизировали и использовали 250 мкг общего белка на мембрану матричного анализа. Все последующие действия выполняли в соответствии с инструкциями производителя. Мембраны визуализировали на LiCor C-digit и количественно определяли с помощью Image Lite studio. Ответ ни на восстановленный IL-33 дикого типа (IL-33), ни на IL-33 с C->S (IL-33[C->S]) (IL33-01 и IL33-16 соответственно) не обнаруживался. Однако oxIL-33 (окисленный IL-33-01) в матричном анализе RTK обеспечивал получение положительного сигнала, соответствующего таковому, обеспечиваемому рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) (фигура 10).

Способность oxIL-33 (окисленный IL-33-01) стимулировать передачу сигналов EGFR была подтверждена дополнительными способами. При активации EGFR фосфорилируется по Tug1068, и такой фосфо-EGFR можно обнаружить с помощью гомогенного анализа FRET (резонансный перенос энергии флуоресценции) HTRF® (гомогенная флуоресценция с временным разрешением, Cisbio International) (набор Cisbio № 64EG1PEH). Вкратце, NHBE высевали в количестве $5 \times 10^5/100$ мкл в 96-луночный планшет (Corning Costar, 3598) в среде для культивирования [BEGM (Lonza CC-3171) и с набором добавок (Lonza CC-4175)]. Планшеты инкубировали при 37°C , 5% CO_2 в течение 18-24 часов. По истечении этого времени среду аспирировали и клетки дважды промывали 0,2 мл PBS перед добавлением истощенной среды (BEGM (Lonza CC-3171) без набора добавок). Затем планшеты инкубировали при 37°C , 5% CO_2 еще в течение 18-24 часов перед стимуляцией возрастающими концентрациями IL-33-01, IL-33-16 и oxIL-33 (окисленный IL-33-01) и лигандами EGFR (таблицы 2 и 3) перед возвращением в инкубатор с 37°C , 5% CO_2 на 10 мин. Среду аспирировали и заменяли с помощью 50 мкл буфера для лизиса на лунку (Cisbio, 64EG1PEH). Затем анализ проводили в соответствии с инструкциями производителя (Cisbio, 64EG1PEH). Флуоресценцию с временным разрешением считывали при длинах волны испускания 620 нм и 665 нм с применением планшет-ридера EnVision (Perkin Elmer).

Данные анализировали путем расчета соотношения 665/620 нм и значений EC50, определенных с применением программного обеспечения GraphPad Prism путем подгонки кривой с использованием четырехпараметрического логистического уравнения.

Таблица 3

Агонист	Поставщик	Идентификатор	Восстановленный в	Конечная концентрация (мкг/мл)
TGF α	R&D systems	239-A-100	10 мМ уксусная кислота	100
HB-EGF	R&D systems	259-HE-050/CF	PBS	100
Амфирегулин (AREG)	R&D systems	262-AR-100/CF	PBS	100
Бетацеллюлин/BTC	R&D systems	261-CE-010/CF	PBS	100
Эпирегулин	R&D systems	1195-EP-025/CF	PBS	100
Эпиген	R&D systems	6629-EP-025/CF	PBS	100
HMGB1	R&D systems	1690-HMB-050	PBS	200
S100A8/A9	R&D systems	8226-S8-050	PBS	500
S100A12	R&D systems	1052-ER-050	PBS	200
S100B	R&D systems	1820-SB-050	PBS	200

Аналогичным образом оценивали фосфорилирование EGFR в линии клеток эпителия A549 с использованием анализа HTRF, как упоминалось ранее в этом разделе. Вкратце, A549 получали из ATCC и культивировали в среде RPMI GlutaMax с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина и 10% FBS. Клетки собирали с использованием аккутазы (РАА, №L1 1-007) и высевали в 96-луночные планшеты по 5×10^5 /100 мкл и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 18-24 часов. Затем лунки дважды промывали 100 мкл PBS перед добавлением 100 мкл истощенной среды (среда RPMI GlutaMax с добавлением 1%

пенициллина/стрептомицина) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 18-24 часов. Клетки стимулировали увеличивающимися концентрациями IL-33-01, IL-33-16 и oхIL-33, лигандов EGFR и лигандов RAGE (таблицы 2 и 3) перед возвращением в инкубатор с 37°C, 5% CO₂ на 10 мин. Среду аспирировали и заменяли с помощью 50 мкл буфера для лизиса на лунку (Cisbio, 64EG1PEN). Затем анализ проводили в соответствии с инструкциями производителя (Cisbio, 64EG1PEN). Флуоресценцию с временным разрешением считывали при длинах волны испускания 620 нм и 665 нм с применением планшет-ридера EnVision (Perkin Elmer). Данные анализировали путем расчета соотношения 665/620 нм и значений EC50, определенных с применением программного обеспечения GraphPad Prism путем подгонки кривой с использованием четырехпараметрического логистического уравнения.

Как в клетках NHBE, так и в клетках A549 oхIL-33 способствовал фосфорилированию EGFR аналогично известному агонисту EGF (фигура 11). Другие исследованные лиганды RAGE не воспроизводили этого.

7. Вестерн-блоттинг сигнальных компонентов

Для дальнейшего изучения того, какие элементы сигнального комплекса EGFR активируются в ответ на oхIL-33, проводили эксперименты с использованием вестерн-блот-анализа. NHBE культивировали и высевали в 6-луночные планшеты, как описано выше в разделе 5. После сывороточного голодания клетки стимулировали с помощью oхIL-33 (30 нг/мл) в течение от 5 до 240 минут. Затем среду аспирировали и клетки промывали охлажденным на льду PBS перед добавлением 150 мкл буфера для лизиса [1x буфер для образцов LDS (Thermo, NP0008), 10 mM MgCl₂ (VWR, 7786-30-3), 2,5% β-меркаптоэтанол (Sigma, M6250) и 0,4 мкг/мл бензоназы (Millipore, 70746)]. Клетки оставляли на льду на 10 мин., затем лизат переносили в пробирки вместимостью 1,5 мл и нагревали до 90°C в течение 5 мин. Растворы переносили в новые пробирки вместимостью 1,5 мл и 10 мкл образца вместе с 5 мкл набора маркерных белков (BioRad, 1610374) анализировали на 4-12% геле SDS-PAGE (Thermo, NW04127BOX) в подвижном буфере MES (B0002). Гели переносили на PVDF-мембраны (BioRad, 1704156) с применением Transblot Turbo (BioRad). PVDF-мембраны блокировали в растворе PBS-Tween, содержащем 5% сухого обезжиренного молока (Marvel), в течение 10 минут. Затем мембраны инкубировали с первичными антителами в PBS-Tween, содержащем 5% BSA, в течение ночи при 4°C. Затем мембраны пять раз промывали с помощью PBS-Tween, а затем инкубировали со вторичными мечеными HRP антителами в PBS-Tween, содержащем 5% сухого обезжиренного молока, в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем мембраны пять

раз промывали с помощью PBS-Tween перед добавлением ECL (BioRad, 1705062) и визуализацией с помощью Licor C-digit.

Результаты показывают, что охIL-33 обеспечивал активацию нескольких компонентов передачи сигнала посредством EGFR (фигура 12).

8. *Ох-IL-33 индуцирует фосфорилирование STAT-5, которое блокируется EGFR-нейтрализующими Ab*

Затем была предпринята попытка установить, можно ли подавлять опосредованную охIL33 активацию STAT5 путем предупреждения связывания с EGFR. Вкратце, клетки A549 культивировали в среде RPMI GlutaMax с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина и 10% FBS. Клетки собирали с использованием аккутазы и высевали в 96-луночные планшеты по 5×10^5 /100 мкл и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 18-24 часов. Затем лунки дважды промывали 100 мкл PBS перед добавлением 100 мкл истощенной среды (среда RPMI GlutaMax с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 18-24 часов. Антитело к EGFR (Clone LA1 (05-101, Millipore) или изотипический контроль (MAB002, R&D Systems) добавляли в лунки дозозависимым образом и планшет возвращали в инкубатор на 30 мин. Затем планшеты стимулировали окисленным IL-33 (30 нг/мл) в течение 30 мин. перед лизисом с использованием буфера для лизиса из набора phospho-STAT5 ELISA (85-86112-11, ThermoFischer Scientific) и проявляли в соответствии с инструкциями производителя перед измерением оптической плотности при 450 нМ. Как показано на фигуре 13, клетки, активированные с помощью охIL-33-01, демонстрируют фосфорилирование STAT5, уровень которого снижается в присутствии антитела к EGFR (фигура 13).

Пример 6. Окисленный IL-33 индуцирует образование комплекса между EGFR и RAGE

9. *ОхIL-33 индуцирует образование комплекса между EGFR и RAGE*

Чтобы понять, как RAGE и EGFR участвуют в способствовании передаче сигнала посредством охIL-33, проводили эксперименты методом иммунопреципитации для изучения сигнального комплекса. Во-первых, обеспечивали ковалентное связывание антител к EGFR с Dynabeads. Два флакона по 100 мкг антител к EGFR (R&D systems, AF231) инкубировали с 40 мг Dynabeads (Thermo, 14311D) и обеспечивали ковалентное связывание в соответствии с инструкциями производителя. После успешного связывания гранулы ресуспендировали в PBS до 30 мг/мл и хранили при 4°C.

ННВЕ получали от Lonza (CC-2540) и замороженное содержимое флаконов высевали непосредственно в чашки с диаметром 15 см (Thermo, 157150) из расчета 1×10^6 клеток на

чашку. NHBE поддерживали в полных средах BEGM (Lonza) в соответствии с протоколом производителя в течение одного месяца со сменой среды каждые три дня до достижения клетками конfluence. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение этого времени. За день до стимуляции планшеты дважды промывали 20 мл PBS перед добавлением 15 мл истощенной среды (BEGM (Lonza CC-3171) без набора добавок). Затем планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение дополнительных 18-24 часов перед стимуляцией отдельно средой (контроль без стимулирования), с помощью 30 нг/мл восстановленного IL-33-01, 30 нг/мл oxIL-33 или 30 нг/мл EGF и возвращали в условия 37°C, 5% CO₂ на 10 мин. Среду аспирировали и планшеты дважды промывали охлажденным на льду PBS перед добавлением 1 мл буфера для лизиса (Abscam, ab152163), содержащего ингибиторы фосфатазы и протеазы (Thermo, 78440), на чашку диаметром 15 см. Клетки соскабливали в буфер для лизиса, затем переносили в пробирки Protein LoBind вместимостью 2 мл (Eppendorf, Z666513) и очищали путем центрифугирования при 14000 об./мин. при 4°C. Концентрацию белка определяли с использованием набора BCA (Thermo, 23225) и все белковые экстракты нормализовали к 3 мг/мл буферу для лизиса. 6 мг экстракта общего белка инкубировали в чистой пробирке LoBind вместимостью 2 мл со 100 мкл Dynabeads к EGFR (описано выше). Затем пробирки помещали во вращающийся смеситель при 4°C на 5 ч. С помощью магнита (BioRad, 1614916) Dynabeads иммобилизовали, белковый экстракт аспирировали и заменяли 2 мл промывочного буфера 1 (50 mM Tris-HCl, pH 7,5 (Thermo, 15567027), 0,5 % TritonX 100 (Sigma, X100), 0,3 M NaCl. Данную процедуру повторяли еще четыре раза. Затем гранулы промывали дополнительно десять раз таким же образом промывочным буфером 2 (50 mM Tris-HCl, pH 7,5). После последней стадии промывки к гранулам добавляли 50 мкл 1% Rapigest (вес/об.) (Waters, 186001861) в 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, и нагревали при 60°C в течение 10 мин. Затем надосадочную жидкость переносили в новую пробирку LoBind вместимостью 2 мл. К смоле добавляли дополнительно 100 мкл 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, и перемешивали перед объединением с продутом первого элюирования. Затем добавляли TCEP (Sigma, 646547) до конечной концентрации 5 mM и образец нагревали при 60°C в течение 10 мин. Затем элюаты алкилировали путем добавления йодацетамида (Sigma, 16125) до 10 mM в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин. Реакцию алкилирования гасили добавлением DTT (Sigma, D5545) до 10 mM. Затем добавляли буфер Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, для получения конечного объема образца 500 мкл. Добавляли 0,5 мкг трипсина (Promega, V5111) на пробирку и расщепление образцов осуществляли при 30°C в течение ночи на платформе для встряхивания при 400 об./мин. Затем образцы подкисляли трифторуксусной

кислотой (Sigma, 302031) до конечной концентрации 2,0% (об./об.) и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Затем образцы центрифугировали при 14000 об./мин. в течение 30 мин., и супернатант переносили в новую пробирку LoBind вместимостью 2 мл. Затем образцы обрабатывали на колонках C18 (Thermo, 87784) в соответствии с инструкциями производителя. Затем образцы высушивали с применением вакуумного концентратора SpeedVac перед хранением при -20°C. Затем образцы анализировали методом идентификации белков по "отпечаткам пептидных масс" с помощью масс-спектрометрии (PMF-LC-MS). Для анализа результатов использовали программное обеспечение Scaffold.

EGFR был обнаружен на аналогичных уровнях при всех 4 условиях, что позволяет предположить, что иммунопреципитация работала хорошо во всех образцах. RAGE и IL-33 были обнаружены в образцах, обработанных с помощью oxIL-33, в отличие от образцов, обработанных с помощью IL33-01 (IL-33) или EGF, что позволяет предположить, что oxIL-33 и RAGE были ассоциированы с EGFR во время передачи сигнала. В соответствии с предыдущими наблюдениями за активацией EGFR в этих клетках с помощью oxIL-33 и EGF, белки, которые, как ранее сообщалось, участвуют в передаче сигнала посредством EGFR и эндоцитозе, были обнаружены после стимуляции указанными лигандами, но не восстановленным IL33-01 (таблица 4).

В таблице 4 показан LCMS-анализ NHBE, стимулированных восстановленным IL-33-01 (IL-33), oxIL-33 (окисленный IL-33-01) или EGF. IL-33 и RAGE обнаруживаются в комплексе с EGFR после стимуляции с помощью oxIL-33, но не после стимуляции восстановленным IL33-01 (IL-33) или EGF. В скобках указано количество уникальных пептидов, идентифицированных для каждого белка.

Таблица 4

Без стимуляции	IL-33	oxIL-33	EGF
EGFR (63)	EGFR (62)	EGFR (60)	EGFR (57)
-	-	IL-33 (11)	-
-	-	RAGE (11)	-
-	-	AP-2 α 1 (20)	AP-2 α 1 (14)
-	-	AP-2 α 2 (16)	AP-2 α 2 (10)

-	-	AP-2 β (15)	AP-2 β (16)
-	-	AP-2 μ (20)	AP-2 μ (20)
-	-	AP-2 σ (10)	AP-2 σ (11)
-	-	CBL-B (5)	CBL-B (4)

Для подтверждения этих наблюдений иммунопреципитацию и вестерн-блоттинг также проводили на лизатах клеток, полученных в соответствии с вышеуказанным протоколом. После определения концентрации белкового экстракта из NHBE 3 мг общего белка инкубировали в пробирке вместимостью 1,5 мл с 6 мкг антитела к EGFR (R&D systems, AF231) и помещали во вращающийся смеситель при 4°C на 2,5 ч. Затем в каждую пробирку добавляли 1,5 мг магнитных гранул с белком A/G (Thermo, 88802), после чего пробирки возвращали в условия 4°C еще на 1 ч. при перемешивании. Затем гранулы собирали с помощью магнита (BioRad, 1614916) и трижды промывали с помощью 500 мкл 50 mM Tris (pH 7,5), 1 % TritonX и 0,25 M NaCl и один раз с помощью 500 мкл 10 mM Tris (pH 7,5). Затем белки высвобождали из магнитных гранул с использованием 35 мкл буфера для образцов LDS (Thermo, NP0008) с восстанавливающим средством (Thermo, NP0004) и нагреванием при 95°C в течение 5 минут. Растворы переносили в новые пробирки вместимостью 1,5 мл и 10 мкл образца вместе с 5 мкл набора маркерных белков (BioRad, 1610374) анализировали на 4-12% геле SDS-PAGE (Thermo, NW04127BOX) в подвижном буфере MES (B0002). Гели переносили на PVDF-мембраны (BioRad, 1704156) с применением Transblot Turbo (BioRad). PVDF-мембраны блокировали в растворе PBS-Tween, содержащем 5% сухого обезжиренного молока (Marvel), в течение 10 минут. Затем мембраны инкубировали с первичными антителами (антителами к EGFR (Cell Signaling Technology, 2232), антителами к RAGE (Cell Signaling Technology, 6996) или антителами к IL-33 (R&D systems, AF3625) в PBS-Tween, содержащем 5% BSA в течение ночи при 4°C. Затем мембраны пять раз промывали с помощью PBS-Tween, а затем инкубировали с мечеными HRP вторичными антителами к антителам кролика (Cell Signaling Technology, 7074) или мечеными HRP вторичными антителами к антителам козы (R&D systems, HAF109) в PBS-Tween, содержащем 5% сухого обезжиренного молока, в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем мембраны пять раз промывали с помощью PBS-Tween перед добавлением ECL (BioRad, 1705062) и визуализацией с помощью Licor C-digit. Посредством вестерн-блоттинга подтвердили, что в присутствии oxIL-33 RAGE осаждается совместно с EGFR, тогда как при стимуляции с помощью EGF RAGE не обнаруживается (фигура 14). Эти данные показывают, что RAGE и EGFR являются функциональной частью окисленного сигнального комплекса IL-33.

10. RAGE необходим для образования комплекса охIL-33 с EGFR

Описанные выше эксперименты показали, что охIL-33 является лигандом для комплекса рецептора EGF (EGFR), который приводит к запуску нисходящей передачи сигнала. Эксперименты в этом разделе предназначены для определения того, является ли охIL-33 лигандом, который непосредственно связывается либо с RAGE, либо с EGFR. Чтобы больше узнать об образовании сигнального комплекса и оценить, взаимодействует ли охIL-33 напрямую с EGFR, применяли формат ELISA для изучения связывания охIL-33 с RAGE, ST2-Fc и EGFR.

Белки и модификации. Белки, содержащие мотив последовательности Avitag (GLNDIFEAQKIEWHE SEQ ID NO:46), биотинилировали с применением фермента биотин-лигазы (BirA) (Avidty, Bulk BirA) в соответствии с протоколом производителя. Все модифицированные белки без Avitag, применяемые в данном документе, биотинилировали по свободным аминам с применением Sulfo-NHS-LC-Biotin EZ link (Thermo/Pierce, 21335), следуя инструкциям производителя. В таблице 5 представлен перечень используемых биотинилированных белков.

Таблица 5.

Реагент
Биотинилированный EGF (Thermo)
Avitag-Human ASGPR
Avitag_IL-33-01 (восстановленный IL-33)
Avitag_IL-33-01 (окисленный IL-33)
Avitag_IL-33-16
HMGB1

Планшеты со стрептавидином (Thermo Scientific, AB-1226) покрывали биотинилированным антигеном из расчета 100 мкл/лунку (10 мкг/мл в PBS) при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшеты промывали 3х с помощью 200 мкл PBS-T (PBS + 1% (об./об.) Tween-20) и блокировали с помощью блокирующего буфера из расчета 300 мкл/лунка (PBS с 1% BSA (Sigma, A9576)) в течение 1 часа. Планшеты промывали 3х с помощью PBS-T. RAGE-Fc (R&D Systems №1145-RG) или ST2-Fc (R&D Systems №523-ST) разводили до 10 мкг/мл в PBS в блокирующем буфере, добавляли в соответствующие лунки и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. В качестве альтернативы добавляли 100 мкл EGFR-Fc (R&D Systems №344-ER-050) в концентрации 10 мкг/мл в PBS

в присутствии или в отсутствие немеченого RAGE (Sino Biological, 11629-HCCH) в концентрации 10 мкг/мл в PBS в течение 1 часа. Планшеты трижды промывали с помощью 200 мкл PBS-T. Затем RAGE-Fc, ST2-Fc и EGFR-Fc обнаруживали с помощью меченого HRP антитела к IgG человека (Sigma AO170, 5,1 мг/мл), разведенного 1:10000 в блокирующем буфере, 100 мкл/лунка в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали 3х с помощью PBS-T и проявляли с помощью TMB, 100 мкл/лунка (Sigma, T0440). Реакцию гасили с помощью 0,1 М H₂SO₄ из расчета 50 мкл/лунку. Поглощение считывали при 450 нм на Cytation Gen5 или аналогичном оборудовании. Результаты показывают, что охIL-33 демонстрировал четкое наличие взаимодействия с RAGE (фиг. 15A), тогда как непосредственное связывание охIL-33 с EGFR было пренебрежимо малым (фиг. 15B). Связывание EGFR с охIL-33 наблюдали только при добавлении sRAGE к смеси в данном анализе (фиг. 15B). Этого нельзя было бы повторить, если бы охIL-33 был заменен известным агонистом RAGE, HMGB1 (фиг. 15B).

Необходимость RAGE для передачи сигнала посредством EGFR, запускаемой охIL-33, была дополнительно подтверждена с использованием линий клеток с дефицитом RAGE. Линию клеток A549 с нокаутом RAGE получали следующим образом:

Получали плазмиду млекопитающих, содержащую векторы экспрессии красного флуоресцентного белка (RFP), направляющую РНК, нацеленную на экзон 3 *AGER* (TGAGGGGATTTTCCGGTGC SEQ ID NO:47), и эндонуклеазу Cas9. Среду, кондиционированную A549, получали путем выращивания клеток A549 в питательной смеси F12K (Gibco, с добавлением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина) в колбах T-175 в течение двух дней. Отработанную среду снимали с клеток A549, фильтровали и разбавляли в пять раз свежей питательной смесью Gibco F12K (с добавлением 20% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина). A549 высевали в три колбы T-75 из расчета 2x10⁵ клеток/мл, всего 15 мл, и помещали в инкубатор при 37°C, 5% CO₂ на ночь. Смесь для трансфекции получали с применением 1,6 мл питательной смеси F12K (с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина) с 8 мкг плазмиды с направляющей РНК *AGER* и 22,5 мкг PEI (Polysciences, 23966-2). Затем смесь встряхивали в течение 10 секунд и оставляли при комнатной температуре на 15 мин. Затем в каждую колбу T-75 добавляли 0,75 мл смеси для трансфекции. Колбы возвращали в инкубатор на двое суток. Затем клетки A549 открепляли с помощью аккутазы и переносили в PBS, содержащий 1% FBS, и отдельные клетки сортировали на клеточном сортере Aria (BD) на основе экспрессии RFP с помещением в 96-луночную планшет. Клетки подпитывали каждые 3-5 дней кондиционированной средой. Когда конфлюэнтность клеток превышала 50%, их переносили в 24-луночные планшеты и

выращивали. Этот процесс масштабирования продолжали до тех пор, пока каждый успешный клон не был распределен в отдельную колбу T15. Затем клетки распределяли в 12-луночные планшеты и выращивали до более чем 50% конfluence перед осуществлением ПЦР-анализа генома в отношении успешных нокаутов. Клетки лизировали в 100 мкл буфера для лизиса ДНК (Viagen Biotech, 301-C, с добавлением 0,3 мкг/мл протеиназы К) на лунку. Эти образцы инкубировали при 55°C в течение 4 часов, а затем 15 мин. при 85°C. ПЦР для RAGE проводили с использованием прямого и обратного праймеров, имеющих следующие последовательности: прямой – gttgcagcctcccaacttc (SEQ ID NO:48), обратный – aatgaggccagtgggaagtca (SEQ ID NO:49). Для реакции и циклов применяли следующие настройки при объеме реакционной смеси 50 мкл [25 мкл смеси полимеразы Q5, 2,5 мкл прямого праймера (10 мкМ исходного раствора), 2,5 мкл обратного праймера (10 мкМ исходного раствора), 2 мкл лизата матричной ДНК, 18 мкл воды без нуклеаз]. Реакцию ПЦР проводили с начальной денатурацией при 98°C в течение 30 секунд, затем следовали 35 циклов: 98°C в течение 5 секунд, 57°C в течение 10 секунд и 72°C в течение 20 секунд, перед последней стадией, осуществляемой при 72°C в течение 2 минут. 4 мкл продукта ПЦР смешивали с 6 мкл воды, не содержащей нуклеаз, и 2 мкл бх буфера для загрузки ДНК (Thermo Scientific, R0611). Обеспечивали прохождение образцов через 1% агарозный гель (1:10000 SYBR safe) при 90 В в течение 1 часа перед визуализацией на Versadoc Imager. Затем оставшиеся продукты ПЦР очищали с помощью набора для очистки ПЦР QIAquick (Qiagen, 28104) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию ДНК-50 измеряли с помощью NanoDrop. Несколько клонов (выбранных из результатов) были отправлены на внутреннее секвенирование. Результаты показали успешную вставку стоп-кодона в клонах RAGE09 и RAGE10.

Чтобы установить значимость RAGE для опосредованной охIL-33 передачи сигнала посредством EGFR, затем проводили иммунопреципитацию и вестерн-блоттинг на клетках A549 и RAGE-дефицитных клетках A549. Вкратце, линии клеток активировали в различные моменты времени (0-15 минут) с помощью охIL-33. Последующая иммунопреципитация EGFR или RAGE сопровождалась вестерн-блоттингом с антителами к RAGE, EGFR и IL-33 в соответствии с соответствующими экспериментальными протоколами, подробно описанными в разделе 9. Результаты показывают существенную роль RAGE в образовании комплекса с охIL-33 и EGFR (фиг. 16).

11. Окисленный IL-33 индуцирует фосфорилирование STAT5, которое блокируется нейтрализующим антителом к RAGE, но не к ST2

Для подтверждения большей важности RAGE по сравнению с ST2 для передачи сигнала посредством охIL-33 тестировали блокирующие антитела. Вкратце, A549 культивировали в среде RPMI GlutaMax с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина и 10% FBS. Клетки собирали с использованием аккутазы и высевали в 96-луночные планшеты по 5×10^5 /100 мкл и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 18-24 часов. Затем лунки дважды промывали 100 мкл PBS перед добавлением 100 мкл истощенной среды (среда RPMI GlutaMax с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 18-24 часов. Антитела к RAGE (M4F4; WO 2008137552), к ST2 (AF532; RnD Systems) или изотипический контроль (MAB002, R&D Systems) добавляли в лунки дозозависимым образом и планшет возвращали в инкубатор на 30 мин. Затем планшеты стимулировали окисленным IL-33 (30 нг/мл) в течение 30 мин. перед лизисом с использованием буфера для лизиса набора фосфо-STAT5 ELISA (85-86112-11, ThermoFischer Scientific) и проявляли в соответствии с инструкциями производителя перед измерением оптической плотности при 450 нМ. Как показано на фиг. 17, клетки, активированные с помощью охIL-33-01, демонстрируют фосфорилирование STAT5, которое снижается в присутствии антитела к RAGE, но не антитела к ST2 (фиг. 17).

Пример 7. Передача сигнала охIL-33 посредством RAGE в клетках почек PTEC

Предыдущие примеры показали, что уровень экспрессии IL-33 повышается при заболевании почек. Уровень экспрессии RAGE также повышается. Было показано, что блокирование передачи сигнала посредством ST2 и RAGE обеспечивает уменьшение UACR и повреждение почек в моделях на мышах. Также было показано, что опосредованная охIL-33 передача сигнала управляется образованием комплекса с EGFR в эпителиальных клетках. В экспериментах, описанных ниже, целью было определить, присутствует ли новый путь передачи сигнала также в эпителии почки.

Уровень ответа на охIL-33 измеряли в PTEC, линии эпителиальных клеток проксимальных канальцев человека.

Вкратце, PTEC (линия первичных эпителиальных клеток канальцев человека) выращивали до достижения конfluence и обрабатывали медиаторами воспаления почек в течение 24 ч. Уровень IL-33 измеряли в лизатах клеток с применением анализов Meso Scale Diagnostics в соответствии с протоколами производителей.

Как показано на фиг. 18А, внутриклеточные концентрации IL-33 увеличиваются, если PTEC обрабатывают с помощью IFN-гамма и TNF, по сравнению с концентрациями при обработке контролем, представляющим собой сахарозу или глюкозу. Эти результаты

свидетельствуют о том, что медиаторы воспаления IFN-гамма и TNF активируют выработку и секрецию IL-33 в РТЕС.

Затем РТЕС обрабатывали с помощью redIL-33 для изучения потенциальных аутокринных или паракринных эффектов redIL-33 в отношении воспалительного пути, задействующего ST2 и NFκB. РТЕС выращивали до достижения конfluence и обрабатывали дозированными концентрациями redIL-33 или IL-1 (полученного из ReproTech 200-01B) в качестве положительного контроля. RedIL-33 получали, как описано в WO 2016/156440. Перемещение NFκB в ядро в качестве маркера активации измеряли с помощью иммунофлуоресценции (в соответствии со способом, описанным в Noursadeghi *et al J Immunol Methods* **2008**). На фиг. 18B показано перемещение NFκB в РТЕС, обработанных возрастающими дозами IL-1 или redIL-33. Эти результаты показывают, что red-IL33 вызывает меньший воспалительный ответ, чем IL-1, в РТЕС.

Это было дополнительно подтверждено посредством анализа дозозависимого высвобождения маркеров воспаления в РТЕС в ответ на увеличение концентрации redIL-33. Вкратце, первичные РТЕС человека (Lonza) культивировали до достижения конfluence, затем высевали на 24-луночные планшеты (без сывороточного голодания) и стимулировали в течение 24 ч. полным диапазоном доз восстановленной формы IL-33 (дозы от 12,8 пМ до 200 нМ). По истечении этого времени супернатанты собирали для обнаружения провоспалительных цитокинов. Обнаружение цитокинов проводили с помощью анализа Meso Scale Diagnostics в соответствии с инструкциями производителя.

Дозозависимого повышения уровня воспалительных цитокинов IL-6, IL8, TNFα и IL1b не было обнаружено (фиг. 18C).

Аналогичным образом активацию MAP-киназ также анализировали в РТЕС при обработке восстановленным IL-33. Активация MAP-киназ является еще одной клеточной функцией, которая регулируется ST2-зависимым путем.

Вкратце, первичные РТЕС человека культивировали до достижения конfluence, затем высевали на 24-луночные планшеты, для данного исследования не требовалось сывороточное голодание. Клетки стимулировали в течение 30 мин. восстановленной формой IL-33 при единственной концентрации 30 нг/мл в течение 30 мин. Через 30 мин. клетки лизировали для измерения уровня фосфорилирования MAP-киназ (p38 и JNK). Фосфорилированные MAP-киназы обнаруживали с помощью анализа Meso Scale Diagnostics в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты показывают, что РТЕС не проявляют повышенной передачи сигнала посредством MAP-киназы в ответ на снижение уровня IL-33 (фиг. 18D), что дополнительно иллюстрирует, что РТЕС не отвечают на снижение уровня IL-33 посредством передачи сигнала по классической оси ST2.

Для изучения ответа РТЕС на передачу сигнала посредством oxIL-33, активацию EGFR измеряли после стимуляции с помощью oxIL-33 и redIL-33. OxIL-33 и redIL-33 получали, как описано в WO 2016/156440 или выше. Вкратце, РТЕС выращивали до достижения конfluence и стимулировали посредством oxIL-33 и redIL-33 в течение 10-15 мин. перед измерением передачи сигнала посредством RAGE/EGFR с помощью гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF).

HTRF®-анализ представляет собой технологию гомогенного анализа, в которой используется резонансный перенос энергии флуоресценции между донорным и акцепторным флуорофором, которые находятся в непосредственной близости (Mathis, G., Clin Chem 41(9):1391-7 (1995)). Эти анализы применяли для измерения взаимодействия макромолекул с помощью прямого или непрямого присоединения одной из молекул, представляющих интерес, к донорному флуорофору, например криптату европия (Eu³⁺), и присоединения другой молекулы, представляющей интерес, к акцепторному флуорофору, например XL665 (стабильный сшитый аллофиикоцианин). В этой донорно-акцепторной системе возбуждение молекулы криптоата (при 337 нм) приводило к испусканию флуоресценции при 620 нм. Энергия, полученная в результате этого испускания, переносилась к XL665, находящемуся в непосредственной близости от криптоата Eu³⁺, что приводило к испусканию специфической долгоживущей флуоресценции (при 665 нм) от XL665. Специфичные сигналы как донора (при 620 нм), так и акцептора (при 665 нм), можно измерить, что делает возможным расчет соотношения 665 нм/620 нм, в котором вводится поправка на присутствие окрашенных соединений в анализе.

Фосфо-EGFR (Tyr1068) обнаруживали в формате сэндвич-анализа с использованием двух разных специфических антител, одно из которых было мечено Eu³⁺-криплатом (донор), а второе – d2 (акцептор). Когда красители находятся в непосредственной близости, возбуждение донора источником света (лазером или лампой-вспышкой) запускает резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET) к акцептору, который, в свою очередь, флуоресцирует на определенной длине волны (665 нм). Специфический сигнал изменяется в положительную сторону пропорционально содержанию фосфо-EGFR (Tyr1068). Следовательно, сигнал FRET будет наблюдаться только при активировании сигнального комплекса EGFR.

Как показано на фиг. 18E, *ox*-IL33 индуцирует фосфорилирование EGFR (p-EGFR) в PTEC, сравнимое с уровнями при использовании положительного контроля (EGF). Природный лиганд RAGE (S1001A9) не приводил к увеличению содержания p-EGFR по сравнению с необработанными контролями. Это справедливо и в отношении *red*IL-33.

Чтобы подтвердить, что увеличение p-EGFR опосредовано путем передачи сигнала *ox*IL33 RAGE-EGFR, PTEC стимулировали окисленным IL-33 в присутствии антител к RAGE и к EGFR.

Первичные PTEC человека культивировали до достижения конfluence, затем высевали на 96-луночные планшеты и обеспечивали сывороточное голодание в течение ночи. Затем клетки стимулировали однократной дозой окисленного IL-33 (конечная концентрация 200 нМ) с антителами к RAGE и к EGFR (конечная концентрация 10 мкг/мл) или без них. PTEC предварительно инкубировали с антителами в течение 40 мин., и затем проводили стимуляцию с применением окисленного IL-33 в течение 10 мин. По прошествии этого времени (всего 50 мин.) процессы стимуляции прекращали путем лизиса клеток и обрабатывали их для определения уровня фосфорилирования EGFR с применением гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF). Детали анализа были описаны ранее. Анализ проводили в соответствии с протоколом поставщика Cisbio.

Результаты показывают, что блокирование RAGE и EGFR обеспечивает уменьшение уровня активации EGFR под действием *ox*IL-33 (фиг. 18F). Это указывает на то, что активация EGFR в PTEC в ответ на *ox*IL33 опосредована RAGE и EGFR.

Эти результаты показывают, что *ox*IL-33, в отличие от *red*IL-33, активирует RAGE/EGFR-зависимую передачу сигнала в клетках PTEC. Это говорит о том, что окисленный IL33 может опосредовать возникновение ответов в эпителиальных клетках в канальцевых областях при заболевании почек с повышенным уровнем IL33.

Для оценки биологического воздействия передачи сигнала посредством *ox*IL33 в эпителии почек PTEC стимулировали с помощью *ox*IL33 и *red*IL-33 и измеряли уровень высвобождения молекула 1 повреждения почек (KIM-1). KIM-1 является ключевым маркером повреждения почечных канальцев (Han et al. 2002, *Kidney Int.* 62(1)237-44).

Первичные PTEC человека культивировали до достижения конfluence, затем высевали на 24-луночные планшеты, обеспечивали сывороточное голодание в течение ночи и стимулировали однократной дозой окисленного IL-33 или/и мутантного восстановленного IL-33 (оба в дозе 1 мкг/мл) (для осуществления контроля конкретно в отношении эффекта, характерного только для окисленной формы). Стимуляцию проводили

в течение 8 ч., после чего собирали супернатанты для последующего обнаружения маркеров почечного повреждения, KIM-1. Обнаружение проводили с помощью анализа Meso Scale Diagnostics в соответствии с протоколом производителя.

Результаты показывают, что oxIL-33, в отличие от восстановленной изоформы IL-33, активирует KIM-1 (фиг. 18G), указывая на то, что повреждение является признаком активации сигнальной оси oxIL-33 в PTEC.

Пример 8. Блокирование ST2-зависимой передачи сигнала в эндотелиальных клетках клубочков человека

Эксперименты, описанные ниже, дают возможность установить, отвечают ли разные типы клеток почек на передачу сигнала посредством redIL-33.

Первичные эндотелиальные клетки клубочков человека (GEnC) выращивали до достижения конfluence и обрабатывали медиаторами воспаления почек в течение 24 ч. Уровень IL-33 измеряли в лизатах клеток с помощью MSD, как описано в примере 7. Как показано на фиг. 19A, внутриклеточные концентрации IL-33 увеличиваются, если GEnC обрабатывают с помощью IFN-гамма и TNF, по сравнению с таковыми при обработке контролем, представляющим собой сахарозу или глюкозу. Эти данные свидетельствуют о том, что медиаторы воспаления IFN-гамма и TNF активируют выработку и секрецию IL-33 в GEnC.

Затем GEnC обрабатывали с помощью redIL-33 для изучения потенциальных аутокринных или паракринных эффектов redIL-33 в отношении воспалительного пути, осуществляемого посредством ST2 и NFkB. GEnC выращивали до достижения конfluence и обрабатывали дозированными концентрациями redIL-33 или IL-1 (полученного от R&D Systems – каталожный номер 3625-IL-010, 201-LB-025) в качестве положительного контроля. RedIL-33 получали, как описано в WO 2016/156440 или выше. Перемещение NFkB в ядро в качестве маркера активации измеряли с помощью иммунофлуоресценции (в соответствии со способом, описанным в Noursadeghi *et al J Immunol Methods* 2008). На фиг. 19B показано перемещение NFkB в GEnC, обработанных возрастающими дозами IL-1 или redIL-33. Эти результаты показывают, что в GEnC при эквивалентных дозах red-IL33 вызывает воспалительный ответ, сравнимый с таковым, вызываемым IL-1.

Чтобы изучить эффекты блокирования IL-33 в отношении ST2-зависимой передачи сигнала в почках, GEnC обрабатывали моноклональным антителом 33_640087-7B по WO 2016/156440 (SEQ ID NO: 616 и SEQ ID NO: 618). Вкратце, GEnC выращивали до достижения конfluence и обрабатывали с помощью IL-33 или контрольными

средствами в течение 24 ч. с использованием 0,0001-100 нМ 33_640087-7В или без него или изотипического контроля. Перемещение NFκB использовали в качестве маркера передачи сигнала посредством ST2 и активации эндотелиальных клеток и анализировали, как описано в предыдущих примерах.

Как показано на фиг. 19С, redIL-33 индуцирует перемещение NFκB в GEnC, обработанных с помощью IL-33, что подавляется с помощью 33_640087-7В. Изотипический контроль не обеспечивал подавления активации, также как и 33_640087-7В не обеспечивал подавления опосредованной IL1 передачи сигнала посредством NFκB, что использовали в качестве положительного контроля.

Для анализа эффекта стимуляции эндотелиальных клеток с помощью redIL-33 проводили дополнительные эксперименты.

Первичные HGMEC человека (Cell Systems) культивировали до достижения конfluence, затем высевали на 24-луночные планшеты и стимулировали однократной дозой (30 нг/мл) восстановленной или окисленной формы IL-33 в течение 24 ч. По прошествии этого времени супернатанты собирали для обнаружения провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8. Обнаружения цитокинов достигали с помощью анализа Meso Scale Diagnostics в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты показывают, что redIL-33 индуцирует высвобождение IL-6 и IL-8 (фиг. 20D). oxIL-33 не индуцировал высвобождения IL-6 или IL-8.

Также измеряли дозозависимое высвобождение воспалительных цитокинов IL-8, TNFα, IL1b и IL-6 после стимуляции с помощью redIL-33 в HGMEC. Первичные HGMEC человека (Cell Systems) культивировали до достижения конfluence, затем высевали на 24-луночные планшеты и стимулировали в течение 24 ч. полным диапазоном доз восстановленной формы IL-33 (дозы от 200 нМ до 12,8 пМ). По истечении этого времени супернатанты собирали для обнаружения провоспалительных цитокинов. Обнаружения цитокинов достигали с помощью анализа Meso Scale Diagnostics в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты показывают, что секреция IL-1b, IL-6, IL-8 и TNFα из эндотелиальных клеток специфична для redIL-33 и зависит от дозы.

Для дальнейшего изучения индуцированной redIL-33 активации NFκB в эндотелиальных клетках клубочков *in vitro* измеряли выработку воспалительных цитокинов в GEnC после инкубации с redIL-33 в течение 24 часов.

Как указано выше, GEnC выращивали до достижения конfluence и инкубировали с IL33 или положительными контролями с 33_640087-7В или без него. Уровни цитокинов

измеряли в супернатантах с помощью анализов Meso Scale Diagnostics (MSD) в соответствии с протоколами производителей.

Способность 33-640087_7B подавлять активацию передачи сигнала посредством MAP-киназы также измеряли в первичных эндотелиальных клетках человека. Первичные HGMEC человека (Cell Systems) культивировали до достижения конfluence, затем высевали на 24-луночные планшеты и стимулировали в течение 30 мин. однократной дозой redIL-33 в количестве 30 нг/мл с 33-640087_7B в количестве 1 мкг/мл или без него. Через 30 мин. клетки лизировали для измерения уровня фосфорилирования MAP-киназ и блокирующего эффекта 33-640087_7B. MAP-киназы обнаруживали с помощью анализа Meso Scale Diagnostics в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты показывают, что 33_640087-7B значительно подавляет секрецию IL-4, IL-6, IL-8 и IL-12, согласно измерению в супернатанте GEnC через 24 ч. (фиг. 20A). Дополнительно, 33_640087-7B обеспечивает подавление фосфорилирования MAP-киназ p38 и JNK (фиг. 20B).

Это демонстрирует, что антагонисты IL-33 можно использовать для уменьшения или подавления воспаления в почке, опосредованного передачей сигнала посредством IL-33/ST2. Это может быть применимо при лечении заболеваний с аномальным воспалением в почке, таких как диабетическая болезнь почек.

Пример 9. Передача сигнала посредством IL33 в первичных мезангиальных клетках человека

Учитывая, что различные изоформы IL-33, как было показано, оказывают различные патологические эффекты в отношении эпителиальных и эндотелиальных клеток почек, также была проанализирована передача сигнала посредством IL-33 в мезангиальных клетках.

Мезангиальные клетки представляют собой специализированные клетки, которые являются еще одним важным компонентом почечных клубочков. Основная функция мезангиальных клеток заключается в удалении захваченных остатков и агрегированного белка из базальной мембраны, тем самым защищая фильтр от накопления дебриса. Диабетическая болезнь почек характеризуется прогрессирующей мезангиальной экспансией и отложением матрикса, что приводит к гипертрофии клубочков и гломерулосклерозу, в следствие чего в конечном итоге происходит окклюзия капилляров клубочков и нарушение функции почек.

Мезангиальные клетки стимулировали посредством ряда стрессовых факторов, характерных для хронического заболевания почек, чтобы установить, индуцируют ли они экспрессию IL-33.

Первичные мезангиальные клетки человека (Lonza) выращивали до достижения конfluence, затем высевали в 6-луночные планшеты и обрабатывали медиаторами воспаления почек в течение 24 ч. Уровень IL-33 измеряли в лизатах клеток с помощью MSD, как описано в примерах выше. Как показано на фиг. 21А, внутриклеточные концентрации IL-33 повышаются при обработке мезангиальных клеток с помощью IFN-гамма и TNF-альфа по сравнению с другими стрессовыми факторами.

Затем исследовали аутокринные и паракринные эффекты экспрессии IL-33 в мезангиальных клетках. Анализировали дозозависимое высвобождение IL-8 из первичных мезангиальных клеток человека при обработке с помощью redIL-33.

Первичные мезангиальные клетки (Lonza) выращивали до достижения конfluence, затем высевали на 24-луночные планшеты и обрабатывали полным диапазоном доз восстановленной формы IL-33 (дозы от 200 нМ до 12,8 пМ) в течение 24 ч. Супернатанты собирали для обнаружения провоспалительного IL8. IL-8 обнаруживали с помощью анализа Meso Scale Diagnostics в соответствии с инструкциями производителя. Для экспериментов по блокированию первичные мезангиальные клетки (Lonza) выращивали до достижения конfluence, затем высевали на 24-луночные планшеты и обрабатывали однократной дозой восстановленного IL-33 (30 нг/мл) с 33-640087_7B в дозе 1 мкг/мл или без него в течение 24 часов. Супернатанты собирали для обнаружения провоспалительного IL8. IL8 обнаруживали с помощью анализа Meso Scale Diagnostics в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты показывают, что высвобождение IL-8 является дозозависимым (фиг. 21В). Высвобождение IL-8 подавляется присутствием 33_640087_7B (фиг. 21С). Таким образом, антагонисты IL-33 могут быть применимы для подавления аутокринной или паракринной воспалительной реакции, опосредованной снижением уровня IL-33 в мезангиальных клетках.

Для исследования возможного вклада передачи сигнала посредством IL-33 в мезангиальную экспансию, которая наблюдается при DKD, первичные мезангиальные клетки человека стимулировали с помощью IL-33 и измеряли пролиферацию этих клеток *in vitro*. Вкратце, первичные мезангиальные клетки человека выращивали до достижения конfluence, высевали в 96-луночные планшеты, затем выдерживали в течение 24 ч. и обрабатывали дозированными концентрациями redIL-33, oxIL-33 или PDGF-BB в качестве

положительного контроля в течение 18 ч. После этого клетки обрабатывали в импульсном режиме с использованием 10 мкМ раствора EdU в течение дополнительных 4 ч. Воздействие EdU позволяет проводить прямое измерение клеток, синтезирующих ДНК. Включение EdU оценивали с использованием реагента Amplex™ UltraRed и измерения испускания флуоресценции в соответствии с инструкциями производителя.

Как показано на фигуре 21D, α IL-33 индуцирует пролиферацию мезангиальных клеток человека дозозависимым образом. Эти результаты свидетельствуют о том, что α IL-33, в отличие от β IL-33, может участвовать в экспансии мезангиальных клеток при прогрессировании диабетической болезни почек.

Пример 10. α IL-33 обеспечивает ухудшение реакции застания раны в виде царапины в монослойных культурах эпителиальных клеток при глубинном культивировании α IL-33 обеспечивает ухудшение застания раны в виде царапины в клетках A549 и NHBE, в отличие от EGF

Эпителиальные клетки A549 получали из ATCC и культивировали в среде RPMI GlutaMax с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина и 10% FBS. Клетки собирали с использованием аккутазы (РАА, №L1 1-007) и высевали в 96-луночные планшеты по $5 \times 10^5/100$ мкл и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 18-24 часов. Затем лунки дважды промывали 100 мкл PBS перед добавлением 100 мкл истощенной среды (среда RPMI GlutaMax с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 18-24 часов. С применением WoundMaker™ (Essen Bioscience), клетки подвергали оцарапыванию, а затем лунки промывали 2x 200 мкл PBS перед добавлением среды RPMI GlutaMax с добавлением 0,1% FBS (об./об.) и 1% (об./об.) пенициллина/стрептомицина, содержащей указанные виды стимулирующих средств: отдельно среда (контроль без стимулирования), 30 нг/мл восстановленного IL-33, 30 нг/мл окисленного IL-33 или 30 нг/мл EGF, и возвращали в условия 37°C, 5% CO₂. Планшеты помещали в IncucyteZoom для визуализации и анализа заживления ран на период 48 часов. Относительную плотность ран рассчитывали с помощью алгоритма заживления ран в программном обеспечении Incucyte Zoom.

Нормальные эпителиальные клетки бронхов человека (NHBE) (CC-2540) получали от Lonza и поддерживали в полной среде BEGM [BEGM (Lonza CC-3171) и наборе добавок (Lonza CC-4175)] в соответствии с протоколом производителя. Клетки собирали с использованием аккутазы и высевали в количестве $5 \times 10^5/100$ мкл в 96-луночный планшет ImageLock (Sartorius, 4379) в среду для культивирования. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 18-24 часов. По прошествии этого времени среду аспирировали и

клетки дважды промывали 100 мкл PBS перед добавлением истощенной среды (BEGM (Lonza CC-3171) без набора добавок с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина). Затем планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение дополнительных 18-24 часов перед созданием раны в виде царапины. С применением WoundMaker™ (Essen Bioscience), клетки подвергали оцарапыванию, а затем лунки промывали 2x 200 мкл PBS перед добавлением среды BEBM (Lonza), с добавлением 0,1% FBS (об./об.) и 1% (об./об.) пенициллина/стрептомицина, содержащей указанные виды стимулирующих средств: отдельно среда (контроль без стимулирования), 30 нг/мл восстановленного IL-33, 30 нг/мл окисленного IL-33 или 30 нг/мл EGF, и возвращали в условия 37°C, 5% CO₂. Планшеты помещали в IncucyteZoom для визуализации и анализа заживления ран на период 48 часов. Относительную плотность ран рассчитывали с помощью алгоритма заживления ран в программном обеспечении Incucyte Zoom. Как показано на фигуре 22, oxIL-33 обеспечивал подавление заживления ран в культурах клеток A549 (фигура 22A) и клеток NHBE (фигура 22B) с глубинным культивированием, оказывая эффект, противоположный эффекту EGF, где наблюдается повышенная плотность клеток раны.

Нарушение застания раны в виде царапины посредством окисленного IL-33 можно предупредить с помощью антител, нейтрализующих RAGE или EGFR, но не ST2

Чтобы понять, были ли эти функциональные эффекты oxIL-33 опосредованы RAGE/EGFR, в клетках NHBE проводили анализ с царапиной, как описано выше, но в присутствии антител, которые нейтрализуют различные компоненты рецептора. Клетки NHBE обрабатывали отдельно средой (контроль без стимулирования), восстановленным IL-33 или окисленным IL-33 в присутствии 10 мкг/мл антител к ST2 (AF532, R&D Systems), к RAGE (M4F4, WO 2008137552) или к EGFR (клон LA1, 05-101 Millipore). OxIL-33, в отличие от восстановленного IL-33, подавляет застание царапин. Этот эффект oxIL-33 устраняется с помощью антител к RAGE и к EGFR, но не антител к ST2, что снова демонстрирует, что RAGE и EGFR являются важными рецепторами, вовлеченными в пути передачи сигнала посредством окисленного IL-33 (фигура 23).

Анализ застания ран в виде царапин также можно применять для изучения ответа эпителиальных клеток на повреждение, наблюдаемое в микроокружении при хроническом заболевании почек. Вкратце, RPTEC высевают из расчета 20000-30000/лунка в 96-луночный планшет на 24 ч. (день 1). В день 2 клетки РТЕС подвергают сывороточному голоданию в течение ночи. В день 3 создавали рану в виде царапины с помощью устройства WoundMaker (Essen Bioscience) и клетки дважды промывали с помощью PBS для удаления открепившихся клеток. Затем применяют стимулирующие средства (100 мкл на лунку) и

получают разведения в среде с 0,1% сыворотки, за исключением клеток в полностью дополненной среде, которые используют в качестве положительных контролей. Планшеты вставляют в Incucyte (Incucyte S3 2019A) и настраивают в соответствии с инструкциями производителя для измерения относительной плотности раны в момент времени 0 ч. (исходный уровень), а затем проводят измерения каждые 4 ч. в течение 4 дней для измерения относительного значения заращения царапины.

В заключение, данные, представленные в примерах, демонстрируют, что медиаторы воспаления активируют выработку IL-33 в эпителии, эндотелии и клубочках почек. RedIL-33, по-видимому, передает сигнал по аутокринному или паракринному механизму посредством активации NFκB (зависимой от ST2) в эндотелиальных клетках почек. Передача сигнала посредством red-IL33 опосредует секрецию провоспалительных цитокинов эндотелием клубочков, что, вероятно, усугубляет повреждение почек *in vivo*. Кроме того, oxIL-33 активирует путь передачи сигнала посредством RAGE/EGFR (зависимый от RAGE) в эпителии почек. Предполагается, что передача сигнала посредством RAGE/EGFR способствует формированию патофизиологической картины при повреждении почек. Также было показано, что уровень экспрессии RAGE повышается в почке на множестве доклинических моделей заболевания почек. Уровень экспрессии IL-33 повышается при заболевании почек. Это означает, что концентрации как redIL-33, так и oxIL-33 могут повышаться в почке при СКД. Учитывая то, что как неожиданно выяснилось, ST-2 подавляется в почке при повреждении, система RAGE-EGFR/IL-33 может способствовать развитию опосредованных IL-33 патологий при заболеваниях почек.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

ПАРА 1 HCDR1 SEQ ID NO 37: SYAMS

ПАРА 1 HCDR2 SEQ ID NO 38: GISAIQSTYYADSVKG

ПАРА 1 HCDR3 SEQ ID NO 39: QKFMQLWGGGLRYPFGY

ПАРА 1 LCDR1 SEQ ID NO 40: SGEGMGDKYAA

ПАРА 1 LCDR2 SEQ ID NO 41: RDTKRPS

ПАРА 1 LCDR3 SEQ ID NO 42: GVIQDNTGV

Сайт расщепления протеазой для N-концевого His10/Avitag/Factor Xa

SEQ ID NO 43: MHHHHHHHHNAAGLNDIFEAQKIEWHEAAIEGR

IL-33-01

SEQ ID NO 44:

SITGISPITEYLASLSTYNDQSITFALEDESYEIYVEDLKKDEKKDKVLLSYYESQHPSN
ESGDGVDGKMLMVTLSPKDFWLHANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVLHNMHSNCV
SFECTDPGVFIGVKDNHLALIKVDSSENLCTENILFKLSET

IL-33-16

SEQ ID NO 45:

SITGISPITEYLASLSTYNDQSITFALEDESYEIYVEDLKKDEKKDKVLLSYYESQHPSN
ESGDGVDGKMLMVTLSPKDFWLHANNKEHSVELHKSEKPLPDQAFFVLHNMHSNSV
SFESKTPGVFIGVKDNHLALIKVDSSENLSTENILFKLSET

Мотив последовательности Avitag

SEQ ID NO 46: GLNDIFEAQKIEWHE

Вектор gRNA, нацеленный на экзон 3 RAGE

SEQ ID NO 47: TGAGGGGATTTTCCGGTGC

Прямой праймер RAGE

SEQ ID NO 48: gttgcagcctccaacttc

Обратный праймер RAGE

SEQ ID NO 49: aatgaggccagtggaagtca

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения в способе лечения повреждения почек у субъекта, где терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, предназначено для введения субъекту для ослабления или подавления опосредованной IL-33 передачи сигнала посредством ST2 и опосредованной IL-33 передачи сигнала посредством RAGE.

2. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 1, где опосредованная IL-33 передача сигнала посредством RAGE представляет собой опосредованную IL-33 передачу сигнала посредством RAGE-EGFR.

3. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 1, где терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, обеспечивает ослабление или подавление активности восстановленного белка IL-33 (redIL-33) и таким образом обеспечивает подавление передачи сигнала посредством ST2.

4. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по любому из пп. 1-3, где терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, обеспечивает ослабление или подавление активности окисленного белка IL-33 (oxIL-33) и таким образом обеспечивает подавление передачи сигнала посредством RAGE.

5. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по любому из пп. 1-4, где повреждение почек включает воспаление.

6. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 5, где повреждение почек представляет собой воспалительное повреждение почек.

7. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 5 или п. 6, где повреждение почек выбрано из диабетической болезни почек, фиброза, гломерулонефрита (например, непролиферативного (такого как гломерулонефрит с минимальными изменениями, мембранный гломерулонефрит, фокально-сегментарный гломерулосклероз) или пролиферативного (такого как IgA-нефропатия, мембранопротролиферативный гломерулонефрит, постинфекционный гломерулонефрит и быстро прогрессирующий гломерулонефрит [такой как синдром Гудпасчера и нарушения, относящиеся к васкулитам {в том числе гранулематоз Вегенера и микроскопический полиангиит}]), системной красной волчанки, альбуминурии, односторонней обструкции мочеточника, синдрома Альпорта, поликистозной болезни почек (PKD), гипертонического гломерулосклероза, хронического гломерулосклероза, хронической обструктивной уропатии, хронического тубулоинтерстициального нефрита и ишемической нефропатии.

8. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по любому из пп. 1-7, где повреждение почек представляет собой диабетическую болезнь почек.

9. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по любому из пп. 1-8, где терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, выбрано из химического ингибитора и антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

10. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 9, где терапевтическое средство содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

11. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 9 или п. 10, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с IL-33.

12. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 11, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат определяющие комплементарность области (CDR) из пары варибельного домена тяжелой цепи (VH) и варибельного домена легкой цепи (VL), выбранной из таблицы 1.

13. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 11 или п. 12, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с redIL-33 и обеспечивают ослабление или подавление активности redIL-33 с обеспечением таким образом подавления передачи сигнала посредством ST2.

14. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по любому из пп. 11-13, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обеспечивают предотвращение связывания окисленного IL-33 с RAGE с обеспечением таким образом подавления передачи сигнала посредством RAGE-EGFR.

15. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по любому из пп. 11-14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с redIL-33 с аффинностью связывания, составляющей 100 пМ или меньше или составляющей 10 пМ или меньше, например составляющей 1 пМ или меньше, такой как 0,5 пМ, в частности 0,05 пМ (например, при измерении с применением KinExA).

16. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по любому из пп. 11-15, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с redIL-33 с $k(\text{on})$, превышающей или равной $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, или $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, или $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, в частности превышающей или равной $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

17. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по любому из пп. 11-16, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с

redIL-33 с k(off), составляющей меньше или равной $5 \times 10^{-1} \text{ c}^{-1}$, 10^{-1} c^{-1} , $5 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$, 10^{-2} c^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-3} c^{-1} , в частности составляющей меньше или равной 10^{-3} c^{-1} .

18. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по любому из пп. 11-17, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент обеспечивают ослабление или подавление активности oxIL-33 и таким образом обеспечивают подавление передачи сигнала посредством RAGE.

19. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по любому из пп. 10-18, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат VHCDR1, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 37, VHCDR2, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 38, VHCDR3, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 39, VLCDR1, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 40, VLCDR2, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 41, и VLCDR3, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 42.

20. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по любому из пп. 10-19, где антитело или антигенсвязывающие VH и VL указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотные последовательности, на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичные SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 19 соответственно.

21. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 20, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, имеющий последовательность под SEQ ID NO: 1, и VL, имеющий последовательность под SEQ ID NO: 19.

22. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по любому из пп. 10-21, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело человека, химерное антитело и гуманизированное антитело.

23. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по любому из пп. 10-22, где антитело или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой встречающееся в природе антитело, scFv-фрагмент, Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, минитело, диатело, триатело, тетратело или одноцепочечное антитело.

24. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по любому из пп. 10-23, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой моноклональное антитело.

25. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по любому из пп. 2-24, где подавление или ослабление передачи сигнала посредством RAGE-EGFR обеспечивает снижение или подавление опосредованных RAGE-EGFR эффектов.

26. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 25, где опосредованный RAGE-EGFR эффект предусматривает аномальную физиологию эпителия, например аномальное ремоделирование эпителия.

27. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 25, где опосредованный RAGE-EGFR эффект предусматривает аномальную мезангиальную экспансию.

28. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 27, где аномальная мезангиальная экспансия предусматривает аномальную пролиферацию мезангиальных клеток.

29. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по любому из пп. 1-28, где подавление или ослабление передачи сигнала посредством ST2 обеспечивает снижение или подавление опосредованных ST2 эффектов.

30. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 29, где опосредованный ST2 эффект представляет собой аномальное воспаление в почке.

31. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 30, где аномальное воспаление находится в эндотелии.

32. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 31, где аномальное воспаление предусматривает повышенную секрецию или экспрессию IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α и/или IL1b, необязательно повышенную секрецию или экспрессию IL-4, IL-6, IL-8 и/или IL-12.

33. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 31 или п. 32, где аномальное воспаление предусматривает активацию MAP-киназы.

34. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 33, где активация MAP-киназы предусматривает активацию киназы p38 или JNK.

35. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 30, где аномальное воспаление находится в клубочках.

36. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 35, где аномальное воспаление предусматривает повышенную секрецию или экспрессию IL-8.

37. Способ лечения повреждения почек у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтического средства, специфического в отношении IL-33, для ослабления или подавления опосредованной IL-33 передачи сигнала посредством ST2 и опосредованной IL-33 передачи сигнала посредством RAGE.

38. Способ по п. 37, где опосредованная IL-33 передача сигнала посредством RAGE представляет собой опосредованную IL-33 передачу сигнала посредством RAGE-EGFR.

39. Способ по п. 37 или п. 38, где терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, обеспечивает ослабление или подавление активности восстановленного белка IL-33 (redIL-33) и таким образом обеспечивает подавление передачи сигнала посредством ST2.

40. Способ по пп. 37-39, где терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, обеспечивает ослабление или подавление активности окисленного белка IL-33 (oxIL-33) и таким образом обеспечивает подавление передачи сигнала посредством RAGE.

41. Способ по любому из пп. 37-40, где повреждение почек включает воспаление.

42. Способ по п. 41, где повреждение почек представляет собой воспалительное повреждение почек.

43. Способ по п. 41 или п. 42, где повреждение почек выбрано из диабетической болезни почек, фиброза, гломерулонефрита (например, непролиферативного (такого как гломерулонефрит с минимальными изменениями, мембранный гломерулонефрит, фокально-сегментарный гломерулосклероз) или пролиферативного (такого как IgA-нефропатия, мембранопротролиферативный гломерулонефрит, постинфекционный гломерулонефрит и быстро прогрессирующий гломерулонефрит [такой как синдром Гудпасчера и нарушения, относящиеся к васкулитам {в том числе гранулематоз Вегенера и микроскопический полиангиит}]), системной красной волчанки, альбуминурии, односторонней обструкции мочеточника, синдрома Альпорта, поликистозной болезни почек (PCKD), гипертонического гломерулосклероза, хронического гломерулосклероза, хронической обструктивной уропатии, хронического тубулоинтерстициального нефрита и ишемической нефропатии.

44. Способ по любому из пп. 37-43, где повреждение почек представляет собой диабетическую болезнь почек.

45. Способ по любому из пп. 37-44, где терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, выбрано из химического ингибитора и антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

46. Способ по п. 45, где терапевтическое средство содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

47. Способ по п. 45 или п. 46, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с IL-33.

48. Способ по п. 47, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат определяющие комплементарность области (CDR) из пары переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL), выбранной из таблицы 1.

49. Способ по п. 47 или п. 48, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с redIL-33 и обеспечивают ослабление или подавление активности redIL-33 с обеспечением таким образом подавления передачи сигнала посредством ST2.

50. Способ по любому из пп. 47-49, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обеспечивают предотвращение связывания окисленного IL-33 с RAGE с обеспечением таким образом подавления передачи сигнала посредством RAGE-EGFR.

51. Способ по любому из пп. 47-50, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с redIL-33 с аффинностью связывания, составляющей 100 пМ или меньше или составляющей 10 пМ или меньше, например составляющей 1 пМ или меньше, такой как 0,5 пМ, в частности 0,05 пМ (например, при измерении с применением KinExA).

52. Способ по любому из пп. 47-51, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с redIL-33 с $k(\text{on})$, превышающей или равной $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, или $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, или $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, в частности превышающей или равной $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

53. Способ по любому из пп. 47-52, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с redIL-33 с $k(\text{off})$, составляющей меньше или равной $5 \times 10^{-1} \text{ c}^{-1}$, 10^{-1} c^{-1} , $5 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$, 10^{-2} c^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ или 10^{-3} c^{-1} , в частности составляющей меньше или равной 10^{-3} c^{-1} .

54. Способ по любому из пп. 47-53, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент обеспечивают ослабление или подавление активности oxIL-33 и таким образом обеспечивают подавление передачи сигнала посредством RAGE.

55. Способ по любому из пп. 47-54, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат VHCDR1, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 37, VHCDR2, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 38, VHCDR3, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 39, VLCDR1, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 40, VLCDR2, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 41, и VLCDR3, имеющую последовательность под SEQ ID NO: 42.

56. Способ по любому из пп. 47-55, где антитело или антигенсвязывающие VH и VL указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотные последовательности, на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичные SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 19 соответственно.

57. Способ по п. 56, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат VH, имеющий последовательность под SEQ ID NO: 1, и VL, имеющий последовательность под SEQ ID NO: 19.

58. Способ по любому из пп. 47-57, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело человека, химерное антитело и гуманизированное антитело.

59. Способ по любому из пп. 47-57, где антитело или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой встречающееся в природе антитело, scFv-фрагмент, Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, минитело, диатело, триатело, тетратело или одноцепочечное антитело.

60. Способ по любому из пп. 47-59, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой моноклональное антитело.

61. Способ по пп. 48-60, где подавление или ослабление передачи сигнала посредством RAGE-EGFR обеспечивает снижение или подавление опосредованных RAGE-EGFR эффектов.

62. Способ по п. 61, где опосредованный RAGE-EGFR эффект предусматривает аномальную физиологию эпителия, например аномальное ремоделирование эпителия.

63. Способ по п. 61, где опосредованный RAGE-EGFR эффект предусматривает аномальную мезангиальную экспансию.

64. Способ по п. 63, где аномальная мезангиальная экспансия предусматривает аномальную пролиферацию мезангиальных клеток.

65. Способ по любому из пп. 47-64, где подавление или ослабление передачи сигнала посредством ST2 обеспечивает снижение или подавление опосредованных ST2 эффектов.

66. Способ по п. 65, где опосредованный ST2 эффект представляет собой аномальное воспаление в почке.

67. Способ по п. 66, где аномальное воспаление находится в эндотелии.

68. Способ по п. 67, где аномальное воспаление предусматривает повышенную секрецию или экспрессию IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α и/или IL1b, необязательно повышенную секрецию или экспрессию IL-4, IL-6, IL-8 и/или IL-12.

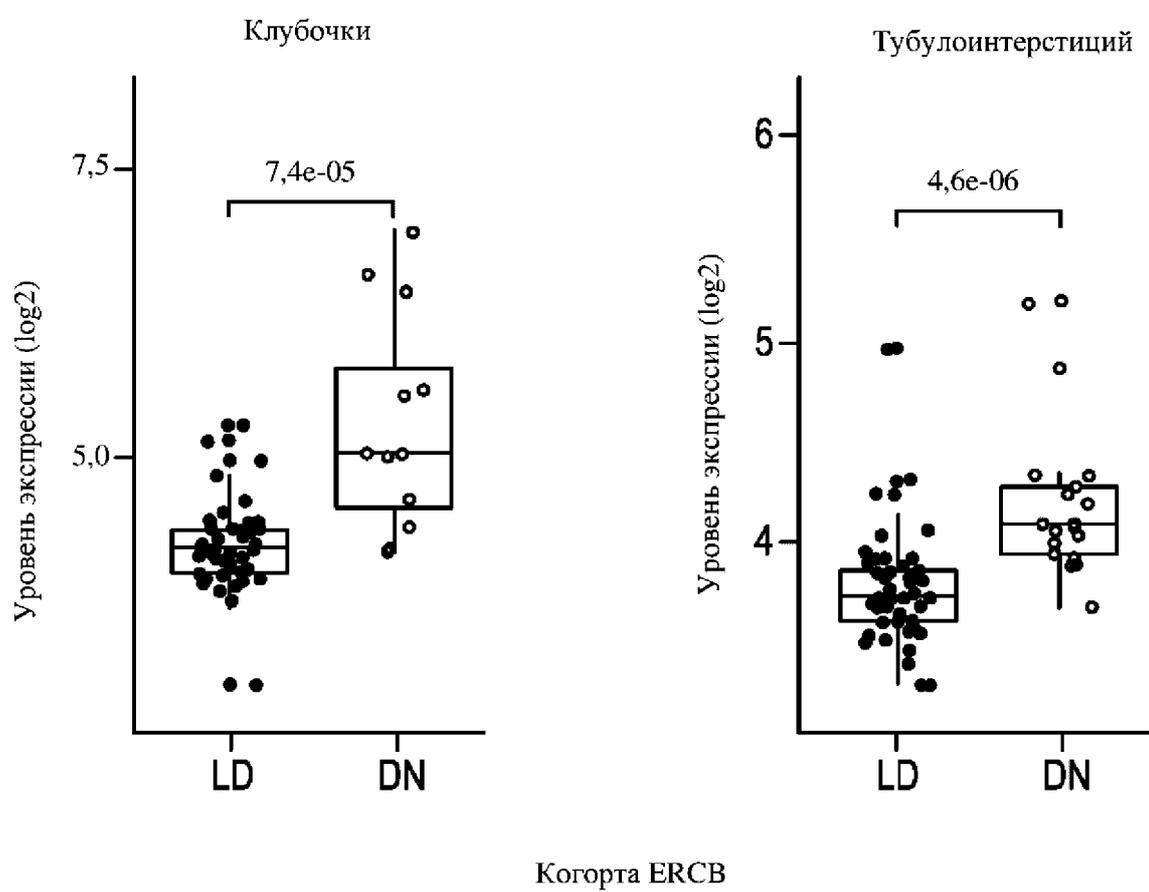
69. Способ по п. 67, где аномальное воспаление предусматривает активацию MAP-киназы.

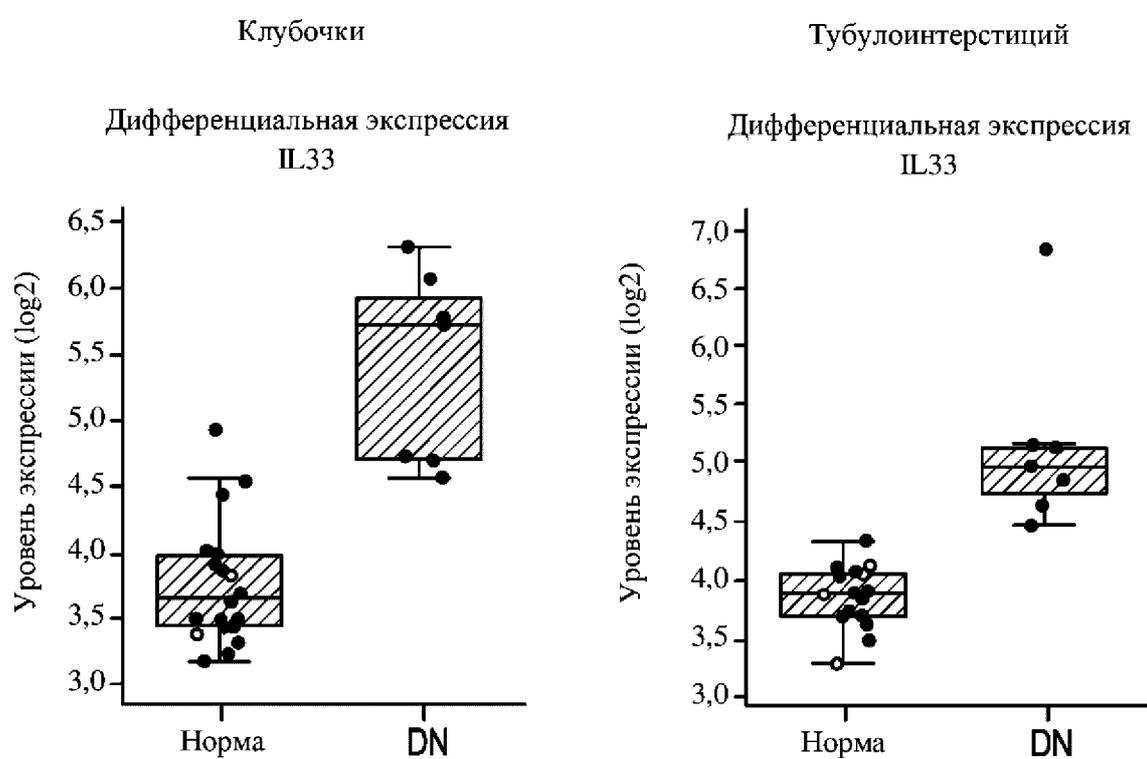
70. Способ по п. 69, где активация MAP-киназы предусматривает активацию киназы p38 или JNK.

71. Способ по п. 66, где аномальное воспаление находится в клубочках.

72. Терапевтическое средство, специфическое в отношении IL-33, для применения по п. 71, где аномальное воспаление предусматривает повышенную секрецию или экспрессию IL-8.

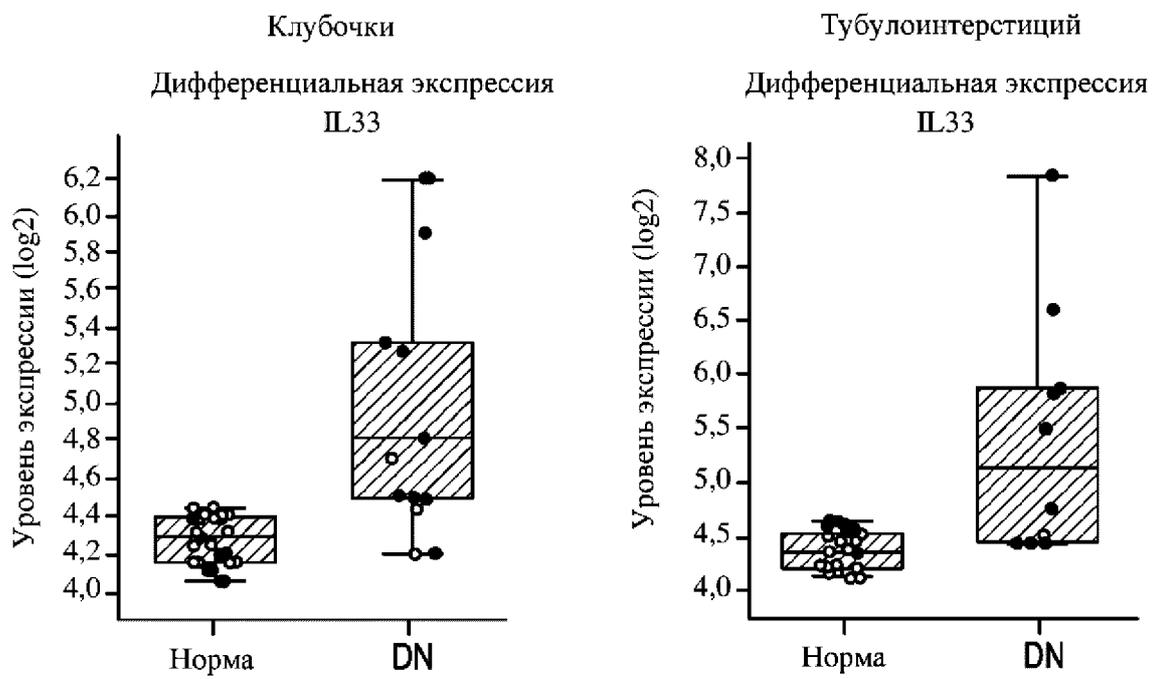
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В

Когорта Ju, 2013

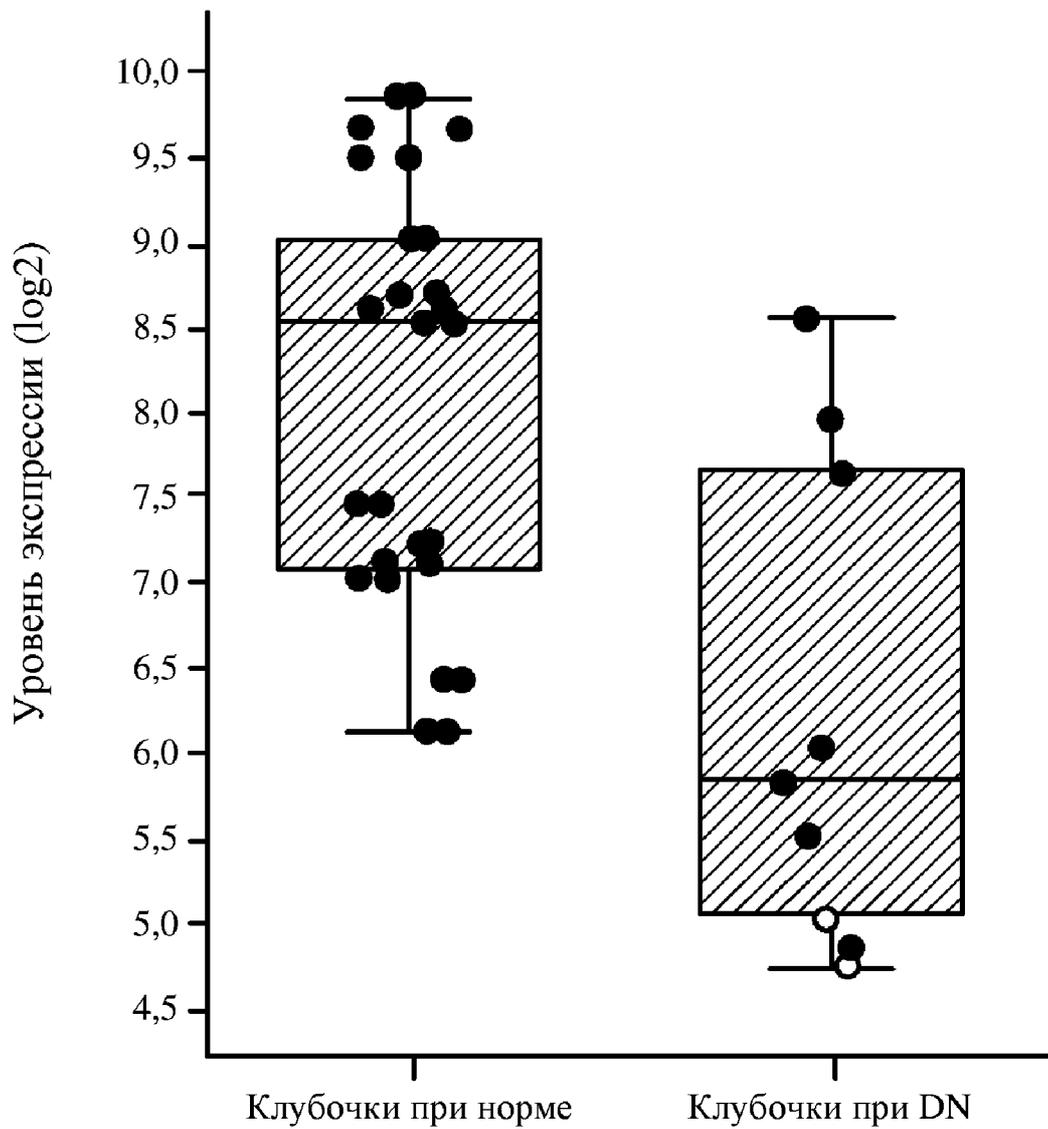
ФИГ. 1С



Когорта Woroniecka, 2011

ФИГ. 2А

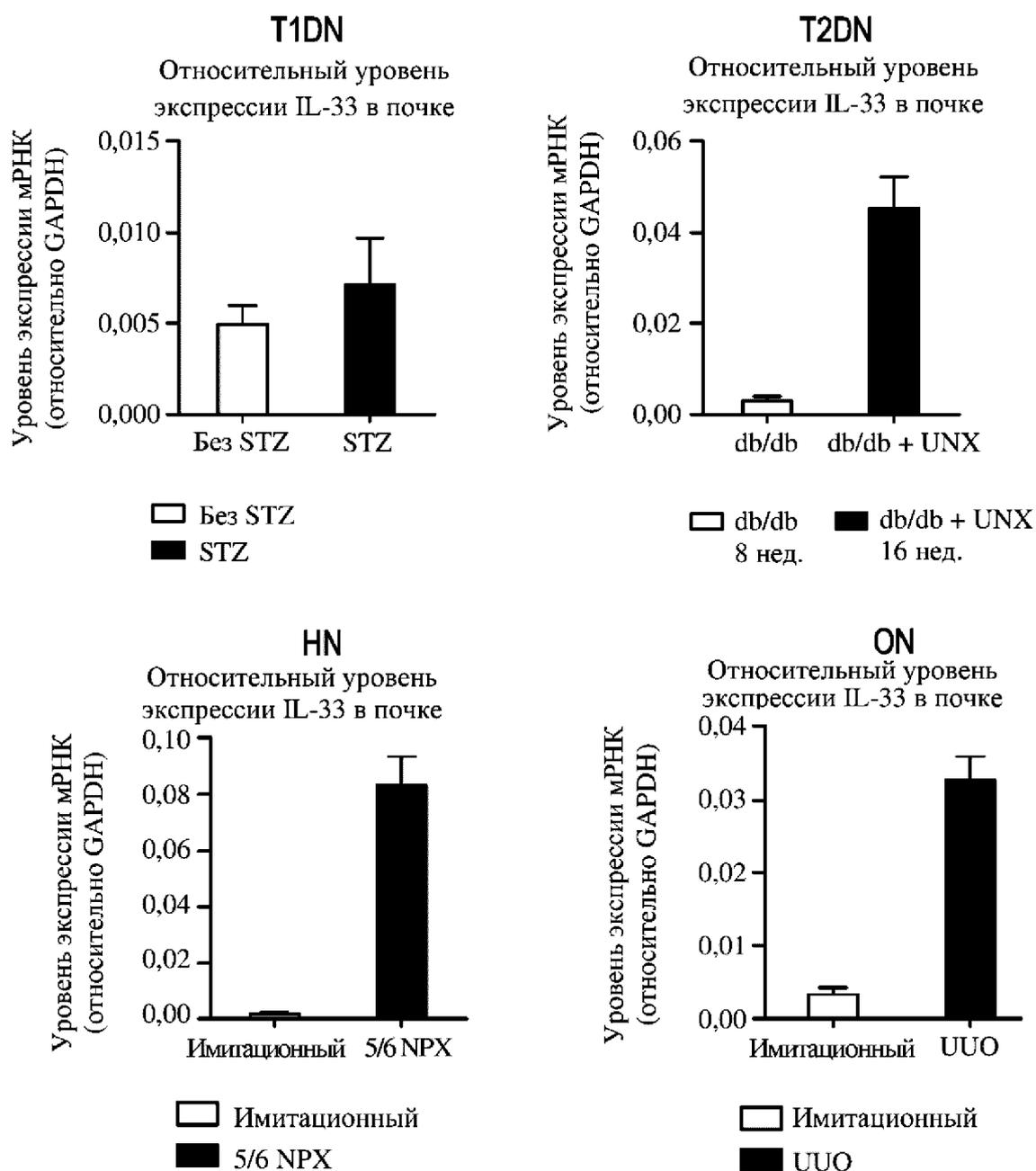
Дифференциальная экспрессия IL1RL1
207526_s_at (исследование: GSE30122)



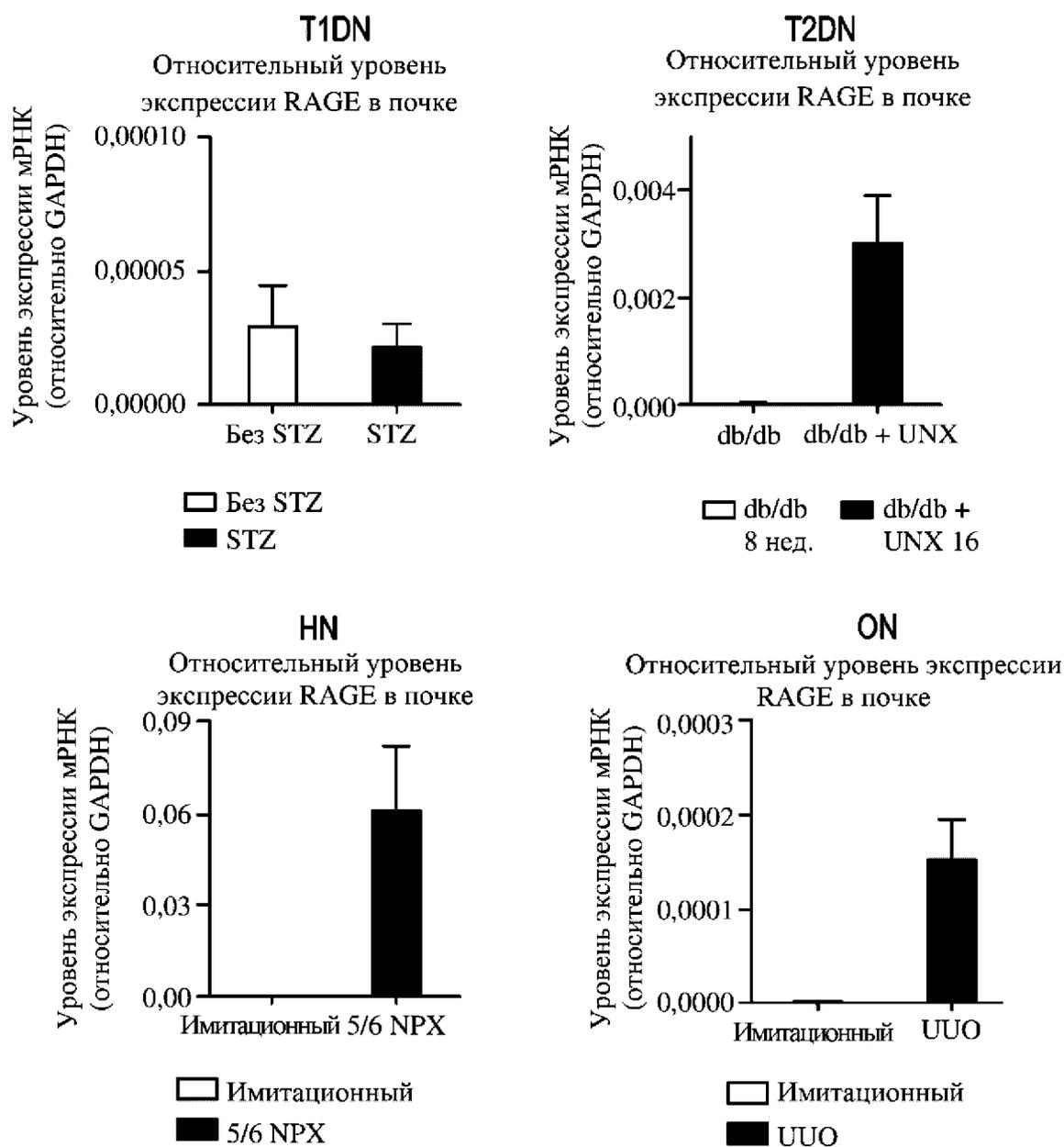
ФИГ. 2В



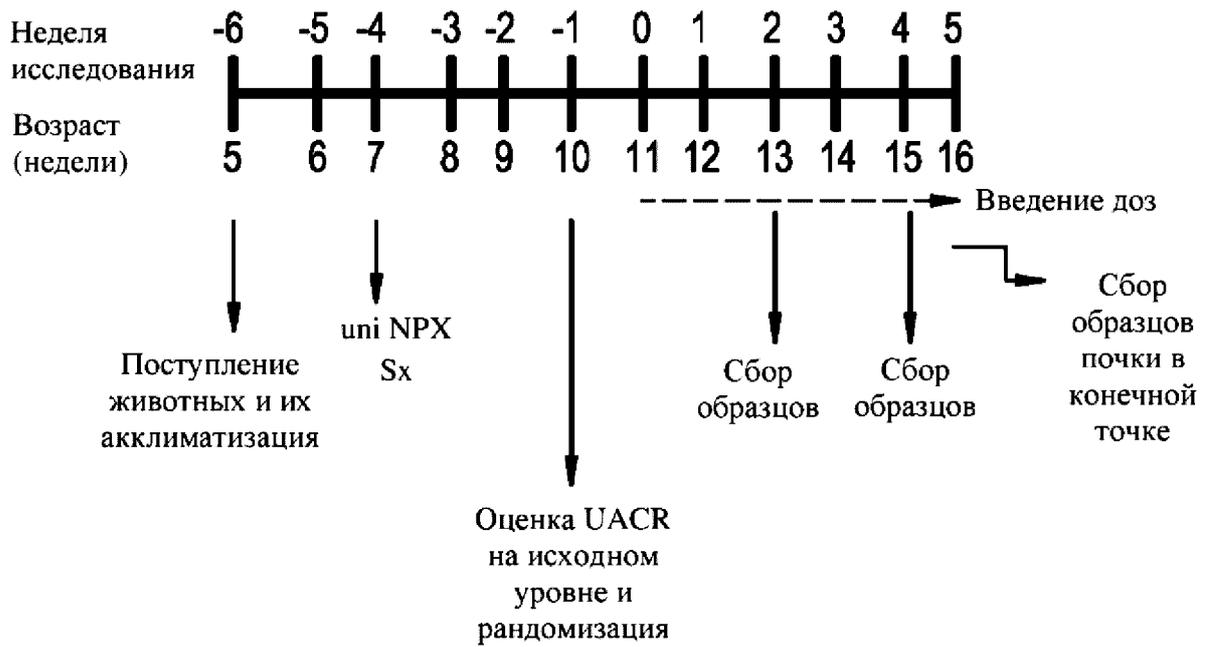
ФИГ. 3



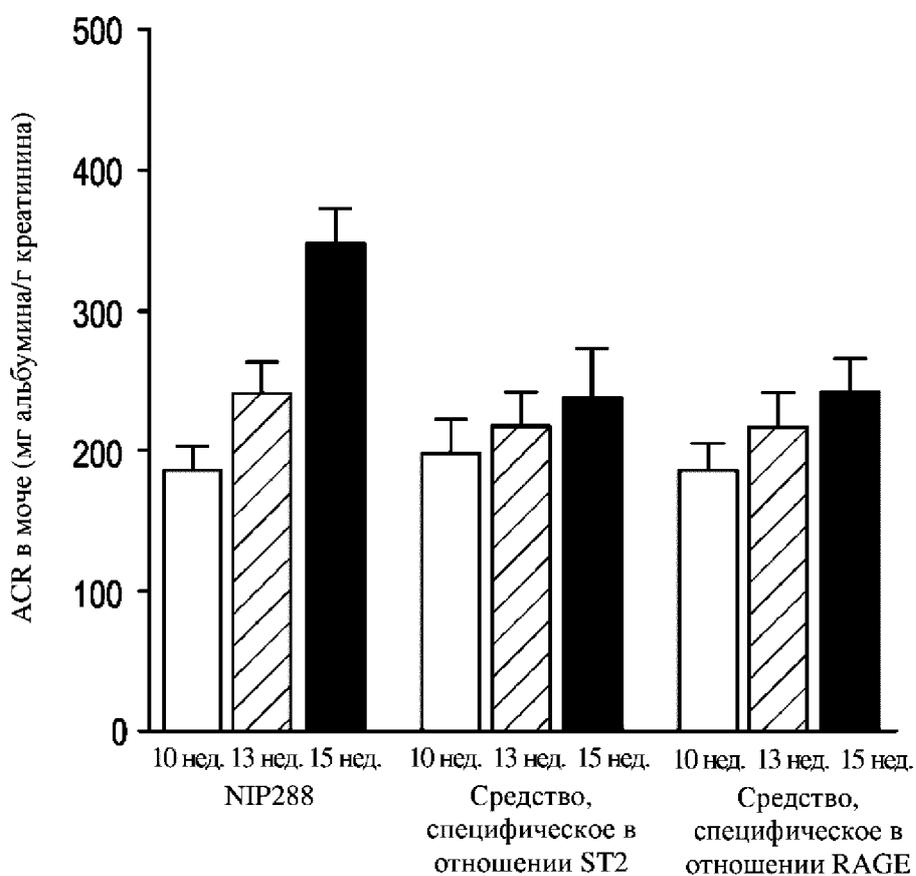
ФИГ. 4



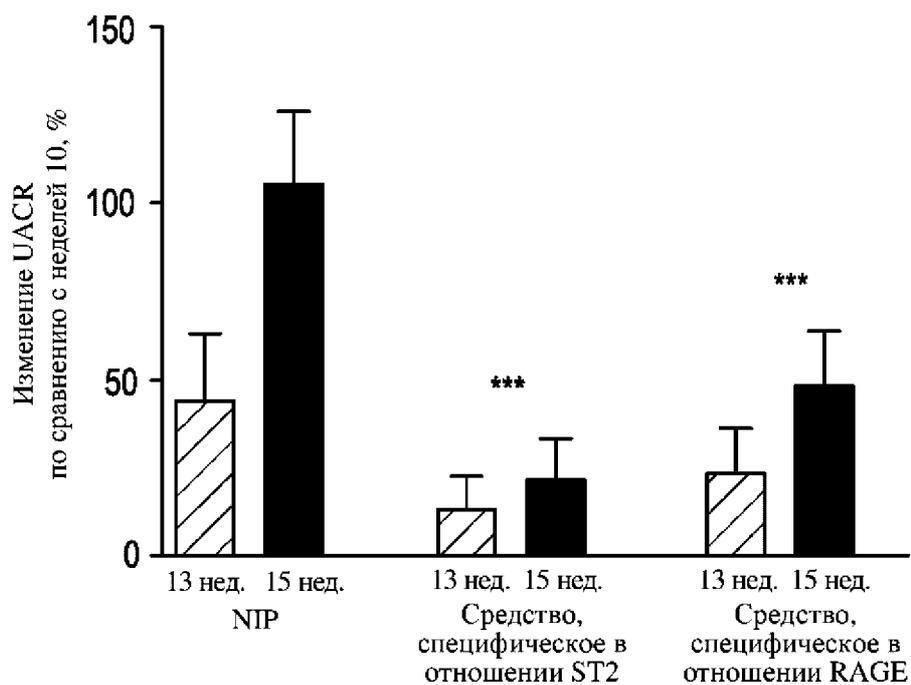
ФИГ. 5



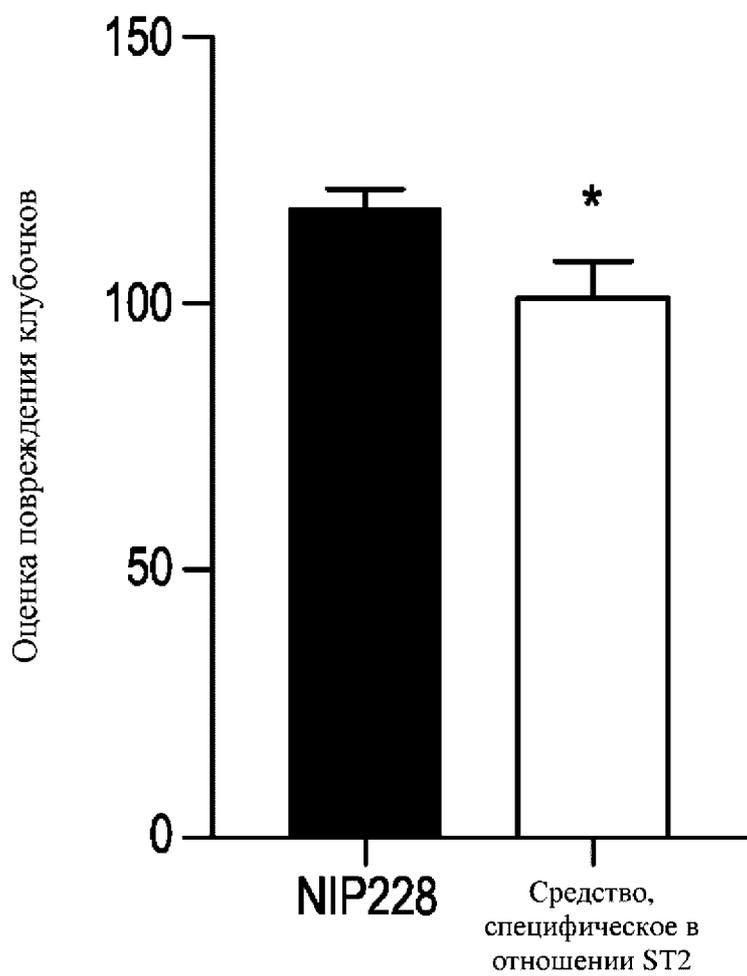
ФИГ. 6



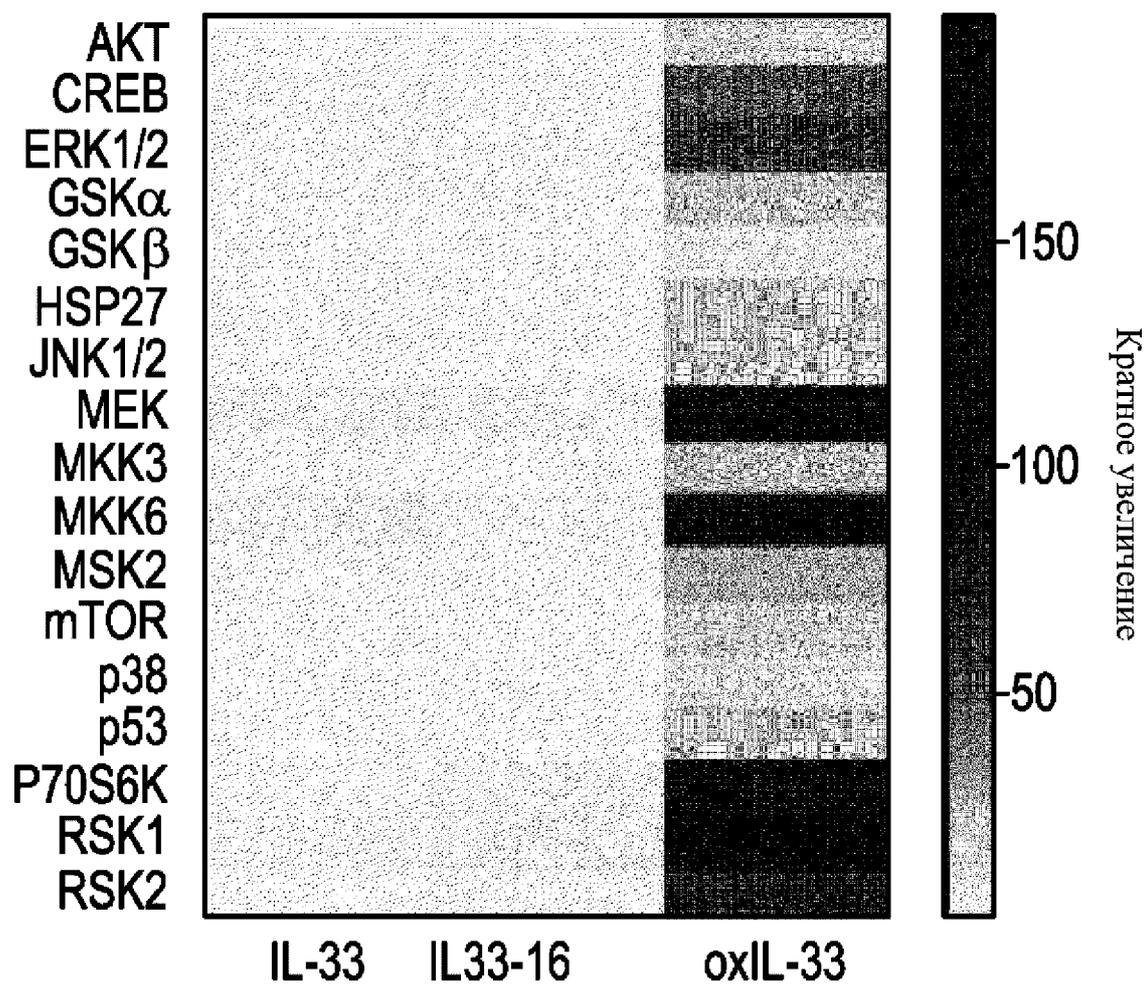
ФИГ. 7



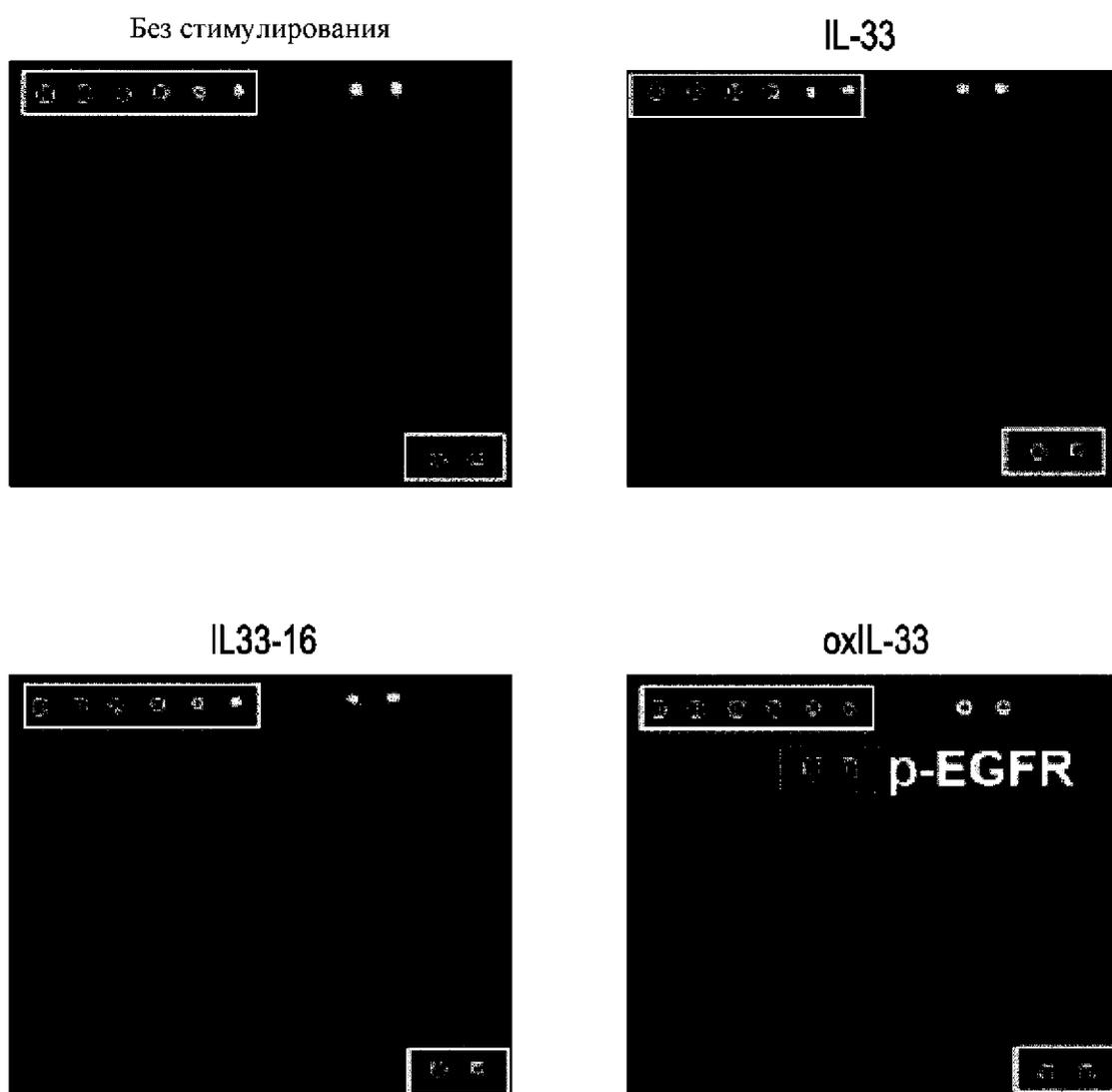
ФИГ. 8



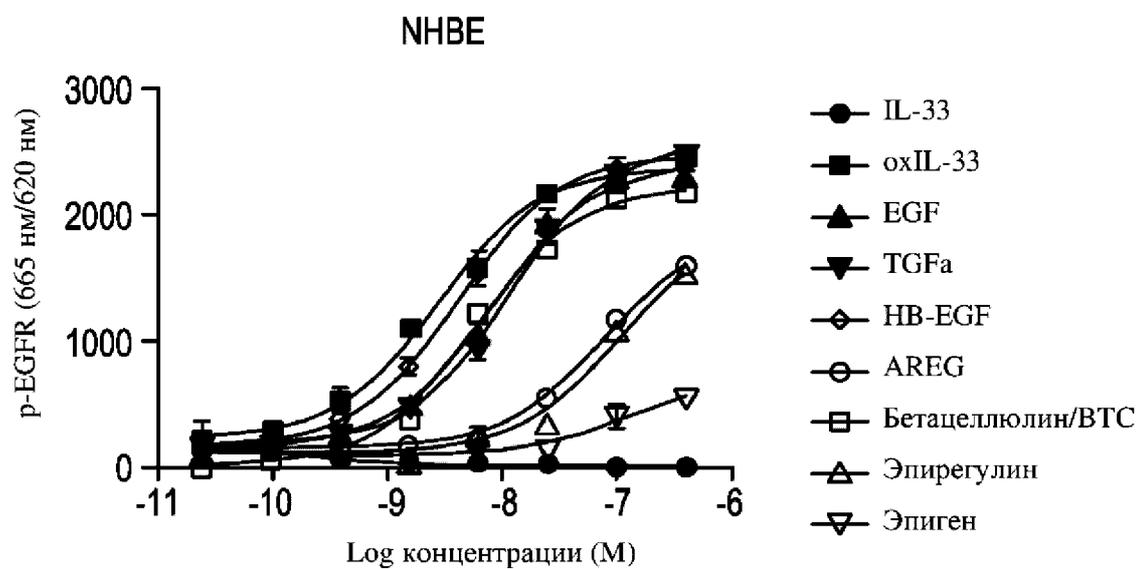
ФИГ. 9



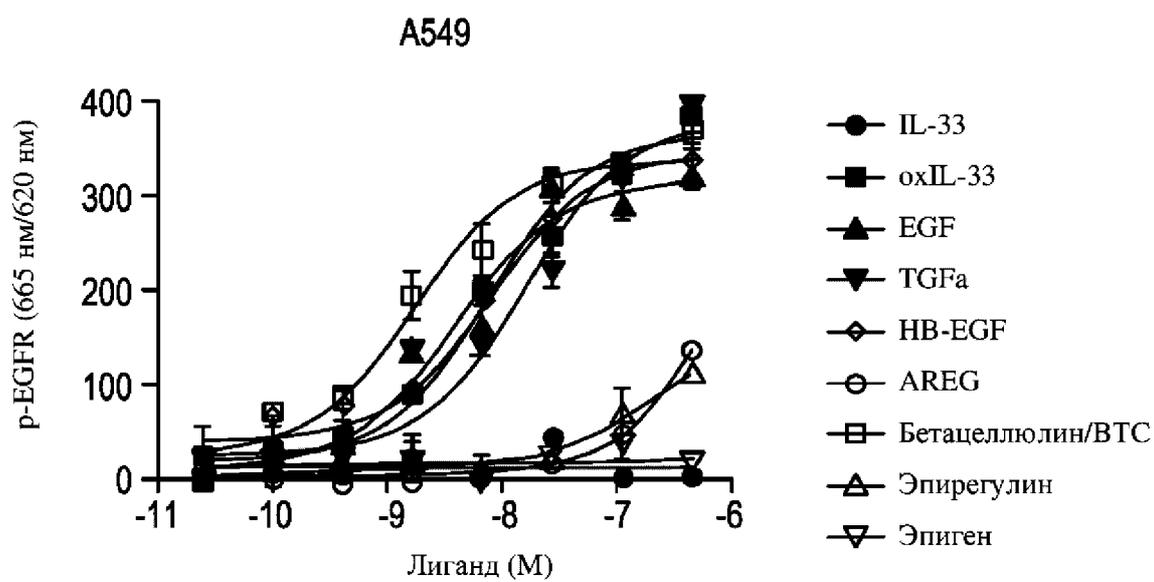
ФИГ. 10



ФИГ. 11А

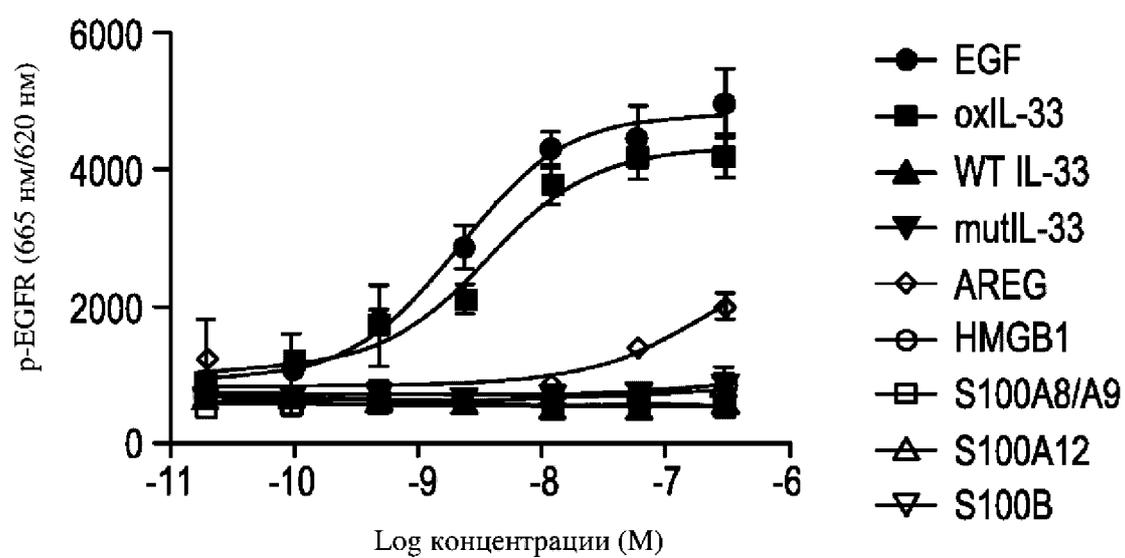


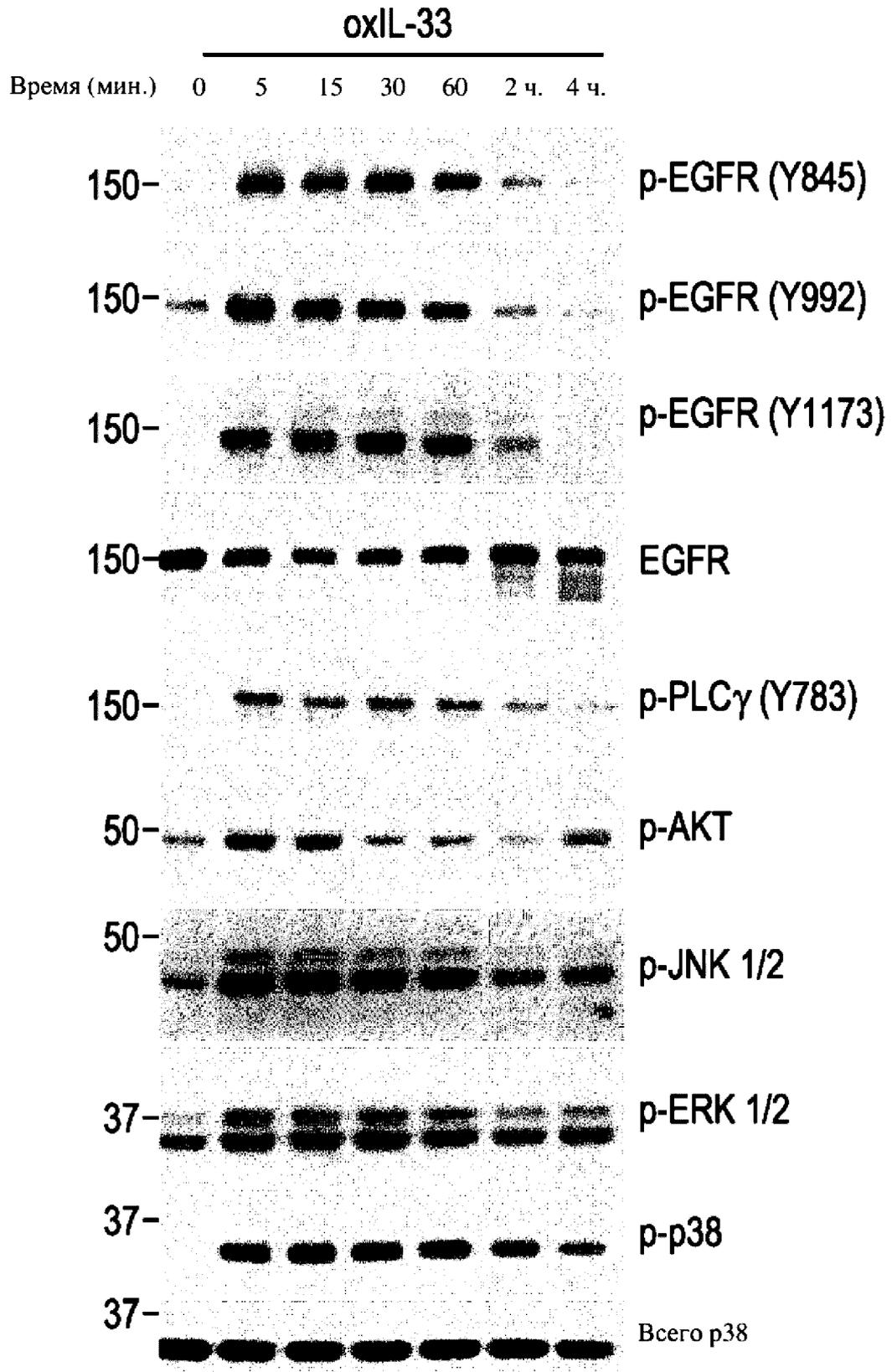
ФИГ. 11В



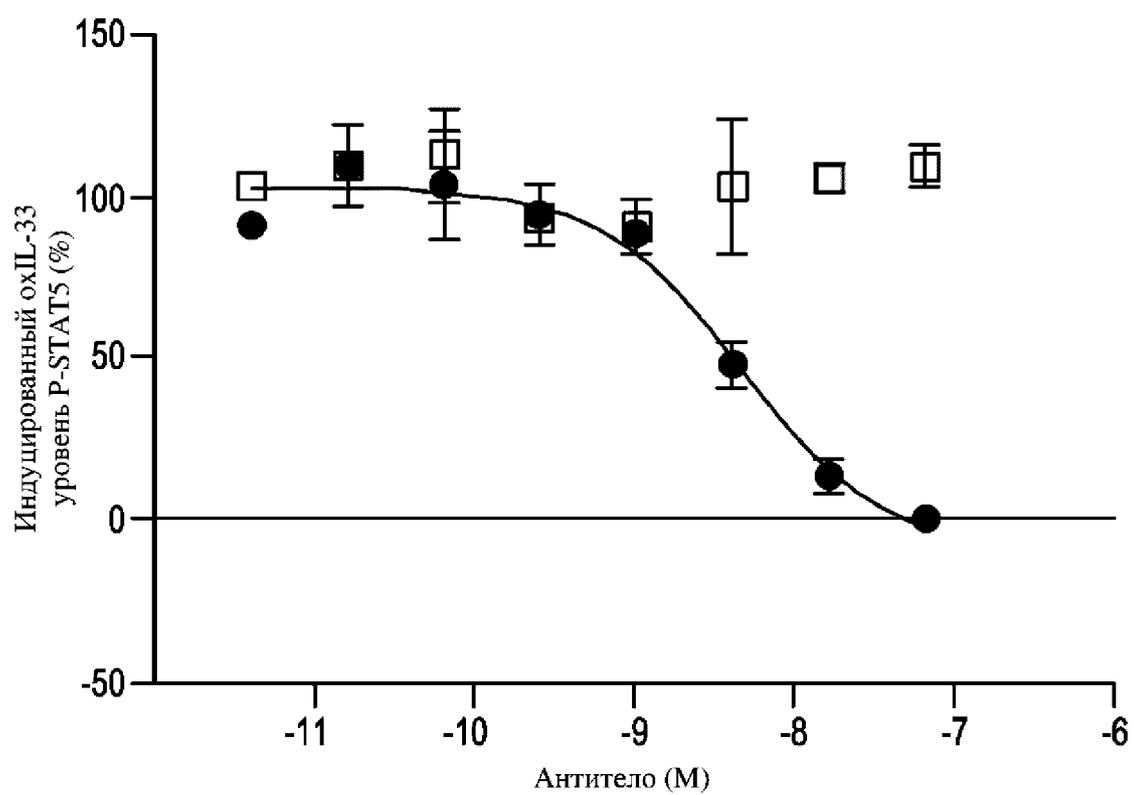
ФИГ. 11С

A549

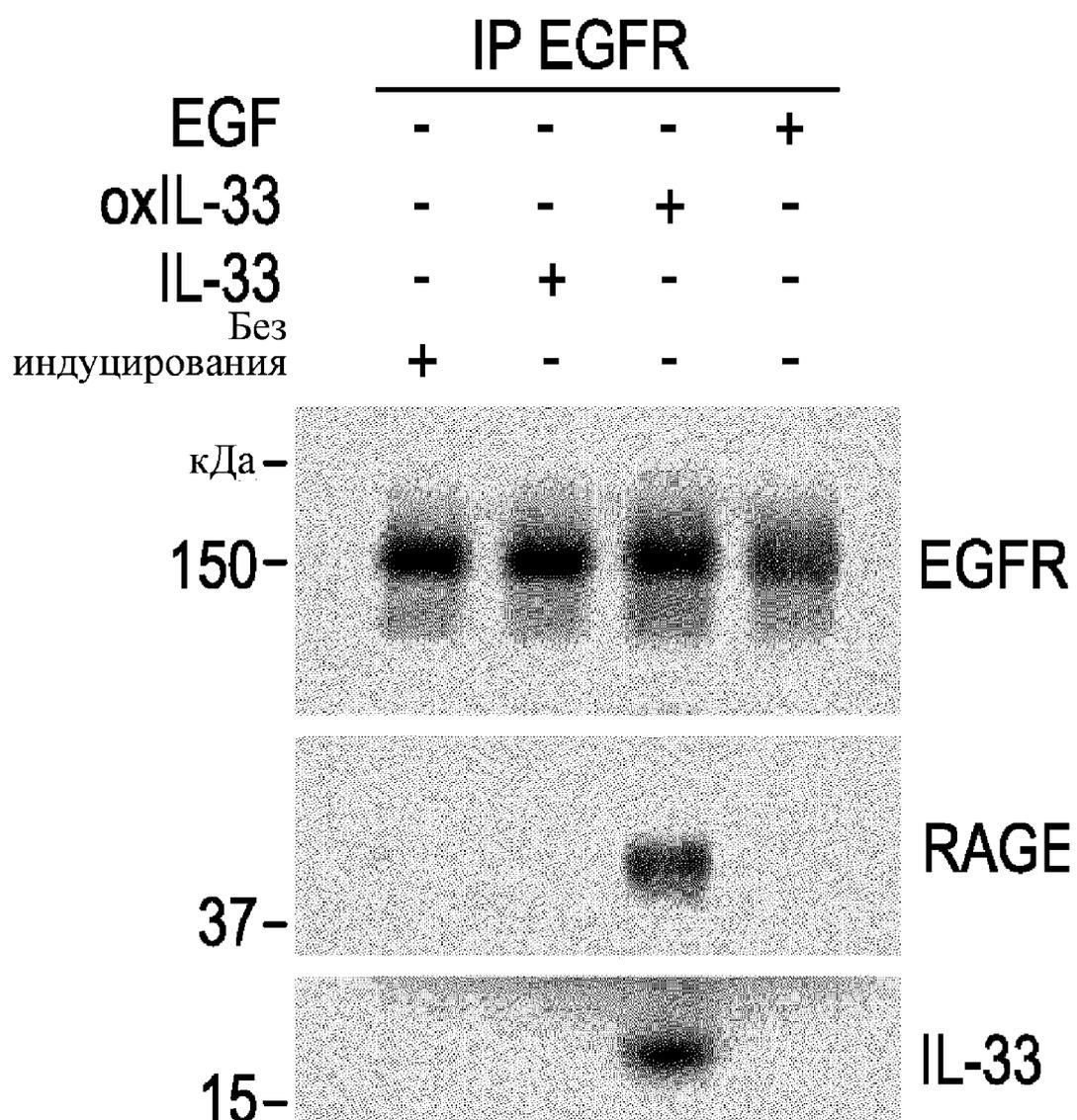




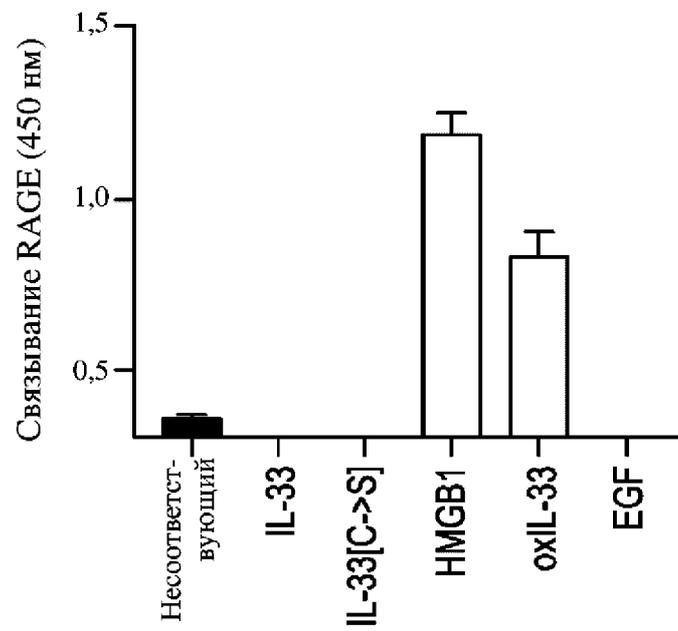
ФИГ. 13



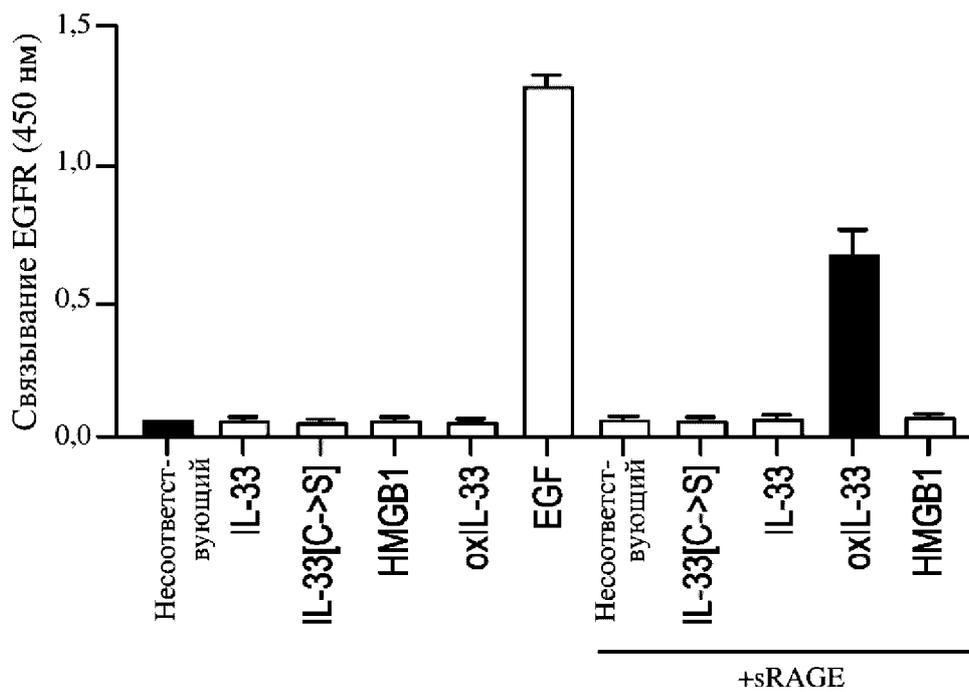
- Средство, специфическое в отношении EGFR
- Изотипическое

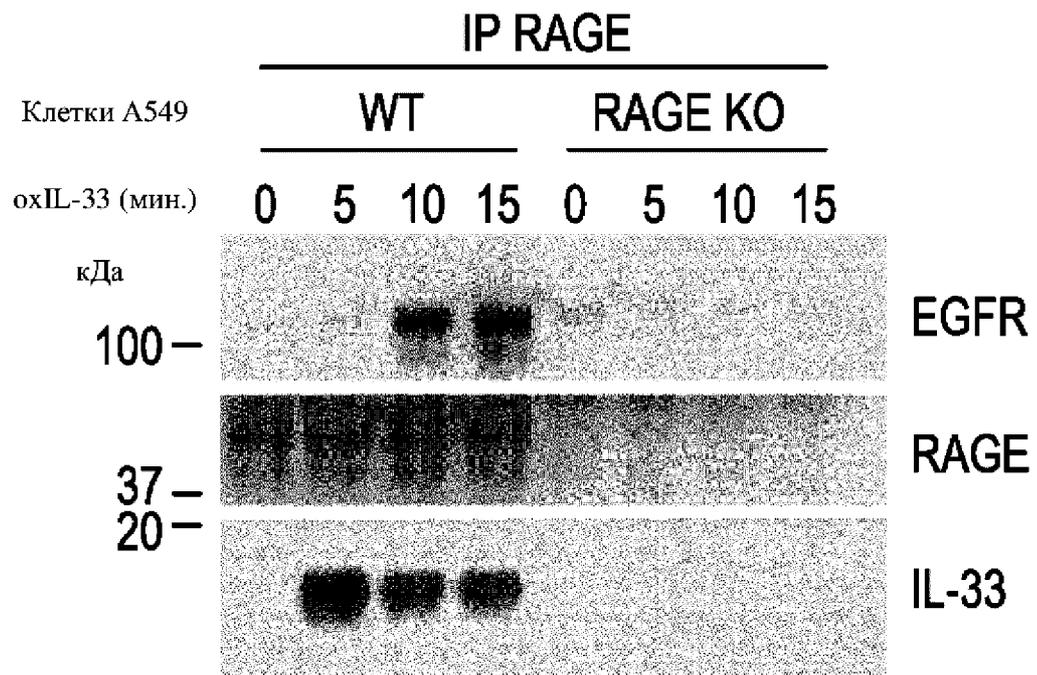
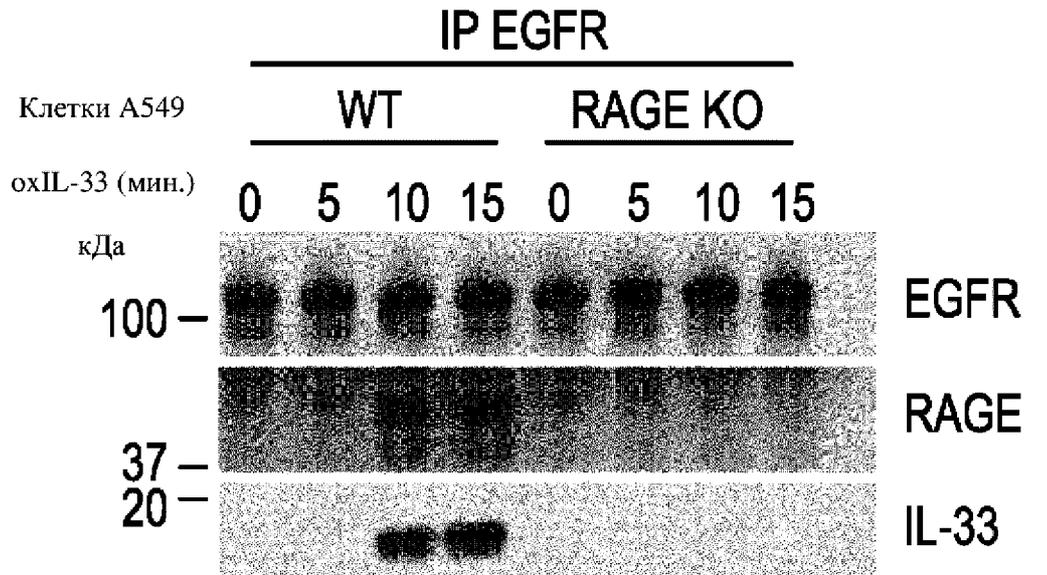
ФИГ. 14

ФИГ. 15А

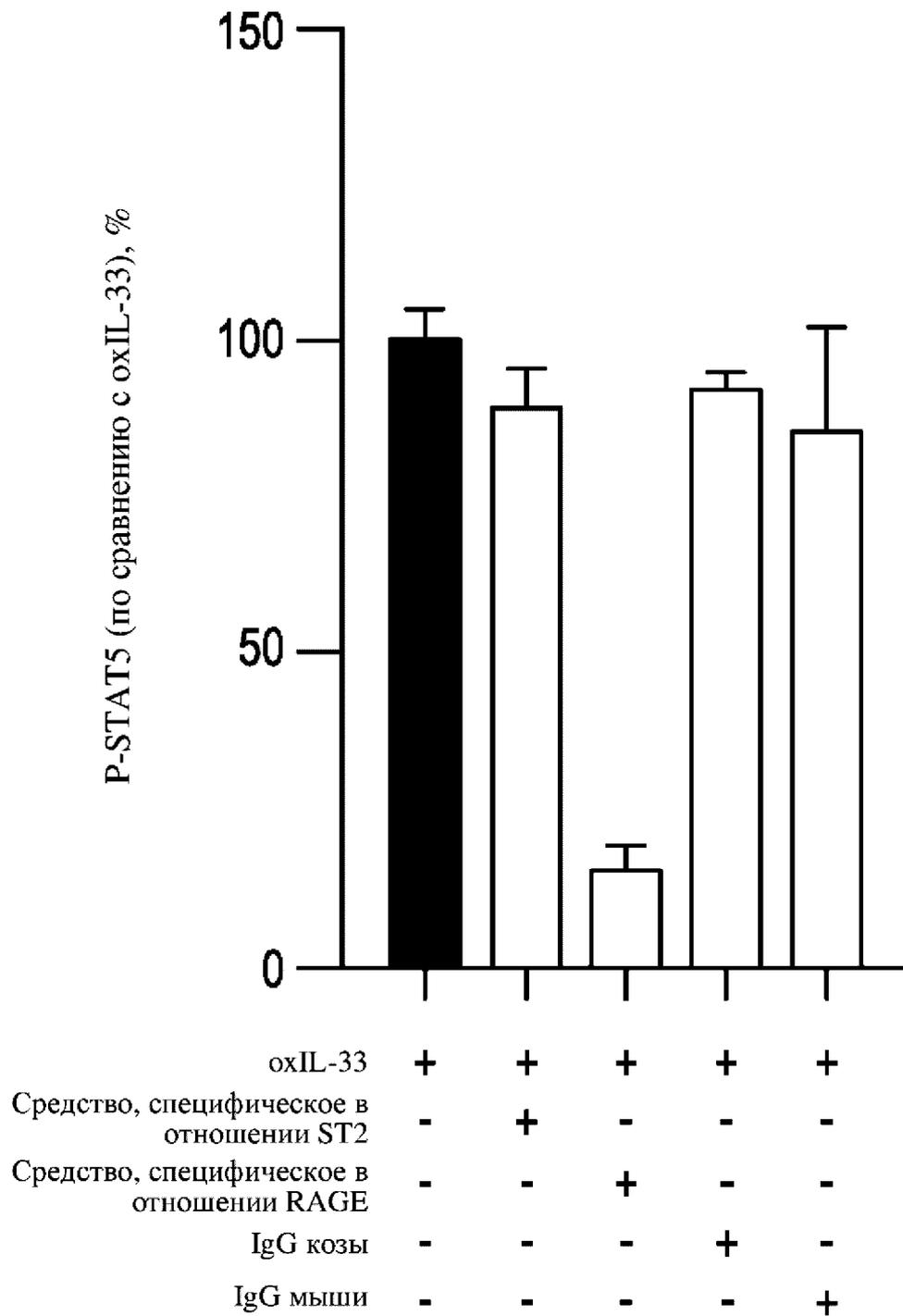


ФИГ. 15В

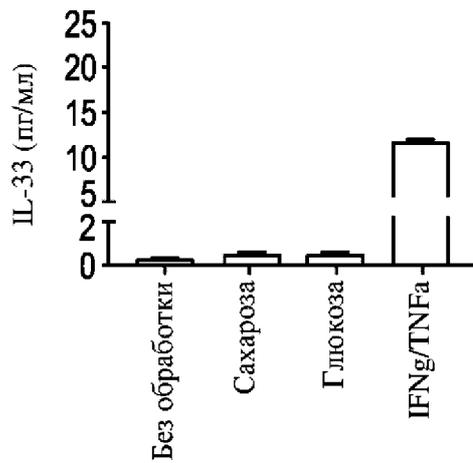


ФИГ. 16

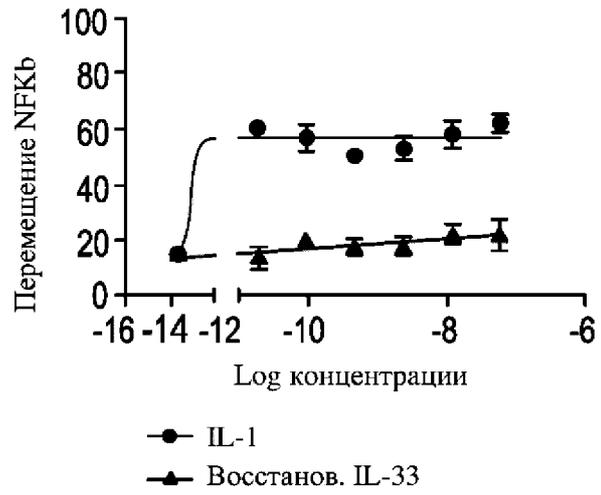
ФИГ. 17



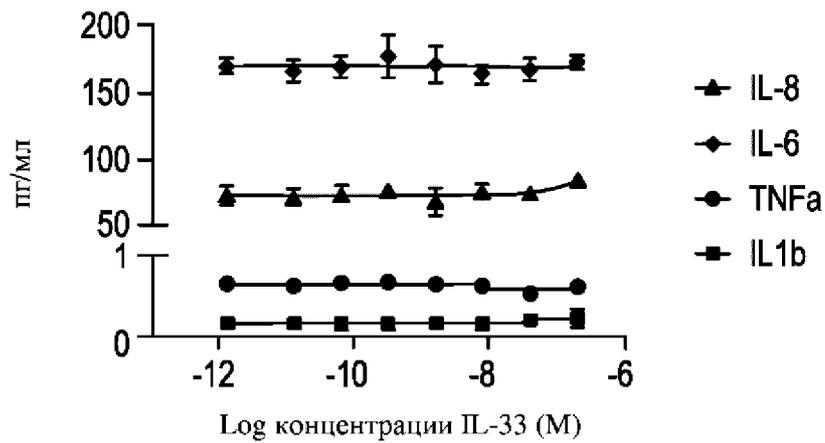
ФИГ. 18А

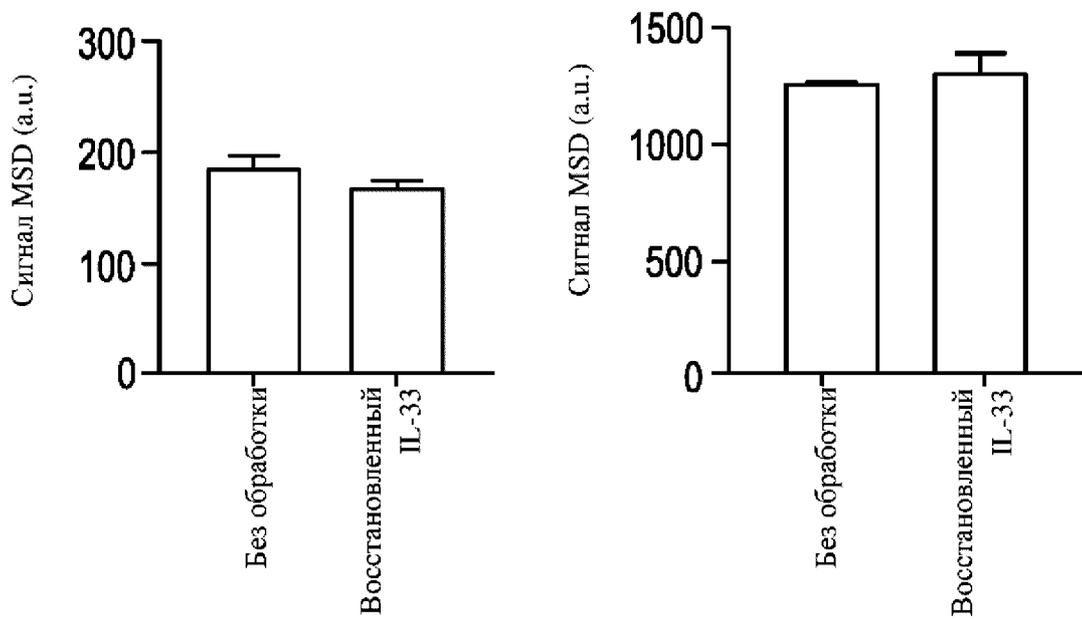


ФИГ. 18В

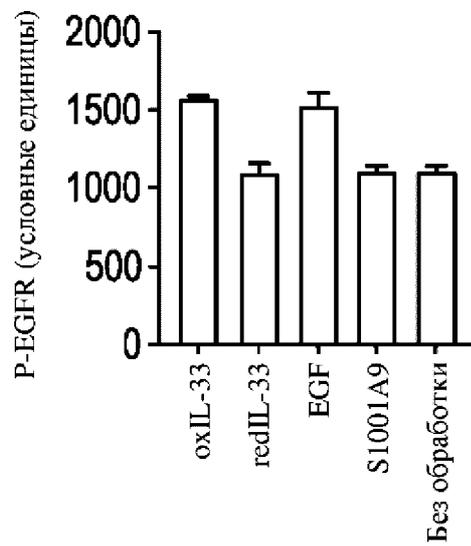


ФИГ. 18С

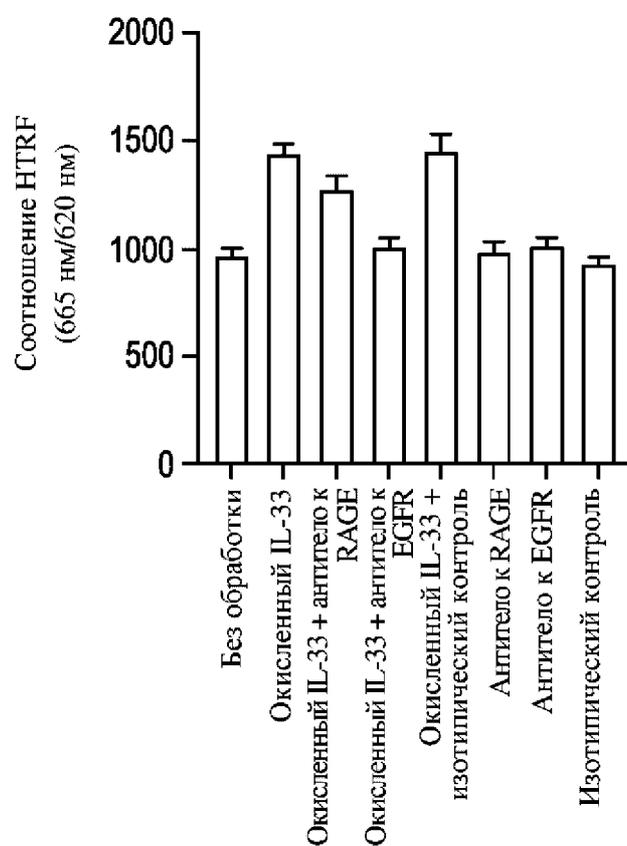


ФИГ. 18D**ФИГ. 18E**

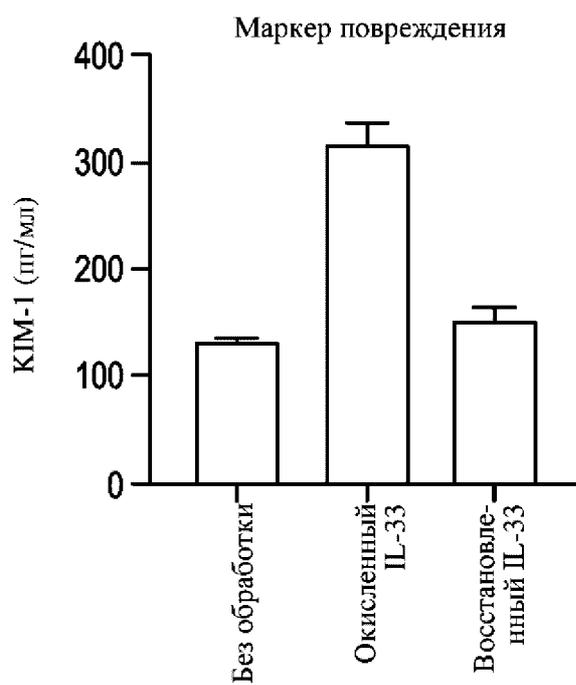
Ответ EGFR на окисленный IL-33
(независимо от ST2)



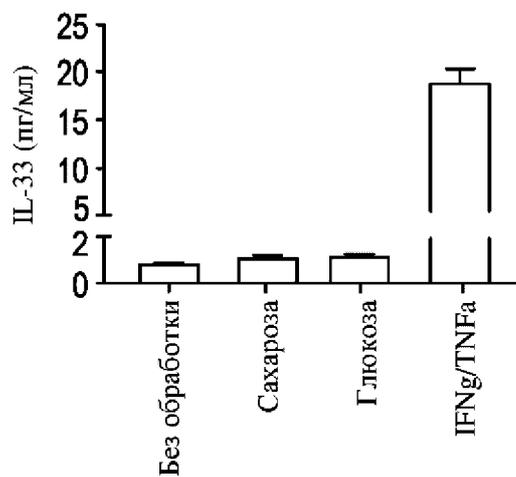
ФИГ. 18F



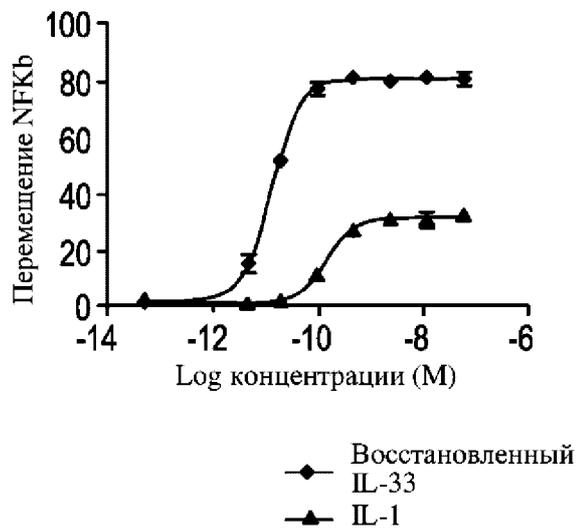
ФИГ. 18G



ФИГ. 19А

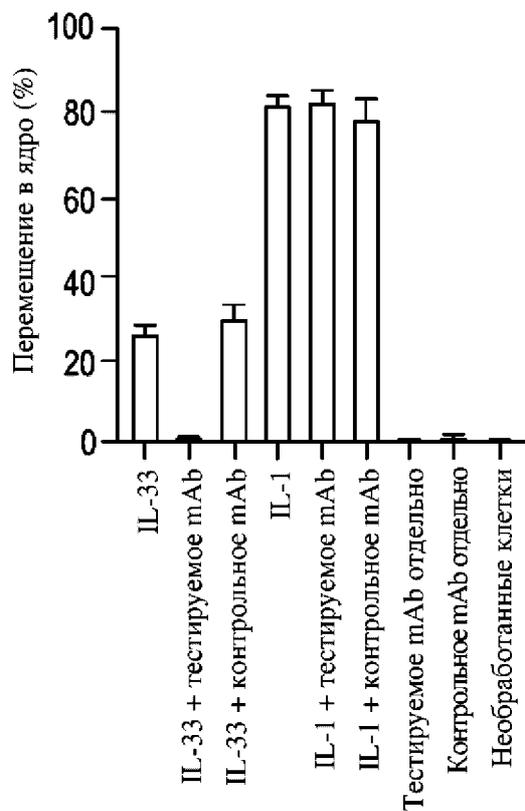


ФИГ. 19В

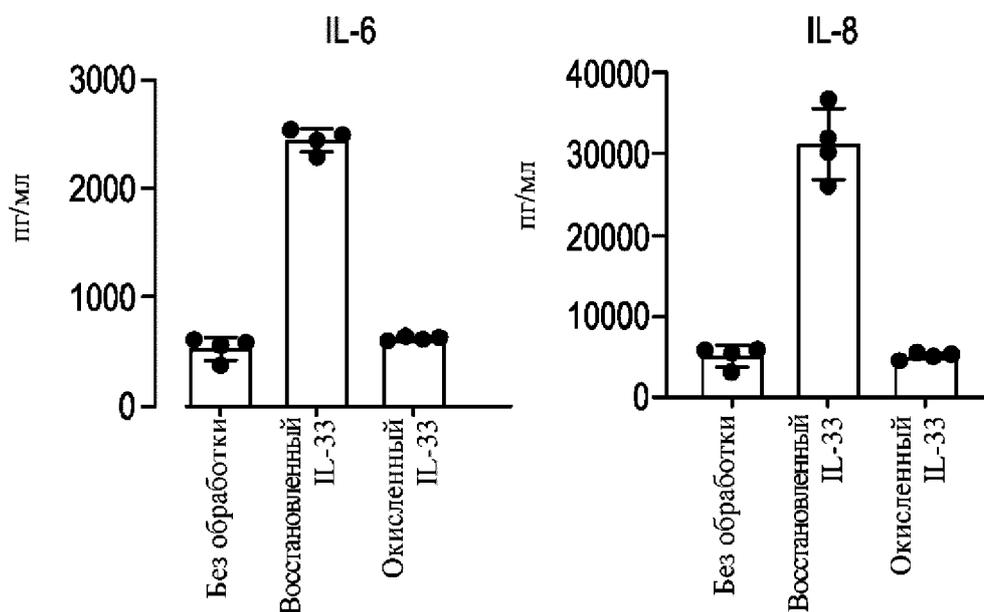


ФИГ. 19С

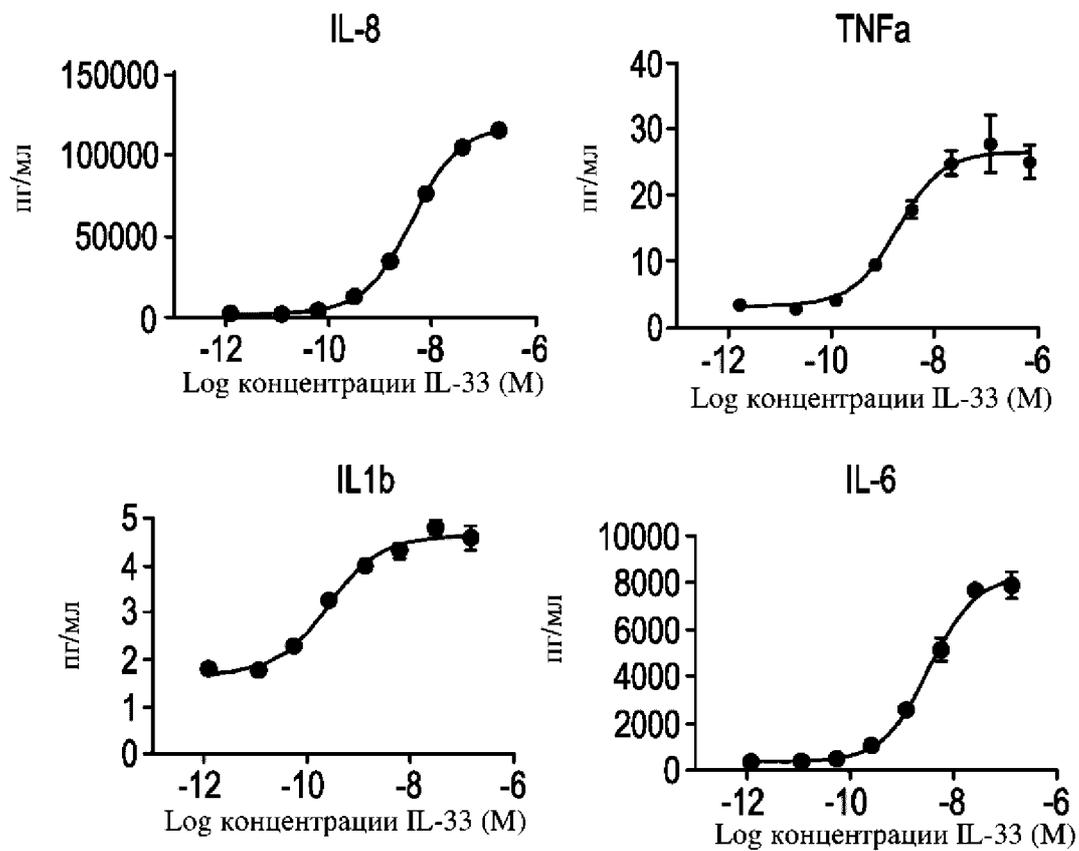
33_640087-7B (тестируемое mAb)
блокирует передачу сигнала
посредством NFkB



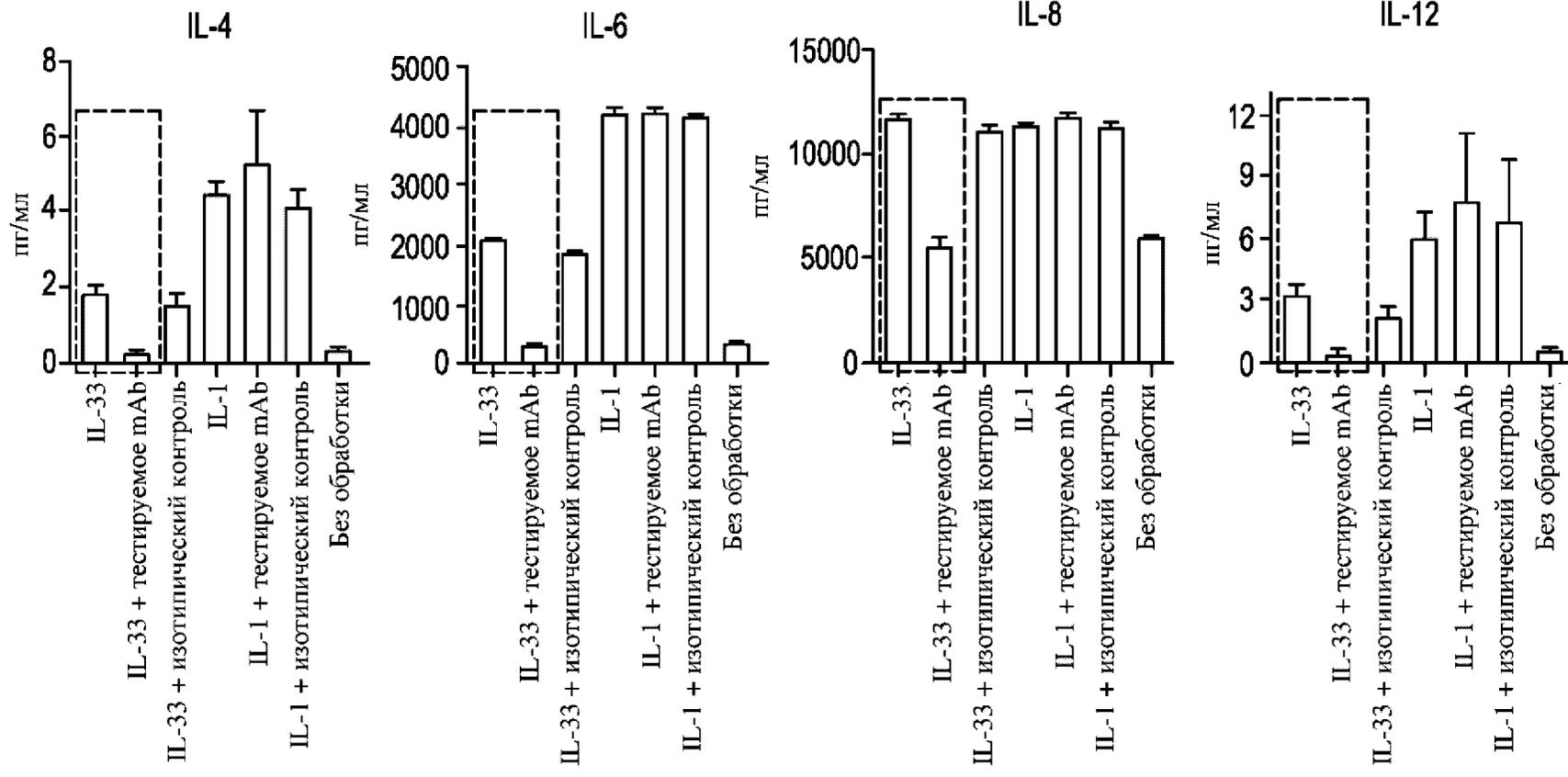
ФИГ. 19D



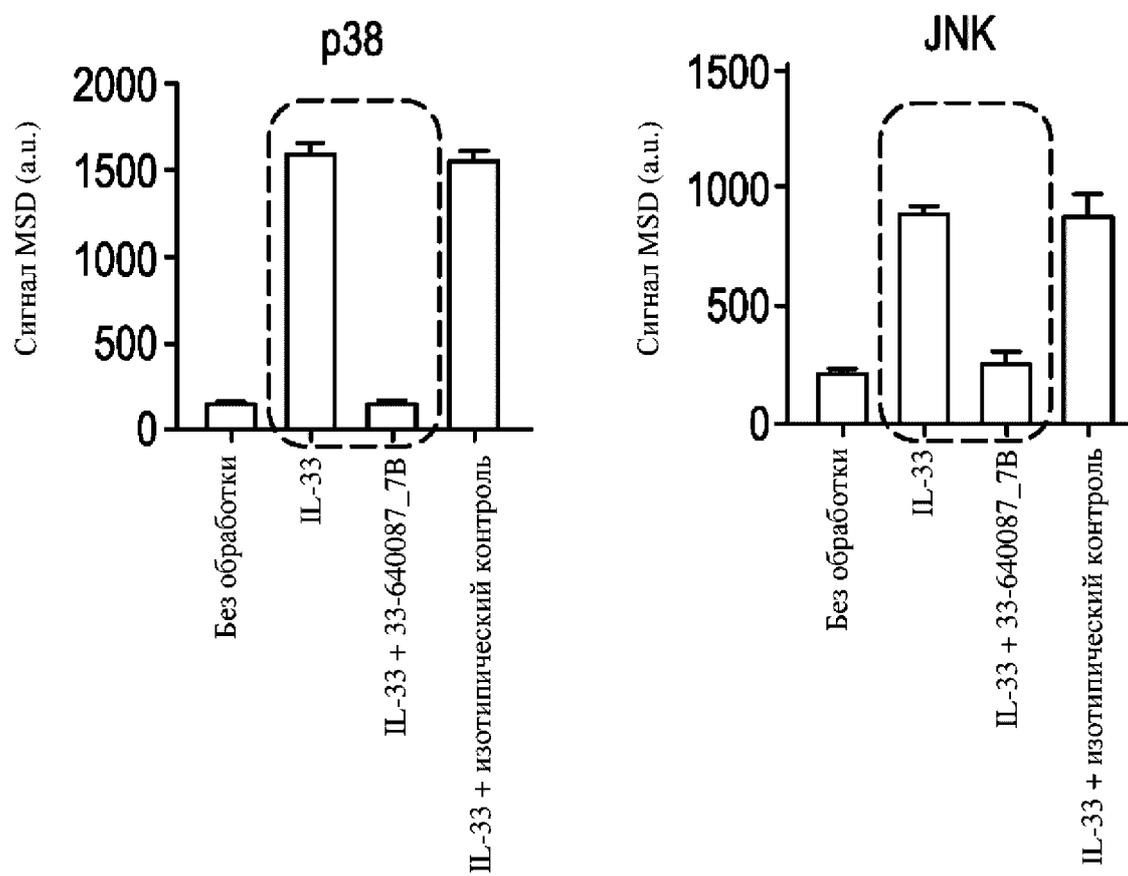
ФИГ. 19E



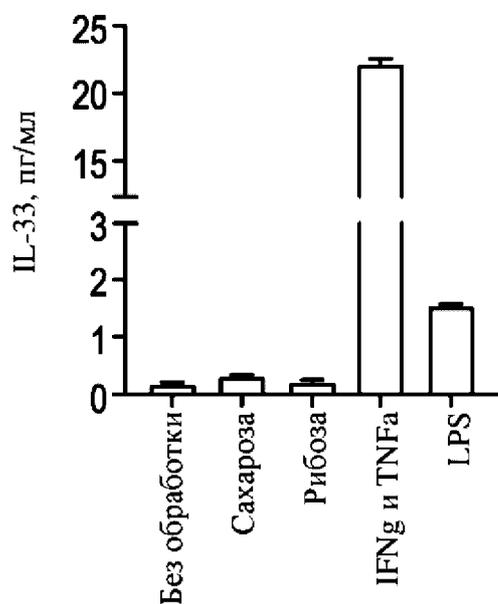
ФИГ. 20А



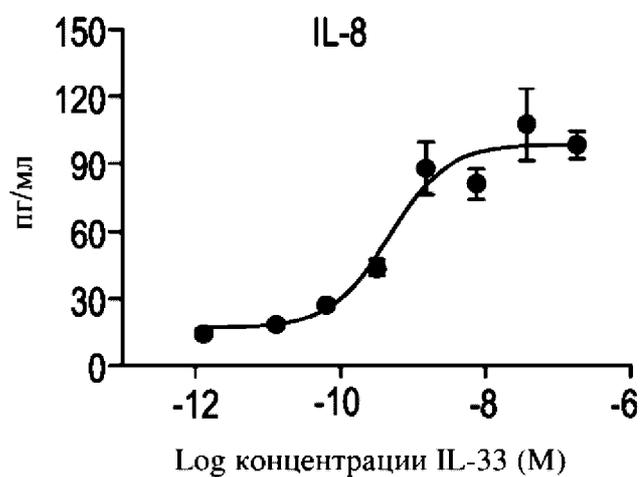
ФИГ. 20В



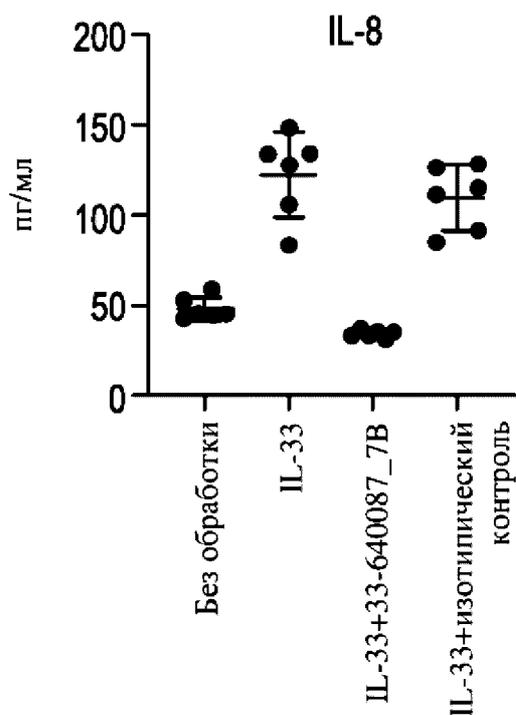
ФИГ. 21А



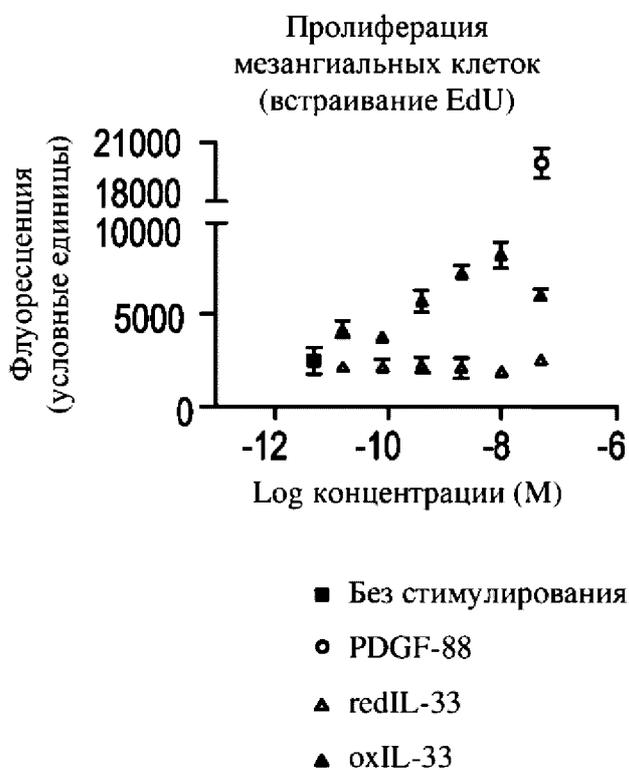
ФИГ. 21В

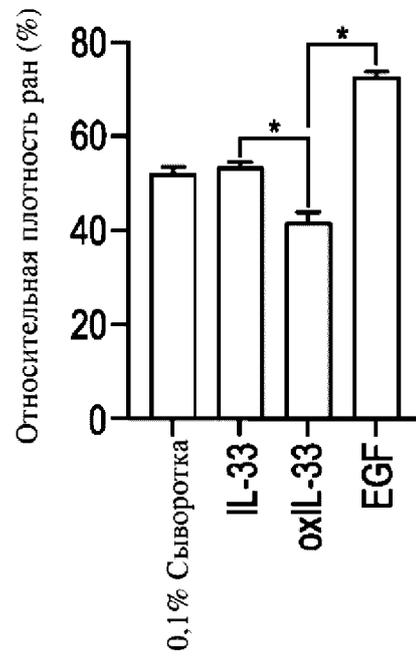
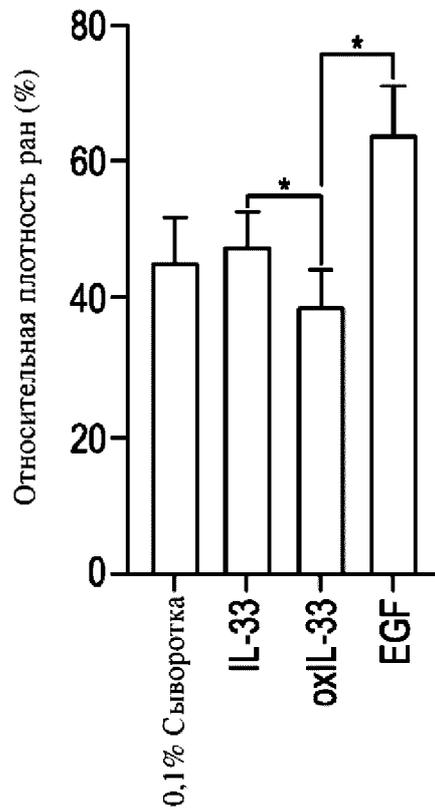


ФИГ. 21С



ФИГ. 21D



ФИГ. 22А**ФИГ. 22В**

ФИГ. 23

