

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043630**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.07

(21) Номер заявки
201991324

(22) Дата подачи заявки
2017.11.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ

(31) **62/428,634; 62/473,738; 62/567,318**

(32) **2016.12.01; 2017.03.20; 2017.10.03**

(33) **US**

(43) **2020.03.17**

(86) **PCT/US2017/064041**

(87) **WO 2018/102597 2018.06.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Оренго Джейми М., Аллин Джинн,
Мерфи Эндрю Дж., Янкопулос
Джордж Д. (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) EP-A1-3027015
US-A1-2014271642
US-A1-2014271658
US-A1-2009074793
Anonymous: "Evaluation of SAR440340 and as Combination Therapy With Dupilumab in Moderate-to-Severe Asthma Patients - Full Text View - ClinicalTrials.gov", 1 January 2018 (2018-01-01), XP055443191, Retrieved from the Internet: URL:https://clinical.trials.gov/ct2/show/NCT03387852?sfpd_d=14 [retrieved on 2018-01-22], the whole document

(57) Изобретение относится к способам лечения воспалительных заболеваний или состояний, связанных или вызванных частично повышенными уровнями ИЛ-33 и ИЛ-4, в частности воспалительных заболеваний легких. Способы по изобретению включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, одной или более терапевтически эффективных доз антагониста ИЛ-33 отдельно или в комбинации с одной или более терапевтически эффективными дозами антагониста ИЛ-4Р. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы по изобретению включают применение антагонистов для лечения любого воспалительного заболевания или состояния, опосредованного частично усиленным ИЛ-33-опосредованным сигналингом и ИЛ-4-опосредованным сигналингом.

B1

043630

043630

B1

Область техники

Изобретение относится к способам лечения воспалительного состояния, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антагониста интерлейкина-33 (ИЛ-33) отдельно или в комбинации с антагонистом интерлейкина-4 (ИЛ-4). Более конкретно, данное изобретение относится к лечению воспалительных или обструктивных заболеваний легких или расстройств путем введения терапевтически эффективного количества антитела к интерлейкину-33 (ИЛ-33) отдельно или в комбинации с антителом к интерлейкину-4Р (ИЛ-4Р).

Уровень техники

Воспаление инициируется хозяином как защитный ответ, но часто может привести к системным патологиям. Количество воспалительных заболеваний легких, таких как астма, аллергия и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), растет в развитых странах, что приводит к серьезным последствиям для расходов на здравоохранение. Несколько воспалительных клеток и их медиаторы участвуют в развитии и прогрессировании этих заболеваний. В некоторых случаях эти заболевания отражают иммунный ответ 2-го типа, который характеризуется инфильтрацией в ткани эозинофилов, базофилов, тучных клеток, CD4⁺ Т-хелперных клеток 2 типа (Th2), врожденных лимфоидных клеток группы 2 (ILC2), макрофагов индуцированных интерлейкином-4 (ИЛ-4) и/или ИЛ-13, а также повышением сывороточного IgE и увеличением цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-9 и ИЛ-13.

Один цитокин, который, как полагают, играет роль в воспалительных заболеваниях легких, представляет собой интерлейкин-33 (ИЛ-33), провоспалительный цитокин, который высвобождается поврежденной эпителиальной тканью в ответ на такие воздействия, как аллергены, вирусы или дым. ИЛ-33 является членом семейства интерлейкинов-1 (ИЛ-1), который мощно стимулирует выработку цитокинов, ассоциированных с Т-хелпером 2 типа (Th2) (например, ИЛ-4). ИЛ-33 экспрессируется широким разнообразием типов клеток, включая фибробласты, тучные клетки, дендритные клетки, макрофаги, остеобласты, эндотелиальные клетки и эпителиальные клетки. Интерлейкин-33 (ИЛ-33) является лигандом для ST2 (иногда его называют "подавление онкогенности 2"), члена суперсемейства толл-подобного/интерлейкин-1 рецептора, который связывается с дополнительным белком ИЛ-1RAcP ("Дополнительный белок рецептора интерлейкина-1", для обзоров см., например, Kakkar and Lee, *Nature Reviews-Drug Discovery* 7 (10): 827-840 (2008), Schmitz et al., *Immunity* 23: 479-490 (2005); Liew et al., *Nature Reviews-Immunology* 10:103-110 (2010); США 2010/0260770; США 2009/0041718). После активации ST2/ИЛ-1RAcP с помощью ИЛ-33, сигнальный каскад запускается через нижестоящие молекулы, такие как MyD88 (фактор дифференцировки миелоида 88) и TRAF6 (фактор 6, связанный с рецептором ФНО), что приводит к активации NFκB (ядерный фактор-κB), среди прочих. ИЛ-33 сигналинг был вовлечен в качестве фактора в различные заболевания и расстройства, включая воспалительные заболевания легких, описанные в данном изобретении. (Liew et al., *Nature Reviews-Immunology* 10: 103-110 (2010)). Ингибиторы ИЛ-33 сигналинга были описаны, например, в США 9453072; US 8187596; US 2013/17373761; US 2014/0212412; US 2014/0271658; US 2014/0271642; US 2014/0004107; WO 2015/099175; WO 2015/106080; WO 2011/031600; WO 2014/164959; WO 2014/152195; WO 2013/165894; WO 2013/173761; EP 1725261; EP 10815921A1; и EP 2850103A2.

Интерлейкин-4 (ИЛ-4, также известный как фактор стимулирования В-клеток или BSF-1) также участвует в качестве ключевого цитокина, который управляет аллергическими и Т-хелперными клетками типа 2 (Th2), поляризованными воспалительными процессами. Было показано, что ИЛ-4 обладает широким спектром биологических активностей, включая стимуляцию роста Т-клеток, тучных клеток, гранулоцитов, мегакариоцитов и эритроцитов. ИЛ-4 индуцирует экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости класса II в покоящихся В-клетках и усиливает секрецию изотипов IgE и IgG1 стимулированными В-клетками. Биологические активности ИЛ-4 опосредуются специфическими рецепторами клеточной поверхности для ИЛ-4.

Альфа-рецептор ИЛ-4 человека (hIL-4R) (SEQ ID NO: 347) описан, например, в патенте США. №№ 5599905, 5767065 и 5840869. Антитела к hIL-4R описаны в патенте США №№ 5717072, 7186809 и 7605237. Способы использования антител к hIL-4R описаны в патенте США №№ 5714146; 5985280; 6716587 и 9290574.

Современные методы лечения воспалительных заболеваний легких оставляют значительные возможности для улучшения безопасности и эффективности у пациентов, страдающих, например, астмой и хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), особенно в снижении обострений. Несмотря на наличие многочисленных ингаляционных комбинаций противовоспалительных и бронхолитических препаратов, у многих пациентов продолжают обострения. Обострения могут потребовать использования системных кортикостероидов, которые эффективны из-за их широкой способности нейтрализовать иммунитет, но обременены нежелательными побочными эффектами, включая потерю костной ткани и инфекцию. Несколько биологических методов лечения, большинство из которых нацелены на отдельные иммунные медиаторы, используются на поздней стадии развития при астме и ХОБЛ. Однако из-за сложности воспалительной среды эти агенты, вероятно, будут ограничены в их применении.

Соответственно, в данной области существует неудовлетворенная потребность в новых комбинациях терапий для лечения и/или профилактики воспалительных заболеваний легких, таких как описанные в

данном изобретении.

Краткое описание сущности изобретения

В соответствии с некоторыми аспектами данного изобретения предлагаются способы лечения воспалительного заболевания или расстройства или, по меньшей мере, одного симптома, связанного с воспалительным заболеванием или расстройством, причем способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, одной или более доз терапевтически эффективного количества антагониста интерлейкина-33 (ИЛ-33) отдельно или в комбинации с одной или более дозами терапевтически эффективного количества антагониста интерлейкина-4 (ИЛ-4), или фармацевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33 и антагонист ИЛ-4 α , нуждающемуся в этом пациенту.

В одном варианте осуществления изобретения введение антагониста ИЛ-33 в комбинации с антагонистом ИЛ-4 приводит к повышенной терапевтической эффективности по сравнению с таковой, наблюдаемой при введении только антагониста ИЛ-33 или только антагониста ИЛ-4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонист ИЛ-33 представляет собой любой агент, который способен блокировать, ослаблять или иным образом вмешиваться в ИЛ-33 сигналинг и/или взаимодействие между ИЛ-33 и клеточным рецептором (например, ST2) или ко-рецептором (например, ИЛ-1RAC β) или его комплексом. Любое из вышеперечисленного может блокировать или ингибировать по меньшей мере одну биологическую активность ИЛ-33.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонист ИЛ-33 представляет собой антитело, которое связывается с или взаимодействует с ИЛ-33 и блокирует взаимодействие ИЛ-33 с его рецептором, ST2 и предотвращает или ингибирует взаимодействие ST2 с корецептором, ИЛ1-RAC β , или предотвращает образование сигнального комплекса.

В одном варианте осуществления изобретения антагонист ИЛ-33 представляет собой моноклональное антитело, которое связывается с или специфически взаимодействует с ИЛ-33 человека.

В одном варианте осуществления изобретения антагонист ИЛ-33 представляет собой ловушку на основе рецептора, которая связывается с или специфически взаимодействует с ИЛ-33 человека.

В одном варианте осуществления изобретения, антагонист ИЛ-4 представляет собой антагонист рецептора интерлейкина-4 (ИЛ-4R).

В одном варианте осуществления изобретения, антагонист ИЛ-4R является любой агент, который связывается с или взаимодействует с ИЛ-4R α или лигандом ИЛ-4R, и ингибирует или ослабляет нормальную биологическую функцию сигналинга типа 1 и/или типа 2 рецептора ИЛ-4.

В одном варианте осуществления изобретения антагонист ИЛ-4R представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывается с ИЛ-4R α человека.

В одном варианте осуществления изобретения антагонист ИЛ-4R представляет собой моноклональное антитело, которое связывается с ИЛ-4R α и блокирует как ИЛ-4, так и ИЛ-13 опосредованный сигналинг через либо рецептор типа I или типа II.

В одном варианте осуществления изобретения моноклональное антитело, которое специфически связывается с ИЛ-4R α человека и блокирует как ИЛ-4, так и ИЛ-13 опосредованный сигналинг, представляет собой дупилумаб или его биоэквивалент.

В одном варианте осуществления изобретения способ лечения воспалительного расстройства или состояния осуществляют с использованием комбинации REGN3500, имеющей пару аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 274/282 переменного участка тяжелой цепи/переменного участка легкой цепи (HCVR/LCVR), и дупилумаба, имеющего пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 337/338.

В одном варианте осуществления изобретения, воспалительное заболевание или расстройство, поддающееся лечению способами по изобретению, выбрано из группы, состоящей из астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), астмы и синдрома перекрытия ХОБЛ (ACOS), атопического дерматита, полипов носа, аллергической реакции, хронического бронхита, эмфиземы, хронического риносинусита с или без полипов носа, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, гиперчувствительного пневмонита, рассеянного склероза, артрита (включая остеоартрит, ревматоидный артрит или псориазический артрит), аллергического ринита, фиброза, эозинофильного эзофагита, васкулита, крапивницы, синдрома Шурга-Штрауса, воспалительной боли и псориаза.

В одном варианте осуществления изобретения, астма представляет собой эозинофильную астму.

В одном варианте осуществления изобретения, астма представляет собой неэозинофильную астму.

В одном варианте осуществления изобретения, астма представляет собой аллергическую астму.

В одном варианте осуществления изобретения, астма представляет собой неаллергическую астму.

В одном варианте осуществления изобретения, астма представляет собой тяжелую рефрактерную астму.

В одном варианте осуществления изобретения, астма представляет собой устойчивую к стероидам астму.

В одном варианте осуществления изобретения, астма представляет собой чувствительную к стероидам астму.

В одном варианте осуществления изобретения, астма представляет собой стероидную рефрактерную астму.

В одном варианте осуществления изобретения, астма представляет собой обострение астмы.

В одном варианте осуществления изобретения, воспалительное заболевание или расстройство ослабляется, или уменьшается по тяжести, продолжительности или частоте возникновения, или по меньшей мере один симптом, связанный с воспалительным заболеванием или расстройством, ослабляется или уменьшается по тяжести, продолжительности или частоте возникновения.

В одном варианте осуществления изобретения, введение терапевтически эффективного количества одной или более доз антагониста ИЛ-33 субъекту, нуждающемуся только в этом, или в сочетании с одной или более дозами терапевтически эффективного количества антагониста ИЛ-4Р с повышенной терапевтической эффективностью, измеряемой любым одним или более из следующих параметров:

а) снижение частоты одного или более из следующих: эозинофилы, активированные В-клетки, активированные CD8, Т-клетки, или соотношение CD4/CD8 Т-клеток в образце ткани;

б) снижение одного или более из следующих: интерлейкин-1 бета (ИЛ-1 β), интерлейкин-4 (ИЛ-4), интерлейкин-5 (ИЛ-5), интерлейкин-6 (ИЛ-6), интерлейкин-13 (ИЛ-13), уровни белка-1 хемоаттрактанта моноцитов (MCP-1) или уровни фактора некроза опухоли альфа (ФНО α) в образце ткани; или

с) снижение уровня экспрессии гена одного или более из следующих: P4, P5, P6, P9, P13, P1r11, P13ra2, ФНО, Tgfb1, Ccl2, Ccl11, Ccl24, Col15a1 или Col24a1 в образце ткани.

В одном варианте осуществления изобретения введение терапевтически эффективного количества одной или более доз антагониста ИЛ-33 субъекту, нуждающемуся только в этом, или в сочетании с одной или более дозами терапевтически эффективного количества антагониста ИЛ-4Р с повышенной терапевтической эффективностью, как дополнительно измеряется одним или более из следующих:

д) снижение уровней сывороточного IgE;

е) снижение метаплазии бокаловидных клеток в легких;

ф) улучшение консолидации легких; или

г) уменьшение субэпителиального фиброза в легких.

В одном варианте осуществления изобретения образец ткани получают из легкого.

В одном варианте осуществления изобретения образец ткани выбран из группы, состоящей из печени, почек, сердца или цельной крови.

В определенных вариантах осуществления изобретения клетки крови, сыворотка или плазма могут использоваться для измерения одного или более параметров, описанных выше.

В одном варианте осуществления изобретения хроническое обструктивное заболевание легких, которое поддается лечению способами по изобретению, усугубляется одним или более из следующих факторов: астма, вирусное заболевание, бактериальная инфекция, воздействие аллергена, воздействие химического вещества или химических паров, или воздействие раздражителя окружающей среды или загрязнения воздуха.

В связанном варианте осуществления изобретения астма, которую можно лечить способами по изобретению, усугубляется одним или более из следующих факторов: вирусное заболевание, бактериальная инфекция, воздействие аллергена, воздействие химического вещества или химических паров, или воздействие раздражителя окружающей среды или загрязнения воздуха.

В определенном варианте осуществления изобретения, астму, которую можно лечить способами по изобретению, выбирают из группы, состоящей из эозинофильной астмы, неэозинофильной астмы, стероид-устойчивой астмы и стероид-чувствительной астмы.

В одном варианте осуществления изобретения хроническое обструктивное заболевание легких, которое можно лечить способами по изобретению, возникает или частично усугубляется сигаретным дымом.

В одном варианте осуществления изобретения пациенты, страдающие хроническим обструктивным заболеванием легких, которое можно лечить способами по изобретению, могут демонстрировать или не демонстрировать увеличение количества эозинофилов.

В одном варианте осуществления изобретения пациенты, страдающие от астмы и синдрома перекрывания ХОБЛ (ACOS), которые поддаются лечению способами по изобретению, могут демонстрировать или не демонстрировать увеличение количества эозинофилов.

Второй аспект изобретения предусматривает лечение воспалительного заболевания или расстройства или, по меньшей мере, одного симптома, связанного с воспалительным заболеванием или расстройством, путем введения эффективного количества одного или более дополнительных терапевтических агентов, полезных для облегчения воспалительного заболевания или расстройства, или по меньшей мере, одного симптома воспалительного заболевания или расстройства в сочетании с терапевтически эффективным количеством антагониста интерлейкина-33 (ИЛ-33), например, антитела к ИЛ-33 или ловушки ИЛ-33, и терапевтически эффективным количеством антагониста интерлейкина-4 (ИЛ-4), например, антитела к ИЛ-4Р, такого как дупилумаб, или его терапевтического эквивалента.

В одном варианте осуществления изобретения один или более дополнительных терапевтических

агентов выбирают из группы, состоящей из нестероидного противовоспалительного средства (NSAID), кортикостероида (например, ингаляционного кортикостероида или ICS), β_2 адренергического агониста длительного действия (LABA), длительно действующего мускаринового антагониста (LAMA), бронхиального дилататора, антигистамина, эпинефрина, противоотечного средства, антагониста тимального стромального лимфопоэтина (TSLP), антагониста ИЛ-1, антагониста ИЛ-8, антагониста ИЛ-13, антагониста ИЛ-13, другого антагониста ИЛ-4, двойного антагониста ИЛ-4/ИЛ-13, двойного антагониста ИЛ-33/ИЛ-13, антагониста ИЛ-5, антагониста ИЛ-6, антагониста ИЛ-12/23, антагониста ИЛ-22, антагониста ИЛ-25, антагониста ИЛ-17, антагониста ИЛ-31, ингибитора ФНО, ингибитора IgE, ингибитора лейкотриена, перорального ингибитора PDE4, метилксантина, недокромила натрия, кромолина натрия, длительно действующего бета 2-агониста и другого антагониста ИЛ-33 (например, другое антитело к ИЛ-33, ловушка на основе другого рецептора ИЛ-33, антагонист ST2, включая антитело к ST2, или растворимый рецептор ST2, или антагонист к другому рецептору ИЛ-33, отличный от ST2, или антагонист ИЛ-1RAcP, включая антитело к ИЛ-1RAcP, или антитело, которое взаимодействует с ИЛ-33/ST2 комплексом).

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к способам лечения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) от умеренной до тяжелой степени тяжести, включающим одновременное введение антагониста ИЛ-4Р (например, дупилумаба) и антагониста ИЛ-33 (например, REGN3500), кроме того для фоновой терапии, включая, например, ингаляционный кортикостероид (ICS) и/или β_2 адренергический агонист длительного действия (LABA) и/или мускариновый антагонист длительного действия (LAMA).

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к способам снижения частоты случаев "потери контроля над астмой" (ЛОАС), включающим лечение пациентов, страдающих астмой, антагонистом ИЛ-4Р (например, дупилумабом) в сочетании с антагонистом ИЛ-33 (например, REGN3500). В некоторых вариантах осуществления изобретения, комбинированное применение антагониста ИЛ-4Р в сочетании с антагонистом ИЛ-33 обеспечивает более эффективный результат, чем введение либо только антагониста ИЛ-4Р, либо только антагониста ИЛ-33.

В связанном варианте осуществления изобретения введение антагониста ИЛ-33 в комбинации с антагонистом ИЛ-4Р приводит к увеличению иммунного ответа типа 1 и/или снижению иммунного ответа типа 2, вызванному заболеванием, или возбудителем заболевания или аллергии.

Третий аспект изобретения относится к способу лечения фиброзного заболевания или расстройства или, по меньшей мере, одного симптома, связанного с фиброзным заболеванием или расстройством, причем способ включает введение комбинации антагониста ИЛ-33 (антитела к ИЛ-33 или ловушки ИЛ-33), который специфически связывается с ИЛ-33, и антитела, которое специфически связывается с ИЛ-4Р α или его антигенсвязывающим фрагментом, или фармацевтической композиции, содержащей антагонист ИЛ-33 и антагонист ИЛ-4 α , пациенту, нуждающийся в этом, причем фиброзное заболевание или расстройство ослаблено или уменьшено по тяжести или продолжительности, или по меньшей мере один симптом, связанный с фиброзным заболеванием или расстройством, смягчен или уменьшен по тяжести, продолжительности или частоте возникновения.

В одном варианте осуществления изобретения лечение фиброзного заболевания антагонистом ИЛ-33 в комбинации с антагонистом ИЛ-4Р может привести к восстановлению фиброзной ткани до ее нормального состояния.

В одном варианте осуществления изобретения фиброзные заболевания или расстройства, которые подаются лечением пути введения анти-ИЛ-33 и ИЛ-4Р антагонистов по изобретению, таких как антитела к ИЛ-33 или ИЛ-33 ловушек в комбинации с антителами к ИЛ-4Р α , описанным в данном изобретении, включают фиброз легких (например, идиопатический фиброз легких, плеомицин-индуцированный фиброз легких, асбест-индуцированный фиброз легких и синдром облитерирующего бронхиолита), хроническую астму, фиброз, связанный с острым повреждением легких и острым респираторным дистрессом (например, вызванный бактериальной пневмонией фиброз, фиброз, вызванный травмой, фиброз, вызванный вирусной пневмонией, фиброз, вызванный ИВЛ, фиброз, вызванный не легочным сепсисом, и фиброз, вызванный аспирацией), силикоз, фиброз, вызванный радиацией, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ, которая может или не может быть связана с, вызванная частично или в результате воздействия сигаретного дыма при активном или пассивном курении), склеродермию, фиброз глаз, фиброз кожи (например, склеродермия), фиброз печени (например, цирроз печени, алкогольный фиброз печени, неалкогольный стеатогепатит (NASH), повреждение желчных протоков, первичный билиарный цирроз, инфекционный или вирусный фиброз печени, аутоиммунный гепатит, почечный (почечный) фиброз, фиброз сердца, атеросклероз, рестеноз стента и миелофиброз.

Четвертый аспект изобретения относится к способу предотвращения или уменьшения тяжести аллергического ответа, включающему введение одной или более доз терапевтически эффективного количества антагониста ИЛ-33 в комбинации с одной или более дозами терапевтически эффективного количества антагониста ИЛ-4Р субъекту, нуждающемуся в этом, причем введение комбинации приводит к повышенной терапевтической эффективности для предотвращения или уменьшения тяжести аллергического ответа по сравнению с таковым, наблюдаемым при введении только антагониста ИЛ-33 или только

антагониста ИЛ-4Р. Субъект, которого лечат антагонистом ИЛ-33 в комбинации с антагонистом ИЛ-4Р, может демонстрировать пониженную чувствительность к, или уменьшенную аллергическую реакцию на аллерген, или может не испытывать какую-либо чувствительность или аллергическую реакцию к, или анафилактическую реакцию на аллерген после введения комбинации антагониста ИЛ-33 и антагониста ИЛ-4Р или композиции, содержащей антагониста.

В одном варианте осуществления изобретения, антагонист ИЛ-33 для применения в способах по изобретению представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с или специфически взаимодействует с ИЛ-33 человека. Антитело к ИЛ-33 или его антигенсвязывающий фрагмент может блокировать взаимодействие ИЛ-33 и ST2, или может обеспечить низкую аффинность связывания ИЛ-33 с рецептором ST2. При этом ST2 может быть запрещено взаимодействовать с ИЛ-1R α сР. Как таковые, антитела к ИЛ-33 по изобретению полезны, среди прочего, для ингибирования передачи сигналов, опосредованных ИЛ-33, и для лечения заболеваний и расстройств, вызванных или связанных с активностью и/или передачей сигналов ИЛ-33.

В одном варианте осуществления изобретения, антитело к ИЛ-33 или его антигенсвязывающий фрагмент снижает частоту одного или более из следующих: эозинофилы, CD4 $^+$ Т-клетки, В-клетки, ST2 $^+$ /CD4 $^+$ клетки в популяции Т-клеток или уменьшает соотношение CD4/CD8 Т-клеток в легких при введении млекопитающему с аллерген-индуцированным воспалением легких.

В одном варианте осуществления изобретения, антитело к ИЛ-33 или его антигенсвязывающий фрагмент снижает уровень экспрессии одного или более из следующих: ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-13, Ccl2, Ccl11, Ccl24 или MCP-1 в легких при введении млекопитающему, имеющему аллерген-индуцированное воспаление легких.

В одном варианте осуществления изобретения, антитело к ИЛ-33 или его антигенсвязывающий фрагмент уменьшает уровни сывороточного IgE, метаплазию бокаловидной клетки, или толщину эпителиального коллагена в легких при введении млекопитающему, имеющему аллерген-индуцированное воспаление легких.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к ИЛ-33, которые специфически связываются с ИЛ-33 человека, или его антигенсвязывающими фрагментами, которые можно использовать в способах по изобретению, содержат три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащие в переменном участке тяжелой цепи (HCVR) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 и 308; и содержит три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащие в переменном участке легкой цепи (LCVR) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298 и 316.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к ИЛ-33, которые специфически связываются с ИЛ-33 человека или его антигенсвязывающими фрагментами, которые можно использовать в способах по изобретению, содержат переменный участок тяжелой цепи (HCVR), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 и 308, или их по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Согласно определенным вариантам осуществления изобретения анти-ИЛ-33-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты для использования в способах по изобретению содержат переменный участок легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298 и 316, или их по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения анти-ИЛ-33-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты для использования в способах по изобретению содержат пару последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 и 308/316.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения анти-ИЛ-33-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты для использования в способах по изобретению содержат домен CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296 и 314, или по существу аналогичная их последовательность, имеющая в по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304 и 322, или их по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения анти-ИЛ-33-антитела или их антиген-

связывающие фрагменты для использования в способах по изобретению содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16, 24/32, 40/48, 56/64, 72/80, 88/96, 104/112, 120/128, 136/144, 152/160, 168/176, 184/192, 200/208, 216/224, 232/240, 248/256, 264/272, 280/288, 296/304 и 314/322.

Согласно определенным вариантам осуществления изобретения анти-ИЛ-33-антитела или их антигенсвязывающие фрагменты для использования в способах по изобретению дополнительно содержат домен CDR1 (HCDR1) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292 и 310 или их по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294 и 312 или их по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR1 (LCDR1) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300 и 318, или их по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR2 (LCDR2) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302 и 320 или их по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Некоторые неограничивающие иллюстративные анти-ИЛ-33 антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые можно использовать в способах по изобретению, содержат домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответственно, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 (например, H1M9559N); 20-22-24-28-30-32 (например, H1M9566N); 36-38-40-44-46-48 (например, H1M9568N); 52-54-56-60-62-64 (например, H4N9629P); 68-70-72-76-78-80 (например, H4N9633P); 84-86-88-92-94-96 (например, H4N9640P); 100-102-104-108-110-112 (например, H4N9659P); 116-118-120-124-126-128 (например, H4N9660P); 132-134-136-140-142-144 (например, H4N9662P); 148-150-152-156-158-160 (например, H4N9663P); 164-166-168-172-174-176 (например, H4N9664P); 180-182-184-188-190-192 (например, H4N9665P); 196-198-200-204-206-208 (например, H4N9666P); 212-214-216-220-222-224 (например, H4N9667P); 228-230-232-236-238-240 (например, H4N9670P); 244-246-248-252-254-256 (например, H4N9671P); 260-262-264-268-270-272 (например, H4N9672P); 276-278-280-284-286-288 (например, H4N9675P); 292-294-296-300-302-304 (например, H4N9676P); и 310-312-314-318-320-322 (H1M9565N).

Согласно определенным вариантам осуществления изобретения анти-ИЛ-33 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты для использования в способах по изобретению, например, для лечения воспалительных состояний, содержат домены CDR тяжелой и легкой цепи, содержащие в переменном участке тяжелой и легкой цепи (HCVR/LCVR) последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 и 308/316. Способы и методы идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и могут быть применены для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, описанных в данном изобретении. Типовые соглашения, которые могут быть применены для определения границ CDR, включают, например, определение по Кабату, определение по Чотиа и определение по АтМ. В общем случае определение по Кабату основано на вариабельности последовательности, определение по Чотии основано на местоположении структурных петлевых участков, а определение по АтМ является компромиссом между подходами Кабата и Чотии. См., например, Rabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Бетесда, штат Мэриленд. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Публичные базы данных также доступны для идентификации последовательностей CDR в антителе.

В одном варианте осуществления изобретения антитело к ИЛ-33 или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах по изобретению содержит CDR тяжелой и легкой цепи пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 274/282.

В связанном варианте осуществления изобретения, антитело к ИЛ-33 или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах по изобретению содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно SEQ ID NO: 276-278-280-284-286-288.

В одном варианте осуществления изобретения антитело, которое специфически связывается с интерлейкином-33 (ИЛ-33) человека, или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах по изобретению, содержит: (а) вариабельный участок тяжелой цепи (HCVR), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274; и (b) вариабельный участок легкой цепи (LCVR), имеющий амино-

кислотную последовательность SEQ ID NO: 282.

В одном варианте осуществления изобретения антитело к ИЛ-33 или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах по изобретению содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR: SEQ ID NO: 274/282.

В одном варианте осуществления изобретения антитело к ИЛ-33 или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах по изобретению взаимодействует с аминокислотной последовательностью в диапазоне от около 1 положения до около 12 положения SEQ ID NO: 349, и/или с аминокислотной последовательностью в диапазоне от около 50 положения до около 94 положения последовательности SEQ ID NO: 349, как определено с помощью обмена водорода/дейтерия.

В одном варианте осуществления изобретения антитело к ИЛ-33 или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах по изобретению взаимодействует с аминокислотной последовательностью в диапазоне от около 112 положения до около 123 положения SEQ ID NO: 348, и/или с аминокислотной последовательностью в диапазоне от около 161 положения до около 205 положения последовательности SEQ ID NO: 348, как определено с помощью обмена водорода/дейтерия.

В одном варианте осуществления изобретения антитело к ИЛ-33 или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах по изобретению взаимодействует либо с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 350, либо с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 351, или взаимодействует с обеими SEQ ID NO: 350 и 351, как определено с помощью обмена водорода/дейтерия.

В одном варианте осуществления изобретения антитело к ИЛ-33 или его антигенсвязывающий фрагмент за использование в способах по изобретению конкурирует за связывание с ИЛ-33 с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 274/282.

В одном варианте осуществления изобретения антитело к ИЛ-33 или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах по изобретению связывается с тем же эпитопом на ИЛ-33, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 274/282.

В пятом аспекте изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим анти-ИЛ-33 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, для использования в способах по изобретению. Рекомбинантные векторы экспрессии, несущие нуклеиновые кислоты по изобретению, и клетки-хозяева, в которые такие векторы были введены, также включены в изобретение, как и способы получения антител путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать антитела, и восстанавливать произведенные антитела.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способам использования антитела или его фрагмента, которое специфически связывается с ИЛ-33 человека, содержащим HCVR, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289 и 307, или по существу идентичной последовательностью, имеющей, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% его гомологии.

Данное изобретение также относится к способам использования антитела или его фрагмента, которое специфически связывается с ИЛ-33 человека, содержащим LCVR, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281, 297 и 315, или по существу идентичной последовательностью, имеющей, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% его гомологии.

Данное изобретение также относится к способам применения антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела, которое специфически связывается с ИЛ-33 человека, содержащим домен HCVR3, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151, 167, 183, 199, 215, 231, 247, 263, 279, 295 и 313, или по существу идентичной последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% его гомологии; и домен LCVR3, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159, 175, 191, 207, 223, 239, 255, 271, 287, 303 и 321 или по существу идентичной последовательностью, имеющей, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% гомологии.

Данное изобретение также относится к способам использования антитела или его фрагмента, которое специфически связывается с ИЛ-33 человека, которое дополнительно содержит домен HCVR1, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 163, 179, 195, 211, 227, 243, 259, 275, 291 и 309 или по существу идентичной последовательностью, имеющей по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% его гомологии; домен HCVR2, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149, 165, 181, 197, 213, 229, 245, 261, 277, 293 и 311, или по существу идентичной последовательностью, имеющей по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% гомологии; домен LCVR1, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11,

27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155, 171, 187, 203, 219, 235, 251, 267, 283, 299 и 317 или по существу идентичной последовательностью, имеющей по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% гомологии; и домен LCDR2, кодируемый нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157, 173, 189, 205, 221, 237, 253 269, 285, 301 и 319, или по существу идентичной последовательностью, имеющей по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% гомологии.

Согласно определенным вариантам осуществления изобретения способы по изобретению предусматривают использование антитела или его фрагмента, который специфически связывается с ИЛ-33 человека, который содержит последовательности CDR тяжелой и легкой цепи, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 и 9 (например, H1M9559N), 17 и 25 (например, H1M9566N), 33 и 41 (например, H1M9568N), 49 и 57 (например, H4N9629P), 65 и 73 (например, H4N9633P), 81 и 89 (например, H4N9640P), 97 и 105 (например H4N9659P), 113 и 121 (например, H4N9660P), 129 и 137 (например, H4N9662P), 145 и 153 (например, H4N9663P), 161 и 169 (например, H4N9664P), 177 и 185 (например, H4N9665P), 193 и 201 (например, H4N9666P), 209 и 217 (например, H4N9667P), 225 и 233 (например, H4N9670P), 241 и 249 (например, H4N9671P), 257 и 265 (например, H4N9672P), 273 и 281 (например, H4N9675P), 289 и 297 (например, H4N9676P), или 307 и 315 (H1M9565N).

В одном варианте осуществления изобретения антагонист ИЛ-33 для использования в способах по изобретению представляет собой ловушку на основе рецептора ИЛ-33, такую как описанная в данном изобретении (см. Фиг. 1).

В одном варианте осуществления изобретения ловушка на основе рецептора ИЛ-33 содержит первый ИЛ-33 связывающий домен (D1), присоединенный к мультимеризирующему домену (M), где D1 содержит ИЛ-33-связывающую часть белка ST2.

В одном варианте осуществления изобретения, ловушка ИЛ-33 для использования в способах по изобретению дополнительно содержит второй ИЛ-33 связывающий домен (D2), присоединенный к D1 и/или M, где D2 содержит внеклеточную часть белка ИЛ-1RAcP.

В одном варианте осуществления изобретения, D1 присоединен к N-концу M.

В одном варианте осуществления изобретения D1 присоединен к C-концу M.

В одном варианте осуществления изобретения D2 присоединен к N-концу M.

В одном варианте осуществления изобретения D2 присоединен к C-концу M.

В одном варианте осуществления изобретения D1 присоединен к N-концу D2, и где D2 присоединен к N-концу M.

В одном варианте осуществления изобретения D1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 328 или 329 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность к ней.

В одном варианте осуществления изобретения D2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 330 или 331, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с ней.

В одном варианте осуществления изобретения антагонист ИЛ-33 для использования в способах по изобретению содержит первый ИЛ-33 связывающий домен (D1), присоединенный к первому мультимеризирующему домену (M1), и второй ИЛ-33 связывающий домен (D2), присоединенный ко второму мультимеризирующему домену (M2), где домены D1 и/или D2 содержат ИЛ-33-связывающую часть рецептора, выбранного из группы, состоящей из ST2 и ИЛ-1RAcP.

В одном варианте осуществления изобретения антагонист ИЛ-33 для использования в способах по изобретению содержит третий ИЛ-33 связывающий домен (D3), который присоединен либо к D1, или к M1, и где D3 содержит ИЛ-33-связывающую часть рецептора, выбранного из группы, состоящей из ST2 и ИЛ-1RAcP.

В одном варианте осуществления изобретения антагонист ИЛ-33 для использования в способах по изобретению содержит четвертый ИЛ-33 связывающий домен (D4), который присоединен либо к D2, или к M2, и где D4 содержит ИЛ-33-связывающую часть рецептора, выбранного из группы, состоящей из ST2 и ИЛ-1RAcP.

В одном варианте осуществления изобретения D1 присоединен к N-концу M1, а D2 присоединен к N-концу M2.

В одном варианте осуществления изобретения D3 присоединен к N-концу D1.

В одном варианте осуществления изобретения D3 присоединен к C-концу M1.

В одном варианте осуществления изобретения D4 присоединен к N-концу D2.

В одном варианте осуществления изобретения D4 присоединен к C-концу M2.

В одном варианте осуществления изобретения D3 присоединен к N-концу D1, а D1 присоединен к N-концу M1; и где D4 присоединен к N-концу D2, а D2 присоединен к N-концу M2.

В одном варианте осуществления изобретения D3 идентичен или по существу идентичен D4, и где D1 идентичен или по существу идентичен D2.

В одном варианте осуществления изобретения каждый из D3 и D4 содержит ИЛ-33-связывающую

часть белка ST2; и где каждый из D1 и D2 содержит внеклеточную часть белка ИЛ-1RAcP.

В одном варианте осуществления изобретения ловушка ИЛ-33 для использования в способах по изобретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 323, 324, 325, 326 и 327.

В одном варианте осуществления изобретения антагонист ИЛ-4 для использования в способах по изобретению представляет собой антагонист рецептора интерлейкина-4 (ИЛ-4Р).

В одном варианте осуществления изобретения антагонист ИЛ-4Р для использования в способах по данному изобретению представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с ИЛ-4Р α и предотвращает взаимодействие ИЛ-4 и/или ИЛ-13 с рецептором ИЛ-4 типа 1 или типа 2.

В связанном варианте осуществления изобретения антитело к ИЛ-4Р или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах по изобретению предотвращает взаимодействие ИЛ-4 и/или ИЛ-13 с рецепторами ИЛ-4 как типа 1, так и типа 2.

В одном варианте осуществления изобретения антагонист ИЛ-4Р для использования в способах по данному изобретению представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывается с ИЛ-4Р α человека.

В одном варианте осуществления изобретения моноклональное антитело, которое специфически связывается с ИЛ-4Р α человека для применения в способах по изобретению представляет собой дупилумаб или его биоэквивалент.

В определенном варианте осуществления изобретения антитело к ИЛ-4Р или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах по изобретению содержит определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR) переменного участка тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 335 или SEQ ID NO: 337, и определяющие комплементарность участки легкой цепи (LCDR) переменного участка легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 336 или SEQ ID NO: 338.

В связанном варианте осуществления изобретения антитело к ИЛ-4Р или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах по изобретению содержит три HCDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три LCDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 339, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 340; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 341; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 342; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 343; и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 344.

В одном варианте осуществления изобретения антитело к ИЛ-4Р или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах по изобретению содержит HCVR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 335 или SEQ ID NO: 337, и LCVR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 336 или SEQ ID NO: 338.

В одном варианте осуществления изобретения антитело к ИЛ-4Р или его антигенсвязывающий фрагмент для использования в способах по изобретению содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 335/336 или SEQ ID NO: 337/338.

В связанном варианте осуществления изобретения антагонистом ИЛ-4Р для применения в способах по изобретению является дупилумаб (SEQ ID NO: 337/338) или его биоэквивалент.

В определенных вариантах осуществления изобретения, антагонист ИЛ-33 и антагонист ИЛ-4Р вводятся в отдельных составах.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонист ИЛ-33 и антагонист ИЛ-4Р совместно комбинируют для введения нуждающемуся в этом пациенту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонист ИЛ-33 и антагонист ИЛ-4Р вводят субъекту подкожно, внутривенно, внутримышечно или интраназально.

Антитела к ИЛ-33 и ИЛ-4Р по изобретению могут быть полноразмерными (например, антителом IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, Fab, F(ab')₂ или фрагмент scFv) и могут быть модифицированными с целью воздействия на функциональность, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. 164:1925-1933).

В одном варианте осуществления изобретения антитела, которые специфически связываются с интерлейкином-33 человека или ИЛ-4Р человека, представляют собой выделенные полностью человеческие моноклональные антитела.

В шестом аспекте изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, или ловушку, которая специфически связывается с ИЛ-33, или антитело, которое специфически связывается с ИЛ-4Р, и фармацевтически приемлемый носитель.

В связанном аспекте изобретения относится к композиции, которая представляет собой комбинацию анти-ИЛ-33 антитела или ловушки ИЛ-33, или антитела, которое специфически связывает ИЛ-4Р и один или несколько дополнительных терапевтических агентов.

В одном варианте осуществления изобретения одним или более дополнительными терапевтическими агентами является любой агент, который преимущественно комбинируется с одним или обоими антагонистом ИЛ-33 и/или антагонистом ИЛ-4Р. Типичные агенты, которые могут быть преимущественно скомбинированы с антагонистом ИЛ-33 и/или антагонистом ИЛ-4Р, включают, без ограничения, другие агенты, которые ингибируют активность ИЛ-33 и/или активность ИЛ-4 (включая другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, пептидные ингибиторы, антагонисты малых молекул и т.д.), и/или агенты, которые непосредственно не связываются с ИЛ-33, или ИЛ-4 или ИЛ-4Р, но тем не менее мешают, блокируют или ослабляют опосредованный ИЛ-33 или ИЛ-4 сигналинг.

В одном варианте осуществления изобретения один или более дополнительных терапевтических агентов могут быть выбраны из группы, состоящей из нестероидного противовоспалительного средства (NSAID), кортикостероида (например, ингаляционного кортикостероида), бронхиальный дилатора, антигистамина, эпинефрина, противоотечного средства, антагониста тимального стромального лимфопоэтина (TSLP), антагониста ИЛ-1, антагониста ИЛ-8, антагониста ИЛ-13, антагониста ИЛ-13, другого антагониста ИЛ-4, двойного антагониста ИЛ-4/ИЛ-13, двойного антагониста ИЛ-33/ИЛ-13, антагониста ИЛ-5, антагониста ИЛ-6, антагониста ИЛ-12/23, антагониста ИЛ-22, антагониста ИЛ-25, антагониста ИЛ-17, антагониста ИЛ-31, ингибитора ФНО, ингибитора IgE, ингибитора лейкотриена, перорального ингибитора PDE4, метилксантина, недокромила натрия, кромолина натрия, длительно действующего бета 2-агониста (LABA), длительно действующего мускаринового антагониста (LAMA), ингаляционного кортикостероида (ICS) и другого антагониста ИЛ-33 или ИЛ-4, или другого антитела к ИЛ-33 или ИЛ-4 или ИЛ-4Р и другого антагониста ИЛ-33.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонист цитокинов может представлять собой низкомолекулярный ингибитор (синтетический или природный) или белок (например, антитело), который взаимодействует либо с самим цитокином, либо с рецептором цитокина, либо с комплексом, включающим оба цитокин и его рецептор(ы). Дополнительные комбинированные терапии и комбинированные составы, включающие анти-ИЛ-33 антитела по данному изобретению и/или антитела к ИЛ-4Р, описанные в другом месте данного изобретения.

В еще одном аспекте изобретение относится к терапевтическим способам ингибирования ИЛ-33 и/или ИЛ-4 активности сигналинга с использованием анти-ИЛ-33 антагониста (такого как антитело к ИЛ-33 или ловушка ИЛ-33), и антитела к ИЛ-4Р или антигенсвязывающей части одного или более антител по изобретению, причем терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело к ИЛ-33 или ловушку ИЛ-33, либо отдельно, либо в комбинации с антителом к ИЛ-4Р или антигенсвязывающим фрагментом одного или более антител по изобретению. Подлежащим лечению расстройством является любое заболевание или состояние, которое улучшается, смягчается, ингибируется или предотвращается путем удаления, ингибирования или снижения ИЛ-33 и/или ИЛ-4 сигналинга. Антагонисты анти-ИЛ-33 и/или ИЛ-4Р по изобретению, при использовании вместе, могут функционировать для блокирования взаимодействия между ИЛ-33 и ИЛ-33-связывающим партнером, и ИЛ-4 и ИЛ-4-связывающим партнером, или иным образом могут ингибировать сигнальную активность как ИЛ-33, так и ИЛ-4.

В одном варианте осуществления изобретения антагонист ИЛ-4Р представляет собой антитело, которое связывается с ИЛ-4Р α , и при этом предотвращает как ИЛ-4, так и ИЛ-13 сигналинг через рецепторы типа I или типа II.

В одном варианте осуществления изобретения антагонист ИЛ-4Р α представляет собой дупилумаб или его биоэквивалент. Учитывая двойную блокирующую активность дупилумаба как для ИЛ-4, так и для ИЛ-13, считается, что при использовании в комбинации с антагонистами ИЛ-33 по изобретению комбинированный режим лечения приводит к усиленному ингибированию нежелательной воспалительной активности посредством части из сигналинга через ИЛ-4, ИЛ-13 и ИЛ-33 сигнальные пути, которые могут возникать во время воспаления.

В одном варианте осуществления изобретения антагонист ИЛ-33 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ИЛ-33 и блокирует взаимодействие ИЛ-33 и его рецептора ST2 (также известного как IL1RL1).

В одном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ИЛ-33, содержит три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащие в переменном участке тяжелой цепи (HCVR) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 и 308; и содержит три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащие в переменном участке легкой цепи (LCVR) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298 и 316.

В одном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ИЛ-33, содержит переменный участок тяжелой цепи (HCVR), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18,

34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290 и 308.

В одном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ИЛ-33, содержит варибельный участок легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298 и 316.

В одном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ИЛ-33, содержит:

(a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 2 92 и 310;

(b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294 и 312;

(c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296 и 314;

(d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284 и 318;

(e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286 и 320;

(f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288 и 322.

В одном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с ИЛ-33, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 и 308/316.

Данное изобретение также включает применение только антагониста ИЛ-33 или в сочетании с антагонистом ИЛ-4Р для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, связанного или вызванного активностью или сигналингом ИЛ-33 и/или ИЛ-4 у пациента.

В одном варианте осуществления изобретения, заболевание или расстройство, связанное с или вызванное активностью ИЛ-33 и/или активностью ИЛ-4 у пациента, представляет собой воспалительное заболевание или расстройство, где воспалительное заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), астмы и синдрома перекрывания ХОБЛ (АСОС), атопического дерматита, полипов носа, аллергической реакции, хронического бронхита, эмфиземы, хронического риносинусита с или без полипов носа, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, гиперчувствительного пневмонита, рассеянного склероза, артрита (включая остеоартрит, ревматоидный артрит и псориатический артрит), аллергического ринита, фиброза, эозинофильного эзофагита, васкулита, крапивницы, синдрома Шурга-Штрауса, воспалительной боли и псориаза. Данное изобретение также включает терапевтически эффективное количество антагониста ИЛ-33 в сочетании с терапевтически эффективным количеством антагониста ИЛ-4Р для применения при лечении воспалительного заболевания или расстройства или, по меньшей мере, одного симптома воспалительного заболевания или расстройства, причем введение антагониста ИЛ-33 в комбинации с антагонистом ИЛ-4Р приводит к повышенной терапевтической эффективности по сравнению с тем, которое наблюдается при введении только антагониста ИЛ-33 или только антагониста ИЛ-4Р. Любой из способов, обсуждаемых в данном изобретении, также включает использование антагонистов ИЛ-33 и/или ИЛ-4Р (например, антител) для лечения, или лечения заболеваний, расстройств и/или симптомов, обсуждаемых в связи со способами.

Другие варианты осуществления изобретения станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 продемонстрированы четыре иллюстративных схемы отдельных компонентов антагонистов ИЛ-33 относительно друг друга. Вставка А показывает схему, в которой первый ИЛ-33-связывающий домен (D1) присоединен к N-концу первого мультимеризирующего домена (M1), а второй ИЛ-33-связывающий домен (D2) присоединен к N-концу второго мультимеризирующего домена (M2). D1 показан в виде белого прямоугольника, а D2 - в виде черного прямоугольника, чтобы указать, что D1 и D2 получены из различных ИЛ-33-связывающих белков. Вставка В показывает схему, в которой первый ИЛ-33-связывающий домен (D1) присоединен к N-концу первого мультимеризирующего домена (M1), а второй ИЛ-33-связывающий домен (D2) присоединен к C-концу второго мультимеризирующего домена (M2). D1 показан в виде белого прямоугольника, а D2 - в виде черного прямоугольника, чтобы указать, что D1 и D2 получены из различных ИЛ-33-связывающих белков. Вставка С и D показывает схемы, содержащие четыре ИЛ-33-связывающих домена, D1, D2, D3 и D4. В этих схемах D3-D1-M1 и

D4-D2-M2 присоединены тандемом, где D3 присоединен к N-концу D1, а D1 присоединен к N-концу M1; и D4 присоединен к N-концу D2, а D2 присоединен к N-концу M2. На вставке C D3 и D4 идентичны или по существу идентичны друг другу, а D1 и D2 идентичны или по существу идентичны друг другу. На вставке D D1 и D4 идентичны или по существу идентичны друг другу, а D3 и D2 идентичны или практически идентичны друг другу.

На фиг. 2 продемонстрировано, что воздействие HDM вызывает аналогичное увеличение активированных эозинофилов в легких ИЛ-33-, ИЛ-4- и ИЛ-4Р α -трижды гуманизированных мышей и мышей дикого типа. Статистическая значимость была определена с помощью двустороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюки. Для обозначения статистически значимых различий использовались следующие символы: звездочки "*" обозначают сравнения между мышами, подвергнутыми воздействию физиологического раствора и HDM одного и того же генотипа; символы "&" обозначают сравнения с соответствующей группой мышей дикого типа, подвергшихся воздействию физиологического раствора или HDM. Увеличение количества символов указывает на возрастающую значимость: 1x=p \leq 0,05; 2x=p \leq 0,01; 3x=p \leq 0,001; 4x=P 0,0001. Сокращения: ДТ=дикий тип. Все мыши имели смешанный фон C57BL/6NTac/129S6SvEvTac.

На фиг. 3 продемонстрировано, что комбинированное введение REGN3500 и дупилумаба блокирует вызванное воздействием HDM увеличение относительной массы легких. Относительная масса легких выражается как отношение сырой массы легких (в мг) к массе тела (в г). Статистическую значимость определяли односторонним ANOVA Крускала-Уоллиса с многократным сравнительным тестом Данна. Следующие символы были использованы для обозначения статистически значимых различий: звездочки "*" отмечают сравнения между всеми 19-недельными группами воздействия HDM; и "#" хэштеги отмечают сравнение подвергшихся воздействию физиологического раствора, необработанных животных со всеми другими группами. Увеличение количества символов указывает на возрастающую значимость: 1x=p \leq 0,05; 2x=p \leq 0,01; 3x=p \leq 0,001. Сокращения: нед=неделя; IgG4^P=антитело изотипического контроля, REGN1945.

На фиг. 4А и В продемонстрировано влияние REGN3500 и дупилумаба, отдельно и в комбинации, на эозинофильную инфильтрацию легких, вызванную воздействием HDM. Статистическую значимость определяли односторонним ANOVA Крускала-Уоллиса с тестом множественных сравнений Данна. Следующие символы были использованы для обозначения статистически значимых различий: звездочки "*" отмечают сравнения между всеми 19-недельными группами воздействия HDM; "#" хэштеги отмечают сравнение подвергшихся воздействию физиологического раствора, необработанных животных, со всеми другими группами; и знаки "+" отмечают сравнение 11-недельных, подвергнутых лечению HDM, необработанных животных со всеми другими группами. Увеличение количества символов указывает на возрастающую значимость:

1x=p \leq 0,05; 2x=p \leq 0,01; 3x=p \leq 0,001; 4x=P 0,0001. Сокращения: нед=неделя; IgG4^P=антитело изотипического контроля, REGN1945.

На фиг. 5 продемонстрировано, что REGN3500, отдельно или в комбинации с дупилумабом, блокирует вызванную воздействием HDM инфильтрацию легких ST2⁺ CD4⁺ Т-клетками. Статистическую значимость определяли односторонним ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюки. Следующие символы были использованы для обозначения статистически значимых различий: звездочки "*" отмечают сравнения между всеми 19-недельными группами воздействия HDM; "#" хэштеги отмечают сравнение подвергшихся воздействию физиологического раствора, необработанных животных, со всеми другими группами; и знаки "+" отмечают сравнение 11-недельных, подвергнутых лечению HDM, необработанных животных со всеми другими группами. Увеличение количества символов указывает на возрастающую значимость: 1x=p \leq 0,05; 2x=p \leq 0,01; 3x=p \leq 0,001; 4x=P 0,0001. Сокращения: нед=неделя; IgG4^P=антитело изотипического контроля, REGN1945.

На фиг. 6 продемонстрировано, что комбинированное введение REGN3500 и дупилумаба блокирует вызванное воздействием HDM увеличение уровней белка MPO легкого, маркера нейтрофильной инфильтрации. Статистическую значимость определяли односторонним ANOVA Крускала-Уоллиса с тестом множественных сравнений Данна. Следующие символы были использованы для обозначения статистически значимых различий: звездочки "*" отмечают сравнения между всеми 19-недельными группами воздействия HDM; и "#" хэштеги отмечают сравнение подвергшихся воздействию физиологического раствора, необработанных животных со всеми другими группами. Увеличение количества символов указывает на возрастающую значимость: 1x=p \leq 0,05; 2x=p \leq 0,01; 3x=p \leq 0,001. Сокращения: нед=неделя; IgG4^P=антитело изотипического контроля, REGN1945.

На фиг. 7А и В продемонстрировано влияние REGN3500 и дупилумаба, отдельно или в комбинации, на вызванное воздействием HDM повышение уровней белка ИЛ-5 и ИЛ-6 в легких. Легкие (краниальные и средние доли правого легкого) собирали, и уровни белка ИЛ-5 (А) и ИЛ-6 (В) измеряли с помощью мультиплексного иммуноанализа. Уровни белка ИЛ-5 и ИЛ-6 в ткани легких выражены в виде количества белка (пг) на долю легкого. Статистическую значимость определяли односторонним ANOVA Крускала-Уоллиса с тестом множественных сравнений Данна. Следующие символы были использованы

для обозначения статистически значимых различий: звездочки "*" отмечают сравнения между всеми 19-недельными группами воздействия HDM; и "#" хэштеги отмечают сравнение подвергшихся воздействию физиологического раствора, необработанных животных со всеми другими группами. Увеличение количества символов указывает на возрастающую значимость: $1x=p\leq 0,05$; $2x=p\leq 0,01$; $3x=p\leq 0,001$. Сокращения: нед=неделя; IgG4^P=антитело изотипического контроля, REGN1945.

На фиг. 8 продемонстрировано, что REGN3500 отдельно или в сочетании с дупилумабом блокирует вызванное воздействием HDM повышение уровней циркулирующего белка SAA. Через четыре дня после последней инъекции антитела цельную кровь собирали пункцией сердца и выделяли сыворотку. Уровни циркулирующего белка SAA измеряли с использованием коммерчески доступного набора ИФА. Уровни циркулирующего белка SAA выражаются как количество белка SAA (мкг) на мл сыворотки. Статистическую значимость определяли односторонним ANOVA Крускала-Уоллиса с тестом множественных сравнений Данна. Следующие символы были использованы для обозначения статистически значимых различий: звездочки "*" отмечают сравнения между всеми 19-недельными группами воздействия HDM; и "#" хэштеги отмечают сравнение подвергшихся воздействию физиологического раствора, необработанных животных со всеми другими группами. Увеличение количества символов указывает на возрастающую значимость: $1x=p\leq 0,05$; $2x=p\leq 0,01$; $3x=p\leq 0,001$. Сокращения: нед=неделя; IgG4^P=антитело изотипического контроля, REGN1945.

На фиг. 9 продемонстрировано, что уровни циркулирующего белка IgE увеличиваются в ответ на воздействие HDM. Цельная кровь была собрана с помощью пункции сердца, и была выделена сыворотка. Уровни циркулирующего белка IgE измеряли с использованием коммерчески доступного набора ИФА. Уровни циркулирующего белка IgE выражаются в виде количества белка IgE (мкг) на мл сыворотки. Статистическую значимость определяли односторонним ANOVA Крускала-Уоллиса с тестом множественных сравнений Данна. Следующие символы были использованы для обозначения статистически значимых различий: звездочки "*" отмечают сравнения между всеми 19-недельными группами воздействия HDM; и "#" хэштеги отмечают сравнение подвергшихся воздействию физиологического раствора, необработанных животных со всеми другими группами. Увеличение количества символов указывает на возрастающую значимость: $1x=p\leq 0,05$; $2x=p\leq 0,01$; $3x=p\leq 0,001$. Сокращения: нед=неделя; IgG4^P=антитело изотипического контроля, REGN1945.

Подробное описание сущности изобретения

Перед описанием данного изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что употребляемая в данном изобретении терминология предназначена исключительно для описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не является ограничивающей, так как объем данного изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном изобретении, имеют то же значение, что обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится данное изобретение. Используемый в данном изобретении термин "около" при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, как используется в данном изобретении, выражение "около 100" включает в себя 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном изобретении, могут быть применены на практике или при испытании данного изобретения, теперь описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в этом описании, включены в данное изобретение путем ссылки во всей их полноте. Определения

Термины "интерлейкин-33", "ИЛ-33" и тому подобное, используемые в данном изобретении, относятся к белку ИЛ-33 человека и охватывают полноразмерный непротессированный ИЛ-33 из 270 аминокислот (см., например, SEQ ID NO: 348, или инвентарный номер UniProtKB 095760), а также любую форму ИЛ-33, которая возникает в результате процессинга в клетке (см., например, SEQ ID NO: 349, которая содержит аминокислотные остатки 112-270 белка полной длины). Другие обработанные формы ИЛ-33 описаны в Lefrangais, et al. (Lefrangais, et al., (2012), Proc. Natl. Acad. Sci. 109 (5): 1693-1678). Термин также охватывает встречающиеся в природе варианты ИЛ-33, например, сплайс-варианты (см., например, Hong, et al., (2011), J. Biol. Chem. 286 (22): 20078-20086 или), или аллельные варианты, или любую другую изоформу ИЛ-33, такую как описанная в WO2016/156440. Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белка в данном изобретении предназначены для ссылки на человеческую версию соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что он относится к виду, отличному от человека.

Используемое в данном изобретении выражение "антагонист ИЛ-33" означает любой агент, который способен блокировать, ослаблять или иным образом мешать ИЛ-33 сигналингу и/или взаимодействию между ИЛ-33 и рецептором клеточной поверхности (например, ST2, известный как IL1RL1) или ко-

рецептором (например, IL1-RAcP), или их комплексом. Например, "антагонист ИЛ-33", также называемый "ингибитором ИЛ-33" или "блокатором ИЛ-33", включает любое из следующего: (1) агент, который связывается с или взаимодействует с ИЛ-33; или (2) агент, который связывается с или взаимодействует с рецептором ИЛ-33 (иногда упоминается как "подавление онкогенности" или "ST2"; также известный как "IL1RL1"); или (3) агент, который связывается или взаимодействует с корецептором ИЛ-33 (вспомогательный белок рецептора интерлейкина-1 или IL1-RAcP); или (4) агент, который связывается с комплексом ИЛ-33/ST2; или (5) агент, который связывается с или взаимодействует с ST2/ИЛ-1RAcP. Любое из вышеперечисленного может привести к ингибированию или ослаблению по меньшей мере одной биологической активности ИЛ-33, такой как, но не ограничиваясь этим, биологическая сигнальная функция, которая возникает при связывании ИЛ-33 с его рецептор/корецептор комплексом.

В одном варианте осуществления изобретения "антагонист ИЛ-33" представляет собой антитело, которое специфически связывается с или взаимодействует с ИЛ-33 и предотвращает связывание с ИЛ-33 с ST2 и при этом предотвращает взаимодействие ST2 с корецептором ИЛ-1RAcP. В одном варианте осуществления изобретения "антагонист ИЛ-33" представляет собой антитело, которое специфически связывается либо с ST2, либо с комплексом ST2/ИЛ-1RAcP и предотвращает связывание ИЛ-33 с ST2, либо с комплексом рецептора ST2/ИЛ-1RAcP. В одном варианте осуществления изобретения, "антагонист ИЛ-33" представляет собой антитело, которое связывается с комплексом ИЛ-33/ST2 и затем предотвращает взаимодействие ST2 с корецептором ИЛ-1RAcP. В одном варианте осуществления изобретения, "антагонист ИЛ-33" представляет собой антитело, которое связывается с ИЛ-33 и может обеспечивать низкую аффинность связывания с ST2, но в то же время такая низкая аффинность связывания может препятствовать последующему взаимодействию ST2 с корецептором ИЛ-1RAcP.

"Антагонист ИЛ-33" также может представлять собой агент, такой как растворимый рецептор ST2, или ловушку на основе рецептора ИЛ-33, такую как описанные в данном изобретении и описанные в US 2014/0271642. Любой агент, который блокирует сигналинг, опосредованный ИЛ-33, считается "антагонистом ИЛ-33". "Антагонист ИЛ-33" может представлять собой небольшую органическую молекулу, белок, такой как антитело или его фрагмент, или ловушку на основе растворимого рецептора ИЛ-33 (как описано в данном изобретении), или нуклеиновую кислоту, такую как анти-смысловая молекула или мРНК. Используемый в данном изобретении термин "антитело, связывающее ИЛ-33" или "анти-ИЛ-33 антитело" включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают белок ИЛ-33 человека или его биологически активный фрагмент (например, см. SEQ ID NO: 348, 349, 350 и 351).

Выражение "рецептор интерлейкина-4", или "ИЛ-4Р", используемый в данном изобретении, относится к рецептору ИЛ-4Р α человека, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 347.

Используемый в данном изобретении термин "антагонист ИЛ-4Р" (также называемый в данном изобретении "ингибитор ИЛ-4Р", "антагонист ИЛ-4Р α ", "блокатор ИЛ-4Р", "блокатор ИЛ-4Р α " и т.д.) представляет собой любой агент, который связывается с или взаимодействует с ИЛ-4Р α или лигандом ИЛ-4Р и ингибирует или ослабляет нормальную биологическую сигнальную функцию рецептора ИЛ-4 типа 1 и/или типа 2. Рецептор ИЛ-4 типа 1 представляет собой димерный рецептор, содержащий цепь ИЛ-4Р α и γ с цепь. Рецептор ИЛ-4 типа 2 представляет собой димерный рецептор, содержащий цепь ИЛ-4Р α и цепь ИЛ-13R α 1. Рецепторы ИЛ-4 типа 1 взаимодействуют с ИЛ-4 и стимулируются им, тогда как рецепторы ИЛ-4 типа 2 взаимодействуют с ИЛ-4 и ИЛ-13 и стимулируются ими. Таким образом, антагонисты ИЛ-4Р, которые можно использовать в способах по данному изобретению, могут функционировать, блокируя ИЛ-4-опосредованный сигналинг, ИЛ-13-опосредованный сигналинг, как ИЛ-4-, так и ИЛ-13-опосредованный сигналинг. Таким образом, антагонисты ИЛ-4Р по данному изобретению могут предотвращать взаимодействие ИЛ-4 и/или ИЛ-13 с рецептором типа 1 или типа 2. Неограничивающие примеры категорий антагонистов ИЛ-4Р включают низкомолекулярные ингибиторы ИЛ-4Р, анти-ИЛ-4Р аптамеры, ингибиторы ИЛ-4Р на основе пептидов (например, молекулы "пептитела"), "рецептора-тела" (например, сконструированные молекулы, содержащие лиганд-связывающий домен компонента ИЛ-4Р) и антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, которые специфически связывают ИЛ-4Р α человека. Используемый в данном изобретении антагонист ИЛ-4Р также включает антигенсвязывающие белки, которые специфически связывают ИЛ-4 и/или ИЛ-13.

Термин "антитело", используемый в данном изобретении, означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR), который специфически связывается с или взаимодействует с конкретным антигеном (например, ИЛ-33 или ИЛ-4Р). Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменный участок тяжелой цепи (сокращенно обозначенный в данном изобретении как HCVR или V_H) и константный участок тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи содержит три домена: C_H1, C_H2 и C_H3. Каждая легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи (сокращенно обозначенный в данном изобретении как LCVR или V_L) и константный участок легкой цепи (C_L). Константный участок легкой цепи содержит один домен (C_L1). Участки V_H и V_L могут быть далее подразделены на участки

гипервариабельности, которые называются участками, определяющими комплементарность (CDR), которые чередуются с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления изобретения, FR анти-ИЛ-33 антитела (или его антигенсвязывающей части) или анти-ИЛ-4Р-антитела могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека, или могут быть природно или искусственно модифицированы. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR.

Термин "антитело", используемый в данном изобретении, также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобное, как используется в данном изобретении, включают в себя любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически модифицированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с целью образования комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антител с применением любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методы генетической инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаговых антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с применением методов молекулярной биологии, например, для организации одного или более вариабельных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и тому подобного.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты $F(ab')_2$; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAt; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельный участок антитела (например, выделенный участок, определяющий комплементарность (CDR), такой как пептид CDR3) или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и тому подобное), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акулы, также охватываются выражением "антигенсвязывающий фрагмент", как применяется в данном изобретении.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, содержать по меньшей мере один CDR, который находится рядом или в рамке считывания с одной или более последовательностями каркаса. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , ассоциированный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, вариабельный участок может быть димерным и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . В альтернативном варианте, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по данному изобретению, включают: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, включая любую из приведенных выше иллюстративных конфигураций, вариабельные и константные домены могут быть либо напрямую связаны друг с другом, либо могут быть связаны полноразмерным или частичным шарнирным, или линкерным участком. Шарнирный участок может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними вариабельными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по данному изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций вариабельных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, дисульфидной связью(ами)).

Как и в случае полных молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Мультиспецифичный антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере два разных вариабельных домена, при этом каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с

другим эпитопом на том же самом антигене. Любой формат мультиспецифичных антител, включая описанные в данном изобретении иллюстративные биспецифичные форматы антител, может быть адаптирован для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по данному изобретению с применением обычных методов, доступных в данной области техники. Например, данное изобретение включает способы, включающие использование биспецифичных антител, в которых одно плечо иммуноглобулина является специфичным для ИЛ-4R α или его фрагмента, или иммуноглобулина, специфичного для ИЛ-33 или его фрагмента, а другое плечо иммуноглобулина специфично для второй терапевтической мишени или конъюгировано с терапевтическим фрагментом. Иллюстративные биспецифичные форматы, которые могут быть применены в контексте данного изобретения, включают, без ограничения, например, биспецифичные форматы на основе scFv или диател, слияния IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, Квадрому, выступы-во-впадины, общую легкую цепь (например, обычную легкую цепь с выступами-во-впадины и тому подобное), CrossMab, CrossFab, (SEED) тело, лейциновую молнию, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и Mab² (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, и ссылки, цитируемые в них, для обзора вышеупомянутых форматов). Биспецифичные антитела также могут быть сконструированы с применением конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, например, при этом не природные аминокислоты с ортогональной химической реактивности применяются для создания сайтспецифических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самособираются в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

В определенных вариантах осуществления изобретения анти-ИЛ-33 и ИЛ-4R антитела по изобретению представляют собой антитела человека. Применяемый в данном изобретении термин "человеческое антитело" предполагает антитела, имеющие вариабельные и константные участки, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, вводимые случайным или сайтспецифическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако термин "человеческое антитело", как применяется в данном изобретении, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были присоединены к каркасным последовательностям человека. Термин включает антитела, рекомбинантно полученные у млекопитающего, отличного от человека, или в клетках млекопитающего, отличного от человека. Этот термин не предназначен для включения антител, выделенных или образующихся у человека.

Антитела по изобретению могут, в некоторых вариантах осуществления изобретения, быть рекомбинантными человеческими антителами. Термин "рекомбинантное человеческое антитело", как используется в данном изобретении, предназначен для включения всех человеческих антител, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такими как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (описано дополнительно ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека (описанной дополнительно ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое трансгенно для генов человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает в себя сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют вариабельные и константные участки, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека.

Однако в некоторых вариантах осуществления изобретения, такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, когда используется трансгенное для последовательностей человеческих Ig животное, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности участков V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и связаны с ними, в естественных условиях не могут существовать в репертуаре зародышевой линии человеческого антитела *in vivo*.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильный четырехцепочечный конструктор приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе межцепочечной дисульфидной связью тяжелой цепи. Во второй форме димеры не связаны через межцепочечные дисульфидные связи, и образуется молекула около 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепи (полуантитело). Эти формы чрезвычайно трудно разделить, даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы в различных изоформах интактных IgG обусловлено, но не ограничиваясь этим, структурными различиями, связанными с шарнирным участком изоформы антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирном участке шарнира IgG4 человека может значительно уменьшить появление второй формы (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30: 105) до уровня, обычно наблю-

даемых с использованием шарнира IgG1 человека. Данное изобретение охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций в шарнире, C_H2 или C_H3 участке, которые могут быть желательны, например, при производстве, для улучшения выхода желаемой формы антитела.

Антитела по изобретению могут быть выделенными антителами. "Выделенное антитело", как используется в данном изобретении, означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено по меньшей мере из одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое было отделено или удалено по меньшей мере из одного компонента организма, или из ткани, или клетки, в которой антитело существует в природе или продуцируется естественным путем, является "выделенным антителом" для целей данного изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения, выделенное антитело может быть по существу не содержащим другого клеточного материала и/или химических веществ.

Данное изобретение включает нейтрализующие и/или блокирующие анти-ИЛ-33 антитела и анти-ИЛ-4R антитела. "Нейтрализующее" или "блокирующее" антитело, как используется в данном изобретении, предназначено для обозначения антитела, связывание которого с молекулой-мишенью, например, ИЛ-33 или ИЛ-4R: (i) препятствует взаимодействию между молекулой-мишенью и либо его рецептором (в случае антител к ИЛ-33), либо его лигандом (в случае антител к ИЛ-4R); и/или (ii) приводит к ингибированию по меньшей мере одной биологической функции молекулы-мишени, например, сигналинга. Ингибирование, вызванное нейтрализующим или блокирующим антителом к ИЛ-33 или ИЛ-4R, необязательно должно быть полным, если его можно обнаружить с помощью соответствующего анализа.

Описанные в данном изобретении антитела могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных участках и/или участках CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации могут быть легко обнаружены путем сравнения описанных в данном изобретении аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из баз данных общедоступных антител. Данное изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, описанных в данном изобретении, при этом одна или более аминокислот в одном или более каркасных участках и/или участках CDR мутированы с соответствующим остатком(ами) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или с соответствующим остатком(ами) другой последовательности зародышевой линии человека или с консервативной аминокислотной заменой соответствующего зародышевого остатка(ов) (такие изменения последовательности упоминаются в данном изобретении совместно как "зародышевые мутации"). Специалист в данной области техники, начиная с описанных в данном изобретении последовательностей переменного участка тяжелой и легкой цепей, может легко продуцировать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных зародышевых мутаций или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения все каркасные остатки и/или остатки CDR в доменах V_H и/или V_L мутируют обратно к остаткам, обнаруженным в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления изобретения только определенные остатки мутируют обратно к исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления изобретения один или более каркасный остаток(ов) и/или остаток(ки) CDR мутируют с соответствующим остатком(ами) другой последовательности зародышевой линии (то есть, последовательностью зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антитело было изначально получено). Кроме того, антитела согласно данному изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных участках и/или CDR-участках, например, при этом определенные отдельные остатки мутируются к соответствующему остатку определенной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или мутируются с соответствующим остатком другой последовательности зародышевой линии. После получения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы на одно или более желательных свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, улучшенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), уменьшенную иммуногенность и тому подобное. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные с помощью этого общего способа, охватываются данным изобретением.

Данное изобретение также включает антитела, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном изобретении, имеющих одну или более консервативных замен. Например, данное изобретение включает антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или ме-

нее, 4 или менее и тому подобное консервативных аминокислотных замен по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном изобретении.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельном участке молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут иметь различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно сопоставленными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда речь идет о нуклеиновой кислоте или ее фрагменте, указывает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) присутствует идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере, в количестве около 95% и более предпочтительно по меньшей мере около 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, как измерено любым известным алгоритмом идентичности последовательностей, таким как FASTA, BLAST или Gap, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, в некоторых случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу подобную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "существенное сходство" или "по существу аналогичный" означает, что две последовательности пептидов при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с применением стандартных штрафов за открытие гэпа, имеют последовательность, идентичную на по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно, последовательность, идентичную на по меньшей мере 98 или 99%. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная замена аминокислоты" представляет собой аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентная идентичность последовательности или степень сходства могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы исправить консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, включенной в данное изобретение в качестве ссылки. Примеры групп аминокислот с боковыми цепями с аналогичными химическими свойствами включают: 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидосодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В альтернативном варианте, консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, включенной в данное изобретение в качестве ссылки. "Умеренно консервативной" заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка подбирает аналогичные последовательности, применяя измерения сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут применяться с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также могут сравниваться, используя FASTA со стандартными или рекомендованными параметрами; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает идентичность выравнивания и процент последовательности участков наилучшего перекрытия между запрашиваемой последовательностью и последовательностью поиска (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности поиска по изобретению с базой данных, содержащей большое количество

последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402, каждый из которых включен в данное изобретение в качестве ссылки.

"Заболевание или расстройство", как используется в данном описании, представляет собой любое состояние, которое можно лечить антагонистами ИЛ-33 и ИЛ-4 по изобретению.

"Воспалительное заболевание или расстройство", как используется в данном изобретении, относится к заболеванию, расстройству или патологическому состоянию, при котором патология возникает, полностью или частично, в результате, например, изменения количества, изменения скорости миграции или изменения в активации, клеток иммунной системы. Клетки иммунной системы включают, например, Т-клетки, В-клетки, моноциты или макрофаги, врожденные лимфоидные клетки, антигенпрезентирующие клетки (АПК), дендритные клетки, микроглию, НК-клетки, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки или любые другие клетки, в частности связанные с иммунологией, например, цитокин-продуцирующие эндотелиальные или эпителиальные клетки. Как используется в данном изобретении, в одном варианте осуществления изобретения, "воспалительное заболевание или расстройство" представляет собой иммунное расстройство или состояние, выбранное из группы, состоящей из астмы (включая астму, устойчивую к стероидам, астму, чувствительную к стероидам, эозинофильную астму или неэозинофильную астму), аллергии, анафилаксии, рассеянного склероза, воспалительного заболевания кишечника (например, болезнь Крона или язвенный колит), хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ, которая может быть или не быть связана, вызвана или частично вызвана воздействием сигаретного дыма при активном или пассивном курении), астмы и синдрома перекрытия ХОБЛ (ACOS), эозинофильного эзофагита, хронического бронхита, эмфиземы, хронического риносинусита с или без полипов носа, волчанки, атопического дерматита, псориаза, склеродермии и других фиброзных заболеваний, синдрома Сьогрена, васкулита (болезнь Бечета, гигантоклеточный артериит, пурпура Геноха-Шонлейна и синдром Шурга-Штрауса), воспалительной боли и артрита. В одном варианте осуществления изобретения, артрит выбран из группы, состоящей из ревматоидного артрита, остеоартрита и псориатического артрита.

В одном варианте осуществления изобретения "воспалительное заболевание или расстройство" представляет собой иммунное расстройство или состояние, которое включает ответ типа 1 и/или ответ типа 2.

"Иммунный ответ типа 1" определяется Т-хелперными 1 (T_H1) клетками и T_H17 -клетками, цитотоксическими Т-клетками, врожденными лимфоидными клетками группы 1 и 3 (ILC) и иммуноглобулином М (IgM), IgA и классы специфических антител IgG и цитокины, в том числе, например, ФНО, ИЛ-1 β и ИЛ-6. Этот эффекторный ответ обеспечивает иммунитет ко многим микроорганизмам, включая бактерии, вирусы, грибы и простейшие. Элементы иммунитета типа 1 также помогают поддерживать иммунный надзор за опухолью.

"Иммунный ответ типа 2" характеризуется CD4+ Т-хелперными (T_H2) клетками, врожденными лимфоидными клетками группы 2 (ILC), эозинофилами, базофилами, тучными клетками, активированными ИЛ-4 и/или ИЛ-13 макрофагами, подклассом IgE-антител, и цитокинами, включающими, например, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-9, ИЛ-13, тимусный стромальный лимфопоэтин, ИЛ-25 и ИЛ-33. Иммунитет типа 2 обеспечивает защиту от крупных внеклеточных паразитов, усиливая защитные барьеры. Элементы иммунного ответа типа 2 также помогают поддерживать метаболический гомеостаз и способствовать ремоделированию тканей после повреждения. Этот тип ответа также может быть инициирован в ответ на алергены.

Используемая в данном изобретении фраза "ингибирует или ослабляет ИЛ-33-опосредованный сигналинг" относится к степени, в которой ИЛ-33 стимулирует трансдукцию сигнала через его рецептор, ST2 и ко-рецептор, ИЛ-1RAcP, которая уменьшается при наличии антагониста, такого как антитело к ИЛ-33, или ловушки ИЛ-33, как описано в данном изобретении, относительно степени, в которой ИЛ-33 стимулирует трансдукцию сигнала через ST2 и ИЛ-1RAcP в отсутствие антагониста, такого как антитело к ИЛ-33 или ловушка ИЛ-33, как описано в данном изобретении. Фраза "ингибирует или ослабляет ИЛ-4Р-опосредованный сигналинг", как используется в данном изобретении, относится к степени, в которой ИЛ-4 стимулирует трансдукцию сигнала через рецептор ИЛ-4 типа 1 и/или типа 2, которая уменьшается в присутствии антагониста, такого как антитело к ИЛ-4 или ИЛ-4Р, как описано в данном изобретении, относительно степени, в которой ИЛ-4 стимулирует трансдукцию сигнала через рецептор ИЛ-4 типа 1 и/или типа 2 в отсутствие антагониста, такого как антитело к ИЛ-4 или ИЛ-4Р, как описано в данном изобретении. Чтобы исследовать степень ингибирования, образец обрабатывают потенциальным ингибитором/антагонистом и сравнивают с контрольным образцом без ингибитора/антагониста. Контрольным образцом, т.е. не обработанным антагонистом, присваивается относительное значение активности 100%.

Ингибирование достигается, когда значение активности относительно контроля составляет около 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25 или 20% или менее. Конечная точка ингибирования может содержать заранее определенное количество или процент, например, показателя воспаления или деградации, секреции или активации клеток, такого как высвобождение цитокина. Ингибирование тран-

сдукции сигнала ИЛ-33 через ST2 и ИЛ-1RAcP можно определить путем анализа трансдукции сигнала ИЛ-33 в анализе *in vitro*, таком как те, которые известны специалисту в данной области. Кроме того, анализы *in vivo* можно использовать для определения того, является ли молекула антагонистом ИЛ-33. Например, анализ *in vivo* можно использовать для оценки влияния антитела к ИЛ-33 на воспаление легких у сенсibilизированных аллергеном животных, которые гомозиготны по экспрессии ИЛ-33 человека. После сенсibilизации животных аллергеном подгруппу животных обрабатывают либо анти-ИЛ-33 антителом по изобретению, либо антителом с отрицательным изотипическим контролем. Затем животных умерщвляют и собирают легкие для оценки клеточных инфильтратов, а также для измерения цитокинов (ИЛ-4 и ИЛ-5). Антитело к ИЛ-33, которое эффективно в качестве антагониста, должно демонстрировать тенденцию к уменьшению количества воспалительных клеток в легких, а также тенденцию к снижению цитокинов, таких как ИЛ-4 и ИЛ-5. Подобные анализы могут быть выполнены для оценки способности антагониста ИЛ-4Р блокировать трансдукцию сигнала после связывания ИЛ-4 с рецептором типа 1 и/или типа 2 *in vitro* или *in vivo*. Кроме того, любой из вышеупомянутых анализов может быть модифицирован для сравнения эффектов использования только антагониста ИЛ-33, только антагониста ИЛ-4 или ИЛ-4Р, или эффекта использования комбинации обоих антагониста ИЛ-33 и ИЛ-4 или антагониста ИЛ-4Р вместе.

В другом аспекте изобретение относится к способам снижения частоты или рецидива астмы или ХОБЛ, или обострения астмы или ХОБЛ у субъекта, нуждающегося в этом, включающим введение фармацевтической композиции, содержащей антагонист рецептора интерлейкина-4 (ИЛ-4Р), субъекту в комбинации с фармацевтической композицией, содержащей антагонист ИЛ-33. Используемое в данном изобретении, выражение "астма или обострение ХОБЛ" означает увеличение тяжести, и/или частоты, и/или продолжительности одного или более симптомов или признаков астмы или ХОБЛ. "Обострение астмы или ХОБЛ" также включает в себя любое ухудшение респираторного здоровья субъекта, которое требует и/или может лечиться с помощью терапевтического вмешательства по поводу астмы или ХОБЛ (такого как, например, лечение стероидами, лечение ингаляционными кортикостероидами, госпитализация и т.д.).

"Снижение частоты или рецидива" обострения астмы или ХОБЛ означает, что субъект, который получил фармацевтические композиции по данному изобретению, испытывает меньше обострений астмы или ХОБЛ (то есть, по меньшей мере, на одно обострение меньше) после лечения, чем до лечения, или не испытывает обострения астмы или ХОБЛ в течение по меньшей мере 4 недель (например, 4, 6, 8, 12, 14 или более недель) после начала лечения фармацевтической композицией по данному изобретению.

"Снижение частоты или рецидива" обострения астмы или ХОБЛ, альтернативно, означает, что после введения фармацевтической композиции по данному изобретению вероятность того, что субъект испытывает обострение астмы или ХОБЛ, уменьшается по меньшей мере на 10% (например, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50% или более) по сравнению с субъектом, который не получил фармацевтическую композицию по данному изобретению.

"Фиброзное заболевание или расстройство" в контексте данного описания относится к состояниям, которые включают избыток фиброзной соединительной ткани в ткани или органе. "Фиброз" относится к патологическому процессу, который включает образование рубцов и перепроизводство внеклеточного матрикса соединительной тканью в ответ на повреждение ткани. Используемые в данном изобретении, примеры "фиброзных заболеваний или расстройств", которые можно лечить путем введения анти-ИЛ-33 и ИЛ-4Р антагонистов по изобретению, включают фиброз легких (например, идиопатический фиброз легких, блеомицин-индуцированный фиброз легких, асбест-индуцированный фиброз легких и синдром облитерирующего бронхиолита), хроническую астму, фиброз, связанный с острым повреждением легких и острым респираторным дистрессом (например, вызванный бактериальной пневмонией фиброз, фиброз, вызванный травмой, фиброз, вызванный вирусной пневмонией, фиброз, вызванный ИВЛ, фиброз, вызванный не легочным сепсисом, и фиброз, вызванный аспирацией), силикоз, фиброз, вызванный радиацией, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ, которая может или не может быть связана с, вызванная частично или в результате воздействия сигаретного дыма при активном или пассивном курении), склеродермию, фиброз глаз, фиброз кожи (например, склеродермия), фиброз печени (например, цирроз печени, алкогольный фиброз печени, неалкогольный стеатогепатит (NASH), повреждение желчных протоков, первичный билиарный цирроз, инфекционный или вирусный фиброз печени, аутоиммунный гепатит, почечный (почечный) фиброз, фиброз сердца, атеросклероз, рестеноз стента и миелофиброз. Хотя астма и ХОБЛ, как правило, считаются воспалительными состояниями, известно, что каждое из них обладает свойствами фиброзных расстройств.

"Ответ" пациента или "отзывчивость" пациента на лечение или терапию, например, лечение, включающее антагонист ИЛ-33 (например, антагонист связывания ИЛ-33 или ST2) или антагонист ИЛ-4, относится к клинической или терапевтической пользе для пациента, подверженного риску или имеющему ИЛ-33-опосредованное расстройство (например, астма, ХОБЛ, ACOS, полипы носа или фиброз легких, например, идиопатический фиброз легких) от или в результате лечения. Такое преимущество может включать клеточные или биологические ответы, полный ответ, частичный ответ, стабильное заболевание (без прогрессирования или рецидива) или ответ пациента с более поздним рецидивом от или в результате

лечения антагонистом. Специалист легко сможет определить, является ли пациент отзывчивым. Например, пациент, страдающий астмой, который реагирует на лечение, включающее антагонист ИЛ-33 и/или антагонист ИЛ-4, может демонстрировать наблюдаемое и/или измеримое уменьшение или отсутствие одного или более из следующих типичных симптомов: рецидивирующее хрипение, кашель, проблемы с дыханием, стеснение в груди, симптомы, которые возникают или ухудшаются ночью, симптомы, вызванные холодным воздухом, физическими упражнениями или воздействием аллергенов.

Кроме того, "повышенная терапевтическая эффективность" может быть определена путем оценки того, приводит ли лечение комбинацией антагониста ИЛ-33 плюс антагониста ИЛ-4Р к заметному улучшению по меньшей мере одного симптома заболевания или расстройства или улучшение по меньшей мере одного из биологических параметров, измеренных в данном изобретении (например, воспаление легких, высвобождение цитокинов и т. д.) по сравнению с результатами, достигнутыми, когда антагонист ИЛ-33 или антагонист ИЛ-4Р используется отдельно. Любая из биологических мер эффективности, как описано в настоящем изобретении, может использоваться для определения терапевтической эффективности или ее повышения.

Антагонисты ИЛ-33 и антагонисты ИЛ-4Р.

Способы по данному изобретению включают введение пациенту, страдающему от воспалительного заболевания или нарушения, терапевтически эффективного количества антагониста ИЛ-33 в комбинации с терапевтически эффективным количеством антагониста ИЛ-4Р.

Антагонисты ИЛ-33.

Термин "интерлейкин-33 человека" или "ИЛ-33 человека", или "hIL-33", или "ИЛ-33" относится к полноразмерному непротессированному ИЛ-33 из 270 аминокислот (см., например, SEQ ID NO: 348, или инвентарный номер UniProtKB (O95760), или его биологически активному фрагменту, а также любой формы ИЛ-33, которая возникает в результате процессинга в клетке (см., например, SEQ ID NO: 349, которая содержит аминокислотные остатки 112-270 белка полной длины). Термин также охватывает встречающиеся в природе варианты ИЛ-33, например, варианты сплайсинга (см., например, Hong, et. Al., (2011), J. Biol. Chem. 286 (22): 20078-20086) или аллельные варианты или любые другие изоформы ИЛ-33, такие как окисленные или восстановленные формы ИЛ-33, описанные в WO 2016/156440. Активность ИЛ-33, которая может быть нейтрализована, ингибирована, блокирована, аннулирована, ослаблена, снижена или нарушена антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению или ловушкой ИЛ-33 по изобретению, включает, но без ограничения, ингибирование опосредованного рецептором ИЛ-33 сигналинга, или ингибирование воспаления, опосредованного ИЛ-33.

Используемый в данном изобретении термин "антагонист ИЛ-33" (также называемый в данном изобретении "ингибитором ИЛ-33" или "блокатором ИЛ-33" и т.д.) представляет собой любой агент, который ингибирует взаимодействие ИЛ-33 с одним или более из его партнеров по связыванию и при этом может ингибировать ИЛ-33-опосредованный сигналинг. Например, "антагонист ИЛ-33" может связываться и/или взаимодействовать с ИЛ-33 или с рецептором ИЛ-33, называемым "подавлением онкогенности" ("ST2"), или с ИЛ-33 ко-рецептором, обозначаемым как "Дополнительный белок рецептора интерлейкина-1 ("ИЛ-1RacP"), или с комплексом любого из следующего: ИЛ-33/ST2 или ST2/ИЛ-1RacP, и при этом может ингибировать ИЛ-33-опосредованный сигналинг.

Неограничивающие примеры категорий антагонистов ИЛ-33 включают низкомолекулярные ингибиторы ИЛ-33 или антагонисты рецепторов, или нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в жестких условиях с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими либо ИЛ-33, либо рецептор ИЛ-33, либо ко-рецептор (например, короткие интерферирующие РНК (миРНК), или кластерные регулярно пересекающиеся короткие РНК с палиндромным повтором (CRISPR-РНК или кРНК), включая одиночные направляющие РНК (огРНК), имеющие последовательность кРНК и тракрРНК, как описано в Mali et al. (Science. 339: 823-26, 2013), которая полностью включена в данное описание посредством ссылки). Другие антагонисты ИЛ-33 включают белки, содержащие лиганд-связывающую часть рецептора ИЛ-33 (например, ST2), ИЛ-33-связывающие скаффолд-молекулы (например, DARPins, HEAT-повторные белки, белки с ARM повтором, белки с тетрапептидным повтором, фибронектин-основанные скаффолд конструкторы, и другие каркасы на основе встречающихся в природе белков с повтором и т.д. [см., например, Voersma and Pluckthun, 2011, Curr. Opin. Biotechnol. 22: 849-857, и ссылки, цитируемые в них]), и анти-ИЛ-33 аптамеры или их части.

Антитела к ИЛ-33.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения антагонисты или ингибиторы ИЛ-33, которые можно использовать в контексте данного изобретения, представляют собой анти-ИЛ-33 антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, которые специфически связывают ИЛ-33 человека. Идентификаторы аминокислотной последовательности для иллюстративных анти-ИЛ-33 антител для использования в способах, описанных в данном изобретении, показаны в табл. 1, а идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие эти антитела к ИЛ-33, показаны в табл. 2.

В одном варианте осуществления изобретения анти-ИЛ-33 антитела, описанные в данном изобретении для использования в способах по изобретению, описаны в патенте США 9453072, который полностью включен в качестве ссылки.

Согласно определенным вариантам осуществления изобретения анти-ИЛ-33 антитела, используемые в способах по данному изобретению, специфически связываются с ИЛ-33. Термин "специфически связывается" или тому подобное означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который относительно устойчив в физиологических условиях. Способы определения того, связывается ли антитело со специфическим антигеном, хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и тому подобное. Например, антитело, которое "специфически связывается с" ИЛ-33, как используется в контексте данного изобретения, включает антитела, которые связываются с ИЛ-33 или его биологически активной частью с K_D менее чем около 1000, менее чем около 500, менее чем около 300, менее чем около 200, менее чем около 100, менее чем около 90, менее чем около 80, менее чем около 70, менее чем около 60, менее чем около 50, менее чем около 40, менее чем около 30, менее чем около 20, менее чем около 10, менее чем около 5, менее чем около 4, менее чем около 3, менее чем около 2, менее чем около 1 или менее чем около 0,5 нМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса. Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с ИЛ-33 человека, может иметь перекрестную реактивность с другими антигенами, такими как молекулы ИЛ- ИЛ-33 от других (не относящихся к человеку) видов.

В соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами осуществления данного изобретения антагонист ИЛ-33 представляет собой анти-ИЛ-33 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи (HCVR), вариабельный участок легкой цепи (LCVR), и/или определяющие комплементарность участки (CDR), содержащие любую из аминокислотных последовательностей анти-ИЛ-33 антител, как указано в патенте США № 9453702 и в табл. 1, описанной в данном изобретении.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонист ИЛ-33 представляет собой анти-ИЛ-33 антитело, имеющее характеристики связывания эталонного антитела, описанного в США 9453072.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществление изобретения анти-ИЛ-33 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которое может быть использовано в контексте способов по данному изобретению, содержит определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR) из вариабельного участка тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274 и определяющие комплементарность участки легкой цепи (LCDR) вариабельного участка легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 282. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, анти-ИЛ-33 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три HCDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три LCDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 276; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 280; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 284; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 286; и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 288.

В других вариантах осуществления изобретения анти-ИЛ-33 антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит HCVR, содержащий SEQ ID NO: 274, и LCVR, содержащий SEQ ID NO: 282.

В одном варианте осуществления изобретения, антагонист ИЛ-33 представляет собой антитело к ИЛ-33, обозначаемое как REGN3500, которое содержит HCVR, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274, и LCVR, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 282, и определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR1-HCDR2-HCDR3), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276-278-280 соответственно, и определяющие комплементарность участки легкой цепи (LCDR1-LCDR2-LCDR3), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NOS: 284-286-288 соответственно.

Другие анти-ИЛ-33 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые можно использовать в описанных в данном изобретении способах, описаны в EP 1725261, US 8187596, WO 2011031600, WO 2015099175, WO 2015106080 (ANB020), US 2016/0168242, WO 2016/077381, WO 2016/077366, или WO 2016/156440, каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки во всей их полноте.

ИЛ-33 ловушки.

Согласно определенным вариантам осуществления изобретения антагонисты или ингибиторы ИЛ-33, которые можно использовать в контексте данного изобретения, представляют собой ловушки ИЛ-33 на основе рецепторов, такие как описанные в данном изобретении.

Описанные в данном изобретении ловушки ИЛ-33 содержат по меньшей мере один связывающий домен ИЛ-33, который содержит связывающую ИЛ-33 часть белка рецептора ИЛ-33, обозначенную как ST2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ловушка ИЛ-33 дополнительно содержит внеклеточную часть ко-рецептора ИЛ-33, обозначенного как дополнительный белок рецептора ИЛ-1 или ИЛ-1RAcP. Ловушка ИЛ-33 также может содержать по меньшей мере один мультимеризирующий компонент, который функционирует для соединения различных компонентов ловушки друг с другом. Различные компоненты ловушек ИЛ-33 описаны ниже и показаны на фиг. 1.

В одном варианте осуществления изобретения, ловушки ИЛ-33, описанные в данном изобретении,

для использования в способах изобретения, описаны в US 2014/0271642 и WO 2014/152195, полностью включенных в данное описание посредством ссылки.

Вкратце, ловушки ИЛ-33 содержат первый ИЛ-33 связывающий домен (D1), присоединенный к мультимеризирующему домену (M). В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонисты ИЛ-33 по изобретению содержат второй ИЛ-33 связывающий домен (D2), присоединенный к D1 и/или M. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, D1 содержит ИЛ-33-связывающую часть белка ST2. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, D2 содержит внеклеточную часть белка ИЛ-1RAcP.

Отдельные компоненты ловушек ИЛ-33 могут располагаться относительно друг друга различными способами, что приводит к образованию функциональных молекул-антагонистов, способных связывать ИЛ-33. Например, D1 и/или D2 могут быть присоединены к N-концу M.

В других вариантах осуществления изобретения D1 и/или D2 присоединены к C-концу M.

В еще других вариантах осуществления изобретения D1 присоединен к N-концу D2, и D2 присоединен к N-концу M, что приводит к слиянию в потоке от N- до C-конца молекулы-антагониста, представленной формулой D1-D2-M. Другие ориентации отдельных компонентов описаны в другом месте в данном изобретении на фиг. 1.

Неограничивающие примеры ловушек ИЛ-33 для использования в способах по изобретению показаны в таблицах 4a и 3b, и включают ловушки ИЛ-33, обозначенные как "hST2-hFc", "hST2-mFc", "hST2-hIL1RAcP-mFc", "hST2-hIL1RAcP-hFc" и "mST2-mIL1RAcP-mFc". Они соответствуют SEQ ID NO: 323, 324, 325, 326 и 327 соответственно. Данное изобретение включает ловушки ИЛ-33 на основе рецептора, имеющие аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична любой из приведенных в данном изобретении иллюстративных ловушек ИЛ-33 на основе рецептора (например, SEQ ID NO: 323, 324, 325, 326 и 327).

Стандартные молекулярно-биологические методы (например, технология рекомбинантных ДНК) могут быть использованы для создания любых ловушек ИЛ-33 по изобретению или их вариантов.

Ловушки ИЛ-33 для использования в способах по изобретению содержат по меньшей мере один связывающий домен ИЛ-33 (иногда обозначаемый в данном изобретении обозначением "D" или "D1", "D2" и т.д.).

В некоторых вариантах осуществления изобретения ИЛ-33 связывающий домен, содержит ИЛ-33-связывающую часть белка ST2. ИЛ-33-связывающая часть белка ST2 может содержать или состоять из всего или части внеклеточного домена белка ST2.

В определенных вариантах осуществления изобретения белок ST2 представляет собой белок ST2 человека. Используемый в данном изобретении термин "белок ST2 человека" относится к белку ST2, как показано аминокислотами 1-556 с инвентарным номером NP 057316.3, также показанным как SEQ ID NO: 352.

В некоторых вариантах осуществления изобретения белок ST2 представляет собой белок ST2 из не относящихся к человеку видов (например, ST2 мыши, ST2 обезьяны и т.д.) Иллюстративная ИЛ-33-связывающая часть белка ST2 представлена в данном изобретении как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 328 (соответствует внеклеточному домену ST2 человека [K19-S328 из NCBI, номер доступа NP 057316.3]). Другие примеры ИЛ-33-связывающей части белка ST2 приведены в данном изобретении как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 329 (соответствующая внеклеточному домену мыши ST2 [S27-R332 из NCBI, номер доступа P14719]).

В некоторых вариантах осуществления изобретения ИЛ-33 связывающий домен, содержит внеклеточную часть белка ИЛ-1RAcP. В определенных вариантах осуществления изобретения, белок ИЛ-1RAcP представляет собой белок ИЛ-1RAcP человека. Термин "белок ИЛ-1RAcP человека" в контексте данного описания относится к белку ИЛ-1RAcP, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 353.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок ИЛ-1RAcP представляет собой белок ИЛ-1RAcP из не относящихся к человеку видов (например, ИЛ-1RAcP мыши, ИЛ-1RAcP обезьяны и т.д.). Пример внеклеточной части белка ИЛ-1RAcP представлен в данном изобретении как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 330 (соответствующая внеклеточному домену ИЛ-1RAcP человека [S21-E359 из NCBI, номер доступа Q9NPH3]). Другой пример внеклеточной части белка ИЛ-1RAcP представлен в данном изобретении как аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 331 (соответствует внеклеточному домену ИЛ-1RAcP мыши [S21-E359 из NCBI, номер доступа Q61730]).

Данное изобретение включает ловушки ИЛ-33, содержащие компоненты D1 и/или D2, имеющие аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична любой из приведенных в данном изобретении иллюстративных аминокислотных последовательностей компонента ИЛ-33 связывающего домена (например, SEQ ID NO: 328, 329, 330 и 331).

Антагонисты ИЛ-33 по данному изобретению также содержат по меньшей мере один мультимеризирующий домен (иногда обозначаемый в данном изобретении аббревиатурой "M", "M1", "M2" и т.д.). В общих чертах, мультимеризирующий домен(ы) по данному изобретению функционирует для соединения

различных компонентов антагонистов ИЛ-33 (например, ИЛ-33-связывающего домена(ов)) друг с другом. Используемый в данном изобретении термин "мультимеризующий домен" представляет собой любую макромолекулу, которая обладает способностью связываться (ковалентно или нековалентно) со второй макромолекулой такой же или сходной структуры или строения. Например, мультимеризующий домен может представлять собой полипептид, содержащий домен C_{H3} иммуноглобулина.

Неограничивающим примером мультимеризирующего домена является Fc-часть иммуноглобулина, например, Fc-домен IgG, выбранный из изоформ IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любой аллотип в каждой группе изоформ.

Неограничивающие иллюстративные мультимеризирующие домены, которые можно использовать в антагонистах ИЛ-33 по данному изобретению, включают Fc IgG1 человека (SEQ ID NO: 332) или Fc IgG2a человека (SEQ ID NO: 333). Данное изобретение включает антагонисты ИЛ-33, содержащие компоненты M, имеющие аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична любой из приведенных в данном изобретении иллюстративных аминокислотных последовательностей M-компонента (например, SEQ ID NO: 332 или 333).

В определенных вариантах осуществления изобретения, антагонисты ИЛ-33 по данному изобретению содержат два мультимеризируемых домена, M1 и M2, где M1 и M2 идентичны друг другу. Например, M1 может представлять собой домен Fc, имеющий конкретную аминокислотную последовательность, а M2 представляет собой домен Fc с той же аминокислотной последовательностью, что и M1.

Отдельные компоненты антагонистов ИЛ-33 по данному изобретению (например, D1, D2, M и т.д.) могут быть расположены относительно друг друга различными способами. Неограничивающие примеры всех вышеупомянутых схем схематично проиллюстрированы на фиг. 1.

Неограничивающие иллюстративные примеры ловушек ИЛ-33 для использования в способах по изобретению, содержащих два мультимеризируемых домена (M1 и M2) и четыре ИЛ-33 связывающих доменов (D1, D2, D3 и D4), также показаны на фиг. 1, схемы C и D).

Отдельные компоненты ловушек ИЛ-33 по данному изобретению (например, D1, D2, M1, M2 и т.д.) могут быть прикреплены друг к другу напрямую (например, D1 и/или D2 могут быть напрямую присоединены к M и т.д.); альтернативно, отдельные компоненты могут быть присоединены друг к другу через компонент линкера (например, D1 и/или D2 могут быть присоединены к M через линкер, ориентированный между отдельными компонентами; D1 может быть присоединен к D2 через линкер и т.д.). В любом из описанных в данном изобретении устройств, в которых один компонент описывается как "присоединенный" к другому компоненту, присоединение может осуществляться через линкер (даже если специально не обозначено как таковое). Как используется в данном изобретении, "линкер" представляет собой любую молекулу, которая соединяет два полипептидных компонента вместе.

Биологические характеристики ловушек ИЛ-33 для использования в способах по изобретению описаны в US 2014/0271642 и в WO 2014/152195, полностью включенных в данное описание посредством ссылки.

Другие антагонисты ИЛ-33.

Полипептиды, которые связываются с ИЛ-33 и/или его рецептором (ST2 и/или ИЛ-1 RAcP) и блокируют взаимодействие лиганд-рецептор, рассматриваются как антагонисты ИЛ-33 и описаны в WO 2014/152195, которая включена в качестве ссылки во всей своей полноте. Другие агенты, которые могут действовать как антагонисты ИЛ-33 и которые могут быть использованы в способах по изобретению, включают иммуноадгезины, пептитела и растворимый ST2 или их производные; рецептор анти-ИЛ-33 антител (например, анти-ST2 антитела, например, AMG-282 (Amgen) или STLM15 (Janssen) или любое из анти-ST2 антител, описанных в WO 2012/113813, WO 2013/173761, WO 2013/165894, US 8444987 или US 7452980, каждый из которых включен в данное описание посредством ссылки во всей их полноте. Другие антагонисты ИЛ-33 для использования в способах по изобретению включают белки ST2-Fc, такие как описанные в WO 2013/173761 или WO 2013/165894, каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки во всей своей полноте.

Антагонисты ИЛ-4R.

Используемый в данном изобретении термин "антагонист ИЛ-4R" (также называемый в данном изобретении "ингибитор ИЛ-4R", "антагонист ИЛ-4R", "блокатор ИЛ-4R", "блокатор ИЛ-4Rα", и т. д.) представляет собой любой агент, который связывается или взаимодействует с ИЛ-4Rα или лигандом ИЛ-4R и ингибирует или ослабляет нормальную биологическую сигнальную функцию рецептора ИЛ-4 типа 1 и/или типа 2. Используемый в данном изобретении термин "ИЛ-4R" или "hIL-4R человека" относится к ИЛ-4R, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 347 или ее биологически активный фрагмент. Рецептор ИЛ-4 типа 1 представляет собой димерный рецептор, содержащий цепь ИЛ-4Rα и γс цепь. Рецептор ИЛ-4 типа 2 представляет собой димерный рецептор, содержащий цепь ИЛ-4Rα и цепь ИЛ-13Rα1. Рецепторы ИЛ-4 типа 1 взаимодействуют с ИЛ-4 и стимулируются им, тогда как рецепторы ИЛ-4 типа 2 взаимодействуют с ИЛ-4 и ИЛ-13 и стимулируются ими. Таким образом, антагонисты ИЛ-4R, которые можно использовать в способах по данному изобретению, могут функционировать, блокируя ИЛ-4-опосредованный сигналинг, ИЛ-13-опосредованный сигналинг, как ИЛ-4-, так и ИЛ-13-

опосредованный сигналинг. Таким образом, антагонисты ИЛ-4Р по данному изобретению могут предотвращать взаимодействие ИЛ-4 и/или ИЛ-13 с рецептором типа 1 или типа 2.

Неограничивающие примеры категорий антагонистов ИЛ-4Р включают низкомолекулярные антагонисты ИЛ-4Р, ингибиторы экспрессии или активности ИЛ-4Р на основе нуклеиновых кислот (например, мРНК или антисмысл), молекулы на основе пептидов, которые специфически взаимодействуют с ИЛ-4Р (например, пептиды), "рецептор-тела" (например, сконструированные молекулы, содержащие лиганд-связывающий домен компонента ИЛ-4Р), ИЛ-4Р-связывающие каркасные молекулы (например, DARPins, белки с HEAT повтором, белки с ARM повтором, белки с тетраатрикопептидным повтором, фибронектин-основанные скаффолд конструкторы, и другие каркасы на основе встречающихся в природе белков с повтором и т.д. [см., например, Voersma and Pluckthun, 2011, Curr. Opin. Biotechnol. 22:849-857, и ссылки, цитируемые в них]), и анти-ИЛ-4Р аптамеры или их части.

Согласно определенным вариантам осуществления изобретения антагонисты ИЛ-4Р, которые можно использовать в контексте данного изобретения, представляют собой анти-ИЛ-4Р антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, которые специфически связывают ИЛ-4Р человека.

В одном варианте осуществления изобретения анти-ИЛ-4Р антитело, которое описано в данном изобретении для использования в способах по изобретению, представляет собой дупилумаб (см. также патенты США №№ 7605377; 7608693 и 9290574).

Анти-ИЛ-4Р антитела.

В соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами осуществления данного изобретения антагонист ИЛ-4Р представляет собой анти-ИЛ-4Р антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ИЛ-4Р. Термин "специфически связывается" или тому подобное означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который относительно устойчив в физиологических условиях. Способы определения того, связывается ли антитело со специфическим антигеном, хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и тому подобное. Например, антитело, которое "специфически связывается с" ИЛ-4Р α , как используется в контексте данного изобретения, включает антитела, которые связываются с ИЛ-4Р α или его биологически активной частью с K_D менее чем около 1000, менее чем около 500, менее чем около 300, менее чем около 200, менее чем около 100, менее чем около 90, менее чем около 80, менее чем около 70, менее чем около 60, менее чем около 50, менее чем около 40, менее чем около 30, менее чем около 20, менее чем около 10, менее чем около 5, менее чем около 4, менее чем около 3, менее чем около 2, менее чем около 1 или менее чем около 0,5 нМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса. Однако выделенное антитело, которое специфически связывает ИЛ-4Р α человека, может иметь перекрестную реактивность с другими антигенами, такими как молекулы ИЛ-4Р α от других (не относящихся к человеку) видов.

В соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами осуществления данного изобретения антагонист ИЛ-4Р представляет собой анти-ИЛ-4Р α антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи (HCVR), вариабельный участок легкой цепи (LCVR), и/или определяющие комплементарность участки (CDR), содержащие любую из аминокислотных последовательностей анти-ИЛ-4Р антител, как указано в патентах США №№ 7605377 и 7608693.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антагонист ИЛ-4Р представляет собой анти-ИЛ-4Р антитело, имеющее характеристики связывания эталонного антитела, называемого в данном изобретении дупилумабом (см. США 7605237 и США 7608693).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления изобретения анти-ИЛ-4Р α антитело или его антиген-связывающий фрагмент может быть использовано в контексте способов по данному изобретению содержит определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR) из вариабельного участка тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 337 и определяющие комплементарность участки легкой цепи (LCDR) вариабельного участка легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 338.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения анти-ИЛ-4Р α антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три HCDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три LCDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 339; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 340; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 341; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 342; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 343; и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 344.

В других вариантах осуществления изобретения анти-ИЛ-4Р антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащий SEQ ID NO: 337, и LCVR, содержащий SEQ ID NO: 338.

В других вариантах осуществления изобретения анти-ИЛ-4Р антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, содержащий SEQ ID NO: 335, и LCVR, содержащий SEQ ID NO: 336.

В еще других вариантах осуществления изобретения анти-ИЛ-4Р антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи (HC), как указано в SEQ

ID NO: 345, и аминокислотную последовательность легкой цепи (LC), как указано в SEQ ID NO: 346.

В соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами осуществления изобретения способы по данному изобретению включают использование анти-ИЛ-4Р α антитела, называемого и известного в данной области как дупилумаб, или его биоэквивалент. Дупилумаб содержит HCVR, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 337, и LCVR, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 338, и определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR1-HCDR2-HCDR3), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 339-340-341 соответственно, и определяющие комплементарность участки легкой цепи (LCDR1-LCDR2-LCDR3), имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NOS: 342-343-344 соответственно.

Другие анти-ИЛ-4Р α антитела, которые могут быть использованы в контексте способов по данному изобретению, включают, например, антитело называемое и известное в данной области техники как AMG317 (Corgen и др., 2010, Am J Respir Crit Care Med., 181 (8): 788-796), или MEDI 9314, или любое из анти-ИЛ-4Р α -антител, как указано в патенте США № 7186809, патенте США № 7605237, патенте США № 7638606, патенте США № 8092804, патенте США № 8679487 или патенте США № 8877189. pH-зависимые характеристики анти-ИЛ-4 и/или анти-ИЛ-33 антител

Анти-ИЛ-4Р α и ИЛ-33 антитела, используемые в контексте способов по данному изобретению, могут иметь pH-зависимые характеристики связывания. Например, анти-ИЛ-4Р α антитело или анти-ИЛ-33 антитело для использования в способах по данному изобретению могут демонстрировать пониженное связывание с ИЛ-4Р α или с ИЛ-33 соответственно при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Альтернативно анти-ИЛ-4Р α антитело по изобретению или анти-ИЛ-33 антитело по изобретению могут проявлять усиленное связывание с его антигеном при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Выражение "кислое pH" включает значения pH менее чем около 6,2, например, около 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или менее. Используемое в данном изобретении выражение "нейтральное pH" означает pH от около 7,0 до около 7,4. Выражение "нейтральное pH" включает значения pH около 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

В некоторых случаях "пониженное связывание с ИЛ-4Р α при кислом pH по сравнению с нейтральным pH" или "пониженное связывание с ИЛ-33 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH" выражается в терминах соотношения величины K_D связывания антитела с ИЛ-4Р α или ИЛ-33 соответственно при кислом pH до значения K_D связывания антитела с ИЛ-4Р α или ИЛ-33 соответственно при нейтральном pH (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно рассматривать как демонстрирующие "пониженное связывание с ИЛ-4Р α при кислом pH по сравнению с нейтральным pH" или "пониженное связывание с ИЛ-33 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH" для целей данного изобретения, если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют кислый/нейтральный коэффициент K_D около 3,0 или более. В некоторых примерных вариантах осуществления изобретения, кислый/нейтральный коэффициент K_D для антитела или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению может составлять около 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или более.

Антитела с pH-зависимыми характеристиками связывания могут быть получены, например, путем скрининга популяции антител для снижения (или усиления) связывания с конкретным антигеном при кислом pH, по сравнению с нейтральным pH. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на уровне аминокислот могут давать антитела с pH-зависимыми характеристиками. Например, путем замены одной или более аминокислот антигенсвязывающего домена (например, в CDR) остатком гистидина может быть получено антитело с пониженным антигенсвязыванием при кислом pH относительно нейтрального pH. Используемое в данном изобретении выражение "кислое pH" означает pH 6,0 или менее.

Биологические эффекты антагонистов ИЛ-33 и ИЛ-4Р, используемых в комбинированной терапии

Данное изобретение включает применение антагониста ИЛ-33 в комбинации с антагонистом ИЛ-4Р для лечения воспалительного состояния.

В одном варианте осуществления изобретения применение анти-ИЛ-33 антитела в комбинации с анти-ИЛ-4Р антителом на модели фиброза и воспаления легких у животных демонстрирует повышенную эффективность по сравнению с результатами, полученными, когда каждое антитело используется отдельно в качестве монотерапии.

Например, в модели животного, описанной в данном изобретении (называемой моделью воспаления легких и фиброза из-за клеща домашней пыли (HDM)), уровень определенных цитокинов в легких значительно повышен. Это включает повышение уровня ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-1 β и MCP-1. Была также тенденция к увеличению уровней ИЛ-13 и ФНО α в легких мышей после введения аллергена клещей домашней пыли. Однако при испытании в этой модели, комбинированное применение антитела к ИЛ-33 и антитела к ИЛ-4Р привело к снижению уровней цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-13, ИЛ-1 β , MCP-1 и ФНО α в легких обработанных мышей. Эффект на уровни цитокинов в легких, наблюдаемый с комбинацией анти-ИЛ-33 и анти-ИЛ-4Р антител, был больше, чем обработка любым отдельным антителом при использовании отдельно, как показано в примере 4.

Кроме того, уровни генов цитокинов, генов хемокинов и генов коллагена, включая *Il4*, *Il13*, *Il6*, *Ccl2*, *Tgfb1*, *Il13ra2* и *Col24a1*, были повышены у мышей, получавших аллерген клещей домашней пыли. В этой модели наблюдалась тенденция к увеличению уровней *Il5*, *Il9*, *Ccl11*, *Ccl24*, *Tnf*, *Il1rl1* и *Col15a1*. После обработки комбинацией анти-ИЛ-33 антитела и анти-ИЛ-4Р антитела наблюдалось значительное снижение экспрессии *Il6*, *Ccl2*, *Ccl11* и *Ccl24* по сравнению с уровнями, наблюдаемыми при лечении только одним антителом. Была также тенденция к снижению количества *Il4*, *Il5*, *Il13*, *Il9*, *Tnf*, *Tgfb1*, *Il1rl1*, *Il13ra2*, *Col15a1* и *Col24a1*, когда мышей лечили анти-ИЛ-33 антителом и анти-ИЛ-4Р антителом, по сравнению с лечением только одним антителом.

Другой биологический эффект, связанный с комбинированным использованием анти-ИЛ-33 плюс анти-ИЛ-4Р антител, наблюдался, когда анализ проводился на легочных клеточных инфильтратах на модели клещей домашней пыли. Как показано в примере 4, частота эозинофилов, активированных В-клеток, активированных CD8-клеток, ST2+CD4+ Т-клеток и CD4/CD8 Т-клеток была значительно выше у мышей, получавших аллерген клеща домашней пыли. Также наблюдалась тенденция к увеличению частоты активированных CD4+ Т-клеток в легких у мышей, получивших аллерген клещей домашней пыли. Наблюдалась тенденция к снижению частоты эозинофилов, активированных В-клеток, активированных CD8-клеток, ST2+CD4+ Т-клеток и соотношений Т-клеток CD4/CD8 у мышей, получавших как анти-ИЛ-33 антитело, так и анти-ИЛ-4Р антитело по сравнению с наблюдаемым, когда любое антитело использовалось отдельно.

Кроме того, мыши, получающие аллерген клеща домашней пыли, также показывают увеличение метаплазии бокаловидных клеток в легких. Точно так же наблюдалось увеличение консолидации легких (накопление твердого или жидкого материала в альвеолярном пространстве), и субэпителиального фиброза (избыток отложения интерстициального коллагена под легочным эпителием) на этой мышинной модели. Обработка этих мышей анти-ИЛ-33 антителом в сочетании с анти-ИЛ-4Р антителом привела к уменьшению метаплазии бокаловидных клеток и толщины субэпителиального коллагена и значительному уменьшению консолидации легких по сравнению с наблюдаемыми результатами, когда любое из двух антител использовалось отдельно.

Мыши, получающие аллерген клеща домашней пыли, также продемонстрировали повышение уровня циркулирующего IgE, а также тенденцию к увеличению специфического IgG1 клеща домашней пыли (HDM). Введение как анти-ИЛ-33 антитела, так и антитела к ИЛ-4Р привело к значительному снижению уровней сывороточного IgE и тенденции к снижению HDM-специфического IgG1 по сравнению с уровнями IgE и HDM-специфического IgG1, наблюдаемыми, когда любое из антител использовалось отдельно.

Антагонист ИЛ-33 и антагонист ИЛ-4Р, такой как антитела, описанные в данном изобретении для применения в качестве комбинированной терапии для лечения воспалительных заболеваний или состояний легких, могут ингибировать или ослаблять ИЛ-33-опосредованный сигналинг и ИЛ-4Р-опосредованный сигналинг, и они могут проявлять одно или более биологических свойств, наблюдаемых в модели HDM, описанной в данном изобретении, например, (1) снижение уровней цитокинов, которые повышаются у млекопитающего в результате воздействия аллергена, например, ИЛ-4 или ИЛ-5; (2) ингибирование воспаления легких в результате острого или хронического воздействия аллергена (например, клещей домашней пыли (HDM)); (3) уменьшение клеточной инфильтрации легких в результате острого или хронического воздействия аллергена (например, клещей домашней пыли (HDM)); (4) улучшение макропатологии легких.

Ингибирование ИЛ-33-опосредованного сигналинга или ИЛ-4Р-опосредованного сигналинга может быть измерено с помощью биоанализа на основе клеток и означает, что анти-ИЛ-33 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-ИЛ-4Р антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует или уменьшает сигнал, продуцируемый в клетках, которые экспрессируют рецептор ИЛ-33 или рецептор ИЛ-4, и репортерный элемент, который генерирует детектируемый сигнал в ответ на связывание ИЛ-33 или связывание ИЛ-4. Например, данное изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют ИЛ-33-опосредованный сигналинг, или ИЛ-4-опосредованный сигналинг в клетках, экспрессирующих ST2 человека, или в клетках, экспрессирующих рецептор ИЛ-4, соответственно, с IC_{50} менее чем около 2 нМ, менее чем около 1 нМ, менее чем около 900 пМ, менее чем около 800, менее чем около 700, менее чем около 600, менее чем около 500, менее чем около 400, менее чем около 350, менее чем около 300, менее чем около 250, менее чем около 200, менее чем около 150, менее чем около 100, менее чем около 90, менее чем около 80, менее чем около 70, менее чем около 60, менее чем около 50, менее чем около 40, менее чем около 30, менее чем около 20 или менее чем около 10 пМ, как измерено в биоанализе блокирования на основе клеток.

Антитела по данному изобретению могут демонстрировать один или более из вышеупомянутых биологических эффектов или любую их комбинацию. Другие биологические эффекты антител по данному изобретению будут очевидны для специалиста в данной области техники из обзора данного изобретения, включая рабочие примеры в данном изобретении. Использование других антагонистов ИЛ-33 в комбинации с антагонистом ИЛ-4 может демонстрировать аналогичные эффекты.

Фармацевтические композиции и введение.

Изобретение обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие антагонисты ИЛ-33 и/или антагонисты ИЛ-4Р по данному изобретению. Антагонисты ИЛ-33 и антагонисты ИЛ-4Р могут быть составлены в отдельных композициях или они могут быть составлены в одной композиции. Фармацевтические композиции по изобретению составляют с подходящими носителями, наполнителями и другими агентами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и тому подобное. Множество подходящих составов можно найти в рецептурном формуляре, известном всем фармацевтическим химикам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Истон, штат Пенсильвания. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липид (катионный или анионный), содержащий везикулы (такие как LIPOFECTIN™ Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа "масло в воде" или "вода в масле", эмульсии на основе карбовакса (полиэтиленгликоли с разной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См., также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антитела, вводимого пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, состояний, пути введения и тому подобного. Предпочтительная доза обычно рассчитывается в зависимости от массы тела или площади поверхности тела. Когда антитело по данному изобретению используется для лечения состояния или заболевания, связанного с активностью ИЛ-33 и/или ИЛ-4 у взрослого пациента, может быть выгодно вводить антитело по данному изобретению внутривенно обычно в однократной дозе от около 0,01 до около 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от около 0,02 до около 7, от около 0,03 до около 5, или от около 0,05 до около 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния, частота и длительность лечения могут быть скорректированы. Эффективные дозы и схемы введения анти-ИЛ-33 антител могут быть определены опытным путем; например, прогресс пациента может контролироваться путем периодической оценки, и доза корректируется соответствующим образом. Кроме того, межвидовое масштабирование доз может быть выполнено с использованием хорошо известных в данной области способов (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

Различные системы доставки известны и могут быть применены для введения фармацевтической композиции согласно изобретению, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, рецепторно-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, но без ограничения, внутрикожные, внутримышечные, внутривенные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и оральные пути введения. Композицию можно вводить любым удобным путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизистые выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, ректальную и кишечную слизистую оболочку и тому подобное) и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или локальным.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно стандартной иглой и шприцем. Кроме того, в отношении подкожной доставки шприц-ручка для доставки легко может иметь применение для доставки фармацевтической композиции по данному изобретению. Такая шприц-ручка может быть многоразовой или одноразовой. Многоразовая шприц-ручка обычно использует сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Как только вся фармацевтическая композиция, содержащаяся в картридже, была введена и картридж становится пустым, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручка может быть повторно использована. В одноразовой шприц-ручке нет сменного картриджа. Скорее, одноразовая шприц-ручка заполняется фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри устройства. Как только резервуар опустеет от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывается.

Многочисленные повторно используемые шприц-ручки и шприц-тюбики имеют применение для подкожной доставки фармацевтической композиции по данному изобретению. Примеры включают, но без ограничений, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, штат Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин Лейке, штат Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), и это лишь некоторые из них. Примеры одноразовых шприц-ручек, которые применяются для доставки фармацевтической композиции по данному изобретению, включают, но без ограничений, шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), шприц-тюбик SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Абботт Парк, Иллинойс), и это лишь некоторые из них.

В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может поставляться в системе контролируемого высвобождения. В одном варианте осуществления изобретения, может использоваться насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201).

В другом варианте осуществления изобретения могут быть использованы полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Бока-Ратон, Флорида. В еще одном варианте осуществления изобретения, система контролируемого высвобождения может быть расположена вблизи мишени композиции, таким образом требуется лишь доля системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в Medical Applications of Controlled Release, выше, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science 249: 1527-1533.

Инъекционные формы могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и тому подобного. Эти инъекционные формы могут быть получены общеизвестными способами. Например, инъекционные формы, могут быть получены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антителя или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно применяемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций существуют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и тому подобное, которые могут быть применены в комбинации с соответствующим солюбилизующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтилен (50 моль) аддукт гидрированного касторового масла)] и тому подобное. В качестве маслянистой среды применяют, например, кунжутное масло, соевое масло и тому подобное, которые могут быть применены в комбинации со солюбилизующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и тому подобное. Инъекцию, полученную таким образом, предпочтительно, заполняют в соответствующую ампулу.

Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в лекарственной форме в единичной дозе, подходящей для дозы активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в единичной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и тому подобное. Количество содержащегося вышеупомянутых антагонистов обычно составляет от около 5 до около 500 мг на лекарственную форму в единичной дозе; особенно в форме инъекции, предпочтительно, чтобы вышеуказанные антагонисты содержались в количестве от около 5 до около 100 и от около 10 до около 250 мг для других лекарственных форм. Дозировка.

Количество антагониста ИЛ-33 и ИЛ-4Р, вводимого субъекту в соответствии со способами данного изобретения, обычно представляет собой терапевтически эффективное количество. Используемое в данном изобретении выражение "терапевтически эффективное количество" означает количество антагониста ИЛ-33 и антагониста ИЛ-4Р, которое при использовании в комбинации приводит к значительному изменению одного или более из следующих факторов: (а) предотвращение воспаления; (б) лечение или уменьшение тяжести воспаления; (с) снижение частоты одного или более из следующих факторов: эозинофилы, активированные В-клетки, активированные CD8 Т-клетки или соотношение CD4/CD8 Т-клеток в легких; (d) снижение одного или более из следующих: уровни интерлейкина-1 бета (ИЛ-1 β), интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерлейкина-5 (ИЛ-5), интерлейкина-6 (ИЛ-6), интерлейкина-13 (ИЛ-13), белка-1 хемотаксанта моноцитов (MCP-1) или альфа-фактора некроза опухоли (ФНО α) в легких; (е) снижение уровня экспрессии гена одного или более из следующих: И4, И5, И6, И9, И13, И11р11, И13ра2, tnf, Tgfb1, Ccl2, Ccl11, Ccl24, Col15a1 или Col24a1 в легких; (f) снижение уровня сывороточного IgE; (g) снижение метаплазии бокаловидных клеток в легких; или (h) снижение уплотнения легких, как описано в данном изобретении. Хотя введение только антагониста ИЛ-33 или только антагониста ИЛ-4Р может привести к положительному терапевтическому эффекту, измеренному с использованием одного или более из указанных выше параметров, использование антагонистов ИЛ-33 и ИЛ-4Р в комбинации демонстрирует значительное улучшение (например, аддитивный или синергетический эффект) по любому одному или более параметрам по сравнению с тем, который наблюдается при монотерапии либо только антагонистом ИЛ-33, либо только антагонистом ИЛ-4Р.

В случае антагониста ИЛ-33 или антагониста ИЛ-4Р терапевтически эффективное количество может составлять от около 0,05 мг до около 600 мг, например, около 0,05, около 0,1, около 1,0, около 1,5, около 2,0, около 10, около 20, около 30, около 40, около 50, около 60, около 70, около 80, около 90, около 100, около 110, около 120, около 130, около 140, около 150, около 160, около 170, около 180, около 190, около 200, около 210, около 220, около 230, около 240, около 250, около 260, около 270, около 280, около 290, около 300, около 310, около 320, около 330, около 340, около 350, около 360, около 370, около 380 мг, около 390, около 400, около 410, около 420, около 430, около 440, около 450, около 460, около 470, около 480, около 490, около 500, около 510, около 520, около 530, около 540, около 550, около 560, около 570, около 580, около 590 или около 600 мг.

В определенных вариантах осуществления изобретения субъекту вводят 75, 150, 200 или 300 мг ан-

тагониста ИЛ-4Р в комбинации с антагонистом ИЛ-33.

В определенных вариантах осуществления изобретения, субъекту вводят 75, 150, 200 или 300 мг антагониста ИЛ-33 в комбинации с антагонистом ИЛ-4Р.

Количество антагониста ИЛ-33 или антагониста ИЛ-4Р, содержащегося в отдельных дозах, может быть выражено в миллиграммах антитела на килограмм массы тела пациента (т.е. мг/кг). Например, антагонист ИЛ-33 или антагонист ИЛ-4Р можно вводить пациенту в дозе от около 0,0001 до около 25 мг/кг массы тела пациента.

В определенных вариантах осуществления изобретения, каждый из антагонистов ИЛ-4Р и ИЛ-33 можно вводить в дозах около 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 или 10 мг/кг.

Комбинация антагониста ИЛ-33 и антагониста ИЛ-4Р может быть введена субъекту подкожно, внутривенно, внутримышечно или интраназально. Их можно вводить одновременно или последовательно.

Терапевтическое применение антител.

Эксперименты с использованием мышиной модельной системы, проведенные авторами данного изобретения, способствовали идентификации различных заболеваний и состояний, которые можно лечить, предотвращать и/или улучшать с помощью комбинированного антагонизма ИЛ-33 и ИЛ-4Р. Например, в модели воспаления легких от клещей домашней пыли и фиброза легких, лечение комбинацией антитела к ИЛ-33 и антитела к ИЛ-4Р приводила к снижению уровня цитокинов в легких, уменьшению легочных инфильтратов клетками в легких (эозинофилы, активированные В-клетки, активированные CD8-позитивные клетки, ST2+CD4+ Т-клетки и соотношение CD4/CD8 Т-клеток), а также улучшение консолидации легких и субэпителиального фиброза по сравнению с результатами, полученными когда каждое антитело использовалось отдельно в качестве монотерапии.

Антитела по изобретению полезны, среди прочего, для лечения, профилактики и/или ослабления любого заболевания или расстройства, связанного с или опосредованного экспрессией ИЛ-33 и ИЛ-4 экспрессией, сигналингом, или активностью, или излечиваемыми с помощью блокирования взаимодействия между ИЛ-33 и рецептором ИЛ-33 (например, ST2), или блокирования взаимодействия между ИЛ-4 и рецептором ИЛ-4, или иным образом ингибировать активность и/или сигналинг ИЛ-33 и ИЛ-4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонист ИЛ-4Р представляет собой антитело, которое связывается с, или взаимодействует с ИЛ-4Р α и при этом блокирует сигнальные пути ИЛ-4 и ИЛ-13 через ИЛ-4Р рецепторы типа 1 и типа 2. Таким образом, использование этого двойного антагониста ИЛ-4 и ИЛ-13 в комбинации с антагонистом ИЛ-33 может обеспечить дополнительные клинические преимущества при введении пациентам с воспалительным состоянием, частично опосредованным всеми тремя сигнальными путями. Например, данное изобретение предлагает способы лечения астмы (аллергическая астма, неаллергическая астма, тяжелая рефрактерная астма, обострения астмы, стероидно-резистентная или стероидно-рефрактерная астма, стероидочувствительная астма, эозинофильная астма или незозинофильная астма и т.д.), хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и обострения ХОБЛ, астмы и синдрома перекрытия ХОБЛ (ACOS), хронического бронхита, эмфиземы, гиперчувствительного пневмонита, атопического дерматита, крапивницы, псориаза, аллергии, аллергического ринита, хронического риносинусита с или без носоглоточных полипов, эозинофильного эзофагита, анафилаксии, сердечно-сосудистых заболеваний, заболеваний центральной нервной системы, боли (включая воспалительную боль), артрита (например, ревматоидный артрит, остеоартрит, псориатический артрит и т.д.), гигантоклеточного артериита, васкулита (болезнь Бечета и синдром Шурга-Штрауса), пурпуры Шенлейна-Геноха, рассеянного склероза, воспалительного заболевания кишечника (например, болезнь Крона или язвенный колит), волчанки, синдрома Шегрена и других воспалительных заболеваний или расстройств, частично опосредованных ИЛ-33 и/или ИЛ-4 сигналингом.

Антитела по данному изобретению также полезны для лечения, профилактики и/или ослабления одного или более фиброзных заболеваний или расстройств. Типичные фиброзные заболевания или расстройства, которые поддаются лечению путем введения антагонистов анти-ИЛ-33 и ИЛ-4Р по изобретению, включают фиброз легких (например, идиопатический фиброз легких, блеомицин-индуцированный фиброз легких, асбест-индуцированный фиброз легких и синдром облитерирующего бронхиолита), фиброз, связанный с острым повреждением легких и острым респираторным дистрессом (например, фиброз, вызванный бактериальной пневмонией, фиброз, вызванный травмой, фиброз, вызванный вирусной пневмонией, фиброз, вызванный ИВЛ, фиброз, вызванный не легочным сепсисом, и фиброз, вызванный аспирацией), силикоз, радиационный фиброз, склеродермию, глазной фиброз, кожный фиброз (например, склеродермия), фиброз печени (например, цирроз печени, алкогольный фиброз печени, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), повреждение желчных протоков, первичный билиарный цирроз, инфекция- или вирус-индуцированный фиброз печени, аутоиммунный гепатит, фиброз почек (почечный), фиброз сердца, атеросклероз, рестеноз стента и миелофиброз.

В контексте способов лечения, описанных в данном изобретении, анти-ИЛ-33 антитело и анти-ИЛ-4Р антитело можно вводить вместе (т.е. в качестве единственной схемы лечения) или в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами (примеры которые описаны в другом месте данного изобретения).

Комбинированная терапия.

Данное изобретение включает применение композиций и терапевтических составов, содержащих любой из анти-ИЛ-33 антагонистов и антагонистов ИЛ-4Р, описанных в данном изобретении, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, включающие введение таких комбинаций субъектам, нуждающимся в этом. Используемое в данном изобретении выражение "в сочетании с" означает, что дополнительные терапевтические агенты вводят до, после или одновременно с фармацевтической композицией, содержащей антагонист ИЛ-33 и антагонист ИЛ-4Р. Термин "в сочетании с" также включает последовательное или одновременное введение антагониста ИЛ-4Р и антагониста ИЛ-33 и одного или более дополнительных терапевтических агентов. Данное изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антагонист ИЛ-33 и антагонист ИЛ-4Р по данному изобретению сочетаются с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентом(ами).

Например, при введении "до" фармацевтических композиций, содержащих антагонист ИЛ-33 и антагонист ИЛ-4Р, дополнительный терапевтический агент можно вводить в течение около 72, около 60, около 48, около 36, около 24, около 12, около 10, около 8, около 6, около 4, около 2, около 1 часа, около 30, около 15 или около 10 минут до введения фармацевтических композиций, содержащих антагонист ИЛ-33 и антагонист ИЛ-4Р. При введении "после" фармацевтических композиций, содержащих антагонист ИЛ-33 и антагонист ИЛ-4Р, дополнительный терапевтический агент можно вводить через 10, около 15, около 30 минут, около 1 часа, около 2, около 4, около 6, около 8, около 10, около 12, около 24, около 36, около 48, около 60 или около 72 ч после введения фармацевтических композиций, содержащих антагонист ИЛ-33 и антагонист ИЛ-4Р. Введение "одновременно" или с фармацевтическими композициями, содержащими антагонист ИЛ-33 и антагонист ИЛ-4Р, означает, что дополнительный терапевтический агент вводят субъекту в отдельной лекарственной форме в течение менее чем 5 мин (до, после или в то же время) введения фармацевтических композиций, содержащих антагонист ИЛ-33 и антагонист ИЛ-4Р, или вводимых субъекту в виде единой комбинированной лекарственной формы, содержащей как дополнительный терапевтический агент, антагонист ИЛ-33, так и антагонист ИЛ-4Р.

Дополнительным терапевтическим агентом может быть, например, другой антагонист ИЛ-33, другой антагонист ИЛ-4Р, антагонист ИЛ-1 (включая, например, антагонист ИЛ-1, как указано в США 6927044), антагонист ИЛ-6, антагонист ИЛ-6R (включая, например, анти-ИЛ-6R антитело, как указано в США 7582298), антагонист ИЛ-13, антагонист ФНО, антагонист ИЛ-8, антагонист ИЛ-9, антагонист ИЛ-17, антагонист ИЛ-5 (например, меполизумаб или NUCALA®), антагонист IgE (например, омализумаб или XOLAIR®), антагонист CD48, антагонист ИЛ-31 (включая, например, как указано в США 7531637), антагонист тимусного стромального лимфопоэтина (TSLP) (включая, например, как указано в US 2011/0274 68), интерферон-гамма (ИФН γ), антибиотики, кортикостероиды (включая ингаляционные кортикостероиды или ICS), β 2 адренергические агонисты длительного действия LABA), мускариновые антагонисты длительного действия (LAMA), такролимус, пимекролимус, циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, кромолин натрия, ингибиторы протеиназы, антигистаминные препараты или их комбинации.

Схемы введения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения многократные дозы антагониста ИЛ-33 и антагониста ИЛ-4Р (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антагониста ИЛ-33, антагониста ИЛ-4Р и любого из дополнительных терапевтически активных агентов, упомянутых в данном изобретении), могут вводиться субъекту в течение определенного времени. Способы согласно этому аспекту изобретения включают последовательное введение субъекту множества доз антагониста ИЛ-33 и антагониста ИЛ-4Р по изобретению. Используемый в данном изобретении термин "последовательное введение" означает, что каждая доза антагониста ИЛ-33 и антагониста ИЛ-4Р вводится субъекту в разные моменты времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы).

Данное изобретение включает способы, которые включают в себя последовательное введение пациенту одной начальной дозы антагониста ИЛ-33 и антагониста ИЛ-4Р с последующим введением одной или более вторичных доз антагониста ИЛ-33 и антагониста ИЛ-4Р, и необязательно с последующей одной или более третичными дозами антагониста ИЛ-33 и антагониста ИЛ-4Р.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антагониста ИЛ-33 и антагониста ИЛ-4Р по изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которая вводится в начале курса лечения (также называемая "исходной дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, вводимые после начальной дозы; а "третичные дозы" представляют собой дозы, вводимые после вторичных доз. Все начальные, вторичные и третичные дозы могут содержать одинаковое количество антагониста ИЛ-33 и антагониста ИЛ-4Р, но, как правило, могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, однако, количество антагониста ИЛ-33 и антагониста ИЛ-4Р, содержащихся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличается друг от друга (например, скорректировано вверх или вниз по мере необходимости) в ходе курса лечения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале курса лечения в качестве "насыщающих доз" с последующими дозами, которые вводятся менее часто (например, "поддерживающие дозы").

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения каждую вторичную и/или третью дозу вводят через от 1 до 26 недель (например, 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2} и более) после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", используемая в данном изобретении, означает, в последовательности нескольких введений, дозу антагониста ИЛ-33 и антагониста ИЛ-4Р, которую вводят пациенту до введения следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы в соответствии с этим аспектом изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антагониста ИЛ-33 и антагониста ИЛ-4Р. Например, в определенных вариантах осуществления изобретения пациенту вводится только одна вторичная доза.

В других вариантах осуществления изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом, в определенных вариантах осуществления изобретения пациенту вводится только одна третичная доза.

В других вариантах осуществления изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В вариантах осуществления с участием нескольких вторичных доз, каждая вторичная доза может быть введена в той же частоте, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может вводиться пациенту через 1-2 недели или через 1-2 месяца после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления изобретения, включающих множество третичных доз, каждая третичная доза может вводиться с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту через 2-12 недели после непосредственно предшествующей дозы.

В определенных вариантах осуществления изобретения частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводятся пациенту, может изменяться в течение курса лечения. Частота введения может также регулироваться в ходе курса лечения лечащим врачом в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

Данное изобретение включает схемы введения, при которых от 2 до 6 нагрузочных доз вводят пациенту с первой частотой (например, один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз в месяц, один раз каждые два месяца и т.д.) с последующим введением пациенту двух или более поддерживающих доз реже. Например, согласно этому аспекту изобретения, если нагрузочные дозы вводят с частотой один раз в месяц, то поддерживающие дозы могут вводиться пациенту один раз каждые шесть недель, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца, так далее.).

Примеры

Следующие примеры приведены с тем, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как производить и применять способы и композиции изобретения, и не предназначены для ограничения объема изобретения, которое авторы изобретения считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении применяемых чисел (например, количеств, температуры и тому подобное), однако необходимо учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, и давление находится на уровне или около атмосферного.

Пример 1. Создание антител человека к ИЛ-33 человека.

Анти-ИЛ-33 антитела человека были получены, как описано в патенте США № 9453072. В табл. 1 приведены пары аминокислотных последовательностей переменного участка тяжелой и легкой цепей, и последовательности CDR выбранных анти-ИЛ-33 антител и их соответствующие идентификаторы антител. В табл. 2 приведены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие пары аминокислотных последовательностей переменного участка тяжелой и легкой цепей, и последовательности CDR выбранных анти-ИЛ-33 антител и их соответствующие идентификаторы антител.

Таблица 1

Идентификаторы аминокислотной последовательности

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M9559N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1M9566N	18	20	22	24	26	28	30	32
H1M9568N	34	36	38	40	42	44	46	48
H4N9629P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4N9633P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4N9640P	82	84	86	88	90	92	94	96
H4N9659P	98	100	102	104	106	108	110	112
H4N9660P	114	116	118	120	122	124	126	128
H4N9662P	130	132	134	136	138	140	142	144
H4N9663P	146	148	150	152	154	156	158	160
H4N9664P	162	164	166	168	170	172	174	176
H4N9665P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4N9666P	194	196	198	200	202	204	206	208
H4N9667P	210	212	214	216	218	220	222	224
H4N9670P	226	228	230	232	234	236	238	240
H4N9671P	242	244	246	248	250	252	254	256
H4N9672P	258	260	262	264	266	268	270	272
H4N9675P	274	276	278	280	282	284	286	288
H4N9676P	290	292	294	296	298	300	302	304
H1M9565N	308	310	312	314	316	318	320	322

Таблица 2

Идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M9559N	1	3	5	7	9	11	13	15
H1M9566N	17	19	21	23	25	27	29	31
H1M9568N	33	35	37	39	41	43	45	47
H4N9629P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4N9633P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4N9640P	81	83	85	87	89	91	93	95
H4N9659P	97	99	101	103	105	107	109	111
H4N9660P	113	115	117	119	121	123	125	127
H4N9662P	129	131	133	135	137	139	141	143
H4N9663P	145	147	149	151	153	155	157	159
H4N9664P	161	163	165	167	169	171	173	175
H4N9665P	177	179	181	183	185	187	189	191
H4N9666P	193	195	197	199	201	203	205	207
H4N9667P	209	211	213	215	217	219	221	223
H4N9670P	225	227	229	231	233	235	237	239
H4N9671P	241	243	245	247	249	251	253	255
H4N9672P	257	259	261	263	265	267	269	271
H4N9675P	273	275	277	279	281	283	285	287
H4N9676P	289	291	293	295	297	299	301	303
H1M9565N	307	309	311	313	315	317	319	321

Антитела обычно упоминаются в данном изобретении в соответствии со следующей номенклатурой: префикс Fc (например, "H1M" или "H4N"), за которым следует числовой идентификатор (например, "9559", "9566" или "9629", как показано в табл. 1), за которым следует суффикс "P" или "N". Таким обра-

зом, согласно этой номенклатуре, антитело может упоминаться в данном изобретении, например, как "H1M9559N", "H1M9566N", "H4H9629P" и т.д. Префиксы H1M и H4H в обозначениях антител, используемых в данном изобретении, указывают конкретный Fc-участок изотипа антитела. Например, антитело "H1M" имеет Fc IgG1 мыши, тогда как антитело "H4H" имеет Fc IgG4 человека. Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, может быть превращено в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc IgG1 мыши может быть превращено в антитело с IgG4 человека и тому подобное), но в любом случае, переменные домены (включая CDR), - которые обозначены численными идентификаторами, приведенными в табл. 1, останутся неизменными, и ожидается, что свойства связывания будут идентичными или практически одинаковыми независимо от природы домена Fc.

Пример 2. Конструирование антагонистов ИЛ-33 (ловушки ИЛ-33).

Анти-ИЛ-33 ловушки человека генерировали, как описано в публикации патента США № 2014/0271642. В табл. 3а приведено краткое содержание идентификаторов аминокислотных последовательностей для различных компонентов ловушек ИЛ-33, а в табл. 3б приведены полноразмерные аминокислотные последовательности ловушек.

Пять различных типичных антагонистов ИЛ-33 по изобретению были сконструированы с использованием стандартных молекулярно-биологических методов. Первый антагонист ИЛ-33 (hST2-hFc, SEQ ID NO: 323) состоит из растворимого внеклеточного участка ST2 человека (SEQ ID NO: 328), слитого на своем С-конце с N-концом Fc-участка IgG1 человека (SEQ ID NO: 332). Второй антагонист ИЛ-33 (hST2-mFc, SEQ ID NO: 324) состоит из растворимого внеклеточного участка ST2 человека (SEQ ID NO: 328), слитого на своем С-конце с N-концом Fc-участка IgG2a мыши (SEQ ID NO: 333). Третий антагонист ИЛ-33 (hST2-hIL1RAcP-mFc, SEQ ID NO: 325) состоит из линейного слияния, имеющего ST2 человека (SEQ ID NO: 328) на его N-конце, за которым следует внеклеточный участок ИЛ-1RAcP человека (SEQ ID NO: 330), за которым следует Fc IgG2a мыши (SEQ ID NO: 333) на его С-конце. Четвертый антагонист ИЛ-33 (mST2-mIL1RAcP-mFc, SEQ ID NO: 326) состоит из линейного слияния, имеющего ST2 мыши (SEQ ID NO: 329) на его N-конце, за которым следует внеклеточный участок ИЛ-1RAcP мыши (SEQ ID NO: 331), за которым следует Fc IgG2a мыши (SEQ ID NO: 333) на его С-конце. Пятый антагонист ИЛ-33 (hST2-hIL1RAcP-hFc, SEQ ID NO: 327) состоит из линейного слияния, имеющего ST2 человека SEQ ID NO: 328 на его N-конце, за которым следует внеклеточный участок ИЛ-1RAcP человека (SEQ ID NO: 330), за которым следует Fc IgG1 человека (SEQ ID NO: 332) на его С-конце. В табл. 3а приведено краткое описание различных антагонистов ИЛ-33 и их составных частей. В табл. 3б приведены аминокислотные последовательности антагонистов ИЛ-33 и их составные части.

Таблица 3а
Сводная информация об антагонистах ИЛ-33 и составных частей

Антагонист ИЛ-33	Аминокислотная последовательность - ность полной молекулы антагониста	Компонент D1	Компонент D2	Компонент M
hST2-hFc	SEQ ID NO: 323	внеклеточный ST2 человека (SEQ ID NO: 328)	Отсутствует	Fc IgG1 человека (SEQ ID NO: 332)
hST2-mFc	SEQ ID NO: 324	внеклеточный ST2 человека (SEQ ID NO: 328)	Отсутствует	Fc IgG2a мыши (SEQ ID NO: 333)
hST2-hIL1RAcP-mFc	SEQ ID NO: 325	внеклеточный ST2 человека (SEQ ID NO: 328)	внеклеточный ИЛ-1RAcP человека (SEQ ID NO: 330)	Fc IgG2a мыши (SEQ ID NO: 333)
mST2-mIL1RAcP-mFc	SEQ ID NO: 326	внеклеточный ST2 мыши (SEQ ID NO: 329)	внеклеточный ИЛ-1RAcP мыши (SEQ ID NO: 331)	Fc IgG2a мыши (SEQ ID NO: 333)
hST2-hIL1RAcP-hFc	SEQ ID NO: 327	внеклеточный ST2 человека (SEQ ID NO: 328)	внеклеточный ИЛ-1RAcP человека (SEQ ID NO: 330)	Fc IgG1 человека (SEQ ID NO: 332)

Таблица 3б

Аминокислотные последовательности

Идентификатор	Последовательность
SEQ ID NO: 323 (hST2-hFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTDWYYSQTNKSIPTQERNRVF ASGQLLKFLLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVP DYLMYSTVSGSEKNSKIYCPIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAH KSFLVIDNVMTEDAGDYTCFKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSL FPVIGAPAQNEIKEVEIGKNaNLTCSACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKI TDFGEPRIQQEEGNQSFNGLACLDMLRDIADVKEEDLLLQYDCLAL NLHGLRRHTVRLSRKNPIDHSDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHTQ KSLSLSPGK
SEQ ID NO: 324 (hST2-mFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTDWYYSQTNKSIPTQERNRVF ASGQLLKFLLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVP DYLMYSTVSGSEKNSKIYCPIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAH KSFLVIDNVMTEDAGDYTCFKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSL FPVIGAPAQNEIKEVEIGKNaNLTCSACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKI TDFGEPRIQQEEGNQSFNGLACLDMLRDIADVKEEDLLLQYDCLAL NLHGLRRHTVRLSRKNPIDHSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSV FI FPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVNEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKVNNKDLPAPIERTI SKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNN GKTELNYKNTPEVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL HNNHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO: 325 (hST2- hIL1RAcP-mFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVF ASGQLLKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVP DYLMYSTVSGSEKNSKIYCPTIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAH KSFLVIDNVMTEADGDTCKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGGFSL FPVIGAPAQNEIKEVEIGKNANLTCACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKI TDFGEPRIQEEGQNSFSNGLACLDMVLRADVKEEDLLLQYDCLAL NLHGLRRHTVRLSRKNPIDHSSERCDDWGLDTRMQIQVFEDEPARIK CPLFEHFLKFNYSTAHSAGLTLIYWTRQDRDLEEFINFRLPENRISK EKDVLFWRPRTLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFFLEVVQKDFNSP KLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVKPTITWYMGCYKIQNFNNV IPEGMNLFLIALISNNGNYTCVVYPENGRFHLTRTLTVKVVGSPK NAVPPVIHSPNDHVVEKEPGEELLPCTVYFSLMDSRNEVWWTIDG KKPDDITIDVTINESISHSRTEDETRTQILSIKKVTSSEDLKRSYVCHA RSAKGEVAKAAVKQKVPAPRYTVE SGE PRGPTIKPCPPCKCPAPNLL GGPSVFI FPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVE VHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMGKEFKCKVNNKDLPA IERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTFDFMPEDIYV EWTNNGKTELNYKNTPEVLSDSGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSV VHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 326 (mST2- mIL1RAcP-mFc)	SKSSWGLENEALIVRCPRGRSTYPVEWYYSDTNESIPTQKRNRIFVS RDRLKFLPARVEDSGIYACVIRSPNLNKTGYLNVTIHKKPPSCNIPDY LMYSTVRGSDKNFKITCPTIDLYNWTAPVQWFKNCKALQEPRFRAHRS YLFIDNVTHDDEGDYTCQFTHAENGNTYIVTATRSFTVEEKGFMSFPV ITNPPYNHTMEVEIGKPASIACSACFGKGSFLADVLWQINKTVVGNF GEARIQEEGRNESSNDMDCLTSVLRITGVTEKDLSEYDCLALNLH GMIRHTIRLRKQPIDHRSERCDDWGLDTRMQIQVFEDEPARIKCPLF EHFLKYNYSTAHSSGLTLIYWTRQDRDLEEFINFRLPENRISKEKDV LWFRTLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFFLEVVQKDFNSAMRFPV HKMYIEHGIHKITCPNVDGYFPSSVKPSVTWYKGCTEIVDFHNVLPEG MNLSFFIPLVSNNNGNYTCVVYPENGRFHLTRTLTVKVVGSPKDALP PQIYSPNDRVVVEKEPGEELVIPCXYVYFSLMDSHNEVWWTIDGKKPD DVTVDITINESVSYSTEDETRTQILSIKKVTPEDLRRNYVCHARNTK GEAEQAAVKQKVI PPRYTVE SGE PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPS VFI FPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTA

	QTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMGKKEFKCKVNNKDLPAPIERT ISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTN NGKTELNYKNTEPVLDSGYSFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEG LHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 327 (hST2- hIL1RAcP-hFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVF ASGQLLKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVP DYLMYSTVSGSEKNSKIYCPTIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAH KSFLVIDNVMTEADAGDYTCFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSL FPVIGAPAQNEIKEVEIGKNANLTCACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKI TDFGEPRIQQEEGQNSFSNGLACLDMVLRADVKEEDLLLQYDCLAL NLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSERCDWGLDTRQIQVFEDEPARIK CPLFEHFLKFNYSSTAHSAGLTLIWYWRQDRDLEEPINFRLPENRISK EKDVLWFRPTLLNDTGNITCMLRNTTYCSKVAFFLEVVQKDCSFCNSPM KLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVKPTITWYMGYKIQNFNNV IPEGMNSFLIALISNNGNYTCVVYTPENGRTFHLTRTLTKVVGSPK NAVPPVIHSPNDHVVEKEPGEELLIPTVYFSLMDSRNEVWWTIDG KKPDDITIDVTINESISHSRTEDETRTQILSIKKVTSIDLKRSYVCHA RSKGEVAKAAKVKQVPAPRYTVEDKTHTCPPELQALGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTI SKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 328 (внеклеточный домен ST2 человека)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKSIPTQERNRVF ASGQLLKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVP DYLMYSTVSGSEKNSKIYCPTIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAH KSFLVIDNVMTEADAGDYTCFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSL FPVIGAPAQNEIKEVEIGKNANLTCACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKI TDFGEPRIQQEEGQNSFSNGLACLDMVLRADVKEEDLLLQYDCLAL NLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHS
SEQ ID NO: 329 (внеклеточный домен ST2)	SKSSWGLENEALIVRCPRQGRSTYPVEWYSDTNESIPTQKRNRIFVS RDLKFLPARVEDSGIYACVIRSPNLNKTGYLNVTIHKKPPSCNIPDY LMYSTVRGSDKNFKITCPTIDLYNWTAPVQWFKNCKALQEPRFRAHRS YLFIDNVTHDDEGDYTCQFTHAENGTNYIVTATRSFTVEEKGFSMFPV

мышь)	ITNPPYNHTMEVEIGKPAS IACSACFGKGSFLADVLWQINKTVVGNF GEARIQEEEGRNESSSNDMDCLTSVLRITGVTEKDLSEYDCLALNLH GMIRHTIRLRKQPIDHR
SEQ ID NO: 330 (внеклеточный домен IL1RAcP человека)	SERCDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSSTAHSAGLTL IWYWRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLFWRPTLLNDTGNYTCML RNTTYCSKVAFPLEVVKDSCFNSPMKLPVHKLYIEYGIORITCPNVD GYFPSSVKPTITWYMGCYKIQNFNNVIPEGMNLFLIALISNNGNYTC VVTYPENGRTFHLTRTLTKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVEKEPGE ELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISHSRTE DETRTQILSIKKVTSSEDLKRSYVCHARSAKGEVAKAAKVKQKVPAPRY TVE
SEQ ID NO: 331 (внеклеточный домен IL1RAcP мышь)	SERCDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSSTAHSAGLTL IWYWRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLFWRPTLLNDTGNYTCML RNTTYCSKVAFPLEVVKDSCFNSAMRFPVHKMYIEHGIHKITCPNVD GYFPSSVKPSVTWYKGCTEIVDFHNVLP EGMNLSFFIPLVSNNGNYTC VVTYPENGRLEFHLTRTVTKVVGSPKDALPPQIYSPNDRVVEKEPGE ELVIPCXYVYFSFIMDSHNEVWWTIDGKKPDDVTVDITINESVSYSTE DETRTQILSIKKVTPEDLRNRYVCHARNTKGEAEQAAKVKQKVIPPRY TVE
SEQ ID NO: 332 (Fc IgG1 человека)	DKHTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 333 (Fc IgG2a мышь)	EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMLSLSPIVTCV VVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEM TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSYFM YSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNNHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 334 (M. fascicularis ИЛ-33-6His)	SITGISPITESLASLSTYNDQSITFALEDESIEIYVEDLKKDKKKDKV LLSYYESQHPSSSESGDVGDKMLMVTLSPTKDFWLQANNKEHSELHK CEKPLPDQAFFVLHNRSFNCVSECKTDPGVFIGVKDNHLALIKVDYS ENLGSENILFKLSEILENNHHHH

Пример 3. Антагонистические антитела к ИЛ-4Р.

Анти-ИЛ-4Р антитела человека были получены, как описано в патенте США № 7608693. Иллюстративное антитело к ИЛ-4Р, используемое в следующем примере, представляет собой антитело мыши, специфичное к ИЛ-4Р мыши, и имеет следующие аминокислотные последовательности: переменный участок тяжелой цепи (HCVR), содержащий SEQ ID NO: 335, и переменный домен легкой цепи (LCVR), содержащий SEQ ID NO: 336. Анти-ИЛ-4Р антитела человека, называемый дупилумабом, специфически связывается с ИЛ-4Р α человека и содержит переменный участок тяжелой цепи (HCVR), содержащий SEQ ID NO: 337, и переменный участок легкой цепи (LCVR), содержащий SEQ ID NO: 338, определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащий SEQ ID NO: 339, HCDR2, содержащий SEQ ID NO: 340, HCDR3, содержащий SEQ ID NO: 341, определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LCDR1), содержащий SEQ ID NO: 342, LCDR2, содержащий SEQ ID NO: 343, и LCDR3, содержащий SEQ ID NO: 344. Полноразмерная тяжелая цепь дупилумаба показана как SEQ ID NO: 345, а полноразмерная легкая цепь показана как SEQ ID NO: 346.

Пример 4. Модели хронического фиброза, вызванного клещами домашней пыли (HDM), и тяжелого воспаления легких для изучения роли ИЛ-33 в воспалении легких. Сравнение эффективности анти-ИЛ-33 антитела, анти-ИЛ-4Р антитела или комбинации обоих.

Хронические воспалительные заболевания дыхательных путей являются следствием повторяющихся эпизодов воспаления дыхательных путей, главным образом из-за многократного воздействия аллергенов или других патогенов. У людей такие хронические повреждения вызывают широкий спектр патологий, которые включают легочную инфильтрацию иммунными клетками, повышенную выработку цитокинов, выработку слизи и отложение коллагена (Hirota, (2013) Chest. Sep; 144 (3):1026-32.; Postma,

(2015), Eng N Engl J Med., Sep 24; 373 (13):1241-9). Это увеличение воспалительных цитокинов и инфильтратов иммунных клеток, сопровождающееся интенсивным ремоделированием дыхательных путей, приводит к сужению дыхательных путей, гиперреактивности к вдыхаемым триггерам, таким как аллергены или патогены, обструкции дыхательных путей и потере функции легких.

Чтобы определить эффект ингибирования анти-ИЛ-33 на соответствующей модели *in vivo*, у мышей, гомозиготных по экспрессии ИЛ-33 человека вместо ИЛ-33 мыши, было проведено исследование хронического фиброза, вызванного экстрактом клеща домашней пыли (HDM), и тяжелого воспаления и ремоделирования легких (ИЛ-33 мыши HumIn; см. патентные публикации США №№ 2015/0320021 и 2015/0320022). Хроническое воздействие экстракта HDM вызывает сильное воспаление легких, что приводит к значительному клеточному инфильтрату, экспрессии цитокинов и ремоделированию. Эффективность анти-ИЛ-33 антитела, анти-мышинного ИЛ-4Р α антитела или сочетание обоих сравнивали в этой модели. Анти-мышинное ИЛ-4Р α антитело, используемое в этом исследовании, обозначено как M1M1875N и содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 335/336. Анти-ИЛ-33 антитело, использованное в этом исследовании, обозначено как H4N9675P и содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 274/282.

Мышам ИЛ-33 HumIn вводили интраназально либо 50 мкг экстракта клеща домашней пыли (HDM; Greer, # XPB70D3A2.5), разведенного в 20 мкл 1X натрий-фосфатного буфера (PBS), либо 20 мкл 1X PBS в течение 3 дней в неделю в течение 15 недель. Второй контрольной группе мышей ИЛ-33 HumIn вводили 50 мкг экстракта HDM, разведенного в 20 мкл 1X PBS в течение 3 дней в неделю в течение 11 недель, для оценки тяжести заболевания в начале лечения антителами. Четырем группам мышей, зараженных HDM, инъецировали подкожно 25 мг/кг либо анти-ИЛ-33 антитела H4N9675P, либо анти-мышинного ИЛ-4Р α антитела M1M1875N, комбинации обоих антител или антитела изотипического контроля, начиная с 11 недели заражения HDM и затем дважды в неделю до конца заражения HDM (4 недели лечения антителами). На 108-й день исследования всех мышей умерщвляли и собирали легкие. Протокол экспериментального дозирования и лечения для групп мышей показан в табл. 4.

Таблица 4

Протокол экспериментального дозирования и лечения для групп мышей

Группа	Мыши	Интраназальное заражение	Продолжительность интраназального заражения	Антитело
1	ИЛ-33 HumIn мыши	1X PBS	15 недель	Нет
2	ИЛ-33 HumIn мыши	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	11 недель	Нет
3	ИЛ-33 HumIn мыши	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	15 недель	Нет
4	ИЛ-33 HumIn мыши	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	15 недель	Антитело изотипического контроля
5	ИЛ-33 HumIn мыши	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	15 недель	Анти-ИЛ-33 антитело (H4N9675P)
6	ИЛ-33 HumIn мыши	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	15 недель	Анти-ИЛ-4Р α антитело (M1M1875N)
7	ИЛ-33 HumIn мыши	50 мкг HDM в 20 мкл 1X PBS	15 недель	Анти-ИЛ-33 (H4N9675P) антитело + анти-ИЛ-4Р α (M1M1875N) антитело

Сбор легкого для анализа цитокинов.

Повышенные уровни ключевых медиаторов в легких, таких как прототипные цитокины типа 2 ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13, а также цитокины, более характерные для иммунных ответов типа 1, такие как ИЛ-1 β или ФНО α , были вовлечены у человека в развитие заболеваний легких (Gandhi, (2016) Nat Rev Drug Discov Jan; 15 (1): 35-50; Barnes, (2008), Nat Rev Immunol, Mar; 8 (3): 183-92. Уровень этих воспалительных цитокинов в легких измеряли в данном исследовании.

После обескровливания удаляли краниальные и средние доли правого легкого каждой мыши и помещали в пробирки, содержащие раствор реагента для экстракции тканевого белка (1X T-PER реагент; Pierce, # 78510) с добавлением 1X коктейля ингибитора Halt протеазы (Thermo Scientific, # 87786). Все дальнейшие шаги были выполнены на льду. Объем реагента T-PER (содержащий коктейль ингибитора протеазы) регулировали для каждого образца, чтобы соответствовать соотношению 1:7 (вес/объем) ткани к T-PER. Образцы легких были механически разрушены с использованием TissueLyser II (Qiagen #85300). Полученные лизаты центрифугировали до осколков осадков. Супернатанты, содержащие растворимые белковые экстракты, переносили в свежие пробирки и хранили при 4°C до дальнейшего анализа.

Содержание общего белка в экстрактах белка легких измеряли с использованием анализа Брэдфорда. Для анализа 10 мкл разведенных образцов экстракта высевали в 96-луночные планшеты в двух повторностях и смешивали с 200 мкл 1X реагента красителя (Biorad, #500-0006). В качестве стандарта для определения концентрации белка в экстрактах использовали серийные разведения бычьего сывороточного альбумина (BSA; Sigma, #A7979), начиная с 700 мкг/мл в 1X T-PER реагенте. После 5-минутной инкубации при комнатной температуре измеряли поглощение при 595 нм на планшет-ридере Molecular Devices SpectraMax M5. Анализ данных для определения общего содержания белка в экстракте легкого на основе стандарта BSA проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™.

Концентрации цитокинов в экстрактах белка легкого измеряли с использованием набора для мультиплексного иммуноанализа Proinflammatory Panel 1 (MesoScale Discovery, # K15048G-2) и специального набора для иммуноанализа bplex Multi-Spot® (MesoScale Discovery, #K152A41-4), согласно инструкции производителя. Вкратце, 50 мкл/лунка калибраторов и образцов (разбавленный в Разбавителе 41) были добавлены к планшетам, предварительно покрытым антителами захвата и инкубировали при комнатной температуре при встряхивании при 700 оборотах в минуту в течение 2 ч. Затем планшеты промывали 3 раза с 1X PBS, содержащим 0,05% (вес/объем) Твин-20, с последующим добавлением 25 мкл раствора обнаружения антител, разведенного в Разбавителе 45. После 2-часовой инкубации при комнатной температуре при встряхивании, планшет промывали 3 раза, и 150 мкл из 2X буфера чтения было добавлено в каждую лунку. Электрохемилюминесценцию немедленно считывали на приборе MSD Spector®. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Каждую концентрацию цитокинов в экстрактах общего белка легких у всех мышей в каждой группе нормализовали по общему содержанию белка в экстрактах, измеренному с помощью анализа Брэдфорда, и выражали для каждой группы как среднее значение пг цитокина на мг общих белков легкого (пг/мг белок легких, \pm SD), как показано в табл. 5.

Анализ цитокинов легких.

Как показано в табл. 5, уровень цитокинов и хемокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-1 β и MCP-1 высвобождается в легких мышей ИЛ-33 HumIn, получающих HDM в течение 15 недель, с или без лечения антителом изотипического контроля были значительно выше, чем у мышей ИЛ-33 HumIn, зараженных только 1X PBS. Аналогично, была тенденция к увеличению высвобождения цитокинов ИЛ-13 и ФНО α в легких мышей ИЛ-33 HumIn, получавших HDM в течение 15 недель. Напротив, наблюдалось значительное снижение уровней ИЛ-6, ИЛ-13 и MCP-1 в легких ИЛ-33 HumIn мышей, получавших комбинацию анти-ИЛ-33 антител и анти-мышинных ИЛ-4Р α антител в течение последних четырех недель хронического заражения HDM по сравнению с ИЛ-33 HumIn мышами, которым вводили HDM с антителом изотипического контроля в течение этого периода времени. В течение последних четырех недель наблюдалась тенденция к снижению легочных уровней ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-1 и ФНО α у мышей ИЛ-33 HumIn, получавших комбинацию анти-ИЛ-33 антител и анти-мышинных ИЛ-4Р α антител в течение последних четырех недель хронического заражения HDM, по сравнению с ИЛ-33 HumIn мышами, которым вводили HDM с антителом изотипического контроля в течение этого периода времени. Влияния на цитокины легких, наблюдаемые с комбинацией анти- ИЛ-33 антител и анти-мышинных ИЛ-4Р α антител, были более значительными, чем лечение только отдельными антителами.

Таблица 5

Концентрация цитокинов в экстрактах легочных белков

Экспериментальная группа	Среднее значение [ИЛ-4] в экстрактах легочного белка (пг/мг легочного белка) (\pm SD)	Среднее значение [ИЛ-5] в экстрактах легочного белка (пг/мг легочного белка) (\pm SD)	Среднее значение [ИЛ-13] в экстрактах легочного белка (пг/мг легочного белка) (\pm SD)	Среднее значение [ИЛ-6] в экстрактах легочного белка (пг/мг легочного белка) (\pm SD)	Среднее значение [ИЛ-18] в экстрактах легочного белка (пг/мг легочного белка) (\pm SD)	Среднее значение [ФНО α] в экстрактах легочного белка (пг/мг легочного белка) (\pm SD)	Среднее значение [MCP-1] в экстрактах легочного белка (пг/мг легочного белка) (\pm SD)
1. Заражение 1X PBS (n=5)	0,13 (\pm 0,17)	0,80 (\pm 1,41)	ND	4,75 (\pm 3,39)	1,97 (\pm 1,67)	2,86 (\pm 1,01)	4,12 (\pm 1,12)
2. Заражение HDM 11 неделя (n=4)	5,71 (\pm 3,76) *	7,31 (\pm 3,67)	0,20 (\pm 0,03)	293,1 (\pm 139,3) *	181,8 (\pm 131,0) *	17,39 (\pm 8,90)	43,06 (\pm 24,21)
3. Заражение HDM 15 неделя (n=4)	2,70 (\pm 1,71)	5,13 (\pm 3,20)	0,19 (\pm 0,03)	308,3 (\pm 390,1)	51,79 (\pm 16,97)	15,38 (\pm 8,11)	105,6 (\pm 106,5) *
4. Заражение HDM 15 неделя+ антитело изотипи ческого контроля (n=4)	5,46 (\pm 3,38) **	7,00 (\pm 4,50) *	0,22 (\pm 0,02)	395,0 (\pm 270,1) **	162,3 (\pm 166,5) **	19,57 (\pm 14,81)	141,7 (\pm 126,3) **
5. Заражение HDM 15 неделя + анти-ИЛ- 33	1,15 (\pm 1,38)	1,93 (\pm 1,90)	0,20 (\pm 0,02)	136,8 (\pm 164,1)	122,9 (\pm 194,1)	17,05 (\pm 4,48) *	16,64 (\pm 6,40)

антитело (n=5)							
6. Заражение HDM 15 недель + анти- мышинное ИЛ-4Р α антитело (n=5)	2,88 ($\pm 2,43$)	13,13 ($\pm 12,81$) **	0,16 ($\pm 0,03$)	18,24 ($\pm 12,43$)	26,73 ($\pm 20,94$)	7,85 ($\pm 4,89$)	11,63 ($\pm 8,69$)
7. Заражение HDM 15 недель + анти-ИЛ- 33+анти- мышинные ИЛ-4Р α антитела (n=5)	0,47 ($\pm 0,13$)	0,73 ($\pm 0,37$)	0,10 ($\pm 0,05$) ++	7,46 ($\pm 2,52$) †	3,722 ($\pm 1,59$)	3,07 ($\pm 1,34$)	4,62 ($\pm 1,27$) ++

Примечание: указывается статистическая значимость, определяемая тестом Крускала-Уоллиса однофакторным ANOVA с многократным сравнением. Дана ретроспективный анализ (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, по сравнению с группами 1: ИЛ-33 HumIn мыши, заражение физиологическим раствором; † $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ по сравнению с группой 4: ИЛ-33 HumIn мыши, заражение HDM через 15 недель+антитело изотипического контроля). ND: не определено.

Сбор легкого для анализа экспрессии генов.

После обескровливания придаточную долю правого легкого у каждой мыши удаляли, помещали в пробирки, содержащие 400 мкл РНК позже (Ambion, # AM7020) и хранили при -20°C до обработки. Ткани гомогенизировали в тризоле и хлороформ использовали для разделения фаз. Водную фазу, содержащую общую РНК, очищали с использованием MagMAX™-96 для набора для выделения полной РНК Microarrays (Ambion by Life Technologies, # AM1839) в соответствии с инструкциями производителя. Геномную ДНК удаляли с использованием MagMAX™ Turbo™ DNase Buffer и TURBO DNase из набора MagMAX, указанного выше. мРНК (до 2,5 мкг) подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием Superscript® VILO™ Master Mix (Invitrogen по Life Technologies, # 11755500). кДНК разводили до 2 нг/мкл и 10 нг кДНК амплифицировали с Expression Master TaqMan® Gene Mix (Applied Biosystems по Life Technologies, # 4369542) и соответствующими зондами (Life Technologies, B2t: Mm00437762_m1 мыши; IL4: Mm00445259_m1 мыши; IL5: Mm00439646_m1 мыши; IL13: Mm00434204_m1 мыши; IL9: Mm00434305_m1 мыши; IL6: Mm00446190_m1 мыши; Ccl2: Mm00441242_m1 мыши; Ccl11: Mm00441238_m1 мыши; Ccl24: Mm00444701_m1 мыши; Tnf: Mm00443258_m1 мыши; Tgfb1: Mm01178820_m1 мыши; Il1r1: Mm00516117_m1 мыши; Il13ra2: Mm00515166_m1 мыши; Col15a1: Mm00456584_m1 мыши; Col24a1: Mm01323744_m1 мыши;) с использованием системы определения последовательности ABI 7900HT (Applied Biosystems). B2m использовали в качестве генов внутреннего контроля для нормализации любых различий во входных данных кДНК. Эталонной группой, использованной для нормализации всех образцов, было среднее значение для образцов группы 1 ("1X PBS заражение"). Экспрессия каждого гена была нормализована до экспрессии B2m в том же образце и выражена относительно его нормализованной экспрессии в контрольной группе (среднее значение \pm SD), как показано в табл. 6.

Анализ экспрессии генов легких.

Как показано в табл. 6, уровень экспрессии цитокинов, хемокинов и генов коллагена IL4, IL13, IL6, Ccl2, Tgfb1, IL13ra2 и Col24a1 в легких ИЛ-33 HumIn мышей, получавших HDM в течение 15 недель, с или без лечения антителом изотипического контроля были значительно увеличены по сравнению с ИЛ-33 HumIn мышами, зараженными только 1X PBS. Сходным образом наблюдалась тенденция к увеличению экспрессии генов IL5, IL9, Ccl11, Ccl24, Tnf, Il1r1 и Col15a1 в легких ИЛ-33 HumIn мышей, получавших HDM в течение 15 недель.

Напротив, наблюдалось значительное снижение уровней экспрессии IL6, Ccl2, Ccl11 и Ccl24 в легких ИЛ-33 HumIn мышей, получавших комбинацию анти-ИЛ-33 антител и анти-мышинных ИЛ-4Р α антител в течение последних четыре недели хронического заражения HDM по сравнению с ИЛ-33 HumIn мышами, которым вводили HDM с антителом изотипического контроля в течение этого периода време-

ни. Наблюдалась тенденция к снижению уровней экспрессии *Il4*, *Il5*, *Il13*, *Il9*, *Tnf*, *Tgfb1*, *Il1rl1*, *Il13ra2*, *Col15a1* и *Col24a1* у мышей, получавших комбинацию анти-ИЛ-33 антител и анти-мышинных ИЛ-4R α антител в течение последних четырех недель хронического заражения HDM по сравнению с ИЛ-33 HumIn мышами, которым вводили HDM с антителом изотипического контроля в течение этого периода времени. Влияния на экспрессию генов, наблюдаемые с комбинацией анти-ИЛ-33 и анти-мышинных ИЛ-4R α антител, были более значительными, чем лечение только отдельными антителами.

Таблица 6

Экспрессия генов (TaqMan) в легких мыши.

Экспериментальная группа	Средняя относительная экспрессия <i>Il4</i> в легких (\pm SD)	Средняя относительная экспрессия <i>Il5</i> в легких (\pm SD)	Средняя относительная экспрессия <i>Il13</i> в легких (\pm SD)	Средняя относительная экспрессия <i>Il9</i> в легких (\pm SD)	Средняя относительная экспрессия <i>Il6</i> в легких (\pm SD)	Средняя относительная экспрессия <i>Ccl2</i> в легких (\pm SD)	Средняя относительная экспрессия <i>Ccl11</i> в легких (\pm SD)	Средняя относительная экспрессия <i>Ccl24</i> в легких (\pm SD)
1. Заражение 1X PBS (n=5)	1,03 (\pm 0,28)	1,54 (\pm 1,61)	4,51 (\pm 7,59)	15,91 (\pm 34,81)	1,25 (\pm 1,09)	1,20 (\pm 0,93)	1,24 (\pm 1,07)	1,05 (\pm 0,33)
2. Заражение HDM 11 недель (n=4)	12,78 (\pm 8,45) *	7,13 (\pm 3,49)	114,1 (\pm 68,3) *	38,66 (\pm 30,04)	9,12 (\pm 1,65)	18,86 (\pm 8,40)	13,36 (\pm 5,05)	15,44 (\pm 12,02)
3. Заражение HDM 15 недель (n=4)	6,27 (\pm 3,39)	4,20 (\pm 1,51)	58,05 (\pm 31,61)	30,63 (\pm 20,54)	8,92 (\pm 4,55)	22,61 (\pm 13,37) *	8,65 (\pm 3,20)	4,58 (\pm 1,91)
4. Заражение HDM 15 недель + антитело *	10,98 (\pm 5,46) *	5,50 (\pm 3,16)	92,51 (\pm 75,96) *	19,51 (\pm 10,29)	13,80 (\pm 6,98) **	24,53 (\pm 9,13) **	12,14 (\pm 7,82)	12,41 (\pm 8,73)

изотипич ческого контроля (n=4)								
5. Заражение HDM 15 недель + анти-ИЛ- 33 антитело (n=5)	2,80 (±3, 11)	1,74 (±1,1 1)	12,91 (±12,9 3)	0,00 (±0,00)	3,87 (±3,00)	5,20 (±2,44)	6,21 (±3,55)	1,45 (±2,09)
6. Заражение HDM 15 недель + анти- мышинное ИЛ-4Rα антитело (n=5)	1,87 (±1, 03)	7,98 (±6,5 2)	69,56 (±66,8 6) *	63,50 (±92,0 4)	2,77 (±1,39)	2,97 (±1,86)	1,00 (±0,18)	0,44 (±0,34)
7. Заражение HDM 15 недель + анти-ИЛ- 33+анти- мышинные ИЛ-4Rα антитела (n=5)	1,37 (±0, 35)	1,56 (±0,9 7)	9,34 (±3,10)	0,57 (±1,27)	1,04 (±0,31) [†] †	1,08 (± 0,24) ^{†† §}	0,72 (±0,28) [†]	0,15 (±0,10) [†] †

Продолжение таблицы 6
Экспрессия гена (TaqMan) в легких мыши.

Экспериментальная группа	Средняя относительная экспрессия <i>Tnf</i> в легких (\pm SD)	Средняя относительная экспрессия <i>Tgfb1</i> в легких (\pm SD)	Средняя относительная экспрессия <i>Il1rl1</i> в легких (\pm SD)	Средняя относительная экспрессия <i>Il13ra2</i> в легких (\pm SD)	Средняя относительная экспрессия <i>Col15a1</i> в легких (\pm SD)	Средняя относительная экспрессия <i>Col24a1</i> в легких (\pm SD)
1. Заражение 1X FBS (n=5)	1,02 ($\pm 0,24$)	1,00 ($\pm 0,11$)	1,11 ($\pm 0,58$)	1,59 ($\pm 1,96$)	1,00 ($\pm 0,10$)	1,02 ($\pm 0,16$)
2. Заражение HDM 11 недель (n=4)	1,45 ($\pm 0,41$)	1,40 ($\pm 0,27$)	3,03 ($\pm 0,88$) *	48,43 ($\pm 34,21$)	2,75 ($\pm 0,96$)	24,55 ($\pm 7,97$) **
3. Заражение HDM 15 недель (n=4)	1,58 ($\pm 0,43$)	1,32 ($\pm 0,33$)	2,53 ($\pm 0,79$) *	32,07 ($\pm 13,45$)	3,00 ($\pm 1,22$)	17,25 ($\pm 5,29$) *
4. Заражение HDM 15 недель+анти тело изотипическ ого контроля (n=4)	1,59 ($\pm 0,78$)	1,37 ($\pm 0,12$) *	3,45 ($\pm 1,48$) *	52,02 ($\pm 40,63$)	3,80 ($\pm 0,96$) *	23,58 ($\pm 6,18$) ***
5. Заражение HDM 15 недель + анти-ИЛ-33 антитело (n=5)	1,38 ($\pm 0,27$)	1,22 ($\pm 0,24$)	0,99 ($\pm 0,47$)	13,54 ($\pm 12,25$)	1,64 ($\pm 0,30$)	10,58 ($\pm 5,42$)
6. Заражение HDM 15	1,00 ($\pm 0,25$)	1,13 ($\pm 0,20$)	3,38 ($\pm 1,97$)	1,89 ($\pm 0,59$)	1,24 ($\pm 0,28$)	7,08 ($\pm 4,56$)

неделя + анти- мышинное ИЛ- 4Р α антитело (n=5)						
7. Заражение НДМ 15 неделя + анти-ИЛ- 33+анти- мышинные ИЛ- 4Р α антитела (n=5)	0,68 ($\pm 0,08$) §	1,09 ($\pm 0,12$)	1,12 ($\pm 0,57$)	1,89 ($\pm 0,27$)	0,74 (\pm 0,21) †† §	1,76 ($\pm 0,15$) †

Примечание: указывается статистическая значимость, определяемая тестом Крускала-Уоллиса однофакторным ANOVA с многократным сравнением. Данных ретроспективного анализа (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$ по сравнению с группами 1: ИЛ33 HumIn мыши, заражение физиологическим раствором; § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$, по сравнению с группой 3: ИЛ33 HumIn мыши, заражение НДМ через 15 недель; † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ по сравнению с группой 4: ИЛ-33 HumIn мыши, заражение НДМ через 15 недель+антитело изотипического контроля).

Сбор легкого для анализа легочного клеточного инфильтрата. Инфильтрация в легкие иммунных клеток наблюдается при множественных воспалительных заболеваниях дыхательных путей, включая астму и ХОБЛ. Нейтрофильное воспаление легких было связано с более низкой функцией легких и тяжелым ремоделированием тканей у пациентов с астмой (Wenzel et al., (2012), Nat Med 18 (5): 716-725) и с повышенным повреждением легких у пациентов с ХОБЛ (Meijer, et al., (2013), Expert Rev. Clin. Immunol. 9 (11):1055-1068). Эозинофильное воспаление легких является признаком воспаления 2 типа, обычно наблюдаемого при atopических заболеваниях (Jacobsen, et al., (2014), Clin. Exp., Allergy, 44(9) :1119-1136). У людей высокие соотношения CD4/CD8 наблюдаются у пациентов с гранулематозными заболеваниями легких и другими хроническими воспалительными состояниями (Costabel, et al., (1997), Eur. Respir. J. 10 (12): 2699-2700; Guo, et al., (2011), Ann. Clin. Biochem, 48 (Pt4): 344-351). Проточная цитометрия была использована в данном исследовании для определения уровня клеточной инфильтрации в легких мышей, подвергшихся воздействию НДМ.

После обескровливания каудальную долю правого легкого каждой мыши извлекали, нарезали кубиками размером приблизительно от 2 до 3 мм и затем помещали в пробирку, содержащую раствор 20 мкг/мл ДНКазы (Roche, #10104159001) и 0,7 Ед/мл либеразы ТН (Roche, #05401151001), разбавленной в сбалансированном солевом растворе Хэнка (HBSS) (Gibco, #14025), который инкубировали на водяной бане при 37°C в течение 20 мин и встряхивали каждые 5 мин. Реакцию останавливали добавлением этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА, Gibco, № 15575) в конечной концентрации 10 мМ. Каждое легкое впоследствии диссоциировало с использованием диссоциатора gentleMACS® (Miltenyi Biotec, #130-095-937), затем фильтровали через фильтр 70 мкм и центрифугировали. Полученный осадок легко ресуспендировали в 1 мл 1X буфера для лизиса эритроцитов (Sigma, #R7757) для удаления эритроцитов. После инкубации в течение 3 мин при комнатной температуре добавляли 3 мл 1X DMEM для деактивации буфера для лизиса эритроцитов. Затем клеточные суспензии центрифугировали и полученные клеточные осадки ресуспендировали в 5 мл буфера MACS (рабочий буфер AutoMACS; Miltenyi Biotec, #130-091-221). Ресуспендированные образцы фильтровали через фильтр 70 мкм и 1×10^6 клеток на лунку помещали в 96-луночный V-образный планшет. Затем клетки центрифугировали и осадки промывали в 1X PBS. После второго центрифугирования осадок клеток ресуспендировали в 100 мкл LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Cell Stain (Life Technologies, # L23105), разведенного при 1:500 в 1X PBS для определения жизнеспособности клеток, и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. После одной промывки в 1X PBS, клетки инкубировали в растворе буфера MACS, содержащего 10 мкг/мл очищенного крысиного анти-мышинного Fc-блока CD16/CD32 (клон: 2.4G2; BD Biosciences, #553142), в течение 10 мин при 4°C. Затем клетки инкубировали в подходящей 2х смеси антител (описанной в табл. 7), разведенной в буфере MACS в течение 30 мин при 4°C в защищенном от света месте. После инкубации антител клетки дважды промывали в буфере MACS, ресуспендировали в BD CytoFix (BD Biosciences, #554655) и затем инкубировали в течение 15 мин при 4°C в защищенном от света месте. Затем клетки промывали, ресуспендировали в буфере MACS, а затем переносили в пробирки BD FACS (BD Biosciences, #352235) для анализа клеточных инфильтратов методом проточ-

ной цитометрии.

CD4 и CD8 Т-клетки были определены как живые клетки, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻ и живые, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁺ соответственно. Активированные CD4 Т-клетки были определены как живые клетки: CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻ и CD69⁺. Активированные CD8 Т-клетки были определены как живые клетки: CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁺ и CD69⁺. Активированные В-клетки были определены как живые клетки: CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁻, CD19⁺ и CD69⁺. ST2⁺ CD4⁺ Т-клетки были определены как живые клетки, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, ST2⁺ и CD4⁺. Эозинофилы были определены как живые, CD45⁺, GR1⁻, CD11c^{lo}, SiglecF^{hi}. Альвеолярные макрофаги были определены как живые, CD45⁺, GR1⁻, CD11c^{hi}, SiglecF^{hi}. Данные для активированных клеток выражены в виде частоты активированных клеток (CD69⁺) в родительской популяции (CD4, ± SD) Данные для ST2⁺ CD4⁺ Т-клеток выражают в виде частоты Т-клеток (определены как живые клетки, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺ и CD19⁻). Данные для эозинофилов и альвеолярных макрофагов выражены в виде частоты живых клеток. Отношение CD4/CD8 Т-клеток рассчитывается как отношение частоты CD4 Т к частоте CD8 Т-клеток в живой популяции. Все данные приведены в табл. 8.

Таблица 7

Антитела, используемые для анализа проточной цитометрией

Антитело	Флюорохром	Производитель	Номер по каталогу	Окончательное разведение
CD45.2	PerCP-Cy5.5	eBioscience	45-0454	1/800
Siglec-F	BV 421	BD	562681	1/200
F4/80	APC	eBioscience	17-4801-82	1/200
Ly6G	BUV395	BD	563978	1/200
Ly6C	PE-Cy7	BD	560593	1/100
CD11c	PE	eBioscience	12-0114-82	1/200
CD11b	FITC	eBioscience	53-0112-82	1/200
CD19	BV650	BD	562701	1/400
CD3	PE-Cy7	BD	552774	1/200
CD4	BV421	BioLegend	100438	1/200
CD8	BUV 395	BD	563786	1/400
NKp46 (CD335)	FITC	eBioscience	11-3351	1/800
CD69	PE	eBioscience	12-0691	1/200
CD25	BV510	BioLegend	102042	1/200
ST2	APC	BioLegend	145306	1/200

Анализ легочного клеточного инфильтрата.

Как показано в табл. 8, частота эозинофилов, активированных В-клеток, активированных CD8-клеток, ST2⁺ Cd4⁺ Т-клеток и CD4/CD8 Т-клеток в легких у ИЛ-33 HumIn мышей, получающих HDM в течение 15 недель, с или без лечения антителом изотипического контроля было значительно выше, чем у ИЛ-33 HumIn мышей, зараженных только 1X PBS. Аналогично, была тенденция к увеличению частоты активированных CD4 Т-клеток в легких у ИЛ-33 HumIn мышей, получавших HDM в течение 15 недель. Наблюдалась тенденция к снижению частоты альвеолярных макрофагов, обнаруживаемых проточной цитометрией в легких у ИЛ-33 HumIn мышей, получавших HDM в течение 15 недель, в отсутствие или в присутствии лечения антителом изотипического контроля. Частота альвеолярных макрофагов была значительно увеличена в легких ИЛ-33 HumIn мышей, получавших комбинацию анти-ИЛ-33 антител и анти-мышинных ИЛ-4Rα антител в течение последних четырех недель хронического заражения HDM по сравнению с ИЛ-33 HumIn мышами, которым вводили HDM с антителом изотипического контроля в течение этого периода времени. Аналогичным образом, наблюдалась тенденция к снижению частоты эозинофилов, активированных CD4 и CD8 Т-клеток, активированных В-клеток, ST2⁺ CD4⁺ Т-клеток, а также соотношения CD4/CD8 Т-клеток в легких мышей, получавших комбинацию анти-ИЛ-33 антител и анти-мышинных ИЛ-4Rα антител в течение последних четырех недель хронического заражения HDM по срав-

нению с ИЛ-33 HumIn мышами, которым вводили НДМ с антителом изотипического контроля в течение этого периода времени. Влияние на частоту эозинофилов, альвеолярных макрофагов, активированных CD8 Т-клеток, ST2+ CD4+ Т-клеток и соотношения CD4/CD8 в легких, наблюдаемое для комбинации анти-ИЛ-33 и анти-мышинного ИЛ-4R α антител, демонстрирует тенденцию к большей эффективности, чем лечение с использованием только отдельных антител.

Таблица 8

Частота легочного клеточного инфильтрата, определенная методом проточной цитометрии

Экспериментальная группа	Средняя частота эозинофилов в живой популяции (\pm SD)	Средняя частота альвеолярных макрофагов в живой популяции (\pm SD)	Среднее соотношение CD4/CD8 Т-клеток (\pm SD)	Средняя частота активированных клеток в популяции CD4 Т-клеток (\pm SD)	Средняя частота активированных клеток в популяции CD8 Т-клеток (\pm SD)	Средняя частота активированных клеток в популяции В-клеток (\pm SD)	Средняя частота ST2+ CD4+ клеток в популяции Т-клеток (\pm SD)
1. Заражение 1X PBS (n=5)	1,45 (\pm 0,92)	5,05 (\pm 1,64)	3,00 (\pm 1,48)	13,12 (\pm 9,89)	3,26 (\pm 1,64)	0,39 (\pm 1,17)	3,25 (\pm 4,15)
2. Заражение НДМ 11 недель (n=4)	17,08 (\pm 3,94) *	2,34 (\pm 0,93)	6,42 (\pm 2,71)	49,95 (\pm 8,76)	9,58 (\pm 7,44)	4,67 (\pm 1,47) **	32,60 (\pm 12,23)
3. Заражение	15,40 (\pm 3,99)	4,92 (\pm 1,55)	6,95 (\pm 0,71)	58,53 (\pm 5,76)	15,68 (\pm 3,03)	3,70 (\pm 1,44)	37,33 (\pm 8,98)

HDM 15 неделя (n=4)	*		**		*	*	*
4. Заражение HDM 15 неделя+ антитело изотипи ческого контроля (n=4)	15,00 (±3,35) *	2,33 (±1,60)	7,49 (±1,28) *	57,75 (±7,64)	14,59 (±3,82)	3,90 (±1,48) *	37,96 (±16,71) *
5. Заражение HDM 15 неделя + анти-ИЛ- 33 антитело (n=5)	8,51 (±7,52)	7,44 (±4,18)	4,03 (±1,28)	48,22 (±5,66)	13,86 (±5,21)	1,72 (±0,72)	19,24 (±5,72)
6. Заражение HDM 15 неделя + анти- мышинное ИЛ-4Р α антитело (n=5)	12,30 (±7,83)	9,93 (±5,18)	5,56 (±2,22)	53,42 (±6,52)	13,11 (±6,26)	2,14 (±1,23)	35,01 (±9,83) *
7. Заражение HDM 15 неделя + анти-ИЛ- 33+анти- мышинные ИЛ-4Р α антитела (n=5)	3,78 (±1,60)	14,64 (±3,86) †	2,96 (±0,93)	42,52 (±9,79)	7,90 (±1,30)	1,74 (±0,91)	11,78 (±3,73)

Примечание: указывается статистическая значимость, определяемая тестом Крускала-Уоллиса однофакторным ANOVA с многократным сравнением. Дана ретроспективный анализ (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, по сравнению с группами 1: ИЛ-33 HumIn мыши, заражение физиологическим раствором; † $p < 0,05$, по сравнению с группой 4: ИЛ-33 HumIn мыши, заражение HDM через 15 недель+антитело изотипического контроля).

Сбор легкого для количественной оценки гистопатологии.

Модель воспаления, наблюдаемая на этой модели, сопровождается широко распространенными и серьезными структурными изменениями в легких, подвергшихся воздействию HDM, с признаками метаплазии бокаловидных клеток, увеличением субэпителиального отложения коллагена и значительной консолидацией легких. Эти патологии представляют собой известные признаки воспалительных респираторных заболеваний человека, которые способствуют снижению функции легких и гиперреактивности дыхательных путей (James, (2007) Eur Respir J., Jul; 30 (1): 134-55; Jeong, (2007) Radiographics May-Jun; 27(3):617-37).

После обескровливания левые части легких удаляли и помещали в чашки, содержащие 3 мл раствора 4% (вес./об.) параформальдегида (Boston Bioproducts, # BM-155) в 1X натрий-фосфатном буфере и хранили при комнатной температуре в течение 3 дней. Образцы легких затем промокали досуха и переносили в пробирки, содержащие 70% этанол, для гистологического анализа. Образцы были отправлены в Histoserv, Inc (Джермантаун, Мэриленд) для заливки парафином, резки и периодического кислотного

окрашивания по Шиффу (PAS) или гематоксилин-эозину (H&E). Количественная оценка метаплазии бокаловидных клеток: Метаплазия бокаловидных клеток и гипер-секреция слизи являются отличительными чертами многих легочных заболеваний, в том числе астмы, хронического обструктивного заболевания легких, и кистозного фиброза (Boucherat, (2013) *Exp Lung Res.* 2013 May-Jun; 39(4-5):207-16). Чрезмерное образование слизи приводит к обструкции дыхательных путей и влияет на несколько важных исходов, таких как функция легких, связанное со здоровьем качество жизни, обострения, госпитализации и смертность у людей (Ramos, FL, et.al., (2014), *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, Jan. 24; 9:139-150). PAS-положительные бокаловидные клетки и общие эпителиальные клетки подсчитывали в миллиметре первичного бронха. Метаплазия бокаловидных клеток выражается в виде частоты PAS-положительных клеток в миллиметре эпителия бронхов (% , \pm SD), как показано в табл. 9.

Количественная оценка консолидации легких.

"Консолидация легких" определяется как накопление твердого или жидкого материала в альвеолярном пространстве. Консолидация легких представляет собой сложную конечную точку, которая, вероятно, отражает комбинацию клеточного инфильтрата, гиперплазии и образования слизи, используемую в данном изобретении для измерения общей патологии. Доля площади легких, занимаемой кристаллическими телами, определялась количественно на окрашенных Моват-пентахромом залитых в парафин срезах легкого, с использованием программного обеспечения ImageJ (NIH, Bethesda, MD). Используя функцию анализа частиц, была измерена общая площадь легких на срезе, а также консолидированная площадь на срезе. Доля консолидированной площади легких определяется отношением обоих измерений, как показано в табл. 9.

Количественная оценка субэпителиального фиброза.

"Субэпителиальный фиброз" определяется как избыток отложения интерстициального коллагена под легочным эпителием (Redington, et al., (1997), *Thorax*, April; 52 (4): 310-312). Сообщалось, что повышенный субэпителиальный фиброз специфически связан с астмой у людей (Boulet, et.al., (1997) *Chest*, July; 112 (1): 45-52; James, AL и Wenzel S., (2007), *Eur Respir J*, July, 30(1) :134-155). В данной модели субэпителиальный фиброз измеряли на окрашенных трихромом по Массону залитых в парафин срезах легкого, с использованием программного обеспечения HaLo (Indica Labs, NM). С помощью инструмента "Толщина слоя" толщина коллагенового слоя под эпителием бронха регистрировалась несколько раз с интервалом около 30 мкм на миллиметре первичного бронха. Субэпителиальный фиброз выражается как средняя толщина слоя коллагена под эпителием (мкм, \pm SD), как показано в табл. 9.

Анализ гистопатологии легких.

Как показано в табл. 9, наблюдалась тенденция к увеличению метаплазии бокаловидных клеток в легких ИЛ-33 HumIn мышей, получавших HDM в течение 15 недель, с или без лечения с антителом изотипического контроля по сравнению с ИЛ-33 HumIn мышами, зараженными только 1X PBS. Точно так же наблюдалось значительное увеличение консолидации легких, а также толщины субэпителиального коллагена у ИЛ-33 HumIn мышей, получавших HDM в течение 15 недель.

Напротив, наблюдалась тенденция к снижению метаплазии бокаловидных клеток и толщины субэпителиального коллагена, а также к значительному снижению консолидации в легких у ИЛ-33 HumIn мышей, получавших комбинацию анти-ИЛ-33 и анти-мышинного ИЛ-4Р α антител в течение последних четырех недель хронического заражения HDM по сравнению с ИЛ-33 HumIn мышами, которым вводили HDM с антителом изотипического контроля в течение этого периода времени. Влияния на метаплазию бокаловидных клеток, консолидацию легких и толщину субэпителиального коллагена, наблюдаемые с комбинацией анти-ИЛ-33 и анти-мышинных ИЛ-4Р α антител, продемонстрировали тенденцию к большей эффективности, чем лечение только отдельными антителами.

Таблица 9

Количественная оценка гистопатологии в легких мыши

Экспериментальная группа	Средняя метаплазия бокаловидных клеток (% PAS-положительных клеток) (\pm SD)	Среднее консолидации легких (% \pm SD)	Средняя толщина субэпителиального коллагена (мкм) (\pm SD)
1. Заражение 1X PBS (n=5)	32,94 (\pm 43,61)	6,97 (\pm 3,72)	25,90 (\pm 4,00)
2. Заражение HDM 11 недель (n=4)	59,98 (\pm 39,01)	70,70 (\pm 12,94)	81,76 (\pm 25,37) *
3. Заражение HDM 15 недель (n=4)	92,15 (\pm 10,16)	83,21 (\pm 3,65) **	82,12 (\pm 23,04) *
4. Заражение HDM 15 недель+антитело изотипического контроля (n=4)		**	(\pm 11,87)
5. Заражение HDM 15 недель + анти-ИЛ-33 антитело (n=5)	39,22 (\pm 18,93)	58,82 (\pm 18,26)	70,99 (\pm 23,85)
6. Заражение HDM 15 недель + анти-мышинное антитело (n=5)	79,82 (\pm 25,02)	57,79 (\pm 18,72)	57,62 (\pm 15,34)
7. Заражение HDM 15 недель + анти-ИЛ-33+анти-мышинные антитела (n=5)	19,69 (\pm 8,80)	35,01 (\pm 20,68)	48,19 (\pm 18,58)

Примечание: указывается статистическая значимость, определяемая тестом Крускала-Уоллиса однофакторным ANOVA с многократным сравнением. Дана ретроспективный анализ (**= $p < 0,01$, по сравнению с группами 1: ИЛ-33 HumIn мыши, заражение физиологическим раствором).

Сбор сыворотки для измерения уровней IgE и HDM-специфического IgG1.

Для определения общей концентрации IgE в образцах сыворотки для каждой мыши использовали сэндвич ИФА OPTEIA набор (BD Biosciences, #555248) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы сыворотки разбавляли и инкубировали с анти-IgE захватывающим антителом, нанесенным на 96-луночные планшеты. Общий IgE определяли с помощью биотинилированного анти-мышинного IgE вторичного антитела. Мышинный IgE, меченный очищенной пероксидазой хрена (HRP), использовали в качестве стандарта. Хромаген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB) (набор реагентов субстрата BD OPTEIA, BD, #555214) использовали для определения активности HRP. Затем добавляли стоп-раствор 1 М серной кислоты и измеряли поглощение при 450 нм на планшет-ридере Molecular Devices SpectraMax M5. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения Prism™. Средние уровни циркулирующего IgE в сыворотке для каждой экспериментальной группы выражены в нг/мл (\pm SD), как показано в табл. 10.

Для определения HDM специфичных уровней IgG1 в образцах сыворотки от каждой мыши использовали ИФА. Планшеты, покрытые HDM (Greer, #XPB70D3A2.5), инкубировали с серийно разведенными образцами мышинной сыворотки с последующей инкубацией с крысиным анти-мышинным IgG1-HRP конъюгированным антителом (BD Biosciences, #559626). Все образцы были разработаны с использованием раствора TMB и проанализированы, как описано выше. Относительные уровни циркулирующего IgG1 в сыворотке были представлены в виде единиц титра (единицы титра были рассчитаны путем умножения измеренной ОП на коэффициент разбавления, необходимый для достижения ОП450, которая была выше фонового в два раза). Средние уровни циркулирующего HDM-специфического IgG1 в сыворотке для ка-

ждой экспериментальной группы выражены в виде титра $\times 10^6$ (TM SD), как показано в табл. 10

Анализ уровней циркулирующего IqE и НРМ-специфического IqG1.

Как показано в табл. 10, наблюдалось значительное увеличение уровней циркулирующего IgE в сыворотке ИЛ-33 HumIn мышей, получавших HDM в течение 15 недель, с или без лечения с антителом изотипического контроля у ИЛ-33 HumIn мышей, зараженных только 1X PBS. Аналогично, была тенденция к увеличению уровня циркулирующего HDM-специфического IgG1 в сыворотке ИЛ-33 HumIn мышей, получавших HDM в течение 15 недель. Напротив, наблюдалось значительное снижение уровней циркулирующего IgE и тенденция к снижению уровней циркулирующего HDM-специфического IgG1 в сыворотке крови ИЛ-33 HumIn мышей, получавших комбинацию анти-ИЛ-33 и анти-мышинных ИЛ-4P α антител в течение последних четырех недель хронического заражения HDM по сравнению с ИЛ-33 HumIn мышами, которым вводили HDM с антителом изотипического контроля.

Таблица 10

Уровни циркулирующего IgE и HDM-специфического IgG1 в сыворотке мыши

Экспериментальная группа	Средние уровни циркулирующего IgE (мкг/мл) (\pm SD)	Средние уровни специфического IgG1 (титр $\times 10^6$) (\pm SD)
1. Заражение 1X PBS (n=5)	2,16 (\pm 2,02)	ND
2. Заражение HDM 11 недель (n=4)	50,16 (\pm 8,35)	1,18 (\pm 0,15)
3. Заражение HDM 15 недель (n=4)	131,38 (\pm 106,84) *	1,88 (\pm 0,81)
4. Заражение HDM 15 недель+антитело изотипического контроля (n=4)	193,07 (\pm 78,96) ***	1,62 (\pm 0,62)
5. Заражение HDM 15 недель + анти-ИЛ-33 антитело (n=5)	45,74 (\pm 45,74)	1,76 (\pm 0,98)
6. Заражение HDM 15 недель + анти-мышинное антитело ИЛ-4P α (n=5)	11,12 (\pm 8,65)	0,99 (\pm 0,56)
7. Заражение HDM 15 недель + анти-ИЛ-33+анти-мышинные антитела ИЛ-4P α (n=5)	6,45 (\pm 5,79) †	0,75 (\pm 0,30)

Примечание: указывается статистическая значимость, определяемая тестом Крускала-Уоллиса однофакторным ANOVA с многократным сравнением Данна ретроспективного анализа (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, по сравнению с группами 1: ИЛ-33 HumIn мыши, заражение физиологическим раствором; † $p < 0,05$, по сравнению с группой 4: ИЛ-33 HumIn мыши, заражение HDM через 15 недель+антитело изотипического контроля). ND: не определено.

Комбинация лечения H4N9675P и анти-mIL-4P α , начатого в контексте тяжелого смешанного воспаления, улучшает все измеренные параметры воспаления, снижая большинство до базовых уровней. Кроме того, аддитивные эффекты наблюдаются на некоторых наиболее злокачественных конечных точках, включая общую патологию легких, метаплазию бокаловидных клеток, инфильтрацию клеток легких и уровни цитокинов. Следовательно, одновременная блокировка обоих путей может оказать влияние на несколько медиаторов воспаления в контексте тяжелого смешанного воспаления и патологии ткани и нормализовать множество параметров до исходного уровня.

Пример 5. Картирование эпитопа H4N9675P, связывающегося с ИЛ33 путем обмена водорода на дейтерий.

Чтобы определить эпитопы ИЛ33 человека, распознаваемого анти-ИЛ33 антителом, H4N9675P, были проведены исследования обмена водород-дейтерий (H/D) для антитела, образующего комплекс с ИЛ33 человека. Для экспериментов использовали рекомбинантный ИЛ33 человека, экспрессированный с С-концевой гексагистиридиновой меткой (SEQ ID NO: 356). Общее описание способа обмена H/D изложено в Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267 (2): 252-259; и Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A. Эксперименты H/D были выполнены на единой платформе Waters HDX/MS, состоящей из системы PAL Leaptec HDX для маркировки дейтерия, Waters Acquity M-класса (вспомогательный менеджер растворителя) для переваривания и загрузки образца, Waters Acquity M-класса (μ Binary менеджер растворителя) для градиента аналитической колонки и масс-спектрометр Synapt G2-Si для измерения пептической массы пептида.

Маркировочный раствор готовили в 10 mM буфера PBS в D₂O при pD 7,0 (эквивалентно pH 6,6). Для мечения дейтерием 3,8 мкл hIL33-ММН (96 пмоль/мкл) или hIL33-ММН, предварительно смешанных с антителом в молярном соотношении 1:1, инкубировали с 56,2 мкл раствора D₂O для мечения в различные моменты времени (2 мин, 10 мин, и недеитерированный контроль=0 с). Дейтерирование гасили путем переноса 50 мкл образца в 50 мкл предварительно охлажденного 0,2 М ТСЕР, 6 М гуанидинхлорида в 100 mM фосфатном буфере при pH 2,5 (буфер гашения), и смешанный образец инкубировали при 1,0°C в течение двух минут. Затем погашенный образец вводили в Waters HDX Manager для онлайн-расщепления пепсином/протеазой XIII. Расщепленные пептиды были захвачены на ACQUITY UPLC ВЕН C18 1,7 мкм, предварительной колонке VanGuard 2,1×5 мм при 0°C и элюированы в ACQUITY UPLC ВЕН C18 1,7 мкм, 1,0×50 мм, используя 9-минутное градиентное разделение 5-40% В (подвижная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в воде, подвижная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле). Масс-спектрометр был настроен на напряжение в конусе 37 В, время сканирования 0,5 с и диапазон масса/заряд 50-1700 Тн.

Для идентификации пептидов из hIL33-ММН данные LC-MS^E из недеитерированного образца обрабатывали и проводили поиск в базе данных, включая ИЛ33 человека, пепсин и их рандомизированные последовательности, с помощью программного обеспечения Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). Идентифицированные пептиды были импортированы в программное обеспечение DynamX и отфильтрованы по двум критериям: 1) минимальное количество продуктов на аминокислоту: 0,3 и 2) порог файла репликации: 3. Программное обеспечение DynamX затем автоматически определяло поглощение дейтерия каждым пептидом на основе времени удерживания и высокой точности массы (<10 миллионных долей) в нескольких временных точках с 3 повторностями в каждой временной точке.

При использовании онлайн пепсин/протеаза XIII колонки в сочетании с получением данных MS^E, всего 68 пептидов из hIL33-ММН были идентифицированы в отсутствие или в присутствии H4N9675P, что составляет 95% покрытия последовательности. Одиннадцать пептидов значительно снижали поглощение дейтерирования (значения дельты центроида >0,4 дальтон с р-значениями < 0,05) при связывании с H4N9675P и перечислены в табл. 11. Записанная масса пептида соответствует среднему значению массы МН⁺ центроида из трех повторностей. Эти пептиды, соответствующие аминокислотам 1-12 и 50-94 SEQ ID NO: 349), имели более медленную скорость дейтерирования при связывании H4N9675P. Эти идентифицированные остатки также соответствуют остаткам 112-123 и 161-205 ИЛ-33 человека, как определено в записи Uniprot 095760 (IL33 HUMAN; см. также SEQ ID NO: 348). Эти данные подтверждают наличие аминокислотных остатков 112-123 и 161-205 SEQ ID NO: 348 или аминокислотных остатков 1-12 и 50-94 SEQ ID NO: 349, определяющих, по меньшей мере, частично участок связывания в ИЛ-33 для антитела H4N9675P.

Таблица 11

Пептиды ИЛ33 человека со значительным снижением дейтерирования при связывании с Н4Н9675Р

Номера остатков на основе SEQ ID NO: 349	2 мин дейтерирования			10 мин дейтерирования		
	ИЛ33 Центроид МН ⁺	ИЛ33+ Н4Н9675Р Центроид МН ⁺	Δ	ИЛ33 Центроид МН ⁺	ИЛ33+Н4Н9675Р Центроид МН ⁺	Δ
1-9	893,43 ± 0,06	891,89 ± 0,02	-1,54	893,60 ± 0,03	892,00 ± 0,08	-1,60
1-10	1023,15 ± 0,06	1021,53 ± 0,05	-1,62	1023,31 ± 0,01	1021,69 ± 0,03	-1,63
1-11	1186,18 ± 0,06	1184,39 ± 0,13	-1,80	1186,43 ± 0,02	1184,61 ± 0,03	-1,82
1-12	1300,27 ± 0,07	1297,88 ± 0,04	-2,39	1300,60 ± 0,03	1298,65 ± 0,01	-1,95
50-61	1458,12 ± 0,06	1456,36 ± 0,00	-1,75	1458,27 ± 0,08	1456,34 ± 0,01	-1,93
52-67	1791,16 ± 0,12	1789,89 ± 0,25	-1,27	1791,20 ± 0,02	1790,27 ± 0,02	-0,93
52-72	2353,80 ± 0,12	2351,27 ± 0,05	-2,53	2353,89 ± 0,03	2351,95 ± 0,10	-1,94
53-70	1945,19 ± 0,10	1944,26 ± 0,07	-0,93	1945,25 ± 0,02	1944,84 ± 0,03	-0,41
53-72	2189,95 ± 0,13	2188,03 ± 0,03	-1,92	2190,02 ± 0,02	2188,58 ± 0,04	-1,44
71-81	1253,89 ± 0,07	1253,08 ± 0,18	-0,81	1254,07 ± 0,02	1253,52 ± 0,16	-0,55
71-94	2815,35 ± 0,05	2814,48 ± 0,00	-0,87	2816,06 ± 0,12	2815,10 ± 0,12	-0,96

Пример 6. Эффект антитела к ИЛ-33 (REGN3500) и антитела к ИЛ-4Р (дупилумаб), отдельно или в комбинации, на 19-недельной модели аллерген-индуцированного воспаления легких с использованием ИЛ-33-, ИЛ-4- и ИЛ-4Р альфа-гуманизированных мышей.

Эффект только антитела к ИЛ-33, только антитела к ИЛ-4Р или комбинации обоих антител впервые был протестирован в примере 4 выше с использованием мышей, которые были гомозиготными по экспрессии ИЛ-33 человека вместо ИЛ-33 мыши (ИЛ-33 HumIn мыши; см. патентные публикации США №№ 2015/0320021 и 2015/0320022). Полностью человеческое анти-ИЛ-33 антитело (REGN3500) и анти-мышинное ИЛ-4Р α антитело или их комбинацию сравнивали в этой модели и с результатами, описанными в примере 4.

Поскольку ни человеческое анти-ИЛ-33 антитело (REGN3500), ни человеческое анти-ИЛ-4Р антитело (дупилумаб) не связывают их соответствующие мышинные белки-мишени, генетически модифицированные мыши, у которых мышинные ИЛ-33, ИЛ-4 и эктодомен ИЛ-4Р α были заменены на соответствующие последовательности человека (IL4RA^{hu/hu} IL4^{hu/hu} IL33^{hu/hu}), были получены. Линия мыши И4га^{hu/hu} И4^{hu/hu} И33^{hu/hu} была валидирована в качестве инструмента для изучения эффекта введения REGN3500 и дупилумаба с использованием 4-недельной модели HDM-индуцированного воспаления легких. В этой модели HDM-обработанные мыши И4га^{hu/hu} И4^{hu/hu} И33^{hu/hu} демонстрировали иммунные ответы, сходные с мышами дикого типа, что оценивалось путем оценки эозинофильной инфильтрации легких.

Описанное ниже исследование было проведено, чтобы определить, может ли одновременная блокада путей ИЛ-33 и ИЛ-4/ИЛ-13 оказывать большее влияние на воспаление легких, чем блокирование одного из этих путей. В этом исследовании мышей И4га^{hu/hu} И4^{hu/hu} И33^{hu/hu} подвергали интраназальному (и/н) воздействию HDM или физиологического раствора в течение 19 недель. Контрольную группу мышей И4га^{hu/hu} И4^{hu/hu} И33^{hu/hu} умерщвляли после 11 недель воздействия HDM для оценки тяжести заболевания в начале лечения антителами. Девятнадцатинедельные мыши, подвергшиеся воздействию HDM, либо не получали лечения антителами, либо получали инъекции антител два раза в неделю подкожно (п/к) с 12 недели по 19 неделю воздействия HDM в общей сложности на 8 недель и 16 доз. Следующие антитела вводили в конечной дозе белка 11 мг/кг: (а) 11 мг/кг антитела изотипического контроля, (б) 1 мг/кг REGN3500+10 мг/кг антитела изотипического контроля (в) 10 мг/кг дупилумаба+1 мг/кг антитела изотипического контроля или (д) 1 мг/кг REGN3500+10 мг/кг дупилумаба. Эффект лечения REGN3500 и дупилумаба, отдельно или в комбинации, у мышей, подвергшихся воздействию HDM, оценивали по сле-

дующим патологическим маркерам воспаления дыхательных путей:

Общая патология (относительная масса легких).

Инфильтрация ткани легких воспалительными клетками типа 1 (нейтрофилы, количественно определяемые по уровням легочного белка нейтрофильного маркера миелопероксидазы [MPO]) и воспалительных клеток типа 2 (общие и активированные [CD11c^{Hi}] эозинофилы и ST2⁺ CD4⁺ Т-клетки, количественно оцененные проточной цитометрией).

Уровни белка воспалительных цитокинов в легких (ИЛ-4 человека и ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-1β, ФНОα, ИФНγ, GROα и MCP-1 мыши, количественный анализ с помощью иммуноанализа).

Циркулирующие уровни системного маркера воспаления, сывороточного белка амилоида А [SAA] (количественно оцененные с помощью иммуноанализа).

Материалы и методы.

Тестовая система.

ИЛ-33-, ИЛ-4- и ИЛ-4Рα эктодомен-гуманизированные мыши.

Ни REGN3500, ни дупилумаб не связываются с ИЛ-33 мыши или ИЛ-4Рα мыши соответственно. Поэтому для тестирования REGN3500 и дупилумаба совместно и в комбинации, были получены генетически модифицированные мыши, у которых мышинные ИЛ-33, ИЛ-4 и эктодомен ИЛ-4Рα были заменены на соответствующие последовательности человека (I4ra^{hu/hu} И4^{hu/hu} И33^{hu/hu}). Эта трижды гуманизированная линия мыши была получена с использованием технологии VelociGene® в Regeneron Pharmaceuticals (Valenzuela, DM, et al. Nat Biotechnol. (2003), Jun; 21(6):652-9, Poueymirou, WT, et al. Nat Biotechnol. (2007) Jan; 25(1):91-9) скрещиванием ранее охарактеризованной ИЛ-4/ИЛ-4Рα эктодомен-гуманизированной линии мыши И4ra^{hu/hu} И4^{hu/hu} с ранее охарактеризованным ИЛ-33-гуманизированной линией И33^{hu/hu}.

Мышиная модель воспаления легких.

Мышиная модель воспаления легких реализуется повторным интраназальным (и/н) воздействием экстракта HDM, который служит в качестве источника аллергена клеща домашней пыли (Johnson et al.; American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine; (2004) Feb 1; 169 (3):378-85), являющегося значительной причиной аллергии в пределах жилья у людей (Calderon, et al., (2015), Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? J Allergy Clin Immunol. 2015 Jul;136 (1):38-48). Сообщается, что хроническое воздействие HDM вызывает тяжелое воспаление легких, приводящее к значительному легочному клеточному инфильтрату, экспрессии цитокинов и ремоделированию. В частности, было продемонстрировано, что у мышей, хронически подверженных воздействию HDM, наблюдается воспаление легких смешанных фенотипов типа 1/типа 2, таких как инфильтрация ткани воспалительными клетками типа 1 и типа 2 (нейтрофилы и эозинофилы, соответственно), увеличение сывороточного IgE, повышение сывороточного HDM-специфического IgG1, а также индукции воспалительных цитокинов типа 2, таких как ИЛ-5 и ИЛ-13 (Johnson, et al. (2004), American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine; Feb 1;169 (3):378-85; Johnson, et al. (2011). PloS ONE. Jan 20;6 (1):e16175; Llop-Guevara, et al., (2008), PloS ONE, Jun 11;3 (6):e2426.

Дизайн эксперимента.

Четырехнедельная модель воспаления легких, вызванная воздействием HDM.

Самки мышей генотипов, указанных в табл. 12, были рандомизированы на 2 группы каждая на генотип. Физиологический раствор (20 мкл) или 50 мкг HDM, разведенного в 20 мкл физиологического раствора, вводили и/н 3 раза в неделю в течение 4 недель. Все линии мышей имели смешанный фон C57BL/6NTac/129S6SvEvTac. Мышей умерщвляли через 4 дня после последнего воздействия, собирали легкие и определяли эозинофильную инфильтрацию легких.

Таблица 12

Протокол эксперимента для 4-недельной модели HDM

Группа	Генотип	N	Реагент воздействия	Продолжитель - ность воздействия (недели)
A	Дикий тип	3	20 мкл физиологического раствора	4
B	Дикий тип	5	50 мкг HDM	4
C	<i>I133^{hu/hu}</i>	5	20 мкл физиологического раствора	4
D	<i>I133^{hu/hu}</i>	5	50 мкг HDM	4
E	<i>I14ra^{hu/hu}</i>	5	20 мкл физиологического раствора	4
F	<i>I14ra^{hu/hu}</i>	5	50 мкг HDM	4
G	<i>I14ra^{hu/hu} I14^{hu/hu}</i>	5	20 мкл физиологического раствора	4
H	<i>I14ra^{hu/hu} I14^{hu/hu}</i>	5	50 мкг HDM	4
I	<i>I14ra^{hu/hu} I14^{hu/hu}</i> <i>I133^{hu/hu}</i>	4	20 мкл физиологического раствора	4
J	<i>I14ra^{hu/hu} I14^{hu/hu}</i> <i>I133^{hu/hu}</i>	5	50 мкг HDM	4

Дикий тип=C57BL/6NTac/129S6SvEvTac.

Девятнадцатинедельная модель воспаления легких, вызванная воздействием HDM.

Мыши *I14ra^{hu/hu} I14^{hu/hu} I133^{hu/hu}*, использованные в этом исследовании, имели смешанный фон C57BL/6NTac (72%)/129S6SvEvTac (28%); самок мышей рандомизировали в 7 отдельных групп. Воздействие HDM и лечение или контрольный протокол дозирования каждой группы мышей показаны на табл. 13. Физиологический раствор (20 мкл) или 50 мкг HDM, разведенного в 20 мкл физиологического раствора, вводили и/н 3 раза в неделю в течение 19 недель. Контрольную группу мышей *I14ra^{hu/hu} I14^{hu/hu} I133^{hu/hu}* умерщвляли после 11 недель воздействия HDM для оценки тяжести заболевания в начале лечения антителами. Девятнадцатинедельные мыши, подвергшиеся воздействию HDM, либо не получали лечения антителами, либо получали подкожные (п/к) инъекции антител два раза в неделю с 12 недели по 19 неделю воздействия HDM в общей сложности 16 доз антител, как указано в табл. 13. Вкратце, следующие антитела вводили в конечной дозе белка 11 мг/кг: 11 мг/кг антитела изотипического контроля (группа D), 1 мг/кг REGN3500+10 мг/кг антитела изотипического контроля (группа E), 10 мг/кг дупилумаба мг/кг+1 мг/кг антитела изотипического контроля (группа F), или 1 мг/кг REGN3500+10 мг/кг дупилумаба (группа G). Для целей данного изобретения группы лечения двойным антителом (D-G) будут идентифицироваться только по терапевтическому антителу (REGN3500 и/или дупилумабу). На 134-й день исследования, через 4 дня после последнего и/н воздействия и введения антитела, всех мышей умерщвляли, собирали кровь с помощью пункции сердца и собирали легкие для анализа.

Протокол эксперимента для 19-недельной модели HDM

Группа	N	Реагент воздействия	Продолжительность воздействия (недели)	Введение антитела	Доза антитела (мг/кг)
A	5	20 мкл физиологиче- ского раствора	19	Нет	Нет
B	9	50 мкг HDM	11	Нет	Нет
C	9	50 мкг HDM	19	Нет	Нет
D	9	50 мкг HDM	19	Контроль IgG4 ^P	11
E	7	50 мкг HDM	19	REGN3500+ Контроль IgG4 ^P	1+10
F	8	50 мкг HDM	19	дупилумаб+ контроль IgG4 ^P	10+1
G	8	50 мкг HDM	19	REGN3500+ дупилумаб	1+10

Контроль IgG4^P=контрольное антитело с изотипным соответствием, REGN1945.

Разведение мышей.

В течение всей продолжительности каждого эксперимента животные оставались в помещении для содержания животных Regeneron в стандартных условиях, и им давали возможность акклиматизироваться в течение по меньшей мере 7 дней до начала исследования. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с руководящими принципами Институционального комитета по уходу и использованию животных в Regeneron.

Особые процедуры.

Измерение относительной массы легких.

Терминальное измерение массы тела было записано перед умерщвлением. После обескровливания левую долю легкого каждой мыши удаляли и помещали в пробирку, содержащую раствор 4% параформальдегида. Сырую массу левого легкого для каждой мыши регистрировали по шкале Mettler Toledo New Classic MS. Чтобы определить относительную массу легких, отношение сырой массы легкого (в мг) к массе тела (в г) рассчитывали путем деления сырой массы легкого на массу тела.

Анализ легочных клеточных инфильтратов.

После обескровливания каудальную долю правого легкого каждой мыши удаляли, помещали в пробирку, содержащую раствор 20 мкг/мл ДНКазы I и 0,7 ед/мл либразы TH, разведенной в сбалансированном солевом растворе Хэнка (HBSS), и разрезали на кусочки размером примерно от 2 до 3 мм. Пробирки, содержащие нарезанные кубиками легкие, затем инкубировали на водяной бане при 37°C в течение 20 мин. Реакцию останавливали добавлением этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в конечной концентрации 10 мМ. Затем образцы переносили в пробирки gentleMACS C. Затем добавляли 2 мл буфера autoMACS и образцы затем диссоциировали с образованием суспензий отдельных клеток с использованием диссоциатора gentleMACS™ (Miltenyi Biotec). Затем пробирки центрифугировали и полученный осадок ресуспендировали в 4 мл 1x буфера для лизиса эритроцитов для лизиса эритроцитов. После инкубации в течение 3 мин при комнатной температуре добавляли 2,5-кратный объем 1x DPBS для дезактивации буфера для лизиса эритроцитов. Затем клеточные суспензии центрифугировали и полученные клеточные осадки ресуспендировали в 1 мл DPBS. Каждый из ресуспендированных образцов был отфильтрован через 50-миллиметровую чашку типа филкон и перенесен в 2 мл планшет с глубокими лунками. Планшет центрифугировали в течение 4 мин при 400×g и каждый образец ресуспендировали в 1 мл DPBS. Приблизительно 1,5×10⁶ клеток на лунку высевали в 96-луночный U-образный планшет. Затем клетки центрифугировали и осадок клеток ресуспендировали в 100 мкл красителя, позволяющего различить погибшие и жизнеспособные клетки, разведенного в 1:500 в 1X DPBS, для определения жизнеспособности клеток. Клетки инкубировали с красителем на жизнеспособность в течение 15 мин при комнатной температуре, в защищенном от света месте. После одной промывки в 1X DPBS клетки инкубировали с очищенным крысиным анти-мышиним Fc-блоком CD16/CD32, разведенным 1:50 в 50 мкл буфера autoMACS в течение 15 мин при 4°C. Клетки затем инкубировали в соответствующей смеси 2x антитела, разбавленного в Brilliant Stain буфере (описанного в табл. 14) в течение 30 мин при 4°C в защищенном от света месте. После инкубации антител клетки дважды промывали в буфере autoMACS, ресуспендировали в BD CytoFix, который был разведен 1:4 в 1X DPBS, и затем инкубировали в течение 15 мин при 4°C в

защищенном от света месте. Затем клетки промывали и ресуспендировали в буфере autoMACS. Суспензии клеток затем фильтровали в новую U-образный планшет через фильтровальный планшет AcoPrep Advance 96 30-40 мкм. Данные образца были получены на клеточном анализаторе LSR Fortessa X-20 с использованием приставки HTS (BD Biosciences). Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения FlowJo X (Tree Star, OR), а статистический анализ - с использованием GraphPad Prism™ (GraphPad Software, Калифорния).

Стратегия рейтинга для эозинофилов (полная и активированная).

Эозинофилы были определены как интактные, одиночные, живые клетки (низкий сигнал красителя, позволяющего различить погибшие и жизнеспособные клетки), CD45⁺, F4/80⁺, Ly6G⁻, SiglecF⁺. Данные для эозинофилов выражали в виде частоты живых клеток. В популяции эозинофилов, активированные эозинофилы были определены как интактные, одиночные, живые, CD45⁺, F4/80⁺, Ly6G⁻, SiglecF⁺, CD11c^{hi} и выражали в виде частоты от общего числа эозинофилов.

Стратегия рейтинга для ST2⁺ CD4⁺ Т-клеток ST2⁺ CD4⁺ Т-клетки были определены как интактные, одиночные, живые, CD45⁺, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻, ST2⁺. Данные для ST2⁺ CD4⁺ Т-клеток выражали в виде частоты CD4⁺ Т-клеток (интактных, одиночных, живых, CD45⁺, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻).

Таблица 14

Антитела, используемые для анализа проточной цитометрии

Антитело	Флюорохром	Производитель	Каталог #	Лот #	Окончательное разведение
Смесь 1: Общие и активированные эозинофилы					
CD45	Alexa Fluor 700	BioLegend	103128	B191240/ B211311	1/200
Siglec-F	BV421	BD	562681	4234913/6 007723	1/200
F4/80	PE	BD	565410	5168713/5 257914	1/500
Ly6G	BUV395	BD	563978	5156800/7 103737	1/200
CD11c	PerCP-Cy5.5	BD	560584	5148566/7 074758	1/200
Смесь 2: ST2⁺ CD4⁺ Т-клетки					
CD45	Alexa Fluor 700	BioLegend	103128	B211311	1/200
CD19	BUV737	BD	564296	6315651	1/200
ST2	PerCP-eFluor710	eBioscience	H6-9335-82	E17254-105	1/200
CD3	PE-Cy7	BD	552774	7074769	1/200
CD8	BUV395	BD	563786	6245983	1/200
CD4	BV786	BD	563331	7075503	1/200

Определение уровней легочного белка.

После обескровливания краниальные и средние доли правого легкого каждой мыши извлекали, взвешивали и помещали в пробирки, содержащие раствор реагента для экстракции тканевого белка (T-PER), дополненный коктейлем с ингибитором протеазы. Для достижения конечного отношения 1:8 (вес/объем) массы ткани легкого к объему T-PER добавляли 8 мкл раствора T-PER (содержащего коктейль ингибитора протеазы) на мг ткани. Образцы легких были механически гомогенизированы с использованием TissueLyser II. Полученные лизаты центрифугировали до осколков осадка. Надосадки, содержащие растворимые белковые экстракты, переносили в свежие пробирки и хранили при 4°C до дальнейшего анализа. Концентрации цитокинов и МРО выражали в виде общего количества белка на исследуемую долю (нг/доля легкого и мкг/доля легкого соответственно).

Многофакторный иммуноанализ цитокинов.

Концентрации мышечных цитокинов (ИЛ-5, ИЛ-13, ИЛ-6, ИЛ-1β, ИЛ-12p70, ФНОα, ИФНγ, GROα и MCP-1) в экстрактах легочного белка измеряли с использованием набора для многофакторного иммуноанализа (Custom mouse 10-Plex, MSD), согласно инструкции производителя. Вкратце, образцы гомогената легкого разводили и инкубировали на чашках, предварительно покрытых захватывающими антителами. Калибровочные белки, предоставленные производителем, использовались в качестве стандартов. Цитокины в гомогенатах определяли с помощью меченых антител для обнаружения, инкубированных с Read Buffer. Электрохемилюминесценцию немедленно считывали на приборе MSD Spectro®. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Самая низкая концен-

трация стандарта в линейном диапазоне каждого анализа была определена как нижний предел количественного определения (LLOQ) для соответствующего цитокина. Значения LLOQ для отдельных протестированных цитокинов были следующими: ИФН γ =0,2 пг/мл, ИЛ-1 β =1,6 пг/мл, ИЛ-5=0,2 пг/мл, ИЛ-6=1,4 пг/мл, ИЛ-12p70=125,8 пг/мл ИЛ-13=24,4 пг/мл, GRO α : 0,5 пг/мл, MCP-1=9,8 пг/мл, ФНО α =2,4 пг/мл.

ИФА ИЛ-4 человека.

Концентрации ИЛ-4 человека в экстрактах легочных белков измеряли с использованием набора для сэндвич-ИФА в соответствии с инструкциями производителя (Human IL-4 Quantikine ELISA, R&D Systems). Вкратце, гомогенаты легких разводили и инкубировали на 96-луночных планшетах, предварительно покрытых анти-человеческим ИЛ-4 захватывающим антителом. Очищенный ИЛ-4 человека использовали в качестве стандарта. Захваченный ИЛ-4 человека детектировали с использованием HRP-конъюгированного анти-человеческого ИЛ-4 антитела обнаружения. Активность HRP определяли с использованием хромагена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Затем добавляли стоп-раствор и измеряли оптическую плотность при 450 нм (ОП₄₅₀) на планшет-ридере Molecular Devices SpectraMax M5. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Самая низкая концентрация стандарта в линейном диапазоне анализа была определена как LLOQ анализа=31,25 пг/мл.

МРО ИФА.

Концентрации МРО в экстрактах легочного белка измеряли с использованием набора для сэндвич-ИФА в соответствии с инструкциями производителя (набор ИФА МРО мыши, Nuncult Biotech). Вкратце, гомогенаты легких разводили и инкубировали на 96-луночных планшетах, предварительно покрытых анти-МРО захватывающим антителом. Очищенный МРО мыши был использован в качестве стандарта. Захваченный МРО был обнаружен с использованием биотинилированного анти-мышинного МРО антитела обнаружения. Очищенный HRP-конъюгированный стрептавидин использовали для обнаружения биотинилированного антимышиного МРО. Активность HRP определяли с использованием хромагена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Затем добавляли стоп-раствор и измеряли оптическую плотность при 450 нм (ОП₄₅₀) на планшет-ридере Molecular Devices SpectraMax M5. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Низкая концентрация стандарта в пределах линейного диапазона анализа была определена как LLOQ в анализе=156,3 нг/мл.

Сбор сыворотки

Цельная кровь была собрана в пробирки Microtainer с помощью пункции сердца в конце исследования. Крови позволяли сворачиваться, оставляя ее при комнатной температуре в течение не менее 30 мин. Свернутую кровь и клетки осаждали центрифугированием при 18000 \times g в течение 10 мин при 4 $^{\circ}$ C. Полученный надосадок, обозначенный сывороткой, переносили в чистые полипропиленовые чашки и использовали для определения уровней циркулирующих антител, как описано ниже.

Определение уровней SAA. в сыворотке крови методом ИФА Общие концентрации SAA в образцах сыворотки для каждой мыши определяли с использованием коммерческого иммуноанализа (Quantikine ELISA, R&D Systems) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, образцы сыворотки разводили и инкубировали на 96-луночных планшетах, предварительно покрытых моноклональным анти-мышинным захватывающим SAA антителом. Рекомбинантный мышинный SAA использовали в качестве стандарта. Захваченный SAA был обнаружен с использованием HRP-конъюгированного поликлонального анти-мышинного SAA антитела обнаружения. Активность HRP определяли с использованием колориметрического HRP субстрата ТМБ. Затем добавляли стоп-раствор разбавленной соляной кислоты и измеряли ОП₄₅₀ на планшет-ридере Molecular Devices SpectraMax M5. Концентрацию циркулирующего SAA в сыворотке для каждого образца определяли, как нг/мл и графически представляли, как мкг/мл. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Самая низкая концентрация стандарта в линейном диапазоне анализа определялась как LLOQ в анализе=31,2 нг/мл.

Определение сывороточных уровней IgE методом ИФА Общие концентрации IgE в образцах сыворотки для каждой мыши определяли с использованием колориметрического набора сэндвич-ИФА OP-TEIA в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, образцы сыворотки разводили и инкубировали на 96-луночных планшетах, предварительно покрытых анти-IgE захватывающим антителом. Очищенный мышинный IgE использовали в качестве стандарта. Захваченный IgE был обнаружен с использованием биотинилированного анти-мышинного IgE антитела обнаружения. Очищенный HRP-конъюгированный стрептавидин использовали для обнаружения биотинилированного анти-мышинного IgE. HRP активность была обнаружена с использованием ТМБ. Затем добавляли стоп-раствор 2N серной кислоты и измеряли ОП₄₅₀ на планшет-ридере Molecular Devices SpectraMax M5. Концентрация циркулирующего IgE в сыворотке для каждого образца выражалась в мкг/мл. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Самая низкая концентрация стандарта в линейном диапазоне анализа определялась как LLOQ в анализе=78,15 нг/мл.

Определение сывороточных HDM-специфических уровней IgG1 методом ИФА.

Колориметрический анализ ИФА был разработан для определения уровней HDM-специфического IgG1 в образцах сыворотки. Планшеты покрывали HDM в концентрации 4 мкг/мл в натрий-фосфатном буфере (PBS) в течение ночи при 4 $^{\circ}$ C, промывали, блокировали раствором 0,5% BSA в PBS в течение 1 ч

при комнатной температуре и инкубировали с серийно разведенными образцами мышинной сыворотки. Через 1 ч при комнатной температуре планшеты промывали и антитела IgG1, захваченные на планшеты, детектировали путем инкубации с крысиным анти-мышинным антителом IgG1, конъюгированным с HRP, в течение 1 ч при комнатной температуре. HRP активность была обнаружена с использованием ТМВ. Затем добавляли стоп-раствор 2N серной кислоты и измеряли ОП₄₅₀ на планшет-ридере Molecular Devices SpectraMax M5. Относительные уровни IgG1 в сыворотке были представлены в виде единиц титра. Единицы измерения титра рассчитывали путем умножения измеренной ОП₄₅₀ на коэффициент разбавления, необходимый для получения показания ОП₄₅₀, которое было в 2 раза больше фонового ОП₄₅₀. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Самый низкий коэффициент разбавления, использованный в анализе, был определен как LLOQ в анализе=100.

Определение уровней мишень-специфических антител IgG4 человека методом ИФА.

Концентрацию человеческого антитела (REGN3500, дупилумаба или IgG4^P изотипического контроля) в образцах сыворотки для каждой мыши определяли с использованием колориметрического сэндвич-ИФА, разработанного для обнаружения антител IgG4 человека. Микротитровальные лунки покрывали антигеном, специфичным для измеряемого антитела человека, то есть ИЛ-33 человека (REGN3931) для захвата REGN3500, ИЛ-4R α человека (REGN560) для захвата REGN668, природного Fel d 1 для захвата REGN1945, в концентрации 2 мкг/мл в PBS в течение ночи при 4°C. Лунки промывали четыре раза 0,05% Твин 20 в DPBS, блокировали раствором 5% BSA в DPBS в течение 3 часов при комнатной температуре и инкубировали с серийно разведенными образцами мышинной сыворотки или серийно разбавленными калибровочными стандартами. Очищенные антитела (REGN3500, REGN668 и IgG4^P антитело контроля) использовали в качестве стандартов для калибровки и количественного определения соответствующих концентраций антител в сыворотке. Через 1 ч при комнатной температуре планшеты промывали 7 раз и IgG4 человека, захваченный на планшеты, определяли с использованием биотинилированного мышинового анти-человеческого IgG4-специфического моноклонального антитела с последующей инкубацией с Poly HRP, конъюгированным со стрептавидином. Активность HRP определяли с использованием субстрата ТМВ в соответствии с инструкциями производителя. Через 10 минут измеряли оптическую плотность при 450 нм с использованием многорежимного планшет-ридера Molecular Devices SpectraMax. Самая низкая концентрация стандарта (REGN3500, REGN668 или IgG4^P антитело контроля), используемого для калибровки (0,002 мкг/мл), была определена как LLOQ этого анализа. Анализ данных проводили с использованием GraphPad Prism™ (GraphPad Software, Калифорния). Концентрация антитела человека в сыворотке для каждого образца выражалась в мкг/мл.

Статистический анализ.

Статистический анализ проводили с использованием GraphPad Prism версии 7.0 (GraphPad Software, Калифорния).

Статистический анализ данных по характеристике ИЛ-33-, ИЛ-4- и ИЛ-4R α -гуманизированных мышей в 4-недельной модели воздействия HDM.

Результаты были интерпретированы с помощью двустороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим ретроспективным тестом Тьюки для множественных сравнений. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Статистический анализ данных из лечения REGN3500/дупилумабом в 19-недельной модели индуцированного воздействием HDM воспаления легких.

Нормальность данных оценивали с использованием теста Шапиро-Вилка. Если данные прошли тест на нормальность, а стандартные отклонения в разных группах статистически не отличались друг от друга, как оценивалось с помощью теста Брауна-Форсайта, результаты интерпретировались односторонним анализом ANOVA, а затем тестом Тьюки для множественных сравнений. Если данные не прошли тест на нормальность или стандартные отклонения были существенно различны, результаты интерпретировались с использованием теста Крускала-Уоллиса с последующим тестом Данна для нескольких сравнений. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Характеристика ИЛ-33-, ИЛ-4- и ИЛ-4R α эктодомен-гуманизированных мышей.

Дикий тип, П33^{hu/hu}- и П4га^{hu/hu}-единожды гуманизированные, П4га^{hu/hu} П4^{hu/hu}-дважды гуманизированные, и П4га^{hu/hu} П4^{hu/hu} П33^{hu/hu}-трижды гуманизированные мыши подвергались и/н воздействию физиологического раствора или HDM 3 раза в неделю в течение 4 недель. Мышей умерщвляли через 4 дня после последнего воздействия и собирали легкие для оценки легочной инфильтрации активированными эозинофилами, идентифицированными по высокой экспрессии CD11c. Данные отдельных мышей и статистический анализ представлены на фиг. 2. Трижды гуманизированные П4га^{hu/hu} П4^{hu/hu} П33^{hu/hu} мыши показали устойчивую реакцию на HDM похожую на мышей дикого типа, как показано значительным увеличением частоты активированных эозинофилов в легочной ткани следующих 4 недель HDM воздействия. П4га^{hu/hu} П4^{hu/hu} П33^{hu/hu} и мыши дикого типа также показали сходные частоты активированных эозинофилов в легочной ткани в отсутствие воздействия HDM (контрольные мыши, подвергшиеся воздействию физиологического раствора).

Статистически значимых различий не наблюдалось при сравнении мышей дикого типа, подвергшихся воздействию HDM, и мышей, подвергшихся воздействию HDM, от любой из протестированной гуманизированной линии мышей, за исключением единожды гуманизированных мышей P4ra^{hu/hu}. Отсутствие статистически значимого вызванного воздействием HDM увеличения процента активированной эозинофильной инфильтрации легких у мышей P4ra^{hu/hu}, вероятно, связано с тем, что ИЛ-4 мыши не передает сигнал через рецептор ИЛ-4R α человека. С другой стороны, было показано, что ИЛ-33 человека передает сигналы через мышинный рецепторный комплекс (REGN3500-MX-16069). Кроме того, не было обнаружено статистически значимых различий при сравнении мышей дикого типа, подвергшихся воздействию физиологического раствора, и мышей, подвергшихся воздействию физиологического раствора, от любой из протестированных гуманизированных линий мышей. Эти данные подтверждают, что линия P4ra^{hu/hu} P4^{hu/hu} P33^{hu/hu} мыши используется в качестве мышинной модели индуцированного воспаления легких, вызванного воздействием HDM.

Эффект лечения REGN3500 и дупилумаба у 19-недельных мышей, подвергшихся воздействию HDM P4ra^{hu/hu} P4^{hu/hu} P33^{hu/hu} мышей подвергали и/н воздействию физиологического раствора или HDM 3 раза в неделю в течение 11 или 19 недель. Четыре группы 19-недельных мышей, подвергшихся воздействию HDM, получали дважды в неделю п/к инъекции антител с 12 по 19 неделю; все остальные группы не получали лечения (нет, светло-серые боксы). Антитела вводили отдельно или в комбинации в конечных дозах белка 11 мг/кг следующим образом: 11 мг/кг антитела изотипического контроля, 1 мг/кг REGN3500+10 мг/кг антитела изотипического контроля, 10 мг/кг дупилумаба+1 мг/кг антитела изотипического контроля или 1 мг/кг REGN3500+10 мг/кг дупилумаба. Одну когорту мышей умерщвляли после 11 недель воздействия для определения профиля воспаления в начале лечения антителом (11-недельная группа воздействия). Остальные 4 когорты были умерщвлены в день 134 (19-недельные группы воздействия), через четыре дня после последнего воздействия и введения антитела. Цельную кровь собирали путем пункции сердца для выделения сыворотки и собирали легкие для дальнейшего анализа.

Все группы включали мышей одной и той же линии (P4ra^{hu/hu} P4^{hu/hu} P33^{hu/hu}), если не указано иное.

Анализ общей патологии легких.

Относительная масса легких была значительно увеличена у 19-недельных мышей, подвергшихся воздействию HDM, по сравнению с контрольными мышами, подвергшимися воздействию физиологического раствора фиг. 3. Вероятно, это связано с усилением клеточной инфильтрации, отложением коллагена, гипертрофией мышц и выработкой слизи. У мышей, подвергшихся воздействию HDM, комбинированное введение REGN3500 и дупилумаба значительно блокировало вызванное воздействием HDM увеличение относительной массы легких по сравнению с мышами, которым вводили антитело изотипического контроля (Фиг. 3). Тенденция к снижению относительной массы легких также наблюдалась у мышей, подвергшихся воздействию HDM, получавших только REGN3500.

Анализ легочных клеточных инфильтратов.

Через четыре дня после последней инъекции антитела, легкие мышей собирали и каудальную долю правого легкого диссоциировали на одноклеточную суспензию для проточной цитометрии анализа эозинофилов. Эозинофилы были определены как интактные, одиночные, живые, CD45⁺, F4/80⁺, Ly6G⁻, SiglecF⁺, а активированные эозинофилы были дополнительно определены как CD11c^{hi}. Инфильтрация легких активированными эозинофилами была сообщена как частота (%) от общих эозинофилов в легких в (A) и общая эозинофильная инфильтрация легких была сообщена как частота (%) от общего числа эозинофилов легких в живых (интактные, одиночные, живые) клетках. По сравнению с контрольными мышами, подвергшимися воздействию физиологического раствора, воздействие HDM в течение 19 недель значительно увеличили легочную клеточную инфильтрацию, что было оценено с помощью проточной цитометрии для выявления общих и активированных эозинофилов легких (Фиг. 4A и 4B) и ST2⁺ CD4⁺ Т-клеток легких (ST2⁺ CD4⁺ Т-клетки были определены как интактные, одиночные, живые, CD45⁺, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻, ST2⁺ и сообщались как частота CD4⁺Т-клеток.) (Фиг. 5) или с помощью иммуноанализа для определения уровней легочного белка MPO в качестве маркера для нейтрофилов (уровни белка MPO измеряли с помощью иммуноферментного анализа). Уровни легочного белка MPO выражены в виде количества белка MPO (мкг) на долю легкого.) (фиг. 6).

Комбинированное введение REGN3500 и дупилумаба у 19-недельных мышей, подвергшихся воздействию HDM, но не только антитела, значительно снижало уровни инфильтрации легких активированными эозинофилами по сравнению с введением антитела изотипического контроля. Примечательно, что уровни инфильтрации легких активированными эозинофилами у мышей, которым вводили REGN3500 и дупилумаб в комбинации, также были значительно снижены по сравнению с 11-недельными уровнями, вызванными воздействием HDM, что соответствует началу лечения фиг. 4A. Хотя введение только антитела не приводило к значительным эффектам, у мышей, получавших дупилумаб, наблюдалась тенденция к снижению легочной инфильтрации активированными эозинофилами. Мыши, подвергшиеся воздействию HDM, которым вводили REGN3500 и дупилумаб в комбинации, также продемонстрировали тенденцию к снижению индуцированной HDM инфильтрации легкого общими эозинофилами (фиг. 4B).

У 19-недельных мышей, подвергшихся воздействию HDM, которым вводили REGN3500 по отдельности или в сочетании с дупилумабом, уровни инфильтрации легких ST2⁺ CD4⁺ Т-клетками были значи-

тельно снижены по сравнению с уровнями у мышей, которым вводили изотипический контроль, и по сравнению с 11-недельными уровнями, индуцированными воздействием HDM в начале лечения (фиг. 5). Подобное блокирование инфильтрации (средние частоты в 1,02 раза) наблюдалось только для REGN3500 и в сочетании с дупилумабом, что указывает на то, что эта патология в основном обусловлена ИЛ-33.

Подобно эозинофильной инфильтрации, комбинированное введение REGN3500 и дупилумаба показало более сильный эффект на блокирование нейтрофильной инфильтрации легких, чем только одно из антител. Индуцированное воздействием HDM повышение уровней легочного белка миелопероксидазы (MPO), маркера нейтрофильной инфильтрации, было значительно блокировано комбинированным введением REGN3500 и дупилумаба по сравнению с изотипическим контролем (фиг. 6). Хотя введение только одного антитела не приводило к значительным эффектам, у мышей, которым вводили REGN3500, наблюдалась тенденция к снижению уровней легочного белка MPO.

Анализ уровня цитокинов в тканях легких.

Влияние воздействия HDM и лечения антителом на уровни легочного белка (общий белок на долю) оценивали по цитокинам ИЛ-5, ИЛ-13, ИЛ-6, ИЛ-1 β , ИЛ-12p70, ФНО α , ИФН γ , GRO α и MCP-1 мыши, и для цитокина hIL-4 человека.

Легкие (краниальные и средние доли правого легкого) собирали и уровни белка указанных цитокинов мышей измеряли с помощью мультиплексного иммуноанализа. Уровни белка ИЛ-4 человека (hIL-4) определяли с использованием коммерчески доступного набора ИФА. Уровни белка ИЛ-5 (фиг. 7А) и ИЛ-6 (фиг. 7В) измеряли с помощью мультиплексного иммуноанализа. Уровни белка цитокинов в ткани легких рассчитывали, как количество белка (пг) на долю легкого. Тепловая карта ложного цвета (здесь не показана) была создана для обозначения относительных цитокинов в диапазоне от светло-желтого до темно-синего. Шкала относительных уровней цитокинов в легких была создана путем определения самого низкого и самого высокого зарегистрированного среднего уровня белка легкого для каждого отдельного цитокина как 0% (светло-желтый) и 100% (темно-синий), соответственно. Относительные уровни белка цитокинов в легких (%) были обозначены цифрами и цветом на тепловой карте. Статистическую значимость определяли односторонним ANOVA Крускала-Уоллиса с тестом множественных сравнений Данна.

Результат для ИЛ-12p70 был ниже нижнего предела количественного определения для всех групп и поэтому не сообщается в данном изобретении.

Восемь цитокинов (hIL-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-13, ИЛ-1 β , ФНО α , GRO α и MCP-1) показали значительное увеличение уровней легочного белка в ответ на 19-недельное воздействие HDM по сравнению с контрольными мышами, подвергшимися воздействию физиологическим раствором. Только ИФН γ не показал значительного увеличения уровней легочного белка в ответ на 19-недельное воздействие HDM по сравнению с контрольными мышами, подвергшимися воздействию физиологического раствора, и уровни ИФН γ не были затронуты терапевтическим введением антител по сравнению с 19-недельными мышами, подвергшимися воздействию HDM, подвергшимися воздействию физиологическим раствором. Индуцированное воздействием HDM повышение уровней легочного белка 5 цитокинов (hIL-4, ИЛ-6, ФНО α , GRO α и MCP-1) было значительно блокировано комбинированным введением REGN3500 и дупилумаба, но не введением только одного из антител, по сравнению с мышами, которым вводили антитело изотипического контроля.

Другие 2 реагирующих на воздействие HDM цитокина (ИЛ-5 и ИЛ-1 β) продемонстрировали тенденции к блокаде комбинированной терапией REGN3500 и дупилумабом, с уменьшением уровней легочного белка на 83% и 78%, соответственно, по сравнению с мышами, которым вводили антитело изотипического контроля (Фиг. 7А и 7В). Введение индивидуальных антител приводило к менее выраженным тенденциям снижения уровней ИЛ-5 и ИЛ-1 β .

Анализ SAA, системного маркера воспаления.

Через четыре дня после последнего воздействия и инъекции антитела цельную кровь собирали путем пункции сердца и выделяли сыворотку. Уровни циркулирующего белка SAA измеряли с использованием коммерчески доступного набора ИФА. Уровни циркулирующего белка SAA выражаются как количество белка SAA (мкг) на мл сыворотки. Уровни циркулирующего белка системного маркера воспаления SAA были значительно повышены у 19-недельных мышей, подвергшихся воздействию HDM, по сравнению с контрольными мышами, подвергшимися воздействию физиологического раствора (фиг. 8).

Индуцированное воздействием HDM увеличение уровней циркулирующего SAA было значительно снижено у мышей, которым вводили только REGN3500 или в комбинации с дупилумабом (фиг. 8), тогда как у мышей, которым вводили только дупилумаб, наблюдалась тенденция к снижению уровней циркулирующего SAA.

Количественная оценка гуморальных аллергических реакций после воздействия HDM.

Через четыре дня после последнего воздействия и инъекции антитела цельную кровь собирали путем пункции сердца и выделяли сыворотку. Уровни циркулирующего белка IgE измеряли с использованием коммерчески доступного набора ИФА. Уровни циркулирующего белка IgE выражаются в виде количества белка IgE (мкг) на мл сыворотки.

Гуморальные аллергические реакции были вызваны воздействием HDM, что оценивалось по уровням циркулирующего IgE (Фиг. 9) и HDM-специфического IgG1 (Табл. 15) в конце исследования (день 134).

Уровни циркулирующего белка IgE были значительно повышены у 19-недельных мышей, подвергшихся воздействию HDM, по сравнению с контрольными мышами, подвергшимися воздействию физиологического раствора (фиг. 9). Средние титры циркулирующего HDM-специфического IgG1 увеличились с $1,14E+02$ у мышей, подвергшихся воздействию физиологического раствора, до уровней в диапазоне от $1,37E+06$ до $2,43E+06$ у мышей, подвергшихся воздействию HDM в течение 19 недель (табл. 15). Статистически значимого эффекта REGN3500, дупилумаба или комбинированного лечения не наблюдалось ни для одной из этих конечных точек, но у мышей, которым вводили комбинацию REGN3500 и дупилумаба, наблюдалась тенденция к снижению уровней IgE в сыворотке.

Таблица 15

Сводная информация о концентрациях в сыворотке HDM-специфического IgG1

HDM-специфический IgG1 в сыворотке (титр)	физиологический раствор 19 недель	HDM 11 недель	HDM 19 недель				
			Нет антитела	IgG4 ^P	REGN3500 + IgG4 ^P	Дупилумаб + IgG4 ^P	REGN3500 + дупилумаб
Среднее	1,14E+02	2,19E+06	2,43E+06	2,14E+06	1,47E+06	1,37E+06	1,21E+06
SD	6,15E+01	1,07E+06	9,81E+05	5,60E+05	1,17E+06	5,79E+05	5,29E+05

Количественная оценка сывороточных концентраций антител человека.

Сывороточная концентрация IgG4^P антител человека (IgG4^P изотипический контроль, REGN3500 и дупилумаб) была определена в конце исследования (день 134), через четыре дня после последнего введения антител, путем мишень-специфического анти-IgG4 человека ИФА. Средние концентрации антител IgG4 человека приведены в табл. 16.

Таблица 16

Уровни сывороточных антител человека в конце исследования

	Уровни сывороточных антител, среднее ± SD (мкг/мл)						
	19-нед. физиологический раствор	11-нед. HDM	19-нед. HDM	19-нед. HDM IgG4 ^P (11 мг/кг)	19-нед. HDM REGN3500 (1 мг/кг) + IgG4 ^P (10 мг/кг)	19-нед. HDM дупилумаб (10 мг/кг) + IgG4 ^P (1 мг/кг)	19-нед. HDM REGN3500 (1 мг/кг) + дупилумаб (10 мг/кг)
REGN3500	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	n/t	11,4 ± 10,1	n/t	12,7 ± 8,8
Дупилумаб	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	n/t	n/t	8,0 ± 13,5	48,9 ± 27,9
IgG4 ^P	0,0 ± 0,0 ^a	<LLOQ	<LLOQ	54,5 ± 63,9	88,6 ± 76,0	0,1 ± 0,1	n/t

^a У одной мыши в этой группе уровень сывороточного IgG4^P >LLOQ, поэтому здесь сообщается округленное значение.

Суть изобретения

По сравнению с контрольными мышами, подвергшимися воздействию только физиологического раствора, мыши, подвергшиеся воздействию HDM в течение 19 недель, продемонстрировали значительное увеличение всех, кроме одного (уровни легочного ИФНγ) из 14 измеренных патологических маркеров воспаления, если их не лечить или после введения IgG4^P антитела изотипического контроля.

Комбинированное введение REGN3500 и дупилумаба значительно блокировало 10/13 протестированных конечных точек, реагирующих на воздействие HDM, по сравнению с антителом изотипического контроля (относительная масса легких, легочная инфильтрация активированными эозинофилами, ней-

трофилами [уровни MPO] и ST2⁺ CD4⁺ Т-клетками, уровни легочного белка цитокинов hIL-4, ИЛ-6, ФНО α , GRO α и MCP-1 и уровни сывороточного SAA). Кроме того, уровни инфильтрации легкого активированными эозинофилами и ST2⁺ CD4⁺ Т-клетками были значительно снижены до уровней ниже уровней, наблюдаемых у 11-недельных мышей, подвергшихся воздействию HDM, что соответствует началу лечения антителом. Введение только дупилумаба не блокировало существенно ни одну из 13 протестированных конечных точек, реагирующих на воздействие HDM в этой модели, в то время как введение только REGN3500 значительно блокировало 2 протестированные конечные точки: ST2⁺ CD4⁺ Т-клеточная инфильтрация легкого и циркулирующие уровни SAA. Для этих 2 конечных точек блокада, опосредованная только REGN3500, была аналогична блокаде, опосредованной REGN3500, в сочетании с дупилумабом, что позволяет предположить, что эти патологические маркеры в основном управляются ИЛ-33.

Комбинированное введение REGN3500 и дупилумаба показало тенденцию к блокированию реакций, индуцированных воздействием HDM, для других 3 конечных точек, реагирующих на воздействие HDM, без достижения статистической значимости (легочная инфильтрация эозинофилами [общая], уровни легочного белка цитокинов ИЛ-5 и ИЛ-1 β , и уровни сывороточного белка IgE). Для этих маркеров индивидуальное лечение антителами с помощью REGN3500 или дупилумаба обычно приводило к более слабому снижению, чем комбинированное лечение.

Все группы лечения антителами были связаны с обнаруживаемыми сывороточными уровнями для мишень-специфичных антител IgG4 человека в конце исследования. У мышей, которым дважды в неделю в течение 8 недель вводили терапевтическое антитело отдельно или в комбинации, средние сывороточные концентрации REGN3500 составляли 11,4 \pm 10,1 и 12,7 \pm 8,8 мкг/мл соответственно, а средние сывороточные концентрации дупилумаба составляли 8,0 \pm 13,5 и 48,9 \pm 27,9 мкг/мл соответственно в конце исследования.

В заключение, комбинированное лечение REGN3500 и дупилумабом на 19-недельной модели воспаления легких, вызванной воздействием HDM, с использованием мышей П4га^{hu/hu} П4^{hu/hu} П33^{hu/hu} привело к более выраженному улучшению почти всех протестированных патологий легких и маркеров воспаления по сравнению с лечением только одним антителом.

Заключение

Комбинированное лечение REGN3500 и дупилумабом в 19-недельной модели воспаления легких, вызванной воздействием HDM, с использованием мышей П4га^{hu/hu} П4^{hu/hu} П33^{hu/hu} привело к более выраженному улучшению почти всех протестированных патологий легких и маркеров воспаления по сравнению с лечением только одним антителом.

Пример 7. Оценка SAR440340/REGN3500, или дупилумаба, при использовании в одиночку и при использовании в качестве комбинированной терапии у пациентов с ХОБЛ от средней до тяжелой степени.

Дизайн исследования.

Это исследование представляет собой рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование в параллельной группе, проводимое в течение 24 недель с целью проверки эффективности, безопасности и переносимости моноклонального антитела к ИЛ-33 (SAR440340/REGN3500), моноклонального антитела к ИЛ-4R (дупилумаб, также известное как DUPIXENT®), когда каждое используется отдельно или в комбинации у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких от средней до тяжелой степени (ХОБЛ).

Восемьсот тридцать два субъекта будут участвовать в исследовании. Исследование будет состоять из четырех групп, причем одной группе пациентов подкожно (п/к) вводят только анти-ИЛ-33 моноклональное антитело (SAR440340/REGN3500); второй группе пациентов подкожно вводят только анти-ИЛ-4R моноклональное антитело (дупилумаб); третьей группе пациентов одновременно вводили подкожно SAR440340/REGN3500 и дупилумаб; и четвертой группе пациентов вводили плацебо.

Пациенты в группе 1 будут получать 2 п/к инъекции SAR440340/REGN3500 каждые 2 недели в течение 24 недель и совместно будут вводить плацебо дупилумаба в виде 1 п/к инъекции каждые 2 недели в течение 24 недель; пациенты в группе 2 будут получать 1 п/к инъекцию дупилумаба каждые 2 недели в течение 24 недель и совместно будут вводить плацебо SAR440340/REGN3500 в виде 2 п/к инъекций каждые 2 недели в течение 24 недель; пациенты в группе 3 будут получать 2 п/к инъекции SAR440340/REGN3500 каждые 2 недели в течение 24 недель и совместно будут вводить дупилумаб в виде 1 п/к инъекции каждые 2 недели в течение 24 недель; пациенты в группе 4 будут получать соответствующие плацебо для SAR440340/REGN3500 и дупилумаба, вводимые в виде 2 и 1 п/к инъекций, соответственно, каждые 2 недели в течение 24 недель.

Цели исследования.

Основная цель этого исследования заключается в определении и сравнении эффектов антитела к интерлейкину-33 (SAR440340/REGN3500), моноклонального антитела к рецептору интерлейкина-4 (дупилумаб) и совместного назначения обоих по сравнению с плацебо у пациентов с умеренной до тяжелой хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), которых лечили с ингаляционным кортикосте-

роидом (ICS), и/или (32 адrenomергическим агонистом длительного действия (LABA) и/или мускариновым антагонистом длительного действия (LAMA) в качестве фоновой терапии (двойная или тройная терапия), при улучшении дыхательной функции по оценке форсированного объема после бронходилататора за 1 секунду (ОФВ1), в течение 24 недель.

Вторичные цели будут заключаться в оценке влияния SAR440340/REGN3500, дупилумаба и совместного введения обоих препаратов по сравнению с плацебо на частоту обострений ХОБЛ от средней до тяжелой степени (AECOPD) в течение 24 недель лечения.

Другой вторичной целью является оценка эффектов SAR440340/REGN3500, дупилумаба и совместного введения обоих препаратов, каждый из которых сравнивают с плацебо на: пре-бронходилататорный ОФВ1 в течение 24 недель; продолжительность от исходного уровня до первого умеренного или тяжелого события AECOPD более 24 недель; оценка клинических симптомов ХОБЛ; Безопасность и переносимость.

Критерии включения.

Критерии включения для исследования следующие: (1) пациенты с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) от средней до тяжелой степени (ХОБЛ) (объем после форсированного бронходилататора за одну секунду (ОФВ1), форсированная жизненная емкость (FVC) <70% и после бронходилататора ОФВ1% прогнозируется <80%, но $\geq 30\%$); (2) пациенты с оценочным тестом ХОБЛ (CAT) с баллом ≥ 10 при скрининговом визите 1 и визите 2/Рандомизация; (3) пациенты с зарегистрированными в анамнезе признаками и симптомами хронического бронхита (хронический продуктивный кашель в течение 3 месяцев в году до скрининга у пациента, у которого были другие причины хронического кашля (например, гастроэзофагеальный рефлюкс, хронический риносинусит, бронхоэктазия); (4) пациенты с документированной историей ≥ 2 умеренных обострений или ≥ 1 тяжелого обострения в течение года, предшествующего скринингу; (5) пациенты с фоновой терапией стандарта ухода за 3 месяца до визита 2/Рандомизации и стабильная доза по меньшей мере за 1 месяц до скринингового визита 1, в том числе либо: двойная терапия: β агонист длительного действия (LABA)+мускариновый антагонист длительного действия (LAMA) или ингаляционные кортикостероиды (ICS)+LABA или ICS+LAMA; или тройная терапия: ICS+LABA+LAMA; (6) подписанное письменное информированное соглашение и (7) действующие или бывшие курильщики с курением в ≥ 10 пачек/год.

Критерий исключения.

Критерии исключения для исследования следующие: (1) возраст ≤ 40 лет или > 75 лет; (2) пациенты с индексом массы тела (ИМТ) < 16 ; (3) пациенты с ХОБЛ диагностированным в течение 6 месяцев до рандомизации; (4) текущий диагноз астмы в соответствии с руководящими принципами Глобальной инициативы по астме (GINA); (5) значительное заболевание легких, отличное от ХОБЛ (например, фиброз легких, саркоидоз, интерстициальная болезнь легких, легочная гипертензия, бронхоэктазия, эозинофильный гранулематоз с полиангиитом, значительное апноэ во сне при двухуровневом положительном давлении в дыхательных путях и т.д.) или другое диагностированное легочное или системное заболевание, связанное с повышенным периферическим количеством эозинофилов; (6) диагностика дефицита α -1-анти-трипсина; (7) запущенная ХОБЛ с необходимостью хронической (> 15 ч/день) кислородной поддержки; (8) пациент с умеренным или тяжелым острым обострением ХОБЛ в течение 4 недель до скрининга; (9) пациент, который перенес инфекцию верхних или нижних дыхательных путей в течение 4 недель до скрининга/визита 1 или во время скрининга; (10) в анамнезе или планируемая пневмонэктомия или хирургическое уменьшение объема легких; (11) пациенты с историей системной реакции гиперчувствительности к биологическому препарату.

Пример 8. Оценка SAR440340/REGN3500 или дупилумаба при использовании отдельно и при комбинированной терапии у пациентов с астмой от средней до тяжелой степени.

Дизайн исследования.

Это исследование представляет собой рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование с параллельными группами с 12-недельным доказанием концепции (PoC) для оценки эффективности, безопасности и переносимости SAR440340/REGN3500, дупилумаба (также известен как DUPIXENT®), и совместного введения SAR440340 и дупилумаба у пациентов с астмой от средней до тяжелой степени, которая плохо контролируется ингаляционным кортикостероидом (ICS) плюс терапией β 2-адrenomергическим агонистом длительного действия (LABA).

В сумме восемьсот субъектов будут участвовать в этом исследовании. Исследование будет состоять из четырех групп, причем одна группа пациентов получала подкожно (п/к) только анти-ИЛ-33 моноклональное антитело (SAR440340/REGN3500); второй группе пациентов вводят подкожно только анти-ИЛ-4R моноклональное антитело (дупилумаб); третьей группе пациентов совместно вводят, как SAR440340/REGN3500, так и дупилумаб подкожно; и четвертой группе пациентов вводят плацебо.

Пациенты в группе 1 будут получать SAR440340/REGN3500 в виде 2 подкожных (п/к) инъекций каждые 2 недели в течение 12 недель и совместно будут вводить плацебо дупилумаба в виде 1 п/к инъекции каждые 2 недели в течение 12 недель; пациенты в группе 2 будут получать дупилумаб, вводимый в виде 1 п/к инъекции каждые 2 недели в течение 12 недель, и совместно будут вводить плацебо

SAR440340/REGN3500 в виде 2 п/к инъекций каждые 2 недели в течение 12 недель; пациенты в группе 3 будут получать SAR440340/REGN3500 в виде 2 п/к инъекций каждые 2 недели в течение 12 недель и совместно будут вводить дупилумаб в виде 1 п/к инъекции каждые 2 недели в течение 12 недель; пациенты в группе 4 будут получать совместно соответствующие плацебо для SAR440340/REGN3500 и дупилумаба, вводимых в виде 2 и 1 п/к инъекций соответственно, каждые 2 недели в течение 12 недель.

Цели исследования.

Основная цель исследования - оценить влияние SAR440340/REGN3500 с или без дупилумаба по сравнению с плацебо на снижение частоты случаев "потери контроля астмы" (LOAC).

Вторичные цели исследования будут заключаться в оценке влияния SAR440340/REGN3500 и совместного введения SAR440340/REGN3500 и дупилумаба по сравнению с плацебо на объем форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ1); оценить влияние совместного введения SAR440340/REGN3500 и дупилумаба по сравнению с SAR440340/REGN3500 по сравнению с дупилумабом на ОФВ1; оценить влияние одновременного введения SAR440340/REGN3500 и дупилумаба по сравнению только с SAR440340/REGN3500 и только с дупилумабом на снижение LOAC; и для оценки безопасности и переносимости только SAR440340/REGN3500 и при совместном введении с дупилумабом.

Критерии включения.

Критерии включения в исследование следующие: (1) взрослые пациенты (от 18 лет и старше) с диагнозом врача "астма" в течение не менее 12 месяцев, на основе рекомендаций Глобальной инициативы по астме (GINA) 2016 года, у которых астма частично контролируется или неконтролируема комбинированной терапией ICS/LABA по следующим критериям: существующее лечение ингаляционными кортикостероидами (ICS) от средней до высокой дозы (≥ 250 мкг флутиказона пропионата два раза в день (BID) или равнодействующей ICS суточной дозы максимум до 2000 мкг/день приема флутиказона пропионата или клинически сопоставимого) в сочетании с бета-агонистом длительного действия (LABA) в качестве второго регулятора в течение не менее 3 месяцев со стабильной дозой ≥ 1 месяц до визита 1; (2) объем форсированного выдоха перед бронходилататором за одну секунду (ОФВ1) $\geq 50\%$, но $\leq 85\%$ от прогнозируемой нормы на визите 2/исходный уровень; (3) обратимость не менее 12% и 200 мл при ОФВ1 после введения от 2 до 4 затяжек (200–400 мкг) альбутерола/сальбутамола или левальбутерола/левосальбутамола во время скрининга (до 3-х возможностей во время одного и того же визита допускаются при максимум 12 затяжек лекарств для снятия боли, если пациент переносит их); задокументированная история 20% изменения пре-бронходилататора ОФВ1 при сравнении 2 приемлемых спирометрических оценок в течение 6 месяцев до визита 1/скрининга, или положительной гиперреактивности дыхательных путей на метахолин в течение 12 месяцев до визита 1/скрининг считается приемлемым для соответствия этому критерию включения; (4) должно хотя бы раз в течение 1 года до визита 1 произойти одно из следующих событий: лечение системным стероидом (пероральным или парентеральным) для лечения обострения астмы или госпитализации или экстренной медицинской помощи при обострении астмы; (5) Подписано письменное информированное соглашение.

Критерий исключения.

Критерии исключения для исследования следующие: (1) пациенты в возрасте < 18 лет или > 70 лет (т.е. достигли возраста 71 года при осмотре); (2) пациенты с индексом массы тела (ИМТ) < 16 ; (3) хроническая болезнь легких (например, хроническая обструктивная болезнь легких [ХОБЛ] или идиопатический легочный фиброз [IPF]), которая может нарушать функцию легких; (4) история угрожающей жизни астмы (то есть, серьезное обострение, которое требует интубации); (5) сопутствующее заболевание, которое может помешать оценке IMP; (6) пациенты с любым из следующих событий в течение 4 недель до скринингового визита 1: лечение одним или более системными (пероральными и/или парентеральными) стероидными введениями при ухудшении астмы или госпитализации или экстренной медицинской помощи при ухудшении астмы; (7) опросник для контроля астмы, версия из 5 вопросов (ACQ-5), оценка $< 1,25$ или $> 3,0$ при B2/рандомизация. В течение скринингового периода приемлемо ACQ-5 до ≤ 4 ; (8) Антииммуноглобулиновая E (IgE) терапия (например, омализумаб [Xolair®]) в течение 130 дней до визита 1 или любая другая биологическая терапия (включая анти-ИЛ5 mAb) или системный иммунодепрессант (например, метотрексат) для лечения воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания (например, ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, первичный билиарный цирроз, системная красная волчанка, рассеянный склероз и т.д.) и другие заболевания в течение 2 месяцев или 5 периодов полураспада до визита 1, в зависимости от того, что дольше; (9) пациенты с историей системной реакции гиперчувствительности на биологический препарат; (10) пациенты, перенесшие или начавшие термопластику бронхов в течение 2 лет до Визита 1 или планирующие начать терапию в течение скринингового периода или рандомизированного периода лечения; (11) курильщик или прекращение курения в течение 6 месяцев до визита 1; (12) бывший курильщик с историей курения > 10 пачек в год.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения воспалительного заболевания или расстройства, причем способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, одной или более доз терапевтически эффективного количества антагониста интерлейкина-33 (ИЛ-33) в комбинации с одной или более дозами терапевтически эффективного количества антагониста рецептора интерлейкина-4 (ИЛ-4Р), причем воспалительное заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), астмы и сочетанного синдрома ХОБЛ (АСОС), хронического бронхита, эмфиземы, хронического риносинусита с назальными полипами или без них, гиперчувствительного пневмонита и аллергического ринита, и где антагонист ИЛ-33 представляет собой моноклональное антитело, содержащее три HCDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276-278-280, соответственно, и три LCDR (LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 284-286-288 соответственно, и антагонист ИЛ-4Р представляет собой моноклональное антитело, содержащее три HCDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 339-340-341, соответственно, и три LCDR (LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 342-343-344 соответственно.

2. Способ по п.1, где воспалительное заболевание или расстройство представляет собой астму.

3. Способ по п.2, где астма (i) усугубляется одним или более из следующих факторов: вирусным заболеванием, бактериальной инфекцией, воздействием аллергена, воздействием химического вещества или химических паров или воздействием раздражителя окружающей среды или загрязнением воздуха, или (ii) является эозинофильной астмой, неэозинофильной астмой, стероид-резистентной астмой или стероид-чувствительной астмой.

4. Способ по п.1, где воспалительное заболевание или расстройство представляет собой ХОБЛ.

5. Способ по п.4, где ХОБЛ (i) усугубляется одним или более из следующих факторов: астмой, вирусным заболеванием, бактериальной инфекцией, воздействием аллергена, воздействием химического вещества или химических паров, или воздействием раздражителя окружающей среды или загрязнением воздуха, или (ii) является результатом или частично усугубляется сигаретным дымом.

6. Способ по любому из пп.1-5, дополнительно включающий введение эффективного количества одного или более дополнительных терапевтических агентов, полезных для облегчения воспалительного заболевания или расстройства, где один или более дополнительных терапевтических агентов выбирают из группы, состоящей из нестероидного противовоспалительного средства (NSAID), кортикостероида, бронхиального дилататора, антигистаминного средства, антигистамина, эпинефрина, противоотечного средства, антагониста тимального стромального лимфопоэтина (TSLP), антагониста ИЛ-1, антагониста ИЛ-8, антагониста ИЛ-13, другого антагониста ИЛ-4, двойного антагониста ИЛ-4/ИЛ-13, двойного антагониста ИЛ-33/ИЛ-13, антагониста ИЛ-5, антагониста ИЛ-6, антагониста ИЛ-12/23, антагониста ИЛ-22, антагониста ИЛ-25, антагониста ИЛ-17, антагониста ИЛ-31, ингибитора ФНО, ингибитора IgE, ингибитора лейкотриена, перорального ингибитора PDE4, метилксантина, недокромилата натрия, кромолина натрия, длительно действующего бета 2-агониста (LABA), длительно действующего мускаринового антагониста (LAMA), ингаляционного кортикостероида (ICS) и другого антагониста ИЛ-33.

7. Способ лечения легочного фиброзного заболевания или расстройства, причем способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, одной или более доз терапевтически эффективного количества антагониста интерлейкина-33 (ИЛ-33) в комбинации с одной или более дозами терапевтически эффективного количества антагониста рецептора интерлейкина-4 (ИЛ-4Р), причем легочное фиброзное заболевание или расстройство выбирают из группы, состоящей из идиопатического легочного фиброза, фиброза, связанного с острым повреждением легких или острой респираторной недостаточностью, силикозом, радиационно-индуцированным фиброзом, блеомицин-индуцированным легочным фиброзом, асбестиндуцированным легочным фиброзом и синдромом облитерирующего бронхиолита, и где антагонист ИЛ-33 представляет собой моноклональное антитело, содержащее три HCDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276-278-280, соответственно, и три LCDR (LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 284-286-288 соответственно, и антагонист ИЛ-4Р представляет собой моноклональное антитело, содержащее три HCDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 339-340-341, соответственно, и три LCDR (LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 342-343-344 соответственно.

8. Способ предотвращения или уменьшения тяжести аллергического ответа в дыхательных путях или легких у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение одной или более доз терапевтически эффективного количества антагониста ИЛ-33 в комбинации с одной или более дозами терапевтически эффективного количества антагониста ИЛ-4Р, причем антагонист ИЛ-33 представляет собой моноклональное антитело, содержащее три HCDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 276-278-280, соответственно, и три LCDR (LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 284-286-288, соответственно, и

антагонист ИЛ-4R представляет собой моноклональное антитело, содержащее три HCDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 339-340-341, соответственно, и три LCDR (LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 342-343-344, соответственно.

9. Способ по любому из пп.1-8, где введение комбинации приводит к:

а) снижению частоты одного или более из следующих факторов: эозинофилы, активированные В-клетки, активированные CD8 Т-клетки или соотношение CD4/CD8 Т-клеток в образце ткани;

б) снижение одного или более из следующих: интерлейкин-1 бета (ИЛ-1 β), интерлейкин-4 (ИЛ-4), интерлейкин-5 (ИЛ-5), интерлейкин-6 (ИЛ-6), интерлейкин-13 (ИЛ-13), уровни белка-1 хемоаттрактанта моноцитов (MCP-1) или уровни фактора некроза опухоли альфа (ФНО α) в образце ткани; или

с) снижение уровня экспрессии гена одного или более из следующих: И4, И5, И6, И9, И13, И11r1, И13ra2, TNF, Tgfb1, Ccl2, Ccl11, Ccl24, Col15a1 и/или Col24a1 в образце ткани.

10. Способ по п.9, где образец ткани получают из легкого или цельной крови субъекта.

11. Способ по п.9 или 10, где введение комбинации приводит к:

а) снижению уровней сывороточного IgE;

б) уменьшению метаплазии бокаловидных клеток в легких;

с) улучшению консолидации легких; или

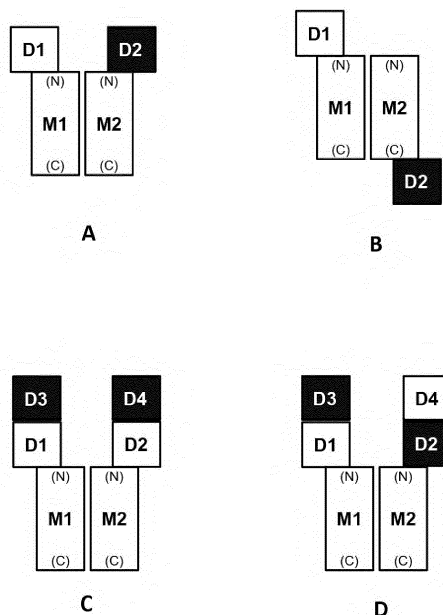
д) уменьшению субэпителиального фиброза в легких.

12. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что введение комбинации приводит к увеличению иммунного ответа типа 1 и/или снижению иммунного ответа типа 2.

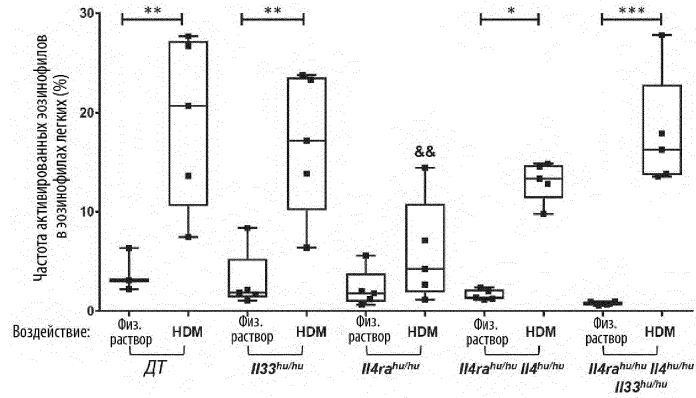
13. Способ по любому из пп.1-12, где антагонист ИЛ-33 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 282.

14. Способ по любому из пп.1-12, где антагонист ИЛ-4R содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 337, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 338.

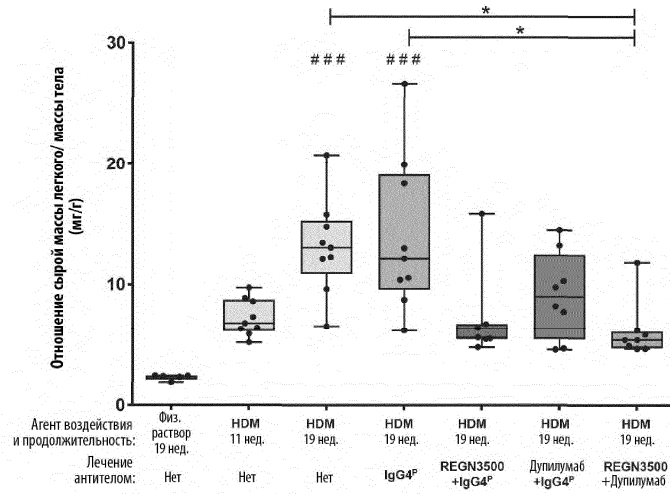
15. Способ по любому из пп.1-12, где антагонист ИЛ-33 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 282, и антагонист ИЛ-4R содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 337, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 338.



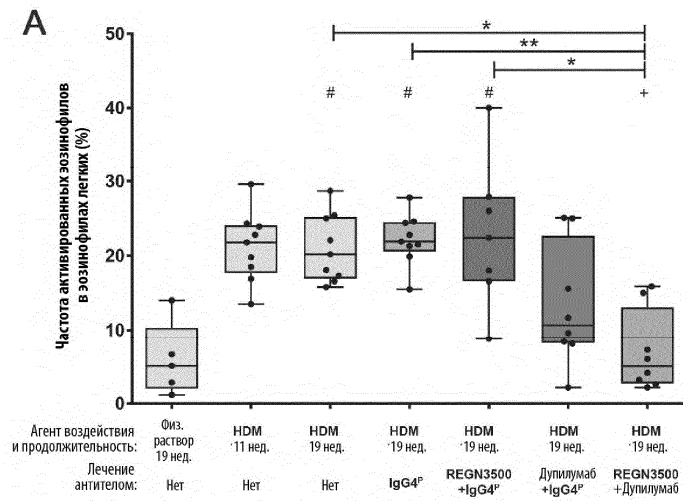
Фиг. 1



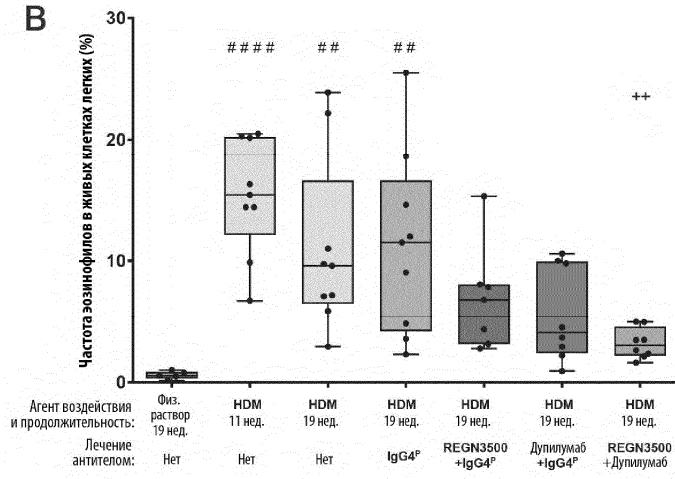
Фиг. 2



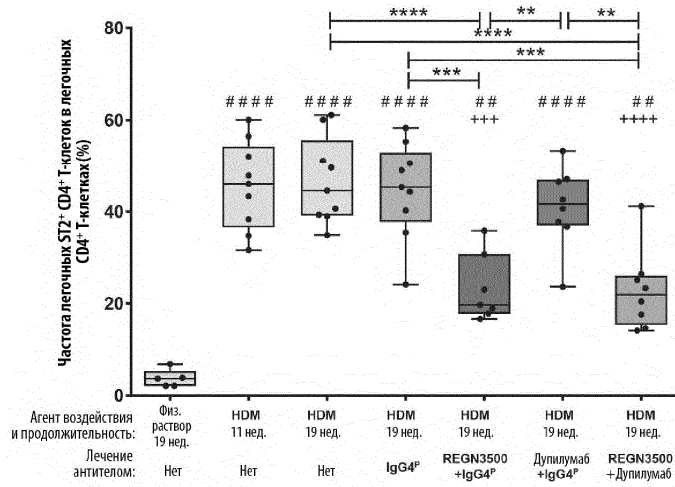
Фиг. 3



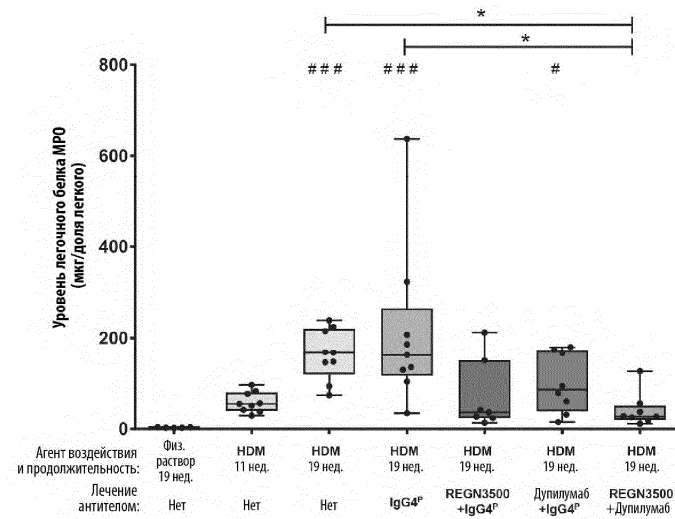
Фиг. 4А



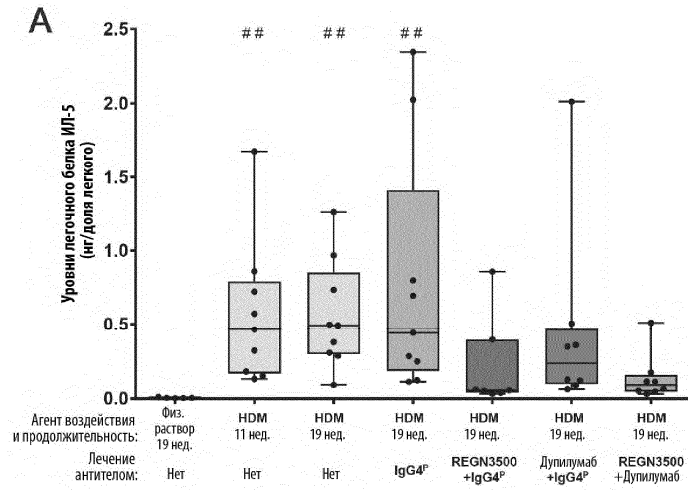
Фиг. 4В



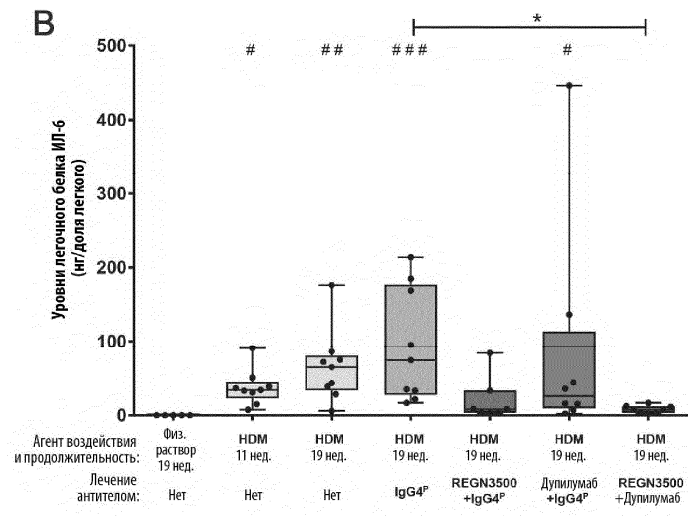
Фиг. 5



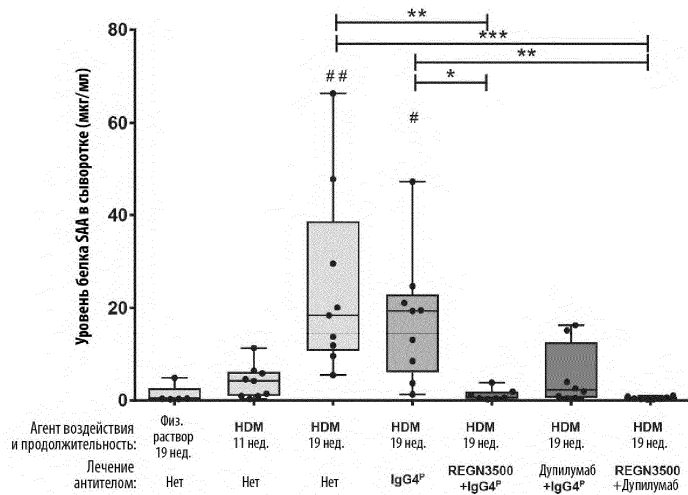
Фиг. 6



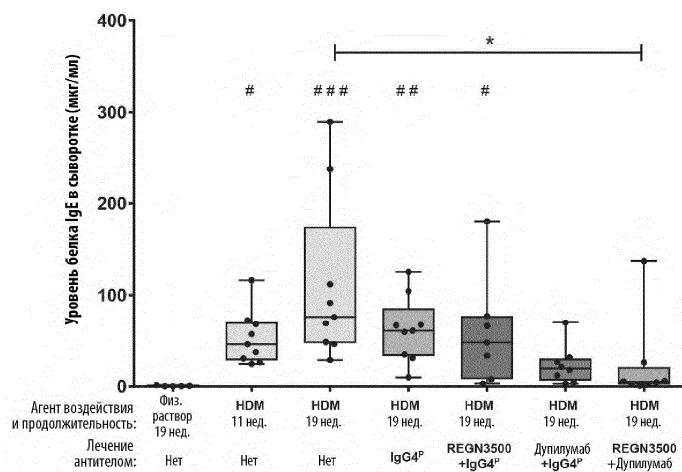
Фиг. 7А



Фиг. 7В



Фиг. 8



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2