



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105007929 B

(45)授权公告日 2019.05.10

(21)申请号 201480013599.0

(22)申请日 2014.03.14

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105007929 A

(43)申请公布日 2015.10.28

(30)优先权数据
61/787,121 2013.03.15 US
61/819,029 2013.05.03 US
61/913,417 2013.12.09 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.09.10

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/027058 2014.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/152195 EN 2014.09.25

(73)专利权人 瑞泽恩制药公司
地址 美国纽约州

(72)发明人 A·J·墨菲 N·J·帕帕多普洛斯
J·奥伦戈

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
代理人 张莉 黄革生

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

C07K 14/715(2006.01)

(56)对比文件

CN 1917902 A,2007.02.21,

CN 102232113 A,2011.11.02,

Shafaqat Ali等.Caspase 3 inactivates biologically active full length interleukin-33 as a classical cytokine but does not prohibit nuclear translocation.《Biochemical and Biophysical Research Communications》.2009,第391卷1512-1516.

Shafaqat Ali等.Caspase 3 inactivates biologically active full length interleukin-33 as a classical cytokine but does not prohibit nuclear translocation.《Biochemical and Biophysical Research Communications》.2009,第391卷1512-1516.

审查员 吕小蒙

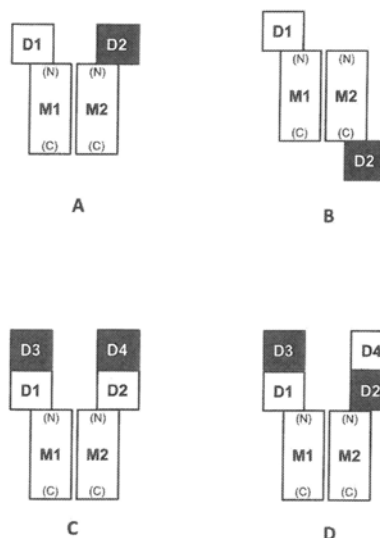
权利要求书3页 说明书26页
序列表19页 附图1页

(54)发明名称

IL-33拮抗剂和其用途

(57)摘要

本发明提供白介素-33(IL-33)拮抗剂及其使用方法,所述白介素-33(IL-33)拮抗剂包含一个或多个IL-33结合结构域和一个或多个多聚结构域。根据本发明的某些实施方案,IL-33结合结构域可包含ST2蛋白的IL-33结合部分和/或IL-1RAcP蛋白的细胞外部分。本发明的IL-33拮抗剂可用于治疗与IL-33信号传递和/或IL-33细胞表达相关联的疾病和病症,所述疾病和病症如感染性疾病、炎性疾病、过敏疾病和纤维化疾病。



1. 一种IL-33拮抗剂,所述IL-33拮抗剂包含:

- D1结构域,即第一IL-33结合结构域、
- D2结构域,即第二IL-33结合结构域、和
- M结构域,即多聚结构域,

其中D1包含人ST2蛋白的细胞外部分,D2包含人IL-1RAcP蛋白的细胞外部分,且M包含免疫球蛋白的Fc部分,且其中:

- (i) D2连接至D1的N端,且D1连接至M的N端;
- (ii) D1连接至M的N-端,且D2连接至M的C端;
- (iii) D1连接至M的C-端,且D2连接至D1的C端;
- (iv) D2连接至M的N-端,且D1连接至M的C端;
- (v) D2连接至M的C-端,且D1连接至D2的C端;
- (vi) D1连接至D2的N-端,且D2连接至M的N-端。

2. 如权利要求1所述的IL-33拮抗剂,其中D2连接至D1的N端,且D1连接至M的N端。

3. 如权利要求1所述的IL-33拮抗剂,其中D1连接至M的N-端,且D2连接至M的C端。

4. 如权利要求1所述的IL-33拮抗剂,其中D1连接至M的C-端,且D2连接至D1的C端。

5. 如权利要求1所述的IL-33拮抗剂,其中D2连接至M的N-端,且D1连接至M的C端。

6. 如权利要求1所述的IL-33拮抗剂,其中D2连接至M的C-端,且D1连接至D2的C端。

7. 如权利要求1所述的IL-33拮抗剂,其中D1连接至D2的N-端,并且D2连接至M的N-端。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的IL-33拮抗剂,其中如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,所述IL-33拮抗剂以小于50pM的结合解离平衡常数(K_D)结合人白介素33(IL-33)。

9. 如权利要求1至7中任一项所述的IL-33拮抗剂,其中如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,所述IL-33拮抗剂以小于10pM的结合解离平衡常数(K_D)结合人白介素33(IL-33)。

10. 如权利要求1至7中任一项所述的IL-33拮抗剂,其中如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,所述IL-33拮抗剂以小于50pM的结合解离平衡常数(K_D)结合猴白介素33(IL-33)。

11. 如权利要求1至7中任一项所述的IL-33拮抗剂,其中如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,所述IL-33拮抗剂以小于10pM的结合解离平衡常数(K_D)结合猴白介素33(IL-33)。

12. 如权利要求1至7中任一项所述的IL-33拮抗剂,其中如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,所述IL-33拮抗剂以小于50pM的结合解离平衡常数(K_D)结合小鼠白介素33(IL-33)。

13. 如权利要求1至7中任一项所述的IL-33拮抗剂,其中如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,所述IL-33拮抗剂以小于100pM的结合解离平衡常数(K_D)结合小鼠白介素33(IL-33)。

14. 如权利要求1至7中任一项所述的IL-33拮抗剂,其中如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,所述IL-33拮抗剂以大于或等于40分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合人白介素33(IL-33)。

15. 如权利要求1至7中任一项所述的IL-33拮抗剂,其中如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,所述IL-33拮抗剂以大于或等于500分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合人白介素33(IL-33)。

16. 如权利要求1至7中任一项所述的IL-33拮抗剂,其中如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,所述IL-33拮抗剂以大于50分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合猴白介素33(IL-33)。

17. 如权利要求1至7中任一项所述的IL-33拮抗剂,其中如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,所述IL-33拮抗剂以大于50分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合猴白介素33(IL-33)。

18. 如权利要求1至7中任一项所述的IL-33拮抗剂,其中如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,所述IL-33拮抗剂以大于40分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合小鼠白介素33(IL-33)。

19. 如权利要求1至7中任一项所述的IL-33拮抗剂,其中如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,所述IL-33拮抗剂以大于30分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合小鼠白介素33(IL-33)。

20. 如权利要求1至7中任一项所述的IL-33拮抗剂,其中如在基于细胞的阻断生物测定试验中测量的,所述IL-33拮抗剂以小于10pM的IC₅₀值抑制表达人ST2的细胞中的IL-33介导的信号传导。

21. 如权利要求20所述的IL-33拮抗剂,其中如在基于细胞的阻断生物测定试验中测量的,所述IL-33拮抗剂以小于5pM的IC₅₀值抑制表达人ST2的细胞中的IL-33介导的信号传导。

22. 如权利要求21所述的IL-33拮抗剂,其中如在基于细胞的阻断生物测定试验中测量的,所述IL-33拮抗剂以小于1.5pM的IC₅₀值抑制表达人ST2的细胞中的IL-33介导的信号传导。

23. 如权利要求1至7中任一项所述的IL-33拮抗剂,其中D1由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成。

24. 如权利要求1至7中任一项所述的IL-33拮抗剂,其中D2由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成。

25. 如权利要求1所述的IL-33拮抗剂,所述IL-33拮抗剂由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成。

26. 如权利要求1所述的IL-33拮抗剂,所述IL-33拮抗剂由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成。

27. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1至26中任一项所述的IL-33拮抗剂,和药学上可接受的载体或稀释剂。

28. 如权利要求27所述的药物组合物在制备用于治疗炎性疾病或病症的药物中的用途。

29. 如权利要求28所述的用途,其中所述炎性疾病或病症选自由下列组成的组:哮喘、异位性皮炎、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、炎性肠病、多发性硬化症、关节炎、过敏性鼻炎、嗜酸细胞性食道炎和牛皮癣。

30. 如权利要求29所述的用途,其中所述炎性疾病或病症为哮喘。
31. 如权利要求30所述的用途,其中所述哮喘为嗜酸细胞性哮喘或非嗜酸细胞性哮喘。
32. 如权利要求30所述的用途,其中所述哮喘为类固醇抗性或类固醇敏感性哮喘。
33. 如权利要求28所述的用途,其中所述炎性疾病或病症为异位性皮炎。
34. 如权利要求28所述的用途,其中所述炎性疾病或病症为慢性阻塞性肺疾病(COPD)。
35. 如权利要求34所述的用途,其中所述慢性阻塞性肺疾病由吸烟所致或部分地由吸烟所造成。
36. 如权利要求28至35中任一项所述的用途,其中所述药物与第二治疗剂联用,所述第二治疗剂可用于减轻所述炎性疾病或病症。
37. 如权利要求36所述的用途,其中所述第二治疗剂选自由下列组成的组:非类固醇消炎药(NSAID)、皮质类固醇、支气管扩张剂、抗组织胺、肾上腺素、去充血剂、胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)拮抗剂、IL-13拮抗剂、IL-4拮抗剂、IL-4/IL-13双拮抗剂、IL-5拮抗剂、IL-6拮抗剂、IL-12/23拮抗剂、IL-22拮抗剂、IL-25拮抗剂、IL-17拮抗剂、IL-31拮抗剂、口服PDE4抑制剂和另一IL-33拮抗剂或IL-33的不同抗体。

IL-33拮抗剂和其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及能够拮抗IL-33的抗原结合分子,和其使用方法。

[0002] 背景

[0003] 白介素-33 (IL-33) 为ST2的配体,一种与辅助蛋白IL-1RAcP (accessory protein) 相关联的toll样/白介素-1受体超家族成员(就回顾文献,参见,例如Kakkar和Lee, Nature Reviews-Drug Discovery 7(10):827-840(2008), Schmitz等人, Immunity 23:479-490(2005); Liew等人, Nature Reviews-Immunology 10:103-110(2010); US 2010/0260770; US 2009/0041718)。当ST2/IL-1RAcP被IL-33激活时,通过下游分子例如MyD88(髓样分化因子88)和TRAF6(TNF受体相关因子6)触发信号传递级联,从而尤其导致NF κ B(核因子- κ B)的激活。IL-33信号传递已意味着成为牵涉各种疾病和病症的因子(Liew等人, Nature Reviews-Immunology 10:103-110(2010))。

[0004] 发明简述

[0005] 本发明提供白介素-33 (IL-33) 拮抗剂。

[0006] 在一个方面,本发明提供IL-33拮抗剂,所述IL-33拮抗剂包含第一IL-33结合结构域(D1)和多聚结构域(M)。

[0007] 在一个实施方案中,IL-33拮抗剂包含连接至多聚结构域(M)的第一IL-33结合结构域(D1),其中D1包含ST2蛋白的IL-33结合部分。

[0008] 在某些实施方案中,IL-33拮抗剂还包含一个或多个另外的IL-33结合结构域(例如,D2、D3、D4等)。

[0009] 根据某些实施方案,IL-33结合结构域(D1、D2、D3、D4等)包含ST2蛋白的IL-33结合部分、IL-1RAcP蛋白的细胞外结构域或其它IL-33结合结构域。

[0010] 在一个实施方案中,IL-33拮抗剂还包含连接至D1和/或M的第二IL-33结合结构域(D2),其中D2包含IL-1RAcP蛋白的细胞外部分。在一个实施方案中,D1连接至M的N-端。在一个实施方案中,D1连接至M的C-端。在一个实施方案中,D2连接至M的N-端。在一个实施方案中,D2连接至M的C-端。在一个实施方案中,D1连接至D2的N-端,并且D2连接至M的N-端。

[0011] 多聚结构域(M)可为具有N-端和C-端的肽或多肽。IL-33结合结构域组分可连接至M的N-端或C-端。根据某些实施方案,D1、D2和M组分以串联方式连接,以使得D1连接至D2的N-端,并且D2连接至M的N-端。在本发明的范围内涵盖D1、D2和M组分的众多布置和配置,本文中描述所述布置和配置的实例。

[0012] 在一个实施方案中,如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,IL-33拮抗剂以小于约80pM的结合解离平衡常数(K_D)结合人白介素33(IL-33),和/或如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,IL-33拮抗剂以小于约400pM的结合解离平衡常数(K_D)结合人白介素33(IL-33)。

[0013] 在一个实施方案中,如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,IL-33拮抗剂以小于约60pM的结合解离平衡常数(K_D)结合人白介素33(IL-33),和/或如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,IL-33拮抗剂以小于约1.0pM的结合解离平衡常数(K_D)结合人白介

素33 (IL-33)。

[0014] 在一个实施方案中,如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,IL-33拮抗剂以小于约60pM的结合解离平衡常数(K_D)结合猴白介素33 (IL-33),和/或如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,IL-33拮抗剂以小于约200pM的结合解离平衡常数(K_D)结合猴白介素33 (IL-33)。

[0015] 在一个实施方案中,如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,IL-33拮抗剂以小于约1.0pM的结合解离平衡常数(K_D)结合猴白介素33 (IL-33),和/或如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,IL-33拮抗剂以小于约1.0pM的结合解离平衡常数(K_D)结合猴白介素33 (IL-33)。

[0016] 在一个实施方案中,如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,IL-33拮抗剂以小于约110pM的结合解离平衡常数(K_D)结合小鼠白介素33 (IL-33),和/或如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,IL-33拮抗剂以小于约100pM的结合解离平衡常数(K_D)结合小鼠白介素33 (IL-33)。

[0017] 在一个实施方案中,如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,IL-33拮抗剂以小于约10pM的结合解离平衡常数(K_D)结合小鼠白介素33 (IL-33),和/或如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,IL-33拮抗剂以小于约5pM的结合解离平衡常数(K_D)结合小鼠白介素33 (IL-33)。

[0018] 在一个实施方案中,如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,IL-33拮抗剂以大于或等于约9分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合人白介素33 (IL-33),和/或如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,IL-33拮抗剂以大于或等于约4分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合人白介素33 (IL-33)。

[0019] 在一个实施方案中,如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,IL-33拮抗剂以大于或等于约30分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合人白介素33 (IL-33),和/或如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,IL-33拮抗剂以大于或等于约1000分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合人白介素33 (IL-33)。

[0020] 在一个实施方案中,如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,IL-33拮抗剂以大于约40分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合猴白介素33 (IL-33),和/或如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,IL-33拮抗剂以大于或等于约10分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合猴白介素33 (IL-33)。

[0021] 在一个实施方案中,如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,IL-33拮抗剂以大于约1000分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合猴白介素33 (IL-33),和/或如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,IL-33拮抗剂以大于或等于约1000分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合猴白介素33 (IL-33)。

[0022] 在一个实施方案中,如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,IL-33拮抗剂以大于约25分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合小鼠白介素33 (IL-33),和/或如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,IL-33拮抗剂以大于约30分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合小鼠白介素33 (IL-33)。

[0023] 在一个实施方案中,如以表面等离子体共振测定在25℃下所测量,IL-33拮抗剂以大于约500分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合小鼠白介素33 (IL-33),和/或如以表面等离子体

共振测定在37℃下所测量,IL-33拮抗剂以大于约1000分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)结合小鼠白介素33(IL-33)。

[0024] 在一个实施方案中,IL-33拮抗剂阻断IL-33与ST2的相互作用。

[0025] 在一个实施方案中,如以体外受体/配体结合测定在25℃下所测量,IL-33拮抗剂以小于约115pM的 IC_{50} 值阻断IL-33与ST2的相互作用。

[0026] 在一个实施方案中,如以体外受体/配体结合测定在25℃下所测量,IL-33拮抗剂以小于约20pM的 IC_{50} 值阻断IL-33与ST2的相互作用。

[0027] 在一个实施方案中,D1包含SEQ ID NO:5或6的氨基酸序列,或具有与所述氨基酸序列至少90%同一性的氨基酸序列。

[0028] 在一个实施方案中,D2包含SEQ ID NO:7或8的氨基酸序列,或具有与所述氨基酸序列至少90%同一性的氨基酸序列。

[0029] 在一个实施方案中,多聚组分包含SEQ ID NO:9或10的氨基酸序列,或具有与所述氨基酸序列至少90%同一性的氨基酸序列。

[0030] 在一个实施方案中,IL-33拮抗剂包含连接至第一多聚结构域(M1)的第一IL-33结合结构域(D1),和连接至第二多聚结构域(M2)的第二IL-33结合结构域(D2),其中D1结构域和/或D2结构域包含选自由ST2和IL-1RAcP组成的组的受体的IL-33结合部分。

[0031] 在一个实施方案中,IL-33拮抗剂包含连接至D1或M1的第三IL-33结合结构域(D3),并且其中D3包含选自由ST2和IL-1RAcP组成的组的受体的IL-33结合部分。

[0032] 在一个实施方案中,IL-33拮抗剂包含连接至D2或M2的第四IL-33结合结构域(D4),并且其中D4包含选自由ST2和IL-1RAcP组成的组的受体的IL-33结合部分。

[0033] 在一个实施方案中,D1连接至M1的N-端,并且D2连接至M2的N-端。

[0034] 在一个实施方案中,D3连接至D1的N-端。

[0035] 在一个实施方案中,D3连接至M1的C-端。

[0036] 在一个实施方案中,D4连接至D2的N-端。

[0037] 在一个实施方案中,D4连接至M2的C-端。

[0038] 在一个实施方案中,D3连接至D1的N-端,D1连接至M1的N-端;D4连接至D2的N-端,并且D2连接至M2的N-端。

[0039] 在一个实施方案中,D3与D4相同或实质上相同,并且D1与D2相同或实质上相同。

[0040] 在一个实施方案中,D3和D4各自包含ST2蛋白的IL-33结合部分;并且D1和D2各自包含IL-1RAcP蛋白的细胞外部分。

[0041] 在一个实施方案中,IL-33拮抗剂包含选自由SEQ ID NO:1、2、3、4和13组成的组的氨基酸序列。

[0042] 本发明的第二方面提供使用本文所述的IL-33拮抗剂来治疗炎性疾病或病症或与炎性疾病或病症相关联的至少一种症状的方法,所述方法包括向有需要的患者施用本发明的一种或多种IL-33拮抗剂,或含有本发明的一种或多种IL-33拮抗剂的药物组合物,其中所述炎性疾病或病症的严重度、持续时间和/或发生频率得以减轻或减少,或与炎性疾病或病症相关联的至少一种症状的严重度、持续时间和/或发生频率得以减轻或减少。

[0043] 在一个实施方案中,可用本发明的任何一种或多种IL-33拮抗剂治疗的炎性疾病或病症可选自由以下组成的组:哮喘、异位性皮炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、炎性肠病、多发

性硬化、关节炎、过敏性鼻炎、嗜酸细胞性食道炎和牛皮癣。

[0044] 在一个实施方案中,可用本发明的任何一种或多种IL-33拮抗剂治疗的炎性疾病或病症是哮喘。哮喘可为嗜酸细胞性或非嗜酸细胞性哮喘。哮喘可为类固醇抗性或类固醇敏感性哮喘。

[0045] 在一个实施方案中,可用本发明的任何一种或多种IL-33拮抗剂治疗的炎性疾病或病症是异位性皮炎。

[0046] 在一个实施方案中,可用本发明的任何一种或多种IL-33拮抗剂治疗的炎性疾病或病症是慢性阻塞性肺病(COPD)。在一个实施方案中,慢性阻塞性肺病可由香烟烟雾产生,或可部分地由香烟烟雾引起。

[0047] 在相关实施方案中,本发明提供用于治疗对过敏原显现敏感性的患者的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的本发明的IL-33拮抗剂中的一种或多种,或包含本发明的IL-33拮抗剂中的一种或多种的药物组合物,其中所述患者在施用抗体或包含抗体的组合物后,对过敏原显现降低的敏感性,或针对过敏原减少的过敏性反应,或不会经历对过敏原的任何敏感或过敏(allergic)反应,或过敏性(anaphylactic)反应。

[0048] 在相关实施方案中,本发明提供用于治疗炎性疾病或病症的包含本发明的IL-33拮抗剂中的一种或多种的药物组合物,其中炎性疾病或病症选自以下组成的组:哮喘、过敏症、过敏性反应、异位性皮炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、炎性肠病、多发性硬化、关节炎、过敏性鼻炎、嗜酸细胞性食道炎和牛皮癣。

[0049] 在一个实施方案中,本发明提供制造用于治疗炎性疾病或病症的药物的包括本发明的IL-33拮抗剂中的一种或多种的药物组合物,其中炎性疾病或病症选自以下组成的组:哮喘、过敏症、过敏反应、异位性皮炎、慢性阻塞性肺病(COPD)、炎性肠病、多发性硬化、关节炎、过敏性鼻炎、嗜酸细胞性食道炎和牛皮癣。

[0050] 在某些实施方案中,本发明提供通过以下方式治疗炎性疾病或病症的方法:施用本发明的IL-33拮抗剂中的一种或多种与有效量的第二治疗剂的组合,所述第二治疗剂适用于减轻炎性疾病或病症或炎性疾病或病症的至少一种症状,或减少对过敏原的过敏反应。

[0051] 在一个实施方案中,第二治疗剂可选自由以下组成的组:非类固醇消炎药(NSAID)、皮质类固醇、支气管扩张剂、抗组织胺、肾上腺素、去充血剂、胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)拮抗剂、IL-13拮抗剂、IL-4拮抗剂、IL-4/IL-13双拮抗剂、IL-5拮抗剂、IL-6拮抗剂、IL-12/23拮抗剂、IL-22拮抗剂、IL-25拮抗剂、IL-17拮抗剂、IL-31拮抗剂、PDE4抑制剂和另一IL-33拮抗剂或IL-33的不同抗体。

[0052] 本发明的第三方面提供包含本文所述的IL-33拮抗剂中的任何一种或多种和药学上可接受的载体或稀释剂的药物组合物,和包括向有需要的受试者施用这类药物组合物的治疗方法。在某些实施方案中,另外的治疗活性组分与本发明的IL-33拮抗剂一起配制或组合施用。

[0053] 根据确认详述的论述,其它的实施方案将变得显而易见。

[0054] 附图简述

[0055] 图1示出IL-33拮抗剂的个别组分相对于彼此的四种示例性布置。图面A示出一种布置,其中第一IL-33结合结构域(D1)连接至第一多聚结构域(M1)的N-端,并且第二IL-33

结合结构域 (D2) 连接至第二多聚结构域 (M2) 的N-端。D1示出为白色框,并且D2示出为黑色框,以指示D1和D2来源于不同的IL-33结合蛋白。图面B示出一种布置,其中第一IL-33结合结构域 (D1) 连接至第一多聚结构域 (M1) 的N-端,并且第二IL-33结合结构域 (D2) 连接至第二多聚结构域 (M2) 的C-端。D1示出为白色框,并且D2示出为黑色框,以指示D1和D2来源于不同的IL-33结合蛋白。图面C和D示出包括四个IL-33结合结构域D1、D2、D3和D4的布置。在这些布置中,D3-D1-M1和D4-D2-M2以串联方式连接,其中D3连接至D1的N-端,并且D1连接至M1的N-端;并且D4连接至D2的N-端,并且D2连接至M2的N-端。在图面C中,D3和D4彼此相同或实质上相同,并且D1和D2彼此相同或实质上相同。在图面D中,D1和D4彼此相同或实质上相同,并且D3和D2彼此相同或实质上相同。

[0056] 详述

[0057] 在描述本发明之前,应了解,本发明不限于所述的特定方法和实验条件,因为这些方法和条件可有所改变。也应了解,本文中所用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并且不希望为限制性的,因为本发明的范围将仅受限于所附的权利要求书。

[0058] 除非另有说明,否则文中所用的所有技术和科学术语具有如本发明所属领域的一般技术人员所正常理解相同意义。如本文中所用,术语“大约”在用于提及特定引述的数值时,指的是所述值可从所引述值变化不大于1%。例如,如本文中所用,表述“约100”包括99和101以及介于之间的所有值(例如99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0059] 虽然在施行或试验本发明时可使用与本文中所述类似或相当的任何方法和材料,但优选的方法和材料是目前所述的。

[0060] IL-33拮抗剂

[0061] 如本文中所用的表述“白介素-33”、“IL-33”和其类似词语指的是具有如NCBI登录号NP_254274.1(人同工型1)、NP_001186569.1(人同工型2)或NP_001186570.1(人同工型3)中所阐述的氨基酸序列的人IL-33蛋白。除非明确地指出来自非人物种(例如,“小鼠IL-33”、“猴IL-33”等),否则对本文中的蛋白、多肽和蛋白片段的所有提及内容意图指的是相应蛋白、多肽和蛋白片段的人源型式。

[0062] 如本文所用,表述“IL-33拮抗剂”意指能够结合IL-33并阻断、减弱或以其它方式干扰IL-33信号传递和/或IL-33与细胞表面受体(例如,ST2)之间的相互作用的任何抗原结合分子。

[0063] 本发明的IL-33拮抗剂包含连接至多聚结构域(M)的第一IL-33结合结构域(D1)。在某些实施方案中,本发明的IL-33拮抗剂包含连接至D1和/或M的第二IL-33结合结构域(D2)。根据某些实施方案,D1包含ST2蛋白的IL-33结合部分。根据某些实施方案,D2包含IL-1RAcP蛋白的细胞外部分。

[0064] IL-33拮抗剂的个别组分可以产生能够结合IL-33的功能性拮抗剂分子的各种方式相对于彼此来布置。举例来说,D1和/或D2可连接至M的N-端。在其它实施方案中,D1和/或D2连接至M的C-端。在其它实施方案中,D1连接至D2的N-端,并且D2连接至M的N-端,从而产生由式D1-D2-M表示的拮抗剂分子的从N-端至C-端的串联融合体。个别组分的其它定向在本文中其它处公开。

[0065] 本发明的IL-33拮抗剂的非限制实例在本文中的研究实施方案中示出,并且包括指定为“hST2-hFc”、“hST2-mFc”、“hST2-hIL1RAcP-mFc”、“hST2-hIL1RAcP-hFc”和“mST2-

mIL1RAcP-mFc”的拮抗剂。hST2-hFc和hST2-mFc也可被称为“ST2受体蛋白”。hST2-hIL1RAcP-mFc、hST2-hIL1RAcP-hFc和mST2-mIL1RAcP-mFc也可在本文中称为“IL-33Trap蛋白”。

[0066] 如本文所用,在第一多肽组分“连接”至第二多肽组分(例如,“D1连接至M”、“D2连接至M”、“D1连接至D2”等)的情形下,术语“连接”意指第一组分实体上直接或间接地连接至第二组分。作为两个多肽组分之间的直接连接的实例,第一组分的C-端氨基酸可通过肽键连接至第二组分的N-端氨基酸,或第一组分的N-端氨基酸可通过肽键连接至第二组分的C-端氨基酸。另一方面,间接连接意指第一组分和第二组分各自实体上连接至介入结构的不同部分,所述介入结构充当第一组分与第二组分之间的键联。介入结构可为例如单一氨基酸、肽接头或另一多肽组分(例如,另一IL-33结合蛋白等)。举例来说,在布置D1-D2-M(其中第一IL-33结合结构域[D1]连接至第二IL-33结合结构域[D2],继而连接至多聚结构域[M])中,D1被视为“连接”至M,尽管在D2充当介入结构的情况下,连接是间接的。

[0067] 标准分子生物技术(例如,重组DNA技术)可用于构建本发明的IL-33拮抗剂中的任何IL-33拮抗剂或其变体。

[0068] IL-33结合结构域

[0069] 本发明的IL-33拮抗剂包含至少一个IL-33结合结构域(本文中有时以名称“D”或“D1”、“D2”等来提及)。在某些实施方案中,IL-33结合结构域包含ST2蛋白的IL-33结合部分。ST2蛋白的IL-33结合部分可包含ST2蛋白的细胞外结构域的全部或一部分或由其组成。在某些实施方案中,ST2蛋白是人ST2蛋白。如本文所用,“人ST2蛋白”指的是具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的ST2蛋白。在某些实施方案中,ST2蛋白是非人物种的ST2蛋白(例如,小鼠ST2、猴ST2等)。ST2蛋白的示例性IL-33结合部分在本文中如SEQ ID NO:5的氨基酸序列(对应于人ST2的细胞外结构域[NCBI登录号NP_057316.3的K19-S328])所阐述。ST2蛋白的IL-33结合部分的另一实例在本文中如SEQ ID NO:6的氨基酸序列(对应于小鼠ST2的细胞外结构域[NCBI登录号P14719的S27-R332])所阐述。

[0070] 在某些实施方案中,IL-33结合结构域包含IL-1RAcP蛋白的细胞外部分。在某些实施方案中,IL-1RAcP蛋白是人IL-1RAcP蛋白。如本文所用,“人IL-1RAcP蛋白”指的是具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的IL-1RAcP蛋白。在某些实施方案中,IL-1RAcP蛋白是来自非人物种的IL-1RAcP蛋白(例如,小鼠IL-1RAcP、猴IL-1RAcP等)。IL-1RAcP蛋白的示例性细胞外部分在本文中如SEQ ID NO:7的氨基酸序列(对应于人IL-1RAcP的细胞外结构域[NCBI登录号Q9NPH3的S21-E359])所阐述。IL-1RAcP蛋白的细胞外部分的另一实例在本文中如SEQ ID NO:8的氨基酸序列(对应于小鼠IL-1RAcP的细胞外结构域[NCBI登录号Q61730的S21-E359])所阐述。

[0071] 本发明包括包含D1组分和/或D2组分的IL-33拮抗剂,所述组分具有与在本文中阐述的任何示例性IL-33结合结构域组分氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:5-8)至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0072] 多聚结构域

[0073] 本发明的IL-33拮抗剂还包含至少一个多聚结构域(本文中有时以缩写“M”、“M1”、“M2”等来提及)。一般地说,本发明的多聚结构域起作用来将IL-33拮抗剂的各个组分(例如,IL-33结合结构域)彼此连接。如本文所用,“多聚结构域”是任何大分子,所述大分子具

有与相同或类似结构或构造的第二大分子缔合(以共价或非共价方式)的能力。举例来说,多聚结构域可为包含免疫球蛋白 C_{H3} 结构域的多肽。多聚结构域的非限制性实例是免疫球蛋白的Fc部分,例如,IgG的Fc结构域,所述IgG选自同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,以及每个同种型组内的任何同种异型。在某些实施方案中,多聚结构域是Fc片段或含有至少一个半胱氨酸残基的长度为1至约200个氨基酸的氨基酸序列。在其它实施方案中,多聚结构域是半胱氨酸残基或含有半胱氨酸的短肽。其它多聚结构域包括肽或多肽,所述肽或多肽包含亮氨酸拉链、螺旋环基元或卷曲螺旋基元或由其组成。

[0074] 可用于本发明的IL-33拮抗剂中的非限制性示例性多聚结构域包括人IgG1Fc (SEQ ID NO:9) 或小鼠IgG2aFc (SEQ ID NO:10)。本发明包括包含M组分的IL-33拮抗剂,所述M组分具有与在本文中阐述的任何示例性M组分氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:9或10)至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0075] 在某些实施方案中,本发明的IL-33拮抗剂包含两个多聚结构域M1和M2,其中M1和M2彼此相同。举例来说,M1可为具有特定氨基酸序列的Fc结构域,并且M2是具有与M1相同氨基酸序列的Fc结构域。

[0076] 或者,在某些实施方案中,本发明的IL-33拮抗剂包含两个多聚结构域M1和M2,所述多聚结构域在一个或多个氨基酸位置上彼此不同。举例来说,M1可包含第一免疫球蛋白(Ig) C_{H3} 结构域并且M2可包含第二Ig C_{H3} 结构域,其中第一Ig C_{H3} 结构域和第二Ig C_{H3} 结构域彼此相差至少一个氨基酸,并且其中当与具有相同M1和M2序列的参考构建体相比时,至少一个氨基酸差异减少靶向构建体与蛋白A的结合。在一个实施方案中,M1的Ig C_{H3} 结构域结合蛋白A并且M2的Ig C_{H3} 结构域含有减少或消除蛋白A结合的突变,如H95R修饰(根据IMGT外显子编号;根据EU编号为H435R)。M2的 C_{H3} 还可包含Y96F修饰(根据IMGT;根据EU为Y436F)。可在M2的 C_{H3} 内发现的其它修饰包括:在IgG1Fc结构域的情况下,D16E、L18M、N44S、K52N、V57M和V82I(根据IMGT;根据EU为D356E、L358M、N384S、K392N、V397M和V422I);在IgG2 Fc结构域的情况下的N44S、K52N和V82I(IMGT;根据EU为N384S、K392N和V422I);以及在IgG4Fc结构域的情况下,Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q和V82I(根据IMGT;根据EU为Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q和V422I)。

[0077] IL-33拮抗剂的组分的定向和布置

[0078] 本发明的IL-33拮抗剂的个别组分(例如,D1、D2、M等)可以各种方式相对于彼此来布置,所述方式的实例在本文中其它处详细描述。多聚结构域(M1和/或M2)可为具有N-端和C-端的肽或多肽。因此,D1组分和D2组分可在M组分的N-端或C-端处连接至M组分。例如,D1可连接至M的N-端(表示为“D1-M”)。或者,D1可连接至M的C-端(表示为“M-D1”)。在一些实施方案中,D2连接至M的N-端(表示为“D2-M”),或D2连接至M的C-端(表示为“M-D2”)。在其它实施方案中,D1连接至D2的N-端,并且D2连接至M的N-端(表示为“D1-D2-M”)。个别组分从N-端至C-端的其它示例性布置可由此如下表示:D2-D1-M;M-D1;M-D2;M-D1-D2;M-D2-D1;D1-M-D2;D2-M-D1;等。

[0079] 在包含两个不同多聚结构域(M1和M2)的实施方案中,一个或多个IL-33结合结构域可以多种布置来连接至多聚结构域。这类布置的非限制实例在图1示意性地示出。举例来说,本发明包括IL-33拮抗剂,所述IL-33拮抗剂包含连接至第一多聚结构域(M1)的第一IL-33结合结构域(D1),和连接至第二多聚结构域(M2)的第二IL-33结合结构域(D2)。本发明的

IL-33拮抗剂还可包括一个或多个另外的IL-33结合结构域(例如,D3、D4等)。举例来说,在包括第三IL-33结合结构域(D3)的情况下,D3组分可连接至D1或M1;同样地,在包括第四IL-33结合结构域(D4)的情况下,D4组分可连接至D2或M2。

[0080] 在涉及多个IL-33结合结构域的实施方案中,IL-33结合结构域中的两个或更多个可彼此相同或实质上相同。举例来说,在包含四个IL-33结合结构域(D1、D2、D3和D4)的实施方案中,D1和D2可彼此相同或实质上相同;并且D3和D4可彼此相同或实质上相同,等。

[0081] 包含两个多聚结构域(M1和M2)和四个IL-33结合结构域(D1、D2、D3和D4)的本发明的IL-33拮抗剂的非限制性说明性实例在图1中示出,布置C和D)。在这种示例性布置中,D1连接至M1的N-端,D2连接至M2的N-端,D3连接至D1的N-端,并且D4连接至D2的N-端。图面C描绘的情况是其中D1和D2彼此相同(例如,各自包含IL-1RAcP的细胞外结构域),并且D3和D4彼此相同(例如,各自包含ST2的细胞外结构域)。图面C描绘的情况是其中D1和D2不相同,并且D3和D4不相同。基于本公开的教义,众多其它布置对本领域普通技术人员而言显而易见,并且在本发明的范围内涵盖这些布置。

[0082] 接头

[0083] 本发明的IL-33拮抗剂的个别组分(例如,D1、D2、M1、M2等)可直接彼此连接(例如,D1和/或D2可直接连接至M等);替代地,个别组分可通过接头组分彼此连接(例如,D1和/或D2可通过在个别组分之间定向的接头连接至M;D1可通过接头连接至D2;等)。在本文公开的任何布置中,其中一个组分描述为“连接”至另一个组分,连接可通过接头(即使没有具体指明为此,也是这样)。如本文所用,“接头”是将两个多肽组分连接在一起的任何分子。举例来说,接头可为包含通过肽键连接在一起的1至20个氨基酸的肽。(然而,肽键本身不被认为是用于本公开目的的“接头”)。在某些实施方案中,接头包括立体上未受阻的氨基酸,如甘氨酸和丙氨酸。在某些实施方案中,接头是耐蛋白水解降解的柔性氨基酸链。接头可包含彼此相互作用的两个分子结构。举例来说,在某些实施方案中,接头可包含链霉亲和素组分和生物素组分;链霉亲和素(连接至一个组分)与生物素(连接至另一个组分)之间的缔合充当IL-33拮抗剂的个别组分之间的连接。本文描述为hST2-hIL1RAcP-mFc和mST2-mIL1RAcP-mFc的示例性IL-33拮抗剂包括IL-1RAcP组分与Fc多聚结构域之间的丝氨酸-甘氨酸(SG)接头。在本发明的范围内涵盖涉及接头的其它类似接头布置和配置。

[0084] IL-33拮抗剂的生物学特性

[0085] 本发明包括以高亲和力结合可溶性IL-33分子的IL-33拮抗剂。举例来说,本发明包括IL-33拮抗剂(如本文中其它处所述),如通过表面等离子体共振,例如,使用如本文中的实施例2中所定义的测定形式所测量,所述IL-33拮抗剂以小于约400pM的 K_D 结合IL-33(例如,在25℃或37℃下)。在某些实施方案中,如通过表面等离子体共振,例如,使用如本文中的实施例2中所定义的测定形式或实质上类似的测定所测量,本发明的IL-33拮抗剂以小于约200pM、小于约100pM、小于约90pM、小于约80pM、小于约70pM、小于约60pM、小于约50pM、小于约40pM、小于约30pM、小于约20pM、小于约10pM、小于约9pM、小于约8pM、小于约6pM或小于约1pM的 K_D 来结合IL-33。

[0086] 本发明还包括IL-33拮抗剂,如通过表面等离子体共振,例如,使用如本文中的实施例2中所定义的测定形式或实质上类似的测定在25℃或37℃下所测量,所述IL-33拮抗剂以大于或等于约4分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)特异性结合IL-33。在某些实施方案中,如通过

表面等离子体共振,例如,使用如本文中的实施例2中所定义的测定形式或实质上类似的测定在25℃或37℃下所测量,本发明的IL-33拮抗剂以大于约10分钟、大于约20分钟、大于约30分钟、大于约40分钟、大于约50分钟、大于约60分钟,或大于约70分钟,或大于约500分钟,或大于约1000分钟的 $t_{1/2}$ 结合IL-33。

[0087] 本发明还包括阻断IL-33与IL-33受体(例如,ST2)的结合的IL-33拮抗剂。举例来说,本发明包括IL-33拮抗剂,如通过基于ELISA的免疫测定,例如,使用如本文中的实施例3中所定义的测定形式或实质上类似的测定所测量,所述IL-33拮抗剂以小于约115pM的 IC_{50} 值在体外阻断IL-33与ST2的结合。在某些实施方案中,如通过基于ELISA的免疫测定,例如,使用如本文中的实施例3中所定义的测定形式或实质上类似的测定所测量,所述本发明的IL-33拮抗剂以小于约120pM、小于约90pM、小于约80pM、小于约70pM、小于约60pM、小于约50pM、小于约40pM、小于约30pM、小于约20pM、小于约18pM、小于约16pM、小于约14pM、小于约12pM、小于约10pM、小于约9pM、小于约8pM或小于约7pM的 IC_{50} 值在体外阻断IL-33与ST2的结合。

[0088] 本发明还包括抑制IL-33介导的细胞信号传递的IL-33拮抗剂。举例来说,本发明包括IL-33拮抗剂,如在基于细胞的阻断生物测定中,例如,使用如本文中的实施例4中所定义的测定形式或实质上类似的测定所测量,所述IL-33拮抗剂以小于约500pM的 IC_{50} 值抑制在表达人ST2的细胞中的IL-33介导信号传递。在某些实施方案中,如在基于细胞的阻断生物测定中,例如,使用如本文中的实施例4中所定义的测定形式或实质上类似的测定所测量,本发明的IL-33拮抗剂以小于约400pM、小于约300pM、小于约200pM、小于约100pM、小于约80pM、小于约60pM、小于约40pM、小于约30pM、小于约20pM、小于约18pM、小于约16pM、小于约14pM、小于约12pM、小于约10pM、小于约8pM、小于约7pM、小于约6pM、小于约5pM、小于约4pM、小于约3pM、小于约2pM或小于约1.5pM的 IC_{50} 阻断在表达人ST2的细胞中的IL-33介导信号传递。

[0089] 本发明还包括抑制IL-33诱导的嗜碱性粒细胞激活的IL-33拮抗剂和抑制IL-33诱导的 $IFN-\gamma$ 从人PBMC的释放的IL-33拮抗剂。嗜碱性粒细胞激活可定义为脱粒作用、细胞表面标记物表达、细胞因子释放和其它免疫介体(如组织胺和白三烯)释放。

[0090] 本发明的IL-33拮抗剂可具有前述生物特性中的一种或多种或其任何组合。根据包括本文中研究实施例的本公开的论述,本发明抗体的其它生物特性对本领域一般技术人员来说是明显的。

[0091] 治疗制剂和施用

[0092] 本发明提供包含本发明的IL-33拮抗剂的药物组合物。本发明的药物组合物可用适合的载体、赋形剂和提供改进转移、递送、耐受性和类似性质的其它试剂来配制。许多适合的制剂可参见所有药物化学家已知的处方集:Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. 这些制剂包括例如粉剂、糊膏、软膏、软冻、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子)的囊泡(例如LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA)、DNA缀合物、无水吸收糊膏、水包油和油包水乳剂、乳剂碳蜡(具有各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含碳蜡(carbowax)的半固体混合物。也参见Powell等人“Compendium of excipients for parenteral formulations”PDA(1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0093] 施用于患者的IL-33拮抗剂的剂量可取决于患者的年龄和体型、目标疾病、病状、施用途径等而有所变化。优选的剂量典型地根据体重或体表面积来计算。当本发明的IL-33拮抗剂用于治疗成人患者的与IL-33活性相关联的病状或疾病时,可为有利的是通常以约0.01至约20mg/kg体重,更优选地约0.02至约7,约0.03至约5,或约0.05至约3mg/kg体重的单一剂量静脉内施用本发明的IL-33拮抗剂。可取决于病状的严重度来调整治疗的频率和持续时间。用于施用IL-33拮抗剂的有效剂量和时程可依经验来决定;例如可通过定期评估来监测患者病情进展,并相应地调整剂量。此外,剂量的物种间标定可使用本领域中熟知的方法来进行(例如Mordenti等人,1991,Pharmaceut.Res.8:1351)。

[0094] 各种递送系统是已知的并可用于施用本发明的药物组合物,例如在脂质体包封、微粒、微胶囊、能表达突变病毒的重组细胞、受体介导内吞作用(参见,例如Wu等人1987,J.Biol.Chem.262:4429-4432)。引入的方法包括但不限于皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。组合物可以任何方便的途径,例如通过输注或团注、通过由上皮或粘膜层(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收来施用,并可与其它生物活性剂共同施用。施用可为全身性或局部的。

[0095] 本发明的药物组合物可由标准针或注射器进行皮下或静脉内递送。此外,就皮下递送来说,笔型递送装置可容易地用于递送本发明的药物组合物。这种笔型递送装置可重复使用或为一次性的。可重复使用的笔型递送装置一般利用含有药物组合物的可更换药筒。一旦药筒内的所有药物组合物施用后并且药筒腾空,那么空药筒可容易丢弃并更换新的含药物组合物的药筒。然后,笔型递送装置便可重复使用。在一次性笔型递送装置中,没有可置换的药筒。取而代之,一次性笔型递送装置预先填充有药物组合物,所述药物组合物被保持在装置内的贮存器中。一旦药物组合物的贮存器腾空,就将整个装置丢弃。

[0096] 许多可重复使用的笔型和自动注射器递送装置可应用于皮下递送本发明的药物组合物。实例包括但不限于AUTOPEN™(Owen Mumford,Inc.,Woodstock,UK)、DISETRONIC™笔(Disetronic Medical Systems,Bergdorf,Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25™笔、HUMALOG™笔,HUMALIN 70/30™笔、(Eli Lilly and Co.,Indianapolis,IN)、NOVOPEN™I、II和III(Novo Nordisk,Copenhagen,Denmark)、NOVOPEN JUNIOR™(Novo Nordisk,Copenhagen,Denmark)、BD™笔(Becton Dickinson,Franklin Lakes,NJ)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™和OPTICLIK™(sanofi-aventis,Frankfurt,Germany),仅举几例。用于皮下递送本发明药物组合物的一次性笔型递送装置包括但不限于SOLOSTAR™笔(sanofi-aventis)、FLEXPEN™(Novo Nordisk)和KWIKPEN™(Eli Lilly)、SURECLICK™自动注射器(Amgen,Thousand Oaks,CA)、PENLET™(Haselmeier,Stuttgart,Germany)、EPIPEN(Dey,L.P.)和HUMIRA™笔(Abbott Labs,Abbott Park IL),仅举几例。

[0097] 在某些情况下,药物组合物可以受控释放系统来递送。在一个实施方案中,可使用泵(参见Langer,如上;Sefton,1987,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201)。在另一实施方案中,可使用聚合物材料;参见Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise(编著),1974,CRC Pres.,Boca Raton,Florida。在另一实施方案中,受释放系统可放置在靠近组合物的目标处,因此仅需要全身剂量的一部分(参见,例如Goodson,1984,Medical Applications of Controlled Release,如上,第2卷,第115-138页)。其它受控制释放系统论述于Langer,1990,Science 249:1527-1533的综述中。

[0098] 可注射制剂可包括用于静脉内、皮下、皮内和肌肉内注射、点滴输注等的剂型。这些可注射制备物可通过公共已知的方法来制备。例如,可注射制备物可例如通过将上述拮抗剂或其盐溶解、悬浮或乳化于常规用于注射的无菌水性介质或油性介质中来制备。用于注射的水性介质例如生理盐水、含葡萄糖的等张溶液和其它佐剂等,其可与下列组合使用:适合的增溶剂,如醇(例如乙醇);多元醇(例如丙二醇、聚乙二醇);非离子表面活性剂[例如聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧乙烯(50摩尔)加合物)]等。可使的用油性介质为例如芝麻油、大豆油等,其可与如苯甲酸苄酯、苄醇等的增溶剂组合使用。由此所制备的注射剂优选地填充于适当的安瓶中。

[0099] 有利地,上述的用于口服或肠胃外用途的药物组合物被制备成呈适于配合活性成分剂量的单位剂量的剂型。这些单位剂量的剂型包括例如片剂、丸剂、胶囊、注射剂(安瓶)、栓剂等。所含的前述拮抗剂分子的量一般为每单位剂量的剂型约5至约500mg;特别在注射剂形式的情况下,优选的是,以约5至约100mg来含有前述拮抗剂分子,而针对其它剂型以约10至约250mg来含有前述抗体。

[0100] IL-33拮抗剂的治疗用途

[0101] 由本发明人进行的实验已对鉴别出可通过IL-33拮抗作用治疗、预防和/或改善的各种疾病和症状做出贡献。例如,小鼠IL-33 DNA的流体动力递送造成小鼠中肺粘液堆积的诱发和总血清IgE的增加。此外,如通过微阵列分析所测量,mIL-33 DNA递送造成ST2和各种下游细胞因子的上调。由本发明人使用IL-33敲除小鼠进行的实验也显示IL-33拮抗作用的各种潜在治疗益处。例如,在IMQ诱发的牛皮癣模型中,已发现在野生型小鼠与IL-33^{-/-}小鼠之间,观察到相当的宏观评分和皮肤浸润。此外,在过敏原诱发的肺炎模型中,IL-33^{-/-}小鼠显示嗜酸性粒细胞和残余粘液堆积的下降。本发明的IL-33拮抗剂尤其可用于治疗、预防和/或改善与IL-33表达、信号传递或活性相关联或由其所介导的任何疾病或病症,或可通过阻断IL-33与IL-33配体(例如ST2)之间的相互作用,或以其它方式抑制IL-33活性和/或信号传递治疗的任何疾病或病症。例如,本发明提供治疗下列的方法:感染性疾病(例如,利什曼原虫感染、鞭虫感染、分枝杆菌感染、李斯特菌感染、弓首线虫感染、血吸虫感染、呼吸道融合瘤病毒感染、流感病毒感染等)、哮喘(例如,嗜酸细胞性哮喘或非嗜酸细胞性哮喘、类固醇抗性哮喘或类固醇敏感性哮喘、过敏性哮喘、非过敏性哮喘、严重难治性哮喘、哮喘急性加重[例如,病毒诱发或过敏原诱发]等)、异位性皮炎、牛皮癣、其它炎性病症、过敏、过敏症、心血管疾病、中枢神经系统疾病、疼痛、关节炎(例如,类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣性关节炎等)、巨细胞动脉炎、炎性肠病(例如,克隆氏症或溃疡性结肠炎)、多发性硬化症、过敏性鼻炎、嗜酸细胞性食道炎、血管炎、过敏性紫斑症(Henoch-Schonlein purpura)。本发明的IL-33拮抗剂也适用于治疗、预防和/或改善一种或多种纤维化疾病。可通过施用本发明的IL-33拮抗剂治疗的示例性纤维化疾病包括肺纤维化(例如,特发性肺纤维化、博来霉素诱发的肺纤维化、石棉诱发的肺纤维化和闭塞性细支气管炎综合征)、慢性哮喘、与急性肺损伤和急性呼吸窘迫相关联的纤维化(例如,过敏原诱发的纤维化、细菌性肺炎诱发的纤维化、创伤诱发的纤维化、病毒性肺炎诱发的纤维化、呼吸器诱发的纤维化、非肺性败血症诱发的纤维化和吸入诱发的纤维化)、硅肺、放射线诱发的纤维化、慢性阻塞性肺疾病(COPD,包括COPD急性加重,或由吸烟或二手香烟烟雾产生或可部分地吸烟或二手香烟烟雾引起的COPD)、眼睛纤维化、皮肤纤维化(例如,硬皮病)、肝纤维化(例如,肝硬化、酒精诱发

的肝纤维化、非酒精性脂肪肝炎 (NASH)、胆管损伤、原发性胆汁性肝硬化、感染或病毒诱发的肝纤维化[例如,慢性HCV感染]、自身免疫性肝炎)、肾脏(肾)纤维化、心纤维化、动脉粥样硬化、支架内再狭窄和骨髓纤维化。

[0102] 在本文中所述的治疗方法的情形中,IL-33拮抗剂可作为单一疗法施用(即作为唯一的治疗剂)或与一种或多种另外的治疗剂(其实例描述于本文中其它处)组合施用。

[0103] 组合疗法和制剂

[0104] 本发明包括包含本文中所述的任何IL-33拮抗剂与一种或多种另外的治疗活性组分组合的组合物和治疗制剂,以及包括将这些组合物施用于有需要的受试者的治疗方法。本发明的IL-33拮抗剂也可与下列共配制或组合施用:例如,细胞因子抑制剂或拮抗剂,包括与细胞因子(例如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-31)结合的小分子细胞因子抑制剂和抗体、IL-4/IL-13双拮抗剂、IL-12/IL-23双拮抗剂、PDE4抑制剂(在一个实施方案中为口服PDE4抑制剂),以及另一IL-33拮抗剂或IL-33的不同抗体、胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP),或其相应受体的拮抗剂。

[0105] 本发明的IL-33拮抗剂还可与抗病毒剂、抗生素、镇痛剂、皮质类固醇、类固醇、氧、抗氧化剂、金属螯合剂、IFN- γ 和/或NSAID、支气管扩张剂、抗组织胺、肾上腺素或去充血剂组合施用或共配制。

[0106] 另外的治疗活性组分可在施用本发明IL-33拮抗剂之前、同时或之后不久施用(就本公开文的目的来说,这些施用方案被视为IL-33拮抗剂与另外的治疗活性组分“组合”施用)。本发明包括药物组合物,其中本发明的IL-33拮抗剂是与本文中其它处所述的另外的治疗活性组分中的一种或多种共调配。

[0107] 施用方案

[0108] 根据本发明某些实施方案,可在限定的实践过程内将多个剂量的IL-33拮抗剂(或包含IL-33拮抗剂与本文中所提的任何另外的治疗活性剂组合的药物组合物)施用于受试者。根据本发明的这个方面的方法包括向受试者连续施用多个剂量的本发明的IL-33拮抗剂。如本文中所用,“连续施用”意指各剂量的IL-33拮抗剂在不同的时间点施用于受试者,例如在以预定间隔分开的不同天(例如小时、天、周或月)。本发明包括的方法包括:向患者连续施用单一初始剂量的IL-33拮抗剂,接着一个或多个第二剂量的IL-33拮抗剂,和任选地接着一个或多个第三剂量的IL-33拮抗剂。

[0109] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”指的是施用本发明IL-33拮抗剂的时间顺序。因此,“初始剂量”为治疗方案开始时所施用的剂量(也称为“基线剂量”);“第二剂量”为在初始剂量之后所施用的剂量;而“第三剂量”为在第二剂量之后所施用的剂量。初始剂量、第二剂量和第三剂量都可含有相同量的IL-33拮抗剂,但就施用频率来说,一般可彼此不同。然而,在某些实施方案中,包含在初始剂量、第二剂量和/或第三剂量中的IL-33拮抗剂的量在治疗过程期间可互不相同(例如,在适当时上调或下调)。在某些实施方案中,在治疗方案开始时施用的两个或更多个(例如2、3、4或5个)剂量为“负荷剂量”,接着以较低频率为基础施用后续剂量(例如“维持剂量”)。

[0110] 在本发明的某些示例性实施方案中,各第二和/或第三剂量是紧接前一剂量之后的1至26周(例如1、1^{1/2}、2、2^{1/2}、3、3^{1/2}、4、4^{1/2}、5、5^{1/2}、6、6^{1/2}、7、7^{1/2}、8、8^{1/2}、9、9^{1/2}、10、

10^{1/2}、11、11^{1/2}、12、12^{1/2}、13、13^{1/2}、14、14^{1/2}、15、15^{1/2}、16、16^{1/2}、17、17^{1/2}、18、18^{1/2}、19、19^{1/2}、20、20^{1/2}、21、21^{1/2}、22、22^{1/2}、23、23^{1/2}、24、24^{1/2}、25、25^{1/2}、26、26^{1/2}或更久)来施用。如本文中所用的短语“紧接前一剂量”意指在多重施用顺序中,不间断剂量的顺序中、在下一剂量施用之前施用于患者的IL-33拮抗剂的剂量。

[0111] 根据本发明的这个方面的方法可包括将任何数目的第二和/或第三剂量的IL-33拮抗剂施用于患者。例如,在某些实施方案中,仅将单一第二剂量施用于患者。在其它实施方案中,将两个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8或更多个)第二剂量施用于患者。同样的,在某些实施方案中,仅将单一第三剂量施用于患者。在其它实施方案中,将两个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8或更多个)第三剂量施用于患者。

[0112] 在涉及多个第二剂量的实施方案中,各第二剂量可以与其它第二剂量相同的频率来施用。例如,各第二剂量可在紧接前面剂量后1至2周或1至2个月施用于患者。同样的,在涉及多个第三剂量的实施方案中,各第三剂量可以与其它第三剂量相同的频率来施用。例如,各第三剂量可在紧接前面剂量后2至12周施用于患者。在本发明的某些实施方案中,施用于患者的第二和/或第三剂量的频率在治疗过程期间,施用频率还可取决于个别患者的需求在临床检查后由医师做出调整。

[0113] 本发明包括其中以第一频率将2至6个负荷剂量施用于患者(例如每周一次、每两周一次、每三周一次、每月一次、每两个月一次等),接着以较低频率为基础将两个或更多个维持剂量施用于患者的施用方案。例如,根据本发明这个方面,如果负荷剂量以每月一次的频率施用,那么维持剂量可每六周一次、每两个月一次、每三个月一次等)施用于患者。

实施例

[0114] 提出下列实施例以为本领域一般技术人员提供如何制造并使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述,但不意图限制发明人所认为的发明范围。虽然已尽力确保就所用数字(例如量、温度等)来说的准确性,但仍应考量一些实验误差和偏差。除非另有指出,否则份数为重量份,分子量为平均分子量,温度以摄氏度数表示,而压力为大气压或接近大气压。

[0115] 实施例1. 构建IL-33拮抗剂

[0116] 使用标准分子生物技术来构建本发明的五种不同示例性IL-33拮抗剂。第一IL-33拮抗剂(hST2-hFc, SEQ ID NO:1)由人ST2(SEQ ID NO:5)的以C-端融合至人IgG1 Fc区(SEQ ID NO:9)的N-端的可溶性细胞外区组成。第二IL-33拮抗剂(hST2-mFc, SEQ ID NO:2)由人ST2(SEQ ID NO:5)的以C-端融合至小鼠IgG2a Fc区(SEQ ID NO:10)的N-端的可溶性细胞外区组成。第三IL-33拮抗剂(hST2-hIL1RAcP-mFc, SEQ ID NO:3)由串联融合体组成,所述融合体具有在它的N-端处的人ST2(SEQ ID NO:5),接着是人IL-1RAcP(SEQ ID NO:7)的细胞外区,接着是在它的C-端处的小鼠IgG2a Fc(SEQ ID NO:10)。第四IL-33拮抗剂(mST2-mIL1RAcP-mFc, SEQ ID NO:4)由串联融合体组成,所述融合体具有在它的N-端处的小鼠ST2(SEQ ID NO:6),接着是小鼠IL-1RAcP(SEQ ID NO:8)的细胞外区,接着是在它的C-端处的小鼠IgG2a Fc(SEQ ID NO:10)。第五IL-33拮抗剂(hST2-hIL1RAcP-hFc, SEQ ID NO:13)由串联融合体组成,所述融合体具有在它的N-端处的SEQ ID NO:5的人ST2,接着是人IL-1RAcP(SEQ ID NO:7)的细胞外区,接着是在它的C-端处的人IgG1 Fc(SEQ ID NO:9)。表1a

列明不同IL-33拮抗剂和它们的组成部分的概要描述。表1b列明IL-33拮抗剂和它们的组成部分的氨基酸序列。

[0117] 表1a:IL-33拮抗剂的概述

IL-33 拮抗剂	完整拮抗剂分子的氨基酸序列	D1 组分	D2 组分	M 组分
hST2-hFc	SEQ ID NO:1	人 ST2 细胞外 (SEQ ID NO:5)	不存在	人 IgG1 Fc (SEQ ID NO:9)
hST2-mFc	SEQ ID NO:2	人 ST2 细胞外 (SEQ ID NO:5)	不存在	小鼠 IgG2a Fc (SEQ ID NO:10)
hST2-hIL1R AcP-mFc	SEQ ID NO:3	人 ST2 细胞外 (SEQ ID NO:5)	人 IL-1RAcP 细胞外 (SEQ ID NO:7)	小鼠 IgG2a Fc (SEQ ID NO:10)
mST2-mIL1R AcP-mFc	SEQ ID NO:4	小鼠 ST2 细胞外 (SEQ ID NO:6)	小鼠 IL-1RAcP 细胞外 (SEQ ID NO:8)	小鼠 IgG2a Fc (SEQ ID NO:10)
hST2-hIL1R AcP-hFc	SEQ ID NO: 13	人 ST2 细胞外 (SEQ ID NO:5)	人 IL-1RAcP 细胞外 (SEQ ID NO:7)	人 IgG1 Fc (SEQ ID NO:9)

[0119] 表1b:氨基酸序列

标识符	序列
SEQ ID NO:1 (hST2-hFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKS IPTQERNRVFASGQLLKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRT GYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSEKNSKIYCPTI DLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTE DAGDYTCKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLPV IGAPAQNEIKEVEIGKNANLTCSACFGKGTQFLAAVLWQ LNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFSNGLACLDMVLRIAD VKEEDLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHSD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK

标识符	序列
	AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:2 (hST2-mFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKS IPTQERNRVFASGQLLKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRT GYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSEKNSKIYCPTI DLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTE DAGDYTCKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFV IGAPAQNEIKEVEIGKNANLTCSACFGKGTQFLAAVLWQ LNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFSNGLACLDMVLRIAD VKEEDLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSEP RGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPI VTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDY NSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERT ISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMP EDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRV EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO:3 (hST2-hIL1RA cP-mFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKS IPTQERNRVFASGQLLKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRT GYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSEKNSKIYCPTI DLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTE DAGDYTCKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFV IGAPAQNEIKEVEIGKNANLTCSACFGKGTQFLAAVLWQ LNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFSNGLACLDMVLRIAD VKEEDLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSSE RCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSTA HSAGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLW FRPTLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFPLEVVQKDSCFN SPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVKPTITWYM GCYKIQNFNVIPEGMNLSFLIALISNNGNYTCVVTYPEN GRTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVEKEP GEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTI NESISHSRTEDETRTQILSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAK GEVAKAAKVQKQVPAPRYTVESGEPGPTIKPCPPCKCP APNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDP DVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQV YVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGK TELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYS CSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO:4 (mST2-mIL1R AcP-mFc)	SKSSWGLENEALIVRCPRQGRSTYPVEWYYSDTNESIPT QKRNRIFVSRDLKFLPARVEDSGIYACVIRSPNLNKTGY LNVTIHKKPPSCNIPDYLMYSTVRGSDKNFKITCPTIDLY NWTAPVQWFKNCKALQEPRFRAHRSYLFIDNVTHDDEG DYTCQFTHAENGNTYIVTATRSFTVEEKGFSMFPVITNPP YNHTMEVEIGKPASIACSACFGKGSFLADVLWQINKTV VGNFGEARIQEEEGRNESSNDMDCLTSVLRITGVTEKD LSLEYDCLALNLHGMIRHTIRLRKQPIDHRSERCDDWG LDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKYNYSTAHSSGLTLI

[0121]

[0122]

标识符	序列
	WYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLFWRPTLLND TGNYTCMLRNTTYCSKVAFPLEVVQKDSCFNSAMRFPV HKMYIEHGIHKITCPNVDGYFPSSVKPSVTWYKGCTEIV DFHNVLPEGMNLSFFIPLVSNNGNVTCVVITYPENGRLFH LTRTVTVKVVGSPKDALPPQIYSPNDRVVYEKEPGEELVI PCKVYFSFIMDSHNEVWWTIDGKKPDDVTVDITINESVS YSSTEDETRTQILSIKKVTPEDLRRNYVCHARNTKGEAE QAAKVQKQVIPPRYTVE SGEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLL GGPSVFIFPPKIKDVLMLISLPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS WVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW MSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP PPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELN YKNTEPVLDSDSGYFMYSKLRVEKKNWVERNYSYSCSVV HEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO:5 (人 ST2 细胞外 结构域)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKS IPTQERNRVFASGQLLKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRT GYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSEKNSKIYCPTI DLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTE DAGDYTCFKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPV IGAPAQNEIKEVEIGKNANLTCSACFGKGTQFLAAVLWQ LNGTKITDFGEPRIQQEEGQNOFSNGLACLDMLRIAD VKEEDLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHS
SEQ ID NO:6 (小鼠 ST2 细胞 外结构域)	SKSSWGLENEALIVRCPRQGRSTYPVEWYYSDTNESIPT QKRNRI FVSRDLKFLPARVEDSGIYACVIRSPNLNKTGY LNVTIHKKPPSCNIPDYLMYSTVRGSDKNFKITCPTIDLY NWTAPVQWFKNCKALQEPRFRAHRSYLFIDNVTHDDEG DYTCQFTHAENGTYIVTATRSFTVEEKGFSMFPVITNPP YNHTMEVEIGKPASIACSACFGKGSFLADVLWQINKTV VGNFGEARIQEEEGRNESSNDMDCLTSVLRITGVTEKD LSLEYDCLALNLHGMIRHTIRLRRKQPIDHR
SEQ ID NO:7 (人 IL1RAcP 细 胞外结构域)	SERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNY TAHSAGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDV LWFRPTLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFPLEVVQKDSC FNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVKPTITW YMGCKYKIQNFNNVIPEGMNLSFLIALISNNGNVTCVV TYPENGRTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHV VYEKEPGEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDD ITIDVTINESISHSRTEDETRTQILSIKKVTSEDLKRSYV CHARSAKGEVAKAAKVQKQVPAPRYTVE
SEQ ID NO:8 (小鼠 IL1RAcP 细胞外结构域)	SERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKYN STAHSAGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDV LWFRPTLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFPLEVVQKDSC FNSAMRFPVHKMYIEHGIHKITCPNVDGYFPSSVKPSVT WYKGCTEIVDFHNVLPEGMNLSFFIPLVSNNGNVTCVV TYPENGRLFHLTRTVTVKVVGSPKDALPPQIYSPNDRV VYEKEPGEELVIPCKVYFSFIMDSHNEVWWTIDGKKPDD VTVDITINESVSYSSTEDETRTQILSIKKVTPEDLRRNYV CHARNTKGEAEQAAKVQKQVIPPRYTVE
SEQ ID NO:9	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC

[0123]

标识符	序列
(人 IgG1 Fc)	VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:10 (小鼠 IgG2a Fc)	EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLS PIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFWVNNVEVHTAQTQTHRE DYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIE RTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDF MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKL RVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO:11 (食蟹猕猴 IL-33-6His)	SITGISPITESLASLSTYNDQSITFALEDESYEIYVEDLKKD KKKDKVLLSYYESQHPSSSESGDGDGKMLMVTLSPTKD FWLQANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVLHNRSFNCVS FECKTDPGVFIGVKDNHLALIKVDYSENLGSENILFKLSE ILEHHHHHH
SEQ ID NO:13 (hST2-hIL1RA cP-hFc)	KFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYSQTNKS IPTQERNRVFASGQLLKFLPAAVADSGIYTCIVRSPTFNRT GYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSEKNSKIYCPTI DLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTE DAGDYTCKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPV IGAPAQNEIKEVEIGKNANLTCSACFGKGTQFLAAVLWQ LNGTKITDFGEPRIQQEEGQNQSFSNGLACLDMLRIAD VKEEDLLLQYDCLALNLHGLRRHTVRLSRKNPIDHHSSE RCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNYSTA HSAGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDV LW FRPTLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFFLEVQKDSFCN SPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVKPTITWYM GCYKIQNFNNVIPEGMNLSFLIALISNNGNYTCVVTPEN GRTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVEKEP GEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTI NESISHSRTEDETRTQILSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAK GEVAKAAKVQKQVPAPRYTVEDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

[0124] 根据这个实施例所产生的示例性IL-33拮抗剂的某些生物性质详述在下文阐述的实施例中。

[0125] 实施例2. 如通过表面等离子体共振测定的IL-33拮抗剂与人、小鼠和猴IL-33的结合

[0126] 针对人IL-33 (R&D Systems, #3625-IL-010/CF)、小鼠IL-33 (R&D Systems, #3626-ML-010/CF) 和表达为具有与纯化IL-33 Trap蛋白和ST2受体蛋白结合的C-端六组氨酸标签的猴IL-33 (MfIL-33-6His; SEQ ID NO:12) 的平衡解离常数 (K_D 值) 是使用实时表面等离子体共振生物传感器、使用Biacore T-200仪器在25℃和/或37℃下来测定。Biacore传感器表

面首先通过与多克隆兔抗小鼠抗体 (GE, #BR-1008-38) 偶联或与单克隆小鼠抗人Fc抗体 (GE, #BR-1008-39) 偶联的胺衍生化, 以分别俘获具有C-端小鼠IgG2a Fc标签或C-端人IgG1 Fc标签的IL-33 Trap蛋白和受体蛋白。动力学实验在0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA和0.005% v/v表面活性剂Tween-20 (HBST电泳缓冲液) 中进行。将在HBST电泳缓冲液 (对于Trap蛋白来说, 在60nM至27.4pM范围内, 3倍稀释; 并且对于ST2受体蛋白来说, 在60nM至0.25nM范围内, 3倍稀释) 中制备的不同浓度的人IL-33、小鼠IL-33或MfIL-33-6His以50μL/分钟的流动速率注射于俘获了IL-33 Trap蛋白和受体蛋白的表面上。对于Trap蛋白来说, 将不同IL-33蛋白质与不同俘获表面的缔合监测7分钟, 或对于ST2受体蛋白来说监测4分钟, 并且对于Trap蛋白来说, 将它们在HBST电泳缓冲液中的解离监测14分钟, 或对于ST2受体蛋白来说监测8分钟。动力学缔合 (k_a) 和解离 (k_d) 速率常数是通过使用Scrubber 2.0c曲线拟合软件将实时结合传感图与1:1结合模型拟合来测定。结合解离平衡常数 (K_D) 和解离半衰期 ($t_{1/2}$) 由动力学速率常数如下计算:

[0127] $K_D (M) = k_d / k_a$ 并且 $t_{1/2} (min) = \ln(2) / (60 * k_d)$

[0128] 在25℃和37℃下IL-33 Trap蛋白与人、猴和小鼠IL-33结合的动力学参数在表2至7中示出, 而在25℃下ST2受体蛋白与人和小鼠IL-33结合的结合动力学在表2和6示出。如表2示出, 在25℃下, IL-33 Trap蛋白和受体蛋白以范围从大致0.53pM至54pM的 K_D 值结合人IL-33。如表3示出, 在37℃下, IL-33 Trap蛋白以范围从大致0.569pM至353pM的 K_D 值结合人IL-33。如表4示出, 在25℃下, IL-33 Trap蛋白以范围从大致0.596pM至53.5pM的 K_D 值结合MfIL-33-6HIs。如表5示出, 在37℃下, IL-33 Trap蛋白以范围从大致0.551pM至190pM的 K_D 值结合MfIL-33-6HIs。如表6示出, 在25℃下, IL-33 Trap和受体蛋白以范围从大致6.1pM至102pM的 K_D 值结合小鼠IL-33。如表7示出, 在37℃下, IL-33 Trap蛋白以范围从大致2.78pM至93.3pM的 K_D 值结合小鼠IL-33。

[0129] 表2: 在25℃下, 人IL-33与人IL-33 Trap、小鼠IL-33 Trap和人ST2受体蛋白结合的结合动力学参数。

[0130]	所俘获的分析物	所俘获的分析物的量(RU)	所结合的60 nM 人IL-33(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
	hST2-hIL1R AcP-hFc	276 ± 0.7	19	1.89E +07	1.00E-0 5*	5.30E-13 *	1155*
	hST2-hIL1R AcP-mFc	256 ± 2.9	28	1.92E +07	6.32E-0 5	3.29E-12	183
	mST2-mIL1 RAcP-mFc	233 ± 3.0	22	1.82E +07	1.29E-0 3	7.09E-11	9
	hST2-hFc	230 ± 7.7	25	5.90E +06	3.20E-0 4	5.40E-11	36
	hST2-mFc	255 ± 6.6	24	5.72E +06	3.07E-0 4	5.36E-11	38

[0131] *在实验条件下, 未观察到IL-33从所俘获的单克隆抗体的解离; 因此, k_d 的值固定于1.00E-05, 并且所衍生的 $t_{1/2}$ 和 K_D 值分别表示下限和上限。

[0132] 表3: 在37℃下, 人IL-33与人和小鼠IL-33 Trap结合的结合动力学参数。

	所俘获的分析物	所俘获的分析物的量(RU)	所结合的60 nM 人IL-33(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
[0133]	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
[0134]	mST2-mIL1RAcP-mFc	222 ± 5.2	20	9.11E+06	3.22E-03	3.53E-10	4

[0135] *在实验条件下,未观察到IL-33从所俘获的单克隆抗体的解离;因此, k_d 的值固定于1.00E-05,并且衍生 $t_{1/2}$ 和 K_D 值分别表示下限和上限。

[0136] 表4:在25℃下,猴IL-33与人和小鼠IL-33 Trap结合的结合动力学参数。

	所俘获的分析物	所俘获的分析物的量(RU)	所结合的60 nM 猴IL-33(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
[0137]	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

[0138] *在实验条件下,未观察到IL-33从所俘获的单克隆抗体的解离;因此, k_d 的值固定于1.00E-05,并且衍生 $t_{1/2}$ 和 K_D 值分别表示下限和上限。

[0139] 表5:在37℃下,猴IL-33与人和小鼠IL-33 Trap结合的结合动力学参数。

	所俘获的分析物	所俘获的分析物的量(RU)	所结合的60 nM 猴IL-33(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
[0140]	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

[0141] *在实验条件下,未观察到IL-33从所俘获的单克隆抗体的解离;因此, k_d 的值固定于1.00E-05,并且衍生 $t_{1/2}$ 和 K_D 值分别表示下限和上限。

[0142] 表6:在25℃下,小鼠IL-33与人IL-33 Trap、小鼠IL-33 Trap和人ST2受体蛋白结合的结合动力学参数。

[0143]	所俘获的分析物	所俘获的分析物的量(RU)	所结合的60 nM 小鼠IL-33(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

[0144] 表7:在37℃下,小鼠IL-33与人和小鼠IL-33 Trap结合的结合动力学参数。

[0145]	所俘获的分析物	所俘获的分析物的量(RU)	所结合的60nM 小鼠IL-33(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

[0146] *在实验条件下,未观察到IL-33从所俘获的单克隆抗体的解离;因此, k_d 的值固定于1.00E-05,并且衍生 $t_{1/2}$ 和 K_D 值分别表示下限和上限。

[0147] 实施例3. IL-33拮抗剂阻断IL-33与人ST2受体结合

[0148] 本发明的示例性IL-33拮抗剂阻断人IL-33 (hIL-33) 与人ST2受体结合的能力是使用竞争夹心ELISA来测量。将表达为具有C-端小鼠Fc标签的人ST2蛋白ecto结构域 (SEQ ID NO:2) 的一部分,在4℃下,以在PBS缓冲液中1μg/mL浓度涂覆于96-孔微量滴定盘上过夜。随后使用PBS中的0.5% (w/v) BSA溶液阻断非特异性结合位点。添加生物素化hIL-33蛋白 (R&D systems, #3625-IL/CF) (biot-hIL-33) 以实现20pM的恒定最终浓度直至范围为从0至100nM的IL-33拮抗剂的连续稀释液。将混合物在室温下 (RT) 孵育1小时,然后将其转移至涂覆hST2-hFc的微量滴定盘。在RT下孵育1小时之后,然后清洗孔槽,并且以缀合HRP的链霉亲和素 (Thermo Scientific, #N200) 来检测盘-结合biot-hIL-33。将所有的样品使用TMB溶液 (BD biosciences, #51-2607KC) 显影,以产生比色反应并然后通过用1M硫酸酸化来淬灭,然后在Victor X5盘式读数器 (PerkinElmer) 上测量450nm处的吸收度。使用Prism™软件内的s型剂量反应模型来进行数据分析。定义为阻断50%biot-hIL-33与hST2-mFc结合所需要的

拮抗剂分子浓度的所计算IC₅₀值被用作阻断效力的指标。最大阻断值表示相对于基线的拮抗剂阻断IL-33结合的能力。在剂量曲线上在恒定量的hIL-33下测量的吸收度定义为0%阻断,而没有添加IL-33的吸收度定义为100%阻断。使用含有对每种拮抗剂所测试的最高浓度的孔槽的吸收值测定最大阻断百分比。

[0149] 表8:通过IL-33拮抗剂的生物素-hIL-33与hST2-hFc的ELISA阻断

[0150]	IL-33 拮抗剂	阻断 hST2-hFc 上的 20pM 生物素-hIL-33 IC ₅₀ (M)	最大阻断%
	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

[0151] 所测试的四种IL-33拮抗剂以范围从112pM至6.34pM的IC₅₀值阻断生物素-hIL-33与hST2-mFc结合,最大阻断百分比范围为从97%至100%,如表8所示。

[0152] 实施例4.通过IL-33拮抗剂对IL-33-介导的受体信号传递的抑制

[0153] 白介素-33 (IL-33) 为ST2的配体,一种与辅助蛋白IL-1RAcP相关联的tol1样/白介素-1受体超家族成员(就回顾文献,参见Kakkar和Lee, (2008), Nat Rev Drug Discovery, 10月;7 (10):827-840)。当ST2/IL-1RAcP被IL-33激活时,通过下游分子例如MyD88(髓样分化因子88)和TRAF6 (TNF受体相关因子6) 触发信号传递级联,从而尤其导致NFκB(核因子-κB)的激活。为了发展测试IL-33拮抗剂的生物学相关生物测定系统,将人胚胎肾细胞(HEK293)稳定地转染以表达人ST2(登录号NP_057316的1-556氨基酸)以及荧光素酶受体[NFκB反应元件(5x)-荧光素酶-IRES-GFP] (HEK293/hST2/NFκB-荧光素酶细胞系)。HEK293细胞系内源性表达IL-1RAcP,并且在HEK293中通过IL-33激活NFκB已在先前证实(Schmitz等人, (2005), Immunity 23:479-490)。将稳定的细胞系分离并维持在10%FBS、DMEM、NEAA、青霉素/链霉素和G418中。

[0154] 就生物测定来说,将HEK293/hST2/NFκB-荧光素酶细胞以每孔10,000个细胞、以溶于含0.1%FBS和OPTIMEM的低血清培养基(Invitrogen, #31985-070)接种在96-孔测定盘上,并且然后在37℃及5%CO₂中孵育过夜。次日,为测定IL-33的剂量反应,将人IL-33 (hIL-33; R&D Systems, #3625-IL)、表达为具有C-端六组氨酸标签的食蟹猴IL-33 (MfIL-33-6His; SEQ ID:11) 或小鼠IL33 (mIL-33; R&D Systems, #3626-IL) 以1:3 (hIL33:15nM-0.3pM或10nM-0.2pM, mfIL33:1.5nM-0.03pM或1nM-0.05pM, mIL33:15nM-0.3pM或10nM-0.2pM) 连续稀释,并且加入细胞中。将含有稀释缓冲液但不含IL-33的对照组加入细胞的一个样品中。为测量抑制,将IL-33 Trap和可溶性受体蛋白连续稀释并加入细胞中,并且接着加入恒定浓度的IL-33 (针对hIL-33测定为5pM或20pM, 针对MfIL-33-6His测定为5pM或3pM, 并且针对mIL-33测定为30pM)。在加入细胞之前将可溶性受体和Trap进行1:3连续稀释,并且以约15nM、150nM、100nM或200nM开始且范围变化降至约0.3pM、3pM或2pM, 另外将不含Trap和可溶性受体蛋白对照的对照样品加入细胞中。也将人Fc蛋白(对照蛋白)以1:3连续稀释,范围从798nM变化至0.01nM或100nM变化至0.002nM,并且以与Trap和受体蛋白相同的方式,用hIL-33、MfIL-33-6His和mIL-33进行测试。在37℃下、5%CO₂中孵育5.5小时之后,使用Victor X (Perkin Elmer) 盘式读数器测量荧光素酶活性,并且使用非线性回归(4-参数逻辑

辑)以Prism 5软件分析结果。结果在表9示出。

[0155] 表9:通过IL-33 Trap蛋白和可溶性人ST2受体对HEK293/hST2/NFkB-荧光素酶细胞的人IL-33、猴IL-33和小鼠IL-33激活的抑制

[0156]

IL-33	人	猴	小鼠	人	猴	小鼠
EC ₅₀ (M)	1.9E-12	1.7E-12	1.0E-11	2.5E-11	1.3E-12	8.8E-11
恒定 IL33	5pM	5pM	30pM	20pM	3pM	30pM
描述	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)
mST2-mIL1RAcP-mFc	4.8E-10	6.4E-11	8.7E-12	未测试	未测试	未测试
hST2-hIL1RAcP-mFc	1.3E-12	1.3E-12	1.3E-11	1.3E-11	4.7E-11	1.9E-10
hST2-hIL1RAcP-hFc	未测试	未测试	未测试	3.0E-11	1.0E-10	3.7E-10
hST2-mFc	1.2E-11	5.5E-12	1.4E-10	未测试	未测试	未测试
hST2-hFc	1.0E-11	4.6E-12	1.1E-10	未测试	未测试	未测试
对照蛋白	NB	NB	NB	NB	NB	NB

[0157] NB=非阻断剂

[0158] 如表9所示,所有5个受测试IL-33拮抗剂在这个以细胞为基础的测定中有效地阻断 (IC₅₀<1nM) 人、食蟹猴和小鼠IL-33的刺激。

[0159] 实施例5. IL-33拮抗剂抑制IL-33-介导的嗜碱性粒细胞激活

[0160] 为进一步评估IL-33拮抗剂hST2-hIL1RAcP-mFc和hST2-hIL1RAcP-hFc的体外特性,测量它们阻断IL-33诱发的嗜碱性粒细胞激活的能力。

[0161] 从来自四个不同人类捐赠者的新鲜全血,通过密度梯度离心纯化周边血液单核细胞(PBMC)。将K2 EDTA全血以1:1在RPMI 1640中稀释,小心地在Ficoll-Paque (GE Healthcare,#17-1440-03) 上分层并离心以分离PBMC。将含PBMC的界面层吸出,转移到新的试管,并以MACS缓冲液清洗两次,其中所述MACS缓冲液由溶于MACS冲洗液 (Miltenyi Biotec,#130-091-222) 的1:20稀释度的MACS BSA溶液 (Miltenyi Biotec,#130-091-376) 所组成。然后将纯化的PBMC以溶于MACS缓冲液的约 3.0×10^6 个细胞/mL的最终浓度涂覆于(每个孔槽100μL) v形底聚丙烯96-孔盘中。为引出包含在PBMC群体中的嗜碱性粒细胞,将1ng的IL-3 (Sigma,#H7166-10UG) 溶于50μL无Ca⁺⁺或Mg⁺⁺ (DPBS) 的Dulbecco's磷酸缓冲盐水中溶液加到细胞悬浮液中,并且然后在37℃下培养10分钟。制造人IL-33拮抗剂(hST2-hIL1RAcP-mFc或hST2-hIL1RAcP-hFc) 或无关对照蛋白的连续稀释液(针对捐赠者655675和655676为1:3,并且针对捐赠者655685、655686、698846和698847为1:4),针对捐赠者655675和655676范围从10nM变化至4.6pM,并且针对捐赠者655685、655686、698846和698847范围从5nM变化至0.3pM。另外,包括不含IL-33拮抗剂或无关对照蛋白的对照组。将溶液与固定浓度的100pM(最终浓度)的人IL-33 (R&D Systems,#6325-IL/CF) 或无IL-33阴性对照组混合,之后加入PBMC中。所有样品进行两次平行测试。

[0162] 将人IL-33和人IL-33拮抗剂加入细胞后,将它们在37℃下孵育20分钟,以促进嗜

碱性粒细胞激活。然后通过将测定盘在湿冰上冷却5分钟来停止激活作用。为了使嗜碱性粒细胞群体的分析能用于测量激活,将20 μ L(按照制造商说明)抗-HLA-DR-FITC(Beckman Coulter,#IM0463U)、抗-CD123-APC(BD,#560087)和抗-CD203c-PE(Beckman Coulter,#IM3575)中的每一种加入各样品中,并在4℃下将样品在黑暗中放置20分钟。然后将细胞离心,以DPBS清洗,并且然后在4℃下悬浮于2%甲醛(固定缓冲液)中。次日,在BD FACSCanto II上分析固定的细胞,用以测定嗜碱性粒细胞激活的量。根据以下流式细胞术参数鉴定嗜碱性粒细胞:淋巴细胞门/CD123⁺/HLA-DR2⁻。嗜碱性粒细胞激活被定义为细胞表面表达标志物的增加,所述标志物即为受刺激嗜碱性粒细胞上的CD203c。激活被定义为CD203c阳性嗜碱性粒细胞的出现频率(%)。结果概述于表10和11中(“NB”=未阻断;“ND”=在单项试验中未测定)。数据以对每一个捐赠者进行3次生物学平行测试的平均值示出。

[0163] 表10.通过人IL-33激发诱发的人嗜碱性粒细胞的激活百分比

捐赠者	100pM IL-33		无 IL-33	
	平均值	SD	平均值	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

[0165] 表11.通过IL-33拮抗剂阻断IL-33诱发的人嗜碱性粒细胞的激活

	捐赠者 655675	捐赠者 655676	捐赠者 655685	捐赠者 655686	捐赠者 698846	捐赠者 698847
拮抗剂	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	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-h	ND	ND	ND	ND	1.97E-11	9.79E-12

Fc						
无关对照蛋白	NB	NB	NB	NB	NB	NB

[0168] 如表10所示,在100pM下,人IL-33在六个不同捐赠者中诱导嗜碱性粒细胞激活,平均激活百分比范围为从22.1%至52.60%。

[0169] 如表11所示,IL-33拮抗剂hST2-hIL1RAcP-mFc阻断通过100pM人IL-33激发来诱导的嗜碱性粒细胞激活,对于捐赠者655675来说,IC₅₀值为19pM;对于捐赠者655676来说,IC₅₀值为15.1pM;对于捐赠者655685来说,IC₅₀值为23pM;对于捐赠者655686来说,IC₅₀值为20.9pM;对于捐赠者698846来说,IC₅₀值为36pM;并且对于捐赠者698847来说,IC₅₀值为11.1pM。IL-33拮抗剂hST2-hIL1RAcP-hFc阻断通过100pM人IL-33激发来诱导的嗜碱性粒细胞激活,对于捐赠者698846来说,IC₅₀值为19.7pM,并且对于捐赠者698847来说,IC₅₀值为

9.79pM。不相关对照蛋白不阻断来自任何受测试捐赠者的嗜碱性粒细胞激活。

[0170] 实施例6. IL-33拮抗剂抑制IL-33介导的细胞激活

[0171] 为进一步测试人IL-33拮抗剂hST2-hIL1RAcP-mFc和hST2-hIL1RAcP-hFc的阻断性质,使用利用周边血液单核细胞(PBMC)的以原代细胞为基础的测定(参见,例如,Smithgall等人,International Immunology,2008,第20(8)卷,第1019-1030页)。

[0172] 从来自六个不同捐赠者的新鲜人全血,以密度梯度离心纯化PBMC。简单来说,将K2 EDTA全血在RPMI 1640中稀释2倍,小心地于Ficoll-Paque (GE Healthcare, #17-1440-03) 上分层并离心20分钟。将含PBMC的界面层吸出,转移到新的试管,并以PBS缓冲液清洗两次。将分离的PBMC以溶于添加10%FBS、2mM L-谷酰氨酸、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素的RPMI 1640中的最终浓度 5×10^5 个细胞/mL涂覆于(每个孔槽200μL)圆底96-孔盘中。然后将细胞用单独10nM至0.64pM的50ng/mL人IL-12(hIL-12;R&D Systems, #219-IL-025/CF)和人IL-33的连续稀释液(hIL-33;R&D Systems, #3625-IL-010/CF),或以与20nM至0.43pM的人IL-33拮抗剂或含无关mIgG的对照蛋白的连续稀释液组合的260pM的hIL-33孵育。每孔最终体积为200μL。各样品以重复进行三次平行测试。当有人IL-33拮抗剂或含无关mIgG的对照蛋白存在时,首先以hIL-33预孵育30分钟,并且然后将其加入细胞中。

[0173] 在37℃下将细胞在湿化孵育器中以5%CO₂孵育过夜,并且然后以ELISA(R&D Systems, #DY285)测量孵育上清液中IFN γ 量。就ELISA来说,根据制造商的说明将96-孔平底盘涂覆俘获抗体。清洗并阻断后,将100μL未稀释培养物上清液加入盘中并孵育2小时。按照制造商的说明进行后续的清洗和检测。结果概述于表12和13中(“NB”=未阻断;“ND”=未测定)。

[0174] 表12:IL-33诱发的IFN γ 从来自四个捐赠者的人PBMC的释放。

[IL-33]	捐赠者 69884 3	捐赠者 69884 2	捐赠者 65568 4	捐赠者 63496 6	捐赠者 65568 1	捐赠者 65568 2	捐赠者 72705 4	捐赠者 72705 5
EC ₅₀ (M)	ND	ND	2.11E-10	3.15E-10	2.04E-10	3.04E-10	ND	ND

[0176] 表13:通过IL-33拮抗剂阻断IL-33诱发的IFN- γ 从人PBMC的释放

	捐赠者 69884 3	捐赠者 69884 2	捐赠者 65568 4	捐赠者 63496 6	捐赠者 65568 1	捐赠者 65568 2	捐赠者 72705 4	捐赠者 72705 5
拮抗剂	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	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
含无关	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB

[0178]

mIgG 的 对照蛋白								
----------------	--	--	--	--	--	--	--	--

[0179] 如在这个实施例中所示,在hIL-12存在下,人IL-33诱导IFN γ 从受测试的四个不同捐赠者的人总PBMC的释放,并且EC₅₀值在204pM至315pM之间,如表12所示。人IL-33拮抗剂hST2-hIL1RacP-mFc阻断通过260pM IL-33诱导的IFN γ 从人PBMC的释放,并且IC₅₀值范围为从2.13pM至334pM,如表13所示。不相关的含有mIgG的对照蛋白在受测试的任何捐赠者中不显现IFN γ 释放的任何可测量阻断。

[0180] 实施例7.mST2-mIL1RacP-mFc在炎性关节疼痛模型中的功效

[0181] 为确定mST2-mIL1RacP-mFc在相关体内模型中的作用,在从杰克逊实验室(The Jackson Laboratory) (Bar Harbor, ME) 获得的12周龄雄性C57BL/6小鼠中进行单侧炎性关节疼痛模型。在实验第0天,向单独的小鼠小组皮下施用50mg/kg的mST2-mIL1RacP-mFc (n=15-16) 或50mg/kg的同种型对照抗体 (n=15-16)。在初始治疗给药之后二十四小时,一半小鼠接受完全弗氏佐剂 (IA-CFA; Sigma, #F5881) (n=7-8) 的30 μ L关节内和50 μ L关节周注射,并且另一半小鼠在相同位置接受对照盐水注射 (n=7-8)。关节炎引发之后并会持续后续四周的一周,在动态承重测定 (BioSeb, Vitrolles, FR) 中测试之前24小时,所有小鼠接受50mg/kg的mST2-mIL1RacP-mFc或50mg/kg的同种型对照抗体的皮下增强注射。记录所有小鼠的患病肢体上负荷的重量百分比和患病肢体上耗费的时间百分比。这个实验的结果在表14和表15中示出 (所有数据表示为群组平均值 \pm SEM), 所述结果被表达为全身重量的平均百分比或在5分钟试验期内患病肢体耗费的时间平均百分比。接受IA-CFA的小鼠小组都显示患病肢体的显著更小 ($p < 0.05$, 根据ANOVA) 承重。与IA-CFA施用之后同种型对照治疗的小鼠相比, IA-CFA施用之后接受mST2-mIL1RacP-mFc的小鼠显现在所有测试时间点较高的承重百分比和较高的患病肢体耗费时间评分, 如表14和15所示。

[0182] 第四周之后,将所有动物安乐死并且将患病关节切开、石蜡包埋、切片并且用苏木精和曙红染色以进行组织学分析。将切片数字化并且遵循类似于在Choe等人 (Choe, JY等人, (2003), J. Exp. Med. 2月17日; 197 (4): 537-542) 中概述的方法, 使用从0-5分级 (0=正常, 1=最小, 2=轻度, 3=中度, 4=明显, 5=严重) 的炎性活动 (包括关节破坏、滑膜增厚、骨骼侵蚀和免疫细胞浸润) 的主观评定量表进行盲法评分。如表16所示, 与IA-CFA施用之后同种型对照治疗的小鼠相比, IA-CFA施用之后用mST2-mIL1RacP-mFc治疗的小鼠显现更“适度”并且不太“严重”的膝关节。因此, 这个实施例表明本发明的IL-33拮抗剂适用于减轻炎性关节疼痛。

[0183] 表14: 患病肢体上负荷的体重百分比

治疗	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
盐水对照 + 同种型对照	43.1 \pm 1.6	42.2 \pm 1.0	41.1 \pm 1.7	41.1 \pm 0.9
盐水对照 + mST2-mIL1RacP-mFc	41.5 \pm 1.9	43.3 \pm 0.6	42.2 \pm 1.2	38.7 \pm 1.4
IA-CFA + 同种型对照	24.9 \pm 1.4	24.2 \pm 1.5	23.8 \pm 1.0	23.6 \pm 2.0
IA-CFA + mST2-mIL1RacP-mFc	30.1 \pm 2.1	24.4 \pm 1.0	28.3 \pm 2.6	29.8 \pm 2.9

[0185] 表15: 患病肢体耗费的时间百分比

[0186]	治疗	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
	盐水对照 + 同种型对照	96.6 ± 1.0	96.6 ± 0.6	96.2 ± 0.9	96.4 ± 0.6
	盐水对照 + mST2-mIL1RacP-mFc	95.5 ± 0.8	97.2 ± 0.3	94.3 ± 1.7	97.0 ± 0.5
	IA-CFA + 同种型对照	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

[0187] 表16: 患病膝关节的组织学严重性评分 (动物%)

[0188]	治疗	最小	轻度	中度	严重
	IA-CFA + 同种型对照	0	0	12%	88%
	IA-CFA + mST2-mIL1RacP-mFc	0	0	38%	62%

[0189] 本发明在范围上不受本文描述的特定实施方案限制。实际上, 根据先前描述和附图, 除了本文所描述的那些改进以外, 本发明的各种改进对本领域技术人员来说是显而易见的。这样的改进意图落在附加权利要求书的范围之内。

序列表

<110> 瑞泽恩制药公司(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)

<120> IL-33 拮抗剂和其用途

<130> 1950-W0

<150> 61/787, 121

<151> 2013-03-15

<150> 61/819, 029

<151> 2013-05-03

<150> 61/913, 417

<151> 2013-12-09

<160> 13

<170> 用于 Windows 的 FastSEQ 4.0 版

<210> 1

<211> 537

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<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

[0001]

[0002]

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 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> 人工序列			
<220>			

<223> 合成
 <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 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 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

[0003]

[0004]

```

Pro Ile Val Thr Cys Val 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> 人工序列
<220>
<223> 合成
<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

```

[0005]

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 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			

[0006]

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
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
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
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
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
	Thr Pro Gly Lys		880
	<210> 4		
	<211> 880		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成		
	<400> 4		
	Ser Lys Ser Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val Arg Cys		
	1	5	10
	Pro Gln Arg Gly Arg Ser Thr Tyr Pro Val Glu Trp Tyr Tyr Ser Asp		15
		20	25
	Thr Asn Glu Ser Ile Pro Thr Gln Lys Arg Asn Arg Ile Phe Val Ser		30
	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		80
		85	90
	Leu Met Tyr Ser Thr Val Arg Gly Ser Asp Lys Asn Phe Lys Ile Thr		95
	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
	Cys Gln Phe Thr His Ala Glu Asn Gly Thr Asn Tyr Ile Val Thr Ala		160
	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
	Gly Glu Ala Arg Ile Gln Glu 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

[0007]

[0008]

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	320
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	400
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	480
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

[0009]

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> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <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

[0010]

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 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> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<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	

[0011]

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 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> 人工序列
<220>
<223> 合成
<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

[0012]

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> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 8

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

[0013]

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> 人工序列

[0014]

<220>
 <223> 合成
 <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> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <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

[0015]

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
 100 105 110
 Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser
 115 120 125
 Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met
 130 135 140
 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
 165 170 175
 Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met
 180 185 190
 Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser
 195 200 205
 Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr
 210 215 220
 Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 11
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <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 His

165

<210> 12

<211> 167

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<220>

<223> aa 1-159: 食蟹猕猴 IL-33 (登录号 EHH57404.1 的 S112-E269, 其中在 E269 后带有额外 I 的)

<220>

<223> aa 160-161: 接头

<220>

<223> aa 162-167: 六组氨酸标签

<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 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 His

165

<210> 13

<211> 876

<212> PRT

[0016]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<220>

<223> aa 1-310: 人 ST2 (登录号 NP_057316.3
的 K19-S328)

<220>

<223> aa 311-649: 人 IL1RacP (登录号 Q9NPH3
的 S21-E359)

<220>

<223> aa 650-876: hFc 标签 (登录号 P01857
的 D104-K330)

<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
225 230 235 240
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

[0017]

[0018]

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
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
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
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
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
[0019] 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	

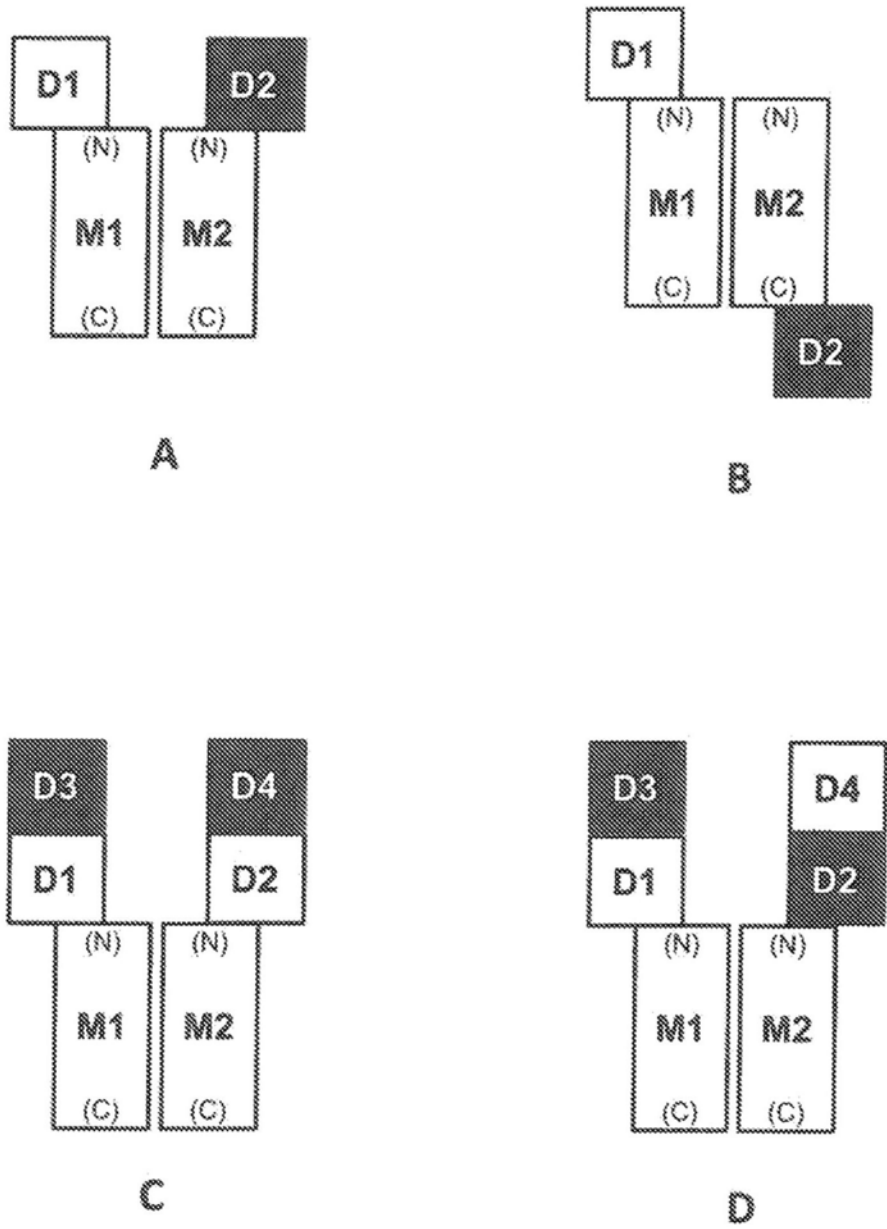


图1