

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

2 972 006

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

11 51498

⑤① Int Cl⁸ : **C 07 K 14/715** (2012.01), C 07 K 16/24, C 12 N 15/63,
5/10, 15/24, A 61 P 35/00, 31/00, 33/00, 29/00, 9/00, A 61 K 38/
20, G 01 N 33/68

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 24.02.11.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 31.08.12 Bulletin 12/35.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) — FR.

⑦② Inventeur(s) : GIRARD JEAN-PHILIPPE, CAYROL-
GIRARD CORINNE et LEFRANCAIS EMMA.

⑦③ Titulaire(s) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHER-
CHE SCIENTIFIQUE (CNRS).

⑦④ Mandataire(s) : CABINET REGIMBEAU.

⑤④ NOUVEAUX FRAGMENTS D'IL-33 SUPERACTIFS ET LEURS UTILISATIONS.

⑤⑦ La présente invention divulgue de nouveaux frag-
ments polypeptidiques actifs de l'IL-33 humaine correspon-
dant à des formes naturelles générées par les protéases
des neutrophiles humains (cathepsine G, elastase 2, protéi-
nase 3), ainsi que leur utilisation en tant que médicament,
notamment pour traiter les maladies infectieuses, les mala-
dies inflammatoires, l'athérosclérose, les maladies cardio-
vasculaires, l'obésité ou le cancer.

FR 2 972 006 - A1



Résumé de l'invention

5 La présente invention divulgue de nouveaux fragments polypeptidiques actifs de l'IL-33 humaine correspondant à des formes naturelles générées par les protéases des neutrophiles humains (cathepsine G, elastase 2, protéinase 3), ainsi que leur utilisation en tant que médicament, notamment pour traiter les maladies infectieuses, les maladies inflammatoires, l'athérosclérose, les maladies cardio-vasculaires, l'obésité ou le cancer.

10

Art antérieur

Les cytokines de la famille interleukine 1 (IL-1) jouent un rôle majeur dans un grand nombre de maladies auto-immunes, infectieuses et inflammatoires (Sims JE and Smith DE, *Nature Rev Immunology* 2010). L'interleukine 33 (IL-33), initialement
15 nommée NF-HEV, est une nouvelle cytokine de la famille IL-1 comportant 270 acides aminés (Figure 1, NP_254274, SEQ ID NO :1). C'est un facteur nucléaire fortement exprimé dans les cellules endothéliales cuboïdales (Bakkevold E. et al., *American Journal Pathology* 2003). L'IL-33 présente, dans sa partie carboxy-terminale, des homologues structuraux avec l'interleukine 1 (structure à 12 feuillets beta) (Lingel et al.,
20 *Structure* 2009) et se lie au récepteur orphelin ST2 (IL1-R4) (Chackerian AA et al., *Journal of Immunology* 2007). L'IL-33 est une protéine nucléaire associée à la chromatine (Carriere V. et al., *PNAS* 2007). Elle est exprimée de façon constitutive dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins de la plupart des tissus, ainsi que dans des cellules épithéliales de tissus exposés à l'environnement comme la peau, l'estomac,
25 les glandes salivaires ou les poumons (Moussion et al., *PLoS ONE* 2008).

Il est connu que l'IL-33 est libérée sous sa forme entière (IL-33_{aa1-270}), biologiquement active, en cas de dommage ou de nécrose cellulaires. L'IL-33 entière est en effet capable de se lier au récepteur ST2 (Cayrol and Girard, *PNAS* 2009) et d'activer les cellules cibles, notamment les cellules du système immunitaire : les lymphocytes
30 Th2, les mastocytes, les cellules tueuses NK et iNKT, les basophiles et les éosinophiles

(pour revue, voir Liew et al., *Nature Rev Immunology* 2010). L'activation du récepteur ST2 sur les cellules cibles induit, selon les cellules, la sécrétion de cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) et/ou de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ). De plus, plusieurs études récentes ont montré la capacité d'IL-33 à recruter des cellules du système immunitaire, comme les neutrophiles (Alves-Filho et al., *Nature Medicine* 2010) sur les sites inflammatoires ou infectieux. Selon ces résultats, l'IL-33 pourrait donc servir de signal de danger pour alerter le système immunitaire après une infection ou un traumatisme des cellules endothéliales ou épithéliales (Moussion et al., *PLoS ONE* 2008; Cayrol and Girard, *PNAS* 2009).

L'IL-33 a un effet protecteur dans certaines pathologies, tandis qu'elle est un facteur d'aggravation dans d'autres. Par exemple, l'IL-33 a un rôle protecteur dans des maladies infectieuses comme le sepsis (Alves-Filho et al., *Nature Medicine* 2010), la kératite à *Pseudomonas* (Hazlett et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010) ou l'infection par des nématodes (Humphreys et al., *Journal of Immunology* 2008). Ce rôle protecteur est également démontré dans l'athérosclérose (Miller et al., *J. Exp. Med* 2008), l'infarctus du myocarde (Seki et al., *Circ Heart Fail* 2009) l'inflammation des tissus adipeux en cas d'obésité (Miller et al., *Circ Res* 2010) et le cancer (WO2005/079844). Ces données suggèrent qu'IL-33 pourrait être utilisée comme agent thérapeutique pour ces pathologies. A l'opposé, il a été démontré qu'IL-33 exacerbe les effets physiopathologiques dans d'autres types de maladies comme la polyarthrite rhumatoïde (Xu et al., *Journal of Immunology* 2010), l'inflammation des voies aériennes de type allergiques comme l'asthme (Stolarski et al., *Journal of Immunology* 2010), la fibrose cutanée (Rankin et al., *J. immunol.* 2010) ou le choc anaphylactique (Pushparaj et al., *PNAS* 2008), faisant d'IL-33 une cible thérapeutique potentielle pour ces pathologies.

Ainsi, ces études ont montré, à la fois chez l'homme et dans des modèles animaux, que l'administration *in vivo* d'IL-33 pourrait favoriser la guérison de nombreuses maladies, en particulier des maladies inflammatoires chroniques, des maladies de type allergiques, des maladies cardio-vasculaires, des maladies infectieuses, le cancer et la maladie d'Alzheimer (pour revue voir Liew et al., *Nature Rev Immunology* 2010).

Il est à noter que les auteurs des différentes études mentionnées ci-dessus ont utilisé, pour leurs études *in vivo*, une forme tronquée artificielle de l'IL-33 (IL-33_{aa112-270}), qui contient le domaine de type « cytokine IL-1 » de l'IL-33 (acides aminés 112 à 270), et qui est dépourvue du domaine N-terminal de la protéine entière (acides aminés 1 à 111) (cf. figure 1A). La communauté scientifique a longtemps cru que cette forme tronquée IL-33_{aa112-270} pouvait être générée *in vivo*. En effet, il avait été suggéré qu'une forme IL-33_{aa112-270}, correspondant au domaine C-terminal de type « Cytokine IL-1 », pouvait être générée suite au clivage de l'IL-33 par la caspase 1 après le résidu Ser111 (Schmitz et al., *Immunity* 2005); il était alors acquis pour la communauté scientifique que la maturation d'IL-33 par la caspase 1 était possible, produisant la forme tronquée active (IL-33_{aa112-270}). Cependant, il a été récemment établi que le clivage par les caspases ne résulte pas en une activation mais en une inactivation de la protéine, car ces protéases clivent la protéine IL-33 dans le domaine de type cytokine IL-1, entre les 4^{ème} et 5^{ème} feuillets β , au niveau de la séquence DGVD (aa175-178). Le clivage de l'IL-33 par les caspases apoptotiques pourrait être un mécanisme sélectionné pour éliminer les activités pro-inflammatoires de l'IL-33 pendant l'apoptose, un processus qui n'entraîne pas d'inflammation *in vivo*. Résultat plus important encore, il a pu être démontré que la forme mature IL-33_{aa112-270}, utilisée dans de nombreuses études, n'était pas générée par l'action de la caspase 1 *in vitro* et donc, *a fortiori*, *in vivo*. Cette forme tronquée IL-33_{aa112-270} n'existe donc pas *in vivo* (Cayrol and Girard, *PNAS* 2009, Lüthi et al., *Immunity* 2009 ; Talabot-Ayer et al., *J. Biol. Chem.* 2009 ; Ali et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2010), et n'a donc jamais été rencontrée par le système immunitaire humain. Son utilisation en thérapie humaine pourrait donc poser des problèmes importants, d'immunogénicité en particulier. L'utilisation d'une forme naturelle d'IL-33 est préférable pour les applications en thérapie humaine. Cependant, il n'a, à ce jour, pas été possible d'exprimer la protéine IL-33 entière dans des quantités compatibles avec la tenue d'essais *in vivo*, et encore moins avec la production industrielle d'un médicament biothérapeutique.

Il convenait donc d'identifier une forme active de l'IL-33 humaine, qui i) soit active, au moins autant, voire plus active que la forme entière, ii) soit générée de façon naturelle (et donc *a priori* peu ou pas immunogène), et iii) puisse être produite à grande

échelle sous forme recombinante (par milligrammes voire par grammes), afin d'être utilisée comme traitement à moyen et long terme chez l'homme.

Or aucune protéase pouvant induire la maturation de l'IL-33 humaine, de façon naturelle, en une forme plus active que la forme entière n'avait été identifiée à ce jour.

5 Les présents inventeurs ont répondu à ce besoin, en démontrant que l'IL-33 entière est clivée de façon naturelle par trois protéases de neutrophiles, la cathepsine G, l'élastase et la protéinase 3 humaines. Ces protéases libèrent des fragments carboxy-terminaux de tailles supérieures à la forme tronquée artificielle IL-33_{aa112-270}, lesdits fragments ayant une activité biologique supérieure, tant *in vitro* qu'*in vivo*, à celle la
10 forme entière IL-33_{aa1-270}. A la différence de la forme IL-33_{aa1-270}, ces nouveaux fragments de l'IL-33 sont facilement exprimés dans les cellules bactériennes comme *E.Coli*. Ils ont l'avantage d'être obtenus de façon naturelle, et sont plus actifs *in vivo* que la forme tronquée artificielle de l'IL-33 utilisée jusqu'à présent (IL-33_{aa112-270}) (cf. exemple d) ci-dessous).

15 De par leurs propriétés, ces nouveaux fragments de l'IL-33 pourraient être produits dans les industries de biotechnologie afin d'être utilisés notamment en santé humaine (traitements de maladies humaines dans lesquelles l'IL-33 a un effet protecteur) ou pour la recherche scientifique.

20 Légendes des figures

La figure 1 A décrit la structure primaire de la protéine IL-33 humaine entière. Les domaines fonctionnels (liaison à la chromatine, cytokine IL-1) sont indiqués. La figure 1 B présente les sites de clivage par les protéases de neutrophile cathepsine G (Cat G), Elastase 2 (Elastase) et Protéase 3 (PR3) en amont du domaine C-terminal de
25 type « cytokine IL-1 » ainsi que les fragments libérés par l'action de ces protéases (fragments IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270}).

La figure 2 A présente les résultats des western-blots démontrant que l'interleukine IL-33 humaine entière est clivée *in vitro* par les protéases recombinantes Cathepsine G (Cat G), Elastase 2 (Elastase) et Protéase 3 (PR3), au contraire de la
30 forme tronquée IL-33_{aa112-270}, qui reste intacte en présence de ces protéases (Figure 2B).

La figure 2C présente les résultats démontrant que l'IL-33 humaine est le substrat de ces mêmes protéases humaines extraites directement de neutrophiles humains *ex vivo*. La figure 2D montre que les fragments IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270} ne sont pas libérés par les protéases de neutrophiles lorsque les sites de clivage correspondant sont mutés.

La figure 3 A présente l'analyse quantitative des protéines recombinantes IL-33_{aa1-270}, IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270} par western blot, tandis que la figure 3 B présente l'activité de ces différentes protéines *in vitro* sur la sécrétion d'IL-6 par des cellules mastocytaires MC/9.

La figure 4 présente les profils d'expression des trois fragments polypeptidiques de l'invention, IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270} obtenus par voie recombinante dans des cellules bactériennes (le vecteur utilisé est le vecteur pET15b et la souche d'*E. coli* est la souche BL21, pour plus de détails voir l'exemple c) ci-dessous). Plusieurs milligrammes de protéine recombinante purifiée ont été obtenus à partir d'un litre de culture d'*E. coli* (cf. tableau).

La figure 5 présente les résultats obtenus *in vivo* avec les fragments polypeptidiques de l'invention. Les rates de souris ayant reçu quotidiennement une injection de ces fragments pendant 7 jours ont été prélevées (A) et leur jejunum a été analysé par marquage PAS-alcian blue (B). Le nombre de granulocytes dans le sang a été mesuré au bout des 7 jours (C).

Description de l'invention

Le but de la présente invention était d'identifier un fragment actif de l'IL-33 humaine (au moins autant, voire plus actif que la forme entière, et préférentiellement au moins aussi actif que IL-33_{aa112-270}), qui corresponde à une forme naturelle (et donc *a priori* peu ou pas immunogène) et qui puisse être produit à grande échelle sous forme recombinante (de l'ordre du milligramme voire du gramme) et donc être utilisable pour des applications en santé (traitements à moyen et long terme chez l'homme) et en biotechnologie (recherche scientifique).

Les neutrophiles sont les premiers leucocytes circulants à migrer sur le site de l'inflammation et constituent la première ligne de défense contre les agents pathogènes. Outre leur rôle de phagocytes, il peuvent assurer une défense innée en relarguant des protéines granulaires, en particulier les protéases Cathepsine G, Elastase 2 ou Protéinase 3, dans le milieu extra-cellulaire.

Les présents inventeurs ont pu démontrer, pour la première fois, que l'action de la cathepsine G ou de la protéinase 3 des leucocytes libère les fragments polypeptidiques IL-33_{aa95-270} et IL-33_{aa109-270} du domaine N-terminal de l'IL-33 humaine. L'action de l'élastase 2 des neutrophiles ou de la protéase 3 libère quant à elles le fragment polypeptidique IL-33_{aa99-270} du domaine N-terminal de l'IL-33 humaine. Les sites de clivage de ces protéases ont pu être déterminés très précisément, mettant ainsi en évidence trois nouveaux fragments de l'IL-33, IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270}, qui n'avaient jamais été identifiés à ce jour (cf. figures 1B et 2). A l'inverse du fragment IL-33_{aa112-270} utilisé jusqu'à présent, ces fragments résultent du clivage naturel de l'IL-33 entière par les protéases des neutrophiles chez l'homme, et sont donc physiologiques.

De façon surprenante, ces fragments de l'IL-33 (IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270}) présentent *in vitro* et *in vivo* une activité biologique supérieure à la forme entière de l'IL-33 humaine et/ou à la forme tronquée IL-33_{aa112-270} utilisée jusqu'ici: en effet, ces trois nouveaux fragments d'IL-33 induisent *in vitro* la sécrétion de quatre fois plus d'IL-6 que la forme entière de l'IL-33 dans une lignée mastocytaire murine MC/9 (figure 3B) et une injection quotidienne de peptides à des souris pendant 7 jours entraîne une réaction inflammatoire se traduisant par un doublement du poids de la rate au bout de 7 jours, et une augmentation significative du nombre de granulocytes (majoritairement des neutrophiles) dans le sang des souris, par rapport à la forme tronquée IL-33_{aa112-270} (cf. exemple d) ci-dessous).

Enfin, contrairement à la forme entière de l'IL-33 humaine, ces fragments polypeptidiques de l'IL-33 (IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270}) sont aisément exprimés par les cellules classiquement utilisées pour la production de protéines recombinantes (cellules *E. coli* par exemple), et des taux de 9 mg par litre de culture cellulaire sont obtenus (voir exemple c) ci-dessous).

Dans un premier aspect, la présente invention concerne donc un fragment polypeptidique isolé de l'interleukine 33 humaine (hIL-33), biologiquement actif, choisi parmi les fragments ayant pour séquence les acides aminés 95 à 270 (SEQ ID NO :2), 99 à 270 (SEQ ID NO :3) ou 109 à 270 (SEQ ID NO :4) de l'interleukine 33 humaine (hIL-33), lesdits fragments étant des produits naturels de clivage de hIL-33 par au moins une protéase des neutrophiles humains.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, ladite protéase des neutrophiles humains est choisie dans le groupe constitué par : la cathepsine G, la protéinase 3 des leucocytes, et l'élastase 2 des neutrophiles.

Plus précisément, la présente invention vise le fragment polypeptidique IL-33_{aa95-270} ayant la séquence SEQ ID NO :2, qui est un produit naturel de clivage de hIL-33 par la Cathepsine G et la protéinase 3 des leucocytes, le fragment polypeptidique IL-33_{aa99-270} ayant la séquence SEQ ID NO :3, qui est un produit naturel de clivage de hIL-33 par la protéinase 3 des leucocytes et l'élastase 2 des neutrophiles, et enfin le fragment polypeptidique IL-33_{aa109-270} ayant la séquence SEQ ID NO :4, qui est un produit naturel de clivage de hIL-33 par la Cathepsine G et la protéinase 3 des leucocytes.

Ces trois fragments résultent donc du clivage de l'IL-33 humaine entière par des protéases naturellement présentes chez l'homme, et sont donc naturels. Ils peuvent être générés naturellement chez l'homme et ne sont donc pas *a priori* immunogènes. En d'autres termes, ces fragments peuvent être reconnus comme des antigènes du soi par le système immunitaire humain, et ne déclenchent donc pas, lorsqu'ils sont injectés chez des êtres humains, de réaction immunitaire visant à leur propre rejet. Ils sont donc tolérés par les individus dans lesquels ils sont injectés, à court, moyen et long terme (typiquement, pendant toute la durée de vie du patient). Il est rappelé ici que la non-immunogénicité du fragment polypeptidique de l'invention n'affaiblit en rien sa faculté à stimuler et à recruter les cellules du système immunitaire (lymphocytes Th2, mastocytes, NK et iNKT, basophiles et éosinophiles) de l'individu dans lequel il est injecté, à l'instar de l'interleukine IL-33 entière.

On entend par « cathepsine G » au sens de la présente invention une enzyme appartenant à la famille des protéases S1 (ou peptidases S1). Son activité enzymatique est de préférence caractérisée par le numéro EC 3.4.21.20. Elle est notamment capable de cliver des chimiokines comme CXCL5 (Nufer O. et al., *Biochemistry* 1999) ou des récepteurs membranaire comme PAR4 (Sambrano G.R. et al., *J. Biol. Chem.* 2000). Elle possède une triade catalytique (sérine, histidine et aspartate), caractéristique des protéases à sérine des mammifères. La compilation de différentes données a permis de définir des sites de clivage préférentiels (Burster T., et al *Molecular Immunology* 2010). De façon caractéristique, des résidus aromatiques (Phe, Tyr) ou chargés (Lys, Arg) sont souvent retrouvés en position P1 (position de l'acide aminé situé juste en amont de la liaison clivée) (Korkmaz, B. et al., *Pharmacological Reviews* 2010). Cette enzyme est retrouvée de préférence dans les granules azurophiles des leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles. Elle participe à la destruction et à la digestion des pathogènes présents dans les tissus conjonctifs ou aux sites d'inflammation (Kargi H.A. et al, *J. Histochem. Cytochem* 1990). Chez l'homme, elle est codée par le gène CTSG. Elle a de préférence la séquence décrite sous le numéro d'accèsion HUMCAPG J04990.1. De manière encore plus préférée, elle a la séquence SEQ ID NO :6. Les présents inventeurs ont pu démontrer, pour la première fois, que l'action de la cathepsine G de séquence SEQ ID NO :6 libère les fragments polypeptidiques IL-33_{aa95-270} et IL-33_{aa109-270} du domaine N-terminal de l'IL-33 humaine.

On entend par « protéinase 3 des leucocytes » au sens de la présente invention la myéloblastine, la protéinase 4 des neutrophiles, la protéine 7 des granules azurophiles, ou encore l'auto-antigène de la granulomatose de Wegener. Elle sera appelée « protéinase 3 » (PRTN3) dans le cadre de la présente demande. Son activité enzymatique est de préférence caractérisée par le numéro EC 3.4.21.76. Cette enzyme, appartenant également à la famille des protéases S1, est capable d'hydrolyser des protéines, et notamment l'élastine (Rao N.V. et al, *PNAS* 1991). Les substrats préférentiels de la PR3 possèdent, en position P1, des acides aminés hydrophobes (Val, Cys, Ala, Met, Leu, Ser) (Korkmaz et al., *Pharmacological Reviews* 2010) ou polaires (Asn, Cys, Glu, Gln, Ser, Thr, Trp, Tyr) (Hajjar E et al., *FEBS Letters* 2007). De préférence, la protéinase 3 utilisée dans l'invention est l'enzyme humaine, par exemple celle référencée sous le numéro d'accèsion NCBI NP_002768.3. De manière encore

plus préférée, la protéinase 3 utilisée dans l'invention a la séquence SEQ ID NO :7. Les présents inventeurs ont pu démontrer que l'action de la protéase 3 de séquence SEQ ID NO :7 sur l'IL-33 humaine libère les fragments polypeptidiques IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa109-270} et IL-33_{aa99-270}.

5 On entend par « élastase 2 des neutrophiles » au sens de la présente invention, la medullasine, ou encore l'élastase des leucocytes, est codée par le gène ELANE. Elle sera appelée « élastase 2 » dans le cadre de la présente demande. Son activité enzymatique est de préférence caractérisée par le numéro EC 3.4.21.37. Cette enzyme est capable de cliver l'élastine (Bieth J.G., *J. Soc. Biol.* 2001). Concernant les sites de
10 clivage spécifiques, on note une préférence de petits résidus hydrophobes en position P1 (Val, Cys, Ala, Met, Leu, Ser) (Korkmaz et al ., 2010 ; Hajjar E. et al., 2007). De préférence, l'élastase 2 utilisée dans la présente invention est l'enzyme humaine, par exemple la protéine référencée sous le numéro d'accèsion NCBI NP_001963.1. De manière encore plus préférée, l'élastase 2 de l'invention a pour séquence SEQ ID
15 NO :8. Les présents inventeurs ont pu démontrer, pour la première fois, que l'action de l'élastase 2 des neutrophiles sur l'IL-33 humaine libère le fragment polypeptidique IL-33_{aa99-270}.

Ces trois protéases (cathepsine G, protéinase 3 et élastase 2) font partie de la famille des « protéases à sérine de neutrophiles ». Dans un mode de réalisation
20 particulier, la cathepsine G ci-dessus mentionnée a la séquence SEQ ID NO :6, la protéinase 3 a la séquence SEQ ID NO :7, et l'élastase 2 a la séquence SEQ ID NO :8. Les homologues de ces protéases peuvent également être visées. On entend ici par « homologues » les protéases ayant une séquence identique à au moins 80 %, de préférence à 85 %, de préférence à 87 %, de préférence à 90 %, de préférence à 92 %, de
25 préférence à 95 %, de préférence à 98 % et de manière encore plus préférée à 99% aux SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :7 et SEQ ID NO :8 et conservant les activités enzymatiques des protéases élastase 2, protéinase 3 et cathepsine G correspondantes, telles que définies ci-dessus.

Au sens de la présente invention, le terme « interleukine 33 humaine » (IL-33) désigne une cytokine de la famille IL-1. Trois isoformes de l'IL-33 ont été identifiées chez l'homme : il s'agit de l'isoforme 1 (NP_254274), de l'isoforme 2 (NP_001186569), et de l'isoforme 3 (NP_001186570). L'IL-33 définie dans l'invention
5 est l'isoforme 1 de l'IL-33, comportant 270 acides aminés, et identifiée sous le numéro d'accèsion NP_254274. Dans un mode de réalisation plus particulier, l'IL-33 de l'invention a la séquence SEQ ID NO :1.

Le terme « fragment polypeptidique » désigne dans la présente invention un enchaînement d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques, comportant au moins
10 50 acides aminés, de préférence au moins 100 acides aminés et au plus 250 acides aminés, de préférence entre environ 150 acides aminés et 180 acides aminés, de manière encore plus préférée entre environ 160 acides aminés et 175 acides aminés.

Lorsqu'il est utilisé par la suite, le terme « les fragments polypeptidiques » désigne chacun des trois fragments polypeptidiques IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-
15 33_{aa109-270} tel que définis ci-avant.

Les fragments polypeptidiques de l'invention sont biologiquement actifs, c'est-à-dire qu'ils possèdent une activité biologique *in vitro* et/ou *in vivo*, par exemple sur l'activation et/ou le recrutement des cellules du système immunitaire.

De préférence, les fragments polypeptidiques de l'invention présentent au moins
20 une (voire plusieurs) activité(s) biologique(s) améliorée(s) par rapport à la forme entière IL-33 et/ou par rapport à la forme tronquée de l'IL-33 déjà connue ayant la séquence SEQ ID NO :5 (IL-33_{aa112-270}). Cette activité biologique améliorée peut être par exemple l'activation et/ou le recrutement des cellules du système immunitaire. Ainsi, dans un mode de réalisation particulier, chacun des fragments polypeptidiques de l'invention a
25 une activité de stimulation des cellules du système immunitaire augmentée par rapport à la forme entière de l'IL-33 humaine. Selon un autre mode de réalisation particulier, chacun des fragments polypeptidiques de l'invention a une activité de recrutement des cellules du système immunitaire augmentée par rapport à la forme tronquée de l'IL-33 humaine ayant la séquence SEQ ID NO :5 (IL-33_{aa112-270}). De préférence, lesdites
30 cellules du système immunitaire sont les lymphocytes Th2, les mastocytes, les mastocytes, les cellules tueuses NK et iNKT, les basophiles et les éosinophiles.

Les propriétés de stimulation des cellules du système immunitaire peuvent être notamment évaluées *in vitro*, par exemple en mettant l'un desdits fragments au contact de cellules du système immunitaire et en mesurant leur état de stimulation. Dans ce test, les cellules du système immunitaire sont de préférence des basophiles ou des cellules mastocytaires, dont l'état de stimulation peut être estimé par exemple en mesurant la quantité de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-18, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-13 ou le GM-CSF, qu'ils sécrètent (Reen D.J., *Methods Mol Biol.* 1994). La mesure de la quantité de cytokines sécrétées peut se faire par de nombreuses techniques bien connues de l'homme du métier, et notamment par la technique ELISA. Un exemple d'un tel test est présenté ci-dessous (cf. exemple b)).

Dans un mode de réalisation préféré, les fragments polypeptidiques de l'invention présentent une meilleure activité *in vitro* de stimulation des cellules du système immunitaire par rapport à l'interleukine 33 humaine (hIL-33) native, et sont capables de stimuler la sécrétion d'au moins une de ces cytokines avec un ratio (par exemple défini comme la quantité de cytokine sécrétée par desdites cellules en présence du fragment de l'invention / quantité de cytokine sécrétée par les mêmes cellules, en présence de l'IL-33 sous forme entière) de préférence d'au moins deux, de manière encore plus préférée d'au moins trois, et de manière préférée entre toutes d'au moins quatre, par rapport à la forme entière de l'IL-33 humaine de SEQ ID NO :1.

Il est également possible d'évaluer *in vitro* la liaison de ces fragments polypeptidiques au récepteur ST2, afin de vérifier que ce dernier est bien stimulé par ces fragments.

Par ailleurs, les propriétés de recrutement de cellules du système immunitaire peuvent être évaluées *in vivo*, en injectant un des fragments peptidiques d'IL-33 dans la cavité péritonéale pendant 6 à 7 jours et en analysant la cellularité (éosinophiles, neutrophiles, granulocytes) dans la rate ou le sérum. Des changements pathologiques peuvent également être observés au niveau des poumons (présence de mucus), du tractus digestif (hyperplasie de cellules épithéliales et cellules caliciformes) ou du plasma (concentration accrue de cytokines comme IL-4, IL-5) (Schmitz J. et al., *Immunity* 2005 ; Lüthi A. et al., *Immunity* 2009). Un tel exemple est décrit ci-dessous (cf. exemple d)).

Dans un mode de réalisation préféré, les fragments de l'invention présentent une meilleure activité *in vivo* de recrutement des cellules du système immunitaire par rapport à la forme tronquée de l'IL-33 ayant pour séquence les acides aminés 112 à 270 (SEQ ID NO :5). Plus précisément, les fragments de l'invention sont de préférence
5 capables d'induire une augmentation du poids de la rate et/ou d'augmenter la cellularité en granulocytes dans le sang des souris d'un facteur d'au moins 1,8, de manière encore plus préférée de 2, par rapport à l'injection d'un véhicule contrôle (PBS), et d'un facteur d'au moins 1,2, de manière encore plus préférée d'au moins 1,3, et de manière préférée entre toutes, d'au moins 1,4, par rapport à l'injection de la forme tronquée de l'IL-33 de
10 séquence SEQ ID NO :5 (IL-33_{aa112-270}).

Au sens de la présente invention, un processus biologique a lieu « *in vitro* » lorsqu'il survient en dehors d'un organisme animal ou humain, par exemple dans du matériel de laboratoire (tube, éprouvette, eppendorfs, etc.), donc de façon artificielle. De préférence, ce processus ne fait pas intervenir de cellule animale ou humaine. A
15 l'inverse, au sens de la présente invention, un processus biologique a lieu « *in vivo* » lorsqu'il survient dans un organisme humain ou animal. Au sens de la présente invention, un processus biologique est qualifié d'« *ex vivo* » lorsqu'il implique des cellules humaines ou animales vivantes qui sont cultivées en dehors de l'organisme dont elles sont issues (lignées cellulaires ou cellules primaires cultivées dans des matériels de
20 laboratoire).

Dans ce premier aspect, la présente invention vise également les homologues des fragments ayant pour séquence les acides aminés 95 à 270 (SEQ ID NO :2), 99 à 270 (SEQ ID NO :3) ou 109 à 270 (SEQ ID NO :4) de l'interleukine 33 humaine (hIL-33).

Les « homologues » ci-dessus visés sont des fragments polypeptidiques qui sont
25 « homologues » à ceux ayant pour séquence SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3 et SEQ ID NO :4. Le terme « homologue » désigne ici un polypeptide ayant une séquence identique à au moins 80 %, de préférence à 85%, de préférence à 87 %, de préférence à 90 %, de préférence à 92 %, de préférence à 95 %, de préférence à 97 %, de préférence à 98 % et de manière encore plus préférée à 99% aux SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3 et
30 SEQ ID NO :4 et ayant essentiellement la (ou les) même(s) activité(s) biologique(s) que celle(s) des fragments polypeptidiques correspondants.

Par « ayant essentiellement la (ou les) même(s) activité(s) biologique(s) » ou « conserve essentiellement la (ou les) même(s) activité(s) biologique(s) », il est entendu ici que au moins 90 %, voire au moins 95 % d'au moins une des activités biologiques du fragment polypeptidique de SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO :3 ou SEQ ID NO :4 est
5 conservée pour le fragment ayant une séquence identique à au moins 80 %, de préférence à 85%, et de manière encore plus préférée à 90%. Avantageusement, cette activité biologique est l'activation des cellules du système immunitaire et peut être mesurée *in vitro* par exemple comme décrit ci-dessus. Alternativement, cette activité biologique est le recrutement des cellules du système immunitaire et peut être mesurée
10 *in vivo* par exemple comme décrit ci-dessus. De manière encore plus préférée, les fragments polypeptidiques ayant une séquence identique à au moins 80 %, de préférence à 85%, et de manière encore plus préférée à 90% aux SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3 et SEQ ID NO :4 ont les mêmes capacités d'activation et de recrutement des cellules du système immunitaire que celles des fragments polypeptidiques
15 correspondants.

Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acide aminé au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement (alignement optimal), ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre
20 les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acide aminé sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison pouvant être réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison ». L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre
25 manuellement, au moyen de certains algorithmes d'homologie locale (algorithme de Smith et Waterman, de Neddleman et Wunsch ou de Pearson et Lipman), au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, ou encore par les logiciels de comparaison BLAST N ou BLAST P).

30 Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acide aminé est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale dans laquelle la séquence d'acide aminé à comparer peut comprendre des additions ou des délétions par rapport à

la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de
 5 comparaison et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Par exemple, on pourra utiliser le programme BLAST, « BLAST 2 sequences » (Tatusova et al., « Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences », *FEMS Microbiol.*, 1999) disponible sur le site
 10 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, les paramètres utilisés étant ceux donnés par défaut (en particulier pour les paramètres « open gap penaltie » : 5, et « extension gap penaltie » : 2 ; la matrice choisie étant par exemple la matrice « BLOSUM 62 » proposée par le programme), le pourcentage d'identité entre les deux séquences à comparer étant calculé directement par le programme.

15 Par « séquence d'acides aminés présentant au moins 80 %, de préférence 85%, de préférence 87 %, de préférence 90 %, de préférence 92 %, de préférence 95 %, de préférence 97 %, de préférence 98 % et de manière encore plus préférée 99% d'identité avec une séquence d'acides aminés de référence », on préfère celles présentant, par rapport à la séquence de référence, certaines modifications, en particulier une délétion,
 20 addition ou substitution d'au moins un acide aminé, une troncation ou un allongement, et qui conservent essentiellement la (ou les) même(s) activité(s) biologique(s) que celle(s) des polypeptides correspondants. Avantageusement, les activités d'activation et/ou de recrutement des cellules du système immunitaire sont essentiellement conservées.

25 Dans le cas d'une substitution, d'un ou plusieurs acide(s) aminé(s) consécutif(s) ou non consécutif(s), on préfère les substitutions dans lesquelles les acides aminés substitués sont remplacés par des acides aminés équivalents. L'expression « acides aminés équivalents » vise ici à désigner tout acide aminé susceptible d'être substitué à l'un des acides aminés de la structure de base sans cependant modifier essentiellement
 30 la ou les activités biologiques des fragments polypeptidiques correspondants. Avantageusement, l'activité d'activation et/ou le recrutement des cellules du système

immunitaire sont conservées. Ces acides aminés équivalents peuvent être déterminés soit en s'appuyant sur leur homologie de structure avec les acides aminés auxquels ils se substituent, soit sur des résultats d'essais comparatifs d'activité biologique susceptibles d'être effectués entre les différents fragments. Cette recherche de similitudes dans une

5 séquence polypeptidique prend en compte les substitutions conservatives qui sont des substitutions d'acides aminés de même classe, telles que des substitutions d'acides aminés aux chaînes latérales non chargées (tels que l'asparagine, la glutamine, la serine, la thréonine, et la tyrosine), d'acides aminés aux chaînes latérales basiques (tels que la lysine, l'arginine, et l'histidine), d'acides aminés aux chaînes latérales acides (tels que

10 l'acide aspartique et l'acide glutamique) ; d'acides aminés aux chaînes latérales apolaires (tels que la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane, et la cystéine) (Hausman RE et al (2004). D.C: ASM Press). L'homme du métier déterminera facilement les régions du fragment peptidique qui peuvent tolérer un changement par référence aux plots Hopp/Woods et

15 Kyte-Doolite, biens connus dans la technique.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, les fragments polypeptidiques peuvent être par ailleurs modifiés chimiquement ou enzymatiquement pour améliorer leur stabilité, leur biodisponibilité et/ou leur activité. Avantageusement, les activités d'activation et/ou de recrutement des cellules du système immunitaire sont

20 améliorées. L'homme du métier connaît de nombreuses techniques pour modifier chimiquement ou enzymatiquement des acides aminés (voir également David L. Nelson et Michael M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd edition, 2000).

De manière non limitative, on peut par exemple modifier un ou plusieurs acides aminés lysine (K) par :

- 25 - amidation : cette modification est simple à accomplir, la charge positive de la lysine étant substituée par des groupements hydrophobes (par exemple, acétyle ou phénylacétyle) ;
- amination : par formation d'amides secondaires à partir de l'amine primaire R = (CH₂)₄-NH₃⁺, par exemple en formant des groupements N- méthyle, N-allyle ou N-
- 30 benzyle ;

- ou encore par formation des groupements N-oxyde, N-nitroso, N- dialkyl phosphoryle, N-sulfényle, ou N-glycoside.

On peut par ailleurs aussi ou alternativement modifier un ou plusieurs acides aminés thréonine (T) et/ou sérine (S) des peptides, notamment en introduisant au niveau
 5 du groupe OH de la chaîne latérale de la thréonine et/ou de la sérine, un groupement ester ou éther. L'estérification, opération simple, peut être réalisée à l'aide d'un acide carboxylique, d'un anhydride, par pontages, etc, pour former par exemple des acétates ou des benzoates. L'éthérification, qui donne des composés plus stables, peut être effectuée à l'aide d'un alcool, d'un halogénure, etc, pour former par exemple un méthyl
 10 éther ou un O-glycoside. On peut par ailleurs aussi ou alternativement modifier un ou plusieurs acides aminés glutamine (Q) par exemple par amination, en formant des amines secondaires ou tertiaires, notamment avec des groupements de type méthyl, éthyl, fonctionnalisés ou non. On peut par ailleurs aussi ou alternativement modifier un ou plusieurs acides aminés glutamate (E) et/ou aspartate (D), par exemple :

- 15 - par estérification, pour former des méthyl esters substitués ou non, des éthyl esters, benzyl esters, des thiols (esters activés), etc,
- par amidation, notamment pour former des groupements N, N diméthyle, nitroanilides, pyrrolidinyles, etc.

En revanche, il est préférable de ne pas modifier les acides aminés proline, qui
 20 participent à la structure secondaire des peptides, sachant en outre que les acides aminés G, A et M n'offrent généralement pas de possibilités de modification qui seraient manifestement intéressantes.

Les fragments de l'IL-33 identifiés par les présents inventeurs (IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270}, et/ou leurs homologues), correspondant aux formes naturelles
 25 générées par les protéases des neutrophiles humains, peuvent être obtenues par génie génétique, en utilisant un système de production de protéine recombinante procaryote ou eucaryote, notamment en i) cultivant un microorganisme ou des cellules eucaryotes transformé(es) à l'aide d'une séquence nucléotidique codant ces différents fragments de l'IL-33 et ii) isolant les fragments de l'IL-33 produits par ledit microorganisme ou
 30 lesdites cellules eucaryotes. Cette technique est bien connue de l'homme du métier. Pour plus de détails la concernant, on pourra se référer à l'ouvrage ci-après : Recombinant

DNA Technology I, Editors Ales Prokop, Raskesh K Bajpai ; Annals of the New-York Academy of Sciences, Volume 646, 1991. Les fragments peptidiques d'IL-33 de l'invention sont de préférence purifiés / isolés à partir de lysats de cellules et/ou de surnageants de cellules par lesquelles elles sont exprimées et/ou sécrétées. Cette
5 purification peut se faire par tout moyen connu de l'homme du métier. De nombreuses techniques de purification sont décrites dans Voet D et Voet JG, Techniques de purification des protéines et des acides nucléiques, chapitre 6, Biochimie, 2nde édition.

Les systèmes de production de protéine recombinante utilisent des vecteurs nucléotidiques comprenant des acides nucléiques codant les polypeptides à synthétiser,
10 qui sont introduits dans des cellules hôtes qui produisent lesdits polypeptides (pour plus de détails, se référer à « Recombinant DNA Technology I », Editors Ales Prokop, Raskesh K Bajpai ; Annals of the New-York Academy of Sciences, Volume 646, 1991).

Dans un deuxième aspect, l'invention vise donc un acide nucléique isolé codant au moins l'un des fragments polypeptidiques selon l'invention, c'est-à-dire codant au
15 moins un polypeptide ayant une séquence choisie dans le groupe constitué en SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3 ou SEQ ID NO :4, ou leurs homologues. Le terme « homologues » désigne ici encore un polypeptide ayant une séquence identique à au moins 80 %, de préférence à 85%, de préférence à 87 %, de préférence à 90 %, de préférence à 92 %, de préférence à 95 %, de préférence à 97 %, de préférence à 98 % et
20 de manière encore plus préférée à 99% à l'une des séquences SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3 ou SEQ ID NO :4.

Dans un mode de réalisation préféré, un acide nucléique selon l'invention a entre 486 et 528 paires de bases. Plus préférentiellement, un acide nucléique de l'invention comprend une séquence choisie dans le groupe consistant en SEQ ID
25 NO :9, SEQ ID NO :10 ou SEQ ID NO :11.

Dans un troisième aspect, l'invention vise également un vecteur comprenant au moins un acide nucléique selon l'invention. Ce vecteur peut servir à la production des fragments polypeptidiques de l'invention (vecteurs de clonage et/ou d'expression qui contiennent l'acide nucléique selon l'invention) ou encore pour transporter ledit
30 fragment *in vivo* à des fins de thérapie génique.

De nombreux vecteurs dans lesquels on peut insérer une molécule d'acide nucléique d'intérêt afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte eucaryote ou procaryote, sont connus; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple répllication de la séquence d'intérêt, expression
5 de cette séquence, maintien de cette séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte), ainsi que de la nature de la cellule hôte (par exemple, les plasmides sont de préférence introduits dans des cellules bactériennes, tandis que les YACs sont de préférence utilisés dans des levures). Ces vecteurs d'expression peuvent être des plasmides, des YACs, des cosmides, des
10 rétrovirus, des épisomes dérivés d'EBV, et tous les vecteurs que l'homme du métier peut juger appropriés à l'expression desdites chaînes. Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le vecteur utilisé pour coder le fragment polypeptidique de l'invention est le vecteur pcDNA3.1 (+) de SEQ ID NO :14 (Invitrogen) pour les études *in vitro* et les vecteurs pET (Novagen) pour les productions à grande échelle chez la bactérie.

15 Les vecteurs selon l'invention comprennent l'acide nucléique codant au moins l'un des fragments polypeptidiques de l'invention, ou une séquence similaire, ainsi que les moyens nécessaires à son expression. On entend par « moyen nécessaire à l'expression d'un peptide », le terme peptide étant utilisé pour toute molécule peptidique, telle que protéine, polyprotéine, polypeptide, etc., tout moyen qui permet d'obtenir le
20 peptide, tel que notamment un promoteur, un terminateur de transcription, une origine de répllication et de préférence un marqueur de sélection. Les moyens nécessaires à l'expression d'un peptide sont liés de façon opérationnelle à la séquence d'acide nucléique codant pour le fragment polypeptidique de l'invention. Par « liés de façon opérationnelle », on entend une juxtaposition desdits éléments nécessaires à l'expression
25 et du gène codant pour le fragment polypeptidique de l'invention, lesquels sont en une relation telle que cela leur permet de fonctionner de façon attendue. Par exemple, il peut exister des bases supplémentaires entre le promoteur et le gène codant le fragment polypeptidique de l'invention tant que leur relation fonctionnelle est préservée. Les moyens nécessaires à l'expression d'un peptide peuvent être des moyens homologues,
30 c'est-à-dire naturellement compris dans le génome du vecteur utilisé, ou bien être hétérologues, c'est-à-dire rajouté de façon artificielle à partir d'un autre vecteur et/ou organisme. Dans ce dernier cas, lesdits moyens sont clonés avec le fragment

polypeptidique à exprimer. Des exemples de promoteurs hétérologues comprennent (i) les promoteurs viraux tels que le promoteur SV40 (Virus simien 40), le promoteur du gène de la thymidine-kinase du virus simplex de l'Herpès (TK-HSV-1), le LTR du virus du sarcome de Rous (RSV), le promoteur premier immédiat du cytomégolovirus (CMV) et le promoteur dernier majeur adénoviral (MLP), ainsi que (ii) tout promoteur cellulaire qui contrôle la transcription des gènes codant pour des peptides chez des eucaryotes supérieurs, tel que le promoteur du gène de phosphoglycérate-kinase (PGK) constitutif (Adra et al., *Gene* 1987), le promoteur des gènes spécifiques du foie alphas-1-antitrypsine et FIX et le promoteur SM22 spécifique des cellules du muscle lisse (Moessler et al., *Development* 1996). Les méthodes de suppression et d'insertion de séquences d'ADN dans des vecteurs d'expression sont largement connues de l'homme du métier et consistent notamment en des étapes de digestion enzymatique et ligature. Les vecteurs de l'invention peuvent également comprendre des séquences nécessaires au ciblage des peptides vers des compartiments cellulaires particuliers. Un exemple de ciblage peut être le ciblage vers le réticulum endoplasmique obtenu en utilisant des séquences d'adressage du type de la séquence leader issue de la protéine E3 de l'adénovirus (Ciernik I. F., et al., *The Journal of Immunology*, 1999).

Le terme « terminateur de transcription » désigne ici une séquence du génome qui marque la fin de la transcription d'un gène ou d'un opéron, en ARN messager. Le mécanisme de terminaison de la transcription est différent chez les procaryotes et chez les eucaryotes. L'homme du métier connaît les signaux à utiliser en fonction des différents types cellulaires. Par exemple, si la cellule dans laquelle le vecteur va être introduit est une bactérie, il utilisera un terminateur Rho-indépendant (séquence répétée inversée suivie d'une série de T (uraciles sur l'ARN transcrit) ou un terminateur Rho-dépendant (constitués d'une séquence consensus reconnue par la protéine Rho).

Le terme « origine de répllication » (aussi appelée ori) est une séquence unique d'ADN permettant l'initiation de la répllication. C'est à partir de cette séquence que débute une répllication unidirectionnelle ou bidirectionnelle. L'homme du métier sait que la structure de l'origine de répllication varie d'une espèce à l'autre ; elle est donc spécifique bien qu'elles aient toutes certaines caractéristiques. Un complexe protéique se forme au niveau de cette séquence et permet l'ouverture de l'ADN et le démarrage de la répllication.

Les marqueurs de sélection sont bien connus de l'homme du métier. De manière préférée, il s'agit d'un gène codant une protéine conférant une résistance à un antibiotique.

Les vecteurs de l'invention, comprenant le ou les acide(s) nucléique(s) d'intérêt
5 de l'invention, sont préparés par des méthodes couramment utilisées par l'homme du métier. Les clones résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standards connues de l'homme du métier pour introduire des polynucléotides dans une cellule hôte. De telles méthodes peuvent être la transformation à l'aide de dextrane, la précipitation par du phosphate de calcium, la transfection à l'aide de
10 polybrène, la fusion de protoplastes, l'électroporation, l'encapsulation des polynucléotides dans liposomes, l'injection biolistique et la micro-injection directe d'ADN dans le noyau. On peut également associer ladite séquence (isolée ou insérée dans un vecteur plasmidique) avec une substance lui permettant de franchir la membrane des cellules hôtes, telle qu'un transporteur comme un nanotransporteur ou
15 une préparation de liposomes, ou de polymères cationiques. En outre, on peut avantageusement combiner ces méthodes, par exemple en utilisant l'électroporation associée à des liposomes.

Dans un quatrième aspect, la présente invention concerne un microorganisme ou une cellule hôte eucaryote transformée de manière transitoire ou stable par – ou
20 comprenant - l'un au moins des acides nucléiques de l'invention ou par l'un des vecteur de l'invention.

A titre d'exemples de microorganisme qui conviennent aux fins de l'invention, on peut citer les levures (Buckholz RG, *Current Opinion in Biotechnology* 1993) et les bactéries (Olins et Lee, *Current Opinion in Biotechnology* 1993). A titre d'exemples de
25 cellules eucaryotes, on peut citer les cellules provenant d'animaux tels que les mammifères (Edwards CP et Aruffo A, *Current Opinion in Biotechnology* 1993), les reptiles, et équivalent. On peut également utiliser les cellules de plantes. Parmi les cellules de mammifère, on peut notamment utiliser les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO), du singe (cellules COS et Vero), du rein de hamster nain (cellules
30 BHK), du rein de cochon (cellules PK 15) et du rein de lapin (cellules RK13, les lignées cellulaires humaines de l'ostéosarcome (cellules 143 B), les lignées cellulaires humaines

HeLa et les lignées cellulaires humaines de l'hépatome (du type cellules Hep G2). Il est également possible d'utiliser des cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant en œuvre des baculovirus par exemple (Luckow VA, *Journal of Virology* 1993). Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la cellule hôte
5 utilisée pour produire le fragment de l'invention est une bactérie, de préférence la bactérie BL21.

L'homme du métier connaît les conditions dans lesquelles cultiver ces cellules, ainsi que les conditions expérimentales nécessaires à l'expression des fragments polypeptidiques par ces cellules.

10 Sous un autre aspect, l'invention a également pour objet un procédé de production d'un fragment polypeptidique recombinant selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la culture dans un milieu et conditions de culture appropriés d'une cellule hôte selon l'invention ; et
- 15 b) l'isolement du fragment polypeptidique selon l'invention produit à l'étape a).

Le fragment peut être isolé (purifié) à partir de la cellule exprimant ledit fragment. Dans ce cas, une étape préalable de lyse desdites cellules pourra être nécessaire.

Les milieux et conditions de culture associées à chaque type cellulaire utilisé
20 pour la production de protéines recombinantes sont bien connus de l'homme du métier.

L'isolement (ou la purification) du fragment polypeptidique de l'invention peut se faire par tout moyen connu de l'homme du métier. On citera par exemple la précipitation différentielle ou l'ultracentrifugation. Il peut être également avantageux de purifier les fragments d'intérêt par chromatographie d'échange ionique, par
25 chromatographie d'affinité, par tamisage moléculaire, ou par isofocalisation. Toutes ces techniques sont décrites dans Voet D et Voet JG, Techniques de purification des protéines et des acides nucléiques, chapitre 6, *Biochimie*, 2^{de} édition.

Plus précisément, dans une première étape, le matériel d'où on veut extraire la protéine (tissu animal, partie de plantes, bactéries, etc) est généralement broyé. Divers appareils ("Waring Blender", appareil Potter-Eveljhem, "Polytron", etc.) peuvent être employés à cette fin. Cette homogénéisation se fait dans un tampon de composition appropriée, bien connue de l'homme du métier. L'homogénat ainsi obtenu est ensuite clarifié, le plus souvent par centrifugation, pour éliminer les grosses particules peu ou mal broyées ou encore pour obtenir la fraction cellulaire contenant la protéine recherchée. Si la protéine est justement dans un compartiment cellulaire, on utilise généralement un détergent doux (Triton, Tween, etc., quelquefois déoxycholate) pour la libérer en dissolvant les membranes de ce compartiment. L'emploi de détergent doit souvent être fait de façon contrôlée car ils peuvent briser les lysosomes, ce qui libère des enzymes hydrolytiques (protéases, nucléases, etc.) qui peuvent attaquer et détruire les protéines ou autres molécules qu'on veut isoler. Des précautions particulières doivent être prises si on travaille avec des protéines sensibles à la dégradation ou peu nombreuses. Une solution fréquente à ce problème est l'inclusion dans les solutions d'inhibiteurs de protéases qui sont soit physiologiques (inhibiteur de trypsine, antipainé. leupeptine...) ou artificiels (E64, PMSF...). Ensuite diverses techniques existent pour isoler la protéine recherchée. Une des méthodes se prêtant le mieux à de gros volumes est la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium. Les chromatographies d'échange ionique ou les chromatographies d'affinité, applicables à de bons volumes d'échantillon mais ayant un assez bon pouvoir de séparation, constituent de bonnes méthodes intermédiaires. Pour finaliser la purification, le tamisage moléculaire ou l'isofocalisation sont souvent utilisés. Ces techniques permettent de raffiner la pureté, mais nécessitent de très petits volumes de protéines concentrées. Il est souvent avantageux, entre ces étapes, d'éliminer les sels ou produits utilisés dans ces chromatographies. Ceci peut être obtenu par dialyse ou par ultrafiltration.

Il peut être avantageux d'utiliser un vecteur selon l'invention portant une séquence permettant d'identifier les fragments polypeptidiques de l'invention. De plus, il peut être avantageux de faciliter la sécrétion dans un système procaryote ou eucaryote. En effet, dans ce cas, les fragments recombinants d'intérêt seront présents dans le surnageant de la culture cellulaire plutôt qu'à l'intérieur des cellules hôtes.

Ainsi, en utilisant l'une ou l'autre de ces techniques, et contrairement à la forme entière de l'IL-33 humaine, les fragments polypeptidiques de l'IL-33 identifiés par les présents Inventeurs (IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270}) peuvent être produits par les cellules recombinantes de l'invention en de grandes quantités (cf. exemple c) ci-
5 dessous). Plus précisément, les fragments de l'invention peuvent être produits à des taux atteignant au moins 1mg par litre, de préférence 2 mg par litre, de manière encore plus préférée, 5mg par litre de culture cellulaire.

De manière alternative, il est possible de préparer les fragments polypeptidiques selon l'invention par synthèse chimique. Un tel procédé de préparation est également un
10 objet de l'invention. L'homme du métier connaît les procédés de synthèse chimique, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides ou des techniques utilisant des phases solides partielles, par condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique. Les fragments de l'invention peuvent par exemple être synthétisés
15 par les techniques de la chimie de synthèse, telles que la synthèse de type Merrifield qui est avantageuse pour des raisons de pureté, de spécificité antigénique, d'absence de produits secondaires non désirés et pour sa facilité de production. Cette synthèse chimique peut être couplée à une approche de génie génétique ou par génie génétique seul en utilisant les techniques bien connues de l'homme du métier et décrites par
20 exemple dans Sambrook J. et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 1989. Les réactifs et produits de départ sont commercialement disponibles, ou peuvent être synthétisés par des techniques conventionnelles bien connues (voir par exemple, WO 00/12508, WO 2005/085260).

Les nouveaux fragments de l'IL-33 identifiés par les présents inventeurs présentent *in vitro* et *in vivo* une activité biologique supérieure à la forme entière de
25 l'IL-33 humaine et/ou à la forme tronquée IL-33_{aa112-270} utilisée jusqu'ici.

Ces fragments peuvent être avantageusement utilisés en tant qu'agonistes *in vitro* des récepteurs ST2 ou de tout autre récepteur se liant à l'IL-33 humaine. Dans un autre aspect, l'invention vise également les fragments de l'invention pour leur utilisation en tant qu'agonistes *in vivo* des récepteurs ST2 ou de tout autre récepteur se
30 liant à l'IL-33 humaine. Par « récepteur ST2 » on entend de préférence la protéine de séquence SEQ ID NO : 12 (isoforme 1, NP_057316.3) ou SEQ ID NO : 13 (isoforme 2,

NP_003847.2), autrement appelée « T1 », « DER4 », « IL1R1 », « FIT-1 », « MGC32623 » ou encore « IL33R ».

Les fragments de l'invention sont capables de stimuler efficacement la sécrétion d'IL-6 par des cellules mastocytaires *in vitro*, et de recruter *in vivo* les cellules de
5 système immunitaire (augmentation du poids de la rate et du nombre de granulocytes dans le sang des souris). Elles peuvent donc avoir *in vivo* une activité thérapeutique significative, notamment contre les maladies réagissant positivement à l'administration de l'IL-33 humaine native.

Dans un autre aspect, la présente invention vise donc une composition
10 pharmaceutique comprenant l'un au moins des fragments polypeptidiques isolés de l'invention, ou l'un au moins des acides nucléiques codant les fragments polypeptidiques de l'invention. Dans le cas où la composition comprend le fragment polypeptidique de l'invention, ledit fragment peut être obtenu par voie recombinante, ou encore par voie de synthèse chimique.

15 De préférence, ladite composition sera additionnée d'un excipient et/ou d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Dans la présente description, on entend désigner par véhicule pharmaceutiquement acceptable, un composé ou une combinaison de composés entrant dans une composition pharmaceutique ne provoquant pas de réactions secondaires et qui permet par exemple la facilitation de l'administration du ou
20 des composés actifs, l'augmentation de sa durée de vie et/ou de son efficacité dans l'organisme, l'augmentation de sa solubilité en solution ou encore l'amélioration de sa conservation. Ces véhicules pharmaceutiquement acceptables sont bien connus et seront adaptés par l'homme de l'art en fonction de la nature et du mode d'administration du ou des composés actifs choisis.

25 De préférence, ces composés seront administrés par voie systémique, en particulier par voie intraveineuse, par voie intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale ou sous-cutanée, par voie orale, ou par voie topique (au moyen de gel, aérosols, gouttes, etc.). De manière plus préférée, la composition pharmaceutique de l'invention sera administrée à plusieurs reprises, de manière étalée dans le temps. Son
30 mode d'administration, sa posologie et sa forme galénique optimale peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un

traitement adapté à un patient comme par exemple l'âge ou le poids corporel du patient, la gravité de son état général, la tolérance au traitement et les effets secondaires constatés.

Dans un autre aspect, l'invention concerne également les fragments
5 polypeptidiques de l'invention, pour leur utilisation en tant que médicament.

Plus précisément, l'invention vise chacun des fragments polypeptidiques de l'invention, pour leur utilisation en tant que médicament permettant de traiter les maladies qui réagissent positivement à l'administration de l'IL-33 humaine native, comme par exemple les maladies infectieuses comme le sepsis, les kératites dues à
10 Pseudomonas, la tuberculose ou les infections dues à un nématode ou au virus de l'influenza, l'athérosclérose, les maladies cardio-vasculaires telles que l'infarctus du myocarde, le cancer ou bien encore l'inflammation des tissus adipeux en cas d'obésité. En d'autres termes, l'invention concerne l'utilisation d'au moins un des fragments polypeptidiques de l'invention, pour la fabrication d'un médicament destiné à traiter les
15 maladies infectieuses comme le sepsis, les kératites dues à Pseudomonas, la tuberculose ou les infections dues à un nématode ou au virus de l'influenza, l'athérosclérose, les maladies cardio-vasculaires telles que l'infarctus du myocarde, le cancer ou bien encore l'inflammation des tissus adipeux en cas d'obésité.

Les maladies cardiovasculaires visées par la présente invention sont par exemple
20 les maladies des coronaires, les maladies du muscle cardiaque, les maladies des valves cardiaques, la maladie du péricarde, les maladies du rythme ou de la conduction cardiaque, les maladies des vaisseaux ou autres. Les maladies des coronaires visées sont par exemple l'angine de poitrine ou l'infarctus du myocarde. Les maladies du muscle cardiaque visées par l'invention sont par exemple la cardiomyopathie ou l'insuffisance
25 cardiaque. Les maladies des valves cardiaques visées sont par exemple l'endocardite, ou les valvulopathies cardiaques. Par « maladie du péricarde », on entend communément la péricardite. Les maladies du rythme ou de la conduction cardiaque sont par exemple la syncope d'origine cardiovasculaire, les troubles de la conduction cardiaque, ou les troubles du rythme cardiaque. Les maladies des vaisseaux visées sont par exemple
30 l'anévrisme, l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs, la dissection aortique aiguë, l'hypertension artérielle pulmonaire, ou la maladie thrombo-embolique. Les

autres maladies visées par l'invention sont par exemple l'arrêt cardio-circulatoire, la cardiopathie congénitale, l'hypertension artérielle, l'hypotension artérielle, ou le syndrome d'Adams-Stokes.

Parmi les cancers qui peuvent être prévenus et/ou traités par le(s) fragment(s)
5 polypeptidique(s) de l'invention, sont particulièrement visés le cancer de la prostate, les ostéosarcomes, le cancer du poumon, le cancer du sein, le cancer de l'endomètre, le cancer du côlon, le myélome multiple ou le cancer des ovaires, le cancer du pancréas, le mélanome ou tout autre cancer.

La présente invention vise également une méthode de traitement comprenant
10 l'administration à un patient d'une composition pharmaceutique comprenant une quantité efficace de l'un des fragments polypeptidiques de l'invention ou un des acides nucléiques de l'invention codant pour celui-ci. De préférence cette méthode de traitement permet de prévenir et ou traiter les maladies infectieuses comme le sepsis, la kératite dues à *Pseudomonas*, la tuberculose ou les infections dues à un nématode ou au
15 virus de l'influenza, l'athérosclérose, les maladies cardio-vasculaires, le cancer, ou bien encore l'inflammation des tissus adipeux en cas d'obésité, chez les patients qui en souffrent.

La présente invention vise donc en particulier une composition pharmaceutique comprenant l'acide nucléique de l'invention ou le vecteur nucléotidique de l'invention.
20 Cette composition pharmaceutique peut donc être utilisée à des fins de thérapie génique.

A cette fin, la présente invention vise également les cellules de mammifères, y compris les cellules humaines, de préférence non-embryonnaires, comprenant l'un des vecteurs ou l'un des acides nucléiques de l'invention. Dans le cadre de la présente invention, le principe de la thérapie génique est d'administrer à un patient un acide
25 nucléique qui code le ou les fragments polypeptidiques d'intérêt de l'invention, dans des conditions telles qu'ils sont exprimés *in vivo* par les cellules du patient dans lesquelles l'acide nucléique a été transféré.

Un tel acide nucléique peut être notamment sous la forme d'un vecteur d'ADN, par exemple un vecteur plasmidique. On peut administrer un ou plusieurs vecteurs,
30 chaque vecteur pouvant porter une ou plusieurs séquence (s) codant pour au moins un des fragments polypeptidiques d'intérêt. Le ou les vecteurs d'ADN peuvent être

introduits *in vivo* par toute technique connue de l'homme du métier. En particulier, il est possible d'introduire le vecteur d'ADN *in vivo* sous une forme nue, c'est-à-dire sans l'aide d'un quelconque véhicule ou système qui faciliterait la transfection du vecteur dans les cellules (EP 465 529). Un « canon à gènes » peut être également employé, par exemple en déposant l'ADN à la surface de particules « en or » et en projetant celles-ci de manière à ce que l'ADN pénètre à travers la peau d'un patient. Des injections au moyen d'un gel liquide sont également possibles pour transfecter à la fois peau, muscle, tissu gras et tissu mammaire (Furth et al., *Anal Biochem* 1992). Des techniques de microinjection, électroporation, précipitation au phosphate de calcium, formulations à l'aide de nanocapsules ou de liposomes sont d'autres techniques disponibles. Des nanoparticules en polyalkyl cyanoacrylate biodégradables sont particulièrement avantageuses. Dans le cas de liposomes, l'utilisation de lipides cationiques favorise l'encapsulation des acides nucléiques qui sont chargés négativement, et facilite la fusion avec les membranes cellulaires chargées négativement. De manière alternative, le vecteur peut être sous la forme d'un virus recombinant comprenant, insérée dans son génome, une séquence d'acide nucléique qui code pour le ou lesdits peptide (s). Le vecteur viral peut être de préférence choisi parmi un adénovirus, un rétrovirus, en particulier un lentivirus, ainsi qu'un virus adéno-associé (AAV), un virus de l'herpès, un cytomégalovirus (CMV), un virus de la vaccine, etc. De manière avantageuse, le virus recombinant est un virus défectif.

Le terme « virus défectif » désigne un virus incapable de se répliquer dans une cellule cible. Généralement, le génome des virus défectifs est dénué d'au moins les séquences nécessaires pour la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées, soit rendues non fonctionnelles ou encore substituées par d'autres séquences et en particulier par l'acide nucléique qui code pour le fragment polypeptidique d'intérêt. Néanmoins, de préférence, le virus défectif conserve malgré tout les séquences de son génome nécessaires à l'encapsulation des particules virales. Une administration ciblée de gènes est par exemple décrite dans la demande WO 95/28 494.

Dans un autre aspect, la présente invention vise l'utilisation d'un fragment polypeptidique selon l'invention, éventuellement obtenu par un des procédés de l'invention, ou l'acide nucléique de l'invention, en combinaison avec un autre médicament, par exemple en combinaison avec un agent chimiothérapeutique pour le traitement du cancer, associé à une prothèse vasculaire (ou stent) pour le traitement par angioplastie des maladies cardiovasculaires, ou en tant qu'adjuvant d'un vaccin contre un virus, comme le virus de l'influenza.

Dans un mode de réalisation préféré, le fragment polypeptidique de l'invention est combiné à un agent chimiothérapeutique compris dans le groupe constitué par : les agents alkylants, les antimétabolites, les alcaloïdes végétaux, les inhibiteurs de la topoisomérase, les antibiotiques antitumoraux, ou les poisons du fuseau mitotiques. Par « agents alkylants » sont visés entre autres le busulfan, la carboplatine, le chlorambucil, le cisplatine, le cyclophosphamide, l'isofamie, le melphalan, la méchloréthamine, l'oxaliplatine, l'uramustine, ou encore la témozolomide. Par « antimétabolites » sont visés entre autres l'azathioprine, la capécitabine, la cytarabine, la floxuridine, la fludarabine, le fluorouracil, la gemcitabine, le méthotrexate, ou encore le pémétréxed. Les « alcaloïdes végétaux » sont par exemple la vinblastine, et la vincristine. Les « inhibiteurs de la topoisomérase » sont par exemple l'irinotécan, le topotécan, ou encore l'étoposide. Les « antibiotiques antitumoraux » sont par exemple la bléomycine, la Daunorubicine, la doxorubicine, l'épirubicine, l'hydroxyurée, l'idarubicine, la mitomycine C, ou encore la mitoxantrone. Enfin, les « poisons du fuseau mitotique » sont par exemple le docétaxel, le paclitaxel, la vinblastine, la vincristine, ou encore la vinorelbine.

Selon un autre aspect, la présente invention vise l'utilisation d'un fragment polypeptidique isolé selon l'invention, éventuellement obtenu par un des procédés de l'invention, ou l'acide nucléique de l'invention, pour diagnostiquer une infection ou un traumatisme chez un individu.

Le diagnostic pourrait être établi en utilisant une technique ELISA permettant de détecter spécifiquement les nouveaux fragments de l'IL-33 (IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270}) dans le sérum ou le plasma des patients.

En effet, une augmentation de la quantité d'IL-33 dans le sang ou le sérum pourrait témoigner d'une infection, d'une inflammation ou d'un traumatisme chez un individu. Il est donc envisageable d'utiliser les fragments polypeptidiques de l'invention, qui sont susceptibles d'être formés *in vivo* par l'action des protéases endogènes, comme marqueur d'un état infectieux ou inflammatoire.

Avantageusement, ces fragments particuliers d'IL-33 peuvent être détectés au moyen d'anticorps les reconnaissant spécifiquement.

Dans un ultime aspect, la présente invention vise donc un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement l'un des fragments polypeptidiques de la présente invention, mais ne reconnaissant pas la forme entière IL-33_{aa1-270} ni la forme tronquée IL-33_{aa112-270}. De façon avantageuse, ledit anticorps est un anticorps conformationnel, c'est-à-dire un anticorps reconnaissant un épitope conformationnel.

Un anticorps selon l'invention peut être préparé par les techniques classiques connues de l'Homme du métier, telles que celles décrites dans Antibodies : A Laboratory Manual, E. Howell and D Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

De manière plus précise, un tel anticorps peut être produit à partir d'hybridomes obtenus par fusion de lymphocytes B d'un animal immunisé par l'un ou plusieurs des fragments polypeptidiques de l'invention, avec des myélomes, selon la technique de Köhler et Milstein (*Nature*, 1975) ; les hybridomes sont cultivés *in vitro*, notamment dans des fermenteurs, ou produits *in vivo*, sous forme d'ascite ; alternativement ledit anticorps monoclonal peut être produit par génie génétique comme décrit dans le brevet américain US 4,816, 567.

Les anticorps selon l'invention qui reconnaissent spécifiquement les fragments polypeptidiques de l'invention avec une affinité élevée (constante d'affinité de l'ordre du nM), représentent des réactifs de diagnostic fiables et sensibles pour la détection, à partir d'un échantillon biologique approprié (sang total, cellules mononucléées du sang périphérique, biopsie tumorale), des patients souffrant d'infections latentes ou de traumatisme.

Dans un mode de réalisation particulier, la présente invention vise donc également une méthode de diagnostic d'infections ou de traumatismes utilisant les anticorps de l'invention. Cette méthode diagnostique peut utiliser ces anticorps dans des techniques de cytométrie de flux, d'immunocytochimie ou d'immunohistochimie ou
5 bien d'immunoprécipitation à partir de cellules non-fixées (congelées ou vivantes) ou fixées dans des conditions non-dénaturantes qui sont connues de l'homme du métier.

L'invention sera décrite plus précisément au moyen des exemples ci-dessous.

Exemples

a) Mise en évidence des fragments de l'IL-33 de l'invention

Les protéines IL-33 humaines entière (IL-33₁₋₂₇₀, SEQ ID NO : 1) ou tronquées ont été produites *in vitro* selon les techniques classiques de production de protéines dans des lysats de réticulocytes selon les recommandations du fabricant (Promega TnT Coupled Reticulocyte Lysate Systems ref L4610) : 1µg de plasmide permettant l'expression d'IL-33 pleine taille ou tronquée (pcDNA3-IL33 1-270, 112-270, ou 95-270 ou 99-270 ou 109-270) est mélangé au lysat de réticulocyte de lapin (25µl) contenant le tampon de réaction 10X (2µl), la polymérase T7 (1µl), le mélange d'acides aminés 1mM (1µl), l'inhibiteur de RNase RNAsin (40U/µl) dans un volume réactionnel de 50µl final. Un contrôle est effectué en utilisant le vecteur vide pcDNA3. Une incubation est réalisée à 30°C pendant 90min. Pour le clivage par les protéases des neutrophiles, 5µl de lysat programmé ou non sont ensuite incubés à 37°C pendant 1h avec 1mU de cathepsine G (Calbiochem, ref : 219373), ou 30 min avec 0.3U d'élastase (Calbiochem ref : 324681) ou 30 min avec 0.25µg de PR3 (Calbiochem ref : 539483). Les produits de clivage sont analysés par gel SDS-PAGE et Western Blot à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la partie C-terminale de l'IL-33 (IL-33305B, Alexis Biochemical ref : ALX-804-726) (figure 2A). L'IL-33 humaine est la cible des protéases recombinantes Cathepsine G (Cat G), Elastase 2 (Elastase), et Protéinase 3 (PR3), qui génèrent *in vitro* les trois fragments matures IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270}. En revanche, les trois protéases de neutrophiles ne clivent pas le domaine de type cytokine IL-1 (domaine C-terminal), comme le montrent les deux blots du dessous sur la figure 2A.

En outre, des neutrophiles humains ont été isolés et purifiés à partir de sang frais total humain collecté sur tube EDTA, en utilisant le milieu de séparation Polymorphprep (Axis-Shield ; ref 1114683). Les neutrophiles sont resuspendus dans du RPMI/Hepes (25mM) et répartis dans des plaques de 96 puits à raison de 100.000 neutrophiles/ml et 100µl/puits, puis activés à l'aide de PMA (Acétate du myristate 13 du Phorbol 12, 25nM) pendant 2 heures à 37°C. La protéine IL-33 entière (25µl de lysat programmé comme décrit ci-dessus) a été incubée avec ces neutrophiles humains, en présence ou en absence d'inhibiteur de protéases à sérine (AEBSF, 5mM). L'analyse

des fragments générés a été réalisée par Western-Blot à l'aide d'un anticorps anti-IL-33 dirigé contre la partie C-terminale (IL-33305B ; Alexis Biochemical, ref : ALX-804-726). Une comparaison des tailles des fragments générés a été réalisée à l'aide des protéines recombinantes IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270}. Les résultats obtenus
 5 sont présentés sur la figure 2B. Ils permettent de démontrer que l'IL-33 humaine est effectivement la cible *ex vivo* des protéases de neutrophiles humains Cathepsine G (Cat G), Elastase 2 (Elastase), et Protéinase 3 (PR3).

b) Les nouveaux fragments de l'IL-33 sont 'superactifs' in vitro.

10 L'activité biologique des nouveaux fragments de l'IL-33, IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270}, a été testée *in vitro* dans deux essais fonctionnels, l'un basé sur la sécrétion de l'IL-5 dépendante de ST2 dans une lignée de basophile humain, et l'autre basé sur la sécrétion d'IL-6 dépendante de ST2 dans une lignée mastocytaire murine.

Brièvement, les cellules mastocytaires MC/9 (ATCC CRL-8306) sont
 15 maintenues dans du milieu DMEM (ATCC, Ref : 30-2002) contenant 6mM de glutamine, 0.05mM de 2-mercaptoéthanol, 10% de Rat-T-STIM (Beckton-Dickinson, ref : 354115) et 10% de sérum de veau fœtal (ATCC, ref : 30-2020). 200.000 cellules par puits sont réparties dans des plaques de 96 puits à raison de 200µl / puits puis incubées pendant 24 heures à 37°C avec les protéines IL-33_{aa1-270}, IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270} (10µl de lysat de réticulocyte programmé). La quantité d'IL-6
 20 sécrétée dans le surnageant de culture a été mesurée de façon classique grâce à la technique ELISA à l'aide du kit 'mouse IL-6' (R&D ref : DY406). Les résultats ont été ramenés à la valeur obtenue pour l'IL-33 pleine taille IL-33_{aa1-270}.

Les cellules de basophiles humaines KU812 (ATCC CRL-2099) sont
 25 maintenues dans du milieu RPMI 1640 (ATCC, Ref : 30-2001) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (ATCC, ref : 30-2020). 10⁶ cellules par puits sont réparties dans des plaques de 96 puits à raison de 200µl/ puits, puis incubées pendant 24 heures à 37°C avec les protéines IL-33_{aa1-270}, IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270} (8µl de lysat de réticulocyte programmé). La quantité d'IL-5 sécrétée dans le surnageant de
 30 culture a été mesurée de façon classique grâce à la technique ELISA à l'aide du kit 'human IL-5' (R&D, ref : DY205).

Dans chacun de ces essais, il a été mis en évidence que les protéines recombinantes IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270}, présentaient une activité plus grande que celle de la forme active pleine taille IL-33_{aa1-270} (Figure 3B et 3C). Les nouveaux fragments de l'IL-33, IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270}, sont donc
 5 'superactifs' par rapport à la forme entière *in vitro*.

c) Procédé de production/purification des fragments d'IL-33 de l'invention par voie recombinante.

Les protéines recombinantes IL-33 humaines entière ou tronquées ont été
 10 produites chez la bactérie en fusion avec une étiquette 6xHistidine en N-terminal pour permettre la purification des protéines, selon les techniques classiques utilisées par l'homme de l'art. Le Tag Histidine a été ensuite éliminée par un clivage à la thrombine et la protéine d'intérêt a été purifiée par chromatographie d'exclusion stérique.

Brièvement, un litre de milieu de culture estensemencé avec la souche
 15 transformée (BL21 pLysS-pET15b-IL-33_{aa1-270} ou BL21 pLysS-pET15b-IL-33_{aa95-270}, ou BL21 pLysS- pET15b-IL-33_{aa99-270} ou BL21 pLysS-pET15b-IL-33_{aa109-270}). Lorsque la DO atteint 0,7, l'expression de la protéine d'intérêt est induite par l'ajout de 1mM d'IPTG pendant 4 heures à 37 °C. Les bactéries sont centrifugées et le culot est repris dans du tampon de lyse (Na₂HPO₄ 50mM, NaCl 300mM, Imidazole 20mM, Triton
 20 0.5%, Dnase I 1mM, lysozyme 1mM, inhibiteur de protéases). Après sonication et ultracentrifugation, le lysat bactérien est récupéré et incubé avec des billes Nickel-NTA à 4° pendant 4 heures. Les billes sont lavées et la protéine purifiée par affinité est éluée avec 500 mM d'imidazole. L'éluat est ensuite débarrassé de l'imidazole et dialysé en tampon Tris-NaCl par centrifugation/concentration à l'aide de Vivaspin (Sartorius ;
 25 20mL de seuil 10kDa). Le tag histidine est clivé par la thrombine (250 unités/mL, 4°C, 20h) et la protéine est ensuite purifiée par chromatographie sur gel perméable ('Gel Filtration' - colonne Superdex 75) suivie d'une concentration par Vivaspin (Sartorius). L'analyse des différentes étapes de purification est effectuée par gel SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. Les protéines purifiées sont quantifiées par dosage au
 30 Nanodrop (Thermoscientific), et la présence d'endotoxine a été déterminée en utilisant le kit 'Limulus Amebocyte Lysate' (Cambrex, Ref : 50-647U).

Des exemples de production/purification des protéines IL-33 (formes entière ou clivées) sont montrés dans la figure 4. Au moins 9 mg de protéines correspondantes aux fragments d'IL-33 (IL-33₉₅₋₂₇₀, IL-33₉₉₋₂₇₀, IL-33₁₀₉₋₂₇₀) ont pu être produites à partir d'un litre de culture bactérienne, tandis que moins d'1 µg a pu être obtenu pour la forme pleine taille. Le rendement pour la production des fragments d'IL-33 est donc au moins 9000 fois supérieur à celui obtenu pour la forme pleine taille 1-270.

d) Les nouveaux fragments de l'IL-33 sont biologiquement 'superactifs' in vivo

L'activité biologique des nouveaux fragments de l'IL-33 a été testée *in vivo* chez la souris et comparée à l'activité de la forme artificielle IL-33_{aa112-270}. L'utilisation de la protéine humaine IL-33 entière dans cette expérience est exclue puisqu'il est impossible d'obtenir la quantité requise de protéine pour l'injection (>340µg, en tenant compte du nombre de souris à injecter, et du nombre total d'injections à effectuer). Les protéines recombinantes IL-33_{aa112-270}, IL-33_{aa95-270}, IL-33_{aa99-270} et IL-33_{aa109-270} produites chez *Escherichia coli* (vecteur pET15b, Novagen ; bactérie BL21) et purifiées par chromatographie d'affinité ont été injectées par voie intra-péritonéale (4 µg dans 200µl PBS) dans des souris Balb/C (12 souris femelles de 8 à 10 semaines) pendant 7 jours, quotidiennement. L'analyse des souris a montré des changements pathologiques nets, avec notamment une augmentation du volume et poids de la rate au bout de 7 jours (figure 4A), et une hyperplasie des cellules caliciformes du jejunum (figure 4B). De façon intéressante, deux des nouveaux fragments de l'IL-33 (IL-33_{aa95-270} et IL-33_{aa99-270}) induisent une augmentation du nombre de granulocytes (majoritairement des neutrophiles) dans le sang des souris après 7 jours, augmentation significativement plus élevée que celle induite par la forme tronquée IL-33_{aa112-270} (Figure 4C), indiquant que les nouveaux fragments de l'IL-33, IL-33_{aa95-270} et IL-33_{aa99-270}, sont 'superactifs' *in vivo*. Ce dernier résultat est tout à fait inattendu car l'existence de fragments de l'IL-33 plus actifs que la forme IL-33_{aa112-270} n'avait jamais été suspectée auparavant.

Références bibliographiques

- Adra et al., 1987, *Gene*, 60 : 65-74
- Ali et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 391 :1512-6
- Alves-Filho et al., *Nature Medicine* 2010, 16 :708-12
- 5 Baekkevold E. et al., *American Journal Pathology* 2003, 163 :69-79
- Bieth JG, *J. Soc. Biol.* 2001, 195(2):173-9
- Buckholz RG, *Current Opinion in Biotechnology* 1993, 4(5):538-42
- Burster T. et al; *Molecular Immunology* 2010, 47:658-665
- Carriere V. et al., *PNAS* 2007, 104 :282-287
- 10 Cayrol and Girard, *PNAS* 2009, 106(22) :9021-6
- Chackerian AA et al., *Journal of Immunology* 2007, 179: 2551-5
- Ciernik I. F., et al., *The Journal of Immunology*, 1999, 162, 3915-3925
- David L. Nelson and Michael M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd edition, 2000
- 15 Edwards CP et Aruffo A, *Current Opinion in Biotechnology* 1993, 4(5):558-63
- Furth PA et al., 1992 *Anal Biochem.* 1992 Sep;205(2):365-8
- Hausman RE et al (2004). *The cell: a molecular approach*. Washington, D.C: ASM Press. p. 51
- Hajjar E. et al., *FEBS Letters* 2007, 581 :5685-5690.
- 20 Hazlett et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010, 51 :1524-32
- Humphreys et al., *Journal of Immunology* 2008, 180 :2443-9
- Kargi et al, 1990, *J. Histochem. Cytochem.*38(8) :1179-86
- Köhler et Milstein, *Nature*, 1975,256, 495-497.
- Korkmaz B. et al., *Pharmacological Reviews* 2010, 62 : 726-759.
- 25 Liew et al., *Nature Rev Immunology* 2010, 10 :103-110
- Lingel et al., *Structure* 2009, 17 :1398-410

- Luckow VA, *Journal of Virology* 1993, 67(8) 4566-79
- Lüthi et al., *Immunity* 2009 ; 31 :84-98
- Miller et al., *J. Exp. Med* 2008, 205 :339-46
- Miller et al. *Circ Res* 2010 107:650-8
- 5 Moessler et al., *Development* 1996, 122 : 2415- 2425.
- Moussion et al., *PLoS ONE* 2008, 3(10) :e3331
- Nufer O et al., *Biochemistry* 1999, 38(2):636-42
- Olins et Lee, *Current Opinion in Biotechnology* 1993, 4(5) :520-5
- Pushparaj et al., *PNAS* 2008, 106 :9773-8
- 10 Rankin et al., *J Immunol* 2010, 184:1526-35.
- Rao NV et al, *PNAS* 1991, 88; 9253-9256
- Reen DJ, *Methods Mol Biol.* 1994, 32:461-6.
- Sambrano G.R. et al., *J. Biol Chem.* 2000, 275 : 6819-6823.
- Schmitz et al., *Immunity* 2005, 23 :479-90
- 15 Seki et al., *Circ Heart Fail* 2009, 2 :684-91
- Sims JE and Smith DE, *Nature Rev Immunology* 2010, 10:89-102
- Stolarski et al., *Journal of Immunology* 2010, 185 :3472-80
- Talabot-Ayer et al., *J. Biol. Chem* 2009 ; 284 :19420-6
- Tatusova et al, *FEMS Microbiol.*, 1999 Lett. 174:247-250
- 20 Xu et al., *Journal of Immunology* 2010; 184 :2620-6

Revendications

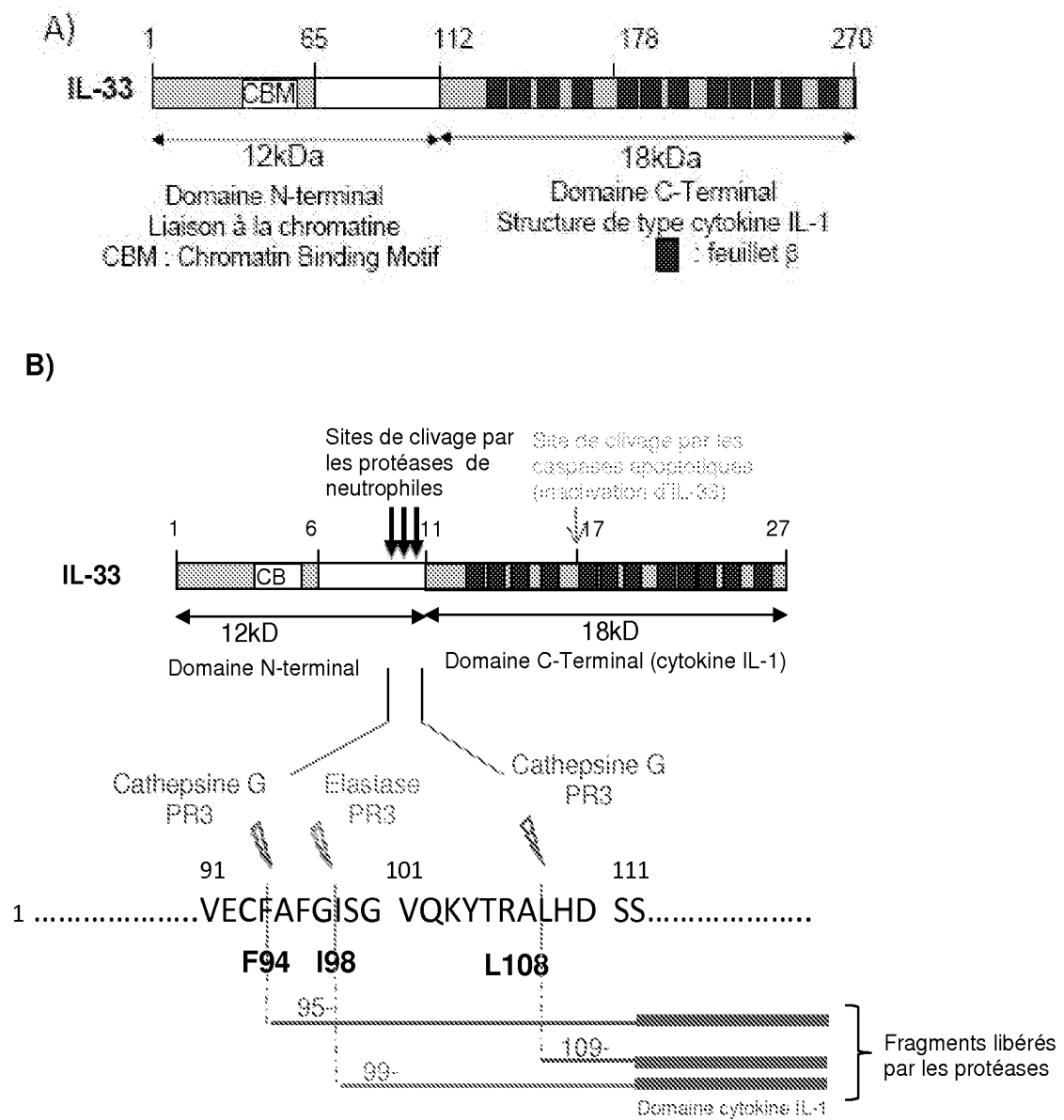
1. Fragment polypeptidique isolé de l'interleukine 33 humaine (hIL-33), biologiquement actif, choisi parmi les fragments ayant pour séquence les acides aminés 95 à 270 (SEQ ID NO :2), 99 à 270 (SEQ ID NO :3) ou 109 à 270 (SEQ ID NO :4) de l'interleukine 33 humaine (hIL-33) et leurs séquences homologues, lesdits fragments étant des produits naturels de clivage de hIL-33 par au moins une protéase des neutrophiles humains.
2. Acide nucléique isolé codant un fragment polypeptidique selon la revendication 1.
3. Vecteur nucléotidique caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique selon la revendication 2.
4. Cellule hôte caractérisée en ce qu'elle est transformée par un acide nucléique selon la revendication 2 ou le vecteur selon la revendication 3
5. Fragment polypeptidique tel que défini dans la revendication 1, pour son utilisation en tant qu'agoniste du récepteur ST2.
6. Fragment polypeptidique tel que défini dans la revendication 1, pour son utilisation en tant que médicament.
7. Fragment polypeptidique tel que défini dans la revendication 1, pour son utilisation dans le traitement des maladies infectieuses comme le sepsis, les kératites dues à *Pseudomonas* ou la tuberculose, des infections dues à un nématode ou au virus de l'influenza, de l'athérosclérose, des maladies cardio-vasculaires telles que l'infarctus du myocarde, du cancer ou de l'inflammation des tissus adipeux en cas d'obésité.
8. Composition pharmaceutique comprenant au moins un fragment polypeptidique isolé selon la revendication 1, ou l'acide nucléique défini à la revendication 2.
9. Utilisation d'un fragment polypeptidique isolé selon la revendication 1, ou de l'acide nucléique défini à la revendication 2, pour diagnostiquer une infection ou un traumatisme chez un individu.
10. Anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement le fragment isolé tel que défini dans la revendication 1.

11. Procédé de production d'un fragment polypeptidique isolé tel que défini dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) culture d'une cellule recombinante telle que définie à la revendication 4, dans un milieu de culture et des conditions de culture appropriés,
- b) isolement du fragment polypeptidique obtenu à l'étape a).

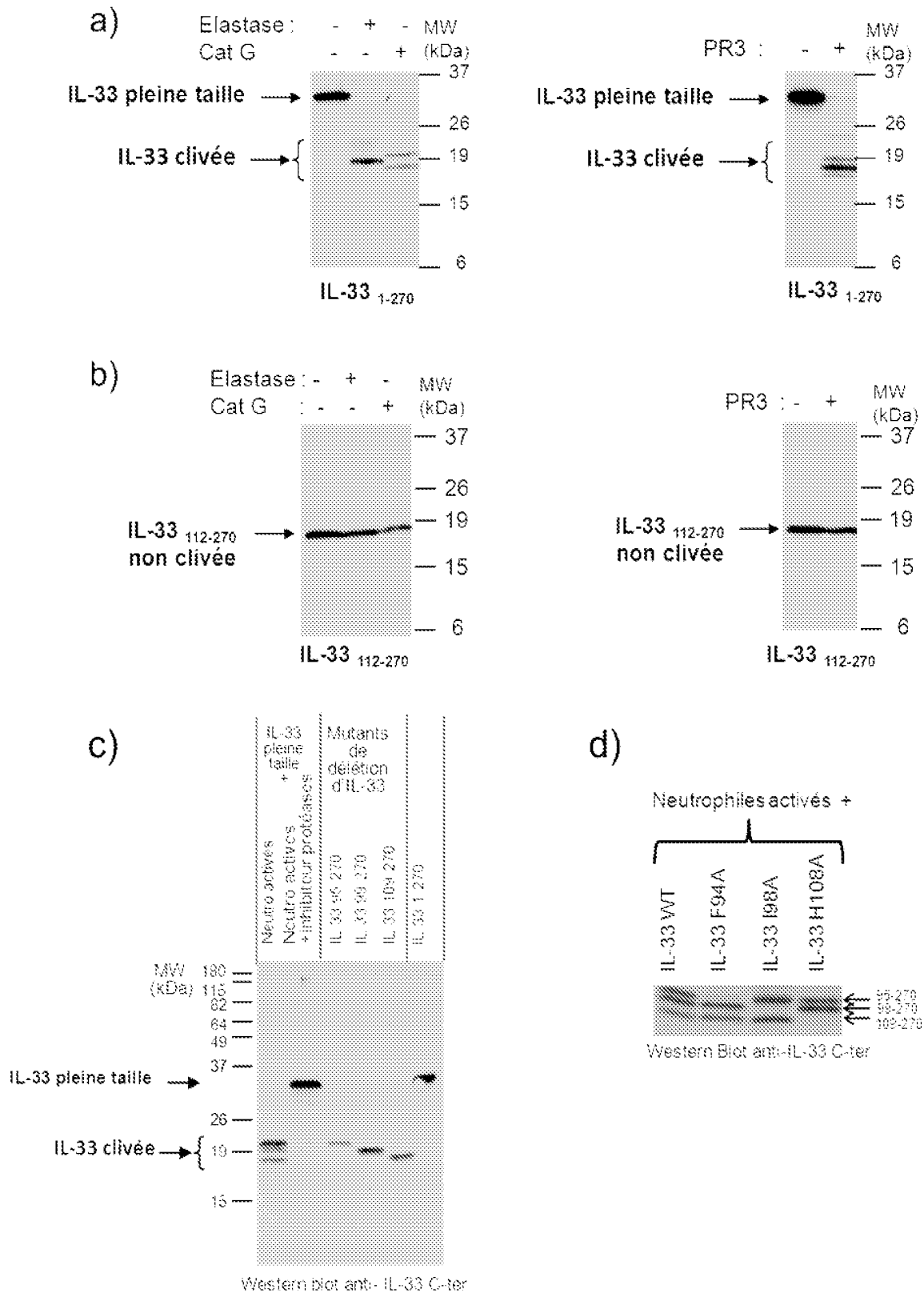
1 / 5

Figure 1

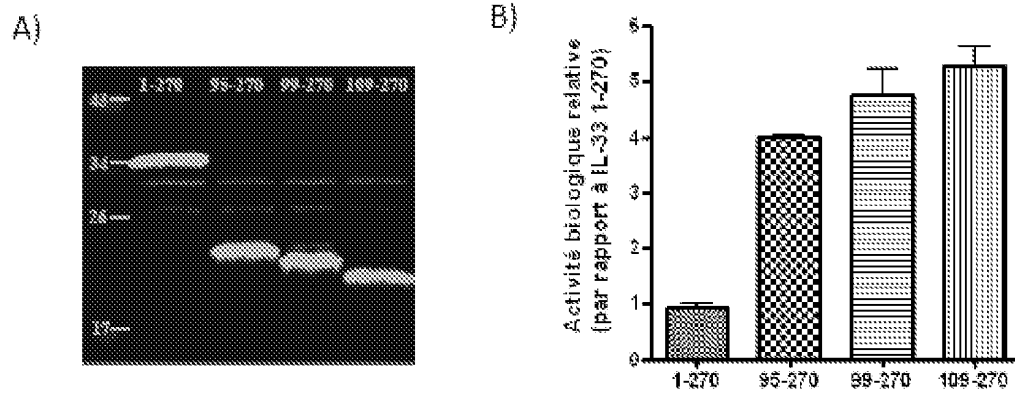


2 / 5

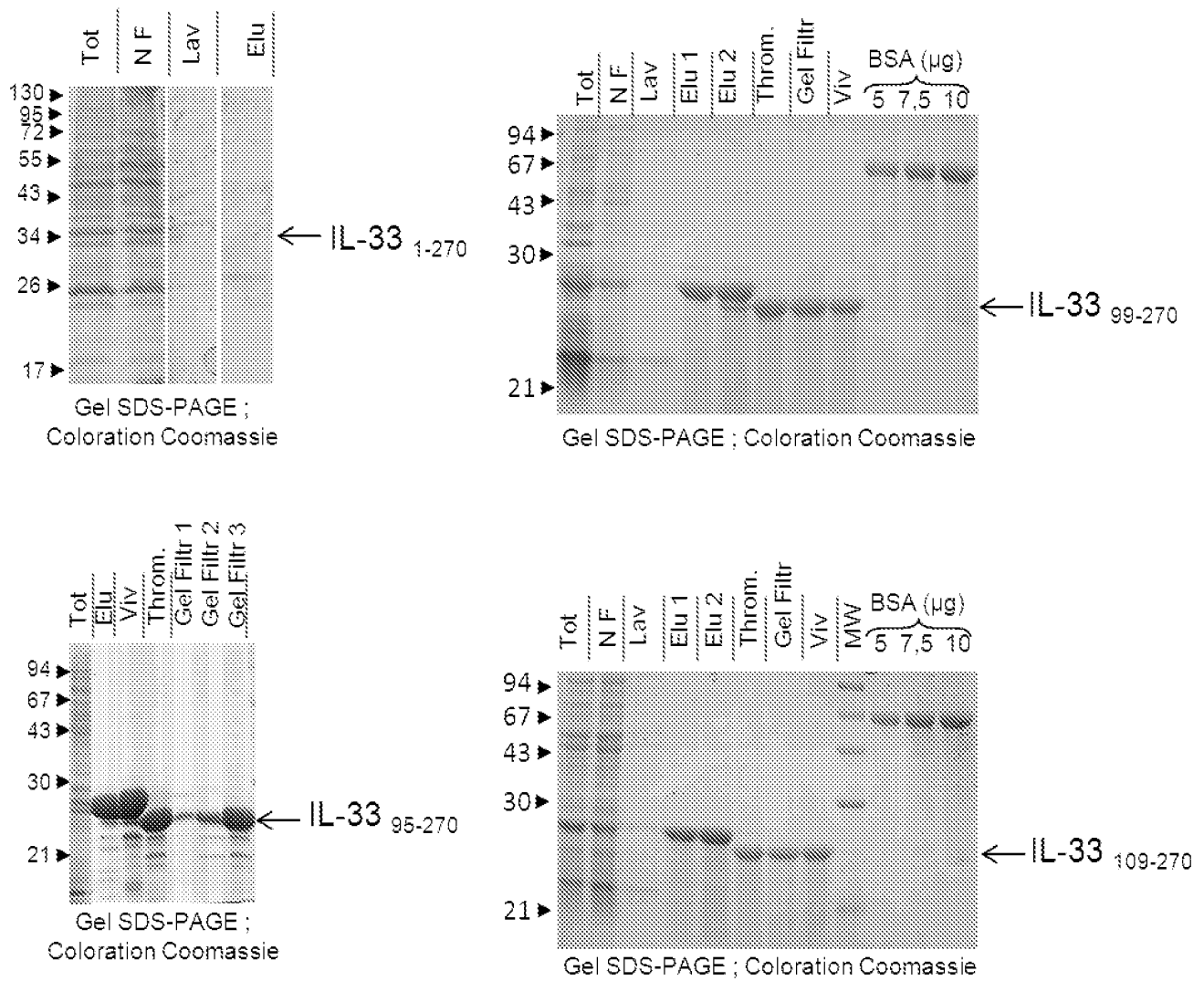
Figure 2



3 / 5

Figure 3

4 / 5

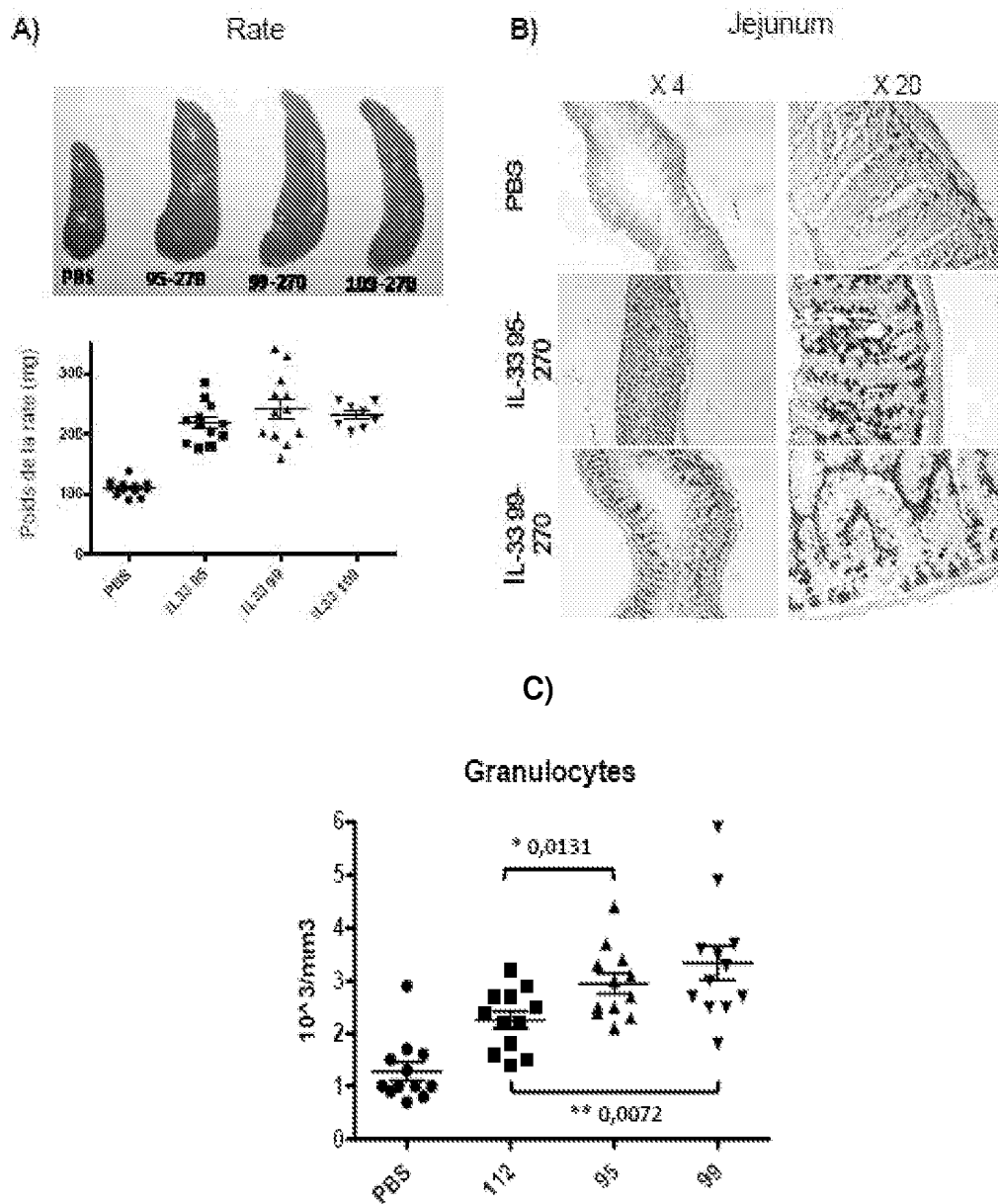
Figure 4

Tot = Total; NF = Non Fixé; Lav = Lavage; Elu = Elution; Throm = Thrombine; Gel Filtr = Gel Filtration; Viv = Vivaspin

Protéines Recombinantes	Quantité obtenue par litre de culture	Dosage endotoxines
Human IL-33 ₁₋₂₇₀	< 1 µg	-
Human IL-33 ₉₅₋₂₇₀	16 mg	0,01 U/µg
Human IL-33 ₉₉₋₂₇₀	11 mg	0,008 U/µg
Human IL-33 ₁₀₉₋₂₇₀	9 mg	0,004 U/µg

5 / 5

Figure 5



SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)

<120> NOUVEAUX FRAGMENTS D'IL-33 SUPERACTIFS ET LEURS UTILISATIONS

<130> 245750D29350

<160> 14

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 270

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

```

Met Lys Pro Lys Met Lys Tyr Ser Thr Asn Lys Ile Ser Thr Ala Lys
1           5           10           15

Trp Lys Asn Thr Ala Ser Lys Ala Leu Cys Phe Lys Leu Gly Lys Ser
          20           25           30

Gln Gln Lys Ala Lys Glu Val Cys Pro Met Tyr Phe Met Lys Leu Arg
          35           40           45

Ser Gly Leu Met Ile Lys Lys Glu Ala Cys Tyr Phe Arg Arg Glu Thr
          50           55           60

Thr Lys Arg Pro Ser Leu Lys Thr Gly Arg Lys His Lys Arg His Leu
65           70           75           80

Val Leu Ala Ala Cys Gln Gln Gln Ser Thr Val Glu Cys Phe Ala Phe
          85           90           95

Gly Ile Ser Gly Val Gln Lys Tyr Thr Arg Ala Leu His Asp Ser Ser
          100          105          110

Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Thr
          115          120          125

Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr Glu
          130          135          140

Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val Leu
          145          150          155          160

Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp Gly
          165          170          175

Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp Phe
          180          185          190

Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys Cys
          195          200          205

Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Met His
          210          215          220

```

2

Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe Ile
 225 230 235 240

Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser Glu
 245 250 255

Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr
 260 265 270

<210> 2
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 2

Ala Phe Gly Ile Ser Gly Val Gln Lys Tyr Thr Arg Ala Leu His Asp
 1 5 10 15

Ser Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu
 20 25 30

Ser Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser
 35 40 45

Tyr Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys
 50 55 60

Val Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly
 65 70 75 80

Asp Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys
 85 90 95

Asp Phe Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His
 100 105 110

Lys Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn
 115 120 125

Met His Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val
 130 135 140

Phe Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser
 145 150 155 160

Ser Glu Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr
 165 170 175

<210> 3
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 3

Ser Gly Val Gln Lys Tyr Thr Arg Ala Leu His Asp Ser Ser Ile Thr
 1 5 10 15

Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Tyr Asn
 20 25 30
 Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr Glu Ile Tyr
 35 40 45
 Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val Leu Leu Ser
 50 55 60
 Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp Gly Val Asp
 65 70 75 80
 Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp Phe Trp Leu
 85 90 95
 His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys Cys Glu Lys
 100 105 110
 Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Met His Ser Asn
 115 120 125
 Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe Ile Gly Val
 130 135 140
 Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser Glu Asn Leu
 145 150 155 160
 Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr
 165 170

<210> 4
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 4

His Asp Ser Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp
 20 25 30
 Glu Ser Tyr Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys
 35 40 45
 Asp Lys Val Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu
 50 55 60
 Ser Gly Asp Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro
 65 70 75 80
 Thr Lys Asp Phe Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu
 85 90 95
 Leu His Lys Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu
 100 105 110
 His Asn Met His Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro
 115 120 125

Gly Val Phe Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val
 130 135 140

Asp Ser Ser Glu Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser
 145 150 155 160

Glu Thr

<210> 5
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 5

Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser
 1 5 10 15

Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr
 20 25 30

Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val
 35 40 45

Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp
 50 55 60

Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp
 65 70 75 80

Phe Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys
 85 90 95

Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Met
 100 105 110

His Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe
 115 120 125

Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser
 130 135 140

Glu Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr
 145 150 155

<210> 6
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 6

Met Gln Pro Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu Leu Pro Thr Gly Ala
 1 5 10 15

Glu Ala Gly Glu Ile Ile Gly Gly Arg Glu Ser Arg Pro His Ser Arg

20					25					30					
Pro	Tyr	Met	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Gln	Ser	Pro	Ala	Gly	Gln	Ser	Arg
		35					40					45			
Cys	Gly	Gly	Phe	Leu	Val	Arg	Glu	Asp	Phe	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His
	50					55					60				
Cys	Trp	Gly	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Thr	Leu	Gly	Ala	His	Asn	Ile	Gln
65					70					75					80
Arg	Arg	Glu	Asn	Thr	Gln	Gln	His	Ile	Thr	Ala	Arg	Arg	Ala	Ile	Arg
				85					90					95	
His	Pro	Gln	Tyr	Asn	Gln	Arg	Thr	Ile	Gln	Asn	Asp	Ile	Met	Leu	Leu
			100					105					110		
Gln	Leu	Ser	Arg	Arg	Val	Arg	Arg	Asn	Arg	Asn	Val	Asn	Pro	Val	Ala
		115					120					125			
Leu	Pro	Arg	Ala	Gln	Glu	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly	Thr	Leu	Cys	Thr	Val
	130					135					140				
Ala	Gly	Trp	Gly	Arg	Val	Ser	Met	Arg	Arg	Gly	Thr	Asp	Thr	Leu	Arg
145					150					155					160
Glu	Val	Gln	Leu	Arg	Val	Gln	Arg	Asp	Arg	Gln	Cys	Leu	Arg	Ile	Phe
				165				170						175	
Gly	Ser	Tyr	Asp	Pro	Arg	Arg	Gln	Ile	Cys	Val	Gly	Asp	Arg	Arg	Glu
			180					185					190		
Arg	Lys	Ala	Ala	Phe	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Leu	Cys	Asn
		195					200					205			
Asn	Val	Ala	His	Gly	Ile	Val	Ser	Tyr	Gly	Lys	Ser	Ser	Gly	Val	Pro
	210					215					220				
Pro	Glu	Val	Phe	Thr	Arg	Val	Ser	Ser	Phe	Leu	Pro	Trp	Ile	Arg	Thr
225					230					235					240
Thr	Met	Arg	Ser	Phe	Lys	Leu	Leu	Asp	Gln	Met	Glu	Thr	Pro	Leu	
				245				250						255	

<210> 7

<211> 256

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 7

Met	Ala	His	Arg	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Leu	Ala	Ser	Val	Leu	Leu	Ala
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Ser	Gly	Ala	Ala	Arg	Ala	Ala	Glu	Ile	Val	Gly	Gly	His
			20					25					30		
Glu	Ala	Gln	Pro	His	Ser	Arg	Pro	Tyr	Met	Ala	Ser	Leu	Gln	Met	Arg
		35					40					45			

Gly Asn Pro Gly Ser His Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile His Pro Ser
 50 55 60
 Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Arg Asp Ile Pro Gln Arg Leu
 65 70 75 80
 Val Asn Val Val Leu Gly Ala His Asn Val Arg Thr Gln Glu Pro Thr
 85 90 95
 Gln Gln His Phe Ser Val Ala Gln Val Phe Leu Asn Asn Tyr Asp Ala
 100 105 110
 Glu Asn Lys Leu Asn Asp Val Leu Leu Ile Gln Leu Ser Ser Pro Ala
 115 120 125
 Asn Leu Ser Ala Ser Val Ala Thr Val Gln Leu Pro Gln Gln Asp Gln
 130 135 140
 Pro Val Pro His Gly Thr Gln Cys Leu Ala Met Gly Trp Gly Arg Val
 145 150 155 160
 Gly Ala His Asp Pro Pro Ala Gln Val Leu Gln Glu Leu Asn Val Thr
 165 170 175
 Val Val Thr Phe Phe Cys Arg Pro His Asn Ile Cys Thr Phe Val Pro
 180 185 190
 Arg Arg Lys Ala Gly Ile Cys Phe Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile
 195 200 205
 Cys Asp Gly Ile Ile Gln Gly Ile Asp Ser Phe Val Ile Trp Gly Cys
 210 215 220
 Ala Thr Arg Leu Phe Pro Asp Phe Phe Thr Arg Val Ala Leu Tyr Val
 225 230 235 240
 Asp Trp Ile Arg Ser Thr Leu Arg Arg Val Glu Ala Lys Gly Arg Pro
 245 250 255

<210> 8

<211> 267

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

Met Thr Leu Gly Arg Arg Leu Ala Cys Leu Phe Leu Ala Cys Val Leu
 1 5 10 15
 Pro Ala Leu Leu Leu Gly Gly Thr Ala Leu Ala Ser Glu Ile Val Gly
 20 25 30
 Gly Arg Arg Ala Arg Pro His Ala Trp Pro Phe Met Val Ser Leu Gln
 35 40 45
 Leu Arg Gly Gly His Phe Cys Gly Ala Thr Leu Ile Ala Pro Asn Phe
 50 55 60
 Val Met Ser Ala Ala His Cys Val Ala Asn Val Asn Val Arg Ala Val
 65 70 75 80

Arg Val Val Leu Gly Ala His Asn Leu Ser Arg Arg Glu Pro Thr Arg
 85 90 95
 Gln Val Phe Ala Val Gln Arg Ile Phe Glu Asn Gly Tyr Asp Pro Val
 100 105 110
 Asn Leu Leu Asn Asp Ile Val Ile Leu Gln Leu Asn Gly Ser Ala Thr
 115 120 125
 Ile Asn Ala Asn Val Gln Val Ala Gln Leu Pro Ala Gln Gly Arg Arg
 130 135 140
 Leu Gly Asn Gly Val Gln Cys Leu Ala Met Gly Trp Gly Leu Leu Gly
 145 150 155 160
 Arg Asn Arg Gly Ile Ala Ser Val Leu Gln Glu Leu Asn Val Thr Val
 165 170 175
 Val Thr Ser Leu Cys Arg Arg Ser Asn Val Cys Thr Leu Val Arg Gly
 180 185 190
 Arg Gln Ala Gly Val Cys Phe Gly Asp Ser Gly Ser Pro Leu Val Cys
 195 200 205
 Asn Gly Leu Ile His Gly Ile Ala Ser Phe Val Arg Gly Gly Cys Ala
 210 215 220
 Ser Gly Leu Tyr Pro Asp Ala Phe Ala Pro Val Ala Gln Phe Val Asn
 225 230 235 240
 Trp Ile Asp Ser Ile Ile Gln Arg Ser Glu Asp Asn Pro Cys Pro His
 245 250 255
 Pro Arg Asp Pro Asp Pro Ala Ser Arg Thr His
 260 265

<210> 9

<211> 528

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 9

gccttttggtat tatcaggggt ccagaaatat actagagcac ttcatgattc aagtatcaca 60
 ggaatttcac ctattacaga gtatcttgct tctctaagca catacaatga tcaatccatt 120
 acttttgctt tggaggatga aagttatgag atatatgttg aagacttgaa aaaagatgaa 180
 aagaaagata aggtgttact gagttactat gagtctcaac acccctcaaa tgaatcaggt 240
 gacggtgttg atggtaagat gttaatggta accctgagtc ctacaaaaga cttctggttg 300
 catgccaaaca acaaggaaca ctctgtggag ctccataagt gtgaaaaacc actgccagac 360
 caggccttct ttgtccttca taatatgcac tccaactgtg tttcatttga atgcaagact 420
 gatcctggag tgtttatagg tgtaaaggat aatcatcttg ctctgattaa agtagactct 480
 tctgagaatt tgtgtactga aaatatcttg tttaagctct ctgaaact 528

<210> 10
 <211> 516
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 10
 tcaggggtcc agaaatatac tagagcactt catgattcaa gtatcacagg aatttcacct 60
 attacagagt atcttgcttc tctaagcaca tacaatgatac aatccattac ttttgctttg 120
 gaggatgaaa gttatgagat atatgttgaa gacttgaaaa aagatgaaaa gaaagataag 180
 gtgttactga gttactatga gtctcaacac ccctcaaatag aatcagggtga cgggtgttgat 240
 ggtaagatgt taatggtaac cctgagtcct acaaaagact tctgggtgca tgccaacaac 300
 aaggaacact ctgtggagct ccataagtgt gaaaaaccac tgccagacca ggccttccttt 360
 gtccttcata atatgcactc caactgtggtt tcatttgaat gcaagactga tcctggagtg 420
 tttataggtg taaaggataa tcattcttgct ctgattaaag tagactcttc tgagaatttg 480
 tgtactgaaa atatcttggtt taagctctct gaaact 516

<210> 11
 <211> 486
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 11
 catgattcaa gtatcacagg aatttcacct attacagagt atcttgcttc tctaagcaca 60
 tacaatgatac aatccattac ttttgctttg gaggatgaaa gttatgagat atatgttgaa 120
 gacttgaaaa aagatgaaaa gaaagataag gtgttactga gttactatga gtctcaacac 180
 ccctcaaatag aatcagggtga cgggtgttgat ggtaagatgt taatggtaac cctgagtcct 240
 acaaaagact tctgggtgca tgccaacaac aaggaacact ctgtggagct ccataagtgt 300
 gaaaaaccac tgccagacca ggccttccttt gtccttcata atatgcactc caactgtggtt 360
 tcatttgaat gcaagactga tcctggagtg tttataggtg taaaggataa tcattcttgct 420
 ctgattaaag tagactcttc tgagaatttg tgtactgaaa atatcttggtt taagctctct 480
 gaaact 486

<210> 12
 <211> 556
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 12

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr
 1 5 10 15

Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu
 20 25 30
 Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp
 35 40 45
 Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg
 50 55 60
 Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg
 85 90 95
 Thr Gly Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn
 100 105 110
 Val Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn
 115 120 125
 Ser Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro
 130 135 140
 Leu Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg
 145 150 155 160
 Ala His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala
 165 170 175
 Gly Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr
 180 185 190
 Ser Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe
 195 200 205
 Ser Leu Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu
 210 215 220
 Val Glu Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly
 225 230 235 240
 Lys Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr
 245 250 255
 Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln
 260 265 270
 Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg
 275 280 285
 Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu
 290 295 300
 Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg
 305 310 315 320
 Lys Asn Pro Ile Asp His His Ser Ile Tyr Cys Ile Ile Ala Val Cys
 325 330 335

Ser Val Phe Leu Met Leu Ile Asn Val Leu Val Ile Ile Leu Lys Met
 340 345 350
 Phe Trp Ile Glu Ala Thr Leu Leu Trp Arg Asp Ile Ala Lys Pro Tyr
 355 360 365
 Lys Thr Arg Asn Asp Gly Lys Leu Tyr Asp Ala Tyr Val Val Tyr Pro
 370 375 380
 Arg Asn Tyr Lys Ser Ser Thr Asp Gly Ala Ser Arg Val Glu His Phe
 385 390 395 400
 Val His Gln Ile Leu Pro Asp Val Leu Glu Asn Lys Cys Gly Tyr Thr
 405 410 415
 Leu Cys Ile Tyr Gly Arg Asp Met Leu Pro Gly Glu Asp Val Val Thr
 420 425 430
 Ala Val Glu Thr Asn Ile Arg Lys Ser Arg Arg His Ile Phe Ile Leu
 435 440 445
 Thr Pro Gln Ile Thr His Asn Lys Glu Phe Ala Tyr Glu Gln Glu Val
 450 455 460
 Ala Leu His Cys Ala Leu Ile Gln Asn Asp Ala Lys Val Ile Leu Ile
 465 470 475 480
 Glu Met Glu Ala Leu Ser Glu Leu Asp Met Leu Gln Ala Glu Ala Leu
 485 490 495
 Gln Asp Ser Leu Gln His Leu Met Lys Val Gln Gly Thr Ile Lys Trp
 500 505 510
 Arg Glu Asp His Ile Ala Asn Lys Arg Ser Leu Asn Ser Lys Phe Trp
 515 520 525
 Lys His Val Arg Tyr Gln Met Pro Val Pro Ser Lys Ile Pro Arg Lys
 530 535 540
 Ala Ser Ser Leu Thr Pro Leu Ala Ala Gln Lys Gln
 545 550 555

<210> 13
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 13

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr
 1 5 10 15
 Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu
 20 25 30
 Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp
 35 40 45
 Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg
 50 55 60

```

Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala
65              70              75              80

Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg
            85              90              95

Thr Gly Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn
            100             105             110

Val Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn
            115             120             125

Ser Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro
            130             135             140

Leu Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg
145              150              155              160

Ala His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala
            165              170              175

Gly Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr
            180             185             190

Ser Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe
            195             200             205

Ser Leu Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu
            210             215             220

Val Glu Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly
225              230              235              240

Lys Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr
            245             250             255

Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln
            260             265             270

Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg
            275             280             285

Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu
            290             295             300

Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg
305              310              315              320

Lys Asn Pro Ser Lys Glu Cys Phe
            325

```

<210> 14

<211> 5428

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> DNA sequence de pcDNA3.1 (+)

<400> 14

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata	300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcg tggctgaccg cccaacgacc	360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca	600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc	900
gtttaaactt aagcttggtg ccgagctcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattctgc	960
agatatccag cacagtggcg gccgctcgag tctagagggc ccgtttaaac ccgctgatca	1020
gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gcccctccc cgtgccttcc	1080
ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg	1140
cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg	1200
gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat ggcttctgag	1260
gcggaaagaa ccagctgggg ctctaggggg tatccccacg cgccctgtag cggcgcatta	1320
agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg	1380
cccgtcctt tcgctttctt cccttccttt ctgcgcacgt tcgccggctt tccccgtcaa	1440
gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc	1500
aaaaaacttg attaggggtga tggttcacgt agtggggccat cgccctgata gacggttttt	1560
cgccctttga cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca	1620
acactcaacc ctatctcggg ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc	1680
tattggttaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt ctgtggaatg	1740
tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca	1800

tgcattctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcgcc aggcctccca gcaggcagaa	1860
gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta actccgccc	1920
tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga ctaatTTTTT	1980
ttatTTtatgc agaggccgag gccgcctctg cctctgagct attccagaag tagtgaggag	2040
gctTTTTtgg aggcctaggc ttttgcaaaa agctcccggg agcttgtata tccattttcg	2100
gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttgcgatgat tgaacaagat ggattgcacg	2160
caggTtctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggcta tgactgggca caacagacaa	2220
tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca gggcgcccg gttctTTTTg	2280
tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg cggctatcgt	2340
ggctggccac gacgggcggt ccttgcgcag ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa	2400
gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc	2460
ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg	2520
ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg	2580
aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg	2640
aactgttcgc caggctcaag gcgcgcgatg ccgacggcga ggatctcgtc gtgacctatg	2700
gcgatgcctg cttgccgaat atcatgggtg aaaatggccg cttttctgga ttcatcgact	2760
gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg	2820
ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttctcgt gctttacggt atcgccgctc	2880
ccgattcgca gcgcacgccc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga gcgggactct	2940
ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcc	3000
tcacgagatt tcgattccac	
cgccgccttc tatgaaagg	3060
tgggcttcgg aatcgTTTT	
cgggacgccg gctggatgat	
cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt cttcgccac	3120
cccaacttgt ttattgcagc	
ttataatgg	3180
tacaaataaa gcaatagcat cacaatttc	
acaaataaag cattTTTTT	
actgcattct agttgtggt	3240
tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctgtatacc	
gtcgacctct agctagagct tggcgtaatc atggctcatg ctgtttcctg	3300
tgtgaaattg	
ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc	3360
ataaagtgta aagcctggg	
tgcctaata	3420
gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcgc tcaactgccg	
ctttccagtc	
gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa	3480
cgcgcgggga gaggcgggtt	
gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg	3540
ctgcgctcgg tcgttcggct	
gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg	3600
ttatccacag aatcagggga	
taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg	3660
ccagcaaaag gccaggaacc	
gtaaaaaggc	

cgcggttgctg gcggtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg	3720
ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg	3780
aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgcccgtt accggatacc tgtccgcctt	3840
tctcccttcg ggaagcgtgg cgcttttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg	3900
gtaggtcggt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg	3960
cgcccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact	4020
ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgagggtat gtaggcgggtg ctacagagtt	4080
cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggtta tctgcgctct	4140
gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac	4200
cgctggtagc ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca	4260
agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta	4320
agggattttg gtcattgagat tatcaaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa	4380
atgaagtttt aatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggcttgaca gttaccaatg	4440
cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca tagttgcctg	4500
actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggttta ccatctggcc ccagtgcctgc	4560
aatgataccg cgagaccac gtcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc	4620
cggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa	4680
ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc	4740
cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg	4800
ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgata ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc	4860
cttcggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat	4920
ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg	4980
tgagtactca accaagtcatt tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc	5040
ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg	5100
aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctggttgagat ccagttcgat	5160
gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg	5220
gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagga ataaggcgca cacggaaatg	5280
ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct	5340
catgagcggg tacatatctg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac	5400
atttccccga aaagtgccac ctgacgtc	5428



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 751061
FR 1151498

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 2008/132709 A1 (TRINITY COLLEGE DUBLIN [IE]; MARTIN SEAMUS J [IE]) 6 novembre 2008 (2008-11-06) * page 1, ligne 4 - ligne 5 * * page 15, ligne 30 * * page 27, ligne 26 - page 28, ligne 18 * * page 30, ligne 9 - ligne 25 * * figures 21-23, 30-35 * -----	1-11	C07K14/715 C12N15/24 C12N15/63 C12N5/10 A61K38/20 A61P35/00 A61P31/00 A61P33/00 A61P29/00 A61P9/00 C07K16/24 G01N33/68
X	CAYROL CORINNE ET AL: "The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1.", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 2 JUN 2009 LNKD- PUBMED:19439663, vol. 106, no. 22, 2 juin 2009 (2009-06-02) , pages 9021-9026, XP000002658772, ISSN: 1091-6490 * abrégé * * page 9021, colonne de droite, alinéa 2 * * page 9022, colonne de droite, dernier alinéa * * page 9023, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite, alinéa 1 * * figure 3 * ----- -/--	1-8,11	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C07K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
26 septembre 2011		Surdej, Patrick	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 751061
FR 1151498

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	LÜTHI ALEXANDER U ET AL: "Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases.", IMMUNITY 17 JUL 2009 LNKD- PUBMED:19559631, vol. 31, no. 1, 17 juillet 2009 (2009-07-17), pages 84-98, XP000002658773, ISSN: 1097-4180 * page 91, colonne de gauche, dernier alinéa - page 93, colonne de gauche, alinéa 1 * * figure 5 *	1-8,11	
X	----- SCHMITZ JOCHEN ET AL: "IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines.", IMMUNITY NOV 2005 LNKD- PUBMED:16286016, vol. 23, no. 5, novembre 2005 (2005-11), pages 479-490, XP000002658774, ISSN: 1074-7613 * abrégé * * page 480, colonne de droite, dernier alinéa - page 481, colonne de gauche, alinéa 1 * * page 488, colonne de gauche, alinéa 3 * * figure 3 * ----- -/--	1-8,11	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
26 septembre 2011		Surdej, Patrick	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 751061
FR 1151498

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	LIEW FOO Y ET AL: "Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family.", NATURE REVIEWS. IMMUNOLOGY FEB 2010 LNKD-PUBMED:20081870, vol. 10, no. 2, février 2010 (2010-02), pages 103-110, XP000002658775, ISSN: 1474-1741 * le document en entier * -----	1-11	
A	KUROWSKA-STOLARSKA M ET AL: "Interleukin-33: a novel mediator with a role in distinct disease pathologies.", JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE JAN 2011 LNKD- DOI:10.1111/J.1365-2796.2010.02316.X PUBMED:21158975, vol. 269, no. 1, janvier 2011 (2011-01), pages 29-35, XP000002658776, ISSN: 1365-2796 * le document en entier * -----	1-11	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
26 septembre 2011		Surdej, Patrick	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1151498 FA 751061**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **26-09-2011**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2008132709 A1	06-11-2008	CA 2685124 A1	06-11-2008
		EP 2152740 A1	17-02-2010
		IE 20080331 A1	08-07-2009
		US 2010260705 A1	14-10-2010
