



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116744959 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 12

(21) 申请号 202180086722.1

(22) 申请日 2021.10.22

(30) 优先权数据

63/104,850 2020.10.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.06.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/056282 2021.10.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/087435 EN 2022.04.28

(71) 申请人 韩汇泉

地址 美国加利福尼亚州

申请人 周小岚

(72) 发明人 韩汇泉 周小岚

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

专利代理师 李敏春 郑霞

(51) Int.Cl.

A61K 38/18 (2006.01)

权利要求书2页 说明书53页

序列表61页 附图10页

(54) 发明名称

肿瘤坏死因子- α 和转化生长因子- β 的双功能拮抗剂及其用途

(57) 摘要

本发明公开内容提供了包含至少一个TNF- α 结合结构域和至少一个TNF- β 结合结构域的新颖的双功能拮抗多肽,其非常能够并行地隔离TNF- α 和TNF- β 。还提供了这样的双功能多肽拮抗剂的药物组合物及其用于治疗各种复杂疾病状况的用途,这些疾病状况的发病机制涉及激活TNF- α 介导的NF- κ B信号传导途径和TGF- β 介导的Smad2/3信号传导途径两者。

TNF α 结合多肽 (融合配偶体A)	接头	TGF β 结合多肽 (融合配偶体B)
-------------------------------	----	------------------------------

1. 一种分离的双功能拮抗剂分子,所述分离的双功能拮抗剂分子包含特异性结合TNF配体的第一抗原结合分子和特异性结合TGF- β 配体的第二抗原结合分子,其中所述双功能拮抗剂分子以有效方式同时中和TNF信号传导和TGF- β 信号传导。

2. 根据权利要求1所述的分离的双功能拮抗剂分子,其中所述第一抗原结合分子特异性结合TNF配体,所述TNF配体选自由包含SEQ ID NO:1-5中列出的氨基酸序列的TNF配体组成的组,并且其中所述第二抗原结合分子特异性结合TGF- β 配体,所述TGF- β 配体选自由包含SEQ ID NO:6-9中列出的氨基酸序列的TGF- β 配体组成的组。

3. 根据权利要求1至2中任一项所述的分离的双功能拮抗剂分子,其中特异性结合TNF- α 配体的所述第一抗原结合分子(“TNF- α 结合多肽”)选自由以下组成的组:抗TNF- α 抗体、抗TNF- α 抗体的片段、野生型TNFR1和TNFR2细胞外结构域(ECD)、修饰的TNFR1和TNFR2细胞外结构域和噬菌体展示衍生的靶向TNF- α 配体的多肽;并且其中特异性结合TGF- β 配体的所述第二抗原结合分子(“TGF- β 结合多肽”)选自由以下组成的组:抗TGF- β 抗体、抗TGF- β 抗体的片段、野生型TGF- β 2型受体(包括TGF β RIIA和TGF β RIIB)细胞外结构域(ECD)、修饰的TGF β RIIA和TGF β RIIB细胞外结构域和噬菌体展示衍生的靶向TGF- β 配体的拮抗多肽。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的分离的双功能拮抗剂分子,其中所述TNF结合多肽选自包含SEQ ID NO:1-5中列出的氨基酸序列的多肽的组,并且所述TGF- β 结合多肽选自包含SEQ ID NO:6-9中列出的氨基酸序列的多肽的组。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的分离的双功能拮抗剂分子,其中所述TNF结合多肽包括分离的抗TNF抗体或其抗原结合片段,并且其中所述TGF- β 结合多肽包括分离的抗TGF- β 抗体或其抗原结合片段。

6. 根据权利要求5所述的分离的双功能拮抗剂分子,其中所述分离的抗TNF抗体或其抗原结合片段和分离的抗TGF- β 抗体或其抗原结合片段选自由以下组成的组:单克隆Ab(mAb)、多克隆Ab、Ab片段(例如,Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fc等)、嵌合Ab、微型-Ab或结构域Ab(dAb)、双重特异性Ab、双特异性Ab、异源缀合Ab、单链Ab(SCA)、单链可变区片段(ScFv)、人源化Ab、完全人类Ab和包含具有所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白(Ig)分子的任何其他修饰构型。

7. 根据权利要求5-6中任一项所述的分离的双功能拮抗剂分子,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段选自由以下组成的组:完全人类抗体、人源化抗体和嵌合抗体。

8. 根据权利要求5-7中任一项所述的分离的双功能拮抗剂分子,其中所述TNF结合多肽是选自由以下组成的组的分离的抗体:包含SEQ ID NO:10中列出的重链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:11中列出的轻链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:10中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:11中列出的轻链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:14中列出的重链可变区氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:15中列出的轻链可变区氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:14中列出的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:15中列出的轻链可变区氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:18中列出的重链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:19中列出的轻链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:18中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:19中列出的轻链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:22中列出的重链可变区氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:23中列出的轻链可变区氨基酸序列的抗体;以及包含SEQ ID NO:22中列出的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:23中列出的轻链可变区氨基酸序列的

抗体。

9. 根据权利要求5-8中任一项所述的分离的双功能拮抗剂分子,其中所述TGF- β 结合多肽是选自由以下组成的组的分离的抗体:包含SEQ ID NO:26中列出的重链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:27中列出的轻链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:26中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:27中列出的轻链氨基酸序列的抗体。

10. 根据权利要求1-2中任一项所述的分离的双功能拮抗剂分子,其中所述双功能分子选自由以下组成的组:包含SEQ ID NO:30中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:11中列出的轻链氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:31中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:11中列出的轻链氨基酸序列的双功能分子;以及包含SEQ ID NO:10中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:11中列出的轻链氨基酸序列的双功能分子。

11. 根据权利要求1-2中任一项所述的分离的双功能拮抗剂分子,其中所述双功能分子选自由以下组成的组:包含SEQ ID NO:32中列出的氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:33中列出的氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:34中列出的氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:35中列出的氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:36中列出的氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:37中列出的氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:39中列出的氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列的双功能分子;以及包含SEQ ID NO:41中列出的氨基酸序列的双功能分子。

12. 一种药物组合物,所述药物组合物包含与药学上可接受的运载体混合的治疗有效量的权利要求1-11中任一项所述的双功能拮抗剂分子。

13. 一种治疗或预防发病机制涉及激活TNF- α 介导的NF- κ B信号传导途径和TGF- β 介导的Smad2/3信号传导途径两者的疾病状况的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求12所述的组合物。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述疾病状况选自由以下组成的组:血液紊乱、无效红细胞生成、贫血、全血细胞减少、骨髓增生异常综合征;纤维化疾病:NASH、肝纤维化、肺纤维化、肾纤维化、多囊肾病、心脏纤维化、肌纤维化、骨髓纤维化、皮肤纤维化、眼的纤维化、手的纤维化、多发性骨髓瘤、急性髓性白血病、黑色素瘤、肌营养不良、脊髓性肌萎缩、脊髓损伤、中风、伤害性疼痛、神经性疼痛、肌少症、癌症恶病质、神经性厌食症、骨转移、骨质疏松、骨折、骨质减少、骨质疏松、肺高压、肺动脉高压、心肌梗死、心力衰竭、胰岛素抗性、糖尿病性肾病、慢性肾病、类风湿性关节炎、炎性肠病、SARS-CoV、细胞因子风暴综合征、脓毒症、以及烧伤。

15. 一种分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含编码权利要求1-11中任一项所述的双功能拮抗剂分子的多核苷酸。

16. 一种重组载体,所述重组载体包含权利要求15所述的核酸分子。

17. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求13所述的重组载体。

18. 一种用于产生权利要求1-11中任一项所述的双功能拮抗剂分子的方法,所述方法包括以下步骤:a)用包含编码所述双功能拮抗剂分子的多核苷酸的载体转化宿主细胞,b)在适合于表达所述双功能拮抗剂分子的条件培养所述宿主细胞,和c)从培养物回收所述双功能拮抗剂分子。

肿瘤坏死因子- α 和转化生长因子- β 的双功能拮抗剂及其用途

[0001] 相关专利申请

[0002] 本申请要求于2020年10月23日提交的美国临时申请第63/104,850号的权益,所述临时申请通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0003] 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 介导NF- κ B信号传导,并在各种生理和病理过程中起重要作用,所述过程包括细胞增殖、分化、凋亡以及调节免疫应答和诱导炎症。TNF通过两种受体即TNFR1 (TNF受体-1) 和TNFR2 (TNF受体-2) 发挥作用。TNF- α 在炎症应答、程序性细胞死亡和组织坏死中起关键作用。TNF- α 信号传导增加与许多炎性疾病,包括类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、克罗恩病和银屑病有关,并且抗TNF疗法,诸如阿达木单抗(adalimumab)、英夫利昔单抗(infliximab) 和依那西普(etanercept) 已被示出在治疗这样的炎性疾病中非常有效。TNF- α 水平升高和TNF- α 信号传导增加也与许多其他疾病状态,包括贫血、白血病、多发性骨髓瘤、纤维化、高血压、肌肉萎缩(muscle wasting)、骨损失、神经退行性变、脓毒症、纤维化、疼痛、慢性肾病、肝病和心力衰竭的发病机制和进展有关。

[0004] 转化生长因子- β (TGF- β), 包括TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3,通过结合和激活细胞表面上的高亲和力受体TGF β RII和TGF β RIIB来介导Smad2/3信号传导。TGF- β 在宽范围的生物学活性,包括免疫功能、细胞增殖和分化、上皮-间充质转化、纤维生成、造血、肌生成和骨重塑的调节中起着关键作用。TGF- β 水平升高和因此增加的Smad2/3信号传导与许多疾病状况,包括癌症、贫血、骨转移、骨损失、纤维化、疼痛、肌肉损失、胰岛素抗性、慢性肾病、肝病和心血管疾病的发病机制和进展有关。

[0005] 越来越多的证据指示,许多复杂的紊乱涉及并行地激活TNF- α 介导的NF- κ B信号传导途径和TGF- β 介导的Smad2/3信号传导途径,它们的活性促进发病机制和进展。这样的复杂紊乱的实例包括某些血液学紊乱诸如难治性贫血和骨髓增生异常综合征,心血管疾病诸如肺高压和充血性心力衰竭,骨紊乱诸如骨转移和骨折,器官衰竭诸如肾、肝或骨髓衰竭,以及纤维化疾病诸如非酒精性脂肪性肝炎、肝硬化和肺纤维化,以及疼痛诸如伤害性或神经性疼痛。

[0006] 目前对这些复杂紊乱的治疗选择是有限的。由于在这些紊乱中涉及多于一种疾病信号传导机制,目前可用的设计为靶向单一疾病机制的疗法通常具有差的效力和低的响应率。因为TNF- α -NF- κ B信号传导途径和TGF- β -Smad2/3信号传导途径两者都与疾病的发病机制和进展密切相关,因此开发能够并行地抑制这两种信号传导途径的新颖的双功能拮抗显然有重要意义。

[0007] 发明的公开内容

[0008] 在一方面,本发明提供了新颖的基于多肽的双功能拮抗剂分子,其被特别设计为以有效方式同时中和TNF- α 信号传导和TGF- β 信号传导。在各种实施方案中,双功能拮抗剂分子被设计为如图1中描绘的。在各种实施方案中,双功能拮抗剂分子被设计为如图2中描绘的。在各种实施方案中,双功能拮抗剂分子被设计为如图3中描绘的。

[0009] 在各种实施方案中,双功能拮抗剂分子是包含特异性结合TNF- α 配体的第一抗原结合分子(“TNF- α 结合多肽”)和特异性结合TGF- β 配体的第二抗原结合分子(“TGF- β 结合多肽”)的双功能分子。在各种实施方案中,“TNF- α 结合多肽”选自由以下组成的组:抗TNF抗体、抗TNF抗体的片段、野生型TNFR1和TNFR2细胞外结构域(ECD)、修饰的TNFR1和TNFR2细胞外结构域和噬菌体展示衍生的靶向TNF- α 配体的多肽,并且“TNF- β 结合多肽”选自由以下组成的组:抗TGF- β 抗体、抗TGF- β 抗体的片段、野生型TGF- β 2型受体(包括TGF β RIIA和TGF β RIIB)细胞外结构域(ECD)、修饰的TGF β RIIA和TGF β RIIB细胞外结构域和噬菌体展示衍生的靶向TGF- β 配体的拮抗多肽。

[0010] 在各种实施方案中,双功能分子包含特异性结合TNF- α 的分离的抗体或其抗原结合片段以及特异性结合TGF- β 配体的分离的抗体或其抗原结合片段。在各种实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段选自由以下组成的组:单克隆Ab(mAb)、多克隆Ab、Ab片段(例如,Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fc等)、嵌合Ab、微型-Ab或结构域Ab(dAb)、双重特异性Ab、双特异性Ab、异源缀合Ab、单链Ab(SCA)、单链可变区片段(ScFv)、人源化Ab、完全人类Ab和包含具有所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白(Ig)分子的任何其他修饰构型。在各种实施方案中,双功能分子包含分离的抗体或其抗原结合片段,其选自由以下组成的组:完全人类抗体、人源化抗体和嵌合抗体。

[0011] 在各种实施方案中,第一抗原结合分子特异性结合包含SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的TNF配体。在各种实施方案中,第一抗原结合分子特异性结合包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的TNF配体。在各种实施方案中,第一抗原结合分子特异性结合包含SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列的TNF配体。在各种实施方案中,第一抗原结合分子特异性结合包含SEQ ID NO:4中列出的氨基酸序列的TNF配体。在各种实施方案中,第一抗原结合分子特异性结合包含SEQ ID NO:5中列出的氨基酸序列的TNF配体。

[0012] 在各种实施方案中,第二抗原结合分子特异性结合包含SEQ ID NO:6中列出的氨基酸序列的TGF- β 配体。在各种实施方案中,第二抗原结合分子特异性结合包含SEQ ID NO:7中列出的氨基酸序列的TGF- β 配体。在各种实施方案中,第二抗原结合分子特异性结合包含SEQ ID NO:8中列出的氨基酸序列的TGF- β 配体。在各种实施方案中,第二抗原结合分子特异性结合包含SEQ ID NO:9中列出的氨基酸序列的TGF- β 配体。

[0013] 在各种实施方案中,特异性结合TNF- α 配体的第一抗原结合分子是分离的抗体,其选自由以下组成的组:包含SEQ ID NO:10中列出的重链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:11中列出的轻链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:10中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:11中列出的轻链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:12中列出的重链可变区氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:13中列出的轻链可变区氨基酸序列的抗体;以及包含SEQ ID NO:12中列出的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:13中列出的轻链可变区氨基酸序列的抗体。

[0014] 在各种实施方案中,特异性结合TNF- α 配体的第一抗原结合分子是分离的抗体,其选自由以下组成的组:包含SEQ ID NO:14中列出的重链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:15中列出的轻链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:14中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:15中列出的轻链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:16中列出的重链可变区氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:17中列出的轻链可变区氨基酸序列的抗体;以及包含SEQ ID

NO:16中列出的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:17中列出的轻链可变区氨基酸序列的抗体。

[0015] 在各种实施方案中,特异性结合TNF- α 配体的第一抗原结合分子是分离的抗体,其选自自由以下组成的组:包含SEQ ID NO:18中列出的重链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:19中列出的轻链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:18中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:19中列出的轻链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:20中列出的重链可变区氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:21中列出的轻链可变区氨基酸序列的抗体;以及包含SEQ ID NO:20中列出的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:21中列出的轻链可变区氨基酸序列的抗体。

[0016] 在各种实施方案中,特异性结合TNF- α 配体的第一抗原结合分子是分离的抗体,其选自自由以下组成的组:包含SEQ ID NO:22中列出的重链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:23中列出的轻链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:22中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:23中列出的轻链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:24中列出的重链可变区氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:25中列出的轻链可变区氨基酸序列的抗体;以及包含SEQ ID NO:24中列出的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:25中列出的轻链可变区氨基酸序列的抗体。

[0017] 在各种实施方案中,特异性结合TGF- β 配体的第二抗原结合分子是分离的抗体,其选自自由以下组成的组:包含SEQ ID NO:26中列出的重链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:27中列出的轻链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:26中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:27中列出的轻链氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:28中列出的重链可变区氨基酸序列的抗体;包含SEQ ID NO:29中列出的轻链可变区氨基酸序列的抗体;以及包含SEQ ID NO:28中列出的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:29中列出的轻链可变区氨基酸序列的抗体。

[0018] 在各种实施方案中,双功能拮抗剂分子是包含特异性结合TNF- α 配体的第一抗原结合分子和特异性结合TGF- β 配体的第二抗原结合分子的双功能分子,其中TNF- α 配体结合分子选自包含SEQ ID NO:1-5和10-25中列出的氨基酸序列的多肽的组,并且TGF- β 配体结合分子选自包含SEQ ID NO:6-9和26-29中列出的氨基酸序列的多肽的组。

[0019] 在各种实施方案中,双功能拮抗剂分子是包含特异性结合TNF- α 配体的第一抗原结合分子和特异性结合TGF- β 配体的第二抗原结合分子的双功能分子,其中双功能分子选自自由以下组成的组:包含SEQ ID NO:30中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:11中列出的轻链氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:31中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:11中列出的轻链氨基酸序列的双功能分子;以及包含SEQ ID NO:10中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:11中列出的轻链氨基酸序列的双功能分子。

[0020] 在各种实施方案中,双功能拮抗剂分子是包含特异性结合TNF- α 配体的第一抗原结合分子和特异性结合TGF- β 配体的第二抗原结合分子的双功能分子,其中双功能分子选自自由以下组成的组:包含SEQ ID NO:32中列出的氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:33中列出的氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:34中列出的氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:35中列出的氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:36中列出的氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:37中列出的氨基酸序列的双功能分子;包含

SEQ ID NO:38中列出的氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:39中列出的氨基酸序列的双功能分子;包含SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列的双功能分子;以及包含SEQ ID NO:41中列出的氨基酸序列的双功能分子。

[0021] 在另一方面,本公开内容提供了包含编码本公开内容的双功能拮抗剂分子的多核苷酸的分离的核酸分子。在各种实施方案中,分离的核酸分子包含本文描述的多核苷酸,并且还包含编码至少一种本文描述的异源蛋白的多核苷酸。在各种实施方案中,核酸分子还包含编码本文描述的接头或铰链接头的多核苷酸。

[0022] 在另一方面,本公开内容提供了包含本文描述的核酸的载体。在各种实施方案中,载体是表达载体。在另一方面,本公开内容提供了包含本公开内容的核酸的分离的细胞。在各种实施方案中,细胞是包含本公开内容的表达载体的宿主细胞。在另一方面,制备双功能拮抗剂分子的方法通过在促进表达蛋白或多肽的条件下培养宿主细胞来提供。

[0023] 在另一方面,提供了用于产生如本文描述的双功能拮抗剂分子的方法,如本文描述的双功能拮抗剂分子包含特异性结合TNF- α 的第一抗原结合分子和特异性结合TGF- β 的第二抗原结合分子,该方法包括以下步骤:a)用包含编码所述双功能拮抗剂分子的多核苷酸的载体转化宿主细胞,b)在适合于表达所述双功能拮抗剂分子的条件下培养宿主细胞,和c)从培养物回收所述双功能拮抗剂分子。本发明还包括通过本发明的方法产生的双功能拮抗剂分子。

[0024] 在另一方面,本公开内容提供了药物组合物,其包含与药学上可接受的运载体混合的分离的双功能拮抗剂分子。

[0025] 在另一方面,本公开内容提供了治疗或预防各种复杂疾病状况的方法,这些疾病状况的发病机制涉及激活TNF- α 介导的NF- κ B信号传导途径和TGF- β 介导的Smad2/3信号传导途径两者。

[0026] 在各种实施方案中,本发明的新颖的双功能拮抗剂分子可广泛应用于治疗包括但不限于以下状况的各种紊乱:血液紊乱:无效红细胞生成、贫血、全血细胞减少、骨髓增生异常综合征;纤维化疾病:NASH(非酒精性脂肪性肝炎)、肝纤维化、肺纤维化、肾纤维化、多囊肾病、心脏纤维化、肌纤维化、骨髓纤维化、皮肤纤维化、手的纤维化和眼的纤维化;癌症:多发性骨髓瘤、急性髓性白血病、黑色素瘤;与检查点抑制剂诸如抗PD1、抗PDL1和抗CTL4抗体或嵌合抗原受体(CAR)-T细胞疗法组合的癌症治疗;神经肌肉疾病:肌营养不良、脊髓性肌萎缩、脊髓损伤、中风;疼痛:伤害性疼痛、神经病理性疼痛;萎缩性紊乱(wasting disorders):肌少症、癌症恶病质、神经性厌食症;骨紊乱:骨转移、骨质疏松、骨折、骨质减少、骨质疏松;心血管疾病:肺高压、肺动脉高压、心肌梗塞、心力衰竭;代谢紊乱:胰岛素抗性、糖尿病性肾病、慢性肾病;炎症性疾病:类风湿性关节炎、炎症肠病;感染:SARS-CoV、细胞因子风暴综合征、脓毒症;以及外伤:烧伤。

[0027] 在另一方面,本公开内容提供了双功能拮抗剂分子用于制备用于治疗如本文描述的任何紊乱或状况的药物的用途。

[0028] 附图简述

[0029] 图1描绘了本发明的代表性双功能拮抗剂分子。如该示意图所示,“TNF结合多肽”是指能够结合TNF- α 的任何多肽,其包括但不限于抗TNF抗体、抗TNF抗体的片段、野生型TNFR1和TNFR2细胞外结构域(ECD)、修饰的TNFR1和TNFR2细胞外结构域和噬菌体展示衍生

的靶向TNF- α 的多肽。如该示意图所示,“TGF- β 结合多肽”是指能够结合TGF- β (即,TGF- β 1、TGF- β 2或TGF- β 3)的任何多肽,其包括但不限于抗TGF- β 抗体、抗TGF- β 抗体的片段、野生型TGF- β 2型受体(包括TGF β RIIA和TGF β RIIB)的细胞外结构域(ECD)、修饰的TGF β RIIA和TGF β RIIB细胞外结构域和噬菌体展示衍生的能够结合和中和TGF- β 的拮抗多肽。如该示意图所示,“接头”是指用于融合不同多肽融合配偶体以产生双特异性和多特异性分子的各种方法,其包括但不限于使用任何肽接头或化学接头。

[0030] 图2描绘了本发明的两种代表性双功能拮抗剂分子,其中:(A)TNF- α 结合多肽是抗TNF- α 抗体,并且TGF- β 结合多肽是通过接头附接到抗TNF- α 抗体的重链CH3的TGF- β 受体ECD;或(B)TGF- β 结合多肽是抗TGF- β 抗体,并且TNF- α 结合多肽是通过接头附接到抗TGF- β 抗体的重链CH3的TNF受体ECD。在可选实施方案中,TGF- β 受体ECD(或TNF受体ECD)通过在抗体的重链可变区(VH)处的接头附接到抗TNF- α 抗体(或抗TGF- β 抗体)。在可选实施方案中,TGF- β 受体ECD(或TNF受体ECD)通过在抗体的轻链可变区(VL)处的接头附接到抗TNF- α 抗体(或抗TGF- β 抗体)。在可选实施方案中,TGF- β 受体ECD(或TNF受体ECD)通过在抗体的内部位点处而不是在重链CH3、VL或VH位点处的接头附接到抗TNF- α 抗体(或抗TGF- β 抗体)。

[0031] 图3描绘了呈双特异性抗体形式的本发明的代表性双功能拮抗剂分子,其包含(A)源自抗TGF- β 抗体的可变区(VH和VL)和(B)抗TNF抗体的可变区(VH和VL)。应注意,尽管图3中所示的双特异性抗体以一种特定的构型示出,但是包含来自抗TGF- β 和抗TNF抗体二者的可变区的双特异性抗体可以由本领域技术人员以各种各样的构型构建。

[0032] 图4描绘了示出双功能拮抗剂分子A-119在基于细胞的测定中有效中和TNF- α 、TGF- β 1和TGF- β 3的线图。使用Prism软件(GraphPad Software)计算基于细胞的TNF- α 中和及TGF- β 中和的IC₅₀值并作图。

[0033] 图5描绘了示出双功能拮抗剂分子A-120在基于细胞的测定中有效中和TNF- α 、TGF- β 1和TGF- β 3的线图。使用Prism软件(GraphPad Software)计算基于细胞的TNF- α 中和及TGF- β 中和的IC₅₀值并作图。

[0034] 图6描绘了不同处理条件下人类原发性肺动脉平滑肌细胞(PASMC)的细胞增殖和细胞形态的变化,示出双功能拮抗剂A120以高度有效的方式防止TNF α 诱导的和TGF- β 1诱导的PASMC的增生和肥大。

[0035] 图7描绘了示出在TNF- α 和TGF- β 1升高的背景下,A120在防止PASMC的增生和肥大两方面比抗TNF抗体或TGFRII-Fc更有效的条形图。使用ImageJ软件进行PASMC的形态分析。

[0036] 图8描绘了H&E染色的肺切片的组织学图像和Ashcraft评分的条形图,示出A120在减少博莱霉素诱导的肺纤维化小鼠的肺组织损伤和纤维化方面比抗TNF抗体或TGFRII-Fc更有效。

[0037] 图9描绘了Masson三色染色的肺切片的组织学图像和胶原沉积区域的定量分析的条形图,示出在博莱霉素处理的小鼠中,A120比抗TNF抗体或TGFRII-Fc更有效地减弱肺纤维化。

[0038] 图10描绘了肺切片中 α SMA染色的组织学图像,示出A120在防止博莱霉素处理的小鼠的肺组织中的 α SMA诱导方面比抗TNF抗体或TGFRII-Fc更有效。用抗 α SMA抗体和HRP标记的二抗对肺切片进行免疫化学染色。

[0039] 实现本公开内容的方式

[0040] 定义

[0041] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。在各种实施方案中,“肽”、“多肽”和“蛋白”为其 α 碳原子通过肽键连接的氨基酸链。因此链的一个末尾(氨基末端)的末端氨基酸具有游离氨基基团,而链的另一个末尾(羧基末端)的末端氨基酸具有游离羧基基团。如本文使用的,术语“氨基末端”(缩写为N-末端)指肽的氨基末端的氨基酸上的游离 α -氨基基团,或该肽中任何其他位置的氨基酸的 α -氨基基团(当参与肽键时为亚氨基基团)。类似地,术语“羧基末端”指肽的羧基末端上的游离羧基基团,或该肽中任何其他位置的氨基酸的羧基基团。肽还包括基本上任何多氨基酸,包括但不限于肽模拟物(peptide mimetic),诸如通过醚键而非酰胺键连接的氨基酸。

[0042] 本公开内容的多肽包括已经以任何方式和出于任何原因被修饰为例如以下的多肽:(1)降低对蛋白水解的敏感性,(2)降低对氧化的敏感性,(3)改变形成蛋白复合体的结合亲和力,(4)改变结合亲和力,和(5)赋予或改变其他物理化学特性或功能特性。

[0043] 如本文使用的氨基酸“取代”是指用不同的氨基酸替换多肽中亲本多肽序列的特定位置处的一个氨基酸。氨基酸取代可以使用本领域熟知的遗传方法或化学方法来产生。例如,单氨基酸取代或多氨基酸取代(例如,保守氨基酸取代)可以在天然存在的序列中进行(例如,在形成分子间接触的结构域以外的多肽部分中)。“保守氨基酸取代”指多肽中氨基酸被功能上相似的氨基酸取代。以下六组各自包含互相为保守取代的氨基酸:

[0044] 1) 丙氨酸(A)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T)

[0045] 2) 天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)

[0046] 3) 天冬酰胺(N)和谷氨酰胺(Q)

[0047] 4) 精氨酸(R)和赖氨酸(K)

[0048] 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)

[0049] 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)

[0050] “非保守氨基酸取代”指这些类别中的一个的成员取代为来自另一个类别的成员。在进行这样的改变时,根据各种实施方案,可以考虑氨基酸的亲水指数(hydrophobic index)。基于氨基酸的疏水性和荷电性质,每个氨基酸被指定亲水指数。它们是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9)和精氨酸(-4.5)。

[0051] 本领域了解亲水氨基酸指数在赋予蛋白相互作用的生物功能中的重要性(参见例如,Kyte等人,1982,J.Mol.Biol.157:105-131)。已知,某些氨基酸可以被具有相似亲水指数或评分的其他氨基酸取代,并且仍保持相似的生物活性。在基于亲水指数进行改变时,在各种实施方案中,包括亲水指数在 ± 2 内的氨基酸的取代。在各种实施方案中,包括在 ± 1 内的那些,且在各种实施方案中,包括在 ± 0.5 内的那些。

[0052] 本领域还理解,可以基于亲水性有效地进行相似氨基酸的取代,特别是当从而产生的生物功能蛋白或肽被意图用于在如本文公开的免疫学实施方案中使用。在各种实施方案中,蛋白的最大局部平均亲水性(如由其相邻氨基酸的亲水性决定的)与其免疫原性和抗原性,即,与蛋白的生物学特性相关。

[0053] 以下亲水性值被指定至这些氨基酸残基:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0,+0.1);谷氨酸(+3.0,+0.1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5,+0.1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5)和色氨酸(-3.4)。在基于相似亲水性值进行改变时,在各种实施方案中,包括亲水性值在 ± 2 内的氨基酸的取代,在各种实施方案中,包括在 ± 1 内的那些,且在各种实施方案中,包括在 ± 0.5 内的那些。

[0054] 示例性的氨基酸取代在表1中列出。

[0055] 表1

原始残基	示例性取代	优选的取代
Ala	Val、Leu、Ile	Val
Arg	Lys、Gln、Asn	Lys
Asn	Gln	
Asp	Glu	
Cys	Ser、Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro、Ala	Ala
His	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
Ile	Leu、Val、Met、Ala、Phe、 正亮氨酸	Leu
[0056] Leu	正亮氨酸、Ile、Val、Met、 Ala、Phe	Ile
Lys	Arg、1,4 二氨基-丁酸、Gln、 Asn	Arg
Met	Leu、Phe、Ile	Leu
Phe	Leu、Val、Ile、Ala、Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr、Ala、Cys	Thr
Thr	Ser	
Trp	Tyr、Phe	Tyr
Tyr	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
Val	Ile、Met、Leu、Phe、Ala、 正亮氨酸	Leu

[0057] 技术人员将能够使用公知技术确定本文列出的适当的多肽变体。在各种实施方案中,本领域技术人员可通过靶向被认为对于活性不重要的区来鉴定可被改变而不破坏活性的分子的适合区域。在其他实施方案中,技术人员可以鉴定在相似多肽间保守的分子的残基和部分。在另外的实施方案中,即使可能对生物活性或对结构重要的区域也可以经历保守氨基酸取代,而不破坏生物活性或不会不利地影响多肽结构。

[0058] 另外,本领域技术人员可以回顾鉴定相似多肽中对活性或结构重要的残基的结构-功能研究。鉴于这样的比较,技术人员可以预测相应于相似多肽中对活性或结构重要的氨基酸残基的多肽中氨基酸残基的重要性。本领域技术人员可以选择对这样的预测的重要氨基酸残基进行化学上相似的氨基酸取代。

[0059] 本领域技术人员还可以在相似多肽中分析三维结构和与该结构相关的氨基酸序列。鉴于这样的信息,本领域技术人员可以对于多肽的三维结构预测其氨基酸残基的排列。在各种实施方案中,本领域技术人员可选择不对预测在多肽表面上的氨基酸残基进行根本改变(radical changes),因为这样的残基可能参与与其他分子的重要相互作用。并且,本领域技术人员可以生成在每个期望的氨基酸残基处包含单氨基酸取代的测试变体。然后可使用本领域技术人员已知的活性测定筛选变体。这样的变体可被用于收集关于合适变体的信息。例如,如果人们发现,特定氨基酸残基的改变导致受损的、不期望地减少的或不适合的活性,则可以避免具有这样的改变的变体。换句话说,基于从这样的常规实验收集的信息,本领域技术人员可以容易地确定应避免在该处单独的或与其他突变组合的进一步取代的氨基酸。

[0060] 本文中使用的术语“多肽片段”和“截短的多肽”指与相应全长蛋白相比具有氨基末端缺失和/或羧基末端缺失的多肽。在各种实施方案中,片段的长度可以为,例如至少5个、至少10个、至少25个、至少50个、至少100个、至少150个、至少200个、至少250个、至少300个、至少350个、至少400个、至少450个、至少500个、至少600个、至少700个、至少800个、至少900个或至少1000个氨基酸。在各种实施方案中,片段的长度还可以为,例如最多1000个、最多900个、最多800个、最多700个、最多600个、最多500个、最多450个、最多400个、最多350个、最多300个、最多250个、最多200个、最多150个、最多100个、最多50个、最多25个、最多10个或最多5个氨基酸。片段还可以在其任一个或两个末端包含一个或更多个另外的氨基酸,例如,来自不同天然存在的蛋白的氨基酸序列(例如,Fc或亮氨酸拉链结构域)或人工氨基酸序列(例如,人工接头序列)。

[0061] 本文使用的术语“多肽变体”、“杂合多肽”和“多肽突变体”指包含以下氨基酸序列的多肽,其中相对于另一个多肽序列,一个或更多个氨基酸残基被插入至该氨基酸序列、从其中缺失和/或被取代到该氨基酸序列中。在各种实施方案中,待被插入、缺失或取代的氨基酸残基的数量可以是例如,至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少10个、至少25个、至少50个、至少75个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个、至少200个、至少225个、至少250个、至少275个、至少300个、至少350个、至少400个、至少450个或至少500个氨基酸的长度。本公开内容的杂合体包括融合蛋白。

[0062] 多肽的“衍生物”是被化学修饰的多肽,所述化学修饰例如缀合至另一个化学部分诸如例如聚乙二醇、白蛋白(例如人类血清白蛋白),磷酸化和糖基化。

[0063] 本文中术语“%序列同一性”与术语“%同一性”可互换使用并且指当使用序列比对程序比对时,两个或更多个肽序列之间的氨基酸序列同一性的水平或两个或更多个核苷酸序列之间的核苷酸序列同一性的水平。例如,如本文使用的,80%同一性与由定义的算法确定的80%序列同一性指相同的事物,并且指的是,给定序列与另一个序列的另一长度至少80%相同。在各种实施方案中,%同一性选自例如,与给定序列至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%或更大的序列同一性。在各种实施方案中,%同一性在例如约60%至约70%、约70%至约80%、约80%至约85%、约85%至约90%、约90%至约95%或约95%至约99%的范围内。

[0064] 本文中术语“%序列同源性”与术语“%同源性”可互换使用并且指当使用序列比对程序比对时,两个或更多个肽序列之间的氨基酸序列同源性的水平或两个或更多个核苷

酸序列之间的核苷酸序列同源性的水平。例如,如本文使用的,80%同源性与由定义的算法确定的80%序列同源性指相同的事物,并且相应地,给定序列的同系物相对于给定序列的长度具有大于80%的序列同源性。在各种实施方案中,%同源性选自例如,与给定序列至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%或更大的序列同源性。在各种实施方案中,%同源性在例如约60%至约70%、约70%至约80%、约80%至约85%、约85%至约90%、约90%至约95%或约95%至约99%的范围内。

[0065] 可以被用于确定两个序列之间的同一性的示例性计算机程序包括但不限于, BLAST程序的套件,例如BLASTN、BLASTX和TBLASTX、BLASTP以及TBLASTN,其在互联网在NCBI的网站上可公开获得。还参见Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-10,1990(特别参考公开的默认设置,即参数 $w=4$ 、 $t=17$)和Altschul等人,Nucleic Acids Res.,25:3389-3402,1997。当相对于GenBank蛋白序列和其他公开数据库中的氨基酸序列评价给定氨基酸序列时,通常使用BLASTP程序进行序列检索。BLASTX程序优选用于相对于GenBank蛋白序列和其他公开数据库中的氨基酸序列检索在所有阅读框已经被翻译的核酸序列。使用开放缺口罚分11.0和延伸缺口罚分1.0的默认参数并使用BLOSUM-62矩阵运行BLASTP和BLASTX。

[0066] 除了计算序列同一性百分比以外,BLAST算法还进行两个序列之间相似性的统计分析(参见例如,Karlin&Altschul,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA,90:5873-5787,1993)。由BLAST算法提供的相似性的一个量度是最小总概率($P(N)$),所述最小总概率提供两个核苷酸序列或氨基酸序列之间的匹配偶然发生的概率的指示。例如,如果在测试核酸与参考核酸的比较中,最小总概率为,例如小于约0.1、小于约0.01或小于约0.001,该核酸被认为与参考序列相似。

[0067] 如本文使用的术语“修饰”是指对肽骨架(例如氨基酸序列)的任何操作或对多肽的翻译后修饰(例如糖基化)。

[0068] 如本文使用的术语“抗原结合分子”在其最广泛的意义上是指特异性结合抗原决定簇的分子。抗原结合分子的实例是抗体、抗体片段和支架抗原结合蛋白。与参考分子“结合相同表位的抗原结合分子”是指在竞争性测定中阻断参考分子与其抗原的结合达50%或更多的抗原结合分子,并且与之相对,参考分子在竞争性测定中阻断抗原结合分子与其抗原的结合达50%或更多。

[0069] 如本文使用的,术语“抗原结合位点”是指抗原结合分子中特异性结合抗原决定簇的部分。更特定地,术语“抗原结合位点”是指抗体中包含特异性结合抗原的一部分或全部并与之互补的区域的部分。当抗原很大时,抗原结合分子可以只与抗原的特定部分结合,该部分称为表位。抗原结合位点可以由例如一个或更多个可变结构域(也称为可变区)提供。优选地,抗原结合位点包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)。

[0070] 如本文使用的,术语“抗原决定簇”与“抗原”和“表位”同义,并且是指多肽大分子上抗原结合部分与其结合形成抗原结合部分-抗原复合物的位点(例如,氨基酸的连续区段或由非连续氨基酸的不同区域组成的构象构型)。可以在例如肿瘤细胞表面、病毒感染细胞表面、其他病变细胞表面、免疫细胞表面上、在血清中(游离的)和/或细胞外基质(ECM)中发现有用的抗原决定簇。本文中用作抗原的蛋白可以是来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物诸如灵长类动物(例如,人类)和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠))的任何天然形式的蛋白,除非另有说明。在各种实施方案中,抗原是人类蛋白。

[0071] 本文中的术语“抗体”是在最广泛的意义上使用的,并且包含各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、单特异性和多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出期望的抗原结合活性。

[0072] 术语“嵌合”抗体是指其中重链和/或轻链的一部分源自特定来源或物种,而重链和/或轻链的剩余部分源自不同来源或物种的抗体。

[0073] “人源化”抗体是指包含来自非人类HVR的氨基酸残基和来自人类FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包含至少一个且通常两个可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部HVR(例如,CDR)对应于非人类抗体的HVR,并且全部或基本上全部FR对应于人类抗体的FR。人源化抗体可以任选地包括源自人类抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体的“人源化形式”,例如非人类抗体,是指已经经历人源化的抗体。本发明包含的“人源化抗体”的其他形式是其中恒定区已经从原始抗体的恒定区被另外修饰或改变以产生根据本发明的特性,特别是关于C1q结合和/或Fc受体(FcR)结合的形式。

[0074] “人类抗体”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类或人类细胞产生的或利用人类抗体组库(repertoires)或其他人类抗体编码序列衍生自非人类来源的抗体的氨基酸序列。人类抗体的这一定义明确排除了包含非人类抗原结合残基的人源化抗体。

[0075] 如本文使用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体的群体获得的抗体,所述基本上同质的抗体的群体即构成该群体的个体抗体除了可能的变体抗体之外是相同的和/或结合相同的表位,所述可能的变体抗体例如包含天然存在的突变或在单克隆抗体制品的产生期间产生,这样的变体通常少量存在。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制品不同,单克隆抗体制品的每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。

[0076] 如本文使用的术语“单特异性”抗体表示具有一个或更多个结合位点,每个结合位点与相同抗原的相同表位结合的抗体。术语“双特异性”意指抗体能够特异性结合至少两个不同的抗原决定簇,例如两个结合位点,每个结合位点由一对抗体重链可变结构域(VH)和抗体轻链可变结构域(VL)形成,结合不同的抗原或同一抗原上的不同表位。这样的双特异性抗体是1+1形式。其他双特异性抗体形式是2+1形式(包含第一抗原或表位的两个结合位点和第二抗原或表位的一个结合位点)或2+2形式(包含第一抗原或表位的两个结合位点和第二抗原或表位的两个结合位点)。通常,双特异性抗体包含两个抗原结合位点,每个位点对不同的抗原决定簇是特异性的。

[0077] 如本申请中使用的术语“价”表示抗原结合分子中指定数量的结合位点的存在。因此,术语“二价”、“四价”和“六价”分别表示抗原结合分子中存在两个结合位点、四个结合位点和六个结合位点。根据本发明的双特异性抗体是至少“二价”的,并且可以是“三价”或“多价”(例如“四价”或“六价”)的。在各种实施方案中,本发明的抗体具有两个或更多个结合位点,并且是双特异性的。也就是说,即使在存在多于两个结合位点的情况下(即抗体是三价或多价的),抗体也可以是双特异性的。特别地,本发明涉及双特异性二价抗体,其对它们特异性结合的每种抗原具有一个结合位点。

[0078] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“整个抗体”在本文可互换地用于指具有与天然抗体结构基本相似的结构抗体。“天然抗体”是指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分

子。例如,天然IgG类抗体是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,包含二硫键结合的两条轻链和两条重链。从N-末端到C-末端,每条重链具有一个可变区(VH),也称为可变重结构域或重链可变结构域,然后是三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3),也称为重链恒定区。类似地,从N-末端到C-末端,每条轻链都有一个可变区(VL),也称为可变轻结构域或轻链可变结构域,然后是轻链恒定结构域(CL),也称为轻链恒定区。抗体的重链可以被指定为称为 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IgG)或 μ (IgM)的五种类型中的一种,其中一些可以进一步分为亚型,例如 $\gamma 1$ (IgG1)、 $\gamma 2$ (IgG2)、 $\gamma 3$ (IgG3)、 $\gamma 4$ (IgG4)、 $\alpha 1$ (IgA1)和 $\alpha 2$ (IgA2)。根据其恒定结构域的氨基酸序列,抗体的轻链可以被指定为称为 κ 和 λ 的两种类型中的一种。

[0079] “抗体片段”是指包含完整抗体的一部分、与完整抗体所结合的抗原结合的不同于完整抗体的分子。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体(diabodies)、三抗体(triabodies)、四抗体(tetrabodies)、cross-Fab片段;线性抗体;单链抗体分子(例如,scFv);由抗体片段和单结构域抗体形成的多特异性抗体。关于某些抗体片段的评述,参见Hudson等人,Nat Med 9,129-134(2003)。关于scFv片段的评述,参见例如Pluckthun,在The Pharmacology of Monoclonal Antibodies中,vol.113,Rosenburg和Moore编著,Springer-Verlag,New York,pp.269-315(1994);还参见WO 93/16185;和美国专利第5,571,894号和第5,587,458号。关于包含补救受体(salvage receptor)结合表位残基并具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,参见美国专利第5,869,046号。双抗体是可以是二价的或双特异性的具有两个抗原结合位点的抗体片段,参见例如EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat Med 9,129-134(2003);和Hollinger等人,Proc Natl Acad Sci USA 90,6444-6448(1993)。还在Hudson等人,Nat Med 9,129-134(2003)中描述了三抗体和四抗体。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,单结构域抗体是人类单结构域抗体(Domantis, Inc., Waltham, Mass.;参见例如美国专利第6,248,516B1号)。此外,抗体片段包含单链多肽,其具有VH结构域的特征,即能够与VL结构域一起组装,或具有VL结构域的特征,即能够与VH结构域一起组装为功能性抗原结合位点,并从而提供全长抗体的抗原结合特性。抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞(例如,大肠杆菌或噬菌体)产生制备,如本文描述的。

[0080] 完整抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,分别包含重链可变结构域和轻链可变结构域,以及还有轻链的恒定结构域和重链的第一个恒定结构域(CH1)。如本文使用的,术语“Fab片段”是指包含含有轻链(CL)的VL结构域和恒定结构域的轻链片段,以及重链的VH结构域和第一恒定结构域(CH1)的抗体片段。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在重链CH1结构域的羧基末端添加了一些残基(a few residues),包括来自抗体铰链区的一个或更多个半胱氨酸。Fab'-SH是其中恒定结构域的一个或更多个半胱氨酸残基带有游离巯基的Fab'片段。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原组合位点(antigen-combining sites)(两个Fab片段)和一部分Fc区域的F(ab')₂片段。

[0081] “单链Fab片段”或“scFab”是由抗体重链可变结构域(VH)、抗体恒定结构域1(CH1)、抗体轻链可变结构域(VL)、抗体轻链恒定结构域(CL)和接头组成的多肽,其中所述抗体结构域和所述接头在N-末端到C-末端方向具有以下顺序之一:a) VH-CH1-接头-VL-CL, b) VL-CL-接头-VH-CH1, c) VH-CL-接头-VL-CH1或d) VL-CH1-接头-VH-CL;并且其中所述接头

是至少30个氨基酸,优选32和50个之间的氨基酸的多肽。所述单链Fab片段通过CL结构域和CH1结构域之间的天然二硫键稳定化。此外,这些单链Fab分子可以通过插入半胱氨酸残基(例如,根据Kabat编号,可变重链中的位置44和可变轻链中的位置100)产生链间二硫键而进一步稳定化。

[0082] “单链可变片段(scFv)”是抗体重链(VH)和轻链(VL)可变区,由10个至约25个氨基酸的短接头肽连接的融合蛋白。该接头通常富含甘氨酸以获得柔性,以及富含丝氨酸或苏氨酸以获得溶解性,并且可以连接VH的N-末端和VL的C-末端,反之亦然。该蛋白保留了原始抗体的特异性,尽管去除了恒定区并引入了接头。scFv抗体例如在Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96中描述。此外,抗体片段包含单链多肽,其具有VH结构域的特征,即能够与VL结构域一起组装,或具有VL结构域的特征,即能够与VH结构域一起组装为功能性抗原结合分子,并从而提供全长抗体的抗原结合特性。

[0083] 本文的术语“Fc结构域”或“Fc区”用于定义抗体重链的包含至少一部分恒定区的C-末端区域。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。特别地,人类IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸到重链的羧基末端。然而,Fc区的C-末端赖氨酸(Lys447)可以存在,也可以不存在。重链的氨基酸序列总是带有C-末端赖氨酸,然而没有C-末端赖氨酸的变体也被包括在本发明中。

[0084] IgG Fc区包含IgG CH2和IgG CH3结构域。人类IgG Fc区的“CH2结构域”通常从约231位的氨基酸残基延伸到约340位的氨基酸残基。在一种实施方案中,糖类链被附接到CH2结构域。本文中的CH2结构域可以是天然序列CH2结构域或变体CH2结构域。“CH3结构域”包含Fc区中C-末端至CH2结构域的残基区段(即,从IgG的约341位的氨基酸残基延伸至约447位的氨基酸残基)。本文中的CH3区可以是天然序列CH3结构域或变体CH3结构域(例如,在其一条链中具有引入的“突起(protuberance)” (“knob”)并且在其另一条链中具有相应的引入的“空腔(cavity)” (“hole”)的CH3结构域;参见美国专利第5,821,333号,通过引用明确并入本文)。这样的变体CH3结构域可以用于促进如本文描述的两个不同的抗体重链的异源二聚体化。除非本文另有说明,否则Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号根据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991中描述的。

[0085] “knob-into-hole”技术在例如美国专利第5,731,168号;美国专利第7,695,936号;Ridgway等人, *Prot Eng* 9,617-621 (1996) 和Carter, *J Immunol Meth* 248,7-15 (2001) 中描述。通常,该方法包括在第一多肽的界面处引入突起 (“knob”) 和在第二多肽的界面处引入相应的空腔 (“hole”), 使得突起可以定位在空腔中,从而促进异源二聚体形成并阻碍同源二聚体形成。通过用较大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替换第一多肽界面的小氨基酸侧链来构建突起。通过用较小的氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)替换大氨基酸侧链,在第二多肽的界面上产生与突起相同或相似尺寸的补偿空腔。突起和空腔可以通过改变编码多肽的核酸,例如通过位点特异性诱变或通过肽合成来形成。在特定实施方案中,knob修饰包括Fc结构域的两个亚基之一中的氨基酸取代T366W,并且hole修饰包括Fc结构域的两个亚基中的另一个亚基中的氨基酸取代T366S、L368A和Y407V。在另外的特定实施方案中,包含knob修饰的Fc结构域的亚基另外包含氨基酸取代S354C,并且包含hole修饰的Fc结构

域的亚基另外包含氨基酸取代Y349C。引入这两个半胱氨酸残基导致在Fc区的两个亚基之间形成二硫桥,从而进一步使二聚体稳定(Carter, J Immunol Methods 248,7-15(2001))。

[0086] “相当于免疫球蛋白Fc区的区域”旨在包括免疫球蛋白Fc区的天然存在的等位基因变体,以及具有产生取代、添加或缺失但不明显降低免疫球蛋白介导效应子功能(诸如抗体依赖性细胞毒性)的改变的变体。例如,一个或多个氨基酸可以从免疫球蛋白Fc区的N-末端或C-末端缺失,而不会明显损失生物学功能。可以根据本领域已知的一般规则选择这样的变体,以便对活性具有最小的影响(参见例如Bowie, J.U. 等人, Science 247:1306-10 (1990))。

[0087] 术语“效应子功能”是指那些可归因于抗体Fc区的生物活性,其随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)、Fc受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、细胞因子分泌、免疫复合物介导的抗原呈递细胞的抗原摄取、细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调和B细胞活化。

[0088] “活化性Fc受体”是在被抗体的Fc区接合后引发信号传导事件,刺激携带受体的细胞执行效应子功能的Fc受体。活化性Fc受体包括Fc γ RIIIIa (CD16a)、Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIa (CD32) 和Fc α RI (CD89)。特定的活化性Fc受体是人类Fc γ RIIIIa (参见UniProt登录号P08637,版本141)。

[0089] “阻断性”抗体或“拮抗剂”抗体是抑制或减少其结合的抗原的生物活性的抗体。在一些实施方案中,阻断性抗体或拮抗剂抗体基本上或完全抑制抗原的生物活性。例如,本发明的双特异性抗体阻断通过TNF- α 和TGF- β 的信号传导,从而抑制TNF- α -NF- κ B信号传导途径和TGF- β -Smad2/3信号传导途径。

[0090] 如本文使用的,“特异性结合”意指对抗原的结合是选择性的,并且可以与不需要的或非特异性的相互作用区分开。抗原结合分子与特定抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定(ELISA)或本领域技术人员熟悉的其他技术,例如表面等离子体共振(SPR)技术(在BIAcore仪器上分析)((Liljeblad等人, Glyco J 17,323-329(2000)) 和传统结合测定(Heeley, Endocr Res 28,217-229(2002))来测量。

[0091] 如本文使用的术语“亲和力”或“结合亲和力”是指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。分子X对其配偶体Y的亲和力一般可以通过解离常数(KD)来呈现,解离常数是解离速率常数和结合速率常数(分别为k_{off}和k_{on})的比率。用于测量亲和力的一种特殊方法是表面等离子体共振(SPR)。如本文使用的,术语抗体的“高亲和力”是指对靶抗原具有10⁻⁹M或更小,甚至更具体地10⁻¹⁰M或更小的K_d的抗体。术语抗体的“低亲和力”是指具有10⁻⁸M或更高的K_d的抗体。如本文使用的,术语“降低的结合”是指各自相互作用的亲和力的降低,如例如通过SPR测量的。相反,“增加的结合”是指各自相互作用的结合亲和力的增加。

[0092] 术语“包含特异性结合TNF- α 的第一抗原结合分子和特异性结合TGF- β 的第二抗原结合分子的双特异性抗体”、“特异性结合TNF- α 和TGF- β 的双特异性抗体”、“对TNF- α 和TGF- β 特异性的双特异性抗原结合分子”在本文可互换使用,并指这样的双特异性抗体,该双特异性抗体能够以足够的亲和力结合TNF- α 和TGF- β ,使得该抗体可用作靶向TNF- α 和TGF- β 的诊断和/或治疗剂。

[0093] 术语“抗TNF- α 抗体”和“包含结合TNF- α 的抗原结合位点的抗体”是指这样的抗体，该抗体能够以足够的亲和力结合TNF- α ，尤其是在细胞表面上表达的TNF- α 多肽，使得该抗体可用作靶向TNF- α 的诊断和/或治疗剂。在一种实施方案中，抗TNF- α 抗体与不相关的、非TNF- α 的蛋白的结合程度小于该抗体与TNF- α 结合的约10%，如例如通过放射免疫测定(RIA)或流式细胞术(FACS)或通过使用生物传感器系统诸如Biacore®系统的表面等离子体共振测定所测量的。在某些实施方案中，与人类TNF- α 结合的抗原结合分子具有例如 10^{-8} M至 10^{-13} M的结合人类TNF- α 的结合亲和力的KD值。在一种优选实施方案中，结合亲和力的相应KD值在使用人类TNF- α 的细胞外结构域(ECD) (TNF- α -ECD)以获得TNF- α 结合亲和力的表面等离子体共振测定中确定。术语“抗TNF- α 抗体”也包括能够结合TNF- α 和第二抗原的双特异性抗体。

[0094] 术语“抗TGF- β 抗体”和“包含结合TGF- β 的抗原结合位点的抗体”是指这样的抗体，该抗体能够以足够的亲和力结合TGF- β ，尤其是在细胞表面上表达的TGF- β 多肽，使得该抗体可用作靶向TGF- β 的诊断和/或治疗剂。在一种实施方案中，抗TGF- β 抗体与不相关的、非TGF- β 的蛋白的结合程度小于该抗体与TGF- β 结合的约10%，如例如通过放射免疫测定(RIA)或流式细胞术(FACS)或通过使用生物传感器系统诸如Biacore®系统的表面等离子体共振测定所测量的。在某些实施方案中，与人类TGF- β 结合的抗原结合分子具有例如 10^{-8} M至 10^{-13} M的结合人类TGF- β 的结合亲和力的KD值。在一种优选实施方案中，结合亲和力的相应KD值在使用人类TGF- β 的细胞外结构域(ECD) (TGF- β -ECD)以获得TGF- β 结合亲和力的表面等离子体共振测定中确定。术语“抗TGF- β 抗体”也包括能够结合TGF- β 和第二抗原的双特异性抗体。

[0095] 如本文使用的术语“融合蛋白”是指包含两个或更多个最初编码不同蛋白的基因的融合多肽分子，其中融合蛋白的组分通过肽键直接彼此连接或通过肽接头彼此连接。如本文使用的术语“融合”是指通过肽键直接连接的组分或经由一个或更多个肽接头连接的组分。

[0096] “接头”指共价地或通过离子、范德华力或氢键连接两个其他分子的分子，例如在5'末端处与一个互补序列杂交并在3'末端处与另一个互补序列杂交，从而连接两个非互补序列的核酸分子。“可裂解的接头”指可被降解或以其他方式切断以使通过该可裂解的接头连接的两个组分分离的接头。可裂解的接头通常被酶，通常为肽酶、蛋白酶、核酸酶、脂肪酶等裂解。可裂解接头还可以通过环境诱因，诸如例如温度、pH、盐浓度等的变化来裂解。

[0097] 如本文使用的术语“肽接头”是指包含一个或更多个氨基酸，通常为约2个-20个氨基酸的肽。肽接头是本领域已知的或在本文中被描述。合适的非免疫原性的接头肽包括例如 $(G_4S)_n$ 、 $(SG_4)_n$ 或 $G_4(SG_4)_n$ 肽接头。“n”一般是1和10之间，通常2和4之间的数字。

[0098] “药物组合物”指适合于在动物中药物使用的组合物。药物组合物包含药理学有效量的活性剂和药学上可接受的运载体。“药理学有效量”指有效产生预期药理学结果的剂的量。“药学上可接受的运载体(pharmaceutically acceptable carrier)”指任何标准的药物运载体、媒介物、缓冲液和赋形剂，诸如磷酸盐缓冲盐水溶液、5%右旋糖水溶液，以及乳液，诸如油/水或水/油乳液，以及各种类型的润湿剂和/或佐剂。适当的药学运载体和制剂在Remington's Pharmaceutical Sciences, 第21版.2005, Mack Publishing Co, Easton中描述。“药学上可接受的盐”指可以被配制用于药学应用的化合物的盐，包括例如金属盐

(钠、钾、镁、钙等)和氨的盐或有机胺的盐。

[0099] 如本文使用的,“治疗(treatment)”(及其语法变化形式诸如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指试图改变被治疗的个体的疾病的自然过程的临床干预,并且临床干预可以为了预防而进行或者在临床病理过程期间进行。期望的治疗效果包括但不限于,防止疾病的发生或复发、减轻症状、减轻疾病的任何直接或间接病理后果、防止转移、降低疾病进展速度、改善或缓和疾病状态以及缓解或改善预后。如本文使用的,“减轻”疾病、紊乱或状况意指减少该疾病、紊乱或状况的症状的严重性和/或发生频率。另外,本文中对“治疗”的提及包括对治愈性、缓解性和预防性治疗的提及。

[0100] 如本文使用的术语“有效量”或“治疗有效量”是指足以治疗特定紊乱、状况或疾病,诸如改善、缓和、减轻和/或延迟其一种或更多种症状的化合物或组合物的量。述及癌症或其他不需要的细胞增殖,有效量包括足以实现以下的量:(i)降低癌细胞的数量;(ii)降低肿瘤尺寸;(iii)在一定程度抑制、延缓、减缓并且优选地停止癌细胞浸润到外周器官中;(iv)抑制(即,在一定程度减缓并且优选地停止)肿瘤转移;(v)抑制肿瘤生长;(vi)防止或延迟肿瘤的发生和/或复发;和/或(vii)在一定程度减轻一种或更多种与癌症相关的症状。有效量可以以一次或更多次施用来施用。

[0101] 措辞“施用”或“引起施用(cause to be administered)”是指由医学专业人员(例如医师)或控制患者的医疗护理的人员采取的控制和/或允许向患者施用所讨论的剂/化合物的行动。引起施用可以包括诊断和/或确定合适的治疗方案,和/或为患者开特定的剂/化合物的处方。这样的开处方可以包括例如起草处方单、注释医疗记录等。当本文中描述施用时也设想了“引起施用”。

[0102] 术语“患者”、“个体”和“受试者”可以互换地使用,并且指哺乳动物,优选人类或非人类灵长类动物,但也指家养哺乳动物(例如犬科动物或猫科动物)、实验室哺乳动物(例如小鼠、大鼠、兔、仓鼠、豚鼠)和农业哺乳动物(例如马科动物、牛科动物、猪、绵羊(ovine))。在各种实施方案中,患者可以是在医院、精神病护理机构如门诊或其他临床环境中的医师或其他卫生工作者的护理下的人类(例如,成年男性、成年女性、青少年男性、青少年女性、男性儿童、女性儿童)。在各种实施方案中,患者可以是免疫功能低下的患者或免疫系统减弱的患者,包括但不限于患有原发性免疫缺陷、AIDS的患者;服用某些免疫抑制药物的癌症患者和移植患者;以及患有影响免疫系统的遗传性疾病(例如,先天性无丙种球蛋白血症、先天性IgA缺乏症)的患者。在各种实施方案中,患者患有免疫原性癌症,包括但不限于膀胱癌、肺癌、黑色素瘤和报道具有高突变率的其他癌症(Lawrence等人,Nature,499(7457):214-218,2013)。

[0103] 术语“免疫疗法”是指癌症治疗,其包括但不限于使用针对特定肿瘤抗原的耗竭性抗体的治疗;使用抗体-药物缀合物的治疗;使用针对共刺激分子或共抑制分子(免疫检查点)诸如CTLA-4、PD-1、OX-40、CD137、GITR、LAG3、TIM-3、SIRP、CD40、CD47、Siglec 8、Siglec 9、Siglec 15、TIGIT和VISTA的激动性、拮抗性或阻断性抗体的治疗;使用双特异性T细胞接合抗体(BiTE®)诸如博纳吐单抗的治疗;涉及施用生物响应调节因子诸如IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、GM-CSF、IFN- α 、IFN- β 和IFN- γ 的治疗;使用治疗性疫苗诸如sipuleucel-T的治疗;使用卡介苗(BCG)的治疗;使用树突细胞疫苗或肿瘤抗原肽疫苗的治疗;使用嵌合抗原受体(CAR)-T细胞的治疗;使用CAR-NK细胞的治疗;使用肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的治疗;

使用过继性转移的抗肿瘤T细胞(离体扩增和/或TCR转基因的)的治疗;使用TALL-104细胞的治疗;以及使用免疫刺激剂诸如Toll样受体(TLR)激动剂CpG和咪喹莫特的治疗。

[0104] “耐受性或难治性癌症”是指对先前的抗癌疗法不响应的肿瘤细胞或癌症,所述先前的抗癌疗法包括例如化学疗法、手术、放射疗法、干细胞移植和免疫疗法。肿瘤细胞可以在治疗开始时是耐受性或难治性的,或者它们可以在治疗期间变成耐受性或难治性的。难治性肿瘤细胞包括在治疗的开始时不响应的肿瘤,或最初响应持续短的时间段但不能响应治疗的肿瘤。难治性肿瘤细胞还包括响应于使用抗癌疗法的治疗但不能响应于随后几轮疗法的肿瘤。为了本发明的目的,难治性肿瘤细胞还包括通过使用抗癌疗法的治疗表现出被抑制但在治疗停止后长达5年,有时长达10年或更长时间而复发的肿瘤。抗癌疗法可以使用单独的化学治疗剂、单独的放射、单独的靶向疗法、单独的免疫疗法、单独的手术或其组合。为了便于描述而非限制,应理解,难治性肿瘤细胞与耐受性肿瘤是可互换的。

[0105] 如本文使用的术语“聚合物”通常包括但不限于均聚物;共聚物,诸如例如嵌段、接枝、无规和交替共聚物;和三元共聚物;以及它们的混合物和变化形式(modifications)。此外,除非另外明确限定,否则术语“聚合物”应包括材料的所有可能的几何构型。这些构型包括但不限于全同立构、间同立构和无规对称。

[0106] “多核苷酸”指包含核苷酸单元的聚合物。多核苷酸包括天然存在的核酸,诸如脱氧核糖核酸(“DNA”)和核糖核酸(“RNA”)以及核酸类似物。核酸类似物包括包含以下的那些:非天然存在的碱基,以天然存在的磷酸二酯键以外的连接与其他核苷酸衔接(engage)的核苷酸,或包含通过除了磷酸二酯键以外的连接附连的碱基的核苷酸。因此,核苷酸类似物包括,例如且不限于,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯(phosphotriester)、氨基磷酸酯、硼烷磷酸酯(boranophosphate)、甲基膦酸酯、手性甲基膦酸酯、2-0-甲基核糖核苷酸、肽核酸(PNA)等。这样的多核苷酸可例如使用自动化DNA合成仪合成。术语“核酸”通常指大的多核苷酸。术语“寡核苷酸”通常指短的多核苷酸,通常不大于约50个核苷酸。应当理解,当核苷酸序列由DNA序列(即,A、T、G、C)表示时,这还包括其中“U”代替“T”的RNA序列(即,A、U、G、C)。

[0107] 本文使用常规符号描述多核苷酸序列:单链多核苷酸序列的左手端为5'-末端;双链多核苷酸序列的左手方向被称为5'-方向。核苷酸向新生RNA转录物的5'至3'添加的方向被称为转录方向。具有与mRNA相同序列的DNA链被称为“编码链”;在具有与从该DNA转录的mRNA相同的序列的DNA链上且位于RNA转录物的5'-末端的5'的序列被称为“上游序列”;在具有与RNA相同的序列的DNA链上并且在编码RNA转录物的3'-末端的3'的序列被称为“下游序列”。

[0108] “互补”指两个多核苷酸的相互作用表面的拓扑相容性或匹配在一起。因此,这两个分子可被描述为互补的,且此外,接触表面特性为彼此互补。如果第一多核苷酸的核苷酸序列与第二多核苷酸的多核苷酸结合配偶体的核苷酸序列基本上相同,或如果第一多核苷酸可与第二多核苷酸在严格杂交条件下杂交,则第一多核苷酸与第二多核苷酸互补。

[0109] “与...特异性杂交”或“特异性杂交”或“与...选择性杂交”指当该序列存在于复杂混合物(例如,总细胞)DNA或RNA中时,核酸分子优先与特定核苷酸序列在严格条件下的结合、双链体化或杂交。术语“严格条件”指在其下探针将优先与其靶子序列杂交,并且在较小程度上与其他序列杂交或根本不与其他序列杂交的条件。在核酸杂交实验诸如DNA杂交

和RNA杂交的背景下,“严格杂交”和“严格杂交洗涤条件”为序列依赖性的,并且在不同的环境参数下是不同的。关于核酸杂交的广泛指导可在以下中发现:Tijssen,1993,Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes,第I部分,第2章,“Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays”,Elsevier,N.Y.;Sambrook等人,2001,Molecular Cloning:ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,第3增补版,NY;以及Ausubel等人,编著,现行版,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates and Wiley Interscience,NY。

[0110] 通常,高度严格的杂交和洗涤条件被选择为比在定义的离子强度和pH下特定序列的热解链温度(T_m)低约5℃。 T_m 为50%的靶序列与完全匹配的探针杂交的温度(在定义的离子强度和pH下)。非常严格的条件被选择为等于特定探针的 T_m 。用于在DNA印迹或RNA印迹中的滤器上具有多于约100个互补残基的互补核酸的杂交的严格杂交条件的实例为在42℃,50%福尔马林与1mg肝素,杂交被进行过夜。高度严格的洗涤条件的实例为在72℃,0.15M NaCl,持续约15分钟。严格洗涤条件的实例为在65℃,0.2x SSC洗涤,持续15分钟。参见Sambrook等人对于SSC缓冲液的描述。高严格洗涤之前可进行低严格洗涤以去除背景探针信号。对于,例如,多于约100个核苷酸的双链体的示例性中度严格洗涤为在45℃,1x SSC,持续15分钟。对于,例如,多于约100个核苷酸的双链体的示例性低严格洗涤为在40℃,4-6x SSC,持续15分钟。通常,比起在特定杂交测定中对于不相关探针观察到的2倍(或更高)的信噪比指示检测到特异性杂交。

[0111] “引物”指能够与指定的多核苷酸模板特异性杂交并提供用于合成互补多核苷酸的起始点的多核苷酸。当多核苷酸引物被置于诱导合成的条件下,即,在存在核苷酸、互补多核苷酸模板和用于聚合的剂诸如DNA聚合酶的情况时,这样的合成发生。引物通常为单链的,但可以为双链的。引物通常为脱氧核糖核酸,但各种各样的合成和天然存在的引物可用于许多应用。引物与模板互补,其被设计为与模板杂交以用作合成起始的位点,但不需要反映模板的精确序列。在这样的情况下,引物与模板的特异性杂交取决于杂交条件的严格度。引物可用例如,显色的、放射性的或荧光的部分标记并用作可检测的部分。

[0112] 当提及多核苷酸使用时,“探针”指能够与另一多核苷酸的指定序列特异性杂交的多核苷酸。探针与靶互补多核苷酸特异性杂交,但不需要反映模板的精确互补序列。在这样的情况下,探针与靶的特异性杂交取决于杂交条件的严格度。探针可用例如,显色的、放射性的或荧光的部分标记并用作可检测的部分。在其中探针提供用于合成互补多核苷酸的起始点的情况下,探针也可以为引物。

[0113] “载体”为可用来将与它连接的另一核酸引入到细胞中的多核苷酸。一种类型的载体为“质粒”,其指可将另外的核酸区段连接到其中的线性或环状双链DNA分子。另一种类型的载体为病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),其中另外的DNA区段可被引入到病毒基因组中。某些载体能够在引入了它们的宿主细胞中自主复制(例如,包含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)在引入到宿主细胞后被整合进宿主细胞的基因组中,并且从而与宿主基因组一起复制。“表达载体”为可指导选择的多核苷酸的表达的一种类型的载体。

[0114] “调节序列”为影响与它可操作地连接的核酸的表达(例如,表达的水平、时机或位

置)的核酸。调节序列可,例如,直接对被调节的核酸发挥其效应,或通过一种或更多种其他分子(例如,结合调节序列和/或核酸的多肽)的作用发挥其效应。调节序列的实例包括启动子、增强子及其他表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。调节序列的另外的实例在以下中描述:例如,Goeddel,1990,Gene Expression Technology:Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif.以及Baron等人,1995,Nucleic Acids Res.23:3605-06。如果调节序列影响核苷酸序列的表达(例如,表达的水平、时机或位置),则核苷酸序列与调节序列“可操作地连接”。

[0115] “宿主细胞”为可用来表达本公开内容的多核苷酸的细胞。宿主细胞可以为原核生物,例如,大肠杆菌(E.coli),或宿主细胞可以为真核生物,例如,单细胞真核生物(例如,酵母或其他真菌)、植物细胞(例如,烟草或番茄植物细胞)、动物细胞(例如,人类细胞、猴细胞、仓鼠细胞、大鼠细胞、小鼠细胞或昆虫细胞)或杂交瘤。通常,宿主细胞为可用编码多肽的核酸转化或转染的培养细胞,所述核酸然后可在宿主细胞中被表达。短语“重组宿主细胞”可用来表示已用待表达的核酸转化或转染的宿主细胞。宿主细胞还可以为包含核酸但不以期望的水平表达该核酸的细胞,除非调节序列被引入到宿主细胞,使得调节序列变成与该核酸可操作地连接。应当理解,术语宿主细胞不仅指特定的受试者细胞,而且还指这样的细胞的后代或潜在后代。因为某些修饰可由于,例如,突变或环境影响而在随后世代中发生,这样的后代实际上可能与亲本细胞不相同,但仍被包括在如本文使用的该术语的范围内。

[0116] 术语“分离的分子”(其中分子为,例如,多肽或多核苷酸)为这样的分子,该分子凭借其起源或衍生来源(1)与在它天然状态中伴随它的、天然缔合的组分不缔合,(2)基本上不含来自同一物种的其他分子,(3)由来自不同物种的细胞表达,或(4)不存在于自然界中。因此,化学合成的、或在与其原始起源的细胞不同的细胞系统中表达的分子,将是与其天然缔合的组分“分离”的。还可以利用本领域公知的纯化技术通过分离使分子变成基本上不含天然缔合的组分。分子纯度或均一性可以通过本领域公知的很多方式来测定。例如,多肽样品的纯度可以使用本领域公知的技术使用聚丙烯酰胺凝胶电泳和使多肽可视化的凝胶染色测定。为了某些目的,可通过使用HPLC或本领域公知的用于纯化的其他手段提供更高的分辨率。

[0117] 当样品的至少约60%至75%表现为单一种类的多肽时,蛋白或多肽是“基本纯”、“基本均一”或“基本纯化”的。多肽或蛋白可以为单体的或多聚体的。基本纯的多肽或蛋白将通常构成蛋白样品的约50%、60%、70%、80%或90% W/W,更通常约95%,并且优选地将超过99%纯。蛋白纯度或均一性可通过本领域公知的许多手段来指示,所述手段诸如蛋白样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳,随后在用本领域公知的染色剂染色凝胶之后可视化单一多肽条带。为了某些目的,可通过使用HPLC或本领域公知的用于纯化的其他手段提供更高的分辨率。

[0118] 如本文使用的术语“标记”或“标记的”指在抗体中掺入另一种分子。在一种实施方案中,标记是可检测的标志物,例如掺入放射性标记的氨基酸或附连至可通过标记的抗生物素蛋白检测的生物素基部分的多肽(例如包含荧光标志物的链霉亲和素或可通过光学方法或量热法来检测的酶促活性)。在另一种实施方案中,标记或标志物可以是治疗性的,例如药物缀合物或毒素。各种标记多肽和糖蛋白的方法是本领域已知的并且可被使用。用于

多肽的标记的实例包括但不限于以下：放射性同位素或放射性核素（例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）；荧光标记（例如FITC、罗丹明、镧系元素荧光团）；酶促标记（例如，辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酯酶）；化学发光标志物；生物素基团；由第二报告物识别的预先确定的多肽表位（例如，亮氨酸拉链配对序列、第二抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签）；磁化剂，诸如钆类螯合物；毒素，诸如百日咳毒素；紫杉醇；细胞松弛素B；短杆菌肽D；溴化乙锭；吐根碱；丝裂霉素；依托泊苷；替尼泊苷；长春新碱；长春花碱；秋水仙素；阿霉素；道诺霉素；二羟基蒽二酮；米托蒽醌；光神霉素；放线菌素D；1-去氢睾酮；糖皮质激素；普鲁卡因；丁卡因；利多卡因；普萘洛尔（propranolol）以及嘌呤霉素及其类似物或同系物。在各种实施方案中，通过各种长度的间隔臂衔接标记以减少潜在的位阻。

[0119] 如本文使用的术语“异源”是指非天然的或在自然界不存在的组成或状态，所述组成或状态例如可以通过用源自另一来源的组成或状态替换现有的天然组成或状态来实现。类似地，在蛋白天然地表达的生物体之外的生物体中表达该蛋白构成异源表达系统和异源蛋白。

[0120] 应理解，本文描述的本公开内容的方面和实施方案包括“由这些方面和实施方案组成”和/或“主要由这些方面和实施方案组成”。

[0121] 本文中，提及“约”值或参数包括（并描述）针对该值或参数本身的变化。例如，提及“约X”的描述包括对“X”的描述。

[0122] 除非上下文另外明确指出，否则如本文和所附的权利要求中使用的单数形式“一”、“或”和“该”包含复数指代物。应理解，本文描述的公开内容的方面和变化包括“由这些方面和变化组成”和/或“主要由这些方面和变化组成”。

[0123] 肿瘤坏死因子配体

[0124] TNF是免疫过程所需的免疫调节细胞因子。TNF的不受调控的活性可以导致炎症性疾病的发展。细胞中过量表达的TNF与免疫疾病，包括类风湿性关节炎、克罗恩病、银屑病性关节炎和炎症肠病的发展有关。TNF的功能需要与其两种受体，即TNF受体1（TNFR1）和TNF受体2（TNFR2）结合。阻断TNF和TNFR之间的相互作用已被成功开发为治疗炎症性疾病或自身免疫性疾病的疗法。

[0125] 在各种实施方案中，本发明的双功能拮抗剂是包含特异性结合TNF- α 配体的第一抗原结合分子和特异性结合TGF- β 配体的第二抗原结合分子的双功能分子。在各种实施方案中，双功能分子能够结合TNF- α 配体，所述TNF- α 配体具有选自由SEQ ID NO:1-5中列出的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列：

[0126] 人类TNFR1 ECD

[0127] IYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNISICTKCHKGTLYNDCPGPGQDTCRECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTCVGCGRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECVSCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGTT (SEQ ID NO:1)

[0128] 人类TNFR2 ECD

[0129] LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFL

LPMGPSPPAEGSTGD (SEQ ID NO:2)

[0130] 人类TNFR1/CRD1-TNFR2/CRD2/3/4

[0131] IYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGYIHPQNNICCTKCHKGTLYNDCPGPGQDTCRSCEDSTY
TQLWNWVPECLSCGSRSSDQVETQACTREQNRICRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDV
VCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPST
APSTSFLPMGPSPPAEGSTGD (SEQ ID NO:3)

[0132] 人类TNFR1/CRD1/2/3-TNFR2/CRD4

[0133] IYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGYIHPQNNICCTKCHKGTLYNDCPGPGQDTCRECESGSF
TASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTCVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTV
CPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAP
STSFLPMGPSPPAEGSTGD (SEQ ID NO:4)

[0134] TNFR1/ΔCRD4

[0135] IYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGYIHPQNNICCTKCHKGTLYNDCPGPGQDTCRECESGSF
TASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTCVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTV
(SEQ ID NO:5)

[0136] 在各种实施方案中,双功能分子能够结合TNF-α配体,所述TNF-α配体具有选自自由表2中列出的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列:

[0137] 表2

[0138] 包含TNF-α配体的多肽

[0139]	配体	数据库	登录号
[0140]	TNF-α	UniProtKB	P01375-1

[0141] TGF-β配体

[0142] 转化生长因子-β (TGF-β),包括TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3,通过结合和激活细胞表面上的高亲和力受体TGFβRII和TGFβRIIB来介导Smad2/3信号传导。TGF-β在宽范围的生物学活性,包括免疫功能、细胞增殖和分化、上皮-间充质转化、纤维生成、造血、肌生成、骨重塑、癌症进展和转移的调节中起着关键作用。TGF-β水平升高和因此增加的Smad2/3信号传导与许多疾病状况,包括癌症、贫血、骨转移、骨损失、纤维化、疼痛、肌肉损失、胰岛素抗性、慢性肾病、肝病和心血管疾病的发病机制和进展有关。

[0143] 在各种实施方案中,本发明的双功能分子能够结合TGF-β配体,所述TGF-β配体具有选自自由SEQ ID NO:6-9中列出的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列:

[0144] 人类TGF-β受体II同种型1

[0145] MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCM
SNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSRSSDECN
DNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQVTGISLLPPLGVAISV I I IFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLMEFSEHCAIIL
EDDRSDISSTCANNINHNTTELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFSD
INLKHENILQFLTAEERKTEL GKQYWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSSLARGIAHLHSDHTPCGRPK
MPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSGQVGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVY
SMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFPGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSFVLNHQGIQMV CETLTECWDHD

PEARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK (SEQ ID NO:6)

[0146] 人类TGF- β 受体II-ECD同种型1 (TGF- β RIIB-ECD)

[0147] TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO:7)

[0148] 人类TGF- β 受体II同种型2

[0149] MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHINNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLMFSEHCAIILED RSDISSTCANNINHNTPELLDITLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFSDINLKHENILQFLTAEERKTELKGQYWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSQVGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFPGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSWLNLHQGIQMVCELTTECWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK (SEQ ID NO:8)

[0150] 人类TGF- β 受体II-ECD同种型2 (TGF- β RIIA-ECD)

[0151] TIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHINNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO:9)

[0152] 在各种实施方案中,双功能分子能够结合TGF- β 配体,所述TGF- β 配体具有选自表3中列出的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列:

[0153] 表3

[0154] 包含TGF- β 配体的多肽

[0155]

配体	数据库	登录号
TGF- β 1	UniProtKB	P01137-1
TGF- β 2	UniProtKB	P61812-1
TGF- β 3	UniProtKB	P10600-1

[0156] TNF- α 和/或TGF- β 抗体和抗体片段

[0157] 产生新颖的与TNF- α 和/或TGF- β 配体和/或受体结合的抗体的方法是本领域技术人员已知的。例如,用于生成与TNF- α 和/或TGF- β 配体特异性结合的单克隆抗体的方法可以包括向小鼠施用一定量的包含对刺激可检测的免疫应答有效的TNF- α 和/或TGF- β 配体的免疫原性组合物,从小鼠获得产生抗体的细胞(例如,来自脾的细胞)并且使产生抗体的细胞与骨髓瘤细胞融合以获得产生抗体的杂交瘤,以及测试产生抗体的杂交瘤以鉴定产生与TNF- α 和/或TGF- β 配体特异性结合的单克隆抗体的杂交瘤。获得后,杂交瘤可以在细胞培养物中繁殖,任选地在杂交瘤来源的细胞产生与TNF- α 和/或TGF- β 配体特异性结合的单克隆抗体的培养条件中繁殖。单克隆抗体可以从细胞培养物纯化。然后,用于测试抗原/抗体相互作用以鉴定特定期望的抗体的多种不同的技术是可获得的。

[0158] 可以使用产生或分离具有必需的特异性的抗体的其他合适的方法,包括例如从文库选择重组抗体的方法,或依赖于对能够产生人类抗体的完整贮库(full repertoire)的

转基因动物(例如小鼠)进行免疫接种的方法。参见例如Jakobovits等人, Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.), 90:2551-2555, 1993; Jakobovits等人, Nature, 362:255-258, 1993; Lonberg等人, 美国专利第5,545,806号; 和Surani等人, 美国专利第5,545,807号。

[0159] 抗体可以以多种方式被工程化。它们可以被制备为单链抗体(包括小模块免疫药物(small modular immunopharmaceutical)或SMIPTM)、Fab和F(ab')₂片段等。抗体可以是人源化的、嵌合的、去免疫的(deimmunized)或完全人类的。多个出版物列出了许多类型的抗体和工程化这样的抗体的方法。例如, 参见美国专利第6,355,245号; 第6,180,370号; 第5,693,762号; 第6,407,213号; 第6,548,640号; 第5,565,332号; 第5,225,539号; 第6,103,889号; 和第5,260,203号。

[0160] 嵌合抗体可以通过本领域已知的重组DNA技术产生。例如, 用限制性酶消化编码鼠(或其他物种)单克隆抗体分子的Fc恒定区的基因, 以去除编码鼠Fc的区域, 并且取代为编码人类Fc恒定区的基因的等效部分(参见Robinson等人, 国际专利公布PCT/US86/02269; Akira等人, 欧洲专利申请184,187; Taniguchi, M., 欧洲专利申请171,496; Morrison等人, 欧洲专利申请173,494; Neuberger等人, 国际申请W0 86/01533; Cabilly等人, 美国专利第4,816,567号; Cabilly等人, 欧洲专利申请125,023; Better等人, Science, 240:1041-1043, 1988; Liu等人, Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.), 84:3439-3443, 1987; Liu等人, J.Immunol., 139:3521-3526, 1987; Sun等人, Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.), 84:214-218, 1987; Nishimura等人, Canc.Res., 47:999-1005, 1987; Wood等人, Nature, 314:446-449, 1985; 以及Shaw等人, J.Natl Cancer Inst., 80:1553-1559, 1988)。

[0161] 本领域中已经描述了用于使抗体人源化的方法。在一些实施方案中, 人源化抗体具有除了非人类CDR之外, 从非人类来源引入的一个或更多个氨基酸残基。人源化基本上可以按照Winter及同事的方法(Jones等人, Nature, 321:522-525, 1986; Riechmann等人, Nature, 332:323-327, 1988; Verhoeyen等人, Science, 239:1534-1536, 1988), 通过将高变区序列取代为人类抗体的相应序列进行。因此, 这样的“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利第4,816,567号), 其中大体上少于一个完整人类可变区已被来自非人类物种的相应序列取代。在实践中, 人源化抗体通常是其中一些高变区残基和可能地一些框架区残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代的人类抗体。

[0162] Queen等人的美国专利第5,693,761号公开了对Winter等人使抗体人源化的改进, 并且基于这样的前提: 将亲合力(avidity)损失归因于人源化框架的结构基序方面的问题, 其由于空间不相容性或其他化学不相容性, 干扰CDR折叠成在小鼠抗体中发现的能够结合的构象。为了解决该问题, Queen教导了使用线性肽序列中与待人源化的小鼠抗体的框架序列密切同源的人类框架序列。因此, Queen的方法关注于比较物种之间的框架序列。通常, 将所有可得的人类可变区序列与特定小鼠序列进行比较, 并计算在对应的框架残基之间的同一性百分比。选择具有最高百分比的人类可变区以提供用于人源化项目的框架序列。Queen还教导了, 在人源化框架中保留对于支持能够结合的构象中的CDR至关重要的来自小鼠框架的某些氨基酸残基是重要的。从分子模型评价潜在的重要性。用于保留的候选残基通常是在线性序列中与CDR相邻或物理地在任何CDR残基的6Å内的那些。

[0163] 被称作“框架改组(framework shuffling)”的另一种使抗体人源化的方法依赖于

生成组合文库,所述组合文库具有符合读框地(in frame)融合至单个人类种系框架的池中的非人类CDR可变区(Dall'Acqua等人,Methods,36:43,2005)。然后,筛选文库以鉴定编码保留良好结合的人源化抗体的克隆。

[0164] 本领域中已经描述了用于制备完全人类抗体的方法。以实例的方式,用于产生抗TNF- α 抗体或其抗原结合片段的方法包括以下步骤:在噬菌体上合成人类抗体的文库、用TNF- α 多肽或其抗体结合部分筛选文库、分离与TNF- α 多肽结合的噬菌体和从噬菌体获得抗体。以另一个实例的方式,用于制备用于在噬菌体展示技术中使用的抗体的文库的一种方法包括以下步骤:用TNF- α 多肽或其抗原性部分对包含人类免疫球蛋白基因座的非人类动物进行免疫接种以产生免疫应答、从经免疫接种的动物提取产生抗体的细胞、从提取的细胞分离编码本发明的抗体的重链和轻链的RNA、逆转录RNA以产生cDNA、使用引物扩增cDNA、并且将cDNA插入到噬菌体展示载体中,使得抗体在噬菌体上表达。本发明的重组抗TNF- α 抗体可以通过这种方式获得。

[0165] 本发明的重组人类抗TNF- α 和/或TGF- β 抗体也可以通过筛选重组组合抗体文库来分离。优选地,文库是使用从B细胞分离的mRNA制备的人类V_L和V_H cDNA产生的scFv噬菌体展示文库。用于制备和筛选这样的文库的方法是本领域已知的。用于产生噬菌体展示文库的试剂盒是商业可得的(例如,Pharmacia重组噬菌体抗体系统,目录号27-9400-01;和Stratagene SurfZAPTM噬菌体展示试剂盒,目录号240612)。也存在可用于产生和筛选抗体展示文库的其他方法和试剂(参见例如,美国专利第5,223,409号;PCT公布第W0 92/18619号、第W0 91/17271号、第W0 92/20791号、第W0 92/15679号、第W0 93/01288号、第W0 92/01047号、第W0 92/09690号;Fuchs等人,Bio/Technology,9:1370-1372(1991);Hay等人,Hum.Antibod.Hybridomas,3:81-85,1992;Huse等人,Science,246:1275-1281,1989;McCafferty等人,Nature,348:552-554,1990;Griffiths等人,EMBO J.,12:725-734,1993;Hawkins等人,J.Mol.Biol.,226:889-896,1992;Clackson等人,Nature,352:624-628,1991;Gram等人,Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.),89:3576-3580,1992;Garrad等人,Bio/Technology,9:1373-1377,1991;Hoogenboom等人,Nuc.Acid Res.,19:4133-4137,1991;以及Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.),88:7978-7982,1991,所有都通过引用并入本文)。

[0166] 人类抗体还通过用人类IgE抗原对非人类转基因动物进行免疫接种来产生,所述非人类转基因动物在其基因组中包含一些或所有人类免疫球蛋白重链和轻链基因座,例如XenoMouseTM动物(Abgenix,Inc./Amgen,Inc.--Fremont,Calif.)。XenoMouseTM小鼠是包含人类免疫球蛋白重链和轻链基因座的大的片段并且在小鼠抗体产生方面是缺陷的工程化小鼠系。参见,例如,Green等人,Nature Genetics,7:13-21,1994和美国专利第5,916,771号、第5,939,598号、第5,985,615号、第5,998,209号、第6,075,181号、第6,091,001号、第6,114,598号、第6,130,364号、第6,162,963号和第6,150,584号。XenoMouseTM小鼠产生完全人类抗体的成人样人类贮库(adult-like human repertoire),并产生抗原特异性人类抗体。在一些实施方案中,通过在酵母人工染色体(YAC)中引入人类重链基因座和 κ 轻链基因座的兆碱基大小的、种系配置片段,XenoMouseTM小鼠包含人类抗体V基因贮库的大约80%。在其他实施方案中,XenoMouseTM小鼠还包含大约所有的人类 λ 轻链基因座。参见Mendez等人,Nature Genetics,15:146-156,1997;Green和Jakobovits,J.Exp.Med.,188:483-495,

1998;以及WO 98/24893。在一方面,本发明提供了用于通过用TNF- α 和/或TGF- β 多肽对包含人类免疫球蛋白基因座的非人类转基因动物进行免疫接种,从非人类、非小鼠动物制备抗TNF- α 和/或TGF- β 抗体的方法。人们可以使用在以上提及的文件中描述的方法生产这样的动物。

[0167] 抗TNF- α 抗体

[0168] FDA批准的抗TNF- α 抗体阿达木单抗(Abbvie **HUMIRA®**;DrugBank DB00051)已被用来治疗人类。在本发明的各种实施方案中,抗TNF- α 抗体是包含SEQ ID NO:10中列出的重链氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:

[0169] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNQYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:10)

[0170] 包含SEQ ID NO:11中列出的轻链氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:11)

[0171] 或包含SEQ ID NO:10中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:11中列出的轻链氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:

[0172] 包含SEQ ID NO:12中列出的重链可变区氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:

[0173] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:12)

[0174] 包含SEQ ID NO:13中列出的轻链可变区氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:

[0175] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:13)

[0176] 或包含SEQ ID NO:12中列出的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:13中列出的轻链可变区氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段。

[0177] 在各种实施方案中,本发明提供了抗体,其包含重链、轻链或重链和轻链两者;重链可变区、轻链可变区或重链可变区和轻链可变区两者;其中所述重链、轻链、重链可变区或轻链可变区包含与如SEQ ID NO:10、11、12或13中列出的氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少约99%同一性的序列;其中所述抗体特异性结合人类TNF- α 。

[0178] FDA批准的抗TNF- α 抗体英夫利昔单抗(Centocor**REMICADE®**;DrugBank DB00065)已被用来治疗人类。在本发明的各种实施方案中,抗TNF- α 抗体是包含SEQ ID NO:14中列出的重链氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:

[0179] EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCLVASGFIFSNHWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYLMQMTDLRTEDTGYYCSRNYGSTDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA

LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHLEAHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

[0180] 包含SEQ ID NO:15中列出的轻链氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:

[0181] DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQFVGSSIHWHYQQRTNGSPRLLIKAYASEMSGIPSRFSGSGSGTDFTLSINTVESEDIADYYCQQSHSWPFTFGSGTNLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:15)

[0182] 或包含SEQ ID NO:14中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:15中列出的轻链氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:

[0183] 包含SEQ ID NO:16中列出的重链可变区氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:

[0184] EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCLVASFIFSNHWMNWRQSPKGLEWVAEIRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYLQMTDLRTEDTGVIYCSRNYGSTDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:16)

[0185] 包含SEQ ID NO:17中列出的轻链可变区氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:

[0186] DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQFVGSSIHWHYQQRTNGSPRLLIKAYASEMSGIPSRFSGSGSGTDFTLSINTVESEDIADYYCQQSHSWPFTFGSGTNLEVK (SEQ ID NO:17)

[0187] 或包含SEQ ID NO:16中列出的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:17中列出的轻链可变区氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段。

[0188] 在各种实施方案中,本发明提供了抗体,其包含重链、轻链或重链和轻链两者;重链可变区、轻链可变区或重链可变区和轻链可变区两者;其中所述重链、轻链、重链可变区或轻链可变区包含与如SEQ ID NO:14、15、16或17中列出的氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少约99%同一性的序列;其中所述抗体特异性结合人类TNF- α 。

[0189] FDA批准的抗TNF- α 抗体Certolizumab pegol (UCB **CIMZIA**[®]; DrugBank DB08904)已被用来治疗人类。在本发明的各种实施方案中,抗TNF- α 抗体是包含SEQ ID NO:18中列出的重链氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:

[0190] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGYFTDYGMNWRQAPGKGLEWGWINTYIGEPYADSVKGRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRADTAVYYCARGYRSYAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCAA (SEQ ID NO:18)

[0191] 包含SEQ ID NO:19中列出的轻链氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:

[0192] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPKAPKALIYSASFLYSGVPYRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNIYPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:19)

[0193] 或包含SEQ ID NO:18中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:19中列出的轻链氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段;

- [0194] 包含SEQ ID NO:20中列出的重链可变区氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:
- [0195] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYVFTDYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTYIGEPITYADSVKGRF
TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYRSYAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:20)
- [0196] 包含SEQ ID NO:21中列出的轻链可变区氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:
- [0197] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASFLYSGVPYRFSGSGSG
TDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNIYPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:21)
- [0198] 或包含SEQ ID NO:20中列出的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:21中列出的
轻链可变区氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段。
- [0199] 在各种实施方案中,本发明提供了抗体,其包含重链、轻链或重链和轻链两者;重
链可变区、轻链可变区或重链可变区和轻链可变区两者;其中所述重链、轻链、重链可变区
或轻链可变区包含与如SEQ ID NO:18、19、20或21中列出的氨基酸序列具有至少约75%、至
少约80%、至少约85%、至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少
约99%同一性的序列;其中所述抗体特异性结合人类TNF- α 。
- [0200] FDA批准的抗TNF- α 抗体戈利单抗 (Golimumab) (Janssen Biotech **SIMPONI**[®];
DrugBank DB06674) 已被用来治疗人类。在本发明的各种实施方案中,抗TNF- α 抗体是包含
SEQ ID NO:22中列出的重链氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:
- [0201] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFISSYAMHWVRQAPGNLEWVAFMSYDGSNKKYADSVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGGNYYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEQ ID NO:22)
- [0202] 包含SEQ ID NO:23中列出的轻链氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:
- [0203] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSG
TDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
ID NO:23)
- [0204] 或包含SEQ ID NO:22中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:23中列出的轻链氨
基酸序列的人类抗体或抗原结合片段;
- [0205] 包含SEQ ID NO:24中列出的重链可变区氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:
- [0206] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFISSYAMHWVRQAPGNLEWVAFMSYDGSNKKYADSVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGGNYYYYGMDVWGQGT TTVTVSS (SEQ ID NO:24)
- [0207] 包含SEQ ID NO:25中列出的轻链可变区氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段:
- [0208] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSG
TDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO:25)
- [0209] 或包含SEQ ID NO:24中列出的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:25中列出的
轻链可变区氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段。
- [0210] 在各种实施方案中,本发明提供了抗体,其包含重链、轻链或重链和轻链两者;重

链可变区、轻链可变区或重链可变区和轻链可变区两者；其中所述重链、轻链、重链可变区或轻链可变区包含与如SEQ ID NO:22、23、24或25中列出的氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少约99%同一性的序列；其中所述抗体特异性结合人类TNF- α 。

[0211] 抗TGF- β 抗体

[0212] 在本发明的各种实施方案中，抗TGF- β 抗体是以下的抗TGF- β 抗体，其是包含SEQ ID NO:26中列出的重链氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段：

[0213] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVES KYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:26)

[0214] 包含SEQ ID NO:27中列出的轻链氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段：

[0215] ETVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKH KVIYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:27)

[0216] 或包含SEQ ID NO:26中列出的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:27中列出的轻链氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段：

[0217] 包含SEQ ID NO:28中列出的重链可变区氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段：

[0218] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:28)

[0219] 包含SEQ ID NO:29中列出的轻链可变区氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段：

[0220] ETVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIK (SEQ ID NO:29)

[0221] 或包含SEQ ID NO:28中列出的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:29中列出的轻链可变区氨基酸序列的人类抗体或抗原结合片段。

[0222] 在各种实施方案中，本发明提供了抗体，其包含重链、轻链或重链和轻链两者；重链可变区、轻链可变区或重链可变区和轻链可变区两者；其中所述重链、轻链、重链可变区或轻链可变区包含与如SEQ ID NO:26、27、28和29中列出的氨基酸序列具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少约99%同一性的序列；其中所述抗体特异性结合人类TGF- β 。

[0223] 接头

[0224] 在各种实施方案中，特异性结合TNF- α 配体的第一抗原结合分子通过接头和/或铰链接头肽附接到特异性结合TGF- β 配体的第二抗原结合分子。接头或铰链接头可以是相对地不含二级结构或展示出 α 螺旋构象的在5个、10个、15个、20个、30个、40个或更多个氨基酸之间的人工序列。

[0225] 肽接头在蛋白结构域之间提供共价连接和另外的结构和/或空间柔性。如本领域已知的,肽接头含有柔性氨基酸残基,诸如甘氨酸和丝氨酸。在各种实施方案中,肽接头可以包含1-100个氨基酸。在各种实施方案中,间隔物可以包含基序GGGSGGGS (SEQ ID NO: 51)。在各种实施方案中,间隔物可以包含基序GGGGS (SEQ ID NO: 54)_n,其中n是从1至10的整数。在其他实施方案中,接头还可以包含除甘氨酸和丝氨酸之外的氨基酸。在另一种实施方案中,接头可以包含其他蛋白基序,包括但不限于 α -螺旋构象的序列,诸如AEAAAKEAAAKEAAKA (SEQ ID NO: 49)。在各种实施方案中,可以调节接头长度和组成以优化活性或可开发性,包括但不限于表达水平和聚集倾向。在另一种实施方案中,肽接头可以是简单的化学键,例如酰胺键(例如通过PEG的化学缀合)。

[0226] 在表4中提供了示例性的肽接头:

[0227] 表4

接头序列	SEQ ID NO:
GGGSGGGS	44
GGGS	45
GSSGSGGSGGSG	46
GSSGT	47
GGGSGGGGSGGGS	48
AEAAAKEAAAKEAAKA	49
GGGSGGGGSGGGGSGGGGS	50
GGGSGGGS	51
GSGST	52
GGSS	53
GGGGS	54
GGSG	55
SGGG	56
GSGS	57
GSGSGS	58
GSGSGSGS	59
GSGSGSGSGS	60
GSGSGSGSGSGS	61
GGGSGGGGS	62
GGGSGGGGSGGGGS	63

[0229] 双功能拮抗剂分子

[0230] 本发明提供了新颖的基于多肽的双功能拮抗剂分子,其被特别设计为以有效方式同时中和TNF- α 信号传导和TGF- β 信号传导并且包含特异性结合TNF- α 配体的第一抗原结合分子和特异性结合TGF- β 配体的第二抗原结合分子。在各种实施方案中,双功能分子包含特异性结合TNF- α 的分离的抗体或其抗原结合片段以及特异性结合TGF- β 配体的分离的抗体或其抗原结合片段。重要的是,这些双功能拮抗剂还提供了有利的特性,诸如可生产性、稳定性、结合亲和力、生物活性、对某些细胞的特异性靶向、靶向效率和降低的毒性。

[0231] 示例性双功能拮抗剂分子

[0232] 在各种实施方案中,本发明的双功能拮抗剂分子选自如表5中描述的设计的并包含融合配偶体的分子的组:

[0233] 表5

融合配偶体 A (TNF α 结合多肽)	接头	融合配偶体 B (TGF- β 结合多肽)
SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
SEQ ID NO: 12	44-63	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 13	44-63	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 12	44-63	SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 13	44-63	SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13	44-63	SEQ ID NO: 28 和 SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO: 16	44-63	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 17	44-63	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 16	44-63	SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 17	44-63	SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 17	44-63	SEQ ID NO: 28 和 SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO: 20	44-63	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 21	44-63	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 20	44-63	SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 21	44-63	SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 21	44-63	SEQ ID NO: 28 和 SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO: 24	44-63	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 25	44-63	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 24	44-63	SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 25	44-63	SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 25	44-63	SEQ ID NO: 28 和 SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO: 1	44-63	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 1	44-63	SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 1	44-63	SEQ ID NO: 28
SEQ ID NO: 1	44-63	SEQ ID NO: 29

[0234]

[0235]

SEQ ID NO: 2	44-63	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 2	44-63	SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 2	44-63	SEQ ID NO: 28
SEQ ID NO: 2	44-63	SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO: 3	44-63	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 3	44-63	SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 3	44-63	SEQ ID NO: 28
SEQ ID NO: 3	44-63	SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO: 4	44-63	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 4	44-63	SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 4	44-63	SEQ ID NO: 28
SEQ ID NO: 4	44-63	SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO: 5	44-63	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 5	44-63	SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 5	44-63	SEQ ID NO: 28
SEQ ID NO: 5	44-63	SEQ ID NO: 29

[0236] 在各种实施方案中,本发明的双功能拮抗剂分子选自如表6中描述的分子的组:

[0237] 表6

[0238]

SEQ ID NO:
SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 11
SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO: 11
SEQ ID NO: 32
SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 34
SEQ ID NO: 35
SEQ ID NO: 36
SEQ ID NO: 37
SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 39
SEQ ID NO: 40
SEQ ID NO: 41
SEQ ID NO: 10、28 和 SEQ ID NO: 11、29

[0239] 多核苷酸

[0240] 在另一方面,本公开内容提供了分离的核酸分子,该分离的核酸分子包含编码本公开内容的双功能拮抗剂分子的多核苷酸。主题核酸可以是单链的或双链的。这样的核酸可以是DNA或RNA分子。DNA包括例如cDNA、基因组DNA、合成的DNA、通过PCR扩增的DNA及其组合。编码双功能拮抗剂分子的基因组DNA获取自基因组文库,该基因组文库对很多物种是可得的。合成的DNA是从化学合成重叠的寡核苷酸片段然后组装片段以重构编码区域和侧翼序列的部分或全部可得的。可以从指导mRNA的高水平合成的原核表达载体,诸如使用T7启动子和RNA聚合酶的载体获得RNA。cDNA可获取自从分离自表达双功能拮抗剂分子的各种组织的mRNA制备的文库。本公开内容的DNA分子包括全长基因以及多核苷酸及其片段。全长基因还可以包含编码N-末端信号序列的序列。

[0241] 在各种实施方案中,该分离的核酸分子包含本文描述的多核苷酸,并且还包含编码本文描述的至少一种异源蛋白的多核苷酸。在各种实施方案中,核酸分子还包含编码本文描述的接头或铰链接头的多核苷酸。

[0242] 在各种实施方案中,本公开内容的重组核酸可以可操作地连接至表达构建体中的一种或更多种调控核苷酸序列。调控序列是本领域公认的并且被选择以指导双功能拮抗剂分子的表达。因此,术语调控序列包括启动子、增强子和其他表达控制元件。示例性调控序列描述于Goeddel;Gene Expression Technology:Methods in Enzymology,Academic Press,San Diego,Calif.(1990)。通常,所述一种或更多种调控核苷酸序列可以包括但不限于启动子序列、前导或信号序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列、以及增强子或激活序列。本公开内容设想了本领域已知的组成型或诱导型启动子。启动子可以是自然存在的启动子或者组合多于一个启动子的元件的杂合启动子。表达构建体可以存在于细胞中的附加体诸如质粒上,或者表达构建体可以插入染色体中。在各种实施方案中,表达构建体包含可选择的标志物基因以允许选择转化的宿主细胞。可选择的标志物基因是本领域众所周知的并且将随着使用的宿主细胞变化。

[0243] 在本公开内容的另一方面,在包含编码双功能拮抗剂分子并可操作地连接至至少一个调控序列的核苷酸序列的表达载体中提供主题核酸。术语“表达载体”指用于从多核苷

酸序列表达多肽的质粒、噬菌体、病毒或载体。适合于在宿主细胞中表达的载体是容易地可得的并利用标准重组DNA技术将核酸分子插入到载体中。这样的载体可以包括很多种表达控制序列,当被可操作地连接至DNA序列时,所述表达控制序列控制该DNA序列的表达,并可以在这些载体中使用以表达编码双功能拮抗剂分子的DNA序列。这样的有用的表达控制序列包括例如SV40的早期启动子和晚期启动子、tet启动子、腺病毒或巨细胞病毒立即早期启动子、RSV启动子、lac系统、trp系统、TAC或TRC系统、其表达由T7 RNA聚合酶指导的T7启动子、 λ 噬菌体的主要操纵子和启动子区域、fd包衣蛋白的控制区域、3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶例如PhoS的启动子、酵母a-交配因子的启动子、杆状病毒系统的多角体启动子和已知控制原核细胞或真核细胞或其病毒的基因表达的其他序列,及其各种组合。应理解的是,表达载体的设计可以取决于诸如待转化的宿主细胞的选择和/或期望表达的蛋白的类型等因素。此外,还应考虑载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力、以及由载体编码的任何其他蛋白诸如抗生素标志物的表达。

[0244] 本公开内容的重组核酸可以通过将克隆的基因或其一部分连接到适合于在原核细胞、真核细胞(酵母、鸟类、昆虫或哺乳动物)或两者中表达的载体中来产生。用于产生重组双功能拮抗剂分子的表达媒介物包括质粒和其他载体。例如,合适的载体包括以下类型的质粒:用于在原核细胞诸如大肠杆菌(E.coli)中表达的pBR322衍生的质粒、pEMBL衍生的质粒、pEX衍生的质粒、pBTac衍生的质粒和pUC衍生的质粒。

[0245] 一些哺乳动物表达载体包含利于载体在细菌中增殖的原核序列以及在真核细胞中表达的一种或更多种真核转录单元两者。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg衍生的载体为适合于转染真核细胞的哺乳动物表达载体的实例。这些载体中的一些被来自细菌质粒诸如pBR322的序列修饰,以利于在原核细胞和真核细胞两者中复制和药物抗性选择。可选地,病毒诸如牛乳头瘤病毒(BPV-1)的衍生物或Epstein-Barr病毒(pHEBo、pREP衍生的和p205)可以用于蛋白在真核细胞中的瞬时表达。以下在基因疗法递送系统的描述中可以找到其他病毒(包括逆转录病毒)表达系统的实例。在质粒的制备中以及在宿主生物体的转化中采用的各种方法是本领域众所周知的。对于适合于原核细胞和真核细胞两者的其他表达系统以及一般的重组程序,参见Sambrook、Fritsch和Maniatis的Molecular Cloning A Laboratory Manual,第2版(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)第16和17章。在一些实例中,可以期望通过使用杆状病毒表达系统表达重组多肽。这样的杆状病毒表达系统的实例包括pVL衍生的载体(诸如pVL1392、pVL1393和pVL941)、pAcUW衍生的载体(诸如pAcUW1)以及pBlueBac衍生的载体(诸如含有B-gal的pBlueBac III)。

[0246] 在各种实施方案中,载体将被设计用于在CHO细胞中产生主题双功能拮抗剂分子,诸如Pcmv-Script载体(Stratagene,La Jolla,Calif.)、pcDNA4载体(Invitrogen,Carlsbad,Calif.)和pCI-neo载体(Promega,Madison,Wis.)。将明显的是,主题基因构建体可以被用于引起主题双功能拮抗剂分子在增殖于培养基中的细胞中表达,例如以产生用于纯化的蛋白,包括融合蛋白或变体蛋白。

[0247] 因此,本公开内容还涉及产生主题双功能拮抗剂分子的方法。例如,可以在允许发生双功能拮抗剂分子的表达的适当的条件下培养用编码双功能拮抗剂分子的表达载体转染的宿主细胞。双功能拮抗剂分子可以从含有双功能拮抗剂分子的细胞分泌和从含有双功

能拮抗剂分子的细胞和培养基的混合物分离。可选地,双功能拮抗剂分子可以保留在细胞质中或保留在膜级分中,并收获、裂解细胞和分离蛋白。细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其他副产物。适合于细胞培养的培养基是本领域熟知的。

[0248] 本公开内容的多肽和蛋白可以根据本领域技术人员所熟知的蛋白纯化技术来纯化。这些技术在一个层面上包括蛋白级分和非蛋白级分的粗分级。将肽或多肽与其他蛋白分离后,可以利用层析技术和电泳技术进一步纯化感兴趣的肽或多肽以实现部分或完全纯化(或纯化至均一)。如本文使用的术语“分离的多肽”或“纯化的多肽”意图指可从其他组分分离的组合物,其中多肽被纯化至相对于其天然可获得的状态的任何程度。因此纯化的多肽还指脱离其可以天然存在的环境的多肽。通常,“纯化的”将指已经经历分级移除各种其他组分的多肽组合物,并且该组合物基本上保留了其表达的生物活性。当使用术语“基本上纯化的”时,该定义将指如下肽或多肽组合物:其中多肽或肽形成该组合物的大部分组分,诸如构成该组合物中的蛋白的约50%、约60%、约70%、约80%、约85%或约90%或更多。

[0249] 适用于纯化的各种技术对于本领域技术人员将是熟知的。这些技术包括例如用硫酸铵、PEG、抗体(免疫沉淀)等或通过热变性沉淀然后离心;层析,诸如亲和层析(蛋白-A柱)、离子交换、凝胶过滤、反相、羟基磷灰石、疏水相互作用层析;等电聚焦;凝胶电泳;以及这些技术的组合。如本领域通常已知的,认为进行各种纯化步骤的顺序可以改变,或者某些步骤可以省略,并且仍导致用于制备基本上纯化的多肽的合适方法。

[0250] 药物组合物

[0251] 在另一方面,本公开内容提供了药物组合物,其包含与药学上可接受的运载体混合的分离的双功能拮抗剂分子。这样的药学上可接受的运载体是本领域普通技术人员所熟知并理解的,并且已被广泛描述(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,A.R.Gennaro编辑,Mack Publishing Company,1990)。可以包括药学上可接受的运载体用于改变、保持或维持例如pH、摩尔渗透压浓度、黏度、透光率、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、成分吸收或渗透的目的。这样的药物组合物可以影响多肽的物理状态、稳定性、体内释放速率、以及体内清除速率。合适的药学上可接受的运载体包括但不限于,氨基酸(诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);抗生素;抗氧化剂(诸如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲剂(诸如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐、其他有机酸);膨胀剂(诸如甘露醇或甘氨酸);螯合剂(诸如乙二胺四乙酸(EDTA));复合剂(complexing agent)(诸如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精);填充剂;单糖;二糖和其他糖类(诸如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白(诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂;调味和稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(诸如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;盐形成抗衡离子(诸如钠);防腐剂(诸如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸或过氧化氢);溶剂(诸如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(诸如甘露醇或山梨醇);悬浮剂;表面活性剂或润湿剂(诸如普朗尼克,PEG,山梨醇酐酯(sorbitan esters),聚山梨醇酯诸如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80, triton, 氨丁三醇,卵磷脂,胆固醇, tyloxapal);稳定性增强剂(蔗糖或山梨醇);张性增强剂(诸如碱金属卤化物(优选氯化钠或氯化钾)、甘露醇和山梨醇);递送媒介物;稀释剂;赋形剂和/或药物佐剂。

[0252] 药物组合物中的主要媒介物(vehicle)或运载体(carrier)实质上可以是水性的

或非水性的。例如,合适的媒介物或运载体可以是可能用于胃肠外施用的组合物中常见的其他材料补充的注射用水、生理盐水溶液或人工脑脊液。中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是另外的示例性媒介物。其他的示例性药物组合物包含约pH 7.0-8.5的Tris缓冲液或约pH 4.0-5.5的乙酸盐缓冲液,其还可以包含山梨醇或其合适的替代物。在本公开内容的一种实施方案中,可以通过将选择的具有期望的纯度的组合物与任选的制剂用剂(formulation agent) (Remington's Pharmaceutical Sciences, 同上)混合来制备组合物用于以冻干的块状物或水性溶液形式贮存。另外,可以使用适当的赋形剂诸如蔗糖将治疗性组合物配制为冻干物。最佳的药物组合物将取决于例如意图的施用途径、递送形式或期望的剂量由本领域普通技术人员来确定。

[0253] 当设想胃肠外施用,治疗性药物组合物可以为在药学上可接受的媒介物中包含期望的双功能拮抗剂分子的无致热原、胃肠外可接受的水性溶液的形式。特别适用于胃肠外注射的媒介物是无菌蒸馏水,其中多肽被配制为适当地储存的无菌、等渗溶液。在各种实施方案中,适用于可注射施用的药物制剂可以在水性溶液,优选地在生理上相容的缓冲液诸如Hanks溶液、Ringer溶液或生理缓冲盐水中配制。水性注射悬浮液可以包含增加悬浮液黏度的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨醇或右旋糖酐。另外,可以将活性化合物的悬浮液制备成适当的油性注射悬浮液。任选地,悬浮液还可以包含合适的稳定剂或增加化合物的溶解度并允许制备高度浓缩的溶液的剂。

[0254] 在各种实施方案中,可以使用胶体分散系统将治疗性药物组合物配制为用于靶向递送。胶体分散系统包括大分子复合体、纳米胶囊、微球、珠、和基于脂质的系统,基于脂质的系统包括水包油乳液、微团、混合的微团和脂质体。在脂质体产生中有用的脂质的实例包括磷脂酰化合物,诸如磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘脂、脑苷脂和神经节苷脂。示例性磷脂包括卵磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰胆碱。脂质体的靶向还可能基于例如器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性并且是本领域已知的。

[0255] 在各种实施方案中,设想了药物组合物的口服施用。以该形式施用的药物组合物可以使用或不使用固体剂型诸如片剂和胶囊的复合中通常使用的那些运载体配制。在用于口服施用的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、粉末、颗粒等)中,本公开内容的一种或更多种治疗化合物可以与一种或更多种药学上可接受的运载体诸如柠檬酸钠或磷酸氢钙(dicalcium phosphate),和/或以下中的任一种混合:(1)填充剂或增量剂(extender),诸如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2)粘合剂,诸如例如羧甲基纤维素、藻酸盐(alginate)、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯树胶;(3)保湿剂,诸如甘油;(4)崩解剂,诸如琼脂-琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5)溶液阻滞剂,诸如石蜡;(6)吸收加速剂,诸如季铵化合物;(7)润湿剂,诸如例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;(8)吸收剂,诸如高岭土和膨润土;(9)润滑剂,诸如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠、及其混合物;以及(10)着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情况中,药物组合物还可以包含缓冲剂。相似类型的固体组合物还可以用作使用诸如乳糖(lactose)或乳糖(milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等的赋形剂软填充和硬填充的明胶胶囊中的填充剂。用于口服施用的液体剂型包括药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆剂和酏剂。除了活性成分之外,液体剂型可以包含本领域中常用的惰性稀释剂,诸如水或其他的

溶剂、增溶剂和乳化剂诸如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特别地,棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨醇的脂肪酸酯、以及其混合物。除惰性稀释剂之外,口服组合物还可以包含佐剂,诸如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、增甜剂、调味剂、着色剂、增香剂和防腐剂。

[0256] 在各种实施方案中,设想了将药物组合物表面施用(topical administration)至皮肤或施用至黏膜。表面制剂还可以包含已知作为皮肤或角质层渗透增强剂有效的很多种剂中的一种或更多种。这些剂的实例是2-吡咯烷酮、N-甲基-2-吡咯烷酮、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、丙二醇、甲醇或异丙醇、二甲基亚砷和氮酮。还可以包含另外的剂以使制剂在化妆品上可接受。这些剂的实例是脂肪、蜡、油、染料、芳香剂、防腐剂、稳定剂和表面活性剂。还可以包含角质软化剂(keratolytic agent),诸如本领域已知的那些角质软化剂。实例是水杨酸和硫磺。用于表面或经皮施用的剂量形式包括粉末、喷雾剂、软膏剂、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶、溶液、贴剂和吸入剂。可以在无菌条件下将活性化合物与药学上可接受的运载体以及与可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。除了本公开内容的主题化合物(例如,双功能拮抗剂分子)之外,软膏剂、糊剂、霜剂和凝胶可以包含赋形剂,诸如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄芪胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石和氧化锌,或其混合物。

[0257] 在本文中设想用于使用的另外的药物组合物包括在持续或控制递送的制剂中包含多肽的制剂。用于配制各种其他持续或控制递送工具诸如脂质体运载体、生物可侵蚀的微粒或多孔珠和贮库型注射剂的技术也是本领域技术人员所已知的。

[0258] 待在治疗上使用的药物组合物的有效量将取决于例如治疗背景和治疗目标。本领域技术人员将领会到,用于治疗的适当剂量水平将因此部分地取决于递送的分子、多肽所用于的适应症、施用途、以及患者的尺寸(体重、体表或器官尺寸)和状况(年龄和总体健康)而变化。因此,临床医师可以调整剂量并且改变使用途径以获得最佳治疗效果。通常的剂量可以取决于以上提到的因素从约0.1mg/kg至多达约100mg/kg或更多变化。多肽组合物可以优选地注射或静脉内施用。长效药物组合物可以取决于特定制剂的半衰期和清除速率每三天至每四天、每周或每两周施用。给药频率将取决于使用的制剂中的多肽的药代动力学参数。通常,施用组合物直至达到实现期望的效果的剂量。因此组合物可以作为单剂量,或作为随时间的多个剂量(相同或不同的浓度/剂量),或者作为持续的输注施用。常规地进行适当剂量的进一步改进。适当的剂量可以通过使用适当剂量响应数据来确定。

[0259] 药物组合物的施用途根据已知方法,例如口服;通过静脉内、腹膜内、脑内(实质内)、脑室内、肌内、眼内、动脉内、门静脉内、病灶内途径,髓内、囊内、心室内、经皮、皮下或腹膜内注射;以及鼻内、肠内、表面、舌下、尿道、阴道或直肠方式;通过持续释放系统或通过植入装置。当期望时,组合物可以通过团注(bolus)注射施用,或通过输注持续施用,或通过植入装置施用。可选地或另外地,组合物可以经由期望的分子已经吸附或包封至其上的膜、海绵状物或另一种适当的材料的植入局部施用。当使用植入装置时,可以将该装置植入到任何合适的组织或器官中,并且期望的分子的递送可以经由扩散施用、缓释团注或持续施用。

[0260] 治疗用途

[0261] 在另一方面,本公开内容提供了治疗或预防其发病机制涉及激活TNF- α 介导的NF- κ B信号传导途径和TGF- β 介导的Smad2/3信号传导途径的各种复杂疾病状况的方法。

[0262] 在各种实施方案中,本发明的新颖的双功能拮抗剂分子可广泛应用于治疗受试者的包括但不限于以下状况的各种紊乱:贫血、炎症、肺高压、心力衰竭、肾衰竭、肌营养不良、关节炎、器官纤维化和癌症,包括向所述受试者施用治疗有效量的(作为单一疗法或在组合疗法方案中)在药学上可接受的运载体中的本公开内容的双功能拮抗剂分子,其中这样的施用减弱肌肉质量(muscle mass)的损失和/或肌肉功能的损失。特别地,本公开内容的双功能拮抗剂分子可作为单一疗法或与免疫检查点抑制剂诸如抗PD1、抗PDL1和抗CTL4抗体组合的共疗法,用于治疗各种复杂疾病,包括但不限于血液紊乱(诸如无效红细胞生成、全血细胞减少、骨髓增生异常综合征、骨髓衰竭、白血病、 β -地中海贫血和镰状细胞病),纤维化疾病(诸如非酒精性脂肪性肝炎或NASH、肝硬化、肺纤维化、肾纤维化、多囊肾病、心脏纤维化、肌纤维化、骨髓纤维化、皮肤纤维化和眼的纤维化),肌营养不良(诸如DMD、Becker MD、肢带型MD、肌强直性MD和FSHD),肌炎(诸如多发性肌炎和皮肌炎),肌病(包括遗传性肌病和获得性肌病),运动神经元疾病(诸如Lou Gehrig病或ALS),神经退行性疾病(诸如帕金森病、亨廷顿病和阿尔茨海默病),癌症恶病质、肌少症,骨质疏松紊乱(诸如骨折和癌症中的转移),慢性心力衰竭,慢性肾病(CKD),糖尿病,慢性阻塞性肺病(COPD),由感染引起的细胞因子风暴(诸如艾滋病、结核病、SARS-CoV和脓毒症),关节炎,包括类风湿性关节炎(RA)和骨关节炎(OA),创伤(诸如烧伤或摩托车事故),ICU重症监护,去神经支配(诸如中风或脊髓损伤),长时间卧床休息,肌少症性肥胖以及与年龄相关的肌肉和骨损失(包括绝经后骨质疏松症和与年龄相关的肌少症),器官或组织移植(诸如心脏移植、肾移植和肝移植),以及各种恶性肿瘤(诸如白血病、黑色素瘤、乳腺癌、多发性骨髓瘤、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、结肠直肠癌、脑癌、膀胱癌和头颈癌)。

[0263] 本公开内容提供了治疗受试者的心血管疾病的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的(作为单一疗法或在组合疗法方案中)在药学上可接受的运载体中的本公开内容的双功能拮抗剂分子,其中这样的施用减弱血管和肌肉(包括平滑肌、心肌和骨骼肌)的炎症和纤维化。特别地,本公开内容的双功能拮抗剂分子可用于治疗心力衰竭、肺高压(包括肺动脉高压)、心肌炎、冠状动脉疾病、心肌梗塞、心律失常、心脏瓣膜疾病、心肌病、心包疾病(pericardial disease)、主动脉疾病、马方综合征和心脏萎缩。

[0264] 本公开内容提供了治疗受试者的心脏功能异常或心力衰竭的方法,包括将有效量的双功能拮抗剂分子施用至受试者。该调节可以使所述受试者的心脏功能改善至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。心脏功能的改善可以通过超声心动描记术测量以下来评价:1)针对排出的血液体积和排出效率的心脏泵功能,和2)针对心肌收缩的强度的心肌功能。

[0265] 本公开内容提供了用于治疗受试者的新陈代谢紊乱的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的(作为单一疗法或在组合疗法方案中)在药学上可接受的运载体中的本公开内容的双功能拮抗剂分子。特别地,本公开内容的双功能拮抗剂分子在治疗选自以下的新陈代谢疾病中是有用的:肥胖症、血脂异常、糖尿病、胰岛素耐受、肌少型肥胖症、脂肪变性、和新陈代谢综合征,以及糖尿病性肌病、肾病、神经病、视网膜病、骨质损失、受损的葡萄

糖耐量、低血糖症和雄激素剥夺。

[0266] 本公开内容提供了治疗受试者的癌细胞的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的(作为单一疗法或在组合疗法方案中)在药学上可接受的运载体中的本公开内容的双功能拮抗剂分子,其中这样的施用抑制癌细胞的生长和/或增殖。特别地,本公开内容的双功能拮抗剂分子在治疗以癌症为特征的紊乱中是有用的。这样的紊乱包括但不限于实体瘤,诸如乳腺癌、呼吸道癌、脑癌、生殖器官的癌症、消化道的癌症、尿道的癌症、眼癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌以及其远端转移,淋巴瘤,肉瘤,多发性骨髓瘤和白血病。乳腺癌的实例包括但不限于侵袭性导管癌、侵袭性小叶癌、原位导管癌和原位小叶癌。呼吸道的癌症的实例包括但不限于小细胞肺癌和非小细胞肺癌,以及支气管腺瘤和胸膜肺母细胞瘤(pleuropulmonary blastoma)。脑癌的实例包括但不限于脑干和下丘脑胶质瘤、小脑和大脑星形细胞瘤、髓母细胞瘤、室管膜瘤,以及神经外胚层和松果体肿瘤。雄性生殖器官的肿瘤包括但不限于前列腺癌和睾丸癌。雌性生殖器官的肿瘤包括但不限于子宫内膜癌、宫颈癌、卵巢癌、阴道癌和外阴癌,以及子宫的肉瘤。消化道的肿瘤包括但不限于肝癌、结肠癌、结肠直肠癌、食管癌、胆囊癌、胃癌、胰腺癌、直肠癌、小肠癌和唾液腺癌。尿道的肿瘤包括但不限于膀胱癌、阴茎癌、肾癌、肾盂癌、输尿管癌和尿道癌。眼癌包括但不限于眼内黑色素瘤和视网膜母细胞瘤。肝癌的实例包括但不限于肝细胞癌(具有或不具有纤维板层变体的肝细胞癌)、胆管癌(肝内胆管癌)和混合性肝细胞胆管癌。皮肤癌包括但不限于鳞状细胞癌、卡波济氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、恶性黑色素瘤、梅克尔细胞癌(Merkel cell skin cancer)和非黑色素瘤皮肤癌。头颈癌包括但不限于鼻咽癌以及唇和口腔癌。淋巴瘤包括但不限于AIDS相关淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)和中枢神经系统淋巴瘤。肉瘤包括但不限于软组织肉瘤、骨肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、淋巴肉瘤和横纹肌肉瘤。白血病包括但不限于急性髓性白血病、急性淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病和毛细胞白血病。在某些实施方案中,癌症将是具有TNF- α 和TGF- β 的高表达的癌症,例如胰腺癌、胃癌、卵巢癌、结肠直肠癌、黑色素瘤、白血病、肺癌、前列腺癌、脑癌、膀胱癌和头颈癌。

[0267] 本公开内容提供了治疗受试者的慢性肾病(CKD)的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的(作为单一疗法或在组合疗法方案中)在药学上可接受的运载体中的本公开内容的双功能拮抗剂分子,其中这样的施用减弱肾功能损失和防止肌肉损失或抑制肾纤维化。特别地,本公开内容的双功能拮抗剂分子在治疗CKD,包括肾衰竭、间质性纤维化和肾透析以及与CKD相关的蛋白能量耗损(protein energy wasting, PEW)中是有用的。该调节可以使所述受试者的CKD或PEW改善至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。肾功能的改善可以通过测量尿中的蛋白/肌酐比率(PCR)和肾小球过滤比率(GFR)来评价。PEW的改善可以通过测量白蛋白和炎症细胞因子的血清水平、蛋白合成和降解的速率、体重(body mass)、肌肉质量、身体活动和营养结果来评价。

[0268] 本公开内容提供了用于治疗受试者的自身免疫疾病的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的(作为单一疗法或在组合疗法方案中)在药学上可接受的运载体中的本公开内容的双功能拮抗剂分子。特别地,本公开内容的双功能拮抗剂分子在治疗选自以下的

自身免疫紊乱中是有用的：多发性硬化、糖尿病(1型)、肾小球性肾炎、重症肌无力、银屑病、全身性硬化症和系统性红斑狼疮、多肌炎和原发性胆汁性肝硬化。

[0269] 本公开内容提供了用于治疗受试者的关节炎的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的(作为单一疗法或在组合疗法方案中)在药学上可接受的运载体中的本公开内容的双功能拮抗剂分子。特别地，本公开内容的双功能拮抗剂分子在治疗选自类风湿性关节炎和骨关节炎的关节炎中是有用的。

[0270] 本公开内容提供了用于治疗受试者的厌食症的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的(作为单一疗法或在组合疗法方案中)在药学上可接受的运载体中的本公开内容的双功能拮抗剂分子。特别地，本公开内容的双功能拮抗剂分子在治疗选自神经性厌食症和厌食症-恶病质综合征的厌食症中是有用的。

[0271] 本公开内容提供了用于治疗受试者的肝病的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的(作为单一疗法或在组合疗法方案中)在药学上可接受的运载体中的本公开内容的双功能拮抗剂分子。特别地，本公开内容的双功能拮抗剂分子在治疗选自以下的肝病中是有用的：非酒精性脂肪肝病、非酒精性脂肪性肝炎、酒精性脂肪肝病、肝硬化、肝衰竭、自身免疫性肝炎和肝细胞癌。

[0272] 本公开内容提供了用于受试者的器官或组织移植的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的(作为单一疗法或在组合疗法方案中)在药学上可接受的运载体中的本公开内容的双功能拮抗剂分子。特别地，本公开内容的双功能拮抗剂分子在治疗选自心脏、肾、肝、肺、胰腺、肠和胸腺的器官移植，或选自骨、肌腱、角膜、皮肤、心脏瓣膜、神经和血管的组织移植的移植中是有用的。

[0273] 本公开内容提供了用于治疗受试者的贫血症的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的(作为单一疗法或在组合疗法方案中)在药学上可接受的运载体中的本公开内容的双功能拮抗剂分子。在各种实施方案中，贫血症选自各种贫血性紊乱，包括癌相关性贫血、化学疗法引起的贫血、慢性肾病相关性贫血、缺铁性贫血、铁和血色素沉着病、地中海贫血、镰状细胞病、再生障碍性贫血、骨髓增生异常综合征、全血细胞减少和骨髓衰竭。

[0274] 本公开内容提供了用于治疗受试者的纤维化的方法，包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的本发明的药物组合物。在一种实施方案中，受试者是人类受试者。在各种实施方案中，纤维化选自肺纤维化(例如特发性肺纤维化和囊性纤维化)、肝纤维化(诸如非酒精性脂肪性肝炎和肝硬化)、气道纤维化(诸如哮喘)、心脏纤维化(诸如心肌梗死、舒张功能障碍或心脏瓣膜疾病)、肾纤维化(诸如间质纤维化)、骨髓纤维化、特发性腹膜后纤维化、肾源性纤维化皮肤病变、炎性肠病中的肠纤维化(诱导克罗恩病)、瘢痕疙瘩、硬皮病、系统性硬化症、手的纤维化(诸如迪皮特朗病)、眼的纤维化和关节纤维化。

[0275] 本公开内容提供了治疗受试者的疼痛的方法，包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的本发明的药物组合物。在一种实施方案中，受试者是人类受试者。在各种实施方案中，疼痛选自神经性疼痛、炎性疼痛或癌症疼痛。

[0276] 本公开内容提供了治疗受试者的骨病的方法，包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的本发明的药物组合物。在一种实施方案中，受试者是人类受试者。在各种实施方案中，骨病选自骨软化症、骨质疏松症、成骨不全症、进行性骨化性纤维发育不良、皮质类固醇引起的骨质损失、骨折和骨转移。

[0277] 本公开内容提供了抑制受试者的肌肉质量和/或肌肉功能的损失的方法,包括将有效量的双功能拮抗剂分子施用至受试者。该调节可以使所述受试者的肌肉质量和/或功能的损失减弱至少5%、10%、至少25%、至少50%、至少75%或至少90%。肌肉质量和功能的损失的抑制可以通过利用成像技术和身体力量测试(physical strength test)来评价。用于肌肉质量评价的成像技术的实例包括双能X射线吸收测定(DEXA)、磁共振成像(MRI)和计算机断层扫描(CT)。肌肉功能测试的实例包括握力强度测试、登楼测试、简易体能状况量表(short physical performance battery, SPPB)和6分钟步行,以及用于测量呼吸肌强度的最大吸气压力(MIP)和最大呼气压力(MEP)。

[0278] “治疗有效量”或“治疗有效剂量”指将使被治疗的紊乱的一种或更多种症状减轻至一定程度的被施用的治疗剂的量。

[0279] 可以通过确定 IC_{50} 从细胞培养测定初始评估治疗有效剂量。随后,可以在动物模型中配制剂量以获得包括如在细胞培养中确定的 IC_{50} 的循环血浆浓度范围。这些信息可用于更精确地确定人体中的有用剂量。可以例如通过HPLC测量血浆中的水平。确切的组成、施用途径和剂量可以由个体医师鉴于受试者的状况选择。

[0280] 可以调整剂量方案以提供最适的期望应答(例如,治疗应答或预防应答)。例如,可以施用单次团注,可以随时间施用多个分次剂量(多个或重复或维持)并且剂量可以如治疗情境的迫切需要指示的按比例减少或增加。为了容易施用和剂量的一致性,配制剂量单位形式的胃肠外组合物是特别有利的。本文使用的剂量单位形式指适于作为用于待被治疗的哺乳动物受试者的单一剂量的物理上的分散单元;每一个单元含有被计算以产生期望的治疗效果的预先确定的量的活性化合物与要求的药学运载体的组合。本公开内容的剂量单位形式的规格将主要由抗体的独特性质和待被实现的特定治疗效果或预防效果决定。

[0281] 因此,技术人员将理解,基于本文提供的公开内容,根据治疗领域公知的方法调整剂量和给药方案。即,最大可耐受剂量可以被容易地确定,并且向受试者提供可检测的治疗益处有效量也可以被确定,向受试者提供可检测的治疗益处而施用每个剂的时间要求同样可以被确定。因此,尽管在本文中举例说明了某个剂量和施用方案,这些实例绝没限制在实践本公开内容时可以被提供至受试者的剂量和施用方案。

[0282] 应注意到,剂量值可以随着待被缓解的状况的类型和严重性变化,并且可以包括单剂量或多剂量。还应理解,对于任何特定受试者,应根据个体需要和施用或监督组合物的施用的人士的专业判断随时间调整具体剂量方案,并且本文列出的剂量范围仅是示例性的并且不意图限制所要求保护的组合物的范围或实践。另外,使用此公开内容的组合物的剂量方案可以基于多个因素,包括疾病的类型、受试者的年龄、体重、性别、医学状况、状况的严重性、施用途径和使用的特定抗体。因此,给药方案可以广泛变化,但可以使用标准方法常规地确定。例如,可以基于药代动力学或药效学参数调整剂量,所述参数可以包括临床作用诸如毒性作用和/或实验值。因此,本公开内容包括如技术人员确定的受试者内的剂量递增(intra-subject dose-escalation)。确定适当的剂量和方案是相关技术领域公知的并且可以被理解为一旦提供本文公开的教导,则由技术人员掌握。

[0283] 本公开内容的双功能拮抗剂分子的治疗有效量或预防有效量的示例性、非限制性每日剂量范围可以为0.001至100mg/kg体重、0.001至90mg/kg体重、0.001至80mg/kg体重、0.001至70mg/kg体重、0.001至60mg/kg体重、0.001至50mg/kg体重、0.001至40mg/kg体重、

0.001至30mg/kg体重、0.001至20mg/kg体重、0.001至10mg/kg体重、0.001至5mg/kg体重、0.001至4mg/kg体重、0.001至3mg/kg体重、0.001至2mg/kg体重、0.001至1mg/kg体重、0.010至50mg/kg体重、0.010至40mg/kg体重、0.010至30mg/kg体重、0.010至20mg/kg体重、0.010至10mg/kg体重、0.010至5mg/kg体重、0.010至4mg/kg体重、0.010至3mg/kg体重、0.010至2mg/kg体重、0.010至1mg/kg体重、0.1至50mg/kg体重、0.1至40mg/kg体重、0.1至30mg/kg体重、0.1至20mg/kg体重、0.1至10mg/kg体重、0.1至5mg/kg体重、0.1至4mg/kg体重、0.1至3mg/kg体重、0.1至2mg/kg体重、0.1至1mg/kg体重、1至50mg/kg体重、1至40mg/kg体重、1至30mg/kg体重、1至20mg/kg体重、1至10mg/kg体重、1至5mg/kg体重、1至4mg/kg体重、1至3mg/kg体重、1至2mg/kg或1至1mg/kg体重。应注意到,剂量值可以随着待被缓解的状况的类型和严重性变化。还应理解,对于任何特定受试者,应根据个体需要和施用或监督组合物的施用的人士的专业判断随时间调整具体剂量方案,并且本文列出的剂量范围仅是示例性的并且不意图限制所要求保护的组合物的范围或实践。

[0284] 在各种实施方案中,施用的总剂量将获得范围在例如约1至1000 μ g/ml、约1至750 μ g/ml、约1至500 μ g/ml、约1至250 μ g/ml、约10至1000 μ g/ml、约10至750 μ g/ml、约10至500 μ g/ml、约10至250 μ g/ml、约20至1000 μ g/ml、约20至750 μ g/ml、约20至500 μ g/ml、约20至250 μ g/ml、约30至1000 μ g/ml、约30至750 μ g/ml、约30至500 μ g/ml、约30至250 μ g/ml的血浆抗体浓度。

[0285] 本公开内容的药物组合物的毒性和治疗指数可在细胞培养物或实验动物中通过标准制药学程序确定,例如,用于确定LD₅₀(对群体的50%致死的剂量)和ED₅₀(对群体的50%治疗有效的剂量)。毒性和治疗有效剂量之间的剂量比是治疗指数,并且其可以表示为比率LD₅₀/ED₅₀。表现出大治疗指数的组合物通常是优选的。

[0286] 双功能拮抗剂分子药物组合物的施用的给药频率取决于疗法的性质和被治疗的特定疾病。受试者可以以规律间隔治疗,诸如每周地或每月地,直到获得期望的治疗结果。示例性的给药频率包括但不限于:无间断地每周一次;每隔一周地每周一次;每2周一次;每3周一次;无间断地每周一次,持续2周,随后每月一次;无间断地每周一次,持续3周,随后每月一次;每月一次;每隔一个月一次;每3个月一次;每4个月一次;每5个月一次;或每6个月一次,或每年一次。

[0287] 组合疗法

[0288] 如本文使用的,提及本公开内容的双功能拮抗剂分子和一种或更多种其他治疗剂时,术语“共施用(co-administration)”、“共施用(co-administered)”和“与...组合(in combination with)”旨在意指,并且的确指并包括以下:当这样的组分被一起配制成在基本上同时将所述组分释放至所述受试者的单一剂型时,将本公开内容的双功能拮抗剂分子和一种或更多种治疗剂的这样的组合同时施用至需要治疗的受试者;当这样的组分彼此分开配制成在基本上同时被所述受试者服用的单独的剂型,届时所述组分基本上同时释放至所述受试者时,将本公开内容的双功能拮抗剂分子和一种或更多种治疗剂的这样的组合基本上同时施用至需要治疗的受试者;当这样的组分彼此分开配制成以每次施用之间的显著的时间间隔被所述受试者在连续时间服用的单独的剂型,届时所述组分在基本上不同的时间释放至所述受试者时,将本公开内容的双功能拮抗剂分子和一种或更多种治疗剂的这样的组合依次施用至需要治疗的受试者;以及,当这样的组分一起配制成以受控方式释放所

述组分的单一剂型,届时它们在相同和/或不同的时间同时、连续和/或重叠地释放至所述受试者,将本公开内容的双功能拮抗剂分子和一种或更多种治疗剂的这样的组合依次施用至需要治疗的受试者,其中每个部分可通过相同或不同的途径施用。

[0289] 在另一方面,本公开内容涉及治疗受试者的肌肉萎缩性疾病的方法,包括施用以下的组合:a)治疗有效量的本公开内容的双功能拮抗剂分子;和b)第二剂。对于对使用单独的第二剂治疗是耐受性或难治性的肌肉萎缩性疾病,该组合疗法可以是特别有效的。在各种实施方案中,第二剂选自:生长激素,生长素释放肽(ghrelin),IGF1,炎性细胞因子诸如TNF- α 和TNF- β 、IL-6、IL-1及其受体的拮抗剂,以及肌生成抑制蛋白和激活蛋白A的其他拮抗剂及其受体。

[0290] 在各种实施方案中,组合疗法包括同时施用在同一药物组合物中或在单独的药物组合物中的双功能拮抗剂分子和第二剂的组合物。在各种实施方案中,依次施用双功能拮抗剂分子组合物和第二剂组合物,即,在施用第二剂组合物之前或之后施用双功能拮抗剂分子组合物。

[0291] 在各种实施方案中,双功能拮抗剂分子组合物和第二剂组合物的施用是同时的,即,双功能拮抗剂分子组合物和第二剂组合物的施用时间段彼此重叠。

[0292] 在各种实施方案中,双功能拮抗剂分子组合物和第二剂组合物的施用是非同时的。例如,在各种实施方案中,在施用第二剂组合物之前终止双功能拮抗剂分子组合物的施用。在各种实施方案中,在施用双功能拮抗剂分子组合物之前终止施用第二剂组合物。

[0293] 给出以下实施例以更充分地说明本公开内容,但并不被理解为限制其范围。

[0294] 实施例1

[0295] 本公开内容的双功能拮抗剂分子可以根据本领域技术人员熟知的重组DNA技术制备。在本实施例中,对双功能拮抗剂分子的制备进行了一般性描述。

[0296] 通过基因合成产生编码各种新颖的双功能拮抗多肽的cDNA,并将其亚克隆到哺乳动物表达质粒中。用编码个体双功能多肽拮抗剂的哺乳动物表达质粒瞬时或稳定地转染CHO细胞。将瞬时转染的CHO细胞或稳定转染的CHO池在高密度悬浮培养物中在32℃在CO₂振荡培养箱中生长6至8天。培养基在通过0.22 μ m过滤单元(Millipore Corporation,MA)后收集。使用AKTA PFLC系统(GE Healthcare)通过蛋白A亲和色谱从培养基纯化重组表达的双功能多肽。

[0297] 实施例2

[0298] 使用Octet RED96(FortéBIO, Pall Corporation, USA)通过生物层干涉测量法(BLI)测量个体双功能拮抗剂与人类配体的结合活性。结合分析通过以下来进行:首先将多肽双功能拮抗剂捕获到生物传感器。为了测量缔合和解离的速率,将捕获双功能拮抗剂的生物传感器浸入含有在1x动力学缓冲液中稀释的不同浓度配体(诸如TNF- α 、TGF- β 1和TGF- β 3)的孔中10min,然后将其浸入1x动力学缓冲液10-20min。注意,所有测试的配体都是基于它们的人类序列重组产生的。还将捕获双功能多肽拮抗剂的传感器浸没在含有1x动力学缓冲液的孔中,以允许单参考减除,从而补偿捕获的双功能拮抗剂的自然解离。使用8通道检测模式在生物传感器上收集结合传感图。使用FortéBIO数据采集软件v11.1(FortéBIO, Pall Corporation, USA)采集数据并分析。

[0299] 如表7中示出的,A119和A120以高亲和力与TNF- α 、TGF- β 1和TGF- β 3结合。

[0300] 表7

结合亲和力 KD (M)			
	TNF- α	TGF- β 1	TGF- β 3
A119	$\sim 1.0\text{E}-12$	$\sim 5.07\text{E}-10$	$\sim 1.0\text{E}-12$
A120	$\sim 1.0\text{E}-12$	$\sim 5.07\text{E}-10$	$\sim 1.0\text{E}-12$

[0302] 使用BLI分析检查以双特异性抗体形式设计的本发明的代表性双功能拮抗剂A131的配体结合亲和力。如表8中示出的, A131能够以高亲和力结合TNF- α 和TGF- β 两者。

[0303] 表8

	TNF- α 结合亲和力(KD M)	TGF- β 1 结合亲和力(KD M)	TGF- β 2 结合亲和力(KD M)	TGF- β 3 结合亲和力(KD M)
A131	$\sim 1.0\text{E}-12$	$\sim 1.0\text{E}-12$	$\sim 1.0\text{E}-8$	$\sim 5.0\text{E}-11$

[0305] 实施例3

[0306] 在本实施例中, 双功能拮抗剂的中和活性通过使用能够感测TNF- α 信号传导和TGF- β 信号传导的基于细胞的NF- κ B和Smad2/3报告物测定来检查。

[0307] Smad2/3信号传导测定。使用能够感测Smad2/3信号传导的工程化萤光素酶报告细胞系C2C12-CAGA-luc来测量细胞培养物中的TGF- β 信号传导活性。为了测量双功能拮抗剂的中和活性, 将1nM人类配体(TGF- β 1、TGF- β 2或TGF- β 3)与0.00004nM、0.0004nM、0.004nM、0.04nM、0.4nM、4nM、40nM和400nM的递增浓度的每种双功能拮抗剂在室温预孵育1小时。随后, 将反应混合物添加至C2C12-CAGA-luc细胞培养物。在CO₂培养箱中在37℃孵育5小时后, 通过使用LuminoSkan Ascent(Thermo Scientific)测量C2C12-CAGA-luc报告物培养物的萤光素酶活性。使用Prism软件(GraphPad Software)分析IC₅₀值并作图。

[0308] NF- κ B信号传导测定。为了测量TNF- α 中和活性, 使用稳定转染的能够感测TNF- α 介导的NF- κ B信号传导的萤光素酶报告细胞系K536-NF- κ B-luc来对每种双功能拮抗剂阻断TNF- α 介导的NF- κ B信号传导的IC₅₀值进行定量。特别地, 为了测量TNF- α 中和活性, 将终浓度为0.02nM的TNF- α 与0.00001nM、0.0001nM、0.001nM、0.01nM、0.1nM、1.0nM、10nM和100nM的递增浓度的个体双功能拮抗剂在室温预孵育1小时。然后将反应混合物添加到K536-NF- κ B-luc报告细胞培养物中。在37℃在CO₂培养箱中孵育5小时后, 使用Luminoskan Ascent(Thermo Scientific)测量K536-NF- κ B-luc报告物培养物的萤光素酶活性。使用Prism软件(GraphPad Software)计算基于细胞的TNF- α 中和IC₅₀值并作图。

[0309] 如图4和图5中描绘的, 在基于细胞的测定中, A-119和A-120强力地中和TNF- α 、TGF- β 1和TGF- β 3。

[0310] 实施例4

[0311] 肺动脉高压(PAH)的特征是由于肺动脉平滑肌细胞的增殖和肥大以及细胞外基质沉积增加而导致肺动脉壁增厚。TNF- α 和TGF- β 已被示出在PAH患者的肺组织中和PAH动物模型中显著升高。抑制TNF- α 或TGF- β 已被示出减弱肺高压。因此, TNF- α 和TGF- β 两者与PAH的发病机制有关。

[0312] 在本实施例中, 通过在存在TNF- α 和TGF- β 的情况下使用人类原代肺动脉平滑肌细胞培养物, 研究了与抗TNF抗体和TGFRII-Fc相比, TNF- α 和TGF- β 的双功能拮抗剂A120影响

肺动脉平滑肌细胞重塑的能力。

[0313] 将人类原代肺动脉平滑肌细胞(ATCC)在37℃的CO₂培养箱中在补充有10% FBS的血管平滑肌培养基中生长。在达到80%汇合后,将细胞重新铺在补充有0.2% FBS的培养基中,并在如下的添加或不添加各种剂的不同条件下孵育:1)无,2)TNF- α ,3)TGF- β 1,4)TNF- α +TGF- β 1,5)TNF- α +TGF- β 1+抗TNF抗体,6)TNF- α +TGF- β 1+TGFRII-Fc,和7)TNF- α +TGF- β 1+A120。孵育72小时后,用耦合有数码相机的倒置显微镜对细胞培养物拍照。使用ImageJ软件进行形态分析。

[0314] 图6和图7描绘了TNF- α 、TGF- β 1以及TNF- α 和TGF- β 1的组合对人类原代肺动脉平滑肌细胞(PASMC)的细胞增殖和细胞尺寸的影响。此外,这些图还分别图示了在存在外源性添加的TNF- α 和TGF- β 1的情况下,抗TNF抗体、TGF- β 中和蛋白TGFRII-Fc和双功能拮抗剂A120对细胞培养物中PASMC的增殖和尺寸的影响。数据表明,向培养物中添加TNF- α 由于加速细胞增殖而导致PASMC的增生(图6,图B),向培养物中添加TGF- β 1由于细胞尺寸的增大而导致PASMC的肥大(图6,图C),并且向培养物中添加TNF- α 和TGF- β 1的组合,由于细胞增殖和细胞尺寸的并行地增加而导致PASMC的增生和肥大(图6,图D)。因此,暴露于升高的TNF- α 和TGF- β 1后,PASMC经历了以增生和肥大两者为特征的明显的病理性重塑。此外,在TNF- α 和TGF- β 1升高的背景下,抗TNF抗体对TNF- α 的抑制防止PASMC的增生而不是肥大(图6,图E),TGFRII-Fc对TGF- β 1的抑制减弱了PASMC的肥大而不是增生(图6,图F),并且A120对TNF- α 和TGF- β 1的并行抑制防止PASMC的增生和肥大两者(图6,图G)。对细胞数量(图7,图A)和细胞尺寸(图7,图B)的形态分析指示,与抗TNF抗体或TGFRII-Fc相比,A120能够更有效地抑制PASMC的病理性重塑。A120抑制PASMC的增生和肥大两者的优越能力表明,本发明中公开的TNF- α 和TGF- β 的新颖的双功能拮抗剂代表了治疗PAH的有前途的新的治疗方法。

[0315] 实施例5

[0316] 纤维化是一种以纤维组织替代功能性组织为特征的病理状态,可以发生在几乎任何种类的组织或器官中,导致各种纤维化疾病。作为主要的纤维化状况,特发性肺纤维化(IPF)涉及肺组织的广泛损伤,其是由于持续的炎症和过度的胶原原纤维的产生和向细胞外基质的沉积。TNF- α 和TGF- β 的表达水平已被示出在IPF患者的肺组织中以及肺纤维化动物模型中上调。TNF- α 升高介导肺部炎症,并也在肺部炎症向纤维化的转变中发挥作用,而TGF- β 升高可以通过刺激胶原原纤维的过度产生直接促进肺纤维化。

[0317] 在本实施例中,分别与抗TNF抗体和TGFRII-Fc比较,评估了TNF- α 和TGF- β 的新颖的双功能拮抗剂A120在博莱霉素引起的肺纤维化的疾病小鼠模型中治疗纤维化的能力。

[0318] 博莱霉素诱导的肺纤维化小鼠模型研究。所有涉及动物的程序都得到了Institutional Committee of Animal Care(动物护理机构委员会)的批准。8周龄的雄性C57BL/6小鼠购自Jackson Laboratories。将小鼠在12-h光/暗循环中维持,并使其自由接触水和啮齿动物实验室食物(rodent laboratory chow)。小鼠在接受治疗前适应1周。将博莱霉素(Sigma)溶解在无菌的0.9%盐水中,并以每只动物0.5mg/kg的单剂量施用。对照动物仅接受盐水。所有动物在第0天接受气管内注射(IT)输注的博莱霉素或盐水。将小鼠随机分配至以下各组:(1)IT盐水(对照);(2)IT博莱霉素(博莱霉素);(3)IT博莱霉素与TGFRII-Fc治疗(博莱霉素+TGFRII-Fc);(4)IT博莱霉素与抗TNF抗体治疗(博莱霉素+TNF Ab);(5)IT博莱霉素与A120治疗(博莱霉素+A120)。从第-2天开始,将TGFRII-Fc、抗TNF和A-120分别

给予各个小鼠组,每周一次通过SC施用,以5mg/kg和10mg/kg之间的剂量,用每种剂的分子量标准化。治疗两周后,处死动物,并将右肺组织收集在盒中,并固定在中性缓冲的福尔马林中。对于组织学评估,将样品在分级乙醇系列中脱水,在二甲苯中澄清并包埋在石蜡中。切取4-6 μ m厚的切片,并用苏木精和伊红(H&E)、Masson三色(TM)和与HRP偶合的抗 α -SMA抗体染色。通过Ashcroft评分系统(Hübner等人,2008.PMID:18476815;DOI:10.2144/000112729)对纤维化肺损伤进行组织学评估。Ashcroft评分在10倍放大进行分析。

[0319] 图8示出了来自对照和博莱霉素诱导的肺纤维化小鼠的H&E染色的肺切片的组织学图像和肺切片的Ashcraft评分。数据指示,A120并行地抑制TNF- α 和TGF- β ,明显减少博莱霉素诱导的肺纤维化,而抗TNF抗体或TGFRII-Fc中度抑制博莱霉素诱导的肺纤维化。对Ashcraft评分的分析揭示,与抗TNF抗体治疗或TGFRII-Fc治疗相比,A120治疗导致肺纤维化的更大减少。

[0320] 图9描绘了Masson三色染色的肺切片的组织学图像和对来自对照和博莱霉素处理的小鼠的肺切片中胶原沉积区域的定量分析。数据表明,与抗TNF抗体或TGFRII-Fc相比,A120能够更有效地减少博莱霉素诱导的胶原沉积。

[0321] 图10示出了在来自对照和博莱霉素处理的小鼠的肺切片中 α -平滑肌肌动蛋白(α SMA)的免疫化学染色, α SMA是纤维化的标志物。数据指示,与抗TNF抗体或TGFRII-Fc相比,A120更有效地减弱博莱霉素处理的小鼠中 α SMA免疫反应性的诱导。

[0322] 综上所述,从博莱霉素诱导的肺纤维化小鼠获得的数据表明,A120通过同时中和TNF- α 和TGF- β ,在防止纤维化方面比抗TNF抗体或TGFRII-Fc更有效。A120的增强的抗纤维化作用表明,本发明中公开的TNF和TGF- β 的新颖的双功能拮抗剂代表了治疗各种纤维化疾病的有前途的新方法。

[0323] 本文公开的和要求保护的所有物品和方法鉴于本发明均可被制备和执行,无需过度实验。尽管已根据优选的实施方案描述本发明的物品和方法,但是变化形式可被应用到所述物品和方法而不偏离本发明的精神和范围,这对本领域技术人员而言是明显的。对于本领域技术人员明显的所有这样的变化和等效物,无论是现存的或以后开发的,都被认为是在本发明的精神和范围之内,如由所附权利要求所限定的。说明书中提及的所有专利、专利申请和出版物指示本发明所属领域的普通技术人员的水平。出于所有目的,所有专利、专利申请和出版物通过引用以其整体并入本文,并且其程度如同每个单独出版物单独地且具体地被指示出于任何和所有目的通过引用以其整体并入本文。本文例证地描述的本发明可在不存在本文未具体地公开的任何一个或更多个要素的情况下被合适地实践。因此,应理解,尽管本发明已通过优选的实施方案和任选的特征被具体地公开,但是本领域技术人员可寻求本文公开的概念的改变和变化形式,并且认为这样的改变和变化形式在如由所附的权利要求所限定的本发明的范围内。

[0324] 序列表

[0325] 如37C.F.R.1.822中规定的,使用核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三字母代码示出随附的序列表中列出的核酸和氨基酸序列。

[0326] SEQ ID NO:1-5是各种TNF配体的氨基酸序列。

[0327] SEQ ID NO:6-9是各种TGF- β 配体的氨基酸序列。

[0328] SEQ ID NO:10、14、18和22是特异性结合TNF- α 配体的各种抗体的重链的氨基酸序

列。

[0329] SEQ ID NO:11、15、19和23是特异性结合TNF- α 配体的各种抗体的轻链的氨基酸序列。

[0330] SEQ ID NO:12、16、20和24是特异性结合TNF- α 配体的各种抗体的重链可变区的氨基酸序列。

[0331] SEQ ID NO:13、17、21和25是特异性结合TNF- α 配体的各种抗体的轻链可变区的氨基酸序列。

[0332] SEQ ID NO:26是特异性结合TGF- β 配体的抗体的重链的氨基酸序列。

[0333] SEQ ID NO:27是特异性结合TGF- β 配体的抗体的轻链的氨基酸序列。

[0334] SEQ ID NO:28是特异性结合TGF- β 配体的抗体的重链可变区的氨基酸序列。

[0335] SEQ ID NO:29是特异性结合TGF- β 配体的抗体的轻链可变区的氨基酸序列。

[0336] SEQ ID NO:30-31是特异性结合TNF- α 配体和TGF- β 配体的双功能拮抗剂分子的重链的氨基酸序列。

[0337] SEQ ID NO:32-41是特异性结合TNF- α 配体并特异性结合TGF- β 配体的各种双功能拮抗剂分子的氨基酸序列。

[0338] SEQ ID NO:42是特异性结合TNF- α 配体和TGF- β 配体的双功能拮抗剂分子的重链的氨基酸序列。

[0339] SEQ ID NO:43是特异性结合TNF- α 配体和TGF- β 配体的双功能拮抗剂分子的轻链的氨基酸序列。

[0340] SEQ ID NO:44-63是各种肽接头序列的氨基酸序列。

序列表

人类 TNFR1 ECD

IYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTYLYNDCPGPGQD
TDCRECEGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRH
YWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECVSCSNCKKSLE
CTKLCLPQIENVKGTEDSGTT (SEQ ID NO: 1)

人类 TNFR2 ECD

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSC
EDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSSDQVETQACTREQNRICRPGWYCALSKQEGC
RLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPG
NASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPSPP
AEGSTGD (SEQ ID NO: 2)

[0341]

人类 TNFR1/CRD1-TNFR2/CRD2/3/4

IYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTYLYNDCPGPGQD
TDCRSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSSDQVETQACTREQNRICRPGWYCAL
SKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICN
VVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPM
MGPSPPAEGSTGD (SEQ ID NO: 3)

人类 TNFR1/CRD1/2/3-TNFR2/CRD4

IYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTYLYNDCPGPGQD
TDCRECEGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRH
YWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCPAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNV
VAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPM
GPSPPAEGSTGD (SEQ ID NO: 4)

TNFR1/ΔCRD4

IYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTYLYNDCPGPGQD
TDCRECEGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRH
YWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVC (SEQ ID NO: 5)

人类 TGF- β 受体 II 同种型 1

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDV
RFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILE
DAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQVGTGISLL
PPLGVAISVIIIIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLMEFSEHCAILEDDEDRSDISSTCA
NNINHNTPELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKT
EKDIFSDINLKHENILQFLTAERKTELKGQYWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWED
LRKLGSSLARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRL
DPTLSVDDLANSQGQVGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVYSMALVLWEMT
SRCNAVGEVKDYEPFPGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSWLHNHQQIQMVC
ETLTECWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK
(SEQ ID NO: 6)

人类 TGF- β 受体 II-ECD 同种型 1 (TGF- β RIIB-ECD)

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEK
PQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFM
CSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 7)

人类 TGF- β 受体 II 同种型 2

[0342]

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHIN
NDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWR
KNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNI
IFSEEYNTSNPDLLLVIQVGTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTR
KLMEFSEHCAILEDDEDRSDISSTCANNINHNTPELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQ
NTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKT EK DIFSDINLKHENILQFLTAERKTELKGQYWL
ITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDL
KSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSQGQVGTARYMAPEVLESRMNL
ENVESFKQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFPGSKVREHPCVESMKDN
VLRDRGRPEIPSWLHNHQQIQMVCETLTECWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHLDR
LSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK (SEQ ID NO: 8)

人类 TGF- β 受体 II-ECD 同种型 2 (TGF- β RIIA-ECD)

TIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHINNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC
DVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDF
ILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 9)

抗 TNF- α 抗体重链氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNS
GHIDYADSVGRFTISRDNANKSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYW
GQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN VY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K (SEQ ID NO: 10)

抗 TNF- α 抗体轻链氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSG
VPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11)

抗 TNF- α 抗体重链可变区氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNS
GHIDYADSVEGRFTISRDNALNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYW
QGGLTVTVSS (SEQ ID NO: 12)

抗 TNF- α 抗体轻链可变区氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSG
VPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO: 13)

抗 TNF- α 抗体重链氨基酸序列

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCLVASGFIFSNHWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRSKSI
NSATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYLQMTDLRTEDTGVIYCSRNYYGSTYDYWG
QGTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 14)

[0343]

抗 TNF- α 抗体轻链氨基酸序列

DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQFVGSSIHWHYQQRNGSPRLLIKYASESMSGIP
SRFSGSGSGTDFTLSINTVESEDIADYYCQQSHSWPFTFGSGTNLEVKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 15)

抗 TNF- α 抗体重链可变区氨基酸序列

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCLVASGFIFSNHWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRSKSI
NSATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYLQMTDLRTEDTGVIYCSRNYYGSTYDYWG
QGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 16)

抗 TNF- α 抗体轻链可变区氨基酸序列

DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQFVGSSIHWHYQQRNGSPRLLIKYASESMSGIP
SRFSGSGSGTDFTLSINTVESEDIADYYCQQSHSWPFTFGSGTNLEVK (SEQ ID NO:
17)

抗 TNF- α 抗体重链氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYVFTDYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTY
IGEPIYADSVKGRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYRSYAMDYWG
QGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCAA (SEQ ID NO: 18)

抗 TNF- α 抗体轻链氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASFLYS
GVPIYRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNIYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 19)

抗 TNF- α 抗体重链可变区氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYVFTDYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTY
IGEPIYADSVKGRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYRSYAMDYWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 20)

抗 TNF- α 抗体轻链可变区氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASFLYS
GVPIYRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNIYPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO: 21)

抗 TNF- α 抗体重链氨基酸序列

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWVAFMSYDG
SNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGGNYYY
YGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
[0344] NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 22)

抗 TNF- α 抗体轻链氨基酸序列

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGI
PARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 23)

抗 TNF- α 抗体重链可变区氨基酸序列

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLEWVAFMSYDG
SNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGGNYYY
YGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 24)

抗 TNF- α 抗体轻链可变区氨基酸序列

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGI
PARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO:
25)

抗 TGF- β 抗体重链氨基酸序列

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVD
IANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPC
PSCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE

VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 26)

抗 TGF- β 抗体轻链氨基酸序列

ETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWEYQQKPGQAPRLLIYGASSRAP
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTTRLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 27)

抗 TGF- β 抗体重链可变区氨基酸序列

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVD
IANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQ
GTLVTVSS
(SEQ ID NO: 28)

抗 TGF- β 抗体轻链可变区氨基酸序列

ETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWEYQQKPGQAPRLLIYGASSRAP
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTTRLEIK (SEQ ID NO:
29)

A119 重链氨基酸序列

[0345]

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSITWNS
GHIDYADSVEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTC
DNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA
SPKCIMKEKKKPGETFFMCSGSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 30)

A120 重链氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSITWNS
GHIDYADSVEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHINNDMIV
TDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDEN
ITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSGSSDECNDNIIFSEEY
NTSNPD (SEQ ID NO: 31)

A121 氨基酸序列

LVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNISICCTKCHKGTLYLNDPCPGPGQDTCRECE
SGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRHYWSENLF
QCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAFFLRENECVSCSNCKKSLECTKLCLPQI
ENVKGTEDSGTTGGGGSGGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHV
QKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV
VAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSD
ECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 32)

A122 氨基酸序列

LVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNISICCTKCHKGTLYLNDPCPGPGQDTCRECE
SGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRHYWSENLF
QCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAFFLRENECVSCSNCKKSLECTKLCLPQI
ENVKGTEDSGTTGGGGSGGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHV
QKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHINNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRST
CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA
SPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 33)

[0346]

A123 氨基酸序列

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSC
EDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICRPGWYCALSKQEGC
RLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPG
NASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPSP
AEGSTGDGGGGSGGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW
RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECND
NIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 34)

A124 氨基酸序列

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSC
EDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICRPGWYCALSKQEGC
RLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPG
NASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPSP
AEGSTGDGGGGSGGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSD

VEMEAQKDEIICPSCNRTAHLRHNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQ
KSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCI
MKEKKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 35)

A125 氨基酸序列

LVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTLYLNDPCPGPGQDTCRSCE
DSTYTQLWNWVPECLSCSRCSSDQVETQACTREQNRICRCPGWYCALSKQEGC
RLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPG
NASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPPSP
AEGSTGDGGGGSGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWR
KNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKKPGETFFMCSCSSDECND
NIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 36)

A126 氨基酸序列

[0347]

LVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTLYLNDPCPGPGQDTCRSCE
DSTYTQLWNWVPECLSCSRCSSDQVETQACTREQNRICRCPGWYCALSKQEGC
RLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPG
NASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPPSP
AEGSTGDGGGGSGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSD
VEMEAQKDEIICPSCNRTAHLRHNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQ
KSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCI
MKEKKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 37)

A127 氨基酸序列

LVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTLYLNDPCPGPGQDTCRECE
SGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTCGCRKNQYRHYWSENLF
QCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPGNAS
MDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPPSPAEG
STGDGGGGSGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNND
MIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS
EEYNTSNPD (SEQ ID NO: 38)

A128 氨基酸序列

LVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTLYLNDPCPGPGQDTCRECE
SGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTCGCRKNQYRHYWSENLF
QCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPGNAS

MDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPSPPAEG
STGDGGGGSGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSTIPPHVQKSDVEME
AQKDEIICPSCNRTAHPLRHINNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCM
SNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEK
KKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 39)

A129 氨基酸序列

LVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTYLYNDGPGGQDTCRECE
SGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTCGCRKNQYRHYWSENLF
QCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCGGGSGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGG
SGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNC
SITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKK
GETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 40)

A130 氨基酸序列

[0348]

LVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTYLYNDGPGGQDTCRECE
SGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTCGCRKNQYRHYWSENLF
QCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCGGGSGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGG
SGGGGSTIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHINNDMIVTDNNGAVK
PQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDP
KLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ
ID NO: 41)

A131 重链氨基酸序列

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVD
IANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQ
GTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYA
MHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA
EDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)

A131 轻链氨基酸序列

ETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAP
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKGGGGSGG
GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIY
AASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 43)

肽接头序列 GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 44)

肽接头序列 GGS (SEQ ID NO: 45)

肽接头序列 GSSGGSGGGSGGSG (SEQ ID NO: 46)

肽接头序列 GSSGT (SEQ ID NO: 47)

肽接头序列 GGGSGGGGGSGGGS (SEQ ID NO: 48)

肽接头序列 AEAAAKEAAAKEAAKA (SEQ ID NO: 49)

[0349] 肽接头序列 GGGSGGGGGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 50)

肽接头序列 GGGSGGGS (SEQ ID NO: 51)

肽接头序列 GS (SEQ ID NO: 52)

肽接头序列 GGS (SEQ ID NO: 53)

肽接头序列 GGGGS (SEQ ID NO: 54)

肽接头序列 GGSG (SEQ ID NO: 55)

肽接头序列 SGGG (SEQ ID NO: 56)

肽接头序列 GSGS (SEQ ID NO: 57)

肽接头序列 GSGSGS (SEQ ID NO: 58)

肽接头序列 GSGSGSGS (SEQ ID NO: 59)

肽接头序列 GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 60)

肽接头序列 GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 61)

肽接头序列 GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 62)

肽接头序列 GGGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 63)。

序列表

<110> 韩汇泉
 周小岚
 <120> 肿瘤坏死因子- α 和转化生长因子- β 的双功能拮抗剂及其用途
 <130> CACAG1.0008W0
 <160> 63
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 1
 Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg
 1 5 10 15
 Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln
 20 25 30
 Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr
 35 40 45
 Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu
 50 55 60
 Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser
 65 70 75 80
 Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys
 85 90 95
 Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg
 100 105 110
 His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys
 115 120 125
 Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val
 130 135 140
 Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser
 145 150 155 160
 Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro
 165 170 175
 Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr
 180 185 190
 <210> 2
 <211> 235

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

```

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1           5           10           15
Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
          20           25           30
Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
          35           40           45
Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
          50           55           60
Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65           70           75           80
Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
          85           90           95
Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
          100          105          110
Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
          115          120          125
Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
          130          135          140
Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
          145          150          155          160
Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
          165          170          175
Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
          180          185          190
His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
          195          200          205
Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
          210          215          220
Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp
          225          230          235

```

<210> 3

<211> 242

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

```

Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg

```

1	5	10	15
Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln			
20	25	30	
Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr			
35	40	45	
Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Ser Cys Glu			
50	55	60	
Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser			
65	70	75	80
Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr			
85	90	95	
Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala			
100	105	110	
Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys			
115	120	125	
Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val			
130	135	140	
Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser			
145	150	155	160
Thr Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro			
165	170	175	
Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg			
180	185	190	
Ser Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg			
195	200	205	
Ser Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr			
210	215	220	
Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr			
225	230	235	240
Gly Asp			
<210> 4			
<211> 240			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 4			
Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg			
1	5	10	15
Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln			
20	25	30	

Asn	Asn	Ser	Ile	Cys	Cys	Thr	Lys	Cys	His	Lys	Gly	Thr	Tyr	Leu	Tyr
	35						40					45			
Asn	Asp	Cys	Pro	Gly	Pro	Gly	Gln	Asp	Thr	Asp	Cys	Arg	Glu	Cys	Glu
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Phe	Thr	Ala	Ser	Glu	Asn	His	Leu	Arg	His	Cys	Leu	Ser
65					70					75					80
Cys	Ser	Lys	Cys	Arg	Lys	Glu	Met	Gly	Gln	Val	Glu	Ile	Ser	Ser	Cys
				85					90					95	
Thr	Val	Asp	Arg	Asp	Thr	Val	Cys	Gly	Cys	Arg	Lys	Asn	Gln	Tyr	Arg
			100					105					110		
His	Tyr	Trp	Ser	Glu	Asn	Leu	Phe	Gln	Cys	Phe	Asn	Cys	Ser	Leu	Cys
			115				120					125			
Leu	Asn	Gly	Thr	Val	His	Leu	Ser	Cys	Gln	Glu	Lys	Gln	Asn	Thr	Val
	130					135					140				
Cys	Pro	Cys	Ala	Pro	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	Asp
145					150					155					160
Ile	Cys	Arg	Pro	His	Gln	Ile	Cys	Asn	Val	Val	Ala	Ile	Pro	Gly	Asn
				165					170					175	
Ala	Ser	Met	Asp	Ala	Val	Cys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Thr	Arg	Ser	Met
			180					185					190		
Ala	Pro	Gly	Ala	Val	His	Leu	Pro	Gln	Pro	Val	Ser	Thr	Arg	Ser	Gln
		195				200					205				
His	Thr	Gln	Pro	Thr	Pro	Glu	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Ser	Phe
	210					215				220					
Leu	Leu	Pro	Met	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Glu	Gly	Ser	Thr	Gly	Asp
225					230					235					240
<210>	5														
<211>	145														
<212>	PRT														
<213>	智人(Homo sapiens)														
<400>	5														
Ile	Tyr	Pro	Ser	Gly	Val	Ile	Gly	Leu	Val	Pro	His	Leu	Gly	Asp	Arg
1				5				10					15		
Glu	Lys	Arg	Asp	Ser	Val	Cys	Pro	Gln	Gly	Lys	Tyr	Ile	His	Pro	Gln
			20					25				30			
Asn	Asn	Ser	Ile	Cys	Cys	Thr	Lys	Cys	His	Lys	Gly	Thr	Tyr	Leu	Tyr
	35						40				45				
Asn	Asp	Cys	Pro	Gly	Pro	Gly	Gln	Asp	Thr	Asp	Cys	Arg	Glu	Cys	Glu
	50					55					60				

Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser			
65	70	75	80
Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys			
	85	90	95
Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg			
	100	105	110
His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys			
	115	120	125
Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val			
	130	135	140
Cys			
145			
<210>	6		
<211>	567		
<212>	PRT		
<213>	智人(Homo sapiens)		
<400>	6		
Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu			
1	5	10	15
Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val			
	20	25	30
Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro			
	35	40	45
Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln			
	50	55	60
Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro			
65	70	75	80
Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr			
	85	90	95
Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile			
	100	105	110
Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys			
	115	120	125
Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn			
	130	135	140
Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu			
145	150	155	160
Leu Leu Val Ile Phe Gln Val Thr Gly Ile Ser Leu Leu Pro Pro Leu			
	165	170	175

Gly Val Ala Ile Ser Val Ile Ile Ile Phe Tyr Cys Tyr Arg Val Asn		
180	185	190
Arg Gln Gln Lys Leu Ser Ser Thr Trp Glu Thr Gly Lys Thr Arg Lys		
195	200	205
Leu Met Glu Phe Ser Glu His Cys Ala Ile Ile Leu Glu Asp Asp Arg		
210	215	220
Ser Asp Ile Ser Ser Thr Cys Ala Asn Asn Ile Asn His Asn Thr Glu		
225	230	235
Leu Leu Pro Ile Glu Leu Asp Thr Leu Val Gly Lys Gly Arg Phe Ala		
245	250	255
Glu Val Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln Asn Thr Ser Glu Gln Phe Glu		
260	265	270
Thr Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Tyr Glu Glu Tyr Ala Ser Trp Lys		
275	280	285
Thr Glu Lys Asp Ile Phe Ser Asp Ile Asn Leu Lys His Glu Asn Ile		
290	295	300
Leu Gln Phe Leu Thr Ala Glu Glu Arg Lys Thr Glu Leu Gly Lys Gln		
305	310	315
Tyr Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Ala Lys Gly Asn Leu Gln Glu Tyr		
325	330	335
Leu Thr Arg His Val Ile Ser Trp Glu Asp Leu Arg Lys Leu Gly Ser		
340	345	350
Ser Leu Ala Arg Gly Ile Ala His Leu His Ser Asp His Thr Pro Cys		
355	360	365
Gly Arg Pro Lys Met Pro Ile Val His Arg Asp Leu Lys Ser Ser Asn		
370	375	380
Ile Leu Val Lys Asn Asp Leu Thr Cys Cys Leu Cys Asp Phe Gly Leu		
385	390	395
Ser Leu Arg Leu Asp Pro Thr Leu Ser Val Asp Asp Leu Ala Asn Ser		
405	410	415
Gly Gln Val Gly Thr Ala Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Glu Ser		
420	425	430
Arg Met Asn Leu Glu Asn Val Glu Ser Phe Lys Gln Thr Asp Val Tyr		
435	440	445
Ser Met Ala Leu Val Leu Trp Glu Met Thr Ser Arg Cys Asn Ala Val		
450	455	460
Gly Glu Val Lys Asp Tyr Glu Pro Pro Phe Gly Ser Lys Val Arg Glu		
465	470	475
His Pro Cys Val Glu Ser Met Lys Asp Asn Val Leu Arg Asp Arg Gly		

485	490	495
Arg Pro Glu Ile Pro Ser Phe Trp Leu Asn His Gln Gly Ile Gln Met		
500	505	510
Val Cys Glu Thr Leu Thr Glu Cys Trp Asp His Asp Pro Glu Ala Arg		
515	520	525
Leu Thr Ala Gln Cys Val Ala Glu Arg Phe Ser Glu Leu Glu His Leu		
530	535	540
Asp Arg Leu Ser Gly Arg Ser Cys Ser Glu Glu Lys Ile Pro Glu Asp		
545	550	555
Gly Ser Leu Asn Thr Thr Lys		560
565		

<210> 7

<211> 137

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 7

Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val		
1	5	10
Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys		
20	25	30
Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn		
35	40	45
Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala		
50	55	60
Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His		
65	70	75
Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser		
85	90	95
Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe		
100	105	110
Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser		
115	120	125
Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp		
130	135	

<210> 8

<211> 592

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 8

Met	Gly	Arg	Gly	Leu	Leu	Arg	Gly	Leu	Trp	Pro	Leu	His	Ile	Val	Leu
1				5					10					15	
Trp	Thr	Arg	Ile	Ala	Ser	Thr	Ile	Pro	Pro	His	Val	Gln	Lys	Ser	Asp
			20					25					30		
Val	Glu	Met	Glu	Ala	Gln	Lys	Asp	Glu	Ile	Ile	Cys	Pro	Ser	Cys	Asn
		35					40					45			
Arg	Thr	Ala	His	Pro	Leu	Arg	His	Ile	Asn	Asn	Asp	Met	Ile	Val	Thr
		50					55				60				
Asp	Asn	Asn	Gly	Ala	Val	Lys	Phe	Pro	Gln	Leu	Cys	Lys	Phe	Cys	Asp
65					70					75					80
Val	Arg	Phe	Ser	Thr	Cys	Asp	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Met	Ser	Asn	Cys
				85					90					95	
Ser	Ile	Thr	Ser	Ile	Cys	Glu	Lys	Pro	Gln	Glu	Val	Cys	Val	Ala	Val
				100					105					110	
Trp	Arg	Lys	Asn	Asp	Glu	Asn	Ile	Thr	Leu	Glu	Thr	Val	Cys	His	Asp
				115					120				125		
Pro	Lys	Leu	Pro	Tyr	His	Asp	Phe	Ile	Leu	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Pro
				130			135				140				
Lys	Cys	Ile	Met	Lys	Glu	Lys	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Phe	Phe	Met
145					150					155					160
Cys	Ser	Cys	Ser	Ser	Asp	Glu	Cys	Asn	Asp	Asn	Ile	Ile	Phe	Ser	Glu
				165					170					175	
Glu	Tyr	Asn	Thr	Ser	Asn	Pro	Asp	Leu	Leu	Leu	Val	Ile	Phe	Gln	Val
				180					185					190	
Thr	Gly	Ile	Ser	Leu	Leu	Pro	Pro	Leu	Gly	Val	Ala	Ile	Ser	Val	Ile
				195					200				205		
Ile	Ile	Phe	Tyr	Cys	Tyr	Arg	Val	Asn	Arg	Gln	Gln	Lys	Leu	Ser	Ser
				210					215				220		
Thr	Trp	Glu	Thr	Gly	Lys	Thr	Arg	Lys	Leu	Met	Glu	Phe	Ser	Glu	His
225					230					235					240
Cys	Ala	Ile	Ile	Leu	Glu	Asp	Asp	Arg	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Cys
				245					250					255	
Ala	Asn	Asn	Ile	Asn	His	Asn	Thr	Glu	Leu	Leu	Pro	Ile	Glu	Leu	Asp
				260					265				270		
Thr	Leu	Val	Gly	Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Glu	Val	Tyr	Lys	Ala	Lys	Leu
				275					280				285		
Lys	Gln	Asn	Thr	Ser	Glu	Gln	Phe	Glu	Thr	Val	Ala	Val	Lys	Ile	Phe
				290					295				300		
Pro	Tyr	Glu	Glu	Tyr	Ala	Ser	Trp	Lys	Thr	Glu	Lys	Asp	Ile	Phe	Ser

305	310	315	320
Asp Ile Asn Leu Lys His Glu Asn Ile Leu Gln Phe Leu Thr Ala Glu			
	325	330	335
Glu Arg Lys Thr Glu Leu Gly Lys Gln Tyr Trp Leu Ile Thr Ala Phe			
	340	345	350
His Ala Lys Gly Asn Leu Gln Glu Tyr Leu Thr Arg His Val Ile Ser			
	355	360	365
Trp Glu Asp Leu Arg Lys Leu Gly Ser Ser Leu Ala Arg Gly Ile Ala			
	370	375	380
His Leu His Ser Asp His Thr Pro Cys Gly Arg Pro Lys Met Pro Ile			
385	390	395	400
Val His Arg Asp Leu Lys Ser Ser Asn Ile Leu Val Lys Asn Asp Leu			
	405	410	415
Thr Cys Cys Leu Cys Asp Phe Gly Leu Ser Leu Arg Leu Asp Pro Thr			
	420	425	430
Leu Ser Val Asp Asp Leu Ala Asn Ser Gly Gln Val Gly Thr Ala Arg			
	435	440	445
Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Glu Ser Arg Met Asn Leu Glu Asn Val			
	450	455	460
Glu Ser Phe Lys Gln Thr Asp Val Tyr Ser Met Ala Leu Val Leu Trp			
465	470	475	480
Glu Met Thr Ser Arg Cys Asn Ala Val Gly Glu Val Lys Asp Tyr Glu			
	485	490	495
Pro Pro Phe Gly Ser Lys Val Arg Glu His Pro Cys Val Glu Ser Met			
	500	505	510
Lys Asp Asn Val Leu Arg Asp Arg Gly Arg Pro Glu Ile Pro Ser Phe			
	515	520	525
Trp Leu Asn His Gln Gly Ile Gln Met Val Cys Glu Thr Leu Thr Glu			
	530	535	540
Cys Trp Asp His Asp Pro Glu Ala Arg Leu Thr Ala Gln Cys Val Ala			
545	550	555	560
Glu Arg Phe Ser Glu Leu Glu His Leu Asp Arg Leu Ser Gly Arg Ser			
	565	570	575
Cys Ser Glu Glu Lys Ile Pro Glu Asp Gly Ser Leu Asn Thr Thr Lys			
	580	585	590

<210> 9

<211> 162

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 9

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

<210> 10

<211> 451

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 10

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr	Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100	105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	Lys Gly Pro Ser
115	120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr	Ser Gly Gly Thr Ala
130	135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val	
145	150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala	
	165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val	
	180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His	
	195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys	
	210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	
225	230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	
	245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	
	260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Val Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	
	275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	
	290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	
305	310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile	
	325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	
	340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser	
	355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu	
	370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	
385	390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val	

405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
435	440	445
Pro Gly Lys		
450		
<210> 11		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 11		
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 Tyr		
20 25 30		
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35 40 45		
Tyr Ala Ala Ser Thr 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr		
85 90 95		
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
100 105 110		
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115 120 125		
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130 135 140		
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145 150 155 160		
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165 170 175		
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180 185 190		
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195 200 205		
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		

210
 <210> 12
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 12
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 13
 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 Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 14
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工的 (Artificial)
 <220>
 <223> 嵌合抗TNF- α 抗体重链氨基酸序列
 <400> 14
 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 Ile Phe Ser Asn His
 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 Ser Lys Ser Ile Asn Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ala
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Thr Asp Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ser Arg Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys

450

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> 嵌合抗TNF- α 抗体轻链氨基酸序列

<400> 15

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Val Gly Ser Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Met Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Thr Val Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Trp Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> 嵌合抗TNF- α 抗体重链可变区氨基酸序列

<400> 16

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 Ile Phe Ser Asn His
 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 Ser Lys Ser Ile Asn Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> 嵌合抗TNF- α 抗体轻链可变区氨基酸序列

<400> 17

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

<210> 18

<211> 229

<212> PRT

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> 人源化抗TNF- α 抗体重链氨基酸序列

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr

<210>	19
<211>	214
<212>	PRT
<213>	人工的 (Artificial)
<220>	
<223>	人源化抗TNF- α 抗体轻链氨基酸序列
<400>	19

35	40	45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 20		
<211> 118		
<212> PRT		
<213> 人工的 (Artificial)		
<220>		
<223> 人源化抗TNF- α 抗体重链可变区氨基酸序列		
<400> 20		
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 Tyr Val Phe Thr Asp Tyr		
20	25	30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr		

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

Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90 95
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly		
	100	105 110
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
	115	120 125
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
	130	135 140
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
145	150	155 160
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
	165	170 175
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
	180	185 190
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
	195	200 205
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
210	215	220
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
225	230	235 240
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
	245	250 255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
	260	265 270
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
	275	280 285
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
290	295	300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
305	310	315 320
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
	325	330 335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
	340	345 350
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr		

355	360	365
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
370	375	380
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
385	390	395
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		400
405	410	415
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
420	425	430
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
435	440	445
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
450	455	
<210> 23		
<211> 215		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 23		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1	5	10
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr		15
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro		80
85	90	95
Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp 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
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		160

	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> 24					
<211> 126					
<212> PRT					
<213> 智人(Homo sapiens)					
<400> 24					
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 Ile Phe Ser Ser Tyr					
	20		25		30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val					
	35		40		45
Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val					
	50		55		60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr					
65	70		75		80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85		90		95
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly					
	100		105		110
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		125
<210> 25					
<211> 108					
<212> PRT					
<213> 智人(Homo sapiens)					
<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 Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr					
	20		25		30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile					
	35		40		45

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

<210> 26

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> 抗TGF- β 抗体重链氨基酸序列

<400> 26

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn
 20 25 30
 Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro		
210	215	220
Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val		
225	230	235
240		
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu		
260	265	270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
320		
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
340	345	350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
385	390	395
400		
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
405	410	415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445
<210>	27	
<211>	215	
<212>	PRT	
<213>	人工的 (Artificial)	
<220>		
<223>	抗TGF- β 抗体轻链氨基酸序列	
<400>	27	

Glu Thr 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 Leu Gly 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 Pro 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 Ala Asp Ser Pro			
	85	90	95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu 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> 28

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> 抗TGF- β 抗体重链可变区氨基酸序列

<400> 28

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn			
	20	25	30

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

<210> 29

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> 抗TGF- β 抗体轻链可变区氨基酸序列

<400> 29

Glu	Thr	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	Leu	Gly	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	Pro	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	Ala	Asp	Ser	Pro
				85				90				95			
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys				
100				105											

<210> 30

<211> 603

<212> PRT

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> A119重链氨基酸序列

<400> 30
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
305	310	315	320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
	325	330	335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
	340	345	350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
	355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
	370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
385	390	395	400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	435	440	445
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
450	455	460	
Gly Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met			
465	470	475	480
Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys			
	485	490	495
Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met			
	500	505	510
Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys			
	515	520	525
Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val			
	530	535	540
Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala			
545	550	555	560
Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr			
	565	570	575
Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile			
	580	585	590
Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp			
	595	600	

<210> 31

<211> 628
 <212> PRT
 <213> 人工的 (Artificial)
 <220>
 <223> A120重链氨基酸序列
 <400> 31
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
275	280	285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
305	310	315
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
325	330	335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
340	345	350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
385	390	395
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
435	440	445
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
450	455	460
Gly Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Asp Val Glu Met Glu		
465	470	475
Ala Gln Lys Asp Glu Ile Ile Cys Pro Ser Cys Asn Arg Thr Ala His		
485	490	495
Pro Leu Arg His Ile Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly		
500	505	510
Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser		
515	520	525
Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser		
530	535	540
Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn		
545	550	555
Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro		
565	570	575

Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met
 580 585 590
 Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser
 595 600 605
 Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr
 610 615 620
 Ser Asn Pro Asp
 625
 <210> 32
 <211> 580
 <212> PRT
 <213> 人工的 (Artificial)
 <220>
 <223> A121氨基酸序列
 <400> 32
 Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro
 1 5 10 15
 Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys
 20 25 30
 Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln
 35 40 45
 Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu
 50 55 60
 Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met
 65 70 75 80
 Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys
 85 90 95
 Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe
 100 105 110
 Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser
 115 120 125
 Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Phe Phe Leu
 130 135 140
 Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu
 145 150 155 160
 Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu
 165 170 175
 Asp Ser Gly Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 180 185 190

Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro		
195	200	205
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
210	215	220
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
225	230	235
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
	245	250
		255
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
	260	265
		270
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
	275	280
		285
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
	290	295
		300
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
305	310	315
		320
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
	325	330
		335
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
	340	345
		350
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
	355	360
		365
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
	370	375
		380
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln		
385	390	395
		400
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
	405	410
		415
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly		
	420	425
		430
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ile Pro Pro His		
	435	440
		445
Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly		
	450	455
		460
Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser		
465	470	475
		480
Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser		
	485	490
		495
Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn		

500																505						510											
Asp	Glu	Asn	Ile	Thr	Leu	Glu	Thr	Val	Cys	His	Asp	Pro	Lys	Leu	Pro																		
515																520						525											
Tyr	His	Asp	Phe	Ile	Leu	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Pro	Lys	Cys	Ile	Met																		
530																535						540											
Lys	Glu	Lys	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Phe	Phe	Met	Cys	Ser	Cys	Ser																		
545																550						555						560					
Ser	Asp	Glu	Cys	Asn	Asp	Asn	Ile	Ile	Phe	Ser	Glu	Glu	Tyr	Asn	Thr																		
565																570						575											
Ser	Asn	Pro	Asp																														
580																																	
<210>	33																																
<211>	605																																
<212>	PRT																																
<213>	人工的 (Artificial)																																
<220>																																	
<223>	A122氨基酸序列																																
<400>	33																																
Leu	Val	Pro	His	Leu	Gly	Asp	Arg	Glu	Lys	Arg	Asp	Ser	Val	Cys	Pro																		
1	5															10						15											
Gln	Gly	Lys	Tyr	Ile	His	Pro	Gln	Asn	Asn	Ser	Ile	Cys	Cys	Thr	Lys																		
20																25						30											
Cys	His	Lys	Gly	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asp	Cys	Pro	Gly	Pro	Gly	Gln																		
35																40						45											
Asp	Thr	Asp	Cys	Arg	Glu	Cys	Glu	Ser	Gly	Ser	Phe	Thr	Ala	Ser	Glu																		
50																55						60											
Asn	His	Leu	Arg	His	Cys	Leu	Ser	Cys	Ser	Lys	Cys	Arg	Lys	Glu	Met																		
65	70															75						80											
Gly	Gln	Val	Glu	Ile	Ser	Ser	Cys	Thr	Val	Asp	Arg	Asp	Thr	Val	Cys																		
85																90						95											
Gly	Cys	Arg	Lys	Asn	Gln	Tyr	Arg	His	Tyr	Trp	Ser	Glu	Asn	Leu	Phe																		
100																105						110											
Gln	Cys	Phe	Asn	Cys	Ser	Leu	Cys	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	His	Leu	Ser																		
115																120						125											
Cys	Gln	Glu	Lys	Gln	Asn	Thr	Val	Cys	Thr	Cys	His	Ala	Phe	Phe	Leu																		
130																135						140											
Arg	Glu	Asn	Glu	Cys	Val	Ser	Cys	Ser	Asn	Cys	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu																		
145	150															155						160											
Cys	Thr	Lys	Leu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ile	Glu	Asn	Val	Lys	Gly	Thr	Glu																		

				165					170					175			
Asp	Ser	Gly	Thr	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		
				180					185					190			
Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro		
				195				200						205			
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe		
				210				215						220			
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val		
225					230				235					240			
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe		
				245					250					255			
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro		
				260				265						270			
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr		
				275				280						285			
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val		
				290				295						300			
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala		
305					310				315					320			
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg		
				325					330					335			
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly		
				340					345					350			
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro		
				355				360						365			
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser		
				370				375						380			
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln		
385					390				395					400			
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His		
				405					410					415			
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly		
				420					425					430			
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Pro	Pro	His		
				435				440						445			
Val	Gln	Lys	Ser	Asp	Val	Glu	Met	Glu	Ala	Gln	Lys	Asp	Glu	Ile	Ile		
				450				455						460			
Cys	Pro	Ser	Cys	Asn	Arg	Thr	Ala	His	Pro	Leu	Arg	His	Ile	Asn	Asn		
465					470				475					480			

Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu		
485	490	495
Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser		
500	505	510
Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu		
515	520	525
Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu		
530	535	540
Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu		
545	550	555
Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly		
565	570	575
Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn		
580	585	590
Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp		
595	600	605
<210>	34	
<211>	634	
<212>	PRT	
<213>	人工的 (Artificial)	
<220>		
<223>	A123氨基酸序列	
<400>	34	
Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser		
1	5	10
Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys		
20	25	30
Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr		
35	40	45
Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu		
50	55	60
Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser		
65	70	75
Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys		
85	90	95
Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys		
100	105	110
Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala		
115	120	125

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

435	440	445
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
450	455	460
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
465	470	475
Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		480
485	490	495
Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile		
500	505	510
Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe		
515	520	525
Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser		
530	535	540
Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val		
545	550	555
Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys		
565	570	575
His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala		
580	585	590
Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe		
595	600	605
Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe		
610	615	620
Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp		
625	630	
<210> 35		
<211> 659		
<212> PRT		
<213> 人工的 (Artificial)		
<220>		
<223> A124氨基酸序列		
<400> 35		
Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser		
1	5	10
Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys		
20	25	30
Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr		
35	40	45
Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu		

50	55	60
Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser		
65	70	75
Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys		
85	90	95
Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys		
100	105	110
Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala		
115	120	125
Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro		
130	135	140
Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His		
145	150	155
Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala		
165	170	175
Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val		
180	185	190
His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr		
195	200	205
Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly		
210	215	220
Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Gly Gly Gly Gly Ser		
225	230	235
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
245	250	255
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
260	265	270
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
275	280	285
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
290	295	300
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
305	310	315
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
325	330	335
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
340	345	350
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
355	360	365

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
370	375	380
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
385	390	395
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
	405	410
		415
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
	420	425
		430
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
	435	440
		445
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
	450	455
		460
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
465	470	475
		480
Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
	485	490
		495
Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Asp Val Glu Met Glu Ala		
	500	505
		510
Gln Lys Asp Glu Ile Ile Cys Pro Ser Cys Asn Arg Thr Ala His Pro		
	515	520
		525
Leu Arg His Ile Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala		
	530	535
		540
Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr		
545	550	555
		560
Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile		
	565	570
		575
Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp		
	580	585
		590
Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr		
	595	600
		605
His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys		
	610	615
		620
Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser		
625	630	635
		640
Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser		
	645	650
		655
Asn Pro Asp		
<210>	36	
<211>	633	

<212> PRT

<213> 人工的(Artificial)

<220>

<223> A125氨基酸序列

<400> 36

Leu	Val	Pro	His	Leu	Gly	Asp	Arg	Glu	Lys	Arg	Asp	Ser	Val	Cys	Pro
1				5					10					15	
Gln	Gly	Lys	Tyr	Ile	His	Pro	Gln	Asn	Asn	Ser	Ile	Cys	Cys	Thr	Lys
				20				25					30		
Cys	His	Lys	Gly	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asp	Cys	Pro	Gly	Pro	Gly	Gln
				35				40					45		
Asp	Thr	Asp	Cys	Arg	Ser	Cys	Glu	Asp	Ser	Thr	Tyr	Thr	Gln	Leu	Trp
				50				55					60		
Asn	Trp	Val	Pro	Glu	Cys	Leu	Ser	Cys	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp
65						70				75					80
Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Cys	Thr	Arg	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr
				85						90				95	
Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg
				100						105				110	
Leu	Cys	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg
				115						120				125	
Pro	Gly	Thr	Glu	Thr	Ser	Asp	Val	Val	Cys	Lys	Pro	Cys	Ala	Pro	Gly
				130						135				140	
Thr	Phe	Ser	Asn	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	Asp	Ile	Cys	Arg	Pro	His	Gln
145						150					155				160
Ile	Cys	Asn	Val	Val	Ala	Ile	Pro	Gly	Asn	Ala	Ser	Met	Asp	Ala	Val
				165						170				175	
Cys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Thr	Arg	Ser	Met	Ala	Pro	Gly	Ala	Val	His
				180						185				190	
Leu	Pro	Gln	Pro	Val	Ser	Thr	Arg	Ser	Gln	His	Thr	Gln	Pro	Thr	Pro
				195						200				205	
Glu	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Ser	Phe	Leu	Leu	Pro	Met	Gly	Pro
				210						215				220	
Ser	Pro	Pro	Ala	Glu	Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
225						230				235					240
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
				245						250				255	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
				260						265				270	

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
275	280	285
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
290	295	300
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
305	310	315
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
	325	330
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
	340	345
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
	355	360
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
	370	375
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
385	390	395
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
	405	410
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
	420	425
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
	435	440
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
450	455	460
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
465	470	475
Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
	485	490
Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val		
	500	505
Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys		
	515	520
Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn		
	530	535
Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala		
545	550	555
Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His		
	565	570
Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser		

			580				585				590				
Pro	Lys	Cys	Ile	Met	Lys	Glu	Lys	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Phe	Phe
			595				600				605				
Met	Cys	Ser	Cys	Ser	Ser	Asp	Glu	Cys	Asn	Asp	Asn	Ile	Ile	Phe	Ser
			610				615				620				
Glu	Glu	Tyr	Asn	Thr	Ser	Asn	Pro	Asp							
			625				630								
<210>		37													
<211>		658													
<212>		PRT													
<213>		人工的 (Artificial)													
<220>															
<223>		A126氨基酸序列													
<400>		37													
Leu	Val	Pro	His	Leu	Gly	Asp	Arg	Glu	Lys	Arg	Asp	Ser	Val	Cys	Pro
1			5				10				15				
Gln	Gly	Lys	Tyr	Ile	His	Pro	Gln	Asn	Asn	Ser	Ile	Cys	Cys	Thr	Lys
			20				25				30				
Cys	His	Lys	Gly	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asp	Cys	Pro	Gly	Pro	Gly	Gln
			35				40				45				
Asp	Thr	Asp	Cys	Arg	Ser	Cys	Glu	Asp	Ser	Thr	Tyr	Thr	Gln	Leu	Trp
			50				55				60				
Asn	Trp	Val	Pro	Glu	Cys	Leu	Ser	Cys	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp
65			70				75				80				
Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Cys	Thr	Arg	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr
			85				90				95				
Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg
			100				105				110				
Leu	Cys	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg
			115				120				125				
Pro	Gly	Thr	Glu	Thr	Ser	Asp	Val	Val	Cys	Lys	Pro	Cys	Ala	Pro	Gly
			130				135				140				
Thr	Phe	Ser	Asn	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	Asp	Ile	Cys	Arg	Pro	His	Gln
145			150				155				160				
Ile	Cys	Asn	Val	Val	Ala	Ile	Pro	Gly	Asn	Ala	Ser	Met	Asp	Ala	Val
			165				170				175				
Cys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Thr	Arg	Ser	Met	Ala	Pro	Gly	Ala	Val	His
			180				185				190				
Leu	Pro	Gln	Pro	Val	Ser	Thr	Arg	Ser	Gln	His	Thr	Gln	Pro	Thr	Pro

195	200	205
Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro		
210	215	220
Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
225	230	235
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
245	250	255
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
260	265	270
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
275	280	285
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
290	295	300
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
305	310	315
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
325	330	335
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
340	345	350
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
355	360	365
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
370	375	380
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
385	390	395
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
405	410	415
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
420	425	430
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
435	440	445
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
450	455	460
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
465	470	475
Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
485	490	495
Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Asp Val Glu Met Glu Ala Gln		
500	505	510

Lys Asp Glu Ile Ile Cys Pro Ser Cys Asn Arg Thr Ala His Pro Leu
 515 520 525
 Arg His Ile Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val
 530 535 540
 Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys
 545 550 555 560
 Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys
 565 570 575
 Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu
 580 585 590
 Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His
 595 600 605
 Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu
 610 615 620
 Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp
 625 630 635 640
 Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn
 645 650 655
 Pro Asp
 <210> 38
 <211> 630
 <212> PRT
 <213> 人工的 (Artificial)
 <220>
 <223> A127氨基酸序列
 <400> 38
 Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro
 1 5 10 15
 Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys
 20 25 30
 Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln
 35 40 45
 Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu
 50 55 60
 Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met
 65 70 75 80
 Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys
 85 90 95
 Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe

100	105	110
Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser		
115	120	125
Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser		
130	135	140
Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn		
145	150	155
Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser		
165	170	175
Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln		
180	185	190
Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser		
195	200	205
Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro		
210	215	220
Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
225	230	235
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
245	250	255
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe		
260	265	270
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
275	280	285
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
290	295	300
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
305	310	315
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
325	330	335
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
340	345	350
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
355	360	365
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
370	375	380
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
385	390	395
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
405	410	415

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp																			
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp																			
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His																			
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly																			
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ile Pro																			
Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn																			
Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg																			
Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile																			
Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg																			
Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys																			
Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys																			
Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser																			
Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr																			
Asn Thr Ser Asn Pro Asp																			
<210> 39																			
<211> 655																			
<212> PRT																			
<213> 人工的 (Artificial)																			
<220>																			
<223> A128氨基酸序列																			
<400> 39																			
Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro																			
Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys																			

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

340	345	350
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser	
355	360	365
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
370	375	380
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
385	390	395
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
405	410	415
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
420	425	430
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
435	440	445
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
450	455	460
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly		
465	470	475
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ile Pro		
485	490	495
Pro His Val Gln Lys Ser Asp Val Glu Met Glu Ala Gln Lys Asp Glu		
500	505	510
Ile Ile Cys Pro Ser Cys Asn Arg Thr Ala His Pro Leu Arg His Ile		
515	520	525
Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro		
530	535	540
Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln		
545	550	555
Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro		
565	570	575
Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr		
580	585	590
Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile		
595	600	605
Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys		
610	615	620
Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn		
625	630	635
Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp		
645	650	655

<210> 40
 <211> 536
 <212> PRT
 <213> 人工的 (Artificial)
 <220>
 <223> A129氨基酸序列
 <400> 40
 Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro
 1 5 10 15
 Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys
 20 25 30
 Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln
 35 40 45
 Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu
 50 55 60
 Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met
 65 70 75 80
 Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys
 85 90 95
 Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe
 100 105 110
 Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser
 115 120 125
 Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 145 150 155 160
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 165 170 175
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 180 185 190
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 195 200 205
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 210 215 220
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 225 230 235 240
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 245 250 255

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
260	265	270
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
275	280	285
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
290	295	300
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
305	310	315
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
325	330	335
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
340	345	350
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
355	360	365
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
370	375	380
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr		
385	390	395
Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr		
405	410	415
Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp		
420	425	430
Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys		
435	440	445
Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val		
450	455	460
Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp		
465	470	475
Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro		
485	490	495
Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met		
500	505	510
Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu		
515	520	525
Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp		
530	535	
<210>	41	
<211>	561	
<212>	PRT	

<213> 人工的(Artificial)

<220>

<223> A130氨基酸序列

<400> 41

Leu	Val	Pro	His	Leu	Gly	Asp	Arg	Glu	Lys	Arg	Asp	Ser	Val	Cys	Pro
1				5				10						15	
Gln	Gly	Lys	Tyr	Ile	His	Pro	Gln	Asn	Asn	Ser	Ile	Cys	Cys	Thr	Lys
			20					25					30		
Cys	His	Lys	Gly	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asp	Cys	Pro	Gly	Pro	Gly	Gln
		35						40					45		
Asp	Thr	Asp	Cys	Arg	Glu	Cys	Glu	Ser	Gly	Ser	Phe	Thr	Ala	Ser	Glu
	50					55					60				
Asn	His	Leu	Arg	His	Cys	Leu	Ser	Cys	Ser	Lys	Cys	Arg	Lys	Glu	Met
65					70					75				80	
Gly	Gln	Val	Glu	Ile	Ser	Ser	Cys	Thr	Val	Asp	Arg	Asp	Thr	Val	Cys
				85					90					95	
Gly	Cys	Arg	Lys	Asn	Gln	Tyr	Arg	His	Tyr	Trp	Ser	Glu	Asn	Leu	Phe
			100					105					110		
Gln	Cys	Phe	Asn	Cys	Ser	Leu	Cys	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	His	Leu	Ser
		115						120					125		
Cys	Gln	Glu	Lys	Gln	Asn	Thr	Val	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
	130							135					140		
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
145					150					155				160	
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
				165					170					175	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
		180						185					190		
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
		195						200					205		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
	210							215					220		
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
225					230					235				240	
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
				245					250					255	
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
			260					265					270		
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu

275	280	285
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
290	295	300
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
305	310	315
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
325	330	335
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
340	345	350
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
355	360	365
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
370	375	380
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr		
385	390	395
Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Asp Val Glu Met Glu Ala Gln Lys		
405	410	415
Asp Glu Ile Ile Cys Pro Ser Cys Asn Arg Thr Ala His Pro Leu Arg		
420	425	430
His Ile Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys		
435	440	445
Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp		
450	455	460
Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu		
465	470	475
Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn		
485	490	495
Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp		
500	505	510
Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys		
515	520	525
Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu		
530	535	540
Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro		
545	550	555
Asp		560
<210>	42	
<211>	586	
<212>	PRT	

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> A131重链氨基酸序列

<400> 42

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Val	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35				40					45			
Gly	Gly	Val	Ile	Pro	Ile	Val	Asp	Ile	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Arg	Phe
		50				55					60				
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Ser	Thr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Asp	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
			115					120					125		
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly
			130				135					140			
Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser
145					150					155					160
Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro
				165					170					175	
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ala	Ile	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	His
			180					185					190		
Ile	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Glu	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
		195					200					205			
Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu
		210					215					220			
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Val	Ser	Tyr	Leu	Ser	Thr	Ala
225					230					235					240
Ser	Ser	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				245					250					255	
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
			260					265					270		
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr

275	280	285
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
290	295	300
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
305	310	315
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
325	330	335
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
340	345	350
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
355	360	365
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
370	375	380
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
385	390	395
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
405	410	415
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
420	425	430
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
435	440	445
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
450	455	460
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
465	470	475
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
485	490	495
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
500	505	510
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
515	520	525
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
530	535	540
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
545	550	555
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
565	570	575
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
580	585	

<210> 43

<211> 337

<212> PRT

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> A131轻链氨基酸序列

<400> 43

Glu Thr 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 Leu Gly 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 Pro 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 Ala Asp Ser Pro	
85	90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly	
100	105 110
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr	
115	120 125
Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile	
130	135 140
Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln	
145	150 155 160
Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr	
165	170 175
Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr	
180	185 190
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr	
195	200 205
Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly	
210	215 220
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile	
225	230 235 240
Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val	
245	250 255

Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys
			260					265					270		
Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu
		275					280					285			
Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu
		290				295					300				
Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr
305					310					315					320
His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu
				325					330					335	

Cys

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> 肽接头序列

<400> 44

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 45

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> 肽接头序列

<400> 45

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> 肽接头序列

<400> 46

Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5 10

<210> 47

<211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工的 (Artificial)
 <220>
 <223> 肽接头序列
 <400> 47
 Gly Ser Ser Gly Thr
 1 5
 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工的 (Artificial)
 <220>
 <223> 肽接头序列
 <400> 48
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工的 (Artificial)
 <220>
 <223> 肽接头序列
 <400> 49
 Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
 1 5 10 15
 Ala
 <210> 50
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工的 (Artificial)
 <220>
 <223> 肽接头序列
 <400> 50
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser
 20
 <210> 51

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工的 (Artificial)
<220>
<223> 肽接头序列
<400> 51
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 52
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工的 (Artificial)
<220>
<223> 肽接头序列
<400> 52
Gly Ser Gly Ser Ser
1 5
<210> 53
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的 (Artificial)
<220>
<223> 肽接头序列
<400> 53
Gly Gly Ser Ser
1
<210> 54
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工的 (Artificial)
<220>
<223> 肽接头序列
<400> 54
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 55
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的 (Artificial)

<220>
<223> 肽接头序列
<400> 55
Gly Gly Ser Gly
1
<210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的 (Artificial)
<220>
<223> 肽接头序列
<400> 56
Ser Gly Gly Gly
1
<210> 57
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的 (Artificial)
<220>
<223> 肽接头序列
<400> 57
Gly Ser Gly Ser
1
<210> 58
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的 (Artificial)
<220>
<223> 肽接头序列
<400> 58
Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5
<210> 59
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工的 (Artificial)
<220>
<223> 肽接头序列
<400> 59

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> 肽接头序列

<400> 60

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 61

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> 肽接头序列

<400> 61

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> 肽接头序列

<400> 62

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> 肽接头序列

<400> 63

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15



图1

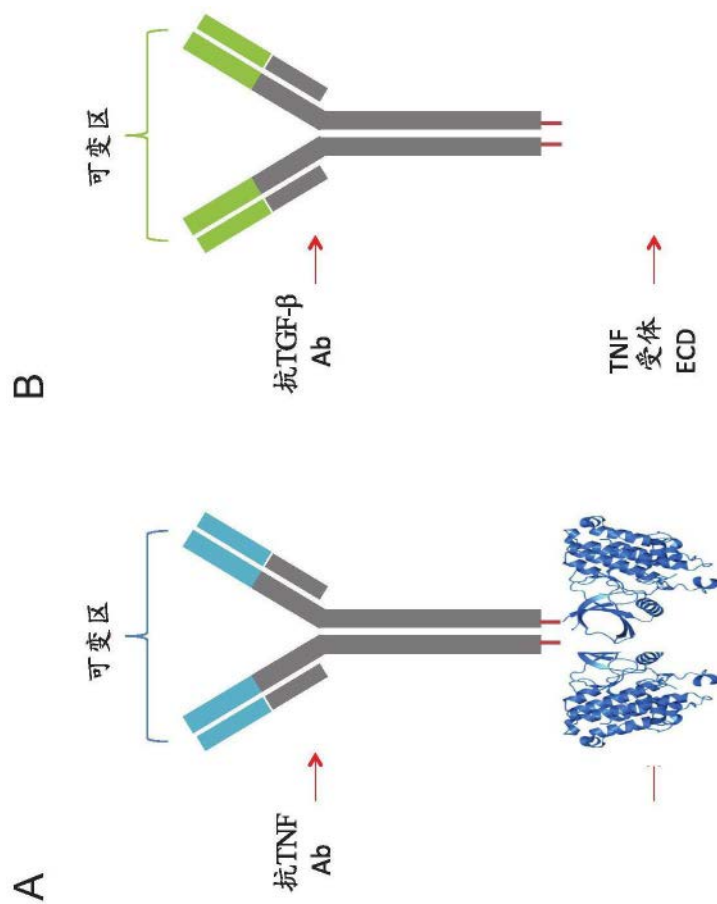


图2

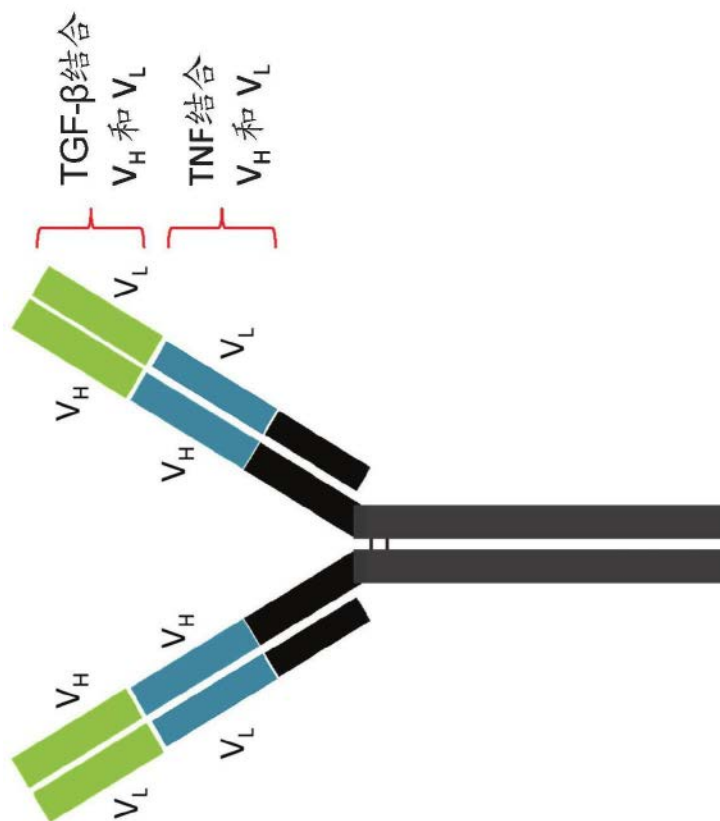


图3

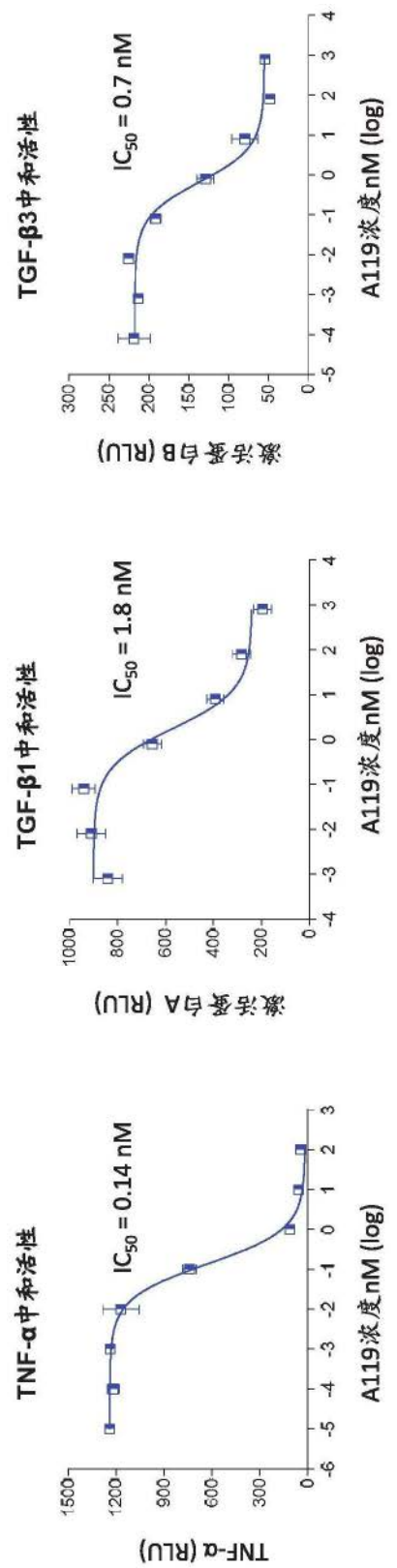


图4

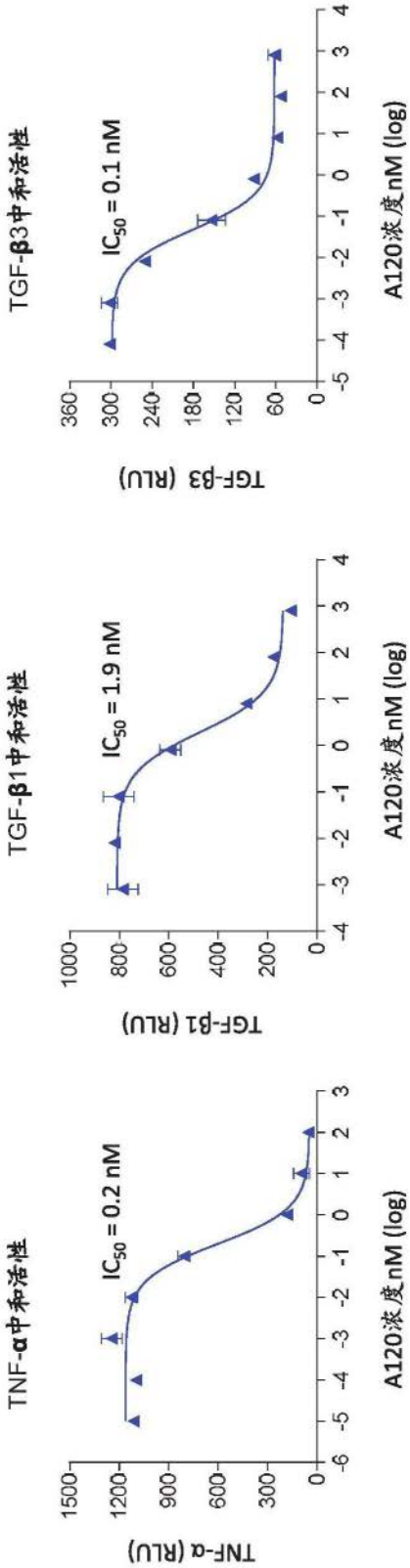


图5

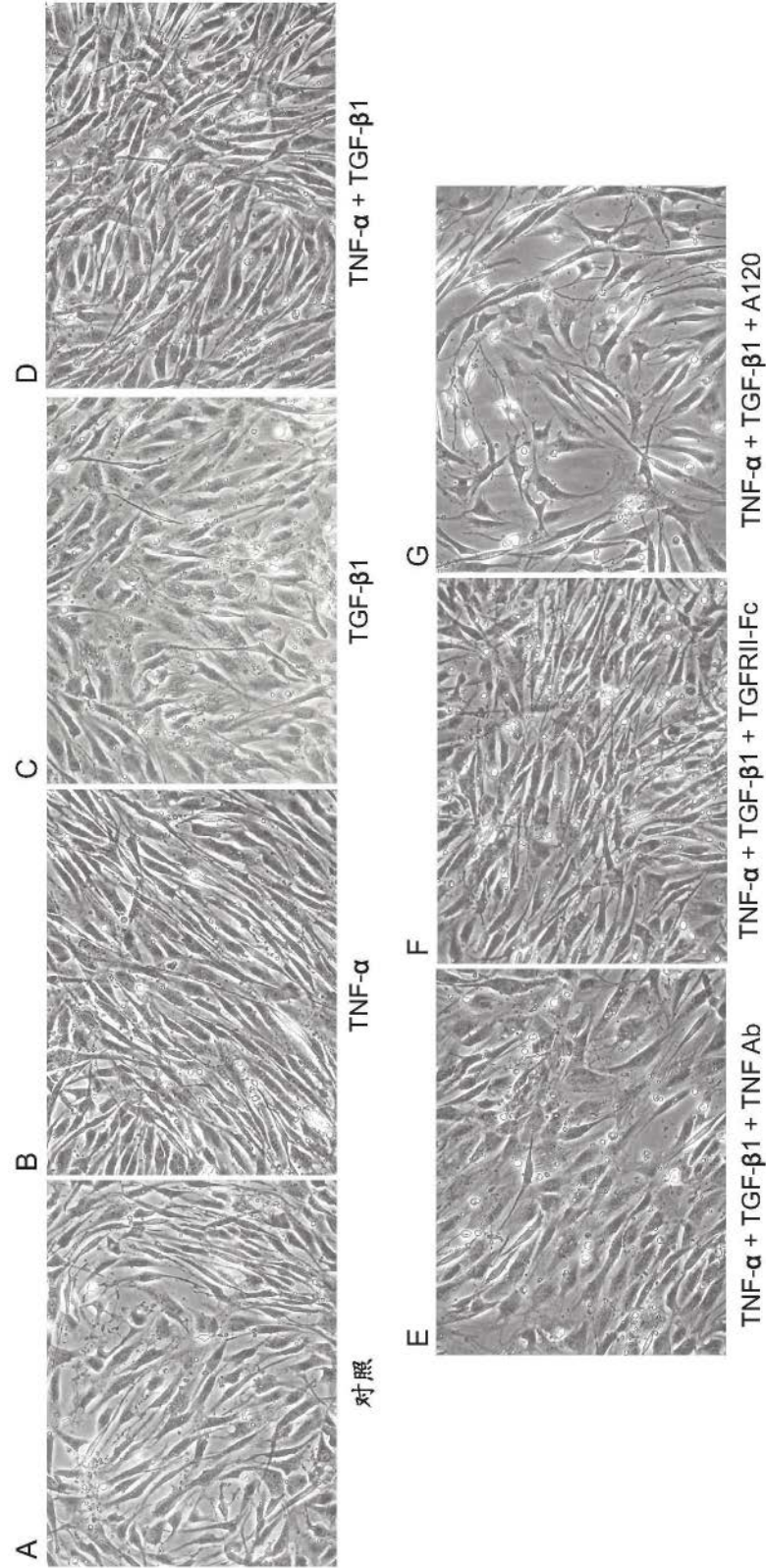


图6

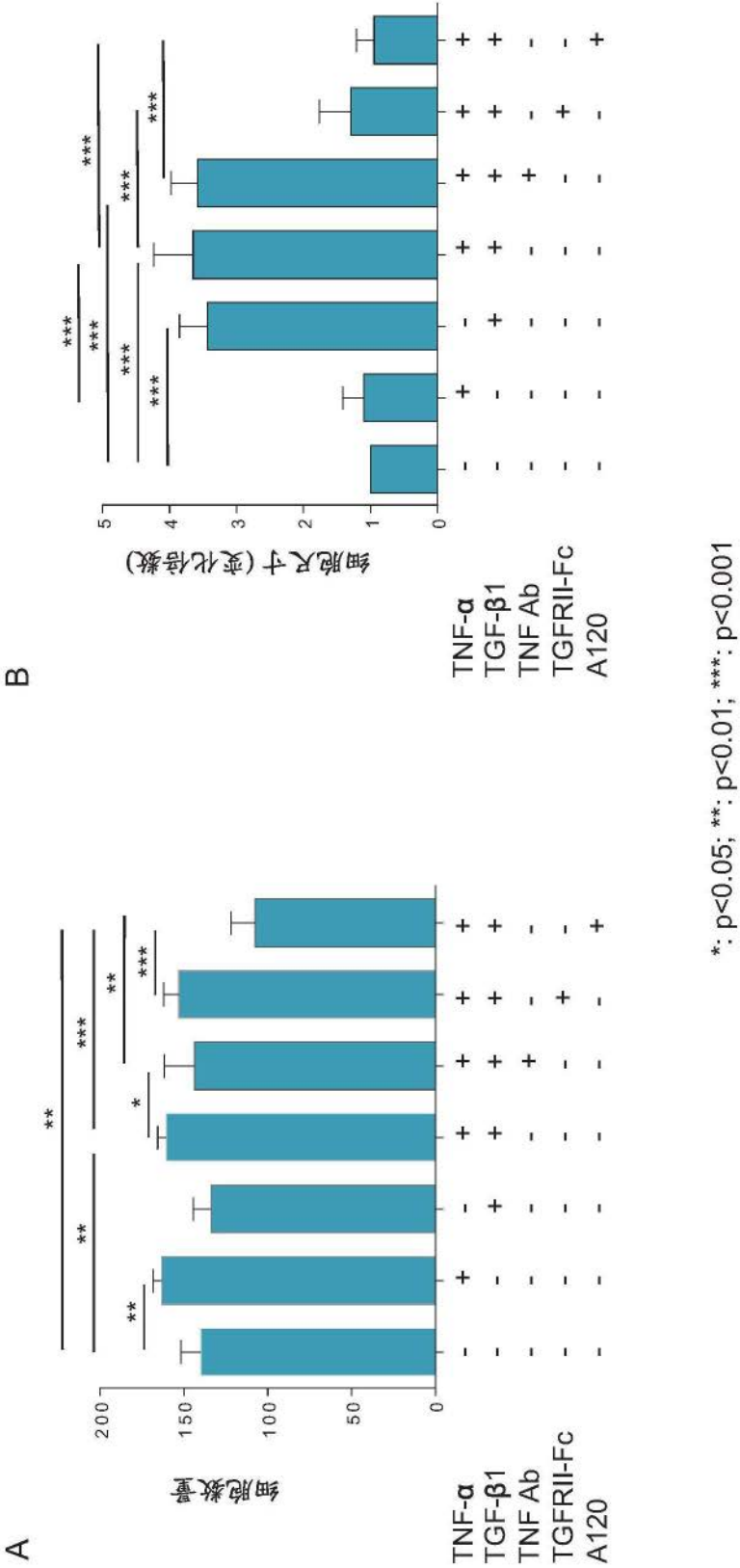


图7

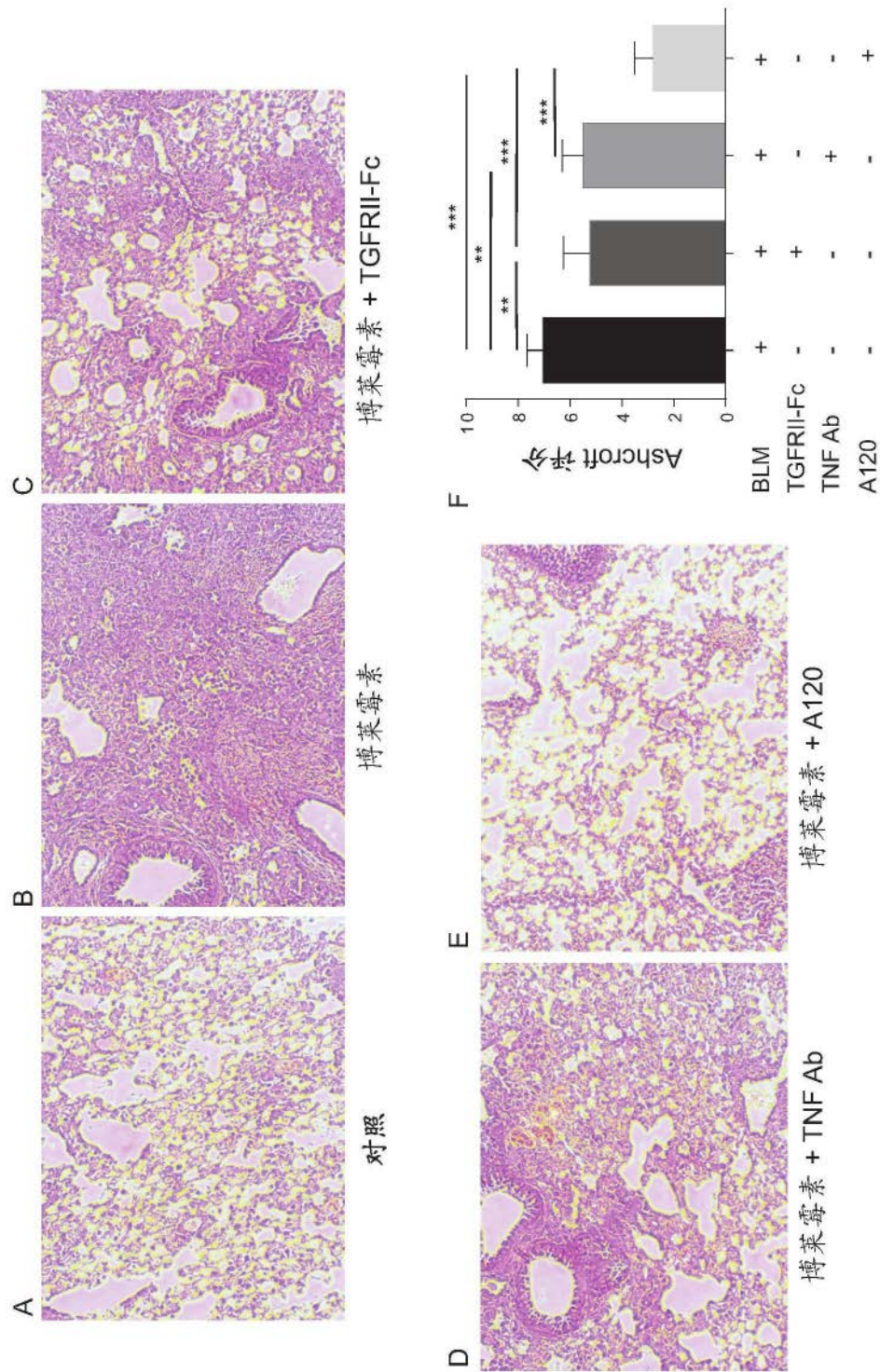


图8

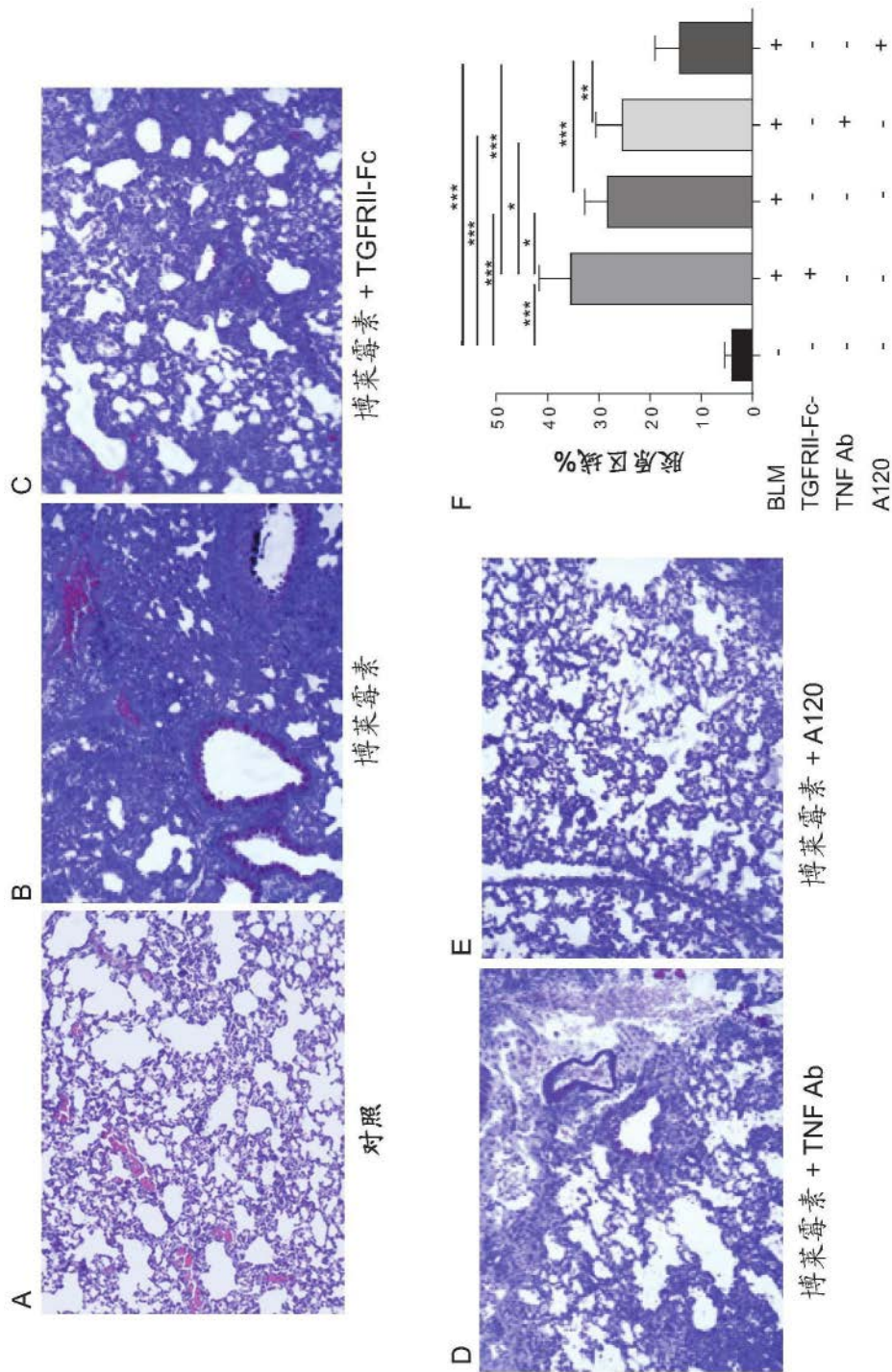


图9

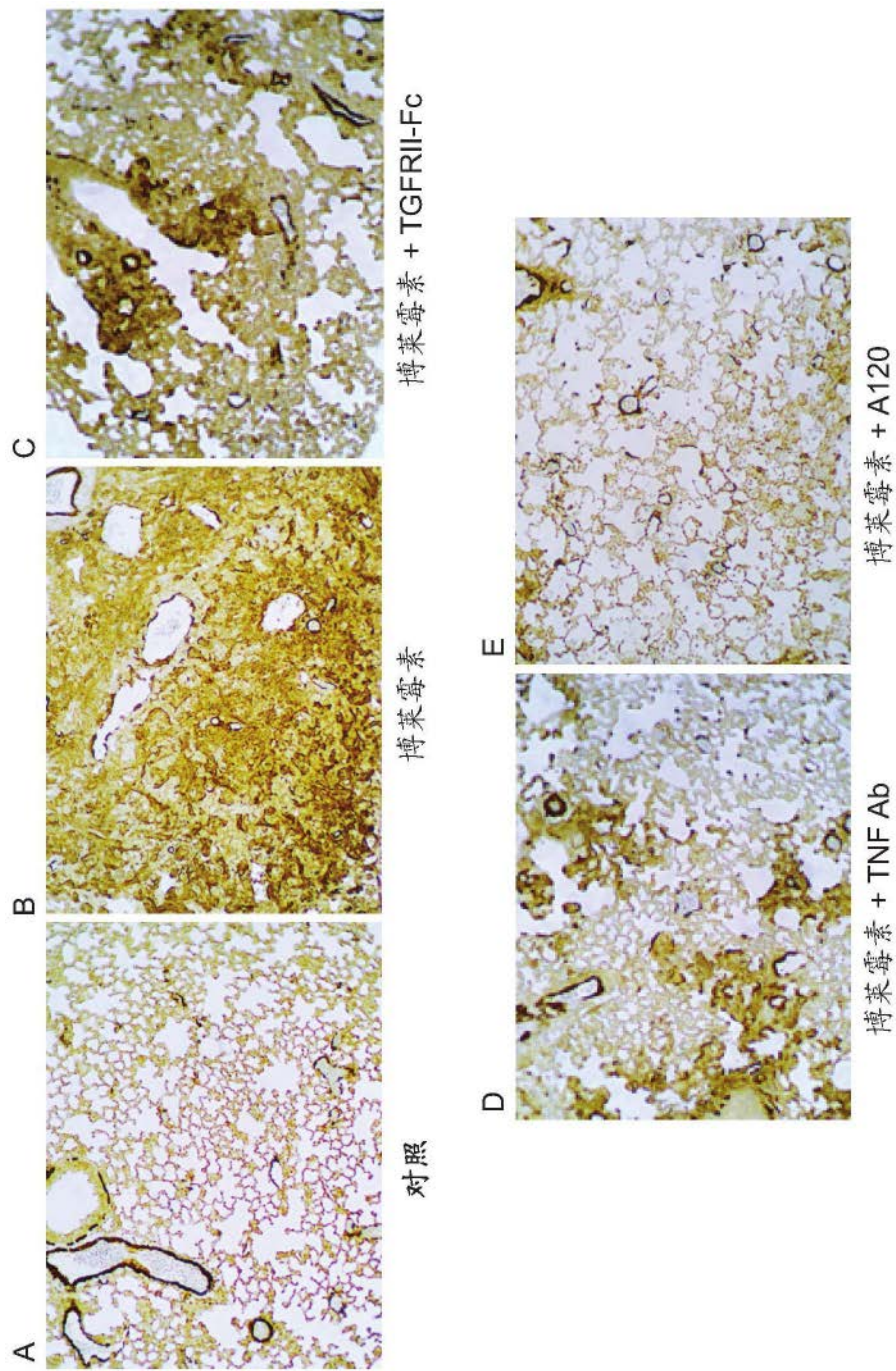


图10