



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107172879 B

(45) 授权公告日 2021. 11. 05

(21) 申请号 201580072740.9
(22) 申请日 2015.11.10
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107172879 A

(43) 申请公布日 2017.09.15
(30) 优先权数据
62/077,876 2014.11.10 US
62/165,732 2015.05.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.07.07
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/060008 2015.11.10

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/077381 EN 2016.05.19

(73) 专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 P·E·哈斯 M·哈森 Y-C·肖
R·科斯拉 G·R·纳卡穆拉
D·舍沙赛义 M·范路克伦康佩齐
H·习 W·翟 J·贝弗斯三世
N·江

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

(51) Int.Cl.
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2005079844 A2,2005.09.01
CN 103562224 A,2014.02.05
WO 2014164959 A2,2014.10.09
Takeshi Nabe. “Interleukin (IL)-33:
New Therapeutic Target for Atopic
Diseases”.《Journal of Pharmacological
Sciences》.2014,第126卷第85-91页.
Pin Li et al.. “IL-33 Neutralization
Suppresses Lupus Disease in Lupus-Prone
Mice”.《Inflammation》.2014,第1-9页.
Y. H. Kim et al.. “Anti-IL-33 antibody
has a therapeutic effect in a murine
model of allergic rhinitis”.《Allergy》
.2012,第67卷第183-190页.
葛剑力.白介素-33特异性受体在心脏疾病
中的调节作用.《疑难病杂志》.2012,第11卷(第4
期),第314-318页.

审查员 陈阜

权利要求书6页 说明书136页
序列表127页 附图110页

(54) 发明名称
抗白细胞介素-33抗体及其用途

(57) 摘要
本发明提供白细胞介素-33(IL-33)抗体及
其使用方法。

CN 107172879 B

1. 特异性结合IL-33的分离的抗体,其中抗原结合结构域包含以下六个HVR:

- (a) 由氨基酸序列SFSMS (SEQ ID NO:1) 组成的HVR-H1;
- (b) 由氨基酸序列TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO:2) 组成的HVR-H2;
- (c) 由氨基酸序列ANYGNWFFEY (SEQ ID NO:3) 组成的HVR-H3;
- (d) 由氨基酸序列RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO:4) 组成的HVR-L1;
- (e) 由氨基酸序列AASNRRGS (SEQ ID NO:5) 组成的HVR-L2; 和
- (f) 由氨基酸序列QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6) 组成的HVR-L3。

2. 权利要求1的特异性结合IL-33的分离的抗体,其中抗体包含:(a) 与氨基酸序列SEQ ID NO:36具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的重链可变(VH) 结构域; 和 (b) 与氨基酸序列SEQ ID NO:37具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变(VL) 结构域,且其中抗原结合结构域包含以下六个HVR:

- (a) 由氨基酸序列SFSMS (SEQ ID NO:1) 组成的HVR-H1;
- (b) 由氨基酸序列TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO:2) 组成的HVR-H2;
- (c) 由氨基酸序列ANYGNWFFEY (SEQ ID NO:3) 组成的HVR-H3;
- (d) 由氨基酸序列RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO:4) 组成的HVR-L1;
- (e) 由氨基酸序列AASNRRGS (SEQ ID NO:5) 组成的HVR-L2; 和
- (f) 由氨基酸序列QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6) 组成的HVR-L3。

3. 权利要求2的特异性结合IL-33的分离的抗体,其中VH结构域包含:

- (a) 由氨基酸序列EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:12) 组成的FR-H1;
- (b) 由氨基酸序列WVRQAPGKLEWVA (SEQ ID NO:13) 组成的FR-H2;
- (c) 由氨基酸序列RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:14) 组成的FR-H3;

和

(d) 由氨基酸序列WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:15) 组成的FR-H4; 且VL结构域包含:

- (a) 由氨基酸序列EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:25) 组成的FR-L1;
- (b) 由氨基酸序列WFQQKPGQPPRLIF (SEQ ID NO:26) 组成的FR-L2;
- (c) 由氨基酸序列GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:27) 组成的FR-L3;

和

(d) 由氨基酸序列FGQGTEKVEIK (SEQ ID NO:28) 组成的FR-L4。

4. 特异性结合IL-33的分离的抗体,其中抗体包含以下的结合结构域:(a) SEQ ID NO:36的氨基酸序列所示的VH结构域; 和 (b) SEQ ID NO:37的氨基酸序列所示的VL结构域。

5. 权利要求1的特异性结合IL-33的分离的抗体,其中VH结构域包含:

- (a) 氨基酸序列DVNLVESGGGSVKPGGSLKLSVASGFTFS (SEQ ID NO:16) 的FR-H1;
- (b) 氨基酸序列WVRQTPEKRLEWVA (SEQ ID NO:17) 的FR-H2;
- (c) 氨基酸序列RFTISRDDAKNTLYLQMSSLESEDAMYYCTR (SEQ ID NO:18) 的FR-H3; 和
- (d) 氨基酸序列WGAGTTVAVSS (SEQ ID NO:19) 的FR-H4, 且VL结构域包含:
 - (a) 氨基酸序列DIVLTQSPGFLVSLGQRATISC (SEQ ID NO:29) 的FR-L1;
 - (b) 氨基酸序列WFQQKPGQPPKLLIF (SEQ ID NO:30) 的FR-L2;
 - (c) 氨基酸序列GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFC (SEQ ID NO:31) 的FR-L3; 和
 - (d) 氨基酸序列FGSGTEKLEIK (SEQ ID NO:32) 的FR-L4。

6. 权利要求1的特异性结合IL-33的分离的抗体,其中抗体包含以下的结合结构域:(a)与氨基酸序列SEQ ID NO:38具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域;和(b)与氨基酸序列SEQ ID NO:39具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域,且其中抗原结合结构域包含以下六个HVR:

- (a) 由氨基酸序列SFSMS (SEQ ID NO:1) 组成的HVR-H1;
- (b) 由氨基酸序列TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO:2) 组成的HVR-H2;
- (c) 由氨基酸序列ANYGNWFFEY (SEQ ID NO:3) 组成的HVR-H3;
- (d) 由氨基酸序列RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO:4) 组成的HVR-L1;
- (e) 由氨基酸序列AASNRRGS (SEQ ID NO:5) 组成的HVR-L2;和
- (f) 由氨基酸序列QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6) 组成的HVR-L3。

7. 权利要求1的特异性结合IL-33的分离的抗体,其中VH结构域进一步包含:

(a) 氨基酸序列EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:12) 或EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:20) 的FR-H1;

(b) 氨基酸序列WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:13) 或WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO:21) 的FR-H2;

(c) 氨基酸序列RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:22)、RFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:23)、RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:24) 或RFTISRDD SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:14) 的FR-H3;和

(d) 氨基酸序列WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:15) 的FR-H4,且VL结构域进一步包含:

(a) 氨基酸序列EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:25) 的FR-L1;

(b) 氨基酸序列WFQQKPGQPPRLIF (SEQ ID NO:26) 的FR-L2;

(c) 氨基酸序列GIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:27)、GVPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYFC (SEQ ID NO:33)、GVPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:34) 或GIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYFC (SEQ ID NO:35) 的FR-L3;和

(d) 氨基酸序列FGQGTEKVEIK (SEQ ID NO:28) 的FR-L4,且其中抗原结合结构域包含以下六个HVR:

- (a) 由氨基酸序列SFSMS (SEQ ID NO:1) 组成的HVR-H1;
- (b) 由氨基酸序列TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO:2) 组成的HVR-H2;
- (c) 由氨基酸序列ANYGNWFFEY (SEQ ID NO:3) 组成的HVR-H3;
- (d) 由氨基酸序列RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO:4) 组成的HVR-L1;
- (e) 由氨基酸序列AASNRRGS (SEQ ID NO:5) 组成的HVR-L2;和
- (f) 由氨基酸序列QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6) 组成的HVR-L3。

8. 权利要求1的特异性结合IL-33的分离的抗体,其中抗体包含以下的结合结构域:(a)与氨基酸序列SEQ ID NO:40具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域;和(b)与氨基酸序列SEQ ID NO:51具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域,且其中抗原结合结构域包含以下六个HVR:

- (a) 由氨基酸序列SFSMS (SEQ ID NO:1) 组成的HVR-H1;
- (b) 由氨基酸序列TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO:2) 组成的HVR-H2;
- (c) 由氨基酸序列ANYGNWFFEY (SEQ ID NO:3) 组成的HVR-H3;

- (d) 由氨基酸序列RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO:4) 组成的HVR-L1;
- (e) 由氨基酸序列AASNRRGS (SEQ ID NO:5) 组成的HVR-L2; 和
- (f) 由氨基酸序列QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6) 组成的HVR-L3。

9. 特异性结合IL-33和IL-13二者的分离的抗体, 其中抗体包含以下六个HVR的特异性结合IL-33的第一结合结构域:

- (a) 由氨基酸序列SFSMS (SEQ ID NO:1) 组成的HVR-H1;
- (b) 由氨基酸序列TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO:2) 组成的HVR-H2;
- (c) 由氨基酸序列ANYGNWFFEV (SEQ ID NO:3) 组成的HVR-H3;
- (d) 由氨基酸序列RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO:4) 组成的HVR-L1;
- (e) 由氨基酸序列AASNRRGS (SEQ ID NO:5) 组成的HVR-L2; 和
- (f) 由氨基酸序列QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6) 组成的HVR-L3; 及

以下六个HVR的特异性结合IL-13的第二结合结构域:

- (a) 由氨基酸序列AYSVN (SEQ ID NO:296) 组成的HVR-H1;
- (b) 由氨基酸序列MIWGDGKIVYNSALKS (SEQ ID NO:297) 组成的HVR-H2;
- (c) 由氨基酸序列DGYYPYAMD (SEQ ID NO:298) 组成的HVR-H3;
- (d) 由氨基酸序列RASKSVDSYGNSFMH (SEQ ID NO:299) 组成的HVR-L1;
- (e) 由氨基酸序列LASNLES (SEQ ID NO:300) 组成的HVR-L2; 和
- (f) 由氨基酸序列QQNNEDPRT (SEQ ID NO:301) 组成的HVR-L3。

10. 权利要求9的特异性结合IL-33和IL-13二者的分离的抗体, 其中抗体包含以下的特异性结合IL-33的第一结合结构域: (a) 与氨基酸序列SEQ ID NO:36具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域; 和 (b) 与氨基酸序列SEQ ID NO:37具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域; 及包含以下的特异性结合IL-13的第二结合结构域: (a) 与氨基酸序列SEQ ID NO:302具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域; 和 (b) 与氨基酸序列SEQ ID NO:303具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域, 其中抗体包含以下六个HVR的特异性结合IL-33的第一结合结构域:

- (a) 由氨基酸序列SFSMS (SEQ ID NO:1) 组成的HVR-H1;
- (b) 由氨基酸序列TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO:2) 组成的HVR-H2;
- (c) 由氨基酸序列ANYGNWFFEV (SEQ ID NO:3) 组成的HVR-H3;
- (d) 由氨基酸序列RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO:4) 组成的HVR-L1;
- (e) 由氨基酸序列AASNRRGS (SEQ ID NO:5) 组成的HVR-L2; 和
- (f) 由氨基酸序列QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6) 组成的HVR-L3; 及

以下六个HVR的特异性结合IL-13的第二结合结构域:

- (a) 由氨基酸序列AYSVN (SEQ ID NO:296) 组成的HVR-H1;
- (b) 由氨基酸序列MIWGDGKIVYNSALKS (SEQ ID NO:297) 组成的HVR-H2;
- (c) 由氨基酸序列DGYYPYAMD (SEQ ID NO:298) 组成的HVR-H3;
- (d) 由氨基酸序列RASKSVDSYGNSFMH (SEQ ID NO:299) 组成的HVR-L1;
- (e) 由氨基酸序列LASNLES (SEQ ID NO:300) 组成的HVR-L2; 和
- (f) 由氨基酸序列QQNNEDPRT (SEQ ID NO:301) 组成的HVR-L3。

11. 权利要求9的特异性结合IL-33和IL-13二者的分离的抗体, 其中抗体包含:

(a) 特异性结合IL-33的第一重链和第一轻链,其中第一重链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:306具有至少99%序列同一性的氨基酸序列,第一轻链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:307具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;和

(b) 特异性结合IL-13的第二重链和第二轻链,其中第二重链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:304具有至少99%序列同一性的氨基酸序列,第二轻链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:305具有至少99%序列同一性的氨基酸序列,其中抗体包含以下六个HVR的特异性结合IL-33的第一结合结构域:

- (a) 由氨基酸序列SFSMS (SEQ ID NO:1) 组成的HVR-H1;
 - (b) 由氨基酸序列TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO:2) 组成的HVR-H2;
 - (c) 由氨基酸序列ANYGNWFFEV (SEQ ID NO:3) 组成的HVR-H3;
 - (d) 由氨基酸序列RASESVAKYGLSLN (SEQ ID NO:4) 组成的HVR-L1;
 - (e) 由氨基酸序列AASNRRGS (SEQ ID NO:5) 组成的HVR-L2;和
 - (f) 由氨基酸序列QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6) 组成的HVR-L3;及
- 包含以下六个HVR的特异性结合IL-13的第二结合结构域:

- (a) 由氨基酸序列AYSVN (SEQ ID NO:296) 组成的HVR-H1;
- (b) 由氨基酸序列MIWGDGKIVYNSALKS (SEQ ID NO:297) 组成的HVR-H2;
- (c) 由氨基酸序列DGYYPYAMD (SEQ ID NO:298) 组成的HVR-H3;
- (d) 由氨基酸序列RASKSVDSYGNSFMH (SEQ ID NO:299) 组成的HVR-L1;
- (e) 由氨基酸序列LASNLES (SEQ ID NO:300) 组成的HVR-L2;和
- (f) 由氨基酸序列QQNNEDPRT (SEQ ID NO:301) 组成的HVR-L3。

12. 权利要求9-11中任一项的特异性结合IL-33和IL-13二者的分离的抗体,其中抗体是抗原结合片段。

13. 权利要求12的抗体,其中抗原结合片段选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv和(Fab')₂片段。

14. 权利要求13的抗体,其中抗原结合片段是Fab或(Fab')₂片段。

15. 分离的核酸,其编码权利要求1-14中任一项的抗体。

16. 载体,其包含权利要求15的分离的核酸。

17. 宿主细胞,其包含权利要求16的载体。

18. 权利要求17的宿主细胞,其中宿主细胞是哺乳动物细胞。

19. 权利要求18的宿主细胞,其中哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

20. 权利要求17的宿主细胞,其中宿主细胞是原核细胞。

21. 权利要求20的宿主细胞,其中原核细胞是大肠杆菌。

22. 产生权利要求1-14中任一项的抗体的方法,所述方法包括在培养基中培养权利要求17的宿主细胞。

23. 权利要求22的方法,其中方法进一步包括从宿主细胞或培养基回收抗体。

24. 组合物,其包含权利要求1-14中任一项的抗体。

25. 权利要求24的组合物,其进一步包含可药用载体、赋形剂或稀释剂。

26. 权利要求25的组合物,其中组合物是药物组合物。

27. 权利要求24-26中任一项的组合物,其中药物组合物进一步包含ST2结合拮抗剂、因子D结合拮抗剂、HtrA1结合拮抗剂、VEGF拮抗剂、类胰蛋白酶-β结合拮抗剂、Th2细胞上表达

的化学引诱物受体同源分子 (CRTH2) 结合拮抗剂、白细胞介素-13 (IL-13) 结合拮抗剂、白细胞介素-17 (IL-17) 结合拮抗剂、JAK1拮抗剂、和/或白细胞介素-5 (IL-5) 结合拮抗剂。

28. 权利要求27的组合物, 其中药物组合物包含因子D结合拮抗剂。

29. 权利要求28的组合物, 其中因子D结合拮抗剂是抗因子D抗体或其抗原结合片段。

30. 权利要求27的组合物, 其中药物组合物包含HtrA1结合拮抗剂。

31. 权利要求30的组合物, 其中HtrA1结合拮抗剂是抗HtrA1抗体或其抗原结合片段。

32. 权利要求27的组合物, 其中药物组合物包含VEGF拮抗剂。

33. 权利要求32的组合物, 其中VEGF拮抗剂是抗VEGF抗体或其抗原结合片段。

34. 权利要求1-14中任一项的抗体在制备用于治疗IL-33介导的障碍的药物中的用途。

35. 权利要求34的用途, 其中IL-33介导的障碍选自炎性病症、免疫障碍、纤维性障碍、嗜酸性粒细胞性障碍、感染、疼痛、中枢神经系统障碍、实体瘤和眼科障碍。

36. 权利要求35的用途, 其中炎性病症选自哮喘、脓毒症、脓毒性休克、类风湿性关节炎、炎性肠病 (IBD)、和慢性阻塞性肺病 (COPD)。

37. 权利要求35的用途, 其中免疫障碍选自哮喘、类风湿性关节炎、变态反应、银屑病、糖尿病和肝病。

38. 权利要求35的用途, 其中纤维性障碍是特发性肺纤维化 (IPF)。

39. 权利要求35的用途, 其中嗜酸性粒细胞性障碍是嗜酸性粒细胞相关胃肠障碍 (EGID)。

40. 权利要求39的用途, 其中EGID是嗜酸性粒细胞性食管炎。

41. 权利要求35的用途, 其中感染是蠕虫感染、原生动物感染或病毒感染。

42. 权利要求41的用途, 其中原生动物感染是硕大利什曼原生动物感染。

43. 权利要求41的用途, 其中病毒感染是RSV感染或流行性感冒感染。

44. 权利要求35的用途, 其中疼痛是炎性疼痛。

45. 权利要求35的用途, 其中中枢神经系统障碍是阿尔茨海默病。

46. 权利要求35的用途, 其中实体瘤选自乳腺肿瘤、前列腺肿瘤、肺肿瘤、肾肿瘤、肝肿瘤、胰腺肿瘤、胃肿瘤、肠肿瘤、脑肿瘤、骨肿瘤和皮肤肿瘤。

47. 权利要求35的用途, 其中眼科障碍选自AMD、眼视网膜病变、PCV、糖尿病性黄斑水肿、干眼病、Behcet病、视网膜脱离、青光眼、葡萄膜炎、色素性视网膜炎、利伯先天性黑矇、Stargardt病、外伤性眼损伤和结膜炎。

48. 权利要求47的用途, 其中AMD是湿性AMD、干性AMD或GA。

49. 权利要求47的用途, 其中AMD是中期AMD或晚期AMD。

50. 权利要求47的用途, 其中眼视网膜病变是DR或ROP。

51. 权利要求47的用途, 其中眼视网膜病变是高原DR。

52. 权利要求47的用途, 其中结膜炎是感染性结膜炎或非感染性结膜炎。

53. 权利要求47的用途, 其中结膜炎是过敏性结膜炎。

54. 权利要求34-53中任一项的用途, 其中所述药物用于与ST2结合拮抗剂、因子D结合拮抗剂、HtrA1结合拮抗剂、VEGF拮抗剂、类胰蛋白酶- β 结合拮抗剂、Th2细胞上表达的化学引诱物受体同源分子 (CRTH2) 结合拮抗剂、白细胞介素-13 (IL-13) 结合拮抗剂、白细胞介素-17 (IL-17) 结合拮抗剂、JAK1拮抗剂、和/或白细胞介素-5 (IL-5) 结合拮抗剂组合使用。

55. 权利要求54的用途,其中药物配制用于与因子D结合拮抗剂组合使用。
56. 权利要求55的用途,其中因子D结合拮抗剂是抗因子D抗体或其抗原结合片段。
57. 权利要求54的用途,其中药物配制用于与HtrA1结合拮抗剂组合使用。
58. 权利要求57的用途,其中HtrA1结合拮抗剂是抗HtrA1抗体或其抗原结合片段。
59. 权利要求54的用途,其中药物配制用于与VEGF拮抗剂组合使用。
60. 权利要求59的用途,其中VEGF拮抗剂是抗VEGF抗体或其抗原结合片段。
61. 权利要求1-14中任一项的抗体的用途,用于制备用于治疗GA的药物,其中药物配制用于与因子D结合拮抗剂组合使用。
62. 权利要求61的用途,其中因子D结合拮抗剂是抗因子D抗体或其抗原结合片段。
63. 权利要求1-14中任一项的抗体在制备用于治疗GA、AMD、DR、PCV或ROP的药物中的用途,其中药物配制用于与HtrA1结合拮抗剂组合使用。
64. 权利要求63的用途,其中HtrA1结合拮抗剂是抗HtrA1抗体或其抗原结合片段。
65. 权利要求1-14中任一项的抗体在制备用于治疗湿性AMD的药物中的用途,其中药物配制用于与VEGF拮抗剂组合使用。
66. 权利要求65的用途,其中VEGF拮抗剂是抗VEGF抗体或其抗原结合片段。

抗白细胞介素-33抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及抗白细胞介素-33 (IL-33) 抗体及其使用方法,包括用于治疗 IL-33介导的障碍。

背景技术

[0002] 白细胞介素-33 (IL-33) 是白细胞介素-1 (IL-1) 细胞因子家族的成员,由 IL33基因编码,在结构细胞如平滑肌、上皮和内皮细胞中组成性表达。在巨噬细胞和树突细胞中,IL-33可以由炎症因子诱导。环境触发物(如变应原、毒素和病原体)引起的细胞应激可以导致IL-33释放。生物可用IL-33与由肿瘤发生2 (ST2) 蛋白质和白细胞介素-1受体辅助蛋白质 (IL-1RAcP) 组成的异二聚体IL-33受体复合物结合,通过衔接蛋白髓样分化初级应答88 (MyD88) 及可能通过MyD88衔接蛋白样 (Mal) 蛋白质激活AP-1和 NF- κ B途径活化。IL-33刺激许多细胞类型,包括先天II型 (ILC2) 细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和树突细胞,以促进2型免疫。

[0003] 已提出IL-33途径涉及多种疾病,包括仍需针对其开发改进的组合物(包括治疗性抗IL-33拮抗剂)和治疗方法的变态反应相关疾病。

[0004] 发明概述

[0005] 本发明涉及抗IL-33抗体(包括双特异性抗IL-33/抗IL-13抗体),及其使用方法。

[0006] 在一方面,本发明特征在于以约500pM或更低的 K_D 特异性结合人和食蟹猴 (cyno) 二者的白细胞介素-33 (IL-33) 的分离的抗体。在一些实施方案中,该抗体以约100fM和约500pM之间的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些实施方案中,该抗体以约1pM和约200pM之间的 K_D 特异性结合人 IL-33。在一些实施方案中,该抗体以约15pM和约180pM之间的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些实施方案中,该抗体以约15pM和约140pM 之间的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些实施方案中,该抗体以约100fM 和约500pM之间的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些实施方案中,该抗体以约1pM和约500pM之间的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些实施方案中,该抗体以约100pM和约500pM之间的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些实施方案中,该抗体以约125pM和约500pM之间的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些实施方案中,该抗体以约1pM和约 500pM之间的 K_D 特异性结合人和食蟹猴二者的IL-33。在一些实施方案中,该抗体以约1pM和约200pM之间的 K_D 特异性结合人IL-33。

[0007] 在一些实施方案中,前述抗体中的任一种能够抑制IL-33与IL-33受体(例如ST2和/或IL-1RAcP)的结合。在一些实施方案中,用基于细胞的阻断测定测量该抑制。在一些实施方案中,该抗体以约0.001 μ g/ml和约 0.5 μ g/ml之间的90%抑制浓度 (IC90) 抑制人IL-33与IL-33受体的结合。在一些实施方案中,该IC90在约0.002 μ g/ml和约0.25 μ g/ml之间。在一些实施方案中,该IC90是约0.17 μ g/ml。在一些实施方案中,该IC90是约0.004 μ g/ml。在一些实施方案中,该抗体以约800fM和约10pM之间的50%抑制浓度 (IC50) 抑制人IL-33与IL-33受体的结合。在一些实施方案中,该IC50在约1pM和约5pM之间。在一些实施方案中,该IC50是约2.5pM。在一些实施方案中,该抗体以约1nM和约5nM之间的IC50 抑制食蟹猴IL-33与

IL-33受体的结合。在一些实施方案中,该IC₅₀是约 4nM。在一些实施方案中,在该基于细胞的阻断测定中使用HEK-BLUE™ IL-33/IL-1β细胞。在一些实施方案中,该HEK-BLUE™ IL-33/IL-1β细胞包含序列SEQ ID NO:311的核酸。在一些实施方案中,该测定包括用IL-33 处理HEK-BLUE™ IL-33/IL-1β细胞。在一些实施方案中,该IL-33包含 SEQ ID NO:313-318中任一个的氨基酸序列。在一些实施方案中,在该基于细胞的阻断测定中用sST2-LZ作为阳性对照。在一些实施方案中,该 sST2-LZ包含氨基酸序列SEQ ID NO:310。

[0008] 在以上方面的一些实施方案中,该抗体包含含有以下的结合结构域: (a) 含有氨基酸序列SFSMS (SEQ ID NO:1) 的HVR-H1; (b) 含有氨基酸序列TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO:2) 的HVR-H2;和(c) 含有氨基酸序列ANYGNWFFEY (SEQ ID NO:3) 的HVR-H3。在一些实施方案中,该结合结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:12) 的 FR-H1; (b) 含有氨基酸序列WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:13) 的 FR-H2;和(c) 含有氨基酸序列 RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:14) 的 FR-H3;和(d) 含有氨基酸序列WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:15) 的 FR-H4。在一些实施方案中,该结合结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列DVNLVESGGGSVKPGGSLKLSCVASGFTFS (SEQ ID NO:16) 的 FR-H1; (b) 含有氨基酸序列WVRQTPEKRLEWVA (SEQ ID NO:17) 的 FR-H2; (c) 含有氨基酸序列 RFTISRDDAKNTLYLQMSSLESEDAMYYCTR (SEQ ID NO:18) 的 FR-H3;和(d) 含有氨基酸序列WGAGTTTAVSS (SEQ ID NO:19) 的 FR-H4。在一些实施方案中,该结合结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:12) 或 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:20) 的 FR-H1; (b) 含有氨基酸序列WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:13) 或 WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO:21) 的FR-H2; (c) 含有氨基酸序列 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:22)、RFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:23)、RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:24) 或 RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:14) 的 FR-H3;和(d) 含有氨基酸序列WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:15) 的 FR-H4。在一些实施方案中,该结合结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO:4) 的HVR-L1; (b) 含有氨基酸序列AASNRRGS (SEQ ID NO:5) 的HVR-L2;和(c) 含有氨基酸序列 QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6) 的HVR-L3。在一些实施方案中,该结合结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:25) 的FR-L1; (b) 含有氨基酸序列WFQQKPGQPRLIF (SEQ ID NO:26) 的FR-L2; (c) 含有氨基酸序列 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC (SEQ ID NO:27) 的 FR-L3;和(d) 含有氨基酸序列FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:28) 的FR-L4。在一些实施方案中,该结合结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列 DIVLTQSPGFLVSLGQRATISC (SEQ ID NO:29) 的FR-L1; (b) 含有氨基酸序列WFQQKPGQPRLIF (SEQ ID NO:30) 的FR-L2; (c) 含有氨基酸序列GVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC (SEQ ID NO:31) 的FR-L3;和(d) 含有氨基酸序列FGSGTKLEIK (SEQ ID NO:32) 的 FR-L4。在一些实施方案中,该结合结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:25) 的FR-L1; (b) 含有氨基酸序列WFQQKPGQPRLIF (SEQ ID NO:26) 的FR-L2; (c) 含有氨基酸序列GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC (SEQ ID NO:27)、GVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC (SEQ ID NO:33)、GV PARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC (SEQ ID NO:34) 或 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC (SEQ ID NO:35) 的 FR-L3;和(d) 含有氨基酸序列FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:28) 的FR-L4。

[0009] 在以上方面的一些实施方案中,该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有氨基酸序列SSIFYWG (SEQ ID NO:65)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列SIYYSGRTYYNPSLKS (SEQ ID NO:66)或 SIYYSGRTYYNPALKS (SEQ ID NO:67)的HVR-H2;和(c)含有氨基酸序列AGGLYNWNDESFSFYMDV (SEQ ID NO:68)的HVR-H3。在一些实施方案中,该结合结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列 ELQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIR (SEQ ID NO:72)的FR-H1;(b)含有氨基酸序列WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO:73)的FR-H2;(c)含有氨基酸序列RVTISVDTSKNQFSLMLTSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO:74)的FR-H3;和(d)含有氨基酸序列WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:75)的FR-H4。在一些实施方案中,该结合结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIR (SEQ ID NO:76)的FR-H1;(b)含有氨基酸序列WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO:73)的FR-H2;(c)含有氨基酸序列 RVTISVDTSKNQFSLMLTSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO:74)的FR-H3;和(d)含有氨基酸序列WGNGTTTVTVSS (SEQ ID NO:78)的FR-H4。在一些实施方案中,该结合结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列ELQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIR (SEQ ID NO:72)、QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIR (SEQ ID NO:76)或 QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIR (SEQ ID NO:77)的FR-H1;(b)含有氨基酸序列WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO:73)的FR-H2;(c)含有氨基酸序列 RVTISVDTSKNQFSLMLTSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO:74)的FR-H3;和(d)含有氨基酸序列WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:75)或 WGNGTTTVTVSS (SEQ ID NO:78)的FR-H4。在一些实施方案中,该结合结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列RASQSFSSSYLA (SEQ ID NO:69)的HVR-L1;(b)含有氨基酸序列GASSRAT (SEQ ID NO:70)的HVR-L2;和(c)含有氨基酸序列QQYDRSPLT (SEQ ID NO:71)的HVR-L3。在一些实施方案中,该结合结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列EIVLTQSPGTLSPGERATLSC (SEQ ID NO:79)的FR-L1;(b)含有氨基酸序列WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:80)的FR-L2;(c)含有氨基酸序列GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:81)的FR-L3;和(d)含有氨基酸序列FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:82)的FR-L4。

[0010] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下六个HVR的结合结构域:(a)含有氨基酸序列SFSX₁S (SEQ ID NO:62)的HVR-H1,其中X₁是Met、Leu或Val;(b)含有氨基酸序列TISGGKTFTDYVDX₁VKG (SEQ ID NO:63)的HVR-H2,其中X₁是Ser或Ala;(c)含有氨基酸序列ANYGX₁X₂FFEY (SEQ ID NO:64)的HVR-H3,其中X₁是Asn或Asp,X₂是Trp或Phe;(d)含有氨基酸序列 RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO:4)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列 AASNRRGS (SEQ ID NO:5)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列 QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6)的HVR-L3。在一些实施方案中,该结合结构域包含以下六个HVR:(a)含有氨基酸序列SFSMS (SEQ ID NO:1)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO:2)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列ANYGNWFFEY (SEQ ID NO:3)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO:4)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASNRRGS (SEQ ID NO:5)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6)的HVR-L3。

[0011] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:36具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:37具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,该VH结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:12) 的 FR-H1; (b) 含有氨基酸序列 WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:13) 的 FR-H2; (c) 含有氨基酸序列 RFTISRDDSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:14) 的 FR-H3; 和 (d) 含有氨基酸序列 WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:15) 的 FR-H4。在一些实施方案中, 该 VH 结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:36。在一些实施方案中, 该 VL 结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:25) 的 FR-L1; (b) 含有氨基酸序列 WFQQKPGQPPRLIF (SEQ ID NO:26) 的 FR-L2; (c) 含有氨基酸序列 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC (SEQ ID NO:27) 的 FR-L3; 和 (d) 含有氨基酸序列 FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:28) 的 FR-L4。在一些实施方案中, 该 VL 结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:37。在一些实施方案中, 该 VH 结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列 DVNLVESGGGSKVPGGSLKLSCVASGFTFS (SEQ ID NO:16) 的 FR-H1; (b) 含有氨基酸序列 WVRQTPEKRLEWVA (SEQ ID NO:17) 的 FR-H2; (c) 含有氨基酸序列 RFTISRDDAKNTLYLQMSSLE SEDTAMYYCTR (SEQ ID NO:18) 的 FR-H3; 和 (d) 含有氨基酸序列 WGAGTTAVVSS (SEQ ID NO:19) 的 FR-H4。在一些实施方案中, 该 VH 结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:38。在一些实施方案中, 该 VL 结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列 DIVLTQSPGFLVSLGQRATISC (SEQ ID NO:29) 的 FR-L1; (b) 含有氨基酸序列 WFQQKPGQPPKLLIF (SEQ ID NO:30) 的 FR-L2; (c) 含有氨基酸序列 GVPARFSGSGSGTDFTSLNIHPMEEDDTAMYFC (SEQ ID NO:31) 的 FR-L3; 和 (d) 含有氨基酸序列 FGSQGTKLEIK (SEQ ID NO:32) 的 FR-L4。在一些实施方案中, 该 VL 结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:39。在一些实施方案中, 该 VH 结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:12) 或 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:20) 的 FR-H1; (b) 含有氨基酸序列 WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:13) 或 WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO:21) 的 FR-H2; (c) 含有氨基酸序列 RFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:22)、RFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:23)、RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:24) 或 RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:14) 的 FR-H3; (d) 含有氨基酸序列 WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:15) 的 FR-H4。在一些实施方案中, 该 VH 结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:40。在一些实施方案中, 该 VL 结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:25) 的 FR-L1; (b) 含有氨基酸序列 WFQQKPGQPPRLIF (SEQ ID NO:26) 的 FR-L2; (c) 含有氨基酸序列 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC (SEQ ID NO:27)、GVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC (SEQ ID NO:33)、GVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC (SEQ ID NO:34) 或 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC (SEQ ID NO:35) 的 FR-L3; 和 (d) 含有氨基酸序列 FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:28) 的 FR-L4。在一些实施方案中, 该 VL 结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:51。

[0012] 在另一方面, 本发明特征在于特异性结合 IL-33 的分离的抗体, 其中该抗体包含含有以下的结合结构域: (a) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:36 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VH 结构域; 和 (b) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:37 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VL 结构域。

[0013] 在另一方面, 本发明特征在于特异性结合 IL-33 的分离的抗体, 其中该抗体包含含有以下的结合结构域: (a) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:38 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VH 结构域; 和 (b) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:39 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VL 结构域。

[0014] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:40 具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域;和(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:51具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。

[0015] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下六个HVR的结合结构域:(a)含有氨基酸序列 SSIFYWG (SEQ ID NO:65)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列 SIYYSGRTYYNPX₁LKS (SEQ ID NO:90)的HVR-H2,其中X₁是Ser 或Ala;(c)含有氨基酸序列AGGLYNWNDESFSFYMDV (SEQ ID NO:68) 的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASQSFSSSYLA (SEQ ID NO:69)的 HVR-L1;(e)含有氨基酸序列GASSRAT (SEQ ID NO:70)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QQYDRSPLT (SEQ ID NO:71)的HVR-L3。在一些实施方案中,该结合结构域包含以下六个HVR:(a)含有氨基酸序列 SSIFYWG (SEQ ID NO:65)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列 SIYYSGRTYYNP₁SLKS (SEQ ID NO:66)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列AGGLYNWNDESFSFYMDV (SEQ ID NO:68)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASQSFSSSYLA (SEQ ID NO:69)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列GASSRAT (SEQ ID NO:70)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列 QQYDRSPLT (SEQ ID NO:71)的HVR-L3。在一些实施方案中,该结合结构域包含以下六个HVR:(a)含有氨基酸序列SSIFYWG (SEQ ID NO:65) 的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列SIYYSGRTYYNPALKS (SEQ ID NO:67) 的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列AGGLYNWNDESFSFYMDV (SEQ ID NO:68)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASQSFSSSYLA (SEQ ID NO: 69)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列GASSRAT (SEQ ID NO:70)的 HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QQYDRSPLT (SEQ ID NO:71)的 HVR-L3。

[0016] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:84 具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:85具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,该VH结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列ELQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIR (SEQ ID NO:72)的FR-H1;(b)含有氨基酸序列WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO:73)的FR-H2;(c)含有氨基酸序列RVTISVDTSKNQFSLMLTSVTA ADTAVYYCAR (SEQ ID NO:74)的FR-H3;和(d)含有氨基酸序列WGQGT₁TVTVSS (SEQ ID NO:75)的FR-H4。在一些实施方案中,该VH结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:84。在一些实施方案中,该VL结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列EIVLTQSPGTL₁SLSPGERATLSC (SEQ ID NO:79)的FR-L1;(b)含有氨基酸序列WYQQKPGQAPRL₁LIY (SEQ ID NO:80)的FR-L2;(c)含有氨基酸序列GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:81)的FR-L3;和(d)含有氨基酸序列FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 82)的FR-L4。在一些实施方案中,该VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:85。在一些实施方案中,该VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 86。在一些实施方案中,该VL结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列 EIVLTQSPGTL₁SLSPGERATLSC (SEQ ID NO:79)的FR-L1;(b)含有氨基酸序列WYQQKPGQAPRL₁LIY (SEQ ID NO:80)的FR-L2;(c)含有氨基酸序列GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 81)的FR-L3;和(d)含有氨基酸序列FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:82)的 FR-L4。在一些实施方案中,该VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:87。在一些实施方案中,该VH结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIR (SEQ ID NO:76) 的 FR-H1; (b) 含有氨基酸序列 WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO:73) 的 FR-H2; (c) 含有氨基酸序列 RVTISVDTSKNQFSLMLTSVT AADTAVYYCAR (SEQ ID NO:74) 的 FR-H3; 和 (d) 含有氨基酸序列 WGNGTTVTVSS (SEQ ID NO:78) 的 FR-H4。在一些实施方案中, 该 VH 结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:88。在一些实施方案中, 该 VL 结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列 EIVLTQSPGTLSPGERATLSC (SEQ ID NO:79) 的 FR-L1; (b) 含有氨基酸序列 WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:80) 的 FR-L2; (c) 含有氨基酸序列 GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:81) 的 FR-L3; 和 (d) 含有氨基酸序列 FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:82) 的 FR-L4。在一些实施方案中, 该 VL 结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:89。

[0017] 在另一方面, 本发明特征在于特异性结合 IL-33 的分离的抗体, 其中该抗体包含含有以下的结合结构域: (a) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:84 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VH 结构域; 和 (b) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:85 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VL 结构域。

[0018] 在另一方面, 本发明特征在于特异性结合 IL-33 的分离的抗体, 其中该抗体包含含有以下的结合结构域: (a) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:86 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VH 结构域; 和 (b) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:87 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VL 结构域。

[0019] 在另一方面, 本发明特征在于特异性结合 IL-33 的分离的抗体, 其中该抗体包含含有以下的结合结构域: (a) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:88 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VH 结构域; 和 (b) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:89 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VL 结构域。

[0020] 在另一方面, 本发明特征在于特异性结合 IL-33 的分离的抗体, 其中该抗体包含含有以下六个 HVR 的结合结构域: (a) 含有氨基酸序列 NYX_1MN (SEQ ID NO:97) 的 HVR-H1, 其中 X_1 是 Trp、Phe 或 Tyr; (b) 含有氨基酸序列 $EITLKFNX_1YX_2THYAESVKG$ (SEQ ID NO:98) 的 HVR-H2, 其中 X_1 是 Asn、Asp、Ser 或 Ala, X_2 是 Ser 或 Ala; (c) 含有氨基酸序列 $RNYGX_1X_2YINV$ (SEQ ID NO:99) 的 HVR-H3, 其中 X_1 是 Asp 或 Asn, X_2 是 Trp 或 Phe; (d) 含有氨基酸序列 $RASESVDKFGX_1SFLN$ (SEQ ID NO:100) 的 HVR-L1, 其中 X_1 是 Met、Val 或 Leu; (e) 含有氨基酸序列 VASSQGS (SEQ ID NO:113) 的 HVR-L2; 和 (f) 含有氨基酸序列 QQSKDIPYT (SEQ ID NO:114) 的 HVR-L3。在一些实施方案中, 该结合结构域包含以下六个 HVR: (a) 含有氨基酸序列 NYWMN (SEQ ID NO:101) 的 HVR-H1; (b) 含有氨基酸序列 EITLKFN NYSTHYAESVKG (SEQ ID NO:104) 的 HVR-H2; (c) 含有氨基酸序列 RNYGDWYINV (SEQ ID NO:109) 的 HVR-H3; (d) 含有氨基酸序列 RASESVDKFGMSFLN (SEQ ID NO:112) 的 HVR-L1; (e) 含有氨基酸序列 VASSQGS (SEQ ID NO:113) 的 HVR-L2; 和 (f) 含有氨基酸序列 QQSKDIPYT (SEQ ID NO:114) 的 HVR-L3。在一些实施方案中, 该结合结构域包含以下六个 HVR: (a) 含有氨基酸序列 NYWMN (SEQ ID NO:101) 的 HVR-H1; (b) 含有氨基酸序列 EITLKFN NYSTHYAESVKG (SEQ ID NO:104) 的 HVR-H2; (c) 含有氨基酸序列 RNYGNWYINV (SEQ ID NO:110) 的 HVR-H3; (d) 含有氨基酸序列 RASESVDKFGMSFLN (SEQ ID NO:112) 的 HVR-L1; (e) 含有氨基酸序列 VASSQGS (SEQ ID NO:113) 的 HVR-L2; 和 (f) 含有氨基酸序列 QQSKDIPYT (SEQ ID NO:114) 的 HVR-L3。在一些实施方案中, 该结合结构域包含以下六个 HVR: (a) 含有氨基酸序列 NYWMN (SEQ ID NO:101) 的 HVR-H1; (b) 含有氨基酸

序列EITLKFNDYSTHYAESVKG (SEQ ID NO:105)的HVR-H2; (c) 含有氨基酸序列RNYGNWYINV (SEQ ID NO: 110)的HVR-H3; (d) 含有氨基酸序列RASESVDKFGVSFLN (SEQ ID NO: 115)的HVR-L1; (e) 含有氨基酸序列VASSQGS (SEQ ID NO:113)的 HVR-L2;和(f) 含有氨基酸序列QQSKDIPYT (SEQ ID NO:114)的 HVR-L3。

[0021] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域: (a) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO:134 具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域; (b) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO:135具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c) 如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,该VH结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCLVASGFTFS (SEQ ID NO:117)的 FR-H1; (b) 含有氨基酸序列WVRQSPEKGLEWMA (SEQ ID NO:119)的 FR-H2; (c) 含有氨基酸序列 RFSISRDDSKSTVYLQMNNLRAEDTGIYYCAR (SEQ ID NO:121)的 FR-H3;和(d) 含有氨基酸序列WGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 124)的 FR-H4。在一些实施方案中,该VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 134。在一些实施方案中,该VL结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列 DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISC (SEQ ID NO:126)的FR-L1; (b) 含有氨基酸序列WFQQKPGQPPKLLIF (SEQ ID NO:128)的FR-L2; (c) 含有氨基酸序列GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDTAMYFC (SEQ ID NO: 130)的FR-L3;和(d) 含有氨基酸序列FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:132) 的FR-L4。在一些实施方案中,该VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 135。

[0022] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域: (a) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO:136 具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域; (b) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO:137具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c) 如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,该VH结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:118)的 FR-H1; (b) 含有氨基酸序列WVRQAPGKGLEWMA (SEQ ID NO:120) 的FR-H2; (c) 含有氨基酸序列 RFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:122)或 RFTISRDDSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:123)的 FR-H3;和(d) 含有氨基酸序列WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:125)的 FR-H4。在一些实施方案中,该VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 138。在一些实施方案中,该VL结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:127)的FR-L1; (b) 含有氨基酸序列WYQQKPGQPPKLLIF (SEQ ID NO:129)的FR-L2; (c) 含有氨基酸序列GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO: 131)的FR-L3;和(d) 含有氨基酸序列FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:133) 的FR-L4。在一些实施方案中,该VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 139。

[0023] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域: (a) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO:134 具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域;和(b) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO:135具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。

[0024] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域: (a) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO:136 具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域;和(b) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO:137具有至少99%序列同一性

的氨基酸序列的VL结构域。

[0025] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:138 具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域;和(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:139具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。

[0026] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下六个HVR的结合结构域:(a)含有氨基酸序列 KFWMN (SEQ ID NO:158)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列 EIRLX₁X₂INYVKDYAESVKG (SEQ ID NO:161)的HVR-H2,其中X₁是 Asn或Ser, X₂是Ser或Ala;(c)含有氨基酸序列RNYGNWFFEI (SEQ ID NO:160)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASESVDRYGISFMN (SEQ ID NO:164)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASNQGS (SEQ ID NO:165)的 HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QHSKEVPYT (SEQ ID NO:166)的 HVR-L3。在一些实施方案中,该结合结构域包含以下六个HVR:(a)含有氨基酸序列KFWMN (SEQ ID NO:158)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列 EIRLNSINYVKDYAESVKG (SEQ ID NO:159)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列RNYGNWFFEI (SEQ ID NO:160)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASESVDRYGISFMN (SEQ ID NO:164)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASNQGS (SEQ ID NO:165)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列 QHSKEVPYT (SEQ ID NO:166)的HVR-L3。在一些实施方案中,该结合结构域包含以下六个HVR:(a)含有氨基酸序列KFWMN (SEQ ID NO:158) 的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列EIRLSSINYVKDYAESVKG (SEQ ID NO:162)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列RNYGNWFFEI (SEQ ID NO: 160)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASESVDRYGISFMN (SEQ ID NO: 164)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASNQGS (SEQ ID NO:165)的 HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列 QHSKEVPYT (SEQ ID NO:166)的 HVR-L3。在一些实施方案中,该结合结构域包含以下六个HVR:(a)含有氨基酸序列KFWMN (SEQ ID NO:158)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列EIRLNAINYVKDYAESVKG (SEQ ID NO:163)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列RNYGNWFFEI (SEQ ID NO:160)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASESVDRYGISFMN (SEQ ID NO:164)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASNQGS (SEQ ID NO:165)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列 QHSKEVPYT (SEQ ID NO:166)的HVR-L3。

[0027] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:183 具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:184具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,该VH结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列 EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFN (SEQ ID NO:167)的 FR-H1;(b)含有氨基酸序列 WVRQSPEKGLEWVA (SEQ ID NO:168)的 FR-H2;(c)含有氨基酸序列 RFTISRDDSKNSVYLQMNNL RAEDTGIYYCIR (SEQ ID NO:169)的 FR-H3;和(d)含有氨基酸序列WGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 170)的 FR-H4。在一些实施方案中,该VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 183。在一些实施方案中,该VL结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC (SEQ ID NO:175)的FR-L1;(b)含有氨基酸序列WFQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:176)的FR-L2;(c)含有氨基酸序列GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPLEEDDAAMYFC (SEQ ID NO: 177)的FR-L3;和(d)含有氨基酸序列FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:178) 的FR-L4。在一些实施方案中,该VL结构域包含

氨基酸序列SEQ ID NO: 184。

[0028] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:185 具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:186具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,该VH结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN(SEQ ID NO:171)的FR-H1;(b)含有氨基酸序列WVRQAPGKGLEWVA(SEQ ID NO:172)的FR-H2;(c)含有氨基酸序列RFTISRDNKNSVYLQMNSLRAEDTAVYYCIR(SEQ ID NO:173)的FR-H3;和(d)含有氨基酸序列WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:174)的FR-H4。在一些实施方案中,该VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 185。在一些实施方案中,该VL结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:179)的FR-L1;(b)含有氨基酸序列WFQQKPGKAPKLLIY(SEQ ID NO:180)的FR-L2;(c)含有氨基酸序列GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC(SEQ ID NO: 181)的FR-L3;和(d)含有氨基酸序列FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:182)的FR-L4。在一些实施方案中,该VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 186。在一些实施方案中,该VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 187。在一些实施方案中,该VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:188。在一些实施方案中,该VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:189。在一些实施方案中,该VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:190。

[0029] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:183 具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域;和(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:184具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。

[0030] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:185 具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域;和(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:186具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。

[0031] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:187 具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域;和(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:188具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。

[0032] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:189 具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域;和(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:190具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。

[0033] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下六个HVR的结合结构域:(a)含有氨基酸序列DYNMN(SEQ ID NO:191)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列DINPKX₁X₂DTFYNQNFKD(SEQ ID NO:192)的HVR-H2,其中X₁是Asn 或Ser,X₂是Gly或Ala;(c)含有氨基酸序列HYYYGSSYGGFVY(SEQ ID NO:196)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列HASQNINWLS(SEQ ID NO: 197)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASKLHT(SEQ ID NO:

198)的 HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QQGQSYPLT(SEQ ID NO:199)的 HVR-L3。在一些实施方案中,该结合结构域包含以下六个HVR:(a)含有氨基酸序列DYNMN(SEQ ID NO:191)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列 DINPKNGDTFYNNFKD(SEQ ID NO:193)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列HYYYGSSYGGFVY(SEQ ID NO:196)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列HASQNINWLS(SEQ ID NO:197)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列 AASKLHT(SEQ ID NO:198)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列 QQGQSYPLT(SEQ ID NO:199)的HVR-L3。在一些实施方案中,该结合结构域包含以下六个HVR:(a)含有氨基酸序列DYNMN(SEQ ID NO:191) 的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列 DINPKSGDTFYNNFKD(SEQ ID NO: 194)或DINPKNADTFYNNFKD(SEQ ID NO:195)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列HYYYGSSYGGFVY(SEQ ID NO:196)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列 HASQNINWLS(SEQ ID NO:197)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASKLHT(SEQ ID NO:198)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列 QQGQSYPLT(SEQ ID NO:199)的HVR-L3。

[0034] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:216 具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:217具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,该VH结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列 EVLLQQSGPELVKPGASVKISCNASGYTFS(SEQ ID NO:200)的 FR-H1;(b)含有氨基酸序列 WVKQSHGKSLESIG(SEQ ID NO:201)的 FR-H2;(c)含有氨基酸序列 KATLTIDKSSSTVYMELRSLTSEDAMYYCAR(SEQ ID NO:202)的 FR-H3;和(d)含有氨基酸序列WGQGTLLTVAA(SEQ ID NO:203)的 FR-H4。在一些实施方案中,该VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 216。在一些实施方案中,该VL结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列 DIQMNQSPSSLSASLGDTITITC(SEQ ID NO:208)的FR-L1;(b)含有氨基酸序列WYQQKAGNNPKLLIY(SEQ ID NO:209)的FR-L2;(c)含有氨基酸序列GVPSRFTGSGSGTLFTLTISSLQPEDIATYYC(SEQ ID NO: 210)的FR-L3;和(d)含有氨基酸序列FGSGTNLELK(SEQ ID NO:211) 的FR-L4。在一些实施方案中,该VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 217。

[0035] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:218 具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:219具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,该VH结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFS(SEQ ID NO:204)的 FR-H1;(b)含有氨基酸序列 WVRQAPGQGLESIG(SEQ ID NO:205)的 FR-H2;(c)含有氨基酸序列RATLTIDKSTSTAYLESSLRSEDTAVYYCAR(SEQ ID NO:206)的 FR-H3;和(d)含有氨基酸序列WGQGTLLTVSS(SEQ ID NO:207)的 FR-H4。在一些实施方案中,该VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 218。在一些实施方案中,该VL结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:212)的FR-L1;(b)含有氨基酸序列WYQQKPGKNPKLLIY(SEQ ID NO:213)的FR-L2;(c)含有氨基酸序列GVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO: 214)的FR-L3;和(d)含有氨基酸序列FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:215) 的FR-L4。在一些实施方案中,该VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 219。

[0036] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:216 具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域;和(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:217具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。在另一实施方案中,该VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:220。在另一实施方案中,该VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:219。

[0037] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:218 具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域;和(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:219具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。

[0038] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:220 具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域;和(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:219具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。

[0039] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下六个HVR的结合结构域:(a)含有氨基酸序列SYWIN (SEQ ID NO:222)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列 RIAPGSGFISYNELFKD (SEQ ID NO:223)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列 EFYYGSFYGGFAY (SEQ ID NO:224)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列 HASQNIHVWLS (SEQ ID NO:225)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列 KASTLHT (SEQ ID NO:226)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列 QQGQSSPLT (SEQ ID NO:227)的HVR-L3。

[0040] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:236 具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:237具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,该VH结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列 QVQLQQSGNDLVKPGASVKLSCKASGYTFT (SEQ ID NO:228)的FR-H1;(b)含有氨基酸序列 WIKRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:229)的FR-H2;(c)含有氨基酸序列 KATLTVDTSSTAYIQLGSL SSEDNAVYFCAR (SEQ ID NO:230)的FR-H3;和(d)含有氨基酸序列WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:231)的FR-H4。在一些实施方案中,该VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:236。在一些实施方案中,该VL结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列 DIQMNQSPSSLSASLGDITITTC (SEQ ID NO:232)的FR-L1;(b)含有氨基酸序列WYQQKPGNIPKLLIY (SEQ ID NO:233)的FR-L2;(c)含有氨基酸序列GVPSRFNGSGSGTGTFTLTISLQPEDATYYC (SEQ ID NO:234)的FR-L3;和(d)含有氨基酸序列FGAGTKLEVK (SEQ ID NO:235)的FR-L4。在一些实施方案中,该VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:237。

[0041] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:246 具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:247具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,该VH结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO:238)的FR-H1;(b)含有氨基酸序列

WVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:239) 的 FR-H2; (c) 含有氨基酸序列 RVTITRDTSTSTAYLELSSL RSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:240) 的 FR-H3; 和 (d) 含有氨基酸序列 WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:241) 的 FR-H4。在一些实施方案中, 该 VH 结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 246。在一些实施方案中, 该 VL 结构域进一步包含: (a) 含有氨基酸序列 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:242) 的 FR-L1; (b) 含有氨基酸序列 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:243) 的 FR-L2; (c) 含有氨基酸序列 GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 244) 的 FR-L3; 和 (d) 含有氨基酸序列 FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:245) 的 FR-L4。在一些实施方案中, 该 VL 结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 247。

[0042] 在另一方面, 本发明特征在于特异性结合 IL-33 的分离的抗体, 其中该抗体包含含有以下的结合结构域: (a) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:236 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VH 结构域; 和 (b) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:237 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VL 结构域。

[0043] 在另一方面, 本发明特征在于特异性结合 IL-33 的分离的抗体, 其中该抗体包含含有以下的结合结构域: (a) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:246 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VH 结构域; 和 (b) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:247 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VL 结构域。

[0044] 在另一方面, 本发明特征在于特异性结合 IL-33 的分离的抗体, 其中该抗体包含含有以下六个 HVR 的结合结构域: (a) 含有氨基酸序列 GSAX₁H (SEQ ID NO:248) 的 HVR-H1, 其中 X₁ 是 Met 或 Ile; (b) 含有氨基酸序列 RIRSX₁X₂NX₃YATX₄YX₅ASVKG (SEQ ID NO:249) 的 HVR-H2, 其中 X₁ 是 Arg 或 Lys, X₂ 是 Asn、Thr 或 Gly, X₃ 是 Asn 或 Ser, X₄ 是 Ala 或 Glu, X₅ 是 Ala 或 Asp; (c) 含有氨基酸序列 X₁X₂X₃X₄PFDY (SEQ ID NO:250) 的 HVR-H3, 其中 X₁ 是 Leu 或 Gln, X₂ 是 Gln、Gly 或 Phe, X₃ 是 Gln 或 Gly, X₄ 是 Pro 或 Asp; (d) 含有氨基酸序列 RASQGIRNDLD (SEQ ID NO:251) 的 HVR-L1; (e) 含有氨基酸序列 AASSLQS (SEQ ID NO:252) 的 HVR-L2; 和 (f) 含有氨基酸序列 LQHX₁X₂YPX₃T (SEQ ID NO:253) 的 HVR-L3, 其中 X₁ 是 Asp 或 Ser, X₂ 是 Ser 或 Ile, X₃ 是 Leu 或 Pro。在一些实施方案中, 该结合结构域包含以下六个 HVR: (a) 含有氨基酸序列 GSAMH (SEQ ID NO:254) 的 HVR-H1; (b) 含有氨基酸序列 RIRSRNNYATAYAASVKG (SEQ ID NO:255) 的 HVR-H2; (c) 含有氨基酸序列 LQQPPFDY (SEQ ID NO:256) 的 HVR-H3; (d) 含有氨基酸序列 RASQGIRNDLD (SEQ ID NO:251) 的 HVR-L1; (e) 含有氨基酸序列 AASSLQS (SEQ ID NO:252) 的 HVR-L2; 和 (f) 含有氨基酸序列 LQHDSYPLT (SEQ ID NO:257) 的 HVR-L3。在一些实施方案中, 该结合结构域包含以下六个 HVR: (a) 含有氨基酸序列 GSAIH (SEQ ID NO:258) 的 HVR-H1; (b) 含有氨基酸序列 RIRSRTNNYATEYDASVKG (SEQ ID NO:259) 的 HVR-H2; (c) 含有氨基酸序列 LGQPPFDY (SEQ ID NO:260) 的 HVR-H3; (d) 含有氨基酸序列 RASQGIRNDLD (SEQ ID NO:251) 的 HVR-L1; (e) 含有氨基酸序列 AASSLQS (SEQ ID NO:252) 的 HVR-L2; 和 (f) 含有氨基酸序列 LQHSIYPPT (SEQ ID NO:261) 的 HVR-L3。在一些实施方案中, 该结合结构域包含以下六个 HVR: (a) 含有氨基酸序列 GSAMH (SEQ ID NO:254) 的 HVR-H1; (b) 含有氨基酸序列 RIRSKGNSYATAYAASVKG (SEQ ID NO:262) 的 HVR-H2; (c) 含有氨基酸序列 QFGDPFDY (SEQ ID NO:263) 的 HVR-H3; (d) 含有氨基酸序列 RASQGIRNDLD (SEQ ID NO:251) 的 HVR-L1; (e) 含有氨基酸序列 AASSLQS (SEQ ID NO:252) 的 HVR-L2; 和 (f) 含有氨基酸序列 LQHDSYPLT (SEQ ID NO:257) 的 HVR-L3。

[0045] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:282 具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:283具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,该VH结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列QVQLVQSGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFS (SEQ ID NO:264)的FR-H1;(b)含有氨基酸序列WVRQASGKGLEWVG (SEQ ID NO:267)的FR-H2;(c)含有氨基酸序列RFTISRDDSKRTTYLQMNSLKTEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:269)的FR-H3;和(d)含有氨基酸序列WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:272)的FR-H4。在一些实施方案中,该VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:282。在一些实施方案中,该VL结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:273)的FR-L1;(b)含有氨基酸序列WYQQKPGKAPKRLIY (SEQ ID NO:276)的FR-L2;(c)含有氨基酸序列GVPSRFNGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:277)的FR-L3;和(d)含有氨基酸序列FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:280)的FR-L4。在一些实施方案中,该VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:283。

[0046] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:284 具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:285具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,该VH结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列EVQLVESGGDLVQPGGSLKLSAASGFTFS (SEQ ID NO:265)的FR-H1;(b)含有氨基酸序列WVRQASGKGLEWVG (SEQ ID NO:267)的FR-H2;(c)含有氨基酸序列RFTISRDDSKRTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:270)的FR-H3;和(d)含有氨基酸序列WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:272)的FR-H4。在一些实施方案中,该VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:284。在一些实施方案中,该VL结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:274)的FR-L1;(b)含有氨基酸序列WYQQKPGKAPKRLIY (SEQ ID NO:276)的FR-L2;(c)含有氨基酸序列GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:278)的FR-L3;和(d)含有氨基酸序列FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:281)的FR-L4。在一些实施方案中,该VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:285。

[0047] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下的结合结构域:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:286 具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:287具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,该VH结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFS (SEQ ID NO:266)的FR-H1;(b)含有氨基酸序列WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:268)的FR-H2;(c)含有氨基酸序列RFSISRDDSKRTAYLQMSSLKTEDSAVYYCAR (SEQ ID NO:271)的FR-H3;和(d)含有氨基酸序列WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:272)的FR-H4。在一些实施方案中,该VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:286。在一些实施方案中,该VL结构域进一步包含:(a)含有氨基酸序列AIRITQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:275)的FR-L1;(b)含有氨基酸序列WYQQKPGKAPKRLIY (SEQ ID NO:276)的FR-L2;(c)

含有氨基酸序列GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 279) 的FR-L3; 和 (d) 含有氨基酸序列FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 280) 的FR-L4。在一些实施方案中, 该VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 287。

[0048] 在另一方面, 本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体, 其中该抗体包含含有以下的结合结构域: (a) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO: 282 具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域; 和 (b) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO: 283具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。

[0049] 在另一方面, 本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体, 其中该抗体包含含有以下的结合结构域: (a) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO: 284 具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域; 和 (b) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO: 285具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。

[0050] 在另一方面, 本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体, 其中该抗体包含含有以下的结合结构域: (a) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO: 286 具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域; 和 (b) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO: 287具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。

[0051] 在另一方面, 本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体, 其中该抗体包含: (a) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO: 288具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的重链; 和 (b) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO: 289具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的轻链。

[0052] 在另一方面, 本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体, 其中该抗体包含: (a) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO: 290具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的重链; 和 (b) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO: 291具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的轻链。

[0053] 在另一方面, 本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体, 其中该抗体包含: (a) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO: 292具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的重链; 和 (b) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO: 293具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的轻链。

[0054] 在另一方面, 本发明特征在于特异性结合IL-33的分离的抗体, 其中该抗体包含: (a) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO: 294具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的重链; 和 (b) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO: 295具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的轻链。

[0055] 在任意前述方面的一些实施方案中, 该抗体特异性结合人或食蟹猴 IL-33。在一些实施方案中, 该抗体特异性结合人和食蟹猴二者的IL-33。在一些实施方案中, 该抗体以约1nM或更低的 K_D 结合人和食蟹猴二者的 IL-33。在一些实施方案中, 该抗体以约100fM和约1nM之间的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些实施方案中, 该抗体以约1pM和约200pM之间的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些实施方案中, 该抗体以约75pM和约180pM之间的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些实施方案中, 该抗体以约75pM和约140pM之间的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些实施方案中, 该抗体以约100fM和约1nM之间的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些实施方案中, 该抗体以约1pM和约500pM之间的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些实施方案中, 该抗体以约200pM和约500pM之间的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些实施方案中, 该抗体以约250pM和约500pM之间的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些实施方案中, 该抗体以约1pM和约500pM之间的 K_D 特异性结合人和食蟹猴二者的IL-33。在一些实施方案中, 该抗体以约1pM和约200pM之间的 K_D 特异性结合人IL-33。

[0056] 在任意前述方面的一些实施方案中,该抗体能够抑制IL-33与IL-33 受体的结合。在一些实施方案中,用基于细胞的阻断测定测量该抑制。在一些实施方案中,该抗体以约0.001 μ g/ml和约0.5 μ g/ml之间的90%抑制浓度(IC90)抑制人IL-33与IL-33受体的结合。在一些实施方案中,该IC90 在约0.002 μ g/ml和约0.25 μ g/ml之间。在一些实施方案中,该IC90为约0.17 μ g/ml。在一些实施方案中,该IC90为约0.004 μ g/ml。

[0057] 在任意前述方面的一些实施方案中,该抗体包含无糖基化(aglycosylation)位点突变。

[0058] 在任意前述方面的一些实施方案中,该抗体是单克隆抗体、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0059] 在任意前述方面的一些实施方案中,该抗体是结合IL-33的抗体片段。在一些实施方案中,抗体片段选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv和(Fab')₂片段。

[0060] 在任意前述方面的一些实施方案中,该抗体是全长抗体。在一些实施方案中,该抗体是IgG抗体。在一些实施方案中,该IgG抗体是IgG1抗体。在一些实施方案中,该IgG抗体是IgG4抗体。在一些实施方案中,该IgG4抗体在铰链区中包含突变。在一些实施方案中,该突变是取代突变。在一些实施方案中,该取代突变是在氨基酸残基S228(EU编号)处。在一些实施方案中,该取代突变是S228P突变。

[0061] 在任意前述方面的一些实施方案中,该抗体是单特异性抗体。

[0062] 在任意前述方面的一些实施方案中,该抗体是多特异性抗体。在一些实施方案中,该抗体是双特异性抗体。在一些实施方案中,该双特异性抗体包含结合第二生物分子的第二结合结构域,其中该第二生物分子选自白细胞介素-13(IL-13)、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-5(IL-5)、白细胞介素-17(IL-17)、因子D、HtrA1、VEGF和VEGF受体。在一些实施方案中,该第二生物分子是因子D。在一些实施方案中,该第二生物分子是HtrA1。在一些实施方案中,该第二生物分子是VEGF。在一些实施方案中,该第二生物分子是IL-13。在一些实施方案中,该第二结合结构域包含以下六个HVR:(a)含有氨基酸序列AYSVN(SEQ ID NO:296)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列MIWGDGKIVYNSALKS(SEQ ID NO:297)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列DGYYPYAMDN(SEQ ID NO:298)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASKSVDSYGNSFMH(SEQ ID NO:299)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列LASNLES(SEQ ID NO:300)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QQNNEDPRT(SEQ ID NO:301)的HVR-L3。在一些实施方案中,该第二结合结构域包含:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:302具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域;(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:303具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些实施方案中,该VH结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:302。在一些实施方案中,该VL结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:303。

[0063] 在另一方面,本发明特征在于特异性结合IL-33和IL-13二者的分离的抗体,其中该抗体包含含有以下六个HVR的特异性结合IL-33的第一结合结构域:(a)含有氨基酸序列SFSMS(SEQ ID NO:1)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列TISGGKFTDYVDSVKG(SEQ ID NO:2)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列ANYGNWFFEY(SEQ ID NO:3)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASESVAKYGLSLLN(SEQ ID NO:4)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASNRRGS(SEQ ID NO:5)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QQSKEVPFT(SEQ ID NO:6)的HVR-L3;及含有以下六个HVR的

特异性结合IL-13的第二结合结构域：(a) 含有氨基酸序列AYSVN (SEQ ID NO: 296) 的HVR-H1；(b) 含有氨基酸序列MIWGDGKIVYNSALKS (SEQ ID NO:297) 的HVR-H2；(c) 含有氨基酸序列DGYYPYAMDN (SEQ ID NO: 298) 的HVR-H3；(d) 含有氨基酸序列RASKSVDSYGNSFMH (SEQ ID NO: 299) 的HVR-L1；(e) 含有氨基酸序列LASNLES (SEQ ID NO:300) 的 HVR-L2；和(f) 含有氨基酸序列QQNNEDPRT (SEQ ID NO:301) 的 HVR-L3。

[0064] 在另一方面，本发明特征在于特异性结合IL-33和IL-13二者的分离的抗体，其中该抗体包含含有以下六个HVR的特异性结合IL-33的第一结合结构域：(a) 含有氨基酸序列SSIFYWG (SEQ ID NO:65) 的HVR-H1；(b) 含有氨基酸序列SIYYSGRITYYNPSLKS (SEQ ID NO:66) 的HVR-H2；(c) 含有氨基酸序列AGGLYNWNDESFSFYMDV (SEQ ID NO:68) 的 HVR-H3；(d) 含有氨基酸序列RASQSFSSSYLA (SEQ ID NO:69) 的 HVR-L1；(e) 含有氨基酸序列GASSRAT (SEQ ID NO:70) 的HVR-L2；和 (f) 含有氨基酸序列QQYDRSPLT (SEQ ID NO:71) 的HVR-L3；及含有以下六个HVR的特异性结合IL-13的第二结合结构域：(a) 含有氨基酸序列 AYSVN (SEQ ID NO: 296) 的HVR-H1；(b) 含有氨基酸序列 MIWGDGKIVYNSALKS (SEQ ID NO:297) 的HVR-H2；(c) 含有氨基酸序列DGYYPYAMDN (SEQ ID NO:298) 的HVR-H3；(d) 含有氨基酸序列RASKSVDSYGNSFMH (SEQ ID NO:299) 的HVR-L1；(e) 含有氨基酸序列LASNLES (SEQ ID NO: 300) 的HVR-L2；和(f) 含有氨基酸序列 QQNNEDPRT (SEQ ID NO:301) 的HVR-L3。

[0065] 在另一方面，本发明特征在于特异性结合IL-33和IL-13二者的分离的抗体，其中该抗体包含含有以下的特异性结合IL-33的第一结合结构域：(a) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO:36具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域；和(b) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO:37具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域；及含有以下的特异性结合IL-13 的第二结合结构域：(a) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO:302具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域；和(b) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO:303具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。

[0066] 在另一方面，本发明特征在于特异性结合IL-33和IL-13二者的分离的抗体，其中该抗体包含含有以下的特异性结合IL-33的第一结合结构域：(a) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO:84具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域；和(b) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO:85具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域；及含有以下的特异性结合IL-13 的第二结合结构域：(a) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO:302具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域；和(b) 含有与氨基酸序列SEQ ID NO:303具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。

[0067] 在另一方面，本发明特征在于特异性结合IL-33和IL-13二者的分离的抗体，其中该抗体包含：(a) 特异性结合IL-33的第一重链和第一轻链，其中该第一重链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:306具有至少99%序列同一性的氨基酸序列，该第一轻链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:307具有至少99%序列同一性的氨基酸序列；及(b) 特异性结合IL-13的第二重链和第二轻链，其中该第二重链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:304具有至少 99%序列同一性的氨基酸序列，该第二轻链包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 305具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0068] 在另一方面，本发明特征在于特异性结合IL-33和IL-13二者的分离的抗体，其中该抗体包含：(a) 特异性结合IL-33的第一重链和第一轻链，其中该第一重链包含与氨基酸

序列SEQ ID NO:308具有至少99%序列同一性的氨基酸序列,该第一轻链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:309具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;及(b)特异性结合IL-13的第二重链和第二轻链,其中该第二重链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:304具有至少99%序列同一性的氨基酸序列,该第二轻链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:305具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0069] 在任意前述方面的一些实施方案中,该抗体是抗原结合抗体片段。在一些实施方案中,该抗原结合抗体片段选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv和(Fab')₂片段。在一些实施方案中,该抗原结合抗体片段是Fab。

[0070] 在另一方面,本发明特征在于编码本文所述任意抗体的分离的核酸。在另一方面,本发明特征在于用于表达该抗体的包含该分离的核酸的载体(例如表达载体)。在另一方面,本发明特征在于包含前述核酸和/或载体的宿主细胞。在一些实施方案中,该宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,该哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在一些实施方案中,该宿主细胞是原核细胞。在一些实施方案中,该原核细胞是大肠杆菌(E. coli)。

[0071] 在另一方面,本发明特征在于产生本文所述任意抗体的方法,该方法包括在培养基中培养包含任意前述载体(例如表达载体)的宿主细胞。在一些实施方案中,该方法进一步包括从宿主细胞或培养基回收该抗体。

[0072] 在另一方面,本发明特征在于包含前述抗体中任一种的组合物。在一些实施方案中,该组合物进一步包含可药用载体、赋形剂或稀释剂。在一些实施方案中,该组合物是药物组合物。在一些实施方案中,该药物组合物进一步包含ST2结合拮抗剂、因子D结合拮抗剂、HtrA1拮抗剂、VEGF拮抗剂、类胰蛋白酶-β结合拮抗剂、Th2细胞上表达的化学引诱物受体同源分子(CRTH2)结合拮抗剂、白细胞介素-13(IL-13)结合拮抗剂、白细胞介素-17(IL-17)结合拮抗剂、JAK1拮抗剂、和/或白细胞介素-5(IL-5)结合拮抗剂。在一些实施方案中,该药物组合物包含因子D结合拮抗剂。在一些实施方案中,该因子D结合拮抗剂是抗因子D抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该药物组合物包含HtrA1拮抗剂。在一些实施方案中,该HtrA1结合拮抗剂是抗HtrA1抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该药物组合物包含VEGF拮抗剂。在一些实施方案中,该VEGF拮抗剂是抗VEGF抗体或其抗原结合片段。

[0073] 在一些方面,前述抗体中的任一种可以用作药物。

[0074] 在一些方面,前述抗体中的任一种可以用于治疗IL-33介导的障碍。在一些实施方案中,该IL-33介导的障碍选自炎症病症、免疫障碍、纤维性障碍、嗜酸性粒细胞性障碍、感染、疼痛、中枢神经系统障碍、实体瘤和眼科障碍。在一些实施方案中,该炎症病症选自哮喘、脓毒症、脓毒性休克、特应性皮炎、过敏性鼻炎、类风湿性关节炎和慢性阻塞性肺病(COPD)。在一些实施方案中,该免疫障碍选自哮喘、类风湿性关节炎、过敏性鼻炎、银屑病、炎性肠病(IBD)、克隆病、糖尿病和肝病。在一些实施方案中,该纤维性疾病是特发性肺纤维化(IPF)。在一些实施方案中,该嗜酸性粒细胞性障碍是嗜酸性粒细胞相关胃肠障碍(EGID)。在一些实施方案中,该EGID是嗜酸性粒细胞性食管炎。在一些实施方案中,该感染是蠕虫感染、原生动物感染或病毒感染。在一些实施方案中,该原生动物感染是硕大利什曼原生动物(*Leishmania major*)感染。在一些实施方案中,该病毒感染是呼吸道合胞病毒

(RSV) 感染或流行性感冒感染。在一些实施方案中,该疼痛是炎性疼痛。在一些实施方案中,该中枢神经系统障碍是阿尔茨海默病。在一些实施方案中,该实体瘤选自乳腺肿瘤、结肠肿瘤、前列腺肿瘤、肺肿瘤、肾肿瘤、肝肿瘤、胰腺肿瘤、胃肿瘤、肠肿瘤、脑肿瘤、骨肿瘤和皮肤肿瘤。在一些实施方案中,该眼科障碍选自年龄相关黄斑变性 (AMD)、眼视网膜病变、息肉状脉络膜血管病变 (PCV)、糖尿病性黄斑水肿、干眼病、Behcet病、视网膜脱离、青光眼、葡萄膜炎、色素性视网膜炎、莱伯先天性黑矇、Stargardt病、外伤性眼损伤和结膜炎。在一些实施方案中,该AMD是湿性AMD、干性AMD或地图状萎缩 (GA)。在一些实施方案中,该AMD是中期AMD或晚期AMD。在一些实施方案中,该眼视网膜病变是糖尿病性视网膜病变 (DR) 或早产儿视网膜病变 (ROP)。在一些实施方案中,该眼视网膜病变是高原DR。在一些实施方案中,该结膜炎是感染性结膜炎或非感染性结膜炎。在一些实施方案中,该结膜炎是过敏性结膜炎。

[0075] 在一些方面,前述抗体中的任一种可以用于制备用于治疗IL-33介导的障碍的药物。在一些实施方案中,该IL-33介导的障碍选自炎性病症、免疫障碍、纤维性障碍、嗜酸性粒细胞性障碍、感染、疼痛、中枢神经系统障碍、实体瘤和眼科障碍。在一些实施方案中,该炎性病症选自哮喘、脓毒症、脓毒性休克、特应性皮炎、过敏性鼻炎、类风湿性关节炎和慢性阻塞性肺病 (COPD)。在一些实施方案中,该免疫障碍选自哮喘、类风湿性关节炎、过敏性鼻炎、银屑病、炎性肠病 (IBD)、克隆病、糖尿病和肝病。在一些实施方案中,该纤维性疾病是特发性肺纤维化 (IPF)。在一些实施方案中,该嗜酸性粒细胞性障碍是嗜酸性粒细胞相关胃肠障碍 (EGID)。在一些实施方案中,该EGID是嗜酸性粒细胞性食管炎。在一些实施方案中,该感染是蠕虫感染、原生动物感染或病毒感染。在一些实施方案中,该原生动物感染是硕大利什曼原生动物感染。在一些实施方案中,该病毒感染是呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染或流行性感冒感染。在一些实施方案中,该疼痛是炎性疼痛。在一些实施方案中,该中枢神经系统障碍是阿尔茨海默病。在一些实施方案中,该实体瘤选自乳腺肿瘤、结肠肿瘤、前列腺肿瘤、肺肿瘤、肾肿瘤、肝肿瘤、胰腺肿瘤、胃肿瘤、肠肿瘤、脑肿瘤、骨肿瘤和皮肤肿瘤。在一些实施方案中,该眼科障碍选自年龄相关黄斑变性 (AMD)、眼视网膜病变、息肉状脉络膜血管病变 (PCV)、糖尿病性黄斑水肿、干眼病、Behcet病、视网膜脱离、青光眼、葡萄膜炎、色素性视网膜炎、莱伯先天性黑矇、Stargardt病、外伤性眼损伤和结膜炎。在一些实施方案中,该AMD是湿性AMD、干性AMD或地图状萎缩 (GA)。在一些实施方案中,该AMD是中期AMD或晚期AMD。在一些实施方案中,该眼视网膜病变是糖尿病性视网膜病变 (DR) 或早产儿视网膜病变 (ROP)。在一些实施方案中,该眼视网膜病变是高原DR。在一些实施方案中,该结膜炎是感染性结膜炎或非感染性结膜炎。在一些实施方案中,该结膜炎是过敏性结膜炎。在一些实施方案中,该药物配制用于与ST2结合拮抗剂、因子D结合拮抗剂、HtrA1结合拮抗剂、VEGF拮抗剂、类胰蛋白酶- β 结合拮抗剂、Th2细胞上表达的化学引诱物受体同源分子 (CRTH2) 结合拮抗剂、白细胞介素-13 (IL-13) 结合拮抗剂、白细胞介素-17 (IL-17) 结合拮抗剂、JAK1拮抗剂、和/或白细胞介素-5 (IL-5) 结合拮抗剂组合使用。在一些实施方案中,该药物配制用于与因子D结合拮抗剂组合使用。在一些实施方案中,该因子D结合拮抗剂是抗因子D抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该药物配制用于与HtrA1结合拮抗剂组合使用。在一些实施方案中,该HtrA1结合拮抗剂是抗HtrA1抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该药物配制用于与VEGF拮抗剂组合使用。在一些实施方案中,该VEGF拮抗剂是抗VEGF抗体或其抗原结合片段。

[0076] 在另一方面,本发明提供特异性结合IL-33和因子D二者的双特异性抗体或其抗原结合抗体片段在制备用于治疗地图状萎缩(GA)的药物中的用途。在一些实施方案中,该抗原结合抗体片段是(Fab')₂片段。

[0077] 在另一方面,前述抗体中的任一种可以用于制备用于治疗地图状萎缩(GA)的药物,其中该药物配制用于与因子D结合拮抗剂组合使用。在一些实施方案中,该因子D结合拮抗剂是抗因子D抗体或其抗原结合片段。

[0078] 在另一方面,本发明提供特异性结合IL-33和HtrA1二者的双特异性抗体或其抗原结合抗体片段在制备用于治疗地图状萎缩(GA)、AMD(湿性或干性)、DR、PCV或ROP的药物中的用途。在一些实施方案中,该抗原结合抗体片段是(Fab')₂片段。

[0079] 在另一方面,前述抗体中的任一种可以用于制备用于治疗地图状萎缩(GA)、AMD(湿性或干性)、DR、PCV或ROP的药物,其中该药物配制用于与HtrA1结合拮抗剂组合使用。在一些实施方案中,该HtrA1结合拮抗剂是抗HtrA1抗体或其抗原结合片段。

[0080] 在另一方面,本发明提供特异性结合IL-33和VEGF二者的双特异性抗体或其抗原结合抗体片段在制备用于治疗湿性AMD的药物中的用途。在一些实施方案中,该抗原结合抗体片段是(Fab')₂片段。

[0081] 在另一方面,前述抗体中的任一种可以用于制备用于治疗湿性AMD的药物,其中该药物配制用于与VEGF拮抗剂组合使用。在一些实施方案中,该VEGF拮抗剂是抗VEGF抗体或其抗原结合片段。

[0082] 在另一方面,本发明特征在于在有需要的个体中治疗IL-33介导的障碍的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的前述抗体中的任一种。在一些实施方案中,该IL-33介导的障碍选自炎症病症、免疫障碍、纤维性障碍、嗜酸性粒细胞性障碍、感染、疼痛、中枢神经系统障碍、实体瘤和眼科障碍。在一些实施方案中,该炎症病症选自哮喘、脓毒症、脓毒性休克、特应性皮炎、过敏性鼻炎、类风湿性关节炎和慢性阻塞性肺病(COPD)。在一些实施方案中,该免疫障碍选自哮喘、类风湿性关节炎、过敏性鼻炎、银屑病、炎性肠病(IBD)、克隆病、糖尿病和肝病。在一些实施方案中,该纤维性疾病是特发性肺纤维化(IPF)。在一些实施方案中,该嗜酸性粒细胞性障碍是嗜酸性粒细胞相关胃肠障碍(EGID)。在一些实施方案中,该EGID是嗜酸性粒细胞性食管炎。在一些实施方案中,该感染是蠕虫感染、原生动物感染或病毒感染。在一些实施方案中,该原生动物感染是硕大利什曼原生动物感染。在一些实施方案中,该病毒感染是呼吸道合胞病毒(RSV)感染或流行性感冒感染。在一些实施方案中,该疼痛是炎症疼痛。在一些实施方案中,该中枢神经系统障碍是阿尔茨海默病。在一些实施方案中,该实体瘤选自乳腺肿瘤、结肠肿瘤、前列腺肿瘤、肺肿瘤、肾肿瘤、肝肿瘤、胰腺肿瘤、胃肿瘤、肠肿瘤、脑肿瘤、骨肿瘤和皮肤肿瘤。在一些实施方案中,该眼科障碍选自年龄相关黄斑变性(AMD)、眼视网膜病变、息肉状脉络膜血管病变(PCV)、糖尿病性黄斑水肿、干眼病、Behcet病、视网膜脱离、青光眼、葡萄膜炎、色素性视网膜炎、莱伯先天性黑矇、Stargardt病、外伤性眼损伤和结膜炎。在一些实施方案中,该AMD是湿性AMD、干性AMD或地图状萎缩(GA)。在一些实施方案中,该AMD是中期AMD或晚期AMD。在一些实施方案中,该眼视网膜病变是糖尿病性视网膜病变(DR)或早产儿视网膜病变(ROP)。在一些实施方案中,该眼视网膜病变是高原DR。在一些实施方案中,该结膜炎是感染性结膜炎或非感染性结膜炎。在一些实施方案中,该结膜炎是过敏性结膜炎。在一些实施方案中,该方法进一步包括对该个体施用

ST2结合拮抗剂、因子D结合拮抗剂、HtrA1结合拮抗剂、VEGF拮抗剂、类胰蛋白酶- β 结合拮抗剂、Th2细胞上表达的化学引诱物受体同源分子 (CRTH2) 结合拮抗剂、白细胞介素-13 (IL-13) 结合拮抗剂、白细胞介素-17 (IL-17) 结合拮抗剂、JAK1拮抗剂、和/或白细胞介素-5 (IL-5) 结合拮抗剂。在一些实施方案中,该方法进一步包括对该个体施用因子D结合拮抗剂。在一些实施方案中,该因子D结合拮抗剂是抗因子D抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该方法进一步包括对该个体施用HtrA1结合拮抗剂。在一些实施方案中,该HtrA1结合拮抗剂是抗HtrA1抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该方法进一步包括对该个体施用VEGF拮抗剂。在一些实施方案中,该VEGF拮抗剂是抗VEGF抗体或其抗原结合片段。

[0083] 在另一方面,本发明特征在于在有需要的个体中治疗地图状萎缩 (GA) 的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的特异性结合IL-33和因子 D二者的双特异性抗体或其抗原结合抗体片段。在一些实施方案中,该抗原结合抗体片段是 (Fab')₂ 片段。

[0084] 在另一方面,本发明特征在于在有需要的个体中治疗地图状萎缩 (GA) 的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的前述抗体中的任一种和治疗有效量的因子D结合拮抗剂。在一些实施方案中,该因子D结合拮抗剂是抗因子D抗体或其抗原结合片段。

[0085] 在另一方面,本发明特征在于在有需要的个体中治疗地图状萎缩 (GA)、AMD (湿性或干性)、DR、PCV或ROP的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的特异性结合IL-33和HtrA1二者的双特异性抗体或其抗原结合抗体片段。在一些实施方案中,该抗原结合抗体片段是 (Fab')₂ 片段。

[0086] 在另一方面,本发明特征在于在有需要的个体中治疗地图状萎缩 (GA)、AMD (湿性或干性)、DR、PCV或ROP的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的前述抗体中的任一种和治疗有效量的HtrA1结合拮抗剂。在一些实施方案中,该HtrA1结合拮抗剂是抗HtrA1抗体或其抗原结合片段。

[0087] 在另一方面,本发明特征在于在有需要的个体中治疗湿性AMD的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的特异性结合IL-33和VEGF二者的双特异性抗体或其抗原结合抗体片段。在一些实施方案中,该抗原结合抗体片段是 (Fab')₂ 片段。

[0088] 在另一方面,本发明特征在于在有需要的个体中治疗湿性AMD的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的前述抗体中的任一种和治疗有效量的VEGF拮抗剂。在一些实施方案中,该VEGF拮抗剂是抗VEGF 抗体或其抗原结合片段。

[0089] 在任意前述方法的一些实施方案中,该抗体皮下、静脉内、肌肉内、局部、口服、经皮、腹腔内、眶内、植入、吸入、鞘内、心室内、鼻内、玻璃体内、眼内、眼周、结膜、结膜下、眼筋膜囊下 (subtenonly)、前房内、视网膜下、眼球后或小管内施用。在一些实施方案中,该个体是人。

[0090] 附图简述

[0091] 图1A是显示基于细胞的IL-33阻断测定的示意图的图表。用SEAP 作为NF- κ B/AP-1分泌型碱性磷酸酶的报告基因。用可溶性ST2 (sST2) 作为阳性对照。

[0092] 图1B是显示人IL-33的基于细胞的IL-33阻断测定的结果的图表。

[0093] 图1C是显示食蟹猴 (cyno) IL-33的基于细胞的IL-33阻断测定的结果的图表。

[0094] 图2是显示所示抗IL-33抗体克隆的基于细胞的IL-33阻断测定的结果的图表。

[0095] 图3是显示所示亲本和人源化抗IL-33抗体的基于细胞的IL-33阻断测定的结果

(IC₅₀和IC₉₀)的表格。

[0096] 图4A是显示剖出用于RNA-seq分析的黄斑和周边视网膜的图像。用解剖剪从眼底周边分离上下颞血管弓形组织之间的黄斑 (macular) 区域。从黄斑和周边视网膜组织都分离RNA用于RNA-seq。虚线指示黄斑区域,实线圆指示中央窝 (fovea) 区域。箭指示视神经盘的位置。

[0097] 图4B是显示健康供体眼的黄斑和周边视网膜中IL-1 α 、IL-1 β 、IL-33 和IL-18的表达的图表。分离正常供体眼的黄斑 (n=14) 和周边视网膜 (n=22),通过RNA-seq分析RNA。数据表示为每千碱基每百万总读出的读出 (RPKM)。水平条表示平均值。**,P<0.01;****,P<0.0001;不成对双尾Student t检验。

[0098] 图5A是显示眼的代表性横切面的图像,通过定量分析(参见图5B)研究的中央和外周区域分别用实线和虚线表示。箭指示中央窝和睫状体。比例尺,5mm。

[0099] 图5B和5C是显示来自84岁男性供体的对照眼的中央(图5B)和周边(图5C)视网膜中的IL-33(绿色)、波形蛋白(红色)和GFAP(黄色)的免疫组织化学三重染色的图像。4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色显示为蓝色。箭指示视网膜内核层(INL)中的IL-33⁺Müller细胞;闭箭头(closed arrowhead)指示视网膜色素上皮(RPE)中的IL-33⁺细胞;开箭头(open arrowhead)指示脉络膜血管中的IL-33⁺细胞;尖括号指示神经节细胞层(GCL)中的IL-33⁺星形胶质细胞。比例尺,50 μ m。

[0100] 图5D是显示中央和周边区域各视网膜层中IL-33⁺细胞的定量的图表。在来自年龄在67-89岁范围内的正常人供体(中位年龄84,5名男性和2名女性)的7只眼的中央和周边区域内沿着约500 μ m切片定量IL-33⁺细胞。与周边视网膜相比,中央视网膜内核层(INL)和视网膜色素上皮(RPE)中IL-33⁺细胞的数目更高。GCL,神经节细胞层;ONL,视网膜外核层。*,P<0.05;****,P<0.0001;ns,不显著;不成对双尾Student t检验。

[0101] 图5E是对照供体眼中央区域的GCL、INL、RPE和脉络膜中IL-33⁺细胞的一系列代表性高倍放大图像。IL-33(绿色)、波形蛋白(红色)和GFAP(黄色)共染色显示IL-33⁺星形胶质细胞(GFAP⁺,尖括号)和IL-33⁺Müller细胞(波形蛋白⁺,箭)。通过IL-33(红色)和PLVAP(绿色)共染色显示脉络膜血管的IL-33⁺内皮细胞(开箭头)。闭箭头,IL-33⁺RPE。DAPI染色显示为蓝色。比例尺,10 μ m。

[0102] 图6A是显示来自无眼病史的84岁男性的对照人供体眼和来自诊断患有AMD的82岁女性供体眼的中央视网膜中IL-33(绿色)、Iba1(红色)和GFAP(黄色)的荧光免疫组织化学三重染色的一系列代表性图像。与同一供体的不显示视网膜变性的邻近区域(AMD:非病灶)相比,或者与对照供体眼的中央视网膜(对照:中央)相比,视网膜变性区域(AMD:病灶)中IL-33⁺Müller细胞和单核吞噬细胞(Iba1⁺细胞)的数目显著增加。箭,IL-33⁺Müller细胞;箭头,视网膜下间隙中的Iba1⁺细胞。DAPI(蓝色),细胞核染色。比例尺,100 μ m。

[0103] 图6B是显示对照眼及AMD眼的病灶和非病灶区域的中央视网膜中IL-33(绿色)、Iba1(红色)和GFAP(黄色)的免疫组织化学的一系列代表性高倍放大图像。明场(BF)图像显示AMD病灶部位中的RPE丧失。比例尺,50 μ m。

[0104] 图6C-6E是显示在67-89岁(中位年龄84岁)的7名对照人供体的中央视网膜以及来自82-92岁(中位年龄86岁)的7名AMD供体的眼的病灶和非病灶区域内,沿着约500 μ m长的切片计数的INL中的IL-33⁺Müller细胞(图6C)、脉络膜中的IL-33⁺细胞(图6D)和视网膜中的

Iba1⁺细胞(图6E) 定量的图表。**, $P<0.01$;***, $P<0.001$;****, $P<0.0001$;进行Tukey 事后检验的单因素方差分析。水平条代表平均值。

[0105] 图6F是显示来自人AMD患者的玻璃体中IL-33水平提高的图表。通过ELISA测定从AMD患者($n=6$,1名男性和5名女性,年龄68-91岁,中位年龄79岁)、患有黄斑皱褶(macular pucker)的对照患者($n=12$,3名男性和9名女性,年龄56-79岁,中位年龄72岁)和患有黄斑裂孔的对照患者($n=21$,5名男性和16名女性,年龄45-75岁,中位年龄65岁)获得的玻璃体样品中的IL-33浓度。****, $P<0.0001$;进行Tukey事后检验的单因素方差分析。水平条代表平均值。

[0106] 图7A显示Sprague-Dawley (SD) 大鼠视网膜中IL-33 (棕色) 和波形蛋白 (红色) 免疫组织化学染色的结果。左图图像中的箭指示IL-33⁺Müller细胞。左图中的嵌入图显示IL-33⁺Müller细胞(波形蛋白⁺)。沿着~500长的切片计数中央和周边视网膜INL、RPE、GCL和脉络膜中的IL-33⁺细胞。右图中显示此定量的结果。比例尺,10 μ m。ND,未检测。

[0107] 图7B显示BALB/c小鼠中IL-33 (棕色) 免疫组织化学染色的结果。左图图像中的箭指示IL-33⁺Müller细胞。沿着~500长的切片计数中央和周边视网膜INL、RPE、GCL和脉络膜中的IL-33⁺细胞。右图中显示此定量的结果。比例尺,10 μ m。

[0108] 图7C是显示通过ELISA测定的BALB/c小鼠视网膜中IL-1家族基因(IL-1 α 、IL-1 β 、IL-33和IL-18)的表达的图表。每个数据点代表单只小鼠($n=5$)。数据代表具有相似结果的至少两次实验。

[0109] 图7D是显示用GFAP和波形蛋白特异性抗体或对照抗体进行胞内染色后通过流式细胞术测量的rMC-1细胞中GFAP和波形蛋白的表达的一系列图表。活化的Müller细胞为GFAP⁺。

[0110] 图7E是显示rMC-1细胞的细胞核(“nuc1”)和胞质(“cyto”)级分中的 IL-33表达的Western印迹。在细胞核中检测到IL-33的全长(IL-33p30)和加工形式(IL-33p19),但胞质中只存在IL-33p19。数据代表具有相似结果的至少两次实验。

[0111] 图7F是显示通过qPCR进行的在高葡萄糖培养基(“HG”)中培养的 rMC-1细胞中GFAP表达的时程分析的结果的图表。将GFAP mRNA对 β -肌动蛋白mRNA归一化。0小时时的GFAP表达设为1。数据代表三个重复实验的平均值 \pm SEM。***, $P<0.001$;****, $P<0.0001$;进行Dunnett 事后检验的单因素方差分析。

[0112] 图7G显示在含高葡萄糖(HG)和低葡萄糖(LG)的培养基中培养的 rMC-1细胞中IL-33分泌的ELISA(左图)和Western印迹(右图)分析。大鼠玻璃体和rMC-1培养物上清中都存在IL-33p19。所显示的数据是三个重复孔的平均值 \pm SEM,且代表三次独立实验。***, $P<0.001$;****, $P<0.0001$ 。进行Bonferroni事后检验的双因素方差分析。数据代表具有相似结果的至少两次实验。

[0113] 图7H是显示HG培养基中培养的rMC-1细胞中IL-33p19分泌的增加(参见图7G)并非与细胞死亡增加相关的图表。通过膜联蛋白V和碘化丙锭(PI)染色的流式细胞术分析来评估细胞活率(viability)。选择活细胞为膜联蛋白V⁻PI⁻。所显示的数据是三个重复孔的平均值 \pm SEM。数据代表具有相似结果的至少两次实验。

[0114] 图7I是显示检测光感受器细胞死亡的视网膜切片末端脱氧核苷酸转移酶dUTP缺口末端标记(TUNEL)染色(棕色)的一系列图像。使 Sprague-Dawley (SD) 大鼠暴露于光

(1200lux)所示天数。箭指示TUNEL+ 光感受器。比例尺,50 μ m。

[0115] 图7J是显示通过流式细胞术定量视杆细胞(左图)和视锥细胞(右图)的一系列图表。每个数据点代表单只大鼠($n=8$ /时间点)。*, $P<0.05$;***, $P<0.001$;****, $P<0.0001$ 。

[0116] 图7K显示CLE提高大鼠玻璃体(左图)和视网膜(右图)中IL-33p19的表达和分泌。使SD大鼠暴露于亮光至多10天(参见示意图)。通过ELISA 和Western印迹(WB)分析玻璃体和视网膜中的IL-33表达。用ImageJ软件定量视网膜中IL-33p19与IL-33p30的比值。用重组大鼠IL-33蛋白质(rrIL-33)(氨基酸109-264;约18kDa)作为检测抗体的阳性对照。ELISA中的每个数据点代表来自两次独立实验之一的单只大鼠($n=8$ /时间点)。****, $P<0.0001$;ns,不显著;进行Dunnett事后检验的单因素方差分析。数据代表具有相似结果的至少两次实验。

[0117] 图7L是显示活化rMC-1细胞和光损伤视网膜(CLE)中IL-33转录物的RT-PCR分析的图像。FL,全长。

[0118] 图7M显示,IL-33细胞因子结构域替换为dsRed且具有完整核定位序列(NLS)和染色质结合结构域(CBD)的IL33^{tm2/tm2}小鼠显示IL-33 N-term-dsRed定位在INL中Müller细胞的细胞核中。图像(左图)是 IL33^{tm2/tm2}视网膜平面(flat-mount)的共焦显微成像的Z截面视图。sdRed 信号显示为红色;DAPI信号显示为蓝色。箭指示IL-33⁺Müller细胞。IL33^{tm2/tm2}视网膜(中图)的流式细胞术分析确认了IL-33在Müller细胞(MC)中而不是在视杆细胞、神经节细胞(RGC)或小胶质细胞(MGL)中表达。IL-33N-term-dsRed在CLE后被加工。通过流式细胞术测量CLE第0天和第7天的IL33^{tm2/tm2}Müller细胞的sdRed平均荧光强度(MFI)以及细胞数目(右图)。数据代表通过IL33^{+/+}小鼠的归一化的IL33^{tm2/tm2}小鼠中dsRed 的MFI。每个数据点代表从两次实验合并的单只小鼠($n=6-7$ /组)。Rho,视紫红质;FCS,前向散射。****, $P<0.0001$;不成对双尾Student t检验。数据代表具有相似结果的至少两次实验。

[0119] 图8A是显示CLE后膜结合(ST2L,左图)和可溶性ST2(sST2,右图)表达提高的一系列图表。用对ST2L和sST2特异的探针通过qPCR分析来自暴露于光照多种天数的BALB/c小鼠的视网膜RNA,并通过18s rRNA 表达归一化。ST2表达的倍数变化是相对于未暴露的小鼠中的ST2表达(d0)显示。每个数据点代表单只小鼠($n=5-6$ /时间点)。数据代表两次独立实验。*, $P<0.05$;****, $P<0.0001$;ns,不显著;进行Dunnett事后检验的单因素方差分析。

[0120] 图8B是显示多种视网膜细胞群体上的ST2表达的流式细胞术分析的一系列图表。结果显示光暴露7天后ST2在活化的Müller细胞(MC)上的专一性表达。ST2仅在活化的Müller细胞(GFAP⁺波形蛋白⁺MC)上表达,而不在静息Müller细胞(GFAP⁻波形蛋白⁺MC)、小胶质细胞(CD11b⁺ CD45^{lo}MGL)或光感受器细胞上表达。除同种型对照抗体外,用ST2^{-/-}小鼠作为阴性对照。

[0121] 图8C显示ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠中基线时(d0)和暴露于光照7天后的视网膜厚度的光学相干断层显像(OCT)分析。显示代表性横切OCT图像。通过将每只小鼠的d0视网膜厚度减去d7视网膜厚度来计算视网膜厚度的变化(Δ)($n=10$ /基因型)。所显示的数据代表三次独立实验。比例尺,100 μ m。***, $P<0.001$;****, $P<0.0001$;不成对双尾Student t检验。

[0122] 图8D是显示CLE后IL-1R1^{-/-}和IL-18R1^{-/-}小鼠中缺乏视网膜保护的一系列图表。使ST2^{-/-}、IL-1R1^{-/-}和IL-18R1^{-/-}小鼠以及对应的野生型(+/+) 小鼠暴露于光照14天。通过OCT测量视网膜厚度。通过将单只小鼠的d0 视网膜厚度减去d14视网膜厚度来计算 Δ 视网膜厚

度。每个数据点代表单只小鼠 ($n=10-15$ /基因型)。****, $P<0.0001$ 。

[0123] 图8E是显示ST2^{-/-}小鼠中视杆细胞和视锥细胞得到保护的一系列图表。通过流式细胞术定量基线时 (d0) 和CLE后多种时间点ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠中的视网膜细胞。流式细胞术图 (左上图) 显示门控策略及基线时和 CLE d7ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠中视杆细胞和视锥细胞 ($\times 10^5$) 的百分比以及绝对数目 (圆括号内)。下图图表中的每个数据点代表单只小鼠 ($n=5-6$ /基因型)。数据代表具有相似结果的两次独立实验。Rho, 视紫红质; CAR, 视锥细胞抑制蛋白。*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$; ****, $P<0.0001$; ns, 不显著; 不成对双尾Student t检验。

[0124] 图8F是显示将基线 (d0) 和暴露于光照14天后ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠ONL 厚度作为与视神经乳头 (ONH) 的距离的函数作图的形态度量分析的图表。在上和下四分之一中都观察到ST2^{-/-}小鼠中视网膜ONL的显著保护。所显示的数据时平均值 \pm SEM ($n=5-7$ /基因型)。*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; 进行 Tukey事后检验的双因素方差分析。

[0125] 图8G是显示基线时 (d0) 和CLE 7天后ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠的视网膜电图 (ERG) 分析的一系列图表。显示基线和CLE 7天后25cd \cdot s/m²闪光强度下的代表性ERG记录。CLE 7天后, 与ST2^{+/+}小鼠相比, ST2^{-/-}小鼠中1 和25cd \cdot s/m²闪光强度下的平均暗适应a-和b-波幅显著更大。所显示的数据是平均值 \pm SEM ($n=10$ /基因型)。*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$; 使用Tukey事后检验的双因素方差分析。

[0126] 图9A是显示可溶性ST2的体外活性的一系列图表。在缺乏或存在20 μ g/ml可溶性ST2-His (sST2) 或对照His标记蛋白质的情况下用1ng/ml重组小鼠IL-33刺激骨髓来源肥大细胞 (BMMC) 24小时。通过ELISA定量上清中的IL-13和IL-6分泌。数据代表来自两次独立实验的三个重复实验的平均值 \pm SEM。

[0127] 图9B显示AAV-sST2的表达。用表达sST2-His (sST2) 的AAV载体或空载体 (EV) 感染HEK293细胞。感染后6天, 通过ELISA (左图) 和Western 印迹 (右图) 测定培养物上清中的sST2表达。数据代表两次实验的平均值 \pm SEM ($n=8$)。ND, 未检测; rsST2, 重组可溶性ST2-His。

[0128] 图9C显示AAV-sST2的表达。用表达可溶性ST2的AAV (AAV-sST2) 或AAV空载体 (AAV-EV) 视网膜下注射BALB/c小鼠, AAV空载体作为阴性对照。感染后三周通过ELISA和Western印迹 (WB) 分析视网膜 (左图) 和RPE/脉络膜 (右图) 中sST2的表达。在10 μ g视网膜裂解物和3 μ g RPE/ 脉络膜裂解物上进行ST2和GAPDH的Western印迹。rsST2, 重组可溶性ST2-His。

[0129] 图10是显示施用可溶性ST2保护光感受器免受光毒性应激的一系列图表。用表达可溶性ST2的AAV (AAV-sST2) 视网膜下注射小鼠, 并在感染后暴露于光照21天 (上图中的示意图)。注射AAV空载体 (AAV-EV) 的小鼠作为对照。光暴露之前 (d0) 和暴露7天后 (d7) 通过流式细胞术定量视杆细胞和视锥细胞。每个数据点代表单只小鼠 ($n=10$ /组)。***, $P<0.001$; ****, $P<0.0001$; 不成对双尾Student t检验。数据代表具有相似结果的两次独立实验。

[0130] 图11A显示CLE 3天后与ST2^{+/+}小鼠相比ST2^{-/-}小鼠中降低的前22个可光暴露诱导的基因。左图是显示通过微阵列分析的CLE之前 (d0) 和之后 (d3) 视网膜中的基因表达结果的热图。 $N=5$ 。右图是显示基因符号、表达的 \log_2 倍数变化和P值的表格。

[0131] 图11B是显示与ST2^{+/+}小鼠相比在ST2^{-/-}小鼠中表达减少的基因(参见图11A)的基因本体(GO)分析的表格。显示前17个富集GO项。

[0132] 图11C是显示CCL2、IL-6和IL-1 β 的表达的一系列图表。上图显示 CLE后视网膜中CCL2、IL-6和IL-1 β 表达的时程qPCR。结果显示与 ST2^{+/+}小鼠相比ST2^{-/-}小鼠中表达减少(n=5-6/基因型)。将d0ST2^{+/+}小鼠中的基因表达设为1。通过ELISA测量视网膜中的CCL2蛋白质表达(下图)。数据代表具有相似结果的两次独立实验。*,P<0.05;**,P<0.01;***, P<0.001;****,P<0.0001;进行Tukey事后检验的单因素方差分析。

[0133] 图11D是显示加入IL-33诱导CCL2从rMC-1细胞分泌的一系列图表。通过流式细胞术检测rMC-1细胞表面的ST2表达(左图)。IL-33刺激 rMC-1细胞以依赖于剂量的方式诱导CCL2分泌,IL-33TRAP而不是对照蛋白质存在下废除了刺激(右图)。通过ELISA测量24小时培养物上清中的CCL2水平。所显示的数据是三个重复孔的平均值 \pm SEM,且代表具有相似结果的两次独立实验。*,P<0.05;**,P<0.01;****,P<0.0001;进行Tukey事后检验的双因素方差分析。

[0134] 图11E是显示加入IL-33TRAP阻断了CCL2从rMC-1细胞自分泌诱导和释放的一系列图表。在IL-33TRAP或对照蛋白质存在下在含HG的培养基中培养rMC-1细胞至多72小时。分别通过qPCR和ELISA测量CCL2mRNA表达(左图)和分泌(右图)。所显示的数据是三次重复实验的平均值 \pm SEM。***,P<0.001;****,P<0.0001;进行Tukey事后检验的双因素方差分析。

[0135] 图12A是显示通过流式细胞术测定的CLE之前(d0)和之后(d7)视网膜 CD11b⁺CD45^{lo}髓样细胞上的CCR2、Ly6C和CD115表达的一系列图表。数据代表具有相似结果的至少两次独立实验。

[0136] 图12B和12C显示光暴露后与ST2^{+/+}小鼠相比ST2^{-/-}小鼠ONL、OS 和GCL中Iba1⁺细胞减少。图像(图12B)显示Iba1⁺染色(红色)的代表性免疫组织化学。定量了CLE之前(d0)和之后(d7)整个上和下视网膜的各视网膜层内的总Iba1⁺细胞(箭)。定量结果显示在图12C中。每个数据点代表单只小鼠(n=10/基因型)。比例尺,40 μ m。*,P<0.05;**,P<0.01;****, P<0.0001;进行Tukey事后检验的单因素方差分析。

[0137] 图12D显示CLE处理期间,氯膦酸二钠(clodronate)排除中定量血单核细胞亚群的流式细胞术门控策略。CLE期间每天用氯膦酸二钠-脂质体(Clod)或对照脂质体(Ctrl)处理ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠。CLE七天后,通过流式细胞术定量外周血单核细胞。显示鉴定CD115⁺Ly6C^{hi}单核细胞和 CD115⁺Ly6C^{lo/-}单核细胞的代表性流式细胞术图(左图)。结果显示在右图中的图表中。n=4-6/组。

[0138] 图12E显示CLE中IL-33/ST2介导的光感受器细胞丧失依赖于循环单核细胞。如左图中的示意图中所示,CLE前2天开始,每天用氯膦酸二钠-脂质体(Clod)静脉内处理ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠。对照脂质体(Ctrl)处理作为对照。CLE 7天后通过流式细胞术定量视网膜细胞(参见图12D)。n=4-6/组。*,P<0.05;****,P<0.0001;ns,不显著;进行Tukey事后检验的单因素方差分析。数据代表具有相似结果的至少两次独立实验。

[0139] 图12F显示,其中用dsRed替换N端核定位信号序列和染色质结合结构域(左图中的示意图中所示)但保留C端细胞因子结构域的IL33^{tm1/tm1}小鼠显示dsRed-IL-33-C-term定位在Müller细胞的细胞质中。图像(左图)是IL33^{tm1/tm1}视网膜平面的共焦显微成像的Z截面视图。dsRed信号显示为红色;DAPI信号显示为蓝色。箭指示IL-33⁺Müller细胞。通过流式细

胞术验证dsRed-IL-33-C-term在Müller细胞中的表达(右下图)。虽然通过qPCR测量的IL33^{tm1/-}和IL33^{tm1/tm1}视网膜中的IL-33mRNA与野生型(WT)视网膜相当,但通过ELISA测量的IL33^{tm1/-}和IL33^{tm1/tm1}小鼠视网膜和血清中的IL-33蛋白质水平显著高于WT小鼠中的水平,表明缺乏N端的IL-33从细胞释放。每个数据点代表单只小鼠(n=6/基因型)。数据代表具有相似结果的两次独立实验。**,P<0.01;***,P<0.001;****,P<0.0001;进行Tukey事后检验的单因素方差分析。

[0140] 图12G是显示IL33^{tm1/tm1}小鼠中依赖ST2的CCL2和IL-6表达增加及视锥细胞和RGC丧失的一系列图表。通过qPCR和流式细胞术分析来自在ST2^{+/+}或ST2^{-/-}背景上繁殖的IL33^{+/+}、IL33^{tm1/+}和IL33^{tm1/tm1}小鼠的视网膜。与IL33^{+/+}对照小鼠相比,在ST2^{+/+}背景而不是ST2^{-/-}背景的IL33^{tm1/+}和IL33^{tm1/tm1}小鼠中观察到CCL2和IL-6表达的显著增加,以及视锥细胞和RGC的丧失。每个数据点代表单只小鼠(n=3-7/基因型)。数据代表具有相似结果的两次独立实验。**,P<0.01;***,P<0.001;****,P<0.0001;ns,不显著;进行Tukey事后检验的单因素方差分析。

[0141] 图13A是显示用NaIO₃处理的小鼠中的Müller细胞活化的一系列图表。用NaIO₃处理的小鼠中GFAP表达(红色)的免疫组织化学显示,与盐水处理的小鼠相比,GFAP⁺Müller细胞(箭)增加。比例尺,100μm。

[0142] 图13B显示用NaIO₃处理的小鼠的视网膜中IL-33加工增加。通过Western印迹分析视网膜中的IL-33表达(左图)。用ImageJ软件(右图)定量IL-33p19与IL-33p30的比值。IL-33的19kDa加工形式在NaIO₃处理后第3天达到峰值。数据代表两次独立实验。

[0143] 图13C是显示与ST2^{+/+}小鼠相比,NaIO₃处理的ST2^{-/-}小鼠视网膜中CCL2诱导减少的图表。通过ELISA测定视网膜中的CCL2表达。n=5-7/基因型。****,P<0.0001;ns,不显著;进行Tukey事后检验的单因素方差分析。

[0144] 图13D是显示与ST2^{+/+}小鼠相比,NaIO₃处理的ST2^{-/-}小鼠视网膜中巨噬细胞浸润减少的一系列图表。通过流式细胞术定量视网膜中的巨噬细胞(CD11b⁺CD45^{hi}) (左上图)。与小胶质细胞(CD11b⁺CD45^{lo})相比,视网膜巨噬细胞表达更高水平的CCR2。n=6-7/基因型。数据代表三次独立实验。MΦ,巨噬细胞;MGL,小胶质细胞;ns,不显著;进行Tukey事后检验的单因素方差分析。

[0145] 图13E是显示与ST2^{+/+}小鼠相比,NaIO₃处理的ST2^{-/-}小鼠OS和ONL中Iba1⁺细胞减少的一系列图表。通过免疫组织化学针对Iba1染色视网膜切片。定量了盐水或NaIO₃处理的小鼠(d3)整个上和下视网膜的OS和ONL中的Iba1⁺细胞。n=6/基因型。*,P<0.05;**,P<0.01;***,P<0.001;****,P<0.0001;进行Tukey事后检验的单因素方差分析。

[0146] 图13F显示ST2^{-/-}小鼠中光感受器的保护。通过OCT测量NaIO₃处理之前(d0)和之后(d7)ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠的视网膜厚度(中图)。显示代表性横切OCT图像(上图)。通过将单只小鼠的d0视网膜厚度减去d7视网膜厚度来计算Δ视网膜厚度。比例尺,100μm。通过流式细胞术定量盐水或NaIO₃处理(d3和d7)的ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠的视网膜细胞(下图)。每个数据点代表单只小鼠(n=6-8/基因型)。数据代表具有相似结果的至少两次独立实验。*,P<0.05;**,P<0.01;***,P<0.001;****,P<0.0001;不成对双尾Student t检验。

[0147] 图13G是显示RPE损伤诱导视网膜变性中的IL-1R1^{-/-}和IL-18^{-/-}小鼠中缺乏视网膜保护的一系列图表。用20mg NaIO₃处理IL-1R1^{-/-}和IL-18^{-/-}小鼠。通过OCT测量基线(d0)和

d7的视网膜厚度。通过将单只小鼠的d0 视网膜厚度减去d7视网膜厚度来计算 Δ 视网膜厚度。每个数据点代表单只小鼠 (n=10-13/基因型)。

[0148] 图13H是显示氯磷酸二钠排除血液单核细胞的一系列图表。 NaIO_3 处理前1天开始,每天用氯磷酸二钠-脂质体 (“Clod”) 或对照脂质体 (“Ctrl”) 处理 $\text{ST2}^{+/+}$ 和 $\text{ST2}^{-/-}$ 小鼠。 NaIO_3 处理三天后,在将小鼠安乐死进行视网膜细胞定量时,通过流式细胞术定量外周血单核细胞。显示鉴定 $\text{CD115}^+\text{Ly6C}^{\text{hi}}$ 单核细胞和 $\text{CD115}^+\text{Ly6C}^{\text{lo}}$ 单核细胞的代表性流式细胞术图。每个数据点代表单只小鼠 (n=5/组)。

[0149] 图13I是显示IL-33/ ST2 介导的光感受器细胞丧失依赖于循环单核细胞的一系列图表。如示意图中所示, NaIO_3 处理前1天开始,每天用氯磷酸二钠-脂质体 (Clod) 静脉内处理 $\text{ST2}^{+/+}$ 和 $\text{ST2}^{-/-}$ 小鼠。对照脂质体 (Ctrl) 处理作为对照。盐水或 NaIO_3 处理三天后通过流式细胞术定量视网膜细胞。每个数据点代表单只小鼠 (n=5/组)。*, $P<0.05$;****, $P<0.0001$;ns,不显著;进行Tukey事后检验的单因素方差分析。

[0150] 图14A显示2型 (Th2) 肺炎的巴西钩虫 (*Nippostrongylus brasiliensis*) 感染模型的示意图。

[0151] 图14B显示巴西钩虫感染后源自 $\text{ST2}^{+/+}$ 和 $\text{ST2}^{-/-}$ (ST2KO) 小鼠的肺组织 (左图) 和BALF (右图) 中的嗜酸性粒细胞 (eos) 数目。按实施例4章节A中所述用对照抗豚草或抗IL-13 (α -IL-13) 抗体处理具有所示基因型的小鼠。首次用于实验的 $\text{ST2}^{+/+}$ 小鼠作为对照。下图是显示来自此研究的原始数据的表格。*, $P<0.05$;ns,不显著。

[0152] 图14C显示来自实施例4中所述的 Th2 肺炎巴西钩虫感染模型的 BALF细胞因子分析的结果。显示按实施例4章节A中所述用对照抗豚草、抗IL-13 (α -IL-13) 和/或抗IL-4 (α -IL-4) 抗体处理的具有所示基因型的小鼠的IL-4、IL-5和IL-13的水平。首次用于实验的小鼠作为对照。下图是显示来自此研究的原始数据的表格。*, $P<0.05$;ns,不显著。

[0153] 图15A显示用TNP-OVA抗原致敏/攻击后源自 $\text{ST2}^{+/+}$ 和 $\text{ST2}^{-/-}$ 小鼠的肺组织 (左上图) 和BALF (右上图) 中的嗜酸性粒细胞数目。下图中的表格显示来自此研究的原始数据。按实施例4章节B中所述用对照抗豚草或抗 IL-13 (α -IL-13) 抗体处理具有所示基因型的小鼠。首次用于实验的小鼠作为对照。*, $P<0.05$ 。

[0154] 图15B是显示来自实施例4章节B中所述TNP-OVA模型的抗原记忆测定 (IL-5, 中图; IL-13, 右图) 中的细胞活率 (左图) 和细胞因子分泌的一系列图表。抗GP120 (α -GP120) 抗体作为对照。

[0155] 图16A显示IL-33增强肥大细胞脱粒。上图显示肥大细胞脱粒测定的示意图,下图显示来自肥大细胞脱粒测定的 β -氨基己糖苷酶 (左)、类胰蛋白酶 (中) 和组胺 (右) 的结果的图表。

[0156] 图16B是显示实施例5中所述全身性过敏反应的示意图。

[0157] 图16C和16D是显示来自被动全身性过敏反应测定 (参见例如图16B) 的结果的图表。图16C显示来自用IgE和IL-33而不加入DNP-HAS处理的 $\text{ST2}^{+/+}$ (WT) 或 $\text{ST2}^{-/-}$ (KO) 小鼠的结果。图16D显示来自用IgE和 DNP-HAS而不加入IL-33处理的 $\text{ST2}^{+/+}$ (WT) 或 $\text{ST2}^{-/-}$ (KO) 小鼠的结果。

[0158] 图16E显示一系列图表,其显示来自被动全身性过敏反应测定的结果。左图中的图表显示用IgE、DNP-HAS和IL-33处理的 $\text{ST2}^{+/+}$ (WT) 或 $\text{ST2}^{-/-}$ (KO) 小鼠的体温 ($^{\circ}\text{F}$) 作为时间

(分钟)的函数。右图中的图表针对所示基因型和攻击显示从45至60分钟的曲线下面积(AUC)。

[0159] 图16F显示IL-33在体外增强人肥大细胞依赖IgE交联的细胞因子分泌。上图显示实验的示意图。下图中的图表显示用IL-33和IgE交联刺激后,来自肥大细胞细胞因子测量的IL-5(左)、IL-13(中)和IL-8(右)的结果。

[0160] 图16G显示IL-33在体外直接刺激不依赖IgE或抗原的肥大细胞细胞因子分泌。上图显示实验的示意图。下图中的图表显示测定所示细胞因子(TNF- α 、IL-10、IL-13、IL-5或IL-8)在缺乏IL-33(0ng/ml)或存在10ng/mL IL-33情况下的表达水平的ELISA实验的结果。

[0161] 图16H是显示通过微阵列分析测定的IL-33刺激后所示基因在肥大细胞中的相对表达的一系列图表。左图显示IL-33刺激后上调的基因的实例,其包括涉及平滑肌生长/迁移的基因(例如CCL1、IL-3和IL-8)、涉及平滑肌收缩的基因(例如TNF α 、IL-10、IL-6、IL13和IL-3)和涉及高反应性的基因(例如TNF α 、IL-10和TNFSF14)。

[0162] 图17A是显示来自实施例6中所述K/BxN血清转移实验的IL33^{-/-}小鼠与IL33^{+/+}小鼠相比较的关节炎得分的图表。数据代表来自ST2^{-/-}或ST2^{+/+}小鼠组的平均值。

[0163] 图17B是显示来自实施例6中所述K/BxN血清转移实验的ST2^{-/-}小鼠与野生型(ST2^{+/+})小鼠(C57B1/6背景)相比较的关节炎得分的图表。数据代表来自ST2^{-/-}或ST2^{+/+}小鼠组的平均值。用Balb/C背景中的ST2^{-/-}基因型获得了相似的结果。

[0164] 图17C-17D是显示来自K/BxN血清转移研究的ST2^{-/-}小鼠与野生型(ST2^{+/+})小鼠相比较的关节炎得分的图表。图17C显示整个实验期间的平均每天临床得分,而图17D显示单只小鼠在第7天的临床得分。

[0165] 图18A是实施例7中所述的确定IL-33诱导的巨噬细胞招募是否依赖于IL-4、IL-5和IL-13的实验的示意图。

[0166] 图18B和18C是显示IL-33诱导的巨噬细胞招募入肺不依赖于IL-4、IL-5和IL-13的图表。

[0167] 图19A是显示实施例8中所述的使用HEK-BLUETMIL-33细胞的人IL-33的基于细胞的IL-33阻断测定的结果的图表。人IL-33N-His的浓度为15pM。刺激细胞20小时。图表下方的表格显示10C12.38.H6.87Y.58I IgG4、抗IL-33/抗IL-13双特异性克隆10C12.38.H6.87Y.58I/IL-13IgG4(缩写为“10C12-IL-13KIH IgG4”)、对照IgG4抗体和ST2-LZ的IC90和IC50。IC90表格的圆括号内的值是以 μ g/ml为单位的IC90值。

[0168] 图19B是实施例8中所述嗜碱性粒细胞IL-33磷酸-p38测定的示意图。

[0169] 图19C是显示来自实施例8中所述嗜碱性粒细胞IL-33磷酸-p38测定的结果的一系列图表。图表显示最大荧光强度的百分比作为磷酸-p38荧光强度的函数。

[0170] 图19D是显示实施例8中所述的单特异性抗IL-33抗体10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和双特异性抗体10C12.38.H6.87Y.58I/IL-13 IgG4(“10C12-IL13 KIH IgG4”)导致嗜碱性粒细胞中IL-33诱导的磷酸-p38水平的剂量依赖性抑制的图表。图表将平均荧光强度(MFI)(来自两名供体的平均值)作为抗体浓度的函数作图。对照IgG4抗体不抑制磷酸-p38水平。图表还显示其中不加入抗体(“无Ab”)或其中不加入IL-33(“无IL-33”)的对照实验的结果。

[0171] 图20是显示通过**BIACORE®** 3000 SPR分析评估的10C12.38.H6.87Y.58I/

IL-13IgG4双特异性抗体(10C12-IL-13 KIH IgG4)与人IL-33、食蟹猴IL-33和人IL-13的结合动力学的表格。表格显示来自三份独立的抗体制备物(批次)的结果。

[0172] 图21A是显示使用HEK-BLUE™IL-33/IL-1 β 报道细胞的基于细胞的人IL-33阻断的结果的图表。用剂量-反应曲线来确定所示抗IL-33抗体(RG1-20和10C12.38.H6.87Y.58I IgG4)、sST2-LZ和同种型对照抗体(IgG4)对10pM人IL-33活性的抑制(通过OD 620测量)。图表还显示其中不加入抗体(“无Ab”)或其中不加入IL-33(“无IL-33”)的对照实验的结果。

[0173] 图21B是显示HEK-BLUE™IL-33/IL-1 β 报道细胞对人IL-33的剂量-反应的图表。

[0174] 图21C是显示所示抗IL-33抗体抑制人和食蟹猴IL-33对HEK-BLUE™IL-33/IL-1 β 报道细胞的激活的表格。

[0175] 图21D是显示具有最高人IL-33阻断活性的五种抗IL-33RG抗体与10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和sST2-LZ相比的剂量-反应曲线的图表。图表还显示其中不加入抗体(“无Ab”)或其中不加入IL-33(“无IL-33”)的对照实验的结果。

[0176] 图22A是显示使用HEK-BLUE™IL-33/IL-1 β 报道细胞的基于细胞的食蟹猴IL-33阻断测定的结果的图表。用剂量-反应曲线来确定所示抗IL-33抗体(RG1-20和10C12.38.H6.87Y.58I IgG4)、sST2-LZ和同种型对照抗体(IgG4)对5pM食蟹猴IL-33活性的抑制。

[0177] 图22B是显示HEK-BLUE™IL-33/IL-1 β 报道细胞对食蟹猴IL-33的剂量-反应的图表。

[0178] 图22C是显示具有最高食蟹猴IL-33阻断活性的五种抗IL-33RG抗体相对于10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和sST2-LZ的剂量-反应曲线的图表。图表还显示其中不加入抗体(“无Ab”)或其中不加入IL-33(“无IL-33”)的对照实验的结果。

[0179] 图22D是显示不阻断食蟹猴IL-33的抗IL-33RG抗体的剂量-反应曲线的图表。

[0180] 图23A是显示来自人PBMC的富集NK细胞(CD56⁺CD3⁻)纯度的流式细胞术分析的一系列图表。

[0181] 图23B是显示响应人IL-33而从原代NK细胞分泌的人IFN- γ 的ELISA分析结果的图表。从IFN- γ ELISA OD 450值产生剂量-反应曲线。

[0182] 图23C是显示所示抗IL-33抗体对人IL-33活化原代NK细胞的抑制的图表。用剂量-反应曲线来确定所示抗IL-33抗体(RG1-RG20和10C12.38.H6.87Y.58I IgG4)、sST2-LZ和同种型对照抗体(IgG4)对人IL-33在NK细胞中的活性的抑制。

[0183] 图23D是显示所示抗IL-33抗体对人IL-33活化原代NK细胞的抑制的表格。

[0184] 图23E是显示具有最高人IL-33阻断活性的五种抗IL-33RG抗体相对于10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和sST2-LZ的剂量-反应曲线的图表。

[0185] 图23F是显示抗IL-33抗体RG1-RG5相对于10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和sST2-LZ的剂量-反应曲线的图表。

[0186] 图23G是显示抗IL-33抗体RG6-RG10相对于10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和sST2-LZ的剂量-反应曲线的图表。

[0187] 图23H是显示抗IL-33抗体RG11-RG15相对于10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和sST2-LZ的剂量-反应曲线的图表。

[0188] 图23I是显示抗IL-33抗体RG16-RG20相对于10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和sST2-

LZ的剂量-反应曲线的图表。

[0189] 图24A是显示来自人PBMC的原代嗜碱性粒细胞 (CD123⁺) 中IL-33 诱导的p38MAPK (Thr180/Tyr182) 磷酸化的流式细胞术分析的示意图。

[0190] 图24B是显示来自响应递增剂量的人IL-33的原代嗜碱性粒细胞的 p38MAPK (Thr180/Tyr182) 磷酸化 (ph-p38) 的平均荧光强度 (MFI) 的图表。

[0191] 图24C是显示所示抗IL-33抗体对人IL-33在原代嗜碱性粒细胞中的活性的抑制的图表。用剂量-反应曲线来确定所示抗IL-33抗体 (RG1-RG20 和10C12.38.H6.87Y.58I IgG4)、sST2-LZ和同种型对照抗体 (IgG4) 对人 IL-33在嗜碱性粒细胞中的活性的抑制。

[0192] 图24D是显示抗IL-33抗体对人IL-33活化原代嗜碱性粒细胞的抑制的表格。“部分阻断”指未能在最高抗体浓度达到基线水平的剂量依赖性阻断活性。

[0193] 图24E是显示具有最高人IL-33阻断活性的五种抗IL-33 RG抗体相对于10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和sST2-LZ的剂量-反应曲线的图表。

[0194] 图24F是显示原代嗜碱性粒细胞中人IL-33活性的抑制的图表。图表将抗IL-33抗体RG1-RG5相对于10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和sST2-LZ 的剂量-反应曲线作图。

[0195] 图24G是显示原代嗜碱性粒细胞中人IL-33活性的抑制的图表。图表将抗IL-33抗体RG6-RG10相对于10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和sST2-LZ 的剂量-反应曲线作图。

[0196] 图24H是显示原代嗜碱性粒细胞中人IL-33活性的抑制的图表。图表将抗IL-33抗体RG11-RG15相对于10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和sST2-LZ 的剂量-反应曲线作图。

[0197] 图24I是显示原代嗜碱性粒细胞中人IL-33活性的抑制的图表。图表将抗IL-33抗体RG16-RG20相对于10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和sST2-LZ 的剂量-反应曲线作图。

[0198] 图24J和24K是显示用来测定0.4nM(图24J) 或2nM(图24K) 抗 IL-33抗体 (RG1-RG20 和10C12.38.H6.87Y.58I IgG4)、sST2-LZ和同种型对照抗体 (IgG4) 对500pM人IL-33在嗜碱性粒细胞中的活性的抑制程度的 p38MAPK (Thr180/Tyr182) 磷酸化 (Ph-p38) 的平均荧光强度 (MFI) 的图表。各图表左侧的表格总结所示抗体的结果。

[0199] 图25A和25B是显示实施例9章节F中所述的测量抗IL-33抗体对人 (图25A) 或食蟹猴 (图25B) IL-33的阻断活性的竞争结合ELISA实验的结果的图表。图表将%IL-33结合作为抗IL-33抗体浓度 (M) 的函数作图。

[0200] 发明详述

[0201] I. 定义

[0202] 本文所用的术语“约”指本领域技术人员易于知道的各值的通常误差范围。本文中提到的“约”某个值或参数包括(和描述)指向该值或参数本身的实施方案。

[0203] 用于本文目的的“受体人构架”是包含衍生自下文定义的人免疫球蛋白构架或人共有构架的轻链可变结构域 (VL) 构架或重链可变结构域 (VH) 构架的氨基酸序列的构架。“衍生自”人免疫球蛋白构架或人共有构架的受体人构架可以包含其相同的氨基酸序列,或者它可以包含氨基酸序列改变。在一些实施方案中,氨基酸改变的数目是10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、或2个或更少。在一些实施方案中,VL受体人构架在序列上与VL人免疫球蛋白构架序列或人共有构架序列相同。

[0204] “亲和力”指分子(例如抗体)的单个结合部位与其结合配偶体(例如抗原)之间非

共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,本文所用的“结合亲和力”指内在的结合亲和力,其反映结合对(例如抗体和抗原)的成员之间的1:1相互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力一般可以通过解离常数(K_D)来表示。亲和力可以通过本领域公知的方法来测量,包括本文中描述的那些。用于测量结合亲和力的具体的说明性和示例性实施方案在下文中描述。

[0205] “亲和力成熟”抗体是在一个或多个HVR和/或构架区中具有一个或多个改变的抗体,与不具有那些改变的亲本抗体相比,该改变导致抗体对抗原的亲和力改善。优选的亲和力成熟抗体将对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。通过本领域已知的方法产生亲和力成熟抗体。例如, Marks等Bio/Technology 10:779-783,1992描述了通过VH和VL结构域改组进行亲和力成熟。Barbas等Proc Natl.Acad.Sci,USA 91:3809-3813, 1994;Schier等Gene 169:147-155,1995;Yelton等J.Immunol. 155:1994-2004,1995;Jackson等,J.Immunol.154(7):3310-3319,1995;和 Hawkins等J.Mol.Biol.226:889-896,1992描述了HVR和/或构架残基的随机诱变。

[0206] 本文的术语“抗体”以最广泛的含义使用并涵盖多种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体,包括抗IL-33/抗IL-13双特异性抗体)和抗体片段,只要它们显示希望得到的抗原结合活性。

[0207] 除非另有说明,本文所用的术语“白细胞介素-13(IL-33)”指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物,如灵长类(例如人和食蟹猴)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠))的任何天然IL-33。IL-33在本领域中也称为高内皮小静脉核因子(NF-HEV;参见例如Baekkevold等Am.J.Pathol.163(1):69-79, 2003)、DVS27,C9orf26和白细胞介素-1家族成员11(IL-1F11)。该术语涵盖“全长”未加工的IL-33,以及产生自细胞内加工的任何形式的IL-33。人全长未加工的IL-33包涵270个氨基酸(a.a.),也可以称为IL-33₁₋₂₇₀。人IL-33的加工形式包括例如IL-33₉₅₋₂₇₀、IL-33₉₉₋₂₇₀、IL-33₁₀₉₋₂₇₀、IL-33₁₁₂₋₂₇₀、IL-33₁₋₁₇₈和IL-33₁₇₉₋₂₇₀(**Lefrançois**等Proc.Natl.Acad.Sci. 109(5):1673-1678,2012和Martin,Semin.Immunol.25:449-457,2013)。在一些实施方案中,人IL-33的加工形式(例如IL-33₉₅₋₂₇₀、IL-33₉₉₋₂₇₀、IL-33₁₀₉₋₂₇₀,或通过蛋白酶如钙激活中性蛋白酶、蛋白酶3、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶和组织蛋白酶G加工的其他形式)与全长IL-33相比可具有提高的生物学活性。该术语还涵盖天然存在的IL-33变体,例如剪接变体(例如缺乏外显子3的组成性激活的剪接变体spIL-33,Hong等J.Biol.Chem. 286(22):20078-20086,2011)或等位基因变体。IL-33可以存在于细胞内(例如细胞核内)或作为分泌性细胞因子形式存在。全长IL-33蛋白质包含螺旋-转角-螺旋DNA结合基序,包括含有染色质结合基序(人IL-33的a.a.40-58)的核定位序列(人IL-33的a.a.1-75)。加工和分泌的IL-33形式缺乏这些N端基序。示例性人IL-33的氨基酸序列可见于例如UniProtKB检索号 095760之下。

[0208] “IL-33轴”指涉及IL-33信号转导的核酸(例如基因或从该基因转录的mRNA)或多肽。例如,IL-33轴可以包括配体IL-33、受体(例如ST2 和/或IL-1RAcP)、衔接分子(例如MyD88)、或与受体分子和/或衔接分子相关的蛋白质(例如激酶,如白细胞介素-1受体相关激酶1(IRAK1)和白细胞介素-1受体相关激酶4(IRAK4)或E3泛素连接酶,如TNF受体相关因子6(TRAF6))。

[0209] 除非另有说明,术语“白细胞介素1受体样1(IL1RL1)”和“ST2”在本文中可互换使用,指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物,如灵长类(例如人类)和啮齿动物(例如小鼠

和大鼠))的任何天然ST2。ST2也称为 DER4、T1和FIT-1。该术语涵盖“全长”未加工的ST2,以及产生自细胞内加工的任何ST2形式。本领域已知ST2的至少四种同种型,包括产生自来自双启动子系统的差异mRNA表达的可溶性(sST2,也称为IL1RL1-a) 和跨膜(ST2L,也称为IL1RL1-b)同种型,以及产生自下文所述的选择性剪接的ST2V和ST2LV。ST2L的结构域结构包括三个胞外免疫球蛋白样 C2结构域、跨膜结构域和胞质Toll/白细胞介素-1受体(TIR)结构域。sST2 缺乏包含在ST2L内的跨膜和胞质结构域,包括独特的9氨基酸(a.a.)C端序列(参见例如Kakkar等Nat.Rev.Drug Disc.7:827-840,2008)。sST2可以作为诱饵(decoy)受体发挥作用来抑制可溶性IL-33。该术语还涵盖天然存在的ST2变体,例如剪接变体(例如缺乏第三免疫球蛋白基序且具有独特的疏水尾部的ST2V,及缺乏ST2L的跨膜结构域的ST2LV)或等位基因变体(例如本文所述防止哮喘风险或赋予哮喘风险的变体)。示例性人 ST2的氨基酸序列可见于例如UniProtKB检索号Q01638之下。ST2连同共同受体蛋白质IL-1RAcP是IL-33受体的一部分。IL-33与ST2和共同受体白细胞介素-1受体辅助蛋白(IL-1RAcP)的结合行程1:1:1的三元信号发放复合物来促进下游信号转导,如图1A中所述(参见例如Lingel等 Structure 17(10):1398-1410,2009和Liu等Proc.Natl.Acad.Sci.110(37): 14918-14924,2013)。

[0210] 术语“抗IL-33抗体”、“结合IL-33的抗体”和“特异性结合IL-33 的抗体”指这样的抗体,其能够以足够的亲和力结合IL-33,使得该抗体可用作靶向IL-33的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施方案中,如例如通过放射免疫测定(RIA)测量,抗IL-33抗体与不相关的非IL-33蛋白质结合的程度小于该抗体与IL-33的结合的约10%。在某些实施方案中,结合IL-33 的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 、或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更小,例如从 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如从 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_D)。在某些实施方案中,抗IL-33抗体结合在来自不同物种的IL-33间保守的IL-33表位。

[0211] 与参考抗体“结合相同表位的抗体”指在竞争测定中将参考抗体与其抗原的结合阻断50%或更多的抗体,相反,参考抗体在竞争测定中将抗体与其抗原的结合阻断50%或更多。本文提供示例性竞争测定。

[0212] “抗体片段”包含完整抗体的部分,优选完整抗体的抗原结合和可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体(参见美国专利号5,641,870实施例2;Zapata等Protein Eng. 8(10):1057-1062,1995);单链抗体分子;及从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0213] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段(称为“Fab”片段)和剩余的“Fc”片段(反映其易结晶的能力的命名)。Fab片段由整个L链连同H链的可变区结构域(VH)和一条重链的第一恒定结构域(C_H1)组成。胃蛋白酶处理抗体产生单个大F(ab')₂片段,其大致对应于具有二价抗原结合活性且仍能够交联抗原的两个二硫键连接的Fab片段。Fab'片段与Fab 片段的不同在于,在C_H1结构域的羧基端具有几个附加的残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文对其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基具有自由巯基的Fab'的命名。F(ab')₂抗体片段最初作为其间具有铰合部半胱氨酸的Fab'片段对产生。还已知抗体片段的其他化学偶联。

[0214] 本文的术语“Fc区”用来定义免疫球蛋白重链的C端区域,其包含至少部分恒定区。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或从

Pro230延伸至重链的羧基端。但是,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在。除非本文另有说明,Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号按照Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述的EU编号系统,也称为 EU指数。

[0215] “Fv”由紧密非共价结合的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。从这两个结构域的折叠发出(emanate)贡献用于抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体抗原结合特异性的六个高变环(各来自 H链和L链的三个环)。但是,甚至单个可变结构域(或仅包含对抗原特异性的三个Hs的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,虽然亲和力通常低于整个结合部位。

[0216] “单链Fv”(也缩写为“sFv”或“scFv”)是包含连接为单条多肽链的 VH和VL抗体结构域的抗体片段。优选地,sFv多肽进一步在VH和VL 结构域之间包含多肽接头,其使得sFv能够形成希望得到的用于抗原结合的结构。sFv的综述参见Pluckthun的The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,113卷,Rosenburg和Moore编辑,Springer-Verlag,纽约,269-315页,1994。

[0217] 术语“双抗体”指通过以下制备的小抗体片段:构建在VH和VL结构域之间具有短接头(约5-10个残基)的sFv片段(见前一段落),使得达到V 结构域的链间配对而不是链内配对,从而产生二价片段,即具有两个抗原结合部位的片段。双特异性双抗体是两个“交换”sFv片段的异二聚体,其中两种抗体的VH和VL结构域存在于不同多肽链上。双抗体更详细地描述于例如EP 404,097;WO 93/11161;和Hollinger等,Proc.Natl.Acad. Sci.USA 90: 6444-6448,1993中。

[0218] “结合结构域”指化合物或分子的特异性结合靶表位、抗原、配体或受体的部分。结合结构域包括但不限于抗体(例如单克隆、多克隆、重组、人源化和嵌合抗体)、抗体片段或其部分(例如Fab片段、Fab' 2、scFv抗体、SMIP、结构域抗体、双抗体、微型抗体、scFv-Fc、亲合体(affibody)、纳米抗体及抗体的VH和/或VL结构域)、受体、配体、适配体及其他具有鉴定出的结合配偶体的分子。

[0219] “阻断”抗体或“拮抗”抗体是抑制或降低它所结合的抗原的生物学活性的抗体。某些阻断抗体或拮抗抗体实质性抑制或完全抑制抗原的生物学活性。

[0220] “基于细胞的阻断测定”指其中可以测量抗体抑制或降低它所结合的抗原的生物学活性的能力的测定。例如,基于细胞的测定可以用于测量抑制特异性生物学或生物化学功能所需的抗体浓度。在一些实施方案中,用基于细胞的阻断测定测量抗体(例如本发明的抗IL-33抗体)的半数最大抑制浓度(IC50)和/或90%抑制浓度(IC90)。在一些实施方案中,基于细胞的阻断测定用于确定抗体是否阻断配体(例如IL-33)和其受体(例如ST2和/或共同受体IL-1RAcP)之间的相互作用。本文在实施例2B中提供IL-33的基于细胞的示例性阻断测定。本文例如在实施例8中提供IL-33的其他基于细胞的示例性阻断测定,包括原代天然杀伤(NK)细胞测定和原代嗜碱性粒细胞测定。

[0221] 抗体的“种类”指其重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五个主要的抗体种类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,这些种类中的几种可以进一步划分为亚类(同种型),例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和 IgA₂。对应于不同种类的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0222] 抗体“效应子功能”指可归因于抗体的Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)且随抗体种类而变的那些生物学活性。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和依赖补体的细胞毒性;Fc受体结合;依赖抗体的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调;及B细胞激活。

[0223] “依赖抗体的细胞毒性”或“ADCC”指细胞毒性的形式,其中分泌型Ig结合至存在于某些细胞毒性细胞(例如天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上的Fc受体(FcR)上,使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合含有抗原的靶细胞,随后用细胞毒素杀死靶细胞。抗体“悬挂(arm)”至细胞毒细胞,并且是这种杀伤绝对必需的。用于介导ADCC的初级细胞(NK细胞)仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。Ravetch等,Annu.Rev.Immunol 9:457-92,1991的第464页上的表3中总结了造血细胞上的FcR表达。为了评估目的分子的ADCC活性,可以进行体外ADCC测定,如美国专利号5,500,362或5,821,337中所述的ADCC测定。用于这类测定的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地,或此外,可以例如在动物模型中,如在Clynes等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:652-656,1998中公开的动物模型中体内评估目的分子的ADCC活性。

[0224] “Fc受体”或“FcR”描述结合抗体Fc区的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外,优选的FcR是结合IgG抗体的FcR(γ 受体),且包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和选择性剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“激活受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),它们具有主要在其胞质结构域中不同的相似氨基酸序列。激活受体Fc γ RIIA在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见综述M.in **Daëron**,Annu.Rev.Immunol.15:203-234,1997)。FcR综述于例如Ravetch等Annu.Rev.Immunol.9:457-492,1991;Capel等Immunomethods 4:25-34,1994;和de Haas等J.Lab.Clin.Med. 126:330-41,1995中。本文的术语“FcR”涵盖了其他FcR,包括有待在未来鉴定的那些。该术语还包括新生儿受体FcRn,其负责将母体IgG转移至胎儿(参见例如Guyer等J.Immunol.117:587,1976;和Kim等J. Immunol.24:249,1994)。

[0225] “人效应细胞”是表达一种或多种FcR并执行效应子功能的白细胞。优选地,该细胞至少表达Fc γ RIII,并执行ADCC效应子功能。介导ADCC的人白细胞的实例包括外周血单核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性粒细胞;优选PBMC和NK细胞。效应细胞可以从天然来源例如从血液分离。

[0226] “依赖补体的细胞毒性”或“CDC”指在补体存在下裂解靶细胞。经典补体途径的激活由补体系统第一成分(C1q)与结合于其关联抗原的(适当亚类的)抗体的结合起始。为了评估补体激活,可以进行例如Gazzano-Santoro等,J.Immunol.Methods 202:163,1996中所述的CDC测定。

[0227] “表位”是抗体选择性结合的抗原的部分。对于多肽抗原,表位通常是约4-15个氨基酸残基的肽部分。

[0228] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,指具有与天然抗体结构基本相似的结构或具有包涵本文定义的Fc区的重链的抗体。

[0229] “人抗体”是具有这样的氨基酸序列的抗体,该氨基酸序列对应于由人产生和/或

用用于制备人抗体的任意技术制备的抗体的氨基酸序列。人抗体的此定义明确排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0230] “人共有构架”是代表人免疫球蛋白VL或VH构架序列的选择中最常存在的氨基酸残基的构架。通常,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自可变结构域序列的亚组。通常,该序列亚组是如Kabat等Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,NIH Publication 91-3242, Bethesda MD,1-3卷,1991的亚组。在一个实施方案中,对于VL,该亚组是如Kabat等,上文中的亚组κIII或κIV。在一个实施方案中,对于VH,该亚组是如Kabat等,上文中的亚组III。

[0231] 非人(例如啮齿动物)抗体的“人源化”形式是嵌合抗体,其包含最少的源自非人抗体的序列。在大多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中用来自具有希望得到的抗体的特异性、亲和力和能力的诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的非人物种的高变区(供体抗体)的残基取代来自受体的高变区的残基。在一些情况下,用对应的非人残基取代人免疫球蛋白的构架区(FR)残基。此外,人源化抗体可以包含不见于受体抗体中或供体抗体中的残基。产生这些修饰来进一步改进抗体性能。通常,人源化抗体将包含至少一个(且通常为两个)可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部高变环对应于非人免疫球蛋白的那些,而全部或基本上全部FR是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还将可选地包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。进一步的详情参见Jones等,Nature 321:522-525,1986;Riechmann等Nature 332:323-329,1988;和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596,1992。

[0232] “免疫缀合物”是与一种或多种异源分子(包括但不限于细胞毒剂)缀合的抗体。

[0233] 在用来描述本文公开的多种抗体时,术语“分离的”指已鉴定并从表达它的细胞或细胞培养物分离和/或回收的抗体。它的天然环境的污染成分是通常将干扰该多肽的诊断或治疗用途的物质,且可以包括酶、激素和其他蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在一些实施方案中,将该抗体纯化至通过例如电泳(例如十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或层析(例如离子交换或反相HPLC)方法测定的纯度大于95%或99%。评估抗体纯度的方法的综述参见例如Flatman等J. Chromatogr.B 848:79-87,2007。在优选实施方案中,将抗体纯化至:(1)足以通过使用旋杯式测序仪获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(2)使用考马斯蓝染色或优选银染的非还原或还原条件下的SDS-PAGE显示同质。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为将不存在该多肽天然环境的至少一种成分。但是,通常将通过至少一个纯化步骤来制备分离的多肽。

[0234] 本文所用的术语“单克隆抗体”指获自基本上同质的抗体群体的抗体,即除了例如包含天然存在的突变或在产生单克隆抗体制剂期间出现的可能的变体抗体(这类变体通常以较小的量存在)外,包含该群体的单种抗体相同和/或结合相同的表位。与通常包含抗不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体抗抗原上的单个决定簇。因此,修饰词“单克隆”指抗体获自基本上同质的抗体群体的特征,而不解释为需要通过任意具体的方法来产生抗体。例如,将要按照本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术来制备,其包括但不限于杂交瘤法、重组DNA法、噬菌体展示法和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,本文描述了用于制备单克隆抗体的这类方法和其他示例性方法。

[0235] 术语“多特异性抗体”以最广泛的含义使用,尤其涵盖包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)的抗体,其中VHVL单位具有多表位特异性(即能够结合一个生物分子上的两个不同表位或不同生物分子上的各表位)。这类多特异性抗体包括但不限于全长抗体、具有两个或多个VL和VH结构域的抗体、抗体片段如Fab、Fv、dsFv、scFv、双抗体、双特异性双抗体和三链抗体、已共价或非共价连接的抗体片段。“多表位特异性”指特异性结合相同或不同靶标上的两个或多个不同表位的能力。“双重特异性”或“双特异性”指特异性结合相同或不同靶标上的两个不同表位的能力。但是,与双特异性抗体不同,双重特异性抗体具有两个抗原结合臂,两个抗原结合臂氨基酸序列相同,每个Fab臂能够识别两种抗原。双重特异性使抗体作为单个Fab或IgG分子以高亲和力与两种不同抗原相互作用。根据一个实施方案,IgG1形式的多特异性抗体以5 μ M至0.001pM、3 μ M至0.001pM、1 μ M至0.001pM、0.5 μ M至0.001pM或0.1 μ M至0.001pM的亲和力结合各表位的IgG抗体。“单特异性”是指仅结合一个表位的能力。

[0236] 本文所用的术语“杵入臼”或“KnH”技术指通过在它们相互作用的界面上,在一条多肽中引入凸起(杵),在另一条多肽中引入凹陷(臼),来指导两条多肽在体外或体内配对在一起的技术。例如,已在抗体的Fc:Fc结合界面、CL:CH1界面或VH/VL界面引入KnH(参见例如US 2011/0287009, US2007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431, 及Zhu等Protein Science 6:781-788, 1997)。在一些实施方案中,KnH驱动两条不同的重链在制备多特异性抗体期间配对在一起。例如,在其Fc区中具有KnH的多特异性抗体可以进一步包含与各Fc区连接的可变结构域,或进一步包含与相似或不同的轻链可变结构域配对的不同的重链可变结构域。KnH技术还可以用来使两个不同的受体胞外域或包含不同靶标识别序列的任意其他多肽序列(例如,包括亲和体、肽体和其他Fc融合)配对在一起。

[0237] 本文所用的术语“杵突变”指在多肽与另一多肽相互作用的界面上将凸起(杵)引入多肽的突变。在一些实施方案中,该另一多肽具有臼突变(参见例如美国专利号5,731,168;5,807,706;5,821,333;7,695,936;和8,216,805,每个专利在此以其整体引入作为参考)。

[0238] 本文所用的术语“臼突变”指在多肽与另一多肽相互作用的界面上将凹陷(臼)引入多肽的突变。在一些实施方案中,该另一多肽具有杵突变(参见例如美国专利号5,731,168;5,807,706;5,821,333;7,695,936;和8,216,805,每个专利在此以其整体引入作为参考)。

[0239] “裸抗体”指未与异源部分(例如细胞毒性部分)或放射性标记缀合的抗体。裸抗体可以存在于药物制剂中。

[0240] 对于抗体与靶分子的结合,术语“特异性结合”或“特异性地结合”或对具体多肽或具体多肽靶标上的表位“特异”意指在测量上不同于非特异性相互作用的结合。特异性结合可以例如通过与对照分子的结合相比较测定分子的结合来测量。例如,可以通过与类似于靶标的对照分子(例如,过量的非标记靶标)竞争来测定特异性结合。在这种情况下,如果过量的未标记靶标竞争性抑制标记的靶标与探针的结合,则指示特异性结合。本文所用的术语“特异性结合”或“特异性地结合至”或对具体多肽或具体多肽靶标上的表位“特异”可以显示为例如对靶标具有 10^{-4} M或更低、备选地 10^{-5} M或更低、备选地 10^{-6} M或更低、备选地 10^{-7} M或更低、备选地 10^{-8} M或更低、备选地 10^{-9} M或更低、备选地 10^{-10} M或更低、备选地 10^{-11} M或更

低、备选地 10^{-12} M或更低的 K_D ,或 10^{-4} M至 10^{-6} M、或 10^{-6} M至 10^{-10} M、或 10^{-7} M至 10^{-9} M范围内的 K_D 。如技术人员将理解,亲和力和 K_D 值负相关。对抗原的高亲和力测量为低 K_D 值。在一个实施方案中,术语“特异性结合”指其中分子结合具体多肽或具体多肽上的表位而不实质性结合任何其他多肽或多肽表位的结合。

[0241] 术语“可变的”指可变结构域的某些区段的序列在抗体间广泛不同的事实。可变或“V”结构域介导抗原结合,并限定特定抗体对其特定抗原的特异性。但是,可变性并非在可变结构域的110个氨基酸的跨度内均匀分布。相反,V区由15-30个氨基酸的称为构架区(FR)的相对不变的序列组成,该序列由长度各为9-12个氨基酸的称为“高变区”的极端可变的较短区域分隔开。在本文中使用时,术语“高变区”或“HVR”指抗体的负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包含来自例如VL中的约残基24-34 (L1)、50-56 (L2) 和89-97 (L3) 及VH中的约残基26-35 (H1)、49-65 (H2) 和 95-102 (H3) (在一个实施方案中,H1是约残基31-35;Kabat等,上文)的氨基酸残基和/或来自“高变环”(例如,VL中的残基26-35 (H1)、49-65 (H2) 和 95-102 (H3), VH中的残基26-32 (H1)、53-55 (H2) 和96-101 (H3); Chothia等 J.Mol.Biol.196:901-917,1987)的那些残基。天然重链和轻链的可变结构域各包含四个FR,四个FR主要采用 β -折叠构型,通过三个高变区连接,该高变区形成连接 β -折叠结构且在一些情况下形成 β -折叠结构的部分的环。各链中的高变区通过FR近距离保持在一起,并与来自另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合部位的形成(参见Kabat等,上文)。因此,HVR和FR序列通常按以下顺序出现在VH(或VL)中:FR1-H1 (L1)-FR2-H2 (L2)-FR3-H3 (L3)-FR4。恒定结构域不直接涉及抗体与抗原的结合,但显示多种效应子功能,如抗体在依赖抗体的细胞毒性(ADCC)中的参与。

[0242] 术语“Kabat中的可变结构域残基编号”或“Kabat中的氨基酸位置编号”及其变形指用于Kabat等,上文中的抗体汇编的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用此编号系统,实际线性氨基酸序列可以包含更少或附加的氨基酸,对应于缩短或插入可变结构域的FR或HVR。例如,重链可变结构域可以在H2的残基52后包含单个氨基酸插入(按照Kabat的残基52a),在重链FR残基82后包含插入残基(例如按照Kabat的残基82a、82b和82c等)。通过在抗体序列的同源性区域与“标准”Kabat编号序列比对,可以为给定的抗体确定残基的Kabat编号。

[0243] 在提到可变结构域(轻链的约残基1-107和重链的约残基1-113)中的残基时,通常使用Kabat编号系统(例如Kabat等,上文)。在提到免疫球蛋白重链恒定区中的残基时,通常使用“EU编号系统”或“EU指数”(例如Kabat等,上文中报道的EU指数)。“Kabat中的EU指数”指人IgG1EU抗体的残基编号。除非文中另有说明,提到抗体可变结构域中的残基编号意指按照Kabat编号系统的残基编号。除非文中另有说明,提到抗体恒定结构域中的残基编号意指按照EU编号系统的残基编号(例如,参见美国临时申请号60/640,323,关于EU编号的附图)。

[0244] 本文所用的“施用”意指向个体提供化合物(例如本发明的抗IL-33抗体或编码本发明的抗IL-33抗体的核酸)或组合物(例如药物组合物,例如包含本发明的抗IL-33抗体的药物组合物)的剂量的方法。用于本文所述方法的组合物可以例如玻璃体内、肌内、静脉内、皮内、经皮、动脉内、腹腔内、病灶内、颅内、关节内、前列腺内、胸腔内、气管内、鞘内、鼻内、阴道内、直肠内、局部、肿瘤内、腹膜、皮下、结膜下、小泡内、黏膜、心包内、脐内、眼内、眶内、

口服、表面、经皮、眼周、结膜、眼筋膜囊下、前房内、视网膜下、眼球后、小管内、通过吸入、通过注射、通过植入、通过输注、通过持续输注、通过直接浸没靶细胞的局部灌注、通过导管、通过灌洗、在cremes中或在液体组合物中施用。用于本文所述方法的组合物还可以全身或局部施用。施用的方法可以取决于多种因素(例如,所施用的化合物或组合物及所治疗的病症、疾病或障碍的严重度)而变。

[0245] 术语“哮喘”在本文中指这样的障碍,其特征在于可变和反复出现的症状、可逆气流阻塞(例如通过支气管扩张剂)和支气管高反应性,其可以与潜在的炎症相关或不相关。哮喘因此可以是炎性/发炎性哮喘或非炎性/非发炎性哮喘。哮喘的实例包括过敏性哮喘、运动诱发性哮喘、阿司匹林敏感性/加剧性哮喘、特应性哮喘、严重哮喘、轻度哮喘、中度至重度哮喘、未进行过糖皮质激素治疗的哮喘、慢性哮喘、糖皮质激素抗性哮喘、糖皮质激素难治性哮喘、新诊断且未治疗的哮喘、吸烟引起的哮喘、不受糖皮质激素控制的哮喘及Bousquet等J.Allergy Clin.Immunol.126(5): 926-938,2010中提到的其他哮喘。

[0246] “障碍”或“疾病”是可从抗体治疗获益的任何病症。例如,障碍可以是IL-33介导的障碍。这包括慢性和急性障碍或疾病,包括使哺乳动物易感所讨论的障碍的那些病理病症。本文的待治疗的障碍的实例包括 IL-33介导的障碍(例如哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎和纤维化(例如肺纤维化,例如特发性肺纤维化))。

[0247] “化疗剂”是用于治疗癌症的化合物。化疗剂的实例包括:烷化剂,如噻替派(thiotepa)和环磷酰胺(**CYTOXAN®**);烷基磺酸盐,如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌酰硫烷(piposulfan);氮丙啶,如 benzodopa、卡波醌(carboquone)、meturedopa和uredopa;氮丙啶和 methylamelamine,包括六甲蜜胺(altretamine)、三亚胺嗪(triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和 trimethylolomelamine;多聚乙酰(acetogenin)(尤其是番荔枝内酯(bullatacin)和布拉它辛酮(bullatacinone)); δ -9-四氢大麻酚(屈大麻酚(dronabinol),**MARINOL®**); β -拉帕醌(beta-lapachone);拉帕醇(lapachol);秋水仙碱;桦木酸;喜树碱(包括合成类似物拓扑替康(topotecan)(**HYCAMTIN®**)、CPT-11(伊立替康(irinotecan),**CAMPTOSAR®**)、乙酰喜树碱、莨菪亭(scopolectin)和9-氨基喜树碱);苔藓抑素(bryostatin);callystatin;CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);鬼臼毒素;鬼臼酸;替尼泊苷(teniposide);cryptophycin(尤其是cryptophycin 1和 cryptophycin 8);多拉司他汀(dolastatin);duocarmycin(包括合成类似物 KW-2189和CB1-TM1);eleutherobin;pancratistatin;sarcodictyin; spongistatin;氮芥,如苯丁酸氮芥、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺(chlorophosphamide)、磷雌氮芥(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、苯丙氨酸氮芥、新氮芥(novembichin)、胆固醇对苯乙酸氮芥(phenesterine)、松龙苯芥(prednimustine)、氯乙环磷酰胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);亚硝脲(nitrosourea),如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine);抗生素,如 enediyne antibiotics(例如棘孢霉

素,尤其是棘孢霉素 γ 1 I 和棘孢霉素 Ω 1 I (见例如 Nicolaou 等, Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)); CDP323, 口服 α -4 整联蛋白抑制剂; 蒽环类抗生素 (dynemicin), 包括蒽环类抗生素 A; esperamicin; 以及新制癌菌素色基和相关色蛋白 enediyne 抗生素色基)、阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素、authramycin、重氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素、放线菌素 C、carabycin、洋红霉素、嗜癌素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycin)、更生霉素 (dactinomycin)、柔红霉素、地托比星 (detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星 (包括 **ADRIAMYCIN®**、吗啉基-多柔比星、氰基吗啉基-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星、盐酸多柔比星脂质体注射液(**DOXIL®**)、脂质体多柔比星 TLC D-99(**MYOCET®**)、聚乙二醇化脂质体多柔比星(**CAELYX®**)和脱氧多柔比星)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素 (如丝裂霉素 C)、霉酚酸、诺加霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、派来霉素 (peplomycin)、泊非霉素 (porfiromycin)、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链唑霉素 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、新制癌菌素 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢剂, 如氨甲喋呤、吉西他滨 (gemcitabine) (**GEMZAR®**)、替加氟 (tegafur) (**UFTORAL®**)、卡培他滨 (capecitabine) (**XELODA®**)、埃坡霉素 (epothilone) 和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 考布他汀 (combretastatin); 叶酸类似物, 如二甲叶酸 (denopterin)、氨甲喋呤、蝶酰三谷氨酸 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物, 如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物, 如盐酸环胞苷 (ancitabine)、氮杂胞苷 (azacitidine)、6-氮尿苷 (6-azauridine)、卡莫氟 (carmofur)、阿拉伯糖苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、去氧氟尿苷 (floxuridine); 雄激素, 如卡普睾酮 (calusterone)、丙酸甲雄烷酮 (dromostanolone propionate)、环硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone); 抗肾上腺素 (anti-adrenal), 如氨鲁米特 (aminogluthethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂, 如 frolinic acid; 醋葡内酯 (aceglatone); 醛磷酰胺糖苷; 氨基乙酰丙酸; 恩尿嘧啶 (eniluracil); 安吡啶 (amsacrine); bestrabucil; 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); 地磷酰胺 (defofamine); 秋水仙胺 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); 依氟鸟氨酸 (elformithine); 醋酸羟吡唑 (elliptinium acetate); epothilone; 乙环氧啶 (etoglucid); 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖; 氯尼达明 (lonidainine); 美登木素生物碱, 如美登素和美登木素柄型菌素; 米托胍脘 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); mopidanmol; nitraerine; 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸芥 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); 2-ethylhydrazide; 甲基苄肼 (procarbazine); **PSK®** 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); 丙亚胺 (razoxane); 根霉素 (rhizoxin); 西佐喃 (sizofuran); 螺旋锗 (spirogermanium); 细格孢氮杂酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2,2',2'-三氯三乙胺; 单端孢霉烯

(trichothecene) (尤其是T-2毒素、verracurin A、杆孢菌素 (roridin) A和anguidine); 乌拉坦 (urethan); 长春碱酰胺 (vindesine) (**ELDISINE®**、**FILDESIN®**); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露莫司汀 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 溴丙哌嗪 (pipobroman); gacytosine; 阿拉伯糖苷 (“Ara-C”); 噻替派 (thiotepa); taxoid, 例如紫杉醇 (paclitaxel) (**TAXOL®**, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、紫杉醇的清蛋白改造纳米颗粒制剂 (ABRAXANETM) 和 doxetaxel (**TAXOTERE®**, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, 法国); chloranbucil; 6-硫鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 氨甲喋呤; 铂药剂, 如顺铂、奥沙利铂 (oxaliplatin) (例如 **ELOXATIN®**) 和卡铂; vincas, 其阻止微管蛋白聚合形成微管, 包括长春灭瘟碱 (**VELBAN®**)、长春花新碱 (**ONCOVIN®**)、长春碱酰胺 (**ELDISINE®**、**FILDESIN®**) 和长春瑞滨 (vinorelbine) (**NAVELBINE®**); 依托泊苷 (VP-16); 异环磷酰胺; 米托蒽醌; 亚叶酸 (leucovorin); 诺消灵 (novantrone); 依达曲沙 (edatrexate); 柔红霉素; 氨基喋呤; 伊班磷酸盐 (ibandronate); 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 类视黄醇, 如视黄酸, 包括贝沙罗汀 (**TARGRETIN®**); 二膦酸盐, 如氯膦酸二钠 (例如, **BONEFOS®** 或 **OSTAC®**)、依替膦酸钠 (etidronate) (**DIDROCAL®**)、NE-58095、唑来膦酸 (zoledronic acid)/唑来膦酸盐 (zoledronate) (**ZOMETA®**)、阿仑膦酸钠 (alendronate) (**FOSAMAX®**)、氨羟二磷酸二钠 (pamidronate) (**AREDIA®**)、替鲁膦酸钠 (tiludronate) (**SKELID®**) 或利塞膦酸钠 (risedronate) (**ACTONEL®**); 曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 尤其是抑制涉及异常细胞增殖的信号传导途径中的基因 (例如 PKC- α 、Raf、H-Ras 和表皮生长因子受体 (EGF-R) (例如厄洛替尼 (erlotinib) (TarcevaTM))) 的表达的那些; 及减少细胞增殖的 VEGF-A; 疫苗, 如 **THERATOPE®** 疫苗和基因疗法疫苗, 例如 **ALLOVECTIN®** 疫苗、**LEUVECTIN®** 疫苗和 **VAXID®** 疫苗; 拓扑异构酶 1 抑制剂 (例如 **LURTOTECAN®**); rmRH (例如 **ABARELIX®**); BAY439006 (索拉非尼 (sorafenib); Bayer); SU-11248 (舒尼替尼 (sunitinib), **SUTENT®**, Pfizer); 哌立福新 (perifosine), COX-2 抑制剂 (例如塞来昔布或 etoricoxib), 蛋白体抑制剂 (例如 PS341); 波替单抗 (bortezomib) (**VELCADE®**); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; Bcl-2 抑制剂, 如 oblimersen sodium (**GENASENSE®**); 匹克生琼 (pixantrone); EGFR 抑制剂; 酪氨酸激酶抑制剂; 丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂, 如雷帕霉素 (西罗莫司 (sirolimus), **RAPAMUNE®**); 法尼基转移酶抑制剂, 如 lonafarnib (SCH 6636, SARASARTM); 以上任一种的可药用盐、酸或衍生物; 以及以上两种或多种的组合, 如 CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春花新碱和强的松龙的联合治疗的缩写) 和 FOLFOX (奥沙利铂 (ELOXATINTM) 与 5-FU 和亚叶酸组合的治疗方案的缩写), 及以上任一种的可药用盐、酸或衍

生物;以及以上两种或多种的组合。

[0248] 本文定义的化疗剂包括“抗激素剂”或“内分泌治疗剂”,其发挥作用来调节、减少、阻断或抑制可促进癌症生长的激素的作用。它们本身可以是激素,包括但不限于:具有混合的激动剂/拮抗剂谱的抗雌激素,包括他莫昔芬(tamoxifen)(**NOLVADEX®**)、4-羟基他莫昔芬(4-hydroxytamoxifen)、托瑞米芬(toremifene)(**FARESTON®**)、艾多昔芬(idoxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、雷洛昔芬(raloxifene)(**EVISTA®**)、曲沃昔芬(trioxifene)、盐酸雷洛昔芬(keoxifene)和选择性雌激素受体调节剂(SERM),如SERM3;无激动剂特性的纯抗雌激素,如fulvestrant(**FASLODEX®**)和EM800(这类药剂可以阻断雌激素受体(ER)二聚化,抑制DNA结合,增加ER翻转,和/或抑制ER水平);芳香酶抑制剂,包括类固醇芳香酶抑制剂,如福美坦(formestane)和依西美坦(exemestane)(**AROMASIN®**),及非类固醇芳香酶抑制剂,如阿那曲唑(anastrozole)(**ARIMIDEX®**)、来曲唑(letrozole)(**FEMARA®**)和氨鲁米特(aminoglutethimide),及其他芳香酶抑制剂,包括伏氯唑(vorozole)(**RIVISOR®**)、醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)(**MEGASE®**)、法屈唑(fadrozole)和4(5)-咪唑;促黄体激素释放激素激动剂,包括醋酸亮丙瑞林(leuprolide)(**LUPRON®**和**ELIGARD®**)、戈舍瑞林(goserelin)、布舍瑞林(buserelin)和tripterelin;性类固醇,包括 progestine,如醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮(medroxyprogesterone acetate),雌激素,如己烯雌酚(diethylstilbestrol)和马雌激素(premarin),及雄激素/类视黄醇,如氟羟甲睾酮(flouxymesterone)、全反式维甲酸和芬维A胺(fenretinide);奥那司酮(onapristone);抗孕酮;雌激素受体下调剂(ERD);抗雄激素,如氟他胺(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)和比卡米特(bicalutamide);及以上任一种的可要用盐、酸或衍生物;以及以上两种或多种的组合。

[0249] 本文所用的术语“细胞毒剂”指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒剂包括但不限于放射性同位素(例如At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²和Lu的放射性同位素);化疗剂或药物(例如氨甲喋呤、阿霉素、长春花生物碱(长春花新碱(vincristine)、长春灭瘟碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide))、多柔比星(doxorubicin)、苯丙氨酸氮芥(melphalan)、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、柔红霉素(daunorubicin)或其他嵌入剂);生长抑制剂、酶及其片段,如核溶解酶;抗生素;毒素,如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包括其片段和/或变体;及本文公开的多种抗肿瘤或抗癌剂。

[0250] 活性剂(agent)(例如药物制剂)的“有效量”指对在必要的剂量和时期下达到希望得到的治疗或预防结果有效的量。

[0251] 在本文中使用时,“生长抑制剂”指在体外或在体内抑制细胞生长的化合物或组合物。因此,生长抑制剂可以是显著降低处于S期的细胞百分比的生长抑制剂。生长抑制剂的实例包括阻断细胞周期进程(在S期以外的地方)的活性剂,如诱导G1阻滞和M期阻滞的活性剂。经典的M期阻断剂包括长春碱(例如长春花新碱和长春灭瘟碱)、紫杉烷(taxane)及诸如

多柔比星、表柔比星、柔红霉素、依托泊苷和博来霉素的拓扑异构酶II抑制剂。阻滞G1的那些活性剂也涉及S期阻滞,例如DNA烷化剂,如他莫昔芬、强的松、达卡巴嗪、氮芥、顺铂、氨甲喋呤、5-氟尿嘧啶和ara-C。其他信息可以见于Mendelsohn等编辑,The Molecular Basis of Cancer,第1章,标题“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”, Murakami等(WB Saunders: Philadelphia, 1995), 例如第13页。紫杉烷(紫杉醇和紫杉萜(docetaxel))二者都是衍生自紫杉的抗癌药物。衍生自欧洲紫杉的紫杉萜(**TAXOTERE®**, Rhone-Poulenc Rorer)是紫杉醇(**TAXOL®**, Bristol-Myers Squibb)的半合成类似物。紫杉醇和紫杉萜促进从微管蛋白二聚体组装微管,并通过阻止解聚来稳定微管,这导致细胞有丝分裂的抑制。

[0252] 本文所用的术语“IL-33介导的障碍”指由IL-33轴介导或与IL-33轴相关的任何障碍或病症。在一些实施方案中,IL-33介导的障碍与过量IL-33水平或活性相关,其中由于身体中局部和/或全身的IL-33水平或活性而可以表现非典型症状。示例性IL-33介导的障碍包括炎性病症、免疫障碍、纤维性障碍、嗜酸性粒细胞性障碍、感染、疼痛、中枢神经系统障碍、实体瘤和眼科障碍。IL-33介导的障碍描述于例如Liew等Nature Reviews Immunology 10:103-110, 2010中,在此以其整体引入作为参考。

[0253] 示例性炎性病症包括哮喘(例如过敏性哮喘、运动诱发性哮喘、阿司匹林敏感性/加剧性哮喘、特应性哮喘、严重哮喘、轻度哮喘、中度至重度哮喘、未进行过糖皮质激素治疗的哮喘、慢性哮喘、糖皮质激素抗性哮喘、糖皮质激素难治性哮喘、新诊断且未治疗的哮喘、吸烟引起的哮喘、不受糖皮质激素控制的哮喘等)、气道炎症、气道高反应性、气道反应过度、鼻窦炎、鼻窦炎伴鼻息肉、鼻息肉病、关节炎(例如骨关节炎、类风湿性关节炎、胶原诱发性关节炎、损伤引起的关节炎等)、嗜酸性粒细胞性炎症、肥大细胞介导的炎性疾病、脓毒病、脓毒性休克、血清阴性起止点病和关节病(SEA)综合征、骨质疏松、嗜酸性粒细胞性食管炎、硬皮病、皮炎、特应性皮炎、过敏性鼻炎、大疱性类天疱疮、慢性荨麻疹、软骨炎症、风湿性多肌痛、结节性多动脉炎、Wegener肉芽肿、Behcet病、肌炎、多肌炎、皮肌炎(dermatomyolitis)、皮肌炎(dermatomyositis)、血管炎、动脉炎、糖尿病肾病、间质性膀胱炎、移植物抗宿主病(GVHD)、胃肠炎性病症(例如炎症性肠病(IBD)、溃疡性结肠炎(UC)、克隆病(CD)、结肠炎(例如环境损害引起的结肠炎(例如由治疗方案如化疗、放疗等引起或与治疗方案相关)、感染性结肠炎、缺血性结肠炎、胶原性或淋巴细胞性结肠炎、坏死性小肠结肠炎、诸如慢性肉芽肿病或乳糜泻的病症中的结肠炎、食物过敏、胃炎、感染性胃炎或小肠结肠炎(例如幽门螺旋杆菌(Helicobacter pylori)感染的慢性活动性胃炎)及由感染剂引起的其他形式的胃肠炎症)、及炎性肺部病症(例如慢性阻塞性肺病(COPD)、嗜酸性粒细胞性肺炎、感染诱发的肺部病症(包括与病毒(例如流感病毒、副流感病毒、轮状病毒、人偏肺病毒和呼吸道合胞病毒)、细菌、真菌(例如曲霉属(Aspergillus))、寄生虫或朊病毒感染相关的那些)、变应原诱发的肺部病症、污染物诱发的肺部病症(例如石棉沉着病、硅肺病或铍中毒)、胃内容物吸入诱发的肺部病症、免疫失调、伴遗传易感性的炎性病症如囊性纤维化、物理创伤诱发的肺部病症(例如呼吸机损伤)、肺气肿、支气管炎、结节病、组织细胞增多病、淋巴管性肌瘤病、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、慢性肺病、支气管肺发育不良、肺炎(例如社区获得性肺炎、医源性肺炎、呼吸机相关肺炎、病毒性肺炎、细菌性肺炎和严重肺炎)、气道恶化和急性呼吸窘迫综合征(ARDS))。

[0254] 示例性免疫障碍包括至少部分由肥大细胞介导的那些,如哮喘(例如过敏性哮喘)、湿疹、疥疮、变态反应、特应性变态反应、过敏反应、过敏性休克、过敏性支气管肺曲霉菌病、过敏性鼻炎、过敏性结膜炎,以及自身免疫障碍,包括类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、银屑病关节炎、胰腺炎、银屑病、斑块状银屑病、点滴状银屑病、反向银屑病、脓疱性银屑病、红皮病型银屑病、副肿瘤性自身免疫病、自身免疫性肝炎、大疱性类天疱疮、重症肌无力、炎性肠病、克隆病、溃疡性结肠炎、乳糜泻、甲状腺炎(例如Graves病)、Sjogren综合征、Guillain-Barre病、Raynaud 现象、Addison病、肝病(例如原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、非酒精性脂肪肝病和非酒精性脂肪肝性肝炎)和糖尿病(例如I型糖尿病)。

[0255] 本文所用的术语“纤维性障碍”或“纤维化”指涉及过量纤维结缔组织在器官或组织中形成的病症。示例性纤维性障碍包括肺纤维化、肝纤维化(例如肝硬化相关纤维化(例如酒精诱发的肝硬化、病毒诱发的肝硬化、丙型肝炎后肝硬化和原发性胆汁性肝硬化)、血吸虫病、胆管炎(例如硬化性胆管炎)和自身免疫诱发的肝炎)、肾纤维化(例如肾小管间质纤维化、硬皮病、糖尿病肾炎和肾小球肾炎)、皮肤纤维化(例如硬皮病、肥厚性和瘢痕瘤性瘢痕形成、肾源性纤维性皮肤病和烧伤)、骨髓纤维化、神经纤维瘤病、纤维瘤、肠纤维化和源自手术流程的纤维性黏附)、心脏纤维化(例如心肌梗塞相关纤维化)、血管纤维化(例如血管成形术后动脉再狭窄和动脉粥样硬化相关纤维化)、眼纤维化(例如白内障手术后相关纤维化、增生性玻璃体视网膜病变和眶后纤维化)和骨髓纤维化(例如特发性骨髓纤维化和药物诱发骨髓纤维化)。纤维化可以是器官特异性的或全身性的(例如系统性硬化病和GVHD相关纤维化)。

[0256] 肺纤维化的实例包括例如特发性肺纤维化相关肺或肺部纤维化、纤维化伴胶原血管病、Hermansky-Pudlak综合征、成人型呼吸窘迫综合征、非特异性间质性肺炎、呼吸性细支气管炎、结节病、组织细胞增多症X、闭塞性细支气管炎和隐源性机化性肺炎。在一个实施方案中,该肺纤维化是特发性肺纤维化。

[0257] 本文所用的“嗜酸性粒细胞性障碍”是与过量嗜酸性粒细胞数目相关的障碍,其中由于身体中局部或全身嗜酸性粒细胞的水平或活性而可表现非典型症状。嗜酸性粒细胞性障碍包括但不限于:哮喘(包括阿司匹林敏感性哮喘、特应性哮喘和严重哮喘)、嗜酸性粒细胞性炎症、特应性皮炎、过敏性鼻炎(包括季节性过敏性鼻炎)、非过敏性鼻炎、慢性嗜酸性粒细胞性肺炎、过敏性支气管肺曲霉菌病、乳糜泻、Churg-Strauss综合征(结节性加特应性周围动脉炎)、嗜酸性粒细胞性肌痛综合征、嗜酸性粒细胞增多综合征、水肿反应(包括发作性血管性水肿)、蠕虫感染(其中嗜酸性粒细胞可具有保护性作用)、盘尾丝虫性皮炎、嗜酸性粒细胞相关胃肠障碍(EGID)(包括但不限于嗜酸性粒细胞性食管炎、嗜酸性粒细胞性胃炎、嗜酸性粒细胞性胃肠炎、嗜酸性粒细胞性肠炎和嗜酸性粒细胞性结肠炎)、鼻腔微息肉(nasal micropolyposis)和鼻息肉、阿司匹林不耐受和阻塞性睡眠呼吸暂停。嗜酸性粒细胞来源的分泌产物还与肿瘤中血管发生和结缔组织形成及在诸如慢性哮喘、克隆病、硬皮病和心内膜心肌纤维化的病症中观察到的纤维性反应的促进相关(Munitz等Allergy 59:268-275,2004;Adamko等 Allergy 60:13-22,2005;Oldhoff等Allergy 60:693-696,2005)。其他实例包括癌症(例如成胶质细胞瘤(如多形性成胶质细胞瘤)和非霍奇金淋巴瘤(NHL))、特应性皮炎、过敏性鼻炎、炎性肠病、纤维化(例如肺纤维化(例如特发性肺纤维化(IPF)和硬化症继发肺纤维化)和肝纤维化)和COPD。

[0258] 感染的实例包括蠕虫感染(例如线虫感染,如小鼠的鼠鞭虫(*Trichuris muris*)感染,其是人寄生虫毛首鞭虫(*Trichuris trichiura*)感染的模型)、原生动物感染(例如硕大利什曼原生动物(*Leishmania major*)感染)和病毒感染(例如呼吸道合胞病毒感染和流感病毒感染)。

[0259] 疼痛的实例包括炎性疼痛、痛觉过敏(例如机械性痛觉过敏)、异常性疼痛和高痛觉(例如皮肤和关节高痛觉,其可以是抗原诱发的或不是抗原诱发的)。

[0260] 中枢神经系统障碍的实例包括蛛网膜下出血、中枢神经系统炎性疾病、神经变性疾病(例如阿尔茨海默病、实验性自身免疫性脑脊髓炎、多发性硬化、帕金森病、亨廷顿病)、双相障碍和中枢神经系统感染(例如病毒感染)。

[0261] 实体瘤的实例包括结肠、乳腺、前列腺、肺、肾、肝、胰腺、卵巢、头和颈、口腔、胃、十二指肠、小肠、大肠、胃肠道、肛门、胆囊、阴唇、鼻咽、皮肤、子宫、男性生殖器、泌尿器官、膀胱和皮肤的肿瘤。非上皮来源的实体瘤包括肉瘤、脑肿瘤和骨肿瘤。

[0262] 眼科障碍的实例包括年龄相关黄斑变性(AMD)(包括湿性AMD、干性AMD、中期AMD、晚期AMD和地图状萎缩(GA))、视网膜病(例如糖尿病性视网膜病(DR)、早产儿视网膜病(ROP)和高原DR)、息肉状脉络膜血管病变(PCV)、糖尿病性黄斑水肿、干眼病、Behcet病、视网膜脱离、青光眼、葡萄膜炎(例如感染性和肺感染性葡萄膜炎)、色素性视网膜炎、莱伯先天性黑矇(也称为莱伯的先天性黑矇)、Stargardt病、外伤性眼损伤和结膜炎(例如感染性结膜炎、非感染性结膜炎和过敏性结膜炎)。

[0263] 在一些实施方案中,眼科障碍包括AMD(包括湿性AMD、干性AMD和GA)、视网膜病(例如DR和ROP)、PCV、糖尿病性黄斑水肿、干眼病、Behcet病、过敏性结膜炎和视网膜脱离。

[0264] 应理解,在其他实施方案中,眼科障碍包括中期AMD、晚期AMD、青光眼、葡萄膜炎(例如感染性和肺感染性葡萄膜炎)、色素性视网膜炎、莱伯先天性黑矇(也称为莱伯的先天性黑矇)、Stargardt病、高原糖尿病性视网膜病、外伤性眼损伤和结膜炎(例如感染性结膜炎和非感染性结膜炎)。

[0265] 以上列表并非无所不包,技术人员将理解,疾病或障碍可落在多个种类之内。例如,哮喘在一些情况下可分类为炎性障碍和免疫障碍二者,且一些临床医生认为其是自身免疫障碍。

[0266] “IL-33轴结合拮抗剂”指抑制IL-33轴结合配偶体与其一种或多种结合配偶体相互作用的分子。本文所用的IL-33轴结合拮抗剂包括IL-33结合拮抗剂、ST2结合拮抗剂和IL1RAcP结合拮抗剂。示例性IL-33轴结合拮抗剂包括:抗IL-33抗体及其抗原结合片段(例如抗IL-33抗体,如ANB-020(AnaptysBio, Inc.)或EP1725261、US8187596、W02011031600、W02014164959、W02015099175或W02015106080中所述的任意抗体,每个专利在此以其整体引入作为参考);结合IL-33和/或其受体(ST2和/或IL-1RAcP)并阻断配体-受体相互作用的多肽(例如,ST2-Fc蛋白质,如W0 2014/152195中所述的那些,在此以其整体引入作为参考;免疫黏附素、肽体和可溶性ST2,或其衍生物);抗IL-33受体抗体(例如抗ST2抗体,例如AMG-282(Amgen)或STLM15(Janssen)或W0 2013/173761和W0 2013/165894中所述的抗ST2抗体,每个专利在此以其整体引入作为参考;或ST2-Fc蛋白质,如W0 2013/173761、W0 2013/165894或W0 2014/152195中所述的那些,每个专利在此以其整体引入作为参考);及IL-33受体拮抗剂,如结合IL-33的小分子抑制剂、适配体,及在严格条件下与IL-33轴核酸

序列杂交的核酸(例如短干扰RNA(siRNA)或规律成簇间隔短回文重复序列RNA(CRISPR-RNA或crRNA),包括Mali等(Science.339:823-26,2013)中所述的具有crRNA和tracrRNA序列的单链向导RNA(sgRNA),该文献在此以其整体引入作为参考)。

[0267] 除非另有说明,本文所用的“Th2细胞上表达的化学引诱物受体同源分子(CRTH2)”指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物,如灵长类(例如人类)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠))的任何天然CRTH2。CRTH2还指G 蛋白偶联受体44(GPR44)、分化群294(CD294)、DL1R和DP2。该术语涵盖“全长”未加工的CRTH2,以及产生自细胞内加工的任何形式的 CRTH2。示例性人CRTH2的氨基酸序列可见于例如UniProtKB检索号 Q9Y5Y4下。

[0268] 术语“CRTH2结合拮抗剂”指减少、阻断、抑制、废除或干扰产生自CRTH2与其一种或多种结合配偶体(如前列腺素D₂)的相互作用的信号转导的分子。本领域已知的示例性CRTH2结合拮抗剂包括AMG-853、AP768、AP-761、MLN6095和ACT129968。

[0269] 除非另有说明,本文所用的术语“白细胞介素-5(IL-5)”指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物,如灵长类(例如人类)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠))的任何天然IL-5。该术语涵盖“全长”未加工的IL-5,以及产生自细胞内加工的任何形式的IL-5。该术语还涵盖天然存在的IL-5变体,如剪接变体或等位基因变体。示例性IL-5的氨基酸序列可见于例如UniProtKB 检索号P05113下。

[0270] 术语“IL-5结合拮抗剂”指减少、阻断、抑制、废除或干扰产生自IL-5 与其一种或多种结合配偶体(如IL-5受体 α (IL5RA))的相互作用的信号转导的分子。可用于本发明方法的示例性IL-5结合拮抗剂包括例如抗IL-5 抗体(例如mepolizumab和reslizumab)和抗IL-5R抗体。

[0271] 除非另有说明,本文所用的“白细胞介素-13(IL-13)”指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物,如灵长类(例如人类)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠))的任何天然IL-13。IL-13是由包括2型T辅助(Th2)细胞的许多细胞类型分泌的细胞因子。该术语涵盖“全长”未加工的IL-13,以及产生自细胞内加工的任何形式的IL-13。示例性人IL-13的氨基酸序列可见于例如 UniProtKB检索号P35225下。

[0272] 术语“IL-13结合拮抗剂”指减少、阻断、抑制、废除或干扰产生自 IL-13与其一种或多种结合配偶体(如IL-4受体 α (IL4R α)、IL-13受体 α 1(IL13RA1)和IL-13受体 α 2(IL13RA2))的相互作用的信号转导的分子。IL-13结合拮抗剂包括抗IL-13抗体,例如lebrikizumab、228B/C-1、228A-4、227-26和227-43(参见例如美国专利号7,674,459;8,067,199;8,088,618; 8,318,160;和8,734,797)。

[0273] 除非另有说明,本文所用的“白细胞介素-17(IL-17)”指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物,如灵长类(例如人类)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠))的任何天然IL-17,且包括家族成员IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F。该术语涵盖“全长”未加工的IL-17,以及产生自细胞内加工的任何形式的IL-17。示例性人IL-17A的氨基酸序列可见于例如 UniProtKB检索号Q16552下。示例性人IL-17B的氨基酸序列可见于例如UniProtKB检索号Q9UHF5下。示例性人IL-17C的氨基酸序列可见于例如UniProtKB检索号Q9P0M4下。示例性人IL-17D的氨基酸序列可见于例如UniProtKB检索号Q8TAD2下。示例性人IL-17E的氨基酸序列可见于例如UniProtKB检索号Q9H293下。示例性人IL-17F的氨基酸序列可见于例如UniProtKB检索号Q96PD4下。

[0274] 术语“IL-17结合拮抗剂”指减少、阻断、抑制、废除或干扰产生自 IL-17与其一种或多种结合配偶体(如白细胞介素-17受体(IL-17R)家族成员蛋白质白细胞介素17受体A(IL17RA)、白细胞介素17受体B(IL17RB)、白细胞介素17受体C(IL17RC)、白细胞介素17受体D(IL17RD)、白细胞介素17受体E(IL17RE)和白细胞介素17受体E样(IL17REL))的相互作用的信号转导的分子。示例性IL-17结合拮抗剂包括例如抗IL-17抗体(例如ixekizumab(LY2439821)和抗IL-17R抗体(例如brodalumab(AMG-827))。

[0275] 除非另有说明,本文所用的术语“Janus激酶1(JAK1)”指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物,如灵长类(例如人类)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠))的任何天然JAK1。该术语涵盖“全长”未加工的JAK1,以及产生自细胞内加工的任何形式的JAK1。该术语还涵盖天然存在的JAK1变体,如剪接变体或等位基因变体。示例性JAK1的氨基酸序列可见于例如UniProtKB检索号P23458下。

[0276] 本文所用的术语“JAK1拮抗剂”指抑制或降低JAK1的生物学活性的化合物或活性剂。示例性JAK1拮抗剂包括小分子抑制剂(例如 ruxolitinib、GLPG0634和GSK2586184)。

[0277] 术语“ST2结合拮抗剂”指抑制ST2与IL-33、IL1RAcP和/或第二 ST2分子相互作用的分子。ST2结合拮抗剂可以是蛋白质,如包含直接相互附着或通过接头(例如丝氨酸-甘氨酸(GS)接头、甘氨酸-甘氨酸(GG)接头或其变体(例如SGG、GGs、SGS或GSG接头))间接相互附着的IL-33结合结构域(例如ST2或IL1RAcP蛋白质的全部或部分)和多聚化结构域(例如免疫球蛋白Fc部分,例如选自同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4以及每个同种型组内的任何同种异型的IgG的Fc结构域)的“ST2-Fc蛋白质”,且包括但不限于WO 2013/173761,WO 2013/165894和WO 2014/152195中所述的ST2-Fc蛋白质及其变体,每个专利在此以其整体引入作为参考。在一些实施方案中,ST2结合拮抗剂可以是抗ST2抗体,例如AMG-282(Amgen)或STLM15(Janssen)或WO 2013/173761和WO 2013/165894中所述的任何抗ST2抗体。

[0278] 除非另有说明,本文所用的“类胰蛋白酶(trypase)- β ”指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物,如灵长类(例如人类)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠))的任何天然类胰蛋白酶- β 。如本文所使用,该术语涵盖类胰蛋白酶 β -1(由TPSAB1基因编码,该基因还编码类胰蛋白酶 α -1)和类胰蛋白酶 β -2(由TPSB2基因编码)。该术语涵盖“全长”未加工的类胰蛋白酶- β ,以及产生自细胞内加工的任何形式的类胰蛋白酶- β 。示例性人类胰蛋白酶- β 的氨基酸序列可见于例如UniProtKB检索号P20231下。

[0279] 本文所用的术语“类胰蛋白酶- β 拮抗剂”指抑制或降低类胰蛋白酶 β 的生物学活性的化合物或活性剂。

[0280] 除非另有说明,本文所用的“因子D”指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物,如灵长类(例如人类)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠))的任何天然因子D。因子D也称为C3激活剂前体转化酶、备解素因子D酯化酶、因子D(补体)、补体因子D、CFD和降脂蛋白。该术语涵盖“全长”未加工的因子D,以及产生自细胞内加工的任何形式的因子D。示例性人因子D的氨基酸序列可见于例如UniProtKB检索号P00746下。

[0281] 本文所用的术语“因子D结合拮抗剂”指抑制或降低因子D的生物学活性的化合物或活性剂。示例性因子D结合拮抗剂包括例如小分子抑制剂和抗因子D抗体,例如WO 2007/056227、WO 01/70818和/或US 2002/0081293中所述的任何抗因子D抗体,每个专利在此以其整体引入作为参考。在一些实施方案中,该抗因子D抗体是由保藏于ATCC并命名为 HB

12476的杂交瘤产生的单克隆抗体166-32,或源自单克隆抗体166-32。

[0282] 除非另有说明,本文所用的术语“高温需要A丝氨酸蛋白酶1”或“HtrA1”指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物,如灵长类(例如人类)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠))的任何天然HtrA1。HtrA1在本领域中也称为HtrA丝氨酸蛋白酶1、L56和丝氨酸蛋白酶11。该术语涵盖“全长”未加工的HtrA1,以及产生自细胞内加工的任何形式的HtrA1。该术语还涵盖天然存在的 HtrA1变体,如剪接变体或等位基因变体。示例性人HtrA1的氨基酸序列可见于例如UniProtKB检索号Q92743下。

[0283] 本文所用的术语“HtrA1结合拮抗剂”指抑制或降低HtrA1的生物学活性的化合物或活性剂。示例性HtrA1结合拮抗剂包括例如小分子抑制剂和抗HtrA1抗体,例如WO 2013/055998中所述的任何抗HtrA1抗体,该申请在此以其整体引入作为参考。

[0284] 术语“血管内皮生长因子”或“VEGF”指Swiss Prot检索号P15692 所示例的血管内皮生长因子蛋白质A。术语“VEGF”涵盖具有Swiss Prot 检索号P15692所示例的氨基酸序列的蛋白质及其同源物和同种型。术语“VEGF”还涵盖已知的同种型,例如VEGF的剪接同种型,例如VEGF₁₁₁、VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₅、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉和VEGF₂₀₆,连同其天然存在的等位基因形式和加工形式,包括Ferrara Mol.Biol.Cell.21:687 (2010), Leung等,Science,246:1306 (1989)和Houck等,Mol.Endocrin.,5:1806 (1991)中所述的通过纤维蛋白溶酶切割VEGF产生的110个氨基酸的人血管内皮细胞生长因子。术语“VEGF”还指来自非人物种(如小鼠、大鼠或灵长类)的VEGF。有时,来自具体物种的VEGF表示为术语hVEGF(人 VEGF)、mVEGF(鼠 VEGF)等。术语“VEGF”还用来指包含165个氨基酸的人血管内皮细胞生长因子的氨基酸8至109或1至109的截短形式的多肽。在本申请中提到任何这种形式的VEGF时标识为例如“VEGF₁₀₉”、“VEGF(8-109)”、“VEGF(1-109)”或“VEGF₁₆₅”。“截短的”天然VEGF的氨基酸位置按天然VEGF序列中所示编号。例如,截短的天然VEGF中的氨基酸位置17(甲硫氨酸)也是天然VEGF中的位置17(甲硫氨酸)。截短的天然VEGF对KDR和Flt-1受体具有与天然VEGF相当的结合亲和力。本文所用的术语“VEGF变体”指在天然VEGF序列中包含一个或多个氨基酸突变的VEGF多肽。可选地,该一个或多个氨基酸突变包括一个或多个氨基酸取代。为了速记本文中VEGF变体的命名的目的,应指出,编号指沿着推定的天然VEGF的氨基酸序列的氨基酸位置(在Leung等,上文和Houck等,上文中提供)。除非另有说明,本文所用的术语“VEGF”指VEGF-A。

[0285] 本文所用的术语“VEGF拮抗剂”指这样的分子,该分子能够结合 VEGF,降低VEGF表达水平,或中和、阻断、抑制、废除、降低或干扰 VEGF生物学活性,包括但不限于VEGF与一种或多种VEGF受体的结合、VEGF信号发放及VEGF介导的血管发生和内皮细胞存活或增殖。例如,能够中和、阻断、抑制、废除、降低或干扰VEGF生物学活性的分子可以通过结合一种或多种VEGF受体(VEGFR)(例如VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、膜结合VEGF受体(mbVEGFR)或可溶性VEGF受体(sVEGFR))来发挥其作用。用于本发明方法的VEGF拮抗剂包括特异性结合VEGF的多肽、抗VEGF抗体及其抗原结合片段、特异性结合VEGF从而螯合其与一种或多种受体的结合的受体分子和衍生物、融合蛋白质(例如 VEGF-Trap(Regeneron)) and VEGF₁₂₁-多花白树毒蛋白(Peregrine)。VEGF 拮抗剂还包括VEGF多肽的拮抗剂变体、与编码VEGF多肽的核酸分子的至少一个片段互补的反义核碱基寡聚物;与编码VEGF多肽的核酸分子的至少一个片段互补的效RNA;靶向VEGF的核酶;抗VEGF的肽体;及VEGF适配体。VEGF拮抗剂还包括结合

VEGFR的多肽,抗VEGFR 抗体及其抗原结合片段,及结合VEGFR从而阻断、抑制、废除、降低或干扰VEGF生物学活性(例如VEGF信号发放)的衍生物,或融合蛋白质。VEGF拮抗剂还包括结合VEGF或VEGFR且能够阻断、抑制、废除、降低或干扰VEGF生物学活性的非肽小分子。因此,术语“VEGF活性”尤其包括VEGF介导的VEGF的生物学活性。在某些实施方案中,VEGF 拮抗剂使VEGF的表达水平或生物学活性降低或抑制10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在一些实施方案中,VEGF 特异性拮抗剂所抑制的VEGF是VEGF (8-109)、VEGF (1-109) 或VEGF₁₆₅。

[0286] 本文所用的VEGF拮抗剂可以包括但不限于抗VEGFR2抗体及相关分子(例如雷莫芦单抗(ramucirumab)、tanibirumab、阿柏西普 (aflibercept)),抗VEGFR1抗体及相关分子(例如icrucumab、阿柏西普 (VEGF Trap-Eye; **EYLEA®**) 和ziv-aflibercept (VEGF Trap; **ZALTRAP®**)),双特异性VEGF抗体(例如MP-0250、vanucizumab (VEGF-ANG2) 和US 2001/0236388中公开的双特异性抗体),包括抗 VEGF、抗VEGFR1和抗VEGFR2臂中两种的组合的双特异性抗体,抗 VEGF抗体(例如贝伐单抗(bevacizumab)、sevacizumab和兰尼单抗 (ranibizumab)),及非肽小分子VEGF拮抗剂(例如帕唑帕尼(pazopanib)、阿西替尼(axitinib)、凡德他尼(vandetanib)、瑞戈非尼(stivarga)、卡博替尼 (cabozantinib)、乐伐替尼(lenvatinib)、nintedanib、orantinib、telatinib、dovitinig、西地尼布(cediranib)、motesanib、sulfatinib、阿帕替尼(apatinib)、foretinib、famitinib和tivozanib)。

[0287] 术语“抗VEGF抗体”、“结合VEGF的抗体”和“特异性结合VEGF 的抗体”指这样的抗体,该抗体能够以足够的亲和力结合VEGF,使得该抗体可用作靶向VEGF的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施方案中,例如通过放射免疫测定(RIA)测量,抗VEGF抗体与不相关的非VEGF蛋白质结合的程度小于该抗体与VEGF的结合的约10%。在某些实施方案中,结合VEGF的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 或 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更小,例如从 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如从 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(Kd)。在某些实施方案中,抗VEGF抗体结合在来自不同物种的VEGF间保守的VEGF表位。

[0288] 在某些实施方案中,该抗VEGF抗体可以用作靶向和干扰其中涉及 VEGF活性的疾病或病症的治疗剂。另外,可对该抗体进行其他生物学活性测定,例如以评价其作为治疗剂的有效性。这类测定为本领域已知,并取决于靶抗原和该抗体的预期用途。实例包括HUVEC抑制测定;肿瘤细胞生长抑制测定(例如,如WO 89/06692中所述);依赖抗体的细胞毒性(ADCC)和补体介导的细胞毒性(CDC)测定(美国专利号5,500,362);激动活性或血细胞生成测定(参见WO 95/27062)。抗VEGF抗体通常将不结合其他VEGF同源物,如VEGF-B或VEGF-C,也不结合其他生长因子,如 P1GF、PDGF或bFGF。在一个实施方案中,抗VEGF抗体是与杂交瘤ATCC HB 10709产生的单克隆抗VEGF抗体A4.6.1结合相同表位的单克隆抗体。在另一实施方案中,该抗VEGF抗体是按照Presta等(1997) Cancer Res.57:4593-4599产生的重组人源化抗VEGF单克隆抗体,包括但不限于贝伐单抗(BV; **AVASTIN®**)。

[0289] 抗VEGF抗体“贝伐单抗(BV)”也称为“rhUMAb VEGF”或“**AVASTIN®**”,是按照Presta等(1997) Cancer Res.57:4593-4599产生的重组人源化抗VEGF单克隆抗体。它包含突变的人IgG1构架区,及来自阻断人VEGF与其受体的结合的鼠抗hVEGF单克隆抗体A.4.6.1

的抗原结合互补决定区。贝伐单抗约93%的氨基酸序列(包括大部分构架区)源自人IgG1,约7%的序列源自鼠抗体A4.6.1。贝伐单抗具有约149,000道尔顿的分子量,并糖基化。贝伐单抗和其他人源化抗VEGF抗体进一步描述于2005年2月26日授权的美国专利号6,884,879中,该专利的全部公开内容在此明确引入作为参考。其他优选的抗体包括PCT申请公开号W0 2005/012359和W0 2005/044853中所述的G6或B20系列抗体(例如G6-31、B20-4.1),每个专利申请在此以其整体引入作为参考。其他优选的抗体参见美国专利号7,060,269、6,582,959、6,703,020、6,054,297、W098/45332、W0 96/30046、W094/10202、EP 0666868B1,美国专利申请公开号 2006009360、20050186208、20030206899、20030190317、20030203409和20050112126,及Popkov等,Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)。其他优选的抗体包括结合人VEGF上的包含残基F17、M18、D19、Y21、Y25、Q89、191、K101、E103和C104或者备选地包含残基F17、Y21、Q22、Y25、D63、183和Q89的功能表位的那些。其他抗VEGF抗体包括PCT申请公开号W0 2009/155724中所述的抗VEGF抗体。

[0290] 抗VEGF抗体“兰尼单抗”也称为“**Lucentis®**”或“rhuFab V2”,是人源化、亲和力成熟的抗人VEGF Fab片段。兰尼单抗是通过标准重组技术方法在大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达载体和细菌发酵中产生。兰尼单抗不糖基化,具有~48,000道尔顿的分子量。参见W0 98/45331和US 2003/0190317。

[0291] “分离的核酸”指已从其天然环境的成分分开的核酸分子。分离的核酸包括这样的核酸分子,其包含在通常含有该核酸分子的细胞内,但该核酸分子存在于染色体外或不同于其天然染色体位置的染色体位置上。

[0292] 术语“控制序列”指在具体宿主生物中表达有效连接的编码序列所必需的DNA序列。适合用于原核生物的控制序列例如包括启动子、可选的操纵基因序列和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号和增强子。

[0293] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,指已在其中引入外源核酸的细胞,包括这类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,起包括初级转化细胞,及其衍生的后代,而不考虑代数。后代可以并非在核酸含量上与亲本细胞完全相同,而是可以包含突变。本文包括具有与在最初转化的细胞中筛选或选择的功能或生物学活性相同的功能或生物学活性的突变体后代。

[0294] 在将它置于与另一核酸序列的功能关系中时,核酸“有效连接”。例如,如果前序列或分泌前导序列的DNA表达为参与多肽分泌的前蛋白,则它与多肽的DNA有效连接;如果启动子或增强子影响序列的转录,则它与编码序列有效连接;或者,如果放置核糖体结合位点以便于翻译,则它与编码序列有效连接。通常,“有效连接”意指所连接的DNA序列是连续的,且在分泌前导序列的情况下是连续且符合读框的。但是,增强子不必是连续的。通过在方便的限制位点处连接来达到连接。如果这类位点不存在,则按照常规实施使用合成的寡核苷酸衔接物或接头。

[0295] 就本文中鉴定的多肽序列而言的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为,在比对序列并在必要时引入缺口来达到最大百分比序列同一性,而不将任何保守取代视为序列同一性的部分之后,候选序列中与所比较的多肽中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。可以以本领域技术之内的多种方式来达到以测定百分比氨基酸序列同一性为目的的比对,例如,使用公开可得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或 Megalign (DNASTAR) 软

件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列全长内达到最大比对所需的任何算法。但是,为了本文的目的,用序列比较计算机程序ALIGN-2来产生%氨基酸序列同一性值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech, Inc.编写,源代码已随用户文件提交美国版权办公室,Washington D.C., 20559,它在美国版权办公室注册为美国版权注册号TXU510087。ALIGN-2程序从Genentech, Inc., South San Francisco, California公开可得。ALIGN-2程序应编译用在 UNIX操作系统上,包括数字UNIX V4.0D。所有序列比较参数由ALIGN-2 程序设定且不变动。

[0296] 在利用ALIGN-2来进行氨基酸序列比较的情况下,按以下计算给定氨基酸序列A与给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(备选地,其可以叙述为具有或包含与给定氨基酸序列B的某%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列A):

[0297] $100 \times \frac{X}{Y}$

[0298] 其中X是在该程序的A和B比对中通过序列比对程序ALIGN-2评分为相同的匹配的氨基酸残基的数目,且其中Y是B中氨基酸残基总数。应理解,在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A与B的%氨基酸序列同一性将不等于B与A的%氨基酸序列同一性。除非另有明确说明,本文中使用的所有%氨基酸序列同一性值都是用ALIGN-2计算机程序按前一段落中所述获得。

[0299] 除非另有说明,本文所述的氨基酸序列是连续氨基酸序列。

[0300] 术语“包装说明书”用来指通常包含在治疗产品的商业包装中的说明书,其包含关于适应症、用法、剂量、施用、联合治疗、禁忌症的信息和/ 或有关这类治疗性产品的用途的警告。

[0301] 术语“药物组合物”指这样的制备物,其处于这样的形式,使得包含在其中的活性成分的生物学活性有效,且不包含对将要施用该制剂的个体具有不可接受的毒性的附加成分。

[0302] “可药用载体”指药物制剂中除活性成分外的成分,其对个体无毒性。可药用载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0303] 本申请中所用的术语“前体药物”指药物活性物质的前体或衍生形式,与亲本药物相比,其对肿瘤细胞的细胞毒性较低,且能够通过酶激活或转化为更具活性的亲本形式。参见例如Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy” Biochemical Society Transactions, 14, 375-382页, 615th Meeting Belfast (1986); 和Stella等, “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,” Directed Drug Delivery, Borchardt等, (编辑), 247-267页, Humana Press (1985)。本发明的前体药物包括但不限于: 包含磷酸的前体药物、包含硫代磷酸的前体药物、包含硫酸的前体药物、包含肽的前体药物、D-氨基酸修饰的前体药物、糖基化的前体药物、包含 β -内酰胺的前体药物、包含可选地取代的苯氧乙酰胺的前体药物或包含可选地取代的苯乙酰胺的前体药物、5-氟胞嘧啶及可以转化为更具活性的细胞毒性游离药物的其他5-氟尿嘧啶前体药物。可以衍生为用于本发明的前体药物形式的细胞毒性药物的实例包括但不限于上文所述的那些化疗剂。

[0304] “减少或抑制”指导致优选20%或更大、更优选50%或更大和最优选 75%、85%、90%、95%或更大的总体减少的能力。减少或抑制可以指所治疗的障碍的症状、转移的存在或大小、原发性肿瘤的大小。

[0305] “个体”是脊椎动物,优选哺乳动物,更优选人。哺乳动物包括但不限于农场动物(如牛和绵羊)、运动动物、宠物(如猫、狗和马)、灵长类(例如人类和非人灵长类,如猴)和啮齿类(例如小鼠和大鼠)。

[0306] 术语“治疗有效量”指在个体中治疗疾病或障碍的抗体或抗体片段的量。在IL-33介导的障碍的情况下,抗体或抗体片段(例如抗IL-33抗体,包括结合IL-33和第二生物分子(例如IL-13)的双特异性抗IL-33抗体,例如双特异性抗IL-33/抗IL-13抗体)的治疗有效量可以改善或治疗疾病,或预防、减少、改善或治疗疾病相关症状。在增生性疾病(例如实体瘤)的情况下,抗体或抗体片段的治疗有效量可以减少癌细胞的数目;减小原发性肿瘤大小;抑制(例如以某种程度减慢和优选阻止)癌细胞浸润入外周器官;抑制(例如以某种程度减慢和优选阻止)肿瘤转移;以某种程度抑制肿瘤生长;和/或以某种程度减轻该障碍的一种或多种相关症状。在抗体或抗体片段可以阻止生长和/或杀死现有癌细胞的程度上,它可以是细胞抑制剂和/或细胞毒剂。对于癌症治疗,可以例如通过评估存活期、疾病进展时间(TTP)、无疾病存活期(DFS)、无进展存活期(PFS)、应答率(RR)、应答持续时间和/或生活质量来测量体内功效。

[0307] 本文所用的“治疗”(及其语法变形)指改变所治疗的个体的自然过程的尝试中的临床干预,且可以为了预防而进行或在临床病理的过程中进行。希望得到的治疗作用包括但不限于防止疾病的发生或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接的病理结果、防止转移、降低疾病进展的速率、改善或缓和疾病状态及消退或改善的预后。在一些实施方案中,用本发明的抗体来延迟疾病的发展或减慢疾病的进展。例如,如果在接受哮喘治疗后,患者显示以下一项或多项的可观察到和/或可测量到的降低或缺乏,则成功对患者进行了哮喘“治疗”:反复喘鸣、咳嗽、呼吸困难、胸闷、夜晚发生或恶化的症状、冷空气、锻炼或暴露于变应原引发的症状。

[0308] 本文所用的“肿瘤”指无论恶性或是良性的任何赘生性细胞生长和增殖,及所有癌前和癌细胞和组织。

[0309] 本文所用的术语“载体”旨在指能够转运与它连接的另一核酸的核酸分子。一类载体是“质粒”,其指其他DNA区段可以连接入其中的环状双链DNA环。另一类载体是噬菌体载体。另一类载体是病毒载体,其中其他DNA区段可以连接入病毒基因组。某些载体能够在它们所引入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如非附加型哺乳动物载体)可以在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组,从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与它们有效连接的基因的表达。这类载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称“重组载体”或“表达载体”)。一般而言,用于重组DNA技术中的表达载体通常是质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用。

[0310] II. 组合物和方法

[0311] 在一方面,本发明部分给基于结合IL-33的新抗体。本发明的抗体用于例如诊断和/或治疗IL-33介导的障碍。

[0312] A. 示例性抗IL-33抗体

[0313] 本发明提供结合IL-33的分离的抗体。在某些实施方案中,本发明的抗IL-33抗体以100nM或更低(例如100nM或更低、10nM或更低、1nM 或更低、100pM或更低、10pM或更低、

1pM或更低、或0.1pM或更低)的 K_D 特异性结合人和食蟹猴(cyno)二者的IL-33。在一些情况下,该抗体以1nM或更低(例如1nM或更低、100pM或更低、10pM或更低、1pM或更低、或0.1pM或更低)的 K_D 特异性结合人IL-33。例如,在一些情况下,该抗体以100fM和1nM之间的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些情况下,该抗体以1nM或更低(例如1nM或更低、100pM或更低、10pM或更低、1pM或更低、或0.1pM或更低)的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。例如,在一些情况下,该抗体以100fM和1nM之间的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些情况下,该抗体以1nM或更低(例如1nM或更低、100pM或更低、10pM或更低、1pM或更低、或0.1pM或更低)的 K_D 特异性结合人和食蟹猴二者的IL-33。例如,在一些情况下,该抗体以1pM和500pM之间的 K_D 特异性结合人和食蟹猴二者的IL-33。在一些情况下,该抗体以1pM和10pM之间的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些情况下,该抗体不特异性结合鼠IL-33。

[0314] 例如,在一些情况下,该抗体以约1pM和约1nM之间(例如,约1pM和约900pM之间、约1pM和约800pM之间、约1pM和约700pM之间、约1pM和约600pM之间、约1pM和约500pM之间、约1pM和约400pM之间、约1pM和约300pM之间、约1pM和约200pM之间、约1pM和约190pM之间、约1pM和约180pM之间、约1pM和约170pM之间、约1pM和约160pM之间、约1pM和约150pM之间、约1pM和约140pM之间、约1pM和约130pM之间、约1pM和约120pM之间、约1pM和约110pM之间、约1pM和约100pM之间、约1pM和约90pM之间、约1pM和约80pM之间、约1pM和约70pM之间、约1pM和约60pM之间、约1pM和约50pM之间、约1pM和约40pM之间、约1pM和约30pM之间、约1pM和约20pM之间、或约1pM和约10pM之间)的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些情况下,该抗体以约1pM和约250pM之间(例如,约1pM和约250pM之间、约1pM和约225pM之间、约1pM和约200pM之间、约1pM和约190pM之间、约1pM和约180pM之间、约1pM和约170pM之间、约1pM和约160pM之间、约1pM和约150pM之间、约1pM和约140pM之间、约1pM和约130pM之间、约1pM和约120pM之间、约1pM和约110pM之间、约1pM和约100pM之间、约1pM和约90pM之间、约1pM和约80pM之间、约1pM和约70pM之间、约1pM和约60pM之间、约1pM和约50pM之间、约1pM和约40pM之间、约1pM和约30pM之间、约1pM和约20pM之间、或约1pM和约10pM之间)的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些情况下,该抗体以约50pM和约180pM之间(例如,约50pM、约60pM、约70pM、约80pM、约90pM、约100pM、约110pM、约120pM、约130pM、约140pM、约150pM、约160pM、或约180pM)的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些实施方案中,任何前述 K_D 值都可以通过例如本文所述的表面等离子共振(参见例如实施例,包括实施例2章节D和实施例8章节E)来测定。

[0315] 在一些情况下,该抗体在25℃下以约400pM或更低的 K_D 特异性结合人IL-33。例如,在一些情况下,该抗体在25℃下以约390pM或更低、约380pM或更低、约375pM或更低、约350pM或更低、约325pM或更低、约300pM或更低、约275pM或更低、约250pM或更低、约250pM或更低、约225pM或更低、约200pM或更低、约175pM或更低、约150pM或更低、约130pM或更低、约125pM或更低、约100pM或更低、约75pM或更低、约50pM或更低、或25pM或更低的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些情况下,该抗体在25℃下以约20pM至约150pM之间(例如,约20pM、约30pM、约40pM、约50pM、约60pM、约70pM、约80pM、约90pM、约100pM、约110pM、约120pM、约130pM、约140pM、或约150pM)的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些情况下,该抗体在25℃下以约130pM的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些实施方案中,任何前述 K_D 值都可以通过例如本文所述的表面等离子共振(参见例如实施例,包括实施例2章节D和实施例8章节E)来测定。

[0316] 在一些情况下,该抗体在37℃下以约200pM或更低的 K_D 特异性结合人IL-33。例如,

在一些情况下,该抗体在37℃下以约190pM或更低、约180pM或更低、约175pM或更低、约150pM或更低、约130pM或更低、约125pM或更低、约100pM或更低、约90pM或更低、约80pM或更低、约75pM或更低、约50pM或更低、或约25pM或更低的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些情况下,该抗体在37℃下以约20pM至约100 pM(例如约20pM、约30pM、约40pM、约50pM、约60pM、约70pM、约80pM、约90pM、或约100pM)的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些情况下,该抗体在37℃下以约90pM的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些实施方案中,任何前述 K_D 值都可以通过例如本文所述的表面等离子共振(参见例如实施例,包括实施例2章节D和实施例8章节E)来测定。

[0317] 在一些情况下,该抗体以约1pM和约1nM之间(例如,约1pM和约900pM之间、约1pM和约800pM之间、约1pM和约700pM之间、约1pM和约600pM之间、约1pM和约500pM之间、约1pM和约400 pM之间、约1pM和约300pM之间、约1pM和约200pM之间、约1pM和约190pM之间、约1pM和约180pM之间、约1pM和约170pM之间、约1pM和约160pM之间、约1pM和约150pM之间、约1pM和约140pM之间、约1pM和约130pM之间、约1pM和约120pM之间、约1pM和约110pM之间、约1pM和约100pM之间、约1pM和约90pM之间、约1pM和约80pM之间、约1pM和约70pM之间、约1pM和约60pM之间、约1pM和约50pM之间、约1pM和约40pM之间、约1pM和约30pM之间、约1pM和约20pM之间、或约1pM和约10pM之间)的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些情况下,该抗体以约100pM和约750nM之间(例如,约100pM和约750pM之间、约200pM和约750pM之间、约225pM和约750pM之间、约250pM和约750pM之间、约265pM和约750pM之间、约275pM和约750pM之间、约300pM和约750pM之间、约325pM和约750pM之间、约350pM和约750pM之间、约375pM和约750pM之间、约400pM和约750pM之间、约425 pM和约750pM之间、约450pM和约750pM之间、约475pM和约750 pM之间、约500pM和约750pM之间、约525pM和约750pM之间、约550pM和约750pM之间、约575pM和约750pM之间、约600pM和约750pM之间、约650pM和约750pM之间、或约250pM和约650pM之间)的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些实施方案中,任何前述 K_D 值都可以通过例如本文所述的表面等离子共振(参见例如实施例,包括实施例2章节D和实施例8章节E)来测定。

[0318] 例如,在一些情况下,该抗体在25℃下以约650pM或更低的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。例如,在一些情况下,该抗体在25℃下以约650pM或更低、约625pM或更低、约600pM或更低、约575pM或更低、约550 pM或更低、约525pM或更低、约500pM或更低、约475pM或更低、约450pM或更低、约425pM或更低、约400pM或更低、约375pM或更低、约350pM或更低、约325pM或更低、约300pM或更低、约275pM或更低、约265pM或更低、约250pM或更低、约225pM或更低、约200 pM或更低、约175pM或更低、约150pM或更低、约125pM或更低、约100pM或更低、约75pM或更低、约50pM或更低、或25pM或更低的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些情况下,该抗体在25℃下以约150 pM至约500pM(例如约150pM、约175pM、约200pM、约225pM、约250pM、约265pM、约275pM、约300pM、约325pM、约350pM、约375pM、约400pM、约425pM、约450pM、约475pM、或约500pM)的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些情况下,该抗体在25℃下以约265 pM的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些实施方案中,任何前述 K_D 值都可以通过例如本文所述的表面等离子共振(参见例如实施例,包括实施例2章节D和实施例8章节E)来测定。

[0319] 在其他情况下,该抗体在37℃下以约1nM或更低的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。例

如,在一些情况下,该抗体在37℃下以约1nM或更低、约950pM或更低、约900pM或更低、约850pM或更低、约800pM或更低、约750pM或更低、约700pM或更低、约650pM或更低、约600pM或更低、约550pM或更低、约525pM或更低、约500pM或更低、约475 pM或更低、约450pM或更低、约425pM或更低、约400pM或更低、约350pM或更低、约300pM或更低、约250pM或更低、约200pM或更低、约150pM或更低、约100pM或更低、或约50pM或更低的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些情况下,该抗体在37℃下以约250pM 至约750pM(例如约250pM、约275pM、约300pM、约325pM、约350 pM、约375pM、约400pM、约425pM、约450pM、约475pM、约500 pM、约525pM、约550pM、约575pM、约600pM、约625pM、约650 pM、约675pM、约700pM、约725pM、或约750pM)的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些情况下,该抗体在37℃下以约475pM的 K_D 特异性结合食蟹猴IL-33。在一些实施方案中,任何前述 K_D 值都可以通过例如本文所述的表面等离子共振(参见例如实施例,包括实施例2章节D和实施例8章节E)来测定。在一些实施方案中,本发明的抗IL-33抗体能够抑制IL-33与IL-33受体的结合。在一些实施方案中,用基于细胞的阻断测定测量该抑制。在一些情况下,该抗体以约0.0001 μ g/ml至约1 μ g/ml(例如,约0.001 μ g/ml至约0.5 μ g/ml)之间的90%抑制浓度(IC90)抑制人IL-33 与IL-33受体的结合。在一些实施方案中,该IC90在约0.002 μ g/ml至约 0.25 μ g/ml之间。在一些实施方案中,该IC90是约0.17 μ g/ml。在一些实施方案中,该IC90是约0.004 μ g/ml。在一些实施方案中,该IC90是约 0.003 μ g/ml。在一些实施方案中,该IC90是约0.002 μ g/ml。在一些实施方案中,该IC90是约0.001 μ g/ml。

[0320] 在一些情况下,该抗体以约750fM和约250pM之间(例如,约750fM 和约250pM之间、约1pM和约250pM之间、约1pM和约100pM之间、约1pM和约50pM之间、约1pM和约10pM之间、或约1pM和约5pM之间)的半数最大抑制浓度(IC50)抑制人IL-33与IL-33受体的结合。在一些情况下,该抗体以约10pM或更低(例如,约10pM或更低、约9pM或更低、约8pM或更低、约7pM或更低、约6pM或更低、约 5pM或更低、约4pM或更低、约3pM或更低、约2.5pM或更低、约2 pM或更低、约1pM或更低、约900fM或更低、约800fM或更低、或约750fM或更低)的IC50抑制人IL-33与IL-33受体的结合。在一些情况下,该抗体以约2.4pM的IC50抑制人IL-33与IL-33受体的结合。在一些情况下,用例如实施例8章节B中所述的使用HEK-BLUE™细胞的基于细胞的阻断测定测量该抑制。

[0321] 在一些情况下,该抗体以约1nM和约10nM之间(例如,约1nM和约10nM之间、约1nM和约9nM之间、约1nM和约8nM之间、约1nM 和约7nM之间、约1nM和约6nM之间、约1nM和约5nM之间、约1 nM和约4nM之间、或约1nM和约3nM之间)的IC50抑制食蟹猴IL-33 与IL-33受体的结合。在一些情况下,该抗体以约4.2nM的IC50抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合。在一些情况下,用例如实施例8章节B 中所述的使用HEK-BLUE™细胞的基于细胞的阻断测定测量该抑制。

[0322] 在一些情况下,该抗体抑制人IL-33和IL-12介导的从人天然杀伤(NK) 细胞诱导TNF- α 。例如,在一些情况下,该抗体以约1pM和约200pM 之间(例如,约1pM和约200pM之间、约1pM和约175pM之间、约 1pM和约150pM之间、约1pM和约125pM之间、约1pM和约100pM 之间、约1pM和约75pM之间、约1pM和约50pM之间、约1pM和约30pM之间、或约1pM和约25pM之间)的IC50抑制人IL-33和IL-12 介导的从人NK细胞诱导TNF- α 。在一些情况下,该抗体以约100pM或更低、例如100pM或更低、75pM或更低、50pM或更低、30pM或更低、或25pM或更低的

IC₅₀抑制人IL-33和IL-12介导的从人NK细胞诱导TNF- α 。在一些情况下,该抗体以约30pM的IC₅₀抑制人IL-33和IL-12介导的从人NK细胞诱导TNF- α 。在一些情况下,用例如实施例8章节C中所述的NK原代细胞测定测量该抑制。

[0323] 在一些情况下,该抗体抑制人IL-33介导的人嗜碱性粒细胞中p38 MAPK (Thr180/Tyr182) 磷酸化的诱导。例如,在一些情况下,该抗体以约1pM或更低(例如,1pM或更低、0.75pM或更低、0.5pM或更低、0.25pM或更低、0.15pM或更低、0.1pM或更低、或0.05pM或更低)的IC₅₀抑制人IL-33介导的人嗜碱性粒细胞中p38MAPK (Thr180/Tyr182) 磷酸化的诱导。在一些情况下,该抗体以约0.15pM的IC₅₀抑制人IL-33介导的人嗜碱性粒细胞中p38MAPK (Thr180/Tyr182) 磷酸化的诱导。在一些情况下,用例如实施例8章节D中所述的嗜碱性粒细胞原代细胞测定测量该抑制。

[0324] 在一些情况下,该抗体在竞争结合ELISA测定中抑制人IL-33与IL-33受体的结合。在一些情况下,该抗体在竞争结合ELISA测定中以约1pM和约200pM之间(例如,约1pM和约200pM之间、约1pM和约175pM之间、约1pM和约150pM之间、约1pM和约125pM之间、约1pM和约100pM之间、约1pM和约75pM之间、约1pM和约60pM之间、约1pM和约50pM之间、约1pM和约25pM之间、约10pM和约60pM之间、约10pM和约50pM之间、或约20pM和约50pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体的结合。在一些情况下,该抗体在竞争结合ELISA测定中以约21pM的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体的结合。在一些情况下,用例如实施例8章节F中所述的竞争结合ELISA测量该抑制。

[0325] 在一些情况下,该抗体在竞争结合ELISA测定中抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合。在一些情况下,该抗体在竞争结合ELISA测定中以1pM和约20nM之间(例如,约1pM和约20nM之间、约1pM和约15nM之间、约1pM和约10nM之间、约1pM和约5nM之间、约1pM和约1nM之间、约1pM和约800pM之间、约1pM和约600pM之间、约1pM和约500pM之间、约1nM和约400pM之间、约1nM和约300pM之间、约200pM和约1nM之间、约200pM和约800pM之间、约200pM和约600pM之间、约200pM和约500pM之间、约300pM和约600pM之间、或约300pM和约500pM之间)的IC₅₀抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合。在一些情况下,该抗体在竞争结合ELISA测定中以约1nM或更低、例如约1nM或更低、约800pM或更低、约600pM或更低、约500pM或更低、约430pM或更低、约400pM或更低、或约300pM或更低的IC₅₀抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合。在一些情况下,该抗体在竞争结合ELISA测定中以约430pM的IC₅₀抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合。在一些情况下,用例如实施例8章节F中所述的竞争结合ELISA测量该抑制。

[0326] 在一些情况下,本文所述(例如上文或下文所述)的任意抗IL-33抗体可具有一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7或8个)以下特征:(i)该抗体以约1pM和约1nM之间的K_d特异性结合人IL-33;(ii)该抗体以约1pM和约1nM之间的K_d特异性结合食蟹猴IL-33;(iii)该抗体例如在使用HEK-BLUETM细胞的基于细胞的阻断测定中以约750fM和约250pM之间的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体(例如ST2和/或IL-1RAcP)的结合;(iv)该抗体例如在使用HEK-BLUETM细胞的基于细胞的阻断测定中以约1nM和约10nM之间的IC₅₀抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体(例如ST2和/或IL-1RAcP)的结合;(v)该抗体以约1pM和约200pM之间的IC₅₀抑制人IL-33和IL-12介导的从人NK细胞诱导TNF- α ;(vi)该抗体以约1pM或更低的IC₅₀抑制人IL-33介导的人嗜碱性粒细胞中p38MAPK (Thr180/Tyr182) 磷酸化的诱导;(vii)该抗体在竞争

结合ELISA测定中以约 1pM和约200pM之间的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体(例如ST2和/或IL-1RAcP)的结合;和/或(viii)该抗体在竞争结合ELISA测定中以约1 pM和约20nM之间的IC₅₀抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体(例如ST2和/或IL-1RAcP)的结合。在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有一个上述特征。在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有两个上述特征。在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33 抗体可以具有三个上述特征。在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33 抗体可以具有四个上述特征。在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33 抗体可以具有五个上述特征。在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33 抗体可以具有六个上述特征。在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33 抗体可以具有七个上述特征。在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33 抗体可以具有八个上述特征。

[0327] 例如,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i) 该抗体以约1pM和约1nM之间(例如约15pM和约180pM 之间)的K_D特异性结合人IL-33;和(ii) 该抗体以约1pM和约1nM之间(例如约100pM和约500pM之间)的K_D特异性结合食蟹猴IL-33。

[0328] 在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i) 该抗体以约1pM和约1nM之间(例如约15pM和约 180pM之间)的K_D特异性结合人IL-33;和(ii) 该抗体例如在使用 HEK-BLUETM细胞的基于细胞的阻断测定中以约750fM和约250pM之间(例如约800fM和约10pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体的结合。

[0329] 在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i) 该抗体以约1pM和约1nM之间(例如约15pM和约 180pM之间)的K_D特异性结合人IL-33;和(ii) 该抗体例如在使用 HEK-BLUETM细胞的基于细胞的阻断测定中以约1nM和约10nM之间(例如约1nM和约5nM之间)的IC₅₀抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合。

[0330] 还在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i) 该抗体以约1pM和约1nM之间(例如约15pM和约180pM之间)的K_D特异性结合人IL-33;和(ii) 该抗体以约1pM和约 200pM之间(例如约1pM和约80pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33和IL-12 介导的从人NK细胞诱导TNF- α 。

[0331] 在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i) 该抗体以约1pM和约1nM之间(例如约15pM和约 180pM之间)的K_D特异性结合人IL-33;和(ii) 该抗体以约1pM或更低(例如约0.05pM至约0.5pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33介导的人嗜碱性粒细胞中p38MAPK(Thr180/Tyr182)磷酸化的诱导。

[0332] 还在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i) 该抗体以约1pM和约1nM之间(例如约15pM和约180pM之间)的K_D特异性结合人IL-33;和(ii) 该抗体在竞争结合ELISA 测定中以约1pM和约200pM之间(例如约1pM至约50pM之间)的IC₅₀ 抑制人IL-33与IL-33受体的结合。

[0333] 在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i) 该抗体以约1pM和约1nM之间(例如约15pM和约 180pM之间)的K_D特异性结合人IL-33;和(ii) 该抗体在竞争结合ELISA 测定中以约1pM和约20nM之间(例如约200pM至约1nM之间)的IC₅₀ 抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合。

[0334] 在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i) 该抗体以约1pM和约1nM之间(例如约100pM和约 500pM之间)的K_D特异性结合食蟹猴

IL-33;和(ii)该抗体例如在使用 HEK-BLUE™细胞的基于细胞的阻断测定中以约750fM和约250pM之间(例如约800fM和约10pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体的结合。

[0335] 还在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体以约1pM和约1nM之间(例如约100pM和约500pM之间)的K_d特异性结合食蟹猴IL-33;和(ii)该抗体例如在使用 HEK-BLUE™细胞的基于细胞的阻断测定中以约1nM和约10nM之间(例如约1nM和约5nM之间)的IC₅₀抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合。在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体以约1pM和约1nM之间(例如约100pM和约500pM之间)的K_d特异性结合食蟹猴IL-33;和(ii)该抗体以约1pM和约200pM之间(例如约1pM和约80pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33和IL-12介导的从人NK细胞诱导TNF-α。

[0336] 在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体以约1pM和约1nM之间(例如约100pM和约500pM之间)的K_d特异性结合食蟹猴IL-33;和(ii)该抗体以约1pM或更低(例如约0.05pM至约0.5pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33介导的人嗜碱性粒细胞中p38MAPK(Thr180/Tyr182)磷酸化的诱导。

[0337] 还在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体以约1pM和约1nM之间(例如约100pM和约500pM之间)的K_d特异性结合食蟹猴IL-33;和(ii)该抗体在竞争结合ELISA测定中以约1pM和约200pM之间(例如约1pM至约50pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体的结合。

[0338] 在另一实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体以约1pM和约1nM之间(例如约100pM和约500pM之间)的K_d特异性结合食蟹猴IL-33;和(ii)该抗体在竞争结合ELISA测定中以约1pM和约20nM之间(例如约200pM至约1nM之间)的IC₅₀抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合。

[0339] 在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体例如在使用HEK-BLUE™细胞的基于细胞的阻断测定中以约750fM和约250pM之间(例如约800fM和约10pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体的结合;和(ii)该抗体例如在使用 HEK-BLUE™细胞的基于细胞的阻断测定中以约1nM和约10nM之间(例如约1nM和约5nM之间)的IC₅₀抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合。

[0340] 还在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体例如在使用HEK-BLUE™细胞的基于细胞的阻断测定中以约750fM和约250pM之间(例如约800fM和约10pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体的结合;和(ii)该抗体以约1pM和约200pM之间(例如约1pM和约80pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33和IL-12介导的从人NK细胞诱导TNF-α。

[0341] 在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体例如在使用HEK-BLUE™细胞的基于细胞的阻断测定中以约750fM和约250pM之间(例如约800fM和约10pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体的结合;和(ii)该抗体以约1pM或更低(例如约0.05pM至约0.5pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33介导的人嗜碱性粒细胞中p38MAPK(Thr180/Tyr182)磷酸化的诱导。

[0342] 还在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体例如在使用HEK-BLUE™细胞的基于细胞的阻断测定中以约750fM和约250pM

之间(例如约800fM和约10pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体的结合;和(ii)该抗体在竞争结合ELISA测定中以约1pM和约200pM之间(例如约1pM至约50pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体的结合。

[0343] 在另一实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体例如在使用HEK-BLUE™细胞的基于细胞的阻断测定中以约750 fM和约250pM之间(例如约800fM和约10pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体的结合;和(ii)该抗体在竞争结合ELISA测定中以约1pM和约20nM之间(例如约200pM至约1nM之间)的IC₅₀抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合。

[0344] 在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体例如在使用HEK-BLUE™细胞的基于细胞的阻断测定中以约1nM和约10nM之间(例如约1nM和约5nM之间)的IC₅₀抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合;和(ii)该抗体以约1pM和约200pM之间(例如约1pM和约80pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33和IL-12介导的从人NK细胞诱导TNF- α 。

[0345] 还在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体例如在使用HEK-BLUE™细胞的基于细胞的阻断测定中以约1nM和约10nM之间(例如约1nM和约5nM之间)的IC₅₀抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合;和(ii)该抗体以约1pM或更低(例如约0.05pM至约0.5pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33介导的人嗜碱性粒细胞中p38MAPK(Thr180/Tyr182)磷酸化的诱导。

[0346] 在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体例如在使用HEK-BLUE™细胞的基于细胞的阻断测定中以约1nM和约10nM之间(例如约1nM和约5nM之间)的IC₅₀抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合;和(ii)该抗体在竞争结合ELISA测定中以约1pM和约200pM之间(例如约1pM至约50pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体的结合。

[0347] 在另一实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体例如在使用HEK-BLUE™细胞的基于细胞的阻断测定中以约1 nM和约10nM之间(例如约1nM和约5nM之间)的IC₅₀抑制食蟹猴 IL-33与IL-33受体的结合;和(ii)该抗体在竞争结合ELISA测定中以约1 pM和约20nM之间(例如约200pM至约1nM之间)的IC₅₀抑制食蟹猴 IL-33与IL-33受体的结合。

[0348] 还在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体以约1pM和约200pM之间(例如约1pM和约80pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33和IL-12介导的从人NK细胞诱导 TNF- α ;和(ii)该抗体以约1pM或更低(例如约0.05pM至约0.5pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33介导的人嗜碱性粒细胞中p38MAPK(Thr180/Tyr182)磷酸化的诱导。

[0349] 在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体以约1pM和约200pM之间(例如约1pM和约 80pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33和IL-12介导的从人NK细胞诱导TNF- α ;和(ii)该抗体在竞争结合ELISA测定中以约1pM和约200pM之间(例如约1pM至约50pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体的结合。

[0350] 在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体以约1pM和约200pM之间(例如约1pM和约 80pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33和

IL-12介导的从人NK细胞诱导TNF- α ;和(ii)该抗体在竞争结合ELISA测定中以约1pM和约20nM之间(例如约200pM至约1nM之间)的IC₅₀抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合。

[0351] 在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体以约1pM或更低(例如约0.05pM至约0.5pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33介导的人嗜碱性粒细胞中p38MAPK (Thr180/Tyr182)磷酸化的诱导;和(ii)该抗体在竞争结合ELISA测定中以约1pM和约200pM之间(例如约1pM至约50pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体的结合。

[0352] 在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体以约1pM或更低(例如约0.05pM至约0.5pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33介导的人嗜碱性粒细胞中p38MAPK (Thr180/Tyr182)磷酸化的诱导;和(ii)该抗体在竞争结合ELISA测定中以约1pM和约20nM之间(例如约200pM至约1nM之间)的IC₅₀抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合。

[0353] 在另一实例中,在一些实施方案中,本文所述的任意抗IL-33抗体可以具有以下特征:(i)该抗体在竞争结合ELISA测定中以约1pM和约200 pM之间(例如约1pM至约50pM之间)的IC₅₀抑制人IL-33与IL-33受体的结合;和(ii)该抗体在竞争结合ELISA测定中以约1pM和约20nM之间(例如约200pM至约1nM之间)的IC₅₀抑制食蟹猴IL-33与IL-33受体的结合。

[0354] 在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a)含有氨基酸序列SFSX₁S (SEQ ID NO: 62)的HVR-H1,其中X₁是Met、Leu或Val;(b)含有氨基酸序列 TISGGKTFTDYVDX₁VKG (SEQ ID NO:63)的HVR-H2,其中X₁是Ser 或Ala;(c)含有氨基酸序列ANYGX₁X₂FFEY (SEQ ID NO:64)的 HVR-H3,其中X₁是Asn或Asp,X₂是Trp或Phe;(d)含有氨基酸序列 RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO:4)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列 AASNRGS (SEQ ID NO:5)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列 QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6)的HVR-L3;或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:4-6或62-64中任一个具有至少约80%序列同一性(例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的变体的组合。

[0355] 例如,该抗IL-33抗体可以包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a)含有氨基酸序列SFSMS (SEQ ID NO:1)、SFSL (SEQ ID NO:7)或SFSVS (SEQ ID NO:8)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列TISGGKTFTDYVDSVK (SEQ ID NO:2)或TISGGKTFTDYVDAVK (SEQ ID NO:9)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列ANYGNWFFEY (SEQ ID NO:3)、ANYGNFFEY (SEQ ID NO:10)或 ANYGDWFFEY (SEQ ID NO:11)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列 RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO:4)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列 AASNRGS (SEQ ID NO:5)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列 QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6)的HVR-L3;或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:1-11中任一个具有至少约80%序列同一性(例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的变体的组合。

[0356] 在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含一个、两个、三个或四个以下重链构架区:含有氨基酸序列 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:12)、DNLVESGGGSVKPGGSLKLSVASGFTFS (SEQ ID NO:16)或 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:20)的 FR-H1;含有氨基酸序列WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:13)、

WVRQTPEKRLEWVA (SEQ ID NO:17) 或 WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO:21) 的 FR-H2; 含有氨基酸序列 RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:14)、RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:22)、RFTISRDDAKNTLYLQMSSLESED TAVYYCTR (SEQ ID NO:18)、RFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:23)、RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:24) 或 RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:14) 的 FR-H3; 和含有氨基酸序列 WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:15) 或 WGAGTTVAVSS (SEQ ID NO:19) 的 FR-H4。

[0357] 在一些情况下, 该抗 IL-33 抗体可以包含一个、两个、三个或四个以下轻链构架区: 含有氨基酸序列 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:25) 或 DIVLTQSPGFLVSLGQRATISC (SEQ ID NO:29) 的 FR-L1; 含有氨基酸序列 WFQQKPGQPPRLLIF (SEQ ID NO:26) 或 WFQQKPGQPPKLLIF (SEQ ID NO:30) 的 FR-L2; 含有氨基酸序列 GIPARFSGSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:27)、GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFC (SEQ ID NO:31)、GVPARFSGSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYFC (SEQ ID NO:33)、GVPARFSGSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:34) 或 GIPARFSGSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYFC (SEQ ID NO:35) 的 FR-L3; 和含有氨基酸序列 FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:28) 或 FGSGTKLEIK (SEQ ID NO:32) 的 FR-L4。

[0358] 在一些情况下, 该抗 IL-33 抗体包含: (a) 含有 SEQ ID NO:36、38 或 40-50 中任一个的序列或与 SEQ ID NO:36、38 或 40-50 中任一个具有至少 90% 序列同一性 (例如至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 序列同一性) 的氨基酸序列的重链可变 (VH) 结构域; (b) 含有 SEQ ID NO:37、39 或 51-61 中任一个的序列或与 SEQ ID NO:37、39 或 51-61 中任一个具有至少 90% 序列同一性 (例如至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 序列同一性) 的氨基酸序列的轻链可变 (VL) 结构域; 或 (c) 如 (a) 中的 VH 结构域和如 (b) 中的 VL 结构域。例如, 在一些情况下, 该抗体包含结合结构域, 该结合结构域包含含有氨基酸序列 SEQ ID NO:36 的 VH 结构域和含有氨基酸序列 SEQ ID NO:37 的 VL 结构域。在一些情况下, 该抗体包含结合结构域, 该结合结构域包含含有氨基酸序列 SEQ ID NO:38 的 VH 结构域和含有氨基酸序列 SEQ ID NO:39 的 VL 结构域。在一些情况下, 该抗体包含结合结构域, 该结合结构域包含含有氨基酸序列 SEQ ID NO:40 的 VH 结构域和含有氨基酸序列 SEQ ID NO:51 的 VL 结构域。在一些情况下, 该抗体包含结合结构域, 该结合结构域包含含有氨基酸序列 SEQ ID NO:41 的 VH 结构域和含有氨基酸序列 SEQ ID NO:52 的 VL 结构域。在一些情况下, 该抗体包含结合结构域, 该结合结构域包含含有氨基酸序列 SEQ ID NO:42 的 VH 结构域和含有氨基酸序列 SEQ ID NO:53 的 VL 结构域。在一些情况下, 该抗体包含结合结构域, 该结合结构域包含含有氨基酸序列 SEQ ID NO:43 的 VH 结构域和含有氨基酸序列 SEQ ID NO:54 的 VL 结构域。在一些情况下, 该抗体包含结合结构域, 该结合结构域包含含有氨基酸序列 SEQ ID NO:44 的 VH 结构域和含有氨基酸序列 SEQ ID NO:55 的 VL 结构域。在一些情况下, 该抗体包含结合结构域, 该结合结构域包含含有氨基酸序列 SEQ ID NO:45 的 VH 结构域和含有氨基酸序列 SEQ ID NO:56 的 VL 结构域。在一些情况下, 该抗体包含结合结构域, 该结合结构域包含含有氨基酸序列 SEQ ID NO:46 的 VH 结构域和含有氨基酸序列 SEQ ID NO:57 的 VL 结构域。在一些情况下, 该抗体包含结合结构域, 该结合结构域包含含有氨基酸序列 SEQ ID NO:47 的 VH 结构域和含有氨基酸序列 SEQ ID NO:58 的 VL 结构域。在一些情况下, 该抗体包含结合结构域, 该结合结构域包含含有氨基酸序列 SEQ ID NO:48 的 VH 结构域和含有氨基酸序列 SEQ ID NO:59 的 VL 结构域。在一些情况下, 该抗体包含结合结构域, 该结合结

构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:49的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:60的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:50的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:61的VL结构域。

[0359] 例如,该抗IL-33抗体可以包含:(a)含有氨基酸序列SFSMS(SEQ ID NO:1)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列TISGGKTFTDYVDSVKG(SEQ ID NO:2)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列ANYGNWFFEYV(SEQ ID NO:3)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASESVAKYGLSLLN(SEQ ID NO:4)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASNRRGS(SEQ ID NO:5)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QQSKEVPFT(SEQ ID NO:6)的HVR-L3。在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含:(a)含有SEQ ID NO:36的序列或与SEQ ID NO:36具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有SEQ ID NO:37的序列或与SEQ ID NO:37具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含以下重链构架区:含有氨基酸序列EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:12)的FR-H1;含有氨基酸序列WVRQAPGKGLEWVA(SEQ ID NO:13)的FR-H2;含有氨基酸序列RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR(SEQ ID NO:14)的FR-H3;和含有氨基酸序列WGQGLTVTVSS(SEQ ID NO:15)的FR-H4。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含以下轻链构架区:含有氨基酸序列EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC(SEQ ID NO:25)的FR-L1;含有氨基酸序列WFQQKPGQPRLIF(SEQ ID NO:26)的FR-L2;含有氨基酸序列GIPARFSGSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYC(SEQ ID NO:27)的FR-L3;和含有氨基酸序列FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:28)的FR-L4。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含结合结构域,该结合结构域包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:36的VH结构域;和(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:37的VL结构域。在一些情况下,该示例性抗IL-33抗体是10C12.38.H6.87Y.58I。

[0360] 在其他情况下,该抗IL-33抗体可以包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a)含有氨基酸序列SSIFYWG(SEQ ID NO:65)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列SIYYSGRTYYNPX₁LKS(SEQ ID NO:90)的HVR-H2,其中X₁是Ser或Ala;(c)含有氨基酸序列AGGLYNWNDESFSFYMDV(SEQ ID NO:68)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASQSFSSSYLA(SEQ ID NO:69)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列GASSRAT(SEQ ID NO:70)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QQYDRSPLT(SEQ ID NO:71)的HVR-L3;或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:65、68-71或90中任一个具有至少约80%序列同一性(例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的变体的组合。

[0361] 例如,该抗IL-33抗体可以包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a)含有氨基酸序列SSIFYWG(SEQ ID NO:65)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列SIYYSGRTYYNPALKS(SEQ ID NO:66)或SIYYSGRTYYNPALKS(SEQ ID NO:67)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列AGGLYNWNDESFSFYMDV(SEQ ID NO:68)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASQSFSSSYLA(SEQ ID NO:69)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列GASSRAT(SEQ ID NO:70)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QQYDRSPLT(SEQ ID NO:71)的HVR-L3;或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:65-71中任一个具有至少约80%序列同一性(例如81%、

82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的变体的组合。

[0362] 在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含一个、两个、三个或四个以下重链构架区:含有氨基酸序列 ELQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIR (SEQ ID NO:72)、QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIR (SEQ ID NO:77)或 QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIR (SEQ ID NO:76)的 FR-H1;含有氨基酸序列WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO:73)的 FR-H2;含有氨基酸序列 RVTISVDTSKNQFSLMLTSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO:74)的 FR-H3;和含有氨基酸序列WGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO:75)或 WGNGTTTVTVSS (SEQ ID NO:78)的FR-H4。

[0363] 在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含一个、两个、三个或四个以下轻链构架区:含有氨基酸序列EIVLTQSPGTLSPGERATLSC (SEQ ID NO:79)的FR-L1;含有氨基酸序列WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:80)的FR-L2;含有氨基酸序列 GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:81)或 GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPKDFAVYYC (SEQ ID NO:83)的 FR-L3;和含有氨基酸序列FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:82)的FR-L4。

[0364] 在一些情况下,该抗IL-33抗体包含:(a)含有SEQ ID NO:84、86、88、91、92或95中任一个的序列或与SEQ ID NO:84、86、88、91、92或95中任一个具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有SEQ ID NO:85、87、89、93、94或96中任一个的序列或与SEQ ID NO:85、87、89、93、94或96中任一个具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。例如,在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:84的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:85的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:86的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:87的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:88的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:89的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:91的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:93的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:92的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:94的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:95的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:96的VL结构域。

[0365] 例如,该抗IL-33抗体可以包含:(a)含有氨基酸序列SSIFYWG (SEQ ID NO:65)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列SIYSGRTYYNPSLKS (SEQ ID NO:66)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列AGGLYNWNDESFSFYMDV (SEQ ID NO:68)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASQSFSSSYLA (SEQ ID NO:69)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列GASSRAT (SEQ ID NO:70)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QQYDRSPLT (SEQ ID NO:71)的HVR-L3。在一些情况下,该抗体包含:(a)含有SEQ ID NO:84的序列或与SEQ ID NO:84具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有SEQ ID NO:85的序列或与SEQ ID NO:85具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的轻链可

变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含以下重链构架区:含有氨基酸序列ELQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIR(SEQ ID NO:72)的FR-H1;含有氨基酸序列WIRQPPGKGLEWIG(SEQ ID NO:73)的FR-H2;含有氨基酸序列RVTISVDTSKNQFSLMLTSVTAADTAVYYCAR(SEQ ID NO:74)的FR-H3;和含有氨基酸序列WGQGTTVTVSS(SEQ ID NO:75)的FR-H4。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含以下轻链构架区:含有氨基酸序列EIVLTQSPGTLSPGERATLSC(SEQ ID NO:79)的FR-L1;含有氨基酸序列WYQQKPGQAPRLLIY(SEQ ID NO:80)的FR-L2;含有氨基酸序列GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYC(SEQ ID NO:81)的FR-L3;和含有氨基酸序列FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:82)的FR-L4。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含结合结构域,该结合结构域包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:84的VH结构域;和(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:85的VL结构域。在一些情况下,该示例性抗IL-33抗体是4G12.FW4。

[0366] 在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a)含有氨基酸序列NYX₁MN(SEQ ID NO:97)的HVR-H1,其中X₁是Trp、Phe或Tyr;(b)含有氨基酸序列EITLKFNX₁YX₂THYAESVKG(SEQ ID NO:98)的HVR-H2,其中X₁是Asn、Asp、Ser或Ala,X₂是Ser或Ala;(c)含有氨基酸序列RNYGX₁X₂YINV(SEQ ID NO:99)的HVR-H3,其中X₁是Asp或Asn,X₂是Trp或Tyr;(d)含有氨基酸序列RASESVDKFGX₁SFLN(SEQ ID NO:100)的HVR-L1,其中X₁是Met、Val或Leu;(e)含有氨基酸序列VASSQGS(SEQ ID NO:113)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QQSKDIPYT(SEQ ID NO:114)的HVR-L3;或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:97-100、113或114中任一个具有至少约80%序列同一性(例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的变体的组合。在一些实施方案中,任意前述抗体不包含含有氨基酸序列NYWMN(SEQ ID NO:101)的HVR-H1。

[0367] 例如,该抗IL-33抗体可以包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a)含有氨基酸序列NYWMN(SEQ ID NO:101)、NYFMN(SEQ ID NO:102)或NYYMN(SEQ ID NO:103)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列EITLKFNNYSTHYAESVKG(SEQ ID NO:104)、EITLKFN DYSTHYAESVKG(SEQ ID NO:105)、EITLKFN SYSTHYAESVKG(SEQ ID NO:106)、EITLKFN AYSTHYAESVKG(SEQ ID NO:107)或EITLKFN NYATHYAESVKG(SEQ ID NO:108)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列RNYGDWYINV(SEQ ID NO:109)、RNYGNWYINV(SEQ ID NO:110)或RNYGNFYINV(SEQ ID NO:111)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASESVDKFGMSFLN(SEQ ID NO:112)、RASESVDKFGVSFLN(SEQ ID NO:115)或RASESVDKFGLSFLN(SEQ ID NO:116)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列VASSQGS(SEQ ID NO:113)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QQSKDIPYT(SEQ ID NO:114)的HVR-L3;或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:101-116中任一个具有至少约80%序列同一性(例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的变体的组合。在一些实施方案中,任意前述抗体不包含含有氨基酸序列NYWMN(SEQ ID NO:101)的HVR-H1。

[0368] 在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含一个、两个、三个或四个以下重链构架区:含有氨基酸序列EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFS(SEQ ID NO:117)或EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS(SEQ ID NO:118)的FR-H1;含有氨基酸序列

WVRQSPEKGLEWMA (SEQ ID NO:119) 或 WVRQAPGKGLEWMA (SEQ ID NO:120) 的FR-H2;含有氨基酸序列 RFSISRDDSKSTVYLQMNRLRAEDTGIYYCAR (SEQ ID NO:121)、RFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:122) 或 RFTISRDDSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:123) 的 FR-H3;和含有氨基酸序列WGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:124) 或 WGQGT LTVSS (SEQ ID NO:125) 的FR-H4。在一些实施方案中,任意前述抗体不包含含有氨基酸序列NYWMN (SEQ ID NO:101) 的HVR-H1。

[0369] 在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含一个、两个、三个或四个以下轻链构架区:含有氨基酸序列DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISC (SEQ ID NO:126) 或DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:127) 的 FR-L1;含有氨基酸序列WFQQKPGQPPKLLIF (SEQ ID NO:128) 或 WYQQKPGQPPKLLIF (SEQ ID NO:129) 的FR-L2;含有氨基酸序列 GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDTAMYFC (SEQ ID NO:130) 或 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO:131) 的 FR-L3;和含有氨基酸序列FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:132) 或 FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:133) 的 FR-L4。在一些实施方案中,任意前述抗体不包含含有氨基酸序列NYWMN (SEQ ID NO:101) 的HVR-H1。

[0370] 在一些情况下,该抗IL-33抗体包含:(a) 含有SEQ ID NO:134、136、138或140-148 中任一个的序列或与SEQ ID NO:134、136、138或140-148 中任一个具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的重链可变(VH) 结构域;(b) 含有SEQ ID NO:135、137、139或149-157中任一个的序列或与SEQ ID NO:135、137、139或149-157中任一个具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的轻链可变(VL) 结构域;或(c) 如(a) 中的VH 结构域和如(b) 中的VL结构域。例如,在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:134的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:135的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:136 的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:137 的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:138的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:139的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:140的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:149 的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:141的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:150的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:142的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:151的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:143的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:152的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:144 的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:153的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:145的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:154的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:146的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:155 的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:147的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:

156的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:148的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:157的VL结构域。在一些实施方案中,任意前述抗体不包含含有氨基酸序列NYWMN (SEQ ID NO:101)的HVR-H1。

[0371] 例如,该抗IL-33抗体可以包含:(a)含有氨基酸序列NYWMN (SEQ ID NO:101)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列EITLKFNNYSTHYAESVKG (SEQ ID NO:104)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列RNYGDWYINV (SEQ ID NO:109)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASESVDFKFGMSFLN (SEQ ID NO:112)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列VASSQGS (SEQ ID NO:113)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QQSKDIPYT (SEQ ID NO: 114)的HVR-L3。在一些情况下,该抗体包含:(a)含有SEQ ID NO:134的序列或与SEQ ID NO:134具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有SEQ ID NO:135的序列或与SEQ ID NO:135具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含以下重链构架区:含有氨基酸序列 EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFS (SEQ ID NO:117)的FR-H1;含有氨基酸序列WVRQSPKGLEWMA (SEQ ID NO:119)的FR-H2;含有氨基酸序列RFSISRDDSKSTVYLQMNLR AEDTGIYYCAR (SEQ ID NO:121)的FR-H3;和含有氨基酸序列WGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:124)的FR-H4。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含以下轻链构架区:含有氨基酸序列DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISC (SEQ ID NO:126)的FR-L1;含有氨基酸序列WFQQKPGQPPKLLIF (SEQ ID NO:128)的FR-L2;含有氨基酸序列GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDTAMYFC (SEQ ID NO:130)的FR-L3;和含有氨基酸序列FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:132)的FR-L4。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含结合结构域,该结合结构域包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:134的VH结构域;和(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:135的VL结构域。在一些情况下,该示例性抗IL-33抗体是10H2。

[0372] 在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a)含有氨基酸序列KFWMN (SEQ ID NO: 158)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列EIRLX₁X₂INYVKDYAESVKG (SEQ ID NO:161)的HVR-H2,其中X₁是Asn或Ser,X₂是Ser或Ala,其中X₁是Asn、Asp、Ser或Ala,X₂是Ser或Ala;(c)含有氨基酸序列RNYGNWFFEI (SEQ ID NO:160)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASESVDRYGISFMN (SEQ ID NO:164)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASNQGS (SEQ ID NO:165)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QHSKEVPYT (SEQ ID NO:166)的HVR-L3;或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:158、160、161或164-166中任一个具有至少约80%序列同一性(例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的变体的组合。

[0373] 例如,该抗IL-33抗体可以包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a)含有氨基酸序列KFWMN (SEQ ID NO:158)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列EIRLNSINYVKDYAESVKG (SEQ ID NO:159)、EIRLSSINYVKDYAESVKG (SEQ ID NO:162)或EIRLNAINYVKDYAESVKG (SEQ ID NO:163)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列RNYGNWFFEI (SEQ ID NO:160)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASESVDRYGISFMN (SEQ ID NO:164)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASNQGS (SEQ ID NO:165)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QHSKEVPYT (SEQ

ID NO:166)的HVR-L3;或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:158-160或162-166中任一个具有至少约80%序列同一性(例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的变体的组合。

[0374] 在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含一个、两个、三个或四个以下重链构架区:含有氨基酸序列 EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFN (SEQ ID NO:167) 或 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN (SEQ ID NO:171) 的 FR-H1;含有氨基酸序列 WVRQSPEKGLEWVA (SEQ ID NO:168) 或 WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO:172) 的FR-H2;含有氨基酸序列 RFTISRDDSKNSVYLQMNRLRAEDTGIYYCIR (SEQ ID NO:169) 或 RFTISRDNKNSVYLQMNSLRAEDTAVYYCIR (SEQ ID NO:173) 的 FR-H3;和(d)含有氨基酸序列WGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:170) 或 WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:174) 的FR-H4。

[0375] 在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含一个、两个、三个或四个以下轻链构架区:含有氨基酸序列DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC (SEQ ID NO:175) 或DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:179) 的 FR-L1;含有氨基酸序列WFQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:176) 或 WFQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:180) 的FR-L2;含有氨基酸序列 GVPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:181) 的FR-L3;和含有氨基酸序列FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:178) 或 FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:182) 的FR-L4。

[0376] 在一些情况下,该抗IL-33抗体包含:(a)含有SEQ ID NO:183、185、187或189中任一个的序列或与SEQ ID NO:183、185、187或189中任一个具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有SEQ ID NO:184、186、188、190中任一个的序列或与SEQ ID NO:184、186、188、190中任一个具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。例如,在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:183的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:184的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:185的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:186的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:187的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:188的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:189的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:190的VL结构域。

[0377] 例如,该IL-33抗体可以包含:(a)含有氨基酸序列KFWMN (SEQ ID NO:158) 的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列EIRLNSINYVKDYAESVKG (SEQ ID NO:159) 的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列RNYGNWFFEI (SEQ ID NO:160) 的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASESVDRYGISFMN (SEQ ID NO:164) 的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASNQGS (SEQ ID NO:165) 的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QHSKEVPYT (SEQ ID NO:166) 的HVR-L3。在一些情况下,该抗体包含:(a)含有SEQ ID NO:183的序列或与SEQ ID NO:183具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的重链可变(VH)结构

域; (b) 含有SEQ ID NO:184的序列或与SEQ ID NO: 184具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含以下重链构架区:含有氨基酸序列 EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFN (SEQ ID NO:167)的FR-H1;含有氨基酸序列WVRQSPEKGLEWVA (SEQ ID NO:168)的FR-H2;含有氨基酸序列 RFTISRDDSKNSVYLQMNLR AEDTGIYYCIR (SEQ ID NO:169)的FR-H3;和含有氨基酸序列WGAGTTTVTVSS (SEQ ID NO:170)的FR-H4。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含以下轻链构架区:含有氨基酸序列 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC (SEQ ID NO:175)的FR-L1;含有氨基酸序列WFQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:176)的FR-L2;含有氨基酸序列GVPARFSGSGSGTDFSLNIH PLEEDDAAMYFC (SEQ ID NO:177)的FR-L3;和含有氨基酸序列FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:178)的FR-L4。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含结合结构域,该结合结构域包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:183的VH结构域;和(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:184的VL结构域。在一些情况下,该示例性抗IL-33抗体是6C11。

[0378] 在其他情况下,该抗IL-33抗体可以包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a)含有氨基酸序列DYNMN (SEQ ID NO: 191)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列DINPKX₁X₂DTFYNQNFKD (SEQ ID NO:192)的HVR-H2,其中X₁是Asn或Ser,X₂是Gly或Ala;(c)含有氨基酸序列HYYYGSSYGGFVY (SEQ ID NO:196)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列HASQNINWLS (SEQ ID NO:197)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASKLHT (SEQ ID NO:198)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QQGQSYPLT (SEQ ID NO:199)的HVR-L3;或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:191、192或196-199中任一个具有至少约80%序列同一性(例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的变体的组合。

[0379] 例如,该抗IL-33抗体可以包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a)含有氨基酸序列DYNMN (SEQ ID NO:191)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列DINPKNGDTFYNQNFKD (SEQ ID NO: 193)、DINPKSGDTFYNQNFKD (SEQ ID NO:194)或DINPKNADTFYNQNFKD (SEQ ID NO:195)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列HYYYGSSYGGFVY (SEQ ID NO:196)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列HASQNINWLS (SEQ ID NO:197)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASKLHT (SEQ ID NO:198)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QQGQSYPLT (SEQ ID NO:199)的HVR-L3;或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:191或193-199中任一个具有至少约80%序列同一性(例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的变体的组合。

[0380] 在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含一个、两个、三个或四个以下重链构架区:含有氨基酸序列EVLLQQSGPELVKPGASVKISCNASGYTFS (SEQ ID NO:200)或EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFS (SEQ ID NO:204)的FR-H1;含有氨基酸序列WVKQSHGKSLESIG (SEQ ID NO:201)或WVRQAPQGLESIG (SEQ ID NO:205)的FR-H2;含有氨基酸序列KATLTIDKSSSTVYMELRSLTSED TAMYVCAR (SEQ ID NO:202)或RATLTIDKSTSTAYLELSS LRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:206)的FR-H3;和含有氨基酸序列WGQGTLLTVVAA (SEQ ID NO:203)或WGQGTLLTVVSS (SEQ ID NO:207)的FR-H4。

[0381] 在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含一个、两个、三个或四个以下轻链构架区:

含有氨基酸序列DIQMNQSPSSLSASLGDITITC (SEQ ID NO:208) 或DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO:212) 的 FR-L1;含有氨基酸序列WYQQKAGNNPKLLIY (SEQ ID NO:209) 或WYQQKPGKNPKLLIY (SEQ ID NO:213) 的FR-L2;含有氨基酸序列 GVPSRFTGSGSGTLFTLTISLQ PEDIATYYC (SEQ ID NO:210) 或 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:214) 的 FR-L3;和含有氨基酸序列FGSGTNLELK (SEQ ID NO:211) 或 FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:215) 的 FR-L4。

[0382] 在一些情况下,该抗IL-33抗体包含:(a)含有SEQ ID NO:216、218、220或221中任一个的序列或与SEQ ID NO:216、218、220或221中任一个具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有SEQ ID NO:217或SEQ ID NO:219的序列或与SEQ ID NO:217或SEQ ID NO:219具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。例如,在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:216的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:217的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:218的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:219的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:220的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:219的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:221的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:219的VL结构域。

[0383] 例如,该抗IL-33抗体可以包含:(a)含有氨基酸序列DYNMN (SEQ ID NO:191) 的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列DINPKNGDTFYNNFKD (SEQ ID NO:193) 的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列HYYYGSSYGGFVY (SEQ ID NO:196) 的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列HASQNINWLS (SEQ ID NO:197) 的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASKLHT (SEQ ID NO:198) 的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列QQGQSYPLT (SEQ ID NO:199) 的HVR-L3。在一些情况下,该抗体包含:(a)含有SEQ ID NO:216的序列或与SEQ ID NO:216具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有SEQ ID NO:217的序列或与SEQ ID NO:217具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含以下重链构架区:含有氨基酸序列EVLLQQSGPELVKPGASVKISCNASGYTFS (SEQ ID NO:200) 的FR-H1;含有氨基酸序列WVKQSHGKSLESIG (SEQ ID NO:201) 的FR-H2;含有氨基酸序列KATLTIDKSSSTVYME LRSLTSED TAMYCAR (SEQ ID NO:202) 的FR-H3;和含有氨基酸序列WGQGT LVT VAA (SEQ ID NO:203) 的FR-H4。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含以下轻链构架区:含有氨基酸序列DIQMNQSPSSLSASLGDITITC (SEQ ID NO:208) 的FR-L1;含有氨基酸序列WYQQKAGNNPKLLIY (SEQ ID NO:209) 的FR-L2;含有氨基酸序列GVPSRFTGSGSGTLFTLTISLQ PEDIATYYC (SEQ ID NO:210) 的FR-L3;和含有氨基酸序列FGSGTNLELK (SEQ ID NO:211) 的FR-L4。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含结合结构域,该结合结构域包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:216的VH结构域;和(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:217的VL结构域。在一些

情况下,该示例性抗IL-33 抗体是2B6。

[0384] 例如,该抗IL-33抗体可以包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a) 含有氨基酸序列SYWIN (SEQ ID NO:222) 的HVR-H1;(b) 含有氨基酸序列RIAPGSGFISYNELFKD (SEQ ID NO: 223) 的HVR-H2;(c) 含有氨基酸序列EFYYGSFYGGFAY (SEQ ID NO: 224) 的HVR-H3;(d) 含有氨基酸序列HASQNIHVWLS (SEQ ID NO:225) 的HVR-L1;(e) 含有氨基酸序列KASTLHT (SEQ ID NO:226) 的HVR-L2;和(f) 含有氨基酸序列QQGQSSPLT (SEQ ID NO:227) 的HVR-L3;或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:222-227中任一个具有至少约80%序列同一性(例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的变体的组合。

[0385] 在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含一个、两个、三个或四个以下重链构架区:含有氨基酸序列 QVQLQQSGNDLVKPGASVKLSCKASGYTFT (SEQ ID NO:228) 或 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT (SEQ ID NO:238) 的 FR-H1;含有氨基酸序列 WIKRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:229) 或 WVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:239) 的FR-H2;含有氨基酸序列 KATLTVDTSSTAYIQLGSLSEDSAVYFCAR (SEQ ID NO:230) 或 RVTITRDTSTSTAYLELSS LRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:240) 的 FR-H3;和含有氨基酸序列WGQGTLLTVSA (SEQ ID NO:231) 或 WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:241) 的FR-H4。

[0386] 在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含一个、两个、三个或四个以下轻链构架区:含有氨基酸序列DIQMNQSPSSLSASLGDTITITC (SEQ ID NO:232) 或DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC (SEQ ID NO:242) 的 FR-L1;含有氨基酸序列WYQQKPGNIPKLLIY (SEQ ID NO:233) 或 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:243) 的FR-L2;含有氨基酸序列 GVPSRFNGSGSGTGFTLTISLQ PEDIATYYC (SEQ ID NO:234) 或 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:244) 的FR-L3;和含有氨基酸序列FGAGTKLEVK (SEQ ID NO:235) 或 FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:245) 的FR-L4。

[0387] 在一些情况下,该抗IL-33抗体包含:(a) 含有SEQ ID NO:236或SEQ ID NO:246的序列或与SEQ ID NO:236或SEQ ID NO:246具有至少 90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b) 含有 SEQ ID NO:237或SEQ ID NO:247的序列或与SEQ ID NO:237或SEQ ID NO:247具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的轻链可变(VL) 结构域;或(c) 如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0388] 例如,该抗IL-33抗体可以包含:(a) 含有氨基酸序列SYWIN (SEQ ID NO:222) 的HVR-H1;(b) 含有氨基酸序列RIAPGSGFISYNELFKD (SEQ ID NO:223) 的HVR-H2;(c) 含有氨基酸序列EFYYGSFYGGFAY (SEQ ID NO:224) 的HVR-H3;(d) 含有氨基酸序列HASQNIHVWLS (SEQ ID NO: 225) 的HVR-L1;(e) 含有氨基酸序列KASTLHT (SEQ ID NO:226) 的 HVR-L2;和(f) 含有氨基酸序列QQGQSSPLT (SEQ ID NO:227) 的 HVR-L3。在一些情况下,该抗体包含:(a) 含有SEQ ID NO:236的序列或与SEQ ID NO:236具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的重链可变(VH) 结构域;(b) 含有SEQ ID NO:237的序列或与SEQ ID NO: 237具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的轻链

可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含以下重链构架区:含有氨基酸序列 QVQLQQSGNDLVKPGASVKLSCKASGYTFT (SEQ ID NO:228)的FR-H1;含有氨基酸序列WIKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:229)的FR-H2;含有氨基酸序列KATLTVDTSSTAYIQLGSLSEDSAVYFCAR (SEQ ID NO:230)的FR-H3;和含有氨基酸序列WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:231)的FR-H4。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含以下轻链构架区:含有氨基酸序列DIQMNQSPSSLSASLGDTITITC (SEQ ID NO:232)的FR-L1;含有氨基酸序列WYQQKPGNIPKLLIY (SEQ ID NO:233)的FR-L2;含有氨基酸序列GVPSRFNGSGSGTGTFTISSLQPEDIATYYC (SEQ ID NO:234)的FR-L3;和含有氨基酸序列FGAGTKLEVK (SEQ ID NO:235)的FR-L4。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含结合结构域,该结合结构域包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:236的VH结构域;和(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:237的VL结构域。在一些情况下,该示例性抗IL-33抗体是9F6。

[0389] 在其他情况下,该抗IL-33抗体可以包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a)含有氨基酸序列GSAX₁H (SEQ ID NO:248)的HVR-H1,其中X₁是Met或Ile;(b)含有氨基酸序列RIRSX₁X₂NX₃YATX₄YX₅ASVKG (SEQ ID NO:249)的HVR-H2,其中X₁是Arg或Lys,X₂是Asn、Thr或Gly,X₃是Asn或Ser,X₄是Ala或Glu,X₅是Ala或Asp;(c)含有氨基酸序列X₁X₂X₃X₄PFDY (SEQ ID NO:250)的HVR-H3,其中X₁是Leu或Gln,X₂是Gln、Gly或Phe,X₃是Gln或Gly,X₄是Pro或Asp;(d)含有氨基酸序列RASQGIRNDLD (SEQ ID NO:251)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASSLQS (SEQ ID NO:252)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列LQHX₁X₂YPX₃T (SEQ ID NO:253)的HVR-L3,其中X₁是Asp或Ser,X₂是Ser或Ile,X₃是Leu或Pro;或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:248-253中任一个具有至少约80%序列同一性(例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的变体的组合。

[0390] 例如,该抗IL-33抗体可以包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a)含有氨基酸序列GSAMH (SEQ ID NO:254)或GSAIH (SEQ ID NO:258)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列RIRSRNNYATAYAASVKG (SEQ ID NO:255)、RIRSRTNNYATEYDASVKG (SEQ ID NO:259)或RIRSKGNSYATAYAASVKG (SEQ ID NO:262)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列LQQPPFDY (SEQ ID NO:256)、LGQPPFDY (SEQ ID NO:260)或QFGDPFDY (SEQ ID NO:263)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASQGIRNDLD (SEQ ID NO:251)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASSLQS (SEQ ID NO:252)的HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列LQHDSYPLT (SEQ ID NO:257)的HVR-L3;或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:251、252或254-263中任一个具有至少约80%序列同一性(例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的变体的组合。

[0391] 在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含一个、两个、三个或四个以下重链构架区:含有氨基酸序列QVQLVQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:264)、EVQLVESGGDLVQPGGSLKLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:265)或EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:266)的FR-H1;含有氨基酸序列WVRQASGKGLEWVG (SEQ ID NO:267)或WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:268)的FR-H2;含有氨基酸序列RFTISRDDSKRTTYLQMNSLKTEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:269)、RFTISRDDSKRTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:270)或RFSISRDDSKRTAYLQMSSLKTEDSAVYYCAR (SEQ ID NO:271)

的 FR-H3;和含有氨基酸序列WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:272)的FR-H4。

[0392] 在一些情况下,该抗IL-33抗体可以包含一个、两个、三个或四个以下轻链构架区:含有氨基酸序列DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:273)、AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:274)或 AIRITQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:275)的FR-L1;含有氨基酸序列WYQQKPGKAPKRLIY (SEQ ID NO:276)的FR-L2;含有氨基酸序列GVPSRFNGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:277)、GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:278)或 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:279)的 FR-L3;和含有氨基酸序列FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:280)或 FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:281)的FR-L4。

[0393] 在一些情况下,该抗IL-33抗体包含:(a)含有SEQ ID NO:282、284或286中任一个的序列或与SEQ ID NO:282、284或286中任一个具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有 SEQ ID NO:283、285或287中任一个的序列或与SEQ ID NO:283、285或287中任一个具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列 SEQ ID NO:282的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:283的VL 结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:284的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:285的VL结构域。在一些情况下,该抗体包含结合结构域,该结合结构域包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:286的VH结构域和含有氨基酸序列 SEQ ID NO:287的VL结构域。

[0394] 例如,该抗IL-33抗体可以包含:(a)含有氨基酸序列GSAMH (SEQ ID NO:254)的HVR-H1;(b)含有氨基酸序列RIRSRNNYATAYAASVKG (SEQ ID NO:255)的HVR-H2;(c)含有氨基酸序列LQQPPFDY (SEQ ID NO:256)的HVR-H3;(d)含有氨基酸序列RASQGIRNDLD (SEQ ID NO:251)的HVR-L1;(e)含有氨基酸序列AASSLQS (SEQ ID NO:252)的 HVR-L2;和(f)含有氨基酸序列LQHDSYPLT (SEQ ID NO:257)的 HVR-L3。在一些情况下,该抗体包含:(a)含有SEQ ID NO:282的序列或与SEQ ID NO:282具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有SEQ ID NO:283的序列或与SEQ ID NO:283具有至少90%序列同一性(例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含以下重链构架区:含有氨基酸序列 QVQLVQSGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFS (SEQ ID NO:264)的 FR-H1;含有氨基酸序列WVRQASGKLEWVG (SEQ ID NO:267)的 FR-H2;含有氨基酸序列 RFTISRDDSKRTTYLQMNSLKTEDTAVYYCTR (SEQ ID NO:269)的 FR-H3;和含有氨基酸序列WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:272)的FR-H4。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含以下轻链构架区:含有氨基酸序列 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:273)的FR-L1;含有氨基酸序列WYQQKPGKAPKRLIY (SEQ ID NO:276)的FR-L2;含有氨基酸序列GVPSRFNGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:277)的FR-L3;和含有氨基酸序列FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:280)的 FR-L4。在一些情况下,该抗IL-33抗体包含结合结构域,该结合结构域包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:282的VH结构域;和(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:283的VL结构域。在

一些情况下,该示例性抗IL-33 抗体是101.B11。

[0395] 在一些情况下,本发明提供抗体,该抗体包含:(a) 含有氨基酸序列SEQ ID NO:288的重链;和/或(b) 含有氨基酸序列SEQ ID NO:289的轻链。在某些实施方案中,该抗体是以IgG4.S228P型式表达的 10C12.38.H6.87Y.58I。

[0396] 在一些情况下,本发明提供抗体,该抗体包含:(a) 含有氨基酸序列SEQ ID NO:292的重链;和/或(b) 含有氨基酸序列SEQ ID NO:293的轻链。在某些实施方案中,该抗体是以IgG4.S228P型式表达的4G12.FW4。

[0397] 在一些情况下,本发明提供抗体,该抗体包含:(a) 含有氨基酸序列SEQ ID NO:290的重链;和/或(b) 含有氨基酸序列SEQ ID NO:291的轻链。在某些实施方案中,该抗体是以IgG1型式表达的10C12.38.H6.87Y.58I。

[0398] 在一些情况下,本发明提供抗体,该抗体包含:(a) 含有氨基酸序列SEQ ID NO:294的重链;和/或(b) 含有氨基酸序列SEQ ID NO:295的轻链。在某些实施方案中,该抗体是以IgG1型式表达的4G12.FW4。

[0399] 在另一方面,本发明提供与本文提供的抗IL-33抗体结合相同的表位的抗体。例如,在某些实施方案中,提供与10C12.38.H6.87Y.58I或 4G12.FW4结合相同的表位的抗体。

[0400] 在本发明的另一方面,任意以上实施方案的抗IL-33抗体是单克隆抗体,包括嵌合、人源化或人抗体。在一个实施方案中,抗IL-33抗体是抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体或F(ab')₂片段。在另一实施方案中,该抗体是全长抗体,例如完整IgG1抗体、完整IgG4抗体、或本文中定义的其他抗体种类或同种型。在一些情况下,该抗体是在铰链区中包含突变的IgG4抗体。在一些情况下,该突变是取代突变。在一些情况下,该取代突变是在氨基酸残基S228(EU编号)处。在一些情况下,该取代突变是S228P突变。

[0401] 在另一方面,任意以上实施方案的抗IL-33抗体可以单独或组合并入下文章节1-7中所述的任意特征。

[0402] 1. 抗体亲和力

[0403] 在某些实施方案中,本文提供的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{ nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{pM}$ 或 $\leq 0.1\text{pM}$ (例如 10^{-6}M 或更小,例如从 10^{-6}M 至 10^{-9}M 或更小,例如从 10^{-9}M 至 10^{-13}M 或更小) 的解离常数(K_D)。

[0404] 在一个实施方案中,通过放射标记抗原结合测定(RIA)来测量 K_D 。在一个实施方案中,用Fab形式的目的抗体及其抗原进行RIA。例如,通过在未标记抗原的滴定系列的存在下用最小浓度的(^{125}I)-标记抗原平衡Fab,然后用抗-Fab抗体包被的平板捕获结合的抗原来测量Fab对抗原的溶液结合亲和力(参见例如Chen等,J.Mol.Biol.293:865-881,1999)。为了确定用于测定的条件,用含 $5\mu\text{g/ml}$ 捕获抗-Fab抗体(Cappel Labs)的50mM碳酸钠(pH 9.6)过夜包被**MICROTITER**[®]多孔板(Thermo Scientific),然后用含2% (w/v)牛血清白蛋白的PBS在室温(约23°C)封闭2至5小时。在非吸附平板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM [^{125}I]-抗原与目的Fab的系列稀释液混合(例如,与Presta等,Cancer Res.57:4593-4599,1997中的抗-VEGF抗体Fab-12的评估一致)。然后过夜孵育目的Fab;但是,孵育可以持续更长时期(例如约65小时),以确保达到平衡。然后,将混合物转移至捕获平板进行室温孵育(例如孵育1小时)。然后去除溶液,用含0.1%聚山梨酸酯20(**TWEEN**[®]-20)的PBS洗

涤平板8次。平板干燥后,加入150 μ l/孔的闪烁体(MICROSCINT-20TM;Packard),在TOPCOUNTTM γ 计数器(Packard)上计数平板10分钟。选择给出小于或等于最大结合的20%的每种Fab的浓度用于竞争结合测定。

[0405] 根据另一实施方案,用**BIACORE**[®]表面等离子共振测定测量 K_D 。例如,使用~10个响应单位(RU)的固定化抗原CM5芯片,在25℃下用**BIACORE**[®]-2000或**BIACORE**[®]-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)进行测定。在一个实施方案中,按照厂家说明书用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物传感芯片(CM5, BIAcore, Inc.)。用10mM醋酸钠pH 4.8将抗原稀释至5 μ g/ml (~0.2 μ M),然后按5 μ l/分钟的流速注入,以达到约10个响应单位(RU)的偶联蛋白质。注入抗原后,注入1M乙醇胺,以封闭未反应的基团。对于动力学测量,按约25 μ l/分钟的流速在25℃下注入两倍系列稀释于含0.05%聚山梨酸酯20(**TWEEN**[®]-20)表面活性剂的磷酸缓冲液溶液(PBS) (PBST)中的Fab(0.78nM至500nM)。通过同时拟合结合和解离传感图,用简单的1:1Langmuir结合模型(**BIACORE**[®] Evaluation Software 版本3.2)计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。将平衡解离常数(K_D)计算为比值 k_{off}/k_{on} 。参见例如Chen等,(J.Mol.Biol.293:865-881,1999)。如果通过以上表面等离子共振测定测量的结合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,则可以通过使用荧光淬灭技术来测定结合速率,如在分光计,如装配停流的分光光度计(Aviv Instruments)或具有搅拌杯的8000系列SLM-AMINCOTM分光光度计(ThermoSpectronic)中测量,该技术在浓度逐渐提高的抗原存在下测量含20nM抗-抗原的抗体(Fab形式)的PBS pH7.2在25℃下的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)的提高或降低。

[0406] 2. 抗体片段

[0407] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv和scFv片段,及下文所述的其他片段。某些抗体片段的综述参见Hudson等Nat.Med.9:129-134(2003)。scFv片段的综述参见例如Pluckthün, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113卷, Rosenberg和Moore编辑, (Springer-Verlag, New York), 269-315页(1994);还参见WO 93/16185;及美国专利号5,571,894和5,587,458。包含补救受体结合表位残基且具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论参见美国专利号US 5,869,046。

[0408] 双抗体是具有两个抗原结合部位的抗体片段,其可以是二价的或双特异性的。参见例如EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等,Nat.Med. 9:129-134,2003;及Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448, 1993。三抗体和四抗体还描述于Hudson等,Nat.Med.9:129-134,2003中。

[0409] 单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体(参见例如美国专利号6,248,516B1)。

[0410] 可以通过包括但不限于本文所述的完整抗体蛋白酶解消化以及通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)产生的多种技术来制备抗体片段。

[0411] 3.嵌合和人源化抗体

[0412] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于例如美国专利号4,816,567;和Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81:6851-6855,1984中。在一个实例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔、或非人灵长类(如猴)的可变区)和人恒定区。在另一实例中,嵌合抗体是“种类转换”抗体,其中种类或亚类已从亲本抗体的种类或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0413] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,人源化非人抗体来降低对人类的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR(或其部分)源自非人抗体,FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体还将可选地包含至少部分人恒定区。在一些实施方案中,用来自非人抗体(例如从其衍生HVR 残基的抗体)的相应残基取代人源化抗体中的一些FR残基,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0414] 人源化抗体和制备它们的方法综述于例如Almagro等,Front.Biosci. 13:1619-1633,2008中,并进一步描述于例如Riechmann等,Nature 332:323-329,1988;Queen等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033, 1989;美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri 等,Methods 36:25-34,2005(描述特异性决定区(SDR)移植);Padlan,Mol. Immunol.28:489-498,1991(描述“表面重建”);Dall'Acqua等,Methods 36:43-60,2005(描述“FR改组”);Osbourn等,Methods 36:61-68,2005;及Klimka等,Br.J.Cancer,83:252-260,2000(描述FR改组的“指导选择”方法)中。

[0415] 可以用于人源化的人构架区包括但不限于:用“最适”法选择的构架区(参见例如Sims等J.Immunol.151:2296,1993);源自具体亚组的轻链或重链可变区的人抗体的共有序列的构架区(参见例如Carter等Proc.Natl. Acad.Sci.USA,89:4285,1992;和Presta等J.Immunol.,151:2623,1993);人成熟(体细胞突变)构架区或人种系构架区(参见例如Almagro等,Front. Biosci.13:1619-1633,2008);和源自筛选FR文库的构架区(参见例如Baca 等,J.Biol.Chem.272:10678-10684,1997和Rosok等,J.Biol.Chem. 271:22611-22618,1996)。

[0416] 4.人抗体

[0417] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是人抗体。可以用本领域已知的多种技术产生人抗体。人抗体一般地描述于van Dijk等,Curr.Opin. Pharmacol.5:368-74,2001及Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459, 2008中。

[0418] 可以通过对转基因动物施用免疫原来制备人抗体,该转基因动物已修饰为响应抗原攻击而产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。这类动物通常包含全部或部分人免疫球蛋白基因座,其取代内源免疫球蛋白基因座,或其存在于染色体外,或随机整合入动物的染色体。在这类转基因小鼠中,内源免疫球蛋白基因座通常已失活。用于从转基因动物获得人抗体的方法的综述参见Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125,2005。还参见例如描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和US 6,150,584;描述HUMAB®技术的美国专利号5,770,429;描述K-MMOUSE®技术的美国专利号7,041,870;描述VELOCIMOUSE®技术的美国专利申请公开号 2007/0061900。可以例如通过与不同的人恒定区组合来进一步修饰来自这类动物所产生的完整抗体的人可变区。

[0419] 还可以通过基于杂交瘤的方法来制备人抗体。已描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂骨髓瘤(heteromyeloma)细胞系(参见例如Kozbor J.Immunol.,133:3001,1984;Brodeur等,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,51-63页(Marcel Dekker,Inc., New York,1987);和Boerner等,J.Immunol.,147:86,1991)。通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体也描述于Li等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 103:3557-3562,2006中。其他方法包括描述于例如美国专利号7,189,826(描述从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268,2006(描述人-人杂交瘤)中。人杂交瘤技术(三元杂交瘤技术)还描述于Vollmers等,Histology and Histopathology,20(3):927-937,2005及 Vollmers等,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,27(3):185-91,2005中。

[0420] 还可以通过分离选自人衍生噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列来产生人抗体。然后可以将这类可变结构域序列与希望的人恒定结构域组合。下文描述用于从抗体文库选择人抗体的技术。

[0421] 5.文库衍生的抗体

[0422] 可以针对具有一种或多种希望得到的活性的抗体筛选组合文库来分离本发明的抗体。例如,本领域已知用于产生噬菌体展示文库并针对具有希望得到的结合特征的抗体筛选这类文库的多种方法。这类方法综述于例如 Hoogenboom等in Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等,编辑,Human Press,Totowa,NJ,2001)中,并进一步描述于例如McCafferty 等,Nature 348:552-554,1990;Clackson等,Nature 352:624-628,1991;Marks等,J.Mol.Biol.222:581-597,1992;Marks等,in Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo,编辑,Human Press,Totowa,NJ,2003);Sidhu等,J.Mol.Biol.338(2):299-310,2004;Lee等,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093,2004;Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472,2004;及Lee等,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132,2004中。

[0423] 在某些噬菌体展示方法中,通过聚合酶链反应(PCR)分别克隆VH和 VL基因库(repertoire),并在噬菌体文库中随机组合,然后按Winter等,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455,1994中所述针对抗原结合噬菌体筛选该文库。噬菌体通常将抗体片段展示为单链Fv(scFv)片段或Fab片段。来自免疫来源的文库提供抗免疫原的高亲和力抗体而无需构建杂交瘤。备选地,可以按Griffiths等,EMBO J,12:725-734,1993所述克隆(例如从人)首次用于实验的库来提供抗广范围的非自身以及自身抗原的抗体的单一来源而无需任何免疫。最后,还可以按Hoogenboom等,J.Mol.Biol.,227:381-388,1992所述,通过以下来合成制备首次用于实验的文库:从干细胞克隆未重排的V基因区段,用包含随机序列的PCR引物来编码高变的HVR3区,并实现体外重排。描述人抗体噬菌体文库的专利公开包括例如美国专利号5,750,373及美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0424] 本文将从人抗体文库分离的抗体或抗体片段视为人抗体或人抗体片段。

[0425] 6.多特异性抗体

[0426] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。多特异

性抗体是对至少两个不同部位具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中,双特异性抗体可以结合IL-33的两个不同表位。在某些实施方案中,结合特异性之一针对IL-33,另一结合特异性针对任意其他抗原(例如第二生物分子,例如IL-13、IL-4、IL-5、IL-17、因子D、HtrA1、VEGF或VEGF受体)。因此,该双特异性抗体可以对IL-33和IL-13、IL-33和IL-4、IL-33和IL-5、IL-33和IL-17、IL-33和因子D、IL-33和HtrA1、IL-33和VEGF、或IL-33和VEGF受体(例如VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、膜结合VEGF受体(mbVEGFR)、或可溶性VEGF受体(sVEGFR))具有结合特异性。在一些情况下,该双特异性抗体可以对IL-33和因子D具有结合特异性。在其他情况下,该双特异性抗体可以对IL-33和HtrA1具有结合特异性。还在其他情况下,该双特异性抗体可以对IL-33和VEGF具有结合特异性。在其他情况下,该双特异性抗体可以对IL-33和VEGF受体具有结合特异性。尤其是,该双特异性抗体可以对IL-33和IL-13具有结合特异性。双特异性抗体可以制备为全长抗体或抗体片段。

[0427] 例如,在一些情况下,包含特异性结合IL-33的第一结合结构域的双特异性抗IL-33抗体可以具有结合IL-13的第二结合结构域,该第一结合结构域包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR: (a) 含有氨基酸序列SFSX₁S (SEQ ID NO:62)的HVR-H1,其中X₁是Met、Leu或Val; (b) 含有氨基酸序列TISGGKTFTDYVDX₁VKG (SEQ ID NO: 63)的HVR-H2,其中X₁是Ser或Ala; (c) 含有氨基酸序列ANYGX₁X₂FFEY (SEQ ID NO:64)的HVR-H3,其中X₁是Asn或Asp,X₂是Trp或Phe; (d) 含有氨基酸序列RASESVAKYGLSLN (SEQ ID NO:4)的HVR-L1; (e) 含有氨基酸序列AASNRGS (SEQ ID NO:5)的HVR-L2;和(f) 含有氨基酸序列QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6)的HVR-L3;或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:4-6或62-64中任一个具有至少约80%序列同一性(例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的变体的组合。特异性结合IL-13的第二结合结构域可以例如包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR: (a) 含有氨基酸序列AYSVN (SEQ ID NO:296)的HVR-H1; (b) 含有氨基酸序列MIWGDGKIVYNSALKS (SEQ ID NO:297)的HVR-H2; (c) 含有氨基酸序列DGYYPYAMDN (SEQ ID NO:298)的HVR-H3; (d) 含有氨基酸序列RASKSVDSYGNSFMH (SEQ ID NO:299)的HVR-L1; (e) 含有氨基酸序列LASNLES (SEQ ID NO:300)的HVR-L2;和(f) 含有氨基酸序列QQNNEDPRT (SEQ ID NO:301)的HVR-L3;或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:296-301中任一个具有至少约80%序列同一性(例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的变体的组合。在一些实施方案中,该第二结合结构域包含抗IL-13抗体lebrikizumab的一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR。

[0428] 例如,在一些情况下,包含特异性结合IL-33的第一结合结构域(如10C12.38.H6.87Y.58I)的双特异性抗IL-33抗体具有结合IL-13的第二结合结构域,该第一结合结构域包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个高变区(HVR): (a) 含有氨基酸序列SFSMS (SEQ ID NO:1)的HVR-H1; (b) 含有氨基酸序列TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO:2)的HVR-H2; (c) 含有氨基酸序列ANYGNWFFEY (SEQ ID NO:3)的HVR-H3; (d) 含有氨基酸序列RASESVAKYGLSLN (SEQ ID NO:4)的HVR-L1; (e) 含有氨基酸序列AASNRGS (SEQ ID NO:5)的HVR-L2;和(f) 含有氨基酸序列QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6)的HVR-L3。特异性结合IL-13的第二结合结构域可以例如包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个

HVR: (a) 含有氨基酸序列AYSVN (SEQ ID NO:296) 的HVR-H1; (b) 含有氨基酸序列MIWGDGKIVYNSALKS (SEQ ID NO: 297) 的HVR-H2; (c) 含有氨基酸序列DGYYPYAMDN (SEQ ID NO:298) 的HVR-H3; (d) 含有氨基酸序列RASKSVDSYGNSFMH (SEQ ID NO:299) 的HVR-L1; (e) 含有氨基酸序列LASNLES (SEQ ID NO:300) 的HVR-L2; 和 (f) 含有氨基酸序列QQNNEDPRT (SEQ ID NO:301) 的HVR-L3。在一些实施方案中, 该第二结合结构域包含抗IL-13抗体lebrikizumab的一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR。

[0429] 在一些情况下, 包含特异性结合IL-33的第一结合结构域(如10C12.38.H6.87Y.58I)的双特异性抗IL-33抗体可以具有结合IL-13的第二结合结构域, 该第一结合结构域包含: (a) 含有SEQ ID NO:36的序列或与SEQ ID NO:36具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的VH结构域; (b) 含有SEQ ID NO:37的序列或与SEQ ID NO:37具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的VL结构域; 或(c) 如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。特异性结合IL-13的第二结合结构域可以例如包含: (a) 含有SEQ ID NO:302的序列或与SEQ ID NO:302具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的VH结构域; (b) 含有SEQ ID NO:303的序列或与SEQ ID NO:303具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的VL结构域; 或(c) 如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下, 特异性结合IL-13的第二结合结构域可以包含: (a) 含有SEQ ID NO:328的序列或与SEQ ID NO:328具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的VH结构域; (b) 含有SEQ ID NO:329的序列或与SEQ ID NO:329具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的VL结构域; 或(c) 如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下, 特异性结合IL-13的第二结合结构域可以包含: (a) 含有抗IL-13抗体lebrikizumab的序列或与抗IL-13抗体lebrikizumab具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的VH结构域; (b) 含有抗IL-13抗体lebrikizumab的序列或与抗IL-13抗体lebrikizumab具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的VL结构域; 或(c) 如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0430] 在其他情况下, 包含特异性结合IL-33的第一结合结构域的双特异性抗IL-33抗体可以具有结合IL-13的第二结合结构域, 该第一结合结构域包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR: (a) 含有氨基酸序列SSIFYWG (SEQ ID NO:65) 的HVR-H1; (b) 含有氨基酸序列SIYYSGRTYYNPX₁LKS (SEQ ID NO:90) 的HVR-H2, 其中X₁是Ser 或Ala; (c) 含

有氨基酸序列AGGLYNWNDESFSFYMDV (SEQ ID NO:68) 的HVR-H3; (d) 含有氨基酸序列RASQSFSSSYLA (SEQ ID NO:69) 的 HVR-L1; (e) 含有氨基酸序列GASSRAT (SEQ ID NO:70) 的HVR-L2; 和 (f) 含有氨基酸序列QQYDRSPLT (SEQ ID NO:71) 的HVR-L3; 或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:65、68-71或90中任一个具有至少约80%序列同一性 (例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性) 的变体的组合。特异性结合IL-13的第二结合结构域可以例如包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR: (a) 含有氨基酸序列AYSVN (SEQ ID NO:296) 的HVR-H1; (b) 含有氨基酸序列MIWGDGKIVYNSALKS (SEQ ID NO:297) 的HVR-H2; (c) 含有氨基酸序列DGYYPYAMDND (SEQ ID NO:298) 的HVR-H3; (d) 含有氨基酸序列RASKSVDSYGNSFMH (SEQ ID NO:299) 的HVR-L1; (e) 含有氨基酸序列LASNLES (SEQ ID NO:300) 的HVR-L2; 和 (f) 含有氨基酸序列 QQNNEDPRT (SEQ ID NO:301) 的HVR-L3; 或一个或多个以上HVR及其一个或多个与SEQ ID NO:296-301中任一个具有至少约80%序列同一性 (例如81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性) 的变体的组合。在一些实施方案中, 该第二结合结构域包含抗IL-13抗体 lebrikizumab的一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR。

[0431] 例如, 在一些情况下, 包含特异性结合IL-33的第一结合结构域 (如 4G12.FW4) 的双特异性抗IL-33抗体可以具有结合IL-13的第二结合结构域, 该第一结合结构域包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR: (a) 含有氨基酸序列SSIFYWG (SEQ ID NO:65) 的 HVR-H1; (b) 含有氨基酸序列SIYYSGRITYYNPSLKS (SEQ ID NO:66) 的HVR-H2; (c) 含有氨基酸序列AGGLYNWNDESFSFYMDV (SEQ ID NO:68) 的HVR-H3; (d) 含有氨基酸序列RASQSFSSSYLA (SEQ ID NO: 69) 的HVR-L1; (e) 含有氨基酸序列GASSRAT (SEQ ID NO:70) 的HVR-L2; 和 (f) 含有氨基酸序列QQYDRSPLT (SEQ ID NO:71) 的 HVR-L3。特异性结合IL-13的第二结合结构域可以例如包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR: (a) 含有氨基酸序列AYSVN (SEQ ID NO:296) 的HVR-H1; (b) 含有氨基酸序列MIWGDGKIVYNSALKS (SEQ ID NO:297) 的HVR-H2; (c) 含有氨基酸序列DGYYPYAMDND (SEQ ID NO:298) 的HVR-H3; (d) 含有氨基酸序列 RASKSVDSYGNSFMH (SEQ ID NO:299) 的HVR-L1; (e) 含有氨基酸序列LASNLES (SEQ ID NO:300) 的HVR-L2; 和 (f) 含有氨基酸序列 QQNNEDPRT (SEQ ID NO:301) 的HVR-L3。在一些实施方案中, 该第二结合结构域包含抗IL-13抗体 lebrikizumab的一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR。

[0432] 在一些情况下, 包含特异性结合IL-33的第一结合结构域 (如 4G12.FW4) 的双特异性抗IL-33抗体可以具有结合IL-13的第二结合结构域, 该第一结合结构域包含选: (a) 含有SEQ ID NO:84的序列或与SEQ ID NO:84具有至少80%序列同一性 (例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性) 的氨基酸序列的VH结构域; (b) 含有SEQ ID NO:85的序列或与SEQ ID NO:85具有至少80%序列同一性 (例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性) 的氨基酸序列的VL结构域; 或 (c) 如 (a) 中的VH结构域和如 (b) 中的 VL结构域。特异性结合IL-13的第二结合结构域可以例如包含: (a) 含有 SEQ ID NO:302的序列或与SEQ ID NO:302具有至少80%序列同一性 (例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的VH结构域; (b) 含有SEQ ID NO:303的序列或与 SEQ ID NO:303具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的VL结构域;或(c) 如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下,特异性结合IL-13的第二结合结构域可以包含:(a) 含有SEQ ID NO:328的序列或与SEQ ID NO:328具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的VH结构域; (b) 含有SEQ ID NO:329的序列或与SEQ ID NO:329具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的VL结构域;或(c) 如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。在一些情况下,特异性结合IL-13的第二结合结构域可以包含:(a) 含有抗IL-13抗体lebrikizumab的序列或与抗IL-13抗体lebrikizumab具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的VH结构域; (b) 含有抗IL-13抗体lebrikizumab的序列或与抗IL-13抗体lebrikizumab具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的VL结构域;或(c) 如(a)中的VH结构域和如(b)中的VL结构域。

[0433] 在一些情况下,双特异性抗IL-33抗体可以包含:(a) 特异性结合IL-33的第一重链和第一轻链,其中第一重链包含SEQ ID NO:306的序列或与 SEQ ID NO:306具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列,第一轻链包含SEQ ID NO:307的序列或与SEQ ID NO:307具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列;和(b) 特异性结合IL-13的第二重链和第二轻链,其中第二重链包含SEQ ID NO:304或330的序列或与SEQ ID NO:304或330具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列,第二轻链包含SEQ ID NO:305或331的序列或与SEQ ID NO:305或331具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列。在一些实施方案中,特异性结合IL-13的第二重链和第二轻链是抗IL-13抗体lebrikizumab的重链和轻链。

[0434] 在一些情况下,双特异性抗IL-33抗体可以包含:(a) 特异性结合IL-33的第一重链和第一轻链,其中第一重链包含SEQ ID NO:308的序列或与 SEQ ID NO:308具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列,第一轻链包含SEQ ID NO:309的序列或与SEQ ID NO:309具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列;和(b)特异性结合IL-13的第二重链和第二轻链,其中第二重链包含SEQ ID NO:304或330的序列或与SEQ ID NO:304或330 具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列,第二轻链包含SEQ ID NO: 305或331的序列或与SEQ ID NO:305或331具有至少80%序列同一性(例如80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列。在一些实施方案中,特异性结合IL-13的第二重链和第二轻链是抗IL-13抗体lebrikizumab的重链和轻链。

[0435] 任意前述双特异性抗体可以以约1nM或更低的 K_D 特异性结合人和食蟹猴(cyno)二者的IL-33。任意前述双特异性抗体可以以约1nM或更低的 K_D 特异性结合人IL-33。例如,在一些情况下,该双特异性抗体以约1pM 和约1nM之间(例如,约1pM和约900pM之间、约1pM和约800pM 之间、约1pM和约700pM之间、约1pM和约600pM之间、约1pM 和约500pM之间、约1pM和约400pM之间、约1pM和约300pM之间、约1pM和约200pM之间、约1pM和约190pM之间、约1pM和约180pM之间、约1pM和约170pM之间、约1pM和约160pM之间、约1pM和约150pM之间、约1pM和约140pM之间、约1pM和约130 pM之间、约1pM和约120pM之间、约1pM和约110pM之间、约1pM和约100pM之间、约1pM和约90pM之间、约1pM和约80pM之间、约1pM和约70pM之间、约1pM和约60pM之间、约1pM和约50pM 之间、约1pM和约40pM之间、约1pM和约30pM之间、约1pM和约25pM之间、约1pM和约20pM之间、或约1pM和约10pM之间)的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些情况下,该双特异性抗体以约1pM和约 250pM之间(例如,约1pM和约250pM之间、约1pM和约225pM之间、约1pM和约200pM之间、约1pM和约190pM之间、约1pM和约180pM之间、约1pM和约170pM之间、约1pM和约160pM之间、约1pM和约150pM之间、约1pM和约140pM之间、约1pM和约130 pM之间、约1pM和约120pM之间、约1pM和约110pM之间、约1pM 和约100pM之间、约1pM和约90pM之间、约1pM和约80pM之间、约1pM和约70pM之间、约1pM和约60pM之间、约1pM和约50pM 之间、约1pM和约40pM之间、约1pM和约30pM之间、约1pM和约25pM之间、约1pM和约20pM之间、或约1pM和约10pM)的 K_D 特异性结合人IL-33。在一些实施方案中,该双特异性抗体以约25pM的 K_D 特异性结合人IL-33。

[0436] 任意前述双特异性抗体可以以约1nM或更低的 K_D 特异性结合人 IL-13。例如,在一些情况下,该双特异性抗体以约1pM和约1nM之间(例如,约1pM和约900pM之间、约1pM和约800pM之间、约1pM和约700pM之间、约1pM和约600pM之间、约1pM和约500pM之间、约1pM和约400pM之间、约1pM和约300pM之间、约1pM和约200 pM之间、约1pM和约190pM之间、约1pM和约180pM之间、约1pM 和约170pM之间、约1pM和约160pM之间、约1pM和约150pM之间、约1pM和约140pM之间、约1pM和约130pM之间、约1pM和约120pM之间、约1pM和约110pM之间、约1pM和约100pM之间、约1pM和约90pM之间、约1pM和约80pM之间、约1pM和约70pM 之间、约1pM和约60pM之间、约1pM和约50pM之间、约1pM和约40pM之间、约1pM和约30pM之间、约1pM和约25pM之间、约1pM和约20pM之间、或约1pM和约10pM之间)的 K_D 特异性结合人 IL-13。在一些情况下,该双特异性抗体以约1pM和约250pM之间(例如,约1pM和约250pM之间、约1pM和约225pM之间、约1pM和约200 pM之间、约1pM和约190pM之间、约1pM和约180pM之间、约1pM 和约170pM之间、约1pM和约160pM之间、约1pM和约150pM之间、约1pM和约140pM之间、约1pM和约130pM之间、约1pM和约120pM之间、约1pM和约110pM之间、约1pM和约100pM之间、约1pM和约

90pM之间、约1pM和约80pM之间、约1pM和约70pM 之间、约1pM和约60pM之间、约1pM和约50pM之间、约1pM和约40pM之间、约1pM和约30pM之间、约1pM和约25pM之间、约 1pM和约20pM之间、或约1pM和约10pM之间)的 K_D 特异性结合人 IL-13。在一些实施方案中,该双特异性抗体以约10pM或更低的 K_D 特异性结合人IL-13。在一些实施方案中,该双特异性抗体以约1pM至约10pM (例如约1pM、约2pM、约3pM、约4pM、约5pM、约6pM、约7pM、约8pM、约9pM或约10pM)的 K_D 特异性结合人IL-13。

[0437] 用于制备多特异性抗体的技术包括但不限于重组共表达两个具有不同特异性的免疫球蛋白重链-轻链对(参见Milstein等,Nature 305:537,1983; WO 93/08829;及Traunecker等,EMBO J.10:3655,1991)和“杵入臼”改造(参见例如美国专利号5,731,168)。还可以通过以下来制备多特异性抗体:用于制备抗体Fc-异二聚体分子的工程静电引导作用(WO 2009/089004A1);交联两种或多种抗体或片段(参见例如美国专利号 4,676,980和Brennan等,Science,229:81,1985);用亮氨酸拉链来产生双特异性抗体(参见例如Kostelny等,J.Immunol.,148(5):1547-1553,1992);使用用于制备双特异性抗体片段的“双抗体”技术(参见例如Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448,1993);使用单链Fv(scFv)二聚体(参见例如Gruber等,J.Immunol.,152:5368,1994);按例如Tutt等J.Immunol.147:60,1991中所述制备三特异性抗体。

[0438] 本文还包括具有三个或多个功能性抗原结合部位的改造抗体,包括“章鱼抗体”(参见例如US 2006/0025576A1)。

[0439] 本文的抗体或片段还可以包括含有与IL-33以及另一不同抗原结合的抗原结合部位的“双重作用Fab”或“DAF”(参见例如US 2008/0069820)。

[0440] 杵入臼

[0441] 杵入臼作为产生多特异性抗体的方法的用途描述于例如美国专利号 5,731,168、WO2009/089004、US2009/0182127、US2011/0287009、Marvin 和Zhu,Acta Pharmacol.Sin.(2005) 26(6):649-658及Kontermann(2005) Acta Pharmacol.Sin.,26:1-9中。下文提供简要的非限制性讨论。

[0442] “凸起”指至少一个氨基酸侧链,其从第一多肽的界面凸出来,因此可定位在邻近界面(即第二多肽的界面)中的互补凹陷内来稳定该异源多聚体,从而例如偏向异源多聚体形成而不是同源多聚体形成。该凸起可以存在于原始界面中或可以合成引入(例如通过改变编码该界面的核酸)。在一些实施方案中,改变编码第一多肽的界面的核酸来编码凸起。为此,用编码至少一个“输入”氨基酸残基的核酸取代编码第一多肽的界面中的至少一个“原始”氨基酸残基的核酸,该输入氨基酸残基具有比该原始氨基酸残基大的侧链体积。应理解,可以存在一个以上原始残基和对应的输入残基。多种氨基残基的侧链体积显示在例如US 2011/0287009的表1或美国专利号7,642,228的表1中。

[0443] 在一些实施方案中,用于形成凸起的输入残基是选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)的天然存在的氨基酸残基。在一些实施方案中,输入残基是色氨酸或酪氨酸。在一些实施方案中,用于形成凸起的原始残基具有小的侧链体积,如丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或缬氨酸。参见例如美国专利号7,642,228。

[0444] “凹陷”指至少一个氨基酸侧链,其从第二多肽的界面缩回,从而容纳第一多肽的邻近界面上对应的凸起。凹陷可以存在于原始界面中,或者可以合成引入(例如通过改变编

码界面的核酸)。在一些实施方案中,改变编码第二多肽的界面的核酸来编码凹陷。为此,用编码至少一个“输入”氨基酸残基的DNA取代编码第二多肽的界面中的至少一个“原始”氨基酸残基的核酸,该输入氨基酸残基具有比该原始氨基酸残基小的侧链体积。应理解,可以存在一个以上原始残基和对应的输入残基。在一些实施方案中,用于形成凹陷的输入残基是选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)的天然存在的氨基酸残基。在一些实施方案中,输入残基是丝氨酸、丙氨酸或苏氨酸。在一些实施方案中,用于形成凹陷的原始残基具有大的侧链体积,如酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。

[0445] 凸起“可定位”在凹陷中意指凸起和凹陷各自在第一多肽和第二多肽的界面上的空间定位及凸起和凹陷的大小是这样,使得凸起可以定位在凹陷中而不显著扰乱第一和第二多肽在界面上的正常结合。由于诸如Tyr、Phe和Trp的凸起通常不从界面的轴垂直延伸,且具有优选的构象,凸起与对应的凹陷的对齐在一些实施方案中可以依赖于根据三维结构(如通过X射线晶体分析法或核磁共振(NMR)获得的三维结构)模拟凸起/凹陷对。这可以用本领域广泛接受的技术来达到。

[0446] 在一些实施方案中,IgG1恒定区中的杵突变是T366W。在一些实施方案中,IgG1恒定区中的白突变包含一个或多个选自T366S、L368A和Y407V的突变。在一些实施方案中,IgG1恒定区中的白突变包含T366S、L368A或Y407V。

[0447] 在一些实施方案中,IgG4恒定区中的杵突变是T366W。在一些实施方案中,IgG4恒定区中的白突变包含一个或多个选自T366S、L368A和Y407V的突变。在一些实施方案中,IgG4恒定区中的白突变包含T366S、L368A或Y407V。

[0448] 7. 抗体变体

[0449] 在某些实施方案中,考虑本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可以希望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。可以通过在编码抗体的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。这类修饰包括例如从抗体的氨基酸序列缺失残基和/或在抗体的氨基酸序列内插入残基和/或取代抗体的氨基酸序列内的残基。可以进行缺失、插入和取代的任意组合来达到最终构建体,只要最终构建体具有希望得到的特征,例如抗原结合。

[0450] a) 取代、插入和缺失变体

[0451] 在某些实施方案中,提供具有一个或多个氨基酸取代的抗体变体。进行取代诱变的目的位点包括HVR和FR。表1中在“优选的取代”的表头下显示保守取代。表1中在“示例性取代”的表头下显示更实质性的改变,如下文参考氨基酸侧链种类进一步描述。可以在目的抗体中引入氨基酸取代,并针对希望得到的活性(例如保留/改善抗原结合、降低免疫原性或改善ADCC或CDC)筛选产物。

[0452] 表1

[0453]

原残基	示例性取代	优选的取代
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Asp,Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu;Asn	Glu
Cys (C)	Ser;Ala	Ser

Gln (Q)	Asn;Glu	Asn
Glu (E)	Asp;Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe (F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val;Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;正亮氨酸	Leu

[0454] 氨基酸可以按照共同的侧链性质分组：

[0455] (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0456] (2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0457] (3) 酸性：Asp、Glu；

[0458] (4) 碱性：His、Lys、Arg；

[0459] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0460] (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

[0461] 非保守取代将需要将这些种类之一的成员换为另一种类。

[0462] 一类取代变体涉及取代亲本抗体(例如人源化抗体或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,所得到的选择用于进一步研究的一种或多种变体将相对于亲本抗体具有某些生物学特性(例如提高的亲合力、降低的免疫原性)的修饰(例如改善),和/或将具有基本上保留的亲本抗体的某些生物学特性。示例性取代变体是亲和力成熟的抗体,其可以例如用基于噬菌体展示的亲合力成熟技术(如本文所述的那些)方便地产生。简言之,突变一个或多个HVR残基,将变体抗体展示在噬菌体上,并针对具体生物学活性(例如结合亲和力)进行筛选。

[0463] 可以在HVR中进行改变(例如取代),例如以改善抗体亲和力。可以在HVR“热点”(即由在体细胞成熟过程中以高频率发生突变的密码子编码的残基)(参见例如Chowdhury, Methods Mol.Biol.207:179-196,2008)和/或接触抗原的残基中进行这类改变,针对结合亲和力测试所得到的变体VH或VL。通过构建二级文库并从二级文库重新选择的亲和力成熟已描述于例如Hoogenboom等in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等,编辑,Human Press,Totowa,NJ,2001)中。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如易错PCR、链改组或寡核苷酸定点诱变)中的任意种来在选择用于成熟的可变基因中引入多样性。然后产生二级文库。然后筛选该文库来鉴定具有希望得到的亲和力的任意抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定点途径,其中随机化几个HVR残基(例如每次

4-6个残基)。可以例如用丙氨酸扫描诱变或模拟来明确地鉴定出涉及抗原结合的HVR残基。尤其是通常靶向HVR-H3和HVR-L3。

[0464] 在某些实施方案中,取代、插入或缺失可以发生在一个或多个HVR内,只要这类改变不实质性降低抗体结合抗原的能力。例如,可以在HVR中进行不实质性降低结合亲和力的保守改变(例如本文提供的保守取代)。这类改变可以例如在HVR中的抗原接触残基之外。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,各HVR未改变,或包含不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0465] 如Cunningham等,Science,244:1081-1085,1989所述,用于鉴定可以靶向进行诱变的抗体残基或区域的方法称为“丙氨酸扫描诱变”。在此方法中,鉴定残基或靶残基组(例如带电荷残基,如Arg、Asp、His、Lys和Glu),并用中性或带负电荷氨基酸(例如Ala或多聚丙氨酸)取代,以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可以在证明对最初取代的功能敏感性的氨基酸位置引入其他取代。备选地或此外,用抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体和抗原之间的接触点。这类接触残基和邻近残基可以作为取代的候选残基来靶向或消除。可以筛选变体来确定它们是否包含希望得到的特性。

[0466] 氨基酸序列插入包括长度在一个残基至含有一百或更多个残基的多肽的范围内的氨基端和/或羧基端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N或C端与酶(例如,对于ADEPT)或增加抗体血清半衰期的多肽融合。

[0467] b)糖基化变体

[0468] 在某些实施方案中,改变本文提供的抗体以提高或降低该抗体的糖基化程度。通过改变氨基酸序列,使得产生或去除一个或多个糖基化位点,可以方便地实现抗体糖基化位点的加入或缺失。

[0469] 在抗体包含Fc区时,可以改变附着于其上的糖类。哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分枝的双触角寡糖,其一般通过N连接附着于Fc区CH2结构域的Asn297。参见例如Wright等TIBTECH 15:26-32,1997。寡糖可以包括多种糖类,例如甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及在双触角寡糖结构的“茎”中附着于GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可以进行本发明的抗体中的寡糖的修饰来产生具有某些改善的特性的抗体变体。

[0470] 在一个实施方案中,提供具有(直接或间接)附着于Fc区的缺乏岩藻糖的糖类结构的抗体变体。例如,这种抗体中岩藻糖的量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%、或20%至40%。相对于通过例如WO 2008/077546中所述的MALDI-TOF质谱法测量的附着于Asn 297的所有糖结构(例如复合、杂合和高甘露糖结构)的总和,通过计算Asn297处的糖链内岩藻糖的平均量来测定岩藻糖的量。Asn297指定位在Fc区中的约297位(Fc区残基的EU编号)的天冬酰胺残基;但是,由于抗体中小的序列变异,Asn297也可以定位在297位上游或下游约±3个氨基酸,即在294位和300位之间。这类岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。参见例如美国专利公开号2003/0157108和2004/0093621。涉及“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺乏”的抗体变体的出版物的实例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;

WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki等J.Mol.Biol. 336:1239-1249, 2004; Yamane-Ohnuki等Biotech.Bioeng. 87:614, 2004。能够产生去岩藻糖基化的抗体的细胞系的实例包括蛋白质岩藻糖基化缺陷的Lec13CHO细胞(Ripka等Arch.Biochem.Biophys. 249:533-545, 1986; US 2003/0157108; 及WO 2004/056312A1, 尤其是在实施例11处)和敲除细胞系, 如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除的CHO细胞(参见例如 Yamane-Ohnuki等Biotech.Bioeng. 87:614, 2004; Kanda等, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688, 2006; 及WO 2003/085107)。

[0471] 还提供具有二等分寡糖的抗体变体, 例如, 其中附着于抗体Fc区的双触角寡糖被GlcNAc二等分。这类抗体变体可以具有减少的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。这类抗体变体的实例描述于例如WO 2003/011878、美国专利号6,602,684和US 2005/0123546中。还提供在附着于Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。这类抗体变体可以具有改善的CDC功能。这类抗体变体描述于例如WO 1997/30087、WO 1998/58964和WO 1999/22764中。

[0472] c) Fc区变体

[0473] 在某些实施方案中, 可以向本文提供的抗体的Fc区中引入一个或多个氨基酸修饰, 从而产生Fc区变体。Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置处含有氨基酸修饰(例如取代)的人Fc区序列(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区)。

[0474] 在某些实施方案中, 本发明考虑具有一些但不是全部效应子功能的抗体变体, 这使得它成为其中抗体的体内半衰期很重要但某些效应子功能(如补体和ADCC)不必要或有害的应用所希望的候选者。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定来确认CDC和/或ADCC活性的降低/减损。例如, 可以进行Fc受体(FcR)结合测定来确保抗体缺乏Fc γ R结合(因此可能缺乏ADCC活性), 但保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII, 而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch等, Annu.Rev.Immunol. 9:457-492, 1991的第464页上的表3中。评估目的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例描述于美国专利号5,500,362中(参见例如Hellstrom等Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:7059-7063, 1986和Hellstrom等Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:1499-1502, 1985; 美国专利号5,821,337(参见Bruggemann等J.Exp. Med. 166:1351-1361, 1987)。备选地, 可以利用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA); 和CytoTox96®非放射性细胞毒性测定(Promega, Madison, WI))。用于这类测定的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地或此外, 可以在体内, 例如在诸如公开于Clynes等Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:652-656, 1998中的动物模型的动物模型中体内评估目的分子的ADCC活性。还可以进行C1q结合测定来确认抗体不能结合C1q, 并因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体活化, 可以进行CDC测定(参见例如Gazzano-Santoro等, J.Immunol.Methods 202:163, 1996; Cragg等, Blood 101:1045-1052, 2003; 及Cragg等, Blood 103:2738-2743, 2004)。还可以用本领域已知的方法进行FcRn结合和体内清除/半衰期测定(参见例如Petkova等, Intl.Immunol. 18(12):1759-1769, 2006)。

[0475] 具有减少的效应子功能的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和

329中的一个或多个的取代的那些(美国专利号6,737,056)。这类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或多个处具有取代的Fc突变体,包括具有残基265和297至丙氨酸的取代的所谓“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0476] 描述了某些具有改善或减少的FcR结合的抗体变体(参见例如美国专利号6,737,056;WO 2004/056312;及Shields等,J.Biol.Chem.9(2): 6591-6604,2001)。

[0477] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有一个或多个改善ADCC的氨基酸取代(例如Fc区298、333和/或334位(残基的EU编号)的取代)的Fc区。

[0478] 在一些实施方案中,例如,如美国专利号6,194,551、WO 99/51642和 Idusogie等J.Immunol.164:4178-4184,2000中所述,在Fc区中进行改变,该改变导致改变(即改善或减少)的C1q结合和/或依赖补体的细胞毒性(CDC)。

[0479] 具有增加的半衰期和改善的新生儿Fc受体(FcRn)结合的抗体描述于US2005/0014934中,新生儿Fc受体负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等,J.Immunol.117:587,1976和Kim等,J.Immunol.24:249,1994)。那些抗体包含其中具有一个或多个取代的Fc区,该取代改善Fc区与FcRn的结合。这类Fc变体包括在Fc区残基238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434中的一个或多个处具有取代的那些,例如,Fc区残基434的取代(美国专利号7,371,826)。

[0480] 关于Fc区变体的其他实例,还参见Duncan等,Nature 322:738-40, 1988;美国专利号5,648,260和5,624,821;及WO 94/29351。

[0481] d) 半胱氨酸改造的抗体变体

[0482] 在某些实施方案中,可以希望产生半胱氨酸改造的抗体,例如“thioMAb”,其中用半胱氨酸残基取代抗体的一个或多个残基。在具体实施方案中,取代的残基存在于抗体的可接近部位。通过用半胱氨酸取代那些残基,从而将反应性巯基放置在抗体的可接近部位,并可以用于将抗体缀合至其他部分,如药物部分或接头-药物部分,以产生本文进一步描述的免疫缀合物。在某些实施方案中,可以用半胱氨酸取代以下残基中的任意一个或多个:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);及重链Fc区的S400(EU编号)。半胱氨酸改造的抗体可以按例如美国专利号7,521,541中所述产生。

[0483] e) 抗体衍生物

[0484] 在某些实施方案中,可以进一步修饰本文提供的抗体以包含本领域已知且易于得到的附加非蛋白质部分。适合用于衍生化抗体的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(同聚物或随机共聚物)、葡聚糖或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、propylene glycol同聚物、polypropylene oxide/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛可以在制备中具有优势。聚合物可以具有任意分子量,且可以分枝或不分枝。附着于抗体的聚合物的数目可以不同,且如果附着超过一个聚合物,则它们可以是相同或不同的分子。一般而言,可以根据包括但不限于抗体要改善的具体特性或功能、抗体衍生物是否将在确定的条件下用于治疗等的考虑来确定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型。

[0485] 在另一实施方案中,提供抗体和可通过暴露于照射来选择性加热的非蛋白质部分

的缀合物。在一个实施方案中,该非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605,2005)。照射可以具有任意波长,且包括但不限于这样的波长,该波长不损害普通细胞,但加热非蛋白质部分至杀死靠近抗体-非蛋白质部分的细胞的温度。

[0486] B. 重组方法和组合物

[0487] 抗体可以用例如美国专利号4,816,567中所述的重组方法和组合物产生。在一个实施方案中,提供分离的编码本文所述的抗IL-33抗体的核酸。这种核酸可以编码含有抗体VL的氨基酸序列和/或含有抗体VH的氨基酸序列(例如抗体轻链和/或重链)。在另一实施方案中,提供一个或多个包含这种核酸的载体(例如表达载体)。在另一实施方案中,提供包含这种核酸的宿主细胞。在一个这种实施方案中,宿主细胞包含以下(例如已用以下转化): (1) 包含编码含有抗体VL的氨基酸序列和含有抗体VH的氨基酸序列的核酸的载体;或(2) 包含编码含有抗体VL的氨基酸序列的核酸的第一载体,和包含编码含有抗体VH的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一个实施方案中,该宿主细胞是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、293 细胞或淋巴样细胞(例如Y0、NS0、Sp20细胞)。在一个实施方案中,提供制备抗IL-33抗体的方法,其中该方法包括在适于表达抗体的条件下培养上文提供的含有编码抗体的核酸的宿主细胞,并可选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0488] 为了重组产生抗IL-33抗体,分离例如上文所述的编码抗体的核酸,并插入一个或多个载体用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。这种核酸可以用常规方法(例如通过使用能够特异性结合编码抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离和测序。

[0489] 适合用于克隆或表达编码抗体的载体的宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,尤其是在不需要糖基化和Fc效应子功能时,可以在细菌中产生抗体。抗体片段和多肽在细菌中的表达参见例如美国专利号 5,648,237、5,789,199和5,840,523。(还参见Charlton,Methods in Molecular Biology,248卷(B.K.C.Lo,编辑,Humana Press,Totowa,NJ,2003), 245-254页,其描述抗体片段在大肠杆菌中的表达)。表达后,可以从可溶性级分中的细菌细胞糊分离抗体,并可以进一步纯化。

[0490] 除原核生物外,诸如丝状真菌或酵母的真核微生物也是编码抗体的载体的适宜的克隆或表达宿主,包括糖基化途径已“人源化”,导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体的真菌和酵母菌株。参见Gerngross,Nat. Biotech.22:1409-1414,2004和Li等,Nat.Biotech.24:210-215,2006。

[0491] 适合用于表达糖基化抗体的宿主细胞还源自多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已鉴定了许多可以与昆虫细胞结合使用,尤其是用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞的杆状病毒毒株。

[0492] 植物细胞培养物也可以用作宿主。参见例如美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(描述用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0493] 脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如,可以使用适应悬浮生长的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例是SV40转化的猴肾 CV1细胞系(COS-7);人胚肾细胞系(描述于例如Graham等,J.Gen Virol. 36:59,1977中的293或293细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠支持细胞(描述于例如Mather,Biol.Reprod.23:243-251,1980中的TM4细胞);

猴肾细胞 (CV1); 非洲绿猴肾细胞 (VERO-76); 人宫颈癌细胞 (HELA); 犬肾细胞 (MDCK); buffalo大鼠肝细胞 (BRL 3A); 人肺细胞 (W138); 人肝细胞 (Hep G2); 小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562); 描述于例如Mather等, *Annals N.Y. Acad.Sci.* 383:44-68, 1982中的TRI细胞; MRC 5细胞; 及FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, 包括 DHFR- CHO细胞 (Urlaub等, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77:4216, 1980); 及骨髓瘤细胞系, 如 Y0、NS0和Sp2/0。适合用于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述参见例如Yazaki等, *Methods in Molecular Biology*, 248卷 (B.K.C.Lo, 编辑, Humana Press, Totowa, NJ), 255-268页, 2003。

[0494] C. 测定

[0495] 可以通过本领域已知的多种测定针对其物理/化学性质和/或生物学活性鉴定、筛选或表征本文提供的抗IL-33抗体。

[0496] 1. 结合测定和其他测定

[0497] 在一方面, 例如通过已知的方法 (如ELISA、Western印迹等), 针对其抗原结合活性测试本发明的抗IL-33抗体。

[0498] 在另一方面, 可以用竞争测定来鉴定与本发明的抗IL-33抗体竞争结合IL-33的抗体。在某些实施方案中, 这种竞争性抗体结合与本发明的抗 IL-33抗体所结合的表位相同的表位 (例如线性表位或构象表位)。用于定位抗体所结合的表位的详细的示例性方法在 Morris“Epitope Mapping Protocols,” *Methods in Molecular Biology* 66卷 (Humana Press, Totowa, NJ), 1996中提供。

[0499] 在示例性竞争测定中, 在溶液中孵育固定化IL-33, 该溶液包含结合 IL-33的第一标记抗体, 及针对其与该第一抗体竞争结合IL-33的能力进行测试的第二未标记抗体。该第二抗体可以存在于杂交瘤上清中。作为对照, 在溶液中孵育固定化IL-33, 该溶液包含该第一标记抗体但不包含该第二未标记抗体。在允许该第一抗体与IL-33结合的条件下孵育后, 去除过量的未结合抗体, 并测量与固定IL-33结合的标记的量。如果测试样品中与固定化IL-33结合的标记的量相对于对照样品实质性减少, 则指示该第二抗体与该第一抗体竞争结合IL-33。参见Harlow等 *Antibodies: A Laboratory Manual*, 第14章 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), 1988。

[0500] 2. 活性测定

[0501] 在一方面, 提供用于鉴定具有生物学活性的抗IL-33抗体的测定。生物学活性可以包括例如在体内、在体外或离体结合IL-33 (例如血流中的 IL-33) 或其肽片段。在其他实施方案中, 生物学活性可以包括阻断或中和 IL-33、或阻止IL-33与配体 (例如受体 (例如IL-33受体ST2和/或IL-1RAcP)) 结合。在一些实施方案中, 生物学活性可以包括结合IL-33上的位点1, 并阻断与IL-33受体 (即ST2和/或IL-1RAcP) 的结合。还提供在体内和/或在体外具有这种生物学活性的抗体。在某些实施方案中, 针对这种生物学活性测试本发明的抗体。在一些实施方案中, 在基于细胞的IL-33阻断测定中针对抑制测试本发明的抗IL-33抗体。在一些实施方案中, 在基于细胞的阻断测定中针对IL-33诱导的报道活性的抑制测试本发明的抗IL-33 抗体 (例如本文所述的基于HEK-BLUE™细胞的IL-33测定 (参见例如实施例2和实施例8, 章节B))。在一些实施方案中, 例如在原代NK细胞测定 (参见例如实施例8章节C) 或原代嗜碱性粒细胞测定 (参见例如实施例8章节D) 中针对原代细胞中IL-33活性的抑制测试

本发明的抗体。在一些实施方案中,在竞争结合ELISA(参见例如实施例8章节F)中针对IL-33与IL-33受体结合的抑制测试本发明的抗体。

[0502] D.免疫缀合物

[0503] 本发明还提供包含与一种或多种细胞毒剂缀合的本文的抗IL-33抗体的免疫缀合物,该细胞毒剂如化疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的蛋白质毒素、酶活性毒素、或其片段)或放射性同位素。

[0504] 在一个实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体与一种或多种药物缀合,该药物包括但不限于美登素生物碱(参见美国专利号5,208,020、5,416,064和欧洲专利EP 0 425 235B1);auristatin,如 monomethylauristatin药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利号5,635,483和5,780,588和7,498,298);多拉司他汀;棘孢霉素或其衍生物(参见美国专利号5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001和5,877,296;Hinman等,Cancer Res.53:3336-3342,1993;及Lode等,Cancer Res.58:2925-2928,1998);蒽环类抗生素,如柔红霉素或阿霉素(参见Kratz等,Current Med.Chem.13:477-523,2006;Jeffrey等,Bioorganic&Med.Chem.Letters 16:358-362,2006;Torgov等,Bioconj.Chem.16:717-721,2005;Nagy等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834,2000;Dubowchik等,Bioorg.&Med.Chem.Letters 12:1529-1532,2002;King等,J.Med.Chem.45:4336-4343,2002;及美国专利号6,630,579);氨甲喋呤;脱乙酰长春花碱;紫杉烷,如紫杉萜、紫杉醇、larotaxel、tesetaxel和 ortataxel;单端孢霉烯;及CC1065。

[0505] 在另一实施方案中,免疫缀合物包含与酶活性毒素或其片段缀合的本文所述抗体,该酶活性毒素或其片段包括但不限于白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、塑莲根毒蛋白A链、 α -帚曲霉素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白质、香石竹毒蛋白蛋白质、美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白质(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、*sapaonaria officinalis*抑制剂、多花白树毒蛋白、米托洁林、局限曲霉素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢霉烯。

[0506] 在另一实施方案中,免疫缀合物包含与放射性原子缀合形成放射性缀合物的本文所述抗体。可用多种放射性同位素来产生放射性缀合物。实例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及Lu的放射性同位素。在放射性缀合物用于检测时,它可以包含用于闪烁照相研究的放射性原子,例如锝-99m(tc99m)或 I^{123} ,或者用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,mri)的自旋标记物,如碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0507] 可以用多种双功能蛋白质偶联剂来产生抗体和细胞毒剂的缀合物,如3-(2-吡啶二巯基)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDP)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸-琥珀酰亚胺酯(SMCC)、亚胺基硫烷(IT)、亚胺酯的双功能衍生物(如己二酰亚氨酸二甲酯HC1)、活性酯(如如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(如戊二醛)、二-叠氮基化合物(如二(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺)、二-重氮基衍生物(如二-(对-重氮基苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如2,6-二异氰酸甲苯酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以按照Vitetta等,Science 238:1098,1987中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳14标记的3-甲基

二乙烯三胺五乙酸1-异硫氰基苄酯(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。参见WO 94/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒性药物的“可切割接头”。例如,可以使用酸敏感接头、肽酶敏感接头、光敏感接头、二甲基接头或包含二硫化物的接头(参见例如Chari等,Cancer Res.52:127-131,1992;美国专利号 5,208,020)。

[0508] 本文的免疫缀合物或ADC明确考虑但不限于用包括但不限于BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC、磺基-SMPB和SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基)苯甲酸盐)的市售交联剂(例如来自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)制备的这类缀合物。

[0509] E. 用于诊断和检测的方法和组合物

[0510] 在某些实施方案中,本文提供的任意抗IL-33抗体可用于检测IL-33在生物样品中的存在。本文所用的术语“检测”涵盖定量或定性检测。在某些实施方案中,生物样品包含细胞或组织,如平滑肌、上皮细胞、内皮细胞、血液、血细胞(例如巨噬细胞、先天II型(ILC)细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和树突细胞)、中枢神经系统细胞(例如胶质细胞)、或眼细胞(例如视网膜细胞(例如Müller细胞或视网膜色素上皮(REP)细胞和眼血管内皮细胞)。

[0511] 在一个实施方案中,提供用于诊断或检测的方法的抗IL-33抗体。在另一方面,提供检测IL-33在生物样品中的存在的方法。在某些实施方案中,该方法包括使该生物样品与本文所述抗IL-33抗体在允许该抗IL-33抗体与IL-33结合的条件下接触,并检测该抗IL-33抗体和IL-33之间是否形成复合物。这种方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中,用抗IL-33抗体来选择适于用抗IL-33抗体治疗的个体,例如,其中IL-33是用于选择患者的生物标志。

[0512] 可以用本发明的抗体诊断的示例性障碍包括IL-33介导的障碍,包括例如炎症病症(例如哮喘、脓毒症、脓毒性休克、特应性皮炎、过敏性鼻炎、类风湿性关节炎和慢性阻塞性肺病(COPD))、免疫障碍(例如哮喘、类风湿性关节炎、变态反应、特应性变态反应、过敏、过敏性休克、过敏性鼻炎、银屑病、炎症肠病(IBD)、克隆病、糖尿病和肝病)、纤维性疾病(例如肺纤维化(例如特发性肺纤维化(IPF))、嗜酸性粒细胞性障碍(例如嗜酸性粒细胞相关胃肠障碍(EGID),包括嗜酸性粒细胞性食管炎)、感染(例如蠕虫感染、原生动物感染和病毒感染)、疼痛(例如炎症疼痛)、中枢神经系统障碍(例如阿尔茨海默病)、实体瘤(例如乳腺、结肠、前列腺、肺、肾、肝、胰腺、胃、肠、脑、骨和皮肤肿瘤)、眼科障碍(例如年龄相关黄斑变性(AMD)或眼视网膜病变)。在一些情况下,可以用本发明的抗体诊断的眼科障碍包括AMD(例如湿性AMD、干性AMD、中期AMD、晚期AMD和地图状萎缩(GA))、视网膜病变(例如糖尿病性视网膜病变(DR)或早产儿视网膜病变(ROP)和高原DR)、息肉状脉络膜血管病变(PCV)、糖尿病性黄斑水肿、干眼病、Behcet病、视网膜脱离、青光眼、葡萄膜炎(例如感染性和非感染性葡萄膜炎)、色素性视网膜炎、莱伯先天性黑矇、Stargardt病、外伤性眼损伤和结膜炎(例如感染性结膜炎、非感染性结膜炎和过敏性结膜炎)。

[0513] 在一些情况下,该眼科障碍包括AMD(例如湿性AMD、干性AMD、和GA)、视网膜病变(例如DR和ROP)、PCV、糖尿病性黄斑水肿、干眼病、Behcet病、过敏性结膜炎和视网膜脱离。

[0514] 在其他情况下,该眼科障碍包括中期AMD、晚期AMD、青光眼、葡萄膜炎(例如感染性

和非感染性葡萄膜炎)、色素性视网膜炎、莱伯先天性黑矇、Stargardt病、高原糖尿病性视网膜炎、外伤性眼损伤和结膜炎(例如感染性结膜炎和非感染性结膜炎)。

[0515] 在某些实施方案中,提供标记的抗IL-33抗体。标记包括但不限于直接检测的标记或部分(如荧光标记、生色标记、电子密度标记、化学发光标记和放射性标记),以及例如通过酶促反应或分子相互作用间接检测的部分,如酶或配体。示例性标记包括但不限于放射性同位素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H和¹³¹I,荧光团如稀土螯合物或荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹磺酰、伞形酮、萤光素酶(例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利号4,737,456))、萤光素、2,3-二氢酞嗪二酮,辣根过氧化物酶(HRP),碱性磷酸酶,β-半乳糖苷酶,葡糖淀粉酶,溶菌酶,糖氧化酶(例如葡糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡糖-6-磷酸脱氢酶),杂环氧化酶(如尿酸氧化酶和黄嘌呤氧化酶),与利用过氧化氢来氧化染料前体的酶(如HRP、乳过氧化物酶或微过氧化物酶)偶联,生物素/抗生物素蛋白,自旋标记,噬菌体标记,稳定自由基等。

[0516] F. 药物制剂

[0517] 可以通过将具有希望的纯度的这种抗体与一种或多种可选的可药用载体(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编辑,1980)混合,以冻干制剂或水溶液的形式制备本发明的抗IL-33抗体的药物制剂。可药用载体一般在所利用的剂量和浓度下对受体无毒性,且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸、柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯己双铵;氯苄烷铵;苄索氯铵;苯酚;丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他糖类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性可药用载体进一步包括间质药物分散剂,如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,如rHuPH20 (**HYLENEX**[®], Baxter International, Inc.)。包括rhuPH20的某些示例性sHASEGP和使用方法描述于美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。在一方面,将sHASEGP与诸如软骨素酶的一种或多种附加的糖胺聚糖酶组合。

[0518] 示例性冻干抗体制剂描述于美国专利号6,267,958中。水性抗体制剂包括描述于美国专利号6,171,586和WO 2006/044908中的那些,后一种制剂包含组氨酸-乙酸缓冲液。

[0519] 本文的制剂还可以根据所治疗的具体适应症的需要包含一种以上活性成分,优选相互无不利影响的具有互补活性的那些。例如,可希望进一步提供ST2结合拮抗剂、补体途径抑制剂(例如因子D结合拮抗剂)、HtrA1结合拮抗剂、VEGF拮抗剂、类胰蛋白酶-β结合拮抗剂、Th2细胞上表达的化学引诱物受体同源分子(CRTH2)结合拮抗剂、白细胞介素-13(IL-13)结合拮抗剂、白细胞介素-17(IL-17)结合拮抗剂、JAK1拮抗剂、和/或白细胞介素-5(IL-5)结合拮抗剂。在一些情况下,该补体途径抑制剂是因子D结合拮抗剂。在一些情况下,该因子D结合拮抗剂是例如下文章节G“治疗方法和组合物”中所述的抗因子D抗体或其抗原结合片段。在一些情况下,该HtrA1结合拮抗剂是例如下文章节G“治疗方法和组合物”

中所述的抗HtrA1抗体或其抗原结合片段。在一些情况下,该抗HtrA1抗体片段是Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。在一些情况下,该抗因子D抗体片段是Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。在一些情况下,该VEGF拮抗剂是例如下文章节G“治疗方法和组合物”中所述的抗VEGF抗体或其抗原结合片段。在一些情况下,该抗VEGF抗体片段是Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。在一些情况下,该VEGF拮抗剂是抗VEGF受体抗体或其抗原结合片段。在一些情况下,该抗VEGF受体抗体片段是Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。这类活性成分以对预期目的有效的量适宜地组合存在。

[0520] 活性成分可以包载在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微囊(例如,分别为羟甲基纤维素微囊或明胶微囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊)中、胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米颗粒和纳米囊(nanocapsule))中或粗滴乳状液中。这类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A.编辑,1980中。

[0521] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的适宜实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,该基质是成形物品的形式,例如膜或微囊。

[0522] 为了递送至眼(眼递送),可将本发明的抗体例如与眼科可用防腐剂、助溶剂、表面活性剂、黏度增强剂、渗透增强剂、缓冲剂、氯化钠和/或水组合。可以包括防腐剂,例如以抑制使用期间的微生物污染。适宜的防腐剂包括:依地酸二钠、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、山梨酸、苯乙醇、氯代丁醇、聚季铵盐-1或本领域已知的其他防腐剂。这类防腐剂通常按0.001至1.0%w/v的水平利用。在一些情况下,本发明的药物制剂不包含防腐剂。在某些情况下,预期对眼局部施用的组合物可以配制为滴眼液或眼膏。在一些情况下,抗体的总量是这种制剂的约0.001至1.0%(w/w),例如约0.01至约1.0%(w/w)。

[0523] 待用于体内施用的制剂通常是无菌的。无菌可以容易地例如通过无菌滤膜过滤来达到。

[0524] G. 治疗方法和组合物

[0525] 本发明的任意抗IL-33抗体可用于治疗方法。

[0526] 本发明提供IL-33轴结合拮抗剂用作药物。在一方面,提供用作药物的抗IL-33抗体。在其他方面,提供用于治疗IL-33介导的障碍的抗IL-33抗体。在某些实施方案中,提供用于治疗方法的抗IL-33抗体。在某些实施方案中,本发明提供用于治疗患有IL-33介导的障碍的个体的方法的抗IL-33抗体,该方法包括对该个体施用有效量的抗IL-33抗体。在一个这种实施方案中,该方法进一步包括对该个体施用有效量的至少一种例如下文所述的附加治疗剂。任意以上实施方案的“个体”优选是人。

[0527] 本发明提供IL-33轴结合拮抗剂用于制造或制备药物。在另一方面,本发明提供抗IL-33抗体在制造或制备药物中的用途。在一个实施方案中,该药物用于治疗IL-33介导的障碍。在另一实施方案中,该药物用于治疗IL-33介导的障碍的方法,该方法包括对患有IL-33介导的障碍的个体施用有效量的该药物。在一个这种实施方案中,该方法进一步包括对该个体施用有效量的至少一种例如下文所述的附加治疗剂。任意以上实施方案的“个体”可以是人。

[0528] 在另一方面,本发明提供特异性结合IL-33和IL-13二者的双特异性抗体或其抗原结合抗体片段在制备用于炎症障碍的药物中的用途,该炎症障碍如哮喘、气道高反应性、气道炎症、脓毒病、脓毒性休克、特应性皮炎、过敏性鼻炎、类风湿性关节炎或慢性阻塞性肺病

(COPD),或纤维性障碍,例如特发性肺纤维化(IPF)。在示例性实施方案中,本发明提供特异性结合IL-33和IL-13二者的双特异性抗体或其抗原结合抗体片段在制备用于治疗哮喘的药物中的用途。该双特异性抗体可以包含源自本文所述任意抗IL-33抗体的特异性结合IL-33的结合结构域。该双特异性抗体可以包含本文所述特异性结合IL-13的结合结构域。在示例性实施方案中,特异性结合IL-33和IL-13二者的双特异性抗体包含:特异性结合IL-33的第一结合结构域,其包含以下六个HVR:含有氨基酸序列SFSMS(SEQ ID NO:1)的HVR-H1、含有氨基酸序列TISGGKTFTDYVDSVKG(SEQ ID NO:2)的HVR-H2、含有氨基酸序列ANYGNWFFEY(SEQ ID NO:3)的HVR-H3、含有氨基酸序列RASESVAKYGLSLLN(SEQ ID NO:4)的HVR-L1、含有氨基酸序列AASNRGS(SEQ ID NO:5)的HVR-L2和含有氨基酸序列QQSKEVPFT(SEQ ID NO:6)的HVR-L3;及特异性结合IL-13的第二结合结构域,其包含以下六个HVR:含有氨基酸序列AYSVN(SEQ ID NO:296)的HVR-H1、含有氨基酸序列MIWGDGKIVYNSALKS(SEQ ID NO:297)的HVR-H2、含有氨基酸序列DGYYPYAMDN(SEQ ID NO:298)的HVR-H3、含有氨基酸序列RASKSVDSYGNFSMH(SEQ ID NO:299)的HVR-L1、含有氨基酸序列LASNLES(SEQ ID NO:300)的HVR-L2和含有氨基酸序列QQNNEDPRT(SEQ ID NO:301)的HVR-L3。在另一实施方案中,特异性结合IL-33和IL-13二者的双特异性抗体包含:特异性结合IL-33的第一结合结构域,其包含:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:36具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域,和(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:37具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域;及特异性结合IL-13的第二结合结构域,其包含:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:302具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域,和(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:303具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。在另一实施方案中,特异性结合IL-33和IL-13二者的双特异性抗体包含:特异性结合IL-33的第一结合结构域,其包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:36的VH结构域,和(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:37的VL结构域;及特异性结合IL-13的第二结合结构域,其包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:302的VH结构域,和(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:303的VL结构域。在另一实施方案中,特异性结合IL-33和IL-13二者的双特异性抗体包含:(a)特异性结合IL-33的第一重链和第一轻链,其中第一重链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:308具有至少99%序列同一性的氨基酸序列,第一轻链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:309具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;和(b)特异性结合IL-13的第二重链和第二轻链,其中第二重链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:304具有至少99%序列同一性的氨基酸序列,第二轻链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:305具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在另一实施方案中,特异性结合IL-33和IL-13二者的双特异性抗体包含:(a)特异性结合IL-33的第一重链和第一轻链,其中第一重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:308,第一轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:309;和(b)特异性结合IL-13的第二重链和第二轻链,其中第二重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:304,第二轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:305。

[0529] 在另一方面,本发明提供特异性结合IL-33和因子D二者的双特异性抗体或其抗原结合抗体片段在制备用于治疗地图状萎缩(GA)的药物中的用途。该双特异性抗体可以包含源自本文所述任意抗IL-33抗体的特异性结合IL-33的结合结构域。该双特异性抗体可以包含源自下文所述任意抗因子D抗体的特异性结合因子D的结合结构域。在一些实施方案中,该抗原结合抗体片段是(Fab')₂片段。

[0530] 在另一方面,本发明提供特异性结合IL-33和HtrA1二者的双特异性抗体或其抗原结合抗体片段在制备用于治疗地图状萎缩(GA)、AMD(湿性或干性)、DR、PCV或ROP的药物中的用途。该双特异性抗体可以包含源自本文所述任意抗IL-33抗体的特异性结合IL-33的结合结构域。该双特异性抗体可以包含源自本文所述任意抗HtrA1抗体的特异性结合HtrA1的结合结构域。在一些实施方案中,该抗原结合抗体片段是(Fab')₂片段。

[0531] 还在另一方面,本发明提供特异性结合IL-33和VEGF二者的双特异性抗体或其抗原结合抗体片段在制备用于治疗湿性AMD的药物中的用途。该双特异性抗体可以包含源自本文所述任意抗IL-33抗体的特异性结合IL-33的结合结构域。该双特异性抗体可以包含源自下文所述任意抗VEGF抗体的特异性结合VEGF的结合结构域。在一些实施方案中,该抗原结合抗体片段是(Fab')₂片段。

[0532] 在另一方面,本发明提供用于治疗IL-33介导的障碍的方法。在一些情况下,该方法包括对患有IL-33介导的障碍的个体施用有效量的IL-33 轴结合拮抗剂。在一个实施方案中,该方法包括对患有IL-33介导的障碍的个体施用有效量的抗IL-33抗体。在一个这种实施方案中,该方法进一步包括对该个体施用有效量的下文所述至少一种附加治疗剂。任意以上实施方案的“个体”可以是人。

[0533] 在另一方面,本发明提供例如用于任意以上治疗方法的包含本文提供的任意抗IL-33抗体的药物制剂。在一个实施方案中,药物制剂包含本文提供的任意抗IL-33抗体和可药用载体。在另一实施方案中,药物制剂包含本文提供的任意抗IL-33抗体和例如下文所述的至少一种附加治疗剂。

[0534] 在任意前述方面中,该IL-33介导的障碍可以是炎性病症、免疫障碍、纤维性障碍、嗜酸性粒细胞性障碍、感染、疼痛、中枢神经系统障碍、实体瘤或眼科障碍。例如,在一些情况下,炎性病症可以是哮喘、气道高反应性、气道炎症、脓毒症、脓毒性休克、特应性皮炎、过敏性鼻炎、类风湿性关节炎或慢性阻塞性肺病(COPD)。在一些情况下,免疫障碍可以是哮喘、类风湿性关节炎、变态反应、特应性变态反应、过敏、过敏性休克、过敏性鼻炎、银屑病、炎性肠病(IBD)、克隆病、糖尿病或肝病。在一些情况下,该纤维性疾病可以是特发性肺纤维化(IPF)。在一些情况下,该嗜酸性粒细胞性障碍可以是嗜酸性粒细胞相关胃肠障碍(EGID)。在一些情况下,该EGID是嗜酸性粒细胞性食管炎。在一情况下,该感染可以是蠕虫感染、原生动物感染或病毒感染。在一情况下,该原生动物感染可以是硕大利什曼原生动物感染。在一些情况下,该病毒感染可以是呼吸道合胞病毒(RSV)感染或流行性感冒感染。在一些情况下,该疼痛可以是炎性疼痛。在一些情况下,该中枢神经系统障碍可以是阿尔茨海默病。在一些情况下,该实体瘤可以是乳腺肿瘤、结肠肿瘤、前列腺肿瘤、肺肿瘤、肾肿瘤、肝肿瘤、胰腺肿瘤、胃肿瘤、肠肿瘤、脑肿瘤、骨肿瘤或皮肤肿瘤。在具体情况下,该IL-33介导的障碍可以是哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎、COPD、嗜酸性粒细胞性食管炎或肺纤维化(例如IPF)。例如,在一些情况下,该IL-33介导的障碍是哮喘。在其他情况下,该IL-33介导的障碍是肺纤维化(例如IPF)。

[0535] 在任意前述方面的一些情况下,该IL-33介导的障碍可以是眼科障碍,包括但不限于年龄相关黄斑变性(AMD)(包括湿性AMD、干性AMD、中期AMD、晚期AMD和地图状萎缩(GA))、视网膜病变(例如糖尿病性视网膜病变(DR)、早产儿视网膜病变(ROP)和高原DR)、息肉状脉络膜血管病变(PCV)、糖尿病性黄斑水肿、干眼病、Behcet病、视网膜脱离、青光眼、葡萄膜炎

(例如感染性和非感染性葡萄膜炎)、色素性视网膜炎、莱伯先天性黑矇、Stargardt病、外伤性眼损伤和结膜炎(例如感染性结膜炎、非感染性结膜炎和过敏性结膜炎)。

[0536] 在一些情况下,该眼科障碍包括AMD(例如湿性AMD、干性AMD和GA)、视网膜病变(例如DR和ROP)、PCV、糖尿病性黄斑水肿、干眼病、Behcet病、过敏性结膜炎和视网膜脱离。

[0537] 在其他情况下,该眼科障碍包括中期AMD、晚期AMD、青光眼、葡萄膜炎(例如感染性和非感染性葡萄膜炎)、色素性视网膜炎、莱伯先天性黑矇、Stargardt病、高原糖尿病性视网膜病变、外伤性眼损伤和结膜炎(例如感染性结膜炎和非感染性结膜炎)。

[0538] 例如,本发明提供在有需要的个体中治疗眼科障碍的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的IL-33轴结合拮抗剂。在一些情况下,该IL-33轴结合拮抗剂是抗IL-33抗体,例如本发明的抗IL-33抗体。在一些情况下,该IL-33轴结合拮抗剂是抗IL-33抗体,如ANB-020 (AnaptixBio Inc.)、或W02014164959、EP1725261、US8187569、W02011031600、W02015099175或W02015106080(每个专利在此以其整体引入作为参考)中所述的任意抗体;抗ST2抗体,如AMG-282 (Amgen) 或STLM15 (Janssen)、或W02013173761或W02013165894(每个专利在此以其整体引入作为参考)中所述的任意抗体;或ST2-Fc蛋白质及其变体,如WO 2013/173761、WO 2013/165894或WO 2014/152195(每个专利在此以其整体引入作为参考)中所述的那些。在一些情况下,该眼科障碍选自年龄相关黄斑变性(AMD)(包括湿性AMD、干性AMD、中期AMD、晚期AMD和地图状萎缩(GA))、视网膜病变(例如糖尿病性视网膜病变(DR)、早产儿视网膜病变(ROP)和高原DR)、息肉状脉络膜血管病变(PCV)、糖尿病性黄斑水肿、干眼病、Behcet病、视网膜脱离、青光眼、葡萄膜炎(例如感染性和非感染性葡萄膜炎)、色素性视网膜炎、莱伯先天性黑矇(也称为莱伯的先天性黑矇)、Stargardt病、外伤性眼损伤和结膜炎(例如感染性结膜炎、非感染性结膜炎和过敏性结膜炎)。在一些情况下,该眼科障碍包括AMD(例如湿性AMD、干性AMD和GA)、视网膜病变(例如DR和ROP)、PCV、糖尿病性黄斑水肿、干眼病、Behcet病、过敏性结膜炎和视网膜脱离。在其他情况下,该眼科障碍包括中期AMD、晚期AMD、青光眼、葡萄膜炎(例如感染性和非感染性葡萄膜炎)、色素性视网膜炎、莱伯先天性黑矇、Stargardt病、高原糖尿病性视网膜病变、外伤性眼损伤和结膜炎(例如感染性结膜炎和非感染性结膜炎)。

[0539] IL-33轴结合拮抗剂(例如本发明的抗IL-33抗体)可以单独与其他活性剂组合用于治疗。例如,IL-33轴结合拮抗剂(例如本发明的抗IL-33抗体)可以与至少一种附加治疗剂共同施用。在某些实施方案中,附加治疗剂是ST2结合拮抗剂、补体途径抑制剂(例如因子D结合拮抗剂)、HtrA1结合拮抗剂、VEGF拮抗剂、类胰蛋白酶- β 结合拮抗剂、Th2细胞上表达的化学引诱物受体同源分子(CRTH2)结合拮抗剂、白细胞介素-13(IL-13)结合拮抗剂、白细胞介素-17(IL-17)结合拮抗剂、JAK1拮抗剂、和/或白细胞介素-5(IL-5)结合拮抗剂。在一些实施方案中,附加治疗剂是化疗剂、抗激素剂、细胞毒剂、生长抑制剂或其组合。

[0540] 例如,IL-33轴结合拮抗剂(例如本发明的抗IL-33抗体)可以与抗IL-13抗体共同施用,例如用于治疗炎性障碍,例如哮喘、气道高反应性、气道炎症、脓毒病、脓毒性休克、特应性皮炎、过敏性鼻炎、类风湿性关节炎或慢性阻塞性肺病(COPD),或纤维性障碍,例如特发性肺纤维化(IPF)。在示例性实施方案中,IL-33轴结合拮抗剂(例如本发明的抗IL-33抗体)可以与抗IL-13抗体共同施用用于治疗哮喘。本文所述的任意抗IL-13抗体都可以与抗IL-33轴结合拮抗剂组合施用。在一个实施方案中,将抗IL-33抗体与抗IL-13抗体组合施

用。在示例性实施方案中,该抗IL-33 抗体包含以下六个HVR:含有氨基酸序列SFSMS (SEQ ID NO:1)的 HVR-H1、含有氨基酸序列TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO:2)的 HVR-H2、含有氨基酸序列ANYGNWFFEY (SEQ ID NO:3)的HVR-H3、含有氨基酸序列RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO:4)的HVR-L1、含有氨基酸序列AASNRRGS (SEQ ID NO:5)的HVR-L2和含有氨基酸序列QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6)的HVR-L3;该抗IL-13抗体包含以下六个HVR:含有氨基酸序列AYSVN (SEQ ID NO:296)的HVR-H1、含有氨基酸序列MIWGDGKIVYNSALKS (SEQ ID NO:297)的HVR-H2、含有氨基酸序列DGYYPYAMD (SEQ ID NO:298)的HVR-H3、含有氨基酸序列RASKSVDSYGNFSMH (SEQ ID NO:299)的HVR-L1、含有氨基酸序列LASNLES (SEQ ID NO:300)的HVR-L2和含有氨基酸序列QQNEDPRT (SEQ ID NO:301)的HVR-L3。在另一实施方案中,该抗IL-33抗体包含:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:36具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域,和(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:37具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域;该抗IL-13抗体包含:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:302具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域,和(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:303具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。在另一实施方案中,该抗IL-33抗体包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:36的VH结构域,和(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:37的VL结构域;该抗IL-13抗体包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:302的VH结构域,和(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:303的VL结构域。在另一实施方案中,该抗IL-33抗体包含:含有与氨基酸序列SEQ ID NO:308具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的重链,及含有与氨基酸序列SEQ ID NO:309具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的轻链;该抗IL-13抗体包含:含有与氨基酸序列SEQ ID NO:304具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的重链,及含有与氨基酸序列SEQ ID NO:305具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的轻链。在另一实施方案中,该抗IL-33抗体包含:含有氨基酸序列SEQ ID NO:308 的重链,及含有氨基酸序列SEQ ID NO:309的轻链;该抗IL-13抗体包含:含有氨基酸序列SEQ ID NO:304的重链,及含有氨基酸序列SEQ ID NO:305的轻链。

[0541] 在另一实例中,IL-33轴结合拮抗剂(例如本发明的抗IL-33抗体)可以与补体途径抑制剂共同施用。在一些情况下,补体途径抑制剂可以是旁路补体途径(例如因子D、备解素、因子B、因子Ba和因子Bb)或经典补体途径(例如C3a、C5、C5a、C5b、C6、C7、C8、C9和C5b-9)的抑制剂。在一些情况下,该补体途径抑制剂可以是WO 2007/056227中所述的任意补体途径抑制剂,该申请在此以其整体引入作为参考。在一些情况下,该补体途径抑制剂可以是因子D结合拮抗剂。在具体情况下,因子D结合拮抗剂可以是抗因子D抗体或其抗原结合抗体片段,例如WO 2007/056227、WO 01/70818和/或US 2002/0081293中所述的任意因子D抗体,每个专利在此以其整体引入作为参考。作为非限制性实例,在一些情况下,该因子D抗体可以包含产生自保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)并命名为HB12476的杂交瘤的单克隆抗体166-32的序列,或与单克隆抗体166-32 具有至少70%序列同一性(例如70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,该抗因子D抗体是单克隆抗体166-32的人源化衍生物。在一些实施方案中,该抗因子D 抗体与单克隆抗体166-32结合相同的表位。在一些情况下,该抗因子D 抗体是源自单克隆抗体166-32的抗体片段。在一些情况下,源自单克隆抗体166-32

的抗体片段是Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。在一些实施方案中,源自单克隆抗体166-32的抗体片段是Fab。

[0542] 在另一实例中,IL-33轴结合拮抗剂(例如本发明的抗IL-33抗体)可以与HtrA1结合拮抗剂共同施用。在一些情况下,该HtrA1结合拮抗剂可以是抗HtrA1抗体或其抗原结合片段。可以使用本领域已知和/或本文描述的任意抗HtrA1抗体或其抗原结合片段。例如,在一些情况下,该抗HtrA1抗体是WO 2013/055998中所述的抗HtrA1抗体。在一些情况下,该抗HtrA1抗体片段是Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。在一些实施方案中,该抗HtrA1抗体片段是Fab。

[0543] 在另一实例中,IL-33轴结合拮抗剂(例如本发明的抗IL-33抗体)可以与VEGF拮抗剂共同施用。在一些情况下,该VEGF拮抗剂可以是抗VEGF抗体或其抗原结合片段。可以使用本领域已知和/或本文描述的任意抗VEGF抗体或其抗原结合片段。例如,在一些情况下,该抗VEGF抗体是贝伐单抗(**AVASTIN®**)或兰尼单抗(**LUCENTIS®**)。在一些情况下,该抗VEGF抗体片段是Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。在一些实施方案中,该抗VEGF抗体片段是Fab。

[0544] 在一些情况下,该抗VEGF抗体或其抗原结合片段是或衍生自WO 2005/044853中所述的任意抗VEGF抗体,该申请在此以其整体引入作为参考。例如,在一些情况下,该抗VEGF抗体是或衍生自G6系列抗体(例如G6、G6-8、G6-23、G6-23.1、G6-23.2或G6-31)或B20系列抗体(例如B20、B20-4或B20-4.1)。例如,在一些情况下,该抗VEGF抗体包含:(a) 含有SEQ ID NO:334、337或340中任一个的序列或与SEQ ID NO:334、337或340中任一个具有至少80%序列同一性(例如至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b) 含有SEQ ID NO:335、336、338、339或341中任一个的序列或与SEQ ID NO:335、336、338、339或341中任一个具有至少80%序列同一性(例如至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c) 如(a) 中的VH结构域和如(b) 中的VL结构域。例如,在一些情况下,该抗VEGF抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:334的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:335的VL结构域(如抗VEGF抗体G6)。在一些情况下,该抗VEGF抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:334的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:336的VL结构域(如抗VEGF抗体G6.31)。在一些情况下,该抗VEGF抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:337的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:338的VL结构域(如抗VEGF抗体B20)。在其他情况下,该抗VEGF抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:337的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:339的VL结构域(如抗VEGF抗体B20-4)。还在其他情况下,该抗VEGF抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:340的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:341的VL结构域(如抗VEGF抗体B20-4.1)。在一些实施方案中,该抗VEGF抗体是任意前述抗体的人源化衍生物。在一些实施方案中,该抗VEGF抗体是源自任意前述抗体的抗体片段。在一些实施方案中,该抗体片段是Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。在一些实施方案中,该抗体片段是Fab。

[0545] 在一方面,本发明提供在有需要的个体中治疗炎性障碍的方法,该炎性障碍如哮喘、气道高反应性、气道炎症、脓毒病、脓毒性休克、特应性皮炎、过敏性鼻炎、类风湿性关节炎

炎或慢性阻塞性肺病 (COPD), 或纤维性障碍, 例如特发性肺纤维化 (IPF), 该方法包括对该个体施用治疗有效量的 IL-33 轴结合拮抗剂 (例如本发明的抗 IL-33 抗体) 和治疗有效量的抗 IL-13 抗体。在示例性实施方案中, 本发明提供在有需要的个体中治疗哮喘的方法, 该方法包括对该个体施用治疗有效量的 IL-33 轴结合拮抗剂 (例如本发明的抗 IL-33 抗体) 和治疗有效量的抗 IL-13 抗体。本文所述的任意抗 IL-13 抗体可以与抗 IL-33 轴结合拮抗剂组合施用。在一个实施方案中, 将抗 IL-33 抗体与抗 IL-13 抗体组合施用。在示例性实施方案中, 该抗 IL-33 抗体包含以下六个 HVR: 含有氨基酸序列 SFSMS (SEQ ID NO:1) 的 HVR-H1、含有氨基酸序列 TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO:2) 的 HVR-H2、含有氨基酸序列 ANYGNWFFEY (SEQ ID NO:3) 的 HVR-H3、含有氨基酸序列 RASESVAKYGLSLN (SEQ ID NO:4) 的 HVR-L1、含有氨基酸序列 AASNRGS (SEQ ID NO:5) 的 HVR-L2 和含有氨基酸序列 QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6) 的 HVR-L3; 该抗 IL-13 抗体包含以下六个 HVR: 含有氨基酸序列 AYSVN (SEQ ID NO:296) 的 HVR-H1、含有氨基酸序列 MIWGDGKIVYNSALKS (SEQ ID NO:297) 的 HVR-H2、含有氨基酸序列 DGYYPYAMDN (SEQ ID NO:298) 的 HVR-H3、含有氨基酸序列 RASKSVDSYGNSFMH (SEQ ID NO:299) 的 HVR-L1、含有氨基酸序列 LASNLES (SEQ ID NO:300) 的 HVR-L2 和含有氨基酸序列 QQNNEDPRT (SEQ ID NO:301) 的 HVR-L3。在另一实施方案中, 该抗 IL-33 抗体包含: (a) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:36 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VH 结构域, 和 (b) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:37 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VL 结构域; 该抗 IL-13 抗体包含: (a) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:302 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VH 结构域, 和 (b) 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:303 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的 VL 结构域。在另一实施方案中, 该抗 IL-33 抗体包含: (a) 含有氨基酸序列 SEQ ID NO:36 的 VH 结构域, 和 (b) 含有氨基酸序列 SEQ ID NO:37 的 VL 结构域; 该抗 IL-13 抗体包含: (a) 含有氨基酸序列 SEQ ID NO:302 的 VH 结构域, 和 (b) 含有氨基酸序列 SEQ ID NO:303 的 VL 结构域。在另一实施方案中, 该抗 IL-33 抗体包含: 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:308 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的重链, 及含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:309 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的轻链; 该抗 IL-13 抗体包含: 含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:304 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的重链, 及含有与氨基酸序列 SEQ ID NO:305 具有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的轻链。在另一实施方案中, 该抗 IL-33 抗体包含: 含有氨基酸序列 SEQ ID NO:308 的重链, 及含有氨基酸序列 SEQ ID NO:309 的轻链; 该抗 IL-13 抗体包含: 含有氨基酸序列 SEQ ID NO:304 的重链, 及含有氨基酸序列 SEQ ID NO:305 的轻链。

[0546] 在另一方面, 本发明提供在有需要的个体中治疗炎症性障碍的方法, 该炎症性障碍如哮喘、气道高反应性、气道炎症、脓毒病、脓毒性休克、特应性皮炎、过敏性鼻炎、类风湿性关节炎或慢性阻塞性肺病 (COPD), 或纤维性障碍, 例如特发性肺纤维化 (IPF), 该方法包括对该个体施用治疗有效量的特异性结合 IL-33 和 IL-13 二者的双特异性抗体或其抗原结合抗体片段。在示例性实施方案中, 本发明提供在有需要的个体中治疗哮喘的方法, 该方法包括对该个体施用治疗有效量的特异性结合 IL-33 和 IL-13 二者的双特异性抗体或其抗原结合抗体片段。该双特异性抗体可以包含源自本文所述任意抗 IL-33 抗体的特异性结合 IL-33 的结合结构域。该双特异性抗体可以包含本文所述的特异性结合 IL-13 的结合结构域。在示例性实施方案中, 特异性结合 IL-33 和 IL-13 二者的双特异性抗体包含: 特异性结合 IL-33 的

第一结合结构域,其包含以下六个HVR:含有氨基酸序列SFSMS (SEQ ID NO:1)的HVR-H1、含有氨基酸序列TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO:2)的HVR-H2、含有氨基酸序列ANYGNWFFEY (SEQ ID NO:3)的HVR-H3、含有氨基酸序列RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO:4)的HVR-L1、含有氨基酸序列AASNRGS (SEQ ID NO:5)的HVR-L2和含有氨基酸序列QQSKEVPFT (SEQ ID NO:6)的HVR-L3;及特异性结合 IL-13的第二结合结构域,其包含以下六个HVR:含有氨基酸序列AYSVN (SEQ ID NO:296)的HVR-H1、含有氨基酸序列MIWGDGKIVYNSALKS (SEQ ID NO:297)的HVR-H2、含有氨基酸序列DGYYPYAMDN (SEQ ID NO:298)的HVR-H3、含有氨基酸序列RASKSVDSYGNSFMH (SEQ ID NO:299)的HVR-L1、含有氨基酸序列LASNLES (SEQ ID NO:300)的HVR-L2和含有氨基酸序列QQNEDPRT (SEQ ID NO:301)的HVR-L3。在另一实施方案中,特异性结合 IL-33和IL-13二者的双特异性抗体包含:特异性结合IL-33的第一结合结构域,其包含:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:36具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域,和(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:37具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域;及特异性结合IL-13的第二结合结构域,其包含:(a)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:302具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VH结构域,和(b)含有与氨基酸序列SEQ ID NO:303具有至少99%序列同一性的氨基酸序列的VL结构域。在另一实施方案中,特异性结合IL-33和IL-13二者的双特异性抗体包含:特异性结合IL-33的第一结合结构域,其包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:36的VH结构域,和(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:37的VL结构域;及特异性结合IL-13的第二结合结构域,其包含:(a)含有氨基酸序列SEQ ID NO:302的VH结构域,和(b)含有氨基酸序列SEQ ID NO:303的VL结构域。在另一实施方案中,特异性结合IL-33和IL-13二者的双特异性抗体包含:(a)特异性结合IL-33的第一重链和第一轻链,其中第一重链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:308具有至少99%序列同一性的氨基酸序列,第一轻链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:309具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;和(b)特异性结合IL-13的第二重链和第二轻链,其中第二重链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:304具有至少99%序列同一性的氨基酸序列,第二轻链包含与氨基酸序列SEQ ID NO:305具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。在另一实施方案中,特异性结合IL-33和IL-13二者的双特异性抗体包含:(a)特异性结合IL-33的第一重链和第一轻链,其中第一重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:308,第一轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:309;和(b)特异性结合IL-13的第二重链和第二轻链,其中第二重链包含氨基酸序列SEQ ID NO:304,第二轻链包含氨基酸序列SEQ ID NO:305。

[0547] 在另一方面,本发明提供在有需要的个体中治疗地图状萎缩的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的IL-33轴结合拮抗剂(例如本发明的抗IL-3抗体)和治疗有效量的因子D结合拮抗剂。在一些情况下,该因子D结合拮抗剂可以是抗因子D抗体或其抗原结合片段,例如WO 2007/056227、WO 01/70818和/或US 2002/0081293中所述的任意因子D抗体。例如,在一些情况下,该抗因子D抗体可以包含产生自保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)并命名为HB12476的杂交瘤的单克隆抗体166-32的序列,或与单克隆抗体166-32具有至少70%序列同一性(例如70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列。在一些情况下,该抗因子D抗体是单克隆抗体166-32的人源化衍生物。在一些实施方案中,该抗因子D抗体与单克隆抗体166-

32结合相同的表位。在一些情况下,该抗因子D抗体是源自单克隆抗体166-32 的抗体片段。在一些情况下,源自单克隆抗体166-32的抗体片段是Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。在一些实施方案中,源自单克隆抗体 166-32的抗体片段是Fab。

[0548] 在另一方面,本发明特征在于在有需要的个体中治疗地图状萎缩(GA) 的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的特异性结合IL-33和因子 D二者的双特异性抗体或其抗原结合抗体片段。该双特异性抗体可以包含源自本文所述任意抗IL-33抗体的特异性结合IL-33的结合结构域。该双特异性抗体可以包含源自任意上述抗因子D抗体的特异性结合因子D的结合结构域。在一些实施方案中,该抗原结合抗体片段是(Fab')₂片段。

[0549] 在另一方面,本发明提供在有需要的个体中治疗GA、AMD(湿性或干性)、DR、PCV或ROP的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的 IL-33轴结合拮抗剂(例如本发明的抗IL-3抗体)和治疗有效量的HtrA1结合拮抗剂。在一些情况下,该HtrA1结合拮抗剂可以是抗HtrA1抗体或其抗原结合片段,例如WO 2013/055998中所述的任意HtrA1抗体。在一些情况下,该抗HtrA1抗体是抗体片段。在一些情况下,该抗体片段是 Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。在一些实施方案中,所衍生的抗体片段是Fab。

[0550] 在另一方面,本发明特征在于在有需要的个体中治疗地图状萎缩 (GA)、AMD(湿性或干性)、DR、PCV或ROP的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的特异性结合IL-33和HtrA1二者的双特异性抗体或其抗原结合抗体片段。该双特异性抗体可以包含源自本文所述任意抗 IL-33抗体的特异性结合IL-33的结合结构域。该双特异性抗体可以包含源自任意上述抗HtrA1抗体的特异性结合HtrA1的结合结构域。在一些实施方案中,该抗原结合抗体片段是(Fab')₂片段。

[0551] 在另一方面,本发明提供在有需要的个体中治疗湿性AMD的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的IL-33轴结合拮抗剂(例如本发明的抗IL-3抗体)和治疗有效量的VEGF拮抗剂。在一些情况下,该VEGF拮抗剂可以是抗VEGF抗体或其抗原结合片段。可以使用本领域已知和/或本文中描述的任意抗VEGF抗体或其抗原结合片段。在一些情况下,该抗VEGF抗体或其抗原结合片段是或衍生自WO 2005/044853中所述的抗 VEGF抗体,该申请在此以其整体引入作为参考。例如,在一些情况下,该抗VEGF抗体是或衍生自G6系列抗体(例如G6、G6-8、G6-23、G6-23.1、G6-23.2或G6-31)或B20系列抗体(例如B20、B20-4或B20-4.1)。例如,在一些情况下,该抗VEGF抗体包含:(a)含有SEQ ID NO:334、337或 340中任一个的序列或与SEQ ID NO:334、337或340中任一个具有至少 80%序列同一性(例如至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域;(b)含有SEQ ID NO:335、336、338、339或341中任一个的序列或与SEQ ID NO: 335、336、338、339或341中任一个具有至少80%序列同一性(例如至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域;或(c)如(a)中的VH结构域和如(b) 中的VL结构域。例如,在一些情况下,该抗VEGF抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:334的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:335的 VL结构域(如抗VEGF抗体G6)。在一些情况下,该抗VEGF抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:334的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:336的VL结构域(如抗VEGF抗体G6.31)。在一些情况下,该抗VEGF 抗体包含含有氨基酸序列

SEQ ID NO:337的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:338的VL结构域(如抗VEGF抗体B20)。在其他情况下,该抗VEGF抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:337的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:339的VL结构域(如抗VEGF抗体B20-4)。还在其他情况下,该抗VEGF抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:340的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:341的VL结构域(如抗VEGF抗体B20-4.1)。在一些实施方案中,该抗VEGF抗体是任意前述抗体的人源化衍生物。在一些实施方案中,该抗VEGF抗体是源自任意前述抗体的抗体片段。在一些实施方案中,该抗体片段是Fab、Fab'-SH、Fv、scFv 或(Fab')₂片段。在一些实施方案中,该抗体片段是Fab。

[0552] 在另一方面,本发明特征在于在有需要的个体中治疗湿性AMD的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的特异性结合IL-33和VEGF二者的双特异性抗体或其抗原结合抗体片段。该双特异性抗体可以包含源自本文所述任意抗IL-33抗体的特异性结合IL-33的结合结构域。该双特异性抗体可以包含源自任意上述抗VEGF抗体的特异性结合VEGF的结合结构域。在一些实施方案中,该抗原结合抗体片段是(Fab')₂片段。

[0553] 还在另一方面,本发明提供在有需要的个体中治疗葡萄膜炎(例如感染性或非感染性葡萄膜炎)的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的IL-33轴结合拮抗剂(例如本发明的抗IL-3抗体)。在一些实施方案中,该IL-33轴结合拮抗剂可以作为单一治疗施用。

[0554] 还在另一方面,本发明提供在有需要的个体中治疗结膜炎(例如感染性结膜炎、非感染性结膜炎或过敏性结膜炎)的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的IL-33轴结合拮抗剂(例如本发明的抗IL-3抗体)。在一些实施方案中,该IL-33轴结合拮抗剂可以作为单一治疗施用。

[0555] 在一些实施方案中,附加治疗剂可以是下文所述的哮喘治疗。目前用根据需要每日吸入型抗炎性糖皮质激素或肥大细胞抑制剂(如色甘酸钠或奈多罗米钠(nedocromil))加吸入型β₂-激动剂(每天3-4次)治疗中度哮喘,以减轻突破性症状或变应原或锻炼诱发的哮喘。示例性吸入型糖皮质激素包括QVAR®、PULMICORT®、SYMBICORT®、AEROBID®、FLOVENT®、FLONASE®、ADVAIR®和AZMACORT®。其他哮喘治疗包括长效支气管扩张剂(LABD)。在某些实施方案中,该LABD是长效β₂-激动剂(LABA)、白三烯受体拮抗剂(LTRA)、长效毒蕈碱拮抗剂(LAMA)、茶碱或口服糖皮质激素(OCS)。示例性LABD包括SYMBICORT®、ADVAIR®、BROVANA®、FORADIL®、PERFOROMIST™和SEREVENT®。

[0556] 上文指出的这类联合治疗涵盖组合施用(其中两种或多种治疗剂包含在相同或分开的制剂中)和分开施用,在这种情况下,本发明的抗体的施用可以发生在施用一种或多种附加治疗剂之前、同时和/或之后。在一个实施方案中,抗IL-33抗体的施用和附加治疗剂的施用发生在彼此的约一个月之内,或约一周、两周或三周之内,或约一天、两天、三天、四天、五天或六天之内。本发明的抗体可以与放疗组合使用。

[0557] IL-33轴结合拮抗剂例如本发明的抗IL-33抗体(和任意附加治疗剂)可以通过任意适宜的手段施用,其包括胃肠外、肺内和鼻内,如果希望进行局部治疗,则可以病灶内施用。胃肠外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹腔内或皮下施用。在一些情况下,IL-33轴结合

拮抗剂例如本发明的抗 IL-33 抗体可以玻璃体内、肌内、静脉内、皮内、经皮、动脉内、腹腔内、病灶内、颅内、关节内、前列腺内、胸腔内、气管内、鞘内、鼻内、阴道内、直肠内、局部、肿瘤内、腹膜、皮下、结膜下、小泡内、黏膜、心包内、脐内、眼内、眶内、口服、表面、经皮、眼周、结膜、眼筋膜囊下、前房内、视网膜下、眼球后、小管内、通过吸入、通过注射、通过植入、通过输注、通过持续输注、通过直接浸没靶细胞的局部灌注、通过导管、通过灌洗、在 cremes 中或在液体组合物中施用。用于本文所述方法的组合物还可以全身或局部施用。部分取决于施用是短暂的还是长期的，可以通过任意适宜的途径给药，例如通过注射，如静脉内或皮下注射。本文考虑多种给药方案，包括但不限于在多种时间点单次或多次施用、快速注射施用和脉冲输注。

[0558] 在一些情况下，通过例如使用玻璃体内、眼内、眼周、结膜、结膜下、眼筋膜囊下、前房内、视网膜下、眼球后或小管内注射的眼组织注射，通过例如用导管或其他放置装置（例如视网膜丸、眼内插入物、栓剂或含有多孔、非多孔或胶状材料的植入物）直接应用于眼，通过局部滴眼液或眼膏，或通过盲管中或邻近巩膜（透巩膜）或在巩膜中（巩膜内）或眼内植入的缓释装置，可以直接对眼施用 IL-33 轴结合拮抗剂（例如本发明的抗 IL-33 抗体）。前房内注射可以通过角膜进入前房，以允许活性剂到达小梁网。小管内注射可以注入静脉收集通道引流巩膜静脉窦或进入巩膜静脉窦。

[0559] 将以符合良好医疗实践的方式配制、给药和施用本发明的抗体。此背景中考虑的因素包括待治疗的具体障碍、待治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床病症、障碍的病因、递送活性剂的部位、施用方法、施用日程及医疗从业者已知的其他因素。无需但可选地用目前用于预防或治疗所讨论的障碍的一种或多种活性剂配制抗体。这类其他活性剂的有效量取决于存在于制剂中的抗体的量、障碍或处理的类型及上文讨论的其他因素。这些通常以相同的剂量并用本文所述给药途径施用，或者本文所述剂量的约 1% 至 99%，或以任意剂量，并通过经验/临床上确定为适当的任意途径施用。

[0560] 对于疾病的预防或治疗，本发明的抗体（在单独使用时或与一种或多种其他附加治疗剂组合使用时）的适当剂量将取决于待治疗的疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重程度和病程、为了预防性还是治疗性目的而施用抗体、之前的治疗、患者的临床病史和对抗体的反应及主治医师的判断。在一次或一系列治疗中适宜地对患者施用抗体。取决于疾病的类型和严重程度，约 1 μ g/kg 至 15mg/kg（例如 0.1mg/kg 至 10mg/kg）的抗体可以是例如通过一次或多次分开的施用或通过连续输注来对患者施用的起始候选剂量。取决于上述因素，一个典型日剂量可以从约 1 μ g/kg 至 100mg/kg 或更多。对于在几天或更长时间内反复施用，取决于病症，治疗通常将持续至出现希望的疾病症状抑制。抗体的一个示例性剂量将在从约 0.05mg/kg 至约 10 mg/kg 的范围内。因此，可以对患者施用约 0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg 或 10mg/kg（或其任意组合）的一个或多个剂量。这类剂量可以间歇施用，例如每周、每两周、每三周或每四周（例如，使得患者接受约 2 至约 20、或例如约 6 个剂量的抗体）。例如，剂量可以每月施用一次（例如通过皮下注射）。可以施用较高的起始负荷剂量，然后施用一个或多个较低剂量。但是，可以使用其他剂量方案。通过常规技术和测定容易地监测此治疗的进展。

[0561] 应理解，任意以上制剂或治疗方法可以用本发明的免疫缀合物取代或附加至抗 IL-33 抗体来进行。

[0562] H. 制成品

[0563] 在本发明的另一方面,提供包含用于治疗、预防和/或诊断上述障碍的材料的制成品。制成品包含容器及容器上或伴随容器的标签或包装说明书。适宜的容器包括例如瓶、小管、注射器、IV溶液袋等。容器可以形成自多种材料,如玻璃或塑料。容器容纳本身或与另一组合物组合时治疗、预防和/或诊断病症有效的组合物,且可以具有无菌接口(例如容器可以是具有可通过皮下注射针头穿孔的塞子的静脉内溶液袋或小管)。组合物中的至少一种活性剂是本发明的抗体。标签或包装说明书指示该组合物用于治疗所选择的病症。此外,制成品可以包含:(a)组合物包含在其中的第一容器,其中该组合物包含本发明的抗体;和(b)组合物包含在其中的第二容器,其中该组合物包含其他细胞毒性剂或其他治疗剂。本发明的此实施方案中的制成品可以进一步包含指示该组合物可以用来治疗特定病症的包装说明书。备选地或此外,制成品可以进一步包含第二(或第三)容器,该容器包含可药用缓冲液,如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸缓冲盐溶液、林格溶液和葡萄糖溶液。它可以进一步包含商业和用户角度希望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释液、滤器、针头和注射器。

[0564] 应理解,任意以上制成品可以包含本发明的免疫缀合物来取代或附加至抗IL-33抗体。

[0565] III. 实施例

[0566] 以下是本发明的方法和组合物的实例。应理解,由于上文提供的一般描述,可以实施多种其他实施方案。

[0567] 实施例1. 抗IL-33抗体的产生

[0568] 如下文所述,寻求几种策略来开发治疗性抗IL-33抗体。希望得到的候选抗IL-33抗体特征包括特异性结合人IL-33、与食蟹猴(cyno) IL-33交叉反应、抑制IL-33活性(例如在基于细胞的IL-33报道测定中测量)、和/或阻断与IL-33受体(ST2和IL-1RAcP)的结合。

[0569] A. 小鼠单克隆抗人IL-33杂交瘤抗体的开发和表征

[0570] 用各2 μ g人(hu) IL-33和食蟹猴(cyno) IL-33蛋白质(Genentech, Inc.)与单磷脂酰-脂质A和海藻糖二棒杆菌分枝菌酸(**MPL**[®]+TDM)佐剂(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)或Toll样受体(TLR)激动剂**MPL**[®](Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、聚肌胞苷酸(PolyI:C; InvivoGen, San Diego, CA)、R848(InvivoGen)和CpG寡脱氧核苷酸(InvivoGen)混合,每周两次腹膜内免疫BALB/c小鼠(Charles River, Hollister, CA)或IL33敲除(ko)小鼠(Genentech, Inc.)。最后一次免疫后三天收集脾脏和骨髓。通过电融合(Harvard Apparatus, Holliston, MA)使来自这些小鼠的脾细胞与P3X63-Ag8U.1小鼠骨髓瘤细胞(American Type Culture Collection, Rockville, MD)融合。融合细胞在CLONACELL[™]-HY培养基C(StemCell Technologies, Vancouver, BC, 加拿大)中37 $^{\circ}$ C、7%CO₂过夜孵育,然后重悬在含抗物种IgG-FITC(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)的半固体CLONACELL[™]-HY培养基D(StemCell Technologies)中,并接种入OMNIWELL[™]盘(Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY)。接种后7天,用CLONEPIX[™]FL(Genetix, New Milton, Hampshire, UK)选择荧光克隆并转入含有CLONACELL[™]-HY培养基E(StemCell Technologies)的96孔板。如下文所述,挑取克隆7天后通过抗人IL-33蛋白质的酶联免疫吸附测定(ELISA)筛选上清。将显示人IL-33结合的杂交瘤细胞系扩大,再次通过ELISA测试;收集来自通过ELISA证明与人和食蟹猴二者的IL-33结合的细胞系的上清,通过蛋白A

(MABSELECT™SURE™, GE Healthcare, Pittsburgh, PA) 纯化。如下文所述, 用 HEK-BLUE™ 细胞报道试剂盒 (InvivoGen) 评价纯化的 IgG 阻断 IL-33 与 ST2 的结合的能力。从一大系列杂交瘤纯化 IgG 的高通量系统的使用允许在早期有效选择潜在的阻断性克隆。如下文所述, 用 **RNEASY®** 试剂盒 (Qiagen, Hilden, 德国) 从强阻断性杂交瘤细胞系提取 RNA, 产生 cDNA, 并扩增用于序列确定。将重链和轻链的可变区基因插入 pRK 质粒载体 (Genentech, Inc.) 进行表达。在 293 细胞中重组表达来自显示最高阻断活性和亲和力的独特克隆的质粒 DNA。然后通过蛋白 A 亲和层析纯化上清。

[0571] B. 从单 B 细胞克隆产生抗 IL-33 单克隆抗体

[0572] 按上文所述用人和食蟹猴 IL-33 免疫转基因小鼠。初始免疫和七次加强后, 测试来自免疫转基因小鼠的血清与 IL-33 的结合。鉴定出对人和食蟹猴 IL-33 具有显著高效价的小鼠, 然后在 HEK-BLUE™ 测定中测试 IL-33 与 ST-2 结合的血清抑制。从显示 IL-33 阻断活性的小鼠分离脾、淋巴结和骨髓组织。将组织机械还原为单细胞悬液, 与 IL-33 抗原 (人和食蟹猴) 预混, 脾内植入 muSCID 小鼠。7-8 天后, 取出脾, 重悬为单细胞。用荧光团缀合的标记染色脾细胞来鉴定 CD138 阳性成浆细胞和 IgM 阳性群体。通过 FACS™ 流式细胞术将 IgM 阴性且能够结合人和食蟹猴二者的 IL-33 的成浆细胞群体单个分选入 96 孔板。对所分选的细胞的免疫球蛋白可变区进行分子克隆, 并重新编排入人 IgG1 哺乳动物表达载体。在哺乳动物细胞中瞬时表达每一重新编排的单克隆抗体并纯化。一般方法描述于 Lin 等 (Nature Protocols 9:1563-1577, 2014) 中。

[0573] C. 从免疫噬菌体衍生文库产生抗 IL-33 单克隆抗体

[0574] 从分离自用人和食蟹猴 IL-33 免疫的转基因小鼠的 RNA 构建展示在噬菌体上的单链 Fv 文库。对 ScFv 噬菌体展示文库进行几轮针对人和食蟹猴 IL-33 的淘选。繁殖单个噬菌体克隆, 并通过 ELISA 测定与人和食蟹猴 IL-33 的结合。为以 IgG 型式表达而重新编排阳性结合克隆, 并瞬时表达。从瞬时表达培养物纯化 IgG, 并测试与 IL-33 的结合及 IL-33 与 HEK-BLUE™ 细胞结合的抑制。

[0575] 实施例 2. 抗 IL-33 抗体的筛选和测序

[0576] A. 抗人/食蟹猴 IL-33 抗体的 ELISA 筛选

[0577] 在 ELISA 型式中对与人和食蟹猴 IL-33 结合的单克隆抗体的产生筛选按上文所述产生的杂交瘤克隆。为了筛选所产生的 1921 个杂交瘤细胞系, 一般按 Baker 等 (Trends Biotechnol. 20:149-156, 2002) 中所述进行 ELISA。简言之, 用 50 μl 包被缓冲液 (0.05M 碳酸盐缓冲液, pH 9.6) 中浓度 2 μg/ml 的可溶性 IL-33 (Genentech) 包被 96 孔 **MAXISORP®** 平底板 (Nalge Nunc International, Rochester, NY), 密封, 并在 4℃ 过夜保存。去除包被溶液后, 向每个孔中加入 200 μl 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) pH 7.4 中含有 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 和 0.05% **TWEEN®**-20 (ELISA 稀释液) 的测定/ 阻断溶液, 室温摇动孵育 1 小时。然后用 300 μl 含 0.05% **TWEEN®**-20 的 PBS (洗涤缓冲液) 洗涤孔三次。

[0578] 洗涤步骤后, 每个孔加入 100 μl 来自单个杂交瘤克隆的培养物上清。室温摇动孵育平板 1 小时, 按前述用洗涤缓冲液洗涤孔三次。

[0579] 洗涤后, 向每个孔加入 50 μl 1:1000 稀释在 ELISA 稀释液中的辣根过氧化物酶偶联绵羊抗小鼠 IgG (与人 IgG 无交叉反应性 (MP Biomedicals, Solon, OH))。室温摇动孵育平板

1小时,按前述用洗涤缓冲液洗涤三次,拍干。向每个孔加入50 μ l四甲基联苯胺(TMB)微孔过氧化物酶底物(BioFX Laboratories, Owing Mills, MD, catalog#TMBW-0100-01),室温孵育5-10分钟或直至观察到颜色变化,对孔进行显色。通过向每个孔加入50 μ l TMB 终止溶液(BioFX Laboratories catalog#BSTP-0100-01)来终止酶促显色。用 SUNRISETM酶标仪(Tecan US, Inc., Research Triangle Park, NC)在650nm 分析平板。

[0580] 用首次免疫前采集的免疫前血清作为阴性对照。用七次免疫后收集的免疫血清作为阳性对照。

[0581] 克隆2B6、6C11、9F6、10C12和10H2为人IL-33和食蟹猴IL-13结合阳性。

[0582] B. 基于细胞的IL-33阻断测定

[0583] 通过基于细胞的阻断测定来测定用上述方法获得的抗IL-33抗体的 IL-33中和活性,其中IL-33刺激HEK-BLUETMIL-33/IL-1 β 细胞 (InvivoGen)并激活NF- κ B和AP-1途径,引起分泌型碱性磷酸酶(SEAP)的产生(图1A)。HEK-BLUETMIL-33/IL-1 β 细胞是用ST2构建体(pUN01-hIL01RL1a;SEQ ID NO:311)稳定转染、且包含处于与五个 NF- κ B和五个AP-1结合位点融合的IFN- β 最小启动子控制下的SEAP报道基因的人HEK293细胞(InvivoGen)。pUN01-hIL01RL1a质粒编码具有氨基酸序列SEQ ID NO:312的ST2L蛋白质。HEK293细胞表达内源性IL-1RAcP。用于基于细胞的阻断测定的IL-33的氨基酸序列如下:成熟人 IL-33(S112-T270),SEQ ID NO:313;人IL-33N-His,SEQ ID NO:314;人IL-33N-His C-Avi,SEQ ID NO:315;成熟食蟹猴IL-33(S112-T270),SEQ ID NO:316;食蟹猴IL-33N-His,SEQ ID NO:317;食蟹猴IL-33 N-His C-Avi,SEQ ID NO:318。

[0584] 简言之,将IL-33配体和预稀释的抗IL-33抗体混合,室温孵育1小时。将抗体和配体混合物转移至HEK-BLUETMIL-33/IL-1 β 细胞。CO₂培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育20小时后,通过在用碱性磷酸酶底物 (QUANTI-BLUETM, InvivoGen) 孵育后记录630nm OD值来测量细胞培养物上清中的SEAP活性。在基于细胞的阻断测定中用作阳性对照(参见例如图2)的sST2-LZ(sST2(M1-F328)C端亮氨酸拉链(LZ)-Flag-His)的全长氨基酸序列可见SEQ ID NO:319中。其中信号肽已去除的sST2-LZ的成熟形式显示在SEQ ID NO:310中。

[0585] 在以IgG型式表达时,纯化的抗IL-33抗体在低于1nM的浓度下显示IL-33的完全抑制(图2)。相反,用对IL-13特异的阴性对照单克隆抗体未观察到抑制。

[0586] C. 杂交瘤分子克隆和测序

[0587] 直接从细胞克隆各杂交瘤细胞系表达的抗体而不进行RNA纯化。用改进的5' RACE(cDNA末端快速扩增)流程(Qzawa等BioTechniques 40(4):469-478,2006)克隆可变重链和轻链免疫球蛋白区。使用对鼠重链(5'-TTTYYTGTCCACCKTGGTGCTGC-3',SEQ ID NO:320)和轻链恒定区(5'-GTAGAAGTTGTTCAAGAAG-3';SEQ ID NO:321)特异的寡核苷酸引物,使用 **SUPERSCRIPT®** III (Invitrogen, Carlsbad, CA) 反转录酶, 55 $^{\circ}$ C反应1小时,直接从杂交瘤细胞产生第一链cDNA。设计简并引物,以允许跨多种鼠重链同种型的引物配对。用末端脱氧核苷酸转移酶 (Promega, San Luis Obispo, CA) 和dGTP (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) 在37 $^{\circ}$ C反应1小时,使反转录酶产物3'端形成多聚G尾巴。使用嵌套式重链恒定区引物(5'-GTGTAGAGKYCAGACTSCAGG-3';SEQ ID NO:322)和轻链恒定区引物(5'-GAGGCACCTCCAGATGTTAAC-3';SEQ ID NO:323)及含有多聚C的N端引物(5'-GATTCAAATCTC AATTATATAATCCGAATATGTTTACCGGCTCG CTCATGGACCCCCCCCCCCDN-3';SEQ ID NO:324),通

过递降 PCR (**ADVANTAGE®**-GC 2, Clontech, Mountain View, CA) 分别进行可变重链和轻链cDNA的扩增。用N端引物 (5' -CAATTATATAATCCGAATATG-3'; SEQ ID NO:325)、重链恒定区引物 (5' -GAARTARCCCTTGACCAGGC-3'; SEQ ID NO:326) 和轻链恒定区引物 (5' -GAAGATGGATACAGTTGGTGC-3'; SEQ ID NO:327) 进行第二嵌套式递降PCR组。

[0588] 将PCR产物连接入**pCR2.1®-TOPO®**克隆载体 (**TOPO®**TA克隆试剂盒, Invitrogen, Carlsbad, CA) 并转化入**ONESHOT®** TOP10感受态细胞。分离并培养转化的大肠杆菌 (*E. coli*) 菌落进行DNA质粒分离。对质粒进行测序, 以确定各细胞系的VH和VL的DNA序列。序列确定后, 用含内切核酸酶限制位点 (*EcoRI*和*XhoI*) 的引物通过PCR扩增可变重链和轻链区, 以允许分别亚克隆入编码鼠IgG_{2a}和κ恒定区的哺乳动物IgG和IgK 表达载体。

[0589] 亚克隆杂交瘤细胞之前, 对亲本克隆进行分子克隆, 以确定可变重链和轻链结构域的序列。在亚克隆之前进行克隆, 以在杂交瘤克隆由于在亚克隆过程中的不稳定性而丢失的情况下捕获序列。根据分子克隆序列数据, 基于CDR和构架序列的比对将17C4、17H2和19C11确定为同胞克隆。这符合针对三个克隆产生的测定数据。

[0590] D. 鼠杂交瘤来源克隆的人源化

[0591] 选择表达以高亲和力结合IL-33并阻断细胞因子与其受体ST2结合的鼠杂交瘤进行人源化。将从克隆杂交瘤获得的抗体可变序列与最匹配的人可变共有序列比对。用Kunkel诱变 (参见例如Kunkel等Methods Enzymol. 154:367-382, 1987) 将来自鼠杂交瘤抗体的高变区 (HVR) 移植入对应的人可变共有序列。通过回复突变轻链和重链二者中关键Vernier位置处的残基为鼠残基, 以及突变构架/HVR相互作用及可变重链和可变轻链相互作用的位点, 产生每个克隆的其他变体。例如, 将所克隆的杂交瘤克隆10C12 的HVR序列移植入共有κIII轻链和共有VHIII重链来产生人源化变体。

[0592] 将所克隆的杂交瘤克隆10H2的HVR序列移植入共有κIV轻链和共有VH III重链来产生人源化变体。以与10C12和10H2类似的型式人源化所克隆的6C11、2B6和9F6的HVR序列。在293细胞中瞬时表达人源化变体, 然后针对结合和功能进行测试。

[0593] 在Biacore 3000或T200仪器 (GE Healthcare) 上用表面等离子共振 (SPR) 测量杂交瘤来源克隆10C12、10H2、6C11、2B6和9F6的人源化变体与IL-33的结合动力学。按照厂家的流程通过基于胺的偶联将抗人Fc (GE Healthcare) 固定在CM5传感芯片上。按500-600个响应单位 (RU) 的水平捕获人源化变体抗IL-33抗体。测量抗体与人IL-33 (Genentech, huIL33.his) 的结合。用0.78至50nM范围内的两倍浓度系列的人IL-33进行实验。在25℃温度下, 以10mM HEPES、pH 7.4、150mM NaCl、3mM EDTA和0.005% **TWEEN®**-20为运行缓冲液, 使用2分钟注射时间、30μl/分钟流速, 记录IL-33结合传感图。注射后, 在运行缓冲液中监测配体从抗体解离600秒。在结合循环之间用40μl 3M氯化镁注射再生表面。扣除仅包含运行缓冲液的空白后, 用厂家提供的软件用1:1Langmuir结合模型分析针对IL-33与人源化抗IL-33抗体结合观察到的传感图, 以计算动力学和结合常数, 包括解离常数 (KD)。如通过Biacore测量 (参见图3和表2), 抗IL-33 10C12人源化变体在人源化后保持与人IL-33的高亲和力结合。表2还显示所选择的源自B细胞克隆和噬菌体展示的抗体克隆的动力学数据。

[0594] 为了测试人源化抗IL-33抗体以及从单B细胞克隆 (例如4G12和衍生物及3E3) 和噬菌体展示获得的抗体的功能, 按上文所述在基于细胞的受体阻断测定中测量了它们的活

性。针对人和食蟹猴二者的IL-33与ST2的结合的阻断测试了抗体。所选择的抗体组的受体阻断测定的结果显示在表3 中。

[0595] 表2:所选择的抗IL-33抗体克隆的动力学数据

克隆	类型	来源	K _D (人)	K _D (食蟹猴)
10C12	鼠	<i>IL33 KO</i>	≤ 7 pM	70 pM
10C12.38.H6.87Y.58I	人源化		15 pM	37 pM
10C12.38.H7.87Y.58I	人源化		177 pM	
10H2	鼠	Balb/C	60 pM	90 pM
10H2.36.F10	人源化		220 pM	
10H2.36.F10.30V.54D	人源化		220 pM	
4G12	B 细胞克隆		96 pM	60 pM
4G12.62A	人源化		84 pM	73 pM
4G12.FW4	人源化		38 pM	70 pM
4G12.F10.F6	B 细胞克隆		110 pM	60 pM
4G12.F11.F8	B 细胞克隆		100 pM	40 pM
3E3	B 细胞克隆		260 pM	40 pM
6C11	鼠	Balb/C	60 pM	790 pM
6C11.34.B2	人源化		225 pM	
6C11.34.B2.52bS	人源化		310 pM	
6C11.HC.G2.52CA	人源化		152 pM	
2B6	鼠	Balb/C	30 pM	330 pM
2B6.35.D1	人源化		312 nM	
2B6.54S	人源化		336 nM	
2B6.55A (NA)	人源化		363 pM	
9F6	鼠	Balb/C	70 pM	910 pM
9F6.34.E10	人源化		795 pM	
101.B11	转基因小鼠/ 噬菌体展示		527 pM	783 pM
101.E11	转基因小鼠/ 噬菌体展示		420 pM	467 pM
101.D9	转基因小鼠/ 噬菌体展示		361 pM	576 pM

[0597] 表3:所选择的抗IL-33抗体克隆的受体阻断数据

[0598]

克隆	细胞测定(人) IC ₉₀ (μg/mL)	细胞测定(人) IC ₉₀ (nM)	细胞测定(食 蟹猴) IC ₉₀ (μg/mL)	细胞测定(食 蟹猴) IC ₉₀ (nM)
10C12	0.002	0.013	0.193	1.27
10C12.38.H6.87Y.58I	0.004	0.026	0.185	1.22
10C12.38.H7.87Y.58I	0.003	0.02	0.09	0.594
10H2	0.003	0.02	0.041	0.27

[0599]

克隆	细胞测定(人) IC ₉₀ (μg/mL)	细胞测定(人) IC ₉₀ (nM)	细胞测定(食 蟹猴) IC ₉₀ (μg/mL)	细胞测定(食 蟹猴) IC ₉₀ (nM)
10H2.36.F10	0.17	1.12	0.025	0.165
10H2.36.F10.30V.54D	0.344	2.27	>1.5	>9.9
4G12	0.128	0.845	0.032	0.211
4G12.62A	0.187	1.23	0.014	0.092
4G12.FW4	0.17	1.12	0.034	0.224
4G12.F10.F6	0.16			
4G12.F11.F8	0.31			
3E3	0.21			
6C11	0.021	0.14	>1.5	>9.9
6C11.34.B2	0.017	0.112	>1.5	>9.9
6C11.34.B2.52bS	0.0087	0.057	>1.5	>9.9
6C11.HC.G2.52CA	0.0305	0.201	>1.5	>9.9
2B6	0.02	0.13	0.526	3.47
2B6.35.D1	0.0093	0.061	0.184	1.21
2B6.54S	ND	ND	ND	ND
2B6.55A (NA)	ND	ND	ND	ND
9F6	0.011	0.73	>1.5	>9.9
9F6.34.E10	0.0128	0.84	> 1.5	>9.9
101.B11	0.3			
101.E11	0.1			
101.D9	0.3			

[0600] 实施例3. IL-33在包括年龄相关黄斑变性 (AMD) 的眼科障碍中的炎症中的作用

[0601] 通常认为炎症是由感染或损伤引发的防御反应。在缺乏感染或明显组织损伤的情况下,组织应激和机能障碍也可以诱发炎症。这类无菌性炎症反应的实例见于中枢神经系统中的免疫豁免区,包括视网膜。在AMD中,视网膜和下衬视网膜色素上皮 (RPE) 细胞终生暴露于多种刺激(例如光、氧化应激和蛋白水解酶)可引起异常新血管形成、RPE细胞死亡和光感受器丧失。神经视网膜丧失通常与无菌性炎症反应相关,无菌性炎症反应部分表征为单核吞噬细胞在光感受器和光感受器外色素层中累积。起始单核吞噬细胞招募的因素仍未知。

[0602] A. 人黄斑Müller细胞中IL-33表达在AMD中提高

[0603] 黄斑是近人视网膜中央的区域,对好的视力至关重要。黄斑中的RPE 和感光细胞

由于终生暴露于氧化应激或暴露于视觉循环的毒性副产物而使活率降低,可对视功能具有重要影响。为了确定与周边视网膜相比黄斑中的IL-33表达是否不同,通过RNA测序(RNA-seq)分析了死后解剖的人视网膜(图4A)。与正常供体周边视网膜相比,黄斑中IL-33转录物显著增加,而与黄斑相比,周边视网膜中其他白细胞介素1(IL-1)家族细胞因子IL-1 α 、IL-1 β 和IL-18的表达水平相似或提高。

[0604] 为了进一步确定正常人视网膜中IL-33的细胞来源,处理来自无眼病史的人供体的7只眼进行免疫组织化学。IL-33主要存在于中央视网膜波形蛋白阳性Müller细胞的细胞核中,周边视网膜中IL-33阳性(IL-33⁺) Müller细胞的数据显著低(图5A-5E),与RNA测序结果一致。IL-33还表达在RPE细胞亚群的细胞核中,与周边视网膜相比,中央视网膜中表达略高(图5B、5C和5D)。与周边视网膜相比,在中央视网膜中,视网膜神经节细胞层中的IL-33⁺星形胶质细胞(胶质细胞原纤维酸性蛋白阳性(GFAP⁺))和脉络膜的IL-33⁺内皮细胞(质膜小泡相关蛋白阳性(PLVAP⁺))的数目没有不同。

[0605] 在有AMD史的供体中,在黄斑中观察到暗示晚期干性AMD或地图状萎缩的RPE和感光细胞丧失区域(图6A和6B)。使用多标记荧光免疫组织化学,在RPE和光感受器萎缩区域中观察到IL-33⁺Müller细胞和髓样细胞的数目增加(图6A-6E)。AMD非病灶区中IL-33⁺Müller细胞的数目显著低于对照中央视网膜中的数目(图6C)。不希望受限于理论,这可以是由于这样的事实,非病灶区通常位于周边视网膜,其中IL-33⁺Müller细胞的丰度低于非AMD眼的中央视网膜中(图5D)。还在AMD病灶区的脉络膜中观察到IL-33⁺细胞相对于对照或非病灶区增加(图6D)。没有一个Iba1⁺髓样细胞为IL-33阳性(图6E)。在AMD患者亚群的玻璃体中,与正常对照(患有黄斑裂口或黄斑皱褶的患者)相比,IL-33水平显著提高(图6F)。

[0606] B. 光毒性应激后在体外和在体内从Müller细胞加工和释放IL-33

[0607] 如之前针对小鼠视网膜所述(图7B),在大鼠视网膜中,IL-33主要表达在中央和周边视网膜的波形蛋白阳性Müller细胞中(图7A)。与人眼中的IL-33表达模式不同,在正常大鼠和小鼠眼中,RPE或脉络膜内皮细胞中IL-33表达非常低,在RPE或脉络膜中几乎观察不到IL-33⁺细胞(图7A和7B)。在正常小鼠眼中,IL-33mRNA和蛋白质表达数量级高于其他IL-1家族成员(IL-1 α 、IL-1 β 和IL-18)(图7C)。用从暴露于亮光的大鼠获得的Müller细胞系rMC-1细胞(Sarthy等Invest.Ophthalmol.Vis.Sci. 39:212-216,1998)来在体外研究IL-33释放的调节。如GFAP的表达(图7D)所示,培养的rMC-1Müller细胞显示活化表型(还参见Sarthy等上文)。rMC-1Müller细胞的亚细胞分级分离在细胞核级分中鉴定出30kDa pro-IL-33(IL-33p30)及~24kDa和~19kDa(IL-33p19)C端肽,而IL-33p19是表达在细胞质中的主要种类(图7E)。与在低葡萄糖(5.5mM)培养基中培养的细胞(图7G)相比,rMC-1细胞暴露于活化Müller细胞的高葡萄糖(25 mM)培养基(图7F;还参见Sarthy等,上文)显著增加IL-33分泌。培养物上清的Western印迹分析显示,IL-33p19是唯一的IL-33种类(图7G)。高葡萄糖刺激(至多72小时)并未在rMC-1细胞上诱导细胞通透性或膜联蛋白V染色(图7H),表明高葡萄糖培养基中IL-33p19分泌的增加不是与细胞死亡增加相关。这些数据证明,IL-33在人和啮齿动物Müller细胞中都表达,主要定位于细胞核,可从活化的培养活大鼠Müller细胞释放IL-33p19。

[0608] 随后,进行了在体内是否在Müller细胞活化后从Müller细胞分泌IL-33的分析。啮齿动物持续暴露于亮(1200lux)光若干天导致视杆细胞和视锥细胞进行性丧失,同时Mu

ller细胞、小胶质细胞和巨噬细胞的活化增加(LaVail等Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89: 11249-11253,1992)。持续光暴露(CLE)后,在视网膜外核层(ONL)中观察到末端dUTP缺口末端标记(TUNEL)阳性细胞数目增加(图7I),随后视杆细胞和视锥细胞丧失(图7J)。在Müller细胞所驻留的视网膜内核层(INL)中很少观察到TUNEL阳性细胞。

[0609] 为了确定IL-33在体内是否由细胞释放,在CLE后多种时间点收集玻璃体。正常大鼠玻璃体中IL-33水平约为1ng/ml。光活化的眼中IL-33浓度提高2倍,在第3天达到平台(图7K),表明IL-33在光诱导视网膜应激后释放。Western印迹分析确认,经加工的C端19kDa蛋白质(IL-33p19)(大小与从培养的rMC-1细胞释放的IL-33片段相同(图7G))是在CLE之前和之后存在于玻璃体中的主要IL-33种类(图7K)。全长IL-33p30是视网膜中的主要种类,光暴露后3天开始,经加工的IL-33p19种类的存在增加,时程类似于玻璃体中的IL-33p19表达。为了确定光损伤的视网膜和高葡萄糖培养基中培养的rMC-1细胞中IL-33p19的存在增加是否是由于存在选择性IL-33转录物变体,用跨IL-33的5'非翻译区(5'-UTR)(外显子1)至终止密码子(外显子9)的PCR引物进行了RT-PCR。两种情况下都只检测到全长IL-33转录物(图7L)。不希望受限于理论,这表明IL-33p19是由蛋白酶解而不是选择性剪接产生。负责IL-33加工的蛋白酶尚未鉴定出来,是正在进行的研究的焦点。

[0610] CLE后,观察到天然IL-33从大鼠Müller细胞丧失。分析了遗传改造IL33^{tm2/tm2}小鼠(Bessa等J.Autoimmunity 55:33-41,2014)来确定体内Müller细胞中IL-33蛋白质表达的调节,在该遗传改造小鼠中,将IL-33的包含核定位信号和染色质结合结构域的N端112个氨基酸与dsRed报道分子融合。在来自IL33^{tm2/tm2}小鼠的视网膜中,IL-33N-term-dsRed主要定位在位于视网膜INL中的Müller细胞的细胞核中(图7M),类似于天然全长IL-33的定位(图7B)。IL33^{tm2/tm2}视网膜的流式细胞术分析确认IL-33-N-term-dsRed在Müller细胞中的选择性表达(图7M)。CLE后观察到IL-33-dsRed从活Müller细胞显著丧失而Müller细胞未丧失(图7M),这反映了IL-33C端在无细胞死亡的情况下从Müller细胞释放。此发现与光暴露后观察到的天然IL-33从大鼠Müller细胞丧失相一致。因此,这些数据证明,IL-33的C端加工形式在细胞响应光毒性而活化后从Müller细胞释放。

[0611] C.ST2表达在活化Müller细胞上并促成光感受器丧失

[0612] IL-33在结合其异二聚体受体ST2/IL1RAcP后引发MyD88介导的信号发放(参见例如Schmitz等Immunity 23:479-490,2005)。编码跨膜ST2(ST2L)和缺乏跨膜结构域(sST2)的ST2剪接变体的视网膜转录物在CLE后提高4至10倍,在第3天达到峰值(图8A)。平行样品中的流式细胞术分析将活化(GFAP⁺)Müller细胞鉴定为光暴露视网膜中跨膜ST2的主要来源(图8B),而光暴露前在Müller细胞上检测不到ST2。CD11b⁺CD45^{lo}小胶质细胞(图8B)、RGC或光感受器上检测不到ST2。

[0613] 进行了分析来确定IL-33与ST2结合是否影响CLE后的光感受器存活。谱域光学相干断层显像(SD-OCT)证明,CLE 7天(图8C)和14天(图8D)后,与ST2^{+/+}小鼠相比,ST2^{-/-}中视网膜得到保护。总视网膜的流式细胞术进一步确认,14天CLE期间,与ST2^{+/+}小鼠相比,ST2^{-/-}中视杆细胞、视锥细胞和神经节细胞得到保护(图8E)。眼切片上的形态度量分析显示,视网膜光毒性损伤后,在视网膜的上半部分和下半部分中,ST2^{-/-}小鼠中的光感受器都得到显著保护(图8F)。在CLE后第7天记录了视网膜电图(ERG),并证明与ST2^{+/+}小鼠相比ST2^{-/-}中视网膜细胞得到保护,转化为改善的a-和b-波反应,反映了视网膜功能的改善(图8G)。与

ST2^{-/-}小鼠视网膜不同,分别缺乏IL-1 α 、IL-1 β 和IL-18受体的IL-1R1^{-/-}和IL-18R1^{-/-}小鼠的视网膜与野生型同窝仔相比在CLE后未得到保护(图8D)。

[0614] 为进一步确定ST2/IL-33相互作用的药理学阻断是否保护光感受器,用表达可溶性ST2的重组腺相关病毒(AAV)(AAV-sST2)处理小鼠后进行CLE。在IL-33刺激的骨髓来源肥大细胞(BMMC)中验证了sST2的阻断活性(图9A)。ELISA和Western印迹分析确认了sST2在AAV感染的HEK293细胞中的表达(图9B)。视网膜下注射AAV-sST2导致sST2在视网膜和RPE中高水平表达(图9C)。用AAV-sST2而不是对照载体处理的光暴露小鼠显示视杆细胞、视锥细胞和神经节细胞的保护(图10)。这些结果证明,IL-33结合其信号发放受体ST2/IL1RAcP引起导致光暴露视网膜中的光感受器丧失的致病反应。

[0615] D. IL-33增加髓样细胞招募至光感受器层

[0616] 为了确定ST2/IL1RAcP信号发放下游的哪条途径引起光感受器丧失,进行了暴露于持续光照3天的ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠的视网膜的微阵列分析。CLE后,与ST2^{-/-}小鼠相比,ST2^{+/+}小鼠的视网膜显示炎症特征的总体增加,包括CCL2、IL-1 β 、IL-6、IRF1、IRF7和STAT3(图11A和11B)。实时PCR确认CCL2、IL-1 β 和IL-6表达提高,与ST2^{+/+}小鼠相比,ST2^{-/-}小鼠中CCL2、IL-1 β 和IL-6的表达显著更低(图11C)。与mRNA表达数据一致,CLE后,与ST2^{+/+}小鼠相比,ST2^{-/-}视网膜中CCL2蛋白质表达减少(图11C)。

[0617] 进行了分析来确定IL-33是否在Müller细胞中诱导CCL2表达。与上述体内结果一致,表达Müller细胞活化标记GFAP的rMC-1细胞表达跨膜、表面暴露的ST2(图11D)。在用重组IL-33刺激时,rMC-1细胞显示CCL2表达的剂量依赖性提高,这种剂量依赖性提高可通过加入IL-33 TRAP来阻断,确认IL-33通过Müller细胞上的ST2发信号(图11D)。除IL-33外,在培养在高葡萄糖培养基中时,rMC-1细胞随时间推移表达和分泌CCL2(图11E)。与在载体存在下培养的rMC-1细胞相比,通过向培养基中加入IL-33TRAP来中和Müller细胞分泌的IL-33显著降低了CCL2表达(图11E)。这些结果证明,培养的Müller细胞释放生物活性IL-33,生物活性IL-33转而可以通过自分泌激活诱导CCL2。

[0618] 视网膜中的CD11b⁺CD45^{lo}(图12A和图13D)和CD11b⁺CD45^{hi}(图13D)细胞都表达CCL2的受体CCR2(图12A)。为了确定IL-33对视网膜中的髓样细胞分布是否具有任何作用,在CLE之前和之后定量ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠的每个视网膜层中的Iba1⁺髓样细胞。光暴露之前,Iba1⁺细胞集群在内网层(IPL)和外网层(OPL),ONL、外节(OS)和视网膜神经节细胞层(GCL)中细胞非常少(图12B)。CLE 14天后,Iba1⁺细胞累积在ONL、OS和GCL中,同时ST2^{+/+}小鼠OPL和IPL中的Iba1⁺细胞减少。与ST2^{+/+}小鼠相比,ST2^{-/-}小鼠显示ONL和OS中的Iba1⁺细胞减少40-50%,OPL中的Iba1⁺细胞增加50%(图12C)。因此,CLE后,ST2/IL1RAcP信号发放促进CCL2表达、Iba1⁺髓样细胞在外视网膜层中的存在的增加及光感受器视杆细胞和视锥细胞的丧失。这些结果扩展了之前提出的Müller细胞分泌的CCL2在促进髓样细胞在ONL中的存在和光损伤或视网膜脱离后光感受器死亡的诱导中的作用。

[0619] 为了确定光暴露时IL-33/ST2诱导的光感受器丧失是否由浸润性髓样细胞介导,我们用氯膦酸二钠(clodronate)排除ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠中的外周单核细胞,并在CLE 7天后定量光感受器和神经节细胞的数据。氯膦酸二钠处理排除了分别超过80%和70%的Ly6C^{hi}CD115⁺和Ly6C^{lo/-}CD115⁺外周单核细胞(图12D)。单核细胞排除在ST2^{+/+}小鼠中导致CLE后视杆细胞、视锥细胞和RGC的保护(图12E)。但是,ST2缺陷在排除单核细胞时未提供进一

步的光感受器保护,表明浸润性髓样细胞介导IL-33/ST2诱导的光感受器丧失。

[0620] 为进一步确定从Müller细胞释放的IL-33是否具有致病作用,分析了其中用dsRed替换IL-33的N端核定位信号和染色质结合结构域的遗传修饰小鼠(IL33^{tm1/tm1}小鼠)(Bessa等J.Autoimmunity 55:33-41,2014)(图12F)。类似于IL33^{tm2/tm2}小鼠,IL33^{tm1/tm1}小鼠选择性地神经视网膜的Müller细胞中显示dsRed染色。但是,与其中dsRed通过IL-33N端锚定至细胞核的IL33^{tm2/tm2}小鼠不同,IL33^{tm1/tm1}小鼠中用dsRed替换IL-33N端阻止了IL-33锚定至细胞核,导致dsRed-IL-33-C-term释放入跨越视网膜内核层的Müller细胞突的胞质(图12F)。与IL-33转录仍处于内源启动子控制下一致(Bessa等,上文),与IL33^{+/+}同窝小鼠相比,IL33^{tm1/+}和IL33^{tm1/tm1}小鼠视网膜中IL-33mRNA未改变,而血清和视网膜中IL-33蛋白质由于缺乏N端的IL-33自发释放而升高(图12F)。还与IL-33轴的致病作用一致,在小鼠表达ST2受体链(ST2^{+/-}背景)时,来自IL33^{tm1/+}和IL33^{tm1/tm1}小鼠的视网膜显示CCL2和IL-6表达提高及光感受器视锥细胞和神经节细胞丧失(图12G)。在缺乏ST2的IL33^{tm1/+}和IL33^{tm1/tm1}小鼠中,CCL2和IL-6表达及视网膜细胞丧失恢复至对照值(图12G)。这些结果表明,在剥夺其定位至细胞核的能力后,IL-33从细胞释放,并诱导依赖ST2的细胞因子和趋化因子释放,连同视网膜细胞死亡。

[0621] E. 视网膜色素上皮破坏后IL-33/ST-2诱导的光感受器细胞丧失需要循环单核细胞归巢至视网膜

[0622] 通过摄取和再循环光感受器外节、失活毒性视觉循环产物及满足视网膜代谢需求,视网膜色素上皮(RPE)在光感受器稳态中发挥重要作用。RPE还维持外侧血-视网膜屏障完整性(参见例如Strauss,“The Retinal Pigment Epithelium.”In Webvision:The Organization of the Retina and Visual System(Kolb等编辑)1995)。已提出RPE细胞丧失在湿性和干性AMD中都与光感受器丧失有因果关系(参见例如Bhutto等Molecular Aspects of Medicine 33:295-317,2012)。碘酸钠(NaIO₃)是氧化化合物,其在全身施用不可逆影响RPE细胞存活(Carido等Invest.Ophthalmol.Vis.Sci. 55:5431-5444,2014),允许考察在RPE细胞死亡后的光感受器丧失中重要的视网膜途径的作用。

[0623] 全身施用NaIO₃导致在第3天消除了中央视网膜中的大部分RPE细胞。这伴随着光感受器外核细胞丧失、Müller细胞活化(图13A),以及中央视网膜中IL-33的19kDa加工形式(IL-33p19)的存在增加,在处理第3天达到峰值(图13B)。NaIO₃处理还导致CCL2提高>1500倍(图13C)。在缺乏ST2的小鼠中,NaIO₃施用引起的CCL2蛋白质水平提高减弱了约35%(图13C)。由于IL-33刺激Müller细胞诱导CCL2(髓样细胞化学引诱物),进行了分析来确定IL-33的阻断是否影响视网膜中髓样细胞的数目。NaIO₃处理ST2^{+/+}小鼠导致存在于视网膜中的CD45^{hi}CD11b⁺CCR2⁺髓样细胞的数目增加>20倍,在第3天达到峰值。与ST2^{+/+}小鼠相比,NaIO₃处理后,ST2^{-/-}小鼠在第3天和第7天分别显示CD45^{hi}CD11b⁺CCR2⁺髓样细胞数目的增加减弱了~70%和~50%(图13D)。相反,在NaIO₃处理后第3天,ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠中CD45^{low}CD11b⁺CCR2⁺小胶质细胞的数据都下降超过5倍。在第7天没有恢复。Iba1⁺细胞的免疫组织化学分析显示,在NaIO₃处理后第3天,与ST2^{+/+}小鼠相比,ST2^{-/-}小鼠OS和ONL中浸润性Iba1⁺髓样细胞减少约50-60%(图13E)。如NaIO₃处理后第7天与ST2^{+/+}小鼠相比ST2^{-/-}小鼠中显著更厚的视网膜所示,ST2^{-/-}小鼠的神经视网膜在NaIO₃处理后得到保护(图13F)。FACS分析进一步证明视杆细胞、视锥细胞和视网膜神经节细胞得到显著保护。与ST2^{-/-}小鼠不

同,在NaIO₃处理后第7天与WT小鼠相比,IL-1R1^{-/-}或IL-18^{-/-}小鼠的视网膜未得到保护(图13G)。

[0624] 为了确定浸润性髓样细胞是否为IL-33诱导的光感受器丧失所需,在NaIO₃处理之前用氯膦酸二钠排除ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠中的外周髓样细胞,并在第3天定量光感受器和神经节细胞的数目。通过流式细胞术确认了Ly6C^{hi}CD11b⁺CCR2⁺和Ly6C^{lo/-}CD115⁺CDR2⁺外周单核细胞及视网膜CD45^{hi}CD11b⁺CCR2⁺巨噬细胞的成功排除(图13H和13I)。氯膦酸二钠介导的髓样细胞排除导致神经视网膜在NaIO₃诱导RPE细胞丧失后得到保护(图13I)。类似于来自CLE中的单核细胞排除实验的结果,在排除髓样细胞时,ST2的丧失未导致进一步保护,表明浸润性巨噬细胞为RPE破坏时IL-33/ST2诱导的光感受器丧失所需。

[0625] 概括起来,使用遗传和药理学方法,这些结果证明,IL-33促成髓样细胞向光感受器层招募和视网膜细胞丧失。在光诱导损伤模型(CLE)和RPE破坏模型中,IL-33轴信号发放都促进髓样细胞在视网膜ONL和OS层中累积。在RPE细胞丧失的模型中,IL-33轴信号发放促进髓样细胞在视网膜中累积。在视网膜损伤啮齿动物模型和人AMD中,髓样细胞在受损视网膜中的累积都与光感受器细胞丧失在解剖学上相关。

[0626] F. 材料和方法

[0627] 小鼠

[0628] ST2敲除(ST2^{-/-})BALB/c小鼠(八代)获自MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, 英国(参见Townsend等J. Exp. Med. 191:1069-1076, 2000)。使ST2^{-/-}小鼠与C57BL/6背景回交10代,以产生ST2^{-/-}C57BL/6小鼠。IL33^{tm1/+}和IL33^{tm2/tm2}BALB/c小鼠获自F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, 瑞士(参见Bessa等J. Autoimmunity 55: 33-41, 2014)。由于IL33^{tm1/+}小鼠的显著发病率和死亡率,使IL33^{tm1/+}小鼠与ST2^{-/-}BALB/c小鼠杂交,并维持在ST2^{-/-}背景上。通过使雌性IL33^{tm1/+}ST2^{-/-}小鼠与雄性IL33^{tm1/+}ST2^{+/+}小鼠繁殖来产生IL33^{tm1/tm1}ST2^{+/+}小鼠。IL-1R1^{-/-}(Il1r1^{tm1Imx})、IL-18R1^{-/-}(Il18r1^{tm1Aki})和IL-18^{-/-}(Il18^{tm1Aki})C57BL/6小鼠购自Jackson Laboratory。通过speed congenics使IL-1R1^{-/-}和IL-18R1^{-/-}小鼠与BALB/c背景回交,以分别产生IL-1R1^{-/-}和IL-18R1^{-/-}BALB/c小鼠(9代)。Sprague-Dawley大鼠购自The Charles River Laboratories。所有动物均在Genentech, Inc以12/12小时明/暗周期饲养在无病原体动物设施内,实验中使用同窝仔。动物实验按照Genentech Institutional Animal Care and Use Committee批准的流程和Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research进行。

[0629] 重组蛋白质

[0630] 重组小鼠IL-33(氨基酸109-266)购自R&D Systems。通过将编码IL-33的氨基酸109-264的大鼠cDNA片段亚克隆入pET28载体(Novagen)来产生重组大鼠IL-33(氨基酸109-264)。在大肠杆菌中表达蛋白质,并通过Ni-NTA层析和随后的凝胶过滤来纯化。通过将小鼠可溶性ST2(氨基酸1-337)亚克隆入在C端具有8x组氨酸(His)标记的pRK5表达载体来产生重组sST2。通过Ni-NTA层析和随后的SUPERDEX® 200凝胶过滤来纯化在CHO细胞中表达的融合蛋白质。通过来自IL-33刺激的骨髓来源肥大细胞(BMMC)的细胞因子产生的阻断验证了sST2的中和活性。按所述(Moulin等Cytokine 40:216-225, 2007)产生BMMC并用IL-33刺激。简言之,在96孔板中在200μl RPMI-1640培养基中,在20μg/ml sST2或对照His

标记蛋白质存在下,用1ng/ml IL-33刺激 10^5 个细胞24小时。收集培养物上清用于通过ELISA (R&D Systems) 测量IL-6和IL-13。用杵入臼技术 (参见例如美国专利号5,731,168和Merchant等Nature Biotechnology 16:677-681,1998) 产生其中ST2的胞外域 (ECD) 与IL1RAcP的ECD异二聚化的重组IL-33 TRAP。将编码具有包含“杵”突变的C端mIgG2a Fc 片段的小鼠ST2 ECD (氨基酸26-328) 的pRK5表达载体与编码具有包含“臼”突变的C端mIgG2a Fc片段的小鼠IL1RAcP ECD (氨基酸21-350) 共转染入CHO细胞。通过MabSURE SELECT柱 (GE Healthcare) 和 **SUPERDEX®** 200凝胶过滤纯化融合蛋白质。

[0631] 持续光暴露 (CLE)

[0632] 将8-12周龄雄性BALB/c小鼠或6-8周龄Sprague-Dawley大鼠保持在光强度<100lux的正常饲养环境中 (用作基线, d0)。对于光暴露,将动物单只饲养在略作改变的正常鼠笼中,鼠笼仅覆盖平线架而没有滤盖。为避免破坏进入鼠笼的光线,将饲料颗粒放在笼底,通过附着在笼侧的水瓶提供水。通过将鼠笼放置在每个笼架上方配置48”荧光冷白光的Metro支架的架子上来诱导视网膜变性。还将支架围在悬挂白板中,以将光线均匀反射回架子。就光源调整架子高度,使得通过照度计测量的每个架子上的光强度为~1200lux。CLE期间使鼠笼在每个架子内和架子之间旋转,以确保同等光暴露。评价前使动物暴露于光所示多种天数。

[0633] RPE损伤诱导的视网膜变性

[0634] 对6-8周龄雄性C57Bl/6小鼠静脉内注射20mg/kg体重的碘酸钠 (NaIO_3) (Sigma)。 NaIO_3 的剂量根据之前通过眼底成像评估RPE损伤和通过OCT评估视网膜厚度的剂量滴定实验来选择。按所示在 NaIO_3 注射后 3或7天评价视网膜。注射等体积盐水的小鼠作为对照。

[0635] 谱域光学相干断层显像 (SD-OCT)

[0636] CLE后,用 **SPECTRALIS®** HRA+OCT系统 (Heidelberg Engineering) 通过SD-OCT测量视网膜厚度。为了针对啮齿动物光学进行调整,按照厂家的建议改造系统,在照相机前放置55°广角镜头。通过腹腔内注射氯胺酮 (70-80mg/kg体重) 和甲苯噻嗪 (15mg/kg体重) 来麻醉小鼠。用托吡卡胺滴眼液USP 1% (Bausch&Lomb) 液滴扩张瞳孔。双侧使用人工泪液,以防止过程中角膜脱水。用整个视神经背颞侧区域 (上四分之一) 的水平容积扫描来评价视网膜厚度。总视网膜厚度定义为横切图像上从内界膜 (ILM) 至 RPE/脉络膜层的宽度,并用 **MATLAB®** (MathWorks) 中的自定义自动图像分割程序测量。

[0637] 视网膜电图 (ERG)

[0638] 用 **ESPION²™**电生理系统 (Diagnosys) 进行ERG记录。使小鼠在ERG 记录前过夜暗适应,所有流程均在暗红光下进行。按上文所述麻醉小鼠并扩张其瞳孔。用恒温板维持体温,并保持37℃。通过前额皮下插入参考电极,在腰部区域皮下插入接地电极。将金环电极 (小鼠电极1.5mm **3.2 mm**) (LKC Technologies) 放置在每只眼的角膜表面。在角膜上加上一滴 GONIOVISC[™]羟丙基甲基纤维素镇痛滴眼液2.5% (HUB Pharmaceuticals),以在角膜和电极之间建立电接触,并在流程期间维持角膜湿度。将小鼠放置在覆盖COLORDOME[™]光刺激器的平台中。按每种强度五次闪光用三种闪光强度 (0.05、1和25cd • s/m²) 的白光刺激眼。通过引入从最低刺激强度时的15秒至最高刺激强度时的1分钟范围内的刺激间间隔

来允许连续闪光之间的最大视杆细胞恢复。信号按0.15-1000Hz进行带通过滤,并按2kHz采样。在动物之间,用乙醇拭纸清洁电极,然后在无菌PBS中漂洗。ERG后,在角膜上局部应用眼膏,以防止脱水。用自定义**MATLAB®**软件(Mathworks)分析所有记录的数据点,从基线至a波的波谷测量a波波幅,从a波的波谷至b波的波峰测量b波波幅。将对3-5次闪光的光刺激的反应平均。

[0639] 氯膦酸二钠排除单核细胞/巨噬细胞

[0640] 为了排除单核细胞/巨噬细胞,分别从CLE或NaIO₃处理前2天或1天开始,每天静脉内施用1mg剂量的200μl体积脂质体包封氯膦酸二钠(Encapsula Nano Sciences)。对照小鼠接受相同体积的对照脂质体。为了监测全身单核细胞排除,在异氟醚麻醉下通过心脏穿刺采血。用ACK(Ammonium-Chloride-Potassium)裂解缓冲液(Life Technologies)从全血样品去除红细胞。然后将细胞重悬在流式细胞术缓冲液中,Fc封闭,用别藻蓝蛋白(APC)缀合的抗CD115(克隆AFS98,eBioscience)、异硫氰酸荧光素(FITC)缀合的抗Ly6C(克隆AL-21,BD Biosciences)和藻红蛋白(PE)缀合的抗CCR2(R&D systems)染色,并通过流式细胞术分析。

[0641] 视网膜下注射AAV载体

[0642] 在遍在CAG启动子控制下编码小鼠sST2(氨基酸1-337)-8xHis(SEQ ID NO:332)的AAV2/5载体由Vector Biosystems定制。SEQ ID NO:333中提供小鼠sST2(氨基酸1-337)-8xHis的氨基酸序列。通过以10⁵基因组拷贝(GC)/细胞的感染复数感染HEK293细胞来验证病毒活性。感染后6天收集培养物上清,并通过ELISA(R&D Systems)和使用山羊抗小鼠ST2 Ab(AF1004,R&D Systems)的Western印迹分析。用AAV空载体感染作为阴性对照。对于视网膜下注射AAV,按上文所述用氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉小鼠并扩张瞳孔。在解剖显微镜下,用30号针头在与角膜交界处附近的巩膜中产生小切口。用钝33号Hamilton针头和自动注射装置通过切口将1μl含10¹²GC/ml的AAV注入右眼视网膜下间隙。注射后,局部应用三抗生素(新霉素、多粘菌素B和杆菌肽)眼膏,以防止眼睛在从麻醉恢复之前感染和干燥。

[0643] 玻璃体和视网膜组织收集

[0644] 为了从大鼠眼收集玻璃体,通过CO₂窒息大鼠进行安乐死,并摘出。去除角膜后,用**SUGI®**楔形吸收拭子(Kettenbach Medical)吸收前房液。用弯曲显微外科镊小心地从后房拉出附着有玻璃体的晶状体。将晶状体-玻璃体组织放入含有20μl溶解在PBS中的蛋白酶抑制剂混合物(Roche)的过滤离心管(Costar)中,4℃、14,000x G离心5分钟。从下室作为洗脱物收集玻璃体。从巩膜和色素上皮分离视网膜,并在PBS中漂洗。将视网膜解离用于流式细胞术分析或匀浆用于ELISA和Western印迹。用组织匀浆器(IKA)在细胞裂解缓冲液(Cell Signaling)中匀浆视网膜。将视网膜和RPE/脉络膜匀浆4℃、14,000x G离心10分钟,收集上清。玻璃体和视网膜组织裂解物在分析前保存于-80℃。

[0645] 流式细胞术

[0646] 按上文所述分离视网膜,并用含20IU/ml木瓜蛋白酶和200IU/ml DNase(Worthington Biochemicals)的Earle平衡盐溶液(EBSS)在37℃消化30分钟。轻轻吹吸解离组织。通过将视网膜细胞重悬在含卵类黏蛋白蛋白酶抑制剂(Worthington Biochemicals)的EBSS中来终止木瓜蛋白酶消化。通过将单细胞悬液的整分试样与标准浓

度的6 μ m**FLUORESBRITE®**YG 微球(Polysciences)1:1混合,然后在LSRFORTESSA™流式细胞仪(BD Biosciences)上计数,来定量总视网膜细胞。将活细胞与碘化丙锭阴性(PI⁻)细胞分开。将原代视网膜细胞重悬在流式细胞术缓冲液(含0.5%牛血清白蛋白和2mM EDTA的PBS,pH 8)中,用抗CD16/CD32(BD Biosciences)孵育30分钟以阻断非特异性染色。用**PE-CY7®**缀合的抗CD11b(克隆 M1/70,BD Biosciences)、APC缀合的抗CD90.2(克隆53-2.1,BD Biosciences)、ALEXA**FLUOR®**700缀合的抗CD45(克隆30-F11,BioLegend)、FITC缀合的抗ST2(克隆DJ8,MD Bioproducts)、PE缀合的抗CCR2(R&D systems)及FITC缀合的抗Ly6C和PE缀合的抗CD115(克隆AFS98,eBioscience)染色小鼠视网膜细胞。用**PE-CY7®**缀合的抗 CD11b/c(克隆OX-42,BD Biosciences)、APC缀合的抗CD90(克隆OX-7, BD Biosciences)和/或ALEXA**FLUOR®**700缀合的抗CD45(克隆OX-1,BioLegend)染色大鼠视网膜细胞。

[0647] 为了检测小鼠和大鼠二者的胞内标记,按照厂家的说明书用抗体缀合试剂盒(Abcam)产生了以下荧光团缀合的抗体:PE缀合的抗视锥细胞抑制蛋白(CAR)(EMD Millipore)、**PE-CY7®**缀合的抗视紫红质(Rho)(克隆1D4, EMD Millipore)、**PerCP-CY5.5®**缀合的抗胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)(克隆GA5,Thermo Scientific)。ALEXA**FLUOR®**647缀合的抗波形蛋白(克隆D21H3)购自Cell Signaling Technology。按厂家说明书用紫色可固定活率染料(Life Technologies)染色细胞,固定,并用INTRAPREP™透化试剂(Beckman Coulter)透化。然后用抗体混合物染色细胞30分钟,洗涤,并在LSRFORTESSA™流式细胞仪上分析。按与针对原代视网膜细胞所述相同的方式进行rMC-1细胞中的ST2、波形蛋白和GFAP的染色。所有数据用BD FACSDIVA™软件获取,并用**FLOWJO®**软件(FlowJo)分析。通过将每种细胞类型的百分比乘以总的活视网膜细胞来计算视杆细胞(Rho⁺CAR⁻)、视锥细胞(Rho⁻CAR⁺)、神经节细胞(CD90⁺CD45⁻)、小胶质细胞(CD11b⁺CD45^{lo})和巨噬细胞(CD11b⁺CD45^{hi})的总数。

[0648] rMC-1刺激

[0649] 将rMC-1细胞(Kerafast)维持在含10%热灭活胎牛血清(FBS)、100 U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的Dulbecco改进Eagle培养基中的低葡萄糖(5.5mM)(LG-DMEM)中。对于高葡萄糖刺激,将5x 10⁵细胞在6孔板中在2ml含2%FBS的LG-DMEM中过夜培养。用含2%FBS的LG-DMEM或含高葡萄糖(25mM)的DMEM(HG-DMEM)更换培养基,并培养至多72小时。通过按照厂家说明书用FITC膜联蛋白V凋亡检测试剂盒(BD Biosciences)对细胞进行膜联蛋白V和碘化丙锭(PI)染色来测定细胞活率。收集培养物上清,通过ELISA和Western印迹分析IL-33表达。对于rMC-1细胞的IL-33刺激,将2x 10⁵细胞于12孔板中培养于1ml 含10%FBS的LG-DMEM,并用大鼠IL-33(1、10或100ng/ml)刺激24 小时。通过在10 μ g/ml IL-33TRAP或对照Fc蛋白质存在下用IL-33刺激细胞来测定IL-33对rMC-1细胞的依赖ST2的活性。通过ELISA测量培养物上清中的CCL2水平。为了测定IL-33在rMC-1细胞中的自分泌活性,在10 μ g/ml IL-33TRAP或对照Fc蛋白质存在下用上述高葡萄糖培养基刺激细胞所示多种时间。收集RNA和培养物上清分别通过qPCR和ELISA 进行CCL2表达分析。

[0650] ELISA

[0651] 用小鼠/大鼠 IL-33 **QUANTIKINE®** ELISA 试剂盒 (R&D Systems) 测量玻璃体、视网膜裂解物、血清和 rMC-1 培养物上清中的 IL-33 浓度。用 **QUANTIKINE®** ELISA 试剂盒 (R&D Systems) 定量 CCL2、IL-1 α 、IL-1 β 、ST2、IL-6 和 IL-13。用小鼠 IL-8 ELISA 试剂盒 (MBL International) 测量 IL-8。将视网膜裂解物中的细胞因子浓度对通过 BCA 测定 (Pierce Biotechnology) 测量的总蛋白质含量归一化。为了评估 AMD 患者玻璃体中的 IL-33 水平,在得到 Western Institutional Review Board (WIRB) 批准和患者书面知情同意书的情况下,从 Midwest Eye Institute 得到诊断患有 AMD 的患者 (1 名男性和 5 名女性,年龄 68-91 岁,中位年龄 79 岁) 及进行黄斑皱褶 (3 名男性和 9 名女性,年龄 56-79 岁,中位年龄 72 岁) 和黄斑裂孔 (5 名男性和 16 名女性,年龄 46-75 岁,中位年龄 65 岁) 手术的患者。按之前所述 (Loyet 等 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 53:6628-6637, 2012) 进行眼切开和玻璃体收集。用 25 号插管 (Alcon) 在局部麻醉下进行经结膜坦部玻璃体切除术。用人 IL-33 **QUANTIKINE®** ELISA 试剂盒 (R&D Systems) 测量玻璃体中的 IL-33 水平。

[0652] 定量 RT-PCR

[0653] 用 **RNEASY®** Plus Mini 试剂盒 (Qiagen) 从视网膜和 rMC-1 细胞分离总 RNA。用 High-Capacity cDNA 反转录试剂盒 (Applied Biosystems) 合成第一链 cDNA。用具有验证的引物和探针组的 **TAQMAN®** Gene Expression Assay (Applied Biosystems) 进行 IL-33、CCL2、ST2L、sST2、IL-6、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-18 和 GFAP 的定量 PCR (qPCR), 并通过 18s rRNA (小鼠) 或 β - 肌动蛋白 (大鼠) 的表达来归一化表达水平。为了检查 rMC-1 细胞和大鼠视网膜中 IL-33 的潜在选择性剪接变体,用跨越全长 IL-33 mRNA 的 5' 非翻译区 (5' -UTR) (外显子 1) 至终止密码子 (外显子 9) 的 PCR 引物进行 RT-PCR, 使用以下引物: 5' - TTAAGACCAGCTATCTCCCATCA-3' (SEQ ID NO:342) 和 5' - ACGTTACATCTTAGAGAGCTTAAACA-3' (SEQ ID NO:343)。按照厂家说明书用 EXPAND™ 高保真 PCR 系统 (Roche) 进行 PCR。通过在 1% 琼脂糖凝胶上电泳来分析得到的 PCR 产物。

[0654] Western 印迹

[0655] 通过 **NOVEX®** SDS 4-20% Tris-甘氨酸聚丙烯酰胺凝胶 (Life Technologies) 上的电泳来分离玻璃体、视网膜裂解物或 rMC-1 培养物上清,并用 **IBLOT®** 系统 (Invitrogen) 转移至硝酸纤维素膜。封闭后,用与大鼠 IL-33 交叉反应的山羊抗小鼠 C 端 IL-33 (AF3626, R&D Systems) 或兔抗 GAPDH (Cell Signaling) 探测膜,然后用适当的 HRP 缀合二抗 (Jackson ImmunoResearch) 探测。用 ECL Plus Western 印迹检测试剂 (GE Healthcare) 处理印迹。按照厂家说明书用 **NE-PER®** 细胞核和细胞质提取试剂 (Thermo Scientific) 制备 rMC-1 细胞的细胞核和细胞质级分。通过 BCA 蛋白质测定定量蛋白质浓度。按上文所述通过 Western 印迹针对 IL-33 表达分析等量的蛋白质。通过分别用小鼠抗 HDAC2 和抗 HSP90 (EMD Millipore) 探测印迹来验证细胞核和细胞质的亚细胞分级分离。

[0656] 微阵列分析

[0657] 用 Agilent 荧光线性扩增试剂盒将总 RNA 转化为双链 cDNA, 然后转化为 **CY®** 染料标记的 cRNA。将 **CY®** 染料标记的 cRNA 片段化, 并按 Agilent's In Situ Hybridization

Kit Plus中所述与Agilent的全小鼠基因组阵列杂交。所有样品均用**CY5®**染料标记,并针对**CY3®**染料标记的通用小鼠参考杂交。杂交后,洗涤阵列,干燥,并在Agilent的DNA微阵列扫描仪上扫描。用Agilent的Feature Extraction软件8.5分析阵列成像数据。按之前所述(Vander Lugt等Nature Immunology 15:161-167,2014)处理原始特征提取数据。过滤微阵列数据以使每个基因仅包含单个探针,在给定基因存在多个探针时选择具有最高方差的探针(Bourgon等Proc.Natl. Acad.Sci.USA 107:9546-9551,2010)。用limma软件包(Smyth,Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology 3:Article 3,2004)进行差异表达分析。为了鉴定在ST2^{-/-}小鼠中受差异调节的基因,鉴定了在ST2^{+/+}小鼠中受CLE上调的探针,选择按<0.01的Benjamini-Hochberg调整P 值显示>1.5倍改变的探针(参见例如Hochberg等Statistics in Medicine 9:811-818,1990)。将这些探针进一步过滤为在ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠间按<0.05 的Benjamini-Hochberg调整P值显示>1.25倍差异的探针。

[0658] 基因本体分析

[0659] 用G0stats R软件包(Falcon等Bioinformatics 23:257-258,2007)对鉴定为差异表达的基因进行基因本体分析。将通过ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠差异调节的基因集用作测试集,通过CLE差异调节的基因集作为考虑的所有基因。将搜索限于生物学过程本体,使用显著性条件检验。选择按0.01的名义(未调整)P值显示显著富集的基因本体项。

[0660] RNA-seq

[0661] 对于人视网膜的RNA-seq分析,在有供体书面知情同意书的情况下从 Lions Eye Institute获得无眼病史的死后健康供体眼。供体眼在死后4小时内摘出,并在收集后立即保存在**RNALATER®**中。黄斑完全包含在上下颞血管弓形组织的边界内,容易看到。用解剖剪从眼底周边剖出黄斑后,从黄斑视网膜从视网膜下的RPE和脉络膜分开。用**RNEASY®** Mini试剂盒(Qiagen)从视网膜分离总RNA。用NANODROP™8000分光光度计测定RNA浓度。如用Agilent 2100Bioanalyzer(Agilent Technologies)评估,保存在**RNALATER®**中的样品通常产生高质量。按照厂家说明书用**TRUSEQ®** RNA样品制备试剂盒(Illumina)制备RNA-seq文库,然后通过 Illumina **HISEQ®** 2000系统(Illumina)测序。按之前所述(Durinck等 Nature Genetics 47:13-21,2015)进行测序数据分析。使用GSNAP短读出比对程序(aligner)(Wu等Bioinformatics 26:873-881,2010),将测序读出定位至参考人基因组(GRCh37)。通过将比对至给定基因中的编码序列的读出的数目对编码序列的总长度和读出的总数归一化,以每千碱基每百万总读出的读出(RPKM)测量表达。

[0662] 组织学和免疫组织化学

[0663] 对于视网膜外核层(ONL)厚度的形态度量分析,将眼在Davidson固定剂(Electron Microscopy Sciences)中固定24小时。沿眼球垂直子午线切割覆盖包括视神经的整个视网膜的石蜡包埋5μm切片,并用苏木精和伊红(H&E)染色。封固切片后,使用Olympus Uplan SApo 0.75NA 20x物镜,用运行NDP Scan软件的Olympus**NANOZOOMER®** 2.0HT数字波片扫描仪(Hamamatsu)扫描波片。用**MATLAB®**(MathWorks)中的自定义自动图像分

割程序分析图像。

[0664] 只分析了切割通过视神经的切片。在从视神经乳头任一侧开始距离 0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8和1.0mm处测量了ONL厚度。对于IL33^{tm2/tm2}和IL33^{tm1/tm1}平面视网膜的成像,将眼在4%多聚甲醛中固定2小时,并在 PBS中漂洗。从眼球完整地剖出视网膜组织,用含1μg/ml DAPI (Invitrogen)的PBST缓冲液(1x PBS,0.5% **TWEEN®**-20)染色2小时,然后在PBST缓冲液中洗涤五次,并在PBS中漂洗。平面视网膜,并用40x 物镜用Nikon A1R共焦显微镜成像。图7M和图12F中的图像通过用**PHOTOSHOP®** (Adobe)微调亮度和对比进行了优化。对于大鼠眼的 IL-33和波形蛋白共染色,在Davidson固定剂中固定眼24小时,浸没在 70%乙醇中,并处理用于石蜡包埋和切片。在Dako自动染色仪平台(Dako) 上进行切片的IHC染色。再水化后,在Dako Target Retrieval Solution (Dako)中处理切片。用含5μg/ml小鼠抗IL-33单克隆抗体(mAb) mAb(克隆Nessy 1, Enzo Life Sciences)和0.18μg/ml兔抗波形蛋白mAb(Cell Signaling Technologies)或阴性对照抗体的封闭缓冲液孵育切片1小时。洗涤后,用PowerVision Poly-HRP抗小鼠IgG和Poly-AP抗兔IgG(Leica Biosystems)孵育切片30分钟,然后用二氨基联苯胺(DAB)和Fast Red/Naphthol Phosphate试剂(ScyTek)检测。用苏木精复染后,用明视野显微镜对切片成像。用1:500的兔抗GFAP多克隆抗体(DAKO)和兔抗Iba1 多克隆抗体(Wako Chemicals) (0.5μg/ml)以相同的方式进行小鼠眼的 IL-33、GFAP和Iba1染色。通过沿着以包括视神经盘的垂直子午线切割的视网膜切片的全长手动计数每一视网膜层中的Iba1⁺细胞来进行小胶质细胞定量。按照厂家说明书用**APOTAG®**过氧化物酶原位凋亡检测试剂盒 (Chemicon)进行大鼠眼切片的TUNEL染色。

[0665] 对于人眼的IHC分析,在有供体或供体家属知情同意书的情况下,从 Lions Eye Institute获得来自年龄在67-89岁范围内的7名正常供体(5名男性和2名女性)和年龄在82-92岁范围内的7名AMD患者(2名男性和5名女性)的眼。按上文所述固定眼和切片。用上述抗IL-33、波形蛋白、GFAP 和Iba1抗体及内部制备的小鼠抗PLVAP单克隆抗体进行IL-33、波形蛋白、GFAP、Iba1和PLVAP的荧光IHC共染色,然后用适当的荧光染料标记二抗或荧光染料TSA(酪胺信号放大)染色,并用DAPI复染。用上文所述波片扫描仪扫描波片。对于图5A-5C、5E和6A-6B中的图像,用NDP view 2软件(Hamamatsu)略微调节了亮度,以更好地显示信号,但一张图内的所有图像都类似地修饰。通过沿着正常眼的中央和外周区域或AMD 眼的病灶和非病灶中约500μm长的区域手动计数IL-33⁺和Iba1⁺细胞来进行IL-33⁺和Iba1⁺细胞定量。

[0666] 统计学分析

[0667] 除非另有说明,所有数据均用Prism 6软件(GraphPad)分析和作图。对于组间比较,按所示用不成对双尾Student t检验或ANOVA进行统计学分析。P值<0.05视为显著。

[0668] 实施例4.阻断IL-33途径和IL-13途径二者与单独阻断任一途径相比导致肺中2型炎症的更大抑制

[0669] A.2型(Th2)炎症的巴西钩虫(*Nippostrongylus brasiliensis*)模型

[0670] 细胞因子IL-33和IL-13在2型免疫反应中促进炎症,大多数数据支持IL-33在调节IL-13表达中的作用。值得注意的是,IL-33途径或IL-13 途径的丧失减弱2型炎症反应,揭示了各细胞因子在体内的非冗余作用。但是,尚不清楚IL-33信号的缺乏是仅仅由于IL-13

的减少还是由于其他炎症途径的抑制而影响2型免疫。

[0671] 为了研究此问题,在存在或缺乏抗鼠IL-13的中和抗体的情况下用在体内引起2型炎症的物质攻击ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠。寄生虫巴西钩虫在肺和肠中引起急性2型炎症反应,其特征性在于嗜酸性粒细胞转移入组织和Th2 细胞因子产生(IL-4、IL-5、IL-13)(参见例如Frontiers in Immunology 4(74):1,2013)。先天性和适应性免疫途径都为抗寄生虫免疫所需。用抗IL-13或对照抗豚草抗体处理ST2^{+/+}小鼠来评价IL-13在2型肺炎中的作用(图14A)。同样,用对照或抗IL-13抗体处理ST2^{-/-}小鼠来在体内评估IL-33 的贡献及IL-13和IL-33的组合贡献。与之前的报道(参见例如Nature 464:1367)一致,巴西钩虫感染在ST2^{+/+}小鼠的BALF和肺组织中都引起强烈的嗜酸性粒细胞性炎症,该炎症在缺乏ST2的情况下显著减弱(即如ST2^{-/-}小鼠中所示)。类似地,用抗IL-13的中和抗体处理导致BALF和组织嗜酸性粒细胞显著减少。令人惊奇地,IL-33信号发放和IL-13二者的联合阻断导致嗜酸性粒细胞转移入肺的更大抑制,水平与首次用于实验的对照相当(图14B)。此外,在ST2^{-/-}小鼠的BALF中未检测到IL-13,与IL-33 在IL-13诱导中的作用一致。此外,两条途径的联合阻断导致BALF中的IL-4和IL-5比单独阻断任一途径降低得更多(图14C)。

[0672] 材料和方法

[0673] 通过第0天在胁腹处皮下注射含500个巴西钩虫(*N.brasiliensis*)L3幼虫的200μl盐水来感染7-9周龄雌性ST2^{+/+}和ST2^{-/-}Balb/C小鼠。注射后,将动物放置在含多粘菌素b和新霉素的水上5天。在感染后第-1、1、3、6 和8天通过腹腔内(i.p.)注射施用抗体(200μg/小鼠,于200μl PBS中)(参见图14A)。在感染后第10天处死动物进行肺部炎症分析。收集支气管灌洗液(BALF)和灌洗肺组织进行流式细胞术和蛋白质分析。用首次用于实验的ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠作为对照。

[0674] 对于肺组织处理,在2mg/ml胶原酶D(Roche)中37℃消化灌洗肺1 小时,并按厂家说明书用GENTLEMACS™C管(Miltenyi)解离。用Fc Receptor Block(2.4G2;BD Pharmingen)孵育单细胞悬液15分钟,然后用抗体冰上染色30分钟。用以下抗体分析了嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞:生物素化抗CD45(30-F11;eBioscience)、别藻蓝蛋白/Cy7抗CD11b(M1/70;BD Pharmingen)、藻红蛋白/Cy7抗CD11c(HL3;BD Pharmingen)、藻红蛋白抗Siglec-F(E50-2440;BD Pharmingen)、别藻蓝蛋白抗F4/80(BM8;eBioscience)、异硫氰酸荧光素抗Gr-1(RB6-8C5;BD Pharmingen)及随后的链霉抗生物素蛋白PACIFIC ORANGE™(S32365; Molecular Probes)。通过ELISA测量BALF细胞因子。

[0675] B. TNP-OVA研究

[0676] 上文在本实施例章节A中描述的巴西钩虫感染模型是对病原体的急性反应,认为其不反映在慢性过敏性炎症中观察到的抗原诱导的炎症。用完善的气道炎症TNP-OVA致敏/攻击模型研究了IL-33途径和IL-13途径在过敏性炎症中的冗余性的问题。在此模型中,设置了针对TNP-OVA抗原的适应性免疫反应,其特征性在于嗜酸性粒细胞转移入组织及T细胞IL-5 和IL-13细胞因子产生。

[0677] 在存在或缺乏抗IL-13阻断抗体的情况下用TNP-OVA/Alum致敏并用TNP-OVA攻击ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠。与使用抗IL-33或ST2的中和试剂的研究一致,TNP-OVA致敏/攻击后在ST2^{+/+}小鼠中观察到的强烈的嗜酸性粒细胞性炎症在ST2^{-/-}品系中显著减弱(参见例如Exp.Lung Research 40(2):66,2014)。如之前已证明,IL-13的抑制还减弱肺组织嗜酸性粒

细胞的累积 (Taube等, J. Immunol. 169 (11) :6482, 2002)。与上文在本实施例章节 A中所述的巴西钩虫感染一致, IL-33信号发放和IL-13的联合阻断使嗜酸性粒细胞内流入肺降低至在首次用于实验的小鼠中观察到的水平 (图 15A)。对TNP-OVA抗原的T细胞反应的分析再次揭示, 两条途径的缺乏对IL-13和IL-5产生具有比单独抑制每条途径更大的影响 (图15B)。

[0678] 本章节中及本实施例章节A中所述的体内研究证明, 与单独阻断任一途径相比, 阻断IL-33和IL-13二者对2型肺炎具有更大的影响, 突出了 IL-33和IL-13的非重叠功能。巴西钩虫寄生虫感染导致先天性和适应性免疫成分的激活, 而TNP-OVA研究是对抗原的适应性免疫反应的经典模型。虽然模型反映了型炎症的不同方面, 但都强调IL-13和IL-33在介导嗜酸性粒细胞性炎症中的作用, 两条途径的抑制完全废除了此反应。这些数据强调IL-33促进炎症的附加功能, 及阻断IL-33和IL-13二者将为2型免疫障碍 (包括IL-33介导的障碍, 如哮喘) 带来的附加益处。

[0679] 材料和方法

[0680] 通过第0天腹腔内 (i.p.) 注射含50 μ g TNP-OVA和2mg alum的100 μ l PBS来致敏7-8周龄雌性ST2^{+/+}和ST2^{-/-} Balb/C小鼠 (Biosearch Technologies)。每组使用七只小鼠。致敏后第35天开始, 连续7天通过喷雾器用含1% TNP-OVA的PBS气溶胶攻击小鼠。致敏后第35-41天腹腔内施用抗gp120IgG1或抗小鼠IL-13IgG1 (100 μ g/小鼠, 于200 μ l PBS 中)。在第42天处死动物进行肺部炎症分析。收集BALF和灌洗肺组织进行流式细胞术和蛋白质分析。收集纵膈淋巴结进行T细胞记忆分析。用首次用于实验的ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠作为对照。通过ELISA测量BALF细胞因子水平。在2mg/ml胶原酶D (Roche) 中37 $^{\circ}$ C消化灌洗肺1小时, 并按厂家说明书用GENTLEMACSTM C管 (Miltenyi) 解离。用Fc Receptor Block (2.4G2; BD Pharmingen) 孵育单细胞悬液15分钟, 然后用抗体冰上染色30分钟。用以下抗体分析了嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞: 生物素化抗CD45 (30-F11; eBioscience)、别藻蓝蛋白/Cy7抗CD11b (M1/70; BD Pharmingen)、藻红蛋白/Cy7抗CD11c (HL3; BD Pharmingen)、藻红蛋白抗Siglec-F (E50-2440; BD Pharmingen)、别藻蓝蛋白抗F4/80 (BM8; eBioscience)、异硫氰酸荧光素抗Gr-1 (RB6-8C5; BD Pharmingen) 及随后的链霉抗生物素蛋白PACIFIC ORANGETM (S32365; Molecular Probes)。

[0681] 对于体外T细胞记忆测定, 在存在或缺乏100 μ g/ml TNP-OVA (Biosearch Technologies) 的情况下在含10% FBS并补充L-谷氨酰胺和青霉素/链霉素的RPMI 1640培养基中培养来自纵膈淋巴结的单细胞悬液 (每孔 3×10^5 细胞) 6天。6天后, 通过**CELLTITER-GLO®** Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 测量细胞增殖, 并收集上清用于通过ELISA进行细胞因子水平分析。

[0682] 实施例5. IL-33调节肥大细胞脱粒和细胞因子分泌

[0683] A. IL-33在体外和在体内增强抗原诱导的肥大细胞脱粒

[0684] 抗原-IgE复合物刺激肥大细胞导致血管活性和促炎性介质从之前形成的粒快速释放。这些介质 (包括组胺、蛋白酶和蛋白聚糖) 作为对抗入侵病原体的一线防御。为了确定IL-33是否增强了此反应, 用IgE致敏肥大细胞24小时, 并在存在或缺乏IL-33的情况下用抗IgE刺激1小时。虽然 IL-33本身不诱导脱粒, 但它显著增强 β -氨基己糖苷酶、类胰蛋白酶和组胺的脱粒 (图16A)。

[0685] 为在体内确认依赖IL-33的肥大细胞活化和脱粒的增强, 使用了被动全身性过敏

反应的模型。用抗二硝基苯基 (抗DNP) IgE致敏28小时后,用含或不含IL-33的DNP-HAS攻击ST2^{+/+}和ST2^{-/-}小鼠。将过敏反应测量为1小时过程内的体温降低(图16B)。类似于上述体外研究,在缺乏抗原的情况下,IL-33不促进过敏反应(图16C)。同样,FcεRI (FcεRI) 激活后ST2^{+/+}和ST2^{-/-}显示相似的体温变化(图16D)。但是,与体外研究一致,如与对照组相比更大的体温下降所证明,IL-33的加入增强了肥大细胞反应(图16E)。

[0686] B. IL-33增强了抗原诱导的肥大细胞细胞因子分泌

[0687] 除脱粒外,肥大细胞通过分泌细胞因子和趋化因子促进宿主防御。为了评价IL-33在肥大细胞细胞因子释放中的作用,用IgE致敏肥大细胞24小时,并在存在或缺乏IL-33的情况下用抗IgE刺激72小时。抗原刺激导致IL-8分泌,IL-33的加入增强了IL-8分泌(图16F)。FcεRI交联单独不导致IL-5或IL-13的分泌(图16F)。如早先所报道,IL-33刺激IL-5和IL-13的释放,FcεRI刺激的加入显著增加了该释放。此外,观察到IL-33介导TNF-α和IL-10从肥大细胞释放(图16G)。微阵列分析揭示,IL-33诱导许多趋化因子、细胞因子和生长因子(图16H)(参见例如Nagarkar等J. Allergy Clin. Immunol. 136(1):202-205, 2015)。这些结果突出了IL-33在促进肥大细胞反应和防御机制中的作用。

[0688] C. 材料和方法

[0689] 体外肥大细胞测定

[0690] 按之前所述(参见例如Nagarkar等J. Allergy Clin. Immunol. 136(1):202-205, 2015)分离肥大细胞。源自10名供体的外周血来源CD34⁺细胞购自Stemcell Technologies (Vancouver, BC, 加拿大),并按之前所述在IL-6和SCF存在下向原代培养的体外CD34⁺来源人肥大细胞分化12周时间。在第0周,将细胞悬浮在含200ng/ml SCF、50ng/ml IL-6、5ng/ml IL-3、11μM 2-巯基乙醇(2-ME, Invitrogen (Carlsbad, CA))、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素(Invitrogen)的Iscove's甲基纤维素培养基(METHOCULTTM SFBIT H4236, Stemcell Technologies)中,然后在5% CO₂中37℃孵育。培养2周后,在甲基纤维素培养物上加上一层含200 ng/ml SCF、50ng/ml IL-6、11μM 2-ME、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的新鲜甲基纤维素培养基。培养4周后,在甲基纤维素培养物上加上一层1ml整分试样的补充了200ng/ml SCF、50ng/ml IL-6、胰岛素-转铁蛋白-硒(Invitrogen)、55μM 2-ME、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)。培养6周后,用PBS溶解甲基纤维素培养基后回收所有细胞。然后重悬细胞,培养在补充了100 ng/ml SCF、50ng/ml IL-6、0.1% BSA、胰岛素-转铁蛋白-硒、55μM 2-ME、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的IMDM中,一周后更换培养基。再培养一周后,将培养基转换为补充了100ng/ml SCF、50ng/ml IL-6、5% FBS (Invitrogen)、55μM 2-ME、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的IMDM。然后每周更换培养基,再孵育细胞5-7周。12周结束时,预期大多数非肥大细胞被消耗。通过在培养12周后在用1μg/ml骨髓瘤IgE (EMD Millipore, Billerica, MA)处理48小时后用流式细胞术测量FcεRI表达来测定肥大细胞的最终纯度。肥大细胞的最终纯度为90%。以这种方式产生了来自10名独立供体的肥大细胞。

[0691] 对于IL-33刺激的肥大细胞的微阵列分析,一式两份地用10ng/ml IL-33刺激来自两名供体的肥大细胞(1×10⁶细胞/ml)24小时的时期。然后收集RNA进行微阵列分析。为了测定IL-33反应,按所示(图16A)用IL-33刺激肥大细胞48小时。收集无细胞上清,按照厂家说明书用Meso Scale Discovery Th1/Th2 10-plex panel (MSD, Rockville, MD)分析IL-5、

IL-13、IL-4、IL-10和TNF- α 水平。对于IL-33和IgE交联共刺激实验,在存在或缺乏10 μ g/ml抗IgE(411520;EMD Millipore)的情况下按所示用IL-33 刺激IgE致敏的肥大细胞(0.5x10⁶细胞/ml),72小时后收集无细胞上清。用IL-8(DY208;R&D systems)、IL-5(88-7056;eBioscience)和IL-13 (88-7439;eBioscience)的ELISA试剂盒分析释放的细胞因子水平。

[0692] 脱粒

[0693] 将人肥大细胞脱粒测量为所释放的 β -氨基己糖苷酶、类胰蛋白酶和组胺占总细胞内容物的百分比。用10 μ M的钙离子载体A23187(C7522; Sigma Aldrich)作为阳性对照。用2 μ g/ml纯化人IgE(AG30P;EMD Millipore)致敏肥大细胞24小时。洗涤致敏的肥大细胞,按6.25x10⁶细胞 /ml重悬在Tyrode缓冲液(10mM HEPES、130mM NaCl、6.2mM D-葡萄糖、3.0mM KCl、1.4mM CaCl₂、1.0mM MgCl₂和0.1%BSA)中。将肥大细胞(6.25x10⁴/孔)一式三份接种在96孔v形底平板中,并在存在或缺乏 100ng/ml人IL-33的情况下以20 μ l终体积用10 μ g/ml抗IgE(411520; EMD Millipore)刺激1小时。收集细胞上清,并用20 μ l含0.5%TRITONTM X-100的Tyrode缓冲液裂解细胞沉淀。通过使用荧光测定来测定 β -氨基己糖苷酶释放。用50 μ l含4mM对-硝基苯基-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷(N9376, Sigma Aldrich)的0.1M柠檬酸缓冲液pH 4.5孵育上清和细胞裂解物(10 μ l)1小时,加入150 μ l 0.2M甘氨酸来终止反应。在ELISA酶标仪中测量 405nm吸光度。按照厂家说明书用肥大细胞脱粒测定试剂盒(IMM001; EMD Millipore)计算上清和细胞裂解物中的类胰蛋白酶水平和活性。按照厂家说明书(409010; Neogen)用组胺ELISA试剂盒测定上清和细胞裂解物中的组胺水平。

[0694] 被动全身性过敏反应

[0695] 在第0天通过静脉注射(i.v.)用含200 μ g DNP小鼠IgE(Biosearch Technologies)的200 μ l盐水致敏7-8周龄雌性ST2^{+/+}和ST2^{-/-}Balb/C小鼠。每组使用五只小鼠。28小时后,含100 μ g DNP-HAS(Biosearch Technologies)、2 μ g鼠IL-33(R&D Systems)或二者的组合的200 μ l盐水静脉注射攻击小鼠。攻击后通过用扫描仪按5分钟间隔扫描所植入的芯片1 小时来测量体温。

[0696] 基因表达分析

[0697] 按之前所述进行RNA提取和PCR(参见例如Nagarkar等J.Allergy Clin.Immunol.136(1):202-205,2015)。用Qiagen **RNEASY®**试剂盒(Germantown, MD)从肥大细胞提取总RNA。用来自Bio-Rad(Hercules, CA)的ISCRIPTMReverse Transcription Supremix从总RNA产生cDNA。用**TAQMAN®** Gene Expression Assays(Applied Biosystems,Foster City, CA)进行cDNA的扩增。除非另有说明,基因表达的倍数变化是与各自的培养基对照相比。对于微阵列分析,对来自肥大细胞样品的RNA进行Agilent单轮扩增。

[0698] 微阵列分析和统计学

[0699] 按所述(参见例如Nagarkar等J.Allergy Clin.Immunol.136(1): 202-205,2015)进行微阵列和统计学分析。分别用ND-1000分光光度计(Thermo Scientific,Wilmington, DE,USA)和Bioanalyzer 2100(Agilent Technologies,Santa Clara,CA,USA)测定总RNA样品的数量和质量。按照厂家说明书(Agilent Technologies)制备**CY®**染料标记的cRNA制

备物和阵列杂交。

[0700] 简言之,用Agilent Quick Amp Labeling试剂盒将总RNA样品转化为双链cDNA,然后转化为**CY®**染料标记的cRNA。用**RNEASY®** Mini试剂盒 (Qiagen) 纯化标记的cRNA。用ND-1000分光光度计 (Thermo Scientific) 测定cRNA产率和**CY®**染料掺入。将750ng标记的cRNA片段化,并与 Agilent全人基因组4 44K v2阵列杂交。所有样品均用**CY®**5染料标记,并针对**CY®**3染料标记的通用参考 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 杂交。样品在65°C杂交17小时。杂交后,洗涤阵列,干燥,并用Agilent 扫描仪扫描。用Agilent Feature Extraction软件版本11.5来分析所获取的阵列图像。所有统计学计算都用R Projec软件包版本2.15.1进行。用 arrayQualityMetrics package for R评估阵列质量控制。用Bioconductor 的vsn软件包归一化微阵列和转化探针强度。用genefilter软件包进行微阵列数据的独立过滤来提高统计功效,以检测真阳性同时保持I型误差控制。

[0701] 由于不变或不对应于Entrez基因转录物的阵列特征对差异基因表达分析而言通常不具信息,所以进行了基于注释和表达变异性的过滤。简言之,按以下进行过滤:1) 仅保留代表Entrez或CCGf基因的阵列特征;2) 根据最高四分位数间距 (IQR) 将对应单个Entrez基因的多个阵列特征简化为单阵列特征;和3) 用Bioconductor的limma软件包进行基因表达微阵列数据的线性模型检验统计。简言之,此方法利用等同于使估计样本方差向合并估计值收缩的经验Bayes法,在阵列数受限时得到稳定得多的推断。差异表达检验统计量估计为包括处理作为因素的模型的线性反差。利用 Benjamini和Hochberg的方法研究了解释多重假设检验的调整P值。

[0702] 实施例6. IL-33轴在K/BxN血清转移关节炎模型中的促炎症作用

[0703] A. IL33或ST2的丧失改善关节炎疾病

[0704] K/BxN血清包含形成免疫复合物的抗葡萄糖-6-磷酸异构酶 (GPI) 自身抗体。对首次用于实验的具有免疫能力的小鼠施用这些免疫复合物诱导类似于类风湿性关节炎的病理,如关节肿胀、骨侵蚀、免疫细胞浸润及细胞因子和趋化因子增加。这些反应依赖于先天免疫系统,包括补体旁路、肥大细胞和嗜中性粒细胞。肥大细胞尤其是在疾病起始期间的非冗余作用之前已得到证明 (参见例如Lee等Science 297:1689-1692, 2002)。鉴于IL-33 在肥大细胞活化中的作用 (如实施例6中所证明), 在IL33^{-/-} (图17A) 和ST2^{-/-} (图17B-17D) 小鼠中检查了疾病活性。与之前的报道一致,ST2缺陷导致关节炎减轻。在IL33^{-/-}小鼠中观察到了相似的观察结果。这些数据扩展了证明IL-33可以影响肥大细胞功能的多个方面 (包括促炎症细胞因子分泌、存活和脱粒) 的细胞研究。

[0705] B. 材料和方法

[0706] 通过使ST2^{+/+}和ST2^{-/-} Balb/C品系回交10代来产生雌性ST2^{+/+}和ST2^{-/-} C57B1/6小鼠。在第0天对7-8周龄小鼠静脉内 (i.v.) 施用20μl关节病 (arthrogenic) K/BxN血清。每组使用10只小鼠。首先测试血清来确定在 ST2^{+/+}小鼠中诱发关节炎所需的最适量。每天检查鼠爪的关节炎迹象。用以下度量通过目测观察对疾病程度进行评分:

[0707] 0=无红斑和肿胀迹象;

[0708] 1=限于足中段 (足弓) 或踝的红斑和轻度肿胀;

[0709] 2=从踝扩展至足中段的红斑和轻度肿胀;

[0710] 3=从踝扩展至跖关节的红斑和中度肿胀;

[0711] 4=包括踝、足和趾的红斑和严重肿胀。

[0712] 数据作为平均得分作图,平均得分是四个爪子得分的总和。用以下度量确定疾病严重程度:

[0713] 轻度(平均得分0-3);

[0714] 中度(平均得分4-8);

[0715] 严重疾病(平均得分9分以上)。

[0716] 平均得分反映所累及的关节数。

[0717] 在第0天对7-8周龄雌性IL33^{+/+}和IL33^{-/-}C57BL/6小鼠静脉内(i.v.)施用70μl关节病K/BxN血清。每组使用5只小鼠。再次测试血清来确定在IL33^{+/+}品系中诱发关节炎所需的最适量。按上文所示进行疾病活性的评分。

[0718] 实施例7. IL-33诱导的巨噬细胞招募入肺不依赖于IL-4、IL-5和IL-13

[0719] 本文所述的体内研究示例了IL-33在促进2型炎症(包括例如嗜酸性粒细胞招募至组织)中的非冗余作用。但是,IL-33还诱导并非专一性与2型免疫关联的宿主防御的其他成分。巨噬细胞尤其有助于抗微生物反应和组织稳态的多个方面,包括吞噬作用、细胞因子和生长因子分泌及创伤修复。它们的功能的中心是招募至感染部位,这部分地由诸如IL-33的细胞因子介导。

[0720] 为确定IL-33诱导的巨噬细胞转移入肺是否依赖于2型细胞因子,从而指示IL-33在免疫中的功能的更宽方面,在存在或缺乏抗IL-4、IL-5和IL-13的中和抗体的情况下用IL-33处理小鼠(图18A-18C)。鉴于这些细胞因子在肺炎中的作用,分析了BALF细胞构成。与这些细胞因子在嗜酸性粒细胞转移中的作用一致,阻断IL-4、IL-5和IL-13时完全废除了IL-33诱导的嗜酸性粒细胞浸润入BALF(图18C)。但是,巨噬细胞浸润入肺未被此处理扰乱(图18B),强调IL-33除诱导IL-4、IL-5和IL-13之外的独特特性。鉴于巨噬细胞在宿主防御中的作用,这些数据表明IL-33在体内除传统的2型免疫反应之外的备选功能。

[0721] 材料和方法

[0722] 7-8周龄的雌性C57BL/6小鼠购自Jackson Laboratory。每组使用五只小鼠。重组小鼠IL-33(氨基酸109-266)购自R&D Systems。对照组动物仅接受盐水处理。从第0天至第7天,小鼠每天腹腔内(i.p.)注射100μg对照抗体或抗IL-4、IL-5和IL-13的中和抗体(抗IL-4和抗IL-5来自R&D Systems,抗IL-13为内部产生)(图18A)。从第1天至第7天,小鼠每天腹腔内注射0.5μg重组鼠IL-33。小鼠在第8天安乐死,并收集支气管灌洗液(BALF)。通过流式细胞术分析评估细胞计数。用Fc Receptor Block (2.4G2;BD Pharmingen)孵育BALF细胞15分钟,然后用抗体冰上染色30分钟。用以下抗体分析了嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞:生物素化抗CD45(30-F11;eBioscience)、别藻蓝蛋白/Cy7抗CD11b(M1/70;BD Pharmingen)、藻红蛋白/Cy7抗CD11c(HL3;BD Pharmingen)、藻红蛋白抗Siglec-F(E50-2440;BD Pharmingen)、别藻蓝蛋白抗F4/80(BM8;eBioscience)、异硫氰酸荧光素抗Gr-1(RB6-8C5;BD Pharmingen)及随后的链霉抗生物素蛋白PACIFIC ORANGE™(S32365;Molecular Probes)。

[0723] 实施例8. 抗IL-33单特异性和抗IL-33/抗IL-13双特异性抗体的表征

[0724] 我们之前建立了在大肠杆菌中产生具有两条不同轻链的人IgG1双特异性抗体的

技术(Yu等,2011,Sci Transl Med 3,84ra44)。该方法用杵入臼技术(参见例如美国专利号5,731,168,Ridgway等,1996,Protein Eng.9, 617-621;Atwell等,1997,J Mol Biol 270, 26-35,在此以其整体引入作为参考)来促进免疫球蛋白重链的异二聚化。为了能够使用两条不同的轻链而无轻链错配,我们在分开的大肠杆菌细胞中作为半抗体培养每条臂。通过将抗IL-33和抗IL-13亲本抗体亚克隆入允许将抗IL-33臂表达为人IgG4臼和将抗IL-13臂表达为人IgG4杵的载体,我们用此方法来产生抗 IL-13/IL-33双特异性抗体。

[0725] 用杵入臼(KIH)技术产生了称为10C12.38.H6.87Y.58I/IL-13IgG4的双特异性抗IL-33/抗IL-13抗体。10C12.38.H6.87Y.58I/IL-13IgG4的抗IL-33 臂具有对应于抗体10C12.38.H6.87Y.58I的VH氨基酸序列SEQ ID NO: 36和VL氨基酸序列SEQ ID NO:37。10C12.38.H6.87Y.58I/IL-13IgG4的抗IL-33臂具有VH氨基酸序列SEQ ID NO:302和VL氨基酸序列SEQ ID NO:303。10C12.38.H6.87Y.58I/IL-13IgG4的抗IL-33臂具有重链氨基酸序列SEQ ID NO:306和轻链氨基酸序列SEQ ID NO:307, 10C12.38.H6.87Y.58I/IL-13IgG4的抗IL-13臂具有重链氨基酸序列SEQ ID NO:304和轻链氨基酸序列SEQ ID NO:305。

[0726] 我们将双特异性抗体的抗IL-13CDR放置在之前产生和表征的 lebrikizumab基础之上。参见例如PCT公开号WO 2005/062967。对于双特异性抗体,与lebrikizumab相比,抗IL-13抗体在FR区中具有两个变异:重链上的Q1E和轻链上的M4L。

[0727] 对于抗体表达,使用了大肠杆菌菌株64B4。在LB(100µg/ml羧苄青霉素)中30℃培养过夜培养物,1:100稀释入5ml CRAP培养基(100µg/ml 羧苄青霉素)(Simmons等,2002,J.Immunol.Methods,263:133-147),并在 30℃培养24小时。

[0728] 为放大至10L发酵罐,将初始起子培养物(500ml)培养至稳定期,并用于接种10L发酵(Simmons等,2002,J.Immunol.Methods,263:133-147)。培养10L补料分批培养物,通过微流体学收获全部发酵液。然后用终浓度 0.4%PEI(v/v)4℃过夜处理裂解的细胞。然后15,000x g离心各混合物20 分钟,然后通过0.22µm滤器过滤。然后在400mL MabSURE SELECT柱(GE Healthcare Life Sciences)上4℃捕获IL-33抗体。用25mM TRIS pH 7.5、150mM NaCl、2mM NaN₃(TBS)洗涤柱至基线,然后用含0.1%Triton X-114、0.4M KPO₄、5mM EDTA、0.2%聚山梨酯20、1mM叠氮化钠、pH 7.0的TBS洗涤,最后用TBS洗涤至基线。然后用0.1M醋酸pH 2.7 洗脱IL-33臂,用1M精氨酸/琥珀酸pH 9.0调节洗脱混合物至pH 5.0。

[0729] 通过液相色谱电喷雾离子化飞行时间质谱(LC-ESI/TOF)分析确认 IL-33和IL-13半抗体的同一性。通过4-20%梯度Tris-甘氨酸SDS PAGE 凝胶分析纯度,通过SEC测定聚集体水平。

[0730] 两种半抗体的组装反应之后,通过疏水作用、阳离子交换和凝胶过滤层析纯化双特异性抗体。具体而言,对于组装,按1:1摩尔比将半抗体混合在含200倍摩尔过量的GSH的精氨酸琥珀酸pH 8.5中,室温4天,然后加入5mM DHAA,4℃16小时。用pH 6.5的含25%异丙醇的硫酸铵梯度在疏水层析柱(Thermo ProPac HIC-10)上分级分离此材料。然后将含 IL-13/IL-33双特异性抗体的混合物透析入20mM组氨酸pH 5.5(H缓冲液),上样至阳离子交换柱(SPFF,GE Healthcare Life Sciences),用含0.1% Triton X114、0.1%Triton X100的H缓冲液过夜洗涤,用H缓冲液洗涤至基线,然后用300mM精氨酸琥珀酸pH 5.5洗脱。混合双特异性抗体级分,上样至大小排阻层析柱(S200,GE Healthcare Life Sciences)。将含有纯化的抗IL-13/IL-33双特异性抗体的级分混合,透析,并分装。

[0731] 用使用报道细胞系的和原代人细胞中的基于细胞的阻断测定二者,检查了单特异性抗IL-33抗体(10C12.38.H6.87Y.58I IgG4)和双特异性抗 IL-33/抗IL-13双特异性抗体10C12.38.H6.87Y.58I/IL-13IgG4(本文中也称为“10C12-IL-13KIH IgG4”)作为人IL-33细胞活性抑制剂的功效。针对诱饵受体ST2-LZ的细胞功效测试了单特异性抗IL-33IgG4和双特异性抗 IL-33/抗IL-13IgG4型式。

[0732] IL-33刺激HEK-BLUE™IL-33细胞导致强烈的NF-κB和AP-1激活,该激活通过NF-κB/AP-1驱动的SEAP报道分子活性测量。对照IgG4抗体的加入未扰乱活性。单特异性抗IL-33抗体10C12.38.H6.87Y.58I IgG4 和双特异性抗体10C12-IL-13KIH IgG4都显示有效的剂量依赖性IL33活性抑制,IC₉₀值分别为102.1和204.7pM(图19A)。如预期,双特异性抗体活性的IC₉₀值约为针对单特异性副本获得的值的一半。两个克隆都显示对诱饵受体ST2-LZ的更大抑制(参见实施例2)。

[0733] 除使用HEK-BLUE™细胞的基于细胞的阻断测定外,还针对原代细胞中的IL-33活性的抑制测试了单特异性抗IL-33抗体 10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和双特异性抗体10C12-IL-13KIH IgG4。向人嗜碱性粒细胞中加入IL-33导致信号发放分子p38的快速磷酸化,其可用胞内染色法通过流式细胞术来测量(图19B)。通过加入CD123标记,可以在大量外周血单核细胞(PBMC)群体内检查嗜碱性粒细胞活性,避免了进行细胞分离的需要(图19B)。使用这种基于流式细胞术的方法,针对嗜碱性粒细胞中IL-33诱导的磷酸化p38(磷酸-p38)的阻断检查了单克隆和双特异性抗体克隆(图19C)。与上文所述的报道细胞数据一致,加入单特异性抗IL-33抗体10C12.38.H6.87Y.58I IgG4或双特异性抗体10C12-IL-13 KIH IgG4导致嗜碱性粒细胞中IL-33诱导的磷酸-p38水平的剂量依赖性抑制(图19D)。对照IgG4抗体未影响IL-33信号(图19D)。

[0734] 用**BIACORE®** 3000 SPR评估了双特异性抗体10C12-IL-13 KIH IgG4与人IL-33、食蟹猴IL-33和人IL-13的结合动力学(图20)。表4中显示此抗体在使用不同抗体制备物的三次实验中的平均K_D。

[0735] 表4: 双特异性抗体10C12-IL-13 KIH IgG4对IL-33和IL-13的K_D

[0736]	K _D (nM) 人 IL-33	K _D (nM) 食蟹猴 IL-33	K _D (nM) 人 IL-13
	0.025	0.076	<0.010

[0738] 材料和方法

[0739] HEK-BLUE™IL-33/IL-1β报道细胞购自Invivogen(Catalog# hkb-il33)。将300pg/ml IL-33配体(IL-33N-His,SEQ ID NO:314)和预稀释的抗IL-33抗体对照IgG4、抗IL3310C12.38.H6.87Y.581IgG4、10C12-IL13KIH IgG4或ST2LZ(SEQ ID NO:319)混合,室温孵育1小时。将抗体和配体混合物转移至按每孔50,000细胞接种的HEK-BLUE™ IL-33/IL-1β细胞。在CO₂培养箱中37℃孵育20小时后,通过在用碱性磷酸酶的底物(QUANTI-BLUE™, InvivoGen)孵育后记录630nm光密度(OD)来测量细胞培养物上清中的SEAP活性。

[0740] 用10ng/ml重组人IL33刺激人PBMC 30分钟。刺激前,用递增浓度的对照IgG4、抗IL-3310C12.38.H6.87Y.581 IgG4或10C12-IL-13 KIH IgG4处理细胞1小时。固定细胞进行FACS分析。用异硫氰酸荧光素抗 CD123(11-1239-42;eBioscience)鉴定嗜碱性粒细胞。通

过按照厂家的流程用藻红蛋白抗磷酸-p38MAPK (Thr180/Tyr182) (6908S;Cell Signaling) 进行胞内染色来分析IL-33活性。数据显示为所选CD123⁺嗜碱性粒细胞群体内磷酸-p38信号的平均荧光强度(MFI)。

[0741] 在**BIACORE®** 3000 (GE Healthcare) 上用SPR评估了双特异性抗体 10C12-IL13KIH IgG4与人IL-33、食蟹猴IL-33和人IL-13的结合动力学。按照厂家的流程通过基于胺基的偶联将抗人Fab (GE Healthcare) 固定在 CM5传感芯片上。捕获双特异性抗体,并测量与人IL-33 (Genentech)、食蟹猴IL-33 (Genentech) 和人IL-13 (Peprotech) 的结合。用1.56至25nM范围内的细胞因子的两倍浓度系列进行实验。在25℃温度下,以10mM HEPES、pH 7.4、150mM NaCl、3mM EDTA和0.005% **TWEEN®**-20 为运行缓冲液,使用2分钟注射时间、30μl/分钟流速,记录细胞因子结合传感图。注射后,在运行缓冲液中监测配体从抗体解离600秒。在结合循环之间用40μl 10mM甘氨酸-HCl pH 2.1注射再生表面。扣除仅包含运行缓冲液的空白后,用厂家提供的软件用1:1Langmuir结合模型分析针对细胞因子与双特异性抗体结合观察到的传感图,以计算动力学和结合常数,包括解离常数(K_D)。

[0742] 实施例9. 抗IL-33抗体10C12.38.H6.87Y.58I IgG4与其他抗IL-33抗体的抑制活性和结合动力学比较

[0743] A. 前言

[0744] 将抗IL-33抗体10C12.38.H6.87Y.58I IgG4的阻断活性和结合动力学直接与国际专利申请公开号W0 2014/164959中所述的二十种抗IL-33抗体(本文中称为RG1-RG20)的阻断活性和结合动力学相比较。与 10C12.38.H6.87Y.58I IgG4比较的来自W0 2014/164959的抗IL-33抗体显示在表5中,表5显示来自W0 2014/164959的抗体名称、本文中所用的缩写名称、恒定区(IgG1或IgG4)及每种抗体的VH和VL的氨基酸和核苷酸序列SEQ ID NO。

[0745] 表5: 来自W0 2014/164959的抗IL-33抗体

[0746]

来 自 WO 2014/164959 的 抗体名称	缩写名称	恒定区	氨基酸序列 SEQ ID NO		核苷酸序列 SEQ ID NO	
			VH	VL	VH	VL
H1M9559N	RG1	IgG1	344	345	346	347
H1M9566N	RG2	IgG1	348	349	350	351
H1M9568N	RG3	IgG1	352	353	354	355
H4H9629P	RG4	IgG4	356	357	358	359
H4H9633P	RG5	IgG4	360	361	362	363
H4H9640P	RG6	IgG4	364	365	366	367
H4H9659P	RG7	IgG4	368	369	370	371
H4H9660P	RG8	IgG4	372	373	374	375
H4H9662P	RG9	IgG4	376	377	378	379
H4H9663P	RG10	IgG4	380	381	382	383
H4H9664P	RG11	IgG4	384	385	386	387
H4H9665P	RG12	IgG4	388	389	390	391
H4H9666P	RG13	IgG4	392	393	394	395
H4H9667P	RG14	IgG4	396	397	398	399
H4H9670P	RG15	IgG4	400	401	402	403
H4H9671P	RG16	IgG4	404	405	406	407
H4H9672P	RG17	IgG4	408	409	410	411
H4H9675P	RG18	IgG4	412	413	414	415
H4H9676P	RG19	IgG4	416	417	418	419
H1M9565N	RG20	IgG1	420	421	422	423

[0747] B. 使用报道细胞系的基于细胞的IL-33阻断测定

[0748] 用使用HEK-BLUE™报道细胞系的基于细胞的IL-33阻断测定,检查了抗IL-33抗体10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和表5中所列的每种抗IL-33 抗体(RG1-RG20)作为人IL-33细胞活性抑制剂的功效(图21A)。用IL-33 活性的天然抑制剂sST2 (sST2-LZ)作为阳性对照。人IL-33刺激 HEK-BLUE™IL-33/IL-1 β 细胞导致强烈的NF- κ B和AP-1激活,该激活通过NF- κ B/AP-1驱动的SEAP报道分子活性测量(图21B)。对照IgG4抗体的加入未扰乱IL-33活性(图21A)。所测试的大多数抗IL-33抗体显示人 IL-33活性的剂量依赖性抑制(图21A),IC₅₀值在图21C中列出。只有两种抗体显示比诱饵受体sST2-LZ (IC₅₀=27pM) 更大的抑制。10C12.38.H6.87Y.58I IgG4显示最高阻断活性(IC₅₀=2.4pM),随后是RG18 抗体(IC₅₀=11pM)。具有最高阻断活性的五种RG抗体(RG3、RG4、RG7、RG8和RG18)连同sST2-LZ和10C12.38.H6.87Y.58I IgG4显示在图21D 中。

[0749] 类似地,用使用HEK-BLUE™报道细胞系的基于细胞的阻断测定,检查了每种抗体作为食蟹猴IL-33细胞活性抑制剂的功效(图22A)。食蟹猴IL-33刺激HEK-BLUE™IL-33/IL-1 β 细胞导致强烈的NF- κ B和AP-1 激活,该激活通过NF- κ B/AP-1驱动的SEAP报道分子活性测量(图22B)。一般而言,与针对人IL-33的阻断活性相比,所测试的抗IL-33抗体显示更弱的食蟹猴IL-33活性的剂量依赖性抑制,IC₅₀值在图21C中列出。诱饵受体sST2-LZ显示最高阻断活性(IC₅₀=30pM),随后是 10C12.38.H6.87Y.58I IgG4 (IC₅₀=4.2nM),然后是RG20抗体 (IC₅₀=6.1 nM)。具有最高阻断活性的五种RG抗体(RG3、RG9、RG10、RG12和 RG20)连同sST2-LZ和10C12.38.H6.87Y.58I IgG4显示在图22C中。值得注意的是,对人IL-33显示高阻断活性的RG18抗体,对食蟹猴IL-33显示相对于10C12.38.H6.87Y.58I IgG4弱14倍的阻断活性。图22D显示非阻断RG抗体在此测定中的剂量-反应曲线。

[0750] 材料和方法

[0751] 用按厂家说明书进行的比色测定测量HEK-BLUE™IL-33/IL-1 β 报道细胞(InvivoGen,hkb-il33)中的IL-33途径活性。将HEK-BLUE™ IL-33/IL-1 β 报道细胞在96孔板中按每孔50,000细胞接种在补充2mM L- 谷氨酰胺、10%FBS、50U/ml青霉素、50 μ g/mL链霉素、100 μ g/mL NORMOCIN™(InvivoGen,ant-nr-1)的DMEM 4.5g/l葡萄糖中。用从139 nM至0.003pM范围内5倍系列稀释的人IL-33(hIL-33;R&D Systems, #3625-IL-010/CF)或内部产生的食蟹猴N端6-His标记和C端Avi标记的 IL-33(S112-T270)(参见实施例2)孵育细胞。对于阻断实验,用10pM人 IL-33或5pM食蟹猴IL-33与从90nM至0.51pM范围内3倍系列稀释的抗体或sST2-LZ(sST2(M1-F328)C端亮氨酸拉链(LZ)-Flag-His)组合孵育细胞。将抗体或sST2-LZ与IL-33在37℃预孵育30分钟,然后加至细胞。每个反应终体积为每孔200 μ L,每个条件一式三份地测试。在5%CO₂湿润培养箱中37℃孵育细胞,20小时后收集上清。用QUANTI-BLUE™测定(InvivoGen,rep-qbl)检测SEAP报道分子活性。将20 μ l上清加至平底 96孔板中的80 μ l溶解并过滤的QUANTI-BLUE™试剂,37℃孵育1小时。用分光光度计在620nm测定SEAP水平。

[0752] C. IL-33活性的天然杀伤(NK)原代细胞测定

[0753] 除上述报道细胞测定外,还在原代人天然杀伤(NK)细胞中针对IL-33 活性的抑制测试了抗IL-33抗体10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和表5中所列的每种IL-33抗体(RG1-RG20)(图23A-23D)。IL-33和IL-12本身不能活化NK细胞,但它们可以一起协同从NK细胞诱导IFN-

γ (参见例如 Smithgall等Int.Immunol.20 (8):1019-1030,2008)。将抗IL-33抗体10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和抗IL-33抗体RG1-RG20的抑制活性与天然抑制剂sST2 (sST2-LZ) 相比较。如通过ELISA测量,在IL-12存在下用递增浓度的人IL-33刺激新鲜纯化的NK细胞(图23A)导致24小时后强烈的IFN- γ 分泌(图23B)。所测试的大多数抗IL-33抗体显示人IL-33活性的剂量依赖性抑制(图23C), IC_{50} 值在图23D中列出。类似于上文章节B中所述的报道细胞系结果,只有两种抗体显示高于诱饵受体sST2-LZ ($IC_{50}=150$ pM) 的抑制。10C12.38.H6.87Y.58I IgG4显示最高阻断活性($IC_{50}=30$ pM),随后是RG18抗体($IC_{50}=97$ pM)。具有最高阻断活性的五种RG抗体(RG7、RG8、RG9、RG18和RG19)连同sST2-LZ和10C12.38.H6.87Y.58I IgG4显示在图23E中。图23F-23I比较了五种RG抗体、10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和sST2-LZ组间的 IC_{50} 曲线。

[0754] 材料和方法

[0755] 通过密度梯度离心从新鲜全血分离PBMC。将全血两倍稀释在PBS 中,放置在LEUCOSEP™管(Greiner Bio One,#227290)中的**FICOLL®**-Paque (GE Healthcare,#17-1440-03) 上,室温2,000转/分钟离心 20分钟。吸出包含PBMC的中间相层,转移至新管,并用PBS洗涤两次。按照厂家说明书用NK细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec,130-092-657) 分离NK细胞。用CD56-APC (BD Pharmingen,555518) 和CD3-FITC (BD Pharmingen,561807) 染色,通过流式细胞术分析细胞的纯度。

[0756] 将分离的NK细胞(>90%纯度)在平底96孔板中按 5×10^5 细胞/ml的终浓度接种在补充10%FBS、2mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的RPMI 1640中。用1ng/ml人IL-12(hIL-12;R&D Systems, #219-IL-025/CF) 和从139nM至0.003pM 5倍系列稀释的人IL-33(huIL-33; R&D Systems,#3625-IL-010/CF) 单独或用260pM huIL-33与从100nM至0.56pM 3倍系列稀释的抗体或sST2-LZ孵育细胞。将抗体或sST2-LZ与 IL-33在37℃预孵育30分钟,然后加至细胞。在5%CO₂湿润培养箱中 37℃过夜孵育细胞。24小时后收集上清。按照厂家说明书通过ELISA (R&D Systems,#DY285) 测量培养物上清中人IFN- γ 的水平。对于每块平板,%IL-33活性计算如下:

[0757] $\% \text{IL-33活性} = 100 \times (\text{OD}_{450_{\text{样品}}} - \text{OD}_{450_{\text{无IL-33}}}) / (\text{OD}_{450_{\text{无抗体}}} - \text{OD}_{450_{\text{无IL-33}}})$ 。

[0758] D. 人嗜碱性粒细胞中IL-33诱导的p38MAPK(Thr180/Tyr182) 磷酸化

[0759] 还在原代人嗜碱性粒细胞中针对IL-33活性的抑制测试了抗IL-33抗体10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和表5中所列的每种抗IL-33抗体(RG1-RG20)。向人嗜碱性粒细胞中加入IL-33导致信号发放分子p38 MAPK(Thr180/Tyr182)的快速磷酸化,其可以用胞内染色法通过流式细胞术测量。通过加入CD123标记,可以在大量PBMC群体内检查嗜碱性粒细胞,避免了分离细胞的需要。

[0760] 使用这种基于流式细胞术的方法,针对嗜碱性粒细胞中IL-33介导的磷酸-p38的诱导的阻断检查了抗IL-33抗体(图24A)。向PBMC中加入 IL-33导致嗜碱性粒细胞群体中p38MAPK(Thr180/Tyr182) 磷酸化(磷酸-p38)的剂量依赖性增加(图24B)。与上文所述的报道细胞系和NK细胞数据一致,抗IL-33抗体的加入导致嗜碱性粒细胞中IL-33诱导的磷酸-p38的剂量依赖性抑制(图24C), IC_{50} 值在图24D中列出。用 IC_{50} 曲线确定的具有最高阻断活性的抗体是RG11($IC_{50}=0.14$ pM)、10C12.38.H6.87Y.58I IgG4($IC_{50}=0.15$ pM),随后是RG18抗体($IC_{50}=0.38$ pM)。具有最高阻断活性的五种RG抗体(RG3、RG4、RG8、RG11和RG18)连同

sST2-LZ和 10C12.38.H6.87Y.58I IgG4显示在图24E中。图24F-24I比较了五种RG 抗体、10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和sST2-LZ组间的 IC_{50} 曲线。

[0761] 由于 IC_{50} 曲线仅包含六个点,在具体抗体浓度下分析了上述结果(图 24J-24K)。对在0.4nM(图24J)或2nM(图24K)抗IL-33抗体或sST2-LZ 浓度下获得的平均荧光强度(MFI)进行作图。图24J和24K中的图显示从最高至最低阻断活性排序的抗体。在两种浓度下,10C12.38.H6.87Y.58I IgG4都显示最高阻断活性,因此显示最低MFI值。与报道细胞系和NK原代细胞数据一致,就对人IL-33的阻断活性而言,RG18抗体是前三个抗体之一。

[0762] 材料和方法

[0763] 通过密度梯度离心从新鲜全血分离PBMC。将全血两倍稀释在PBS 中,放置在LEUCOSEP™管(Greiner Bio One, #227290)中的**FICOLL®**-Paque (GE Healthcare, #17-1440-03)上,室温2,000转/分钟离心 20分钟。吸出包含PBMC的中间相层,转移至新管,并用PBS洗涤两次。分离的PBMC在v形底96孔板中按1百万细胞/孔接种在50 μ l PBS中。将5倍系列稀释(从10nM至3.2pM范围内)的IL-33抗体、sST2-LZ或同种型对照抗体与500pM(终浓度)的人IL-33(R&D Systems, #6325-IL/CF)在37℃孵育30分钟。向PBMC中加入50 μ l混合物,终体积为每孔100 μ l。在5%CO₂湿润培养箱中37℃孵育细胞20分钟。通过加入100 μ l预热的BD PHOSFLOW™固定缓冲液(BD Biosciences, 557870)并在37℃孵育10分钟来终止反应。通过1500转/分钟离心5分钟来沉淀细胞,弃上清。用200 μ l流式细胞术缓冲液(1X PBS, 0.5% BSA, 0.05%叠氮化钠)洗涤细胞沉淀。通过缓慢加入100 μ l冷BD PHOSFLOW™Perm Buffer II (BD Biosciences, 558052)并在冰上孵育30分钟来透化细胞。在流式细胞术缓冲液中洗涤细胞沉淀两次。通过用抗磷酸-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)-PE(按1:50使用, Cell Signaling Technology, 6908S)和抗 CD123-FITC(按1:10使用, eBiosciences, 11-1239-42)染色每个样品来分析嗜碱性粒细胞中依赖IL-33的p38磷酸化。样品在室温避光孵育1小时。沉淀细胞并用流式细胞术缓冲液洗涤两次。在BD FACSCALIBUR™上分析细胞来测定CD123⁺嗜碱性粒细胞中磷酸-p38MAPK(Thr180/Tyr182)的平均荧光强度(MFI)水平。

[0764] E.通过表面等离子共振测定的抗IL-33抗体与IL-33的结合

[0765] 在**BIACORE®**T200仪器(GE Healthcare)上用表面等离子共振 (SPR)测量抗IL-33抗体10C12.38.H6.87Y.58I IgG4和表5中所列的每种抗 IL-33抗体(RG1-RG20)与IL-33的结合动力学。按照厂家的流程经基于胺基的偶联将抗人Fc或抗鼠Fc(GE Healthcare, 分别为#BR-1008-39或 BR-1008-38)固定在CM5传感芯片上。用表面来捕获单克隆人IgG4和单克隆鼠IgG进行动力学研究。测量抗体与人IL-33(R&D systems, #3625-IL-010/CF)和食蟹猴IL-33N-His (SEQ ID NO:317) (Genentech, Inc.)的结合。用3.7至100nM范围内的细胞因子的三倍浓度系列进行实验。以0.01M N-(2-乙酰氨基)亚氨基二乙酸(ADA) pH 7.4、0.15M NaCl、3 mM EDTA和0.05% **TWEEN®**-20作为运行缓冲液,使用4分钟注射时间、30 μ l/分钟流速,记录IL-33结合的传感图。注射后,在运行缓冲液中监测配体从抗体解离10分钟。在循环间注射3M氯化镁或甘氨酸-HCl pH 1.7 再生表面。所有结合实验都在25℃和37℃的温度下进行。扣除仅包含运行缓冲液的空白后,用厂家提供的软件用1:1Langmuir结合模型分析针对 IL-33与抗IL-33抗体结合观察到的传感图,以计算动力学和结合常数,包括解离常数(K_D)。从动力学速率常数计算解离半衰期($t_{1/2}$)。 $K_D(M) = k_{off}/$

$k_{on}, t_{1/2}$ (分钟) = $\ln(2) / (60 * k_{off})$ 。表6显示在25℃结合人IL-33的结合动力学结果。表7显示在37℃结合人IL-33的结合动力学结果。表8显示在25℃结合食蟹猴IL-33的结合动力学结果。表9显示在37℃结合食蟹猴 IL-33的结合动力学结果。在表6-9中,*IC表示结果由于观察到抗体的弱捕获(导致结合数据差)而是不确定的。

[0766] 在每个条件下,如通过 K_D 测量,与抗IL-33抗体RG1-RG20相比,抗IL-33抗体10C12.38.H6.87Y.58I IgG4对人或食蟹猴IL-33都具有最高亲和力(表6-9)。与对人IL-33具有最高亲和力的RG抗体RG18相比,10C12.38.H6.87Y.58I IgG4具有提高约2-4倍的亲和力(表6和7)。与对食蟹猴IL-33具有最高亲和力的RG抗体(在25℃下为RG2,在37℃下为RG10)相比,10C12.38.H6.87Y.58I IgG4也具有提高约2-4倍的亲和力。

[0767] 表6:抗IL-33抗体在25℃结合人IL-33的结合动力学

抗体	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (分钟)
RG1	226000	0.000184	8.11E-10	63
RG2	96900	0.0000773	7.98E-10	149
RG3	IC*	IC*	IC*	IC*
RG4	1130000	0.000632	5.59E-10	18
RG5	491000	0.000462	9.41E-10	25
RG6	797000	0.000438	5.49E-10	26
RG7	456000	0.000499	1.09E-09	23
RG8	581000	0.00039	6.7E-10	30
RG9	871000	0.000459	5.27E-10	25
RG10	1680000	0.000937	5.58E-10	12
RG11	339000	0.000445	1.31E-09	26
RG12	931000	0.00116	1.25E-09	10
RG13	665000	0.00115	1.74E-09	10
RG14	626000	0.000328	5.25E-10	35
RG15	680000	0.000517	7.61E-10	22
RG16	1310000	0.000963	7.36E-10	12
RG17	960000	0.000806	8.39E-10	14
RG18	1630000	0.000637	3.91E-10	18
RG19	1790000	0.001	5.6E-10	12
RG20	84400	0.000238	2.82E-09	49
10C12.38.H6.87Y.58I IgG4	4600000	0.000613	1.33E-10	19

[0769] 表7:抗IL-33抗体在37℃结合人IL-33的结合动力学

[0770]

抗体	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (分钟)
RG1	374000	0.000888	2.37E-09	13
RG2	129000	0.000522	4.04E-09	22
RG3	IC*	IC*	IC*	IC*
RG4	2820000	0.000738	2.61E-10	16
RG5	1160000	0.000845	7.26E-10	14
RG6	1740000	0.000626	3.59E-10	18
RG7	1080000	0.000498	4.62E-10	23
RG8	1370000	0.000413	3.02E-10	28
RG9	2340000	0.000566	2.42E-10	20

RG10	3110000	0.00161	5.17E-10	7
RG11	789000	0.000531	6.74E-10	22
RG12	2350000	0.00235	1E-09	5
RG13	1690000	0.00158	9.34E-10	7
RG14	1210000	0.000497	4.11E-10	23
RG15	1280000	0.000663	5.19E-10	17
RG16	3680000	0.00203	5.52E-10	6
RG17	2390000	0.00127	5.31E-10	9
RG18	4060000	0.000779	1.92E-10	15
RG19	3470000	0.00158	4.57E-10	7
RG20	218000	0.000162	7.42E-10	71
10C12.38.H6.87Y.58I gG4	6160000	0.000547	8.89E-11	21

[0771] 表8:抗IL-33抗体在25℃结合食蟹猴IL-33的结合动力学

[0772]

抗体	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (分钟)
RG1	122000	0.000458	3.76E-09	25
RG2	117000	0.0000766	6.56E-10	151
RG3	IC*	IC*	IC*	IC*
RG4	379000	0.0204	5.4E-08	1
RG5	227000	0.00337	1.49E-08	3
RG6	244000	0.000528	2.17E-09	22
RG7	183000	0.000479	2.61E-09	24
RG8	238000	0.00064	2.69E-09	18
RG9	245000	0.000313	1.28E-09	37
RG10	511000	0.000545	1.07E-09	21
RG11	99000	0.000556	5.62E-09	21
RG12	437000	0.000426	9.76E-10	27
RG13	164000	0.00625	3.8E-08	2
RG14	208000	0.00059	2.83E-09	20
RG15	212000	0.000557	2.63E-09	21
RG16	533000	0.000915	1.72E-09	13
RG17	331000	0.0019	5.74E-09	6
RG18	362000	0.000988	2.73E-09	12
RG19	787000	0.00248	3.15E-09	5
RG20	203000	0.000606	2.98E-09	19
10C12.38.H6.87Y.58I gG4	1050000	0.000278	2.65E-10	42

[0773] 表9:抗IL-33抗体在37℃结合食蟹猴IL-33的结合动力学

[0774]

抗体	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (分钟)
RG1	232000	0.00193	8.33E-09	6
RG2	185000	0.000469	2.54E-09	25
RG3	IC*	IC*	IC*	IC*
RG4	916	0.000502	5.47E-07	23
RG5	265000	0.0113	4.27E-08	1
RG6	9340000	0.0392	4.2E-09	0
RG7	277000	0.00114	4.13E-09	10
RG8	385000	0.00305	7.93E-09	4
RG9	484000	0.00112	2.31E-09	10
RG10	1960000	0.00202	1.03E-09	6
RG11	205000	0.00213	1.04E-08	5
RG12	727000	0.00142	1.96E-09	8
RG13	293000	0.0139	4.74E-08	1
RG14	398000	0.00214	5.38E-09	5
RG15	380000	0.00221	5.82E-09	5
RG16	890000	0.00326	3.66E-09	4
RG17	584000	0.00757	1.3E-08	2
RG18	751000	0.00505	6.72E-09	2
RG19	1600000	0.0111	6.93E-09	1
RG20	IC*	IC*	IC*	IC*
10C12.38.H6.87Y.58I IgG4	1690000	0.000804	4.76E-10	14

[0775] F. 测量抗IL-33抗体的阻断活性的竞争结合ELISA

[0776] 材料

[0777] 重组人ST2-Fc嵌合蛋白质和人IL-33蛋白质获自R&D Systems (Minneapolis, MN)。重组食蟹猴IL-33蛋白质在Genentech制备。人和食蟹猴IL-33蛋白质都按照厂家的流程用**EZ-LINK®** NHS-PEG4-Biotin (Thermo Scientific; Rockford, IL) 进行生物素标记。

[0778] 实验方法

[0779] 在竞争结合ELISA中测试了抗IL-33抗体10C12.38.H6.87Y.58I IgG4 和表5中所列的每种抗IL-33抗体 (RG1-RG20) 阻断人IL-33或食蟹猴IL-33 与人ST2受体结合的能力。简言之, 在384孔**MAXISORP®**板 (Nalgene Nunc International; Rochester, NY) 上包被在包被缓冲液 (50mM碳酸钠, pH 9.6) 中制备的1 μ g/ml的重组人ST2-Fc嵌合蛋白质, 4 $^{\circ}$ C过夜孵育。次日, 用含0.5% (w/v) 牛血清白蛋白 (BSA) 的PBS溶液封闭非特异性结合。将在测定缓冲液 (25mM PBS, pH 7.2, 0.1% BSA, 0.05% **TWEEN®**-20) 中制备的固定浓度的生物素化人或食蟹猴IL-33与等体积的系列稀释的抗 IL-33抗体或测定缓冲液单独混合, 室温孵育1小时。生物素化人IL-33 或食蟹猴IL-33的最终测定浓度分别为20pM和45pM, 每种抗体的最终测定浓度在0-300nM范围内。将预先混合的溶液加至ST2-Fc包被的平板, 室温孵育1小时。通过顺次加入Streptavidin Poly-HRP80 (Fitzgerald; Buckinghamshire, UK) 和3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) Microwell Peroxidase Substrate System (KPL; Gaithersburg, MD) 来检测生物素化 IL-33与包被的ST2-Fc的结合。用MULTISKAN **ASCENT®**酶标仪 (Thermo Scientific; Rockford, IL) 记录吸光度 (450nm)。将抗IL-33

存在下生物素化IL-33与ST2的结合活性(%)作为抗体浓度的函数作图。用Prism 软件(Graphpad Software;La Jolla,CA)将所产生的数据拟合至四参数方程来测定每种抗体的 IC_{50} 值。将每种抗体的最大阻断(%)计算为在抗体存在下测量到的信号降低相对于IL-33单独的信号和背景测量结果之间差值的比值。表10中总结了每种抗体的 IC_{50} 和最大阻断活性。结果显示三次独立实验的平均数据。

[0780] 如表10中所示,10C12.38.H6.87Y.58I IgG4是所测试的任何抗体中最有效的阻断剂,与来自W0 2014/164959的所有抗体相比具有更低的 IC_{50} 值和更高的最大阻断。

[0781] 表10:抗IL-33抗体阻断生物素-huIL-33或生物素-cyIL-33与huST2 的结合

抗体	阻断 20 pM 生物素 -huIL-33 与 hST2-Fc, IC_{50} (M)	最大阻断	阻断 40 pM 生物素 -cyIL-33 与 hST2-Fc, IC_{50} (M)	最大阻断
[0782] 10C12.38.H6.87Y.58I IgG4	2.1E-11	92%	4.3E-10	87%
H1M9559N	4.1E-09	75%	NA	NB
H1M9566N	9.9E-11	27%	NA	NB
H1M9565N	5.4E-08	81%	1.9E-08	85%
H1M9568N	1.9E-10	85%	7.7E-08	45%
H4H9629P	9.2E-11	82%	NA	NB
H4H9633P	1.1E-09	68%	NA	NB

[0783]

抗体	阻断 20 pM 生物素 -huIL-33 与 hST2-Fc, IC ₅₀ (M)	最大阻断	阻断 40 pM 生物素 -cyIL-33 与 hST2-Fc, IC ₅₀ (M)	最大阻断
H4H9640P	1.9E-10	80%	4.5E-08	25%
H4H9659P	2.3E-10	88%	4.7E-08	42%
H4H9660P	9.2E-11	78%	1.2E-07	18%
H4H9662P	2.5E-10	85%	6.6E-08	47%
H4H9663P	4.4E-10	82%	2.6E-08	61%
H4H9664P	1.9E-10	87%	NA	10%
H4H9665P	7.0E-10	63%	1.9E-08	53%
H4H9666P	2.1E-10	81%	NA	NB
H4H9667P	4.1E-10	77%	NA	7%
H4H9670P	4.2E-10	80%	1.5E-07	27%
H4H9671P	9.6E-11	77%	7.0E-08	40%
H4H9672P	2.2E-10	77%	NA	NB
H4H9675P	6.3E-11	84%	NA	NB
H4H9676P	9.7E-10	73%	NA	NB

[0784] NA=不适用

[0785] NB=非阻断剂

[0786] 其他实施方案

[0787] 虽然已为了理解的清晰性的目的以说明和实例的方式较为详细地描述了前述发明,但该描述和实例不解释为限制本发明的范围。本文引用的所有专利和科学文献的公开

内容在此以其整体引入作为参考。

序 列 表

<110> 基因泰克公司 (Genentech, Inc.)
豪夫迈·罗氏有限公司 (F. Hoffmann-La Roche AG)
<120> 抗白介素-33 抗体及其用途
<130> 50474-099W03
<150> US 62/165, 732
<151> 2015-05-22
<150> US 62/077, 876
<151> 2014-11-10
<160> 371
<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 1
Ser Phe Ser Met Ser
1 5

[0001]

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 2
Thr Ile Ser Gly Gly Lys Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 3
Ala Asn Tyr Gly Asn Trp Phe Phe Glu Val
1 5 10

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 4

[0002]

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Lys Tyr Gly Leu Ser Leu Leu Asn
1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 5

Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 6

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Phe Thr
1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 7

Ser Phe Ser Leu Ser
1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 8

Ser Phe Ser Val Ser
1 5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 9

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

Gly

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 10

Ala Asn Tyr Gly Asn Phe Phe Phe Glu Val

1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 11

Ala Asn Tyr Gly Asp Trp Phe Phe Glu Val

1 5 10

<210> 12

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

<210> 13

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 13

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 14

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 14

[0003]

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

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 15

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 16
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 16

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

[0004]

<210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 17

Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

<210> 18
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 18

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

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT

[0005]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 19

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Ala Val Ser Ser

1 5 10

<210> 20

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

<210> 21

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 21

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

1 5 10

<210> 22

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 22

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg

20 25 30

<210> 23

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 23

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg

20 25 30

<210> 24
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 24
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg
20 25 30

<210> 25
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 25
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

[0006]

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 26
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Phe
1 5 10 15

<210> 27
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 27
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

	<223>	合成构建体
	<400>	28
	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
	1	5 10
	<210>	29
	<211>	23
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	29
	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Phe Leu Val Val Ser Leu Gly	
	1	5 10 15
	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys	
	20	
	<210>	30
	<211>	15
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	30
	Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe	
[0007]	1	5 10 15
	<210>	31
	<211>	32
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	31
	Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser	
	1	5 10 15
	Leu Asn Ile His Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys	
	20	25 30
	<210>	32
	<211>	10
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	32
	Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
	1	5 10
	<210>	33
	<211>	32
	<212>	PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 33

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

<210> 34

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 34

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

<210> 35

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 35

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

<210> 36

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 36

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

[0008]

Thr Arg Ala Asn Tyr Gly Asn Trp Phe Phe Glu Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 37
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 37

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

[0009]

<210> 38
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 38

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

<210> 39

<211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 39
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Phe Leu Val Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Lys Tyr
 20 25 30
 Gly Leu Ser Leu Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

[0010]

<210> 40
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 40
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Lys Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ala Asn Tyr Gly Asn Trp Phe Phe Glu Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 41
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体

<400> 41
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Lys Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asp Ala Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ala Asn Tyr Gly Asn Trp Phe Phe Glu Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 42
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 42

[0011]

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

<210> 43
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 43

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

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

<210> 44
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 44

[0012]

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

<210> 45
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 45

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly					
1		5		10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe					
	20		25		30
Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					
	35		40		45

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

<210> 46
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 46

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

[0013]

<210> 47
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 47

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ala Asn Tyr Gly Asn Trp Phe Phe Glu Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 48
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 48

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

[0014]

<210> 49
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 49

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 50

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

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

[0015]

<210> 51

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 51

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

<210> 52

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 52

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

<210> 53

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 53

[0016]

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

<210> 54

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 54

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

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

<210> 55
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 55

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

[0017]

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 56
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 56

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

				85					90					95
Glu	Val	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				100				105					110	

<210> 57
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 57

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

[0018]

<210> 58
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 58

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

<210> 59
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 59

$\langle 400 \rangle$ 60

<400> 61

162

35	40	45
Arg Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Ile Pro Ala		
50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65	70	75
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys		
85	90	95
Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	110

<210> 62
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4).. (4)
 <223> Xaa 是 Met, Leu 或 Val
 <400> 62
 Ser Phe Ser Xaa Ser
 1 5

[0020]

<210> 63
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14).. (14)
 <223> Xaa 是 Ser 或 Ala
 <400> 63
 Thr Ile Ser Gly Gly Lys Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asp Xaa Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 64
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5).. (5)
 <223> Xaa 是 Asn 或 Asp
 <220>
 <221> MOD_RES

<222> (6).. (6)

<223> Xaa 是 Trp 或 Phe

<400> 64

Ala Asn Tyr Gly Xaa Xaa Phe Phe Glu Val

1 5 10

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 65

Ser Ser Ile Phe Tyr Trp Gly

1 5

<210> 66

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 66

Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

[0021]

<210> 67

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 67

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

1 5 10 15

<210> 68

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 68

Ala Gly Gly Leu Tyr Asn Trp Asn Asp Glu Ser Phe Ser Phe Tyr Met

1 5 10 15

Asp Val

<210> 69

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体
<400> 69
Arg Ala Ser Gln Ser Phe Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成构建体
<400> 70
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 71
Gln Gln Tyr Asp Arg Ser Pro Leu Thr
1 5

[0022]

<210> 72
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 72
Glu Leu 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 Arg
20 25 30

<210> 73
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 73
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 74
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

	<220>
	<223> 合成构建体
	<400> 74
	Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Met
	1 5 10 15
	Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
	20 25 30
	<210> 75
	<211> 11
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成构建体
	<400> 75
	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
	1 5 10
	<210> 76
	<211> 30
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成构建体
	<400> 76
[0023]	Gln Leu 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 Arg
	20 25 30
	<210> 77
	<211> 30
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成构建体
	<400> 77
	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 Arg
	20 25 30
	<210> 78
	<211> 11
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成构建体
	<400> 78
	Trp Gly Asn Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
	1 5 10

[0024]

<210> 79
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 79
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 80
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 80
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 81
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 81
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 82
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 82
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 83
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 83
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

	1			5					10					15		
	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Lys	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30		
	<210> 84															
	<211> 128															
	<212> PRT															
	<213> 人工序列															
	<220>															
	<223> 合成构建体															
	<400> 84															
	Glu	Leu	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	Arg	Ser	Ser
				20					25					30		
	Ile	Phe	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
			35					40					45			
	Trp	Ile	Gly	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55						60				
	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
	65					70					75				80	
	Ser	Leu	Met	Leu	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85						90					95	
	Cys	Ala	Arg	Ala	Gly	Gly	Leu	Tyr	Asn	Trp	Asn	Asp	Glu	Ser	Phe	Ser
				100					105					110		
[0025]	Phe	Tyr	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
			115					120					125			
	<210> 85															
	<211> 108															
	<212> PRT															
	<213> 人工序列															
	<220>															
	<223> 合成构建体															
	<400> 85															
	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
	1				5				10					15		
	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Phe	Ser	Ser	Ser
			20						25				30			
	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
			35					40					45			
	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55						60				
	Gly	Ser	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	Arg	Ser	Pro
				85					90						95	
	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100						105							
	<210> 86															
	<211> 128															

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 86
 Glu Leu 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 Arg Ser Ser
 20 25 30

 Ile Phe Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Met Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ala Gly Gly Leu Tyr Asn Trp Asn Asp Glu Ser Phe Ser
 100 105 110
 Phe Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

[0026]

<210> 87
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 87
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Phe Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser 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 Arg Ser Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

 <210> 88
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 88

Gln Leu 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 Arg Ser Ser
 20 25 30
 Ile Phe Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Met Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ala Gly Gly Leu Tyr Asn Trp Asn Asp Glu Ser Phe Ser
 100 105 110
 Phe Tyr Met Asp Val Trp Gly Asn Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 89

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 89

[0027] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Phe Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser 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 Arg Ser Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 90

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Xaa 是 Ser 或 Ala

<400> 90

Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Xaa Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 91
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 91
 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 Arg Ser Ser
 20 25 30
 Ile Phe Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Met Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ala Gly Gly Leu Tyr Asn Trp Asn Asp Glu Ser Phe Ser
 100 105 110
 Phe Tyr Met Asp Val Trp Gly Asn Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

[0028]

<210> 92
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 92
 Gln Leu 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 Arg Ser Ser
 20 25 30
 Ile Phe Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Met Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ala Gly Gly Leu Tyr Asn Trp Asn Asp Glu Ser Phe Ser
 100 105 110
 Phe Tyr Met Asp Val Trp Gly Asn Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 93
 <211> 108
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 93

```

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

```

<210> 94

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 94

```

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

```

<210> 95

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 95

```

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 Arg Ser Ser
          20           25           30

```

[0029]

```

Ile Phe Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
   35                               40                               45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
   50                               55                               60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
  65                               70                               75                               80
Ser Leu Met Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
           85                               90                               95
Cys Ala Arg Ala Gly Gly Leu Tyr Asn Trp Asn Asp Glu Ser Phe Ser
           100                               105                               110
Phe Tyr Met Asp Val Trp Gly Asn Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
           115                               120                               125

```

```

<210> 96
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 96

```

```

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

```

[0030]

```

<210> 97
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Xaa 是 Trp, Phe 或 Tyr
<400> 97
Asn Tyr Xaa Met Asn
1           5

```

```

<210> 98
<211> 19
<212> PRT

```


[0032]

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 101
Asn Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 102
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 102
Asn Tyr Phe Met Asn
1 5

<210> 103
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 103
Asn Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 104
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 104
Glu Ile Thr Leu Lys Phe Asn Asn Tyr Ser Thr His Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly

<210> 105
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 105
Glu Ile Thr Leu Lys Phe Asn Asp Tyr Ser Thr His Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly

<210> 106
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 106
Glu Ile Thr Leu Lys Phe Asn Ser Tyr Ser Thr His Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly

<210> 107
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 107
Glu Ile Thr Leu Lys Phe Asn Ala Tyr Ser Thr His Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly

[0033]

<210> 108
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 108
Glu Ile Thr Leu Lys Phe Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly

<210> 109
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 109
Arg Asn Tyr Gly Asp Trp Tyr Ile Asn Val
1 5 10

<210> 110
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体

[0034]

<400> 110

Arg Asn Tyr Gly Asn Trp Tyr Ile Asn Val
1 5 10

<210> 111

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 111

Arg Asn Tyr Gly Asn Phe Tyr Ile Asn Val
1 5 10

<210> 112

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 112

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Lys Phe Gly Met Ser Phe Leu Asn
1 5 10 15

<210> 113

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 113

Val Ala Ser Ser Gln Gly Ser
1 5

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 114

Gln Gln Ser Lys Asp Ile Pro Tyr Thr
1 5

<210> 115

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 115

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Lys Phe Gly Val Ser Phe Leu Asn

	1	5	10	15
	<210> 116			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成构建体			
	<400> 116			
	Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Lys Phe Gly Leu Ser Phe Leu Asn			
	1	5	10	15
	<210> 117			
	<211> 30			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成构建体			
	<400> 117			
	Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
	1	5	10	15
	Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser			
		20	25	30
[0035]	<210> 118			
	<211> 30			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成构建体			
	<400> 118			
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
	1	5	10	15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser			
		20	25	30
	<210> 119			
	<211> 14			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成构建体			
	<400> 119			
	Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Met Ala			
	1	5	10	
	<210> 120			
	<211> 14			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成构建体			

	<400>	120	
	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Ala		
	1	5	10
	<210>	121	
	<211>	32	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体	
	<400>	121	
	Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln		
	1	5	10 15
	Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg		
		20	25 30
	<210>	122	
	<211>	32	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体	
	<400>	122	
	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln		
	1	5	10 15
[0036]	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg		
		20	25 30
	<210>	123	
	<211>	32	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体	
	<400>	123	
	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln		
	1	5	10 15
	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg		
		20	25 30
	<210>	124	
	<211>	11	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体	
	<400>	124	
	Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
	1	5	10
	<210>	125	
	<211>	11	

	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	125
		Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
	1	5 10
	<210>	126
	<211>	23
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	126
		Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
	1	5 10 15
		Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
		20
	<210>	127
	<211>	23
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
[0037]	<223>	合成构建体
	<400>	127
		Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
	1	5 10 15
		Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
		20
	<210>	128
	<211>	15
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	128
		Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe
	1	5 10 15
	<210>	129
	<211>	15
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	129
		Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe
	1	5 10 15

<210> 130
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 130
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
1 5 10 15
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 131
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 131
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

[0038]

<210> 132
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 132
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 133
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 133
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 134
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 134
Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

<210> 135

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 135

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

<210> 136

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 136

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	
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Ala Glu Ile Thr Leu Lys Phe Asn Asn Tyr Ser Thr His Tyr Ala Glu			

[0039]

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

<210> 137
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 137

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

[0040]

<210> 138
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 138

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

	100		105		110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		
<210> 139 <211> 111 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 合成构建体 <400> 139					
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly					
1	5		10		15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Lys Phe					
	20		25		30
Gly Val Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro					
	35		40		45
Lys Leu Leu Ile Phe Val Ala Ser Ser Gln Gly Ser Gly Val Pro Asp					
	50		55		60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser					
65		70		75	80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys					
	85		90		95
Asp Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys					
	100		105		110

[0041]

	140				
	121				
	PRT				
	人工序列				
	合成构建体				
	140				
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
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met					
	35		40		45
Ala Glu Ile Thr Leu Lys Phe Asn Asn Tyr Ser Thr His Tyr Ala Glu					
	50		55		60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr					
65		70		75	80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr					
	85		90		95
Tyr Cys Ala Arg Arg Asn Tyr Gly Asn Trp Tyr Ile Asn Val Trp Gly					
	100		105		110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		
<210> 141 <211> 121					

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 141
 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
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Ala Glu Ile Thr Leu Lys Phe Asn Asn Tyr Ser Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Arg Asn Tyr Gly Asn Trp Tyr Ile Asn Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0042]

<210> 142
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 142
 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
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Ala Glu Ile Thr Leu Lys Phe Asn Asp Tyr Ser Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Arg Asn Tyr Gly Asn Trp Tyr Ile Asn Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 143
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体

<400> 143
 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
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Ala Glu Ile Thr Leu Lys Phe Asn Ser Tyr Ser Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Arg Asn Tyr Gly Asn Trp Tyr Ile Asn Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 144
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体

[0043]

<400> 144
 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
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Ala Glu Ile Thr Leu Lys Phe Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Arg Asn Tyr Gly Asn Trp Tyr Ile Asn Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 145
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体

<400> 145
 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
Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
                35                40                45
Ala Glu Ile Thr Leu Lys Phe Asn Asn Tyr Ser Thr His Tyr Ala Glu
                50                55                60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65                70                75                80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                90                95
Tyr Cys Ala Arg Arg Asn Tyr Gly Asn Trp Tyr Ile Asn Val Trp Gly
                100                105                110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                115                120

```

<210> 146

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 146

```

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

```

[0044]

<210> 147

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 147

```

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
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35                40                45
Ala Glu Ile Thr Leu Lys Phe Asn Ala Tyr Ser Thr His Tyr Ala Glu

```

```

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

```

<210> 148
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 148

```

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
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
      35              40              45
Ala Glu Ile Thr Leu Lys Phe Asn Asn Tyr Ser Thr His Tyr Ala Glu
      50              55              60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
[0045] 65              70              75              80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
      85              90              95
Tyr Cys Ala Arg Arg Asn Tyr Gly Asn Tyr Tyr Ile Asn Val Trp Gly
      100             105             110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115             120

```

<210> 149
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 149

```

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

```

				85					90					95
Asp	Ile	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				100				105					110	

<210> 150
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 150

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

[0046]

<210> 151
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 151

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

<210> 152
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 152

```

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

```

<210> 153

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 153

[0047]

```

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

```

<210> 154

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 154

```

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

```

35	40	45
Lys Leu Leu Ile Phe Val Ala Ser Ser Gln Gly Ser Gly Val Pro Asp		
50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65	70	75
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys		
85	90	95
Asp Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	110

<210> 155
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 155

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

[0048]

<210> 156
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 156

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

	100	105	110
<210>	157		
<211>	111		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成构建体		
<400>	157		
	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
	1 5 10 15		
	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Lys Phe		
	20 25 30		
	Gly Met Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
	35 40 45		
	Lys Leu Leu Ile Phe Val Ala Ser Ser Gln Gly Ser Gly Val Pro Asp		
	50 55 60		
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
	65 70 75 80		
	Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys		
	85 90 95		
	Asp Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100 105 110		
[0049]	<210>	158	
	<211>	5	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体	
	<400>	158	
		Lys Phe Trp Met Asn	
		1 5	
	<210>	159	
	<211>	19	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体	
	<400>	159	
		Glu Ile Arg Leu Asn Ser Ile Asn Tyr Val Lys Asp Tyr Ala Glu Ser	
		1 5 10 15	
		Val Lys Gly	
	<210>	160	
	<211>	10	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体	

<400> 160
 Arg Asn Tyr Gly Asn Trp Phe Phe Glu Ile
 1 5 10

 <210> 161
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa 是 Asn 或 Ser
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 是 Ser 或 Ala
 <400> 161
 Glu Ile Arg Leu Xaa Xaa Ile Asn Tyr Val Lys Asp Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

[0050]

<210> 162
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 162
 Glu Ile Arg Leu Ser Ser Ile Asn Tyr Val Lys Asp Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

<210> 163
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 163
 Glu Ile Arg Leu Asn Ala Ile Asn Tyr Val Lys Asp Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

<210> 164
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体
<400> 164
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Arg Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 165
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成构建体
<400> 165
Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 166
Gln His Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr
1 5

[0051]

<210> 167
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 167
Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn
20 25 30

<210> 168
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 168
Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 169
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 169

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Ile Arg

20 25 30

<210> 170

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 170

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 171

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 171

[0052] 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 Asn

20 25 30

<210> 172

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 172

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 173

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 173

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ile Arg

20 25 30

[0053]

<210> 174
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 174
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 175
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 175
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
20

<210> 176
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 176
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 177
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 177
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
1 5 10 15
Leu Asn Ile His Pro Leu Glu Glu Asp Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 178
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 178
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

	1	5	10
	<210> 179		
	<211> 23		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成构建体		
	<400> 179		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1	5	10 15
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys		
	20		
	<210> 180		
	<211> 15		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成构建体		
	<400> 180		
	Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr		
	1	5	10 15
	<210> 181		
	<211> 32		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成构建体		
	<400> 181		
	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr		
	1	5	10 15
	Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys		
	20 25 30		
	<210> 182		
	<211> 10		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成构建体		
	<400> 182		
	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	1	5	10
	<210> 183		
	<211> 121		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成构建体		

[0054]

<400> 183
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Phe
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Leu Asn Ser Ile Asn Tyr Val Lys Asp Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ile Arg Arg Asn Tyr Gly Asn Trp Phe Phe Glu Ile Trp Gly
 100 105 110
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 184
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 184

[0055]

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

<210> 185
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 185

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 Asn Lys Phe
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

```

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

```

<210> 186
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 186

```

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

```

[0056]

<210> 187
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 187

```

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

```

					85					90					95	
	Tyr	Cys	Ile	Arg	Arg	Asn	Tyr	Gly	Asn	Trp	Phe	Phe	Glu	Ile	Trp	Gly
				100					105					110		
	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115					120								
	<210>		188													
	<211>		111													
	<212>		PRT													
	<213>		人工序列													
	<220>															
	<223>		合成构建体													
	<400>		188													
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Arg	Tyr
				20					25					30		
	Gly	Ile	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro
			35				40						45			
	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
		50					55					60				
	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
	65					70					75				80	
	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Lys
					85					90					95	
[0057]	Glu	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
				100					105						110	
	<210>		189													
	<211>		121													
	<212>		PRT													
	<213>		人工序列													
	<220>															
	<223>		合成构建体													
	<400>		189													
	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	Asn	Lys	Phe
				20					25					30		
	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
	Ala	Glu	Ile	Arg	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Tyr	Val	Lys	Asp	Tyr	Ala	Glu
		50					55					60				
	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser
	65					70					75				80	
	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
					85					90					95	
	Tyr	Cys	Ile	Arg	Arg	Asn	Tyr	Gly	Asn	Trp	Phe	Phe	Glu	Ile	Trp	Gly
				100					105						110	
	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
				115					120							

<210> 190
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 190
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Lys
 85 90 95
 Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

[0058]

<210> 191
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 191
 Asp Tyr Asn Met Asn
 1 5

 <210> 192
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 是 Asn 或 Ser
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa 是 Gly 或 Ala
 <400> 192
 Asp Ile Asn Pro Lys Xaa Xaa Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
 1 5 10 15
 Asp

<210> 193
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 193
Asp Ile Asn Pro Lys Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 194
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 194
Asp Ile Asn Pro Lys Ser Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15
Asp

[0059]

<210> 195
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 195
Asp Ile Asn Pro Lys Asn Ala Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 196
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 196
His Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Gly Phe Val Tyr
1 5 10

<210> 197
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体

[0060]

<400> 197
His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 198
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体

<400> 198
Ala Ala Ser Lys Leu His Thr
1 5

<210> 199
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体

<400> 199
Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 200
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体

<400> 200
Glu Val Leu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Asn Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 201
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体

<400> 201
Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Ser Ile Gly
1 5 10

<210> 202
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体

<400> 202

Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu
 1 5 10 15
 Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 203

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 203

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ala Ala
 1 5 10

<210> 204

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 204

Glu 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 Ser
 20 25 30

[0061]

<210> 205

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 205

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Ser Ile Gly
 1 5 10

<210> 206

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 206

Arg Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 207

<211> 11

[0062]

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 207
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 208
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 208
 Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 209
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 209
 Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Asn Asn Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 210
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 210
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Leu Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 211
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 211
 Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Leu Lys
 1 5 10

[0063]

<210> 212
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 212
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 213
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 213
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Asn Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 214
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 214
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 215
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 215
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 216
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 216
Glu Val Leu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

```

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

```

<210> 217
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 217

[0064]

```

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

```

<210> 218
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 218

```

Glu 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 Ser Asp Tyr
          20           25           30
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Ser Ile
          35           40           45
Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe

```

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

<210> 219
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 219

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1	5
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp	
	20
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Asn Pro Lys Leu Leu Ile	
	35
Tyr Ala Ala Ser Lys Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
	50
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65	70
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Leu	
	85
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
	100

[0065]

<210> 220
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 220

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1	5
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr	
	20
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Ser Ile	
	35
Gly Asp Ile Asn Pro Lys Ser Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Asn Phe	
	50
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
65	70
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85
Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Gly Phe Val Tyr Trp	
	90

	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	224
		Glu Phe Tyr Tyr Gly Ser Phe Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr
	1	5 10
	<210>	225
	<211>	11
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	225
		His Ala Ser Gln Asn Ile His Val Trp Leu Ser
	1	5 10
	<210>	226
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	226
[0067]		Lys Ala Ser Thr Leu His Thr
	1	5
	<210>	227
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	227
		Gln Gln Gly Gln Ser Ser Pro Leu Thr
	1	5
	<210>	228
	<211>	30
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	228
		Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Asn Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
	1	5 10 15
		Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
		20 25 30
	<210>	229
	<211>	14

	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	229
	Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly	
	1	5 10
	<210>	230
	<211>	32
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	230
	Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Gln	
	1	5 10 15
	Leu Gly Ser Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg	
		20 25 30
	<210>	231
	<211>	11
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
[0068]	<223>	合成构建体
	<400>	231
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
	1	5 10
	<210>	232
	<211>	23
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	232
	Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly	
	1	5 10 15
	Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys	
		20
	<210>	233
	<211>	15
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	233
	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
	1	5 10 15

<210> 234
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 234
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Asn Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 235
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 235
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys
 1 5 10

<210> 236
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 236
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Asn Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Ala Pro Gly Ser Gly Phe Ile Ser Tyr Asn Glu Leu Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Ile Gln Leu Gly Ser Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Phe Tyr Tyr Gly Ser Phe Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 237
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体

[0069]

<400> 237

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

<210> 238

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 238

Glu 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
 20 25 30

[0070]

<210> 239

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 239

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 240

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 240

Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 241

<211> 11

	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	241
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	1	5 10
	<210>	242
	<211>	23
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	242
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
	1	5 10 15
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys	
		20
	<210>	243
	<211>	15
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
[0071]	<223>	合成构建体
	<400>	243
	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
	1	5 10 15
	<210>	244
	<211>	32
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	244
	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
	1	5 10 15
	Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys	
		20 25 30
	<210>	245
	<211>	10
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	245
	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
	1	5 10

<210> 246
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 246
 Glu 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
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Ala Pro Gly Ser Gly Phe Ile Ser Tyr Asn Glu Leu Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Phe Tyr Tyr Gly Ser Phe Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0072]

<210> 247
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 247
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile His Val Trp
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Ser Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 248
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa 是 Met 或 Ile
 <400> 248
 Gly Ser Ala Xaa His
 1 5

<210> 249
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa 是 Arg 或 Lys
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 是 Asn, Thr 或 Gly
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 是 Asn 或 Ser
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa 是 Ala 或 Glu
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa 是 Ala 或 Asp
 <400> 249
 Arg Ile Arg Ser Xaa Xaa Asn Xaa Tyr Ala Thr Xaa Tyr Xaa Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

<210> 250
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 是 Leu 或 Gln
 <220>
 <221> MOD_RES

[0074]

<222> (2)..(2)
 <223> Xaa 是 Gln, Gly 或 Phe
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa 是 Gln 或 Gly
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa 是 Pro 或 Asp
 <400> 250
 Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 251
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 251
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Asp
 1 5 10

<210> 252
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 252
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 253
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa 是 Asp 或 Ser
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa 是 Ser 或 Ile
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 是 Leu 或 Pro

<400> 253

Leu Gln His Xaa Xaa Tyr Pro Xaa Thr

1 5

<210> 254

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 254

Gly Ser Ala Met His

1 5

<210> 255

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 255

Arg Ile Arg Ser Arg Asn Asn Asn Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

[0075]

<210> 256

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 256

Leu Gln Gln Pro Pro Phe Asp Tyr

1 5

<210> 257

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 257

Leu Gln His Asp Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 258

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 258
Gly Ser Ala Ile His
1 5

<210> 259
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 259
Arg Ile Arg Ser Arg Thr Asn Asn Tyr Ala Thr Glu Tyr Asp Ala Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly

<210> 260
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 260
Leu Gly Gln Pro Pro Phe Asp Tyr
1 5

[0076]

<210> 261
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 261
Leu Gln His Ser Ile Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 262
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 262
Arg Ile Arg Ser Lys Gly Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly

<210> 263
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体
<400> 263
Gln Phe Gly Asp Pro Phe Asp Tyr
1 5

<210> 264
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 264
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 265
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 265
[0077] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 266
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 266
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 267
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 267
Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

[0078]

<210> 268
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 268
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 1 5 10

<210> 269
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 269
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Arg Thr Thr Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg
 20 25 30

<210> 270
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 270
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Arg Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg
 20 25 30

<210> 271
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 271
 Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Arg Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 272
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体

	<400>	272	
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	1	5	10
	<210>	273	
	<211>	23	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体	
	<400>	273	
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1	5	10 15
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys		
		20	
	<210>	274	
	<211>	23	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体	
	<400>	274	
	Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1	5	10 15
[0079]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys		
		20	
	<210>	275	
	<211>	23	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体	
	<400>	275	
	Ala Ile Arg Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1	5	10 15
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys		
		20	
	<210>	276	
	<211>	15	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体	
	<400>	276	
	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr		
	1	5	10 15
	<210>	277	
	<211>	32	

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 277
Gly Val Pro Ser Arg Phe Asn Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 278
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 278
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

[0080]

<210> 279
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 279
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 280
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 280
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 281
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 281
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1	5	10
<210> 282		
<211> 119		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成构建体		
<400> 282		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1 5 10 15		
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser		
20 25 30		
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35 40 45		
Gly Arg Ile Arg Ser Arg Asn Asn Asn Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala		
50 55 60		
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Arg Thr		
65 70 75 80		
Thr Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
85 90 95		
Tyr Cys Thr Arg Leu Gln Gln Pro Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
100 105 110		
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		

[0081]

<210> 283		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成构建体		
<400> 283		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1 5 10 15		
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp		
20 25 30		
Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile		
35 40 45		
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Asn Gly		
50 55 60		
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65 70 75 80		
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Ser Tyr Pro Leu		
85 90 95		
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100 105		
<210> 284		
<211> 119		
<212> PRT		
<213> 人工序列		

<220>

<223> 合成构建体

<400> 284

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

<210> 285

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 285

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

<210> 286

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 286

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

[0082]

```

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

```

<210> 287
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 287

[0083]

```

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

```

<210> 288
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 288

```

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

```


65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85	90	95
Thr Arg Ala Asn Tyr	Gly Asn Trp Phe Phe	Glu Val Trp Gly Gln Gly	
	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val	Ser Ser Ala Ser Thr	Lys Gly Pro Ser Val Phe	
	115	120	125
Pro Leu Ala Pro Cys	Ser Arg Ser Thr Ser	Glu Ser Thr Ala Ala Leu	
	130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys	Asp Tyr Phe Pro Glu	Pro Val Thr Val Ser Trp	
145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu	Thr Ser Gly Val His	Thr Phe Pro Ala Val Leu	
	165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu	Tyr Ser Leu Ser Ser	Val Val Thr Val Pro Ser	
	180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr	Lys Thr Tyr Thr Cys	Asn Val Asp His Lys Pro	
	195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val	Asp Lys Arg Val Glu	Ser Lys Tyr Gly Pro Pro	
	210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro	Ala Pro Glu Phe Leu	Gly Gly Pro Ser Val Phe	
225	230	235	240
Leu Phe Pro Pro Lys	Pro Lys Asp Thr Leu	Met Ile Ser Arg Thr Pro	
	245	250	255
Glu Val Thr Cys Val	Val Val Asp Val Ser	Gln Glu Asp Pro Glu Val	
	260	265	270
Gln Phe Asn Trp Tyr	Val Asp Gly Val Glu	Val His Asn Ala Lys Thr	
	275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu	Gln Phe Asn Ser Thr	Tyr Arg Val Val Ser Val	
	290	295	300
Leu Thr Val Leu His	Gln Asp Trp Leu Asn	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	
305	310	315	320
Lys Val Ser Asn Lys	Gly Leu Pro Ser Ser	Ile Glu Lys Thr Ile Ser	
	325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln	Pro Arg Glu Pro Gln	Val Tyr Thr Leu Pro Pro	
	340	345	350
Ser Gln Glu Glu Met	Thr Lys Asn Gln Val	Ser Leu Thr Cys Leu Val	
	355	360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro	Ser Asp Ile Ala Val	Glu Trp Glu Ser Asn Gly	
	370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn	Tyr Lys Thr Thr Pro	Pro Val Leu Asp Ser Asp	
385	390	395	400
Gly Ser Phe Phe Leu	Tyr Ser Arg Leu Thr	Val Asp Lys Ser Arg Trp	
	405	410	415
Gln Glu Gly Asn Val	Phe Ser Cys Ser Val	Met His Glu Ala Leu His	
	420	425	430
Asn His Tyr Thr Gln	Lys Ser Leu Ser Leu	Ser Leu Gly	
	435	440	445
<210>	289		
<211>	218		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		

<220>

<223> 合成构建体

<400> 289

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Lys Tyr
 20 25 30
 Gly Leu Ser Leu Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Arg Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

[0085]

<210> 290

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

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

	100	105	110
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
	115	120	125
	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
	130	135	140
	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
	145	150	155
	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
	165	170	175
	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
	180	185	190
	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
	195	200	205
	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
	210	215	220
	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
	225	230	235
	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
	245	250	255
	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
	260	265	270
	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
	275	280	285
	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
	290	295	300
[0086]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
	305	310	315
	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
	325	330	335
	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
	340	345	350
	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
	355	360	365
	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
	370	375	380
	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
	385	390	395
	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
	405	410	415
	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
	420	425	430
	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	435	440	445
	<210> 291		
	<211> 218		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成构建体		
	<400> 291		
	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		

1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Lys Tyr
 20 25 30
 Gly Leu Ser Leu Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Arg Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 [0087] 210 215

<210> 292

<211> 454

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 292

Glu Leu 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 Arg Ser Ser
 20 25 30
 Ile Phe Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Met Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ala Gly Gly Leu Tyr Asn Trp Asn Asp Glu Ser Phe Ser
 100 105 110
 Phe Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

[0088]

130				135				140							
Ser 145	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				150				155				160			
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
				165				170				175			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
				180				185				190			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr
				195				200				205			
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				210				215				220			
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
				225				230				235			
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
				245				250				255			
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
				260				265				270			
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
				275				280				285			
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe
				290				295				300			
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
				305				310				315			
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu
				325				330				335			
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
				340				345				350			
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
				355				360				365			
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
				370				375				380			
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
				385				390				395			
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
				405				410				415			
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				420				425				430			
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
				435				440				445			
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly										
				450											

<210> 293

<211> 215

<212> PRT

〈213〉 人工序列

<220>

〈223〉 合成构建体

<400> 293

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

```

                20                25                30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
    35                40                45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                55                60
Gly Ser 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 Arg Ser Pro
    85                90                95
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
    100                105                110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
    115                120                125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
    130                135                140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
    145                150                155                160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
    165                170                175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
    180                185                190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
    195                200                205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                215

```

[0089]

```

<210> 294
<211> 457
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 294
Glu Leu 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 Arg Ser Ser
    20                25                30
Ile Phe Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
    35                40                45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
    50                55                60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
    65                70                75                80
Ser Leu Met Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
    85                90                95
Cys Ala Arg Ala Gly Gly Leu Tyr Asn Trp Asn Asp Glu Ser Phe Ser
    100                105                110
Phe Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    115                120                125
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
    130                135                140
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

```

	145					150					155					160
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
					165					170						175
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
				180					185					190		
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
		195						200					205			
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
		210					215					220				
	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
	225					230					235					240
	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
					245						250					255
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
				260						265					270	
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
		275						280					285			
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
		290					295					300				
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
	305					310					315					320
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
					325						330				335	
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
				340						345				350		
[0090]	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
		355						360					365			
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
		370					375						380			
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
	385					390					395					400
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
					405						410				415	
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
				420						425				430		
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
		435						440					445			
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly							
		450					455									
	<210>	295														
	<211>	215														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	合成构建体														
	<400>	295														
	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
	1					5				10					15	
	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Phe	Ser	Ser	Ser
						20				25				30		
	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu

```

          35          40          45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50          55          60
Gly Ser 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 Arg Ser Pro
          85          90          95
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
    100          105          110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
    115          120          125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
    130          135          140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
    145          150          155          160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
          165          170          175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
          180          185          190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
          195          200          205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210          215

```

[0091]

```

<210> 296
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 296
Ala Tyr Ser Val Asn
1          5

```

```

<210> 297
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 297
Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1          5          10          15

```

```

<210> 298
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 298
Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn

```


	1	5	10	
	<210>	299		
	<211>	15		
	<212>	PRT		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	合成构建体		
	<400>	299		
	Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His			
	1	5	10	15
	<210>	300		
	<211>	7		
	<212>	PRT		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	合成构建体		
	<400>	300		
	Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser			
	1	5		
	<210>	301		
	<211>	9		
	<212>	PRT		
[0092]	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	合成构建体		
	<400>	301		
	Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr			
	1	5		
	<210>	302		
	<211>	118		
	<212>	PRT		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	合成构建体		
	<400>	302		
	Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln			
	1	5	10	15
	Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr			
		20	25	30
	Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu			
		35	40	45
	Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys			
		50	55	60
	Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu			
	65	70	75	80
	Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala			
		85	90	95
	Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser			

	100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 303			
<211> 111			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 303			
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly			
1 5 10 15			
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr			
20 25 30			
Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
35 40 45			
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp			
50 55 60			
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
65 70 75 80			
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn			
85 90 95			
Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100 105 110			

[0093]

<210> 304			
<211> 444			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 304			
Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln			
1 5 10 15			
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr			
20 25 30			
Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu			
35 40 45			
Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys			
50 55 60			
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu			
65 70 75 80			
Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala			
85 90 95			
Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser			
100 105 110			
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			
115 120 125			
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly			
130 135 140			
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn			

	145		150		155		160
	Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln						
		165		170		175	
	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser						
		180		185		190	
	Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser						
		195		200		205	
	Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys						
		210		215		220	
	Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu						
	225		230		235		240
	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu						
		245		250		255	
	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln						
		260		265		270	
	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys						
		275		280		285	
	Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu						
		290		295		300	
	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys						
	305		310		315		320
	Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys						
		325		330		335	
	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser						
		340		345		350	
[0094]	Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys						
		355		360		365	
	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln						
		370		375		380	
	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly						
	385		390		395		400
	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln						
		405		410		415	
	Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn						
		420		425		430	
	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly						
		435		440			
	<210>	305					
	<211>	218					
	<212>	PRT					
	<213>	人工序列					
	<220>						
	<223>	合成构建体					
	<400>	305					
	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly						
	1	5		10		15	
	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr						
		20		25		30	
	Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro						
		35		40		45	
	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp						

```

      50              55              60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65              70              75              80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
      85              90              95
Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
      100             105             110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
      115             120             125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
      130             135             140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145             150             155             160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
      165             170             175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
      180             185             190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
      195             200             205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210             215

```

<210> 306

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 306

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
      20              25              30
Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40              45
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Lys Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asp Ser Val
      50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Thr Arg Ala Asn Tyr Gly Asn Trp Phe Phe Glu Val Trp Gly Gln Gly
      100             105             110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
      115             120             125
Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
      130             135             140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145             150             155             160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
      165             170             175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

```

[0095]

180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445

 <210> 307
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 307
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Lys Tyr
 20 25 30
 Gly Leu Ser Leu Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Arg Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ly

<210>	308
<211>	454
<212>	PRT
<213>	人工序列
<220>	
<223>	合成构建体
<400>	308

Glu	Leu	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	Arg	Ser	Ser
			20					25					30		
Ile	Phe	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
	35					40						45			
Trp	Ile	Gly	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50				55					60					
Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
65				70					75					80	
Ser	Leu	Met	Leu	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
			85					90					95		
Cys	Ala	Arg	Ala	Gly	Gly	Leu	Tyr	Asn	Trp	Asn	Asp	Glu	Ser	Phe	Ser
	100							105					110		
Phe	Tyr	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
	115					120					125				
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
	130					135				140					
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
145				150					155					160	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			165					170					175		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		180				185						190			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr
	195					200					205				
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys

<210> 309
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 309
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser 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 Arg Ser Pro
85 90 95
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

	100		105		110										
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
	115		120		125										
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
	130		135		140										
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser
	145		150		155										160
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
			165						170					175	
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
			180						185					190	
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys
		195							200					205	
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
	210					215									

<210> 310

<211> 362

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 310

[0099]

Ala	Lys	Phe	Ser	Lys	Gln	Ser	Trp	Gly	Leu	Glu	Asn	Glu	Ala	Leu	Ile
1				5					10					15	
Val	Arg	Cys	Pro	Arg	Gln	Gly	Lys	Pro	Ser	Tyr	Thr	Val	Asp	Trp	Tyr
		20					25						30		
Tyr	Ser	Gln	Thr	Asn	Lys	Ser	Ile	Pro	Thr	Gln	Glu	Arg	Asn	Arg	Val
		35				40						45			
Phe	Ala	Ser	Gly	Gln	Leu	Leu	Lys	Phe	Leu	Pro	Ala	Ala	Val	Ala	Asp
	50					55				60					
Ser	Gly	Ile	Tyr	Thr	Cys	Ile	Val	Arg	Ser	Pro	Thr	Phe	Asn	Arg	Thr
	65				70					75				80	
Gly	Tyr	Ala	Asn	Val	Thr	Ile	Tyr	Lys	Lys	Gln	Ser	Asp	Cys	Asn	Val
			85						90					95	
Pro	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ser	Thr	Val	Ser	Gly	Ser	Glu	Lys	Asn	Ser
		100						105					110		
Lys	Ile	Tyr	Cys	Pro	Thr	Ile	Asp	Leu	Tyr	Asn	Trp	Thr	Ala	Pro	Leu
	115					120						125			
Glu	Trp	Phe	Lys	Asn	Cys	Gln	Ala	Leu	Gln	Gly	Ser	Arg	Tyr	Arg	Ala
	130					135						140			
His	Lys	Ser	Phe	Leu	Val	Ile	Asp	Asn	Val	Met	Thr	Glu	Asp	Ala	Gly
	145				150					155					160
Asp	Tyr	Thr	Cys	Lys	Phe	Ile	His	Asn	Glu	Asn	Gly	Ala	Asn	Tyr	Ser
			165						170					175	
Val	Thr	Ala	Thr	Arg	Ser	Phe	Thr	Val	Lys	Asp	Glu	Gln	Gly	Phe	Ser
		180						185						190	
Leu	Phe	Pro	Val	Ile	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Asn	Glu	Ile	Lys	Glu	Val
	195					200						205			
Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Ala	Asn	Leu	Thr	Cys	Ser	Ala	Cys	Phe	Gly	Lys
	210					215						220			
Gly	Thr	Gln	Phe	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Thr	Lys

225	230	235	240
Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln Asn			
	245	250	255
Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg Ile			
	260	265	270
Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu Ala			
	275	280	285
Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg Lys			
	290	295	300
Asn Pro Ile Asp His His Ser Gly Gly Arg Ala Arg Met Lys Gln Leu			
305	310	315	320
Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr His Leu Glu Asn			
	325	330	335
Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly Glu Arg Asp Tyr Lys Asp			
	340	345	350
Asp Asp Asp Lys His His His His His His			
	355	360	

<210> 311
 <211> 4852
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 311

[0100]

ggatctgcga tcgctccggt gcccgctcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccecg	60
agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa cgggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa	120
actgggaaag tgatgtcgtg tactggtctc gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt	180
atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac	240
agctgaagct tcgaggggct cgcattcttc cttcacgcgc ccgccgccct acctgaggcc	300
gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc cgcctcccgc ctgtggtgcc tctgaactg	360
cgtcgcgcgt ctaggttaagt ttaaagctca ggtcgagacc gggcctttgt ccggcgctcc	420
cttggagcct acctagactc agccggtctc ccacgcttg cctgaccctg cttgctcaac	480
tctacgtctt tgtttcgttt tctgttctgc gccgttacag atccaagctg tgaccggcgc	540
ctacctgaga tcaccggtca ccatgggggt ttggatctta gcaattctca caattctcat	600
gtattccaca gcagcaaagt ttagtaaaca atcatggggc ctggaaaatg aggccttaat	660
tgtaagatgt cctagacaag gaaaacctag ttacaccgtg gattggtatt actcacaac	720
aaacaaaagt attccactc aggaaagaaa tcgtgtgttt gcctcaggcc aacttctgaa	780
gtttctacca gctgcagttg ctgattctgg tatttatacc tgtattgtca gaagtcacac	840
attcaatagg actggatatg cgaatgtcac catatataaa aaacaatcag attgcaatgt	900
tccagattat ttgatgtatt caacagtatc tggatcagaa aaaaattcca aaatttattg	960
tcctaccatt gacctctaca actggacagc acctcttgag tggtttaaga attgtcaggc	1020
tcttcaagga tcaaggtaca gggcgacaaa gtcatttttg gtcattgata atgtgatgac	1080
tgaggacgca ggtgattaca cctgtaaatt tatacacaat gaaaatggag ccaattatag	1140
tgtgacggcg accaggtcct tcacggtcaa ggaatgagca ggcttttctc tgtttccagt	1200
aatcggagcc cctgcacaaa atgaaataaa ggaagtggaa attggaaaaa acgcaaacct	1260
aacttgctct gcttgttttg gaaaaggcac tcagttcttg gctgccgtcc tgtggcagct	1320
taatggaaca aaaattacag actttggtga accaagaatt caacaagagg aagggaacaa	1380
tcaaagtttc agcaatgggc tggttgtctc agacatggtt ttaagaatag ctgacgtgaa	1440
ggaagaggat ttattgctgc agtacgactg tctggccctg aatttgcatt gcttgagaag	1500
gcacaccgta agactaagta ggaaaaatcc aattgatcat catagcatct actgcataat	1560
tgcagtatgt agtgtatatt taatgctaata caatgtcctg gttatcatcc taaaaatggt	1620

[0101]	ctggattgag gccactctgc tctggagaga catagctaaa ccttacaaga ctaggaatga	1680
	tggaaagctc tatgatgctt atgttgtcta cccacggaac tacaaatcca gtacagatgg	1740
	ggccagtcgt gtagagcact ttgttcacca gattctgcct gatgttcttg aaaataaatg	1800
	tggctatacc ttatgcattt atgggagaga tatgttacct ggagaagatg tagtactgc	1860
	agtggaaacc aacatacgaa agagcaggcg gcacatttcc atcctgaccc ctcagatcac	1920
	tcacaataag gagtttgctt acgagcagga ggttgccctg cactgtgccc tcattccagaa	1980
	cgacgccaag gtgatactta ttgagatgga ggccttgagc gagctggaca tgcctgcaggc	2040
	tgaggcgctt caggactccc tccagcatct tatgaaagta caggggacca tcaagtggag	2100
	ggaggaccac attgccaata aaaggtccct gaattctaaa ttctggaagc acgtgaggta	2160
	ccaaatgcct gtgccaagca aaattcccag aaaggcctct agtttgactc ccttggtgc	2220
	ccagaagcaa tagagctagc tggccagaca tgataagata cattgatgag ttggacaaa	2280
	ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt	2340
	tatttgtaac cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta	2400
	tgtttcaggt tcagggggag gtgtgggagg ttttttaaag caagtaaac ctctacaaat	2460
	gtggtatgga attctaaaat acagcatagc aaaactttaa cctccaaatc aagcctctac	2520
	ttgaatcctt ttctgaggga tgaataaggc ataggcatca ggggctgttg ccaatgtgca	2580
	ttagctgttt gcagcctcac cttctttcat ggagttaaag atatagtgtt ttttcccaag	2640
	gtttgaacta gctcttcatt tctttatgtt ttaaatgcac tgacctccca cattcccttt	2700
	ttagtaaaat attcagaaat aatttaaata catcattgca atgaaaataa atgtttttta	2760
	ttaggcagaa tccagatgct caaggccctt cataatatcc cccagtttag tagttggact	2820
	tagggaacaa aggaaacctt aatagaaatt ggacagcaag aaagcgagct tctagcttta	2880
	gttcctggtg tacttgaggg ggatgagttc ctcaatggtg gttttgacca gcttgccatt	2940
	catctcaatg agcacaaagc agtcaggagc atagtcagag atgagctctc tgcacatgcc	3000
	acaggggctg accacctga tggatctgtc cacctcatca gtagtagggg cctgacagc	3060
	cacaatggtg tcaaatcctt tctgcccgtt gctcacagca gaccaatgg caatggcttc	3120
	agcacagaca gtgacctgc caatgtaggc ctcaatgtgg acagcagaga tgatctcccc	3180
	agtcttggtc ctgatggccg ccccgacatg gtgcttgttg tctcataga gcatggtgat	3240
	cttctcagtg gcgacctcca ccagctccag atcctgctga gagatgttga aggtcttcat	3300
	gatggccctc ctatagttag tctattata ctatgccgat atactatgcc gatgattaat	3360
	tgtaaaaaca gcgtggatgg cgtctccagc ttatctgacg gttcactaaa cgagctctgc	3420
	ttatatagac ctcccaccgt acacgcctac cgcccatttg cgtcaatggg gcggagtgtg	3480
	tacgacattt tggaaagtcc cgttgattta ctagtcaaaa caaactccca ttgacgtcaa	3540
	tggggtggag acttggaat ccccgtagt caaacgcta tccacgcca ttgatgtact	3600
	gccaaaaccg catcatcatg gtaatagcga tgactaatac gtagatgtac tgccaagtag	3660
	gaaagtccca taaggtcatg tactgggcat aatgccaggc gggccattta ccgtcattga	3720
	cgtcaatagg gggcgtaatt ggcatatgat acacttgatg tactgccaag tgggcagttt	3780
	accgtaaata ctccacctat tgacgtcaat ggaaagtccc tattggcgtt actatgggaa	3840
	catacgtcat tattgacgtc aatgggcggg ggtcgttggg cggtcagcca ggcgggccat	3900
	ttaccgtaag ttatgtaacg cctgcagggt aattaagaac atgtgagcaa aaggccagca	3960
	aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc	4020
	tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcaag tcagaggtgg cgaaaccga caggactata	4080
	aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc	4140
	gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttccgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc	4200
	acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga	4260
	acccccgtt cagcccagc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc	4320
	ggtaaagcac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag	4380
	gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct aactagaag	4440
	aacagtattt ggtatctgcg ctctgtgaa gccagttacc ttcgaaaaa gatttgtag	4500
	ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca	4560
	gattacgctc agaaaaaag gatctcaaga agatccttg atcttttcta cggggtctga	4620
	cgtcagtggt aacgaaaact cacgttaagg gattttgtgc atggctagtt aattaacatt	4680
	taaatcagcg gccgcaataa aatatcttta ttttcattac atctgtgtgt tggttttttg	4740

tgtgaatcgt aactaacata cgctctccat caaaacaaaa cgaacacaaa caaactagca 4800
 aaataggctg tccccagtgc aagtcaggt gccagaacat ttctctatcg aa 4852

<210> 312

<211> 556

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 312

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr
 1 5 10 15
 Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu
 20 25 30
 Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp
 35 40 45
 Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg
 50 55 60
 Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg
 85 90 95
 Thr Gly Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn
 100 105 110
 Val Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn
 115 120 125
 Ser Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro
 130 135 140
 Leu Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg
 145 150 155 160
 Ala His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala
 165 170 175
 Gly Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr
 180 185 190
 Ser Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe
 195 200 205
 Ser Leu Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu
 210 215 220
 Val Glu Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly
 225 230 235 240
 Lys Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr
 245 250 255
 Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln
 260 265 270
 Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg
 275 280 285
 Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu
 290 295 300
 Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg
 305 310 315 320
 Lys Asn Pro Ile Asp His His Ser Ile Tyr Cys Ile Ile Ala Val Cys
 325 330 335
 Ser Val Phe Leu Met Leu Ile Asn Val Leu Val Ile Ile Leu Lys Met
 340 345 350

[0102]

Phe Trp Ile Glu Ala Thr Leu Leu Trp Arg Asp Ile Ala Lys Pro Tyr
 355 360 365
 Lys Thr Arg Asn Asp Gly Lys Leu Tyr Asp Ala Tyr Val Val Tyr Pro
 370 375 380
 Arg Asn Tyr Lys Ser Ser Thr Asp Gly Ala Ser Arg Val Glu His Phe
 385 390 395 400
 Val His Gln Ile Leu Pro Asp Val Leu Glu Asn Lys Cys Gly Tyr Thr
 405 410 415
 Leu Cys Ile Tyr Gly Arg Asp Met Leu Pro Gly Glu Asp Val Val Thr
 420 425 430
 Ala Val Glu Thr Asn Ile Arg Lys Ser Arg Arg His Ile Phe Ile Leu
 435 440 445
 Thr Pro Gln Ile Thr His Asn Lys Glu Phe Ala Tyr Glu Gln Glu Val
 450 455 460
 Ala Leu His Cys Ala Leu Ile Gln Asn Asp Ala Lys Val Ile Leu Ile
 465 470 475 480
 Glu Met Glu Ala Leu Ser Glu Leu Asp Met Leu Gln Ala Glu Ala Leu
 485 490 495
 Gln Asp Ser Leu Gln His Leu Met Lys Val Gln Gly Thr Ile Lys Trp
 500 505 510
 Arg Glu Asp His Ile Ala Asn Lys Arg Ser Leu Asn Ser Lys Phe Trp
 515 520 525
 Lys His Val Arg Tyr Gln Met Pro Val Pro Ser Lys Ile Pro Arg Lys
 530 535 540
 Ala Ser Ser Leu Thr Pro Leu Ala Ala Gln Lys Gln
 545 550 555

[0103]

<210> 313
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> 人类
 <400> 313

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

<210> 314
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 314
 Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15
 Arg Gly Ser His Met Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Ser Leu Ser Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu
 35 40 45
 Glu Asp Glu Ser Tyr Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu
 50 55 60
 Lys Lys Asp Lys Val Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser
 65 70 75 80
 Asn Glu Ser Gly Asp Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu
 85 90 95
 Ser Pro Thr Lys Asp Phe Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser
 100 105 110
 Val Glu Leu His Lys Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe
 115 120 125
 Val Leu His Asn Met His Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr
 130 135 140
 [0104] Asp Pro Gly Val Phe Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile
 145 150 155 160
 Lys Val Asp Ser Ser Glu Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys
 165 170 175
 Leu Ser Glu Thr
 180

<210> 315
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 315
 Met His His His His His His Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser
 1 5 10 15
 Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr Glu
 35 40 45
 Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val Leu
 50 55 60
 Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp Gly
 65 70 75 80
 Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp Phe
 85 90 95

Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys Cys
 100 105 110
 Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Met His
 115 120 125
 Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe Ile
 130 135 140
 Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser Glu
 145 150 155 160
 Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr Gly Asn
 165 170 175
 Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
 180 185 190
 His Glu

<210> 316

<211> 159

<212> PRT

<213> 食蟹猴(Macaca fascicularis)

<400> 316

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 Thr
 145 150 155

<210> 317

<211> 180

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 317

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15
 Arg Gly Ser His Met Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Ser
 20 25 30

[0105]

```

Leu Ala Ser Leu Ser Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu
   35                               40                               45
Glu Asp Glu Ser Tyr Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Lys
   50                               55                               60
Lys Lys Asp Lys Val Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser
   65                               70                               75                               80
Ser Glu Ser Gly Asp Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu
                               85                               90                               95
Ser Pro Thr Lys Asp Phe Trp Leu Gln Ala Asn Asn Lys Glu His Ser
                               100                               105                               110
Val Glu Leu His Lys Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe
                               115                               120                               125
Val Leu His Asn Arg Ser Phe Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr
                               130                               135                               140
Asp Pro Gly Val Phe Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile
   145                               150                               155                               160
Lys Val Asp Tyr Ser Glu Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ile Leu Phe Lys
                               165                               170                               175
Leu Ser Glu Thr
                               180

```

<210> 318

<211> 194

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 318

```

Met His His His His His His Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser
1                               5                               10                               15
Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Ser Leu Ala Ser Leu Ser Thr
                               20                               25                               30
Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr Glu
                               35                               40                               45
Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Lys Lys Lys Asp Lys Val Leu
   50                               55                               60
Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Ser Glu Ser Gly Asp Gly
   65                               70                               75                               80
Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp Phe
                               85                               90                               95
Trp Leu Gln Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys Cys
                               100                               105                               110
Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Arg Ser
                               115                               120                               125
Phe Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe Ile
   130                               135                               140
Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Tyr Ser Glu
   145                               150                               155                               160
Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr Gly Asn
                               165                               170                               175
Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
                               180                               185                               190

```

[0106]

His Glu

<210> 319

<211> 379

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 319

```

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr
1           5           10           15
Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu
20           25           30
Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp
35           40           45
Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg
50           55           60
Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala
65           70           75           80
Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg
85           90           95
Thr Gly Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn
100          105          110
Val Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn
115          120          125
Ser Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro
130          135          140
Leu Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg
145          150          155          160
Ala His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala
165          170          175
Gly Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr
180          185          190
Ser Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe
195          200          205
Ser Leu Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu
210          215          220
Val Glu Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly
225          230          235          240
Lys Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr
245          250          255
Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln
260          265          270
Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg
275          280          285
Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu
290          295          300
Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg
305          310          315          320
Lys Asn Pro Ile Asp His His Ser Gly Gly Arg Ala Arg Met Lys Gln
325          330          335

```

[0107]

	Leu Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr His Leu Glu	
	340 345 350	
	Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly Glu Arg Asp Tyr Lys	
	355 360 365	
	Asp Asp Asp Asp Lys His His His His His	
	370 375	
	<210> 320	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 320	
	tttyttgtcc accktggtgc tgc	23
	<210> 321	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 321	
	gtagaagttg ttcaagaag	19
[0108]	<210> 322	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 322	
	gtgtagagky cagactscag g	21
	<210> 323	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 323	
	gaggcacctc cagatgttaa c	21
	<210> 324	
	<211> 66	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (66).. (66)	

[0109]	<223> n是 a, c, g 或 t	
	<400> 324	
	gattcaaatc tcaattatat aatccgaata tgtttaccgg ctgcgtcatg gacccccccc	60
	ccccdn	66
	<210> 325	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 325	
	caattatata atccgaatat g	21
	<210> 326	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 326	
	gaartarccc ttgaccaggc	20
	<210> 327	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 327	
	gaagatggat acagttggtg c	21
	<210> 328	
	<211> 118	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 328	
	Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln	
	1 5 10 15	
	Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr	
	20 25 30	
	Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu	
	35 40 45	
	Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys	
	50 55 60	
	Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu	
	65 70 75 80	
	Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala	
	85 90 95	
	Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser	

	100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 329			
<211> 111			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 329			
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly			
1 5 10 15			
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr			
20 25 30			
Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
35 40 45			
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp			
50 55 60			
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
65 70 75 80			
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn			
85 90 95			
Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100 105 110			

[0110]

<210> 330			
<211> 444			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 330			
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln			
1 5 10 15			
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr			
20 25 30			
Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu			
35 40 45			
Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys			
50 55 60			
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu			
65 70 75 80			
Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala			
85 90 95			
Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser			
100 105 110			
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			
115 120 125			
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly			
130 135 140			
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn			

	145		150		155		160	
	Ser Gly Ala Leu Thr	Ser Gly Val His Thr	Phe Pro Ala Val Leu Gln					
		165		170		175		
	Ser Ser Gly Leu Tyr	Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser						
		180		185		190		
	Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser							
		195		200		205		
	Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys							
		210		215		220		
	Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu							
		225		230		235		240
	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu							
		245		250		255		
	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln							
		260		265		270		
	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys							
		275		280		285		
	Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu							
		290		295		300		
	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys							
		305		310		315		320
	Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys							
		325		330		335		
	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser							
		340		345		350		
[0111]	Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys							
		355		360		365		
	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln							
		370		375		380		
	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly							
		385		390		395		400
	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln							
		405		410		415		
	Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn							
		420		425		430		
	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly							
		435		440				
	<210> 331							
	<211> 218							
	<212> PRT							
	<213> 人工序列							
	<220>							
	<223> 合成构建体							
	<400> 331							
	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly							
	1	5		10		15		
	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr							
		20		25		30		
	Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro							
		35		40		45		
	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp							

50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65	70	75
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn		80
	85	90
Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		95
	100	105
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		110
	115	120
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		125
	130	135
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		140
145	150	155
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		160
	165	170
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		175
	180	185
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		190
	195	200
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		205
210	215	

<210> 332

<211> 1050

<212> DNA

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 332

atgattgaca gacagagaat gggactttgg gctttggcaa ttctgacact tcccatgtat	60
ttgacagtta cggagggcag taaatcgctc tggggctctgg aaaatgaggc tttaattgtg	120
agatgcccc aaagaggacg ctcgacttat cctgtggaat ggtattactc agatacaaat	180
gaaagtattc ctactcaaaa aagaaatcgg atctttgtct caagagatcg tctgaagttt	240
ctaccagcca gagtgaaga ctctgggatt tatgcttgtg ttatcagaag cccaacttg	300
aataagactg gatacttgaa tgtcaccata cataaaaagc cgccaagctg caatatecct	360
gattatttga tgtactcgac agtacgtgga tcagataaaa atttcaagat aacgtgtcca	420
acaattgacc tgtataattg gacagcacct gttcagtggt ttaagaactg caaagctctc	480
caagagccaa gggttcaggc acacaggtcc tacttggtca ttgacaacgt gactcatgat	540
gatgaaggtg actacacttg tcaattcaca cagcggaga atggaaccaa ctacatcgtg	600
acggccacca gatcattcac agttgaagaa aaaggctttt ctatgtttcc agtaattaca	660
aatcctccat acaaccacac aatggaagtg gaaataggaa aaccagcaag tattgcctgt	720
tcagcttgct ttggcaaagg ctctcacttc ttggctgatg tcctgtggca gattaacaaa	780
acagtagttg gaaatttttg tgaagcaaga attcaagaag aggaaggtcg aaatgaaagt	840
tccagcaatg acatggattg tttaacctca gtgttaagga taactgggtg gacagaaaag	900
gacctgtccc tggaatatga ctgtctggcc ctgaaccttc atggcatgat aaggcacacc	960
ataaggctga gaaggaaaca accaagtaag gagtgtccct cacacattgc tggcgggcgc	1020
gcccatcatc atcatcatca tcaccactaa	1050

<210> 333

<211> 349

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 333

Met Ile Asp Arg Gln Arg Met Gly Leu Trp Ala Leu Ala Ile Leu Thr

	1				5					10					15	
	Leu	Pro	Met	Tyr	Leu	Thr	Val	Thr	Glu	Gly	Ser	Lys	Ser	Ser	Trp	Gly
				20					25					30		
	Leu	Glu	Asn	Glu	Ala	Leu	Ile	Val	Arg	Cys	Pro	Gln	Arg	Gly	Arg	Ser
			35					40					45			
	Thr	Tyr	Pro	Val	Glu	Trp	Tyr	Tyr	Ser	Asp	Thr	Asn	Glu	Ser	Ile	Pro
		50					55					60				
	Thr	Gln	Lys	Arg	Asn	Arg	Ile	Phe	Val	Ser	Arg	Asp	Arg	Leu	Lys	Phe
	65					70					75				80	
	Leu	Pro	Ala	Arg	Val	Glu	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ala	Cys	Val	Ile	Arg
					85					90					95	
	Ser	Pro	Asn	Leu	Asn	Lys	Thr	Gly	Tyr	Leu	Asn	Val	Thr	Ile	His	Lys
				100					105					110		
	Lys	Pro	Pro	Ser	Cys	Asn	Ile	Pro	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ser	Thr	Val
			115					120						125		
	Arg	Gly	Ser	Asp	Lys	Asn	Phe	Lys	Ile	Thr	Cys	Pro	Thr	Ile	Asp	Leu
		130					135					140				
	Tyr	Asn	Trp	Thr	Ala	Pro	Val	Gln	Trp	Phe	Lys	Asn	Cys	Lys	Ala	Leu
	145					150					155				160	
	Gln	Glu	Pro	Arg	Phe	Arg	Ala	His	Arg	Ser	Tyr	Leu	Phe	Ile	Asp	Asn
					165					170					175	
	Val	Thr	His	Asp	Asp	Glu	Gly	Asp	Tyr	Thr	Cys	Gln	Phe	Thr	His	Ala
				180					185					190		
	Glu	Asn	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ile	Val	Thr	Ala	Thr	Arg	Ser	Phe	Thr	Val
		195						200					205			
[0113]	Glu	Glu	Lys	Gly	Phe	Ser	Met	Phe	Pro	Val	Ile	Thr	Asn	Pro	Pro	Tyr
		210					215					220				
	Asn	His	Thr	Met	Glu	Val	Glu	Ile	Gly	Lys	Pro	Ala	Ser	Ile	Ala	Cys
	225					230					235				240	
	Ser	Ala	Cys	Phe	Gly	Lys	Gly	Ser	His	Phe	Leu	Ala	Asp	Val	Leu	Trp
				245						250					255	
	Gln	Ile	Asn	Lys	Thr	Val	Val	Gly	Asn	Phe	Gly	Glu	Ala	Arg	Ile	Gln
				260					265					270		
	Glu	Glu	Glu	Gly	Arg	Asn	Glu	Ser	Ser	Ser	Asn	Asp	Met	Asp	Cys	Leu
		275						280					285			
	Thr	Ser	Val	Leu	Arg	Ile	Thr	Gly	Val	Thr	Glu	Lys	Asp	Leu	Ser	Leu
		290					295					300				
	Glu	Tyr	Asp	Cys	Leu	Ala	Leu	Asn	Leu	His	Gly	Met	Ile	Arg	His	Thr
	305					310					315				320	
	Ile	Arg	Leu	Arg	Arg	Lys	Gln	Pro	Ser	Lys	Glu	Cys	Pro	Ser	His	Ile
					325					330					335	
	Ala	Gly	Gly	Arg	Ala	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His
				340						345						
	<210>		334													
	<211>		120													
	<212>		PRT													
	<213>		人工序列													
	<220>															
	<223>		合成构建体													
	<400>		334													
	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 Ile Ser Asp Tyr
          20           25           30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45
Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95
Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
          100          105          110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 335
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 335

[0114]

```

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

```

<210> 336
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 336

```

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

```

<210> 337
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 337

```

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

```

[0115]

<210> 338
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 338

```

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

```


	100	105
<210>	339	
<211>	107	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成构建体	
<400>	339	
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
	1 5 10 15	
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Arg Arg Ser	
	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 Ala 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 Thr Ser Pro Leu	
	85 90 95	
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
	100 105	
[0116]	<210>	340
	<211>	121
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成构建体
	<400>	340
	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 Ser Ile Asn Gly Ser	
	20 25 30	
	Trp Ile Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
	35 40 45	
	Gly Ala Ile Trp Pro Phe Gly Gly Tyr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val	
	50 55 60	
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr	
	65 70 75 80	
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
	Ala Arg Trp Gly His Ser Thr Ser Pro Trp Ala Met Asp Tyr Trp Gly	
	100 105 110	
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115 120	
<210>	341	
<211>	107	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	

	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 341	
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
	1 5 10 15	
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Arg Arg Ser	
	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 Ala 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 Thr Ser Pro Leu	
	85 90 95	
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
	100 105	
	<210> 342	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 342	
[0117]	ttaagaccag ctatctccca tca	23
	<210> 343	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 343	
	acgttacatc ttagagagct taaaca	26
	<210> 344	
	<211> 122	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 344	
	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> 345
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 345

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly	
1	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp	
20	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile	
35	45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe	
85	95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys	
100	105

[0118]

<210> 346
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 346

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
tctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatggca tgcatgggt ccgccagget	120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagaaa taaatactat	180
acagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatgg acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagagg	300
tatatcagca gctattatgg ggggttcgac cctgggggcc agggagccct ggtcaccgtc	360
tctca	366

<210> 347
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 347

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgtc gggcgagtc gggatattagt agttggtttag cctgggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaaggctct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccattcac tttcggcct      300
gggaccaaac tggatatcaa g                                          321

```

<210> 348
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 348

```

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

```

[0119]

<210> 349
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 349

```

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>	350	
<211>	357	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成构建体	
<400>	350	
	gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagac ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt caccttcagc agctatgcc tgcagctgggt ccgccaggct	120
	ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attagtggta gtggaagtag cacagactac	180
	gcagactccg tgaagggccg gttcaccatt tccagagaca attccaggga cacgctgcat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaacgttc	300
	tactacttct acggttttga cgtctggggc caagggaacca cggtcaccgt ctctca	357
<210>	351	
<211>	321	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成构建体	
<400>	351	
	gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctttaagaga cagagtcacc	60
	atcacttgcc gggcgagtcg gggcattagc aattatttag cctggtatca gcagaaacca	120
	gggaaagtcc ctaaggtcct aatctatgct gcattcactt tgcaatcagg ggtcccatct	180
	cggttcagtg gcagtggatc tgggacagtt ttcactctca ccatcagcag cctgcagact	240
[0120]	gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaag tatagcagtg ccccatcac tttcggccct	300
	gggaccaaag tggatatcaa a	321
<210>	352	
<211>	117	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成构建体	
<400>	352	
	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> 353
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 353
 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

[0121]

<210> 354
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 354
 cagggtgcttc tggtagcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggccac agtgaaggtc 60
 tcttgcagg cttctggatc cactttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acaatggtgg cacaaactat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggaattga gcaggtctgag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gagagagttg 300
 cgggtataact ggaagtcctg gggccaggga accctggatc ccgtctcctc a 351

 <210> 355
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 355
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagtcacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttggc aggccctact tagcctggta ccaacagata 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tgacatccca 180
 gacaggttca gtggcaatgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag tagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatgata attcccctta tacttttggc 300
 caggggacca ggctggagat caaa 324

 <210> 356

<211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 356
 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

[0122]

<210> 357
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 357
 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 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 358
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 358

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacaac ctgggggggc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttaga agctttgcca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggcctggaatt ggtctcagat ctcaggacta gtggtggtag tacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gctcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagccac      300
tatagcacca gctggttcgg gggctttgac tactggggcc agggaaccct ggtcactgtc      360
tcctca

```

<210> 359
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 359

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgctt ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgtc gggcgagtca gggttttagc agctggttag cctggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatget gcattccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactcttca ccatcaccaa cctgcagcct      240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctctcac tttcgcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa a

```

<210> 360
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 360

```

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> 361
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体

[0123]

<400> 361															
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					
			100					105							

<210>	362
<211>	366
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	合成构建体
<400>	362

gaggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	cacgttttagc	agctatgtca	tgagctgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagc	ggcttgagtg	ggtctcaagt	attagtggta	atggtggtag	cacaaactac	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgttt	240
ctggaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggccgtat	attactgtgc	gaaatcactg	300
ggaactacca	cgactttttt	ggggtttgac	tattggggcc	agggaaccct	ggtcaccgtc	360
tcctca						366

<210>	363
<211>	321
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	合成构建体
<400>	363

gacatccaga	tgaccacgtc	tccatcttcc	gtgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgtc	gggcgagtca	gggtattagc	agctggtttag	cctggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaaactcct	gatctatgct	gcatccagtt	tgcaaagtgg	ggtcccatca	180
aggttcagcg	gcagtggtac	tgggacatat	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagcct	240
gaagattttg	caacttacta	ttgtcaacag	gctaacagtt	tcctcttcac	tttcggcgga	300
gggaccaagg	tggagatcaa	a				321

<210>	364
<211>	121
<212>	PRT
<213>	人工序列
<220>	
<223>	合成构建体
<400>	364

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

<210> 365
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 365

[0125]

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> 366
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 366

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttattact ggagctggat ccggcagccc 120
 ccaggaagg gactggagtt gattgggtat atttattaca gtgggagcac caattataac 180
 cctccctca agagtcgagt caccatatct gtagacacgt ccaagaacca cttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtatatt actgtgcgag atcccagtat 300
 accagtagtt ggtacggttc tttgatatac tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360

	tca	363
	<210> 367	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 367	
	gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
	atcacttgtc gggcgagtc gggatttagc acctggtag cctggtttca gcagaaacca	120
	gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tacaaggtgg ggtcccatca	180
	aggttcagcg gcagtggatc tgggccagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
	gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgtggac gttcggccaa	300
	gggaccaagg tggaaatcaa a	321
	<210> 368	
	<211> 122	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 368	
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
	1 5 10 15	
[0126]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Ser Tyr	
	20 25 30	
	Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
	35 40 45	
	Gly Trp Ile Ser Ser His Asn Gly Asn Ser His Tyr Val Gln Lys Phe	
	50 55 60	
	Gln Gly Arg Val Ser Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
	65 70 75 80	
	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
	Ala Arg His Ser Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr Trp	
	100 105 110	
	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115 120	
	<210> 369	
	<211> 107	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 369	
	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 Leu Ile	

	35	40	45	
	Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60	
	Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
	65	70	75	80
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu			
	85	90	95	
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105		
	<210> 370			
	<211> 366			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成构建体			
	<400> 370			
[0127]	caggttcagc tggtcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc			60
	tcctgcaagg cctctgggta cacctttaac agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc			120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagctccc acaatggtaa cagtcactat			180
	gtacagaagt tccagggcag agtctccatg accacagaca catccacgag tacagcctac			240
	atggaactga ggagcccttag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagacactcg			300
	tataccacca gctggtacgg gggttttgac tattggggcc agggaaccct ggtcaccgtc			360
	tctca			366
	<210> 371			
	<211> 321			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成构建体			
	<400> 371			
	gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc			60
	atcacttgtc gggcgagtca gggtttttagc agctgggttag cctggtatca gcagaaacca			120
	gggaaagccc ctcagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca			180
	aggttcagcg gcagtggatc tgggtcagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct			240
	gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctctcac ttctcgcgga			300
	gggaccaagg tggagatcaa a			321

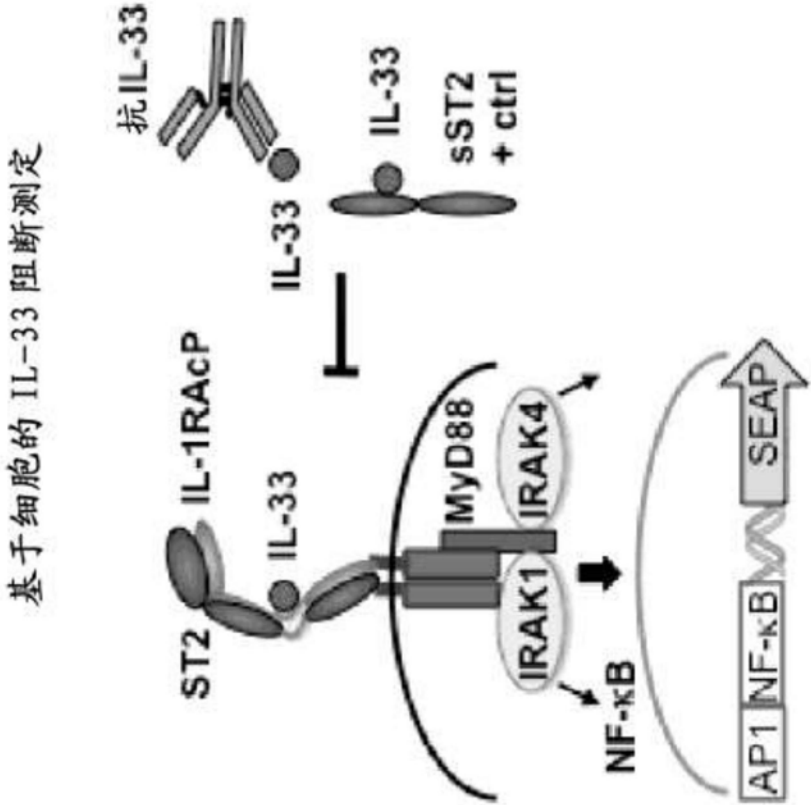


图1A

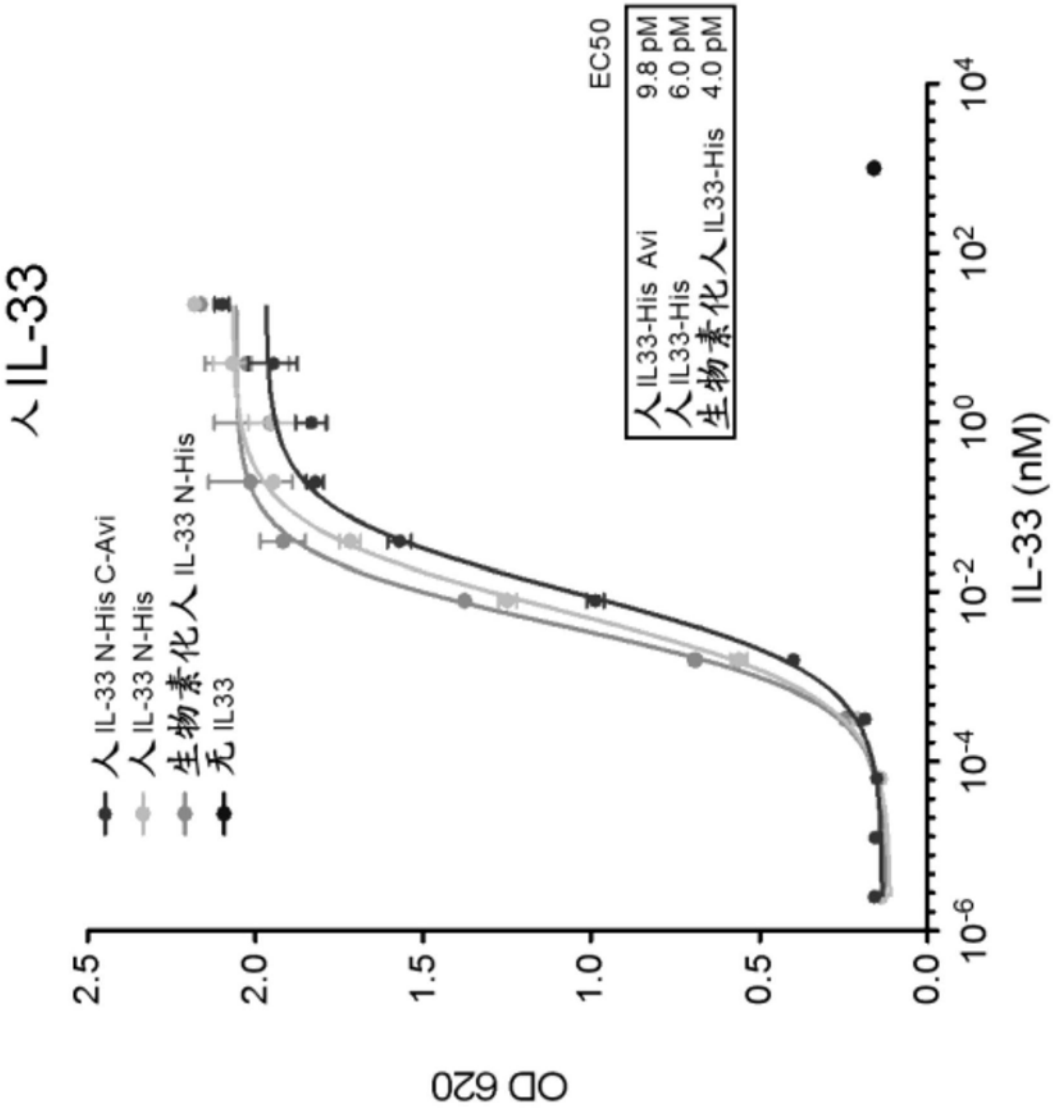


图1B

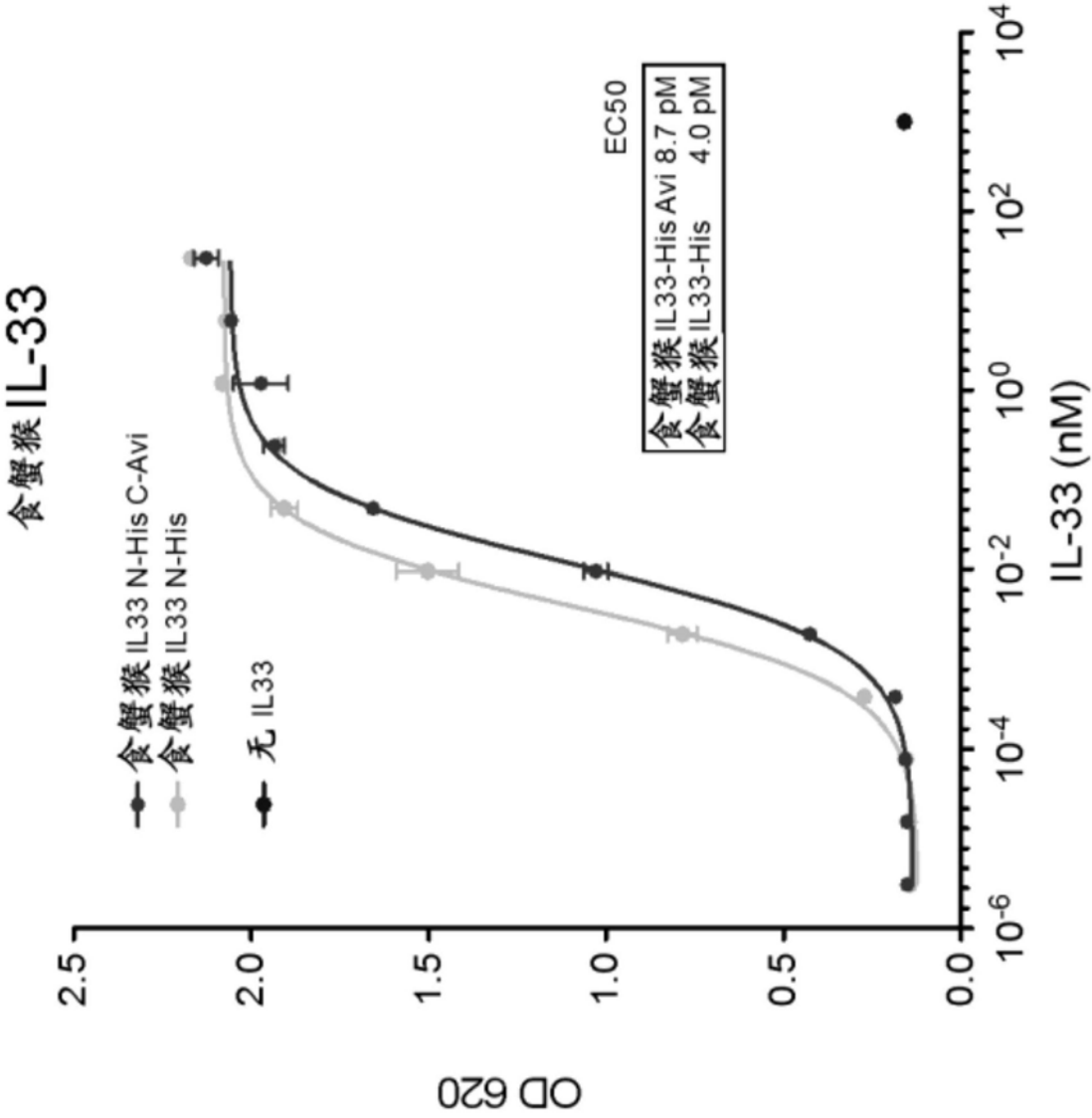


图1C

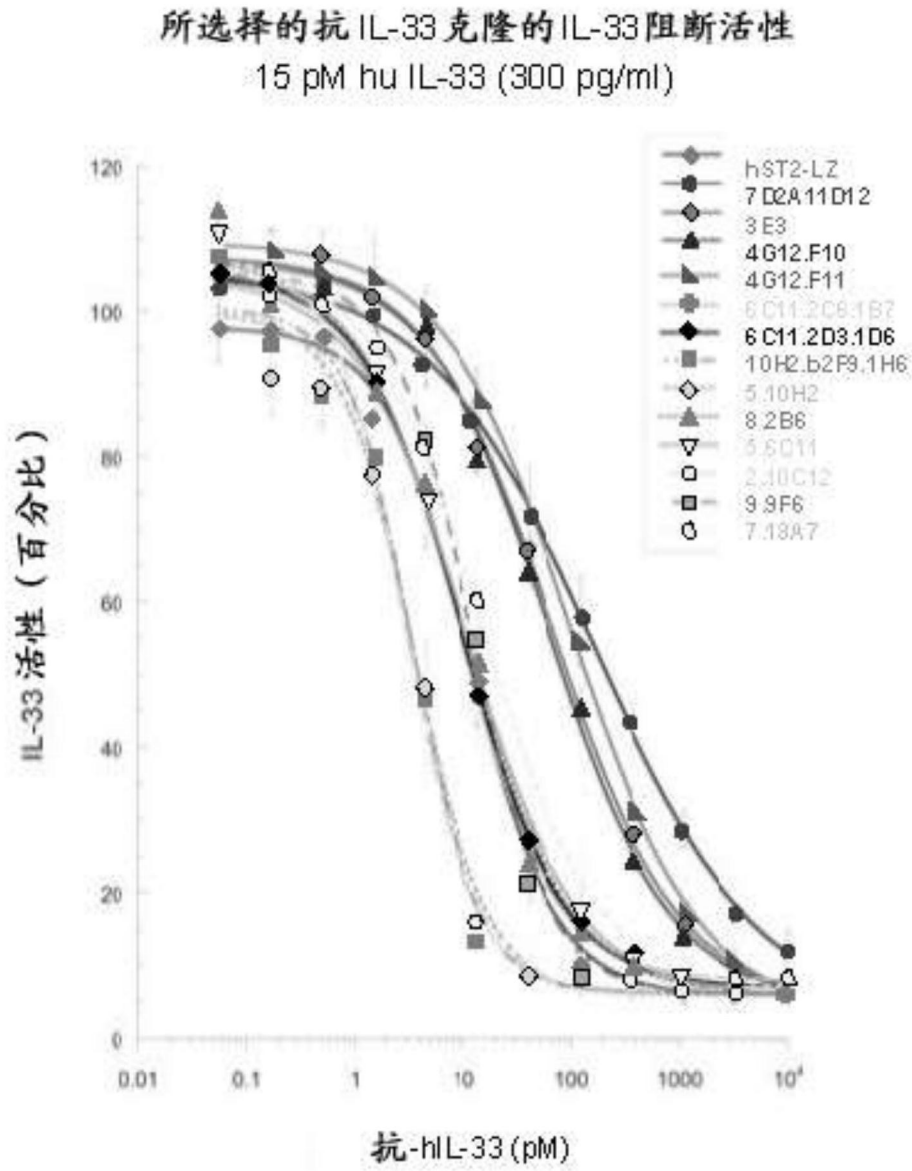
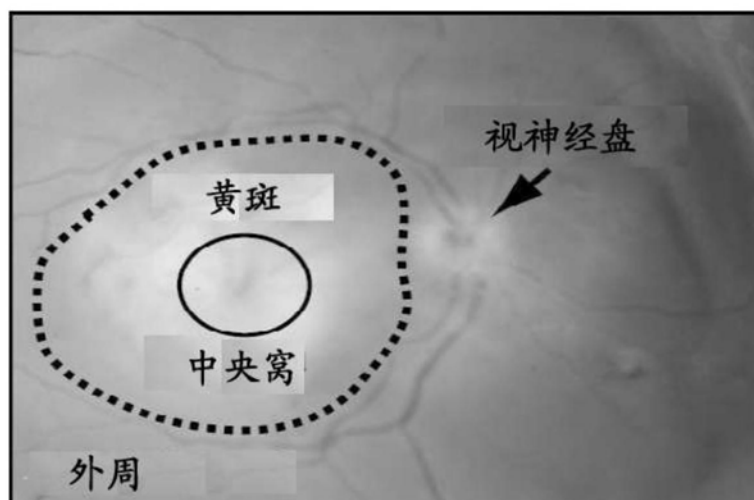


图2

抗-IL-33	Hu IL-33_IC ₅₀ (pM)	Hu IL-33_IC ₅₀ (pM)	Hu IL-33_IC ₉₀ (ug/mL)	食蟹猴IL-33_IC ₅₀ (pM)	食蟹猴 IL-33_IC ₉₀ (pM)	食蟹猴IL-33_IC ₉₀ (ug/mL)
hST2-LZ	12.2	46.7		1.8	3.6	
10C12小鼠形式	3.9	18.2	0.0027	141.9	1289.0	0.1934
10C12.38.H7.HC.62A	2.7	7.7	0.0012	43.5	435.5	0.0653
10C12.38.H7.HC.100Y	>10000	>10000	>1.5	>10000	>10000	>1.5
10C12.38.H7.HC.34L	2.5	8.0	0.0012	39.5	592.9	0.0889
10C12.38.H7.HC.100F	121.3	1625.0	0.2438	>10000	>10000	>1.5
10C12.38.H7.HC.34V	4.5	20.9	0.0031	89.1	1313.0	0.1970
10C12.38.H1.87Y.58I	12.9	182.2	0.0273	134.9	1451.0	0.2177
10C12.38.H4.87Y.58I	3.6	33.3	0.0050	50.6	531.6	0.0797
10C12.38.H6.87Y	2.6	17.4	0.0026	119.1	1674.0	0.2511
10C12.38.H6.87Y.58I	2.0	20.5	0.0031	181.3	1217.0	0.1826
10C12.38.H6.58I	3.2	18.8	0.0028	156.6	2299.0	0.3449
10C12.38.H7.87Y	2.7	10.9	0.0016	55.0	583.8	0.0876
10C12.38.H7.87Y.58I	3.4	15.2	0.0023	59.1	1087.0	0.1631
10C12.38.H7.58I	2.1	6.5	0.0010	28.6	374.6	0.0562
10H2小鼠形式	5.3	31.0	0.0047	17.4	271.0	0.0407
10H2.36.F10.LC30L	3.1	11.0	0.0017	4.2	17.0	0.0026
10H2.36.F10.LC30V	6.5	34.7	0.0052	39.6	1185.0	0.1778
10H2.36.F10.HC54D	6.9	32.5	0.0049	72.2	1531.0	0.2297
10H2.36.F10.HC54S	3.5	13.4	0.0020	24.8	435.7	0.0654
10H2.36.F10.HC56A	2.9	11.5	0.0017	22.9	260.1	0.0390
10H2.36.F10.HC100Y	>10000	>10000	>1.5	>10000	>10000	>1.5
10H2.36.F10.HC33F	4.3	26.8	0.0040	17.6	431.0	0.0647
10H2.36.F10.HC33Y	5.6	77.8	0.0117	62.8	527.1	0.0791
10H2.36.F10.HC54A	3.0	15.1	0.0023	21.5	471.6	0.0707
10H2.36.F10.HC100F	46.7	447.5	0.0671	1166.0	>10000	>1.5
6C11小鼠形式	21.3	120.4	0.0181	>10000	>10000	>1.5
6C11.36.B2.52cA	18.3	203.5	0.0305	1099.0	>10000	>1.5
6C11.36.B2.52bS	4.9	58.1	0.0087	2153.0	>10000	>1.5
6C11.36.B2.100Y	>10000	>10000	>1.5	>10000	>10000	>1.5
6C11.36.B2.100F	1350.0	>10000	>1.5	6664.0	>10000	>1.5
4G12亲本	80.7	854.2	0.1281	18.3	215.6	0.0323
4G12.100aY	4433.0	>10000	>1.5	1181.0	>10000	>1.5
4G12.100aF	2698.0	>10000	>1.5	2427.0	>10000	>1.5
4G12.62A	94.1	1244.0	0.1866	19.6	93.7	0.0141

图3

A.



B.

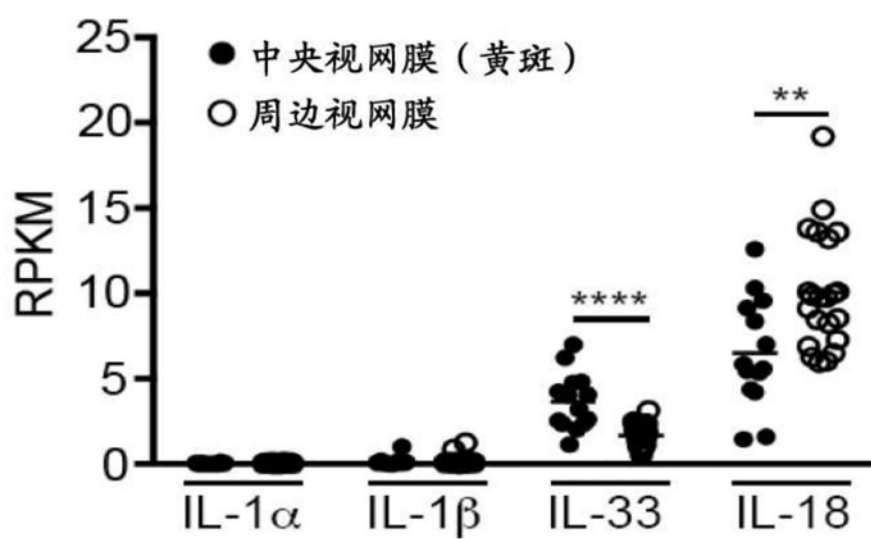


图4A-4B

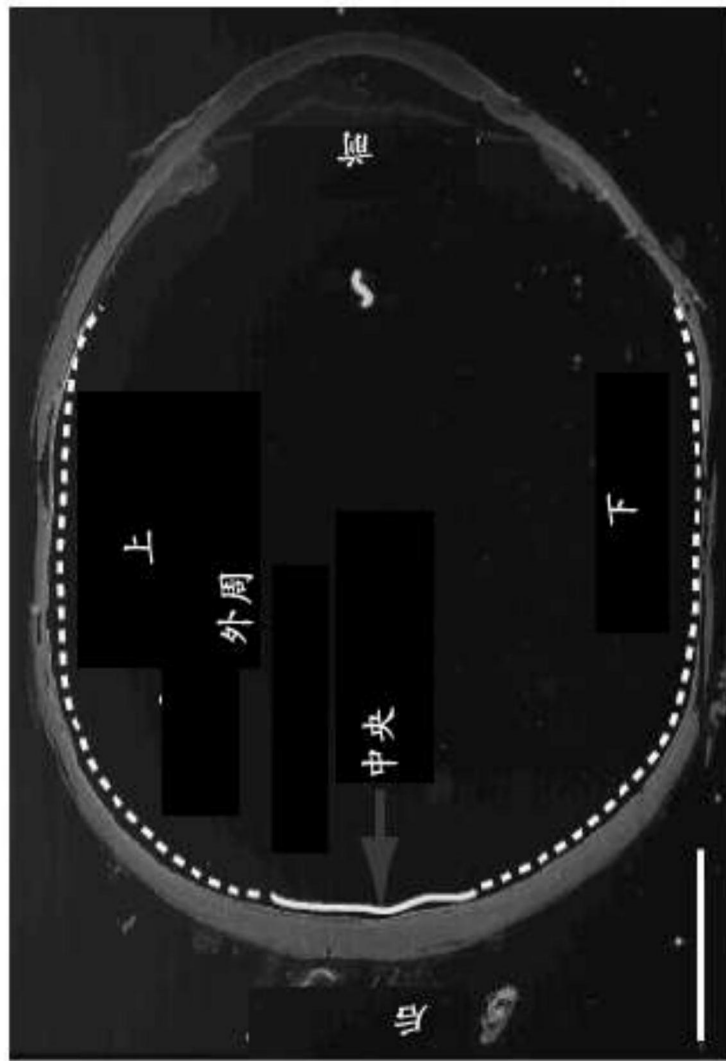


图5A

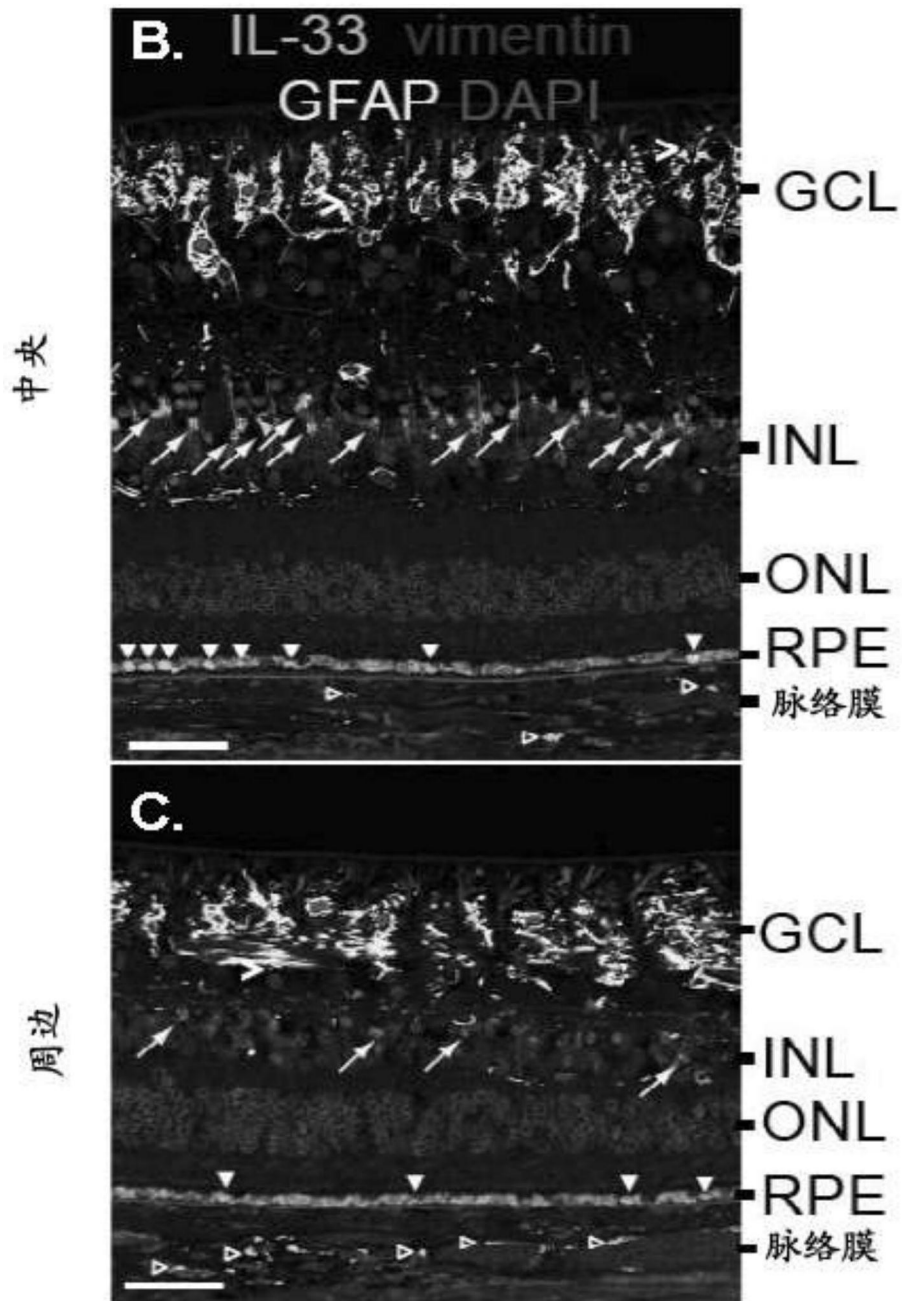


图5B-5C

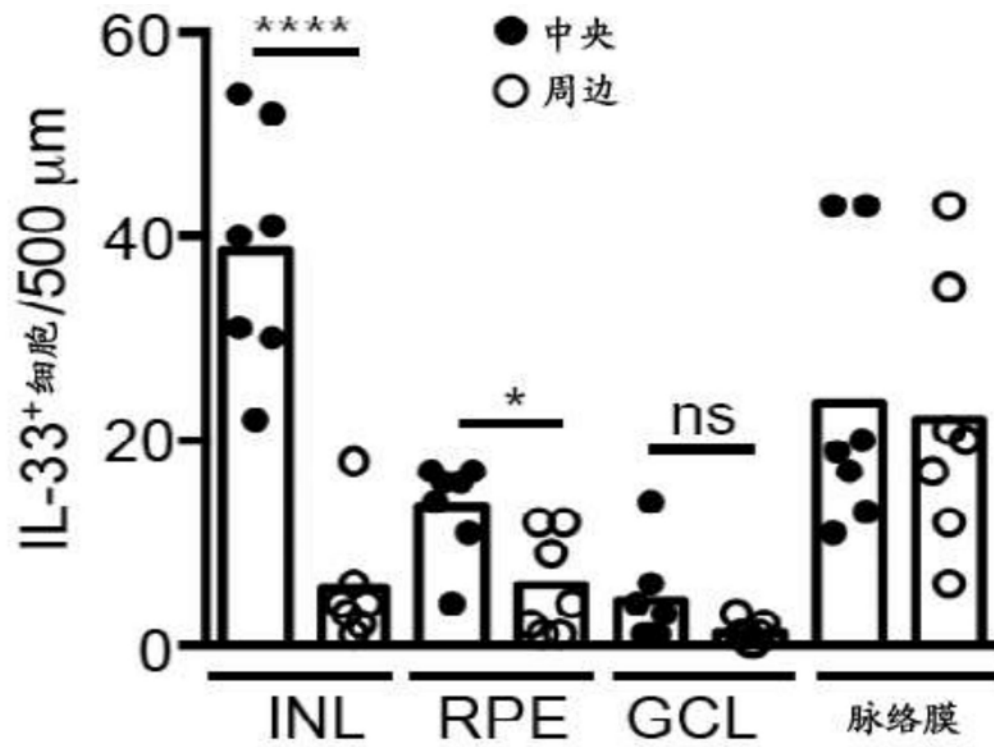


图5D

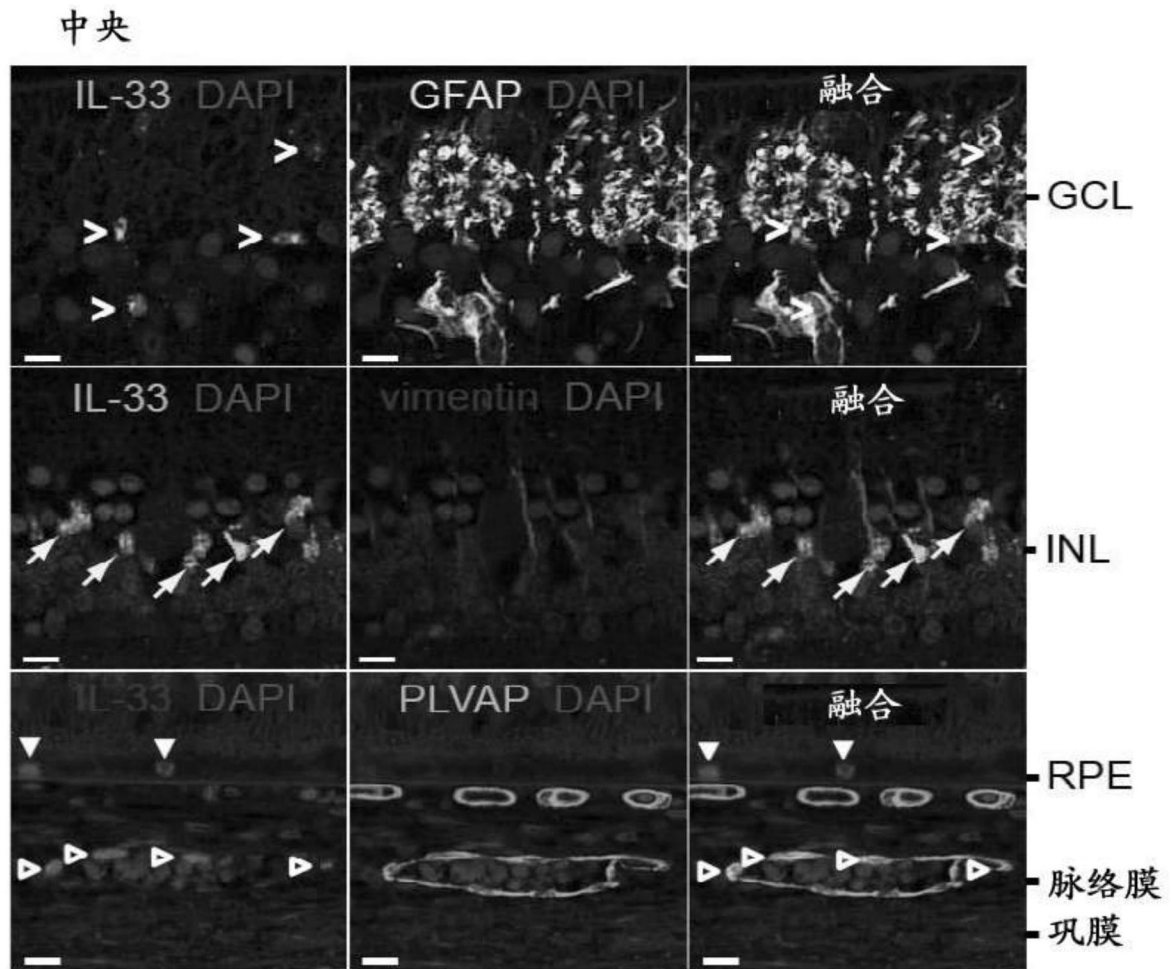


图5E

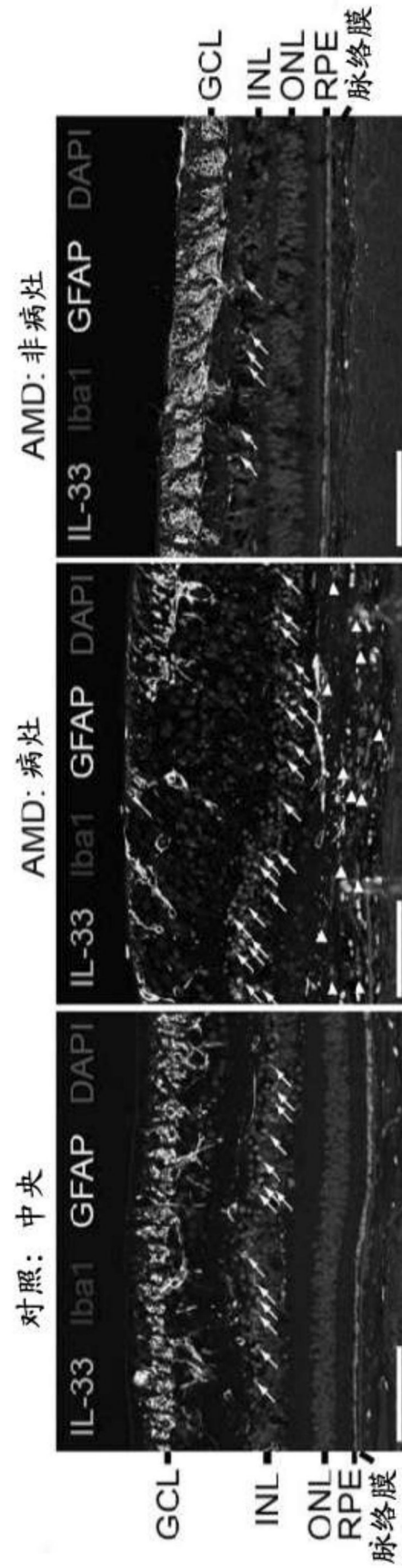


图6A

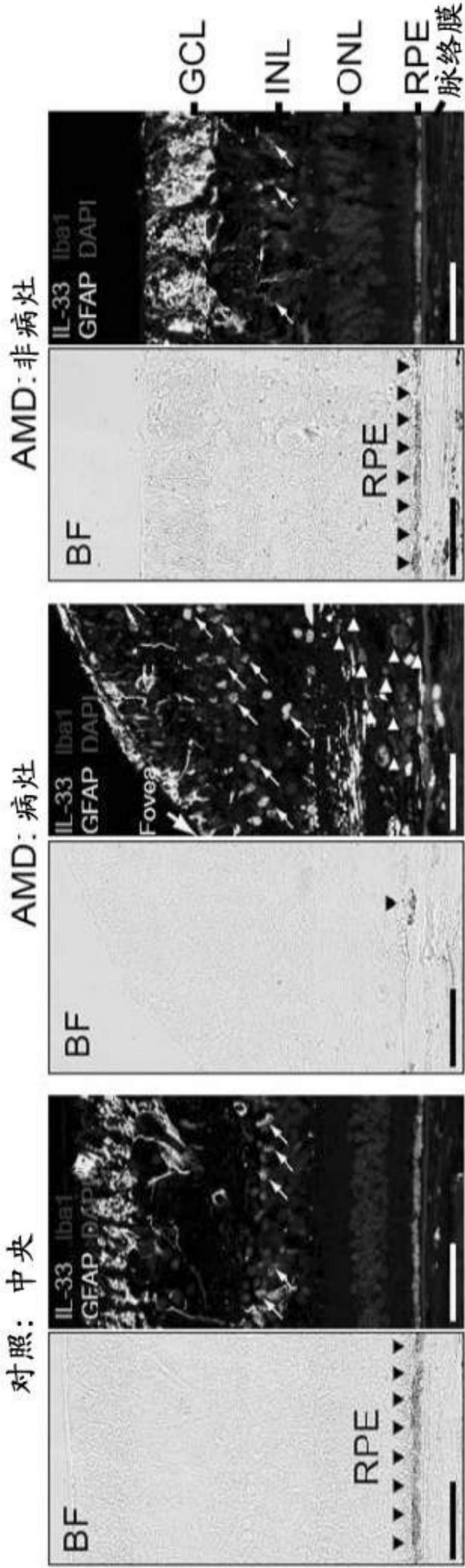


图6B

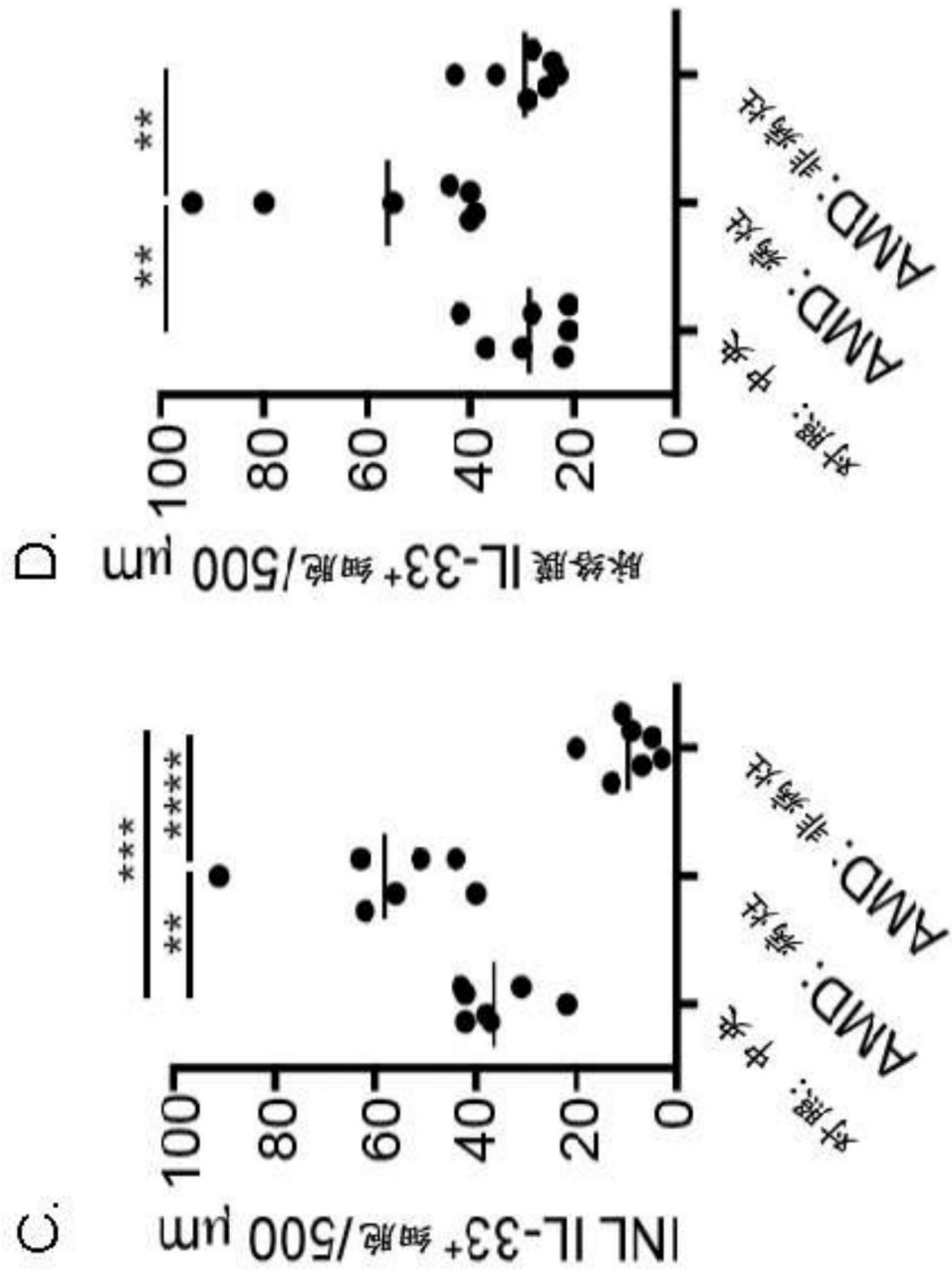


图6C-6D

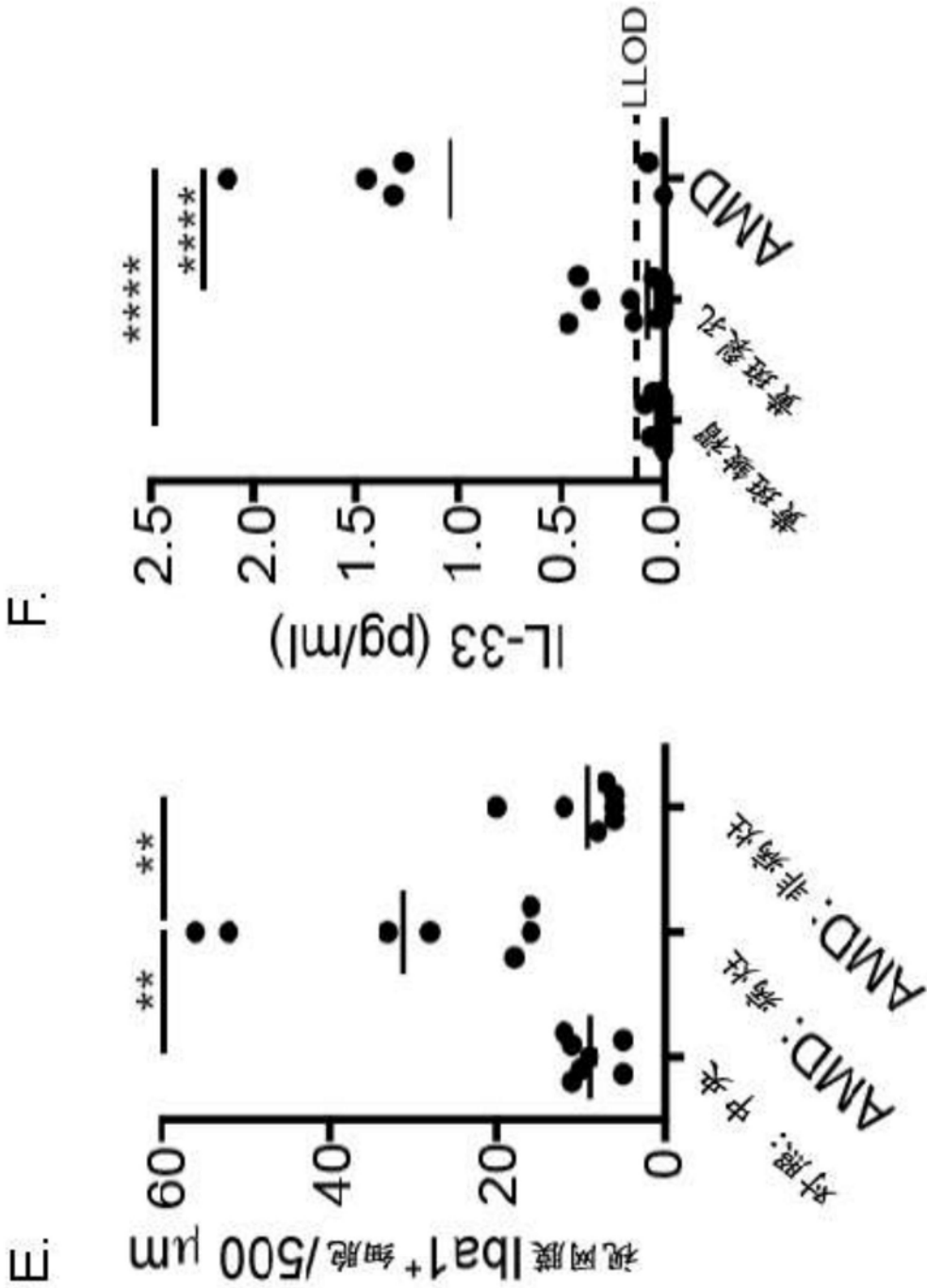


图6E-6F

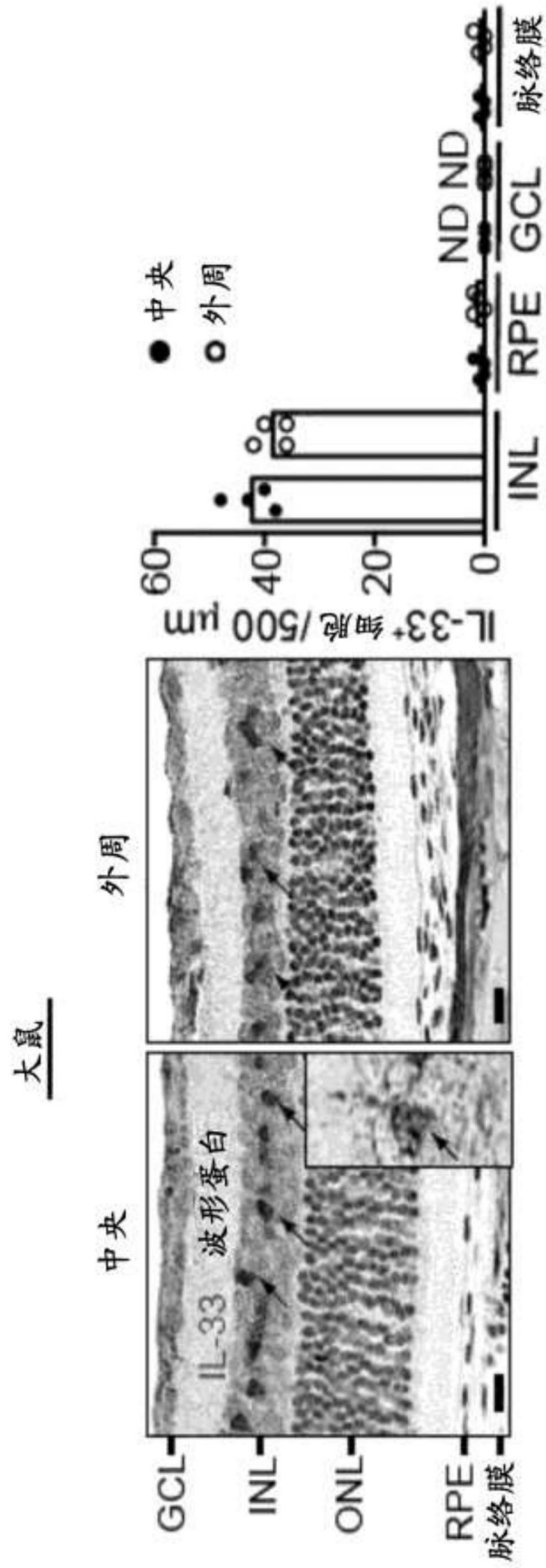


图7A

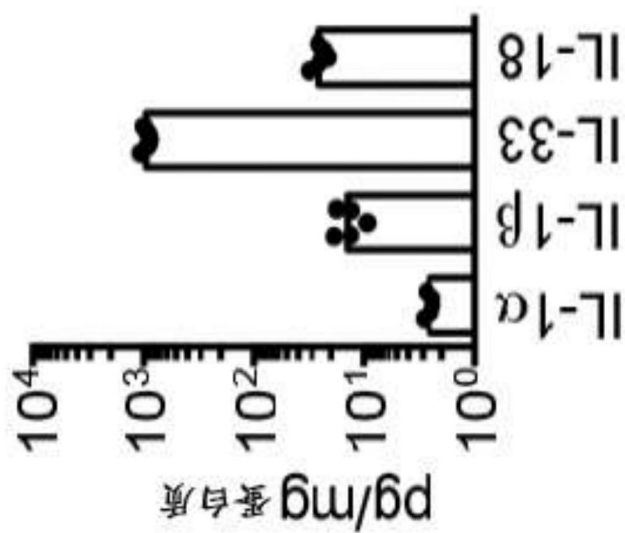


图7C

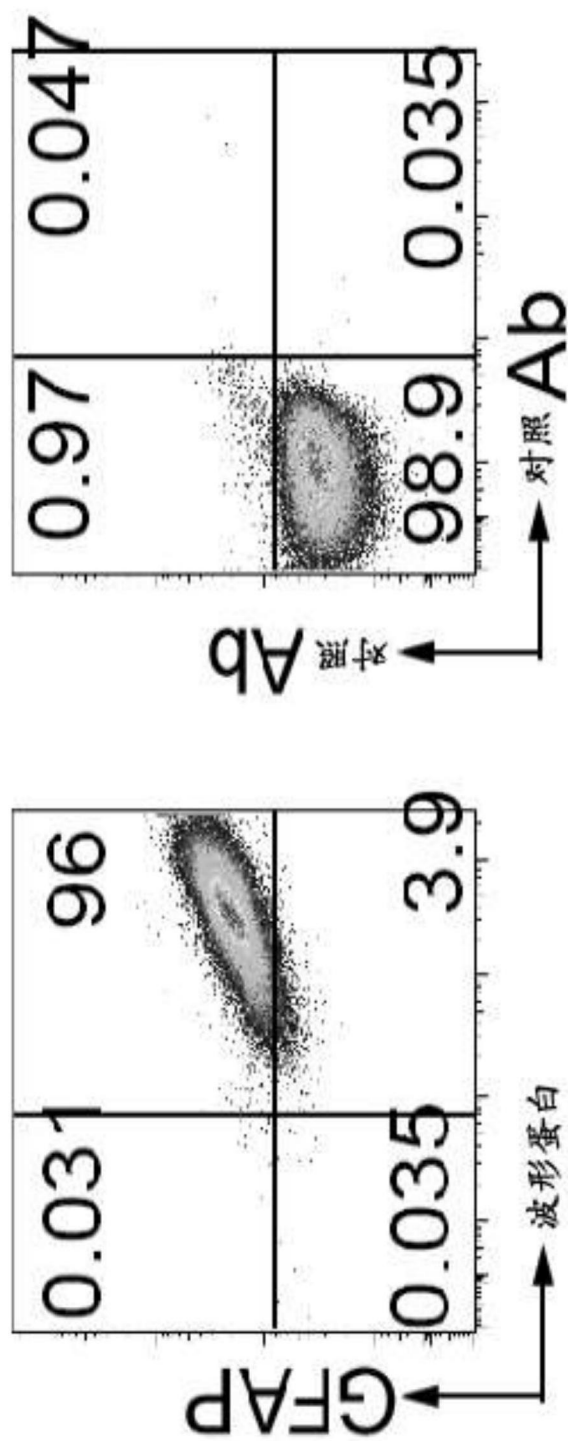


图7D

E.

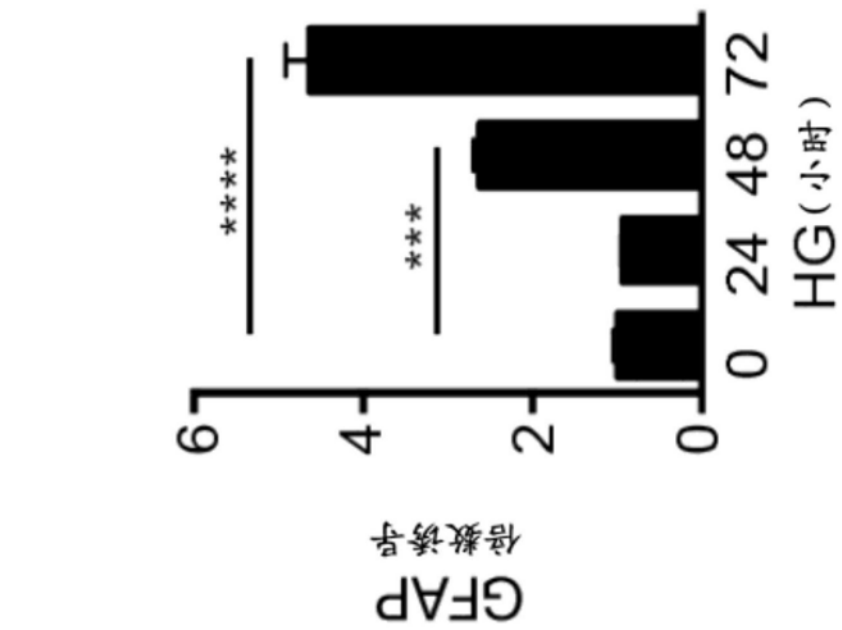
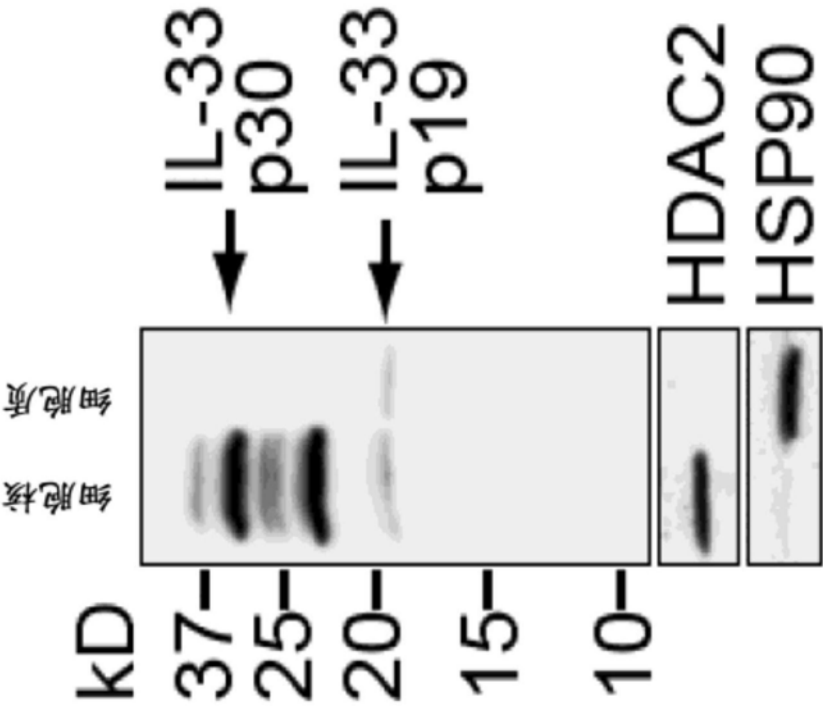


图7E-7F

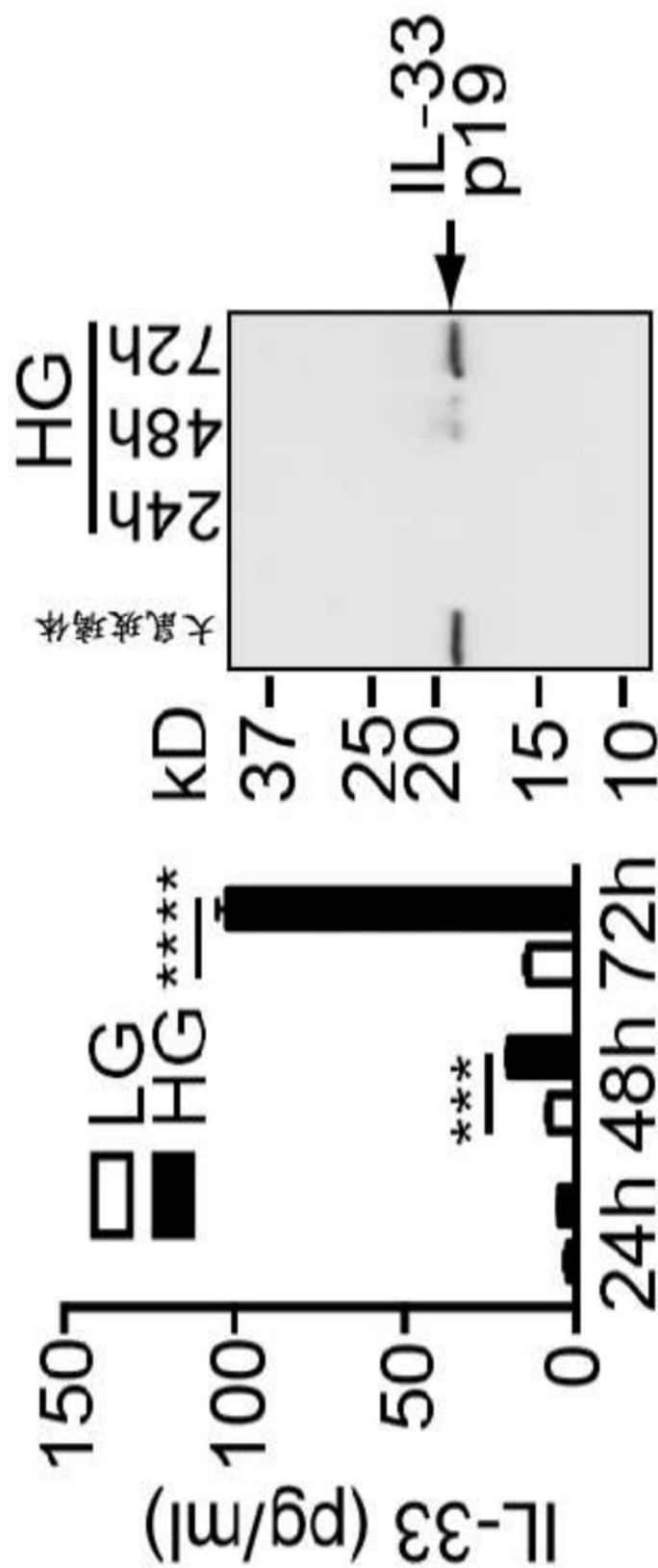


图7G

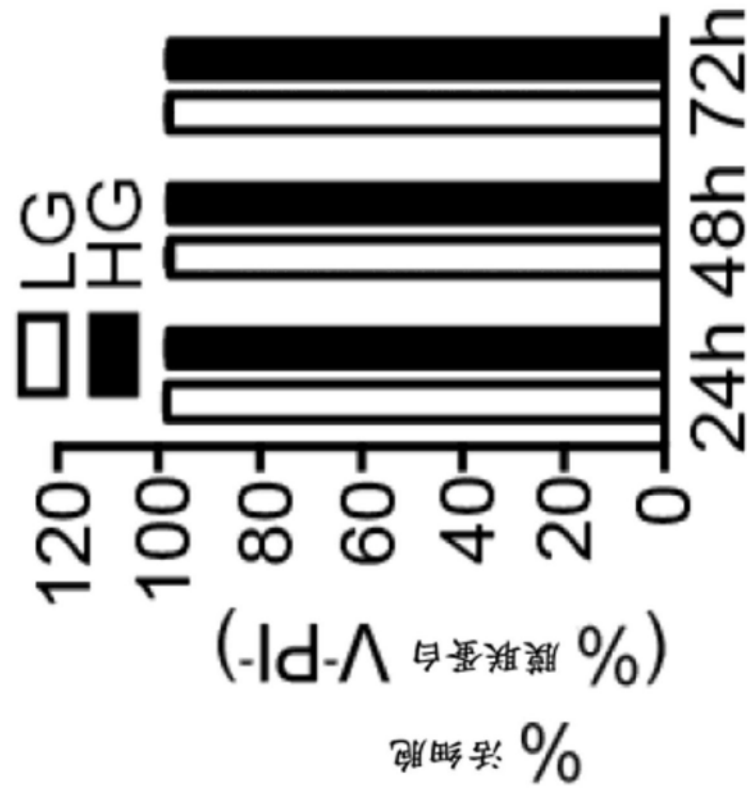


图7H

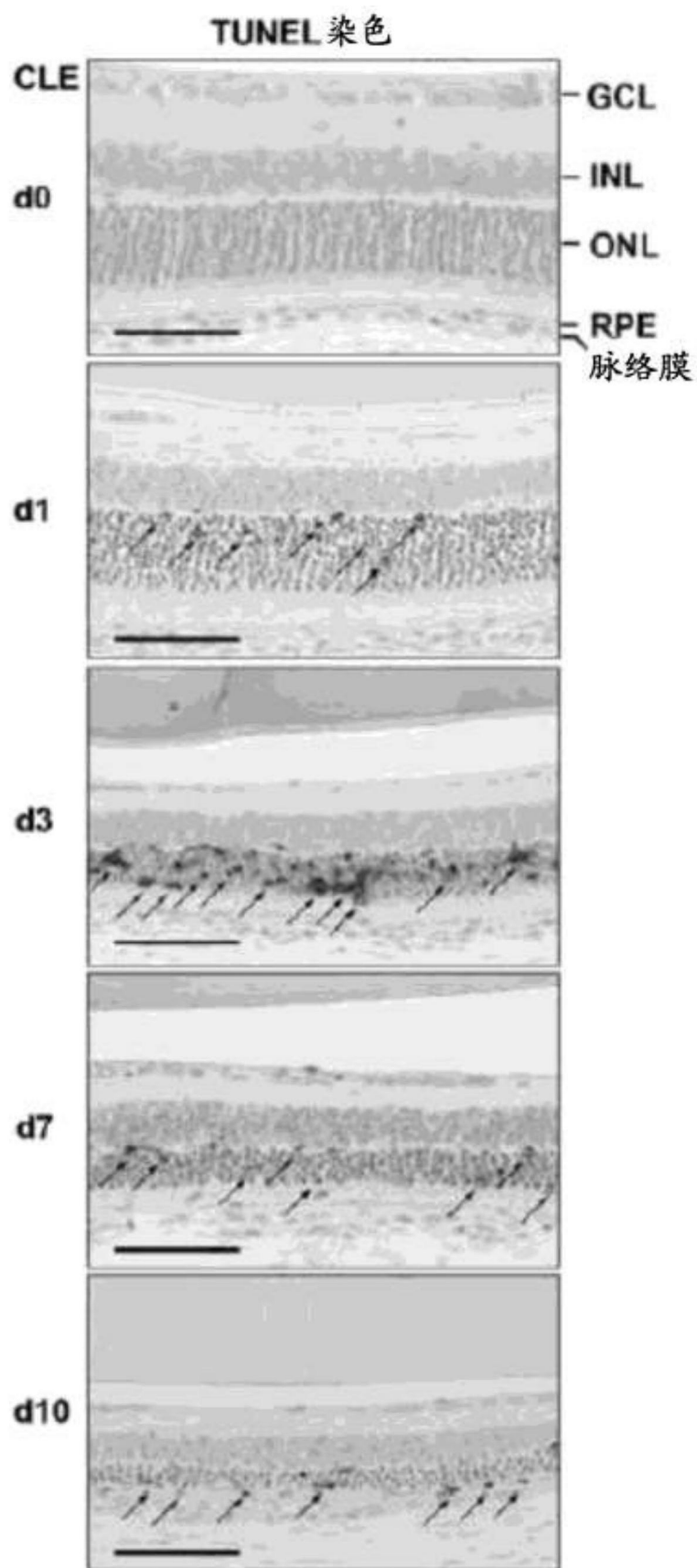


图7I

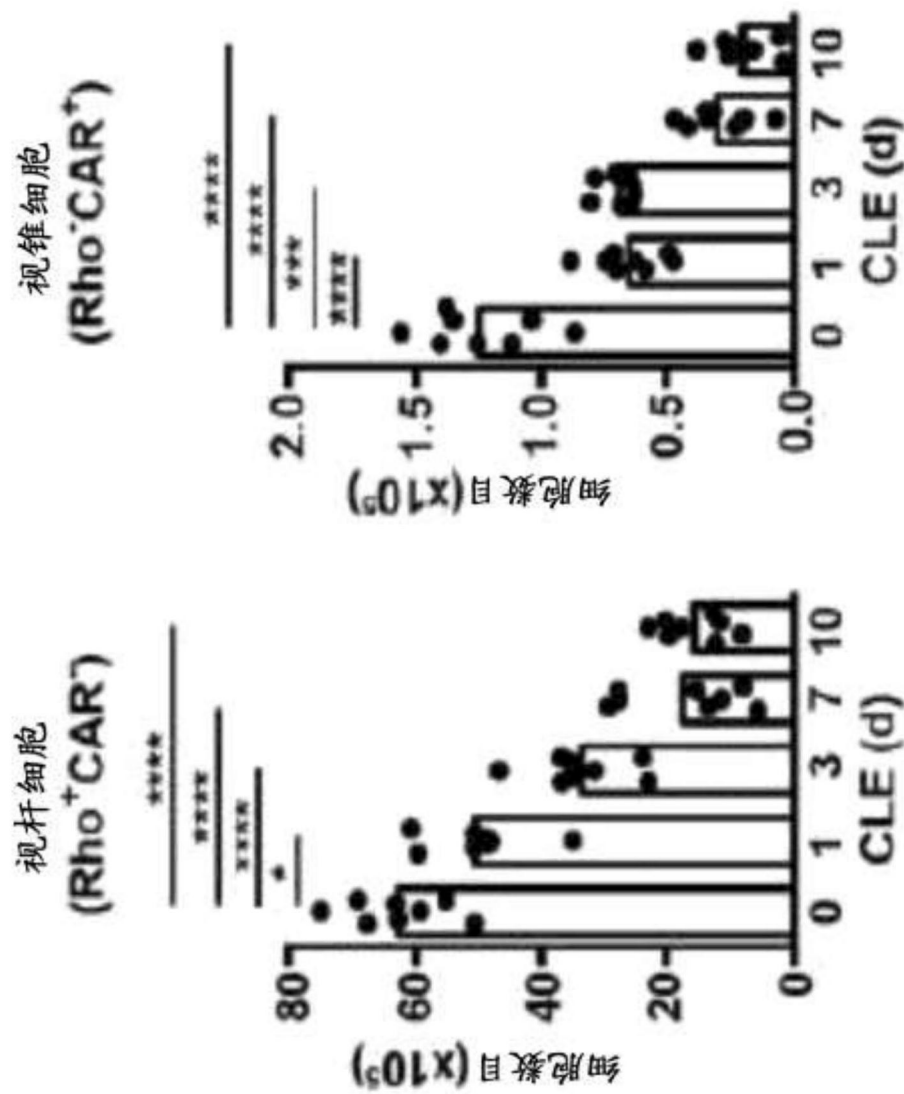


图7J

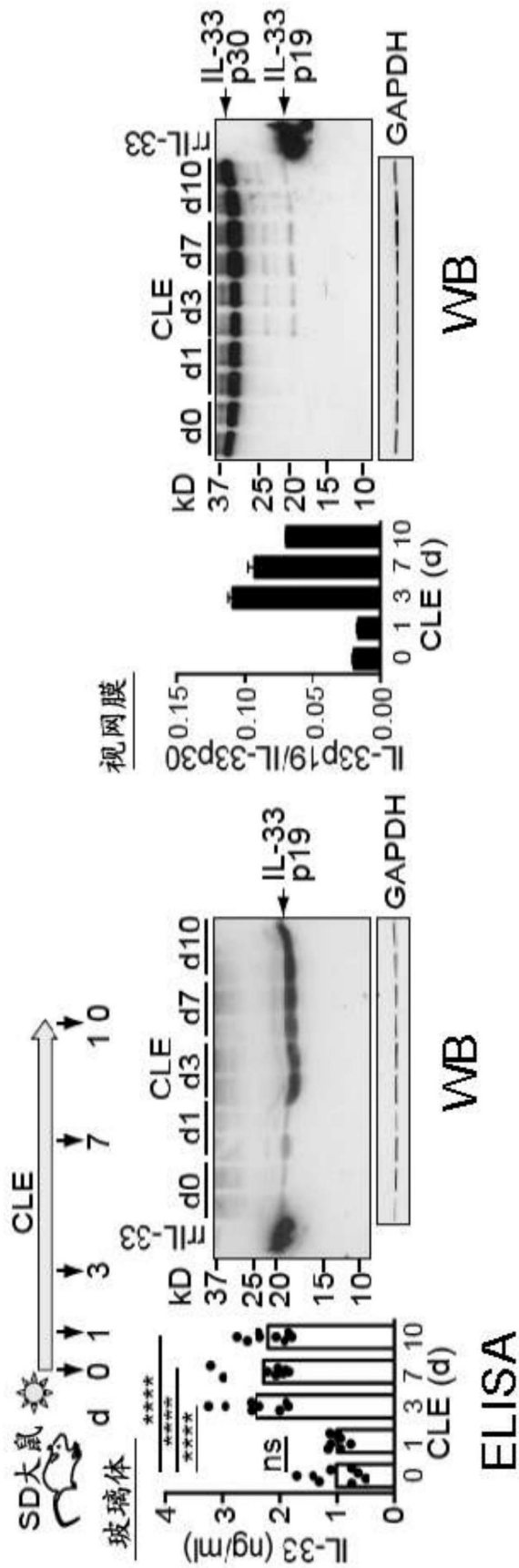


图7K

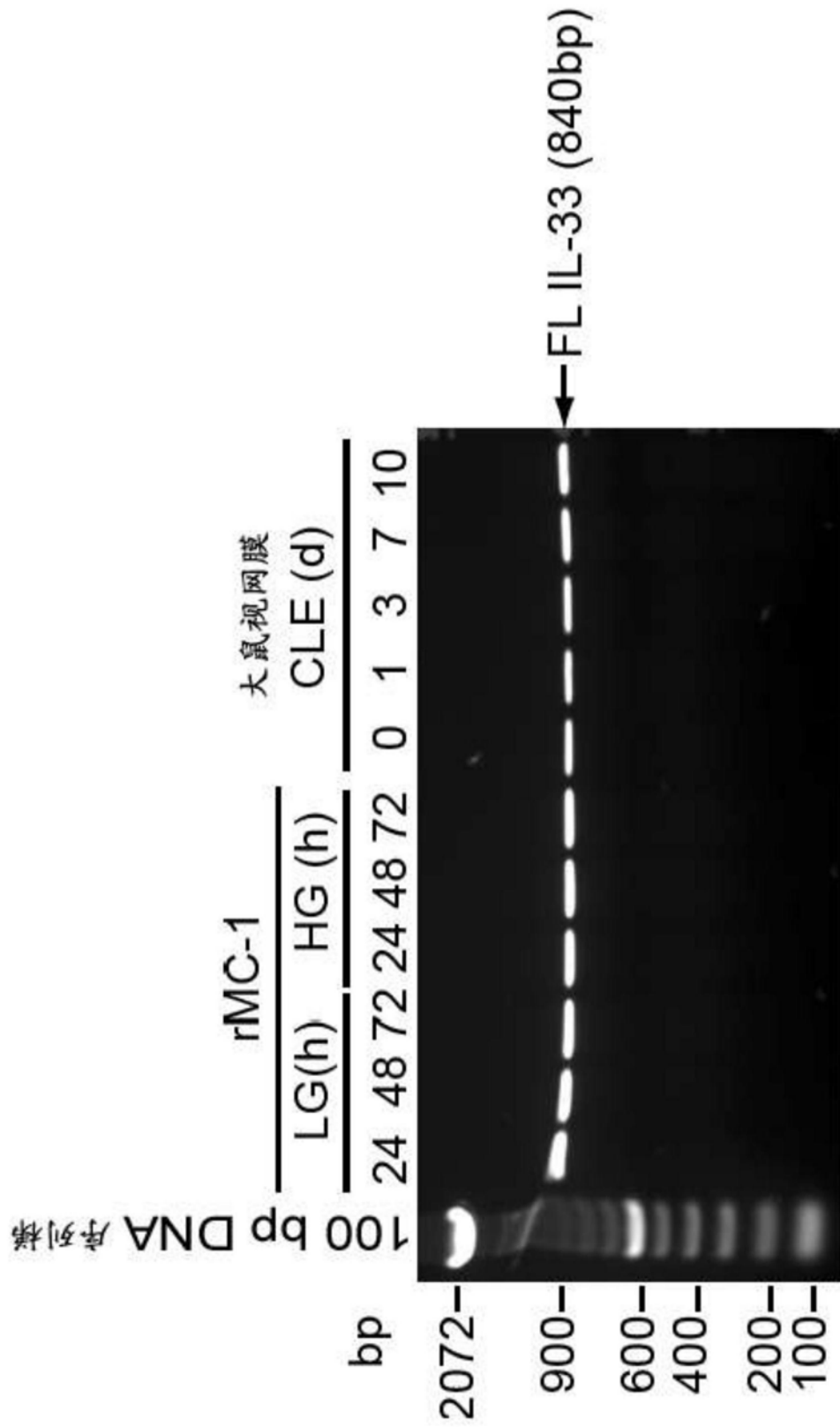


图7L

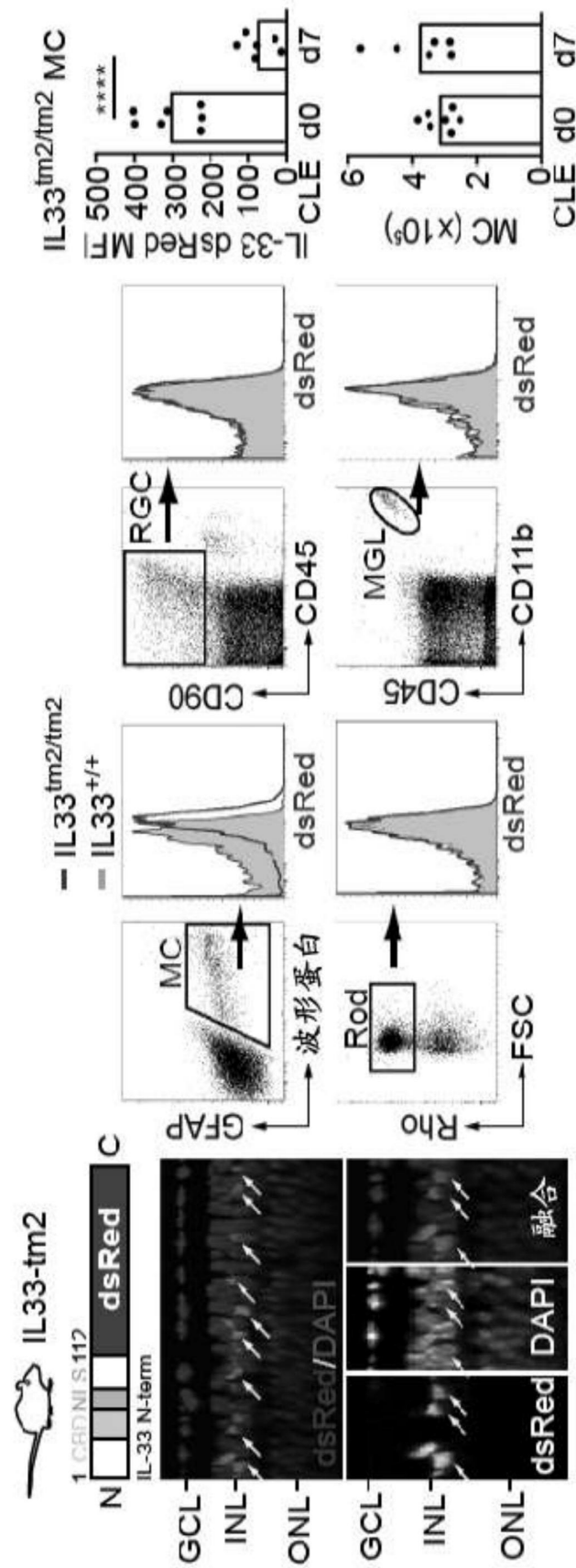


图7M

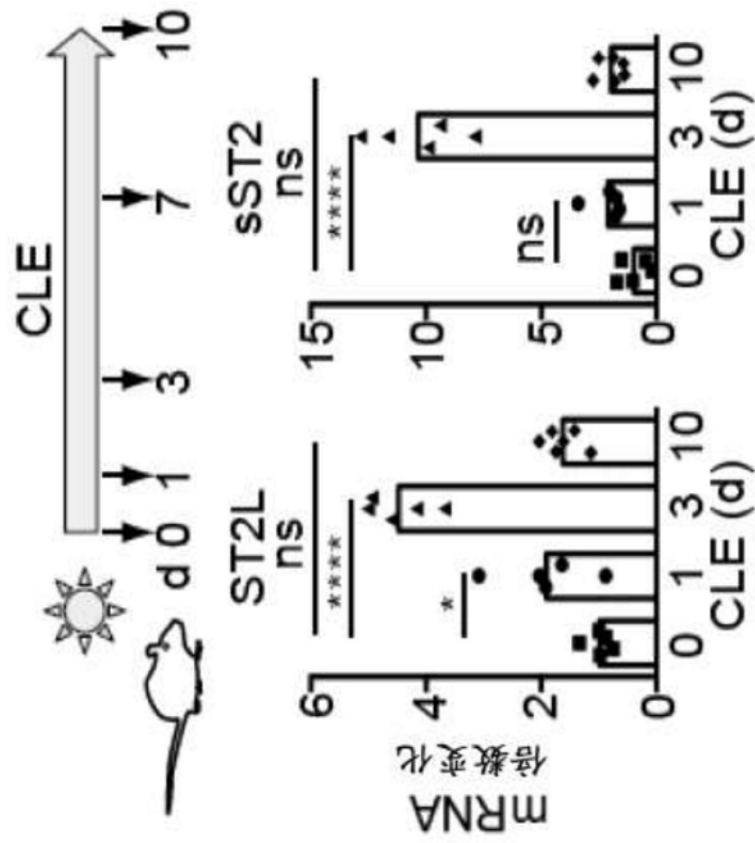


图8A

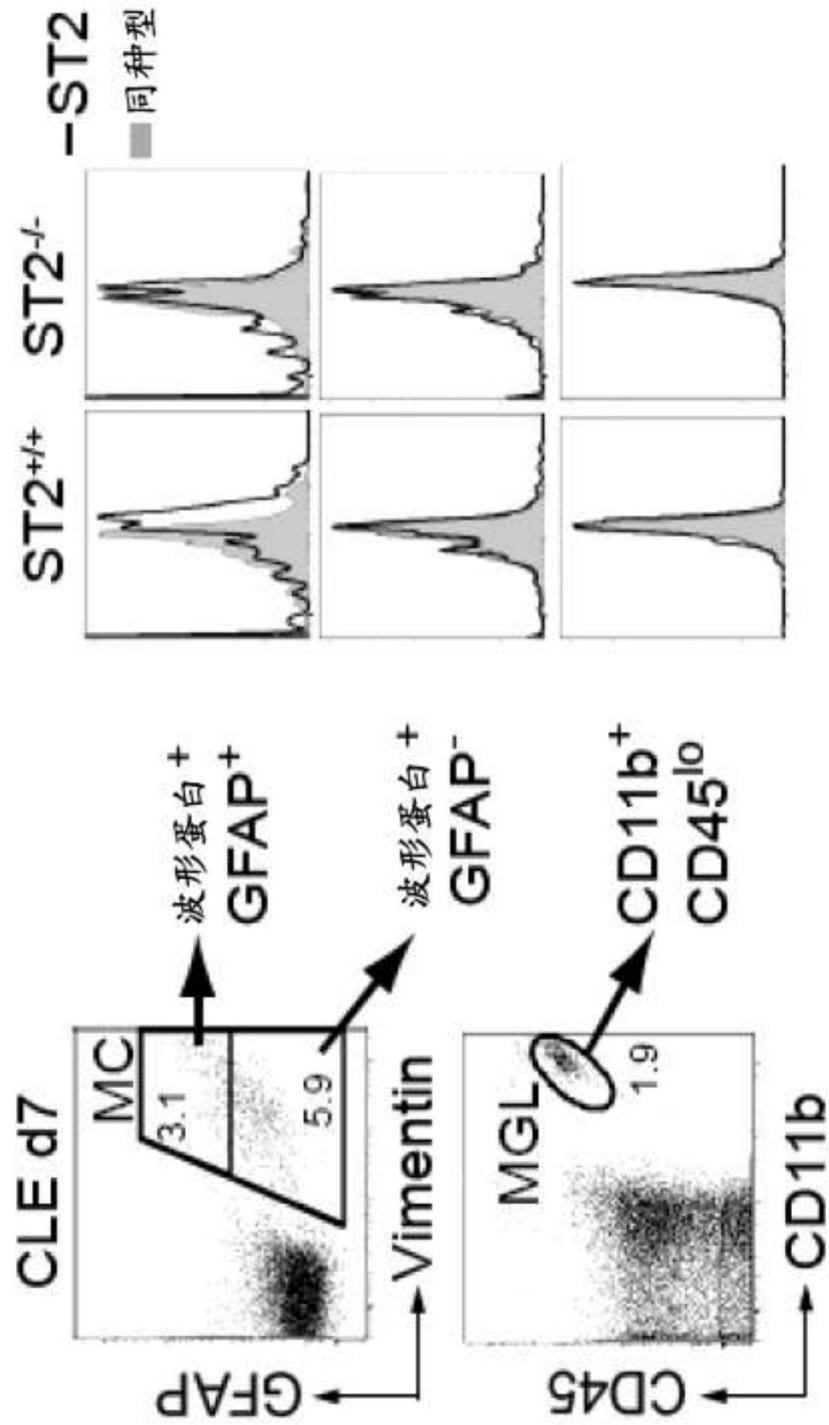


图8B

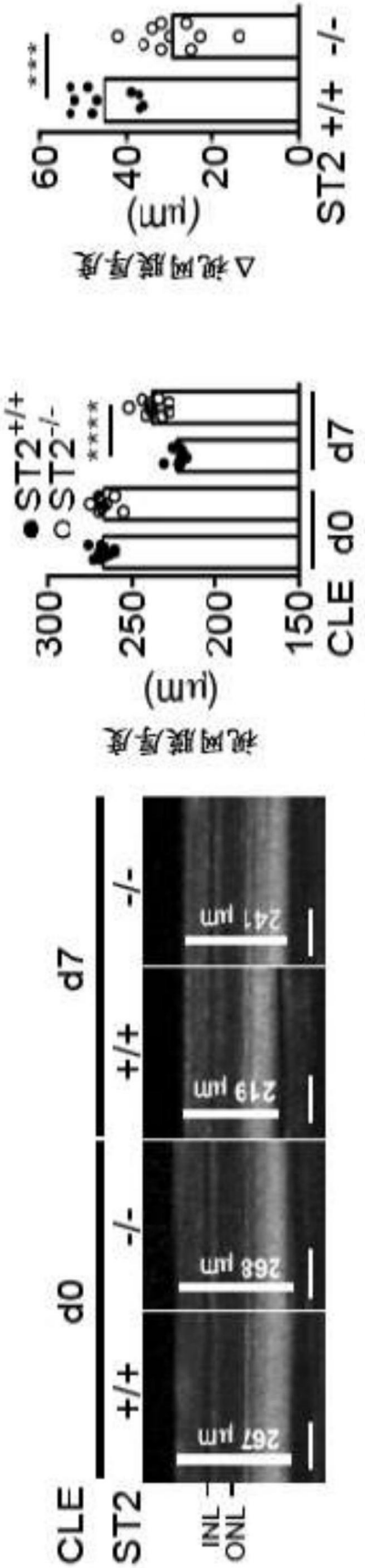


图8C

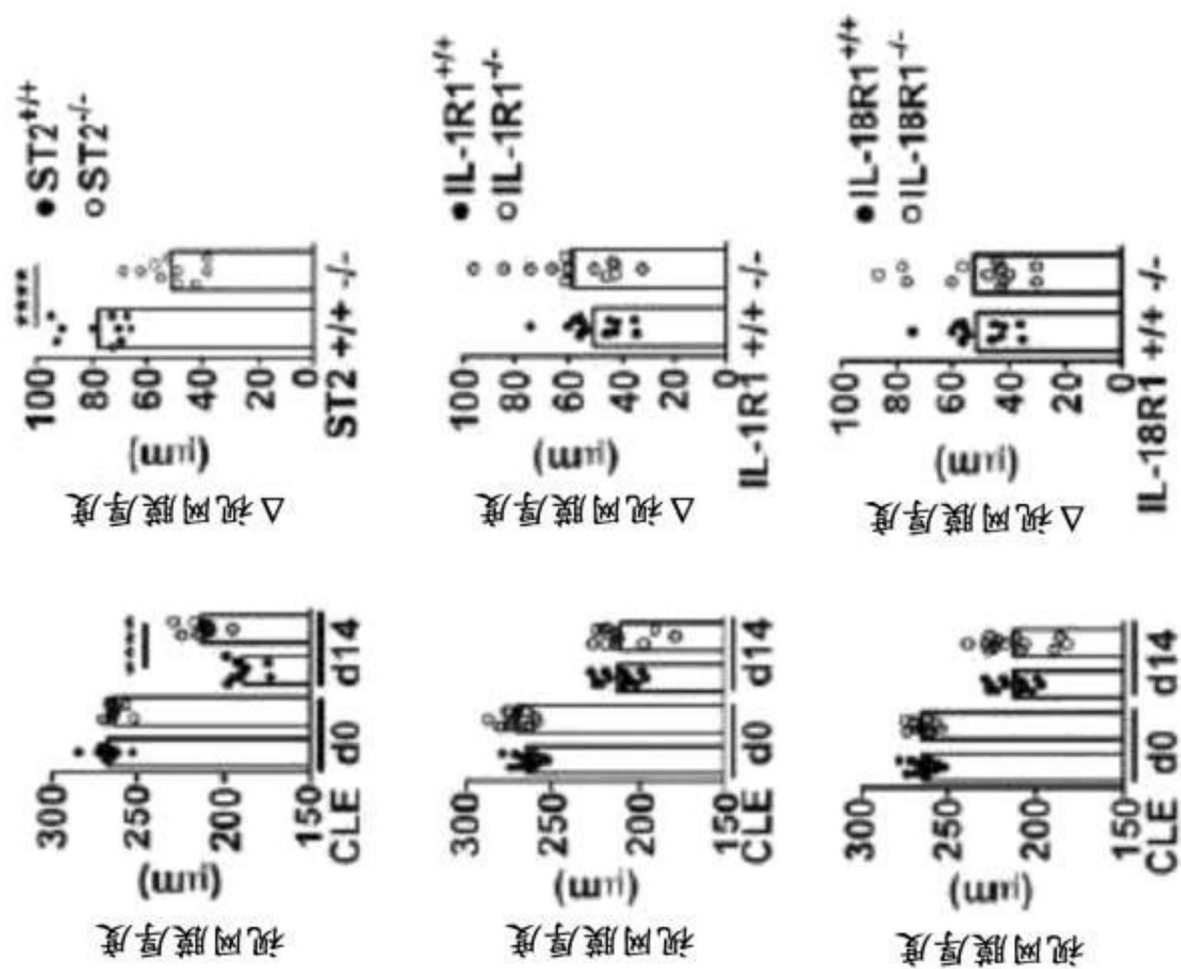


图8D

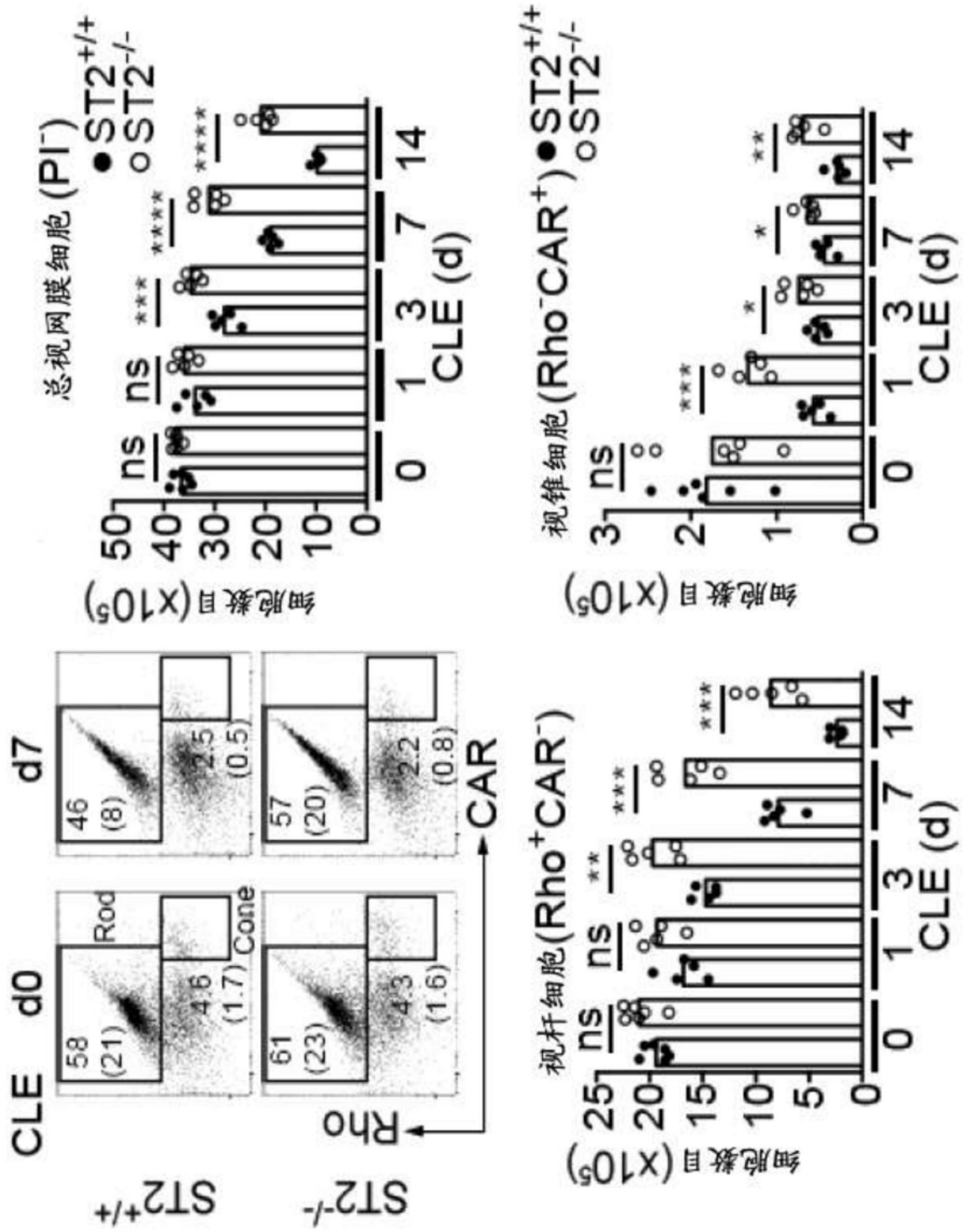


图8E

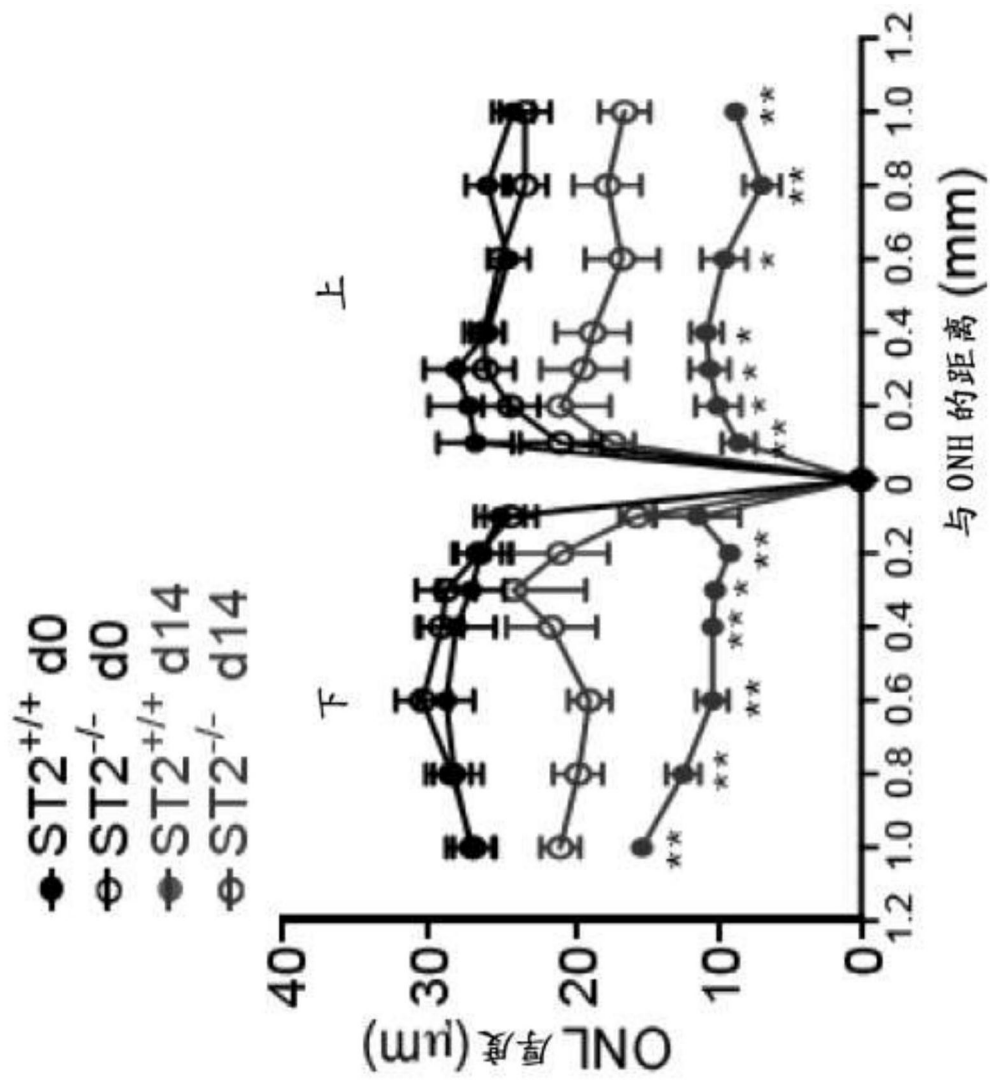


图8F

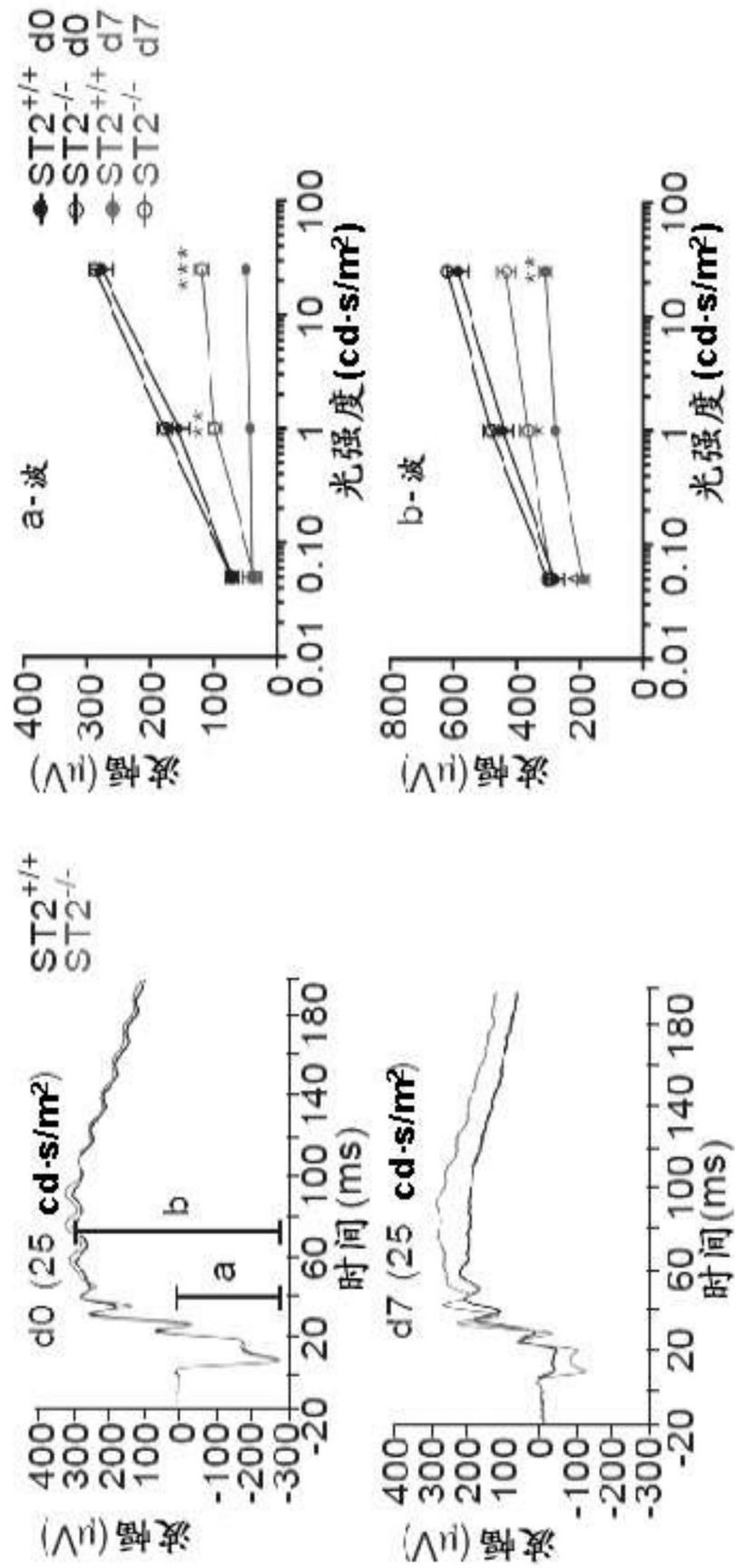


图8G

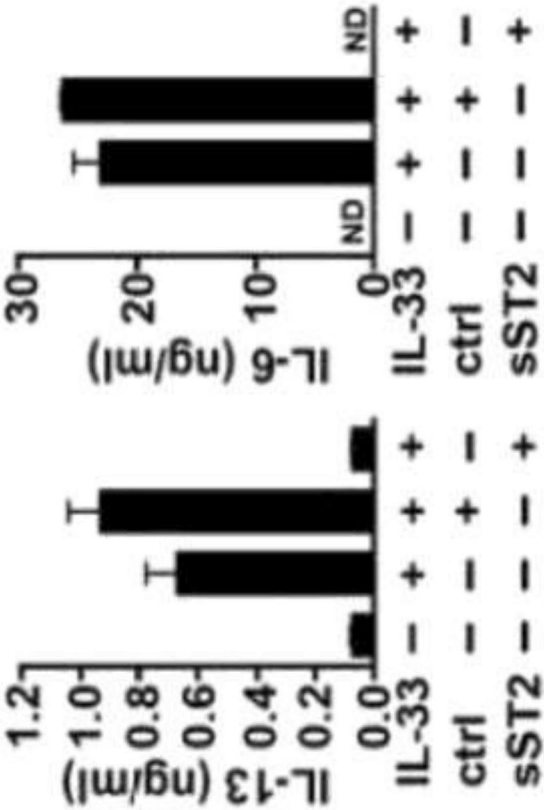


图9A

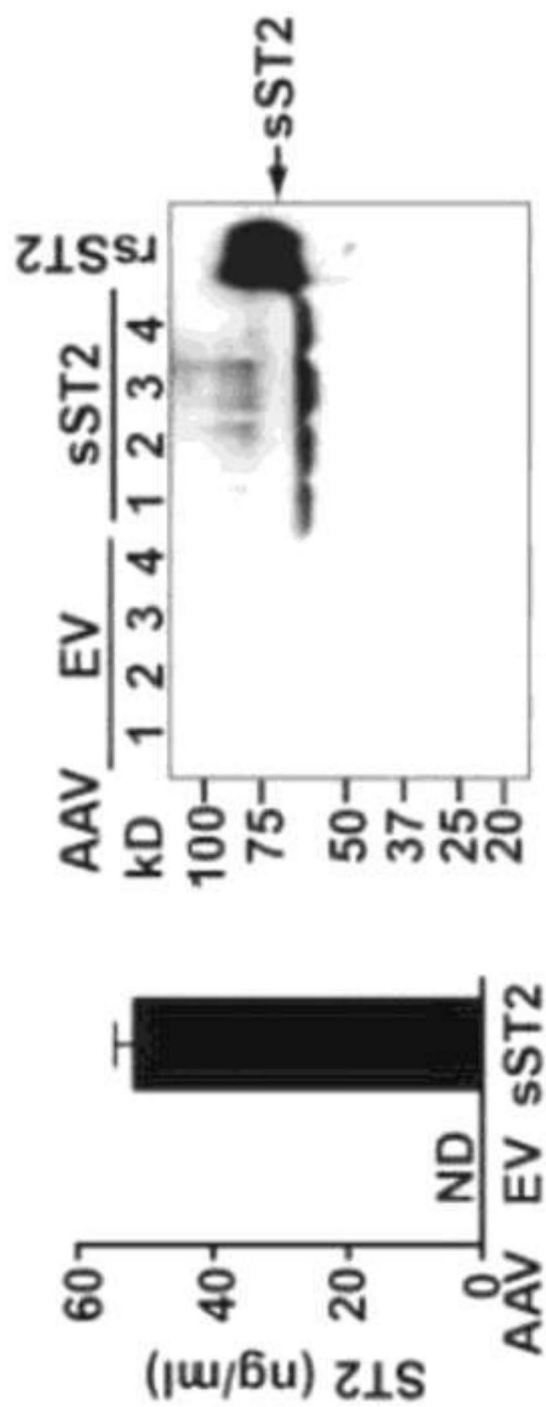


图9B



图9C

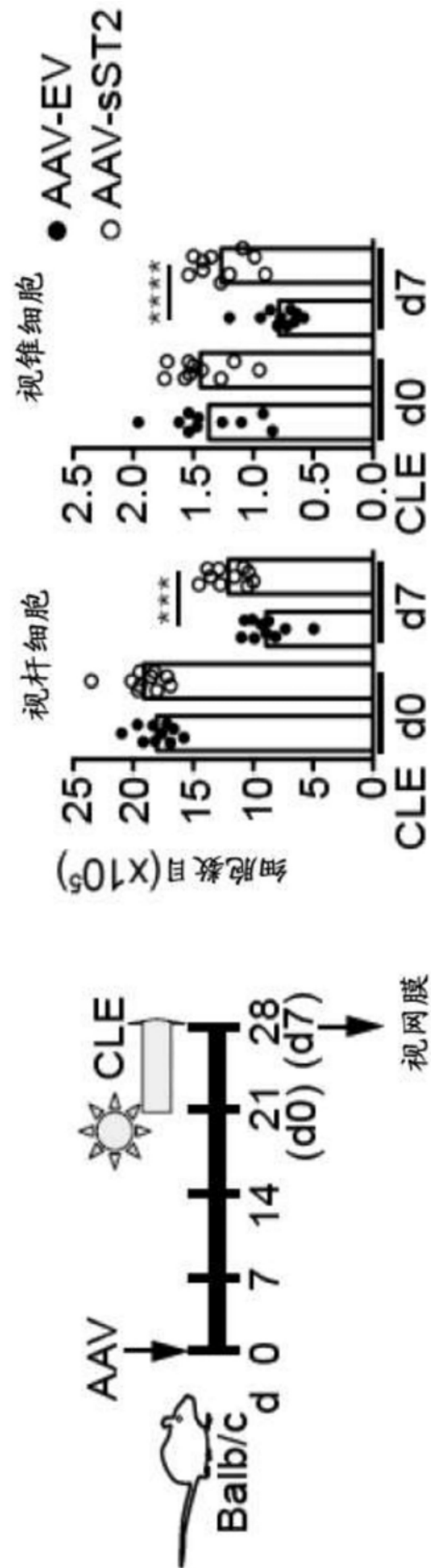


图10

基因符号	Log ₂ 倍数变化	P值
Parp10	-0.4070	0.031338
Mx2	-0.5531	0.023956
Tap1	-0.3652	0.008909
Igtp	-0.4489	0.011741
Irgm2	-0.4251	0.028030
Timp1	-0.4043	0.004441
Rtp4	-0.6969	0.016280
Irf7	-0.3266	0.031338
Cp	-0.4225	0.007205
Stat3	-0.3860	0.006960
Mt2	-0.4169	0.047613
Osmr	-0.3798	0.006583
Irf1	-0.3453	0.004749
Cebpd	-0.3662	0.004441
Bcl3	-0.4159	0.002762
Egr2	-0.4352	0.004441
Hsd17b2	-0.4163	0.004441
Ccl4	-0.4988	0.007205
Il1b	-0.4339	0.010421
Ifi202b	-0.6794	0.044264
Gbp7	-0.5574	0.004441
Ccl2	-0.3398	0.013638

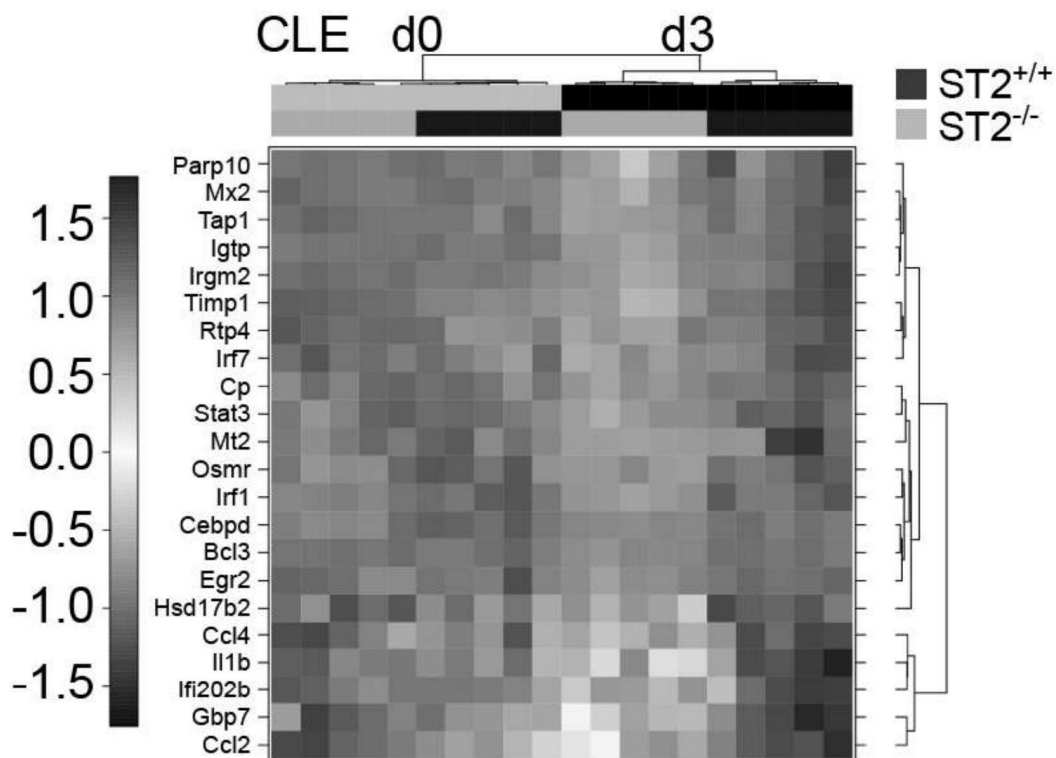


图11A

CLE 后 ST2^{-/-} 视网膜中下调的基因的途径分析

GO ID	生物学功能	p-值	下调的基因
GO:0006886	胞内蛋白质转运	0.001504	Rcl3, Fgr2, Il1h, Stat3, Tap1, Rtp4, Parp10
GO:0071345	对细胞因子刺激的细胞反应	0.001569	Igtp, Il1b, Irf1, Osmr, Ccl2, Stat3, Ifi202b, Irf7, Gbp7
GO:0034124	依赖 MyD88 的 TLR 信号转导途径	0.002303	Irf1, Irf7
GO:0060416	对生长激素的反应	0.002303	Irf1, Stat3
GO:0045944	从 RNA Pol II 启动子转录	0.004203	Bcl3, Cebpd, Egr2, Il1b, Irf1, Stat3, Irf7
GO:0006913	核质转运	0.005380	Bcl3, Egr2, Il1b, Stat3, Parp10
GO:0032870	对激素刺激的细胞反应	0.005669	Fgr2, Il1h, Irf1, Stat3
GO:0042089	细胞因子生物合成过程	0.005669	Bcl3, Il1b, Irf1, Irf7
GO:0007021	细胞大分子定位	0.006119	Bcl3, Egr2, Il1b, Stat3, Iap1, Rtp4, Parp10
GO:0047771	对化学品的反应	0.006125	Cn, Fgr2, Hsd17h2, Igfb, Il1h, Irf1, Mx2, Osmr, Ccl2, Ccl4, Stat3, Ifi202b, Irf7, Ingm2, Rtp4, Gbp7
GO:0031330	细胞代谢的负调节	0.006697	Stat3, Timp1
GO:0045064	Th2 细胞分化	0.006697	Bcl3, Irf1
GO:0046688	对铜离子的反应	0.006697	Cn, Mx2
GO:1901652	对肽的反应	0.007156	Egr2, Il1b, Irf1, Stat3
GO:0042632	对原生物物的防御反应	0.007270	Bcl3, Ingm2, Gbp7
GO:0010557	大分子生物合成的调节	0.007896	Rcl3, Cebpd, Fgr2, Il1h, Irf1, Ccl2, Stat3, Irf7
GO:0034341	对干扰素-γ 的反应	0.008882	Irf1, Ccl2, Ingm2, Gbp7

图11B

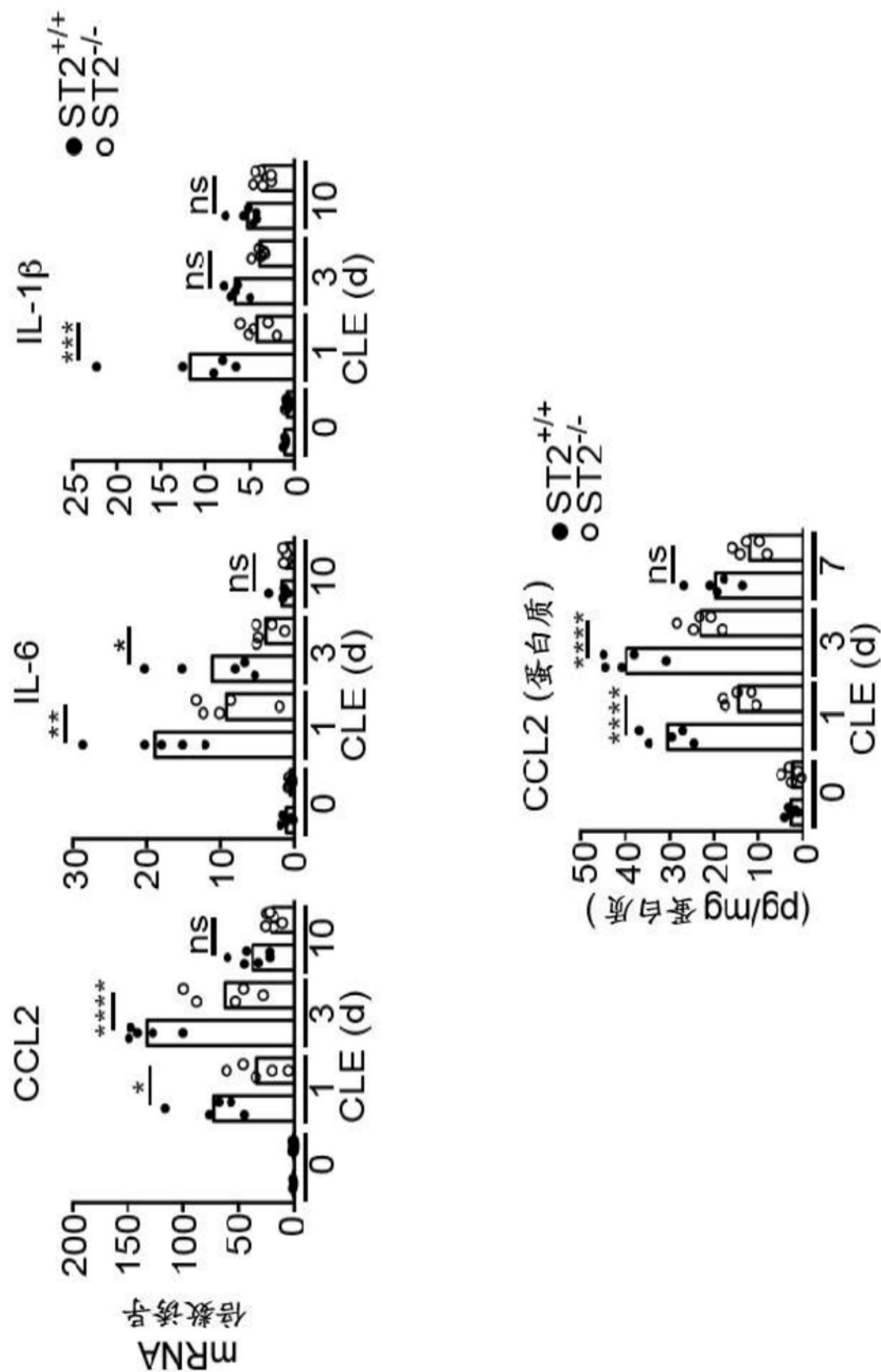


图11C

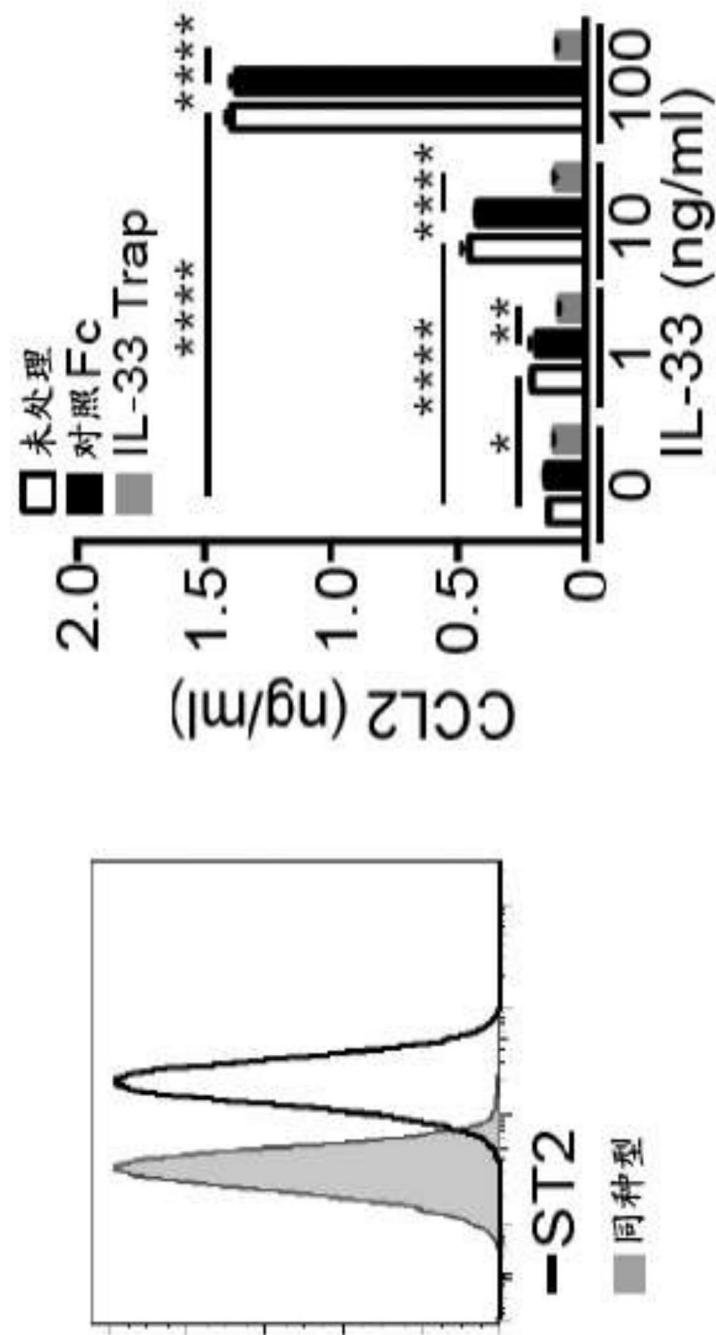


图11D

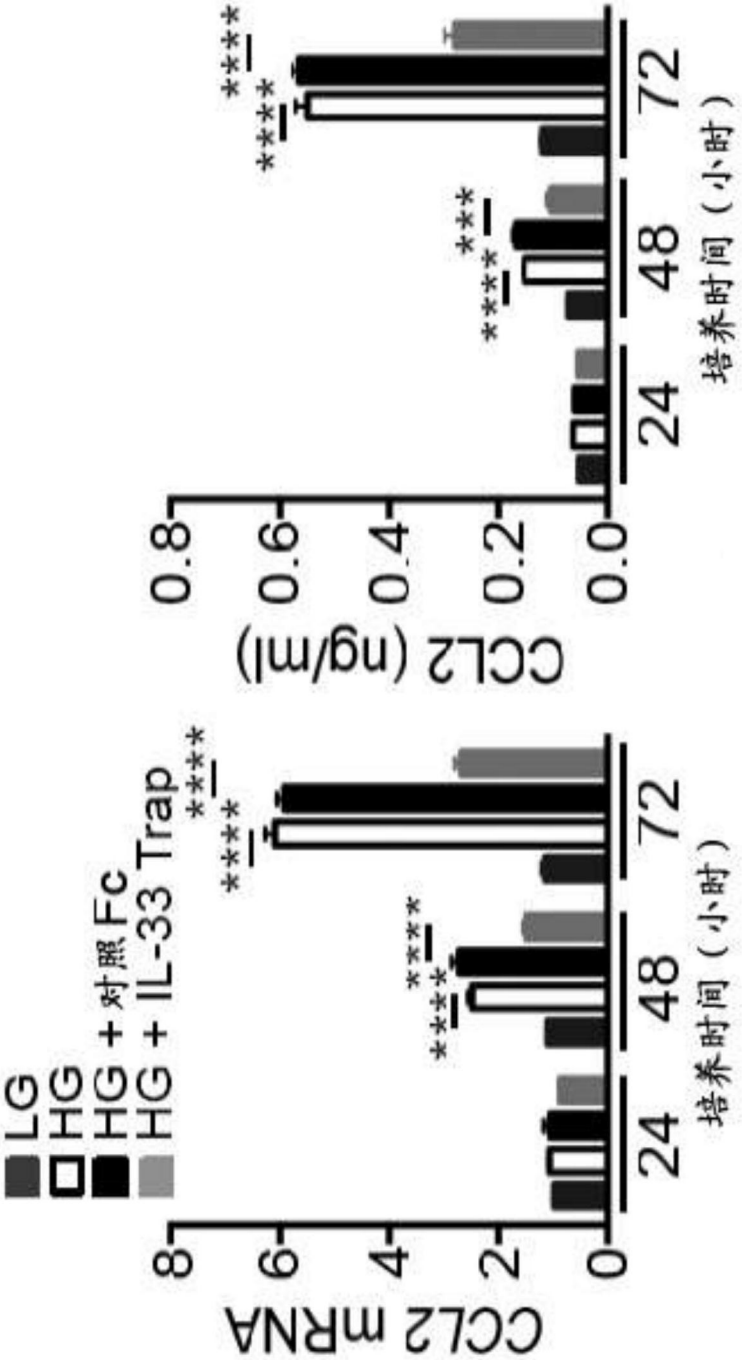


图11E

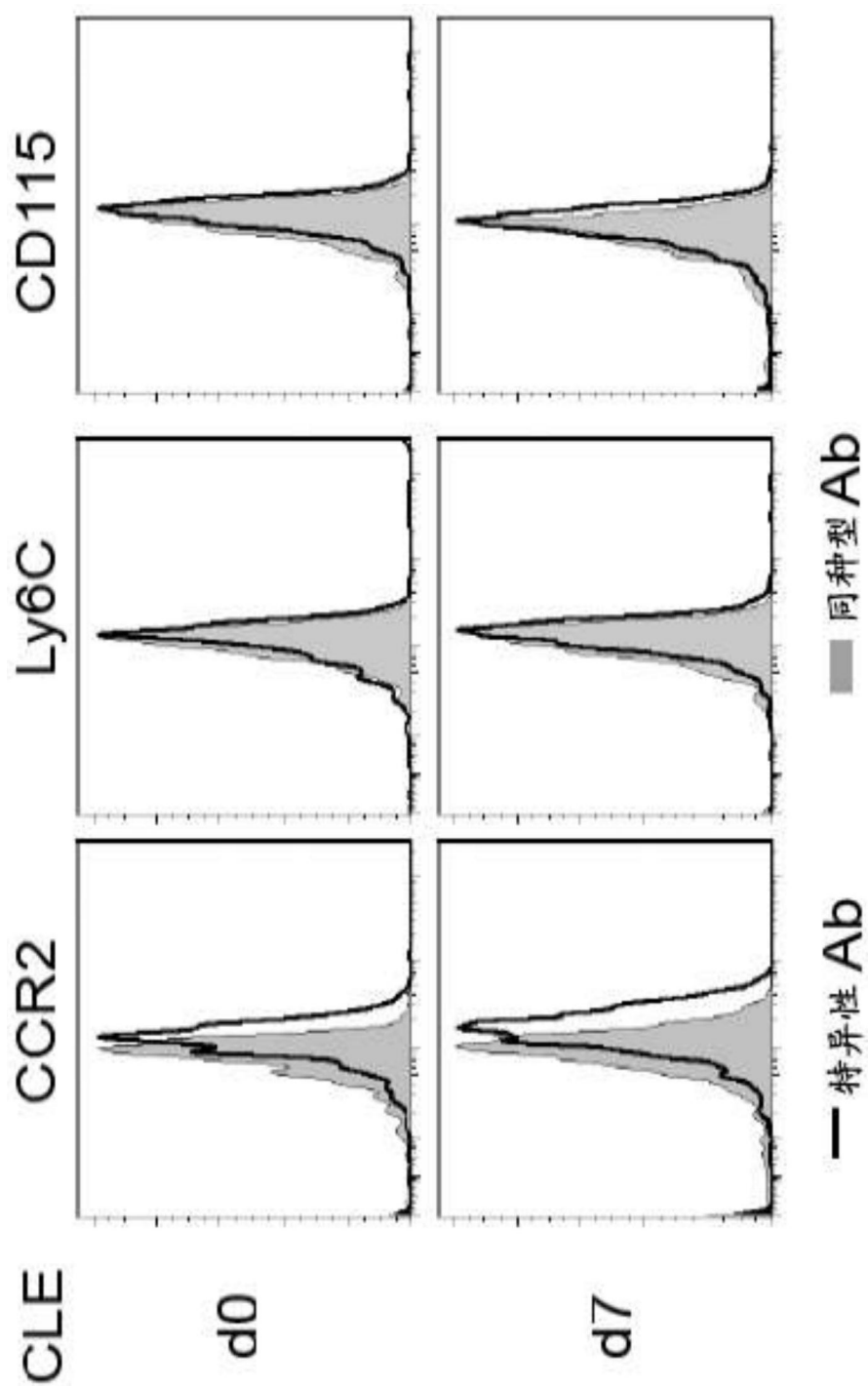


图12A

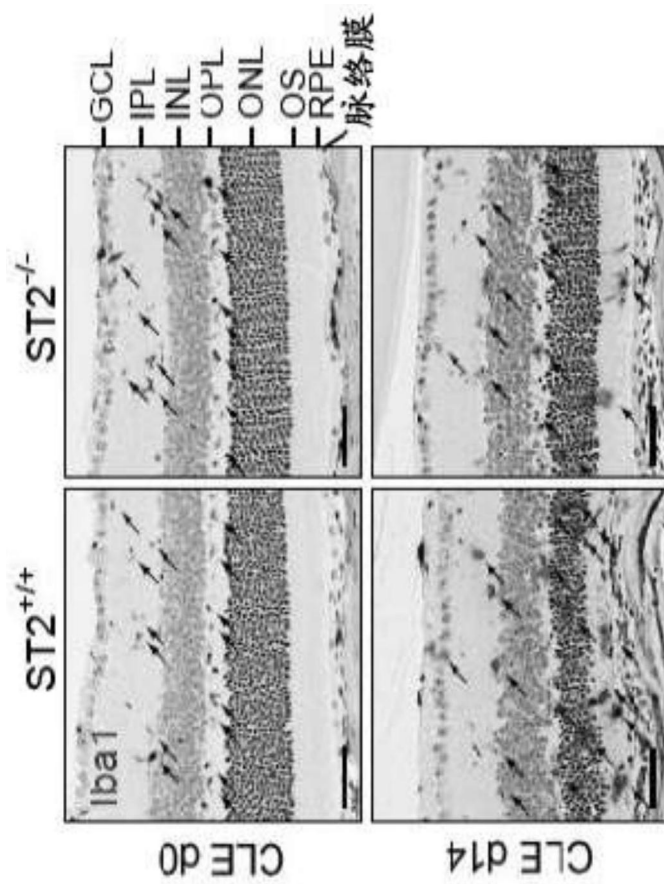


图12B

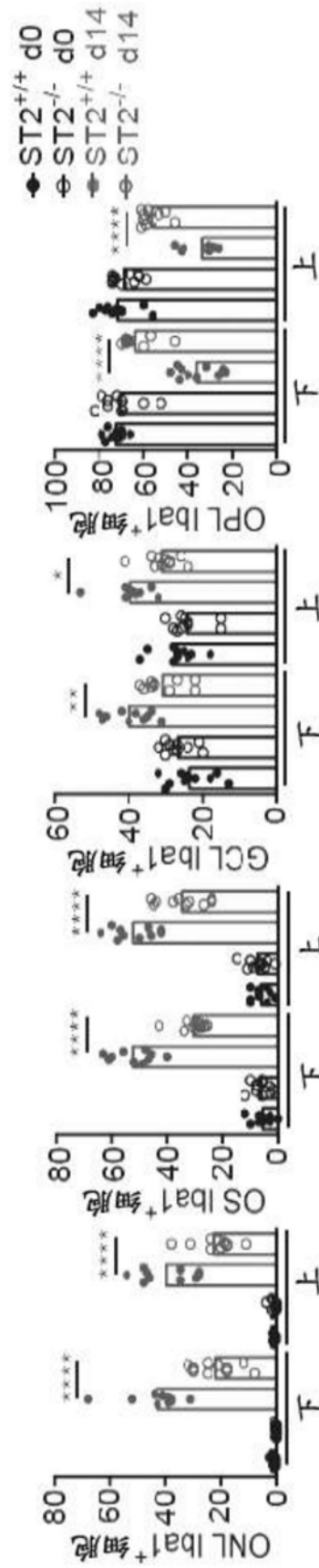


图12C

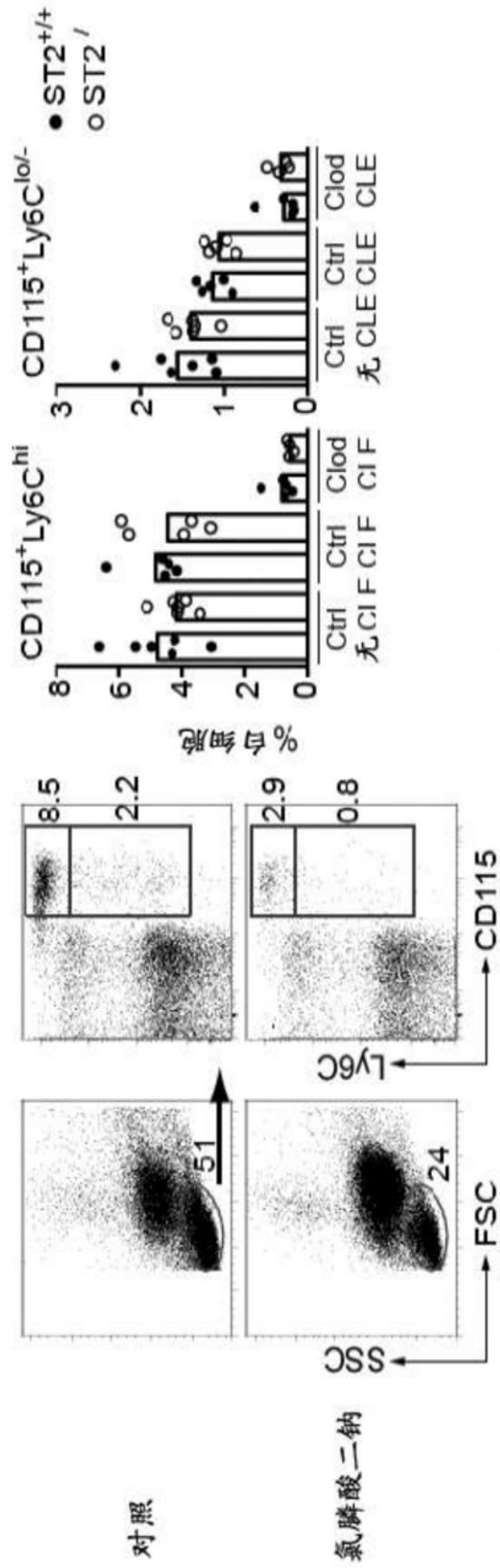


图12D

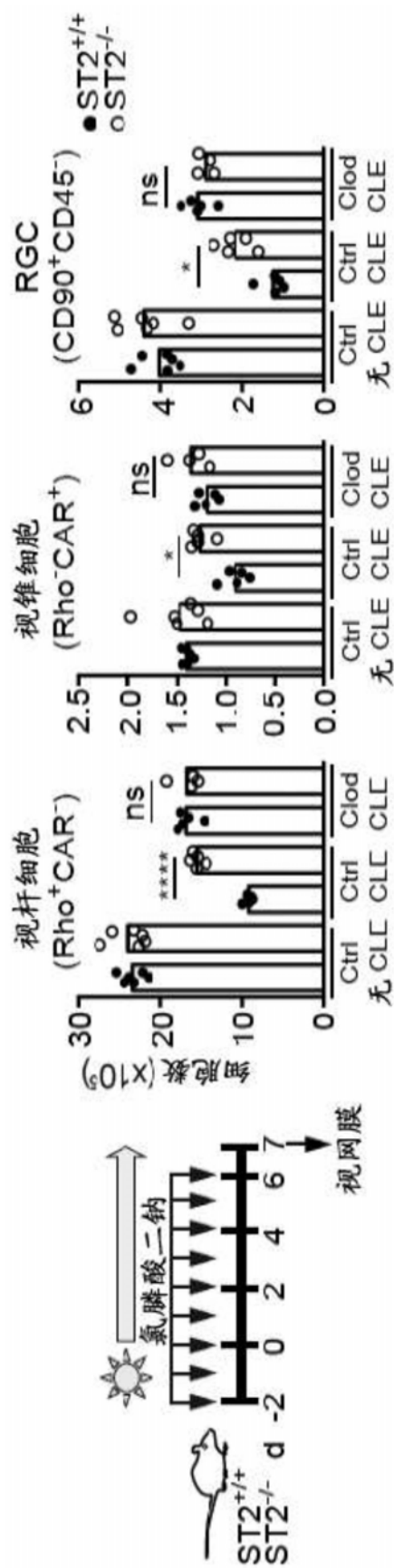


图12E

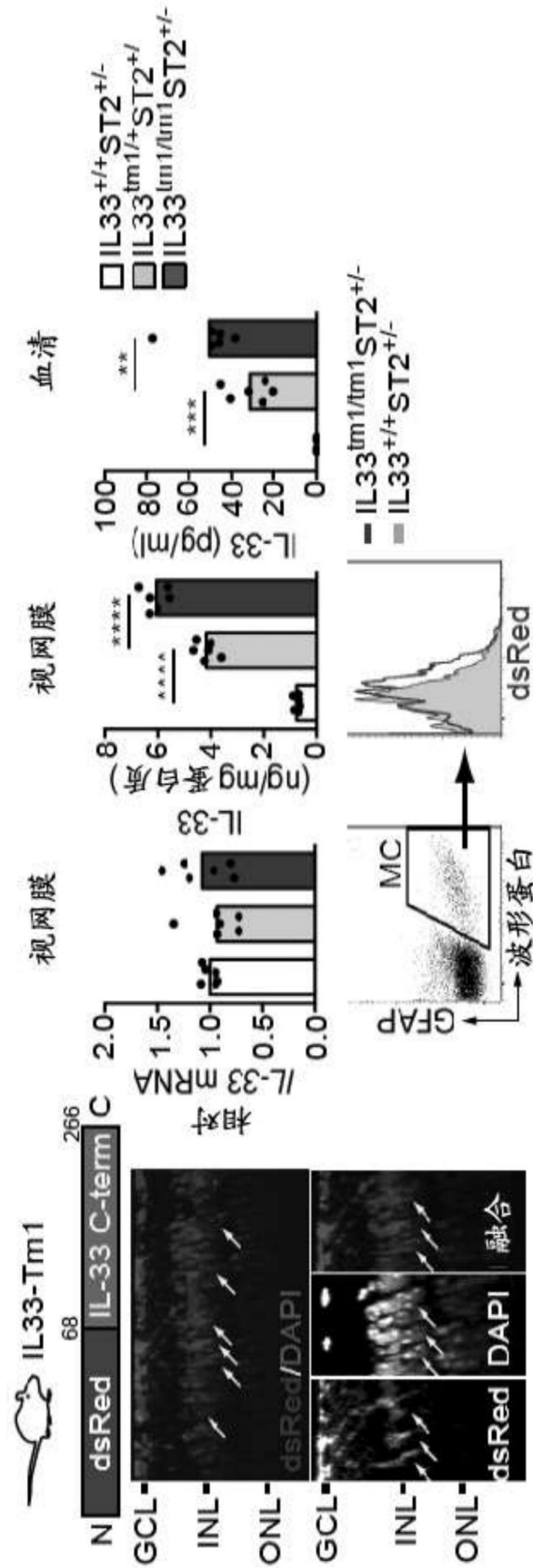


图12F

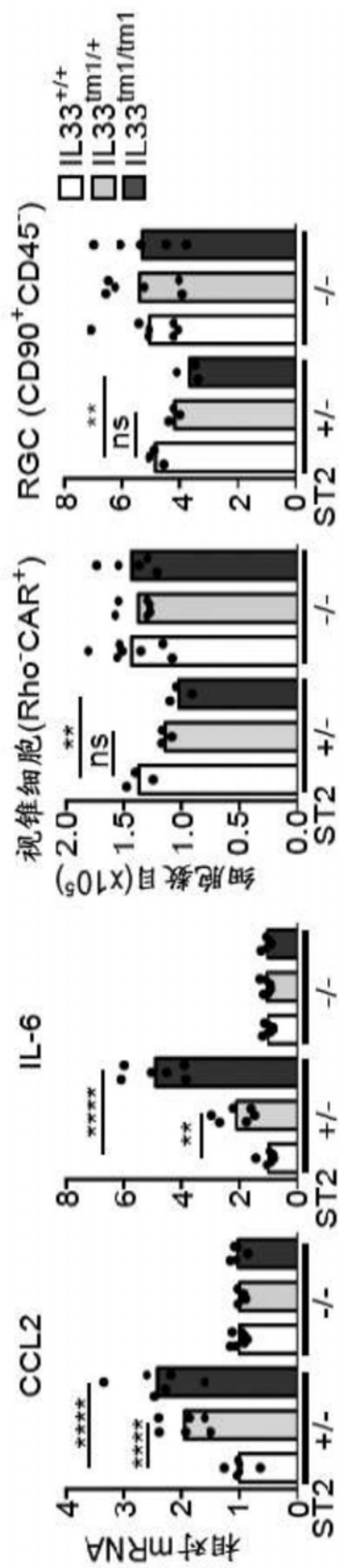


图12G

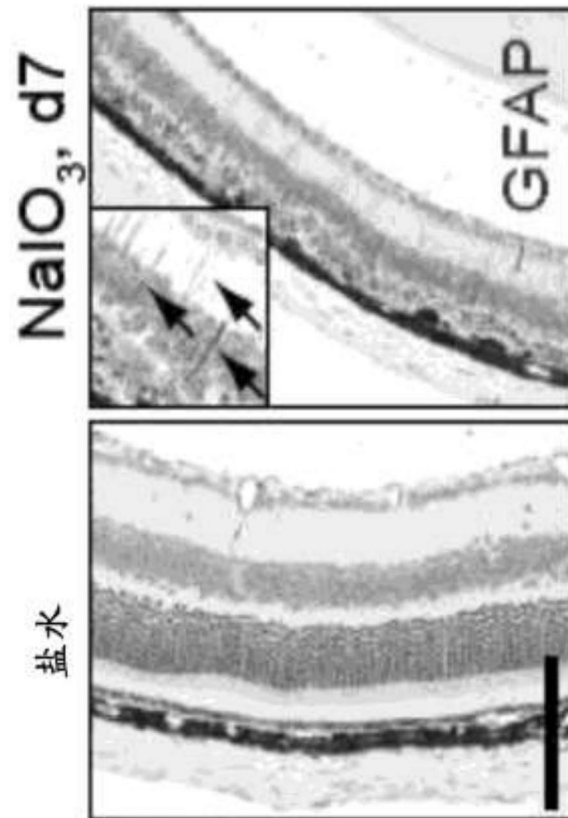


图13A

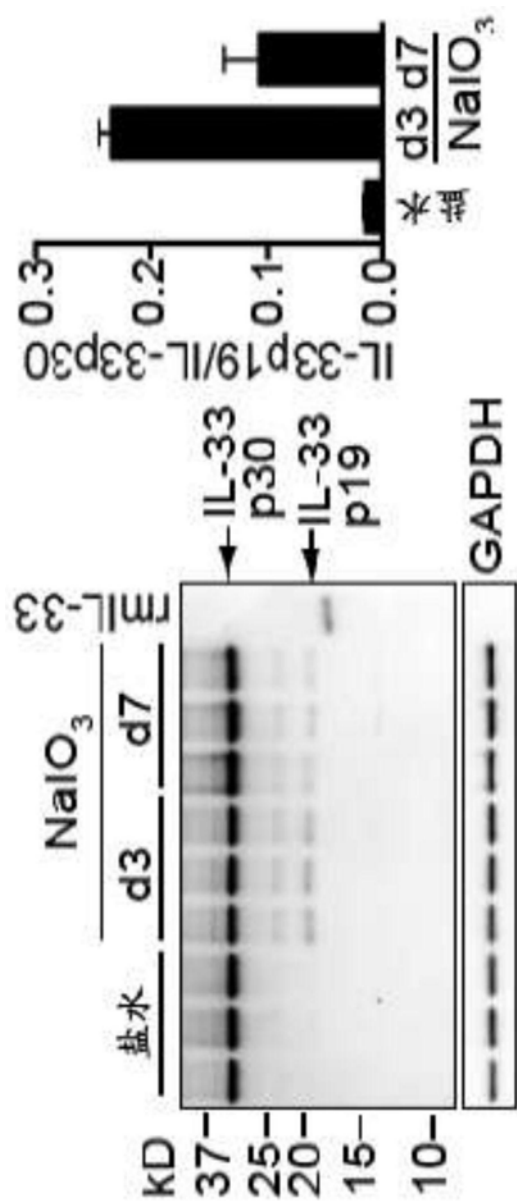


图13B

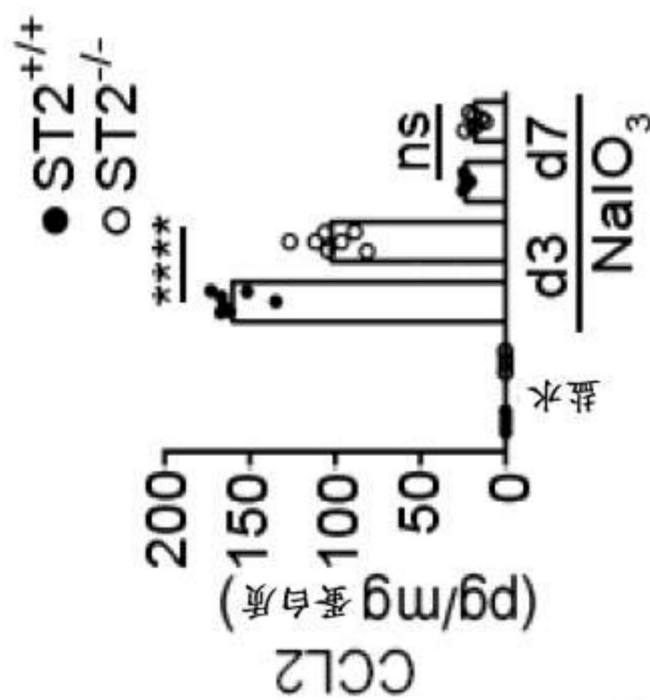


图13C

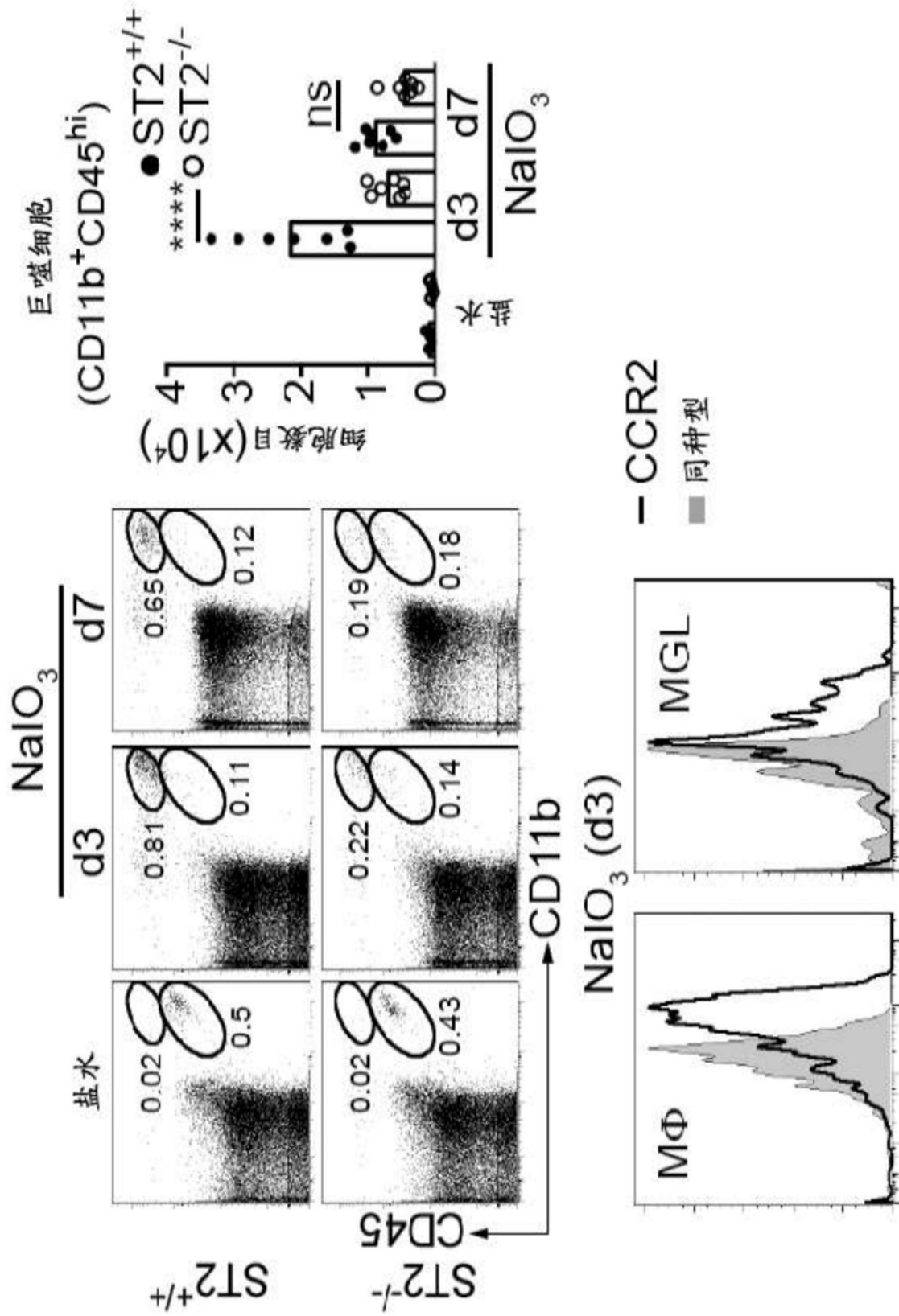


图13D

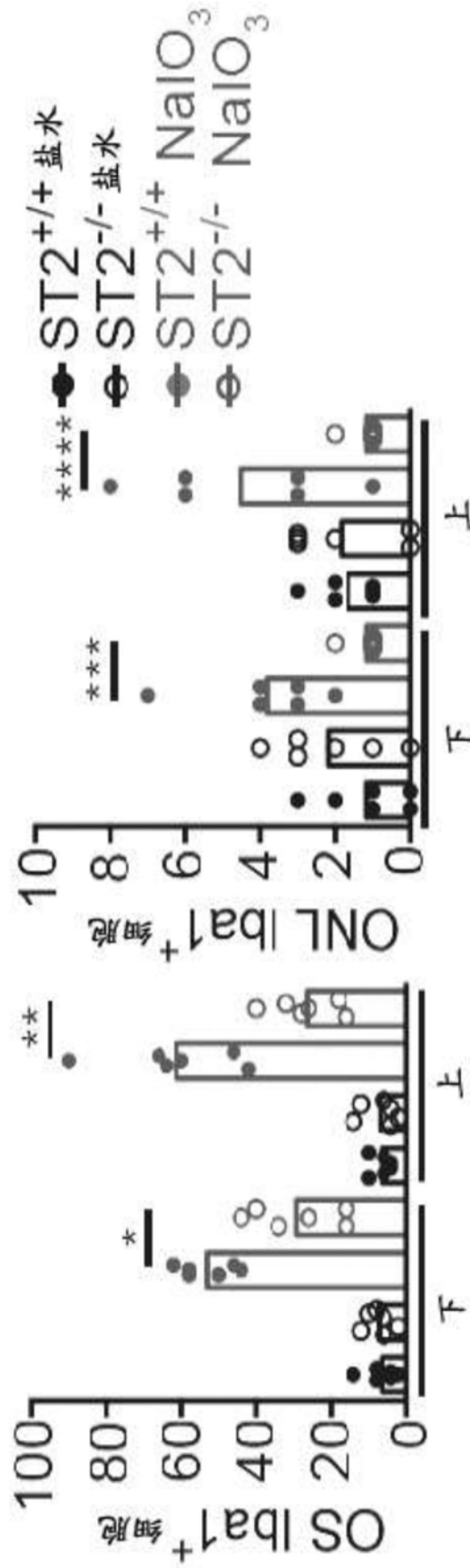


图13E

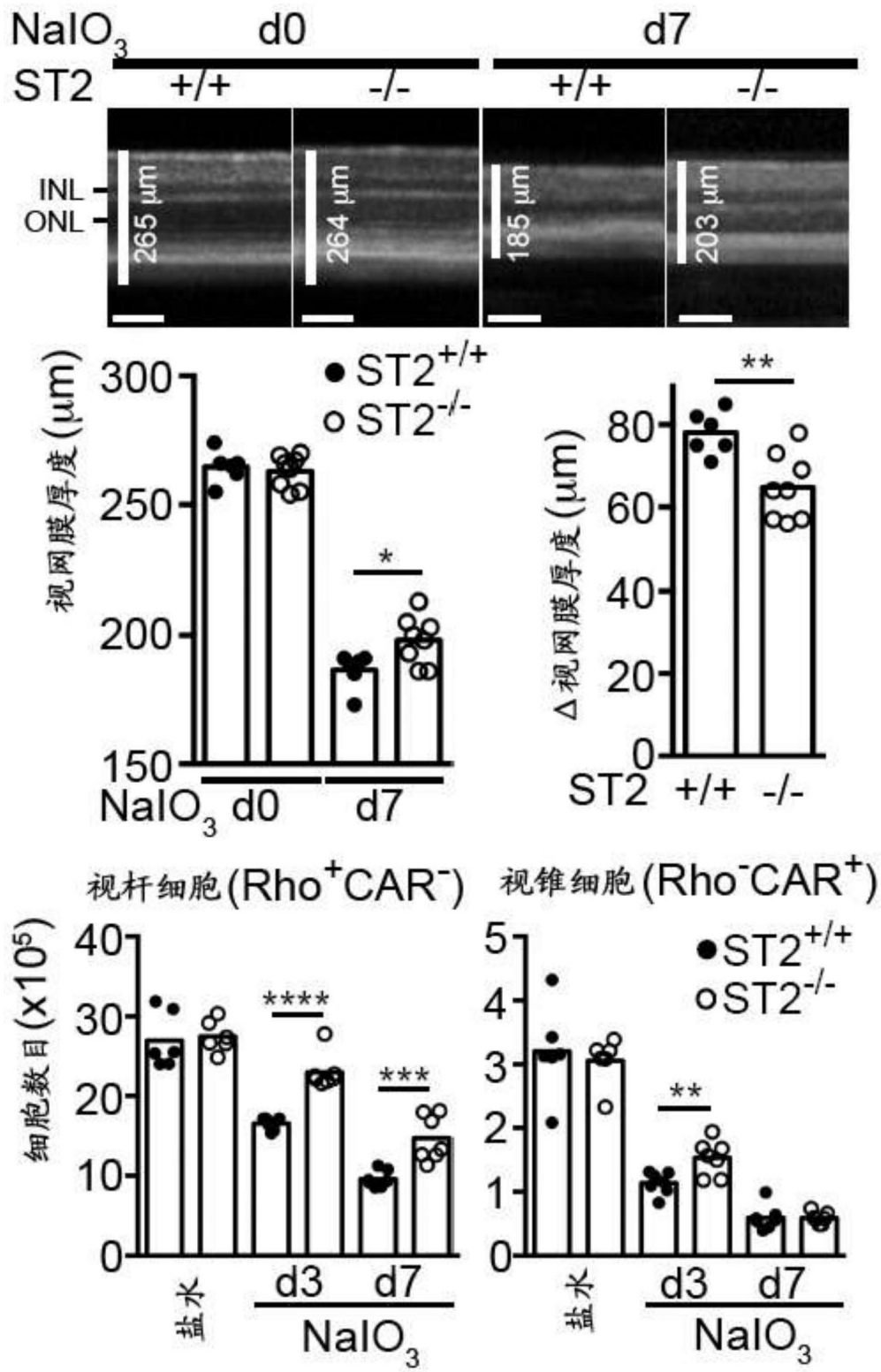


图13F

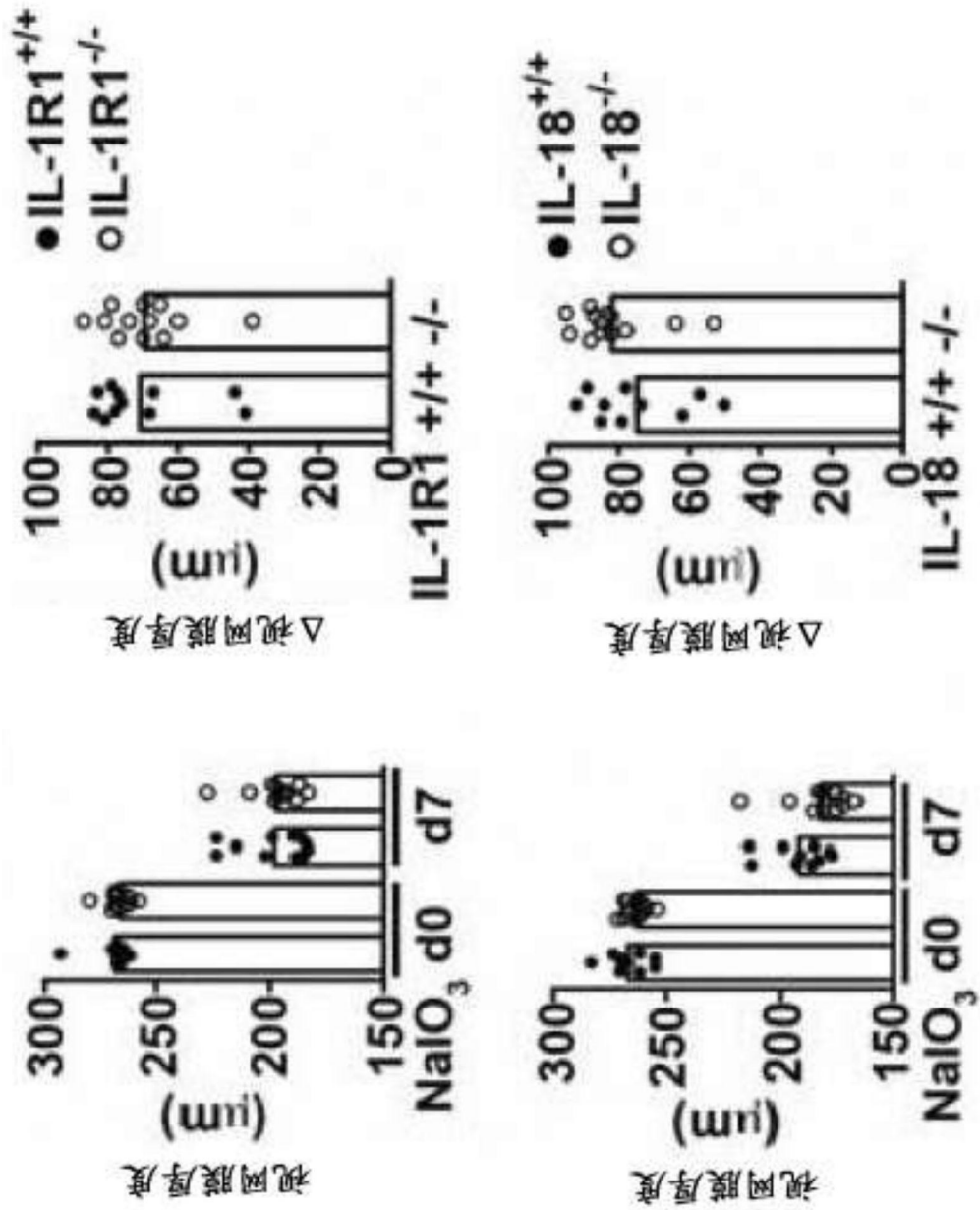


图13G

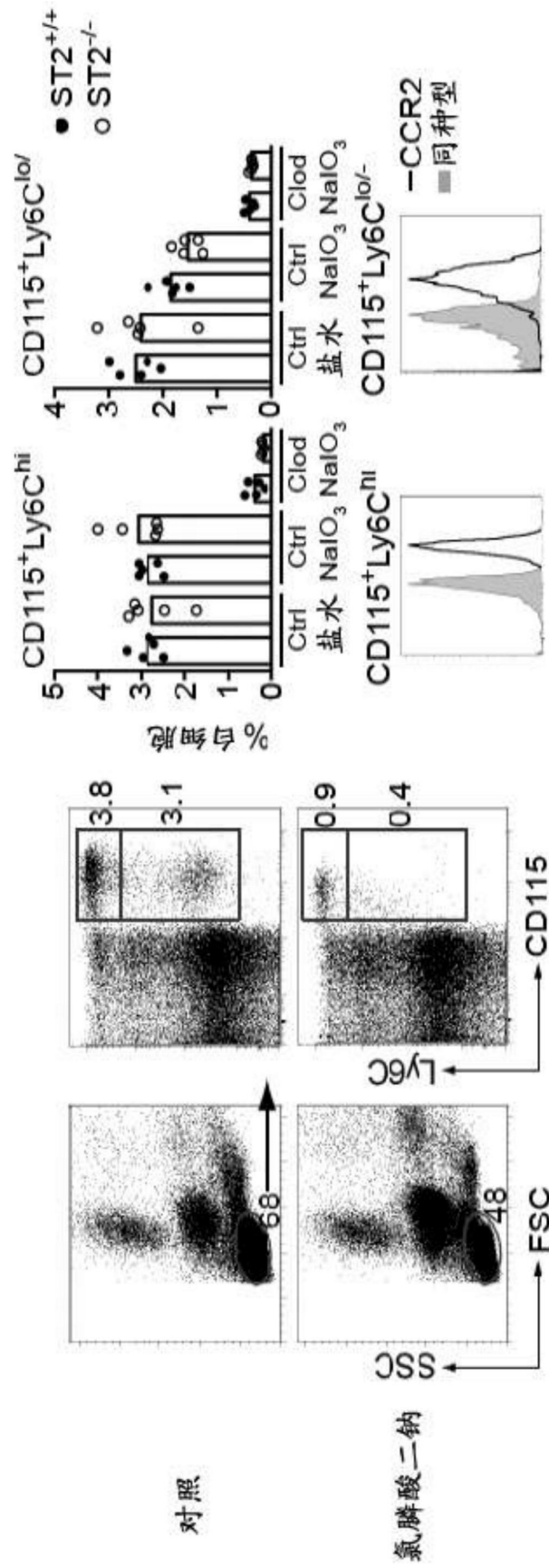


图13H

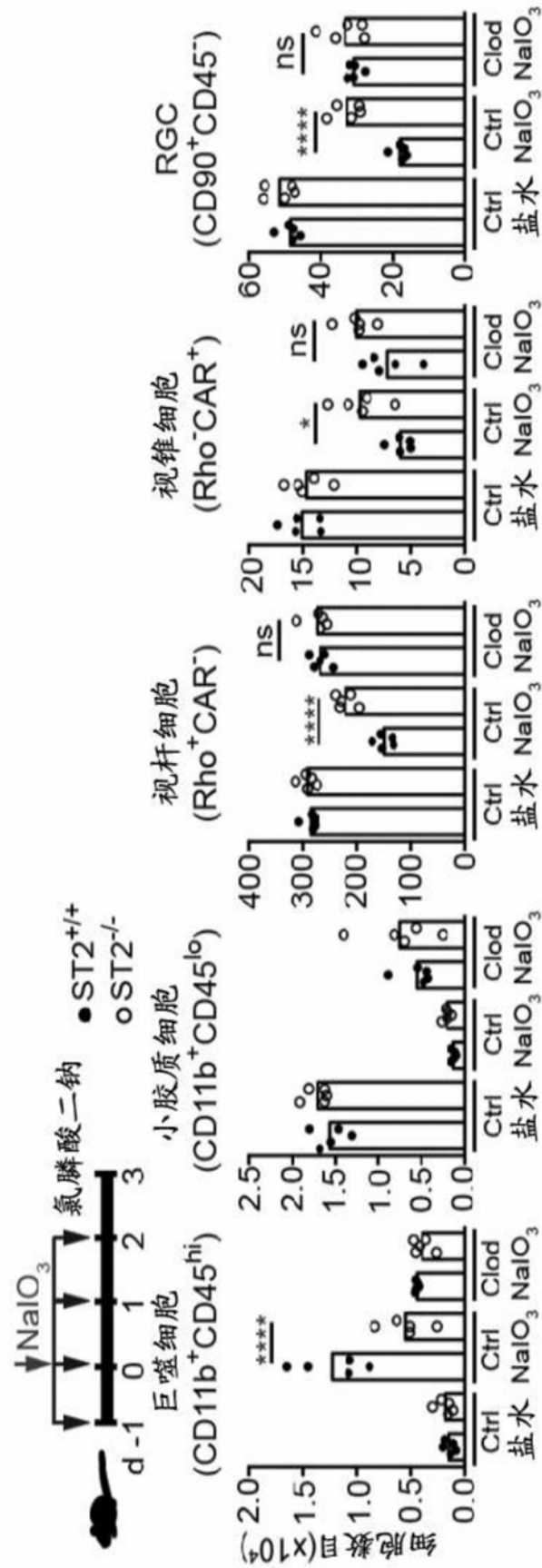


图13I

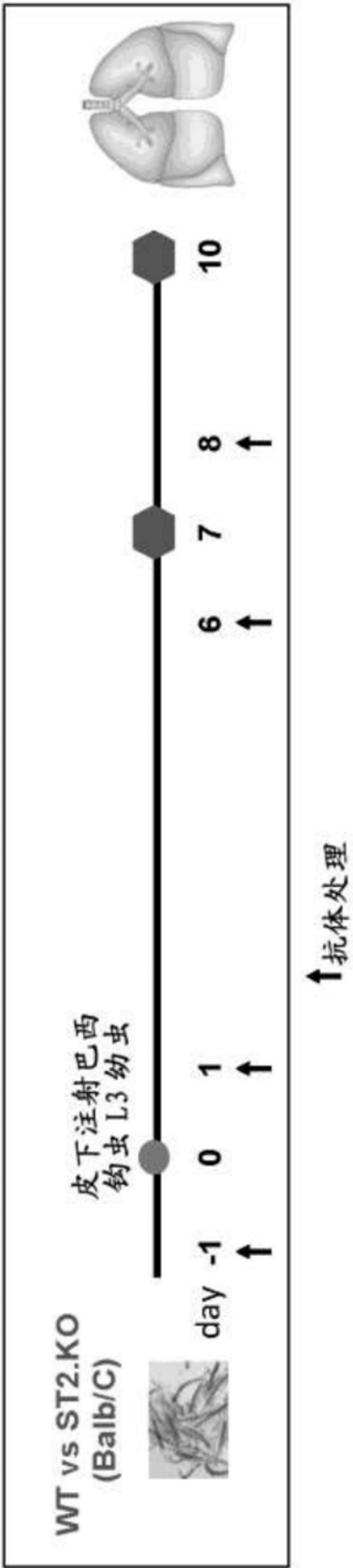


图14A

感染后第 10 天的肺流式细胞术分析

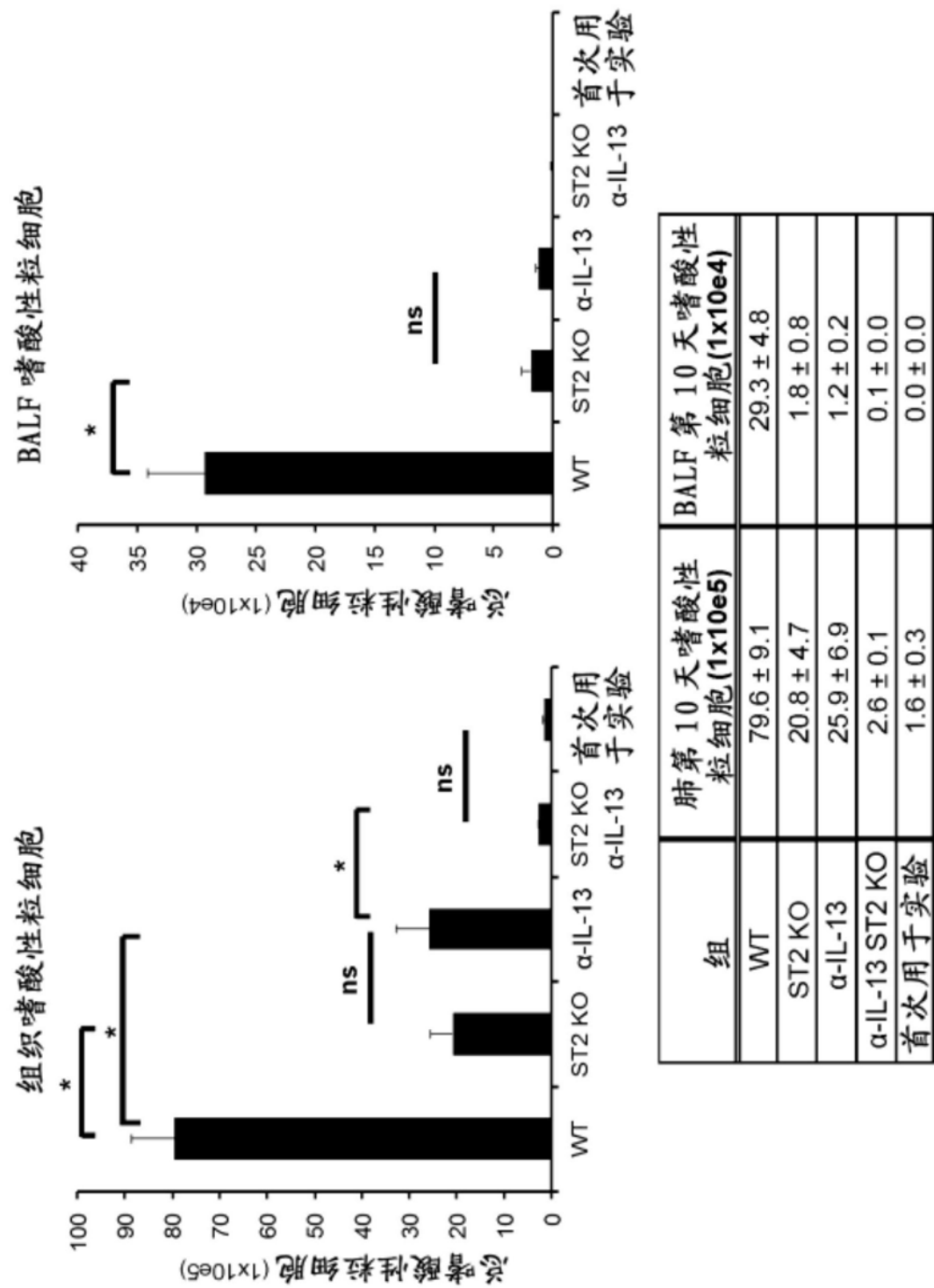
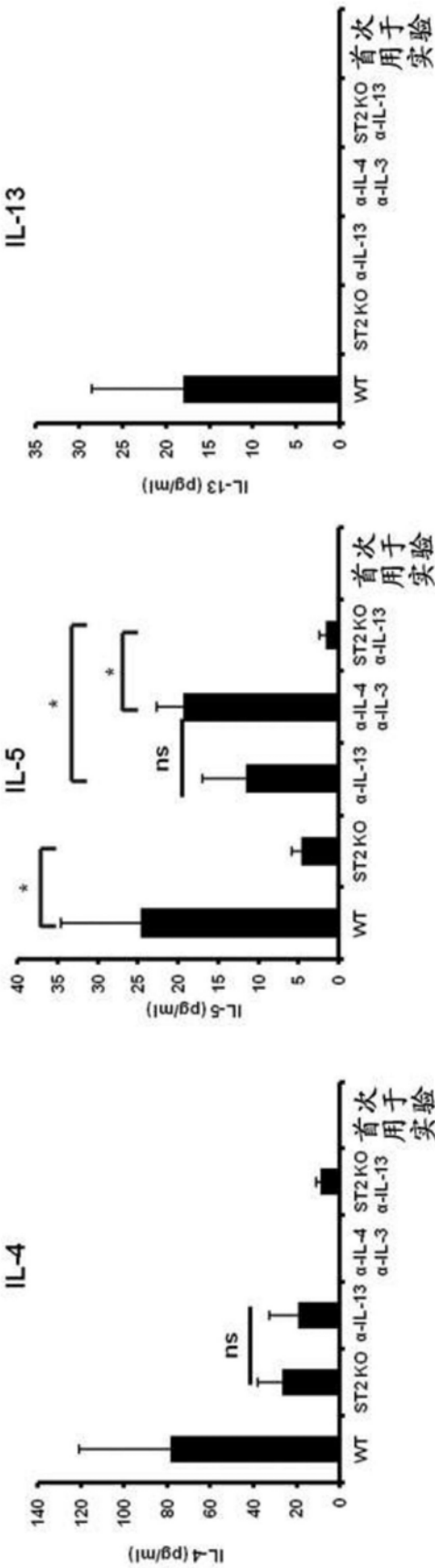


图14B

感染后第 10 天 BALF 细胞因子分析



组	BALF 第10天 IL-4 (pg/ml)	BALF 第10天 IL-5 (pg/ml)	BALF 第10天 IL-13 (pg/ml)
WT	78 ± 42	25 ± 10	18 ± 11
ST2 KO	26 ± 11	5 ± 1	0 ± 0
α-IL-13	19 ± 13	11 ± 6	0 ± 0
α-IL-13 ST2 KO	9 ± 2	2 ± 1	0 ± 0
首次用于实验	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

图14C

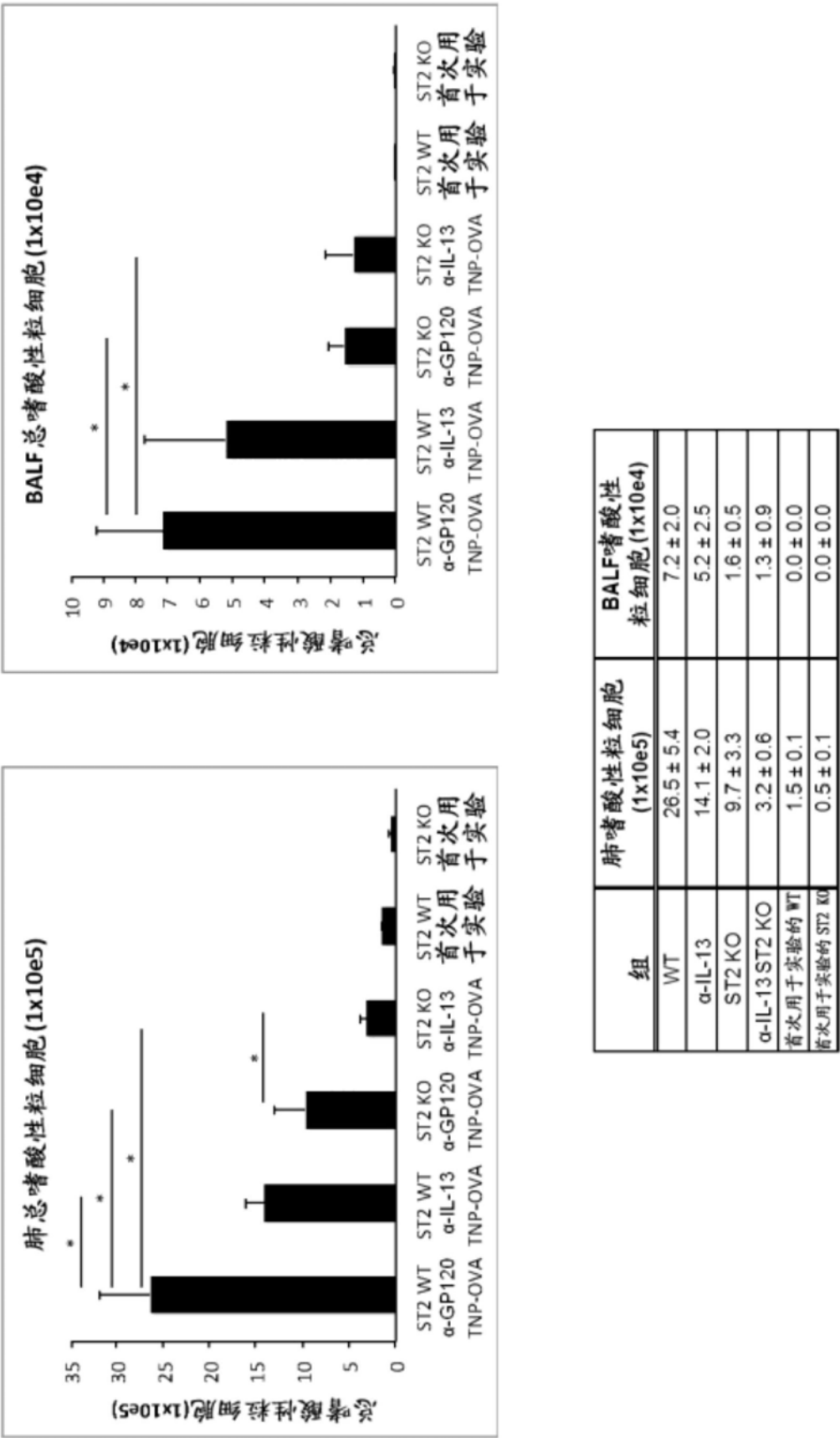


图15A

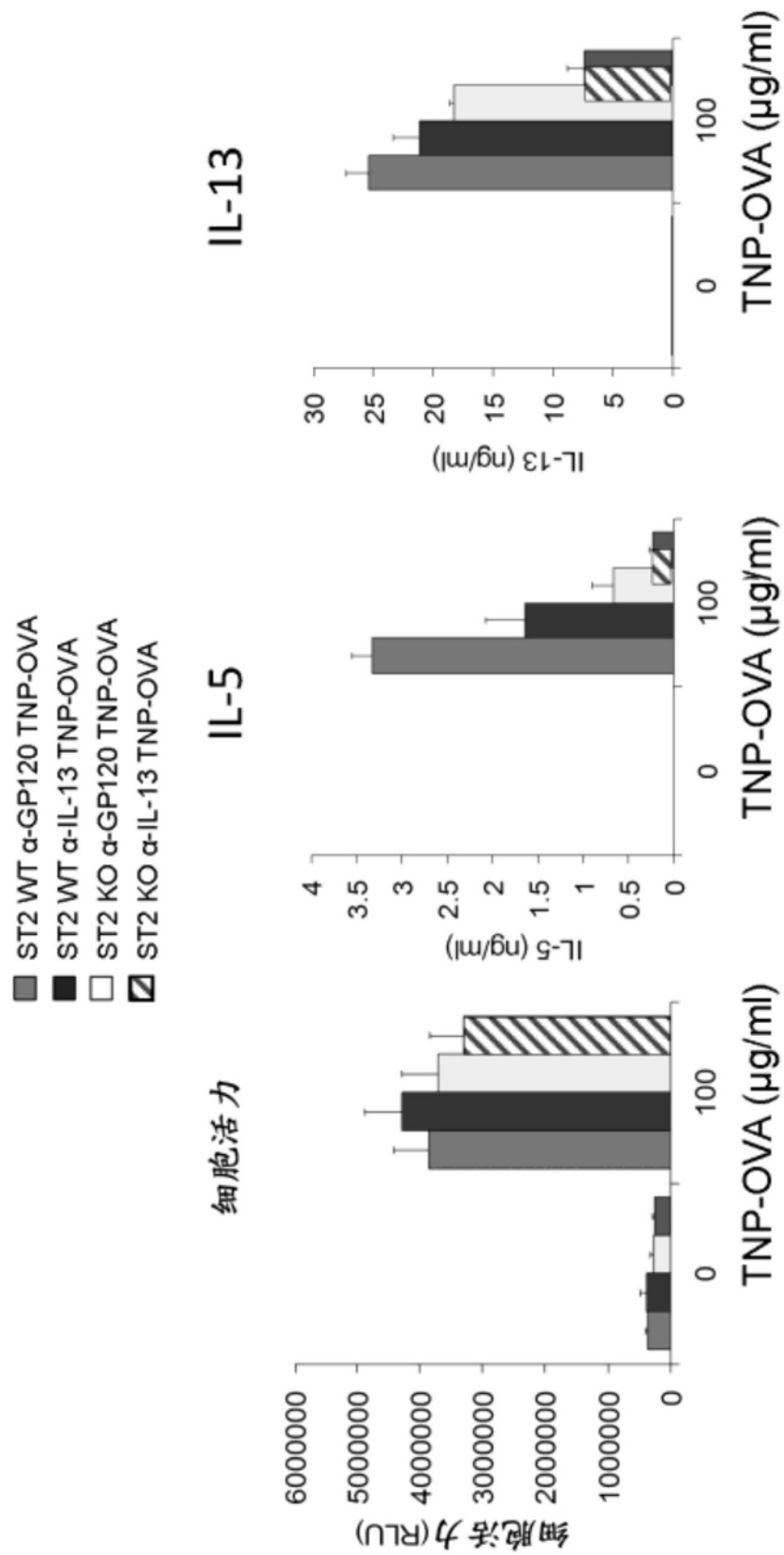


图15B

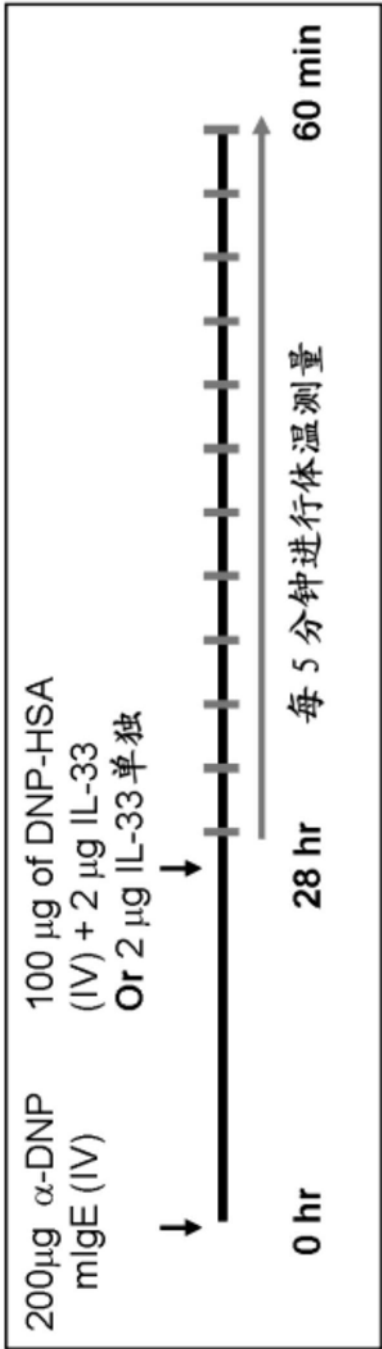


图16B

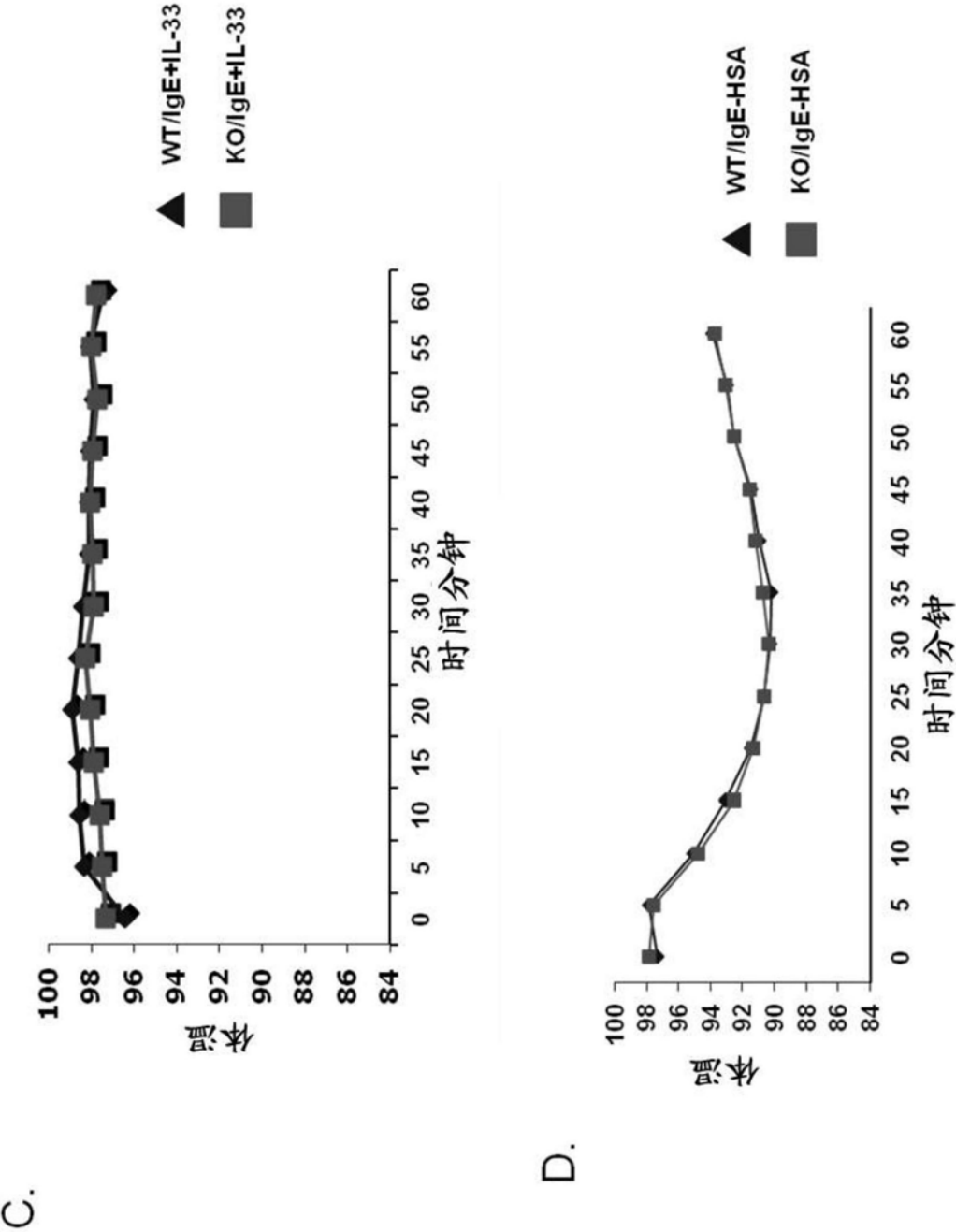


图16C-16D

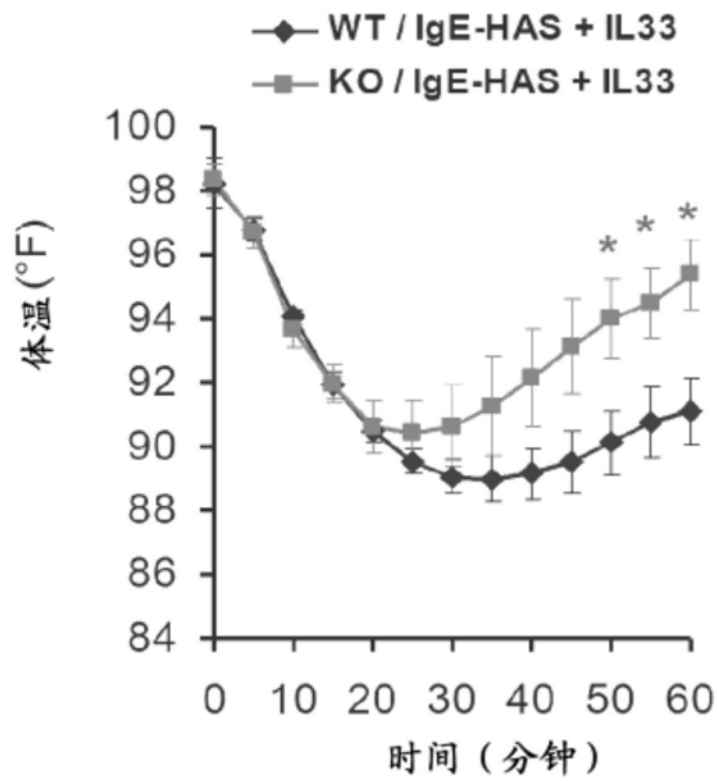
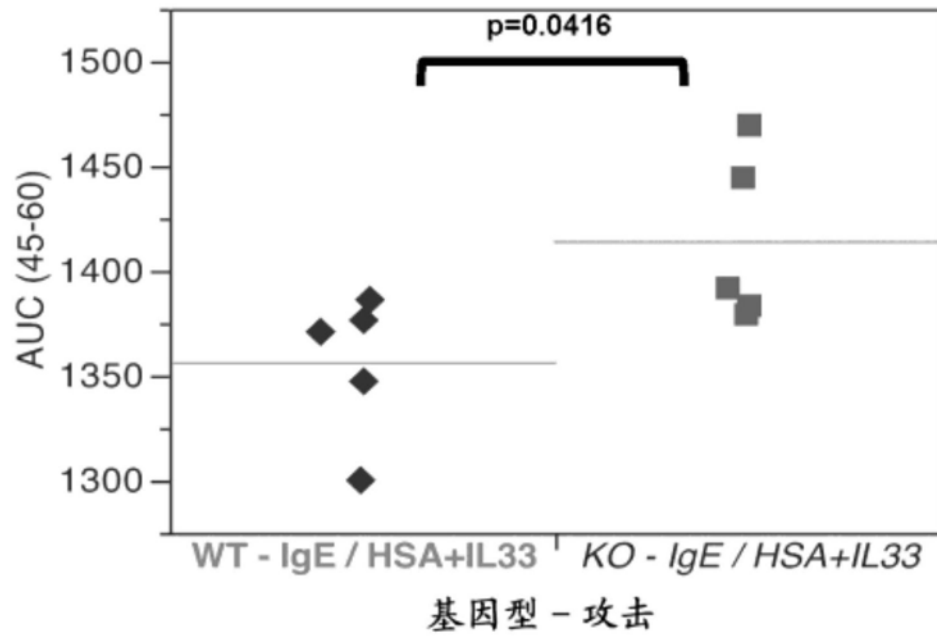


图16E

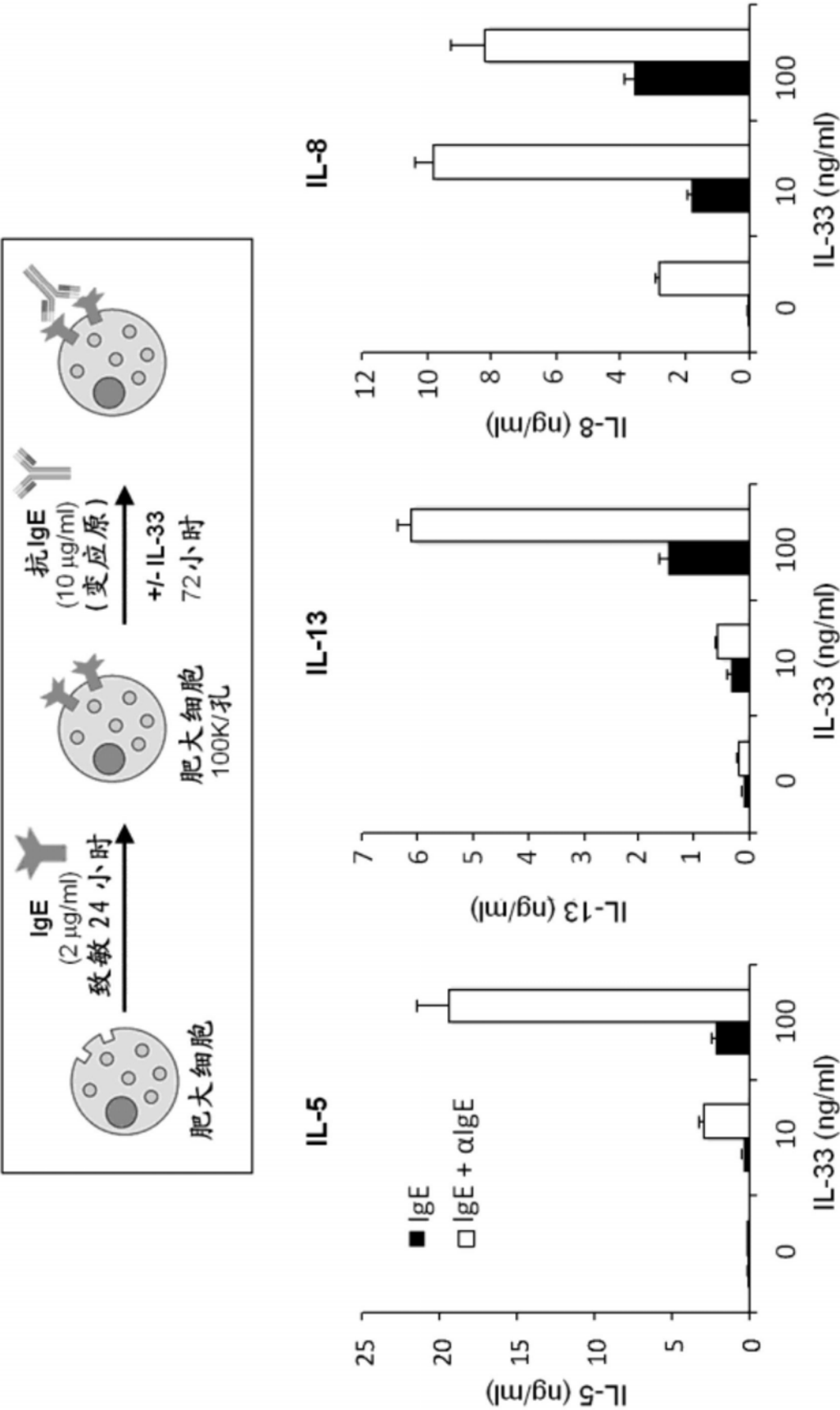


图16F

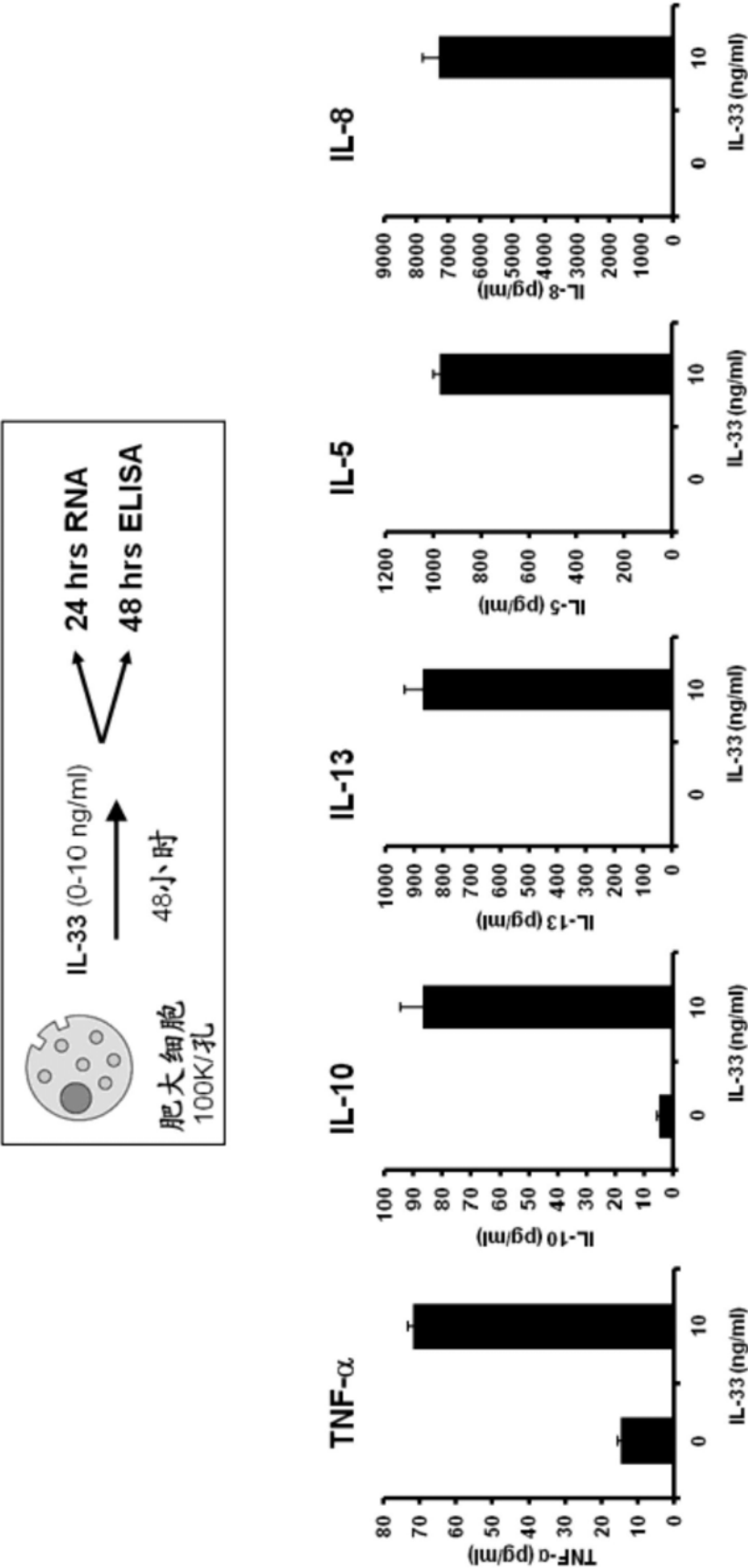


图16G

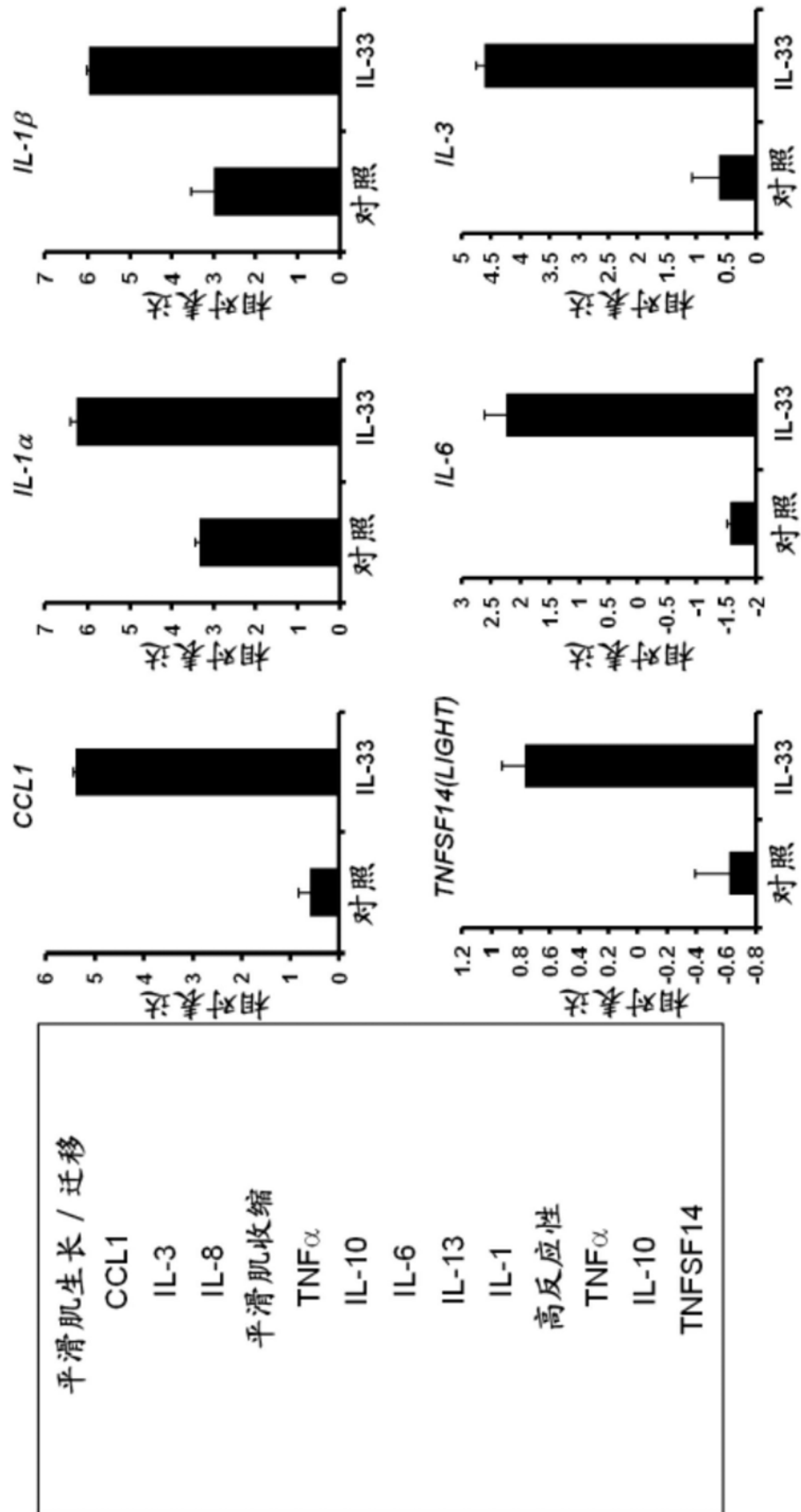


图16H

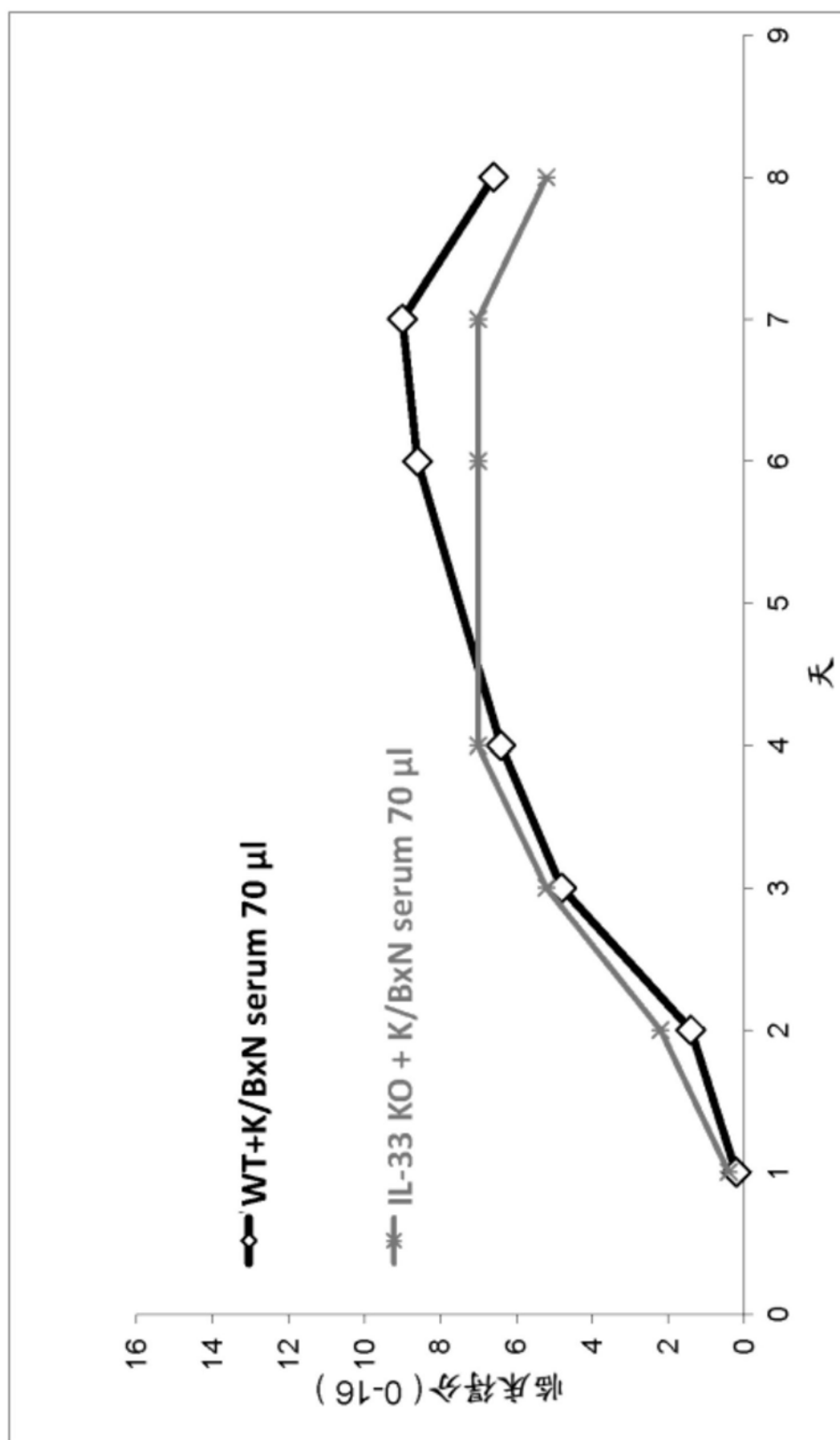


图17A

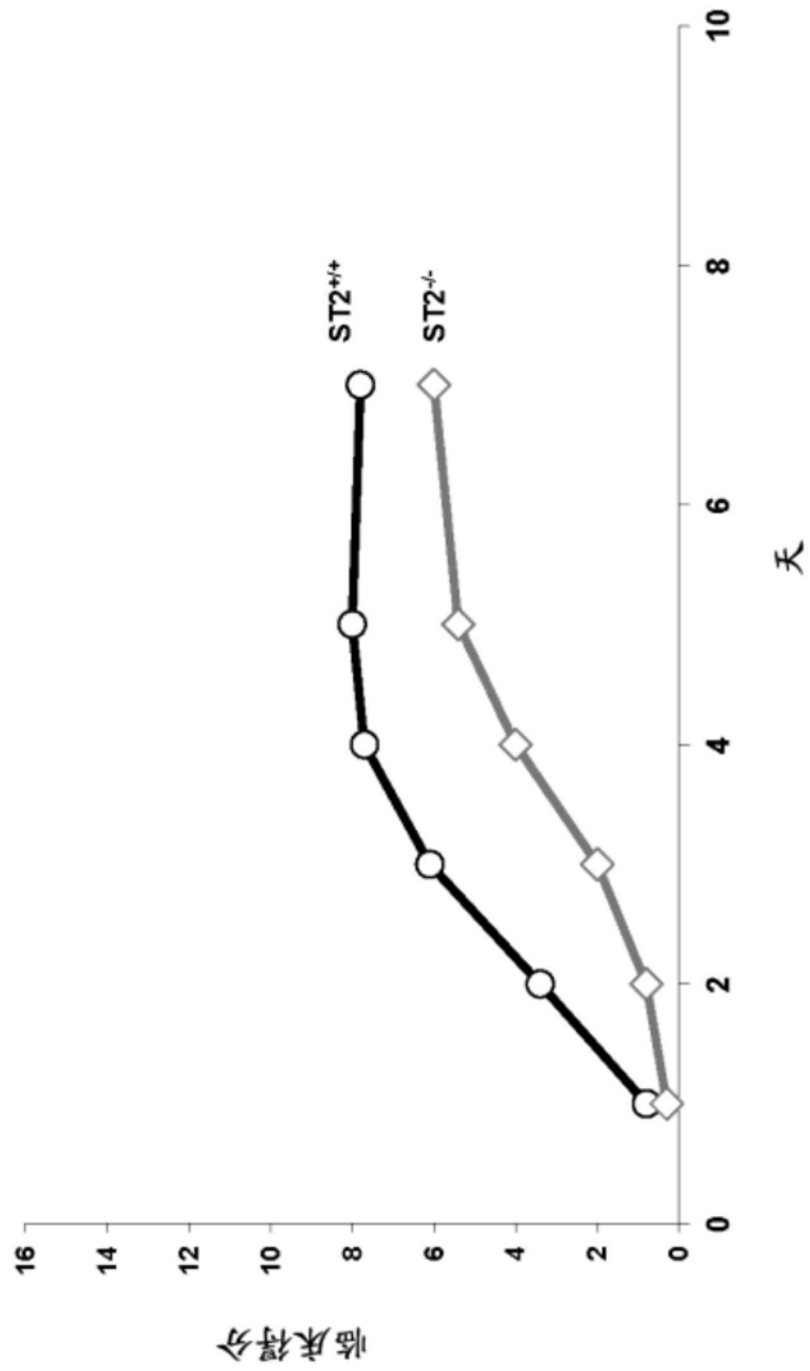


图17B

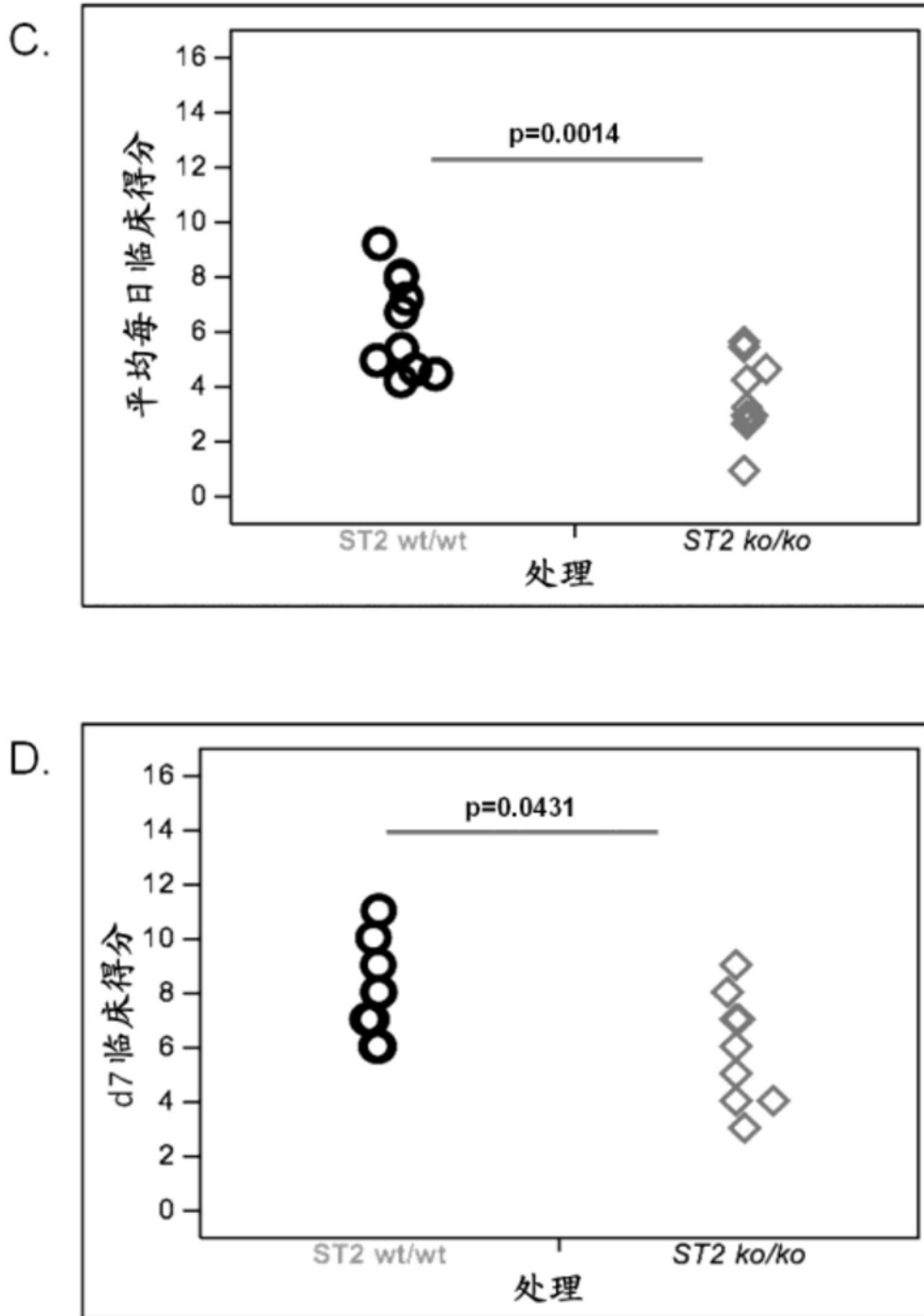


图17C-17D

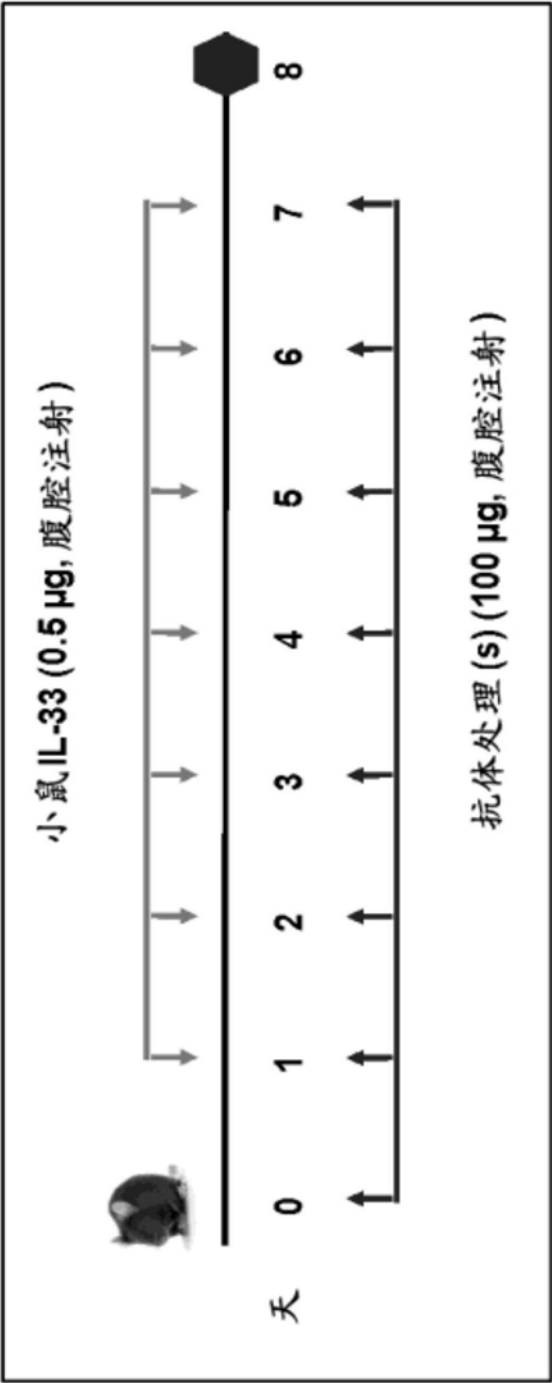


图18A

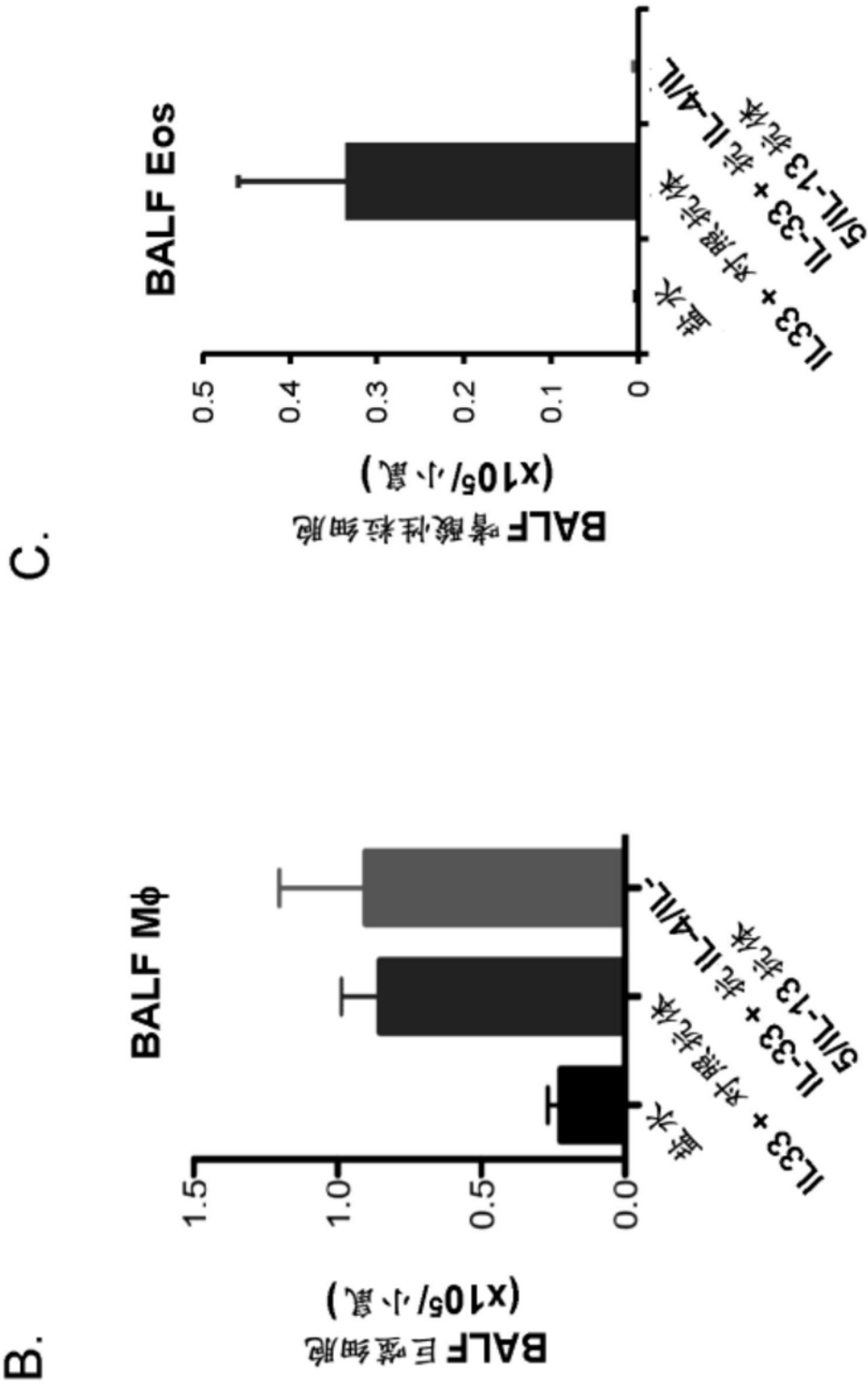
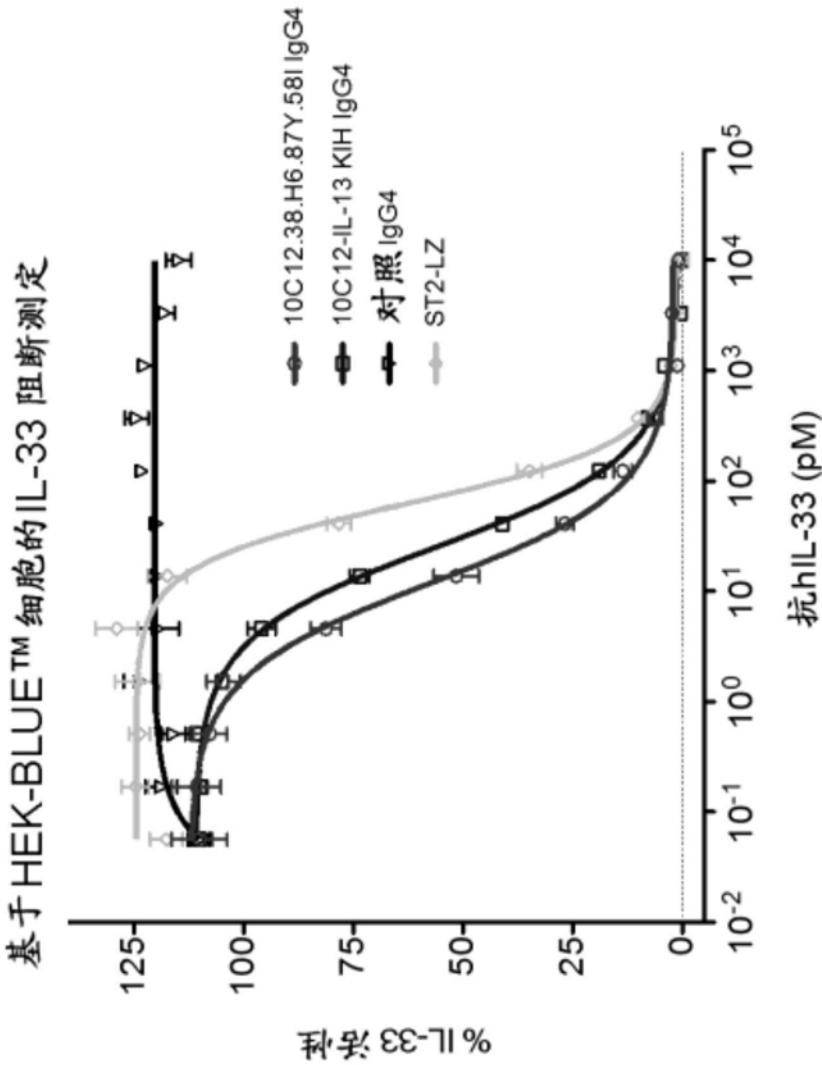


图18B-18C



10C12.38.H6.87Y.58I IgG4	10C12-IL-13 KIH IgG4	对照 IgG4	ST2-LZ
102.1 (0.0153 µg/ml)	204.7 (0.0307 µg/ml)	1.082e-006	256.6

IC90 (pM)

10C12.38.H6.87Y.58I IgG4	10C12-IL-13 KIH IgG4	对照 IgG4	ST2-LZ
11.99	25.35	7.633e-006	62.11

IC50 (pM)

图19A

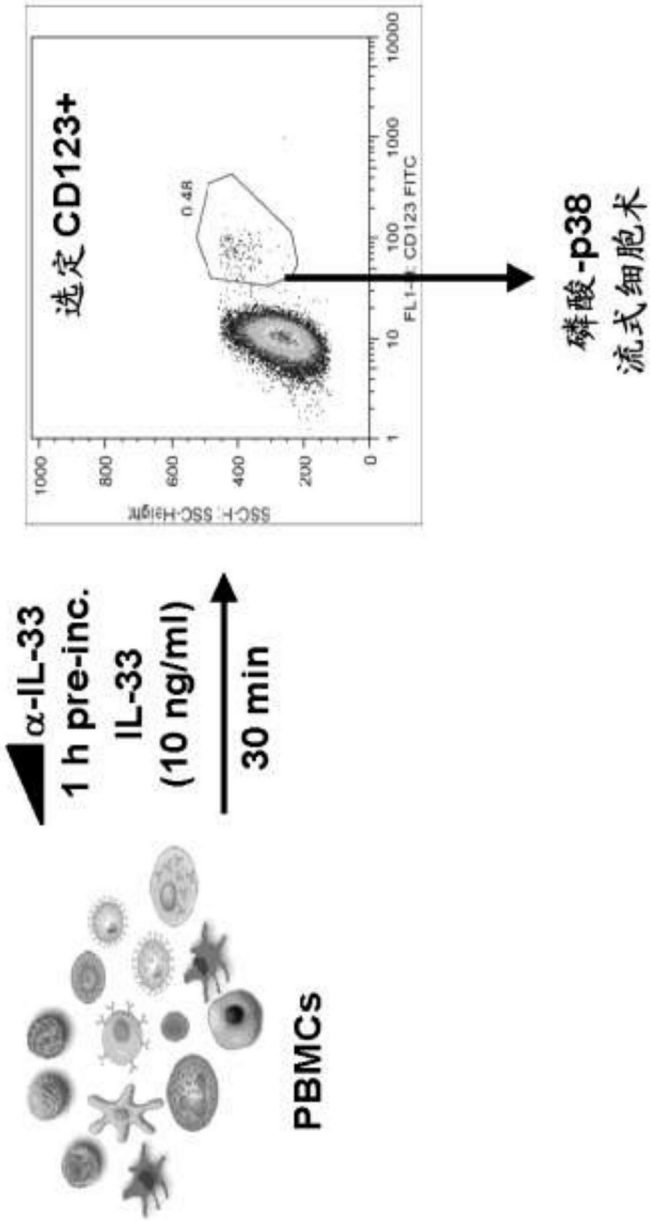


图19B

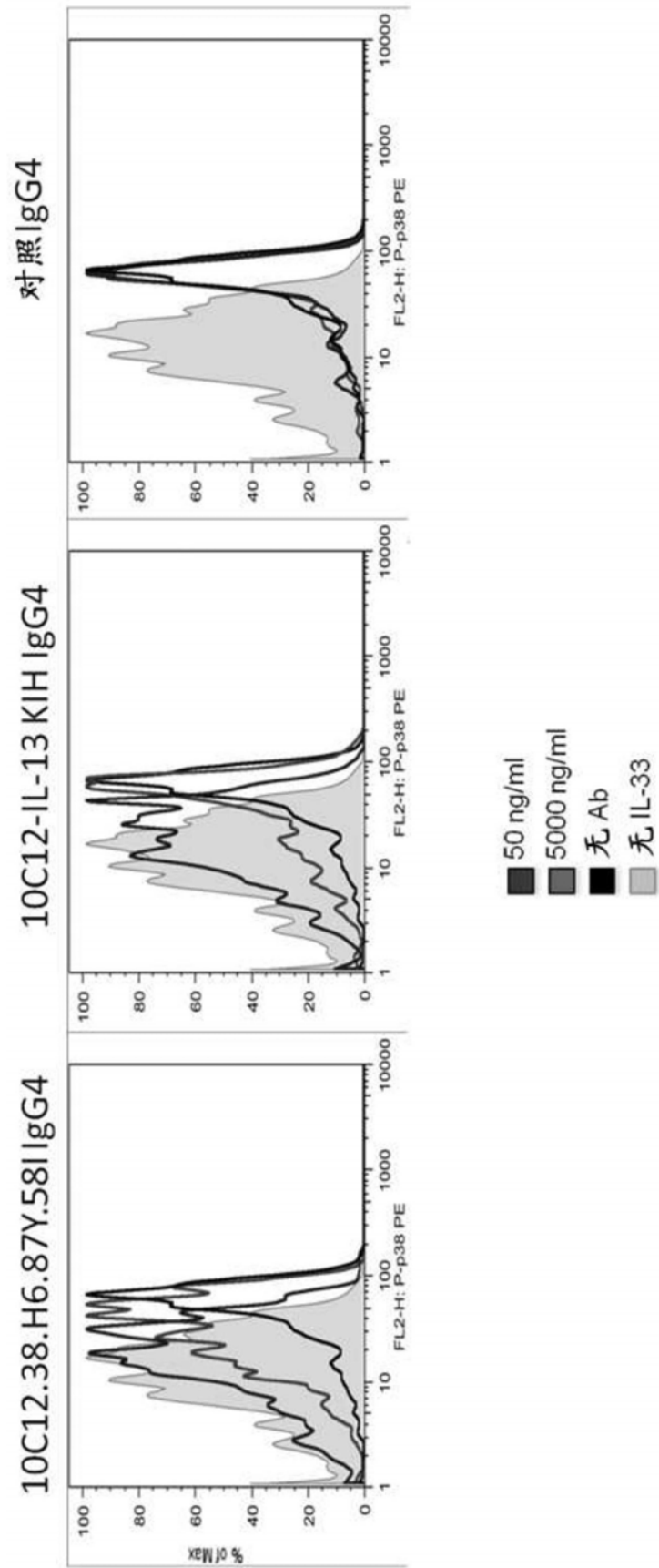


图19C

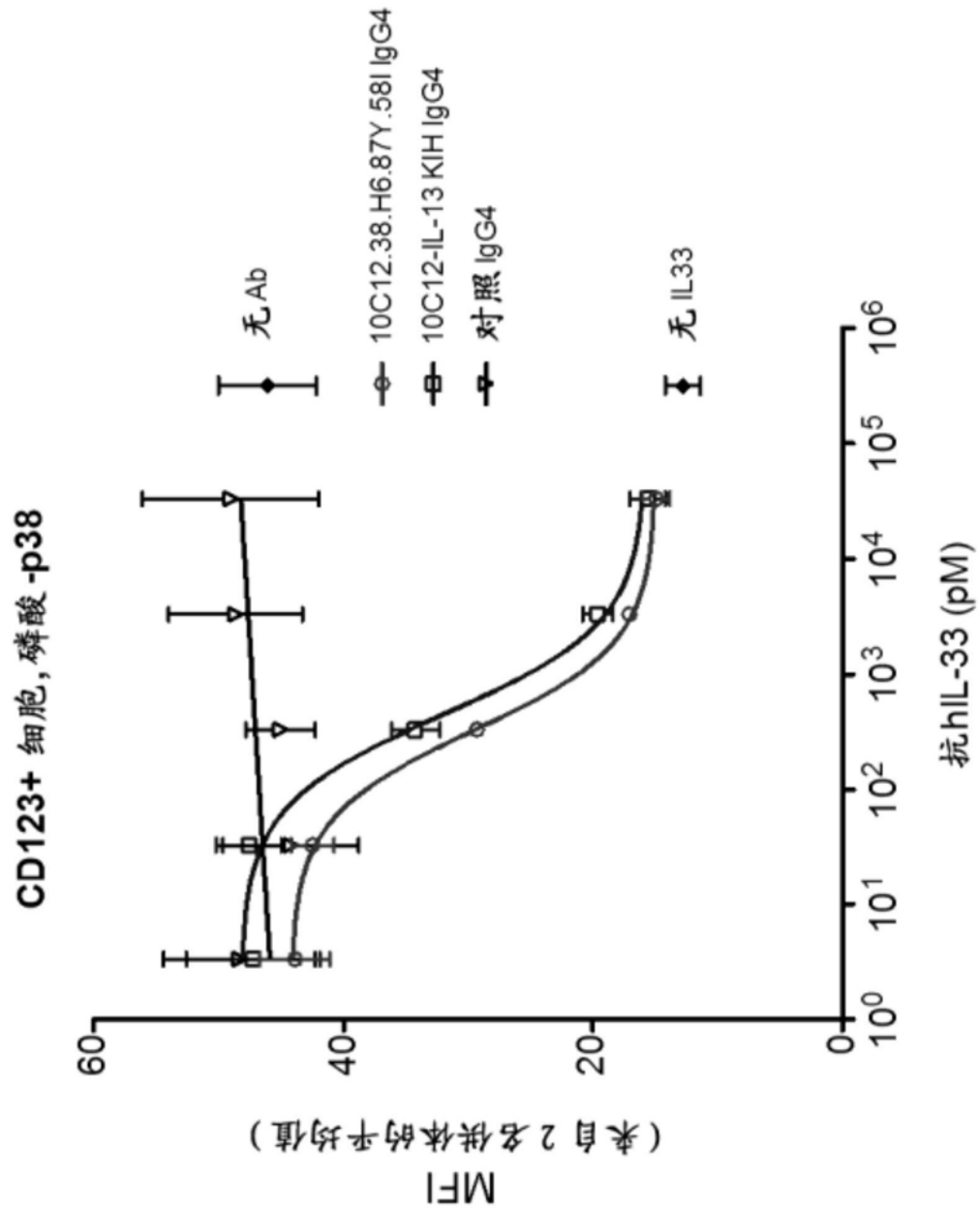


图19D

10C12.38.H6.87Y.58I/L-13 IgG4 双特异性抗体

人IL-33				食蟹猴IL-33				人IL-13			
Lot	k _{on} (1/Ms) (x10 ⁵)	k _{off} (1/s) (x10 ⁻⁴)	K _D (nM)	k _{on} (1/Ms) (x10 ⁵)	k _{off} (1/s) (x10 ⁻⁴)	K _D (nM)	k _{on} (1/Ms) (x10 ⁵)	k _{off} (1/s) (x10 ⁻⁴)	KD (nM)		
1	11.0	0.11	0.010	6.7	0.72	0.107	14.9	0.02	<0.010		
2	11.4	0.30	0.026	6.5	0.40	0.062	14.7	0.04	<0.010		
3	9.9	0.40	0.041	7.0	0.41	0.059	14.5	0.06	<0.010		

图20

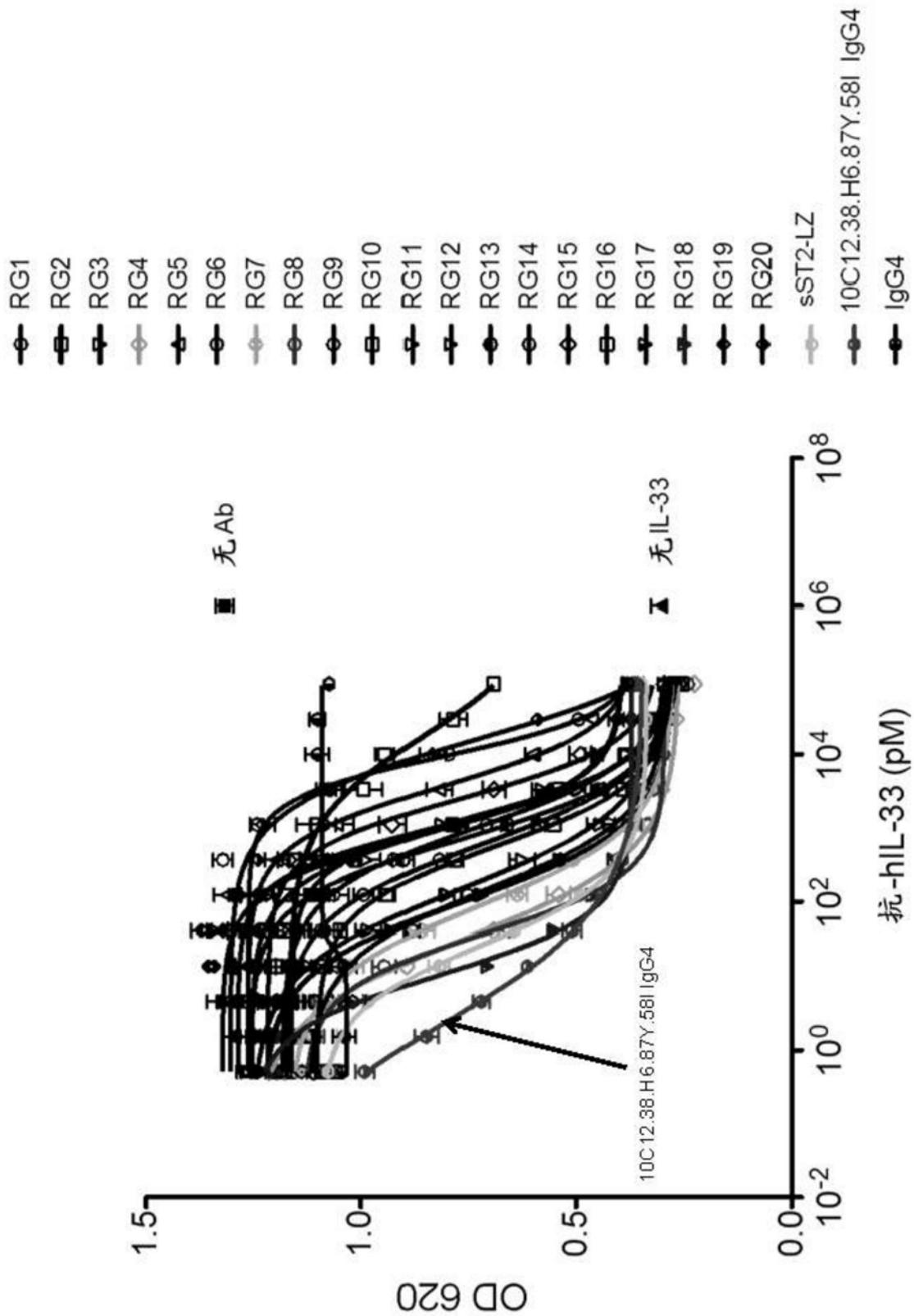


图21A

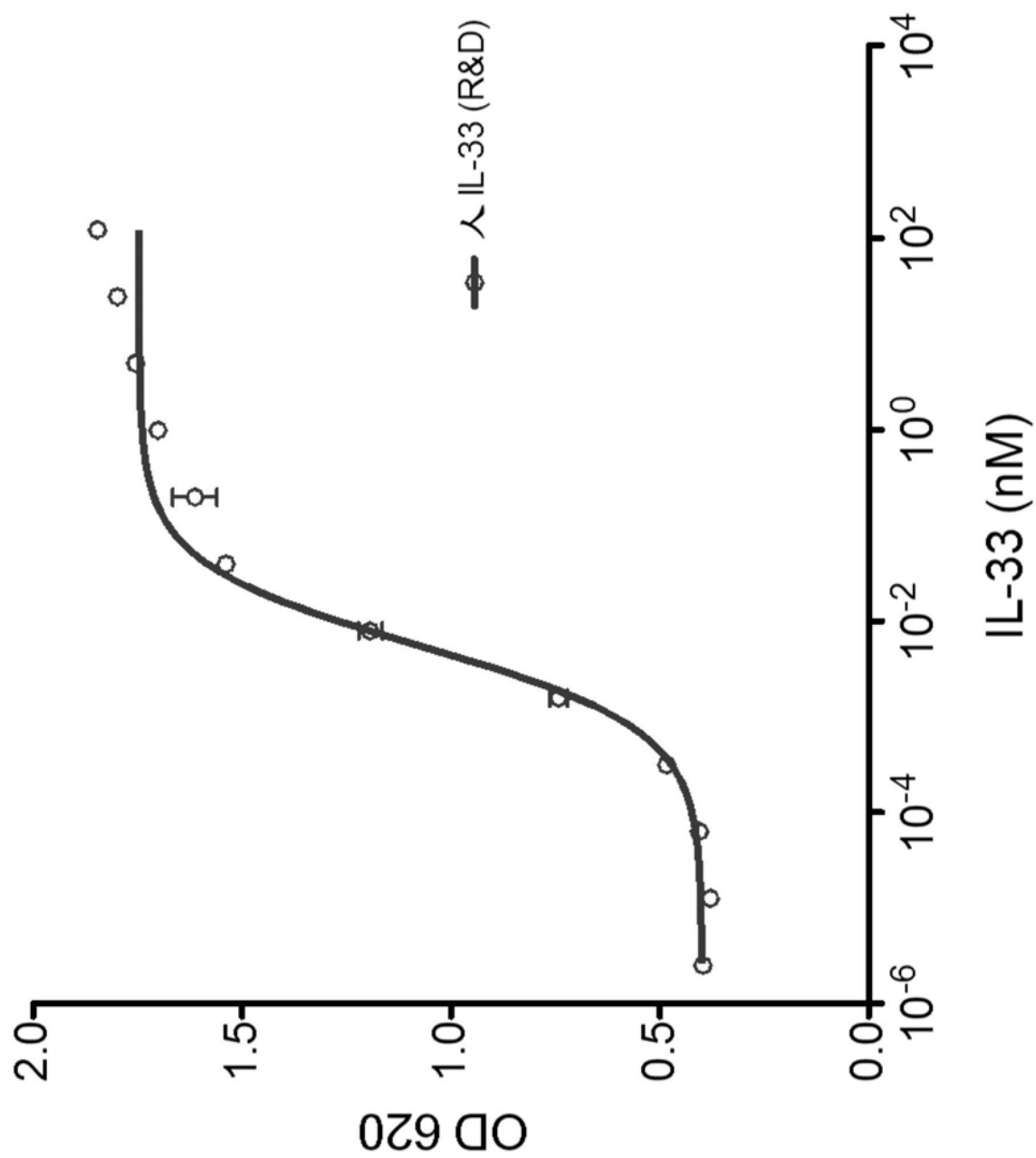


图21B

物种	人	食蟹猴
EC50 [M]	5.5E-12	2.1E-11
IL-33	10pM hIL-33	5pM cIL-33-Nhis
Ab	IC50 [M]	IC50 [M]
10C12.38.H6.87Y.58I IgG4	2.4E-12	4.2E-09
sST2	2.7E-11	3.0E-11
RG1	9.5E-09	非阻断
RG2	1.7E-08	非阻断
RG3	1.1E-10	2.9E-08
RG4	3.3E-11	非阻断
RG5	3.7E-09	非阻断
RG6	6.1E-10	非阻断
RG7	9.2E-11	6.6E-08
RG8	3.8E-11	4.8E-08
RG9	1.5E-10	3.4E-08
RG10	1.5E-09	2.3E-08
RG11	1.5E-10	非阻断
RG12	1.1E-09	1.1E-08
RG13	7.1E-10	非阻断
RG14	1.0E-09	非阻断
RG15	2.6E-09	非阻断
RG16	5.7E-10	5.0E-08
RG17	9.8E-10	非阻断
RG18	1.1E-11	5.7E-08
RG19	8.2E-10	非阻断
RG20	1.6E-08	6.1E-09

图21C

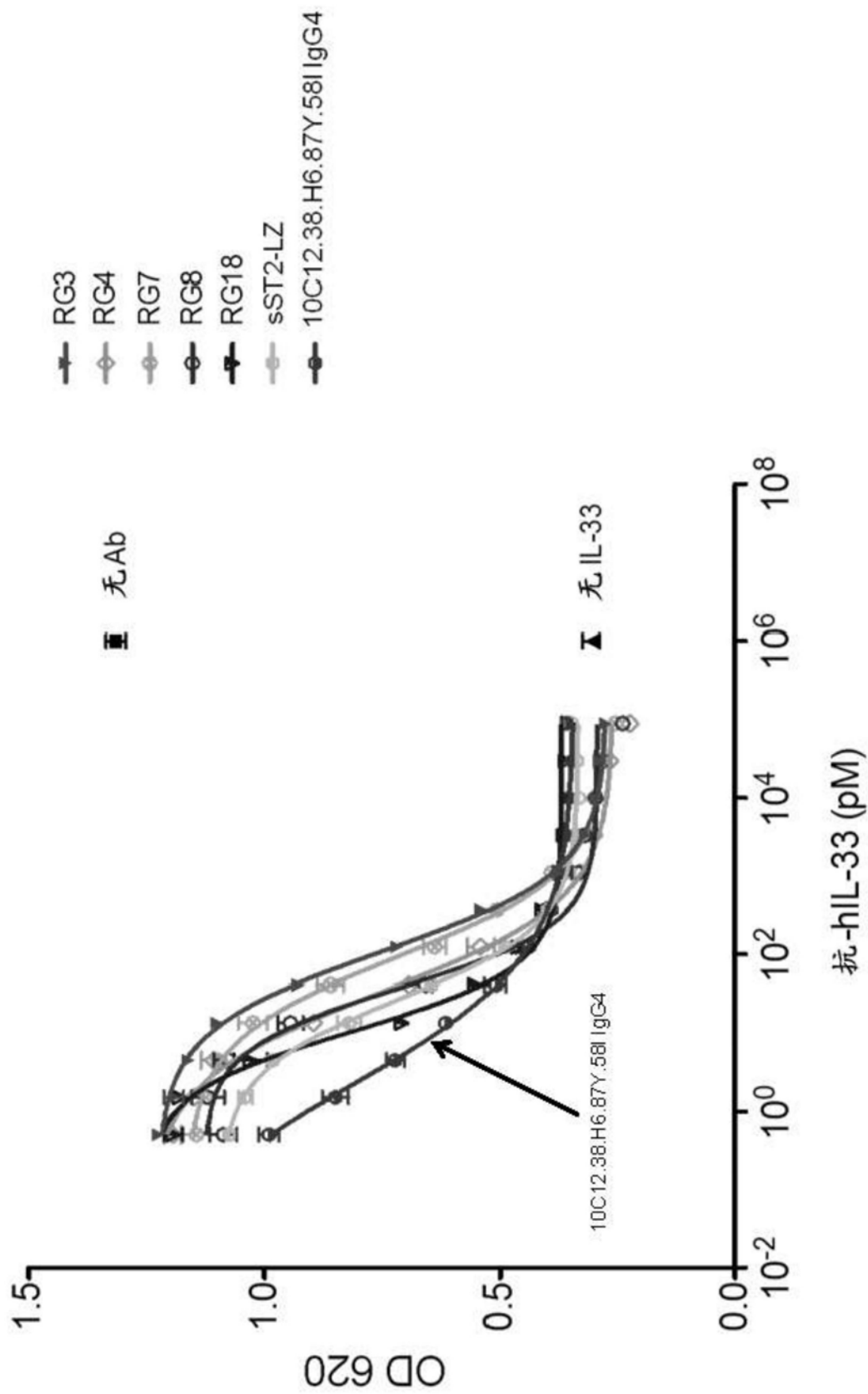


图21D

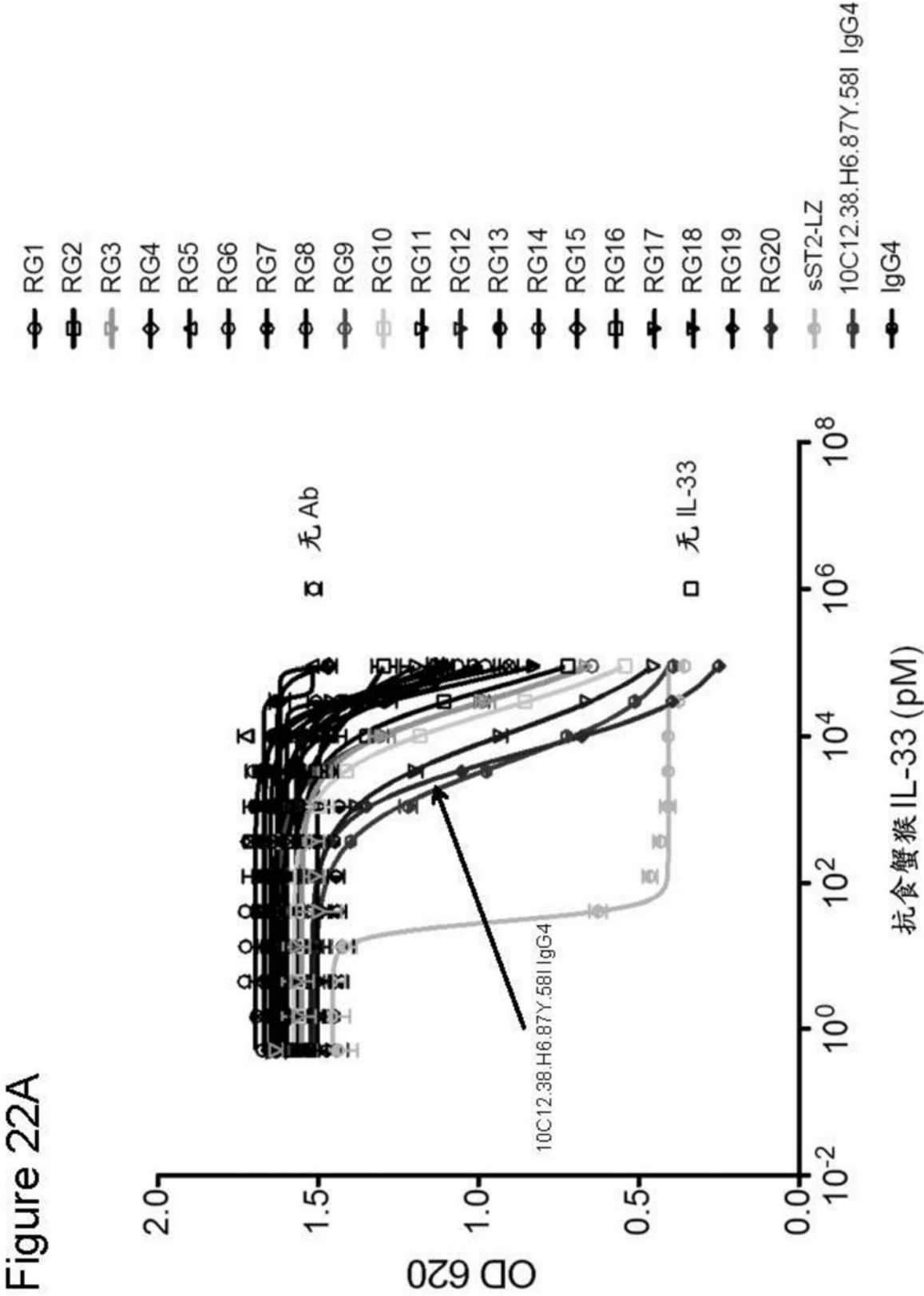


图22A

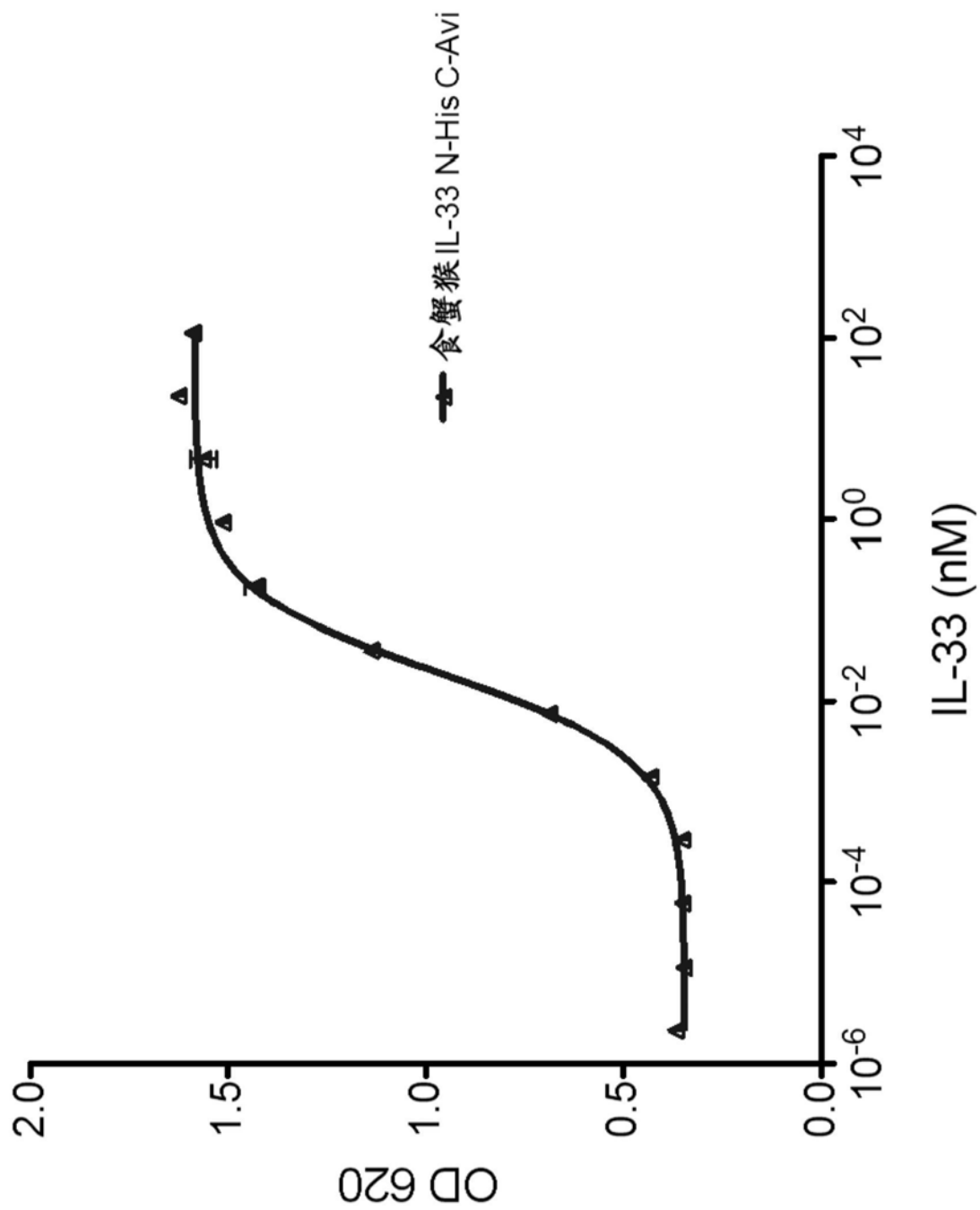


图22B

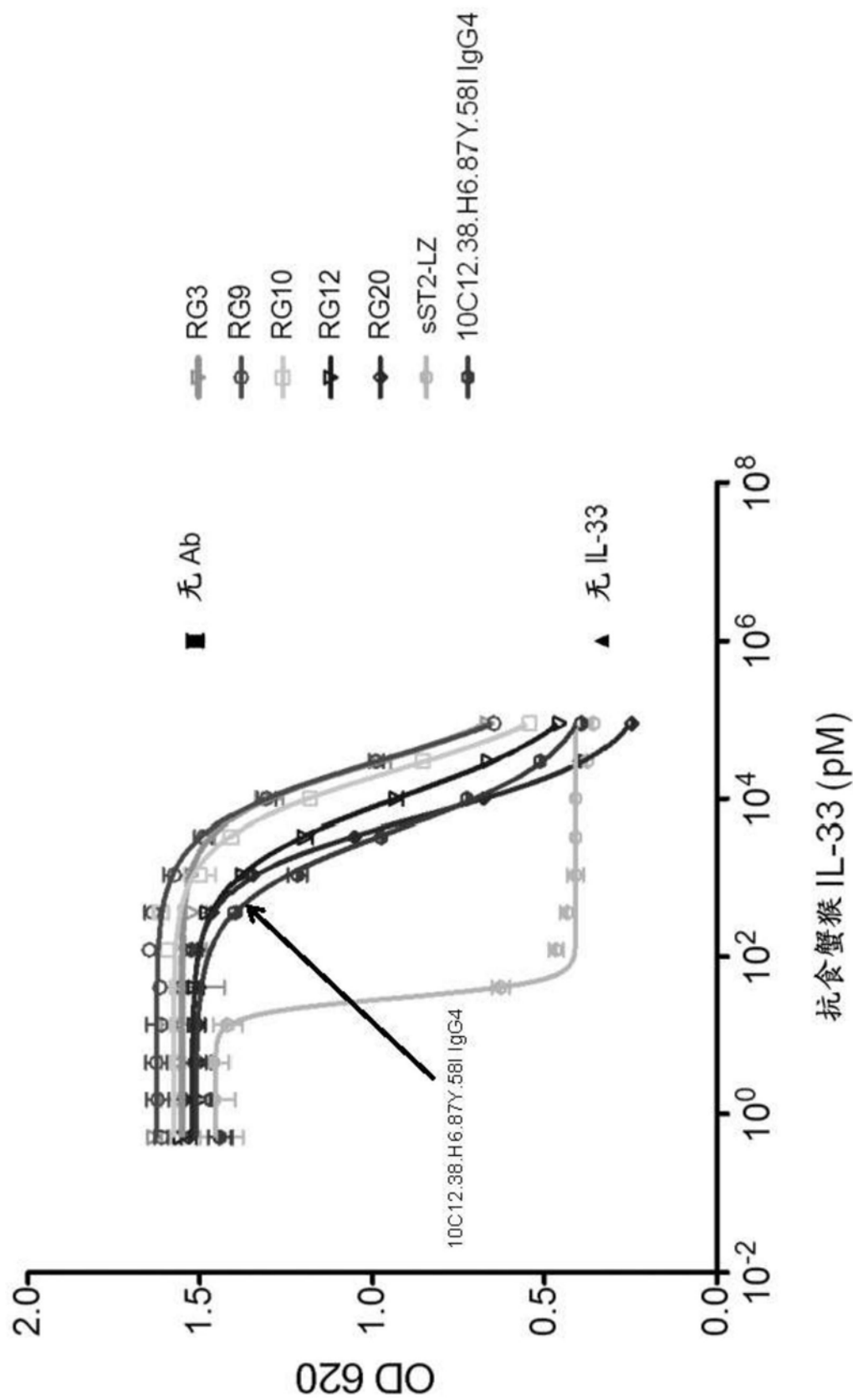


图22C

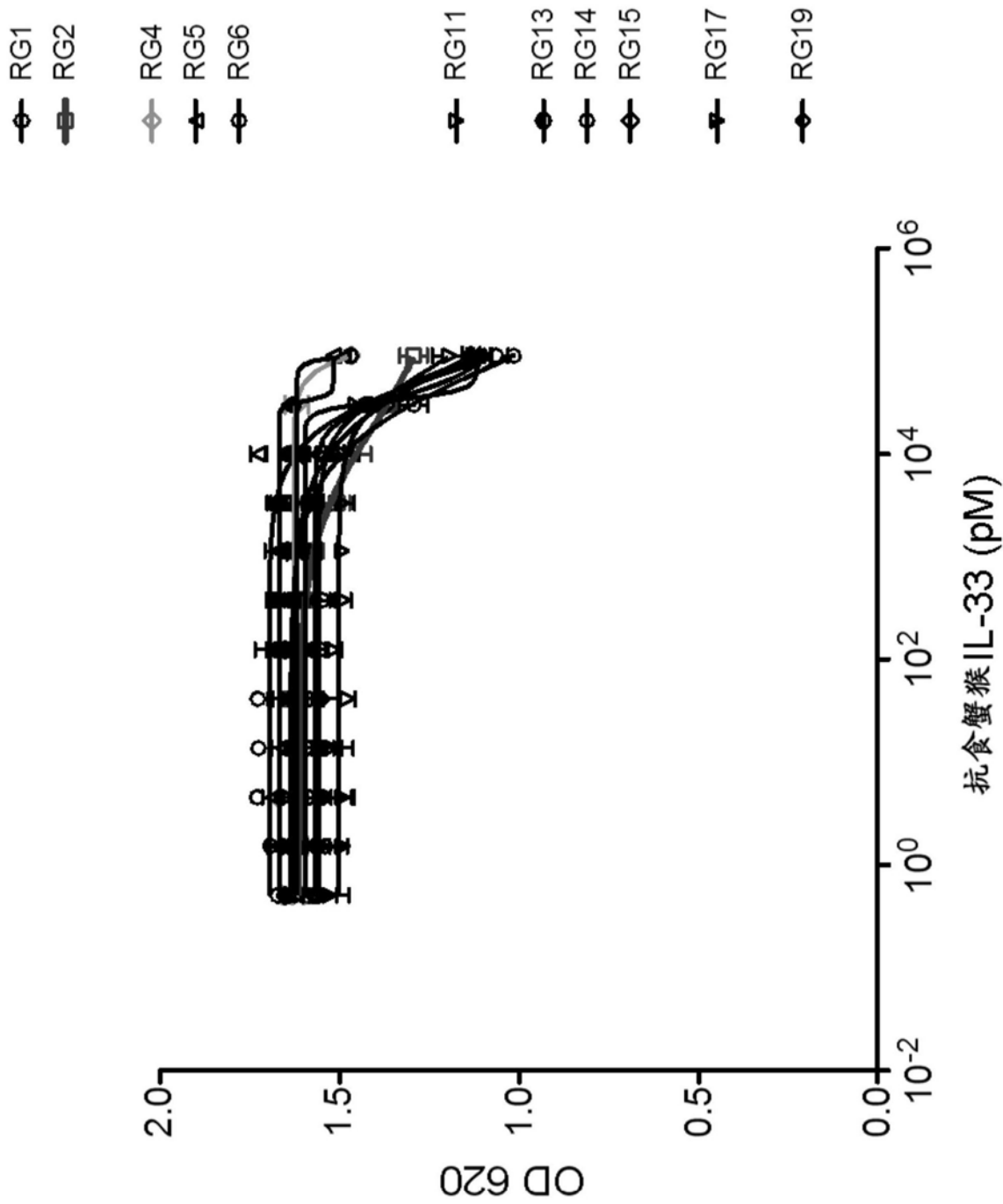


图22D

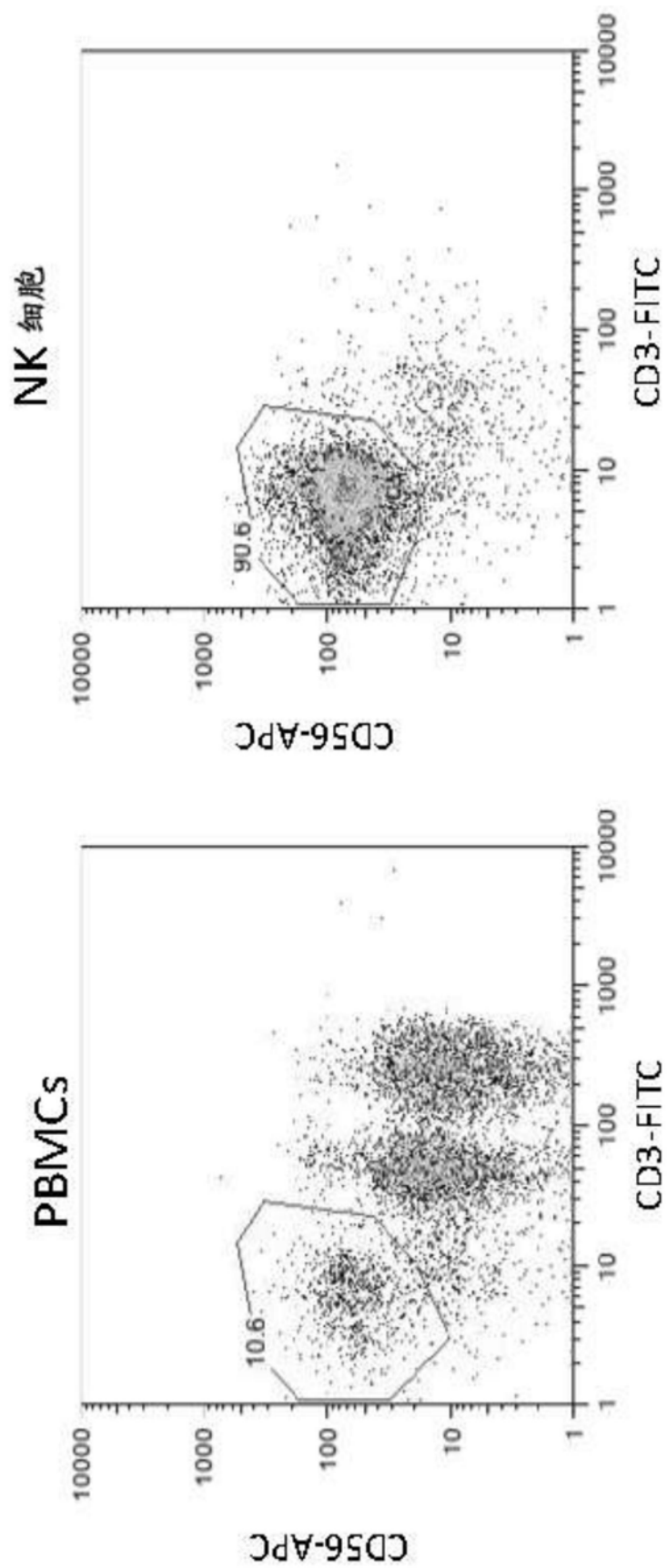


图23A

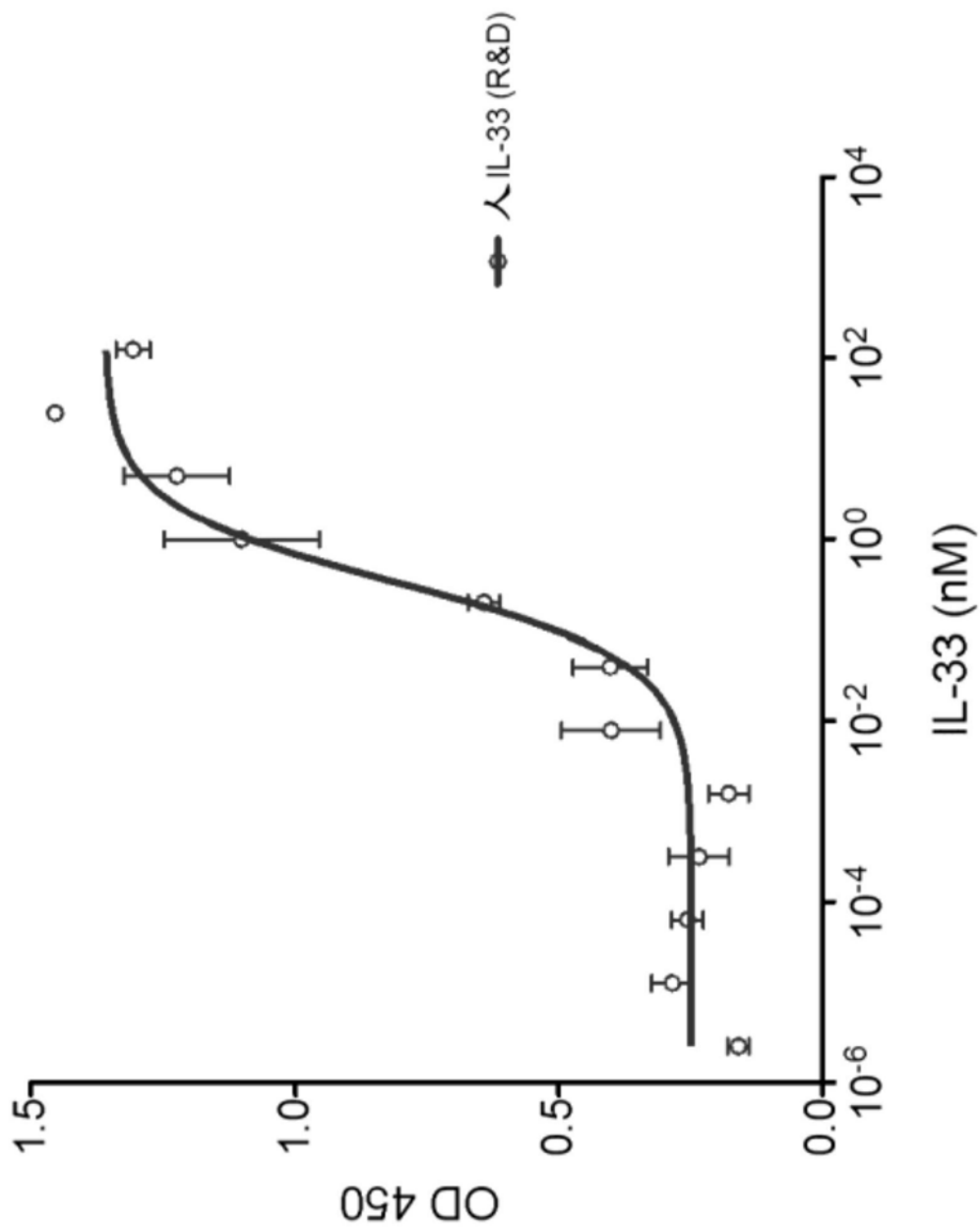


图23B

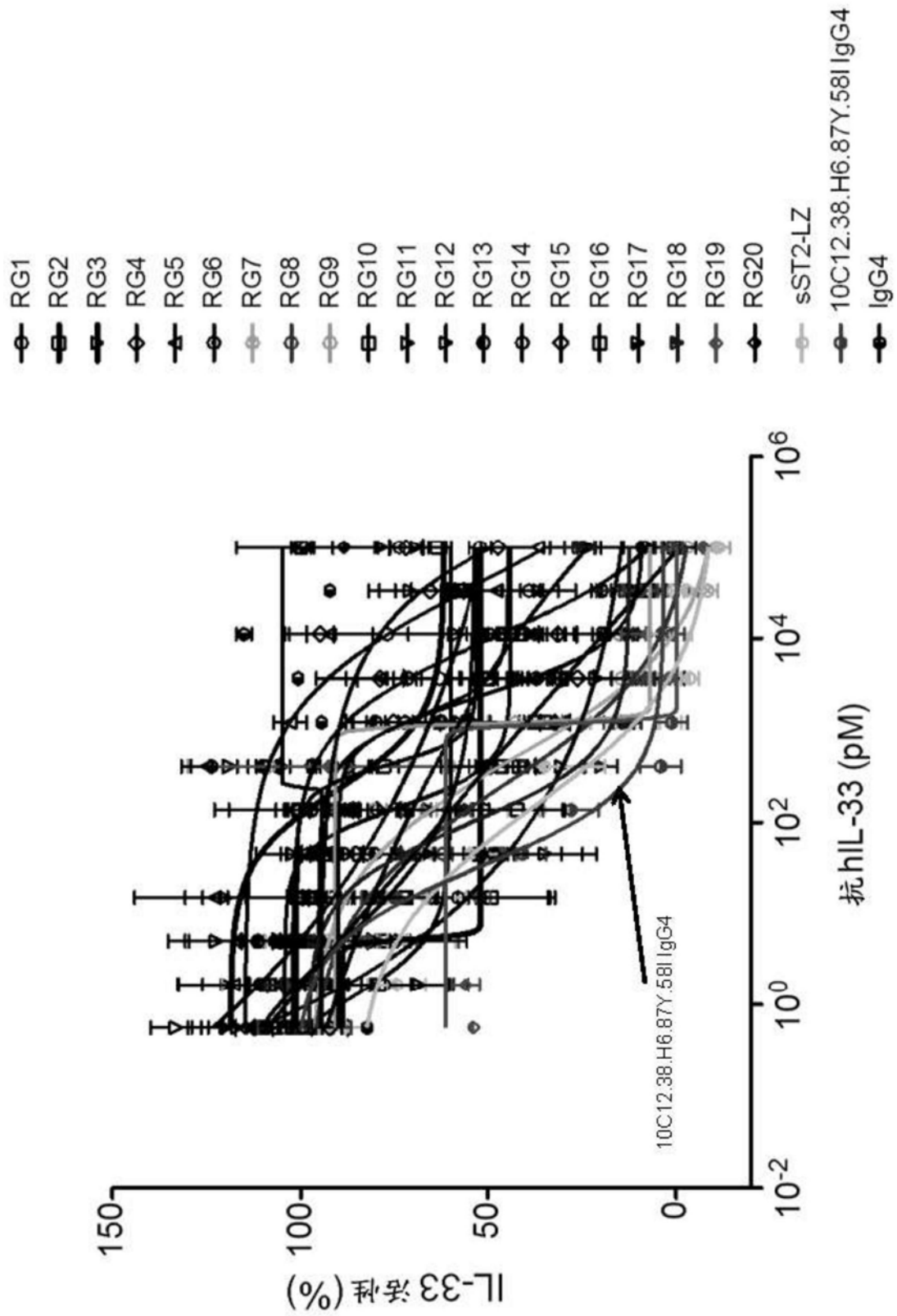


图23C

NK测定

物种	人
EC50 [M]	3.3E-10
IL-33	260pM hIL-33
Ab	IC50 [M]
10C12.38.H6.87Y.58I IgG4	3.3E-11
sST2	1.5E-10
RG1	非阻断
RG2	非阻断
RG3	非阻断
RG4	非阻断
RG5	4.1E-08
RG6	2.4E-09
RG7	5.1E-10
RG8	2.4E-10
RG9	1.2E-09
RG10	4.6E-09
RG11	非阻断
RG12	非阻断
RG13	1.0E-08
RG14	非阻断
RG15	非阻断
RG16	非阻断
RG17	非阻断
RG18	9.7E-11
RG19	1.2E-09
RG20	非阻断

图23D

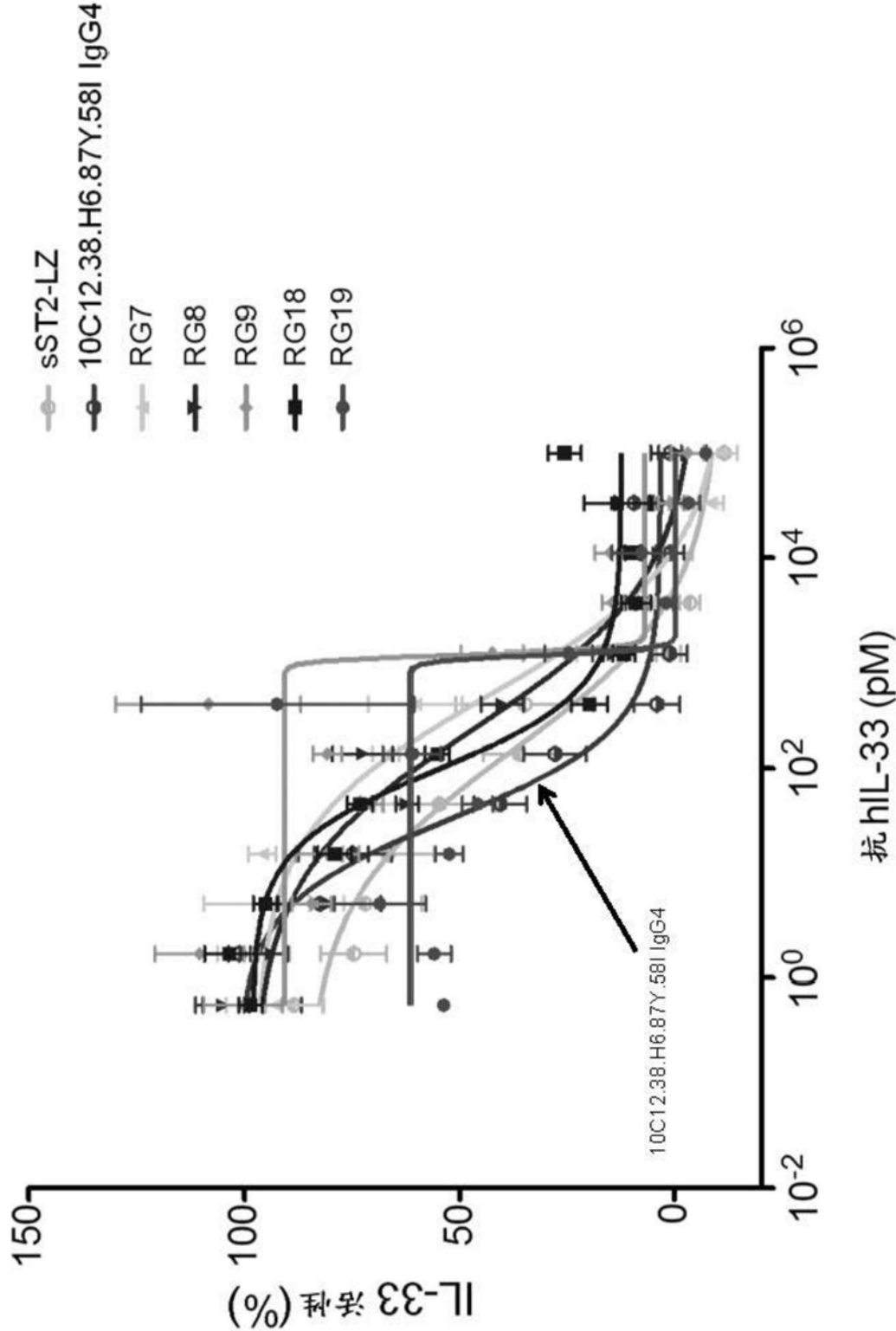


图23E

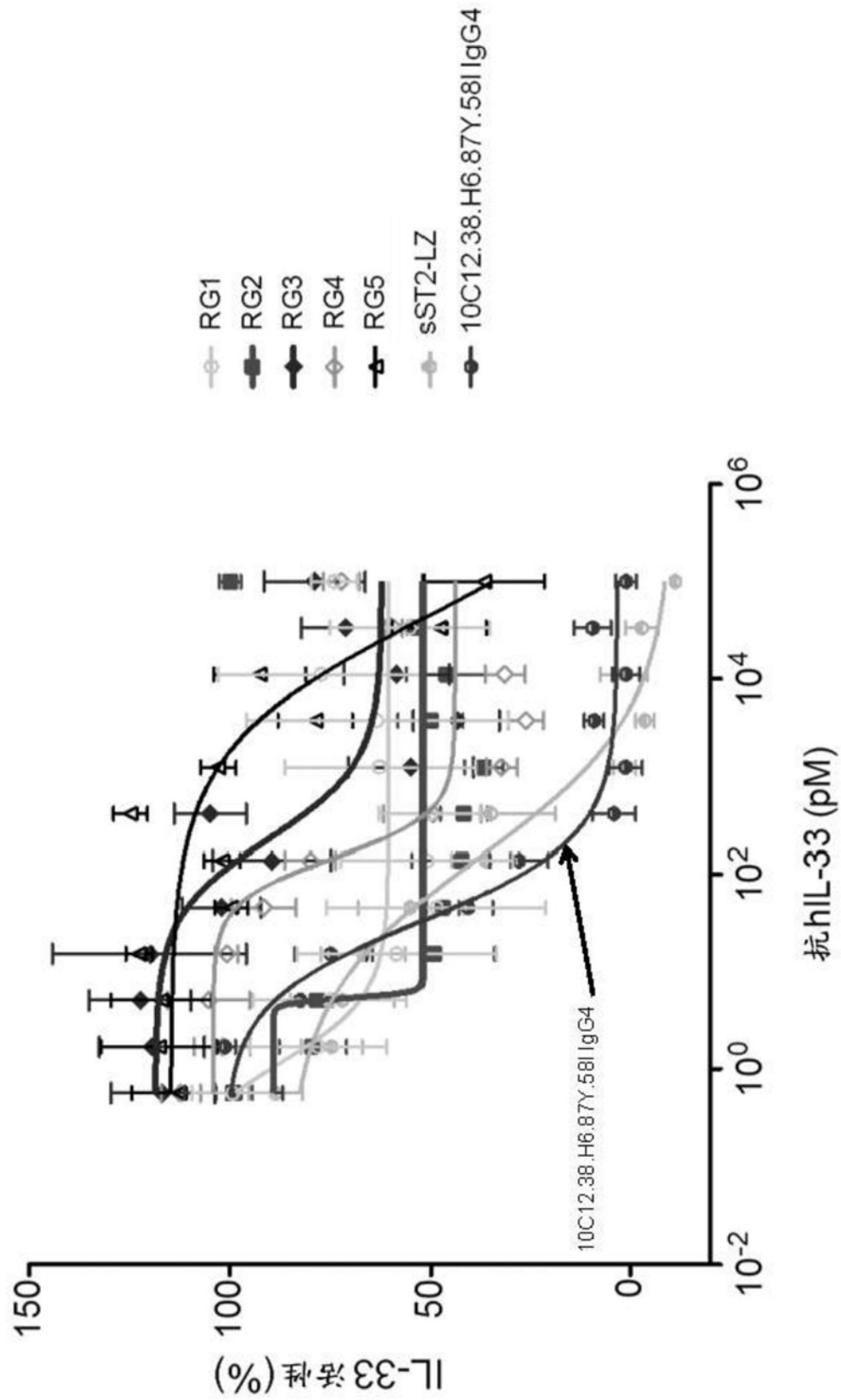


图23F

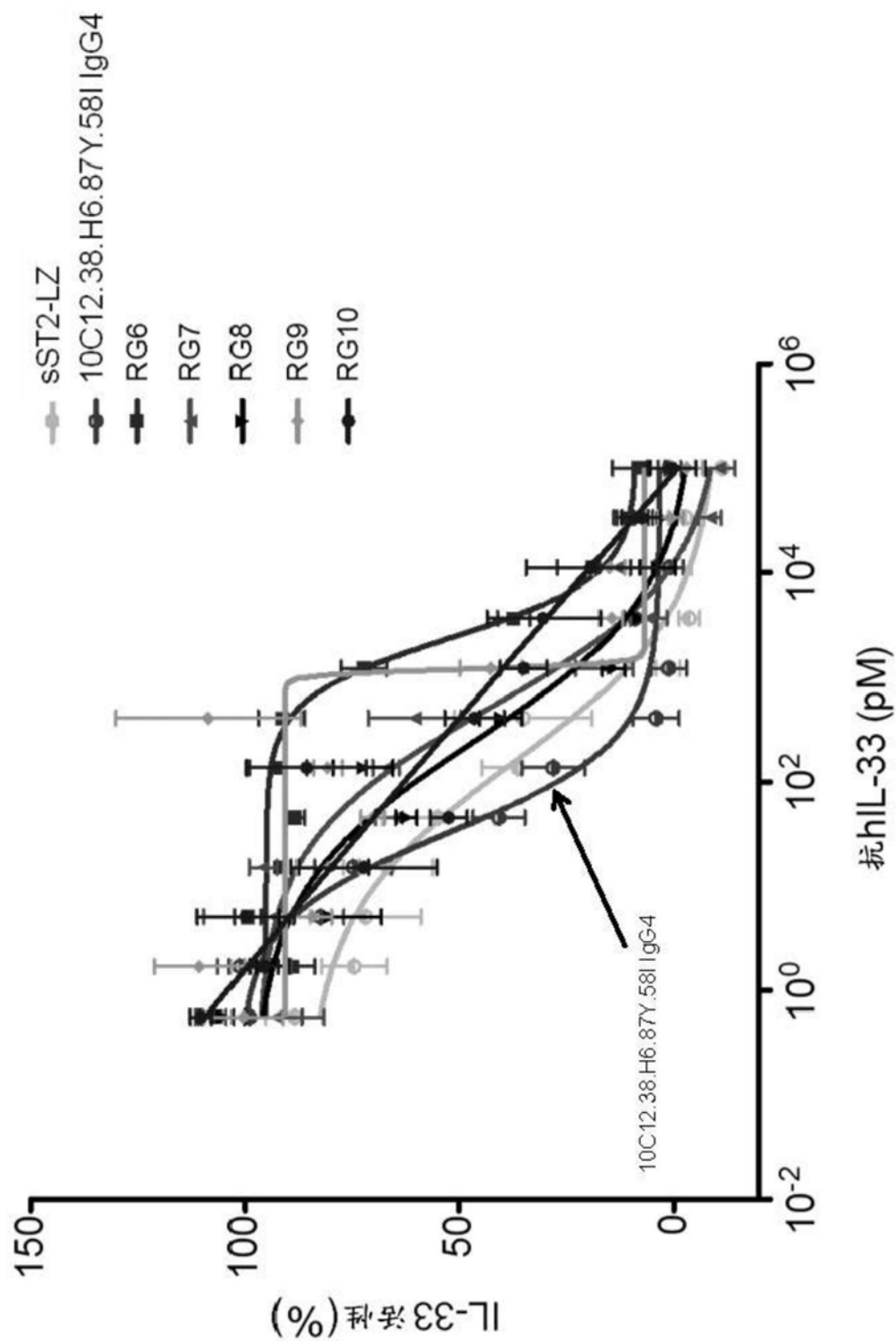


图23G

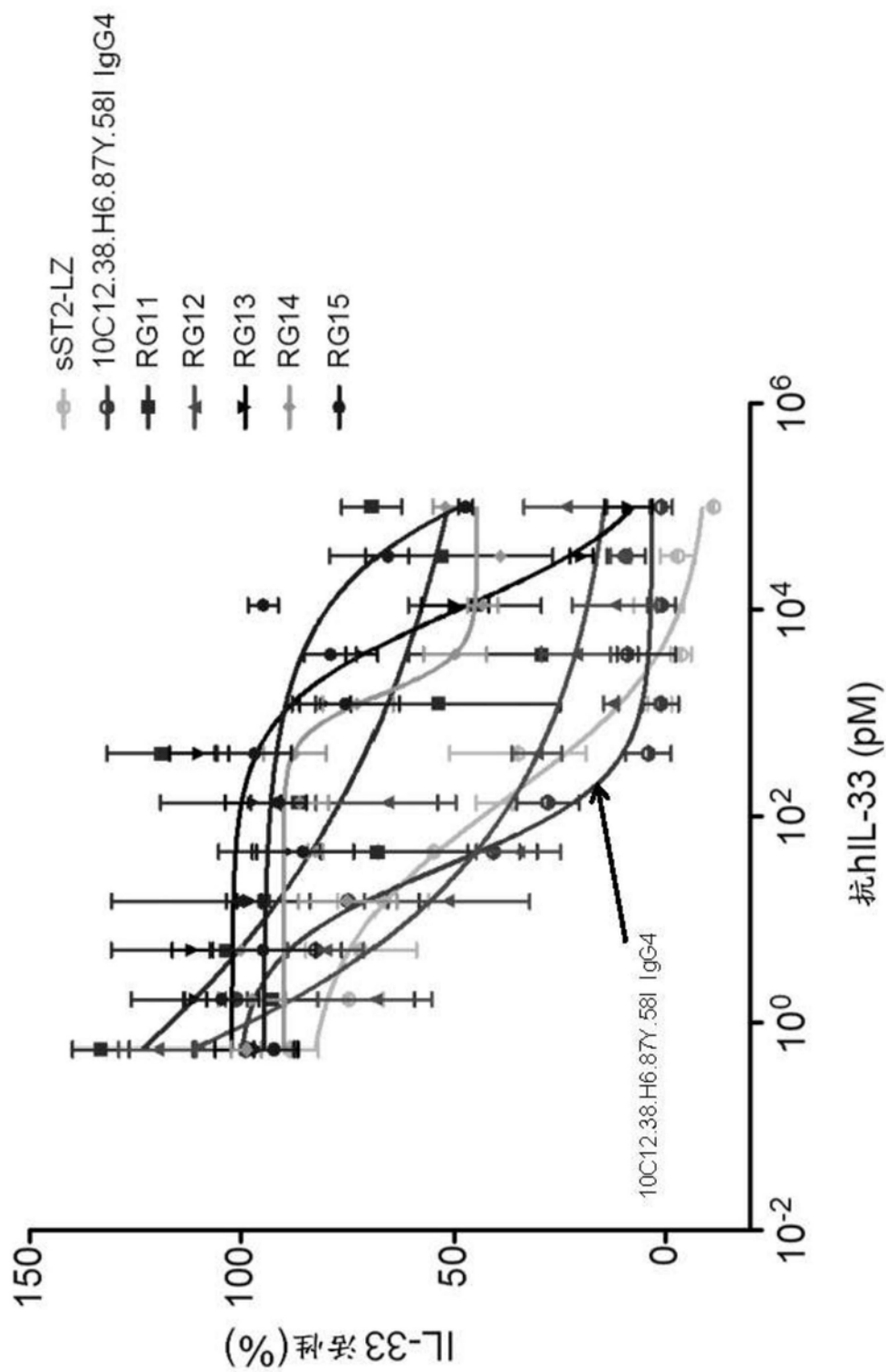


图23H

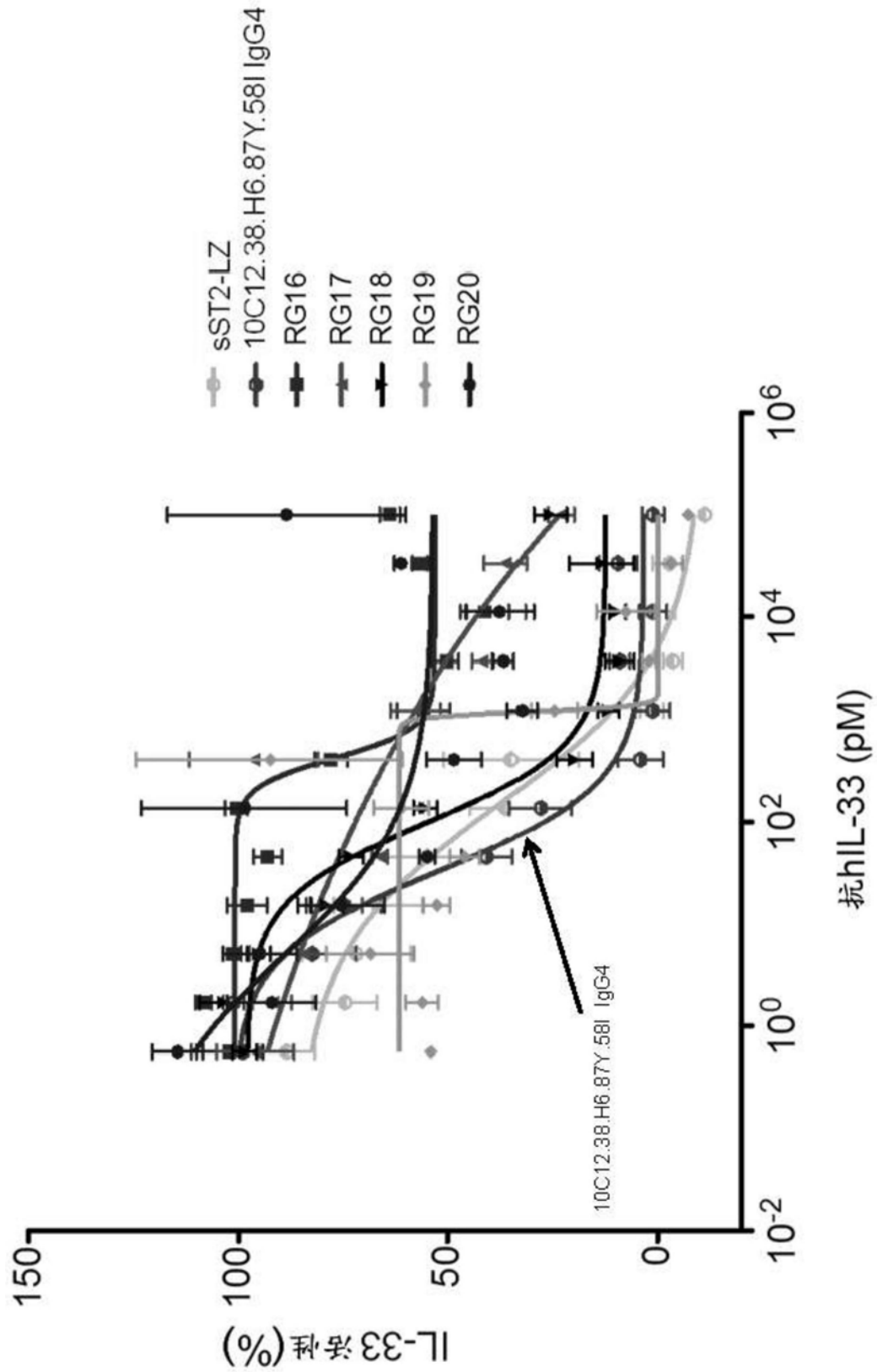


图23I

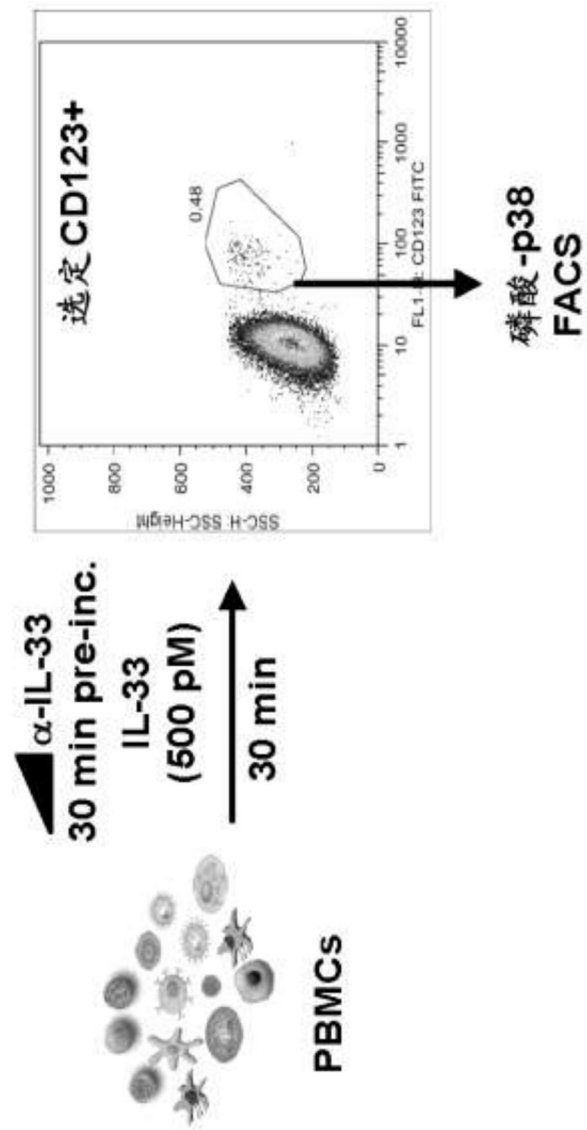


图24A

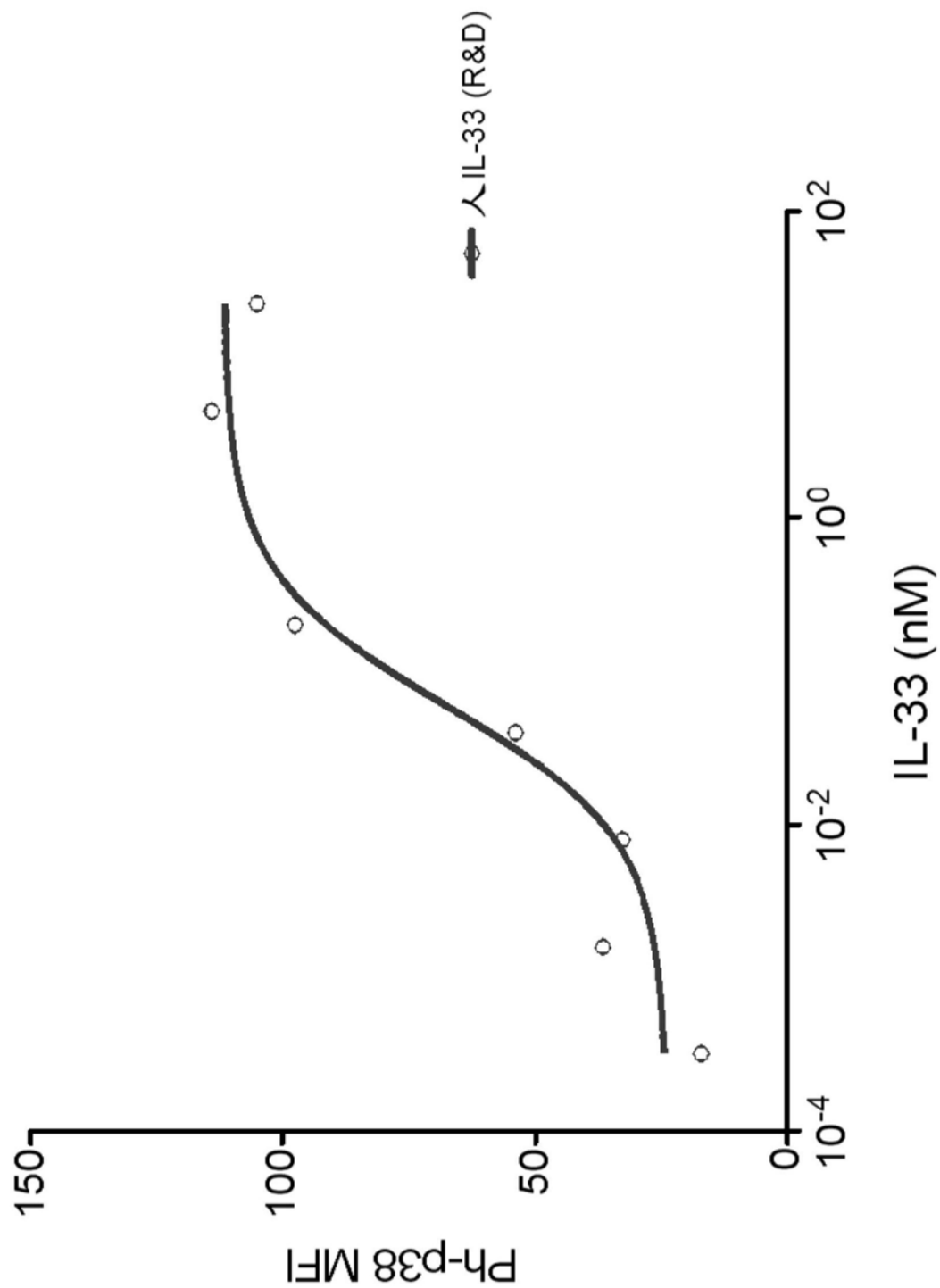


图24B

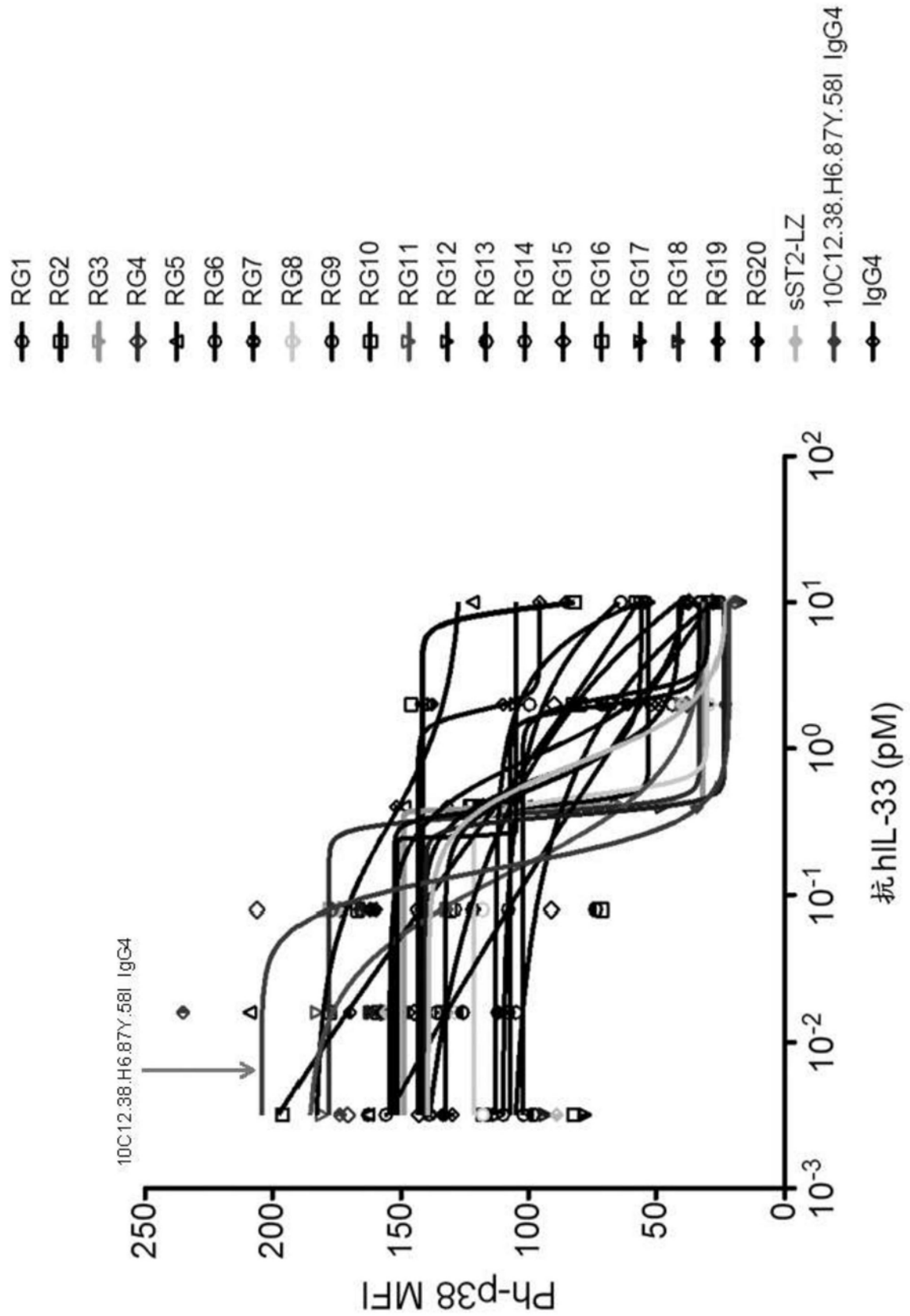


图24C

嗜碱性粒细胞测定

物种	人
EC50 [M]	6.4E-11
IL-33	500pM hIL-33
Ab	IC50 [M]
10C12.38.H6.87Y.58I IgG4	1.5E-13
sST2	7.9E-13
RG1	非阻断
RG2	非阻断
RG3	4.0E-13
RG4	3.6E-13
RG5	非阻断
RG6	3.9E-13
RG7	6.7E-13
RG8	4.8E-13
RG9	2.5E-09
RG10	partial-blocking
RG11	1.4E-13
RG12	2.4E-09
RG13	7.6E-06
RG14	2.0E-12
RG15	9.4E-03
RG16	2.3E-12
RG17	5.7E-13
RG18	3.5E-13
RG19	9.1E-13
RG20	非阻断

图24D

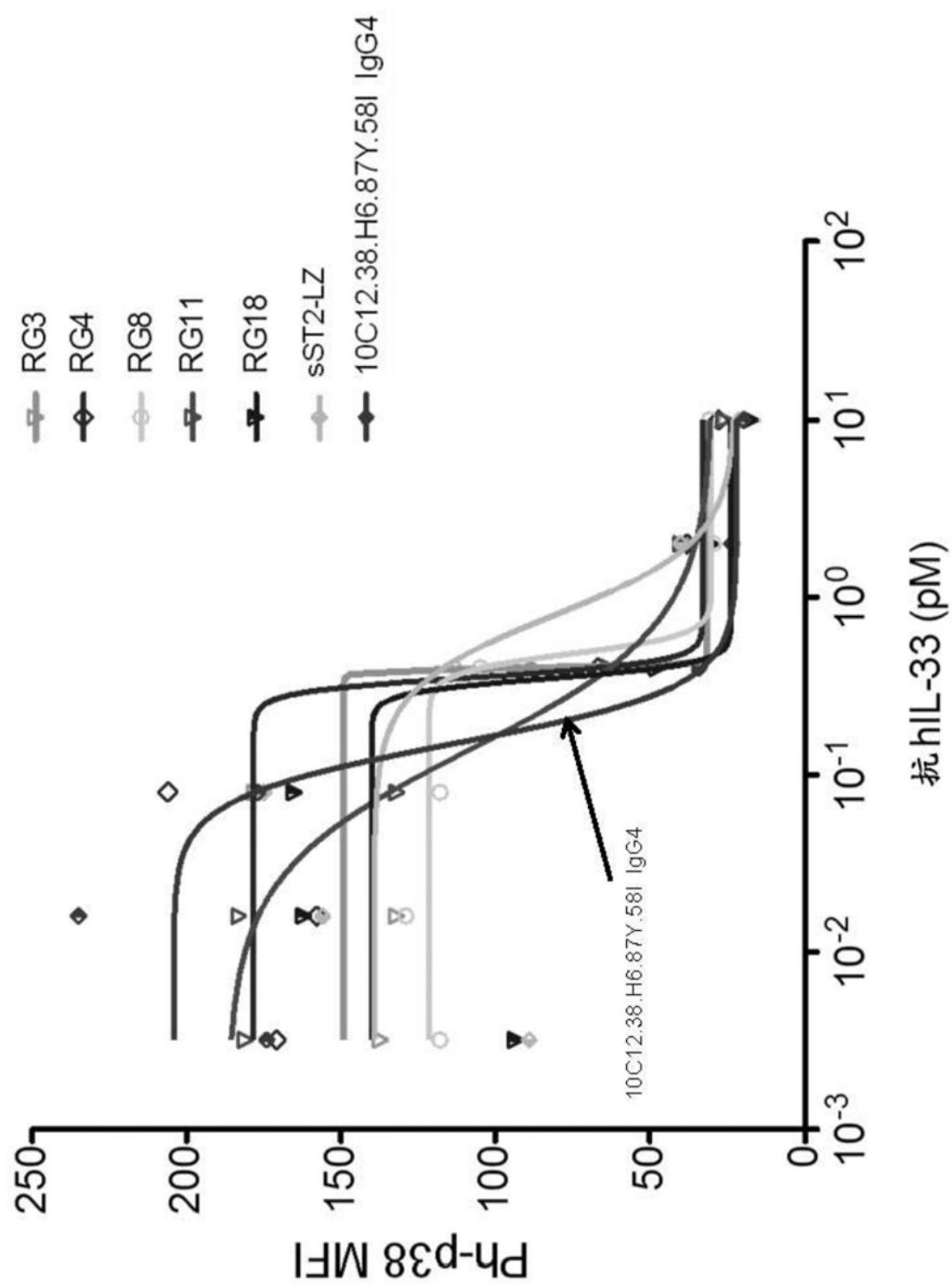


图24E

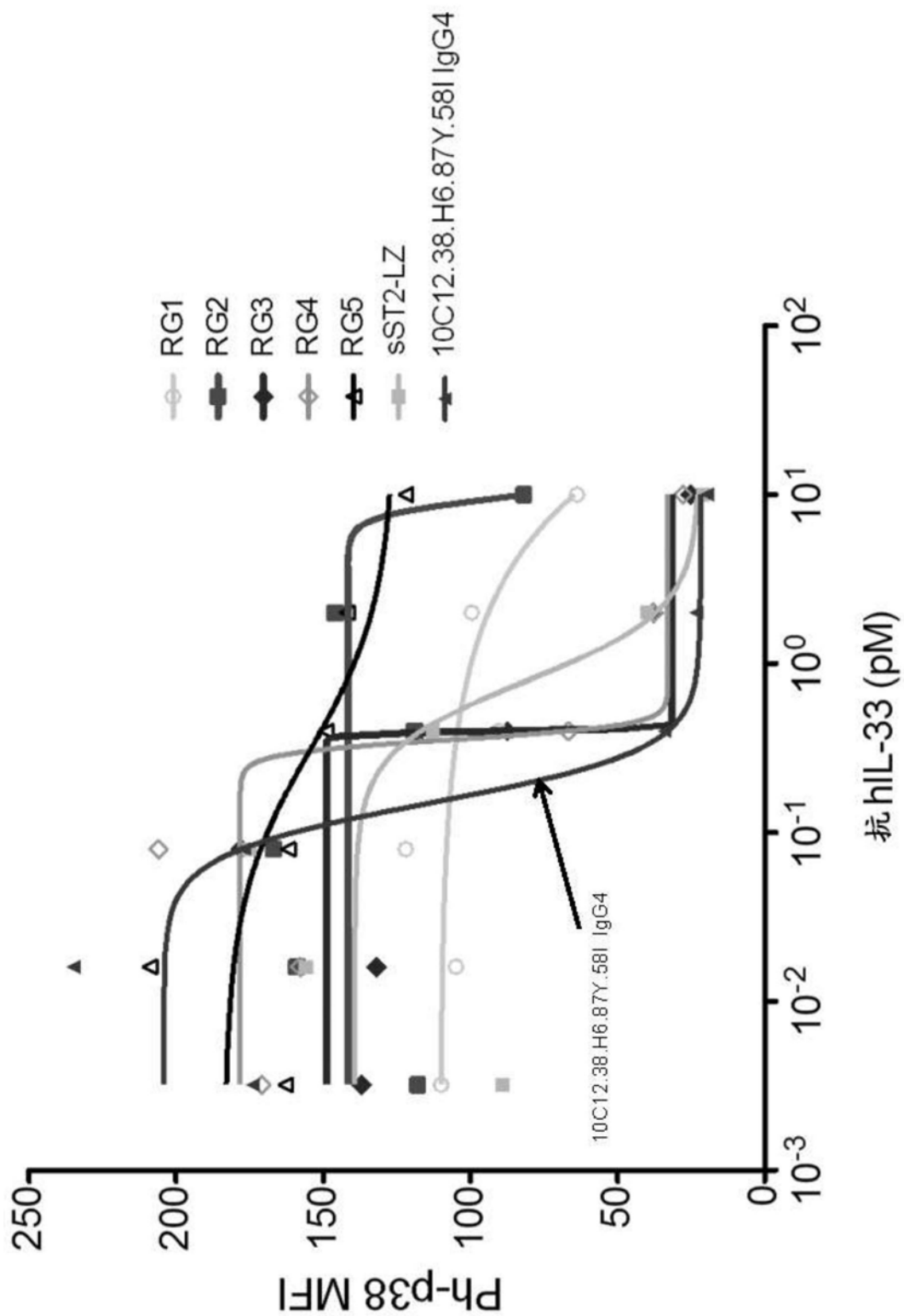


图24F

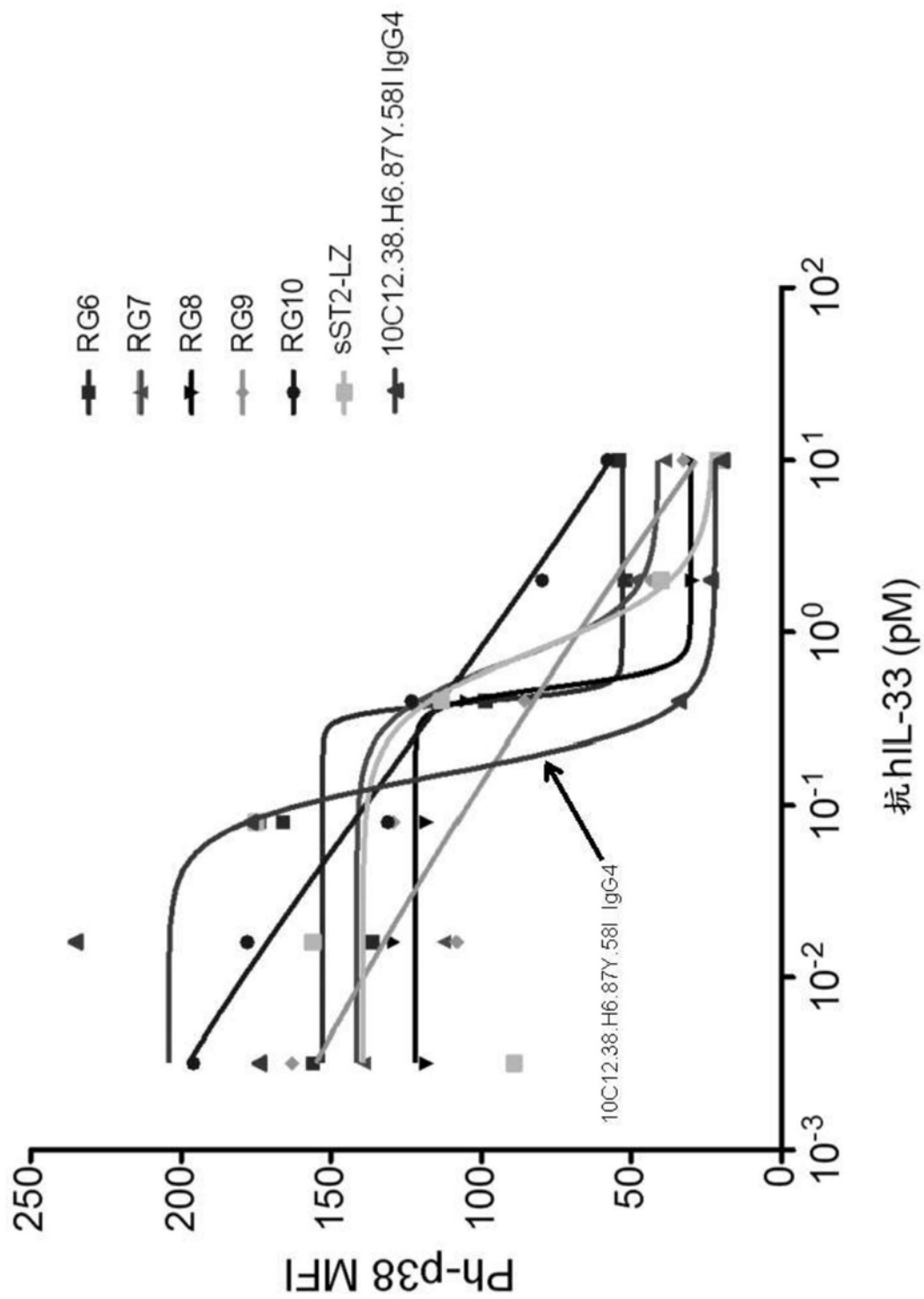


图24G

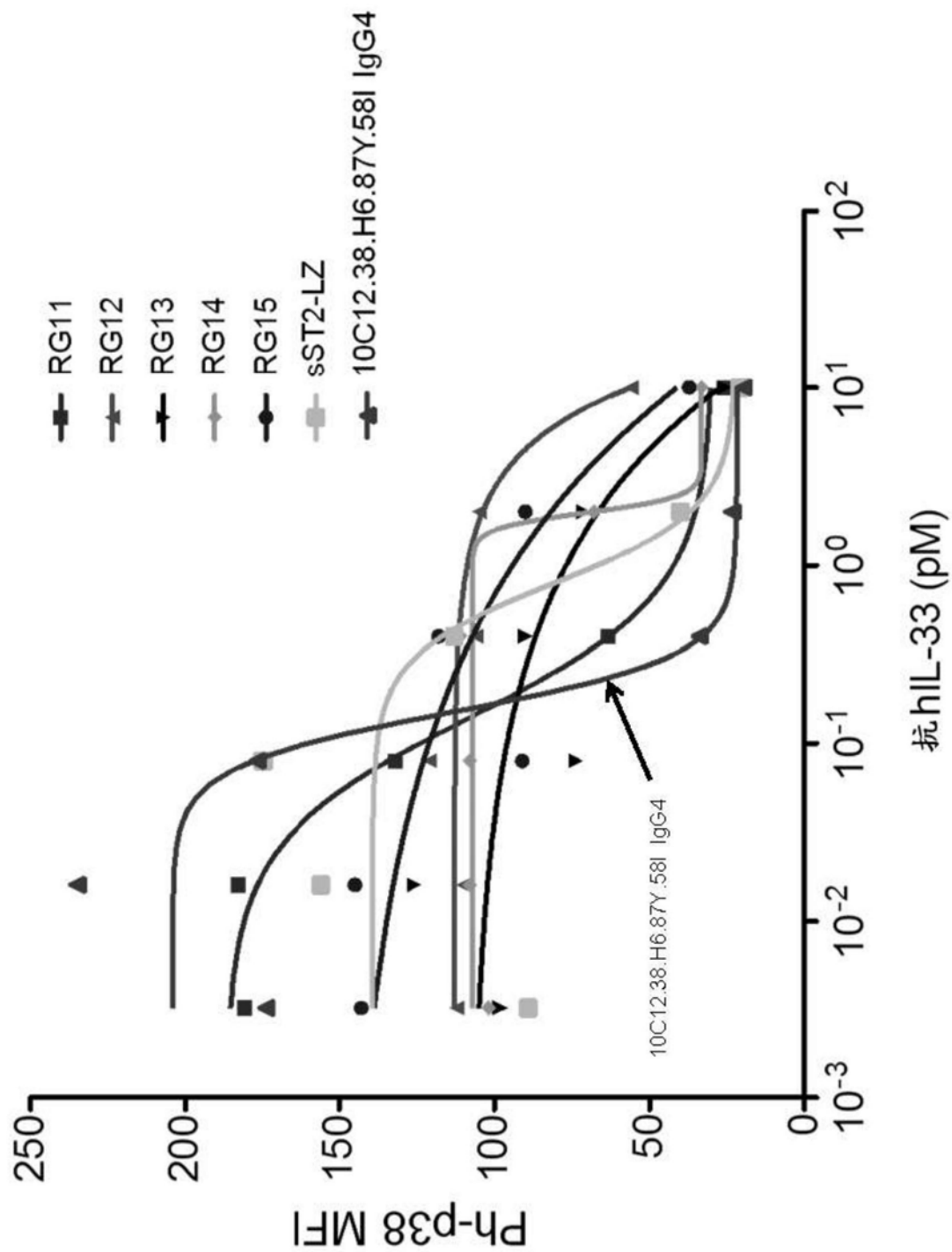


图24H

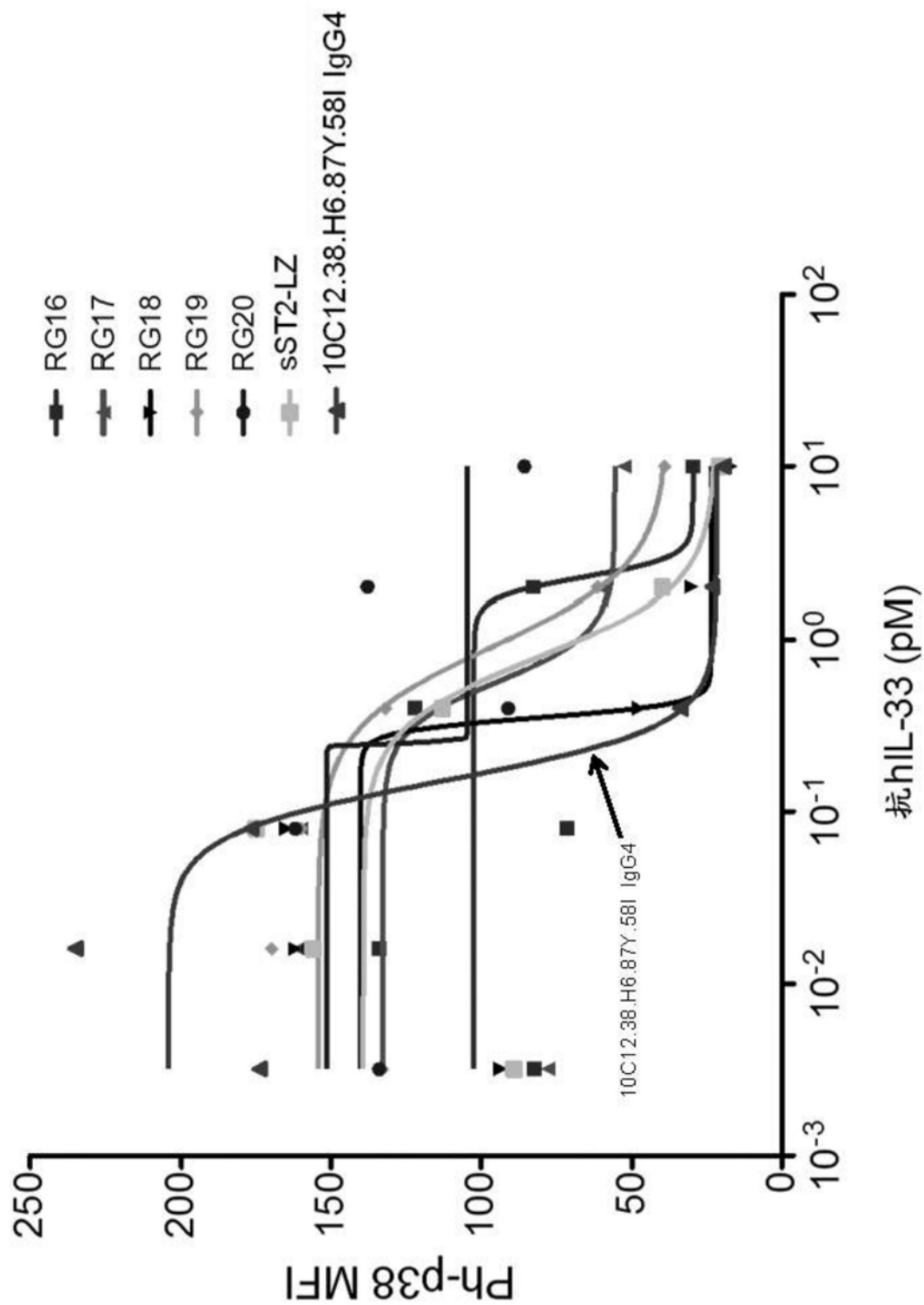


图24I

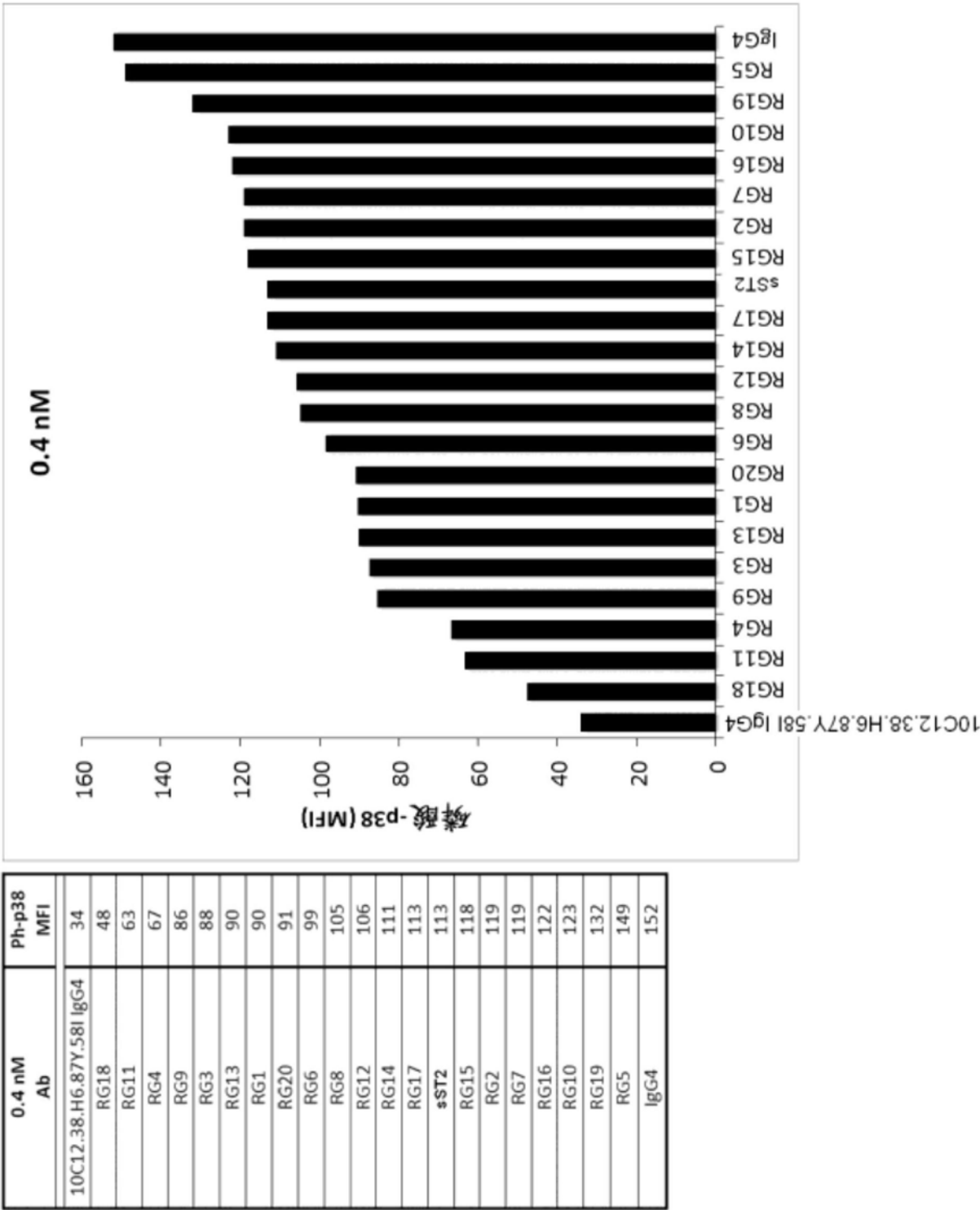


图24J

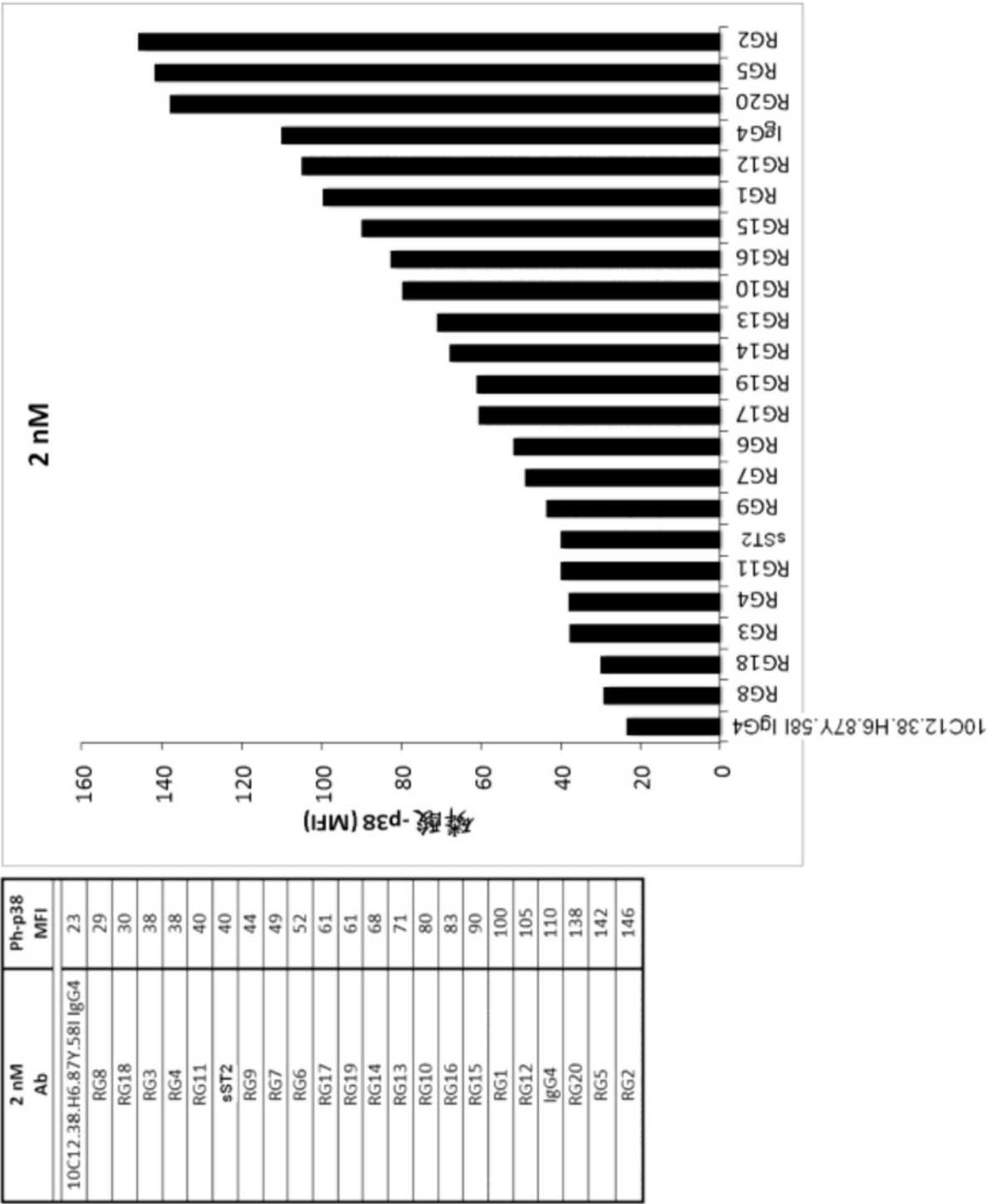


图24K

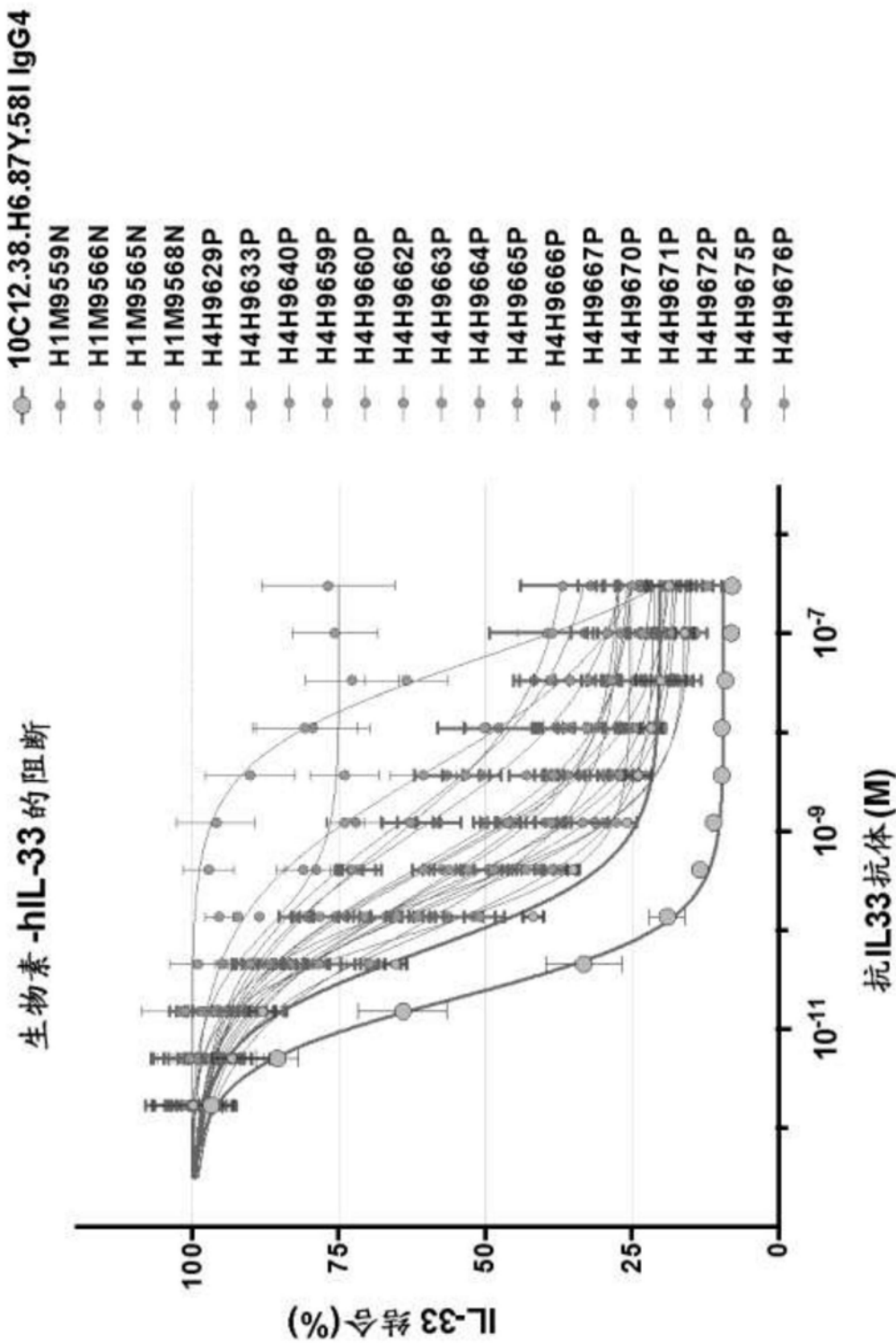


图25A

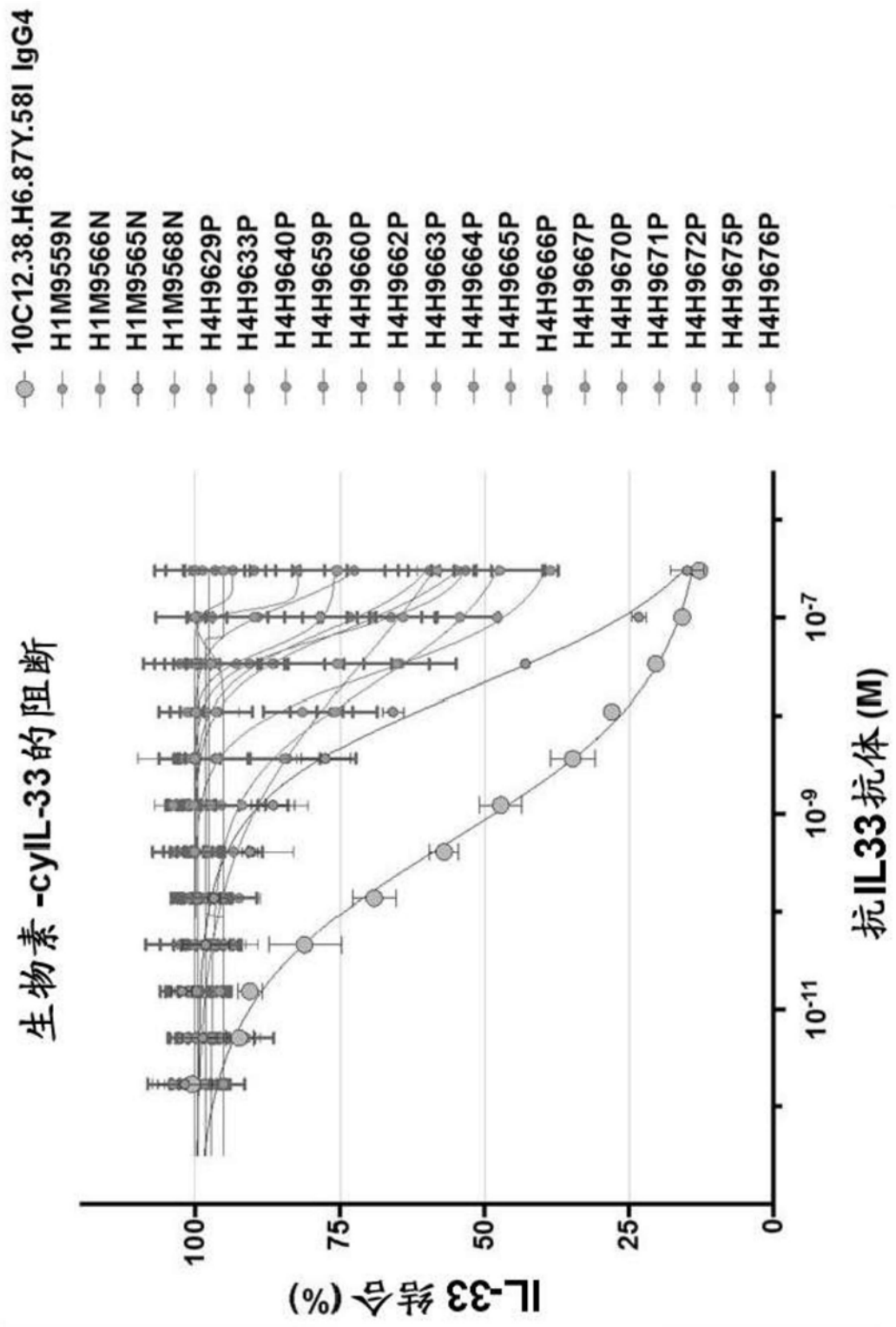


图25B