



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114641494 A

(43) 申请公布日 2022.06.17

(21) 申请号 202080076198.5

(22) 申请日 2020.11.03

(30) 优先权数据

62/930179 2019.11.04 US

63/068601 2020.08.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.04.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/080837 2020.11.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/089559 EN 2021.05.14

(71) 申请人 免疫医疗有限公司

地址 英国剑桥郡

(72) 发明人 D·J·贝克 C·P·莫雷诺 奎恩

K·J·乌拉德 A·赛斯

E·李亚特 梅林 B·穆西亚尔

E·S·科亨 S·斯特里克森

K·豪斯莱

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 李波 李唐

(51) Int.Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书4页 说明书45页

序列表30页 附图31页

(54) 发明名称

抗-33治疗剂FPR治疗肾脏障碍

(57) 摘要

本披露涉及治疗肾脏损伤的方法,该方法通过施用抑制ST2信号传导和RAGE信号传导两者的抗IL-33治疗剂来实现。

1. 一种用于在治疗受试者的肾脏损伤的方法中使用的抗IL-33治疗剂,其中将该抗IL-33治疗剂施用于受试者,以减弱或抑制IL-33介导的ST2信号传导和IL-33介导的RAGE信号传导。

2. 用于根据权利要求1所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该IL-33介导的RAGE信号传导是IL-33介导的RAGE-EGFR信号传导。

3. 用于根据权利要求1所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗IL-33治疗剂减弱或抑制还原型IL-33蛋白(redIL-33)的活性,并且由此抑制ST2信号传导。

4. 用于根据权利要求1至3中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗IL-33治疗剂减弱或抑制氧化型IL-33蛋白(oxIL-33)的活性,并且由此抑制RAGE信号传导。

5. 用于根据权利要求1至4中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该肾脏损伤包括炎症。

6. 用于根据权利要求5所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该肾脏损伤是炎性肾脏损伤。

7. 用于根据权利要求5或6所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该肾脏损伤选自糖尿病性肾病、纤维化、肾小球肾炎(例如非增生性(例如轻微病变性肾小球肾炎、膜型肾小球肾炎、局灶性节段性肾小球硬化)或增生性(例如IgA肾病、膜性增生性肾小球肾炎、感染后肾小球肾炎、和急进性肾小球肾炎[例如肺出血肾炎综合征和血管炎性障碍{其包括韦格纳肉芽肿病和显微镜下多血管炎}])、系统性红斑狼疮、蛋白尿、单侧输尿管梗阻、奥尔波特综合征、多囊肾病(PCKD)、高血压性肾小球硬化症、慢性肾小球硬化症、慢性梗阻性尿路病、慢性肾小管-间质肾炎和缺血性肾病。

8. 用于根据权利要求1至7中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该肾脏损伤是糖尿病性肾病。

9. 用于根据权利要求1至8中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗IL-33治疗剂选自化学抑制剂以及抗体或其抗原结合片段。

10. 用于根据权利要求9所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该治疗剂包含抗体或其抗原结合片段。

11. 用于根据权利要求9或10所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合IL-33。

12. 用于根据权利要求11所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗体或抗原结合片段具有选自表1的可变重结构域(VH)和可变轻结构域(VL)配对的互补决定区(CDR)。

13. 用于根据权利要求11或12所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合redIL-33,并且减弱或抑制redIL-33的活性,由此抑制ST2信号传导。

14. 用于根据权利要求11至13中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗体或其抗原结合片段阻止氧化型IL-33结合RAGE,由此抑制RAGE-EGFR信号传导。

15. 用于根据权利要求11至14中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗体或其抗原结合片段以小于或等于100pM、或小于或等于10pM,例如小于或等于1pM,例如0.5pM,尤其是0.05pM的结合亲和力(例如当使用KinExA进行测量时)结合redIL-33。

16. 用于根据权利要求11至15中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗体或其抗原结合片段以大于或等于 $10^5\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5\times 10^5\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、或 $5\times 10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 或 $10^7\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、尤其是大于或等于 $10^7\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 的k(on)结合redIL-33。

17. 用于根据权利要求11至16中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗体或其抗原结合片段以小于或等于 $5 \times 10^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-1}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-2}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或 10^{-3}sec^{-1} 、尤其是小于或等于 10^{-3}sec^{-1} 的k(off)结合redIL-33。

18. 用于根据权利要求11至17中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗体或抗原结合片段减弱或抑制oxIL-33的活性,并且由此抑制RAGE信号传导。

19. 用于根据权利要求10至18中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:37的序列的VHCDR1、具有SEQ ID NO:38的序列的VHCDR2、具有SEQ ID NO:39的序列的VHCDR3、具有SEQ ID NO:40的序列的VLCDR1、具有SEQ ID NO:41的序列的VLCDR2、以及具有SEQ ID NO:42的序列的VLCDR3。

20. 用于根据权利要求10至19中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗体或者所述抗体或其抗原结合片段的抗原结合VH和VL分别包含与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:19具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

21. 用于根据权利要求20所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:1的序列的VH和具有SEQ ID NO:19的序列的VL。

22. 用于根据权利要求10至21中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗体或其抗原结合片段是人类抗体、嵌合抗体、和人源化抗体。

23. 用于根据权利要求10至22中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗体或该抗体或其抗原结合片段是天然存在的抗体、scFv片段、Fab片段、F(ab')₂片段、微型抗体、双体抗体、三体抗体、四体抗体或单链抗体。

24. 用于根据权利要求10至23中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体。

25. 用于根据权利要求2至24中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中抑制或减弱RAGE-EGFR信号传导下调或抑制了RAGE-EGFR介导的效应。

26. 用于根据权利要求25所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该RAGE-EGFR介导的效应包括异常上皮生理学,例如异常上皮重塑。

27. 用于根据权利要求25所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该RAGE-EGFR介导的效应包括异常系膜扩张。

28. 用于根据权利要求27所述使用的抗IL-33治疗剂,其中异常系膜扩张包括异常系膜细胞增殖。

29. 用于根据权利要求1至28中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中抑制或减弱ST2信号传导下调或抑制了ST2介导的效应。

30. 用于根据权利要求29所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该ST2介导的效应是肾脏中的异常炎症。

31. 用于根据权利要求30所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该异常炎症是在内皮中。

32. 用于根据权利要求31所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该异常炎症包括增加的IL-4、IL-6、IL-8、IL-12、TNF α 和/或IL1b分泌或表达,任选地增加的IL-4、IL-6、IL-8和/或IL-12分泌或表达。

33. 用于根据权利要求31或32中任一项所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该异常炎症包括MAP激酶激活。

34. 用于根据权利要求33所述使用的抗IL-33治疗剂,其中MAP激酶激活包括p38或JNK激酶激活。

35. 用于根据权利要求30所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该异常炎症是在肾小球中。

36. 用于根据权利要求35所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该异常炎症包括增加的IL-8分泌或表达。

37. 一种治疗有需要的受试者中的肾脏损伤的方法,该方法包括向该受试者施用抗IL-33治疗剂,以减弱或抑制IL-33介导的ST2信号传导和IL-33介导的RAGE信号传导。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中该IL-33介导的RAGE信号传导是IL-33介导的RAGE-EGFR信号传导。

39. 根据权利要求37或38所述的方法,其中该抗IL-33治疗剂减弱或抑制还原型IL-33蛋白(redIL-33)的活性,并且由此抑制ST2信号传导。

40. 根据权利要求37至39所述的方法,其中该抗IL-33治疗剂减弱或抑制氧化型IL-33蛋白(oxIL-33)的活性,并且由此抑制RAGE信号传导。

41. 根据权利要求37至40中任一项所述的方法,其中该肾脏损伤包括炎症。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中该肾脏损伤是炎性肾脏损伤。

43. 根据权利要求41或42所述的方法,其中该肾脏损伤选自糖尿病性肾病、纤维化、肾小球肾炎(例如非增生性(例如轻微病变性肾小球肾炎、膜型肾小球肾炎、局灶性节段性肾小球硬化)或增生性(例如IgA肾病、膜性增生性肾小球肾炎、感染后肾小球肾炎、和急进性肾小球肾炎[例如肺出血肾炎综合征和血管炎性障碍{其包括韦格纳肉芽肿病和显微镜下多血管炎}])、系统性红斑狼疮、蛋白尿、单侧输尿管梗阻、奥尔波特综合征、多囊肾病(PCKD)、高血压性肾小球硬化症、慢性肾小球硬化症、慢性梗阻性尿路病、慢性肾小管-间质肾炎和缺血性肾病。

44. 根据权利要求37至43中任一项所述的方法,其中该肾脏损伤是糖尿病性肾病。

45. 根据权利要求37至44中任一项所述的方法,其中该抗IL-33治疗剂选自化学抑制剂以及抗体或其抗原结合片段。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中该治疗剂包含抗体或其抗原结合片段。

47. 根据权利要求45或46所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合IL-33。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段具有选自表1的可变重结构域(VH)和可变轻结构域(VL)配对的互补决定区(CDR)。

49. 根据权利要求47或48所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合redIL-33,并且减弱或抑制redIL-33的活性,由此抑制ST2信号传导。

50. 根据权利要求47至49中任一项所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段阻止氧化型IL-33结合RAGE,由此抑制RAGE-EGFR信号传导。

51. 根据权利要求47至50中任一项所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段以小于或等于100pM、或小于或等于10pM,例如小于或等于1pM,例如0.5pM,尤其是0.05pM的结合亲和力(例如当使用KinExA进行测量时)结合redIL-33。

52. 根据权利要求47至51中任一项所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段以大于或等于 $10^5\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5\times 10^5\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、或 $5\times 10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 或 $10^7\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、尤其是大于或

等于 $10^7\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 的k(on)结合redIL-33。

53. 根据权利要求47至52中任一项所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段以小于或等于 $5\times 10^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 10^{-1}sec^{-1} 、 $5\times 10^{-2}\text{sec}^{-1}$ 、 10^{-2}sec^{-1} 、 $5\times 10^{-3}\text{sec}^{-1}$ 或 10^{-3}sec^{-1} 、尤其是小于或等于 10^{-3}sec^{-1} 的k(off)结合redIL-33。

54. 根据权利要求47至53中任一项所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段减弱或抑制oxIL-33的活性,并且由此抑制RAGE信号传导。

55. 根据权利要求47至54中任一项所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:37的序列的VHCDR1、具有SEQ ID NO:38的序列的VHCDR2、具有SEQ ID NO:39的序列的VHCDR3、具有SEQ ID NO:40的序列的VLCDR1、具有SEQ ID NO:41的序列的VLCDR2、以及具有SEQ ID NO:42的序列的VLCDR3。

56. 根据权利要求47至55中任一项所述的方法,其中该抗体或者所述抗体或其抗原结合片段的抗原结合VH和VL分别包含与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:19具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:1的序列的VH和具有SEQ ID NO:19的序列的VL。

58. 根据权利要求47至57中任一项所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段是人类抗体、嵌合抗体、和人源化抗体。

59. 根据权利要求47至57中任一项所述的方法,其中该抗体或该抗体或其抗原结合片段是天然存在的抗体、scFv片段、Fab片段、F(ab')₂片段、微型抗体、双体抗体、三体抗体、四体抗体或单链抗体。

60. 根据权利要求47至59中任一项所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体。

61. 根据权利要求48至60所述的方法,其中抑制或减弱RAGE-EGFR信号传导下调或抑制了RAGE-EGFR介导的效应。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中该RAGE-EGFR介导的效应包括异常上皮生理学,例如异常上皮重塑。

63. 根据权利要求61所述的方法,其中该RAGE-EGFR介导的效应包括异常系膜扩张。

64. 根据权利要求63所述的方法,其中异常系膜扩张包括异常系膜细胞增殖。

65. 根据权利要求47至64中任一项所述的方法,其中抑制或减弱或ST2信号传导下调或抑制了ST2介导的效应。

66. 根据权利要求65所述的方法,其中该ST2介导的效应是肾脏中的异常炎症。

67. 根据权利要求66所述的方法,其中该异常炎症是在内皮中。

68. 根据权利要求67所述的方法,其中该异常炎症包括增加的IL-4、IL-6、IL-8、IL-12、TNFa和/或IL1b分泌或表达,任选地增加的IL-4、IL-6、IL-8和/或IL-12分泌或表达。

69. 根据权利要求67所述的方法,其中该异常炎症包括MAP激酶激活。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中MAP激酶激活包括p38或JNK激酶激活。

71. 根据权利要求66所述的方法,其中该异常炎症是在肾小球中。

72. 用于根据权利要求71所述使用的抗IL-33治疗剂,其中该异常炎症包括增加的IL-8分泌或表达。

抗-33治疗剂FPR治疗肾脏障碍

[0001] 本申请要求于2019年11月4日提交的美国临时专利申请号62/930,179和于2020年8月21日提交的美国临时专利申请号63/068,601的权益。这些申请的内容通过引用以其全文并入本文。

技术领域

[0002] 本披露涉及用于治疗肾脏损伤,例如糖尿病性肾病的方法。

背景技术

[0003] 慢性肾脏疾病(CKD)是世界范围内的公共健康问题(Ritz等人1999;Nwankwo等人2005),其与显著的发病率和死亡率相关(Brenner等人2001;Lewis等人2001;Go等人2004)。在美国,糖尿病占第二阶段肾脏疾病病例的发病率的约45%,其中约90%的这些病例是患有2型糖尿病的患者(USRDS 2009)。用于治疗糖尿病性肾病(DKD)的公认护理标准是使用血管紧张素转化酶抑制剂(ACEi)或血管紧张素受体阻断剂(ARB)。其他通路,例如RAGE信号传导和经由IL-33/ST2轴的信号传导已经成为疾病进展的促成因素。这些通路是由免疫系统,通过浸润性免疫细胞和促炎细胞因子、趋化因子和粘附分子介导的(Hickey 2018;Ferhat等人JASN 201829:1272-1288)。DKD的复杂病理生理学(Brenner等人2001;Lewis等人2001)意味着ACEi和ARB的血液动力学效应提供不完全保护而免于肾功能的进行性丧失。

[0004] 因此,在这一领域中,存在未满足的医学需求。

发明内容

[0005] 如实例中所示并且出于以下阐述的原因,通过ST2受体和RAGE两者抑制信号传导提供了对于肾脏损伤的有效治疗。本披露首次证明IL-33经由不同通路,在不同肾脏细胞类型中介导病理信号传导。更具体地,显示IL-33的还原形式(redIL-33)经由ST2通路在肾小球上皮细胞中引发信号传导。此外,描述了迄今未知的信号传导通路,其中显示氧化型IL-33(oxIL-33)在肾上皮细胞亚型中经由RAGE/EGFR引发信号传导。尽管oxIL-33先前未被公认是RAGE的配体,但RAGE信号传导已牵涉到肾脏疾病病理学。因此,本披露提供了用于通过抑制oxIL-33信号传导来治疗肾脏疾病的新机制。然而,治疗效果可以不限于抑制oxIL-33,因为结合并且中和IL-33也可以抑制病理性redIL-33活性。此外,本披露鉴定出,两种同种类型的IL-33对系膜细胞具有不同的潜在病理作用。显示RedIL-33在此细胞类型中引发炎症细胞因子的产生,而oxIL-33诱导系膜细胞增殖。系膜扩张是某些慢性肾脏疾病,例如糖尿病性肾病(DKD)的病理特点。这样,本披露证明了通过靶向单个细胞因子IL-33来阻断与肾脏疾病有关的多个不同病理通路的可能性,以减少或抑制肾脏中IL-33介导的炎症,减少或抑制与oxIL-33信号传导相关的异常上皮生理学,和/或减少或抑制系膜扩张。

[0006] 因此,第一方面提供了用于治疗肾脏损伤的方法,该方法包括施用抑制ST2信号传导和RAGE信号传导两者的抗IL-33治疗剂。在一些实施例中,该方法减弱或抑制还原型IL-33蛋白(redIL-33)的活性,并且由此抑制ST2信号传导。在一些实施例中,该方法减弱或抑

制氧化型IL-33蛋白(oxIL-33)的活性,并且由此抑制RAGE信号传导。

[0007] 在一些实施例中,该肾脏损伤包括炎症。在一些实施例中,该肾脏损伤是炎性的。

[0008] 在一些实施例中,该肾脏损伤选自糖尿病性肾病、纤维化、肾小球肾炎(例如非增生性(例如轻微病变性肾小球肾炎、膜型肾小球肾炎、局灶性节段性肾小球硬化)或增生性(例如IgA肾病、膜性增生性肾小球肾炎、感染后肾小球肾炎、和急进性肾小球肾炎[例如肺出血肾炎综合征(Goodpastures syndrome)和血管炎性障碍{其包括韦格纳肉芽肿病(Wegners granulomatosis)和显微镜下多血管炎}]))、系统性红斑狼疮、蛋白尿、单侧输尿管梗阻、奥尔波特综合征(Alport syndrome)、多囊肾病(PCKD)、高血压性肾小球硬化症、慢性肾小球硬化症、慢性梗阻性尿路病、慢性肾小管-间质肾炎和缺血性肾病。在一些实施例中,该肾脏损伤是糖尿病性肾病。

[0009] 在一些实施例中,该治疗剂是化学抑制剂或结合分子,例如抗体或其抗原结合片段。

[0010] 在一些实施例中,其中该治疗剂是抗体或其抗原结合片段,其特异性结合IL-33。在一些实施例中,该抗体或其抗原结合片段特异性结合redIL-33,并且减弱或抑制redIL-33的活性,由此抑制ST2信号传导。在一些实施例中,该抗体或其抗原结合片段以小于或等于100pM、或小于或等于10pM,例如小于或等于1pM,例如0.5pM,尤其是0.05pM的结合亲和力(例如当使用KinExA进行测量时)结合redIL-33。在一些实施例中,该抗体或其抗原结合片段以大于或等于 $10^3\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5\times 10^3\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $10^4\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 或 $5\times 10^4\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 的结合速率(k(on))结合redIL-33。在一些实施例中,该抗体或其抗原结合片段以小于或等于 $5\times 10^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 10^{-1}sec^{-1} 、 $5\times 10^{-2}\text{sec}^{-1}$ 、 10^{-2}sec^{-1} 、 $5\times 10^{-3}\text{sec}^{-1}$ 或 10^{-3}sec^{-1} 的解离速率(k(off))结合redIL-33。具有这些结合特征的抗体是特别有利的,因为它们结合并且螯合还原形式的IL-33,由此使得能够抑制或减弱redIL-33的活性。结合的程度还可足以在靶标接合之前(即在与ST-2接合之前)螯合redIL-33。此外,结合的程度还可以阻止从redIL-33/结合分子复合物释放redIL-33,从而阻止red-IL-33转化为氧化形式。这样,这些结合分子或抗原结合片段因此抑制或减弱oxIL-33的活性,由此抑制经由RAGE的信号传导。因此,在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段减弱或抑制oxIL-33的活性,并且由此抑制RAGE信号传导。

[0011] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:37的序列的VHCDR1、具有SEQ ID NO:38的序列的VHCDR2、具有SEQ ID NO:39的序列的VHCDR3、具有SEQ ID NO:40的序列的VLCDR1、具有SEQ ID NO:41的序列的VLCDR2、以及具有SEQ ID NO:42的序列的VLCDR3。

[0012] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:1的序列的VH和具有SEQ ID NO:19的序列的VL。

[0013] 在另一方面,提供了用于在治疗受试者的肾脏损伤的方法中使用的抗IL-33治疗剂,其中将该抗IL-33治疗剂施用于受试者,以减弱或抑制IL-33介导的ST2信号传导和IL-33介导的RAGE信号传导。

[0014] 在一些实施例中,该IL-33介导的RAGE信号传导是IL-33介导的RAGE-EGFR信号传导。在一些实施例中,抑制或减弱RAGE-EGFR信号传导减弱或抑制了RAGE-EGFR介导的效应。在一些实施例中,该RAGE-EGFR介导的效应包括异常上皮生理学。在一些实施例中,该异常上皮生理学是异常上皮重塑。在一些实施例中,该RAGE-EGFR介导的效应包括异常系膜扩

张。在一些实施例中,该异常系膜扩张包括异常系膜细胞增殖。

[0015] 在一些实施例中,抑制或减弱ST2信号传导减弱或抑制了ST2介导的效应。在一些实施例中,该ST2介导的效应包括肾脏中的异常炎症。在一些实施例中,该异常炎症包括增加的IL-4、IL-6、IL-8、IL-12、TNF α 和/或IL1 β 分泌或表达,任选地增加的IL-4、IL-6、IL-8和/或IL-12分泌或表达。在一些实施例中,该异常炎症包括MAP激酶激活。在一些实施例中,MAP激酶激活包括p38或JNK激酶激活。在一些实施例中,该炎症是在内皮、肾小球、或两者中。

[0016] 在另一方面,提供了用于治疗肾脏损伤的治疗剂,该治疗剂抑制或减弱还原型IL-33的活性,从而抑制或减弱ST2信号传导,其中该治疗进一步包括抑制或减弱氧化型IL-33的活性,从而抑制或减弱RAGE信号传导。

[0017] 在另一方面,提供了治疗剂在制造用于治疗肾脏损伤的药物中的用途,该治疗剂抑制或减弱还原型IL-33的活性,从而抑制或减弱ST2信号传导,其中该治疗进一步包括抑制或减弱氧化型IL-33的活性,从而抑制或减弱RAGE信号传导。

[0018] 在另一方面,提供了用于治疗肾脏损伤的治疗剂,该治疗剂抑制或减弱氧化型IL-33的活性,从而抑制或减弱RAGE信号传导,其中该治疗进一步包括抑制或减弱还原型IL-33的活性,从而抑制或减弱ST2信号传导。

[0019] 在另一方面,提供了治疗剂在制造用于治疗肾脏损伤的药物中的用途,该治疗剂抑制或减弱氧化型IL-33的活性,从而抑制或减弱RAGE信号传导,其中该治疗进一步包括抑制或减弱还原型IL-33的活性,从而抑制或减弱ST2信号传导。

[0020] 在另一方面,提供了抑制或减弱还原型IL-33的活性从而抑制或减弱ST2信号传导的治疗剂,以及抑制或减弱氧化型IL-33的活性从而抑制或减弱RAGE信号传导的治疗剂,这两种治疗剂用于治疗肾脏损伤。

[0021] 在另一方面,提供了抑制或减弱还原型IL-33的活性从而由此抑制或减弱ST2信号传导的治疗剂、以及抑制或减弱氧化型IL-33的活性从而由此抑制或减弱RAGE信号传导的治疗剂在制造用于治疗肾脏损伤的药物中的用途。

[0022] 在另一方面,提供了用于治疗肾脏损伤的治疗剂,该治疗剂抑制或减弱还原型IL-33和氧化型IL-33的活性,从而抑制或减弱ST2信号传导和RAGE信号传导。

[0023] 在另一方面,提供了治疗剂在制造用于治疗肾脏损伤的药物中的用途,该治疗剂抑制或减弱还原型IL-33和氧化型IL-33的活性,从而抑制或减弱ST2信号传导和RAGE信号传导。

附图说明

[0024] 图1:从ERCB组群(A)、Ju 2013组群(B)和Woroniecka组群(C)分析IL33的肾小球和肾小管间质RNA表达。

[0025] 图2:(A)在正常和糖尿病肾脏中的ST2的RNA表达,和(B)ST2的RNA表达在肾脏皮质中是富集的(稳定状态)。

[0026] 图3:IL33 mRNA在临床前CKD小鼠模型中的表达。

[0027] 图4:RAGE mRNA在临床前CKD小鼠模型中的表达。

[0028] 图5:使用具有抗ST2和抗RAGE干预的db/db UNX模型,临床前CKD模型设计

[0029] 图6:与同型对照抗体治疗(NIP)相比,在抗ST2和抗RAGE治疗的小鼠中,在第13和15周时测量的db/db UNX CKD模型中的UACR变化,显示为绝对值

[0030] 图7:与同型对照抗体治疗(NIP)相比,在抗ST2和抗RAGE治疗的小鼠中,在第13和15周时测量的db/db UNX CKD模型中的UACR变化,显示为与第10周相比,在第13和15周的百分比变化。

[0031] 图8:当用抗ST2或同型对照抗体治疗(NIP)进行治疗时,在db/db UNX临床前CKD模型中的肾小球损伤评分(GDS)

[0032] 图9:显示了对于在MAP激酶磷酸化抗体阵列上的检测测定中的每一种而言,与未处理的对照相比,在激酶磷酸化中增加倍数的灰度热图。还原型IL-33(分别是IL-33-01和IL-33-16)不引起高于基线的任何信号。oxIL-33(氧化型IL-33-01)引起多种激酶的磷酸化增加;

[0033] 图10:显示了在受体酪氨酸激酶(RTK)活性阵列上针对每种刺激条件的信号模式。oxIL-33(但分别不是还原型IL33-01和IL33-16)在RTK阵列上引发对应于表皮生长因子受体(EGFR)的正信号。点强度与受体酪氨酸激酶磷酸化相关;

[0034] 图11A:显示了在用浓度增加的IL-33或EGFR配体刺激的正常人支气管上皮(NHBE)细胞中的pEGFR(Tyr1068)活性。oxIL-33,而不是还原型IL-33(IL33-01),促进EGFR的与EGF、HB-EGF和TGF α 类似的磷酸化;

[0035] 图11B:显示了在用浓度增加的IL-33或EGFR配体刺激的A549细胞中的pEGFR(Tyr1068)活性。oxIL-33(氧化型IL-33-01),而不是还原型IL-33(IL-33-01),以与NHBE细胞中所见的类似模式,促进EGFR的与EGF、HB-EGF和TGF α 类似的磷酸化;

[0036] 图11C:显示了在用浓度增加的IL-33、EGFR配体或RAGE配体刺激的A549细胞中的pEGFR(Tyr1068)活性。oxIL-33,而不是野生型(WT)IL-33(IL-33-01)、C->S突变的(mut)IL-33(IL-33-16)或RAGE配体,促进EGFR的与EGF类似的磷酸化;

[0037] 图12:显示了氧化型IL-33诱导EGFR通路中涉及的多种分子(EGFR、PLC、AKT、JNK、ERK 1/2、p38)的磷酸化,如通过蛋白质印迹进行分析;

[0038] 图13:显示了与同型对照相比,通过剂量增加的抗EGFR抗体,减少了oxIL-33诱导的STAT5磷酸化;

[0039] 图14:显示了用抗EGFR进行免疫沉淀,随后通过蛋白质印迹检测EGFR、RAGE或IL-33。在用oxIL-33刺激NHBE之后,IL-33和RAGE与EGFR共沉淀,这表明它们形成了复合物。与EGF相比,RAGE似乎是oxIL-33信号传导复合物所特有的;

[0040] 图15A:显示了oxIL-33直接结合RAGE。HMGB1是已知的RAGE配体,并且充当此研究中的阳性对照;

[0041] 图15B:显示了oxIL-33并不直接结合EGFR(但是已知的EGFR配体EGF直接结合EGFR)。然而,当将RAGE与oxIL-33组合添加至此测定中时,则见到EGFR结合;

[0042] 图16:显示了在指示的时间点,在用oxIL-33激活后,在野生型和RAGE缺陷型A549细胞中,用抗EGFR或抗RAGE进行免疫沉淀,随后针对EGFR、RAGE和IL-33进行蛋白质印迹;

[0043] 图17:显示了抗RAGE抗体,而不是抗ST2抗体,减少了由oxIL-33-01诱导的STAT5磷酸化;

[0044] 图18:显示了(A)响应于炎症介质,原代近端肾小管上皮细胞(PTEC)分泌IL33。还

在 (B) 中显示了通过NFkB易位而检测到的PTEC响应于外源IL-1b但不响应于外源redIL-33。(C) 显示了通过分泌炎性细胞因子IL-6、IL8、TNFa和IL1b, PTEC不以剂量依赖性方式响应于IL-33。(D) 显示了当用redIL-33处理时, PTEC不增加p38或JNK (高于基线水平的ST2信号传导轴激活的两种下游介质) 的激活。(E) 显示了当用外源oxIL33或EGF (而不是redIL-33或S1001A9 (RAGE配体)) 处理时, 检测到PTEC中磷酸化EGFR (pEGFR) 增加。在抗RAGE和抗EGFR抗体存在下, 当oxIL33处理时, PTEC中增加的pEGFR是减少的 (F)。(G) 显示了当暴露于oxIL-33但不暴露于还原型IL-33时, KIM-1在PTEC中是增加的。

[0045] 图19: (A) 显示了响应于炎症介质, 原代肾小球内皮细胞 (GEnC) 分泌IL33增加。(B) 显示了通过增加NFkB易位GEnC响应于外源redIL33处理。存在抗IL-33抗体 (C) 时阻断反应。(D) 显示了当用redIL-33而不用oxIL-33刺激时, GEnC分泌炎性细胞因子IL-6和IL-8。IL-8的分泌。当用redIL33处理时, 来自GEnC的TNFa、IL1b和IL-6以剂量依赖性方式增加 (E)

[0046] 图20: (A) 显示了响应于IL33, 原代肾小球内皮细胞 (GEnC) 分泌炎性细胞因子。存在抗IL33抗体时分泌被阻断。(B) 显示了redIL-33激活p38和JNK激酶活性, 该激酶活性在33-640087_7B存在下受到抑制。

[0047] 图21: (A) 显示了在人原代系膜细胞中的IL-33信号传导。当被干扰素 γ 和TNFa胁迫时, 系膜细胞上调IL-33的水平。当暴露于浓度增加的IL-33时, 系膜细胞以剂量依赖性方式分泌IL-8 (B)。(C) 显示了在33-6400877B存在下, 系膜细胞分泌IL-8受到抑制。(D) 显示了浓度增加的oxIL-33增加系膜细胞增殖。

[0048] 图22A: 显示了在用还原型IL-33、oxIL-33或EGF处理后, A549细胞的相对伤口愈合密度。条形图显示了每种条件下, 来自6个技术重复的平均值和SEM;

[0049] 图22B: 显示了在用还原型IL-33、oxIL-33或EGF处理后, NHBE细胞的相对伤口愈合密度。条形图显示了每种条件下, 来自6个技术重复的平均值和SEM;

[0050] 图23: 显示了在抗ST2、抗RAGE或抗EGFR存在下, 用单独的培养基 (未刺激的对照)、还原型IL-33、氧化型IL-33、或氧化型IL-33处理的NHBE细胞的刮伤闭合百分比。条形图显示了每种条件下, 来自6个技术重复的平均值和SEM。

具体实施方式

[0051] 一般定义

[0052] 如本文所用的“经分离”是指尤其是从自然界分离的处于非天然环境中的蛋白质, 例如该术语不包括体内蛋白质, 也不包括取自人体或动物体的样品中的蛋白质。通常, 蛋白质将处于载体 (诸如液体或介质) 中, 或可配制、冷冻或冷冻干燥, 并且在适当时所有这些形式可由“经分离”涵盖。在一个实施例中, 经分离不指呈凝胶状的蛋白质, 例如在蛋白质印迹分析中使用的凝胶或相似物。

[0053] 如本文所用的“IL-33”蛋白是指白介素33, 尤其是哺乳动物白介素33蛋白, 例如以UniProt编号095760保藏的人类蛋白。此实体不以单一种类存在而是以还原和氧化形式存在 (Cohen等人Nature Comms [自然通讯])。鉴于还原形式在体内例如在5分钟至40分钟时段内和在体外快速氧化, 通常现有技术对IL-33的提及实际上为对氧化形式的提及。术语“IL-33”和“IL-33多肽”以及“IL-33蛋白”可互换使用。在某些实施例中, IL-33是全长。在另一实施例中, IL-33是成熟的截短IL-33 (氨基酸112-270)。最近研究表明全长IL-33是有活性的

(Cayrol和Girard, Proc Natl Acad Sci USA [美国国家科学院院刊] 106 (22): 9021-6 (2009); Hayakawa等人, Biochem Biophys Res Commun [生物化学和生物物理学研究通讯] 387 (1): 218-22 (2009); Talabot-Ayer等人, J Biol Chem. [生物化学杂志] 284 (29): 19420-6 (2009)。然而, N-末端处理的或截短的IL-33 (包括但不限于aa 72-270、79-270、95-270、99-270、107-270、109-270、111-270、112-270) 可具有增强的活性 (Lefrancais 2012、2014)。在另一实施例中, IL-33可包括全长IL-33、其片段或IL-33突变体或变体多肽, 其中IL-33的片段或IL-33变体多肽保留活性IL-33的一些或所有功能特性。

[0054] 氧化型IL-33、oxIL-33、IL-33-DSB (二硫键结合的) 和DSB IL-33在本文中也可互换使用。氧化型IL-33是指作为独特带可见的蛋白质, 例如通过在非还原条件下的蛋白质印迹分析, 尤其是其质量比相应还原形式小4Da。具体而言, 其是指在独立地选自半胱氨酸208、227、232和259的半胱氨酸之间具有一个或两个二硫键的蛋白质。氧化型IL-33是指结合RAGE并且触发RAGE介导的信号传导的IL-33的形式。在一个实施例中, 氧化型IL-33显示不与ST2结合。

[0055] 还原型IL-33和redIL-33在本文中可互换使用。如本文所用的还原型IL-33是指与ST2结合且触发ST2依赖性信号传导的IL-33形式。具体而言, 该还原形式的半胱氨酸208、227、232和259并非二硫键键合的。如本文所用的redIL-33活性片段是指具有与redIL-33可比的活性 (例如相似程度的ST2依赖性信号传导) 的片段。在一个实施例中, 活性片段是全长redIL-33的活性的20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0056] 如本文所用的“ST2信号传导”是指IL-33/ST2系统, 其中由ST2识别的IL-33促进在细胞表面上与IL1-RAcP二聚以及在细胞内将受体复合物组分MyD88、TRAF6和IRAK1-4募集到胞内TIR结构域中。由可位于肾脏中的Th2细胞、肥大细胞和其他免疫细胞类型表达在基线处的ST2受体。胞外IL-33形式通过与ST2结合且随后激活NF κ B和MAP激酶途径而刺激靶细胞, 导致包括产生细胞因子和趋化因子的一系列功能反应。因此, ST2依赖性信号传导可通过扰动IL-33与ST2的相互作用或者可替代地通过中断与IL-1RAcP的相互作用来中断。如本文所用的ST-2信号传导“抑制或减弱”是指减少或阻断通过ST-2/IL-33系统的信号传导。可以通过测定由于ST-2信号传导而上调的炎性细胞因子 (例如IL-4、IL-6、IL-8和IL-12) 的浓度水平, 来确定ST-2信号传导的程度 (并且因此确定对其的抑制或减弱)。可以例如使用ELISA测定或定量质谱分析法, 从获得自经历本文所述的治疗方法的受试者的生物样品测量细胞因子的浓度。

[0057] “RAGE信号传导”, 也称为“AGER信号传导”, 是指IL-33/RAGE系统, 其中IL-33结合该受体, 由此产生促炎性基因激活。如本文所用的RAGE信号传导的抑制或减弱是指通过RAGE/IL-33系统减少或阻断病理信号传导, 例如促炎性信号传导, 或减少或阻断诱导肾小球中的异常上皮重塑或系膜细胞扩张的信号传导。

[0058] 用于本披露中的“结合分子”或“抗原结合分子”在其最广泛意义上是指特异性结合抗原决定簇的分子。在一个实施例中, 该结合分子或其抗原结合片段特异性地结合IL-33, 尤其是redIL-33和/或oxIL-33。在另一实施例中, 本披露的结合分子是抗体或其抗原结合片段。

[0059] 如本文所用的“抗体”是指如下文更详细论述的免疫球蛋白分子, 尤其是全长抗体

或包含全长抗体的分子,例如DVD-Ig分子等。

[0060] “结合片段”或“抗原结合片段”是抗体片段的表位/抗原结合片段,例如包含结合结构域,尤其是包含6个CDR,诸如重链可变区中的3个CDR和轻链可变区中的3个CDR的那些。

[0061] 除非确切地提及全尺寸的抗体诸如天然存在的抗体,否则术语“抗IL-33”涵盖全尺寸抗体以及这类抗体的抗原结合片段、变体、类似物或衍生物,例如天然存在的抗体或免疫球蛋白分子或工程化的抗体分子或以与抗体分子类似的方式结合抗原的片段。

[0062] 本文所用的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以就抗原的一个或多个表位或一个或多个部分,例如其识别或特异性结合的本文所披露的靶多肽(例如,全长或成熟IL-33)而言进行描述或规定。特异性地与抗体的抗原结合结构域相互作用的靶多肽的部分是“表位”或“抗原决定簇”。取决于抗原的尺寸、构型和类型,靶多肽可包含单一表位,但典型地包含至少两个表位,并且可以包括任何数目的表位。此外,应注意的是,靶多肽上的“表位”可以是或可包括非多肽元素,例如表位可包括碳水化合物侧链。

[0063] 抗体的肽或多肽表位的最小尺寸被认为是约四至五个氨基酸。肽或多肽表位优选地含有至少七个,更优选地至少九个且最优选地至少约15至约30个氨基酸。由于CDR可以识别三级形式的抗原肽或多肽,所以包含表位的氨基酸不必连续,并且在一些情况下甚至可不在同一肽链上。被用于本披露中的抗IL-33抗体识别的肽或多肽表位可含有IL-33的至少4、至少5、至少6、至少7,更优选地至少8、至少9、至少10、至少15、至少20、至少25个、或约15至约30个之间的连续或非连续氨基酸的序列。

[0064] 如本文所用,术语“治疗(treat或treatment)”是指治疗性治疗和防治性或预防性措施,其中目标是预防或减慢(减轻)不希望的生理变化或障碍,诸如炎症病症的进展。有益或所希望的临床结果包括但不限于症状缓解、疾病程度减轻、疾病状态稳定化(即未恶化)、疾病进展延迟或减缓、疾病状态改善或缓和、以及减轻(无论是部分减轻还是全部减轻),无论是可检测的还是不可检测的。“治疗”还可以意指当与未接受治疗时的预期存活相比,延长存活。需要治疗的那些包括已患有病症或障碍的那些以及易于患上病症或障碍的那些或打算预防病症或障碍的那些。

[0065] “受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”意指希望进行诊断、预后或治疗的任何受试者,尤其是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括人、家畜、农畜、以及动物园动物、体育动物、或宠物动物,诸如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、奶牛等。在一个实施例中,患者是人。

[0066] 如本文所用的“减弱.....的活性”是指减少相关活性或停止相关活性。除非上下文另外指示,否则减弱和抑制通常在本文中可互换使用。

[0067] 治疗用途

[0068] 如本文所述,抑制通过ST2受体和RAGE两者进行的信号传导可以为肾脏损伤提供有效治疗。如本文所定义的,“肾脏损伤”是指肾脏的长期的或慢性的疾病或损伤,例如来自疾病或创伤(包括物理的或化学的创伤)。换句话说,如本文所用,“肾脏损伤”是指一种疾病,其中肾功能是慢性损害的和/或其中肾脏组织是慢性受损的,例如其中这些异常持续至少三个月。

[0069] 本文所述的方法与至少部分地由IL-33介导的肾脏损伤的治疗相关。已经显示在患有肾脏损伤的受试者的肾脏中,IL-33的水平是局部增加的。还原型IL-33(redIL-33)通

过激活由直接结合受体ST2进行的信号传导而刺激肾脏中的炎症。本披露鉴定出,IL-33介导的ST2发生在多种细胞类型中,包括内皮细胞和系膜细胞。本披露还描述了存在迄今为止未知的IL-33信号传导通路,通过此通路,氧化形式的IL-33(oxIL-33)引发经由RAGE/EGFR的信号传导。实例描述了RAGE-EGFR信号传导在肾脏上皮中被激活。出人意料地,本披露还鉴定出,oxIL-33介导的RAGE/EGFR信号传导包括增加系膜细胞增殖,潜在促进在肾脏的慢性疾病(例如糖尿病性肾病)中观察到的系膜扩张。因此,本文所述的方法不仅可用于治疗肾脏疾病的IL-33介导的炎症方面,例如由ST2信号传导介导的那些,而且还可用于治疗通过经由RAGE/EGFR的oxIL-33病理信号传导介导的肾脏疾病的要素。

[0070] 更具体地,IL-33介导的ST2依赖性和RAGE依赖性信号传导(例如RAGE-EGFR信号传导)的双重阻断可以为患有肾脏损伤的受试者的治疗提供改善的结果。肾脏疾病的体内建模已经显示了IL-33的水平 and 肾脏受损之间的相关性。处于还原形式的IL-33经由很好描述的ST2信号传导通路进行信号传导。经由ST2通路的信号传导产生促成肾脏损伤和疾病的病理学的炎症反应。

[0071] 此外,经由RAGE的病理信号传导已经与不同肾脏障碍相关(D'Agati等人*Nat Rev Nephrol*[肾脏病学自然综述]2010:352-60)。RAGE是结合晚期糖基化终产物的IgG超家族的多配体受体。这样,已经提出RAGE信号传导的拮抗作用可作为用于治疗慢性肾脏疾病的治疗策略。

[0072] 然而,由于RAGE是多配体受体(Fritz Trends in Biochemlcail Sciences[生物化学趋势]2011 36:625-632),所以除了肾脏疾病中的任何功效以外,直接抑制RAGE还可能具有脱靶效应和毒性。在肾脏上皮生物学的背景下,通过抑制迄今为止未知的RAGE的配体,认为与完全抑制RAGE相比,本文披露的治疗策略是有利的。这是因为它允许通过直接抑制RAGE配体oxIL-33来抑制或减弱病理RAGE信号传导。在患有肾脏损伤的受试者中的血清中,IL-33表达通常较低(Bao等人*J Clin Immunol*[临床免疫学杂志]2012:587-94;Caner等人*Renal Failure*[肾衰竭]2014:78-80;Musolino等人*Br. J. Haematol*[英国血液学杂志]2013:709-710;Mok等人*Rheumatology*[风湿病学]2010:520-527)。这样,靶向oxIL-33-RAGE介导的信号传导使得能够抑制或减弱(即,减少)病理肾脏损伤的这些要素,同时通过直接抑制RAGE潜在减小可能显现的脱靶毒性。这是因为本披露使得能够通过靶向主要在疾病部位(即肾脏)发现的RAGE配体,以局部方式抑制或减弱病理RAGE信号传导。此外,该策略可以与redIL-33ST2通路的抑制组合,从而允许肾脏损伤中涉及的两个重要病理通路的抑制和/或减弱。

[0073] 如实例中证明,在多个患有糖尿病性肾病的受试者中,以及在多个肾脏疾病的临床前模型中,IL-33肾脏表达是升高的。实例还证明,在肾脏上皮、内皮、和肾小球中,ST2和RAGE IL-33信号传导通路两者都被激活。实例还显示,抑制IL-33信号传导活性阻止了炎症介质的释放。因此,通过抑制或减弱IL-33介导的ST2和RAGE依赖性信号传导两者,本披露为肾脏损伤的治疗提供了新治疗策略。

[0074] 这样,提供了治疗肾脏损伤的方法,该方法包括向受试者施用抗IL-33治疗剂,其中施用该抗IL-33治疗剂以抑制ST2信号传导和RAGE信号传导两者。治疗剂是如本文其他地方所定义的。

[0075] 本披露还首次显示,氧化型IL-33结合RAGE,该RAGE继而与EGFR复合。这样,本披露

提供了使用可以抑制氧化型IL-33的信号传导的治疗剂的可能性,由此抑制对RAGE的潜在的oxIL-33介导的病理激活。例如,这些治疗剂可以抑制RAGE-EGFR复合。本文披露的数据证明,阻止RAGE-EGFR复合物的形成阻止了IL-33介导的RAGE/EGFR信号传导,这可以预防oxIL-33诱导的肾小管上皮功能障碍,和/或通过抑制oxIL-33介导的系膜细胞增殖,预防系膜功能障碍,如系膜扩张。

[0076] 因此,除了抑制ST2信号传导以外,用于本文披露的用途的方法和治疗剂还抑制RAGE-EGFR信号传导,用于治疗肾脏损伤。

[0077] 在一些实例中,该治疗剂抑制EGFR信号传导。在一些实例中,该治疗剂抑制RAGE-EGFR信号传导。在一些实例中,该治疗剂抑制氧化型IL33-RAGE-EGFR信号传导。

[0078] 在一些实例中,该治疗剂抑制氧化型IL-33与RAGE的结合。在一些实例中,该治疗剂抑制RAGE-EGFR复合物的形成。在一些实例中,该治疗剂抑制氧化型IL33-RAGE-EGFR复合物的形成。

[0079] 在一些实例中,该治疗剂抑制EGFR的激活。在一些实例中,该治疗剂抑制EGFR的磷酸化。

[0080] 在一些实例中,该治疗剂抑制RAGE-EGFR介导的效应。在一些实例中,该治疗剂抑制RAGE-EGFR复合物介导的效应。在一些实例中,该治疗剂抑制氧化型IL33-RAGE-EGFR复合物介导的效应。

[0081] 在一些实例中,该治疗剂抑制氧化型IL-33与RAGE的结合,由此抑制RAGE-EGFR复合,由此抑制RAGE-EGFR介导的效应,例如下游信号传导。

[0082] 在一些实例中,该治疗剂抑制IL-33介导的EGFR效应。在一些实例中,该治疗剂抑制IL-33介导的EGFR信号传导。在一些实例中,该治疗剂抑制氧化型IL-33介导的EGFR效应。在一些实例中,该治疗剂抑制氧化型IL-33介导的EGFR信号传导。在一些实例中,该治疗剂抑制氧化型IL-33介导的RAGE-EGFR效应。适合地,该治疗剂抑制氧化型IL-33介导的RAGE-EGFR信号传导。

[0083] 在一些实例中,RAGE-EGFR介导的效应是由RAGE-EGFR复合物引起的,例如由氧化型IL-33-RAGE-EGFR复合物引起的。此类效应可以典型地包括下游信号传导,其在本文中 can 称为RAGE信号传导、EGFR信号传导或RAGE-EGFR信号传导。在一些实例中,此类信号传导可以包括磷酸化和/或趋化因子释放。

[0084] 如本文列举的“RAGE-EGFR介导的效应”是指在细胞膜中由RAGE与EGFR复合以及所得的异常EGFR活性引起的任何生理学效应。此类RAGE-EGFR介导的效应可以呈现为异常肾脏上皮生理学。异常肾脏上皮生理学可以包括对以下的负面影响:屏障完整性;组织和腔之间的化学实体的调节和交换;化学物质分泌到腔中;适应不良的组织修复;和/或组织重塑(例如纤维化)。

[0085] 在一些实例中,此类RAGE-EGFR信号传导包括EGFR的磷酸化,以及随后EGFR通路中的组分(例如EGFR、PLC、JNK、MAPK/ERK1/2、p38、和STAT5)的磷酸化。适合地,EGFR信号传导包括酪氨酸激酶(例如JNK、MAPK/ERK、p38)的磷酸化。

[0086] 因此,在一些实例中,该治疗剂抑制EGFR通路中的组分的磷酸化。在一些实例中,该治疗剂抑制以下中的任一项的磷酸化:EGFR、PLC、JNK、MAPK/ERK 1/2、p38、和STAT5。在一些实例中,该治疗剂抑制以下中的任一项的EGFR介导的磷酸化:EGFR、PLC、JNK、MAPK/ERK

1/2、p38、和STAT5。在一些实例中，治疗剂抑制酪氨酸激酶的磷酸化。在一些实例中，该治疗剂抑制选自以下的酪氨酸激酶的磷酸化：JNK、MAPK/ERK、p38。在一些实例中，该治疗剂抑制选自以下的酪氨酸激酶的EGFR介导的磷酸化：JNK、MAPK/ERK、和p38。

[0087] 因此，在一些实例中，该治疗剂抑制趋化因子的释放。在一些实例中，该治疗剂抑制IL-8的释放。在一些实例中，该治疗剂抑制IL-4、IL-6、IL-8、IL-12、TNF α 和/或IL1b的释放。在一些实例中，该治疗剂抑制趋化因子的EGFR介导的释放。在一些实例中，该治疗剂抑制IL-8的EGFR介导的释放。

[0088] 在一些实例中，该RAGE-EGFR介导的效应可以呈现为异常系膜扩张。在一些实例中，该异常系膜扩张包括增加的系膜扩张。在一些实例中，该系膜扩张包括异常系膜细胞增殖。在一些实例中，该异常系膜细胞增殖包括增加的系膜细胞增殖。

[0089] 这些方法和治疗剂用于治疗或预防肾脏损伤。

[0090] 本披露还提供了如本文其他地方所定义的治疗剂中的任一项在制造用于治疗肾脏损伤的药物中的用途。

[0091] 在肾脏疾病的临床前模型中，已经显示本披露的方法减小了炎性负担。此外，本披露证明，患有慢性肾脏疾病的受试者表达升高水平的白介素-33。因此，在一些实施例中，该方法包括治疗作为炎症的肾脏损伤。在一些实施例中，该方法包括治疗包含炎症的肾脏损伤。在一些实施例中，该方法包括治疗包含慢性炎症的肾脏损伤。在一些实施例中，该方法可以治疗或预防与肾脏损伤相关的炎症。在一些实施例中，这些方法可以治疗或预防与肾脏损伤相关的急性炎症。在一些实施例中，这些方法可以治疗或预防与肾脏损伤相关的慢性炎症。在一些实施例中，该方法可用于治疗与肾脏损伤相关的炎性疾病。

[0092] 在一些实例中，这些方法包括抑制或减弱IL-33介导的ST2信号传导。在一些实例中，该IL-33介导的ST2信号传导是redIL-33介导的ST2信号传导。在一些实例中，抑制或减弱IL-33介导的ST2信号传导包括抑制或减弱ST2介导的效应。

[0093] 在一些实例中，该ST2介导的效应是肾脏中的异常炎症。在一些实例中，该肾脏中的异常炎症是肾脏中的增加的炎症。在一些实例中，该异常炎症是在内皮中。在一些实例中，该异常炎症是在肾小球中。在一些实例中，在肾小球中的异常炎症是由于系膜细胞刺激。在一些实例中，该异常炎症包括增加的IL-4、IL-6、IL-8、IL-12、TNF α 和/或IL1b分泌或表达，任选地增加的IL-4、IL-6、IL-8和/或IL-12分泌或表达。在一些实例中，该异常炎症包括增加的IL-8分泌或表达。在一些实例中，该异常炎症包括MAP激酶激活。在一些实例中，该MAP激酶激活包括p38或JNK激酶激活。

[0094] 在一些实施例中，本文所述的方法改善了与肾脏损伤相关的一个或多个症状。在一些实施例中，该方法可以减少体重损失、水肿、呼吸短促、疲劳、失眠、痉挛、恶心、皮肤瘙痒或头痛。在一些实施例中，该方法可以改善食欲。这些症状中的许多可能与肾脏损伤相关的肾功能的潜在损害有关。这样，通过进行本文披露的方法减小肾脏损伤来改善肾功能可以改善这些症状中的任何一个或多个。

[0095] 如本文所定义的，“改善”意指通过进行本文所述的方法减轻受试者的关于疾病的一个或多个症状的不适。当进行该方法时，可以通过监测以评估受试者体内显现症状的次数并且以观看这些事件如何随时间减少来确定受试者的改善。

[0096] 在一些实施例中，本文所述的方法减少了受试者中的尿白蛋白：肌酐酞比率

(UACR)。例如,当进行该方法时,受试者的UACR可能降低。UACR是从受试者收集的尿液样品中总白蛋白量的量度,其归一化为肌酐的浓度。更高UACR评分指示受试者在尿中具有增加浓度的白蛋白(蛋白尿)。白蛋白通常由于肾脏损伤而释放到尿中。因此,该方法可以用于降低受试者的UACR评分,其中“降低”意指与治疗开始前的UACR相比,在治疗期间或治疗之后,UACR评分减小。可以使用本领域中可用的多种UACR测试中的任一项,从收集自患者的尿液样品测量UACR评分。

[0097] 在一些实施例中,该肾脏损伤选自糖尿病性肾病、纤维化、肾小球肾炎(例如非增生性(例如轻微病变性肾小球肾炎、膜型肾小球肾炎、局灶性节段性肾小球硬化)或增生性(例如IgA肾病、膜性增生性肾小球肾炎、感染后肾小球肾炎、和急进性肾小球肾炎[例如肺出血肾炎综合征和血管炎性障碍{其包括韦格纳肉芽肿病和显微镜下多血管炎}]))、系统性红斑狼疮、蛋白尿、单侧输尿管梗阻、奥尔波特综合征、多囊肾病(PCKD)、高血压性肾小球硬化症、慢性肾小球硬化症、慢性梗阻性尿路病、慢性肾小管-间质肾炎和缺血性肾病。所有这些病症都与炎性组分相关,并且因此可以受益于使用本文所述的方法或治疗剂进行的治疗。

[0098] 在一些实施例中,该方法用于治疗糖尿病性肾病。本文所定义的糖尿病性肾病是指II型糖尿病的诊断和30-75ml/min的估算的肾小球滤过率(eGFR)。典型地,DKD进一步定义为从100至3000mg白蛋白与g肌酐的UACR比率的诊断。

[0099] 用于计算eGFR的测试是本领域可获得的。此类测试典型地考虑到血清肌酐值、血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂C值、年龄、性别和种族。计算还可以考虑到体表调整值,例如身高和/或质量。典型地,肌酐值和半胱氨酸蛋白酶抑制剂C值是标准化值。例如,肌酐值可追溯到同位素稀释质谱法(IDMS)。半胱氨酸蛋白酶抑制剂C值应可追溯到国际临床化学和检验医学联合会(IFCC)/参考材料和测量研究所(IRMM)工作组。典型地,30-75ml/min的eGFR表明受试者具有轻度至中重度的肾功能丧失。这样,这些方法可以用于治疗或预防具有轻度至中重度的肾功能丧失的DKD。在一些实施例中,这些方法用于改善患有DKD的受试者的肾功能。

[0100] 可以与用于治疗肾脏损伤的已知方法组合来进行本文所述的方法。对于肾脏损伤(包括对于与肾脏损伤相关的并发症)的已知治疗包括施用:1)血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂,2)他汀类,3)利尿剂,4)促红细胞生成素,5)铁补充剂,6)血管紧张素受体阻断剂,7)类固醇类,或8)钠-葡萄糖转运蛋白-2抑制剂(SGLT2i-也称为格列净(gliflozin))。

[0101] 因此,该方法可以用于已经历或正在经历用ACE抑制剂进行治疗的受试者中。

[0102] 因此,该方法可以用于已经历或正在经历用他汀进行治疗的受试者中。

[0103] 因此,该方法可以用于已经历或正在经历用利尿剂进行治疗的受试者中。

[0104] 因此,该方法可以用于已经历或正在经历用EPO进行治疗的受试者中。

[0105] 因此,该方法可以用于已经历或正在经历用铁补充剂进行治疗的受试者中。

[0106] 因此,该方法可以用于已经历或正在经历用ARB进行治疗的受试者中。

[0107] 因此,该方法可以用于已经历或正在经历用类固醇进行治疗的受试者中。

[0108] 因此,该方法可以用于已经历或正在经历用SGLT2i进行治疗的受试者中。在一些实例中,该SGLT2i是达格列净(dagliflozin)。在该方法包括另一种治疗的组合施用的情况下,本披露的方法涵盖使用单独配制品或单一药物配制品共施用、以及以任一顺序连续施

用。在本披露的一些实施例中，本文所述的治疗剂与消炎药组合施用，其中治疗剂（例如IL-33或其抗原结合片段）和另外的治疗可以任一顺序依次或同时（即，同时或在同一时间范围内）施用。

[0109] 在一些实施例中，该方法用于治疗在肾脏中具有升高水平的IL-33表达（也称为“上调的IL-33”）的受试者。如本文所述，患有肾脏损伤的受试者，例如患有糖尿病性肾病的受试者，在肾小球和肾小管间质中具有增加的IL-33表达。因此，这些方法可以特别有益于治疗具有上调的IL-33的肾脏损伤受试者。这些方法可以特别有益于治疗在肾小球中具有上调的IL-33的肾脏损伤受试者。这些方法可以特别有益于治疗在肾小管间质中具有上调的IL-33的肾脏损伤受试者。因此，这些方法可以特别有益于治疗在肾小球和肾小管间质中具有上调的IL-33的肾脏损伤受试者。

[0110] 用于检测细胞中IL-33表达的方法是本领域熟知的，并且包括但不限于PCR技术、免疫组织化学、流式细胞术、蛋白质印迹、ELISA等。这些方法可以用于鉴定具有上调的IL-33的患者。

[0111] 在一个实施例中，该方法包括在受试者或患者患有肾脏损伤、具有肾脏损伤的症状、或具有肾脏损伤的易患病体质的情况下，向受试者或患者应用或施用治疗剂（例如，IL-33抗体或其抗原结合片段），或向来自受试者或患者的分离组织或细胞系应用或施用该抗IL-33抗体或其抗原结合片段。在另一实施例中，该方法也旨在包括向受试者或患者应用或施用包含治疗剂（例如，抗IL-33结合分子）的药物组合物，或向来自受试者或患者的分离组织或细胞系应用或施用包含该抗IL-33结合分子的药物组合物，该受试者或患者患有肾脏损伤、具有肾脏损伤的症状或具有疾病的易患病体质。

[0112] 根据本披露的方法，如本文其他地方所定义的至少一种治疗剂（例如，抗IL-33结合分子或其抗原结合片段）用于促进相对于肾脏损伤中的炎性反应的阳性治疗反应。相对于炎症治疗的“阳性治疗反应”旨在指与这些结合分子（例如，抗体或其片段）的抗炎活性相关的疾病改善和/或与疾病相关的症状改善。即，可以观察到抗炎作用，进一步炎症预防和/或现有炎症减轻，和/或与疾病相关的一种或多种症状减少。因此，例如，疾病的改善可被表征为完全应答。术语“完全应答”旨在通过任何先前测试结果的归一化，不存在临床上可检测的疾病。在一个实施例中，这样一种应答必须持续在根据本披露的方法治疗之后至少一个月。可替代地，疾病的改善可被归类为部分应答。

[0113] 包括施用至少一种治疗剂（例如抗IL-33结合分子或其抗原结合片段）的本披露的方法还可以用于治疗与表达IL-33的细胞相关的免疫系统的炎性疾病和缺陷或障碍（它们显现为肾脏损伤）。炎性疾病由炎症和组织破坏或其组合表征。“抗炎活性”旨在指炎症减轻或预防。“炎性疾病”包括任何炎性免疫介导的过程，其中免疫反应的引发事件或靶标涉及一种或多种非自身抗原，包括例如同种抗原、异种抗原、病毒抗原、细菌抗原、未知抗原、过敏原或毒素。

[0114] 根据本披露的方法，至少一种治疗剂（例如，抗IL-33结合分子或其抗原结合片段）用于促进相对于治疗或预防炎性肾脏损伤的阳性治疗反应。相对于炎性肾脏损伤的“阳性治疗反应”旨在指与这些抗体的抗炎活性等相关的疾病改善，和/或与疾病相关的症状改善。即，可以观察到炎性反应减少，包括但不限于炎性细胞因子、黏附分子、蛋白酶、免疫球蛋白、其组合等的分泌减少；抗炎蛋白的产生增加；自体反应细胞的数目减少；免疫耐受性

增加;自体反应细胞存活抑制;细胞凋亡减少;内皮细胞迁移减少;自发单核细胞迁移增加;通过刺激表达IL-33的细胞所介导的一种或多种症状减轻和/或减少。这类阳性治疗反应不受限于施用途径。

[0115] 临床反应可以使用筛选技术评估,诸如磁共振成像(MRI)扫描、x射线照相成像、计算机断层成像(CT)扫描、流式细胞术或荧光活化细胞分选仪(FACS)分析、组织学、宏观病理学以及血液化学,包括但不限于可通过ELISA、RIA、色谱等检测的变化。除了这些阳性治疗反应之外,正经受用抗IL-33结合分子(例如,抗体或其抗原结合片段)进行的治疗的受试者可经历与该疾病相关的症状改善的有益效果。

[0116] 本披露的另一实施例是抗IL-33结合分子(例如,抗体或其抗原结合片段)的用途,其用于诊断监测组织中的蛋白质水平作为临床测试程序的一部分,例如以确定给定治疗方案的功效。例如,通过使抗体偶联到可检测物质上可以促进检测。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适辅基复合物的实例包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例包括鲁米诺;生物发光材料的实例包括萤光素酶、萤光素和水母素;并且合适放射性材料的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

[0117] 治疗剂

[0118] “治疗剂”是指向受试者施用的活性药物成分,目的是为了对受试者的疾病状态产生有益影响。如本文所用,治疗剂是设计用于向受试者施用的、用于治疗或预防肾脏损伤的活性成分。肾脏损伤是如本文其他地方所定义的。更具体地,设计该一种或多种治疗剂来抑制ST2信号传导、RAGE信号传导、或两者,用于治疗肾脏损伤。在一些实施例中,该一种或多种活性成分减弱或抑制还原型IL-33蛋白(redIL-33)的活性,由此抑制ST2信号传导。在一些实施例中,该一种或多种活性成分减弱或抑制氧化型IL-33蛋白(oxIL-33)的活性,由此抑制RAGE信号传导。本文其他地方描述了在治疗肾脏损伤的背景下,抑制这两个信号传导通路的优势。

[0119] 在一些实施例中,该一种或多种治疗剂包括“化学抑制剂”。如本文所用,“化学抑制剂”是指具有抑制活性的合成的或半合成的分子,例如其中该分子具有500或更小的分子量。

[0120] 可以设计该化学抑制剂来抑制ST-2信号传导、RAGE信号传导或两者。在一些实施例中,该化学抑制剂用于抑制ST-2信号传导。该化学抑制剂可以通过直接结合ST-2并且拮抗ST-2的信号传导活性来抑制ST-2信号传导。这可以通过结合ST-2,从而阻止ST-2激活配体redIL-33的结合来实现。可替代地,该化学抑制剂可以直接结合redIL-33并且抑制结合ST-2。

[0121] 在一些实施例中,该化学抑制剂可以抑制RAGE信号传导。该化学抑制剂可以通过直接结合RAGE并且拮抗RAGE的信号传导活性来抑制RAGE信号传导。在一些实施例中,该化学抑制剂可以减弱或抑制oxIL-33的活性,并且由此抑制RAGE信号传导。可替代地,该化学抑制剂可以直接结合oxIL-33并且抑制结合RAGE。

[0122] 在一些实施例中,该化学抑制剂可以抑制ST-2信号传导和RAGE信号传导。这可以

例如通过结合与ST-2和RAGE两者接合的IL-33上的界面,从而激活信号传导来实现。

[0123] 在一个实施例中,该一种或多种治疗剂包括结合分子。适合地,该结合分子是抗体或其抗原结合片段、变体、或衍生物。抗体或抗原结合片段是如本文其他地方所描述的。

[0124] 适合地,该结合分子特异性结合IL-33。这样一种结合分子也称为“IL-33结合分子”或“抗IL-33结合分子”。适合地,该结合分子特异性结合IL-33并且抑制或减弱IL-33活性,例如,抑制或减弱还原型IL-33活性、氧化型IL-33活性或两者的活性。

[0125] 适合地,该IL-33结合分子特异性结合还原型IL-33、氧化型IL-33或还原型IL-33和氧化型IL-33两者。

[0126] 适合地,该结合分子可以通过结合处于还原或氧化形式的IL-33来减弱或抑制IL-33活性。适合地,其中该结合分子抑制或减弱还原型IL-33活性和氧化型IL-33活性,这通过结合处于还原形式的IL-33(即通过结合还原型IL-33)来实现。

[0127] 适合地,该结合分子抑制或减弱redIL-33和oxIL-33两者的活性,由此抑制或减弱ST2信号传导和RAGE信号传导两者。

[0128] 适合地,对氧化型IL-33的活性的抑制下调或关闭RAGE依赖性信号传导和/或RAGE介导的效应。适合地,该抑制下调或关闭RAGE-EGFR依赖性信号传导和/或RAGE-EGFR介导的效应。适合地,该抑制下调或关闭EGFR依赖性信号传导。适合地,该抑制下调或关闭EGFR介导的效应。具体而言,已经显示,结合还原型IL-33的IL33拮抗剂可以阻止氧化型IL-33结合RAGE,由此抑制RAGE-EGFR信号传导。

[0129] 适合地,对氧化型IL-33的活性的抑制下调或阻止RAGE-EGFR复合。适合地,该抑制下调或阻止EGFR激活,适合地是RAGE介导的EGFR激活。

[0130] 适合地,该结合分子或其片段或变体可以按以下结合亲和力(Kd)特异性结合redIL-33:小于 $5 \times 10^{-2} \text{M}$ 、 10^{-2}M 、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ 、 10^{-3}M 、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 10^{-4}M 、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 10^{-5}M 、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 10^{-6}M 、 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 10^{-7}M 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 10^{-8}M 、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 10^{-9}M 、 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 10^{-10}M 、 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 10^{-11}M 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 、 10^{-12}M 、 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 10^{-13}M 、 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ 、 10^{-14}M 、 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ 、或 10^{-15}M 。适合地,与redIL-33的结合亲和力小于 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ (即0.05pM)。适合地,使用动力学排阻测定(KinExA)或BIAcore™,适合地,使用KinExA、使用例如WO 2016/156440中描述的那些方案(参见例如实例11,将该文献通过引用以其整体并入本文)来测量结合亲和力。以此结合亲和力与redIL-33结合的结合分子似乎与redIL-33足够紧密地结合,以阻止结合分子/redIL-33复合物在生物学相关的时间范围内解离。不希望被理论束缚,认为此结合强度阻止了在体内抗体/抗原复合物降解之前释放抗原,使得redIL-33不被释放并且不能进行从redIL-33向oxIL-33的转化。因此,结合分子当以此结合亲和力与redIL-33结合时,可以通过阻止oxIL-33的形成来抑制或减弱oxIL-33的活性,从而抑制RAGE信号传导。

[0131] 在一些实例中,该结合分子或其片段可以按大于或等于 $10^3 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或 $5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 的结合速率(k(on))特异性结合redIL-33。例如,本披露的结合分子可以按大于或等于 $10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或 $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或 $10^7 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 的结合速率(k(on))结合redIL-33或其片段或变体。适合地,该k(on)速率大于或等于 $10^7 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 。

[0132] 在一些实例中,该结合分子或其片段可以按小于或等于 $5 \times 10^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-1}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-2}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或 10^{-3}sec^{-1} 的解离速率(k(off))特异性结合redIL-33。

例如,可以说,本披露的结合分子按小于或等于 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-4}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或 10^{-5}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-6}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{sec}^{-1}$ 或 10^{-7}sec^{-1} 的解离速率(k(off))结合redIL-33或其片段或变体。适合地,该k(off)速率小于或等于 10^{-3}sec^{-1} 。IL-33是响应于炎症刺激迅速且以高浓度释放的警报蛋白细胞因子。在释放到细胞外环境后约5-45min,redIL-33被转化成氧化型。因此,为了阻止redIL-33转化为oxIL-33,本文所述的结合分子可以按这些k(on)和/或k(off)速率与redIL-33结合。不希望受理论约束,认为这些k(on)/k(off)速率确保了结合分子可以在redIL-33转化成oxIL-33之前快速与redIL-33结合,由此减少oxIL-33的形成,由此减弱或抑制RAGE信号传导。

[0133] 适合地,IL-33结合分子可以竞争性抑制IL-33与表1中引用的结合分子中的任一项结合:

[0134] 表1:示例性抗IL-33抗体VH和VL配对

配对	SEQ ID NO:	HCVR氨基酸序列	SEQ ID NO:	LCVR氨基酸序列
1	SEQ ID NO: 1	EVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSG ISAIQSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARQK FMQLWGGGLRYPFGY WGQGMVTVSS	SEQ ID NO: 19	SYVLTQPPSVSVSPGQ TASITCSGEGMGDKYA AWYQQKPGQSPVLVI YRDTKRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAM DEADYYCGVIQDNTG VFGGGTKLTVL
[0135]	SEQ ID NO: 2	EVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFRSFAM SWVRQAPGKGLELVS LRTSGGSTYYADSVKGR LTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKSH YSTSWFGGFDYWGGT LVTVSS	SEQ ID NO: 20	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITICRASQGFSSW LAWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTITNLQPE DFATYYCQQANSFPLT FGGGTKVEIK
	SEQ ID NO: 3	QVQLQESGPGLVKPSSET LSLTCTVSGGSISSYYWS WIRQPPGKGLELIGYIYY SGSTNYNPSLKSRTISV DTSKNHFSCLKLSSVTAA	SEQ ID NO: 21	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITICRASQGISTW LAWFQQKPGKAPKLLI YAASTLQGGVPSRFSG SGSGPEFTLTISLQPE

[0136]

		DTAVYYCARSQYTSSW YGSFDIWGQGMVTVS S		DFATYYCQQANSFPW TFGQGTKVEIK
4	SEQ ID NO: 4	QVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFNSYG ISWVRQAPGQGLEWMG WISSHNGNSHYVQKFQ GRVSMITDTSTSTAYM ELRSLRSDDTAVYYCAR HSYTTSWYGGFDYWGQ GTLVTVSS	SEQ ID NO: 22	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITTCRASQGFSSW LAWYQQKPGKAPQLLI YAASSLQSGVPSRFSG SGSGSDFTLTISLQPE DFATYYCQQANSFPLT FGGGTKVEIK
5	SEQ ID NO: 5	EVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYALT WVRQAPGKGLEWVSFI SGSGRPFYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMN LRAEDTAIYYCAKSLYT TSWYGGFDSWGQGLV TVSS	SEQ ID NO: 23	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITTCRASQGVVSW LAWYQQKPGKAPQLLI YAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQNSFPFT LPGGTKVDIK
6	SEQ ID NO: 6	EVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSNYAM TWVRQAPGKGLEWVST ISGSGDNTYYADSVQGR FTISRGHSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKPT YSRSWYGAFDFWGQGT MVTVSS	SEQ ID NO: 24	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITTCRASQGISSWL AWYQQKPGKAPQLLI YAASRLQSGVPSRFWG SGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQANFPFT FGPGTKVDIK
7	SEQ ID NO: 7	EVQLVESGGNLEQPGGS LRLSCTASGFTFSRSAM NWVRRAPGKGLEWVSG ISGSGGRYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMN SLSAEDTAIYYCAKDS YTTSWYGGMDVWGHG TTVTVSS	SEQ ID NO: 25	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITTCRASQGIFSWL AWYQQKPGKAPQLLI YAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPE DFAIYYCQQANSVPITF GQGTRLEIK

[0137]

8	SEQ ID NO: 8	EVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSDYYM NWVRQAPGKGLEWVSS ISRYSSYIYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCARDIGG MDVWGQGLTVTVSS	SEQ ID NO: 26	QSVLTQPPSASGTPGQ RVTISCTGSSSNIGAVY DVHWYQQLPGTAPKLLI LIYRNNQRPSGVPDRF SGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCQTYDSSR WVFGGGTKLTVL
9	SEQ ID NO: 9	EVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSNYM HWVRQAPGKGLEWVSS ISARSRYHYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARLA TRHNAFDIWGQGLTV VSS	SEQ ID NO: 27	QSVLTQPPSASGTPGQ RVTISCSGSSSNIGNNA VSWYQQLPGTAPKLLI YASNMRVIGVPDRFSG SKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCGAWDDSQK ALVFGGGTKLTVL
10	SEQ ID NO: 10	EVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSNYM HWVRQAPGKGLEWVSS ISARSSYIYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCARLAT RNNAFDIWGQGLTV SS	SEQ ID NO: 28	QSVLTQPPSASGTPGQ RVTISCSGSSSNIGRNA VNWYQQLPGTAPKLLI YASNMRVSGVPDRFS GSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCWAWDSS QKVGVFGGGKTLTVL
11	SEQ ID NO: 11	EVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSRYM HWVRQAPGKGLEWVSS ISAQSSHIYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCARLAT RQNAFDIWGQGLTV SS	SEQ ID NO: 29	QSVLTQPPSASGTPGQ RVTISCSGSSSNIGRNA VNWYQQLPGTAPKLLI YASNMRVSGVPDRFSG SKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCSAWDDSQK VVVFGGGTKLTVL
12	SEQ ID NO: 12	EVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSNYM HWVRQAPGKGLEWVSS ISARSSYLYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARLA TRHVAFDIWGQGLTV VSS	SEQ ID NO: 30	QSVLTQPPSASGTPGQ RVTISCSGSSSNIGNNA VNWYQQLPGTAPKLLI YASNMRVPGVPDRFSG SKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCEAWDDSQK AVVFGGGTKLTVL

[0138]

13	SEQ ID NO: 13	MRAWIFFLLCLAGRALA QVQLMQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTSY WMHWVRQAPGQGLEW MGTIYPRNSNTDYNQKF KARVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCA RPLYYYLTSPPTLFWGQ GTLVTVSS	SEQ ID NO: 31	MRAWIFFLLCLAGRAL ADIQLTQSPSFLSASVG DRVITICKASQDVGTA VAWYQQKPGKAPKLL IYWASTRHTGVPSRFS GSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCQQAQKTYPF TFGSGTKLEIKR
14	SEQ ID NO: 14	EVQLVETGGGLIQPGGS LRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARTL HGIRAAAYDAFIIWGQGT LVTVSS	SEQ ID NO: 32	EIVLTQSPGTLSSLSPGE RATLSCRASQSVGINLS WYQQKPGQAPRLLIY GASHRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCHQYSQSPPF FGGGTKVEIK
15	SEQ ID NO: 15	EVQLVETGGGLIQPGGS LRLSCAASGFTFSFYAM SWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARTL HGIRAAAYDAFIIWGQGT LVTVSS	SEQ ID NO: 33	EIVLTQSPGTLSSLSPGE RATLSCRASQSVGINLS WYQQKPGQAPRLLIY GASHRLTGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCHQYSQPPPF GGGGTKVEIK
16	SEQ ID NO: 16	EVQLVETGGGLIQPGGS LRLSCAASGFTFSFYAM SWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARTIH GIRAAAYDAFIIWGQGT LVTVSS	SEQ ID NO: 34	EIVLTQSPGTLSSLSPGE RATLSCRASQSVGINLS WYQQKPGQAPRLLIY GASHRLTGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCHQYSQPPPF GGGGTKVEIK
17	SEQ ID NO: 17	EVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYWM YWVRQAPGKGLEWVA AITPNAGEDYYPEVKG RFTISRDNKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARG	SEQ ID NO: 35	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITICKASQNINKH LDWYQQKPGKAPKLLI YFTNNLQIGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCFQYNQGW

		HYYYTSYSLGYWGQGT LVTVSS		FGGGTKVEIK	
[0139]	18	SEQ ID NO: 18	EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSS FMS WVRQAPGKGLEWV ATI SGGKFTFDYVDSV KGRF TISRDDSKNTLYL QMNS LRAEDTAVYYCTR ANY GNWFFEYWGQGT LVT V SS	SEQ ID NO: 36	EIVLTQSPATLSLSP GPE RATLSCRASESVAK Y G LSLLNWFQQKPGQP R R LLIFAASNRGSGIP ARF SGSGSGTDFLTIS SLE PEDFAVYYCQQSKE VP FTFGQGTKVEIK

[0140] 已经报道了所有这些结合分子均结合IL-33,并且抑制或减弱ST-2信号传导。因此,与表1中披露的抗体中的任一项竞争结合redIL-33的结合分子或其结合片段可以抑制或减弱ST-2信号传导。

[0141] 如果结合分子或其片段以在某种程度上阻断参考抗体与给定表位结合的程度与该表位结合,则称该结合分子或其片段竞争性抑制参考抗体与该表位的结合。竞争性抑制可通过本领域已知的任何方法确定,例如固相测定(诸如竞争ELISA测定)、解离增强镧系荧光免疫测定(DELFIAR[®],珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))和放射性配体结合测定。例如,技术人员可以通过使用体外竞争性结合测定,例如以下实例中详细描述的HTRF测定,来确定结合分子或其片段是否竞争结合redIL-33。例如,技术人员可以用供体荧光团标记表1的重组抗体,并且将多个浓度的重组抗体与受体荧光团标记的redIL-33的固定浓度样品混合。随后,可以测量每个样品内供体与受体荧光团之间的荧光共振能量转移,以确定结合特征。为了阐明竞争性结合分子,技术人员可以首先将各种浓度的测试结合分子与固定浓度的表1的标记抗体混合。当将混合物与标记的IL-33一起孵育时,与仅标记抗体的阳性对照相比,FRET信号的减少指示竞争性结合IL-33。可以称结合分子或其片段将参考抗体与给定表位的结合竞争性抑制至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%。

[0142] 适合地,IL-33结合分子可以竞争性地抑制IL-33与结合分子33_640087-7B的结合(如WO2016/156440中所述)。适合地,WO 2016/156440披露了33_640087-7B以特别高的亲和力与redIL-33结合并且减弱了ST-2和RAGE依赖性IL-33信号传导。因此,竞争性抑制IL-33与结合分子33_640087-7B的结合的结合分子极有可能抑制redIL-33和oxIL-33信号传导两者,因此特别适用于本文所述的方法。

[0143] 在一些实例中,抑制或减弱IL-33活性的结合分子选自以下抗IL-33抗体中的任一项:33_640087-7B(如WO 2016/156440中所述)、称为埃托克单抗(Etokimab)的ANB020(如WO 2015/106080中所述)、9675P(如US 2014/0271658中所述)、A25-3H04(如US 2017/0283494中所述)、Ab43(如WO 2018/081075中所述)、IL33-158(如US 2018/0037644中所述)、10C12.38.H6、87Y.581 1gG4(如WO 2016/077381中所述)或其结合片段,将这些文献各自通过引用并入本文。在表1中引用了所有这些抗体。

[0144] 适合地,该结合分子或抗原结合片段包含选自表1的可变重结构域(VH)和可变轻

结构域 (VL) 配对的互补决定区 (CDR)。配对1对应于WO 2016/156440中所述的33_640087-7B的VH和VL结构域序列。配对2-7对应于US 2014/0271658中所述的抗体的VH和VL结构域序列。配对8-12对应于US 2017/0283494中所述的抗体的VH和VL结构域序列。配对13对应于WO 2015/106080中所述的ANB020的VH和VL结构域序列。配对14-16对应于WO 2018/081075中所述的抗体的VH和VL结构域序列。配对17对应于US 2018/0037644中所述的IL33-158的VH和VL结构域序列。配对18对应于WO 2016/077381中所述的10C12.38.H6.87Y.581 IgG4的VH和VL结构域序列。

[0145] 适合地, IL-33结合分子是包含以下的抗体或抗原结合片段: 包含SEQ ID NO:1的序列的重链可变区 (HCVR) 的互补决定区 (CDR), 和包含SEQ ID NO:19的序列的轻链可变区 (LCVR) 的互补决定区 (CDR)。这些CDR对应于源自33_640087-7B的CDR (如WO 2016/156440中所述), 33_640087-7B结合还原型IL-33并抑制其转化为氧化型IL-33。在WO 2016/156440中充分描述了33_640087-7B, 将该文献通过引用并入本文。因此, 此抗体可以特别适用于本文所述的方法中以抑制或减弱ST-2和RAGE信号传导两者。

[0146] 适合地, IL-33结合分子是包含以下的抗体或抗原结合片段: 包含SEQ ID NO:7的序列的重链可变区 (HCVR) 的互补决定区 (CDR), 和包含SEQ ID NO:25的序列的轻链可变区 (LCVR) 的互补决定区 (CDR)。这些CDR对应于源自抗体9675P的那些CDR。在US 2014/0271658中充分描述了9675P, 将该文献通过引用并入本文。

[0147] 适合地, IL-33结合分子是包含以下的抗体或抗原结合片段: 包含SEQ ID NO:11的序列的重链可变区 (HCVR) 的互补决定区 (CDR), 和包含SEQ ID NO:29的序列的轻链可变区 (LCVR) 的互补决定区 (CDR)。这些CDR对应于源自抗体A25-3H04的那些CDR。在US 2017/0283494中充分描述了A25-3H04, 将该文献通过引用并入本文。

[0148] 适合地, IL-33结合分子是包含以下的抗体或抗原结合片段: 包含SEQ ID NO:13的序列的重链可变区 (HCVR) 的互补决定区 (CDR), 和包含SEQ ID NO:31的序列的轻链可变区 (LCVR) 的互补决定区 (CDR)。这些CDR对应于源自抗体ANB020的那些CDR。在WO 2015/106080中充分描述了ANB020, 将该文献通过引用并入本文。

[0149] 适合地, IL-33结合分子是包含以下的抗体或抗原结合片段: 包含SEQ ID NO:16的序列的重链可变区 (HCVR) 的互补决定区 (CDR), 和包含SEQ ID NO:34的序列的轻链可变区 (LCVR) 的互补决定区 (CDR)。这些CDR对应于源自抗体Ab43的那些CDR。在WO 2018/081075中充分描述了Ab43, 将该文献通过引用并入本文。

[0150] 适合地, IL-33结合分子是包含以下的抗体或抗原结合片段: 包含SEQ ID NO:17的序列的重链可变区 (HCVR) 的互补决定区 (CDR), 和包含SEQ ID NO:35的序列的轻链可变区 (LCVR) 的互补决定区 (CDR)。这些CDR对应于源自抗体IL33-158的那些CDR。在US 2018/0037644中充分描述了IL33-158, 将该文献通过引用并入本文。

[0151] 适合地, IL-33结合分子是包含以下的抗体或抗原结合片段: 包含SEQ ID NO:18的序列的重链可变区 (HCVR) 的互补决定区 (CDR), 和包含SEQ ID NO:36的序列的轻链可变区 (LCVR) 的互补决定区 (CDR)。这些CDR对应于源自抗体10C12.38.H6.87Y.581 IgG4的那些CDR。在WO 2016/077381中充分描述了10C12.38.H6.87Y.581 IgG4, 将该文献通过引用并入本文。

[0152] 适合地, 技术人员已知本领域中可用于鉴定抗体或其抗原结合片段的重链和轻链

可变区内的CDR的方法。适合地,技术人员可以例如进行基于序列的注释。CDR之间的区域通常是高度保守的,并且因此,可以使用逻辑规则来确定CDR位置。技术人员可以使用用于常规抗体的一组基于序列的规则(Pantazes和Maranas,Protein Engineering,Design and Selection[蛋白质工程化、设计和选择],2010),可替代地或另外,他还可以基于多序列比对来完善规则。可替代地,技术人员可以使用BLAST+的BLASTP指令将抗体序列与根据Kabat、Chothia或IMGT方法操作的公众可获得的数据库进行比较,以鉴定最类似的注释序列。这些方法中的每一种均设计了独特的残基编号方案,根据该编号方案对高变区残基进行编号,然后根据某些关键位置确定六个CDR中的每一个的起始和结束。在例如与最类似的注释序列比对后,可以将CDR从注释序列外推至非注释序列,从而鉴定CDR。合适的工具/数据库是:例如,Kabat数据库、Kabatman、Scalinger、IMGT、Abnum。

[0153] 适合地,IL-33治疗剂是包含选自表1的可变重结构域(VH)和可变轻结构域(VL)配对的抗体或抗原结合片段。

[0154] 因此,适合地,IL33抗体或抗原结合片段包含SEQ ID NO:1的序列的VH结构域和SEQ ID NO:19的序列的VL结构域。

[0155] 因此,适合地,IL33抗体或抗原结合片段包含SEQ ID NO:7的序列的VH结构域和SEQ ID NO:25的序列的VL结构域。

[0156] 因此,适合地,IL33抗体或抗原结合片段包含SEQ ID NO:11的序列的VH结构域和SEQ ID NO:29的序列的VL结构域。

[0157] 因此,适合地,IL33抗体或抗原结合片段包含SEQ ID NO:13的序列的VH结构域和SEQ ID NO:31的序列的VL结构域。

[0158] 因此,适合地,IL33抗体或抗原结合片段包含SEQ ID NO:16的序列的VH结构域和SEQ ID NO:34的序列的VL结构域。

[0159] 因此,适合地,IL33抗体或抗原结合片段包含SEQ ID NO:17的序列的VH结构域和SEQ ID NO:35的序列的VL结构域。

[0160] 因此,适合地,IL33抗体或抗原结合片段包含SEQ ID NO:18的序列的VH结构域和SEQ ID NO:36的序列的VL结构域。

[0161] 因此,适合地,治疗剂是结合分子,该结合分子可以包含例如独立地选自SEQ ID NO:1、7、11、13、16、17和18的重链可变区中的3个CDR。

[0162] 适合地,IL-33治疗剂是结合分子,该结合分子包含根据SEQ ID NO:1的重链可变区中的3个CDR。

[0163] 适合地,IL-33治疗剂是结合分子,该结合分子可以包含独立地选自SEQ ID NO:19、25、29、31、34、35和36的轻链可变区中的3个CDR。

[0164] 适合地,IL-33治疗剂是结合分子,该结合分子包含根据SEQ ID NO:19的轻链可变区中的3个CDR。

[0165] 因此,适合地,IL-33治疗剂是结合分子,该结合分子可以包含例如独立地选自SEQ ID NO:1、7、11、13、16、17和18的重链可变区中的3个CDR,以及例如独立地选自SEQ ID NO:19、25、29、31、34、35和36的轻链可变区中的3个CDR。

[0166] 因此,适合地,IL-33治疗剂是结合分子,该结合分子包含根据SEQ ID NO:1的重链可变区中的3个CDR,以及根据SEQ ID NO:19的轻链可变区中的3个CDR。

[0167] 因此,适合地,IL-33治疗剂是结合分子,该结合分子可以包含具有VH CDR 1-3的可变重结构域(VH)和可变轻结构域(VL),VH CDR 1-3分别具有SEQ ID NO:37、38和39的序列,其中一个或多个VHCDR具有3个或更少的单个氨基酸取代、插入和/或缺失。

[0168] 因此,适合地,IL-33治疗剂是结合分子,该结合分子包含VH结构域,该VH结构域分别包含SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39的VHCDR 1-3。

[0169] 因此,适合地,IL-33治疗剂是结合分子,该结合分子包含VH结构域,该VH结构域包含分别由SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39组成的VHCDR 1-3。

[0170] 因此,适合地,IL-33治疗剂是结合分子,该结合分子可以包含具有VL CDR 1-3的可变重结构域(VH)和可变轻结构域(VL),VL CDR 1-3分别具有SEQ ID NO:40、41和42的序列,其中一个或多个VLCDR具有3个或更少的单个氨基酸取代、插入和/或缺失。

[0171] 因此,适合地,IL-33治疗剂是结合分子,该结合分子包含VL结构域,该VL结构域分别包含SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的VLCDR 1-3。

[0172] 因此,适合地,IL-33治疗剂是结合分子,该结合分子包含VL结构域,该VL结构域包含分别由SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42组成的VLCDR 1-3。

[0173] 因此,适合地,IL-33治疗剂是结合分子,该结合分子可以包含具有SEQ ID NO:37的序列的VHCDR1、具有SEQ ID NO:38的序列的VHCDR2、具有SEQ ID NO:39的序列的VHCDR3、具有SEQ ID NO:40的序列的VLCDR1、具有SEQ ID NO:41的序列的VLCDR2、以及具有SEQ ID NO:42的序列的VLCDR3。

[0174] 因此,适合地,IL-33治疗剂是包含VH和VL的抗体或其结合片段,其中VH具有与根据SEQ ID NO:1、7、11、13、16、17和18的VH具有至少90%,例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0175] 因此,适合地,IL-33治疗剂是包含VH和VL的抗体或其结合片段,其中VH具有与根据SEQ ID NO:1的VH具有至少90%,例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0176] 因此,适合地,IL-33治疗剂是包含VH和VL的抗体或其结合片段,其中以上披露的VH具有以下序列,其中框架中的1、2、3或4个氨基酸缺失、被不同氨基酸插入和/或独立地替换。

[0177] 因此,适合地,IL-33治疗剂是包含VH和VL的抗体或其结合片段,其中VL具有与根据SEQ ID NO:19、25、29、31、34、35和36的VL具有至少90%,例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0178] 因此,适合地,IL-33治疗剂是包含VH和VL的抗体或其结合片段,其中VL具有与根据SEQ ID NO:19的VL具有至少90%,例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0179] 因此,适合地,IL-33治疗剂是包含VH和VL的抗体或其结合片段,其中以上披露的VL具有以下序列,其中框架中的1、2、3或4个氨基酸独立地缺失、被不同氨基酸插入和/或替换。

[0180] 因此,适合地,IL-33治疗剂是包含VH和VL的抗体或其结合片段,其中VH具有与根据SEQ ID NO:1、7、11、13、16、17和18的VH具有至少90%,例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,并且VL具有与根据SEQ ID NO:19、25、

29、31、34、35和36的VL具有至少90%，例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0181] 因此，适合地，IL-33治疗剂是包含VH和VL的抗体或其结合片段，其中VH具有由SEQ ID NO:1、7、11、13、16、17和18组成的氨基酸序列，并且VL具有由SEQ ID NO:19、25、29、31、34、35和36组成的氨基酸序列。

[0182] 因此，适合地，IL-33治疗剂是包含VH和VL的抗体或其结合片段，其中VH具有由SEQ ID NO:1组成的氨基酸序列，并且VL具有由SEQ ID NO:19组成的氨基酸序列。

[0183] 适合地，该结合分子可以选自：抗体、其抗原结合片段、适配体、参考抗体分子的至少一个重链或轻链CDR、以及来自一个或多个参考抗体分子的至少六个CDR。

[0184] 适合地，IL-33治疗剂是抗体或其结合片段。适合地，IL-33治疗剂是抗IL-33抗体或其结合片段。适合地，抗IL-33抗体或其结合片段特异性结合IL-33，尤其是还原型IL-33或氧化型IL-33。

[0185] 适合地，IL-33治疗剂适合地通过抑制氧化型IL-33的形成来抑制氧化型IL-33的活性。适合地，IL-33治疗剂抑制还原型IL-33转化成氧化型IL-33。

[0186] 适合地，IL-33结合分子或其抗原结合片段是还原型IL-33结合分子或其抗原结合片段。换句话说，IL-33结合分子或其抗原结合片段抑制或减弱还原型IL-33的活性。适合地，减弱是通过结合还原型IL-33来进行。适合地，通过结合还原型IL-33，该结合分子或其抗原结合片段还适合地通过阻止还原型IL-33转化成氧化型IL-33形式来减弱氧化型IL-33的活性。

[0187] 适合地，对氧化型IL-33的活性的抑制下调或关闭RAGE依赖性信号传导和/或RAGE介导的效应。

[0188] 适合地，IL-33治疗剂具有以上所述的所有抑制作用。适合地，还原型IL-33治疗剂具有以上所述的所有抑制作用。

[0189] 适合地，IL-33治疗剂是还原型IL-33结合分子或其片段。适合地，IL-33治疗剂是还原型IL-33抗体或其结合片段，适合地是抗还原型IL33抗体或其结合片段。

[0190] 适合地，治疗剂可以通过结合ST-2来抑制或减弱IL-33信号传导。此类治疗剂在本文称为“ST-2抑制剂”。ST2抑制剂可以是本领域已知的任何此类抑制剂，例如GSK3772847 (WO 2013/165894中所述) 和RG6149 (WO 2013/173761)，将这些文献通过引用并入本文。ST-2抑制剂可以与抑制或减弱RAGE信号传导的第二治疗剂组合使用。在需要潜在病理学的情况下，使用不同治疗剂来抑制ST-2信号传导和RAGE信号传导可能对于递送不同剂量以抑制这两个通路是有利的。

[0191] 配制品

[0192] 在本文所述的医学用途和方法中的治疗剂可以按药物组合物的形式施用于患者。

[0193] 适合地，本文对“治疗剂”的任何引用还可以指药物组合物，该药物组合物包含例如减弱或抑制redIL-33和/或oxIL-33的活性的化学抑制剂或抗体或其抗原结合片段。适合地，药物组合物可以包含一种或多种治疗剂。

[0194] 适合地，在本文的医学用途和治疗方法方面，可以按用于体内治疗肾脏损伤(适合地糖尿病性肾病)的药学有效量施用治疗剂。

[0195] 适合地，“药学有效量”或“治疗有效量”的所述一种或多种治疗剂应意指一个量，

该量足以实现对redIL-33和oxIL-33活性的有效抑制,并且足以实现益处,例如改善如在本文的医学用途/方法中列举的疾病或病症的症状。

[0196] 适合地,一种或多种治疗剂或其药物组合物可以根据前述治疗方法/医学用途,按足以产生治疗效果的量施用于人或其他动物。

[0197] 适合地,一种或多种治疗剂或其药物组合物可以按常规剂型来施用于这样的人或其他动物,该剂型是通过根据已知技术,将一种或多种治疗剂与常规药学上可接受的载体或稀释剂相组合来制备的。

[0198] 本领域技术人员应认识到,药学上可接受的载体或稀释剂的形式和特征是通过与其组合的一种或多种活性成分的量、施用途径以及其他熟知变量来确定。

[0199] 可以与载体材料组合以产生单一剂型的一种或多种治疗剂的量将根据所治疗的受试者和具体的施用方式而变化。适合地,药物组合物可以以单次剂量、多次剂量或经确定时间段以输注形式施用。适合地,也可以调整剂量方案以提供最佳期望反应(例如,治疗性或防治性反应)。

[0200] 适合地,将配制一种或多种治疗剂,以有助于施用并且促进该一种或多种治疗剂的稳定性。

[0201] 适合地,药物组合物被配制为包含药学上可接受的、无毒性的、无菌的载体,诸如生理盐水、无毒性的缓冲剂、防腐剂等。适合地,药物组合物可以包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液以及乳液。用于本文披露的治疗方法的适合配制品描述于Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿氏药物科学](麦克出版公司(Mack Publishing Co.))第16版(1980)。

[0202] 适合地,用于可注射用途的药物组合物可以包括无菌水溶液(在可溶于水时)或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。在这样的情况下,该组合物必须是无菌的并且必须具有达到容易注射的程度的流动性。在制造和存储条件下它应当是稳定的,并且将被保存以防止微生物(诸如细菌和真菌)的污染作用。适合地,载体可以是含有以下物质的溶剂或分散介质:例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。可以例如通过使用涂层(诸如卵磷脂)、通过在分散液的情况下维持所需颗粒大小以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。适合地,阻止微生物的作用可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来实现。在许多情况下,在药物组合物中适合地包括等渗剂,例如,糖、多元醇(诸如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的延长吸收。

[0203] 适合地,无菌可注射溶液可以通过在具有本文所列举的成分之一或组合的适当溶剂中并入所需量的活性化合物(例如,本文所定义的一种或多种治疗剂,单独地或与其他活性剂组合),视需要随后过滤灭菌来制备。通常,通过将活性化合物并入无菌媒剂来制备分散液,该无菌媒剂含有基础分散介质以及来自以上列举的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法可以是真空干燥和冷冻干燥,这些方法产生活性成分的粉末以及来自其以前的无菌过滤溶液的任何其他期望成分。

[0204] 将一种或多种治疗剂或其药物组合物施用至有需要的受试者的方法是本领域技术人员所熟知的或本领域技术人员容易确定的。

[0205] 适合地,一种或多种治疗剂或其药物组合物的施用途径可以是例如口服、肠胃外、通过吸入或局部施用。适合地,如本文使用的术语肠胃外包括例如静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、直肠或经阴道施用。

[0206] 适合地,可以按可接受的剂型,包括例如胶囊、片剂、水性悬浮液或溶液,口服施用一种或多种治疗剂或其药物组合物。

[0207] 适合地,可以通过鼻气雾剂或吸入剂施用一种或多种治疗剂或其药物组合物。使用苯醇或其他合适的防腐剂、提高生物利用度的吸收促进剂和/或其他常规增溶剂或分散剂,这样的组合物可以作为盐水中的溶液来制备。

[0208] 适合地,肠胃外配制品可以是单次推注剂量,输注或上样推注剂量,随后是维持剂量。这些组合物可以按特定的固定或可变的间隔施用,例如每天一次,或基于“根据需要”施用。

[0209] 适合地,将一种或多种治疗剂或其药物组合物直接递送至疾病或病症的部位,例如肾脏,由此增加患病组织对治疗剂的暴露。适合地,将一种或多种治疗剂或其药物组合物直接施用至疾病或病症的部位。因此,适合地,将一种或多种治疗剂或其药物组合物施用至肾脏损伤的部位。

[0210] 因此,适合地,将一种或多种治疗剂或其药物组合物配制为液体组合物。

[0211] 适合地,可以将上文所述的用于制备本文所述的药物组合物的组分以试剂盒的形式包装和出售。此种试剂盒适合地具有标签或包装说明书以指示相关药物组合物可用于治疗患有或倾向于患有疾病或障碍的受试者。

[0212] 适合地,将用于液体配制品的组分处理,填充至容器诸如安瓿、袋子、瓶子、注射器或小瓶中,并根据本领域中已知的方法密封在无菌条件下。适合地,这些容器可以被加压,适合地,它们可以是气雾剂容器。这些容器可以包括在如以上所述的试剂盒中。适合地,试剂盒可以进一步包含吸入器装置。适合地,吸入器装置包含本文所述的一种或多种治疗剂或药物组合物,或是可操作的以包含如以上所述的容器,该容器可以包含本文所述的一种或多种治疗剂或药物组合物。

[0213] 概述

[0214] 除非另外说明,本发明的实践将使用本领域技术范围内的化学、生物化学、分子生物学、免疫学和药理学的常规方法。此类技术在文献中得到充分解释。参见例如参考文献(Gennaro(2000)Remington:The Science and Practice of Pharmacy.[雷明顿:药物科学与实践],第20版,ISBN:0683306472;Molecular Biology Techniques:An Intensive Laboratory Course[分子生物学技术:密集实验课],(Ream等人编辑,1998,学术出版社(Academic Press));Methods In Enzymology[酶学方法](S.Colowick和N.Kaplan编辑,学术出版社公司(Academic Press,Inc.));Handbook of Experimental Immunology[实验免疫学手册],卷I-IV(D.M.Weir和C.C.Blackwell,编辑,1986,英国布莱克威尔出版公司(Blackwell Scientific Publications));Sambrook等人(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第3版(冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press));Handbook of Surface and Colloidal Chemistry[表面和胶体化学手册](Birdi,K.S.编辑,CRC出版社(CRC Press),1997);Ausubel等人(编辑)(2002)Short protocols in molecular biology[精编分子生物学实验指南],第5版

(Current Protocols[当代实验指南]);PCR(Introduction to Biotechniques Series)[PCR(生物技术导论系列)],第2版(Newton和Graham编辑,1997,施普林格出版社(Springer Verlag))。

[0215] 术语“包含(comprising)”涵盖“包括(including)”以及“由.....组成(consisting)”,例如,组合物“包含”X可以仅由X组成,或可以包括其他物质,例如X+Y。

[0216] 相对于数值x的术语“约”是任选的,并且意指例如 $x \pm 10\%$ 。

[0217] 词语“基本上”并不排除“完全地”,例如“基本上不含”Y的组合物可以完全不含Y。必要时,词语“基本上”可以从本发明的定义中省略。

[0218] 提及两个核苷酸序列之间的序列同一性百分比意指当进行比对时,在比较两个序列时,核苷酸或氨基酸的百分比是相同的。可以使用本领域已知的软件程序,例如Current Protocols in Molecular Biology[当前分子生物学方法](F.M.Ausubel等人编辑,1987)增刊30中的部分7.7.18所述的那些,确定此比对以及同源性或序列同一性百分比。通过Smith-Waterman同源性搜索算法,使用空位开放罚分为12且空位延伸罚分为2的仿射空位搜索(BLOSUM 62矩阵)确定优选的比对。Smith-Waterman同源性搜索算法披露于Smith和Waterman(1981)Adv.Appl.Math.[应用数学进展]2:482-489中。

[0219] 除非明确声明,包括多个步骤的工艺或方法可以在该方法开始或结束时包括另外的步骤,或可以包括另外的插入步骤。而且,如果适当,步骤可以组合、省略或以替代顺序进行。

[0220] 本文描述了本发明的不同实施例。应当理解,各个实施例中指定的特征可以与其他指定特征组合以提供另外的实施例。具体而言,本文突出显示为是合适的、典型的或优选的实施例可以彼此组合(除了当它们是相互排的时候)。

[0221] 实施例

[0222] 实施例1针对治疗肾脏损伤的方法,该方法包括施用抑制ST2信号传导和RAGE信号传导两者的治疗,其中所述治疗包括一种或多种治疗剂,例如1种或2种治疗剂。

[0223] 实施例2针对根据实施例1所述的方法,该方法减弱或抑制还原型IL-33蛋白(redIL-33)的活性,并且由此抑制ST2信号传导。

[0224] 实施例3针对根据实施例1或2所述的方法,该方法减弱或抑制氧化型IL-33蛋白(oxIL-33)的活性,并且由此抑制RAGE信号传导。

[0225] 实施例4针对根据实施例1至3中任一项所述的方法,其中该肾脏损伤包括炎症。

[0226] 实施例5针对根据实施例4所述的方法,其中该肾脏损伤是炎性的。

[0227] 实施例6针对根据实施例4或5所述的方法,其中该肾脏损伤选自糖尿病性肾病、纤维化、肾小球肾炎(例如非增生性(例如轻微病变性肾小球肾炎、膜型肾小球肾炎、局灶性节段性肾小球硬化)或增生性(例如IgA肾病、膜性增生性肾小球肾炎、感染后肾小球肾炎、和急进性肾小球肾炎[例如肺出血肾炎综合征和血管炎性障碍{其包括韦格纳肉芽肿病和显微镜下多血管炎}]))、系统性红斑狼疮、蛋白尿、单侧输尿管梗阻、奥尔波特综合征、多囊肾病(PCKD)、高血压性肾小球硬化症、慢性肾小球硬化症、慢性梗阻性尿路病、慢性肾小管-间质肾炎和缺血性肾病。

[0228] 实施例7针对根据实施例1至6中任一项所述的方法,其中该肾脏损伤是糖尿病性肾病。

[0229] 实施例8针对根据实施例1至7中任一项所述的方法,其中该一种或多种治疗剂独立地选自化学抑制剂以及抗体或其抗原结合片段。

[0230] 实施例9针对根据实施例8所述的方法,其中该一种或多种治疗剂包含抗体或其抗原结合片段。

[0231] 实施例10针对根据实施例8或9所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合IL-33。

[0232] 实施例11针对根据实施例10所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段具有选自表1的可变重结构域(VH)和可变轻结构域(VL)配对的互补决定区(CDR)。

[0233] 实施例12针对根据实施例10或11所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合redIL-33,并且减弱或抑制redIL-33的活性,由此抑制ST2信号传导。

[0234] 实施例13针对根据实施例10至12中任一项所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段阻止氧化型IL-33结合RAGE,由此抑制RAGE-EGFR信号传导。

[0235] 实施例14针对根据实施例10至13中任一项所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段以小于或等于100pM、或小于或等于10pM,例如小于或等于1pM,例如0.5pM,尤其是0.05pM的结合亲和力(例如当使用KinExA进行测量时)结合redIL-33。

[0236] 实施例15针对根据实施例10至14中任一项所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段以大于或等于 $10^5\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5\times 10^5\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、或 $5\times 10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 或 $10^7\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、尤其是大于或等于 $10^7\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 的k(on)结合redIL-33。

[0237] 实施例16针对根据实施例10至15中任一项所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段以小于或等于 $5\times 10^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 10^{-1}sec^{-1} 、 $5\times 10^{-2}\text{sec}^{-1}$ 、 10^{-2}sec^{-1} 、 $5\times 10^{-3}\text{sec}^{-1}$ 或 10^{-3}sec^{-1} 、尤其是小于或等于 10^{-3}sec^{-1} 的k(off)结合redIL-33。

[0238] 实施例17针对根据实施例10至16中任一项所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段减弱或抑制oxIL-33的活性,并且由此抑制RAGE信号传导。

[0239] 实施例18针对根据实施例9至17中任一项所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:37的序列的VHCDR1、具有SEQ ID NO:38的序列的VHCDR2、具有SEQ ID NO:39的序列的VHCDR3、具有SEQ ID NO:40的序列的VLCDR1、具有SEQ ID NO:41的序列的VLCDR2、和具有SEQ ID NO:42的序列的VLCDR3。

[0240] 实施例19针对根据实施例9至18中任一项所述的方法,其中该抗体或所述抗体或其抗原结合片段的抗原结合VH和VL分别包含与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:19具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0241] 实施例20针对根据实施例19所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:1的序列的VH和具有SEQ ID NO:19的序列的VL。

[0242] 实施例21针对根据实施例8至20中任一项所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段是人抗体、嵌合抗体、和人源化抗体。

[0243] 实施例22针对根据实施例8至21中任一项所述的方法,其中该抗体或者该抗体或其抗原结合片段是天然存在的抗体、scFv片段、Fab片段、F(ab')₂片段、微型抗体、双体抗体、三体抗体、四体抗体或单链抗体。

[0244] 实施例23针对根据实施例8至22中任一项所述的方法,其中该抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体。

[0245] 实施例24针对根据实施例1至23中任一项所述的方法,其中使用了至少两种治疗剂,例如其中一种治疗剂抑制ST2信号传导,并且第二种治疗剂抑制RAGE信号传导,例如其中该治疗剂阻止一种或多种配体与一种或多种受体结合。

[0246] 实施例25针对根据实施例1至24中任一项所述的方法,其中使用了一种治疗剂,其中该治疗剂抑制ST2和RAGE信号传导两者,例如其中该药剂阻止该配体与这两种受体结合。

[0247] 实施例26针对根据任一前述实施例所述的方法,其中该RAGE信号传导是RAGE-EGFR信号传导。

[0248] 实施例27针对根据实施例26所述的方法,其中抑制RAGE-EGFR信号传导下调或抑制RAGE-EGFR介导的效应。

[0249] 实施例28针对根据实施例27所述的方法,其中该RAGE-EGFR介导的效应是异常上皮重塑。

[0250] 实施例29针对用于治疗肾脏损伤或用于在制造用于治疗肾脏损伤的药物中使用的治疗剂,该治疗剂抑制或减弱还原型IL-33的活性,从而抑制或减弱ST2信号传导,其中该治疗进一步包括抑制或减弱氧化型IL-33的活性,从而抑制或减弱RAGE信号传导。

[0251] 实施例30针对用于治疗肾脏损伤或用于在制造用于治疗肾脏损伤的药物中使用的治疗剂,该治疗剂抑制或减弱氧化型IL-33的活性,从而抑制或减弱RAGE信号传导,其中该治疗进一步包括抑制或减弱还原型IL-33的活性,从而抑制或减弱ST2信号传导。

[0252] 实施例31针对抑制或减弱还原型IL-33的活性从而抑制或减弱ST2信号传导的治疗剂、以及抑制或减弱氧化型IL-33的活性从而抑制或减弱RAGE信号传导的治疗剂,这两种治疗剂用于治疗肾脏损伤,或用于在制造用于治疗肾脏损伤的药物中使用。

[0253] 实施例32针对用于治疗肾脏损伤或用于在制造用于治疗肾脏损伤的药物中使用的治疗剂,该治疗剂抑制或减弱还原型IL-33和氧化型IL-33的活性,从而抑制或减弱ST2信号传导和RAGE信号传导。

[0254] 实施例33针对用于根据实施例29至32中任一项所述使用或使用的治疗剂,该治疗剂是抗体或其抗原结合片段。

[0255] 实施例34针对用于根据实施例33所述使用的治疗剂,其中该抗体或其抗原结合片段如实施例10至23中任一项所表征。

[0256] 实施例35针对用于根据实施例29至34中任一项所述使用的治疗剂,其中该肾脏损伤如实施例4至7中任一项所表征。

[0257] 实施例36针对用于根据实施例29至35中任一项所述使用的治疗剂,其中该RAGE信号传导是RAGE-EGFR信号传导。

[0258] 实施例37针对用于根据实施例29至36中任一项所述使用的治疗剂,其中抑制或减弱RAGE-EGFR信号传导下调或抑制RAGE-EGFR介导的效应。

[0259] 实施例38针对用于根据实施37中任一项所述使用的治疗剂,其中该RAGE-EGFR介导的效应是异常上皮重塑。

[0260] 实施例39针对根据实施例9至26中任一项所述的方法,或针对用于据实施例31至38中任一项所述使用的治疗剂,其中该抗体或其抗原结合片段与33_640087-7B竞争结合redIL-33,例如,如通过均相时间分辨荧光所确定的。

[0261] 实例

[0262] 实例1-评估IL-33生物学在人糖尿病性肾病中的作用

[0263] 已经显示,在肾脏疾病的背景下,一系列炎症介质上调(Thomas等人,Nat reviews Dis Primers.[自然综述疾病导论],2015)。使用以下所述的方法来确定已知涉及肾脏疾病的其他炎症介质中白介素-33(IL-33)的表达水平如何分级。

[0264] 分析了来自患有糖尿病性肾病的患者的三个不同组群的公开的RNA转录组材料(图1:欧洲肾脏cDNA库组群(图1A),Hu 2013组群(图1B)、和Woroniecka,2013组群(图1C))。测量肾小球和肾小管间质组织样品内的RNA表达水平。根据标准化的方法学,基于RNA序列计数读数进行转录组分析(Ju等人2013;Woroniecka等人2013)。

[0265] 从所有三个组群发现,在患有糖尿病性肾病(DN)的受试者的肾脏中,IL-33是最高过表达的细胞因子之一。在DN肾脏中,在肾小球和肾小管间质两者中,IL-33表达上调(图1)。出人意料地,发现在至少一个组群的糖尿病性肾病患者的肾小球中,IL-33同源受体ST2(IL1RL1)的表达下调(图2B)。先前已经显示,与体内的其他组织相比,在肾脏(主要是肾皮质)中,ST2以比较高的水平表达(图2A)。这表明可以存在某种补偿机制以下调ST2表达,以阻止由于升高水平的IL-33产生的过度活性。

[0266] 实例2-评估IL-33在肾脏疾病的临床前模型中的肾脏中的水平

[0267] 使用以下所述的方法来评估在肾脏疾病的一系列临床前模型中,IL-33表达的水平是否升高。在源自II型糖尿病性肾病(T2DN)小鼠模型(获得自杰克逊实验室(Jackson laboratory)的db/db小鼠,目录号000697,它们已经进行单侧肾切除(unx))、高血压性肾病(HN)小鼠模型(通过手术干预移除BL6小鼠的5/6肾元质量获得的5/6Npx小鼠(参见Wang等人J.Vis.Exp.[可视化实验杂志],129;e55825;2017))、梗阻性肾病小鼠模型(ON)(获得自对BL6小鼠进行的手术单侧输尿管梗阻(参见Hesketh等人J.Vis.Exp.[可视化实验杂志],94;e52559;2014))和1型糖尿病性肾病(T1DN)的小鼠模型(使用化学消融与STZ,参见Chow等人69;73-80;Kidney International[国际肾脏期刊],2006)的肾脏样品中,将IL-33mRNA表达水平进行量化。

[0268] 按照公认的方案进行疾病建模(参见例如Wang等人J.Vis.Exp.[可视化实验杂志],129;e55825;2017;Hesketh等人J.Vis.Exp.[可视化实验杂志],94;e52559;2014;Chow等人69;73-80;Kidney International[国际肾脏期刊],2006;Zhou等人Am J Transl Res[美国翻译研究杂志]8:1339-54,2016;Yang等人Drug Discov Today Dis Models[今日药物发现:疾病模型],7;13-19;2010)。

[0269] 对于T2DN小鼠,在具有单侧肾切除的db/db小鼠(db/db+unx)中,在8周龄或在16周龄的db/db小鼠中,测定相对的IL-33肾脏表达水平。对于T1DN小鼠,在12周时,在使用STZ和不使用STZ的小鼠中,测定相对的IL-33肾脏表达水平。对于HN小鼠,在6周时,在5/6NPX后的小鼠和假手术小鼠中,测定相对的IL-33肾脏表达水平。对于ON小鼠,在7天时,在UUO小鼠和假手术对照中,测定相对的IL-33肾脏表达水平。制备样品用于根据Zhou等人Am J Transl Res[美国翻译研究杂志]8:1339-54,2016所述进行转录组分析。在每个组群中,将表达的相对水平归一化为GAPDH的相对表达水平。

[0270] 如图3中所示,在(a) T2DN db/db unx小鼠,(b) 使用STZ的T1DN小鼠,(c) 具有5/6NPX的HN小鼠和(d) 具有UUO的ON小鼠中,归一化的IL-33表达升高。在每个组群中,将表达水平归一化为GAPDH。这些结果显示,与对照相比,在肾脏疾病的所有临床前模型中,IL-33

在肾脏中的表达水平升高。

[0271] 实例3-在肾脏疾病的模型中,RAGE上调

[0272] 先前已经描述了存在两种生物活性形式的IL-33,即redIL-33和oxIL-33。如W0 2016/156440中所报道,还原型IL-33 (redIL-33) 显示为经由ST2信号传导通路进行信号传导的同种型。通过在天然半胱氨酸之间形成二硫键而将red-IL33转化成氧化型 (oxIL-33) 被提出为redIL-33信号传导的关闭机制。然而,在W0 2016/156440中,发明人表征了新的信号传导通路,通过该通路,oxIL-33经由RAGE刺激信号传导 (参见例如W0 2016/156440中的图58)。

[0273] 假定存在RAGE信号传导通路,确定在肾脏疾病的临床前模型中RAGE表达谱的变化。

[0274] 使用实例2中所述的相同模型和方法,将RAGE表达进行量化。如图4中所示,在(a) T2DN db/db unx小鼠,(b) 使用STZ的T1DN小鼠,(c) 具有5/6NPX的HN小鼠和(d) 具有UUO的ON小鼠中,归一化的RAGE表达升高。在每个组群中,将表达水平归一化为GAPDH。这些结果显示,在肾脏疾病的所有测试的临床前模型中,RAGE表达上调。

[0275] 实例4-RAGE和ST2信号传导促成体内肾脏功能障碍

[0276] 由于在CKD的临床前模型中观察到RAGE和IL-33这两者表达水平升高,所以确定了涉及这些分子的信号传导通路促成肾脏疾病的病理学。

[0277] 简言之,在以上所述的db/db单侧肾切除小鼠模型中,研究ST2和RAGE介导的细胞毒性效应。在单独的小鼠中,阻断了ST2和RAGE依赖性信号传导。通过监测尿液中白蛋白的浓度来评估肾脏受损(蛋白尿)。蛋白尿被测量为:尿液中归一化为肌酸酐的浓度(以补偿尿液浓度变化)的白蛋白的量。此值称为白蛋白:肌酸酐比率(UACR)。

[0278] 如图5中所示进行该研究。简言之,在第7周,将小鼠进行单侧肾切除,以加速肾脏受损。向小鼠给予10mg/Kg 3x/周的抗RAGE hu-IgG1、抗ST2 muIgG1或用作阴性对照的huNUP228 IgG1。在第10、13和15天时收集尿液样品,并且使用Cobas®免疫化学测定白蛋白和肌酸酐水平。还通过使用系膜扩张、细胞核的缺乏和减小毛细血管腔的空间的内科病理学评分来测定肾小球受损。

[0279] 结果显示,阻断ST2和RAGE信号传导两者都导致UACR评分的显著降低(图6和图7)。图8还证明,与阴性对照相比,通过阻断ST2信号传导实现了肾小球受损的显著减少(*指示与同型对照相比,显著更小($P < 0.05$)的GDS)。

[0280] 实例5-氧化型IL-33驱动RAGE和EGFR之间的信号传导复合物的形成

[0281] 在Cohen,E.S.等人Nat. Commun. [自然通讯]6:8327 (2015) 中,描述了氧化型二硫键键合形式的IL-33 (oxIL-33) 的发现。显示oxIL-33并不结合ST2或激活ST2依赖性信号传导。随后(参见W0 2016156440A1),显示oxIL-33结合晚期糖基化终产物的受体(RAGE),并且以RAGE依赖性方式进行信号传导,以激活STAT5并且影响上皮细胞迁移。

[0282] 为了进一步探索oxIL-33的功能,用处于还原或氧化形式的IL-33 (redIL-33和oxIL-33) 刺激上皮细胞,并且研究信号传导通路。本文显示,oxIL-33是晚期糖基化终产物的受体(RAGE)和表皮生长因子受体(EGFR)的复合物的新型配体,从而对上皮功能产生深远的影响。

[0283] 1. IL33的人成熟和半胱氨酸突变变体的克隆和表达

[0284] 通过引物延伸PCR合成编码人IL-33成熟组分(112-270)(登录号(UniProt)095760)(也称为IL33-01或IL-33)和4个半胱氨酸残基突变为丝氨酸的变体(也称为IL33-16或IL-33[C->S])的cDNA分子,并将其克隆至pJexpress 411(DNA 2.0)中。修饰野生型(WT)和突变型IL-33编码序列以在蛋白质的N-末端含有10xHis、Avitag和因子Xa蛋白酶切割位点(MHHHHHHHHHAAGLNDIFEAQKIEWHEAAIEGR SEQ ID NO:43)。通过转化大肠杆菌BL21(DE3)细胞产生N-末端标签化的His10/Avitag IL33-01(WT,SEQ ID NO:44)和N-末端标签化的His10/Avitag IL33-16(WT,SEQ ID NO:45)。在37℃下,在自体诱导培养基(Overnight Express™自体诱导系统1,默克密理博公司(Merck Millipore),71300-4)中培养转化的细胞18小时,随后通过离心收获细胞且储存在-20℃下。将细胞再悬浮于含有完全无EDTA的蛋白酶抑制剂混合物片剂(罗氏公司(Roche),11697498001)和50U/ml Benzonase核酸酶(默克密理博公司,70746-3)的2x DPBS中,并通过超声处理裂解。通过在4℃下以50,000x g离心30min来使细胞裂解物变澄清。将IL-33蛋白通过固定金属亲和色谱法,以5ml/min加载到在2x DPBS、1mM DTT中平衡的HisTrap excel柱(GE医疗公司(GE Healthcare),17371205)上来从上清液中纯化。用2xDPBS、1mM DTT、20mM咪唑(pH 7.4)洗涤柱以去除杂质,然后用2x DPBS、0.1%Triton X-114洗涤以去除固定的内毒素蛋白。用2xDPBS、1mM DTT、20mM咪唑(pH 7.4)进一步洗涤后,将样品用2x DPBS、1mM DTT、400mM咪唑(pH 7.4)洗脱。通过使用在2x DPBS中的HiLoad Superdex 7526/600pg柱(GE医疗公司,28989334)的、以2.5ml/min进行的尺寸排阻色谱法,进一步纯化IL-33。通过SDS PAGE分析峰级分。将含有纯IL-33的级分合并,并且通过280nm下的吸光度来确定浓度。通过SDS-PAGE分析最终样品。

[0285] 为了产生未标签化的IL-33,使N-末端标签化的His10/Avitag IL33与10个单位因子Xa(GE医疗公司,27084901)/mg蛋白质在室温下在2x DPBS缓冲液中一起孵育1小时。在2x DPBS中,在HiLoad 16/600 Superdex 75pg柱(GE医疗公司,28989333)上,以1ml/min的流速使用SEC色谱法来纯化未标签化的IL-33。

[0286] 2. 氧化型IL-33(oxIL-33)的产生和纯化

[0287] 通过在60%IMDM培养基(无酚红)、40%DPBS中稀释至0.5mg/ml的最终浓度,并在37℃下孵育18小时,将还原型IL33氧化。通过将样品加载到HiTrap Capto Q ImpRes阴离子交换柱(GE医疗公司,17547055)上,从样品中去除氧化过程中产生的聚集体。加载之前,通过添加1M Tris(pH 9.0)直至pH达到8.3并添加5M NaCl至125mM的最终浓度来修饰样品-在这些加载条件下,聚集体与柱结合并且单体oxIL-33流过而没有结合并被收集。通过在22℃下与因子Xa(NEB,P8010L)以1μg因子Xa/50μg oxIL-33的最终浓度孵育120min来从oxIL-33切割标签。为了消耗具有任何剩余还原型IL-33的样品,将与人IgG1 Fc-His6融合的可溶性人ST2S胞外结构域与样品在22℃下孵育30min,并结合还原型IL-33。将样品在截留值为3,000Da的离心浓缩器中进行浓缩,并以2ml/min的流速加载到HiLoad Superdex7526/600pg柱(GE医疗公司,28989334)上,从而将单体oxIL-33与其他样品组分分离。合并含有纯oxIL-33的级分并浓缩,并且通过UV吸收光谱法在280nm下测定样品的最终浓度。最终产品质量通过SDS-PAGE、HP-SEC和RP-HPLC进行评估。

[0288] 3. 人ST2 ECD的克隆、表达和纯化

[0289] 通过PCR用引物扩增编码不含内源信号肽(氨基酸残基19-328)的ST2的天然存在的ST2S可溶性同型(UniProt登录号Q01638-2)的cDNA,这些引物编码与Gibson组装相容的

延伸序列和与ST2S编码序列的N-末端融合的CD33信号肽。类似地扩增具有C-末端His6-标签的人IgG1 Fc的编码序列。使用Gibson组装用pDEST12.2 OriP组装ST2S cDNA和IgG1 Fc-His6 cDNA,pDEST12.2 OriP是一种哺乳动物CMV启动子驱动的表达载体,其带有来自EBV的OriP复制起点,从而可在表达EBNA-1蛋白的细胞系中进行游离基因维持(episomal maintenance)。为进行蛋白质表达,使用聚乙烯亚胺作为转染试剂,将质粒瞬时转化到过表达EBNA-1的CHO细胞悬浮培养物中。转染后7天收集含有分泌的ST2S-Fc-His6融合蛋白的条件培养基,并以2ml/min加载到HiTrap MabSelect SuRe(蛋白A,GE医疗公司,11-0034-95)亲和色谱柱上。用2x DPBS洗涤柱,并用25mM乙酸钠(pH 3.6)洗脱蛋白质。合并含有ST2S-Fc-His6的级分,并以2ml/min加载到在2x DPBS中平衡的HiLoad Superdex200 26/600pg柱(GE医疗公司,28989336)上。合并含有纯ST2S-Fc-His6蛋白的级分,并通过在280nm下的吸光度确定浓度。通过SDS-PAGE分析最终样品。

[0290] 4. 人脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR) ECD的克隆、表达和纯化

[0291] 在Geneart化学合成了编码无细胞质和跨膜结构域(氨基酸残基62-291)的脱唾液酸糖蛋白受体(UniProt登录号P07306)的胞外结构域(ECD)的cDNA,其具有CD33信号肽后接与ECD结构域的N-末端融合的His10_Avi Tag序列。将构建体直接克隆到pDEST12.2 OriP中,pDEST12.2 OriP是一种哺乳动物CMV启动子驱动的表达载体,其带有来自EBV的OriP复制起点,从而可在表达EBNA-1蛋白的细胞系中进行游离基因维持。为进行蛋白质表达,使用293 Fectin作为转染试剂将质粒瞬时转化到HEK Freestyle 293F细胞的悬浮培养物中。转染后7天,通过以4ml/min加载到在2x DPBS中平衡的HisTrap excel柱(GE医疗公司,17371205)上的固定金属亲和色谱法来收集含有分泌的HisAVi_hASGPR ECD融合蛋白的条件培养基。用2x DPBS、40mM咪唑(pH7.4)洗涤柱以去除杂质,并用2x DPBS、400mM咪唑(pH7.4)洗脱样品。通过使用在2x DPBS中的HiLoad Superdex7516/600pg柱(GE医疗公司,28-9893-33)的、以1ml/min进行的尺寸排阻色谱法进一步纯化人ASGPR ECD。通过SDS PAGE分析峰级分。将含有纯单体ASGPR的级分合并,并且通过280nm下的吸光度来确定浓度。通过SDS-PAGE分析最终样品。

[0292] 5. IL-33的氧化形式激活MAP激酶通路

[0293] 从龙沙公司(Lonza)获得正常人支气管上皮(NHBE)细胞(CC-2540),并根据制造商的方案维持在完全BEGM培养基(龙沙公司)中。用accutase(PAA,#L11-007)收获NHBE,并以 1×10^6 个/2ml接种在6孔培养皿(康宁公司(Corning)Costar,3516)中的培养基[BEGM(龙沙公司CC-3171)和补充试剂盒(龙沙公司CC-4175)]中。将细胞在37°C、5%CO₂下孵育18-24小时。此后,吸出培养基,并将细胞用1ml PBS洗涤两次,随后添加饥饿培养基(补充有1%青霉素/链霉素的BEGM(龙沙公司CC-3171))。然后将这些板在37°C、5%CO₂下再孵育18-24小时,之后进行刺激。

[0294] MAP激酶磷酸化抗体阵列试剂盒(ab211061)购自艾博抗公司(Abcam),并根据制造商的说明书进行实验。对已经饥饿18-24h的6孔培养皿中的NHBE不处理或用30ng/ml还原型IL-33、IL-33-16或氧化型IL-33处理,随后放回37°C、5%CO₂下的孵育箱维持10min(对于此测定中使用的激活剂,参见表2)。从孵育箱中移出这些板,并用冰冷的PBS洗涤细胞,随后添加100μl/孔由试剂盒提供的1x裂解缓冲液。将蛋白质提取物转移至1.5ml管中,随后在4°C下以14,000rpm使其变澄清。使用BCA技术(赛默公司(Thermo),23225)测定蛋白质浓度,并

且每个阵列膜使用250 μ g总蛋白。按照制造商的说明进行所有后续步骤。将膜在LiCor C-digit上可视化,并使用Image Lite studio定量。

[0295] 表2

	激动剂	鉴定剂	在以下中重构	最终浓度 (μ g/ml)
[0296]	未标签化的氧化型 IL33-01	RD15	PBS	100
	未标签化的 IL33-01	07/24/2015	PBS	100
	未标签化的 IL33-16	11/12/2015	PBS	100
	EGF	236-EG-200	PBS	100

[0297] 与野生型(IL-33)和IL-33的C->S(IL-33[C->S])还原形式(分别为IL33-01和IL33-16)相比,氧化型IL33(oxIL-33)激活了与受体酪氨酸激酶(RTK)参与的路径一致的多个关键信号传导分子(图9)。

[0298] 6. IL-33的氧化形式激活表皮生长因子受体(EGFR)

[0299] 为了尝试和鉴定被oxIL-33激活的受体酪氨酸激酶(RTK),使用71RTK阵列进行筛选。RTK磷酸化抗体阵列试剂盒(ab193662)购自艾博抗公司,并根据制造商的说明书进行实验。培养NHBE,并以 1×10^6 个/2ml接种在6孔板(康宁公司Costar, 3516)中的培养基田EGM(龙沙公司CC-3171)和补充试剂盒(龙沙公司CC-4175)中。将细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育18-24小时。此后,吸出培养基,并将细胞用1ml PBS洗涤两次,随后添加饥饿培养基(无补充试剂盒的BEGM(龙沙公司CC-3171))。然后将这些板在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下再孵育18-24小时,之后进行刺激。遵循先前对于MAP激酶阵列所述的相同步骤,将细胞激活(表2的激活剂),裂解,并且每个阵列膜使用250 μ g总蛋白。按照制造商的说明进行所有后续步骤。将膜在LiCor C-digit上可视化,并使用Image Lite studio定量。未检测到对还原的野生型(IL-33)或C->S(IL-33[C->S])IL-33(分别为IL33-01和IL33-16)的反应。但是,oxIL-33(氧化型IL-33-01)在RTK阵列上触发了与表皮生长因子受体(EGFR)相对应的阳性信号(图10)。

[0300] 通过其他方法证实了oxIL-33(氧化型IL-33-01)刺激EGFR信号传导的能力。激活后,将EGFR在Tyr1068处磷酸化,并且此磷酸-EGFR可以使用均相FRET(荧光共振能量转移)

HTRF[®](均相时间分辨荧光,齐斯博国际公司(Cisbio International))测定(Cisbio试剂盒#64EG1PEH)检测到。简言之,将NHBE以 5×10^5 个/100 μ l铺在96孔板(康宁公司Costar, 3598)中的培养基[BEGM(龙沙公司CC-3171)和补充试剂盒(龙沙公司CC-4175)]中。将这些板在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育18-24小时。此后,吸出培养基,并将细胞用0.2ml PBS洗涤两次,随后添加饥饿培养基(无补充试剂盒的BEGM(龙沙公司CC-3171))。然后将板在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下再孵育18-24小时,随后用浓度增加的IL-33-01、IL-33-16和oxIL-33(氧化型IL-33-01)以及EGFR配体(表2和表3)刺激,随后放回37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下的孵育箱维持10min。吸出培养基,并且每孔用50 μ l裂解缓冲液(齐斯博公司,64EG1PEH)替换。然后按照制造商的说明书(齐斯博公司,64EG1PEH)进行测定。使用EnVision读板仪(珀金埃尔默公司)在620nm和665nm发射波长下读取时间分辨荧光。通过计算665/620nm比率和使用GraphPad Prism软件通过使用四参数逻辑斯谛方程进行曲线拟合确定的EC50值来分析数据。

[0301] 表3

激动剂	供应商	鉴定剂	在以下中重构	最终浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
TGF α	R&D 系统公司	239-A-100	10 mM 乙酸	100
HB-EGF	R&D 系统公司	259-HE-050/CF	PBS	100
双调蛋白 (AREG)	R&D 系统公司	262-AR-100/CF	PBS	100
β 动物纤维素/BTC	R&D 系统公司	261-CE-010/CF	PBS	100
[0302] 上皮调节蛋白	R&D 系统公司	1195-EP-025/CF	PBS	100
上皮细胞有丝分裂 蛋白抗体 (Epigen)	R&D 系统公司	6629-EP-025/CF	PBS	100
HMGB1	R&D 系统公司	1690-HMB-050	PBS	200
S100A8/A9	R&D 系统公司	8226-S8-050	PBS	500
S100A12	R&D 系统公司	1052-ER-050	PBS	200
S100B	R&D 系统公司	1820-SB-050	PBS	200

[0303] 类似地,使用如本部分先前提及的HTRF测定评估上皮细胞系A549中的EGFR磷酸化。简言之,从ATCC获得A549,并在补充有1%青霉素/链霉素和10%FBS的RPMI GlutaMax培养基中培养。用accutase (PAA, #L11-007) 收获细胞,以 5×10^5 个/100 μl 接种到96孔板中,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下孵育18-24小时。然后将孔用100 μl PBS洗涤两次,随后添加100 μl 饥饿培养基(补充有1%青霉素/链霉素的RPMI GlutaMax培养基),并在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下孵育18-24小时。用浓度增加的IL-33-01、IL-33-16和oxIL-33、EGFR配体和RAGE配体(表2和表3)刺激细胞,随后放回37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱维持10min。吸出培养基,并且每孔用50 μl 裂解缓冲液(齐斯博公司,64EG1PEH)替换。然后按照制造商的说明书(齐斯博公司,64EG1PEH)进行测定。使用EnVision读板仪(珀金埃尔默公司)在620nm和665nm发射波长下读取时间分辨荧光。通过计算665/620nm比率和使用GraphPad Prism软件通过使用四参数逻辑斯谛方程进行曲线拟合确定的EC50值来分析数据。

[0304] 在NHBE和A549细胞两者中,oxIL-33均与真正的激动剂EGF类似地促进EGFR的磷酸化(图11)。这未被测试的其他RAGE配体重复。

[0305] 7. 信号传导组分的蛋白质印迹

[0306] 进行了蛋白质印迹实验,以进一步研究响应于oxIL-33,EGFR信号传导复合物的哪些元件被激活。如以上部分5中所述,将NHBE培养并铺在6孔培养皿中。血清饥饿后,用oxIL-33 (30ng/ml) 刺激细胞持续5至240分钟之间。然后吸出培养基,并用冰冷的PBS洗涤细胞,随后添加150 μl 裂解缓冲液[1x LDS样品缓冲液(赛默公司,NP0008)、10mM MgCl₂ (VWR,7786-30-3)、2.5% β -巯基乙醇(西格玛公司(Sigma),M6250)和0.4 $\mu\text{g/ml}$ benzonase(密理博公司,70746)]。将细胞在冰上放置10min,随后将裂解物转移至1.5ml管中,并加热至90 $^{\circ}\text{C}$ 后维持5min。将溶液转移至新的1.5ml管中,并在4% - 12% SDS-PAGE凝胶(赛默公司,NW04127BOX)上在MES运行缓冲液(B0002)中运行10 μl 样品以及5 μl 蛋白梯(伯乐公司(BioRad),1610374)。使用Transblot Turbo(伯乐公司)将凝胶转移到PVDF膜(伯乐公司,1704156)上。将PVDF膜在含有5%脱脂奶粉(Marvel)的PBS-吐温溶液中阻断10分钟。然后将

膜与一级抗体在含有5%BSA的PBS-吐温中在4℃下孵育过夜。然后将膜用PBS-吐温洗涤五次,接着在室温下在含有5%脱脂奶粉的PBS-吐温中与HR标签化的二级抗体一起孵育1小时。然后用PBS-吐温将膜洗涤五次,随后添加ECL(伯乐公司,1705062)并用Licor C-digit可视化。

[0307] 结果显示,oxIL-33激活几种EGFR信号传导组分(图12)。

[0308] 8.0x-IL-33诱导STAT-5磷酸化,这被EGFR中和性Ab阻断

[0309] 接下来试图确定是否可以通过阻止与EGFR结合来抑制oxIL33介导的STAT5激活。简言之,在补充有1%青霉素/链霉素和10%FBS的RPMI GlutaMax培养基中培养A549细胞。用accutase收获细胞,以 5×10^5 个/100 μ l接种到96孔板中,并在37℃、5%CO₂下孵育18-24小时。然后将孔用100 μ l PBS洗涤两次,随后添加100 μ l饥饿培养基(补充有1%青霉素/链霉素的RPMI GlutaMax培养基),并在37℃、5%CO₂下孵育18-24小时。将抗EGFR抗体(克隆LA1(05-101,密理博公司)或同型对照(MAB002,R&D系统公司)以剂量依赖性方式添加至各孔中,并将板放回孵育箱维持30min。然后用氧化型IL-33(30ng/ml)刺激板30min,随后按照制造商的说明书,使用磷酸-STAT5 ELISA试剂盒裂解缓冲液(85-86112-11,赛默飞世尔科技公司(ThermoFischer Scientific))裂解并显影,然后读取450nm下的吸光度。如图13中所示,用oxIL-33-01激活的细胞呈现出STAT5磷酸化,该磷酸化在存在抗EGFR抗体的情况下会降低(图13)。

[0310] 实例6-氧化型IL-33诱导EGFR和RAGE之间的复合物形成

[0311] 9.0xIL-33诱导EGFR和RAGE之间的复合物形成

[0312] 为了了解RAGE和EGFR如何参与促进oxIL-33的信号传导,进行了免疫沉淀实验以探索信号传导复合物。首先,使抗EGFR抗体与Dynabead共价偶联。按照制造商的说明书,将两个100 μ g小瓶的抗EGFR抗体(R&D系统公司,AF231)与40mg Dynabead(赛默公司,14311D)一起孵育,并共价偶联。成功偶联后,将珠粒以30mg/ml再悬浮于PBS中,并保持在4℃下。

[0313] 从龙沙公司获得NHBE(CC-2540),并且将冷冻小瓶以每培养皿 1×10^6 个细胞直接接种到15cm培养皿(赛默公司,157150)中。根据制造商的方案,将NHBE维持在完全BEGM培养基(龙沙公司)中一个月,其中每三天更换一次培养基,直到细胞达到汇合为止。将这些板在37℃、5%CO₂下孵育此时间段。在刺激前一天,将板用20ml PBS洗涤两次,随后添加15ml饥饿培养基(无补充试剂盒的BEGM(龙沙公司CC-3171))。然后将板在37℃、5%CO₂下再孵育18-24小时,随后用单独的培养基(未刺激的对照)、30ng/ml还原型IL-33-01、30ng/mL oxIL-33或30ng/mL EGF刺激,并放回37℃、5%CO₂中维持10min。吸出培养基,并用冰冷的PBS洗涤板两次,随后每15cm培养皿添加1ml含有磷酸酶和蛋白酶抑制剂(赛默公司,78440)的裂解缓冲液(艾博抗公司,ab152163)。将细胞刮入裂解缓冲液中,随后转移至2ml蛋白LoBind管(艾本德公司(Eppendorf),Z666513)中,并通过在4℃下以14,000rpm离心变得澄清。使用BCA试剂盒(赛默公司,23225)测定蛋白质浓度,并用裂解缓冲液将所有蛋白质提取物标准化至3mg/ml。将6mg总蛋白提取物在具有100 μ l抗EGFR Dynabead(如上所述)的2ml洁净LoBind管中孵育。然后将管放置在4℃下的立式圆筒形混合机(end-over-end mixer)上5h。使用磁铁(伯乐公司,1614916)将Dynabead固定,吸出蛋白质提取物,并用2ml洗涤缓冲液1(50mM Tris-HCl pH 7.5(赛默公司,15567027)、0.5%TritonX 100(西格玛公司,X100)、0.3M NaCl)替换。将此再重复四次。然后用洗涤缓冲液2(50mM Tris-HCl pH 7.5)以相同方式将

珠粒再洗涤十次。在最后的洗涤步骤之后,将在50mM Tris-HCl (pH 8.0)中的50 μ l 1% Rapigest (w/v) (沃特世公司 (Waters), 186001861) 添加到珠粒中,并在60 $^{\circ}$ C下加热10min。然后将上清液转移至新的LoBind 2ml管中。再将100 μ l 50mM Tris-HCl pH 8.0添加到树脂中并混合,随后将其与第一次洗脱物组合。然后添加TCEP (西格玛公司, 646547) 至最终浓度为5mM,并将样品在60 $^{\circ}$ C下加热10min。然后通过黑暗中在室温下添加碘乙酰胺 (西格玛公司, 16125) 至10mM使洗脱液烷基化20min。通过添加DTT (西格玛公司, D5545) 至10mM来淬灭烷基化。然后添加Tris-HCl缓冲液50mM pH 8.0,得到500 μ l的最终样品体积。每管添加0.5 μ g胰蛋白酶 (普洛麦格公司 (Promega), V5111),并在30 $^{\circ}$ C下在400rpm的振荡平台上将样品消化过夜。然后将样品用三氟乙酸 (西格玛公司, 302031) 酸化至最终浓度为2.0% (v/v),并在37 $^{\circ}$ C下孵育1h。然后将样品以14,000rpm离心30min,并将上清液转移至新的2ml LoBind管中。然后按照制造商的说明书通过C18柱 (赛默公司, 87784) 处理样品。然后使用speed-vac干燥样品,随后储存在-20 $^{\circ}$ C下。然后通过肽质量指纹质谱法 (PMF-LC-MS) 分析样品。使用 Scaffold软件分析结果。

[0314] 在所有4种条件下均类似地检测到了EGFR,这表明免疫沉淀在所有样品中均表现良好。与用IL33-01 (IL-33) 或EGF处理的样品相比,在用oxIL-33处理的样品中检测到RAGE和IL-33,这表明在信号传导期间oxIL-33和RAGE与EGFR相关。与先前用oxIL-33和EGF在这些细胞中激活EGFR的观察结果一致 (还原型IL33-01除外),用这些配体刺激后,检测到先前报道的参与EGFR信号传导和内吞作用的蛋白质 (表4)。

[0315] 表4显示了用还原型IL-33-01 (IL-33)、oxIL-33 (氧化型IL-33-01) 或EGF刺激的NHBE的LCMS分析。用oxIL-33刺激后,检测到IL-33和RAGE与EGFR复合,但用还原型IL33-01 (IL-33) 或EGF刺激后未检测到。括号指示对于每种蛋白质鉴定的独特肽的数量。

[0316] 表4

	未刺激的	IL-33	oxIL-33	EGF
	EGFR (63)	EGFR (62)	EGFR (60)	EGFR (57)
[0317]	-	-	IL-33 (11)	-
	-	-	RAGE (11)	-
	-	-	AP-2 α 1 (20)	AP-2 α 1 (14)
	-	-	AP-2 α 2 (16)	AP-2 α 2 (10)
[0318]	-	-	AP-2 β (15)	AP-2 β (16)
	-	-	AP-2 μ (20)	AP-2 μ (20)
	-	-	AP-2 σ (10)	AP-2 σ (11)
	-	-	CBL-B (5)	CBL-B (4)

[0319] 为了证实这些观察结果,还对根据上述方案制备的细胞裂解物进行了免疫沉淀和蛋白质印迹。确定NHBE蛋白提取物的浓度后,将3mg总蛋白与6 μ g抗EGFR抗体 (R&D系统公司, AF231) 一起在1.5ml管中孵育,并放置在4 $^{\circ}$ C下的立式圆筒形混合机上2.5h。然后将1.5mg蛋白A/G磁珠 (赛默公司, 88802) 添加到每个管中,随后将管放回4 $^{\circ}$ C在混合下再维持1h。然后用磁铁 (伯乐公司, 1614916) 收集珠粒,并用500 μ l (50mM Tris (pH 7.5)、1% TritonX和

0.25M NaCl) 洗涤三次,并用500 μ l 10mM Tris (pH 7.5) 洗涤一次。然后使用35 μ l具有还原剂(赛默公司,NP0004)的LDS样品缓冲液(赛默公司,NP0008)从磁珠释放蛋白质,并在95 $^{\circ}$ C下加热5分钟。将溶液转移至新的1.5ml管中,并在4%-12% SDS-PAGE凝胶(赛默公司,NW04127BOX)上在MES运行缓冲液(B0002)中运行10 μ l样品以及5 μ l蛋白梯(伯乐公司(BioRad),1610374)。使用Transblot Turbo(伯乐公司)将凝胶转移到PVDF膜(伯乐公司,1704156)上。将PVDF膜在含有5%脱脂奶粉(Marvel)的PBS-吐温溶液中阻断10分钟。然后将膜与一级抗体(抗EGFR(细胞信号传导技术公司(Cell Signaling Technology),2232)、抗RAGE(细胞信号传导技术公司,6996)或抗IL-33(R&D系统公司,AF3625))在含有5%BSA的PBS-吐温中在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。然后将膜用PBS-吐温洗涤五次,接着在室温下在含有5%脱脂奶粉的PBS-吐温中与抗兔HRP标签化的二级抗体(细胞信号传导技术公司,7074)或抗山羊HRP标签化的二级抗体(R&D系统公司,HAF109)一起孵育1小时。然后用PBS-吐温将膜洗涤五次,随后添加ECL(伯乐公司,1705062)并用Licor C-digit可视化。蛋白质印迹证实oxIL-33存在下RAGE与EGFR共沉淀,而在EGF刺激下未检测到RAGE(图14)。这些发现揭露,RAGE和EGFR是氧化型IL-33信号传导复合物的功能部分。

[0320] 10. oxIL-33需要RAGE与EGFR形成复合物

[0321] 上述实验显示,oxIL-33是引起下游信号传导的EGF受体(EGFR)复合物的配体。本部分中的实验经设计以确定oxIL-33是否是RAGE或EGFR的直接结合配体。为了更多地了解有关信号传导复合物的形成并评估oxIL-33是否直接与EGFR相互作用,使用ELISA形式探索oxIL-33与RAGE、ST2-Fc和EGFR的结合。

[0322] 蛋白质和修饰:遵循制造商的方案使用生物素连接酶(BirA)(Avidty,Bulk BirA)将含有Avitag序列基序(GLNDIFEAQKIEWHE SEQ ID NO:46)的蛋白质生物素化。遵循制造商的方案使用EZ连接磺基-NHS-LC-生物素(赛默公司/皮尔斯公司(Pierce),21335)经由游离胺将本文所用的所有修饰的无Avitag的蛋白质生物素化。表5是使用的生物素化蛋白的列表。

[0323] 表5.

[0324]

试剂
生物素化的EGF(赛默公司)
Avitag人ASGPR
Avitag_IL-33-01(还原型IL-33)
Avitag_IL-33-01(氧化型IL-33)
Avitag_IL-33-16
HMGB1

[0325] 在室温下用100 μ l/孔生物素化的抗原(10 μ g/ml,PBS中)涂布链霉抗生物素蛋白板(赛默科技公司(Thermo Scientific),AB-1226),持续1小时。将板用200 μ l PBS-T(PBS+1%(v/v)吐温-20)洗涤3次,并用300 μ l/孔封闭缓冲液(含1%BSA的PBS(西格玛公司,A9576))阻断1小时。将板用PBS-T洗涤3次。将RAGE-Fc(R&D系统公司#1145-RG)或ST2-Fc(R&D系统公司#523-ST)在含PBS的封闭缓冲液中稀释至10 μ g/mL,添加至相关孔中,并在室温下孵育1小时。可替代地,在存在或不存在PBS中的10 μ g/mL未标签化的RAGE(北京义翘神州生物公司(Sino Biological),11629-HCCH)的情况下,添加100 μ l的PBS中的10 μ g/mL EGFR-Fc(R&D系

统公司#344-ER-050),持续1小时。将板用200 μ l PBS-T洗涤三次。然后在室温下用在100 μ l/孔封闭缓冲液中以1:10000稀释的抗人IgG HR(西格玛公司A0170,5.1mg/mL)检测RAGE-Fc、ST2-Fc和EGFR-Fc,持续1小时。将板用PBS-T洗涤3次且用100 μ l/孔TMB(西格玛公司,T0440)显影。用50 μ l/孔的0.1M H₂SO₄淬灭反应。在Cytation Gen5或类似设备上读取450nm下的吸光度。结果显示,oxIL-33呈现出与RAGE明显相互作用(图15A),而oxIL-33与EGFR的直接结合可忽略(15B)。仅通过向此测定中添加sRAGE可观察到EGFR与oxIL-33结合(图15B)。如果用oxIL-33取代真正的RAGE激动剂HMGB1,则此不能重现(图15B)。

[0326] 使用RAGE缺陷型细胞系进一步证实了oxIL-33触发的EGFR信号传导中需要RAGE。如下产生敲除RAGE的A549细胞系:

[0327] 产生哺乳动物质粒,其含有红色荧光蛋白(RFP)的表达载体、靶向AGER的外显子3的指导RNA(TGAGGGGATTTCCGGTGCSEQ ID NO:47)和Cas9内切核酸酶。通过使A549细胞在T-175烧瓶中在F12K坚果混合物(吉博科公司(Gibco),补充有10%FBS和1%青霉素/链霉素)中生长两天来产生A549条件培养基。将消耗的培养基从A549取出,过滤,并在新鲜的吉博科公司F12K坚果混合物(补充有20%FBS和1%青霉素/链霉素)中进行五倍稀释。将A549以2x10⁵个细胞/ml接种到三个T-75烧瓶中,共15ml,并置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂孵育箱中过夜。使用1.6ml F12K坚果混合物(补充1%青霉素/链霉素)以及8 μ g AGER指导RNA质粒和22.5 μ g PEI(波利塞斯公司(Polysciences),23966-2)制备转染混合物。然后将混合物涡旋10秒,并在室温下放置15min。然后将0.75ml转染混合物添加到每个T-75烧瓶中。将烧瓶放回孵育箱,维持两天。然后使用Accutase使A549细胞分开,转移到含1%FBS的PBS中,并根据RFP在96孔培养皿中的表达,在Aria细胞分选仪(BD)上分选单个细胞。每3-5天用条件培养基喂养细胞。一旦细胞超过50%汇合后,将其转移到24孔板中并使其生长。将此过程继续放大,直至每个成功的克隆被分到T15烧瓶中。然后将细胞分到12孔板中,并使其生长直至超过50%汇合,随后分析基因组PCR以获得成功敲除情况。使每孔的细胞在100 μ l DNA裂解缓冲液(维亚根生物技术公司(Viagen Biotech),301-C,补充有0.3 μ g/ml蛋白酶K)中裂解。将这些样品在55 $^{\circ}$ C下孵育4小时,随后在85 $^{\circ}$ C下孵育15min。使用具有以下序列的正向和反向引物进行RAGE的PCR:正向引物-gttgcagcctcccaacttc(SEQ ID NO:48),反向引物-aatgaggccagtggaagtca(SEQ ID NO:49)。反应和循环的设定如下:反应体积为50 μ l[25 μ l Q5聚合酶混合物、2.5 μ l正向引物(10 μ M储备液)、2.5 μ l反向引物(10 μ M储备液)、2 μ l模板DNA裂解物、18 μ l无核酸酶的水]。运行PCR反应,其中在98 $^{\circ}$ C下进行初始变性30秒,随后进行如下35个循环:在98 $^{\circ}$ C下5秒,在57 $^{\circ}$ C下10秒以及在72 $^{\circ}$ C下20秒,随后最后一步在72 $^{\circ}$ C下2分钟。将4 μ l PCR产物与6 μ l无核酸酶的水和2 μ l 6x DNA加载缓冲液(赛默科技公司,R0611)混合。将样品在90V下在1%琼脂糖凝胶(1:10000 SYBR safe)上运行1小时,随后在Versadoc成像仪上可视化。然后遵循制造商的方案,使用QIAquick PCR纯化试剂盒(凯杰公司(Qiagen),28104)清理其余的PCR产物。使用nanodrop测量DNA-50浓度。发送几个克隆(从结果中选择)进行内部测序。结果显示,在克隆RAGE09和RAGE10中成功插入了终止密码子。

[0328] 为了确定RAGE对oxIL-33介导的EGFR信号传导的必要性,然后对A549和RAGE缺陷型A549细胞进行了免疫沉淀和蛋白质印迹。简言之,在不同时间点(0-15分钟)用oxIL-33激活细胞系。随后进行EGFR或RAGE的免疫沉淀,然后遵循部分9中详述的相关实验方案用抗RAGE、抗EGFR和抗IL-33进行蛋白质印迹。结果显示了RAGE在与oxIL-33和EGFR形成复合物

中的关键作用(图16)。

[0329] 11. 氧化型IL-33诱导STAT5磷酸化,该磷酸化被RAGE阻断,但米被ST2中和性抗体阻断

[0330] 为了证实oxIL-33信号传导中RAGE的重要性优于ST2,测试了阻断抗体。简言之,在补充有1%青霉素/链霉素和10%FBS的RPMI GlutaMax培养基中培养A549。用accutase收获细胞,以 5×10^5 个/100 μ l接种到96孔板中,并在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育18-24小时。然后将孔用100 μ l PBS洗涤两次,随后添加100 μ l饥饿培养基(补充有1%青霉素/链霉素的RPMI GlutaMax培养基),并在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育18-24小时。将抗RAGE(M4F4;WO 2008137552)、抗ST2(AF532;RnD系统公司)或同型对照(MAB002,R&D系统公司)以剂量依赖性方式添加至孔中,并将板放回孵育箱维持30min。然后用氧化型IL-33(30ng/ml)刺激板30min,随后按照制造商的说明书,使用磷酸-STAT5 ELISA试剂盒裂解缓冲液(85-86112-11,赛默飞世尔科技公司)裂解并显影,随后读取450nm下的吸光度。如图17中所示,用oxIL-33-01激活的细胞呈现出STAT5磷酸化,该磷酸化在存在抗RAGE抗体而非抗ST2抗体的情况下会降低(图17)。

[0331] 实例7-在PTEC肾脏细胞中经由RAGE进行oxIL-33信号传导

[0332] 先前实例已经显示,在肾脏疾病中,IL-33表达升高。RAGE表达也升高。显示阻断ST2和RAGE信号传导减少了小鼠模型中的UACR和肾脏受损。还已经显示,在上皮细胞中,oxIL-33介导的信号传导由与EGFR的复合物形成而驱动。以下所述实验试图确定在肾脏上皮中是否还存在新的信号传导通路。

[0333] 在PTEC(一种人近端小管上皮细胞系)中测量对oxIL-33的反应。

[0334] 简言之,使PTEC(原代人肾小管上皮细胞系)生长至汇合,并且用肾脏炎症介质处理24h。根据制造商的方案,使用中尺度诊断测定法在细胞裂解产物中测量IL-33。

[0335] 如图18A中所示,与用蔗糖或葡萄糖对照处理时相比,当用IFN- γ 和TNF处理PTEC时,IL-33胞内浓度升高。这些结果表明,在PTEC中,炎症介质IFN γ 和TNF上调IL-33的产生和分泌。

[0336] 然后将PTEC用redIL-33处理,以检查redIL-33经由ST2和NF κ B在炎症通路上的潜在自分泌或旁分泌效应。使PTEC生长至汇合,并且用各剂量浓度的redIL-33或IL-1作为阳性对照进行处理(获得自派普泰克公司(peprotec)200-01B)。如WO 2016/156440所述制备RedIL-33。通过免疫荧光(遵循Noursadeghi等人J Immunol Methods[免疫学方法杂志]2008中所述的方法)测量作为激活标记的NF κ B易位至细胞核。图18B显示了用剂量增加的IL-1或redIL-33处理的PTEC中的NF κ B易位。这些结果显示,在PTEC中,与IL-1相比,red-IL33更少地引起炎性反应。

[0337] 通过分析在PTEC中响应于浓度增加的redIL-33,炎症标志物的剂量依赖性释放,进一步证实了这一点。简言之,将原代人PTEC(龙沙公司)培养至达到汇合,然后接种到24孔板(无血清饥饿)上,并且用全剂量范围的IL-33还原形式(剂量从12.8pM至200nM)刺激24hr。在此时间后,收集上清液以检测促炎性细胞因子。根据制造商的说明,通过使用中尺度诊断测定法进行细胞因子的检测。

[0338] 没有检测到炎性细胞因子IL-6、IL8、TNF α 和IL1 β 的水平的剂量依赖性增加(图18C)。

[0339] 类似地,还在PTEC中,在用还原型IL-33处理后,分析了MAP激酶的激活。MAP激酶的

激活是由ST2依赖性通路调节的另一细胞功能。

[0340] 简言之,将原代人PTEC培养至达到汇合,然后接种到24孔板上,该研究不需要血清饥饿。用30ng/ml单一浓度的还原形式的IL-33刺激细胞30min,持续30min。30min后,裂解细胞以测量MAP激酶(p38和JNK)的磷酸化。根据制造商的说明,通过使用中尺度诊断测定法检测磷酸化的MAP激酶。

[0341] 结果显示,PTEC并不展现出响应于还原型IL-33的增加的MAP激酶信号传导(图18D),这进一步说明,PTEC并不经由经典ST2信号传导轴而响应于还原型IL-33。

[0342] 为了检查PTEC是否响应于具有oxIL-33的信号传导,在用oxIL-33和redIL-33进行刺激后,测量EGFR激活。如WO 2016/156440中或以上所述制备OxIL-33和redIL-33。简言之,使PTEC生长至汇合,并且用oxIL-33和redIL-33刺激10-15min,之后通过均相时间分辨荧光(HTRF)测量RAGE/EGFR信号传导。

[0343] HTRF®测定是在非常接近的供体与受体荧光团之间利用荧光共振能量转移进行的均相测定技术(Mathis等人Clin Chem[临床化学]41(9):1391-7(1995))。这些测定用于通过使目的分子之一与供体荧光团(例如铕(Eu³⁺)穴状化合物)直接或间接偶联、以及使另一目的分子与受体荧光团(例如XL665(稳定交联的别藻蓝蛋白))偶联来测量大分子相互作用。在此供体/受体系统中,穴状化合物分子的激发(在337nm下)导致在620nm下的荧光发射。将来自此发射的能量转移至非常接近Eu³⁺穴状化合物的XL665,这导致特定长寿命荧光(在665nm下)自XL665发射。可以测量供体(在620nm下)和受体(在665nm下)两者的特定信号,这允许计算665/620nm比率,该比率在该测定中补偿有色化合物的存在。

[0344] 使用两种不同的特异性抗体,一种用Eu³⁺穴状化合物(供体)标记,并且第二种用d2(受体)标记,以夹心测定形式检测磷酸化EGFR(Tyr1068)。当染料非常靠近时,用光源(激光或闪光灯)激发供体引发了朝向受体的荧光共振能量转移(FRET),该受体继而在特定波长(665nm)下发出荧光。该特定信号正向调节与磷酸化EGFR(Tyr1068)的比例。因此,将仅在EGFR信号传导复合物激活时,观察到FRET信号。

[0345] 如图18E中所示,ox-IL33诱导与阳性对照(EGF)的水平可比的PTEC中的EGFR的磷酸化(p-EGFR)。与未处理的对照相比,RAGE的天然配体(S1001A9)并不导致p-EGFR的增加。redIL-33也没有导致增加。

[0346] 为了证实p-EGFR的增加是由oxIL33RAGE-EGFR信号传导通路介导的,在抗RAGE和抗EGFR抗体存在下,用氧化型IL-33刺激PTEC。

[0347] 将原代人PTEC培养至达到汇合,然后接种到96孔板上,并且血清饥饿过夜。然后在有/没有抗RAGE和抗EGFR抗体(最终10ug/ml)的情况下,用单剂量的氧化型IL-33(最终200nM)刺激细胞。将PTEC与抗体预孵育40min,并且随后是使用氧化型IL-33刺激10min。在此时间(总计50min)后,通过裂解细胞而终止刺激,并且使用均相时间分辨荧光(HTRF)进行EGFR的磷酸化水平的检测。测定的细节已在前面描述。根据齐斯博供应商的方案进行测定。

[0348] 结果显示,阻断RAGE和EGFR减少了oxIL-33对EGFR的激活(图18F)。这指示在PTEC中,响应于oxIL33的EGFR激活是由RAGE和EGFR介导的。

[0349] 这些结果显示,在PTEC细胞中,oxIL-33,而不是redIL-33,激活RAGE/EGFR依赖性信号传导。这表明,在具有升高的IL33的肾脏疾病内的肾小管区域中,氧化型IL33可以介导上皮反应。

[0350] 为了评估oxIL33信号传导在肾脏上皮中的生物学影响,用oxIL33和redIL-33刺激PTEC,并且测量肾脏损伤分子1(KIM-1)的释放。KIM-1是肾小管损伤的关键标志物(Han等人2002,Kidney Int.[国际肾脏期刊]62(1)237-44)。

[0351] 将原代人PTEC培养至达到汇合,然后接种到24孔板上,血清饥饿过夜,并且用单剂量的氧化型IL-33或和突变体还原型IL-33(两者都是1ug/ml)进行刺激(为了特异性控制仅对氧化形式具有特异性的效应)。刺激持续8hr,在此时间后,收集上清液用于随后检测肾脏损伤标志物KIM-1。根据制造商的方案,使用中尺度诊断测定法进行检测。

[0352] 结果显示,oxIL-33,而不是还原型IL-33同种型,上调KIM-1(图18G),这表明在PTEC中,损伤是激活oxIL-33信号传导轴的特征。

[0353] 实例8-在人肾小球上皮细胞中阻断ST2依赖性信号传导

[0354] 以下所述实验确定了不同肾脏细胞类型是否响应于redIL-33信号传导。

[0355] 使原代人肾小球上皮细胞(GEnC)生长至汇合,并且用肾脏炎症介质处理24h。如实例7中所述,使用MSD,在细胞裂解产物中测量IL-33。如图19A中所示,与用蔗糖或葡萄糖对照处理时相比,当用IFN- γ 和TNF处理GEnC时,IL-33胞内浓度升高。这些数据表明,在GEnC中,炎症介质IFN γ 和TNF上调IL-33的产生和分泌。

[0356] 然后将GEnC用redIL-33处理,以检查redIL-33经由ST2和NFkB在炎症通路上的潜在自分泌或旁分泌效应。使GEnC生长至汇合,并且用各剂量浓度的redIL-33或IL-1(获得自R&D系统公司-目录号3625-IL-010、201-LB-025)作为阳性对照进行处理。如WO 2016/156440或以上所述制备RedIL-33。通过免疫荧光(遵循Noursadeghi等人J Immunol Methods[免疫学方法杂志]2008中所述的方法)测量作为激活标记的NFkB易位至细胞核。图19B显示了用剂量增加的IL-1或redIL-33处理的GEnC中的NFkB易位。这些结果显示,在GEnC中,等效剂量的red-IL33引起与IL-1可比的炎性反应。

[0357] 为了检查阻断IL-33对肾脏中ST2依赖性信号传导的作用,用WO 2016/156440中的单克隆抗体33_640087-7B(SEQ ID NO:616和SEQ ID NO:618)处理GEnC。简言之,使GEnC生长至汇合,并且在有或没有0.0001-100nM 33_640087-7B或同型对照的情况下,用IL-33或对照剂处理24h。将NFkB易位用作ST2信号传导和内皮激活的标记,并且如前述实例所述进行测定。

[0358] 如图19C中所示,在用IL-33处理的GEnC中,redIL-33诱导NFkB易位,该易位受到33_640087-7B抑制。同型对照并不抑制激活,33_640087-7B也不抑制IL1介导的NFkB信号传导,将后者用作阳性对照。

[0359] 进行另外的实验来分析redIL-33对内皮细胞的刺激作用。

[0360] 将原代人HGMEC(细胞系统公司(Cell Systems))培养至达到汇合,然后接种到24孔板上,并且用单剂量(30ng/ml)的还原或氧化形式的IL-33刺激24hr。在此时间后,收集上清液用于检测促炎性IL-6和IL-8细胞因子。根据制造商的说明,通过使用中尺度诊断测定法实现细胞因子的检测。

[0361] 结果显示,redIL-33诱导IL-6和IL-8的释放(图20D),oxIL-33并不诱导IL-6或IL-8释放。

[0362] 还测量了在HGMEC中,在redIL-33刺激后,炎性细胞因子IL-8、TNFa、IL1b和IL-6的剂量依赖性释放。使原代人HGMEC(细胞系统公司)培养至达到汇合,然后接种到24孔板上,

并且用全剂量范围的还原形式的IL-33(剂量从200nM至12.8pM)刺激24hr。在此时间后,收集上清液以检测促炎性细胞因子。根据制造商的说明,通过使用中尺度诊断测定法实现细胞因子的检测。

[0363] 结果显示,由内皮细胞分泌IL-1b、IL-6、IL-8和TNFa是以剂量依赖方式对redIL-33具有特异性。

[0364] 为了进一步探索redIL-33诱导的体外肾小球上皮细胞NFkB激活,在与redIL-33孵育一起孵育24h后,测量GEnC中的炎性细胞因子的产生。

[0365] 如以上,使GEnC生长至汇合,并且与IL33或阳性对照(具有或没有33_640087-7B)一起孵育。根据制造商的方案,使用中尺度诊断(MSD)测定法,从上清液测量细胞因子水平。

[0366] 还在原代人内皮细胞中测量了33-640087_7B抑制MAP激酶信号传导的激活的能力。将原代人HGMEC(细胞系统公司)培养至达到汇合,然后接种到24孔板上,并且在有/没有1ug/ml的33-640087_7B的情况下,用单剂量的30ng/ml的redIL-33刺激30min。30min后,裂解细胞以测量MAP激酶的磷酸化和33-640087_7B的阻断作用。根据制造商的说明,通过使用中尺度诊断测定法检测MAP激酶。

[0367] 结果显示,在24h后,如从GEnC上清液所测量的,33_640087-7B显著抑制IL-4、IL-6、IL-8和IL-12的分泌(图20A)。此外,33_640087-7B抑制MAP激酶p38和JNK的磷酸化(图20B)。

[0368] 这证明,IL-33拮抗剂可以用于减轻或抑制肾脏中由IL-33/ST2信号传导介导的炎症。这可用于治疗在肾脏中具有异常炎症的疾病,例如糖尿病性肾病。

[0369] 实例9在人原代系膜细胞中的IL33信号传导

[0370] 鉴于已经显示出不同的IL-33同种型在肾上皮和内皮细胞中具有不同的病理学效应,因此还分析了系膜细胞中的IL-33信号传导。

[0371] 系膜细胞是特化细胞,它们是肾小球的另一种主要组分。系膜细胞的主要功能是从基底膜去除捕获的残余物和聚集的蛋白质,由此使滤膜保持不含碎片。糖尿病性肾病的特征在于进行性系膜扩张和基质沉积,这导致肾小球肥大和肾小球硬化症,最终堵塞肾小球毛细血管并且损害肾功能。

[0372] 用一系列慢性肾脏疾病应激物刺激系膜细胞,以确定它们是否诱导IL-33表达。

[0373] 使原代人系膜细胞(龙沙公司)生长至汇合,然后接种到6孔板上,并且用肾脏炎症介质处理24h。如以上实例中所述,使用MSD,在细胞裂解产物中测量IL-33。如图21A中所示,与其他应激物相比,当用IFN- γ 和TNF- α 处理系膜细胞时,IL-33胞内浓度上调。

[0374] 接下来测试了在系膜细胞内,IL-33表达的自分泌和旁分泌效应。分析了当用redIL-33处理后,IL-8从原代人系膜细胞的剂量依赖性释放。

[0375] 是原代系膜细胞(龙沙公司)生长至汇合,然后接种到24孔板上,并且用全剂量范围的还原形式的IL-33(剂量从200nM至12.8pM)处理24hr。收集上清液用于检测促炎性IL8。根据制造商的说明,通过使用中尺度诊断测定法检测IL-8。对于阻断实验,使原代系膜细胞(龙沙公司)生长至汇合,然后接种到24孔板上,并且再有/没有1ug/ml的33-6400877B的情况下,用单剂量的30ng/ml的还原型IL-33处理24hr。收集上清液用于检测促炎性IL8。根据制造商的说明,通过使用中尺度诊断测定法检测IL8。

[0376] 结果指示,IL-8释放是剂量依赖性的(图21B)。存在33_640087_7B抑制了IL-8的释

放(图21C)。因此,在系膜细胞中,IL-33拮抗剂可用于抑制还原型IL-33介导的自分泌或旁分泌炎症反应。

[0377] 为了研究IL-33信号传导可能促成在DKD中观察到的系膜扩张,用IL-33刺激原代人系膜细胞,并且在体外测量这些细胞的增殖。简言之,使人原代系膜细胞生长至汇合,接种在96孔板中,然后饥饿24h,并且用各剂量浓度的redIL-33、oxIL-33或作为阳性对照的PDGF-BB处理18h。然后,将细胞用10 μ M EdU溶液再脉冲处理4h。EdU暴露允许直接测量合成DNA的细胞。遵循制造商的说明,通过使用AmplexTM UltraRed试剂并且测量荧光发射来评估EdU掺入。

[0378] 如图21D中所示,oxIL-33以剂量依赖性方式诱导人系膜细胞的增殖。这些结果表明,在糖尿病性肾病进展期间,oxIL-33,但不是redIL-33,可能参与系膜细胞扩张。

[0379] 实例10-0xIL-33损害深层单层上皮培养物中的刮伤修复反应

[0380] 与EGF相反,oxIL-33损害A549和NHBE细胞中的刮伤闭合

[0381] 从ATCC获得A549上皮细胞,并在补充有1%青霉素/链霉素和10%FBS的RPMI GlutaMax培养基中培养。用accutase (PAA, #L11-007) 收获细胞,以5x10⁵个/100 μ l接种到96孔板中,并在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育18-24小时。然后将孔用100 μ l PBS洗涤两次,随后添加100 μ l饥饿培养基(补充有1%青霉素/链霉素的RPMI GlutaMax培养基),并在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育18-24小时。使用WoundMakerTM (埃森生物科学公司 (Essen Bioscience)) 刮伤细胞,然后将孔用200 μ l PBS洗涤2次,随后添加补充有0.1%FBS (v/v) 和1% (v/v) 青霉素/链霉素的、含有指定刺激的RPMI GlutaMax培养基或单独的培养基(未刺激的对照)、30ng/ml还原型IL-33、30ng/ml氧化型IL-33或30ng/ml EGF,并放回37 $^{\circ}$ C、5%CO₂中。将板放置在IncucyteZoom中以在48小时内进行伤口愈合成像和分析。通过Incucyte Zoom软件中的伤口愈合算法计算相对伤口密度。

[0382] 从龙沙公司获得正常的人支气管上皮细胞(NHBE) (CC-2540),并根据制造商的方案维持在完全BEGM培养基[BEGM (龙沙公司CC-3171) 和补充试剂盒(龙沙公司CC-4175)]中。用accutase收获细胞,并以5x10⁵个/100 μ l接种在96孔ImageLock板(赛多利斯公司(Sartorius), 4379) 中的培养基中。将这些板在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育18-24小时。此后,吸出培养基,并将细胞用100 μ l PBS洗涤两次,随后添加饥饿培养基(BEGM (龙沙公司CC-3171), 无补充试剂盒,补充有1%青霉素/链霉素)。然后将这些板在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下再孵育18-24小时,之后进行刮伤。使用WoundMakerTM (埃森生物科学公司) 刮伤细胞,然后将孔用200 μ l PBS洗涤2次,随后添加补充有0.1%FBS (v/v) 和1% (v/v) 青霉素/链霉素的、含有指定刺激的BEBM培养基(龙沙公司) 或单独的培养基(未刺激的对照)、30ng/ml还原型IL-33、30ng/ml氧化型IL-33或30ng/ml EGF,并放回37 $^{\circ}$ C、5%CO₂中。将板放置在IncucyteZoom中以在48小时内进行伤口愈合成像和分析。通过Incucyte Zoom软件中的伤口愈合算法计算相对伤口密度。如图22中所示,oxIL-33抑制A549细胞(图22A) 和NHBE细胞(图22B) 的深层培养物中的伤口愈合,这与EGF(在其中观察到受伤细胞密度增加) 有相反的作用。

[0383] 可以通过中和RAGE或EGFR而不中和ST2的抗体来阻止氧化型IL-33对刮伤闭合的损害

[0384] 为了了解oxIL-33的这些功能作用是否通过RAGE/EGFR介导,如以上所述,但在中和不同受体组分的抗体存在下,在NHBE细胞中进行刮伤测定。在10 μ g/ml抗ST2 (AF532, R&D

系统公司)、抗RAGE (M4F4, WO 2008137552) 或抗EGFR (克隆LA1, 05-101, 密理博公司) 存在下, 用单独的培养基 (未刺激的对照)、还原型IL-33或氧化型IL-33处理NHBE细胞。oxIL-33, 而不是还原型IL-33, 抑制刮伤闭合。oxIL-33的此作用可被抗RAGE和抗EGFR而非抗ST2逆转, 这再次证明RAGE和EGFR是参与氧化型IL-33信号传导通路的必需受体 (图23)。

[0385] 刮伤测定还可以用于检查上皮细胞对慢性肾脏疾病微环境中提到的损伤的反应。简言之, 按20,000-30,000/孔, 将RPTEC接种在96孔板中, 持续24hr (第1天)。在第2天, 使PTEC细胞血清饥饿过夜。在第3天, 使用伤口标记 (埃森生物科学公司) 造成刮伤, 并且用PBS洗涤细胞两次, 以去除脱离的细胞。然后施加刺激 (100u1/孔), 并且在0.1%血清培养基中进行稀释, 除了用作阳性对照的在充分补充的培养基中的细胞以外。将板插入Incucyte (Incucyte S3 2019A) 并且根据制造商的说明进行设置, 以测量0hr时的相对伤口密度 (基线), 并且然后每4hr进行测量, 持续4天, 以测量相对伤口闭合。

[0386] 总之, 实例中呈现的数据证明, 在肾脏上皮、内皮和肾小球中, 炎症介质上调IL-33的产生。在肾脏内皮细胞中, redIL-33似乎通过NFkB激活 (ST2依赖性的)、经由自分泌或旁分泌机制来进行信号传导。red-IL33信号传导介导肾小球内皮分泌促炎性细胞因子, 这可能加剧了体内肾脏损伤。此外, 在肾脏上皮中, oxIL-33激活RAGE/EGFR信号传导通路 (RAGE依赖性的)。怀疑RAGE/EGFR信号传导促成肾脏损伤的病理生理学。还已经显示, 在肾脏疾病的多个临床前模型中, RAGE在肾脏中的表达增强。在肾脏疾病中, IL-33表达增强。这意味着在CKD的肾脏中, redIL-33和oxIL-33两者的浓度都可能增加。鉴于在损伤期间的肾脏中ST-2似乎出人意料地下调, RAGE-EGFR/IL-33系统可能促成肾脏疾病中的IL-33介导的病理学。

[0387] 另外的序列

[0388] 配对1 HCDR1 SEQ ID NO 37:SYAMS

[0389] 配对1 HCDR2 SEQ ID NO 38:GISAIDQSTYYADSVKG

[0390] 配对1 HCDR3 SEQ ID NO 39:QKFMQLWGGGLRYPFGY

[0391] 配对1 LCDR1 SEQ ID NO 40:SGEGMGDKYAA

[0392] 配对1 LCDR2 SEQ ID NO 41:RDTKRPS

[0393] 配对1 LCDR3 SEQ ID NO 42:GVIQDNTGV

[0394] N末端His10/Avitag/因子Xa蛋白酶切割位点

[0395] SEQ ID NO 43:MHHHHHHHHHAAGLNDIFEAQKIEWHEAAIEGR

[0396] IL-33-01

[0397] SEQ ID NO 44:

SITGISPITEYLASLSTYNDQSITFALEDESYEIYVEDLKKDEKKDKVLLSYYESQHPSNESGD

[0398] GVDGKMLMVTLSPTKDFWLHANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVLHNMHSNCVSFECKTD
PGVFIGVKDNHLALIKVDSSENLCTENILFKLSET

[0399] IL-33-16

[0400] SEQ ID NO 45:

SITGISPITEYLASLSTYNDQSITFALEDESYEIYVEDLKKDEKKDKVLLSYYESQHPSNESGD

[0401] GVDGKMLMVTLSPTKDFWLHANNKEHSVELHKSEKPLPDQAFFVLHNMHSNSVSFESKTD
PGVFIGVKDNHLALIKVDSSENLSTENILFKLSET

[0402] Avitag序列基序

[0403] SEQ ID NO 46:GLNDIFEAQKIEWHE

- [0404] 靶向RAGE外显子3的gRNA载体
- [0405] SEQ ID NO 47: TGAGGGGATTTTCCGGTGC
- [0406] RAGE正向引物
- [0407] SEQ ID NO 48: gttgcagcctcccaacttc
- [0408] RAGE反向引物
- [0409] SEQ ID NO 49: aatgaggccagtggaagtca

<110> 免疫医疗有限公司
 <120> 抗-33 治疗剂 FPR 治疗肾脏障碍
 <130> IL33-106-US-PROV
 <160> 49
 <170> PatentIn 3.5 版
 <210> 1
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 配对 1 VH
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 [0001] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ala Ile Asp Gln Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro
 100 105 110
 Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 2
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 配对 2 VH

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ser Asp Leu Arg Thr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0002]

Ala Lys Ser His Tyr Ser Thr Ser Trp Phe Gly Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 3 VH

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ser Gln Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Ser Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配对 4 VH

[0003]

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ser His Asn Gly Asn Ser His Tyr Val Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Ser Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Ser Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配对 5 VH

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Leu Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0004] Ser Phe Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配对 6 VH

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gly His Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Pro Thr Tyr Ser Arg Ser Trp Tyr Gly Ala Phe Asp Phe Trp
100 105 110

[0005]

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 7 VH

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asn Leu Glu Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Ser
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Ser Ala Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Ser Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly His Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 8 VH

<400> 8

[0006]

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Arg Tyr Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Ile Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 配对 9 VH

<400> 9

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ala Arg Ser Arg Tyr His Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

[0007]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Ala Thr Arg His Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 配对 10 VH

<400> 10

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ala Arg Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Ala Thr Arg Asn Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

[0008]

<220>

<223> 配对 11 VH

<400> 11

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ala Gln Ser Ser His Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Ala Thr Arg Gln Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 12
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 配对 12 VH

<400> 12

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

[0009] Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Ala Thr Arg His Val Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 13
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 配对 13 VH

<400> 13

Met Arg Ala Trp Ile Phe Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg Ala Leu
1 5 10 15

Ala Gln Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
20 25 30

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
35 40 45

Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
50 55 60

Met Gly Thr Ile Tyr Pro Arg Asn Ser Asn Thr Asp Tyr Asn Gln Lys
65 70 75 80

Phe Lys Ala Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val
85 90 95

[0010]

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Ala Arg Pro Leu Tyr Tyr Tyr Leu Thr Ser Pro Pro Thr Leu Phe
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 14

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 14 VH

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Leu His Gly Ile Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Phe Ile Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

[0011]

<220>

<223> 配对 15 VH

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Phe Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Leu His Gly Ile Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Phe Ile Ile
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 配对 16 VH

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Phe Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

[0012]

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Thr Ile His Gly Ile Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Phe Ile Ile
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 配对 17 VH

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ala Ile Thr Pro Asn Ala Gly Glu Asp Tyr Tyr Pro Glu Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly His Tyr Tyr Tyr Thr Ser Tyr Ser Leu Gly Tyr Trp Gly
100 105 110

[0013]

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 18 VH

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Lys Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ala Asn Tyr Gly Asn Trp Phe Phe Glu Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 1 VL

<400> 19

[0014]

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Gly Met Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Ile Gln Asp Asn Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 20

<211> 107

<212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 配对 2 VL

 <400> 20

 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Phe Ser Ser Trp
 20 25 30

 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Leu Gln Pro
 65 70 75 80

 [0015] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
 85 90 95

 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 21
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 配对 3 VL

 <400> 21

 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Thr Trp
 20 25 30

 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Pro Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 4 VL

<400> 22

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

[0016]

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Phe Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 5 VL

<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Val Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Phe Pro Phe
85 90 95

[0017]

Thr Leu Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 6 VL

<400> 24

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Trp Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Asn Phe Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 7 VL

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Phe Ser Trp
20 25 30

[0018]

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Val Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 26

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 8 VL

<400> 26

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Val
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

[0019]

Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 27

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 9 VL

<400> 27

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Ala Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ala Ser Asn Met Arg Val Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ala Trp Asp Asp Ser Gln
85 90 95

Lys Ala Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 28

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 10 VL

<400> 28

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

[0020]

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ala Ser Asn Met Arg Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Trp Ala Trp Asp Asp Ser Gln
85 90 95

Lys Val Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 29

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 11 VL

<400> 29

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ala Ser Asn Met Arg Arg Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Asp Asp Ser Gln
85 90 95

Lys Val Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

[0021]

<210> 30

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 12 VL

<400> 30

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ala Ser Asn Met Arg Arg Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Ala Trp Asp Asp Ser Gln
85 90 95

Lys Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 31

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 13 VL

<400> 31

Met Arg Ala Trp Ile Phe Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg Ala Leu
1 5 10 15

Ala Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val
20 25 30

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr
35 40 45

[0022]

Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
50 55 60

Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
65 70 75 80

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
85 90 95

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Lys Thr Tyr Pro
100 105 110

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

<210> 32

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 14 VL

<400> 32

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ile Asn
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser His Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser Gln Ser Pro Pro
85 90 95

[0023]

Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 33

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 15 VL

<400> 33

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ile Asn
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser His Arg Leu Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser Gln Pro Pro Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 34

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 16 VL

<400> 34

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ile Asn
20 25 30

[0024]

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser His Arg Leu Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser Gln Pro Pro Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 35

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 17 VL

<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Lys His
20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Tyr Asn Gln Gly Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

[0025]

<210> 36

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 18 VL

<400> 36

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Lys Tyr
20 25 30

Gly Leu Ser Leu Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 1 HCDR1

<400> 37

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

[0026]

<220>

<223> 配对 1 HCDR2

<400> 38

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

Gly

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 配对 1 HCDR3

<400> 39

Gln Lys Phe Met Gln Leu Trp Gly Gly Gly Leu Arg Tyr Pro Phe Gly
1 5 10 15

Tyr

<210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 配对 1 LCDR1

<400> 40

Ser Gly Glu Gly Met Gly Asp Lys Tyr Ala Ala
 1 5 10

<210> 41
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 配对 1 LCDR2

<400> 41

Arg Asp Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5

[0027]

<210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 配对 1 LCDR3

<400> 42

Gly Val Ile Gln Asp Asn Thr Gly Val
 1 5

<210> 43
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> N末端 His10/Avitag/Factor Xa 蛋白酶切割位点

<400> 43

Met His His His His His His His His His His Ala Ala Gly Leu Asn
 1 5 10 15

Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Ala Ala Ile Glu
 20 25 30

Gly Arg

<210> 44

<211> 159

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IL-33-01

<400> 44

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

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

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

[0028]

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

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

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

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

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

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

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

<210> 45
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IL-33-16

<400> 45

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

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

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

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

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

[0029]

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

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

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

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

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

<210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Avitag 序列基序

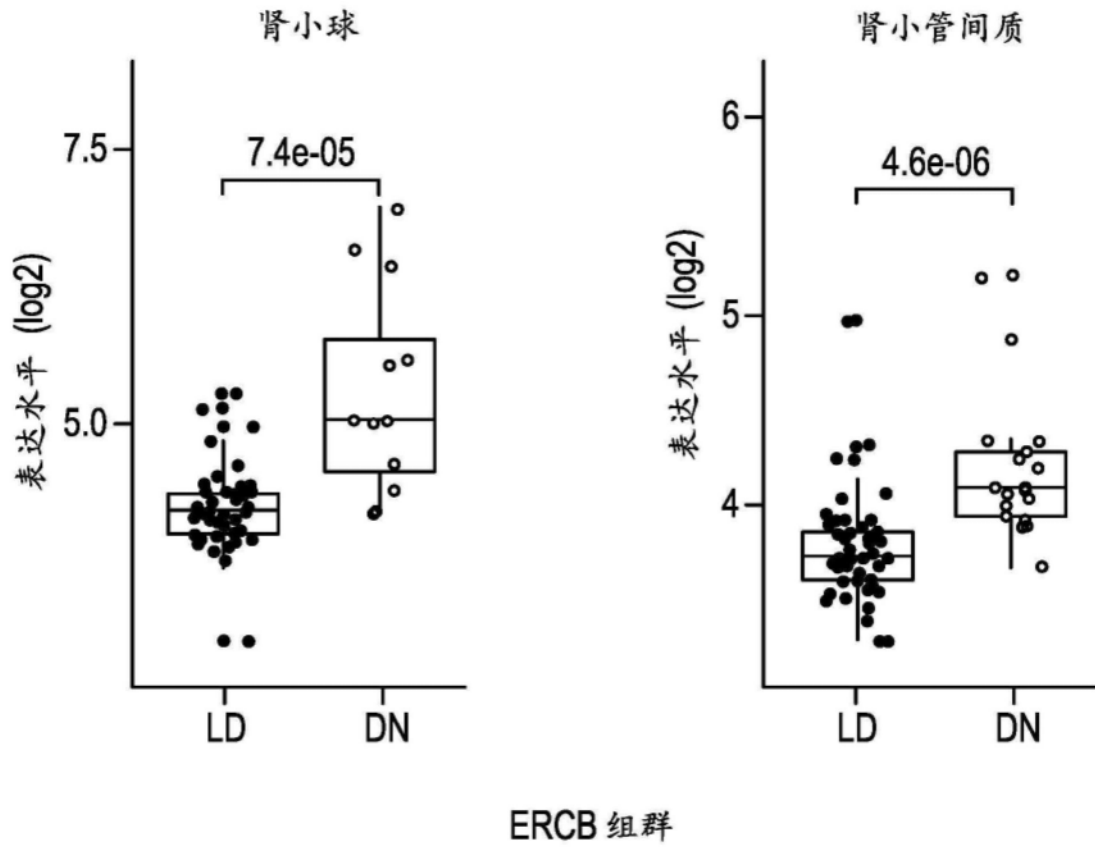
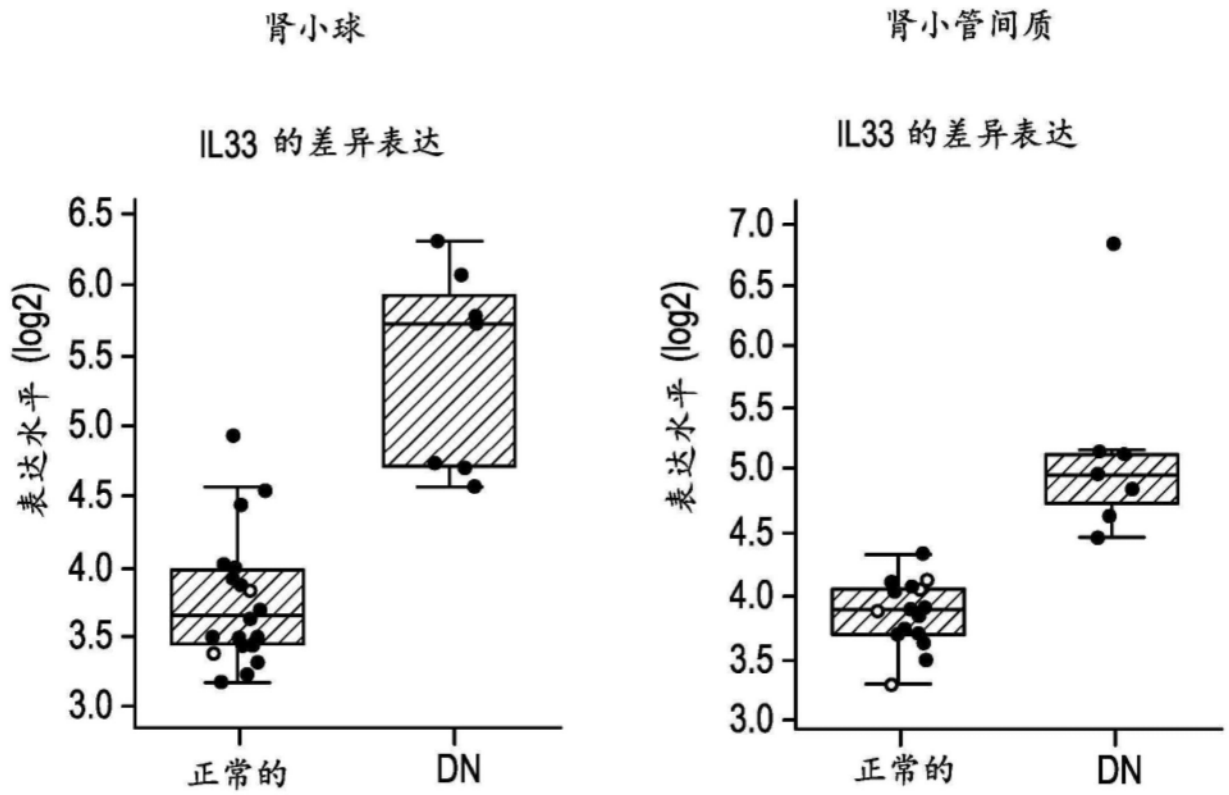
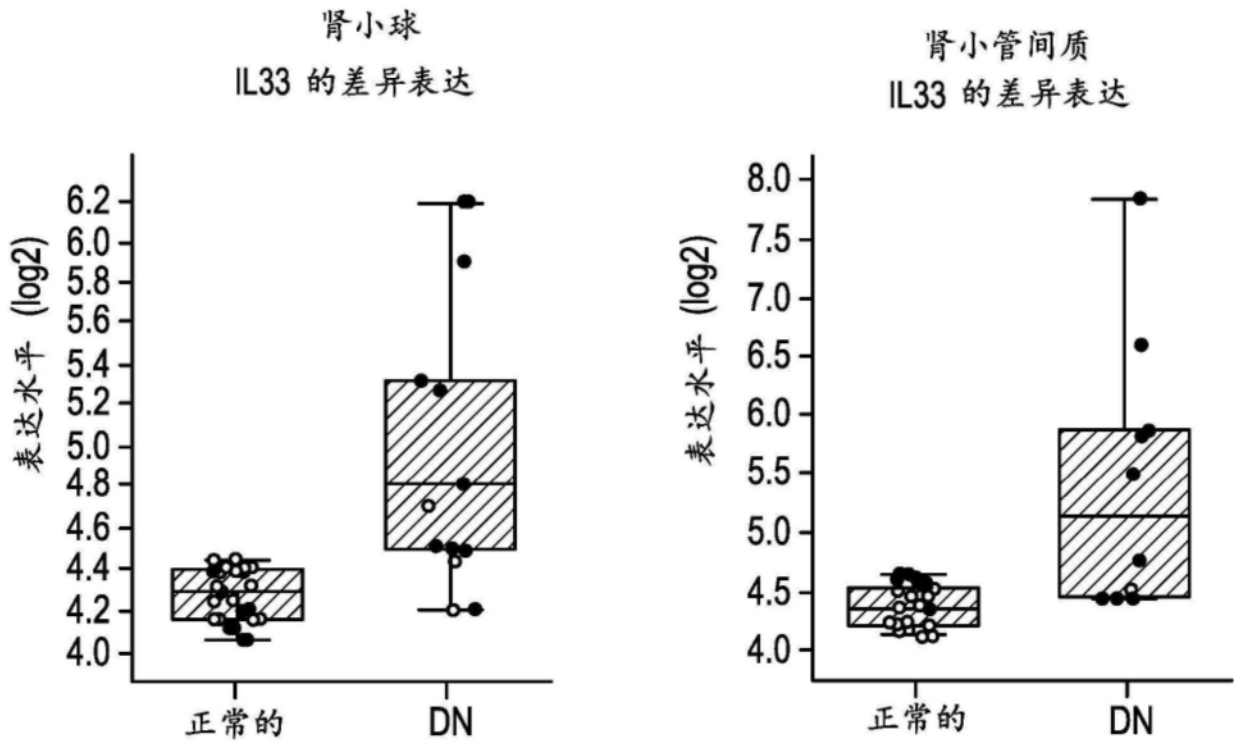


图1A



Ju, 2013 组群

图1B



Woroniccka,
2011 组群

图1C

IL1RL1 的差异表达
207526_s_at (研究: GSE30122)

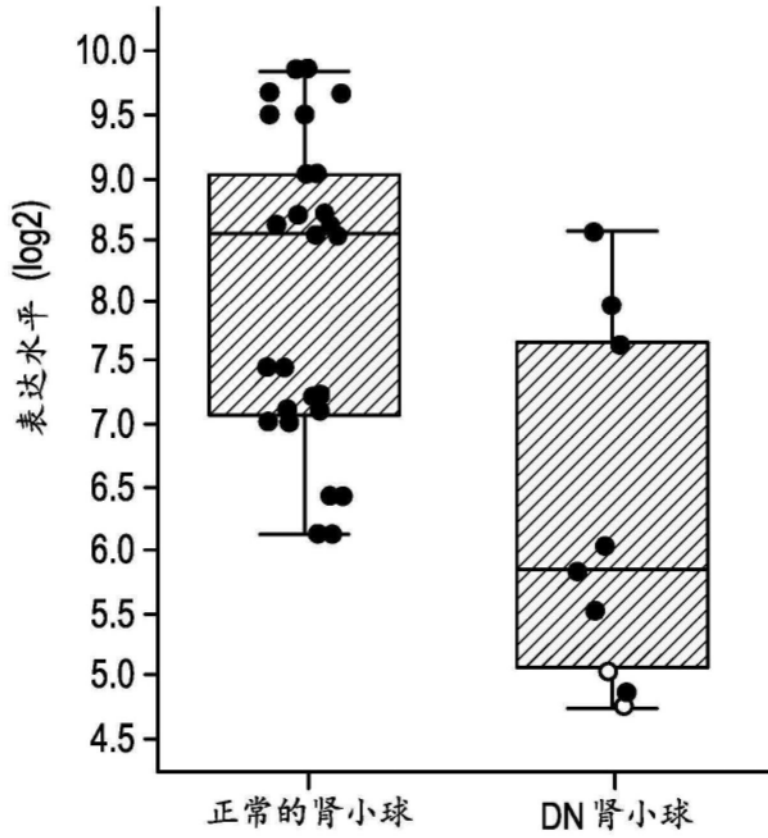


图2A

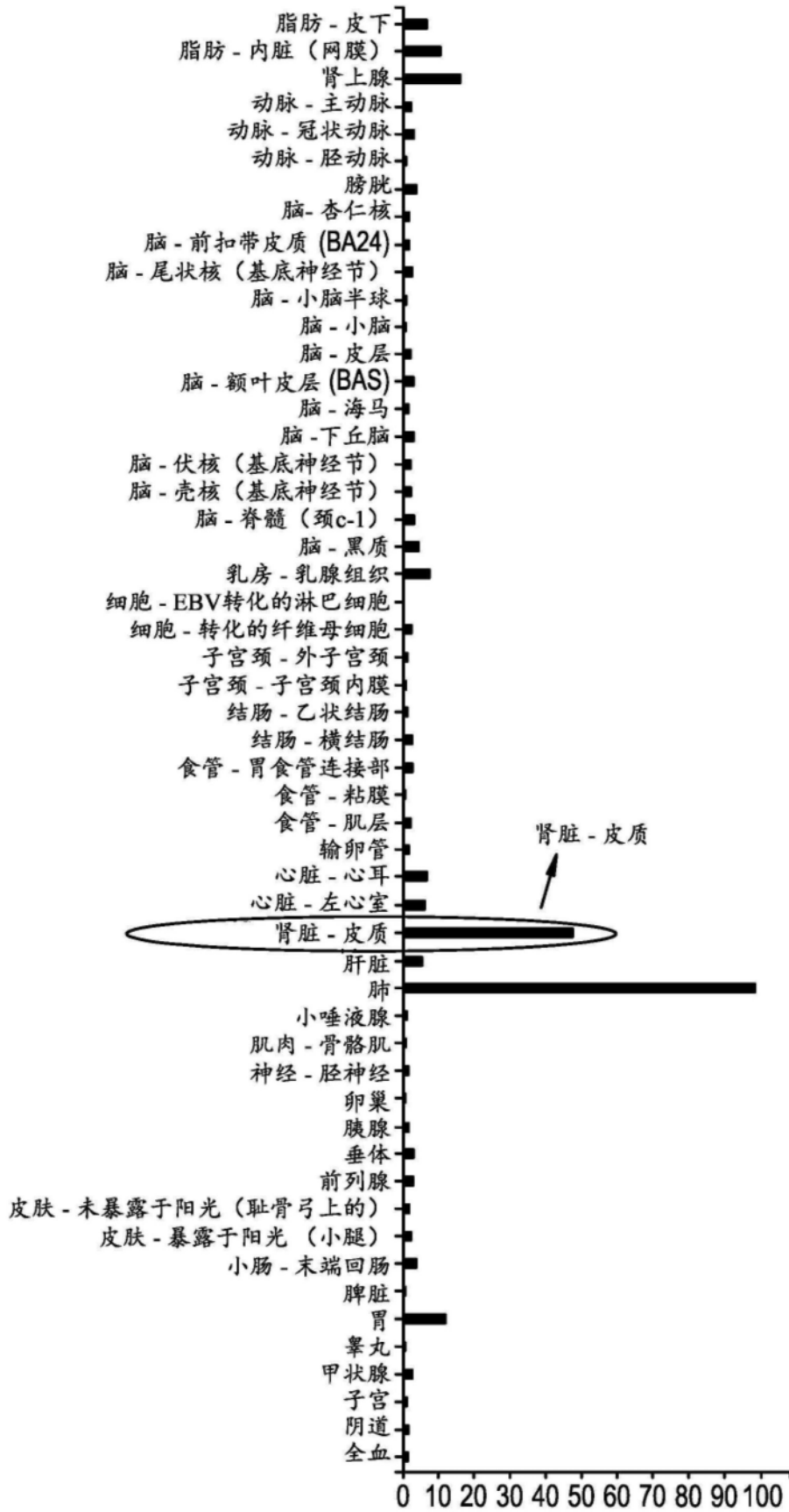


图2B

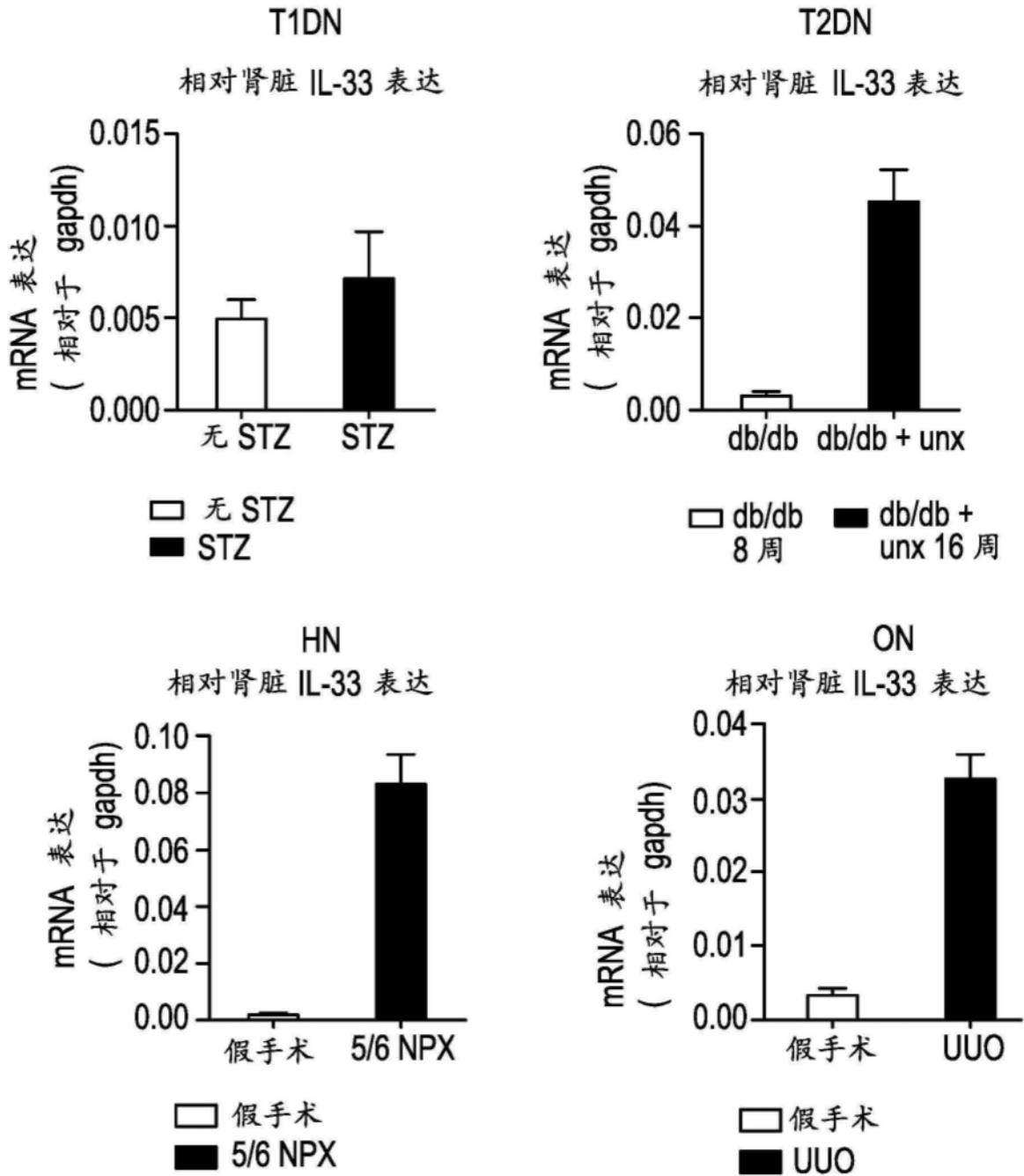


图3

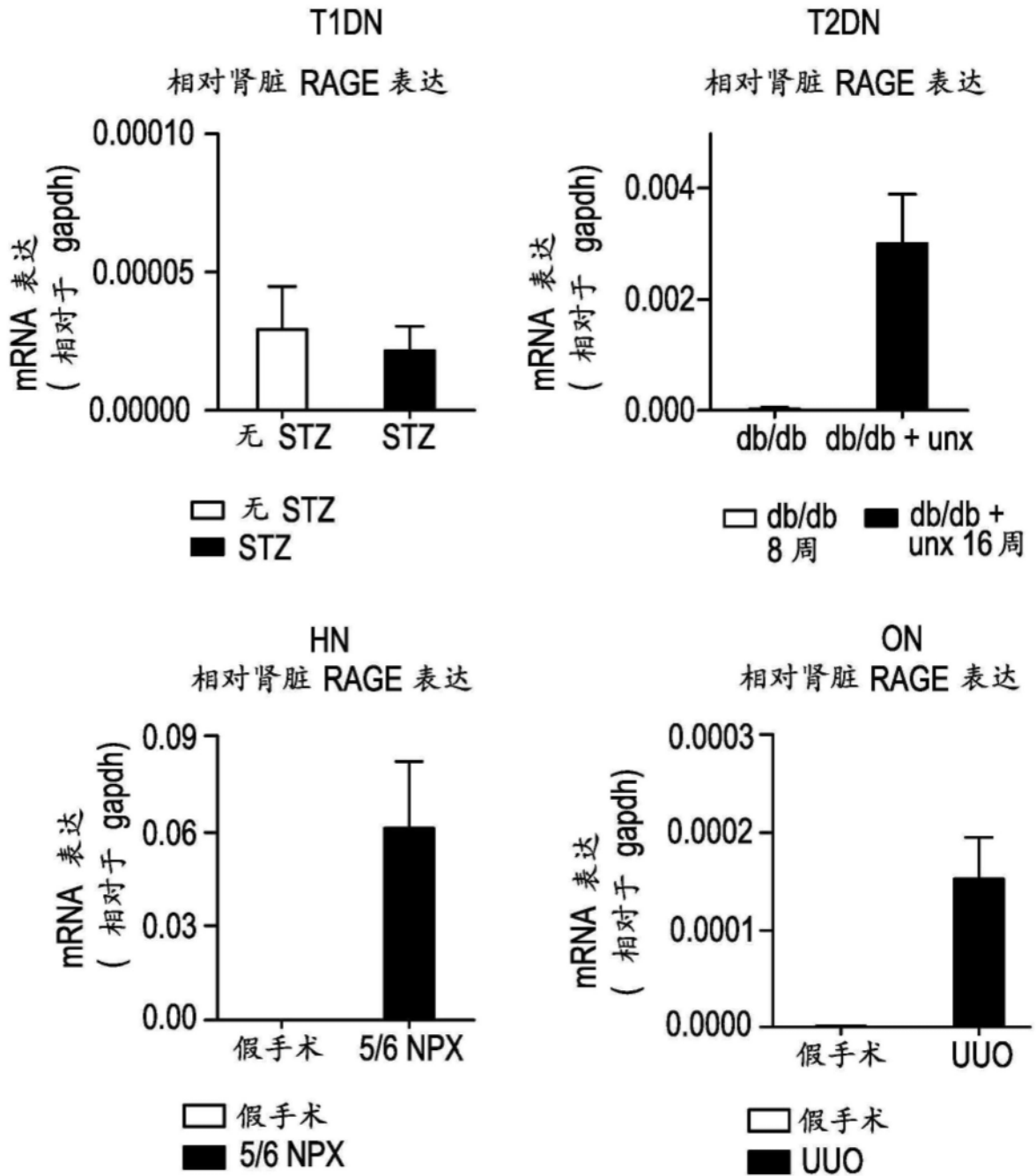


图4

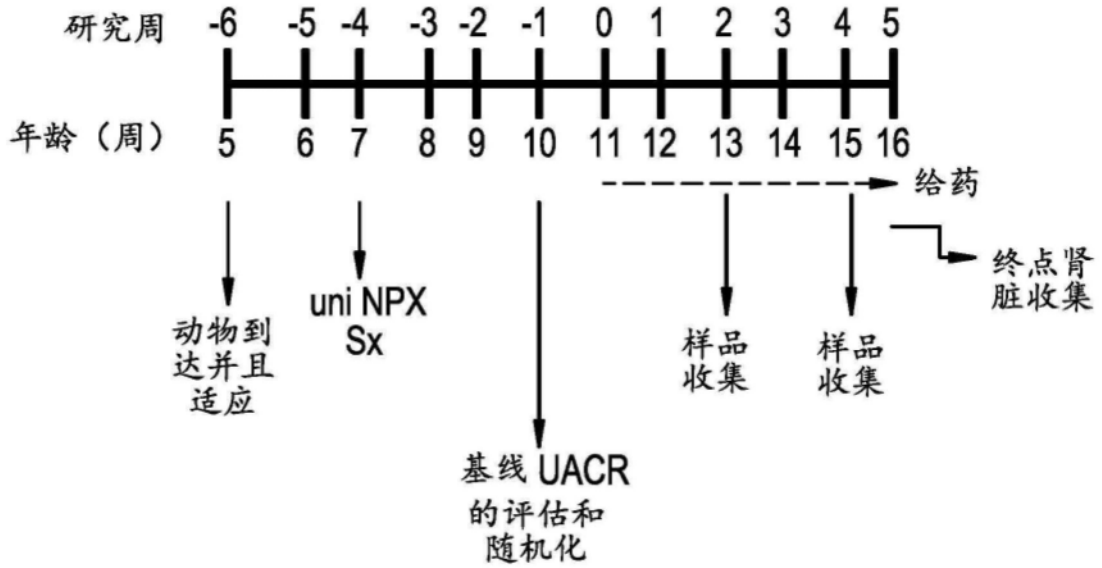


图5

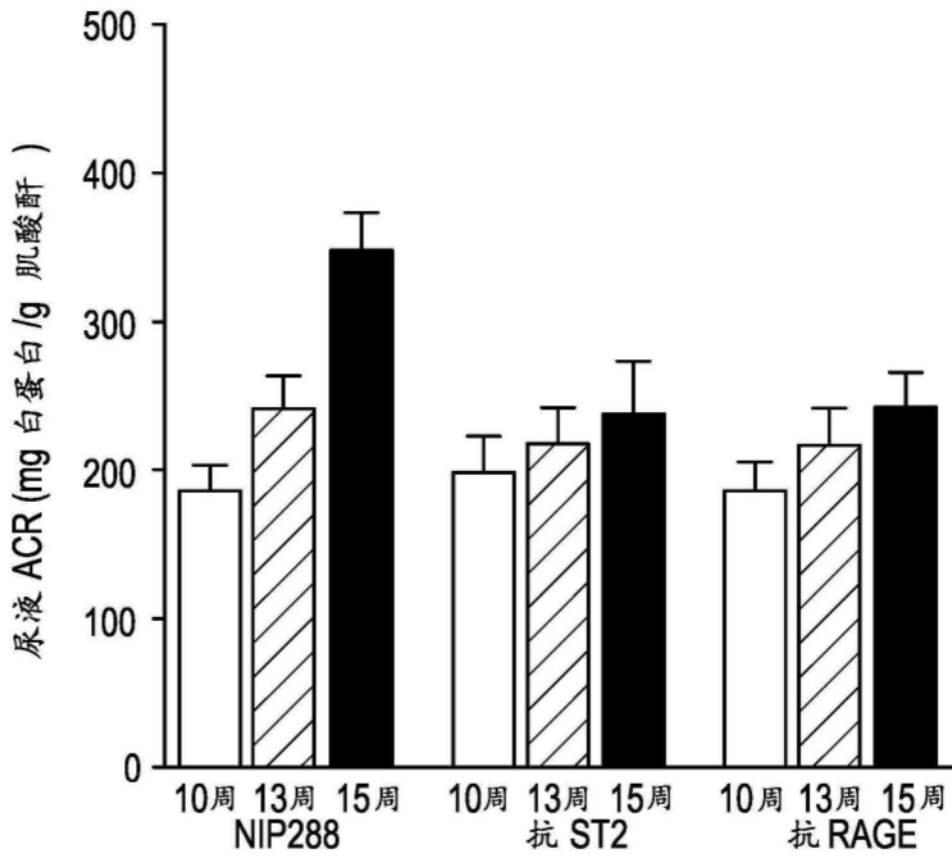


图6

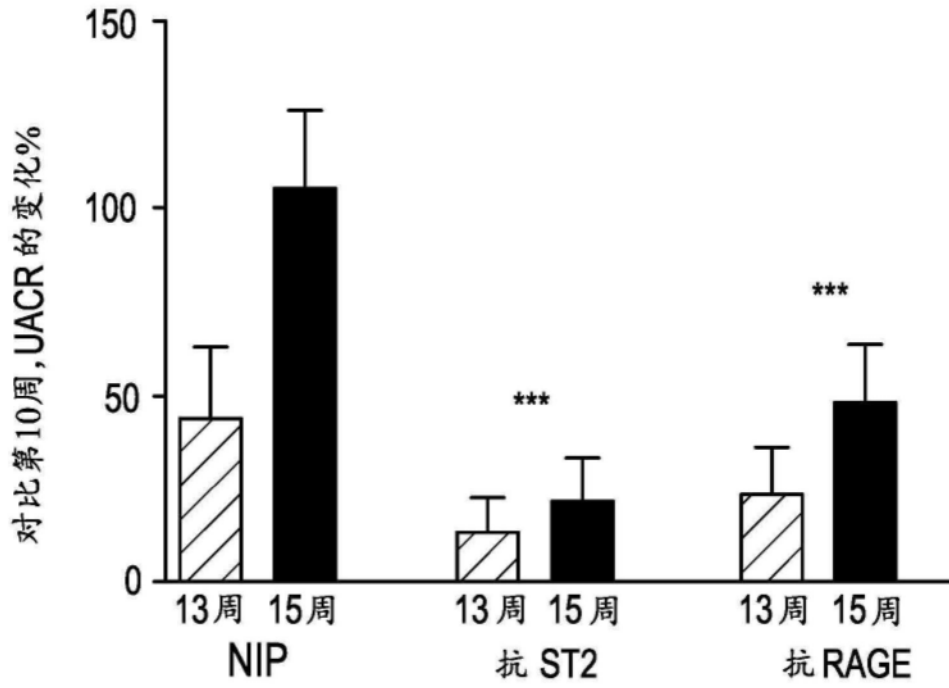


图7

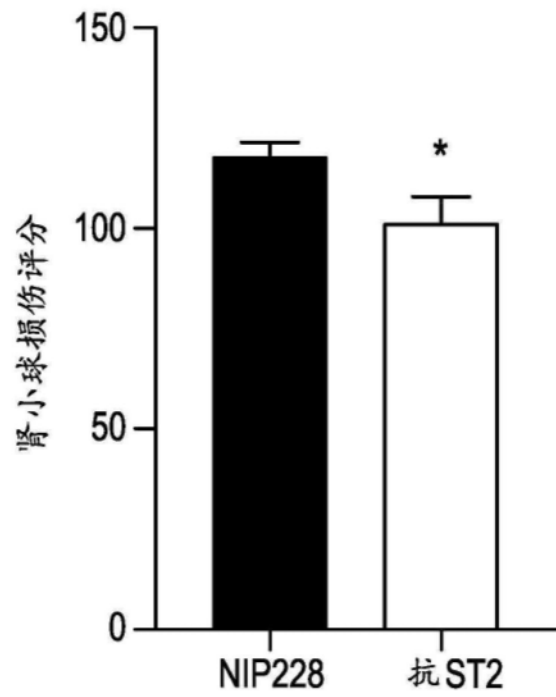


图8

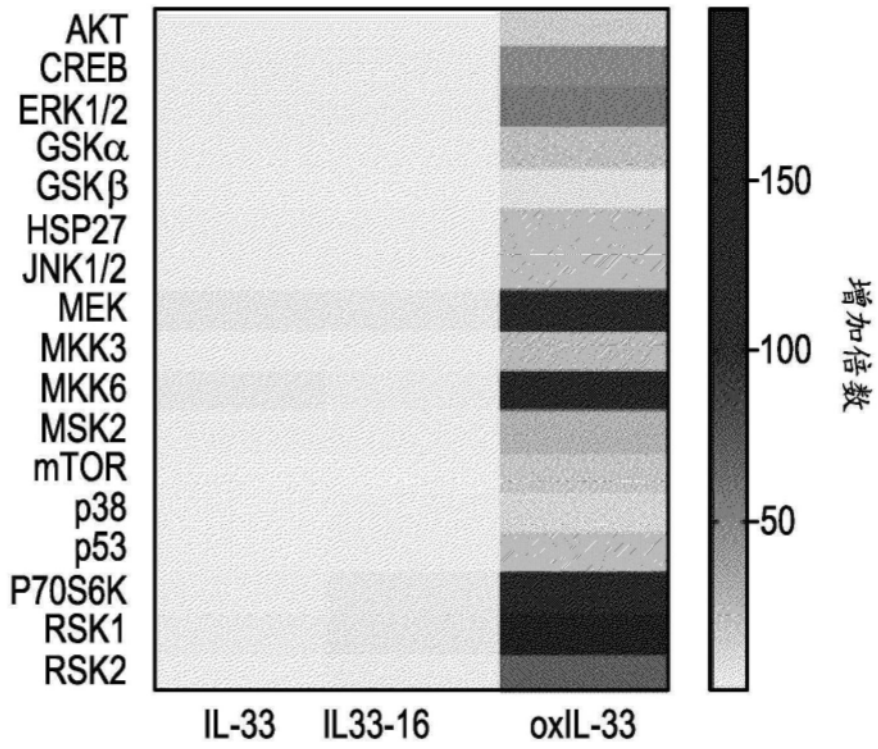


图9

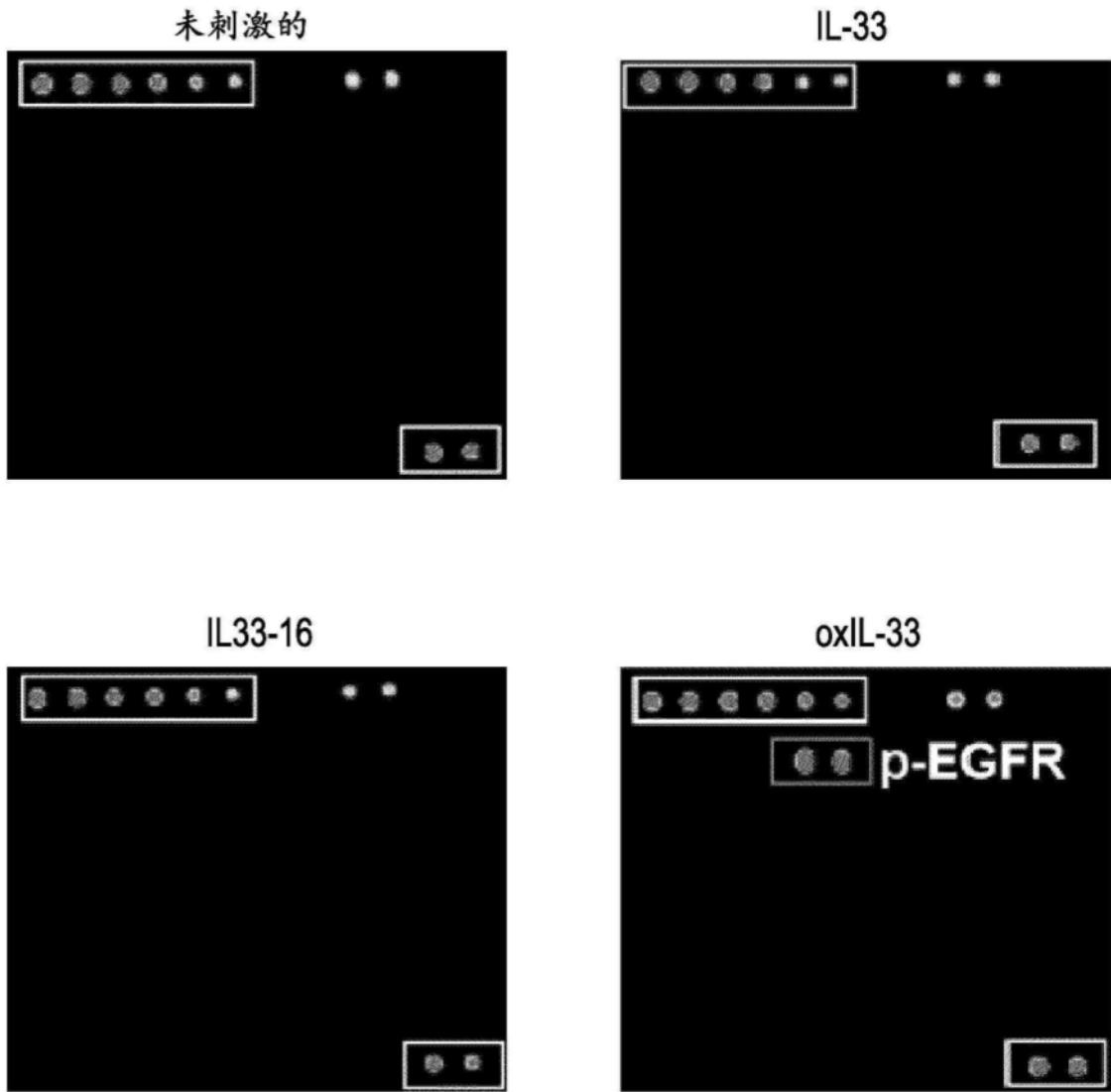


图10

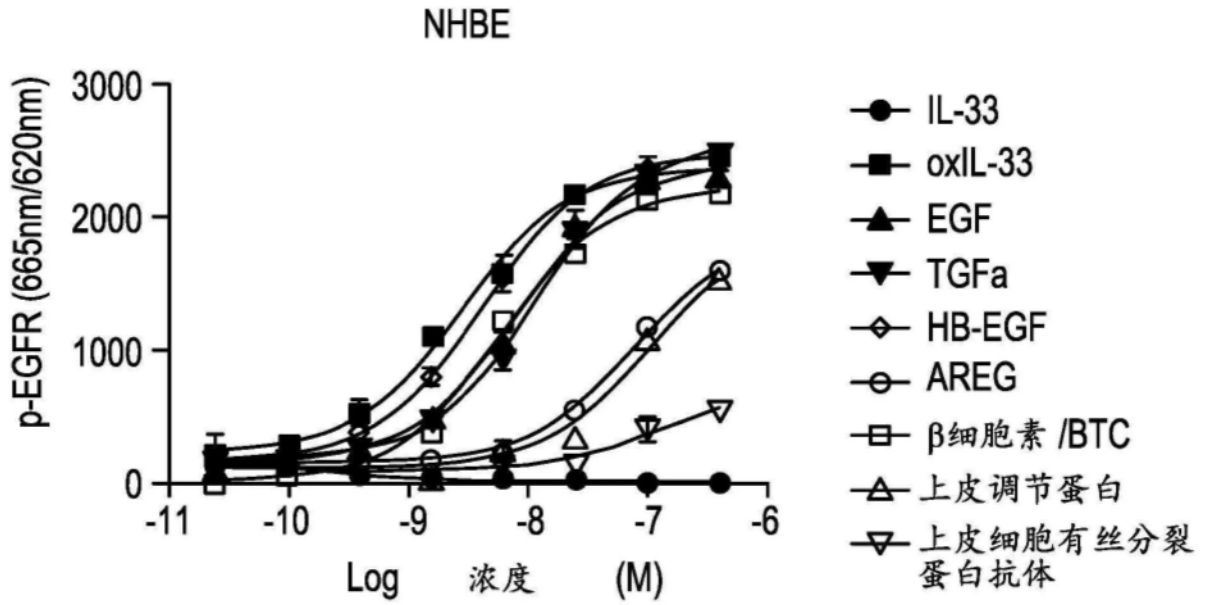


图11A

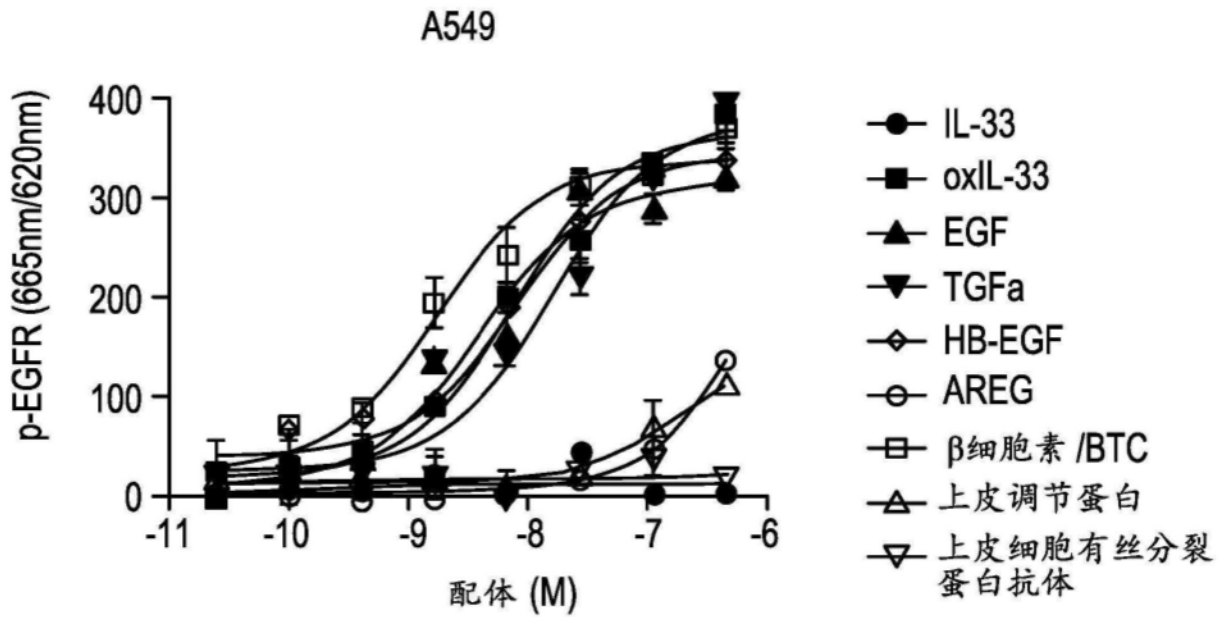


图11B

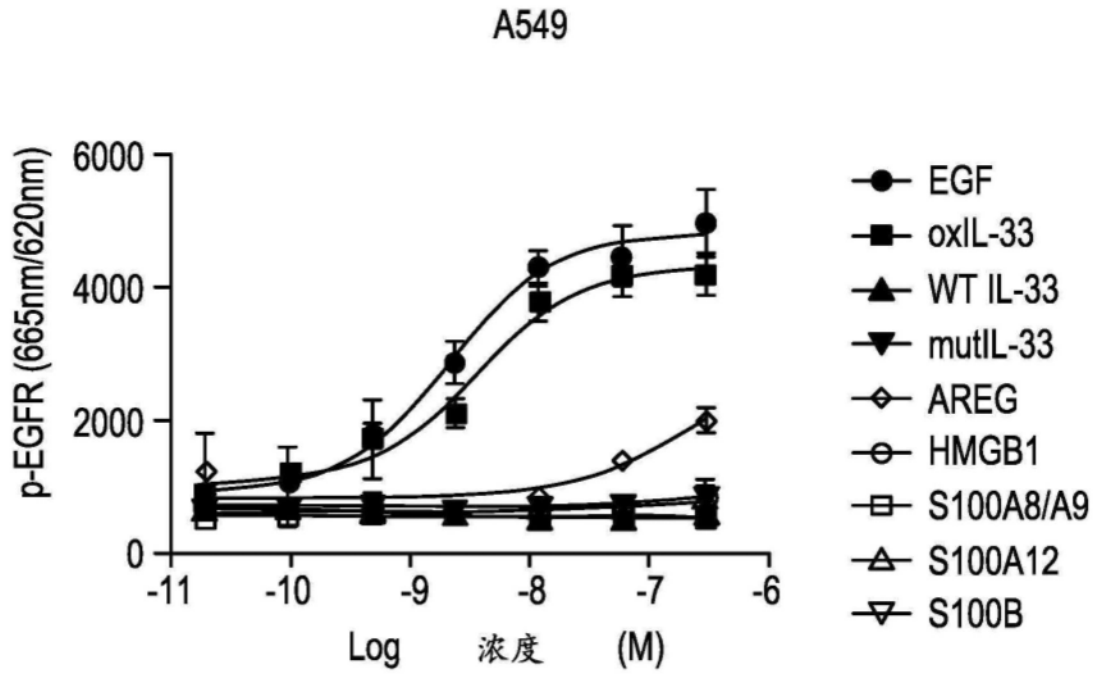


图11C

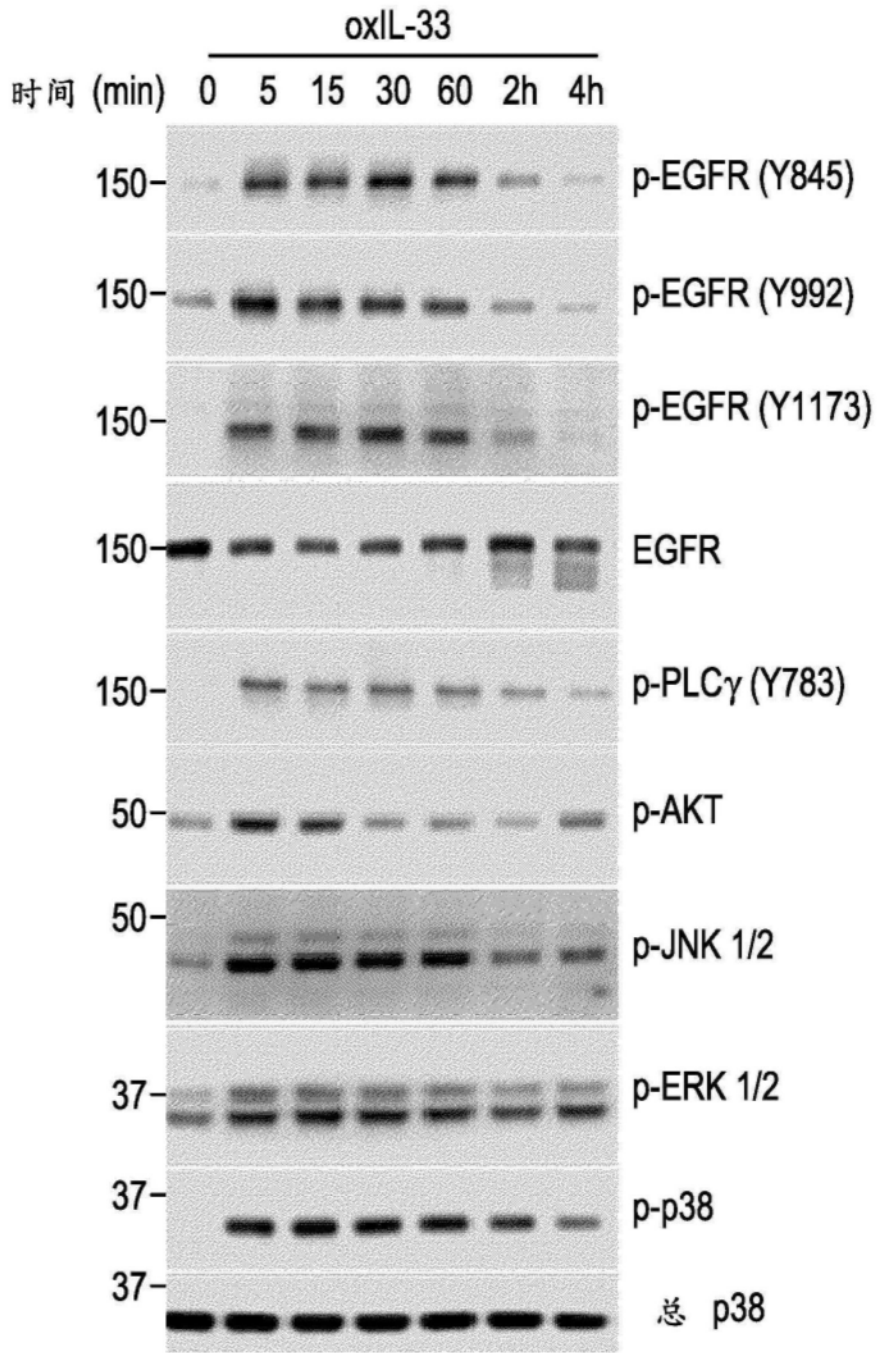


图12

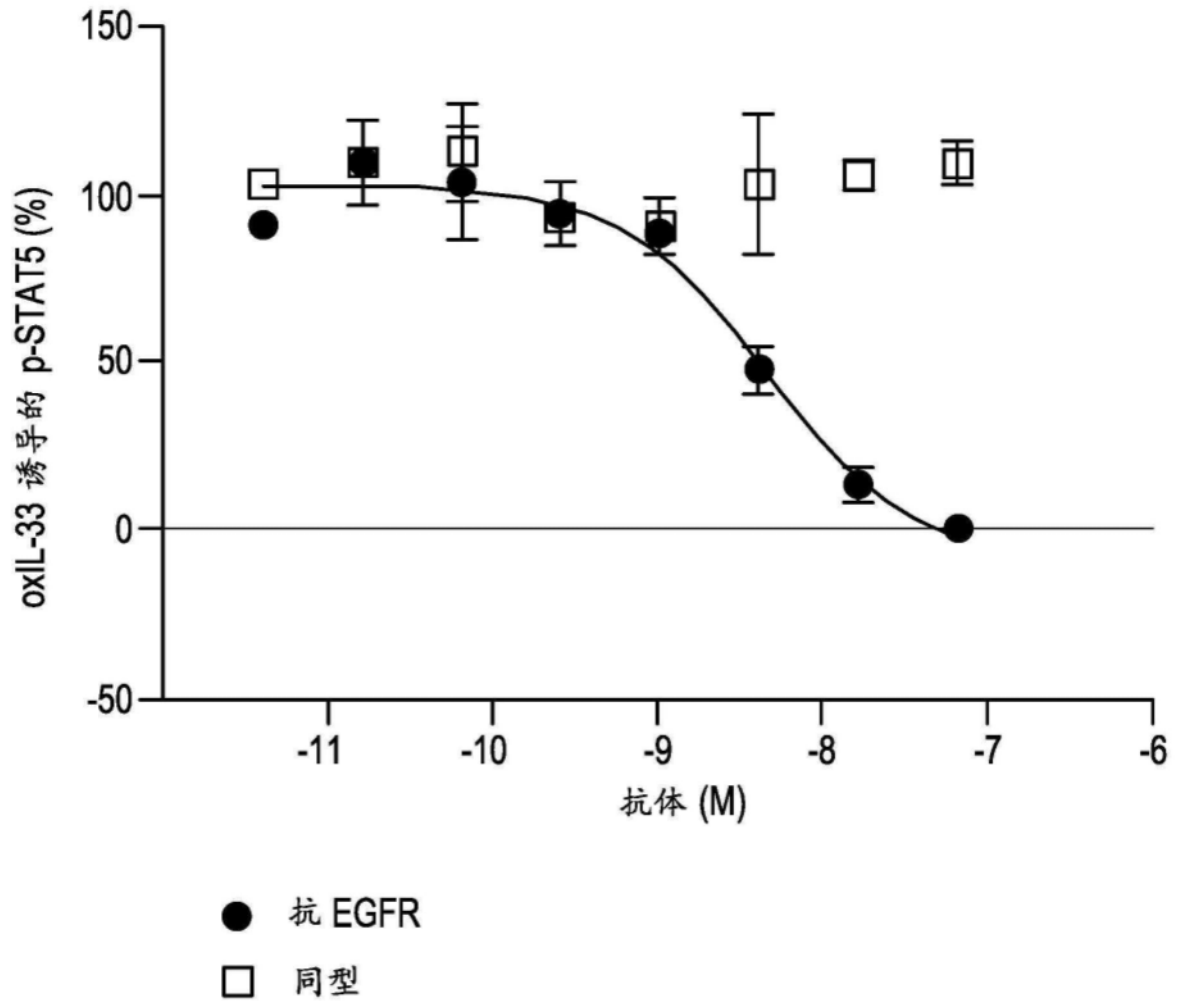


图13

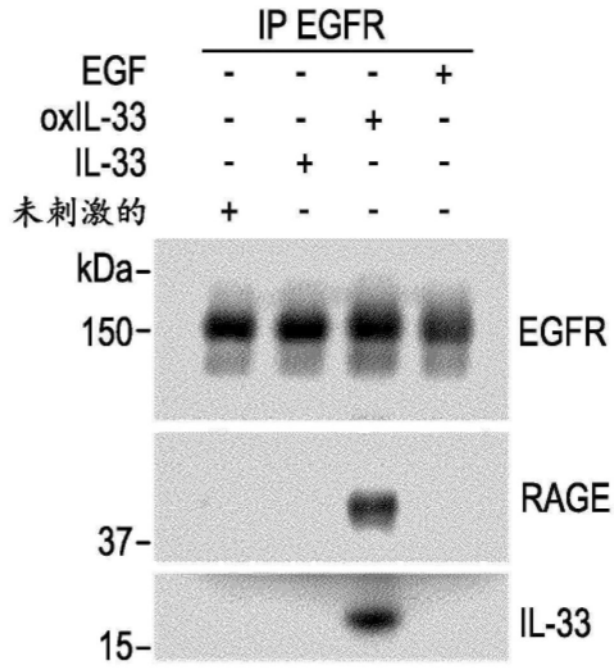


图14

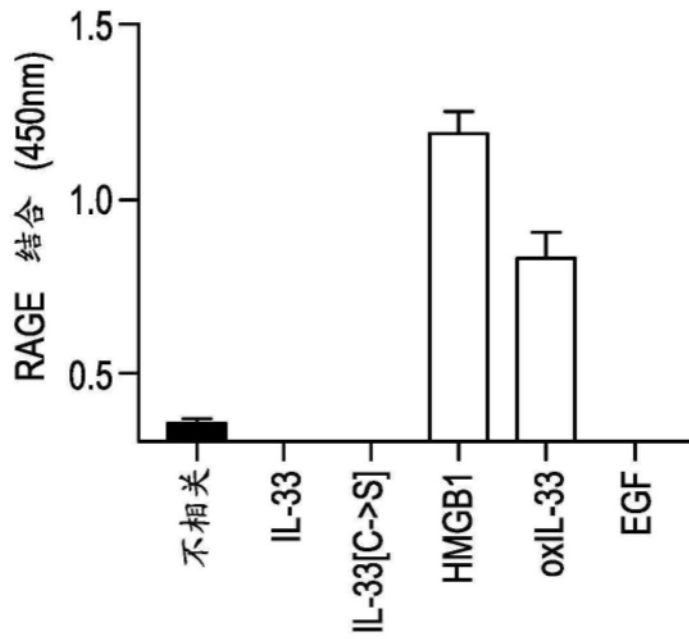


图15A

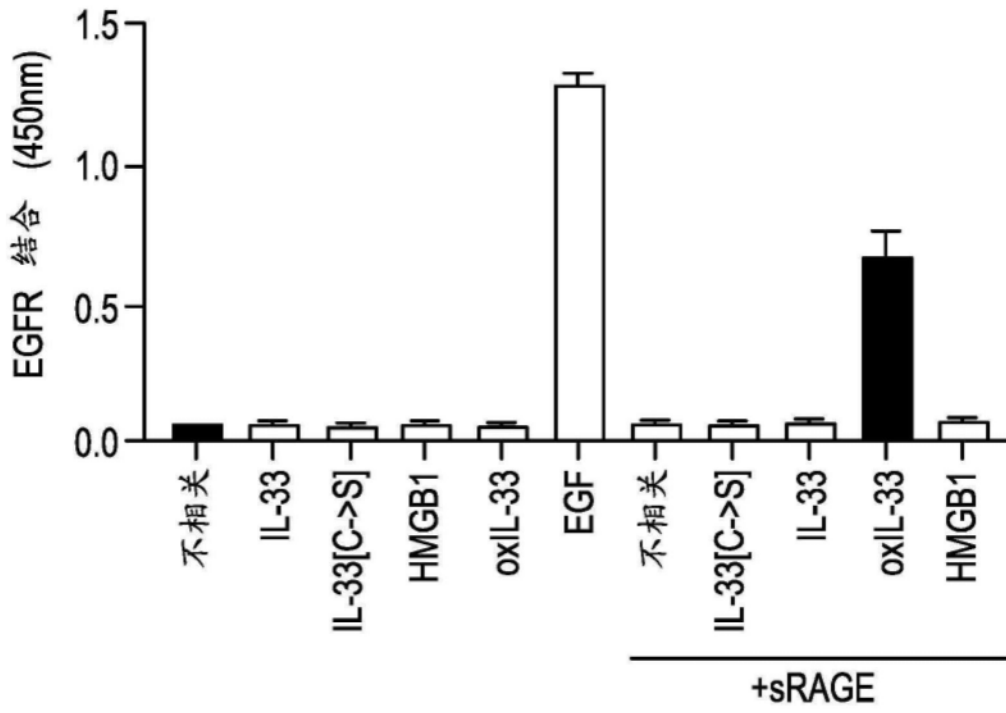


图15B

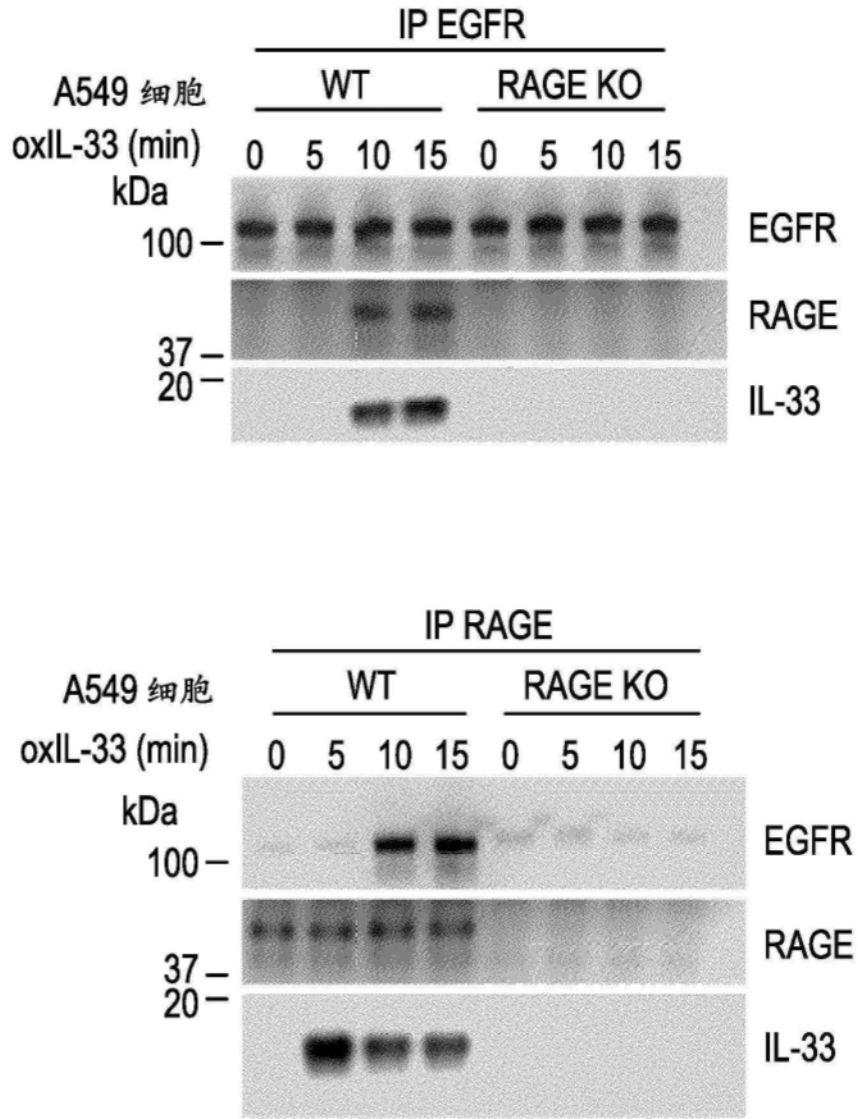


图16

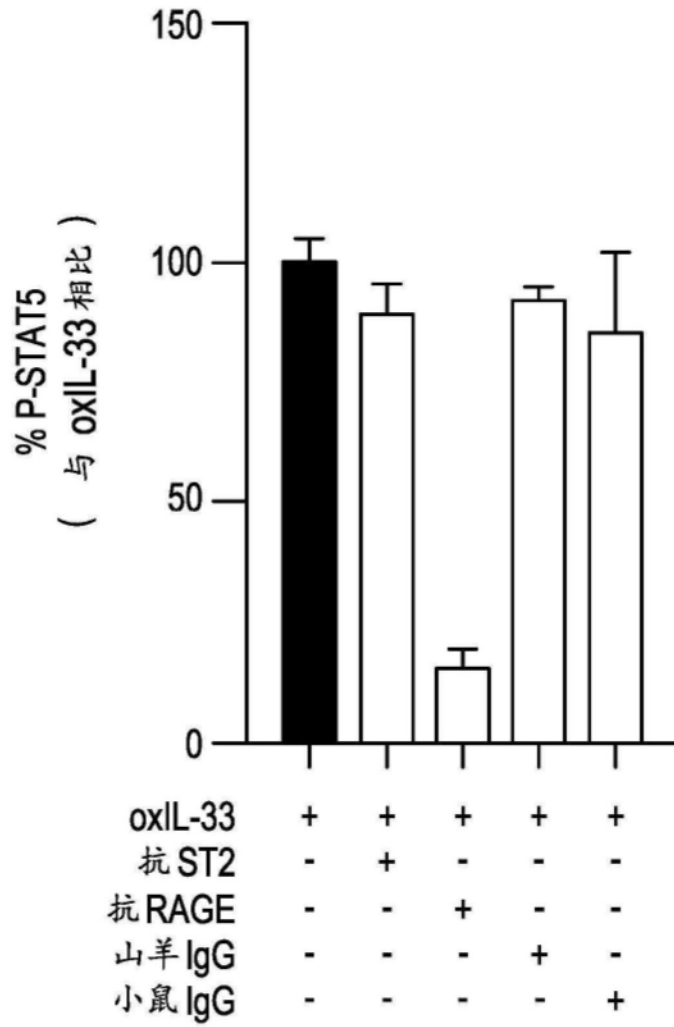


图17

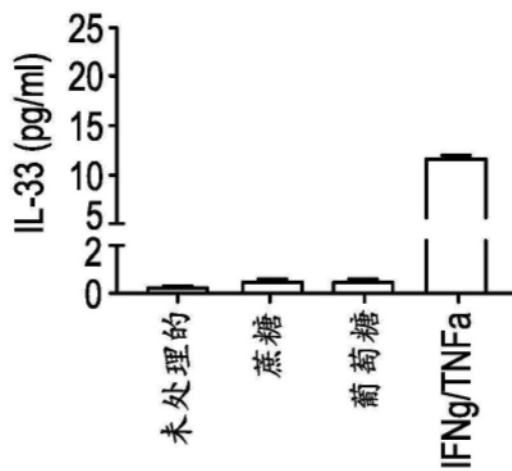


图18A

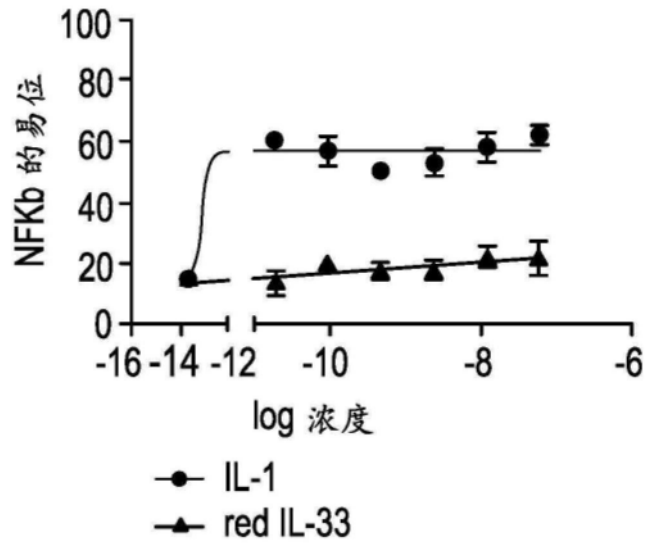


图18B

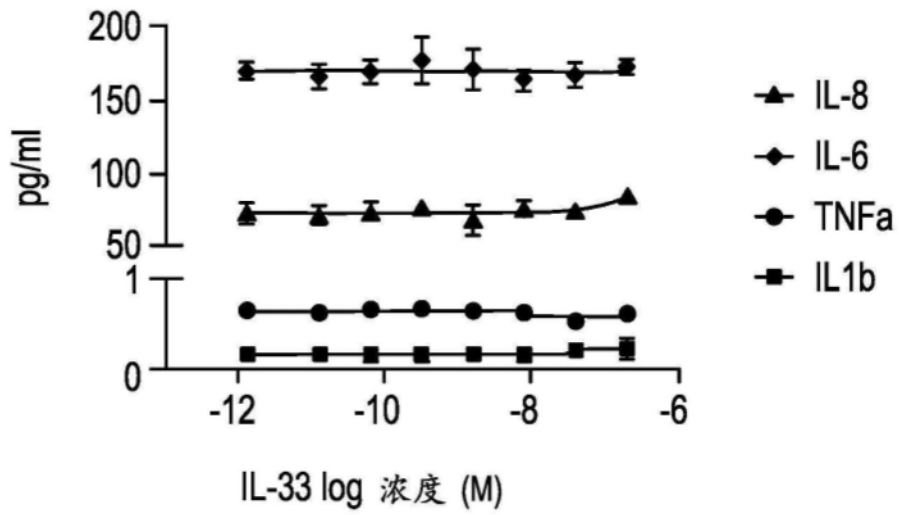


图18C

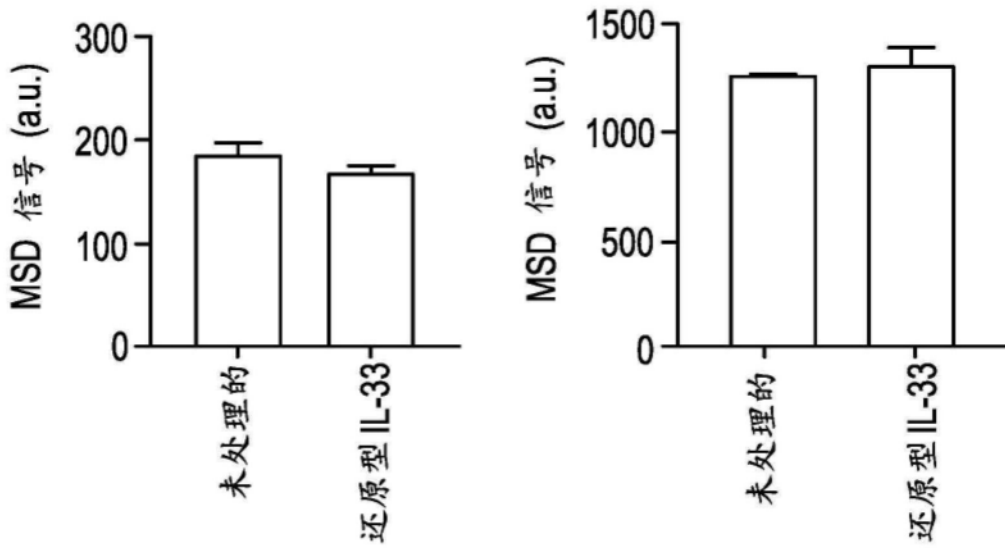


图18D

EGFR 响应于 氧化型
IL-33 (ST2 非依赖性)

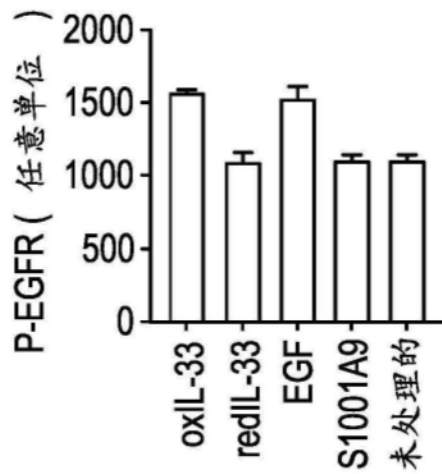


图18E

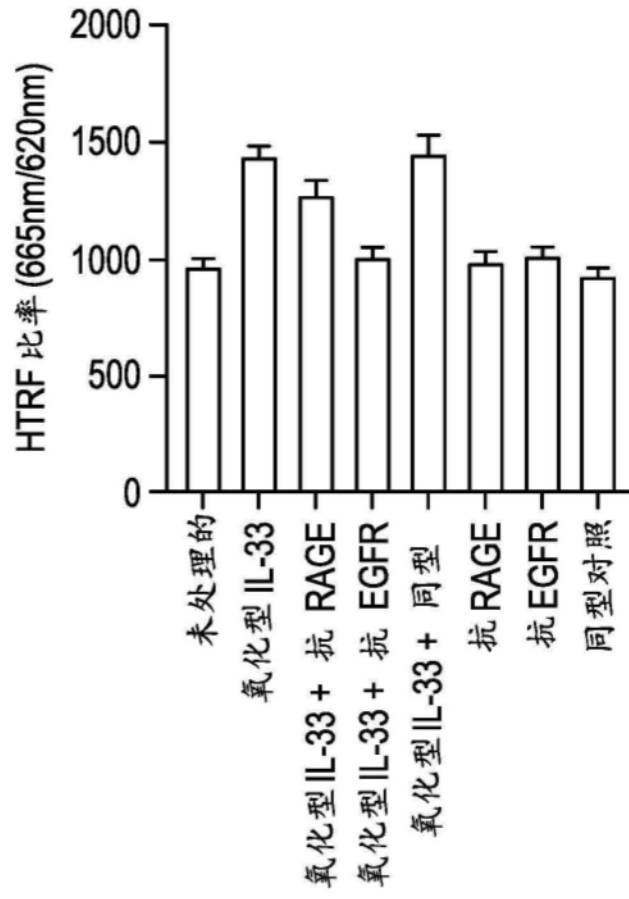


图18F

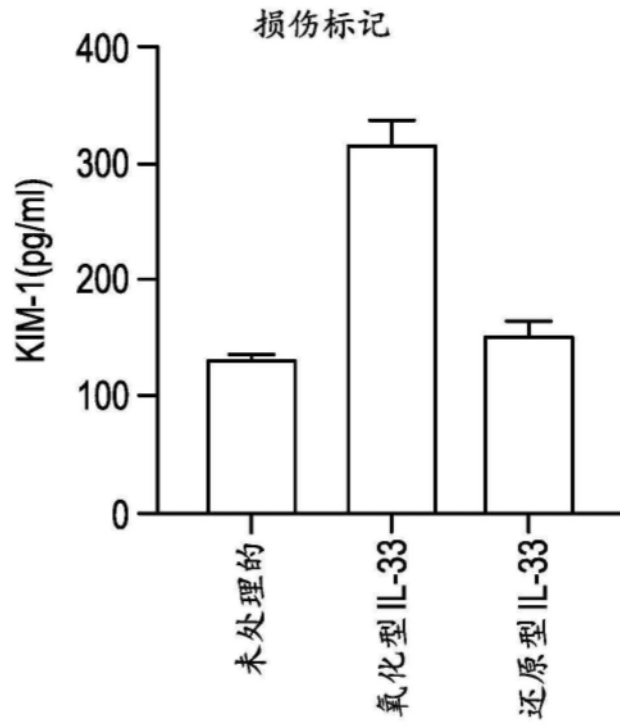


图18G

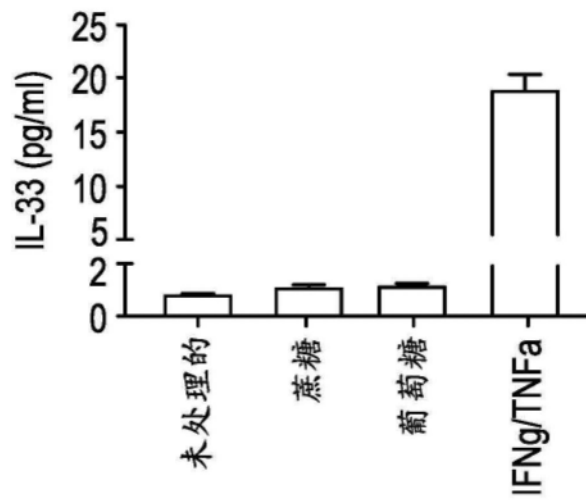


图19A

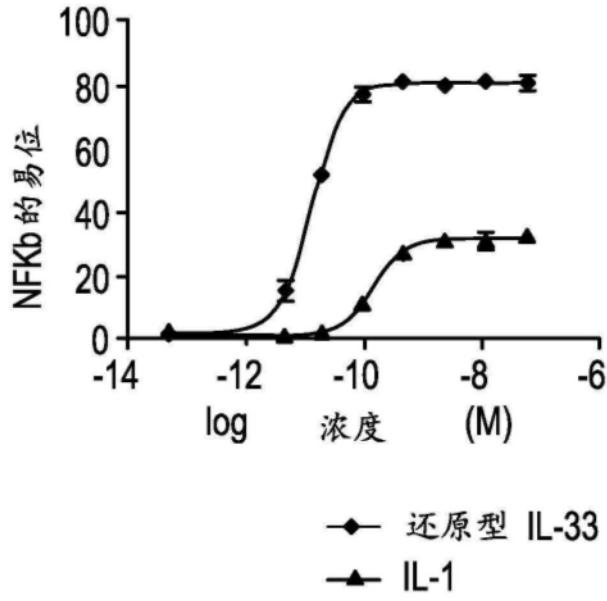


图19B

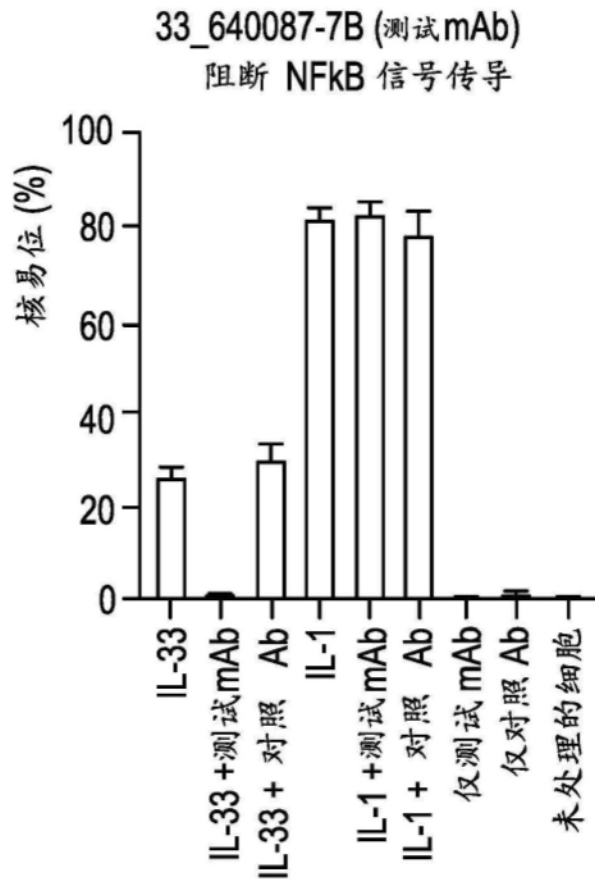


图19C

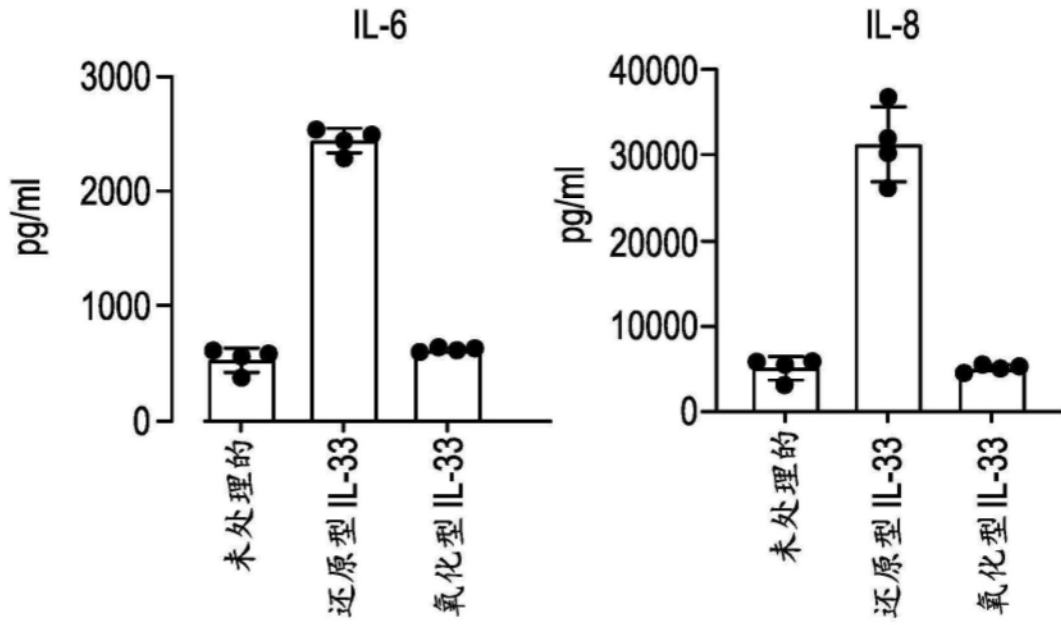


图19D

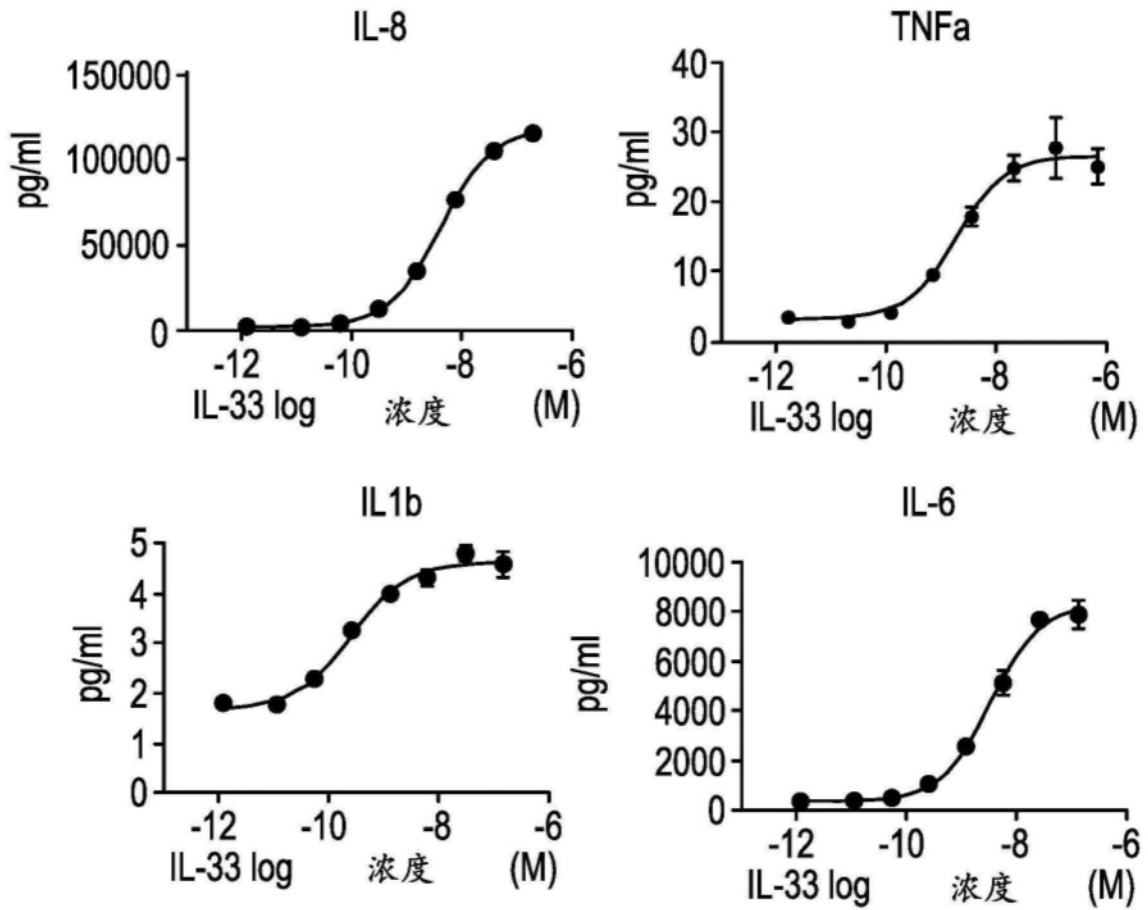


图19E

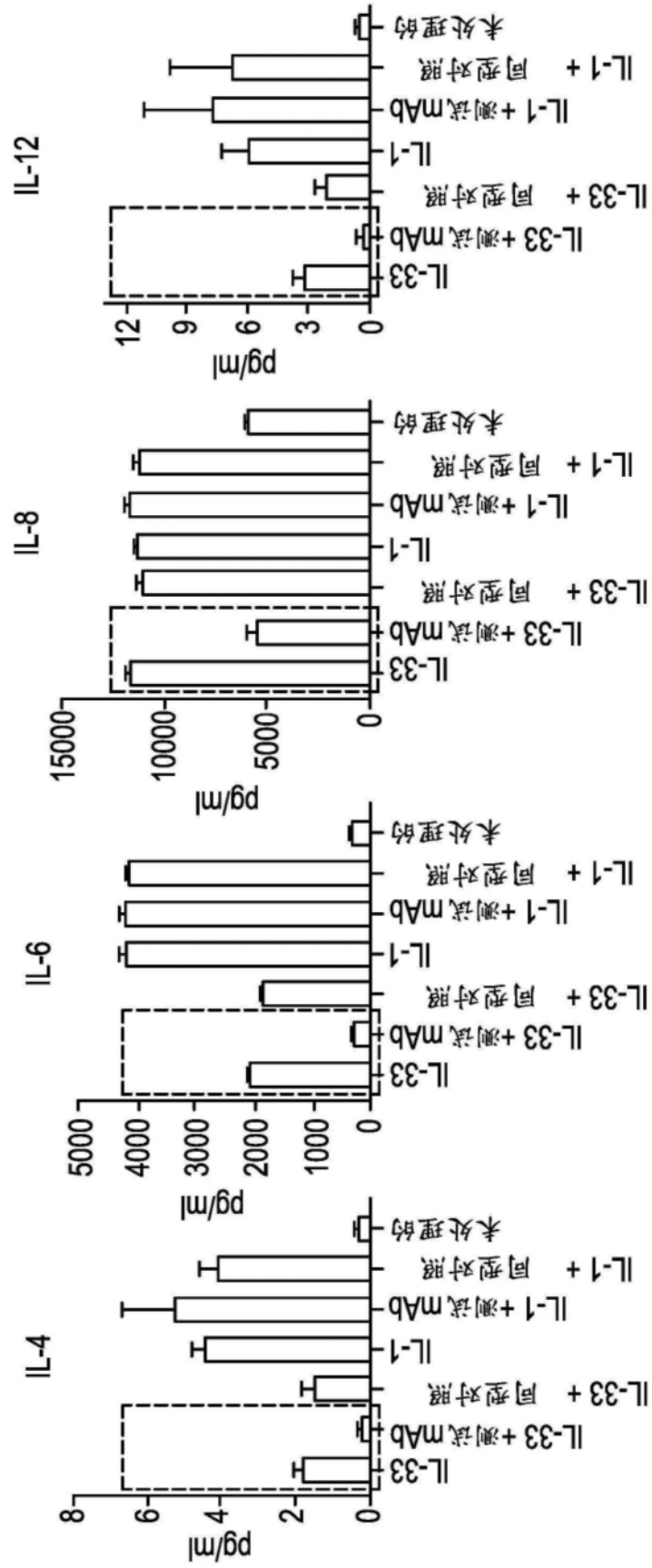


图20A

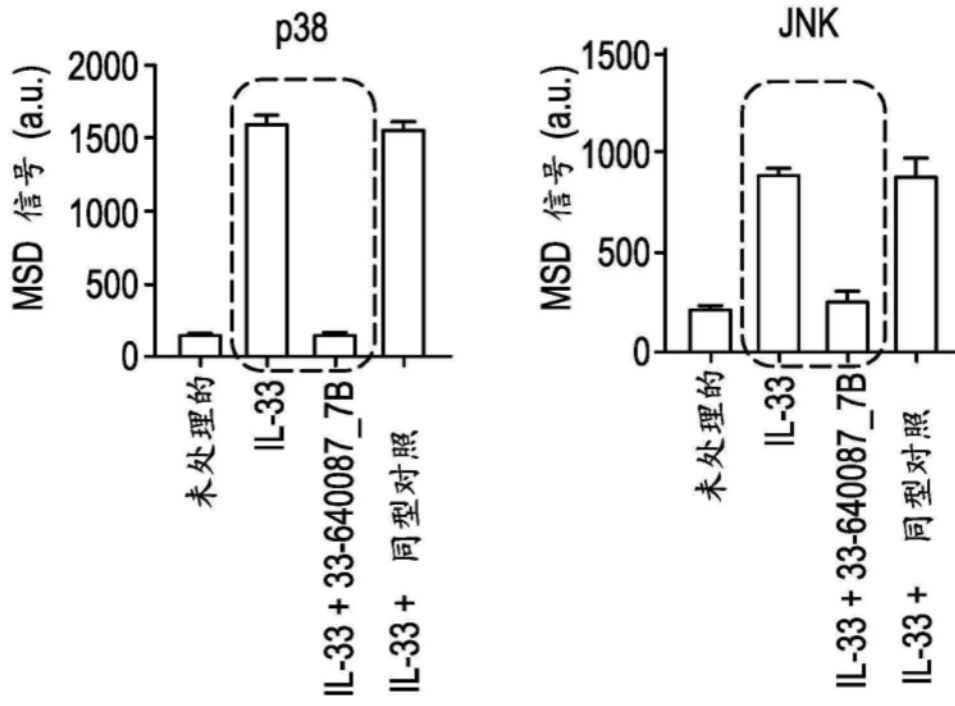


图20B

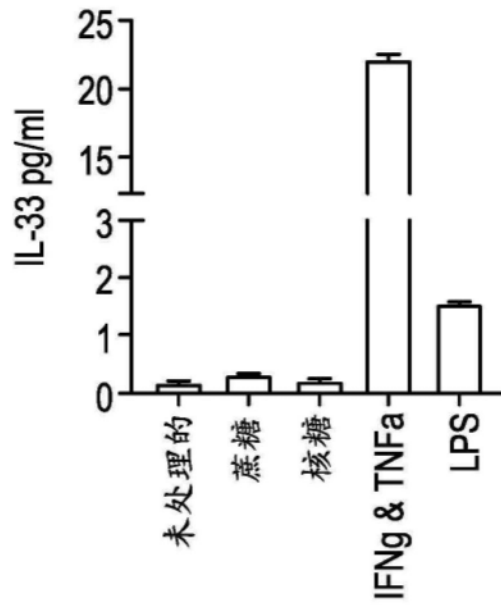


图21A

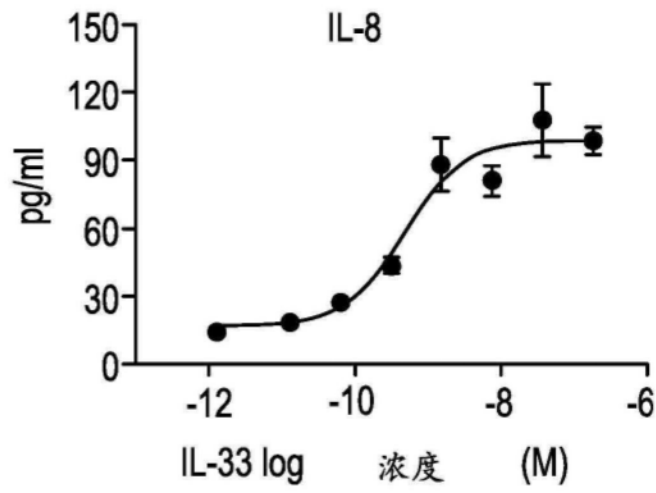


图21B

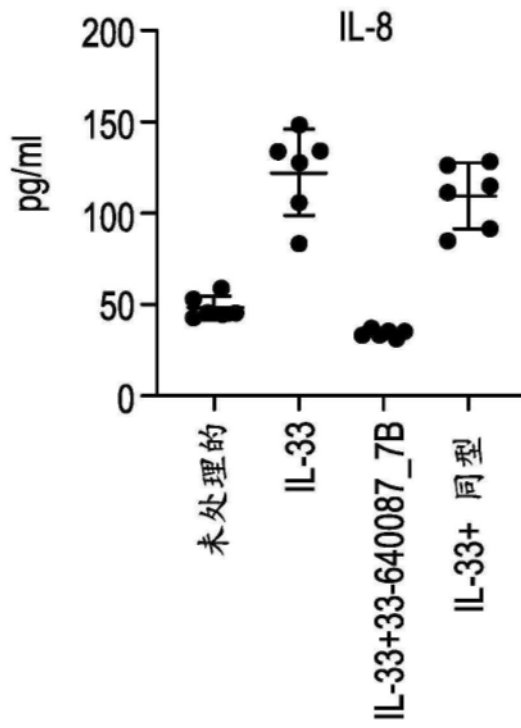


图21C

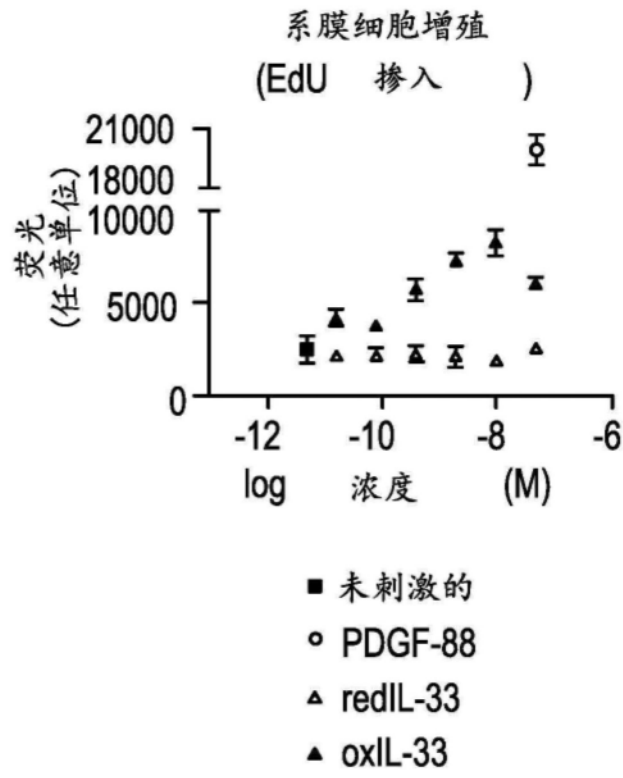


图21D

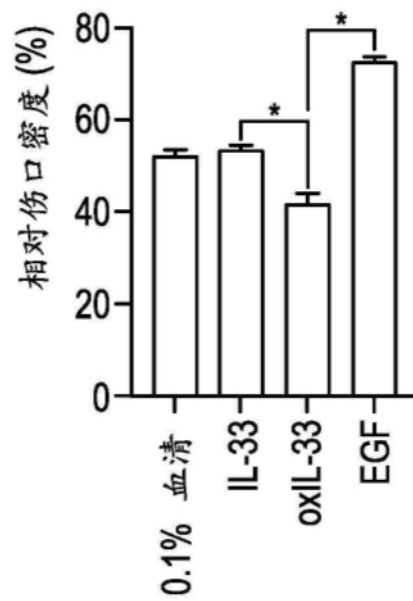


图22A

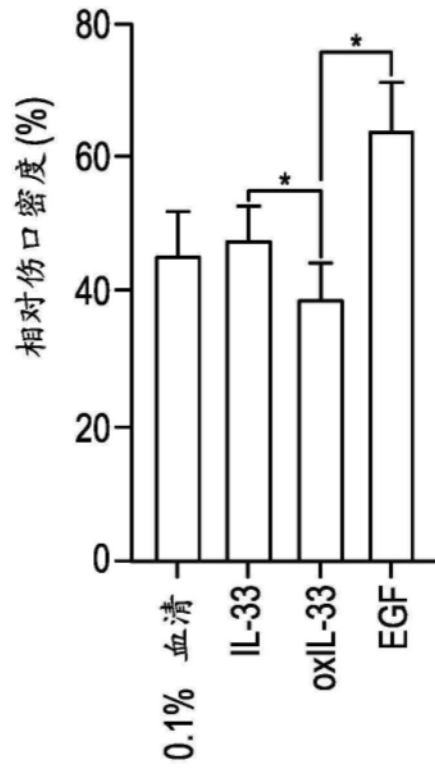


图22B

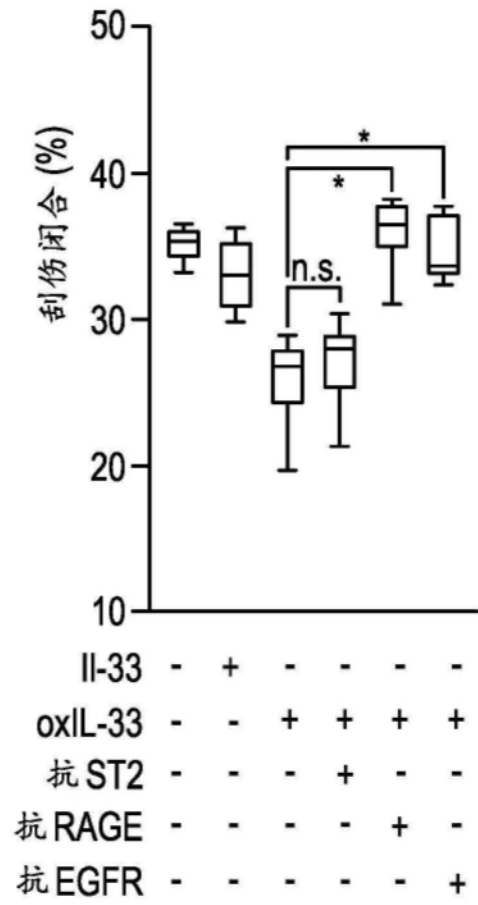


图23