



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104394881 B

(45)授权公告日 2016.10.26

(21)申请号 201380032597.1

安惠敬 丁在甲 李亨根

(22)申请日 2013.02.07

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

(65)同一申请的已公布的文献号

72003

申请公布号 CN 104394881 A

代理人 王芝艳 吴小瑛

(43)申请公布日 2015.03.04

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

A61K 38/17(2006.01)

10-2012-0066527 2012.06.21 KR

A61K 38/16(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 38/18(2006.01)

2014.12.19

A61P 27/02(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

(56)对比文件

PCT/KR2013/000983 2013.02.07

WO 2012036410 A2, 2012.03.22,

(87)PCT国际申请的公布数据

WO 2012036410 A2, 2012.03.22,

WO2013/191352 EN 2013.12.27

US 20090098136 A1, 2009.04.16,

(73)专利权人 韩诺生物制药株式会社

WO 2011049350 A2, 2011.04.28,

地址 韩国大田市

CN 101883787 A, 2010.11.10,

审查员 李谦

(72)发明人 金圣旭 朴胜国 宋连情 金银善

权利要求书2页 说明书16页

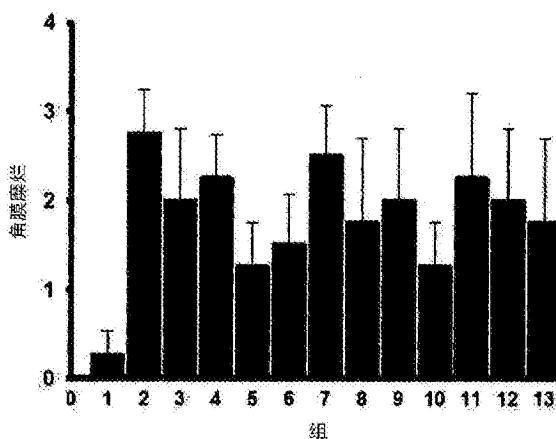
序列表28页 附图3页

(54)发明名称

修饰的人肿瘤坏死因子受体-1多肽的新用途

(57)摘要

本发明涉及修饰的人肿瘤坏死因子受体-1 (TNFRI)多肽的新用途,并且更具体地,涉及其用于预防和治疗干眼综合征的用途。本发明的修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段具有优异TNF α 中和活性,并且在患者的眼表面上抑制TNF α 活性以抑制与干眼相关的炎症诱导作用。因此,本发明的修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段在预防和治疗干眼综合征方面显示显著效果,并且因此可以在预防和治疗干眼综合征中非常有用。



1. 用于预防或治疗干眼综合征的组合物,所述组合物包含至少一种修饰的TNFRI,其中所述修饰的TNFRI的氨基酸修饰选自以下组:

i)选自L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N、L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N和L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N的氨基酸修饰,其中所述修饰的TNFRI的除修饰的氨基酸外的氨基酸序列与SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列相同;

ii)选自L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N、L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N和L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N的氨基酸修饰,其中所述修饰的TNFRI的除修饰的氨基酸外的氨基酸序列与由SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列的氨基酸残基41至211组成的氨基酸序列相同;和

iii)选自L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N和L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N的氨基酸修饰,其中所述修饰的TNFRI的除修饰的氨基酸外的氨基酸序列与由SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列的氨基酸残基41至166组成的氨基酸序列相同。

2. 根据权利要求1所述的用于预防或治疗干眼综合征的组合物,其中所述修饰的TNFRI的氨基酸修饰选自以下组:

i)选自L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N和L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N的氨基酸修饰,其中所述修饰的TNFRI的除修饰的氨基酸外的氨基酸序列与SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列相同;和

ii)选自L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N和L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207的氨基酸修饰,其中所述修饰的TNFRI的除修饰的氨基酸外的氨基酸序列与由SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列的氨基酸残基41至211组成的氨基酸序列相同。

3. 根据权利要求1所述的用于预防或治疗干眼综合征的组合物,其中所述修饰的TNFRI的氨基酸修饰是L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N,其中所述修饰的TNFRI的除修饰的氨基酸外的氨基酸序列与由SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列的氨基酸残基41至211组成的氨基酸序列相同。

4. 根据权利要求1所述的用于预防或治疗干眼综合征的组合物,其中所述修饰的TNFRI的氨基酸序列是SEQ ID NO:18或20。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的用于预防或治疗干眼综合征的组合物,其中所述修饰的TNFRI在大肠杆菌(E.coli)中产生。

6. 根据权利要求5所述的用于预防或治疗干眼综合征的组合物,其中所述修饰的TNFRI是在大肠杆菌中通过添加信号序列或甲硫氨酸至所述修饰的TNFRI的氨基端而产生的。

7. 用于预防或治疗干眼综合征的组合物,所述组合物包含至少一种多肽复合物,其是至少两种根据权利要求1至4中任一项所述的修饰的TNFRI通过共价键连接。

8. 根据权利要求1至4中任一项所述的用于预防或治疗干眼综合征的组合物,其中所述修饰的TNFRI还包含修饰,其中所述修饰是糖基化、酰化、甲基化、磷酸化、hasylation、氨甲酰化、硫酸化、异戊烯化、氧化、胍基化、酰胺化、三硝基苯化、硝化或PEG化。

9. 用于预防或治疗干眼综合征的组合物,所述组合物包含编码根据权利要求1至4中任一项所述的修饰的TNFRI的基因。

10. 用于眼的局部用药物制剂,其包含根据权利要求1至4中任一项所述的组合物。

11. 根据权利要求10所述的局部用药物制剂,其中所述局部用药物制剂是滴眼剂或眼

膏剂。

修饰的人肿瘤坏死因子受体-1多肽的新用途

技术领域

[0001] 本发明涉及修饰的人肿瘤坏死因子受体-1(TNFR1)多肽的新用途,并且更具体地,涉及其用于预防和治疗干眼综合征的用途。

背景技术

[0002] 干眼综合征(或“干眼”),也称作干燥性角结膜炎,是每年侵袭数百万人的眼病。特别地,已知这种疾病常见于绝经后的女性中,原因在于月经停止引起的激素变化。干眼综合征的程度随人而不同。具有轻度症状的患者可能有烧灼感、干燥和异样体感,而具有严重症状的患者可能有严重受损的视力。其他疾病如Sjogren综合征和瘢痕性类天疱疮有时也显示出复杂的干眼综合征。

[0003] 基于迄今的研究结果,已经理解与细胞因子、抗原标记细胞等相关的自身免疫反应在眼表面上因各种应激发生,这造成免疫细胞附聚在角膜组织上,导致损害组织,并且因此引起干眼综合征。

[0004] 作为干眼综合征的代表性疗法,将人工泪用来弥补眼泪膜或减少泪蒸发以稳定泪膜。此外,泪植入物可以用来刺激泪产生。人工泪的主要成分是纤维素醚、卡波姆、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、透明质酸钠等,并且通过在缓冲液或等渗盐水中溶解该主要成分,制备人工泪。这些成分使溶液粘稠以因而防止溶液易于从眼部流走、防止泪蒸发并充当润滑剂。但是,这些治疗具有局限性:它们不是根本治疗,而是对症治疗。

[0005] 同时,随着发现干眼的病因与眼表面上的炎症反应相关,实施了采用各种抗炎材料用于治疗的研究和工作并且它们的效果得到证实。

[0006] 具体而言,已经报道,干眼综合征患者的眼组织如泪腺和睑板腺显示不平衡和过度的炎症,并且已经已知多种化合物,例如类固醇、细胞因子分泌抑制剂、环孢菌素A和15-HETE有效减轻干眼综合征。

[0007] 肿瘤坏死因子 α (TNF α)是一种与炎症反应相关的重要因子,并且与人TNF受体(TNFR)I或II结合以由此诱导各种细胞反应,包括凋亡和炎症反应。在证明可以通过抑制TNF α 和TNFR的结合作用治疗多种自身免疫相关的炎性疾病后,已经开发了多种TNF α 抑制剂。TNF α 抑制剂的代表性例子可以是由可溶性TNFRII联合FC部分组成的依那西普(产品名称:Enbrel)、作为针对TNF α 的抗体的英夫单抗(产品名称:英利昔单抗(Remicade))和阿达木单抗(产品名称:修美乐),等等。这些抑制剂主要用作治疗类风湿性关节炎、银屑病、Crohn病等。

[0008] 同时,已经公开TNF α 抑制剂对干眼具有治疗效果(US 6,428,787B、US 6,379,666B、US 6,177,077B、US 6,204,270B、US 2004/0126372A、WO 00/27421A)。此外,US 2009/0098136A公开了依那西普和英夫单抗在动物模型中具有治疗干眼综合征的作用,并且以滴眼剂形式施用这两种物质倾向于改善泪膜破裂时间和角膜染色。

[0009] 然而,仍然迫切需要显示更高治疗功效的干眼综合征新疗法,特别地是含有TNF α 抑制剂作为有效成分的干眼综合征新疗法。

[0010] 发明简述

[0011] 发明人发现某些类型的肿瘤坏死因子受体-1(TNFRI)变体及其片段在治疗干眼综合征方面显示显著的临床效果,并且随后完成本发明。因此,本发明涉及修饰的人肿瘤坏死因子受体-1多肽或其片段的新用途,特别是治疗干眼综合征的用途。

[0012] 作为TNF α 抑制剂,本申请人的韩国专利特开平No.2011-0043485公开了修饰的人肿瘤坏死因子受体-1多肽及其片段,其具有针对身体中存在的蛋白酶的改善抗性,并且作为TNF α 抑制剂,本申请人的韩国专利特开平No.2012-0027666公开了具有增加的TNF α 结合强度的修饰的人肿瘤坏死因子受体-1多肽及其片段,作为TNF α 抑制剂。

[0013] 在与新的修饰的肿瘤坏死因子受体-1多肽相关的以上专利申请后通过艰苦研究工作和努力,发明人开发了下一代肿瘤坏死因子受体-1变体,所述变体比修饰的肿瘤坏死因子受体-1多肽(参见,韩国专利特开平No.2012-0072323)具有改善更多的有效性,并且证实其中如此开发的肿瘤坏死因子受体-1变体的某些在干眼综合征中显示出显著的临床效果。

[0014] 特别地,发明人通过动物模型证实,本发明的某些变体在治疗干眼综合征方面显示显著效果,而令人惊讶地是,依那西普(一种代表性TNF α 抑制剂)在改善干眼综合征的症状方面没有出众的效果。这个事实意味着,全部TNF α 抑制剂均在干眼综合征中显示显著效果,并且证明仅本发明的某些变体可以治疗治理干眼综合征中非常有用。

[0015] 作为本发明的一个方面,本发明提供一种用于预防和/或治疗干眼综合征的组合物,所述组合物含有至少一种修饰的肿瘤坏死因子受体-1多肽或至少一个其片段作为有效成分,和一种使用所述组合物预防和/或治疗干眼综合征的方法。

[0016] 在下文更详细地描述本发明之前,对本文所用的术语进行定义以更清晰地解释本发明的技术特征。除非另外声明,否则以下术语在本说明书和本发明权利要求书通篇范围内具有如下文定义的意思。

[0017] 如本文所用,术语“全长人肿瘤坏死因子受体-1”或“全长人肿瘤坏死因子受体-1多肽”(下文,“TNFRI”或“TNFRI多肽”)指源自人的由455个氨基酸组成并且能够与TNF α 结合的多肽。特别地,天然(野生型)TNFRI具有如SEQ ID:1中所述的氨基酸序列。

[0018] 如本文所用,术语“人肿瘤坏死因子受体-1片段”或“人肿瘤坏死因子受体-1多肽片段”(下文,“TNFRI片段”或“TNFRI多肽片段”)指TNFRI的部分,所述部分的氨基酸序列与TNFRI的相应氨基酸序列100%相同并且至少一个氨基酸残基缺失。在TNFRI片段中,缺失的氨基酸残基可以位于多肽的任何位置,包括TNFRI的N末端、C末端和内部。该片段与TNFRI共有至少一个生物学特征,例如,作为TNF α 抑制剂发挥作用,或具有干眼综合征治疗功效。TNFRI片段的代表性例子是具有从TNFRI N末端第41个氨基酸残基延伸的105、126、171个氨基酸残基的片段,所述片段分别命名为TNFRI105、TNFRI126和TNFRI171。

[0019] 如本文所用,术语“TNFRI变体(或突变体)”或“TNFRI变体(或突变体)片段”、“修饰的TNFRI多肽”或“修饰的TNFRI多肽片段”指与TNFRI或TNFRI片段具有小于100%序列同一性的修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段,所述TNFRI或TNFRI片段从如下文定义的天然或重组细胞分离,并且“TNFRI变体(或突变体)片段”或“修饰的TNFRI多肽片段”与“TNFRI变体(或突变体)”或“修饰的TNFRI多肽”共有多个生物学特征,例如,作为TNF α 抑制剂发挥作用或具有干眼综合征治疗功效。通常,TNFRI变体具有与野生型或天然TNFRI或TNFRI片段具

有大约70%或更高序列同一性的氨基酸序列。这种序列同一性优选地是至少大约75%、更优选地至少大约80%、仍更优选地至少大约85%、甚至更优选地至少大约90%并且最优选地至少大约95%。TNFRI的代表性修饰类型是在特定位置以不同氨基酸残基置换。

[0020] 如本文所用,术语“四重变体”指在肿瘤坏死因子受体-1或人肿瘤坏死因子受体-1片段的氨基酸序列中的4个位置内具有突变的变体。

[0021] 如本文所用,术语“五重变体”指在肿瘤坏死因子受体-1或人肿瘤坏死因子受体-1片段的氨基酸序列中的5个位置内具有突变的变体。

[0022] 如本文所用,术语“六重变体”指在肿瘤坏死因子受体-1或人肿瘤坏死因子受体-1片段的氨基酸序列中的6个位置内具有突变的变体。

[0023] 如本文所用,术语“TNFRI_m”指具有由TNFRI的氨基酸序列中从N末端第41个氨基酸残基延伸的m个氨基酸残基组成的氨基酸序列的TNFRI片段。例如,TNFRI105片段指具有从TNFRI N末端第41氨基酸残基延伸的一条105个氨基酸的序列的TNFRI片段。作为另一个例子,TNFRI126片段指具有从TNFRI N末端第41氨基酸残基延伸的一条126个氨基酸的序列的TNFRI片段。

[0024] 在本文提供的各条氨基酸序列中存在的氨基酸由它们的已知三字母或单字母缩写表述。在各种核酸片段中存在的核苷酸由本领域中常规使用的标准单字母名称命名。

[0025] 如本文所用,符号“xAz”指在TNFRI的或TNFRI片段的氨基酸序列中在自N末端第A位置处(基于TNFRI的氨基酸序列)用z置换x的氨基酸残基置换。例如,K48Q指在根据SEQ ID NO:1的TNFRI的氨基酸序列中在自N末端第48位置处用谷氨酰胺(Gln)置换赖氨酸(Lys)的氨基酸残基置换。

[0026] 作为用于预防和/或治疗干眼综合征的本发明组合物的有效成分,修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段优选地包含在如SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列中或TNFRI片段的氨基酸序列中:

[0027] 在第92、95、97和98位置处包含4个氨基酸残基修饰的氨基酸序列(四重变体);

[0028] 在第68、92、95、97和98位置处包含5个氨基酸残基修饰的氨基酸序列(五重变体);
或

[0029] 在第68、92、95、97和98位置处包含5个氨基酸残基修饰并在第161或207位置处包含一个额外氨基酸残基修饰的氨基酸序列(六重变体)。

[0030] 所述氨基酸修饰与天然TNFRI或TNFRI片段相比,维持或增加了对TNF α 的结合亲和力、维持或增加了蛋白酶抗性,并且可以包括全部修饰如插入、置换、缺失等。作为代表性实例,可以使用氨基酸置换。对于具有本发明所属领域的普通知识的人员(这里,“本领域技术人员”)显而易见的是,只要可以提供增加的结合强度或可以维持或增加蛋白酶抗性,则可以使用在特定位置处氨基酸的其他化学修饰、翻译后修饰,例如,通过糖部分的糖基化、酰化(例如,乙酰化或琥珀酰化)、甲基化、磷酸化、hasylation、氨甲酰化、硫酸化、异戊烯化、氧化、胍基化、酰胺化、氨甲酰化(carbamylation)(例如,氨甲酰化(carbamoylation))、三硝基苯化、硝化、PEG化等。

[0031] 作为用于预防和/或治疗干眼综合征的本发明组合物的有效成分,修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段必然地包含在如SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列或TNFRI片段的氨基酸序列中:

- [0032] 在第92位置用I或M置换S;
- [0033] 在第95位置用F置换H;
- [0034] 在第97位置用P置换R;
- [0035] 在第98位置用A或G置换H,
- [0036] 并且,
- [0037] 优选地进一步包括选自以下的至少一个置换:
- [0038] 在第68位置处用V置换L;
- [0039] 在第161位置处用Q或N置换K;和
- [0040] 在第207位置处用N置换D。
- [0041] 在前述修饰中,优选地,在第92位置处用M置换S;在第98位置处用G置换H;和在第161位置处用N置换K。
- [0042] 也即是说,四重变体,其包含在第92位置处用I或M置换S;在第95位置处用F置换H;在第97位置处用P置换R;并且在第98位置处用A或G置换H;
- [0043] 五重变体,除四重变体的之外,其还包含在第68位置处用V置换L;或
- [0044] 六重变体,除五重变体之外,其还包括在第161位置处用Q或N置换K或是在第207位置处用N置换D,
- [0045] 优选地用作预防和/或治疗干眼综合征的本发明组合物的有效成分。
- [0046] 进一步,用于预防和/或治疗干眼综合征的本发明组合物可以包含多于一种修饰的TNFRI或TNFRI片段。
- [0047] 如先前定义,TNFRI片段指TNFRI的一部分,所述部分显示与TNFRI基本上等同的作用。特别地,在本发明中,由如SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列的氨基酸残基41至211(SEQ ID NO:2;TNFRI171)组成的氨基酸序列;由如SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列的氨基酸残基41至166(SEQ ID NO:3;TNFRI126)组成的氨基酸序列;由如SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列的氨基酸残基41至145(SEQ ID NO:4;TNFRI105)组成的氨基酸序列。作为参考,已知TNFRI的第四结构域不是与TNF α 结合必需的,并且第二和第三结构域的缺失造成与TNF α 结合活性的丧失(Corcoran等人,Eur.J.Biochem.233:831-8401994),并且还众所周知,第三结构域的某个部分在TNFRI和TNF α 的结合中可能不足(deficient),并且由天然TNFRI(SEQ ID NO:1)的氨基酸残基59至143组成的氨基酸序列单独显示TNFRI的生物活性(参见,美国专利号6,989,147等)。
- [0048] 本领域技术人员显而易见,与修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段基本上相同的多肽也包括在本发明修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段的范围内。术语“与修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段基本上相同的多肽”指包含氨基酸残基的置换、缺失、添加或其他修饰,同时不具体限制具有修饰的氨基酸残基的数目和修饰种类,只要修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段的内在特征能够得到保持的多肽。
- [0049] 特别地,“与修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段基本上相同的多肽”优选地在下述残基位置具有用于增加针对TNF α 的结合亲和力和/或维持/提高蛋白酶抗性的氨基酸修饰,其中所述残基位置为根据与修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段的氨基酸序列的序列比对被鉴定为不改变功能的残基位置。通过比对TNFRI多肽的氨基酸序列并使用保守和相同的氨基酸残基作为引导,本领域技术人员可以鉴定相应的残基。

[0050] 另外,只要可以维持本发明所需的特征,“与修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段基本上相同的多肽”可以包括甚至在下述残基位置处具有修饰的多肽,所述残基位置能够影响本发明修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段的功能,例如,保守性置换等。

[0051] 优选地,除了在本发明特定位置处的氨基酸修饰外,“与修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段基本上相同的多肽”可以与具有如SEQ ID NO:1中所述的序列的多肽具有多于90%、多于95%、多于96%、多于97%、多于98%或多于99%序列同源性,并且可以包括等位变体同工型、组织特异性同工型和其等位变体,具有至少一个氨基酸突变、置换、缺失、插入或添加的合成变体,通过翻译核酸制备的合成分子,从人类和非人类组织及细胞分离的蛋白质,嵌合TNFRI多肽及其修饰形式。

[0052] 另外,包含至少两种前述修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段的聚合多肽(或称作“多肽复合物”)也包括在本发明修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段的范围内。

[0053] 该多肽复合物具有至少两种修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段连接、优选地通过共价键连接的结构。

[0054] 作为本发明的优选实施方案,本发明的组合物包含至少一种修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段作为有效成分,所述修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段具有选自以下的氨基酸序列:

[0055] 在SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列(TNFRI)中包含选自如下的氨基酸修饰的氨基酸序列:S92I/H95F/R97P/H98A、S92M/H95F/R97P/H98A、L68V/S92M/H95F/R97P/H98A、L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N、L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N、L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N、L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q和L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N;

[0056] 在SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列的氨基酸残基41至211组成的氨基酸序列(TNFRI171)中包含选自如下的氨基酸修饰的氨基酸序列:S92I/H95F/R97P/H98A、S92M/H95F/R97P/H98A、L68V/S92M/H95F/R97P/H98A、L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N、L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N、L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N、L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q和L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N;

[0057] 在SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列的氨基酸残基41至166组成的氨基酸序列(TNFRI126)中包含选自如下的氨基酸修饰的氨基酸序列:S92I/H95F/R97P/H98A、S92M/H95F/R97P/H98A、L68V/S92M/H95F/R97P/H98A、L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N、L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N、L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q和L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N;和

[0058] 在SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列的氨基酸残基41至145组成的氨基酸序列(TNFRI105)中包含选自如下的氨基酸修饰的氨基酸序列:S92I/H95F/R97P/H98A、S92M/H95F/R97P/H98A和L68V/S92M/H95F/R97P/H98A;

[0059] 作为本发明的更优选实施方案,本发明的组合物包含至少一种修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段作为有效成分,所述修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段具有选自以下的氨基酸序列:

[0060] 在SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列(TNFRI)中包含选自如下氨基酸修饰的氨基酸序列:L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N、L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/

D207N和L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N;

[0061] 在SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列的氨基酸残基41至211组成的氨基酸序列(TNFRI171)中包含选自如下氨基酸修饰的氨基酸序列:L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N、L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N和L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N;和

[0062] 在SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列的氨基酸残基41至166组成的氨基酸序列(TNFRI126)中包含选自如下氨基酸修饰的氨基酸序列:68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N和L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N。

[0063] 作为本发明的最优选实施方案,本发明的组合物包含至少一种修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段作为有效成分,所述修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段具有选自以下的氨基酸序列:

[0064] 在SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列(TNFRI)中包含选自如下氨基酸修饰的氨基酸序列:L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N和L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N;

[0065] 在SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列的氨基酸残基41至211组成的氨基酸序列(TNFRI171)中包含选自如下氨基酸修饰的氨基酸序列:L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N和L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207;和

[0066] 在SEQ ID NO:1中所述的天然TNFRI的氨基酸序列的氨基酸残基41至166组成的氨基酸序列(TNFRI126)中包含氨基酸修饰L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N的氨基酸序列。

[0067] 作为本发明的另一个优选实施方案,本发明的组合物包含至少一种修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段作为有效成分,所述修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段具有选自SEQ ID NO:5至30的氨基酸序列。

[0068] 可以通过使用微生物如大肠杆菌、酵母等或动物细胞制备本发明的修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段。这些多肽及其制备物是本领域已知的,并且特别地在韩国专利特开平NO.2012-0027666中详述。

[0069] 此外,修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段具有用于微生物如大肠杆菌、酵母等或动物细胞中生产的额外修饰。优选地,修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段具有添加至其氨基酸序列氨基端的信号序列或甲硫氨酸。

[0070] 进一步,本发明提供编码修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段的基因;包含该基因的载体;或转化有该载体的微生物或动物细胞,并且还提供使用该基因、载体和微生物或动物细胞产生修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段的方法。

[0071] 进一步,本发明提供一种用于预防或治疗干眼综合征的组合物,所述组合物包含编码修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段的基因;和包含该基因的载体。

[0072] 本文中,宽泛地定义干眼综合征,包括因Stevens-Johnson综合征、Sjogren综合征、眼瘢痕性类天疱疮、眼睑炎、角膜损伤、感染、Lily-Day综合征、先天性无齿症、营养紊乱或缺乏(包括维生素)、药物副作用、眼应力、腺体和细胞损伤、烟雾、烟草、环境暴露于非常干燥的空气、风媒粉尘、自身免疫和其他免疫缺陷病以及因衰老所致的燥性角结膜炎(KCS)和干眼。

[0073] 通常,用于治疗或预防干眼综合征的本发明的修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段的剂量可以根据待施用的受试者的种类、年龄和重量、症状严重性、所需治疗效果、施用方法、

治疗阶段等变动,并且可以使用用于消除或改善干眼综合征的药学有效量。如本文所用,术语“药学有效量”指改善干眼综合征的量。通常,在全身性施用情况下,该剂量是约0.0001-1000mg和优选地0.001-500mg,所述剂量以单次剂量或每日2次至4次的分割剂量施用或以延迟方式施用。特别地,在局部施加至眼部的情况下,将含有0.001-10.0w/v%和优选地0.01-10.0w.v%本发明的修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段的药物每日几次施加至眼部,并且优选地每日1次至6次滴加至眼部。然而,药物的施加不限于此,并且显然本领域技术人员在考虑各种因素的情况下可以控制适宜的剂量、施用间隔时间等。

[0074] 除了本发明的修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段之外,本发明的组合物还可以包含生理相容性载体和/或添加物,它们通常是本领域可选的。作为载体和/或添加物,本发明的组合物还可以包含等渗剂、缓冲剂、表面活性剂、稳定化聚合物、防腐剂、增粘剂、抗氧化剂等,但不限于此。对于本领域技术人员显而易见的是,还可以包含常规使用的其他组分。此外,本发明的组合物还可以包含表面活性剂和/或缓和剂(mitigating agent)和/或稳定化聚合物。

[0075] 等渗剂用来调节组合物的张力,优选用作眼科组合物的天然泪的张力。例如,可以通过向组合物添加氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化钙、简单糖如右旋糖、果糖和半乳糖、和/或简单多元醇如糖醇、甘露醇、山梨醇、木糖醇、乳糖醇、异麦芽酮糖醇及麦芽糖醇或氢化淀粉水解物,将组合物的张力调节至类似于生理学等渗。可以根据试剂的具体种类适当地选择这种等渗剂的量。

[0076] 作为缓冲剂,可以使用选自例如磷酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠、硼酸钠和硼酸的至少一种。缓冲剂可以用来防止储存条件下组合物的pH变化。缓冲剂的浓度根据试剂的种类变动,但是可以如此选择从而维持5至8和更优选地5至7的pH值。

[0077] 表面活性剂用来溶解有效成分并稳定胶态分散体,例如,胶束溶液剂、微乳液、乳液或悬液。例如,可以使用聚山梨醇酯、泊洛沙姆、聚乙二醇40硬脂酸酯、聚乙二醇蓖麻油、泰洛沙泊(tyloxapol)、triton(例如,Triton X114)和山梨糖醇酐单月桂酸酯。

[0078] 作为稳定化聚合物,可以使用选自交联聚丙烯酸酯的聚电解质,例如,卡波姆或Pemulen(产品名称),特别地,0.1%至0.5%(w/w)卡波姆974P(聚丙烯酸)。

[0079] 防腐剂用来防止使用组合物期间的微生物污染,并且可以使用例如苯扎氯铵、氯丁醇、苯扎溴铵(benzododecynium bromide)、尼泊金甲酯、尼泊金丙酯、苯乙基醇、依地酸二钠、山梨酸、聚季铵-1或本领域已知的其他物质。

[0080] 增粘剂用来增加载体的粘度,并且其例子可以包括多糖,如透明质酸及其盐、硫酸软骨素及其盐、葡聚糖和纤维素的多种聚合物;乙烯基聚合物;丙烯酸聚合物,但是不限于此。

[0081] 可以进一步将抗氧化剂添加至本发明的组合物以防止有效成分在储存期间氧化。抗氧化剂的例子可以包括维生素E及其类似物、抗坏血酸及其衍生物和丁化羟基茴香醚(BHA)。

[0082] 将本发明中使用的修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段配制成向人或动物施用的药物制品,并且可以通过口服施用、静脉内施用、皮下施用、直肠或阴道施用或向局部区域(眼部)施用,全身性或局部施用。优选地,在考虑全身性影响、效果明显表现等的情况下可以使用向眼部局部施用。

[0083] 当配制修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段时,它可以以通过常规方法产生的制剂形式施用。施用形式可以例如是滴眼剂、眼膏剂、散剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、注射、油膏剂等,并且可以优选滴眼剂和眼膏剂。这些制品可以通过本领域已知的一般方法产生。作为眼科局部施用形式,滴剂、喷雾剂或凝胶型是可能的,并且作为另一种施用形式,可以利用脂质体向眼部施用。可选地,可以利用通过泵-导管系统向泪膜注射。作为另一个实施方案,可以使用连续释放或选择性释放装置,例如系统如Ocuser(商标名称)系统(Alza Corp., Palo Alto, CA)。作为又一个实施方案,TNFRI变体可以包含于眼上的隐形眼镜中,并且可以因而转移或与之接合。作为再一个实施方案,可以使用TNFRI变体,同时包含适用于眼表面的海绵或棉拭子,或作为适用于眼表面的液体喷雾剂。作为再一个实施方案,可以将本发明的修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段直接注射到眼表面或泪腺组织上。

[0084] 除局部施用方法之外,还可以通过多种方法全身性施用本发明的修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段。一个例子是可吸入粒子的气溶胶悬剂。本发明的修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段可以经肺部吸收入血液中、通过鼻泪管与泪腺组织接触或以药学有效量与泪腺接触。作为另一种方法,可吸入粒子的鼻喷雾剂、液态制剂的鼻滴剂或施用洗眼液或滴眼剂类型的液/液混悬剂是可能的。可以通过借助本领域已知的技术与适宜载体如消毒盐水溶液或无菌无热原水混合,制备用于鼻喷雾剂和滴鼻剂或滴眼剂的组合物。

[0085] 本发明的修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段可以通过口服施用法施用至组织,并且可以按片剂、糖锭、水悬剂或油悬剂、可分散散剂或颗粒剂、乳剂、硬胶囊剂或软胶囊剂、糖浆剂或酏剂形式使用。可以通过药物制造领域已知的方法制备口服组合物。

[0086] 可选地,本发明的修饰的TNFRI多肽或其片段可以在手术期间以凝胶剂、乳膏剂或液体悬剂的形式直接滴加。

[0087] 除了以上描述之外,本领域技术人员将从本说明书的描述对发明的实施方案作出适当修改和应用,所述修改和应用也包含在本发明的范围中。

[0088] 附图简述

[0089] 图1显示TNFRI变体对角膜损伤恢复的作用。

[0090] 道1:正常组,道2:诱导干眼+载体(局部施用),道3:诱导干眼+依那西普(2.5mg/ml,局部施用),道4:诱导干眼+HL036335(2.5mg/ml,局部施用),道5:诱导干眼+HL036337(2.5mg/ml,局部施用),道6:诱导干眼+HL036326(2.5mg/ml,局部施用),道7:诱导干眼+HL036222(2.5mg/ml,局部施用),道8:诱导干眼+HL036329(2.5mg/ml,局部施用),道9:诱导干眼+HL036304(2.5mg/ml,局部施用),道10:诱导干眼+HL036330(2.5mg/ml,局部施用),道11:诱导干眼+HL036229(2.5mg/ml,局部施用),道12:诱导干眼+HL036402(2.5mg/ml,局部施用),道13:诱导干眼+环孢菌素A(0.05%,局部施用)

[0091] 图2显示根据TNFRI变体浓度的角膜损伤恢复作用。

[0092] 道1:正常组,道2:诱导干眼,道3:诱导干眼+依那西普(5mg/kg,皮下施用),道4:诱导干眼+HL036337(0.5mg/kg,皮下施用),道5:诱导干眼+HL036337(5mg/kg,皮下施用),道6:诱导干眼+HL036337(0.625mg/ml,局部施用),道7:诱导干眼+HL036337(6.25mg/ml,局部施用)

[0093] 图3显示TNFRI变体的泪体积增加作用。

[0094] 道1:正常组,道2:诱导干眼,道3:诱导干眼+依那西普(5mg/kg,皮下施用),道4:诱

导干眼+HL036337(0.5mg/kg,皮下施用),道5:诱导干眼+HL036337(5mg/kg,皮下施用),道6:诱导干眼+HL036337(0.625mg/ml,局部施用),道7:诱导干眼+HL036337(6.25mg/ml,局部施用)

[0095] 图4显示角膜中TNFRI变体的抗炎作用。

[0096] 道1:正常组,道2:诱导干眼,道3:诱导干眼+依那西普(5mg/kg,皮下施用),道4:诱导干眼+HL036337(5mg/kg,皮下施用),道5:诱导干眼+HL036337(6.25mg/ml,局部施用)

[0097] 图5显示眼表面上TNFRI变体的抗炎作用。

[0098] 道1:正常组,道2:诱导干眼,道3:诱导干眼+依那西普(5mg/kg,皮下施用),道4:诱导干眼+HL036337(6.25mg/ml,局部施用)

[0099] 图6显示泪腺中TNFRI变体的抗炎作用

[0100] 道1:正常组,道2:诱导干眼+载体(局部施用),道3:诱导干眼+依那西普(0.25%,局部施用),道4:诱导干眼+HL036337(0.25%,局部施用),道5:诱导干眼+环孢菌素A(0.05%,局部施用),道6:诱导干眼+甲泼尼龙(0.1%,局部施用)

[0101] 本发明的详述和优选实施方案

[0102] 根据下文的制备实施例、实施例和实验实施例,本发明的各种优点和特征和用于实现它们的方法变得显而易见。然而,提供这些实施例仅为了更好地理解本发明,并且本发明不限于下文公开的实施例。

[0103] [制备实施例]TNFRI片段变体的制备

[0104] (1)TNFRI变体的设计

[0105] 从韩国专利申请号2010-0089395(特开平No.2012-0027666)和韩国专利申请号2011-0138751(特开平No.2012-0072323),选择具有下表1的氨基酸修饰的修饰的TNFRI(“TNFRI变体”)作为候选物。

[0106] [表1]本发明的TNFRI变体

[0107]

编号	TNFRI变体ID.	修饰
HL036222	TNFRI _m -A2	S92I, H95F, R97P, H98A
HL036229	TNFRI _m -A9	S92M, H95F, R97P, H98A
HL036304	TNFRI _m -S36	L68V, S92M, H95F, R97P, H98A
HL036326	TNFRI _m -S54	L68V, S92I, H95F, R97P, H98A, K161N
HL036329	TNFRI _m -S57	L68V, S92M, H95F, R97P, H98A, K161N
HL036330	TNFRI _m -S58	L68V, S92M, H95F, R97P, H98A, D207N
HL036335	TNFRI _m -S62	L68V, S92I, H95F, R97P, H98G, K161Q
HL036337	TNFRI _m -S63	L68V, S92M, H95F, R97P, H98G, K161N
HL036402	TNFRI _m -WT	无(野生型)

[0108] (“m”意指105、126或171)

[0109] 为了制备TNFRI变体,使用已经公开的人TNFRI的遗传信息。TNFRI171、TNFRI126和TNFRI105变体多肽的氨基酸序列(对其进行了上表1的修饰)在SEQ ID NOs:13至30中阐述(不包括野生型)。

[0110] (2)编码TNFRI变体的DNA的制备

[0111] 为了构建位点特异性TNFRI变体,通过位点定向诱变构建TNFRI变体。下表2中显示用来构建具有上表1中所述氨基酸修饰的TNFRI变体的引物和模板。

[0112] 具体而言,使用TNFRI质粒作为模板,将下表2的20pmole每对引物溶解于蒸馏水中,随后使用Pfu聚合酶进行PCR,由此构建每种位点定向变体。

[0113] 根据韩国专利特开平No.2012-0027666的公开内容构建用于构建TNFRI变体的TNFRI171片段基因和TNFRI表达载体TNFRI105, TNFRI126和TNFRI171表达载体。

[0114] 为了构建编码TNFRI105-A30、TNFRI-126-A30和TNFRI-171-A30的质粒,通过使用与表2的A30相对应的引物并使用已构建的pET44a-Met-TNFRI105、pET44a-Met-TNFRI126和pET44a-Met-TNFRI171质粒作为模板(如此获得的质粒分别指pET-TNFRI105_A30、pET-TNFRI126_A30和pET-TNFRI171_A30,并且省略对氨基酸序列长度的描述),实施相应的扩增反应。随后,如下表2中所显示,通过相同方法,同时使用与A2和A9相对应的引物并使用如此构建的质粒作为模板,构建pET-TNFRI_A2和pET-TNFRI_A9。通过相同方法,同时使用表2的引物并使用如此构建的质粒作为模板,构建其他质粒。

[0115] [表2]用于位点定向诱变的引物的信息

[0116]

突变体号	引物	
	PCR 模板	引物序列
A2 (pET-TNFRI_A2)	pET-TNFRI_A 30	5'-GTCATTTACAGCGATTGAGAATTTTCTGCCGGC-3' 5'-GCCGGCAGAAAATTCTCAATCGCTGTAAATGAC-3'
A9 (pET-TNFRI_A9)	pET-TNFRI_A 2	5'-GGGTCATTTACAGCGATGGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCCATCGCTGTAAATGACCC-3'
A21 (pET-TNFRI_A21)	pET-TNFRI_A 2	5'-GAGAATTTTCTGCCGGGGTGCCTGAGCTGTTCTA-3' 5'-TAGAACAGCTCAGGCACCCCGGCAGAAAATTCTC-3'
A22 (pET-TNFRI_A22)	pET-TNFRI_A 9	5'-GAGAATTTTCTGCCGGGGTGCCTGAGCTGTTCTA-3' 5'-TAGAACAGCTCAGGCACCCCGGCAGAAAATTCTC-3'
A30 (pET-TNFRI_A30)	pET44a-Met-T NFRI105, pET44a-Met-T	5'-GAGTGGGTCATTTACAGCGATTCCGAATTTTCTGCC GGCGTGCCTGAGCTGTTCTAAG-3' 5'-CTTAGAACAGCTCAGGCACGCCGGCAGAAAATTCTG

[0117]

突变体号	引物	
	PCR 模板	引物序列
	NFRI126, 或者 pET44a-Met-T NFRI171	GAATCGCTGTAAATGACCCACTC-3'
S31 (pET-TNFRI_S31)	pET-TNFRI_A 2	5'-CACAAAGGGACGTACGTGTATAATGACTGTCCG-3' 5'-CGGACAGTCATTATACACGTACGTCCCTTTGTG-3'
S36 (pET-TNFRI_S36)	pET-TNFRI_A 9	5'-CACAAAGGGACGTACGTGTATAATGACTGTCCG-3' 5'-CGGACAGTCATTATACACGTACGTCCCTTTGTG-3'
S46 (pET-TNFRI_S46)	pET-TNFRI_A 21	5'-GAGAATTTTCTGCCGGGGTGCCTGAGCTGTTCTA-3' 5'-TAGAACAGCTCAGGCACCCCGGCAGAAAATTCTC-3'
S47 (pET-TNFRI_S47)	pET-TNFRI_A 22	5'-GAGAATTTTCTGCCGGGGTGCCTGAGCTGTTCTA-3' 5'-TAGAACAGCTCAGGCACCCCGGCAGAAAATTCTC-3'
S54 (pET-TNFRI_S54)	pET-TNFRI_S 31	5'-CTGTCCTGTCAGGAGAACCAGAATACAGTTTGTA-3' 5'-TACAAACTGTATTCTGGTTCTCCTGACAGGACAG-3'
S57 (pET-TNFRI_S57)	pET-TNFRI_S 36	5'-CTGTCCTGTCAGGAGAACCAGAATACAGTTTGTA-3' 5'-TACAAACTGTATTCTGGTTCTCCTGACAGGACAG-3'
S58 (pET-TNFRI_S58)	pET-TNFRI_S 36	5'-ATGTTAAGGGCACTGAGAACTCAGGCACACATA-3' 5'-TATGTGGTGCCTGAGTTCTCAGTGCCCTTAACAT-3'
S62	pET-TNFRI_S	5'-ATCTGTCCTGTCAGGAGCAGCAGAATACAGTTTG-3'

[0118]

突变体号	引物	
	PCR 模板	引物序列
(pET-TNFRI_S62)	46	5'-CAAACGTGATTCTGCTGCTCCTGACAGGACAGAT-3'
S63	pET-TNFRI_S	5'-CTGTCCTGTCAGGAGAACCAGAATACAGTTTGTA-3'
(pET-TNFRI_S63)	47	5'-TACAAACGTGATTCTGGTTCTCCTGACAGGACAG-3'

[0119] 通过使用1.0μl每种模板质粒DNA、1.0μl 20pmole N-引物,1.0μl 20pmole C-引物,25.0μl 2x PrimeSTAR PCR缓冲剂,4.0μl 200μM dNTP,0.5μl PrimeSTAR HS DNA聚合酶(Takara,目录号:R044A),和17.5μl蒸馏水,制备50.0μl反应液,并且随后用于以上扩增反应。

[0120] 实施PCR,包括:主变性:98℃5分钟,次级变性:98℃30秒,引物复性:55℃30秒和延伸:72℃9分钟。重复上述过程中从次级变性至延伸的步骤17次(个循环)并且随后最终酶促反应在72℃持续10分钟。

[0121] PCR产物用DpnI酶在37℃处理2小时以降解大肠杆菌衍生的DNA并获得PCR扩增的DNA。取2μl DNA溶液并且随后将其引入XL1-蓝感受态细胞(目录号:RH119-J80,RBC),随后通过在42℃施加热休克1分钟转化所述感受态细胞,随后在含有氨苄青霉素的LB固体培养基中静置培养以获得菌落。在含有氨苄青霉素的LB液体培养基中培养菌落,并且随后分离质粒并进行核苷酸测序分析以证实完成位点特异性突变。

[0122] (3)在大肠杆菌中产生生物活性的TNFRI和TNFRI变体

[0123] (A)TNFRI和TNFRI变体的表达

[0124] 取1μl通过以上制备实施例构建的质粒溶液并且随后将其引入BL21Star(DE3)感受态细胞(Invitrogen,目录号:C6010-03),随后通过在42℃施加热休克1分钟转化所述感受态细胞,随后在含有氨苄青霉素的LB固体培养基中静置培养以获得菌落。将其中含有表达载体的大肠杆菌BL21Star(DE3)接种到含有100μg/ml氨苄青霉素的50mL YP培养基(酵母提取物:Merck,目录号103753,蛋白胨:BD,目录号243620,和NaCl:Merck,目录号1064049025)上,随后在37℃通气培养16小时。将培养的培养基接种到含有100μg/ml氨苄青霉素的250mL YP培养基上至1L烧瓶中600nm处吸光度值为0.1。当细胞在37℃培养至吸光度值3~4时,添加IPTG以达到终浓度1.0mM,由此诱导表达。在诱导表达后,通气培养在37℃继续3小时,并且随后通过在6,000rpm离心20分钟收集细胞。

[0125] (B)回收不溶性TNFRI和TNFRI变体

[0126] 将收集的细胞重悬于重悬溶液(50mM Tris,0.5mM EDTA(pH 8.5))。将悬浮的细胞用超声破碎器(Sonics,目录号:VCX 750)破坏。在细胞破碎后,在10℃实施以8000×g离心30分钟。抛弃上清液并将沉淀的沉淀物悬浮于洗涤液1(50mM Tris,10mM EDTA,0.5% Triton X-100(pH8.0))中,随后以8000×g和10℃离心20分钟。抛弃上清液并将所产生的沉

淀重悬于重悬液中,随后以 $8000\times g$ 和 10°C 离心20分钟。洗涤的沉淀物立即使用,或冷冻贮存 -80°C 。

[0127] (C)TNFRI和TNFRI变体的溶解和再折叠

[0128] 将如此获得的沉淀溶解于6mL变性溶液(6-8M脲或6-8M胍-HCl,10mM二硫苏糖醇(DTT),2.0mM EDTA和0.2MNaCl)中。随后,通过使用 $0.45\mu\text{m}$ 注射器滤器滤除不溶性沉淀物。将溶解有沉淀的溶液在再折叠溶液(50mM Tris,1.0mM EDTA,0.5M L-精氨酸,6.0mM GSH,4.0mM GSSG,240mM NaCl,10mM KCl(pH 9.0)中稀释20倍并且在 4°C 温和地搅拌12-24小时以引起再折叠。

[0129] (D)纯化再折叠的TNFRI和TNFRI变体

[0130] 为了纯化再折叠的TNFRI和TNFRI变体,通过使用3kD Amicon Ultra(Millipore,目录号:UFC900324)浓缩再折叠溶液20倍。随后,使用Superdex 75制备级树脂(GE)装填的XK25/70柱(GE,目录号:19-0146-01),通过使用凝胶渗透色谱(GPC)实施纯化。

[0131] 具体而言,在柱上加载再折叠的样品之前,将柱用4-5个柱体积的平衡缓冲液(50mM磷酸钠,100mM NaCl(pH 7.0)平衡。将2mL样品在柱上加载后,允许平衡溶液以5mL/分钟的流速流经该柱,并且采集每个5mL样品级分。通过SDS-PAGE分析采集的样品,并且随后仅取得具有90%或更高纯度的级分。通过以上流程,纯化了TNFRI105、TNFRI126和TNFRI171和其氨基端添加有Met的TNFRI105变体、TNFRI126变体和TNFRI171变体。

[0132] [实施例]

[0133] 实施例1:验证TNFRI变体在干眼综合征治疗上的作用

[0134] 为了验证在干眼综合征治疗中因抑制TNF α 所致的治疗作用,将TNF α 抑制剂施用至使用小鼠的干眼综合征动物模型。使用依那西普和TNFRI变体作为TNF α 抑制剂,并且比较依那西普和TNFRI变体之间的治疗作用。使用环孢菌素A作为阳性对照组。

[0135] 参考现有已知方法(J.Immunol 2011;187;3653-3662),建立干眼综合征动物模型。具体而言,将抗副交感神经药东莨菪碱(Scopolamine,5mg/ml)皮下施用至C57BL/6小鼠,每次0.1mL,一日3次,同时使用维持40%或更低湿度受控环境腔室,持续14日,由此诱导干眼综合征。此后,持续7日注射试验材料并且观察每个病例的症状改善程度。

[0136] 通过以2.5mg/ml浓度施加滴眼剂1日4次持续7日,将TNFRI变体和依那西普施用至具有所诱导的干眼综合征的小鼠。此外,通过1日2次施加滴眼剂持续7日,施加0.05%环孢菌素A,并且测量角膜损伤的改善程度。

[0137] 通过肉眼观察角膜状况,并且随后根据如表3中所示的症状严重性评定角膜损伤。等级0意指角膜中未观察到损害;等级1意指在约1/3的角膜中观察到损害;等级2意指在约1/2的角膜中观察到损害;等级3意指在约2/3的角膜中观察到损害;和等级4级意指在几乎整个角膜中观察到损害。

[0138] 结果证实,与依那西普、HL036402(天然TNFRI)和环孢菌素A相比,三种TNFRI变体HL036337、HL036326和HL036330在角膜损伤的改善程度方面均非常有效(参见图1)

[0139] [表3]角膜糜烂等级

[0140]

角膜糜烂等级
0 级：无糜烂
1 级：轻度
2 级：轻度到中度
3 级：中度

[0141]

4 级：重度

[0142] 实施例2.验证在干眼综合征动物模型中HL036337治疗的治疗效果

[0143] 实施例2.1角膜损伤恢复作用的验证

[0144] 使用缓冲液制备HL036337(作为TNFRI变体)以分别具有浓度0.625mg/ml和6.25mg/ml,其中对于滴眼剂,所述HL036337每次施加8L,1日4次,并且对于皮下施用,1日1次施加0.5mg/kg和5mg/kg。此外,作为对照组,皮下应用依那西普5mg/kg,1日1次。

[0145] 将试验材料施用至如上文实施例1中所述那样构建的干眼综合征动物模型7日,并且随后观察症状改善程度。经皮下施用施加依那西普,并且通过皮下施用和滴眼施用TNFRI变体。

[0146] 按照与上文实施例1相同的方式评价角膜损伤程度。

[0147] 作为结果,尽管皮下施用依那西普显示出少许症状改善作用,TNFRI变体的皮下施用和滴眼施用均显示角膜损伤恢复作用,并且特别地,滴眼施用显示显著的修复角膜损伤的作用(参见图2)。

[0148] 此外,证实HL036326和HL036330作为TNFRI变体也显示程度与HL036337相似的角膜损伤恢复作用。

[0149] 实施例2.2验证泪体积增加作用

[0150] 为了验证因施用试验材料所致的泪体积增加程度,将荧光素纸置于下眼睑上并且随后测量泪体积。如表4中显示根据泪体积的等级。等级0意指纸中存在少许泪;等级1意指纸被浸湿3mm;等级2意指纸被浸湿2-4mm;并且等级3意指纸被浸湿6mm。

[0151] [表4]泪分泌等级

[0152]

泪分泌等级	
0 级：无泪湖(tear lake)	
1 级：重度	3mm
2 级：中度	4-5mm
3 级：中度	6 mm

[0153] 相应材料的施用方法与实施例2.1中的那些相同。结果证实,在相等剂量的情况

下,与依那西普相比,HL036337作为TNFRI变体显示优越的泪体积恢复程度,并且TNFRI变体的滴眼施用组具有显著作用,如恢复泪体积至几乎正常的水平,类似于角膜损伤恢复作用(参见图3)。

[0154] 证实HL036326和HL036330作为TNFRI变体也显示程度与HL036337相似的泪体积恢复作用。

[0155] 实施例2.3验证在角膜中的抗炎功效

[0156] 为了验证抗炎功效,从角膜组织提取mRNA并且通过使用qPCR方法实施炎症相关细胞因子的测量。证实IFN- γ 、IL-1、IL-4、IL-6、IL-21和IL-22的mRNA的水平。

[0157] 相应材料的施用方法与实施例2.1中的那些相同。结果证实,因诱导干眼综合征所致的炎症相关细胞因子(IFN- γ 、IL-1、IL-6、IL-4、IL-21和IL-22)显著地增加。但是,证实皮下施用作为TNFRI变体的HL036337减少炎症相关的细胞因子,并且特别地,其滴眼施用具有明显作用,如,改善炎症程度至恢复几乎正常水平。而在皮下施用依那西普的情况下,几乎观察不到炎症降低作用(参见图4)。

[0158] 证实HL036326和HL036330作为TNFRI变体也在角膜中显示程度与HL036337相似的抗炎作用。

[0159] 实施例2.4验证在眼表面上的抗炎功效

[0160] 为了测定眼表面上炎性细胞因子的量,通过使用Lumine x100实施其测量。测量IFN- γ 、IL-6、IL-21和IL-22的量。

[0161] 通过使用缓冲液制备含有6.25mg/ml TNFRI变体HL036337的溶液,并且将该溶液通过滴眼剂(1日4次,每次8 μ l)和皮下方式(1日1次,5mg/kg剂量)施用至具有所诱导的干眼综合征的小鼠。此外,将依那西普皮下施用至具有所诱导的干眼综合征的小鼠(1日1次,5mg/kg剂量)。

[0162] 如实施例1中所述制备具有所诱导的干眼的小鼠。将HL036337和依那西普施用7日,并且测量在眼表面上的抗炎功效。

[0163] 作为结果,炎症相关细胞因子(IFN- γ 、IL-6、IL-21和IL-22)在眼表面上因诱导干眼综合征而明显增加。在滴眼施用作为TNFRI变体的HL036337情况下,观察到显著的炎症改善作用。但是,在皮下施用依那西普的情况下,几乎观察不到炎症降低作用。

[0164] 证实HL036326和HL036330作为TNFRI变体也在眼表面上显示程度与HL036337相似的抗炎作用。

[0165] 实施例2.5验证在泪腺上的抗炎功效

[0166] 为了比较目前作为干眼综合征治疗药使用的0.05%环孢菌素A和0.1%甲基泼尼松龙滴眼剂的效果,测量泪腺中炎性细胞因子的量。从泪腺组织提取mRNA并且通过使用qPCR方法进行炎症相关细胞因子的测量。证实了IFN- γ 和IL-6的mRNA水平。

[0167] 通过使用缓冲液制备含有6.25mg/ml TNFRI变体HL036337的溶液,并且将该溶液通过滴眼剂(1日4次,每次8 μ l),并将依那西普皮下施用至具有诱导的干眼综合征的小鼠(1日1次,5mg/kg剂量)。

[0168] 如实施例1中所述制备具有所诱导的干眼的小鼠。将HL036337和依那西普施用7日,并且测量在泪腺上的抗炎功效。

[0169] 作为结果,观察到因诱导干眼综合征所致的炎症相关细胞因子(IFN- γ 和IL-6)在

泪腺中明显地增加,并且与滴眼施加甲基泼尼松龙相比,滴眼施加作为TNFRI变体的HL036337具有相等的效果。但是,观察到环孢菌素A具有略微低于HL036337或甲基泼尼松龙的效果(参见图6)。

[0170] 证实HL036326和HL036330作为TNFRI变体也在泪腺中显示程度与HL036337相似的抗炎作用。

[0171] 工业适用性

[0172] 如上文所述,本发明的修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段具有优异的TNF α 中和活性,并且在患者的眼表面上抑制TNF α 活性以抑制与干眼综合征相关的炎症诱导效应。因此,本发明的修饰的TNFRI或修饰的TNFRI片段在预防和治疗干眼综合征方面显示显著作用,并且因此可以在预防和治疗干眼综合征中非常有用。

[0173] 已经基于具体特征详细描述了本发明,并且本领域技术人员显而易见,这些具体技术仅是优选实施方案并且因此本发明的范围不局限于这些实施方案。因此,本发明的主要范围由后续权利要求及其等同物限定。

[0174] 序列表

[0175] 所附

序列表

<110> 韩诺生物制药株式会社 (Hanall Biopharma Co., Ltd.)

<120> 修饰的人肿瘤坏死因子受体-1多肽的新用途

<130> PF-B1426

<140> PCT/KR2013/000983

<141> 2013-02-07

<150> 10-2012-0066527

<151> 2012-06-21

<160> 30

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 455

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

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

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
35 40 45

[0001] Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
50 55 60

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu
85 90 95

Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
145 150 155 160

Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
165 170 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
195 200 205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210 215 220
 Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285
 Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300
 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 [0002] Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455
 <210> 2
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)
 <400> 2
 Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
 20 25 30
 Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
 35 40 45
 Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 50 55 60
 Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 65 70 75 80
 Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
 85 90 95
 Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
 100 105 110
 Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
 115 120 125
 His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
 130 135 140
 Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
 145 150 155 160
 Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr
 165 170

[0003]

<210> 3
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)
 <400> 3

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

	115	120	125
<210>	4		
<211>	105		
<212>	PRT		
<213>	人 (Homo sapiens)		
<400>	4		
Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser			
1 5 10 15			
Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys			
20 25 30			
Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser			
35 40 45			
Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys			
50 55 60			
Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp			
65 70 75 80			
Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp			
85 90 95			
Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn			
100 105			
[0004]			
<210>	5		
<211>	455		
<212>	PRT		
<213>	人 L		
<220>			
<223>	TNFR1 A2 S92L/H95F/R97P/H98A		
<400>	5		
Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu			
1 5 10 15			
Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro			
20 25 30			
His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys			
35 40 45			
Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys			
50 55 60			
Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp			
65 70 75 80			
Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu			
85 90 95			
Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val			
100 105 110			

	Glu	Ile	Ser	Ser	Cys	Thr	Val	Asp	Arg	Asp	Thr	Val	Cys	Gly	Cys	Arg	
	115							120					125				
	Lys	Asn	Gln	Tyr	Arg	His	Tyr	Trp	Ser	Glu	Asn	Leu	Phe	Gln	Cys	Phe	
	130						135					140					
	Asn	Cys	Ser	Leu	Cys	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	His	Leu	Ser	Cys	Gln	Glu	
	145					150					155					160	
	Lys	Gln	Asn	Thr	Val	Cys	Thr	Cys	His	Ala	Gly	Phe	Phe	Leu	Arg	Glu	
					165					170					175		
	Asn	Glu	Cys	Val	Ser	Cys	Ser	Asn	Cys	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Cys	Thr	
				180					185					190			
	Lys	Leu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ile	Glu	Asn	Val	Lys	Gly	Thr	Glu	Asp	Ser	
		195						200					205				
	Gly	Thr	Thr	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Val	Ile	Phe	Phe	Gly	Leu	Cys	Leu	
	210						215						220				
	Leu	Ser	Leu	Leu	Phe	Ile	Gly	Leu	Met	Tyr	Arg	Tyr	Gln	Arg	Trp	Lys	
	225					230					235					240	
	Ser	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Val	Cys	Gly	Lys	Ser	Thr	Pro	Glu	Lys	Glu	
				245						250					255		
[0005]	Gly	Glu	Leu	Glu	Gly	Thr	Thr	Thr	Lys	Pro	Leu	Ala	Pro	Asn	Pro	Ser	
			260						265					270			
	Phe	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Phe	Thr	Pro	Thr	Leu	Gly	Phe	Ser	Pro	Val	
		275					280						285				
	Pro	Ser	Ser	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Tyr	Thr	Pro	Gly	Asp	Cys	
		290					295					300					
	Pro	Asn	Phe	Ala	Ala	Pro	Arg	Arg	Glu	Val	Ala	Pro	Pro	Tyr	Gln	Gly	
	305					310					315					320	
	Ala	Asp	Pro	Ile	Leu	Ala	Thr	Ala	Leu	Ala	Ser	Asp	Pro	Ile	Pro	Asn	
				325					330					335			
	Pro	Leu	Gln	Lys	Trp	Glu	Asp	Ser	Ala	His	Lys	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp	
			340						345				350				
	Thr	Asp	Asp	Pro	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Val	Glu	Asn	Val	Pro	Pro	
		355					360					365					
	Leu	Arg	Trp	Lys	Glu	Phe	Val	Arg	Arg	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	His	Glu	
		370					375					380					
	Ile	Asp	Arg	Leu	Glu	Leu	Gln	Asn	Gly	Arg	Cys	Leu	Arg	Glu	Ala	Gln	
	385					390					395					400	
	Tyr	Ser	Met	Leu	Ala	Thr	Trp	Arg	Arg	Arg	Thr	Pro	Arg	Arg	Glu	Ala	
				405						410					415		

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
450 455

<210> 6
<211> 455
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> TNFRI-A9 S92M/H95F/R97P/H98A

<400> 6

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

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
50 55 60

[0006]

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu
85 90 95

Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
145 150 155 160

Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
165 170 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
195 200 205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
210 215 220

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285
 Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300
 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 [0007] Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455
 <210> 7
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> TNFRI-S36 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A
 <400> 7
 Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

[0008]

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30
 His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
 35 40 45
 Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60
 Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80
 Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu
 85 90 95
 Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110
 Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125
 Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140
 Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160
 Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175
 Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190
 Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
 195 200 205
 Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210 215 220
 Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285
 Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300
 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320

Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455
 <210> 8
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> TNFRI-S54 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N
 <400> 8
 Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30
 His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
 35 40 45
 Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60
 Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80
 Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu
 85 90 95
 Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110
 Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125

[0009]

[0010]

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140
 Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160
 Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175
 Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190
 Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
 195 200 205
 Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210 215 220
 Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285
 Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300
 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
450 455

<210> 9
<211> 455
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> TNFRI-S57 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 9

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

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
50 55 60

[0011]

Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu
85 90 95

Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
145 150 155 160

Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
165 170 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
195 200 205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
210 215 220

[0012]

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285
 Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300
 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455
 <210> 10
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> TNFRI-S58 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N
 <400> 10
 Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
 35 40 45
 Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60
 Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80
 Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu
 85 90 95
 Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110
 Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125
 Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140
 Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160
 Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175
 [0013] Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190
 Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asn Ser
 195 200 205
 Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210 215 220
 Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Gln
 245 250 255
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285
 Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300
 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335

Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455
 <210> 11
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> 人工
 [0014]
 <220>
 <223> TNFRI-S62 L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q
 <400> 11
 Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30
 His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
 35 40 45
 Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60
 Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80
 Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu
 85 90 95
 Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110
 Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125

	Lys	Asn	Gln	Tyr	Arg	His	Tyr	Trp	Ser	Glu	Asn	Leu	Phe	Gln	Cys	Phe	
	130						135					140					
	Asn	Cys	Ser	Leu	Cys	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	His	Leu	Ser	Cys	Gln	Glu	
	145					150					155					160	
	Lys	Gln	Asn	Thr	Val	Cys	Thr	Cys	His	Ala	Gly	Phe	Phe	Leu	Arg	Glu	
					165					170					175		
	Asn	Glu	Cys	Val	Ser	Cys	Ser	Asn	Cys	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Cys	Thr	
				180					185					190			
	Lys	Leu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ile	Glu	Asn	Val	Lys	Gly	Thr	Glu	Asp	Ser	
		195						200					205				
	Gly	Thr	Thr	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Val	Ile	Phe	Phe	Gly	Leu	Cys	Leu	
	210						215						220				
	Leu	Ser	Leu	Leu	Phe	Ile	Gly	Leu	Met	Tyr	Arg	Tyr	Gln	Arg	Trp	Lys	
	225					230					235					240	
	Ser	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Val	Cys	Gly	Lys	Ser	Thr	Pro	Glu	Lys	Glu	
				245						250					255		
	Gly	Glu	Leu	Glu	Gly	Thr	Thr	Thr	Lys	Pro	Leu	Ala	Pro	Asn	Pro	Ser	
				260					265					270			
[0015]	Phe	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Phe	Thr	Pro	Thr	Leu	Gly	Phe	Ser	Pro	Val	
			275					280					285				
	Pro	Ser	Ser	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Tyr	Thr	Pro	Gly	Asp	Cys	
		290					295					300					
	Pro	Asn	Phe	Ala	Ala	Pro	Arg	Arg	Glu	Val	Ala	Pro	Pro	Tyr	Gln	Gly	
	305					310					315					320	
	Ala	Asp	Pro	Ile	Leu	Ala	Thr	Ala	Leu	Ala	Ser	Asp	Pro	Ile	Pro	Asn	
				325					330					335			
	Pro	Leu	Gln	Lys	Trp	Glu	Asp	Ser	Ala	His	Lys	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp	
			340						345				350				
	Thr	Asp	Asp	Pro	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Val	Glu	Asn	Val	Pro	Pro	
		355					360						365				
	Leu	Arg	Trp	Lys	Glu	Phe	Val	Arg	Arg	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	His	Glu	
		370					375					380					
	Ile	Asp	Arg	Leu	Glu	Leu	Gln	Asn	Gly	Arg	Cys	Leu	Arg	Glu	Ala	Gln	
	385					390					395					400	
	Tyr	Ser	Met	Leu	Ala	Thr	Trp	Arg	Arg	Arg	Thr	Pro	Arg	Arg	Glu	Ala	
				405					410						415		
	Thr	Leu	Glu	Leu	Leu	Gly	Arg	Val	Leu	Arg	Asp	Met	Asp	Leu	Leu	Gly	
				420					425					430			

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
450 455

<210> 12
<211> 455
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> TNFRI-S63 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N

<400> 12

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

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
50 55 60

Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
65 70 75 80

[0016]

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu
85 90 95

Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
145 150 155 160

Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
165 170 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
195 200 205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
210 215 220

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
225 230 235 240

Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285
 Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300
 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 [0017] Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455
 <210> 13
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> TNFRI171-A2 S92I/H95F/R97P/H98A
 <400> 13
 Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1 5 10 15
 Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
 20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
 35 40 45
 Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 50 55 60
 Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 65 70 75 80
 Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
 85 90 95
 Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
 100 105 110
 Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
 115 120 125
 His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
 130 135 140
 Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
 145 150 155 160
 Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr
 165 170

[0018]

<210> 14
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> TNFRI171-A9 S92M/H95F/R97P/H98A

<400> 14

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1 5 10 15
 Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
 20 25 30
 Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
 35 40 45
 Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 50 55 60
 Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 65 70 75 80
 Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
 85 90 95
 Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
 100 105 110
 Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
 115 120 125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
130 135 140

Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
145 150 155 160

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr
165 170

<210> 15
<211> 171
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> TNFRI 171-S36 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A

<400> 15

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
50 55 60

[0019]

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
115 120 125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
130 135 140

Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
145 150 155 160

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr
165 170

<210> 16
<211> 171
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> TNFRI 171-S54 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 16

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
115 120 125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
130 135 140

[0020]

Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
145 150 155 160

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr
165 170

<210> 17

<211> 170

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> TNFRI 171-S57 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 17

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
115 120 125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
130 135 140

Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
145 150 155 160

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr
165 170

<210> 18

<211> 171

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> TNFRI 171-S58 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N

<400> 18

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

[0021]

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
115 120 125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
130 135 140

Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
145 150 155 160

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asn Ser Gly Thr Thr
165 170

<210> 19
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> TNFRI 171-S62 L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q

<400> 19

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
 20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
 35 40 45

Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
 85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
 100 105 110

[0022]

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
 115 120 125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
 130 135 140

Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
 145 150 155 160

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr
 165 170

<210> 20
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> TNFRI 171-S63 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N

<400> 20

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
 20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
 35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 50 55 60
 Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 65 70 75 80
 Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
 85 90 95
 Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
 100 105 110
 Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
 115 120 125
 His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
 130 135 140
 Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
 145 150 155 160
 Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr
 165 170

[0023]

<210> 21
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> TNFRI126-A2 S92I/H95F/R97P/H98A
 <400> 21

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1 5 10 15
 Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
 20 25 30
 Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
 35 40 45
 Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 50 55 60
 Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 65 70 75 80
 Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
 85 90 95
 Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
 100 105 110
 Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys
 115 120 125

<210> 22
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> TNFRI126-A9 S92M/H95F/R97P/H98A

<400> 22

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
 20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
 35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
 85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
 100 105 110

[0024]

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys
 115 120 125

<210> 23
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> TNFRI 126-S36 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A

<400> 23

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
 20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
 35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
 85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys
115 120 125

<210> 24
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> TNFRI 126-S54 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 24

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

[0025]

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Asn Gln Asn Thr Val Cys
115 120 125

<210> 25
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> TNFRI 126-S57 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 25

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Asn Gln Asn Thr Val Cys
115 120 125

<210> 26
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> TNFRI 126-S62 L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q

<400> 26

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

[0026]

Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys
115 120 125

<210> 27
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> TNFRI 126-S63 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N

<400> 27

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
 35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
 85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
 100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Asn Gln Asn Thr Val Cys
 115 120 125

<210> 28
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> TNFRI105-A2 S92I/H95F/R97P/H98A

<400> 28

Asp Ser Val Cys Pro Gln Lys Gln Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1 5 10 15

[0027]

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
 20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
 35 40 45

Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
 85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn
 100 105

<210> 29
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> TNFRI105-A9 S92M/H95F/R97P/H98A

<400> 29

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn
100 105

<210> 30
<211> 105
<212> PRT
<213> 人工

[0028] <220>
<223> TNFRI 105-S36 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A

<400> 30

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn
100 105

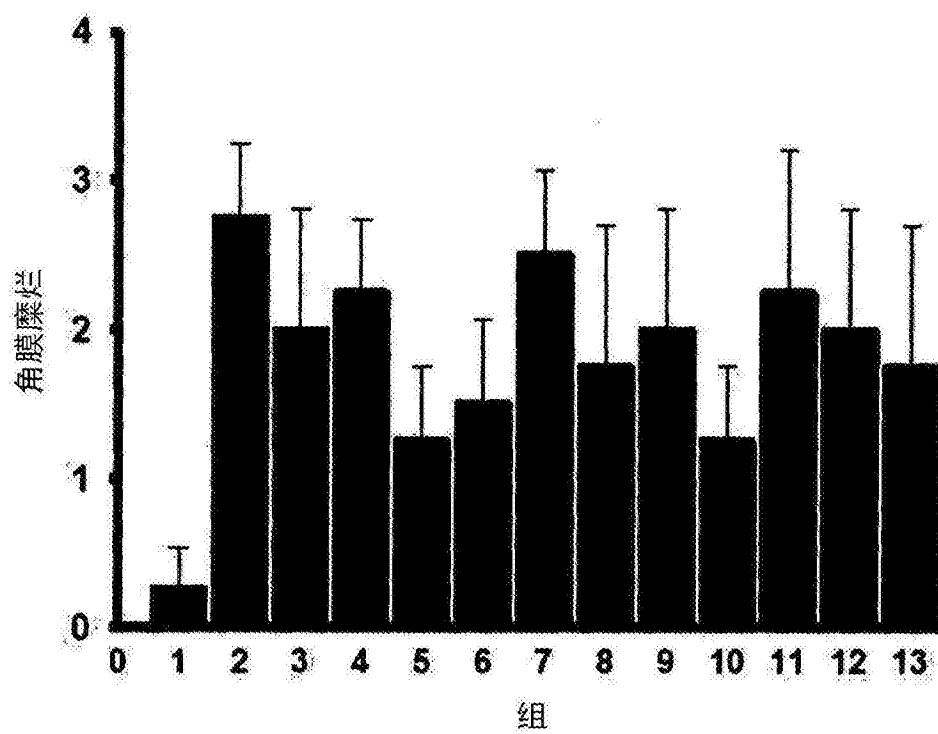


图1

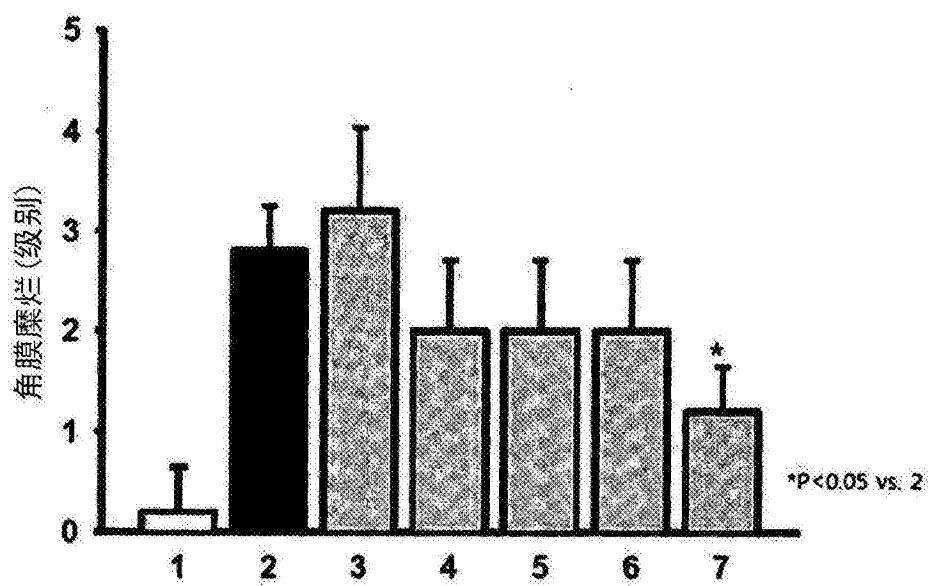


图2

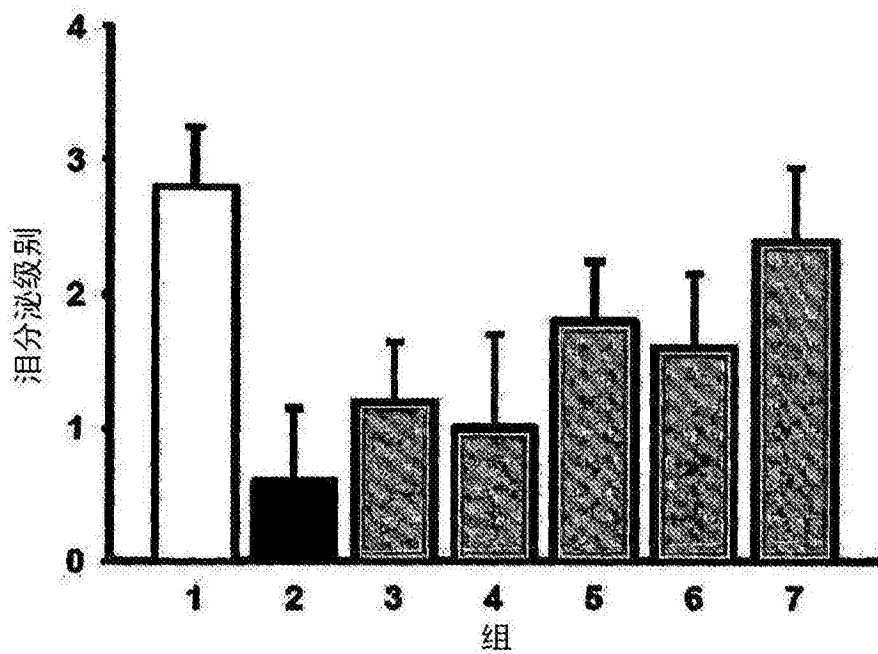


图3

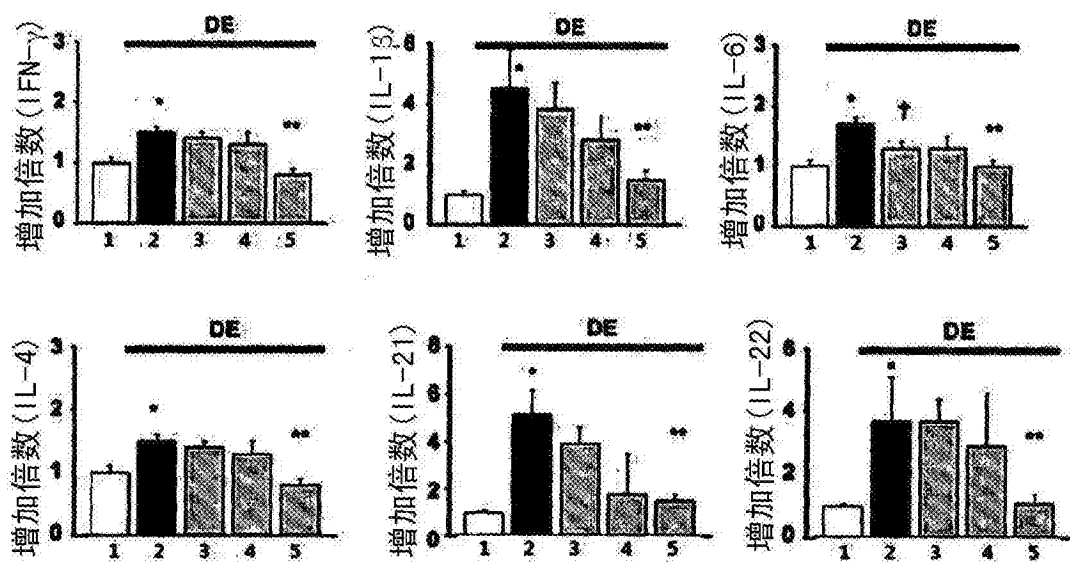


图4

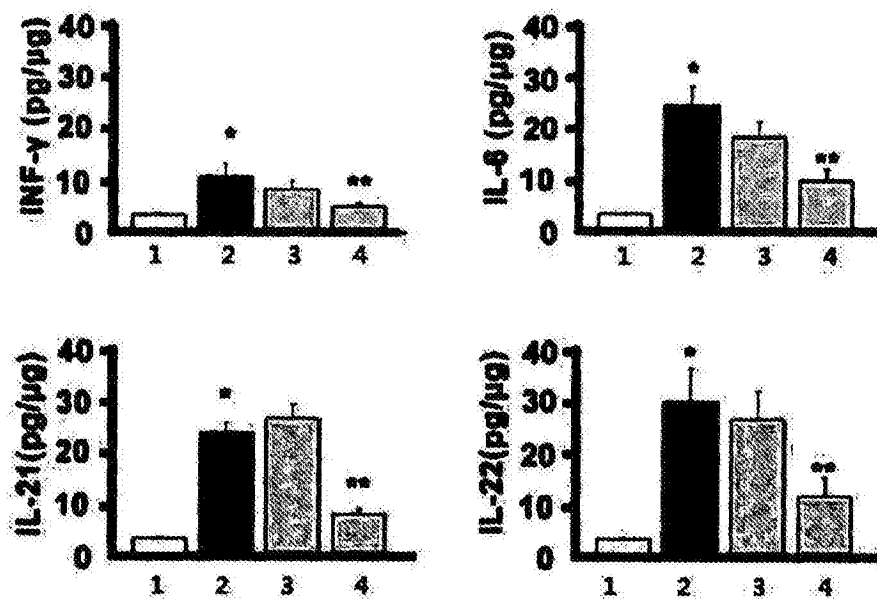


图5

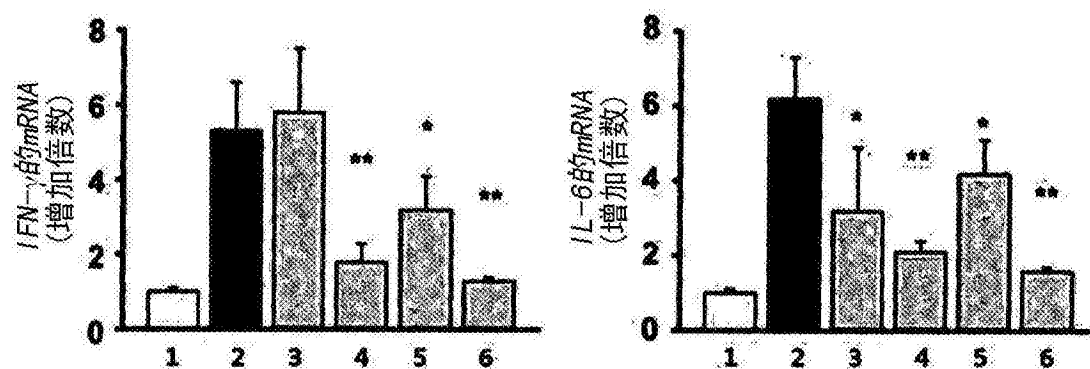


图6