

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291280** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.05

(22) Дата подачи заявки
2020.11.03

(51) Int. Cl. *A61P 11/00* (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ АНТАГОНИСТОВ IL-33

(31) 19206984.7

(32) 2019.11.04

(33) EP

(86) PCT/EP2020/080841

(87) WO 2021/089563 2021.05.14

(71) Заявитель:
МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)

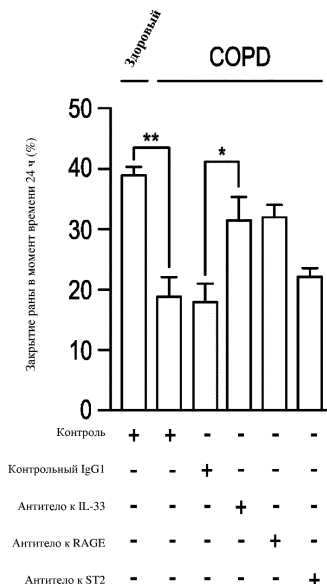
(72) Изобретатель:

Дагер Рания (US), Хауслэй Кирсти (GB), Гаеди Махбубе (US), Стриксон Сэм, Коэн Эмма Сюзанн, Белвис Мария, Ромеро Рос Хавьер (GB)

(74) Представитель:

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

(57) Изобретение относится к антагонисту IL-33, предназначенному для применения в предупреждении или лечении аномального физиологического состояния эпителия или заболеваний, опосредованных EGFR, и к соответствующим способам предупреждения или лечения, предусматривающим введение антагониста IL-33 нуждающемуся в этом пациенту.



A1

202291280

202291280

A1

СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ АНТАГОНИСТОВ IL-33

Для настоящей заявки испрашивается приоритет в соответствии с заявкой на европейский патент № 19206984.7, поданной 04 ноября 2019 г. Содержание данной предварительной заявки включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к антагонисту IL-33, предназначенному для применения в предупреждении или лечении аномального физиологического состояния эпителия или заболеваний, опосредованных EGFR, и к соответствующим способам предупреждения или лечения, предусматривающим введение антагониста IL-33 нуждающемуся в этом пациенту.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Интерлейкин-33 (IL-33), также известный как IL-1F11, является представителем семейства цитокинов IL-1. IL-33 представляет собой белок из 270 аминокислот, состоящий из двух доменов: гомеодомена и цитокинового (IL-1-подобного) домена. Гомеодомен содержит сигнал ядерной локализации (NLS). Известно, что IL-33 существует в разных формах: восстановленной форме (redIL-33) и окисленной форме (oxIL-33). Предыдущие исследования показали, что восстановленная форма быстро окисляется в физиологических условиях с образованием по меньшей мере одной дисульфидной связи в окисленной форме, и что эти две формы, вероятно, обладают разными механизмами связывания и эффектами. Ранее было обнаружено, что восстановленная форма IL-33 связывается с ST2 и по сути является единственным известным лигандом рецептора ST2, экспрессируемого клетками Th2 и тучными клетками. Восстановленный IL-33 стимулирует клетки-мишени путем связывания ST2 и последующей активации киназных путей NFkB и MAP, что приводит к продуцированию цитокинов и хемокинов, например, IL-4, IL-5 и IL-13, для стимуляции воспаления. Считается, что растворимый ST2 (sST2) является рецептором-приманкой, который обеспечивает предотвращение передачи сигнала восстановленного IL-33.

Совсем недавно было обнаружено, что окисленная форма IL-33 также обладает физиологическими эффектами. Было обнаружено, что окисленный IL-33 не связывается с ST2, а вместо этого связывается с рецептором конечных продуктов усиленного гликирования (RAGE) и передает сигналы через этот альтернативный путь.

IL-33 представляет немалый интерес в качестве терапевтической мишени, в основном за счет способности того, что сейчас известно как восстановленная форма, стимулировать ST2 и вызывать сильные воспалительные эффекты. Однако в отношении сигнального пути окисленной формы IL-33 в качестве терапевтической мишени значительных исследований проведено не было и к нему не проявляли интерес отчасти ввиду его более позднего

открытия, а также ввиду того факта, что RAGE имеет множество лигандов и его нисходящие пути взаимодействия недостаточно изучены.

Более подробно в данном документе описан по меньшей мере один из таких нисходящих путей взаимодействия RAGE, возникающий в результате стимуляции окисленным IL-33. Неожиданно было обнаружено, что комплексы RAGE с рецептором эпителиального фактора роста (EGFR) являются частью пути окисленного IL-33. Восстановленный IL-33 быстро превращается в окисленный IL-33, который затем связывается с RAGE и образует комплексы с EGFR, стимулируя активность EGFR. Неожиданное открытие вовлечения EGFR имеет важное значение в том смысле, что EGFR является ключевой терапевтической мишенью при многих заболеваниях, связанных с аспектами аномального физиологического состояния эпителия.

В результате этого открытия считается, что антагонисты, которые могут связываться с любой формой IL-33, способны эффективно предотвращать передачу сигнала окисленного IL-33. Это может осуществляться либо непосредственно путем связывания с собственно окисленным IL-33, либо опосредованно путем подавления превращения восстановленного IL-33 в окисленный IL-33, что, в свою очередь, предотвращает стимуляцию RAGE и стимуляцию EGFR. Такое снижение стимуляции EGFR будет иметь терапевтические преимущества при любых заболеваниях, опосредованных EGFR, но особенно при патологических состояниях, когда EGFR избыточно стимулируется.

Известно, что EGFR оказывает различные гомеостатические эффекты в отношении физиологического состояния эпителия. Стимуляция EGFR повышает дифференцировку эпителиальных клеток, повышает миграцию эпителиальных клеток и увеличивает продуцирование эпителия слизистой оболочки. Считается, что подавление передачи сигнала, опосредованного EGFR, будет обеспечивать лечение или предупреждение нарушений, которые характеризуются аномальным физиологическим состоянием эпителия, например, аномальным ремоделированием тканей эпителия респираторного тракта или избыточным продуцированием слизи.

IL-33 ранее был охарактеризован, как связанный с ремоделированием тканей в дыхательных путях (Li *et al* JACI, 2014 134: 1422-32; Vannella *et al* Sci Transl Med, 337ra65; Allinne *et al* JACI, 2019, 144: 1624-37). Однако считается, что это происходит косвенно через самоподдерживающуюся петлю амплификации, в результате чего передача сигналов IL-33 обеспечивает повышение экспрессии как IL-33, так и его когнатного рецептора ST2, что приводит к длительной передаче сигналов оси ST2. Ранее не существовало доказательств или предположений того, что сам IL-33 непосредственно влияет на биологию эпителия

дыхательных путей, поскольку активность при участии ST2 опосредуется врожденными клетками, на которых экспрессируется ST2, такими как макрофаги и врожденные лимфоидные клетки 2 типа.

Как уже отмечалось выше, настоящее изобретение основано на выявлении того, что IL-33 также действует непосредственно через другой механизм, путь RAGE-EGFR, для непосредственного воздействия на физиологическое состояние эпителия. Эти новые сведения являются важными, поскольку их можно использовать для расширения терапевтического применения антагонистов IL-33 с целью лечения большего количества заболеваний, большего количества симптомов заболеваний и большего числа пациентов. Терапевтическую возможность прямого контроля и подавления IL-33-опосредованной EGFR-опосредованной передачи сигнала путем нацеливания на IL-33 ранее не реализовывали.

Раскрытие настоящей заявки впервые показывает, что применение антагониста IL-33 может оказывать непосредственное воздействие на нарушенные ответы репарации эпителия, уменьшать дифференцировку и пролиферацию эпителиальных бокаловидных клеток, снижать продуцирование слизи и улучшать мукоцилиарный транспорт у пациентов с аномальным физиологическим состоянием эпителия, например, при COPD (хронической обструктивной болезни легких) или бронхите, путем прямого подавления активности oxIL-33, опосредованной RAGE/EGFR. Таким образом, представленное в данном документе исследование является обоснованием вариантов терапевтического применения антагонистов IL-33 в отношении прямого предупреждения или лечения аномального физиологического состояния эпителия, как правило возникающего в результате эффектов, опосредованных EGFR, и, таким образом, присутствующего при заболеваниях, опосредованных EGFR.

СУТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту представлен антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении аномального физиологического состояния эпителия путем модулирования или подавления эффекта, опосредованного RAGE-EGFR.

Согласно альтернативному первому аспекта представлен способ предупреждения или лечения аномального физиологического состояния эпителия у пациента, предусматривающий введение эффективного количества антагониста IL-33 нуждающемуся в этом пациенту для модулирования или подавления эффекта, опосредованного RAGE-EGFR.

Согласно альтернативному первому аспекту представлено применение антагониста IL-33 в производстве лекарственного препарата для предупреждения или лечения аномального физиологического состояния эпителия.

Согласно второму аспекту представлен антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении заболевания, опосредованного EGFR.

Согласно альтернативному второму аспекту представлен способ предупреждения или лечения заболевания, опосредованного EGFR, у пациента, предусматривающий введение эффективного количества антагониста IL-33 нуждающемуся в этом пациенту.

Согласно альтернативному второму аспекту представлено применение антагониста IL-33 в производстве лекарственного препарата, предназначенного для предупреждения или лечения заболевания, опосредованного EGFR.

Согласно третьему аспекту представлен антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении заболевания путем улучшения физиологического состояния эпителия.

Согласно альтернативному третьему аспекту представлен способ предупреждения или лечения респираторного заболевания путем улучшения физиологического состояния эпителия у пациента, предусматривающий введение эффективного количества антагониста IL-33 нуждающемуся в этом пациенту.

Согласно альтернативному третьему аспекту в настоящем изобретении представлено применение антагониста IL-33 в производстве лекарственного препарата для предупреждения или лечения респираторного заболевания посредством улучшения физиологического состояния эпителия.

Согласно четвертому аспекту представлен антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении заболевания посредством подавления эффектов, опосредованных EGFR.

Согласно альтернативному четвертому аспекту представлен способ предупреждения или лечения респираторного заболевания путем подавления эффектов, опосредованных EGFR, у пациента, предусматривающий введение эффективного количества антагониста IL-33 нуждающемуся в этом пациенту.

Согласно альтернативному четвертому аспекту в настоящем изобретении представлено применение антагониста IL-33 в производстве лекарственного препарата для предупреждения или лечения респираторного заболевания посредством подавления эффектов, опосредованных EGFR.

Согласно еще одному аспекту представлен антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении заболевания путем подавления передачи сигнала EGFR, опосредованной IL-33.

Согласно альтернативному дополнительному аспекту представлен способ предупреждения или лечения заболевания путем подавления передачи сигнала EGFR, опосредованной IL-33, у пациента, предусматривающий введение эффективного количества антагониста IL-33 нуждающемуся в этом пациенту.

Согласно альтернативному дополнительному аспекту в настоящем изобретении представлено применение антагониста IL-33 в производстве лекарственного препарата для предупреждения или лечения заболевания путем подавления передачи сигнала EGFR, опосредованной IL-33.

Дополнительные признаки и варианты осуществления определенных выше аспектов описаны ниже в озаглавленных разделах. Каждый раздел можно комбинировать с любым из вышеупомянутых аспектов в любой совместимой комбинации.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Определения

Термин 'белок IL-33', используемый в данном документе, относится к интерлейкину 33, в частности, к белку-интерлейкину 33 млекопитающих, например, белку человека, депонированному в UniProt под номером 095760. Однако понятно, что этот объект не является единственной молекулой, а существует в виде восстановленной и окисленной форм. С учетом быстрого окисления восстановленной формы *in vivo*, например, в течение периода от 5 минут до 40 минут, и *in vitro* в большинстве случаев ссылки на IL-33 из предшествующего уровня техники могут в действительности представлять собой ссылки на окисленную форму. Кроме того, коммерческие анализы могут обеспечивать неэффективную дифференцировку восстановленной и окисленной формы. Термины "IL-33" и "полипептид IL-33" используются взаимозаменяемо в данном документе. 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 процессированный или усеченный на N-конце IL-33, включающий без ограничения 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 или вариантный полипептид IL-33, где фрагмент IL-33 или вариантный полипептид IL-33 сохраняет некоторые или все функциональные свойства активного IL-33.

Термины ‘окисленный IL-33’ или ‘oxIL-33’, используемый в данном документе, относится к форме IL-33, которая связывается с RAGE и запускает передачу сигнала, опосредованную RAGE-EGFR. Окисленный IL-33 представляет собой белок, различимый в виде отдельной полосы, например, при вестерн-блот-анализе 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. В одном варианте осуществления окисленный IL-33 не демонстрирует связывание с ST2.

Термины ‘восстановленный IL-33’ или ‘redIL-33’, используемый в данном документе, относится к форме IL-33, которая связывается с ST2 и запускает передачу сигнала, опосредованную ST2. В частности, остатки цистеина 208, 227, 232 и 259 восстановленной формы не связаны дисульфидными связями. В одном варианте осуществления восстановленный IL-33 не демонстрирует связывание с RAGE.

Следует понимать, что ссылки на “WT IL-33” или “IL-33” могут относиться либо к восстановленной, либо к окисленной формам, либо к обеим формам, если только из контекста, в котором она используется, не ясно, что имеется в виду одна из форм.

Термин ‘антигенно отличающиеся формы IL-33’, используемый в данном документе, относится к любой форме IL-33, которая может действовать как антиген и связываться с антителом или его связывающим фрагментом, как правило, в контексте настоящего раскрытия означает окисленный IL-33, восстановленный IL-33 и комплексы восстановленный IL-33/sST2.

Термин ‘передача сигнала/эффекты, опосредованные ST-2’, используемый в данном документе, относится к системе IL-33/ST2, где распознавание восстановленного IL-33 посредством ST2 стимулирует димеризацию с IL1-RAcP на поверхности клетки и внутриклеточный рекрутинг компонентов рецепторного комплекса MyD88, TRAF6 и IRAK1-4 к внутриклеточному домену TIR. Таким образом, передачу сигнала/эффекты, опосредованные ST-2, можно прерывать или ослаблять путем нарушения взаимодействия IL-33 с ST2 или альтернативно путем прерывания взаимодействия с IL-1RAcP.

Термин ‘передача сигнала/эффекты, опосредованные RAGE-EGFR’, используемый в данном документе, относится к системе окисленный IL-33/RAGE-EGFR, где распознавание

окисленного IL-33 посредством RAGE стимулирует образование комплекса с EGFR внутри клеточных мембран. Таким образом, передача сигнала/эффекты, опосредованные RAGE-EGFR, могут быть прерваны и ослаблены путем нарушения взаимодействия окисленного IL-33 с RAGE или путем прерывания превращения восстановленного IL-33 в окисленный IL-33.

Выражение 'ослабляет активность', используемое в данном документе, относится к снижению или подавлению соответствующей активности или к прекращению соответствующей активности. В целом ослабление и подавление используются в данном документе взаимозаменяемо.

Следует отметить, что форма единственного числа объекта относится к одному или нескольким таким объектам; например, подразумевается, что "антитело к IL-33" означает одно или несколько антител к IL-33. В связи с этим формы единственного числа, выражения "один или несколько" и "по меньшей мере один" можно использовать в данном документе взаимозаменяемо.

Используемые в данном документе выражения "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. 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, которому требуется диагностика, прогнозирование или терапия, за исключением ситуаций, когда субъект определен как 'здоровый субъект'. Субъекты-млекопитающие включают людей, одомашненных животных, сельскохозяйственных животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и т. д.

Антагонист IL-33

Настоящее изобретение относится к вариантам медицинского применения антагониста IL-33, в частности к вариантам медицинского применения для предупреждения или лечения заболевания путем подавления передачи сигнала EGFR, опосредованной IL-33. В конкретных случаях настоящее изобретение относится к применению антагониста IL-33 для предупреждения или лечения аномального физиологического состояния эпителия, которое может выявляться при заболеваниях, опосредованных EGFR.

Термин 'антагонист IL-33', используемый в данном документе, относится к любому средству, которое обеспечивает ослабление активности IL-33, например, активности восстановленного IL-33, активности окисленного IL-33 или активности обеих форм. Соответственно, антагонист IL-33 характеризуется специфичностью к восстановленному и/или окисленному IL-33. Соответственно, ослабление осуществляется путем связывания IL-33 в восстановленной или окисленной формах. Соответственно, если антагонист обеспечивает ослабление активности восстановленного IL-33 и активности окисленного IL-33, ослабление происходит за счет связывания с IL-33 в восстановленной форме (т. е. за счет связывания с восстановленным IL-33).

Соответственно, антагонист IL-33 представляет собой связывающую молекулу или ее фрагмент.

Выражения "связывающая молекула" или "антигенсвязывающая молекула" по настоящему изобретению относятся в своем наиболее широком смысле к молекуле, которая специфически связывает антигенную детерминанту. Соответственно, связывающая молекула специфически связывается с IL-33, в частности с восстановленным IL-33 или окисленным IL-33.

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

Соответственно, антагонист IL-33 представляет собой антитело или его связывающий фрагмент. Соответственно, антагонист 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.

Термин "антитело", используемый в данном документе, относится к молекуле иммуноглобулина, более подробно обсуждаемой ниже, в частности, к полноразмерному

антителу или молекуле, предусматривающей полноразмерное антитело, например, к молекуле DVD-Ig и т. п.

Выражение “его связывающий фрагмент” используется взаимозаменяемо с выражением “его антигенсвязывающий фрагмент” и относится к эпитопу/антигенсвязывающему фрагменту фрагмента антитела, например, содержащему связывающую область, в частности, к содержащему 6 CDR, например 3 CDR в вариабельной области тяжелой цепи и 3 CDR в вариабельной области легкой цепи.

Соответственно, антитело или его связывающий фрагмент выбраны из природных, поликлональных, моноклональных, мультиспецифических, мышинных, человеческих, гуманизированных, приматизированных или химерных. Соответственно, антитело или его связывающий фрагмент могут представлять собой эпитоп-связывающий фрагмент, например, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), дисульфид-связанные Fv (sdFv), фрагменты, содержащие либо VL-, либо VH-домены, либо фрагменты, полученные с использованием библиотеки экспрессии Fab. Соответственно, антитело или его связывающий фрагмент могут представлять собой миниантитело, диантитело, триантитело, тетраантитело или одноцепочечное антитело. Соответственно, антитело или его связывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело. Молекулы ScFv известны из уровня техники и описаны, например, в патенте США № 5892019.

Молекулы иммуноглобулина или антитела по настоящему изобретению могут принадлежать к молекулам иммуноглобулина любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2 и т. д.) или подкласса.

Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление активности окисленного IL-33, соответственно, путем подавления образования окисленного IL-33. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление превращения восстановленного IL-33 в окисленный IL-33.

Соответственно, антагонист IL-33 представляет собой антагонист восстановленного IL-33. Другими словами, антагонист IL-33 ослабляет активность восстановленного IL-33. Соответственно, ослабление осуществляется путем связывания с восстановленным IL-33. Соответственно, связываясь с восстановленным IL-33, указанный антагонист также обеспечивает подавление/ослабление активности окисленного IL-33 путем предупреждения его превращения в окисленную форму IL-33.

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

зависимой передачи сигнала и/или опосредованных RAGE-EGFR эффектов. Соответственно, подавление обеспечивает снижение или выключение EGFR-зависимой передачи сигнала. Соответственно, подавление обеспечивает снижение или выключение опосредованных EGFR эффектов. В частности, было показано, что антагонисты IL-33, 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 снижает или предотвращает образование комплекса RAGE-EGFR. Соответственно, подавление снижает или предотвращает активацию EGFR, соответственно, опосредованную RAGE активацию EGFR.

Соответственно, антагонист IL-33 обладает всеми подавляющими эффектами, описанными выше. Соответственно, антагонист восстановленного IL-33 обладает всеми подавляющими эффектами, описанными выше.

Соответственно, антагонист IL-33 представляет собой связывающую молекулу к восстановленному IL-33 или ее фрагмент. Соответственно, антагонист IL-33 представляет собой антитело к восстановленному IL-33 или его связывающий фрагмент, предпочтительно антитело к восстановленному IL-33 или его связывающий фрагмент.

Соответственно, связывающая молекула или ее фрагмент специфически связывается с redIL-33 с аффинностью связывания (K_d), составляющей менее 5×10^{-2} М, 10^{-2} М, 5×10^{-3} М, 10^{-3} М, 5×10^{-4} М, 10^{-4} М, 5×10^{-5} М, 10^{-5} М, 5×10^{-6} М, 10^{-6} М, 5×10^{-7} М, 10^{-7} М, 5×10^{-8} М, 10^{-8} М, 5×10^{-9} М, 10^{-9} М, 5×10^{-10} М, 10^{-10} М, 5×10^{-11} М, 10^{-11} М, 5×10^{-12} М, 10^{-12} М, 5×10^{-13} М, 10^{-13} М, 5×10^{-14} М, 10^{-14} М, 5×10^{-15} М или 10^{-15} М. Соответственно, аффинность связывания с redIL-33 составляет менее 5×10^{-14} М (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 считается, что 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 oxIL-33. Таким образом, при связывании с redIL-33 с такой аффинностью связывания связывающая молекула может подавлять или ослаблять активность oxIL-33 путем предупреждения его образования с обеспечением таким образом подавления передачи сигнала посредством RAGE.

Соответственно, 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 $k(\text{on})$ превышает или равняется $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

Соответственно, связывающая молекула или ее фрагмент могут специфически связываться с redIL-33 при скорости диссоциации ($k(\text{off})$), меньшей 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 ($k(\text{off})$), меньшей или равной $5 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, 10^{-4} c^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$, 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 oxIL-33 связывающие молекулы, описанные в данном документе, могут связываться с redIL-33 при указанных скоростях $k(\text{on})$ и/или $k(\text{off})$. Без ограничения какой-либо теорией считается, что указанные скорости $k(\text{on})/k(\text{off})$ гарантируют, что связывающая молекула может быстро связываться с redIL-33 прежде чем превратится в oxIL-33, за счет чего обеспечивается снижение образования oxIL-33, за счет чего обеспечивается ослабление передачи сигналов RAGE, соответственно, передачи сигналов RAGE/EGFR, и за счет чего обеспечивается ослабление эффектов, опосредованных RAGE/EGFR.

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

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 (DELFI[®], 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 производный анализа HTRF, описанный в примере 1 WO 2016/156440, который настоящим включен посредством ссылки. 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, меченного 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%. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула выбрана из любого из следующих антител к IL-33: 33_640087-7B (описанного в WO 2016/156440), ANB020, известного как этокимаб (описанного в WO 2015/106080), 9675P (описанного в US2014/0271658), A25-3H04 (описанного в US2017/0283494), Ab43 (описанного в WO2018/081075), IL33-158 (описанного 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, антагонист IL-33 представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые 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.

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

П а р а	S E Q I D N O: 1	Аминокислотная последовательность HCVR	S E Q I D N O: 1	Аминокислотная последовательность LCVR
1	SE Q ID N O: 1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIS AIDQSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLR AEDTAVYYCARQKFMQL WGGGLRYPFGYWGGTMTVSS	S E Q I D N O: 1	SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSG EGMGDKYAAWYQQKPGQSPVL VIYRDTKRPSGIPERFSGSNSGNT ATLTISGTQAMDEADYYCGVIQ DNTGVFGGGTKLTVL

			1 9	
2	SE Q ID N O: 2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFRSFAMSWVRQAPGKGLELVSDLR TSGGSTYYADSVKGRLTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSHYST SWFGGFDYWGGQGLTVTVSS	S E Q I D N O : 2 0	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC RASQGFSSWLAWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTITNLQPEDFATYYCQQ ANSFPLTFGGGTKVEIK
3	SE Q ID N O: 3	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSYYWSWIRQPPGKGLELIGYIYY SGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNHFSL KLSSVTAADTAVYYCARSQYTSSWY GSFDIWGGQGTMTVTVSS	S E Q I D N O : 2 1	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC RASQGISTWLAWFQQKPGKAPK LLIYAASLTQGGVPSRFSGSGSG PEFTLTISLQPEDFATYYCQQA NSFPWTFGQGTKVEIK
4	SE Q ID N O: 4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFNSYGISWVRQAPGQGLEWMG WISSHNGNSHYVQKFQGRVSMITDTS TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARHSY TTSWYGGFDYWGGQGLTVTVSS	S E Q I D N O :	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC RASQGFSSWLAWYQQKPGKAP QLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GSDFTLTISLQPEDFATYYCQQ ANSFPLTFGGGTKVEIK

			2	
			2	
5	SE Q ID N O: 5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSYALTWVRQAPGKGLEWVSFIS GSGGRPFYADSVKGRFTISRDN SKNM LYLQMNSLRAEDTAIYYCAKS LYTTS WYGGFDSWGQGTLVTVSS	S E Q I D N O : 2 3	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC RASQGVVSWLAWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SNSFPFTLGPGTKVDIK
6	SE Q ID N O: 6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSNYAMTWVRQAPGKGLEWVSTIS GSGDNTYYADSVQGRFTISRGH SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPTYSR SWYGAFDFWGQGTMTVTVSS	S E Q I D N O : 2 4	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC RASQGISSWLAWYQQKPGKAPQ LLIYAASRLQSGVPSRFWGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQA NNFPFTFGPGTKVDIK
7	SE Q ID N O: 7	EVQLVESGGNLEQPGGSLRLSCTASG FTFSRSAMNWVRRAPGKGLEWVSGIS GSGGRTYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLSAEDTAAYYCAKDSYTT SWYGGMDVWGHGTTVTV SS	S E Q I D N O :	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC RASQGIFSWLAWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFAIYYCQQANS VPITFGQGTRLEIK

			2 5	
8	SE Q ID N O: 8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSDYYMNWVRQAPGKGLEWVSSI SRYSSYIYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGGM DVWGQGTLVTVSS	S E Q I D N O : 2 6	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCT GSSSNIGAVYDVHWYQQLPGTA PKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCQ TYDSSRWVFGGGTKLTVL
9	SE Q ID N O: 9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSNYYMHWVRQAPGKGLEWVSSI SARSRYHYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLATR HNAFDIWQGTLVTVSS	S E Q I D N O : 2 7	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCS GSSSNIGNNAVSWYQQLPGTAP KLLIYASNMRVIGVPDRFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCGA WDDSQKALVFGGGTKLTVL
10	SE Q ID N O: 10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSNYYMHWVRQAPGKGLEWVSSI SARSSYIYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARLATRN NAFDIWQGTLVTVSS	S E Q I D N O : :	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCS GSSSNIGRNAVNWYQQLPGTAP KLLIYASNMRVSGVPDRFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCW AWDDSQKVG VFGGGTKLTVL

			28	
11	SE Q ID N O: 11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSRYMHWRQAPGKGLEWVSSIS AQSSHIYYADSVEGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARLATRQN AFDIWGQGLTVTVSS	S E Q I D N O : 2 9	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCS GSSSNIGRNAVNWYQQLPGTAP KLLIYASNMRRSGVPDRFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCSA WDDSQKVVVFSGGKLTVL
12	SE Q ID N O: 12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSNYMHWRQAPGKGLEWVSSI SARSSYLYYADSVKGRFTISRDNKNTL TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLATR HVAFDIWGQGLTVTVSS	S E Q I D N O : 3 0	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCS GSSSNIGNNAVNWYQQLPGTAP KLLIYASNMRRPGVPDRFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCEA WDDSQKAVVFSGGKLTVL
13	SE Q ID N O: 13	MRAWIFFLLCLAGRALAQVQLMQSG AEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYW MHWVRQAPGQGLEWMGTIYPRNSNT DYNQKFKARVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDVAVYYCARPLYYYLTSPPTL FWGQGLTVTVSS	S E Q I D N O : :	MRAWIFFLLCLAGRALADIQLT QSPSFLSASVGDRVTITCKASQD VGTAVAWYQQKPGKAPKLLIY WASTRHTGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPEDFATYYCQQAKTYP FTFGSGTKLEIKR

			3 1	
1 4	SE Q ID N O: 14	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGF TFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLHGIR AAYDAFIIWGQGT LVT VSS	S E Q I D N O : 3 2	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCR ASQSVGINLSWYQQKPGQAPRL LIYGASHRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYS QSPPFTFGGGTKVEIK
1 5	SE Q ID N O: 15	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGF TFSFYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARTLHGIR AAYDAFIIWGQGT LVT VSS	S E Q I D N O : 3 3	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCR ASQSVGINLSWYQQKPGQAPRL LIYGASHRLTGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCHQYSQ PPPFTFGGGTKVEIK
1 6	SE Q ID N O: 16	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGF TFSFYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIHGIR AAYDAFIIWGQGT LVT VSS	S E Q I D N O :	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCR ASQSVGINLSWYQQKPGQAPRL LIYGASHRLTGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCHQYSQ PPPFTFGGGTKVEIK

			3 4	
1 7	SE Q ID N O: 17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSYWMYWVRQAPGKGLEWVAAI TPNAGEDYYPESVKGRFTISRDNANKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHYY YTSYSLGYWGQGTLLTVSS	S E Q I D N O : 3 5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC KASQNINKHLDWYQQKPGKAP KLLIYFTNNLQTGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCFQ YNQGWTFGGGTKVEIK
1 8	SE Q ID N O: 18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSFMSWVRQAPGKGLEWVATIS GGKTFSTDYVDSVKGRFTISRDDSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRANYGN WFFEYWGQGTLLTVSS	S E Q I D N O : 3 6	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASESVAKYGLSLLNWFQQKPGQ PPRLIFAAASNRGSGIPARFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQ QSKEVPFTFGQGTKVEIK

Соответственно, антагонист IL-33 представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность области (CDR) из вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:1, и определяющие комплементарность области (CDR) из вариабельной 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.

Соответственно, антагонист IL-33 представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность области (CDR) из вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:7, и определяющие комплементарность области (CDR) из 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, антагонист IL-33 представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность области (CDR) из вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:11, и определяющие комплементарность области (CDR) из 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, антагонист IL-33 представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность области (CDR) из вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:13, и определяющие комплементарность области (CDR) из 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, антагонист IL-33 представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность области (CDR) из вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:16, и определяющие комплементарность области (CDR) из 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, антагонист IL-33 представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющие комплементарность области (CDR) из вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:17, и определяющие комплементарность области (CDR) из вариабельной области легкой цепи

(LCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:35. Эти CDR соответствуют таковому, 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) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:18, и определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей последовательность под SEQ ID NO:36. Эти CDR соответствуют таковому, 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 вариабельных 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 гипервариабельной 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, антагонист IL-33 представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие пару переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL), выбранную из таблицы 1.

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

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

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

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

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

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

Соответственно, антагонист IL-33 представляет собой связывающую молекулу, которая может содержать 3 CDR, например, в переменной области тяжелой цепи, независимо выбранные из SEQ ID NO: 1, 7, 11, 13, 16, 17 и 18.

Соответственно, антагонист IL-33 представляет собой связывающую молекулу, которая содержит 3 CDR в переменной области тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO:1.

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

Соответственно, антагонист IL-33 представляет собой связывающую молекулу, которая содержит 3 CDR в переменной области легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO:19.

Соответственно, антагонист IL-33 представляет собой связывающую молекулу, которая может содержать 3 CDR, например, в переменной 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, антагонист 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, антагонист 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, антагонист IL-33 представляет собой связывающую молекулу, содержащую VH-домен, который содержит VHCDR 1-3 под SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39 соответственно.

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

Соответственно, антагонист 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, антагонист IL-33 представляет собой связывающую молекулу, содержащую VH-домен, который содержит VLCDR 1-3 под SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42 соответственно.

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

Соответственно, антагонист 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, антагонист 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, антагонист 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, антагонист 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 подвергли делеции, вставке и/или независимой замене на другую аминокислоту.

Соответственно, антагонист 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, антагонист 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, антагонист IL-33 представляет собой антитело или его связывающий фрагмент, содержащие VH и VL, где VL, раскрытый выше, имеет последовательность с 1, 2, 3 или 4 аминокислотами в каркасной области, которые подвергли независимо делеции, вставке и/или замене на другую аминокислоту.

Соответственно, антагонист 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, антагонист 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, антагонист 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.

Композиции и введение

Антагонисты IL-33 в вариантах медицинского применения и способах, описанных в данном документе, можно вводить пациенту в форме фармацевтической композиции.

Соответственно, любые ссылки в данном документе на 'антагонист/антагонисты IL-33' могут также относиться к фармацевтической композиции, содержащей антагонист IL-33. Соответственно, фармацевтическая композиция может содержать один или несколько антагонистов IL-33.

Соответственно, антагонист IL-33 можно вводить в фармацевтически эффективном количестве для лечения *in vivo* аномального физиологического состояния эпителия, или заболеваний, опосредованных EGFR, или респираторных заболеваний, что определено в аспектах медицинского применения и способа лечения в данном документе.

Соответственно, 'фармацевтически эффективное количество' или 'терапевтически эффективное количество' антагониста IL-33 следует понимать как количество, достаточное для достижения эффективного связывания с IL-33 и для достижения положительного эффекта, т. е. для облегчения симптомов заболевания или патологического состояния, что указано в вариантах медицинского применения/способах в данном документе.

Соответственно, антагонист IL-33 или фармацевтическая композиция на его основе могут быть введены человеку или другому животному в соответствии с вышеупомянутыми способами лечения/вариантами медицинского применения в количестве, достаточном для достижения терапевтического эффекта.

Соответственно, антагонист IL-33 или фармацевтическая композиция на его основе могут быть введены такому человеку или другому животному в стандартной лекарственной форме, полученной путем объединения антагониста IL-33 с общепринятым фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем в соответствии с известными методиками.

Специалисту в данной области техники следует принимать во внимание, что форму и характер фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя определяют количество активного ингредиента, с которым их объединяют, путь введения и другие хорошо

известные переменные. Специалисты в данной области техники также поймут, что смесь, содержащая один или несколько видов антагонистов IL-33, может оказаться особенно эффективной.

Количество антагониста IL-33, которое можно объединять с материалами-носителями для получения лекарственной формы для однократного введения, будет варьироваться 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, антагонист IL-33 будет составлен таким образом, чтобы облегчить введение и обеспечивать стабильность антагониста IL-33.

Соответственно, фармацевтические композиции составляют таким образом, чтобы они содержали фармацевтически приемлемый, нетоксичный, стерильный носитель, например физиологический раствор, нетоксичные буферы, консерванты и т. п.

Соответствующие фармацевтические композиции могут содержать фармацевтически приемлемые носители, в том числе, например, воду, ионообменные вещества, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как сульфат протамина, гидрофосфат динатрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, полиакрилаты, воски, блок-сополимеры полиэтилена и полиоксипропилена, полиэтиленгликоль и ланолин.

Соответственно, фармацевтическая композиция может включать стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примеры неводных растворителей представляют собой пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают, например, воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевой раствор и буферные среды.

Соответственно, фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения 0,01-0,1 М и предпочтительно 0,05 М фосфатный буфер или 0,8% солевой раствор. Другие

общепринятые носители для парентерального введения включают растворы фосфата натрия, раствор Рингера с декстрозой, растворы декстрозы и хлорида натрия, лактатный раствор Рингера или нелетучие масла. Носители для внутривенного введения включают жидкость и растворы с добавками питательных веществ, растворы с добавками электролитов, как, например, на основе растворов Рингера с декстрозой и т. п. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства и инертные газы и т. п.

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 диспергирующая 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.

Подходящие составы для применения в терапевтических способах, раскрытых в данном документе, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980).

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 готовить путем помещения активного соединения (например, антагониста IL-33 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 антагониста IL-33 или фармацевтическая композиция на его основе нуждающемуся в этом субъекту хорошо известны или могут быть легко определены специалистами в данной области техники.

Соответственно, путь введения антагониста IL-33 или фармацевтической композиции на его основе может быть, например, пероральным, парентеральным, ингаляционным или местным. Соответственно, используемый в данном документе термин "парентеральное" включает, например, внутривенное, внутриартериальное, внутривнутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение.

Соответственно, антагонист IL-33 или фармацевтическая композиция на его основе могут быть введены перорально в приемлемой лекарственной форме, включая, например, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы.

Соответственно, антагонист IL-33 или фармацевтическую композицию на его 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, антагонисты IL-33 или фармацевтические композиции на их основе доставляют непосредственно к очагу заболевания или патологического состояния, например, к очагу с аномальным физиологическим состоянием эпителия, за счет чего обеспечивается усиление воздействия терапевтического средства на пораженную ткань.

Соответственно, антагонисты IL-33 или фармацевтические композиции на их основе вводят непосредственно в очаг заболевания или патологического состояния. Соответственно, антагонисты IL-33 или фармацевтические композиции на их основе вводят в очаг с аномальным физиологическим состоянием эпителия, заболевания, опосредованного EGFR, или респираторного заболевания.

В одном варианте осуществления введение антагониста IL-33 или фармацевтической композиции на его основе осуществляют в респираторный тракт. Соответственно, путем интраназального введения. Соответственно, путем интраназальной ингаляции. Соответственно, антагонист IL-33 или фармацевтическая композиция на его основе могут быть предоставлены в виде устройства для ингаляции. Соответствующие устройства для ингаляции хорошо известны из уровня техники.

В одном варианте осуществления представлен ингалятор, содержащий антагонист IL-33 или фармацевтическую композицию на его основе, для применения в предупреждении или лечении патологического состояния или заболевания, определенных в данном документе.

Соответственно, антагонист IL-33 или фармацевтическая композиция на его основе составлены в виде жидкой композиции. Соответственно, в виде жидкой композиции, которая может быть превращена в аэрозоль.

В одном варианте осуществления антагонист IL-33 или фармацевтическая композиция на его основе представлены в виде аэрозоля.

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 антагонист IL-33 или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, или выполнено с возможностью включения контейнера, описанного выше, который может

содержать антагонист IL-33 или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе.

Аномальное физиологическое состояние эпителия

Настоящее изобретение относится к вариантам медицинского применения антагониста IL-33 для предупреждения или лечения аномального физиологического состояния эпителия.

Используемый в данном документе термин “аномальное физиологическое состояние эпителия” означает любое аномальное состояние функции эпителия в организме человека.

Функции эпителия в организме человека включают следующие: барьера для защиты тканей под ним; регуляция и обмен химическими веществами между тканями и полостью; выделение химических веществ в полость и обеспечение восприятия. Нарушения любой из данных функций могут приводить к разрушительным физиологическим последствиям. Эпителий присутствует в широком спектре тканей организма, в том числе в коже, респираторном тракте, желудочно-кишечном тракте, репродуктивном тракте, мочевыводящих путях, экзокринных и эндокринных железах, поэтому аномалии в эпителии могут быть связаны с широким спектром заболеваний или патологических состояний. Соответственно, эпителий представляет собой эпителий дыхательных путей, а аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное физиологическое состояние эпителия дыхательных путей.

Используемый в данном документе термин “аномальный” означает отличие функции по сравнению с указанной функцией у здорового субъекта, как правило, повышение или снижение функции по сравнению с указанной функцией у здорового субъекта.

Соответственно, эпителий выбран из следующего: плоского, кубического, столбчатого и псевдомногослойного. Соответственно, эпителий является столбчатым.

Соответственно, эпителий является реснитчатым. Соответственно, эпителий является реснитчатым столбчатым. Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное физиологическое состояние реснитчатого столбчатого эпителия.

Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия включает аномальную миграцию эпителиальных клеток. Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия может включать сниженную миграцию эпителиальных клеток. Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия может включать аномальную пролиферацию эпителиальных клеток. Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия может включать сниженную пролиферацию эпителиальных клеток.

Соответственно, уменьшение миграции эпителиальных клеток приводит к нарушению способности эпителия к заживлению раны. Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия включает нарушенное заживление раны. Нарушение заживления раны может включать нарушение закрытия раны и плотности клеток раны.

Соответственно, лечение аномального физиологического состояния эпителия может включать повешение или улучшение миграции эпителиальных клеток. Соответственно, лечение аномального физиологического состояния эпителия может включать повышение или улучшение заживления раны эпителия. Соответственно, лечение аномального физиологического состояния эпителия может включать повышение или улучшение способности закрытия раны. Соответственно, лечение аномального физиологического состояния эпителия может включать повышение или улучшение плотности клеток раны.

Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы.

Термин “аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы”, используемый в данном документе, означает любую аномалию функционирования, в частности, функций мукоцилиарной системы эпителия. Аномалия функционирования мукоцилиарной системы эпителия может быть связана с аномалиями функционирования реснитчатых столбчатых клеток и/или бокаловидных клеток, которые являются ключевыми для мукоцилиарных функций. Соответственно, аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы обусловлено аномальным функционированием бокаловидных клеток.

Термин “мукоцилиарный”, используемый в данном документе, относится к функции реснитчатых столбчатых клеток и бокаловидных столбчатых клеток в эпителии по секреции и транспорту слизи. Мукоцилиарные функции эпителия могут включать следующие: пролиферация бокаловидных клеток; дифференцировка бокаловидных клеток; секреция слизи; регуляция состава слизи и/или транспорт или клиренс слизи.

В одном варианте осуществления представлен антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении аномального физиологического состояния мукоцилиарной системы, такой как аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы эпителия.

В одном варианте осуществления представлен способ предупреждения или лечения аномального физиологического состояния мукоцилиарной системы, такого как аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы эпителия, у пациента, предусматривающий введение эффективного количества антагониста IL-33 нуждающемуся в этом пациенту.

Аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы может включать любую аномальную функцию реснитчатых столбчатых клеток или бокаловидных клеток эпителия. Соответственно, аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы выбрано из аномального продуцирования слизи; аномальной дифференцировки бокаловидных клеток, аномальной пролиферации бокаловидных клеток; аномальной толщины эпителия; аномального клиренса слизи и/или аномального состава слизи.

Соответственно, аномальное продуцирование слизи включает аномальное продуцирование MUC5AC. Соответственно, аномальная дифференцировка бокаловидных клеток включает аномальную дифференцировку бокаловидных клеток MUC5AC⁺. Соответственно, аномальная пролиферация бокаловидных клеток включает аномальную пролиферацию бокаловидных клеток MUC5AC⁺. Соответственно, аномальная толщина эпителия включает аномальное количество бокаловидных клеток MUC5AC⁺ в общей площади ткани эпителия. Соответственно, аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы включает следующее: повышенное количество бокаловидных клеток; повышенное продуцирование слизи; повышенную дифференцировку бокаловидных клеток; повышенную толщину эпителия и/или сниженный клиренс слизи.

Соответственно, повышенное продуцирование слизи включает повышенное продуцирование MUC5AC. Соответственно, повышенная дифференцировка бокаловидных клеток включает повышенную дифференцировку бокаловидных клеток MUC5AC⁺. Соответственно, повышенная пролиферация бокаловидных клеток включает повышенную пролиферацию бокаловидных клеток MUC5AC⁺. Соответственно, повышенная толщина эпителия включает повышенное количество бокаловидных клеток MUC5AC⁺ в общей площади ткани эпителия.

Соответственно, повышенное продуцирование MUC5AC вызвано повышением экспрессии гена *MUC5AC*. Соответственно, аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы включает повышенную экспрессию гена *MUC5AC* в клетках эпителия. Соответственно, аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы включает повышенную экспрессию *MUC5AC* в бокаловидных клетках эпителия.

Соответственно, аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы включает изменение состава слизи. Такое изменение может включать повышенное или пониженное соотношение разных соединений, содержащихся в слизи, повышение или понижение концентрации одного или нескольких конкретных соединений, содержащихся в слизи, или повышение или понижение концентрации или толщины слизи.

Изменения в составе слизи могут включать повышение или снижение соотношения различных муцинов, например повышение или снижение соотношения муцинов MUC5AC и MUC5B.

Изменения в составе слизи могут включать повышение или снижение концентрации муцинов. Соответственно, изменения в составе слизи включают снижение концентрации Mucin 5AC. Соответственно, изменения в составе слизи включают снижение количества бокаловидных клеток с повышенной экспрессией MUC5AC.

Такие изменения в отношении муцинов, содержащихся в слизи, можно измерить и рассчитать согласно описанному в патентном документе WO 2018/204598, включенному в данный документ посредством ссылки.

Соответственно, аномальный состав слизи включает повышение соотношения MUC5AC:MUC5B. Соответственно, аномальный состав слизи включает повышение уровня MUC5AC, содержащегося в слизи. Соответственно, аномальный состав слизи включает повышение толщины слизи.

Аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы может включать любой один или несколько из вышеперечисленных симптомов в комбинации.

Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия включает аномальное ремоделирование ткани, например, аномальное ремоделирование эпителия. Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия включает повышенное ремоделирование ткани. Соответственно аномальное физиологическое состояние эпителия включает повышенное ремоделирование эпителия.

Аномальное физиологическое состояние эпителия может включать любой один или несколько из вышеперечисленных симптомов в комбинации.

Лечение или предупреждение аномального физиологического состояния эпителия или лечение или предупреждение аномального физиологического состояния мукоцилиарной системы может включать следующее:

- улучшение или повышение мукоцилиарного клиренса;
- снижение или подавление продуцирования слизи;
- подавление образования аномального состава слизи;
- снижение или подавление ремоделирования эпителия и/или
- снижение или подавление дифференцировки и/или пролиферации бокаловидных клеток.

Соответственно, снижение или подавление продуцирования слизи включает снижение или подавление продуцирования MUC5AC. Соответственно, лечение или предупреждение обеспечивает снижение или подавление продуцирования MUC5AC.

Соответственно, подавление образования аномального состава слизи может включать восстановление нормального состава слизи. Соответственно, это может включать снижение соотношения MUC5AC:MUC5B. Соответственно, лечение или предупреждение обеспечивают снижение соотношения MUC5AC:MUC5B. Соответственно, предупреждение или лечение обеспечивают подавление или снижение уровня MUC5AC в слизи. Соответственно, предупреждение или лечение обеспечивают снижение толщины слизи.

Соответственно, снижение или подавление дифференцировки и/или пролиферации бокаловидных клеток включает снижение или подавление дифференцировки или пролиферации бокаловидных клеток MUC5AC⁺. Соответственно, лечение или предупреждение обеспечивают снижение или подавление дифференцировки или пролиферации бокаловидных клеток MUC5AC⁺.

Соответственно, снижение или подавление ремоделирования эпителия включает снижение толщины респираторного эпителия. Соответственно, лечение или предупреждение обеспечивает снижение толщины респираторного эпителия.

Соответственно, снижение или подавление ремоделирования эпителия включает снижение количества бокаловидных клеток MUC5AC⁺ в общей площади ткани эпителия. Соответственно, лечение или предупреждение обеспечивает снижение или подавление количества бокаловидных клеток MUC5AC⁺ в общей площади ткани эпителия.

Улучшение или повышение мукоцилиарного клиренса включает улучшение или повышение мукоцилиарного транспорта. Таким образом, лечение или предупреждение обеспечивает улучшение или повышение мукоцилиарного транспорта.

Соответственно, эпителий представляет собой респираторный эпителий. Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное физиологическое состояние респираторного эпителия.

В одном варианте осуществления представлен антагонист IL-33 для применения в лечении аномального физиологического состояния эпителия при респираторном заболевании.

В одном варианте осуществления представлен способ предупреждения или лечения аномального физиологического состояния эпителия у пациента с респираторным заболеванием, предусматривающий введение эффективного количества антагониста IL-33 нуждающемуся в этом пациенту.

Соответствующие респираторные заболевания определены в другом месте в данном документе.

Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы респираторного эпителия.

В одном варианте осуществления представлен антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении аномального физиологического состояния мукоцилиарной системы респираторного эпителия.

В одном варианте осуществления представлен способ предупреждения или лечения аномального физиологического состояния мукоцилиарной системы респираторного эпителия у пациента, предусматривающий введение эффективного количества антагониста IL-33 нуждающемуся в этом пациенту.

Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы при респираторном заболевании.

В одном варианте осуществления представлен антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении аномального физиологического состояния мукоцилиарной системы при респираторном заболевании.

В одном варианте осуществления представлен способ предупреждения или лечения аномального мукоцилиарного физиологического состояния у пациента с респираторным заболеванием, предусматривающий введение эффективного количества антагониста IL-33 нуждающемуся в этом пациенту.

Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия присутствует в респираторном тракте. Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное физиологическое состояние эпителия респираторного тракта. Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы респираторного тракта.

Респираторный тракт включает верхний и нижний отделы респираторного тракта. Как правило, верхний отдел респираторного тракта включают носовые ходы, придаточные пазухи носа, глотку и гортань. Как правило, нижний отдел респираторного тракта включает трахею, бронхи, бронхиолы, альвеолярные ходы и альвеолы.

Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное физиологическое состояние эпителия нижнего отдела респираторного тракта, такого как бронхи.

Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное физиологическое состояние эпителия нижнего отдела респираторного тракта.

Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное физиологическое состояние эпителия бронхов. Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия нижнего отдела респираторного тракта представляет собой аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы нижнего отдела респираторного тракта. Соответственно, аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы нижнего отдела респираторного тракта представляет собой аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы бронхов.

В одном варианте осуществления представлен антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении аномального физиологического состояния мукоцилиарной системы нижнего отдела респираторного тракта.

В одном варианте осуществления представлен способ предупреждения или лечения аномального физиологического состояния мукоцилиарной системы нижнего отдела респираторного тракта у пациента, предусматривающий введение эффективного количества антагониста IL-33 нуждающемуся в этом пациенту.

В одном варианте осуществления представлен антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении аномального физиологического состояния мукоцилиарной системы бронхов.

В одном варианте осуществления представлен способ предупреждения или лечения аномального физиологического состояния мукоцилиарной системы бронхов у пациента, предусматривающий введение эффективного количества антагониста IL-33 нуждающемуся в этом пациенту.

Передача сигнала EGFR

Настоящее изобретение основано на выявлении того, что окисленный IL-33 связывается с RAGE, который, в свою очередь, образует комплекс с EGFR и проявляет свое действие посредством нарушения гомеостаза эпителия. Применение антагонистов IL-33 может обеспечивать подавление передачи сигнала окисленного IL-33 и за счет этого подавлять активацию RAGE и подавлять образование комплекса RAGE-EGFR. Представленные в данном документе данные демонстрируют, что предупреждение образования комплексов

RAGE-EGFR обеспечивает предупреждение передачи сигнала EGFR, опосредованной IL-33, и восстановление нормального физиологического состояния эпителия.

Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление передачи сигнала окисленного IL-33.

Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление связывания окисленного IL-33 с RAGE.

Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление образования комплексов RAGE-EGFR. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление образования комплексов окисленный-IL33-RAGE-EGFR.

Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление кластеризации EGFR. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление кластеризации EGFR в клеточных мембранах. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление интернализации EGFR. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление совместной локализации RAGE и EGFR в пределах клеточной мембраны. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление интернализации комплексов RAGE-EGFR.

Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление активации EGFR. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление фосфорилирования EGFR.

Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление эффектов, опосредованных RAGE-EGFR. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление эффектов, опосредованных комплексом RAGE-EGFR. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление эффектов, опосредованных комплексом окисленный IL33-RAGE-EGFR.

Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление передачи сигнала EGFR. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление передачи сигнала RAGE-EGFR. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление передачи сигнала окисленный-IL33-RAGE-EGFR.

Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление связывания окисленного IL-33 с RAGE, за счет чего обеспечивается подавление образования комплекса RAGE-EGFR, за счет чего обеспечивается подавление эффектов, опосредованных RAGE-EGFR, например, нисходящей передачи сигнала.

Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление эффекта EGFR, опосредованного IL-33. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление передачи сигнала EGFR, опосредованной IL-33. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление эффекта EGFR, опосредованного окисленным IL-33.

Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление передачи сигнала EGFR, опосредованной окисленным IL-33. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление эффекта RAGE-EGFR, опосредованного окисленным IL-33. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление передачи сигнала RAGE-EGFR, опосредованной окисленным IL-33.

Соответственно, эффект, опосредованный RAGE-EGFR, вызывается комплексом RAGE-EGFR, соответственно, комплексом окисленный IL-33-RAGE-EGFR.

Соответственно, такие эффекты, как правило, могут включать передачу нисходящего сигнала, которая может упоминаться в данном документе как передача сигнала посредством RAGE, передача сигнала посредством EGFR или передача сигнала посредством RAGE-EGFR. Соответственно, такая передача сигнала EGFR может включать фосфорилирование и/или высвобождение хемокинов.

Соответственно, такая передача сигнала EGFR включает фосфорилирование EGFR и последующее фосфорилирование компонентов пути EGFR, например, EGFR, PLC, JNK, MAPK/ERK 1/2, p38 и STAT5. Соответственно, передача сигнала EGFR включает фосфорилирование тирозинкиназ, таких как JNK, MAPK/ERK, p38.

Соответственно, передача сигнала EGFR включает повышенное высвобождение хемокинов, например IL-8.

Таким образом, антагонист IL-33 обеспечивает подавление фосфорилирования и/или высвобождения хемокинов, опосредованных EGFR.

Таким образом, антагонист IL-33 обеспечивает подавление фосфорилирования компонентов пути EGFR. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление фосфорилирования любого из EGFR, PLC, JNK, MAPK/ERK 1/2, p38 и STAT5. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление фосфорилирования, опосредованного EGFR, любого из EGFR, PLC, JNK, MAPK/ERK 1/2, p38 и STAT5. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление фосфорилирования тирозинкиназ. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление фосфорилирования тирозинкиназ, выбранных из JNK, MAPK/ERK, p38. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление фосфорилирования тирозинкиназ, опосредованного EGFR, выбранных из JNK, MAPK/ERK и p38.

Таким образом, антагонист IL-33 обеспечивает подавление высвобождения хемокинов.

Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление высвобождения IL-8.

Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление высвобождения хемокинов,

опосредованного EGFR. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление высвобождения IL-8, опосредованного EGFR.

В одном варианте осуществления представлен антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении заболевания, опосредованного EGFR.

В другом варианте осуществления антагонист IL-33 можно применять для предупреждения или лечения респираторного заболевания путем подавления эффекта, опосредованного EGFR.

Кроме того, антагонист IL-33 можно применять для предупреждения или лечения аномального физиологического состояния эпителия при заболевании, опосредованном EGFR.

В одном варианте осуществления представлен антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении заболевания, опосредованного EGFR, путем улучшения аномального физиологического состояния эпителия.

Соответственно, заболевание, опосредованное EGFR, представляет собой заболевание, опосредованное RAGE-EGFR.

Соответственно, эффект, опосредованный EGFR, представляет собой эффект, опосредованный RAGE-EGFR.

Соответственно, эффект, опосредованный EGFR, представляет собой передачу сигнала, опосредованную RAGE-EGFR.

Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление эффекта, опосредованного EGFR. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает лечение или предупреждение заболевания или патологического состояния путем подавления эффекта, опосредованного EGFR.

Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает подавление эффекта, опосредованного RAGE-EGFR. Соответственно, антагонист IL-33 обеспечивает лечение или предупреждение заболевания или патологического состояния путем подавления эффекта, опосредованного RAGE-EGFR.

“Эффект, опосредованный RAGE-EGFR”, указанный в данном документе, относится к любому физиологическому эффекту, обусловленному образованием комплекса RAGE и EGFR в клеточных мембранах и возникшей в результате aberrантной активностью EGFR. Эффекты, опосредованные RAGE-EGFR, также могут включать и/или упоминаться в данном документе как ‘передача сигнала RAGE-EGFR’, необязательно ‘передача сигнала, опосредованная RAGE-EGFR’. Такие эффекты, опосредованные RAGE-EGFR, как правило, наблюдаются в эпителии и проявляются в виде аномального физиологического состояния

эпителия. Аномальное физиологическое состояние эпителия определено выше, но может включать негативные эффекты в отношении целостности барьера, регуляции и обмена химическими веществами между тканями и полостью, выделение химических веществ в полость и обеспечения восприятия.

Соответственно, заболевание и/или эффекты, опосредованные RAGE-EGFR, характеризуются абберрантной активностью EGFR. Соответственно, заболевание и/или эффекты, опосредованные RAGE-EGFR, характеризуются абберрантной передачей сигнала EGFR. Соответственно, эффекты, опосредованные RAGE-EGFR, и/или передача сигнала RAGE-EGFR являются характеристиками заболевания, опосредованного RAGE-EGFR.

Соответственно, заболевание, опосредованное RAGE-EGFR, может представлять собой заболевание, характеризующееся аномальным физиологическим состоянием эпителия.

Соответственно, заболевание, опосредованное RAGE-EGFR, может представлять собой заболевание, характеризующееся аномальным физиологическим состоянием респираторного эпителия.

Соответственно, заболевание, опосредованное RAGE-EGFR, может представлять собой заболевание, характеризующееся аномальным физиологическим состоянием мукоцилиарной системы.

Соответственно, заболевание, опосредованное RAGE-EGFR, может представлять собой заболевание, характеризующееся аномальным физиологическим состоянием мукоцилиарной системы респираторного эпителия.

Соответствующие заболевания, опосредованные RAGE-EGFR, могут быть выбраны из любых респираторных заболеваний, определенных ниже.

Респираторные заболевания

Настоящее изобретение относится к вариантам медицинского применения антагониста IL-33 для предупреждения или лечения респираторного заболевания путем улучшения физиологического состояния эпителия или модулирования эффекта, опосредованного EGFR, соответственно, путем подавления эффекта, опосредованного EGFR, соответственно, путем подавления эффекта, опосредованного RAGE/EGFR.

Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия может быть симптомом респираторного заболевания. Следовательно, антагонист IL-33 можно применять для лечения или предупреждения респираторного заболевания, характеризующегося аномальным физиологическим состоянием эпителия.

Как определено в дополнительном варианте осуществления, представлен антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении респираторного заболевания путем улучшения физиологического состояния эпителия.

Аномальное физиологическое состояние эпителия определено в данном документе в другом месте.

Соответственно, улучшение физиологического состояния эпителия может включать улучшение аномального физиологического состояния эпителия.

Соответствующие средства для улучшения аномального физиологического состояния эпителия описаны выше.

Соответственно, лечение респираторного заболевания путем улучшения аномального физиологического состояния эпителия может включать:

- улучшение или повышение мукоцилиарного клиренса;
- снижение или подавление продуцирования слизи;
- подавление образования аномального состава слизи;
- снижение или подавление аномального ремоделирования эпителия и/или
- снижение или подавление дифференцировки или пролиферации бокаловидных клеток.

Более подробная информация о каждом из данных эффектов представлена выше в отношении лечения или предупреждения аномального физиологического состояния эпителия и может быть объединена в данном документе с лечением респираторного заболевания.

Соответственно, аберрантная активность EGFR может быть симптомом респираторного заболевания. Следовательно, антагонист IL-33 можно применять для лечения или предупреждения респираторного заболевания, характеризующегося аберрантной активностью EGFR.

Как определено в дополнительном варианте осуществления, представлен антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении респираторного заболевания путем подавления эффекта, опосредованного EGFR.

Эффекты, опосредованные EGFR, определены в другом месте в данном документе.

Соответственно, респираторное заболевание представляет собой заболевание нижнего отдела респираторного тракта, соответственно, респираторное заболевание представляет собой заболевание, которое поражает трахею, бронхи, бронхиолы, альвеолярные ходы

и/или альвеолы. Соответственно, респираторное заболевание представляет собой бронхиальное заболевание.

Соответственно, респираторное заболевание может быть выбрано из следующего: COPD, бронхита, эмфиземы, бронхоэктаза, например, CF-бронхоэктаза (муковисцидозного бронхоэктаза) или бронхоэктаза, отличного от CF-бронхоэктаза, астмы, синдрома перекреста астмы и COPD (ACO).

Соответственно, респираторное заболевание представляет собой COPD. Соответственно, респираторное заболевание представляет собой COPD с бронхитом. COPD с бронхитом представляет собой специфическую форму COPD, при которой у пациента с COPD имеется хронический бронхит. COPD с бронхитом вызывает большую смертность у пациентов, чем COPD из-за более быстрого снижения функции легких, усиления симптомов и повышенного риска вторичных инфекций. В частности, у пациентов с COPD с бронхитом наблюдаются более высокие концентрации общего муцина и гиперсекреция слизи. Таким образом, лечение посредством антагониста IL-33, как это описано в данном документе, может принести особую пользу пациентам с COPD с бронхитом, поскольку было обнаружено, что антагонисты IL-33 подавляют активность EGFR и улучшают физиологическое состояние мукоцилиарной системы.

Соответственно, по тем же причинам респираторное заболевание может представлять собой бронхиальную астму.

В одном варианте осуществления представлен антагонист IL-33 для предупреждения или лечения COPD с бронхитом.

В одном варианте осуществления представлен способ предупреждения или лечения COPD с бронхитом у пациента, предусматривающий введение эффективного количества антагониста IL-33 нуждающемуся в этом пациенту.

Передача сигнала ST2

Хотя настоящее изобретение относится к медицинскому применению антагониста IL-33 для подавления передачи сигнала и эффектов, опосредованных RAGE-EGFR, уже известно, что антагонисты IL-33 могут подавлять передачу сигнала и эффекты, опосредованные ST2. Следовательно, варианты медицинского применения, описанные в данном документе, предусматривают модулирование как эффектов, опосредованных EGFR, так и эффектов, опосредованных ST2.

Соответственно, антагонист IL-33 предназначен для применения в предупреждении и лечении аномального физиологического состояния эпителия путем модулирования эффектов, опосредованных EGFR, и эффектов, опосредованных ST2. Соответственно,

антагонист IL-33 предназначен для применения в предупреждении и лечении аномального физиологического состояния эпителия путем подавления эффектов, опосредованных EGFR, и эффектов, опосредованных ST2. Соответственно, антагонист IL-33 предназначен для применения в предупреждении и лечении аномального физиологического состояния эпителия путем подавления эффектов, опосредованных RAGE/EGFR, и эффектов, опосредованных ST2. Аномальное физиологическое состояние эпителия определено в другом месте в данном документе.

Соответственно, антагонист IL-33 предназначен для применения в предупреждении и лечении заболевания, опосредованного EGFR, путем модулирования эффектов, опосредованных EGFR, и эффектов, опосредованных ST2. Соответственно, антагонист IL-33 предназначен для применения в предупреждении и лечении заболевания, опосредованного EGFR, путем подавления эффектов, опосредованных EGFR, и эффектов, опосредованных ST2. Соответственно, антагонист IL-33 предназначен для применения в предупреждении и лечении заболевания, опосредованного EGFR, путем подавления эффектов, опосредованных RAGE/EGFR, и эффектов, опосредованных ST2. Заболевания, опосредованные EGFR, определены в другом месте в настоящем документе.

Соответственно, эффекты, опосредованные ST2, включают воспаление. Соответственно, таким образом антагонист IL-33 предназначен для применения в предупреждении и лечении заболевания, опосредованного ST2, путем модулирования эффектов, опосредованных EGFR, и эффектов, опосредованных ST2. Соответственно, антагонист IL-33 предназначен для применения в предупреждении и лечении заболевания, опосредованного ST2, путем подавления эффектов, опосредованных EGFR, и эффектов, опосредованных ST2. Соответственно, антагонист IL-33 предназначен для применения в предупреждении и лечении заболевания, опосредованного ST2, путем подавления эффектов, опосредованных RAGE/EGFR, и эффектов, опосредованных ST2. Соответствующие заболевания, опосредованные ST2, могут включать заболевания, характеризующиеся воспалением. Соответствующие заболевания, опосредованные ST2, могут включать воспалительные заболевания.

Заболевания или воспалительные заболевания, опосредованные ST2, могут включать COPD; аллергические нарушения, например, астму, хронический риносинусит, пищевую аллергию, экзему и дерматит; фибропролиферативные заболевания, например фиброз; легочную эозинофилию; злокачественное новообразование плевры; ревматоидный артрит; коллагеноз сосудов; атеросклеротическое сосудов; крапивницу; воспалительное заболевание кишечника; болезни Крона; глютенную болезнь; системную волчанку;

прогрессирующий системный склероз; гранулематоз Вегнера; септический шок и болезнь Бехчета.

Соответственно, заболевание, опосредованное ST2, или воспалительное заболевание является респираторным. Соответственно, заболевание, опосредованное ST2, или воспалительное заболевание присутствует в респираторном тракте, как определено выше.

Соответственно, антагонист IL-33 дополнительно предназначен для применения в предупреждении и лечении воспаления или воспалительного заболевания. Соответственно, антагонист IL-33 может быть дополнительно предназначен для применения в предупреждении и лечении воспаления, опосредованного ST2, или воспалительного заболевания, опосредованного ST2.

Соответственно, заболевание, опосредованное ST2, и заболевание, опосредованное EGFR, совпадают. Другими словами, эффекты, опосредованные ST2, и эффекты, опосредованные EGFR, соответственно, эффекты, опосредованные RAGE-EGFR, вносят свой вклад в патологию заболевания. Преимущественно считается, что медицинское применение одного антагониста IL-33 может обеспечивать активацию как RAGE, так и ST2 посредством IL-33. Следовательно, посредством одного антагониста IL-33 можно одновременно обеспечивать лечение как заболевания, опосредованного RAGE-EGFR, так и заболевания, опосредованного ST2.

В одном варианте осуществления представлен антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении аномального физиологического состояния эпителия и воспаления. В одном варианте осуществления представлен способ предупреждения или лечения аномального физиологического состояния эпителия и воспаления у пациента, предусматривающий введение эффективного количества антагониста IL-33.

Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия и воспаление могут быть симптомами респираторного заболевания. Соответственно, заявления о лечении и предупреждении этих симптомов могут относиться к респираторному заболеванию и могут соответственно включать лечение или предупреждение аномального физиологического состояния эпителия и воспаления при респираторном заболевании.

В одном варианте осуществления представлен антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении заболевания, опосредованного EGFR, и заболевания, опосредованного ST2.

В одном варианте осуществления представлен способ предупреждения или лечения заболевания, опосредованного EGFR, и заболевания, опосредованного ST2, у пациента, предусматривающий введение эффективного количества антагониста IL-33.

Соответственно, антагонист IL-33 представляет собой антагонист восстановленного IL-33. Соответственно, антагонист восстановленного IL-33 является таким, как определено выше. Соответственно, антагонист IL-33 является таким, как определено выше. Соответственно, антагонист IL-33 представляет собой 33_640087-7B.

Альтернативно для подавления активации как RAGE, так и ST2 посредством IL-33 в качестве комбинированной терапии можно использовать различные антагонисты IL-33. Таким образом, комбинация антагонистов IL-33 предназначена для одновременного лечения как заболевания, опосредованного RAGE-EGFR, так и заболевания, опосредованного ST2.

Соответственно, респираторное заболевание является таким, как определено выше. Соответственно, респираторное заболевание характеризуется аберрантной активностью EGFR и аберрантной активностью ST2.

Таким образом, в одном варианте осуществления представлен первый антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении аномального физиологического состояния эпителия в комбинации со вторым антагонистом IL-33 для применения в предупреждении или лечении воспаления.

Соответственно, в одном варианте осуществления представлен способ предупреждения или лечения аномального физиологического состояния эпителия и воспаления у пациента, предусматривающий введение эффективного количества первого антагониста IL-33 в комбинации с эффективным количеством второго антагониста IL-33.

Соответственно, в одном варианте осуществления представлен первый антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении заболевания, опосредованного EGFR, в комбинации со вторым антагонистом IL-33 для применения в предупреждении или лечении заболевания, опосредованного ST2.

Соответственно, в одном варианте осуществления представлен способ предупреждения или лечения заболевания, опосредованного EGFR, и заболевания, опосредованного ST2, у пациента, предусматривающий введение эффективного количества первого антагониста IL-33 в комбинации с эффективным количеством второго антагониста IL-33.

Соответственно, первый антагонист IL-33 предназначен для предупреждения или лечения аномального физиологического состояния эпителия и/или заболевания, опосредованного EGFR.

Соответственно, второй антагонист IL-33 предназначен для предупреждения или лечения воспаления и/или заболевания, опосредованного ST2.

Соответственно, первый и второй антагонисты IL-33 отличаются.

Соответственно, первый антагонист IL-33 является таким, как определено выше. Соответственно, второй антагонист IL-33 может представлять собой любой другой антагонист IL-33, который, как известно, обеспечивает подавление эффектов, опосредованных ST2. Соответственно, второй антагонист IL-33 также определен выше.

Соответственно, первый антагонист может представлять собой антагонист восстановленного или окисленного IL-33. Соответственно, второй антагонист IL-33 представляет собой антагонист восстановленного IL-33.

Соответственно, по меньшей мере один из антагонистов IL-33 представляет собой 33_640087-7B. Соответственно, первый антагонист представляет собой 33_640087-7B.

Соответственно, первый и второй антагонисты IL-33 можно вводить в комбинации. Соответственно, первый и второй антагонисты IL-33 можно вводить в комбинации в одно и то же время или в разное время. Соответствующие режимы дозирования могут быть определены медицинским работником.

Эти заявления в равной степени применимы к медицинскому применению/способу лечения, упомянутому выше, при котором заболевания, опосредованные ST-2, также могут быть подвергнуты предупреждению или лечению.

Альтернативно в дополнительных вариантах осуществления антагонист IL-33 можно вводить в комбинации с ингибитором ST2. Соответственно, ингибитор ST2 может не являться антагонистом IL-33, но может обеспечивать подавление рецептора ST2 посредством других механизмов. Соответственно, ингибитор ST2 может проявлять свою активность для лечения или предупреждения заболеваний, опосредованных ST2, указанных выше.

Таким образом, в одном варианте осуществления представлен антагонист IL-33 для применения в лечении или предупреждении аномального физиологического состояния эпителия в комбинации с ингибитором ST2 для применения в лечении или предупреждении воспаления.

В одном варианте осуществления представлен способ предупреждения или лечения аномального физиологического состояния эпителия и воспаления у пациента, предусматривающий введение эффективного количества антагониста IL-33 в комбинации с эффективным количеством ингибитора ST2.

Соответственно, аномальное физиологическое состояние эпителия и воспаление могут быть симптомами респираторного заболевания. Соответственно, заявления о лечении и предупреждении этих симптомов могут относиться к респираторному заболеванию и могут

соответственно включать лечение или предупреждение аномального физиологического состояния эпителия и воспаления при респираторном заболевании.

Следовательно, в одном варианте осуществления представлен антагонист IL-33 для применения в лечении или предупреждении заболевания, опосредованного EGFR, в комбинации с ингибитором ST2 для применения в лечении или предупреждении заболевания, опосредованного ST2.

В одном варианте осуществления представлен способ предупреждения или лечения заболевания, опосредованного EGFR, в комбинации с заболеванием, опосредованным ST2, у пациента, предусматривающий введение эффективного количества антагониста IL-33 в комбинации с эффективным количеством ингибитора ST2.

Соответственно, антагонист IL-33 является таким, как определено в другом месте в данном документе. Соответствующие заболевания, опосредованные EGFR, и заболевания, опосредованные ST2, определены в другом месте в данном документе.

Соответственно, 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), которые оба включены в данный документ посредством ссылки.

Соответственно, антагонист IL-33 и ингибитор ST2 можно вводить в комбинации. Соответственно, антагонист IL-33 и ингибитор ST2 можно вводить в комбинации в одно и то же время или в разное время. Соответствующие режимы дозирования могут быть определены медицинским работником.

Пациент

Способы и варианты медицинского применения осуществляют в отношении пациента или субъекта. Пациенту может потребоваться идентификация, диагностика или лечение физиологического состояния или заболевания, например, аномального физиологического состояния эпителия, заболевания, опосредованного EGFR, или респираторного заболевания.

Подходящим пациентом может быть человек. Пациент может являться индивидуумом, получающим медицинскую помощь, или индивидуумом, нуждающимся в медицинской помощи. Соответственно, пациентом является мужчина или женщина. Соответственно, пациентом является взрослый или ребенок.

Соответственно, в способах, описанных в данном документе, подходящим пациентом может быть пациент с аномальным физиологическим состоянием эпителия, или заболеванием, опосредованным EGFR, или респираторным заболеванием. Например, у

подходящего пациента могут наблюдаться симптомы, соответствующие таким патологическим состояниям.

Альтернативно подходящим пациентом в контексте способов, описанных в данном документе, может считаться пациент с риском развития аномального физиологического состояния эпителия, или заболевания, опосредованного EGFR, или респираторного заболевания. Например, такой пациент мог быть в контакте с индивидуумом, страдающим от такого патологического состояния, может страдать от сопутствующего патологического состояния или может соответствовать факторам риска, связанным с указанными патологическими состояниями, такими как курение, пожилой возраст, аллергия и т. д.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Части настоящего изобретения могут характеризоваться следующими вариантами осуществления, в которых:

В варианте осуществления 1 описан антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении заболевания путем подавления эффекта, опосредованного EGFR.

В варианте осуществления 2 описан антагонист IL-33 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1, где эффект, опосредованный EGFR, представляет собой эффект, опосредованный RAGE-EGFR.

В варианте осуществления 3 описан антагонист IL-33 для применения в соответствии с вариантом осуществления 1 или 2, где эффект, опосредованный EGFR, представляет собой эффект, опосредованный передачей сигнала RAGE-EGFR.

В варианте осуществления 4 описан антагонист IL-33 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-3, где заболевание представляет собой респираторное заболевание.

В варианте осуществления 5 описан антагонист IL-33 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-4, где заболевание характеризуется аномальным физиологическим состоянием эпителия и/или aberrантной активностью EGFR.

В варианте осуществления 6 описан антагонист IL-33 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-5, где заболевание выбрано из следующего: COPD, бронхита, эмфиземы, бронхоэктаза, например, CF-бронхоэктаза или бронхоэктаза, отличного от CF-бронхоэктаза, астмы или синдрома перекреста астмы и COPD (ACO).

В варианте осуществления 7 описан антагонист IL-33 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 4-6, где респираторное заболевание представляет собой COPD с бронхитом.

В варианте осуществления 8 описан антагонист IL-33 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-7, где лечение обеспечивает улучшение клиренса слизи; подавление аномального продуцирования слизи; подавление аномального ремоделирования эпителия и/или подавление аномальной дифференцировки бокаловидных клеток.

В варианте осуществления 9 описан антагонист IL-33 для применения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антагонист IL-33 обеспечивает подавление активности окисленного IL-33.

В варианте осуществления 10 описан антагонист IL-33 для применения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антагонист IL-33 обеспечивает предотвращение связывания окисленного IL-33 с RAGE, за счет чего обеспечивается подавление передачи сигнала RAGE-EGFR.

В варианте осуществления 11 описан антагонист IL-33 для применения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где антагонист IL-33 представляет собой антитело к IL-33 или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно антитело к восстановленному IL-33 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В варианте осуществления 12 описан антагонист IL-33 для применения в соответствии с вариантом осуществления 11, где антитело к IL-33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющие комплементарность области (CDR) из пары переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL), выбранной из таблицы 1.

В варианте осуществления 13 описан антагонист IL-33 для применения в соответствии с вариантом осуществления 12, где антитело к IL-33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL), выбранную из таблицы 1.

В варианте осуществления 14 описан антагонист IL-33 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 11-13, где антитело к IL-33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит 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 варианте осуществления 15 описан антагонист IL-33 для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 11-14, где антагонист IL-33 представляет собой антитело к IL33 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий VH-домен с

последовательностью под SEQ ID NO:1 и VL-домен с последовательностью под SEQ ID NO:19.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Варианты осуществления будут описаны в качестве примера со ссылкой на следующие графические материалы, на которых:

Фигура 1. 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 2** показан паттерн сигналов для каждого условия стимулирования 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 3А** 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 3В** 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 3С** 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 4** 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 5** показано, что фосфорилирование STAT5, индуцированное oxIL-33-01, уменьшается при увеличении доз антитела к EGFR по сравнению с изотипическим контролем.

На **фигуре 6** 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 7А** показано, что oxIL-33 непосредственно связывается с RAGE. HMGB1 является известным лигандом RAGE и выступает в качестве положительного контроля в данном исследовании.

На **фигуре 7В** показано, что oxIL-33 не связывается напрямую с EGFR (при этом известный лиганд EGFR, EGF, связывается). Однако когда в этот анализ добавляют RAGE в комбинации с oxIL-33, то наблюдается связывание EGFR.

На **фигуре 8** показана иммунопреципитация с помощью средства, специфического в отношении EGFR или RAGE, с последующим вестерн-блот-анализом в отношении 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 9** показано, что фосфорилирование STAT5, индуцированное oxIL-33-01, уменьшается посредством антитела к RAGE, но не антитела к ST2.

На **фигуре 10** показано, что EGF и окисленный IL33 (oxIL33) индуцируют кластеризацию и интернализацию EGFR в клетках EGFR-GFP A549. Репрезентативные изображения показаны после 5 минут стимуляции. На гистограммах показано истощение EGFR в некластеризованной области (сдвиг влево пиков колоколообразной формы гистограммы) в клетках, обработанных EGF и oxIL-33, и увеличение количества насыщенных пикселей (интенсивность 255) в этих клетках, вызванное кластеризацией.

На **фигуре 11** показано кратное увеличение секреции IL-8, обусловленное NHBEs и DHBE, после 24-часовой стимуляции отдельно средой (нестимулированный контроль), 30 нг/мл IL-33-01, 30 нг/мл IL-33-16, 30 нг/мл окисленного IL-33 или 30 нг/мл EGF. На гистограммах показаны средние значения и SEM от доноров 4 NHBE и 3 DHBE.

На **фигуре 12А** показана относительная плотность заживления раны для клеток A549 после обработки окисленным IL-33, oxIL-33 или EGF. На гистограмме показано среднее значение и SEM для 6 технических повторов для каждого условия.

На **фигуре 12B** показана относительная плотность заживления раны 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 13** показана процент закрытия раны, представляющей собой царапину, для клеток NHBE, обработанных только средой (контроль без стимуляции), 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.

Фигура 14: показана относительная плотность заживления раны в клетках эпителия бронхов человека от здоровых субъектов, курящих и пациентов с COPD, со стимуляцией окисленным IL-33 и без нее;

фигура 15: показано закрытие раны через 24 часа (%) для клеток NHBE (n = 5 доноров) по сравнению с клетками DHBE COPD (n = 5 доноров) и DHBE, обработанными контрольным IgG1, антителом к IL-33 (33_640087-7B), антителом к RAGE (M4F4) и антителом к ST2. На гистограмме показано среднее значение и SEM для n = 5 отдельных доноров;

на **фигуре 16A** показано репрезентативное иммуногистохимическое окрашивание базальных (p63+; синий), реснитчатых (альфа-тубулин; фиолетовый) и бокаловидных (Mucin5ac+MucinB; желтый) клеток из культур ALI, полученных от здоровых доноров.

На **фигуре 16B** показана количественная оценка, выполненная посредством иммуногистохимического исследования различных типов эпителиальных клеток и с использованием программного обеспечения HALO после 7 дней обработки антителом к IL-33 (33_640087-7B) или изотипическим контрольным антителом; показаны данные в виде среднего и SEM для n = 2-3 отдельных доноров.

На **фигуре 16C** показана количественная оценка бокаловидных клеток с использованием программного обеспечения HALO после 7 дней обработки антителом к IL-33 (33_640087-7B) или изотипическим контрольным антителом; показаны данные в виде среднего и SEM для n = 2-3 отдельных доноров.

На **фигуре 17** показан пример окрашивания отдельных муцинов (муцин 5AC и муцин 5B) в культурах ALI, полученных от здоровых пациентов (1 донор) или пациентов с COPD (1 донор), и уменьшение окрашивания муцина в культурах от пациента с COPD после 7 дней обработки антителом к IL-33 (33_640087-7B).

На **фигуре 18** показаны графики tSNE, иллюстрирующие различные доли подтипов клеток, которые обнаруживаются в культурах ALI COPD, полученных от отдельных доноров, обработанных антителом к IL-33, по сравнению с отсутствием обработки.

Фигура 19А: демонстрируется репрезентативный контурный график проточной цитометрии с обнаружением бокаловидных клеток в культурах ALI от здорового донора. Muc5B показан на оси x, а Muc5AC на оси y. Культуры ALI обрабатывали белками в течение 7 дней. Обработка восстановленным IL-33 (IL-33[C->S]) не приводила к повышению количества бокаловидных клеток по сравнению с исходным уровнем. oxIL-33 (окисленный IL-33-01) приводил к повышению процентной доли бокаловидных клеток, как и IL-13. Известно, что IL-13 обеспечивает повышение количества бокаловидных клеток в культурах ALI и используется в качестве положительного контроля в данном исследовании. Цифры в квадрантах показывают процентные доли от общей популяции: в верхнем левом квадранте бокаловидные клетки, одноположительные по Muc5AC, в нижнем правом квадранте бокаловидные клетки, одноположительные по Muc5B, и в верхнем правом квадранте бокаловидные клетки, дважды положительные по Muc5AC и Muc5B.

На **фигуре 19В** показаны объединенные данные проточной цитометрии, полученные для культур ALI от здоровых доноров ($n = 6$), которые показывают процент бокаловидных клеток (объединенные бокаловидные клетки, одноположительные по Muc5AC, одноположительные по Muc5B и дважды положительные по Muc5AC и Muc5B) по отношению к общей популяции эпителиальных клеток. Восстановленный IL-33 (IL-33[C->S]) не приводил к повышению количества бокаловидных клеток по сравнению с исходным уровнем. oxIL-33 (окисленный IL-33-01) приводил к повышению процентной доли бокаловидных клеток, как и IL-13. Скрипичные графики показывают все точки данных и медиану.

На **фигуре 19С** показаны объединенные данные проточной цитометрии, полученные для культур ALI от здоровых доноров ($n = 6$), которые демонстрируют бокаловидные клетки, одноположительные по Muc5AC. Восстановленный IL-33 (IL-33[C->S]) не приводил к повышению количества бокаловидных клеток по сравнению с исходным уровнем. oxIL-33 (окисленный IL-33-01) приводил к повышению процентной доли бокаловидных клеток, как и IL-13. Скрипичные графики показывают все точки данных и медиану.

На **фигуре 19D** показаны объединенные данные RT-qPCR, полученные для культур ALI от здоровых доноров ($n = 4$), которые демонстрируют кратность изменения уровня мРНК *MUC5AC*. Восстановленный IL-33 (IL-33[C->S]) не приводил к повышению уровня мРНК *MUC5AC*. oxIL-33 (окисленный IL-33-01) приводил к повышению уровня мРНК *MUC5AC*, как и IL-13. Скрипичные графики показывают все точки данных и медиану.

На **фигуре 20А** показано репрезентативное иммуногистохимическое окрашивание базальных (p63+; фиолетовый), реснитчатых (альфа-тубулин; бирюзовый) и бокаловидных

(Muc5ac+Muc5B; желтый) клеток из культур ALI, полученных от здоровых доноров. Восстановленный IL-33 (IL-33[C->S]) не обеспечивал визуального увеличения количества бокаловидных клеток. oxIL-33 (окисленный IL-33-01) приводил к визуальному повышению бокаловидных клеток.

На **фигуре 20B** показана количественная оценка площади mucin5ac+mucin5b (% от общей площади эпителиальной ткани), выполненная посредством иммуногистохимического исследования срезов (минимум $n = 3$ донора на условие) и с использованием программного обеспечения HALO. По сравнению с необработанными и обработанными контрольными восстановленными IL-33, oxIL-33 и IL-13 приводит к увеличению площади окрашивания муцина.

Фигура 21A: демонстрируется репрезентативный контурный график проточной цитометрии с обнаружением бокаловидных клеток в культурах ALI от донора с COPD. Muc5B показан на оси x, а Muc5AC на оси y. Культуры ALI обрабатывали антителами в течение 7 дней. Обработка антителом к IL-33 (33_640087-7B) обеспечивала снижение общего количества бокаловидных клеток. Цифры в квадрантах показывают процентные доли от общей популяции: в верхнем левом квадранте бокаловидные клетки, одноположительные по Muc5AC, в нижнем правом квадранте бокаловидные клетки, одноположительные по Muc5B, и в верхнем правом квадранте бокаловидные клетки, дважды положительные по Muc5AC и Muc5B.

Фигура 21B: показаны объединенные данные проточной цитометрии, полученные для культур ALI от доноров с COPD ($n = 6$), которые показывают общее количество бокаловидных клеток (объединенные бокаловидные клетки, одноположительные по Muc5AC, одноположительные по Muc5B и дважды положительные по Muc5AC и Muc5B). Культуры ALI обрабатывали антителами в течение 7 дней. Обработка антителом к IL-33 (33_640087-7B) обеспечивала снижение общего количества бокаловидных клеток. Скрипичные графики показывают все точки данных и медиану.

Фигура 21C: показаны объединенные данные проточной цитометрии, полученные для культур ALI от доноров с COPD ($n = 6$), которые демонстрируют бокаловидные клетки, одноположительные по Muc5AC. Культуры ALI обрабатывали антителами в течение 7 дней. Обработка антителом к IL-33 (33_640087-7B) обеспечивала снижение количества бокаловидных клеток, одноположительных по Muc5AC. Скрипичные графики показывают все точки данных и медиану.

Фигура 21D: показаны объединенные данные RT-qPCR, полученные для культур ALI от доноров с COPD ($n = 5$), которые демонстрируют кратность изменения уровня мРНК

MUC5AC. Обработка антителом к IL-33 (33_640087-7B) обеспечивала снижение экспрессии *MUC5AC*. Скрипичные графики показывают все точки данных и медиану.

Фигура 21Е: показаны объединенные данные проточной цитометрии, полученные для культур ALI от доноров с COPD ($n = 6$), которые демонстрируют общую жизнеспособность в разных условиях обработки согласно окрашиванию LD-отрицательных клеток.

На **фигуре 22А** показано репрезентативное иммуногистохимическое окрашивание базальных (p63+; фиолетовый), реснитчатых (альфа-тубулин; бирюзовый) и бокаловидных (Muc5ac+MucB; желтый) клеток из культур ALI, полученных от доноров с COPD. Обработка посредством IL-33 (33_640087-7B) в течение 7 дней обеспечивала видимое снижение количества бокаловидных клеток.

На **фигуре 22В** показана количественная оценка площади Muc5ac+Muc5b (% от общей площади эпителиальной ткани), выполненная посредством иммуногистохимического исследования срезов ($n = 4$ донора) и с использованием программного обеспечения HALO. По сравнению с необработанными и обработанными человеческим IgG1 антитела к IL-33 (33-640087_7B) обеспечивали снижение площади окрашивания муцина.

На **фигуре 23А** показано количественное определение Muc5AC в апикальных смывах, полученных из культур ALI от доноров с COPD и здоровых доноров. Уровни Muc5AC превышают уровни в культурах от доноров COPD согласно результатам ELISA Muc5AC.

На **фигуре 23В** показано количественное определение Muc5AC в апикальных смывах, полученных из культур ALI от здоровых доноров. Культуры ALI обрабатывали восстановленным IL-33mut16 (IL-33[C->S]), oxIL-33 и IL-33 дикого типа, что определено посредством ELISA Muc5AC.

На **фигуре 23С** показано количественное определение Muc5AC в апикальных смывах, полученных из культур ALI от доноров с COPD. Клетки обрабатывали контрольными IgG1 человека и мыши (hIgG1 и mIgG1), 33-640087_7B или антителом к ST2. Обработка антителом к IL-33 (33-640087_7B) обеспечивала снижение уровней Muc5AC, что определено посредством ELISA Muc5AC.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Окисленный IL-33 способствует образованию сигнального комплекса между RAGE и EGFR

В Cohen, E. S. et al. Nat. Commun. 6:8327 (2015) заявитель описал открытие окисленной формы IL-33, связанной дисульфидной связью (DSB IL-33), и показал, что такая форма не связывает ST2 и не способна активировать передачу сигнала, зависящую от ST2. В дальнейшем (см. WO 2016156440A1) заявитель показал, 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 клетки эпителия стимулировали с использованием IL-33 в восстановленной или окисленной формах и исследовали сигнальные пути. В данном документе авторы настоящего изобретения показывают, что oxIL-33 является новым лигандом для комплекса рецептора конечных продуктов усиленного гликирования (RAGE) и рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), что приводит к выраженным эффектам 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 (MННННННННННАAGLNDIFEAQKIEWHEAAIEGR 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 аутоиндуцирования (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 IL33-01 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 мМ – в этих условиях загрузки агрегаты связывались с колонкой и мономеры oxIL-33 протекали без связывания и подвергались сбору. Метки отщепляли от oxIL-33 путем инкубации с фактором Ха (NEB, P8010L) в конечной концентрации 1 мкг фактора Ха на 50 мкг oxIL-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 oxIL-33 от других компонентов образца. Фракции, содержащие чистый oxIL-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 С-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 транзientную трансформацию суспензионной культуры клеток CHO, сверхэкспрессирующих EBNA-1, плазмидой с использованием полиэтиленимин в качестве реагента для трансфекции. Кондиционированную среду, содержащую секретиремый 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 mM 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 HEK 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 mM 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 Abcam, 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 1х буфера для лизиса, поставляемого с наборами. Белковые экстракты переносили в пробирки вместимостью 1,5 мл перед освещением 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 стадии 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 IL33-01 (охIL-33) активирует большое количество ключевых сигнальных молекул (фигура 1), 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 охIL-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% 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) без набора добавок). Затем планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ 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 стадии 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 охIL-33 (окисленный IL-33-01) в матричном анализе RTK обеспечивал получение положительного сигнала,

соответствующего таковому, обеспечиваемому рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) (фигура 2).

Способность oxIL-33 (окисленный IL-33-01) стимулировать передачу сигналов EGFR была подтверждена дополнительными способами. При активации EGFR фосфорилируется по Tyr1068, 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% CO₂ 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% CO₂ 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% CO₂ 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 mM 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 $5 \times 10^5/100$ 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. Клетки стимулировали возрастающими концентрациями IL-33-01, IL-33-16 и oxIL-33-01 (синоним окисленного IL-33-01), лигандов EGFR и лигандов RAGE (таблицы 2 и 3) до помещения обратно в инкубатор с 37°C, 5% CO₂ 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.

Как в клетках NHBE, так и в клетках A549 охIL-33 способствовал фосфорилированию EGFR аналогично истинному агонисту EGF (фигура 3). 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 охIL-33 (окисленный IL33-01), 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 охIL-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-33-01 обеспечивал активацию нескольких компонентов передачи сигнала посредством EGFR (фигура 4).

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 предотвращения 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 x 10⁵/100 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 планшеты 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 фосфо-STAT5 ELISA (85-86112-11, ThermoFischer Scientific) и проявляли в соответствии с инструкциями производителя перед измерением оптической плотности при 450 нМ. На фигуре 5 показано, что клетки, активированные с помощью oxIL-33-01, демонстрируют фосфорилирование STAT5, уровень которого снижается в присутствии антитела к EGFR (фигура 5).

Пример 2. Окисленный IL-33 индуцирует образование комплекса между EGFR и RAGE

9. OxIL-33 индуцирует образование комплекса между EGFR и RAGE

Чтобы понять, как RAGE и EGFR участвуют в способствовании передаче сигнала посредством oxIL-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.

NHBE получали от Lonza (CC-2540) и замороженное содержимое флаконов высевали непосредственно в чашки с диаметром 15 см (Thermo, 157150) из расчета 1 x 10⁶ 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 окисленного IL-33-01 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 (Abcam, 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 продуктом 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 помещением на хранение при -20°C. Далее образцы анализировали посредством метода 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 oхIL-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 стимулирования	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 6). Эти данные показывают, что RAGE и EGFR являются функциональной частью окисленного сигнального комплекса IL-33.

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

Описанные выше эксперименты показали, что oxIL-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 oxIL-33 лигандом, который непосредственно связывается либо с RAGE, либо с EGFR. Чтобы больше узнать об образовании сигнального комплекса и оценить, взаимодействует ли oxIL-33 непосредственно с EGFR, использовали формат ELISA для исследования связывания oxIL-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 oxIL-33 демонстрировал четкое наличие взаимодействия с

RAGE (фигура 7A), тогда как непосредственное связывание oxIL-33 с EGFR было незначительным (фигура 7B). Связывание EGFR с oxIL-33 наблюдали только при добавлении sRAGE к смеси в данном анализе (фигура 7B). Это нельзя было бы повторить, если бы oxIL-33 был заменен известным агонистом RAGE, HMGB1 (фигура 7B).

Необходимость RAGE для передачи сигнала посредством EGFR, запускаемой oxIL-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 2×10^5 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-луночный планшет. Клетки подпитывали каждые 3-5 дней кондиционированной средой. Когда конфлюентность 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% конфлюентности 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 6x 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 QIAquick PCR purification kit (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 α IL-33 передачи сигнала посредством EGFR, затем проводили иммунопреципитацию и вестерн-блоттинг на клетках A549 и RAGE-дефицитных клетках A549. Если вкратце, линии клеток активировали в различные моменты времени (0-15 минут) с помощью α IL-33-01. 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 α IL-33 и EGFR (фигура 8).

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 α IL-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 планшеты 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 фосфо-STAT5 ELISA (85-86112-11, ThermoFischer Scientific) и проявляли в соответствии с инструкциями производителя перед измерением оптической плотности при 450 нМ. На фигуре 9 показано, что клетки, активированные с помощью oxIL-33-01, демонстрируют фосфорилирование STAT5, которое снижается в присутствии антитела к RAGE, но не антитела к ST2 (фигура 9).

Пример 3. OxIL-33 запускает интернализацию EGFR в эпителиальных клетках

Затем исследовали, вызывает ли oxIL-33 изменения в динамике EGFR по сравнению с EGF.

12. Конфокальные эксперименты по интернализации EGF

Данный эксперимент направлен на изучение динамики EGFR в клетках эпителия после стимуляции посредством EGF, восстановленных или окисленных форм IL-33 с применением конфокальной визуализации. Клеточную линию эпителия EGFR-GFP A549 (Sigma, CLL1141-1VL) высевали в концентрации 20000 клеток/мл (среда RPMI + 10% FCS + пенициллин/стрептомицин), 1 мл на 24-луночный планшет со стеклянным дном (Greiner, 662892). Рецептор EGF, связанный с зеленым флуоресценцентным белком (GFP), позволяет отслеживать динамику и интернализацию мембраны EGFR. Клетки однократно промывали PBS и инкубировали в среде RPMI (без FCS). Через 24 часа голодания клетки промывали RPMI и инкубировали с 0,5 мл среды RPMI с красителем CellMask (Invitrogen C10046) темно-красный в разведении 1:5000. Клетки кратковременно окрашивали с помощью красителя CellMask перед обработкой для маркировки мембран и проводили визуализацию в режиме реального времени сразу после обработки в конфокальном режиме со скоростью 1 кадр/мин для записи динамики EGFR-GFP. Клетки окрашивали при 37°C в течение 5 минут, один раз промывали PBS и стимулировали посредством oxIL-33 (окисленным IL-33-01) или IL-33-16 в концентрации 200 нг/мл в 0,5 мл бесывороточной RPMI/лунка. Конфокальные изображения получали немедленно, 40-кратный объектив с масляной иммерсией, 1 мин/кадр, 5 комплексов с интервалом 2 мкм в течение 25 минут (приблизительно через 30 минут после добавления белков). Разрывный (пунктирный) рисунок сигнала GFP указывает на кластеризацию рецептора на мембране и интернализацию. Гистограммы интенсивности пикселей области мембраны (маскированной красителем CellMask) и внутриклеточной области (маскированной инвертированным красителем CellMask, не показано) получали в разные моменты времени при визуализации в режиме реального времени, которые показывают истощение EGFR в некластеризованной области (сдвиг влево пиков колоколообразной формы гистограммы) и увеличение количества насыщенных пикселей (интенсивность 255), вызванное

кластеризацией. *oxIL-33* индуцировал кластеризацию и интернализацию рецептора EGF, хотя стимуляция EGF приводила к наиболее очевидной кластеризации EGFR. И напротив, восстановленная форма IL-33 (IL-33-16) не продемонстрировала существенных изменений в отношении распределения клеток EGFR (фигура 10).

Пример 4. OxIL-33 индуцирует секрецию IL-8 эпителиальными клетками подобно EGF

13. Селективная секреция IL-8 с помощью oxIL-33

Бронхиальные эпителиальные клетки человека от здоровых субъектов (NHBE; Lonza CC-2540) и пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (COPD) (DHBE; Lonza 00195275) выращивали в полной среде BEGM (Lonza) в соответствии с протоколом производителя в течение одного месяца со сменой среды один раз в три дня до достижения клетками конfluence. Клетки собирали с использованием аккутазы и высевали в количестве $5 \times 10^5/100$ мкл в 96-луночный планшет (Corning 3596) 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 стимуляцией отдельно средой (контроль без стимулирования), с помощью 30 нг/мл восстановленного IL-33-01, 30 нг/мл окисленного IL-33-01 или 30 нг/мл EGF и возвращали в условия 37°C, 5% CO₂. Через 24 часа после стимуляции супернатант собирали и оценивали в отношении продуцирования хемокинов с использованием мультиплексного анализа (Mesoscale Discovery K15047D-2). На фигуре 11 показано, что NHBE и DHBE демонстрируют 4-кратное повышение секреции IL-8 при активации *oxIL-33* по сравнению с нестимулированными клетками (отдельно среда). Для других хемокинов (TARC, MIP-1a, MIP1b, MCP4, MCP1, IP10, эотаксин, эотаксин-3, MDC – данные не представлены) существенных отличий не выявляли.

Пример 5. OxIL-33 обеспечивает ухудшение отклика заживления раны, представляющей собой царапину, в монослойных культурах эпителиальных клеток при глубинном культивировании

14. oxIL-33 обеспечивает ухудшение застания раны в виде царапины в клетках A549 и NHBE, в отличие от EGF

A549 получали от 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 2х 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-33-01, 30 нг/мл окисленного IL-33-01 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.

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 5×10^5 /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 2х 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-33-01, 30 нг/мл окисленного IL-33-01 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. На фигуре 12 показано, что oxIL-33 подавлял заживление ран в культурах клеток A549 (фигура 12А) и клеток NHBE (фигура 12В) с глубинным культивированием, оказывая эффект, противоположный эффекту EGF, где наблюдается повышенная плотность клеток раны.

15. 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 охIL-33 опосредованы RAGE/EGFR, в клетках NHBE проводили скретч-тест, как описано в разделе 14, 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). ОхIL-33, в отличие от восстановленного IL-33, подавляет застание царапин. Этот эффект охIL-33 устраняется с помощью антитела к RAGE и к EGFR, но не антитела к ST2, что снова демонстрирует, что RAGE и EGFR являются важными рецепторами, вовлеченными в пути передачи сигнала посредством окисленного IL-33 (фигура 13).

Пример 6. Антитело к IL-33 улучшает фенотип клеток COPD в глубинных культурах

16. ОхIL-33 может приводить к реакции, подобной при COPD, у здоровых NHBE в скретч-тесте

Затем исследовали влияние окисленного IL-33 на бронхиальные эпителиальные клетки здоровых, курильщиков и пациентов с COPD. NHBE (CC-2540), NHBE от курильщиков (CC-2540) и DHBE (COPD, 00195275) получали от Lonza и поддерживали в полных средах BEGM (Lonza) в соответствии с протоколом производителя. Скретч-тест проводили так, как это описано в разделе 14. Клетки обрабатывали отдельно средой (нестимулированный контроль) или 30 нг/мл окисленного IL-33. Клетки эпителия бронхов курильщиков или пациентов с COPD продемонстрировали нарушенную способность к закрытию царапины по сравнению с клетками здоровых субъектов, что было сопоставимо с нарушением, наблюдаемым после обработки здоровых клеток посредством охIL-33 (фигура 14). В отличие от здоровых клеток, охIL-33 дополнительно не нарушал реакцию закрытия царапины в клетках НВЕ курильщика и пациента с COPD (фигура 14).

17. Блокирование эндогенного IL-33 посредством пути RAGE/EGFR может улучшить фенотип нарушенного заживления раны, представляющей собой царапину, базальными клетками COPD

Поскольку известно, что эпителиальные клетки продуцируют IL-33, возможно, что аутокринная секреция IL-33 может объяснить фенотип нарушенного восстановления царапины, наблюдаемый в клетках COPD. С целью исследования проводили скретч-тест в клетках эпителия бронхов от COPD в присутствии нейтрализации IL-33. NHBE (Lonza CC-2540) и DHBE (Lonza, COPD 00195275) поддерживали в полной среде BEGM (Lonza) 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 дважды промывали 200 мкл PBS перед добавлением среды BEBM (Lonza) с добавлением 0,1% FBS (об./об.) и 1% (об./об.) пенициллина/стрептомицина, содержащей 10 мкг/мл антитела к IL-33 (33_640087-7B, описанного в WO2016/156440), антитела к ST2 (AF532, R&D Systems), антитела к RAGE (M4F4, WO 2008137552) или NIP228 (изотипический контроль IgG1), и возвращали к условиям 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 наблюдалось ранее, у клеток, полученных от доноров с COPD, была нарушена реакция закрытия царапины по сравнению с клетками, полученными от здоровых субъектов. Антитела к IL-33 и антитела к RAGE, но не антитела к ST2, были способны улучшать реакцию закрытия царапины в клетках от доноров COPD до уровня, сопоставимого со здоровыми клетками (фигура 15), демонстрируя, что эпителиальные клетки продуцируют аутокринный IL-33, который обеспечивает передачу сигналов посредством пути RAGE/EGFR (фигура 15).

Пример 7. Антитело к IL-33 обеспечивает снижение количества бокаловидных клеток в 3D-культурах эпителиальных клеток

18. Культура базальных клеток дыхательных путей на основе границы раздела воздушной и водной сред (ALI)

Затем авторы настоящего изобретения определяли релевантность передачи сигнала IL-33 в культурах клеток на границе раздела воздушной и водной сред (“культуры ALI”). Культивирование ALI представляет собой метод, при котором базальные клетки выращивают таким образом, что их базальные поверхности находятся в контакте со средой, а верхний (апикальный) клеточный слой контактирует с воздухом. Культивирование ALI обеспечивает развитие трехмерной клеточной структуры *in vitro* с мукоцилиарным фенотипом псевдомногослойного эпителия, сходного с эпителием трахеи. Таким образом,

культуры ALI можно использовать для изучения фундаментальных аспектов в отношении респираторного эпителия, таких как передача сигнала между клетками, моделирование заболеваний и регенерация дыхательных путей.

Криопробирки с замороженными базальными клетками легких от здоровых контрольных пациентов или пациентов с COPD получали от Университета Северной Каролины и Университета Питтсбурга. Клетки оттаивали и помещали в колбу T-75, покрытую коллагеном Purecol Type I Bovine Collagen (Advanced BioMatrix, Сан-Диего, Калифорния), разбавленным 1:70 в 1X PBS (Gibco, Уолтем, Массачусетс), и выращивали в среде EpiX (276-201, Propagenix, Роквилл, Мэриленд). После достижения конfluence эти клетки однократно разделяли на соответствующее количество колб T-75 перед сбором для культуры ALI. Трансвелы для культуры ALI, содержащие 12 мм полиэфирные мембранные вкладыши с диаметром пор 0,4 мкм (Costar, Corning, Нью-Йорк), подготавливали путем покрытия вкладышей раствором Purecol 1:70 и инкубации при 37°C в течение 1-16 часов. Раствор Purecol удаляли, трансвелы помещали под УФ-освещение на 30 минут, а затем промывали PBS. Базальные клетки в колбах T-75 отделяли с использованием 4 мл раствора трипсина (ThermoFisher, 15400054). Клеточную суспензию добавляли в 50 мл пробирку, содержащую 5 мл FBS, а затем подсчитывали на счетчике ViCell (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния) и центрифугировали при 1000 об./мин в течение 5 минут. Затем клетки ресуспендировали в среде Pneumacult ALI (Stemcell Tech, Ванкувер, Британская Колумбия) с плотностью $3,57 \times 10^5$ /мл и по 700 мкл распределяли на каждый трансвел. В пространство под вкладышем добавляли 1 мл среды ALI. Клетки оставляли погруженными в среду ALI до образования конfluence и плотных контактов (как правило, 7 дней), после чего среду удаляли с апикальной стороны и для дифференцировки клетки культивировали еще в течение 2 недель со сменой среды на базальной стороне через день. Полностью дифференцированные культуры обрабатывали без добавления антитела, посредством добавления 1 мкг/мл антитела к IL-33 (33_640087-7B) или 1 мкг/мл NIP228 (изотипического контроля IgG1) в течение 7 дней путем добавления средств для обработки в среду, подаваемую к базальной стороне культуры. Среду заменяли через день (содержащую соответствующие средства для обработки).

19. Тройное иммуногистохимическое (ИНС) окрашивание (базальные, бокаловидные и реснитчатые клетки) и количественный анализ

Культуры ALI от доноров с COPD получали и обрабатывали так, как это описано в разделе 18. Культуры эпителиальных клеток ALI фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов и заливали парафином. Парафиновые срезы (4 мкм)

помещали на положительно заряженные предметные стекла и окрашивали на приборе Ventana Discovery Ultra с помощью последовательного тройного хромогенного анализа. Демаскирование антигена выполняли посредством клеточного кондиционера 1 (CC1) (кат. № 5424569001, Roche), а эндогенную пероксидазу блокировали ингибитором Discovery (кат. № 7017944001, Roche) в течение 12 мин. Антитело к p63 (клон 4A4) (кат. № 790-4509, Roche, Базель, Швейцария) наносили на 24 мин при 36°C, и визуализировали с использованием мышиного антитела к HQ (12 мин) (кат. № 7017782001, Roche) и антитела к HQ HRP (12 мин) (кат. № 7017936001, Roche), и инкубировали в субстрате Teal (кат. № 8254338001, Roche) в течение 12 мин. Предметные стекла обрабатывали на стадии денатурации антител (100°C в течение 24 мин) с клеточным кондиционером 2 (CC2) (кат. № 5424542001, Roche), а затем антитело к тубулину (кат. № ab24610, Abcam, Кембридж, Великобритания), разбавленным до 0,01 мкг/мл с использованием Dako Antibody Diluent (кат. № S3022) в течение 16 мин, и детектировали с использованием мышиного OmniMap-HRP (8 мин) (кат. № 5269652001, Roche), и визуализировали с использованием субстрата Discovery Purple (кат. № 7053983001, Roche) в течение 16 мин. Предметные стекла обрабатывали с дополнительной денатурацией антител с использованием CC2, а затем смесь из кроличьего антитела к муцину 5AC 1,1 мкг/мл и кроличьего антитела к муцину 5B 7 мкг/мл (кат. № ab198294 и кат. № ab87376, Abcam соответственно) наносили на 20 минут и визуализировали с использованием кроличьего антитела к NP (4 мин) (кат. № 7425317001, Roche), антитела к NP-AP (8 мин) (кат. № 7425325001, Roche) и затем Discovery Yellow (кат. № 7698445001, Roche) в течение 20 мин. Окрашенные предметные стекла промывали детергентом Dawn, контр-окрашивали гематоксилином (кат. № 5277965001, Roche), промывали, обезвоживали в возрастающих концентрациях этанола и ксилола и помещали в среду для заливки. Количественная оценка с применением программного обеспечения HALO показала уменьшение количества бокаловидных клеток в культуре ALI, полученной от здоровых доноров, которых подвергали обработке посредством IL-33 (фигура 16).

Пример 8. Антитело к IL-33 обеспечивает регуляцию муцинов в 3D-культурах эпителиальных клеток при COPD и улучшают транспорт слизи

20. Двойное иммуногистохимическое (IHC) иммунофлуоресцентное (IF) окрашивание (муцин 5B + муцин 5AC)

Культуры ALI от доноров с COPD получали и обрабатывали так, как это описано в разделе 18. Культуры эпителиальных клеток ALI фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов и заливали парафином. Парафиновые срезы (4 мкм) помещали на положительно заряженные предметные стекла и окрашивали на приборе

Ventana Discovery Ultra с помощью последовательного двойного иммунофлуоресцентного анализа. Демаскирование антигена проводили с использованием клеточного кондиционера 1 (CC1), а эндогенную пероксидазу блокировали ингибитором Discovery в течение 12 мин, и блокировали в течение 8 мин с использованием S Block (RUO) Roche Diagnostics (кат. № 760-4212), и инкубировали с антителом к муцину 5B, используя его в концентрации 7 мкг/мл при разбавлении в Dako Ab Diluent, S3022, в течение 24 мин при 36°C, и детекцию выполняли с использованием кроличьего антитела к HQ (Roche Diagnostics, кат. № 760-4815) в течение 4 мин и антитела к HQ-HRP (Roche Diagnostics, кат. № 760-4820) в течение 8 мин. Затем образцы инкубировали с Discovery FITC, конъюгатом с тирамидом (Roche Diagnostics, кат. № 760-232) в течение 8 мин. Dual Sequence выбирали в программе Discovery Ultra, и образцы обрабатывали на стадии денатурации антител (100°C в течение 24 мин) с клеточным кондиционером 2 (CC2), а затем нейтрализовали ингибитором Discovery (40°C, 24 мин) перед нанесением антитела к муцину 5AC, 1,1 мкг/мл, в течение 20 мин при 36°C. Муцин 5AC обнаруживали с использованием кроличьего антитела к HQ (Roche Diagnostics, кат. № 760-4815) в течение 4 мин и антитела к HQ-HRP (Roche Diagnostics, кат. № 760-4820) в течение 8 мин и визуализировали с использованием Discovery Red610, конъюгата с тирамидом, в течение 8 мин. После завершения данной стадии окрашенные предметные стекла извлекали из автостейнера Discovery Ultra Autostainer и промывали детергентом Dawn, а затем деионизированной водой. Образцы инкубировали в 4',6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлориде (флуоресцентный краситель DAPI), кат. № D1306 ThermoFisher, разведенном в деионизированной воде в концентрации 1 мкг/мл, в течение 2 мин. Образцы промывали деионизированной водой, накрывали и фиксировали покровным стеклом с использованием заливочной среды ProLong Gold Antifade (ThermoFisher, кат. № P36930) и хранили в светонепроницаемом контейнере для предметных стекол. Окрашенные срезы визуализировали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Уайт-Плейнс, Нью-Йорк). На фигуре 17 показано, что обработка культур ALI антителом к IL-33 может привести к снижению продуцирования различных муцинов в культурах COPD.

21. Антитело к IL-33 устраняет нарушение мукоцiliaryного клиренса, наблюдаемое в культурах ALI COPD

Культуры ALI от доноров с COPD получали и обрабатывали так, как это описано в разделе 18. 30 мкл 0,2 мкМ FluoSpheres (ThermoFisher, F8811), разбавленных 1:33 в PBS, затем наносили со стороны апикальной поверхности, и с помощью микроскопа Zeiss LSM800 получали короткие видеоролики движения FluoSphere, которое показывает, что

мукоцилиарный транспорт увеличивается после обработки антителом к IL-33 (33_640087-7B), но не контрольным антителом.

Пример 9. Анализ РНК отдельных клеток культур ALI показывает изменения в отношении бокаловидных клеток после обработки антителом к IL-33

Культуры ALI от доноров с COPD получали и обрабатывали так, как это описано в разделе 18. Для получения суспензии одиночных клеток фильтр-вкладыш инкубировали с 0,25% трипсином в течение 5 мин при 37°C. Клетки эпителия осторожно отделяли от фильтра, промывая PBS с помощью пипетирования вверх и вниз, а затем переносили в пробирку Falcon объемом 15 мл. Клетки центрифугировали при 1000 об./мин в течение 5 мин при 4°C. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в 0,4% BSA в PBS и концентрацию клеток доводили до 1000 клеток/мкл для секвенирования. Суспензию клеток загружали в соответствии со стандартным протоколом к набору Chromium single cell 3' для захвата от 5000 до 10000 клеток/канал. Использовали Version 2 chemistry. Библиотеки Single cell 3' для секвенирования Illumina получали в соответствии с протоколом производителя (Chromium™ Single Cell 3' Reagent Kit, v2 Chemistry). Оценивали качество библиотек (TapeStation 4200, Agilent), а затем их секвенировали на приборах NextSeq 500 или NovaSeq 6000 (Illumina). Первичную обработку данных выполняли с использованием программного конвейера Cell Ranger версии 2.0 (10x Genomics). Постобработку выполняли с использованием пакета Seurat для исключения низкого качества клеток и нормализации. Каждый образец анализировали как независимые данные, чтобы зафиксировать неоднородность в пределах образца (субтипирование клеток). Кластеризацию и визуализацию реализовывали с помощью метода нелинейного снижения размерности и визуализации многомерных переменных (tSNE). Идентификацию клеточных кластеров при COPD проводили по маркерным генам. Для других образцов исходные кластеры проверяли вручную, затем для идентификации подтипа применяли алгоритм Seurat's Label Transfer. Анализ экспрессии генов MUC5AC и MUC5B осуществляли для каждого кластера между клетками из культур ALI COPD с обработкой антителом к IL-33 и без нее, как указано в разделе 18. Построение тепловых карт и графиков tSNE осуществляли с помощью Seurat. На фигуре 18 показаны графики tSNE, иллюстрирующие различные доли подтипов клеток, которые обнаружены в культурах ALI, обработанных антителом к IL-33 (33_640087-7B), по сравнению с отсутствием обработки. На фигуре 18 показано, что после обработки антителом к IL-33 отмечалось снижение количества клеток с высоким уровнем MUC5B.

Пример 10. Антитело к IL-33 обеспечивает снижение количества бокаловидных клеток в 3D-культурах эпителия от донора с COPD

22. Культура базальных клеток дыхательных путей на основе границы раздела воздушной и водной сред (ALI)

Для количественной оценки и подробного исследования эффектов охIL-33 в физиологически релевантной системе культивирования на основе границы раздела воздушной и водной сред (ALI) выполняли проточную цитометрию, направленную на различение типов бокаловидных клеток (MUC5ac против MUC5b) и остальных популяций эпителия (муцин-отрицательные).

Криопробирки с замороженными базальными клетками легких от здоровых (CC-2540) контрольных людей или от пациентов с COPD (195275) получали от Lonza. Одну пробирку на донора размораживали и помещали в колбы 4х Т-175 в среду Epiх Media (276-201, Progenix, Роквилл, Мэриленд). После достижения конfluence эти клетки замораживали в количестве 1е6 клеток на флакон в пассаже P2. Клетки в P2 индуцировали в 2х Т-75 колбах в среде Epiх и выращивали до 80% конfluence. Трансвелы для культуры ALI, содержащие 12 мм или 6,5 мм полиэфирные мембранные вкладыши с диаметром пор 0,4 мкм (Costar, Corning, NY), подготавливали путем покрытия вкладышей 1х раствором коллагена I (Celladhere™ Collagen I – Stemcell #07001, приготовленным в бидистиллированной H₂O) и инкубировали при 37°C в течение 1-16 часов. Раствор коллагена I удаляли, а трансвелы промывали посредством PBS. Базальные клетки в колбах Т-75 промывали посредством PBS и отслаивали с применением 6 мл раствора трипсина (набор для трипсинизации субкультур клеток от Lonza - кат. № CC-5034). Трипсин нейтрализовали посредством 6 мл раствора для нейтрализации трипсина (набор для трипсинизации субкультур клеток от Lonza - кат. № CC-5034), и клеточную суспензию добавляли в пробирку на 15 мл, подсчитывали клетки и центрифугировали пробирку со скоростью 1200 об./мин в течение 5 минут. Затем клетки ресуспендировали в среде Pneumacult ALI (Stemcell Tech, Ванкувер, Британская Колумбия) с плотностью 8×10^5 /мл и вносили по 0,5 мл на каждый 12 мм трансвел и по 0,25 мл на каждый 6,5 мм трансвел. 1 мл среды ALI добавляли в пространство под вкладышем 12 мм и 0,5 мл под вкладышем 6,5 мм. Клетки оставляли погруженными в среду ALI до образования конfluence и плотных контактов (как правило, 7 дней), после чего среду удаляли с апикальной стороны и для дифференцировки клетки культивировали еще в течение 3 недель со сменой среды на базальной стороне каждые понедельник, среду и пятницу. Полностью дифференцированные культуры от здоровых людей оставляли необработанными или

обрабатывали восстановленным или окисленным немеченым IL33-01 (30 нг/мл), немеченым IL33-16 (30 нг/мл), IL-13 (10 нг/мл), EGF (30 нг/мл) или HMGB1 (30 нг/мл) в течение 7 дней путем добавления средств для обработки в среду, подаваемую к базальной стороне культуры (7-дневные обработки). Полностью дифференцированные культуры COPD оставляли необработанными или обрабатывали 1 мкг/мл антитела к IL-33 (33_640087-7B), 1 мкг/мл NIP228 (изотипического контроля IgG1), 10 мкг/мл mNIP228, 10 мкг/мл антитела к ST2, 1 мкг/мл антитела к RAGE или 1 мкг/мл антитела к EGFR в течение 7 дней путем добавления видов обработки в среду, подаваемую к базальной стороне культуры. Замену среды проводили каждые понедельник, среду и пятницу (содержащую соответствующие средства для обработки).

Таблица 6

Антитело	Идентификатор
hIgG1	NIP228_ SP14-266
Антитело к IL-33 (33_640087-7B)	SP15-124
mIgG1	mNIP228_ SP14-108
Антитело к ST2	Ab1440361
Антитело к RAGE	M4F4
Антитело к EGFR	LA1 (Merk, 05-101)

23. FACS-анализ бокаловидных клеток в культурах ALI

После 7-дневной обработки (таблица 6) 4-недельные контрольные культуры от здоровых людей или культуры ALI COPD на вкладышах диаметром 6,5 мм анализировали посредством проточной цитометрии. 200 мкл PBS при 37°C добавляли к апикальной области (поверхность трансвела) каждого трансвела и помещали в инкубатор на 30 мин. Апикальный смыв хранили при -80°C для анализа муцина. 150 мкл трипсина (набор для трипсинизации субкультур клеток от Lonza - кат. № CC-5034) добавляли как в апикальный, так и в базолатеральный (под трансвел) компартменты. Трансвелы помещали обратно в инкубатор на 30 мин. ALI диссоциировали посредством осторожного пипетирования трипсина вверх и вниз. В каждую апикальную камеру добавляли 150 мкл раствора, нейтрализующего трипсин (набор для трипсинизации субкультур клеток от Lonza - кат. № CC-5034), и перемешивали. Суспензию клеток переносили в 96-луночный планшет с U-образным дном лунок, подсчитывали клетки и центрифугировали при 1200 об./мин при 4°C в течение 5 мин. Трипсин/TNS удаляли и в каждую лунку добавляли 200 мкл красителя для

оценки жизнеспособности (eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780 Thermo 65-0865-14, разбавленный 1:2000 в PBS). Клетки ресуспендировали и инкубировали 10 мин на льду в темноте. Планшет центрифугировали при 1200 об./мин при 4°C в течение 5 мин, краситель для оценки жизнеспособности удаляли и в каждую лунку добавляли 200 мкл PBS. Планшет центрифугировали при 1200 об./мин при 4°C в течение 5 мин, удаляли PBS и заменяли его 200 мкл раствора для фиксации/пермеабиллизации (Thermo 00-5123 и 00-5223). Планшет инкубировали 40 мин на льду в темноте. Планшет центрифугировали при 1200 об./мин при 4°C в течение 5 мин и раствор удаляли. Клетки ресуспендировали в 300 мкл 1x раствора для пермеабиллизации (Thermo 00-8333). Клетки в количестве 5e4 из каждой лунки добавляли в новый 96-луночный планшет с U-образным дном лунок, центрифугировали при 1200 об./мин при 4°C в течение 5 мин и клетки ресуспендировали в 50 мкл 1x раствора для пермеабиллизации. 50 мкл смеси антител для окрашивания (антитело к Muc5AC в разведении 1:400 и антитело к Muc5B в разведении 1:800) или смеси изотипов для окрашивания в тех же разведениях. Планшет инкубировали в течение 30 мин на льду в темноте. Планшет центрифугировали при 1200 об./мин при 4°C в течение 5 мин и раствор удаляли. Клетки промывали посредством PBS, центрифугировали и затем ресуспендировали в 150 мкл PBS. Затем получали данные на BD FACSymphony™ и анализировали их с использованием программного обеспечения FlowJo.

Таблица 7

Название	Идентификатор	Поставщик	Флуорофор	Клеточный маркер
Антитело к Muc5AC	ab3649	Abcam	Меченое AF488 (Expedeon, 332-0005)	Бокаловидные клетки
Антитело к Muc5B	ab105460	Abcam	Меченое AF647 (Expedeon, 336-0005)	Бокаловидные клетки
Изотип AF488	400109	BioLegend	FITC	Изотип
Изотип AF647	400130	BioLegend	AF647	Изотип

24. qPCR/секвенирование суммарной РНК, полученной из культур ALI

После 7-дневной обработки (таблица 6) 4-недельные контрольные культуры от здоровых людей или культуры ALI COPD на вкладышах диаметром 6,5 мм лизировали для анализа РНК. Первые 200 мкл PBS при 37°C добавляли к каждой апикальной поверхности ALI и

планшеты помещали обратно в инкубатор на 30 мин. Апикальный смыв хранили при -80°C для анализа муцина. Набор для выделения общей РНК MagMAX™-96 (Thermo, AM1830) использовали для лизиса культур ALI и выделения РНК. Затем РНК использовали для синтеза кДНК с применением набора High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Thermo, 4388950). При этом 9 мкл каждого образца РНК инкубировали с 10 мкл 2X буфера RT Buffer Mix и 1 мкл 20X реагента RT Enzyme Mix в пробирках для ПЦР (Thermo, AM12230), помещали в амплификатор и инкубировали при 37°C в течение 60 минут. Реакцию останавливали нагреванием до 95°C в течение 5 минут и выдерживанием при 4°C . В каждую пробирку, содержащую 20 мкл кДНК, добавляли 60 мкл воды, свободной от нуклеаз (Thermo, 750024). Для выполнения RT-qPCR 4 мкл кДНК добавляли в 384-луночные планшеты прозрачные реакционные планшеты MicroAmp™ EnduraPlate™ Optical 384-Well Clear Reaction со штрих-кодом (Thermo 4483273) с 5 мкл TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo, 4444557), и 0,5 мкл зонда Muc5AC FAM (Thermo, Hs01365616_m1), и 0,5 мкл зонда GAPDH VIC (Thermo, Hs02786624_g1). Планшеты запечатывали и кратковременно центрифугировали перед анализом с использованием системы для ПЦР в режиме реального времени QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo). Затем рассчитывали дельта-дельта-с_t путем нормализации данных относительно необработанного контроля от здорового пациента.

охIL-33, в отличие от восстановленного IL-33, приводит к увеличению количества бокаловидных клеток, в частности субпопуляции бокаловидных клеток MUC5AC⁺ (фиг. 19A-C). Соответственно, количество копий мРНК *MUC5AC* возрастало при обработке охIL-33, исходя из результатов количественной ПЦР (фиг. 19D).

25. Тройное иммуногистохимическое (ИНС) окрашивание (базальные, бокаловидные и реснитчатые клетки) и количественный анализ

Затем выполняли количественный анализ изображений, полученных после иммуногистохимического окрашивания ALI. Культуры ALI от доноров с COPD получали и обрабатывали так, как это описано в разделе 22; культура на основе границы раздела воздушной и водной сред (ALI) базальных клеток дыхательных путей. Культуры эпителиальных клеток ALI фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов и заливали парафином. Парафиновые срезы (4 мкм) помещали на положительно заряженные предметные стекла и окрашивали на приборе Ventana Discovery Ultra с помощью последовательного тройного хромогенного анализа. Демаскирование антигена выполняли посредством клеточного кондиционера 1 (Ultra CC1) (кат.

№ 5424569001, Roche), а эндогенную пероксидазу блокировали ингибитором Discovery (кат. № 7017944001, Roche) в течение 12 мин. Антитело к p63 (клон 4A4) (кат. № 790-4509, Roche, Базель, Швейцария) наносили на 24 мин и визуализировали с использованием мышиного антитела к HQ (12 мин) (кат. № 7017782001, Roche) и антитела к HQ HRP (12 мин) (кат. № 7017936001, Roche) и инкубировали с компонентами набора Discovery Purple (кат. № 07053983001, Roche) в течение 12 мин. Предметные стекла обрабатывали на стадии денатурации антител (92°C в течение 24 мин) посредством клеточного кондиционера 2 (Ultra CC2) (кат. № 5424542001, Roche), а затем антителом к тубулину (кат. № ab24610, Abcam, Кембридж, Великобритания), разбавленным Dako Antibody Diluent (кат. № S3022), в течение 16 мин (концентрация на предметном стекле 0,003 мкг/мл), и детектировали посредством мышиного OmniMap-HRP (8 мин) (кат. № 5269652001, Roche), и визуализировали с использованием набора Discovery Teal HRP (кат. № 82544338001, Roche). Предметные стекла подвергали дополнительной денатурации антител с использованием CC2, а затем на 20 минут наносили смесь из кроличьего антитела к муцину 5AC 1,1 мкг/мл (концентрация в дозаторе) и антитела к муцину 5B 7 мкг/мл (концентрация в дозаторе) (Abcam, кат. № ab198294 и кат. № ab87376 соответственно), и визуализировали с использованием кроличьего антитела к NP (4 мин) (кат. № 7425317001, Roche), антитела к NP-AP (8 мин) (кат. № 7425325001, Roche), а затем набора Discovery Yellow (кат. № 7698445001, Roche) в течение 20 мин. Окрашенные предметные стекла контр-окрашивали гематоксилином II (8 мин) (кат. № 5277965001, Roche) и реагентом Blueing (4 мин) (кат. № 5266769001, Roche), промывали моющим средством для посуды, обезвоживали в возрастающих концентрациях этанола и ксилола и помещали в среду для заливки.

Изображения, полученные при ИНС-окрашивании, анализировали в программе HALO v3.1 (Indica Labs), где их сначала описывали вручную, чтобы исключить не включенные в фокус области и поврежденные ткани. Классификатор на основе алгоритма случайного леса обучали распознавать эпителий и отделять его от трансмембранного фона и фона предметного стекла. Для количественной оценки площади ресничек другой классификатор на основе алгоритма случайного леса обучали грубой детекции окрашивания тубулином с последующей точной детекцией с использованием алгоритма Area Quantification v2.1.7. Для количественной оценки площади муцина с целью детекции окрашивания использовали непосредственно Area Quantification v2.1.7. Для подсчета базальных (p63+) клеток использовали алгоритм CytoNuclear 2.0.9 для разделения клеток на основе окрашивания ядер, а затем базальные клетки выявляли путем подсчета p63-положительных ядер. Все

методики количественной оценки валидировали на соответствие распознаванию человеком и они характеризовались точностью более 90%.

В соответствии с предыдущими выводами охIL-33 оказывал значительное влияние на количество бокаловидных клеток (MUC5ac+b) (фиг. 20А и 20В).

Вместе данные исследования показали роль охIL-33 в стимуляции дифференцировки бокаловидных клеток в эпителии легких. Это свидетельствует о том, что эпителий, который в течение продолжительного периода подвергается воздействию ох-IL33, развивается в сторону бокаловидного гиперплазированного фенотипа, который отрицательно влияет на функцию легких.

26. Обращение бокаловидного фенотипа COPD посредством блокирующих средств

Важным признаком COPD является избыток слизи из-за увеличения количества бокаловидных клеток и секреции слизи (Gohy et al. 2019 Sci Rep 9:17963). Для исследования того, может ли окисленный IL-33 играть непосредственную роль в формировании бокаловидного фенотипа COPD, получали культуры ALI от доноров COPD с показателями, описанными в разделах 22-25.

ALI COPD культивировали в присутствии нейтрализующих антител к IL-33 (33-640087_7B), к RAGE или к EGFR. Все три средства для обработки приводили к снижению количества бокаловидных клеток MUC5AC+ (фиг. 21А-D). Отсутствие обработок не оказывало влияния на жизнеспособность культур ALI (фиг. 21Е), подтверждая, что эффект обработки не является артефактом или результатом токсичности антител. В соответствии с предыдущими результатами обработка посредством антитела к ST2 не приводила к снижению количества бокаловидных клеток, что дополнительно указывает на то, что это фенотип заболевания опосредован непосредственно IL-33, преимущественно ох-IL-33, через путь охIL-33-RAGE-EGFR. Влияние антитела к IL-33 (33-640087_7B) на культуры ALI COPD было дополнительно подтверждено иммуногистохимическим анализом, где блокирование IL-33 приводило к снижению количества бокаловидных клеток при парном анализе (фиг. 22А и 22В). После обработки антителом к IL-33 (33-640087_7B) эпителий в культуре ALI COPD напоминал здоровый эпителий, что показано на фиг. 20А.

И наконец, MUC5AC и MUC5B, высвобождаемые в апикальной слизи как в культурах ALI от здоровых, так и культурах ALI при COPD, измеряли посредством ELISA. Для количественного определения муцина, высвобождаемого из культур ALI, апикальные супернатанты анализировали в отношении уровней MUC5AC посредством иммуноанализа (Novus NBP2-76703) в соответствии с протоколом производителя. Образцы разводили 1:2000 в разбавителе для образцов, и концентрации экстраполировали из стандартных

кривых рекомбинантного белка MUC5AC. На фигуре 23 показано, что культуры ALI от пациентов с COPD высвобождали повышенные уровни MUC5AC по сравнению с ALI от здоровых доноров (фигура 23A). Лечение экзогенным охIL-33 приводило к повышению секреции муцинов в культурах ALI от здоровых доноров (фигура 23B). У доноров ALI с COPD повышенные уровни муцинов снижались за счет блокирования антителами к IL-33 (33_640087_7B), которые подавляли уровни белка MUC5AC, высвобождаемого из культур ALI, в отличие от антител к ST2 или изотипических контрольных mAb (фигура 23C).

Таким образом, данный пример подчеркивает роль окисленного IL-33 в нарушении регуляции дифференцировки эпителиальных клеток в легких. Результаты указывают на то, что в неконтролируемых условиях, окисленный IL-33 может быть причиной гиперплазии бокаловидных клеток и избыточного продуцирования слизи, наблюдаемых при некоторых фенотипах COPD. Следовательно, лечение посредством антагонистов сигнальной оси охIL-33, например, посредством молекул-антител, связывающих IL-33, RAGE или EGFR, может приносить существенную терапевтическую пользу пациентам с COPD за счет восстановления нормального физиологического состояния эпителия, например, снижения количества бокаловидных клеток и уменьшения избыточного продуцирования слизи.

Дополнительные последовательности

В дополнение к последовательностям, перечисленным в таблице 1, авторы настоящего изобретения предоставляют следующие дополнительные последовательности CDR:

SEQ ID NO 37: SYAMS

SEQ ID NO 38: GISAIQSTYYADSVKG

SEQ ID NO 39: QKFMQLWGGGLRYPFGY

SEQ ID NO 40: SGEGMGDKYAA

SEQ ID NO 41: RDTKRPS

SEQ ID NO 42: GVIQDNTGV

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

SEQ ID NO 43: MHHHHHHHHHHAAGLNDIFEAQKIEWHEAAIEGR

IL-33-01

SEQ ID NO 44:

SITGISPITEYLA SLSTYNDQSITFALEDES YEIYVEDLKKDEKKDKVLLSYYESQHPSNES
GDGVDGKMLMVTLSP TKDFWLHANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVLHNMHSNCVSF
ECKTDPGVFIGVKDNHLALIKVDSS ENLCTENILFKLSET

IL-33-16

SEQ ID NO 45:

SITGISPITEYLA SLSTYNDQSITFALEDES YEIYVEDLKKDEKKDKVLLSYYESQHPSNES
 GDGVDGKMLMVTLSP TKDFWLHANNKEHSVELHKSEKPLPDQAFFVLHNMHSNSVSF
 ESKTDPGVFIGVKDNHLALIKVDSS ENLSTENILFKLSET

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: gttgcagcctcccaacttc

Обратный праймер RAGE

SEQ ID NO 49: aatgaggccagtggaagta

ST2S человека (сигнальный пептид подчеркнут)

SEQ ID NO 50:

MGFWILAILTILMYSTAAKFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPT
 QERNRVFASGQLLKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYL
 YSTVSGSEKNSKIYCPTIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTE
 DADYTCFKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNEIKEVEIGKNAN
 LTCSA CFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFSNGLACLD
 MVLRIADVKEED LLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPSKECF

Fc-His6 ST2S-huIgG1 человека (сигнальный пептид подчеркнут)

SEQ ID NO 51:

MPLLLLLPLLWAGALAKFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQE
 RNRVFASGQLLKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYL
 MYS TVSGSEKNSKIYCPTIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTE
 DADYTCFKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNEIKEVEIGKNAN
 LTCSAC FGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFSNGLACLD
 MVLRIADVKEED LLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPSKECFEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHHH

SEQ ID NO 52:

His10/Avitag ECD ASGPR человека (сигнальный пептид подчеркнут, метки подчеркнуты дважды)

MPLLLLLPLLWAGALHHHHHHHHHHHggsGLNDIFEAQKIEWHEGGSQNSQLQEELRGL
RETFSNFTASTEAVKGLSTQGGNVGRKMKSLESQLEKQQKDLSEDHSSLLLHVKQFVS
DLRSLSCQMAALQGNGSERTCCPVNWVEHERSCYWFSRSGKAWADADNYCRLEDAH
LVVVTSWEEQKFVQHHIGPVNTWMGLHDQNGPWKWVDGTDYETGFKNWRPEQPDD
WYGHGLGGGEDCAHFTDDGRWNDDVCQRPYRWVCETELDKASQEPPLL

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении аномального физиологического состояния эпителия путем модулирования или подавления эффекта, опосредованного RAGE-EGFR.
2. Антагонист IL-33 для применения по п. 1, где аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы, предпочтительно аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы респираторного эпителия.
3. Антагонист IL-33 для применения по п. 2, где аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы выбрано из аномального продуцирования слизи; аномальной дифференцировки бокаловидных клеток, аномальной пролиферации бокаловидных клеток; аномальной толщины эпителия; аномального клиренса слизи и/или аномального состава слизи.
4. Антагонист IL-33 для применения по п. 3, где аномальное продуцирование слизи включает аномальное продуцирование MUC5AC; и/или где аномальная дифференцировка бокаловидных клеток включает аномальную дифференцировку бокаловидных клеток MUC5AC⁺; и/или где аномальная пролиферация бокаловидных клеток включает аномальную пролиферацию бокаловидных клеток MUC5AC⁺; и/или где аномальная толщина эпителия включает аномальное количество бокаловидных клеток MUC5AC⁺ в общей площади ткани эпителия.
5. Антагонист IL-33 для применения по п. 2, п. 3 или п. 4, где аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы включает повышенное продуцирование слизи; повышенную дифференцировку бокаловидных клеток; повышенную пролиферацию бокаловидных клеток; повышенную толщину эпителия и/или пониженный клиренс слизи.
6. Антагонист IL-33 для применения по п. 5, где повышенное продуцирование слизи включает повышенное продуцирование MUC5AC; и/или где повышенная дифференцировка бокаловидных клеток включает повышенную дифференцировку бокаловидных клеток MUC5AC⁺; и/или где повышенная пролиферация бокаловидных клеток включает повышенную пролиферацию бокаловидных клеток MUC5AC⁺; и/или

где повышенная толщина эпителия включает повышенное количество бокаловидных клеток MUC5AC⁺ в общей площади ткани эпителия.

7. Антагонист IL-33 для применения по п. 3, где аномальный состав слизи включает повышение или понижение соотношения различных соединений, содержащихся в слизи; повышение или понижение концентрации одного или нескольких соединений, содержащихся в слизи; и/или повышение или понижение концентрации или толщины слизи.
8. Антагонист IL-33 для применения по п. 7, где аномальный состав слизи включает повышение соотношения MUC5AC:MUC5B; и/или где аномальный состав слизи включает повышение уровня MUC5AC, содержащегося в слизи; и/или где аномальный состав слизи включает повышение толщины слизи.
9. Антагонист IL-33 для применения по п. 1, где аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное ремоделирование эпителия.
10. Антагонист IL-33 для применения по любому из предыдущих пунктов, где аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное физиологическое состояние респираторного тракта, предпочтительно аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы респираторного тракта.
11. Антагонист IL-33 для применения по п. 10, где респираторный тракт представлен нижним отделом респираторного тракта, предпочтительно бронхами.
12. Антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении заболевания, опосредованного EGFR.
13. Антагонист IL-33 для применения по п. 12, где заболевание, опосредованное EGFR, представляет собой заболевание, опосредованное RAGE-EGFR.
14. Антагонист IL-33 для применения по п. 12 или п. 13, где заболевание, опосредованное EGFR, характеризуется aberrантной активностью EGFR.

15. Антагонист IL-33 для применения по любому из пп. 12-14, где заболевание, опосредованное EGFR, характеризуется аномальным физиологическим состоянием эпителия.
16. Антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении заболевания путем улучшения физиологического состояния эпителия.
17. Антагонист IL-33 для применения в предупреждении или лечении заболевания путем подавления эффекта, опосредованного EGFR.
18. Антагонист IL-33 для применения по п. 17, где эффект, опосредованный EGFR, представляет собой передачу сигнала EGFR.
19. Антагонист IL-33 для применения по п. 17 или п. 18, где эффект, опосредованный EGFR, представляет собой эффект, опосредованный RAGE-EGFR.
20. Антагонист IL-33 для применения по любому из пп. 17-19, где эффект, опосредованный EGFR, представляет собой передачу сигнала, опосредованную RAGE-EGFR.
21. Антагонист IL-33 для применения по любому из пп. 16-20, где заболевание представляет собой респираторное заболевание.
22. Антагонист IL-33 для применения по п. 21, где респираторное заболевание характеризуется аномальным физиологическим состоянием эпителия и/или аберрантной активностью EGFR.
23. Антагонист IL-33 для применения по п. 21 или п. 22, где респираторное заболевание представляет собой заболевание нижнего отдела респираторного тракта, предпочтительно респираторное заболевание бронхов.
24. Антагонист IL-33 для применения по любому из пп. 21-23, где респираторное заболевание выбрано из следующего: COPD, бронхита, эмфиземы, бронхоэктаза, например, CF-бронхоэктаза или бронхоэктаза, отличного от CF-бронхоэктаза, астмы или синдрома перекреста астмы и COPD (ACO).

25. Антагонист IL-33 для применения по любому из пп. 21-24, где респираторное заболевание представляет собой COPD, предпочтительно COPD с бронхитом.
26. Антагонист IL-33 для применения по любому из пп. 21-24, где респираторное заболевание представляет собой астму, предпочтительно бронхиальную астму.
27. Антагонист IL-33 для применения по любому из пп. 16-26, где предупреждение или лечение обеспечивает улучшение клиренса слизи.
28. Антагонист IL-33 для применения по любому из пп. 16-27, где предупреждение или лечение обеспечивает подавление или снижение аномального продуцирования слизи.
29. Антагонист IL-33 для применения по п. 28, где предупреждение или лечение обеспечивает подавление или снижение продуцирования MUC5AC.
30. Антагонист IL-33 для применения по любому из пп. 16-29, где предупреждение или лечение обеспечивает подавление образования аномального состава слизи.
31. Антагонист IL-33 для применения по п. 30, где предупреждение или лечение обеспечивает подавление или снижение соотношения MUC5AC:MUC5B; и/или где предупреждение или лечение обеспечивает подавление или снижение уровня MUC5AC в слизи; и/или где предупреждение или лечение обеспечивает снижение толщины слизи.
32. Антагонист IL-33 для применения по любому из пп. 16-31, где предупреждение или лечение обеспечивает подавление аномального ремоделирования эпителия.
33. Антагонист IL-33 для применения по любому из пп. 16-32, где предупреждение или лечение обеспечивает подавление аномальной дифференцировки или пролиферации бокаловидных клеток.
34. Антагонист IL-33 для применения по п. 33, где аномальная дифференцировка или пролиферация бокаловидных клеток представляет собой аномальную дифференцировку или пролиферацию бокаловидных клеток MUC5AC+.

35. Антагонист IL-33 для применения по любому из пп. 16-34, где предупреждение или лечение обеспечивает снижение толщины респираторного эпителия.
36. Антагонист IL-33 для применения по п. 35, где предупреждение или лечение обеспечивает снижение количества бокаловидных клеток MUC5AC+ в общей площади ткани эпителия.
37. Антагонист IL-33 для применения по любому из предыдущих пунктов, где антагонист IL-33 обеспечивает подавление активности окисленного IL-33.
38. Антагонист IL-33 для применения по любому из предыдущих пунктов, где антагонист IL-33 обеспечивает предотвращение связывания окисленного IL-33 с RAGE, за счет чего обеспечивается подавление передачи сигнала RAGE-EGFR.
39. Антагонист IL-33 для применения по любому из предыдущих пунктов, где антагонист IL-33 обеспечивает снижение или подавление передачи сигнала, зависимой от RAGE-EGFR, и/или эффектов, опосредованных RAGE-EGFR.
40. Антагонист IL-33 для применения по любому из предыдущих пунктов, где антагонист IL-33 представляет собой связывающую молекулу или ее фрагмент, которые связываются с IL-33, предпочтительно связываются с восстановленным IL-33 или окисленным IL-33, предпочтительно связываются с восстановленным IL-33.
41. Антагонист IL-33 для применения по любому из предыдущих пунктов, где антагонист IL-33 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно антитело к IL-33 или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно антитело к восстановленному IL-33 или его антигенсвязывающий фрагмент.
42. Антагонист IL-33 для применения по любому из предыдущих пунктов, где антагонист IL-33 представляет собой связывающую молекулу, которая содержит определяющие комплементарность области (CDR) из пары вариабельного домена тяжелой цепи (VH) и вариабельного домена легкой цепи (VL), выбранной из таблицы 1.

43. Антагонист IL-33 для применения по любому из предыдущих пунктов, где антагонист IL-33 представляет собой связывающую молекулу, которая содержит пару переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL), выбранную из таблицы 1.
44. Антагонист IL-33 для применения по любому из предыдущих пунктов, где антагонист IL-33 представляет собой связывающую молекулу, которая содержит 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.
45. Способ предупреждения или лечения аномального физиологического состояния эпителия у субъекта путем введения терапевтически эффективного количества антагониста IL-33 для модулирования или подавления эффекта, опосредованного RAGE-EGFR.
46. Способ по п. 45, где аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы, предпочтительно аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы респираторного эпителия.
47. Способ по п. 46, где аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы выбрано из аномального продуцирования слизи; аномальной дифференцировки бокаловидных клеток, аномальной пролиферации бокаловидных клеток; аномальной толщины эпителия; аномального клиренса слизи и/или аномального состава слизи.
48. Способ по п. 47, где аномальное продуцирование слизи включает аномальное продуцирование MUC5AC; и/или где аномальная дифференцировка бокаловидных клеток включает аномальную дифференцировку бокаловидных клеток MUC5AC⁺; и/или где аномальная пролиферация бокаловидных клеток включает аномальную пролиферацию бокаловидных клеток MUC5AC⁺; и/или где аномальная толщина эпителия включает аномальное количество бокаловидных клеток MUC5AC⁺ в общей площади ткани эпителия.

49. Способ по п. 47 или п. 48, где аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы включает повышенное продуцирование слизи; повышенную дифференцировку бокаловидных клеток; повышенную пролиферацию бокаловидных клеток; повышенную толщину эпителия и/или пониженный клиренс слизи.
50. Способ по п. 49, где повышенное продуцирование слизи включает повышенное продуцирование MUC5AC; и/или где повышенная дифференцировка бокаловидных клеток включает повышенную дифференцировку бокаловидных клеток MUC5AC⁺; и/или где повышенная пролиферация бокаловидных клеток включает повышенную пролиферацию бокаловидных клеток MUC5AC⁺; и/или где повышенная толщина эпителия включает повышенное количество бокаловидных клеток MUC5AC⁺ в общей площади ткани эпителия.
51. Способ по п. 47, где аномальный состав слизи включает повышение или понижение соотношения различных соединений, содержащихся в слизи; повышение или понижение концентрации одного или нескольких соединений, содержащихся в слизи; и/или повышение или понижение концентрации или толщины слизи.
52. Способ по п. 51, где аномальный состав слизи включает повышение соотношения MUC5AC:MUC5B; и/или где аномальный состав слизи включает повышение уровня MUC5AC, содержащегося в слизи; и/или где аномальный состав слизи включает повышение толщины слизи.
53. Способ по п. 45, где аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное ремоделирование эпителия.
54. Способ по любому из пп. 45-53, где аномальное физиологическое состояние эпителия представляет собой аномальное физиологическое состояние респираторного тракта, предпочтительно аномальное физиологическое состояние мукоцилиарной системы респираторного тракта.
55. Способ по п. 54, где респираторный тракт представлен нижним отделом респираторного тракта, предпочтительно бронхами.

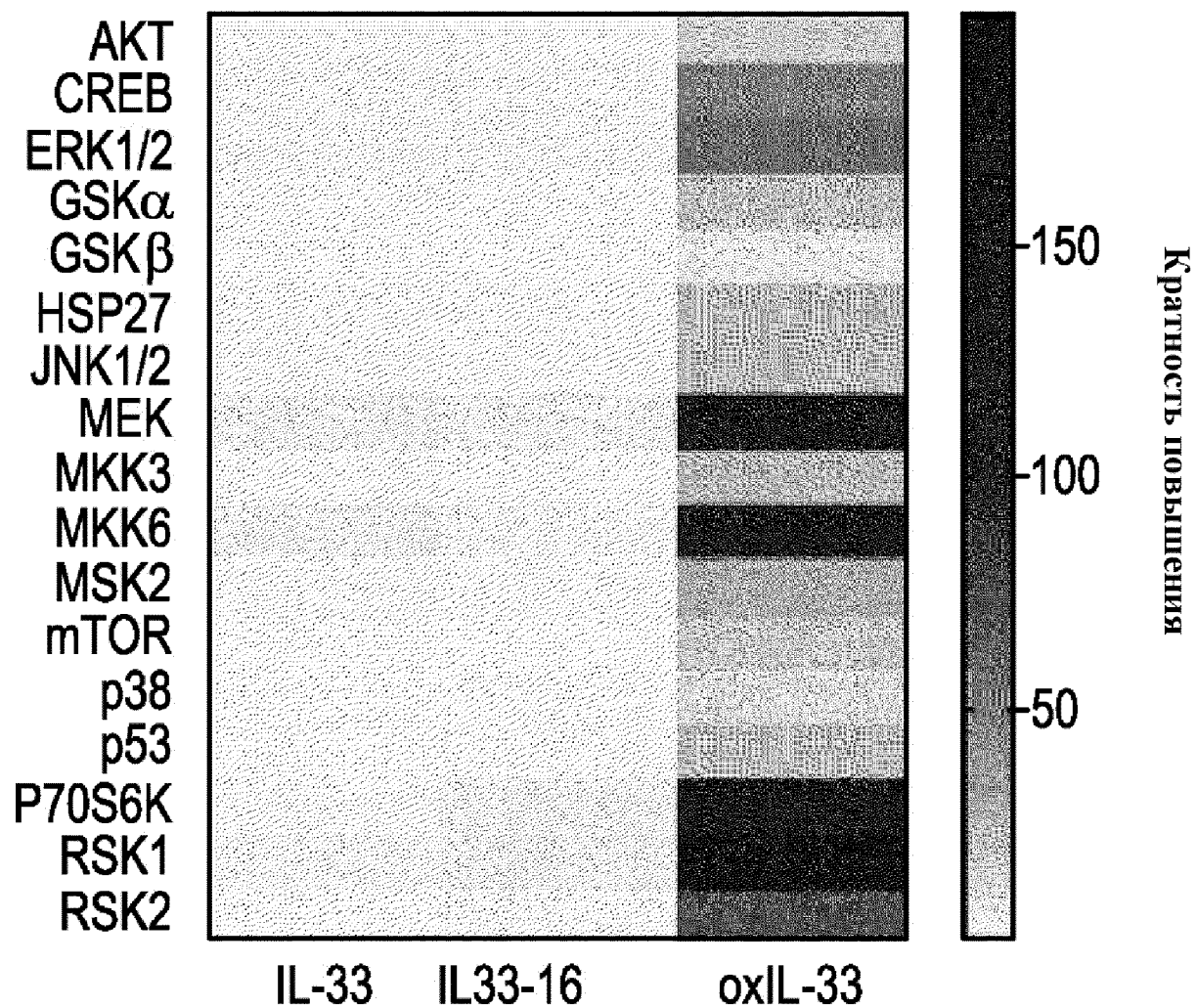
56. Способ предупреждения или лечения заболевания, опосредованного EGFR, путем введения терапевтически эффективного количества антагониста IL-33.
57. Способ по п. 56, где заболевание, опосредованное EGFR, представляет собой заболевание, опосредованное RAGE-EGFR.
58. Способ по п. 56 или п. 57, где заболевание, опосредованное EGFR, характеризуется aberrантной активностью EGFR.
59. Способ по любому из пп. 56-58, где заболевание, опосредованное EGFR, характеризуется аномальным физиологическим состоянием эпителия.
60. Способ предупреждения или лечения заболевания путем введения терапевтически эффективного количества антагониста IL-33 для улучшения физиологического состояния эпителия.
61. Способ предупреждения или лечения заболевания путем введения терапевтически эффективного количества антагониста IL-33 для подавления эффекта, опосредованного EGFR.
62. Способ по п. 61, где эффект, опосредованный EGFR, представляет собой передачу сигнала EGFR.
63. Способ по п. 61 или п. 62, где эффект, опосредованный EGFR, представляет собой эффект, опосредованный RAGE-EGFR.
64. Способ по любому из пп. 61-63, где эффект, опосредованный EGFR, представляет собой передачу сигнала, опосредованную RAGE-EGFR.
65. Способ по любому из пп. 60-64, где заболевание представляет собой респираторное заболевание.
66. Способ по п. 65, где респираторное заболевание характеризуется аномальным физиологическим состоянием эпителия и/или aberrантной активностью EGFR.

67. Способ по п. 65 или п. 66, где респираторное заболевание представляет собой заболевание нижнего отдела респираторного тракта, предпочтительно респираторное заболевание бронхов.
68. Способ по любому из пп. 65-67, где респираторное заболевание выбрано из следующего: COPD, бронхита, эмфиземы, бронхоэктаза, например, CF-бронхоэктаза или бронхоэктаза, отличного от CF-бронхоэктаза, астмы или синдрома перекреста астмы и COPD (ACO).
69. Способ по любому из пп. 65-68, где респираторное заболевание представляет собой COPD, предпочтительно COPD с бронхитом.
70. Способ по любому из пп. 65-69, где респираторное заболевание представляет собой астму, предпочтительно бронхиальную астму.
71. Способ по любому из пп. 45-70, где способ обеспечивает улучшение клиренса слизи.
72. Способ по любому из пп. 45-71, где способ обеспечивает подавление или снижение аномального продуцирования слизи.
73. Способ по п. 72, где аномальное продуцирование слизи представляет собой повышение продуцирования MUC5AC.
74. Способ по любому из пп. 45-73, где способ обеспечивает подавление образования аномального состава слизи.
75. Способ по п. 74, где способ обеспечивает подавление или снижение соотношения MUC5AC:MUC5B; и/или где способ обеспечивает подавление или снижение уровня MUC5AC в слизи; и/или где способ обеспечивает снижение толщины слизи.
76. Способ по любому из пп. 45-75, где способ обеспечивает подавление аномального ремоделирования эпителия.
77. Способ по любому из пп. 45-76, где способ обеспечивает подавление или снижение аномальной дифференцировки или пролиферации бокаловидных клеток.

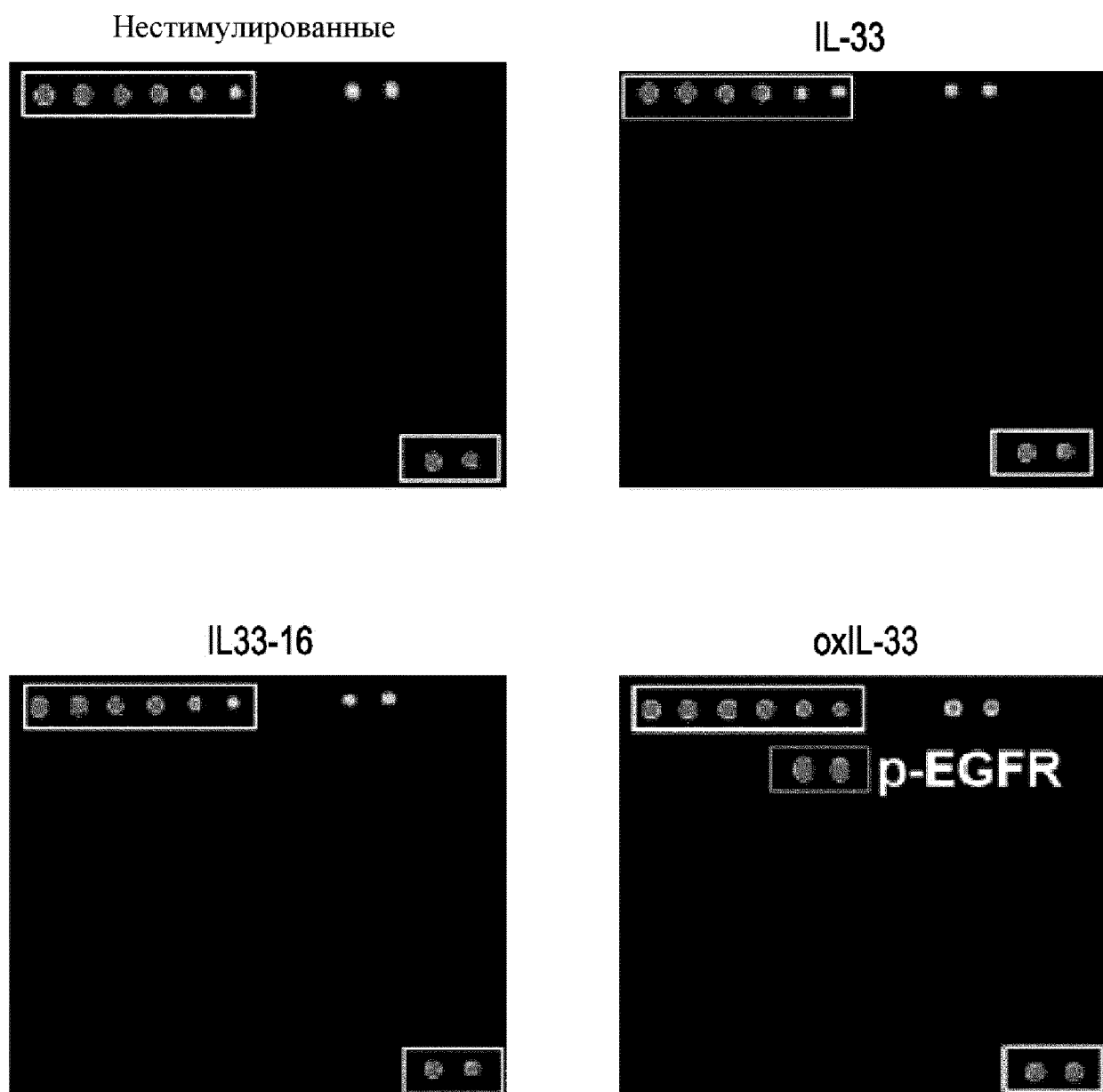
78. Способ по п. 77, где способ обеспечивает подавление или снижение аномальной дифференцировки или пролиферации бокаловидных клеток MUC5AC+.
79. Способ по любому из пп. 45-78, где способ обеспечивает снижение толщины респираторного эпителия.
80. Способ по п. 79, где способ обеспечивает снижение количества бокаловидных клеток MUC5AC+ в общей площади ткани респираторного эпителия.
81. Способ по любому из пп. 45-80, где антагонист IL-33 обеспечивает подавление активности окисленного IL-33.
82. Способ по любому из пп. 45-81, где антагонист IL-33 обеспечивает предотвращение связывания окисленного IL-33 с RAGE, за счет чего обеспечивается подавление передачи сигнала RAGE-EGFR.
83. Способ по любому из пп. 45-82, где антагонист IL-33 обеспечивает снижение или подавление передачи сигнала, зависимой от RAGE-EGFR, и/или эффектов, опосредованных RAGE-EGFR.
84. Способ по любому из пп. 45-83, где антагонист IL-33 представляет собой связывающую молекулу или ее фрагмент, которые связываются с IL-33, предпочтительно с восстановленным IL-33 или окисленным IL-33, предпочтительно с восстановленным IL-33.
85. Способ по любому из пп. 45-84, где антагонист IL-33 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно антитело к IL-33 или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно антитело к восстановленному IL-33 или его антигенсвязывающий фрагмент.
86. Способ по любому из пп. 45-85, где антагонист IL-33 представляет собой связывающую молекулу, которая содержит определяющие комплементарность области (CDR) из пары варибельного домена тяжелой цепи (VH) и варибельного домена легкой цепи (VL), выбранной из таблицы 1.

87. Способ по любому из пп. 45-86, где антагонист IL-33 представляет собой связывающую молекулу, которая содержит пару переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL), выбранную из таблицы 1.
88. Способ по любому из пп. 45-87, где антагонист IL-33 представляет собой связывающую молекулу, которая содержит 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.
89. Способ по любому из пп. 45-88 или антагонист IL-33 для применения по любому из пп. 1-44, где антагонист IL-33 представляет собой антитело к IL33 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие VH-домен с последовательностью под SEQ ID NO:1 и VL-домен с последовательностью под SEQ ID NO:19.

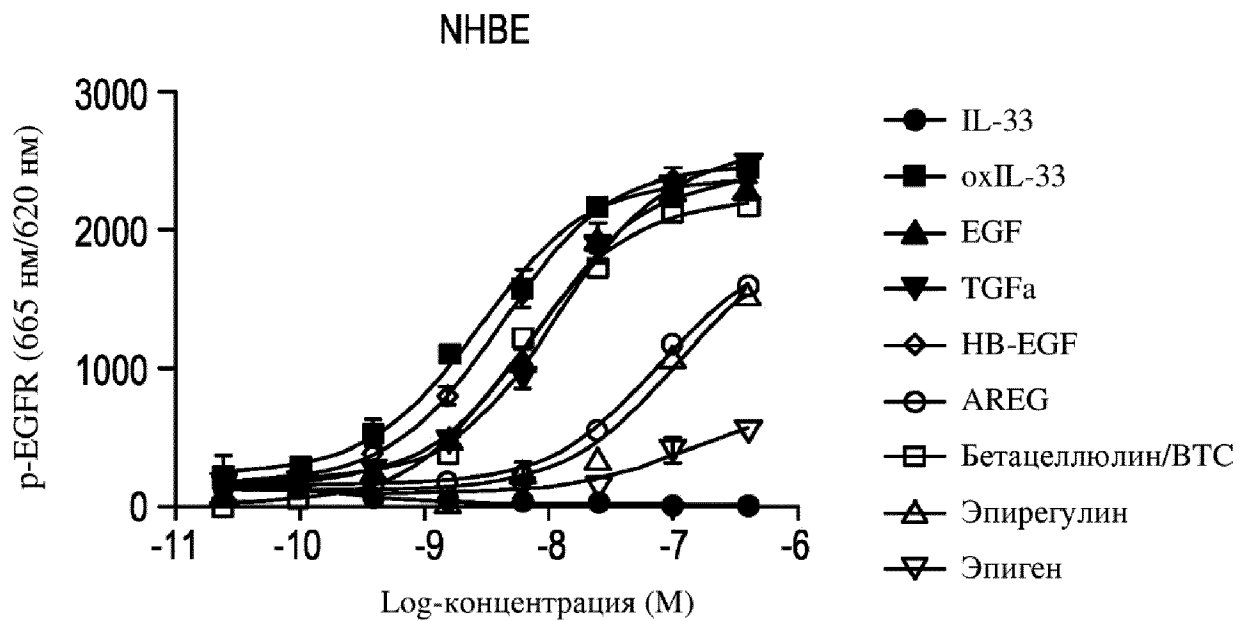
ФИГ. 1



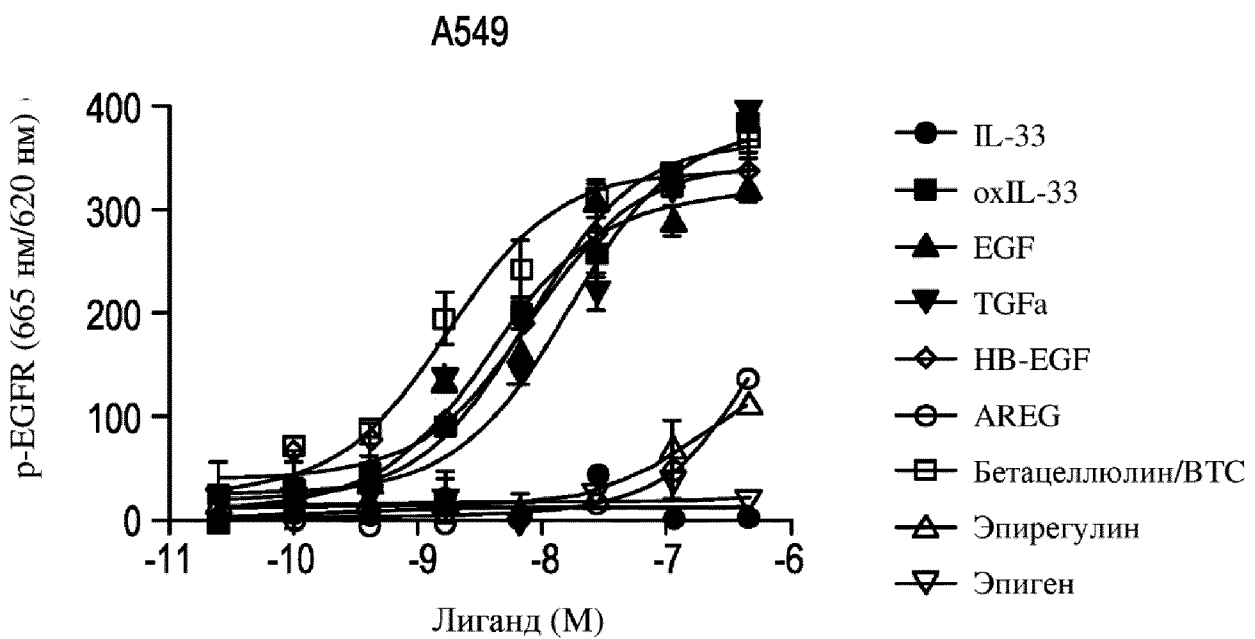
ФИГ. 2



ФИГ. 3А

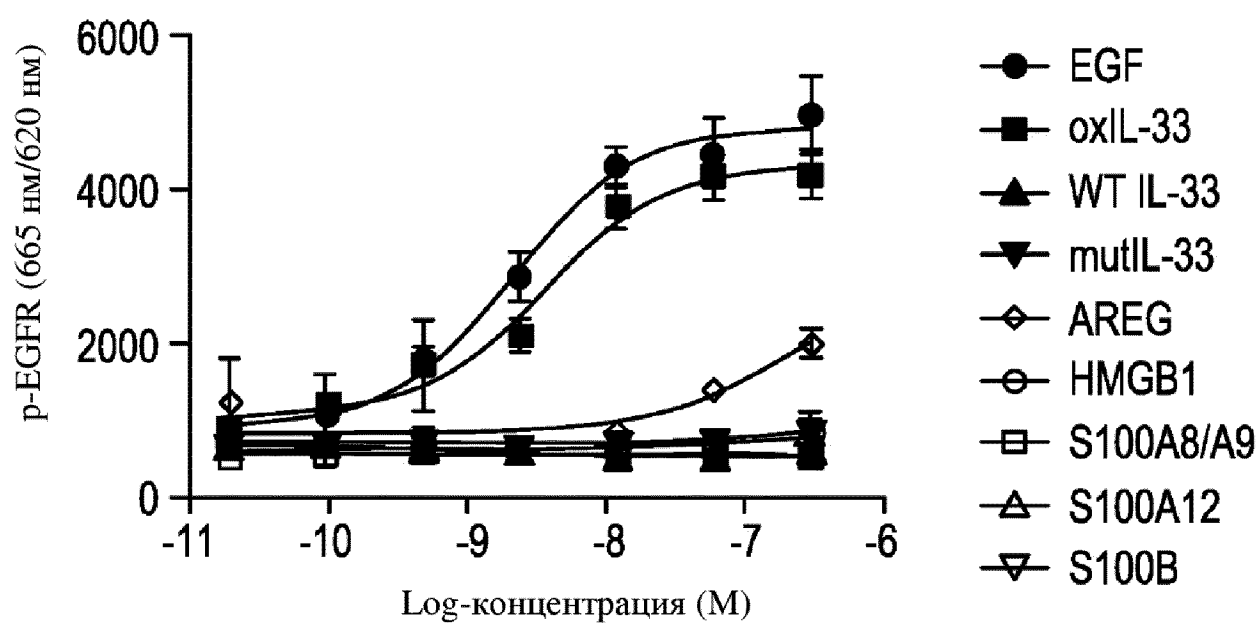


ФИГ. 3В

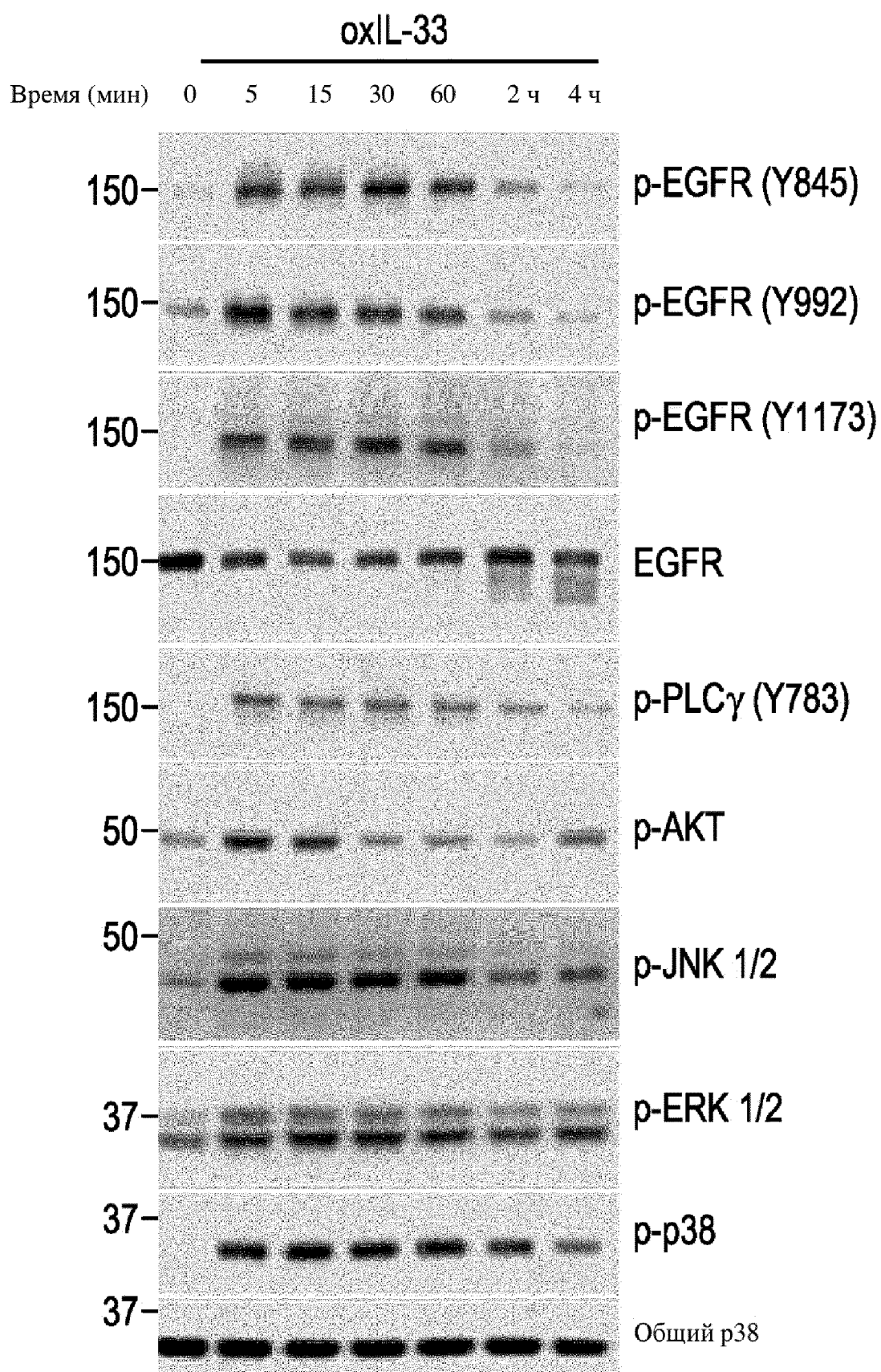


ФИГ. 3С

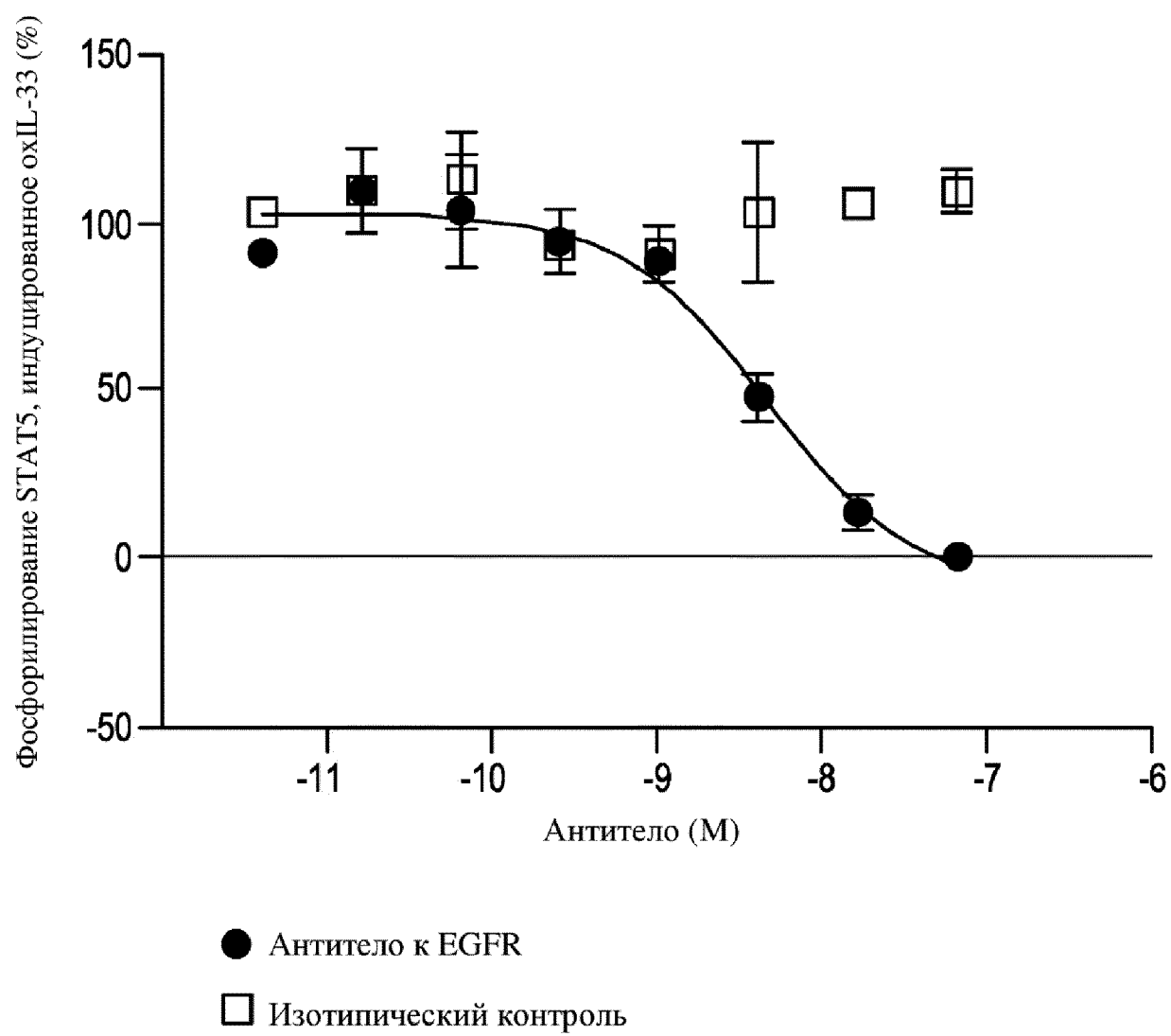
A549



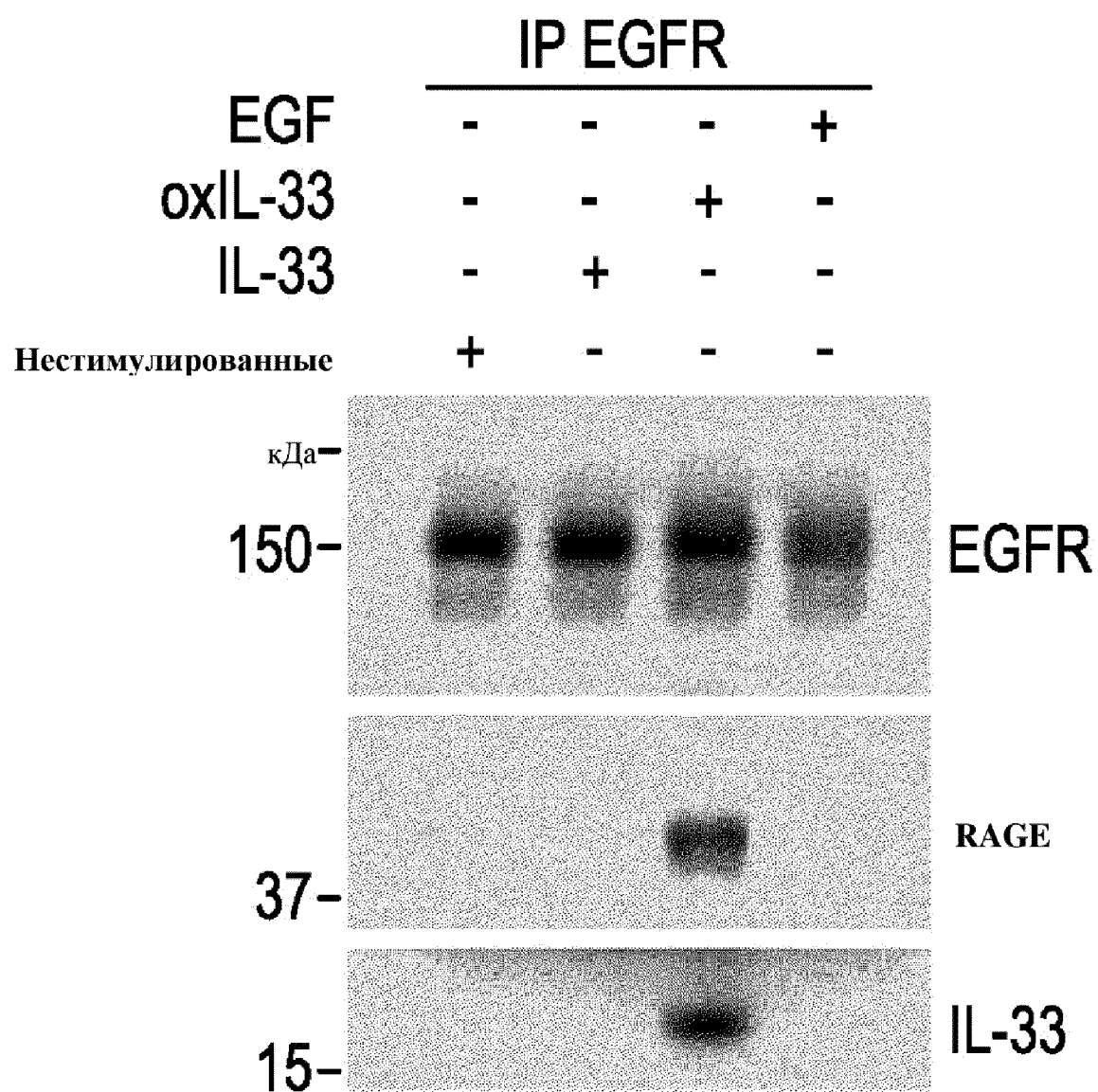
ФИГ. 4



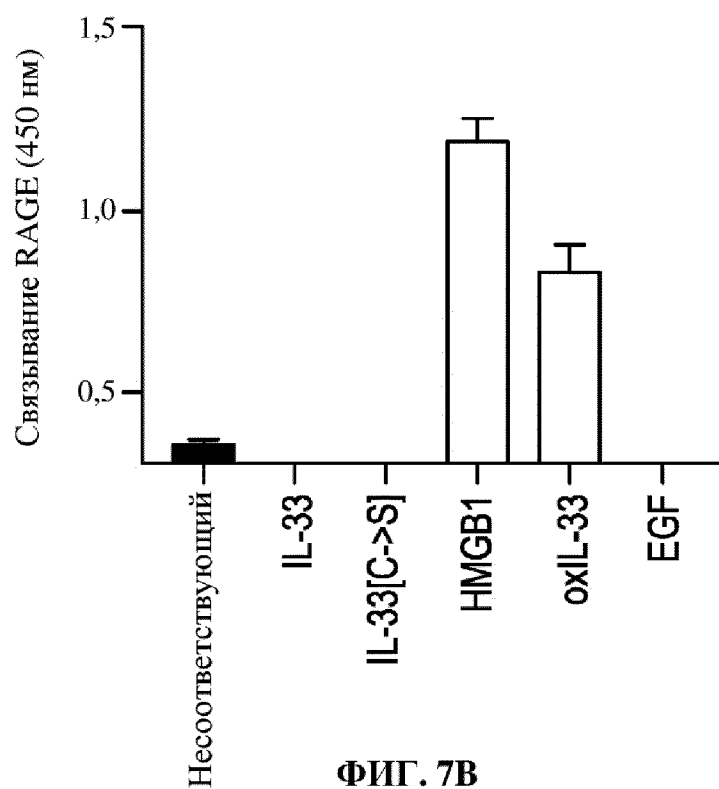
ФИГ. 5



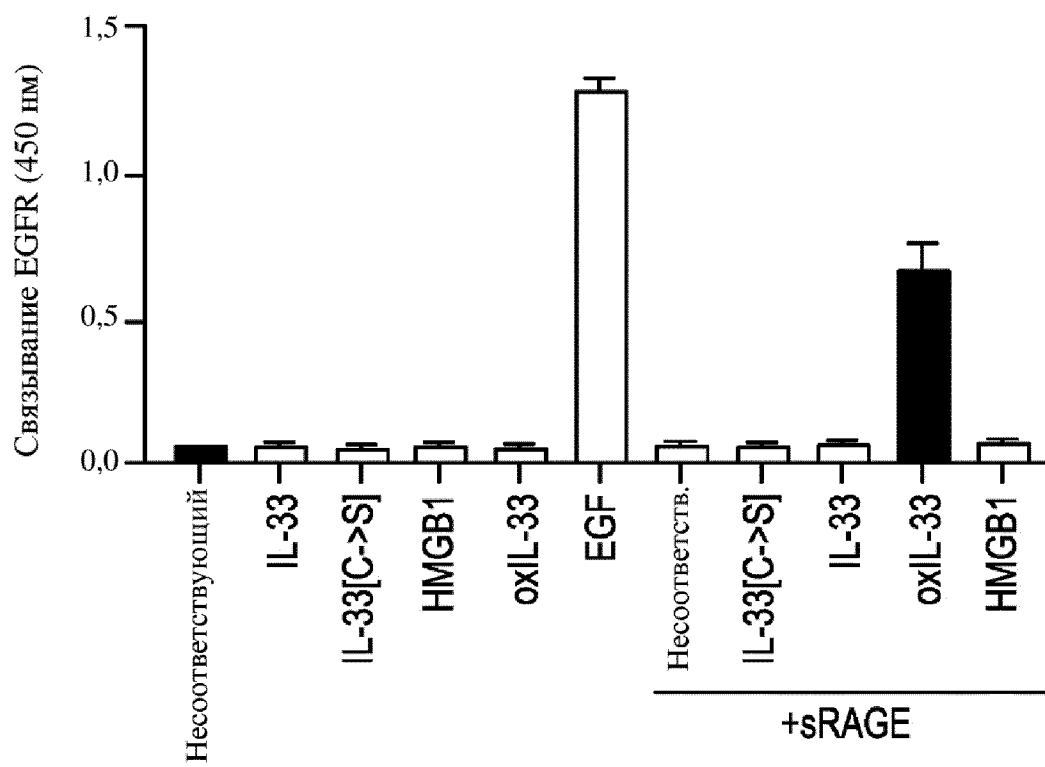
ФИГ. 6



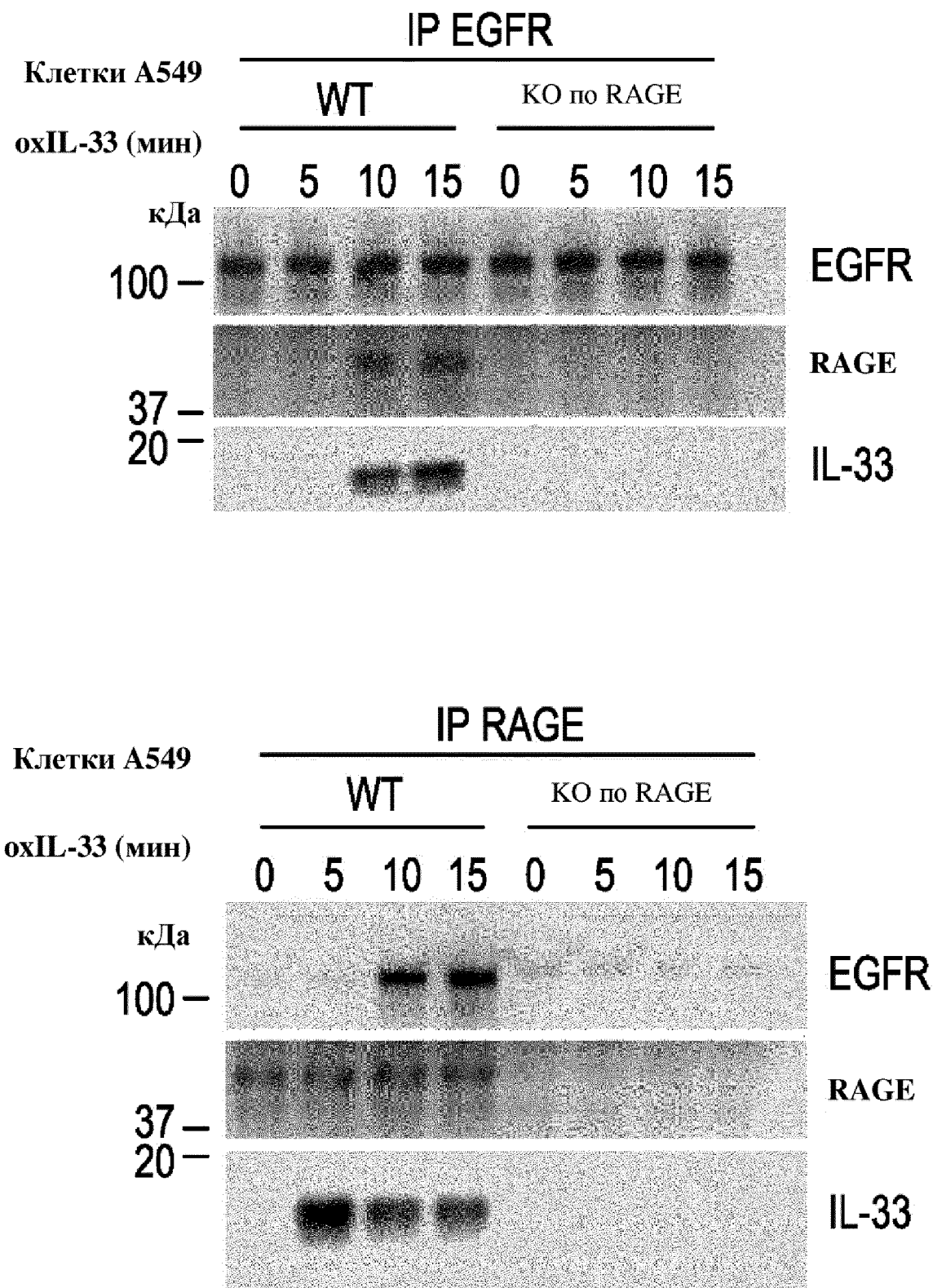
ФИГ. 7А



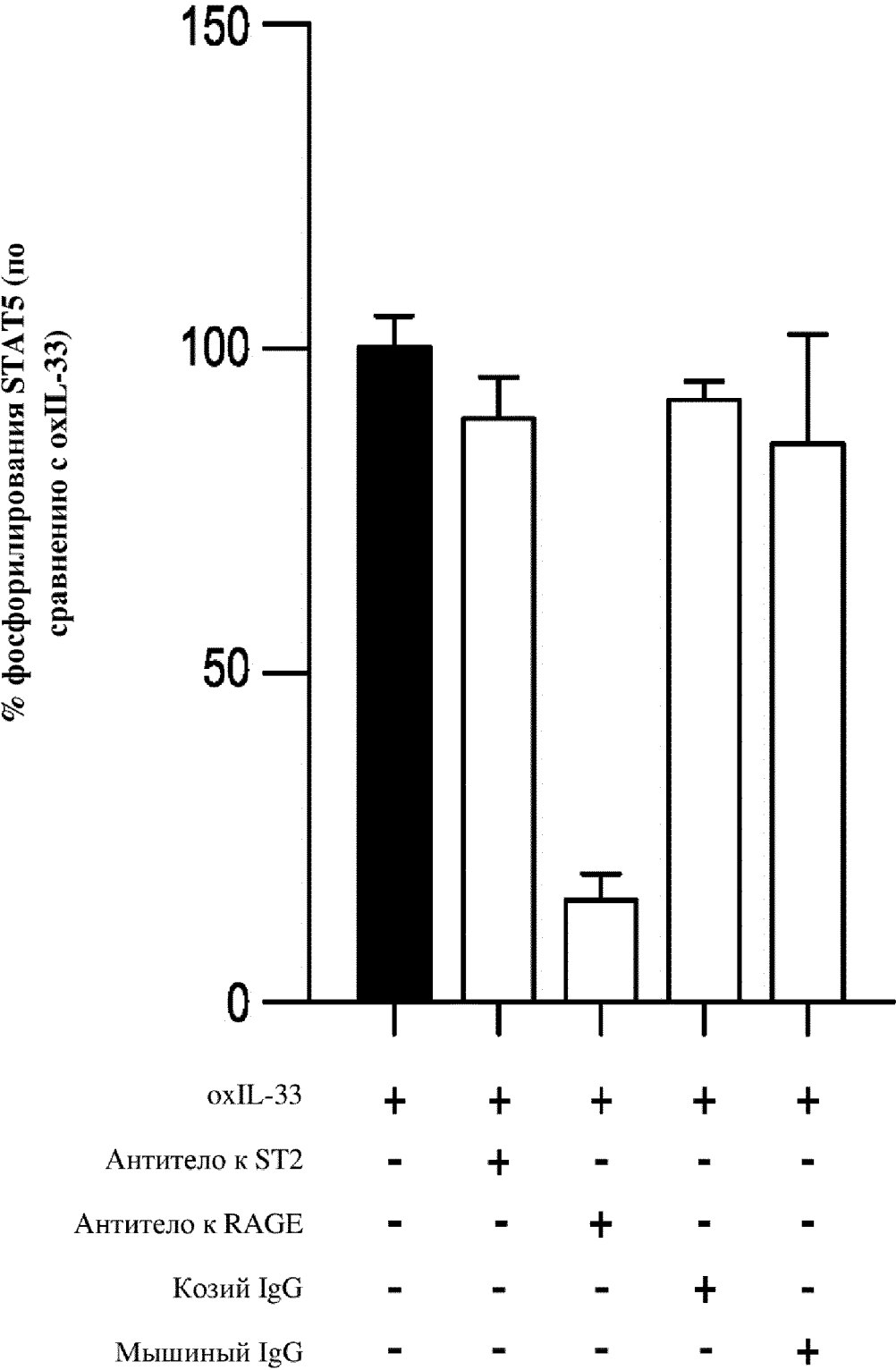
ФИГ. 7В



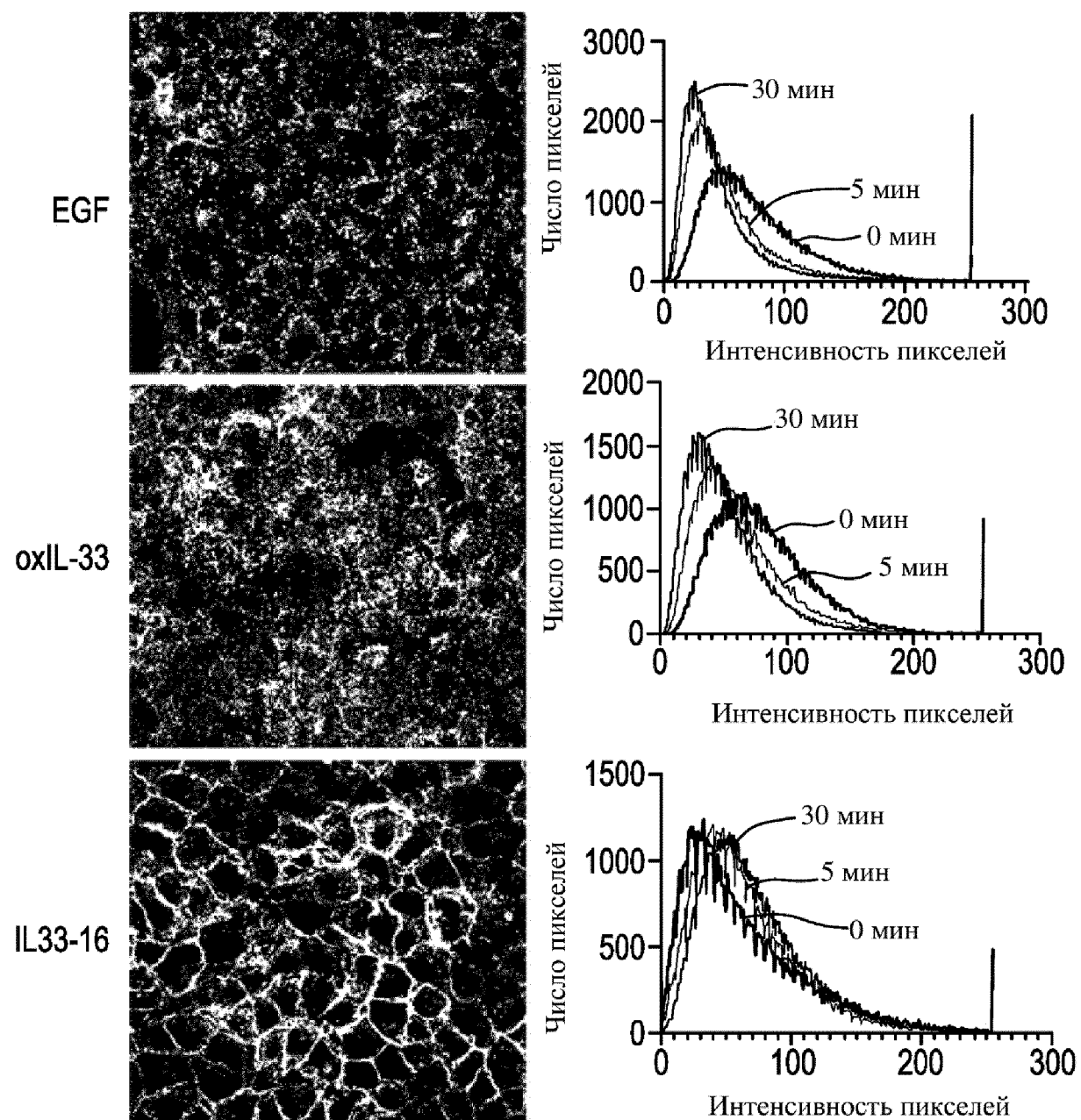
ФИГ. 8



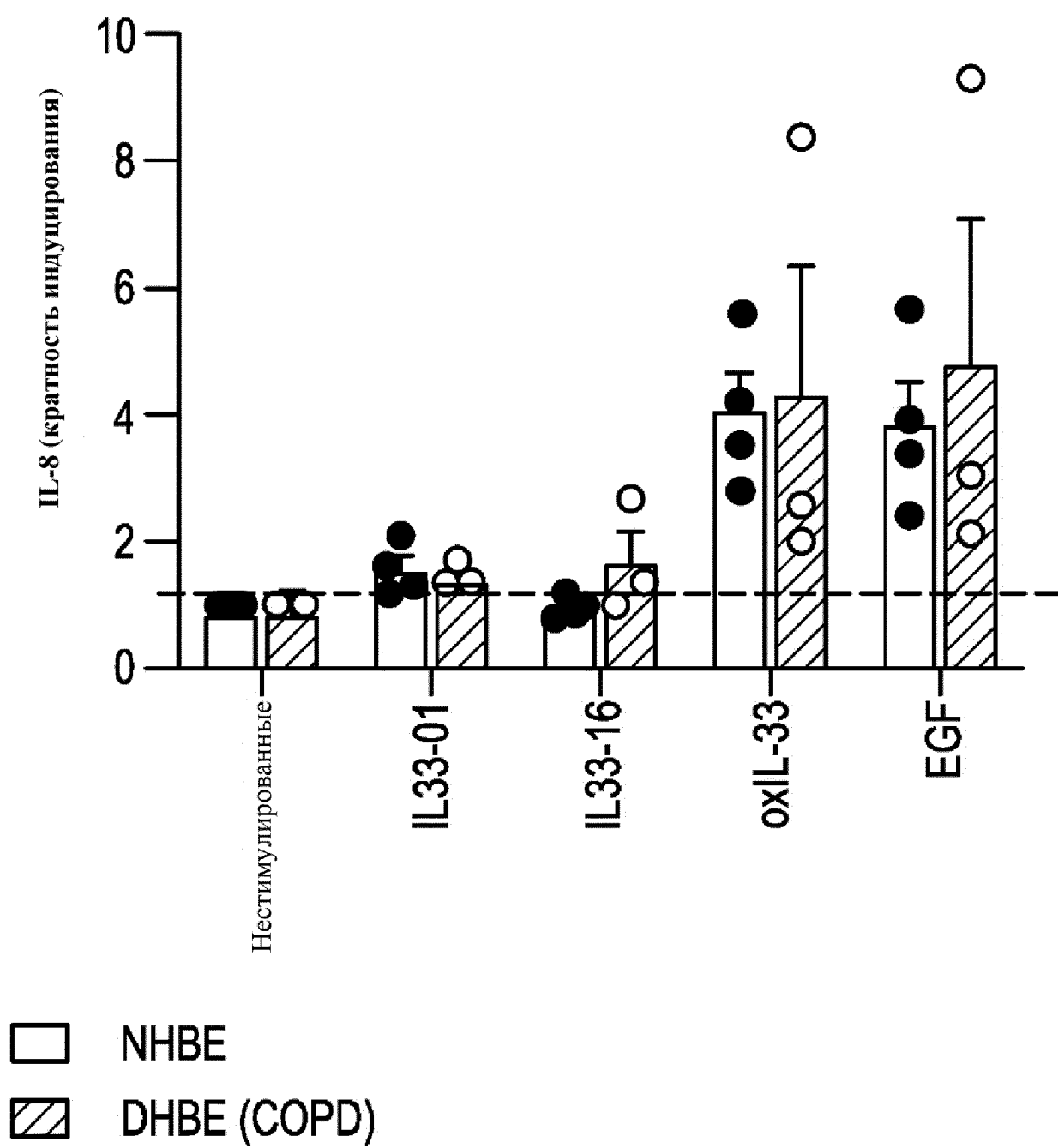
ФИГ. 9



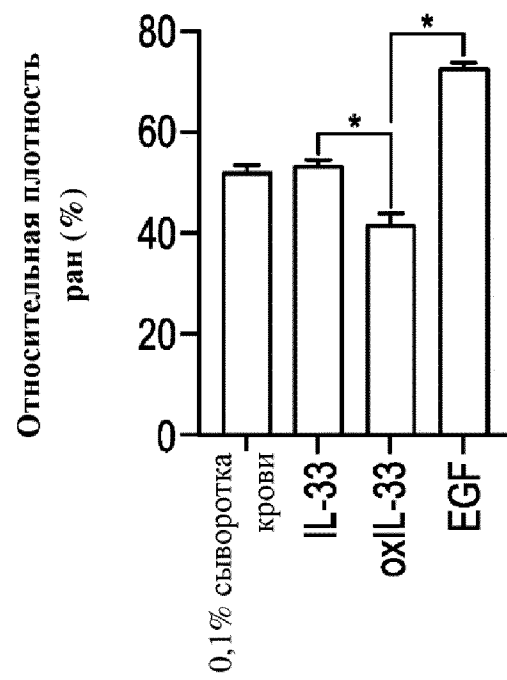
ФИГ. 10



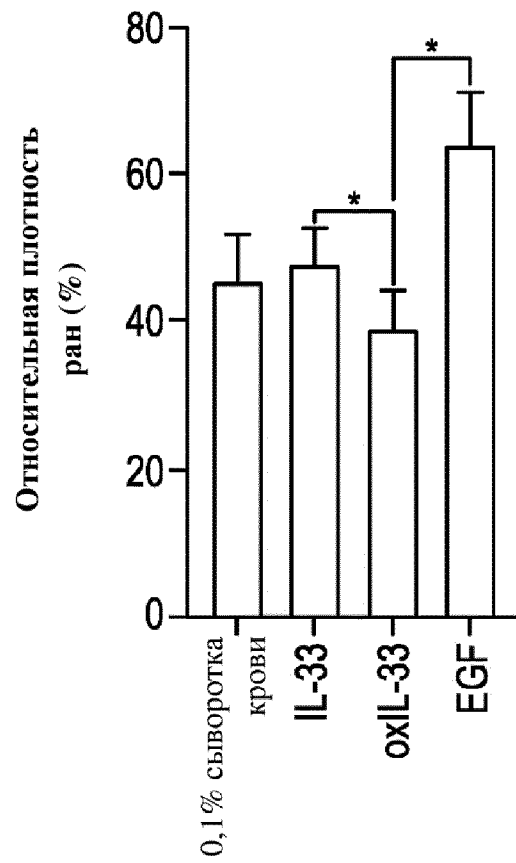
ФИГ. 11



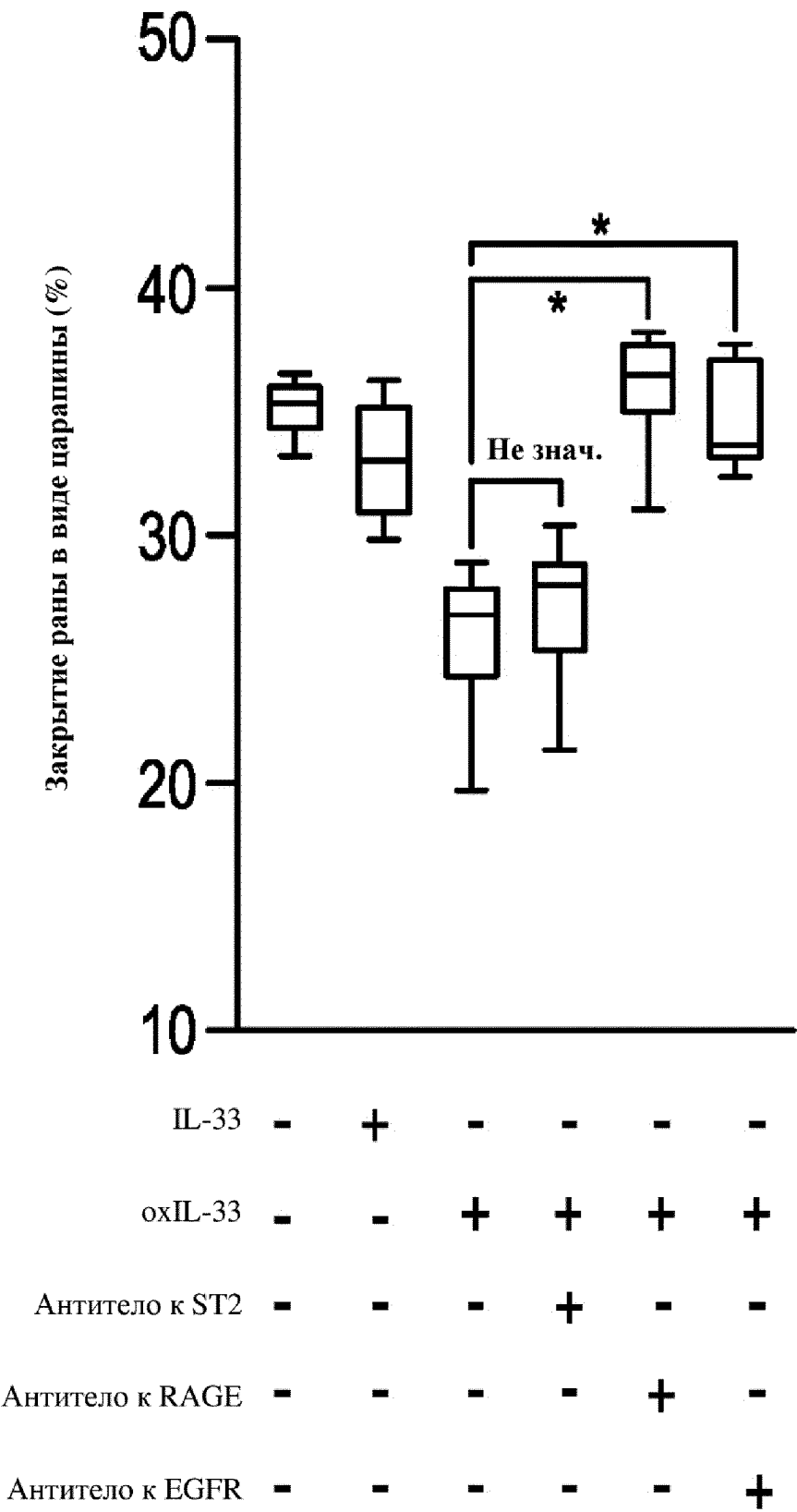
ФИГ. 12А



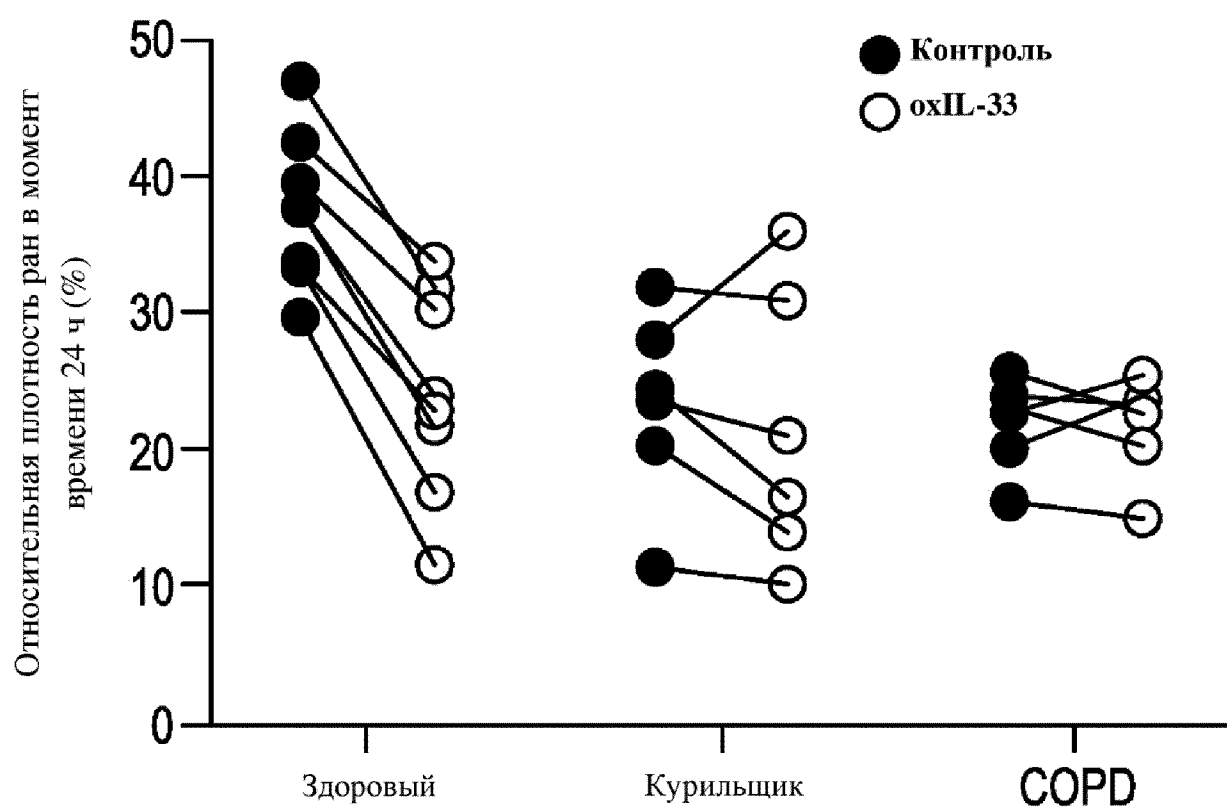
ФИГ. 12В



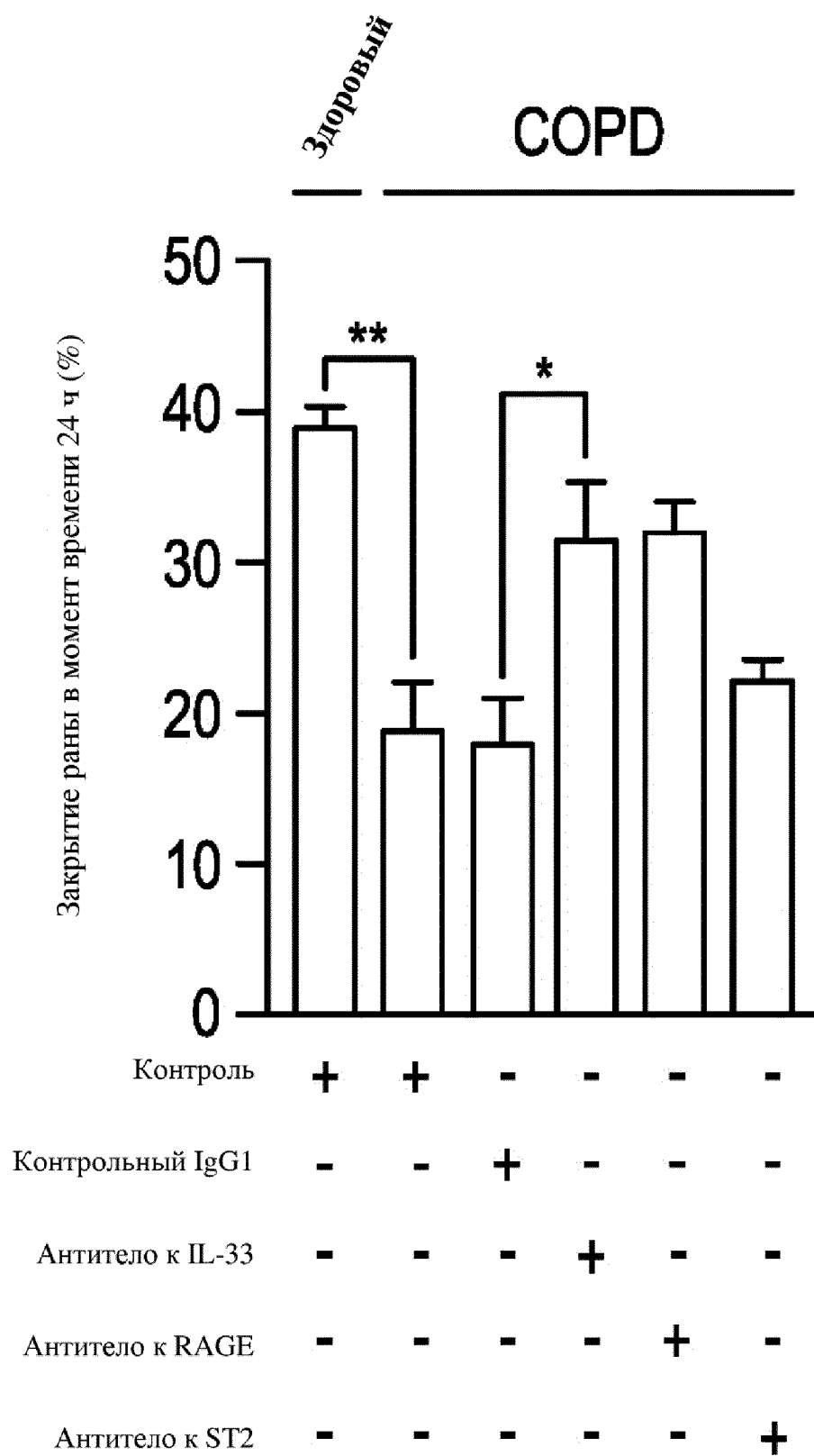
ФИГ. 13



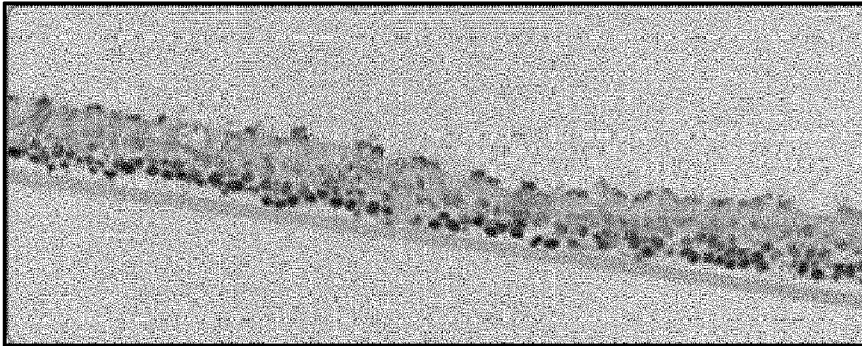
ФИГ. 14



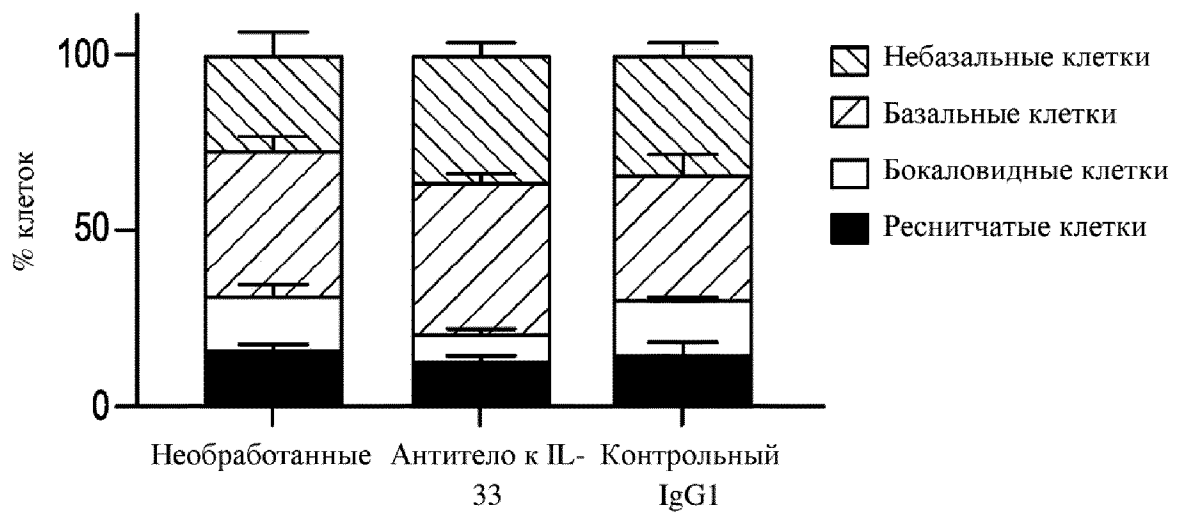
ФИГ. 15



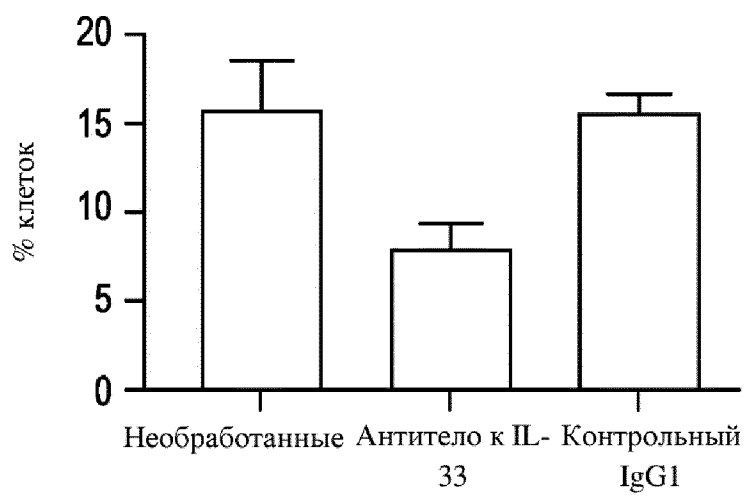
ФИГ. 16А



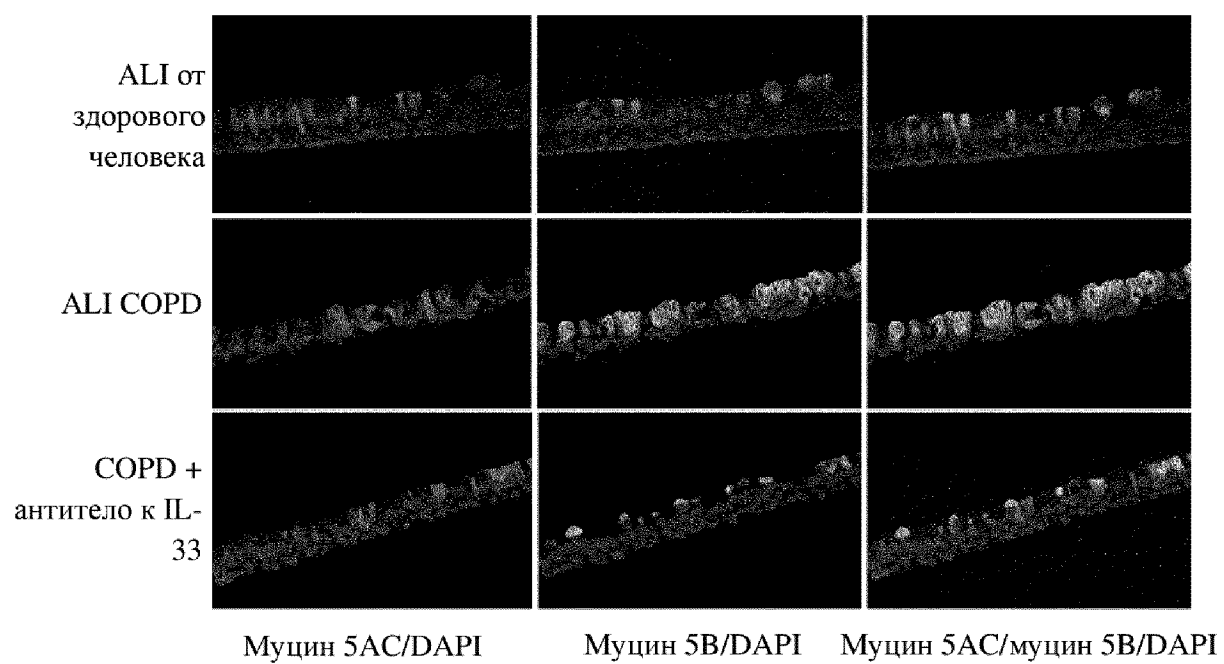
ФИГ. 16В



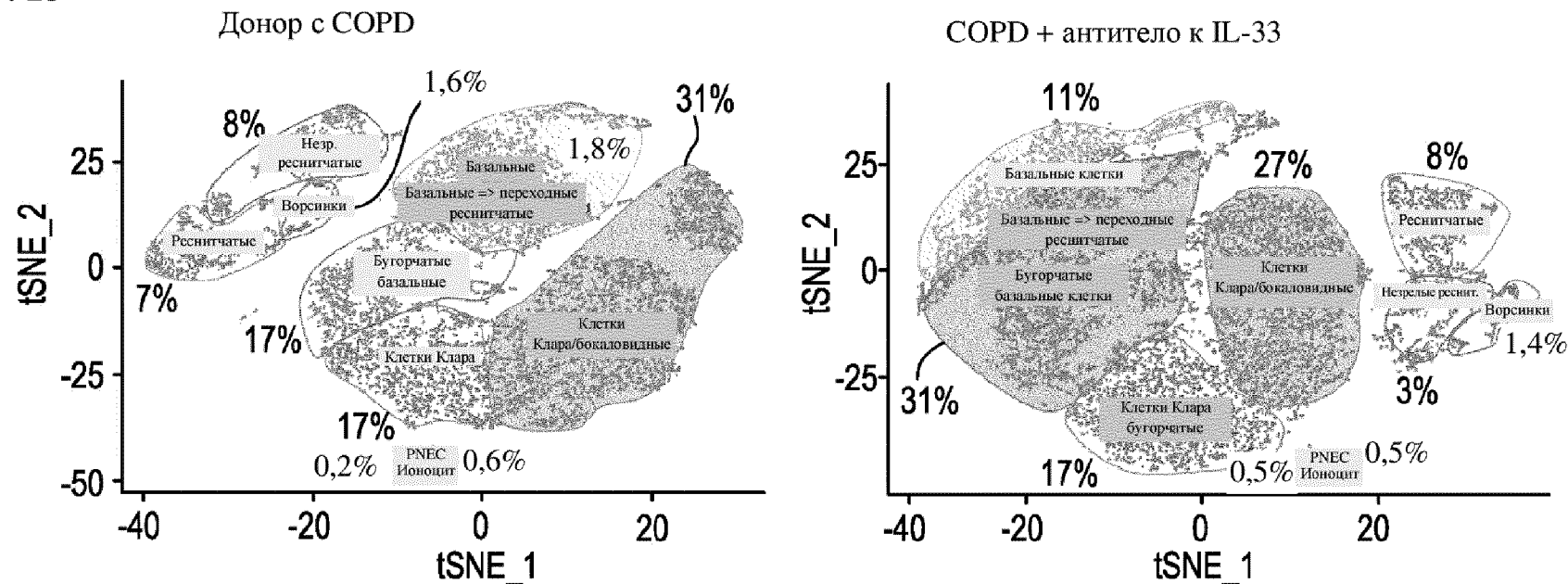
ФИГ. 16С



ФИГ. 17

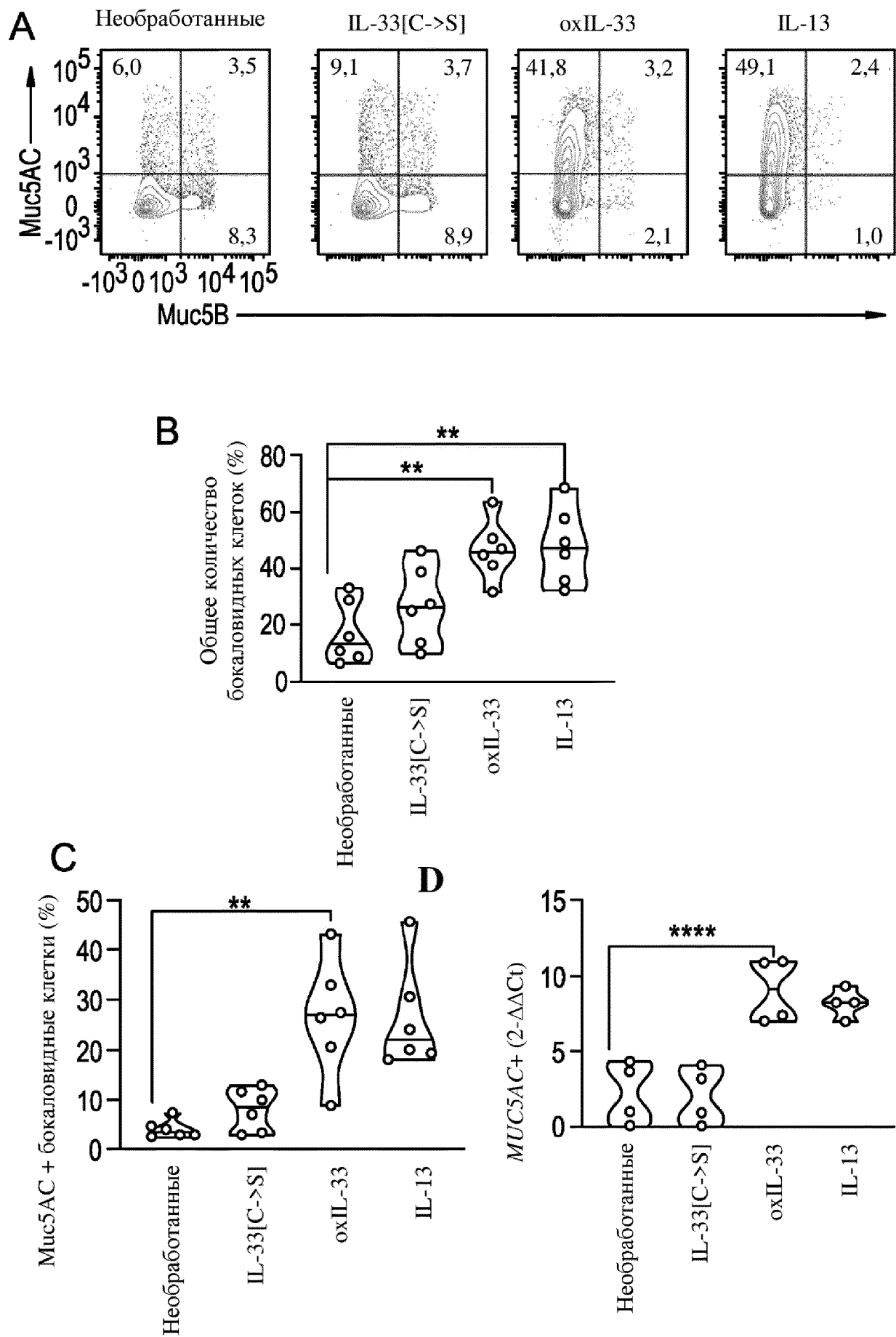


ФИГ. 18



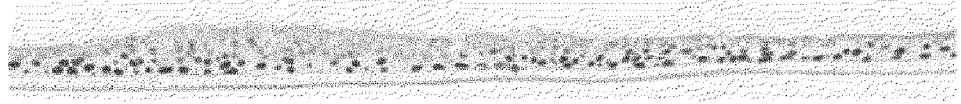
COPD		COPD + антитело к IL-33	
18%	Базальные клетки	11%	
7%	Реснитчатые	8%	
31%	(27% с выс. MUC5B) Клетки Клара/бокаловидные	27%	(19% с выс. MUC5B)
17%	Бугорчатые базальные клетки	31%	
8%	Незрелые реснитчатые	3%	
0,2%	Ионцит	0,5%	
17%	Клетки Клара бугорчатые	17%	
0,6%	PNEC	0,5%	
1,6%	Ворсинки	1,4%	

ФИГ. 19

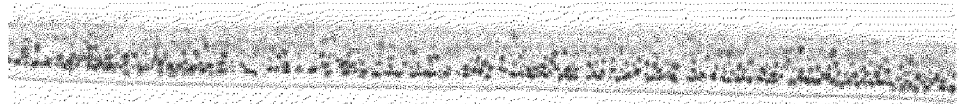


ФИГ. 20А

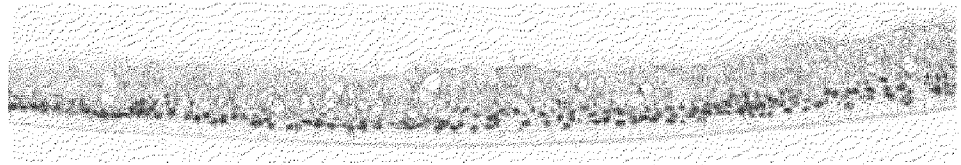
Здоровый без
обработки



Здоровый +
IL-33[C->S]

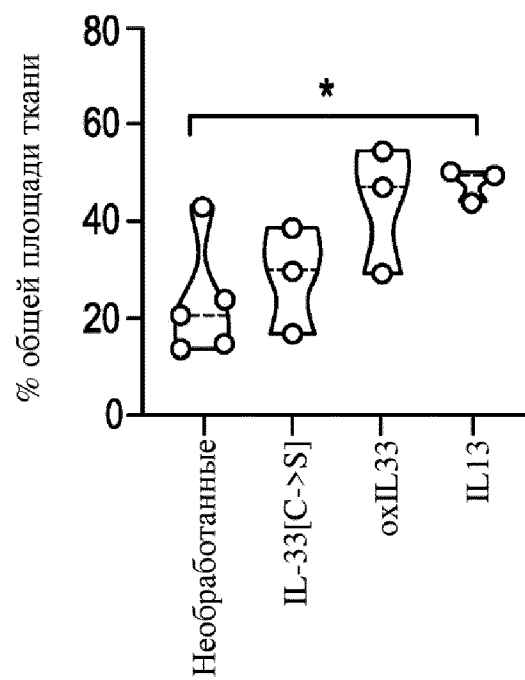


Здоровый +
oxIL33

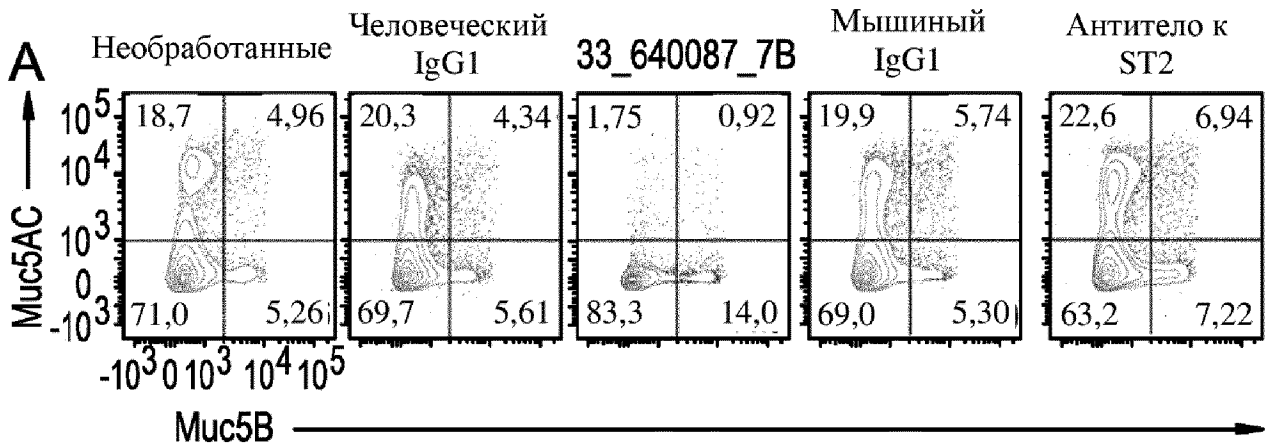


ФИГ. 20В

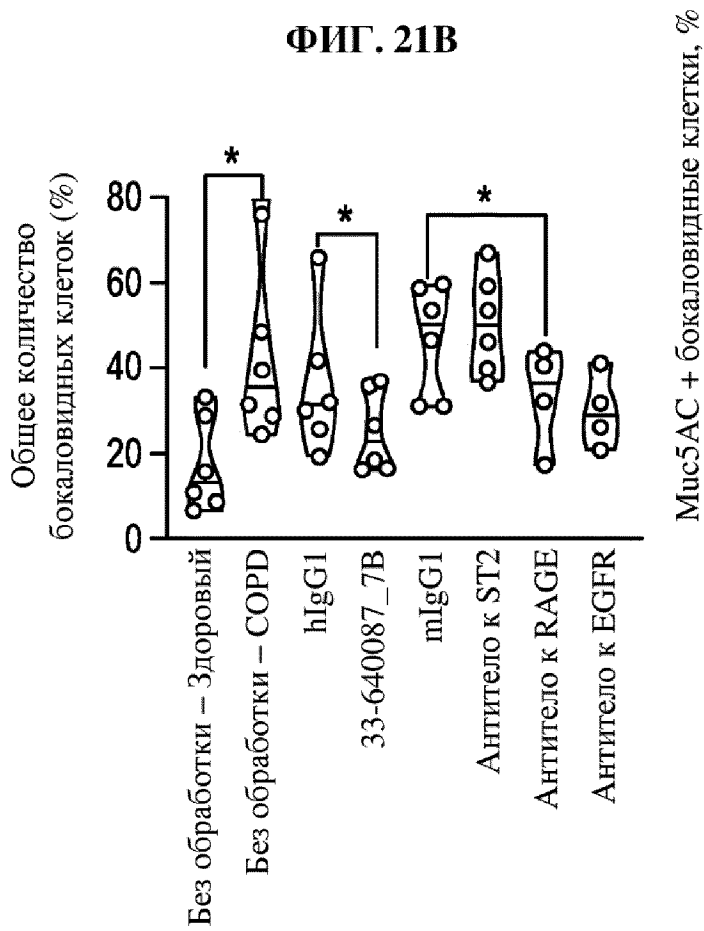
Муцин_NHBE



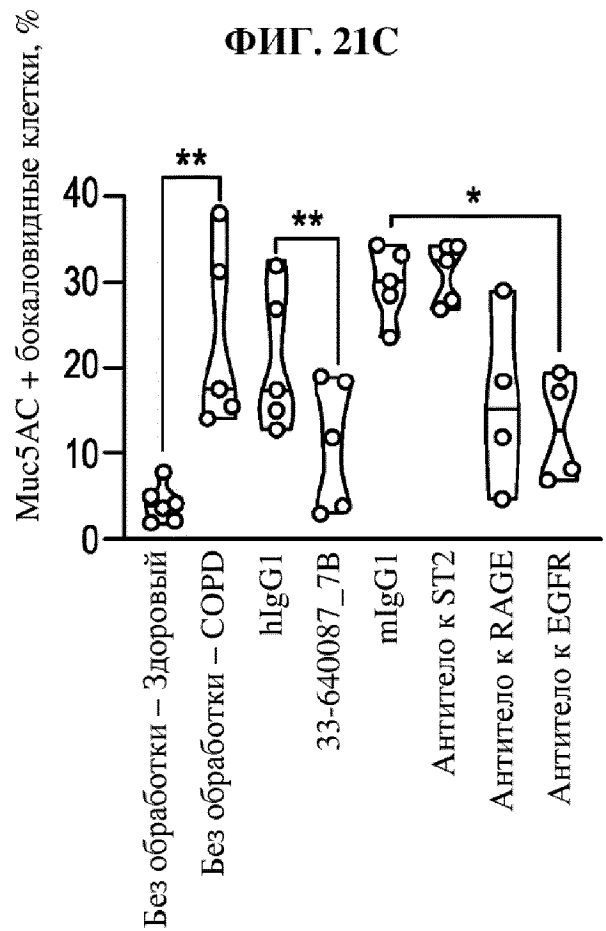
ФИГ. 21А



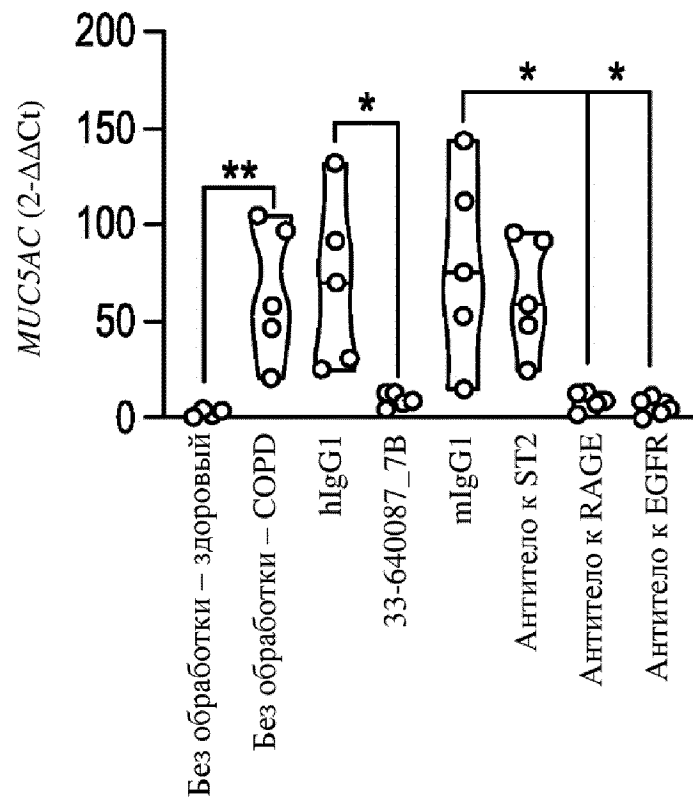
ФИГ. 21В



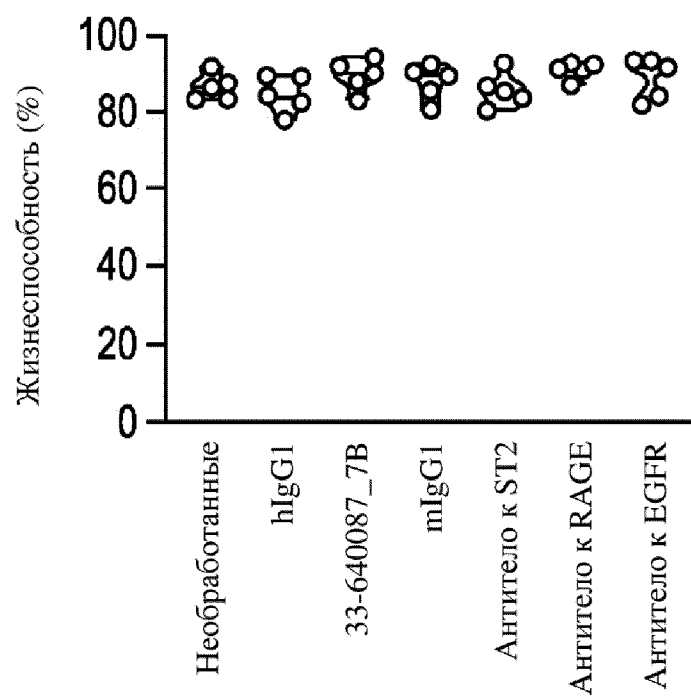
ФИГ. 21С

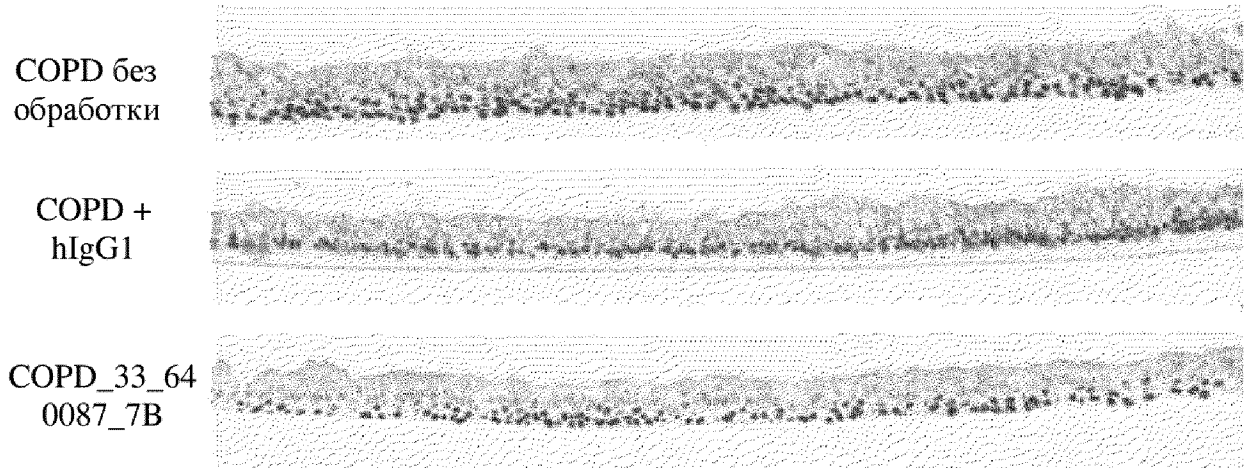


ФИГ. 21D

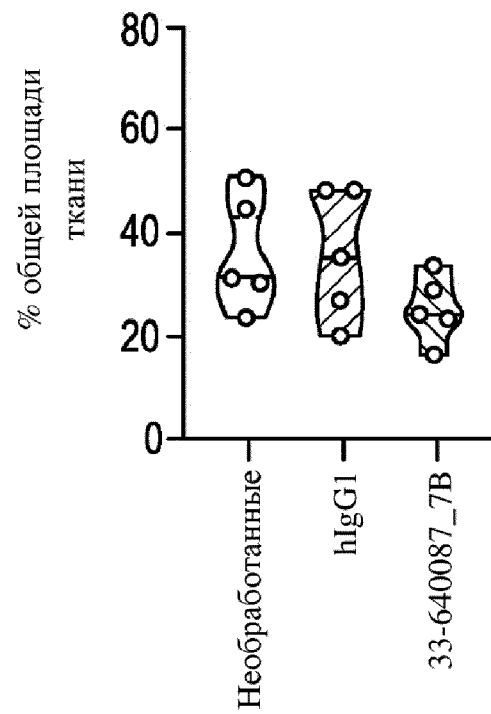


ФИГ. 21E



ФИГ. 22А**ФИГ. 22В**

Муцин_COPD



ФИГ. 23

