(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110494453 B
(45)授权公告日 2023.05.26

(21)申请号 201880024550.3
(22)申请日 2018.02.09
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110494453 A
(43)申请公布日 2019.11.22
(30)优先权数据
62/457,722 2017.02.10 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.10.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/017680 2018.02.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/148585 EN 2018.08.16
(73)专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士巴塞尔
(72)发明人 陈晓诚 M·丹尼斯 J·杰克曼 J·T·柯尔柏 M·陆 H·R·毛恩 K·拉贾帕克萨 S·拉马努扬 T·斯塔顿 L·吴 易唐盛
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 胡志君 黄革生
(51)Int.Cl.
C07K 16/40(2006.01)
(56)对比文件
US 5744319 A,1998.04.28
EP 0379295 A2,1990.07.25
,Yoshihiro Fukuoka et al.The B12 Anti-Tryptase Monoclonal Antibody Disrupts the Tetrameric Structure of Heparin-Stabilized-Tryptase to Form Monomers That Are Inactive at Neutral pH and Active at Acidic pH.《The Journal of Immunology》.2006,第176卷
Lawrence B. Schwartz et al.Development of a new,more sensitive immunoassay for human tryptase:use in systemic anaphylaxis.《Journal of clinical immunology》.1994,第14卷(第3期),
审查员 毕晴
权利要求书6页 说明书140页
序列表55页 附图35页

(54)发明名称

抗类胰蛋白酶抗体、其组合物及其用途

(57)摘要

本发明提供了包含抗类胰蛋白酶抗体的组合物及其药物组合物以及使用它们的方法。

1.与人类胰蛋白酶β1结合的分离的抗体,其中所述抗体包含以下六个高变区(HVR):

(a)DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1;

(b)FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2;

(c)RNYDDWYFDV(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列的HVR-H3;

(d)SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1;

(e)RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2;和

(f)QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3。

2.根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体包含(a)重链可变(VH)结构域,其包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;(b)轻链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列,或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

3.根据权利要求1所述的抗体,还包含以下VH结构域构架区(FR):

(a)FR-H1,其为EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列;

(b)FR-H2,其为WVRQAPGKGLEWVA(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列;

(c)FR-H3,其为RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR(SEQ IDNO:13)的氨基酸序列;和

(d)FR-H4,其为WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:14)的氨基酸序列。

4.根据权利要求1所述的抗体,其中VH结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

5.根据权利要求1所述的抗体,还包含以下VL结构域FR:

(a)FR-L1,其为DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:15)的氨基酸序列;

(b)FR-L2,其为WYQQKPGKSPKPWIY(SEQ ID NO:16)的氨基酸序列;

(c)FR-L3,其为GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:17)的氨基酸序列;和

(d)FR-L4,其为FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:18)的氨基酸序列。

6.根据权利要求1所述的抗体,其中VL结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

7.与人类胰蛋白酶β1结合的分离的抗体,其中所述抗体包含(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少99%序列同一性的氨基酸序列,和(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少99%序列同一性的氨基酸序列,其中所述VH结构域包含以下高变区(HVR):DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1;FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2;RNYDDWYFDV(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列的HVR-H3;且所述VL结构域包含以下高变区(HVR):SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1;RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2;和QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3。

8.根据权利要求7所述的抗体,其中所述抗体包含VH结构域,所述VH结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和VL结构域,所述VL结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

9.根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体包含(a)重链,其包含SEQ IDNO:76的氨基酸序列,和(b)轻链,其包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列。

10.根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体包含(a)重链,其包含SEQ IDNO:78的氨基酸序列,和(b)轻链,其包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列。

11.根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体能够解离四聚体人类胰蛋白酶β1的小界

面和四聚体人类胰蛋白酶β1的大界面这二者。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的抗体，其中所述抗体还结合食蟹猴(cyno)类胰蛋白酶。

13.根据权利要求1-11中任一项所述的抗体，其中所述抗体还结合人类胰蛋白酶α。

14.根据权利要求13所述的抗体，其中所述抗体还结合人类胰蛋白酶β2或人类胰蛋白酶β3。

15.根据权利要求14所述的抗体，其中所述抗体结合人类胰蛋白酶β2和人类胰蛋白酶β3。

16.根据权利要求1-11、14或15中任一项所述的抗体，其中所述抗体以1nM或更小的K_D结合类胰蛋白酶。

17.根据权利要求16所述的抗体，其中所述抗体以120pM和0.5nM之间的K_D结合类胰蛋白酶。

18.根据权利要求16所述的抗体，其中所述抗体以120pM和200pM之间的K_D结合类胰蛋白酶。

19.根据权利要求1所述的抗体，其中所述抗体能够抑制人类胰蛋白酶β1的酶活性。

20.根据权利要求19所述的抗体，其中所述抗体以2.5nM或更低的IC_{50}抑制类胰蛋白酶的活性，其通过使用合成肽S-2288作为底物的人类胰蛋白酶β酶促测定法所测定。

21.根据权利要求1所述的抗体，其中所述抗体能够在pH 6抑制人类胰蛋白酶β1的酶活性。

22.根据权利要求1所述的抗体，其中所述抗体能够抑制类胰蛋白酶介导的刺激支气管平滑肌细胞增殖和/或基于胶原蛋白的收缩。

23.根据权利要求1所述的抗体，其中所述抗体能够抑制肥大细胞组胺释放。

24.根据权利要求23所述的抗体，其中所述抗体能够抑制IgE触发的组胺释放和/或类胰蛋白酶触发的组胺释放。

25.根据权利要求1所述的抗体，其中所述抗体能够抑制食蟹猴支气管肺泡灌洗(BAL)样品或鼻吸附样品中的类胰蛋白酶活性。

26.根据权利要求1所述的抗体，其中所述抗体能够解离四聚体人类胰蛋白酶β1。

27.根据权利要求26所述的抗体，其中处于单价样式的所述抗体能够解离四聚体人类胰蛋白酶β1。

28.根据权利要求27所述的抗体，其中单价样式是Fab样式。

29.根据权利要求1-11和19-28中任一项所述的抗体，其中所述抗体能够在肝素存在下解离四聚体人类胰蛋白酶β1。

30.根据权利要求1-11和19-28中任一项所述的抗体，其中所述抗体是单克隆的。

31.根据权利要求1-11和19-28中任一项所述的抗体，其中所述抗体是人源化的。

32.根据权利要求1-11和19-28中任一项所述的抗体，其中所述抗体是结合人类胰蛋白酶β1的抗体片段。

33.根据权利要求32所述的抗体，其中所述抗体片段选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv和$(Fab')_2$片段。

34.根据权利要求1-11和19-28中任一项所述的抗体，其中所述抗体是全长抗体。

35.根据权利要求34所述的抗体，其中所述抗体是IgG抗体。

36.根据权利要求35所述的抗体，其中IgG抗体是IgG1抗体。

37.根据权利要求35所述的抗体，其中IgG抗体是IgG4抗体。

38.根据权利要求37所述的抗体，其中IgG4抗体包含根据EU编号的S228P突变。

39.根据权利要求1-11和19-28中任一项所述的抗体，其中所述抗体是单特异性抗体。

40.根据权利要求1-11和19-28中任一项所述的抗体，其中所述抗体是多特异性抗体。

41.根据权利要求40所述的抗体，其中所述抗体是双特异性抗体。

42.根据权利要求41所述的抗体，其中所述抗体包含与人类胰蛋白酶β1结合的第一结合结构域和与第二生物分子结合的第二结合结构域，其中第二生物分子选自白介素-13(IL-13)、白介素-4(IL-4)、白介素-5(IL-5)、白介素-17(IL-17)、IgE和白介素-33(IL-33)。

43.根据权利要求42所述的抗体，其中第二生物分子是IL-13。

44.根据权利要求42所述的抗体，其中第二生物分子是IL-33。

45.根据权利要求42所述的抗体，其中第二生物分子是IgE。

46.分离的核酸，其编码权利要求1-45中任一项所述的抗体。

47.分离的核酸，其编码权利要求1的抗体，所述抗体包含了包含SEQ IDNO:9的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL结构域，其中所述核酸包含与SEQ ID NO:104和SEQ ID NO:105的序列至少99％同一的序列。

48.根据权利要求46所述的核酸，其中所述抗体包含(a)重链，其包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列；和(b)轻链，其包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列，并且其中所述核酸包含与SEQ ID NO:106和SEQ ID NO:107的序列至少99％同一的序列。

49.根据权利要求46所述的核酸，其中所述抗体包含(a)重链，其包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列；和(b)轻链，其包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列，并且其中所述核酸包含与SEQ ID NO:108和SEQ ID NO:107的序列至少99％同一的序列。

50.根据权利要求46所述的核酸，其中所述核酸包含SEQ ID NO:108和SEQ ID NO:107的序列。

51.载体，包含根据权利要求46所述的分离的核酸。

52.宿主细胞，包含权利要求51所述的载体。

53.根据权利要求52所述的宿主细胞，其中宿主细胞是哺乳动物细胞。

54.根据权利要求53所述的宿主细胞，其中哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

55.根据权利要求52所述的宿主细胞，其中宿主细胞是原核细胞。

56.根据权利要求55所述的宿主细胞，其中原核细胞是大肠杆菌(E.coli)。

57.产生根据权利要求1-45中任一项所述的抗体的方法，所述方法包括在培养基中在允许产生所述抗体的合适条件下培养权利要求52所述的宿主细胞。

58.药物组合物，包含根据权利要求1-45中任一项所述的抗体和可药用载体、赋形剂或稀释剂。

59.药物组合物，包含与人类胰蛋白酶β1结合的分离的单克隆抗体和可药用载体、赋形剂或稀释剂，其中所述抗体以0.1nM至1nM的K_D与单体类胰蛋白酶β1结合，和/或其中所述抗体能够以0.1nM至5nM的半数最大抑制浓度(IC_{50})抑制类胰蛋白酶的酶活性，其是通过使用S-2288作为底物的体外类胰蛋白酶酶促测定法测定，其中所述抗体包含以下六个高变区

(HVR)：

(a)DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1；

(b)FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2；

(c)RNYDDWYFDV(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列的HVR-H3；

(d)SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1；

(e)RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2；和

(f)QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3。

60.药物组合物，包含：

(i)与人类胰蛋白酶β1结合的分离的抗体，其中所述抗体包含以下六个高变区(HVR)：

(a)DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1；

(b)FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2；

(c)RNYDDWYFDV(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列的HVR-H3；

(d)SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1；

(e)RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2；和

(f)QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3，其中HVR-H3(SEQ ID NO:8)的位置6处色氨酸的氧化不多于30％。

61.药物组合物，包含：

(i)与人类胰蛋白酶结合的分离的抗体，其中所述抗体包含以下六个高变区(HVR)：

(a)DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1；

(b)FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2；

(c)RNYDDWYFDV(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列的HVR-H3；

(d)SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1；

(e)RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2；和

(f)QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3；

(ii)浓度0.1mm至1mM的N-乙酰色氨酸；和

(iii)浓度1mM至10mM的甲硫氨酸。

62.根据权利要求60或61所述的组合物，还包含一种或多种选自稳定剂、缓冲剂、表面活性剂和张力剂的额外赋形剂。

63.根据权利要求62所述的组合物，其中组合物还包含缓冲剂。

64.根据权利要求63所述的组合物，其中缓冲剂包含琥珀酸精氨酸和/或琥珀酸组氨酸。

65.根据权利要求64所述的组合物，其中缓冲剂包含琥珀酸精氨酸和琥珀酸组氨酸。

66.根据权利要求62所述的组合物，其中组合物还包含表面活性剂。

67.根据权利要求66所述的组合物，其中表面活性剂是泊洛沙姆188或聚山梨醇酯20。

68.根据权利要求67所述的组合物，其中表面活性剂是泊洛沙姆188。

69.根据权利要求59-61和66中任一项所述的组合物，其中组合物的pH是4.5至7.0。

70.根据权利要求59-61和66中任一项所述的组合物，其中组合物在遮光容器中。

71.根据权利要求59-61和66中任一项所述的组合物，其中组合物在预填充式注射器中。

72.根据权利要求59-61和66中任一项所述的组合物，其中组合物还包含IL-13轴结合拮抗剂、IL-5轴结合拮抗剂、IL-33轴结合拮抗剂、M1 prime拮抗剂、IgE拮抗剂、TRPA1拮抗剂、CRTH2拮抗剂、支气管扩张剂或哮喘症状控制药物、免疫调节剂、皮质类固醇、Th2途径抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂或磷酸二酯酶抑制剂。

73.根据权利要求72所述的组合物，其中IL-13轴结合拮抗剂是抗IL-13抗体。

74.根据权利要求73所述的组合物，其中抗IL-13抗体是来金珠单抗。

75.根据权利要求72所述的组合物，其中IL-5轴结合拮抗剂是IL-5结合拮抗剂或IL-5受体结合拮抗剂。

76.根据权利要求72所述的组合物，其中IL-33轴结合拮抗剂是IL-33结合拮抗剂或ST2结合拮抗剂。

77.根据权利要求73所述的组合物，其中IL-33结合拮抗剂是抗IL-33抗体。

78.根据权利要求72所述的组合物，其中M1 prime拮抗剂是quilizumab。

79.根据权利要求59-61和66中任一项所述的组合物，其中配制所述组合物以施用至人。

80.根据权利要求1-45中任一项所述的抗体的用途，用于制造治疗类胰蛋白酶相关疾病的药物。

81.根据权利要求80所述的用途，其中类胰蛋白酶相关疾病是肺部疾病、自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性疾病、单核细胞性疾病、淋巴细胞性疾病、与正常或异常组织常驻性细胞或基质细胞的数目或分布增加相关的疾病、或肥大细胞增生症。

82.根据权利要求81所述的用途，其中粒细胞性疾病是嗜中粒细胞性疾病或嗜酸粒细胞性疾病。

83.根据权利要求81所述的用途，其中肺部疾病是哮喘。

84.根据权利要求83所述的用途，其中哮喘是高Th2哮喘或低Th2哮喘。

85.根据权利要求80所述的用途，其中配制药物用于与IL-13轴结合拮抗剂、IL-5轴结合拮抗剂、IL-33轴结合拮抗剂、M1 prime拮抗剂、IgE拮抗剂、TRPA1拮抗剂、CRTH2拮抗剂、支气管扩张剂或哮喘症状控制药物、免疫调节剂、皮质类固醇、Th2途径抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂或磷酸二酯酶抑制剂联用。

86.根据权利要求85所述的用途，其中IL-13轴结合拮抗剂是抗IL-13抗体。

87.根据权利要求86所述的用途，其中抗IL-13抗体是来金珠单抗。

88.根据权利要求85所述的用途，其中IL-5轴结合拮抗剂是IL-5结合拮抗剂或IL-5受体结合拮抗剂。

89.根据权利要求85所述的用途，其中IL-33轴结合拮抗剂是IL-33结合拮抗剂或ST2结合拮抗剂。

90.根据权利要求89所述的用途，其中IL-33结合拮抗剂是抗IL-33抗体。

91.根据权利要求85所述的用途，其中M1 prime拮抗剂是quilizumab。

92.根据权利要求58-79中任一项所述的药物组合物的用途，用于制造治疗类胰蛋白酶相关疾病的药物。

93.根据权利要求92所述的用途，其中类胰蛋白酶相关疾病是肺部疾病、自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性疾病、单核细胞性疾病、淋巴细胞性疾病、与正常或异

常组织常驻性细胞或基质细胞的数目或分布增加相关的疾病、或肥大细胞增生症。

94.根据权利要求93所述的用途，其中粒细胞性疾病是嗜中粒细胞性疾病或嗜酸粒细胞性疾病。

95.根据权利要求93所述的用途，其中肺部疾病是哮喘。

96.根据权利要求95所述的用途，其中哮喘是高Th2哮喘或低Th2哮喘。

97.根据权利要求93所述的用途，其中自身免疫疾病选自类风湿性关节炎、银屑病、嗜酸粒细胞性食管炎、炎性肠病(IBD)和克罗恩病。

98.根据权利要求93所述的用途，其中炎性疾病是慢性自发性荨麻疹(CSU)、过敏反应或特应性皮炎。

99.根据权利要求98所述的用途，其中过敏反应是过敏性休克。

100.根据权利要求98所述的用途，其中过敏反应是过敏性鼻炎。

101.根据权利要求93所述的用途，其中纤维化疾病是特发性肺纤维化(IPF)。

102.根据权利要求92所述的用途，其中配制药物用于与IL-13轴结合拮抗剂、IL-5轴结合拮抗剂、IL-33轴结合拮抗剂、M1 prime拮抗剂、IgE拮抗剂、TRPA1拮抗剂、CRTH2拮抗剂、支气管扩张剂或哮喘症状控制药物、免疫调节剂、皮质类固醇、Th2途径抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂或磷酸二酯酶抑制剂联用。

103.根据权利要求102所述的用途，其中IL-13轴结合拮抗剂是抗IL-13抗体。

104.根据权利要求103所述的用途，其中抗IL-13抗体是来金珠单抗。

105.根据权利要求102所述的用途，其中IL-5轴结合拮抗剂是IL-5结合拮抗剂或IL-5受体结合拮抗剂。

106.根据权利要求102所述的用途，其中IL-33轴结合拮抗剂是IL-33结合拮抗剂或ST2结合拮抗剂。

107.根据权利要求106所述的用途，其中IL-33结合拮抗剂是抗IL-33抗体。

108.根据权利要求102所述的用途，其中M1 prime拮抗剂是quilizumab。

109.根据权利要求83、84、95和96中任一项所述的用途，用于静脉内施用或局部施用。

110.根据权利要求83、84、95和96中任一项所述的用途，用于皮下、肌内、经口、经皮、腹膜内、眶内、通过植入、通过吸入、鞘内或室内施用。

111.根据权利要求83、84、95和96中任一项所述的用途，用于鼻内施用。

112.根据权利要求109所述的用途，用于人类受试者中。

抗类胰蛋白酶抗体、其组合物及其用途

[0001] 交叉引用相关申请

[0002] 本申请要求2017年2月10日提交的美国临时申请号62/457,722的权益,所述文献通过引用方式完整并入本文作为参考。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已经通过电子方式以ASCII格式提交并因而通过引用方式完整并入的序列表。2018年2月9日创建的所述ASCII副本命名为50474-112WO2_Sequence_Listing_2.9.18_ST25并且大小为108,967比特。

技术领域

[0005] 本发明涉及抗类胰蛋白酶抗体、药物组合物和使用其的方法。

[0006] 背景

[0007] 人类胰蛋白酶β是一种在肥大细胞中丰富并且更低程度地在嗜碱性粒细胞中丰富的胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶。由TPSAB1和TPSB2基因座产生的人类胰蛋白酶β(human tryptase beta)(存在其三个亚型:类胰蛋白酶β1、类胰蛋白酶β2和类胰蛋白酶β3)是人肥大细胞产生的优势活性类胰蛋白酶。这两个基因座产生四个类胰蛋白酶同工型;TPSAB1产生类胰蛋白酶α和类胰蛋白酶β1,而TPSB2产生类胰蛋白酶β2和类胰蛋白酶β3。类胰蛋白酶α以及其他同工型如类胰蛋白酶γ、类胰蛋白酶δ和类胰蛋白酶ε基本上无活性。

[0008] 蛋白酶解加工的活性类胰蛋白酶β在肥大细胞的分泌颗粒中作为与肝素复合的四聚体储存。肥大细胞脱颗粒,其可以由IgE依赖性刺激(例如,变应原)或非IgE依赖性刺激(例如,P物质或活性类胰蛋白酶)引起,导致类胰蛋白酶β连同其他颗粒酶和组胺一起释放。先前研究已经在哮喘患者的支气管平滑肌和上皮中观察到肥大细胞数目升高,以及在支气管肺泡灌洗液中观察到类胰蛋白酶β水平升高。此外,类胰蛋白酶对气道支气管收缩和高反应性作出贡献,并且还已经提出它在作为气道重塑过程之标志的纤维化和胞外基质周转(turnover)中发挥作用。

[0009] 已经提出类胰蛋白酶涉及多种疾病和病症,包括哮喘和其他肺部疾病、炎性疾病、自身免疫疾病和纤维化疾病,对它们而言,仍需要改进的治疗药(包括治疗用抗类胰蛋白酶拮抗剂)和治疗方法。已经尝试开发小分子类胰蛋白酶抑制剂(参见,例如,Cairns,J.A.,2005,Pulmonary Pharmacology&Therapeutics18:55-66);然而,就我们所知,尚未报道类胰蛋白酶拮抗性生物治疗药、尤其抗类胰蛋白酶拮抗性抗体。

[0010] 发明简述

[0011] 本发明涉及抗类胰蛋白酶抗体及其药物组合物,以及使用其的方法。

[0012] 在一个方面,本发明的特征在于一种与人类胰蛋白酶β1结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中抗体包含以下六个高变区(HVR):(a)包含DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含RNYDDWYFDV(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包

含QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体由包含SEQ ID NO:7、2、8、4、5和6的氨基酸序列的六个HVR定义。在一些实施方案中,抗体还包含轻链可变(VL)结构域构架区L2(FR-L2)中的S43、P46和W47(Kabat编号)。在一些实施方案中,抗体包含(a)重链可变(VH)结构域,其包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少95%或至少99%序列同一性的氨基酸序列;(b)轻链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90%、至少95%或至少99%同一性的氨基酸序列,或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,抗体还包含以下VH结构域构架区(FR):(a)FR-H1,其包含EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列;(b)FR-H2,其包含WVRQAPGKGLEWVA(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列;(c)FR-H3,其包含RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR(SEQ ID NO:13)的氨基酸序列;和(d)FR-H4,其包含WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:14)的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体还包含以下VL结构域FR:(a)FR-L1,其包含DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:15)的氨基酸序列;(b)FR-L2,其包含WYQQKPGKSPKPWIY(SEQ ID NO:16)的氨基酸序列;(c)FR-L3,其包含GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:17)的氨基酸序列;和(d)FR-L4,其包含FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:18)的氨基酸序列。在一些实施方案中,VL结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含(a)重链,其包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,和(b)轻链,其包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列。在其他实施方案中,抗体包含(a)重链,其包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列,和(b)轻链,其包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列。

[0013] 在另一个方面,本发明的特征在于一种与人类胰蛋白酶β1结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中抗体包含(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少95%或至少99%序列同一性的氨基酸序列,和(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90%、至少95%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含(a)重链,其包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,和(b)轻链,其包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列。在其他实施方案中,抗体包含(a)重链,其包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列,和(b)轻链,其包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列。

[0014] 在另一个方面,本发明的特征在于一种分离的抗体,所述抗体包含(a)重链,其包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,和(b)轻链,其包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列。

[0015] 在另一个方面,本发明的特征在于一种分离的抗体,所述抗体包含(a)重链,其包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列,和(b)轻链,其包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列。

[0016] 在另一个方面,本发明的特征在于一种与人类胰蛋白酶β1结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中抗体包含以下六个HVR:(a)包含DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含RDNYDWYFDV(SEQ ID NO:29)的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3。

[0017] 在一些实施方案中,抗体还包含以下VH结构域FR:(a)FR-H1,其包含

EVKLVESGGGSVQPGGSRKLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列;(b)FR-H2,其包含WVRQAPGKGLEWVA(SEQ ID NO:22)的氨基酸序列;(c)FR-H3,其包含RFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMYYCAR(SEQ ID NO:23)的氨基酸序列;和(d)FR-H4,其包含WGTGTTVTVSS(SEQ ID NO:24)的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH结构域包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体还包含以下VL结构域FR:(a)FR-L1,其包含QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISC(SEQ ID NO:25)的氨基酸序列;(b)FR-L2,其包含WYQQKPGSSPKPWIY(SEQ ID NO:26)的氨基酸序列;(c)FR-L3,其包含GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC(SEQ ID NO:27)的氨基酸序列;和(d)FR-L4,其包含FGAGTKLELK(SEQ ID NO:28)的氨基酸序列。在一些实施方案中,VL结构域包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0018] 在另一个方面,本发明的特征在于一种与人类胰蛋白酶β1结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中抗体包含(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少90%、至少95%或至少99%同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,抗体还包含以下VH结构域FR:(a)FR-H1,其包含EVKLVESGGGSVQPGGSRKLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列;(b)FR-H2,其包含WVRQAPGKGLEWVA(SEQ ID NO:22)的氨基酸序列;(c)FR-H3,其包含RFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMYYCAR(SEQ ID NO:23)的氨基酸序列;和(d)FR-H4,其包含WGTGTTVTVSS(SEQ ID NO:24)的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH结构域包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体还包含以下VL结构域FR:(a)FR-L1,其包含QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISC(SEQ ID NO:25)的氨基酸序列;(b)FR-L2,其包含WYQQKPGSSPKPWIY(SEQ ID NO:26)的氨基酸序列;(c)FR-L3,其包含GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC(SEQ ID NO:27)的氨基酸序列;和(d)FR-L4,其包含FGAGTKLELK(SEQ ID NO:28)的氨基酸序列。在一些实施方案中,VL结构域包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0019] 在另一个方面,本发明的特征在于一种与人类胰蛋白酶β1结合的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体包含(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少99%序列同一性的氨基酸序列,和(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0020] 在任一前述方面的一些实施方案中,抗体与人类胰蛋白酶β1上的表位结合,所述表位包含至少一个、至少两个、至少三个或全部四个残基,所述残基选自SEQ ID NO:71的His51、Val80、Lys81和Asp82。在一些实施方案中,抗体与人类胰蛋白酶β1上的表位结合,所述表位包含至少一个、至少两个、至少三个或全部四个残基,所述残基选自SEQ ID NO:71的His51、Val80、Lys81和Asp82。在一些实施方案中,抗体与人类胰蛋白酶β1上的表位结合,所述表位包含SEQ ID NO:71的His51和至少一个、至少两个或全部三个选自SEQ ID NO:71的Val80、Lys81和Asp82的残基。在一些实施方案中,人类胰蛋白酶β1上的表位还包含一个或多个选自SEQ ID NO:71的Gln67、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130的氨基酸残基。在一些实施方案中,人类胰蛋白酶β1上的表位包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个或全部十二个选自SEQ ID NO:71的Gln67、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130的氨基酸残基。在一些实施方案中,人类胰蛋白酶β1上的表位包含SEQ ID NO:71的His51、Gln67、Val80、Lys81、

Asp82、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130。在一些实施方案中，表位是对于人类胰蛋白酶β1单体或四聚体而言的表位。在一些实施方案中，通过X射线结晶学模型确定表位。在一些实施方案中，抗体能够使四聚体人类胰蛋白酶β1的小界面和四聚体人类胰蛋白酶β1的大界面这二者解离。

[0021] 在另一个方面，本发明的特征在于一种与人类胰蛋白酶β1结合的分离的抗体或其抗原结合片段，其中抗体包含以下六个HVR：(a)包含GYAIT(SEQ ID NO:30)的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含GISSAATTFYSSWAKS(SEQ ID NO:31)的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含DPRGYGAALDRLDL(SEQ ID NO:32)的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含QSIKSVYNNRLG(SEQ ID NO:33)的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含ETSILTS(SEQ ID NO:34)的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含AGGFDRSGDTT(SEQ ID NO:35)的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中，抗体由包含SEQ ID NO:30、31、32、33、34和35的氨基酸序列的六个HVR定义。在一些实施方案中，抗体还包含VH结构域FR-H3中的Arg71和Val78(Kabat编号)。在一些实施方案中，抗体还包含以下VH结构域FR：(a)FR-H1，其包含EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列；(b)FR-H2，其包含WIRQPPGKGLEWIG(SEQ ID NO:42)的氨基酸序列；(c)FR-H3，其包含RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR(SEQ ID NO:43)的氨基酸序列；和(d)FR-H4，其包含WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:41)的氨基酸序列。在一些实施方案中，VH结构域包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体包含以下VL结构域FR：(a)FR-L1，其包含DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:64)的氨基酸序列；(b)FR-L2，其包含WYQQKPGKAPKLLIY(SEQ ID NO:65)的氨基酸序列；(c)FR-L3，其包含GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:66)的氨基酸序列；和(d)FR-L4，其包含FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:63)的氨基酸序列。在一些实施方案中，VL结构域包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体包含(a)重链，其包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列，和(b)轻链，其包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。在其他实施方案中，抗体包含(a)重链，其包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列，和(b)轻链，其包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列。

[0022] 在另一个方面，本发明的特征在于一种与人类胰蛋白酶β1结合的分离的抗体或其抗原结合片段，其中抗体包含(a)VH结构域，其包含与SEQ ID NO:36、47、48、49、50、51和52中任一者的氨基酸序列具有至少90％、至少95％或至少99％序列同一性的氨基酸序列；(b)VL结构域，其包含与SEQ ID NO:37、53、58或59中任一者的氨基酸序列具有至少90％、至少95％或至少99％同一性的氨基酸序列；或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中，抗体还包含以下VH结构域FR：(a)FR-H1，其包含EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列；(b)FR-H2，其包含WIRQPPGKGLEWIG(SEQ ID NO:42)的氨基酸序列；(c)FR-H3，其包含RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR(SEQ ID NO:43)的氨基酸序列；和(d)FR-H4，其包含WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:41)的氨基酸序列。在一些实施方案中，VH结构域包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体包含以下VL结构域FR：(a)FR-L1，其包含DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:64)的氨基酸序列；(b)FR-L2，其包含WYQQKPGKAPKLLIY(SEQ ID NO:65)的氨基酸序列；(c)FR-L3，其包含GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:66)的氨基酸序列；和(d)FR-L4，其包含FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:63)的氨基酸序列。在一些实施方案中，VL结构域包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体包含(a)重链，其包含

SEQ ID NO:80的氨基酸序列，和(b)轻链，其包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。在其他实施方案中，抗体包含(a)重链，其包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列，和(b)轻链，其包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列。

[0023] 在另一个方面，本发明的特征在于一种与人类胰蛋白酶结合的分离的抗体或其抗原结合片段，其中抗体包含(a)VH结构域，其包含与SEQ ID NO:36的氨基酸序列具有至少90％、至少95％或至少99％序列同一性的氨基酸序列，和(b)VL结构域，其包含与SEQ ID NO:37的氨基酸序列具有至少90％、至少95％或至少99％序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体包含VH结构域，其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列，和VL结构域，其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体包含(a)重链，其包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列，和(b)轻链，其包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。在其他实施方案中，抗体包含(a)重链，其包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列，和(b)轻链，其包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列。

[0024] 在另一个方面，本发明的特征在于一种分离的抗体，所述抗体包含(a)重链，其包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列，和(b)轻链，其包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。

[0025] 在另一个方面，本发明的特征在于一种分离的抗体，所述抗体包含(a)重链，其包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列，和(b)轻链，其包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列。

[0026] 在另一个方面，本发明的特征在于一种与人类胰蛋白酶结合的分离的抗体或其抗原结合片段，其中抗体包含(a)VH结构域，其包含与SEQ ID NO:52的氨基酸序列具有至少90％、至少95％或至少99％序列同一性的氨基酸序列，和(b)VL结构域，其包含与SEQ ID NO:53的氨基酸序列具有至少90％、至少95％或至少99％序列同一性的氨基酸序列。

[0027] 在任一前述方面的一些实施方案中，抗体与人类胰蛋白酶β1上的表位结合，所述表位包含至少一个、至少两个或全部三个选自SEQ ID NO:71的Gln100、Leu101和Leu102的残基。在一些实施方案中，人类胰蛋白酶β1上的表位还包含一个或多个选自SEQ ID NO:71的Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128和Glu129的氨基酸残基。在一些实施方案中，人类胰蛋白酶β1上的表位包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、至少十二个、至少十三个或全部十四个选自SEQ ID NO:71的Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128和Glu129的氨基酸残基。在一些实施方案中，表位包含SEQ ID NO:71的Gln35、Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Gln100、Leu101、Leu102、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128、Glu129和Arg216。在一些实施方案中，表位是相对于人类胰蛋白酶β1单体或四聚体而言的表位。在一些实施方案中，表位相对于人类胰蛋白酶β1四聚体而言，并且人类胰蛋白酶β1上的表位还包含SEQ ID NO:71的Gln35和Arg216中一者或两者。在一些实施方案中，通过X射线结晶学模型确定表位。在一些实施方案中，抗体能够解离人类胰蛋白酶β1的小界面和/或大界面。

[0028] 在任一前述方面的一些实施方案中，抗体还结合食蟹猴(cyno)类胰蛋白酶。在一些实施方案中，抗体还结合人类胰蛋白酶α。在一些实施方案中，抗体还结合人类胰蛋白酶β2或人类胰蛋白酶β3。在一些实施方案中，抗体结合人类胰蛋白酶β2和人类胰蛋白酶β3。

[0029] 在任一前述方面的一些实施方案中，抗体抗体以约1nM或更小的K_D结合类胰蛋白

酶。在一些实施方案中，通过表面等离子体共振测定法(SPR)测量K_D。在一些实施方案中，抗体以约120pM和约0.5nM之间的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中，抗体以约120pM和约300pM之间的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中，抗体以约120pM和约200pM之间的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中，抗体以约180pM的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中，抗体以约400pM的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中，在25℃进行SPR测定法。在一些实施方案中，使用**BIACORE®** SPR测定法测量K_D，例如，如实施例1，第(A)(vii)部分中所述。在一些实施方案中，SPR测定法可以使用**BIAcore®**T200或等同装置。在一些实施方案中，将**BIAcore®**Series S CM5传感芯片(或等同传感芯片)用小鼠单克隆抗人IgG(Fc)抗体固定化并且随后在流动池上捕获抗类胰蛋白酶抗体。以流速30μl/min注射加His标签的人类胰蛋白酶β1单体(SEQ ID NO:128)的3倍连续稀释物。用3分钟结合和10分钟解离分析每份样品。该测定法在25℃进行。在每次注射后，使用3M $MgCl_2$使芯片再生。通过扣减来自以相似密度捕获无关IgG的流动池的响应单位(RU)来校正结合响应。同时拟合k_{on}和k_{off}的1:1朗缪尔模型用于动力学分析。

[0030] 在任一前述方面的一些实施方案中，抗体能够抑制人类胰蛋白酶β1的酶活性。在一些实施方案中，抗体以约2.5nM或更低的IC_{50}抑制类胰蛋白酶的活性，如通过使用合成肽S-2288作为底物的人类胰蛋白酶β酶促测定法所测定。在一些实施方案中，抗体以约550pM和约2.5nM之间的IC_{50}抑制类胰蛋白酶的活性。在一些实施方案中，抗体以约500pM和约2nM之间的IC_{50}抑制类胰蛋白酶的活性。在一些实施方案中，抗体以约550nM和1.5nM之间的IC_{50}抑制类胰蛋白酶的活性。在一些实施方案中，抗体以约500pM和约700pM之间的IC_{50}抑制类胰蛋白酶的活性。在一些实施方案中，如实施例1(A)(viii)(a))中所述那样测定抗体的抑制活性。在一些实施方案中，在使用合成肽S-2288的人类胰蛋白酶β酶促测定法中肝素的终浓度是66μg/ml。在一些实施方案中，将重组人类胰蛋白酶β1四聚体活性酶在TNH缓冲液(200mM Tris，150mM NaCl，0.1mg/mL肝素，0.01%TRITON™X-100、pH 8.0)中稀释至0.75nM，并且在384孔平板中与抗类胰蛋白酶抗体(稀释于PBS中)1:1合并。将平板在环境温度温育1小时，同时温和振荡。将比色底物S-2288(Chromogenix，Part No.82-0852-39)或等同底物在TNH缓冲液中稀释至1200μM并添加至平板。在一些实施方案中，孔内终浓度是400μM S-2288、0.25nM重组人类胰蛋白酶β1四聚体、66μg/mL肝素和0.10至222nM抗类胰蛋白酶抗体。将平板在环境温度温育40分钟，同时温和振荡，并且随后在A_{405}读取。从抗类胰蛋白酶抗体的各自曲线的四参数拟合测定其IC_{50}。

[0031] 在任一前述方面的一些实施方案中，抗体能够在pH 6抑制人类胰蛋白酶β1的酶活性。特别地，可以在pH 6测定抗体的抑制活性。

[0032] 在一些实施方案中，抗体能够抑制类胰蛋白酶介导的对支气管平滑肌细胞增殖和/或基于胶原蛋白的收缩的刺激。在一些实施方案中，抗体能够抑制肥大细胞组胺释放。在一些实施方案中，抗体能够抑制IgE触发的组胺释放和/或类胰蛋白酶触发的组胺释放。在一些实施方案中，抗体能够抑制食蟹猴类胰蛋白酶D1，如通过活性类胰蛋白酶ELISA测定所评估。在一些实施方案中，抗体能够抑制食蟹猴支气管肺泡灌洗(broncheoloar lavage；BAL)样品或鼻吸附(nasosorption)样品中的类胰蛋白酶活性。在一些实施方案中，抗体能够使四聚体人类胰蛋白酶β1解离。在一些实施方案中，处于单价样式的抗体能够使四聚体人类胰蛋白酶β1解离。在一些实施方案中，单价样式是Fab样式。在一些实施方案中，抗体能

够在肝素存在下使四聚体人类胰蛋白酶β1解离。在一些实施方案中，抗体能够在66μg/ml肝素存在下使四聚体类胰蛋白酶β解离。

[0033] 在另一个方面，本发明的特征在于一种这样的抗体，其结合的表位与任一前述抗体结合的表位相同。在一些实施方案中，通过表位分拣测定法(epitope binning assay)确定抗体是否与相同表位结合或竞争与人类胰蛋白酶β1结合。在一些实施方案中，表位分拣测定法是如实施例3、第C部分中描述的**OCTET®**表位分拣测定法。在一些实施方案中，通过与NHS-PEG4-生物素反应，人类胰蛋白酶β1单体蛋白在Lys残基处生物素酰化。将生物素酰化的单体在动力学缓冲液(ForteBio,Inc.)中稀释至5μg/ml并且固定到链霉亲和素传感器头(ForteBio,Inc.)上。在固定步骤后，将人类胰蛋白酶β1固定的传感器用按照10-20μg/ml稀释的第一抗体浸透，随后与按照2.5μg/ml稀释的第二抗体结合。在一些实施方案中，表位分拣测定法在30℃进行。

[0034] 在另一个方面，本发明的特征在于一种这样的抗体，其与任一前述抗体竞争与人类胰蛋白酶β1的结合或交叉阻断任一前述抗体或被任一前述抗体交叉阻断。

[0035] 在任一前述方面的一些实施方案中，抗体是单克隆的、人的、人源化的或嵌合的。在一些实施方案中，抗体是人源化的。

[0036] 在任一前述方面的一些实施方案中，抗体是结合类胰蛋白酶的抗体片段。在一些实施方案中，抗体片段选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv和$(Fab')_2$片段。

[0037] 在任一前述方面的一些实施方案中，抗体是全长抗体。在一些实施方案中，抗体是IgG抗体。在一些实施方案中，IgG抗体是IgG1抗体。在一些实施方案中，IgG抗体是IgG4抗体。在一些实施方案中，IgG4抗体包含铰链区中的突变。在一些实施方案中，突变是置换突变。在一些实施方案中，置换突变在氨基酸残基S228处(EU编号)。在一些实施方案中，IgG4抗体包含S228P突变(EU编号)。

[0038] 在任一前述方面的一些实施方案中，抗体是单特异性抗体。

[0039] 在任一前述方面的一些实施方案中，抗体是多特异性抗体。在一些实施方案中，抗体是双特异性抗体。在一些实施方案中，抗体包含与类胰蛋白酶结合的第一结合结构域和与第二生物分子结合的第二结合结构域，其中第二生物分子选自白介素-13(IL-13)、白介素-4(IL-4)、白介素-5(IL-5)、白介素-17(IL-17)、IgE和白介素-33(IL-33)。在一些实施方案中，第二生物分子是IL-13。在一些实施方案中，第二生物分子是IL-33。在一些实施方案中，第二生物分子是IgE。

[0040] 在另一个方面，本发明的特征在于一种编码本文所述的任何抗体的分离的核酸或共同编码该抗体的分离的核酸的集合。

[0041] 在另一个方面，本发明的特征在于一种编码抗体的分离的核酸，所述抗体包含了包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH结构域和/或包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL结构域，或共同编码该抗体的分离的核酸的集合，其中核酸包含与SEQ ID NO:104和/或SEQ ID NO:105的序列至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中，抗体包含(a)重链，其包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列；和/或(b)轻链，其包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列，并且其中核酸或集合包含与SEQ ID NO:106和/或SEQ ID NO:107的序列至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中，抗体包含(a)重链，其包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列；和/或(b)轻链，其包含SEQ ID NO:79的氨基酸序

列，并且其中核酸或集合包含与SEQ ID NO:108和/或SEQ ID NO:107的序列至少85％、至少90％、至少95％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中，核酸或集合包含SEQ ID NO:108和/或SEQ ID NO:107的序列。

[0042] 在另一个方面，本发明的特征在于一种编码抗体的分离的核酸，所述抗体包含了包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH结构域和/或包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VL结构域，或共同编码该抗体的分离的核酸的集合，其中核酸包含与SEQ ID NO:109和/或SEQ ID NO:110的序列至少85％、至少90％、至少95％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中，抗体包含(a)重链，其包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列；和/或(b)轻链，其包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列，并且其中核酸或集合包含与SEQ ID NO:111和/或SEQ ID NO:112的序列至少85％、至少90％、至少95％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中，抗体包含(a)重链，其包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列；和/或(b)轻链，其包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列，并且其中核酸或集合包含与SEQ ID NO:113和/或SEQ ID NO:112的序列至少85％、至少90％、至少95％或至少99％同一的序列。在一些实施方案中，核酸或集合包含SEQ ID NO:113和/或SEQ ID NO:112的序列。

[0043] 在另一个方面，本发明的特征在于一个包含本文所述的任何分离的核酸或分离的核酸集合的载体(例如，表达载体)或载体集合。在另一个方面，本发明特征在于包含前述核酸和/或载体和/或核酸集合和/或载体集合的宿主细胞。在一些实施方案中，宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中，哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在一些实施方案中，宿主细胞是原核细胞。在一些实施方案中，原核细胞是大肠杆菌(E.coli)。

[0044] 在另一个方面，本发明的特征在于一种产生本文所述的任何抗体的方法，所述方法包括在培养基中在允许产生抗体的合适条件下培养包含前述载体(例如，表达载体)或载体集合中任意者的宿主细胞。在一些实施方案中，该方法还包括从宿主细胞或培养基回收抗体。

[0045] 在另一个方面，本发明的特征在于包含任一前述抗体的组合物(例如，药物组合物)。在一些实施方案中，组合物还包含可药用载体、赋形剂或稀释剂。

[0046] 在另一个方面，本发明的特征在于一种药物组合物，其包含与人类胰蛋白酶β1结合的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段和可药用载体、赋形剂或稀释剂，其中抗体以约0.1nM至约1nM的K_D与单体类胰蛋白酶β1结合，和/或其中抗体能够以约0.1nM至约5nM的半数最大抑制浓度(IC50)抑制类胰蛋白酶的酶活性，如通过使用S-2288作为底物的体外类胰蛋白酶酶促测定法测定。

[0047] 在前述方面的一些实施方案中，抗体以约0.5nM至约1nM的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中，抗体以约0.1nM至约0.5nM之间的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中，抗体以约0.4nM的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中，抗体以约0.2nM的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中，通过表面等离子体共振测定法(SPR)测量K_D。在一些实施方案中，在25℃进行SPR测定法。在一些实施方案中，使用**BIACORE®** SPR测定法测量K_D，例如，如实施例1，第(A)(vii)部分中所述。在一些实施方案中，SPR测定法可以使用**BIAcore®** T200或等同装置。在一些实施方案中，将**BIAcore®** Series S CM5传感芯片(或等同传感芯片)用小鼠单克隆抗人IgG(Fc)抗体固定化并且随后在流动池上捕获抗类胰蛋白酶抗体。以流速30μl/min注射加His标签的人类胰蛋白酶β1单体(SEQ ID NO:128)的3倍连续稀释物。用3

分钟结合和10分钟解离分析每份样品。该测定法在25℃进行。在每次注射后，使用3M $MgCl_2$使芯片再生。通过扣减来自以相似密度捕获无关IgG的流动池的响应单位(RU)来校正结合响应。同时拟合k_{on}和k_{off}的1:1朗缪尔模型用于动力学分析。

[0048] 在前述方面的一些实施方案中，抗体能够以约0.5nM至约5nM的IC_{50}抑制类胰蛋白酶的活性。在一些实施方案中，抗体能够以约0.1nM至约2nM的IC_{50}抑制类胰蛋白酶的活性。在一些实施方案中，抗体能够以约4nM的IC_{50}抑制人类胰蛋白酶的活性。在一些实施方案中，抗体能够以约0.6nM的IC_{50}抑制类胰蛋白酶的活性。在一些实施方案中，抗体能够在使用S-2288作为底物的体外类胰蛋白酶酶促测定法中在pH 6抑制类胰蛋白酶活性。在一些实施方案中，如实施例(实施例1，第(A)(viii)(a)部分)中所述那样测定抗体的抑制活性。在一些实施方案中，将重组人类胰蛋白酶β1四聚体活性酶在TNH缓冲液(200mM Tris，150mM NaCl，0.1mg/mL肝素，0.01％TRITON™X-100、pH 8.0)中稀释至0.75nM，并且在384孔平板中与抗类胰蛋白酶抗体(稀释于PBS中)1:1合并。将平板在环境温度温育1小时，同时温和振荡。将比色底物S-2288(Chromogenix，Part No.82-0852-39)或等同底物在TNH缓冲液中稀释至1200μM并添加至平板。在一些实施方案中，孔内终浓度是400μM S-2288、0.25nM重组人类胰蛋白酶β1四聚体、66μg/mL肝素和0.10至222nM抗类胰蛋白酶抗体。将平板在环境温度温育40分钟，同时温和振荡，并且随后在A_{405}读取。从抗类胰蛋白酶抗体的各自曲线的四参数拟合测定其IC_{50}。在一些实施方案中，在使用合成肽S-2288的人类胰蛋白酶β酶促测定法中肝素的终浓度是66μg/ml。

[0049] 在前述方面的一些实施方案中，抗体能够抑制类胰蛋白酶介导的对支气管平滑肌细胞增殖和/或基于胶原蛋白的收缩的刺激。在一些实施方案中，抗体能够抑制肥大细胞组胺释放。在一些实施方案中，抗体能够抑制IgE触发的组胺释放和/或类胰蛋白酶触发的组胺释放。在一些实施方案中，抗体能够抑制食蟹猴支气管肺泡灌洗(BAL)样品或鼻吸附样品中的类胰蛋白酶活性。在一些实施方案中，抗体能够使四聚体人类胰蛋白酶β1解离。在一些实施方案中，处于单价样式的抗体能够使四聚体人类胰蛋白酶β1解离。在一些实施方案中，单价样式是Fab样式。在一些实施方案中，抗体能够在肝素存在下使四聚体人类胰蛋白酶β1解离。在一些实施方案中，抗体能够在66μg/ml肝素存在下使四聚体类胰蛋白酶β解离。

[0050] 在前述方面的一些实施方案中，抗体包含以下六个高变区(HVR)：(a)包含DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含RNYDDWYFDV(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中，抗体包含(a)重链可变(VH)结构域，其包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90％、至少95％或至少99％序列同一性的氨基酸序列；(b)轻链可变(VL)结构域，其包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90％、至少95％或至少99％同一性的氨基酸序列，或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中，抗体还包含以下VH结构域FR：(a)FR-H1，其包含EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列；(b)FR-H2，其包含WVRQAPGKGLEWVA(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列；(c)FR-H3，其包含RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR(SEQ ID NO:13)的氨基酸序列；和(d)FR-H4，其包含WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:14)的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体的VH结构域包含SEQ

ID NO:9的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体还包含以下VL结构域FR：(a)FR-L1，其包含DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:15)的氨基酸序列；(b)FR-L2，其包含WYQQKPGKSPKPWIY(SEQ ID NO:16)的氨基酸序列；(c)FR-L3，其包含GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:17)的氨基酸序列；和(d)FR-L4，其包含FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:18)的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体的VL结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体包含(a)重链，其包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列，和(b)轻链，其包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体包含(a)重链，其包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列，和(b)轻链，其包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体与人类胰蛋白酶β1上的表位结合，所述表位包含至少一个、至少两个、至少三个或全部四个残基，所述残基选自SEQ ID NO:71的His51、Val80、Lys81和Asp82。在一些实施方案中，抗体与人类胰蛋白酶β1上的表位结合，所述表位包含SEQ ID NO:71的His51和至少一个、至少两个或全部三个选自SEQ ID NO:71的Val 80、Lys81和Asp82的残基。在一些实施方案中，人类胰蛋白酶β1上的表位还包含一个或多个选自SEQ ID NO:71的Gln67、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130的氨基酸残基。在一些实施方案中，人类胰蛋白酶β1上的表位包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个或全部十二个选自SEQ ID NO:71的Gln67、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130的氨基酸残基。在一些实施方案中，人类胰蛋白酶β1上的表位包含SEQ ID NO:71的His51、Gln67、Val80、Lys81、Asp82、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130。在一些实施方案中，表位相对于人类胰蛋白酶β1单体或四聚体而言。在一些实施方案中，通过X射线结晶学模型确定表位。在一些实施方案中，抗体能够解离四聚体人类胰蛋白酶β1的小界面和四聚体人类胰蛋白酶β1的大界面这二者。

[0051] 在前述方面的其他实施方案中，抗体包含以下六个HVR：(a)包含GYAIT(SEQ ID NO:30)的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含GISSAATTFYSSWAKS(SEQ ID NO:31)的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含DPRGYGAALDRLDL(SEQ ID NO:32)的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含QSIKSVYNNRLG(SEQ ID NO:33)的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含ETSILTS(SEQ ID NO:34)的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含AGGFDRSGDTT(SEQ ID NO:35)的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中，抗体包含(a)VH结构域，其包含与SEQ ID NO:36、47、48、49、50、51和52中任一者的氨基酸序列具有至少90％、至少95％或至少99％序列同一性的氨基酸序列；(b)VL结构域，其包含与SEQ ID NO:37、53、58或59中任一者的氨基酸序列具有至少90％、至少95％或至少99％同一性的氨基酸序列；或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中，抗体还包含以下VH结构域FR：(a)FR-H1，其包含EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列；(b)FR-H2，其包含WIRQPPGKGLEWIG(SEQ ID NO:42)的氨基酸序列；(c)FR-H3，其包含RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR(SEQ ID NO:43)的氨基酸序列；和(d)FR-H4，其包含WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:41)的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体的VH结构域包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体还包含以下VL结构域FR：(a)FR-L1，其包含DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:64)的氨基酸序列；(b)FR-L2，其包含

WYQQKPGKAPKLLIY(SEQ ID NO:65)的氨基酸序列;(c)FR-L3,其包含GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:66)的氨基酸序列;和(d)FR-L4,其包含FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:63)的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体的VL结构域包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含(a)重链,其包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列,和(b)轻链,其包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含(a)重链,其包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列,和(b)轻链,其包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体与人类胰蛋白酶β1上的表位结合,所述表位包含至少一个、至少两个或全部三个选自SEQ ID NO:71的Gln100、Leu101和Leu102的残基。在一些实施方案中,人类胰蛋白酶β1上的表位还包含一个或多个选自SEQ ID NO:71的Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128和Glu129的氨基酸残基。在一些实施方案中,人类胰蛋白酶β1上的表位包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、至少十二个、至少十三个或全部十四个选自SEQ ID NO:71的Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128和Glu129的氨基酸残基。在一些实施方案中,表位包含SEQ ID NO:71的Gln35、Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Gln100、Leu101、Leu102、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128、Glu129和Arg216。在一些实施方案中,表位相对于人类胰蛋白酶β1单体或四聚体而言。在一些实施方案中,表位相对于人类胰蛋白酶β1四聚体而言,并且人类胰蛋白酶β1上的表位还包含SEQ ID NO:71的Gln35和Arg216中一者或两者。在一些实施方案中,通过X射线结晶学模型确定表位。在一些实施方案中,抗体能够解离人类胰蛋白酶β1的小界面和/或大界面。

[0052] 在另一个方面,本发明的特征在于一种组合物(例如,药物组合物),其包含与人类胰蛋白酶β1结合的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段和可药用载体、赋形剂或稀释剂,其中抗体与人类胰蛋白酶β1上的表位结合,所述表位包含至少一个、至少两个、至少三个或全部四个残基,所述残基选自SEQ ID NO:71的His51、Val80、Lys81和Asp82。在一些实施方案中,抗体与人类胰蛋白酶β1上的表位结合,所述表位包含SEQ ID NO:71的His51和至少一个、至少两个或全部三个选自SEQ ID NO:71的Val80、Lys81和Asp82的残基。在一些实施方案中,人类胰蛋白酶β1上的表位还包含一个或多个选自SEQ ID NO:71的Gln67、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130的氨基酸残基。在一些实施方案中,人类胰蛋白酶β1上的表位包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个或全部十二个选自SEQ ID NO:71的Gln67、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130的氨基酸残基。在一些实施方案中,人类胰蛋白酶β1上的表位包含SEQ ID NO:71的His51、Gln67、Val80、Lys81、Asp82、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130。在一些实施方案中,表位相对于人类胰蛋白酶β1单体或四聚体而言。在一些实施方案中,通过X射线结晶学模型确定表位。在一些实施方案中,抗体能够解离四聚体人类胰蛋白酶β1的小界面和四聚体人类胰蛋白酶β1的大界面这二者。在一些实施方案中,抗体包含以下六个高变区(HVR):(a)包含DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含RNYDDWYFDV(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SASSSVTYMY

(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含(a)重链可变(VH)结构域,其包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少95%或至少99%序列同一性的氨基酸序列;(b)轻链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90%、至少95%或至少99%同一性的氨基酸序列,或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,抗体还包含以下VH结构域FR:(a)FR-H1,其包含EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列;(b)FR-H2,其包含WVRQAPGKGLEWVA(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列;(c)FR-H3,其包含RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR(SEQ ID NO:13)的氨基酸序列;和(d)FR-H4,其包含WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:14)的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体的VH结构域包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体还包含以下VL结构域FR:(a)FR-L1,其包含DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:15)的氨基酸序列;(b)FR-L2,其包含WYQQKPGKSPKPWIY(SEQ ID NO:16)的氨基酸序列;(c)FR-L3,其包含GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:17)的氨基酸序列;和(d)FR-L4,其包含FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:18)的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体的VL结构域包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含(a)重链,其包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,和(b)轻链,其包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含(a)重链,其包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列,和(b)轻链,其包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列。

[0053] 在另一个方面,本发明的特征在于一种组合物(例如,药物组合物),其包含与人类胰蛋白酶β1结合的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段和可药用载体、赋形剂或稀释剂,其中抗体与人类胰蛋白酶β1上的表位结合,所述表位包含至少一个、至少两个或全部三个选自SEQ ID NO:71的Gln100、Leu101和Leu102的残基。在一些实施方案中,人类胰蛋白酶β1上的表位还包含一个或多个选自SEQ ID NO:71的Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128和Glu129的氨基酸残基。在一些实施方案中,人类胰蛋白酶β1上的表位包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、至少十二个、至少十三个或全部十四个选自SEQ ID NO:71的Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128和Glu129的氨基酸残基。在一些实施方案中,表位包含SEQ ID NO:71的Gln35、Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Gln100、Leu101、Leu102、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128、Glu129和Arg216。在一些实施方案中,表位相对于人类胰蛋白酶β1单体或四聚体而言。在一些实施方案中,表位相对于人类胰蛋白酶β1四聚体而言,并且人类胰蛋白酶β1上的表位还包含SEQ ID NO:71的Gln35和Arg216中一者或两者。在一些实施方案中,通过X射线结晶学模型确定表位。在一些实施方案中,抗体能够解离人类胰蛋白酶β1的小界面和/或大界面。在一些实施方案中,抗体包含以下六个HVR:(a)包含GYAIT(SEQ ID NO:30)的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含GISSAATTFYSSWAKS(SEQ ID NO:31)的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含DPRGYGAALDRLDL(SEQ ID NO:32)的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含QSIKSVYNNRLG(SEQ ID NO:33)的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含ETSILTS(SEQ ID NO:34)的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含AGGFDRSGDTT(SEQ ID NO:35)的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体

包含(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:36、47、48、49、50、51和52中任一者的氨基酸序列具有至少90%、至少95%或至少99%序列同一性的氨基酸序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:37、53、58或59中任一者的氨基酸序列具有至少90%、至少95%或至少99%同一性的氨基酸序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,抗体还包含以下VH结构域FR:(a)FR-H1,其包含EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列;(b)FR-H2,其包含WIRQPPGKGLEWIG(SEQ ID NO:42)的氨基酸序列;(c)FR-H3,其包含RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR(SEQ ID NO:43)的氨基酸序列;和(d)FR-H4,其包含WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:41)的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体的VH结构域包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体还包含以下VL结构域FR:(a)FR-L1,其包含DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:64)的氨基酸序列;(b)FR-L2,其包含WYQQKPGKAPKLLIY(SEQ ID NO:65)的氨基酸序列;(c)FR-L3,其包含GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:66)的氨基酸序列;和(d)FR-L4,其包含FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:63)的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体的VL结构域包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含(a)重链,其包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列,和(b)轻链,其包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含(a)重链,其包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列,和(b)轻链,其包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列。

[0054] 在一些实施方案中,抗体能够进一步与人类胰蛋白酶α、类胰蛋白酶β2、类胰蛋白酶β3和/或食蟹猴类胰蛋白酶D1结合。

[0055] 在前述组合物(例如,药物组合物)的任意者中,抗体可以是单克隆的、人的、人源化的或嵌合的。在一些实施方案中,抗体是人源化的。

[0056] 在前述组合物(例如,药物组合物)的任意者中,组合物可以用于人中。

[0057] 前述组合物(例如,药物组合物)的任意者可以是冻干的。在其他实施方案中,前述组合物(例如,药物组合物)的任意者可以是液体。

[0058] 在前述组合物(例如,药物组合物)的任意者中,赋形剂可以是抗氧化剂。在一些实施方案中,组合物包含一种或多种抗氧化剂,所述抗氧化剂选自N-乙酰色氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸、谷胱甘肽、硫代山梨糖醇、抗坏血酸、一硫代甘油、环糊精、Trolox(6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸)、吡哆素、甘露糖醇和金属螯合剂。在一些实施方案中,组合物包含N-乙酰色氨酸或甲硫氨酸。在一些实施方案中,组合物包含N-乙酰色氨酸和甲硫氨酸。

[0059] 在另一个方面,本发明的特征在于一种组合物(例如,药物组合物),其包含:(i)与人类胰蛋白酶β1结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中抗体包含以下六个高变区(HVR):(a)包含DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含RNYDDWYFDV(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3,其中HVR-H3(SEQ ID NO:8)的位置6处色氨酸的氧化不多于30%。在一些实施方案中,HVR-H3(SEQ ID NO:8)的位置6处色氨酸的氧化不多于28%、25%、20%、15%、10%或6%。在一些实施方案中,在AAPH胁迫(AAPH stress)试验后,测定HVR-H3(SEQ ID NO:8)的位置6处色氨酸的氧化。在一些实施方案中,从初始产生组合物起一年内,测定HVR-H3(SEQ

ID NO:8)的位置6处色氨酸的氧化。

[0060] 前述组合物(例如,药物组合物)的任意者可以按约0.1mM至约5mM的浓度包含N-乙酰色氨酸。在一些实施方案中,N-乙酰色氨酸的浓度是约0.1mM至约1mM。在一些实施方案中,N-乙酰色氨酸的浓度是约0.3mM。在一些实施方案中,组合物以约1mM至约20mM的浓度包含甲硫氨酸。在一些实施方案中,甲硫氨酸的浓度是约1mM至约10mM。在一些实施方案中,甲硫氨酸的浓度是约5mM。

[0061] 在另一个方面,本发明的特征在于一种组合物(例如,药物组合物),其包含:(i)与人类胰蛋白酶结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中抗体包含以下六个高变区(HVR):(a)包含DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含RNYDDWYFDV(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3;(ii)浓度约0.1mm至约1mM的N-乙酰色氨酸;和(iii)浓度约1mM至约10mM的甲硫氨酸。

[0062] 在前述组合物(例如,药物组合物)的任意者中,抗体浓度可以是约1mg/ml至约250mg/ml。在一些实施方案中,抗体浓度是约150mg/ml。

[0063] 前述组合物(例如,药物组合物)的任意者可以还包含一种或多种选自稳定剂、缓冲剂、表面活性剂和张力剂(tonicity agent)的额外赋形剂。在一些实施方案中,组合物还包含缓冲剂。在一些实施方案中,缓冲剂是琥珀酸精氨酸和/或琥珀酸组氨酸。在一些实施方案中,缓冲剂包含琥珀酸精氨酸和琥珀酸组氨酸。在一些实施方案中,琥珀酸精氨酸的浓度是约50mM至约500mM。在一些实施方案中,琥珀酸精氨酸的浓度是约100mM至约300mM。在一些实施方案中,琥珀酸精氨酸的浓度是约200mM。在一些实施方案中,琥珀酸组氨酸的浓度是约1mM至约50mM。在一些实施方案中,琥珀酸组氨酸的浓度是约15mM至约25mM。在一些实施方案中,琥珀酸组氨酸的浓度是约20mM。在一些实施方案中,组合物还包含表面活性剂。在一些实施方案中,表面活性剂是泊洛沙姆188或聚山梨醇酯20(polysorbate 20)。在一些实施方案中,表面活性剂是泊洛沙姆188。在一些实施方案中,泊洛沙姆188的浓度是约0.005%至约0.1%。在一些实施方案中,泊洛沙姆188的浓度是约0.005%至约0.05%。在一些实施方案中,泊洛沙姆188的浓度是约0.02%。在一些实施方案中,组合物的pH是约4.5至约7.0。在一些实施方案中,组合物的pH是约4.5至约6.5。在一些实施方案中,组合物的pH是约5.5。在一些实施方案中,组合物在遮光容器中。在一些实施方案中,组合物在预填充式注射器(pre-filled syringe)中。

[0064] 前述组合物(例如,药物组合物)的任意者可以还包含IL-13轴结合拮抗剂、IL-5轴结合拮抗剂、IL-33轴结合拮抗剂、M1 prime拮抗剂、IgE拮抗剂、TRPA1拮抗剂、CRTH2拮抗剂、支气管扩张剂或哮喘症状控制药物、免疫调节剂、皮质类固醇、Th2途径抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂或磷酸二酯酶抑制剂。在一些实施方案中,IL-13轴结合拮抗剂是抗IL-13抗体。在一些实施方案中,抗IL-13抗体是来金珠单抗(lebrikizumab)。在一些实施方案中,IL-5轴结合拮抗剂是IL-5结合拮抗剂或IL-5受体结合拮抗剂。在一些实施方案中,IL-33轴结合拮抗剂是IL-33结合拮抗剂或ST2结合拮抗剂。在一些实施方案中,IL-33结合拮抗剂是抗IL-33抗体。在一些实施方案中,M1 prime拮抗剂是quilizumab。在一些情况下,IgE拮抗剂是奥马佐单抗**(XOLAIR®)**。

[0065] 可以配制前述组合物(例如,药物组合物)的任意者以施用至人。在某些实施方案中,药物组合物包含了不包含非人类恒定区序列的抗体。在某些实施方案中,药物组合物包含了不包含非人类构架和非人类恒定区序列的抗体。在某些实施方案中,药物组合物包含作为人抗体、人源化抗体或嵌合抗体的抗体。

[0066] 在一些方面,任一前述抗体可以用作药物。

[0067] 在一些方面,任一前述抗体可以用于治疗疾病。在一些实施方案中,疾病选自肺部疾病、自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、淋巴细胞性疾病、或与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病。在一些实施方案中,疾病是肺部疾病。在一些实施方案中,肺部疾病选自哮喘、气道高反应性和慢性阻塞性肺病(COPD)。在一些实施方案中,肺部疾病是哮喘。在一些实施方案中,哮喘是高Th2哮喘或低Th2哮喘。在一些实施方案中,自身免疫疾病选自类风湿性关节炎、银屑病、嗜酸粒细胞性食管炎、炎性肠病(IBD)和克罗恩病。在一些实施方案中,炎性疾病是慢性特发性荨麻疹(CIU,也称作慢性自发性荨麻疹,CSU)、过敏反应、变应性休克、特应性皮炎或过敏性鼻炎。在一些实施方案中,纤维化疾病是特发性肺纤维化(IPF)。在一些实施方案中,疾病是与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病。在一些实施方案中,疾病是肥大细胞增生症。在一些实施方案中,抗体用于与额外的治疗剂联用。在一些实施方案中,额外的治疗剂是IL-13轴结合拮抗剂、IL-5轴结合拮抗剂、IL-33轴结合拮抗剂、M1 prime拮抗剂、IgE拮抗剂、TRPA1拮抗剂、CRTH2拮抗剂、支气管扩张剂或哮喘症状控制药物、免疫调节剂、皮质类固醇、Th2途径抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂或磷酸二酯酶抑制剂。在一些实施方案中,IL-13轴结合拮抗剂是抗IL-13抗体。在一些实施方案中,抗IL-13抗体是来金珠单抗。在一些实施方案中,IL-5轴结合拮抗剂是IL-5结合拮抗剂或IL-5受体结合拮抗剂。在一些实施方案中,IL-33轴结合拮抗剂是IL-33结合拮抗剂或ST2结合拮抗剂。在一些实施方案中,IL-33结合拮抗剂是抗IL-33抗体。在一些实施方案中,M1 prime拮抗剂是quilizumab。在一些实施方案中,抗体用于皮下、静脉内、肌内、局部、经口、经皮、腹膜内、眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、室内或鼻内施用。在一些实施方案中,抗体用于皮下施用。在一些实施方案中,抗体用于人类受试者中。

[0068] 在一些方面,前述组合物(例如,药物组合物)的任意者可以用作药物。

[0069] 在一些方面,前述组合物(例如,药物组合物)的任意者可以用于治疗疾病。在一些实施方案中,疾病选自肺部疾病、自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、淋巴细胞性疾病、或与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病。在一些实施方案中,疾病是肺部疾病。在一些实施方案中,肺部疾病选自哮喘、气道高反应性和慢性阻塞性肺病(COPD)。在一些实施方案中,肺部疾病是哮喘。在一些实施方案中,哮喘是高Th2哮喘或低Th2哮喘。在一些实施方案中,自身免疫疾病选自类风湿性关节炎、银屑病、嗜酸粒细胞性食管炎、炎性肠病(IBD)和克罗恩病。在一些实施方案中,炎性疾病是慢性特发性荨麻疹(CIU

或CSU)、过敏反应、过敏性休克、特应性皮炎或过敏性鼻炎。在一些实施方案中,纤维化疾病是特发性肺纤维化(IPF)。在一些实施方案中,疾病是与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病。在一些实施方案中,疾病是肥大细胞增生症。在一些实施方案中,组合物(例如,药物组合物)用于与额外的治疗剂联用。在一些实施方案中,额外的治疗剂是IL-13轴结合拮抗剂、IL-5轴结合拮抗剂、IL-33轴结合拮抗剂、M1 prime拮抗剂、IgE拮抗剂、TRPA1拮抗剂、CRTH2拮抗剂、支气管扩张剂或哮喘症状控制药物、免疫调节剂、皮质类固醇、Th2途径抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂或磷酸二酯酶抑制剂。在一些实施方案中,IL-13轴结合拮抗剂是抗IL-13抗体。在一些实施方案中,抗IL-13抗体是来金珠单抗。在一些实施方案中,IL-5轴结合拮抗剂是IL-5结合拮抗剂或IL-5受体结合拮抗剂。在一些实施方案中,IL-33轴结合拮抗剂是IL-33结合拮抗剂或ST2结合拮抗剂。在一些实施方案中,IL-33结合拮抗剂是抗IL-33抗体。在一些实施方案中,M1 prime拮抗剂是quilizumab。在一些实施方案中,将组合物(例如,药物组合物)皮下、静脉内、肌内、局部、经口、经皮、腹膜内、眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、室内或鼻内施用。在一些实施方案中,将组合物(例如,药物组合物)皮下施用。在一些实施方案中,组合物(例如,药物组合物)用于人类受试者中。

[0070] 在一些方面,任一前述抗体可以用于制造治疗疾病的药物中。在一些实施方案中,疾病选自肺部疾病、自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、淋巴细胞性疾病、或与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病。在一些实施方案中,疾病是肺部疾病。在一些实施方案中,肺部疾病选自哮喘、气道高反应性和慢性阻塞性肺病(COPD)。在一些实施方案中,肺部疾病是哮喘。在一些实施方案中,哮喘是高Th2哮喘或低Th2哮喘。在一些实施方案中,自身免疫疾病选自类风湿性关节炎、银屑病、嗜酸粒细胞性食管炎、炎性肠病(IBD)和克罗恩病。在一些实施方案中,炎性疾病是慢性特发性荨麻疹(CIU或CSU)、过敏反应、过敏性休克、特应性皮炎或过敏性鼻炎。在一些实施方案中,纤维化疾病是特发性肺纤维化(IPF)。在一些实施方案中,疾病是与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病。在一些实施方案中,疾病是肥大细胞增生症。在一些实施方案中,配制药物以与额外的治疗剂联用。在一些实施方案中,额外的治疗剂是IL-13轴结合拮抗剂、IL-5轴结合拮抗剂、IL-33轴结合拮抗剂、M1 prime拮抗剂、IgE拮抗剂、TRPA1拮抗剂、CRTH2拮抗剂、支气管扩张剂或哮喘症状控制药物、免疫调节剂、皮质类固醇、Th2途径抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂或磷酸二酯酶抑制剂。在一些实施方案中,IL-13轴结合拮抗剂是抗IL-13抗体。在一些实施方案中,抗IL-13抗体是来金珠单抗。在一些实施方案中,IL-5轴结合拮抗剂是IL-5结合拮抗剂或IL-5受体结合拮抗剂。在一些实施方案中,IL-33轴结合拮抗剂是IL-33结合拮抗剂或ST2结合拮抗剂。在一些实施方案中,IL-33结合拮抗剂是抗IL-33抗体。在一些实施方案中,M1 prime拮抗剂是quilizumab。在一些实施方案中,配制药物以皮下、静脉内、肌内、局部、经口、经皮、腹膜内、眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、室内或鼻内施用。在一些实施方案中,配制药物以皮下施用。在一些实施方案中,配制药物以用于

人类受试者中。

[0071] 在一些方面，前述组合物(例如，药物组合物)的任意者可以用于制造治疗疾病的药物中。在一些实施方案中，疾病选自肺部疾病、自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、淋巴细胞性疾病、或与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病。在一些实施方案中，疾病是肺部疾病。在一些实施方案中，肺部疾病选自哮喘、气道高反应性和慢性阻塞性肺病(COPD)。在一些实施方案中，肺部疾病是哮喘。在一些实施方案中，哮喘是高Th2哮喘或低Th2哮喘。在一些实施方案中，自身免疫疾病选自类风湿性关节炎、银屑病、嗜酸粒细胞性食管炎、炎性肠病(IBD)和克罗恩病。在一些实施方案中，炎性疾病是慢性特发性荨麻疹(CIU或CSU)、过敏反应、过敏性休克、特应性皮炎或过敏性鼻炎。在一些实施方案中，纤维化疾病是特发性肺纤维化(IPF)。在一些实施方案中，疾病是与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病。在一些实施方案中，疾病是肥大细胞增生症。在一些实施方案中，配制药物以与额外的治疗剂联用。在一些实施方案中，额外的治疗剂是IL-13轴结合拮抗剂、IL-5轴结合拮抗剂、IL-33轴结合拮抗剂、M1 prime拮抗剂、IgE拮抗剂、TRPA1拮抗剂、CRTH2拮抗剂、支气管扩张剂或哮喘症状控制药物、免疫调节剂、皮质类固醇、Th2途径抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂或磷酸二酯酶抑制剂。在一些实施方案中，IL-13轴结合拮抗剂是抗IL-13抗体。在一些实施方案中，抗IL-13抗体是来金珠单抗。在一些实施方案中，IL-5轴结合拮抗剂是IL-5结合拮抗剂或IL-5受体结合拮抗剂。在一些实施方案中，IL-33轴结合拮抗剂是IL-33结合拮抗剂或ST2结合拮抗剂。在一些实施方案中，IL-33结合拮抗剂是抗IL-33抗体。在一些实施方案中，M1 prime拮抗剂是quilizumab。在一些实施方案中，配制药物以皮下、静脉内、肌内、局部、经口、经皮、腹膜内、眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、室内或鼻内施用。在一些实施方案中，配制药物以皮下施用。在一些实施方案中，配制药物以用于人类受试者中。

[0072] 在另一个方面，本发明的特征在于一种在有需求的受试者中治疗疾病的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的任一前述抗体。在一些实施方案中，疾病选自肺部疾病、自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、淋巴细胞性疾病、或与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病。在一些实施方案中，疾病是肺部疾病。在一些实施方案中，肺部疾病选自哮喘、气道高反应性和慢性阻塞性肺病(COPD)。在一些实施方案中，肺部疾病是哮喘。在一些实施方案中，哮喘是高Th2哮喘或低Th2哮喘。在一些实施方案中，自身免疫疾病选自类风湿性关节炎、银屑病、嗜酸粒细胞性食管炎、炎性肠病(IBD)和克罗恩病。在一些实施方案中，炎性疾病是慢性特发性荨麻疹(CIU或CSU)、过敏反应、过敏性休克、特应性皮炎或过敏性鼻炎。在一些实施方案中，纤维化疾病是特发性肺纤维化(IPF)。在一些实施方案中，疾病是与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病。在一些实施方案中，疾病是肥大细胞增生症。在一些实施方案中，该方

法还包括向受试者施用额外的治疗剂。在一些实施方案中，额外的治疗剂是IL-13轴结合拮抗剂、IL-5轴结合拮抗剂、IL-33轴结合拮抗剂、M1 prime拮抗剂、IgE拮抗剂、TRPA1拮抗剂、CRTH2拮抗剂、支气管扩张剂或哮喘症状控制药物、免疫调节剂、皮质类固醇、Th2途径抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂或磷酸二酯酶抑制剂。在一些实施方案中，IL-13轴结合拮抗剂是抗IL-13抗体。在一些实施方案中，抗IL-13抗体是来金珠单抗。在一些实施方案中，IL-5轴结合拮抗剂是IL-5结合拮抗剂或IL-5受体结合拮抗剂。在一些实施方案中，IL-33轴结合拮抗剂是IL-33结合拮抗剂或ST2结合拮抗剂。在一些实施方案中，IL-33结合拮抗剂是抗IL-33抗体。在一些实施方案中，M1 prime拮抗剂是quilizumab。在一些实施方案中，IgE拮抗剂是奥马佐单抗**(Xolair®)**。在一些实施方案中，将抗体皮下、静脉内、肌内、局部、经口、经皮、腹膜内、眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、室内或鼻内施用。在一些实施方案中，受试者是人。

[0073] 在另一个方面，本发明的特征在于一种在有需求的受试者中治疗疾病的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的前述组合物(例如，药物组合物)的任意者。在一些实施方案中，疾病选自肺部疾病、自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、淋巴细胞性疾病、或与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病。在一些实施方案中，疾病是肺部疾病。在一些实施方案中，肺部疾病选自哮喘、气道高反应性和慢性阻塞性肺病(COPD)。在一些实施方案中，肺部疾病是哮喘。在一些实施方案中，哮喘是高Th2哮喘或低Th2哮喘。在一些实施方案中，自身免疫疾病选自类风湿性关节炎、银屑病、嗜酸粒细胞性食管炎、炎性肠病(IBD)和克罗恩病。在一些实施方案中，炎性疾病是慢性特发性荨麻疹(CIU或CSU)、过敏反应、过敏性休克、特应性皮炎或过敏性鼻炎。在一些实施方案中，纤维化疾病是特发性肺纤维化(IPF)。在一些实施方案中，疾病是与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病。在一些实施方案中，疾病是肥大细胞增生症。在一些实施方案中，该方法还包括向受试者施用额外的治疗剂。在一些实施方案中，额外的治疗剂是IL-13轴结合拮抗剂、IL-5轴结合拮抗剂、IL-33轴结合拮抗剂、M1 prime拮抗剂、IgE拮抗剂、TRPA1拮抗剂、CRTH2拮抗剂、支气管扩张剂或哮喘症状控制药物、免疫调节剂、皮质类固醇、Th2途径抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂或磷酸二酯酶抑制剂。在一些实施方案中，IL-13轴结合拮抗剂是抗IL-13抗体。在一些实施方案中，抗IL-13抗体是来金珠单抗。在一些实施方案中，IL-5轴结合拮抗剂是IL-5结合拮抗剂或IL-5受体结合拮抗剂。在一些实施方案中，IL-33轴结合拮抗剂是IL-33结合拮抗剂或ST2结合拮抗剂。在一些实施方案中，IL-33结合拮抗剂是抗IL-33抗体。在一些实施方案中，M1 prime拮抗剂是奥马佐单抗**(Xolair®)**。在一些实施方案中，将组合物皮下、静脉内、肌内、局部、经口、经皮、腹膜内、眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、室内或鼻内施用。在一些实施方案中，受试者是人。

[0074] 附图简述

[0075] 图1是hu31A.v11和huE104.v2的VH结构域和VL结构域的序列比对結果，其显示根据Kabat、Chothi和接触(Contact)命名的互补决定区(CDR)。高变区(HVR)加下划线。

[0076] 图2A是显示如通过人类胰蛋白酶酶促测定法所测定的hu31A.v11和huE104.v2 IgG抑制分析结果的系列图。两种抗体均完全抑制类胰蛋白酶酶活性。

[0077] 图2B和图2C是显示人主气道平滑肌细胞(SMC)增生(图2B)和收缩(图2C)测定法的结果的图。添加类胰蛋白酶β刺激人主气道SMC增生,通过添加抗类胰蛋白酶抗体hu31A.v11 IgG4或huE104.v2 IgG4以剂量依赖性方式抑制所述增生(图2B)。添加类胰蛋白酶也刺激人主气道SMC收缩,通过添加hu31A.v11IgG4和huE104.v2 IgG4也抑制所述收缩(图2C)。

[0078] 图2D和图2E是显示肥大细胞脱颗粒测定法的结果的图,其中通过添加类胰蛋白酶β或抗4-羟基-3-硝基苯基乙酰基(NP)IgE和NP,在体外刺激肥大细胞。添加类胰蛋白酶导致组胺释放,通过添加hu31A.v11阻断所述释放(图2D)。无催化活性的突变类胰蛋白酶(S195A)充当对照。添加IgE和NP也导致组胺释放,通过添加类胰蛋白酶小分子抑制剂(SMI)或hu31A.v11抑制所述释放(30-50%)(图2E)。

[0079] 图3A是显示通过大小排阻色谱(SEC)分析的hu31A.v11 Fab所致人类胰蛋白酶β1四聚体解离的结果的图。通过SEC分析了三个试验:试验1仅含有WT四聚体类胰蛋白酶,其产生保留时间Tr=26分钟、保留体积Vr=13ml的峰1;试验2含有WT四聚体类胰蛋白酶+Fab hu31A.v11+肝素,其产生峰2(Tr=27.6分钟,Vr=13.8ml)和峰4(Tr=31分钟,Vr=15.5ml);试验3含有WT四聚体类胰蛋白酶+Fab hu31A.v11,无肝素,其产生峰3(Tr=28.1分钟,Vr=14ml)和峰4(Tr=31分钟,Vr=15.5ml)。

[0080] 图3B是显示huE104.v2 Fab所致人类胰蛋白酶β1四聚体解离的结果的图。通过SEC分析了三个试验:试验1含有加His标签的单体类胰蛋白酶+Fab huE104.v2,其产生峰2(Tr=25.8分钟)和峰6(31.6分钟);试验2含有WT四聚体类胰蛋白酶+Fab huE104.v2,其产生峰3(Tr=26分钟)和峰7(Tr=31.8分钟),并且试验3含有WT四聚体类胰蛋白酶+Fab huE104.v2+肝素,其产生峰1(Tr=21分钟)、峰4(Tr=27.2分钟)和峰5(Tr=31.2分钟)。

[0081] 图4A和图4B是显示药代动力学(PK)模拟结果的系列图,所述模拟在基线类胰蛋白酶水平(4ng/ml血清、10ng/ml肺组织,图4A)或高类胰蛋白酶水平(10ng/ml血清、40ng/ml肺组织,图4B),将解离性抗类胰蛋白酶抗体的PK和中和活性与类胰蛋白酶四聚体特异的稳定性抗体比较。

[0082] 图4C是显示中和活性模拟结果的系列图,所述模拟在基线类胰蛋白酶水平或高类胰蛋白酶水平比较解离性抗类胰蛋白酶抗体和类胰蛋白酶四聚体特异的稳定性抗体。

[0083] 图5A和图5B显示考马斯蓝染色的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶的图像(顶部小图),其显示人类胰蛋白酶β1在pH 6(图5A)和7.5(图5B)均将纤维蛋白原剪切成肽片段。在高浓度肝素的实验条件下,抗类胰蛋白酶抗体hu31A.v11 Fab在pH 6和pH 7.5均阻断纤维蛋白原剪切作用,而huE102.v2 Fab则否。泳道1,仅纤维蛋白原,显示未剪切的纤维蛋白原的α,β和γ链;泳道2,纤维蛋白原和类胰蛋白酶β;泳道3,纤维蛋白原、类胰蛋白酶β和hu31A.v11 Fab;泳道4,纤维蛋白原、类胰蛋白酶β和B12 IgG;泳道5,纤维蛋白原、类胰蛋白酶β1和huE104.v2 Fab;以及泳道6显示仅B12mIgG1。α链的强度下降提示类胰蛋白酶蛋白酶解活性,其中在底部小图中分析和定量所述活性。

[0084] 图6A是显示hu31A.v11 Fab所致WT或突变四聚体解离的结果的图。通过SEC分析了四个试验:试验1含有WT四聚体+huE104.v1 Fab,其产生参比峰(Tr=21.6分钟);试验2含有四聚体Y75C变体+hu31A.v11 Fab,其产生峰1(Tr=25.6分钟)和峰4(Tr=31.6分钟);试验3

含有四聚体I99C变体+hu31A.v11 Fab,其产生峰2(Tr＝23.9分钟)和峰4(Tr＝31.6分钟)并且试验4含有WT四聚体+hu31A.v11 Fab,其产生峰3(Tr＝28.1分钟)和峰4(Tr＝31.6分钟)。

[0085] 图6B显示图6A的大小排阻色谱峰的考马斯蓝染色的SDS-PAGE凝胶分析的结果。hu31A.v11 Fab与类胰蛋白酶突变体Y75C和I99C形成复合体并使四聚体解离成共价连接的二聚体。

[0086] 图6C是显示huE104.v2 Fab所致WT或突变四聚体解离的结果的图。通过SEC分析了三个试验:试验1含有四聚体Y75C变体+huE104.v2 Fab,其产生峰1(Tr＝21.6分钟)和峰4(Tr＝31分钟);试验2含有四聚体I99C变体+huE104.v2 Fab,其产生峰2和峰5(Tr＝31分钟)并且试验3含有WT四聚体+huE104.v2 Fab,其产生峰3(Tr＝26分钟)和峰6(Tr＝31.8分钟)。结果显示,huE104.v2 Fab与类胰蛋白酶突变体Y75C和I99C形成复合体并仅使I99C大界面锁定的四聚体解离成共价连接的二聚体。峰4、峰5和峰6均含有过量的Fab,如通过SDS-PAGD所测定(数据未显示)。

[0087] 图7显示成熟的人类胰蛋白酶β1的氨基酸序列,以及一般用于哺乳动物丝氨酸胰蛋白酶的基因顺序编号体系和糜蛋白酶原(chymotrypsinogen)编号(“chymo-编号”)体系。

[0088] 图8显示人类胰蛋白酶β1上Fab hu31A.v11的结合表位(类胰蛋白酶残基均按糜蛋白酶原编号)。

[0089] 图9是显示将Fab hu31A.v11建模到类胰蛋白酶四聚体上的展示。与Fab hu31A.v11复合的类胰蛋白酶单体与类胰蛋白酶四聚体中的原体A和C对齐。显示了重链和轻链。通过虚划椭圆突出显示这个模型中邻近类胰蛋白酶原体上Fab hu31A.v11的轻链之间的交锋(clashes)。

[0090] 图10显示复合物结构中检测到的类胰蛋白酶60s环的构象变化。Val60c和Val90(以棍显示)产生一个用于结合来自临近原体的Tyr173d的疏水性口袋作为四聚体类胰蛋白酶的大界面中蛋白质-蛋白质相互作用的部分。指示了四聚体构象中的类胰蛋白酶原体。与Fab hu31A.v11结合的类胰蛋白酶叠加到四聚体复合物的一个原体上。当结合Fab hu31A.v11时Val60c的构象变化,这产生预计防止Tyr173d与该口袋结合的空间位阻(类胰蛋白酶残基均按糜蛋白酶原编号)。

[0091] 图11显示与hu31A.v11结合后,复合物结构中检测到的位于小界面中的类胰蛋白酶30s环的构象变化。

[0092] 图12A是与四个huE104.v1 Fab复合的WT类胰蛋白酶四聚体的晶体结构的展示。根据字母标记或原体指示类胰蛋白酶原体(参见Pereir等人,Nature392:306-311,1998)。

[0093] 图12B是huE104.v1结合对类胰蛋白酶四聚体的小界面影响的展示,如通过氢-氘交换(HDX)所评估。

[0094] 图13是显示人源化抗类胰蛋白酶抗体huE104.v2和hu31A.v11的药代动力学(PK)分析结果的图,所述抗体各自通过静脉内(IV)注射以1或10mg/kg施用至C57BL/6小鼠。该图显示随时间(日)变化的抗类胰蛋白酶抗体浓度(μg/mL)。结果来自三个动物。

[0095] 图14是显示与对照抗gD IgG4抗体相比,人源化抗类胰蛋白酶抗体huE104.v2和hu31A.v11的PK分析结果的图。将每种抗体通过IV注射以30mg/kg施用至食蟹猴(cyno)。该图显示随时间(日)变化的抗类胰蛋白酶抗体浓度(μg/mL)。

[0096] 图15是测量样品中活性类胰蛋白酶(左图)和总类胰蛋白酶(右图)的量的测定法

的示意图。指示了类胰蛋白酶单体和四聚体。在左图中，添加大豆胰蛋白酶抑制物(SBTI)。接下来，将示例性生物素酰化的基于活性的探针(ABP)添加至含有类胰蛋白酶的样品(例如，支气管肺泡灌洗液(BAL))，以标记物活性类胰蛋白酶。通过添加示例性小分子抑制剂G02849855(例如，BMS-262084，Sutton等人Bioorg.Med.Chem.Lett.12:3229-33,2002;Qian等人，J.Org.Chem.2002,67:3595-3600)，终止标记过程。添加hu31A.v11抗体，以使类胰蛋白酶四聚体解离。随后在使用与链霉亲和素缀合的辣根过氧化物酶的酶联免疫吸附测定(ELISA)中检测标记的类胰蛋白酶。在总类胰蛋白酶测定法中，向样品添加hu31A.v11，以使样品中的类胰蛋白酶四聚体解离。随后使用ELISA测定类胰蛋白酶的量。

[0097] 图16显示对BAL样品进行的活性类胰蛋白酶测定法的结果，其中从通过静脉内(IV)施用30mg/kg抗类胰蛋白酶抗体hu31A.v11的食蟹猴获得所述样品。顶部小图显示实验方案的示意图。

[0098] 图17是显示实施例6中描述的食蟹猴蛔虫(Ascaris)攻击模型的实验方案的示意图。

[0099] 图18A和图18B是显示活性类胰蛋白酶测定法(图18A)和总类胰蛋白酶测定法(图18B)的结果的图，所述测定法对从实施例6中描述的食蟹猴蛔虫攻击实验的各只动物获得的BAL进行。

[0100] 图18C是显示确定鼻粘膜衬层液(MLF)中总类胰蛋白酶的量的总类胰蛋白酶测定法的结果的图，其中使用合成吸附性基质(SAM)，通过鼻吸附从实施例6中描述的食蟹猴蛔虫攻击实验的各只动物获得所述鼻粘膜衬层液。

[0101] 图19是显示抗类胰蛋白酶抗体hu31A.v11的施用在人植入的小鼠中抑制IgE介导的被动全身性过敏反应的图。当IgE攻击时，如与对照抗gD抗体处理的小鼠相比，抗类胰蛋白酶抗体hu31A.v11处理的小鼠显示改善的体温维持。***P<0.0001(配对T检验)。

[0102] 本发明实施方案的详细描述

[0103] I.定义

[0104] 如本文所用的术语“约”指本技术领域的技术人员轻易已知的相应值的常规误差范围。本文中对“约”某个值或参数的提及包括(并且描述)涉及该值或参数本身的实施方案。

[0105] 出于本文目的，“接纳体人类构架”是这样的构架，其包含从如下文定义的人免疫球蛋白构架或人共有序列构架衍生的轻链可变结构域(VL)构架或重链可变结构域(VH)构架的氨基酸序列。“衍生自”人免疫球蛋白构架或人共有构架的接纳体人类构架可以包含其相同的氨基酸序列，或它可以含有氨基酸序列变化。在一些实施方案中，氨基酸变化的数目是10个或更小、9个或更小、8个或更小、7个或更小、6个或更小、5个或更小、4个或更小、3个或更小、或2个或更小。在一些实施方案中，VL接纳体人类构架在序列上与VL人免疫球蛋白构架序列或人类共有构架序列相同。

[0106] “亲和力”指分子(例如，抗体)的单一结合位点及其结合配偶体(例如，抗原)之间总计非共价相互作用的强度。除非另外指出，否则如本文所用，“结合亲和力”指反映结合对子的成员(例如，抗体和抗原)之间1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数(K_D)代表。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量，包括本文所述的那些方法。在下文中描述用于测量结合亲和力的具体示意性和示例性实施方案。

[0107] 在权利要求的背景下使用时，术语“通过表面等离子体共振测定法测量K_D”意指，根据实施例1(A)(vii)中描述的方法测量K_D，所述方法测量抗类胰蛋白酶抗体与不自发形成类胰蛋白酶四聚体的人类胰蛋白酶β1单体(例如，如SEQ ID NO:128中所示的加His6标签的类胰蛋白酶单体)结合的动力学参数。该测定法可以使用**BIAcore®** T200或等同装置。简而言之，将**BIAcore®** Series S CM5传感芯片(或等同传感芯片)用小鼠单克隆抗人IgG(Fc)抗体固定化并且随后在流动池上捕获抗类胰蛋白酶抗体。以流速30μl/min注射人类胰蛋白酶β1单体的3倍连续稀释物。用3分钟结合和10分钟解离分析每份样品。该测定法在25℃进行。在每次注射后，使用3M $MgCl_2$使芯片再生。通过扣减来自以相似密度捕获无关IgG的流动池的响应单位(RU)来校正结合响应。同时拟合k_{on}和k_{off}的1:1朗缪尔模型用于动力学分析。

[0108] “亲和力成熟的”抗体是在一个或多个HVR区和/或构架区中存在一个或多个改变的一种抗体，其中与没有这些改变的亲本抗体相比，所述改变导致抗体对抗原的亲和力改善。优选的亲和力成熟抗体将对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔亲和力。通过本领域已知的方法产生亲和力成熟的抗体。例如，Marks等人，Bio/Technology 10:779-783，1992描述了借助VH和VL结构域改组的亲和力成熟。HVR残基和/或构架残基的随机诱变由Barbas等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:3809-3813，1994；Schier等人Gene 169:147-155，1995；Yelton等人J.Immunol.155:1994-2004，1995；Jackson等人J.Immunol.154(7):3310-3319，1995；和Hawkins等人J.Mol.Biol.226:889-896，1992描述。

[0109] 术语“抗体”在本文中以最广意义使用并且涵盖各种抗体结构物，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)和抗体片段，只要它们显示出所需的抗原结合活性即可。

[0110] 除非另外说明，否则如本文所用，术语“类胰蛋白酶”指来自任何脊椎动物来源的任何天然类胰蛋白酶，所述脊椎动物来源包括哺乳动物如灵长类(例如，人类)和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)。类胰蛋白酶在本领域中也称作肥大细胞类胰蛋白酶、肥大细胞蛋白酶II、皮肤类胰蛋白酶、肺类胰蛋白酶、垂体类胰蛋白酶、肥大细胞中性蛋白酶和肥大细胞丝氨酸蛋白酶II。术语“类胰蛋白酶”涵盖类胰蛋白酶α(人类中由TPSAB1编码)、类胰蛋白酶β(人类中由TPSAB1和TPSB2编码；参见下文)、类胰蛋白酶δ(人类中由TPSD1编码)、类胰蛋白酶γ(人类中由TPSG1编码)和类胰蛋白酶ε(人类中由PRSS22编码)。类胰蛋白酶α、β和γ蛋白质是可溶的，而类胰蛋白酶ε蛋白质是膜锚定的。类胰蛋白酶β和γ是活性丝氨酸蛋白酶，虽然它们具有不同的特异性。类胰蛋白酶α和δ蛋白质是主要无活性的蛋白酶，因为它们在关键位置具有与典型的活性丝氨酸蛋白酶不同的残基。可以依据NCBI GenBank登录号ACZ98910.1找到示例性类胰蛋白酶α全长蛋白质序列(SEQ ID NO:118)。可以依据Uniprot登录号Q9NRR2或GenBank登录号Q9NRR2.3、AAF03695.1、NP_036599.3或AAF76457.1找到示例性类胰蛋白酶γ全长蛋白质序列。可以依据Uniprot登录号Q9BZJ3或GenBank登录号NP_036349.1找到示例性类胰蛋白酶δ全长蛋白质序列。几种类胰蛋白酶基因簇集在人染色体第16p13.3号上。该术语涵盖“全长”、未加工的类胰蛋白酶以及因细胞中加工而产生的任何形式的类胰蛋白酶。类胰蛋白酶β是肥大细胞中表达的主要类胰蛋白酶，而类胰蛋白酶α是嗜碱性粒细胞中表达的主要类胰蛋白酶。类胰蛋白酶α和类胰蛋白酶β一般包含大约30个氨基酸的前导序列和大约245个氨基酸的催化序列(参见，例如，Schwartz，Immunol.Allergy

Clin.N.Am.26:451-463,2006)。

[0111] 除非另外说明,否则如本文所用,术语“类胰蛋白酶β”指来自任何脊椎动物来源的任何类胰蛋白酶β,所述脊椎动物来源包括哺乳动物如灵长类(例如,人类)和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。类胰蛋白酶β是作为肥大细胞分泌颗粒的主要组分的丝氨酸蛋白酶。如本文所用,该术语涵盖类胰蛋白酶β1(由TPSAB1基因编码,所述基因还编码类胰蛋白酶α1)、类胰蛋白酶β2(由TPSB2基因编码)和类胰蛋白酶β3(也由TPSB2基因编码)。示例性人类胰蛋白酶β1序列在SEQ ID NO:71中显示(还参见GenBank登录号NP_003285.2)。示例性人类胰蛋白酶β2序列在SEQ ID NO:72中显示(还参见GenBank登录号AAD13876.1)。示例性人类胰蛋白酶β3序列在SEQ ID NO:73中显示(还参见GenBank登录号NP_077078.5)。术语“类胰蛋白酶β”涵盖“全长”未加工的类胰蛋白酶β以及因翻译后修饰(包括蛋白酶解加工)产生的类胰蛋白酶β。认为全长、原类胰蛋白酶β在两个蛋白酶解性步骤中加工。首先,在R^{-3}处发生自催化分子间剪切,尤其在酸性pH和存在聚阴离子(例如,肝素或硫酸葡聚糖)时。接着,移除剩余pro二肽(可能通过二肽基肽酶I移除)。对于全长人类胰蛋白酶β1,参考以下SEQ ID NO:71,加下划线的氨基酸残基对应于天然前导序列,并且加粗和加灰色阴影的氨基酸残基对应于pro结构域,它们遭受切割以形成成熟蛋白(参见,例如,Sakai等人J.Clin.Invest.97:988-995,1996)

[0112] MLNLLLLALPVLASR**AYAAPAPGQALQRVG**IVGGQEAPRSKWPWQVSLRVHGPYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVNVSSHVHTVTLPPASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSCQGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWGEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKP(SEQ ID NO:71)

[0113] 虽然已经报道了类胰蛋白酶β的活性单体,但成熟、有酶促活性的类胰蛋白酶β一般是同型四聚体或异四聚体(参见,例如,Fukuoka等人J.Immunol.176:3165,2006)。类胰蛋白酶β四聚体的亚基由亚基之间的疏水性和极性相互作用聚在一起并由聚阴离子(尤其肝素和硫酸葡聚糖)稳定。术语“类胰蛋白酶”可以指类胰蛋白酶四聚体或类胰蛋白酶单体。成熟人类胰蛋白酶β1、β2和β3的示例性序列分别地在SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:116和SEQ ID NO:117中显示。每个亚基的活性部位面向四聚体的中央孔,所述孔测量为大约50x 30埃(参见,例如,Pereir等人Nature 392:306-311,1998)。中央孔的尺寸一般限制抑制物接近活性部位。类胰蛋白酶β的示例性底物包括但不限于PAR2、C3、纤维蛋白原、纤连蛋白和激肽原。

[0114] 术语“抗类胰蛋白酶抗体”、“与类胰蛋白酶结合的抗体”和“特异性结合类胰蛋白酶的抗体”指这样的抗体,所述抗体能够以足够亲和力结合类胰蛋白酶,从而该抗体可用作靶向类胰蛋白酶的诊断药和/或治疗药。在一个实施方案中,抗类胰蛋白酶抗体与不相关的非类胰蛋白酶蛋白结合的程度小于约10%该抗体与类胰蛋白酶结合的程度,如通过放射免疫测定(RIA)所测量。在某些实施方案中,与类胰蛋白酶结合的抗体具有≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM,或≤0.001nM(例如,10^{-8}M或更小,例如,10^{-8}M至10^{-13}M,例如,10^{-9}M至10^{-13}M)的解离常数(K_D)。在某些实施方案中,抗类胰蛋白酶抗体与来自不同物种的类胰蛋白酶之间保守的类胰蛋白酶表位结合。

[0115] “与参考抗体结合相同表位的抗体”指这样的抗体,所述抗体如与参考抗体相比,接触抗原的重叠性氨基酸残基集合或在竞争测定法中阻断参考抗体与其抗原的结合达50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多或90%或更多。在一些实施方案中,所述

抗体接触的氨基酸残基集合可以完全重叠或部分重叠于参考抗体接触的氨基酸残基集合。在一些实施方案中，与参考抗体结合相同表位的抗体在竞争测定法中阻断参考抗体与其抗原的结合达50％或更多、60％或更多、70％或更多、80％或更多、或90％或更多，并且反过来，参考抗体在竞争测定法中阻断该抗体与其抗原的结合达50％或更多、60％或更多、70％或更多、80％或更多、或90％或更多。本文提供示例性竞争测定法。

[0116] 在权利要求的语境下，术语“通过表位分拣测定法确定”意指，使用如第C部分实施例3中描述的**OCTET®**表位分拣测定法，确定抗体与相同表位结合和/或与参考抗类胰蛋白酶抗体(例如，hu31A.v11或huE104.v2)竞争结合作用。简而言之，通过与NHS-PEG4-生物素反应，人类胰蛋白酶β1单体蛋白在Lys残基处生物素酰化。将生物素酰化的单体在动力学缓冲液(ForteBio，Inc.)中稀释至5μg/ml并且固定到链霉亲和素传感器头(ForteBio，Inc.)上。在固定步骤后，将人类胰蛋白酶β1固定的传感器用稀释为10-20μg/ml的第一抗体浸透，随后与稀释为2.5μg/ml的第二抗体结合。此类表位结合测定法的运行温度是30℃。第二抗体所致的结合信号提示，两种抗体可以在不同、非重叠性表位同时结合抗原，而无结合信号提示它们共有共同表位。在一些情况下，观察到第二抗体所致的部分信号(即，信号小于若不添加第一抗体时观察到的信号，但是大于背景)，这提示表位是部分重叠的。

[0117] “抗体片段”包含完整抗体的一部分，优选地完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括Fab、Fab’、$F(ab')_2$和Fv片段；双体抗体(diabodies)；线性抗体(参见美国专利号5,641,870，实施例2；Zapata等人Protein Eng.8(10)：1057-1062，1995)；单链抗体分子；和从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0118] 木瓜蛋白酶消化抗体产生了两个相同的抗原结合片段，称作“Fab”片段，和一个残余“Fc”片段，所述“Fc”片段的命名反映轻易结晶的能力。Fab片段由完整L链连同H链的可变区结构域(VH)和一条重链的第一恒定结构域(C_H1)组成。胃蛋白酶处理抗体产生了大的单一$F(ab')_2$片段，所述片段大致对应于二硫键连接的两个具有二价抗原结合活性的Fab片段并且仍然能够交联抗原。Fab’片段因在C_H1结构域的羧基端处具有额外几个残基(包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸)而与Fab片段不同。Fab’-SH在本文是这样的Fab’的名称，其中恒定结构域的半胱氨酸残基具有游离巯基。$F(ab')_2$抗体片段最初作为成对Fab’片段产生，所述成对Fab’片段在它们之间具有铰合半胱氨酸。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。

[0119] 术语“Fc区”在本文中用来定义免疫球蛋白重链的含有至少一部分恒定区的C端区域。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中，人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基端。然而，Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可以存在或可以不存在。除非本文中另外说明，否则Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号根据如Kabat等人Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD，1991中所述的EU编号体系，也称作EU索引。

[0120] “Fv”由紧密、非共价缔合的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。贡献用于抗原结合的氨基酸残基并向该抗体赋予抗原结合特异性的六个高变环(分别来自H和L链的3个环)源自这两个结构域的折叠。然而，甚至单一可变结构域(或仅包含三个对抗原特异的高变区的半个Fv)具有识别并结合抗原的能力，尽管经常以低于完整

结合部位的亲和力识别并结合。

[0121] 也缩写为“sFv”或“scFv”的“单链Fv”是包含连接成为单条多肽链的VH和VL抗体结构域的抗体片段。优选地，sFv多肽还包含在VH结构域和VL结构域之间的多肽接头，所述多肽接头能够使sFv形成抗原结合所需的结构。关于sFv的综述，参见Pluckthun，The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，第113卷，Rosenburg和Moore编著，Springer-Verlag，New York，第269-315页，1994。

[0122] 术语“双体抗体”指通过以下方式制备的小抗体片段(参见前述段落)：构建在VH结构域和VL结构域之间具有短接头(约5-10个残基)的sFv片段，从而实现V结构域的链间而非链内配对，产生双价片段，即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双体抗体是两个“交换(crossover)”sFv片段的异源二聚体，其中这两种抗体的VH结构域和VL结构域存在于不同的多肽链上。在例如EP 404，097；WO 93/11161；和Hollinger等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448，1993中更充分地描述双体抗体。

[0123] “结合结构域”意指化合物或分子的与靶表位、抗原、配体或受体特异性结合的部分。结合部分包括但不限于抗体(例如，单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人源化抗体和嵌合抗体)、抗体片段或其部分(例如，Fab片段、Fab'_2、scFv抗体、SMIP、结构域抗体、双体抗体、微型抗体、scFv-Fc、亲和体、纳米体和抗体的VH结构域和/或VL结构域)、受体、配体、适配体和具有已鉴定的结合配偶体的其他分子。

[0124] “阻断性抗体”或“拮抗性抗体”是抑制或减少与该抗体结合的抗原的生物学活性的一种抗体。某些阻断性抗体或拮抗性抗体基本上或彻底地抑制抗原的生物学活性。在一些实施方案中，活性可以是类胰蛋白酶酶活性，例如，蛋白酶活性。在其他情况下，活性可以是类胰蛋白酶介导的对支气管平滑肌细胞增殖和/或基于胶原蛋白的收缩的刺激。在其他情况下，活性可以是肥大细胞组胺释放(例如，IgE触发的组胺释放和/或类胰蛋白酶触发的组胺释放)。本发明的抗体可以抑制类胰蛋白酶的生物学活性至少约1％、约5％、约10％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或约100％。

[0125] 在权利要求的背景下，术语“如通过使用合成肽S-2288作为底物的人类胰蛋白酶β酶促测定法所测定”意指，根据实施例1(A)(viii)(a)中描述的测定法测量抑制活性。简而言之，将重组人类胰蛋白酶β1四聚体活性酶在TNH缓冲液(200mM Tris，150mM NaCl，0.1mg/mL肝素，0.01％TRITON™X-100、pH8.0)中稀释至0.75nM，并且在384孔平板中与抗类胰蛋白酶抗体(稀释于PBS中)1:1合并。将平板在环境温度温育1小时，同时温和振荡。将比色底物S-2288(Chromogenix，Part No.82-0852-39)或等同底物在TNH缓冲液中稀释至1200μM并添加至平板。孔内终浓度是400μM S-2288、0.25nM重组人类胰蛋白酶β1四聚体、66μg/mL肝素和0.10至222nM抗类胰蛋白酶抗体。将平板在环境温度温育40分钟，同时温和振荡，并且随后在A_{405}读取。从抗类胰蛋白酶抗体的各自曲线的四参数拟合测定其IC_{50}。

[0126] 抗体的“类”指由其重链拥有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五个大类的抗体：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，并且这些类别中的几种可以进一步划分成亚类(同种型)，例如，IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1和IgA_2。对应于不同类别免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称作α、δ、ε、γ和μ。

[0127] 抗体“效应子功能”指归因于抗体Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的

那些生物活性，并随抗体同种型而变动。抗体效应子功能的例子包括：C1q结合和补体依赖的细胞毒性；Fc受体结合作用；抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)；吞噬；下调细胞表面受体(例如，B细胞受体)；和B细胞活化。

[0128] “抗体依赖的细胞介导细胞毒性”或“ADCC”指一种形式的细胞毒性，其中结合到某些细胞毒性细胞(例如，天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上存在的Fc受体(FcRs)上的分泌型Ig使得这些细胞毒效应细胞与携带抗原的靶细胞特异性结合并随后用细胞毒素杀伤靶细胞成为可能。抗体“武装”细胞毒性细胞并且是这类杀伤作用绝对需要的。用于介导ADCC的主要细胞即NK细胞，其仅表达FcγRIII，而单核细胞表达FcγRI、FcγRII和FcγRIII。Ravetch等人Annu.Rev.Immunol.9:457-492,1991的第464页上的表3中总结了造血细胞上的FcR表达。为了评估目的分子的ADCC活性，可以进行体外ADCC测定法，如美国专利号5,500,362或5,821,337中描述的那种测定法。用于此类测定法的效应细胞括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地或额外地，可以在体内，例如，在动物模型(如Clynes等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:652-656,1998公开中的那种动物模型)中评估目的分子的ADCC活性。

[0129] “Fc受体”或“FcR”描述与抗体的Fc区结合的受体。优选的FcR是人天然序列FcR。另外，优选的FcR是结合IgG抗体(γ受体)的一种受体并且包括FcγRI、FcγRII和FcγRIII亚类受体，包括这些受体的等位变体和备选的剪接形式。FcγRII受体包括FcγRIIA(“激活性受体”)和FcγRIIB(“抑制性受体”)，它们具有主要在其胞质域内不同的相似氨基酸序列。激活性受体FcγRIIA在其胞质域中含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。抑制性受体FcγRIIB在其胞质域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见M.Daëron, Annu.Rev.Immunol.15:203-234,1997中的综述)。例如，在Ravetch等人Annu.Rev.Immunol.9:457-492,1991;Capel等人Immunomethods 4:25-34,1994;和de Haas等人J.Lab.Clin.Med.126:330-41,1995中综述了FcR。本文中的术语“FcR”涵盖其他FcR，包括将来待鉴定的那些。该术语还包括负责将母体IgG转移至胎儿的新生儿受体FcRn(参见，例如，Guyer等人J.Immunol.117:587,1976;和Kim等人J.Immunol.24:249,1994)。

[0130] “人效应细胞”是表达一种或多种FcR并执行效应子功能的白细胞。优选地，这些细胞至少表达FcγRIII并且执行ADCC效应子功能。介导ADCC的人白细胞的例子包括外周血单个核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒T细胞和中性粒细胞，优选PBMC和NK细胞。效应细胞可以从天然来源(例如，从血液)分离。

[0131] “补体依赖细胞毒性”或“CDC”指在补体存在下靶细胞的溶解。经典补体途径的活化因补体系统第一组分(C1q)与结合至其相应抗原的(适宜亚类的)抗体结合而启动。为评估补体激活，可以进行CDC测定法，例如，如Gazzano-Santoro等人J.Immunol.Methods 202:163,1996中所述。

[0132] “表位”是抗原的与抗体选择性结合的部分。对于多肽抗原，线性表位可以是约4-15个(例如，4、5、6、7、8、9、10、11、12个)氨基酸残基的肽部分。非线性构象表位可以包含多肽序列的在蛋白质的三维的(3D)结构中使其密切靠近的残基。在一些实施方案中，表位包含在抗体的任何原子的4埃(Å)范围内的氨基酸。在一些实施方案中，表位包含类胰蛋白酶原体的在配偶体Fab的4埃(Å)范围内的氨基酸。在某些实施方案中，表位包含在抗体的任何

原子的**3.5 Å**、**3 Å**、**2.5 Å**或**2 Å**范围内的氨基酸。可以例如通过测定与抗原复合的抗体的晶体结构或通过进行氢/氘交换，确定抗体的接触抗原的氨基酸残基(即，互补位)。

[0133] 在权利要求的背景下使用时，术语“通过X射线结晶学模型确定表位”意指确定类胰蛋白酶氨基酸残基(例如，人类胰蛋白酶β1残基)的原子位于(例如，如实施例3中所述)的X射线结晶学模型中抗类胰蛋白酶抗体(例如，本文所述的任何抗类胰蛋白酶抗体，例如，hu31A.v11或huE104.v2)的任何原子的**4 Å**范围内。在一些实施方案中，X射线结晶学模型具有约**3.5 Å**或更小、约**3 Å**或更小、约**2.5 Å**或更小、约**2.15 Å**或更小或约**2 Å**或更小的分辨率。

[0134] 术语“全长抗体”、“完好抗体”和“完整抗体”在本文中可互换地用来指一种抗体，所述抗体具有基本上与天然抗体结构相似的结构或具有含有如本文定义的Fc区的重链。

[0135] “人抗体”是一种抗体，所述抗体拥有与人产生的抗体的氨基酸序列相对应的氨基酸序列和/或已经使用产生人抗体的任何技术产生。人抗体的这种定义特别排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0136] “人类共有构架”是这样的构架，它代表在人免疫球蛋白VL或VH构架序列的选项中最常出现的氨基酸残基。通常，人免疫球蛋白VL或VH构架序列的选项来自可变结构域序列的亚组。通常，序列亚组是如Kabat等人Sequences of Proteins of Immunological Interest，第五版，NIH Publication 91-3242，Bethesda MD，第1-3卷，1991中描述的亚组。在一个实施方案中，对于VL，该亚组是如上文Kabat等人中描述的亚组κIII或κIV。在一个实施方案中，对于VH，该亚组是如上文Kabat等人中描述的亚组III。

[0137] 非人(例如，啮齿类)抗体的“人源化”形式是含有源自非人抗体中最少序列的嵌合抗体。对大部分情况而言，人源化抗体是这样的人免疫球蛋白(受体抗体)，其中来自所述受体的高变区中的残基由来自非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的具有所需特异性、亲和力和能力的高变区中的残基替换。在一些情况下，人免疫球蛋白的构架区(FR)残基由相应的非人残基替换。另外，人源化抗体可以包含在受体抗体中或在供体抗体中不存在的残基。作出这些修饰以进一步完善抗体性能。通常，人源化抗体将包含基本上全部的至少一个和一般两个可变结构域，其中全部或基本上全部的高变环与非人免疫球蛋白的那些高变环对应并且全部或基本上全部的FR区是具有人免疫球蛋白序列的那些FR。人源化抗体任选地也将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分，一般是人免疫球蛋白恒定区的部分。关于其他细节，参见Jones等人Nature 321:522-525，1986；Riechmann等人Nature 332:323-329，1988；和Presta，Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596，1992。

[0138] “免疫缀合物”是与一个或多个异源分子(包括但不限于细胞毒性剂)缀合的抗体。

[0139] 当用来描述本文中公开的各种抗体时，术语“分离的”意指这样的抗体，其中已经鉴定过并且从其中表达所述抗体的细胞或细胞培养物分出和/或回收该抗体。其自然环境的杂质组分是一般将会干扰该多肽的诊断性或治疗性用途的物质，并且可以包括酶、激素和其他蛋白质性或非蛋白质性溶质。在一些实施方案中，将抗体纯化至大于95％或99％纯度，如通过例如电法泳法(例如，十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)、等电聚焦法(IEF)、毛细管电泳法)或色谱法(例如，离子交换法或反相HPLC法)所确定。关于抗体纯度评估方法的综述，例如参见Flatman等人J.Chromatogr.B 848:79-87，2007。在优选的

实施方案中，将该抗体纯化(1)至足以通过转杯测序仪(spinning cup sequenator)获得至少15个N端残基或内部氨基酸序列的程度或纯化(2)至通过非还原或还原条件下使用考马斯蓝或优选使用银染的SDS-PAGE所确定的均一性。分离的抗体包括在重组细胞内部在原位的抗体，因为自然环境下多肽的至少一种组分将不存在。然而，一般将通过至少一个纯化步骤制备分离的多肽。

[0140] 如本文中所用的术语“单克隆抗体”指从基本上均一的抗体群体获得的抗体，即，构成该群体的各个抗体是相同的和/或结合抗原上的相同表位，除了可能的变体抗体之外(例如，含有天然存在突变或在产生单克隆抗体制备物期间出现)，这类变体通常以微小的量存在。另外，与一般包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物相反，单克隆抗体制备物的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此，修饰语“单克隆的”指示该抗体的特征为从基本上均一的抗体群体获得，并且不得解释为要求通过任何特定方法产生该抗体。例如，可以通过多种技术产生根据本发明待使用的单克隆抗体，所述技术包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有全部或部分的人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法，本文中描述了用于产生单克隆抗体的这类方法和其他示例性方法。在某些实施方案中，术语“单克隆抗体”涵盖双特异性抗体。

[0141] 术语“双价抗体”指对抗原具有两个结合位点的抗体。双价抗体可以处于，而不限于IgG样式或$F(ab')_2$样式。

[0142] 术语“多特异性抗体”以最广意义使用并且指与一种抗原上的两个或更多个决定簇或表位或多于一种抗原上的两个或更多个决定簇或表位结合的抗体。这类多特异性抗体包括但不限于全长抗体、具有两个或更多个VL结构域和VH结构域的抗体、抗体片段如Fab、Fv、dsFv、scFv、双体抗体、双特异性双体抗体和三体抗体、已经共价或非共价连接的抗体片段。“多表位特异性”指与相同靶或不同靶上两个或更多个不同表位特异性结合的能力。在某些实施方案中，多特异性抗体是双特异性抗体。“双重特异性”或“双特异性”指与相同靶或不同靶上两个不同表位特异性结合的能力。但是，与双特异性抗体相反，双重特异性抗体具有两个在氨基酸序列上相同的抗原结合臂并且每个Fab臂能够识别两种抗原。双重特异性允许抗体作为单个Fab或IgG分子以高亲和力与两种不同抗原相互作用。根据一个实施方案，所述多特异性抗体以5μM至0.001pM，3μM至0.001pM，1μM至0.001pM，0.5μM至0.001pM或0.1μM至0.001pM的亲和力与每个表位结合。“单特异性”指仅结合一个表位的能力。

[0143] “裸抗体”指不与异源部分(例如，细胞毒性部分)或放射标记物缀合的抗体。裸抗体可以存在于药物组合物中。

[0144] 就抗体与靶分子结合而言，术语“结合”或“结合了”或“特异性结合”或“特异性结合了”或“特异性针对”特定多肽或特定多肽靶上的表位意指可度量地与非特异性相互作用不同的结合作用。可以测量特异性结合作用，例如，通过与对照分子的结合作用相比确定分子的结合作用来测量。例如，可以通过与类似于靶的对照分子(例如过量的未标记靶)竞争来测定特异性结合。在这种情况下，如果标记的靶与探针的结合受过量未标记的靶竞争性抑制，则证实特异性结合。如本文所用的术语“特异性结合”或“特异性结合于特定多肽或特定多肽靶上的表位”或“对特定多肽或特定多肽靶上的表位特异的”可以由例如对靶具有下述K_D的分子显示，所述K_D为10^{-4}M或更低、备选地10^{-5}M或更低、备选地10^{-6}M或更低、备选地10^{-7}M或更低、备选地10^{-8}M或更低、备选地10^{-9}M或更低、备选地10^{-10}M或更低、备选地10^{-11}M或更

低、备选地10^{-12}M或更低或处于10^{-4}M至10^{-6}M或10^{-6}M至10^{-10}M或10^{-7}M至10^{-9}M的范围内。技术人员将领会，亲和力和K_D值反向相关。对抗原的高亲和力由低K_D值度量。在一个实施方案中，术语“特异性结合”指这样的结合，其中某分子与特定多肽或特定多肽上的表位结合而基本上不与任何其他的多肽或多肽表位结合。

[0145] 通过“互补位”意指结合抗原的表位的抗体部分。互补位一般是抗体Fv区的约15-22个氨基酸残基的区域并且可以含有来自抗体V_H链和V_L链的氨基酸。

[0146] 术语“可变的”指抗体之间可变结构域的某些节段在序列方面广泛不同的事实。可变或“V”结构域介导抗原结合并定义特定针对其特定抗原的特异性。然而，变异性在涵盖可变结构域的110个氨基酸范围内并非均匀地分布。相反，V区由被具有极端变动性的叫做“高变区”的各自长9-12个氨基酸的较短区域隔开的、称作构架区(FR)的15-30个氨基酸的相对不变动区段组成。在本文中使用时，术语“高变区”或“HVR”指抗体的负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包含来自例如以下的氨基酸残基，VL中约第24-34位(L1)、第50-56位(L2)和第89-97位(L3)残基左右和VH中约第26-35位(H1)、第49-65位(H2)和第95-102位(H3)残基左右(在一个实施方案中，H1在约第31-35位残基左右)；(Kabat等人，上文)和/或来自“高变环”的那些残基(例如VL中第26-32位(L1)、第50-52位(L2)和第91-96位(L3)残基和VH中第26-32位(H1)、第53-55位(H2)和第96-101位(H3)残基；Chothia等人，J.Mol.Biol.196:901-917,1987)。天然重链和轻链的可变结构域各自包括由三个高变区连接的大体上采取β折叠构型的四个FR，所述高变区形成环，所述环连接该β折叠结构和在一些情况下形成该β折叠结构的部分。每条链中的高变区由FR密切接近地结合在一起，并且在高变区来自其他链的情况下，对形成抗体的抗原-结合部位作出贡献(参见Kabat等人，上文)。因此，HVR序列和FR序列通常按以下序列出现在VH(或VL)中：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。恒定结构域不直接参与抗体与抗原结合，但是展示出多种效应子功能，如使抗体参与抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)。

[0147] 术语“如Kabat中编号的可变结构域残基”或“如Kabat中编号的氨基酸位置”和其变型指用于Kabat等人(见上文)中抗体汇编的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号体系。使用这种编号体系，实际的线性氨基酸序列可以含有比可变结构域的FR或HVR短的或向可变结构域的FR或HVR中插入的氨基酸，这对应于较少的或额外的氨基酸。例如，重链可变结构域可以包括在H2的残基52后的单个氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)和在重链FR残基82之后的插入残基(例如，根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。对于给定的抗体，可以通过在抗体的序列的同源区域处与Kabat编号的“标准”序列比对，确定残基的Kabat编号。

[0148] 当提到可变结构域中的残基(大约第1-107位轻链残基和第1-113位重链残基)时，通常使用Kabat编号体系(例如，Kabat等人，上文)。当提到免疫球蛋白重链恒定区中的残基时，通常使用“EU编号体系”或“EU索引”(例如，Kabat等人上文中报道的EU索引)。“如Kabat中那样的EU索引”指人IgG1 EU抗体的残基编号法。除非本文中另外说明，对抗体的可变结构域中残基的称谓意指借助Kabat编号体系的残基编号。除非本文中另外说明，对抗体的恒定结构域中残基的称谓意指借助EU编号体系的残基编号(例如，参见美国临时申请号60/640,323，EU编号法附图)。

[0149] “病症”或“疾病”是将从抗体(例如，本文所述的任何抗类胰蛋白酶抗体)治疗获益的任何疾病。这包括慢性和急性病症或疾病，包括使哺乳动物易罹患所讨论病症的那些病

理疾病。在一些实施方案中，疾病是肺部疾病、自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、淋巴细胞性疾病、或与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病。在一些实施方案中，疾病是肺部疾病。在一些例子中，疾病可以是类胰蛋白酶相关的疾病或类胰蛋白酶介导的疾病。

[0150] 如本文所用的术语“类胰蛋白酶相关疾病”和“类胰蛋白酶介导的疾病”指由类胰蛋白酶介导或与之相关的任何疾病或病状。在一些实施方案中，类胰蛋白酶介导的疾病与类胰蛋白酶水平或活性过高相关，其中非典型症状可以因类胰蛋白酶水平或活性而在体内局部和/或全身性表现。

[0151] 在一些实施方案中，肺部疾病是哮喘。在一些实施方案中，哮喘是持续性慢性重度哮喘伴随可能威胁生命的症状恶化急性事件(加重或骤发)。在一些实施方案中，哮喘是异位性(也称作过敏性)哮喘、非过敏性哮喘(例如，经常由呼吸道病毒(例如，流感、副流感、鼻病毒、人偏肺病毒和呼吸道合胞体病毒)感染或吸入的刺激物(大气污染物、烟雾、柴油粒子、挥发性化学品和室内或户外气体、或甚至因干冷空气)触发。

[0152] 在一些实施方案中，哮喘是间歇性或锻炼所致哮喘，原因在于急性或慢性初次或二次暴露于“烟”(一般是香烟、雪茄、烟斗)、吸入或“蒸发”(烟草、大麻或其他这类物质)或由最近摄入阿司匹林或相关NSAID触发的哮喘。在一些实施方案中，哮喘是轻度的或未用皮质类固醇治疗的哮喘(corticosteroid **naïve** asthma)、新诊断且未治疗过的哮喘、或先前不需要长期使用吸入型局部用或全身性类固醇控制症状(咳嗽、喘鸣、气短/呼吸困难、或胸痛)。在一些实施方案中，哮喘是慢性、皮质类固醇耐药性哮喘、皮质类固醇难治性哮喘、皮质类固醇或其他慢性哮喘控制药物无法控制的哮喘。

[0153] 在一些实施方案中，哮喘是中度至重度哮喘。在某些实施方案中，哮喘是高Th2哮喘。在一些实施方案中，哮喘是重度哮喘。在一些实施方案中，哮喘是异位性哮喘、过敏性哮喘、非过敏性哮喘(例如，归因感染和/或呼吸道合胞体病毒(RSV))、锻炼所致哮喘、阿司匹林敏感/加重型哮喘、轻度哮喘、中度至重度哮喘、未用过皮质类固醇的哮喘、慢性哮喘、皮质类固醇耐药性哮喘、皮质类固醇难治性哮喘、新诊断且未治疗过的哮喘、因吸烟所致的哮喘、皮质类固醇无法控制的哮喘。在一些实施方案中，哮喘是辅助T细胞淋巴细胞2型(Th2)或2型(Th2)高、或2型(T2)驱动的哮喘。在一些实施方案中，哮喘是嗜酸粒细胞性哮喘。在一些实施方案中，哮喘是过敏性哮喘。在一些实施方案中，已经确定个体为嗜酸粒细胞性炎症阳性(EIP)。参见WO 2015/061441。在一些实施方案中，哮喘是高骨膜蛋白型哮喘(例如，具有至少约任何20ng/mL、25ng/mL或50ng/mL血清的骨膜蛋白水平)。在一些实施方案中，哮喘是高嗜酸性粒细胞型哮喘(例如，至少约任何150、200、250、300、350、400个嗜酸性粒细胞计数/ml血液)。在某些实施方案中，哮喘是低Th2哮喘或非Th2驱动的哮喘。在一些实施方案中，已经确定个体为嗜酸粒细胞性炎症阴性(EIN)。参见WO2015/061441。在一些实施方案中，哮喘是低骨膜蛋白型哮喘(例如，具有小于约20ng/mL血清的骨膜蛋白水平)。在一些实施方案中，哮喘是低嗜酸性粒细胞型哮喘(例如，小于约150个嗜酸性粒细胞计数/μl血液或小于约100个嗜酸性粒细胞计数/μl血液)。

[0154] 如本文所用，术语“高Th2哮喘”指显示高水平的一种或多种Th2细胞相关的细胞因

子(例如,IL13、IL4、IL9、IL5)或显示Th2细胞因子相关炎症的哮喘。在某些实施方案中,术语高Th2哮喘可以与高嗜酸性粒细胞型哮喘可互换使用。在某些实施方案中,高Th2哮喘是Th2驱动的哮喘。在一些实施方案中,已经确定哮喘患者为嗜酸粒细胞性炎症阳性(EIP)。参见,例如,国际专利申请公开号WO 2015/061441,所述文献通过引用方式完整并入本文作为参考。在某些实施方案中,已经确定如与对照或参比水平相比,个体具有升高水平的至少一个嗜酸粒细胞性特征标识基因。参见WO2015/061441。在某些实施方案中,高Th2哮喘是高骨膜蛋白型哮喘。在一些实施方案中,个体具有高血清骨膜蛋白。在某些实施方案中,个体为十八岁或以上。在某些实施方案中,已经确定如与对照或参比水平相比,个体具有升高水平的血清骨膜蛋白。在某些实施方案中,对照或参比水平是群体中骨膜蛋白的中位水平。在某些实施方案中,已经确定个体具有20ng/ml或更高的血清骨膜蛋白。在某些实施方案中,已经确定个体具有25ng/ml或更高的血清骨膜蛋白。在某些实施方案中,已经确定个体具有50ng/ml或更高的血清骨膜蛋白。在某些实施方案中,血清骨膜蛋白的对照或参比水平是20ng/ml、25ng/ml或50ng/ml。在某些实施方案中,哮喘是高嗜酸性粒细胞型哮喘。在某些实施方案中,已经确定如与对照或参比水平相比,个体具有升高的嗜酸性粒细胞计数。在某些实施方案中,对照或参比水平是群体的中位水平。在某些实施方案中,已经确定个体具有150个或更高的嗜酸性粒细胞计数/μl血液。在某些实施方案中,已经确定个体具有200个或更高的嗜酸性粒细胞计数/μl血液。在某些实施方案中,已经确定个体具有250个或更高的嗜酸性粒细胞计数/μl血液。在某些实施方案中,已经确定个体具有300个或更高的嗜酸性粒细胞计数/μl血液。在某些实施方案中,已经确定个体具有350个或更高的嗜酸性粒细胞计数/μl血液。在某些实施方案中,已经确定个体具有400个或更高的嗜酸性粒细胞计数/μl血液。在某些实施方案中,已经确定个体具有450个或更高的嗜酸性粒细胞计数/μl血液。在某些实施方案中,已经确定个体具有500个或更高的嗜酸性粒细胞计数/μl血液。在某些优选的实施方案中,已经确定个体具有300个或更高的嗜酸性粒细胞计数/μl血液。在某些实施方案中,嗜酸性粒细胞是外周血嗜酸性粒细胞。在某些实施方案中,嗜酸性粒细胞是痰嗜酸性粒细胞。在某些实施方案中,个体显示升高的FeNO水平(呼出气一氧化氮(fractional exhaled nitric oxide))和/或升高的IgE水平。例如,在一些情况下,个体显示FeNO水平高于约250份/十亿(ppb)、高于约275ppb、高于约300ppb、高于约325ppb、高于约325ppb或高于约350ppb。在一些情况下,个体具有高于50IU/ml的IgE水平。

[0155] 如本文所用,术语“低Th2哮喘”或“非高Th2哮喘”指显示低水平的一种或多种Th2细胞相关的细胞因子(例如,IL13、IL4、IL9、IL5)或显示非Th2细胞因子相关炎症的哮喘。在某些实施方案中,术语低Th2哮喘可以与低嗜酸性粒细胞型哮喘可互换使用。在一些实施方案中,已经确定哮喘患者为嗜酸粒细胞性炎症阴性(EIN)。参见,例如,WO 2015/061441。在某些实施方案中,低Th2哮喘是Th17驱动的哮喘。在某些实施方案中,低Th2哮喘是低骨膜蛋白型哮喘。在某些实施方案中,个体为十八岁或以上。在某些实施方案中,已经确定如与对照或参比水平相比,个体具有降低水平的血清骨膜蛋白。在某些实施方案中,对照或参比水平是群体中骨膜蛋白的中位水平。在某些实施方案中,已经确定个体具有小于20ng/ml的血清骨膜蛋白。在某些实施方案中,哮喘是低嗜酸性粒细胞型哮喘。在某些实施方案中,已经确定如与对照或参比水平相比,个体具有降低的嗜酸性粒细胞计数。在某些实施方案中,对照或参比水平是群体的中等水平。在某些实施方案中,已经确定个体具有小于150个嗜酸性

粒细胞计数/μl血液。在某些实施方案中，已经确定个体具有小于100个嗜酸性粒细胞计数/μl血液。在某些实施方案中，已经确定个体具有小于300个嗜酸性粒细胞计数/μl血液。

[0156] 在一些实施方案中，自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、或淋巴细胞性疾病是食管炎(例如，嗜酸粒细胞性食管炎)、过敏性鼻炎、非过敏性鼻炎、鼻窦炎伴息肉、鼻息肉、支气管炎、慢性肺炎、过敏性支气管肺曲霉菌病、气道炎症、过敏性鼻炎、支气管扩张症、和/或慢性支气管炎。

[0157] 在一些实施方案中，自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、或淋巴细胞性疾病是关节炎。在一些实施方案中，关节炎是类风湿性关节炎。在一些实施方案中，关节炎是骨关节炎、类风湿性关节炎、幼年型关节炎、幼年型类风湿关节炎、早期关节炎、多关节的类风湿性关节炎、全身性-初起类风湿性关节炎、肠病性关节炎、反应性关节炎、银屑病性关节炎、和/或作为损伤结果的关节炎。

[0158] 在一些实施方案中，自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、或淋巴细胞性疾病是胃肠道炎性疾病。在一些实施方案中，胃肠道炎性疾病是IBD(炎性肠病)、溃疡性结肠炎(UC)、克罗恩病(CD)、结肠炎(例如，由环境性损伤引起的结肠炎(例如，由治疗方案如化疗、放射治疗等引起或与之相关))、传染性结肠炎、缺血性结肠炎、胶原性或淋巴细胞性结肠炎、坏死性小肠结肠炎、在多种病状如慢性肉芽肿性疾病或乳糜泻(celiac disease)中的结肠炎、食物过敏、胃炎、胃肠炎、传染性胃炎或小肠结肠炎(例如，幽门螺杆菌(Helicobacter pyloris)感染的慢性活动性胃炎)、食管炎和由传染因子引起的其他形式的胃肠道炎症或未定型结肠炎。

[0159] 在一些实施方案中，自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、或淋巴细胞性疾病是胃肠道炎性疾病。在一些实施方案中，胃肠道炎性疾病是IBD(炎性肠病)。在一些实施方案中炎性肠病是溃疡性结肠炎(UC)或克罗恩病(CD)。在一些实施方案中，胃肠道炎性疾病是结肠炎(例如，由环境性损伤引起的结肠炎(例如，由治疗方案如化疗、放射治疗等引起或与之相关)、传染性结肠炎、缺血性结肠炎、胶原性或淋巴细胞性结肠炎、坏死性小肠结肠炎、在多种病状如慢性肉芽肿性疾病或乳糜泻(celiac disease)中的结肠炎、食物过敏、胃炎、胃肠炎、传染性胃炎或小肠结肠炎(例如，幽门螺杆菌(Helicobacter pyloris)感染的慢性活动性胃炎)和由传染因子引起的其他形式的胃肠道炎症或未定型结肠炎。在一些实施方案中，胃肠道炎性疾病是溃疡性结肠炎(UC)或克罗恩病(CD)。在一些实施方案中，胃肠道炎性疾病是溃疡性结肠炎(UC)。在一些实施方案中，溃疡性结肠炎是轻度至中度远端结肠炎。在一些实施方案中，溃疡性结肠炎是轻度至中度泛发性结肠炎。在一些实施方案中，溃疡性结肠炎是重度结肠炎。在一些实施方案中，胃肠道炎性疾病是克罗恩病(CD)。在一些实施方案中，克罗恩病处于急性疾病阶段。在一些实施方案中，克罗恩病处于诱导的临床缓解阶段。在一些实施方案中，克罗恩病处于维持响应/缓解阶段。在一些实施方案中，克罗恩病是轻度至中度疾病。在一些实施方案中，克罗恩病是中度至重度疾病。在一些实施方案中，克罗恩病是重度/爆发性疾病。在一些实施方案中，克罗恩病是回肠、回结肠或结肠的疾病。

[0160] 在一些实施方案中，自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、或淋巴细胞性疾病、或与正常或异常组织常驻

性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病是狼疮或系统性红斑狼疮(SLE)或狼疮的一个或多个器官特异性表现(例如,侵袭肾脏的狼疮性肾炎(LN)、或侵袭血液和/或淋巴器官的肾外狼疮(ERL)(淋巴结、脾、胸腺和相关淋巴管,和/或关节和/或其他器官,但并不必然侵袭肾脏))。

[0161] 在一些实施方案中,自身免疫疾病、炎性疾病或纤维化疾病与败血症和/或外伤、HIV感染相关或是特发性的(未病因学知)如ANCA相关的脉管炎(AAV)、肉芽肿病伴多血管炎(以前称作韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis))、Behcet病、心血管疾病、嗜酸粒细胞性支气管炎、Reiter综合征、SEA综合征(血清阴性、接骨点病变、关节病综合征)、强直性脊柱炎、皮肌炎、硬皮病,例如,全身性硬皮病也称作全身性硬化症、血管炎(例如,巨细胞动脉炎(GCA),也称作颞动脉炎、颅动脉炎或Horton病)、肌炎、多发性肌炎、皮肌炎、结节性多发性动脉炎、动脉炎、风湿性多肌痛、类肉状瘤病、原发性胆汁性硬化、硬化性胆管炎、Sjogren综合征、银屑病斑块银屑癣、点滴状银屑癣、皮褶性银屑病、脓疱性银屑病、红皮病型银屑病、皮炎、特应性皮炎、天疱疮,例如,寻常型天疱疮、动脉粥样硬化、狼疮、Still病、重症肌无力、乳糜泻、多发性硬化(MS)复发-缓解(RRMS)或原发进展性(PPMS)或继发进展性(SPMS)亚型、Guillain-Barre病、I型糖尿病(T1DM)或胰岛素依赖型(IDDM)或幼年发作型DM类型、甲状腺炎(例如,Graves病)、脂泻病(Coeliac disease)、Churg-Strauss综合征、肌痛综合征、高嗜酸性粒细胞综合征、水肿性反应(包括阵发性血管性水肿)、蠕虫感染、盘尾丝虫性皮炎、嗜酸粒细胞性食管炎、嗜酸粒细胞性肠炎、嗜酸粒细胞性结肠炎、阻塞性睡眠呼吸暂停、心内膜心肌纤维化、Addison病、Raynaud病或现象、自身免疫性肝炎、移植物抗宿主病(GVHD)或器官移植排异。

[0162] 在一些实施方案中,疾病是皮肤的炎性疾病。在一些实施方案中,疾病是特应性皮炎或盘尾丝虫性皮炎。在一些实施方案中,疾病是慢性特发性荨麻疹(CIU或CSU)。

[0163] 在一些实施方案中,自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、嗜中性粒细胞性疾病或嗜酸粒细胞性疾病是纤维化疾病。在一些实施方案中,纤维化疾病包括肺纤维化、肝纤维化(例如,肝硬化相关的纤维化(例如,酒精所致肝硬化、病毒所致肝硬化、丙型肝炎后肝硬化和原发性胆汁性肝硬变)、血吸虫病、胆管炎(例如,硬化性胆管炎)和自身免疫所致肝炎)、肾纤维化(例如,小管间质性纤维化、硬皮病、糖尿病型肾炎和肾小球肾炎)、真皮纤维化(例如,硬皮病、肥大性和瘢痕疙瘩、肾源性纤维化硬皮病和烧伤)、骨髓纤维化、神经纤维瘤病、纤维瘤、肠纤维化和外科手术产生的纤维化粘连)、心脏纤维化(例如,与心肌梗死相关的纤维化)、脉管纤维化(例如,与血管成形术后动脉再狭窄和动脉粥样硬化相关的纤维化)、眼纤维化(例如,与白内障手术后相关的纤维化、增生性玻璃体视网膜病变和眶后纤维化)和骨髓纤维化(例如,特发性骨髓纤维化和药物所致骨髓纤维化)。纤维化可以是器官特有的或是全身性的(例如,全身性硬化症和与GVHD相关的纤维化)。在一些实施方案中,纤维化疾病是肺纤维化。在一些实施方案中,肺纤维化是纤维化间质性肺炎。在一些实施方案中,肺纤维化是特发性肺纤维化(IPF),也称作隐原性纤维化肺泡炎。在一些实施方案中,IPF为性别、年龄和生理学(GAP)I期。在一些实施方案中,IPF是GAP II期。在一些实施方案中,IPF是GAP III期。在一些实施方案中,肺纤维化是散发性IPF。在一些实施方案中,肺纤维化是家族性肺纤维化。在一些实施方案中,肺纤维化是合并肺纤维化和肺气肿。在一些实

施方案中，肺纤维化与以下一者或多者相关：普通型间质性肺炎；特发性间质性肺炎；剥脱性间质性肺炎；呼吸的细支气管炎-间质性肺病；急性间质性肺炎；非特异性间质性肺炎；类肉状瘤病；潜隐性机化肺炎；嗜酸粒细胞性肺炎；感染；暴露于职业物质或环境物质；吸烟；药物或照射引起的间质性肺病；风湿病相关的间质性肺病；淋巴样间质性肺炎；胸膜肺纤维弹性组织增生；肺朗格汉斯细胞组织细胞增多症；全身性硬化症-间质性肺病；Hermansky-Pudlak综合征；和端粒病(telomeropathy)。

[0164] 在一些实施方案中，肺部疾病、自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、嗜中性粒细胞性疾病或嗜酸粒细胞性疾病是慢性阻塞性肺病(COPD)。在一些实施方案中，COPD是慢性阻塞性肺病全球倡议(GOLD)类别A。在一些实施方案中，COPD是GOLD类别B。在一些实施方案中，COPD是GOLD类别C。在一些实施方案中，COPD是GOLD类别D。在一些实施方案中，COPD是慢性支气管炎。在一些实施方案中，COPD是肺气肿。在一些实施方案中，肺气肿是近端腺泡状、全小叶性或远端腺泡状肺气肿。在一些实施方案中，肺气肿是香烟所致肺气肿。在一些实施方案中，COPD与暴露于颗粒状粉尘、化学烟气和/或空气污染相关。在一些实施方案中，COPD与肺发育受损相关。在一些实施方案中，COPD是慢性阻塞性哮喘。在一些实施方案中，COPD与α-1抗胰蛋白酶缺乏相关。在一些实施方案中，COPD与丝氨酸蛋白酶抑制剂进化枝E成员2(SERPINE2)破坏相关。在一些实施方案中，COPD是伴有迁延性全身性炎症的COPD。在一些实施方案中，COPD是嗜酸粒细胞性或高辅助T细胞2型(T_H2)的COPD。在一些实施方案中，COPD是伴随迁延性细菌定植的COPD。在一些实施方案中，COPD是频繁加重的COPD。在一些实施方案中，自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、嗜中性粒细胞性疾病或嗜酸粒细胞性疾病是哮喘-COPD重叠综合征(ACOS)。在一些实施方案中，ACOS是嗜酸性粒细胞占优势、嗜中性粒细胞占优势、混合模式或无炎症(粒细胞缺乏性)ACOS。在一些实施方案中，自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、嗜中性粒细胞性疾病或嗜酸粒细胞性疾病是COPD-阻塞性睡眠呼吸暂停(OSA)重叠综合征。

[0165] 上文清单并非包括一切，并且技术人员将理解疾病或病症可以落于多种分类范围内。

[0166] 术语“包装插页”用来指治疗性产品的商业包装中习惯性纳入的说明书，所述说明书含有关于涉及使用此类治疗性产品的适应症、用法、剂量、施用、联合疗法、禁忌症和/或警告的信息。

[0167] 术语“药物制剂”和“药物组合物”在本文中互换地使用，并且指这样的制备物，所述制备物处于这类形式，从而允许其中所含的有效成分的生物活性有效，并且不含有对将会施用该制剂的受试者不可接受地有毒的额外组分。这类制剂是无菌的。在一个优选的实施方案中，将药物组合物或药物制剂施用至人类受试者。

[0168] “无菌”药物制剂是无菌的或不含或基本上不含全部活微生物及其孢子。

[0169] “稳定的”药物制剂是这样的药物制剂，其中蛋白质(例如，抗体，如抗类胰蛋白酶抗体)在储存时基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性。优选地，当储存时，制剂基本上保留其物理和化学稳定性，以及其生物学活性。通常基于制剂的预期保质期选择储存时间。用于测量蛋白质稳定性的各种分析技术是本领域可获得的并且例如在Peptide and Protein Drug Delivery,247-301,Vincent Lee编著,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,Pubs.(1991)和Jones,A.Adv.Drug Delivery Rev.10:29-90(1993)中综

述。可以在选定光暴露量和/或温度持续选定时间段测量稳定性。可以按照多种不同方式定性和/或定量评价稳定性，所述方式包括评估聚集物形成(例如，使用大小排阻色谱、通过测量浊度、和/或通过视检)；评估ROS形成(例如，通过使用光胁迫测定法或AAPH胁迫测定法)；蛋白质的特定氨基酸残基(例如，单克隆抗体的Trp残基和/或Met残基)的氧化；通过使用阳离子交换色谱、图像毛细管等电聚焦(icIEF)或毛细管区带电泳评估电荷异质性；氨基端或羧基端序列分析；质谱分析；比较还原型和完整抗体的SDS-PAGE分析；肽图(例如，胰蛋白酶解或LYS-C)分析；评价蛋白质的生物学活性或靶结合功能(例如，抗体的抗原结合功能)等。不稳定性可以涉及以下任一种或多种情况：聚集、脱酰胺化(例如Asn脱酰胺化)、氧化(例如Met氧化和/或Trp氧化)、异构化(例如Asp异构化)、修剪/水解/片段化(例如，铰链区片段化)、琥珀酰亚胺形成、非配对的半胱氨酸、N端延长、C端加工、糖基化差异等。

[0170] 如果视验颜色和/或澄清度时或如通过UV光散射或通过大小排阻色谱所测量，一种蛋白质不显示或显示很少聚集、析出、片段化和/或变性迹象，则抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体)在药物制剂中“保持其物理稳定性”。

[0171] 如果化学稳定性在给定时间认为抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体)仍保留其如下文定义的生物学活性，则该抗体在药物制剂中“保持其化学稳定性”。可以通过检测抗体的化学改变形式并对其定量，评估化学稳定性。化学改变可以涉及例如可使用胰蛋白酶解肽图、反相高效液相色谱(HPLC)和液相色谱-质谱(LC/MS)评价的蛋白质氧化。其他类型的化学改变包括抗体的电荷改变，后者可以例如通过离子交换色谱或icIEF评价。

[0172] 如果某抗体(例如抗类胰蛋白酶抗体)的生物活性在给定时间处于制备某药物制剂时所显示的生物学活性的约20％范围内(如约10％范围内)(处于测定法的误差范围内)，如例如在单克隆抗体(例如，抗类胰蛋白酶单克隆抗体)的抗原结合测定法或体外抑制性测定法中测定，则该抗体在该药物制剂中“保持其生物学活性”。在一些实施方案中，抗体在给定时间的生物学活性处于制备药物制剂时所显示的生物学活性的约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％范围内。

[0173] 如本文所用，抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体)的“生物学活性”指抗体结合其靶的能力，例如单克隆抗体与抗原结合的能力。它还可以包括可以在体外或体内测量的生物学反应。这种活性可以是拮抗性或激动性的。

[0174] “易受氧化”的蛋白质(例如，抗体、如抗类胰蛋白酶抗体)是这样的蛋白质，其包含已经发现易受氧化的一个或多个残基，如，但不限于、甲硫氨酸(Met)、半胱氨酸(Cys)、组氨酸(His)、色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)。例如，单克隆抗体的Fab部分中的色氨酸氨基酸或单克隆抗体的Fc部分中的甲硫氨酸氨基酸可以易受氧化。

[0175] 术语“氧化百分数”指制剂(例如，药物组合物)中特定氨基酸残基(例如Trp残基(例如，hu31A.v11的HVR-H3的Trp100)或Met残基)处氧化的抗体的百分数。可以例如通过质谱法(MS)分析其中存在一个或多个特定易氧化氨基酸残基的一个或多个胰蛋白酶解肽，测定氧化百分数。在某些实施方案中，相对于总体(氧化型和非氧化型)胰蛋白酶解肽的质量，依据存在Trp100的氧化型胰蛋白酶解肽的质量确定hu31A.v11的HVR-H3中Trp100的氧化百分数，如通过MS分析所测定。可以从初始产生抗体或其药物组合物起例如9个月、12个月、18个月或两年内测定氧化百分数。

[0176] 如本文所用，术语“在AAPH胁迫试验后测定”意指，在40℃ 25小时于5mM AAPH中以

150mg/ml配制抗体后，通过质谱分析胰蛋白酶解肽，测定特定氨基酸残基处(例如，hu31A.v11的HVR-H3的Trp100处)的氧化百分数，例如，如实施例5中所述。用胰蛋白酶消化受胁迫的抗体并且消化的肽经历超高效液相色谱法-高分辨质谱(UHPLC-HRMS)以测定氧化百分数。

[0177] 如本文所用，术语“缓冲液”指通过其酸-碱共轭组分的作用，抵抗pH变化的缓冲溶液。本发明的缓冲液优选地具有约4.5至约8.0范围内(例如，约4.5、约5、约5.5、约6、约6.5、约7、约7.5或约8)的pH，例如，约pH 5.5。例如，乙酸组氨酸是将控制pH处于这个范围的缓冲剂的例子。另一个合适的缓冲剂是琥珀酸精氨酸和/或琥珀酸组氨酸。

[0178] “防腐剂”是可以在制剂中任选地包含以实质上减少其中的细菌性作用、由此例如促进产生多用途制剂的化合物。可能的防腐剂的例子包括十八烷基二甲基氯化铵、氯己双铵、苯扎氯铵(其中烷基是长链化合物的烷基苄基二甲基氯化铵的混合物)和苄索氯铵。其他类型的防腐剂包括芳族醇如苯酚、丁基、和苯甲醇；烷基尼泊金酯如甲基或尼泊金丙酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇和间甲酚。在一个实施方案中，本文中的防腐剂是苄醇。

[0179] 如本文所用，“表面活性剂”指表面活性物质、优选地非离子表面活性剂。本文中表面活性剂的例子包括聚山梨醇酯(例如，聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯-80)；泊洛沙姆(例如，泊洛沙姆188)；**TRITON®;** 十二烷基硫酸钠(SDS)；月桂基硫酸钠；辛基糖苷钠；月桂基-磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油基-磺基甜菜碱或十八烷基-磺基甜菜碱；月桂基-肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油基-肌氨酸或十八烷基-肌氨酸；亚油基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱或鲸蜡基-甜菜碱；月桂酰胺丙基-甜菜碱、椰油酰胺丙基-甜菜碱、亚油酰胺丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺丙基-甜菜碱、棕榈酰胺丙基-甜菜碱或异硬脂酰胺丙基-甜菜碱(例如，月桂酰胺丙基)；肉豆蔻酰胺丙基-二甲胺、棕榈酰胺丙基-二甲胺或异硬脂酰胺丙基-二甲胺；甲基椰油基-牛磺酸钠或甲基油基-牛磺酸二钠；和MONAQUAT™系列(Mona Industries, Inc.,Paterson,N.J.)；聚乙二醇、聚丙二醇以及乙烯和丙二醇的共聚物(例如，**PLURONIC®**型嵌段共聚物，例如，**PLURONIC®** F-68)等。在一个实施方案中，本文中的表面活性剂是聚山梨醇酯20。在又一个实施方案中，本文中的表面活性剂是泊洛沙姆188。

[0180] “可药用载体”指药物制剂中除有效成分之外的对受试者无毒的成分。可药用载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0181] 如本申请中所用的术语“前药”指药学活性物质的前体或衍生物形式，其中与母药相比，所述前体或衍生物对肿瘤细胞具有较低的细胞毒性并且能够酶促地被活化或转变成更有活性的母药形式。参见，例如，Wilman,“Prodrugs in Cancer Chemotherapy” Biochemical Society Transactions,14,第375-382页,615th Meeting Belfast(1986)和Stella等人“Prodrugs:A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery”Directed Drug Delivery,Borchardt等人(编著),第247-267页,Human Press(1985)。本发明的前药包括但不限于含有磷酸酯的前药、含有硫代磷酸酯的前药、含有硫酸酯的前药、含有肽的前药、D-氨基酸修饰的前药、糖基化前药、含有β-内酰胺的前药、含有任选取代的苯氧乙酰胺的前药或任选取代的苯乙酰胺的前药、5-氟胞嘧啶和其他5-氟尿苷前药，这些前药可以转变成细胞毒性更强的游离药物。可以衍生成前药形式用于本发明中的细胞毒性剂的实例包括但不限于上文描述的那些化疗药。

[0182] “受试者”是脊椎动物，优选地是哺乳动物，更优选地是人。哺乳动物包括但不限于农场动物(如奶牛和绵羊)、竞赛动物、宠物(如猫、犬和马)、灵长类(例如，人类和非人灵长类如猴(例如，食蟹猴))和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)。

[0183] 如本文所用，“施用”意指一种向受试者给予某个剂量的化合物(例如，本发明的抗类胰蛋白酶抗体或额外的治疗剂)或组合物(例如，药物组合物，例如，包含本发明的抗类胰蛋白酶抗体、任选地还包含额外的治疗剂的药物组合物，所述药物组合物可以包含赋形剂如抗氧化剂(例如，N-乙酰色氨酸和/或甲硫氨酸))的方法。在本文所述的方法中利用的组合物可以例如玻璃体内、肌内、静脉内、皮内、经皮的(percutaneous)、动脉内、腹膜内、病灶内、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、气管内、鞘内、鼻内、阴道内、直肠内、局部地、瘤内、腹膜、皮下、结膜下、囊内、粘膜、心包内、脐内、眼内、眶内、经口、局部、经皮、眼周、结膜、筋膜下、前房内、视网膜下、眼球后、小管内、通过吸入、通过注射、通过植入、通过输注、通过连续输注、通过直接浸浴靶细胞的局限化灌流、通过导管、通过灌洗、在膏中或在脂质组合物中施用。在本文所述的方法中利用的组合物也可以全身或局部施用。给药方法可以根据多种因素(例如，正在施用的化合物或组合物和正在接受治疗的病状、疾病或病症的严重程度)变动。

[0184] 药剂(例如，抗类胰蛋白酶抗体或药物制剂(例如，包含抗类胰蛋白酶抗体的药物制剂，所述药物制剂可以包含赋形剂如抗氧化剂(例如，N-乙酰色氨酸和/或甲硫氨酸)))的“有效量”或“治疗有效量”指按照实现所需治疗结果或预防性结果必需的剂量和时间段，有效实现前述结果的量。治疗有效量的抗体或抗体片段(例如，抗类胰蛋白酶抗体)或其组合物可以减轻或治疗病症或疾病、或防止、减少、减轻或治疗与病症或疾病相关的症状。

[0185] 如本文所用，名词“治疗”(和其语法变型如动词“治疗”或分词“治疗”)指意欲改变正在接受治疗的个体的天然过程的临床干预，并且可以旨在预防或在临床病理学过程期间实施。想要的治疗效果包括但不限于防止疾病出现或复发、减轻症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低病情进展速率、改善或缓和疾病状态，以及缓解或预后改善。在一些实施方案中，本发明的抗体用来延缓疾病发展或用来减慢疾病的进展。例如，如果在接受哮喘疗法后，患者显示出以下一者或多者的可观察和/或可度量减少或不存在：复发性哮鸣、咳嗽、呼吸困难、胸闷、夜间出现或加重的症状、冷空气、锻炼或暴露于变应原所触发的症状，则可能成功地“治疗”了患者的哮喘。

[0186] 除非另外说明，否则如本文所用，术语“白介素-5(IL-5)”指来自任何脊椎动物来源的任何天然IL-5，所述脊椎动物来源包括哺乳动物如灵长类(例如，人类)和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)。该术语涵盖“全长”未加工的IL-5、成熟IL-5以及因翻译后修饰产生的任何形式的IL-5。该术语还涵盖IL-5的天然存在变体，如剪接变体或等位变体。可以例如依据UniProtKB登录号P05113找到示例性IL-5的氨基酸序列。

[0187] “IL-5轴结合拮抗剂”指这样的分子，所述分子减少、阻断、抑制、消除或干扰因IL-5与其一种或多种结合配偶体(如IL-5受体α(IL5RA))相互作用产生的信号转导。可以在本发明方法中使用的示例性IL-5轴结合拮抗剂例如包括IL-5结合拮抗剂(例如，抗IL-5抗体(例如，美泊利单抗(mepolizumab)、benralizumab和瑞利珠单抗(reslizumab))和IL-5受体结合拮抗剂(例如，抗IL-5R抗体))。

[0188] 除非另外说明，否则如本文所用，术语“白介素-13(IL-13)”指来自任何脊椎动物

来源的任何天然IL-13,所述脊椎动物来源包括哺乳动物如灵长类(例如,人类)和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。IL-13是许多细胞类型(包括辅助T细胞2型(Th2)细胞)分泌的细胞因子。该术语涵盖“全长”未加工的IL-13、成熟IL-13以及因翻译后修饰产生的任何形式的IL-13。可以例如依据UniProtKB登录号P35225找到示例性人IL-13的氨基酸序列。

[0189] “IL-13轴结合拮抗剂”指这样的分子,所述分子减少、阻断、抑制、消除或干扰因IL-13与其一种或多种结合配偶体(如IL-4受体α(IL4Rα)、IL-13受体α1(IL13RA1)和IL-13受体α2(IL13RA2))相互作用产生的信号转导。IL-13轴结合拮抗剂包括IL-13结合拮抗剂(例如,抗IL-13抗体,例如,来金珠单抗(lebrikizumab)、228B/C-1、228A-4、227-26和227-43(参见,例如,美国专利号7,674,459;8,067,199;8,088,618;8,318,160;和8,734,797)和IL-13受体结合拮抗剂(例如,抗IL4Rα抗体、抗IL13RA1抗体或抗IL13RA2抗体)。

[0190] 除非另外说明,否则如本文所用,术语“白介素-17(IL-17)”指来自任何脊椎动物来源的任何天然IL-17,所述脊椎动物来源包括哺乳动物如灵长类(例如,人类)和啮齿类(例如,小鼠和大鼠),并且包括家族成员IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F。该术语涵盖“全长”未加工的IL-17、成熟IL-17以及因翻译后修饰产生的任何形式的IL-17。可以例如依据UniProtKB登录号Q16552找到示例性人IL-17A的氨基酸序列。可以例如依据UniProtKB登录号Q9UHF5找到示例性人IL-17B的氨基酸序列。可以例如依据UniProtKB登录号Q9P0M4找到示例性人IL-17C的氨基酸序列。可以例如依据UniProtKB登录号Q8TAD2找到示例性人IL-17D的氨基酸序列。可以例如依据UniProtKB登录号Q9H293找到示例性人IL-17E的氨基酸序列。可以例如依据UniProtKB登录号Q96PD4找到示例性人IL-17F的氨基酸序列。

[0191] “IL-17轴结合拮抗剂”指这样的分子,所述分子减少、阻断、抑制、消除或干扰因IL-17与其一种或多种结合配偶体(如白介素-17受体(IL-17R)家族成员蛋白质:白介素17受体A(IL17RA)、白介素17受体B(IL17RB)、白介素17受体C(IL17RC)、白介素17受体D(IL17RD)、白介素17受体E(IL17RE)和白介素17受体E样(IL17REL))相互作用产生的信号转导。示例性IL-17轴结合拮抗剂例如包括IL-17结合拮抗剂(例如,抗IL-17抗体(例如,苏金单抗(secukinumab)(AIN417)、ixekizumab(LY2439821)、bimekizumab和NI-1401)和IL-17受体结合拮抗剂(例如,抗IL-17R抗体(例如,brodalumab(AMG-827)))。参见,例如,WO 2006/013107、WO 2007/070750、WO 2012/156219和美国专利号8,715,669。

[0192] 除非另外说明,否则如本文所用,术语“白介素-33(IL-33)”指来自任何脊椎动物来源的任何天然IL-33,所述脊椎动物来源包括哺乳动物如灵长类(例如,人类和食蟹猴)和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。IL-33在本领域中也称作高内皮微静脉的核因子(NF-HEV;参见,例如,Baekkevold等人,Am.J.Pathol.163(1):69-79,2003)、DVS27、C9orf26和白介素-1家族成员11(IL-1F11)。该术语涵盖“全长”未加工的IL-33、成熟IL-33以及因翻译后修饰产生的任何形式的IL-33。人全长、未加工的IL-33含有270个氨基酸(a.a.)并且也可以称作$IL\text{-}33_{1\text{-}270}$。加工形式的人IL-33例如包括$IL\text{-}33_{95\text{-}270}$、$IL\text{-}33_{99\text{-}270}$、$IL\text{-}33_{109\text{-}270}$、$IL\text{-}33_{112\text{-}270}$、$IL\text{-}33_{1\text{-}178}$和$IL\text{-}33_{179\text{-}270}$(**Lefrançais**等人,Proc.Natl.Acad.Sci.109(5):1673-1678,2012和Martin,Semin.Immunol.25:449-457,2013)。在一些实施方案中,与全长IL-33相比,加工形式的人IL-33,例如,$IL\text{-}33_{95\text{-}270}$、$IL\text{-}33_{99\text{-}270}$、$IL\text{-}33_{109\text{-}270}$或由蛋白酶如钙激活蛋白酶、蛋白酶3、中性粒细胞弹性蛋白酶和组织蛋白酶G加工的其他形式,可以具有增加的生物学活

性。本术语还涵盖IL-33的天然存在变体，例如，剪接变体(例如，缺少外显子3的组成型活性剪接变体spIL-33，Hong等人，J.Biol.Chem.286(22):20078-20086,2011)或等位变体。IL-33可以存在于细胞内部(例如，胞核内部)或作为分泌型细胞因子形式存在。全长IL-33蛋白含有螺旋-转角-螺旋DNA结合基序，包括核定位序列(人IL-33的氨基酸1-75)，所述基序包括染色质结合基序(人IL-33的氨基酸40-58)。加工和分泌的IL-33形式缺少这些N末端基序。可以例如依据UniProtKB登录号O95760找到示例性人IL-33的氨基酸序列。

[0193] 除非另外说明，否则本文中互换使用的术语“白介素1受体样1(IL1RL1)”和“ST2”指来自任何脊椎动物来源的任何天然ST2，所述脊椎动物来源包括哺乳动物如灵长类(例如，人类)和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)。ST2在本领域中也称作DER4、T1和FIT-1。本术语涵盖“全长”、未加工的ST2、成熟ST2、以及因翻译后修饰产生的任何形式的ST2。本领域已知ST2的至少四个同工型，包括可溶性(sST2，也称作IL1RL1-a)和跨膜型(ST2L，也称作IL1RL1-b)(其因来自双启动子系统的差异性mRNA表达产生)和(其因可变剪接产生)ST2V和ST2LV，如下文描述。ST2L的结构域结构包括三个胞外免疫球蛋白样C2结构域、一个跨膜结构域；和一个胞质Toll/白介素-1受体(TIR)结构域。sST2缺少含于ST2L内部的跨膜结构域和胞质结构域并且包括一个独特的9氨基酸(a.a.)C末端序列(参见，例如，Kakkar等人，Nat.Rev.Drug Disc.7:827-840,2008)。sST2可以作为抑制可溶性IL-33的诱饵受体发挥作用。该术语还涵盖ST2的天然存在变体，例如，剪接变体(例如，ST2V，其缺少第三免疫球蛋白基序并具有独特的疏水尾部，和ST2LV，其缺少ST2L的跨膜结构域)或等位变体(例如，如本文所述的保护地对抗哮喘风险或引起哮喘风险的变体)。可以例如依据UniProtKB登录号Q01638找到示例性人ST2的氨基酸序列。ST2是与共受体蛋白IL-1RAcP一起的部分。IL-33与ST2和共受体白介素-1受体辅助蛋白(IL-1RAcP)的结合形成促进下游信号转导的1:1:1三元信号传导复合体(参见，例如，Lingel等人，Structure 17(10):1398-1410,2009和Liu等人，Proc.Natl.Acad.Sci.110(37):14918-14924,2013)。

[0194] “IL-33轴”意指涉及IL-33信号转导的核酸(例如，基因或从该基因转录mRNA)或多肽。例如，lL-33轴可以包括配体IL-33、受体(例如，ST2和/或IL-1RAcP)、衔接分子(例如，MyD88)、与受体分子和/或衔接分子(例如，激酶，如白介素-1受体相关激酶1(IRAK1)和白介素-1受体相关激酶4(IRAK4)或E3泛素连接酶，如TNF受体相关因子6(TRAF6))缔合的蛋白质。

[0195] “IL-33轴结合拮抗剂”指抑制IL-33轴结合配偶体与其一种或多种结合配偶体相互作用的分子。如本文所用，IL-33轴结合拮抗剂包括IL-33结合拮抗剂、ST2结合拮抗剂和IL1RAcP结合拮抗剂。示例性IL-33轴结合拮抗剂包括抗IL-33抗体及其抗原结合片段(例如，抗IL-33抗体如ANB-020(AnaptysBio Inc.)或在EP1725261、US8187596、WO2011031600、WO2014164959、WO2015099175或WO2015106080中描述的任何抗体，所述文献各自通过引用方式完整并入本文作为参考)；结合IL-33和/或其受体(ST2和/或IL-1RAcP)和阻断配体-受体相互作用(例如，ST2-Fc蛋白，如WO 2014/152195中描述的那些，所述文献通过引用的方式完整并入本文；免疫黏附素、肽体(peptibody)和可溶性ST2、或其衍生物)的多肽；抗IL-33受体抗体(例如，抗ST2抗体，例如，AMG-282(Amgen)或STLM15(Janssen)或在WO 2013/173761和WO 2013/165894中描述的任何抗ST2抗体，所述文献各自通过引用方式完整并入本文；或ST2-Fc蛋白，如在WO 2013/173761；WO 2013/165894；或WO 2014/152195中描述的

那些,所述文献各自通过引用方式完整并入本文作为参考);和IL-33受体拮抗剂,如小分子抑制剂、结合IL-33的适配体和在严格条件下与IL-33轴核酸序列杂交的核酸(例如,短干扰性RNA(siRNA)或成簇规律间隔的短回文重复序列RNA(CRISPR-RNA或crRNA),包括具有如Mali等人(Science.339:823-26,2013)中所述的crRNA和tracrRNA序列的单一向导RNA(sgRNA),所述文献通过引用方式完整并入本文作为参考)。

[0196] 术语"抗IL-33抗体"、"与IL-33结合的抗体"和"特异性结合IL-33的抗体"指这样的抗体,所述抗体能够以足够亲和力结合IL-33,从而该抗体可用作靶向IL-33的诊断药和/或治疗药。在一个实施方案中,抗IL-33抗体与不相关的非IL-33蛋白结合的程度小于该抗体与IL-33结合的程度约10%,如通过放射免疫测定(RIA)所测量。在某些实施方案中,与IL-33结合的抗体具有≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM,或≤0.001nM(例如,10^{-8}M或更小,例如,10^{-8}M至10^{-13}M,例如,10^{-9}M至10^{-13}M)的解离常数(K_D)。在某些实施方案中,抗IL-33抗体与来自不同物种的IL-33之间保守的IL-33表位结合。

[0197] 术语"ST2结合拮抗剂"指抑制ST2与IL-33、IL1RAcP和/或第二ST2分子相互作用的分子。ST2结合拮抗剂可以是这样的蛋白质,如"ST2-Fc蛋白",所述蛋白质包含IL-33结合结构域(例如,ST2或IL1RAcP蛋白的全部或部分)和多聚化结构域(例如,免疫球蛋白的Fc部分,例如,选自同种型lgG1、lgG2、lgG3和lgG4以及每个同种型组内部的任何同种异型的IgG的Fc结构域),所述结构域彼此直接连接或通过接头(例如,丝氨酸-甘氨酸(SG)接头、甘氨酸-甘氨酸(GG)接头或其变体(例如,SGG、GGS、SGS或GSG接头))间接地连接,并且包括但不限于在WO 2013/173761、WO 2013/165894和WO 2014/152195中描述的ST2-Fc蛋白及其变体,所述文献各自通过引用方式完整并入本文作为参考。在一些实施方案中,ST2结合拮抗剂可以是抗ST2抗体,例如,AMG-282(Amgen)或STLM15(Janssen)或任何在WO 2013/173761和WO 2013/165894中描述的抗ST2抗体。

[0198] "分离的核酸"指已经与其自然环境的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括包含在通常包含该核酸分子的细胞中的核酸分子,但是该核酸分子存在于染色体外或在不同于其天然染色体位置的染色体位置处。

[0199] 术语"控制序列"指在特定宿主生物中表达有效连接的编码序列必需的DNA序列。适于原核生物的控制序列例如包括启动子、任选地操纵基因序列和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多聚腺苷化信号和增强子。

[0200] 术语"宿主细胞"、"宿主细胞系"和"宿主细胞培养物"互换使用并且指已经向其中引入外源核酸的细胞,包括这类细胞的子代。宿主细胞包括"转化体"和"转化的细胞",这包括原代转化的细胞和从中衍生的子代,而无论传代次数是多少。子代可以在核酸内容物方面不完全与亲本细胞相同,反而可以含有突变。本文中包括突变子代,所述突变子代具有与最初转化的细胞中所筛选或选择的子代相同的功能或生物学活性。

[0201] 当一种核酸与另一个核酸序列处于功能性关系时,该核酸是"有效连接的"。例如,前序列或分泌性前导序列的DNA与编码多肽的DNA有效连接,若前者表达为参与所述多肽分泌的前蛋白;启动子或增强子与编码序列有效连接,若它影响该序列的转录;或核糖体结合位点与编码序列有效连接,若该结合位点如此安置从而促进翻译。通常,"有效连接的"意指连接的DNA序列是连续的,并且,在分泌性前导序列情况下,是连续的并处于读取相。然而,增强子不必是连续的。通过在便利的限制性位点处连接而完成连接。如此类位点不存在,则

根据常规实践使用合成性寡核苷酸衔接头或接头。

[0202] 将相对于本文中鉴定的多肽序列而言的“氨基酸序列同一性百分数(%)”定义为比对序列并根据需要引入空位以实现最大序列同一性百分数并且不考虑任何保守性置换作为序列同一性的部分之后,候选序列中与正在比较的多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分数。为了确定氨基酸序列同一性百分数的比对可以按本领域能力范围内的多种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适宜参数,包括为实现正在比较的全长序列范围内最大比对所需要的任何算法。然而,出于本文目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生氨基酸序列同一性%值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech,Inc.授权,并且源代码已经随用户文档提交至华盛顿特区20559的美国版权局,在那里它以美国版权登记号TXU510087登记。ALIGN-2程序可通过Genentech,Inc.,South San Francisco,加利福尼亚州公开获得。应当汇编ALIGN-2程序以用于在UNIX操作系统(优选地,数字式UNIX V4.0D)上。全部序列比较参数由ALIGN-2程序设定并且不变动。

[0203] 在使用ALIGN-2比较氨基酸序列的情况下,如下计算给定氨基酸序列A相对、与或针对给定氨基酸序列B(这可以备选地描述为相对、与或针对给定氨基酸序列B具有或包含某个氨基酸序列同一性%的给定氨基酸序列A)的氨基酸序列同一性%:

[0204] 100乘以分数X/Y

[0205] 其中X是由序列比对程序ALIGN-2在该程序的A和B比对结果中评定为相同匹配的氨基酸残基的数目,并且其中Y是B中氨基酸残基的总数。将可以理解在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A相对于B的氨基酸序列同一性%将不等于B相对于A的氨基酸序列同一性%。除非另外特别声明,否则本文所用的全部氨基酸序列同一性值%如紧接前段中所述那样使用ALIGN-2计算机程序获得。

[0206] 除非另外说明,否则本文所述的氨基酸序列是连续氨基酸序列。

[0207] 如本文所用,术语“载体”意指能够运输已经与之连接的另一个核酸的核酸分子。一个类型的载体是“质粒”,其指可以向其中连接额外DNA区段的环状双链DNA环。另一类型的载体是噬菌体载体。另一类型的载体是病毒载体,其中额外的DNA区段可以连入病毒基因组中。某些载体能够在导入它们的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加体型哺乳动物载体)。其他载体(例如非附加体型哺乳动物载体)可以在导入宿主细胞时整合到该宿主细胞的基因组中,并因而随宿主基因组一起复制。另外,某些载体能够指导与它们有效连接的基因表达。此类载体在本文中称作“重组表达载体”(或简单地称作“重组载体”或“表达载体”)。通常,重组DNA技术中使用的表达载体经常处于质粒形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换地使用。

[0208] II.组合物和方法

[0209] 在一个方面,本发明部分地基于与类胰蛋白酶结合的新抗体。在另一个方面,本发明部分地基于以下发现:抗类胰蛋白酶抗体的特定残基(例如,HVR残基,如HVR-H3 W100,其指抗类胰蛋白酶抗体hu31A.v11的VH结构域的W100)可能易遭氧化。本发明提供包含抗氧化剂(例如,N-乙酰色氨酸和/或甲硫氨酸)以减少或防止本文所述的抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)氧化的药物组合物。其他合适的抗氧化赋形剂包括但不限于游离色氨酸、环糊精、Trolox(6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸)、吡哆素、多元醇(例如,甘露糖醇)

和金属螯合剂(例如,EDTA)。参见,例如,Ji等人,Biotechnology 98:4485-4500,2009。本发明的抗体和药物组合物例如用于诊断和/或治疗疾病,例如,肺部疾病、自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、淋巴细胞性疾病、与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病,或类胰蛋白酶相关的疾病或类胰蛋白酶介导的疾病。在另一个方面,本发明提供冻干的药物组合物以减少或消除本文所述抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)的氧化。

[0210] A.示例性抗类胰蛋白酶抗体

[0211] 本发明提供与类胰蛋白酶结合的分离的抗体。在某些实施方案中,本发明的抗类胰蛋白酶抗体以约100nM或更低(例如,100nM或更低、10nM或更低、1nM或更低、100pM或更低、10pM或更低、1pM或更低或0.1pM或更低)的K_D与类胰蛋白酶结合。在一些实施方案中,抗体以10nM或更低(例如,10nM或更低、1nM或更低、100pM或更低、10pM或更低、1pM或更低或0.1pM或更低)的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中,抗体以1nM或更低(例如,1nM或更低、100pM或更低、10pM或更低、1pM或更低或0.1pM或更低)的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中,抗体以0.5nM或更低(例如,0.5nM或更低、400pM或更低、300pM或更低、200pM或更低、100pM或更低、50pM或更低、25pM或更低、10pM或更低、1pM或更低或0.1pM或更低)的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中,抗体以约0.1nM至约0.5nM之间(例如,约0.1nM、约0.2nM、约0.3nM、约0.4nM或约0.5nM)的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中,抗体以约1pM至约500pM、约1pM至约400pM、约1pM至约300pM、约1pM至约200pM、约1pM至约100pM、约1pM至约50pM、约25pM至约500pM、约25pM至约400pM、约25pM至约300pM、约25pM至约100pM、约50pM至约500pM、约50pM至约450pM、约50pM至约425pM、约50pM至约400pM、约50pM至约375pM、约50pM至约350pM、约50pM至约325pM、约50pM至约300pM、约50pM至约275pM、约50pM至约250pM、约50pM至约200pM、约50pM至约180pM、约50pM至约175pM、约50pM至约150pM、约50pM至约125pM、约50pM至约100pM、约50pM至约75pM、约100pM至约500pM、约100pM至约475pM、约100pM至约450pM、约100pM至约425pM、约100pM至约400pM、约100pM至约375pM、约100pM至约350pM、约100pM至约325pM、约100pM至约300pM、约100pM至约275pM、约100pM至约250pM、约100pM至约225pM、约100pM至约200pM、约100pM至约180pM、约100pM至约175pM、约100pM至约150pM、约100pM至约125pM、约150pM至约500pM、约150pM至约475pM、约150pM至约450pM、约150pM至约425pM、约150pM至约400pM、约150pM至约375pM、约150pM至约350pM、约150pM至约325pM、约150pM至约300pM、约150pM至约375pM、约150pM至约350pM、约150pM至约325pM、约150pM至约300pM、约150pM至约275pM、约150pM至约225pM、约150pM至约200pM、约175pM至约500pM、约175pM至约475pM、约175pM至约450pM、约175pM至约425pM、约175pM至约400pM、约175pM至约375pM、约175pM至约350pM、约175pM至约325pM、约175pM至约300pM或约180pM至约400pM之间的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中,抗体以约0.4nM的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中,抗体以约0.2nM的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中,抗体以约0.18nM的K_D结合类胰蛋白酶。在一些实施方案中,类胰蛋白酶是人类胰蛋白酶,例如,人类胰蛋白酶β(例如,人类胰蛋白酶β1、人类胰蛋白酶β2和/或人类胰蛋白酶β3)。在一些实施方案中,在**BIACORE®** SPR测定法中测定K_D。在某些实施方案中,类胰蛋白酶是人类胰蛋白酶α。在某些实施方案中,抗体是人抗体或人源化抗体。

[0212] 在另一个例子中，在一些实施方案中，本发明的抗类胰蛋白酶抗体(包含前述抗类胰蛋白酶抗体的任意者)能够抑制类胰蛋白酶的活性。在一些实施方案中，本发明的抗类胰蛋白酶抗体能够抑制类胰蛋白酶的蛋白酶解活性，例如，如体外类胰蛋白酶酶促测定法中所测定。在一些实施方案中，人工底物，例如，合成肽S-2288可以用作体外类胰蛋白酶酶促测定法中的底物。在一些实施方案中，本发明的抗类胰蛋白酶抗体能够以约100nM或更低(例如，100nM或更低、10nM或更低、5nM或更低、2.5nM或更低、1nM或更低、100pM或更低、10pM或更低、1pM或更低或0.1pM或更低)的半数最大抑制浓度(IC_{50})抑制人类胰蛋白酶的活性，如通过使用例如S-2288作为底物的体外类胰蛋白酶酶促测定法所测定。在一些实施方案中，抗体能够以约10nM或更低(例如，10nM或更低、5nM或更低、2.5nM或更低、1nM或更低、100pM或更低、10pM或更低、1pM或更低或0.1pM或更低)的IC_{50}抑制人类胰蛋白酶的活性，如通过使用例如S-2288作为底物的体外类胰蛋白酶酶促测定法所测定。在一些实施方案中，抗体能够以约2.5nM或更低(例如，2.5nM或更低、1nM或更低、100pM或更低、10pM或更低、1pM或更低或0.1pM或更低)的IC_{50}抑制人类胰蛋白酶的活性，如通过使用例如S-2288作为底物的体外类胰蛋白酶酶促测定法所测定。在一些实施方案中，抗体能够以约0.1nM至约2nM(例如，约0.1nM、约0.2nM、约0.3nM、约0.4nM、约0.5nM、约0.6nM、约0.7nM、约0.8nM、约0.9nM、约1.0nM、约1.1nM、约1.2nM、约1.3nM、约1.4nM、约1.5nM、约1.6nM、约1.7nM、约1.8nM、约1.9nM或约2.0nM)的IC_{50}抑制人类胰蛋白酶的活性。在一些实施方案中，抗体能够以约0.5nM至约2.5nM(例如，约0.5nM、约0.6nM、约0.7nM、约0.8nM、约0.9nM、约1.0nM、约1.1nM、约1.2nM、约1.3nM、约1.4nM、约1.5nM、约1.6nM、约1.7nM、约1.8nM、约1.9nM、约2.0nM、约2.1nM、约2.2nM、约2.3nM、约2.4nM或约2.5nM)的IC_{50}抑制人类胰蛋白酶的活性。在一些实施方案中，抗体能够以约1pM至约2.5nM、约25pM至约2.5nM、约50pM至约2.5nM、约75pM至约2.5nM、约100pM至约2.5nM、约125pM至约2.5nM、约150pM至约2.5nM、约175pM至约2.5nM、约200pM至约2.5nM、约225pM至约2.5nM、约250pM至约2.5nM、约300pM至约2.5nM、约325pM至约2.5nM、约325pM至约2.5nM、约350pM至约2.5nM、约375pM至约2.5nM、约400pM至约2.5nM、约425pM至约2.5nM、约450pM至约2.5nM、约500pM至约2.5nM、约450pM至约2.5nM、约500pM至约2.5nM、约550pM至约2.5nM、约600pM至约2.5nM、约650pM至约2.5nM、约700pM至约2.5nM、约750pM至约2.5nM、约800pM至约2.5nM、约850pM至约2.5nM、约900pM至约2.5nM、约950pM至约2.5nM、约1nM至约2.5nM、约1.1nM至约2.5nM、约1.2nM至约2.5nM、约1.3nM至约2.5nM、约1.4nM至约2.5nM、约1.5nM至约2.5nM、约1.6nM至约2.5nM、约1.7nM至约2.5nM、约1.8nM至约2.5nM、约1.9nM至约2.5nM、约2.0nM至约2.5nM、约2.1nM至约2.5nM、约2.2nM至约2.5nM、约2.3nM至约2.5nM、约500pM至约1.9pM、约750pM至约1.9pM、约1nM至约1.9pM、约1.25nM至约1.9pM、约1.5nM至约1.9pM、约1nM至约1.85nM、约1.25nM至约1.85nM、约1.25nM至约1.85nM、约1.5nM至约1.85nM、约1nM至约1.8nM、约1.25nM至约1.8nM、约1.5nM至约1.8nM或约1.6nM至约1.8nM的IC_{50}抑制人类胰蛋白酶的活性。在一些实施方案中，抗体能够以约1.8nM的IC_{50}抑制人类胰蛋白酶的活性。在其他实施方案中，抗体能够以约0.5nM至约1nM(例如，约0.5nM、约0.6nM、约0.7nM、约0.8nM、约0.9nM或约1.0nM)的IC_{50}抑制人类胰蛋白酶的活性。在一些实施方案中，抗体能够以约1pM至约1nM、约25pM至约1nM、约50pM至约1nM、约75pM至约1nM、约100pM至约1nM、约125pM至约1nM、约150pM至约1nM、约175pM至约1nM、约200pM至约1nM、约225pM至约1nM、约250pM至约1nM、约300pM至约1nM、约325pM至约1nM、约350pM至约1nM、约

375pM至约1nM、约400pM至约1nM、约425pM至约1nM、约450pM至约1nM、约500pM至约1nM、约450pM至约1nM、约500pM至约1nM、约550pM至约1nM、约600pM至约1nM、约650pM至约1nM、约700pM至约1nM、约750pM、约250pM至约800pM、约300pM至约800pM、约325pM至约800pM、约325pM至约800pM、约350pM至约800pM、约375pM至约800pM、约400pM至约800pM、约425pM至约800pM、约450pM至约800pM、约500pM至约800pM、约450pM至约800pM、约500pM至约800pM、约550pM至约800pM、约600pM至约800pM、约650pM至约800pM、约700pM至约800pM、约750pM至约800pM、约1pM至约600pM、约25pM至约600pM、约50pM至约600pM、约75pM至约600pM、约100pM至约600pM、约125pM至约600pM、约150pM至约600pM、约175pM至约600pM、约200pM至约600pM、约225pM至约600pM、约250pM至约600pM、约300pM至约600pM、约325pM至约600pM、约325pM至约600pM、约350pM至约600pM、约375pM至约600pM、约400pM至约600pM、约425pM至约600pM、约450pM至约600pM、约500pM至约600pM、约450pM至约600pM、约500pM至约600pM或约550pM至约600pM的IC_{50}抑制人类胰蛋白酶的活性。在一些实施方案中，抗体能够以约0.6nM的IC_{50}抑制人类胰蛋白酶的活性。在一些实施方案中，类胰蛋白酶是人类胰蛋白酶，例如，人类胰蛋白酶β(例如，人类胰蛋白酶β1、人类胰蛋白酶β2和/或人类胰蛋白酶β3)。在一些情况下，如本文中实施例(例如在实施例1，尤其第(A)(viii)(a)部分)中所述那样或通过本领域已知的其他方案测定抗体的抑制活性。在某些实施方案中，抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施方案中，抗体能够作为单价抗体或其结合抗原的抗体片段(例如，Fab)抑制人类胰蛋白酶的活性。在其他实施方案中，抗体能够作为双价抗体(例如，IgG抗体(例如，IgG1或IgG4抗体)或$F(ab')_2$)抑制人类胰蛋白酶的活性。

[0213] 在一些情况下，本文所述的任何抗类胰蛋白酶抗体可以抑制类胰蛋白酶刺激的人主气道平滑肌细胞收缩。在其他情况下，本文所述的任何抗类胰蛋白酶抗体可以抑制类胰蛋白酶刺激的人主气道平滑肌细胞收缩。在另外其他情况下，本文所述的任何抗类胰蛋白酶抗体可以抑制类胰蛋白酶刺激或IgE刺激的肥大细胞脱颗粒和/或组胺释放。在另外的情况下，本文所述的任何抗类胰蛋白酶抗体例如在施用至受试者后可以减少活性类胰蛋白酶(例如，在样品如支气管肺泡灌洗液或鼻吸附样品)中的量。例如，本文所述的任何抗类胰蛋白酶抗体可以减少活性类胰蛋白酶的量约1％、约5％、约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约75％、约80％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或更多。所述减少可以是相对于活性类胰蛋白酶的参考量而言的减少，所述参考量是例如施用抗类胰蛋白酶抗体之前样品中活性类胰蛋白酶的量。

[0214] 在一些情况下，抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体)可以包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个高变区(HVR)，所述高变区选自：(a)包含$X_1X_2GMX_3$(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列的HVR-H1，其中X_1是Asp或Ser，X_2是Tyr或Phe，并且X_3是Val或His；(b)包含FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含$RX_1X_2X_3DWYFDV$(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列的HVR-H3，其中X_1是Asn或Asp，X_2是Tyr或Asn，并且X_3是Asp或Tyr；(d)包含SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3，或者以上一个或多个HVR及其与SEQ ID NO:1-6中任一者具有至少约80％序列同一性(例如，81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性)的一个或多个变体的组合。

[0215] 例如，在一些实施方案中，抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体)可以包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个高变区(HVR)，所述高变区选自：(a)包含DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含RNYDDWYFDV(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3，或者以上一个或多个HVR及其与SEQ ID NO:2或4-8中任一者具有至少约80％序列同一性(例如，81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性)的一个或多个变体的组合。

[0216] 在一个具体例子中，在一些实施方案中，抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体)可以包含(a)包含DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含RNYDDWYFDV(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中，抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体)包含(a)重链可变(VH)结构域，其包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90％序列同一性(例如，至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列；(b)轻链可变(VL)结构域，其包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90％同一性(例如，至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列，或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中，抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体)包含一个、二个、三个或四个以下重链构架区(FR)：(a)FR-H1，其包含EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列；(b)FR-H2，其包含WVRQAPGKGLEWVA(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列；(c)FR-H3，其包含RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR(SEQ ID NO:13)的氨基酸序列；和(d)FR-H4，其包含WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:14)的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体)包含一个、二个、三个或四个以下轻链FR：(a)FR-L1，其包含DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:15)的氨基酸序列；(b)FR-L2，其包含WYQQKPGKSPKPWIY(SEQ ID NO:16)的氨基酸序列；(c)FR-L3，其包含GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:17)的氨基酸序列；和(d)FR-L4，其包含FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:18)的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体)包含VH结构域，其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列，和VL结构域，其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列，如抗体hu31A.v11。

[0217] 在另一个具体例子中，在一些实施方案中，抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体)可以包含(a)包含DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含RDNYDWYFDV(SEQ ID NO:29)的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中，抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体)包含(a)重链可变(VH)结构域，其包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少90％序列同一性(例如，至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列；(b)轻

链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少90%同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列,或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)包含一个、二个、三个或四个以下重链构架区(FR):(a)FR-H1,其包含EVKLVESGGGSVQPGGSRKLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列;(b)FR-H2,其包含WVRQAPGKGLEWVA(SEQ ID NO:22)的氨基酸序列;(c)FR-H3,其包含RFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMYYCAR(SEQ ID NO:23)的氨基酸序列;和(d)FR-H4,其包含WGTGTTVTVSS(SEQ ID NO:24)的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)包含一个、二个、三个或四个以下轻链FR:(a)FR-L1,其包含QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISC(SEQ ID NO:25)的氨基酸序列;(b)FR-L2,其包含WYQQKPGSSPKPWIY(SEQ ID NO:26)的氨基酸序列;(c)FR-L3,其包含GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC(SEQ ID NO:27)的氨基酸序列;和(d)FR-L4,其包含FGAGTKLELK(SEQ ID NO:28)的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,如抗体31a。

[0218] 在一些情况下,抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)包含(a)重链可变(VH)结构域,其包含与SEQ ID NOs:9、101、102、103和104中任一者的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或包含SEQ ID NOs:9、101、102、103和104中任一者的序列;(b)轻链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NOs:10、105和106中任一者的氨基酸序列具有至少90%同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或包含SEQ ID NOs:10、105和106中任一者的序列,或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。例如,在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列。在其他情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在其他情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列。在其他情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列。在其他情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在其他情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列。在其他情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列。在其他情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在其他情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列。在其他情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列。在其他情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在其他情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列。在其他情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列。在其他情况下,抗体包含VH

结构域，其包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列，和VL结构域，其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在其他情况下，抗体包含VH结构域，其包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列，和VL结构域，其包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列。

[0219] 在一些情况下，任一前述抗体与人类胰蛋白酶β1上的表位结合，所述表位包含至少一个、至少两个、至少三个或全部四个残基，所述残基选自SEQ ID NO:71的His51、Val80、Lys81和Asp82。在一些实施方案中，抗体与人类胰蛋白酶β1上的表位结合，所述表位包含至少一个、至少两个、至少三个或全部四个残基，所述残基选自SEQ ID NO:71的His51、Val80、Lys81和Asp82。在一些实施方案中，抗体与人类胰蛋白酶β1上的表位结合，所述表位包含SEQ ID NO:71的His51和至少一个、至少两个或全部三个选自SEQ ID NO:71的Val80、Lys81和Asp82的残基。在一些实施方案中，人类胰蛋白酶β1上的表位还包含一个或多个选自SEQ ID NO:71的Gln67、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130的氨基酸残基。在一些实施方案中，人类胰蛋白酶β1上的表位包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个或全部十二个选自SEQ ID NO:71的Gln67、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130的氨基酸残基。在一些实施方案中，人类胰蛋白酶β1上的表位包含SEQ ID NO:71的His51、Gln67、Val80、Lys81、Asp82、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130。在一些实施方案中，表位相对于人类胰蛋白酶β1单体或四聚体而言。在一些实施方案中，通过X射线结晶学模型确定表位。在一些实施方案中，抗体能够解离四聚体人类胰蛋白酶β1的小界面和四聚体人类胰蛋白酶β1的大界面这二者。

[0220] 在一些情况下，前述抗类胰蛋白酶抗体的任意者包含结合类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)的互补位，所述互补位包含一个或多个氨基酸残基(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个氨基酸残基)，所述氨基酸残基选自轻链可变区氨基酸残基Val30;Thr31;Tyr32;Tyr34;Arg50;Tyr90;His92;Ser93和Tyr94，和重链可变区氨基酸残基Phe50;Ser52;Gly53;Ser54;Ser55;Thr56;Tyr58;Arg95;Tyr97和Asp98。

[0221] 例如，在一些情况下，抗类胰蛋白酶抗体包含结合类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)的互补位，所述互补位包含轻链可变区氨基酸残基Val30、Thr31、Tyr32、Tyr34、Arg50、Tyr90、His92、Ser93和Tyr94或重链可变区氨基酸残基Phe50、Ser52、Gly53、Ser54、Ser55、Thr56、Tyr58、Arg95、Tyr97和Asp98。在一些情况下，抗类胰蛋白酶抗体包含结合类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)的互补位，所述互补位包含轻链可变区氨基酸残基Val30、Thr31、Tyr32、Tyr34、Arg50、Tyr90、His92、Ser93和Tyr94和重链可变区氨基酸残基Phe50、Ser52、Gly53、Ser54、Ser55、Thr56、Tyr58、Arg95、Tyr97和Asp98。

[0222] 在一些情况下，抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体)可以包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个高变区(HVR)，所述高变区选自：(a)包含GYAIT(SEQ ID NO:30)的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含GISSAATTFYSSWAKS(SEQ ID NO:31)的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含DPRGYGAALDRLDL(SEQ ID NO:32)的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含QSIKSVYNNRLG(SEQ ID NO:33)的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含ETSILTS(SEQ ID NO:34)的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含AGGFDRSGDTT(SEQ ID NO:35)的氨基酸序列的HVR-L3，或者以上一个或多个HVR及其与SEQ ID NO:30-35中任一者具有至少约80％序列同一性(例如，81％、82％、83％、

84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的一个或多个变体的组合。

[0223] 在一些情况下,抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)包含(a)重链可变(VH)结构域,其包含与SEQ ID NOs:36、47、48、49、50、51和52中任一者的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或包含SEQ ID NOs:36、47、48、49、50、51和52中任一者的序列;(b)轻链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NOs:37、53、58或59中任一者的氨基酸序列具有至少90%同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或包含SEQ ID NOs:37、53、58或59中任一者的序列,或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0224] 在一些情况下,前述抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)之任一者可以包含一个、二个、三个或四个以下重链构架区(FR):(a)FR-H1,其包含与EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列;(b)FR-H2,其包含与WX_1RQPPGKGLEWIG(SEQ ID NO:39)的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列,其中X_1是Ile或Val;(c)FR-H3,其包含与RX_1TISX_2DTSKNQX_3SLKLSSVTAADTAVYX_4CAR(SEQ ID NO:40)的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列,其中X_1是Val或Ser,X_2是Arg或Val,X_3是Val或Phe,并且X_4是Tyr或Phe;和(d)FR-H4,其包含与WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:41)的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列。

[0225] 例如,在一些情况下,任一前述抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)可以包含一个、二个、三个或四个以下重链FR:(a)FR-H1,其包含EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列;(b)FR-H2,其包含WIRQPPGKGLEWIG(SEQ ID NO:42)的氨基酸序列;(c)FR-H3,其包含RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR(SEQ ID NO:43)的氨基酸序列;和(d)FR-H4,其包含WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:41)的氨基酸序列。

[0226] 在另一个例子中,在一些情况下,任一前述抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)可以包含一个、二个、三个或四个以下重链FR:(a)FR-H1,其包含EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSRFSLI(SEQ ID NO:44)的氨基酸序列;(b)FR-H2,其包含WVRQAPGKGLEWIG(SEQ ID NO:45)的氨基酸序列;(c)FR-H3,其包含RSTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCAR(SEQ ID NO:46)的氨基酸序列;和(d)FR-H4,其包含WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:41)的氨基酸序列。

[0227] 在另一个例子中,在一些情况下,任一前述抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)可以包含一个、二个、三个或四个以下重链FR:(a)FR-H1,其包含EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSRFSLI(SEQ ID NO:44)的氨基酸序列;(b)FR-H2,其包含WVRQAPGKGLEWIG(SEQ ID NO:45)的氨基酸序列;(c)FR-H3,其包含RSTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCAR(SEQ ID NO:46)的氨基酸序列;和(d)FR-H4,其包含WGQGTLVTVSS(SEQ ID

NO:41)的氨基酸序列。

[0228] 在一些情况下，前述抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体)之任一者可以包含一个、二个、三个或四个以下轻链FR：(a)FR-L1，其包含与DX_1QX_2TQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:60)的氨基酸序列具有至少90％序列同一性(例如，至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列，其中X_1是Ile或Ala，并且X_2是Met或Leu；(b)FR-L2，其包含与WYQQKPGKX_1PKLLIY(SEQ ID NO:61)的氨基酸序列具有至少90％序列同一性(例如，至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列，其中X_1是Ala或Pro；(c)FR-L3，其包含与VPSRFSGSGSX_1TDFTLTISSLQPEDFATYX_2C(SEQ ID NO:62)的氨基酸序列具有至少90％序列同一性(例如，至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列，其中X_1是Gly或Glu，并且X_2是Tyr或Phe；和(d)FR-L4，其包含与FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:63)的氨基酸序列具有至少90％序列同一性(例如，至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列。

[0229] 例如，在具体的情况下，任一前述抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体)可以包括一个、二个、三个或四个以下轻链FR：(a)FR-L1，其包含DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:64)的氨基酸序列；(b)FR-L2，其包含WYQQKPGKAPKLLIY(SEQ ID NO:65)的氨基酸序列；(c)FR-L3，其包含GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:66)的氨基酸序列；和(d)FR-L4，其包含FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:63)的氨基酸序列。

[0230] 在一些实施方案中，前述抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体之任一者)可以包含一个、二个、三个或四个以下轻链FR：(a)FR-L1，其包含AAVLTQTPASVSAAVGGTVSISC(SEQ ID NO:67)的氨基酸序列；(b)FR-L2，其包含WYQQKPGQPPKLLIY(SEQ ID NO:68)的氨基酸序列；(c)FR-L3，其包含GVPSRFKGSGSETQFTLTISDVQX_1DDAATYFC(SEQ ID NO:69)的氨基酸序列，其中X_1是Cys或Ala；和(d)FR-L4，其包含FGQGTKVEIK FGGGTEVVVK(SEQ ID NO:70)的氨基酸序列。

[0231] 在一些情况下，抗体(例如，抗类胰蛋白酶抗体)包含(a)重链可变(VH)结构域，其包含与SEQ ID NOs:36、47、48、49、50、51和52中任一者的氨基酸序列具有至少90％序列同一性(例如，至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含SEQ ID NOs:36、47、48、49、50、51和52中任一者的序列；(b)轻链可变(VL)结构域，其包含与SEQ ID NOs:37、53、58和59中任一者的氨基酸序列具有至少90％同一性(例如，至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含SEQ ID NOs:37、53、58和59中任一者的序列，或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。例如，在一些情况下，抗体包含VH结构域，其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列，和VL结构域，其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些情况下，抗体包含VH结构域，其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列，和VL结构域，其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些情况下，抗体包含VH结构域，其包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列，和VL结构域，其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些情况下，抗体包含VH结构域，其包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列，和VL结构域，其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些情况下，抗体包含VH结构域，其包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列，和VL结构域，其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些情况下，抗体包含VH结构域，其包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列，和VL结构域，其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些情况下，抗体包含VH结构域，其包含SEQ ID NO:51的氨基酸序

列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列。在一些情况下,抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列。

[0232] 在另一个具体例子中,在一些实施方案中,抗类胰蛋白酶抗体可以包含(a)包含GYAIT(SEQ ID NO:30)的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含GISSAATTFYSSWAKS(SEQ ID NO:31)的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含DPRGYGAALDRLDL(SEQ ID NO:32)的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含QSIKSVYNNRLG(SEQ ID NO:33)的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含ETSILTS(SEQ ID NO:34)的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含AGGFDRSGDTT(SEQ ID NO:35)的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗类胰蛋白酶抗体包含(a)重链可变(VH)结构域,其包含与SEQ ID NO:36的氨基酸序列具有至少90％序列同一性(例如,至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列;(b)轻链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NO:37的氨基酸序列具有至少90％同一性(例如,至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列,或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,抗类胰蛋白酶抗体包含一

个、二个、三个或四个以下重链构架区(FR):(a)FR-H1,其包含EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列;(b)FR-H2,其包含WIRQPPGKGLEWIG(SEQ ID NO:42)的氨基酸序列;(c)FR-H3,其包含RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR(SEQ ID NO:43)的氨基酸序列;和(d)FR-H4,其包含WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:41)的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗类胰蛋白酶抗体包含一个、二个、三个或四个以下轻链FR:(a)FR-L1,其包含DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:64)的氨基酸序列;(b)FR-L2,其包含WYQQKPGKAPKLLIY(SEQ ID NO:65)的氨基酸序列;(c)FR-L3,其包含GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:66)的氨基酸序列;和(d)FR-L4,其包含FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:63)的氨基酸序列。在一些实施方案中,在一些实施方案中,抗类胰蛋白酶抗体包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,如抗类胰蛋白酶抗体huE104.v2。

[0233] 在另一个具体例子中,在一些实施方案中,抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)可以包含(a)包含GYAIT(SEQ ID NO:30)的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含GISSAATTFYSSWAKS(SEQ ID NO:31)的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含DPRGYGAALDRLDL(SEQ ID NO:32)的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含QSIKSVYNNRLG(SEQ ID NO:33)的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含ETSILTS(SEQ ID NO:34)的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含AGGFDRSGDTT(SEQ ID NO:35)的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)包含(a)重链可变(VH)结构域,其包含与SEQ ID NO:52的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列;(b)轻链可变(VL)结构域,其包含与SEQ ID NO:53的氨基酸序列具有至少90%同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列,或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)包含一个、二个、三个或四个以下重链构架区(FR):(a)FR-H1,其包含QXSLEESGGGLFKPTDTLTLTCTVSRFSLI(SEQ ID NO:54)的氨基酸序列;(b)FR-H2,其包含WVRQSPENGLEWIG(SEQ ID NO:55)的氨基酸序列;(c)FR-H3,其包含RSTITRNTNENTVTLKMTSLTAADTATYFCAR(SEQ ID NO:56)的氨基酸序列;和(d)FR-H4,其包含WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:57)的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)包含一个、二个、三个或四个以下轻链FR:(a)FR-L1,其包含AAVLTQTPASVSAAVGGTVSISC(SEQ ID NO:67)的氨基酸序列;(b)FR-L2,其包含WYQQKPGQPPKLLIY(SEQ ID NO:68)的氨基酸序列;(c)FR-L3,其包含GVPSRFKGSGSETQFTLTISDVQX_1DDAATYFC(SEQ ID NO:69)的氨基酸序列,其中X_1是Cys或Ala;和(d)FR-L4,其包含FGQGTKVEIKFGGGTEVVVK(SEQ ID NO:70)的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,如抗体E104。在一些实施方案中,抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)包含VH结构域,其包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列,和VL结构域,其包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列。

[0234] 在一些情况下,本发明提供抗体,所述抗体包含(a)重链,其包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列;和/或(b)轻链,其包含与SEQ ID NO:77的氨基酸序列具有至少90%序列同一性(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、

96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列。在一些情况下，抗体包含重链，所述重链包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列，和轻链，所述轻链包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列。在一些实施方案中，重链还在C末端包含赖氨酸(K)残基。

[0235] 在一些情况下，本发明提供抗体，所述抗体包含(a)重链，其包含与SEQ ID NO:78的氨基酸序列具有至少90％序列同一性(例如，至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列；和/或(b)轻链，其包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列具有至少90％序列同一性(例如，至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列。在一些情况下，抗体包含重链，所述重链包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列，和轻链，所述轻链包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列。在一些实施方案中，重链还在C末端包含赖氨酸(K)残基。

[0236] 在一些情况下，本发明提供抗体，所述抗体包含(a)重链，其包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列具有至少90％序列同一性(例如，至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列；和/或(b)轻链，其包含与SEQ ID NO:81的氨基酸序列具有至少90％序列同一性(例如，至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列。在一些情况下，抗体包含重链，所述重链包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列，和轻链，所述轻链包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。在一些实施方案中，重链还在C末端包含赖氨酸(K)残基。

[0237] 在一些情况下，本发明提供抗体，所述抗体包含(a)重链，其包含与SEQ ID NO:82的氨基酸序列具有至少90％序列同一性(例如，至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列；和/或(b)轻链，其包含与SEQ ID NO:83的氨基酸序列具有至少90％序列同一性(例如，至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列。在一些情况下，抗体包含重链，所述重链包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列，和轻链，所述轻链包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列。在一些实施方案中，重链还在C末端包含赖氨酸(K)残基。

[0238] 在一些情况下，任一前述抗体与人类胰蛋白酶β1上的表位结合，所述表位包含至少一个、至少两个或全部三个选自SEQ ID NO:71的Gln100、Leu101和Leu102的残基。在一些实施方案中，人类胰蛋白酶β1上的表位还包含一个或多个选自SEQ ID NO:71的Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128和Glu129的氨基酸残基。在一些实施方案中，人类胰蛋白酶β1上的表位包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、至少十二个、至少十三个或全部十四个选自SEQ ID NO:71的Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128和Glu129的氨基酸残基。在一些实施方案中，表位包含SEQ ID NO:71的Gln35、Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Gln100、Leu101、Leu102、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128、Glu129和Arg216。在一些实施方案中，表位相对于人类胰蛋白酶β1单体或四聚体而言。在一些实施方案中，表位相对于人类胰蛋白酶β1四聚体而言，并且人类胰蛋白酶β1上的表位还包含SEQ ID NO:71的Gln35和Arg216中一者或两者。在一些实施方案中，通过X射线结晶学模型确定表位。在一些实施方案中，抗体能够解离人类胰蛋白酶β1的小界面和/或大界面。

[0239] 在一些情况下，前述抗类胰蛋白酶抗体的任意者包含结合类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)的互补位，所述互补位包含一个或多个氨基酸残基(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16、19个氨基酸残基)，所述氨基酸残基选自轻链可变区氨基酸残基Tyr29；Asn30；Arg32和Arg94和重链可变区氨基酸残基Gly31；Tyr32；Ser52；Ser53；Ala54；Thr56；Phe58；Pro96；Arg97；Gly98；Tyr99和Arg100e。

[0240] 例如，在一些情况下，抗类胰蛋白酶抗体包含了结合类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)的互补位，所述互补位包含轻链可变区氨基酸残基Tyr29；Asn30；Arg32和Arg94或重链可变区氨基酸残基Gly31；Tyr32；Ser52；Ser53；Ala54；Thr56；Phe58；Pro96；Arg97；Gly98；Tyr99和Arg100e。在一些情况下，抗类胰蛋白酶抗体包含了结合类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)的互补位，所述互补位包含轻链可变区氨基酸残基Tyr29；Asn30；Arg32和Arg94和重链可变区氨基酸残基Gly31；Tyr32；Ser52；Ser53；Ala54；Thr56；Phe58；Pro96；Arg97；Gly98；Tyr99和Arg100e。

[0241] 在一些情况下，前述抗类胰蛋白酶抗体的任意者结合人类胰蛋白酶。在一些情况下，任一前述抗体结合食蟹猴(cyno)类胰蛋白酶。在一些情况下，抗体结合人类胰蛋白酶α或人类胰蛋白酶β。在一些情况下，抗体结合人类胰蛋白酶β1、人类胰蛋白酶β2或人类胰蛋白酶β3。

[0242] 在另一个方面，本发明提供与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上表位结合的类胰蛋白酶抗体，所述表位包含一个或多个氨基酸残基(例如，1、2、3、4、5、6或7个氨基酸残基)，所述氨基酸残基选自His51、Val80、Lys81、Asp82、Leu83、Ala84和Ala85(其可以参考SEQ ID NO:71的氨基酸序列)或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。例如，在一些实施方案中，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位包含至少一个、至少两个、至少三个或全部四个残基，所述残基选自SEQ ID NO:71的His51、Val80、Lys81和Asp82或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些实施方案中，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位包含SEQ ID NO:71的His51和至少一个、至少两个或全部三个选自SEQ ID NO:71的Val 80、Lys81和Asp82的残基，或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些实施方案中，类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位还包含一个或多个选自SEQ ID NO:71的Gln67、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130或任何类胰蛋白酶蛋白之相应氨基酸的氨基酸残基。在一些实施方案中，类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个或全部十二个选自SEQ ID NO:71的Gln67、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130或任何类胰蛋白酶蛋白之相应氨基酸的氨基酸残基。在一些实施方案中，类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位包含SEQ ID NO:71的His51、Gln67、Val80、Lys81、Asp82、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些实施方案中，表位相对于类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)单体或四聚体而言。在一些实施方案中，通过X射线结晶学模型确定表位。在一些实施方案中，抗体能够使四聚体类胰蛋白酶的小界面和四聚体类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)的大界面这两者解离。

[0243] 在又一个方面，本发明提供与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上表位结合的

抗类胰蛋白酶抗体，所述表位包含一个或多个氨基酸残基(例如，1、2、3、4、5、6或7个氨基酸残基)，所述氨基酸残基选自Gln100、Leu101、Leu102、Pro103、Val104、Ser105和Arg106(其可以参考SEQ ID NO:71的氨基酸序列)或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些实施方案中，类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位还包含一个或多个选自SEQ ID NO:71的Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128和Glu129或任何类胰蛋白酶蛋白之相应氨基酸的氨基酸残基。在一些实施方案中，类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、至少十二个、至少十三个或全部十四个选自SEQ ID NO:71的Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128和Glu129或任何类胰蛋白酶蛋白之相应氨基酸的氨基酸残基。在一些实施方案中，表位包含SEQ ID NO:71的Gln35、Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Gln100、Leu101、Leu102、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128、Glu129和Arg216或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些实施方案中，表位相对于类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)单体或四聚体而言。在一些实施方案中，表位相对于四聚体而言，并且类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位还包含SEQ ID NO:71的Gln35和Arg216中一者或两者或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些实施方案中，通过X射线结晶学模型确定表位。在一些实施方案中，抗体能够使类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)的小界面和/或大界面解离。

[0244] 在一些实施方案中，任一前述抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位包含一个或多个氨基酸残基(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个氨基酸残基)，所述氨基酸残基选自Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128和Glu129(其可以参考SEQ ID NO:71的氨基酸序列)或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。

[0245] 例如，在一些情况下，任一前述抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位包含SEQ ID NO:71的Gln67或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位包含SEQ ID NO:71的Asp82或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位包含SEQ ID NO:71的Leu83或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位包含SEQ ID NO:71的Ala84或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位包含SEQ ID NO:71的Arg87或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位包含SEQ ID NO:71的Pro103或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位包含SEQ ID NO:71的Val104或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位包含SEQ ID NO:71的Ser105或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位包含SEQ ID NO:71的Arg106或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位

结合，所述表位包含SEQ ID NO:71的Glu128或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位包含SEQ ID NO:71的Glu129或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。

[0246] 在一些实施方案中，任一前述抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位包含两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、十个或更多个或全部十一个氨基酸残基，所述，所述氨基酸残基选自Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128和Glu129(其可以参考SEQ ID NO:71的氨基酸序列)或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。

[0247] 在一些情况下，任一前述抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位还包含一种或多种额外的氨基酸残基(例如，1、2、3、4或5个额外的氨基酸残基)，所述额外的氨基酸残基选自His51、Val80、Lys81、Ala85和Pro130(其可以参考SEQ ID NO:71的氨基酸序列)或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。例如，在一些情况下，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位还包含SEQ ID NO:71的His51或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位还包含SEQ ID NO:71的Val80或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些实施方案中，抗类胰蛋白酶抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位还包含SEQ ID NO:71的Lys81或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位还包含SEQ ID NO:71的Ala85或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位还包含SEQ ID NO:71的Pro130或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。

[0248] 在一些情况下，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位还包含两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个或五个或更多个额外的氨基酸残基，所述额外的氨基酸残基选自His51、Val80、Lys81、Ala85和Pro130(其可以参考SEQ ID NO:71的氨基酸序列)或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。

[0249] 在一些情况下，抗类胰蛋白酶抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位包含SEQ ID NO:71的His51、Gln67、Val80、Lys81、Asp82、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130(其可以参考SEQ ID NO:71的氨基酸序列)或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下，抗类胰蛋白酶抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位由SEQ ID NO:71的His51、Gln67、Val80、Lys81、Asp82、Leu83、Ala84、Ala85、Arg87、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu128、Glu129和Pro130组成。

[0250] 在其他情况下，前述抗类胰蛋白酶抗体的任意者与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位还包含一个或多个(例如，1、2、3、4、5、6、7或8)额外的氨基酸残基，所述额外的氨基酸残基选自Gln35、Trp55、Gln100、Leu101、Leu102、Glu126、Leu127和Arg216(其可以参考SEQ ID NO:71的氨基酸序列)或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。例如，在一些情况下，抗体与类胰蛋白酶(例如，人类胰蛋白酶β1)上的表位结合，所述表位还包含SEQ ID NO:71的Gln35或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下，抗体与类

胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶β1)上的表位结合,所述表位还包含SEQ ID NO:71的Trp55或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下,抗体与类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶β1)上的表位结合,所述表位还包含SEQ ID NO:71的Gln100或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下,抗体与类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶β1)上的表位结合,所述表位还包含SEQ ID NO:71的Leu101或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下,抗体与类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶β1)上的表位结合,所述表位还包含SEQ ID NO:71的Leu102或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下,抗体与类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶β1)上的表位结合,所述表位还包含SEQ ID NO:71的Glu126或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下,抗体与类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶β1)上的表位结合,所述表位还包含SEQ ID NO:71的Leu127或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下,抗体与类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶β1)上的表位结合,所述表位还包含SEQ ID NO:71的Arg216或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下,抗体与类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶β1)上的表位结合,所述表位还包含两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个,七个或更多个或八个或更多个额外的氨基酸残基,所述额外的氨基酸残基选自Gln35、Trp55、Gln100、Leu101、Leu102、Glu126、Leu127和Arg216(其可以参考SEQ ID NO:71的氨基酸序列)或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。

[0251] 在一些情况下,抗类胰蛋白酶抗体与类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶β1)上的表位结合,所述表位包含Gln35、Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Gln100、Leu101、Leu102、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128、Glu129和Arg216(其可以参考SEQ ID NO:71的氨基酸序列)或任何类胰蛋白酶蛋白的相应氨基酸。在一些情况下,抗类胰蛋白酶抗体与类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶β1)上的表位结合,所述表位由SEQ ID NO:71的Gln35、Trp55、Gln67、Asp82、Leu83、Ala84、Arg87、Gln100、Leu101、Leu102、Pro103、Val104、Ser105、Arg106、Glu126、Leu127、Glu128、Glu129和Arg216组成。

[0252] 在另一个方面,本发明提供与任一前述抗体竞争与类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶β1)结合的抗体。

[0253] 在另一个方面,本发明提供一种与如任一前述抗体相同的表位或重叠表位结合的抗体。

[0254] 在一些实施方案中,任一前述抗体可以具有破坏有四聚体结构的类胰蛋白酶(如,存在于肥大细胞分泌型颗粒中或从其中释放的成熟类胰蛋白酶)形成更小分子量种类(例如,单体、二聚体和/或三聚体)的能力。

[0255] 在又一个方面,根据任一个以上实施方案的抗体可以并入单独或组合的任何特征,如以下第1-7部分中所述:

[0256] 1.抗体亲和力

[0257] 在某些实施方案中,本文提供的抗体具有≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM、≤1pM,或≤0.1pM(例如,10^{-6}M或更小,例如,10^{-6}M至10^{-9}M或更小,例如,10^{-9}M至10^{-13}M或更小)的解离常数(K_D)。在一些实施方案中,本发明的抗类胰蛋白酶抗体以约100nM或更低(例如,100nM或更低、10nM或更低、1nM或更低、100pM或更低、10pM或更低、1pM或更低或0.1pM或更低)的K_D与类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶,例如,人类胰蛋白酶β)结合。在一些实施方案中,抗体以10nM或更低(例如,10nM或更低、1nM或更低、100pM或更低、

10pM或更低、1pM或更低或0.1pM或更低)的K_D结合类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶,例如,人类胰蛋白酶β)。在一些实施方案中,抗体以1nM或更低(例如,1nM或更低、100pM或更低、10pM或更低、1pM或更低或0.1pM或更低)的K_D结合类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶,例如,人类胰蛋白酶β)。在一些实施方案中,上文或本文描述的任何抗类胰蛋白酶抗体以约0.5nM或更低(例如,0.5nM或更低、400pM或更低、300pM或更低、200pM或更低、100pM或更低、50pM或更低、25pM或更低、10pM或更低、1pM或更低或0.1pM或更低)的K_D与类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶,例如,人类胰蛋白酶β)结合。在一些实施方案中,抗体以约0.1nM至约0.5nM之间(例如,约0.1nM、约0.2nM、约0.3nM、约0.4nM或约0.5nM)的K_D结合类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶,例如,人类胰蛋白酶β)。在一些实施方案中,抗体以约0.4nM的K_D结合类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶,例如,人类胰蛋白酶β)。在一些实施方案中,抗体以约0.18nM的K_D结合类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶,例如,人类胰蛋白酶β)。

[0258] 在一个实施方案中,通过放射标记的抗原结合测定法(RIA)测量K_D。在一个实施方案中,用Fab形式的目的抗体及其抗原进行RIA。例如,通过以下方式测量Fab对抗原的溶液结合亲和力:在未标记抗原的滴定系列存在下用最低浓度的(^{125}I)的标记抗原平衡Fab,随后用抗Fab抗体包被的平板捕获结合的抗原(参见,例如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881,1999)。为了建立该测定法的条件,将**MICROTITER®**多孔板(Thermo Scientific)用50mM碳酸钠(pH 9.6)中的5μg/ml抗Fab捕获抗体(Cappel Labs)包被过夜并随后用PBS中的2%(w/v)牛血清白蛋白在室温(大约23℃)封闭二至五小时。在非吸附性平板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM[^{125}I]-抗原与目的Fab的连续稀释物(例如,与Presta等人Cancer Res.57:4593-4599,1997中评估抗VEGF抗体Fab-12一致)混合。随后将目的Fab温育过夜;然而,温育可以持续较长时间(例如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获平板以便在室温温育(例如,一小时)。随后移除溶液并将平板用PBS中的0.1%聚山梨醇酯20(**TWEEN®**-20)洗涤八次。当平板已经干燥时,添加150μl/孔闪烁体(MICROSCINT-20™;Packard),并且将平板在TOPCOUNT™γ计数器(Packard)上计数十分钟。选择产生小于或等于20%最大结合作用的每种Fab的浓度用于竞争性结合测定法中。

[0259] 根据另一个实施方案,使用**BIACORE®**表面等离子体共振测定法测量K_D。例如,使用**BIACORE®**-2000或**BIACORE®**-3000(BIAcore,Inc.,Piscataway,NJ)的测定法在25℃采用固定化抗原CM5芯片以约10个响应单位(RU)进行。在一个实施方案中,根据供应商说明书,以盐酸N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5,BIACORE,Inc.)。将抗原用10mM乙酸钠,pH 4.8稀释至5μg/ml(约0.2μM),随后以5μl/分钟的流速上样以实现偶联蛋白的大约10个响应单位(RU)。注射抗原后,注入1M乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量,在25℃以大约25μl/分钟的流速注入含0.05%聚山梨醇酯20(**TWEEN®**-20)表面活性剂的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中(PBST)Fab的二倍连续稀释物(例如,0.78nM至500nM)。使用简单一对一Langmuir结合模型(**BIACORE®**评价软件3.2版),通过同时拟合结合和解离传感图(sensorgram),计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(K_D)计算为比率k_{off}/k_{on}。参见,例如,Chen等人(J.Mol.Biol.293:865-881,1999)。如果通过以上表面等离子体共振测定法显示结合速率超过$10^6M^{-1}s^{-1}$,则可以使用荧光猝灭技术测定结合速率,其中在如光

谱仪(如配备止流法(stop-flow)的分光光度计(Aviv Instruments)或具有搅拌型比色皿的8000-系列SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic))中所测量的增加浓度的抗原存在下,所述荧光猝灭技术在25℃测量在PBS,pH 7.2中的20nM抗抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)增加或减少。

[0260] 在一些实施方案中,使用**BIACORE®** SPR测定法测量K_D,例如,如实施例1,第(A)(vii)部分中所述。在一些实施方案中,SPR测定法可以使用**BIAcore®** T200或等同装置。在一些实施方案中,将**BIAcore®** Series S CM5传感芯片(或等同传感芯片)用小鼠单克隆抗人IgG(Fc)抗体固定化并且随后在流动池上捕获抗类胰蛋白酶抗体。以流速30μl/min注射加His标签的人类胰蛋白酶β1单体(SEQ ID NO:128)的3倍连续稀释物。用3分钟结合和10分钟解离分析每份样品。在25℃进行该测定法。在每次注射后,使用3M $MgCl_2$使芯片再生。通过扣减来自以相似密度捕获无关IgG的流动池的响应单位(RU)来校正结合响应。同时拟合k_{on}和k_{off}的1:1朗缪尔模型用于动力学分析。

[0261] 2.抗体片段

[0262] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、$F(ab')_2$、Fv和scFv片段和下文描述的其他片段。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见例如Pluckthün,引自The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编著,(Springer-Verlag,New York,第269-315页(1994));还参见WO 93/16185;和美国专利号5,571,894和5,587,458。关于包含救援受体(salvage receptor)结合表位残基和具有增加的体内半寿期的Fab和$F(ab')_2$片段的讨论,参见美国专利号5,869,046。

[0263] 双体抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,所述两个抗原结合位点可以是双价或双特异性的。参见,例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人Nat.Med.9:129-134,2003;和Hollinger等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448,1993。三体抗体和四体抗体还在Hudson等人,Nat.Med.9:129-134,2003中描述。

[0264] 单结构域抗体是包含抗体的全部或一部分重链可变结构域或全部或一部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体(参见,例如美国专利号6,248,516B1)。

[0265] 抗体片段可以通过多种技术产生,所述多种技术包括但不限于蛋白酶解消化完整抗体以及由重组宿主细胞产生(例如,大肠杆菌或噬菌体),如本文所述。

[0266] 3.嵌合抗体和人源化抗体

[0267] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体例如在美国专利号4,816,567;和Morrison等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855,1984)中描述。在一个例子中,嵌合抗体包含非人类可变区(例如,源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类如猴的可变区)和人类恒定区。在又一个例子中,嵌合抗体是"类转换"抗体,其中类或亚类已经相对亲本抗体发生改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0268] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。一般,将非人抗体人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含其中HVR(或其部分)衍生自非人类抗体并且FR(或其部分)衍生自人抗体序列的一个或多个可变结构域。人源化抗体任选地也将包含人恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,将人源化抗体

中的一些FR残基置换为来自非人类抗体(例如,从其衍生HVR残基的抗体)的相应残基,例如,以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0269] 人源化抗体和制造它们的方法在例如Almagro等人Front.Biosci.13:1619-1633,2008中,并且例如还在Riechmann等人Nature 332:323-329,1988;Queen等人Proc.Natl Acad.Sci.USA 86:10029-10033,1989;美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人Methods 36:25-34,2005(描述特异性决定区(SDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498,1991(描述“表面重塑”);Dall'Acqua等人Methods 36:43-60,2005(描述“FR改组”);和Osbourn等人Methods 36:61-68,2005和Klimka等人Br.J.Cancer,83:252-260,2000(描述针对FR改组的“导向选择”方案)中综述。

[0270] 可以用于人源化的人构架区包括但不限于:使用“最佳配合”法选择的构架区(参见,例如,Sims等人,J.Immunol.151:2296,1993);从具有特定亚组的轻链可变区或重链可变区的人抗体的共有序列衍生的构架区(参见,例如,Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285,1992;和Presta等人,J.Immunol.,151:2623,1993);人成熟(体细胞突变的)构架区或人种系构架区(参见,例如,Almagro等人Front.Biosci.13:1619-1633,2008);和从筛选FR文库衍生的构架区(参见,例如,Baca等人,J.Biol.Chem.272:10678-10684,1997和Rosok等人,J.Biol.Chem.271:22611-22618,1996)。

[0271] 4.人抗体

[0272] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是人抗体。可以使用本领域已知的多种技术产生人抗体。人抗体总体上在Van Dijk等人Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74,2001和Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459,2008中描述。

[0273] 可以通过施用免疫原至转基因动物制备人抗体,其中所述转基因动物已经被修饰成响应于抗原攻击而产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。这类动物一般含有替换内源免疫球蛋白基因座或在染色体外存在或随机整合入动物染色体的全部或部分人免疫球蛋白基因座。在这类转基因小鼠中,内源免疫球蛋白基因座通常已经失活。关于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125,2005。还参见,例如,描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584;描述**HUMAB®**技术的美国专利号5,770,429;描述K-M **MOUSE®**技术的美国专利号7,041,870,和描述**VELOCIMOUSE®**技术的美国专利申请公开号US 2007/0061900。可以进一步修饰来自这类动物产生的完整抗体的人可变区,例如,通过与不同的人类恒定区组合。

[0274] 也可以通过基于杂交瘤的方法产生人抗体。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤细胞系和小鼠-人杂合骨髓瘤细胞系。(参见,例如,Kozbor J.Immunol.,133:3001,1984;Brodeur等人Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,第51-63页(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);和Boerner等人J.Immunol.,147:86,1991)。借助人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体还在Li等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562,2006中描述。额外的方法包括例如在美国专利号7,189,826(描述从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue,26(4):265-268,2006(描述人-人杂交瘤)中描述的那些。人杂交瘤技术(三体瘤技术)还在Vollmers等人Histology and Histopathology 20(3):927-937,2005,和Vollmers等人

Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27(3):185-91,2005中描述。

[0275] 也可以通过分离从人衍生的噬菌体展示文库中选择的Fv克隆可变结构域序列产生人抗体。这类可变结构域序列随后可以与目的人恒定结构域组合。下文描述用于从抗体文库选出人抗体的技术。

[0276] 5.文库衍生的抗体

[0277] 可以通过对组合文库筛选具有所需一种活性或多种活性的抗体,分离本发明的抗体。例如,本领域已知用于产生噬菌体展示文库并对这类文库筛选拥有所需结合特征的抗体的多种方法。这类方法例如在Hoogenboom等人,引自Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人编著,Human Press,Totowa,NJ,2001)中综述并且例如进一步在McCafferty等人Nature348:552-554,1990;Clackson等人Nature 352:624-628,1991;Marks等人J.Mol.Biol.222:581-597,1992;Marks等人,引自Methods in Molecular Biology248:161-175(Lo编著,Human Press,Totowa,NJ,2003);Sidhu等人J.Mol.Biol.338(2):299-310,2004;Lee等人J.Mol.Biol.340(5):1073-1093,2004;Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472,2004;和Lee等人J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132,2004中描述。

[0278] 在某些噬菌体展示方法中,VH基因和VL基因库分别由聚合酶链反应(PCR)克隆并且在噬菌体文库中随机重组,其中随后可以对所述噬菌体文库筛选结合抗原的噬菌体,如Winter等人Ann.Rev.Immunol.,12:433-455,1994中所述。噬菌体一般将抗体片段展示为单链Fv(scFv)片段或展示为Fab片段。来自已免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,无需构建杂交瘤。备选地,可以(例如,从人)克隆天然库以在不进行任何免疫的情况下,提供针对广泛类型非自身抗原的抗体和还针对自身抗原的抗体的单一来源,如Griffiths等人EMBO J,12:725-734,1993所述。最后,也可以通过从干细胞克隆未重排的V-基因区段并使用含有随机序列以编码高度可变的HVR3区并实现体外重排的PCR引物,合成地产生原初文库,如Hoogenboom等人J.Mol.Biol.,227:381-388,1992所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公布例如包括:美国专利号5,750,373和美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0279] 将从人抗体文库分离的抗体或抗体片段视为本文中的人抗体或人抗体片段。

[0280] 6.多特异性抗体

[0281] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是多特异性抗体,例如,双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中,双特异性抗体可以与类胰蛋白酶的两个不同表位结合。在某些实施方案中,这些结合特异性之一针对类胰蛋白酶,并且另一者针对任何其他抗原(例如,第二生物分子)。在一些实施方案中,双特异性抗体可以与类胰蛋白酶的两个不同表位结合。在其他实施方案中,这些结合特异性之一针对类胰蛋白酶(例如,人类胰蛋白酶,例如,人类胰蛋白酶β),并且另一者针对任何其他抗原(例如,第二生物分子,例如,IL-13、IL-4、IL-5、IL-17、IL-33、IgE、M1 prime、CRTH2或TRPA)。因此,双特异性抗体可以对类胰蛋白酶和IL-13;类胰蛋白酶和IL-4;类胰蛋白酶和IL-5;类胰蛋白酶和IL-17、或类胰蛋白酶和IL-33具有结合特异性。特别地,双特异

性抗体可以对类胰蛋白酶和IL-13或类胰蛋白酶和IL-33具有结合特异性。双特异性抗体可以被制备为全长抗体或抗体片段。

[0282] 例如，在一些情况下，双特异性抗体包含结合类胰蛋白酶的第一结合结构域和结合IL-13的第二结合结构域。在一些实施方案中，结合类胰蛋白酶的第一结合结构域可以例如包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个高变区(HVR)，所述高变区选自：(a)包含$X_1X_2GMX_3$(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列的HVR-H1，其中X_1是Asp或Ser，X_2是Tyr或Phe，并且X_3是Val或His；(b)包含FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含$RX_1X_2X_3$DWYFDV(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列的HVR-H3，其中X_1是Asn或Asp，X_2是Tyr或Asn，并且X_3是Asp或Tyr；(d)包含SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3，或者以上一个或多个HVR及其与SEQ ID NO:1-6中任一者具有至少约80％序列同一性(例如，81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性)的一个或多个变体的组合。在一些情况下，与IL-13结合的第二结合结构域可以例如包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自以下的HVR：(a)包含AYSVN(SEQ ID NO:84)的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含MIWGDGKIVYNSALKS(SEQ ID NO:85)的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含DGYYPYAMDN(SEQ ID NO:86)的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含RASKSVDSYGNSFMH(SEQ ID NO:87)的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含LASNLES(SEQ ID NO:88)的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含QQNNEDPRT(SEQ ID NO:89)的氨基酸序列的HVR-L3，或者以上一个或多个HVR及其与SEQ ID NO:84-89中任一者具有至少约80％序列同一性(例如，81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性)的一个或多个变体的组合。在一些实施方案中，第二结合结构域包含抗IL-13抗体来金珠单抗的一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR。

[0283] 例如，在一些情况下，结合类胰蛋白酶的第一结合结构域包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个高变区(HVR)，所述高变区选自：(a)包含DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含RNYDDWYFDV(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3，如hu31a.v11。在一些情况下，结合IL-13的第二结合结构域可以例如包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自以下的HVR：(a)包含AYSVN(SEQ ID NO:84)的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含MIWGDGKIVYNSALKS(SEQ ID NO:85)的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含DGYYPYAMDN(SEQ ID NO:86)的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含RASKSVDSYGNSFMH(SEQ ID NO:87)的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含LASNLES(SEQ ID NO:88)的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含QQNNEDPRT(SEQ ID NO:89)的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中，第二结合结构域包含抗IL-13抗体来金珠单抗的一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR。在一些实施方案中，第一结合结构域包含hu31a.v11的VH和/或VL的氨基酸序列并且第二结合结构域包含抗IL-13抗体来金珠单抗的VH和/或VL的氨基酸序列。

[0284] 前述双特异性抗类胰蛋白酶/抗IL-13抗体的任意者可以包含结合类胰蛋白酶的

第一结合结构域，所述第一结合结构域包含(a)VH结构域，其包含与SEQ ID NO:9具有至少80％序列同一性(例如，80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列；(b)VL结构域，其包含与SEQ ID NO:10具有至少80％序列同一性(例如，80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列；或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。前述双特异性抗类胰蛋白酶/抗IL-13抗体的任意者可以包含与IL-13结合的第二结合结构域，所述第二结合结构域包含(a)VH结构域，其包含与SEQ ID NO:90或SEQ ID NO:114具有至少80％序列同一性(例如，80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列；(b)VL结构域，其包含与SEQ ID NO:91或SEQ ID NO:115具有至少80％序列同一性(例如，80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列；或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下，第二结合结构域包含来金珠单抗的VH和/或VL结构域。

[0285] 在另一个例子中，双特异性抗体包含结合类胰蛋白酶的第一结合结构域和结合IL-33的第二结合结构域。结合IL-33的第二结合结构域可以包括例如在美国专利公开号2016/0168242中描述的任何抗IL-33抗体，所述文献通过引用方式完整并入本文作为参考。在一些实施方案中，结合类胰蛋白酶的第一结合结构域可以例如包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个高变区(HVR)，所述高变区选自：(a)包含$X_1X_2GMX_3$(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列的HVR-H1，其中X_1是Asp或Ser，X_2是Tyr或Phe，并且X_3是Val或His；(b)包含FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含$RX_1X_2X_3DWYFDV$(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列的HVR-H3，其中X_1是Asn或Asp，X_2是Tyr或Asn，并且X_3是Asp或Tyr；(d)包含SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3，或者以上一个或多个HVR及其与SEQ ID NO:1-6中任一者具有至少约80％序列同一性(例如，81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性)的一个或多个变体的组合。在一些情况下，与IL-33结合的第二结合结构域可以例如，包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自以下的HVR：(a)包含SFSMS(SEQ ID NO:120)的氨基酸序列的HVR-H1；(b)包含TISGGKTFTDYVDSVKG(SEQ ID NO:121)的氨基酸序列的HVR-H2；(c)包含ANYGNWFFEV(SEQ ID NO:122)的氨基酸序列的HVR-H3；(d)包含RASESVAKYGLSLLN(SEQ ID NO:123)的氨基酸序列的HVR-L1；(e)包含AASNRGS(SEQ ID NO:124)的氨基酸序列的HVR-L2；和(f)包含QQSKEVPFT(SEQ ID NO:125)的氨基酸序列的HVR-L3，或者以上一个或多个HVR及其与SEQ ID NO:120-125中任一者具有至少约80％序列同一性(例如，81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％同一性同一性)的一个或多个变体的组合。在一些实施方案中，第二结合结构域包含抗IL-33抗体10C12.38.H6.87Y.58I的一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR。

[0286] 例如，在一些情况下，结合类胰蛋白酶的第一结合结构域包含至少一个、两个、三

个、四个、五个或六个高变区(HVR),所述高变区选自:(a)包含DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含RNYDDWYFDV(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3,如hu31a.v11。在一些情况下,结合IL-33的第二结合结构域可以例如包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自以下的HVR:(a)包含SFSMS(SEQ ID NO:120)的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含TISGGKTFTDYVDSVKG(SEQ ID NO:121)的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含ANYGNWFFEV(SEQ ID NO:122)的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含RASESVAKYGLSLLN(SEQ ID NO:123)的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含AASNRGS(SEQ ID NO:124)的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含QQSKEVPFT(SEQ ID NO:125)的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,第二结合结构域包含抗IL-33抗体10C12.38.H6.87Y.58I的一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR。在一些实施方案中,第一结合结构域包含hu31a.v11的VH和/或VL的氨基酸序列并且第二结合结构域包含抗IL-33抗体10C12.38.H6.87Y.58I的VH和/或VL的氨基酸序列。

[0287] 前述双特异性抗类胰蛋白酶/抗IL-33抗体的任意者可以包含结合类胰蛋白酶的第一结合结构域,所述第一结合结构域包含(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:9具有至少80%序列同一性(例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:10具有至少80%序列同一性(例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。前述双特异性抗类胰蛋白酶/抗IL-33抗体的任意者可以包含与IL-33结合的第二结合结构域,所述第二结合结构域包含(a)VH结构域,其包含与SEQ ID NO:126具有至少80%序列同一性(例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列;(b)VL结构域,其包含与SEQ ID NO:127具有至少80%序列同一性(例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列或包含该序列;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下、第二结合结构域包含10C12.38.H6.87Y.58I的VH结构域和/或VL结构域。

[0288] 用于产生多特异性抗体的技术包括但不限于重组共表达具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对(参见Milstein等人Nature 305:537,1983;WO93/08829;和Traunecker等人EMBO J.10:3655,1991)和“结-扣”工程化(例如,参见美国专利号5,731,168)。也可以通过以下方式产生多特异性抗体:工程化静电转向效应用于产生抗体Fc-异二聚体分子(WO 2009/089004A1);交联两个或更多个抗体或片段(例如,参见美国专利号4,676,980,和Brennan等人Science,229:81,1985);使用亮氨酸拉链以产生双特异性抗体(例如,参见J.Immunol.,148(5):1547-1553,1992);使用“双体抗体(diabody)”技术以产生双特异性抗体片段(例如,参见Hollinger等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448,1993);和使用单链Fv(scFv)二聚体(例如,参见Gruber等人J.Immunol.152:5368,1994);以

及制备三特异性抗体，如在例如Tutt等人J.Immunol.147:60,1991中所述那样。

[0289] 本文中还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程化抗体，包括“章鱼抗体(Octopus antibody)”(参见，例如US 2006/0025576A1)。

[0290] 本文的抗体或片段还包括“双重功能Fab(Dual Acting Fab)”或“DAF”，其包含与类胰蛋白酶以及另一种不同抗原结合的抗原结合位点(例如参见，US2008/0069820)。

[0291] 结入扣法

[0292] 例如在美国专利号5,731,168、WO2009/089004、US2009/0182127、US2011/0287009、Marvin和Zhu,Acta Pharmacol.Sin.(2005)26(6):649-658和Kontermann(2005) Acta Pharmacol.Sin.26:1-9中描述了使用结入扣法作为产生多特异性抗体的方法。下文提供非限制性简要讨论。

[0293] “突出部分”指至少一个氨基酸侧链，所述氨基酸侧链从第一多肽的界面伸出并且因此可布置在毗邻界面(即第二多肽的界面)的补偿性空穴中，从而使异源多聚体稳定并且因而例如有利于异源多聚体形成胜过同型多聚体形成。突出部分可以存在于原始界面中或可以合成地引入(例如通过改变编码该界面的核酸)。在一些实施方案中，改变编码第一多肽的界面的核酸以编码突出部分。为了实现这个目的，将编码第一多肽的界面中至少一个“原始”氨基酸残基的核酸替换为编码具有比原始氨基酸残基更大的侧链体积的至少一个“输入”氨基酸残基的核酸。可以理解可能存在多于一个原始残基和相应的输入残基。多种氨基酸残基的侧链体积例如显示在US 2011/0287009的表1或美国专利号7,642,228的表1中。

[0294] 在一些实施方案中，用于形成突出部分的输入残基是选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)的天然存在氨基酸残基。在一些实施方案中，输入残基是色氨酸或酪氨酸。在一些实施方案中，用于形成突出部分的原始残基具有小侧链体积，如丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或缬氨酸。参见，例如，美国专利号7,642,228。

[0295] “空穴”指至少一个氨基酸侧链，所述氨基酸侧链从第二多肽的界面凹陷并且因此容纳毗邻的第一多肽界面上相应的突出部分。空穴可以存在于原始界面中或可以合成地引入(例如通过改变编码该界面的核酸)。在一些实施方案中，改变编码第二多肽的界面的核酸以编码空穴。为了实现这个目的，将编码第二多肽的界面中至少一个“原始”氨基酸残基的DNA替换为编码具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积的至少一个“输入”氨基酸残基的核酸。将可以理解可能存在多于一个原始残基和相应的输入残基。在一些实施方案中，用于形成空穴的输入残基是选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)的天然存在氨基酸残基。在一些实施方案中，输入残基是丝氨酸、丙氨酸或苏氨酸。在一些实施方案中，用于形成空穴的原始残基具有大侧链体积，如酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。

[0296] 突出部分“可布置”在空穴中，这意指分别在第一多肽界面和第二多肽界面上的突出部分和空穴的空间位置和突出部分和空穴的尺寸是这样的，从而突出部分可以在不明显扰动第一多肽和第二多肽在界面处正常缔合情况下位于空穴中。由于突出部分如Tyr、Phe和Trp一般不从界面的轴垂直延伸并且具有优选的构象，所以在一些情况下，突出部分与相应空穴的排布可以依赖于根据三维结构(如通过X射线结晶学或核磁共振(NMR)获得的那种)，对突出部分/空穴对建模。这可以使用本领域广泛接受的技术实现。

[0297] 在一些实施方案中，IgG1恒定区中的结突变是T366W。在一些实施方案中，IgG1恒定区中的扣突变包括选自T366S、L368A和Y407V的一个或多个突变。在一些实施方案中，IgG1恒定区中的扣突变包括T366S、L368A和Y407V。

[0298] 在一些实施方案中，IgG4恒定区中的结突变是T366W。在一些实施方案中，IgG4恒定区中的扣突变包括选自T366S、L368A和Y407V的一个或多个突变。在一些实施方案中，IgG4恒定区中的扣突变包括T366S、L368A和Y407V。

[0299] 7.抗体变体

[0300] 在某些实施方案中，构思了本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如，可能想要改善该抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性，如抑制活性。可以通过向编码抗体的核苷酸序列引入适宜修饰或通过肽合成制备该抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如，从抗体的氨基酸序列内部缺失残基和/或将残基插入所述氨基酸序列中和/或置换所述氨基酸序列中的残基。可以产生缺失、插入和置换的任意组合以获得最终构建体，只要所述最终构建体拥有想要的特征，例如，抗原结合作用。

[0301] a)置换变体、插入变体和缺失变体

[0302] 在某些实施方案中，提供具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体。用于置换诱变的目的位点包括HVR和FR。表1中在“优选的置换”的标题下显示保守性置换。表1中在“示例性置换”标题下显示并且参考氨基酸侧链类别如下文进一步描述更多基本的变化。可以将氨基酸置换引入目的抗体并且筛选产物的所需活性，例如，保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性或改善的ADCC或CDC。

[0303] 表1

[0304]

原始残基	示例性置换	优选的置换
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp、Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu，Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile

[0305]

原始残基	示例性置换	优选的置换
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0306] 氨基酸可以根据常见的侧链特性分组：

[0307] (1)疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0308] (2)中性的亲水的:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0309] (3)酸性:Asp、Glu;

[0310] (4)碱性:His、Lys、Arg;

[0311] (5)影响链方向的残基:Gly、Pro

[0312] (6)芳香族:Trp、Tyr、Phe。

[0313] 非保守性置换将使这些类别之一的成员交换为另一个类别的成员。

[0314] 一个置换变体类型涉及置换亲本抗体(例如,人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,经选择用于进一步研究的所得变体将相对于亲本抗体在某些生物学特性方面(例如,增加的亲和力、降低的免疫原性)具有修饰(例如,改善)和/或将具有亲本抗体的基本上保留的某些生物学特性。示例性置换变体是亲和力成熟抗体,可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术(如本文所述的那些技术),便利地产生所述抗体。简而言之,将一个或多个HVR残基突变并且将变体抗体在噬菌体上展示并筛选特定生物学活性(例如,结合亲和力)。

[0315] 可以在HVR中做出改变(例如,置换),例如以改善抗体亲和力。这类改变可以在HVR“热点”,即,在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子所编码的残基(参见,例如,Chowdhury,Methods Mol.Biol.207:179-196,2008)和/或接触抗原的残基中做出,同时对所产生的变体VH或VL测试结合亲和力。已经例如在Hoogenboom等人,引自Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人编著,Human Press,Totowa,NJ,2001)中描述了通过构建次级文库并从中重新选择实现亲和力成熟。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如,易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变)的任一种,将多样性引入所选择用于成熟的可变基因中。随后产生次级文库。随后筛选该文库以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法涉及针对HVR的方案,其中将几个HVR残基(例如,

一次4-6个残基)随机分组。可以特别地鉴定参与抗原结合的HVR残基,例如,使用丙氨酸扫描法诱变或建模。尤其经常靶向HVR-H3和HVR-L3。

[0316] 在某些实施方案中,可以在一个或多个HVR中进行置换、插入或缺失,只要这类改变不实质降低抗体结合抗原的能力。例如,可以在HVR中做出不实质降低结合亲和力的保守性改变(例如,如本文中提供的保守性置换)。这类改变可以例如是在HVR中的抗原接触残基外部。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR或者不予改变或含有不多于一个、两个或三个氨基酸置换。

[0317] 一种用于鉴定可以被靶向用于诱变的抗体残基或区域的有用方法称作“丙氨酸扫描诱变法”,如Cunningham等人Science 244:1081-1085,1989所述。在这种方法中,鉴定一个残基或靶残基组(例如,带电荷残基如Arg、Asp、His、Lys和Glu)并且用中性或带负电荷的氨基酸(例如,Ala或聚丙氨酸)替换以确定该抗体与抗原的相互作用是否受影响。可以在对于初始置换显示功能敏感的氨基酸位置处引入其他置换。备选地或额外地,测定抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体和抗原之间的接触点。可以将这类接触残基和邻近残基作为置换候选物打靶或消除。可以筛选变体以确定它们是否含有所需的特性。

[0318] 氨基酸序列插入包括长度从一个残基至含有成百个或更多个残基的多肽间变动的氨基端和/或羧基端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N末端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入性变体包括抗体的N末端或C末端与酶(例如,针对ADEPT的酶)或增加该抗体血清半寿期的多肽融合。

[0319] b)糖基化变体

[0320] 在某些实施方案中,改变本文提供的抗体以增加或减少抗体发生糖基化的程度。可以通过改变氨基酸序列从而产生或移除一个或多个糖基化位点,便利地实现对抗体添加或删除糖基化位点。

[0321] 在抗体包含Fc区的情况下,可以改变与之连接的糖。哺乳动物细胞产生的天然抗体一般包含分枝的双天线状低聚糖,所述低聚糖通常借助N联连接至Fc区的CH2结构域的Asn297。参见例如Wright等人TIBTECH 15:26-32,1997。低聚糖可以包括多种糖,例如,甘露糖、N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及与双天线状低聚糖结构的“茎部”中GlcNAc连接的岩藻糖。在一些实施方案中,可以修饰本发明抗体中的低聚糖以产生某些特性改善的抗体变体。

[0322] 在一个实施方案中,提供具有糖结构的抗体变体,所述糖结构缺少与Fc区(直接或间接)连接的岩藻糖。例如,这种抗体中岩藻糖的量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。通过以下方式确定岩藻糖的量:相对于如通过MALDI-TOF质谱法所测量的与Asn297连接的全部糖结构(例如复杂结构、杂合结构和高甘露糖结构)的总和,计算糖链内部Asn 297处岩藻糖的平均量,例如,如WO 2008/077546中所述。Asn297指位于Fc区内约位置297处的天冬酰胺残基(Fc区残基的Eu编号);然而,Asn297也可以位于位置297的上游或下游±3个氨基酸附近,即,位置294和位置300之间,原因在于抗体中的微小序列变异。这类岩藻糖化变体可以具有改善的ADCC功能。参见,例如,美国专利公开号2003/0157108和2004/0093621。与“去岩藻糖化”或“缺乏岩藻糖的”抗体变体相关的出版物的例子包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;

WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO 2005/053742;WO 2002/031140;Okazaki等人J.Mol.Biol.336:1239-1249,2004;Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614,2004。能够产生去岩藻糖化抗体的细胞系的例子包括在蛋白质岩藻糖化方面缺陷的Lec13 CHO细胞(Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545,1986;US 2003/0157108;和WO 2004/056312A1,尤其在实施例11)中,和敲除细胞系,如α-1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除CHO细胞(参见,例如,Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614,2004;Kanda等人Biotechnol.Bioeng.94(4):680-688,2006;和WO 2003/085107)。

[0323] 还可以为抗体变体提供双分低聚糖,例如,其中与抗体Fc区连接的双天线状低聚糖由GlcNAc对分。这类抗体变体可以具有减少的岩藻糖化和/或改善的ADCC功能。这类抗体变体的例子例如在WO 2003/011878;美国专利号6,602,684;和US 2005/0123546中描述。也提供低聚糖中至少一个半乳糖残基与Fc区连接的抗体变体。这类抗体变体可以具有改善的CDC功能。这类抗体变体例如在WO 1997/30087;WO 1998/58964和WO1999/22764中描述。

[0324] c)Fc区变体

[0325] 在某些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入本文提供的抗体的Fc区中,因而产生Fc区变体。Fc区变体可以包含人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),所述的人Fc区序列在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如,置换)。

[0326] 在某些实施方案中,本发明构思了拥有一些但非全部效应子功能的抗体变体,这使所述抗体变体成为下述应用的有利候选物,其中抗体的体内半寿期重要、但某些效应子功能(如补体和ADCC)是不必要或有害的。可以实施体外和/或体内细胞毒性测定法以证实CDC和/或ADCC活性降低/耗尽。例如,可以实施Fc受体(FcR)结合测定法以确保抗体缺少FcγR结合作用(因此可能缺少ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞—NK细胞仅表达FcγRIII,而单核细胞表达FcγRI、FcγRII和FcγRIII。Ravetch等人Annu.Rev.Immunol.9:457-492,1991的第464页上的表3中总结了造血细胞上的FcR表达。评估目的分子的ADCC活性的体外测定法的非限制性例子在美国专利号5,500,362(参见,例如,Hellstrom等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:7059-7063,1986和Hellstrom等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:1499-1502,1985);美国专利号5,821,337(参见Bruggemann等人J.Exp.Med.166:1351-1361,1987)中描述。备选地,可以使用非放射性分析方法(参见,例如,用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定法(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA;和CytoTox96®非放射性细胞毒性测定法(Promega,Madison,WI)。用于此类测定法的效应细胞括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地或额外地,可以在体内,例如,在动物模型(如Clynes等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:652-656,1998公开中的那种动物模型)中评估目的分子的ADCC活性。也可以实施C1q结合测定法以证实抗体不能结合C1q并因此缺少CDC活性。参见,例如,WO2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可以进行CDC测定法(参见,例如,Gazzano-Santoro等人J.Immunol.Methods 202:163,1996;Cragg等人Blood 101:1045-1052,2003;和Cragg等人Blood 103:2738-2743,2004)。也可以使用本领域已知的方法确定FcRn结合作用和体内清除率/半寿期(参见,例如,Petkova等人Intl.Immunol.18(12):1759-1769,2006)。

[0327] 效应子功能减少的抗体包括置换了一个或多个Fc区残基238、265、269、270、297、327和329(美国专利号6,737,056)的那些。这类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、

297和327的两个或更多个位置处具有置换的Fc突变体，包括残基265和297置换成丙氨酸的所谓“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0328] 描述了FcR结合作用改善或削弱的某些抗体变体。(参见，例如，美国专利号6,737,056;WO 2004/056312;和Shields等人J.Biol.Chem.9(2):6591-6604,2001)。

[0329] 在某些实施方案中，抗体变体包含具有改善ADCC的一个或多个氨基酸置换(例如，在Fc区的位置298、333和/或334处的置换)(残基的EU编号)的Fc区。

[0330] 在一些实施方案中，在Fc区内做出改变，所述改变导致变更(即改善或削弱)的C1q结合作用和/或补体依赖细胞毒性(CDC)，例如，如美国专利号6,194,551、WO 99/51642和Idusogie等人J.Immunol.164:4178-4184,2000中所述。

[0331] 在US2005/0014934中描述了半寿期增加和新生儿Fc受体(FcRn)结合作用改善的抗体，所述新生儿Fc受体负责转移母源IgG至胎儿(Guyer等人J.Immunol.117:587,1976和Kim等人J.Immunol.24:249,1994)。这些抗体包含其中具有一个或多个置换的Fc区，其中所述置换改善Fc区与FcRn的结合。这类Fc变体包括在一个或多个Fc区残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434处具有置换(例如，Fc区残基434置换)的那些(美国专利号7,371,826)。

[0332] 还参见Duncan等人Nature 322:738-40,1988;美国专利号5,648,260和号5,624,821;和WO 94/29351，它们涉及Fc区变体的其他例子。

[0333] d)半胱氨酸工程化抗体变体

[0334] 在某些实施方案中，可能想要产生半胱氨酸工程化的抗体，例如，“硫代MAb”，其中所述抗体的一个或多个残基用半胱氨酸残基置换。在具体的实施方案中，置换的残基出现在抗体的可及位点处。通过用半胱氨酸置换这些残基，因而将反应性巯基安置在抗体的可及位点处并且可以用来使抗体缀合至其他部分，如药物部分或接头-药物部分以产生免疫缀合物，如本文中进一步所述。在某些实施方案中，可以用半胱氨酸置换以下残基的任何一个或多个：轻链的V205(Kabat编号)；重链的A118(EU编号)；和重链Fc区的S400(EU编号)。可以例如美国专利号7,521,541中所述那样产生半胱氨酸工程化的抗体。

[0335] e)抗体衍生物

[0336] 在某些实施方案中，可以进一步修饰本文提供的抗体以含有本领域已知并轻易可获得的额外的非蛋白质部分。适于抗体衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚1,3-二氧戊环、聚1,3,6-三噁烷、亚乙基/马来酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、和葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如、丙三醇)、聚乙烯醇和它们的混合物。聚乙二醇丙醛可以具有制造方面的优点，原因在于其在水中的稳定性。这种聚合物可以具有任何分子量，并可以是分枝或不分枝的。与抗体连接的聚合物的数目可以变动，并且如果连接多于一个聚合物，它们可以是相同或不同的分子。通常，用于衍生化的聚合物的数目和/或类型可以基于以下考虑事项确定，包括但不限于待改善的抗体特定特性或功能、抗体衍生物是否将用于定义情况下的疗法中等。

[0337] 在另一个实施方案中，提供了抗体和非蛋白质部分的缀合物，其中所述非蛋白质部分可以通过暴露于辐射而选择性加热。在一个实施方案中，非蛋白质部分是碳纳米管

(Kam等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605,2005)。辐射可以具有任何波长,并包括但不限于这样的波长,所述波长不伤害普通细胞,但是使非蛋白质部分加热至杀伤临近于抗体-非蛋白质部分的细胞的温度。

[0338] B.重组方法和组合物

[0339] 可以使用重组方法和组合物产生抗体,例如,如美国专利号4,816,567中所述。在一个实施方案中,提供分离的核酸,其编码本文所述的抗类胰蛋白酶抗体。这种核酸可以编码构成抗体VL的氨基酸序列和/或构成抗体VH的氨基酸序列(例如,抗体的轻链和/或重链)。在又一个实施方案中,提供一种或多种包含这种核酸的载体(例如,表达载体)。在又一个实施方案中,提供包含这种核酸的宿主细胞。在这样一个实施方案中,宿主细胞包含以下载体(例如,已经用其转化):(1)包含核酸的载体,所述核酸编码构成抗体的VL的氨基酸序列和构成抗体的VH的氨基酸序列,或(2)包含核酸的第一载体,所述核酸编码构成抗体的VL的氨基酸序列,和包含核酸的第二载体,所述核酸编码构成抗体的VH的氨基酸序列。在一个实施方案中,宿主细胞是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、293细胞或淋巴样细胞(例如,Y0、NS0、Sp20细胞)。在一个实施方案中,提供一种产生抗类胰蛋白酶抗体的方法,其中所述方法包括在适于表达抗体的条件下培养如上文提供的宿主细胞,所述宿主细胞包含编码抗体的核酸,和任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0340] 为了重组产生抗类胰蛋白酶抗体,将编码抗体的核酸(例如,如上文所述)分离并插入一种或多种载体中用于宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规方法(例如,通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针),轻易地分离这种核酸并将其测序。

[0341] 克隆或表达编码抗体的载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,可以在细菌中产生抗体,尤其当不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见,例如,美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523。还参见Charlton,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编著,Humana Press,Totowa,NJ,2003),第245-254页,其描述在大肠杆菌中表达抗体片段。在表达后,可以将抗体从细菌细胞糊状物分离于可溶性级分中并且可以进一步纯化抗体。

[0342] 除原核生物之外,真核微生物如丝状真菌或酵母是编码抗体的载体的合适克隆宿主或表达宿主,包括其糖基化途径已经“人源化”的真菌和酵母菌株,导致产生具有部分或完全人类糖基化模式的抗体。参见Nat.Biotech.22:1409-1414,2004和Li等人Nat.Biotech.24:210-215,2006。

[0343] 表达糖基化抗体的合适宿主细胞还源自多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的例子包括植物细胞和昆虫细胞。已经鉴定了可以与昆虫细胞一起使用、尤其用于转染草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞的许多杆状病毒毒株。

[0344] 也可以利用植物细胞培养物作为宿主。参见,例如,美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(它们描述在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0345] 也可以使用脊椎动物细胞作为宿主。例如,可以使用适应于悬浮培养的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他例子是由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(如Graham等人J.Gen Virol.36:59,(1977)中所述的293或293细胞);幼仓鼠肾细胞

(BHK)；小鼠支持细胞(如在例如Mather,Biol.Reprod.23:243-251,(1980)中所述的TM4细胞)；猴肾细胞(CV1)；非洲绿猴肾细胞(VERO-76)；人宫颈癌细胞(HELA)；犬肾细胞(MDCK;布法罗大鼠肝脏细胞(BRL 3A)；人肺细胞(W138)；人肝脏细胞(Hep G2)；小鼠乳腺瘤细胞(MMT060562)；TRI细胞，如在例如Mather等人Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68,(1982)中所述；MRC 5细胞和FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞，包括DHFR⁻CHO细胞(Urlaub等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216,1980)；和骨髓瘤细胞系如Y0、NS0和Sp2/0。关于适于产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的综述，参见，例如，Yazaki等人Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编著,Humana Press,Totowa,NJ),第255-268页,2003。

[0346] C.测定法

[0347] 可以通过本领域已知的多种测定法，鉴定、筛选或表征本文提供的抗类胰蛋白酶抗体的物理/化学特性和/或生物学活性。

[0348] 1.结合测定法和其他测定法

[0349] 在一个方面，例如，通过已知的方法如ELISA、蛋白质印迹法、表面等离子体共振(SPR)等，对本发明的抗类胰蛋白酶抗体测试抗原结合活性。

[0350] 在另一个方面，竞争测定法可以用来鉴定与本发明的抗类胰蛋白酶抗体竞争结合类胰蛋白酶的抗体。在某些实施方案中，这种竞争性抗体与本发明的抗类胰蛋白酶抗体所结合的相同表位(例如，线性表位或构象表位)结合。在某些实施方案中，这种竞争性抗体与本发明的抗类胰蛋白酶抗体所结合的重叠性表位(例如，线性表位或构象表位)结合。Morris“Epitope Mapping Protocols,”引自Methods in Molecular Biology第66卷(Humana Press,Totowa,NJ),1996中提供用于定位与抗体结合的表位的详细示例性方法。

[0351] 在示例性竞争测定法中，将固定的类胰蛋白酶在溶液中温育，所述溶液包含与类胰蛋白酶结合的第一标记抗体和正受测试与第一抗体竞争结合类胰蛋白酶的能力的第二未标记抗体。第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照，将固定的类胰蛋白酶在包含第一标记抗体但是不包含第二未标记抗体的溶液中温育。在允许第一抗体与类胰蛋白酶结合的条件下温育后，移除过多的未结合的抗体，并且测量与固定的类胰蛋白酶结合的标记物的量。如果与固定的类胰蛋白酶结合的标记物的量在测试样品中相对于对照样品实质降低，则这表示第二抗体正在与第一抗体竞争结合类胰蛋白酶。参见Harlow等人Antibodies: A Laboratory Manual第14章(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY),1988。

[0352] 在另一个实施方案中，通过表位分拣法测定两种抗体竞争与相同表位的结合。例如，将标记的抗原固定在固态表面上，并且与饱和量的第一抗体反应。随后添加第二竞争性抗体。如通过例如**OCTET®** (ForteBio)或其他生物层干涉测量(BLI)技术检测到由第二抗体所致的任何额外结合则表示两种抗体与不同的非重叠性表位结合。无额外结合表示两种抗体与相同或重叠性表位结合。几种其他方法，包括ELISA、大小排阻色谱、结晶学、HDX-MS、诱变和其他SPR方法，也可以用来显示两种抗体与相同或重叠性表位结合。相似的技术可以用来确定一种抗体是否交叉阻断本发明的抗体或被本发明的抗体交叉阻断。

[0353] 2.活性测定法

[0354] 在一个方面，提供了用于鉴定具有生物学活性的抗类胰蛋白酶抗体的测定法。生

物学活性可以例如包括与类胰蛋白酶(例如,血流中或气道中的类胰蛋白酶)或其肽片段在体内、在体外或离体结合。在其他实施方案中,生物学活性可以包括阻断或中和类胰蛋白酶。例如,在一些实施方案中,生物学活性可以包括阻断或中和类胰蛋白酶蛋白酶解活性。还提供在体内和/或在体外具有这类生物学活性的抗体。在某些实施方案中,对本发明的抗体测试这种生物学活性。

[0355] 例如,在一些实施方案中,在类胰蛋白酶酶促测定法中,例如,使用肽底物(例如,合成肽S-2288),例如,如实施例(例如,实施例1、尤其第(A)(viii)(a)部分)中所述那样,或使用本领域已知的方法(参见,例如,Fukuoka等人J.Immunol.176:3165-3172,2006),对本发明的抗体测试抑制类胰蛋白酶活性。在一些实施方案中,类胰蛋白酶酶促测定法中对类胰蛋白酶活性的抑制在中性pH或其左右(例如,pH 7左右,例如,约pH 7、约pH 7.4或约pH 8)进行。在其他实施方案中,类胰蛋白酶酶促测定法中对类胰蛋白酶活性的抑制在酸性pH或其左右(例如,约pH 6.0,例如,约pH 4.0、约pH 5.0、约pH 6.0或约pH 6.5)进行。

[0356] 在其他实施方案中,对本发明的抗体测试破坏具有四聚体结构的类胰蛋白酶(如,存在于肥大细胞分泌型颗粒中或从其中释放的成熟类胰蛋白酶)形成单体的能力,这可以使用本领域已知的任何合适方法(包括凝胶过滤色谱(例如,**SUPEROSE®**12凝胶过滤色谱))确定。参见,例如,Fukuoka等人J.Immunol.176:3165-3172,2006。

[0357] 在另外的其他实施方案中,对本发明的抗体测试抑制类胰蛋白酶刺激的增生和/或人主气道平滑肌细胞收缩的能力,例如实施例1中所述那样。

[0358] 在另外的其他实施方案中,对本发明的抗体测试抑制(例如,受类胰蛋白酶和/或IgE刺激的)肥大细胞脱颗粒和/或组胺释放的能力。例如实施例1中描述了此类测定法。

[0359] 在一些实施方案中,例如,在活性类胰蛋白酶测定法中(参见,例如,图15和实施例6),例如,在(例如,通过静脉内或皮下注射)施用抗体至受试者后从受试者获得的样品中(例如,支气管肺泡灌洗液),对本发明的抗体测试抑制活性类胰蛋白酶的能力。

[0360] 仍在其他实施方案中,例如,在总类胰蛋白酶测定法中(参见,例如,图15和实施例6),例如,在(例如,通过静脉内或皮下注射)施用抗体至受试者后从受试者获得的样品中(例如,支气管肺泡灌洗液),对本发明的抗体测试调节(例如,升高或降低)总类胰蛋白酶水平的能力。

[0361] D.免疫缀合物

[0362] 本发明也提供免疫缀合物,所述免疫缀合物包含与一种或多种细胞毒性剂如化疗药或药物、生长抑制剂、毒素(例如,细菌源、真菌源、植物源或动物源的蛋白质毒素、酶活性毒素)或放射性同位素缀合的本文抗类胰蛋白酶抗体。

[0363] 在一个实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体与一种或多种药物缀合,所述药物包括但不限于类美登素(maytansinoid)(参见美国专利号5,208,020、5,416,064和欧洲专利EP 0 425 235B1);澳瑞司他汀如单甲基澳瑞司他汀药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利号5,635,483和5,780,588和7,498,298);海兔毒素(dolastatin);刺孢霉素或其衍生物(参见美国专利号5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001和5,877,296;Hinman等人Cancer Res.53:3336-3342,1993;和Lode等人Cancer Res.58:2925-2928,1998);蒽环类如柔红霉素或多柔比星(参见Kratz等人Current Med.Chem.13:477-523,2006;Jeffrey等人Bioorganic&

Med.Chem.Letters 16:358-362,2006;Torgov等人Bioconj.Chem.16:717-721,2005;Nagy等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834,2000;Dubowchik等人Bioorg.&Med.Chem.Letters 12:1529-1532,2002;King等人J.Med.Chem.45:4336-4343,2002;和美国专利号6,630,579);甲氨蝶呤;长春地辛;紫杉烷如多西紫杉醇、紫杉醇、拉罗他赛(larotaxel)、替司他赛(tesetaxel)和ortataxel;单端孢霉烯族化合物;和CC1065。

[0364] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含与酶活性毒素或其片段缀合的如本文所述的抗体,所述酶活性毒素或其片段包括但不限于白喉毒素A链、白喉毒素的无结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒蛋白A链、α-帚曲菌素、油桐(Aleurites fordii)蛋白、香石竹毒蛋白、垂序商陆(Phytolaca americana)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-5)、苦瓜(momordica charantia)抑制蛋白、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制蛋白、多花白树毒蛋白、丝林霉素(丝林霉素(mitogellin))、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢霉烯类。

[0365] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含与放射性原子缀合以形成放射缀合物的如本文所述的抗体。多种放射性同位素可用于产生放射缀合物。例子包括At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}和Lu的放射性同位素。当放射缀合物用于检测时,它可以包含用于闪烁法研究的放射性原子,例如锝-99m(tc99m)或I^{123},或核磁共振(NMR)成像的自旋标记物(也称作磁共振成像,mri),再次如碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0366] 可以使用多种双官能蛋白质偶联剂产生抗体和细胞毒性剂的缀合物,所述双官能蛋白质偶联剂如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酯的双官能衍生物(如己二亚氨盐酸二甲酯)、活性酯(如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(如戊二醛)、双-叠氮化合物(如双(对-重氮盐苯甲酰基)己二胺)、双-重氮盐衍生物(如双-(对-重氮盐苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如2,6-二异氰酸甲苯酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以如Vitetta等人Science 238:1098,1987中所述那样制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14-标记的1-异硫氰酸根合苄基-3-甲基二乙三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于放射性核素与抗体缀合的示例性螯合剂。参见WO 94/11026。接头可以是促进细胞毒性剂在细胞中释放的“可切割接头”。例如,可以使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、光不稳定接头、二甲基接头或含有二硫键的接头(参见例如,Chari等人Cancer Res.52:127-131,1992;美国专利号5,208,020)。

[0367] 免疫缀合物或ADC在本文中明确地构思,但不限于采用交联剂试剂制备的这类缀合物,所述交联剂试剂包括但不限于BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC、和磺基-SMPB、和可商业获得的SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯砜)苯甲酸酯)(例如,来自Pierce Biotechnology,Inc.,Rockford,IL.,U.S.A)。

[0368] E.用于诊断和检测的方法和组合物

[0369] 在某些实施方案中,本文提供的任一种抗类胰蛋白酶抗体可用于检测生物样品中类胰蛋白酶的存在。如本文所用,术语“检测”涵盖定量性或定性检测。在某些实施方案中,

生物样品包括细胞或组织，后者包括但不限于肥大细胞、嗜碱性粒细胞、上皮细胞或肺组织(例如，支气管平滑肌)。在某些实施方案中，生物样品包括血液(例如，全血、血清或血浆)、痰、支气管肺泡灌洗液或吸鼻样品。

[0370] 在一个实施方案中，提供在诊断或检测方法中使用的抗类胰蛋白酶抗体。在又一个方面，提供一种检测类胰蛋白酶在生物样品中存在的方法。在某些实施方案中，该方法包括：使生物样品与如本文所述的抗类胰蛋白酶抗体在允许抗类胰蛋白酶抗体与类胰蛋白酶结合的条件下接触，并且检测抗类胰蛋白酶抗体和类胰蛋白酶之间是否形成复合物。这种方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中，抗类胰蛋白酶抗体用来选择适于用抗类胰蛋白酶抗体治疗的受试者，例如其中类胰蛋白酶是选择患者的生物标记物。

[0371] 可以使用本发明抗体诊断的示例性疾病包括肺部疾病(例如，哮喘(例如，高Th2哮喘或低Th2哮喘)、气道高反应性或COPD)、自体免疫疾病(例如，类风湿性关节炎、银屑病、嗜酸粒细胞性食管炎、IBD和克罗恩病)、炎性疾病(例如，慢性特发性荨麻疹(CIU或CSU)、特应性皮炎或过敏性鼻炎)、纤维化疾病(例如，IPF)、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、淋巴细胞性疾病、与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病，或类胰蛋白酶相关的疾病或类胰蛋白酶介导的疾病。

[0372] 例如，在一些情况下，本发明的抗体可以用来诊断或检测过敏反应(例如，急性全身过敏)或肥大细胞增生症(例如，非急性全身性肥大细胞增生症)，例如，如Schwartz等人Immunol.Allergy Clin.N.Am.26:451-463,2006)。本发明的抗体可以例如在ELISA中用来检测总类胰蛋白酶、前类胰蛋白酶和/或成熟类胰蛋白酶的水平。在一些实施方案中，本发明的抗体可以用作ELISA中的捕获抗体。在其他实施方案中，本发明的抗体可以用作ELISA中的检测抗体。在具体的实施方案中，血清或血浆中总类胰蛋白酶的正常参考水平可以是约1-15ng/mL(例如，约1ng/mL、约2ng/mL、约3ng/mL、约4ng/mL、约5ng/mL、约6ng/mL、约7ng/mL、约8ng/mL、约9ng/mL、约10ng/mL、约11ng/mL、约12ng/mL、约13ng/mL、约14ng/mL或约15ng/mL)。在一些情况下，相对于总类胰蛋白酶正常参考水平的升高用作类胰蛋白酶相关疾病的诊断指标。在一些实施方案中，血清或血浆中成熟类胰蛋白酶的正常参考水平可以<1ng/mL。在一些实施方案中，相对于成熟类胰蛋白酶正常参考水平的升高可以用作类胰蛋白酶相关疾病的诊断指标。

[0373] 在某些实施方案中，提供标记的抗类胰蛋白酶抗体。标记物包括但不限于，直接检测到的标记物或部分(如荧光、发色、电子致密、化学发光和放射性标记)，以及间接检测到(例如借助酶促反应或分子相互作用)的部分，如酶或配体。示例性标记物包括但不限于放射性同位素^{32}P、^{14}C、^{125}I、^{3}H和^{131}I、荧光团如稀土元素螯合物或荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹磺酰、伞形酮、萤光素酶，例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利号4,737,456)、萤光素、2,3-二氢二氮杂萘二酮、辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、杂环氧化酶如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶，其与利用过氧化氢来氧化染料前体的酶如HRP、乳过氧化物酶或微过氧化物酶偶联，生物素/抗生物素蛋白、自旋标记物、噬菌体标记物、稳定自由基等。

[0374] F.药物制剂

[0375] 通过以下方式制备冻干制剂或水溶液剂形式的本发明抗类胰蛋白酶抗体的药物制剂:将具有所需纯度的这种抗体与一种或多种任选的可药用载体混合(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编著,1980)。可药用载体总体上在所用的剂量和浓度对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂(包括抗坏血酸和甲硫氨酸);防腐剂(如十八烷基苄基二甲基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵、苯扎溴铵;苯酚、丁醇或苄醇;烷基尼泊金酯如尼泊金甲酯或丙酯;儿茶酚;雷琐辛;环己醇;3-戊醇和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他糖包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖、甘露糖、海藻糖或山梨糖;成盐反离子如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白质络合物)和/或非离子表面活性剂如聚乙二醇(PEG)。本文中的示例性可药用载体还包括间质药物分散剂如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如,人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,如rHuPH20(**HYLENEX®**,Baxter International,Inc.)。在美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中描述了某些示例性sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20。在一个方面,sHASEGP与一种或多种额外的糖胺聚糖酶如软骨素酶组合。

[0376] 示例性冻干抗体制剂在美国专利号6,267,958中描述。水质抗体制剂包括在美国专利号6,171,586和WO 2006/044908中描述的那些制剂,后类制剂包含组氨酸-乙酸盐缓冲剂。

[0377] 本文中的制剂也可以根据正在接受治疗的特定适应症需要而含有多于一种有效成分,优选地是具有并未相互不利影响的互补活性的那些有效成分。例如,可能想要进一步提供白介素-13(IL-13)结合拮抗剂、白介素-17(IL-17)轴结合拮抗剂、白介素-5(IL-5)轴结合拮抗剂、IL-33轴结合拮抗剂、M1 prime拮抗剂、IgE拮抗剂、TRPA1拮抗剂、CRTH2拮抗剂、支气管扩张剂或哮喘症状控制药物、免疫调节剂、皮质类固醇、Th2途径抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂或磷酸二酯酶抑制剂。在一些实施方案中,IL-13轴结合拮抗剂是抗IL-13抗体,例如,来金珠单抗。在一些实施方案中,IL-5轴结合拮抗剂是IL-5结合拮抗剂或IL-5受体结合拮抗剂。在一些实施方案中,IL-33轴结合拮抗剂是IL-33结合拮抗剂或ST2结合拮抗剂。在一些实施方案中,IL-33结合拮抗剂是抗IL-33抗体。在一些情况下,M1 prime拮抗剂是quilizumab。在一些情况下,IgE拮抗剂是奥马佐单抗**(XOLAIR®)**。这种有效成分以有效用于预期目的的量适当地存在。

[0378] 有效成分可以包埋于例如分别通过凝聚技术或界面聚合而制备的微胶囊(例如,羟甲基纤维素微胶囊或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、胶态药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)或粗乳液(macroemulsion)中。此类技术在Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编著,1980中公开。

[0379] 可以制备持续释放制品。持续释放制品的合适例子包括含有抗体的固态疏水性聚合物半通透性基质,所述基质处于成型制品(例如,膜或微胶囊)形式。

[0380] 待用于体内施用的制剂通常是无菌的。可以例如通过借助无菌滤膜过滤轻易地实现无菌性。

[0381] 本发明提供包含抗氧化剂的药物组合物。这类组合物可以用来减少本文所述抗体

(例如,抗类胰蛋白酶抗体,如hu31A.v11)的氧化。在一些情况下,包含抗氧化剂以减少色氨酸残基(例如,可变区的HVR区或FR区中的色氨酸残基)的氧化。在具体的情况下,包含抗氧化剂以减少抗类胰蛋白酶抗体的HVR-H3残基(例如,hu31A.v11中的W100)的氧化。在一些情况下,组合物中包含抗氧化剂以减少甲硫氨酸残基(例如抗体(例如,抗类胰蛋白酶抗体)的Fc区内的甲硫氨酸残基,如(例如,hu31A.v11的)Fc残基M251、M357、和/或M427)的氧化。

[0382] 在一些情况下,药物组合物包含本文所述的任何抗体和抗氧化剂。在一些情况下,抗体易遭氧化(例如,在一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)色氨酸或甲硫氨酸残基处)。可以使用任何合适的抗氧化剂。例如,在一些情况下,组合物包括一种或多种抗氧化剂(例如,1、2、3、4、5、6、7、8或9种抗氧化剂),所述氧化剂选自N-乙酰色氨酸(例如,N-乙酰DL-色氨酸或N-乙酰D-色氨酸),色氨酸、甲硫氨酸(例如,L-甲硫氨酸)、半胱氨酸、谷胱甘肽、硫代山梨糖醇、抗坏血酸、一硫代甘油、环糊精、Trolox、吡哆醇、多元醇(例如,甘露糖醇)、蔗糖、金属螯合剂(例如,EDTA)及其组合(例如,N-乙酰色氨酸和甲硫氨酸的组合)。在一些情况下,抗氧化剂是N-乙酰色氨酸(例如,N-乙酰DL-色氨酸或N-乙酰D-色氨酸)。在其他情况下,抗氧化剂是甲硫氨酸(例如,L-甲硫氨酸或D-甲硫氨酸)。在具体的情况下,组合物包含N-乙酰色氨酸(例如,N-乙酰DL-色氨酸或N-乙酰D-色氨酸)和甲硫氨酸(例如,L-甲硫氨酸或D-甲硫氨酸)。在一些情况下,N-乙酰色氨酸减少或防止抗体中色氨酸的氧化。在一些情况下,甲硫氨酸减少或防止抗体中甲硫氨酸的氧化。

[0383] 药物组合物可以包含任何合适浓度的抗氧化剂以减少或消除氧化。例如,多元醇(例如,甘露糖醇)或蔗糖的浓度可以是约1%(w/v)至约25%(w/v),例如,约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%或约25%(w/v)。在具体的情况下,多元醇(例如,甘露糖醇)或蔗糖的浓度可以是约15%(w/v)。在另一个例子中,金属螯合剂(例如,EDTA)的浓度可以是约0.01%(w/v)至约1%(w/v),例如,约0.01%、约0.02%、约0.03%、约0.04%、约0.05%、约0.06%、约0.07%、约0.08%、约0.09%、约0.1%、约0.15%、约0.2%、约0.25%、约0.3%、约0.4%、约0.45%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%或约1%(w/v)。在具体的情况下,金属螯合剂(例如,EDTA)的浓度可以是约0.4%(w/v)。在又一个例子中,甲硫氨酸和/或色氨酸的浓度可以是约0.1mg/ml至约10mg/ml,例如,约0.1mg/ml、约0.5mg/ml、约1mg/ml、约2mg/ml、约3mg/ml、约4mg/ml、约5mg/ml、约6mg/ml、约7mg/ml、约8mg/ml、约9mg/ml或约10mg/ml。在一些情况下,甲硫氨酸和/或色氨酸的浓度是约2mg/ml。

[0384] 例如,在一些情况下,本发明提供一种药物组合物,其包含:

[0385] (i)与人类胰蛋白酶结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中抗体包含以下六个高变区(HVR):(a)包含DYGMV(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含FISSGSSTVYYADTMKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含RNYDDWYFDV(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SASSSVTYMY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含RTSDLAS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含QHYHSYPLT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3;(ii)N-乙酰色氨酸(例如,N-乙酰DL-色氨酸或N-乙酰D-色氨酸);和(iii)甲硫氨酸(例如,L-甲硫氨酸或D-甲硫氨酸)。

[0386] 任何合适浓度的N-乙酰色氨酸(例如,N-乙酰DL-色氨酸或N-乙酰D-色氨酸)可以用于本文所述的任何组合物中。在一些情况下,N-乙酰色氨酸(例如,N-乙酰DL-色氨酸或N-

乙酰D-色氨酸)的浓度是约0.05mM至约20mM(例如,约0.05mM至约20mM、约0.05mM至约19mM、约0.05mM至约18mM、约0.05mM至约17mM、约0.05mM至约16mM、约0.05mM至约15mM、约0.05mM至约14mM、约0.05mM至约13mM、约0.05mM至约13mM、约0.05mM至约12mM、约0.05mM至约11mM、约0.05mM至约10mM、约0.05mM至约9mM、约0.05mM至约8mM、约0.05mM至约7mM、约0.05mM至约6mM、约0.05mM至约5mM、约0.05mM至约4mM、约0.05mM至约3mM、约0.05mM至约2mM、约0.05mM至约1mM、约0.1mM至约20mM、约0.1mM至约19mM、约0.1mM至约18mM、约0.1mM至约17mM、约0.1mM至约16mM、约0.1mM至约15mM、约0.1mM至约14mM、约0.1mM至约13mM、约0.1mM至约13mM、约0.1mM至约12mM、约0.1mM至约11mM、约0.1mM至约10mM、约0.1mM至约9mM、约0.1mM至约8mM、约0.1mM至约7mM、约0.1mM至约6mM、约0.1mM至约5mM、约0.1mM至约4mM、约0.1mM至约3mM、约0.1mM至约2mM、约0.1mM至约1mM、约0.1mM至约0.9mM、约0.1至约0.8mM、约0.1mM至约0.7mM、约0.1mM至约0.6mM、约0.1mM至约0.5mM、约0.1mM至约0.4mM、约0.1mM至约0.3mM、约0.2mM至约20mM、约0.2mM至约19mM、约0.2mM至约18mM、约0.2mM至约17mM、约0.2mM至约16mM、约0.2mM至约15mM、约0.2mM至约14mM、约0.2mM至约13mM、约0.2mM至约13mM、约0.2mM至约12mM、约0.2mM至约11mM、约0.2mM至约10mM、约0.2mM至约9mM、约0.2mM至约8mM、约0.2mM至约7mM、约0.2mM至约6mM、约0.2mM至约5mM、约0.2mM至约4mM、约0.2mM至约3mM、约0.2mM至约2mM、约0.2mM至约1mM、约0.2mM至约0.9mM、约0.2至约0.8mM、约0.2mM至约0.7mM、约0.2mM至约0.6mM、约0.2mM至约0.5mM、约0.2mM至约0.4mM、约0.2mM至约0.3mM、约0.3mM至约20mM、约0.3mM至约19mM、约0.3mM至约18mM、约0.3mM至约17mM、约0.3mM至约16mM、约0.3mM至约15mM、约0.3mM至约14mM、约0.3mM至约13mM、约0.3mM至约13mM、约0.3mM至约12mM、约0.3mM至约11mM、约0.3mM至约10mM、约0.3mM至约9mM、约0.3mM至约8mM、约0.3mM至约7mM、约0.3mM至约6mM、约0.3mM至约5mM、约0.3mM至约4mM、约0.3mM至约3mM、约0.3mM至约2mM、约0.3mM至约1mM、约0.3mM至约0.9mM、约0.3至约0.8mM、约0.3mM至约0.7mM、约0.3mM至约0.6mM、约0.3mM至约0.5mM或约0.3mM至约0.4mM)。在一些情况下,N-乙酰色氨酸处于约0.1mM至约1mM(例如,约0.1mM、约0.2mM、约0.3mM、约0.4mM、约0.5mM、约0.6mM、约0.7mM、约0.8mM、约0.9mM或约1mM)的浓度。在具体的情况下,N-乙酰色氨酸(例如,N-乙酰DL-色氨酸或N-乙酰D-色氨酸)的浓度是约0.3mM。在具体的情况下,N-乙酰色氨酸是或N-乙酰DL-色氨酸。

[0387] 任何合适浓度的甲硫氨酸(例如,L-甲硫氨酸或D-甲硫氨酸)可以用于本文所述的任何组合物中。例如,在一些情况下,甲硫氨酸(例如,L-甲硫氨酸或D-甲硫氨酸)的浓度是约0.1mM至约30mM(例如,约0.1mM至约30mM、约0.1mM至约25mM、约0.1mM至约20mM、约0.1mM至约19mM、约0.1mM至约18mM、约0.1mM至约17mM、约0.1mM至约16mM、约0.1mM至约15mM、约0.1mM至约14mM、约0.1mM至约13mM、约0.1mM至约13mM、约0.1mM至约12mM、约0.1mM至约11mM、约0.1mM至约10mM、约0.1mM至约9mM、约0.1mM至约8mM、约0.1mM至约7mM、约0.1mM至约6mM、约0.1mM至约5mM、约0.1mM至约4mM、约0.1mM至约3mM、约0.1mM至约2mM、约0.1mM至约1mM、约1mM至约20mM、约1mM至约19mM、约1mM至约18mM、约1mM至约17mM、约1mM至约16mM、约1mM至约15mM、约1mM至约14mM、约1mM至约13mM、约1mM至约13mM、约1mM至约12mM、约1mM至约11mM、约1mM至约10mM、约1mM至约9mM、约1mM至约8mM、约1mM至约7mM、约1mM至约6mM、约1mM至约5mM、约1mM至约4mM、约1mM至约3mM、约1mM至约2mM、约2mM至约20mM、约2mM至约19mM、约2mM至约18mM、约2mM至约17mM、约2mM至约16mM、约2mM至约15mM、约2mM至约14mM、约2mM至约

13mM、约.2mM至约13mM、约2mM至约12mM、约2mM至约11mM、约2mM至约10mM、约2mM至约9mM、约2mM至约8mM、约2mM至约7mM、约2mM至约6mM、约2mM至约5mM、约2mM至约4mM、约2mM至约3mM、约5mM至约20mM、约5mM至约19mM、约5mM至约18mM、约5mM至约17mM、约5mM至约16mM、约5mM至约15mM、约5mM至约14mM、约5mM至约13mM、约5mM至约13mM、约5mM至约12mM、约5mM至约11mM、约5mM至约10mM、约5mM至约9mM、约5mM至约8mM、约5mM至约7mM或约5mM至约6mM)。在一些情况下,甲硫氨酸(例如,L-甲硫氨酸或D-甲硫氨酸)处于约1mM至约10mM(例如,约1mM、约2mM、约3mM、约4mM、约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM或约10mM)的浓度。在具体的情况下,甲硫氨酸(例如,L-甲硫氨酸或D-甲硫氨酸)的浓度是约5mM。在其他情况下,甲硫氨酸的浓度是约10mM。在具体的情况下,甲硫氨酸是L-甲硫氨酸。

[0388] 在一些情况下,例如,相对于抗氧化剂不存在情况下该残基处的氧化百分数,抗氧化剂(例如,N-乙酰色氨酸(例如,N-乙酰DL-色氨酸)和/或甲硫氨酸(例如,L-甲硫氨酸或D-甲硫氨酸))的存在降低抗类胰蛋白酶抗体在特定残基(例如,色氨酸残基或甲硫氨酸残基,例如,在HVR-H3残基中(例如,hu31A.v11的VH结构域的W100)或在Fc残基中(例如,(例如,hu31A.v11的)Fc残基M251、M357和/或M427)处的氧化百分数约1%、约2%、约5%、约6%、约10%、约15%、约20%、约25%、约28%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更大。

[0389] 在其中抗体包含在HVR-H3(例如,hu31A.v11)中对氧化敏感的VH结构域W100残基情况下,在一些情况下,HVR-H3中的VH结构域W100残基具有小于约35%(例如,小于35%、小于34%、小于33%、小于32%、小于31%、小于30%、小于29%、小于28%、小于27%、小于26%、小于25%、小于24%、小于23%、小于22%、小于21%、小于20%、小于19%、小于18%、小于17%、小于16%、小于15%、小于14%、小于13%、小于12%、小于11%、小于10%、小于9%、小于8%、小于7%、小于6%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%、小于1%或更小)的氧化百分数。例如,在一些情况下,HVR-H3中的W100残基具有小于约35%的氧化百分数。在其他情况下,HVR-H3中的W100残基具有小于约25%的氧化百分数。在另外其他情况下,HVR-H3中的W100残基具有小于约15%的氧化百分数。仍在其他情况下,HVR-H3中的W100残基具有小于约10%的氧化百分数。在其他情况下,HVR-H3中的W100残基具有小于约5%的氧化百分数。在其他情况下,HVR-H3中的W100残基具有小于约4%、约3%、约2%或约1%的氧化百分数。

[0390] 作为一个例子,在其中抗体包括在HVR-H3中对氧化敏感的VH结构域W100残基的一些情况下,在一些情况下,HVR-H3中的VH结构域W100残基具有在约1%至约50%之间、在约1%至约45%之间、在约1%至约40%之间、在约1%至约35%之间、在约1%至约30%之间、在约1%至约25%之间、在约1%至约20%之间、在约1%至约15%之间、在约1%至约10%之间、在约1%至约5%之间、在约1%至约4%之间、在约1%至约3%之间、在约1%至约2%之间、在约5%至约50%之间、在约5%至约45%之间、在约5%至约50%之间、在约5%至约35%之间、在约5%至约30%之间、在约5%至约25%之间、在约5%至约20%之间、在约5%至约15%之间、在约5%至约10%之间、在约10%至约50%之间、在约10%至约45%之间、在约10%至约40%之间、在约10%至约35%之间、在约10%至约30%之间、在约10%至约25%之间、在约10%至约20%之间、在约10%至约15%之间、在约15%至约50%之间、在约15%

至约45％之间、在约15％至约40％之间、在约15％至约35％之间、在约15％至约30％之间、在约15％至约25％之间、在约15％至约20％之间、在约25％至约50％之间或在约30％至约50％之间的氧化百分数。

[0391] 可以例如从初始产生抗体或其药物组合物起约1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、18个月、两年或更长时间内确定氧化百分数。在一些情况下，从初始产生抗体或其药物组合物起测定氧化百分数约9个月、约12个月、约18个月或两年。

[0392] 抗体在本发明组合物中的浓度可以是例如约1mg/mL至约350mg/mL(例如，约1mg/mL至约350mg/mL、约1mg/mL至约325mg/mL、约1mg/mL至约300mg/mL、约1mg/mL至约275mg/mL、约1mg/mL至约250mg/mL、约1mg/mL至约225mg/mL、约1mg/mL至约200mg/mL、约1mg/mL至约175mg/mL、约1mg/mL至约150mg/mL、约1mg/mL至约125mg/mL、约1mg/mL至约100mg/mL、约1mg/mL至约75mg/mL、约1mg/mL至约50mg/mL、约1mg/mL至约25mg/mL、约25mg/mL至约350mg/mL、约25mg/mL至约325mg/mL、约25mg/mL至约300mg/mL、约25mg/mL至约275mg/mL、约25mg/mL至约250mg/mL、约25mg/mL至约225mg/mL、约25mg/mL至约200mg/mL、约25mg/mL至约175mg/mL、约25mg/mL至约150mg/mL、约25mg/mL至约125mg/mL、约25mg/mL至约100mg/mL、约25mg/mL至约75mg/mL、约25mg/mL至约50mg/mL、约50mg/mL至约350mg/mL、约50mg/mL至约325mg/mL、约50mg/mL至约300mg/mL、约50mg/mL至约275mg/mL、约50mg/mL至约250mg/mL、约50mg/mL至约225mg/mL、约50mg/mL至约200mg/mL、约50mg/mL至约175mg/mL、约50mg/mL至约150mg/mL、约50mg/mL至约125mg/mL、约50mg/mL至约100mg/mL、约50mg/mL至约75mg/mL、约75mg/mL至约350mg/mL、约75mg/mL至约325mg/mL、约75mg/mL至约300mg/mL、约75mg/mL至约275mg/mL、约75mg/mL至约250mg/mL、约75mg/mL至约225mg/mL、约75mg/mL至约200mg/mL、约75mg/mL至约175mg/mL、约75mg/mL至约150mg/mL、约75mg/mL至约125mg/mL、约75mg/mL至约100mg/mL、约100mg/mL至约350mg/mL、约100mg/mL至约325mg/mL、约100mg/mL至约300mg/mL、约100mg/mL至约275mg/mL、约100mg/mL至约250mg/mL、约100mg/mL至约225mg/mL、约100mg/mL至约200mg/mL、约100mg/mL至约175mg/mL、约100mg/mL至约150mg/mL、约100mg/mL至约125mg/mL或约150mg/mL至约175mg/mL)。在一些情况下，抗体处于约50mg/mL至约200mg/mL(例如，约50mg/mL、约60mg/mL、约70mg/mL、约80mg/mL、约90mg/mL、约100mg/mL、约110mg/mL、约120mg/mL、约130mg/mL、约140mg/mL、约150mg/mL、约160mg/mL、约170mg/mL、约180mg/mL、约190mg/mL或约200mg/mL)的浓度。在具体的情况下，抗体浓度是约150mg/mL。

[0393] 本文所述的任何组合物可以包含一种或多种选自稳定剂、缓冲剂、表面活性剂和张力剂的额外赋形剂。在一些情况下，缓冲剂包含琥珀酸精氨酸和/或琥珀酸组氨酸。在一些情况下，缓冲剂包含琥珀酸精氨酸和琥珀酸组氨酸。

[0394] 可以使用任何合适浓度的琥珀酸精氨酸。例如，在一些情况下，琥珀酸精氨酸的浓度是约10mM至约500mM(例如，约10mM、约20mM、约30mM、约40mM、约50mM、约75mM、约100mM、约125mM、约150mM、约175mM、约200mM、约225mM、约250mM、约275mM、约300mM、约325mM、约350mM、约375mM、约400mM、约425mM、约450mM、约475mM或约500mM)。例如，在一些情况下，琥珀酸精氨酸的浓度是约100mM至约300mM、约125mM至约300mM、约150mM至约300mM、约175mM至约300mM、约200mM至约300mM、约225mM至约300mM、约250mM至约300mM、约275mM至约300mM、约100mM至约250mM、约125mM至约250mM、约150mM至约250mM、约175mM至约250mM、约

200mM至约250mM、约100mM至约225mM、约125mM至约225mM、约150mM至约225mM、约175mM至约225mM、约200mM至约225mM、约100mM至约200mM、约125mM至约200mM、约150mM至约200mM或约175mM至约200mM。在具体的情况下，琥珀酸精氨酸的浓度是约200mM。

[0395] 可以使用任何合适浓度的琥珀酸组氨酸。例如，在一些实施方案中，琥珀酸组氨酸的浓度是约1mM至约100mM(例如，约1mM、约5mM、约10mM、约15mM、约20mM、约25mM、约30mM、约35mM、约40mM、约45mM、约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM或约100mM)。在具体的情况下，琥珀酸组氨酸的浓度是约20mM。

[0396] 本文所述的任何组合物可以具有约4.0至约7.0(例如，约4.0、约4.5、约5.0、约5.5、约6.0、约6.5或约7.0)的pH。在一些情况下，pH是从约4.5至约7.0(例如，约4.5、约5.0、约5.5、约6.0、约6.5或约7.0)。在一些情况下，pH是从约4.5至约6.5(例如，约4.5、约4.6、约4.7、约4.8、约4.9、约5、约5.1、约5.2、约5.3、约5.4、约5.5约5.6、约5.7、约5.8、约5.9、约6、约6.1、约6.2、约6.3、约6.4或约6.5)。在一些情况下，pH是从约5.0至约6.0(例如，约5.0、约5.1、约5.2、约5.3、约5.4、约5.5、约5.6、约5.7、约5.8、约5.9或约6.0)。在一些情况下，pH是约5.5。

[0397] 任何合适的表面活性剂可以用于本文所述的任何组合物中。在一些情况下，表面活性剂是泊洛沙姆188或聚山梨醇酯20。可以使用任何合适浓度的泊洛沙姆188。例如，泊洛沙姆188的浓度可以是约0.005％至约0.5％、约0.005％至约0.05％或约0.02％。在一些情况下，泊洛沙姆188的浓度是约0.01％、约0.02％、约0.03％、约0.04％、约0.05％、约0.06％、约0.07％、约0.08％、约0.09％或约0.1％。在具体的实施方案中，泊洛沙姆188的浓度是约0.02％。可以使用任何合适浓度的聚山梨醇酯20。例如，聚山梨醇酯20的浓度可以是约0.005％至约0.5％、约0.005％至约0.05％或约0.02％。在一些情况下，聚山梨醇酯20的浓度是约0.01％、约0.02％、约0.03％、约0.04％、约0.05％、约0.06％、约0.07％、约0.08％、约0.09％或约0.1％。

[0398] 在具体的情况下，组合物包含约150mg/mL本文所述的抗类胰蛋白酶抗体(例如，hu31A.v11)、约200mM琥珀酸精氨酸、约20mM琥珀酸组氨酸、约0.3mM N-乙酰DL-色氨酸)、约5mM L-甲硫氨酸、约0.02％泊洛沙姆188，并且具有约5.8的pH。

[0399] 可以配制本文所述的任何组合物以通过任何合适的途径施用。在具体情况下，将组合物配制用于皮下施用或静脉内施用。在一些情况下，配制组合物用于皮下施用。

[0400] G.治疗方法和组合物

[0401] 本发明的任何抗类胰蛋白酶抗体或药物组合物可以用于治疗方法中。

[0402] 在一个方面，提供抗类胰蛋白酶抗体或其药物组合物用作药物。在其他方面，提供抗类胰蛋白酶抗体或其药物组合物用治疗疾病。在某些实施方案中，提供抗类胰蛋白酶抗体或其药物组合物用于治疗方法中。在某些实施方案中，本发明提供抗类胰蛋白酶抗体或其药物组合物用于治疗患有疾病的受试者的方法中，所述方法涉及向受试者施用有效量的抗类胰蛋白酶抗体。在一些实施方案中，例如，如下文描述，方法还包括向受试者施用有效量的至少一种额外的治疗剂。根据以上实施方案中任一个实施方案，“受试者”优选地是人。

[0403] 在又一个方面，本发明提供抗类胰蛋白酶抗体或其药物组合物在制造或制备药物中的用途。在一个实施方案中，药物用于治疗疾病。在又一个实施方案中，药物用于治疗疾病的方法中，所述方法包括向患有疾病的受试者施用有效量的药物。在这样的一个实施方

案中，例如，如下文描述，方法还包括向受试者施用有效量的至少一种额外的治疗剂。根据以上实施方案中任一个实施方案，“受试者”可以是人。

[0404] 在又一个方面，本发明提供一种用于治疗疾病的方法，所述疾病例如包括肺部疾病(例如，哮喘(例如，高Th2哮喘或低Th2哮喘)、气道高反应性、或COPD)、自身免疫疾病(例如，类风湿性关节炎、银屑癣、嗜酸粒细胞性食管炎、IBD或克罗恩病)、炎性疾病(例如，慢性特发性荨麻疹(CIU或CSU)、过敏反应、特应性皮炎或过敏性鼻炎)、纤维化疾病(例如，IPF)、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、淋巴细胞性疾病、与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病，和类胰蛋白酶相关的疾病或类胰蛋白酶介导的疾病。在一个实施方案中，该方法包括向患有疾病的受试者施用有效量的抗类胰蛋白酶抗体或其药物组合物。在这样的一个实施方案中，如下文描述，方法还包括向受试者施用有效量的至少一种额外的治疗剂。根据以上实施方案中任一个实施方案，“受试者”可以是人。

[0405] 在又一个方面，本发明提供包含本文提供的任何抗类胰蛋白酶抗体的药物制剂，例如，用于上述任一种治疗方法中。在一个实施方案中，药物制剂包含本文提供的任何抗类胰蛋白酶抗体和可药用载体。在另一个实施方案中，药物制剂包含本文提供的任何抗类胰蛋白酶抗体和至少一种额外的治疗剂，例如，如下文描述。上文在第F部分中描述的任何药物制剂(例如，包含抗氧化剂如N-乙酰色氨酸和/或甲硫氨酸的那些)可以用于本文所述的任何用途或方法中。

[0406] 在一些实施方案中，疾病是自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、淋巴细胞性疾病、或与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病。在一些实施方案中，疾病是肺部疾病。

[0407] 在一些实施方案中，肺部疾病与粒细胞性(嗜酸粒细胞性和/或嗜中性)肺部炎症、感染所致肺部病状(包括与病毒性触发物(例如，流感、副流感、鼻病毒、人偏肺病毒和呼吸道合胞体病毒)、细菌性触发物或真菌性触发物(例如，曲霉(Aspergillus))相关的那些肺部病状)相关。在一些实施方案中，疾病是变应原所致肺部病状、有毒环境污染物所致肺部病状(例如，石棉肺、矽肺或铍病)、胃内容物误吸所致肺部病状或与伴随遗传素质的免疫失调或炎性疾病(如囊性纤维化)相关。在一些实施方案中，疾病是物理外伤所致肺部病状(例如，呼吸机损伤)、肺气肿、香烟所致肺气肿、支气管炎、类肉状瘤病、组织细胞增多症、淋巴管肌瘤病、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、慢性肺部疾病、支气管肺发育不良、肺炎(例如，社区获得性肺炎、院内肺炎、呼吸机相关性肺炎、病毒性肺炎、细菌性肺炎和重度肺炎)、气道加重和急性呼吸窘迫综合征(ARDS))。在一些实施方案中，肺部疾病是COPD。

[0408] 在任一所述方法的一些实施方案中，肺部疾病是哮喘。在一些实施方案中，哮喘是持续性慢性重度哮喘伴随可能威胁生命的症状恶化急性事件(加重或骤发)。在一些实施方案中，哮喘是异位性(也称作过敏性)哮喘、非过敏性哮喘(例如，经常由呼吸道病毒(例如，流感、副流感、鼻病毒、人偏肺病毒和呼吸道合胞体病毒)感染或吸入的刺激物(大气污染物、烟雾、柴油粒子、挥发性化学品和室内或户外气体、或甚至因干冷空气)触发。

[0409] 在任一所述方法的一些实施方案中，哮喘是间歇性或锻炼所致哮喘，原因在于急性或慢性初次或二次暴露于“烟”(一般是香烟、雪茄、烟斗)、吸入或“蒸发”(烟草、大麻或其他这类物质)或由最近摄入阿司匹林或相关NSAID触发的哮喘。在一些实施方案中，哮喘是轻度的或未用皮质类固醇治疗的哮喘、新诊断且未治疗过的哮喘、或先前不需要长期使用吸入型局部用或全身性类固醇控制症状(咳嗽、喘鸣、气短/呼吸困难、或胸痛)。在一些实施方案中，哮喘是慢性、皮质类固醇耐药性哮喘、皮质类固醇难治性哮喘、皮质类固醇或其他慢性哮喘控制药物无法控制的哮喘。

[0410] 在任一所述方法的一些实施方案中，哮喘是中度至重度哮喘。在某些实施方案中，哮喘是高Th2哮喘。在一些实施方案中，哮喘是重度哮喘。在一些实施方案中，哮喘是异位性哮喘、过敏性哮喘、非过敏性哮喘(例如，归因感染和/或呼吸道合胞体病毒(RSV))、锻炼所致哮喘、阿司匹林敏感/加重型哮喘、轻度哮喘、中度至重度哮喘、未用过皮质类固醇的哮喘、慢性哮喘、皮质类固醇耐药性哮喘、皮质类固醇难治性哮喘、新诊断且未治疗过的哮喘、因吸烟所致的哮喘、皮质类固醇无法控制的哮喘。在一些实施方案中，哮喘是辅助T细胞淋巴细胞2型(Th2)或2型(Th2)高、或2型(T2)驱动的哮喘。在一些实施方案中，哮喘是嗜酸粒细胞性哮喘。在一些实施方案中，哮喘是过敏性哮喘。在一些实施方案中，已经确定个体为嗜酸粒细胞性炎症阳性(EIP)。参见WO2015/061441。在一些实施方案中，哮喘是高骨膜蛋白型哮喘(例如，具有至少约任何20ng/mL、25ng/mL或50ng/mL血清的骨膜蛋白水平)。提供了确定血清骨膜蛋白(periostin)水平的方法，例如，在US 2012/0156194中提供。在一些实施方案中，哮喘是高嗜酸性粒细胞型哮喘(例如，至少约任何150、200、250、300、350、400个嗜酸性粒细胞计数/ml血液)。在某些实施方案中，哮喘是低Th2哮喘或非Th2驱动的哮喘。在一些实施方案中，已经确定个体为嗜酸粒细胞性炎症阴性(EIN)。参见WO2015/061441。在一些实施方案中，哮喘是低骨膜蛋白型哮喘(例如，具有小于约20ng/mL血清的骨膜蛋白水平)。在一些实施方案中，哮喘是低嗜酸性粒细胞型哮喘(例如，小于约150个嗜酸性粒细胞计数/μl血液或小于约100个嗜酸性粒细胞计数/μl血液)。在某些实施方案中，个体显示升高的FeNO水平(呼出气一氧化氮)和/或升高的IgE水平。例如，在一些情况下，个体显示FeNO水平高于约250份/十亿(ppb)、高于约275ppb、高于约300ppb、高于约325ppb、高于约325ppb或高于约350ppb。在一些情况下，个体具有高于50IU/ml的IgE水平。在一些实施方案中，个体具有40％至80％预测值的1秒用力呼气容积(FEV1)。

[0411] 在任一所述方法的其他实施方案中，自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、嗜中性粒细胞性疾病或嗜酸粒细胞性疾病是肺纤维化。在一些实施方案中，肺纤维化是特发性肺纤维化(IPF)。

[0412] 仍在任一所述方法的其他实施方案中，自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、或淋巴细胞性疾病是食管炎(例如，嗜酸粒细胞性食管炎)、过敏性鼻炎、非过敏性鼻炎、鼻窦炎伴息肉、鼻息肉、支气管炎、慢性肺炎、过敏性支气管肺曲霉菌病、气道炎症、过敏性鼻炎、支气管扩张症、和/或慢性支气管炎。

[0413] 在任一所述方法的一些实施方案中，自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病或淋巴细胞性疾病是关节炎。在一些实施方案中，关节炎是类风湿性关节炎。在一些实施方案中，关节炎是骨关节炎、类

风湿性关节炎、幼年型关节炎、幼年型类风湿关节炎、早期关节炎、多关节的类风湿性关节炎、全身性-初起类风湿性关节炎、肠病性关节炎、反应性关节炎、银屑病性关节炎、和/或作为损伤结果的关节炎。

[0414] 依然在任一所述方法的其他实施方案中，自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病或淋巴细胞性疾病是胃肠道炎性疾病。在一些实施方案中，胃肠道炎性疾病是IBD(炎性肠病)、溃疡性结肠炎(UC)、克罗恩病(CD)、结肠炎(例如，由环境性损伤引起的结肠炎(例如，由治疗方案如化疗、放射治疗等引起或与之相关))、传染性结肠炎、缺血性结肠炎、胶原性或淋巴细胞性结肠炎、坏死性小肠结肠炎、在多种病状如慢性肉芽肿性疾病或乳糜泻(celiac disease)中的结肠炎、食物过敏、胃炎、胃肠炎、传染性胃炎或小肠结肠炎(例如，幽门螺杆菌(Helicobacter pyloris)感染的慢性活动性胃炎)、食管炎和由传染因子引起的其他形式的胃肠道炎症或未定型结肠炎。

[0415] 在任一所述方法的一些实施方案中，自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中粒细胞性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病或淋巴细胞性疾病是胃肠道炎性疾病。在一些实施方案中，胃肠道炎性疾病是IBD(炎性肠病)。在一些实施方案中炎性肠病是溃疡性结肠炎(UC)或克罗恩病(CD)。在一些实施方案中，胃肠道炎性疾病是结肠炎(例如，由环境性损伤引起的结肠炎(例如，由治疗方案如化疗、放射治疗等引起或与之相关)、传染性结肠炎、缺血性结肠炎、胶原性或淋巴细胞性结肠炎、坏死性小肠结肠炎、在多种病状如慢性肉芽肿性疾病或乳糜泻(celiac disease)中的结肠炎、食物过敏、胃炎、胃肠炎、传染性胃炎或小肠结肠炎(例如，幽门螺杆菌(Helicobacter pyloris)感染的慢性活动性胃炎)和由传染因子引起的其他形式的胃肠道炎症或未定型结肠炎。

[0416] 在任一所述方法的一些实施方案中，胃肠道炎性疾病是溃疡性结肠炎(UC)或克罗恩病(CD)。在一些实施方案中，胃肠道炎性疾病是溃疡性结肠炎(UC)。在一些实施方案中，溃疡性结肠炎是轻度至中度远端结肠炎。在一些实施方案中，溃疡性结肠炎是轻度至中度泛发性结肠炎。在一些实施方案中，溃疡性结肠炎是重度结肠炎。在一些实施方案中，胃肠道炎性疾病是克罗恩病(CD)。在一些实施方案中，克罗恩病处于急性疾病阶段。在一些实施方案中，克罗恩病处于诱导的临床缓解阶段。在一些实施方案中，克罗恩病处于维持响应/缓解阶段。在一些实施方案中，克罗恩病是轻度至中度疾病。在一些实施方案中，克罗恩病是中度至重度疾病。在一些实施方案中，克罗恩病是重度/爆发性疾病。在一些实施方案中，克罗恩病是回肠、回结肠或结肠的疾病。

[0417] 在任一所述方法的一些实施方案中，自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、粒细胞性(嗜中性或嗜酸粒细胞性)疾病、单核细胞性疾病、或淋巴细胞性疾病、或与正常或异常组织常驻性细胞(如肥大细胞、巨噬细胞或淋巴细胞)或基质细胞(如成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞、上皮细胞或内皮细胞)的数目或分布增加相关的疾病是狼疮或系统性红斑狼疮(SLE)或狼疮的一个或多个器官特异性表现(例如，侵袭肾脏的狼疮性肾炎(LN)、或侵袭血液和/或淋巴器官的肾外狼疮(ERL)(淋巴结、脾、胸腺和相关淋巴管，和/或关节和/或其他器官，但并不必然侵袭肾脏))。

[0418] 在任一所述方法的一些实施方案中，自身免疫疾病、炎性疾病或纤维化疾病与败血症和/或外伤、HIV感染相关或是特发性的(未病因学知)如ANCA相关的脉管炎(AAV)、肉芽

肿病伴多血管炎(以前称作韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis))、Behcet病、心血管疾病、嗜酸粒细胞性支气管炎、Reiter综合征、SEA综合征(血清阴性、接骨点病变、关节病综合征)、强直性脊柱炎、皮肌炎、硬皮病,例如,全身性硬皮病也称作全身性硬化症、血管炎(例如,巨细胞动脉炎(GCA),也称作颞动脉炎、颅动脉炎或Horton病)、肌炎、多发性肌炎、皮肌炎、结节性多发性动脉炎、动脉炎、风湿性多肌痛、类肉状瘤病、原发性胆汁性硬化、硬化性胆管炎、Sjogren综合征、银屑病斑块银屑癣、点滴状银屑癣、皮褶性银屑病、脓疱性银屑病、红皮病型银屑病、皮炎、特应性皮炎、天疱疮,例如,寻常型天疱疮、动脉粥样硬化、狼疮、Still病、重症肌无力、乳糜泻、多发性硬化(MS)复发-缓解(RRMS)或原发进展性(PPMS)或继发进展性(SPMS)亚型、Guillain-Barre病、I型糖尿病(T1DM)或胰岛素依赖型(IDDM)或幼年发作型DM类型、甲状腺炎(例如,Graves病)、脂泻病(Coeliac disease)、Churg-Strauss综合征、肌痛综合征、高嗜酸性粒细胞综合征、水肿性反应(包括阵发性血管性水肿)、蠕虫感染、盘尾丝虫性皮炎、嗜酸粒细胞性食管炎、嗜酸粒细胞性肠炎、嗜酸粒细胞性结肠炎、阻塞性睡眠呼吸暂停、心内膜心肌纤维化、Addison病、Raynaud病或现象、自身免疫性肝炎、移植物抗宿主病(GVHD)或器官移植排异。

[0419] 在任一所述方法的一些实施方案中,疾病是皮肤的炎性疾病。在一些实施方案中,疾病是特应性皮炎或盘尾丝虫性皮炎。在一些实施方案中,疾病是慢性特发性荨麻疹(CIU或CSU)。在任一所述方法的一些实施方案中,方法还包括施用IL-13拮抗剂,IL-33拮抗剂、IgE拮抗剂、钙抑制剂、白细胞三烯抑制剂或抗组胺药。在一些实施方案中,IL-13拮抗剂是来金珠单抗。在一些实施方案中,IgE拮抗剂是奥马佐单抗或ligelizumab。

[0420] 在任一所述方法的一些实施方案中,自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、嗜中性粒细胞性疾病或嗜酸粒细胞性疾病是纤维化疾病。在一些实施方案中,纤维化疾病包括肺纤维化、肝纤维化(例如,肝硬化相关的纤维化(例如,酒精所致肝硬化、病毒所致肝硬化、丙型肝炎后肝硬化和原发性胆汁性肝硬变)、血吸虫病、胆管炎(例如,硬化性胆管炎)和自身免疫所致肝炎)、肾纤维化(例如,小管间质性纤维化、硬皮病、糖尿病型肾炎和肾小球肾炎)、真皮纤维化(例如,硬皮病、肥大性和瘢痕疙瘩、肾源性纤维化硬皮病和烧伤)、骨髓纤维化、神经纤维瘤病、纤维瘤、肠纤维化和外科手术产生的纤维化粘连)、心脏纤维化(例如,与心肌梗死相关的纤维化)、脉管纤维化(例如,与血管成形术后动脉再狭窄和动脉粥样硬化相关的纤维化)、眼纤维化(例如,与白内障手术后相关的纤维化、增生性玻璃体视网膜病变和眶后纤维化)和骨髓纤维化(例如,特发性骨髓纤维化和药物所致骨髓纤维化)。纤维化可以是器官特有的或是全身性的(例如,全身性硬化症和与GVHD相关的纤维化)。在一些实施方案中,纤维化疾病是肺纤维化。在一些实施方案中,肺纤维化是纤维化间质性肺炎。在一些实施方案中,肺纤维化是特发性肺纤维化(IPF),也称作隐原性纤维化肺泡炎。在一些实施方案中,IPF为性别、年龄和生理学(GAP)I期。在一些实施方案中,IPF是GAP II期。在一些实施方案中,IPF是GAP III期。在一些实施方案中,肺纤维化是散发性IPF。在一些实施方案中,肺纤维化是家族性肺纤维化。在一些实施方案中,肺纤维化是合并肺纤维化和肺气肿。在一些实施方案中,肺纤维化与以下一者或多者相关:普通型间质性肺炎;特发性间质性肺炎;剥脱性间质性肺炎;呼吸的细支气管炎-间质性肺病;急性间质性肺炎;非特异性间质性肺炎;类肉状瘤病;潜隐性机化肺炎;嗜酸粒细胞性肺炎;感染;暴露于职业物质或环境物质;吸烟;药物或照射引起的间质性肺病;风湿病相关的间质性肺病;淋巴样间质性肺炎;

胸膜肺纤维弹性组织增生;肺朗格汉斯细胞组织细胞增多症;全身性硬化症-间质性肺病;Hermansky-Pudlak综合征;和端粒病(telomeropathy)。

[0421] 在任一所述方法的一些实施方案中,自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、嗜中性粒细胞性疾病或嗜酸粒细胞性疾病是慢性阻塞性肺病(COPD)。在一些实施方案中,COPD是慢性阻塞性肺病全球倡议(GOLD)类别A。在一些实施方案中,COPD是GOLD类别B。在一些实施方案中,COPD是GOLD类别C。在一些实施方案中,COPD是GOLD类别D。在一些实施方案中,COPD是慢性支气管炎。在一些实施方案中,COPD是肺气肿。在一些实施方案中,肺气肿是近端腺泡状、全小叶性或远端腺泡状肺气肿。在一些实施方案中,肺气肿是香烟所致肺气肿。在一些实施方案中,COPD与暴露于颗粒状粉尘、化学烟气和/或空气污染相关。在一些实施方案中,COPD与肺发育受损相关。在一些实施方案中,COPD是慢性阻塞性哮喘。在一些实施方案中,COPD与α-1抗胰蛋白酶缺乏相关。在一些实施方案中,COPD与丝氨酸蛋白酶抑制剂进化枝E成员2(SERPINE2)破坏相关。在一些实施方案中,COPD是伴有迁延性全身性炎症的COPD。在一些实施方案中,COPD是嗜酸粒细胞性或高辅助T细胞2型(T_H2)的COPD。在一些实施方案中,COPD是伴随迁延性细菌定植的COPD。在一些实施方案中,COPD是频繁加重的COPD。在一些实施方案中,自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、嗜中性粒细胞性疾病或嗜酸粒细胞性疾病是哮喘-COPD重叠综合征(ACOS)。在一些实施方案中,ACOS是嗜酸性粒细胞占优势、嗜中性粒细胞占优势、混合模式或无炎症(粒细胞缺乏性)ACOS。在一些实施方案中,自身免疫疾病、炎性疾病、纤维化疾病、嗜中性粒细胞性疾病或嗜酸粒细胞性疾病是COPD-阻塞性睡眠呼吸暂停(OSA)重叠综合征。

[0422] 本发明的抗体或其药物组合物可以在疗法中单独或与其他药物组合使用。例如,本发明的抗体或其药物组合物可以与至少一种额外的治疗剂共施用。在某些实施方案中,额外的治疗剂是白介素-13(IL-13)结合拮抗剂、白介素-17(IL-17)轴结合拮抗剂、白介素-5(IL-5)轴结合拮抗剂或IL-33轴结合拮抗剂。在一些实施方案中,IL-13轴结合拮抗剂是抗IL-13抗体,例如,来金珠单抗。在一些实施方案中,IL-5轴结合拮抗剂是IL-5结合拮抗剂或IL-5受体结合拮抗剂。在一些实施方案中,IL-33轴结合拮抗剂是IL-33结合拮抗剂或ST2结合拮抗剂。在一些实施方案中,IL-33结合拮抗剂是抗IL-33抗体。

[0423] 在一些实施方案中,额外的治疗剂是如下文描述的哮喘治疗药。中度哮喘是目前用每日吸入型抗炎皮质类固醇或肥大细胞抑制剂如色甘酸钠或奈多罗米治疗,根据需要外加吸入型β2-激动剂(每日3-4次)以减轻突现症状(breakthrough symptom)或变应原诱导或运动诱导的哮喘。示例性吸入型皮质类固醇包括**QVAR®**、**PULMICORT®**、**SYMBICORT®**、**AEROBID®**、**FLOVENT®**、**FLONASE®**、**ADVAIR®**和**AZMACORT®**。额外的哮喘疗法包括长效支气管的扩张剂(LABD)。在某些实施方案中,LABD是长效β-2激动剂(LABA)、白三烯受体拮抗剂(LTRA)、长效毒蕈碱拮抗剂(LAMA)、茶碱或口服皮质类固醇(OCS)。示例性LABD包括**SYMBICORT®**、**ADVAIR®**、**BROVANA®**、**FORADIL®**、PERFOROMIST™和**SEREVENT®**。

[0424] 在任一所述方法的一些实施方案中,方法还包括施用支气管扩张剂或哮喘症状控制药物。在一些实施方案中,支气管扩张剂或哮喘控制药物是β2肾上腺素能激动剂,如短效

β2激动剂(SABA)(如沙丁胺醇)或长效β2-肾上腺素能激动剂(LABA)。在一些实施方案中，LABA是沙美特罗、abediterol、茚达特罗、维兰特罗和/或福莫特罗(无水富马酸福莫特罗)。在一些实施方案中，哮喘控制药物是白三烯受体拮抗剂(LTRA)。在一些实施方案中，LTRA是孟鲁司特、扎鲁司特和/或齐留通。在一些实施方案中，支气管扩张剂或哮喘控制药物是毒蕈碱拮抗药，如长效毒蕈碱型乙酰胆碱受体(胆碱能)拮抗剂(LAMA)。在一些实施方案中，LAMA是格隆铵(glycopyrronium)。在一些实施方案中，支气管扩张剂或哮喘控制药物是离子通道(如苦味受体(如TAS2R))的激动剂。

[0425] 在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用支气管扩张剂。在一些实施方案中，支气管扩张剂是吸入型支气管扩张剂。在一些实施方案中，吸入型支气管扩张剂是β2-肾上腺素能激动剂。在一些实施方案中，β2-肾上腺素能激动剂是短效β2-肾上腺素能激动剂(SABA)。在一些实施方案中，SABA是比托特罗(bitolterol)、非诺特罗、异丙肾上腺素、左旋沙丁胺醇、奥西那林、吡布特罗、丙卡特罗(procaterol)、利托君、沙丁胺醇(albuterol)和/或特布他林。在一些实施方案中，β2-肾上腺素能激动剂是长效β2-肾上腺素能激动剂(LABA)。在一些实施方案中，LABA是阿福特罗、班布特罗(bambuterol)、克仑特罗、福莫特罗、沙美特罗、abediterol、卡莫特罗(carmoterol)、茚达特罗、奥达特罗和/或维兰特罗。在一些实施方案中，吸入型支气管扩张剂是毒蕈碱受体拮抗剂。在一些实施方案中，毒蕈碱受体拮抗剂是短效毒蕈碱受体拮抗剂(SAMA)。在一些实施方案中，SAMA是异丙托溴铵。在一些实施方案中，毒蕈碱受体拮抗剂是长效毒蕈碱受体拮抗剂(LAMA)。在一些实施方案中，LAMA是噻托溴铵、格隆溴铵、芜地溴铵、阿地溴铵和/或来福那新(revefenacin)。在一些实施方案中，吸入型支气管扩张剂是SABA/SAMA组合。在一些实施方案中，SABA/SAMA组合是沙丁胺醇/异丙托铵。在一些实施方案中，吸入型支气管扩张剂是LABA/LAMA组合。在一些实施方案中，LABA/LAMA组合是福莫特罗/阿地溴铵、福莫特罗/格隆铵、福莫特罗/噻托溴铵、茚达特罗/格隆铵、茚达特罗/噻托溴铵、奥达特罗/噻托溴铵、沙美特罗/噻托溴铵、和/或维兰特罗/芜地溴铵。在一些实施方案中，吸入型支气管扩张剂是双官能支气管扩张剂。在一些实施方案中，双官能支气管扩张剂是毒蕈碱拮抗剂/β2-激动剂(MABA)。在一些实施方案中，MABA是batefenterol、THRX 200495、AZD 2115、LAS 190792、TEI3252、PF-3429281和/或PF-4348235。在一些实施方案中，吸入型支气管扩张剂是TAS2R的激动剂。在一些实施方案中，支气管扩张剂是雾化型SABA。在一些实施方案中，雾化型SABA是沙丁胺醇和/或左旋沙丁胺醇。在一些实施方案中，支气管扩张剂是雾化型LABA。在一些实施方案中，雾化型LABA是阿福特罗和/或福莫特罗。在一些实施方案中，支气管扩张剂是雾化型SAMA。在一些实施方案中，雾化型SAMA是异丙托铵。在一些实施方案中，支气管扩张剂是雾化型LAMA。在一些实施方案中，雾化型LAMA是格隆铵和/或来福那新。在一些实施方案中，支气管扩张剂是雾化型SABA/SAMA组合。在一些实施方案中，雾化型SABA/SAMA组合是沙丁胺醇/异丙托铵。在一些实施方案中，支气管扩张剂是白三烯受体拮抗剂(LTRA)。在一些实施方案中，LTRA是孟鲁司特、扎鲁司特和/或齐留通。在一些实施方案中，支气管扩张剂是甲基黄嘌呤。在一些实施方案中，甲基黄嘌呤是茶碱。

[0426] 在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用免疫调节剂。在一些实施方案中，免疫调节剂是针对免疫球蛋白型E(IgE)的抗体或抗IgE(IgE抑制物)。在一些实施方案中，抗IgE是奥马珠单抗和/或ligelizumab。在任一所述方法的一些实施方案中，方法还

包括色甘酸。在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括甲基黄嘌呤。在一些实施方案中，甲基黄嘌呤是茶碱或咖啡因。

[0427] 在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用一种或多种皮质类固醇类，如吸入性皮质类固醇(ICS)或口服皮质类固醇。非限制的示例性皮质类固醇类包括吸入型皮质类固醇，如丙酸倍氯米松、布地奈德、环索奈德、氟尼缩松、丙酸氟替卡松、氟替卡松糠酸酯、莫米松、和/或曲安奈德，和口服皮质类固醇，如甲基泼尼松龙、泼尼松龙(prednisolone)和泼尼松。在一些实施方案中，皮质类固醇是ICS。在一些实施方案中，ICS是倍氯米松、布地奈德、氟尼缩松、氟替卡松糠酸酯、丙酸氟替卡松、莫米松、环索奈德和/或曲安西龙。在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用ICS/LABA和/或LAMA组合。在一些实施方案中，ICS/LABA和/或LAMA组合是丙酸氟替卡松/沙美特罗、布地奈德/福莫特罗、莫米松/福莫特罗、氟替卡松糠酸酯/维兰特罗、丙酸氟替卡松/福莫特罗、倍氯米松/福莫特罗、氟替卡松糠酸酯/芜地溴铵、氟替卡松糠酸酯/维兰特罗/芜地溴铵、氟替卡松/沙美特罗/噻托溴铵、倍氯米松/福莫特罗/格隆铵、布地奈德/福莫特罗/格隆铵、和/或布地奈德/福莫特罗/噻托溴铵。在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用雾化型皮质类固醇。在一些实施方案中，雾化型皮质类固醇是布地奈德。在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用口服或静脉用皮质类固醇。在一些实施方案中，口服或静脉用皮质类固醇是泼尼松、泼尼松龙(prednisolone)、甲基泼尼松龙和/或氢化可的松。

[0428] 在任意方法的一些实施方案中，方法还包括施用抑制选自一种或多种靶的TH2或T2途径抑制剂，所述靶选自ITK、BTK、JAK(JAK1、JAK2和/或JAK3)、IL-9、IL-6、IL-5、IL-13、IL-4、IL-17(例如，IL-17A和IL-17F)、OX40L、TSLP、IL-25、IL-33、IgE、IL-9受体、IL-5受体、IL-4受体α、IL-13受体(例如，IL-13受体α1和/或α2)、OX40、TSLP-R、IL-7受体(例如，IL7Rα)、IL-17受体(例如，IL-17Rβ)、ST2(IL-33受体)、CCR3、CCR4、CRTH2、FcεRI、FcεRII/CD23、Flap、Syk激酶；CCR4、TLR9、CCR3、趋化因子受体拮抗剂和GM-CSF。在一些实施方案中，方法还包括施用IL-5拮抗剂。在一些实施方案中，IL-5拮抗剂是benralizumab、美泊利单抗(mepolizumab)和/或瑞利珠单抗(reslizumab)。在一些实施方案中，方法还包括施用IL-13拮抗剂。在一些实施方案中，IL-13拮抗剂是来金珠单抗、德克特单抗(dectrekumab)或tralokinumab。在一些实施方案中，方法还包括施用IL-4拮抗剂(包括IL-4/IL-13拮抗剂)。在一些实施方案中，IL-4拮抗剂是dupilumab或QBX-258(Novartis)。在一些实施方案中，方法还包括施用TSLP拮抗剂。在一些实施方案中，TSLP拮抗剂是AMG-157(MEDI-9929)。在一些实施方案中，方法还包括施用ST2拮抗剂。在一些实施方案中，方法还包括施用IL-17拮抗剂。在一些实施方案中，IL-17拮抗剂是苏金单抗(secukinumab)、ixekizumab或bimekizumab。在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用非维匹仑。在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用马赛替尼。在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用磷酸二酯酶(PDE)抑制剂或拮抗剂，如PDE3和/或PDE4拮抗剂。在一些实施方案中，PDE拮抗剂是Theo-24、daliresp或罗氟司特。

[0429] 在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用一种或多种有效成分，所述有效成分选自氨基水杨酸盐；类固醇；生物药物；巯基嘌呤；甲氨蝶呤；钙调神经磷酸酶抑制剂，例如环孢菌素或他克莫司；和抗生素。在任一所述方法的一些实施方案中，该方法包括施用口服或局部用制剂中的其他有效成分。氨基水杨酸盐的例子包括4-氨基水杨酸、柳氮

磺吡啶(sulfasalazine)、巴柳氮(Balsalazide)、奥沙拉嗪(olsalazine)和美沙拉嗪(mesalamine),其处于多种形式如Eudragit-S包衣的、pH依赖性美沙拉嗪、乙基纤维素包衣美沙拉嗪和多基质释放型美沙拉嗪。类固醇的例子包括皮质类固醇类或糖皮质类固醇。皮质类固醇的例子包括泼尼松和氢化可的松或甲基泼尼松龙、或第二代皮质类固醇,例如布地奈德或硫唑嘌呤;例如,处于多种形式如氢化可的松灌肠剂或氢化可的松泡沫剂。生物制品的例子包括依那西普;抗体肿瘤坏死因子α,例如英夫单抗(infliximab)、阿达木单抗(adalimumab)或赛妥珠单抗(certolizumab);针对IL-12和IL-23的抗体,例如优特克单抗(ustekinumab);维多珠单抗(vedolizumab);etrolizumab和那他珠单抗。巯嘌呤类的例子包括硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤和硫鸟嘌呤。抗生素的例子包括万古霉素、雷莫拉宁(ramoplanin)、甲硝唑、甲氧苄啶、磺胺甲基异噁唑、二氨基二苯砜和环丙沙星;和抗病毒药如更昔洛韦

[0430] 在任一所述方法的一些实施方案中,方法还包括施用抗纤维化药。在一些实施方案中,抗纤维化药抑制转化生长因子β(TGF-β)刺激的胶原蛋白合成、减少胞外基质和/或阻断成纤维细胞增殖。在一些实施方案中,抗纤维化药是吡非尼酮。在一些实施方案中,抗纤维化药是PBI-4050。在一些实施方案中,抗纤维化药是tipelukast。

[0431] 在任一所述方法的一些实施方案中,方法还包括施用酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方案中,酪氨酸激酶抑制剂抑制介导一种或多种纤维化生长因子精细化的酪氨酸激酶。在一些实施方案中,纤维化生长因子是血小板衍生生长因子、血管内皮生长因子和/或成纤维细胞生长因子。在一些实施方案中,酪氨酸激酶抑制剂是伊马替尼和/或尼达尼布。在一些实施方案中,酪氨酸激酶抑制剂是尼达尼布。在任一所述方法的一些实施方案中,方法还包括施用止泻剂。在一些实施方案中,止泻剂是洛哌丁胺。

[0432] 在任一所述方法的一些实施方案中,方法还包括施用抗体。在一些实施方案中,抗体是抗白介素(IL)-13抗体。在一些实施方案中,抗IL-13抗体是tralokinumab。在一些实施方案中,抗体是抗IL-4/抗IL-13抗体。在一些实施方案中,抗IL-4/抗IL-13抗体是SAR 156597。在一些实施方案中,抗体是抗结缔组织生长因子(CTGF)抗体。在一些实施方案中,抗CTGF抗体是FG-3019。在一些实施方案中,抗体是抗赖氨酰氧化酶样2(LOXL2)抗体。在一些实施方案中,抗LOXL2抗体是simtuzumab。在一些实施方案中,抗体是抗αvβ6整联蛋白受体抗体。在一些实施方案中,抗αvβ6整联蛋白受体抗体是STX-100。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。

[0433] 在任一所述方法的一些实施方案中,方法还包括施用溶血磷脂酸-1(LPA1)受体拮抗剂。在一些实施方案中,LPA1受体拮抗药是BMS-986020。在任一所述方法的一些实施方案中,方法还包括施用半乳凝集素3抑制剂。在一些实施方案中,半乳凝集素(galectin)3抑制剂是TD-139。

[0434] 在任一所述方法的一些实施方案中,方法还包括施用治标疗法(palliative therapy)。在一些实施方案中,治标疗法包含抗生素、抗焦虑药、皮质类固醇、和阿片样物质中的一者或多者。在一些实施方案中,抗生素是广谱抗生素。在一些实施方案中,抗生素是青霉素、β-内酰胺酶抑制剂和/或头孢菌素类抗生素。在一些实施方案中,抗生素是哌拉西林/三唑巴坦、头孢克肟、头孢曲松和/或头孢地尼。在一些实施方案中,抗焦虑药是阿普唑仑、丁螺环酮、氯丙嗪(chlorpromazine)、地西泮、咪达唑仑、劳拉西泮、和/或异丙嗪。在一

些实施方案中，皮质类固醇是糖皮质类固醇。在一些实施方案中，糖皮质类固醇是泼尼松、泼尼松龙、甲基泼尼松龙和/或氢化可的松。在一些实施方案中，阿片样物质是吗啡、可待因，双氢可待因和/或二乙酰吗啡。

[0435] 在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用抗生素。在一些实施方案中，抗生素是大环内酯类。在一些实施方案中，大环内酯类是阿奇霉素和/或克拉霉素。在一些实施方案中，抗生素是多西环素。在一些实施方案中，抗生素是甲氧苄啶/磺胺甲基异噁唑。在一些实施方案中，抗生素是头孢菌素类抗生素。在一些实施方案中，头孢菌素类抗生素是头孢吡肟、头孢克肟、头孢泊肟、头孢丙烯、头孢他啶和/或头孢呋辛。在一些实施方案中，抗生素是青霉素。在一些实施方案中，抗生素是阿莫西林、氨苄青霉素、和/或匹氨西林。在一些实施方案中，抗生素是青霉素/β-内酰胺酶抑制剂组合。在一些实施方案中，青霉素/β-内酰胺酶抑制剂组合是阿莫西林/克拉维酸盐和/或哌拉西林/三唑巴坦。在一些实施方案中，抗生素是氟喹诺酮。在一些实施方案中，氟喹诺酮是环丙沙星、吉米沙星、左氧氟沙星、莫西沙星和/或氧氟沙星。

[0436] 在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用磷酸二酯酶抑制剂。在一些实施方案中，磷酸二酯酶抑制剂是磷酸二酯酶类型5抑制剂。在一些实施方案中，磷酸二酯酶抑制剂是阿伐那非、benzamidenafil、达生他非(dasantafil)、淫羊藿甙(icariin)、罗地那非(lodenafil)、米罗那非(mirodenafil)、西地那非、他达拉非、尤地那非(udenafil)和/或伐地那非。在一些实施方案中，PDE抑制剂是PDE-4抑制剂。在一些实施方案中，PDE-4抑制剂是罗氟司特、西洛司特、替托司特(tetomilast)和/或CHF6001。在一些实施方案中，PDE抑制剂是PDE-3/PDE-4抑制剂。在一些实施方案中，PDE-3/PDE-4抑制剂是RPL-554。

[0437] 在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用细胞毒药物和/或免疫抑制剂。在一些实施方案中，细胞毒药物和/或免疫抑制剂是硫唑嘌呤、秋水仙碱、环磷酰胺、环孢菌素、甲氨蝶呤、青霉胺和/或沙立度胺。在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用使肺中耗尽的谷胱甘肽水平恢复的药物。在一些实施方案中，使肺中耗尽的谷胱甘肽水平恢复的药物是N-乙酰半胱氨酸。在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用抗凝剂。在一些实施方案中，抗凝剂是华法林、肝素、活化的蛋白C和/或组织因子途径抑制剂。

[0438] 在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用内皮素受体拮抗剂。在一些实施方案中，内皮素受体拮抗剂是波生坦、马西替坦和/或安贝生坦。在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用TNF-α拮抗剂。在一些实施方案中，TNF-α拮抗剂包括依那西普、阿达木单抗(adalimumab)、英夫单抗(infliximab)、赛妥珠单抗(certolizumab)和戈利木单抗(golimumab)中一者或多者。在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用干扰素γ-1b。

[0439] 在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用白介素(IL)抑制剂。在一些实施方案中，IL抑制剂是IL-5抑制剂。在一些实施方案中，IL-5抑制剂是美泊利单抗(mepolizumab)和/或benralizumab。在一些实施方案中，IL抑制剂是IL-17A抑制剂。在一些实施方案中，IL-17A抑制剂是CNTO-6785。

[0440] 在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用p38促分裂原活化的蛋白激酶(MAPK)抑制剂。在一些实施方案中，p38 MAPK抑制剂是losmapimod和/或AZD-7624。在任

一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用CXCR2拮抗剂。在一些实施方案中，CXCR2拮抗剂是danirixin。

[0441] 在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括免疫接种。在一些实施方案中，免疫接种是针对肺炎球菌和/或流感的免疫接种。在一些实施方案中，免疫接种是针对肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)和/或流感的免疫接种。在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用抗病毒疗法。在一些实施方案中，抗病毒治疗是奥司他韦、帕拉米韦和/或扎那米韦。

[0442] 在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括防止胃食管回流和/或复发性微量误吸。

[0443] 在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括通气支持。在一些实施方案中，通气支持是机械通气。在一些实施方案中，通气支持是非侵入性通气。在一些实施方案中，通气支持是补氧。在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括肺康复。

[0444] 在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括肺移植。在一些实施方案中，肺移植是单肺移植。在一些实施方案中，肺移植是双侧肺移植。

[0445] 在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括非药理学干预。在一些实施方案中，非药理学干预是戒烟、健康膳食和/或定期锻炼。在任一所述方法的一些实施方案中，方法还包括施用戒烟的药理学辅助。在一些实施方案中，戒烟的药理学辅助是尼古丁替代治疗、安非他酮和/或伐尼克兰。在一些实施方案中，非药理学干预是肺疗法。在一些实施方案中，肺治疗是肺康复和/或补氧。在一些实施方案中，非药理学干预是肺手术。在一些实施方案中，肺手术是肺减容积手术、单肺移植、双侧肺移植或肺大泡切除术。在一些实施方案中，非药理学干预是使用器械。在一些实施方案中，该器械是肺减容线圈、呼气道支架、和/或鼻通气支持系统。

[0446] 上文所示的这类联合疗法涵盖联合施用(其中在相同或独立的制剂中包含两种或更多种治疗剂)，和独立施用，在这种情况下，抗类胰蛋白酶抗体或其药物组合物的施用可以在施用额外的治疗剂之前、同时和/或之后进行。在一个实施方案中，抗类胰蛋白酶抗体或其药物组合物的施用和额外的治疗剂的施用彼此相隔约一个月内；或相隔约一周、两周或三周内；或相隔约一、二、三、四、五或六天内；或相隔约1、2、3、4、5、6、7、8或9小时内；或相隔约1、5、10、20、30、40或50分钟内进行。对于涉及依次施用的实施方案，抗类胰蛋白酶抗体可以在施用额外治疗药之前或之后施用。

[0447] 本发明的抗类胰蛋白酶抗体或其药物组合物(和任何额外的治疗剂)可以通过任何合适的手段施用，所述手段包括肠胃外、肺内和鼻内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。在一些情况下，本发明的抗类胰蛋白酶抗体可以玻璃体内、肌内、静脉内、皮内、经皮的、动脉内、腹膜内、病灶内、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、气管内、鞘内、鼻内、阴道内、直肠内、局部地、瘤内、腹膜、皮下、结膜下、囊内、粘膜、心包内、脐内、眼内、眶内、经口、局部、经皮、眼周、结膜、筋膜下、前房内、视网膜下、眼球后、小管内、通过吸入、通过注射、通过植入、通过输注、通过连续输注、通过直接浸浴靶细胞的局限化灌流、通过导管、通过灌洗、在膏中或在脂质组合物中施用。在具体的情况下，抗体或其药物组合物可以通过皮下施用法施用。在本文所述的方法中利用的组合物也可以全身或局部施用。给药可以通过任何合适的途径进行，例如通过注射，如静脉内或皮下注射，这部分地取

决于施用是否为短暂或长期。本文中构思了各种给药方案，包括但不限于单次或在各种时间点多次施用、推注(bolus)施用和脉冲输注。

[0448] 本发明的抗体或其药物组合物将以符合良好医学实践的方式配制、定剂量和施用。在这种情况下考虑的因素包括正在治疗的具体病症、正在治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状况、病症原因、送递药物的部位、施用方法，施用计划和医疗执业者已知的其他因素。抗体或其药物组合物不需要与目前用来预防或治疗所讨论病症的一种或多种药物一起配制，但是任选地与它们一起配制。这类其他药物的有效量取决于该制剂中存在的抗体的量、疾病类型或疗法和上文讨论的其他因素。这些药物通常以与本文所述相同的剂量并且采用与本文所述相同的施用途径使用，或以约1％至99％的本文所述剂量使用，或以经验地/临床上确定适宜的任何剂量和任何途径使用。

[0449] 对于预防或治疗疾病，本发明抗体的适宜剂量(当单独或与一种或多种其他额外治疗药组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重性和过程、抗体是否出于预防或治疗目的施用、先前疗法、患者的临床史和对抗体的反应以及主治医师的决定。将抗体适当地按一次或经过一系列治疗施用至患者。取决于疾病的类型和严重程度，约1μg/kg至15mg/kg(例如0.1mg/kg至10mg/kg)抗体可以是向患者施用的起始候选剂量，无论是否例如通过一个或多个单独施用或通过连续输注来施用。取决于上文提到的因素，一个常见的每日剂量可能是从约1μg/kg至200mg/kg或更多。对于在几日或更长时间范围内重复施用，取决于病状，治疗通常将持续直至对疾病症状的所需抑制作用出现。抗体的一个示例性剂量将处于约0.05mg/kg至约10mg/kg范围内。因此，可以向患者施用一剂或多剂的约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或其任意组合)。这类剂量可以间歇地施用，例如，每周、每两周、每三周或每四周(例如，从而，患者接受约两剂至约二十剂或例如约六剂抗体)。例如，可以每月一次(例如，通过皮下注射)施用剂量。可以施用较高的初始负荷剂量，随后是一个或多个较低剂量。然而，可以使用其他剂量方案。通过常规技术和测定法容易地监测这种疗法的进程。在一些情况下，可以施用剂量约50mg/mL至约200mg/mL(例如，约50mg/mL、约60mg/mL、约70mg/mL、约80mg/mL、约90mg/mL、约100mg/mL、约110mg/mL、约120mg/mL、约130mg/mL、约140mg/mL、约150mg/mL、约160mg/mL、约170mg/mL、约180mg/mL、约190mg/mL或约200mg/mL)的抗体，例如，通过皮下注射。在一些情况下，可以通过皮下注射施用约150mg/mL抗体。

[0450] 可以理解，替代抗类胰蛋白酶抗体或除了抗类胰蛋白酶抗体之外，还可以使用本发明的免疫缀合物实施上述制剂或治疗方法的任一者。

[0451] H.制造品

[0452] 在本发明的另一个方面，提供一种制造物，所述制造物含有上文描述的可用于治疗、预防和/或诊断疾病(例如，类胰蛋白酶相关疾病)的物质。该制造品包括容器和或在该容器上或与之结合的标签或药品说明书。合适的容器包括例如瓶、小药瓶、注射器、静脉内输液袋等。容器可以从多种材料如玻璃或塑料中形成。该容器容纳了本身或与另一种组合物组合时有效治疗、预防和/或诊断病症的组合物并且可以具有无菌接入口(例如该容器可以是静脉内输液袋或是具有皮下注射针头可穿透的瓶塞的小药瓶)。组合物中的至少一种活性物质是本发明的抗体或其药物组合物。标签或药品说明书说明该组合物用于治疗选择的病状。另外，制造品可以包含(a)其中含有组合物的第一容器，其中所述组合物包含本发

明的抗体;和(b)其中含有组合物的第二容器,其中所述组合物包含额外的治疗剂。在本发明的这个实施方案中制造物还可以包含指示组合物可以用来治疗特定病状的药品说明书。备选地或额外地,该制造品可以还包含第二(或第三)容器,其包含可药用缓冲剂,如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、Ringer溶液和葡萄糖溶液。它可以还包括从商业和用户观点看受欢迎的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

[0453] 可以理解,替代抗类胰蛋白酶抗体或除了抗类胰蛋白酶抗体之外,上述制造物中任一者还可以包含本发明的免疫缀合物。

[0454] III.实施例

[0455] 以下是本发明方法和组合物的实施例。应当理解,鉴于上文提供的一般性描述,可以实施多种其他实施方案。除非特别指出,研究中使用人类胰蛋白酶β1。

[0456] 实施例1:抗类胰蛋白酶抗体的产生和人源化

[0457] A.材料和方法

[0458] 根据Kabat等人Sequences of proteins of immunological interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991进行残基编号。

[0459] (i)在昆虫细胞和哺乳动物细胞中重组表达类胰蛋白酶及其纯化

[0460] 将编码成熟野生型人类胰蛋白酶β1(Ile16-Pro246糜蛋白酶原编号,SEQ ID NO:97)的序列克隆入修饰的pAcGP67A载体,位于多角体启动子和gp67分泌信号序列之后。除非另外注明,否则在本章节中,类胰蛋白酶指人类胰蛋白酶β1(也称作人类胰蛋白酶b1)。该构建体含有N末端His6标签、肠激酶剪切位点,对于一些构建体,含有C末端FLAG标签。使用标准QuikChange™方案(Stratagene)进行位点定向诱变,以产生类胰蛋白酶突变体。通过DNA测序确认全部构建体。遵循标准方案,使用BaculoGold™系统(BD Biosciences)在Sf9细胞中生成重组杆状病毒。感染粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)细胞用于大规模蛋白质产生并且感染后48小时收获。收获用培养基补充有1mM $NiCl_2$、5mM $CaCl_2$和20mM Tris pH 8,振摇30分钟并且随后以8500x g离心20分钟,以从培养基移除细胞和沉淀物。通过0.22μm聚醚砜(PES)滤器过滤上清培养基,之后加载到镍-次氮基三乙酸(Ni-NTA)亲和柱上。还在CHO DP12哺乳动物细胞系中通过瞬时转染法表达人类胰蛋白酶β1。对细胞培养基进行相同的纯化,始于如下文描述的Ni-NTA亲和纯化。

[0461] 将含有分泌的加His6标签的重组类胰蛋白酶(野生型或突变体)的昆虫细胞培养基或CHO细胞培养基以容积流速170cm/小时加载于10mL Ni-NTA Superflow柱(Qiagen)上。将柱用10个CV(柱体积)洗涤缓冲液(20mM Tris pH8、10mM咪唑、300mM NaCl)洗涤并且用8个CV洗脱缓冲液(20mM Tris pH8、300mM咪唑、300mM NaCl)洗脱。合并已用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析的含有类胰蛋白酶的级分、浓缩并加载于S200大小排阻柱(GE Healthcare)上,以使用运行缓冲液(10mM 3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)pH 6.8、2M NaCl),按照生产商推荐的流速进一步纯化。合并并浓缩含有加His标签的(单体)重组类胰蛋白酶的级分。将重组类胰蛋白酶随后在室温按浓度2mg/ml在含有0.5mg/ml肝素(Sigma Aldrich)和0.1mg/ml肠激酶(New England Biolabs,Inc)的缓冲液(10mM MOPS pH 6.8、0.2M NaCl)中切割过夜。这个步骤移除N末端His6标签并且导致四聚化和蛋白酶解有活性的类胰蛋白酶,所述类胰蛋白酶以IVGG作为新形成的始于残基16(糜蛋白酶原编号)处

的N端序列。四聚体类胰蛋白酶随后在缓冲液(10mM MOPS pH 6.8和2M NaCl)中进行使用S200柱(GE Healthcare)的大小排阻色谱,以通过移除肠激酶和任何未剪切的重组类胰蛋白酶,纯化四聚体类胰蛋白酶。

[0462] 通过如上文所述的Ni-亲和色谱,纯化了类胰蛋白酶突变体Y75C和I99C,以及无催化活性的突变体S195A(糜蛋白酶原编号,与SEQ ID NO:71的全长类胰蛋白酶序列的Ser224至Ala置换相对应)。随后通过S200大小排阻色谱,将二硫键连接的类胰蛋白酶二聚体突变体与非二硫键连接的类胰蛋白酶单体突变体分离。如上文对野生型类胰蛋白酶所述,将二硫键连接的二聚体突变体进一步加工成四聚体。

[0463] (ii)兔和小鼠抗人类胰蛋白酶单克隆抗体的产生

[0464] 将两只兔用CHO衍生的人类胰蛋白酶β1(四聚体)配合弗氏完全佐剂(CFA)免疫接种。所述兔用相同蛋白质配合弗氏不完全佐剂(IFA)强化免疫,每2周一次。在4次注射后,通过酶联免疫吸附测定(ELISA)评价纯化的血清样品的结合作用并且使用酶活性测定法评价对人类胰蛋白酶活性的抑制。来自从前述兔之一收获的脾的B细胞,其展示抑制人类胰蛋白酶活性,随后与兔融合配偶体融合。在10-14天后,收获上清液并且通过ELISA筛选蛋白质结合作用。

[0465] ELISA方案如下。将96孔NUNC **MAXISORB®**ELISA平板用Neutr**Avidin®**生物素结合蛋白(Thermo Scientific目录号31000,储液10mg/ml)以5μg/ml,100μl/孔包被过夜。将诸孔用洗涤缓冲液(含0.05%**TWEEN®**-20的PBS)洗涤三次并且蘸干。随后用200μl/孔封闭缓冲液(含0.5%牛血清白蛋白(BSA)和0.05%**TWEEN®**-20的PBS)封闭诸孔并且在室温温育大于或等于30分钟。将生物素酰化的人类胰蛋白酶β1蛋白质(稀释于测定缓冲液中;含0.5%BSA、0.05%**TWEEN®**-20和0.1mg/ml肝素的PBS)以1μg/ml添加至诸孔并在室温温育1小时±10分钟。纳入肝素以确保类胰蛋白酶仍作为四聚体。将诸孔用洗涤缓冲液洗涤(200μl/孔)三次并且蘸干。将杂交瘤上清液(样品)或对照(例如,纯化的兔多克隆抗体YZ4209阳性对照(储液0.25mg/ml)添加至诸孔(稀释于测定缓冲液中,100μl/孔)并且在室温温育1小时。接着,将诸孔用洗涤缓冲液洗涤(200μl/孔)三次并且蘸干。添加辣根过氧化物酶(HRP)缀合物(驴抗山羊IgG(H+L)HRP;Thermo Scientific目录号31460)(测定缓冲液中1:10,000稀释,100μl/孔)并且在室温温育30分钟。将诸孔再次用洗涤缓冲液洗涤(200μl/孔)三次并且蘸干。添加底物(BioFX TMB底物,产品编号:TMBW-1000-01)(100μl/孔)并且在室温温育5分钟。通过添加100μl/孔BioFX终止溶液(产品编号:BSTP-0100-01),终止反应,并且在A_{650}读取平板。

[0466] 使用标准方法(MabSelect SuRe™;GE Healthcare),通过亲和色谱纯化全部ELISA-阳性克隆,并且随后在重组类胰蛋白酶活性测定法中筛选对人类胰蛋白酶活性的抑制。简而言之,将抗体稀释在PBS pH 7.4中,稀释为0.007至100000ng/mL(0.046pM至667nM)。将重组人类胰蛋白酶β1在TNH缓冲液(200mM Tris,150mM NaCl,0.1mg/mL肝素,0.01%TRITON™X-100、pH 8.0)中稀释至3nM,并且在黑色384孔平板(ViewPlate-384 F,黑色,透明底,Perkin Elmer,目录号6007470)中与抗类胰蛋白酶抗体1:1合并。将平板在环境温度温育1小时,同时温和振荡。将比色底物S-2288(Chromogenix,Part No.82-0852-39)在TNH缓冲液中稀释至900μM并添加至平板。孔内终浓度是300μM S-2288、1nM重组人类胰蛋白

酶β1和0.015pM至222nM抗类胰蛋白酶抗体。将平板在环境温度温育40分钟，同时温和振荡，并且随后在A_{405}读取。从抗类胰蛋白酶抗体的各自曲线的四参数拟合测定其半数最大抑制浓度(IC_{50})。随后将显示所需抑制作用的克隆通过有限稀释法亚克隆(单个细胞/孔)，如上文所述复验并且进一步表征。

[0467] 生成和筛选小鼠杂交瘤并且以相似方式分析阳性克隆。将三只A/J小鼠(Harlan, Indianapolis,Ind.)用纯化的类胰蛋白酶蛋白作为抗原(EPC,Inc.#TR913)免疫接种。与弗氏完全佐剂(第一次免疫接种)或弗氏不完全佐剂(第二、第三和第四次免疫接种)1:1混合并乳化后，将有酶促活性的类胰蛋白酶按照每次免疫接种20μg/只小鼠皮下和腹膜内施用。强化免疫(第五次免疫接种)无佐剂。在第四次免疫接种后，通过ELISA测试来自免疫接种小鼠的血清并且选择在稀释度1:1.28x 10^4时血清滴度高于OD_{450}>2.16的小鼠用于杂交瘤融合。将107x 10^6个分离的脾细胞与100x 10^6个Sp2/0骨髓瘤细胞(ATCC)混合，以便在聚乙二醇(Sigma-Aldrich，目录号P7777-5G)存在下融合。对二十四个克隆筛选与类胰蛋白酶的结合并分析对类胰蛋白酶酶活性的抑制。选择克隆T31a(本文也称作“31A”和“mu.31A”)用于人源化。

[0468] (iii)兔抗类胰蛋白酶杂交瘤克隆的分子克隆和重建

[0469] 从产生兔抗类胰蛋白酶单克隆抗体的杂交瘤细胞提取总RNA(**RNeasy®**微量试剂盒，Qiagen)。使用**SMARTer®**RACE cDNA扩增试剂盒(Clontech)，首先RNA逆转录，随后经历用以下引物的可变轻链结构域(VL)和可变重链结构域(VH)的第一链cDNA合成和5’RACE PCR扩增：

[0470] 轻链(LC)正向引物：

[0471] 通用引物混合物(**SMARTer®**RACE cDNA扩增试剂盒，Clontech，目录号#634858)

[0472] 重链(HC)正向引物：

[0473] 通用引物混合物(**SMARTer®**RACE cDNA扩增试剂盒，Clontech，目录号#634858)

[0474] LC反向引物：

[0475] 5’-GATGGTGACTGTTCCAGTTGC-3’(SEQ ID NO:74)

[0476] HC反向引物：

[0477] 5’-CATTGGTGAGGGTGCCCGAGTTC-3’(SEQ ID NO:75)

[0478] LC反向引物和HC反向引物设计成与恒定轻链结构域(CL)和恒定重链结构域1(CH1)中的区域复性。

[0479] 直接对扩增的PCR产物测序。随后将鉴定的VL DNA序列亚克隆入含有人κ恒定结构域的pRK哺乳动物细胞表达载体。将VH DNA序列插入编码全长人γ1恒定结构域的pRK载体中。

[0480] (iv)兔抗类胰蛋白酶单克隆抗体E104的人源化

[0481] 来自兔抗类胰蛋白酶单克隆抗体E104的VL结构域(SEQ ID NO:53)和VH结构域(SEQ ID NO:52)与人VLκI(VL_{KI})共有序列和人VH亚组IV(VH_{IV})共有序列(分别是SEQ ID NO:92和93)比对。参见，例如，Dennis，第2章CDR Repair:A Novel Approach to Antibody

Humanization in Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing,编者Shire等人Springer,New York,NY。将高变区(HVR)工程化入共有的人VL_{KI}和VH_{IV}接纳体构架以产生CDR移植变体。从E104 VL结构域中,将位置24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)移植入VL_{KI}中。从VH结构域中,将位置26-35b(H1)、50-65(H2)和93-102(H3)移植入VH_{IV}中。为了评价可能重要的构架游标位置(vernier positions),将选择的游标位置回复突变成兔序列。回复突变成兔序列的游标位置包括VL中的位置2、4、43、68和87及VH中的37、67、71、78和91。

[0482] 来自兔抗类胰蛋白酶单克隆抗体E104的VL结构域和VH结构域还与人VLκI(VL_{KI})和人VH亚组III(VH_{III})共有序列(分别是SEQ ID NOs:92和94)比对。参见上文Dennis。将高变区(HVR)工程化入共有的人VL_{KI}和VH_{III}接纳体构架以产生CDR移植变体。从rab.E104 VL结构域中,将位置24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)移植入VL_{KI}中。从VH结构域中,将位置26-35(H1)、50-65(H2)和93-102(H3)移植入VH_{III}中。

[0483] 总计,合成两个不同形式的人源化VL序列和六个不同形式的人源化VH序列并随后亚克隆入pRK哺乳动物表达载体。通过组合不同形式的LC和HC,总计生成十二种不同的人源化E104变体(v1至v12)(表3)。全部人源化抗类胰蛋白酶变体均在哺乳动物细胞中表达为IgG1抗体或IgG4抗体。使用标准方法(MabSelect SuRe™;GE Healthcare),通过亲和色谱纯化抗体。实施例部分中所用的全部IgG4抗体均在重链恒定区中包含S228P突变(EU编号);然而,本文所述的发明不限于具有S228P突变的IgG4变体。

[0484] 在SEQ ID NO:109中显示了编码huE104.v2的VH结构域的DNA序列。在SEQ ID NO:110中显示了编码huE104.v2的VL结构域的DNA序列。在SEQ ID NO:111中显示了编码重链(IgG1)的DNA序列。在SEQ ID NO:113中显示了编码重链(IgG4.S228P)的DNA序列。在SEQ ID NO:112中显示了编码轻链(IgG1和IgG4)的DNA序列。在SEQ ID NO:80中显示huE104.v2 IgG1的重链(HC)的氨基酸序列。在SEQ ID NO:81中显示huE104.v2(IgG1或IgG4)的轻链(LC)的氨基酸序列。在SEQ ID NO:82中显示huE104.v2 IgG4 S228P的HC的氨基酸序列。

[0485] (v)小鼠抗类胰蛋白酶单克隆抗体31A的人源化

[0486] 来自小鼠抗类胰蛋白酶单克隆抗体31A(“mu.31A”)的VL结构域(SEQ ID NO:20)和VH结构域(SEQ ID NO:19)与人VLκI(VL_{KI})共有序列和人VH亚组III(VH_{III})共有序列(分别是SEQ ID NO:92和93)比对。将高变区(HVR)工程化入共有的人VL_{KI}和VH_{III}接纳体构架以产生CDR移植变体。从mu.31A VL结构域中,将位置24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)移植入VL_{KI}中。从mu.31A VH结构域中,将位置26-35(H1)、50-65(H2)和93-102(H3)移植入VH_{III}中。为了评价构架游标位置的重要性,将选定的游标位置回复突变成小鼠序列。回复突变成小鼠序列的游标位置包括VL中的位置4、43、46、47和71及VH中的位置49。

[0487] 总之,合成三个人源化LC和五个人源化HC并随后亚克隆入pRK哺乳动物表达载体。通过组合不同形式的LC和HC,总计生成十五种不同的31A(“hu31A”)人源化变体(v1至v15)(表4)。

[0488] 全部人源化抗类胰蛋白酶变体均在哺乳动物细胞中表达为IgG1抗体或IgG4抗体。使用标准方法(MabSelect SuRe™;GE Healthcare,Piscataway,NJ,USA),通过亲和色谱纯化抗体。

[0489] 在SEQ ID NO:104中显示了编码hu31A.v11的VH结构域的DNA序列。在SEQ ID NO:

105中显示了编码hu31A.v11的VL结构域的DNA序列。在SEQ ID NO:106中显示了编码重链(IgG1)的DNA序列。在SEQ ID NO:108中显示了编码重链(IgG4.S228P)的DNA序列。在SEQ ID NO:107中显示了编码轻链(IgG1和IgG4)的DNA序列。在SEQ ID NO:76中显示hu31A.v11 IgG1的HC的氨基酸序列。在SEQ ID NO:77中显示hu31A.v11 IgG1的LC的氨基酸序列。在SEQ ID NO:78中显示hu31A.v11 IgG4 S228P的HC的氨基酸序列。在SEQ ID NO:79中显示hu31A.v11 IgG4 S228P的LC的氨基酸序列。

[0490] (vi)Fab片段的克隆、表达和纯化

[0491] 如先前所述那样克隆并在大肠杆菌中表达Fab(参见Simmons等人J.Immunol.Methods 263:133-147,2002;Lombana等人Sci.Rep.5:17488,2015)。含有表达的Fab的大肠杆菌细胞糊状物收获自表达Fab的发酵物并且溶解于含有25mM EDTA和1mM苯甲基磺酰氟(PMSF)的PBS缓冲液中。将混合物均化并且随后穿过微流化器两次。悬液随后以21,500x g离心60分钟。随后上清液按5ml/分钟加载于PBS平衡的蛋白G柱上。将柱用PBS缓冲剂洗涤至基线并且随后用0.6%乙酸洗脱蛋白质。合并如通过SDS-PAGE所分析的含有Fab的级分并且随后加载于20mM MES(pH 5.5)中平衡的50mL SP **SEPHAROSE®**柱上。将柱用20mM MES缓冲液(pH 5.5)洗涤2个柱体积并且随后用线性梯度洗脱至20mM MES缓冲液(pH 5.5)中的0.5M NaCl。为了最终纯化,浓缩来自离子交换色谱的含有Fab的级分并且在S75大小排阻柱上于PBS缓冲液中运行。相同方案用于实验中所用的全部Fab。

[0492] (vii)人源化抗类胰蛋白酶变体的**BIAcore®**表面等离子体共振(SPR)分析

[0493] 在这个实验中,通过瞬时转染293细胞,将全部人源化变体均表达为IgG。用蛋白G亲和色谱纯化IgG。使用**BIAcore®**T200,通过SPR分析测定每种变体对加His标签的重组人类胰蛋白酶β1单体(SEQ ID NO:128)的亲和力。将**BIAcore®** Series S CM5传感芯片用小鼠单克隆抗人IgG(Fc)抗体(来自GE Healthcar的人抗体捕获试剂盒)固定化并且随后在每个流动池上捕获抗类胰蛋白酶变体。以流速30μl/min注射人类胰蛋白酶β1单体的3倍连续稀释物。用3分钟结合和10分钟解离分析每份样品。在每次注射后,使用3M $MgCl_2$使芯片再生。通过扣减来自以相似密度捕获无关IgG的流动池的响应单位(RU)来修正结合响应。同时拟合k_{on}和k_{off}的1:1朗缪尔模型用于动力学分析。

[0494] (viii)分析人源化抗类胰蛋白酶变体的抑制活性

[0495] a.类胰蛋白酶酶促测定法

[0496] 通过使用重组类胰蛋白酶活性测定法,测量人源化抗类胰蛋白酶抗体对人类胰蛋白酶活性的抑制。将hu31a.v11 IgG4和hu31a.v11 IgG1在PBS pH 7.4中从0.05至100μg/ml(0.30至667nM)稀释,并且将huE104.v2 IgG4和huE104.v2 IgG1在PBS pH 7.4中从0.02至50μg/ml(0.15至333nM)稀释。将重组人类胰蛋白酶β1四聚体活性酶在TNH缓冲液(200mM Tris,150mM NaCl,0.1mg/mL肝素,0.01%TRITON™X-100、pH 8.0)中稀释至0.75nM,并且在黑色384孔平板(ViewPlate-384 F,黑色,透明底,Perkin Elmer,目录号6007470)中与抗类胰蛋白酶抗体1:1合并。将平板在环境温度温育1小时,同时温和振荡。将比色底物S-2288(Chromogenix,Part No.82-0852-39)在TNH缓冲液中稀释至1200μM并添加至平板。孔内终浓度是400μM S-2288、0.25nM重组人类胰蛋白酶β1四聚体、66μg/mL肝素和对于hu31A.v11,0.10至222nM抗类胰蛋白酶抗体,及对于huE104.v2,0.05至111nM抗类胰蛋白酶抗体。将平

板在环境温度温育40分钟，同时温和振荡，并且随后在A_{405}读取。从抗类胰蛋白酶抗体的各自曲线的四参数拟合测定其IC_{50}。

[0497] b.支气管平滑肌细胞增殖测定法和基于胶原蛋白的收缩测定法

[0498] 将人支气管平滑肌细胞(BSMCs;目录号CC-2576,Lonza Minneapolis,MN)在37℃含5%CO_2的增湿培养箱中于完全培养基SmGM-2(目录号CC-3182,Lonza)中培养。测定培养基是不含人血清或添加补充物的SmGm-2培养基(目录号CC-3181,Lonza)。按指定浓度使用人野生型四聚体类胰蛋白酶或人S195A无催化活性类胰蛋白酶酶(糜蛋白酶原编号)。按指定浓度使用抗人类胰蛋白酶抗体hu31A.v11 IgG4和E104.v2 IgG4。

[0499] 对于增殖测定法，进行测定之前1天，将BSMC按$2x10^5$个细胞/ml铺种在96孔组织培养板(目录号353072,Falcon BD)的完全培养基中。在24小时后，将培养基替换为测定培养基并另外温育细胞24小时。在96孔组织培养平板(目录号353072,Falcon BD)中，将抗人类胰蛋白酶抗体在测定培养基中连续稀释3.3倍。将100μL稀释的hu31A.v11 IgG4转移至含有100μL的200nM人类胰蛋白酶的96孔平板。将活性类胰蛋白酶和抗人类胰蛋白酶抗体在室温温育30分钟。在这个时间，从铺种的细胞移除测定培养基并替换为100μL稀释的抗体加类胰蛋白酶。抗体的终浓度为2.0μM至4pM。类胰蛋白酶的终浓度是100nM(无肝素的情况下)。最终的盐浓度是约130mM。纳入仅有类胰蛋白酶的孔作为刺激对照。纳入仅有测定培养基的孔作为未刺激的对照。将平板在37℃温育24小时，之后每孔添加1μCi H^3-胸苷。在额外温育6小时后，通过H^3-胸苷掺入测量增殖。细胞结合型放射性活度由闪烁计数法定量。结果表示为三次重复样品的均数。生成曲线并且使用KaleidaGraph(Synergy Software)执行统计分析。

[0500] 对于基于胶原蛋白的收缩测定法，进行分析之前1天，遵循生产商的指南(目录号CBA-201,Cell BioLabs Inc.)，将BSMC按$9x10^6$个细胞/mL铺种在24孔平板(目录号353047,Falcon BD)的胶原蛋白中。在37℃温育1小时后，将细胞用1mL测定培养基覆盖。在37℃温育24小时后，将培养基替换为250μL新鲜的测定培养基。在4μM抗人类胰蛋白酶抗体存在或不存在时，将类胰蛋白酶稀释于250μL测定培养基中至660nM并且在37℃温育30分钟，之后添加至含有细胞:胶原蛋白基质的指定孔。终浓度是330nM类胰蛋白酶和2μM抗体(无肝素情况下)。最终的盐浓度是约130mM。通过使用无菌移液器吸头从平板壁释放细胞:胶原蛋白基质，启动细胞收缩。使用仅有测定培养基作为未刺激的对照。在细胞收缩伊始(t＝0)，使用ProteinSimple **AlphaImager®**可视化、成像并记录细胞:胶原蛋白基质。将细胞在37℃温育额外3小时并对细胞:胶原蛋白基质再成像及记录(t＝3)。使用NIH Image J软件分析数据。数据表示为细胞:胶原蛋白基质直径从收缩伊始(t＝0)直至3小时时间点(t＝3)的变化百分数。结果表示为三次重复样品的均数。

[0501] c.肥大细胞组胺释放测定法

[0502] 使用人肥大细胞系LAD2。在37℃含5%CO_2的增湿培养箱中，将LAD2细胞在含有Stem**Pro®**-34养分补充物(目录号10640-019,Gibco/Technologies)、1x青霉素-链霉素-谷氨酰胺(目录号10378-016,Gibco/Technologies)和100ng/mL重组人干细胞因子(SCF)(目录号573908,BioLegend)的无血清生长培养基Stem**Pro®**-34中培养。参见Kirshenbaum等人.Leukemia Research 27:677-682,2003。按指定浓度使用人类胰蛋白酶野生型或人类胰蛋白酶S195A突变体。按指定浓度使用获自Serotec Inc.NP-BSA(目录号N5050H-10,

Biosearch Technologies,Petaluma,CA)的抗NP人IgE(JW8.5.13;参见Jackm等人J.Biol Chem.285(27):20850-20859,2010)以触发组胺释放。按指定浓度使用抗人类胰蛋白酶抗体hu31A.v11 IgG4和E104.v2 IgG4。按指定浓度使用小分子抑制剂G02849855。使用Tyrode盐(目录号T-2397,Sigma)执行细胞刺激。使用组胺ELISA试剂盒(GenWay.目录号40-371-25010),测量组胺。

[0503] 对于人IgE触发的组胺释放测定法,将LAD2细胞按$4x10^6$个细胞/4ml铺种在6孔培养皿的2个孔中。将抗NP IgE(100ng/ml)添加至一个孔并将细胞在37℃温育过夜以激发细胞。在另一个孔中,将细胞在仅不添加抗NP IgE的培养基中培养,以充当阴性对照。在温育过夜后,将细胞用细胞培养基洗涤3次以除去未结合的IgE。将细胞重悬于4mL Tyrode盐(细胞密度为$1x10^6$个细胞/ml)中并等分入**Eppendorf®**管(300,000个细胞/管)。将样品与100μg/mL hu31A.v11IgG4或10μM G02849855温育,彻底混合并且在室温温育1小时。在这次温育后,将NP-BSA以终浓度0.1μg/mL添加至样品,以触发细胞脱颗粒。将样品彻底混合并且在37℃在CO_2培养箱中温育1小时。细胞随后在室温以3000转/分钟离心5分钟,并且收集上清液用于组胺测量。使用组胺ELISA试剂盒,定量在脱颗粒上清液中的组胺。结果表现为重复样品的均数。

[0504] 对于人类胰蛋白酶触发的组胺释放测定法,将LAD2细胞以浓度10^6个细胞/mL重悬于Tyrode盐中并等分入**Eppendorf®**管(300,000个细胞/管)。为了促进细胞脱颗粒,将细胞用已经在室温与100μg/mL hu31A.v11预温育45分钟的3μg/mL类胰蛋白酶(野生型或S195A突变体)或3μg/mL类胰蛋白酶处理。使用PBS作为无刺激对照。将样品彻底混合并且在37℃在CO_2培养箱中温育1小时。最终的盐浓度是约140mM。细胞随后在室温以3000转/分钟离心5分钟,并且收集上清液用于组胺测量。使用组胺ELISA试剂盒,定量在脱颗粒上清液中的组胺。结果表现为重复样品的均数。

[0505] (ix)重组类胰蛋白酶单体和四聚体的纯化

[0506] 无内源信号肽(SEQ ID NO:71的氨基酸残基1-15)和前肽(SEQ ID NO:71的氨基酸残基16-30)的人类胰蛋白酶在哺乳动物CHO细胞中表达为带工程化肠激酶剪切位点的加His标签的重组蛋白并且进行5x超滤,随后5x稀释入PBS中。随后将介质加载于Ni-NTA柱上并用250mM咪唑洗脱。将洗脱物透析入10mM MOPS,0.2M NaCl,pH 6.8缓冲液,以产生单体类胰蛋白酶。未剪切的加His6标签的类胰蛋白酶单体仍是单体的并且不形成四聚体。

[0507] 为了产生四聚体类胰蛋白酶,将含有His标签的单体类胰蛋白酶使用0.1mg/ml肠激酶酶消化并在室温用0.5mg/ml的硫酸葡聚糖-10钠盐稳定16-20小时。使蛋白质在SUPERDEX™200柱上通过进入10mM MOPS,2M NaCl,pH6.8的最终缓冲液,以分离四聚体与单体和任何残余的掺杂性蛋白酶。图3A峰1中显示纯化的示例性四聚体。合并的四聚体类胰蛋白酶用于免疫接种和活性测定法。

[0508] B.结果

[0509] (i)杂交瘤克隆

[0510] 来自ELISA阳性杂交瘤克隆的五个兔抗类胰蛋白酶抗体的分子克隆揭示了四个独特的抗类胰蛋白酶克隆。这些克隆当中,克隆E104在酶促测定法中显示最稳健的抑制活性,并且选定其用于进一步工程化。平行地,还选定在酶促测定法中显示抑制活性的鼠抗类胰

蛋白酶单克隆抗体克隆31A用于进一步工程化。

[0511] (ii)嵌合E104(chE104)变体的生成

[0512] 兔抗类胰蛋白酶单克隆抗体E104的轻链是兔κ轻链,在可变结构域(VL)的FR3中的Cys80和恒定结构域(CL)中的Cys170之间含有二硫键。为了评价Cys80在VL中的重要性,生成了位置80处的半胱氨酸突变成丙氨酸(Cys80Ala)的嵌合E104变体。如表2中所示,两种变体之间就产率或聚集而言无差异,如通过大小排阻色谱测定的Cys80嵌合变体和Cys80Ala嵌合变体中的高单体%佐证。因此,确定Cys80残基并非关键,并且在人源化形式中,如VH4移植物中那样,将Cys80改变成脯氨酸残基。此外,与人IgG1或IgG4恒定结构域融合的在可变结构域FR3中具有Cys80Ala突变的嵌合E104抗体显示与位置80处具有半胱氨酸的兔单克隆抗体相似的抑制活性(数据未显示)。

[0513] 表2:抗类胰蛋白酶抗体E104的Cys80残基对产率和聚集的影响

[0514]

抗类胰蛋白酶克隆	轻链变体(位置 80 残基)	产率(mg)	单体%
E104	chE104.C	3.01	95.45
	chE104.A	3.14	95.2

[0515] (iii)兔抗类胰蛋白酶单克隆抗体克隆E104和小鼠抗类胰蛋白酶单克隆抗体克隆31A的人源化

[0516] 全部人源化变体均表达为IgG并且在**BIAcore®** SPR测定法中评价它们的结合亲和力。通常,全部人源化E104变体(huE104)均对人类胰蛋白酶β1单体显示相似的结合亲和力(表3)。表3列出了huE104变体以及如通过**BIAcore®**SPR分析所测定的结合亲和力(以K_D表示)。表3还提供每种变体的VH结构域和VL结构域的SEQ ID NO。表3中的每个克隆以IgG1样式受测试。一致地,在上文描述的酶活性测定法中观测到这些抗体的IC_{50}值非常相似,例外是在酶促测定法中,huE104.v1和huE104.v5克隆,及更低程度地,huE104.v11和huE104.v12,显示某种“钩状效应”(其中在高抗体浓度观察到酶活性增加,即,抗体抑制活性降低)。重链FR3区域中,从人源化抗体的V71修饰成兔单克隆抗体的原始Arg残基(V71R)和从人源化抗体的F78修饰成兔单克隆抗体的原始Val残基(F78V)消除了E104.v1、v5、v11和v12中所见的钩状效应。E104.v9嵌合克隆含有如亲本兔单克隆Ab E104中那样的R71和V78。参见表3。如图12B中所示,位置71处的精氨酸(R)残基和位置78处的缬氨酸(V)残基(均为Kabat编号)可能在HVR-H2的构象中发挥重要作用,并且因此在抗体结合类胰蛋白酶中发挥重要作用。作为结果,huE104.v2中的V71R和F78V修饰可能影响在形成小界面的两个原体缔合中重要的类胰蛋白酶80环的构象。参见以下实施例3。因此,如与位置71处具有V和位置78处具有F的v1相比,具有V71R和F78V回复突变的hu104.v2具备改善的结合及抑制活性。除v1、v5、v11和v12外的全部变体均显示完全抑制类胰蛋白酶活性,如通过上文描述的酶促测定法所测量。选择人源化克隆huE104.v2用于进一步评估。图1中显示huE104.v2的重链可变结构域和轻链可变结构域的氨基酸序列。

[0517] 表3:人源化E104(huE104)变体的结合亲和力(括号中是对人类胰蛋白酶b1单体的结合亲和力)

[0518]

		轻链		
		K1 移植物 (SEQ ID NO: 37)	K1 移植物 +A2 +L4 +P43 +E68 +F87 (SEQ ID NO: 58)	嵌合 LC (SEQ ID NO: 59)
重链	VH4 移植物 (SEQ ID NO: 47)	v1 (0.43 nM)	v5 (0.18 nM)	--
	VH4 移植物 +R71 +V78 (SEQ ID NO: 36)	v2 (0.18 nM)	v6 (0.14 nM)	v10 (0.26 nM)
	VH4 移植物 +V37 +S67 +R71 +V78 +F91 (SEQ ID NO: 48)	v3 (0.21 nM)	v7 (0.25 nM)	--
	VH3 移植物 +I48 +S67 +T73 +V78 (SEQ ID NO: 51)	v4 (0.44 nM)	v8 (0.24 nM)	--
	嵌合 HC (SEQ ID NO: 52)	v9 (0.24 nM)	--	--
	VH4 移植物 +V78 (SEQ ID NO: 49)	v11 (0.32 nM)	--	--
	VH4 移植物 +R71 (SEQ ID NO: 50)	v12 (0.12 nM)	--	--

[0519] 表4列出了hu31A变体以及如通过**BIAcore®**SPR分析所测量的结合亲和力(以K_D表示,纳摩尔)。表4还显示每种抗体的VH和VL的SEQ ID NO。全部变体均显示完全抑制类胰蛋白酶活性,如通过酶促测定法所测量(数据未显示)。表4中的每个克隆以IgG1样式受测试。克隆hu31A.v11在酶促测定法中显示最佳亲和力和最佳抑制活性并且因此选择它用于进一步评估。图1中显示hu31A.v11的重链可变结构域和轻链可变结构域的氨基酸序列。

[0520] 表4:人源化31A(hu31A)变体的结合亲和力(括号中是对人类胰蛋白酶b1单体的结合亲和力)

[0521]

	轻链		
	K1 移植物 (SEQ ID NO: 102)	K1 移植物 +S43 +P46 +W47 (SEQ ID NO: 10)	K1 移植物 + L4 +S43 +P46 +W47 +Y71

[0522]

				(SEQ ID NO: 103)
重链	**VH3 移植物 (SEQ ID NO: 98)**	**v1 (4.04 nM)**	**v2 (0.74 nM)**	**v3 (0.79 nM)**
	VH3 移植物 +A49 (SEQ ID NO: 99)	**v4 (11.8 nM)**	**v5 (1.68 nM)**	**v6 (1.65 nM)**
	VH3 移植物 +S31 +F32 +H35 +A49 (SEQ ID NO: 100)	**v7 (2.06 nM)**	**v8 (0.94 nM)**	**v9 (0.94 nM)**
	VH3 移植物 +A49 +T93 +N96 +Y97 +D98 (SEQ ID NO: 9)	**v10 (1.19 nM)**	**v11 (0.40 nM)**	**v12 (0.43 nM)**
	VH3 移植物 +A49 +T93 (SEQ ID NO: 101)	**v13 (9.65 nM)**	**v14 (1.34 nM)**	**v15 (1.32 nM)**

[0523] 使用上文描述的重组类胰蛋白酶酶活性测定法，还测定了人源化抗类胰蛋白酶抗体的抑制活性。在酶促测定法中，h31A.v11和huE104.v2，IgG1和IgG4，均完全抑制类胰蛋白酶活性(参见图2A)。下文显示IC_{50}值(表5)。

[0524] 表5：人源化抗类胰蛋白酶抗体的抑制活性(IC_{50})

[0525]

抗体	IgG1	IgG4
hu31A.v11	1.82nM±0.09	3.9nM±0.65
huE104.v2	0.91nM±0.35	0.59nM±0.11

[0526] 除了结合类胰蛋白酶β1外，hu31A.v11和huE104.v2均还结合并抑制人类胰蛋白酶β2和β3。基于上文对亲和力分析和使用人类胰蛋白酶β1作为靶的酶促测定法所述的方案，下文在表6中显示代表性数据。hu31A.v11和huE104.v2也均结合并且抑制食蟹猴类胰蛋白酶D1。

[0527] 表6：人源化抗类胰蛋白酶抗体的亲和力和IC_{50}

[0528]

抗体	人类胰蛋白酶	K_D(nM)	IC_{50}(nM)
hu31A.v11 IgG4	类胰蛋白酶β1	0.27	3.16
	类胰蛋白酶β2	0.12	1.46
	类胰蛋白酶β3	0.10	2.47
huE104.v2 IgG4	类胰蛋白酶β1	0.3	0.42

	类胰蛋白酶β2	0.18	0.95
	类胰蛋白酶β3	0.13	2.80

[0529] 在人主气道平滑肌细胞(SMC)功能的几个离体(ex vivo)模型中进一步评估hu31A.v11 IgG4或huE104.v2 IgG4的抑制活性。添加类胰蛋白酶β1至培养基导致人主气道SMC增殖增加(图2B)以及细胞收缩增加(图2C)。添加hu31A.v11或huE104.v2导致增殖的剂量依赖性减少并且在300μg/ml抑制增殖至基线水平(图2B)。类似地,添加hu31A.v11或huE104.v2减少收缩至基线水平(图2C)。这些数据显示,抗类胰蛋白酶抗体hu31A.v11和huE104.v2抑制类胰蛋白酶功能。

[0530] 添加类胰蛋白酶或IgE至肥大细胞导致脱颗粒和组胺释放(图2D-图2E)。评估了hu31A.v11抑制组胺释放的能力。具有S195A置换的类胰蛋白酶β1无催化活性。添加hu31A.v11阻断了类胰蛋白酶促进组胺释放的能力(图2D-图2E)。抑制程度(30-50%)类似于类胰蛋白酶β1活性的小分子抑制剂G02849855(图2E)。这些结果进一步显示,抗类胰蛋白酶抗体hu31A.v11抑制类胰蛋白酶功能。

[0531] 实施例2:hu31A.v11和huE104.v2 IgG使人类胰蛋白酶β四聚体解离

[0532] 活性四聚体类胰蛋白酶的晶体结构显示,每个原体的催化位点(由每个原体的S195、H57和D102代表,糜蛋白酶原编号)位于四聚体的孔内部,并且到达活性部位的通路如此受限,从而仅肽底物和更小的分子可以到达(Pereir等人Nature 392:306-11,1999)。迄今已知没有哺乳动物丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制类胰蛋白酶的蛋白酶解活性。Kunitz-结构域型架构的人丝氨酸蛋白酶抑制剂太大,以致于不能接近活性部位。人类中不存在类胰蛋白酶的已知天然抑制剂。迄今,类胰蛋白酶的唯一已知天然大分子抑制剂是水蛭衍生的类胰蛋白酶抑制剂(LDTI)(Sommerhoff等人Biol.Chem.373:685-94,1997)和蜱衍生的蛋白酶抑制剂(TdPI)(Paesen等人J.Mol.Biol.368:1172-86,2007)。LDTI(4.7kDa)和TdPI(11.1kDa)分别具有阻断类胰蛋白酶四聚体的四个活性部位中两个或三个活性部位的能力。LDTI和TdPI不使类胰蛋白酶四聚体解离。hu31A.v11的IgG和Fab均比LDTI或TdPI大得多,然而它们完全抑制类胰蛋白酶。

[0533] 我们在溶液中测定了Fab hu31A.v11与四聚体类胰蛋白酶结合的化学计量。将活性四聚体类胰蛋白酶β1与相对于每种原体2倍摩尔过量的Fab hu31A.v11混合并且允许复合物形成以达到平衡。因为四聚体非共价地装配,通过大小排阻色谱(SEC)分析每种抗体对四聚体结构的解离影响并且测定各蛋白质峰的保留时间/体积和分子量。通过SDS-PAGE表征含有蛋白质的级分,以确定蛋白质组分(图3A)。与复合有Fab hu31A.v11(t_r=28.1分钟,试验3,峰3)相比时,仅有四聚体类胰蛋白酶的保留时间显著较短(t_r=26分钟,试验1,峰1)。进行额外的SEC分析联合多角度光散射(MALS)以确定洗脱的蛋白质复合物的分子量。根据MALS,四聚体类胰蛋白酶具有分子量120kDa±0.2%,与基于氨基酸序列(不包括糖基化)的理论分子量109.537kDa一致。依据MALS,含有与Fab hu31A.v11复合的类胰蛋白酶的蛋白质峰经测量为67.7kDa±3%(峰3),其反映包含与1个Fab结合的1个类胰蛋白酶单体的复合物。这表明与Fab hu31A.v11结合时,类胰蛋白酶四聚体解离成单体,这通过hu31A.v11 Fab的晶体结构(参见实施例3)和抑制活性进一步确证。

[0534] 在含有高浓度肝素(例如,100μg/ml肝素(试验2))的酶测定缓冲液中通过SEC分析相同四聚体类胰蛋白酶/Fab hu31A.v11复合物时,类胰蛋白酶-Fab复合物的保留时间仅从

28.1分钟(试验3,峰3)略微降至27.6分钟(试验2,峰2),可能归因于肝素与类胰蛋白酶单体和Fab的蛋白质复合物结合。来自猪肠粘膜的肝素是具有6至30kDa分子量的聚阴离子链的混合物,其中大部分链处于17至19kDa范围内。这个结果表明,肝素对四聚体类胰蛋白酶的稳定化影响也被Fab hu31A.v11抵消或破坏;甚至高浓度100μg/ml的肝素亦不能阻止Fab hu31A.v11完全解离四聚体。参见图3A。

[0535] 还测定了溶液中huE104.v1和huE104.v2 Fab与四聚体类胰蛋白酶结合的化学计量。将活性四聚体类胰蛋白酶与相对于每种原体2倍摩尔过量的Fab混合并且允许复合物形成以达到平衡。通过SEC用不含肝素的类胰蛋白酶SEC缓冲液分离所得的复合物混合物并且测定各蛋白质峰的保留时间/体积和分子量。通过SDS-PAGE表征含有蛋白质的级分,以确定蛋白质组分(数据未显示)。根据MALS,WT四聚体类胰蛋白酶具有保留时间t_r=26分钟(参见例如,图3A的峰1)和分子量120kDa±0.2%,与基于氨基酸序列(不包括糖基化)的理论分子量109,537kDa一致。

[0536] huE104.v1 Fab与WT四聚体类胰蛋白酶形成均匀复合物,保留时间为t_r=21.6mL且分子量为276.1kDa,如通过SEC-MALS所测定(数据未显示)。这将代表类胰蛋白酶四聚体与4个与之结合的Fab的复合物。来自这个峰级分的SDS-PAGE分析证实Fab和类胰蛋白酶原体的存在。因此,huE104.v1 Fab与四聚体类胰蛋白酶形成稳定的复合物并且不影响四聚体稳定性(数据未显示)。

[0537] 将加His6标签的单体类胰蛋白酶(图3B,试验1)或WT四聚体类胰蛋白酶(图3B,试验2)与2倍摩尔过量的huE104.v2 Fab混合并且通过SEC逐一分析每种复合物混合物。每个色谱图的第一蛋白质峰分别具有保留时间t_r=25.8分钟(图2B,试验1,峰2)和t_r=26分钟(图2B,试验2,峰3)。来自这两个第一峰级分的SDS-PAGE分析显示类胰蛋白酶和E104.v2 Fab均存在于这个峰中。还通过MALS分析了两个蛋白质峰并且测定分子量为68kDa±3%,其反映包含与1个Fab结合的1个类胰蛋白酶单体的复合物。每个试验的第二峰分别具有保留时间t_r=31.6分钟(试验1,峰6)和t_r=31.8分钟(试验2,峰7),并且仅含有Fab huE104.v2,如通过SDS-PAGE所测定。两个SEC试验的色谱图实际上叠加,由于保留时间实际上相同,这表明huE104.v2 Fab结合使WT四聚体类胰蛋白酶解离成单体,与是否是四聚体类胰蛋白酶或加His标签的单体类胰蛋白酶用于复合物形成无关。

[0538] 在100μg/mL肝素存在下,将四聚体类胰蛋白酶与过量huE104.v2 Fab再次混合并在作为运行缓冲液的TNH缓冲液中通过SEC分析(试验3)时,观察到3个蛋白质峰:第一峰具有比仅有WT四聚体类胰蛋白酶(t_r=26分钟,例如,图3A,峰1)短得多的保留时间(t_r=21分钟,图3B,试验3,峰1)。第二峰具有保留时间t_r=27.2分钟(图3B,试验3,峰4)并且最后一个峰具有保留时间t_r=31.2分钟(图3B,试验3,峰5),其指示仅有Fab。SDS-PAGE分析显示类胰蛋白酶和Fab均存在于峰1和峰4中,其中峰1含有huE104.v2 Fab结合的活性四聚体,并且峰4含有huE104.v2 Fab结合的类胰蛋白酶单体(数据未显示)。这让我们得出结论:在100μg/mL高浓度的肝素存在下,仅部分的四聚体类胰蛋白酶被huE104.v2 Fab解离,如峰4中那样,而大部分的类胰蛋白酶保持峰1中与hu104.v2 Fab结合的四聚体类胰蛋白酶。总之,huE104.v1 Fab未显示可检测的抑制活性,而huE104.v2 Fab使类胰蛋白酶四聚体完全解离。然而,不同于hu31A.v11 Fab或huE104.v2 IgG,huE104.v2 Fab使四聚体解离的能力部分地被高浓度肝素抵消。因此,基于这些数据,我们得出结论:hu31A.v11 Fab能够在具有或

没有高浓度肝素的情况下，使类胰蛋白酶四聚体解离，并且huE104.v2 Fab能够在高浓度肝素不存在的情况下使类胰蛋白酶四聚体解离。

[0539] 每种类胰蛋白酶单体具有一组相同的催化三联体(catalytic triad)，并且四个单体装配以形成具有四个催化位点的四聚体，所述催化位点面向底物进入其中的中心孔。参见上文Pereira等人。通过阻断活性部位，Pereir等人讨论了小分子类胰蛋白酶抑制剂的设计。开发中的几种小分子类胰蛋白酶抑制剂已经因选择性差或生物利用度差而停止。参见，例如，Cairns,J.A.,2005,Pulmonary Pharmacology&Therapeutics 18:55-66。

[0540] 野生型四聚体类胰蛋白酶并未共价结合在一起并且可以在生理条件下解离成单体(Schwartz等人J.Biol.Chem.261:7372-7370,1986;Alter等人Biochem.J.248:821-827,1987;Schwartz等人J.Immunol.144:2304-2311,1990)。已经报道，成熟的类胰蛋白酶作为四聚体展示高度酶活性，并且在生理相关的条件下作为单体无活性(Schwartz等人.J.Biol.Chem.261:7372-7379,1986)。本文显示的数据表明：hu31.v11和huE104.v2均与类胰蛋白酶单体结合，均至少在低浓度肝素时解离四聚体成单体，并且在解离后，保持与单体结合。还已经报道，单体类胰蛋白酶可能在某些条件下有酶促活性(Fukuoka等人J.Immunol.176:3165,2006;Fajardo等人,2003,Biochem.J.369:603-610)。这些观察提出了问题：解离性抗类胰蛋白酶抗体是否将劣于活性部位阻断性抑制剂如稳定四聚体的活性部位阻断性抗体，因为血清无活性单体可以充当与单体结合的解离性抗体的主要池(sink)。并且如果单体可能在某些条件下有酶促活性，稳定四聚体的活性部位阻断性抗体可能作为治疗药更有利。

[0541] 我们首先在计算机模拟实验中使用药代动力学-药效动力学(PKPD)模型研究了如与稳定四聚体的中和性抗体相比，四聚体解离性抗体的有效性。该模型在**Simbiology ®**软件(Mathworks Inc,Cambridge MA)中开发，以模拟四聚体类胰蛋白酶在循环中和肺组织中生成、解离和清除，以及抗类胰蛋白酶抗体的PK和结合影响。考虑了两个类型的抗体：(1)当结合时使四聚体快速地解离，但也结合单体的解离性抗体；和(2)稳定四聚体的特异性抗体，其仅结合活性四聚体并且通过阻断其底物通路，中和其活性，而且还延长四聚体的半寿期。在每四周皮下施用300mg的假定给药方案下模拟K_D为0.2nM的四聚体解离性抗体。我们假定抗体的肺分配系数为10％。对于基线场景，我们假定血清中总类胰蛋白酶为4ng/ml并且组织区室中总类胰蛋白酶为10ng/ml，并且对于高类胰蛋白酶场景，我们假定血清类胰蛋白酶水平为10ng/ml和组织类胰蛋白酶水平为40ng/ml。四聚体生理性解离成单体的相对速率常数和每个种类的清除率导致总类胰蛋白酶池内单体对四聚体的8:1比率。

[0542] 对于模拟的给药方案300mg sc q4w施用解离性或稳定性抗体，图4A左小图显示肺中基线场景下总抗体和游离/未结合型抗体的抗体浓度，并且右小图显示相对于处理前单体水平和四聚体水平的相应肺(游离)类胰蛋白酶水平。结果表明，对于K_D＝0.2nM的解离性抗体(顶部小图)，大部分肺抗体保持游离(左上方小图)，表明即便与单体和四聚体结合，药物可用性足够；结果进一步表明，解离性抗体将实现超过90％的四聚体(活性)类胰蛋白酶持久减少(右上小图)。对于稳定性抗体(底部小图)，几乎全部抗体均游离(底部左小图)；然而，四聚体减少仅维持在或高于80％。

[0543] 因为在高总类胰蛋白酶条件可以认为四聚体特异的稳定性抗体有利，所以在更高的类胰蛋白酶场景下重复这些模拟(图4B)。在这些条件下，更多的解离性抗体被无活性单

体类胰蛋白酶结合，导致较低的游离抗体(比较图4B的左上方小图与图4A)并且导致解离性抗体更少但仍良好地中和四聚体(最小约80%)(图4B，右上小图)。通过比较，对于稳定四聚体的抗体，尽管游离抗体因缺少与单体结合而更多(图4B，底部左小图)，但与相同条件下的解离性抗体相比，抗体实现更少的中和(最小约70%)，即便在模拟中认为稳定性抗体具10倍更高的亲和力(K_D=0.02nM)(图4B，底部右小图)。更少的中和因充当四聚体“储库”的结合型靶的稳定性(半寿期)更大所致。因此，我们的模拟预测，解离性抗体有前景并且在测试的不同场景下将比四聚体特异的稳定抗体表现更好。

[0544] 我们接下来测试在不同的抗体剂量，解离性抗体与四聚体特异的稳定抗体比较会如何。图4C显示在基线场景和高类胰蛋白酶场景下，两种类型抗体的四聚体中和作用随抗体剂量水平变化(30，100，300mg sc q4w)而变化。在基线场景(图4C，左小图)，在考虑的全部剂量下，解离性抗体始终比稳定性抗体更好地减少四聚体活性。在高类胰蛋白酶场景(图4C，右小图)，就四聚体中和作用方面，解离性抗体在除最低剂量(30mg)外的全部剂量优于稳定性抗体，在最低剂量时两种抗体表现相当。尽管稳定性抗体的亲和力(K_D=0.02nM)比解离性抗体(K_D=0.2nM)大10倍，使用稳定性抗体实现的总体上较少的中和作用表明，与解离性抗体相比，使用稳定性抗体时，对于相当的四聚体中和作用，亲和力要求高得多(>10x)。对于两个场景，解离性抗体的四聚体中和作用(90%)的最佳剂量低于稳定性抗体(结果未显示)，即便对稳定性抗体要求亲和力10x更大。因此，在该模型下，跨所测试的剂量范围和类胰蛋白酶血清浓度和肺浓度，解离性抗体将优于或至少匹敌具有10x更高亲和力的稳定性抗体。此外，我们在本文展示，hu31A.v11和huE104.v2 IgG完全抑制全部类胰蛋白酶活性。参见图2A和表5。

[0545] 就我们所知，尚不存在为治疗性用途所开发的类胰蛋白酶四聚体解离性抗体的任何例子。已知，如与对照受试者相比，疾病组织(包括急性哮喘性肺)的炎性部位为酸性；参见，例如，Hunt等人Am.J.Respir.Crit.Care Med.161:694-699,2000；Steen等人J.Neuroscience 15:3982,1995；Bellocq等人J.Biol.Chem.273:5086,1998；和Lardner J.Leukocyte Biol.69:522,2001)。发表的数据显示，鼠单克隆抗类胰蛋白酶抗体B12在中性pH中和人类胰蛋白酶β，但是在酶促测定法中不能在酸性pH 6中和人类胰蛋白酶β活性(参见Fukuoka等人J.Immunol.176:3165,2006)。因此，我们对抗体hu31a.v11和huE104.v2测试其抑制人类胰蛋白酶β在中性pH和酸性pH剪切纤维蛋白原的活性的能力。

[0546] 简而言之，将人类胰蛋白酶β四聚体(1.0μg/mL)与受测试的抗体在pH 6.0或7.5的TNH缓冲液(50mM Tris，150mM NaCl，0.1mg/ml肝素)中，在室温预温育30分钟。随后将混合物与5μg人纤维蛋白原底物(Haematologic Technologies，Inc.，目录号HIC-0150R)在37℃温育2.5小时。hu31A.v11 Fab、huE104.v2 Fab和B12 mIgG1各自以200μg/mL受测试。通过SDS-PAGE和考马斯蓝染色分析剪切产物。

[0547] 如图5A和图5B中所示，人类胰蛋白酶β1在pH 6和7.5均剪切纤维蛋白原α和β链(比较泳道1：仅纤维蛋白原与泳道2：纤维蛋白原加类胰蛋白酶β1)。抗体hu31A.v11 Fab在pH 6和pH 7.5均抑制人类胰蛋白酶β(泳道3)，而在0.1mg/ml高浓度肝素的分析条件下，huE104.v2 Fab则否(泳道5)。泳道6是仅有B12 mIgG1。纤维蛋白原α链的减少指示类胰蛋白酶蛋白酶解活性。纤维蛋白原β链也受剪切，但是β链剪切作用往往在凝胶上模糊。因此定量α链的强度并且在图5A和图5B的底部小图中显示。因此，hu31A.v11 Fab在pH 6和7.5抑制类

胰蛋白酶活性，而在高肝素浓度的分析条件下，huE104.v2 Fab无抑制性。

[0548] 还在pH 6、7或8的TNH缓冲液中，使用S-2288肽作为抑制测定法中的底物，在1nM类胰蛋白酶和400μM生色性S-2288存在下，评价IgG样式抗体(hu31A.v11 IgG4和huE104.v2 IgG4)的抑制活性。在这个实验中，肝素终浓度是约95μg/ml。IgG样式的hu31A.v11和huE104.v2均在pH 6、7和8完全抑制类胰蛋白酶活性(数据未显示)。

[0549] 因此，hu31A.v11 IgG和huE104.v2 IgG均与类胰蛋白酶以高亲和力结合并且在对类胰蛋白酶相关疾病(如哮喘)的生理相关条件下也均有效抑制类胰蛋白酶活性。令人感兴趣地，在我们的实验条件中，与发表的结果相反，鼠单克隆抗人类胰蛋白酶抗体B12 IgG1还显示在pH 6抑制人类胰蛋白酶β(图5A，泳道4)。这种不一致可能归因于发表的数据中用于测定法的材料里存在的任何残余非类胰蛋白酶蛋白酶活性，所述活性由酸性pH激活并且抵抗B12抑制。

[0550] 实施例3：抗类胰蛋白酶抗体的结构性分析

[0551] A.31A家族抗体

[0552] (i).X射线结晶学

[0553] 将野生型四聚体类胰蛋白酶与1.5倍摩尔过量的Fab hu31A.v11和2倍摩尔过量的大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)(Roche)混合并且在室温温育10分钟。添加STI以促进结晶。混合物随后在10mM MOPS(pH 6.8)，0.5M NaCl中用S200柱(GE Healthcare)进行SEC。合并含有胰蛋白酶、STI和Fab hu31A.v11三元复合物的级分并浓缩至40mg/mL。

[0554] 使用蒸气扩散法在悬滴中，在19℃生长类胰蛋白酶/Fab hu31A.v11/STI的晶体。含有0.1M Tris(pH 7.5)、0.2M硫酸锂和5％聚乙二醇(PEG)4000的结晶缓冲液以等体积与蛋白质溶液混合。将晶体滴在含有25％乙二醇的人工母液中并且在液氮中玻璃化。

[0555] 表7显示Fab hu31A.v11/类胰蛋白酶/STI的结构的X射线数据采集和修正信息。在ALS Beamline 5.0.2在六边形晶格中采集扩展至**2.15 Å**的衍射数据。数据整理和缩放允许将Laue类归属至6/mmm(Otwinowski,Methods in Enzymol.276,307-326,1997;Winn等人Acta Crystallogr.Sect.D-Biol.Crystallogr.67,235-242,2011)。基于晶胞体积和拟议的蛋白质含量，以结晶学不对称单元预期单一Fab hu31A.v11/类胰蛋白酶/STI复合物。在空间群$P6_222$中使用分子置换(McCoy等人J.Appl.Crystallogr.40:658-674,2007)解析结构。使用以下检索探针，各自作为独立本体：衍生自PDB登录号4A6L的先前测定的类胰蛋白酶原体(Liang等人Bioorg.Med.Chem.Lett.22:1049-1054,2012)、来自PDB 1AVU的STI(Song等人J.Mol.Biol.275:347-363,1998)、从源于PDB1FVC的CDR环剥离的Fv片段(Eigenbrot等人J.Mol.Biol.229:969-995,1993)和来自PDB 1FVD的恒定区。在一些限制性修正(Murshudov等人Acta Crystallogr.Sect.D-Biol.Crystallogr.67:355-367,2011)后，电子密度图允许更正Fab蛋白质序列并将遗失的残基和侧链装配成清晰密度(Emsley等人Acta Crystallogr.Sect.D-Biol.Crystallogr.66:486-501,2010)。自动加入水(Adams等人Acta Crystallogr.Sect.D-Biol.Crystallogr.66:213-221,2010)。更多轮次的模型调整和修正(BUSTER软件;Global Phasing Ltd.,2011)导致最终模型。该模型对类胰蛋白酶残基Ile16-Lys244(糜蛋白酶原编号)、STI残基Asp1-Asp177、Fab轻链残基Asp1-Cys214(Kabat编号)(Kabat,Sequences of Proteins of Immunological Interest.Bethesda,MD,U.S.美国卫生和公众服务部(U.S.Dept.of Health and Human Services)，美国国家卫

生研究院,1991)是连续的。Fab重链为连续的,例外是恒定结构域中的五个氨基酸残基空位。形状互补性统计量(Sc)的值(Lawrence等人J.Mol.Biol.234:946-950,1993)是0.73,与其他紧密结合性Fab/抗原复合体一致。当类胰蛋白酶和STI各自在它们的界面损失**1260 Å^2**溶剂可及表面(Broger C,xsae,F.Hoffman-La Roche,巴赛尔,瑞士,2000),最大的蛋白质间接触区域是在它们之间的接触区域。与之相反,在每侧上Fab/类胰蛋白酶接触仅是**760 Å^2,**均匀分布在Fab的轻链和重链之间。**4 Å**或更小的晶胞堆积接触完全分布在STI、类胰蛋白酶和全部四个Fab结构域周围,并且包括众多氢键以及疏水性接触。

[0556] 表7:Fab hu31A.v11/类胰蛋白酶/STI的X射线数据集合和修正

[0557]

数据整理	
X射线源	**ALS 5.0.2**
波长(Å)	**0.97395**
分辨率范围(Å)	**31.48-2.15 (2.226-2.149)**
空间群	**P_6222**
晶胞边缘(Å)	**128.52 128.52 245.88**
晶胞角度(°)	**90 90 120**
全反射	**308799**
独特反射	**65702 (6404)**
重复度	**4.7 (4.8)**
完整度(%)	**99.8 (100)**
平均 I/σ(I)	**14.2 (2.3)**
Wilson B-因子(Å^2)	**37.02**
R-对称	**0.086 (0.681)**

[0558]

修正	
R-自由的参比	**1996**
R-作业	**0.190**
R-自由	**0.233**
非 H 原子的数目	**7057**
大分子	**6608**
乙二醇	**8**
水	**441**
蛋白质残基	**850**
RMS(键)	**0.010**
RMS(角)	**1.1**
Rama 有利 (%)	**97**
平均 B-因子(Å^2)	**45.7**
大分子	**45.6**
乙二醇	**59.7**
溶剂	**47.1**

[0559] (ii)通过氢-氘交换(HDX)分析和通过MS测量的抗类胰蛋白酶抗体的表位定位

[0560] 测量在抗体存在和不存在下单体类胰蛋白酶的氘摄取速率以确定当抗体结合时被修饰的结构区。结合的样品含有在室温配制和温育1小时的类胰蛋白酶和各抗体的1:1混合物。抗体结合的和未结合的样品中,氘标记之前的类胰蛋白酶浓度是30μM。HDX实验涉及将样品15倍稀释入pD 7.0的含有20mM乙酸组氨酸的氘标记缓冲液中。一式三份取得在30秒和1000分钟之间对数采样的六个标记时间,通过降低pH至pH 2.5并添加2M氯化胍(GdmCl)和0.25M三(2-羧乙基)膦(TCEP)来猝灭,并且注入在线冷系统,如先前所描述(Mayne等人,J.Am.Soc.Mass.Spectrom.22:1898-1905,2011)。

[0561] 简而言之,将样品首先穿过固定化胃蛋白酶柱(2.1x 30mm,Applied Biosystems)并加载于捕获柱上(Acquity Vanguard C_8)脱盐。随后使用Acquity UPLC™BEH C_{18}柱(1.7μm粒度,1.0x 50mm),通过反相色谱分离肽片段,并引入质谱仪(Thermo Orbitrap Elite™,在m/z 400时120k Hz分辨率)供质量分析。如先前所描述那样制备色谱流动相,以最大限度减少氘回溯交换(Walters等人,J.Am.Soc.Mass Spectrom.23:2132-2139,2012)。ExMS程序(Kan等人J.Am.Soc.Mass.Spectrom.22:1906-1915,2011)用来鉴定氘化肽并制备提取离子色谱图,所述色谱图随后用自有python脚本分析(Walters等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA

110:18898-18903,2013)。这些脚本组合简并电荷状态,用二项式拟合同位素分布,并且提取每种肽平均携带的氘的数目。

[0562] (iii)通过液相色谱/质谱(LC/MS)的完整质量

[0563] 将纯化的蛋白质(包括类胰蛋白酶及其突变体)用0.1%三氟酸(TFA)(Thermo,Rockford,IL)酸化并稀释至终浓度10μM。在联合Agilent 1260Infinity高效液相色谱(HPLC)-Chip Cube接口的Agilent 6520Accurate-Mass四极飞行时间(Q-TOF)(Agilent,加利福尼亚州圣克拉拉)上分析样品。在PLRP-S150mm x 75μm柱上以40nL/分钟流速,采用水溶剂A(97%H_2O,3%乙腈,0.1%甲酸)的5-80%梯度至有机溶剂B(98%乙腈,0.1%甲酸)10分钟,通过反相HPLC分离蛋白质。用Mass**Hunter®**工作站(Agilent,加利福尼亚州圣克拉拉)采集数据并且将原始质谱解卷积以产生完整质量数据。在61764.4Da和63152.9Da观察到主峰。还观察到加入多个GlcNAc(203Da)质量。

[0564] (iv)结果

[0565] 人类胰蛋白酶的晶体结构显示,四聚体的每个单体在两个不同界面通过六个环区段接触其邻居:大界面(在原体A/D和B/C之间)或小界面(在原体A/B和C/D之间)(根据Pereira等人Nature 392:306-11,1998描述的原体命名法,所述文献通过引用方式完整并入本文作为参考)。每个原体的六个表面环围绕活性部位并参与单体间接触(Pereira,上文)。在其中,147环、70-80环和37环参与小界面的相互作用,并且173翼(flap)、97环和60环在大界面相互作用中重要。在小界面仅包括疏水相互作用的同时,大界面除疏水相互作用之外还包含几个极性、带电荷的相互作用。肝素通过跨越两个邻近原体A/B和C/D与带正电荷残基非共价结合来进一步稳定小界面,认为这些小界面是四聚体的剪切点。参见上文Pereir。天然地,小界面是四聚体的剪切点,随后由大界面维持的二聚体解离。在形成全身过敏后,人血中循环的类胰蛋白酶的半寿期是约2-3小时(参见,例如,Schwartz等人J.Clin.Invest.83:1551-1555,1989)。四聚体的正常半寿期是约30分钟。

[0566] 我们确定当hu31A.v11或huE104.v2与类胰蛋白酶结合时,将类胰蛋白酶四聚体固定在一起的蛋白质小界面或大界面是否去稳定化。生成两个类胰蛋白酶突变体,其导致四聚体中的两个邻近原体通过大界面(在原体A/D和B/C之间)或小界面(在原体A/B和C/D之间)(根据上文Pereira等人所述的原体命名法)中的分子间二硫键共价连接。因此,因共价二硫键连接的二聚体形成而阻止小界面解离时,仍允许大界面解离。相反地,因共价二硫键连接的二聚体形成而阻止大界面解离时,仍允许小界面解离。

[0567] 将小界面中的Tyr75和大界面中的Ile99(糜蛋白酶原编号,图7)各自突变成半胱氨酸。因为这些位点在这些界面中因四聚体的准2重对称性而面向自身,所以选择这些位点(Sommerhoff等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:10984-91,1999)。使用PyMOL软件的计算机模拟Tyr75或Ile99替换成半胱氨酸显示每个对立半胱氨酸的硫醇之间的各自距离为**2.4 Å**和**3.2 Å**,所述距离或多或少大于常见二硫键长度**2.05 Å**。然而,表达并纯化两个所得的四聚体突变体并且它们含有在各自界面之间已经形成的二硫键,如通过胰蛋白酶解肽MS分析所测定。另外,两种突变体还有酶促活性,但与野生型四聚体类胰蛋白酶相比时,其中催化效率为约一半(k_{cat}/K_M)(表8)。

[0568] 表8:野生型和突变类胰蛋白酶的酶活性

[0569]

类胰蛋白酶	K_M (μM)	V_{max} (nM/sec)	k_{cat} (1/s)	k_{cat}/K_M (1/(M*s)	催化效率(突变体/WT)
WT	554	400	100	180505.42	1
Y75C 小界面锁定	320	133	33.25	103906.25	0.57

[0570]

I99C 大界面锁定	798	235	58.75	73621.55	0.41

[0571] 分析与hu31A.v11 Fab或huE104.v1 Fab复合的这些突变体大小。如上文对野生型类胰蛋白酶所述，将类胰蛋白酶突变体Y75C和I99C各自与2倍摩尔过量的Fab hu31A.v11混合以形成复合物，并通过大小排阻色谱分析。作为比较用参考，将野生型四聚体类胰蛋白酶与来自抗体huE104.v1的Fab复合，所述抗体与类胰蛋白酶特异性结合，但不使四聚体解离并且在高抗体对四聚体比率时丧失抑制活性。与huE104.v1 Fab复合的野生型四聚体类胰蛋白酶具有保留时间21.6分钟(图6A，参比峰)。对这种复合体的SEC-MALS分析确定分子量为276.1kDa，表示包含一个类胰蛋白酶四聚体和四个结合的Fab的复合物。

[0572] Fab hu31A.v11与四聚体类胰蛋白酶突变体Y75C和I99C形成保留时间分别是25.6分钟(图6A，试验2，峰1)和23.9分钟(图6A，试验3，峰2)(图6A)的复合物。两个保留时间均长于参考复合物的保留时间，这表明与Fab hu31A.v11形成复合物时，这两种四聚体突变体均解离成其各自共价连接的二聚体。从每个峰采集样品并通过SDS-PAGE分析，以确认每个峰中的种类(图6B)。对这些洗脱的蛋白质峰的SDS-PAGE分析显示，Fab hu31A.v11和各自的类胰蛋白酶二聚体均存在于相同级分中(图6B)。试验4的峰3(T_r为28.1分钟)和峰4(T_r为31.6分钟)分别代表与Fab hu31A.v11和过量的Fab复合的WT单体。在SDS PAGE中，少量峰3样品交叉污染至峰4样品。与Fab hu31A.v11复合的两种类胰蛋白酶突变体均以长于参比峰的保留时间运行，表明当Fab hu31A.v11结合时，大界面和小界面均去稳定化。这种去稳定化导致四聚体解离，如对野生型类胰蛋白酶四聚体所观察到的那样，这最终使类胰蛋白酶的蛋白酶解活性失活。B12 Fab还使两种突变四聚体去稳定化(数据未显示)。

[0573] 使用X射线结晶学，研究人源化抗类胰蛋白酶抗体hu31A.v11与成熟人类胰蛋白酶β1的结合，以**2.15 Å**分辨率确定类胰蛋白酶和hu31A.v11的Fab片段之间分子复合物的结构。结果是含有与一个hu31A.v11 Fab相互作用的一个类胰蛋白酶/STI(大豆胰蛋白酶抑制剂)复合物的结晶学不对称单元。出于结晶目的包含STI。

[0574] 表位的一个定义是在hu31A.v11 Fab的任何原子的**4 Å**范围内的类胰蛋白酶氨基酸集合。程序PyMOL用来发现表位。类胰蛋白酶多肽链中的氨基酸残基可以根据背离顺序编号以允许同源蛋白之间比较的惯例编号(糜蛋白酶原编号)。提供在这种类胰蛋白酶残基编号方案和简单顺序编号方案之间转换的表(图7)。以下类胰蛋白酶残基根据该惯例命名，在括号中为基因顺序编号方案。

[0575] 类胰蛋白酶上hu31A.v11的表位包含以下残基：H36、Q50、V60c、K60d、D60e、L61、

A62、A63、R65、P84、V85、S86、R87、E109、E110、P111(糜蛋白酶原编号,分别与SEQ ID NO:71的H51、Q67、V80、K81、D82、L83、A84、A85、R87、P103、V104、S105、R106、E128、E129和P130相对应)。参见图8。类胰蛋白酶的60s、80s和100s环的残基密切接触于Fab hu31A.v11,而His36和Gln50残基更多在与Fab相互作用的外围。还参见上文Pereira等人。Fab-类胰蛋白酶接触排除来自溶剂(每侧面)的**760 Å^2**,来自Fab轻链(Val30、Thr31、Tyr32、Tyr34、Arg50、Tyr90、His92、Ser93、Tyr94)和重链(Phe50、Ser52、Gly53、Ser54、Ser55、Thr56、Tyr58、Arg95、Tyr97、Asp98)的贡献相等。认为上文描述的表位残基还将适用于31A衍生的其余抗体。

[0576] 当来自三元复合物的Fab/类胰蛋白酶二聚体叠加到来自野生型四聚体的类胰蛋白酶原体A和D上时(上文Pereir等人),我们发现两个Fab坐落于四聚体的相同侧面上,几乎垂直于四聚体平面(图9)。对原体B和C重复这个过程则将两个Fab置于四聚体的对侧面上。值得注意地,这些结果突显Fab轻链之间的空间冲突(steric clashes),与以下事实一致:在SEC上Fab作为与单体类胰蛋白酶的1:1复合物洗脱并且不作为与四聚体类胰蛋白酶的复合物洗脱(图9)。

[0577] 四聚体类胰蛋白酶并未共价结合在一起,而是可以在生理条件下解离成单体,如通过酶活性随时间推移衰减和溶液中圆二色性(CD)谱变化所监测的那样(Schwartz等人J.Biol.Chem.261:7372-7379,1986;Schwartz等人J.Immunol.144:2304-11,1990)。hu31A.v11(Fab或IgG)与四聚体的每个原体结合将促进并加速四聚体解离并且阻止因结合于类胰蛋白酶时Fab的空间冲突所致的任何四聚体复缔合。因此,类胰蛋白酶以更迅速的方式解离并且变成无酶促活性的单体,原因在于每个原体上hu31A.v11结合引起的变构变化。因为四聚体中的伪2重对称性,构成小界面和大界面的几乎全部相互作用存在两次。这还意味着hu31A.v11结合引起的每个难以察觉的类胰蛋白酶结构变化在每个界面中出现两次,因而激活去稳定化。

[0578] Fab hu31A.v11与类胰蛋白酶的复合物结构在位于大界面的60s环中显示显著变化。特别地,当被hu31A.v11 Fab结合时,残基Val60c(与SEQ ID NO:71的Val80相对应)与其在未结合的类胰蛋白酶结构中发现的位置相比时,在侧链显著位移。在未结合的类胰蛋白酶四聚体中,来自邻近原体的Tyr173d位于残基Val60c和Val90产生的疏水性口袋中(图10,二者均依据糜蛋白酶原编号,还参见图7)。在抗体复合物中,Val60c的构象变化产生阻止Tyr173d与该口袋结合的空间位阻。由于hu31A.v11与类胰蛋白酶的结合涉及与60s环的部分和附近残基相互作用,它可能是Val60c中这钟构象变化的原因。这可能导致大界面去稳定化并且将因此增强类胰蛋白酶四聚体解离成无活性单体。

[0579] 类胰蛋白酶中的咪唑环His36(与SEQ ID NO:71的His51相对应)与Fab hu31A.v11发生疏水相互作用,与未结合的四聚体结构中的类胰蛋白酶原体相比时,这导致类胰蛋白酶残基His36、Pro37a和Tyr37b的30s环中的C_α轨迹变化。这影响Tyr37b侧链的构象,从而可能削弱与小界面中包含Pro152和Pro152a的邻近原体的关键疏水相互作用(图11,全部依据糜蛋白酶原编号,也参见图7)。

[0580] 两种不同的二硫键锁定型类胰蛋白酶变体Y75C和I99C与hu31A.v11 Fab的复合体形成研究显示,四聚体类胰蛋白酶的大界面和小界面被抗体去稳定化。与四聚体结合的Fab的空间冲突以及大界面和小界面的关键相互作用残基的构象变化均在促成聚体解离方面

可能重要。这两种因素不互斥。计算机模拟展示在结合至四聚体的每个原体时来自hu31A.v11 Fab的空间位阻表明，来自单个IgG的两个Fab一般不与一个四聚体同时结合(图9)。这个观察与hu31A.v11的Fab和IgG能够使四聚体解离，因而抑制酶活性的研究结果一致。这个观察还表示抗体结合的已解离单体不大可能再装配以形成四聚体。

[0581] 接着，进行与hu31A.v11 Fab结合的单体类胰蛋白酶的HDX实验以研究溶液中的结合相互作用。通过质谱法监测随时间推移的HDX程度。尽管这种方法提供指示hu31A.v11结合表位的信息，它还检测构象稳定性的变构变化，后者可能远离抗体结合表位发生。当结合hu31A.v11时显示类胰蛋白酶中较慢交换的酰胺键位于残基25-29、40-41、57-59、60-61、66-67、83-88、108-110和231-233的区域(糜蛋白酶原编号)。将这些区域与如晶体结构中所见的Fab hu31A.v11的**4 Å**范围内的类胰蛋白酶残基比较时，在鉴定60s、80s和100s环中结合表位残基的两种方法之间观察到高程度的重叠(图8)。根据晶体结构，用HDX鉴定的其他区域，如类胰蛋白酶一级序列的20s、40s、50s和230s区域中的位置，并不与抗体直接接触，但显示在hu31A.v11存在下构象动力学降低。令人感兴趣地，残基57-59似乎变构地受hu31A.v11结合影响。这个短α-螺旋含有作为丝氨酸蛋白酶中催化三元组的部分并且对催化活性必需的残基His57(糜蛋白酶原编号)。尽管通过HDX鉴定的残基40和41不与hu31A.v11直接接触，它们在一个令人好奇的结构性位置中，所述结构性位置作为在其发夹环中展示Tyr37b(胰凝乳蛋白酶编号)的反平行β-折叠的部分，所述Tyr37b是如上文讨论的小界面的重要的接触残基(图11)。该区域的结构性改变可能影响小界面的稳定性并潜在地导致四聚体解离。

[0582] 在20s环(非结构化环中的全部残基)和230s区域(也称作230s螺旋)中根据HDX也在其结构性动力学方面经历变化的肽键远离hu31A.v11的结合位点。HDX实验监测结构动力学的变化，并且不区分体积构象(bulk conformation)的变化与特定构象的能量学稳定性的变化。总之，我们在通过HDX和X射线结晶学获得的结构信息和鉴定的变构上受hu31A.v11结合影响的额外残基之间找到高程度一致性。

[0583] B.E104衍生的抗类胰蛋白酶抗体的结构分析

[0584] (i)材料和方法

[0585] huE104.v1 Fab用来产生与类胰蛋白酶四聚体的晶体结构，因为huE104.v1的结合不使四聚体解离。使用蒸气扩散法，通过将蛋白质按1:1(v/v)与含有0.1M Tris(pH 8.5)、0.2M氯化钙、20％聚乙二醇(PEG)4000和8％季戊四醇乙氧基化物的储液混合，在19℃生长类胰蛋白酶/huE104.v1晶体。在含有0.1M Tris(pH 8.5)、0.2M氯化钙、35％PEG 3350的人工母液中深冷保护晶体并且在液氮中急冻。使用Pilatus 6M像素阵列检测器和**0.9795 Å**波长X射线，在延伸至**3 Å**分辨率的单斜晶格中在SSRL光束线12-2采集衍射数据。将数据整理(Kabsch,Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.66:125-132,2010;Vonrhein等人Acta.Crystallogr.D67:293-302,2011)并缩放(Winn等人Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.67:235-242,2011)，并且在空间群P21中通过分子置换(McCoy等人J.Appl.Crystallogr.40:658-674,2007)解析结构，揭示由四个Fab结合的类胰蛋白酶四聚体。分子置换检索探针是来自PDB登录号4A6L的类胰蛋白酶原体和仅使用旋转函数通过用一系列弯角扫描修饰的形式，从PDB登录号1FVD导出的抗体Fab片段。在有限修正后，在分子

置换检索中，仅使用来自1FVD的恒定区，替换一个Fab恒定区。将类胰蛋白酶残基编号改变为糜蛋白酶原方案，并将Fab-E104v1残基编号改变为Kabat方案。使用Coot(Emsley等人Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.66:486-501,2010)实施模型和电子密度图检查与调整，并且使用REFMAC5(Murshudov等人Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.67:355-367,2011)和Phenix(Adams等人Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.66,213-221,2010)修正结构。表9中显示数据采集和修正指标。如上文所述进行HDX实验。

[0586] 表9:类胰蛋白酶β-huE104.V1 Fab的X射线指标表

[0587]

数据	
X射线源	SSRL 12-2
波长(Å)	0.9795
分辨率范围(Å)	50 - 3.0 (3.112 - 3.005)
空间群	P21
晶胞 *a*、*b*、*c* (Å)	89.573 168.811 114.652
晶胞 α、β、γ (°)	90 109.97 90
全反射	214206
独特反射	62353
重复度	3.4 (3.5)

[0588]

完整度(%)	**97.8 (99.7)**
平均 I/σ(I)	**11.3 (2.1)**
Wilson B (Å^2)	**72.2**
R-对称	**0.098 (0.577)**
修正	
R-自由的反射	**1266**
R-作业	**0.187 (0.278)**
R-自由	**0.232 (0.340)**
非 H 原子的数目	**20794**
大分子	**20689**
配体	**100**
离子	**3**
水	**2**
蛋白质残基	**2702**
RMS(键) (Å)	**0.01**
RMS(角) (°)	**1.2**
拉氏有利(%)	**94**
平均 B-因子(Å^2)	**71.5**
大分子	**71.6**
配体	**48.4**
离子、水	**71.6**

[0589] (ii)结果

[0590] 为了确定使类胰蛋白酶四聚体结合在一起的蛋白质小界面或大界面是否在huE104.v2 Fab结合时去稳定化,将四聚体类胰蛋白酶突变体Y75C或I99C(参见上文)与2倍摩尔过量的Fab huE104.v2混合用于复合物形成,并且用SEC分析(图6C)。huE104.v2 Fab与四聚体类胰蛋白酶突变体Y75C形成复合物并且色谱图显示保留时间t_r=21.6分钟(图6C,试验1,峰1)和t_r=31分钟(峰4)的两个峰,所述峰包含过量的Fab。huE104.v2 Fab与四聚体类胰蛋白酶突变体I99C形成复合物并且色谱图显示保留时间t_r=23.8分钟(图6C,试验2,峰2)和t_r=31分钟(试验2,峰5)的两个峰,所述峰包含过量的Fab。SDS-PAGE分析显示,

huE104.v2 Fab和类胰蛋白酶二聚体突变体均存在于峰1和峰2中并且过量的Fab存在于峰4和峰5中(数据未显示)。为了比较,与WT类胰蛋白酶四聚体复合的huE104.v2 Fab具有保留时间t_r=26分钟(图6C,试验3,峰3),包含Fab huE104.v结合的单体,所述单体小于与huE104.v2复合的类胰蛋白酶四聚体突变体I99C(t_r=23.8分钟,试验2,峰2)。与huE104.v2 Fab复合的类胰蛋白酶突变体Y75C(小界面锁定的突变四聚体)具有与结合至huE104.v1的四个Fab的WT类胰蛋白酶四聚体的稳定、完整复合物相似的保留时间(参见图6A,试验1,参比峰)。在另一方面,相比试验1中的第一峰,与huE104.v2复合的类胰蛋白酶突变体I99C(大界面锁定的突变四聚体)具有较长的保留时间,提示更小的复合物。结果表明huE104.v2 Fab仅能够使四聚体的小界面解离,但不能够使其大界面解离。因此,与野生型类胰蛋白酶四聚体结合时,huE104.v2 Fab结合仅使小界面解离。在实验条件下,解离的小界面可以被局部高浓度(例如,0.1mg/ml)存在的肝素迅速恢复,这将导致四聚体再装配。这个肝素浓度大幅度高于肝素生理浓度,已经报道后者是约1.5μg/ml血清(参见,例如,Engelberg等人,Circulation 23:578-581,1961和Davids等人S.Afr.Med.J.100:307-307,2010)。在低肝素浓度,huE104.v2 Fab也能够使WT类胰蛋白酶四聚体完全解离并且中和类胰蛋白酶活性,但是其效力小于IgG形式的huE104.v2。

[0591] 为了进一步深入了解huE104.v2在类胰蛋白酶上的确切结合表位,我们试图结晶Fab huE104.v2/类胰蛋白酶复合物。由于我们不能获得任何合适的晶体,所以通过大小排阻色谱分离的与四个Fab E104.v1结合的WT四聚体类胰蛋白酶的复合物用于结晶。huE104.v1和huE104.v2仅相差两个构架游标位置,而HVR相同。因此,huE104.v1是阐明huE104.v2的结合表位的良好代用品。使用X射线结晶学,研究人源化抗类胰蛋白酶抗体huE104.v1(参见实施例1)与成熟人类胰蛋白酶β1的结合,以3.0埃(Å)分辨率确定类胰蛋白酶和huE104.v1的Fab片段之间分子复合物的结构。结果是含有一个类胰蛋白酶四聚体的结晶学不对称单元,所述类胰蛋白酶四聚体通过与EGR-氯甲基酮复合而稳定化,与四个huE104.v1 Fab以如此方式相互作用,从而每个Fab几乎排他地与仅类胰蛋白酶原体之一相互作用(图12A)。分子间晶胞堆积环境不包括巨大空隙,并且具有中等数目的小于4 Å的晶胞堆积接触。例如,两个huE104.v1 Fab VL结构域在它们的ABDEβ-链面遇到非结晶学2重接触,涉及来自Thr和Ser链和其他者的H键。另一个具有几个分子间接触的更小区域存在于重链恒定结构域(在与相同链的可变结构域的肽连接附近)和邻近轻链恒定结构域“底部”之间。在Fab的堆积接触(平均12)中存在比类胰蛋白酶原体(平均3.5)更多的残基,即便类胰蛋白酶原体具有更多残基(243个残基,相对于大约215个残基而言是更多残基)。在这个意义上,晶体至少部分地借助Fab-Fab分子间接触形成。

[0592] huE104.v1 Fab的三个拷贝展示密切相似的140°、138°和141°弯角(可变结构域(VH和VL)和恒定结构域(CH和CL)之间的角度)。huE104.v1 Fab的第四拷贝以其恒定区的电子密度相对贫乏为特征并展示152°弯角。作为溶剂可及表面区域计算的抗体抗原结合表面区域(互补位)丧失(Adams等人Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.66:213-221,2010)与类胰蛋白酶原体接触,平均682 $Å^2$并且为重链占优势,为71%,相比之下,轻链为29%。形状互补性统计量(Lawrence等人J.Mol.Biol.234:946-950,1993)Sc平均为0.76,这在带蛋白质抗原的抗体的高端点上。我们的结果的分辨率太低,以致于不能分辨出水结构,

但是Sc值提示，可能存在极少的界面水。非结晶学对称性(NCS)限制的使用根据R-自由值产生优越的修正。Fab结构域(VL、CL、VH或CH1)的Cα原子的叠加的均方根偏差(RMSD)处于十分之几埃的数量级上。

[0593] 在其配偶体类胰蛋白酶的4 Å范围内的抗体残基对于四个拷贝而言十分相似并且包括：轻链残基Y29、N30、R32(HVR-L1)、R94(HVR-L3)和重链残基G31、Y32(HVR-H1)、S52、S53、A54、T56、F58(HVR-H2)和P96、R97、G98、Y99、R100e(HVR-H3)。

[0594] 每一huE104.v1 Fab接触配偶体类胰蛋白酶原体的密切类似区域。这个表位离开活性部位底物结合裂隙大约90°，并且将每个Fab布置成从大致呈四方平面的类胰蛋白酶四聚体的平面垂直伸出。由于类胰蛋白酶原体围绕类胰蛋白酶环以上/下/上/下方式缔合，存在两个从四聚体“向上”伸出的Fab和两个“向下”伸出的Fab(图12A)。

[0595] 结晶学不对称单元(asu)包括4个组织成大约对称性四聚体的类胰蛋白酶原体。四个类胰蛋白酶原体各自在活性部位被共价修饰(来自使用Glu-Gly-Arg-氯甲基酮处理)并且用基于Cα原子约0.1 Å的配对rmsd叠加。如果asu中每个原体处于四个Fab中仅一者的4 Å范围内，则它将有可能定义四个huE104.v1表位，每个类胰蛋白酶原体一个表位，并且，缺少严格对称性时，这四个表位可能略微不同。存在一些处于某个Fab的4 Å范围内的类胰蛋白酶残基，所述Fab不提供与之相互作用的体积，本文中称作“非配偶体Fab”。既然这是真实的，故还可能定义类胰蛋白酶四聚体的huE104.v1表位。

[0596] 程序PyMOL用来鉴定表位，在这个实施例中，所述表位在huE104.v1 Fab的任何原子的4 Å范围内的类胰蛋白酶氨基酸集合。如上文所述，类胰蛋白酶多肽链中的氨基酸残基可以根据糜蛋白酶原编号方案编号(图7)。以下类胰蛋白酶残基根据糜蛋白酶原编号方案命名，在括号中为基因顺序编号方案。

[0597] 存在4个在类胰蛋白酶原体和其配偶体Fab之间定义的表位。全部四者均含有几乎完全相同的类胰蛋白酶氨基酸残基集合。这些残基是：W38、Q50、D60e、L61、A62、R65、Q81、L82、L83、P84、V85、S86、R87、E107、L108、E109和E110(糜蛋白酶原编号，分别对应于使用基因顺序编号方案的残基W55、Q67、D82、L83、A84、R87、Q100、L101、L102、P103、V104、S105、R106、E126、L127、E128和E129，残基对应于SEQ ID NO:71的位置)。对于四个表位中的两者，残基L61(SEQ ID NO:71的L83)不存在，但仅勉强超过4 Å标准。对于四个表位中的一者，残基Q81(SEQ ID NO:71的Q100)不存在。如果不是这种情况，则全部四个表位将依据定义标准为相同。

[0598] 另外，非配偶体Fab在四聚体产生小数目的4 Å接触。正是这些类胰蛋白酶残基区分四聚体表位与原体表位。接触的类胰蛋白酶残基是：Q20和R187(分别对应于SEQ ID NO:71的Q35和R216)。

[0599] 因此，类胰蛋白酶四聚体上huE104.v1的表位是以下每者的4个凡例：W38、Q50、D60e、L61、A62、R65、L82、L83、P84、V85、S86、R87、E107、L108、E109和E110(糜蛋白酶原编号，分别与SEQ ID NO:71的使用基因顺序编号方案的残基W55、Q67、D82、L83、A84、R87、L101、L102、P103、V104、S105、R106、E126、L127、E128和E129相对应)、加Q81(SEQ ID NO:71的Q100)的三个凡例、加Q20(SEQ ID NO:71的Q35)的1个凡例、加R187(SEQ ID NO:71的R216)

的三个凡例的总和。认为上文描述的表位残基还将适用于E104衍生的其余抗体，包括huE104.v2。

[0600] 尽管huE104.v1和v2具有相同的CDR序列，并且将与相同表位结合，但这两种变体在Fab中及IgG中表现不同：huE104.v2 Fab使四聚体解离并且更具体地在小界面使四聚体解离，而huE104.v1 Fab则否；并且在IgG中，huE104.v2使四聚体解离并失活，而huE104.v1在高抗体对类胰蛋白酶比率时丧失抑制活性。我们假设，虽然huE104.v1和huE104.v2与类胰蛋白酶上的相同接触残基结合，但是在它们怎样与类胰蛋白酶相互作用之间存在微妙差异。为了在溶液中鉴定huE104.v1和huE104.v2 Fab之间与类胰蛋白酶相互作用的差异，用单独的或与huE104.v1或huE104.v2结合的单体类胰蛋白酶进行HDX实验，并且通过质谱法监测随时间推移的氢-氘交换程度。尽管这种方法提供指示huE104.v1和huE104.v2的结合表位的信息，它总体上监测结构动力学变化，后者可能远离抗体结合表位发生。这些测量不区分体积构象(bulkconformation)的变化与特定构象的能量学稳定性的变化。

[0601] 当结合huE104.v1或huE104.v2时显示类胰蛋白酶中较慢交换的酰胺键定位至残基25-27、60-61、66-68、88和108-110的区域(糜蛋白酶原编号；表10)，但是还找到了显示较慢交换的仅为huE104.v1或huE104.v2特有的酰胺键。例如，仅当结合huE104.v1时，类胰蛋白酶残基47-50、54-55、85-87、119-122、179、230-231和244-245(糜蛋白酶原编号)的酰胺键才显示较慢交换。另一方面，仅当结合huE104.v2时，类胰蛋白酶残基25、41-43、81-81和160-162(糜蛋白酶原编号)的酰胺键才显示较慢交换(表10)。最令人好奇的较慢氢交换差异是类胰蛋白酶中残基81-83(糜蛋白酶原编号下的Q81、L82和L83，与SEQ ID NO:71的Q100、L101和L102相对应)的酰胺键，仅当结合huE104.v2时，其才显示较慢交换。该区域特别有意义，因为它是其中驻留小界面的两个关键接触残基(Y74和Y75)的环的部分。类胰蛋白酶残基81-83还与huE104.v1的HVR-H2直接接触，如具有四聚体类胰蛋白酶的复合物的晶体结构中所见，但是根据HDX结果，认为该区域必须与huE104.v2发生比huE104.v1与类胰蛋白酶相互作用更强且推定不同的相互作用。80s环Cα-主链和侧链的构象变化可能影响对四聚体复合物中两个类胰蛋白酶原体之间疏水性小界面关键的Y74和Y75的构象。由于界面对称，故huE104.v2与每个原体结合时，来自两个相互作用性原体的残基Y74和Y75受影响，这将会放大这个界面的任何变变化和不稳定性。

[0602] 如上文提到，huE104.v1和huE104.v2之间的差异是构架游标残基V71R和F78V。先前已经报道，抗体的重链中位置71处的构架残基变化影响HVR-H2的构象。HVR-H2在huE104.v1和huE104.v2中的建模实验确认情况如此(数据未显示)。不受理论约束，两个游标残基的变化可能影响HVR-H2的构象，从而与类胰蛋白酶残基81至83的相互作用不同并转换成四聚体的小界面的变化。另外，结构上紧密靠近的残基R69和E70(糜蛋白酶原编号)的类胰蛋白酶酰胺键也显示仅结合huE104.v2时HDX才较慢。这个发现将对构成小界面的显著部分的70s环做出改变，甚至更有可能做出改变。

[0603] 将因Fab结合而HDX较慢的区域与如晶体结构中所见的Fab E104.v1的**4 Å**范围内的类胰蛋白酶残基比较时，在鉴定20s、40s、60s、80s和100环中结合表位残基的两种方法之间观察到高程度的重叠(表10)。根据晶体结构，用HDX鉴定的其他区域，如类胰蛋白酶一级序列的110s、160s、179、230s和245区域中的位置，并不与抗体直接接触，但显示在huE104.v1和huE104.v2存在下构象动力学降低。

[0604] 表10:与huE104.v1或huE104.v2结合时显示较慢HDX的类胰蛋白酶残基的酰胺键

[0605]

受影响的类胰蛋白酶残基(糜蛋白酶原编号)		
huE104.v1	huE104.v2	晶体结构中的接触残基
26-27	25-27	25-29
-	-	38
-	41-43	40-41

[0606]

47-50	-	50
54-55	-	-
-	-	-
60-61	60-61	60-62
66-68	66-70	65
-	81-83	81-87
85-88	88	-
108-110	108-110	107-110
119-122	-	-
-	160-162	-
179	-	-
230-231	-	-
-	-	-
244-245	-	-

[0607] 总结这些数据,huE104.v1和huE104.v2具有人类胰蛋白酶β1上的相同HVR序列和相同接触残基。然而,基于HDX研究,检测到两种抗体与靶结合方式的微妙差异。图12B中显示huE104.v1的重链FR3区域中的V71和F78。如该图中所示,huE104.v2的重链的FR3区域中的V71R和F78V可能已经影响HVR-H2的位置和HVR-H2与类胰蛋白酶的结合,这由结合huE104.v2时Q81、L82和L83区域(糜蛋白酶原编号)中HDX较慢佐证。Q81、L82和L83残基显示当huE104.v2与类胰蛋白酶结合时,如与未结合的类胰蛋白酶相比,HDX较慢。作为结果,Y75与邻近原体的疏水相互作用削弱。huE104.v1在位置71处具有V并且在78位置处具有F(如VH_{IV}移植体中那样)。在这种情况下,略微不同地呈现HVR-H2,并且如与E104.v2相比,E104.v1与类胰蛋白酶结合的影响,尽管在相同的接触残基处,在使小界面解离方面略微不同。

[0608] 总之,hu31A.v11 Fab和IgG均使类胰蛋白酶四聚体解离。huE104.v2 Fab和IgG也均使类胰蛋白酶四聚体解离。huE104.v1 IgG能够使类胰蛋白酶四聚体解离,但Fab不能。然而,huE104.v1 IgG在高抗体对四聚体比率时丧失抑制活性。多于一个hu31A.v11 Fab与相同四聚体结合将造成空间冲突,而多个huE104.v2 Fab与相同四聚体结合则否。因此,IgG1或IgG4的铰链区可能在huE104.v1 IgG的两个Fab定向中发挥作用并且产生导致使四聚体解离的足够张力(数据未显示)。然而,在高抗体对四聚体比率时,huE104.v1 IgG更可能作为单价结合物(即,Fab)与四聚体结合,并且丧失抑制活性。

[0609] C.hu31A.v11和huE104.v2竞争结合至人类胰蛋白酶β1

[0610] 通过X射线结晶学确定的hu31A.v11表位基本上与huE104.v1和huE104.v2的表位重叠。接下来,我们通过表位分拣法确定hu31A.v11和huE104.v2是否竞争结合至人类胰蛋白酶β1。使用**OCTET®** RED384系统(ForteBio,Inc.,Menlo Park,CA,USA)进行表位分拣。简而言之,通过与NHS-PEG4-生物素反应,人类胰蛋白酶β1单体蛋白在Lys残基处生物素酰化。将生物素酰化的单体在动力学缓冲液(ForteBio,Inc.,Menlo Park,CA,USA)中稀释至5μg/ml并且固定到链霉亲和素传感器头(ForteBio,Inc.,Menlo Park,CA,USA)上。在固定步骤后,将人类胰蛋白酶β1固定的传感器用稀释为10-20μg/ml的第一抗体浸透,随后与稀释为2.5μg/ml的第二抗体结合。第二抗体所致的结合信号提示,两种抗体可以在不同、非重叠性表位同时结合抗原,而无结合信号提示它们共有共同表位。Forte Bio数据分析软件8.1用来生成表位分拣矩阵。

[0611] 下表11中所示的结果显示,使用huE104.v2作为第一抗体并使用hu31A.v11作为第二抗体,未检测到额外的结合信号,或反之亦然。在缓冲液后添加的任一抗体导致额外的结合。因此,两种抗体竞争结合至人类胰蛋白酶β1。

[0612] 表11:hu31A.v11和huE104.v2竞争结合至人类胰蛋白酶β1

[0613]

第一抗体	第二抗体	
	hu31A.v11 IgG4	huE104.v2 IgG4
huE104.v2 IgG4	-0.0086	-0.0083
Hu31A.v11 IgG4	-0.0205	0.011
缓冲液	0.423	0.514

[0614] 实施例4:人源化抗类胰蛋白酶抗体的药代动力学(PK)分析

[0615] 为了评估人源化抗类胰蛋白酶抗体的药代动力学(PK)特征,将huE104.v2或hu31A.v11 IgG4抗体通过静脉内(IV)注射以1或10mg/kg施用至C57BL/6小鼠,n=3。使用绵羊抗人IgG(The Binding Site;圣迭戈,CA)用于捕获并使用HRP缀合的绵羊抗人IgG(Bethyl Laboratories,Montgomery,TX)用于检测,以通用免疫球蛋白药代动力学ELISA测定C57-BL6小鼠血清中抗gD IgG4、抗类胰蛋白酶hu31A.v11 IgG4或抗类胰蛋白酶huE104.v2 IgG4的浓度。该测定法灵敏度是血清中15.6ng/mL。huE104.v2和hu31A.v11 IgG4抗体显示出相似的PK,其特征在于跨所测试剂量范围的剂量比例关系和线性PK(图13和表12)。此外,两种抗体具有相对低的清除率(约5ml/日/kg),显示两种抗体在单剂量施用

后表现良好并且完全在被接受的范围内。在其他实验中，huE104.v2 IgG1表现类似于huE104.v2 IgG4和hu31A.v11 IgG4抗体(数据未显示)。

[0616] 表12：小鼠中人源化抗类胰蛋白酶抗体的PK分析

[0617]

抗类胰蛋白酶 IgG4	剂量	AUC_{last} (日•μg/ml)	清除率 (ml/日/kg)	C_{max} (μg/ml)
huE104.v2	1 mg/kg	127	5.00	21.6
huE104.v2	10 mg/kg	1400	5.12	242
hu31A.v11	1 mg/kg	155	4.74	25.8
hu31A.v11	10 mg/kg	1750	4.54	251

[0618] 在雄性食蟹猴(cyno)，n＝3中也评估了人源化抗类胰蛋白酶抗体的PK特征。将对照抗体(抗gD)、huE104.v2 IgG4或hu31A.v11 IgG4通过静脉内(IV)注射按30mg/kg施用(图14和表13)。以Gyrolab XP免疫测定法测定食蟹猴血清中抗gD IgG4、抗类胰蛋白酶hu31A.v11 IgG4或抗类胰蛋白酶huE104.v2IgG4的浓度，所述测定法由用于捕获的生物素缀合的山羊抗人IgG(Bethyl Laboratories，Montgomery，TX)和用于检测的**Alexa®**Fluor 647缀合的小鼠抗人Fc(R10Z8E9)组成。该测定法灵敏度是血清中41ng/mL。表13显示曲线下面积(AUC)、清除率(CL)、C_{max}和半寿期($T_{1/2}$)。hu31A.v11显示出与对照抗gD抗体相似的药代动力学。大约3mL/日/kg的低清除率(CL)和约15天的$T_{1/2}$完全在可接受的范围内。

[0619] 表13：食蟹猴(n＝3)中人源化抗类胰蛋白酶抗体的PK分析

[0620]

组	AUC (日•μg/mL)	CL (mL/日/kg)	C_{max} (μg/mL)	T1/2 (天)
抗 gD	11100 ± 1220	2.73 ± 0.285	972 ± 68.8	14.1 ± 1.37
hu31A.v11	10700 ± 3530	2.99 ± 0.855	805 ± 72.3	14.9 ± 5.95
huE104.v2	7910 ± 2270	3.98 ± 1.00	808 ± 48.9	11.5 ± 4.43

[0621] 实施例5：配制抗类胰蛋白酶抗体hu31A.v11以减轻HVR-H3 Trp100(W100)氧化

[0622] 在评价hu31A.v11抗体和huE104.v2抗体时，出乎意料地发现在hu31A.v11的HVR-H3区域存在的VH Trp100残基(图1)易遭氧化，例如，在暴露于二盐酸2,2-偶氮双(2-脒基丙烷)(AAPH)(也称作“AAPH胁迫”)或环境光(“环境光胁迫”)后易遭氧化。在治疗性抗体的情况下，可以认为这种氧化不利。然而，发现Trp100残基对hu31A.v11与类胰蛋白酶结合以及抑制活性重要。例如，如下文描述，突变Trp100以减轻氧化产生结合亲和力和抑制活性降低的变体。因此，使用含有抗氧化赋形剂(例如，N-乙酰色氨酸和/或甲硫氨酸)的制剂，减轻、尤其在HVR-H3 W100处减轻hu31A.v11的氧化。

[0623] 评价了AAPH胁迫和hu31A.v11 HVR-H3 W100(即，VH结构域的位置100处的色氨酸残基，参见图1)氧化对类胰蛋白酶结合和抑制活性的影响。将样品在40℃在1mM AAPH中配

制16小时。在这些条件下，W100氧化(氧化百分数)增加75%。用胰蛋白酶消化受胁迫的抗体并且消化的肽进行UHPLC-HRMS(超高效液相色谱法-高分辨质谱)以测定色氨酸氧化百分数。简而言之，将250μg的hu31A.v11样品用6M盐酸胍、360mM Tris和2mM EDTA中的20mM DTT在pH 8.6还原1小时。将还原的样品冷却至室温并使用1M碘乙酸(终浓度，50mM)于黑暗下烷基化15分钟。随后将样品的缓冲液交换成消化缓冲液(25mM Tris，2mM $CaCl_2$，pH 8.2)。使用1:40(w/w)酶对抗体比率，将交换过缓冲液的样品用胰蛋白酶在37℃消化4小时。通过添加100%甲酸至终浓度3.0%终止消化。

[0624] 将10μg胰蛋白酶解肽注射到偶联有Q Exactive质谱仪系统的含1.7μm，**130 Å**粒子的Waters 2.1x 150mm，Acquity **UPLC®** CSH C18柱上，所述柱在77℃以流速0.2mL/分钟按以下梯度运行：在0-2分钟1%B(乙腈中0.1%甲酸)；在7分钟13%B；在42分钟35%B；在44-46分钟85%B；在46.1分钟1%B。Q Exactive以数据依赖性模式运行，从200-2000m/z以35,000分辨率采集完整MS扫描，并且自动增益控制(AGC)目标为$1x10^6$。选择每次扫描8个最丰富离子用于串联MS，分辨率为17,500且AGC目标为$1x10^5$。如下生成W100氧化的相对定量：(1)通过用天然胰蛋白酶解肽及其氧化对应物的10%及以上的相对丰度积分来自电荷状态的前三个最丰富同位素的提取离子色谱图，计算峰面积。(2)总氧化峰面积除以氧化峰面积和天然峰面积的总和并乘以100以获得氧化百分数。

[0625] 表14中的结果显示，AAPH胁迫减少hu31A.v11与类胰蛋白酶单体结合，如通过**BIAcore®**SPR分析所测量(表14)。还对结合于类胰蛋白酶四聚体观测到结合减少。与之相反，huE104.v2与类胰蛋白酶单体和四聚体的结合不受AAPH胁迫影响(表14)。另外，AAPH胁迫在体外类胰蛋白酶酶活性测定法中降低hu31A.v11的活性约5倍，而huE104.v2的抑制活性不受影响(数据未显示)。总之，在AAPH胁迫后，在HVR-H3 W100处具有75%氧化的hu31A.v11 IgG4显示大约6倍更高的K_D(即，降低的亲和力)(具有35%R_{max})，和IC_{50}增加5倍(即，效价下降)。R_{max}表示**BIAcore®** SPR实验中的最大响应，并且R_{max}下降反映以下事实：更少的经过AAPH胁迫的抗体与类胰蛋白酶结合。与之相反，AAPH胁迫最小(若有)影响huE104.v2 IgG4的结合和效价。

[0626] 表14:AAPH胁迫减少hu31A.v11与类胰蛋白酶结合

[0627]

样品	类胰蛋白酶β1	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
hu31A.v11 对照	单体	5.976E5	1.328E-4	2.222E-10
hu31A.v11 AAPH	单体	6.076E5	7.978E-4	1.313E-9

[0628]

huE104.v2 对照	单体	5.846E5	1.861E-4	3.183E-10
huE104.v2 AAPH	单体	6.795E5	1.535E-4	2.260E-10

[0629] 在一个减少HVR-H3氧化的方案中，产生在HVR-H3 W100具有置换的变体抗体，并且评估了这些变体与类胰蛋白酶β1单体的结合(表15)。hu31A.v11的残基W100突变成苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)或精氨酸(R)。令人惊讶地，全部变体均显示与类

胰蛋白酶β1单体结合减少。与其他变体相比，hu31A.v11 W100F变体对类胰蛋白酶β1单体具有最高亲和力，但与野生型hu31A.v11相比，显示出解离速率(K_{off})快大约100倍，结合速率(K_{on})相似(表15)。另外，这些变体在抑制活性方面劣于hu31A.v11 WT(表15)。对于一些变体，抑制活性基本上丧失(例如，对于W100R、W100L和W100V而言)。hu31A.v11 W100F和W100Y变体抑制人类胰蛋白酶β1，但是具有与hu31A.v11WT相比增加大约2至3倍的IC_{50}值(即，活性降低)。在表15中，“nd”表示不可检测或高于1μM。

[0630] 表15：与hu31A.v11野生型相比，hu31A.v11 W100变体对类胰蛋白酶β1单体结合亲和力和IC_{50}的影响(表示为增加倍数)

[0631]

	hu31A.v11 (W100)	hu31A.v11 W100F	hu31A.v11 W100Y	hu31A.v11 W100V	huE104.v2 W100L	huE104.v2 W100R
K_D	1	80	234	821	2411	54
IC50	1	2.5	3.46	nd	nd	nd

[0632] 如前所述，结构研究揭示，HVR-H3 W100与类胰蛋白酶发生多重相互作用，包括与类胰蛋白酶的R65(糜蛋白酶原编号)相互作用，其中确定所述R65是hu31A.v11的接触残基的部分(参见图8)。认为相比W100F突变体中的Phe，位置100处的Trp与类胰蛋白酶相互作用至更大程度，导致更高的结合亲和力和更强力的抑制活性。

[0633] 考虑到在HVR-H3 W100氧化的hu31A.v11的亲和力和抑制活性降低以及如上文所示W100在类胰蛋白酶抑制过程中的重要性，寻求减轻W100处氧化的备选性策略。测定抗氧化赋形剂减少W100氧化的能力。在一个实施例中，使样品在含有0.02％聚山梨醇酯20、200mM琥珀酸精氨酸(pH 5.5)和150mg/mL hu31A.v11抗体的制剂中，在具有或没有示例性抗氧化赋形剂(即，0.3mM N-乙酰色氨酸(NAT)和5mM甲硫氨酸(Met))的情况下，在40℃经受5mM AAPH持续24小时。基于生色性S-2288酶促测定法，测量抗体的CDR H3 W100氧化水平和效价。下表16中的数据显示，在这个实验中，AAPH胁迫在hu31A.v11 IgG4的W100导致38％氧化，如与对照、未经历胁迫的抗体样品(n＝2)相比，这导致效价损失32％。含有0.3mM NAT和5mM Met的制剂中的抗体组成显示氧化水平从38％降至26％，并且效价损失从32％降至21％(n＝2)。因此，含有抗氧化赋形剂如NAT和Met的制剂减少AAPH诱导的W100处氧化并且恢复抗体效价。在一个独立实施例中，在含有或不含抗氧化赋形剂的相同制剂中样品经受环境光胁迫条件(在5000Lux/小时下60小时，这是比AAPH更温和的胁迫条件)。温和的环境光胁迫条件导致W100处6％氧化，并且赋形剂的存在进一步降低氧化水平(表16)。由环境光所致胁迫过程引起的氧化水平不影响抗体效价。

[0634] 表16：抗氧化制剂对hu31A.v11氧化的影响

[0635]

样品描述	平均相对效价，(效价损失)(n= 2)	HVR-H3 W100 氧化
5 mM AAPH 样品，含/不含 NAT/MET	68% (32%)	38%
5 mM AAPH 样品，0.3 mM NAT/5 mM MET	79% (21%)	26%
经历光胁迫的样品，含/不含 NAT/MET	100% (0%)	6%

[0636] 总之,这些结果显示hu31A.v11 HVR-H3 W100出乎意料地易遭氧化。诱变数据显示,W100对hu31A.v11抗体的结合亲和力和抑制活性重要,并且在这个残基处受测试的变体均没有与野生型hu31A.v11相当的亲和力或抑制活性。抗氧化剂如NAT和Met可以用来减轻在hu31A.v11 HVR-H3 W100处观察到的非预期氧化,例如,在治疗疾病(例如,哮喘)的药用抗体制剂中。

[0637] 实施例6:抗类胰蛋白酶抗体hu31A.v11在体内抑制类胰蛋白酶活性

[0638] A.材料和方法

[0639] (i)食蟹猴活性类胰蛋白酶ELISA测定法

[0640] 通过ELISA测定法确定生物样品(例如,支气管肺泡灌洗液(BAL))中食蟹猴(cyno)活性类胰蛋白酶(四聚体)的浓度。利用一种识别食蟹猴类胰蛋白酶D1的单克隆抗体作为捕获抗体。使用重组的食蟹猴活性类胰蛋白酶D1作为配制测定标准品的来源材料。将测定标准品、对照和稀释样品与500μg/ml大豆胰蛋白酶抑制剂(SBTI;Sigma目录号10109886001)温育10分钟并且随后用基于活性的探针(ABP;G0353816)标记1小时。参见Pan等人Bioorg.Med.Chem.Lett.16:2882-85,2006。SBTI用来与单体中的活性部位结合,这减少由活性单体(可以在特定体外条件下形成的种类)造成的任何背景。当类胰蛋白酶处于四聚体构象时,SBTI不能与活性部位结合。添加小分子类胰蛋白酶抑制剂(G02849855)持续20分钟,以终止ABP标记。添加一种四聚体解离性抗体(例如,hu31A.v11IgG4)持续10分钟,以使ABP标记的和未标记的四聚体解离。将这种混合物添加至含捕获抗体的ELISA板持续1小时,用1x PBST洗涤,并且与SA-HRP试剂(链霉亲和素缀合的辣根过氧化物酶,General Electric(GE)目录编号RPN4401V)温育2小时。通过施加HRP底物四甲基联苯胺(TMB)生成比色信号,并且通过添加磷酸终止反应。在Spectra**Max®** M5(Molecular Devices,Sunnyvale,CA.)平板读数仪上,将450nm用于检测吸光度并将650nm用于参考吸光度,读取平板。该测定法具有20-0.04ng/mL的可报告范围(孔内),并且确定该测定法最小可定量浓度(MQC)在1:2稀释食蟹猴BAL时是0.08ng/mL。在单一稀释度一式两份筛查每份单个食蟹猴样品。将最小稀释度时测定出的低于MQC的样品报告为小于可报告的(LTR)。

[0641] (ii)食蟹猴总类胰蛋白酶ELISA测定

[0642] 通过ELISA测定法确定生物样品(例如,BAL)中食蟹猴(cyno)总类胰蛋白酶的浓度。利用一种识别食蟹猴类胰蛋白酶D1的抗体作为捕获抗体。利用一种识别食蟹猴类胰蛋白酶D1的不与四聚体解离性抗体竞争结合至食蟹猴类胰蛋白酶D1的抗体作为检测抗体。使用重组的食蟹猴活性类胰蛋白酶D1作为配制测定标准品的来源材料。添加一种四聚体解离性抗体(例如,hu31A.v11,IgG4)持续10分钟,以测定标准品、对照和稀释的样品,旨在使任何存在的四聚体解离。将这种混合物添加至含捕获抗体的ELISA板持续2小时并且随后用1x PBST洗涤。添加生物素酰化的检测抗体持续1小时。接下来,添加SA-HRP试剂持续1小时。用TMB生成比色信号,并且通过添加磷酸终止反应。在Spectra**Max®** M5平板读数仪上,将450nm用于检测吸光度并将650nm用于参考吸光度,读取平板。该测定法具有20-0.02ng/mL的可报告范围(孔内),并且确定该测定法MQC在1:2稀释食蟹猴BAL时是0.08ng/mL。在单一稀释度一式两份筛查每份单个食蟹猴样品。将最小稀释度时测定出的低于MQC的样品报告为小于可报告的(LTR)。

[0643] (iii)人活性类胰蛋白酶ELISA测定法

[0644] 通过ELISA测定法确定人活性类胰蛋白酶(四聚体)的浓度。利用识别人类胰蛋白酶和能够使类胰蛋白酶四聚体解离的小鼠单克隆抗体克隆B12作为捕获抗体(见上文Fukuoka等人)。也可以使用结合人类胰蛋白酶的其他抗体。纯化重组的人活性类胰蛋白酶β1并且用作配制测定标准品的来源材料。将测定标准品、对照和稀释样品与500μg/ml SBTI温育10分钟并且随后用ABP(G0353816)标记1小时。添加小分子类胰蛋白酶抑制剂(G02849855)持续20分钟,以终止ABP标记。将这种混合物添加至含捕获抗体的ELISA板持续1小时并且用1x PBST洗涤,并且与SA-HRP试剂温育2小时。通过施加TMB生成比色信号,并且通过添加磷酸终止反应。在Spectra**Max®**M5平板读数仪上,将450nm用于检测吸光度并将650nm用于参考吸光度,读取平板。

[0645] (iv)人总类胰蛋白酶ELISA测定

[0646] 通过ELISA测定法确定人总类胰蛋白酶的浓度。利用一种识别人类胰蛋白酶和能够使类胰蛋白酶四聚体解离的抗体(克隆B12)作为捕获抗体。利用一种识别人类胰蛋白酶的单克隆抗体作为检测抗体。纯化重组的人活性类胰蛋白酶β1并且用作配制测定标准品的来源材料。将样品添加至含捕获抗体的ELISA板持续2小时并且随后用1x PBST洗涤。添加生物素酰化的检测抗体持续1小时。接下来,添加SA-HRP试剂持续1小时。通过施加TMB生成比色信号,并且通过添加磷酸终止反应。在Spectra**Max®**M5平板读数仪上,将450nm用于检测吸光度并将650nm用于参考吸光度,读取平板。

[0647] B.结果

[0648] 为了评估抗类胰蛋白酶抗体如hu31A.v11是否在体内靶向类胰蛋白酶并且抑制活性类胰蛋白酶的活性,开发了一种测定法以测量(例如,来自食蟹猴的)如支气管肺泡灌洗液(BAL)或通过侵入性更小的方法(如鼻吸附法)取得的样品中存在的活性类胰蛋白酶的量。开发了基于活性的探针,其包括标记物(例如,生物素)、接头和与活性类胰蛋白酶反应的反应基。这种探针选择性地并共价地与活性类胰蛋白酶结合。参见上文Pan等人。该工具可以用来测量样品中活性类胰蛋白酶的量(图15)。BAL采集程序涉及将缓冲液向气道中滴注并随后回收流体(这可以是可变的)并且因此需要归一化因数以跨时间点和动物比较样品。因为尿素是在血管区室和气道区室之间被动扩散的小分子,BAL中的尿素/血清中尿素比率可以用来跨时间点和跨动物归一化。参见Pinheiro de Oliveira等人2010,Critical Care 14:R39。

[0649] 为了确定hu31A.v11的施用是否在体内靶向类胰蛋白酶,通过向健康、未受激发的食蟹猴静脉内注射来施用30mg/kg剂量的抗体,并且测定BAL中活性类胰蛋白酶的量。在基线时,活性类胰蛋白酶水平相对低并且跨动物可变。在基线时具有可检测活性类胰蛋白酶的动物中施用hu31A.v11后,在BAL中观察到活性类胰蛋白酶的水平降低的趋势(图16)。

[0650] 还在变应原激发模型中评估hu31A.v11施用的影响,其中通过多种途径重复给予,使食蟹猴对寄生性线虫蛔虫致敏(图17)。致敏阶段包括在第0、7、15、71、78和85天腹膜内和肌内施用蛔虫;在第29、50、120、184和198-205天通过吸入施用蛔虫;和在第34天肌内施用蛔虫(图17)。在皮内施用后第-7、57和140天在这些天时评估风团潮红(Wheal flare)。每只动物接受如通过ORD(最佳反应剂量)法所确定的最佳剂量的蛔虫,其中实施所述方法以表征在每只动物中激发所需反应的适宜蛔虫剂量水平(在致敏阶段期间实施)。剂量包括4、400和4000μg/ml。实验阶段包括溶媒阶段,其中在第1天施用溶媒,随后在第2天通过吸入施

用蛔虫，随后BAL采样和30分钟鼻吸附后，以评估总类胰蛋白酶和活性类胰蛋白酶的量(图17)。四周后，药物阶段包括在第1天施用hu31A.v11，随后在第2天施用蛔虫，并且BAL采样和30分钟鼻吸附后，以评估总类胰蛋白酶和活性类胰蛋白酶的量(图17)。

[0651] 在蛔虫致敏模型中，施用抗类胰蛋白酶抗体hu31A.v11导致在基线时具有可检测的活性类胰蛋白酶水平的5只动物的BAL中，活性类胰蛋白酶显著减少(图18A)，这表明这种抗体在体内抑制类胰蛋白酶活性。另外，施用抗类胰蛋白酶抗体还导致全部动物的BAL中总类胰蛋白酶的量增加(图18B)。其他实验显示，鼻粘膜衬层液(MLF)中总类胰蛋白酶的水平在给予抗类胰蛋白酶抗体hu31A.v11后升高，如通过鼻吸附样品中总类胰蛋白酶的水平所评估(图18C)。在这个实验中，使用合成性吸附基质(SAM;Hunt Developments(UK),Ltd,West Sussex,England)，采集MLF。给药后总类胰蛋白酶增加显示靶接合作用。在给药之前和之后鼻吸附样品中不可检出活性类胰蛋白酶。图18A和图18C中*表示低于检测水平。

[0652] 接着，在人植入的(human-engrafted)IL2Rgnull-3/GM/SF NOD-SCID小鼠中检验体内活性证据。之前已开发了一个针对人肥大细胞植入和人IgE依赖性过敏反应的人源化小鼠模型。简而言之，NSG-SGM3小鼠(ackson Laboratory，品种编号013062)从NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)背景开发而来，并且如同它们的NSG亲本，NSG-SGM3小鼠缺少成熟的T细胞、B细胞和有功能的NK细胞，并且在小鼠细胞因子信号传导方面有缺陷。这些小鼠含有三个各自受人巨细胞病毒启动子/增强子序列驱动的共注射的转基因。三重转基因NSG-SGM3小鼠以组成型方式产生2-4ng/ml血清水平的人SCF、GM-CSF和IL-3，从而提供细胞增殖和存活信号(参见，例如，Bryce等人J.Allergy Clin Immunol.138(3):769-779,2016)。NSG-SGM3 BLT小鼠形成移居外周淋巴组织、粘膜组织和腹膜腔的人肥大细胞群体。NSG-SGM3 BLT小鼠中的人肥大细胞表达CD117、类胰蛋白酶和IgE-受体，并且可以以IgE依赖性抗原特异性方式发生钙流和脱颗粒。一旦激发，NSG-SGM3-BLT小鼠形成人肥大细胞依赖性、抗原特异性IgE介导的被动全身性过敏反应，后者可以通过测量体温变化来分析。

[0653] 该实验设计成检验抗类胰蛋白酶抗体在所述植入的小鼠中抑制IgE介导的被动全身性过敏反应的能力。将10-12周龄NSG-SGM3小鼠(杰克逊实验室品种编号013062)分成三个组：组1：NSG-SGM3小鼠用同种型抗体(500μg/小鼠)腹膜内(i.p.)处理；组2：NSG-SGM3小鼠用人抗类胰蛋白酶抗体(hu31A.v11IgG4，13.3mg/mL)腹膜内(500μg/小鼠)处理；和组3：NSG-SGM3小鼠用类胰蛋白酶小分子抑制剂G02849855(30mg/kg)腹膜内处理。在第-1天，全部小鼠均剔净腹部毛发以利于体温测量。在第0天，对动物注射对照同种型抗体或抗类胰蛋白酶抗体。给药量配制为100μL。抗类胰蛋白酶抗体溶解于200μL注射用盐水中。处理后15分钟，用200μL盐水中的1.6μg抗NP(4-羟基-3-硝基苯基乙酰基半抗原)IgE JW8.5.13(Sigma目录号87080706-1VL;还参见US20070253948和Jackman等人J.Biol.Chem.285(27):20850-20859,2010)静脉内致敏组1-3的小鼠。在第1天(处理后24小时)，通过手工保定小鼠并将Braun Thermo**Scan®**Pro 4000就在胸骨下方牢固抵住剃毛的腹部皮肤，测量体温。在基线体温测量后立即用200μL盐水中500μg与载体蛋白BSA缀合的抗原NP(NP-BSA)静脉内激发小鼠。激发后每15分钟测量体温，持续至少60分钟。

[0654] 如图19中所示，当IgE攻击时，如与对照抗gD抗体处理的小鼠相比，抗类胰蛋白酶抗体hu31A.v11处理的小鼠显示体温维持改善。

[0655] 这些数据显示，抗类胰蛋白酶抗体hu31A.v11有活性并且可以在体内结合并抑制

类胰蛋白酶活性。这些数据提供了进一步的证据:抗类胰蛋白酶抗体如hu31A.v11可以用作治疗类胰蛋白酶相关疾病如哮喘的治疗药。

[0656] 其他实施方案

[0657] 虽然已经出于清晰理解的目的,以说明和举例方式某种程度地详细描述前述发明,但是这些说明和例子不应当解释为限制本发明的范围。本文中援引的全部专利和科学文献的公开内容通过引用方式明确地完整并入本文作为参考。

[0658] IV.序列表

[0659] 表17显示本申请通篇范围内使用的序列。

[0660] 表17:序列表

[0661]

SEQ ID NO:	序列
1	$X_1X_2GMX_3$，其中 X_1 是 Asp 或 Ser，X_2 是 Tyr 或 Phe，并且 X_3 是 Val 或 His
2	FISSGSSTVYYADTMKG
3	$RX_1X_2X_3DWYFDV$，其中 X_1 是 Asn 或 Asp，X_2 是 Tyr 或 Asn，并且 X_3 是 Asp 或 Tyr

[0662]

4	SASSSVTYMY
5	RTSDLAS
6	QHYHSYPLT
7	DYGMV
8	RNYDDWYFDV
9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMVWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRNYDDWYFDVWGQGTLVTVSS
10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKSPKPWIYRTSDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYHSYPLTFGQGTKVEIK
11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
12	WVRQAPGKGLEWVA
13	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR
14	WGQGTLVTVSS
15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
16	WYQQKPGKSPKPWIY
17	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
18	FGQGTKVEIK
19	EVKLVESGGGSVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYGMVWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMYYCARRDNYDWYFDVWGTGTTVTVSS
20	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSVTYMYWYQQKPGSSPKPWIYRTSDLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQHYHSYPLTFGAGTKLELK
21	EVKLVESGGGSVQPGGSRKLSCAASGFTFS
22	WVRQAPGKGLEWVA
23	RFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMYYCAR
24	WGTGTTVTVSS

[0663]

25	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISC
26	WYQQKPGSSPKPWIY
27	GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC
28	FGAGTKLELK
29	RDNYDWYFDV
30	GYAIT
31	GISSAATTFYSSWAKS
32	DPRGYGAALDRLDL
33	QSIKSVYNNRLG
34	ETSILTS
35	AGGFDRSGDTT
36	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGISSAATTFYSSWAKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDPRGYGAALDRLDLWGQGTLVTVSS
37	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGKAPKLLIYETSILTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFDRSGDTTFGQGTKVEIK
38	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI
39	$WX_1RQPPGKGLEWIG$，其中 X_1 是 Ile 或 Val
40	$RX_1TISX_2DTSKNQX_3SLKLSSVTAADTAVYX_4CAR$，其中 X_1 是 Val 或 Ser，X_2 是 Arg 或 Val，X_3 是 Val 或 Phe，并且 X_4 是 Tyr 或 Phe
41	WGQGTLVTVSS
42	WIRQPPGKGLEWIG
43	RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR
44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSRFSLI
45	WVRQAPGKGLEWIG
46	RSTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCAR
47	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGISSAATTFY

[0664]

	SSWAKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDPRGYGAALDRLDLWGQG TLVTVSS
48	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWVRQPPGKGLEWIGGISSAATTF YSSWAKSRSTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYFCARDPRGYGAALDRLDLWGQG TLVTVSS
49	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGISSAATTFY SSWAKSRVTISVDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDPRGYGAALDRLDLWGQG TLVTVSS
50	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGISSAATTFY SSWAKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDPRGYGAALDRLDLWGQG TLVTVSS
51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSRFSLIGYAITWVRQAPGKGLEWIGGISSAATTF YSSWAKSRSTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARDPRGYGAALDRLDLWGQ GTLVTVSS
52	QSLEESGGGLFKPTDTLTLTCTVSRFSLIGYAITWVRQSPENGLEWIGGISSAATTFYS SWAKSRSTITRNTNENTVTLKMTSLTAADTATYFCARDPRGYGAALDRLDLWGQGT LVTVSS
53	AAVLTQTPASVSAAVGGTVSISCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGQPPKLLIYETSILTSG VPSRFKGSGSETQFTLTISDVQCDDAATYFCAGGFDRSGDTTFGGGTEVVVK
54	QSLEESGGGLFKPTDTLTLTCTVSRFSLI
55	WVRQSPENGLEWIG
56	RSTITRNTNENTVTLKMTSLTAADTATYFCAR
57	WGQGTLVTVSS
58	DAQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGKPPKLLIYETSILTSGV PSRFSGSGSETDFTLTISSLQPEDFATYFCAGGFDRSGDTTFGQGTKVEIK
59	AAVLTQTPASVSAAVGGTVSISCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGQPPKLLIYETSILTSG VPSRFKGSGSETQFTLTISDVQADDAATYFCAGGFDRSGDTTFGGGTEVVVK
60	$DX_1QX_2TQSPSSLSASVGDRVTITC$，其中 X_1 是 Ile 或 Ala，并且 X_2 是 Met 或 Leu

[0665]

61	WYQQKPGKX$_1$PKLLIY，其中 X$_1$是 Ala 或 Pro
62	GVPSRFSGSGSX$_1$TDFTLTISSLQPEDFATYX$_2$C，其中 X$_1$是 Gly 或 Glu，并且 X$_2$是 Tyr 或 Phe
63	FGQGTKVEIK
64	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
65	WYQQKPGKAPKLLIY
66	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
67	AAVLTQTPASVSAAVGGTVSISC
68	WYQQKPGQPPKLLIY
69	GVPSRFKGSGSETQFTLTISDVQX$_1$DDAATYFC，其中 X$_1$是 Cys 或 Ala
70	FGGGTEVVVK
71	MLNLLLLALPVLASRAYAAPAPGQALQRVGIVGGQEAPRSKWPWQVSLRVHGPYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVNVSSHVHTVTLPPASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSCQGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWGEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKP
72	MLNLLLLALPVLASRAYAAPAPGQALQRVGIVGGQEAPRSKWPWQVSLRVHGPYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVKVSSHVHTVTLPPASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSCQGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWGEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKP
73	MLNLLLLALPVLASRAYAAPAPGQALQRVGIVGGQEAPRSKWPWQVSLRVRDRYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVNVSSHVHTVTLPPASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSCQVATAPHTFPAPS
74	GATGGTGACTGTTCCAGTTGC
75	CATTGGTGAGGGTGCCCGAGTTC

[0666]

76	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMVWVRQAPGKGLEWVAFISSGSS TVYYADTMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRNYDDWYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
77	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKSPKPWIYRTSDLASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYHSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
78	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMVWVRQAPGKGLEWVAFISSGSS TVYYADTMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRNYDDWYFDVWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
79	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKSPKPWIYRTSDLASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYHSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
80	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGISSAATTFY SSWAKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDPRGYGAALDRLDLWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

[0667]

	PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
81	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGKAPKLLIYETSILTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFDRSGDTTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
82	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGISSAATTFYSSWAKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDPRGYGAALDRLDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
83	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGKAPKLLIYETSILTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFDRSGDTTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
84	AYSVN
85	MIWGDGKIVYNSALKS
86	DGYYPYAMDN
87	RASKSVDSYGNSFMH
88	LASNLES
89	QQNNEDPRT
90	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLSAYSVNWIRQPPGKALEWLAMIWGDGKIVYNSALKSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAGDGYYPYAMDNWGQGS

[0668]

	LVTVSS
91	DIVMTQSPDSLSVSLGERATINCRASKSVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNL ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEDPRTFGGGTKVEIK
92	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSYPFTFGQGTKVEIK
93	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGS TYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARFDYWGQFTLVTVSS
94	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVGAISSSGSS TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFDYWGQGTLVTVSS
95	TLTISSLQPEDFATYYCQQYYSYPFTFGQGTKVEIK
96	TLTISDVQCDDAATYFCAGGFDRSGDTTFGGGTEVVVK
97	IVGGQEAPRSKWPWQVSLRVHGPYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLA ALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVNVSSHVHTVTL PPASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYT GDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSCQGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWGEGCAQPN RPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKP
98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMVWVRQAPGKGLEWVGFISSGSS TVYYADTMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARRDNYDWYFDVWGQ GTLVTVSS
99	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMVWVRQAPGKGLEWVAFISSGSS TVYYADTMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARRDNYDWYFDVWGQ GTLVTVSS
100	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSST VYYADTMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARRDNYDWYFDVWGQG TLVTVSS
101	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMVWVRQAPGKGLEWVAFISSGSS TVYYADTMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCTRRDNYDWYFDVWGQ GTLVTVSS

[0669]

102	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKAPKLLIYRTSDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYHSYPLTFGQGTKVEIK
103	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKSPKPWIYRTSDLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHYHSYPLTFGQGTKVEIK
104	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCAGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCGATTATGGCATGGTGTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGGCCTTCATCAGCAGCGGCAGCAGCACCGTGTATTATGCCGATACCATGAAAGGCCGCTTCACCATCAGCCGCGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAAGATACCGCCGTGTATTATTGCACCCGCCGCAACTACGATGATTGGTATTTCGATGTGTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTCTCGAGT
105	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATCACCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGACCTATATGTATTGGTATCAGCAGAAACCAGGCAAAAGCCCAAAACCATGGATCTATCGCACCAGCGATCTGGCCAGCGGCGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAAGATTTCGCCACCTATTATTGCCAGCACTATCACAGCTATCCACTGACCTTCGGCCAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAA
106	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCAGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCGATTATGGCATGGTGTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGGCCTTCATCAGCAGCGGCAGCAGCACCGTGTATTATGCCGATACCATGAAAGGCCGCTTCACCATCAGCCGCGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAAGATACCGCCGTGTATTATTGCACCCGCCGCAACTACGATGATTGGTATTTCGATGTGTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTCTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCA

[0670]

	GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA AGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
107	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGC GTGACCATCACCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGACCTATATGTATTGGTATCAG CAGAAACCAGGCAAAAGCCCAAAACCATGGATCTATCGCACCAGCGATCTGGCC AGCGGCGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTCACCCTG ACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAAGATTTCGCCACCTATTATTGCCAGCACTATC ACAGCTATCCACTGACCTTCGGCCAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTG TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACA GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
108	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCAGGCGGCAGCCT GCGCCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCGATTATGGCATGGTGTG

[0671]

	GGTGCGCCAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGGCCTTCATCAGCAGCG GCAGCAGCACCGTGTATTATGCCGATACCATGAAAGGCCGCTTCACCATCAGCC GCGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAAG ATACCGCCGTGTATTATTGCACCCGCCGCAACTACGATGATTGGTATTTCGATGT GTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTCTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATC GGTCTTCCCCCTGGCACCCTGCTCCCGCAGTACTTCTGAGTCCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTC AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCAA GACCTACACGTGCAACGTGGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAACG CGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTG GGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCC GAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA
109	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCCCAGGCCTGGTGAAACCAAGCGAAACCCT GAGCCTGACCTGCACCGTGAGCCGCTTCAGCCTGATCGGCTATGCCATCACCTG GATCCGCCAGCCACCAGGCAAAGGCCTGGAATGGATCGGCGGCATCAGCAGCG CCGCCACCACCTTCTATAGCAGCTGGGCCAAAAGCCGCGTGACCATCAGCCGCG ATACCAGCAAAAACCAGGTGAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGATA

		CCGCCGTGTATTATTGCGCCCGCGATCCACGCGGCTATGGCGCCGCCCTGGATCGCCTGGATCTGTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTCTCGAGT
[0672]	**110**	**GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATCACCTGCCAGAGCATCAAAAGCGTGTATAACAACCGCCTGGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGCAAAGCCCCAAAACTGCTGATCTATGAAACCAGCATCCTGACCAGCGGCGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAAGATTTCGCCACCTATTATTGCGCCGGCGGCTTCGATCGCAGCGGCGATACCACCTTCGGCCAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAA**
	111	**GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCCCAGGCCTGGTGAAACCAAGCGAAACCCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGCCGCTTCAGCCTGATCGGCTATGCCATCACCTGGATCCGCCAGCCACCAGGCAAAGGCCTGGAATGGATCGGCGGCATCAGCAGCGCCGCCACCACCTTCTATAGCAGCTGGGCCAAAAGCCGCGTGACCATCAGCCGCGATACCAGCAAAAACCAGGTGAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGATACCGCCGTGTATTATTGCGCCCGCGATCCACGCGGCTATGGCGCCGCCCTGGATCGCCTGGATCTGTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTCTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC**

[0673]

	CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG GGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAA
112	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGC GTGACCATCACCTGCCAGAGCATCAAAAGCGTGTATAACAACCGCCTGGGCTGG TATCAGCAGAAACCAGGCAAAGCCCCAAAACTGCTGATCTATGAAACCAGCATC CTGACCAGCGGCGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTC ACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAAGATTTCGCCACCTATTATTGCGCC GGCGGCTTCGATCGCAGCGGCGATACCACCTTCGGCCAGGGTACCAAGGTGGAG ATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC AGTTGAAATCTGGAACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCA GGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG T
113	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCCCAGGCCTGGTGAAACCAAGCGAAACCCT GAGCCTGACCTGCACCGTGAGCCGCTTCAGCCTGATCGGCTATGCCATCACCTG GATCCGCCAGCCACCAGGCAAAGGCCTGGAATGGATCGGCGGCATCAGCAGCG CCGCCACCACCTTCTATAGCAGCTGGGCCAAAAGCCGCGTGACCATCAGCCGCG ATACCAGCAAAAACCAGGTGAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGATA CCGCCGTGTATTATTGCGCCCGCGATCCACGCGGCTATGGCGCCGCCCTGGATC GCCTGGATCTGTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTCTCGAGTGCCTCCACCA AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTGCTCCCGCAGTACTTCTGAGTCCA

[0674]

	CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTT GGGCACCAAGACCTACACGTGCAACGTGGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAACGCGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACC TGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCCAAGGACAC TCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA GGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGA CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA
114	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLSAYSVNWIRQPPGKALEWLAMIWGDGKI VYNSALKSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAGDGYYPYAMDNWGQGS LVTVSS
115	DIVLTQSPDSLSVSLGERATINCRASKSVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNL ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEDPRTFGGGTKVEIK
116	IVGGQEAPRSKWPWQVSLRVHGPYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLA ALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVKVSSHVHTVTL PPASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYT GDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSCQGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWGEGCAQPN RPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKPGNSDYKDDDDK
117	IVGGQEAPRSKWPWQVSLRVRDRYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLA

[0675]

	ALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVNVSSHVHTVTLPPASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSCQGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWGEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKPGNSDYKDDDDK
118	IVGGQEAPRSKWPWQVSLRVRDRYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCLGPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYIIQTGADIALLELEEPVNISSRVHTVMLPPASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDEPLSPPFPLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRIIRDDMLCAGNSQRDSCKGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWDEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKPGNSDYKDDDDK
119	ALPVLVSPAHAAPAPGQALQRVGIVGGKEAPRSKWPWQVSLRLHGQYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLADLRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYAVQIGADIALLELEEPVNVSSHVHTVTLPPALETFPPGTPCWVTGWGDVDNDVRLPPPYPLKEVEVPIVENQLCDAEYHTGLHTGDSFRIVRDDMLCAGSEKHDSCQGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWGEGCALPNRPGIYTRVTYYLDWIHRYVPEKP
120	SFSMS
121	TISGGKTFTDYVDSVKG
122	ANYGNWFFEV
123	RASESVAKYGLSLLN
124	AASNRGS
125	QQSKEVPFT
126	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVATISGGKTFTDYVDSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRANYGNWFFEVWGQGTLVTVSS
127	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVAKYGLSLLNWFQQKPGQPPRLLIFAASNRGSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPFTFGQGTKVEIK
128	AGSTHHHHHHDDDDKIVGGQEAPRSKWPWQVSLRVHGPYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVNVSSHVHTVTLPPASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIM

[0676]

	ENHICDAKYHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSCQGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWGEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKP

序列表

<110> 基因工程技术公司
豪夫迈·罗氏有限公司
<120> 抗类胰蛋白酶抗体、其组合物及其用途
<130> 50474-112WO2
<150> US 62/457,722
<151> 2017-02-10
<160> 128
<170> PatentIn 版本 3.5
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> X 是 Asp 或 Ser
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
[0001] <223> X 是 Tyr 或 Phe
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> X 是 Val 或 His
<400> 1
Xaa Xaa Gly Met Xaa
1 5
<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 2
Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 3
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X 是 Asn 或 Asp
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> X 是 Tyr 或 Asn
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> X 是 Asp 或 Tyr
<400> 3
Arg Xaa Xaa Xaa Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10
<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
[0002]
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 4
Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met Tyr
1 5 10
<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 5
Arg Thr Ser Asp Leu Ala Ser
1 5
<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 6
Gln His Tyr His Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5
<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 7
Asp Tyr Gly Met Val
1 5
<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 8
Arg Asn Tyr Asp Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10
<210> 9
<211> 119
[0003] <212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 9
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 Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met
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
Thr Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 10
<211> 106

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 10
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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45
Arg Thr Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr His Ser Tyr Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 11
<211> 30
<212> PRT
[0004] <213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 11
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
20 25 30
<210> 12
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 12
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10
<210> 13
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的构建体
<400> 13
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg
20 25 30
<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 14
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 15
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
[0005] <400> 15
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
20
<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 16
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 17
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 17
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 18
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 19
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 19
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0006] Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Asp Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 20
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45
Arg Thr Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr His Ser Tyr Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105
<210> 21
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 21
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

[0007]

<210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 22
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10
<210> 23
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 23
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln
1 5 10 15
Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30
<210> 24

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 24
Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 25
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 25
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys
20
<210> 26
<211> 15
[0008] <212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 26
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 27
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 27
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30
<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的构建体
<400> 28
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
1 5 10
<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 29
Arg Asp Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10
<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 30
Gly Tyr Ala Ile Thr
1 5
[0009]
<210> 31
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 31
Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys Ser
1 5 10 15
<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 32
Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu
1 5 10
<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的构建体
<400> 33
Gln Ser Ile Lys Ser Val Tyr Asn Asn Arg Leu Gly
1 5 10
<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 34
Glu Thr Ser Ile Leu Thr Ser
1 5
<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 35
[0010] Ala Gly Gly Phe Asp Arg Ser Gly Asp Thr Thr
1 5 10
<210> 36
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 36
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Arg Phe Ser Leu Ile Gly Tyr
20 25 30
Ala Ile Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val 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 Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp
100 105 110

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

<210> 37
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 37

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 Gln Ser Ile Lys Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30
Arg Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Glu Thr Ser Ile Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Asp Arg Ser
85 90 95
Gly Asp Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

[0011]

<210> 38
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 38

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

<210> 39
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X 是 Ile 或 Val

<400> 39
Trp Xaa Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10
<210> 40
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X 是 Val 或 Ser
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> X 是 Arg 或 Val
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> X 是 Val 或 Phe
<220>
[0012]
<221> MOD_RES
<222> (29)..(29)
<223> X 是 Tyr 或 Phe
<400> 40
Arg Xaa Thr Ile Ser Xaa Asp Thr Ser Lys Asn Gln Xaa Ser Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Xaa Cys Ala Arg
20 25 30
<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 41
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 42
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的构建体
<400> 42
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10
<210> 43
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 43
Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30
<210> 44
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 44
[0013]
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 Val Ser Arg Phe Ser Leu Ile
20 25 30
<210> 45
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 45
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10
<210> 46
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 46
Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 47
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 47

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Arg Phe Ser Leu Ile Gly Tyr
20 25 30
Ala Ile Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln 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 Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0014]

<210> 48
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 48

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

Arg Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 49
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 49
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Arg Phe Ser Leu Ile Gly Tyr
20 25 30
Ala Ile Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80
[0015] Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 50
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 50
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Arg Phe Ser Leu Ile Gly Tyr
20 25 30
Ala Ile Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln 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 Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 51
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 51
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 Val Ser Arg Phe Ser Leu Ile Gly Tyr
20 25 30
Ala Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys
50 55 60
[0016] Ser Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 52
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 52
Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Phe Lys Pro Thr Asp Thr
1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Arg Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Ala
20 25 30
Ile Thr Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Asn Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45
Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys Ser
50 55 60

Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asn Thr Asn Glu Asn Thr Val Thr Leu Lys
65 70 75 80
Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
85 90 95
Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 53
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 53
Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15
Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ile Lys Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30
Arg Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45
[0017] Ile Tyr Glu Thr Ser Ile Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Glu Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln
65 70 75 80
Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Gly Gly Phe Asp Arg Ser
85 90 95
Gly Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110
<210> 54
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 54
Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Phe Lys Pro Thr Asp Thr
1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Arg Phe Ser Leu Ile
20 25
<210> 55
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的构建体
<400> 55
Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Asn Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10
<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 56
Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asn Thr Asn Glu Asn Thr Val Thr Leu Lys
1 5 10 15
Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
20 25 30
<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
[0018] <223> 合成的构建体
<400> 57
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 58
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 58
Asp Ala Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ile Lys Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30
Arg Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Glu Thr Ser Ile Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Gly Gly Phe Asp Arg Ser
85 90 95

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

<210> 59
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 59

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

[0019]

<210> 60
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> X 是 Ile 或 Ala
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> X 是 Met 或 Leu
<400> 60

Asp Xaa Gln Xaa Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 61
<211> 15

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> X 是 Ala 或 Pro
<400> 61
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Xaa Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 62
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> X 是 Gly 或 Glu
<220>
[0020] <221> MOD_RES
<222> (31)..(31)
<223> X 是 Tyr 或 Phe

<400> 62
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Xaa Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Xaa Cys
20 25 30
<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 63
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10
<210> 64
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的构建体
<400> 64
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
20
<210> 65
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 65
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 66
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
[0021] <400> 66
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30
<210> 67
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 67
Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15
Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys
20
<210> 68
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体

<400> 68
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 69
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(24)
<223> X 是 Cys 或 Ala
<400> 69
Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Glu Thr Gln Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Xaa Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys
20 25 30
<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
[0022]
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 70
Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
1 5 10
<210> 71
<211> 275
<212> PRT
<213> 智人
<400> 71
Met Leu Asn Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Val Leu Ala Ser Arg Ala
1 5 10 15
Tyr Ala Ala Pro Ala Pro Gly Gln Ala Leu Gln Arg Val Gly Ile Val
20 25 30
Gly Gly Gln Glu Ala Pro Arg Ser Lys Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu
35 40 45
Arg Val His Gly Pro Tyr Trp Met His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile
50 55 60
His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Val Gly Pro Asp Val
65 70 75 80
Lys Asp Leu Ala Ala Leu Arg Val Gln Leu Arg Glu Gln His Leu Tyr
85 90 95

Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro Val Ser Arg Ile Ile Val His Pro Gln
100 105 110
Phe Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu
115 120 125
Glu Pro Val Asn Val Ser Ser His Val His Thr Val Thr Leu Pro Pro
130 135 140
Ala Ser Glu Thr Phe Pro Pro Gly Met Pro Cys Trp Val Thr Gly Trp
145 150 155 160
Gly Asp Val Asp Asn Asp Glu Arg Leu Pro Pro Pro Phe Pro Leu Lys
165 170 175
Gln Val Lys Val Pro Ile Met Glu Asn His Ile Cys Asp Ala Lys Tyr
180 185 190
His Leu Gly Ala Tyr Thr Gly Asp Asp Val Arg Ile Val Arg Asp Asp
195 200 205
Met Leu Cys Ala Gly Asn Thr Arg Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser
210 215 220
Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys Val Asn Gly Thr Trp Leu Gln Ala Gly
225 230 235 240
Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln Pro Asn Arg Pro Gly Ile
245 250 255
Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr Leu Asp Trp Ile His His Tyr Val Pro
260 265 270

[0023]

Lys Lys Pro
275
<210> 72
<211> 275
<212> PRT
<213> 智人
<400> 72
Met Leu Asn Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Val Leu Ala Ser Arg Ala
1 5 10 15
Tyr Ala Ala Pro Ala Pro Gly Gln Ala Leu Gln Arg Val Gly Ile Val
20 25 30
Gly Gly Gln Glu Ala Pro Arg Ser Lys Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu
35 40 45
Arg Val His Gly Pro Tyr Trp Met His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile
50 55 60
His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Val Gly Pro Asp Val
65 70 75 80
Lys Asp Leu Ala Ala Leu Arg Val Gln Leu Arg Glu Gln His Leu Tyr
85 90 95
Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro Val Ser Arg Ile Ile Val His Pro Gln
100 105 110
Phe Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu

115 120 125
Glu Pro Val Lys Val Ser Ser His Val His Thr Val Thr Leu Pro Pro
130 135 140
Ala Ser Glu Thr Phe Pro Pro Gly Met Pro Cys Trp Val Thr Gly Trp
145 150 155 160
Gly Asp Val Asp Asn Asp Glu Arg Leu Pro Pro Pro Phe Pro Leu Lys
165 170 175
Gln Val Lys Val Pro Ile Met Glu Asn His Ile Cys Asp Ala Lys Tyr
180 185 190
His Leu Gly Ala Tyr Thr Gly Asp Asp Val Arg Ile Val Arg Asp Asp
195 200 205
Met Leu Cys Ala Gly Asn Thr Arg Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser
210 215 220
Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys Val Asn Gly Thr Trp Leu Gln Ala Gly
225 230 235 240
Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln Pro Asn Arg Pro Gly Ile
245 250 255
Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr Leu Asp Trp Ile His His Tyr Val Pro
260 265 270
Lys Lys Pro
275

[0024] <210> 73
<211> 233
<212> PRT
<213> 智人
<400> 73
Met Leu Asn Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Val Leu Ala Ser Arg Ala
1 5 10 15
Tyr Ala Ala Pro Ala Pro Gly Gln Ala Leu Gln Arg Val Gly Ile Val
20 25 30
Gly Gly Gln Glu Ala Pro Arg Ser Lys Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu
35 40 45
Arg Val Arg Asp Arg Tyr Trp Met His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile
50 55 60
His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Val Gly Pro Asp Val
65 70 75 80
Lys Asp Leu Ala Ala Leu Arg Val Gln Leu Arg Glu Gln His Leu Tyr
85 90 95
Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro Val Ser Arg Ile Ile Val His Pro Gln
100 105 110
Phe Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu
115 120 125
Glu Pro Val Asn Val Ser Ser His Val His Thr Val Thr Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Ser Glu Thr Phe Pro Pro Gly Met Pro Cys Trp Val Thr Gly Trp
145 150 155 160
Gly Asp Val Asp Asn Asp Glu Arg Leu Pro Pro Pro Phe Pro Leu Lys
165 170 175
Gln Val Lys Val Pro Ile Met Glu Asn His Ile Cys Asp Ala Lys Tyr
180 185 190
His Leu Gly Ala Tyr Thr Gly Asp Asp Val Arg Ile Val Arg Asp Asp
195 200 205
Met Leu Cys Ala Gly Asn Thr Arg Arg Asp Ser Cys Gln Val Ala Thr
210 215 220
Ala Pro His Thr Phe Pro Ala Pro Ser
225 230
<210> 74
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 74
gatggtgact gttccagttg c 21
<210> 75
<211> 23
[0025] <212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 75
cattggtgag ggtgcccgag ttc 23
<210> 76
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 76
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 Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met
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
Thr Arg Arg Asn Tyr Asp Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
[0026] Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
<210> 77
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 77
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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45
Arg Thr Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr His Ser Tyr Pro Leu Thr
85 90 95
[0027] Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205
Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 78
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体

<400> 78

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 Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met
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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

[0028] Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350
Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415
Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445
<210> 79
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 79
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
[0029] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45
Arg Thr Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr His Ser Tyr Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205
Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 80
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 80
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Arg Phe Ser Leu Ile Gly Tyr
20 25 30
Ala Ile Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80
[0030] Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
[0031] Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445
Ser Pro Gly
450
<210> 81
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 81
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 Gln Ser Ile Lys Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30
Arg Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Glu Thr Ser Ile Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Asp Arg Ser
85 90 95

Gly Asp Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 82
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
[0032] <400> 82
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Arg Phe Ser Leu Ile Gly Tyr
20 25 30
Ala Ile Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ala Thr Thr Phe Tyr Ser Ser Trp Ala Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val 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 Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Ala Ala Leu Asp Arg Leu Asp Leu Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220
Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335
[0033] Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445
<210> 83
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 83
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 Gln Ser Ile Lys Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30
Arg Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Glu Thr Ser Ile Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Phe Asp Arg Ser
85 90 95
Gly Asp Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190
[0034] Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 84
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 84
Ala Tyr Ser Val Asn
1 5
<210> 85
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 85
Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 86
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 86
Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn
1 5 10
<210> 87
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 87
Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15
<210> 88
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
[0035]
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 88
Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5
<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 89
Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr
1 5
<210> 90
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 90
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr
20 25 30
Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
65 70 75 80
Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 91
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 91
[0036]
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30
Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
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 Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95
Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
<210> 92
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 92
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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
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 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 93
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 93

[0037]

Glu Val Gln Leu Val 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 Gly
20 25 30
Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Phe Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser

<210> 94
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 94

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 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Ala Ile Ser Ser Ser Gly Ser 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 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110
<210> 95
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 95
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
1 5 10 15
[0038] Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
20 25 30
Val Glu Ile Lys
35
<210> 96
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 96
Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Phe
1 5 10 15
Cys Ala Gly Gly Phe Asp Arg Ser Gly Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly
20 25 30
Thr Glu Val Val Val Lys
35
<210> 97
<211> 245
<212> PRT
<213> 智人
<400> 97

Ile Val Gly Gly Gln Glu Ala Pro Arg Ser Lys Trp Pro Trp Gln Val
1 5 10 15
Ser Leu Arg Val His Gly Pro Tyr Trp Met His Phe Cys Gly Gly Ser
20 25 30
Leu Ile His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Val Gly Pro
35 40 45
Asp Val Lys Asp Leu Ala Ala Leu Arg Val Gln Leu Arg Glu Gln His
50 55 60
Leu Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro Val Ser Arg Ile Ile Val His
65 70 75 80
Pro Gln Phe Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu
85 90 95
Leu Glu Glu Pro Val Asn Val Ser Ser His Val His Thr Val Thr Leu
100 105 110
Pro Pro Ala Ser Glu Thr Phe Pro Pro Gly Met Pro Cys Trp Val Thr
115 120 125
Gly Trp Gly Asp Val Asp Asn Asp Glu Arg Leu Pro Pro Pro Phe Pro
130 135 140
Leu Lys Gln Val Lys Val Pro Ile Met Glu Asn His Ile Cys Asp Ala
145 150 155 160
Lys Tyr His Leu Gly Ala Tyr Thr Gly Asp Asp Val Arg Ile Val Arg
165 170 175

[0039]

Asp Asp Met Leu Cys Ala Gly Asn Thr Arg Arg Asp Ser Cys Gln Gly
180 185 190
Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys Val Asn Gly Thr Trp Leu Gln
195 200 205
Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln Pro Asn Arg Pro
210 215 220
Gly Ile Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr Leu Asp Trp Ile His His Tyr
225 230 235 240
Val Pro Lys Lys Pro
245

<210> 98
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 98
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 Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Gly Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met
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 Val Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Asp Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 99
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 99
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 Asp Tyr
20 25 30
[0040] Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met
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 Val Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Asp Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 100
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 100
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
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met
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 Val Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Asp Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 101
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 101
[0041] 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 Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Val Tyr Tyr Ala Asp Thr Met
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 Val Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Arg Asp Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 102
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 102

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Arg Thr Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr His Ser Tyr Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 103
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 103

[0042]

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45
Arg Thr Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr His Ser Tyr Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 104
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 104
gaagtgcagc tggtggaaag cggcggcggc ctggtgcagc caggcggcag cctgcgcctg 60
agctgcgccg ccagcggctt caccttcagc gattatggca tggtgtgggt gcgccaggcc 120

ccaggcaaag gcctggaatg ggtggccttc atcagcagcg gcagcagcac cgtgtattat 180
gccgatacca tgaaaggccg cttcaccatc agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat 240
ctgcagatga acagcctgcg cgccgaagat accgccgtgt attattgcac ccgccgcaac 300
tacgatgatt ggtatttcga tgtgtggggc cagggcaccc tggtgaccgt ctcgagt 357

<210> 105
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 105

gatatccaga tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga tcgcgtgacc 60
atcacctgca gcgccagcag cagcgtgacc tatatgtatt ggtatcagca gaaaccaggc 120
aaaagcccaa aaccatggat ctatcgcacc agcgatctgg ccagcggcgt gccaagccgc 180
ttcagcggca gcggcagcgg caccgatttc accctgacca tcagcagcct gcagccagaa 240
gatttcgcca cctattattg ccagcactat cacagctatc cactgacctt cggccagggt 300
accaaggtgg agatcaaa 318

<210> 106
<211> 1347
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 106

[0043]

gaagtgcagc tggtggaaag cggcggcggc ctggtgcagc caggcggcag cctgcgcctg 60
agctgcgccg ccagcggctt caccttcagc gattatggca tggtgtgggt gcgccaggcc 120
ccaggcaaag gcctggaatg ggtggccttc atcagcagcg gcagcagcac cgtgtattat 180
gccgatacca tgaaaggccg cttcaccatc agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat 240
ctgcagatga acagcctgcg cgccgaagat accgccgtgt attattgcac ccgccgcaac 300
tacgatgatt ggtatttcga tgtgtggggc cagggcaccc tggtgaccgt ctcgagtgcc 360
tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgactgtg ccctctagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccccа tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaagagatg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1347
<210> 107
<211> 639
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 107
gatatccaga tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga tcgcgtgacc 60
atcacctgca gcgccagcag cagcgtgacc tatatgtatt ggtatcagca gaaaccaggc 120
aaaagcccaa aaccatggat ctatcgcacc agcgatctgg ccagcggcgt gccaagccgc 180
ttcagcggca gcggcagcgg caccgatttc accctgacca tcagcagcct gcagccagaa 240
gatttcgcca cctattattg ccagcactat cacagctatc cactgacctt cggccagggt 300
accaaggtgg agatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 360
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcttct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 600
agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgt 639
[0044] <210> 108
<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 108
gaagtgcagc tggtggaaag cggcggcggc ctggtgcagc caggcggcag cctgcgcctg 60
agctgcgccg ccagcggctt caccttcagc gattatggca tggtgtgggt gcgccaggcc 120
ccaggcaaag gcctggaatg ggtggccttc atcagcagcg gcagcagcac cgtgtattat 180
gccgatacca tgaaaggccg cttcaccatc agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat 240
ctgcagatga acagcctgcg cgccgaagat accgccgtgt attattgcac ccgccgcaac 300
tacgatgatt ggtatttcga tgtgtggggc cagggcaccc tggtgaccgt ctcgagtgcc 360
tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctgct cccgcagtac ttctgagtcc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgactgtg ccctctagca gcttgggcac caagacctac 600
acgtgcaacg tggatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaaacgcgt tgagtccaaa 660
tatggtcccc catgcccacc atgcccagca cctgagttcc tgggggggacc atcagtcttc 720
ctgttccccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc 780
gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc 840
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 900
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 960

aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020
cagccccgag agccacaggt gtacaccctg cccccatccc aggaggagat gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat 1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 1320
tccctgtctc tgggtaaa 1338

<210> 109
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 109

gaagtgcagc tggtggaaag cggcccaggc ctggtgaaac caagcgaaac cctgagcctg 60
acctgcaccg tgagccgctt cagcctgatc ggctatgcca tcacctggat ccgccagcca 120
ccaggcaaag gcctggaatg gatcggcggc atcagcagcg ccgccaccac cttctatagc 180
agctgggcca aaagccgcgt gaccatcagc cgcgatacca gcaaaaacca ggtgagcctg 240
aaactgagca gcgtgaccgc cgccgatacc gccgtgtatt attgcgcccg cgatccacgc 300
ggctatggcg ccgccctgga tcgcctggat ctgtggggcc agggcaccct ggtgaccgtc 360
tcgagt 366

[0045]

<210> 110
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 110

gatatccaga tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga tcgcgtgacc 60
atcacctgcc agagcatcaa aagcgtgtat aacaaccgcc tgggctggta tcagcagaaa 120
ccaggcaaag ccccaaaact gctgatctat gaaaccagca tcctgaccag cggcgtgcca 180
agccgcttca gcggcagcgg cagcggcacc gatttcaccc tgaccatcag cagcctgcag 240
ccagaagatt tcgccaccta ttattgcgcc ggcggcttcg atcgcagcgg cgataccacc 300
ttcggccagg gtaccaaggt ggagatcaaa 330

<210> 111
<211> 1356
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 111

gaagtgcagc tggtggaaag cggcccaggc ctggtgaaac caagcgaaac cctgagcctg 60
acctgcaccg tgagccgctt cagcctgatc ggctatgcca tcacctggat ccgccagcca 120
ccaggcaaag gcctggaatg gatcggcggc atcagcagcg ccgccaccac cttctatagc 180

agctgggcca aaagccgcgt gaccatcagc cgcgatacca gcaaaaacca ggtgagcctg 240
aaactgagca gcgtgaccgc cgccgatacc gccgtgtatt attgcgcccg cgatccacgc 300
ggctatggcg ccgccctgga tcgcctggat ctgtggggcc agggcaccct ggtgaccgtc 360
tcgagtgcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc 420
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgactgtgc cctctagcag cttgggcacc 600
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 660
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 720
gggggaccgt cagtcttcct cttccccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 780
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1020
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1080
gaagagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200
cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1260
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 1356

[0046]

<210> 112
<211> 651
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 112

gatatccaga tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga tcgcgtgacc 60
atcacctgcc agagcatcaa aagcgtgtat aacaaccgcc tgggctggta tcagcagaaa 120
ccaggcaaag ccccaaaact gctgatctat gaaaccagca tcctgaccag cggcgtgcca 180
agccgcttca gcggcagcgg cagcggcacc gatttcaccc tgaccatcag cagcctgcag 240
ccagaagatt tcgccaccta ttattgcgcc ggcggcttcg atcgcagcgg cgataccacc 300
ttcggccagg gtaccaaggt ggagatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 360
ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgctt ctgttgtgtg cctgctgaat 420
aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480
aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540
accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600
catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg t 651

<210> 113
<211> 1347
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体

<400> 113

[0047]

gaagtgcagc tggtggaaag cggcccaggc ctggtgaaac caagcgaaac cctgagcctg 60
acctgcaccg tgagccgctt cagcctgatc ggctatgcca tcacctggat ccgccagcca 120
ccaggcaaag gcctggaatg gatcggcggc atcagcagcg ccgccaccac cttctatagc 180
agctgggcca aaagccgcgt gaccatcagc cgcgatacca gcaaaaacca ggtgagcctg 240
aaactgagca gcgtgaccgc cgccgatacc gccgtgtatt attgcgcccg cgatccacgc 300
ggctatggcg ccgccctgga tcgcctggat ctgtggggcc agggcaccct ggtgaccgtc 360
tcgagtgcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctgctc ccgcagtact 420
tctgagtcca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgactgtgc cctctagcag cttgggcacc 600
aagacctaca cgtgcaacgt ggatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caaacgcgtt 660
gagtccaaat atggtccccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 720
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gacccctgag 780
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 840
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag 1260
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 1320
aagagcctct ccctgtctct gggtaaa 1347

<210> 114
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 114

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 115

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 115

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr

20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

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 Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn

85 90 95

[0048] Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 116

<211> 256

<212> PRT

<213> 智人

<400> 116

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Val His Gly Pro Tyr Trp Met His Phe Cys Gly Gly Ser

20 25 30

Leu Ile His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Val Gly Pro

35 40 45

Asp Val Lys Asp Leu Ala Ala Leu Arg Val Gln Leu Arg Glu Gln His

50 55 60

Leu Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro Val Ser Arg Ile Ile Val His

65 70 75 80

Pro Gln Phe Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu

85 90 95

Leu Glu Glu Pro Val Lys Val Ser Ser His Val His Thr Val Thr Leu

100 105 110

Pro Pro Ala Ser Glu Thr Phe Pro Pro Gly Met Pro Cys Trp Val Thr

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

<210> 117
<211> 256
<212> PRT
<213> 智人
<400> 117

[0049]

Ile Val Gly Gly Gln Glu Ala Pro Arg Ser Lys Trp Pro Trp Gln Val
1 5 10 15
Ser Leu Arg Val Arg Asp Arg Tyr Trp Met His Phe Cys Gly Gly Ser
20 25 30
Leu Ile His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Val Gly Pro
35 40 45
Asp Val Lys Asp Leu Ala Ala Leu Arg Val Gln Leu Arg Glu Gln His
50 55 60
Leu Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro Val Ser Arg Ile Ile Val His
65 70 75 80
Pro Gln Phe Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu
85 90 95
Leu Glu Glu Pro Val Asn Val Ser Ser His Val His Thr Val Thr Leu
100 105 110
Pro Pro Ala Ser Glu Thr Phe Pro Pro Gly Met Pro Cys Trp Val Thr
115 120 125
Gly Trp Gly Asp Val Asp Asn Asp Glu Arg Leu Pro Pro Pro Phe Pro
130 135 140
Leu Lys Gln Val Lys Val Pro Ile Met Glu Asn His Ile Cys Asp Ala
145 150 155 160
Lys Tyr His Leu Gly Ala Tyr Thr Gly Asp Asp Val Arg Ile Val Arg
165 170 175

Asp Asp Met Leu Cys Ala Gly Asn Thr Arg Arg Asp Ser Cys Gln Gly
180 185 190
Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys Val Asn Gly Thr Trp Leu Gln
195 200 205
Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln Pro Asn Arg Pro
210 215 220
Gly Ile Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr Leu Asp Trp Ile His His Tyr
225 230 235 240
Val Pro Lys Lys Pro Gly Asn Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
245 250 255
<210> 118
<211> 256
<212> PRT
<213> 智人
<400> 118
Ile Val Gly Gly Gln Glu Ala Pro Arg Ser Lys Trp Pro Trp Gln Val
1 5 10 15
Ser Leu Arg Val Arg Asp Arg Tyr Trp Met His Phe Cys Gly Gly Ser
20 25 30
Leu Ile His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Gly Pro
35 40 45
[0050] Asp Val Lys Asp Leu Ala Ala Leu Arg Val Gln Leu Arg Glu Gln His
50 55 60
Leu Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro Val Ser Arg Ile Ile Val His
65 70 75 80
Pro Gln Phe Tyr Ile Ile Gln Thr Gly Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu
85 90 95
Leu Glu Glu Pro Val Asn Ile Ser Ser Arg Val His Thr Val Met Leu
100 105 110
Pro Pro Ala Ser Glu Thr Phe Pro Pro Gly Met Pro Cys Trp Val Thr
115 120 125
Gly Trp Gly Asp Val Asp Asn Asp Glu Pro Leu Ser Pro Pro Phe Pro
130 135 140
Leu Lys Gln Val Lys Val Pro Ile Met Glu Asn His Ile Cys Asp Ala
145 150 155 160
Lys Tyr His Leu Gly Ala Tyr Thr Gly Asp Asp Val Arg Ile Ile Arg
165 170 175
Asp Asp Met Leu Cys Ala Gly Asn Ser Gln Arg Asp Ser Cys Lys Gly
180 185 190
Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys Val Asn Gly Thr Trp Leu Gln
195 200 205
Ala Gly Val Val Ser Trp Asp Glu Gly Cys Ala Gln Pro Asn Arg Pro
210 215 220
Gly Ile Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr Leu Asp Trp Ile His His Tyr

225 230 235 240
Val Pro Lys Lys Pro Gly Asn Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
245 250 255
<210> 119
<211> 268
<212> PRT
<213> 食蟹猴（Macaca fascicularis）
<400> 119
Ala Leu Pro Val Leu Val Ser Pro Ala His Ala Ala Pro Ala Pro Gly
1 5 10 15
Gln Ala Leu Gln Arg Val Gly Ile Val Gly Gly Lys Glu Ala Pro Arg
20 25 30
Ser Lys Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Leu His Gly Gln Tyr Trp
35 40 45
Met His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile His Pro Gln Trp Val Leu Thr
50 55 60
Ala Ala His Cys Val Gly Pro Asp Val Lys Asp Leu Ala Asp Leu Arg
65 70 75 80
Val Gln Leu Arg Glu Gln His Leu Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro
85 90 95
Val Ser Arg Ile Ile Val His Pro Gln Phe Tyr Ala Val Gln Ile Gly
100 105 110
[0051] Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Glu Pro Val Asn Val Ser Ser
115 120 125
His Val His Thr Val Thr Leu Pro Pro Ala Leu Glu Thr Phe Pro Pro
130 135 140
Gly Thr Pro Cys Trp Val Thr Gly Trp Gly Asp Val Asp Asn Asp Val
145 150 155 160
Arg Leu Pro Pro Pro Tyr Pro Leu Lys Glu Val Glu Val Pro Ile Val
165 170 175
Glu Asn Gln Leu Cys Asp Ala Glu Tyr His Thr Gly Leu His Thr Gly
180 185 190
Asp Ser Phe Arg Ile Val Arg Asp Asp Met Leu Cys Ala Gly Ser Glu
195 200 205
Lys His Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys
210 215 220
Val Asn Gly Thr Trp Leu Gln Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Glu Gly
225 230 235 240
Cys Ala Leu Pro Asn Arg Pro Gly Ile Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr
245 250 255
Leu Asp Trp Ile His Arg Tyr Val Pro Glu Lys Pro
260 265
<210> 120
<211> 5

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 120
Ser Phe Ser Met Ser
1 5
<210> 121
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 121
Thr Ile Ser Gly Gly Lys Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 122
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
[0052]
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 122
Ala Asn Tyr Gly Asn Trp Phe Phe Glu Val
1 5 10
<210> 123
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 123
Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Lys Tyr Gly Leu Ser Leu Leu Asn
1 5 10 15
<210> 124
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 124
Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser

1 5
<210> 125
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 125
Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Phe Thr
1 5
<210> 126
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 126
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
[0053] 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> 127
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 127
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> 128
<211> 260
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 128
Ala Gly Ser Thr His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Ile
1 5 10 15
Val Gly Gly Gln Glu Ala Pro Arg Ser Lys Trp Pro Trp Gln Val Ser
20 25 30
[0054] Leu Arg Val His Gly Pro Tyr Trp Met His Phe Cys Gly Gly Ser Leu
35 40 45
Ile His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Val Gly Pro Asp
50 55 60
Val Lys Asp Leu Ala Ala Leu Arg Val Gln Leu Arg Glu Gln His Leu
65 70 75 80
Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Leu Pro Val Ser Arg Ile Ile Val His Pro
85 90 95
Gln Phe Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu
100 105 110
Glu Glu Pro Val Asn Val Ser Ser His Val His Thr Val Thr Leu Pro
115 120 125
Pro Ala Ser Glu Thr Phe Pro Pro Gly Met Pro Cys Trp Val Thr Gly
130 135 140
Trp Gly Asp Val Asp Asn Asp Glu Arg Leu Pro Pro Pro Phe Pro Leu
145 150 155 160
Lys Gln Val Lys Val Pro Ile Met Glu Asn His Ile Cys Asp Ala Lys
165 170 175
Tyr His Leu Gly Ala Tyr Thr Gly Asp Asp Val Arg Ile Val Arg Asp
180 185 190
Asp Met Leu Cys Ala Gly Asn Thr Arg Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp
195 200 205
Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys Val Asn Gly Thr Trp Leu Gln Ala

210 215 220

Gly Val Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln Pro Asn Arg Pro Gly

225 230 235 240

[0055] Ile Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr Leu Asp Trp Ile His His Tyr Val

245 250 255

Pro Lys Lys Pro

260

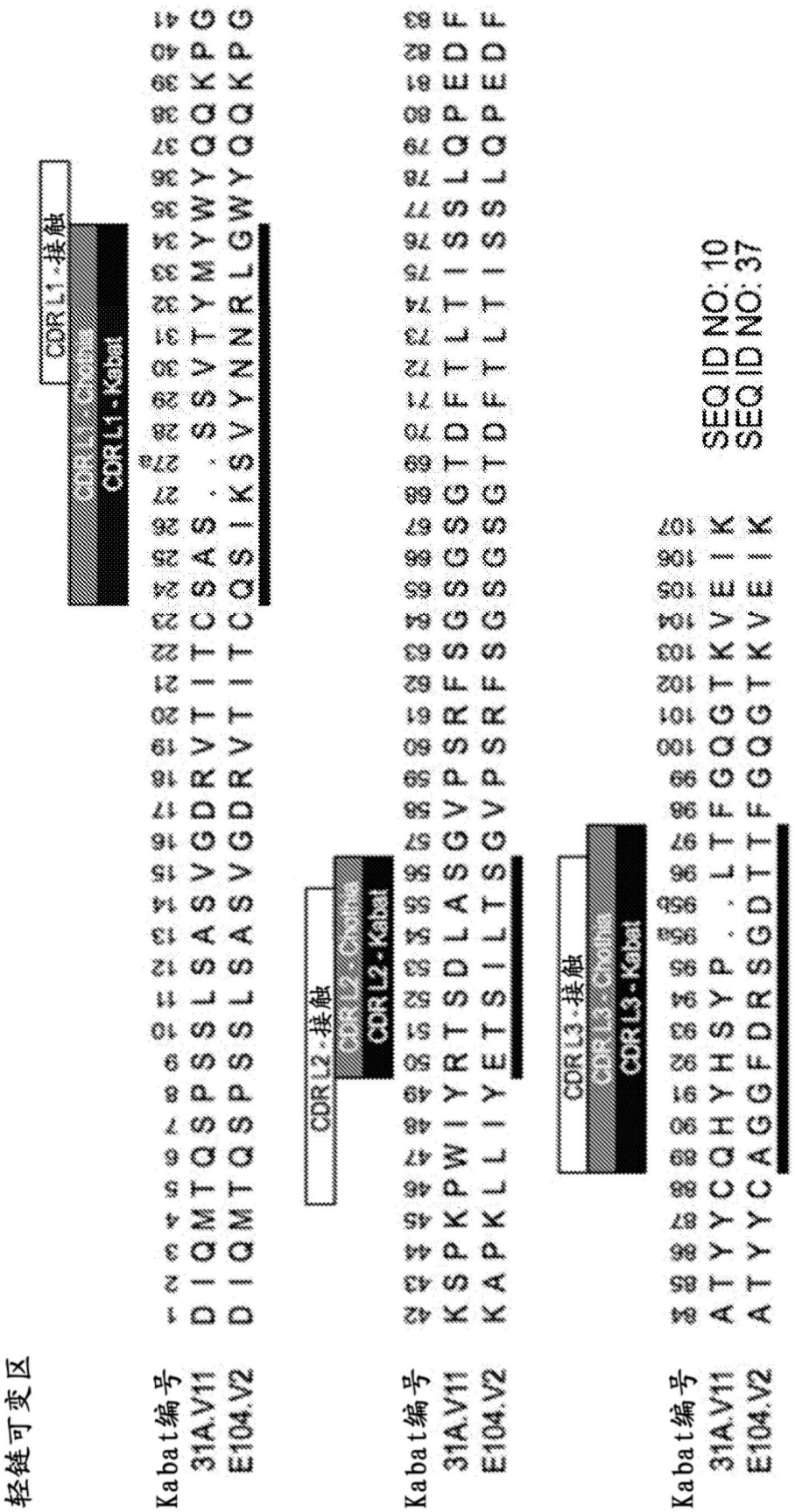

轻链可变区
Kabat编号
31A.V11
E104.V2
CDR L1-接触
CDR L1-Kabat
CDR L2-接触
CDR L2-Kabat
CDR L3-接触
CDR L3-Kabat
SEQ ID NO: 10
SEQ ID NO: 37

图1

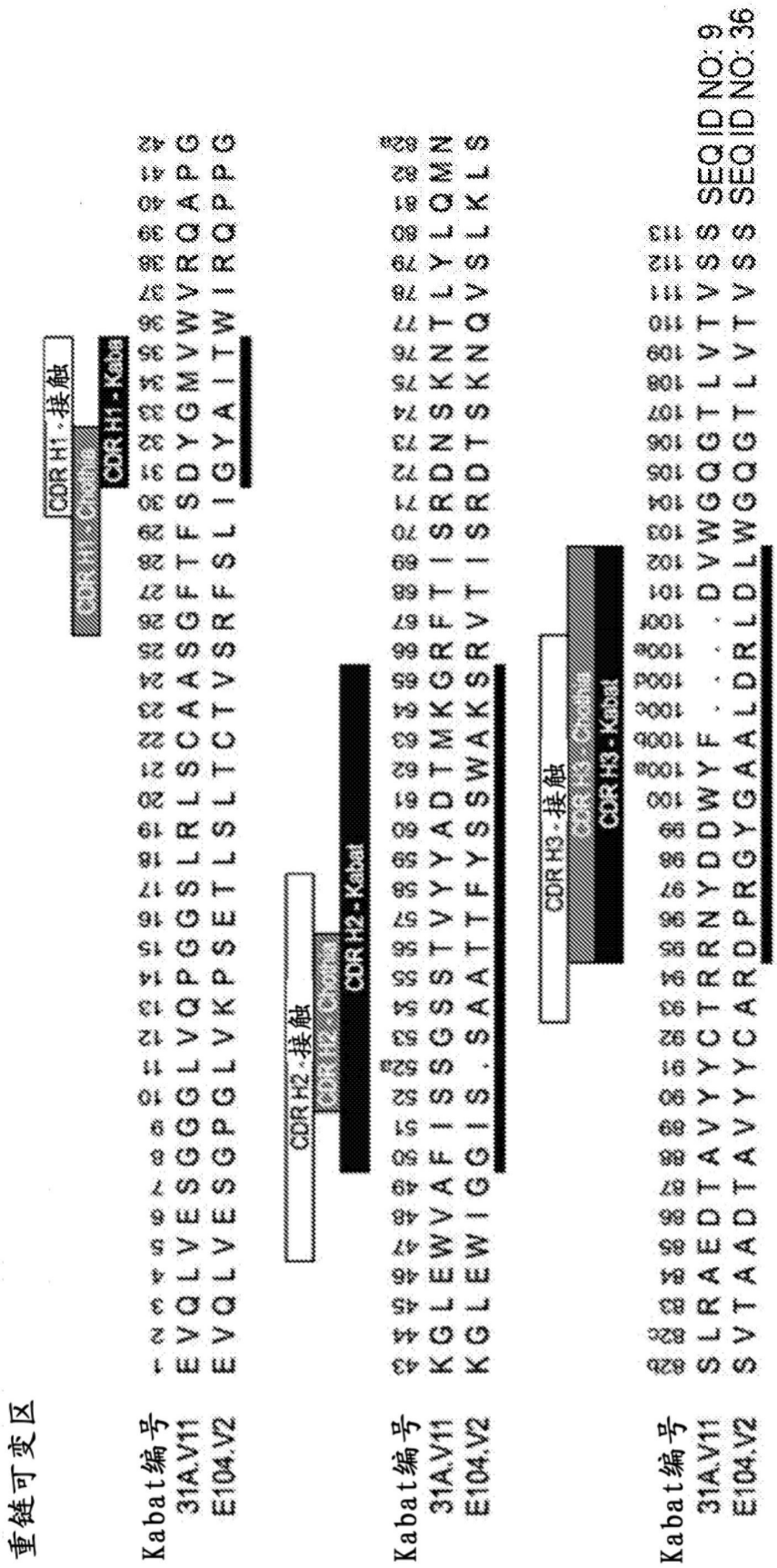

重链可变区
Kabat编号
31A.V11
E104.V2
CDR H1-接触
CDR H1-Kabat
CDR H2-接触
CDR H2-Kabat
CDR H3-接触
CDR H3-Kabat
SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 36

图1续

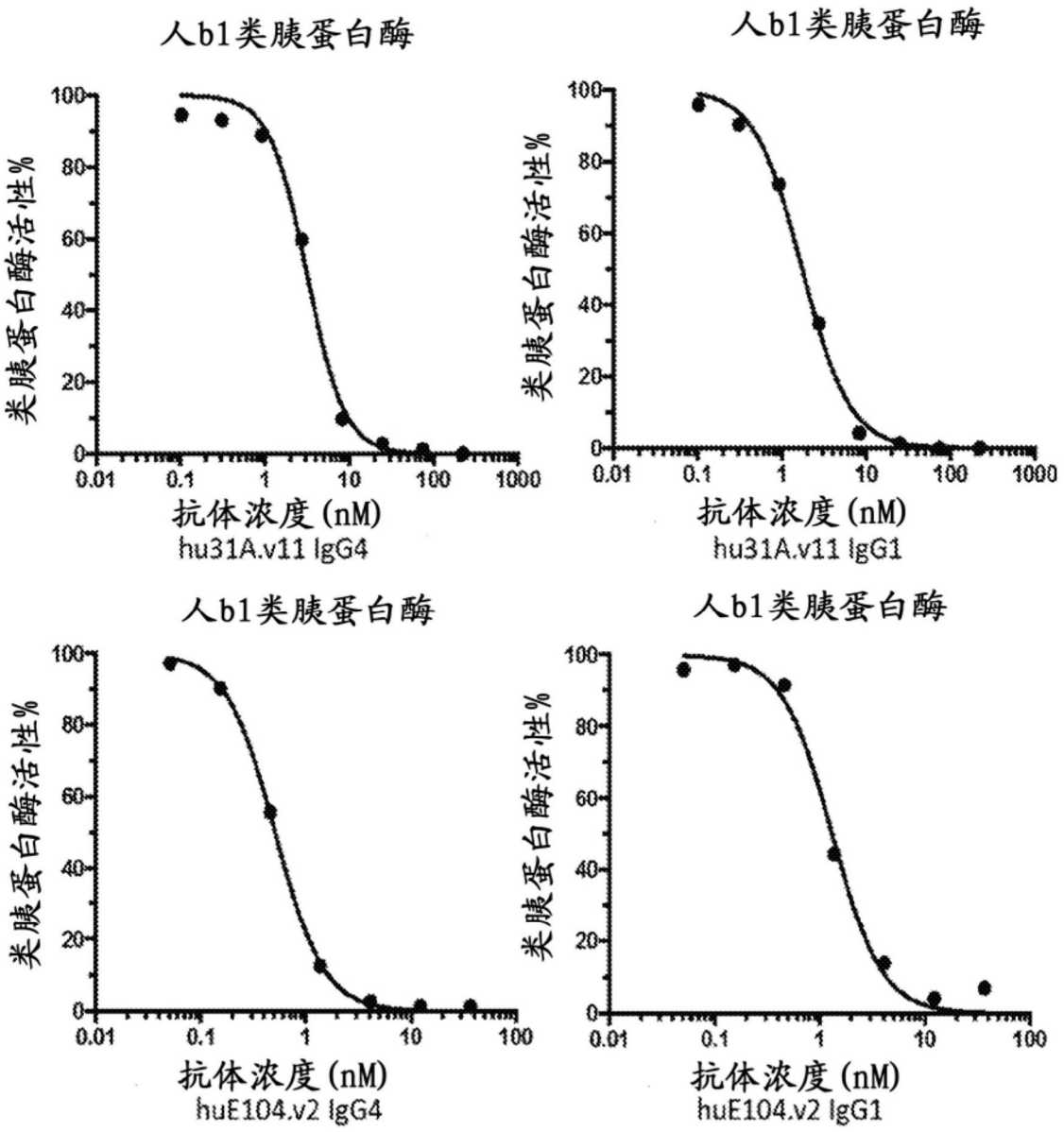

人b1类胰蛋白酶
类胰蛋白酶活性%
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度(nM)
hu31A.v11 IgG4
人b1类胰蛋白酶
类胰蛋白酶活性%
抗体浓度(nM)
hu31A.v11 IgG1
人b1类胰蛋白酶
类胰蛋白酶活性%
抗体浓度(nM)
huE104.v2 IgG4
人b1类胰蛋白酶
类胰蛋白酶活性%
抗体浓度(nM)
huE104.v2 IgG1

图2A

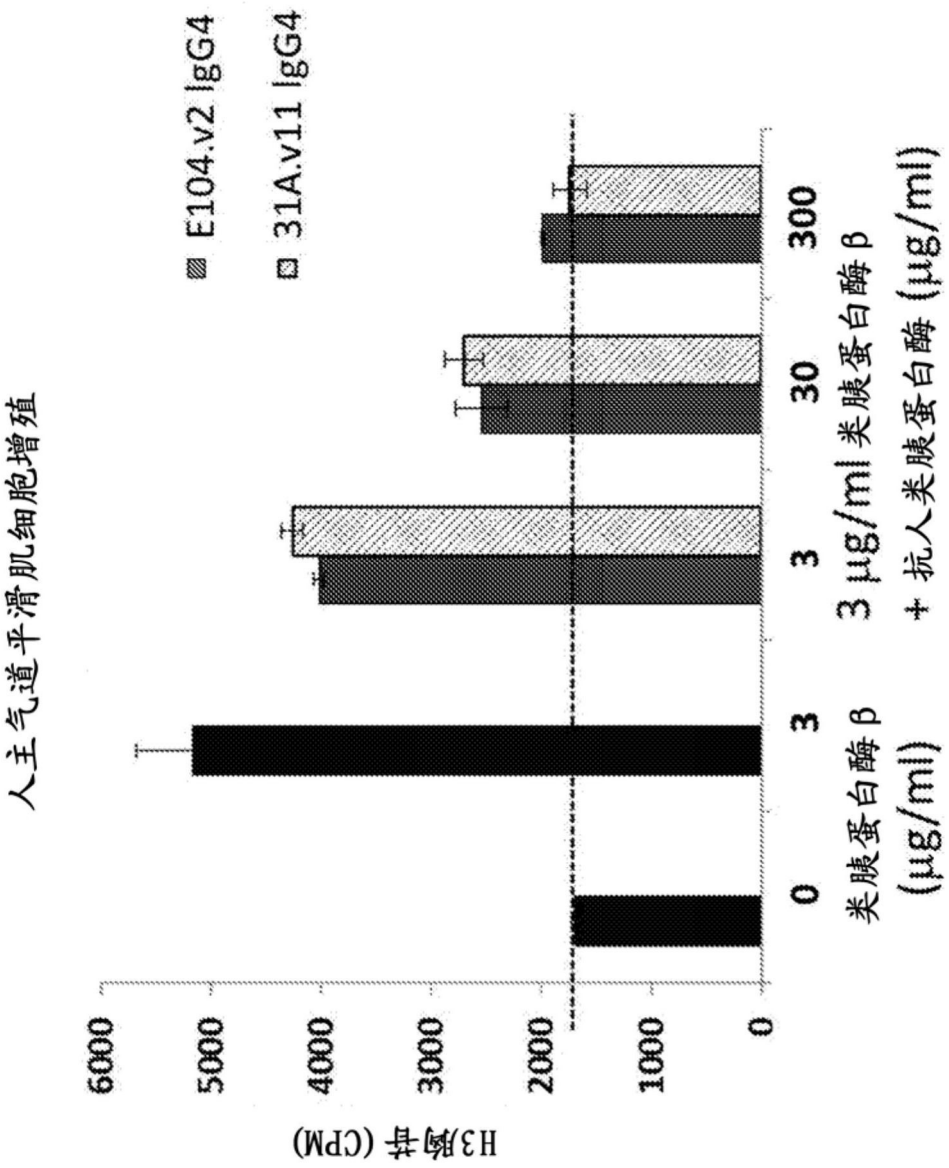

人主气道平滑肌细胞增殖
E104.v2 IgG4
31A.v11 IgG4
H3掺杂 (CPM)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
3
3
30
300
类胰蛋白酶 β (μg/ml)
3 μg/ml 类胰蛋白酶 β + 抗人类胰蛋白酶 (μg/ml)

图2B

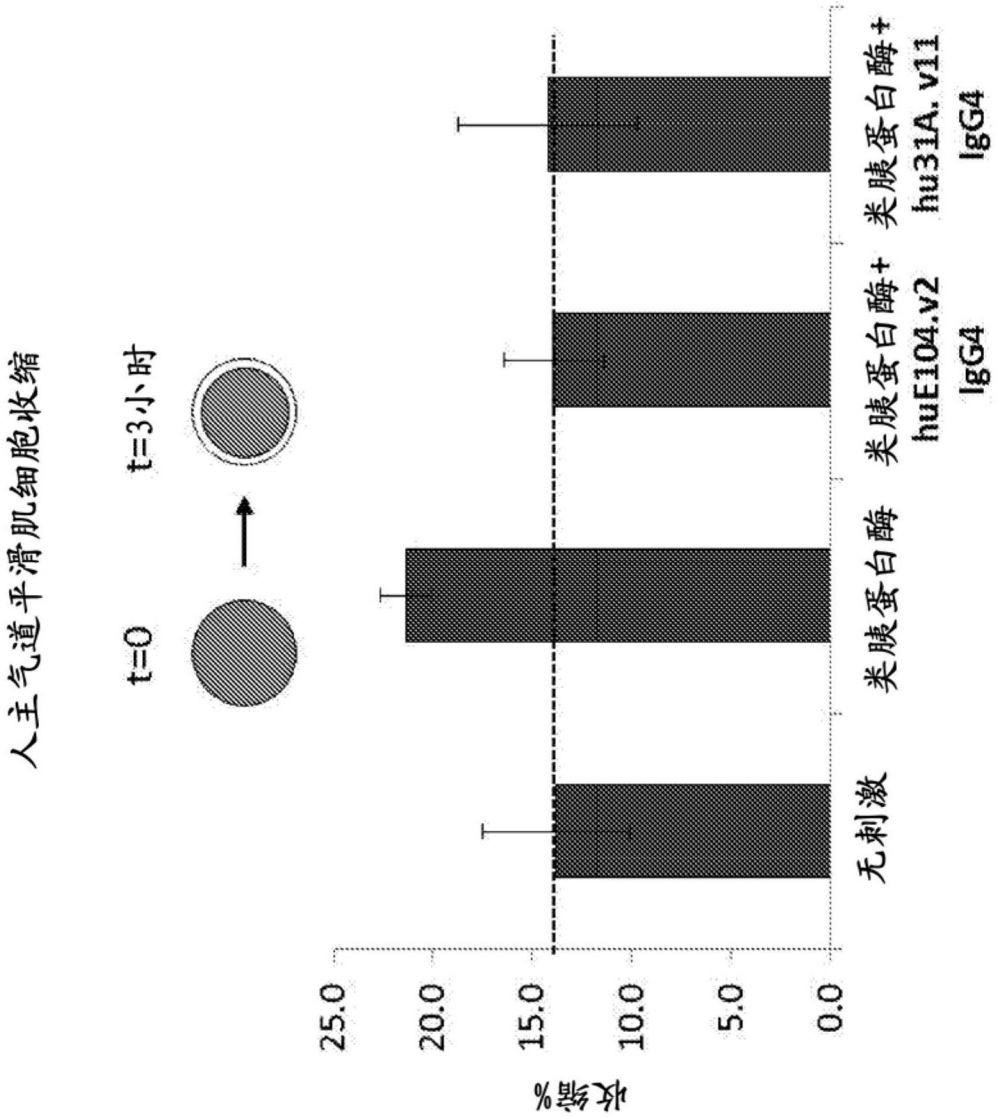

人主气道平滑肌细胞收缩
t=0
t=3小时
收缩%
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
无刺激
类胰蛋白酶
类胰蛋白酶+ huE104.v2 IgG4
类胰蛋白酶+ hu31A.v11 IgG4

图2C

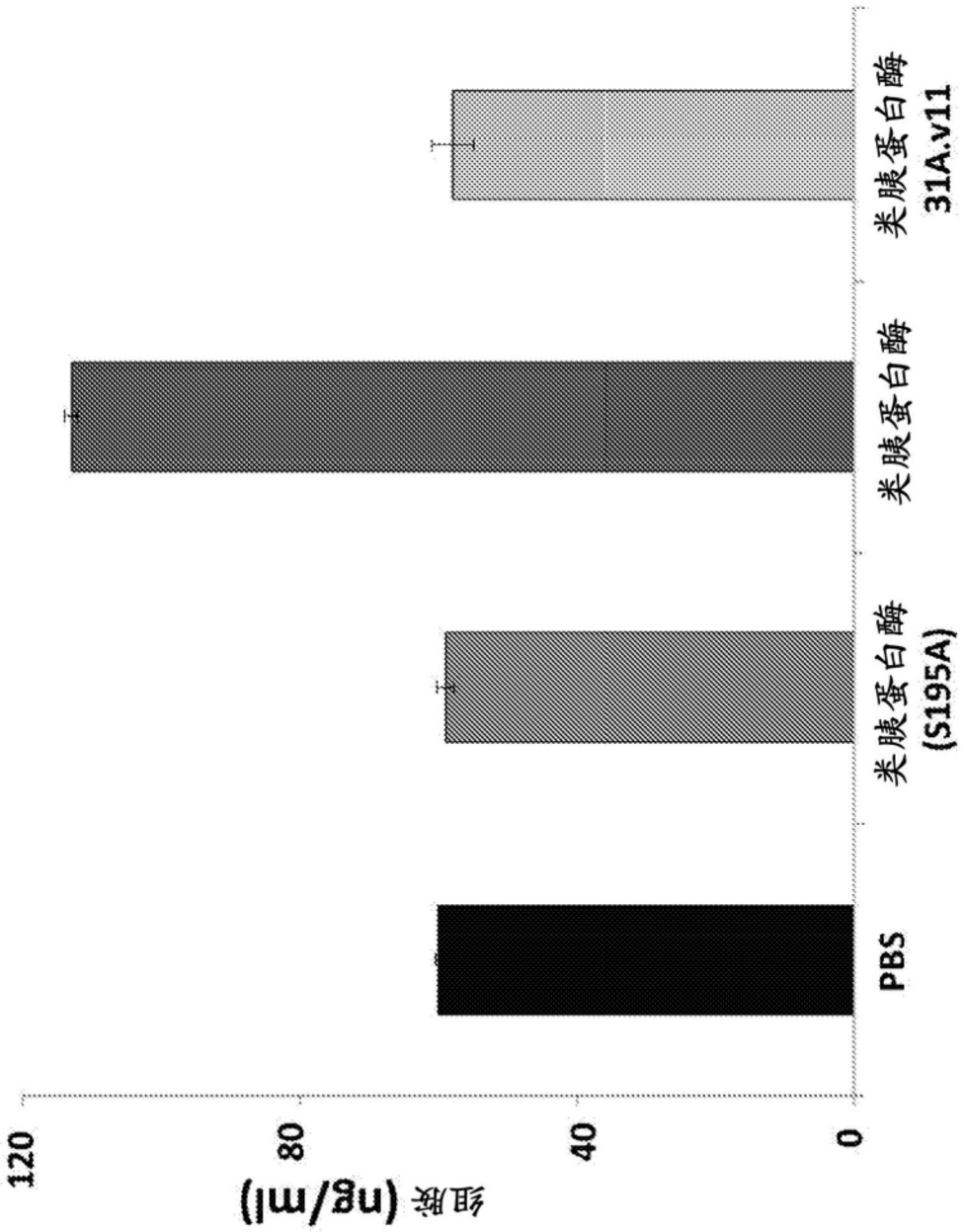


图2D

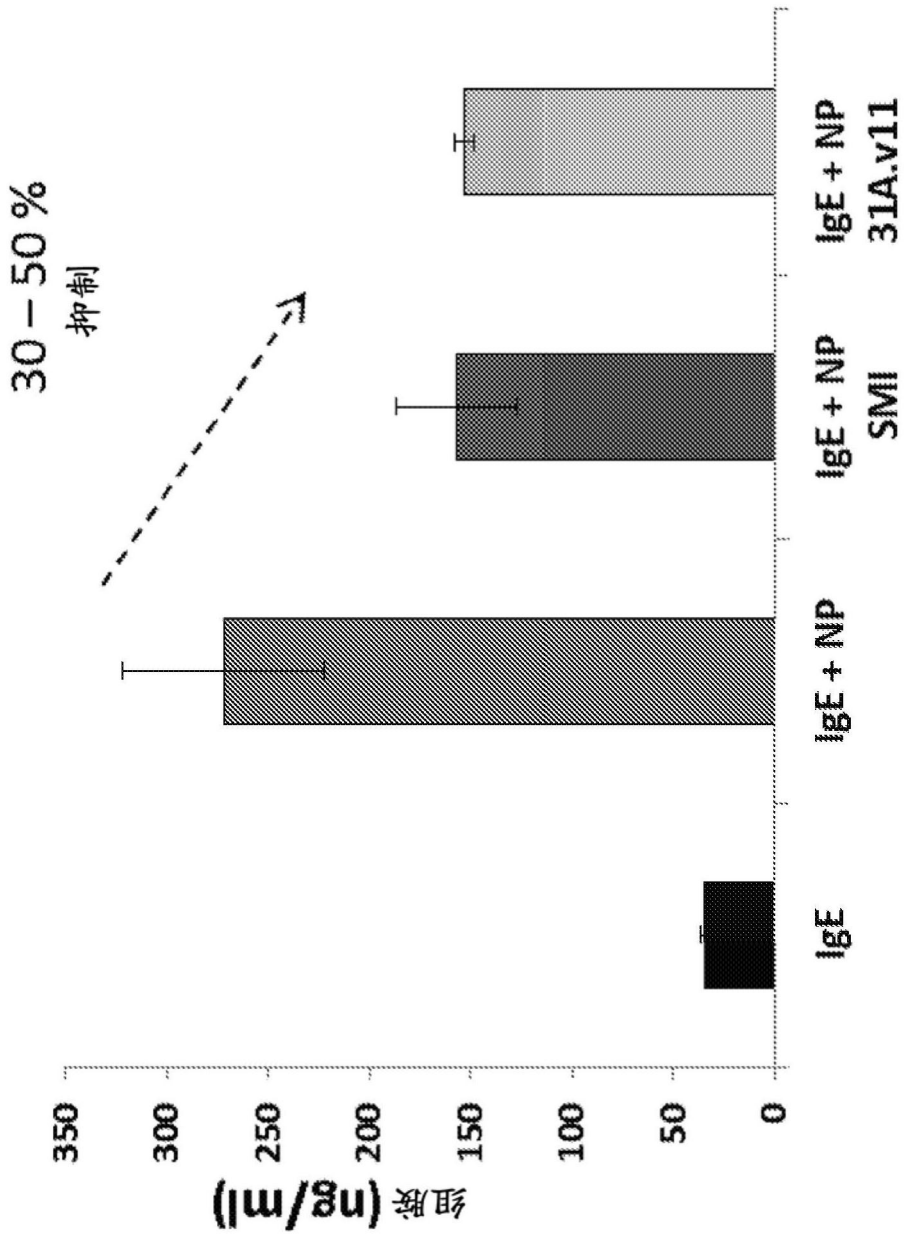

350
300
250
200
150
100
50
0
组胺 (ng/ml)
30 – 50 %
抑制
IgE
IgE + NP
IgE + NP
SMII
IgE + NP
31A.v11

图2E

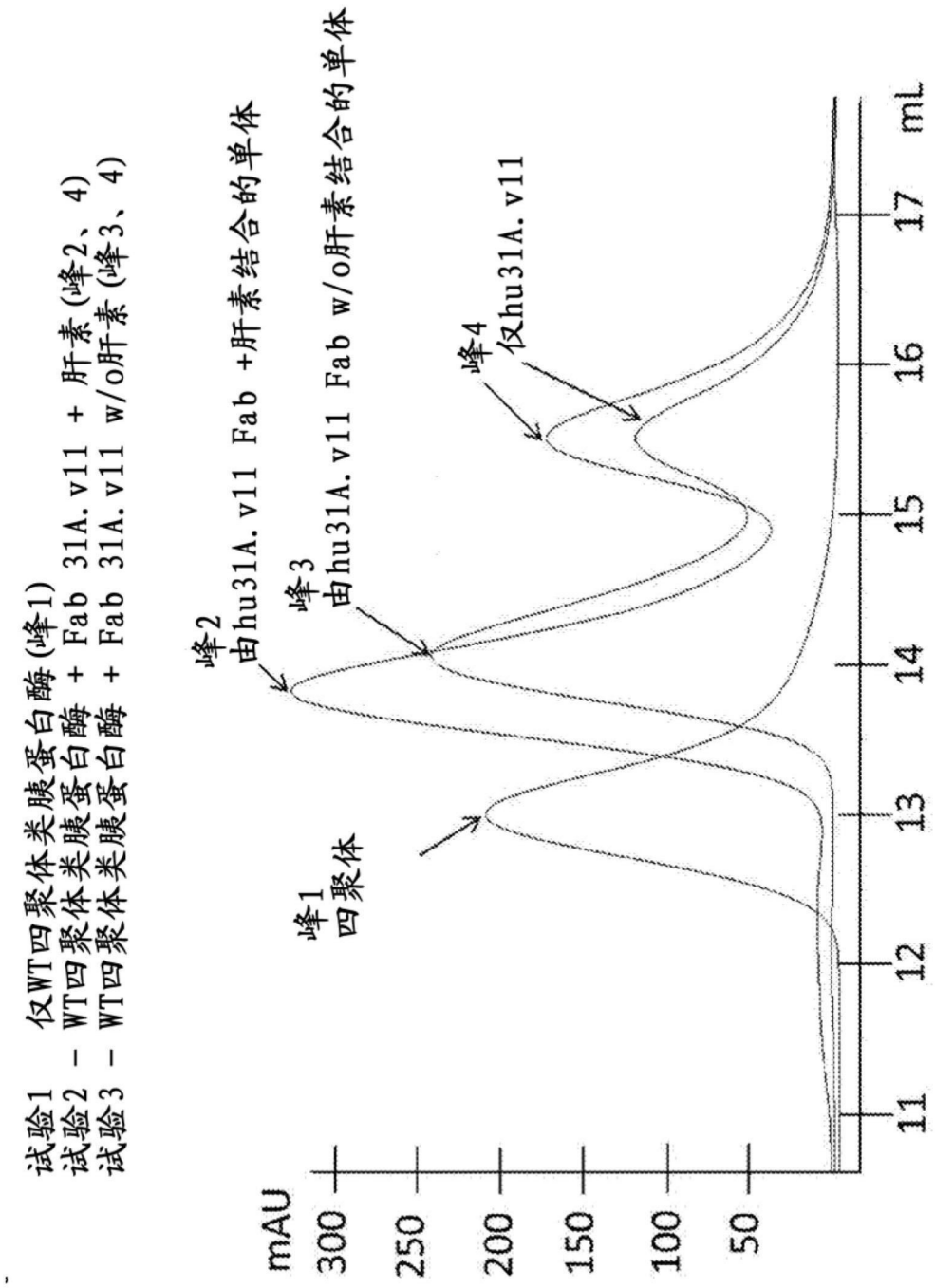

试验1 仅WT四聚体类胰蛋白酶(峰1)
试验2 – WT四聚体类胰蛋白酶 + Fab 31A.v11 + 肝素(峰2、4)
试验3 – WT四聚体类胰蛋白酶 + Fab 31A.v11 w/o肝素(峰3、4)
峰2
由hu31A.v11 Fab +肝素结合的单体
峰3
由hu31A.v11 Fab w/o肝素结合的单体
峰4
仅hu31A.v11
峰1
四聚体
mAU
300
250
200
150
100
50
11
12
13
14
15
16
17
mL

图3A

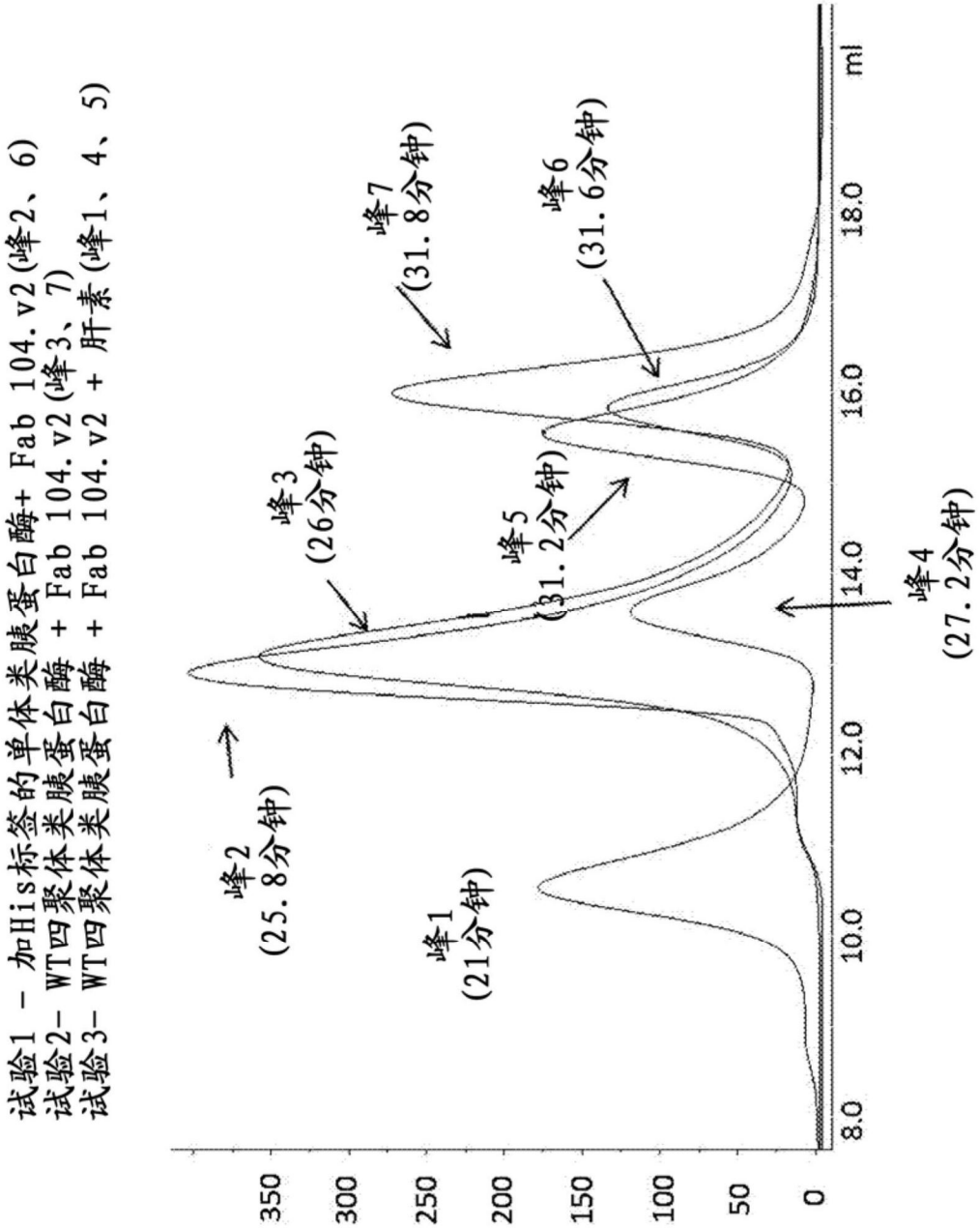

试验1 – 加His标签的单体类胰蛋白酶+ Fab 104.v2(峰2、6)
试验2– WT四聚体类胰蛋白酶 + Fab 104.v2(峰3、7)
试验3– WT四聚体类胰蛋白酶 + Fab 104.v2 + 肝素(峰1、4、5)
峰1
(21分钟)
峰2
(25.8分钟)
峰3
(26分钟)
峰4
(27.2分钟)
峰5
(31.2分钟)
峰6
(31.6分钟)
峰7
(31.8分钟)
350
300
250
200
150
100
50
0
8.0
10.0
12.0
14.0
16.0
18.0
ml

图3B

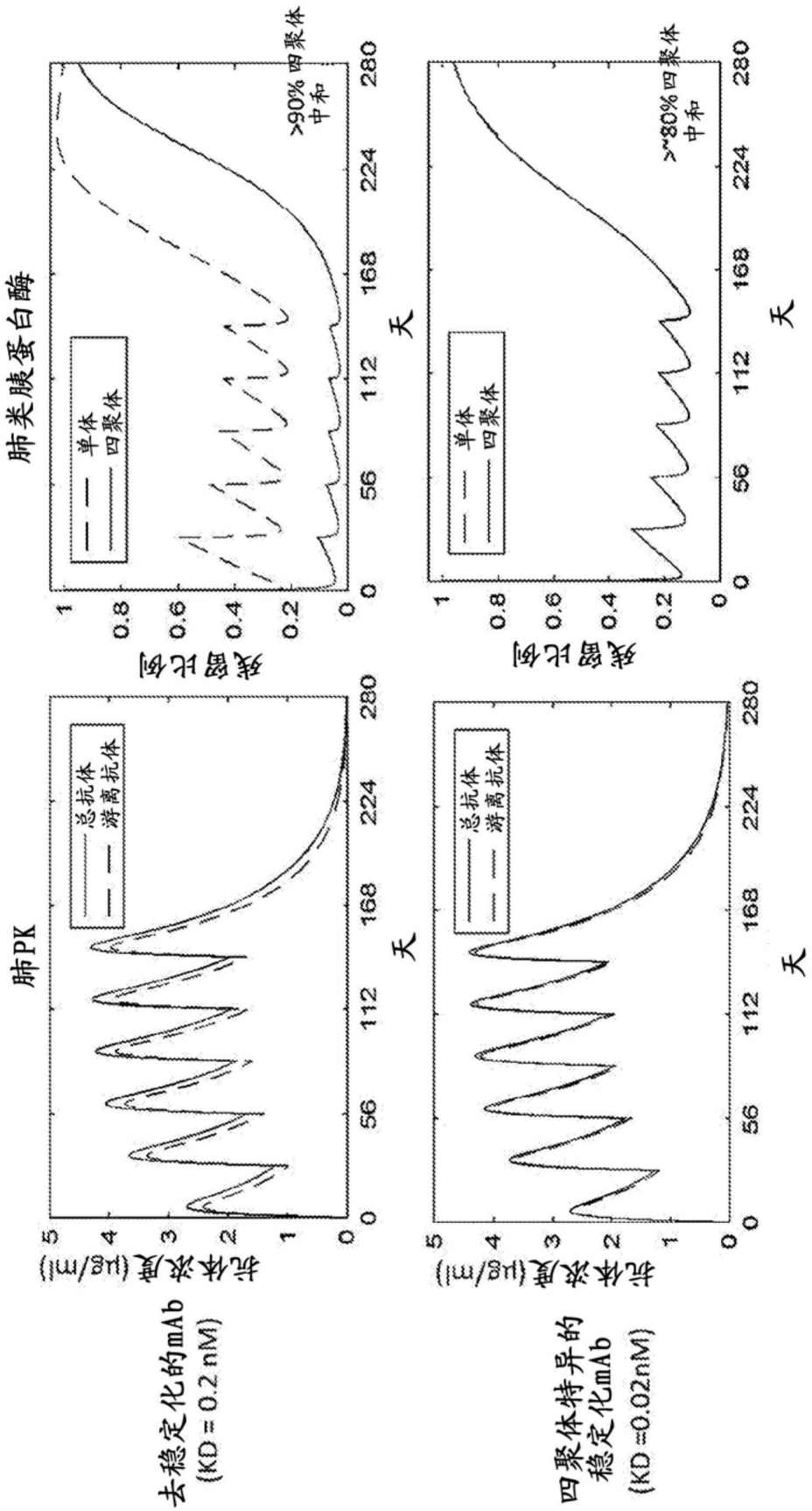

肺PK
肺类胰蛋白酶
去稳定化的mAb
(KD = 0.2 nM)
四聚体特异的
稳定化mAb
(KD =0.02nM)
抗体浓度(μg/ml)
残留比例
天
总抗体
游离抗体
单体
四聚体
>90% 四聚体
中和
>~80% 四聚体
中和
0
56
112
168
224
280
0
1
2
3
4
5
0.2
0.4
0.6
0.8
1

图4A

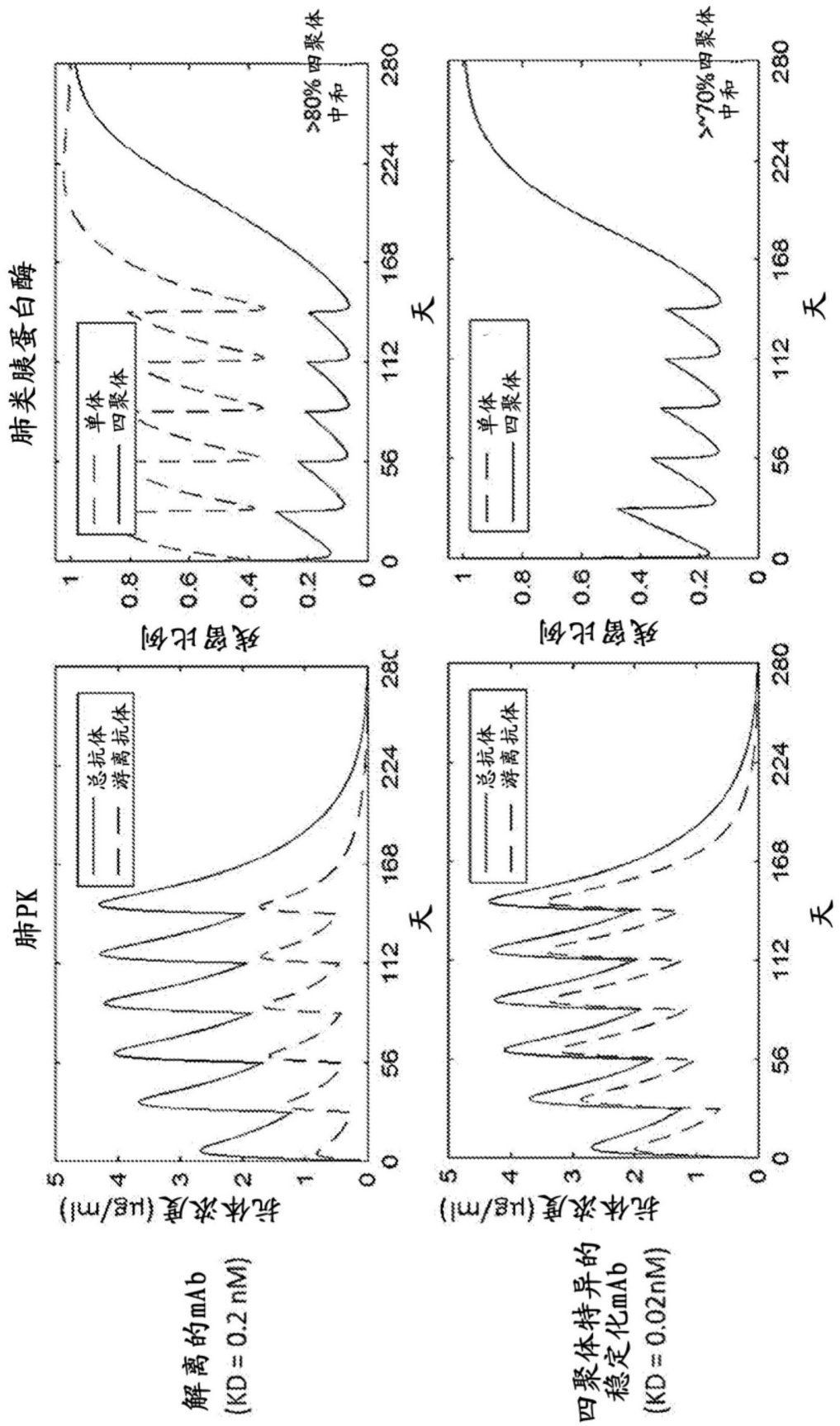

肺PK
肺类胰蛋白酶
解离的mAb
(KD = 0.2 nM)
四聚体特异的
稳定化mAb
(KD = 0.02nM)
抗体浓度 (μg/ml)
残留比例
天
总抗体
游离抗体
单体
四聚体
>80% 四聚体
中和
>~70% 四聚体
中和

图4B

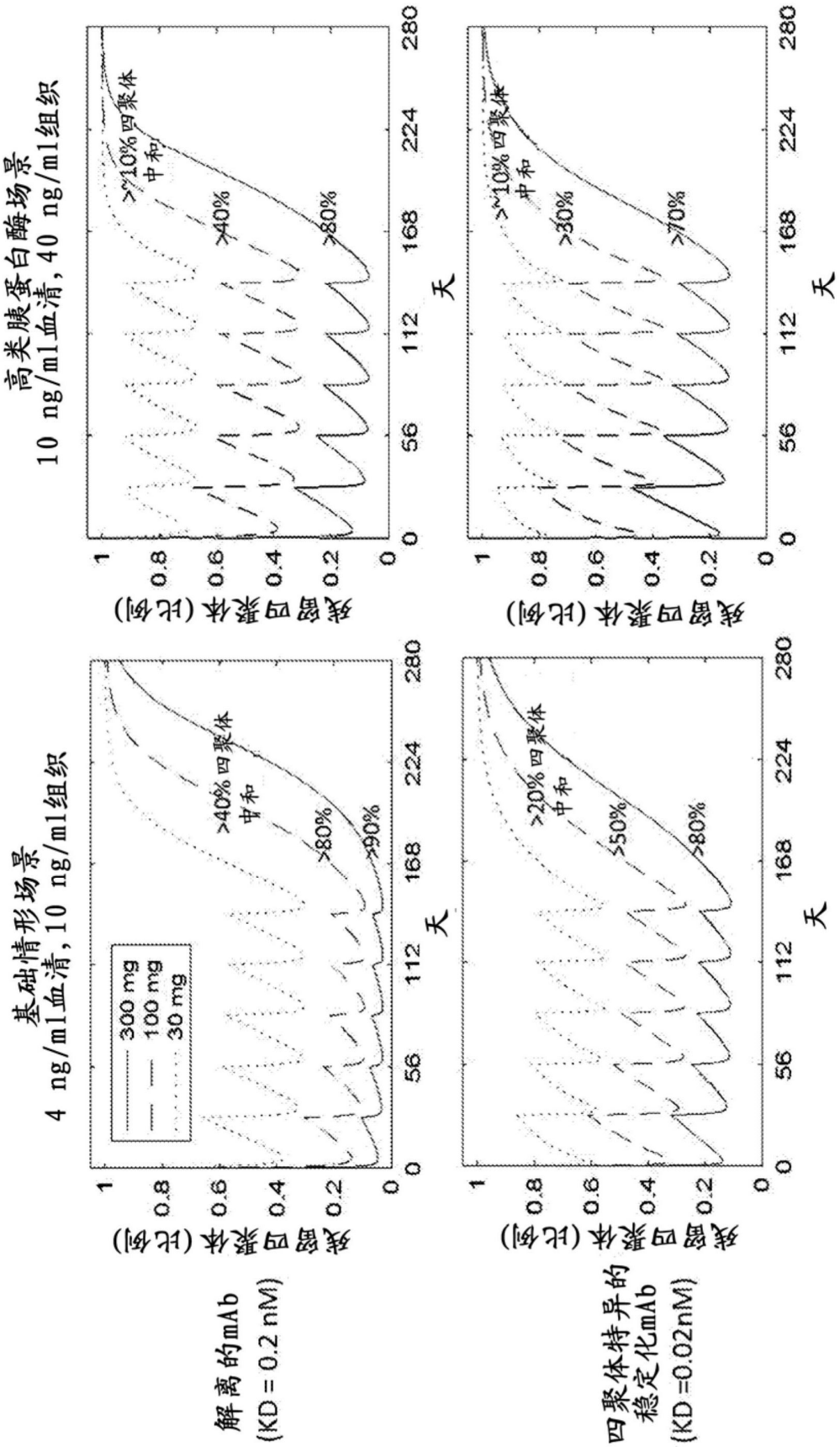
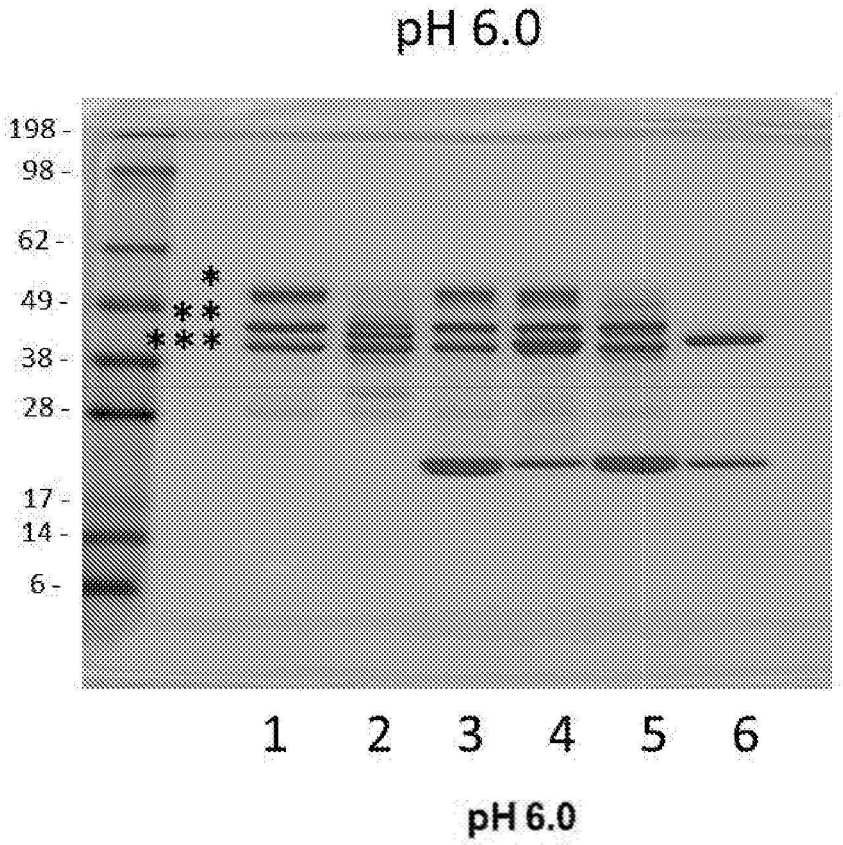

基础情形场景
4 ng/ml血清，10 ng/ml组织
高类胰蛋白酶场景
10 ng/ml血清，40 ng/ml组织
残留四聚体（比例）
天
300 mg
100 mg
30 mg
>40% 四聚体中和
>80%
>90%
>~10% 四聚体中和
>40%
>80%
>20% 四聚体中和
>50%
>80%
>~10% 四聚体中和
>30%
>70%
解离的mAb
(KD = 0.2 nM)
四聚体特异的稳定化mAb
(KD =0.02nM)

图4C


pH 6.0
198 -
98 -
62 -
49 -
38 -
28 -
17 -
14 -
6 -
*
***
***
1 2 3 4 5 6
pH 6.0

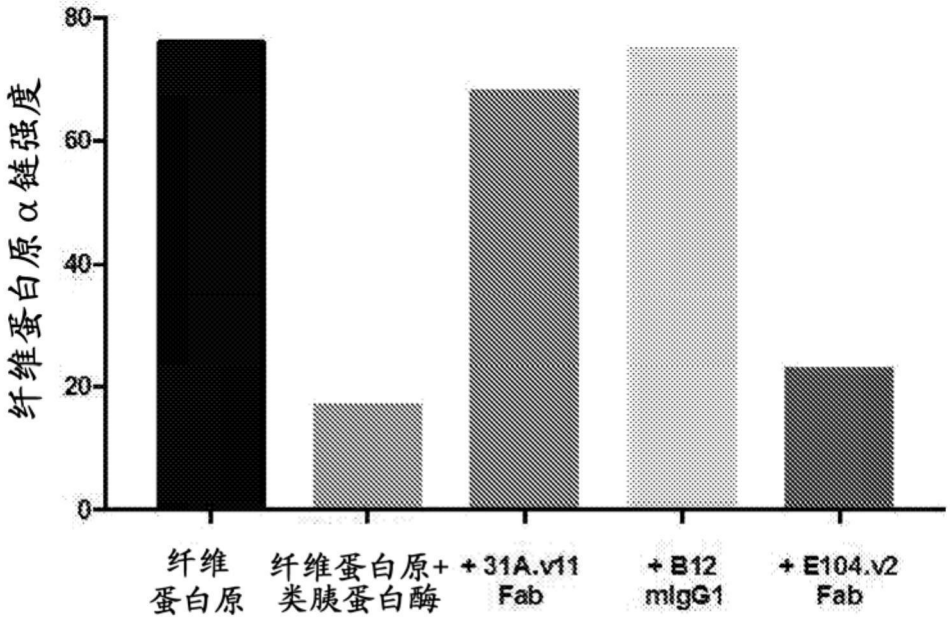
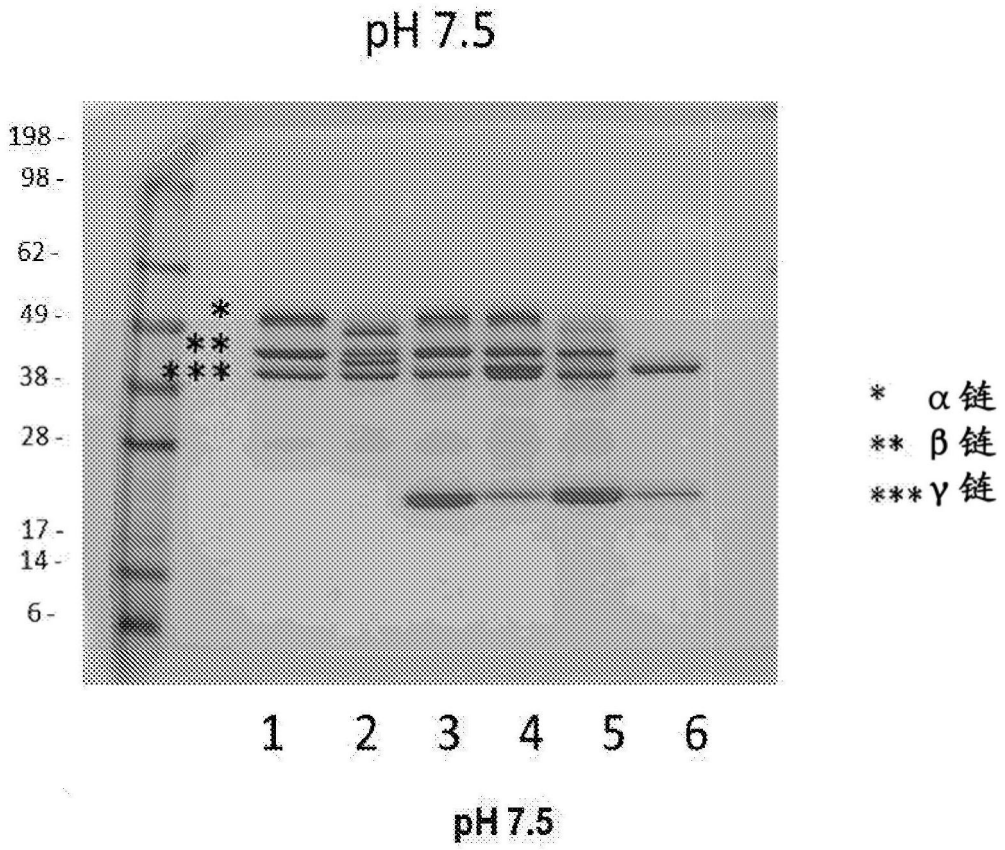

纤维蛋白原α链强度
80
60
40
20
0
纤维蛋白原
纤维蛋白原+类胰蛋白酶
+31A.v11 Fab
+B12 mIgG1
+E104.v2 Fab

图5A


pH 7.5
198 -
98 -
62 -
49 -
38 -
28 -
17 -
14 -
6 -
*
**
***
1 2 3 4 5 6
pH 7.5
* α链
** β链
***γ链

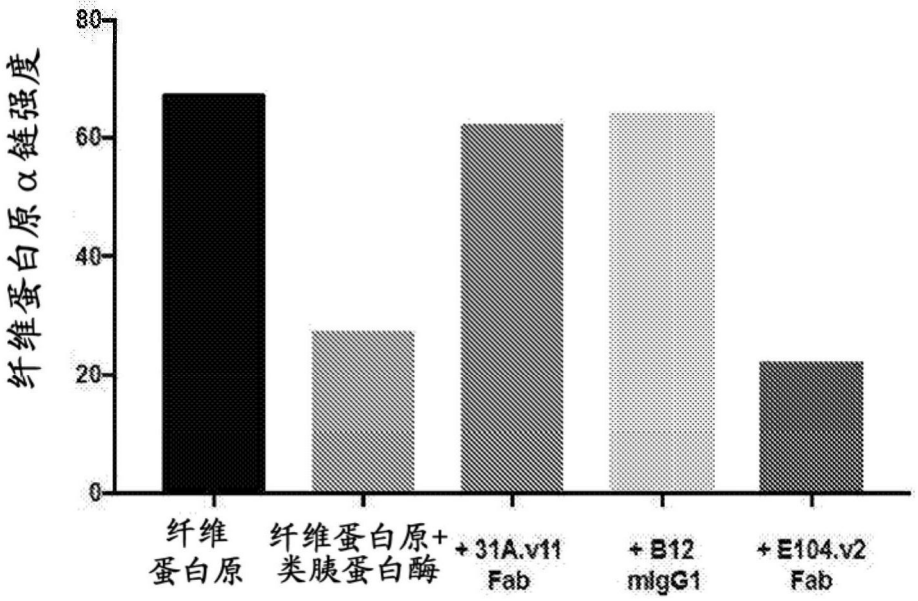

纤维蛋白原α链强度
80
60
40
20
0
纤维蛋白原
纤维蛋白原+类胰蛋白酶
+31A.v11 Fab
+B12 mIgG1
+E104.v2 Fab

图5B

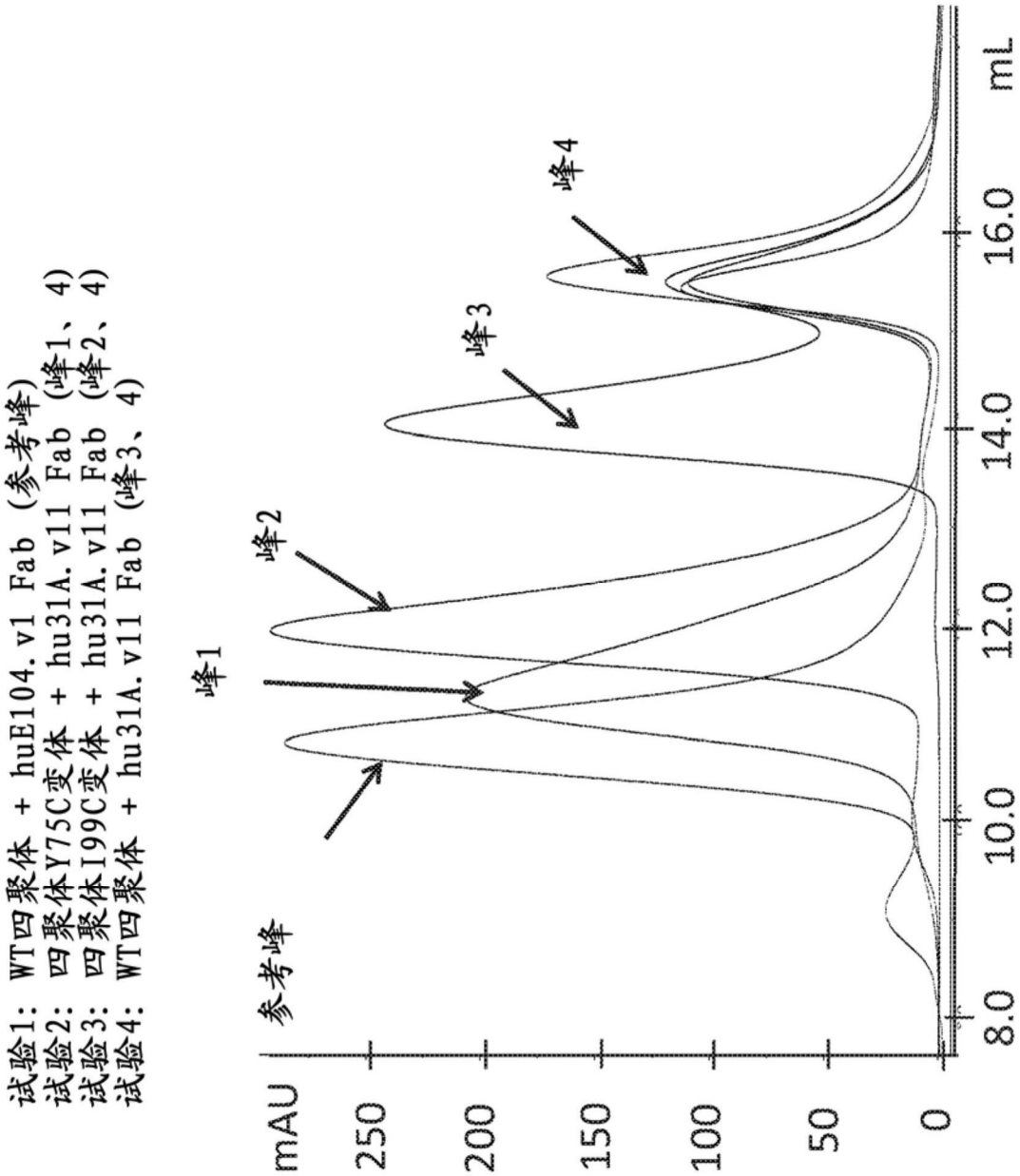

试验1: WT四聚体 + huE104.v1 Fab (参考峰)
试验2: 四聚体Y75C变体 + hu31A.v11 Fab (峰1、4)
试验3: 四聚体I99C变体 + hu31A.v11 Fab (峰2、4)
试验4: WT四聚体 + hu31A.v11 Fab (峰3、4)
峰1
参考峰
峰2
峰3
峰4
mAU
250
200
150
100
50
0
8.0
10.0
12.0
14.0
16.0
mL

图6A

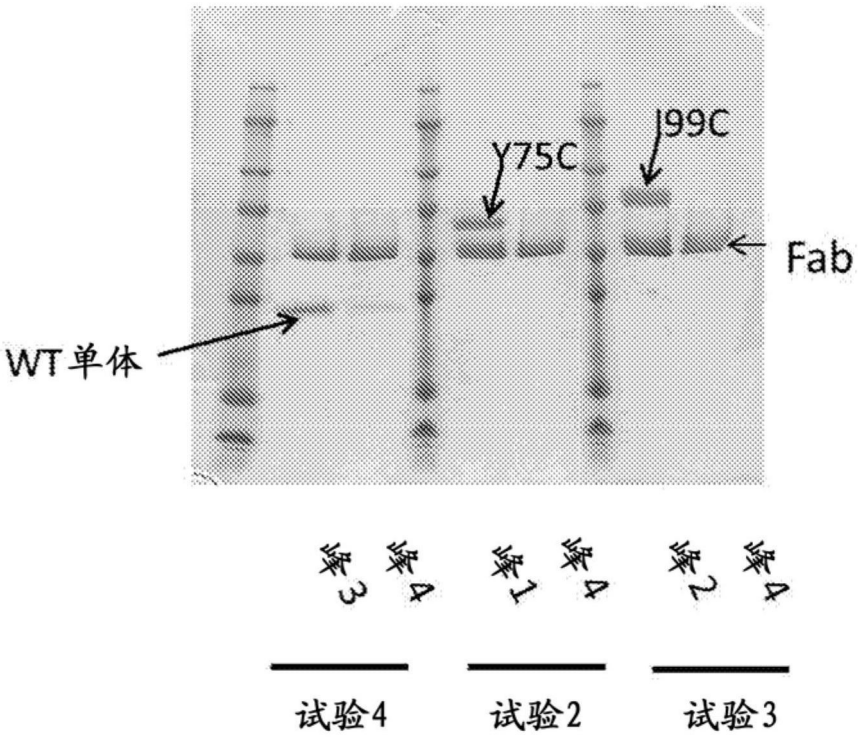


图6B

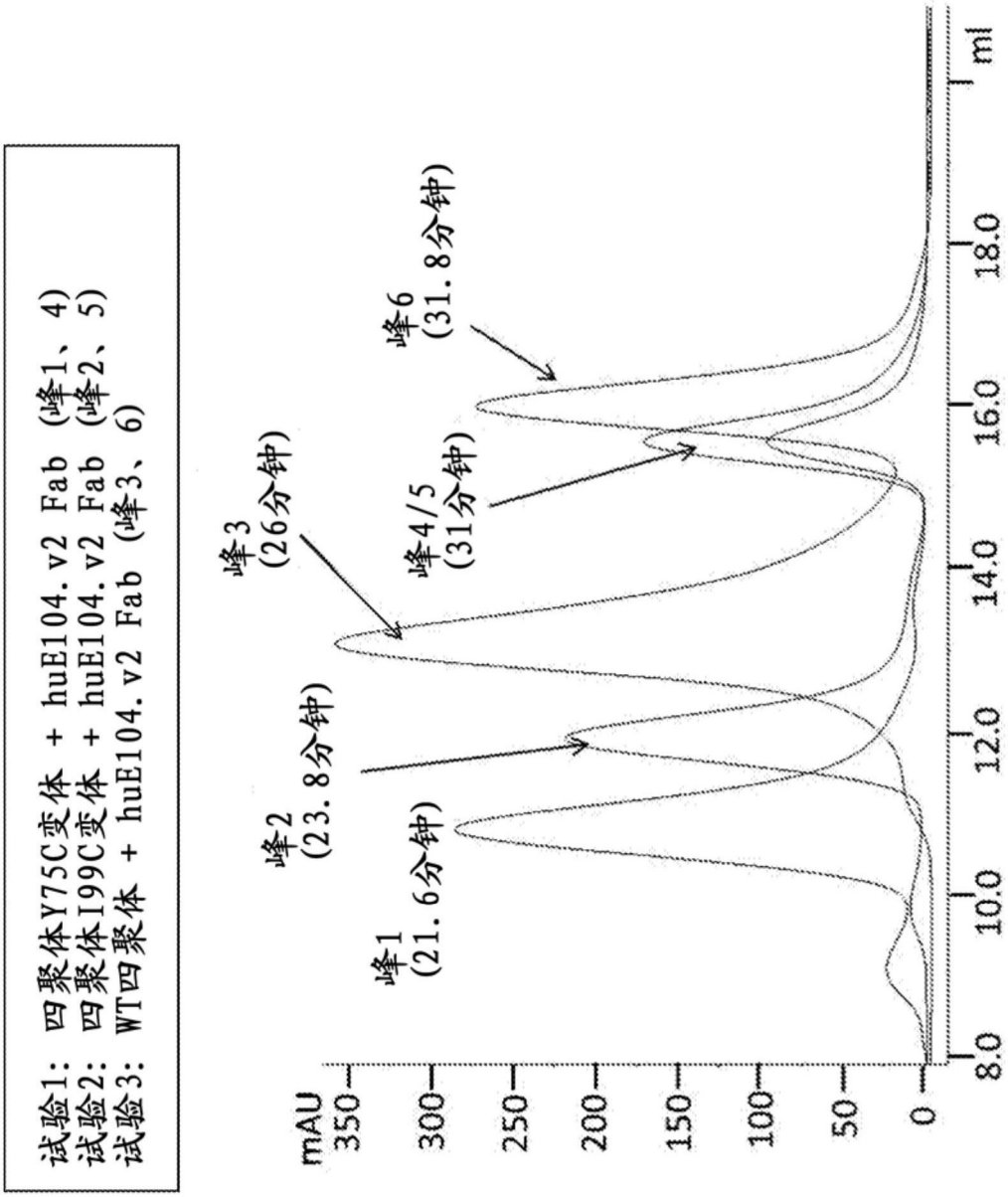

试验1: 四聚体Y75C变体 + huE104.v2 Fab (峰1、4)
试验2: 四聚体I99C变体 + huE104.v2 Fab (峰2、5)
试验3: WT四聚体 + huE104.v2 Fab (峰3、6)
mAU
350
300
250
200
150
100
50
0
峰1
(21.6分钟)
峰2
(23.8分钟)
峰3
(26分钟)
峰4/5
(31分钟)
峰6
(31.8分钟)
8.0
10.0
12.0
14.0
16.0
18.0
ml

图6C

结构：chymo-编号	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	a	b	38	39	40
基因顺序编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57
成熟的人类胰蛋白酶β1 [a] 氨基酸序列	I	V	G	G	Q	E	A	P	R	S	K	W	P	W	Q	V	S	L	R	V	H	G	P	Y	W	M	H

结构：chymo-编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	a	b	c	d	e
基因顺序编号	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
成熟的人类胰蛋白酶β1 氨基酸序列	F	C	G	G	S	L	I	H	P	Q	W	V	L	T	A	A	H	C	V	G	P	D	V	K	D

结构：chymo-编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
基因顺序编号	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109
成熟的人类胰蛋白酶β1 氨基酸序列	L	A	A	L	R	V	Q	L	R	E	Q	H	L	Y	Y	Q	D	Q	L	L	P	V	S	R	I	I	V

结构：chymo-编号	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114
基因顺序编号	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133
成熟的人类胰蛋白酶β1 氨基酸序列	V	H	P	Q	F	Y	T	A	Q	I	G	A	D	I	A	L	L	E	L	E	E	P	V	N	V

结构：chymo-编号	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	138
基因顺序编号	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158
成熟的人类胰蛋白酶β1 氨基酸序列	S	S	H	V	H	T	V	T	L	P	P	A	S	E	T	F	P	P	G	M	P	C	W	V	T

图7

结构：chymo-编号	140	141	142	143	144	145	146	147	149	150	151	152	a	b	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164
基因顺序编号	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184
成熟的人类胰蛋白酶β1 氨基酸序列	G	W	G	D	V	D	N	D	E	R	L	P	P	P	F	P	L	K	Q	V	K	V	P	I	M	E

结构：chymo-编号	165	166	167	168	169	170	171	172	173	a	b	c	d	e	f	g	h	i	174	175	176	177	178	179	180	181
基因顺序编号	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
成熟的人类胰蛋白酶β1 氨基酸序列	N	H	I	C	D	A	K	Y	H	L	G	A	Y	T	G	D	D	V	R	I	V	R	D	D	M	L

结构：chymo-编号	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206
基因顺序编号	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235
成熟的人类胰蛋白酶β1 氨基酸序列	C	A	G	N	T	R	R	D	S	C	Q	G	D	S	G	G	P	L	V	C	K	V	N	G	T

结构：chymo-编号	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	219	220	221a	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231
基因顺序编号	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
成熟的人类胰蛋白酶β1 氨基酸序列	W	L	Q	A	G	V	V	S	W	G	E	G	C	A	Q	P	N	R	P	G	I	Y	T	R	V

结构：chymo-编号	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246
基因顺序编号	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275
成熟的人类胰蛋白酶β1 氨基酸序列	T	Y	Y	L	D	W	I	H	H	Y	V	P	K	K	P

SEQ. ID NO.:97

图7续

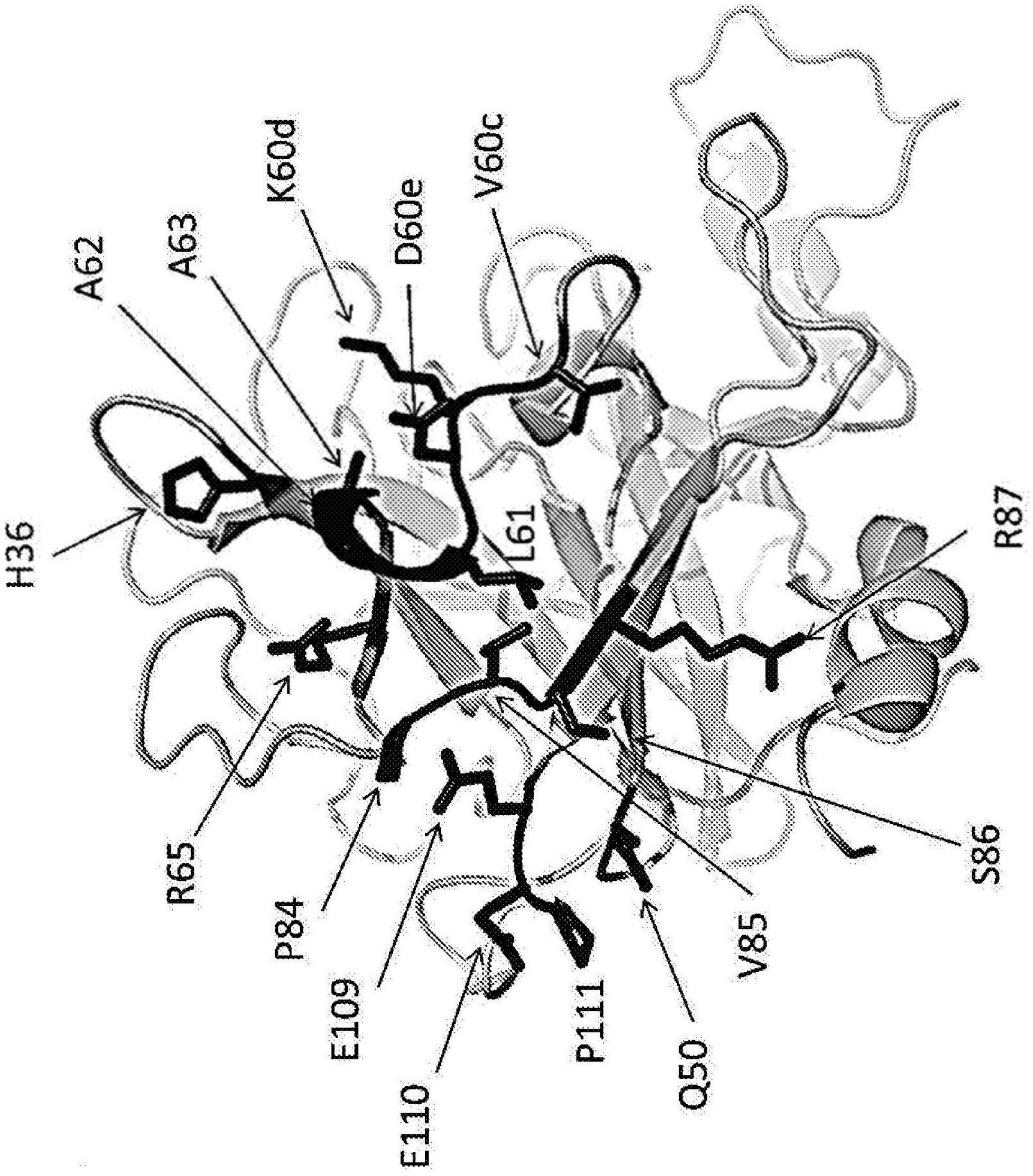

H36
A62
A63
K60d
D60e
V60c
L61
R65
P84
E109
E110
P111
Q50
V85
S86
R87

图8

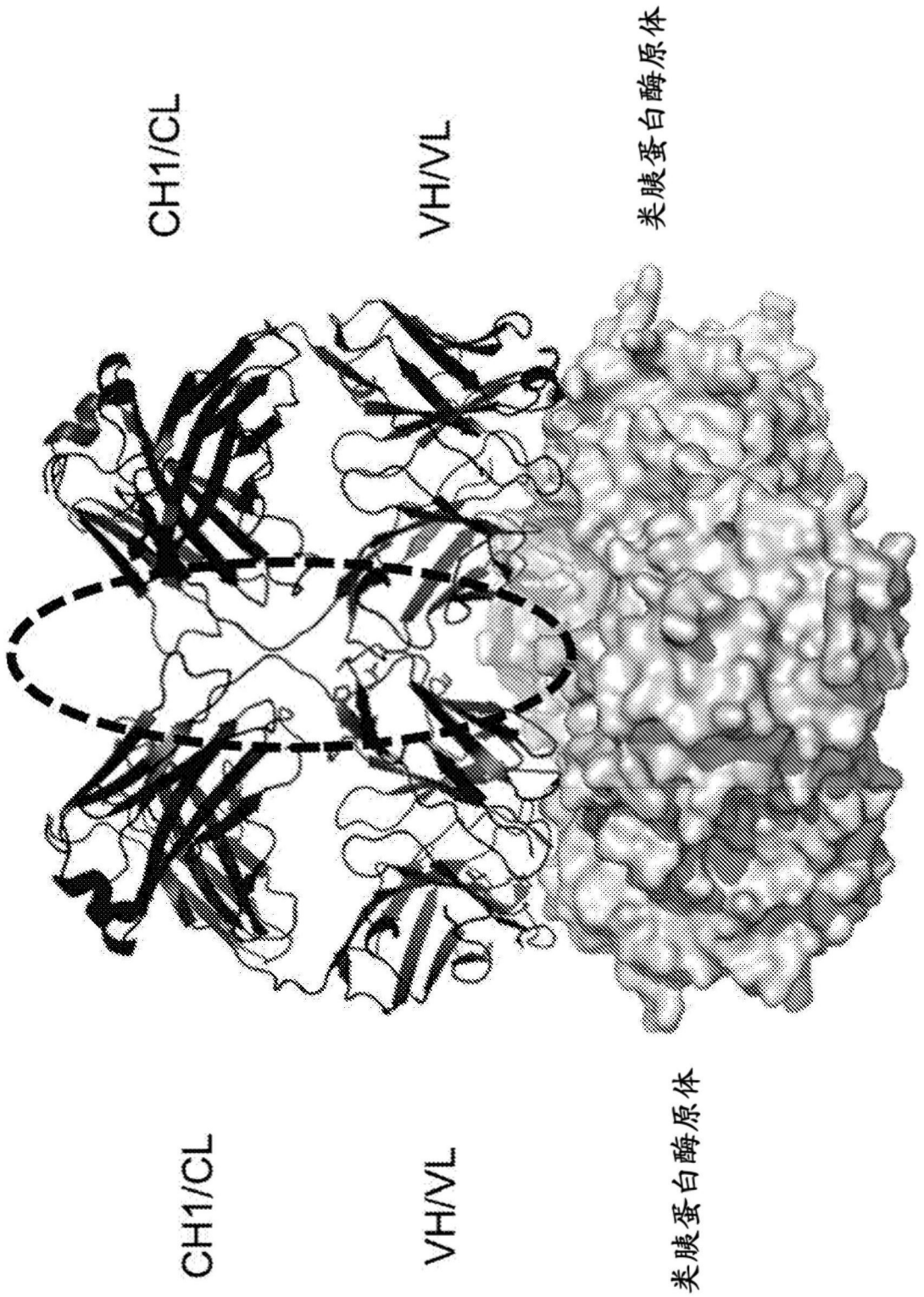


图9

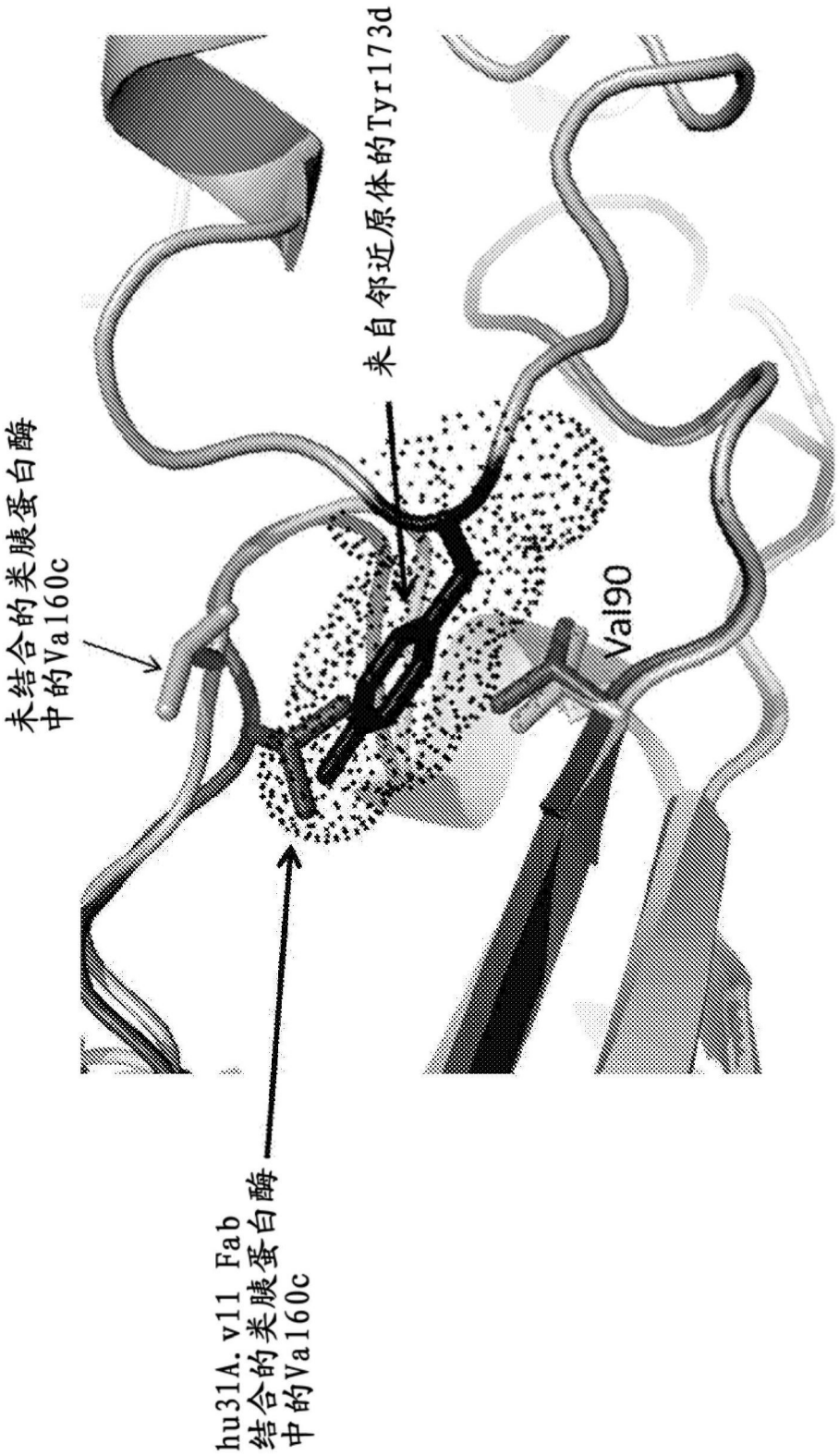

未结合的类胰蛋白酶
中的Va160c
来自邻近原体的Tyr173d
Val90
hu31A.v11 Fab
结合的类胰蛋白酶
中的Va160c

图10

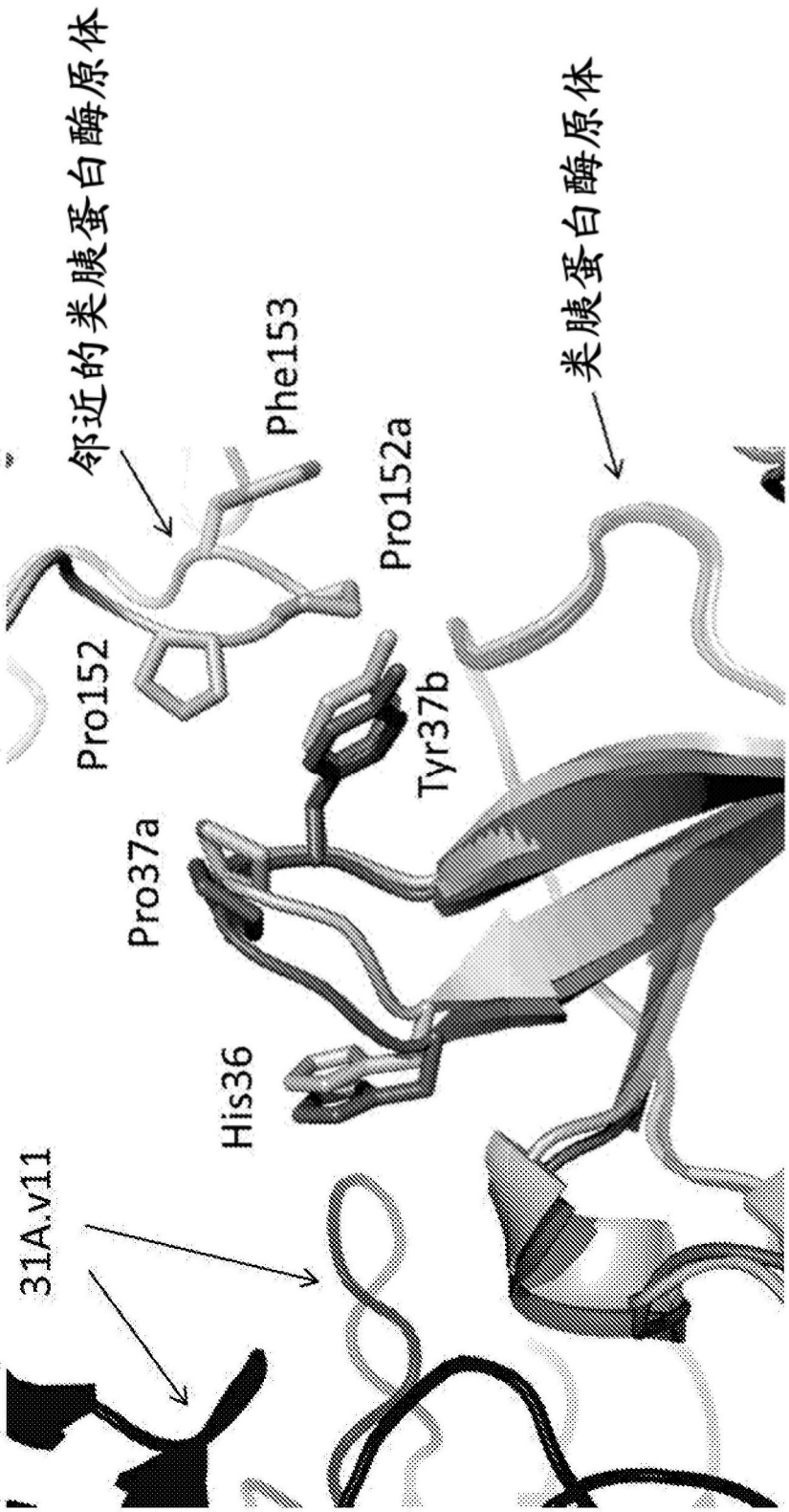
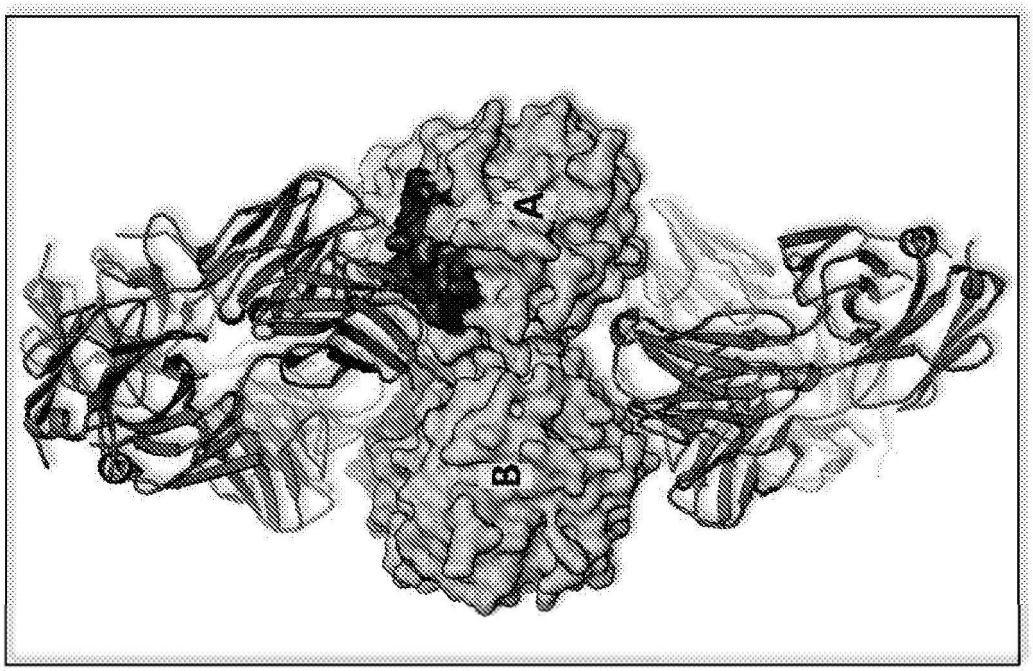
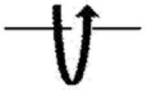

31A.v11
邻近的类胰蛋白酶原体
Pro152
Pro37a
His36
Phe153
Pro152a
Tyr37b
类胰蛋白酶原体

图11





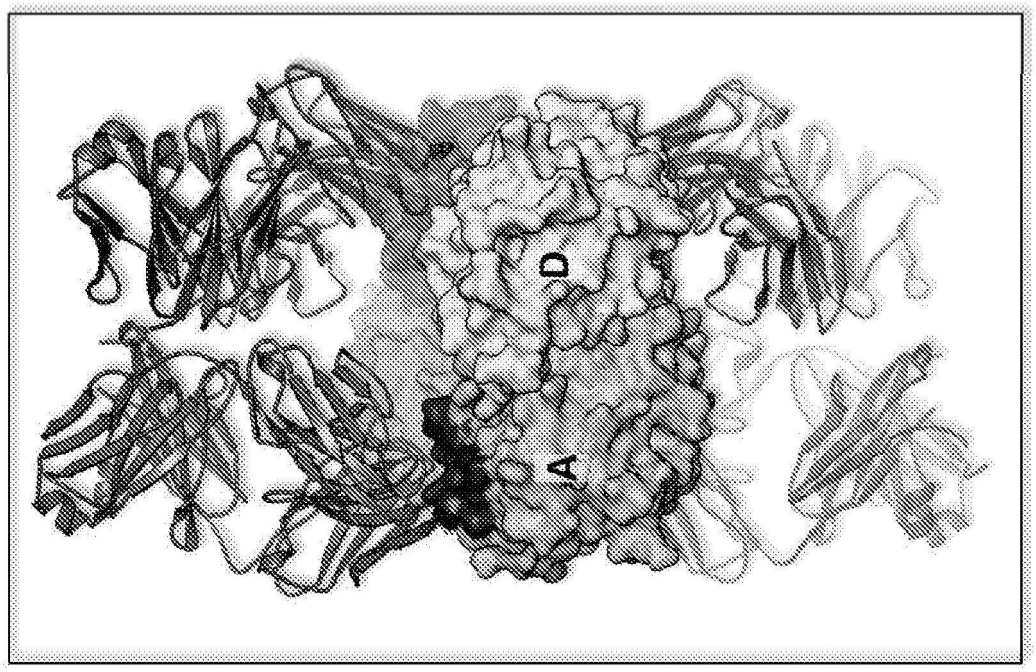


图12A

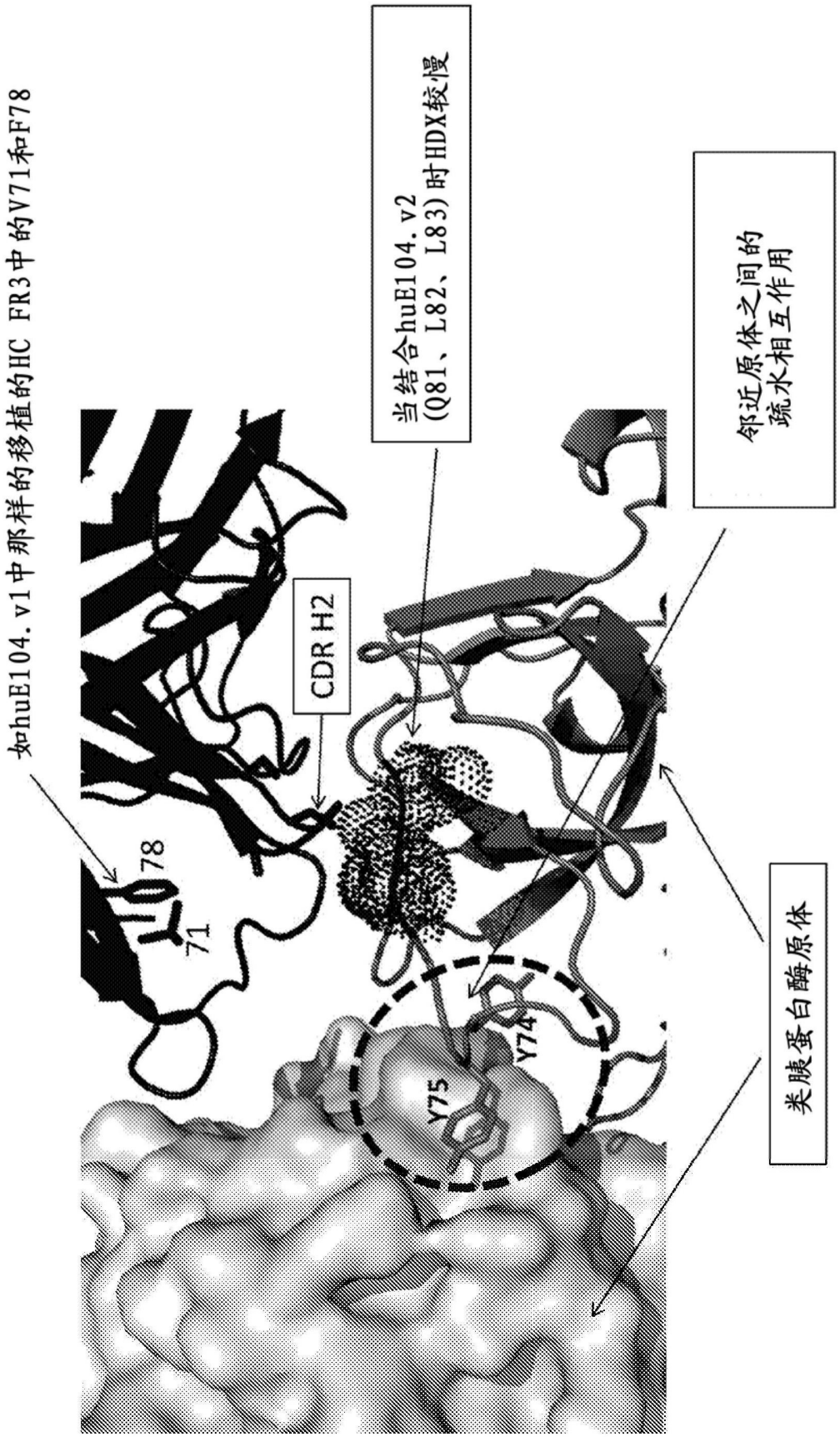

如huE104.v1中那样的移植的HC FR3中的V71和F78
当结合huE104.v2
(Q81、L82、L83)时HDX较慢
邻近原体之间的
疏水相互作用
CDR H2
78
71
Y74
Y75
类胰蛋白酶原体

图12B

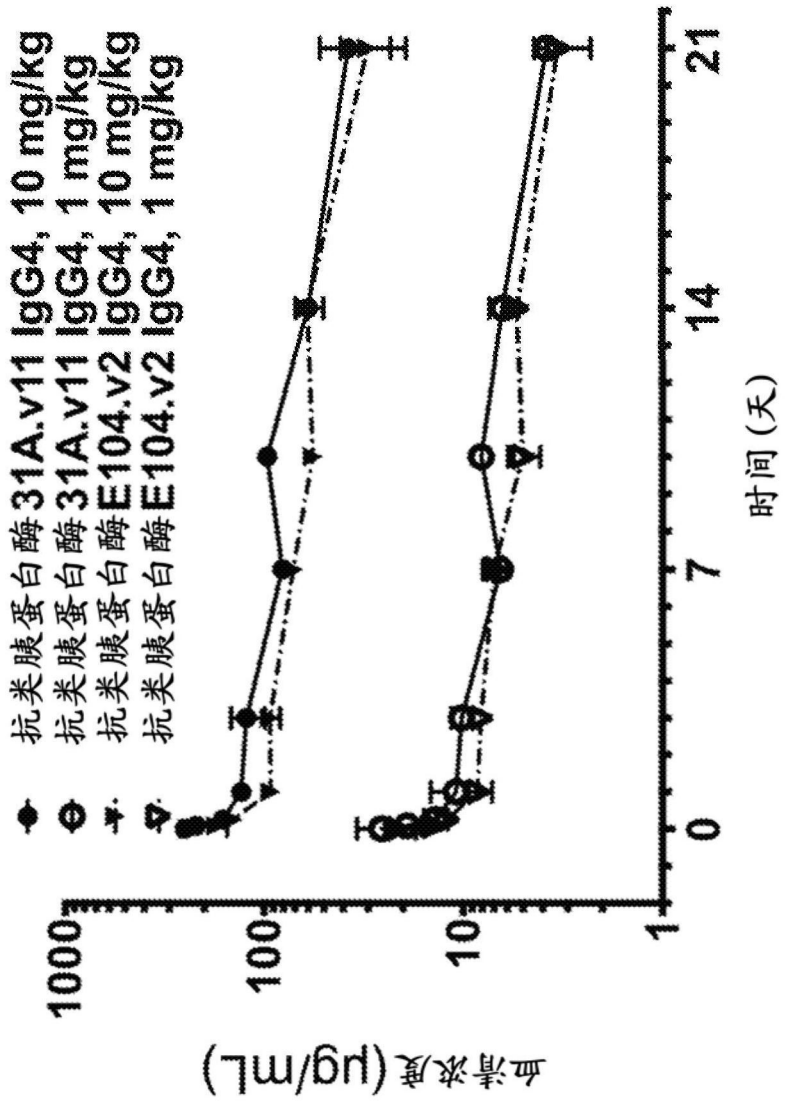

抗类胰蛋白酶31A.v11 IgG4, 10 mg/kg
抗类胰蛋白酶31A.v11 IgG4, 1 mg/kg
抗类胰蛋白酶E104.v2 IgG4, 10 mg/kg
抗类胰蛋白酶E104.v2 IgG4, 1 mg/kg
血清浓度(μg/mL)
1000
100
10
1
0
7
14
21
时间(天)

图13

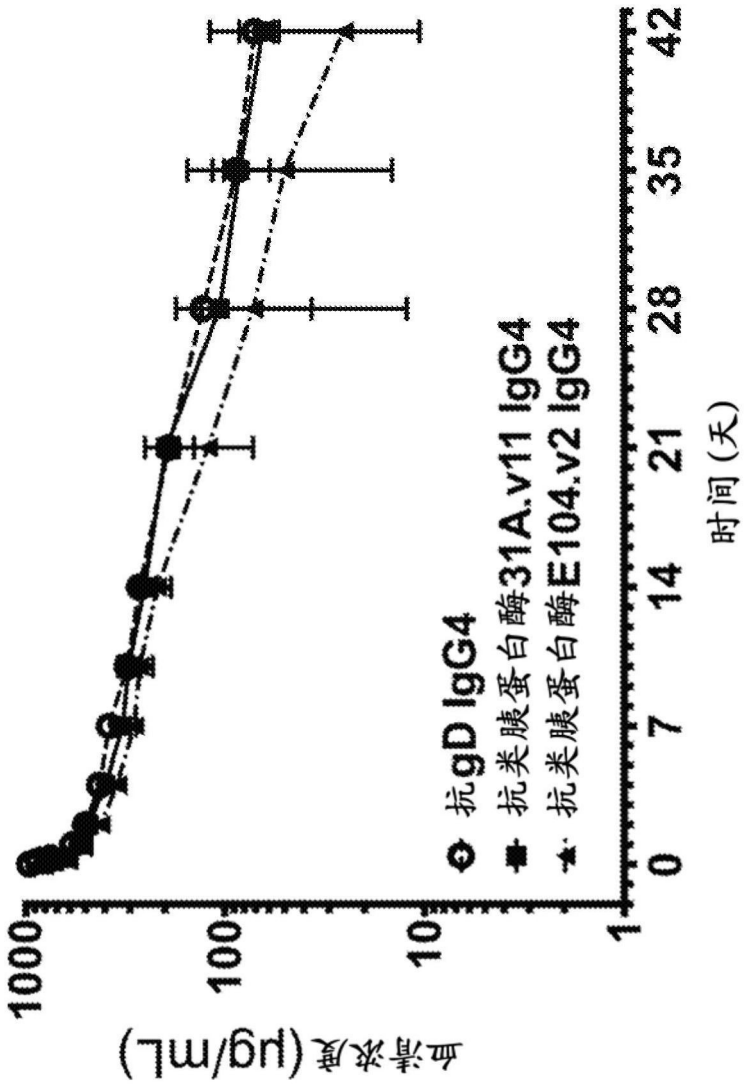

血清浓度(μg/mL)
1000
100
10
1
0
7
14
21
28
35
42
时间(天)
抗gD IgG4
抗类胰蛋白酶31A.v11 IgG4
抗类胰蛋白酶E104.v2 IgG4

图14

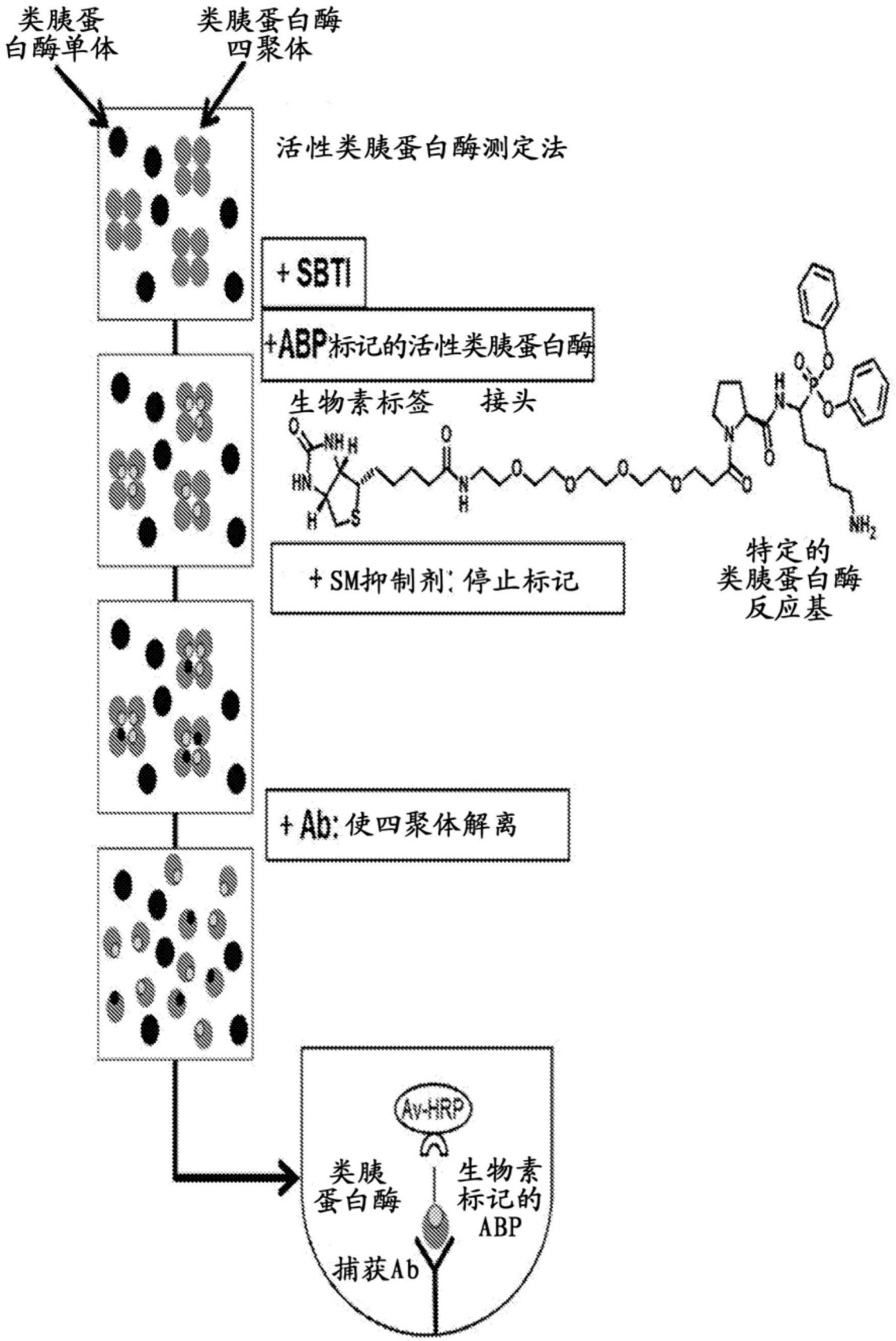

类胰蛋白酶单体
类胰蛋白酶四聚体
活性类胰蛋白酶测定法
+SBTI
+ABP标记的活性类胰蛋白酶
生物素标签
接头
+SM抑制剂：停止标记
特定的类胰蛋白酶反应基
+Ab：使四聚体解离
Av-HRP
类胰蛋白酶
生物素标记的ABP
捕获Ab

图15

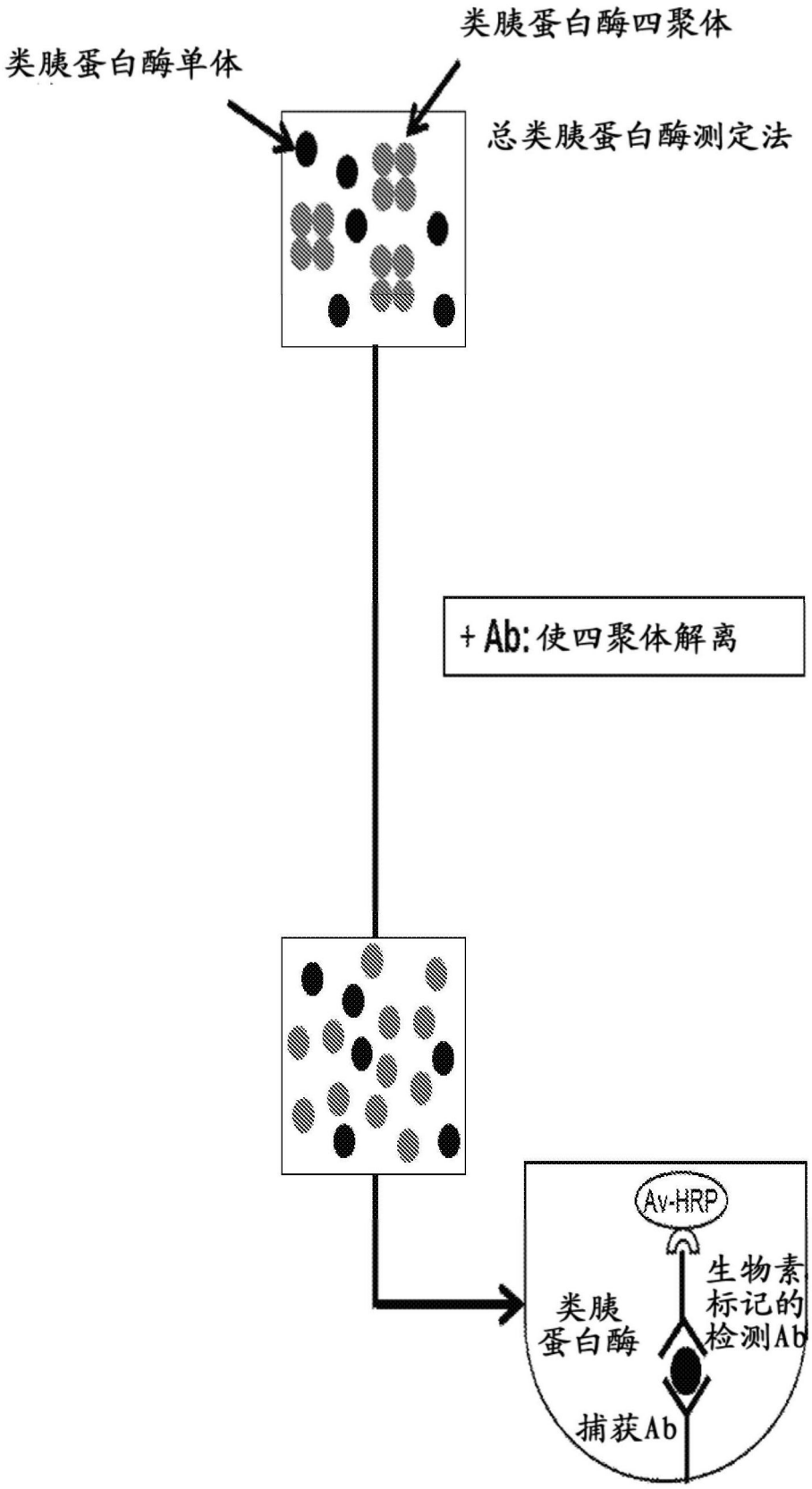

类胰蛋白酶四聚体
类胰蛋白酶单体
总类胰蛋白酶测定法
+Ab:使四聚体解离
Av-HRP
生物素
标记的
检测Ab
类胰
蛋白酶
捕获Ab

图15续

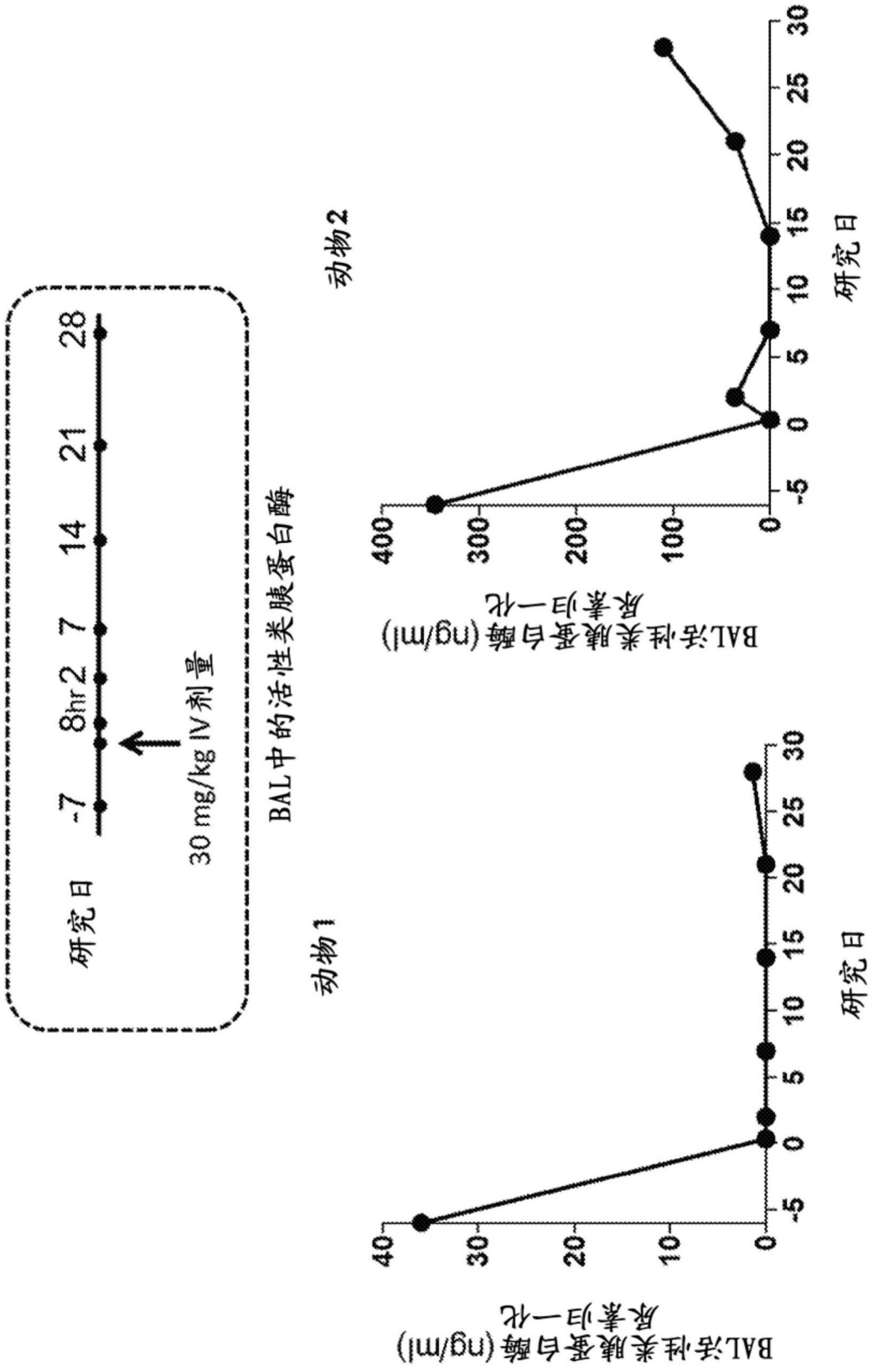

研究日
-7
8hr
2
7
14
21
28
30 mg/kg IV剂量
BAL中的活性类胰蛋白酶
动物1
BAL活性类胰蛋白酶(ng/ml)
尿素归一化
40
30
20
10
0
-5
0
5
10
15
20
25
30
研究日
动物2
BAL活性类胰蛋白酶(ng/ml)
尿素归一化
400
300
200
100
0
-5
0
5
10
15
20
25
30
研究日

图16

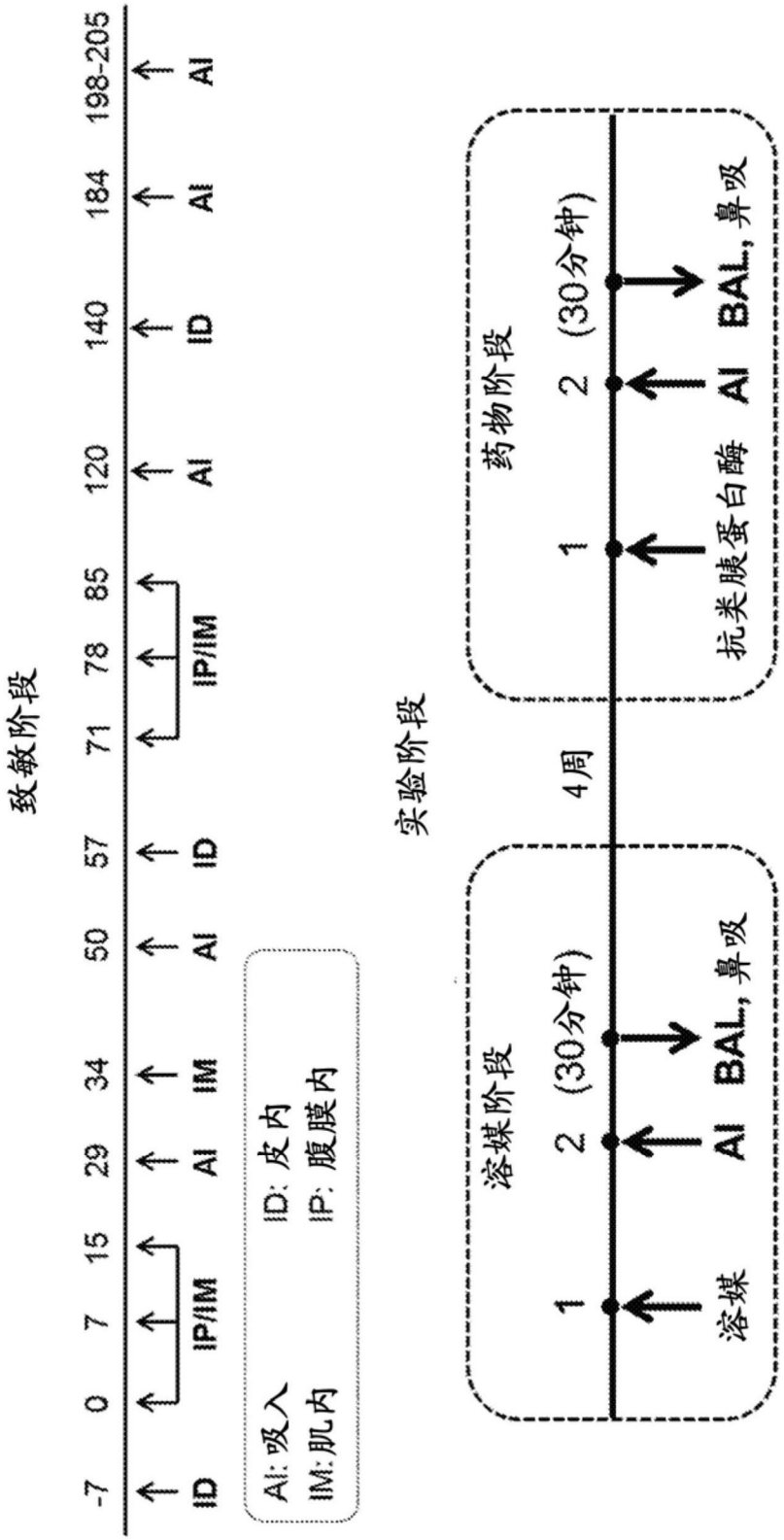

致敏阶段
-7
0
7
15
29
34
50
57
71
78
85
120
140
184
198-205
ID
IP/IM
AI
IM
AI
ID
IP/IM
AI
ID
AI
AI: 吸入
IM: 肌内
ID: 皮内
IP: 腹膜内
实验阶段
溶媒阶段
1
2 (30分钟)
溶媒
AI
BAL, 鼻吸
4周
药物阶段
1
2 (30分钟)
抗类胰蛋白酶
AI
BAL, 鼻吸

图17

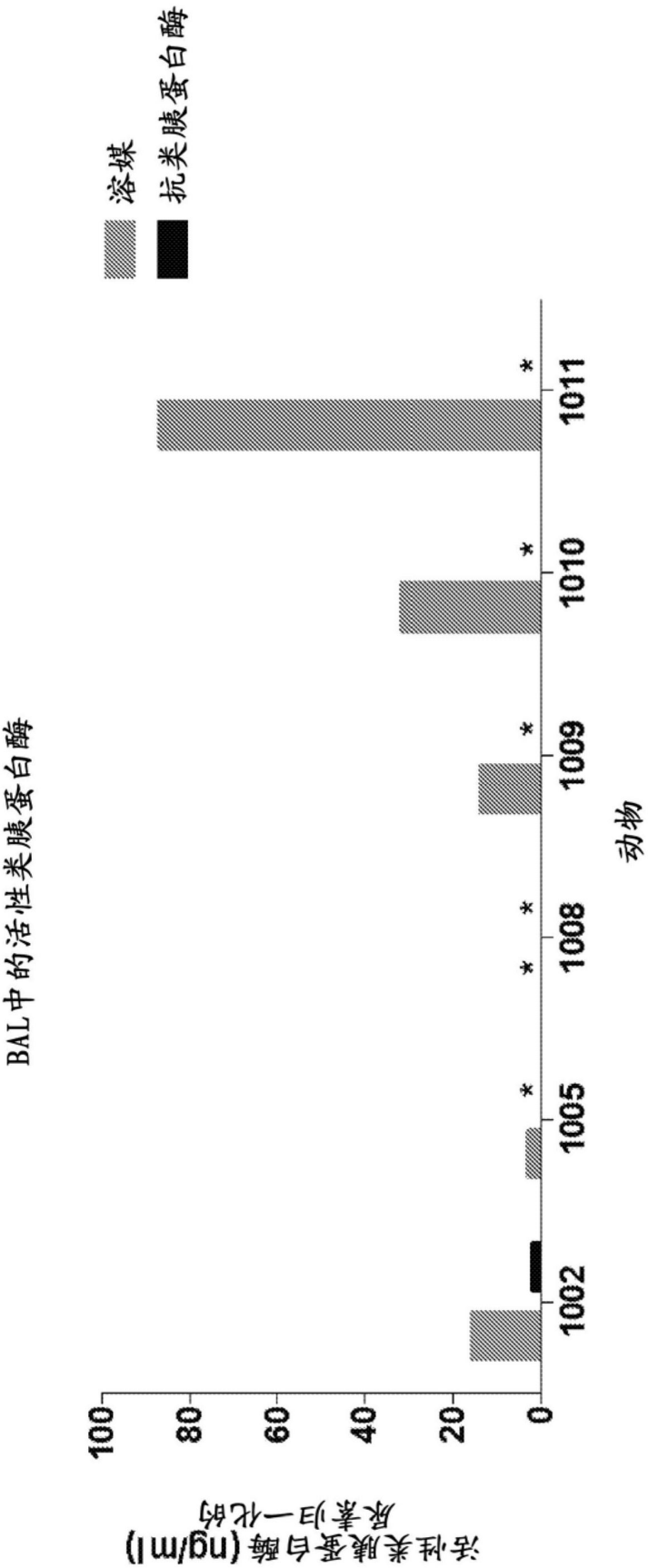

BAL中的活性类胰蛋白酶
溶媒
抗类胰蛋白酶
活性类胰蛋白酶 (ng/ml)
尿素归一化的
100
80
60
40
20
0
1002
1005
1008
1009
1010
1011
*
动物

图18A

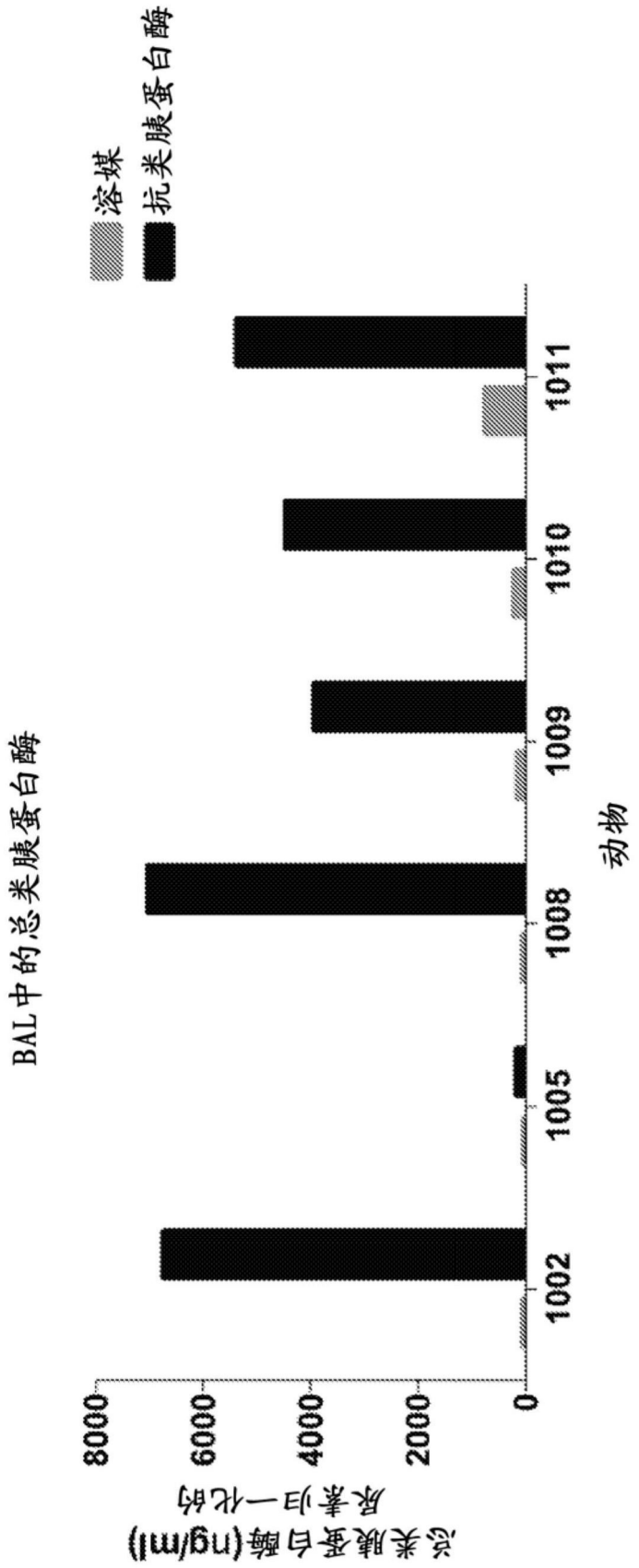

BAL中的总类胰蛋白酶
溶媒
抗类胰蛋白酶
总类胰蛋白酶(ng/ml)
尿素归一化的
8000
6000
4000
2000
0
1002
1005
1008
1009
1010
1011
动物

图18B

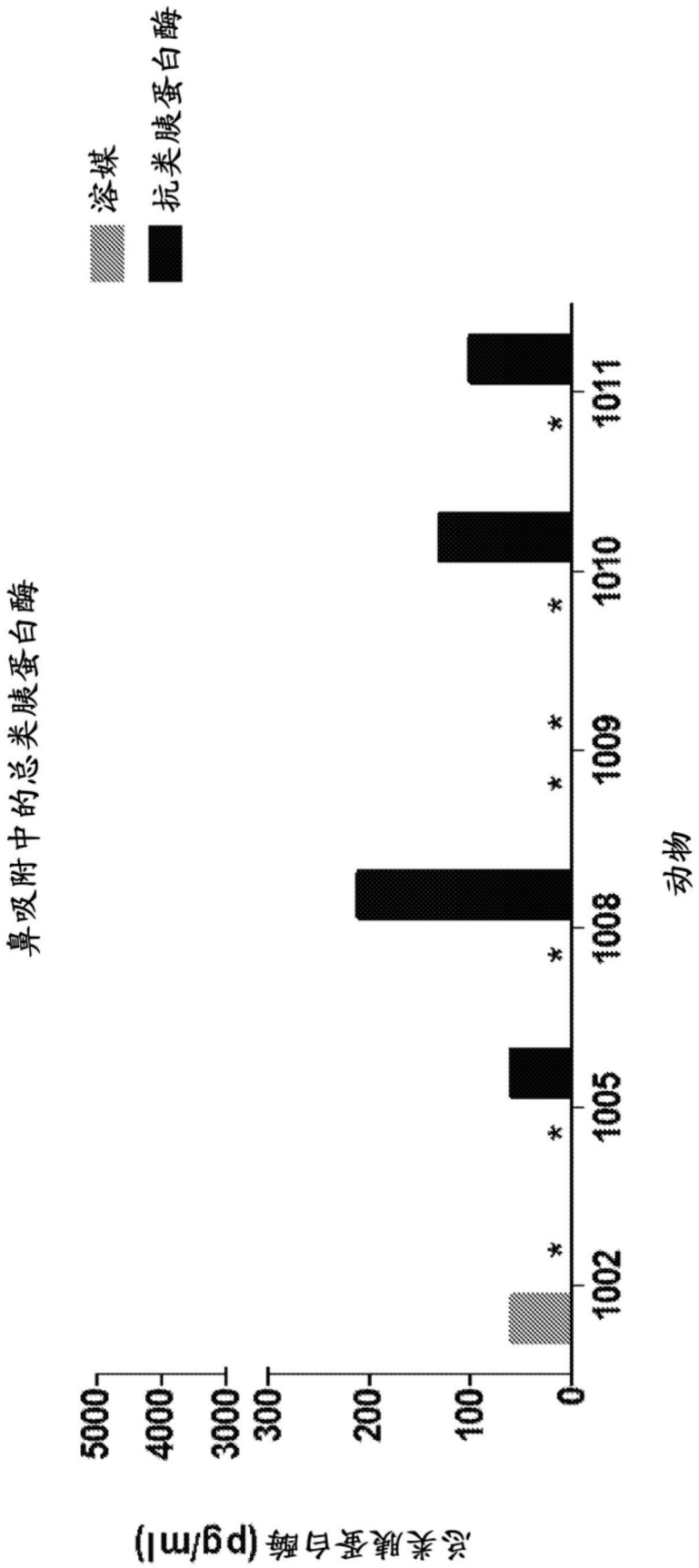

溶媒
抗类胰蛋白酶
鼻吸附中的总类胰蛋白酶
总类胰蛋白酶 (pg/ml)
5000
4000
3000
300
200
100
0
1002
1005
1008
1009
1010
1011
动物

图18C

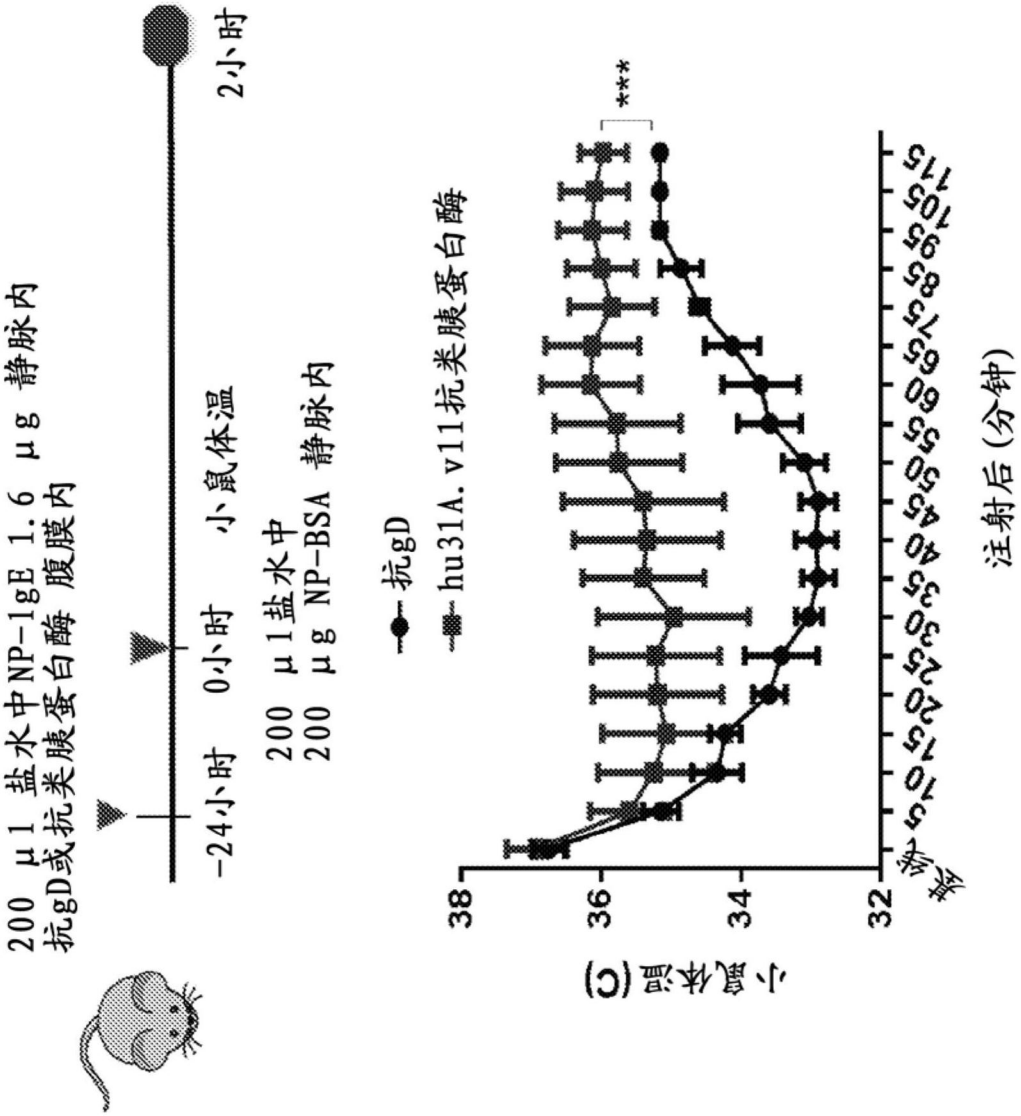

200 μl 盐水中NP-1gE 1.6 μg 静脉内
抗gD或抗类胰蛋白酶 腹膜内
-24小时
0小时
小鼠体温
2小时
200 μl盐水中
200 μg NP-BSA 静脉内
抗gD
hu31A.v11抗类胰蛋白酶
***
小鼠体温(C)
38
36
34
32
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
105
115
注射后(分钟)

图19