

(52) CPC특허분류

A61K 39/3955 (2013.01)
C07K 14/7155 (2013.01)
C07K 2319/32 (2013.01)
C07K 2319/735 (2013.01)

(30) 우선권주장

61/819,029 2013년05월03일 미국(US)
61/913,417 2013년12월09일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

다량체화 도메인(M)에 부착된 제1 IL-33 결합 도메인(D1)을 포함하는 IL-33 길항제로서, 상기 D1은 ST2 단백질의 IL-33-결합 부분을 포함하는, IL-33 길항제.

청구항 2

제 1 항에 있어서, D1 및/또는 M에 부착된 제2 IL-33 결합 도메인(D2)을 추가로 포함하며, 상기 D2는 IL-1RAcP 단백질의 세포외 부분을 포함하는, IL-33 길항제.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 D1이 M의 N-말단에 부착된, IL-33 길항제.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 D1이 M의 C-말단에 부착된, IL-33 길항제.

청구항 5

제 2 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 D2가 M의 N-말단에 부착된, IL-33 길항제.

청구항 6

제 2 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 D2가 M의 C-말단에 부착된, IL-33 길항제.

청구항 7

제 2 항에 있어서, 상기 D1이 D2의 N-말단에 부착되고, D2가 M의 N-말단에 부착된, IL-33 길항제.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-33 길항제가, 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법 (surface plasmon resonance assay)으로 측정시 약 80 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 400 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합하는, IL-33 길항제.

청구항 9

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-33 길항제가, 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 60 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 1.0 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합하는, IL-33 길항제.

청구항 10

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-33 길항제가, 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 60 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 200 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합하는, IL-33 길항제.

청구항 11

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-33 길항제가, 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 1.0 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약

1.0 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합하는, IL-33 길항제.

청구항 12

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-33 길항제가, 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 110 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 100 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합하는, IL-33 길항제.

청구항 13

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-33 길항제가, 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 10 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 5 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합하는, IL-33 길항제.

청구항 14

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-33 길항제가, 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 9분 이상의 해리 반감기($t_{1/2}$) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 4분 이상의 해리 반감기($t_{1/2}$)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합하는, IL-33 길항제.

청구항 15

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-33 길항제가, 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 30분 이상의 해리 반감기($t_{1/2}$) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 1000분 이상의 해리 반감기($t_{1/2}$)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합하는, IL-33 길항제.

청구항 16

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-33 길항제가, 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 40분 초과의 해리 반감기($t_{1/2}$) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 10분 이상의 해리 반감기($t_{1/2}$)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합하는, IL-33 길항제.

청구항 17

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-33 길항제가, 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 1000분 초과의 해리 반감기($t_{1/2}$) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 1000분 이상의 해리 반감기($t_{1/2}$)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합하는, IL-33 길항제.

청구항 18

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-33 길항제가, 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 25분 초과의 해리 반감기($t_{1/2}$) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 30분 초과의 해리 반감기($t_{1/2}$)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합하는, IL-33 길항제.

청구항 19

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-33 길항제가, 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 500분 초과의 해리 반감기($t_{1/2}$) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 1000분 초과의 해리 반감기($t_{1/2}$)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합하는, IL-33 길항제.

청구항 20

제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-33 길항제가 IL-33과 ST2의 상호작용을 차단하는, IL-33 길항제.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 상기 IL-33 길항제가, 25°C에서 시험관내(*in vitro*) 수용체/리간드 결합 분석법으로 측정시

약 115 pM 미만의 IC₅₀ 값을 갖는 IL-33과 ST2의 상호작용을 차단하는, IL-33 길항제.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 상기 IL-33 길항제가, 25°C에서 시험관내 수용체/리간드 결합 분석법으로 측정시 약 20 pM 미만의 IC₅₀ 값을 갖는 IL-33과 ST2의 상호작용을 차단하는, IL-33 길항제.

청구항 23

제 1 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 D1이 서열번호:5 또는 6의 아미노산 서열 또는 이와 90% 이상 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, IL-33 길항제.

청구항 24

제 2 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 D2가 서열번호:7 또는 8의 아미노산 서열 또는 이와 90% 이상 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, IL-33 길항제.

청구항 25

제1 다량체화 도메인(M1)에 부착된 제1 IL-33 결합 도메인(D1), 및 제2 다량체화 도메인(M2)에 부착된 제2 IL-33 결합 도메인(D2)을 포함하는 IL-33 길항제로서, 상기 D1 및/또는 D2 도메인은 ST2 및 IL-1RAcP로 이루어진 군으로부터 선택된 수용체의 IL-33-결합 부분을 포함하는, IL-33 길항제.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 제3 IL-33 결합 도메인(D3)이 D1 또는 M1 중 어느 하나에 부착되며, 이때 D3이 ST2 및 IL-1RAcP로 이루어진 군으로부터 선택된 수용체의 IL-33-결합 부분을 포함하는, IL-33 길항제.

청구항 27

제 26 항에 있어서, 제4 IL-33 결합 도메인(D4)이 D2 또는 M2 중 어느 하나에 부착되며, 이때 D4가 ST2 및 IL-1RAcP로 이루어진 군으로부터 선택된 수용체의 IL-33-결합 부분을 포함하는, IL-33 길항제.

청구항 28

제 25 항에 있어서, 상기 D1이 M1의 N-말단에 부착되고, D2가 M2의 N-말단에 부착된, IL-33 길항제.

청구항 29

제 26 항에 있어서, 상기 D3이 D1의 N-말단에 부착된, IL-33 길항제.

청구항 30

제 26 항에 있어서, 상기 D3이 M1의 C-말단에 부착된, IL-33 길항제.

청구항 31

제 27 항에 있어서, 상기 D4가 D2의 N-말단에 부착된, IL-33 길항제.

청구항 32

제 27 항에 있어서, 상기 D4가 M2의 C-말단에 부착된, IL-33 길항제.

청구항 33

제 27 항에 있어서, 상기 D3가 D1의 N-말단에 부착되고, D1이 M1의 N-말단에 부착되고; D4가 D2의 N-말단에 부착되고, D2가 M2의 N-말단에 부착된, IL-33 길항제.

청구항 34

제 33 항에 있어서, 상기 D3이 D4와 동일하거나 실질적으로 동일하고, D1이 D2와 동일하거나 실질적으로

동일한, IL-33 길항제.

청구항 35

제 34 항에 있어서, 상기 D3 및 D4가 각각 ST2 단백질의 IL-33-결합 부분을 포함하고; D1 및 D2가 각각 IL-1RAcP 단백질의 세포외 부분을 포함하는, IL-33 길항제.

청구항 36

서열번호:1, 2, 3, 4 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 IL-33 길항제.

청구항 37

제 1 항 내지 제 36 항 중 어느 한 항의 IL-33 길항제 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 38

제 37 항의 약학 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 염증성 질환 또는 장애, 또는 상기 염증성 질환 또는 장애와 관련된 하나 이상의 증상을 치료하는 방법으로서,

상기 염증성 질환 또는 장애가 중증도, 기간 또는 발생 빈도 면에서 경감 또는 감소되거나, 또는 상기 염증성 질환 또는 장애와 관련된 하나 이상의 증상이 중증도, 기간 또는 발생 빈도 면에서 경감 또는 감소되는, 방법.

청구항 39

제 38 항에 있어서, 상기 염증성 질환 또는 장애가 천식, 아토피성 피부염, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 염증성 장 질환, 다발성 경화증, 관절염, 알레르기성 비염, 호산구 식도염 및 건선으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 40

제 39 항에 있어서, 상기 염증성 질환 또는 장애가 천식인, 방법.

청구항 41

제 40 항에 있어서, 상기 천식이 호산구성 또는 비-호산구성 천식인, 방법.

청구항 42

제 39 항 내지 제 41 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천식이 스테로이드 저항성 또는 스테로이드 민감성 천식인, 방법.

청구항 43

제 38 항에 있어서, 상기 염증성 질환 또는 장애가 아토피성 피부염인, 방법.

청구항 44

제 38 항에 있어서, 상기 염증성 질환 또는 장애가 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD)인, 방법.

청구항 45

제 44 항에 있어서, 상기 만성 폐쇄성 폐 질환이 부분적으로 담배 연기에 의해 발생하거나 이에 의해 야기되는, 방법.

청구항 46

제 37 항의 약학 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 알레르겐(allergen)에 대해 민감성을 보이는 환자를 치료하는 방법으로서,

상기 환자가, 항체 또는 상기 항체를 포함하는 조성물의 투여 후, 상기 알레르겐에 대해 감소된 민감성 또는 감

소된 알레르기성 반응을 보이거나, 또는 상기 알레르겐에 대해 임의의 민감성 또는 알레르기성 반응, 또는 초과 민성 반응을 느끼지 않는, 방법.

청구항 47

제 37 항에 있어서, 천식, 알레르기, 과민증, 아토피성 피부염, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 염증성 장 질환, 다발성 경화증, 관절염, 알레르기성 비염, 호산구 식도염 및 건선으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염증성 질환 또는 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 48

제 37 항에 있어서, 천식, 알레르기, 과민증, 아토피성 피부염, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 염증성 장 질환, 다발성 경화증, 관절염, 알레르기성 비염, 호산구 식도염 및 건선으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염증성 질환 또는 장애의 치료용 약제의 제조에서의 약학 조성물.

청구항 49

제 38 항 내지 제 48 항 중 어느 한 항에 있어서, 염증성 질환 또는 장애, 또는 상기 염증성 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상을 경감시키거나, 또는 알레르겐에 대한 알레르기성 반응을 감소시키는 데 유용한 제2 치료제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 50

제 49 항에 있어서, 상기 제2 치료제가 비-스테로이드성 항염증제(NSAID), 코르티코스테로이드, 기관지 확장제, 항히스타민제, 에피네프린, 충혈제거제, 흉선 간질 림포포이에틴(TSLP) 길항제, IL-13 길항제, IL-4 길항제, IL-4/IL-13 이중 길항제, IL-5 길항제, IL-6 길항제, IL-12/23 길항제, IL-22 길항제, IL-25 길항제, IL-17 길항제, IL-31 길항제, PDE4 억제제 및 다른 IL-33 길항제 또는 IL-33에 대한 다른 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 IL-33을 길항시킬 수 있는 항원-결합 분자 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인터루킨-33(IL-33)은, 보조 단백질 IL-1RAcP와 화합되는 틀(tol1)-유사 수용체 슈퍼-페밀리 구성원인 ST2에 대한 리간드이다(검토를 위해서는 예를 들면 문헌[Kakkar and Lee, *Nature Reviews - Drug Discovery* 7(10):827-840 (2008)]; [Schmitz 등, *Immunity* 23:479-490 (2005)]; [Liew 등, *Nature Reviews - Immunology* 10:103-110 (2010)]; 및 US 2010/0260770; US 2009/0041718 참조). IL-33에 의한 ST2/IL-1RAcP의 활성화시, 신호화 캐스케이드는, 무엇보다도, NF_κB(핵 인자-κB)의 활성화로 이어지는 다운스트림 분자 예를 들어 MyD88(콜수성 분화 인자 88) 및 TRAF6(TNF 수용체 결합 인자 6)을 통해 야기된다. IL-33 신호화는 다양한 질환 및 장애 요인과 연루되어 있다(문헌[Liew 등, *Nature Reviews - Immunology* 10:103-110 (2010)]).

발명의 간단한 요약

[0004] 본 발명은 인터루킨-33(IL-33) 길항제를 제공한다.

[0005] 하나의 양태에서, 본 발명은 제1 IL-33 결합 도메인(D1) 및 다량체화(multimerizing) 도메인(M)을 포함하는 IL-33 길항제를 제공한다.

[0006] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항제는 다량체화 도메인(M)에 부착된 제1 IL-33 결합 도메인(D1)을 포함하며, 이 때 D1은 ST2 단백질의 IL-33-결합 부분을 포함한다.

[0007] 특정 실시양태에서, 상기 IL-33 길항제는 하나 이상의 추가적인 IL-33 결합 도메인(예컨대, D2, D3, D4 등)을 추가로 포함한다.

[0008] 특정 실시양태에 따르면, IL-33 결합 도메인(D1, D2, D3, D4 등)은 ST2 단백질의 IL-33-결합 부분, IL-1RAcP

단백질의 세포외 도메인, 또는 다른 IL-33 결합 도메인을 포함한다.

[0009] 하나의 실시양태에서, 상기 IL-33 길항체는 D1 및/또는 M에 부착된 제2 IL-33 결합 도메인(D2)을 포함하며, 상기 D2는 IL-1RAcP 단백질의 세포외 부분을 포함한다. 하나의 실시양태에서, D1은 M의 N-말단에 부착된다. 하나의 실시양태에서, D1은 M의 C-말단에 부착된다. 하나의 실시양태에서, D2는 M의 N-말단에 부착된다. 하나의 실시양태에서, D2는 M의 C-말단에 부착된다. 하나의 실시양태에서, D1은 D2의 N-말단에 부착되고, D2는 M의 N-말단에 부착된다.

[0010] 다량체화 도메인(M)은 N-말단 및 C-말단을 갖는 웨티드 또는 폴리웨티드일 수 있다. IL-33 결합 도메인 성분은 M의 N-말단 또는 C-말단에 부착될 수 있다. 특정 실시양태에 따르면, D1, D2 및 M은, D1이 D2의 N-말단에 부착되고 D2가 M의 N-말단에 부착되도록 직렬로 부착된다. D1, D2 및 M 성분들의 다수의 배치 및 구성은 본 발명의 범위 내에서 고려되며, 이들의 예시가 본원에 기재된다.

[0011] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항체는 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 80 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 400 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합한다.

[0012] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항체는 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 60 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 1.0 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합한다.

[0013] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항체는 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 60 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 200 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합한다.

[0014] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항체는 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 1.0 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 1.0 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합한다.

[0015] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항체는 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 110 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 100 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합한다.

[0016] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항체는 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 10 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 5 pM 미만의 결합 해리 평형 상수(K_D)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합한다.

[0017] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항체는 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 9분 이상의 해리 반감기($t_{1/2}$) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 4분 이상의 해리 반감기($t_{1/2}$)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합한다.

[0018] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항체는 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 30분 이상의 해리 반감기($t_{1/2}$) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 1000분 이상의 해리 반감기($t_{1/2}$)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합한다.

[0019] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항체는 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 40분 초과의 해리 반감기($t_{1/2}$) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 10분 이상의 해리 반감기($t_{1/2}$)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합한다.

[0020] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항체는 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 1000분 초과의 해리 반감기($t_{1/2}$) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 1000분 이상의 해리 반감기($t_{1/2}$)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합한다.

[0021] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항체는 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 25분 초과의 해리 반감기($t_{1/2}$) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 30분 초과의 해리 반감기($t_{1/2}$)를 갖는

인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합한다.

[0022] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항제는 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 500분 초파의 해리 반감기($t_{1/2}$) 및/또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정시 약 1000분 초파의 해리 반감기($t_{1/2}$)를 갖는 인간 인터루킨 33(IL-33)과 결합한다.

[0023] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항제는 IL-33과 ST2의 상호작용을 차단한다.

[0024] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항제는 25°C에서 시험관내(*in vitro*) 수용체/리간드 결합 분석법으로 측정시 약 115 pM 미만의 IC₅₀ 값을 갖는 IL-33과 ST2의 상호작용을 차단한다.

[0025] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항제는 25°C에서 시험관내 수용체/리간드 결합 분석법으로 측정시 약 20 pM 미만의 IC₅₀ 값을 갖는 IL-33과 ST2의 상호작용을 차단한다.

[0026] 하나의 실시양태에서, D1은 서열번호:5 또는 6의 아미노산 서열, 또는 이와 90% 이상 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0027] 하나의 실시양태에서, D2는 서열번호:7 또는 8의 아미노산 서열, 또는 이와 90% 이상 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0028] 하나의 실시양태에서, 다량체화 성분은 서열번호:9 또는 10의 아미노산 서열, 또는 이와 90% 이상 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0029] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항제는, 제1 다량체화 도메인(M1)에 부착된 제1 IL-33 결합 도메인(D1), 및 제2 다량체화 도메인(M2)에 부착된 제2 IL-33 결합 도메인(D2)을 포함하고, 이때 D1 및/또는 D2 도메인은 ST2 및 IL-1RAcP로 이루어진 군으로부터 선택된 수용체의 IL-33-결합 부분을 포함한다.

[0030] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항제는 D1 또는 M1 중 어느 하나에 부착된 제3 IL-33 결합 도메인(D3)을 포함하고, 이때 D3은 ST2 및 IL-1RAcP로 이루어진 군으로부터 선택된 수용체의 IL-33-결합 부분을 포함한다.

[0031] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항제는 D2 또는 M2 중 어느 하나에 부착된 제4 IL-33 결합 도메인(D4)을 포함하고, 이때 D4는 ST2 및 IL-1RAcP로 이루어진 군으로부터 선택된 수용체의 IL-33-결합 부분을 포함한다.

[0032] 하나의 실시양태에서, D1은 M1의 N-말단에 부착되고, D2는 M2의 N-말단에 부착된다.

[0033] 하나의 실시양태에서, D3은 D1의 N-말단에 부착된다.

[0034] 하나의 실시양태에서, D3은 M1의 C-말단에 부착된다.

[0035] 하나의 실시양태에서, D4는 D2의 N-말단에 부착된다.

[0036] 하나의 실시양태에서, D4는 M2의 C-말단에 부착된다.

[0037] 하나의 실시양태에서, D3은 D1의 N-말단에 부착되고, D1은 M1의 N-말단에 부착되고; D4는 D2의 N-말단에 부착되고, D2는 M2의 N-말단에 부착된다.

[0038] 하나의 실시양태에서, D3은 D4와 동일하거나 실질적으로 동일하고, D1은 D2와 동일하거나 실질적으로 동일하다.

[0039] 하나의 실시양태에서, D3 및 D4는 각각 ST2 단백질의 IL-33-결합 부분을 포함하고; D1 및 D2는 각각 IL-1RAcP 단백질의 세포외 부분을 포함한다.

[0040] 하나의 실시양태에서, IL-33 길항제는 서열번호:1, 2, 3, 4 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0041] 본 발명의 제2 양태는 염증성 질환 또는 장애, 또는 상기 염증성 질환 또는 장애와 관련된 하나 이상의 증상을 치료하기 위한 본원에 기재된 IL-33 길항제를 사용하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 하나 이상의 본 발명의 IL-33 길항제 또는 하나 이상의 본 발명의 IL-33 길항제를 함유하는 약학 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 이때 상기 염증성 질환 또는 장애가 중증도, 기간 또는 발생 빈도 면에서 경감 또는 감소되거나, 또는 상기 염증성 질환 또는 장애와 관련된 하나 이상의 증상이 중증도, 기간 또는 발생 빈도 면에서 경감 또는 감소된다.

[0042] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 임의의 하나 이상의 IL-33 길항제로 치료될 수 있는 염증성 질환 또는 장애는

천식, 아토피성 피부염, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 염증성 장 질환, 다발성 경화증, 관절염, 알레르기성 비염, 호산구 식도염 및 건선으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0043] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 임의의 하나 이상의 IL-33 길항제로 치료될 수 있는 염증성 질환 또는 장애는 천식이다. 천식은 호산구성 또는 비-호산구성 천식일 수 있다. 천식은 스테로이드 저항성 또는 스테로이드 민감성 천식일 수 있다.

[0044] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 임의의 하나 이상의 IL-33 길항제로 치료될 수 있는 염증성 질환 또는 장애는 아토피성 피부염이다.

[0045] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 임의의 하나 이상의 IL-33 길항제로 치료될 수 있는 염증성 질환 또는 장애는 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD)이다. 하나의 실시양태에서, 만성 폐쇄성 폐 질환은 부분적으로 담배 연기에 의해 발생하거나 이에 의해 야기될 수 있다.

[0046] 관련된 실시양태에서, 본 발명은 알레르겐(allergen)에 대해 민감성을 보이는 환자를 치료하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 하나 이상의 본 발명의 IL-33 길항제 또는 하나 이상의 본 발명의 IL-33 길항제를 함유하는 약학 조성물을 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 이때 상기 환자는 항체 또는 상기 항체를 포함하는 조성물의 투여 후 상기 알레르겐에 대해 감소된 민감성 또는 감소된 알레르기성 반응을 보이거나, 또는 상기 알레르겐에 대해 임의의 민감성 반응 또는 알레르기성 반응, 또는 초과민성 반응을 느끼지 않는다.

[0047] 관련된 실시양태에서, 본 발명은 염증성 질환 또는 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 하나 이상의 본 발명의 IL-33 길항제를 포함하는 약학 조성물을 제공하며, 이때 상기 염증성 질환 또는 장애는 천식, 알레르기, 과민증, 아토피성 피부염, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 염증성 장 질환, 다발성 경화증, 관절염, 알레르기성 비염, 호산구 식도염 및 건선으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0048] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 염증성 질환 또는 장애의 치료를 위한 약제의 제조에서의 본 발명의 IL-33 길항제 하나 이상을 포함하는 약학 조성물을 제공하며, 이때 상기 염증성 질환 또는 장애는 천식, 알레르기, 과민증, 아토피성 피부염, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 염증성 장 질환, 다발성 경화증, 관절염, 알레르기성 비염, 호산구 식도염 및 건선으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0049] 특정 실시양태에서, 본 발명은 염증성 질환 또는 장애, 또는 상기 염증성 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상을 경감시키거나, 또는 알레르겐에 대한 알레르기성 반응을 감소시키는 데 유용한 제2 치료제의 유효량과 조합하여 본 발명의 IL-33 길항제 하나 이상을 투여함으로써 염증성 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0050] 하나의 실시양태에서, 제2 치료제는 비-스테로이드성 항염증제(NSAID), 코르티코스테로이드, 기관지 확장제, 항히스타민제, 에피네프린, 충혈제거제, 흉선 간질 림포포이에틴(lymphopoietin)(TSLP) 길항제, IL-13 길항제, IL-4 길항제, IL-4/IL-13 이중 길항제, IL-5 길항제, IL-6 길항제, IL-12/23 길항제, IL-22 길항제, IL-25 길항제, IL-17 길항제, IL-31 길항제, PDE4 억제제 및 다른 IL-33 길항제 또는 IL-33에 대한 다른 항체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0051] 본 발명의 제3 양태는 본원에 기재된 IL-33 길항제 및 약학적으로 허용가능한 단체 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물, 및 이러한 약학 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 치료 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 추가의 치료학적 활성 성분은 본 발명의 IL-33 길항제와 함께 제형화되거나, 또는 이와 함께 투여된다.

[0052] 다른 실시양태들은 하기의 상세한 설명을 검토하는 것으로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 IL-33 길항제의 개별 성분들의 4가지 예시적인 배치를 서로에 대해 나타낸다. 패널 A는 제1 IL-33-결합 도메인(D1)이 제1 다양체화 도메인(M1)의 N-말단에 부착되어 있고 제2 IL-33-결합 도메인(D2)이 제2 다양체화 도메인(M2)의 N-말단에 부착되어 있는 배치를 보여준다. D1과 D2가 상이한 IL-33 결합 단백질로부터 유도된 것임을 나타내기 위해, D1은 흰색 상자로 표시되고, D2는 검은색 박스로 표시된다. 패널 B는 제1 IL-33-결합 도메인(D1)이 제1 다양체화 도메인(M1)의 N-말단에 부착되어 있고 제2 IL-33-결합 도메인(D2)이 제2 다양체화 도메인(M2)의 C-말단에 부착되어 있는 배치를 보여준다. D1과 D2가 상이한 IL-33 결합 단백질로부터 유도된 것임을 나타내기 위해, D1은 흰색 상자로 표시되고, D2는 검은색 박스로 표시된다. 패널 C 및 D는 4개의 IL-33-결합 도메인, D1, D2, D3 및 D4를 포함하는 배치를 보여준다. 이를 배치에서, D3-D1-M1 및 D4-D2-M2는 직렬로

연결되되, 이때 D3은 D1의 N-말단에 부착되고, D1은 M1의 N-말단에 부착되며; D4는 D2의 N-말단에 부착되고, D2는 M2의 N-말단에 부착된다. 패널 C에서, D3 및 D4는 서로 동일하거나 실질적으로 동일하고, D1 및 D2는 서로 동일하거나 실질적으로 동일하다. 패널 D에서, D1과 D4는 서로 동일하거나 실질적으로 동일하고, D2와 D3은 서로 동일하거나 실질적으로 동일하다.

[0055] 상세한 설명

본 발명을 기술하기 전에, 본 발명은 기술한 특정 방법 및 실험 조건에 한정되지 않고, 이러한 방법 및 조건은 다양할 수 있음을 이해하여야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특정 실시양태를 기술하기 위한 것일 뿐, 제한하려는 것은 아니며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구범위에 의해서만 제한되는 것임을 이해하여야 한다.

다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 일반적으로 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 사용된 바와 같이, 인용된 특정의 수치를 참조하여 사용될 때, "약"이라는 용어는, 그 값이 인용된 값과 1% 이하에서 다를 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 본원에 사용된 표현 "약 100"은 99 및 101 그리고 그 사이의 모든 값(예컨대, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4 등)을 포함한다.

본원에 기재된 임의의 방법 및 이와 유사하거나 균등한 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료에 대해 이하에서 설명한다.

[0059] IL-33 길항제

본원에 사용된 표현 "인터루킨-33", "IL-33" 등은 NCBI 수탁 번호 NP_254274.1(인간 이성체 1), NP_001186569.1(인간 이성체 2) 또는 NP_001186570.1(인간 이성체 3)에 기재된 아미노산 서열을 갖는 인간 IL-33 단백질을 의미한다. 본원의 단백질, 폴리펩티드 및 단백질 단편에 대한 언급은 모두, 비-인간 종(예컨대, "마우스 IL-33", "원숭이 IL-33" 등)으로 명시하지 않는 한, 각각의 단백질, 폴리펩티드 또는 단백질 단편의 인간 버전을 의미하는 것으로 의도된다.

본원에 사용된 표현 "IL-33 길항제"는 IL-33에 결합할 수 있고, IL-33 신호화 및/또는 IL-33과 세포 표면 수용체(예컨대, ST2) 간의 상호작용을 차단 또는 경감하거나 또는 다르게 방해할 수 있다.

본 발명의 IL-33 길항제는 다량체화 도메인(M)에 부착된 제1 IL-33 결합 도메인(D1)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 IL-33 길항제는 D1 및/또는 M에 부착된 제2 IL-33 결합 도메인(D2)을 포함한다. 특정 실시양태에 따르면, D1은 ST2 단백질의 IL-33-결합 부분을 포함한다. 특정 실시양태에 따르면, D2는 IL-1RAcP 단백질의 세포외 부분을 포함한다.

IL-33 길항제의 개별적인 성분은 IL-33에 결합할 수 있는 기능성 길항제 분자가 생기는 다양한 방식으로 또 하나에 대해 정렬될 수 있다. 예를 들어, D1 및/또는 D2는 M의 N-말단에 부착될 수 있다. 다른 실시양태에서, D1 및/또는 D2는 M의 C-말단에 부착된다. 또 다른 실시양태에서, D1은 D2의 N-말단에 부착되고, D2는 M의 N-말단에 부착되는 결과, N-말단으로부터 C-말단까지, 식 D1-D2-M으로 표시되는 길항제 분자의 인-라인 융합을 생성한다. 각 성분들의 다른 배향은 본원의 다른 곳에 개시되어 있다.

본 발명의 IL-33 길항제의 비-제한적인 예는 본원의 실시예에 도시되어 있으며, "hST2-hFc," "hST2-mFc," "hST2-hIL1RAcP-mFc," "hST2-hIL1RAcP-hFc" 및 "mST2-mIL1RAcP-mFc"라 지정된 길항제들을 포함한다. hST2-hFc 및 hST2-mFc는 또한 "ST2 수용체 단백질"이라고도 할 수 있다. hST2-hIL1RAcP-mFc, hST2-hIL1RAcP-hFc 및 mST2-mIL1RAcP-mFc는 또한 본원에서 "IL-33 트랩 단백질"로 지칭될 수 있다.

본원에 사용된 "부착된"이라는 용어는, 제2 폴리펩티드 성분에 "부착된" 제1 폴리펩티드라는 문맥(예컨대, "D1은 M에 부착된다", "D2는 M에 부착된다", "D1은 D2에 부착된다" 등)에서, 제1 성분이 물리적으로 직접 또는 간접적으로 제2 성분에 연결되어 있음을 의미한다. 2개의 폴리펩티드 성분들 사이의 직접적인 부착의 예로서, 제1 성분의 C-말단 아미노산은 제2 성분의 N-말단 아미노산에 펩티드 결합을 통해 연결되거나, 또는 제1 성분의 N-말단 아미노산은 제2 성분의 C-말단 아미노산에 펩티드 결합을 통해 연결될 수 있다. 간접적인 부착은, 다른 한편으로는, 제1 및 제2 성분들이 각각 제1 및 제2 성분들 사이의 링크로서 역할하는 중간 구조체의 상이한 부분에 물리적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 중간 구조체는 예를 들어 단일의 아미노산, 펩티드 링커, 또는 다른 폴리펩티드 성분(예컨대, 다른 IL-33 결합 단백질 등)일 수 있다. 예를 들어, D1-D2-M의 배치(여기서, 제1 IL-33 결합 도메인[D1]은 제2 IL-33 결합 도메인[D2]에 부착되고, 이는 차례로 다량체화 도메인[M]에 연결된다)에서, D1은 M에 "부착된" 것으로 간주되지만, 이러한 부착은 중간 구조체로서 제공되는 D2에 의해 간접적인

것이 된다.

[0066] 표준 분자 생물학 기술(예컨대, 재조합 DNA 기술)은 본 발명의 임의의 IL-33 길항제 또는 이의 변형체를 구성하는 데 사용될 수 있다.

IL-33 결합 도메인

[0068] 본 발명의 IL-33 길항제는 하나 이상의 IL-33 결합 도메인(때때로 본원에서는 "D" 또는 "D1", "D2" 등이라 함)을 포함한다. 특정 실시양태에서, IL-33 결합 도메인은 ST2 단백질의 IL-33-결합 부분을 포함한다. ST2 단백질의 IL-33 결합 부분은 ST2 단백질의 세포외 도메인의 전부 또는 일부를 포함하거나 이들로 구성될 수 있다. 특정 실시양태에서, ST2 단백질은 인간 ST2 단백질이다. 본원에 사용된 "인간 ST2 단백질"은 서열번호:12의 아미노산 서열을 갖는 ST2 단백질을 지칭한다. 특정 실시양태에서, ST2 단백질은 비-인간 종(예컨대, 마우스 ST2, 원숭이 ST2 등)으로부터의 ST2 단백질이다. ST2 단백질의 예시적인 IL-33-결합 부분은 서열번호:5의 아미노산 서열(인간 ST2[NCBI 수탁 번호 NP_057316.3의 K19-S328]의 세포외 도메인에 상응함)로서 본원에 기재된다. ST2 단백질의 IL-33-결합 부분의 다른 예는 서열번호:6의 아미노산 서열(마우스 ST2[NCBI 수탁 번호 P14719의 S27-R332]의 세포외 도메인에 상응함)로서 본원에 기재된다.

[0069] 특정 실시양태에서, IL-33 결합 도메인은 IL-1RAcP 단백질의 세포외 부분을 포함한다. 특정 실시양태에서, IL-1RAcP 단백질은 인간 IL-1RAcP 단백질이다. 본원에 사용된 "인간 IL-1RAcP 단백질"은 서열번호:13의 아미노산 서열을 갖는 IL-1RAcP 단백질을 의미한다. 특정 실시양태에서, IL-1RAcP 단백질은 비-인간 종(예컨대, 마우스 IL-1RAcP, 원숭이 IL-1RAcP 등)으로부터의 IL-1RAcP 단백질이다. IL-1RAcP 단백질의 전형적인 세포외 부분은 서열번호:7의 아미노산 서열(인간 I L-1RAcP[수탁 번호 Q9NPH3의 S21-E359 NCBI]의 세포외 도메인에 상응함)로서 본원에 기재된다. IL-1RAcP 단백질의 세포외 부분의 다른 예는 서열번호:8의 아미노산 서열(마우스 IL-1RAcP[NCBI 수탁 번호 Q61730의 S21-E359]의 세포외 도메인에 상응함)로서 본원에 기재된다.

[0070] 본 발명은 본원에 기재된 임의의 예시적인 IL-33 결합 도메인 성분 아미노산 서열(예컨대, 서열번호:5 내지 8)과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 D1 및/또는 D2 성분을 포함하는 IL-33 길항제를 포함한다.

다량체화 도메인

[0072] 본 발명의 IL-33 길항제는 또한 하나 이상의 다량체화 도메인(때때로 약어 "M", "M1", "M2" 등으로 지칭됨)을 포함한다. 일반적인 용어에서, 본 발명의 다량체화 도메인은 IL-33 길항제의 다양한 성분들(예컨대, IL-33-결합 도메인)을 서로 연결하는 기능을 한다. 본원에 사용된 "다량체화 도메인"은 동일 또는 유사한 구조 또는 구성의 제2 거대분자(macromolecule)와 (공유 또는 비-공유적으로) 연결할 수 있는 능력을 갖는 임의의 거대분자이다. 예를 들어, 다량체화 도메인은 면역글로불린 C_h3 도메인을 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 다량체화 도메인의 비-제한적인 예로는 면역글로불린의 Fc 부분, 예를 들어 동형(isotype) IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4뿐만 아니라 각각의 동형 그룹 내의 임의의 동종이형(allotype)으로부터 선택된 IgG의 Fc 도메인이다. 특정 실시양태에서, 다량체화 도메인은 Fc 단편 또는 하나 이상의 시스테인 잔기를 함유하는 길이가 1 내지 약 200개의 아미노산의 아미노산 서열이다. 다른 실시양태에서, 다량체화 도메인은 시스테인 잔기 또는 짧은 시스테인-함유 웹티드이다. 기타 다량체화 도메인은 류신 지퍼, 나선-루프 모티프 또는 코일형 코일 모티프를 포함하거나 또는 이들로 구성된 웹티드 또는 폴리펩티드를 포함한다.

[0073] 본 발명의 IL-33 길항제에 사용될 수 있는 비-제한적인 예시적인 다량체화 도메인은 인간 IgG1 Fc(서열번호:9) 또는 마우스 IgG2a Fc(서열번호:10)를 포함한다. 본 발명은, 본원에 기재된 예시적인 M 성분의 아미노산 서열 중 어느 하나(예를 들어, 서열번호:9 또는 10)와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 M 성분을 포함하는 IL-33 길항제를 포함한다.

[0074] 특정 실시양태에서, 본 발명의 IL-33 길항제는 2개의 다량체화 도메인 M1 및 M2를 포함하며, 이때 M1 및 M2는 서로 동일하다. 예를 들어, M1은 특정 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인일 수 있고, M2는 M1과 동일한 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인이다.

[0075] 다르게는, 특정 실시 양태에서, 본 발명의 IL-33 길항제는 하나 이상의 아미노산 위치에서 서로 다른 2개의 다량체화 도메인 M1 및 M2를 포함한다. 예를 들면, M1은 제1 면역 글로불린(Ig) C_h3 도메인을 포함할 수 있고 M2는 제2 Ig C_h3 도메인을 포함할 수 있으며, 이때 제1 및 제2 Ig C_h3 도메인은 하나 이상의 아미노산에 의해 서로 다르고, 하나 이상의 아미노산 차이는 동일한 M1 및 M2 서열을 갖는 침조 구조체에 비해 단백질 A에 대한 타겟

구조체의 결합을 감소시킨다. 하나의 실시양태에서, M1의 Ig C_H3 도메인은 단백질 A와 결합하고 M2의 Ig C_H3 도메인은 예를 들어 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링(numbering)에 의해; EU 넘버링에 의해 H435R)과 같은 단백질 A 결합을 감소 또는 폐기시키는 돌연변이를 함유한다. M2의 C_H3은 Y96F 변형(IMGT 의해; EU 의해 Y436F)을 추가로 포함할 수 있다. M2의 C_H3 내에서 찾을 수 있는 추가의 변형은 다음을 포함한다: IgG1 Fc 도메인이 경우에 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I(IMGT에 의해; EU에 의해 D356E, L358M, N384S, K392N, V397M 및 V422I); IgG2 Fc 도메인의 경우에 N44S, K52N 및 V82I(IMGT에 의해; EU에 의해 N384S, K392N 및 V422I); 및 IgG4 Fc 도메인의 경우에 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I(IMGT에 의해; EU에 의해 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I).

[0076] IL-33 길항제의 성분들의 배향 및 배열

본 발명의 IL-33 길항제의 개별 성분들(예컨대, D1, D2, M 등)은 본원의 다른 부분에서 상세히 설명된 예들과 같은 다양한 방식으로 서로에 대해 배열될 수 있다. 다양체화 도메인(M1 및/또는 M2)은 N-말단 및 C-말단을 갖는 웨티드 또는 폴리웨티드일 수 있다. 따라서, D1 및 D2 성분은 M 성분의 N- 또는 C- 말단 중 하나에서 M 성분에 부착될 수 있다. 예를 들어, D1은 M의 N-말단에 부착될 수 있다("D1-M"으로 표시됨). 다른계는, D1은 M의 C-말단에 부착될 수 있다("M-D1"으로 표시됨). 일부 실시양태에서, D2는 M의 N-말단에 부착되거나("D2-M"으로 표시됨), 또는 D2는 M의 C- 말단에 부착된다("M-D2"로 표시됨). 또 다른 실시양태에서, D1은 D2의 N-말단에 부착되고, D2는 M의 N-말단에 부착된다("D1-D2-M"으로 표시됨). 따라서, N-말단에서 C-말단까지의 개별 성분들의 다른 예시적인 배열은 다음과 같이 표시될 수 있다: D2-D1-M; M-D1; M-D2; M-D1-D2; M-D2-D1; D1-M-D2; D2-M-D1 등.

[0078] 2개의 다른 다양체화 도메인(M1 및 M2)을 포함하는 실시양태에서, 하나 이상의 IL-33 결합 도메인은 다양한 배열의 다양체화 도메인에 부착될 수 있다. 이러한 배열의 비-제한적인 예는 도 1에 개략적으로 도시되어 있다. 예를 들어, 본 발명은 제1 다양체화 도메인(M1)에 부착된 제1 IL-33 결합 도메인(D1) 및 제2 다양체화 도메인(M2)에 부착된 제2 IL-33 결합 도메인(D2)을 포함하는 IL-33 길항제를 포함한다. 본 발명의 IL-33 길항제는 또한 하나 이상의 부가적인 IL-33 결합 도메인(예컨대, D3, D4 등)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 제3 IL-33 결합 도메인(D3)을 포함하는 경우, D3 성분은 D1 또는 M1 중 하나에 부착될 수 있고; 마찬가지로, 제4 IL-33 결합 도메인(D4)을 포함하는 경우, D4 성분은 D2 또는 M2 중 하나에 부착될 수 있다.

[0079] 다수의 IL-33 결합 도메인을 포함하는 실시양태에서, IL-33 결합 도메인 중 2개 이상은 서로 동일하거나 실질적으로 동일할 수 있다. 예를 들어, 4개의 IL-33 결합 도메인(D1, D2, D3 및 D4)을 포함하는 실시양태에서, D1 및 D2가 서로 동일하거나 실질적으로 동일할 수 있고, D3 및 D4가 서로 동일하거나 실질적으로 동일할 수 있다.

[0080] 2개의 다양체화 도메인(M1 및 M2) 및 4개의 IL-33 결합 도메인(D1, D2, D3 및 D4)을 포함하는 본 발명의 IL-33 길항제의 비-제한적인 예시적인 예는 도 1(배열 C 및 D)에 도시되어 있다. 이러한 종류의 예시적인 배열에서, D1은 M1의 N-말단에 부착되고, D2는 M2의 N-말단에 부착되고, D3은 D1의 N-말단에 부착되고, D4는 D2의 N-말단에 부착된다. 패널 C는 D1 및 D2가 서로 동일하고(예컨대, 각각 IL-1RAcP의 세포와 도메인을 포함함), D3 및 D4가 서로 동일한(예컨대, 각각 ST2의 세포와 도메인을 포함함) 상황을 도시한다. 패널 C는 D1 및 D2가 동일하지 않고, D3 및 D4가 동일하지 않은 상황을 도시한다. 많은 다른 배열은 본 발명의 교시 내용에 기초하여 당업자에게 명백할 것이며 본 발명의 범주 내에 포함된다.

[0081] 링커(linker)

본 발명의 IL-33 길항제의 개별 성분들(예컨대, D1, D2, M1, M2 등)은 서로 직접 부착될 수 있고(예컨대, D1 및/또는 D2는 M에 직접 부착될 수 있다); 다른계는, 상기 개별 성분들은 링커 성분을 통해 서로 부착될 수 있다(예컨대, D1 및/또는 D2는 개별 성분들 사이에 배향된 링커를 통해 M에 부착될 수 있고; D1은 링커를 통해 D2에 부착될 수 있다). 하나의 성분이 다른 성분에 "부착"되는 것으로 기재된 본원에 개시된 임의의 배열에서, 상기 부착은 (구체적으로 지정되지 않은 경우에도) 링커를 통한 것일 수 있다. 본원에 사용된 "링커"는 2개의 폴리웨티드 성분을 결합시키는 임의의 문자이다. 예를 들어, 링커는 웨티드 결합을 통해 함께 연결된 1 내지 20개의 아미노산을 포함하는 웨티드일 수 있다. (그러나, 웨티드 결합 자체는 본원의 목적상 "링커"로 간주되지 않는다). 특정 실시양태에서, 링커는 예를 들어 글리신 및 알라닌과 같은 입체적으로 방해받지 않는 아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커는 단백질 가수분해에 대해 저항성인 아미노산의 유연한 사슬이다. 링커는 서로 상호작용하는 2개의 문자 구조를 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 링커는 스트렙타비딘

성분 및 비오틴 성분을 포함할 수 있고; (하나의 성분에 부착된) 스트렙타비딘과 (다른 성분에 부착된) 비오틴 사이의 결합은 IL-33 길항체의 개별 성분들 간의 연결 역할을 한다. hST2-hIL1RAcP-mFc 및 mST2-mIL1RAcP-mFc로서 본원에 기재된 예시적인 IL-33 길항체는 IL-1RAcP 성분과 Fc 다향체화 도메인 간의 세린-글리신(SG) 링커를 포함한다. 다른 유사한 링커 배열 및 링커를 포함하는 구성은 본 발명의 범주 내에서 고려된다.

[0083] IL-33 길항체의 생물학적 특성

본 발명은 높은 친화성의 IL-33 분자와 결합하는 IL-33 길항체를 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 예컨대 본원의 실시예 2에 정의된 바와 같은 분석 포맷을 사용하여 표면 플라즈몬 공명으로 측정시 약 400 pM 미만의 K_D 를 갖는 IL-33(예컨대, 25°C 또는 37°C에서)과 결합하는 (본원의 다른 부분에서 기재된 바와 같은) IL-33 길항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 IL-33 길항체는 예를 들어 본원의 실시예 2에 정의된 바와 같은 분석 포맷 또는 실질적으로 유사한 분석법을 사용하여 표면 플라즈몬 공명으로 측정시 약 200 pM 미만, 약 100 pM 미만, 약 90 pM 미만, 약 80 pM 미만, 약 70 pM 미만, 약 60 pM 미만, 약 50 pM 미만, 약 40 pM 미만, 약 30 pM 미만, 약 20 pM 미만, 약 10 pM 미만, 약 9 pM 미만, 약 8 pM 미만, 약 6 pM 미만, 또는 약 1 pM 미만의 K_D 를 갖는 IL-33과 결합한다.

본 발명은 또한 예를 들어 본원의 실시예 2에 정의된 바와 같은 분석 포맷 또는 실질적으로 유사한 분석법을 사용하여 25°C 또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명으로 측정시 구체적으로 약 4분 이상의 해리 반감기($t_{1/2}$)를 갖는 IL-33과 결합하는 IL-33 길항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 IL-33 길항체는 예를 들어 본원의 실시예 2에 정의된 바와 같은 분석 포맷 또는 실질적으로 유사한 분석법을 사용하여 25°C 또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명으로 측정시 약 10분 초과, 약 20분 초과, 약 30분 초과, 약 40분 초과, 약 50분 초과, 약 60분 초과, 약 70분 초과, 또는 약 500분 초과, 또는 약 1000분 초과의 $t_{1/2}$ 를 갖는 IL-33과 결합한다.

본 발명은 또한 IL-33 수용체(예컨대, ST2)에 대한 IL-33의 결합을 차단하는 IL-33 길항체를 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 예컨대 본원의 실시예 3에 정의된 바와 같은 분석 포맷 또는 실질적으로 유사한 분석법을 사용하여 ELISA 기반 면역 분석법으로 측정시 약 115 pM 미만의 IC_{50} 값을 갖는 시험관내 ST2에 대한 IL-33의 결합을 차단하는 IL-33 길항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 IL-33 길항체는 예컨대 본원의 실시예 3에 정의된 바와 같은 분석 포맷 또는 실질적으로 유사한 분석법을 사용하여 ELISA 기반 면역 분석법으로 측정시 약 120 pM 미만, 약 90 pM 미만, 약 80 pM 미만, 약 70 pM 미만, 약 60 pM 미만, 약 50 pM 미만, 약 40 pM 미만, 약 30 pM 미만, 약 20 pM 미만, 약 18 pM 미만, 약 16 pM 미만, 약 14 pM 미만, 약 12 pM 미만, 약 10 pM 미만, 약 9 pM 미만, 약 8 pM 미만, 또는 약 7 pM 미만의 IC_{50} 값을 갖는 시험관내 ST2에 대한 IL-33의 결합을 차단한다.

본 발명은 또한 IL-33 매개된 세포 신호전달을 억제하는 IL-33 길항체를 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 예컨대 본원의 실시예 4에 정의된 바와 같은 분석 포맷 또는 실질적으로 유사한 분석법을 사용하여 세포-기반 차단 생물학적 검정법으로 측정시 약 500 pM 미만의 IC_{50} 값을 갖는 인간 ST2를 발현시키는 세포에서 IL-33-매개된 신호전달을 억제하는 IL-33 길항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 IL-33 길항체는 예컨대 본원의 실시예 4에 정의된 바와 같은 분석 포맷 또는 실질적으로 유사한 분석법을 사용하여 세포-기반 차단 생물학적 검정법으로 측정시 약 400 pM 미만, 약 300 pM 미만, 약 200 pM 미만, 약 100 pM 미만, 약 80 pM 미만, 약 60 pM 미만, 약 40 pM 미만, 약 30 pM 미만, 약 20 pM 미만, 약 18 pM 미만, 약 16 pM 미만, 약 14 pM 미만, 약 12 pM 미만, 약 10 pM 미만, 약 8 pM 미만, 약 7 pM 미만, 약 6 pM 미만, 약 5 pM 미만, 약 4 pM 미만, 약 3 pM 미만, 약 2 pM 미만, 또는 약 1.5 pM 미만의 IC_{50} 값을 갖는 인간 ST2를 발현시키는 세포에서 IL-33-매개된 신호전달을 차단한다.

본 발명은 또한 IL-33-유도된 호염기구 활성화를 억제하는 IL-33 길항체 및 인간 PBMC로부터 IL-33-유도된 IFN- γ 방출을 억제하는 IL-33 길항체를 포함한다. 호염기구 활성화는 예를 들어 히스타민 및 류코트리엔과 같이 탈과립, 세포 표면 마커 발현, 사이토카인 방출 및 다른 면역 매개체 방출로서 정의될 수 있다.

본 발명의 IL-33 길항체는 하나 이상의 상기 생물학적 특징들 또는 이들의 임의의 조합을 가질 수 있다. 본 발명의 항체의 다른 생물학적 특성은 본원의 실시예를 비롯하여 본원의 검토로부터 당업자에게 명백할 것이다.

[0090] 치료 제형 및 투여

본 발명은 본 발명의 IL-33 길항체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 약학 조성물은 적합한

담체, 부형제 및 기타 향상된 전송, 전달, 공차 등을 제공하는 약제와 배합될 수 있다. 모든 제약학자에게 알려진 다음의 처방집: 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA]에서 많은 적절한 제형을 찾을 수 있다. 이들 제형은 예를 들어 분말, 페이스트, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 지질, 지질(양이온성 또는 음이온성) 함유 비히클(예컨대, LIPOFECTIN™, 캠리포니아 칼스베드 소재 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)), DNA 접합체, 무수 흡수 페이스트, 수중유 및 유중수 에멀젼, 에멀젼 카보왁스(다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜), 반고체 젤, 및 카보왁스를 함유하는 반고체 혼합물을 포함한다. 또한, 문헌 [Powell 등 "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311] 참조.

[0092] 환자에 투여되는 IL-33 길항제의 투여량은 환자의 나이 및 체격, 질환, 증상, 투여 경로 등에 따라 변할 수 있다. 바람직한 투여량은 전형적으로 체중 또는 체 표면적에 따라 계산된다. 본 발명의 IL-33 길항제가 성인 환자의 IL-33 활성과 관련된 증상 또는 질환을 치료하기 위해 사용되는 경우, 이는 통상 약 0.01 내지 약 20 mg/kg 체중, 더 바람직하게는 약 0.02 내지 약 7, 약 0.03 내지 약 5, 또는 약 0.05 내지 약 3 mg/kg 체중의 단일 용량으로 본 발명의 길항제를 정맥내 투여하는 것이 유리할 수 있다. 증상의 중증도에 따라, 치료 횟수 및 기간은 조정될 수 있다. IL-33 길항제 투여에 효과적인 투여량 및 일정은 경험적으로 결정될 수 있다; 예를 들어, 환자의 진행 상태를 주기적인 평가에 의해 모니터링하고, 그에 따라 용량을 조정할 수 있다. 또한, 투여량의 종간 스케일링을 당업계에 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다(예컨대, 문헌[Mordenti 등, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351]).

[0093] 다양한 전달 시스템 예를 들어 리포좀 캡슐화, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 변종 바이러스를 발현시킬 수 있는 재조합 세포, 수용체 매개 엔도시토시스 등이 알려져 있으며 본 발명의 약학 조성물을 투여하는 데 사용될 수 있다(예컨대, 문헌[Wu 등, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432] 참조). 도입 방법은 피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비강내, 경막외 및 경구 경로를 포함하지만 이에 국한되는 것은 아니다. 상기 조성물은 임의의 편리한 경로 예를 들어 주입 또는 블루스 주사에 의해 상피 또는 점막 벽(예컨대, 구강 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통해 투여될 수 있고 다른 생물학적 활성 제제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 또는 국소 투여일 수 있다.

[0094] 본 발명의 약학 조성물은 표준 바늘 및 주사기를 사용하여 피하 또는 정맥내 전달될 수 있다. 또한, 피하 전달과 관련하여, 펜 전달 장치를 사용하면 본 발명의 약학 조성물을 쉽게 전달할 수 있다. 이러한 펜 전달 장치는 재사용하거나 일회용일 수 있다. 재사용 가능한 펜 전달 장치는 일반적으로 약학 조성물을 함유하는 교체 가능한 카트리지를 이용한다. 카트리지 내 약학 조성물이 모두 투여되고 카트리지가 비게 되면, 빈 카트리지는 쉽게 폐기하고 약학 조성물이 담긴 새로운 카트리지로 교체할 수 있다. 그 다음 펜 전달 장치를 재사용할 수 있다. 일회용 펜 전달 장치에는 교환 가능한 카트리지가 없다. 대신에, 일회용 펜 전달 장치는 장치 내 저장조에 약학 조성물이 예비충전되어 공급된다. 저장조에서 약학 조성물이 비게 되면, 전체 장치를 폐기한다.

[0095] 다수의 재사용 가능한 펜 및 자동 주입 전달 장치가 본 발명의 약학 조성물의 피하 전달에 적용된다. 몇 가지만 예를 들면 AUTOPEN™(Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), DISETRONIC™ 펜(Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), HUMALOG MIX 75/25™ 펜, HUMALOG™ 펜, HUMALIN 70/30™ 펜(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II 및 III(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), BD™ 펜(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, 및 OPTICLIK™(sanofi-aventis, Frankfurt, Germany)을 들 수 있으나 이들에 국한되지 않는다. 본 발명의 약학 조성물의 피하 전달에 사용되는 일회용 펜 전달 장치의 예를 몇 가지만 들면 SOLOSTAR™ 펜(sanofi-aventis), FLEXPENT™(Novo Nordisk), KWIKPEN™(Eli Lilly), SURECLICK™ Autoinjector(Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™(Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN(Dey, L.P.), 및 HUMIRA™ 펜(Abbott Labs, Abbott Park IL)을 들 수 있으나 이들에 국한되지 않는다.

[0096] 특정 상황에서, 상기 약학 조성물은 조절 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 하나의 실시양태에서는, 펌프가 사용될 수도 있다(문헌[Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201] 참조). 다른 실시양태에서, 중합체성 물질이 사용될 수 있다; 문헌[Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida] 참조. 또 다른 실시양태에서, 조절 방출 시스템은 조성물의 표적 부근에 위치할 수 있으며, 따라서 전신 용량의 일부분만 필요로 할 수 있다(예컨대, 문헌[Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138] 참조). 기타 조절 방출 시스템은 문헌[Langer, 1990, Science 249:1527-1533]에서 검토되어 있다.

[0097] 주사용 제제는 정맥내, 피하, 피내 및 근육내 주사, 점적 주사 등의 투여 형태를 포함할 수 있다. 이러한 주사용 제제는 공지의 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 주사용 제제는 위에서 설명한 항체 또는 이의 염을 통상적인 주사용 무균 수성 매질 또는 유성 매질에 용해, 혼탁 또는 유화시킴으로써 조제될 수 있다. 주사용 수성 매질의 예로는 적절한 가용화제 예를 들어 알코올(예컨대, 에탄올), 다가 알코올(예컨대, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜), 바이온성 계면활성제[예컨대, 폴리소르베이트 80, HCO-50(수소 첨가 피마자유의 폴리옥시에틸렌(50 mol) 부가물)] 등과 함께 조합하여 사용될 수 있는 생리 식염수, 글루코스 함유 등장액 및 다른 보조제 등이 있다. 유성 매질로는 예를 들어 벤질 벤조에이트, 벤질 알코올 등과 같은 가용화제와 조합하여 사용될 수 있는 참깨 오일, 대두 오일 등이 사용된다. 이렇게 제조된 주사용제는 바람직하게는 적당한 앰풀에 충전된다.

[0098] 유리하게는, 위에 기술된 경구 또는 비경구용 약학 조성물은 유효 성분 용량에 맞춘 단위 용량으로 제조된다. 단위 용량의 이러한 제형에는 예를 들어 정제, 환제, 캡슐제, 주사제(앰풀), 좌제 등이 포함된다. 함유된 상기 길항제 분자의 양은 일반적으로 단위 용량의 제형, 특히 주사 형태당 약 5 내지 약 500 mg이고; 상기 길항제 분자는 다른 투여 형태에 대해서는 약 5 내지 약 100 mg 및 약 10 내지 약 250 mg으로 함유되는 것이 바람직하다.

IL-33 길항제의 치료 용도

[0100] 본 발명자들에 의해 수행된 실험은 IL-33 길항작용에 의해 치료, 예방 및/또는 경감될 수 있는 다양한 질환 및 증상의 식별에 기여했다. 예를 들어, 마우스 IL-33 DNA의 유체역학적 전달은 폐 점액 축적 및 마우스의 전체 혈청 IgE의 증가를 유도하였다. 또한, mIL-33 DNA 전달은 마이크로어레이 분석으로 측정시 ST2의 상향 조절 및 각종 하류의 사이토카인을 유도하였다. IL-33 녹아웃 마우스를 사용하여 본 발명자들에 의해 수행된 실험은 또한 IL-33 길항작용의 다양한 잠재적인 치료 효과를 밝혀내었다. 예를 들어, 육안 점수 및 피부 침윤은 IMQ-유도된 건선 모델에서 야생 마우스와 IL-33^{-/-} 마우스 간에 유사한 점이 밝혀졌다. 더욱이, IL-33^{-/-} 마우스는 알레르겐-유도된 폐 염증 모델에서 감소된 호산구 및 잔류 점액 축적을 나타내었다. 본 발명의 IL-33 길항제는 특히 IL-33 발현, 신호전달 또는 활성화 관련되거나 이에 의해 매개되거나 또는 IL-33과 IL-33 리간드(예컨대, ST2) 간의 상호작용을 차단함으로써 치료 가능한 임의의 질환 또는 장애를 치료, 예방 및/또는 경감시키거나, 또는 다른 계는 IL-33 활성 및/또는 신호전달을 억제하는 데 유용하다. 예를 들어, 본 발명은 감염성 질환(예컨대, 리슈만(*Leishmania*) 감염, 트리큐리스(*Trichuris*) 감염, 미코박테리움(*Mycobacterium*) 감염, 리스테리아(*Listeria*) 감염, 톡소플라스마(*Toxoplasma*) 감염, 치스토조마(*Schistosoma*) 감염, 호흡기 세포 융합 바이러스 감염, 인플루엔자 바이러스 감염 등), 천식(예컨대, 호산구 또는 비-호산구 천식, 스테로이드 내성 또는 스테로이드 민감성 천식, 알레르기성 천식, 비-알레르기성 천식, 중증 난치성 천식, 천식 악화[예 바이러스 성- 또는 알레르겐-유도된 천식] 등), 아토피성 피부염, 건선, 기타 염증 장애, 알레르기, 과민증, 심혈관 질환, 중추 신경계 질환, 통증, 및 관절염(예컨대, 류마티스성 관절염, 골관절염, 건선성 관절염 등), 거대 세포 동맥염, 염증성 장 질환(예컨대, 크론병 또는 궤양성 대장염), 다발성 경화증, 알레르기성 비염, 호산구성 식도염 및 자반증(Henoch-schonlein purpura)을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 IL-33 길항제는 또한 하나 이상의 섬유성 질환의 치료, 예방 및/또는 경감에 유용하다. 본 발명의 IL-33 길항제를 투여함으로써 치료 할 수 있는 예시적인 섬유성 질환은 폐 섬유증(예컨대, 특발성 폐 섬유증, 블레오마이신-유발 폐 섬유증, 석면-유발 폐 섬유증, 및 폐쇄성 세기관지염 증후군), 만성 천식, 급성 폐 손상 및 급성 호흡 곤란과 관련된 섬유증(예컨대, 알레르기 유발 섬유증, 세균성 폐렴 유발 섬유증, 외상에 의한 섬유증, 바이러스성 폐렴 유발 섬유증, 인공 호흡기에 의한 섬유증, 비-폐 폐혈증 유발 섬유증 및 흡인에 의한 섬유증), 규폐증, 방사선-유발 섬유증, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD, 예컨대 COPD 악화, 또는 제1 또는 제2 손 담배 연기에 의해 부분적으로 발생하거나 또는 그로 인한 COPD), 눈 섬유증, 피부 섬유증(예컨대, 경피증), 간 섬유증(예컨대, 간경변, 알코올-유도 간 섬유증, 비-알코올성 지방간염(NASH), 담도 손상, 원발성 담즙성 간경변증, 갑염- 또는 바이러스-유도 간 섬유증[예컨대, 만성 HCV 감염, 자가 면역 간염], 신장(신) 섬유증, 심장 섬유증, 동맥 경화, 스텐트 재협착증 및 골수 섬유증을 포함한다.

[0101] 본원에 기재된 치료 방법의 맥락에서, IL-33 길항제는 단일 요법(즉, 유일한 치료제)으로서 투여되거나 또는 하나 이상의 추가의 치료제(이의 예는 본원의 다른 부분에 기재되어 있음)와 함께 투여될 수 있다.

병용 치료 및 제형

[0103] 본 발명은 본원에 기재된 임의의 IL-33 길항제를 하나 이상의 추가적인 치료 활성 성분과 조합하여 포함하는 조성물 및 치료 제형, 및 이러한 조합물을 이를 필요로 하는 피험자에게 투여하는 것을 포함하는 치료 방법을 포함한다. 본 발명의 IL-33 길항제는 또한 예를 들어 사이토카인 억제제 또는 길항제 예컨대 IL-1, IL-2, IL-3,

IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-26, IL-31와 같은 사이토카인에 결합하는 항체 및 소분자 사이토카인 억제제, IL-4/IL-13 이중 길항제, IL-12/IL-23 길항제, PDE4 억제제(하나의 실시양태에서, 경구 PDE4 억제제), 및 다른 IL-33 길항제 또는 IL-33에 대한 다른 항체, 흉선 간질 텁포포이에틴(TSLP), 또는 이를 각각의 수용체의 길항제와 조합되어 공동-제형화되고/되거나 투여될 수 있다.

[0104] 본 발명의 IL-33 길항제는 또한 항바이러스제, 항생제, 진통제, 코르티코스테로이드, 스테로이드, 산소, 항산화제, 금속 칼레이트제, IFN- γ 및/또는 NSAID, 기관지 확장제, 항히스타민제, 에피네프린 또는 충혈 경감제와 조합되어 투여되고/되거나 공동-제형화될 수 있다.

[0105] 추가적인 치료 활성 성분은 본 발명의 IL-33 길항제의 투여 직전에, 동시에 또는 직후에 투여될 수 있다; (본 발명의 목적상, 이러한 투여 요법은 부가적인 치료 활성 성분과 "조합하여" IL-33 길항제를 투여하는 것으로 간주된다). 본 발명은 본 발명의 IL-33 길항제가 본원의 다른 부분에 기재된 하나 이상의 추가적인 치료 활성 성분(들)과 공동-제형화된 약학 조성물을 포함한다.

투여 요법

[0107] 본 발명의 특정 실시양태에 따르면, IL-33 길항제(또는 IL-33 길항제와 본원에 언급된 임의의 추가적인 치료 활성제의 조합을 포함하는 약학 조성물)의 다중 투여량은 정해진 기간에 걸쳐 피험자에게 투여될 수 있다. 본 발명의 이러한 양태에 따른 방법은 본 발명의 IL-33 길항제의 다중 투여량을 피험자에게 순차적으로 투여하는 것을 포함한다. 본원에 사용된 "순차적 투여"는 IL-33 길항제의 각 투여량이 다른 시점 예를 들어 미리 정해진 시간 간격(예컨대, 시간, 일, 주 또는 월)에 의해 분리된 다른 일자에 피험자에게 투여되는 것을 의미한다. 본 발명은 IL-33 길항제의 단일 초기 투여량을 환자에게 투여한 다음 IL-33 길항제의 1회 또는 그 이상의 2차 투여량을 투여하고, 임의적으로 IL-33 길항제의 1회 또는 그 이상의 3차 투여량을 순차적으로 투여하는 것을 포함하는 방법을 포함한다.

[0108] 용어 "초기 용량", "2차 용량" 및 "3차 용량"은 본 발명의 IL-33 길항제 투여의 임시 순서를 지칭한다. 따라서, "초기 용량"은 치료 요법의 시작 시점에 투여되는 용량("기준선 용량"이라고도 함)이고; "2차 용량"은 초기 용량 후에 투여되는 용량이며; "3차 용량"은 2차 용량 후에 투여되는 용량이다. 초기, 2차 및 3차 용량은 모두 동일한 양의 IL-33 길항제를 포함하지만 일반적으로 투여 빈도에 따라 서로 달라질 수 있다. 그러나, 특정 실시양태에서, 초기, 2차 및/또는 3차 용량에 함유된 IL-33 길항제의 양은 치료 과정 중에 서로 달라진다(예컨대, 필요에 따라 증량 또는 감량된다). 특정 실시양태에서, 둘 이상(예컨대, 2, 3, 4 또는 5)의 투여량이 치료 요법 초기에 "로딩 용량"으로 투여된 후 빈도를 줄인 후속 용량(예컨대, "유지 용량")으로 투여된다.

[0109] 본 발명의 특정의 예시적인 실시양태에서, 각각의 2차 및/또는 3차 용량은 바로 전 용량 투여 후 1 내지 26주(예컨대, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ 또는 그 이상)에 투여된다. 본원에 사용된 표현 "바로 전 투여량"은 다중 투여 순서에서, 순서의 중간에 개재되는 투여량 없이 바로 다음 용량 투여 전에 환자에게 투여되는 IL-33 길항제의 투여량을 의미한다.

[0110] 본 발명의 이러한 양태에 따른 방법은 IL-33 길항제의 2차 및/또는 3차 용량을 임의의 횟수로 환자에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 단일 2차 용량만을 환자에게 투여한다. 다른 실시양태에서, 둘 또는 그 이상(예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 그 이상)의 2차 용량이 환자에게 투여된다. 유사하게, 특정 실시양태에서, 단일 3차 용량만을 환자에게 투여한다. 다른 실시양태에서, 둘 또는 그 이상(예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 그 이상)의 3차 용량을 환자에게 투여한다.

[0111] 다중 2차 용량과 관련된 실시양태에서, 각각의 2차 용량은 다른 2차 용량과 같은 빈도로 투여될 수 있다. 예를 들어, 각각의 2차 용량은 이전 용량 직후 1 내지 2주 또는 1 내지 2개월 시점에 환자에게 투여될 수 있다. 유사하게, 다중 3차 용량과 관련된 실시양태에서, 각각의 3차 용량은 다른 3차 용량과 같은 빈도로 투여될 수 있다. 예를 들어, 각각의 3차 용량은 이전 용량 직후 2 내지 12주 시점에 환자에게 투여될 수 있다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 2차 및/또는 3차 용량이 환자에게 투여되는 빈도는 치료 요법 동안에 다를 수 있다. 또한, 투여 빈도는 임상 시험에 따른 개별 환자의 필요에 따라 치료 과정 동안 의사에 의해 조정될 수 있다.

[0112] 본 발명은 2 내지 6개의 로딩 용량을 제1 빈도(예컨대, 주 1회, 2주에 1회, 3주에 1회, 한 달에 1회, 두 달에 1회 등)로 환자에게 투여한 후 빈도를 줄여 2개 이상의 유지 용량을 환자에게 투여하는 투여 요법을 포함한다.

예를 들어, 본 발명의 이러한 양태에 따르면, 로딩 용량을 1달에 1회 빈도로 투여하는 경우, 유지 용량은 6주에 1회, 2달에 1회, 3달에 1회 등으로 환자에게 투여할 수 있다.

[0113] 실시예

하기 예시는 당해 분야 통상의 기술자에게 본 발명의 방법 및 조성물을 제조하고 사용하는 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을 제공하기 위해 제시되는 것으로, 본 발명자들이 발명으로서 간주하는 범위를 제한하려는 것은 아니다. 사용된 수치(예컨대, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 기하려고 노력하였지만 약간의 실험적 오류와 편차를 고려해야 한다. 달리 표시되지 않는 한, 부(part)는 중량부이고, 분자량은 평균 분자량이며, 온도는 섭씨 온도이고, 압력은 대기압 또는 그 부근이다.

[0115] 실시예 1. IL-33 길항제의 제조

본 발명의 5개의 예시적인 IL-33 길항제는 표준 분자 생물학적 기술을 이용하여 구축하였다. 제1 IL-33 길항제(hST2-hFc, 서열번호:1)는 그 C-말단에서 인간 IgG1 Fc 영역(서열번호:9)의 N- 말단과 융합된 인간 ST2(서열번호:5)의 가용성 세포외 영역으로 구성된다. 제2 IL-33 길항제(hST2-mFc, 서열번호:2)는 그 C-말단에서 마우스 IgG2a Fc 영역(서열번호:10)의 N-말단과 융합된 인간 ST2(서열번호:5)의 가용성 세포외 영역으로 구성된다. 제3 IL-33 길항제(hST2-hIL1RAcP-mFc, 서열번호:3)는 그 N-말단에서 인간 ST2(서열번호:5)에 이어서 인간 IL-1RAcP(서열번호:7)의 세포외 영역에 이어서 그 C-말단에서 마우스 IgG2a Fc(서열번호:10)를 갖는 인-라인 융합으로 구성된다. 제4 IL-33 길항제(mST2-mIL1RAcP-mFc, 서열번호:4)는 그 N-말단에서 마우스 ST2(서열번호:6)에 이어서 마우스 IL-1RAcP(서열번호:8)에 이어서 그 C-말단에서 마우스 IgG2a Fc(서열번호:10)를 갖는 인-라인 융합으로 구성된다. 제5 IL-33 길항제(hST2-hIL1RAcP-hFc, 서열번호:13)는 그 N-말단에서 서열번호:5의 인간 ST2에 이어서 인간 IL-1RAcP(서열번호:7)의 세포외 영역에 이어서 그 C-말단에서 인간 IgG1을 Fc(서열번호:9)를 갖는 인-라인 융합으로 구성된다. 표 1a는 서로 다른 IL-33 길항제 및 이들의 구성 성분의 개요를 나타낸다. 표 1b는 IL-33 길항제 및 이들의 구성 성분의 아미노산 서열을 나타낸다.

표 1a: IL-33 길항제 요약

IL-33 길항제	전체 길항제 분자의 아미노산 서열	D1 성분	D2 성분	M 성분
hST2-hFc	서열번호:1	인간 ST2 세포외 (서열번호:5)	부재	인간 IgG1 Fc (서열번호:9)
hST2-mFc	서열번호:2	인간 ST2 세포외 (서열번호:5)	부재	마우스 IgG2a Fc (서열번호:10)
hST2-hIL1RAcP-mFc	서열번호:3	인간 ST2 세포외 (서열번호:5)	인간 IL-1RAcP 세포외(서열번호:7)	마우스 IgG2a Fc (서열번호:10)
mST2-mIL1RAcP-mFc	서열번호:4	마우스 ST2 세포외(서열번호:6)	마우스 IL-1RAcP 세포외(서열번호:8)	마우스 IgG2a Fc (서열번호:10)
hST2-hIL1RAcP-hFc	서열번호: 13	인간 ST2 세포외 (서열번호:5)	인간 IL-1RAcP 세포외(서열번호:7)	인간 IgG1 Fc (서열번호:9)

[0118]

표 1b: 아미노산 서열

식별자	서열
서열번호:1 (hST2-hFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPROGKPSYTVWDWYYSQTNKSIPTQERNRFFASGQILKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFXRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMSITVSGSEKNSKIYCPTIDLYNWTAPLEWFKNQCALQGSRYRAHKSLVIDNVMTEDAGDYTCKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNIEKEVEIGKNAULTCSACFGKGTOQFLAALWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFNSNGLACDMVLRIADVKEEDILLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSDKHTCPPCPAPEIILGGPSVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNYYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVSVSLTVLHQQDWLNKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQPEENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
서열번호:2 (hST2-mFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPROGKPSYTVWDWYYSQTNKSIPTQERNRFFASGQILKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFXRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMSITVSGSEKNSKIYCPTIDLYNWTAPLEWFKNQCALQGSRYRAHKSLVIDNVMTEDAGDYTCKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNIEKEVEIGKNAULTCSACFGKGTOQFLAALWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFNSNGLACDMVLRIADVKEEDILLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNILGGPSVIFPPKIKDVLMIISLPIVTCVVVDVSEDDPDVQ1SWFVNNEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALP1QHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQYVLPPEEMTKQVLTCTMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLREVEKKWVERNSYSCSVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
서열번호:3 (hST2-hIL1RAcP-mFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPROGKPSYTVWDWYYSQTNKSIPTQERNRFFASGQILKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFXRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMSITVSGSEKNSKIYCPTIDLYNWTAPLEWFKNQCALQGSRYRAHKSLVIDNVMTEDAGDYTCKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNIEKEVEIGKNAULTCSACFGKGTOQFLAALWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFNSNGLACDMVLRIADVKEEDILLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSSERCDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNFYSTAHSGALTLIWYWTQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLWFRPTILNDTGYTCMLRNNTYCSKVAFFPLEVVKQDCFSXPMKLPVHKLYIEYG1QRITCPNDGYFPSSVKPTITWYMGCYK1QXFNVIPEGMNLSSLIALISXNGYTCVVTYPENGRFTLRTLTVKVVGSPKNAVPPVISHPNDVYVEKEPGEELIIPCTVYFSFLMDSRNEVWTIDGKKPDDITIDVTTINESIHSRTEDETRTQILSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAKGEVAKAAKVQKQVPAFRTVESGEPRGPTIKCPCPKCPAPXILGGPSVIFPPKIKDVLMIISLPIVTCVVVDVSEDDPDVQ1SWFVNNEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALP1QHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQYVLPPEEMTKQVLTCTMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLREVEKKWVERNSYSCSVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
서열번호:4 (mST2-mIL1RAcP-mFc)	SKSSWGLENEALIVRCPROGKPSYTVWDWYYSQTNKSIPTQERNRFFASGQILKFLPARVEDSGIYACVIRSPNLNKTGYLVTIHKPPSCNIPDYLMSITVGRSDKFKITCTPTIDLYNWTAPVWFKNCKALQPRFRAHRSYLFIDNVTHDDEGDYTCQFTHAEGTNIVTATRSFTVEEKGFMSFPVITNPPYNHMEVEIGKPASIACACFGKGSHFLADVLWQINKTVVGNFGEARIQEEGRNEESSNDMDCLTSVRLITGVTEKDLSELEYDCLALNLHGMIRHTIRLRRKQPIDHRSERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNFYSTAHSSGGLTLIWYWTQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLWFRPTILNDTGYTCMLRNNTYCSKVAFFPLEVVKQDCFSXAMRPVHKMYIEHG1HK1TCPNDGYFPSSVKPSVTWYKGCTEVDFHNVLPEGMNLSSLF1PLVSXNGYTCVVTYPENGRFLHLTRTVTKVVGSPKDALPPQIVSPNDRVYEKEPGEELV1PCKVYFSFIMDSHNEVWTIDGKKPDDTVDTITNESVSYSSTEDETRTQILSIKKVTPEDLRRNYVCHARNTKGAEAQAAVKQKV1PPRTVESGEPRGPTIKCPCPKCPAPNILGGPSVIFPPKIKDVLMIISLPIVTCVVVDVSEDDPDVQ1SWFVNNEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALP1QHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQYVLPPEEMTKQVLTCTMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLREVEKKWVERNSYSCSVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
서열번호:5 (인간-ST2 세포외 도메인)	KFSKQSWGLENEALIVRCPROGKPSYTVWDWYYSQTNKSIPTQERNRFFASGQILKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFXRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMSITVSGSEKNSKIYCPTIDLYNWTAPLEWFKNQCALQGSRYRAHKSLVIDNVMTEDAGDYTCKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQNIEKEVEIGKNAULTCSACFGKGTOQFLAALWQLNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFNSNGLACDMVLRIADVKEEDILLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHH

[0120]

식별자	서열
서열번호:6 (마우스 ST2 세포외 도메인)	SKSSWGLENEALIVRCPRQRGRSTYPVEWYYSDTNESIPTQQRNRIFVSRDRLKFLPARVEDSGIYACVIRSPNLNKTGYLNVTIHKKPPSCNIPDYLMSYSTVRGSDKNFKITCPTIDLYNWATPVQWFKNCKALOEPFRFAHRSYLFIDNVTHDDEGDYTCQFTHAENGNTVIATRASFTVEEKGSMPVITNPYNNHTMEVEIJKPASIACASACFGKGSFLADVLWQINKTVGNGEARIQEEGRNESSNSMDCLTSVLR1TGVTEKDLSEYDCLALNHGMIRHT1RLRRKOPIDHR
서열번호:7 (인간 IL1RAcP 세포외 도메인)	SERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPAR1KCPFLFEHFLKFNYSTAHSAGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLWFRPTILNDTGNYTCMLRNNTYCSKVAFFPLEVVKDSCFNNSPMKLPVHKLYIEGYIQRITCPNDGYFPSSVKPTITWYMCYKIQNFNNV1PEGMNLFLIALISNNGNYCTVVTYPENGRTFHLLRTLTVKVGSPKXAVPPVIIHSPNDHVVEKEPGEELILIPCTVYFSFLMDSRNVEWWTIDGKKPDDITIDVTINESIHSRSTEDETRTQILSIKKVTPEDLRRSYVCHARSAKGEVAKVQKVPPRYTVE
서열번호:8 (마우스 IL1RAcP 세포외 도메인)	SERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPAR1KCPFLFEHFLKFNYSTAHSAGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLWFRPTILNDTGNYTCMLRNNTYCSKVAFFPLEVVKDSCFNNSPMKLPVHKLYIEGHJHKITCPNDGYFPSSVKPTVTWYKGCTEIVDFHNVLPVGMNLSSFFIPLVSNNNGNYCTVVTYPENGRLFHLLRTLTVKVGSPKDALPPQIYSPNDRVVEKEPGEELVIPCCKVYFSFIMDSHNEWWTIDGKKPDDITIDVTINESIHSRSTEDETRTQILSIKKVTPEDLRRNYVCHARNTKGEAEQAAKVQKVPPRYTVE
서열번호:9 (인간 IgG1 Fc)	DKHTCPPCPAPEILGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFWYDGVEVHNAKTKPREEQYNXSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGYPSDIAVEWESNGOPENYYKTPVLDSDGSFFYSLKTVDSRWQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
서열번호:10 (마우스 IgG2a Fc)	EPRGFTIKPCPPCKCPAPN1LGGPSVFIFFPKIKDVLMSLSP1VTCVVVDVSEDDPDVQISWVFVNNEVHTAQQTQHREDYNSTLRSVSLP1QHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLLPPPEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTXNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNVERNSYCSVVHEGLHNHHHTKSFSRTPGK
서열번호:11 (<i>M.</i> <i>fascicularis</i> IL-33-6His)	SITGISPITESLASLSTYNDQSITFALEDESYE1YVEDLKKDKKKDKVILSYYESQHPSSESQDGKMLMTLSPTKDFWLQANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVLHNRSFNCVSEFECKTDPGVF1GVKDNLHALIKVDYSENLSENILFKLSE1LEHHHHHH
서열번호:13 (hST2- hIL1RAcP- hFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQILKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFXRTGYAVENTIYKKQSDCNCVPDYLMSYSTVGSEKNSK1YCPTIDLYNWATPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEDAGDYTCFKF1HENEGANYSVATRSTVYKDEQGFSLFVPIGAPAQNIEKEVEIGKNAVLTCSCAFGKGTQFLAAVLWQLNNGTKITDGFEPRIQEEQGQNSQFSNGLAICLDMVLR1ADYKEEDILLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNP1DHHSSERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPAR1KCPFLFEHFLKFNYSTAHSAGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLWFRPTILNDTGNYTCMLRNNTYCSKVAFFPLEVVKDSCFNNSPMKLPVHKLYIEGYIQRITCPNDGYFPSSVKPTITWYMCYKIQNFNNV1PEGMNLFLIALISNNGNYCTVVTYPENGRTFHLLRTLTVKVGSPKXAVPPVIIHSPNDHVVEKEPGEELILIPCTVYFSFLMDSRNVEWWTIDGKKPDDITIDVTINESIHSRSTEDETRTQILSIKKVTPEDLRRSYVCHARSAKGEVAKVQKVPPRYTVEDEKTHTCPPCPAPEILGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVDDVSHEDPEVFKFWYDGVEVHNAKTKPREEQYNXSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGYPYSLAIVEWESNGOPENYYKTPVLDSDGSFFYSLKTVDSRWQOGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0121]

실시예에 따라 발생한 예시적인 IL-33 길항제의 특정의 생물학적 특성을 하기 실시예에서 상세히 기재한다.

실시예 2. 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정된 인간, 마우스 및 원숭이 IL-33에 대한 IL-33 길항제의 결합

정제 IL-33 트랩 단백질 및 ST2 수용체 단백질에 결합하는 C-말단 핵사히스티딘 태그(Mf IL-33-6His; 서열번호:12)로 발현되는 인간 IL-33(R & D Systems, # 3625 IL-010/CF), 마우스 IL-33(R & D Systems, # 3626-ML-010/CF) 및 원숭이 IL-33에 대한 평형 해리 상수(K_D μ M)는 25°C 및/또는 37°C에서 비아코어(Biacore) T-200 기기를 사용하여 실시간 표면 플라즈몬 공명 바이오센서를 사용하여 측정하였다. 비아코어 센서면은 우선 각각 C-말단 마우스 IgG2a Fc 태그 또는 C-말단 인간 IgG1 Fc 태그의 IL-33 트랩 ALC 수용체 단백질을 포획하기 위해 폴리클로날 토끼 항-마우스 항체(GE, # BR-1008-38) 또는 모노클로날 마우스 항-인간 Fc 항체(GE, # BR-1008-39)를 아민 커플링하여 유도하였다. 반응속도 실험은 0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA 및 0.005% v/v 서팩턴트 트윈(Surfactant Tween)-20(HBST 실행 버퍼)에서 수행하였다. HBST 실행 버퍼(트랩 단백질의 경우, 60 nM 내지 27.4 pM, 3배 희석, ST2 수용체 단백질의 경우 60 nM 내지 0.25 nM, 3배 희석)는 50 μ l /분의 유속으로 포획된 IL-33 트랩 및 수용체 단백질 표면상에 주입하였다. 상이한 IL-33 단백질과 상이한 포획 표면의 희합은 트랩 단백질에 대해서는 7분 동안 또는 ST2 수용체 단백질에 대해서는 4분 동안 모니터링하고, HBST 실행 버퍼 중의 해리는 트랩 단백질에 대해서는 14분 동안 또는 ST2 수용체 단백질에 대해서는 8분 동안 모니터링하였다. 동적 해리(k_d) 및 해리(k_a) 속도 상수는 스크러버(Scrubber) 2.0c 커브-피팅 소프트웨어를 사용하여 실시간 결합 센서그램을 1:1 결합 모델로 피팅하여 결정하였다. 결합 해리 평형 상수(K_D) 및 해리 반감기($t_{1/2}$)는 하기 식과 같은 동적 속도 상수로부터 계산하였다:

$$K_D(M) = k_d/k_a \quad \text{및} \quad t_{1/2}(\text{분}) = \ln(2)/(60*k_d)$$

[0125]

[0126]

25°C 및 37°C에서 인간, 원숭이, 마우스 IL-33에 결합하는 IL-33 트랩 단백질에 대한 반응속도 파라미터는 표 2 내지 표 7에 나타내었고, 25°C에서 인간 및 마우스 IL-33에 결합하는 ST2 수용체 단백질에 대한 결합 속도는 표 2 및 6에 나타내었다. 표 2에 나타낸 바와 같이, IL-33 트랩 및 수용체 단백질은 25°C에서 약 0.53 pM 내지 54 pM 범위의 K_D 값을 갖는 인간 IL-33에 결합된다. 표 3에 나타낸 바와 같이, IL-33 트랩 단백질은 37°C에서 약 0.569 pM 내지 353 pM 범위의 K_D 값을 갖는 인간 IL-33과 결합한다. 표 4에 나타낸 바와 같이, IL-33 트랩 단백질은 25°C에서 약 0.596 pM 내지 53.5 pM 범위의 K_D 값을 갖는 MfIL-33-6H1s와 결합한다. 표 5에 나타낸 바와 같이, IL-33 트랩 단백질은 37°C에서 약 0.551 pM 내지 190 pM 범위의 K_D 값을 갖는 MfIL-33-6H1s와 결합한다. 표 6에 나타낸 바와 같이, IL-33 트랩 및 수용체 단백질은 25°C에서 약 6.1 pM 내지 약 102 pM 범위의 K_D 값을 갖는 마우스 IL-33과 결합한다. 표 7에 나타낸 바와 같이, IL-33 트랩 단백질은 37°C에서 약 2.78 pM 내지 93.3 pM 범위의 K_D 값을 갖는 마우스 IL-33과 결합한다.

[0127]

표 2: 25°C 인간 IL-33 트랩, 마우스 IL-33 트랩 및 인간 ST2 수용체 단백질에 결합하는 인간 IL-33의 결합 속도 파라미터

포획 분석물질	포획 분석물질의 양 (RU)	60nM 인간 IL-33 결합 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
hST2-hIL1RAcP-hFc	276 ± 0.7	19	1.89E+07	1.00E-05*	5.30E-13*	1155*
hST2-hIL1RAcP-mFc	256 ± 2.9	28	1.92E+07	6.32E-05	3.29E-12	183
mST2-mIL1RAcP-mFc	233 ± 3.0	22	1.82E+07	1.29E-03	7.09E-11	9
hST2-hFc	230 ± 7.7	25	5.90E+06	3.20E-04	5.40E-11	36
hST2-mFc	255 ± 6.6	24	5.72E+06	3.07E-04	5.36E-11	38

* 실험 조건 하에서, 포획 단일클론 항체로부터 IL-33의 분해는 관찰되지 않았으며; 따라서, k_d 값은 1.00E-05로 고정되었고, 유도된 $t_{1/2}$ 및 K_D 값은 각각 하한 및 상한을 나타낸다.

[0128]

표 3: 37°C에서 인간 및 마우스 IL-33 트랩에 결합하는 인간 IL-33의 결합 속도 파라미터

포획 분석물질	포획 분석물질의 양(RU)	60nM 인간 IL-33 결합 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
hST2-hIL1RAcP-hFc	339 ± 10.7	26	1.76E+07	1.00E-05*	5.69E-13*	1155*
hST2-hIL1RAcP-mFc	258 ± 4.3	28	1.82E+07	2.02E-05	1.11E-12	573
mST2-mIL1RAcP-mFc	222 ± 5.2	20	9.11E+06	3.22E-03	3.53E-10	4

* 실험 조건 하에서, 포획 단일클론 항체로부터 IL-33의 분해는 관찰되지 않았으며; 따라서, k_d 값은 1.00E-05로 고정되었고, 유도된 $t_{1/2}$ 및 K_D 값은 각각 하한 및 상한을 나타낸다.

[0130]

[0131]

표 4: 25°C에서 인간 및 마우스 IL-33 포획에 결합하는 원숭이 IL-33의 결합 속도 파라미터

포획 분석물질	포획 분석물질의 양(RU)	60nM 원숭이 IL-33 결합 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
hST2- hIL1RAcP-hFc	274 ± 0.9	20	1.68E+07	1.00E-05*	5.96E-13*	1155*
hST2- hIL1RAcP-mFc	247 ± 4.1	28	1.31E+07	4.09E-05	3.13E-12	282
mST2- mIL1RAcP-mFc	225 ± 3.6	23	4.55E+06	2.44E-04	5.35E-11	47

* 실험 조건 하에서, 포획 단일클론 항체로부터 IL-33의 분해는 관찰되지 않았으며; 따라서, k_d 값은 1.00E-05로 고정되었고, 유도된 $t_{1/2}$ 및 K_D 값은 각각 하한 및 상한을 나타낸다.

[0132]

표 5: 37°C에서 인간 및 마우스 IL-33 트랩에 결합하는 원숭이 IL-33의 결합 속도 파라미터

포획 분석물질	포획 분석물질의 양(RU)	60nM 원숭이 IL-33 결합 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
hST2- hIL1RAcP-hFc	308 ± 8.2	25	1.82E+07	1.00E-05*	5.51E-13*	1155*
hST2- hIL1RAcP-mFc	247 ± 3	27	1.45E+07	4.79E-05	3.29E-12	241
mST2- mIL1RAcP-mFc	209 ± 3.1	21	6.16E+06	1.17E-03	1.90E-10	10

* 실험 조건 하에서, 포획 단일클론 항체로부터 IL-33의 분해는 관찰되지 않았으며; 따라서, k_d 값은 1.00E-05로 고정되었고, 유도된 $t_{1/2}$ 및 K_D 값은 각각 하한 및 상한을 나타낸다.

[0134]

표 6: 25°C에서 인간 IL-33 트랩, 마우스 IL-33 트랩 및 인간 ST2 수용체 단백질에 결합하는 마우스 IL-33의 결합 속도 파라미터

포획 분석물질	포획 분석물질의 양(RU)	60nM 마우스 IL-33 결합(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
hST2- hIL1RAcP-hFc	272 ± 0.9	17	3.66E+06	2.23E-05	6.10E-12	517
hST2- hIL1RAcP-mFc	237 ± 2.7	22	4.67E+06	8.97E-05	1.92E-11	129
mST2- mIL1RAcP-mFc	217 ± 1.9	22	4.73E+06	4.94E-05	1.05E-11	234
hST2-hFc	211 ± 4.4	18	4.10E+06	4.23E-04	1.02E-10	27
hST2-mFc	238 ± 4.1	18	3.97E+06	3.50E-04	8.82E-11	33

[0136]

표 7: 37°C에서 인간 및 마우스 IL-33 트랩에 결합하는 마우스 IL-33의 결합 속도 파라미터

포획 분석물질	포획 분석물질의 양(RU)	60nM 마우스 IL-33 결합(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
hST2-hIL1RAcP-hFc	280 ± 7.7	18	3.60E+06	1.00E-05*	2.78E-12*	1155*
hST2-hIL1RAcP-mFc	236 ± 3.2	21	3.39E+06	3.17E-04	9.33E-11	36
mST2-mIL1RAcP-mFc	199 ± 2.8	20	6.00E+06	1.28E-04	2.13E-11	90

* 실험 조건 하에서, 포획 단일클론 항체로부터 IL-33의 분해는 관찰되지 않았으며; 따라서, k_d 값은 1.00E-05로 고정되었고, 유도된 $t_{1/2}$ 및 K_D 값은 각각 하한 및 상한을 나타낸다.

실시 예 3. 인간 ST2 수용체에 대한 IL-33의 결합을 차단하는 IL-33 길항제

인간 ST2 수용체에 결합하는 인간 IL-33(hIL-33)을 차단하는 본 발명의 예시적인 IL-33 길항제의 능력을 경쟁 샌드위치 ELISA를 사용하여 측정하였다. C-말단 마우스의 Fc 태그(서열번호:2)로 발현된 인간 ST2 단백질 세포 와 도메인 부분을 밤새 4°C에서 96-웰 마이크로티터 플레이트에 PBS 완충액 중의 1 μg/mL의 농도로 코팅하였다. 비특이적 결합 부위는 이후 PBS 중의 0.5%(w/v) BSA 용액으로 차단하였다. 바이오텐일화된 hIL-33 단백질(R & D systems, #3625-IL/CF)(biot-hIL-33)은 0 내지 100 nM 범위의 IL-33 길항제의 계대 희석액에 첨가하여 20 pM의 일정한 최종 농도를 달성하였다. 혼합물을 hST2-hFc 피복된 마이크로티터 플레이트로 이동하기 전에 실온(RT)에서 1시간 동안 배양하였다. RT에서 1시간 동안 배양한 후, 웰을 세척하고, 플레이트-결합 biot-hIL-33을 HRP-접합 스트렙타비딘(써모 사이언티픽(Thermo Scientific), # N200)으로 검출하였다. 모든 샘플은 TMB 용액(BD 바이오사이언시스, # 51-2607KC)으로 현상하여 비색 반응을 생성하고, 이어서 1 M 황산으로 산성화하여 켄칭한 후 빅터 X5 플레이트 판독기(퍼킨 엘머(PerkinElmer))상에서 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 데이터 분석은 프리즘(Prism™) 소프트웨어 내에서 S 자형 용량-반응 모델을 사용하여 수행하였다. hST2-mFc에 대한 biot-hIL-33 결합의 50%를 차단하는 데 필요한 길항제 분자의 농도로서 정의된 IC₅₀ 값은 역 가 차단의 지표로서 사용하였다. 최대 차단 값은 기준선에 대해 IL-33 결합을 차단하는 길항제의 능력을 나타낸다. 용량 곡선에서 hIL-33의 일정량에서 측정된 흡광도를 0% 차단율로 정의하고, IL-33 첨가량이 없는 것을 100% 차단율로 정의하였다. 각각의 길항제에 대해 최고 농도를 함유하는 웰의 흡광도 값은 최대 차단율을 결정하는 데 사용하였다.

표 8: IL-33 길항제에 의한 비오텐-hIL-33의 hST2-hFc에 대한 ELISA 차단

IL-33 길항제	hST2-hFc에 대한 20pM 비오텐-hIL-33 차단, IC ₅₀ (M)	% 최대 차단율
hST2-hFc	1.92E-11	99
hST2-mFc	1.69E-11	100
hST2-hIL1RAcP-mFc	6.34E-12	97
mST2-mIL1RAcP-mFc	1.12E-10	97

표 8에 나타낸 바와 같이, 4개의 IL-33 길항제는 hST2-mFc와 비오텐-hIL-33 결합 차단에 대해 시험하였고, 112 pM 내지 6.34 pM 범위의 IC₅₀ 값 및 최대 차단율 97% 내지 100% 범위를 가졌다.

실시예 4: IL-33 길항에 의한 IL-33-매개된 수용체 신호화 억제

인터루킨-33(IL-33)은 보조 단백질 IL-1RAcP와 회합하는 툴(to11)-유사/인터루킨-1 수용체 수퍼-페밀리 구성원인 ST2에 대한 리간드이다(검토를 위해서는 문헌[Kakkar and Lee, (2008), Nat Rev Drug Discovery, Oct; 7(10): 827-840] 참조). IL-33에 의한 ST2-1RAcP의 활성화시, 신호화 캐스케이드는 MyD88(골수성 차별화 인자 88) 및 TRAF6(TNF 수용체 결합된 인자 6)와 같은 다운스트림 분자들을 통해 야기되어, 특히 NF κB(핵 인자-κ B)의 활성화를 유도한다. IL-33 길항제를 시험하는 생물학적 관련 생물검정 시스템을 개발하기 위해, 인간 배

아 신장 세포(HEK293)를 안정적으로 형질감염시켜 루시퍼라제 수용체[NF_κB 반응 요소(5x)-루시퍼라제-IRES-GFP](HEK293/hST2/NF_κB-루시퍼라제 세포주)와 함께 인간 ST2(접근번호 NP_057316의 아미노산 1-556)를 발현 시켰다. HEK293 세포주는 IL-1RAcP 내생 발현하고, HEK293 세포에서 IL-33에 의한 NF_κB 활성화가 앞서서 나타났다(문헌[Schmitz 등, (2005), *Immunity* 23:479-490]). 안정한 세포주를 단리하고 10% FBS, DMEM, NEAA, 페니실린/스트렙토마이신 및 G418에 유지하였다.

[0146] 생물검정을 위해, HEK293/hST2/NF_κB-루시퍼라제 세포를 0.1% FBS 및 OPTIMEM(인비트로겐, #31985-070)를 함유하는 저 혈청 배지에서 웰 당 10,000개 세포에서 96-웰 분석 플레이트에 접종한 다음에 5% CO₂에서 밤새 37°C에서 배양하였다. 다음날, IL-33의 용량 반응을 결정하기 위해, 인간 IL-33(hIL-33; R & D Systems, #3625-IL), C-말단 핵사히스티딘 태그(MfIL-33-6His; 서열번호:11)로 발현된 시노몰거스(cynomolgus) 원숭이 IL-33, 또는 마우스 IL-33(mIL-33; R & D Systems, #3626-IL)을 1:3(hIL33: 15nM - 0.3pM 또는 10nM - 0.2pM, mIL33: 1.5nM - 0.03pM 또는 1nM - 0.05pM, mIL33: 15nM - 0.3pM 또는 10nM - 0.2pM)으로 계대 회석시키고, 세포에 첨가하였다. 회석 완충액은 함유하지만 IL-33은 함유하지 않은 대조군을 또한 하나의 세포 샘플에 첨가했다. 억제율을 측정하기 위해, IL-33 트랩 및 가용성 수용체 단백질을 계대 회석시키고, 세포에 첨가한 후, 일정한 농도의 IL-33(hIL-33에 대해서는 5 pM 또는 20 pM, MfIL-33-6His에 대해서는 5 pM 또는 3 pM 및 mIL-33에 대해서는 30 pM)을 첨가했다. 세포에 첨가하기 전 가용성 수용체 및 트랩의 계대 회석은 1:3이었고, 약 15, 150, 100 또는 200 nM에서 시작해서 약 0.3, 3 또는 2 pM까지 이르렀고, 대조군 샘플은 트랩 또는 가용성 수용체 단백질 대조군을 함유하지 않았다. 인간 Fc 단백질(대조군 단백질)을 또한 798 nM 내지 0.01 nM 또는 100 nM 내지 0.002 nM 범위의 1:3으로 계대 회석시키고, 상기 트랩 및 수용체 단백질과 같은 방식으로 hIL-33, MfIL-33-6His 및 mIL-33으로 시험하였다. 루시퍼라제 활성을 빅터 X(퍼킨 엘머) 플레이트 판독기를 사용하여 5% CO₂에서 37°C에서 5.5시간 배양 후 측정하고, 결과를 프리즘 5 소프트웨어에 의해 비선형 회귀(4-파라미터 로지스틱 함수)를 사용하여 분석하였다. 결과를 하기 표 9에 나타내었다.

표 9: IL-33 트랩 단백질과 가용성 인간 ST2 수용체에 의한 HEK293/hST2/NF_κB-루시퍼라제 세포의 인간 IL-33, 원숭이 IL-33 및 마우스 IL-33 활성화 억제

IL-33	인간	원숭이	마우스	인간	원숭이	마우스
EC ₅₀ (M)	1.9E-12	1.7E-12	1.0E-11	2.5E-11	1.3E-12	8.8E-11
일정한 IL33	5pM	5pM	30pM	20pM	3pM	30pM
성상	IC ₅₀ (M)					
mST2-mIL1RAcP-mFc	4.8E-10	6.4E-11	8.7E-12	시험하지 않음	시험하지 않음	시험하지 않음
hST2-hIL1RAcP-mFc	1.3E-12	1.3E-12	1.3E-11	1.3E-11	4.7E-11	1.9E-10
hST2-hIL1RAcP-hFc	시험하지 않음	시험하지 않음	시험하지 않음	3.0E-11	1.0E-10	3.7E-10
hST2-mFc	1.2E-11	5.5E-12	1.4E-10	시험하지 않음	시험하지 않음	시험하지 않음
hST2-hFc	1.0E-11	4.6E-12	1.1E-10	시험하지 않음	시험하지 않음	시험하지 않음
대조군 단백질	NB	NB	NB	NB	NB	NB
NB = 비]-차단제						

[0148] 표 9에 나타낸 바와 같이, IL-33 길항제의 5개 시험 모두는 이 세포 기반 분석에서 인간, 시노몰거스 원숭이 및 마우스 IL-33의 자극을 강력하게 차단하였다(IC₅₀ < 1 nm).

실시예 5. IL-33 길항제의 IL-33-매개 호염기구 활성화 억제

[0151] IL-33 길항제 hST2-hIL1RAcP-mFc 및 hST2-hIL1RAcP-hFc의 시험판내 특성을 추가로 평가하기 위해, IL-33-유도 호염기구 활성화 차단 능력을 측정하였다.

[0152] 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 밀도 구배 원심분리에 의해 4개의 다른 인간 도너로부터 신선한 전혈로부터 정제하였다. K2 EDTA 전혈을 RPMI 1640에서 1:1 회석시키고, 피콜-페이크(Ficoll-Paque)(GE Healthcare, # 17-1440-03)를 통해 조심스럽게 적층하고, PBMC를 분리하기 위해 원심 분리하였다. PBMC를 함유하는 계면 층을 흡인하고, 새로운튜브로 옮기고, MACS 세정액(Miltenyi Biotec, #130-091-222) 중에 MACS BSA 용액(Miltenyi Biotec, #130-091-376)의 1:20 회석액으로 구성된 MACS 완충액으로 2회 세척하였다. 이어서, 정제된 PBMC를

v-자 바닥의 폴리프로필렌 96-웰 플레이트에서 MACS 완충액 중의 약 3.0×10^6 세포/mL의 최종 농도로 (웰당 100 μl) 플레이팅하였다. PBMC 집단에 포함된 호염기구를 프라이밍하기 위해, Ca^{++} 또는 Mg^{++} 없이 50 μl 둘베코 포스페이트-완충 염수(DPBS) 중의 IL-3(시그마, #h7166-10UG) 1 ng을 세포 혼탁액에 첨가하고, 이어서 10분 동안 37°C에서 배양하였다. 인간 IL-33 길항체(hST2-hIL1RAcP-mFc 또는 hST2-hIL1RAcP-hFc) 또는 관련 대조군 단백질의 계대 희석액(도너 655675 및 655676에 대해서는 1:3 및 도너 655685, 655686, 698846 및 698847에 대해서는 1:4)을 도너 655675 및 655676에 대해서는 10 nM 내지 4.6 pM 범위로 도너 655685, 655686, 698846 및 698847에 대해서는 5 nM 내지 0.3 pM 범위로 제조하였다. 또한, IL-33 길항체를 함유하지 않거나 또는 무관한 대조군 단백질을 갖는 대조군을 포함시켰다. 이를 용액을 인간 IL-33(R & D Systems, #6325-IL/CF)의 100 pM (최종 농도)의 고정 농도로 또는 IL-33 음성 대조군 없이 혼합한 후 PBMC에 첨가했다. 모든 샘플은 이중으로 시험하였다.

[0153]

세포에 인간 IL-33 및 인간 IL-33 길항체의 첨가 후, 이들을 20분 동안 37°C에서 배양하여 호염기구의 활성화를 측정하였다. 이어서, 5분 동안 습윤 열음 위에서 분석 플레이트를 냉각시킴으로써 활성화를 중단시켰다. 활성화를 측정하기 위해 사용되는 호염기구 집단을 분석하기 위해, 항-HLA-DR-FITC(베크만 코울터, #IM0463U), 항-CD123-APC(BD, # 560087) 및 항-CD203c-PE(베크만 코울터, # IM3575)의 (제조업체의 지침에 따라) 각각 20 μl 를 각각의 샘플에 첨가하고, 이들 샘플을 암실에서 20분 동안 4°C에서 유지하였다. 이어서, 이들 세포를 원심 분리하고, PBS로 세척하고, 이어서 4°C에서 2% 포름알데하이드(고정화 완충액)에 혼탁하였다. 다음날, 고정된 세포를 BD FACSCanto II 상에서 분석하여 호염기구 활성화 수준을 측정하였다. 호염기구는 다음 유세포 분석기 파라미터에 따라 식별된다: 럼프구 게이트/CD123⁺/HLA-DR2⁻. 호염기구 활성화는 자극 호염기구 상의 세포 표면 발현 마커 CD203c의 증가로서 정의된다. 활성화는 CD203c 포지티브 호염기구 빈도(%)로 정의된다. 결과를 하기 표 10 및 11에 요약하였다("NB"= 비-차단; "ND"=개별 실험에서 결정되지 않음). 데이터는 각 도너에 대해 3 개 생물 복제의 평균으로 표시된다.

[0154]

표 10. 인간 IL-33 철린지에 의해 유도된 인간 호염기구의 퍼센트 활성화

도너	100pM IL-33		No IL-33	
	평균	SD	평균	SD
655675	39.00	0.28	9.43	0.02
655676	29.75	0.21	9.36	2.18
655685	42.30	3.39	10.9	0.42
655686	52.60	2.69	10.59	0.86
698846	26.25	0.78	9.79	0.18
698847	22.10	1.98	8.83	0.44

[0155]

표 11. IL-33 길항제에 의한 인간 호염기구의 IL-33 유도 활성화의 차단

	도너 655675	도너 655676	도너 655685	도너 655686	도너 698846	도너 698847
길항제	IC_{50} (M)					
hST2-hIL1RAcP-mFc	1.90E-11	1.51E-11	2.30E-11	2.09E-11	3.60E-11	1.11E-11
hST2-hIL1RAcP-hFc	ND	ND	ND	ND	1.97E-11	9.79E-12
무관한 대조군 단백질	NB	NB	NB	NB	NB	NB

[0157]

표 10에 나타낸 바와 같이, 100 pM의 인간 IL-33은 22.1% 내지 52.59% 범위의 평균 퍼센트 활성화를 갖는 6개 상이한 도너의 호염기구 활성화를 유도하였다.

[0158]

표 11에 나타낸 바와 같이, IL-33 길항제 hST2-hIL1RAcP-mFc는 도너 655675에 대해서는 19 pM의 IC_{50} 값, 도너 655676에 대해서는 15.1 pM의 IC_{50} 값, 도너 655685에 대해서는 23 pM의 IC_{50} 값, 도너 655686에 대해서는 20.9

pM의 IC₅₀ 값, 도너 698846에 대해서는 36 pM의 IC₅₀ 값, 및 도너 698847에 대해서는 11.1 pM의 IC₅₀ 값을 갖는 100 pM 인간 IL-33 철린지에 의해 유도된 호염기구 활성화를 차단하였다. IL-33 길항체 hST2-hIL1RAcP-hFc는 도너 698846에 대해서는 19.7 pM의 IC₅₀ 값 및 도너 698847에 대해서는 9.79의 IC₅₀ 값을 갖는 인간 IL-33 철린지에 의해 유도된 호염기구 활성화를 차단하였다. 무관한 대조군 단백질은 시험 도너들 중 임의의 것으로부터의 호염기구 활성화를 차단하지 못했다.

[0160] 실시예 6. IL-33 길항체의 IL-33-매개 세포 활성화 억제

[0161] 인간 IL-33 길항체 hST2-hIL1RAcP-mFc 및 hST2-hIL1RAcP-hFc의 차단 특성을 더 시험하기 위해, 말초 혈 단핵 세포(PBMC)를 사용한 1차 세포 기반 분석법을 사용하였다(예컨대, 문현[Smithgall 등, *International Immunology*, 2008, vol. 20 (8) pp. 1019-1030] 참조).

[0162] PBMC를 밀도 구배 원심분리에 의해 6명의 다른 도너의 신선한 인간 전혈로부터 정제하였다. 간단히, K2 EDTA 전혈을 RPMI 1640 중에서 2배 희석하고, 조심스럽게 피콜-페이크(GE Healthcare, # 17-1440-03) 위에 적층하고, 20분 동안 원심분리하였다. PBMC를 함유하는 계면 층을 흡인하고, 새로운 튜브로 옮기고, PBS로 2회 세척하였다. 단리한 PBMC를, 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 100 U/mL 페니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신으로 보충된 RPMI 1640 중에 5×10⁵ 세포/mL의 최종 농도로 원형-바닥 96-웰 플레이트에서 (200 µL/웰) 풀레이팅 하였다. 이어서, 이들 세포를 50 ng/mL의 인간 IL-12(hIL-12; R & D Systems, # 219-IL-025/CF) 및 10 nM 내지 0.64 pM 단독의 인간 IL-33(hIL-33; R & D Systems, # 3625-IL-010/CF)의 계대 희석액, 또는 260 pM의 hIL-33과 20 nM 내지 0.43 pM의 인간 IL-33 길항체를 조합한 계대 희석액, 또는 무관한 mIgG 함유 대조군 단백질과 함께 배양하였다. 최종 부피는 웰당 200 µL였다. 각각의 샘플은 3회 시험하였다. IL-33 길항체 또는 무관한 mIgG 함유 대조군 단백질이 존재하는 경우, 이를 먼저 hIL-33으로 30분 동안 예비-배양하고, 이어서 세포에 첨가하였다.

[0163] 이들 세포를 5% CO₂ 하의 가습 인큐베이터에서 37°C에서 밤새 배양하고, 이어서 배양 상등액의 IFNy 수준을 ELISA(R & D Systems, #DY285)로 측정하였다. ELISA의 경우, 96-웰 평면-바닥 플레이트를 제조업체의 지침에 따라 포획 항체로 코팅하였다. 세척 및 차단 후, 100 µL의 원액 배양 상등액을 플레이트에 첨가하고 2시간 동안 배양하였다. 이후의 세척 및 검출을 제조업체의 지침에 따라 수행하였다. 결과를 하기 표 12 및 13에 요약하였다("NB"=비-차단, "ND"=측정되지 않음).

[0164] 표 12: 4명의 도너로부터 인간 PBMC에서 IL-33 유도 IFN-γ 방출

[IL-33]	도너 698843	도너 698842	도너 655684	도너 634966	도너 655681	도너 655682	도너 727054	도너 727055
EC ₅₀ (M)	ND	ND	2.11E-10	3.15E-10	2.04E-10	3.04E-10	ND	ND

[0165] 표 13: IL-33 길항체에 의한 인간 PBMC에서 IL-33 유도 IFN-γ 방출 차단

	도너 698843	도너 698842	도너 655684	도너 634966	도너 655681	도너 655682	도너 727054	도너 727055
길항체	IC ₅₀ (M)							
hST2-hIL1RAcP-mFc	1.73E-11	7.39E-11	6.79E-11	2.13E-12	4.59E-11	3.97E-12	3.34E-10	1.23E-10
hST2-hIL1RAcP-hFc	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.52E-10	4.07E-10

무관한 mIgG 함유 대조군 단백질	NB							
---------------------	----	----	----	----	----	----	----	----

[0166] [0167] [0168] 이 실시예에 나타낸 바와 같이, 인간 IL-33은 hIL-12의 존재 하에서, 4명의 다른 시험 도너로부터 인간 전체 PBMC에서 IFN γ 방출을 유도하였고, 표 12에 보인 바와 같이, EC₅₀ 값은 204 pM 내지 315 pM을 갖는다. 인간 IL-33 길항체 hST2-hIL1RAcP-mFc는 260 pM IL-33에 의해 유도된 인간 PBMC에서 IFN γ의 방출을 차단하였고, 표 13에 보인 바와 같이, IC₅₀ 값은 2.13 pM 내지 334 pM 범위를 갖는다. 무관한 mIgG 함유 대조군 단백질은 시험

도너 중 어느 누구에서도 IFN γ 방출의 임의의 측정가능한 차단을 보여주지 못했다.

[0169] 실시예 7. 염증성 관절 통증의 모델에서 mST2-mIL1RacP-mFc의 효능

[0170] 관련 생체내 모델에서 mST2-mIL1RacP-mFc의 효과를 결정하기 위해, 편측 염증성 관절 통증 모델을 책은 연구소(메릴랜드 주, 바 하버(Bar Harbor))에서 입수한 12주령의 수컷 C57BL/6 마우스에서 수행하였다. 실험 0 일차에, 마우스의 별도의 코호트에 50 mg/kg의 mST2-mIL1RacP-mFc(n=15-16) 또는 50 mg/kg의 동형 대조군 항체(n=15-16)를 피하 투여하였다. 초기 치료 투여 후 24시간째에, 마우스의 절반은 콤플리트 프로인트 보조제(Complete Freund's Adjuvant)(IA-CFA; 시그마, # F5881)(n=7-8)의 30 μ l 관절내 및 50 μ l 관절 주위 주사를 받았고, 나머지 마우스 절반은 동일한 위치(n=7-8)에서 대조군 염수 주사를 받았다. 관절 염증 개시 1주일 후 그리고 다음 4주 동안 계속해서, 모든 마우스에 50 mg/kg의 mST2-mIL1RacP-mFc 또는 50 mg/kg의 동형 대조군 항체 피하 부스트 주사 후 24시간 뒤에 동적 체중 부하 분석법(프랑스 비트롤르 소재 바이오셉(BioSeb))으로 시험하였다. 손상된 사지에 대해 소요된 중량% 및 시간%를 모든 마우스에서 기록하였다. 이 실험의 결과를 하기 표 14 및 표 15에 나타내었고, 5분의 시험 기간 동안 손상된 사지에 대해 소요된 시간의 평균 백분율 또는 전체 체중의 평균 백분율로 표현하였다(모든 데이터는 그룹 평균 ± SEM으로서 표시된다). IA-CFA를 받은 마우스의 코호트는 모두 손상된 사지에 대해 훨씬 적은(ANOVA에 의해 p<0.05) 중량 부하를 나타내었다. IA-CFA 투여 후 mST2-mIL1RacP-mFc를 받은 마우스는, 표 14 및 15에 나타낸 바와 같이, IA-CFA 투여 후 동형 대조군 처리된 마우스에 비해, 모든 시험 시점에서 손상된 사지 스코어에 소요되는 높은 백분율의 중량 부하 및 시간을 나타내었다.

[0171] 4주 후, 조직학적 분석을 위해 모든 동물을 안락사시키고 손상된 관절을 해부하고 파라핀을 봉입하고 절단하고 혜모톡실린과 에오신으로 염색하였다. 색션을 디지털화하고, 문헌[Choe, JY et. al., (2003), J. Exp. Med. Feb 17; 197(4):537-542]에 설명된 것과 유사한 방법에 따라 0 내지 5등급(0=정상, 1=최소, 2=경미한, 3=중간, 4=중, 5=심한)으로 등급화된 염증 활성(예컨대, 관절 파괴, 혈액막 비후, 골 침식 및 면역 세포 침윤)의 주관적 평가 척도를 사용하여 블라인드 방식으로 점수화하였다. 하기 표 16에 나타낸 바와 같이, IA-CFA 투여 후 mST2-mIL1RacP-mFc로 처리된 마우스는 IC-CFA 투여 후 동형 대조군 처리된 마우스에 비해 "중간" 이상 "심각"보다 덜한 무를 관절을 나타내었다. 따라서, 이 실시예는 본 발명의 IL-33 길항제가 염증성 관절 통증의 경감에 유용함을 나타낸다.

[0172] 표 14: 손상된 사지에 대한 체중 부하 비율

치료	1주	2주	3주	4주
염수 대조군 + 동형 대조군	43.1 ±1.6	42.2 ±1.0	41.1 ±1.7	41.1 ±0.9
염수 대조군 + mST2-mIL1RacP-mFc	41.5 ±1.9	43.3 ±0.6	42.2 ±1.2	38.7 ±1.4
IA-CFA + 동형 대조군	24.9 ±1.4	24.2 ±1.5	23.8 ±1.0	23.6 ±2.0
IA-CFA + mST2-mIL1RacP-mFc	30.1 ±2.1	24.4 ±1.0	28.3 ±2.6	29.8 ±2.9

[0173] 표 15: 손상된 사지에 대해 소요된 시간의 비율

치료	1주	2주	3주	4주
염수 대조군 + 동형 대조군	96.6 ±1.0	96.6 ±0.6	96.2 ±0.9	96.4 ±0.6
염수 대조군 + mST2-mIL1RacP-mFc	95.5 ±0.8	97.2 ±0.3	94.3 ±1.7	97.0 ±0.5
IA-CFA + 동형 대조군	68.4 ±1.6	64.8 ±2.1	72.8 ±3.5	80.9 ±2.7
IA-CFA + mST2-mIL1RacP-mFc	78.9 ±3.6	68.5 ±3.1	80.9 ±4.2	88.0 ±2.7

[0176]

표 16: 손상된 무릎 관절에 대한 조직학적 증증도 점수 (동물의 %)

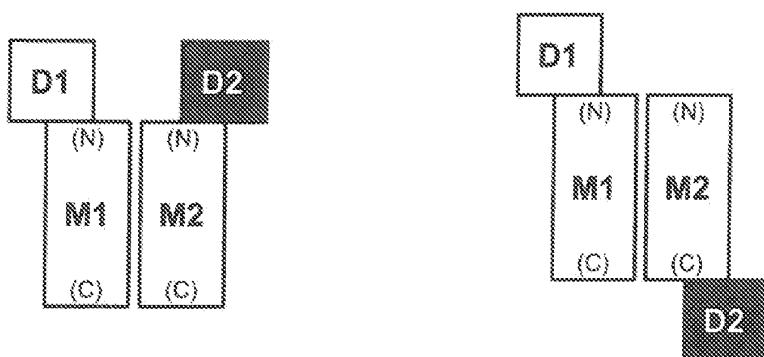
치료	최소	가벼운	중간	심한
IA-CFA + 동형 대조군	0	0	12%	88%
IA-CFA + mST2-mIL1RacP-mFc	0	0	38%	62%

[0177]

본 발명은 본원에 기재된 특정 실시양태로 그 범위가 제한되지 않는다. 실제로, 본원에 기재된 것들뿐만 아니라 본 발명의 다양한 변형이 전술한 설명 및 첨부 도면으로부터 당업자에게 자명할 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위 내에 속하는 것으로 의도된다.

도면

도면1



A

B

C

D

서 열 목 록

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> IL-33 ANTAGONISTS AND USES THEREOF

<130> 1950-WO
 <150> US 61/787,121
 <151> 2013-03-15
 <150> US 61/819,029
 <151> 2013-05-03
 <150> US 61/913,417
 <151> 2013-12-09
 <160> 13
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 537
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 1

Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr Tyr

20	25	30
----	----	----

Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val Phe

35	40	45
----	----	----

Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala Asp Ser

50	55	60
----	----	----

Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg Thr Gly

65	70	75	80
----	----	----	----

Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn Val Pro

85	90	95
----	----	----

Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn Ser Lys

100	105	110
-----	-----	-----

Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Leu Glu

115	120	125
-----	-----	-----

Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg Ala His

130	135	140
-----	-----	-----

Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala Gly Asp
 145 150 155 160

 Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr Ser Val
 165 170 175
 Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe Ser Leu
 180 185 190
 Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu Val Glu
 195 200 205
 Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly Lys Gly
 210 215 220
 Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr Lys Ile

 225 230 235 240
 Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln Asn Gln
 245 250 255
 Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg Ile Ala
 260 265 270
 Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu Ala Leu
 275 280 285
 Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg Lys Asn
 290 295 300

 Pro Ile Asp His His Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 305 310 315 320
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 325 330 335
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 340 345 350
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 355 360 365
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

 370 375 380
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

385 390 395 400
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 405 410 415
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 420 425 430
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 435 440 445

 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 450 455 460
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 465 470 475 480
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 485 490 495
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 500 505 510
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

 515 520 525
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 530 535
 <210> 2
 <211> 543
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 2

 Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val
 1 5 10 15
 Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr Tyr
 20 25 30
 Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val Phe

 35 40 45
 Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala Asp Ser

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

305 310 315 320

Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

325 330 335

Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser

340 345 350

Pro Ile Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp

355 360 365

Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln

370 375 380

Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser

385 390 395 400

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys

405 410 415

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile

420 425 430

Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro

435 440 445

Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met

450 455 460

Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn

465 470 475 480

Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser

485 490 495

Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn

500 505 510

Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu

515 520 525

His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

530 535 540

<210> 3

<211> 884

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 3

Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val

1 5 10 15

Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr Tyr

20 25 30

Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val Phe

35 40 45

Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala Asp Ser

50 55 60

Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg Thr Gly

65 70 75 80

Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn Val Pro

85 90 95

Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn Ser Lys

100 105 110

Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Leu Glu

115 120 125

Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg Ala His

130 135 140

Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala Gly Asp

145 150 155 160

Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr Ser Val

165 170 175

Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe Ser Leu

180 185 190

Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu Val Glu

195 200 205

Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly Lys Gly

210 215 220

Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr Lys Ile
 225 230 235 240
 Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln Asn Gln
 245 250 255
 Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg Ile Ala
 260 265 270

 Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu Ala Leu
 275 280 285
 Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg Lys Asn
 290 295 300
 Pro Ile Asp His His Ser Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp
 305 310 315 320
 Thr Met Arg Gln Ile Gln Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys
 325 330 335
 Cys Pro Leu Phe Glu His Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His

 340 345 350
 Ser Ala Gly Leu Thr Leu Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp
 355 360 365
 Leu Glu Glu Pro Ile Asn Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys
 370 375 380
 Glu Lys Asp Val Leu Trp Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly
 385 390 395 400
 Asn Tyr Thr Cys Met Leu Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala
 405 410 415

 Phe Pro Leu Glu Val Val Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met
 420 425 430
 Lys Leu Pro Val His Lys Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile
 435 440 445
 Thr Cys Pro Asn Val Asp Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr
 450 455 460
 Ile Thr Trp Tyr Met Gly Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val
 465 470 475 480

Ile Pro Glu Gly Met Asn Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn

485 490 495

Asn Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Thr

500 505 510

Phe His Leu Thr Arg Thr Leu Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys

515 520 525

Asn Ala Val Pro Pro Val Ile His Ser Pro Asn Asp His Val Val Tyr

530 535 540

Glu Lys Glu Pro Gly Glu Glu Leu Leu Ile Pro Cys Thr Val Tyr Phe

545 550 555 560

Ser Phe Leu Met Asp Ser Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly

565 570 575

Lys Lys Pro Asp Asp Ile Thr Ile Asp Val Thr Ile Asn Glu Ser Ile

580 585 590

Ser His Ser Arg Thr Glu Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile

595 600 605

Lys Lys Val Thr Ser Glu Asp Leu Lys Arg Ser Tyr Val Cys His Ala

610 615 620

Arg Ser Ala Lys Gly Glu Val Ala Lys Ala Ala Lys Val Lys Gln Lys

625 630 635 640

Val Pro Ala Pro Arg Tyr Thr Val Glu Ser Gly Glu Pro Arg Gly Pro

645 650 655

Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu

660 665 670

Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu

675 680 685

Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

690 695 700

Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu

705 710 715 720

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr

725 730 735

Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser

740 745 750

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro

755 760 765

Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln

770 775 780

Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val

785 790 795 800

Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val

805 810 815

Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu

820 825 830

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg

835 840 845

Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val

850 855 860

Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg

865 870 875 880

Thr Pro Gly Lys

<210> 4

<211> 880

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 4

Ser Lys Ser Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val Arg Cys

1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Arg Ser Thr Tyr Pro Val Glu Trp Tyr Tyr Ser Asp

20 25 30

Thr Asn Glu Ser Ile Pro Thr Gln Lys Arg Asn Arg Ile Phe Val Ser

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

290	295	300
His Arg Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met Arg Gln		
305	310	315
Ile Gln Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro Leu Phe		
325	330	335
Glu His Phe Leu Lys Tyr Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ser Gly Leu		
340	345	350
Thr Leu Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu Glu Pro		
355	360	365
Ile Asn Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys Asp Val		
370	375	380
Leu Trp Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Cys		
385	390	395
Met Leu Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro Leu Glu		
405	410	415
Val Val Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Ala Met Arg Phe Pro Val		
420	425	430
His Lys Met Tyr Ile Glu His Gly Ile His Lys Ile Thr Cys Pro Asn		
435	440	445
Val Asp Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Ser Val Thr Trp Tyr		
450	455	460
Lys Gly Cys Thr Glu Ile Val Asp Phe His Asn Val Leu Pro Glu Gly		
465	470	475
Met Asn Leu Ser Phe Phe Ile Pro Leu Val Ser Asn Asn Gly Asn Tyr		
485	490	495
Thr Cys Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Leu Phe His Leu Thr		
500	505	510
Arg Thr Val Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys Asp Ala Leu Pro		
515	520	525
Pro Gln Ile Tyr Ser Pro Asn Asp Arg Val Val Tyr Glu Lys Glu Pro		
530	535	540

Gly Glu Glu Leu Val Ile Pro Cys Lys Val Tyr Phe Ser Phe Ile Met
 545 550 555 560
 Asp Ser His Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys Pro Asp
 565 570 575
 Asp Val Thr Val Asp Ile Thr Ile Asn Glu Ser Val Ser Tyr Ser Ser
 580 585 590

Thr Glu Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile Lys Lys Val Thr
 595 600 605
 Pro Glu Asp Leu Arg Arg Asn Tyr Val Cys His Ala Arg Asn Thr Lys
 610 615 620
 Gly Glu Ala Glu Gln Ala Ala Lys Val Lys Gln Lys Val Ile Pro Pro
 625 630 635 640
 Arg Tyr Thr Val Glu Ser Gly Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro
 645 650 655
 Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 660 665 670

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
 675 680 685
 Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
 690 695 700
 Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
 705 710 715 720
 Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val
 725 730 735

Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 740 745 750
 Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
 755 760 765
 Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu
 770 775 780
 Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys
 785 790 795 800

Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn

805 810 815

Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp

820 825 830

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys

835 840 845

Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly

850 855 860

Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

865 870 875 880

<210> 5

<211> 310

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 5

Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val

1 5 10 15

Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr Tyr

20 25 30

Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val Phe

35 40 45

Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala Asp Ser

50 55 60

Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg Thr Gly

65 70 75 80

Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Gln Ser Asp Cys Asn Val Pro

85 90 95

Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn Ser Lys

100 105 110

Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Leu Glu

115	120	125
Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg Ala His		
130	135	140
Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala Gly Asp		
145	150	155
Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr Ser Val		
165	170	175
Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe Ser Leu		
180	185	190
Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu Val Glu		
195	200	205
Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly Lys Gly		
210	215	220
Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr Lys Ile		
225	230	235
Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln Asn Gln		
245	250	255
Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg Ile Ala		
260	265	270
Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu Ala Leu		
275	280	285
Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg Lys Asn		
290	295	300
Pro Ile Asp His His Ser		
305	310	
<210>	6	
<211>	306	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic	
<400>	6	
Ser Lys Ser Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val Arg Cys		

1	5	10	15
---	---	----	----

Pro Gln Arg Gly Arg Ser Thr Tyr Pro Val Glu Trp Tyr Tyr Ser Asp

20	25	30
----	----	----

Thr Asn Glu Ser Ile Pro Thr Gln Lys Arg Asn Arg Ile Phe Val Ser

35	40	45
----	----	----

Arg Asp Arg Leu Lys Phe Leu Pro Ala Arg Val Glu Asp Ser Gly Ile

50	55	60
----	----	----

Tyr Ala Cys Val Ile Arg Ser Pro Asn Leu Asn Lys Thr Gly Tyr Leu

65	70	75	80
----	----	----	----

Asn Val Thr Ile His Lys Lys Pro Pro Ser Cys Asn Ile Pro Asp Tyr

85	90	95
----	----	----

Leu Met Tyr Ser Thr Val Arg Gly Ser Asp Lys Asn Phe Lys Ile Thr

100	105	110
-----	-----	-----

Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Val Gln Trp Phe

115	120	125
-----	-----	-----

Lys Asn Cys Lys Ala Leu Gln Glu Pro Arg Phe Arg Ala His Arg Ser

130	135	140
-----	-----	-----

Tyr Leu Phe Ile Asp Asn Val Thr His Asp Asp Glu Gly Asp Tyr Thr

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Cys Gln Phe Thr His Ala Glu Asn Gly Thr Asn Tyr Ile Val Thr Ala

165	170	175
-----	-----	-----

Thr Arg Ser Phe Thr Val Glu Glu Lys Gly Phe Ser Met Phe Pro Val

180	185	190
-----	-----	-----

Ile Thr Asn Pro Pro Tyr Asn His Thr Met Glu Val Glu Ile Gly Lys

195	200	205
-----	-----	-----

Pro Ala Ser Ile Ala Cys Ser Ala Cys Phe Gly Lys Gly Ser His Phe

210	215	220
-----	-----	-----

Leu Ala Asp Val Leu Trp Gln Ile Asn Lys Thr Val Val Gly Asn Phe

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Gly Glu Ala Arg Ile Gln Glu Glu Gly Arg Asn Glu Ser Ser Ser

245	250	255
-----	-----	-----

Asn Asp Met Asp Cys Leu Thr Ser Val Leu Arg Ile Thr Gly Val Thr
 260 265 270
 Glu Lys Asp Leu Ser Leu Glu Tyr Asp Cys Leu Ala Leu Asn Leu His
 275 280 285
 Gly Met Ile Arg His Thr Ile Arg Leu Arg Arg Lys Gln Pro Ile Asp
 290 295 300

His Arg

305

<210> 7

<211> 339

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 7

Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met Arg Gln Ile Gln
 1 5 10 15

Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro Leu Phe Glu His
 20 25 30

Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ala Gly Leu Thr Leu
 35 40 45

Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu Glu Pro Ile Asn
 50 55 60

Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys Asp Val Leu Trp
 65 70 75 80

Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Met Leu
 85 90 95

Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro Leu Glu Val Val
 100 105 110

Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met Lys Leu Pro Val His Lys
 115 120 125

Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile Thr Cys Pro Asn Val Asp
 130 135 140

Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr Ile Thr Trp Tyr Met Gly
 145 150 155 160
 Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val Ile Pro Glu Gly Met Asn
 165 170 175
 Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Cys
 180 185 190
 Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Thr Phe His Leu Thr Arg Thr
 195 200 205
 Leu Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys Asn Ala Val Pro Pro Val
 210 215 220
 Ile His Ser Pro Asn Asp His Val Val Tyr Glu Lys Glu Pro Gly Glu
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Ile Pro Cys Thr Val Tyr Phe Ser Phe Leu Met Asp Ser
 245 250 255
 Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys Pro Asp Asp Ile
 260 265 270
 Thr Ile Asp Val Thr Ile Asn Glu Ser Ile Ser His Ser Arg Thr Glu
 275 280 285
 Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile Lys Lys Val Thr Ser Glu
 290 295 300
 Asp Leu Lys Arg Ser Tyr Val Cys His Ala Arg Ser Ala Lys Gly Glu
 305 310 315 320
 Val Ala Lys Ala Ala Lys Val Lys Gln Lys Val Pro Ala Pro Arg Tyr
 325 330 335
 Thr Val Glu

<210> 8
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 8

Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met Arg Gln Ile Gln

1 5 10 15

Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro Leu Phe Glu His

20 25 30

Phe Leu Lys Tyr Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ser Gly Leu Thr Leu

35 40 45

Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu Glu Pro Ile Asn

50 55 60

Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys Asp Val Leu Trp

65 70 75 80

Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Met Leu

85 90 95

Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro Leu Glu Val Val

100 105 110

Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Ala Met Arg Phe Pro Val His Lys

115 120 125

Met Tyr Ile Glu His Gly Ile His Lys Ile Thr Cys Pro Asn Val Asp

130 135 140

Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Ser Val Thr Trp Tyr Lys Gly

145 150 155 160

Cys Thr Glu Ile Val Asp Phe His Asn Val Leu Pro Glu Gly Met Asn

165 170 175

Leu Ser Phe Phe Ile Pro Leu Val Ser Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Cys

180 185 190

Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Leu Phe His Leu Thr Arg Thr

195 200 205

Val Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys Asp Ala Leu Pro Pro Gln

210 215 220

Ile Tyr Ser Pro Asn Asp Arg Val Val Tyr Glu Lys Glu Pro Gly Glu

225 230 235 240

Glu Leu Val Ile Pro Cys Lys Val Tyr Phe Ser Phe Ile Met Asp Ser

245 250 255

His Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys Pro Asp Asp Val

260 265 270

Thr Val Asp Ile Thr Ile Asn Glu Ser Val Ser Tyr Ser Ser Thr Glu

275 280 285

Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile Lys Lys Val Thr Pro Glu

290 295 300

Asp Leu Arg Arg Asn Tyr Val Cys His Ala Arg Asn Thr Lys Gly Glu

305 310 315 320

Ala Glu Gln Ala Ala Lys Val Lys Gln Lys Val Ile Pro Pro Arg Tyr

325 330 335

Thr Val Glu

<210> 9

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 9

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 10

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 10

Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro

1 5 10 15

Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys

20 25 30

Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val

35 40 45

Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe

50 55 60

Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu

65 70 75 80

Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His
85 90 95

Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys

Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser

Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met

Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro

145 150 155 160

Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn

Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met

Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser

Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr

Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

225 230

<210> 11

211 <211>

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> synthetic

<400> 11

Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Ser 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 Lys Lys Lys Asp Lys Val

35 40 45

Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Ser 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 Gln 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 Arg
 100 105 110

Ser Phe 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 Tyr Ser

130 135 140

Glu Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Ile Leu
 145 150 155 160

Glu His His His His His

165

<210> 12

<211> 167

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<220><221> SITE

<222> (160)..(161)

<223> aa 160-161: linker

<220><221> SITE

<222> (162)..(167)

<223> aa 162-167: hexahistidine tag

<220><221>

> SITE

<222> (1)..(159)

<223> aa 1-159: M.fascicularis IL-33 (S112-E269 of accession number EHH57404.1 with an extra I after E269)

<400> 12

Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Ser 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 Lys Lys Asp Lys Val

35 40 45

Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Ser 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 Gln 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 Arg

100 105 110

Ser Phe 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 Tyr Ser

130 135 140

Glu Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Ile Leu

145 150 155 160

Glu His His His His His

165

<210> 13

<211> 876

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<220><221> SITE

<222> (311)..(649)

<223>

aa 311-649: Human IL1RacP (S21-E359 of accession number Q9NPH3)

<220><221> SITE

<222> (650)..(876)

<223> aa 650-876: hFc tag (D104-K330 of accession number P01857)

<220><221> SITE

<222> (1)..(310)

<223> aa 1-310: Human ST2 (K19-S328 of accession number NP_057316.3)

<400> 13

Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr Tyr

20	25	30
----	----	----

Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val Phe

35	40	45
----	----	----

Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala Asp Ser

50	55	60
----	----	----

Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg Thr Gly

65	70	75	80
----	----	----	----

Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn Val Pro

85	90	95
----	----	----

Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn Ser Lys

100	105	110
-----	-----	-----

Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Leu Glu

115	120	125
-----	-----	-----

Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg Ala His

130	135	140
-----	-----	-----

Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala Gly Asp

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr Ser Val

165	170	175
-----	-----	-----

Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe Ser Leu

180	185	190
-----	-----	-----

Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu Val Glu

195	200	205
-----	-----	-----

Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly Lys Gly

210	215	220
Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr Lys Ile		
225	230	235
Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Gly Gln Asn Gln		240
245	250	255
Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg Ile Ala		
260	265	270
Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu Ala Leu		
275	280	285
Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg Lys Asn		
290	295	300
Pro Ile Asp His His Ser Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp		
305	310	315
		320
Thr Met Arg Gln Ile Gln Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys		
325	330	335
Cys Pro Leu Phe Glu His Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His		
340	345	350
Ser Ala Gly Leu Thr Leu Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp		
355	360	365
Leu Glu Glu Pro Ile Asn Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys		
370	375	380
Glu Lys Asp Val Leu Trp Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly		
385	390	395
		400
Asn Tyr Thr Cys Met Leu Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala		
405	410	415
Phe Pro Leu Glu Val Val Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met		
420	425	430
Lys Leu Pro Val His Lys Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile		
435	440	445
Thr Cys Pro Asn Val Asp Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr		
450	455	460

Ile Thr Trp Tyr Met Gly Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val
 465 470 475 480
 Ile Pro Glu Gly Met Asn Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn
 485 490 495
 Asn Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Thr
 500 505 510
 Phe His Leu Thr Arg Thr Leu Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys
 515 520 525
 Asn Ala Val Pro Pro Val Ile His Ser Pro Asn Asp His Val Val Tyr
 530 535 540
 Glu Lys Glu Pro Gly Glu Glu Leu Leu Ile Pro Cys Thr Val Tyr Phe
 545 550 555 560
 Ser Phe Leu Met Asp Ser Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly
 565 570 575
 Lys Lys Pro Asp Asp Ile Thr Ile Asp Val Thr Ile Asn Glu Ser Ile
 580 585 590
 Ser His Ser Arg Thr Glu Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile
 595 600 605
 Lys Lys Val Thr Ser Glu Asp Leu Lys Arg Ser Tyr Val Cys His Ala
 610 615 620
 Arg Ser Ala Lys Gly Glu Val Ala Lys Ala Ala Lys Val Lys Gln Lys
 625 630 635 640
 Val Pro Ala Pro Arg Tyr Thr Val Glu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 645 650 655
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 660 665 670
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 675 680 685
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 690 695 700
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 705 710 715 720

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
725	730	735
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
740	745	750

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 755 760 765
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 770 775 780
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 785 790 795 800
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 805 810 815
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 820 825 830
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 835 840 845
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 850 855 860
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 865 870 875