



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105051063 B

(45)授权公告日 2019.08.16

(21)申请号 201480014548.X

(22)申请日 2014.03.12

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105051063 A

(43)申请公布日 2015.11.11

(30)优先权数据

61/778,687 2013.03.13 US

61/819,018 2013.05.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.09.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/023930 2014.03.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/164959 EN 2014.10.09

(73)专利权人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约州

(72)发明人 A·J·墨菲 N·J·帕帕多普洛斯

J·M·奥兰格

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 史文静 黄革生

(51)Int.Cl.

C07K 16/24(2006.01)

(56)对比文件

CN 1917902 A, 2007.02.21, 说明书第3页第4段, 第4页第4段, 第11页第4段, 第14页第2段-第16页第3段, 第17页第1-4段, 第21页第1-4段, 第28页第4段, 第35页第4段.

CN 1917902 A, 2007.02.21, 说明书第3页第4段, 第4页第4段, 第11页第4段, 第14页第2段-第16页第3段, 第17页第1-4段, 第21页第1-4段, 第28页第4段, 第35页第4段.

Mingcai Li et al.. "IL-33 blockade suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice".《Journal of Neuroimmunology》.2012, 第247卷(第1-2期), 摘要, 第25页右栏第1-2段.

审查员 刘婷

权利要求书2页 说明书38页

序列表44页 附图2页

(54)发明名称

抗-IL-33抗体及其用途

(57)摘要

本发明提供与白介素-33(IL-33)结合的抗体和其使用方法。本发明包括抑制或减弱IL-33介导的信号传递的抗体。本发明的抗体可进行阻断IL-33与ST2之间的相互作用。另外,本发明的某些抗体在不阻断IL-33/ST2相互作用下,抑制或减弱IL-33介导的信号传递。根据本发明的特定实施方案,所述抗体为以高亲和力与人IL-33结合的全人抗体。本发明的抗体可用于治疗与IL-33信号传递和/或IL-33细胞表达有关的疾病和病症,例如炎症性疾病或过敏性疾病。

1. 一种结合人白介素33 (IL-33) 的分离的人单克隆抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段抑制或减弱IL-33-介导的信号传递, 并且包含选自由下列组成的组的重链可变区/轻链可变区 (HCVR/LCVR) 氨基酸序列对的重链和轻链互补决定区 (CDR): SEQ ID NO: 2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154、162/170、178/186、194/202、210/218、226/234、242/250、258/266、274/282、290/298和308/316。

2. 如权利要求1所述的分离的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段阻断IL-33和ST2的相互作用。

3. 如权利要求1所述的分离的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段包含分别选自由下列组成的组的HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域: SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16; 20-22-24-28-30-32; 36-38-40-44-46-48; 52-54-56-60-62-64; 68-70-72-76-78-80; 84-86-88-92-94-96; 100-102-104-108-110-112; 116-118-120-124-126-128; 132-134-136-140-142-144; 148-150-152-156-158-160; 164-166-168-172-174-176; 180-182-184-188-190-192; 196-198-200-204-206-208; 212-214-216-220-222-224; 228-230-232-236-238-240; 244-246-248-252-254-256; 260-262-264-268-270-272; 276-278-280-284-286-288; 292-294-296-300-302-304; 和310-312-314-318-320-322。

4. 如权利要求1所述的分离的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段包含选自由下列组成的组的HCVR/LCVR氨基酸序列对: SEQ ID NO: 2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154、162/170、178/186、194/202、210/218、226/234、242/250、258/266、274/282、290/298和308/316。

5. 如权利要求1所述的分离的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO: 274的氨基酸序列的HCVR的CDR, 和含有SEQ ID NO: 282的氨基酸序列的轻链可变区的CDR。

6. 如权利要求5所述的分离的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段包含HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域, 其分别包含SEQ ID NO: 276-278-280-284-286-288的氨基酸序列。

7. 如权利要求6所述的分离的抗体或抗原结合片段, 其中所述抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO: 274的氨基酸序列的HCVR, 和含有SEQ ID NO: 282的氨基酸序列的LCVR。

8. 如权利要求7所述的分离的抗体或抗原结合片段, 其为IgG1抗体。

9. 如权利要求7所述的分离的抗体或抗原结合片段, 其为IgG4抗体。

10. 如权利要求1至4所述的分离的抗体或抗原结合片段, 其为IgG1或IgG4抗体。

11. 一种分离的核酸分子, 其编码如权利要求1至10中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

12. 一种表达载体, 其包含如权利要求11所述的核酸分子。

13. 一种宿主细胞, 其包含如权利要求12所述的表达载体。

14. 一种药物组合物, 其包含如权利要求5至9中任一项所述的抗体或抗原结合片段, 以及药学上可接受的载体或稀释剂。

15. 根据权利要求5至9之任一项所述的特异性结合IL-33的抗体或抗原结合片段或权利要求14所述的药物组合物在制备药物中的用途, 所述药物用于在有需要的患者中治疗炎性疾病或病症或与所述炎性疾病或病症相关联的至少一种症状, 其中所述炎性疾病或病症

是IL-33介导的炎性疾病或病症,其选自

由下列组成的组:哮喘、异位性皮炎、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、炎性肠病、多发性硬化症、关节炎、过敏性鼻炎、嗜酸细胞性食道炎和牛皮癣。

16.如权利要求15所述的用途,其中所述炎性疾病或病症为哮喘。

17.如权利要求16所述的用途,其中所述哮喘为嗜酸细胞性哮喘或非嗜酸细胞性哮喘。

18.如权利要求16或17所述的用途,其中所述哮喘为类固醇抗性或类固醇敏感性哮喘。

19.如权利要求16的用途,其中所述哮喘包括哮喘恶化。

20.如权利要求15所述的用途,其中所述炎性疾病或病症为异位性皮炎。

21.如权利要求15所述的用途,其中所述炎性疾病或病症为慢性阻塞性肺疾病(COPD)。

22.如权利要求21所述的用途,其中所述慢性阻塞性肺疾病由吸烟所致或部分地由吸烟所造成。

23.根据权利要求5至9中任一项所述的特异性地与IL-33结合的抗体或其抗原结合片段或权利要求14所述的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗对过敏原显现敏感性的患者。

24.如权利要求15所述的用途,其中所述抗体、抗原结合片段或药物组合物与第二治疗剂组合使用,所述第二治疗剂可用于减轻所述炎性疾病或病症或与所述炎性疾病或病症相关联的至少一种症状。

25.如权利要求24所述的用途,其中所述第二治疗剂选自由下列组成的组:非类固醇消炎药(NSAID)、皮质类固醇、支气管扩张剂、抗组织胺、肾上腺素、去充血剂、胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)拮抗剂、IL-13拮抗剂、IL-4拮抗剂、IL-4/IL-13双拮抗剂、IL-5拮抗剂、IL-6拮抗剂、IL-12/23双拮抗剂、IL-22拮抗剂、IL-25拮抗剂、IL-17拮抗剂、IL-31拮抗剂、口服PDE4抑制剂和另一IL-33拮抗剂或IL-33的不同抗体。

抗-IL-33抗体及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及对人IL-33具特异性的抗体、其抗原结合片段及其使用方法。

[0002] 背景

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

[0004] 发明概述

[0005] 本发明提供结合人白介素-33(“IL-33”)的抗体。本发明的抗体可尤其用于抑制IL-33-介导的信号传递,并且用于治疗由IL-33活性和/或信号传递所造成或与其相关的疾病和病症。

[0006] 本发明的抗体可为全长(例如, IgG1或IgG4抗体)或可仅包含抗原结合蛋白(例如 Fab、F(ab')₂或scFv片段),并且可被修饰以影响功能性,例如消除残余效应子功能(Reddy 等人, 2000, J. Immunol. 164: 1925-1933)。

[0007] 在一个实施方案中,特异性地与人白介素-33结合的抗体为分离的全人单克隆抗体。

[0008] 在一个实施方案中,特异性地与人白介素-33结合的抗体或其抗原结合片段抑制或减弱IL-33-介导的信号传递。

[0009] 在一个实施方案中,特异性地与人白介素-33结合的抗体或其抗原结合片段阻断IL-33和ST2的相互作用。

[0010] 在一个实施方案中,如以体外受体/配体结合测定在25℃下所测量,特异性地与人白介素-33结合的抗体或其抗原结合片段以低于约 10nM的IC₅₀值阻断IL-33和ST2的相互作用,或阻断大于约50%的IL-33和ST2的相互作用。

[0011] 在一个实施方案中,特异性地与人白介素-33结合的抗体或其抗原结合片段不阻断,或仅部分阻断IL-33和ST2的相互作用。

[0012] 在一个实施方案中,如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,特异性地与人白介素-33结合的抗体或其抗原结合片段以低于约 1nM的结合解离平衡常数(K_D)结合人IL-33。

[0013] 在一个实施方案中,如以表面等离子体共振测定在37℃下所测量,特异性地与人白介素-33结合的抗体或其抗原结合片段以大于约 8分钟的解离半衰期(t_{1/2})结合人IL-33。

[0014] 在一个实施方案中,特异性地与人白介素-33结合的抗体或其抗原结合片段抑制

IL-33-介导的人嗜碱性粒细胞的脱粒作用。

[0015] 在一个实施方案中,如以体外嗜碱性粒细胞激活试验(BAT)所测量,特异性地与人白介素-33结合的抗体或其抗原结合片段以低于约600pM的IC₅₀值抑制IL-33-介导的人嗜碱性粒细胞的脱粒作用。

[0016] 在一个实施方案中,特异性地与人白介素-33结合的抗体或其抗原结合片段抑制IL-33-介导的IFN- γ 从人PBMC的产生。

[0017] 在一个实施方案中,如以体外PBMC IFN- γ 产生测定所测量,特异性地与人白介素-33结合的抗体或其抗原结合片段以低于约25nM的IC₅₀抑制IL-33-介导的IFN- γ 从人PBMC的产生。

[0018] 在一个实施方案中,如以体外PBMC IFN- γ 产生测定所测量,特异性地与人白介素-33结合的抗体或其抗原结合片段以低于约3nM的IC₅₀抑制IL-33-介导的IFN- γ 从人PBMC的产生。

[0019] 在一个实施方案中,如以体外PBMC IFN- γ 产生测定所测量,特异性地与人白介素-33结合的抗体或其抗原结合片段以低于约0.5nM的IC₅₀抑制IL-33-介导的IFN- γ 从人PBMC的产生。

[0020] 在一个实施方案中,当施用于过敏原诱发的肺炎症的动物模型时,特异性地与人白介素-33结合的抗体或其抗原结合片段降低肺中CD4⁺T细胞、嗜酸性粒细胞和ILC2细胞的出现频率。

[0021] 在一个实施方案中,当施用于过敏原诱发的肺炎症的动物模型时,特异性地与人白介素-33结合的抗体或其抗原结合片段降低肺中IL-4和IL-5的量。

[0022] 在一个实施方案中,当施用于过敏原诱发的肺炎症的动物模型时,在与接受同种型对照抗体的过敏原激发动物相比时,特异性地与人白介素-33结合的抗体或其抗原结合片段造成IL-4的量至少4倍降低和/或IL-5的量至少5倍降低。

[0023] 本发明提供抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区(HCVR),所述重链可变区具有选自由下列组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO: 2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290和308,或它的具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的实质上类似序列。

[0024] 本发明还提供抗体或其抗原结合片段,其包含轻链可变区(LCVR)的,所述轻链可变区具有选自由下列组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298和316,或它的具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的实质上类似序列。

[0025] 本发明还提供抗体或其抗原结合片段,其包含选自由下列组成的组的HCVR和LCVR(HCVR/LCVR)序列对:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154、162/170、178/186、194/202、210/218、226/234、242/250、258/266、274/282、290/298和308/316。

[0026] 本发明还提供抗体或抗体的抗原结合片段,其包含具有选自由下列组成的组的氨基酸序列的重链CDR3(HCDR3)结构域:SEQ ID NO: 8、24、40、56、72、88、104、120、136、152、168、184、200、216、232、248、264、280、296和314,或它的具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的实质上类似序列;以及具有选自由下列组成的组的氨基

酸序列的轻链CDR3 (LCDR3) 结构域:16、32、48、64、80、96、112、128、144、160、176、192、208、224、240、256、272、288、304和322,或它的具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的实质上类似序列。

[0027] 在某些实施方案中,抗体或抗体的抗原结合部分包含选自由下列组成的组的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对:SEQ ID NO:8/16、24/32、40/48、56/64、72/80、88/96、104/112、120/128、136/144、152/160、168/176、184/192、200/208、216/224、232/240、248/256、264/272、280/288、296/304和314/322。

[0028] 本发明还提供抗体或其抗原结合片段,其还包含具有选自由下列组成的组的氨基酸序列的重链CDR1 (HCDR1) 结构域:SEQ ID NO:4、20、36、52、68、84、100、116、132、148、164、180、196、212、228、244、260、276、292和310,或它的具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的实质上类似序列;具有选自由下列组成的组的氨基酸序列的重链CDR2 (HCDR2) 结构域:SEQ ID NO:6、22、38、54、70、86、102、118、134、150、166、182、198、214、230、246、262、278、294和312,或它的具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的实质上类似序列;具有选自由下列组成的组的氨基酸序列的轻链CDR1 (LCDR1) 结构域:SEQ ID NO:12、28、44、60、76、92、108、124、140、156、172、188、204、220、236、252、268、284、300和318,或它的具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的实质上类似序列;以及具有选自由下列组成的组的氨基酸序列的轻链CDR2 (LCDR2) 结构域:SEQ ID NO:14、30、46、62、78、94、110、126、142、158、174、190、206、222、238、254、270、286、302和320,或它的具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的实质上类似序列。

[0029] 本发明的某些非限制性示例性抗体和其抗原结合片段包含HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3结构域,其分别具有选自由下列组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4-6-8-12-14-16 (例如H1M9559N);20-22-24-28-30-32 (例如H1M9566N);36-38-40-44-46-48 (例如H1M9568N);52-54-56-60-62-64 (例如H4H9629P);68-70-72-76-78-80 (例如H4H9633P);84-86-88-92-94-96 (例如H4H9640P);100-102-104-108-110-112 (例如H4H9659P);116-118-120-124-126-128 (例如H4H9660P);132-134-136-140-142-144 (例如H4H9662P);148-150-152-156-158-160 (例如H4H9663P);164-166-168-172-174-176 (例如H4H9664P);180-182-184-188-190-192 (例如H4H9665P);196-198-200-202-204-206-208 (例如H4H9666P);212-214-216-220-222-224 (例如H4H9667P);228-230-232-236-238-240 (例如H4H9670P);244-246-248-252-254-256 (例如H4H9671P);260-262-264-268-270-272 (例如H4H9672P);276-278-280-284-286-288 (例如H4H9675P);292-294-296-300-302-304 (例如H4H9676P);以及310-312-314-318-320-322 (H1M9565N)。

[0030] 在相关的实施方案中,本发明包括特异性地与IL-33结合的抗体或抗体的抗原结合片段,其中抗体或片段包含重链和轻链CDR结构域,所述结构域含在选自由下列组成的组的重链和轻链可变区 (HCVR/LCVR) 序列内:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154、162/170、178/186、194/202、210/218、226/234、242/250、258/266、274/282、290/298和308/316。用于鉴别HCVR和LCVR氨基酸序列内的CDR的方法和技术已为本领域所熟知并可用于鉴别文中所公开的特定HCVR和/或LCVR氨基酸序列内的CDR。可用于鉴别CDR边界的示例性常规方法包括例如 Kabat定义、

Chothia定义和AbM定义。一般来说,Kabat定义以序列变异性为基础,Chothia定义以结构环区的位置为基础,而AbM定义为Kabat方法与Chothia方法间的折衷方法。参见,例如Kabat,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”National Institutes of Health,Bethesda,Md. (1991);Al-Lazikani等人,J. Mol.Biol. 273:927-948 (1997);以及Martin等人,Proc.Natl.Acad. Sci.USA 86:9268-9272 (1989)。也可利用公开的数据库供辨识抗体内的CDR 序列。

[0031] 在另一方面中,本发明提供编码抗-IL-33抗体或其抗原结合片段的核酸。本发明也涵盖带有本发明的核酸的重组表达载体,和已引入了这些载体的宿主细胞,以及通过在允许产生抗体的条件下培养宿主细胞,并回收所产生的抗体来产生抗体的方法。

[0032] 在一个实施方案中,本发明提供包含HCVR的抗体或其片段,所述HCVR由选自由下列组成的组的核酸序列所编码:SEQ ID NO: 1、17、33、49、65、81、97、113、129、145、161、177、193、209、225、241、257、273、289和307,或它的具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的实质上相同序列。

[0033] 本发明还提供包含LCVR的抗体或其片段,所述LCVR由选自由下列组成的组的核酸序列所编码:SEQ ID NO:9、25、41、57、73、89、105、121、137、153、169、185、201、217、233、249、265、281、297和315,或它的具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的实质上相同序列。

[0034] 本发明还提供抗体或抗体的抗原结合片段,其包含:HCDR3结构域,所述HCDR3结构域由选自由下列组成的组的核苷酸序列所编码:SEQ ID NO:7、23、39、55、71、87、103、119、135、151、167、183、199、215、231、247、263、279、295和313,或它的具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的实质上相同序列;以及LCDR3结构域,所述LCDR3结构域由选自由下列组成的组的核苷酸序列所编码:SEQ ID NO:15、31、47、63、79、95、111、127、143、159、175、191、207、223、239、255、271、287、303和321,或它的具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的实质上相同序列。

[0035] 本发明还提供抗体或其抗原结合片段,其还包含:HCDR1结构域,所述HCDR1结构域由选自由下列组成的组的核苷酸序列所编码:SEQ ID NO:3、19、35、51、67、83、99、115、131、147、163、179、195、211、227、243、259、275、291和309,或它的具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的实质上相同序列;HCDR2结构域,所述HCDR2结构域由选自由下列组成的组的核苷酸序列所编码:SEQ ID NO:5、21、37、53、69、85、101、117、133、149、165、181、197、213、229、245、261、277、293和311,或它的具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的实质上相同序列;LCDR1结构域,所述LCDR1结构域由选自由下列组成的组的核苷酸序列所编码:SEQ ID NO:11、27、43、59、75、91、107、123、139、155、171、187、203、219、235、251、267、283、299和317,或它的具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的实质上相同序列;以及LCDR2结构域,所述LCDR2结构域由选自由下列组成的组的核苷酸序列所编码:SEQ ID NO:13、29、45、61、77、93、109、125、141、157、173、189、205、221、237、253、269、285、301和319,或它的具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的实质上相同序列。

[0036] 根据某些实施方案,抗体或其片段包含由下列核酸序列所编码的重链轻链CDR序列和轻链CDR序列:SEQ ID NO:1和9(例如H1M9559N)、17和25(例如H1M9566N)、33和41(例

如H1M9568N)、49和57(例如H4H9629P)、65和73(例如H4H9633P)、81和89(例如 H4H9640P)、97和105(例如H4H9659P)、113和121(例如H4H9660P)、129和137(例如H4H9662P)、145和153(例如H4H9663P)、161和 169(例如H4H9664P)、177和185(例如H4H9665P)、193和201(例如H4H9666P)、209和217(例如H4H9667P)、225和233(例如H4H9670P)、241和249(例如H4H9671P)、257和265(例如H4H9672P)、273和 281(例如H4H9675P)、289和297(例如H4H9676P)或307和 315(H1M9565N)。

[0037] 本发明包括具有修饰糖基化模式的抗-IL-33抗体。在一些应用中,移除不合需要的糖基化位置的修饰作用,或寡糖链上缺乏岩藻糖 部分存在的抗体可能为有用的,例如用以增加抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 功能(参见Shield等人(2002) JBC 277:26733)。在其它应用中,可进行半乳糖基化的修饰作用以改变补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0038] 在另一方面,本发明提供药物组合物,其包含特异性地结合IL-33 的重组人抗体或其片段以及药学上可接受的载体。在相关方面中,本 发明的特征为组合抗-IL-33抗体和第二治疗剂的组合物。在一个实施 方案中,第二治疗剂为有利地与抗-IL-33抗体组合的任何试剂。可有 利地与抗-IL-33抗体组合的示例性试剂包括而限于抑制IL-33活性 的其它试剂(包括其它抗体或其抗原结合片段、肽抑制剂、小分子拮 抗剂等)和/或不会直接结合IL-33但会干扰、阻断或减弱IL-33介导 的信号传递的试剂。在一个实施方案中,第二治疗剂可选自由下列组 成的组:非类固醇消炎药(NSAID)、皮质类固醇、支气管扩张剂、抗 组织胺、肾上腺素、去充血剂、胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)拮抗 剂、IL-13拮抗剂、IL-4拮抗剂、IL-4/IL-13双拮抗剂、IL-5拮抗剂、IL-6拮抗剂、IL-12/23双拮抗剂、IL-22拮抗剂、IL-25拮抗剂、IL-17 拮抗剂、IL-31拮抗剂、口服PDE4抑制剂和另一IL-33拮抗剂或IL-33的不同抗体。

[0039] 在某些实施方案中,细胞因子拮抗剂可为小分子抑制剂(合成的 或天然衍生),或与细胞因子本身相互作用的蛋白(例如抗体),或细胞 因子的受体,或包含细胞因子和其受体的复合物(例如抗IL-4或IL-6 的抗体,或IL-4或IL-6的受体的抗体)。涉及本发明抗-IL-33抗体的 另外的组合疗法和共配制剂公开本文中其它处。

[0040] 在另一方面,本发明提供使用本发明的抗-IL-33抗体或抗体的抗 原结合部分来抑制IL-33活性的治疗方法,其中所述治疗方法包括施 用治疗有效量的包含本发明抗体或抗体的抗原结合片段的药物组合 物。所治疗的病症为通过移除、抑制或降低IL-33活性或信号传递加 来改善、缓解、抑制或预防的任何疾病或症状。本发明的抗-IL-33抗 体或抗体片段可起作用来阻断IL-33和IL-33结合搭档(例如IL-33受 体组分)之间的相互作用,或另外抑制IL-33的信号传递活性。

[0041] 在一个实施方案中,本发明提供用于治疗炎性疾病或病症或与炎 性疾病或病症相关联的至少一种症状的方法,所述方法包括向有需要 的患者施用特异性地与IL-33结合的抗体或其抗原结合片段,或包含 特异性地与IL-33结合的抗体的药物组合物,其中所述炎性疾病或病 症的严重度、持续时间和/或发生频率得以减轻或减少,或与炎性疾 病或病症相关联的至少一种症状的严重度、持续时间和/或发生频率 得以减轻或减少。

[0042] 在一个实施方案中,炎性疾病或症状选自由下列组成的组:哮喘、异位性皮炎、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、炎性肠病、多发性硬化症、关节炎、过敏性鼻炎、嗜酸性细胞性食道炎和牛皮癣。

[0043] 在一个实施方案中,本发明提供用于治疗对过敏原显现敏感性的患者的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的特异性地与 IL-33结合的抗体或其抗原结合片段,或包含特异性地与IL-33结合的抗体或其抗原结合片段的药物组合物,其中所述患者在施用抗体或包含抗体的组合物后,对过敏原显现降低的敏感性,或对过敏原减少的过敏反应,或不会经历对过敏原的任何敏感或过敏(allergic)反应,或过敏性(anaphylactic)反应。

[0044] 在一个实施方案中,本发明提供用于施用有效量的第二治疗剂,所述第二治疗剂适用于减轻炎性疾病或病症或炎性疾病或病症的至少一种症状,或减少对过敏原的过敏反应。如上所述,第二治疗剂可选自由下列组成的组:非类固醇消炎药(NSAID)、皮质类固醇、支气管扩张剂、抗组织胺、肾上腺素、去充血剂、胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)拮抗剂、IL-13拮抗剂、IL-4拮抗剂、IL-5拮抗剂、IL-6拮抗剂、IL-25拮抗剂、IL-17拮抗剂及另一IL-33拮抗剂,或IL-33的不同抗体。

[0045] 在相关方面中,本发明提供本发明的抗IL-33抗体或其抗原结合片段,或包含抗体或其抗原结合片段的药物组合物,其适用于治疗患者的与IL-33活性有关或由所述IL-33活性所造成的疾病或病症。在一个实施方案中,患者的与IL-33活性有关或由所述IL-33活性所造成的疾病或病症为炎性疾病或病症,其中所述炎性疾病或病症选自由下列组成的组:哮喘、异位性皮炎、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、炎性肠病、多发性硬化症、关节炎、过敏性鼻炎、嗜酸细胞性食道炎和牛皮癣。

[0046] 本发明还包括本发明的抗-IL-33抗体或抗体的抗原结合部分用于制造药物供治疗患者的与IL-33活性有关或由所述IL-33活性所造成的疾病或病症的用途。在一个实施方案中,患者的与IL-33活性有关或由所述IL-33活性所造成的疾病或病症为炎性疾病或病症,其中所述炎性疾病或病症选自由下列组成的组:哮喘、异位性皮炎、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、炎性肠病、多发性硬化症、关节炎、过敏性鼻炎、嗜酸细胞性食道炎和牛皮癣。

[0047] 根据确认详述的论述,其它的实施方案将变得显而易见。

[0048] 附图简述

[0049] 图1. 抗-IL-33抗体间对人IL-33的交叉竞争

[0050] 图2. 抗-IL-33抗体间对重组猴IL-33的交叉竞争

[0051] 详述

[0052] 在描述本发明之前,应了解,本发明不限于所述的特定方法和实验条件,因为这些方法和条件可有所改变。也应了解,本文中所用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并且不希望为限制性的,因为本发明的范围将仅受限于所附的权利要求书。

[0053] 除非另有说明,否则文中所用的所有技术和科学术语具有如本发明所属领域的一般技术人员所正常理解相同意义。如本文中所用,术语“大约”在用于提及特定引述的数值时,指的是所述值可从所引述值变化不大于1%。例如,如本文中所用,表述“约100”包括99和101以及介于之间的所有值(例如99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0054] 虽然在施行或试验本发明时可使用与本文中所述类似或相当的任何方法和材料,但优选的方法和材料是目前所述的。

[0055] 定义

[0056] 如本文中所用的表述“白介素-33”、“IL-33”和其类似词语指的是从例如R & D

Systems, 目录#3625-IL-010/CF获得的的人IL-33蛋白。除非明确地指出来自非人物种(例如,“小鼠IL-33”、“猴IL-33”等),否则对本文中的蛋白、多肽和蛋白片段的所有提及内容意图指的是相应蛋白、多肽和蛋白片段的人源型式。

[0057] 如本文中所用,“结合IL-33的抗体”或“抗-IL-33抗体”包括结合IL-33蛋白的可溶性片段的抗体和其抗原结合片段。可溶性IL-33分子包括天然IL-33蛋白和重组IL-33蛋白变体,例如像单聚和二聚IL-33构建体。

[0058] 如本文中所用的术语“抗体”指的是包含与特定抗原(例如IL-33)特异性地结合或相互作用的至少一个互补决定区(CDR)的任何抗原结合分子或分子复合物。术语“抗体”包括:包含通过双硫键相互连接的四条多肽链(二条重(H)链和二条轻(L)链)的免疫球蛋白分子以及其多聚体(例如IgM)。各重链包含重链可变区(文中缩写为HCVR或 V_H)和重链恒定区。重链恒定区包括三个结构域,即 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。各轻链包含轻链可变区(文中缩写为LCVR或 V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域(C_{L1})。 V_H 和 V_L 区可进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间散布着较保守的区域,称为框架区(FR)。各 V_H 和 V_L 由三个CDR和四个FR构成,以下列顺序由氨基端排列至羧基端:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明不同的实施方案中,抗-IL-33抗体(或其抗原结合部分)的FR可与人生殖系序列相同,或可为天然的或人工修饰的。氨基酸共有序列可基于两个或更多个CDR的并排(side-by-side)分析来定义。

[0059] 如本文中所用的术语“抗体”也包括全抗体分子的抗原结合片段。如本文中所用的术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等等包括与抗原特异性结合形成复合物的任何天然存在、可以酶促方法获得、合成或基因工程改造的多肽或糖蛋白。抗体的抗原结合片段可使用任何适合的标准技术例如从例如全抗体分子获得,所述标准技术如蛋白质水解消化作用或涉及操作和表达编码抗体可变区和任选地恒定区的DNA的重组基因工程改造技术。这种DNA为已知的和/或可容易地从例如商业来源、DNA文库(包括,例如噬菌体-抗体文库)获得,或可进行合成。DNA可用化学方法或通过使用分子生物学技术来定序和操作,例如将一个或多个可变结构域和/或恒定结构域排列成适合构形,或引入密码子,产生半胱氨酸残基,修饰、增添或缺失氨基酸等。

[0060] 抗原结合片段的非限制性实例包括:(i) Fab片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;和(vii) 由模拟抗体高变区的氨基酸残基组成的最小鉴别单位(例如,分离的互补决定区(CDR),如CDR3肽)或限制性FR3-CDR3-FR4肽。如本文中所用的表述“抗原结合片段”内还涵盖其它工程改造分子,如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失的抗体、嵌合抗体、CDR-接枝抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、微抗体、纳米抗体(例如单价纳米抗体、双价纳米抗体等)、小模块免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域。

[0061] 抗体的抗原结合片段将典型地包含至少一个可变结构域。可变结构域可为具有任何大小或氨基酸组成的结构域,并且一般应包含与一个或多个框架序列相邻或同框的至少一个CDR。在具有 V_L 结构域与 V_H 结构域缔合的抗原结合片段中, V_H 结构域和 V_L 结构域可以任何适合的排列相对彼此定位。例如可变区可为二聚的并含有 V_H - V_H 、 V_H - V_L 或 V_L - V_L 二聚体。或者,抗体的抗原结合片段可含有单聚 V_H 或 V_L 结构域。

[0062] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合片段可含有与至少一个恒定结构域共价连

接的至少一个可变结构域。在本发明的抗体的抗原结合片段内可发现的可变结构域和恒定结构域的非限制性、示例性构形包括：(i) V_H-C_H1 ；(ii) V_H-C_H2 ；(iii) V_H-C_H3 ；(iv) $V_H-C_H1-C_H2$ ；(v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ ；(vi) $V_H-C_H2-C_H3$ ；(vii) V_H-C_L ；(viii) V_L-C_H1 ；(ix) V_L-C_H2 ；(x) V_L-C_H3 ；(xi) $V_L-C_H1-C_H2$ ；(xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$ ；(xiii) $V_L-C_H2-C_H3$ ；和(xiv) V_L-C_L 。在任何可变结构域和恒定结构域的构形（包括上列任何的示例性构形）中，可变结构域和恒定结构域可直接彼此连接或可通过完整或部分铰链区或接头区连接。铰链区可由至少2个（例如5、10、15、20、40、60或更多个）氨基酸组成，从而在单一多肽分子中相邻的可变结构域和/或恒定结构域之间产生柔性和半柔性键联。此外，本发明的抗体的抗原结合片段可包含呈非共价相互缔合和/或呈与一个或多个单聚 V_H 或 V_L 结构域缔合（例如，通过双硫键）形式的任何上列可变结构域和恒定结构域构形的同源二聚体或异源二聚体（或其它多聚体）。

[0063] 就全抗体分子来说，抗原结合片段可为单特异性或多特异性（例如双特异性）。抗体的多特异性抗原结合片段将典型地包含至少两个不同的可变结构域，其中各可变结构域能够特异性地与单独抗原结合或与相同抗原上不同的表位结合。任何多特异性抗体型式，包括本文中所公开的示例性双特异性抗体型式，可使用本领域中可利用的常规技术来改编，使其适用于本发明抗体的抗原结合片段情形。

[0064] 本发明的抗体可通过补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞介导细胞毒性(ADCC)来作用。“补体依赖性细胞毒性(CDC)”涉及在补体的存在下通过本发明的抗体裂解抗原表达细胞。“抗体依赖性细胞介导细胞毒性(ADCC)”涉及细胞介导的反应，其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞（例如天然杀手(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞）鉴别出靶细胞上的结合抗体并由此导致靶细胞的裂解。CDC和ADCC可使用本领域中所熟知和可利用的此等来测量。（参见，例如美国专利第5,500,362号和第5,821,337号，和Clynes等人（1998）*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656）。抗体的恒定区对于抗体固定补体和介导细胞依赖性细胞毒性生物能力来说很重要。因此，抗体的同种型可基于是否需要抗体介导细胞毒性来选择。

[0065] 在本发明的某些实施方案中，本发明的抗-IL-33抗体为人抗体。如本文中所用的术语“人抗体”意图包括具有来源于人生殖系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可包括并非由人生殖系免疫球蛋白序列所编码的氨基酸残基（例如通过随机或位点特异性体外诱变或通过体内体细胞突变所引入的突变），例如在CDR中和特别是CDR3中的氨基酸残基。然而，如本文中所用的术语“人抗体”不意图包括其中来源于另外哺乳动物物种（如小鼠）的生殖系的CDR序列已接枝在人框架序列上的抗体。

[0066] 在一些实施方案中，本发明的抗体可为重组人抗体。如本文中所用的术语“重组人抗体”意图包括通过重组方法所制备、表达、产生或分离的抗体，如使用转染至宿主细胞中的重组表达载体（以下进一步详述）表达的抗体，由重组组合人抗体文库（以下进一步详述）分离的抗体，由针对人免疫球蛋白基因转基因的动物（例如小鼠）分离的抗体（参见，例如Taylor等人（1992）*Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295），或由涉及将人免疫球蛋白基因序列与DNA序列拼接的任何其它方法所制备、表达、产生或分离的抗体。这些重组人抗体具有来源于人生殖系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而，在某些实施方案中，这些重组人抗体经受体外诱变（或，当使用针对人Ig序列基因转基因的动物时，为体内体细胞诱变），并且因此在重组抗体的 V_H 区和 V_L 区的氨基酸序列来源于人生殖系 V_H 和 V_L 序列或与其

有关时,所述氨基酸 序列为可能不是天然存在于体内人抗体生殖系文库中的序列。

[0067] 人抗体可以与铰链异质性相关联的两种形式存在。在一种形式 中,免疫球蛋白分子包含约150-160kDa的稳定四链构建体,其中二 聚体通过链间重链双硫键保持一起。在第二种形式中,二聚体不通过 双硫键连接,并且约75-80kDa的分子由共价偶联轻链和重链(半抗体) 组成。这些形式极难以分离,即使在亲和纯化后也是如此。

[0068] 在各种完整的IgG同种型中,第二种形式的出现频率是由于但不 限于与抗体的铰链区同种型相关联的结构差异所致。在人IgG4铰链 的铰链区中单一氨基酸取代可显著地减少第二种形式出现 (Angal等 人(1993)Molecular Immunology 30:105) 达到典型地使用人IgG1铰链 所观察到的程度。本发明涵盖在铰链区、C_H2区或C_H3区中具有一个 或多个突变的抗体,所述突变例如在制造上可能为合乎需要的,用以 改善所需抗体形式的产率。

[0069] 本发明的抗体可为分离的抗体。如本文中所用的“分离的抗体” 指的是已被鉴定并从它的天然环境的至少一种组分分离和/或回收的 抗体。例如,就本发明的目的来说,已从生物体的至少一种组分或从 抗体天然存在或天然地产生的抗体的组织或细胞分离或移除的抗体 为“分离的抗体”。分离的抗体还包括重组细胞内的原位抗体。分离的 抗体为已经受至少一个纯化或分离步骤的抗体。根据某些实施方案, 分离的抗体可能实质上不含其它细胞物质和/或化学物。

[0070] 本发明包括中和和/或阻断抗-IL-33抗体。如本文中所用的“中和” 或“阻断”抗体意图指与IL-33结合的抗体,所述抗体:(i) 干扰IL-33 或IL-33片段与IL-33受体组分(例如ST2、IL-1RAcP等)之间的相互 作用;和/或(ii) 产生对IL-33的至少一种生物功能的抑制。由中和或 阻断IL-33的抗体所造成的抑制作用不需为完全的,只要可使用适当 测定检测即可。用于检测IL-33抑制的示例性测定描述于本文中的研 究实施例中。

[0071] 如与抗体所来自的对应生殖系序列相比时,本文中所公开的抗 -IL-33抗体可在重链可变结构域和轻链可变结构域的框架区和/或 CDR区中包括一个或多个氨基酸取代、插入和/或缺失。通过将本文 中所公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的生殖 系序列相比较,可容易地确定这些突变。本发明包括来源于本文中所 公开的任何氨基酸序列的抗体和其抗原结合片段,其中在一个或多个 框架区和/或CDR区中的一个或多个氨基酸被突变成抗体所来自的生 殖系序列的对应残基,或另一个人生殖系序列的对应残基,或对应生 殖系残基的保守氨基酸取代(这些序列变化在本文中统称为“生殖系 突变”)。由本文中所公开的重链可变区和轻链可变区序列开始,本领 域的一般技术人员可容易地制造许多包含一个或多个独立生殖系突 变或其组合的抗体和抗原结合片段。在某些实施方案中,V_H结构域 和/或V_L结构域内的所有框架残基和/或CDR残基被突变回到抗体所 来自的原始生殖系序列中所发现的残基。在其它实施方案中,仅某些 残基突变回到原始的生殖系序列,例如仅在FR1的前8个氨基酸中 或FR4的后8个氨基酸中发现突变的残基,或仅在CDR1、CDR2或 CDR3内发现突变残基。在其它的实施方案中,框架残基和/或CDR 残基中的一个或多个被突变成具有不同生殖系序列的对应残基(即与 抗体最初所来自的生殖系序列不同的生殖系序列)。此外,本发明的 抗体在框架区和/或CDR区内可含有两个或更多个生殖系突变的任何 组合,例如,其中某些独立残基被突变成特定生殖系序列的对应残基, 而与原始生殖系序列不同的其它残基被维持或被突变成不同生殖系 序列的对应残基。一旦获得含有一个或多个生殖系突变的抗体和抗原 结合片段后,可容易地测试所述抗体和

抗原结合片段的一种或多种所需的性质,如提高的结合特异性、增加的结合亲和力、提高或增强(视情况而定)的拮抗或促效性生物学性质、降低的免疫源性等。以这种通用方式获得的抗体和抗原结合片段涵盖在本发明中。

[0072] 本发明还包括抗-IL-33抗体,其包含具有一个或多个保守取代的本文中所公开的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的变体。例如,本发明包括抗-IL-33抗体,所述抗-IL-33抗体相对于本文中所公开的任何HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列,具有含例如10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少的保守氨基酸取代的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列。

[0073] 术语“表位”指的是与抗体分子可变区中称为互补位(paratope)的特定抗原结合位点相互作用的抗原决定子。单一抗原可具有一个以上的表位。因此,不同的抗体可与抗原上不同的区域结合并可具有不同的生物效应。表位可为构型或线性的。构型表位由直链多肽链的不同节段的空間上并列的氨基酸所产生。线性表位由多肽链中相邻的氨基酸残基所产生。在某些情况下,表位可包括抗原上具有糖类基团、磷酸基或磺酰基的部分。

[0074] 在提及核酸或其片段时,术语“实质同一性”或“实质上相同”指示;当利用适当核苷酸插入或缺失与另一核酸(或它的互补链)进行最佳化比对时,如通过序列同一性的任何熟知算法(如FASTA、BLAST或Gap,如以下所论述)所测量,至少约95%,并且更优选至少约96%、97%、98%或99%的核苷酸碱基存在核苷酸序列同一性。在某些情况下,具有与参考核酸分子实质同一性的核酸分子可编码与由参考核酸分子所编码的多肽具有相同或实质上类似氨基酸序列的多肽。

[0075] 在应用于多肽时,术语“实质类似性”或“实质上类似”意指当如通过使用默认间隙权重的程序GAP或BESTFIT进行最佳化比对时,两个肽序列共享至少95%序列同一性,甚至更优选至少98%或99%序列同一性。优选地,不相同的残基位置相差了保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”为一种氨基酸残基被具有带类似化学性质(例如电荷或疏水性)的侧链(R基)的氨基酸残基取代的取代。一般来说,保守氨基酸取代实质上将不会改变蛋白的功能性质。在两个或更多个氨基酸序列彼此相差保守取代的情况中,可向上调整序列同一性百分比或类似程度以修正取代作用的保守性质。用于做出调整的方法已为本领域技术人员所熟知。参见,例如Pearson(1994)Methods Mol.Biol.24: 307-331。具有带类似化学性质的侧链的氨基酸基团的实例包括(1)脂族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;(3)含酰胺侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸,并且(7)含硫侧链有半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代组为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸及天冬酰胺-谷氨酰胺。或者,保守置换为在Gonnet等人(1992)Science 256:1443-1445所公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化。“中度保守”置换为在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0076] 多肽的序列类似性(也称为序列同一性的)典型地使用序列分析软件来测量。蛋白分析软件使用分配至各种取代、缺失和其它修饰作用(包括保守氨基酸取代)的类似性度量配出类似的序列。例如,GCG软件含有如Gap和Bestfit的程序,所述程序可使用默认参数来测定密切相关多肽之间(如来自不同生物物种的同源多肽),或野生型蛋白与其突变

蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见,例如GCG 6.1 版。多肽序列还可使用利用默认或推荐参数的FASTA(其为GCG 6.1 版内的程序)进行比较。FASTA(例如FASTA2和FASTA3)提供查询序列和检索序列之间的最佳重叠区的比对和序列同一性百分比(Pearson (2000), 如上)。当将本发明序列与含有大量来自不同生物体的序列的数据库进行比较时,另一优选的算法为使用默认参数的计算机程序 BLAST,特别是BLASTP或TBLASTN。参见,例如Altschul等人(1990) J.Mol.Biol.215:403-410,和Altschul等人(1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402。

[0077] 如本文中所用的“炎性疾病或病症”指的是其中病理学全部或部分地由例如免疫系统细胞的数目改变、迁移速率改变或激活改变所造成的疾病、病症或病理学病状。免疫系统的细胞包括例如T细胞、B 细胞、单核细胞或巨噬细胞、抗原呈递细胞(APC)、树突状细胞、小 胶质细胞、NK细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性细胞、肥大细胞或特别 与免疫学有关的其它细胞,例如产生细胞因子的内皮或表皮细胞。如 本文中所用,在一个实施方案中,“炎性疾病或病症”为选自由下列组 成的组的免疫病症或病状:哮喘(包括类固醇抗性哮喘、类固醇敏感 性哮喘、嗜酸细胞性哮喘或非嗜酸细胞性哮喘、过敏、过敏症、多发性硬化症、炎性肠病症(例如克隆氏症或溃疡性结肠炎)、慢性阻塞性 肺病(COPD,其可能与吸烟或暴露于二手烟有关或无关,或部分地由 其引起或所造成)、狼疮、异位性皮炎、牛皮癣、硬皮病和其它纤维 化疾病、sjogren氏综合征(白塞氏病、巨细胞动脉炎、过敏性紫斑症(Henoch-Schonlein purpura)和Churg Strauss综合征)和关节炎。在另一 实施方案中,关节炎选自由类风湿性关节炎、骨关节炎和牛皮癣性关节炎组成的组。在另一实施方案中,“炎性疾病或病症”为包括TH₁-型反应或TH₂-型反应的免疫病症或症状。

[0078] 如本文中所用的“抑制或减弱IL-33-介导的信号传递”指的是:相 对于在缺乏如本文中所述的IL-33抗体的拮抗剂时IL-33通过ST2和 IL-1RAcP刺激信号转导的程度来说,在如本文中所述的IL-33抗体 的拮抗剂的存在下,IL-33通过ST2和IL-1RAcP刺激信号转导的程 度减低。为检查抑制的程度,用可能的抑制剂/拮抗剂处理样品,并 与无抑制剂/拮抗剂的对照样品进行比较。对照样品,即不用拮抗剂 处理的样品被指定为100%的相对活性值。当相对于对照的活性值为 约90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%或20%或更低时,即实现抑制。抑制的终点 可包括预定量或百分比的例如炎症指标或细胞脱粒作用、分泌或激 活,如细胞因子的释放。抑制通过ST2和IL-1RAcP的IL-33信号转 导可通过在体外测定中测定IL-33信号转导来确定,如实施例6中 所述。此外,体内测定可用于确定分子是否为IL-33的拮抗剂。例如, 如实施例11和12中所述的体内分析可用于在对人IL-33的表达为纯 合的过敏原敏化动物中评估IL-33的抗体对肺炎症的作用。在用过敏 原敏化动物后,用本发明的抗-IL-33抗体或负性同种型对照抗体 治疗 动物的子组。之后,将动物安乐死并收取肺供细胞浸润的评估,以及 细胞因子(IL-4和IL-5)测量。作为拮抗剂有效的IL-33抗体应当展现 肺中炎性细胞的减少趋向,以及如IL-4和IL-5的细胞因子的减少趋 向。

[0079] 抗体的生物特性

[0080] 本发明包括结合人IL-33并且抑制或减弱IL-33-介导的信号传递 的抗-IL-33抗体和其抗原结合片段。如果例如抗-IL-33抗体展现选自 由下列组成的组的一种或多种性质,那么抗体被视为“抑制或减弱 IL-33-介导的信号传递”: (1) 在以细胞为基础的生物测

定中抑制IL-33介导的信号传递；(2)抑制IL-33诱发的人嗜碱性粒细胞的脱粒作用；(3)抑制IL-33诱发的IFN γ 从人PBMC的产生；(4)降低动物中因暴露于过敏原而导致升高的细胞因子量，所述过敏原例如IL-4或IL-5；以及(5)抑制因急性或慢性暴露于过敏原(例如，居室尘螨(HDM))所产生的肺炎症。

[0081] 在以细胞为基础的生物测定中抑制IL-33介导的信号传递指的是：抗-IL-33抗体或其抗原结合片段抑制或降低在表达IL-33受体的细胞和响应于IL-33结合而产生可检测信号的报告元件中所产生的信号，例如使用如本文中实施例6中所定义的测定形式或实质上类似的测定。例如，如在以细胞为基础的阻断生物测定中例如使用如本文中实施例5所定义的测定形式或实质上类似的测定所测量，本发明包括在表达ST2的细胞中以低于约2nM、低于约1nM、低于约900pM、低于约800pM、低于约700pM、低于约600pM、低于约500pM、低于约400pM、低于约350pM、低于约300pM、低于约250pM、低于约200pM、低于约150pM、低于约100pM、低于约90pM、低于约80pM、低于约70pM、低于约60pM、低于约50pM、低于约40pM、低于约30pM、低于约20pM或低于约10pM的IC₅₀来阻断IL-33介导的信号传递的抗体和其抗原结合片段。

[0082] 抑制IL-33诱发的人嗜碱性粒细胞的脱粒作用指的是：例如，如使用实施例7的测定系统或实质上类似的测定所测量，抗-IL-33抗体或其抗原结合片段在体外抑制或降低IL-33诱发的嗜碱性粒细胞脱粒的程度。例如，如在体外人嗜碱性粒细胞脱粒测定中使用如本文中实施例7所定义的测定形式或实质上类似的测定所测量，本发明包括在人IL-33(例如，约100pM最终浓度)的存下以低于约500pM、低于约400pM、低于约350pM、低于约300pM、低于约250pM、低于约200pM、低于约150pM、低于约100pM、低于约90pM、低于约80pM、低于约70pM、低于约60pM、低于约50pM、低于约40pM、低于约30pM、低于约20pM或低于约10pM的IC₅₀来抑制人嗜碱性粒细胞的脱粒作用的抗体和其抗原结合片段。

[0083] 抑制IL-33诱发的IFN γ 从人PBMC的产生指的是：例如，如使用实施例8的测定系统或实质上类似的测定所测量，抗-IL-33抗体或其抗原结合片段在人IL-12的存在下抑制或降低从用人IL-33处理的PBMC中所释放的IFN γ 的量。例如，如在IL-33诱发的IFN γ 释放测定中例如使用如本文中实施例8所定义的测定形式或实质上类似的测定所测量，本发明包括在人IL-12的存在下以低于约50nM、低于约25nM、低于约20nM、低于约15nM、低于约10nM、低于约5nM、低于约1nM、低于约900pM、低于约800pM、低于约700pM、低于约600pM、低于约500pM、低于约400pM或低于约300pM的IC₅₀来抑制IL-33诱发的IFN γ 释放的抗体和其抗原结合片段。

[0084] 在某些实施方案中，本发明的抗-IL-33抗体和抗原结合片段阻断IL-33与IL-33受体(例如ST2)的结合。例如，如通过ELISA为基础的免疫测定例如使用本文中实施例4所定义的测定形式或实质上类似的测定所测量，本发明包括以低于约15nM的IC₅₀值来体外阻断IL-33与ST2结合的抗-IL-33抗体。在某些实施方案中，如通过以ELISA为基础的免疫测定例如使用本文中实施例4所定义的测定形式或实质上类似的测定所测量，本发明的抗体或抗原结合片段以低于约10nM、低于约5nM、低于约900pM、低于约800pM、低于约700pM、低于约600pM、低于约500pM、低于约400pM、低于约300pM、低于约280pM、低于约260pM、低于约250pM、低于约240pM、低于约230pM、低于约220pM、低于约200pM、低于约180pM、低于约160pM或低于约150pM的IC₅₀值来体外阻断IL-33与ST2结合。

[0085] 然而,在其它实施方案中,本发明的某些抗-IL-33抗体和抗原结合片段虽然具有抑制或减弱IL-33-介导的信号传递的能力,但不会阻断或仅部分阻断IL-33和ST2的相互作用。这些抗体和其抗原结合片段在文中可称为“间接阻断剂”。不受限于理论,据信本发明的间接阻断剂在与IL-33的ST2-结合结构域重叠或仅部分重叠的表位上与IL-33结合来发挥作用,但在不直接阻断IL-33/ST2相互作用的情况下,干扰IL-33-介导的信号传递。

[0086] 本发明包括以高亲和力结合可溶性IL-33分子的抗-IL-33抗体和其抗原结合片段。例如,本发明包括抗体和抗体的抗原结合片段,如通过表面等离子体共振例如使用本文中实施例3所定义的测定形式所测量,所述抗体和抗体的抗原结合片段以低于约10nM的 K_D (例如在25°C或37°C下)结合IL-33。在某些实施方案中,如通过表面等离子体共振例如使用本文中实施例3所定义的测定形式或实质上类似的测定所测量,本发明的抗体或抗原结合片段以低于约5nM、低于约2nM、低于约1nM、低于约800pM、低于约600pM、低于约500pM、低于约400pM、低于约300pM、低于约200pM、低于约180pM或低于约160pM的 K_D 结合IL-33。

[0087] 本发明还包括抗-IL-33抗体和其抗原结合片段,如通过表面等离子体共振在25°C或37°C下例如使用本文中实施例3所定义的测定形式或实质上类似的测定所测量,所述抗-IL-33抗体和其抗原结合片段以大于约10分钟的解离半衰期($t_{1/2}$)与IL-33特异性地结合。在某些实施方案中,如通过表面等离子体共振在25°C或37°C下例如使用本文中实施例3所定义的测定形式或实质上类似的测定所测量,本发明的抗体或抗原结合片段以大于约20分钟、大于约30分钟、大于约40分钟、大于约50分钟、大于约60分钟、大于约70分钟、大于约80分钟、大于约90分钟、大于约100分钟的 $t_{1/2}$ 结合IL-33。

[0088] 本发明的抗体可具有前述生物特性中的一种或多种或其任何组合。根据包括本文中研究实施例的本公开的论述,本发明抗体的其它生物特性对本领域一般技术人员来说是明显的。

[0089] 包含Fc变体的抗-IL-33抗体

[0090] 根据本发明某些实施方案,提供包含Fc结构域的抗-IL-33抗体,所述Fc结构域包括一个或多个突变,所述突变例如在酸性pH下与在中性pH下相比增强或减低抗体与FcRn受体的结合。例如,本发明包括抗-IL-33抗体,其在Fc结构域的 C_H2 区或 C_H3 区中包含突变,其中所述突变增加Fc结构域在酸性环境中(例如,在pH范围为约5.5至约6.0的内体中)对FcRn的亲和力。这些突变可在施用于动物时使抗体的血清半衰期增加。这些Fc修饰的非限制性实例包括例如位置250(例如E或Q);250和428(例如L或F);252(例如L/Y/F/W或T)、254(例如S或T)和256(例如S/R/Q/E/D或T)处的修饰;或位置428和/或433(例如H/L/R/S/P/Q或K)和/或434(例如H/F或Y)处的修饰;或位置250和/或428处的修饰;或位置307或308(例如308F, V308F)和434处的修饰。在一个实施方案中,修饰包括428L(例如M428L)和434S(例如N434S)修饰;428L、259I(例如V259I)和308F(例如V308F)修饰;433K(例如H433K)和434(例如434Y)修饰;252、254和256(例如252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如T250Q和M428L);以及307和/或308修饰(例如308F或308P)。在另一实施方案中,修饰包括265A(例如D265A)和/或297A(例如D297A)修饰。

[0091] 例如,本发明包括包含Fc结构域的抗-IL-33抗体,所述Fc结构域包括选自由下列组成的组的一对(或组)或多对(或组)突变:250Q和248L(例如T250Q和M248L);252Y、254T

和256E(例如M252Y、S254T 和T256E);428L和434S(例如M428L和N434S);以及433K和434F(例如H433K和N434F)。在本发明的范围内涵盖前述Fc结构域突变的所有可能组合,和本文公开的抗体可变结构域内的其它突变。

[0092] 本发明还包括包含嵌合重链恒定(C_H)区的抗-IL-33抗体,其中所述嵌合C_H区包含来源于一个以上免疫球蛋白同种型的C_H区的片段。例如,本发明的抗体可包含嵌合C_H区,其包含来源于人IgG1、人IgG2 或人IgG4分子的C_H2结构域的部分地或全部,与来源于人IgG1、人 IgG2或人IgG4分子的C_H3结构域的部分地或全部相组合。根据某些 实施方案,本发明的抗体包含具有嵌合铰链区的嵌合C_H区。例如, 嵌合铰链可包含来源于人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“上铰链”氨基酸序列(从根据EU编号的位置216至227的氨基酸残基),与来源于人IgG1、人IgG2或人IgG4铰链区的“下铰链”序列(从根据EU 编号的位置228至236的氨基酸残基)相组合。根据某些实施方案,嵌合铰链包含来源于人IgG1或人IgG4上铰链的氨基酸残基以及来源于人IgG2下铰链的氨基酸残基。在某些实施方案中,包含如本文中所述的嵌合C_H区的抗体在不会不利地影响抗体的治疗或药物动力学 性质的情况下可展现改进的Fc效应子功能。(参见,例如2013年2 月1日提交的美国临时申请第61/759,578号)。

[0093] 表位定位和相关技术

[0094] 本发明包括与IL-33的一个或多个氨基酸相互作用的抗-IL-33抗 体。例如,本发明包括与位于IL-33的ST2-相互作用结构域内的一个 或多个氨基酸相互作用的抗-IL-33抗体。与抗体结合的表位可由IL-33 的3或更多个(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个)的氨基酸的单一连续序列组成。或者,表位可由IL-33的多个不连续氨基酸(或氨基酸序列)组成。

[0095] 本领域一般技术人员已知的各种技术都可用于确定抗体是否与 多肽或蛋白内的“一个或多个氨基酸相互作用”。示例性技术包括例 如,如描述于Antibodies,Harlow和Lane(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb.,NY)中的常规交叉阻断测定、丙氨酸扫描突变分析、肽印迹分析(Reineke,2004,Methods Mol Biol 248:443-463)和肽裂解分析。此外,可使用如表位切除、表位提取和抗原的化学修饰的方法 (Tomer,2000,Protein Science 9:487-496)。可用于辨识多肽内与抗体 相互作用的氨基酸的另一方法为通过质谱术检测氢/氘交换。一般来 说,氢/氘交换方法涉及以氘标记目标蛋白,接着使抗体与氘标记的 蛋白结合。接着,将蛋白/抗体复合物转移到水中以使除了受抗体保 护的残基(保持为氘标记的)以外的所有残基发生氢-氘交换。解离抗体 后,使靶蛋白经受蛋白酶裂解和质谱分析,从而找出氘标记残基,其 对应于与抗体相互作用的特定氨基酸。参见,例如Ehring(1999) Analytical Biochemistry 267 (2):252-259;Engen和Smith(2001) Anal. Chem. 73:256A-265A。

[0096] 本发明还包括与本文中所述的任何特定示例性抗体(例如,H1M9 559N、H1M9566N、H1M9568N、H4H9629P、H4H9633P、H4H9640 P、H4H9659P、H4H9660P、H4H9662P、H4H9663P、H4H9664P、H 4H9665P、H4H9666P、H4H9667P、H4H9670P、H4H9671P、H4H96 72P、H4H9675P、H4H9676P、H1M9565N等)结合相同表位的抗-IL- 33抗体。同样的,本发明还包括与本文中所述的任何特定示例性抗 体(例如,H1M9559N、H1M9566N、H1M9568N、H4H9629P、H4H9 633P、H4H9640P、H4H9659P、H4H9660P、H4H9662P、H4H9663P、 H4H9664P、H4H9665P、H4H9666P、H4H9667P、H4H9670P、H4H9 671P、H4H9672P、H4H9675P、H4H9676P、H1M9565N等)竞争与I L-

33结合的抗-IL-33抗体。

[0097] 通过使用本领域中已知和本文中例证的常规方法,可容易地测定 抗体是否与参考抗-IL-33抗体结合相同表位或是与其竞争结合。例如,为测定试验抗体是否与本发明的参考抗-IL-33抗体结合相同表位,首先使参考抗体与IL-33蛋白结合。接着,评估试验抗体与IL-33 分子结合的能力。如果在与参考抗-IL-33抗体饱和结合后,试验抗体 能够与IL-33结合,那么可得出结论:试验抗体与参考抗-IL-33抗体 结合不同表位。另一方面,如果在与参考抗-IL-33抗体饱和结合后, 试验抗体不能与IL-33分子结合,那么试验抗体可结合与由本发明的 参考抗-IL-33抗体所结合表位相同的表位。然后可进行另外的常规实验(例如,肽突变和结合测定),以确认所观察到的缺乏试验抗体结合 是否事实上由于与参考抗体结合相同表位所致,或是否因立体阻断(或另一现象)造成缺乏观察到的结合。这类实验可使用ELISA、RIA、Biacore、流式细胞术或本领域中可利用的任何其它定量或定性抗体结合测定来进行。根据本发明的某些实施方案,如在竞争结合测定中所 测量,如果例如1-、5-、10-、20-或100-倍过量的一种抗体抑制另一种抗体的结合至少50%,但优选地75%、90%或甚至99%,那么两种 抗体与相同(或重叠)表位结合(参见,例如Junghans等人,Cancer Res. 199050:1495-1502)。另外,如果降低或消除一种抗体的结合的抗原中基本上所有氨基酸突变都降低或消除另一种抗体的结合,那么两种 抗体被视为与相同表位结合。如果仅降低或消除一种抗体的结合的氨基酸突变的子组降低或消除另一种抗体的结合,那么两种抗体被视为 具有“重叠表位”。

[0098] 为了测定抗体是否与参考抗-IL-33抗体竞争结合(或交叉竞争结合),在两个取向上进行上述结合方法:在第一个取向上:使参考抗体在饱和条件下与IL-33蛋白结合,接着评估试验抗体与IL-33分子的结合。在第二个取向上:使试验抗体在饱和条件下与IL-33分子结合,接着评估参考抗体与IL-33分子的结合。如果在两个取向上,仅有第一(饱和)抗体能够与IL-33分子结合,那么得出结论:试验抗体 和参考抗体竞争与IL-33结合。本领域的一般技术人员应了解,与参考抗体竞争结合的抗体可能不一定与参考抗体结合相同表位,但可通过结合重叠或相邻的表位而在立体上阻断参考抗体的结合。

[0099] 制备人抗体

[0100] 用于制造包括全人单克隆抗体的单克隆抗体的方法已为本领域中所知。任何这些已知的方法可用于本发明的情形中来制造特异性地 与人IL-33结合的人抗体。

[0101] 使用例如VELOCIMMUNE™技术,或用于产生全人单克隆抗体的任何其它已知方法,初始地将IL-33的具有人可变区和小鼠恒定区的高亲和力嵌合抗体分离。如下文实验部分,将抗体进行表征并针对所需的特性进行选择,所述特性包括亲和力、选择性、表位等。如果需要,以所需的人恒定区(例如野生型或修饰的IgG1或IgG4)置换小鼠恒定区,以产生全人抗-IL-33抗体。虽然所选的恒定区可根据特定用途改变,但是高亲和力抗原结合和靶特异性特性驻留在可变区中。在某些情况下,全人抗-IL-33抗体直接从抗原阳性B细胞分离出。

[0102] 生物等效物

[0103] 本发明的抗-IL-33抗体和抗体片段涵盖具有与所述抗体的那些不同但保留结合人IL-33能力的氨基酸序列的蛋白。这些变体抗体和 抗体片段包括当与亲代序列相比时氨基酸的一个或多个添加、缺失或 取代,但展现与所述抗体的生物活性基本上等效的生物活

性。同样的，本发明的编码抗-IL-33抗体的DNA序列涵盖的序列包括当与所公开序列相比时核苷酸的一个或多个添加、缺失或取代，但编码与本发明的抗-IL-33抗体或抗体片段基本上生物等效的抗-IL-33抗体或抗体片段。这些变体氨基酸和DNA序列的实例如上所论述。

[0104] 如果例如两种抗原结合蛋白或抗体为药学等效物或药学替代品，即当在类似的实验条件下以相同摩尔剂量、以单次给药或多次给药来施用，它们的吸收速率和程度并不显示显著差异，那么所述两种抗原结合蛋白或抗体被视为生物等效。如果一些抗体在它们的吸收程度上相当但是吸收速率不同，那么所述抗体将被视为等效物或药物替代品，并且还可视为生物等效的，因为吸收速率上的这些差异为有意的并被反映在标记上，对于获得例如长期使用的有效身体药物浓度来说并非必要，并且就所研究的特定药物产品来说被视为医疗上不显著的。

[0105] 在一个实施方案中，如果两种抗原结合蛋白在它们的安全性、纯度和效力上不具有临床上的有意义差异，那么所述两种抗原结合蛋白为生物等效的。

[0106] 在一个实施方案中，如果患者可在参考产品与生物产品之间作一次或多次切换，而与没有这种切换的持续治疗相比无预期的不利效应风险的增加，那么两种抗原结合蛋白为生物等效的，所述不利效应包括免疫原性的临床上显著改变或减低的有效性。

[0107] 在一个实施方案中，如果两种抗原结合蛋白通过针对一种或多种使用条件的共同的机制或作用机制来起作用，以达到这些机制已知的程度，那么所述两种抗原结合蛋白为生物等效的。

[0108] 生物等效性可通过体内和体外方法来验证。生物等效性测量包括例如(a)人或其它哺乳动物的体内试验，其中测量血液、血浆、血清或其它生物体液中随着时间变化的抗体或其代谢物浓度；(b)与人体内生物可利用性数据关联并且可合理预测所述数据的体外试验；(c)人或其它哺乳动物的体内试验，其中测量随时间变化的抗体(或其靶)的适当急性药理学效果；以及(d)建立抗体的安全性、功效或生物可利用性或生物等效性的良好控制临床试验。

[0109] 本发明的抗-IL-33抗体的生物等效变体可通过例如制造残基或序列的各种取代，或缺失对生物活性来说不需要的末端或内部残基或序列来建构。例如，对生物活性来说非必需的半胱氨酸残基可被缺失或以其它氨基酸置换，以防止变性之后形成不必要或不正确的分子内双硫键联。在其它情形中，生物等效抗体可包括抗-IL-33抗体变体，其包含修饰抗体的糖基化特性的氨基酸改变，例如消除或移除糖基化的突变。

[0110] 物种选择性和物种交叉反应

[0111] 根据某些实施方案，本发明提供与人IL-33结合但不与其它物种的IL-33结合的抗-IL-33抗体。本发明还包括与人IL-33和来自一种或多种非人物种的IL-33结合的抗-IL-33抗体。例如，本发明的抗-IL-33抗体可与人IL-33结合，并且可或可不(视情况而定)与下列一种或多种结合：小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、猪、猫、狗、兔、山羊、绵羊、牛、马、骆驼、猕猴、绒猴、恒河猴或黑猩猩IL-33。根据本发明的某些示例性实施方案，提供特异性地结合人IL-33和食蟹猴(例如，食蟹猕猴(*Macaca fascicularis*))IL-33的抗-IL-33抗体。

[0112] 免疫缀合物

[0113] 本发明涵盖与治疗部分缀合的抗-IL-33抗体(“免疫缀合物”),所述治疗部分如细胞毒素、化疗药物、免疫抑制剂或放射性同位素。细胞毒性剂包括对细胞有害的任何试剂。用于形成免疫缀合物的适合的细胞毒性剂和化疗剂的实例已为本领域中所知(参见,例如WO 05/103081)。

[0114] 多特异性抗体

[0115] 本发明的抗体可为单特异性、双特异性或多特异性。多特异性抗体可对一个靶多肽的不同表位具特异性或可含有对一个以上靶多肽具特异性的抗原结合结构域。参见,例如Tutt等人,1991,J. Immunol. 147:60-69; Kufer等人,2004,Trends Biotechnol. 22:238-244。本发明的抗-IL-33抗体可与另一功能分子连接或共表达,所述另一功能分子例如另一肽或蛋白。例如,抗体或其片段可与一个或多个其它分子实体功能性连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或其它方式),所述其它分子实体如用于产生具有第二结合特异性的双特异性或多特异性抗体的另一抗体或抗体片段。例如,本发明包括双特异性抗体,其中免疫球蛋白的一个臂对人IL-33或其片段具特异性,而免疫球蛋白的另一臂对第二治疗目标具特异性,或与第二治疗部分缀合。

[0116] 可用于本发明情形中的示例性地抗体形式涉及使用第一免疫球蛋白(Ig) C_H3结构域和第二Ig C_H3结构域,其中所述第一Ig C_H3结构域和第二Ig C_H3结构域彼此相差至少一个氨基酸,并且其中至少一个氨基酸差异与缺乏所述氨基酸差异的双特异性抗体相比降低了所述双特异性抗体与蛋白A的结合。在一个实施方案中,第一Ig C_H3结构域结合蛋白A,而第二Ig C_H3结构域含有降低或消除蛋白A结合的突变,如H95R修饰(根据IMGT外显子编号;根据EU编号为H435R)。第二C_H3可进一步包含Y96F修饰(根据IMGT;根据EU为Y436F)。在IgG1抗体的情况下,在第二C_H3中可发现的其它修饰包括:D16E、L18M、N44S、K52N、V57M和V82I(根据IMGT;根据EU为D356E、L358M、N384S、K392N、V397M和V422I);在IgG2抗体的情况下,则为N44S、K52N和V82I(根据IMGT;根据EU为N384S、K392N和V422I);并且在IgG4抗体的情况下,则为Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q和V82I(根据IMGT;根据EU为Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q和V422I)。上述双特异性抗体形式的变异涵盖在本发明的范围内。

[0117] 可用于本发明情形中的其它示例性双特异性形式包括而不限于例如scFv为基础的形式或双功能抗体双特异性形式、IgG-scFv融合物、双可变结构域(DVD)-Ig、四源杂交瘤(Quadroma)、杵臼结构(knobs-into-holes)、共同轻链(例如带有杵臼结构的共同轻链等)、CrossMab、CrossFab、(SEED)体、亮氨酸拉链、Duobody、IgG1/IgG2、双作用Fab(DAF)-IgG和Mab²双特异性形式(参见,例如Klein等人2012,mAbs 4:6,1-11和本文中所引用的参考文献,作为对前述形式的回顾)。双特异性抗体还可使用肽/核酸缀合来构建,例如其中使用具有正交化学反应性的非天然氨基酸来产生位点特异性抗体-寡核苷酸缀合物,然后自我组装成具有限定组成、价态和几何形状的多聚复合物(参见,例如Kazane等人,J. Am. Chem. Soc. [Epub:2012年12月4日])。

[0118] pH-依赖性结合

[0119] 本发明提供以pH-依赖方式结合IL-33的抗-IL-33抗体和其抗原结合片段。例如,本发明的抗-IL-33抗体在酸性pH下与中性pH相比可展现与IL-33结合的降低。另外,本发明的抗-IL-33抗体在酸性pH下与中性pH相比可展现与其抗原结合的增强。

[0120] 在某些情况下,“在酸性pH下与中性pH相比与IL-33结合的降低”是就在酸性pH下抗体与IL-33结合的 K_D 值和在中性pH下抗体与IL-33结合的 K_D 值的比率(或反之亦然)来表述。例如,就本发明的目的来说,如果抗体或其抗原结合片段展现约3.0或更大的酸性/中性 K_D 比率,那么抗体或其抗原结合片段在酸性pH时可被视为展现“在酸性pH下与中性pH相比与IL-33结合的降低”。在某些示例性实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段的酸性/中性 K_D 比率可为约3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、20.0、25.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0、100.0或更大。

[0121] 具有pH-依赖性结合特性的抗体可例如通过筛选在酸性pH下与中性pH相比与特定抗原结合降低(或提高)的抗体群体来获得。另外,氨基酸水平对抗原结合结构域的修饰可产生具有pH-依赖性结合特性的抗体。例如,通过将抗原结合结构域(例如CDR内)的一个或多个氨基酸以组氨酸残基取代,可获得在酸性pH下与中性pH相比具有降低的抗原结合的抗体。如本文中所用,表述“酸性pH”意指约6.0或更低、约5.5或更低或约5.0或更低的pH。表述“酸性pH”包括约6.0、5.95、5.9、5.85、5.8、5.75、5.7、5.65、5.6、5.55、5.5、5.45、5.4、5.35、5.3、5.25、5.2、5.15、5.1、5.05、5.0或更低的pH。如本文中所用,表述“中性pH”意指约7.0至约7.4的pH。表述“中性pH”包括约7.0、7.05、7.1、7.15、7.2、7.25、7.3、7.35和7.4的pH值。

[0122] 治疗制剂和施用

[0123] 本发明提供包含本发明的抗-IL-33抗体或其抗原结合片段的药物组合物。本发明的药物组合物是用适合的载体、赋形剂和提供改进转移、递送、耐受性和类似性质的其它试剂来配制。许多适合的制剂可参见所有药物化学家已知的处方集:Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA。这些制剂包括例如粉剂、糊膏、软膏、软冻、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子)的囊泡(例如LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA)、DNA缀合物、无水吸收糊膏、水包油和油包水乳剂、乳剂碳蜡(具有各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含碳蜡(carbowax)的半固体混合物。也参见Powell等人“Compendium of excipients for parenteral formulations”PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0124] 施用于患者的抗原的剂量可取决于患者的年龄和体型、目标疾病、病状、施用于患者等而有所变化。优选的剂量典型地根据体重或体表面积来计算。当本发明的抗体用于治疗成人患者的与IL-33活性相关联的病状或疾病时,可为有利的是通常以约0.01至约20mg/kg体重,更优选地约0.02至约7mg/kg体重,约0.03至约5mg/kg体重,或约0.05至约3mg/kg体重的单一剂量静脉内施用本发明的抗体。可取决于病状的严重度来调整治疗的频率和持续时间。用于施用抗-IL-33抗体的有效剂量和时程可依经验来决定;例如可通过定期评估来监测患者病情进展,并相应地调整剂量。此外,剂量的物种间标定可使用本领域中熟知的方法来进行(例如Mordenti等人,1991, Pharmaceut. Res. 8:1351)。

[0125] 各种递送系统是已知的并可用于施用本发明的药物组合物,例如在脂质体包封、微粒、微胶囊、能表达突变病毒的重组细胞、受体介导内吞作用(参见,例如Wu等人(1987) J. Biol. Chem. 262: 4429-4432)。引入的方法包括但不限于皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。组合物可以任何方便的途径,例如通过输注或团注、通过

由上皮或粘膜层(例如口腔粘膜、直肠和 肠粘膜等)吸收来施用,并可与其它生物活性剂共同施用。施用可为 全身性或局部的。

[0126] 本发明的药物组合物可由标准针或注射器进行皮下或静脉内递 送。此外,就皮下递送来说,笔型递送装置可容易地用于递送本发明的药物组合物。这种笔型递送装置可重复使用或为一次性的。可重复 使用的笔型递送装置一般利用含有药物组合物的可更换药筒。一旦药 筒内的所有药物组合物施用后并且药筒腾空,那么空药筒可容易丢弃 并更换新的含药物组合物的药筒。然后,笔型递送装置便可重复使用。在一次性笔型递送装置中,没有可置换的药筒。取而代之,一次性笔 型递送装置预先填充有药物组合物,所述药物组合物被保持在装置内 的贮存器中。一旦药物组合物的贮存器腾空,就将整个装置丢弃。

[0127] 许多可重复使用的笔型和自动注射器递送装置可应用于皮下递 送本发明的药物组合物。实例包括但不限于AUTOPEN™(Owen Mu mford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC™笔(Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25™笔、HUMALOG™笔, HUMALIN 70/30™笔、(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPEN™ I、II 和III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、NOVOPEN JUNIOR™(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、BD™笔(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™和OPTICLIK™(sanofi-ave ntis, Frankfurt, Germany), 仅举几例。用于皮下递送本发明药物组合 物的一次性笔型递送装置包括但不限于SOLOSTAR™笔(sanofi-avent is)、FLEXPEN™(Novo Nordisk)和KWIKPEN™(Eli Lilly)、SURE CLICK™自动注射器(Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLET™(Ha selmeier, Stuttgart, Germany)、EPIPEN (Dey, L.P.)和HUMIRA™笔(A bbott Labs, Abbott Park IL), 仅举几例。

[0128] 在某些情况下,药物组合物可以受控释放系统来递送。在一个实 施方案中,可使用泵(参见Langer,如上;Sefton,1987,CRC Crit.Ref. Biomed.Eng.14:201)。在另一实施方案中,可使用聚合物材料;参见 Medical Applications of Controlled Release, Langer和Wise(编著),1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida。在另一实施方案中,受释放系统可放 置在靠近组合物的目标处,因此仅需要全身剂量的一部分(参见,例 如Goodson, 1984, Medical Applications of Controlled Release,如上, 第2卷,第115-138页)。其它受控制释放系统论述于Langer,1990, Science 249:1527-1533的综述中。

[0129] 可注射制剂可包括用于静脉内、皮下、皮内和肌肉内注射、点滴 输注等的剂型。这些可注射制备物可通过公共已知的方法来制备。例 如,可注射制备物可例如通过将上述抗体或其盐溶解、悬浮或乳化于 常规用于注射的无菌水性介质或油性介质中来制备。用于注射的水性 介质例如生理盐水、含葡萄糖的等张溶液和其它佐剂等,其可与下列 组合使用:适合的增溶剂,如醇(例如乙醇);多元醇(例如丙二醇、聚 乙二醇);非离子表面活性剂[例如聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻 油的聚氧乙烯(50摩尔)加合物)]等。可使用的油性介质例如芝麻油、大豆油等,其可与如苯甲酸苄酯、苄醇等的增溶剂组合使用。由此所 制备的注射剂优选地填充于适当的安瓶中。

[0130] 有利地,上述的用于口服或肠胃外用途的药物组合物被制备成呈 适于配合活性成分剂量的单位剂量的剂型。这些单位剂量的剂型包括 例如片剂、丸剂、胶囊、注射剂(安瓶)、栓剂等。所含的前述抗体的 量一般为每单位剂量的剂型约5至约500mg;特别在注射剂形式的 情况下,优选的是,以约5至约100mg来含有前述抗体,而针对其 它剂型以约10至约

250mg来含有前述抗体。

[0131] 抗体的治疗用途

[0132] 由本发明人进行的使用小鼠模型系统的实验已对鉴别出可通过 IL-33拮抗作用治疗、预防和/或改善的各种疾病和症状做出贡献。例如,小鼠 IL-33DNA的流体动力递送造成小鼠中肺粘液堆积的诱发和总血清IgE的增加。此外,如通过微阵列分析所测量,miL-33DNA递送造成ST2和各种下游细胞因子的上调。由本发明人使用IL-33敲除小鼠进行的实验也显示IL-33拮抗作用的各种潜在治疗益处。例如,在IMQ诱发的牛皮癣模型中,已发现在野生型小鼠与IL-33^{-/-}小鼠之间,观察到相当的宏观评分和皮肤浸润。此外,在过敏原诱发的肺炎症模型中,IL-33^{-/-}小鼠显示嗜酸性粒细胞和残余粘液堆积的下降。

[0133] 本发明的抗体尤其可用于治疗、预防和/或改善与IL-33表达、信号传递或活性相关联或由其所介导的任何疾病或病症,或可通过阻断 IL-33与IL-33配体(例如ST2)之间的相互作用,或以其它方式抑制 IL-33活性和/或信号传递治疗的任何疾病或病症。例如,本发明提供治疗下列的方法:哮喘(例如过敏性哮喘、非过敏性哮喘、严重难治性哮喘、哮喘恶化、类固醇抗性哮喘、类固醇敏感性哮喘、嗜酸细胞性哮喘或非嗜酸细胞性哮喘等)、异位性皮炎、牛皮癣、其它炎症病症、过敏、过敏症、心血管疾病、中枢神经系统疾病、疼痛、关节炎(例如类风湿性关节炎、骨关节炎和牛皮癣性关节炎等)、巨细胞动脉炎、血管炎(白塞氏病和Churg Strauss综合征)、过敏性紫斑症(Henoch-Schonlein purpura)、多发性硬化症、炎症肠病(例如克隆氏症或溃疡性结肠炎)、狼疮和sjogren氏综合征。

[0134] 本发明的抗体还可用于治疗、预防和/或改善一种或多种纤维化疾病。可通过施用本发明的抗-IL-33抗体治疗的示例性纤维化疾病包括肺纤维化(例如特发性肺纤维化、博来霉素引起的肺纤维化、石棉诱发的肺纤维化和闭塞性细支气管炎综合征)、慢性哮喘、与急性肺损伤和急性呼吸窘迫相关联的纤维化(例如细菌性肺炎诱发的纤维化、创伤诱发的纤维化、病毒性肺炎诱发的纤维化、呼吸器诱发的纤维化、非肺性败血症诱发的纤维化和吸入诱发的纤维化)、硅肺、放射线诱发的纤维化、慢性阻塞性肺疾病(COPD,其可能与吸烟或暴露于二手烟有关或无关,或部分地由其引起或所造成)、硬皮病、眼睛纤维化、皮肤纤维化(例如硬皮病)、肝纤维化(例如肝硬化、酒精诱发的肝纤维化、非酒精性脂肪肝炎(NASH)、胆管损伤、原发性胆汁性肝硬化、感染或病毒诱发的肝纤维化、自身免疫性肝炎、肾纤维化、心纤维化、动脉粥样硬化、支架内再狭窄和骨髓纤维化。

[0135] 在本文中所述的治疗方法的情形中,抗-IL-33抗体可作为单一疗法施用(即作为唯一的治疗剂)或与一种或多种另外的治疗剂(其实例描述于本文中其它处)组合施用。

[0136] 组合疗法和制剂

[0137] 本发明包括包含如本文中所述的任何抗-IL-33抗体与一种或多种另外的治疗活性组分组合的组合物和治疗制剂,以及包括将这些组合物施用于有需要的患者的治疗方法。

[0138] 本发明的抗-IL-33抗体可与下列共配制或组合施用:例如,细胞因子抑制剂,包括与细胞因子(例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、IL-21、IL-23、IL-25、IL-26)结合的小分子细胞因子抑制剂和抗体,或其相应受体的拮抗剂。

[0139] 本发明的抗-IL-33抗体还可与抗病毒剂、抗生素、镇痛剂、皮质类固醇、类固醇、

氧、抗氧化剂、金属螯合剂、IFN- γ 和/或NSAID 组合施用或共配制。

[0140] 另外的治疗活性组分可在施用本发明抗-IL-33抗体之前、同时或 之后不久施用(就本公开文的目的来说,这些施用方案被视为抗-IL-33 抗体与另外的治疗活性组分“组合”施用)。本发明包括药物组合物,其中本发明的抗-IL-33抗体是与本文中其它处所述的另外的治疗活 性组分中的一种或多种共调配。

[0141] 施用方案

[0142] 根据本发明某些实施方案,可在限定的实践过程内将多个剂量的 抗-IL-33抗体(或包含抗-IL-33抗体与本文中所提的任何另外的治疗 活性剂组合的药物组合物)施用于受试者。根据本发明的这个方面的 方法包括向受试者连续施用多个剂量的本发明的抗-IL-33抗体。如本 文中所用,“连续施用”意指各剂量的抗-IL-33抗体在不同的时间点施 用于受试者,例如在以预定间隔分开的不同天(例如小时、天、周或 月)。本发明包括的方法包括:向患者连续施用单一初始剂量的抗 -IL-33抗体,接着一个或多个第二剂量的抗-IL-33 抗体,和任选地接 着一个或多个第三剂量的抗-IL-33抗体。

[0143] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”指的是施用本发明抗 -IL-33抗体的时间顺序。因此,“初始剂量”为治疗方案开始时所施用 的剂量(也称为“基线剂量”);“第二剂量”为在初始剂量之后所施用的 剂量;而“第三剂量”为在第二剂量之后所施用的剂量。初始剂量、第 二剂量和第三剂量都可含有相同量的抗-IL-33抗体,但就施用频率来 说,一般可彼此不同。然而,在某些实施方案中,包含在初始剂量、第二剂量和/或第三剂量中的 抗-IL-33抗体的量在治疗过程期间可互 不相同(例如,在适当时上调或下调)。在某些实施 方案中,在治疗方 案开始时施用的两个或更多个(例如2、3、4或5个)剂量为“负荷剂量”, 接着以较低频率为基础施用后续剂量(例如“维持剂量”)。

[0144] 在本发明的某些示例性实施方案中,各第二和/或第三剂量是紧 接前一剂量之后的1至26周(例如1、1^{1/2}、2、2^{1/2}、3、3^{1/2}、4、4^{1/2}、5、5^{1/2}、6、6^{1/2}、7、7^{1/2}、8、8^{1/2}、9、9^{1/2}、10、10^{1/2}、11、11^{1/2}、12、12^{1/2}、13、13^{1/2}、14、14^{1/2}、15、15^{1/2}、16、16^{1/2}、17、17^{1/2}、18、18^{1/2}、19、19^{1/2}、20、20^{1/2}、21、21^{1/2}、22、22^{1/2}、23、23^{1/2}、24、24^{1/2}、25、25^{1/2}、26、26^{1/2}或更久)来施用。如本文中所用的短语“紧接前一剂量” 意指在多重施用顺序中,不间断剂量的顺序中、 在下一剂量施用之前 施用于患者的抗-IL-33抗体的剂量。

[0145] 根据本发明的这个方面的方法可包括将任何数目的第二和/或第 三剂量的抗-IL-33抗体施用于患者。例如,在某些实施方案中,仅将 单一第二剂量施用于患者。在其它 实施方案中,将两个或更多个(例 如2、3、4、5、6、7、8或更多个)第二剂量施用于患者。同样的, 在某些实施方案中,仅将单一第三剂量施用于患者。在其它实施方案 中,将两个或更 多个(例如2、3、4、5、6、7、8或更多个)第三剂量 施用于患者。

[0146] 在涉及多个第二剂量的实施方案中,各第二剂量可以与其它第二 剂量相同的频率来施用。例如,各第二剂量可在紧接前面剂量后1至 2周或1至2个月施用于患者。同样的, 在涉及多个第三剂量的实施 方案中,各第三剂量可以与其它第三剂量相同的频率来施用。例如, 各第三剂量可在紧接前面剂量后2至12周施用于患者。在本发明的 某些实施方案 中,施用于患者的第二和/或第三剂量的频率在治疗方 案过程内可有所不同。在治疗过程 期间,施用频率还可取决于个别患 者的需求在临床检查后由医师做出调整。

[0147] 本发明包括其中以第一频率将2至6个负荷剂量施用于患者(例 如每周一次、每两

周一一次、每三周一一次、每月一次、每两个月一次等)，接着以较低频率为基础将两个或更多个维持剂量施用于患者的施用方案。例如，根据本发明这个方面，如果负荷剂量以每月一次的频率施用，那么维持剂量可每六周一一次、每两个月一次、每三个月一次等施用于患者。

[0148] 抗体的诊断用途

[0149] 本发明的抗-IL-33抗体还可用于检测或测量样品中的表达IL-33或IL-33的细胞，例如达到诊断目的。例如，抗-IL-33抗体或其片段可用于诊断特征为IL-33异常表达（例如过度表达，表达不足，缺乏表达等）的病状或疾病。IL-33的示例性诊断测定可包括例如：将得自患者的样品与本发明的抗-IL-33抗体接触，其中所述抗-IL-33抗体由可检测标记或受体分子标记。或者，未标记的抗-IL-33抗体可与本身被可检测标记的第二抗体组合用于诊断应用。可检测标记或报道分子可为放射性同位素，例如³H、¹⁴C、³²P、³⁵S或¹²⁵I；荧光或化学荧光部分，例如荧光素异硫氰酸酯或罗丹明（rhodamine）；或酶，例如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或荧光素酶（luciferase）。可用于检测或测量样品的IL-33的特定示例性测定包括酶联免疫吸附测定（ELISA）、放射性免疫测定（RIA）和荧光激活细胞分选（FACS）。

[0150] 根据本发明的可用于IL-33诊断测定的样品包括可在正常或病理学条件下从含有可检测量的IL-33蛋白或其片段的患者获得的任何组织或液体样品。一般来说，测量得自健康患者（例如未罹患与异常的IL-33量或活性相关联的疾病或病状的患者）的特定样品中IL-33的量以初始地建立IL-33的基线或标准量。然后可将IL-33的基线量与得自疑似患有IL-33相关疾病或病状的个体的样品中所测量的IL-33的量进行比较。

实施例

[0151] 提出下列实施例以为本领域一般技术人员提供如何制造并使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述，但不意图限制发明人所认为的发明范围。虽然已尽力确保就所用数字（例如量、温度等）来说的准确性，但仍应考量一些实验误差和偏差。除非另有指出，否则份数为重量份，分子量为平均分子量，温度以摄氏度数表示，而压力为大气压或接近大气压。

[0152] 实施例1. 产生抗人IL-33的人抗体

[0153] 将包含人IL-33的免疫原与用于刺激免疫反应的助剂直接施用于包含编码人免疫球蛋白重链可变区和κ轻链可变区的DNA的VELOCIMMUNE[®]小鼠。通过IL-33-特异性免疫测定监测抗体免疫应答。当达到所需的免疫应答时，收取脾脏细胞并与小鼠骨髓瘤细胞融合以保留其生存力并形成杂交瘤细胞系。对杂交瘤细胞进行筛选并选择以鉴别产生IL-33-特异性抗体的细胞系。使用这种技术获得一些抗-IL-33嵌合抗体（即，具有人可变结构域和小鼠恒定结构域的抗体）；以这种方式产生的示例性抗体如下：H1M9559N、H1M9566N、H1M9568N和H1M9565N。随后将来自嵌合抗体的人可变结构域克隆到人恒定结构域上，以制造如本文中所述的全人抗-IL-33抗体。

[0154] 如US 2007/0280945A1中所述，直接从没有与骨髓瘤细胞融合的抗原阳性B细胞分离全人抗-IL-33抗体。使用这种方法，获得一些全人抗-IL-33抗体（即拥有人可变结构域和人恒定结构域的抗体）；以这种方式产生的示例性抗体如下：H4H9629P、H4H9633P、

H4H9640P、H4H9659P、H4H9660P、H4H9662P、H4H9663P、H4H9664P、H4H9665P、H4H9666P、H4H9667P、H4H9670P、H4H9671P、H4H9672P、H4H9675P和H4H9676P。

[0155] 根据这个实施例的方法所产生的示例性抗-IL-33抗体的某些生物性质详述在下文阐述的实施例中。

[0156] 实施例2. 重链可变区和轻链可变区氨基酸序列

[0157] 表1列出所选的抗-IL-33抗体的重链可变区和轻链可变区氨基酸序列对和CDR序列以及它们的对应抗体标识符。

[0158] 表1

抗体名称	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
9559N	2	4	6	8	10	12	14	16
9566N	18	20	22	24	26	28	30	32
9568N	34	36	38	40	42	44	46	48
9629P	50	52	54	56	58	60	62	64
9633P	66	68	70	72	74	76	78	80
9640P	82	84	86	88	90	92	94	96
9659P	98	100	102	104	106	108	110	112
9660P	114	116	118	120	122	124	126	128
9662P	130	132	134	136	138	140	142	144
9663P	146	148	150	152	154	156	158	160
9664P	162	164	166	168	170	172	174	176
9665P	178	180	182	184	186	188	190	192
9666P	194	196	198	200	202	204	206	208
9667P	210	212	214	216	218	220	222	224
9670P	226	228	230	232	234	236	238	240
9671P	242	244	246	248	250	252	254	256
9672P	258	260	262	264	266	268	270	272
9675P	274	276	278	280	282	284	286	288
9676P	290	292	294	296	298	300	302	304
9565N	308	310	312	314	316	318	320	322

[0161] 抗体在本文中典型地根据下列命名法来命名:Fc前缀(例如“H1M”或“H4H”),接着数字标识符(例如,如表1中所示的“9559”、“9566”或“9629”等),接着“P”或“N”后缀。因此,根据这种命名法,抗体在本文中可称为例如“H1M9559N”、“H1M9566N”、“H4H9629P”等。在用于本文中的抗体命名上的H1M和H4H前缀指示抗体的特定Fc区同种型。例如,“H1M”抗体具有小鼠IgG1Fc,而“H4H”抗体具有人IgG4Fc。本领域一般技术人员应了解,具有特定Fc同种型的抗体可转变为具有不同Fc同种型的抗体(例如带有小鼠IgG1Fc的抗体可转变为带有人IgG4的抗体等),但在任何情况下,可变结构域(包括CDR)-通过如表1所示的数字标识符指示-保持不变,并且结合性质预期为相同的或实质上类似的,与Fc结构域的性质无关。

[0162] 实施例3. 通过表面等离子体共振测定的与人IL-33的抗体结合

[0163] IL-33与纯化的抗-IL-33单克隆抗体结合的平衡解离常数(K_D 值)是使用实时表面等离子体共振生物传感器、使用Biacore 4000仪器来测定。将Biacore传感器表面先用与多克隆兔抗-小鼠抗体(GE, #BR-1008-38)偶联或与单克隆小鼠抗-人Fc抗体(GE, #BR-1008-39)偶联的胺衍生化,以分别俘获表达为具有小鼠或人IgG4恒定区的抗-IL-33单克

隆抗体。所有的Biacore结合研究都在0.01MADA pH 7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA和0.05% v/v界面活性剂Tween-20 (ABS-ET 电泳缓冲液) 中进行。将在ABS-ET电泳缓冲液(范围从100nM至3.7 nM, 3倍稀释)中所制备的不同浓度的人IL-33 (hIL-33; R&D Systems, #3625-IL-010/CF) 或表达为具有C-端六聚组氨酸标签的食蟹猴 IL-33 (MfIL-33-6His; SEQ ID NO: xx), 以30μL/分钟的流动速率注射于俘获了抗-IL-33单克隆抗体的表面上。监测hIL-33或MfIL-33-6His与所俘获的单克隆抗体的缔合历时4分钟, 并且监测它们在ABS-ET电泳缓冲液中的解离历时10分钟。使用在线pH追逐测定形式, 在0.01M ADA pH 6.0、0.15M NaCl、3mM EDTA和0.05% v/v界面活性剂Tween-20 (ABS-ET pH6缓冲液) 中研究pH降低对各抗-IL-33抗体与hIL-33或MfIL-33-6His结合的影响。为了实现这个研究, 在ABS-ET电泳缓冲液中监测hIL-33或MfIL-33-6His与所俘获的单克隆抗体的结合历时4分钟。在hIL-33或MfIL-33-6His在ABS-ET电泳缓冲液中解离30秒后, 注射ABS-ET pH6缓冲液3分钟, 并在低pH条件下测量分析物的解离。所有的结合动力实验都在25℃和37℃下进行。动力缔合(k_a)和解离(k_d)常数是通过使用Scrubber 2.0c曲线拟合软件将实时感应图与1:1结合模型拟合来测定。结合解离平衡常数(K_D)和解离半衰期($t_{1/2}$)由动力学速率常数如下计算:

[0164] $K_D (M) = k_d / k_a$ 并且 $t_{1/2} (min) = \ln(2) / (60 * k_d)$

[0165] 在25℃和37℃下hIL-33和MfIL-33-6His与不同抗-IL-33单克隆抗体结合的结合作用参数如表2至5所示。如表2所示, 在25℃下, hIL-33以范围从78pM至757pM的 K_D 与抗-IL-33抗体结合。如表3所示, 在37℃下, hIL-33以范围从411pM至2.03nM的 K_D 与抗-IL-33抗体结合。在25℃和37℃下, 一种抗-IL-33抗体显现弱的结合, 并且因此其结合作用参数无法使用1:1结合模型拟合。如表4所示, 在25℃下, MfIL-33-6His以范围从333pM至38nM的 K_D 与抗-IL-33抗体结合。如表5所示, 在37℃下, MfIL-33-6His以范围从1nM至48.6nM的 K_D 与抗-IL-33抗体结合。

[0166] 表2: 在25℃下抗-IL-33单克隆抗体与人IL-33结合的结合动力参数。

[0167]

所俘获的抗体	ABS-ET 电泳缓冲液中人 IL-33 结合动力学				ABS-ET pH6 缓冲液中的在线追逐		
	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$	$t_{1/2}(min)$	$k_d(1/s)$	$t_{1/2}(min)$	$t_{1/2}$ 比率 (pH7.4/pH6.0)
H4H9675P	1.02E+06	2.58E-04	2.54E-10	45	1.11E-03	10	4.3
H4H9662P	8.11E+05	2.50E-04	3.08E-10	46	8.26E-04	14	3.3
H4H9640P	9.12E+05	2.37E-04	2.60E-10	49	6.57E-04	18	2.8
H4H9629P	7.77E+05	2.26E-04	2.90E-10	51	1.28E-03	9	5.7
H4H9659P	5.26E+05	1.72E-04	3.27E-10	67	6.64E-04	17	3.9
H4H9660P	6.96E+05	2.24E-04	3.22E-10	52	7.08E-04	16	3.2
H4H9667P	6.37E+05	2.52E-04	3.95E-10	46	5.66E-04	20	2.2
H4H9670P	7.86E+05	2.89E-04	3.68E-10	40	8.25E-04	14	2.9
H4H9663P	1.36E+06	4.14E-04	3.05E-10	28	1.10E-03	11	2.7
H4H9666P	5.08E+05	2.80E-04	5.51E-10	41	1.34E-03	9	4.8
H4H9676P	1.03E+06	3.45E-04	3.34E-10	33	1.21E-03	10	3.5
H4H9633P	6.56E+05	2.83E-04	4.32E-10	41	8.10E-04	14	2.9
H4H9671P	7.71E+05	3.49E-04	4.53E-10	33	1.62E-03	7	4.6
H4H9672P	6.68E+05	3.52E-04	5.27E-10	33	1.41E-03	8	4.0
H4H9665P	8.88E+05	4.74E-04	5.33E-10	24	2.12E-03	5	4.5
H4H9664P	3.39E+05	2.57E-04	7.57E-10	45	8.23E-04	14	3.2
H1M9568N	7.02E+05	1.30E-04	1.84E-10	89	1.78E-04	65	1.4
H1M9566N	1.27E+05	1.00E-05**	7.88E-11**	1155**	1.10E-04	105	11.0
H1M9559N	4.04E+05	2.74E-04	6.78E-10	42	1.87E-04	62	0.7
H1M9565N	IC*	IC*	IC*	IC*	IC*	IC*	IC*

[0168] *IC: 不确定, 因为在实验条件下观察到非常弱的结合, 并且实时结合数据无法与

1:1结合模型可靠拟合。

[0169] **在实验条件下没有观察到IL33从所俘获的单克隆抗体解离，因此 k_d 值固定为 $1.00E-05$ ，并且得出的 $t_{1/2}$ 和 K_D 值分别代表下限和上限。

[0170] 表3:在37℃下抗-IL-33单克隆抗体与人IL-33结合的结合动力参数。

[0171]

所俘获的抗体	ABS-ET 电泳缓冲液中人 IL-33 结合动力学				ABS-ET pH6 缓冲液中的在线追逐		
	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$	$t_{1/2}(min)$	$k_a(1/s)$	$t_{1/2}(min)$	$t_{1/2}$ 比率(pH7.4/pH6.0)
H4H9675P	2.12E+06	8.72E-04	4.11E-10	13	4.63E-03	2	5.3
H4H9662P	1.40E+06	6.20E-04	4.43E-10	19	3.83E-03	3	6.2
H4H9640P	1.15E+06	5.73E-04	4.98E-10	20	2.65E-03	4	4.6
H4H9629P	1.27E+06	6.46E-04	5.08E-10	18	5.82E-03	2	9.0
H4H9659P	7.07E+05	4.03E-04	5.70E-10	29	2.99E-03	4	7.4
H4H9660P	8.03E+05	4.79E-04	5.96E-10	24	3.23E-03	4	6.8
H4H9667P	9.76E+05	6.03E-04	6.18E-10	19	2.44E-03	5	4.0
H4H9670P	1.16E+06	7.83E-04	6.76E-10	15	3.83E-03	3	4.9
H4H9663P	1.83E+06	1.24E-03	6.77E-10	9	4.62E-03	3	3.7
H4H9666P	1.13E+06	7.70E-04	6.81E-10	15	6.80E-03	2	8.8
H4H9676P	1.38E+06	1.28E-03	9.22E-10	9	5.24E-03	2	4.1
H4H9633P	7.40E+05	6.89E-04	9.31E-10	17	2.40E-03	5	3.5

[0172]

H4H9671P	1.21E+06	1.14E-03	9.38E-10	10	5.85E-03	2	5.1
H4H9672P	1.09E+06	1.15E-03	1.05E-09	10	5.41E-03	2	4.7
H4H9665P	1.21E+06	1.44E-03	1.19E-09	8	9.65E-03	1	6.7
H4H9664P	5.19E+05	7.21E-04	1.39E-09	16	2.79E-03	4	3.9
H1M9568N	6.72E+05	9.61E-04	1.43E-09	12	1.10E-03	10	1.1
H1M9566N	1.66E+05	2.83E-04	1.70E-09	41	9.67E-04	12	3.4
H1M9559N	4.73E+05	9.62E-04	2.03E-09	12	9.92E-04	12	1.0
H1M9565N	IC*	IC*	IC*	IC*	IC*	IC*	IC*

[0173] *IC:不确定,因为在实验条件下观察到非常弱的结合,并且实时结合数据无法与1:1结合模型可靠拟合。

[0174] 表4:在25℃下抗-IL-33单克隆抗体与Mf IL-33-6His结合的结合动力参数。

[0175]

所俘获的抗体	ABS-ET 电泳缓冲液中 MfIL-33-6His 结合动力学				ABS-ET pH6 缓冲液中的在线追逐		
	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$	$t_{1/2}(min)$	$k_a(1/s)$	$t_{1/2}(min)$	$t_{1/2}$ 比率(pH7.4/pH6.0)
H4H9675P	5.06E+05	1.29E-03	2.55E-09	9	1.56E-03	7	1.2
H4H9662P	3.53E+05	4.42E-04	1.25E-09	26	1.17E-04	99	0.3
H4H9640P	4.50E+05	1.37E-03	3.06E-09	8	5.01E-04	23	0.4
H4H9629P	5.62E+05	1.35E-02	2.39E-08	0.9	3.58E-02	0.3	2.7
H4H9659P	3.25E+05	4.86E-04	1.50E-09	24	1.23E-04	94	0.3
H4H9660P	4.26E+05	1.49E-03	3.49E-09	8	1.08E-03	11	0.7
H4H9667P	3.43E+05	9.91E-04	2.89E-09	12	6.96E-04	17	0.7
H4H9670P	4.40E+05	2.10E-03	4.77E-09	6	3.93E-04	29	0.2
H4H9663P	8.69E+05	9.25E-04	1.06E-09	12	6.83E-04	17	0.7
H4H9666P	2.22E+05	3.54E-03	1.59E-08	3.3	8.09E-03	1.4	2.3
H4H9676P	8.52E+05	4.12E-03	4.84E-09	2.8	1.45E-03	8	0.4
H4H9633P	2.62E+05	9.97E-03	3.80E-08	1.2	2.87E-03	4	0.3
H4H9671P	5.87E+05	1.50E-03	2.55E-09	8	1.61E-03	7	1.1
H4H9672P	4.37E+05	3.60E-03	8.22E-09	3.2	2.67E-03	4	0.7
H4H9665P	5.57E+05	5.66E-04	1.02E-09	20	7.53E-04	15	1.3
H4H9664P	1.40E+05	1.65E-03	1.18E-08	7	4.80E-04	24	0.3
H1M9568N	2.44E+05	2.61E-04	1.07E-09	44	3.02E-04	38	1.2
H1M9566N	2.93E+05	9.75E-05	3.33E-10	119	1.26E-04	91	1.3
H1M9559N	3.21E+05	1.23E-03	3.82E-09	9	1.52E-03	8	1.2
H1M9565N	4.06E+04	7.20E-05	1.77E-09	160	1.43E-04	81	2.0

[0176] 表5:在37℃下抗-IL-33单克隆抗体与MfIL-33-6His结合的结合 动力参数。

[0177]

所俘获的抗体	ABS-ET 电泳缓冲液中 MfIL-33-6His 结合动力				ABS-ET pH6 缓冲液中的在线追逐		
	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$	$t_{1/2}(min)$	$k_a(1/s)$	$t_{1/2}(min)$	$t_{1/2}$ 比率(pH7.4/pH6.0)
H4H9675P	1.02E+06	4.91E-03	4.81E-09	2.4	7.35E-03	1.6	1.5
H4H9662P	7.07E+05	1.58E-03	2.24E-09	7	1.68E-03	7	1.1
H4H9640P	8.10E+05	4.36E-03	5.38E-09	2.6	2.26E-03	5	0.5
H4H9629P	1.07E+06	3.47E-02	3.24E-08	0.3	FT*	FT*	FT*
H4H9659P	5.98E+05	1.86E-03	3.11E-09	6	1.02E-03	11	0.5
H4H9660P	6.80E+05	4.44E-03	6.53E-09	2.6	4.63E-03	2.5	1.0
H4H9667P	6.81E+05	3.17E-03	4.66E-09	4	2.68E-03	4	0.8
H4H9670P	7.35E+05	5.03E-03	6.84E-09	2.3	1.65E-03	7	0.3
H4H9663P	1.62E+06	3.61E-03	2.22E-09	3.2	3.54E-03	3.3	1.0
H4H9666P	4.32E+05	1.41E-02	3.27E-08	0.8	FT*	FT*	FT*
H4H9676P	1.87E+06	1.44E-02	7.70E-09	0.8	FT*	FT*	FT*

[0178]

H4H9633P	4.68E+05	2.27E-02	4.86E-08	0.5	FT*	FT*	FT*
H4H9671P	1.20E+06	6.07E-03	5.08E-09	1.9	8.19E-03	1.4	1.3
H4H9672P	9.46E+05	1.30E-02	1.37E-08	0.9	FT*	FT*	FT*
H4H9665P	1.10E+06	2.10E-03	1.91E-09	5	4.00E-03	2.9	1.9
H4H9664P	3.61E+05	5.84E-03	1.62E-08	2.0	1.93E-03	6	0.3
H1M9568N	3.89E+05	1.73E-03	4.46E-09	7	2.24E-03	5	1.3
H1M9566N	3.99E+05	4.00E-04	1.00E-09	29	1.15E-03	10	2.9
H1M9559N	4.93E+05	3.47E-03	7.04E-09	3.3	3.07E-03	4	0.9
H1M9565N	7.82E+04	2.02E-04	2.59E-09	57	2.28E-04	51	1.1

[0179] *FT:快速 $t_{1/2}$,与抗-IL-33单克隆抗体结合的MfIL-33-6His为

[0180] 实施例4.抗-IL-33抗体阻断IL-33与人类ST2受体结合

[0181] 抗-IL-33抗体阻断人IL-33(hIL-33)或食蟹猴IL-33与人ST2受体 结合的能力是使用竞争夹心ELISA来测量。将以表达为具有C-端人 IgG1Fc标签的人ST2蛋白ecto结构域(hST2-hFc;SEQ ID NO:306)的一部分,在4℃下以1μg/mL于PBS缓冲液中的浓度涂覆于96-孔 微量滴定盘上过夜。随后使用0.5% (w/v)的BSA在PBS中溶液阻断 非特异性地结合位点。将恒定浓度的30pM生物素化hIL-33蛋白 (R&D systems,Cat#3625-IL/CF)(生物素-hIL-33)或表达为具有六组氨 酸标签的150pM食蟹猴IL-33(MfIL-33-6His;SEQ ID NO:305)单独 地加入抗体的连续稀释液中,使得抗体的最终浓度范围为0至100 nM。将抗体/IL-33混合物在室温下孵育1小时,之后将其转移到涂 覆hST2-hFc的微量滴定盘。在室温下孵育1小时后,然后清洗孔槽 并以缀合辣根过氧化物酶(HRP)的链霉亲和素(Thermo Scientific,Cat# N200)检测盘-结合生物素-hIL-33,并且以缀合抗-His单克隆抗体的HRP(Qiagen,#34460)检测盘-结合MfIL-33-6His。将所有的样品以 TMB溶液(BD biosciences,#51-2607KC)显影,产生比色反应并然后 以1M硫酸酸化停止反应,之后在Victor X5盘式读数器上测量450nm 处的吸收度。使用Prism™软件内的s型剂量反应模型进行数据分析。使用所计算的IC₅₀值(定义为从生物素-hIL-33或MfIL-33-6His与盘- 涂覆hST2-hFc结合的最大信号降低50%所需的抗体浓度)被用作阻断 效力的指标。阻断百分比被计算为抗体存在下所观察的信号降低相对 于单独IL-33和背景信号(来自缀合HRP的第二抗体或单独的链霉亲 和素的信号)之间的差异的比率。对恒定浓度的单独生物素-hIL-33或 MfIL-33-6His所测量的吸收度被定义为0%阻断,而无添加IL-33所 测量的吸收度被定义为100%阻断。使用对各抗体含有最高浓度的孔 槽的吸收值来测定最大阻断百分比。

[0182] 表6:通过抗-IL-33抗体对生物素-hIL-33或MfIL-33-6His与 hST2-hFc结合的ELISA阻断

[0183]

Ab ID	阻断 hST2-hFc 上 30pM 生物素 -hIL-33 IC ₅₀ (M)	hST2-hFc 上生物 素-hIL-33 的最 大阻断%	阻断 hST2-hFc 上 150pM Mf-IL-33-6His IC ₅₀ (M)	hST2-hFc 上 Mf-IL-33-6His 的 最大阻断%
H1M9559N*	1.4E-10	88	1.0E-08	53
H1M9566N*	3.2E-10	69	2.2E-10	41
H1M9565N*	2.2E-08	68	1.2E-08	86
H1M9568N*	1.9E-10	55	8.4E-10	38
H4H9629P	4.5E-10	80	N/A	NBI
H4H9633P	4.4E-10	66	N/A	NBI
H4H9640P	3.5E-10	78	3.5E-09	73
H4H9659P	4.0E-10	78	6.0E-10	92
H4H9660P	3.1E-10	57	4.2E-09	68
H4H9662P	1.0E-09	77	8.6E-10	87
H4H9663P	5.0E-10	74	1.2E-09	81
H4H9664P	3.0E-10	73	3.8E-09	67
H4H9665P	8.7E-10	55	4.2E-10	81
H4H9666P	6.0E-10	71	1.3E-08	40
H4H9667P	4.1E-10	78	4.1E-09	72
H4H9670P	4.8E-10	69	3.5E-09	69
H4H9671P	4.6E-10	46	5.8E-10	62
H4H9672P	4.4E-10	63	5.5E-09	48
H4H9675P	4.4E-10	58	1.5E-09	72
H4H9676P	4.6E-10	54	3.2E-09	57

[0184] N/A=不适用

[0185] NBI=非阻断剂

[0186] *=在单独的一天进行实验

[0187] 对20个抗体的结合实验在单独的两天进行,如表6所示。所有 20种抗-IL-33抗体都以范围从140pM至22nM的IC₅₀值阻断生物素 -hIL-33与hST2-hFc的结合,而最大阻断百分比范围从46%至88%。如表6所示,20种抗-IL-33抗体中有18种以范围从220pM至13nM 的IC₅₀值阻断MfIL-33-6His与hST2-hFc的结合,而最大阻断百分比 范围从38%至92%。两种受测试抗体H4H9629P和H4H9633P并未 显现对MfIL-33-6His与hST2-hFc结合的可测量阻断。

[0188] 实施例5.如Biacore分析所示,通过ST2对IL-33与抗-IL-33单 克隆抗体结合的抑制

[0189] 抗-IL-33抗体与IL-33和ST2的预形成复合物的结合能力是使用 配备实时表面等离子体共振生物传感器的Biacore T-200仪器来测试。实验在25℃下以由0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA 和0.05%v/v界面活性剂Tween-20 (HBS-ET) 所组成的电泳缓冲液来 进行。将Biacore传感器表面先以偶联抗-myc标签-特异性单克隆抗 体(克隆#9E10) 衍生化的胺,并且在这个衍生化传感器上俘获大约160 个反应单位(RU)的表达为具有C-端 myc-myc-六组氨酸标签的人ST2 蛋白(hST2-MMH;SEQ ID NO:323)。然后将所俘获的hST2-

MMH表面通过注射100nM的人IL-33 (hIL-33; R&D Systems, # 3625-IL-010/CF) 历时3分钟使其饱和,接着注射3分钟的100nM的抗-IL-33单克隆抗体溶液。在整个实验过程期间监测实时结合反应,并且在将抗-IL-33抗体注射至hIL-33的预形成复合物后3分钟时所观察的结合反应和所俘获的hST2-MMH记录和制表,并如表7所示。没有观察到抗-IL-33单克隆抗体与抗-myc标签俘获表面的非特异性结合。如表7中所示,受测试抗体中有17种在与hST2-MMH预复合后并未显现与hIL-33的可测量结合,而三种抗体 (H1M9565N、H1M9566N和H1M9568N) 在与hST2-MMH预复合后与hIL-33结合。

[0190] 表7:抗-IL-33抗体与hIL-33和hST2-MMH的预形成复合物的结合

[0191]

抗体	抗体结合反应 (RU)
H4H9629P	-1
H4H9633P	-1
H4H9640P	-1
H4H9659P	-1

[0192]

H4H9660P	-1
H4H9662P	0
H4H9663P	-1
H4H9664P	-1
H4H9665P	0
H4H9666P	-1
H4H9667P	-1
H4H9670P	-1
H4H9671P	-1
H4H9672P	-1
H4H9675P	-1
H4H9676P	-1
H1M9559N	-4
H1M9565N	11
H1M9566N	13
H1M9568N	131

[0193] 实施例6.通过抗-IL-33抗体对IL-33-介导的受体信号传递的抑制

[0194] 白介素-33 (IL-33) 为ST2的配体,一种与辅助蛋白IL-1RAcP相关联的tol1样/白介素-1受体超家族成员(就回顾文献,参见Kakkar和 Lee, 2008)。当ST2/IL-1RAcP被IL-33激活时,通过下游分子例如 MyD88 (髓样分化因子88) 和TRAF6 (TNF受体相关因子6) 触发信号传递级联,从而尤其导致NFκB (核因子-κB) 的激活。为了发展测试抗-IL-33抗体的生物学相关生物测定系统,将人胚胎肾细胞 (HEK293) 稳定地转染以表达人ST2 (登录号NP_057316的1-556氨基酸) 以及荧光素酶受体[NFκB反应元件 (5x)-荧光素酶-IRES-GFP] (HEK293/hST2/NFκB-荧光素酶细胞系)。HEK293细胞系内源性表达 IL-1RAcP,并且在

HEK293中通过IL-33激活NFκB已在先前证实 (Schmitz等人, Immunity 23:479-490 (2005))。将稳定的细胞系分离并维持在10%FBS、DMEM、NEAA、青霉素/链霉素和G418中。

[0195] 就生物测定来说,将HEK293/hST2/NFκB-荧光素酶细胞以每孔 10,000个细胞、以溶于含0.1%w/v FBS和OPTIMEM的低血清培养基 (Invitrogen, #31985-070) 接种在96-孔测定盘上,并且然后在37℃及 5%CO₂中孵育过夜。次日,为测定IL-33的剂量反应,将人IL-33 (hIL-33; R&D Systems, #3625-IL) 或表达为具有C-端六组氨酸标签的 食蟹猴IL-33 (MfIL-33-6His; SEQ ID NO:305) 以1:3连续稀释并由10 nM开始范围变化降至0.0002nM,并且将不含IL-33的对照样品加入细胞中。为测量抑制,将抗体连续稀释并加入细胞中,接着加入恒定浓度的IL-33 (针对人测定为10pM hIL-33, 针对猴测定为5pM MfIL-33-6His)。进行抗体的3倍连续稀释,之后加入细胞,从100pM 开始且范围变化降至0.002nM,或从10nM开始且范围变化降至 0.0002nM。除了抗体连续稀释外,还包括含有恒定浓度的IL-33但无抗体的孔槽。在37℃及5%CO₂中孵育5.5小时后,使用Victor X (Perkin Elmer) 盘式读数器检测荧光素酶活性,使用非线性回归(4-参数 逻辑)以Prism 5分析结果。结果如表8所示。

[0196] 表8:通过抗-IL33抗体对HEK293/hST2/NFκB-荧光素酶细胞的人IL-33和猴IL-33激活的抑制

[0197]

物种	人			猴		
EC ₅₀ [M]	2.2E-12	3.5E-12	2.4E-11	8.2E-13	3.5E-12	
恒定 IL-33	10pM hIL-33			5pM MfIL-33-6His		
AbPID	IC ₅₀ [M]	注解	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	注解
H1M9559N	2.0E-09				4.9E-08	
H1M9566N	9.5E-10	部分抑制(最大为 66%)			1.5E-09	部分抑制(最大为 61%)
H1M9565N	2.9E-08				1.7E-08	
H1M9568N	2.5E-10	部分抑制(最大为 48%)			3.5E-09	部分抑制(最大为 34%)
H4H9629P				1.3E-11		5.5E-08
H4H9633P			2.2E-10			1.3E-07
H4H9640P			3.0E-11			1.4E-08
H4H9659P			4.7E-11			3.3E-09
H4H9660P			3.5E-11			1.9E-08
H4H9662P				2.0E-11		1.5E-09
H4H9663P			1.3E-10			2.7E-09
H4H9664P			5.0E-11			2.6E-08
H4H9665P			9.0E-11			6.6E-10
H4H9666P			3.5E-11			7.8E-08
H4H9667P			7.1E-11			1.2E-08
H4H9670P			1.2E-10			1.7E-08
H4H9671P				2.5E-11		4.8E-09
H4H9672P			2.5E-11			2.0E-08
H4H9675P				7.5E-12		4.1E-09
H4H9676P			3.5E-11			8.4E-09

[0198] 如表8所示,20种抗-IL33抗体中有18种以范围从7.5pM至29 nM的IC₅₀值阻断HEK293/hST2/NFκB-荧光素酶细胞的人IL-33刺激。两种受测试抗体H1M9566N和H1M9568N以48%和66%的最大抑制部分地抑制hIL-33,其中IC₅₀值分别为950pM和250pM。如表8所示,20种抗-IL33抗体中有18种以范围从660pM至130nM的IC₅₀值阻断HEK293/hST2/NFκB-荧光素酶细胞的MfIL-33-6His刺激。两种受测试抗体H1M9566N和H1M9568N以61%和34%的最大抑制部分地抑制MfIL-33-6His,其中IC₅₀值分别为1.5nM和3.5nM。

[0199] 实施例7.通过抗-IL-33抗体对IL-33诱发的人嗜碱性粒细胞的脱粒作用的抑制

[0200] 为进一步评估本发明的所选抗-IL-33抗体的体外特性,测量其阻断IL-33诱发的人嗜碱性粒细胞的脱粒作用的能力。从来自两个不同人类捐赠者的新鲜全血,通过密度梯度离心纯化周边血液单核细胞(PBMC)。将K2EDTA全血以1:1在RPMI 1640中稀释,小心地在Ficoll-Paque (GE Healthcare, #17-1440-03) 上分层并离心以分离 PBMC。将含PBMC的界面层吸出,转移到新的试管,并以MACS 缓冲液清洗两次,其中所述MACS缓冲液由溶于MACS冲洗液 (Miltenyi Biotec, #130-091-222) 的1:20稀释度的MACS BSA溶液 (Miltenyi Biotec, #130-091-376) 所组成。然后将纯化的PBMC以溶于 100 μ L的MACS缓冲液的约 3.0×10^6 个细胞/mL的最终浓度涂覆于v 形底96-孔盘中。为引出包含在PBMC群体中的嗜碱性粒细胞,将1ng 的IL-3 (Sigma, #H7166-10UG) 溶于50 μ L无Ca⁺⁺或Mg⁺⁺ (DPBS) 的 Dulbecco's磷酸缓冲盐水中溶液加到细胞悬浮液中,并且然后在37 $^{\circ}$ C 下孵育10分钟。

[0201] 制造两种本发明的不同示例性抗-IL-33抗体 (H4H9675P和 H4H9659P) 或同种型对照抗体的连续稀释液 (1:3), 范围从10nM至 4.6pM, 以及无抗体的对照组。将溶液与固定浓度的100pM (最终浓度) 的人IL-33 (R&D Systems, #3625-IL/CF) 或无IL-33阴性对照组混合, 之后加入PBMC中。所有的条件进行两次平行测试。

[0202] 将人IL-33和抗体加入细胞后,将细胞在37 $^{\circ}$ C下孵育20分钟, 以促进嗜碱性粒细胞脱粒。然后将测定盘在湿冰上冷却5分钟来 停止脱粒作用。为了使嗜碱性粒细胞群体的分析能用于测量脱粒作用,将20 μ L (按照制造商说明) 抗-HLA-DR-FITC (Beckman Coulter, # IM0463U)、抗-CD123-APC (BD, #560087) 和抗-CD203c-PE (Beckman Coulter, # IM3575) 中的每一种加入各样品中,并在4 $^{\circ}$ C下将样品在黑暗中放置20分钟。然后将细胞离心,以DPBS清洗,并且然后在4 $^{\circ}$ C 下悬浮于2%甲醛 (固定缓冲液) 中。次日,在BD FACSCanto II上分析 固定的细胞,用以测定嗜碱性粒细胞脱粒的量。结果概述于表9和 10中。

[0203] 表9:通过人IL-33激发所诱发的人嗜碱性粒细胞的脱粒百分比

[0204]	捐赠者	100 pM IL-33		无 IL-33	
		平均值	SD	平均值	SD
	655687	68.800	2.263	10.295	0.856
	655688	61.600	0.849	9.915	0.969

[0205] 表10:抗-IL-33抗体阻断人IL-33诱发的人嗜碱性粒细胞的脱粒作用

[0206]	抗体	捐赠者 655687	捐赠者 655688
		IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)
	H4H9675P	1.329E-10	9.712E-11
	H4H9659P	5.786E-10	4.465E-10
	同种型对照组	无阻断	无阻断

[0207] 如表9所示,在100pM时,在两个不同捐赠者中,人IL-33诱发的嗜碱性粒细胞脱粒作用就捐赠者655687为68.8%的平均脱粒百分比,而捐赠者655688为61.6%。

[0208] 如表10所示,一种抗-IL33抗体H4H9675P就捐赠者655687是以132.9pM的IC₅₀值,而就捐赠者655688是以97.12pM的IC₅₀值 阻断由100pM人IL-33激发所诱发的嗜碱性粒细胞脱粒作用。另一 抗-IL33抗体H4H9659P就捐赠者655687是以578.6pM的IC₅₀值,而就捐赠者655688是以446.5pM的IC₅₀值阻断由100pM人IL-33 激发所诱发的嗜碱性粒细胞脱粒作用。对比来说,同种型对照组并未 阻断任何受测试捐赠者的嗜碱性粒细胞脱粒作用。

[0209] 实施例8.通过抗-IL-33抗体对人PBMC的IL-33诱发的IFN- γ 的抑制

[0210] 为进一步表征本发明的抗-IL-33抗体,利用使用周边血液单核细胞(PBMC)的以原代细胞为基础的测定。用于这个实施例的测定以 Smithgall等人在International Immunology,2008,第20(8)卷,第 1019-1030页中所公开的结果为基础。就这项分析来说,从来自三个 不同捐赠者的新鲜全血,以密度梯度离心纯化PBMC。简单来说,将 K2 EDTA全血在RPMI 1640中稀释2倍,小心地于Ficoll-Paque (GE Healthcare,#17-1440-03) 上分层并离心20分钟。将含PBMC的界面 层吸出,转移到新的试管,并以PBS缓冲液清洗两次。将分离的PBMC 以溶于添加10%FBS、2mM L-谷酰氨酸、100U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的RPMI 1640中的最终浓度 5×10^5 个细胞/mL涂覆于圆 底96-孔盘中。然后将细胞用单独10nM至0.64pM的50g/mL人IL-12 (hIL-12;R&D Svstems,#219-IL-025/CF) 和人IL-33的连续稀释液 (hIL-33;R&D Systems,#3625-IL-010/CF),或以与100nM至6.4pM 的抗体连续稀释液组合的260pM的hIL-33孵育。每孔最终体积为 200 μ L。各条件以重复进行三次平行测试。当有抗体存在时,在以 hIL-33预孵育30分钟后,将其加入细胞中。

[0211] 在37℃下将细胞在湿化孵育器中以5%CO₂孵育过夜,并且然后 以ELISA (R&D Systems,#DY285) 测量孵育上清液中IFN γ 量。就 ELISA来说,根据制造商的说明将96-孔平底盘涂覆俘获抗体。清洗 并阻断后,将100 μ L未稀释培养物上清液加入盘中并孵育2小时。按照制造商的说明进行后续的清洗和检测。

[0212] 如表11中所示,在hIL-12的存在下,人IL-33以介于274pM至 39pM的EC₅₀值诱发IFN γ 从来自三个不同受测试捐赠者的人总 PBMC的释放。使用来自捐赠者#603486和#603487的PBMC测试11 种抗-IL-33抗体,而用来自捐赠者#603491的PBMC测试3种抗-IL-33 抗体。如表12所示,在捐赠者#603486和#603487中测试的所有11 种抗-IL-33抗体以范围从175pM至22nM的IC₅₀值阻断由260pM IL-33所诱发的IFN γ 从PBMC的释放。对捐赠者#603491测试的三种 IL-33抗体均未阻断由260pM hIL-33所诱发的IFN γ 从PBMC的释放, 并且取而代之造成以介于56.1pM至189nM的EC₅₀值增加IFN γ 的 释放。

[0213] 表11:hIL-33诱发的IFN γ 从来自三个捐赠者的人PBMC的释放。

[IL-33]	捐赠者 603486	捐赠者 603487	捐赠者 603491
EC ₅₀ (M)	1.101E-10	3.878E-11	2.739E-10

[0215] 表12:抗-IL-33抗体阻断IL-33诱发的IFN- γ 从来自捐赠者#603486 和#603487的PBMC的释放

抗体	捐赠者#603486 IC ₅₀ (M)	捐赠者#603487 IC ₅₀ (M)
H4H9629P	8.154E-10	5.205E-09
H4H9640P	4.419E-09	1.224E-08
H4H9659P	1.252E-09	2.710E-09
H4H9660P	6.669E-10	2.913E-09
H4H9662P	9.640E-10	3.021E-09
H4H9663P	1.236E-08	2.203E-08
H4H9664P	3.984E-09	6.081E-09
H4H9665P	1.044E-08	2.337E-08
H4H9667P	8.066E-09	1.876E-08
H4H9671P	2.968E-09	8.622E-09
H4H9675P	1.754E-10	4.715E-10

[0217] 表13:抗-IL-33抗体阻断IL-33诱发的IFN- γ 从来自捐赠者#603491 的PBMC的释放。

[0218]	抗体	捐赠者#603491 IC ₅₀ (M)
	H1M9559N	未阻断
	H1M9566N	未阻断
	H1M9568N	未阻断

[0219] 本发明并不意图被限制于本文中所述的特定实施方案的范围中。实际上,除了本文中所述的那些实施方案外,根据前述描述和附图,本发明的各种修改对本领域技术人员为显而易见。这些修改意图落在 所附的权利要求书的范围内。

[0220] 实施例9. 使用生物膜层干涉术的人IL-33交叉竞争

[0221] 使用实时、无标记生物膜层干涉术测定在 Octet® HTX生物传感器 (ForteBio, A Division of Pall Life Sciences) 上测定一组不同的抗 -IL-33单克隆抗体之间的结合竞争。实验是在25℃下、使用0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、0.05% v/v界面活性剂 Tween-20和 0.1mg/ml BSA (HBS-ET动力学缓冲液)的缓冲液来进行,同时将盘以 1000rpm 的速度振荡下。为评估两种抗体是否能彼此竞争与人IL-33 相结合,使用预混合测定形式,其中将100nM的人IL-33 (R&D Systems; #3625-IL-010/CF) 与500nM不同的抗-IL-33单克隆抗体 (后续称为mAb-2) 预混合至少2小时,之后进行结合竞争测定。将涂覆 抗-小鼠Fc多克隆抗体 (Pall ForteBio Corp., #18-5088; 后续称为AMC) 或抗-人Fc多克隆抗体 (Pall ForteBio Corp., #18-5060; 后续称为AHC) 的Octet生物传感器先浸入含20 μ g/mL的独立抗-IL-33单克隆抗体的 孔槽中历时3分钟,用以俘获分别表达为具有小鼠Fc或人Fc的抗 -IL-33单克隆抗体 (后续称为mAb-1)。在俘获步骤之后,将生物传感器上未被占据的抗-小鼠Fc多克隆抗体和抗-人Fc多克隆抗体通过将其浸入含200 μ g/mL非特异性地单克隆抗体 (分别具有小鼠Fc或具有 人Fc) 的孔槽中历时4分钟,使其饱和。最后,将Octet生物传感器浸入含100nM的人IL-33和500nM mAb-2的预混合样品的孔槽中历时4分钟。在各周期结束时,使用3次交替的20秒浸入10mM HCl 中,接着浸入HBS-ET动力缓冲液中,将非共价俘获的抗-IL-33抗体 与结合的人IL-33和mAb-2的预复合物从生物传感器移除。在每个实验步骤之间,在HBS-ET动力缓冲液中清洗生物传感器。在结合事件 期间监测实时结合反应,并且在每个步骤结束时记录结合反应 (以nm 为单位)。在分析期间,将观察到的所有mAb-2结合事件的信号 (在交叉竞争矩阵中跨列),减去给定mAb-2 (其中mAb-1=mAb-2,即沿着 矩阵地对角线) 的自我-自我背景结合信号,并且将背景-校正的结果在 图1示出。测量了人IL-33和各个不同mAb-2样品的预复合物的 mAb-1结合的反应,用以确定不同的抗-IL-33单克隆抗体相对于彼此的竞争/非竞争行为。

[0222] 如图1所示,带有黑色字体的淡灰色框格代表自我竞争。以双向 相互竞争的抗体 (与结合的顺序无关) 以黑色框格和白色字体表示。带 有黑色字体以深灰色突显的框格代表与人IL-33微弱结合从而导致观察到单向交叉-竞争的抗-IL-33单克隆抗体。用于实验中的同种型对 照组以带有白色字体的深灰色框格表示。带有黑色字体的白色框格代表抗体之间无竞争,暗示各抗体具有明显不同的结合表位。

[0223] 实施例10. 使用生物膜层干涉术的猴IL-33交叉竞争

[0224] 使用实时、无标定生物膜层干涉术分析在 Octet® HTX 生物传感器 (ForteBio, A Division of Pall Life Sciences) 上测定一组不同的抗-IL-33 单克隆抗体之间的结合竞争。实验是在 25℃ 下、使用 0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.05% v/v 界面活性剂 Tween-20 和 0.1mg/ml BSA (HBS-ET 动力学缓冲液) 的缓冲液来进行, 同时将盘以 1000rpm 的速度振荡。为评估两种抗体是否能彼此竞争与表达为具有 C-端六组氨酸标签的重组的猴 IL-33 (MfIL-33-6His; SEQ ID: xx) 相结合, 通过将生物传感器浸入含 2μg/mL 的 MfIL-33-6His 的孔槽中历时 85 秒, 将大约 0.15nm 结合单位的 MfIL-33-6His 先俘获至涂覆抗-五-His 抗体的生物传感器 (ForteBio Inc, #18-5079) 上。然后将俘获抗原的生物传感器以第一抗-IL-33 单克隆抗体 (后续称为 mAb-1) 通过浸入含 50μg/mL mAb-1 溶液的孔槽 5 分钟使其饱和。然后将生物传感器浸入含 50μg/mL 第二抗-IL-33 单克隆抗体溶液 (后续称为 mAb-2) 的孔槽中历时 4 分钟。在每个实验步骤间, 在 HBS-ET 动力缓冲液中清洗生物传感器。在结合事件期间监测实时结合反应, 并且记录每个步骤的最大结合反应。测量 mAb-2 和与 mAb-1 预复合的 MfIL-33-6His 结合的反应, 并测定不同的抗-IL-33 单克隆抗体相对于彼此的竞争/非竞争行为。

[0225] 如图 2 所示, 带有黑色字体的淡灰色框格 (沿着对角线) 代表自我竞争 (其中 mAb-1 = mAb-2)。以双向竞争的抗体 (与结合的顺序无关) 以黑色框格和白色字体表示。带有黑色字体的白色框格代表抗体之间无竞争, 暗示各抗体具有明显不同的结合表位。带有白色字体的深灰色框格代表用于本实验的同种型对照组。

[0226] 实施例 11. 在体内模型中测试的 mAb; 急性 HDM 诱发的肺炎模型用以研究 IL-33 在肺炎中的作用

[0227] 为在相关活体模型中测定抗-IL-33 抗体 H4H9675P 的影响, 在小鼠中进行急性 HDM 诱发的肺炎研究, 其中小鼠为对人 IL-33 而非小鼠 IL-33 (IL-33HumIn 小鼠) 的表达为纯合的。

[0228] 对 IL-33HumIn 小鼠鼻内施用在 20μL 的 1X 磷酸缓冲盐水 (PBS) (n=17) 或 20μL 的 1X PBS (n=3) 中稀释的 50μg 的居室尘螨提取物 (HDM; Greer, #XPB70D3A2.5), 每周 5 天历时 2 周。由第一次 HDM 施用的 3 天前开始, 将 HDM 激发的小鼠子组皮下注射 25mg/kg 的抗-IL-33 抗体 H4H9675 (n=6) 或同种型对照抗体 (n=6), 然后每周一次, 直到 HDM 激发结束。在第一次鼻内施用 HDM 后的 15 天, 将所有的小鼠进行安乐死并收取它们的肺。用于各组小鼠的实验给药与治疗方案在表 14 中示出。

[0229] 表 14: 各组小鼠的实验给药与治疗方案

组别	小鼠	鼻内激发	鼻内激发的时间	抗体
1	IL-33 HumIn 小鼠	1X PBS	2 周	无
2	IL-33 HumIn 小鼠	50μg HDM 溶于 20μL 1X PBS	2 周	无
3	IL-33 HumIn 小鼠	50μg HDM 溶于 20μL 1X PBS	2 周	同种型对照
4	IL-33 HumIn 小鼠	50μg HDM 溶于 20μL 1X PBS	2 周	抗-IL-33 抗体 (H4H9675)

[0231] 收取肺供细胞因子分析:

[0232] 放血后, 将右肺的前叶和中叶从小鼠中移除并放入含有添加 1X Halt 蛋白酶抑制

剂混合液 (Pierce, #78430) 的组织蛋白提取试剂 (1X T-PER试剂; Pierce, #78510) 溶液的试管中。所有其它步骤是在冰上进行。针对各样品调整T-PER试剂 (含有蛋白酶抑制剂混合液) 的量以符合1:8 (w/v) 组织与T-PER比率。使用一次性研杵 (Kimble Chase, # 749625-0010) 在试管中将肺样品手动地均质化。将产生的裂解物离心成团块碎片。将含有可溶性蛋白提取物的上清液转移到新的试管并在 4℃下储存, 直到进一步分析。

[0233] 使用Bradford测定测量肺蛋白提取物中的总蛋白含量。就测定来说, 将10μL稀释的提取物样品在两次平行测试中涂覆于96孔盘中并与200μL的1X染料试剂 (Biorad, #500-0006) 混合。使用牛血清白蛋白 (Sigma, #A7979) 的连续稀释液, 由700μg/mL溶于1X T-Per试剂的溶液开始, 作为标准测量提取物的提取蛋白浓度。在室温下孵育5分钟后, 在Molecular Devices SpectraMax M5盘式读数器上测量在595nm处的吸收度。使用GraphPad Prism™软件进行测定总蛋白含量的数据分析。

[0234] 肺蛋白提取物中的细胞因子浓度使用促炎性盘板1 (Proinflammatory Panel 1) (小鼠) 多重免疫测定试剂盒 (MesoScale Discovery, #K15048D-2), 根据制造商说明来测量。简单来说, 将50 μL/孔的校准液和样品 (以稀释剂41稀释) 加入预先涂覆俘获抗体的盘中并在室温下同时以700rpm振荡下孵育2小时。然后以含0.05% (w/v) Tween-20的1X PBS将盘清洗3次, 接着加入以稀释剂45稀释的25 μL的检测抗体溶液。在振荡和室温下再孵育2小时后, 将盘清洗3次, 并于各孔槽中加入150μL的2X读取缓冲液 (Read Buffer)。立即在MSD SPECTOR®仪器上读取电化学发光。使用GraphPad Prism™软件进行数据分析。

[0235] 将来自各组所有小鼠的肺总蛋白提取物中的各细胞因子浓度标准化成通过Bradford测定所测量的提取物的总蛋白含量, 并且表示各组每mg总肺蛋白的细胞因子的平均pg (pg/mg肺蛋白, ±SD) 在表15中示出。

[0236] 收取肺供细胞因子分析:

[0237] 在接受HDM 2周的IL-33HumIn小鼠肺中释放的细胞因子IL-4和IL-5的量明显地高于以盐水缓冲液激发的IL-33HumIn小鼠中的量。对比来说, 与施用HDM而无治疗或用同种型对照物治疗的IL-33 HumIn小鼠相比, 在急性HDM激发期间用抗-IL-33抗体治疗的IL-33 HumIn小鼠肺中, 存在IL-4和IL-5量减低的趋势。

[0238] 表15: 肺蛋白提取物中的细胞因子浓度

[0239]	实验组别	肺蛋白提取物中的平均 [IL-4](pg/mg 肺蛋白)(±SD)	肺蛋白提取物中的平均 [IL-5](pg/mg 肺蛋白)(±SD)
	1. 1X PBS 激发(n=3)	0.01 (±0.01)	0.03 (±0.01)
	2. HDM 激发 (n=5)	1.77 (±1.63) *	4.72 (±4.14)**
	3. HDM 激发+同种型对照 抗体(n=6)	0.79 (±0.52)*	2.03 (±1.05)*
	4. HDM 激发+ H4H9675P (n=6)	0.30 (±0.18)	0.81 (±0.67)

[0240] 注意: 指示通过Kruskal-Wallis单因子ANOVA、以邓恩 (Dunn's) 多重比较法事后试验所测定的统计上显著性 (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, 与第1组相比: IL33HumIn小鼠, 盐水激发)。

[0241] 收取肺供肺细胞浸润分析

[0242] 放血后, 将右肺尾叶从各小鼠中移除, 切成约2至3mm大小的方块, 并且然后放入

含有以Hank平衡盐溶液(HBSS)(Gibco,#14025) 稀释的20 μ g/mL DNA酶(Roche,#10104159001)和0.7U/mL释放酶 TH(Roche,#05401151001)溶液的试管中,将其在37℃下水浴中孵育 20分钟并每5分钟进行涡旋。以10mM的最终浓度加入乙二胺四乙酸(Gibco,#15575) 停止反应。随后使用gentleMACS dissociator[®](Milt enyi Biotec,#130-095-937) 解离各肺,然后通过70 μ m过滤器过滤并 离心。将所得肺团块悬浮于1mL的1X红血球裂解缓冲液(Sigma,# R7757)中,以移除红血球细胞。在室温下孵育3分钟后,加入3mL 的1X DMEM以解除红血球细胞裂解缓冲液。然后将细胞悬浮液离 心,并将所得细胞团块悬浮于5mL的MACS缓冲液(autoMACS电泳缓冲液:Miltenyi Biotec,#130-091-221)。将悬浮的样品通过70 μ m过滤器过滤并以每孔 1×10^6 个细胞涂覆于V形底96-孔盘中。然后将细胞离心并以1X PBS清洗团块。第二次离心后,将细胞团块悬浮 于以1:1000在1X PBS中稀释的100 μ L的LIVE/DEAD[®] Fixable Aqua Dead Cell Stain(Life Technologies,#L34957),用以测定细胞存 活力并在室温下同时避光孵育20分钟。以1X PBS清洗1次后,将 细胞以含有10 μ g/mL纯化的大鼠-抗-小鼠CD16/CD32 Fc Block(克 隆:2.4G2:BD Biosciences,#553142)的MACS缓冲液溶液在4℃下 孵育10分钟。将细胞清洗1次并且然后以MACS缓冲液稀释的适当的抗体混合物(描述在表16中),在4℃下同时避光孵育30分钟。抗 体孵育后,将细胞以MACS缓冲液清洗2次,再悬浮于BD cytofix (BD Biosciences,#554655),并且然后在4℃下同时避光孵育15分钟。随后清洗细胞,在悬浮于MACS缓冲液中,并且然后转移于BD FA CS 试管(BD Biosciences,#352235)以流式细胞术进行嗜碱性粒细胞、第2型先天性淋巴细胞(ILC2)和淋巴细胞的分析。

[0243] 激活的CD4⁺ T细胞定义为活的、CD45⁺、SSC^{Lo}、FSC^{Lo}、CD3⁺、CD19⁻、CD4⁺、CD8⁻和CD69⁺的细胞。激活的B细胞定义为活的、CD45⁺、SSC^{Lo}、FSC^{Lo}、CD3⁻、CD19⁺和CD69⁺的细胞。嗜碱性粒细胞定义为活的、CD45⁺、GR1⁻、CD11c^{Lo}、SiglecF^{hi}的细胞。ILC2细胞系定义为活的、CD45⁺、谱系-(谱系:CD19、CD3、CD11b、CD11c、F4/80)、CD127⁺、Sca-1⁺、ST2⁺。激活的CD4细胞的数据以母群体(CD4, \pm SD)中激活细胞(CD69⁺)的出现率表示,在表17中示出。

[0244] 表16:用于流式细胞术分析的抗体

[0245]

抗体	荧光染料	制造商	目录号	最终稀释度
CD11c	APC	BD Biosciences	550261	1/100
CD45	PerCP Cy5.5	eBiosciences	45-0454-82	1/800
F4/80	太平洋蓝	eBiosciences	48-4801-82	1/200

[0246]

抗体	荧光染料	制造商	目录号	最终稀释度
Siglec-F	PE	BD Biosciences	552126	1/100
Ly6G (Gr-1)	APC-eFluor780	eBiosciences	47-5931-82	1/200
CD3	PE-Cy7	BD Biosciences	552774	1/200
CD19	eFluor 450	eBiosciences	48-0193-82	1/200
CD4	APC-H7	BD Biosciences	560181	1/200
CD8	APC	eBiosciences	17-0081-82	1/200

CD69	PE	eBiosciences	12-0691-82	1/200
CD3	eFluor 450	eBiosciences	48-0031-82	1/200
CD11b	eFluor450	eBiosciences	40-0112-82	1/100
CD11c	eFluor450	eBiosciences	48-0114-82	1/100
CD127	APC-eFluor780	eBiosciences	47-1271-82	1/200
Sca-1	FITC	BD Biosciences	557405	1/200
ST2	APC	Biolegend	145306	1/200

[0247] 肺细胞浸润分析:

[0248] 如表17所示,在接受HDM 2周的IL-33 HumIn小鼠肺中,激活的CD4⁺T细胞、嗜碱性粒细胞和ILC2的出现率显著高于以1X PBS 对照物激发的IL-33 HumIn小鼠。对比来说,与施用HDM而无治疗 或用同种型对照物治疗的IL-33 HumIn小鼠相比,在急性HDM激发 期间用抗-IL-33抗体治疗的IL-33 HumIn小鼠中观察到这些浸润的出现率趋向降低。

[0249] 与以1X PBS对照物激发的IL-33 HumIn小鼠相比,在用HDM 激发2周的IL-33 HumIn小鼠肺中观察到激活B细胞的出现率趋向增加。与施用HDM而无治疗或用同种型对照物治疗的IL-33 HumIn小鼠,因抗-IL-33抗体治疗,在用HDM激发的IL-33 HumIn小鼠肺中观察到肺激活B细胞的出现率显著降低。

[0250] 表17:通过流式细胞术测定的肺细胞浸润的出现率

实验组别	CD4 ⁺ 群体中激活的 CD4 ⁺ T 细胞的平均出现频率(±SD)	B 细胞群体中激活的 B 细胞的平均出现频率(±SD)	CD45 ⁺ 群体中嗜碱性粒细胞的平均出现频率(±SD)	淋巴细胞群体中 ILC2 的平均出现频率(±SD)
1. 1X PBS 激发(n=3)	6.17 (±0.59)	6.85 (±3.09)	2.55 (±0.79)	0.33 (±0.05)
2. HDM 激发(n=5)	29.52(±8.57)*	10.13(±3.30)	17.28 (±3.97)*	1.15 (±0.37)*
3. HDM 激发+同种型对照抗体(n=6)	29.68(±9.84)*	11.01(±2.31)	19.19(±11.55)*	1.57 (±0.78)*
4. HDM 激发+H4H9675P (n=6)	16.38 (±3.30)	4.88 (±1.70) [†]	10.32 (±4.63)	0.53 (±0.12)

[0252] 注意:指示通过Kruskal-Wallis单因子ANOVA以邓恩(Dunn's)多重比较法事后试验所测定的统计上显著性(*=p<0.05,**=p<0.01,与第1组相比:IL33HumIn小鼠,盐水激发;[†]p<0.05,与第3组:IL33HumIn小鼠相比,HDM激发2周+同种型对照抗体)。

[0253] 实施例12:在体内模型中测试的mAb;慢性HDM诱发的纤维化和严重肺炎模型用以研究IL-33在肺炎中的作用

[0254] 为在相关体内模型中测定抗-IL-33抗体H4H9675P的影响,在小鼠中进行慢性HDM诱发的纤维化和严重肺炎研究,其中小鼠为对人IL-33而非小鼠IL-33(IL-33HumIn小鼠)的表达为纯合的。

[0255] 对IL-33HumIn小鼠鼻内施用在20μL的1X磷酸缓冲盐水(PBS)或20μL的1X PBS中稀释的50μg的居室尘螨提取物(HDM;Greer, #XPB70D3A2.5),每周5天共计12周。将第二对照组的IL33HumIn小鼠施用在20μL的1X PBS中稀释的50μg的HDM提取物,每周5天共计4周,以评估在开始抗体治疗时疾病的严重度。在HDM激发4周后,开始将两组HDM激发的小鼠皮下注射25mg/kg的抗-IL-33抗体H4H9675P或同种型对照抗体,并且然后每周两次,直到HDM激发结束(8周抗体治疗)。在研究的第85天,将所有的小鼠进行安乐死并收取其肺。针

对各组小鼠的实验给药与治疗方案在表18中示出。

[0256] 表18:各组小鼠的实验给药与治疗方案

[0257]

组别	小鼠	鼻内激发	鼻内激发的时间	抗体
1	IL-33 HumIn 小鼠	1X PBS	12 周	无
2	IL-33 HumIn 小鼠	50µg HDM 溶于 20µL 1X PBS	4 周	无
3	IL-33 HumIn 小鼠	50µg HDM 溶于 20µL 1X PBS	12 周	无
4	IL-33 HumIn 小鼠	50µg HDM 溶于 20µL 1X PBS	12 周	同种型对照抗体
5	IL-33 HumIn 小鼠	50µg HDM 溶于 20µL 1X PBS	12 周	抗-IL-33 抗体 (H4H9675P)

[0258] 收取肺供细胞因子分析:

[0259] 放血后,将右肺的前叶和中叶从各小鼠中移除并放入含有添加 1X Halt蛋白酶抑制剂混合液(Pierce,#78430)的组织蛋白提取试剂(1X T-PER试剂;Pierce,#78510)溶液的试管中。所有其它步骤是在冰上 进行。针对各样品调整T-PER试剂(含有蛋白酶抑制剂混合液)的量以 符合1:8(w/v)组织与T-PER比率。使用一次性研杵(Kimble Chase,# 749625-0010)在试管中将肺样品手动地均质化。将产生的裂解物离心 成团块碎片。将含有可溶性蛋白提取物的上清液转移到新的试管并在 4℃下储存,直到进一步分析。

[0260] 使用Bradford测定测量肺蛋白提取物中的总蛋白含量。就测定来 说,将10µL稀释的提取物样品在两次平行测试中涂覆于96孔盘中 并与200µL的1X染料试剂(Biorad,#500-0006)混合。使用牛血清白 蛋白(BSA;Sigma,#A7979)的连续稀释液,由700µg/mL溶于1X T-Per 试剂的溶液开始,作为标准测量提取物的蛋白浓度。在室温下孵育5 分钟后,在Molecular Devices SpectraMax M5盘式读数器上以595nm 测量吸收度。使用GraphPad Prism™软件进行以BSA标准为基础测 定总肺提取蛋白含量的数据分析。

[0261] 肺蛋白提取物中的细胞因子浓度使用促炎性盘1(小鼠)多重免疫 测定试剂盒(MesoScale Discovery,#K15048D-2),根据制造商说明来 测量。简单来说,将50µL/孔的校准液和样品(以稀释剂41稀释)加入 预先涂覆俘获抗体的盘中并在室温下同时以700rpm振荡下孵育2小 时。然后以含0.05% (w/v) Tween-20的1X PBS将盘清洗3次,接着 加入以稀释剂45稀释的25µL的检测抗体溶液。在室温下同时振荡 下再孵育2小时后,将盘清洗3次,并在各孔槽中加入150µL的2X 读取缓冲液。立即于在MSD Sceptor®仪器上读取电化学发光。使 用 GraphPadPrism软件进行数据分析。

[0262] 将来自各组所有小鼠的肺总蛋白提取物中的各细胞因子浓度标 准化成通过Bradford测定所测量的提取物的总蛋白含量,并且表示各 组每mg总肺蛋白的细胞因子的平均pg (pg/mg肺蛋白,±SD)在表19 中示出。

[0263] 表19:肺蛋白提取物中的细胞因子浓度

[0264]	实验组别	肺蛋白提取物中的平均 [IL-4](pg/mg 肺蛋白)(±SD)	肺蛋白提取物中的平均 [IL-5] (pg/mg 肺蛋白)(±SD)
	1. 1X PBS 激发, 12 周(n=5)	0.03 (±0.01)	0.08 (±0.05)
	2. HDM 激发, 4 周 (n=6)	2.84 (±2.22) *	4.44 (±4.00) **
	3. HDM 激发, 12 周 (n=3)	7.31 (±3.94) **	6.23 (±3.81) *
	4. HDM 激发, 12 周+同种型 对照抗体(n=2)	2.28 (±1.94)	3.39 (±3.29)
	5. HDM 激发, 12 周+ H4H9675P (n=5)	0.38 (±0.21)	0.48 (±0.17)

[0265] 注意:指示通过Kruskal-Wallis单因子ANOVA以邓恩(Dunn's)多重比较法事后试验所测定的统计上显著性(*=p<0.05,**=p<0.01,与第1组相比:IL33HumIn小鼠,盐水激发)。

[0266] 肺细胞因子分析:

[0267] 在接受HDM 4周和12周的IL-33HumIn小鼠肺中释放的细胞因子IL-4和IL-5的量明显地高于以1X PBS激发的IL-33HumIn小鼠。对比来说,与施用HDM而无治疗或用同种型对照物治疗的IL-33 HumIn小鼠相比,在慢性HDM激发期间用抗-IL-33抗体治疗的IL-33 HumIn小鼠肺中,存在IL-4和IL-5量减低的趋势。

序列表

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> 抗-IL-33抗体及其用途

<130> 1850-W0

<140> TBA

<141>

<150> 61/778,687

<151> 2013-03-13

<150> 61/819,018

<151> 2013-05-03

<160> 323

<170> FastSEQ, 用于Windows的4.0版

<210> 1

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 1

```
caggtagcagc tggtaggagc tgggggagc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccctcagt agttatggca tgcatgggt cgcagagct 120
ccaggcaagg ggcctggagt ggtggcagtt atatggtatg atggaagaaa taaatactat 180
acagactcgg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
ctgcaaatgg acagcctgag agccgaggac acgctgtgt attactgtgc gagagagagg 300
tatatcagca gctattatgg ggggttcgac cctggggccc agggagccct ggtcaccgtc 360
tctca
```

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 2

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20      25      30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35      40      45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Thr 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 Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Arg Glu Arg Tyr Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Asp Pro Trp
100      105      110
Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
115      120
```

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 3

ggattcacct tcagtagtta tggc

24

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1 5

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 5

atatggtatg atggaagaaa taaa

24

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

[0001]

[0002]

<400> 6
 Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys
 1 5

<210> 7
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 7
 gcgagagaga ggtatatcag cagctattat ggggggttcg accccc 45

<210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 8
 Ala Arg Glu Arg Tyr Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Asp Pro
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 9
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc ggtattagt agttggttag cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaagcccc ctaaggctct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagttggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccattcac ttctggccct 300
 gggaccacaac tggatatcaa g 321

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 10
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val 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
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
 100 105

<210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 11
 cagggtatta gtagttgg 18

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 12
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 13
 gctgcatcc 9

<210> 14
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 14
Ala Ala Ser
1

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 15
caacaggcta acagtttccc attcact 27

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 16
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 17
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 17
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagac ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagc agctatgccg tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attagtggta gtggaagtag cacagactac 180
cgagactcgg tgaagggccg gtccaccatt tccagagaca attccaggga cagctgcat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaacgttc 300
tactactctt acggttttga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctctca 357

<210> 18
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

[0003] <220>
<223> 合成
<400> 18
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Asp 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
Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asp Thr Leu His
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Thr Phe Tyr Tyr Phe Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 19
ggattcacct tcagcagcta tgcc 24

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 20
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 21

attagtggta gtggaagtag caca 24

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 22
Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr
1 5

<210> 23
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 23
gcgaaaacgt tctactactt ctacggttg gacgtc 36

<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 24
Ala Lys Thr Phe Tyr Tyr Phe Tyr Gly Leu Asp Val
1 5 10

<210> 25
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 25
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat cttaaagaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtc gggcattagc aattatttag cctggatca gcagaaacca 120
gggaaagtgc ctaaggtcct aatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cgtttcagtg gcagtggtac tgggacagtt ttcactctca ccatcagcag cctgcagact 240
gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaag tatagcagtg cccattcac ttctggccct 300
gggaccaaaag tggatatcaa a 321

<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 26
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Arg
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Thr
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 27
cagggcatta gcaattat 18

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 28
Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

[0005]	<220> <223> 合成	
	<400> 29 gctgcatcc	9
	<210> 30 <211> 3 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 30 Ala Ala Ser 1	
	<210> 31 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 31 caaaagtata gcagtgcctc attcact	27
	<210> 32 <211> 9 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 32 Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Phe Thr 1 5	
	<210> 33 <211> 351 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 33 cagggtcttc tggtagctc tggggctgag gtgaagaagc ctggggccac agtgaagtc 60 tcctgcaagg ctcttgatc cactttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120 cctggacaag ggcttgagt gatggatgg atcaacccta acaatgggtg cacaactat 180 gcacagaagt ttccaggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240 atggaatga gcaggctgag atctgacgac accgccgtat attactgtgc gagagagtg 300 cgtataact ggaagtctg gggccaggga accctgtga ccgtctctc a 351	
	<210> 34 <211> 117 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 34 Gln Val Leu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15 Thr Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Thr Phe Thr Gly Tyr 20 25 30 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met 35 40 45 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe 50 55 60 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95 Ala Arg Glu Leu Arg Tyr Asn Trp Lys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu 100 105 110 Val Thr Val Ser Ser 115	
	<210> 35 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 35 ggatccactt tcaccggcta ctat	24
	<210> 36 <211> 8 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 36 Gly Ser Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr 1 5	

[0006]

<210> 37
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 37
atcaacccta acaatggtgg caca 24

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 38
Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr
1 5

<210> 39
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 39
gcgagagagt tgcggtataa ctggaagtcc 30

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 40
Ala Arg Glu Leu Arg Tyr Asn Trp Lys Ser
1 5 10

<210> 41
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 41
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccaggsga aagagtcacc 60
ctctctctgca gggccagtcg gagtggtggc aggcctact tagcctgta ccaacagata 120
cctggccagg ctccagagct cctcatctat ggtgcatcca gcaggccac tgacatccca 180
gacaggttca gtggcaatgg gttcgggaca gacttcactc tcaccatcag tagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtaigata attcccctta tacttttggc 300
caggggacca ggctggagat caaa 324

<210> 42
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 42
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Arg Pro
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Asp Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Asn Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Ser Pro
85 90 95
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 43
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 43
cagagtgttg gcaggcccta c 21

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

	<400> 44 Gln Ser Val Gly Arg Pro Tyr 1 5	
	<210> 45 <211> 9 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 45 ggtgcatcc	9
	<210> 46 <211> 3 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 46 Gly Ala Ser 1	
	<210> 47 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 47 cagcagtatg ataattcccc ttatact	27
	<210> 48 <211> 9 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 48 Gln Gln Tyr Asp Asn Ser Pro Tyr Thr 1 5	
[0007]	<210> 49 <211> 366 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 49 gaggtgcagc tsgtggagtc tssgggagcc ttggtacaac ctggggggtc cctgagactc 60 tccttgtagcag cctctggatt cacccttaga agctttgccg tgagctgggt ccgccagct 120 ccagggaagg ggcctggaatt ggtctcagat ctccaggacta gtgggtgtag tacatactac 180 gcagactccg tgaaggccg gctcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240 ctgcgaatga acagcctgag agcccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagccac 300 tatagcacca gctggttcgg gggctttgac tactggggcc aggaaccct ggtcactgtc 360 tcctca 366	
	<210> 50 <211> 122 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 50 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe 20 25 30 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val 35 40 45 Ser Asp Leu Arg Thr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val 50 55 60 Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95 Ala Lys Ser His Tyr Ser Thr Ser Trp Phe Gly Gly Phe Asp Tyr Trp 100 105 110 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115 120	
	<210> 51 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 51 ggattcacct ttagaagctt tgcc	24
	<210> 52	

[0008]

<211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成

 <400> 52
 Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Ala
 1 5

 <210> 53
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成

 <400> 53
 ctcaggacta gtggtgtag taca 24

 <210> 54
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成

 <400> 54
 Leu Arg Thr Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

 <210> 55
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成

 <400> 55
 gcgaaaagcc actatagcac cagctgggtc gggggctttg actac 45

 <210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成

 <400> 56
 Ala Lys Ser His Tyr Ser Thr Ser Trp Phe Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

 <210> 57
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成

 <400> 57
 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgctt ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgte gggcgagtc gggtttttag agctggttag cctggatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctect gatctatgct gcatccagtt tgcaaatgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcaccaa cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctctcac ttctggcgga 300
 gggaccaagg tgagatcaa a 321

 <210> 58
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成

 <400> 58
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Phe Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

 <210> 59
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成

[0009]

<400> 59
cagggtttta gcagctgg 18

<210> 60
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 60
Gln Gly Phe Ser Ser Trp
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 61
gctgcatcc 9

<210> 62
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 62
Ala Ala Ser
1

<210> 63
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 63
caacaggeta acagtttccc tctcact 27

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 64
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 65
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 65
gaggtgcagc tggtagagtc tgggggagcc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cccttggtatt cagcttttagc agctatgtca tgagctgggt ccgccaggtc 120
ccagggaagg ggcctggagtg ggtctcaagt attagtgtga atggtgtgag cacaactac 180
gcagactccg tgaaggcccg gtccaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgttt 240
ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaatcactg 300
ggaactacca cgactttttt ggggtttgac tattggggcc aggaaccct ggtcaccgtc 360
tcttca 366

<210> 66
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 66
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
Val Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Asn Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ser Leu Gly Thr Thr Thr Thr Phe Leu Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67

[0010]

<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 67
ggattcacgt ttagcagcta tgtc 24

<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 68
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val
1 5

<210> 69
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 69
attagtgga atggtagtag caca 24

<210> 70
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 70
Ile Ser Gly Asn Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 71
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 71
gcgaatcac tgggaactac cagactttt ttgggttg actat 45

<210> 72
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 72
Ala Lys Ser Leu Gly Thr Thr Thr Thr Phe Leu Gly Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 73
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 73
gacatccaga tgaccagtc tccatcttc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc ggtattagc agctggtag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaactcct gatctatgct gcattccagt tgcaaatgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtgatc tgggacatat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagt tccctctcac ttctggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 74
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 74
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 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 Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0011]

100 105

<210> 75
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 75
cagggtatta gcagctgg 18

<210> 76
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 76
Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 77
gctgcatcc 9

<210> 78
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 78
Ala Ala Ser
1

<210> 79
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 79
caacaggeta acagtttccc tctcact 27

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 80
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 81
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 81
cagggtcagc tgcaggagtc gggcccagga ctgggaagc ctctggagac cctgtccctc 60
accigcaactg tctctggtag ctccatcagt agttattact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtt gattgggtat atttattaca gtgggagcac caattataac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatct gtagacacgt ccaagaacca cttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtatatt actgtgcgag atcccagtat 300
accagtagtt ggtacggttc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
tca 363

<210> 82
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 82
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

[0012]

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ser Gln Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Ser Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 83
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 83
ggtaggtcca tcagtagtta ttac 24

<210> 84
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 84
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 85
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 85
atttattaca gtggagcac c 21

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 86
Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 87
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 87
gcgagatccc agtataccag tagttggtac ggttcttttg atatac 45

<210> 88
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 88
Ala Arg Ser Gln Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Ser Phe Asp Ile
1 5 10 15

<210> 89
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 89
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtcg gggtattagc acctggttag cctggtttca gcagaaacca 120
gggaagccgc ctaagctctc gatctatgct gcattccactt tacaaggtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggccagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccgtggac gttcgccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 90
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 90
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

<210> 91
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 91
cagggtatta gcacctgg 18

<210> 92
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 92
Gln Gly Ile Ser Thr Trp
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 93
gctgcatcc 9

<210> 94
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

[0013]

<220>
<223> 合成

<400> 94
Ala Ala Ser
1

<210> 95
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 95
caacaggcta acagtttccc gtggacg 27

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 96
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 97
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 97
caggttcagc tgggtcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagtc 60
tcctgcaagg cctctgggta cacccttaac agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagctccc acaatggtaa cagtcactat 180
gtacagaagt tccagggcag agtctccatg accacagaca catccacgag tacagcctac 240
atggaactga ggagccttag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagacactcg 300
tataaccacca gctggtacgg gsgttttgac tatitggggcc agggaaacct ggtcaccgtc 360
tcctca 366

<210> 98
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0014]

<223> 合成
 <400> 98
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Ser His Asn Gly Asn Ser His Tyr Val Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Ser Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Ser Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 99
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 99
 ggttacacct ttaacagcta tggt 24

<210> 100
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 100
 Gly Tyr Thr Phe Asn Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 101
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 101
 atcagctccc acaatggtaa cagt 24

<210> 102
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 102
 Ile Ser Ser His Asn Gly Asn Ser
 1 5

<210> 103
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 103
 gcgagacact cgtataccac cagctggtag gggggttttg actat 45

<210> 104
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 104
 Ala Arg His Ser Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 105
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 105
 gacatccaga tgaccacagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca ggggttttagc agctggttag cctggatatca gcagaaacca 120
 gggaagccc ctcagctect gatctatgct gcatccagtt tgcaaaagtg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggtcagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctctcac ttctggcgga 300
 gggaccaagg tgagatcaa a 321

[0015]

<210> 106
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 106
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Phe Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 107
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 107
cagggtttta gcagctgg 18

<210> 108
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 108
Gln Gly Phe Ser Ser Trp
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 109
gctgcatcc 9

<210> 110
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 110
Ala Ala Ser
1

<210> 111
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 111
caacaggcta acagtttccc tctcact 27

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 112
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 113
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 113
gaggtgcagc tgggtggagtc cgggggaggc ttggttcagc cgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggaat caccttgagc agctatggca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gactggagtg ggtgcatcc atttttgcta gtggtggtgg cccatactac 180

gcagactcgg tgaaggccg gttcaccatg tccagagaca attccaagaa cacgtgtat 240
ttgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggcgtat attattgtgc gaaagatcga 300
tacagtggga gctactacgg aggttttgac tactggggcc ggggaacctt ggtcaccgtc 360
tcctca 366

<210> 114
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 114
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 Ile Thr Leu Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Phe Gly Ser Gly Gly Gly Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Met 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 Lys Asp Arg Tyr Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 115
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 115
ggaatcacct tgagcagcta tggc 24

<210> 116
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 116
Gly Ile Thr Leu Ser Ser Tyr Gly
1 5

[0016]

<210> 117
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 117
atttttggtg gtggtggtgg ccca 24

<210> 118
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 118
Ile Phe Gly Ser Gly Gly Gly Pro
1 5

<210> 119
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 119
gcgaagatgc gatacagtgg gagctactac ggaggttttg actac 45

<210> 120
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 120
Ala Lys Asp Arg Tyr Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 121
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 121
gacatccaga tgaccacgac tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagatgcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc ggggtattacc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaagccc ctacactect gatctatgct gcacccagtt tgcaaacctgg ggteccatca 180
aggttcagcg gcagtgagtc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaacattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctectac ttctggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 122
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 122
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Thr Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Thr Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu His Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 123
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 123
cagggtatta ccagctgg 18

<210> 124
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

[0017] <220>
<223> 合成

<400> 124
Gln Gly Ile Thr Ser Trp
1 5

<210> 125
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 125
gtgcatcc 9

<210> 126
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 126
Ala Ala Ser
1

<210> 127
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 127
caacaggeta acagtttccc tectact 27

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 128
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 129

[0018]

<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 129
gaggtgcagc tggtagagtc tgggggagcc ttggtacagc ctggggggtc cctaagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccctttagc agttatgcct tgacctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggcctggagtg ggtctctttt attagtggta gtggtgtag gccattctac 180
gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa catctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccatat attactgtgc gaagtcctg 300
tataaccacca gctggtacgg ggggttcgac tctggggccc agggaaacct ggtcaccgtc 360
tcctca

<210> 130
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 130
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Leu Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Phe Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ser Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 131
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 131
ggattcacct ttagcagtta tgcc 24

<210> 132
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 132
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 133
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 133
attagtggta gtggtgtag gcca 24

<210> 134
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 134
Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Pro
1 5

<210> 135
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 135
gcgaagtccc tgtataccac cagctggtag ggggggttcg actcc 45

<210> 136
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 136
Ala Lys Ser Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ser
1 5 10 15

<210> 137
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 137
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca ggggtctgtc agctggtag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaatgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ttgtcaacag tctaacagtt tccctttcac tctggccct 300
gggaccaag tggatatcaa a 321

<210> 138
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 138
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Val Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Phe Pro Phe
85 90 95
Thr Leu Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 139
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

[0019] <400> 139
caggggtgctg tcagctgg 18

<210> 140
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 140
Gln Gly Val Val Ser Trp
1 5

<210> 141
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 141
gctgcatcc 9

<210> 142
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 142
Ala Ala Ser
1

<210> 143
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 143
caacagtcta acagtttccc ttic 24

<210> 144
<211> 8
<212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 144
 Gln Gln Ser Asn Ser Phe Pro Phe
 1 5

 <210> 145
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 145
 caggtgcagc tgggtgcagc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagtc 60
 tcttgcgaag cttctggata caccctcacc ggccactata tgtactggat gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180
 gcacagaagt ttcaggacag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaggagaa 300
 tatggcagta gctggtacgg ggggtttgag tactggggcc aggaaccct ggtcaccgtc 360
 tctcca
 <210> 146
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 146
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly His
 20 25 30
 Tyr Met Tyr Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Arg Tyr Gly Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Glu Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 [0020]
 <210> 147
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 147
 ggatacacct tcaccggcca ctat 24
 <210> 148
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 148
 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly His Tyr
 1 5

 <210> 149
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 149
 atcaacccta acagtgggtg caca 24
 <210> 150
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 150
 Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
 1 5

 <210> 151
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成

<400> 151
gcgagagggga gatatggcag tagctggtag ggggggtttg agtac 45

<210> 152
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 152
Ala Arg Gly Arg Tyr Gly Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Glu Tyr
1 5 10 15

<210> 153
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 153
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgttgaga cagagtcacc 60
atcaattgtc gggcgagtca gggtattacc agctggtag cctggtagc gcagaaacca 120
gggaagccc ctaacctctc gatctatgct gcagccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacggat ttcaactctc ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagacttta caacttacta ttgtcaacag gcttacagtc tccctctcac ttctggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 154
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 154
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Thr Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ala 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 Thr Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Ser Leu Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

[0021]

<210> 155
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 155
cagggtatta ccagctgg 18

<210> 156
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 156
Gln Gly Ile Thr Ser Trp
1 5

<210> 157
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 157
gctgcagcc 9

<210> 158
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 158
Ala Ala Ala
1

<210> 159
<211> 27
<212> DNA

[0022]

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 159
caacaggett acagtctccc tctcact 27

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 160
Gln Gln Ala Tyr Ser Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 161
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 161
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggagtc cctgagactc 60
tctgtgcagc cctctggatt cacttccagt agctatggct tgcactgggt ccgccagtct 120
ccaggcaagg ggcctgggaatg ggtggcactt atatcatatg acggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaaggccgc attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag acctgaggac acggctggat atttctgtgc gaaatcccta 300
tatacaacca gctgtacgg gggctttgac tattggggcc agggaacctt ggtcaccgtc 360
tcttca 366

<210> 162
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 162
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Pro Glu Asp Thr Ala Gly Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Lys Ser Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 163
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 163
ggattcacct tcatagcta tggc 24

<210> 164
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 164
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 165
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 165
atatcatatg acggaagtaa taaa 24

<210> 166
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 166

[0023]

```

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1           5

<210> 167
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 167
gcgaatccc tatatacaac cagctggtac gggggctttg actat          45

<210> 168
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 168
Ala Lys Ser Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr
1           5           10          15

<210> 169
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 169
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtcg gggtattaga agctggtagg cctggatatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct gcgtccagtt tgcaaaagggt ggcccatca 180
aggttcagcg gcagtggtac tgggacagat ttcaacttca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctccacac ttgcggcct 300
gggaccaaaag tggtatcaaa a          321

<210> 170
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 170
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Trp
20          25          30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn 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 Ala Asn Ser Phe Pro Pro
85          90          95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100         105

<210> 171
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 171
cagggtatta gaagctgg          18

<210> 172
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 172
Gln Gly Ile Arg Ser Trp
1           5

<210> 173
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 173
gctgcgtcc          9

<210> 174
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

```


<220>
<223> 合成
<400> 174
Ala Ala Ser
1

<210> 175
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 175
caacaggcta acagtttccc tccact 27

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 176
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 177
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 177
gaggtgcagc tggtagagtc tgggggagcc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tctgtgcag cctctgggtt cacttcagc aactatgccg tgacctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggcctggagt ggtctcaact atcagtgcca gtggtgataa cacatactac 180
gcagactccg tgcagggccg gttcaccatc tccagaggcc attccaagaa cagctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaacctacg 300
tatagcagaa gctggtacgg tgcctttgat ttctggggcc aagggacaat ggtcacgcgc 366
tcttca 366

<210> 178
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

[0024] <220>
<223> 合成
<400> 178
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gly His Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Pro Thr Tyr Ser Arg Ser Trp Tyr Gly Ala Phe Asp Phe Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 179
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 179
gggttcacct tcagcaacta tgcc 24

<210> 180
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 180
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
1 5

<210> 181
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
<400> 181

[0025]

atcagtgcca gtggtgataa caca 24

<210> 182
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 182
Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr
1 5

<210> 183
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 183
gcgaaccta cgtatagcag aagctggtag ggtgcttttg atttc 45

<210> 184
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 184
Ala Lys Pro Thr Tyr Ser Arg Ser Trp Tyr Gly Ala Phe Asp Phe
1 5 10 15

<210> 185
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 185
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc ggtatttagc agctggttag cctggatca gcagaaaccg 120
gggaagccc ctcaactct gatctatgct gcatccagat tgcaaatgg ggtcccatca 180
aggttctggg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacaatt tccattcac ttctggccct 300
gggaccaag tgatataca a 321

<210> 186
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 186
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Trp Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Asn Phe Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 187
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 187
cagggtatta gcagctgg 18

<210> 188
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 188
Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 189
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

[0026]

<220>
<223> 合成

<400> 189
gctgcatcc 9

<210> 190
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 190
Ala Ala Ser
1

<210> 191
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 191
caacaggcta acaatttccc attcact 27

<210> 192
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 192
Gln Gln Ala Asn Asn Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 193
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 193
caggttcagc tggtagcagc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctcttggtta caccittacc agttatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag gctctgagtg gatgggatgg atccgcgctt acaatggta cacaaactat 180
gcacagaagt ttcaggcgag agtcaccatg accacagaca catccagaa caccgcctac 240
atggagctga ggaccttgaa ttctgacgat acggccgttt attactgtgc gagagatcga 300
tatagtggga gcttcacgg taactttgac tactggggcc agggaaacct ggtcacgcgc 360
tcttca 366

<210> 194
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 194
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Arg Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Thr Leu Asn Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Arg Tyr Ser Gly Ser Phe His Gly Asn Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 195
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 195
ggttacacct ttaccagtta tgggt 24

<210> 196
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 196
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly
1 5

[0027]

<210> 197
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 197
atccgcgctt acaatggta caca 24

<210> 198
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 198
Ile Arg Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr
1 5

<210> 199
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 199
gcgagagatc gatatagtagg gagcttcac ggtaactttg actac 45

<210> 200
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 200
Ala Arg Asp Arg Tyr Ser Gly Ser Phe His Gly Asn Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 201
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 201
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcgt ctgtaggaga cagagtacc 60
atcacttgtc gggcgagtc gggatatttc agctggtag cctggatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaggtcct aatctatgct gcatccaatt tggaaagtg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtgatc tggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt taccgctcac ttctggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 202
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 202
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Phe Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu 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 Ala Asn Ser Leu Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 203
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 203
cagggtattt tcagctgg 18

<210> 204
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 204
Gln Gly Ile Phe Ser Trp
1 5

<210> 205
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 205
gctgcatcc 9

<210> 206
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 206
Ala Ala Ser
1

<210> 207
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 207
caacaggcta acagtttacc gctcact 27

<210> 208
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 208
Gln Gln Ala Asn Ser Leu Pro Leu Thr
1 5

[0028]

<210> 209
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 209
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagc ttggtccagc ctggggggc cctgagactc 60
tccttgtagc cctctggatt cacttcagc acctattcta tgcactgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gactgggata tgtttcaact attaataata atggggatac cacatattat 180
gcagactctg tgaaggcgag attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgat 240
cttcaactgg gcagcctgag acctgaggac atggctgtgt attactgtgc gagacagacg 300
tataccagca gctggtacgg ggggttcgac tcctgggggc agggaaacct ggtaaccgtc 360
tctctca 366

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

<220>
<223> 合成

<400> 210
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 Thr Tyr
20 25 30
Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
35 40 45
Ser Thr Ile Asn Asn Asn Gly Asp Thr 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 Leu Gly Ser Leu Arg Pro Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gln Thr Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 211
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 211
ggattcacct tcagtaccta ttct 24

[0029]

<210> 212
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 212
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ser
1 5

<210> 213
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 213
attaataata atggggatac caca 24

<210> 214
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 214
Ile Asn Asn Asn Gly Asp Thr Thr
1 5

<210> 215
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 215
gcgagacaga cgtataccag cagctggtag ggggggttcg actcc 45

<210> 216
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 216
Ala Arg Gln Thr Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ser
1 5 10 15

<210> 217
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 217
gacatccaga tgaccacgac tccattcttc gtgtctgcat ctgtaggcga cagagtcacc 60
atcactttgtc gggcgagatca gggtattacc agctggtag cctggatca gcagaaacca 120
gggaagacccc cttaactctc gatctatgct gcattcaatt tgcaaatgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccataccag cctgcagcct 240
gaggattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtc tccattcac ttteggccct 300
gggaccaaaag tggatatcaa a 321

<210> 218
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 218
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Thr Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Leu Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 219
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

[0030]

<400> 219
cagggtatta ccagctgg 18

<210> 220
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 220
Gln Gly Ile Thr Ser Trp
1 5

<210> 221
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 221
gctgcatcc 9

<210> 222
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 222
Ala Ala Ser
1

<210> 223
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 223
caacaggcta acagtctccc attcaact 27

<210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 224
Gln Gln Ala Asn Ser Leu Pro Phe Thr
1 5

<210> 225
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 225
ggaggtgcagc tgggtgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggsgtc cctgagactc 60
ttctgtgcag cctctggatt cacccttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggctcagct attagtggta gttgtggcag cacatactac 180
gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa ctgcgtgtat 240
ctgcaatiga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaagacgtg 300
tatactacca gctggtacgg gggtcttcag cactggggcc agggcacccct ggctactgtc 360
tcttca 366

<210> 226
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 226
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 Leu Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Thr Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Gln His Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0031]

<210> 227
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 227
ggattcacc ttagcagcta tgcc 24

<210> 228
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 228
Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 229
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 229
attagtggtta gtggggcag caca 24

<210> 230
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 230
Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 231
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 231
gcgaagacgc tgtatactac cagctgggtac gggggcttcc agcac 45

<210> 232
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 232
Ala Lys Thr Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Gln His
1 5 10 15

<210> 233
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 233
gacatccaga tgaccacgac tccatcttcc gtgtctgcat ctataggaga cagagtcacc 60
atcaactgtc gggcgagtc ggaatcagc agttgggttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaagtc ctaagctcct gatctatgct gcgtctcttt tgcaaagtgg gttcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtag cctgcagccc 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag actcacagtt tccgtggac ggtcgcccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 234
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 234
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Phe 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 Thr His Ser Phe Pro Trp
85 90 95

	Thr Val Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100 105	
	<210> 235 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 235 cagggaaatca gcagttgg	18
	<210> 236 <211> 6 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 236 Gln Gly Ile Ser Ser Trp 1 5	
	<210> 237 <211> 9 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 237 gctgcgtcc	9
	<210> 238 <211> 3 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 238 Ala Ala Ser 1	
[0032]	<210> 239 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 239 caacagactc acagtttccc gtgg	24
	<210> 240 <211> 8 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 240 Gln Gln Thr His Ser Phe Pro Trp 1 5	
	<210> 241 <211> 366 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 241 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagge ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60 tcctgtgcag cctctggatt cacccttagg agctatttca tgacctgggt ccgccaggtt 120 ccagggaagg ggcctggagg ggtctcagct attagtggca ttagtgggtg cacatactac 180 acagactccg ttaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacctgtttt 240 ctgcaaatga acagcctgag agccaggagc acggccgtat atttctgtgc gagaacggtg 300 tatagtagta gttactacgg ggctttccag cactggggcc agggcaccct ggtcaccgtc 366 tcctca	
	<210> 242 <211> 122 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成	
	<400> 242 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 Leu Arg Ser Tyr 20 25 30 Phe Met Thr Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val 35 40 45 Ser Ala Ile Ser Gly Ile Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val	

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Val Tyr Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln His Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 243
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 243
ggattcacc ttaggagcta tttc 24

<210> 244
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 244
Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr Phe
1 5

<210> 245
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 245
attagtgga ttagtggtgg caca 24

<210> 246
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

[0033] <400> 246
Ile Ser Gly Ile Ser Gly Gly Thr
1 5

<210> 247
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 247
gcgagacgg tgtatagtag tagttactac gggggcttcc agcac 45

<210> 248
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 248
Ala Arg Thr Val Tyr Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln His
1 5 10 15

<210> 249
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 249
gacatccaga tgaccacgac tccatcttcc gtgtctgtat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacitgtc gggcgagtc gggtaattgc agttgggttag cctggatca gcagaaacca 120
gggaagccc ctaagctcct gatctatgtt gcatccagtt tacaagtg ggtcccatca 180
agggtcagcg gcagtgatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag actaacagtt tccctctcac ttteggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 250
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 250
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Val Ser Val Gly

[0034]

1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Val 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 Thr Asn Ser Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 251
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 251
cagggtatta gcagttgg 18

<210> 252
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 252
Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 253
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 253
gttgcaccc 9

<210> 254
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 254
Val Ala Ser
1

<210> 255
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 255
caacagacta acagtttccc tctcact 27

<210> 256
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 256
Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 257
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 257
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagcc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacccttagg agttatgtca tgtactgggt ccgccagggt 120
ccagggaagg ggcctggagg ggtctcaggt attagtggca gtagtggtag cacatactac 180
acagactccg tgaaggcccg gtccaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgttt 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgc gagatcggtg 300
tatagtacca cctggtacgg gggctttccag cactggggcc agggcaccct ggtcacgcgc 360
tctcca 366

<210> 258
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

[0035]

<220>
 <223> 合成
 <400> 258
 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 Leu Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met Tyr Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Gly Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Val Tyr Ser Thr Thr Trp Tyr Gly Gly Phe Gln His Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 259
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 259
 ggattcacc ttaggagtta tgtc 24
 <210> 260
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 260
 Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr Val
 1 5
 <210> 261
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 261
 attagtggca gtagtggtgg caca 24
 <210> 262
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 262
 Ile Ser Gly Ser Ser Gly Gly Thr
 1 5
 <210> 263
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 263
 gcgagatcgg tgtatagtag caccctggtag gggggcttcc agcac 45
 <210> 264
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 264
 Ala Arg Ser Val Tyr Ser Thr Thr Trp Tyr Gly Gly Phe Gln His
 1 5 10 15
 <210> 265
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <400> 265
 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgtat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc ggttattagc agttggtag cctggtatca gctgaaacca 120
 gggaagccc cttaactcct gatctatgct gcatccagtt tacaagtggt ggteccatca 180
 aggttcagcg gcagttgcat tgggacagat ttcactctca ccatcagcgg cctgcagcct 240
 gaagattttg cagtttacta ttgtcaacag actaacagtt tccctctcac ttteggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

[0036]

<210> 266
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 266
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Leu 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 Gly Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 267
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 267
caggttatta gcagttgg 18

<210> 268
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 268
Gln Val Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 269
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 269
gctgcatcc 9

<210> 270
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 270
Ala Ala Ser
1

<210> 271
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 271
caacagacta acagtttccc tctcact 27

<210> 272
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 272
Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 273
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 273
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaaac ttggaacagc ctggggggtc ccttagactc 60
tccgtacag cctctggatt cacccttttagc agatctgccca tgaactgggt ccgcccggct 120

ccagggaagg ggtggagtg ggtctcagga attagtggta gtgggtgctg aacatactac 180
gcagactcgc tgaaggccgc gtccaccatc tccagagaca attccaagaa tacgtatat 240
ctgcaaatga acagcctgag cgcggaggac acggcgcgat attactgtgc gaaagattcg 300
tatactacca gtgggtacgg aggtatggac gtctggggcc acgggaccac ggtcaccgtc 360
tctcca

<210> 274
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 274
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asn Leu Glu Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Ser
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Ser Ala Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Ser Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Met Asp Val Trp
100 105 110
Gly His Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 275
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 275
ggattcacct ttagcagatc tgcc 24

<210> 276
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 276
Gly Phe Thr Phe Ser Arg Ser Ala
1 5

[0037]

<210> 277
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 277
attagtggta gtgggtgctg aaca 24

<210> 278
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 278
Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr
1 5

<210> 279
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 279
gcgaaagatt cgtatactac cagttggtag ggaggtatgg acgtc 45

<210> 280
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 280
Ala Lys Asp Ser Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 281
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 281
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc gggatatttc agctggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
ggaaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcttcagtt tacaaagtgg ggteccatca 180
agattcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaggatttg caatttacta ttgtcaacag gctaacagtg tcccgatcac ctteggccaa 300
gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 282
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 282
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Phe Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Val Pro Ile
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 283
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 283
cagggtattt tcagctgg 18

<210> 284
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

[0038]

<220>
<223> 合成

<400> 284
Gln Gly Ile Phe Ser Trp
1 5

<210> 285
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 285
gctgcttcc 9

<210> 286
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 286
Ala Ala Ser
1

<210> 287
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 287
caacaggcta acagtgtccc gatcacc 27

<210> 288
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 288
Gln Gln Ala Asn Ser Val Pro Ile Thr
1 5

[0039]

<210> 289
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 289
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggc cctgagactc 60
tcctgttcag cctctggatt cacccttagc agctatgcc tgaactgggt ccgccagct 120
ccagggaagg ggcctggagtg ggtcaccgct attagtggca gtggtgggtg cacatactac 180
gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa ctgctgttt 240
ctgcaattga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaacaaac 300
tataaccaga gctgttacgg tggctttgat atctggggcc aggggacaat ggtcaccgtc 360
tttca

<210> 290
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 290
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 Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Thr Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gln Thr Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ile Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 291
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 291
ggattcacct ttagcagcta tgcc 24

<210> 292
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 292
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 293
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 293
attagtggca gtggtgggtg caca 24

<210> 294
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 294
Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr
1 5

<210> 295
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 295
gcgaacacaaa cgtataccag cagctggtac ggtgctttg atatc 45

<210> 296
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 296
Ala Lys Gln Thr Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ile
1 5 10 15

<210> 297
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 297
gacatccaga tgacccagtc gccatcttcc gtgtcccgct ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc gggttttagt tcttggttag cctggatca gcagatacca 120
gggaagccc ccaagctect gatctatgct gcatcaaggt tgcaaagtgg ggteccatcc 180
aggttccgcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaggattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgctcac ttteggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 298
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 298
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Phe Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 299
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

[0040] <220>
<223> 合成

<400> 299
cagggtttta gttctctgg 18

<210> 300
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 300
Gln Gly Phe Ser Ser Trp
1 5

<210> 301
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 301
gctgcatca 9

<210> 302
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 302
Ala Ala Ser
1

<210> 303
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 303
caacaggcta acagtttccc getcact 27

<210> 304
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 304
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 305
<211> 167
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 305
Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Ser Leu Ala Ser Leu Ser
1 5 10 15
Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr
20 25 30
Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Lys Lys Lys Asp Lys Val
35 40 45
Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Ser Glu Ser Gly Asp
50 55 60
Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp
65 70 75 80
Phe Trp Leu Gln Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys
85 90 95
Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Arg
100 105 110
Ser Phe Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe
115 120 125
Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Tyr Ser
130 135 140
Glu Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Ile Leu
145 150 155 160
Glu His His His His His His
165

<210> 306
<211> 167
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 306
Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Ser Leu Ala Ser Leu Ser
1 5 10 15
Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr
20 25 30
Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Lys Lys Lys Asp Lys Val
35 40 45
Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Ser Glu Ser Gly Asp
50 55 60
Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp
65 70 75 80
Phe Trp Leu Gln Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys
85 90 95
Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Arg
100 105 110
Ser Phe Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe
115 120 125
Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Tyr Ser
130 135 140
Glu Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Ile Leu
145 150 155 160
Glu His His His His His His
165

<210> 307
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 307
caggtcacct tgaaggagtc tggctctgtg ctgggtgaac ccacagagag cctcacgctg 60
acctgtccg tctctgatt ctcaactcagt aatgttagaa tgggtgtgag ctggatccgt 120
cagtcgccag ggaaggccct ggagtgcttt gcacacattt ttctgaatga cgaataatcc 180
tacaccacat ctctgaagac caggtcacc atctccaagg acacctccag aagccaggtg 240
gtccttacca tgaccgacat ggacctggg gacacagcca catattactg tgcacgata 300
cggaatttgg cctttaatta ctggggccag ggaacctgg tcacctctc ctca 354

<210> 308
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 308
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15
Ser Leu Thr Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Val
20 25 30
Arg Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Asn Asp Glu Lys Ser Tyr Thr Thr Ser

[0041]

50 55 60
Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Ser Gln Val
65 70 75 80
Val Leu Thr Met Thr Asp Met Asp Pro Gly Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ile Arg Asn Leu Ala Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 309
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 309
ggattctcac tcagtaatgt tagaatgggt 30

<210> 310
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 310
Gly Phe Ser Leu Ser Asn Val Arg Met Gly
1 5 10

<210> 311
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 311
attttttcga atgacgaaaa a 21

<210> 312
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

[0042] <400> 312
Ile Phe Ser Asn Asp Glu Lys
1 5

<210> 313
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 313
gcacggatac ggaatttggc cttaattac 30

<210> 314
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 314
Ala Arg Ile Arg Asn Leu Ala Phe Asn Tyr
1 5 10

<210> 315
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 315
gacttcgtga tgaccacagtc tccagactcc ctggtgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtgtgita cacaggtcca gcaataagaa ctacttagct 120
tggtatcagc agaagccagg acagctctct aacctgetca ttacttgggc atctaccgg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcagctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatgggtact 300
ctatttactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

<210> 316
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 316
Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

[0043]

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

<210> 317
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 317
cagagtgtgt tacacaggtc cagcaataag aactac 36

<210> 318
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 318
Gln Ser Val Leu His Arg Ser Ser Asn Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 319
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 319
tgggcatct 9

<210> 320
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 320
Trp Ala Ser
1

<210> 321
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 321
cagcaatatt atgtactct atttact 27

<210> 322
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 322
Gln Gln Tyr Tyr Gly Thr Leu Phe Thr
1 5

<210> 323
<211> 338
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成
氨基酸1-310: 人ST2 (登录号NP_057316.3
的K19-S328)
氨基酸311-338: Myc-Myc-六组氨酸标签

<400> 323
Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val
1 5 10 15
Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr Tyr
20 25 30
Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val Phe
35 40 45
Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala Asp Ser
50 55 60

[0044]

```

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

```

与mAb-2和hIL-33的预混合物结合的mAb-1																								
mAb-1	捕获的mAb	mAb #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
H4H9628P	1.88 ± 0.11	1	0.00	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.04	0.02	0.00	0.02	0.03	0.06	0.03	0.10	-0.10	1.45	1.00	0.00	0.22	0.14
H4H9633P	1.75 ± 0.04	2	-0.02	0.00	-0.01	-0.01	0.00	-0.01	-0.01	0.00	0.02	-0.01	-0.01	0.00	0.07	0.02	0.03	0.07	-0.10	1.32	0.89	0.00	0.21	0.15
H4H9640P	1.44 ± 0.03	3	-0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	-0.02	0.01	0.03	0.01	-0.01	-0.01	0.10	0.05	-0.02	0.09	-0.11	1.20	0.70	0.00	0.16	0.10
H4H9658P	1.4 ± 0.03	4	-0.02	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	-0.01	0.00	0.10	0.04	0.03	0.09	-0.03	1.08	0.59	0.00	0.17	0.09
H4H9660P	1.88 ± 0.13	5	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	-0.02	0.02	0.04	0.02	0.01	0.00	0.09	0.06	0.03	0.11	-0.03	1.06	0.71	0.00	0.21	0.15
H4H9662P	1.61 ± 0.05	6	0.00	0.00	0.01	0.00	0.03	0.00	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	0.04	0.07	0.04	0.03	0.10	-0.03	1.12	0.89	0.00	0.19	0.11
H4H9663P	1.51 ± 0.04	7	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.02	0.01	-0.01	0.04	0.07	0.03	0.02	0.10	-0.03	1.09	0.85	0.00	0.17	0.09
H4H9664P	1.51 ± 0.04	8	-0.02	-0.01	-0.02	0.00	0.01	0.01	-0.01	0.00	0.02	0.00	-0.01	0.01	0.05	0.03	0.03	0.08	-0.09	0.97	0.38	0.00	0.15	0.10
H4H9665P	1.88 ± 0.03	9	-0.02	0.01	-0.01	-0.01	0.02	0.02	-0.01	-0.01	0.00	0.00	-0.01	0.00	0.07	0.03	0.01	0.06	-0.09	1.28	0.80	0.00	0.14	0.09
H4H9666P	1.53 ± 0.03	10	-0.05	-0.02	-0.02	-0.01	0.01	0.02	0.03	-0.02	-0.02	0.00	-0.02	0.03	0.06	0.03	0.00	0.05	-0.09	1.17	0.59	0.00	0.15	0.08
H4H9667P	1.47 ± 0.1	11	-0.01	-0.01	0.02	-0.01	0.01	0.03	0.00	0.02	0.04	0.01	0.00	0.03	0.05	0.03	0.02	0.05	-0.10	1.09	0.87	0.00	0.23	0.12
H4H9678P	1.48 ± 0.08	12	-0.02	0.01	0.00	0.00	-0.01	-0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.00	0.00	0.04	0.01	0.00	0.05	-0.09	1.13	0.64	0.00	0.18	0.12
H4H9671P	1.92 ± 0.04	13	-0.03	0.00	0.00	0.01	0.00	-0.01	-0.01	-0.01	-0.03	-0.02	-0.01	0.00	0.00	-0.01	0.01	0.02	-0.06	1.17	0.86	0.00	0.13	0.07
H4H9672P	1.67 ± 0.08	14	-0.03	-0.02	-0.01	-0.02	-0.02	-0.01	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	-0.01	0.03	0.01	0.00	0.03	0.05	-0.03	1.11	0.88	0.00	0.15	0.07
H4H9675P	1.88 ± 0.14	15	-0.01	0.01	0.01	-0.02	-0.04	-0.02	0.05	-0.03	-0.03	-0.03	0.04	0.01	0.02	0.03	0.00	0.03	-0.07	1.11	0.89	0.00	0.13	0.11
H4H9676P	1.75 ± 0.07	16	-0.03	-0.01	-0.03	-0.03	-0.05	-0.05	-0.05	-0.05	-0.05	-0.05	-0.01	-0.02	-0.05	-0.04	-0.03	0.00	0.08	1.07	0.74	0.00	0.11	0.10
H1M9659N	0.94 ± 0.14	17	-0.15	-0.10	-0.06	-0.09	-0.15	-0.11	-0.18	-0.12	-0.16	-0.15	-0.05	-0.00	0.15	-0.16	-0.16	-0.15	0.00	0.86	0.48	0.00	0.06	0.11
H1M9660N	0.76 ± 0.02	18	0.40	0.46	0.47	0.52	0.41	0.46	0.58	0.47	0.57	0.52	0.47	0.46	0.52	0.49	0.47	0.57	0.58	0.00	0.40	0.00	0.06	0.10
H1M9668N	0.66 ± 0.02	19	0.44	0.57	0.53	0.55	0.45	0.56	0.59	0.51	0.63	0.56	0.58	0.56	0.56	0.58	0.50	0.54	0.52	0.67	0.00	0.00	0.04	0.06
对照																						0.00	0.01	0.03
对照	1.38 ± 0.06	21	-0.02	0.00	0.01	0.01	0.03	0.02	0.02	-0.02	-0.03	0.02	0.01	0.01	0.00	-0.02	0.00	0.01	0.06	0.09	0.06	0.00	0.00	0.07
对照	0.70 ± 0.07	22	-0.15	-0.15	0.06	0.08	-0.12	-0.10	-0.12	-0.12	-0.17	-0.14	0.02	-0.02	0.16	-0.14	-0.14	-0.14	0.02	-0.13	0.09	0.04	0.06	0.09

图1

与mAb-1和mIL-33-6xHis的预复合物结合的mAb-2																								
mAb-1	捕获的mIL-33-6xHis (nm)	mAb-1结合(nm)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
H4H9629P	0.15 ± 0.01	0.72 ± 0.02	0.03	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.07	0.02	0.01	0.04	0.05	0.04	0.04	0.06	0.01	0.21	0.60	0.89	0.01	0.01
H4H9633P	0.16 ± 0.01	0.64 ± 0.01	0.07	0.02	0.03	0.03	0.04	0.05	0.03	0.05	0.04	0.01	0.04	0.03	0.05	0.05	0.06	0.09	0.02	0.32	0.59	0.47	0.01	0.00
H4H9640P	0.16 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.02	0.01	0.03	0.02	0.02	0.03	0.04	0.03	0.04	0.03	0.02	0.04	0.02	0.04	0.03	0.04	0.03	0.24	0.60	0.58	0.02	0.01
H4H9649P	0.15 ± 0.01	0.58 ± 0.02	0.02	0.02	0.02	0.04	0.02	0.04	0.01	0.02	0.06	0.02	0.01	0.03	0.05	0.03	0.03	0.04	0.02	0.24	0.52	0.48	0.01	0.01
H4H9660P	0.15 ± 0.01	0.63 ± 0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.06	0.02	0.01	0.03	0.05	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.28	0.52	0.46	0.02	0.00
H4H9662P	0.15 ± 0.01	0.66 ± 0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.01	0.02	0.03	0.27	0.51	0.46	0.02	0.01
H4H9683P	0.15 ± 0.01	0.64 ± 0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	0.02	0.03	0.02	0.03	0.02	0.01	0.26	0.49	0.44	0.02	0.00
H4H9664P	0.15 ± 0.01	0.61 ± 0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.04	0.02	0.04	0.02	0.03	0.03	0.02	0.26	0.58	0.47	0.02	0.01
H4H9665P	0.16 ± 0.01	0.57 ± 0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.06	0.02	0.02	0.02	0.05	0.03	0.03	0.03	0.01	0.22	0.57	0.39	0.00	0.00
H4H9667P	0.16 ± 0.01	0.60 ± 0.02	0.04	0.02	0.03	0.03	0.04	0.02	0.03	0.05	0.03	0.02	0.03	0.05	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.27	0.55	0.58	0.03	0.00
H4H9670P	0.16 ± 0.01	0.56 ± 0.02	0.02	0.03	0.04	0.01	0.02	0.02	0.01	0.03	0.05	0.01	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03	0.05	0.02	0.23	0.51	0.46	0.01	0.01
H4H9671P	0.15 ± 0.01	0.59 ± 0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.23	0.51	0.44	0.02	0.02
H4H9672P	0.15 ± 0.01	0.56 ± 0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.04	0.01	0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	0.02	0.22	0.49	0.41	0.04	0.01
H4H9675P	0.15 ± 0.01	0.52 ± 0.03	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.04	0.04	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.24	0.40	0.38	0.02	0.00
H4H9678P	0.16 ± 0.01	0.62 ± 0.02	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.02	0.01	0.22	0.53	0.46	0.02	0.02
H1M9568N	0.16 ± 0.01	0.50 ± 0.02	0.03	0.04	0.02	0.02	0.03	0.03	0.01	0.03	0.05	0.02	0.02	0.02	0.04	0.02	0.03	0.03	0.02	0.21	0.52	0.48	0.01	0.00
H1M9568N	0.16 ± 0.01	0.46 ± 0.02	0.24	0.21	0.24	0.22	0.21	0.21	0.23	0.21	0.23	0.23	0.21	0.22	0.20	0.24	0.26	0.26	0.19	0.08	0.39	0.23	0.04	0.02
H1M9568N	0.16 ± 0.01	0.68 ± 0.01	0.45	0.46	0.44	0.43	0.42	0.37	0.47	0.46	0.46	0.47	0.43	0.43	0.46	0.46	0.46	0.45	0.36	0.29	0.03	0.44	0.04	0.02
H1M9568N	0.16 ± 0.01	0.52 ± 0.02	0.35	0.32	0.30	0.29	0.32	0.33	0.34	0.26	0.49	0.30	0.28	0.29	0.42	0.38	0.39	0.43	0.26	0.17	0.48	0.05	0.00	0.01
平均值/标准差	0.15 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.25	0.26	0.26	0.25	0.26	0.22	0.23	0.27	0.30	0.28	0.26	0.23	0.26	0.25	0.26	0.25	0.24	0.14	0.34	0.34	0.04	0.03
标准差	0.16 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03

图2