(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106459190 A
(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201580017113.5

(22)申请日 2015.02.02

(30)优先权数据
61/934,828 2014.02.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.09.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2015/052098 2015.02.02

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/114150 EN 2015.08.06

(71)申请人 麦迪穆有限责任公司
地址 英国剑桥郡

(72)发明人 D·斯科菲尔德 M·A·斯利曼 I·P·切赛尔 J·哈彻 D·洛

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 陈桉

(51)Int.Cl.
C07K 16/22(2006.01)
C07K 14/48(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)

权利要求书7页 说明书54页
序列表63页 附图17页

(54)发明名称

用于治疗疼痛的化合物和方法

(57)摘要

本发明提供用于控制疼痛的组合物和方法。具体而言本发明提供用于控制疼痛的方法，包括共同施用NGF拮抗剂和TNFα拮抗剂。所述NGF拮抗剂和TNFα拮抗剂可以是单独的分子或是多功能多肽的一部分，例如包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的多特异性结合分子。本发明还提供多功能多肽，例如多特异性结合分子，其包含NGF拮抗剂，和TNFα拮抗剂域。所述方法提供改进的疼痛控制。如本文提供的，NGF拮抗剂和TNFα拮抗剂的施用能在受试者中控制疼痛，其比单独施用等量的NGF拮抗剂或TNFα拮抗剂更有效。

CN 106459190 A

1.一种结合分子,其包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域。

2.权利要求1的结合分子,其中所述TNFα拮抗剂结合包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多肽。

3.权利要求1的结合分子,其中所述NGF拮抗剂结合包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽。

4.权利要求1的结合分子,其中所述NGF拮抗剂是抗NGF抗体或其抗原结合片段。

5.权利要求4的结合分子,其中所述抗NGF抗体或其片段能抑制NGF对TrkA、对p75NRT、或对TrkA和P75NRT二者的结合。

6.权利要求5的结合分子,相对于NGF对p75NRT的结合,所述结合分子优先地阻断NGF对TrkA的结合。

7.权利要求4-6任一项的结合分子,其中所述抗NGF抗体或其片段以约0.25-0.44nM的亲和力结合人NGF。

8.权利要求4-6任一项的结合分子,其中所述抗NGF抗体或其片段结合至与MEDI-578相同的表位。

9.权利要求4-6任一项的结合分子,其中所述抗NGF抗体或其片段竞争性地抑制MEDI-578对人NGF的结合。

10.权利要求4-9任一项的结合分子,其中所述抗NGF抗体或其片段包含抗体VH域和抗体VL域,所述抗体VH域包含一组CDR,即HCDR1、HCDR2、HCDR3,所述抗体VL域包含一组CDR,即LCDR1、LCDR2、和LCDR3,其中所述HCDR1具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列或SEQ ID NO:4具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列,所述HCDR2具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列或SEQ ID NO:5具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列,所述HCDR3具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列、SEQ ID NO:6具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列、SSRIYDFNSALISYYDMDV(SEQ ID NO:11)、或SSRIYDMISSLQPYYDMDV(SEQ ID NO:12),所述LCDR1具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列或SEQ ID NO:8具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列,所述LCDR2具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列或SEQ ID NO:9具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列,且所述LCDR3具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列或SEQ ID NO:10具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列。

11.权利要求10的结合分子,其中所述抗NGF抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH。

12.权利要求10或11的结合分子,其中所述抗NGF抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL。

13.权利要求10的结合分子,其中所述抗NGF抗体或其片段包含VH,所述VH具有与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%或99%相同的氨基酸序列。

14.权利要求10的结合分子,其中所述抗NGF抗体或其片段包含VL,所述VL具有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%或99%相同的氨基酸序列。

15.权利要求4-14任一项的结合分子,其中所述抗NGF抗体或其片段是完全H_2L_2抗体、Fab片段、Fab'片段、$F(ab)_2$片段或单链Fv(scFv)片段。

16.权利要求4-15任一项的结合分子,其中所述抗NGF抗体或其片段是人源化的、嵌合的、灵长类化的(primatized)、或完全人的。

17.权利要求15的结合分子,其中所述NGF拮抗剂是抗NGF scFv片段。

18.权利要求17的结合分子，其中所述scFv是SS-稳定化的。

19.权利要求17的结合分子，其中所述抗NGF scFv片段从N末端至C末端包含如下：包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH、15个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_3$(SEQ ID NO:15)、以及包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL。

20.权利要求17的结合分子，其中所述抗NGF scFv片段从N末端至C末端包含如下：包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的VH、20个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_4$(SEQ ID NO:19)、以及包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的VL。

21.权利要求1-20任一项的结合分子，其中所述TNFα拮抗剂抑制TNFα对细胞表面上的TNF受体(TNFR)的结合，由此阻断TNFα活性。

22.权利要求21的结合分子，其中所述TNFα拮抗剂包含抗TNFα抗体或其抗原结合片段。

23.权利要求22的结合分子，其中所述抗TNFα抗体或其抗原结合片段包含抗体VH域和抗体VL域，所述抗体VH域包含一组CDR，即HCDR1、HCDR2、和HCDR3，所述抗体VL域包含一组CDR，即LCDR1、LCDR2和LCDR3，其中CDR与英夫利昔单抗(infliximab)的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3或阿达木单抗(adalimumab)的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3相同。

24.权利要求23的结合分子，其中所述结合分子包含完整的抗TNFα抗体和融合至所述抗TNFα抗体的重链的C末端的抗NGF scFv。

25.权利要求24的结合分子，其中所述结合分子包含轻链和重链，所述轻链包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列，所述重链包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

26.权利要求21的结合分子，其中所述TNFα拮抗剂包含可溶的、TNFR的TNFα结合片段。

27.权利要求26的结合分子，其中所述TNFR是TNFR-2。

28.权利要求27的结合分子，其中所述TNFR-2的可溶的片段是75kD片段。

29.权利要求26-28任一项的结合分子，其中所述TNFR-2片段融合至免疫球蛋白Fc域。

30.权利要求29的结合分子，其中所述免疫球蛋白Fc域是人IgG1Fc域。

31.权利要求26-30任一项的结合分子，其中所述TNFα拮抗剂包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列或其功能性片段。

32.权利要求1-31任一项的结合分子，其中所述结合分子包含融合蛋白，所述融合蛋白包含经接头融合至TNFα拮抗剂的NGF拮抗剂。

33.权利要求32的结合分子，其中所述结合分子包含融合蛋白的同二聚体。

34.权利要求33的结合分子，其中所述NGF拮抗剂是抗NGF scFv域且所述TNFα拮抗剂是可溶的TNFR-2的TNFα结合片段，其于其羧基末端处融合至免疫球蛋白Fc域。

35.权利要求34的结合分子，其中所述scFv经接头融合至所述免疫球蛋白Fc域的羧基末端。

36.权利要求35的结合分子，其中所述结合分子包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽从N末端至C末端包含如下：TNFR-2的结合TNFα的75kD片段、人IgG1Fc域、10个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_2$、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH、15个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_3$(SEQ ID NO:15)、和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL。

37.权利要求35的结合分子，其中所述结合分子包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽从N末端至C末端包含如下：TNFR-2的结合TNFα的75kD片段，其包含与SEQ ID NO:13的氨

基酸1-235对应的序列相同的氨基酸序列、人IgG1Fc域、10个氨基酸的接头序列(GGGGS)$_2$、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH、15个氨基酸的接头序列(GGGGS)$_3$(SEQ ID NO:15)、和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL。

38.权利要求36或37的结合分子,其中所述结合分子包含融合多肽的同二聚体,所述融合多肽包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

39.权利要求36或37的结合分子,其中所述结合分子包含融合多肽的同二聚体,所述融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%或99%相同的氨基酸序列。

40.权利要求35的结合分子,其中所述结合分子包含融合多肽的同二聚体,所述融合多肽从N末端至C末端包含如下:TNFR-2的结合TNFα的75kD片段、人IgG1Fc域、10个氨基酸的接头序列(GGGGS)$_2$、包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的VH、20个氨基酸的接头序列(GGGGS)$_4$(SEQ ID NO:19)、和包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的VL。

41.权利要求35的结合分子,其中所述结合分子包含融合多肽的同二聚体,所述融合多肽从N末端至C末端包含如下:TNFR-2的结合TNFα的75kD片段,其包含与SEQ ID NO:13的氨基酸1-235对应的序列相同的氨基酸序列、人IgG1Fc域、10个氨基酸的接头序列(GGGGS)$_2$、包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的VH、20个氨基酸的接头序列(GGGGS)$_4$(SEQ ID NO:19)、和包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的VL。

42.权利要求40或41的结合分子,其中所述结合分子包含融合多肽的同二聚体,所述融合多肽包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

43.权利要求40或41的结合分子,其中所述结合分子包含融合多肽的同二聚体,所述融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%或99%相同的氨基酸序列。

44.一种分离的多核苷酸,其编码权利要求1-43任一项的结合分子。

45.一种分离的多核苷酸,其包含与SEQ ID NO:99的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%或99%相同的核苷酸序列。

46.一种分离的多核苷酸,其包含与SEQ ID NO:99的氨基酸序列相同的核苷酸序列。

47.一种分离的多核苷酸,其包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%或99%相同的核苷酸序列。

48.一种分离的多核苷酸,其包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列相同的核苷酸序列。

49.一种分离的多核苷酸,其包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%或99%相同的核苷酸序列。

50.一种分离的多核苷酸,其包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列相同的核苷酸。

51.一种载体,其包含权利要求44-50任一项的多核苷酸,所述多核苷酸与启动子可操作地相连。

52.一种宿主细胞,其包含权利要求44-50任一项的多核苷酸或权利要求51的载体。

53.一种生产权利要求1-43任一项的结合分子的方法,包括在促进所述结合分子表达的条件下培养权利要求52的宿主细胞,以及回收所述结合分子。

54.一种组合物,其包含权利要求1-43任一项的结合分子,以及载剂。

55.一种组合物,其包含TNFα拮抗剂、NGF拮抗剂、和载剂,其用于治疗疼痛,其中施用有

效量的所述组合物能在需要治疗的受试者中控制疼痛，其比单独施用等量的NGF拮抗剂或TNFα拮抗剂更有效。

56.权利要求54或55的组合物，其中所述组合物是药物组合物且所述载体是药学上可接受的赋形剂。

57.一种冻干的组合物，其包含权利要求1-43任一项的结合分子。

58.一种重建的冻干组合物，其包含权利要求1-43任一项的结合分子。

59.一种试剂盒，其包含权利要求1-43任一项的结合分子，权利要求44-50任一项的多核苷酸，权利要求51的载体，或权利要求54-58任一项的组合物。

60.一种用于控制受试者中的疼痛的方法，包括将有效量的神经生长因子(NGF)拮抗剂和肿瘤坏死因子α(TNFα)拮抗剂施用于有需要的受试者，其中所述施用比单独施用等量的NGF拮抗剂或TNFα拮抗剂能更有效地控制受试者中的疼痛。

61.权利要求60的方法，包括共同施用TNFα拮抗剂和NGF拮抗剂。

62.权利要求60的方法，其中所述TNFα拮抗剂结合包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多肽。

63.权利要求60的方法，其中所述NGF拮抗剂结合包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽。

64.权利要求61的方法，其中所述TNFα拮抗剂和NGF拮抗剂序贯施用或同时施用。

65.权利要求60的方法，其包括施用包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的结合分子。

66.权利要求60-65任一项的方法，其中所述NGF拮抗剂是抗NGF抗体或其抗原结合片段。

67.权利要求66的方法，其中所述抗NGF抗体或其片段能抑制NGF对TrkA、对p75NRT、或对TrkA和P75NRT二者的结合。

68.权利要求67的方法，相对于NGF对p75NRT的结合，所述结合分子优先地阻断NGF对TrkA的结合。

69.权利要求66-68任一项的方法，其中所述抗NGF抗体或其片段以约0.25-0.44nM的亲和力结合人NGF。

70.权利要求66-69任一项的方法，其中所述抗NGF抗体或其片段结合至与MEDI-578相同的表位。

71.权利要求66-70任一项的方法，其中所述抗NGF抗体或其片段竞争性地抑制MEDI-578对人NGF的结合。

72.权利要求66-71任一项的方法，其中所述抗NGF抗体或其片段包含抗体VH域和抗体VL域，所述抗体VH域包含一组CDR，即HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述抗体VL域包含一组CDR，即LCDR1、LCDR2、和LCDR3，其中所述HCDR1具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列或SEQ ID NO:4具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列，所述HCDR2具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列或SEQ ID NO:5具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列，所述HCDR3具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列、SEQ ID NO:6具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列、SSRIYDFNSALISYYDMDV(SEQ ID NO:11)、或SSRIYDMISSLQPYYDMDV(SEQ ID NO:12)，所述LCDR1具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列或SEQ ID NO:7具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列，所述LCDR2具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列或SEQ ID NO:9具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列，且所述LCDR3具有SEQ ID

NO:10的氨基酸序列或SEQ ID NO:10具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列。

73.权利要求72的方法，其中所述抗NGF抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH。

74.权利要求72或73的方法，其中所述抗NGF抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL。

75.权利要求72的方法，其中所述抗NGF抗体或其片段包含VH，所述VH具有与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％或99％相同的氨基酸序列。

76.权利要求72或75的方法，其中所述抗NGF抗体或其片段包含VL，所述VL具有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％或99％相同的氨基酸序列。

77.权利要求72的方法，其中所述抗NGF抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:94的氨基酸序列的VH。

78.权利要求72或权利要求77的方法，其中所述抗NGF抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的VL。

79.权利要求72的方法，其中所述抗NGF抗体或其片段包含VH，所述VH具有与SEQ ID NO:94的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％或99％相同的氨基酸序列。

80.权利要求72或79的方法，其中所述抗NGF抗体或其片段包含VL，所述VL具有与SEQ ID NO:95的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％或99％相同的氨基酸序列。

81.权利要求66-80任一项的方法，其中所述抗NGF抗体或其片段是完全H_2L_2抗体、Fab片段、Fab'片段、$F(ab)_2$片段或单链Fv(scFv)片段。

82.权利要求66-81任一项的方法，其中所述抗NGF抗体或其片段是人源化的、嵌合的、灵长类化的、或完全人的。

83.权利要求82的方法，其中所述NGF拮抗剂是抗NGF scFv片段。

84.权利要求83的方法，其中所述scFv是SS-稳定化的。

85.权利要求83的结合分子，其中所述抗NGF scFv片段从N末端至C末端包含如下：包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH、15个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_3$(SEQ ID NO:15)、以及包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL。

86.权利要求83的方法，其中所述抗NGF scFv片段从N末端至C末端包含如下：包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的VH、20个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_4$(SEQ ID NO:19)、以及包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的VL。

87.权利要求60-86任一项的方法，其中所述TNFα拮抗剂抑制TNFα对TNF受体(TNFR)的结合，由此阻断TNFα活性。

88.权利要求87的方法，其中所述TNFα拮抗剂包含抗TNFα抗体或其抗原结合片段。

89.权利要求88的方法，其中所述抗TNFα抗体或其抗原结合片段包含抗体VH域和抗体VL域，所述抗体VH域包含一组CDR，即HCDR1、HCDR2、和HCDR3，所述抗体VL域包含一组CDR，即LCDR1、LCDR2和LCDR3，其中CDR与英夫利昔单抗的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3或阿达木单抗的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3相同。

90.权利要求88或89的方法，其中所述结合分子包含完整的抗TNFα抗体和融合至所述抗TNFα抗体的重链的C末端的抗NGF scFv。

91.权利要求90的结合分子，其中所述结合分子包含轻链和重链，所述轻链包含SEQ ID

NO:20的氨基酸序列，所述重链包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

92.权利要求60-87任一项的方法，其中所述TNFα拮抗剂包含可溶的、TNFR的TNFα结合片段。

93.权利要求92的方法，其中所述TNFR是TNFR-2。

94.权利要求93的方法，其中所述TNFR-2的可溶片段是75kD片段。

95.权利要求93或权利要求94的方法，其中所述TNFR-2片段融合至免疫球蛋白Fc域。

96.权利要求95的方法，其中所述免疫球蛋白Fc域是人IgG1Fc域。

97.权利要求92-96任一项的方法，其中所述TNFα拮抗剂包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列或其功能性片段。

98.权利要求60-97任一项的方法，其中所述结合分子包含融合蛋白，所述融合蛋白包含经接头融合至TNFα拮抗剂的NGF拮抗剂。

99.权利要求98的方法，其中所述结合分子包含融合蛋白的同二聚体。

100.权利要求98或权利要求99的方法，其中所述NGF拮抗剂是抗NGF scFv域且所述TNFα拮抗剂是可溶的、TNFR-2的TNFα结合片段，其于其羧基末端处融合至免疫球蛋白Fc域。

101.权利要求100的方法，其中所述scFv经接头融合至所述免疫球蛋白Fc域的羧基末端。

102.权利要求99-101任一项的方法，其中所述结合分子包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽从N末端至C末端包含如下：TNFR-2的结合TNFα的75kD片段、人IgG1Fc域、10个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_2$、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH、15个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_3$(SEQ ID NO:15)、和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL。

103.权利要求102的方法，其中所述结合分子包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

104.权利要求99-101任一项的方法，其中所述结合分子包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％或99％相同的氨基酸序列。

105.权利要求99-101任一项的方法，其中所述结合分子包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽从N末端至C末端包含如下：TNFR-2的结合TNFα的75kD片段、人IgG1Fc域、10个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_2$、包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的VH、20个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_4$(SEQ ID NO:19)、和包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的VL。

106.权利要求105的方法，其中所述结合分子包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

107.权利要求99-101任一项的方法，其中所述结合分子包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％或99％相同的氨基酸序列。

108.权利要求60-107任一项的方法，其中所述施用足以预防、减少、减轻、或消除受试者中的疼痛。

109.权利要求60-108任一项的方法，其中所述疼痛是急性疼痛、短期疼痛、持续伤害性疼痛、或是持续或慢性神经性疼痛。

110.权利要求60-109任一项的方法，其中所述施用对于控制受试者中的疼痛比单独施

用等量的NGF拮抗剂或TNFα拮抗剂至少5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、或100％更有效。

用于治疗疼痛的化合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求要求申请日为2014年2月2日，序列号为61/934,828的美国临时申请的权益。上文引用的申请的所有教导通过提述在此并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表，其已经以ASCII格式电子提交并在此通过提述以其整体并入本文。所述ASCII拷贝创建于2015年1月29日，名为110421-0054-WO1_SL.txt，且大小为134,721字节。

技术背景

[0005] 疼痛是寻求医疗救助最常见的症状之一，并且是所有求医患者的一半的主要疾病。尽管存在许多疼痛药物并得到广泛使用，对于疼痛尤其是慢性疼痛的消除仍然未获成功。因此，社会的负担依然高昂。据多项研究评价，疼痛导致每年5千万工作日损失和612亿美元的生产力损失。对于慢性疼痛罹患者而言，仅有约一半能以可用的处方治疗选择来管控疼痛。并且，总的处方疼痛药物市场约为每年250亿美元。如这些数据所提示的，对于安全有效的新镇痛药的巨大需求依然存在。

[0006] 降低分泌的神经生长因子(NGF或β-NGF)的组织水平或抑制其效果的治疗剂正是具有成为此种新镇痛药的潜力。NGF在神经系统发育中起着众所周知的关键作用；然而，NGF还是公认的疼痛靶标，因为其在动物和人中引起疼痛。具体而言，在成人中NGF促进一部分中枢和周围神经元的健康和生存(Huang&Reichardt,Ann.Rev.Neurosci.24:677-736(2001))。NGF还有助于这些神经元的功能特性的调整(modulation)并对痛感受体(称为伤害性感受器(nociceptor))的敏感性或兴奋性发挥紧张控制(tonic control)(Priestley等,Can.J.Physiol.Pharmacol.80:495-505(2002)；Bennett,Neuroscientist 7:13-17(2001))。伤害性感受器感觉到各种引发疼痛知觉的伤害性刺激并将其传递至中枢神经系统(伤害感受)。NGF受体定位在伤害性感受器上。NGF的表达在受伤或发炎的组织中增加，并且在人疼痛状态中上调。因此，由于NGF在伤害感受中的作用，降低NGF水平的NGF结合剂作为镇痛治疗是具有实用性的。

[0007] NGF的皮下注射本身在人和动物产生疼痛。注射的NGF引起快速热痛觉过敏，然后是延迟的热痛觉过敏和机械异常性疼痛(allodynia)(Petty等,Ann.Neurol.36:244-46(1994)；McArthur等,Neurology 54:1080-88(2000))。内源性分泌的NGF是类似地促伤害感受性的(pro-nociceptive)。组织损伤诱导的NGF释放及其随后的在周围的作用，通过“周围致敏作用”的过程在热痛觉过敏的诱导中其主要作用(Mendell&Arvanian,Brain Res.Rev.40:230-39(2002))。组织损伤促进促伤害感受性细胞因子和促炎性细胞因子的释放，其转而诱导NGF从角质形成细胞和成纤维细胞释放。这种释放的NGF直接作用于伤害性感受器上，在伤害性侵犯数分钟内诱导疼痛或伤害感受性状态。因此，NGF在前馈释放中还间接作用诱导并维持伤害感受性/疼痛状态。其诱发肥大细胞脱颗粒作用，释放促伤害感受性剂如组胺和血清素，以及更重要的是释放更多的NGF，并且还能刺激交感神经末梢释放促

伤害感受性神经递质，如去甲肾上腺素(Ma&Woolf,Neuroreport.8:807-10(1997))。

[0008] NGF的组织水平在注射了完全弗氏佐剂(CFA)和角叉菜胶(carrageenan)的动物中是升高的(Ma&Woolf,Neuroreport.8:807-10(1997);Amann&Schuligoi,Neurosci.Lett.278:173-78(2000))。在大鼠中，NGF增强DRG(背根神经节)辣椒素(capsaicin)响应。在罹患类风湿性关节炎(Aloe&Tuveri,Clin.Exp.Rheumatol.15:433-38(1997))或膀胱炎(Lowe等,Br.J.Urol.79:572-77(1997))的患者中记录到了提高的NGF水平。在啮齿类动物中，周围神经损伤增加巨噬细胞、成纤维细胞、和施旺细胞(Schwann cell)中的NGF mRNA的表达(Heumann等,J.Cell Biol.104:1623-31(1987))。在神经损伤后，转基因小鼠中NGF的过表达导致了高于野生型小鼠的增强的神经性疼痛行为(Ramer等,Pain,Supp.6:S111-20(1998))。在数小时和15天后，升高的NGF水平在促进“中枢致敏作用”(脊髓的伤害感受性途径中突触处神经传递的增强)中起作用。中枢致敏作用导致持续且慢性的痛觉过敏和异常性疼痛。这个过程被认为涉及NGF与其高亲和力受体，酪氨酸受体激酶A(trkA)的复合体的内化。这些复合体在DRG中向伤害性感受器细胞体的逆向运输增强脊髓背角(dorsal horn)中伤害感受性神经肽(例如P物质、或降钙素基因相关肽(CGRP))的分泌、蛋白激酶C(PKC)活化、和N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体活化(Sah等,Nat.Rev.Drug Disc.2:460-72(2003))——所有促进伤害感受性途径的致敏作用的过程。NGF还在电压依赖性离子通道和配体门控离子通道的上调和重分布中起作用，包括钠通道亚型和辣椒素受体，瞬时受体电位阳离子通道亚家族V成员1(TRPV1)(Mamet等,J.Biol.Chem.278:48907-13(1999);Fjell等,J.Neurosci.Res.57:39-47(1999);Priestley等,Can.J.Physiol.Pharmacol.80:495-505(2002))。递质、受体、和阳离子通道的改变的活性和/或表达是神经性疼痛相关的伤害性感受器的增加的敏感性和兴奋性的基础。

[0009] NGF诱导的伤害感受/疼痛是由高亲和力NGF受体trkA(酪氨酸受体激酶A)所介导的(Sah,等,Nat.Rev.Drug Disc.2:460-72(2003))。DRG中约40-45％的伤害性感受器细胞体表达trkA。这些是小直径纤维或C-纤维的细胞体，其表达分泌的促伤害感受性肽、P物质和CGRP。这些纤维末端是背角的I层或II层，其中它们将周围伤害性感受器所感觉到的伤害性刺激传递至中枢神经系统。在人(Indo,Clin.Auton.Res.12(Supp 1):I20-I32(2002))和在trkA敲除小鼠(de Castro等,Eur.J.Neurosci.10:146-52(1998))中trkA基因中的突变或删除产生特征为痛觉丧失的表型。值得关注的是，在处于关节炎(Pozza等,J.Rheumatol.27:1121-27(2000))或膀胱炎疼痛(Qiao&Vizzard,J.Comp.Neurol.454:200-11(2002))模型的动物中或处于炎性疼痛(其由注射CFA或角叉菜胶入爪中所诱导)的动物(Cho等,Brain Res.716:197-201(1996))中trkA的表达是上调的。

[0010] NGF还结合至p75神经营养蛋白受体(p75NTR)。p75NTR的作用取决于其细胞环境和其他受体的存在，据信所述其他受体起辅助受体或共同受体的功能。trkA和p75NTR的相互作用导致对NGF的高亲和力结合位点的形成。此类受体相互作用在NGF介导的疼痛信号传输中的重要性尚未明确，但近期的研究已启示了在细胞过程中p75NTR可能是相关的(Zhang&Nicol,Neurosci.Lett.366:187-92(2004))。然而，虽然p75NTR敲除小鼠表现出对伤害性刺激升高的阈值，但它们仍保持对NGF的痛觉过敏效果的响应性，说明单独trkA受体不足以介导这些效果(Bergmann等,Neurosci.Lett.255:87-90(1998))。

[0011] NGF阻断在慢性伤害性疼痛(例如骨关节炎(OA))和慢性下背痛中产生对NSAID的

阶跃变化的(step-change)效力。一些靶向NGF的治疗性抗体候选物正处于各种临床前阶段和临床开发中。此类抗体包括例如他尼珠单抗(Tanezumab)(PF-4383119;Pfizer),其是一种IgG2形式的人源化抗体;SAR164877/REGN475(Sanofi-Aventis/Regeneron Pharmaceuticals),其是一种IgG4形式的人抗体;AMG403(Amgen/Johnson&Johnson),其是一种IgG2形式的人抗体;PG110(PanGenetics/Abbott),其是一种IgG4形式的人源化抗体。其他治疗性抗体候选物公开于WO 2006/077441中,其涉及NGF抗体和用所述公开的抗体治疗NGF在其中起作用的疾病或病症的方法。MEDI-578是一种IgG4形式的人抗体。尽管开发了这些候选物,依然需要通过NGF结合剂对更广范围的疼痛病况提供镇痛缓解,所述NGF结合剂具有强效力和改进的安全性概貌。

[0012] 肿瘤坏死因子α(TNFα)也称为恶病质素(cachectin),其是一种多效细胞因子,具有广范围的生物活性,包括细胞毒性、免疫细胞增殖、炎症反应、肿瘤发生、和病毒复制(Kim等,J.Mol.Biol.374,1374(2007))。TNFα最初是作为跨膜蛋白产生(tm TNFα),其随后被金属蛋白酶切割为可溶形式(sTNFα)(Wallis,Lancet Infect.Dis.8(10):601(2008))。TNFα(~17kDa)作为刚性的(rigid)同三聚体分子而存在,其结合至细胞表面TNF受体1或TNF受体2,诱导受体寡聚化和信号转导。

[0013] 已知炎性细胞因子,以及更具体而言TNFα,在产生痛觉过敏中具有作用(Leung,L.和Cahill,CM.,J.Neuroinflammation 7:27(2010))。一些初步数据已显示TNFα抑制剂可能在控制神经性疼痛中是有用的。参见例如Sommer C,等,J.Peripher.Nerv.Syst.6:67-72(2001),Cohen等,A&A Feb 2013,116,2,455-462,Genevay等,Ann Rheum Dis 2004,63,1120-1123。临床研究测试了TNFα抑制剂作为单一治疗用于治疗神经性疼痛,其结果仍然是不确定性的。参见Leung和Cahill(2010)。

[0014] 尽管已在开发靶向NGF的和靶向TNFα的候选物用于治疗疼痛,依然需要通过对当前标准疗理更有效的制剂来对更多种疼痛病况提供镇痛缓解。本发明提供了靶向NGF和TNFα二者的组合治疗,其能提高效力且具有降低对罹患疼痛者的施用量和频率二者的潜力。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明提供用于控制受试者中的疼痛的方法,包括将有效量的神经生长因子(NGF)拮抗剂和肿瘤坏死因子-α(TNFα)拮抗剂、或包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的结合分子施用于对其有需要的受试者。在一些实施方案中,所述施用比单独施用等量的所述NGF拮抗剂或TNFα拮抗剂更有效地控制受试者中的疼痛。在一些实施方案中,所述方法包括共同施用TNFα拮抗剂和NGF拮抗剂。在一些实施方案中,将TNFα拮抗剂和NGF拮抗剂序贯施用或同时施用。

[0017] 在一些实施方案中,所述方法足以预防、减少、减轻、或消除受试者中的疼痛。在一些实施方案中,所述疼痛是急性疼痛、短期疼痛、持续或慢性伤害性疼痛、或是持续或慢性神经性疼痛。在一些实施方案中,所述方法对于控制受试者中的疼痛比单独施用等量的NGF拮抗剂或TNFα拮抗剂至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%更有效。

[0018] 在一些实施方案中,所述结合分子的TNFα拮抗剂部分结合包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,所述NGF拮抗剂结合包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽。

[0019] 在一些实施方案中，所述结合分子的NGF拮抗剂部分是抗NGF抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，抗NGF抗体或其片段能抑制NGF对TrkA、对p75NRT、或对TrkA和P75NRT二者的结合。在一些实施方案中，相对于NGF对p75NRT的结合，所述结合分子优先地阻断NGF对TrkA的结合。在一些实施方案中，所述抗NGF抗体或其片段以约0.25-0.44nM的亲和力结合人NGF。在一些实施方案中，所述抗NGF抗体或其片段结合至与MEDI-578相同的表位。在一些实施方案中，所述抗NGF抗体或其片段竞争性地抑制MEDI-578对人NGF的结合。

[0020] 在一些实施方案中，抗NGF抗体或其片段包含抗体VH域和抗体VL域，所述抗体VH域包含一组CDR，即HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述抗体VL域包含一组CDR，即LCDR1、LCDR2、和LCDR3，其中所述HCDR1具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列或SEQ ID NO:4具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列，所述HCDR2具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列或SEQ ID NO:5具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列，所述HCDR3具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列、SEQ ID NO:6具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列、SSRIYDFNSALISYYDMDV(SEQ ID NO:11)、或SSRIYDMISSLQPYYDMDV(SEQ ID NO:12)，所述LCDR1具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列或SEQ ID NO:8具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列，所述LCDR2具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列或SEQ ID NO:9具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列，且所述LCDR3具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列或SEQ ID NO:10具有多至两个氨基酸取代的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗NGF抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH。在一些实施方案中，抗NGF抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中，抗NGF抗体或其片段包含VH，所述VH具有与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％或99％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗NGF抗体或其片段包含VL，所述VL具有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％或99％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗NGF抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:94的氨基酸序列的VH。在一些实施方案中，抗NGF抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中，抗NGF抗体或其片段包含VH，所述VH具有与SEQ ID NO:94的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％或99％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，抗NGF抗体或其片段包含VL，所述VL具有与SEQ ID NO:95的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％或99％相同的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施方案中，抗NGF抗体或其片段是完全H_2L_2抗体、Fab片段、Fab'片段、F(ab)$_2$片段或单链Fv(scFv)片段。在一些实施方案中，抗NGF抗体或其片段是人源化的、嵌合的、灵长类化的(primatized)、或完全人的。在一些实施方案中，NGF拮抗剂是抗NGF scFv片段。在一些实施方案中，scFv是SS-稳定化的。在一些实施方案中，所述抗NGF scFv片段从N末端至C末端包含如下：包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH、15个氨基酸的接头序列(GGGGS)$_3$(SEQ ID NO:15)、以及包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中，所述抗NGF scFv片段从N末端至C末端包含如下：包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的VH、20个氨基酸的接头序列(GGGGS)$_4$(SEQ ID NO:19)、以及包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的VL。

[0022] 在一些方面，所述方法包括施用TNFα拮抗剂，所述TNFα拮抗剂抑制TNFα对TNF受体(TNFR)的结合，由此阻断TNFα活性。在一些实施方案中，TNFα拮抗剂包含抗TNFα抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，抗TNFα抗体或其抗原结合片段包含抗体VH域和抗体VL域，所述抗体VH域包含一组CDR，即HCDR1、HCDR2、和HCDR3，所述抗体VL域包含一组CDR，即

LCDR1、LCDR2和LCDR3，其中CDR与英夫利昔单抗(infliximab)的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3或阿达木单抗(adalimumab)的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3相同。

[0023] 在一些实施方案中，所述结合分子包含完整的抗TNFα抗体和融合至抗TNFα抗体的重链的C末端的抗NGF scFv。此种结合分子可以包含轻链和重链，所述轻链包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列，所述重链包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0024] 在一些实施方案中，TNFα拮抗剂包含可溶的、TNFR的TNFα结合片段。在一些实施方案中，所述TNFR是TNFR-2或其可溶片段。在其他实施方案中，所述TNFR是TNFR-1或其可溶片段。在一些实施方案中，所述TNFR-1的可溶片段是55kD片段。在其他实施方案中，所述TNFR-2的可溶片段是75kD片段。在一些实施方案中，所述TNFR片段融合至免疫球蛋白Fc域。在一些实施方案中，所述免疫球蛋白Fc域是人IgG1Fc域。在一些实施方案中，所述TNFα拮抗剂具有SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列或其功能性片段。

[0025] 在一些实施方案中，所述结合分子包含融合蛋白，所述融合蛋白包含经接头融合至TNFα拮抗剂的NGF拮抗剂。在一些实施方案中，所述结合分子是融合蛋白的同二聚体。

[0026] 在一些实施方案中，所述NGF拮抗剂是抗NGF scFv域且所述TNFα拮抗剂是可溶的、TNFR-2的TNFα结合片段，其于其羧基末端处融合至免疫球蛋白Fc域。在一些实施方案中，所述scFv经接头融合至所述免疫球蛋白Fc域的羧基末端。

[0027] 在一些实施方案中，所述结合分子包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽从N末端至C末端包含如下：TNFR-2的结合TNFα的75kD片段、人IgG1Fc域、10个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_2$、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH、15个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_3$(SEQ ID NO:15)、和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中，所述结合分子包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述结合分子包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％或99％相同的氨基酸序列。

[0028] 在一些实施方案中，所述结合分子包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽从N末端至C末端包含如下：TNFR-2的结合TNFα的75kD片段、人IgG1Fc域、10个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_2$、包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的VH、20个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_4$(SEQ ID NO:19)、和包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中，所述结合分子包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述结合分子包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％或99％相同的氨基酸序列。

[0029] 在一些实施方案中，所述结合分子包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽自N末端至C末端包含如下：TNFR-2的结合TNFα的75kD片段、人IgG1Fc域、接头序列、和抗NGF scFv域。

[0030] 本公开内容还提供用于抑制细胞中p38磷酸化的方法，其中所述方法包括使细胞接触本文所述的任何多肽(例如包含本文所述NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的任何结合分子)。本公开内容还提供用于抑制细胞中ERK磷酸化的方法，其中所述方法包括使细胞接触本文所述的任何多肽(例如包含本文所述NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的任何结合分子)。在一些实施方案中，所述细胞是神经元细胞。在其他实施方案中，所述细胞是周围神经元细

胞。在又一些实施方案中，所述细胞是中枢神经元细胞。在一些实施方案中，所述细胞在哺乳动物内。在一些实施方案中，所述哺乳动物是人。在一些实施方案中，所述细胞在细胞培养物内。

[0031] 本发明还提供编码本文所述结合分子的多核苷酸序列、包含这些多核苷酸序列的载体、以及包含这些多核苷酸或载体的宿主细胞。

[0032] 本发明还提供用于产生本文所述的结合分子的方法。

[0033] 本发明还提供包含本文所述结合分子的组合物、药物组合物和试剂盒。

[0034] 附图/图表简述

[0035] 图1：TNFR2-Fc融合蛋白(图面A)，以及示例性的包含融合至抗NGF scFv域的TNFR2-Fc域的多特异性结合分子TNFR2-Fc_VH#4(图面B)的示意图。

[0036] 图2A显示了一批纯化的TNFR2-Fc_VH#4中聚集体、单体、和蛋白片段化水平的SEC-HPLC分析的结果。

[0037] 图2B显示了还原和非还原条件下纯化的TNFR2-Fc_VH#4和纯化的TNFR2-Fc蛋白的SDS-PAGE分析。凝胶加载顺序：1.TNFR2-Fc_VH#4，2.TNFR2-Fc_VL-VH(以反向可变域基因取向融合至抗NGF scFv的TNFR2-Fc)，3.TNFR2-Fc不相关scFv 1，4.TNFR2-Fc，5.TNFR2-Fc不相关scFv 2。

[0038] 图3A显示了蛋白A柱纯化后TNFR2-Fc_VH#4的纯度。图3B显示了在SP琼脂糖柱上的第二次纯化步骤后TNFR2-Fc_VH#4的纯度。

[0039] 图4显示了用差示扫描量热法进行的TNFR2-Fc_VH#4的稳定性分析。

[0040] 图5显示了TNFR2-Fc_VH#4对TNFα和NGF的结合(单独和一起两者)，如由ELISA确定。图5A显示了对NGF的结合，图5B显示了对TNFα的结合，而图5C显示了对TNFα和NGF的同时结合。

[0041] 图6显示了TNFR2-Fc_VH#4的表面等离子体共振结合测定的传感图(sensorgram)。用BIAcore 2000来进行TNFR2-Fc_VH#4多特异性抗体的并行的抗原结合。通过将TNFα和NGF连续结合到结合至传感器表面的TNFR2-Fc_VH#4之上(over)来评估同时的抗原结合。传感图的第一部分显示了饱和量的TNFα对所述多特异性抗体的结合，传感图的第二部分显示了当应用第二抗原时的结合，所述第二抗原或者又是TNFα(其显示表面是饱和的)，或者是等摩尔的TNFα和NGF混合物。共振单位的增加等同于NGF对多特异性分子的结合，并且因此等同于同时的抗原衔接(antigen engagement)。还用相反顺序添加抗原来进行测定以确定这些数据。

[0042] 图7显示了NGF介导的TF-1细胞增殖的抑制。A.在不存在添加的NGF拮抗剂时NGF介导的增殖。B.通过TNFR2-Fc_VH#4对人NGF响应的抑制。C.通过TNFR2-Fc_VH#4对鼠NGF响应的抑制。NGF的活性通常表示为RLU-相对发光单位，而NGF介导的增殖的百分比以单独针对NGF配体的百分比响应用如下公式来计算：100*(孔RLU-背景RLU)/(总RLU-背景RLU)，其中背景RLU＝介质对照的平均值，并且总RLU＝仅配体对照的平均值。D.TNFR2-Fc_VarB和ndimab VarB对人NGF响应的抑制。E.TNFR2-Fc_VarB和ndimab VarB对鼠NGF响应的抑制。

[0043] 图8显示了U937细胞中TNFα诱导的胱天蛋白酶3(Caspase 3)活性的抑制。A.在没有添加TNFα拮抗剂的条件下U937细胞中TNFα诱导的胱天蛋白酶3活性。B.U937细胞中TNFα诱导的胱天蛋白酶3活性的抑制，其显示为未添加拮抗剂的条件下的响应的百分比。TNF的

活性通常表示为RLU-相对发光单位，而TNF介导的胱天蛋白酶3释放的％以单独对TNF配体的百分比响应用上述图7C中所述的公式来计算。C.对相关分子TNFR2-Fc_varB和ndimab VarB显示了相似的结果。

[0044] 图9显示了用依那西普(etanercept)和MEDI-578组合治疗对局部坐骨神经结扎诱导的机械性痛觉过敏的效果。结果以同侧/对侧比率来显示。N＝9-10每组。用2因素ANOVA分析、以时间和处理作为相关因子(dependent factor)来分析数据。随后用Boniferroni事后检验(Boniferroni's Post Hoc test)获得了统计学显著性。对比Op+CAT-251对照，***p<0.001。

[0045] 图10A显示了TNFR2-Fc_VH#4对局部坐骨神经结扎诱导的机械性痛觉过敏的效果。结果以同侧/对侧比率来显示。N＝10每组。用2因素ANOVA分析、以时间和处理作为相关因子来分析数据。随后用Boniferroni事后检验获得了统计学显著性。对比双特异性同种型对照，***p<0.001。图10B用相关分子TNFR2-Fc_varB显示了相似的结果。

[0046] 图11显示了共同施用MEDI-578和依那西普对机械超敏性的关节痛模型中的疼痛降低的效果。N＝9-10每组。用2因素ANOVA分析来分析数据。随后用Boniferroni事后检验获得了统计学显著性。对比CAT-251，*P>0.05；***P<0.001。

[0047] 图12显示了TNFR2-Fc_VH#4对机械超敏性的关节痛模型中的疼痛降低的效果。N＝9-10每组。用2因素ANOVA分析来分析数据。随后用Boniferroni事后检验获得了统计学显著性。对比双特异性同种型对照，***P<0.001。

[0048] 图13显示了大鼠模型中五个不同剂量的TNFR2-Fc_varB对CFA诱导的痛觉过敏的效果。

[0049] 图14：显示来自磷酸-p38反应的HTRF比率的热图。

[0050] 图15：剂量响应曲线，其显示了TNFα、NGF、或TNFα和NGF的组合对p38磷酸化的效果。

[0051] 图16：显示来自磷酸-ERK反应的HTRF比率的热图。

[0052] 图17：剂量响应曲线，其显示了TNFα、NGF、或TNFα和NGF的组合对ERK磷酸化的效果。

[0053] 发明详述

[0054] 定义

[0055] 应当注意，术语“一(a)”或“一(an)”事物意指一个或多个该事物。同样，一(a)”(或“一(an)”)、“一个或多个”、和“至少一个”在此可以互换地使用。

[0056] 此外，本文所用的“和/或”应当认为是具体公开了两个具体特征或组分的每一个连同或连同另一个。因此，本文的术语“和/或”用于短语如“A和/或B”中时意欲包括“A和B”、“A或B”、“A(单独)”、和“B(单独)”。同样，术语“和/或”用于短语如“A、B、和/或C”中时意欲涵盖如下的每一个方面：A、B和C；A、B、或C；A或C；A或B；B或C；A和C；A和B；B和C；A(单独)；B(单独)；和C(单独)。

[0057] 应当理解，任何在此以语言“包含/包括(comprising)”来描述方面之处，也提供以术语“由……组成”和/或“基本由……组成”来描述的类似方面。

[0058] 除另有定义外，本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明相关领域普通技术人员的通常理解相同的含义。例如，《简明生物医学及分子生物学词典》，Juo，Pei-Show，第

二版,2002,CRC Press;《细胞及分子生物学词典》,第三版,1999,Academic Press;以及《牛津生物化学及分子生物学词典》,2000修订版,Oxford University Press,为技术人员提供了本发明中所用的许多术语的通用词典。

[0059] 单位、前缀、和符号以其国际单位制(Système International de Unites,SI)所接受的形式来表示。数字范围为包含定义该范围的数字。除另有说明外,氨基酸序列按从氨基至羧基方向从左至右书写。本文提供的标题并非对本发明各种方面的限制,而是通过提述并入说明书作为一个整体。因而,紧接本段的下文所定义的术语通过对说明书的提述以其整体来更完整地定义。

[0060] 如本文所用的,术语"结合分子"其最广义是意指特异性结合抗原决定簇(例如抗原)的分子。结合分子的非限制性的例子包括抗体或其片段、可溶受体融合蛋白或其片段、非免疫球蛋白骨架或其片段,其各保留有抗原特异性结合。示例性的非免疫球蛋白骨架包括Tn3(Koide等,J Mol Biol 2012Jan 13;415(2):393-405)、DARPin(Boersma&Pluckthun,Curr Opin Biotechnol.2011 22(6):849-57)、Anticalin(Gebauer&Skerra,Methods Enzymol.2012;503:157-88)。示例性的可溶受体融合蛋白和抗体提供于下文。在一些实施方案中,可以对所述结合分子进行工程化以包含如下的组合:此类抗体或其片段、可溶受体融合蛋白或其片段、以及基于非免疫球蛋白的骨架或其片段。

[0061] 结合分子或所述结合分子的任何识别抗原的部分在此处称为"结合域"。除明确提及完整大小的(full-sized)结合分子如天然存在的抗体外,术语"结合分子"不受限地涵盖完整大小的抗体或其他非抗体结合分子,以及此类结合分子的抗原结合片段、变体、类似物、或衍生物,例如天然存在的抗体或免疫球蛋白分子或工程化的结合分子或以与完整大小的结合分子相似的方式结合抗原的片段。

[0062] 在一些实施方案中,本发明提供一些多特异性结合分子,例如双特异性、三特异性、四特异性等的结合分子,或其抗原结合片段、变体、或衍生物。如本文所用的,多特异性结合分子可以包括一个或多个抗体结合域、一个或多个非抗体结合域、或其组合。

[0063] 如本文所用的,术语"神经生长因子"("NGF"),在字面上也称为β-神经生长因子,意指在多种神经元的生长和存活中起作用的分泌蛋白。人NGF以Genbank登录号NP_002497.2呈示,并在本文以SEQ ID NO:1呈示。如本文所用的,术语NGF不限于人NGF,并且包含人NGF的所有物种直向同源物。术语"NGF"涵盖NGF的前体形式(pro-form)、前NGF(pro-NGF)、全长NGF、以及由细胞内过程产生的任何形式的NGF。该术语还涵盖天然存在的NGF的变体,例如剪接变体、等位基因变体、和同种型。NGF能结合两个受体:p75神经营养蛋白受体(p75(NTR))和TrkA,其是一种跨膜酪氨酸激酶。NGF是经过充分验证的针对疼痛的靶标,已知其介导伤害性感受器的致敏作用。

[0064] 多种制剂正在作为NGF活性的拮抗剂接受测试。一种这样的抗NGF剂是trkA-Fc,其充当诱饵或清道夫(scavenger)来结合至内源性NGF并且由此使之失活。TrkA-Fc是由trkA的NGF结合区连接至IgG抗体的恒定域片段(Fc)组成的融合蛋白。TrkA-Fc在未处理动物中产生痛觉减退(hypoalgesia),降低伤害性感受器响应,并降低无髓鞘的疼痛感受神经元的出芽(sprouting)(Bennett,D.L.等(1998)Eur J Neurosci,10:1282-91)。

[0065] NGF介导的疼痛特别适于用本文所示的结合分子进行的安全有效的治疗,这是因为周围的NGF水平响应于伤害性刺激而升高且抗体具有低血脑屏障穿透性。一些可以用于

本文所述的治疗和组合物的抗NGF抗体及其抗原结合片段可见于文献中，参见例如PCT公开No.WO02/096458和WO04/032870。

[0066] 术语“MEDI-578”意指一种特异性结合NGF的抗体，其是国际申请No.PCT/GB2006/000238和美国专利申请公开No.2008/0107658A1的主题，二者在此均通过提述以其整体并入本文。MEDI-578重链和轻链序列分别示于SEQ ID NOs:3和7中。

[0067] 术语NGF-NG意指一种特异性结合NGF的抗体。NGF-NG重链和轻链序列分别示于SEQ ID NOs:24和26中。

[0068] 术语“肿瘤坏死因子α”(“TNFα”)，字面上也称为恶病质素，APC1蛋白；肿瘤坏死因子；TNF；或肿瘤坏死因子配体超家族2，如本文所用，意指具体的TNFα蛋白，并且不是TNF配体的超家族。人TNFα以Genbank登录号NP_000585.2呈示，并在本文以SEQ ID NO:2呈示。如本文所用的，术语TNFα不限于人TNF，并且包括人TNFα的所有物种直向同源物。术语“TNFα”涵盖TNFα的前体形式、前TNFα(pro-TNFα)、全长TNFα、以及由细胞内过程产生的任何形式的TNFα。该术语还涵盖TNFα的天然存在的和非天然存在的变体，例如剪接变体、等位基因变体、和同种型。TNFα能结合两个受体，TNFR1(1型TNF受体；CD120a；p55/60)和TNFR2(2型TNF受体；CD120b；p75/80)。TNFα起促炎性细胞因子的作用，例如在神经炎症中起作用。例如TNFα被认为在功能上涉及神经性疼痛的发生(Leung,L.和Cahill,CM.,J.Neuroinflammation 7:27(2010))。

[0069] 本领域已知大量的TNFα拮抗剂，并且许多是商业上可获得的治疗剂。能用于本文提供的治疗和组合物的商业上可获得的TNF-α拮抗剂包括依那西普(ENBREL®,Amgen/Pfizer)、英夫利昔单抗(infliximab)(例如REMICADE®,Centocor)、聚乙二醇赛妥珠单抗(certolizumab pegol)(例如CIMZIA®,UCB)、戈利木单抗(golimumab)(例如SIMPONI™,Centocor)和阿达木单抗(例如HUMIRA®/TRUDEXA®,Abbott)。

[0070] “分离的”结合分子、多肽、抗体、多核苷酸、载体、宿主细胞、或组合物意指以非天然存在的形式存在的结合分子、多肽、抗体、多核苷酸、载体、宿主细胞、或组合物。分离的结合分子、多肽、抗体、多核苷酸、载体、宿主细胞、或组合物包括经过改变、适应、组合、重排、工程化、或以其他方式操作达到不再是其天然存在的形式的程度。在一些方面，被分离的结合分子、多肽、抗体、多核苷酸、载体、宿主细胞、或组合物是“重组的”。

[0071] 如本文所用的，术语“多功能多肽”和“双功能多肽”意指设计来靶向两个或更多个抗原的非天然存在的结合分子。本文所述的多功能多肽通常是遗传工程化的融合蛋白，其经设计以将两个不同的所需的生物学功能带入单个结合分子。例如，多功能多肽可以是多功能结合分子。本文所述的示例性多功能多肽是包含NGF拮抗剂域(例如阻断、降低、或抑制一种或多种天然NGF功能的肽结构域)和TNFα拮抗剂域(例如阻断、降低、或抑制一种或多种天然TNFα功能的肽结构域)的多功能结合分子。

[0072] 本文提供的一组多功能多肽是多特异性结合分子，例如包含一个或多个抗体结合域的(例如“多特异性抗体”)、一个或多个非抗体结合域的(例如诱饵受体)、或其组合的结合分子。例如，包含一个或多个抗体结合域、一个或多个非抗体结合域、或其组合的多特异性结合分子是具有能特异性识别并结合至至少两个不同表位的结合域的分子。不同的表位或是可以在相同的分子(例如相同的NGF)内或是在不同的分子上，从而使例如多特异性结

合分子能特异性识别并结合NGF以及另一含有表位的分子，例如TNFα，从而使多特异性结合分子特异性识别NGF和TNFα。

[0073] 用于制作多特异性结合分子(例如包含一个或多个抗体结合域、一个或多个非抗体结合域、或其组合的多特异性结合分子)的技术可从本领域获得(Dimasi,N.,等,2009,J Mol Biol.393:672-92;Milstein等,1983,Nature 305:537-539;Brennan等,1985,Science 229:81;Suresh等,1986,Methods in Enzymol.121:120;Traunecker等,1991,EMBO J.10:3655-3659;Shalaby等,1992,J.Exp.Med.175:217-225;Kostelny等,1992,J.Immunol.148:1547-1553;Gruber等,1994,J.Immunol.152:5368;和U.S.Patent 5,731,168)。具有多于两价(valencies)的抗体也涵盖在内。例如，可以制备三特异性抗体(Tutt等,J.Immunol.147:60(1991))。

[0074] 术语“抗体”意指经免疫球蛋白分子可变区内的至少一个抗原识别位点识别并特异性结合至靶标的免疫球蛋白分子，所述靶标例如蛋白、多肽、肽、糖类、多核苷酸、脂质、或前述的组合。如本文所用的，术语“抗体”涵盖完整多克隆抗体、完整单克隆抗体、抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')$_2$、和Fv片段)、单链Fv(scFv)突变体、多特异性抗体如双特异性、三特异性、四特异性抗体等，其从至少两个包含抗体的抗原结合部分的完整抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、融合蛋白产生、以及任何其他包含抗原识别位点的修饰的免疫球蛋白分子，只要所述抗体表现出所需的生物学活性。抗体可以属于免疫球蛋白的五个主要类别的任一：IgA、IgD、IgE、IgG、和IgM、或其亚类(同种型)(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)，其是基于它们的重链恒定域的身份分别称为α、δ、ε、γ、和μ。不同类别的免疫球蛋白具有不同的且众所周知的亚基结构和三维构型。

[0075] 在一些实施方案中，“阻断”结合分子，例如阻断抗体或“拮抗剂”阻断分子，例如拮抗剂抗体或融合蛋白，是抑制或降低其结合的抗原(如NGF或TNF)的生物活性的那种结合分子。在一些方面，阻断抗体或拮抗剂结合分子基本上或完全抑制抗原的生物活性。例如，所述生物活性可以降低0.01％、0.1％、0.5％、1％、5％、10％、20％、30％、50％、70％、80％、90％、95％、或甚至100％。本文所用的“拮抗剂”和“拮抗剂域”包括这样的多肽或其他分子，所述多肽或其他分子结合至其靶标(例如TNFα或NGF)，由此阻断或抑制靶标与受体相互作用。因此，NGF和/或TNFα拮抗剂包括阻断或抑制NGF与trkA或p75神经营养蛋白相互作用、或TNFα与TNFR-1或TNFR-2相互作用的分子。NGF和/或TNFα拮抗剂还包括降低p38磷酸化和/或ERK磷酸化的分子。示例性的拮抗剂包括但不限于抗体或其抗原结合片段，以及靶标特异性的、可溶的、非信号传输的受体肽(“诱饵受体”，或其配体结合片段)。

[0076] 术语“抗体片段”意指完整抗体的一部分并且意指完整抗体的抗原决定簇可变区。抗体片段的例子包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')$_2$、和Fv片段、线性抗体、单链抗体、和由抗体片段形成的多特异性抗体。在本文其他部分描述的非抗体结合分子的抗原结合片段也通过本文而提供。

[0077] “单克隆抗体”意指同质性抗体群体，其涉及对单一抗原决定簇或表位的高度特异性识别和结合。这与多克隆抗体形成对比，多克隆抗体通常包含针对不同抗原决定簇的不同抗体。术语“单克隆抗体”涵盖完整的和全长单克隆抗体以及抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')$_2$、Fv)、单链(scFv)突变体、包含抗体部分的融合蛋白、以及任何其他经修饰的包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子。此外，“单克隆抗体”意指这样的以任何数目的方式制成的

抗体，所述方式包括但不限于通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、以及转基因动物。

[0078] 术语“人源化抗体”意指非人(例如鼠)抗体的形式，其是特异性的免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白、或其含有最小非人(例如鼠)序列的片段。通常，人源化抗体是人免疫球蛋白，其中来自互补决定区(CDR)的残基由来自具有合意的特异性、亲和力、和能力的非人物种(例如小鼠、大鼠、兔、或仓鼠)的CDR的残基所替代(Jones等，1986，Nature，321:522-525；Riechmann等，1988，Nature，332:323-327；Verhoeyen等，1988，Science，239:1534-1536)。在一些实例中，人免疫球蛋白的Fv框架区(FR或FW)残基由来自具有合意的特异性、亲和力和能力的非人物种的抗体中的对应残基替代。所述人源化抗体还可以通过取代额外的残基来进行修饰，所述残基或是在Fv框架区中和/或在替换的非人残基内，以改进和优化抗体特异性、亲和力和/或能力。一般而言，人源化抗体包含基本上全部的至少一个、且通常是两个或三个含有全部或基本上全部的与非人免疫球蛋白对应的CDR区的可变域，但是全部的或基本上全部的FR区是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体还可以包含至少一部分免疫球蛋白恒定区或域(Fc)，通常是人免疫球蛋白的恒定区或域。用于产生人源化抗体的方法描述于美国专利5,225,539或5,639,641中。

[0079] 抗体的“可变区”意指抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区，或是单独或是以组合形式。所述重链和轻链可变区各自由通过3个互补决定区(CDR)(也称为高变区)连接的4个框架区(FR或FW)组成。各条链中的CDR通过FR聚在一起非常靠近，并且与来自另一条链的CDR促进抗体的抗原结合位点的形成。至少有两种技术用于确定CDR：(1)基于跨物种序列可变性的手段(即，Kabat等，Sequences of Proteins of Immunological Interest，(第五版，1991，National Institutes of Health，Bethesda Md.))；和(2)基于抗原-抗体复合体的晶体学研究的手段(Al-lazikani等(1997)J.Molec.Biol.273:927-948))。此外，有时也用这两种手段的组合来确定CDR。

[0080] 指代可变域中的残基(约轻链的残基1-107和重链的残基1-113)时通常使用Kabat编号系统(例如Kabat等，Sequences of Immunological Interest，第五版.Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，Md.(1991))。

[0081] 如Kabat中的氨基酸位置编号，意指Kabat等，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第五版.Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD.(1991)中用于抗体的汇编的重链可变域或轻链可变域的编号系统。使用这种编号系统，实际的线性氨基酸序列能包含与可变域的FR或CDR的缩短或插入相对应的更少的或额外的氨基酸。例如，重链可变域可以包括H2的残基52之后的氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)和重链FR残基82之后的插入残基(例如根据Kabat的残基82a、82b、和82c等)。可以用“标准”Kabat编号序列通过抗体的序列同源性区域处的比对来确定给定抗体的残基的Kabat编号。作为代替，Chothia意指结构环的位置(Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。当用Kabat编号惯例进行编号时，Chothia CDR-H1环的末端在H32和H34之间变化，这取决于环的长度(这是因为Kabat编号策略将插入置于H35A和H35B处；如果35A和35B都不存在，则环在32处结束；如果仅存在35A，则环在33处结束；如果35A和35B都存在，则环在34处结束)。AbM高变区代表Kabat CDR和Chothia结构环之间的妥协，并由Oxford Molecular's AbM抗体建模软件使用。下表1中提供了比较。

[0082] 表1：抗体编号系统的比较

[0083]

环	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B (Kabat编号)	H26-H32..34
H1	H31-H35	H26-H35 (Chothia编号)	H26-H32
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0084] 术语“人抗体”意指天然人抗体或具有与天然人抗体对应的氨基酸序列的抗体，其用本领域已知的任何技术制成。该人抗体的定义包括完整或全长抗体、其片段、和/或包含至少一个人重链和/或轻链多肽的抗体，例如包含鼠轻链和人重链多肽的抗体。

[0085] 术语“嵌合抗体”意指这样的抗体，其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列来源于两个或更多个物种。通常，轻链和重链二者的可变区均对应于来源于一个具有合意的特异性、亲和力和能力的哺乳动物物种(例如小鼠、大鼠、兔等)的抗体的可变区，而恒定区与来源与另一个物种(通常是人)的抗体中的序列是同源的，以避免在该物种中诱发免疫响应。多特异性结合分子，例如包含一个或多个抗体结合域、一个或多个非抗体结合域、或其组合，例如本文提供的TNFα拮抗剂和/或NGF拮抗剂的多特异性结合分子，可以包含抗体恒定区(例如Fc区)，其中一个或多个恒定区域的至少一部分被删除或是被修改从而提供合意的生化特性，如与免疫原性大致相同且包含天然的或未改变的恒定区的抗体相比提高的肿瘤定位或降低的血清半衰期。本文提供的修饰的恒定区可以包含对三个重链恒定域(CH1、CH2或CH3)的一个或多个和/或对轻链恒定域(CL)的变化或修饰。在一些方面，可以将一个或多个恒定域部分地或全部地删除。在一些方面，可以删除完整的CH2域(ΔCH2构建体)。参见例如Oganesyan V,等,2008Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.64:700-4;Oganesyan V,等,Mol Immunol.46:1750-5;Dall'Acqua,W.F.,等,2006.J.Biol.Chem.281:23514-23524;和Dall'Acqua等,2002.J.Immunol.169:5171-5180。

[0086] 术语“表位”或“抗原决定簇”在此处可以互换地使用并意指抗原的能被特定抗体识别并特异性结合的那一部分。当抗原是多肽时，可以从通过蛋白的三级折叠而并置的连续氨基酸和非连续氨基酸二者形成表位。从连续氨基酸形成的表位通常在蛋白变性时时得以保留，然而通过三级折叠形成的表位通常在蛋白变性时丢失。表位通常以独特的空间构象包含至少3个，更常见的是至少5个或8-10个氨基酸。如本文所述的表位不需要限定至形成表位的具体氨基酸。在一些方面，可以通过一组抗原特异性抗体，通过检查对多肽抗原的肽亚基的结合或通过检查对抗原的结合竞争来鉴定表位。

[0087] “受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”意指任何需要对其进行诊断、预后、或治疗的受试者，尤其是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括人、家养动物、农场动物、竞技动物(sports animals)、和动物园动物，包括例如人、非人灵长类、狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牲畜/牛(cattle)、熊、等等。

[0088] 术语“组合物”和“药物组合物”意指这样的制备物，其处于允许活性成分的生物活性有效的形式，并且不含对于其所施用的受试者有不可接受的毒性的额外组分。此类组合物可以是无菌的。

[0089] 如本文所用的，术语“有效量”和“治疗有效量”意指对控制受试者中的疼痛有效的一个或多个治疗组合物的量。术语“控制疼痛”和语法上等同的表达在本文用于描述任何在需要疼痛控制的患者中有益的或合意的效果。例如，本文所述的有效量的一个或多个治疗组合物可以例如在受试者中防止疼痛、维持可耐受水平的疼痛、减轻疼痛、降低疼痛、将疼痛降至最小、或消除疼痛。

[0090] 本文所述的术语“施用”意指对受试者施用一个或多个本文所述的治疗组合物，例如包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的双功能多肽、包含NGF拮抗剂和TNFα拮抗剂的组合的治疗组合物、或分开的治疗组合物，其一个包含NGF拮抗剂，一个包含TNFα拮抗剂。术语“共同施用”意指对受试者施用两个或更多个治疗组合物，例如一个包含NGF拮抗剂而另一个包含TNFα拮抗剂。如本文所用的，共同施用包括但不一定需要所述两个或更多个治疗组合物同时施用于受试者。所述两个或更多个治疗组合物可以序贯地施用于受试者，例如相隔30分钟、相隔1小时、相隔2小时、相隔3小时、相隔4小时、或相隔5个或更多个小时。如本文所述的共同施用的顺序和时机可以是固定的，或者可以基于医疗机构的专业人员的判断而变化。

[0091] 术语“多核苷酸”和“核酸”意指由共价连接的核苷酸残基组成的多聚化合物。多核苷酸可以是DNA、cDNA、RNA、单链的、或双链的、载体、质粒、噬菌体、或病毒。

[0092] 术语“载体”意指这样的构建体，其能在宿主细胞中传递和表达一个或多个目的基因或序列。载体的例子包括但不限于病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子凝聚剂/缩合剂(cationic condensing agent)相连的DNA或RNA表达载体、包囊于脂质体中的DNA或RNA表达载体、以及一些真核细胞如生产者细胞。

[0093] 本文的术语“多肽”、“肽”和“蛋白”可互换地用于意指任何长度的氨基酸聚合物。所述聚合物可以是线性的或分枝的，其可以包含修饰的氨基酸，并且非氨基酸能将其中断。该术语还涵盖经天然修饰或通过干预修饰的氨基酸聚合物；例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化、或任何其他操作或修饰，如与标记组分缀合。同样涵盖在本定义内的是，例如含有一个或多个氨基酸类似物(包括例如非天然氨基酸等)以及其他本领域已知的修饰的多肽。

[0094] “保守氨基酸取代”是这样的取代，其中氨基酸残基由具有相似侧链的另一氨基酸替代。具有相似侧链的氨基酸残基的家族在本领域已有定义，包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β-分枝的侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。例如，用酪氨酸取代苯丙氨酸是保守取代。在一些方面，本文提供的多肽和抗体的序列中的保守取代不消除含有氨基酸序列的多肽的结合或其他功能活性。鉴定不影响功能的核苷酸和氨基酸保守取代的方法是本领域熟知的(参见例如Brummell等，Biochem.32:1180-1 187(1993)；Kobayashi等Protein Eng.12:879-884(1999)；和Burks等Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:.412-417

(1997))。

[0095] 包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的结合分子

[0096] 本发明提供包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的双功能多肽。在一些方面，施用有效量的本文提供的双功能多肽能比单独使用等量的所述NGF拮抗剂或TNFα拮抗剂更有效地在对其有需要的受试者中控制疼痛。本文提供的双功能多肽能以任何顺序、结构、或构象包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域。任何合适的NGF拮抗剂或TNFα拮抗剂都可以是本文提供的双功能多肽的一部分。示例性的NGF拮抗剂和TNFα拮抗剂描述于本文的其他部分。

[0097] 在一些方面，NGF拮抗剂是一种非抗体分子或其结合域，其能抑制NGF活性，例如可溶的、TrkA的NGF结合片段。在一些方面，NGF拮抗剂是抗NGF抗体或其抗原结合片段。合适的抗NGF拮抗剂(例如拮抗剂抗体)能抑制NGF对TrkA、对p75NRT、或对TrkA和p75NRT二者的结合。在一些方面，抗NGF拮抗剂，例如用于本文中提供的双功能分子(例如多特异性结合分子)的拮抗剂抗体或其片段，相对于NGF对p75NRT的结合能优先地阻断NGF对TrkA的结合。

[0098] 示例性的抗体或其用于本文所述的双功能多肽(例如多特异性结合分子)中的片段可以获取自美国申请公开No.2008/0107658，其在此通过提述以其整体并入本文。在一些方面，抗NGF抗体或其片段结合至与抗NGF抗体MEDI-578相同的表位、能与MEDI-578竞争性地抑制NGF、或能以比MEDI-578更大的亲和力结合至NGF。在一些实施方案中，抗NGF抗体或其片段以或低于1、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3或0.2nM的亲和力结合人NGF和/或大鼠NGF。例如，抗NGF抗体或其片段可以以约0.2-0.8、0.2-0.7、0.2-06(0.2-0.6)、0.2-0.5和/或0.25-0.44nM的亲和力结合人NGF以及以约0.2-0.9、0.2-0.8和/或0.25-0.70nM的亲和力结合大鼠NGF。

[0099] 在一些方面，抗NGF抗体或其片段是MEDI-578。MEDI-578作为克隆1252A5公开于美国申请公开No.2008/0107658中。在其他方面，抗NGF抗体或其片段是他尼珠单抗(RN-624)，其是一种人源化的抗NGF单抗(Pfizer；描述于Kivitz等，(2013)PAIN,154,9,1603-161中)；Fulranumab，其是一种完全人抗NGF单抗(Amgen；描述于Sanga等，PAIN,154卷，第10期，2013年10月，第1910-1919页中)；REGN475/SAR164877，其是一种完全人抗NGF单抗(Regeneron/Sanafi-Aventis)；ABT-110(PG110)，其是一种人源化的抗NGF单抗(Abbott Laboratories)。包含在双功能多肽(例如本文提供的多特异性结合分子)中的抗NGF抗体或其片段可以是例如人源化的、嵌合的、灵长类化的、或完全人的。

[0100] 在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VH域，所述抗体VH域包含MEDI-578的HCDR1、HCDR2、和HCDR3域，具有多至1、2、3、4、5、或更多个氨基酸取代(例如保守氨基酸取代)的MEDI-578重链CDR的变体。例如，抗NGF抗体或其片段可以包含具有准确的SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HCDR1，或具有SEQ ID NO:4经一个或多个(例如1、2、3、4、5、或更多个)氨基酸取代的氨基酸序列的HCDR1。类似地，抗NGF抗体或其片段可以包含具有准确的SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR2，或具有SEQ ID NO:5经一个或多个(例如1、2、3、4、5、或更多个)氨基酸取代的氨基酸序列的HCDR2。同样，抗NGF抗体或其片段可以包含具有准确的SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HCDR3，或具有SEQ ID NO:6经一个或多个(例如1、2、3、4、5、或更多个)氨基酸取代的氨基酸序列的HCDR3。在一些方面，所述HCDR3可以包含氨基酸序列SSRIYDFNSALISYYDMDV(SEQ ID NO:11)或SSRIYDMISSLQPYYDMDV(SEQ ID NO:12)。

[0101] 在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VL域，所述抗体VL域包含MEDI-578的

LCDR1、LCDR2、和LCDR3域，具有多至1、2、3、4、5、或更多个氨基酸取代(例如保守氨基酸取代)的MEDI-578轻链CDR的变体。在一些方面，抗NGF抗体或其片段可以包含具有准确的SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR1，或具有SEQ ID NO:8经一个或多个(例如1、2、3、4、5、或更多个)氨基酸取代的氨基酸序列的LCDR1。类似地，抗NGF抗体或其片段可以包含具有准确的SEQ ID NO:9的氨基酸序列的LCDR2，或具有SEQ ID NO:9经一个或多个(例如1、2、3、4、5、或更多个)氨基酸取代的氨基酸序列的LCDR2。同样地，抗NGF抗体或其片段可以包含具有准确的SEQ ID NO:10的氨基酸序列的LCDR3，或具有SEQ ID NO:10经一个或多个(例如1、2、3、4、5、或更多个)氨基酸取代的氨基酸序列的LCDR3。

[0102] 在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VH域，所述抗体VH域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的VH氨基酸序列。在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VH域，所述抗体VH域包含SEQ ID NO:3的VH氨基酸序列。

[0103] 在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VL域，所述抗体VL域包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的VL氨基酸序列。在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VL域，所述抗体VL域包含SEQ ID NO:7的VL氨基酸序列。

[0104] 在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VH域，所述抗体VH域包含与SEQ ID NO:94的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的VH氨基酸序列。在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VH域，所述抗体VH域包含SEQ ID NO:94的VH氨基酸序列。

[0105] 在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VL域，所述抗体VL域包含与SEQ ID NO:95的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的VL氨基酸序列。在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VL域，所述抗体VL域包含SEQ ID NO:95的VL氨基酸序列。

[0106] 在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VH域，所述抗体VH域包含SEQ ID NOs:30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86和96的任一个的HCDR1、HCDR2、和HCDR3域，以及其具有多至1、2、3、4、5、或更多个氨基酸取代(例如保守氨基酸取代)的变体。

[0107] 在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VL域，所述抗体VL域包含SEQ ID NOs:31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87和97的任一个的LCDR1、LCDR2、和LCDR3域，以及其具有多至1、2、3、4、5、或更多个氨基酸取代(例如保守氨基酸取代)的变体。

[0108] 在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VH域，所述抗体VH域包含与SEQ ID NOs:30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86和96的任一个的氨基酸序列至少0％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的VH氨基酸序列。在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VH域，所述抗体VH域包含SEQ ID NOs:30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86和96的任一个的VH氨基酸序列。

[0109] 在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VL域，所述抗体VL域包含与SEQ ID

NOs:31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87和97的任一个的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的VL氨基酸序列。在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VL域，所述抗体VL域包含SEQ ID NOs:31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87和97的任一个的VL氨基酸序列。

[0110] 在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VH域，所述抗体VH域包含NGF-NG的HCDR1、HCDR2、和HCDR3域，具有多至1、2、3、4、5、或更多个氨基酸取代(例如保守氨基酸取代)的NGF-NG重链CDR的变体。例如，抗NGF抗体或其片段可以包含具有准确的SEQ ID NO:88的氨基酸序列的HCDR1，或具有SEQ ID NO:88经一个或多个(例如1、2、3、4、5、或更多个)氨基酸取代的氨基酸序列的HCDR1。类似地，抗NGF抗体或其片段可以包含具有准确的SEQ ID NO:89的氨基酸序列的HCDR2，或具有SEQ ID NO:89经一个或多个(例如1、2、3、4、5、或更多个)氨基酸取代的氨基酸序列的HCDR2。同样的，抗NGF抗体或其片段可以包含具有准确的SEQ ID NO:90的氨基酸序列的HCDR3，或具有SEQ ID NO:90经一个或多个(例如1、2、3、4、5、或更多个)氨基酸取代的氨基酸序列的HCDR3。

[0111] 在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VL域，所述抗体VL域包含NGF-NG的LCDR1、LCDR2、和LCDR3域，具有多至1、2、3、4、5、或更多个氨基酸取代(例如保守氨基酸取代)的NGF-NG轻链CDR的变体。在一些方面，抗NGF抗体或其片段可以包含具有准确的SEQ ID NO:91的氨基酸序列的LCDR1，或具有SEQ ID NO:91经一个或多个(例如1、2、3、4、5、或更多个)氨基酸取代的氨基酸序列的LCDR1。类似地，抗NGF抗体或其片段可以包含具有准确的SEQ ID NO:92的氨基酸序列的LCDR2，或具有SEQ ID NO:92经一个或多个(例如1、2、3、4、5、或更多个)氨基酸取代的氨基酸序列的LCDR2。同样地，抗NGF抗体或其片段可以包含具有准确的SEQ ID NO:93的氨基酸序列的LCDR3，或具有SEQ ID NO:93经一个或多个(例如1、2、3、4、5、或更多个)氨基酸取代的氨基酸序列的LCDR3。

[0112] 在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VH域，所述抗体VH域包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的VH氨基酸序列。在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VH域，所述抗体VH域包含SEQ ID NO:24的VH氨基酸序列。

[0113] 在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VL域，所述抗体VL域包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的VL氨基酸序列。在一些方面，抗NGF抗体或其片段包含抗体VL域，所述抗体VH域包含SEQ ID NO:26的VL氨基酸序列。

[0114] 多功能多肽，例如本发明提供的多特异性结合分子可以包含完整的抗NGF抗体，即包含两条完整重链和两条完整轻链的呈H_2L_2形式的抗体。当抗NGF抗体是完整抗体时，可以将一个或多个TNFα拮抗剂域融合至所述抗NGF抗体的一个或多个重链的N末端或C末端或所述抗NGF抗体的一个或多个轻链的N末端或C末端。或者，多功能多肽(即本发明提供的多特异性结合分子)可以包含抗NGF抗体的抗原结合片段。在一些方面，抗NGF抗体片段可以包含抗体的恒定域的任何部分或可仅包含可变域。供包含在双功能多肽(例如多特异性结合分子)中的示例性抗NGF抗体片段包括但不限于Fab片段、Fab'片段、$F(ab)_2$片段或单链Fv(scFv)片段。

[0115] 在本文提供的一些示例性的组合物中，抗NGF抗体是scFv片段(例如MEDI-578的scFv片段)或其NGF结合变体。在本文提供的一些示例性的组合物中，抗NGF抗体是scFv片段(例如NGF-NG的scFv片段)或其NGF结合变体。抗NGF scFv多肽可以以任何顺序包含VH和VL域，或是N-VH-VL-C，或是N-VL-VH-C。ScFv分子通常经工程化从而通过柔性接头将VH和VL域连接。示例性的scFv结构，包括多种接头，可见于Dimasi,N.,等,J Mol Biol.393:672-92(2009)中，以及PCT公开No.WO 2013/070565中，二者在此均通过提述以其整体并入本文。如本领域普通技术人员所理解的，scFv抗体片段可以具有相对于标准Fab构造中存在的可变域降低的稳定性。在一些方面，可以通过引入稳定化的突变或通过引入链间二硫键(例如SS-稳定化的)将scFv在结构上稳定化。然而，稳定化的突变和/或引入的链间二硫键不是必要的，并且在一些方面是不存在的。可以用许多本领域承认的方法来将scFv多肽稳定化。

[0116] 可以用接头来连接本文提供的双功能多肽的域/区。可以用接头来连接双功能分子的NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域，并且还可用于将scFv的可变重链和轻链互相连接。示例性的接头的非限制实例是包含至少4个残基的多肽链。此类接头的多个部分(portions)可以是柔性的、亲水性的并且具有极少的或是没有其自身二级结构(接头部分或柔性接头部分)。至少4个氨基酸的接头可以用于在双功能多肽分子组装之后连接互相接近的域和/或区。还可以使用较长的接头。因此，接头可以是约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50个残基。接头还可以是例如约100-175个残基。当用多个接头将双功能多肽分子的多个部分互相连接时，所述接头可以是相同的或不同的(例如相同的或不同的长度和/或氨基酸序列)。

[0117] 双功能多肽分子中的接头有助于形成所需的结构。接头可以包含$(Gly-Ser)_n$残基(其中n是至少1、2并多至例如3、4、5、6、10、20、50、100或更多的整数)，并具有一些Glu或Lys残基分散于各处以增加溶解性。或者，某些接头不包含任何丝氨酸残基，例如在接头发生O-连接的糖基化之处不包含任何丝氨酸残基。在一些方面，接头可以含有半胱氨酸残基，例如如果使用接头的二聚化以将双功能多肽的域引入其适当折叠的构象，则接头可以含有半胱氨酸残基。在一些方面，双功能多肽可以包含连接多肽的域的至少1、2、3、4、或更多个多肽接头。

[0118] 在一些方面，多肽接头可以包含1-50个残基、1-25个残基、25-50个残基、或30-50个残基。在一些方面，所述多肽接头可以包含Fc模块的一部分。例如，在一些方面，所述多肽接头可以包含IgG1、IgG2、IgG3、和/或IgG4抗体或其变体的免疫球蛋白铰链域的一部分。

[0119] 在一些方面，多肽接头可以包含gly-ser接头或由gly-ser接头组成。如本文所用的，术语“gly-ser接头”意指由甘氨酸和丝氨酸残基组成的肽。示例性的gly-ser接头包含式$(Gly_4Ser)n$的氨基酸序列，其中n是至少1、2直至3、4、5、6、10、20、50、100或更多的整数。在一些方面，多肽接头可以包含铰链域(例如来源于IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4分子)的至少一部分和一系列gly-ser氨基酸残基(例如gly-ser接头如$(Gly_4Ser)n$)。

[0120] 当多功能多肽(例如多特异性结合分子)包含scFv时，柔性接头能连接所述scFv的重链和轻链。这种柔性接头通常不包含铰链部分，而是gly-ser接头或其他柔性接头。将scFv的域互相连接的柔性接头的长度和氨基酸序列可以容易地进行选择和优化。

[0121] 在一些方面，多功能多肽(例如多特异性结合分子)可以包含抗NGF scFv片段，所述抗NGF scFv片段从N末端至C末端包含：VH、15个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_3$、和VL。在一

些实施方案中，连接scFv的VH和VL的接头是20个氨基酸的接头序列(GGGGS)$_4$。在一些方面，所述VH包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在一些方面，所述VL包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述VH包含SEQ ID NOs:24、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、94和96的任一个的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述VL包含SEQ ID NOs:26、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、95和97的任一个的氨基酸序列。在一些方面，所述VH域包含与SEQ ID NOs:3、24、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、94和96的任一个的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的氨基酸序列。在一些方面，所述VL域包含与SEQ ID NOs:7、26、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、95和97的任一个的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的氨基酸序列。

[0122] 在其他方面，可以通过在VH域和VL域之间添加链间二硫键来提高多肽的稳定性，所述添加二硫键通过将VH和VL域内的某些残基修饰为半胱氨酸残基而进行。参见例如Michaelson,J.S.,等(2009)MAbs 1,128-41;Brinkmann,U.,等,(1993)Proc Natl Acad Sci U S A 90,7538-42;Young,N.M.,等,(1995)FEBS Lett 377,135-9。例如，可以将VL的位置100、101或102处的甘氨酸残基修饰为半胱氨酸残基并且可以将VH的位置44处的甘氨酸残基修饰为半胱氨酸残基。

[0123] 本文提供的多功能多肽(例如多特异性结合分子)可以包括TNFα拮抗剂域。在一些方面，TNFα拮抗剂域能抑制TNFα对细胞表面上TNF受体(TNFR)的结合，由此阻断TNF活性。

[0124] 在一些方面，本文提供的多功能多肽的TNFα拮抗剂域是抗TNFα抗体或其抗原结合片段。在一些方面，所述抗TNFα抗体是英夫利昔单抗、阿达木单抗、聚乙二醇赛妥珠单抗、戈利木单抗、或这些抗体的任一个的抗原结合片段。

[0125] 在一些方面，抗TNFα抗体或其片段结合至与如下任一个相同的表位、能竞争性地抑制如下任一个、或能以比如下任一个更大的亲和力结合至TNFα：抗TNFα抗体英夫利昔单抗、阿达木单抗、聚乙二醇赛妥珠单抗、或戈利木单抗、或这些抗体的任一个的抗原结合片段。在一些方面，所述抗TNFα抗体是英夫利昔单抗、阿达木单抗、聚乙二醇赛妥珠单抗、或戈利木单抗、或这些抗体的任一个的抗原结合片段。技术人员可以容易地获得这些抗TNFα抗体的结构或序列，并且其可以被包含入本文所述的多功能多肽(例如多特异性结合分子)，而不需要过多的实验。包含在多功能多肽中的抗TNFα抗体或其片段可以是例如人源化的、嵌合的、灵长类化的、或完全人的。

[0126] 在一些方面，抗TNFα抗体或其片段包含抗体VH域，所述抗体VH域包含英夫利昔单抗、阿达木单抗、聚乙二醇赛妥珠单抗、或戈利木单抗的HCDR1、HCDR2、和HCDR3域，或英夫利昔单抗、阿达木单抗、聚乙二醇赛妥珠单抗、或戈利木单抗的重链CDR具有多至1、2、3、4、5个或更多个氨基酸取代(例如保守氨基酸取代)的变体。

[0127] 在一些方面，抗TNFα抗体或其片段包含抗体VL域，所述抗体VL域包含英夫利昔单抗、阿达木单抗、聚乙二醇赛妥珠单抗、或戈利木单抗的LCDR1、LCDR2、和LCDR3域，或英夫利昔单抗、阿达木单抗、聚乙二醇赛妥珠单抗、或戈利木单抗的轻链CDR具有多至1、2、3、4、5个或更多个氨基酸取代(例如保守氨基酸取代)的变体。

[0128] 在一些方面，抗TNFα抗体或其片段包含抗体VH域，所述抗体VH域包含与英夫利昔单抗、阿达木单抗、聚乙二醇赛妥珠单抗、或戈利木单抗的VH氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的VH氨基酸序列。在一些方面，所述抗TNFα抗体或其片段包含抗体VH域，所述抗体VH域包含英夫利昔单抗、阿达木单抗、聚乙二醇赛妥珠单抗、或戈利木单抗的VH氨基酸序列。

[0129] 在一些方面，抗TNFα抗体或其片段包含抗体抗体VL域，所述抗体VL域包含英夫利昔单抗、阿达木单抗、聚乙二醇赛妥珠单抗、或戈利木单抗的VL氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的VL氨基酸序列。在一些方面，所述抗TNFα抗体或其片段包含抗体VL域，所述抗体VL域包含英夫利昔单抗、阿达木单抗、聚乙二醇赛妥珠单抗、或戈利木单抗的VL氨基酸序列。

[0130] 在一些方面，抗TNFα抗体或其片段包含抗体VH域，所述抗体VH域包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的VH氨基酸序列。在一些方面，所述抗TNFα抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的抗体VH域。

[0131] 在一些方面，抗TNFα抗体或其片段包含抗体VL域，所述抗体VL域包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的VL氨基酸序列。在一些方面，所述抗TNFα抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的抗体VL域。

[0132] 本发明提供的多功能多肽(例如多特异性结合分子)可以包含完整抗TNFα抗体，即包含链2条完整重链和2条完整轻链的呈H_2L_2形式的抗体。当抗TNFα抗体是完整抗体时，可以将一个或多个NGF拮抗剂域融合至所述抗TNFα抗体的一个或多个重链的N末端或C末端或所述抗TNFα抗体的一个或多个轻链的N末端或C末端。或者，本发明提供的多功能多肽(例如多特异性结合分子)可以包含抗TNFα抗体的抗原结合片段。在一些方面，抗TNFα抗体片段可以包含所述抗体的恒定域的任何部分或可仅包含可变域。用于包含在多功能多肽内的示例性的抗TNFα抗体片段包括但不限于Fab片段、Fab'片段、$F(ab)_2$片段或单链Fv(scFv)片段。

[0133] 在一些方面，多功能分子是ndimab varB，其是包含完整抗TNFα抗体(即包含链2条完整重链和2条完整轻链的呈H_2L_2形式的抗体)以及融合至所述抗TNFα抗体的重链的C末端的MEDI-578scFv的分子。Ndimab varB包含轻链和重链，所述轻链包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列，所述重链包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在一些方面，双功能分子包含轻链和重链，所述轻链包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的氨基酸序列，所述重链包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的氨基酸序列。

[0134] 在一些方面，抗TNFα抗体是scFv片段，例如来源于英夫利昔单抗、阿达木单抗、聚乙二醇赛妥珠单抗、或戈利木单抗的scFv片段，或其TNFα结合变体。抗TNFαscFv多肽可以以任何顺序包含VH和VL域，无论是N-VH-VL-C还是N-VL-VH-C。ScFv分子通常经过工程化从而通过柔性接头将VH和VL连接，并且能承担一些不同的结构，如上文所述。可以将抗TNFαscFv多肽稳定化，同样如上文所述。

[0135] 在一些方面，TNFα拮抗剂是TNF受体(例如TNFR-1或TNFR-2)的结合TNFα的可溶片段，或其变体或其可溶片段。在一些方面，TNFR-1的可溶片段是55kD片段。在一些实施方案

中，TNFR-2的可溶片段是75kD片段。在一些方面，TNF受体片段融合至异源多肽，例如免疫球蛋白Fc片段，例如IgG1Fc域。在一些方面，TNFα拮抗剂包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸，或其TNFα结合片段。TNFR-2部分包含SEQ ID NO:13的氨基酸1至235。在一些方面，TNFR-2的结合TNFα的可溶片段的变体包含与SEQ ID NO:13的氨基酸1至235至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、或100％相同的氨基酸序列。在一些方面，TNFR-2的结合TNFα的可溶片段的变体包含SEQ ID NO:13的氨基酸1至235，除了还有例如1、2、3、4、5、10、20、20、40、或50个氨基酸的插入、取代或删除之外。IgG1Fc部分包含SEQ ID NO:13的氨基酸236至467。在一些方面，TNFR-2的结合TNFα的可溶片段可以融合至任何人或非人抗体的Fc部分，或提供稳定性的任何其他蛋白或非蛋白物质，如白蛋白或聚乙二醇。在一些方面，TNFR-2的结合TNFα的可溶片段包含与SEQ ID NO:13的氨基酸236至467至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、或100％相同的氨基酸序列。在一些方面，TNFR-2的结合TNFα的可溶片段的变体包含SEQ ID NO:13的氨基酸236至467，除了还有例如1、2、3、4、5、10、20、20、40、或50个氨基酸的插入、取代或删除之外。在一些方面，TNFR-2的结合TNFα的可溶片段的变体包含与SEQ ID NO:13至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、或100％相同的氨基酸序列。在一些方面，TNFR-2的结合TNFα的可溶片段的变体包含SEQ ID NO:13，除了还有例如1、2、3、4、5、10、20、20、40、或50个氨基酸的插入、取代或删除之外。

[0136] 在一些方面，TNFR-2的结合TNFα的可溶片段是单链融合蛋白。在一些方面，TNFR-2的结合TNFα的可溶片段是两个融合蛋白的二聚体，其通过例如两个Fc域之间的二硫键相连。

[0137] 本文提供的多功能多肽(例如多特异性结合分子)能具有多种不同的结构和构象。在一个方面，本文提供的多功能多肽包含融合蛋白，其中如上文所述的NGF拮抗剂域通过柔性接头融合至如上文所述的TNFα拮抗剂域。接头的例子在本文其他部分已作描述。在一些方面，多功能多肽包含融合蛋白的同二聚体。

[0138] 在一个示例性的方面，提供了多功能多肽，其中NGF拮抗剂是来源于MEDI-578的抗NGF scFv域并且TNFα拮抗剂是TNFR-2的可溶的、结合TNFα的片段，所述片段于其羧基末端融合至免疫球蛋白Fc域。在一些方面，抗NGF scFv可以经接头融合至免疫球蛋白Fc域的羧基末端。在一些方面，这种多功能多肽的单体形成同二聚体，其各个亚基从N末端至C末端包含：TNFR-2的结合TNFα的75kD片段、人IgG1Fc域、10个氨基酸的接头$(GGGGS)_2$(SEQ ID NO:98)、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的抗NGF VH、15个氨基酸的接头$(GGGGS)_3$(SEQ ID NO:15)、和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的抗NGF VL。在一个方面，所述多功能多肽是TNFR2-Fc_VH#4，其包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在一些方面，所述多功能多肽包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽包含与SEQ ID NO:14至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％相同的氨基酸序列。

[0139] 在另一个示例性的方面，多功能多肽从N末端至C末端包含：TNFR-2的结合TNFα的75kD片段、人IgG1Fc域、10个氨基酸的接头$(GGGGS)_2$(SEQ ID NO:98)、包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的抗NGF VH、20个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_4$(SEQ ID NO:19)、和包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的抗NGF VL。在一些方面，所述多功能多肽是TNFR2-Fc_varB，其包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些方面，所述多功能多肽包含融合多肽的同二聚体，所述融合多肽包含与SEQ ID NO:17至少80％、85％、

90％、95％、96％、97％、98％、99％相同的氨基酸序列。

[0140] 多肽

[0141] 如本文提供的包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的多肽(例如多功能多肽)，或分别包含NGF拮抗剂域或TNFα拮抗剂域的单独的多肽，可以是重组多肽、衍生自天然多肽或合成多肽。本领域会理解，一些氨基酸序列可以在不显著影响该蛋白的结构或功能的前提下变化。因此，本发明还提供了本文所述的多肽的变化，其具有大体的活性或其包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域。此类突变体包括删除、插入、倒位、重复、和类型取代(type substitution)。

[0142] 可以对所述多肽和类似物进行进一步修饰以含有非蛋白质常规部分的额外的化学模块。这些衍生的模块能提高溶解度、生物半衰期或所述蛋白的吸收。所述模块还能降低或清除蛋白质等等的任何不合意的副作用。对这些模块的综述可见于REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,第20版,Mack Publishing Co.,Easton,PA(2000)。

[0143] 在一些方面，本文提供的多功能多肽可以包含非抗体的NGF或TNFα结合域。本领域已知多种用于鉴定和生产以高亲和力结合至蛋白靶标的非抗体多肽的方法。参见例如Skerra,Curr.Opin.Biotechnol.,18:295-304(2007),Hosse等,Protein Science,15:14-27(2006),Gill等,Curr.Opin.Biotechnol.,17:653-658(2006),Nygren,FEBS J.,275:2668-76(2008),和Skerra,FEBS J.,275:2677-83(2008)，其各自在此通过提述以其整体并入本文。在一些方面，噬菌体展示技术能用于鉴定/生产合适的多功能多肽。在一些方面，本文提供的多功能多肽(例如多特异性结合分子)可以包含选自下组的类型的蛋白骨架:蛋白A、脂质运载蛋白(lipocalin)、纤连蛋白(fribronectin)域、锚蛋白共有重复域(ankyrin consensus repeat domain)、和硫氧还蛋白。

[0144] 多核苷酸、载体、和宿主细胞

[0145] 本发明提供了包含多核苷酸的核酸分子，所述多核苷酸编码包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的多功能多肽。本发明还提供了包含多核苷酸的核酸分子，所述多核苷酸编码分别包含NGF拮抗剂和TNFα拮抗剂的单独多肽。在一些方面，此类多核苷酸编码特异性结合NGF或其片段并且还结合TNFα或其片段的肽域。例如，本发明提供了编码包含抗NGF抗体或其抗原结合片段的多肽域，以及包含TNFα拮抗剂(如抗TNFα抗体或其抗原结合片段)或TNF受体(例如TNFR2)的可溶的、TNFα结合部分的多肽域的多核苷酸。多核苷酸可以是RNA形式或DNA形式。DNA包括cDNA、基因组DNA、和合成DNA;并且可以是双链的或单链的，并且如果是单链的话，可以是编码链或非编码(反义)链。

[0146] 在一些实施方案中，编码本文所述多功能多肽的分离的多核苷酸包含SEQ ID NO:16、18或99的核苷酸序列或其片段，或与SEQ ID NO:16、18或99或其片段至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、或99％相同的序列。

[0147] 本文所述的分离的多肽可以通过任何合适的本领域已知方法来生产。此类方法范围从直接蛋白合成法到构建编码分离多肽序列的DNA序列并在合适的转化宿主中表达这些序列。在一些方面，用重组技术通过分离或合成DNA序列来构建DNA序列，所述DNA序列编码包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的多功能多肽，或分别包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的单独多肽。因此，本发明提供了编码包含如上文详述的NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的双功能多肽的分离的多核苷酸。还提供了编码分别包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的单独

多肽的分离的多核苷酸。

[0148] 在一些方面，编码目的多功能多肽(例如多特异性结合分子)或分别包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的单独多肽的DNA序列可以用寡核苷酸合成仪器通过化学合成来构建。此类寡核苷酸可以基于所需的多功能多肽的氨基酸序列而设计，并且选择这些密码子在产生目的重组蛋白的宿主细胞中是有利的。可以应用标准方法来合成编码目的多功能多肽的分离的多肽序列。例如，可以用完整氨基酸序列来构建逆向翻译(back-translated)的基因。此外，可以合成含有编码具体多功能多肽或单独多肽的核苷酸序列的DNA寡聚体。例如，可以合成一些编码所需多肽的部分的小寡核苷酸然后进行连接。单独寡核苷酸通常含有5’或3’悬臂(overhang)以供互补装配。

[0149] 在一些方面，本文提供的多核苷酸能包含成熟多肽的编码序列，所述成熟多肽融合进与标志序列相同的读框，从而允许例如对编码的多肽进行纯化。例如，标志序列可以是pQE-9载体提供的6-组氨酸标签以提供对融合至标志的成熟多肽的纯化(对细菌宿主而言)，或者标志序列可以是来源于流感血凝素蛋白的血凝素(HA)标签(当使用哺乳动物宿主(例如COS-7细胞)时)。

[0150] 本文提供的多核苷酸还含有编码区、非编码区、或二者的变化。在一些方面，多核苷酸变体含有产生沉默取代、添加、或删除但不改变编码多肽的活性的变化。在一些方面，核苷酸变体通过由遗传密码简并性引起的沉默取代产生。多核苷酸变体可以出于多种原因而产生，例如为了针对具体宿主而优化密码子表达(将人mRNA中的密码子改变成细菌宿主如大肠杆菌(E.coli)所偏好的密码子)。

[0151] 还提供了包含本文所述多核苷酸的载体和细胞。一旦装配(通过合成、定向诱变或其他方法)，可以将编码具体的目的分离多肽的多核苷酸序列插入表达载体并可操作地连接至适于在所需宿主中表达蛋白的表达控制序列。本发明提供了此类载体。核苷酸测序、限制性酶切作图、和合适宿主中生物活性多肽的表达能确认适当的装配。如本领域所熟知的，为了在宿主中获得高表达水平的转染基因，该基因必须可操作地连接至在选定的表达宿主中起作用的转录和翻译表达控制序列。

[0152] 在一些方面，存在表达载体可用于扩增和表达编码多功能多肽(例如多特异性结合分子)或单独多肽的DNA，所述多功能多肽包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域，所述单独多肽分别包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域。重组表达载体是可复制的DNA构建体，其具有合成的或cDNA来源的DNA片段，其编码多功能多肽或分别包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的单独多肽，所述DNA构建体可操作地连接至来自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的合适的转录或翻译调控元件。转录单位通常包含如下的装配：(1)在基因表达中具有调控作用的一个或多个遗传元件，例如转录启动子或增强子，(2)转录至mRNA中且翻译至蛋白中的结构或编码序列，以及(3)适当的转录和翻译起始和终止序列，如下文所详述的。此类调控元件可以包括操纵基因(operator)序列以控制转录。在宿主中复制的能力通常由复制起点赋予，并且促进转化株的识别的选择基因能够被额外地整合。当DNA区域在功能上互相联系时，可以将其可操作地连接。例如，将用于信号肽(分泌引导物)的DNA可操作地连接至多肽的DNA，如果其表达为参与该多肽分泌的前体的话；将启动子可操作地连接至编码序列，如果其控制该序列的转录的话；或者将核糖体结合位点可操作地连接至编码序列，如果其位置允许翻译的话。意欲在酵母表达系统中使用的结构元件包括允许翻译的蛋白被宿主细胞

分泌到细胞外的引导物序列。或者，当重组蛋白在没有引导物或转运序列的情况下表达时，其可以包含N末端甲硫氨酸残基。该残基随后可以任选地从表达的重组蛋白切除，以提供最终产物。

[0153] 表达控制序列和表达载体的选择取决于对宿主的选择。许多表达宿主/载体组合都是可以采用的。对于真核宿主有用的表达载体包括例如包含来自SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。对于细菌宿主有用的表达载体包括已知的细菌质粒，如来自大肠杆菌的质粒，包括pCR 1、pBR322、pMB9及它们的衍生物，更广的宿主范围的质粒，如M13以及丝状单链DNA噬菌体。

[0154] 本发明还提供了包含编码本文所述多肽的多核苷酸的宿主细胞。适于表达本文所述多肽的宿主细胞包括处于合适的启动子控制下的原核生物、酵母、昆虫或较高级的真核细胞。原核生物包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物，例如大肠杆菌或杆菌纲(bacilli)。较高级的真核细胞包括如下所述已建立的哺乳动物来源的细胞系。还可以采用无细胞的翻译系统。适于与细菌、真菌、酵母、和哺乳动物细胞宿主一起使用的克隆和表达载体在Pouwels等(Cloning Vectors:A Laboratory Manual,Elsevier,N.Y.,1985)中有描述，其相关公开内容在此通过提述并入本文。关于蛋白生产(包括抗体生产)的其他方法可见于例如美国专利公开No.2008/0187954、美国专利No.6,413,746和6,660,501、以及国际专利公开No.WO 04009823中，其各自在此通过提述以其整体并入本文。

[0155] 还可以有利地采用多种哺乳动物或昆虫细胞培养系统来表达重组蛋白。在哺乳动物细胞中表达重组蛋白能够进行，是因为此类蛋白通常是正确折叠、适当修饰、并且具有完整功能性的。合适的哺乳动物宿主细胞系的例子包括HEK-293和HEK-293T、猴肾细胞的COS-7系(描述于Gluzman(Cell 23:175,1981))、以及其他细胞系，包括例如L细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、HeLa和BHK细胞系。哺乳动物表达载体可以包含非转录元件，如与要表达的基因相连的复制起点、合适的启动子和增强子，以及其他5’或3’侧翼的非转录序列，以及5’或3’非翻译序列，如必需的核糖体结合位点、多聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点、以及转录终止序列。用于在昆虫细胞中生产异源蛋白的杆状病毒系统在Luckow和Summers,Bio/Technology 6:47(1988)中进行了综述。

[0156] 本发明还提供了生产如本文所述的多功能多肽的方法，或生产分别包含NGF拮抗剂或TNFα拮抗剂的单独多肽的方法。所述方法需要在促进表达所述多功能多肽或单独多肽的条件下培养如上文所述的宿主细胞，并回收所述多功能多肽或单独多肽。

[0157] 对于长期的、高产量/得率(yield)的重组蛋白生产而言，稳定的表达是合适的。例如，可以工程化生成稳定表达多功能多肽的细胞系。可以用受合适的表达控制元件(例如启动子、增强子、序列、转录终止子、多聚腺苷酸化位点等等)控制的DNA以及选择标志物来转化宿主细胞，而不是使用含有病毒复制起点的表达载体。在引入外来的DNA后，可以允许工程化的细菌在富集培养基中生长1-2天，然后转入选择性培养基。重组质粒中的选择标志物赋予选择抗性并允许细胞将质粒稳定地整合至它们的染色体中并生长以形成集落(foci)，其又可以被克隆并扩大为细胞系。该方法可以用于对表达多功能多肽的细胞系进行工程化。

[0158] 在一些实施方案中，本文提供的多功能多肽在细胞系中以所述多功能多肽的瞬时表达而表达。瞬时转染是这样的过程，其中引入细胞的核酸不整合入该细胞的基因组或染

色体DNA中而是保持为细胞中染色体外的元件，例如附加体(episome)。附加体的核酸的转录过程不受影响并且产生由附加体的核酸编码的蛋白。

[0159] 将细胞系(稳定的或瞬时转染的)维持在细胞培养基以及本领域已知导致多肽的表达和生产的条件中。在一些实施方案中，哺乳动物细胞培养基是基于商业上可获得的培养基配制物，包括例如DMEM或Ham's F12。在一些实施方案中，对细胞培养基进行改良以支持细胞生长和生物蛋白表达的增加。如本文所用的，术语“细胞培养基”、“培养基”和“培养基配制物”意指用于细胞在多细胞生物体或组织外的人工或体外环境中的维持、生长、繁殖、或扩大的营养溶液。可以针对特定细胞培养用途而优化细胞培养基，包括但不限于细胞培养生长培养基(其经配制来促进细胞生长)、或细胞培养生产培养基(其经配制来促进重组蛋白生产)。术语营养物、成分、和组分可以互换地使用，用于意指组成细胞培养基的组成部分。

[0160] 在多种实施方案中，用补料分批方法来维持细胞系。如本文所用的，“补料分批方法”意指这样的方法，通过所述方法在首先用基底培养基温育后向补料分批细胞培养物供应额外的营养物。例如，补料分批方法可以包括根据确定的补料方案在给定的时间段内添加补充的培养基。因此，“补料分批细胞培养”意指这样的细胞培养，其中首先向培养容器供应细胞(通常为哺乳动物细胞)和培养基并在培养期间向培养物连续地或离散递增地补料额外的培养营养物，伴随或不伴随培养终止前的定期的细胞和/或产物收获。

[0161] 在一些实施方案中，细胞培养基包含基底培养基和至少一种水解产物，例如基于大豆的水解产物、基于酵母的水解产物，或这两种类型水解产物的组合物，其产生改良的基底培养基。额外的营养物有时可仅含有基底培养基，如浓缩的基底培养基，或可仅含有水解产物，如浓缩的水解产物。合适的基底培养基包括但不限于达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium,DMEM)、DME/F12、最小必需培养基(Minimal Essential Medium,MEM)、基底培养基伊格尔(Basal Medium Eagle,BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、.alpha.-最小必需培养基(.alpha.-MEM)、格拉斯哥最小必需培养基(Glasgow's Minimal Essential Medium,G-MEM)、PF CHO(参见例如CHO无蛋白培养基(Sigma)或EX-CELL.TM.325PF CHO无血清培养基用于CHO细胞无蛋白(SAFC Bioscience)、以及Iscove改良达尔伯克培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)。可用于本文所述的技术中的基底培养基的其他例子包括BME基底培养基(Gibco-Invitrogen;达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM,粉剂)(Gibco-Invitrogen(#31600))。

[0162] 在一些实施方案中，基底培养基可以是无血清的(意即所述培养基不含血清(例如胎牛血清(FBS)、马血清、山羊血清，或本领域技术人员已知的任何其他动物来源的血清))或无动物蛋白培养基或是化学成分确定的培养基。

[0163] 可以改良基底培养基从而去除标准基底培养基中发现的一些非营养组分，如各种无机或有机缓冲剂、表面活性剂、和氯化钠。从基底培养基去除这些组分允许了剩余营养组分的浓度增加，并且可能改进总体细胞生长和蛋白表达。此外，根据细胞培养条件的需要，可以将遗漏的组分添加回含有改良基底培养基的细胞培养基。在一些实施方案中，所述细胞培养基含有改良的基底培养基，以及至少一种如下营养物：铁源、重组生长因子；缓冲剂；表面活性剂；渗透压调节剂；能量源；以及非动物水解产物。此外，改良的基底细胞培养基可以任选地含有氨基酸、维生素、或氨基酸和维生素二者的组合。在一些实施方案中，改良的

培养基还含有谷氨酰胺，例如L-谷氨酰胺和/或甲氨蝶呤。

[0164] 在一些实施方案中，用本领域已知的补料分批、分批、灌注或连续补料生物反应器方法通过生物反应器工艺进行大量蛋白生产。大规模生物反应器具有至少50L升的容积，有时约超过500升或1,000至100,000升的容积。这些生物反应器使用搅拌叶轮来分配氧和营养物。小规模生物反应器通常意指不超过约100升的容积中的细胞培养，并且所述溶剂范围可以是约1升至约100升。或者，可将单用途生物反应器(SUB)用于大规模或小规模培养。

[0165] 温度、pH、搅拌、通气、和接种密度可以根据所用的宿主细胞和要表达的重组蛋白而变化。例如，重组蛋白培养物可以维持在30至45摄氏度的温度。可以在培养过程期间监测培养基的pH，从而使pH保持在最佳水平，所述最佳水平对于一些宿主细胞而言可以是在6.0至8.0的范围内。可以采用叶轮驱动的混合用于此类培养方法以进行搅拌。叶轮的旋转速度可以是约50至200cm/sec尖端速度，但还可以使用已知的其他空气运输(airlift)或其他混合/通气系统，其取决于培养的宿主细胞的类型。提供充分的通气以在培养物中维持溶解氧浓度为约20％至80％空气饱和度，其同样取决于所选择的培养的宿主细胞。或者，生物反应器可以将气体或氧直接喷射至培养基中。存在其他氧供应方法，包括采用中空纤维膜通气装置的无气泡通气系统。

[0166] 蛋白纯化

[0167] 由如上文所述的转化的宿主产生的蛋白可以根据任何合适的方法进行纯化。此类标准方法包括色谱法(例如离子交换、亲和力、以及大小(sizing)柱色谱法)、离心法、差示溶解度法(differential solubility)、或通过任何其他标准技术用于蛋白纯化。可以将亲和力标签(如六聚组氨酸、麦芽糖结合域、流感外壳(coat)序列和谷胱甘肽-S-转移酶)附接至所述蛋白以允许通过流经合适的亲和力柱而容易地纯化。还可以用此类技术(如蛋白水解、核磁共振和x射线晶体分析)来物理地表征分离的蛋白。

[0168] 例如，来自将重组蛋白分泌至培养基中的系统的上清可以用商业上可获得的蛋白浓缩滤器加以浓缩，所述滤器例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元。在浓缩步骤之后，将浓缩液涂在合适的纯化基质上。或者可以采用阴离子交换树脂，其为一种具有悬垂(pendant)二乙氨乙基(DEAE)基团的基质或基底材料。基质可以是丙烯酰胺、琼脂糖、右旋糖酐(dextran)、纤维素或常应用于蛋白纯化的其他类型。合适的阳离子交换物包括多种不可溶的基质，包括磺丙基或羧甲基。最后，可以用一个或多个逆相(reversed-phase)高效液相色谱(RP-HPLC)步骤(其采用疏水性RP-HPLC介质，例如具有悬垂甲基或其他脂肪族基团的二氧化硅凝胶)来进一步纯化NGF结合剂。前述纯化步骤的一些或全部还能以各种组合用于提供均质的重组蛋白。

[0169] 可以对细菌培养物中产生的重组蛋白进行分离，例如通过首先从细胞沉淀物提取，然后是一次或多次浓缩、盐析、含水离子交换(aqueous ion exchange)或大小排阻色谱步骤。可以将高效液相色谱(HPLC)用于最终纯化步骤。重组蛋白表达中采用的微生物细胞可以通过任何便利的方法加以破碎，包括反复冻融、机械破碎、或使用细胞裂解剂。

[0170] 本领域已知用于纯化重组多肽的方法还包括例如美国专利公开No.2008/0312425、2008/0177048、和2009/0187005中描述的那些，其各自在此通过提述以其整体并入本文。

[0171] 使用方法和药物组合物

[0172] 本发明提供了用于控制或治疗受试者中的疼痛的方法，包括施用治疗有效量的TNFα和NGF拮抗剂多功能多肽(例如多特异性结合分子)，如本文所提供的，或是包括共同施用TNFα拮抗剂和NGF拮抗剂。在一些方面，所述受试者是人。

[0173] 本发明还提供了包含如本文提供的TNFα和NGF拮抗剂多功能多肽(例如多特异性结合分子)的药物组合物，或包含如本文提供的TNFα和NGF拮抗剂的组合的药物组合物。在一些方面，所述药物组合物还包含药学上可接受的载剂。这些药物组合物对于治疗疼痛(例如神经性疼痛和炎性疼痛(例如骨关节炎或类风湿性关节炎))是有用的。

[0174] 本文提供的包含NGF拮抗剂和TNFα拮抗剂的多功能多肽和组合物可用于多种应用，包括但不限于控制或治疗疼痛，例如神经性疼痛。使用的方法可以是体外、离体、或体内方法。

[0175] 在一些方面，用NGF结合剂(例如抗体或多肽)治疗的疾病、病症、或病况与疼痛有关。在一些方面，所述疼痛与慢性伤害性疼痛、慢性下背痛、神经性疼痛、癌性疼痛、带状疱疹神经痛(PHN)疼痛、或内脏痛病况有关。

[0176] 本发明提供了用于控制受试者中的疼痛的方法，包括将有效量的神经生长因子(NGF)拮抗剂和肿瘤坏死因子(TNFα)拮抗剂施用于需要疼痛控制的受试者，其中所述施用能比单独施用等量的所述NGF拮抗剂或TNFα拮抗剂更有效地控制受试者中的疼痛。

[0177] 在一些方面，所述施用是共同施用NGF拮抗剂和TNFα拮抗剂作为组合治疗。如本文其他部分所讨论的，可以同时或序贯地施用多个单独组分。单独的NGF拮抗剂或TNFα拮抗剂可以是本文提供的任何NGF或TNFα拮抗剂，例如可溶的结合NGF的TrkA受体片段、抗NGF抗体或其抗原结合片段、TNF受体(例如TNFR-2)的可溶的TNFα结合片段、或抗TNFα抗体或其片段(例如英夫利昔单抗、阿达木单抗、聚乙二醇赛妥珠单抗、戈利木单抗、或这些抗体任一种的抗原结合片段)。

[0178] 共同施用可以包括多种剂量的控制疼痛所需的各种拮抗剂。在一些方面，共同施用可以包括比作为单独治疗所常规施用更低的剂量或更低频率的剂量的各种组分，由此提供更多的安全性、便利性、和经济性。

[0179] 在一些方面，本文提供的控制疼痛的方法包括施用包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的多功能多肽(例如多特异性结合分子)。用于在此方法中使用的示例性的多功能多肽在本文中有详细描述。基于本公开，可用于本方法中的其他多功能多肽对于本领域普通技术人员来说是显而易见的。

[0180] 比单独施用的组分“更有效地”控制疼痛，意指组合治疗对于控制疼痛比单独施用等量的NGF拮抗剂或TNFα拮抗剂更有效。在一些方面，以及如下文中进一步详述的，本文提供的控制疼痛的方法可以提供协同效力，例如施用所述NGF拮抗剂和TNFα拮抗剂二者的效果可以提供大于累加的效果，或者在单独NGF拮抗剂或TNFα拮抗剂均无效时，所述二者共同施用是有效的。在一些方面，所述组合可以允许剂量节约，例如在共同施用时，各组分的有效剂量可以比单独施用任一组分的有效剂量更低。

[0181] 在一些方面，本文提供的控制疼痛的方法对于控制受试者中的疼痛是比单独施用等量的NGF拮抗剂或TNFα拮抗剂至少5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、或100％更有效的。在一些方面，共同施用于受试者的个体NGF拮抗剂或TNFα拮抗剂的剂量或施用本文提供的双功能多肽后提供的NGF拮抗剂或TNFα拮抗剂的相对剂量的剂量可

以比单独施用所述组分所需的剂量低例如5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[0182] 疼痛控制的效力可以通过询问患者来测量，以根据不同的标度来评定经历疼痛的质量和强度。文字疼痛标度使用词语来形容范围，所述范围从无疼痛、轻度疼痛、中度疼痛和重度疼痛，各自分配到0-3的分值。或者可以要求患者根据从0(无疼痛)至10(可能的最大疼痛)的数字疼痛标度来评定他们的疼痛。在视觉类比标度(visual analog scale,VAS)上，垂直或水平线具有文字以描述从无疼痛至可能的最大疼痛的疼痛，并且要求患者在代表他们当前疼痛水平的点处对这些线条进行标记。McGill疼痛指数使患者能通过选择最佳描述其疼痛的词语描述疼痛的质量和强度二者，所述词语选自短候选名单，例如重击、灼烧、掐捏。其他疼痛标度可以用于经历困难的成人，所述标度使用VAS或数字标度例如FACES，或是用于无语言能力的(non-verbal)患者，例如行为评定标度。功能活性标度评分涉及患者是如何被他们的疼痛所妨碍的，其通过要求他们执行一个与疼痛区域相关的任务而进行。使用这些类型的标度的疼痛评分的改进会潜在地指示镇痛剂效力的改进。

[0183] 根据本文提供的控制疼痛的方法，所述施用足以在需要疼痛控制的受试者中控制疼痛，例如共同施用NGF拮抗剂和TNFα拮抗剂，或施用包含NGF拮抗剂域和TNFα拮抗剂域的多功能多肽(例如多特异性结合分子)能防止、降低、减轻、或消除受试者中的疼痛。在一些方面，所述疼痛可以是急性疼痛、短期疼痛、持续或慢性伤害性疼痛、或是持续或慢性神经性疼痛。

[0184] 在一些方面，制备了用于储存和使用的配制物，所述制备是通过将本文提供的TNFα和NGF拮抗剂多功能多肽(例如多特异性结合分子)或本文提供的TNFα拮抗剂和NGF拮抗剂的组合、以及药学上可接受的载体(例如载剂、赋形剂)进行组合来完成的(Remington,The Science and Practice of Pharmacy第20版Mack Publishing,2000)。合适的药学上可接受的载体包括但不限于无毒缓冲剂如磷酸、柠檬酸、和其他有机酸；盐类如氯化钠；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵；氯化六甲双铵(hexamethonium chloride)；苯扎氯铵；苄索氯铵；苯酚，丁基或苄基醇；烷基对羟基苯甲酸酯类(alkyl parabens)，如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚)；低分子量多肽(例如小于约10个氨基酸残基)；蛋白质如血清白蛋白，明胶，或免疫球蛋白；亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸如甘氨酸，谷氨酰胺，天冬酰胺，组氨酸，精氨酸或赖氨酸；碳水化合物如单糖(monosacchandes)，二糖，葡萄糖，甘露糖，或糊精；螯合剂如EDTA；糖，如蔗糖，甘露醇，海藻糖或山梨醇；成盐反离子(salt-forming counter-ions)如钠；金属复合物(例如，Zn-蛋白质复合物)；和非离子表面活性剂如吐温(TWEEN)或聚乙二醇(PEG)。

[0185] 本发明的多功能多肽可以配制为液体、半固体、或固体形式，取决于分子和递送途径的理化特性。配制物可以包含赋形剂，或赋形剂的组合，例如：糖、氨基酸和表面活性剂。液体配制物可以包含多种多肽浓度和pH。固体配制物可以通过例如冷冻干燥、喷雾干燥、或通过超临界流体技术的干燥来产生。在一些实施方案中，本文所述的任何配制物为冷冻干燥的配制物。

[0186] 在一个具体实施方案中，本发明的多功能多肽配制于20mM磷酸钠、50mM L-精氨酸-HCL、150mM蔗糖、0.03%(w/v)聚山梨醇酯80、pH 6.5中。

[0187] 本文提供的药物组合物可以以任何数量的方法施用，用于局部或全身治疗。施用可以是局部的(如施用于粘膜，包括阴道和直肠递送)如透皮贴片、软膏剂(ointment)、洗剂、乳膏剂(cream)、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体或粉剂；肺的(例如通过吸入或吹入粉剂或气雾剂，包括通过喷雾器来进行；气管内的、鼻内的、表皮的和经皮的)；口腔的；或胃肠外的，包括静脉内的、动脉内的、皮下的、腹膜内的或肌内的注射或输注；或是颅内的(例如鞘内的或脑室内的)施用。

[0188] 本文提供的TNFα和NGF拮抗剂多功能多肽或本文提供的TNFα拮抗剂与NGF拮抗剂的组合还可以进一步与具有抗伤害感受性特性的第二(或第三)化合物组合于药物组合配制物中，或给药方案中作为组合治疗。

[0189] 对于治疗的治疗，本文提供的TNFα和NGF拮抗剂多功能多肽(例如多特异性结合分子)或本文提供的TNFα拮抗剂和NGF拮抗剂的组合的合适剂量取决于要治疗的疼痛类型、疼痛的严重程度和病因、疼痛的响应性、多功能多肽或多肽组合的施用是出于治疗还是预防目的、既往治疗、患者的临床史、等等，其均由治疗的医师决定。多功能多肽或多肽组合组合可以施用一次或在一系列治疗内持续数天至数月以维持有效的疼痛控制。可以由患者体内药物积累的测量值来计算最佳给药方案，并且其根据各抗体或多肽的相对效力而变化。施用的医师能容易地确定最佳剂量、给药方法和重复率。

[0190] 本文提供的多功能多肽(例如多特异性结合分子)或多肽组合治疗的施用能提供“协同作用”并且证明是“协同的”，即当活性成分一起使用时达到的效果大于将化合物分开使用所产生的效果的总和。当活性成分：(1)作为单个的多功能融合多肽施用；(2)共同配制并施用或在组合的单位剂量配制物中同时递送；(3)作为分开的配制物以交替或并行递送；或(4)按照一些其他方案时，其达到协同效果。当按照交替治疗递送时，当化合物以序贯施用或递送(例如在分开的注射器中通过不同次注射进行)时能达到协同作用。一般而言，在交替治疗期间，有效剂量的各活性成分是序贯施用的，而在组合治疗中，有效剂量的两个或更多个活性成分是一起施用的。

[0191] 疼痛

[0192] 在最广义的用法中，“疼痛”意指一种经验现象，其高度依赖于经历其的个体的主观性，并且受到该个体的心理状态的影响，包括环境和文化背景。“物理性”疼痛通常可以与第三方可感知的刺激相联系，所述刺激引起实际的或潜在的组织损伤。从这个意义上讲，根据国际疼痛研究协会(International Association for the Study of Pain,IASP)，可以认为疼痛是“与实际或潜在组织损伤相关的或按照此种损伤来描述的感觉和情感体验”。然而，一些疼痛的实例没有可感知的引发因素。例如心因性疼痛，包括在患有心理病症且没有任何可感知疼痛引发因素的证据的人中预成的物理性疼痛的恶化，其由心理因素或是有时持续的感知到的疼痛的综合征导致。

[0193] 疼痛的类型

[0194] 疼痛包括伤害性疼痛、神经性疼痛/神经源性疼痛(neurogenic pain)、爆发性疼痛、异常性疼痛、痛觉过敏、感觉过敏(hyperesthesia)、感觉迟钝(dysesthesia)、感觉异常、痛觉过度(hyperpathia)、幻肢疼痛、心理性疼痛、痛性感觉缺失、神经痛、神经炎。其他分类包括恶性疼痛、心绞痛、和/或特发性疼痛、复杂性局部疼痛综合征I、复杂性局部疼痛综合征II。疼痛的类型和症状不必互斥。这些术语意在如IASP所定义的那样。

[0195] 伤害性疼痛是通过周围神经中的专门的感觉伤害性感受器响应于伤害性刺激而起始的，其将伤害性刺激编码为动作电位。伤害性感受器，其通常在Aδ纤维和(Polymodal)C纤维上，是一种终止于皮肤下、肌腱、关节中、以及身体器官中的游离神经末梢。背根神经节(DRG)神经元提供了周围和脊髓之间通信的部位。信号经过脊髓处理至脑干和丘脑部位并最终传递至大脑皮层，信号通常(但不全是)在该处引发疼痛感觉。伤害性疼痛可以由多种具有刺激或损伤身体组织可能性的化学的、热的、生物的(例如炎性的)、或机械的事件引发，其通常超过了在伤害性感受器中引起伤害感受性活性所需的一定的最小阈值强度。

[0196] 神经性疼痛通常是由周围或中枢神经系统中的异常作用引起的，其分别产生周围或中枢神经性疼痛。神经性疼痛由IASP定义为神经系统中的原发性病损(lesion)或功能紊乱所起始的或引起的疼痛。神经性疼痛常常涉及对神经系统的实际损伤，尤其是对于慢性情况而言。炎性的伤害性疼痛通常是组织损伤及其产生的炎性过程的结果。神经性疼痛能在组织的任何可观察到的损伤明显愈合后(例如数月或数年后)充分持续。

[0197] 对于神经性疼痛的情况而言，来自受影响区域的感觉处理能变成异常而无害的刺激(例如热、接触/压力)，其通常不会引起疼痛(即异常性疼痛)或者伤害性刺激响应于正常疼痛刺激可诱发对疼痛夸大的知觉(即痛觉过敏)。此外，与电麻刺感或电击或“针扎和针刺(pins and needles)”(即感觉异常)和/或具有令人不快的特质的感觉(即感觉迟钝)相似的感觉可能由正常刺激诱发。爆发性疼痛是已存在的慢性疼痛的加剧。痛觉过敏是由对刺激的异常疼痛反应所引起的疼痛综合征。所述刺激在大多数情况下是重复性的且具有升高的疼痛阈值，所述阈值可以视为患者能识别为疼痛的最小的疼痛经历。

[0198] 神经性疼痛的实例包括触觉异常性疼痛(例如在神经损伤后诱导的)、神经痛(例如疱疹后的(或带状疱疹后的)神经痛、三叉神经痛)、反射交感性营养不良/灼痛(神经创伤)、癌症疼痛的组分(例如癌症本身或其相关病况如炎症引起的疼痛，或治疗如化疗、手术或放疗引起的疼痛)、幻肢疼痛、嵌压性神经病变(entrapment neuropathy)(例如腕管综合征)、和神经病变如周围神经病变(例如由糖尿病、HIV、慢性酒精使用、暴露于其他毒素(包括许多化疗)、维生素缺乏、和大量的各种其他医学情况引起)。神经性疼痛包括由多种因素引起的神经损伤后的神经系统病理学操作(pathological operation)的表达而诱导的疼痛，例如外科手术，创伤，带状疱疹，糖尿病性神经病，腿或手臂的截肢，癌症等等。与神经性疼痛相关的医学情况包括创伤性神经损伤、中风、多发性硬化、脊髓空洞症、脊髓损伤、和癌症。

[0199] 引发疼痛的刺激通常引起炎性响应，其本身能促成疼痛体验。在一些情况中，疼痛表现为通过伤害感受性和神经病变因素的复杂混合体引起。例如，慢性疼痛通常包括炎性伤害性疼痛或神经性疼痛，或二者的混合体。初始神经系统障碍或损失可能引发炎性介导物质的释放及随后的神经性炎症。例如，偏头疼可以代表神经性和伤害性疼痛的混合体。同样，肌盘膜痛可能是从肌肉输入(input)伤害感受性的次级疼痛，但异常肌肉活动可能是由神经性病况导致的。

[0200] 包含TNFα和NGF拮抗剂的试剂盒

[0201] 本公开提供了包含如本文所述的TNFα和NGF拮抗剂多功能多肽(例如多特异性结合分子)或本文所述的TNFα拮抗剂与NGF拮抗剂的组合的试剂盒，其能用于进行本文所述的方法。在一些方面，试剂盒在一个或多个容器中包含至少多功能融合多肽，所述多功能融合

多肽包含TNFα拮抗剂与NGF拮抗剂，例如包含SEQ ID NO:14或17的氨基酸序列的多肽，或者试剂盒包含NGF拮抗剂(例如MEDI-578)和TNFα拮抗剂(例如抗TNFα抗体如英夫利昔单抗或阿达木单抗，或TNF受体的结合TNFα的可溶片段，例如TNFR2-Fc)的组合。本领域技术人员会容易地认识到本文公开的TNFα和NGF拮抗剂能容易地整合至已确立的试剂盒形式之一中，其是本领域所熟知的。

实施例

[0202] 本发明在此进行一般描述，其通过参考如下实施例会更容易理解，所述实施例仅出于阐释本发明的一些方面和实施方案而包含在内，而非意欲限制本发明。

[0203] 实施例1.抗NGF scFv/TNFR2-Fc多特异性结合分子的构建和表征

[0204] 包含抗NGF抗体域和TNFR2-Fc域的多功能分子(具体而言是多特异性结合分子)如下文产生。将抗NGF抗体scFv片段经重链CH3域融合至TNFR2-Fc融合蛋白(SEQ ID NO:13)的C末端，其是根据Dimasi,N.,等,J Mol Biol.393:672-92(2009)及PCT公开No.WO 2013/070565中所述的Bs3Ab形式。结构图示于图1中。通过GeneArt(Invitrogen)合成了编码TNFR2-Fc多肽和多特异性结合分子的DNA构建体。对于多特异性结合分子而言，构建了包含通过15个氨基酸接头序列$(GGGGS)_3$(SEQ ID NO:15)连接在一起的MEDI-578的VH(SEQ ID NO:3)和VL(SEQ ID NO:7)域的抗NGF scFv。将scFv的N末端经10个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_2$融合至SEQ ID NO:13的C末端。该多特异性结合分子在本文称为TNFR2-Fc_VH#4。对编码所述多特异性结合分子的DNA构建体进行工程化以在3'末端含有终止密码子和EcoRI限制位点，以供克隆至Bs3Ab表达载体中。编码TNFR2-Fc_VH#4的DNA序列表示为SEQ ID NO:16并且其氨基酸序列为SEQ ID NO:14。

[0205] 通过在所述多特异性结合分子的MEDI-578scFv部分的VH和VL域之间添加链间二硫键而改进了TNF-NGF多特异性结合分子的热稳定性。这是通过在VH域(SEQ ID NO:94)的氨基酸44处和VL域(SEQ ID NO:95)的氨基酸102处引入G->C突变而完成的。该克隆称为TNFR2-Fc_varB。TNFR2-Fc_varB的氨基酸序列表示为SEQ ID NO:17。编码TNFR2-Fc_varB的DNA序列表示为SEQ ID NO:18。经密码子优化的编码TNFR2-Fc_varB的DNA序列表示为SEQ ID NO:99。TNFR2-Fc_varB与TNFR2-Fc_VH#4的不同还在于连接所述scFv部分的VH与VL的15个氨基酸的接头序列$(GGGGS)_3$由20个氨基酸的接头$(GGGGS)_4$(SEQ ID NO:19)所替代。使用差示扫描荧光测定法(DSF)来测量TNFR2-Fc_VH#4和TNFR2-Fc_varB的Tm。该方法测量荧光染料Sypro Orange(Invitrogen)的并入，所述荧光染料结合至在暴露于升高的温度后蛋白域解折叠过程中揭示的疏水表面。在DSF测定中，TNFR2-Fc_VH#4的Tm是62℃，而TNFR2-Fc_varB的Tm是66℃。因此，在多特异性分子的MEDI-578scFv部分中添加链间二硫键将分子的热稳定性提高了4℃。

[0206] 用聚乙烯亚胺(PEI)(Polysciences)作转染试剂将TNFR2-Fc蛋白和TNFR2-Fc_VH#4瞬时表达于悬浮的CHO细胞中。将细胞维持在CD-CHO培养基(Life Technologies)中。用1ml HiTrap MabSelect SuRe™亲和色谱根据制造商的规程(GE Healthcare)对来自小规模转染的培养收获物进行纯化，并随后在1％蔗糖、100mM NaCl、25mM L-精氨酸盐酸盐、和25mM磷酸钠(pH 6.3)中进行缓冲液交换。在还原性条件下用SDS-PAGE并用分析性大小排阻色谱(参见下文方法)来分析重组蛋白的纯度，并通过读取280nm处的吸光度用理论上确定

的消光系数来确定浓度。

[0207] TNFR2-Fc融合蛋白与TNF-NGF多特异性构建体TNFR2-Fc_VH#4的小规模瞬时表达和蛋白A柱纯化分别产出了36.6和79.9mg L^{-1}的产量/得率。

[0208] 如下文产生了较大批次的TNFR2-Fc_VH#4。用深层过滤来过滤了来自大规模转染(多至6L)的粗培养收获物并将其装载至用缓冲液A(磷酸盐缓冲盐水,pH 7.2)预平衡的1.6x 20cm蛋白A琼脂糖柱(GE Healthcare)上。然后用缓冲液A洗涤所述柱并在缓冲液B(50mM乙酸钠,pH<4.0)的不连续梯度(step gradient)中洗脱产物。通过加载至在缓冲液C(50mM乙酸钠缓冲液,pH<5.5)中预平衡的1.6x 20cm Poros HS 50柱(Applied Biosystems)上将产物进一步纯化,于缓冲液C中洗涤并随后在50mM乙酸钠缓冲液pH<5.5中的0至1M NaCl的线性梯度中洗脱产物。通过大小排阻HPLC来分析所得的洗脱物。通过A280光谱法用Beckman DU520分光光度计使用计算的1.36的消光系数来确定蛋白浓度。

[0209] TNFR2-Fc_VH#4的表征方法

[0210] 用标准实验方案进行了Western印记分析。用Xcell SureLock™系统(Invitrogen)根据制造商的说明将蛋白质转移至聚偏二氟乙烯膜(Life Technologies)上。用磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的3%(w/v)脱脂奶粉来封闭该膜室温1小时。用标准实验方案采用HRP缀合的抗人IgG Fc特异性抗体(Sigma)来对Western印记进行显影。

[0211] 用Gilson HPLC系统(等度泵-307,UV/Vis-151检测器,液体操纵器-215和注射模块-819)、采用Phenomenex BioSep-SEC-S3000(300x 7.8mm)柱、以D-PBS(life Technologies)为移动相、以1ml/分钟的流速来进行大小排阻HPLC。将25μL样品注射至柱上并于A280nm监测蛋白种类的分离。

[0212] 对小规模纯化的TNFR2-Fc_VH#4的酶促去糖基化用EDGLY试剂盒(Sigma Aldrich)根据制造商的规程来进行。在变性条件和天然条件下将蛋白去糖基化。对于变性蛋白而言,用PNGase F、O-糖苷酶、和α-(2→3,6,8,9)-神经氨酸苷酶、β-N-乙酰葡糖胺酶和β-(1→4)-半乳糖苷酶将30μg的蛋白于37℃去糖基化3小时。在未处理条件下,用与上述相同的酶将35μg的蛋白于37℃去糖基化3天。通过考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE以及通过Western印迹用标准测定实验方案来分析了去糖基化的蛋白。

[0213] 如下文所述对TNFR2-Fc_VH#4进行了N末端氨基酸测序。在SDS-PAGE凝胶上用标准实验方案运行了约2μg的TNFR2-Fc_VH#4。用Xcell SureLock™系统(Invitrogen)根据制造商的说明将蛋白转移至PVDF膜上。在轨道振荡平台上用0.1%(w/v)氨基黑(amidoblack)对膜染色约15分钟,然后用dH_2O洗涤以降低PVDF膜的背景染色。对膜进行空气干燥,然后进行N末端测序。将目的条带切出并在Applied Biosystems 494HT测序仪(Applied Biosystems,San Francisco,CA,U.S.A.)上用在线乙内酰苯硫脲分析使用Applied Biosystems 140A微HPLC进行多特异性结合分子的N末端的序列确认。

[0214] 表征结果

[0215] 通过对聚集物、单体、和蛋白片段化水平的SEC-HPLC来对纯化的TNFR2-Fc_VH#4和TNFR2-Fc进行概述(图2A和2B)。包含单体的主峰组成为约90%的总蛋白连同剩余的约10%的具有较低柱保留时间的蛋白团块(mass),指示存在较高阶的种类或聚集体。然而,来自SEC-HPLC的单体峰具有两个显著的肩部(pronounced shoulders),指示峰内的蛋白不是单一种。用考马斯亮蓝染色进行的SDS-PAGE分析显示了在还原条件下TNFR2-Fc_VH#4的两个

不同的条带(约100和75kD处)以及TNFR2-Fc融合蛋白也类似地显示两个不同条带(约70和45kD处)(图2B)。在非还原条件下,TNFR2-Fc_VH#4存在三个主条带(在150和250kD之间)而TNFR2-Fc融合蛋白具有一个主条带和一个副条带(分别位于约150和120kD)。由于还原条件下两个条带之间的分子量差异与scFv片段(~26.5kD)的大小是约为相等的,进行了进一步分析以了解正在生成何种形式的多特异性结合分子。未处理条件下的质谱分析确认了SDS-PAGE数据,对于两个单独纯化的蛋白制备物在纯化的TNFR2-Fc_VH#4制备物中在约125、152和176kD处存在3个分子量(图2C)。

[0216] 如果通过SDS-PAGE观察到的条带型是由于TNFR2-Fc_VH#4的差别糖基化引起的,则在去糖基化时其会解析回到(resolved back)单个条带。然而,无论当TNFR2-Fc_VH#4作为天然蛋白还是作为变性蛋白而去糖基化时,所述条带模式在还原和非还原条件下均得以维持(数据未显示)。用多克隆抗人IgG Fc特异性抗体对糖基化的和去糖基化的TNFR2-Fc_VH#4二者进行的Western印迹染色显示,全长预期条带和较低分子量条带二者均与抗Fc特异性抗体具有反应性(数据未显示)。

[0217] 通过蛋白的N末端氨基酸测序对截短产物进行了最终鉴定。其揭示了阶段蛋白的N末端的起始8个氨基酸是SMAPGAVH,其对应于TNFR2-Fc_VH#4序列(SEQ ID NO:14)的氨基酸176至183。这代表了在TNFR2-Fc_VH#4的N末端处175个氨基酸的截短,其仅剩余TNFR2域的42个氨基酸。这允许我们精确解释来自SDS-PAGE、质谱分析和SEC-HPLC分析的大量数据。有三种可能的TNFR2-Fc_VH#4二聚体的组合,其均存在于纯化蛋白制备物中:(1)全长同二聚体,(2)全长和截短种的异二聚体,以及(3)截短种的同二聚体。为了精确测量体内和体外二者的生物活性,通过两步柱色谱工艺生成了全长同二聚体的制备物。在第一步中,在蛋白A纯化之后,产物含有80.5%单体(图3A),而在第二柱纯化步骤(SP琼脂糖)后单体百分比为97.8%(图3B)。整个过程的产量/得率为7.3%。

[0218] 实施例2.通过差示扫描量热法(DSC)的热稳定性分析

[0219] 将自动MicroCal VP毛细管DSC(GE Healthcare,USA)用于量热测量。在25mM组氨酸/组氨酸-HCL缓冲液(pH 6.0)中于1mg/mL处测试蛋白样品。对蛋白样品和缓冲液进行线性加热,所述加热以每小时95℃的速率从25℃至100℃来进行。用Origin 7软件从蛋白样品减去作为参照的缓冲液并确定热转变(thermal transitions)。

[0220] TNFR2-Fc_VH#4的热谱图(图4)显示了3个不同的解折叠转变,变性温度(Tm)为64、67、和84℃。我们推知64℃的Tm与TNFR2域和抗NGF scFv域二者的变性均符合,67℃和84℃的Tm分别是IgG1CH2和CH3域的典型变性温度(例如Dimasi,N.,等,J Mol Biol.393:672-92(2009),以及PCT公开No.WO 2013/070565)。不愿受理论束缚,scFv通常具有比其他抗体域更低的变性温度,并且它们的解折叠的特征在于单个转换事件(Roberge等,2006,Jung等,1999,Tischenko等,1998)。

[0221] 实施例3.抗原对TNFR2-Fc_VH#4的结合的确认

[0222] A.通过ELISA的单或双抗原结合

[0223] 将Nunc Maxisorp孔用50μl的稀释于PBS(pH 7.4)中至5μg ml^{-1}的TNFα(R&D Systems)在4℃涂覆过夜。在随后那天将涂覆的溶液去除并用150μl的封闭缓冲液[3%脱脂奶-PBS]将孔在室温封闭1小时,在PBS中将孔漂洗3次,然后添加50μl的封闭缓冲液中制成的TNFR2-Fc_VH#4稀释系列液(dilution series)。在室温1小时后,将孔在PBS-吐温20

(0.1%v/v;PBS-T)中洗涤3次。然后向孔添加50微升的生物素化的NGF并在室温再温育1小时,然后如上文所述洗涤并添加50μl的链霉亲和素-HRP(1:100)。在室温1小时后,用PBS-T洗涤孔,向孔添加50μl的3,3′,5,5′-四甲基联苯胺基质并允许进行显色。通过添加1M H_2SO_4来终止反应并用微量滴定板读取仪(reader)于450nm处测量吸光度。用Prism 5软件(GraphPad,San Diego,CA)来分析得到的数据。对于单抗原结合ELISA,用TNFα或NGF-生物素如上文所述来涂覆孔,并用抗人IgG Fc特异性HRP缀合的抗体(1:5000)来检测抗体结合,并如上文所述进行显色。

[0224] ELISA结果显示于图5中。将TNFR2-Fc_VH#4设计为结合TNFα和NGF抗原二者。通过首先将一个抗原固定到96孔微量滴定板上然后添加TNFR2-Fc_VH#4的系列稀释液,从而进行了单抗原结合。通过使用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗IgG Fc特异性抗体检测了特异性结合。对于双抗原结合ELISA,将第一抗原TNFα固定于ELISA板上,然后添加TNFR2-Fc_VH#4的系列稀释液,然后添加生物素化的第二抗原,即固定浓度的NGF。然后用HRP缀合的链霉亲和素来检测特异性结合。TNFR2-Fc_VH#4在单抗原结合ELISA中结合至TNFα和NGF(图5A和B)。在双抗原结合ELISA中,TNFR2-Fc_VH#4同时结合至TNFα和NGF二者(图5C)。

[0225] B.通过表面等离子体共振的同时抗原结合

[0226] 同时抗原结合实验基本如Dimasi,N.,等,J Mol Biol.393:672-92(2009)中所述用BIAcore 2000仪器(GE Healthcare)进行。简言之,用CM5传感器芯片将大约1500个共振单位的TNFR2-Fc_VH#4以100nM进行固定化。然后将传感器芯片表面用于TNFα和NGF的同时结合。将抗原制备于HBS-EP缓冲液(10mM HEPES(pH 7.4),150mM NaCl,3mM乙二胺四乙酸(EDTA),0.005%P20)中。对结合测量使用30μl/分钟的流速。为了确定多特异性抗体对TNFα和NGF的同时结合,将1μM的TNFα(分子量17.5kD)注射于传感器芯片表面上,并且在完成注射之时随后注射TNFα和NGF(分子量13.5kD)的混合物(均为1μM)。将TNFα包括在与NGF的混合物中以防止由于NGF结合阶段中的TNFα解离引起的信号丢失。作为对照,进行了类似的结合步骤,并在最后一次注射时仅添加了TNFα,这次注射的共振单位没有进一步增加,指示TNFα以饱和水平被结合。进行了类似的结合和对照实验,其中将TNFα和NGF的注射顺序颠倒。

[0227] 通过表面等离子体共振表征了TNFR2-Fc_VH#4的同时抗原结合。以顺序方式定性地分析了结合事件。用胺偶联化学方法将TNFR2-Fc_VH#4共价固定至传感器芯片表面上。随后,注射第一抗原以提供对TNFR2-Fc_VH#4的饱和水平的结合,然后将第二抗原作为与抗原1的等摩尔掺合物予以注射。结合传感图明确显示,TNFR2-Fc_VH#4同时结合至TNFα和NGF(图6)。无论抗原注射顺序如何,都发生对两种抗原的同时结合。

[0228] 实施例4.由NGF诱导的TF-1细胞增殖的抑制

[0229] 将TF-1细胞(ECACC产品编号:93022307)以$1.5x10^4$细胞/孔接种于96孔组织培养板(Corning Costar)内的50μl无血清培养基中并在37℃以5%CO_2温育18小时。将重组人(Sigma)或小鼠NGF(R&D Systems)于37℃在96孔圆底平板(Greiner)中与TNFR2-Fc_VH#4、MEDI-578IgG1TM YTE(MEDI-578的一种非结合的IgG1TM YTE同种型对照)、或非结合的双特异性同种型对照R347Bs3Ab的稀释液预温育30分钟。然后将50微升的每个样品添加至细胞平板并于37℃温育48小时。在温育期后,添加100μl的细胞TITRE GLO®测定缓冲液(Promega)并将平板于37℃以5%CO_2温育10分钟。然后用标准发光规程来测量发光。在没有

抗体时标准NGF诱导的TF-1增殖显示于图7A中。

[0230] 用NGF诱导的TF-1增殖确定了TNFR2-Fc_VH#4的功能活性。TNFR2-Fc_VH#4能够完全抑制人和鼠NGF二者诱导的增殖(分别为图7B和7C)。图7B:用对应于EC_{80}浓度的重组人NGF刺激TF-1细胞。将细胞与配体与抗体的系列稀释液一起温育48小时,之后通过用细胞TITRE GLO®测定缓冲液(Promega)培养10分钟来对细胞增殖进行定量。图7C:用对应于EC_{80}浓度的重组鼠NGF来刺激TF-1细胞。将细胞与配体与抗体的系列稀释液一起温育48小时,之后通过用细胞TITRE GLO®测定缓冲液(Promega)培养10分钟来对细胞增殖进行定量。这些数据证明,TNFR2-Fc_VH#4的NGF抑制性部分是生物学上活性的,并且以类似于IgG1TM对MEDI-578的效力来抑制NGF诱导的增殖。对TNFR2-Fc_varB和另一个TNF-NGF多特异性结合分子ndimab var B也观察到了相似的数据(图7D和7E)。ndimab varB包含完全抗TNFα抗体,即以H_2L_2形式包含两条完整重链和两条完整轻链的抗体,及融合至所述抗TNFα抗体的重链C末端的MEDI-578scFv。ndimab varB的轻链描述于SEQ ID NO:20中而ndimab varB的重链描述于SEQ ID NO:22中。

[0231] 实施例5.由TNFα诱导的U937细胞凋亡的抑制

[0232] 将U937细胞(ECACC产品编号:85011440)以$8x10^5$细胞/孔的浓度置于黑壁(black walled)96孔组织培养平板(Corning Costar)中的50μl培养基中。用对应于EC_{80}浓度的重组人TNFα来刺激U937细胞。将细胞与配体与抗体的系列稀释液温育2小时,然后通过与胱天蛋白酶3测定反应缓冲液一起培养2小时对胱天蛋白酶3活性进行定量。将TNFR2-Fc_VH#4,一种非结合的双特异性同种型对照,R347Bs3Ab,以及依那西普在37℃与细胞预温育30分钟。之后添加50μl重组人TNFα(R&D Systems)以获得20ng/ml的最终测定浓度,然后在37℃温育2小时。在温育期后,添加50μl的胱天蛋白酶3测定反应缓冲液(0.2%w/v CHAPS、0.5%v/v Igepal CA-630、200mM NaCl、50mM HEPES、20μM DEVD-R110底物(Invitrogen))并将细胞在37℃温育2.5小时。通过在475nm处激发和512nm处发射来测量荧光。缺乏TNFα拮抗剂的胱天蛋白酶活性示于图8A。

[0233] 用U937细胞中的TNFα诱导的胱天蛋白酶3活性测定来确定TNFR2-Fc_VH#4的功能活性。TNFR2-Fc_VH#4完全抑制了TNFα诱导的胱天蛋白酶3活性,正如依那西普一样(图8B)。这清楚地说明了TNFR2-Fc_VH#4的TNFα抑制性部分是生物学上活性的并且具有与依那西普相似的效力。对TNFR2-Fc_varB和ndimab varB也观察到了相似数据(见图8C)。

[0234] 实施例6.体内测定

[0235] 所有体内程序根据英国内政部动物(科学程序)法案(1986)进行,并经当地伦理委员会批准。整个过程中使用了雌性C57Bl/6小鼠(Charles River,UK)。将小鼠养在每笼5/6只的组中,于单独通风的笼(IVC)中,并能在12小时亮/暗周期(在07:00-19:00亮灯)下自由接触食物和水。饲养和操作间维持在24℃,并藉由常规广播电台维持恒定的背景噪音。出于鉴定目的,所有小鼠在开始各项研究之前至少5天在麻醉条件下(氧气中3%的异氟烷)经历了转发器(transponders)的插入。

[0236] A.神经性疼痛的Seltzer模型

[0237] 用无痛量器(analgysemeter)(Randall LO,Selitto JJ,Arch Int Pharmacodyn Ther.111:409-19(1957))(Ugo Basile)来确定机械痛觉过敏。对每个后爪的背表面轮流施加增加的力,直至观察到撤回(withdrawal)响应。在这个点处停止施加力,并以克记录重

量。数据表示为同侧和对侧爪的撤回阈值，以克计。在确立基线读数后，将小鼠以大致相等的同侧/对侧比率分为2组，并经历手术。用3％异氟烷麻醉小鼠。此后，经大腿中段水平的切口通过钝性分离暴露大约1cm的左坐骨神经。然后将缝合线(10/0Virgin Silk:Ethicon)穿过背部第三神经并绑牢。用胶关闭伤口并允许小鼠在开始测试前恢复至少7天。经假手术的小鼠经历了相同的实验方案，但在暴露神经后将伤口粘合并允许恢复。在手术后第7和10天测试小鼠的痛觉过敏。在第10天的测试后，将经手术的小鼠进一步细分为接受CAT251IgG1同种型对照(0.03mg/kg皮下)、依那西普(0.01mg/kg皮下)、MEDI-578(0.03mg/kg皮下)、或依那西普(0.01mg/kg皮下)与MEDI-578(0.03mg/kg皮下)的组合的组。经假手术的小鼠全部接受了CAT251(0.03mg/kg皮下)。在给药后第4小时、第1、2、3、4、和7天测量机械痛觉过敏。

[0238] 在机械痛觉过敏模型中共同施用依那西普和MEDI-578，在手术后第10天显示为与经假手术的对照相比同侧/对侧比率的显著降低(图9)。施用单剂的依那西普(0.01mg/kg皮下)或MEDI-578(0.03mg/kg皮下)不能显著逆转该种痛觉过敏。共同施用依那西普(0.01mg/kg皮下)连同MEDI-578(0.03mg/kg皮下)在给药后4小时处显著逆转了机械痛觉过敏，并且其效果维持直至给药后7天。

[0239] 在第二项研究中，评估了TNFR2-Fc_VH#4的效果。在确立机械痛觉过敏后，对小鼠在手术后第13天给药R347Bs3Ab同种型对照(0.03mg/kg皮下)、依那西普(0.01mg/kg皮下)、MEDI-578(0.03mg/kg皮下)或TNFR2-Fc_VH#4(0.01mg/kg或0.03mg/kg皮下)。假手术处理的动物接受了R347Bs3Ab同种型对照(0.03mg/kg皮下)。如上文所述在给药后4小时以及给药后第1、2、4和7天测试了小鼠的机械痛觉过敏。

[0240] 施用TNFR2-Fc_VH#4在手术后第10天产生了与经假手术的对照相比同侧/对侧比率的显著降低(图10A)。施用依那西普(0.01mg/kg皮下)或MEDI-578(0.03mg/kg皮下)都不能显著逆转该种机械痛觉过敏。然而，施用TNFR2-Fc_VH#4(0.01和0.03mg/kg皮下)在给药后4小时产生了机械痛觉过敏的显著逆转，这种效果维持到直至给药后6天。在施用R347对照Bs3Ab后未观察到效果。当施用TNFR2-Fc_varB时观察到了相似的数据(参见图10B)。这些数据提示，TNFR2-Fc_VH#4能以非常低的剂量显著逆转疼痛，而单独用等量的MEDI-578或依那西普则已显示为无效或最低的效果。

[0241] B.慢性关节痛模型

[0242] 在小鼠双足平衡测痛仪(incapacitance tester)(Linton Instrumentation)中确定了机械超敏感性。将小鼠置于设备中，将其后爪放在分离的传感器上，并在4秒的时间段计算体重分布。数据以同侧和对侧承重的比率以克表示。

[0243] 在确立基线读数后，将小鼠以大致相等的同侧/对侧比率分为2组。用如下技术进行关节内注射：用氧气中的3％异氟烷麻醉动物并将左膝除毛并清洁。用10μl的弗氏完全佐剂(FCA)(10mg/ml)或介质(轻矿物油)以装载于100μl Hamilton注射器上的25-号针头注射每只小鼠的膝关节。直接注射至膝关节的滑膜空间(synovial space)中。如上文所述允许小鼠恢复并在注射后7和10天再次测试其机械超敏感性的变化。在第10天的测试后，将FCA处理的小鼠进一步随机化至各组中，并在第13天对小鼠给药依那西普(0.01mg/kg腹膜内)或介质，然后小鼠接受一剂MEDI-578(0.03mg/kg静脉内)或CAT251同种型对照(0.03mg/kg静脉内)。如上文所述在给药后4小时以及在给药后第1、2、4和7天处测试小鼠的机械超敏感性。

[0244] 用炎性疼痛的关节内FCA模型评估了共同施用依那西普和MEDI-578的效果。关节内施用FCA引起机械超敏感性，其显示为第7和10天与介质对照相比同侧/对侧比率的显著降低(图11)。在假手术处理的组中未观察到与处理前基线水平相比的同侧/对侧比率降低。施用依那西普(0.01mg/kg腹膜内)+CAT251(0.03mg/kg静脉内)或PBS(10ml/kg腹膜内)+MEDI-578(0.03mg/kg静脉内)在给药后4小时或第1、2、4和7天处引起FCA诱导的机械超敏感性的轻微逆转，但其未达到统计学显著性。然而，施用依那西普(0.01mg/kg腹膜内)+MEDI-578(0.03mg/kg静脉内)在给药后所有测试时间均引起FCA诱导的机械超敏感性的显著逆转。

[0245] 在第二项研究中，评估了TNFR2-Fc_VH#4的效果。在确立FCA诱导的机械超敏感性后，在FCA后第13天对小鼠给药如下药剂：R347Bs3Ab同种型对照(0.01mg/kg皮下)、依那西普(0.01mg/kg皮下)、MEDI-578(0.01mg/kg皮下)或TNFR2-Fc_VH#4(0.003mg/kg或0.01mg/kg皮下)。如上文所述在给药后4小时以及在给药后第1、2、4和7天处再次测试小鼠的机械超敏感性。

[0246] TNFR2-Fc_VH#4(“双特异性”)的效果与依那西普和MEDI-578单独的效果相比显示于图12中。依那西普(0.01mg/kg皮下)和MEDI-578(0.01mg/kg皮下)在给药后任何时间点处均未显著逆转FCA诱导的机械超敏感性。然而，施用TNFR2-Fc_VH#4引起FCA诱导的机械超敏感性的显著逆转。较高剂量的TNFR2-Fc_VH#4(0.01mg/kg皮下)显示出对于研究持续时间的显著活性，而较低剂量(0.003mg/kg皮下)在给药后第1天达到显著性并且在研究持续时间保持在与较高剂量相似的水平。

[0247] C.大鼠中机械超敏感性的FCA诱导模型的确立

[0248] 弗氏完全佐剂(FCA)的足底(intraplantar)注射引起炎症反应，其诱导超敏感性和水肿，并且模拟临床炎性疼痛的一些方面。这些效果可以用测量负重的装备来研究。对TNFR2-Fc_VH#4的潜在抗痛觉过敏特性的评估，用承重方法FCA诱导的超敏感性。未处理大鼠的体重在两个后爪之间均等分布。然而，当注射的(左)后爪发炎和/或疼痛时，其重量重新分布从而在受影响的爪上重量较轻(在受伤的爪上承重降低)。使用大鼠双足平衡测痛仪(Linton Instruments,UK)测量各条后肢的承重。将大鼠置于双足平衡测痛仪中，使其后爪在分离的传感器上，并在4秒记录两条后肢发出的平均力。

[0249] 对于本项研究，使未处理的大鼠(naïverats)(雄性，Sprague Dawley大鼠(Harlan,UK)，198-258g)适应于其居住笼中的操作间，并且食物与水可任取。在数天进行对双足平衡测痛仪的习惯。在诱导伤害前取得基线承重记录。通过足底注射FCA(可获取自Sigma，100μl的1mg/ml溶液)至左后爪中来诱导炎性超敏感性。取处理前的承重测量值来评估FCA后23小时的超敏感性。

[0250] 然后根据承重FCA窗口以拉丁方设计对动物进行评级并随机化至治疗组。在FCA注射后24小时，用0.003、0.01、0.03、0.3、和3mg/kg的静脉内给予的TNFR2-Fc_VH#4(“双特异性”)、3mg/kg的静脉内给予的阴性对照抗体NIP228(产生以结合至半抗原硝基酚的抗体)、2ml/kg的口服给予的介质(1％甲基纤维素)、或10mg/kg的口服给予的吲哚美辛来处理动物。

[0251] 在抗体/药物处理后4或24小时评估承重。通过在每个时间点将处理组与介质对照组进行比较来分析数据。统计学分析包括重复测量ANOVA，然后是用InVivoStat

(invivostat.co.uk)的计划的比较检验(Planned comparison test),($p<0.05$认为是显著的)。结果显示于图13中。在4和24小时处对吲哚美辛(10mg/kg)观察到了超敏感性的显著逆转。以0.3和3mg/kg给药的TNFR2-Fc_VH#4在4和24小时处显示出超敏感性的显著逆转,以0.003和0.03mg/kg给药的TNFR2-Fc_VH#4也显示出超敏感性的显著逆转,但其仅在24小时处显示。同种型对照NIP228在任何时间点对FCA反应都没有显著效果。

[0252] 实施例7.通过TNFα和NGF的p38磷酸化

[0253] 文献表明了p38磷酸化在神经性疼痛的进展中起重要作用。例如,用p38抑制剂治疗已显示出在保留性神经损伤模型中(Wen YR等,Anesthesiology 2007,107:312-321)和坐骨神经炎性神经病变模型中(Milligan ED等,J Neurosci 2003,23:1026-1040)预防神经性疼痛症状的进展。在本实验中,在细胞培养测定中研究了TNFα、NGF、以及TNFα和NGF的组合对p38磷酸化的作用。简言之,将Neuroscreen-1细胞(一种PC-12大鼠神经内分泌细胞的亚克隆)与增加的量的TNFα、NGF、或TNFα和NGF的组合一起温育。在20分钟温育期后,用均质时间解析荧光(HTRF)测定(Cisbio)对磷酸-p38进行定量。

[0254] HTRF测定:在用TNFα、NGF、或TNFα和NGF的组合刺激后,快速去除细胞上清液并在裂解缓冲液中裂解细胞。在夹心测定形式中用两种不同的特异性抗体在裂解液中检测磷酸-p38MAPK(Thr180/Tyr182);所述抗体为缀合至铕穴状化合物(europium cryptate)(供体荧光团)的抗磷酸-p38抗体和缀合至d2(受体荧光团)的抗-p38(总)抗体。将抗体与细胞裂解液一起温育并从665nm和620nm处的荧光测量值计算HTRF比率,所述测量值用EnVision Multilabel Plate Reader(Perkin Elmer)测得。

[0255] 数据以HTRF比率表示,其计算为665nm处的发射和620nm处的发射之间的比率。显示来自磷酸-p38反应的HTRF比率的热图显示于图14中。显示TNFα、NGF、或TNFα和NGF的组合的效果的剂量响应曲线示于图15中。如图15所示,较高浓度的TNFα和NGF对磷酸-p38的组合效果大于任一单个因子所诱导的磷酸-p38信号的预测总量。这些数据提示,TNFα和NGF可一起作用以诱导p38磷酸化,以及两个途径可涉及导致疼痛的分子信号传输。

[0256] 实施例8.通过TNFα和NGF的ERK磷酸化

[0257] 如同p38一样,ERK在神经性疼痛进展过程中也被激活(Zhuang ZY等,Pain 2005,114:149-159)。在本实验中,在细胞培养测定中研究了TNFα、NGF、以及TNFα和NGF的组合对ERK磷酸化的作用。简言之,将Neuroscreen-1细胞(一种PC-12大鼠神经内分泌细胞的亚克隆)与增加的量的TNFα、NGF、或TNFα和NGF的组合一起温育。在20分钟温育期后,用均质时间解析荧光(HTRF)测定(Cisbio)对磷酸-ERK进行定量。

[0258] HTRF测定:在刺激后,快速去除细胞上清液并在裂解缓冲液中裂解细胞。在夹心测定形式中用两种不同的特异性抗体在裂解液中检测磷酸-ERK MAPK(Thr202/Tyr204);所述抗体为缀合至铕穴状化合物(供体荧光团)的抗磷酸-ERK抗体和缀合至d2(受体荧光团)的抗ERK(总)抗体。将抗体与细胞裂解液一起温育并从665nm和620nm处的荧光测量值计算HTRF比率,所述测量值用EnVision Multilabel Plate Reader(Perkin Elmer)测得。

[0259] 数据以HTRF比率表示,其计算为665nm处的发射和620nm处的发射之间的比率。显示来自磷酸-ERK反应的HTRF比率的热图显示于图16中。显示TNFα、NGF、或TNFα和NGF的组合的效果的剂量响应曲线示于图17中。如图17所示,单独的低量TNFα不诱导磷酸-ERK,但较高量增强了NGF诱导的磷酸-ERK。这些数据提示,TNFα和NGF可一起作用以诱导ERK磷酸化,以

及两个途径可涉及导致疼痛的分子信号传输。

[0260] 序列表

[0261] SEQ ID NO:1 NP_002497.2|β-神经生长因子前体[人(Homo sapiens)]

1 MSMLFYTLIT AFLIGIQAEP HSESNVPAGH TIPQAHWTKL QHSLDTALRR ARSAPAAAIA

61 ARVAGQTRNI TVDPRLFKKR RLRSPRVLFS TQPPREAADT QDLDFEVGGA APFNRTHRSK

[0262] 121 RSSSHPIFHR GEFSVCDSVS VWVGDKTTAT DIKGKEVMVL GEVNINNSVF KQYFFETKCR

181 DPNPVDSGCR GIDSKHWNSY CTTTHTFVKA LTMDGKQAAW RFIRIDTACV CVLSRKAVRR

241 A

[0263] SEQ ID NO:2 NP_000585.2|肿瘤坏死因子[人]

1 MSTESMIRDV ELAEEALPKK TGGPQGSRRC LFLSLFSFLI VAGATTLFCL LHFGVIGPQR

61 EEFPRDLSLI SPLAQAVRSS SRTPSDKPVA HVVANPQAEG QLQWLNRRAN ALLANGVELR

[0264]

121 DNQLVVPSEG LYLIYSQVLF KGQGCPSTHV LLTHTISRIA VSYQTKVNLL SAIKSPCQRE

181 TPEGAEAKPW YEPIYLGGVF QLEKGDRLSA EINRPDYLDF AESGQVYFGI IAL

[0265] SEQ ID NO:3 MEDI-578VH(1256A5VH)

1 QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS TYGISWVRQA PGQGLEWMGG IIPIFDTGNS

[0266] 61 AQSFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSS RIYDLNPSLT AYYDMDVWGQ

121 GTMVTVSS

[0267] SEQ ID NO:4 MEDI-578VHCDR1

[0268] 1 TYGIS

[0269] SEQ ID NO:5 MEDI-578VHCDR2

[0270] 1 GIIPIFDTGN SAQSFQG

[0271] SEQ ID NO:6 MEDI-578VHCDR3

[0272] 1 SSRIYDLNPS LTAYYDMDV

[0273] SEQ ID NO:7 MEDI-578VL(1256A5VL)

1 QSVLTQPPSV SAAPGQKVTI SCSGSSSNIG NNYVSWYQQL PGTAPKLLIY DNNKRPSGIP

[0274]

61 DRFSGSKSGT SATLGITGLQ TGDEADYYCG TWDSSLSAWV FGGGTKLTVL

[0275] SEQ ID NO:8 MEDI-578VLCDR1

[0276] 1 SGSSSNIGNN YVS

[0277] SEQ ID NO:9 MEDI-578VLCDR2

[0278] 1 DNNKRPS

[0279] SEQ ID NO:10 MEDI-578VLCDR3

[0280] 1 GTWDSSLSAW V

[0281] SEQ ID NO:11

[0282] 1 SSRIYDFNSA LISYYDMDV

[0283] SEQ ID NO:12

[0284] 1 SSRIYDMISS LQPYYDMDV

[0285] SEQ ID NO:13 可溶的TNFR2氨基酸序列

1 LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPGQH AKVFCTKTSD TVCDSCEDST

61 YTQLWNWVPE CLSCGSRCSS DQVETQACTR EQNRICTCRP GWYCALSKQE GCRLCAPLRK

121 CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTFSNT TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS

[0286] 181 TSPTRSMAPG AVHLPQPVST RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGPSPPAE GSTGDEPKSC

241 DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

301 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK

361 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS

[0287] 421 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

[0288] SEQ ID NO:14 TNFR2-Fc_VH#4-氨基酸序列

1 LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPGQH AKVFCTKTSD TVCDSCEDST

61 YTQLWNWVPE CLSCGSRCSS DQVETQACTR EQNRICTCRP GWYCALSKQE GCRLCAPLRK

121 CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTFSNT TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS

181 TSPTRSMAPG AVHLPQPVST RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGPSPPAE GSTGDEPKSC

241 DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

301 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK

[0289] 361 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS

421 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGGSQVQ

481 LVQSGAEVKK PGSSVKVSCK ASGGTFSTYG ISWVRQAPGQ GLEWMGGIIP IFDTGNSAQS

541 FQGRVTITAD ESTSTAYMEL SSLRSEDTAV YYCARSSRIY DLNPSLTAYY DMDVWGQGTM

601 VTVSSGGGGS GGGGSGGGGS AQSVLTQPPS VSAAPGQKVT ISCSGSSSNI GNNYVSWYQQ

661 LPGTAPKLLI YDNNKRPSGI PDRFSGSKSG TSATLGITGL QTGDEADYYC GTWDSSLSAW

721 VFGGGTKLTV L

[0290] SEQ ID NO:15 $(Gly4Ser)_3$ 15aa接头序列

[0291] 1 GGGGSGGGGS GGGGS

[0292] SEQ ID NO:16 TNFR2-Fc_VH#4-核苷酸序列

[0293]

```
   1 CTGCCCGCCC AGGTGGCCTT TACCCCTTAT GCCCCCGAGC CCGGCAGCAC CTGTCGGCTG
  61 AGAGAGTACT ACGACCAGAC CGCCCAGATG TGCTGCAGCA AGTGCTCTCC TGGCCAGCAT
 121 GCCAAGGTGT TCTGCACCAA GACCAGCGAC ACCGTGTGCG ACAGCTGCGA GGACAGCACC
 181 TACACCCAGC TGTGGAACTG GGTGCCCGAG TGCCTGAGCT GCGGCAGCAG ATGCAGCAGC
 241 GACCAGGTGG AAACCCAGGC CTGCACCAGA GAGCAGAACC GGATCTGCAC CTGTAGACCC
 301 GGCTGGTACT GCGCCCTGAG CAAGCAGGAA GGCTGCAGAC TCTGCGCCCC TCTGCGGAAG
 361 TGCAGACCCG GCTTTGGCGT GGCCAGACCC GGCACCGAGA CAAGCGACGT GGTCTGTAAG
 421 CCCTGCGCTC CTGGCACCTT CAGCAACACC ACCAGCAGCA CCGACATCTG CAGACCCCAC
 481 CAGATCTGCA ACGTGGTGGC CATCCCCGGC AACGCCAGCA TGGATGCCGT CTGCACCAGC
 541 ACTAGCCCCA CCAGAAGTAT GGCCCCTGGC GCCGTGCATC TGCCCCAGCC TGTGTCCACC
```

601 AGAAGCCAGC ACACCCAGCC CACCCCTGAG CCTAGCACCG CCCCCTCCAC CAGCTTTCTG

661 CTGCCTATGG GCCCTAGCCC TCCAGCCGAG GGAAGCACAG GCGACGAGCC CAAGAGCTGC

721 GACAAGACCC ACACCTGTCC CCCCTGCCCT GCCCCTGAAC TGCTGGGCGG ACCCAGCGTG

781 TTCCTGTTCC CCCCAAAGCC CAAGGACACC CTGATGATCA GCCGGACCCC CGAAGTGACC

841 TGCGTGGTGG TGGACGTGTC CCACGAGGAC CCTGAAGTGA AGTTCAATTG GTACGTGGAC

901 GGCGTGGAAG TGCACAACGC CAAGACCAAG CCCAGAGAGG AACAGTACAA CTCCACCTAC

961 CGGGTGGTGT CCGTGCTGAC CGTGCTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA AGAGTACAAG

1021 TGCAAGGTCT CCAACAAGGC CCTGCCTGCC CCCATCGAGA AAACCATCAG CAAGGCCAAG

1081 GGCCAGCCCC GCGAGCCTCA GGTGTACACA CTGCCCCCCA GCCGGGAAGA GATGACCAAG

1141 AACCAGGTGT CCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGATAT CGCCGTGGAA

1201 TGGGAGAGCA ATGGCCAGCC CGAGAACAAC TACAAGACCA CCCCCCCTGT GCTGGACAGC

1261 GACGGCTCAT TCTTCCTGTA CAGCAAGCTG ACCGTGGACA AGAGCCGGTG GCAGCAGGGC

1321 AACGTGTTCA GCTGCAGCGT GATGCACGAG GCCCTGCACA ACCACTACAC CCAGAAGTCC

[0294] 1381 CTGAGCCTGA GCCCCGGAAA GGGCGGTGGC GGATCCGGAG GTGGGGGATC TCAGGTGCAG

1441 CTGGTGCAGT CTGGCGCCGA AGTGAAGAAA CCCGGCTCTA GCGTGAAGGT GTCCTGCAAG

1501 GCCAGCGGCG GCACCTTCTC CACCTACGGC ATCAGCTGGG TCCGCCAGGC CCCTGGACAG

1561 GGCCTGGAAT GGATGGGCGG CATCATCCCC ATCTTCGACA CCGGCAACAG CGCCCAGAGC

1621 TTCCAGGGCA GAGTGACCAT CACCGCCGAC GAGAGCACCT CCACCGCCTA CATGGAACTG

1681 AGCAGCCTGC GGAGCGAGGA CACCGCCGTG TACTACTGCG CCAGAAGCAG CCGGATCTAC

1741 GACCTGAACC CCAGCCTGAC CGCCTACTAC GACATGGACG TGTGGGGCCA GGGCACCATG

1801 GTCACAGTGT CTAGCGGAGG CGGCGGATCT GGCGGCGGAG GAAGTGGCGG GGGAGGATCT

1861 GCCCAGAGCG TGCTGACCCA GCCCCCTTCT GTGTCTGCCG CCCCTGGCCA GAAAGTGACC

1921 ATCTCCTGCA GCGGCAGCAG CAGCAACATC GGCAACAACT ACGTGTCCTG GTATCAGCAG

1981 CTGCCCGGCA CCGCCCCTAA GCTGCTGATC TACGACAACA ACAAGCGGCC CAGCGGCATC

2041 CCCGACCGGT TTAGCGGCAG CAAGAGCGGG ACTTCTGCTA CACTGGGCAT CACAGGCCTG

2101 CAGACCGGCG ACGAGGCCGA CTACTACTGC GGCACCTGGG ACAGCAGCCT GAGCGCTTGG

2161 GTGTTCGGCG GAGGCACCAA GCTGACAGTG CTG

[0295] SEQ ID NO:17-TNFR2-Fc_varB-氨基酸序列

[0296] 1 LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPGQH AKVFCTKTSD TVCDSCEDST

61 YTQLWNWVPE CLSCGSRCSS DQVETQACTR EQNRICTCRP GWYCALSKQE GCRLCAPLRK

121 CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTFSNT TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS

181 TSPTRSMAPG AVHLPQPVST RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGPSPPAE GSTGDEPKSC

241 DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

301 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK

361 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS

[0297] 421 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG GSGGGGSQVQ

481 LVQSGAEVKK PGSSVKVSCK ASGGTFSTYG ISWVRQAPGQ CLEWMGGIIP IFDTGNSAQS

541 FQGRVTITAD ESTSTAYMEL SSLRSEDTAV YYCARSSRIY DLNPSLTAYY DMDVWGQGTM

601 VTVSSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSQSVLT QPPSVSAAPG QKVTISCSGS SSNIGNNYVS

661 WYQQLPGTAP KLLIYDNNKR PSGIPDRFSG SKSGTSATLG ITGLQTGDEA DYYCGTWDSS

721 LSAWVFGCGT KLTVL

[0298] SEQ ID NO:18-TNFR2-Fc_varB-核苷酸序列

1 CTGCCCGCCC AGGTGGCCTT TACCCCTTAT GCCCCCGAGC CCGGCAGCAC CTGTCGGCTG

61 AGAGAGTACT ACGACCAGAC CGCCCAGATG TGCTGCAGCA AGTGCTCTCC TGGCCAGCAT

121 GCCAAGGTGT TCTGCACCAA GACCAGCGAC ACCGTGTGCG ACAGCTGCGA GGACAGCACC

181 TACACCCAGC TGTGGAACTG GGTGCCCGAG TGCCTGAGCT GCGGCAGCAG ATGCAGCAGC

241 GACCAGGTGG AAACCCAGGC CTGCACCAGA GAGCAGAACC GGATCTGCAC CTGTAGACCC

301 GGCTGGTACT GCGCCCTGAG CAAGCAGGAA GGCTGCAGAC TCTGCGCCCC TCTGCGGAAG

361 TGCAGACCCG GCTTTGGCGT GGCCAGACCC GGCACCGAGA CAAGCGACGT GGTCTGCAAG

421 CCCTGCGCTC CTGGCACCTT CAGCAACACC ACCAGCAGCA CCGACATCTG CAGACCCCAC

481 CAGATCTGCA ACGTGGTGGC CATCCCCGGC AACGCCAGCA TGGATGCCGT GTGCACCAGC

[0299]

541 ACCAGCCCCA CCAGAAGTAT GGCCCCTGGC GCCGTGCATC TGCCCCAGCC TGTGTCCACC

601 AGAAGCCAGC ACACCCAGCC CACCCCTGAG CCTAGCACCG CCCCCTCCAC CAGCTTTCTG

661 CTGCCTATGG GCCCTAGCCC TCCAGCCGAG GGAAGCACAG GCGACGAGCC CAAGAGCTGC

721 GACAAGACCC ACACCTGTCC CCCCTGCCCT GCCCCTGAAC TGCTGGGCGG ACCCAGCGTG

781 TTCCTGTTCC CCCCAAAGCC CAAGGACACC CTGATGATCA GCCGGACCCC CGAAGTGACC

841 TGCGTGGTGG TGGACGTGTC CCACGAGGAC CCTGAAGTGA AGTTCAATTG GTACGTGGAC

901 GGCGTGGAAG TGCACAACGC CAAGACCAAG CCCAGAGAGG AACAGTACAA CTCCACCTAC

961 CGGGTGGTGT CCGTGCTGAC CGTGCTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA AGAGTACAAG

1021 TGCAAAGTCT CCAACAAGGC CCTGCCTGCC CCCATCGAGA AAACCATCAG CAAGGCCAAG

1081 GGCCAGCCCC GCGAGCCTCA gGTGTACACA CTGCCCCCCA GCCGGGAAGA GATGACCAAG

1141 AACCAGGTGT CCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGATAT CGCCGTGGAA

1201 TGGGAGAGCA ACGGCCAGCC CGAGAACAAC TACAAGACCA CCCCCCCTGT GCTGGACAGC

1261 GACGGCTCAT TCTTCCTGTA CAGCAAGCTG ACCGTGGACA AGAGCCGGTG GCAGCAGGGC

1321 AATGTCTTCA GCTGTAGCGT GATGCACGAG GCCCTGCACA ACCACTACAC CCAGAAGTCC

1381 CTGAGCCTGA GCCCCGGAAA GGGCGGAGGC GGATCCGGAG GTGGGGGATC TCAGGTGCAG

1441 CTGGTGCAGT CTGGCGCCGA AGTGAAGAAA CCCGGCTCTA GCGTGAAGGT GTCCTGCAAG

1501 GCCAGCGGCG GCACCTTCTC CACCTACGGC ATCAGCTGGG TCCGCCAGGC CCCTGGACAG

1561 TGTCTGGAAT GGATGGGCGG CATCATCCCC ATCTTCGACA CCGGCAACAG CGCCCAGAGC

[0300] 1621 TTCCAGGGCA GAGTGACCAT CACCGCCGAC GAGAGCACCT CCACCGCCTA CATGGAACTG

1681 AGCAGCCTGC GGAGCGAGGA CACCGCCGTG TACTACTGCG CCAGAAGCAG CCGGATCTAC

1741 GACCTGAACC CCAGCCTGAC CGCCTACTAC GACATGGACG TGTGGGGCCA GGGCACCATG

1801 GTCACAGTGT CTAGCGGAGG CGGAGGCAGC GGAGGTGGTG GATCTGGTGG CGGAGGAAGT

1861 GGCGGCGGAG GCTCTCAGAG CGTGCTGACC CAGCCCCCTT CTGTGTCTGC CGCCCCTGGC

1921 CAGAAAGTGA CCATCTCCTG CAGCGGCAGC AGCAGCAACA TCGGCAACAA CTACGTGTCC

1981 TGGTATCAGC AGCTGCCCGG CACCGCCCCT AAGCTGCTGA TCTACGACAA CAACAAGCGG

2041 CCCAGCGGCA TCCCCGACCG GTTTAGCGGC AGCAAGAGCG GGACTTCTGC TACACTGGGC

2101 ATCACAGGCC TGCAGACCGG CGACGAGGCC GACTACTACT GCGGCACCTG GGACAGCAGC

2161 CTGAGCGCTT GGGTGTTCGG CTGCGGCACC AAGCTGACAG TGCTG

[0301] SEQ ID NO:19-$(Gly4Ser)_4$ 20aa接头序列

[0302] 1 GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS

[0303] SEQ ID NO:20-ndimab varB-L链氨基酸序列

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVY SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRAIGIPA

61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPFTFG PGTKVDIKRT VAAPSVFIFP

[0304]

121 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL

181 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC

[0305] SEQ ID NO:21-ndimab varB-L链核苷酸序列

[0306] 1 GAAATCGTGC TGACCCAGAG CCCCGCCACC CTGTCTCTGA GCCCTGGCGA GAGAGCCACC

61 CTGAGCTGCA GAGCCAGCCA GAGCGTGTAC TCCTACCTGG CTTGGTATCA GCAGAAGCCC

121 GGCCAGGCCC CCAGACTGCT GATCTACGAC GCCAGCAACC GGGCCATCGG CATCCCTGCC

181 AGATTTTCTG GCAGCGGCAG CGGCACCGAC TTCACCCTGA CCATCAGCAG CCTGGAACCC

241 GAGGACTTCG CCGTGTACTA CTGCCAGCAG CGGAGCAACT GGCCCCCCTT CACCTTCGGC

301 CCTGGCACCA AGGTGGACAT CAAGCGTACG GTGGCTGCAC CATCTGTCTT CATCTTCCCG

[0307]

361 CCATCTGATG AGCAGTTGAA ATCTGGAACT GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC

421 TATCCCAGAG AGGCCAAAGT ACAGTGGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC

481 CAGGAGAGTG TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG CAGCACCCTG

541 ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG CCTGCGAAGT CACCCATCAG

601 GGCCTGAGCT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC AACAGGGGAG AGTGT

[0308] SEQ ID NO:22-ndimab varB-H链氨基酸序列

1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFIFS SYAMHWVRQA PGNGLEWVAF MSYDGSNKKY

61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR GISAGGNYYY YGMDVWGQGT

121 TVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP

181 AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KTHTCPPCPA

241 PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP

301 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL

[0309] 361 PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT

421 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGKGGGG SGGGGSQVQL VQSGAEVKKP

481 GSSVKVSCKA SGGTFSTYGI SWVRQAPGQC LEWMGGIIPI FDTGNSAQSF QGRVTITADE

541 STSTAYMELS SLRSEDTAVY YCARSSRIYD LNPSLTAYYD MDVWGQGTMV TVSSGGGGSG

601 GGGSGGGGSG GGGSQSVLTQ PPSVSAAPGQ KVTISCSGSS SNIGNNYVSW YQQLPGTAPK

661 LLIYDNNKRP SGIPDRFSGS KSGTSATLGI TGLQTGDEAD YYCGTWDSSL SAWVFGCGTK

721 LTVL

[0310] SEQ ID NO:23-ndimab varB-H链核苷酸序列

1 CAGGTGCAGC TGGTGGAAAG CGGCGGAGGC GTGGTGCAGC CCGGCAGAAG CCTGAGACTG

61 AGCTGCGCTG CCAGCGGCTT CATCTTCAGC AGCTACGCCA TGCACTGGGT CCGCCAGGCC

[0311]

121 CCTGGCAACG GACTGGAATG GGTGGCCTTC ATGAGCTACG ACGGCAGCAA CAAGAAGTAC

181 GCCGACAGCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC AGCCGGGACA ACAGCAAGAA CACCCTGTAC

241 CTGCAGATGA ACAGCCTGCG GGCTGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CAGAGACCGA

301 GGCATCAGTG CTGGCGGCAA CTACTACTAC TACGGCATGG ACGTGTGGGG CCAGGGCACC

361 ACCGTGACCG TGTCTAGCGC GTCGACCAAG GGCCCATCCG TCTTCCCCCT GGCACCCTCC

421 TCCAAGAGCA CCTCTGGGGG CACAGCGGCC CTGGGCTGCC TGGTCAAGGA CTACTTCCCC

481 GAACCGGTGA CGGTGTCCTG GAACTCAGGC GCTCTGACCA GCGGCGTGCA CACCTTCCCG

541 GCTGTCCTAC AGTCCTCAGG ACTCTACTCC CTCAGCAGCG TGGTGACCGT GCCCTCCAGC

601 AGCTTGGGCA CCCAGACCTA CATCTGCAAC GTGAATCACA AGCCCAGCAA CACCAAGGTG

661 GACAAGAGAG TTGAGCCCAA ATCTTGTGAC AAAACTCACA CATGCCCACC GTGCCCAGCA

721 CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC

781 ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTCACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT

841 GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG

901 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG

961 GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC

1021 ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT CTACACCCTG

1081 CCCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC

[0312] 1141 TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC

1201 AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CAAGCTCACC

1261 GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT

1321 CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAAGG CGGAGGGGGA

1381 TCCGGCGGAG GGGGCTCTCA GGTGCAGCTG GTGCAGTCTG GCGCCGAAGT GAAGAAACCC

1441 GGCTCTAGCG TGAAGGTGTC CTGCAAGGCC AGCGGCGGCA CCTTCTCCAC CTACGGCATC

1501 AGCTGGGTCC GCCAGGCCCC TGGACAGTGT CTGGAATGGA TGGGCGGCAT CATCCCCATC

1561 TTCGACACCG GCAACAGCGC CCAGAGCTTC CAGGGCAGAG TGACCATCAC CGCCGACGAG

1621 AGCACCTCCA CCGCCTACAT GGAACTGAGC AGCCTGCGGA GCGAGGACAC CGCCGTGTAC

1681 TACTGCGCCA GAAGCAGCCG GATCTACGAC CTGAACCCCA GCCTGACCGC CTACTACGAC

1741 ATGGACGTGT GGGGCCAGGG CACCATGGTC ACAGTGTCTA GCGGAGGCGG AGGCAGCGGA

1801 GGTGGTGGAT CTGGTGGCGG AGGAAGTGGC GGCGGAGGCT CTCAGAGCGT GCTGACCCAG

1861 CCCCCTTCTG TGTCTGCCGC CCCTGGCCAG AAAGTGACCA TCTCCTGCAG CGGCAGCAGC

1921 AGCAACATCG GCAACAACTA CGTGTCCTGG TATCAGCAGC TGCCCGGCAC CGCCCCTAAG

1981 CTGCTGATCT ACGACAACAA CAAGCGGCCC AGCGGCATCC CCGACCGGTT TAGCGGCAGC

2041 AAGAGCGGGA CTTCTGCTAC ACTGGGCATC ACAGGCCTGC AGACCGGCGA CGAGGCCGAC

2101 TACTACTGCG GCACCTGGGA CAGCAGCCTG AGCGCTTGGG TGTTCGGCTG CGGCACCAAG

[0313] 2161 CTGACAGTGC TG

[0314] SEQ ID NO:24-NGF-NG VH氨基酸序列

[0315] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFWFGAFTWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGLTNLAQNFQGRVTITADESTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0316] SEQ ID NO:25-NGF-NG VH核苷酸序列

caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctctggagg caccttctgg ttcggcgcgt tcacctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag gacttgagtg gatgggaggg attattccta tcttcgggtt gacgaacttg 180

[0317] gcacagaact tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagtctac 240

atggagctga gcagcttgag atctgaagac acggccgtat attattgtgc acgttcaagt 300

cgtatctacg atctgaaccc gtccctgacc gcctactacg atatggatgt ctggggccag 360

gggacaatgg tcaccgtctc gagt 384

[0318] SEQ ID NO:26-NGF-NG VL氨基酸序列

[0319] QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0320] SEQ ID NO:27-NGF-NG VL核苷酸序列

cagtctgtgc tgactcagcc gccatcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60

tcctgctctg gaagcagctc cgacattggg aataattatg tatcgtggta ccagcagctc 120

ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180

[0321] gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240

actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgcttgggtg 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

[0322] SEQ ID NO:28-ndimab VH氨基酸序列

1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFIFS SYAMHWVRQA PGNGLEWVAF MSYDGSNKKY

[0323]

61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDR GISAGGNYYY YGMDVWGQGT

[0324] 121 TVTVSS

[0325] SEQ ID NO:29-ndimab VL氨基酸序列

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVY SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRAIGIPA

[0326]

61 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPFTFG PGTKVDIK

[0327] SEQ ID NO:30-1126F1VH氨基酸序列

[0328] EVQLVQTGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVTITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDANRQAVPYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0329] SEQ ID NO:31-1126F1VL氨基酸序列

[0330] QAVLTQPSSVSTPPGQMVTISCSGSSSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0331] SEQ ID NO:32-1126G5VH氨基酸序列

[0332] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFTSGLAPYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0333] SEQ ID NO:33-1126G5VL氨基酸序列

[0334] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPPGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSTWVFGGGTKLTVL

[0335] SEQ ID NO:34-1126H5VH氨基酸序列

[0336] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDAGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAHMEVSSLRSEDTAVYYCASSSRIYDHHIQKGGYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0337] SEQ ID NO:35-1126H5VL氨基酸序列

[0338] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0339] SEQ ID NO:36-1127D9VH氨基酸序列

[0340] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDYHTIAYYD

[0341] SEQ ID NO:37-1127D9VL氨基酸序列

[0342] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0343] SEQ ID NO:38-1127F9VH氨基酸序列

[0344] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMKVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDYIPGMRPYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0345] SEQ ID NO:39-1127F9VL氨基酸序列

[0346] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGNSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSRSG TLATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0347] SEQ ID NO:40-1131D7VH氨基酸序列

[0348] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFNSSLIAYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0349] SEQ ID NO:41-1131D7VL氨基酸序列

[0350] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDETDYYCGTWDSSLSAWVFSGGTKLTVL

[0351] SEQ ID NO:42-1131H2VH氨基酸序列

[0352] EVQLVQSGAEVKKPGSTVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0353] SEQ ID NO:43-1131H2VL氨基酸序列

[0354] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGTSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0355] SEQ ID NO:44-132A9VH氨基酸序列

[0356] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFGTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFEPSLIYYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0357] SEQ ID NO:45-132A9VL氨基酸序列

[0358] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0359] SEQ ID NO:46-1132H9VH氨基酸序列

[0360] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0361] SEQ ID NO:47-1132H9VL氨基酸序列

[0362] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPTGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0363] SEQ ID NO:48-1133C11VH氨基酸序列

[0364] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0365] SEQ ID NO:49-1133C11VL氨基酸序列

[0366] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0367] SEQ ID NO:50-1134D9VH氨基酸序列

[0368] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVA ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0369] SEQ ID NO:51-1134D9VL氨基酸序列

[0370] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSGLSAWVFGGGTKLTVL

[0371] SEQ ID NO:52-1145D1VH氨基酸序列

[0372] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTSNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFRTLYSTYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0373] SEQ ID NO:53-1145D1VL氨基酸序列

[0374] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGISDRFSGSKSG TSATLGIAGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0375] SEQ ID NO:54-1146D7VH氨基酸序列

[0376] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0377] SEQ ID NO:55-1146D7VL氨基酸序列

[0378] QAVLTQPSSVSTPPGQEVTISCSGSSTNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0379] SEQ ID NO:56-1147D2VH氨基酸序列

[0380] EVQLVQSGAEVKKPGSSVRISCKASGGTFSTYGVSWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0381] SEQ ID NO:57-1147D2VL氨基酸序列

[0382] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0383] SEQ ID NO:58-1147G9VH氨基酸序列

[0384] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSAYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFNTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMVTV

[0385] SEQ ID NO:59-1147G9VL氨基酸序列

[0386] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTVSCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0387] SEQ ID NO:60-1150F1VH氨基酸序列

[0388] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQDRVT ITADESTSTAYMEVGSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGHGTMVTVSS

[0389] SEQ ID NO:61-1150F1VL氨基酸序列

[0390] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0391] SEQ ID NO:62-1152H5VH氨基酸序列

[0392] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLVWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDMISSLQPYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0393] SEQ ID NO:63-1152H5VL氨基酸序列

[0394] QAVLTQPSSVSTPPGQKATISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0395] SEQ ID NO:64-1155H1VH氨基酸序列

[0396] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFHLANKGYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0397] SEQ ID NO:65-1155H1VL氨基酸序列

[0398] QAVLTQPSSVSTPPGQKATISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLDITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0399] SEQ ID NO:66-1158A1VH氨基酸序列

[0400] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFGTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDHHNHVGGYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0401] SEQ ID NO:67-1158A1VL氨基酸序列

[0402] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYASWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDGSLSAWVFGGGTKLTVL

[0403] SEQ ID NO:68-1160E3VH氨基酸序列

[0404] EVQLVQSGAEVKKPGSSAKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0405] SEQ ID NO:69-1160E3VL氨基酸序列

[0406] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSNSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTV

[0407] SEQ ID NO:70-1165D4VH氨基酸序列

[0408] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0409] SEQ ID NO:71-1165D4VL氨基酸序列

[0410] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIENNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0411] SEQ ID NO:72-1175H8VH氨基酸序列

[0412] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQRLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDATTGLTPYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0413] SEQ ID NO:73-1175H8VL氨基酸序列

[0414] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLRTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0415] SEQ ID NO:74-1211G10VH氨基酸序列

[0416] EVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSCKAYGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWVGGIIPIFDTRNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDMVSTLIPYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0417] SEQ ID NO:75-1211G10VL氨基酸序列

[0418] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0419] SEQ ID NO:76-1214A1VH氨基酸序列

[0420] EVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDAHLQAYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0421] SEQ ID NO:77-1214A1VL氨基酸序列

[0422] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPPGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTRDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0423] SEQ ID NO:78-1214D10VH氨基酸序列

[0424] EVQLVQSGAEAKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGRGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVA ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDAHLNHHGYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0425] SEQ ID NO:79-1214D10VL氨基酸序列

[0426] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQAGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0427] SEQ ID NO:80-1218H5VH氨基酸序列

[0428] EVQLVQSGAVVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGSSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDLNPSLTAYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0429] SEQ ID NO:81-1218H5VL氨基酸序列

[0430] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNTGNNYVSWYQQLSGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL

[0431] SEQ ID NO:82-1230H7VH氨基酸序列

[0432] EMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWIGGIIPIFDTGNSAQSFQGRVT ITADESTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCASSSRIYDFNSALISYYDMDVWGQGTMVTVSS

[0433] SEQ ID NO:83-1230H7VL氨基酸序列

[0434] QAVLTQPSSVSTPPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTV

[0435] SEQ ID NO:84-1083H4VH氨基酸序列

[0436] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFAYHYLHWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTTNYAQRFQDRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASADYVWGSYRPDWYFDLWGRGTMVTVSS

[0437] SEQ ID NO:85-1083H4VL氨基酸序列

[0438] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQRLPGAAPQLLIYNNDQRPSGIPDRFSGSKSGTSGSLVISGLQSEDEADYYCASWDDSLNGRVFGGGTKLTVL

[0439] SEQ ID NO:86-1227H8VH氨基酸序列

[0440] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGHTFAYHYLHWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTTNYAQRFQDRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASADYAWESYQPPQINGVWGRGTMVTVSS

[0441] SEQ ID NO:87-1227H8VL氨基酸序列

[0442] QSVLTQPPSVSAAPGQKVTITCSGSTSNIGNNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSEFFFGTGTKLTVL

[0443] SEQ ID NO:88-NGF-NG HCDR1

[0444] FGAFT

[0445] SEQ ID NO:89-NGF-NG HCDR2

[0446] GIIPIFGLTNLAQNFQG

[0447] SEQ ID NO:90-NGF-NG HCDR3

[0448] SSRIYDLNPSLTAYYDMDV

[0449] SEQ ID NO:91-NGF-NG LCDR1

[0450] SGSSSDIGNNYVS

[0451] SEQ ID NO:92-NGF-NG LCDR2

[0452] DNNKRPS

[0453] SEQ ID NO:93-NGF-NG LCDR3

[0454] GTWDSSLSAWV

[0455] SEQ ID NO:94-MEDI-578VH氨基酸序列,具有G->C

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS TYGISWVRQA PGQCLEWMGG IIPIFDTGNS

[0456] AQSFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSS RIYDLNPSLT AYYDMDVWGQ

GTMVTVSS

[0457] SEQ ID NO:95-MEDI-578VL氨基酸序列,具有G->C

QSVLTQPPSV SAAPGQKVTI SCSGSSSNIG NNYVSWYQQL PGTAPKLLIY DNNKRPSGIP

[0458]

DRFSGSKSGT SATLGITGLQ TGDEADYYCG TWDSSLSAWV FGCGTKLTVL

[0459] SEQ ID NO:96-1230D8VH氨基酸序列

[0460] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFPYHYLHWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTTNYAQRFQDRVTITADESTSTAYMEFSSLRSEDTAVYYCASADYVWESYHPATSLSLWGRGTMVTVSS

[0461] SEQ ID NO:97-1230D8VL氨基酸序列

[0462] QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCPGSTSNIGNNYVSWYQQRPGKAPKLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLDISELQSEDEADYYCAAWDDSLSEFLFGTGTKLTVL

[0463] SEQ ID NO:98

[0464] GGGGSGGGGS

[0465] SEQ ID NO:99-TNFR2-Fc_varB-密码子优化的核苷酸序列

[0466]
1 CTGCCCGCCC AGGTGGCCTT TACCCCTTAT GCTCCTGAGC CCGGCTCTAC CTGCCGGCTG

61 AGAGAGTACT ACGACCAGAC CGCCCAGATG TGCTGCTCCA AGTGCTCTCC TGGCCAGCAC

121 GCCAAGGTGT TCTGCACCAA GACCTCCGAT ACCGTGTGCG ACTCCTGCGA GGACTCCACC

181 TACACCCAGC TGTGGAACTG GGTGCCCGAG TGCCTGTCCT GCGGCTCCAG ATGTTCCTCC

241 GACCAGGTGG AAACCCAGGC CTGCACCAGA GAGCAGAACC GGATCTGCAC CTGTCGGCCT

301 GGCTGGTACT GCGCCCTGTC TAAGCAGGAA GGCTGCAGAC TGTGCGCCCC TCTGCGGAAG

361 TGTAGACCTG GCTTTGGCGT GGCCAGACCC GGCACCGAGA CATCTGATGT CGTGTGCAAG

421 CCTTGCGCCC CTGGCACCTT CTCCAACACC ACCTCCTCCA CCGACATCTG CCGGCCTCAC

481 CAGATCTGCA ACGTGGTGGC CATCCCTGGC AACGCCTCTA TGGACGCCGT GTGCACCTCT

541 ACCTCCCCCA CCAGAAGTAT GGCCCCTGGC GCTGTGCATC TGCCCCAGCC TGTGTCTACC

601 AGATCCCAGC ACACCCAGCC CACCCCTGAG CCTTCTACCG CCCCTTCTAC CAGCTTCCTG

661 CTGCCTATGG GCCCTAGCCC TCCTGCTGAG GGATCTACAG GCGACGAGCC CAAGTCCTGC

721 GACAAGACCC ACACCTGTCC CCCTTGTCCT GCCCCTGAAC TGCTGGGCGG ACCTTCCGTG

781 TTCCTGTTCC CCCCAAAGCC CAAGGACACC CTGATGATCA GCCGGACCCC TGAAGTGACC

841 TGCGTGGTGG TGGATGTGTC CCACGAGGAT CCCGAAGTGA AGTTCAATTG GTACGTGGAC

901 GGCGTGGAAG TGCACAACGC CAAGACCAAG CCCAGAGAGG AACAGTACAA CTCCACCTAC

961 CGGGTGGTGT CCGTGCTGAC CGTGCTGCAC CAGGATTGGC TGAACGGCAA AGAGTACAAG

[0467] 1021 TGCAAGGTGT CCAACAAGGC CCTGCCTGCC CCCATCGAAA AGACCATCTC CAAGGCCAAG

1081 GGCCAGCCCC GGGAACCCCA GGTGTACACA CTGCCCCCTA GCCGGGAAGA GATGACCAAG

1141 AACCAGGTGT CCCTGACCTG TCTCGTGAAG GGCTTCTACC CCTCCGATAT CGCCGTGGAA

1201 TGGGAGTCCA ACGGCCAGCC TGAGAACAAC TACAAGACCA CCCCCCCTGT GCTGGACTCC

1261 GACGGCTCAT TCTTCCTGTA CTCCAAGCTG ACAGTGGACA AGTCCCGGTG GCAGCAGGGC

1321 AACGTGTTCT CCTGCTCCGT GATGCACGAG GCCCTGCACA ACCACTACAC CCAGAAGTCC

1381 CTGTCCCTGA GCCCTGGAAA AGGCGGCGGA GGATCTGGCG GAGGCGGATC TCAGGTGCAG

1441 CTGGTGCAGT CTGGCGCTGA AGTGAAGAAA CCCGGCTCCT CCGTGAAGGT GTCCTGCAAG

1501 GCTTCTGGCG GCACCTTCTC TACCTACGGC ATCTCCTGGG TGCGACAGGC CCCTGGCCAG

1561 TGCCTGGAAT GGATGGGCGG CATCATCCCC ATCTTCGACA CCGGCAACTC CGCCCAGAGC

1621 TTCCAGGGCA GAGTGACCAT CACCGCCGAC GAGTCTACCT CCACCGCCTA CATGGAACTG

1681 TCCTCCCTGC GGAGCGAGGA CACCGCCGTG TACTACTGCG CCCGGTCCTC TCGGATCTAC

1741 GACCTGAACC CTTCCCTGAC CGCCTACTAC GACATGGACG TGTGGGGCCA GGGCACAATG

1801 GTCACCGTGT CATCTGGTGG TGGCGGCTCT GGTGGCGGAG GAAGTGGGGG AGGGGGTTCT

1861 GGGGGGGGAG GATCTCAGTC TGTGCTGACC CAGCCTCCTT CCGTGTCTGC TGCCCCAGGC

1921 CAGAAAGTGA CAATCTCCTG CAGCGGCTCC AGCTCCAACA TCGGCAACAA CTACGTGTCC

[0468]

```
1981  TGGTATCAGC AGCTGCCCGG CACCGCTCCC AAACTGCTGA TCTACGATAA CAACAAGCGG
2041  CCCTCCGGCA TCCCCGACAG ATTCTCCGGC TCTAAGTCCG GCACCTCTGC CACCCTGGGC
2101  ATCACCGGAC TGCAGACAGG CGACGAGGCC GACTACTACT GTGGCACCTG GGACTCCTCC
2161  CTGTCCGCTT GGGTGTTCGG CTGCGGCACC AAACTGACTG TGCTG
```

[0469] ***

[0470] 本发明的范围不受所描述的具体方面的限制，所述具体方面意为对本发明的个体方面的单个描述，并且功能上等同的任何组合或方法均在本发明范围内。实际上，对本文所显示和描述的内容所添加的本发明的多种修饰，对于本领域技术人员在本文的描述及所附的附图基础上会是显而易见的。此类修饰意欲落在所附权利要求书的范围内。

[0471] 本说明书中提及的所有出版物和专利申请在此通过提述并入本文，其公开程度相当于具体且单独地说明每个单独出版物或专利申请通过提述并入一样。

序列表

<110> 麦迪穆有限责任公司(MEDIMMUNE LIMITED)

<120> 用于治疗疼痛的化合物和方法
<130> 110421-0054-WO1

<140>
<141>

<150> 61/934,828
<151> 2014-02-02

<160> 99

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 241
<212> PRT
<213> 人

<400> 1
Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Phe Leu Ile Gly Ile
1 5 10 15

Gln Ala Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile
20 25 30

Pro Gln Ala His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu
35 40 45

[0001]

Arg Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val Ala
50 55 60

Gly Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg
65 70 75 80

Arg Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg Glu
85 90 95

Ala Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala Pro
100 105 110

Phe Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Ser His Pro Ile Phe
115 120 125

His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly
130 135 140

Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu
145 150 155 160

Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu
165 170 175

Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile
180 185 190

Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val
195 200 205

Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg
210 215 220

Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg
225 230 235 240

Ala

<210> 2
<211> 233
<212> PRT
<213> 人

<400> 2
Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
1 5 10 15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
35 40 45

[0002]

Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
50 55 60

Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
65 70 75 80

Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
85 90 95

Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
100 105 110

Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
115 120 125

Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
130 135 140

Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
145 150 155 160

Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
165 170 175

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu

180 185 190

Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
195 200 205

Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
210 215 220

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
225 230

<210> 3
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列描述：合成多肽"

<400> 3
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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0003] 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala 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 Arg Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列描述：合成肽"

<400> 4
Thr Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成肽”

<400> 5
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成肽”

<400> 6
Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr Tyr Asp
1 5 10 15

Met Asp Val

[0004]

<210> 7
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 7
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu

85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成肽”

<400> 8
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成肽”

<400> 9
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

[0005]

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成肽”

<400> 10
Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Val
1 5 10

<210> 11
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成肽”

<400> 11
Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Phe Asn Ser Ala Leu Ile Ser Tyr Tyr Asp
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 12
<211> 19

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成肽”

<400> 12
Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Met Ile Ser Ser Leu Gln Pro Tyr Tyr Asp
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 13
<211> 467
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 13
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

[0006]

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 Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

[0007]

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 14
<211> 731
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列描述：合成多肽"

<400> 14
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

[0008]

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 Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

[0009] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
465 470 475 480

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys
485 490 495

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr Gly Ile Ser
500 505 510

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile
515 520 525

Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe Gln Gly Arg
530 535 540

Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
545 550 555 560

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser
565 570 575

Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr Tyr Asp Met
580 585 590

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
595 600 605

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Ser Val
610 615 620

[0010]

Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr
625 630 635 640

Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
645 650 655

Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp
660 665 670

Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys
675 680 685

Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp
690 695 700

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp
705 710 715 720

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
725 730

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

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成肽”

<400> 15
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 16
<211> 2193
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多核苷酸”

<400> 16
ctgcccgccc aggtggcctt taccccttat gcccccgagc ccggcagcac ctgtcggctg 60

agagagtact acgaccagac cgcccagatg tgctgcagca agtgctctcc tggccagcat 120

gccaaggtgt tctgcaccaa gaccagcgac accgtgtgcg acagctgcga ggacagcacc 180

tacacccagc tgtggaactg ggtgcccgag tgcctgagct gcggcagcag atgcagcagc 240

gaccaggtgg aaacccaggc ctgcaccaga gagcagaacc ggatctgcac ctgtagaccc 300

ggctggtact gcgccctgag caagcaggaa ggctgcagac tctgcgcccc tctgcggaag 360

tgcagacccg gctttggcgt ggccagaccc ggcaccgaga caagcgacgt ggtctgtaag 420

[0011] ccctgcgctc ctggcacctt cagcaacacc accagcagca ccgacatctg cagaccccac 480

cagatctgca acgtggtggc catccccggc aacgccagca tggatgccgt ctgcaccagc 540

actagcccca ccagaagtat ggcccctggc gccgtgcatc tgccccagcc tgtgtccacc 600

agaagccagc acacccagcc caccccctgag cctagcaccg ccccctccac cagctttctg 660

ctgcctatgg gccctagccc tccagccgag ggaagcacag gcgacgagcc caagagctgc 720

gacaagaccc acacctgtcc ccctgccct gccccctgaac tgctgggcgg acccagcgtg 780

ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 840

tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac 900

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa ctccacctac 960

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 1020

tgcaaggtct ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 1080

ggccagcccc gcgagcctca ggtgtacaca ctgccccccа gccgggaaga gatgaccaag 1140

aaccaggtgt ccctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 1200

tgggagagca atggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggacagc 1260

gacggctcat tcttcctgta cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 1320

aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1380

ctgagcctga gccccggaaa gggcggtggc ggatccggag gtgggggatc tcaggtgcag 1440

ctggtgcagt ctggcgccga agtgaagaaa cccggctcta gcgtgaaggt gtcctgcaag 1500

gccagcggcg gcaccttctc cacctacggc atcagctggg tccgccaggc ccctggacag 1560

ggcctggaat ggatgggcgg catcatcccc atcttcgaca ccggcaacag cgcccagagc 1620

ttccagggca gagtgaccat caccgccgac gagagcacct ccaccgccta catggaactg 1680

agcagcctgc ggagcgagga caccgccgtg tactactgcg ccagaagcag ccggatctac 1740

gacctgaacc ccagcctgac cgcctactac gacatggacg tgtggggcca gggcaccatg 1800

gtcacagtgt ctagcggagg cggcggatct ggcggcggag gaagtggcgg gggaggatct 1860

gcccagagcg tgctgaccca gcccccttct gtgtctgccg ccctggccca gaaagtgacc 1920

atctcctgca gcggcagcag cagcaacatc ggcaacaact acgtgtcctg gtatcagcag 1980

ctgcccggca ccgccctaa gctgctgatc tacgacaaca acaagcggcc cagcggcatc 2040

cccgaccggt ttagcggcag caagagcggg acttctgcta cactgggcat cacaggcctg 2100

cagaccggcg acgaggccga ctactactgc ggcacctggg acagcagcct gagcgcttgg 2160

gtgttcggcg gaggcaccaa gctgacagtg ctg 2193

<210> 17
<211> 735
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

[0012] <400> 17

```
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 Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

[0013] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
465 470 475 480

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys
485 490 495

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr Gly Ile Ser
500 505 510

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile
515 520 525

Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe Gln Gly Arg
530 535 540

[0014]

Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
545 550 555 560

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser
565 570 575

Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr Tyr Asp Met
580 585 590

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
595 600 605

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
610 615 620

Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly
625 630 635 640

Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn
645 650 655

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
660 665 670

Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
675 680 685

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu
690 695 700

Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser
705 710 715 720

Leu Ser Ala Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
725 730 735

<210> 18
<211> 2205
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多核苷酸”

<400> 18
ctgcccgccc aggtggcctt taccccttat gccccgagc ccggcagcac ctgtcggctg 60

agagagtacc acgaccagac cgcccagatg tgctgcagca agtgctctcc tggccagcat 120

gccaaggtgt tctgcaccaa gaccagcgac accgtgtgcg acagctgcga ggacagcacc 180

tacacccagc tgtggaactg ggtgcccgag tgcctgagct gcggcagcag atgcagcagc 240

gaccaggtgg aaacccaggc ctgcaccaga gagcagaacc ggatctgcac ctgtagaccc 300

ggctggtact gcgccctgag caagcaggaa ggctgcagac tctgcgcccc tctgcggaag 360

[0015] tgcagacccg gctttggcgt ggccagaccc ggcaccgaga caagcgacgt ggtctgcaag 420

ccctgcgctc ctggcacctt cagcaacacc accagcagca ccgacatctg cagaccccac 480

cagatctgca acgtggtggc catccccggc aacgccagca tggatgccgt gtgcaccagc 540

accagcccca ccagaagtat ggcccctggc gccgtgcatc tgccccagcc tgtgtccacc 600

agaagccagc acacccagcc cacccctgag cctagcaccg ccccctccac cagctttctg 660

ctgcctatgg gccctagccc tccagccgag ggaagcacag gcgacgagcc caagagctgc 720

gacaagaccc acacctgtcc ccctgccct gccctgaac tgctgggcgg acccagcgtg 780

ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaagtgacc 840

tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac 900

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa ctccacctac 960

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 1020

tgcaaagtct ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 1080

ggccagcccc gcgagcctca ggtgtacaca ctgccccca gccgggaaga gatgaccaag 1140

aaccaggtgt ccctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggaa 1200

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggacagc 1260

gacggctcat tcttcctgta cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 1320

aatgtcttca gctgtagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1380

ctgagcctga gccccggaaa gggcggaggc ggatccggag gtgggggatc tcaggtgcag 1440

ctggtgcagt ctggcgccga agtgaagaaa cccggctcta gcgtgaaggt gtcctgcaag 1500

gccagcggcg gcaccttctc cacctacggc atcagctggg tccgccaggc ccctggacag 1560

tgtctggaat ggatgggcgg catcatcccc atcttcgaca ccggcaacag cgcccagagc 1620

ttccagggca gagtgaccat caccgccgac gagagcacct ccaccgccta catggaactg 1680

agcagcctgc ggagcgagga caccgccgtg tactactgcg ccagaagcag ccggatctac 1740

gacctgaacc ccagcctgac cgcctactac gacatggacg tgtggggcca gggcaccatg 1800

gtcacagtgt ctagcggagg cggaggcagc ggaggtggtg gatctggtgg cggaggaagt 1860

ggcggcggag gctctcagag cgtgctgacc cagccccctt ctgtgtctgc cgcccctggc 1920

cagaaagtga ccatctcctg cagcggcagc agcagcaaca tcggcaacaa ctacgtgtcc 1980

tggtatcagc agctgcccgg caccgccccc aagctgctga tctacgacaa caacaagcgg 2040

cccagcggca tccccgaccg gtttagcggc agcaagagcg ggacttctgc tacactgggc 2100

atcacaggcc tgcagaccgg cgacgaggcc gactactact gcggcacctg ggacagcagc 2160

ctgagcgctt gggtgttcgg ctgcggcacc aagctgacag tgctg 2205

<210> 19
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
[0016] <223> /注释=“人工序列描述：合成肽”

<400> 19
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> 20
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 20
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 Ile 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 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

[0017]

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> 21
<211> 645
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多核苷酸”

<400> 21
gaaatcgtgc tgacccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60

ctgagctgca gagccagcca gagcgtgtac tcctacctgg cttggtatca gcagaagccc 120

ggccaggccc ccagactgct gatctacgac gccagcaacc gggccatcgg catccctgcc 180

agattttctg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctggaaccc 240

gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cggagcaact ggccccccct caccttcggc 300

cctggcacca aggtggacat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 22
<211> 724
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列描述：合成多肽"

<400> 22
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

[0018] 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 Ser 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 Arg 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
```

[0019]

```
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met 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                 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
                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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    450                 455                 460

Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
465                 470                 475                 480

Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser
```

485 490 495

Thr Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu
500 505 510

Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln
515 520 525

Ser Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr
530 535 540

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
545 550 555 560

Tyr Cys Ala Arg Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr
565 570 575

Ala Tyr Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
580 585 590

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
595 600 605

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
610 615 620

[0020]

Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser
625 630 635 640

Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly
645 650 655

Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly
660 665 670

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu
675 680 685

Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
690 695 700

Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys
705 710 715 720

Leu Thr Val Leu

<210> 23
<211> 2172
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多核苷酸”

<400> 23

caggtgcagc tggtggaaag cggcggaggc gtggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60

agctgcgctg ccagcggctt catcttcagc agctacgcca tgcactgggt ccgccaggcc 120

cctggcaacg gactggaatg ggtggccttc atgagctacg acggcagcaa caagaagtac 180

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggctgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagaccga 300

ggcatcagtg ctggcggcaa ctactactac tacggcatgg acgtgtgggg ccagggcacc 360

accgtgaccg tgtctagcgc gtcgaccaag ggcccatccg tcttccccct ggcaccctcc 420

tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc 480

gaaccggtga cggtgtcctg gaactcaggc gctctgacca gcggcgtgca caccttcccg 540

gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc 600

agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg 660

gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 720

cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 780

atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 840

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 900

[0021] cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 960

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 1020

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt ctacaccctg 1080

cccccatccc gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1140

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1200

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctatag caagctcacc 1260

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1320

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaagg cggagggga 1380

tccggcggag ggggctctca ggtgcagctg gtgcagtctg gcgccgaagt gaagaaaccc 1440

ggctctagcg tgaaggtgtc ctgcaaggcc agcggcggca ccttctccac ctacggcatc 1500

agctgggtcc gccaggcccc tggacagtgt ctggaatgga tgggcggcat catccccatc 1560

ttcgacaccg gcaacagcgc ccagagcttc cagggcagag tgaccatcac cgccgacgag 1620

agcacctcca ccgcctacat ggaactgagc agcctgcgga gcgaggacac cgccgtgtac 1680

tactgcgcca gaagcagccg gatctacgac ctgaacccca gcctgaccgc ctactacgac 1740

atggacgtgt ggggccaggg caccatggtc acagtgtcta gcggaggcgg aggcagcgga 1800

ggtggtggat ctggtggcgg aggaagtggc ggcggaggct ctcagagcgt gctgacccag 1860

ccccctctg tgtctgccgc ccctggccag aaagtgacca tctcctgcag cggcagcagc 1920

agcaacatcg gcaacaacta cgtgtcctgg tatcagcagc tgcccggcac cgccccctaag 1980

ctgctgatct acgacaacaa caagcggccc agcggcatcc ccgaccggtt tagcggcagc 2040

aagagcggga cttctgctac actgggcatc acaggcctgc agaccggcga cgaggccgac 2100

tactactgcg gcacctggga cagcagcctg agcgcttggg tgttcggctg cggcaccaag 2160

ctgacagtgc tg 2172

<210> 24
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 24
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 Gly Thr Phe Trp Phe Gly
20 25 30

Ala Phe Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Leu Thr Asn Leu Ala Gln Asn Phe
50 55 60

[0022]

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val 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 Arg Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 25
<211> 384
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多核苷酸”

<400> 25
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctctggagg caccttctgg ttcggcgcgt tcacctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag gacttgagtg gatgggaggg attattccta tcttcgggtt gacgaacttg 180

gcacagaact tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagtctac 240

atggagctga gcagcttgag atctgaagac acggccgtat attattgtgc acgttcaagt 300

cgtatctacg atctgaaccc gtccctgacc gcctactacg atatggatgt ctggggccag 360

gggacaatgg tcaccgtctc gagt 384

<210> 26
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 26
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asp Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

[0023]

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 27
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多核苷酸”

<400> 27
cagtctgtgc tgactcagcc gccatcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60

tcctgctctg gaagcagctc cgacattggg aataattatg tatcgtggta ccagcagctc 120

ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240

actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgcttgggtg 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 28
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 28
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

[0024] Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ser 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> 29
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 29
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 Ile 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> 30
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 30
Glu Val Gln Leu Val Gln Thr Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

[0025]

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Ala Asn Arg Gln Ala Val Pro Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 31
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 31
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Met Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asp Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 32
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

[0026]

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Phe Thr Ser Gly Leu Ala Pro Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 33
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 33
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

[0027]

<210> 34
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 34
Glu 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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Ala Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala His
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp His His Ile Gln Lys Gly Gly Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 35
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 35
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

[0028]

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 36
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 36
Glu 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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

```
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Tyr His Thr Ile Ala Tyr Tyr Asp
            100                 105                 110
```

<210> 37
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 37

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
            20                  25                  30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45
```

[0029]

```
Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65                  70                  75                  80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
                85                  90                  95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105                 110
```

<210> 38
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 38

```
Glu 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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
            20                  25                  30
```

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Lys Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Tyr Ile Pro Gly Met Arg Pro Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 39
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 39
[0030] Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Asn Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Leu Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 40
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源

<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 40
Glu 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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Phe Asn Ser Ser Leu Ile Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

[0031]

<210> 41
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 41
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Thr Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Ser Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 42
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述: 合成多肽”

<400> 42
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Thr Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

[0032] Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 43
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述: 合成多肽”

<400> 43
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 44
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 44
Glu 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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

[0033]
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Phe Glu Pro Ser Leu Ile Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 45
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 45
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 46
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

[0034] <400> 46
Glu 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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 47

<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 47
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asp Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[0035] 100 105 110

<210> 48
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 48
Glu 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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 49
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 49
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

[0036]

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 50
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 50
Glu 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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

```
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Ala Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
            100                 105                 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 51
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 51

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

[0037]

```
Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
            20                  25                  30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65                  70                  75                  80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Gly Leu
                85                  90                  95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105                 110
```

<210> 52
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 52

```
Glu 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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
            20                  25                  30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Ser Asn Ser Ala Gln Ser Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Phe Arg Thr Leu Tyr Ser Thr Tyr
            100                 105                 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

[0038]

<210> 53
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 53

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
            20                  25                  30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Ala Gly Leu Gln
65                  70                  75                  80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
                85                  90                  95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105                 110
```

<210> 54
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 54
Glu 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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0039]

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 55
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 55
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Glu Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Thr Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 56
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 56
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

[0040] Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 57
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 57
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 58
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 58
[0041] Glu 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 Gly Thr Phe Ser Ala Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asn Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
115 120 125

<210> 59
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 59
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Val Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

[0042]

<210> 60
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 60
Glu 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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr

100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly His Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 61
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 61
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

[0043]
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 62
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 62
Glu 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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Val Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Met Ile Ser Ser Leu Gln Pro Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 63
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 63
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Ala Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

[0044]

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 64
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 64
Glu 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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Phe His Leu Ala Asn Lys Gly Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 65
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

[0045]

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 65
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Ala Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Asp Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 66
<211> 128

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 66
Glu 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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp His His Asn His Val Gly Gly Tyr
100 105 110

[0046]

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 67
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 67
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Gly Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 68
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 68
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Ala Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

[0047]

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 69
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 69
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

```
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65                  70                  75                  80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
                85                  90                  95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
            100                 105
```

<210> 70
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

```
<400> 70
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1               5                   10                  15
```

[0048]

```
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
            20                  25                  30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
            100                 105                 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 71
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源

<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 71
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Glu Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

[0049]

<210> 72
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 72
Glu 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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Ala Thr Thr Gly Leu Thr Pro Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 73
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 73
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Arg
65 70 75 80

[0050] Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 74
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 74
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Tyr Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Arg Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Met Val Ser Thr Leu Ile Pro Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 75
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 75
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
[0051] 35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 76
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 76
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Ala His Leu Gln Ala Tyr Tyr Asp
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 77
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

[0052]

<400> 77
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Arg Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 78
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 78
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Ala Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Ala Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Ala His Leu Asn His His Gly Tyr
100 105 110

[0053] Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 79
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 79
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 80
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 80
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Val Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Ser Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

[0054]

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 81
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 81
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Thr Pro Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Thr Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Ser Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 82
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 82
Glu Met 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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

[0055]

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Phe Asn Ser Ala Leu Ile Ser Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 83
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 83

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
100 105

<210> 84
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

[0056]

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 84
Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Tyr His
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala 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 Ala Asp Tyr Val Trp Gly Ser Tyr Arg Pro Asp Trp Tyr Phe
100 105 110

Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 85
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 85
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Arg Leu Pro Gly Ala Ala Pro Gln Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

[0057]

Asn Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 86
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 86
Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Thr Phe Ala Tyr His
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala 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 Ala Asp Tyr Ala Trp Glu Ser Tyr Gln Pro Pro Gln Ile Asn
100 105 110

Gly Val Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 87
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 87
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met
35 40 45

[0058]

Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Asn Ser Ala Ser Leu Asp Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Glu Phe Phe Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 88
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成肽”

<400> 88
Phe Gly Ala Phe Thr
1 5

<210> 89
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成肽”

<400> 89
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Leu Thr Asn Leu Ala Gln Asn Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 90
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成肽”

<400> 90
Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr Tyr Asp
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 91
<211> 13
<212> PRT
[0059] <213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成肽”

<400> 91
Ser Gly Ser Ser Ser Asp Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成肽”

<400> 92
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 93
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成肽”

<400> 93

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Val
1 5 10

<210> 94
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述: 合成多肽”

<400> 94
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 Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Gly Asn Ser Ala Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

[0060] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Ser Arg Ile Tyr Asp Leu Asn Pro Ser Leu Thr Ala Tyr
100 105 110

Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 95
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述: 合成多肽”

<400> 95
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 96
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 96
Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Pro Tyr His
20 25 30

[0061]

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Phe Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ala Asp Tyr Val Trp Glu Ser Tyr His Pro Ala Thr Ser Leu
100 105 110

Ser Leu Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 97
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多肽”

<400> 97
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Pro Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met
35 40 45

Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Asn Ser Ala Ser Leu Asp Ile Ser Glu Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Glu Phe Leu Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 98
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成肽”

[0062] <400> 98
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 99
<211> 2205
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列描述：合成多核苷酸”

<400> 99
ctgcccgccc aggtggcctt taccccttat gctcctgagc ccggctctac ctgccggctg 60

agagagtact acgaccagac cgcccagatg tgctgctcca agtgctctcc tggccagcac 120

gccaaggtgt tctgcaccaa gacctccgat accgtgtgcg actcctgcga ggactccacc 180

tacacccagc tgtggaactg ggtgcccgag tgcctgtcct gcggctccag atgttcctcc 240

gaccaggtgg aaacccaggc ctgcaccaga gagcagaacc ggatctgcac ctgtcggcct 300

ggctggtact gcgccctgtc taagcaggaa ggctgcagac tgtgcgcccc tctgcggaag 360

tgtagacctg gctttggcgt ggccagaccc ggcaccgaga catctgatgt cgtgtgcaag 420

ccttgcgccc ctggcacctt ctccaacacc acctcctcca ccgacatctg ccggcctcac 480

cagatctgca acgtggtggc catccctggc aacgcctcta tggacgccgt gtgcacctct 540

acctcccccа ccagaagtat ggcccctggc gctgtgcatc tgccccagcc tgtgtctacc 600

agatcccagc acacccagcc cacccctgag ccttctaccg ccccttctac cagcttcctg 660

ctgcctatgg gccctagccc tcctgctgag ggatctacag gcgacgagcc caagtcctgc 720

gacaagaccc acacctgtcc cccttgtcct gcccctgaac tgctgggcgg accttccgtg 780

ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc tgaagtgacc 840

tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac 841

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa ctccacctac 960

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag 1020

tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaaa agaccatctc caaggccaag 1080

ggccagcccc gggaacccca ggtgtacaca ctgccccccta gccgggaaga gatgaccaag 1140

aaccaggtgt ccctgacctg tctcgtgaag ggcttctacc cctccgatat cgccgtggaa 1200

tgggagtcca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggactcc 1260

gacggctcat tcttcctgta ctccaagctg acagtggaca agtcccggtg gcagcagggc 1320

aacgtgttct cctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1380

[0063] ctgtccctga gccctggaaa aggcggcgga ggatctggcg gaggcggatc tcaggtgcag 1440

ctggtgcagt ctggcgctga agtgaagaaa cccggctcct ccgtgaaggt gtcctgcaag 1500

gcttctggcg gcaccttctc tacctacggc atctcctggg tgcgacaggc ccctggccag 1560

tgcctggaat ggatgggcgg catcatcccc atcttcgaca ccggcaactc cgcccagagc 1620

ttccagggca gagtgaccat caccgccgac gagtctacct ccaccgccta catggaactg 1680

tcctccctgc ggagcgagga caccgccgtg tactactgcg cccggtcctc tcggatctac 1740

gacctgaacc cttccctgac cgcctactac gacatggacg tgtggggcca gggcacaatg 1800

gtcaccgtgt catctggtgg tggcggctct ggtggcggag gaagtggggg agggggttct 1860

ggggggggag gatctcagtc tgtgctgacc cagcctcctt ccgtgtctgc tgccccaggc 1920

cagaaagtga caatctcctg cagcggctcc agctccaaca tcggcaacaa ctacgtgtcc 1980

tggtatcagc agctgcccgg caccgctccc aaactgctga tctacgataa caacaagcgg 2040

ccctccggca tccccgacag attctccggc tctaagtccg gcacctctgc caccctgggc 2100

atcaccggac tgcagacagg cgacgaggcc gactactact gtggcacctg ggactcctcc 2160

ctgtccgctt gggtgttcgg ctgcggcacc aaactgactg tgctg 2205

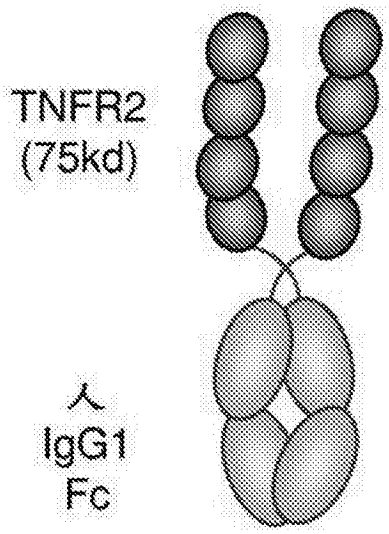


图1A

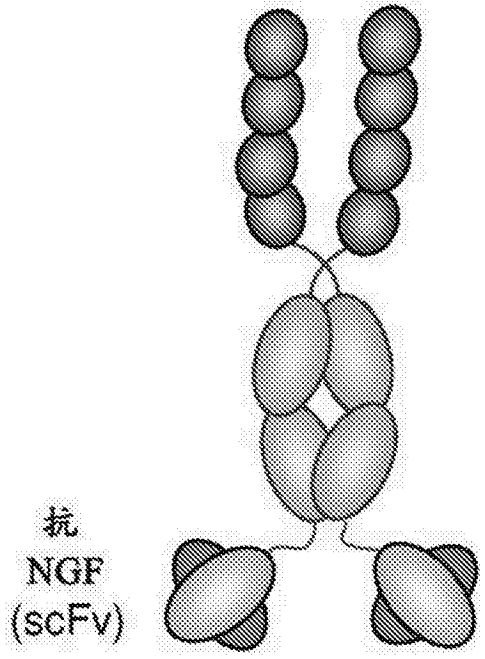


图1B

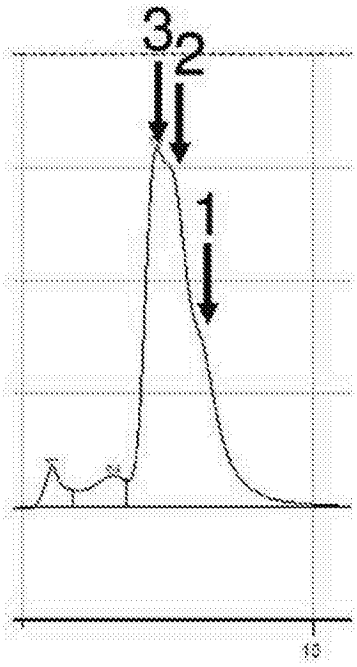


图2A

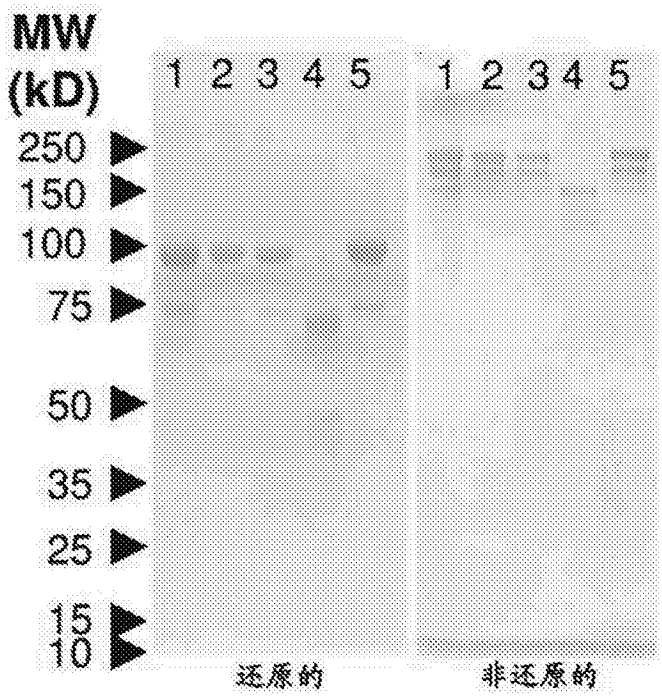


图2B

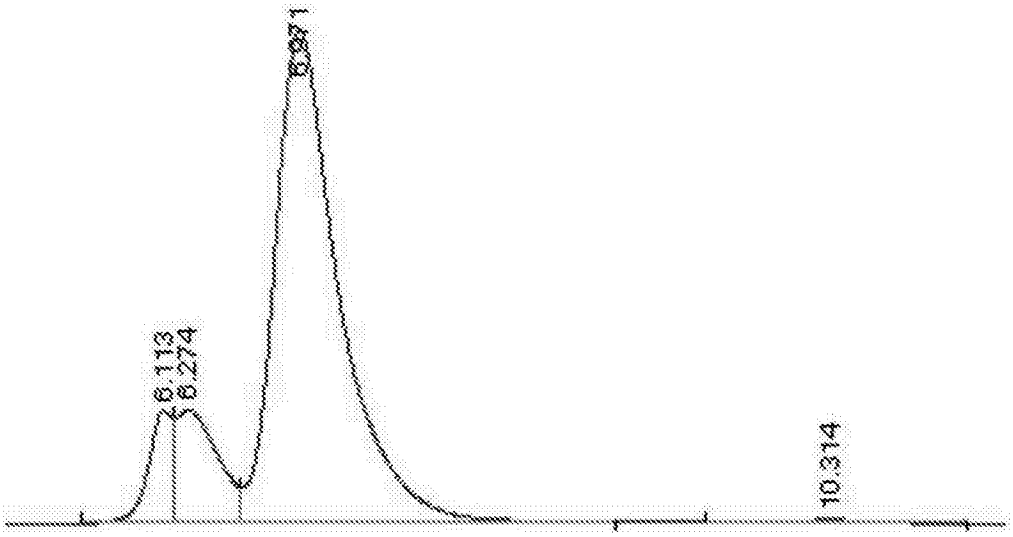


图3A

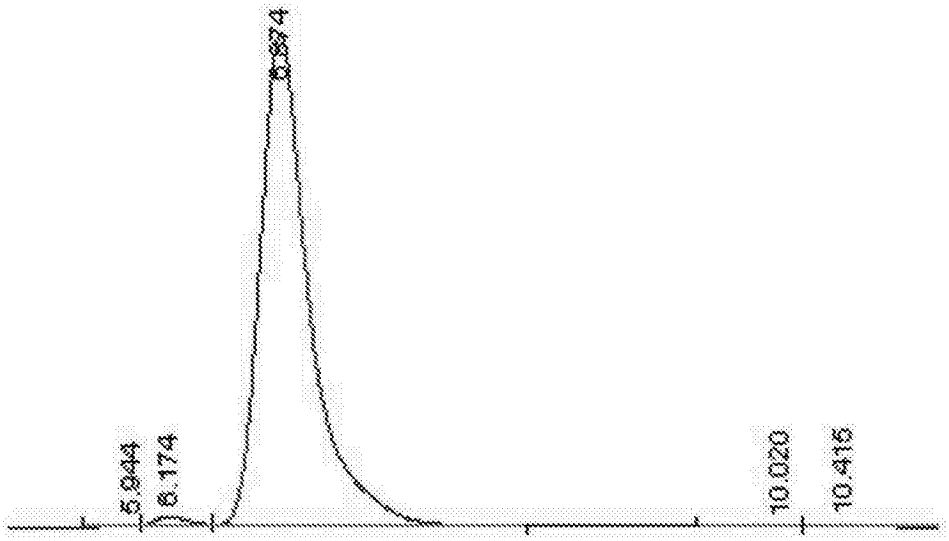


图3B

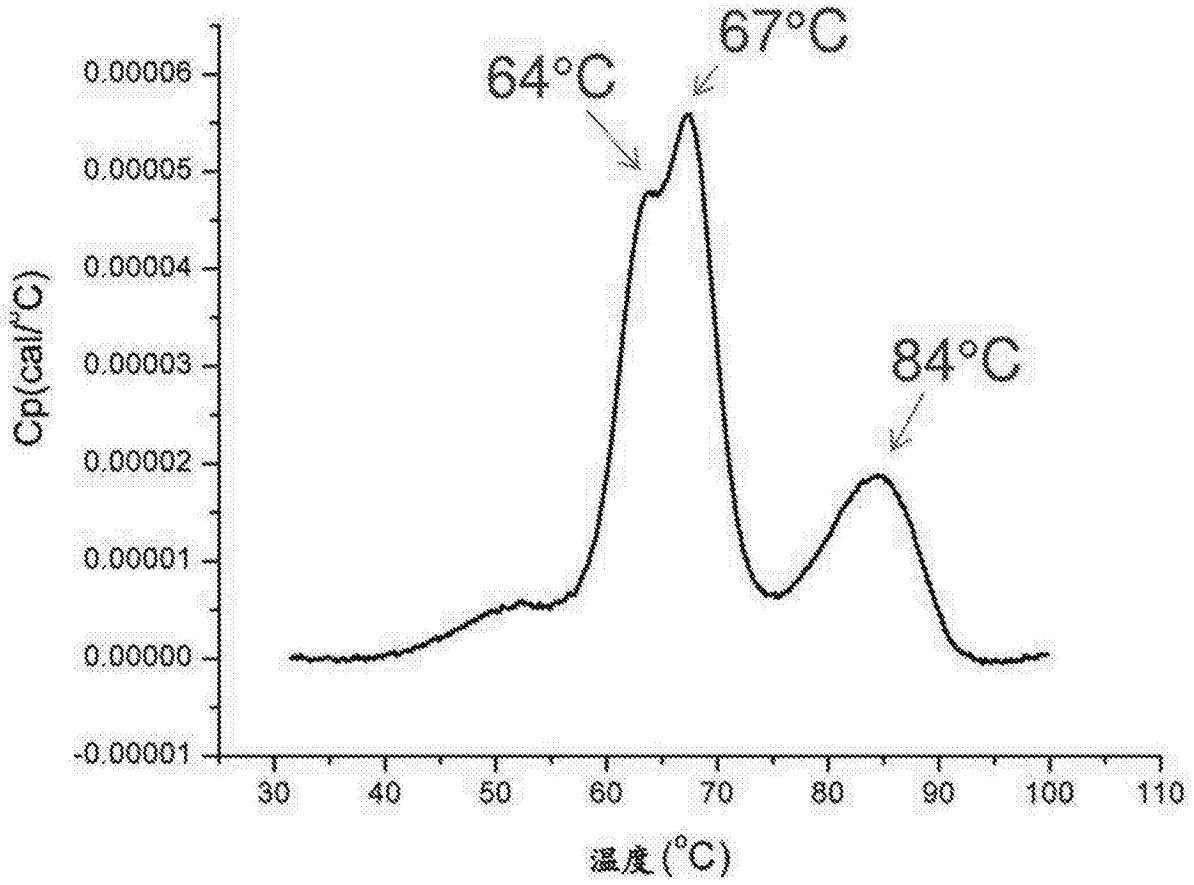

67°C
64°C
84°C
0.00006
0.00005
0.00004
0.00003
0.00002
0.00001
0.00000
-0.00001
Cp(cal/°C)
30
40
50
60
70
80
90
100
110
温度(°C)

图4

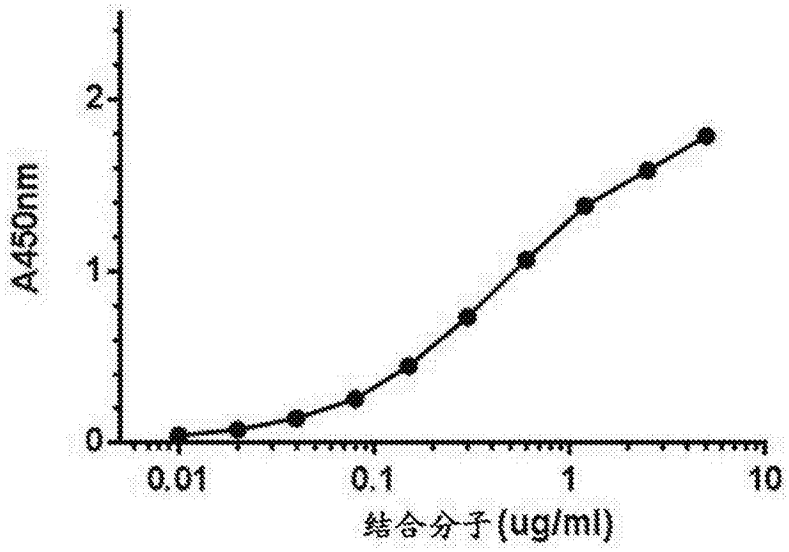

A450nm
2
1
0
0.01
0.1
1
10
结合分子(ug/ml)

图5A

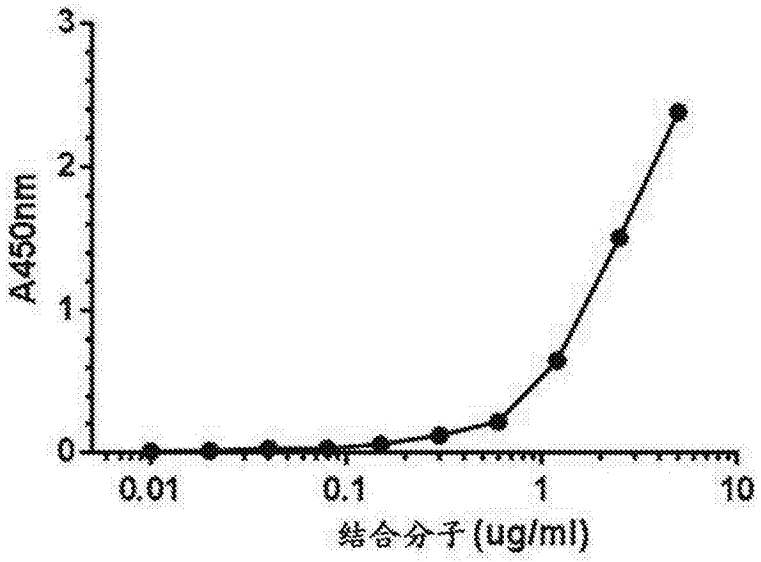

A450nm
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
结合分子(ug/ml)

图5B

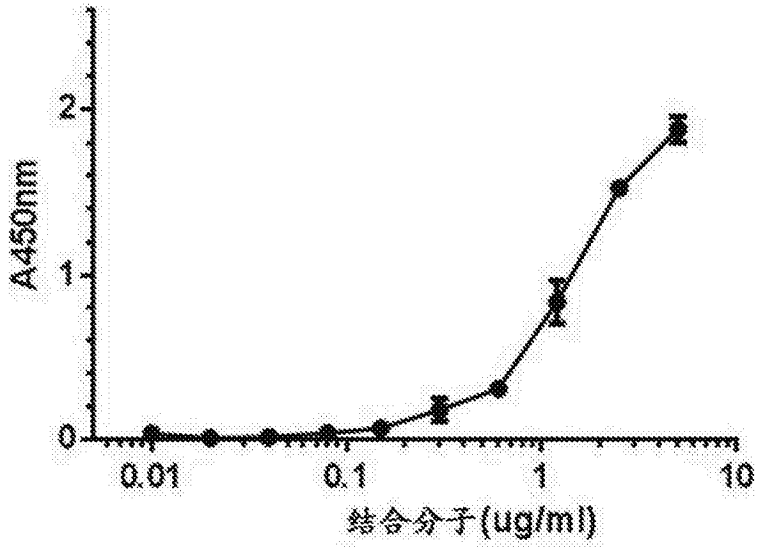

A450nm
2
1
0
0.01
0.1
1
10
结合分子(ug/ml)

图5C

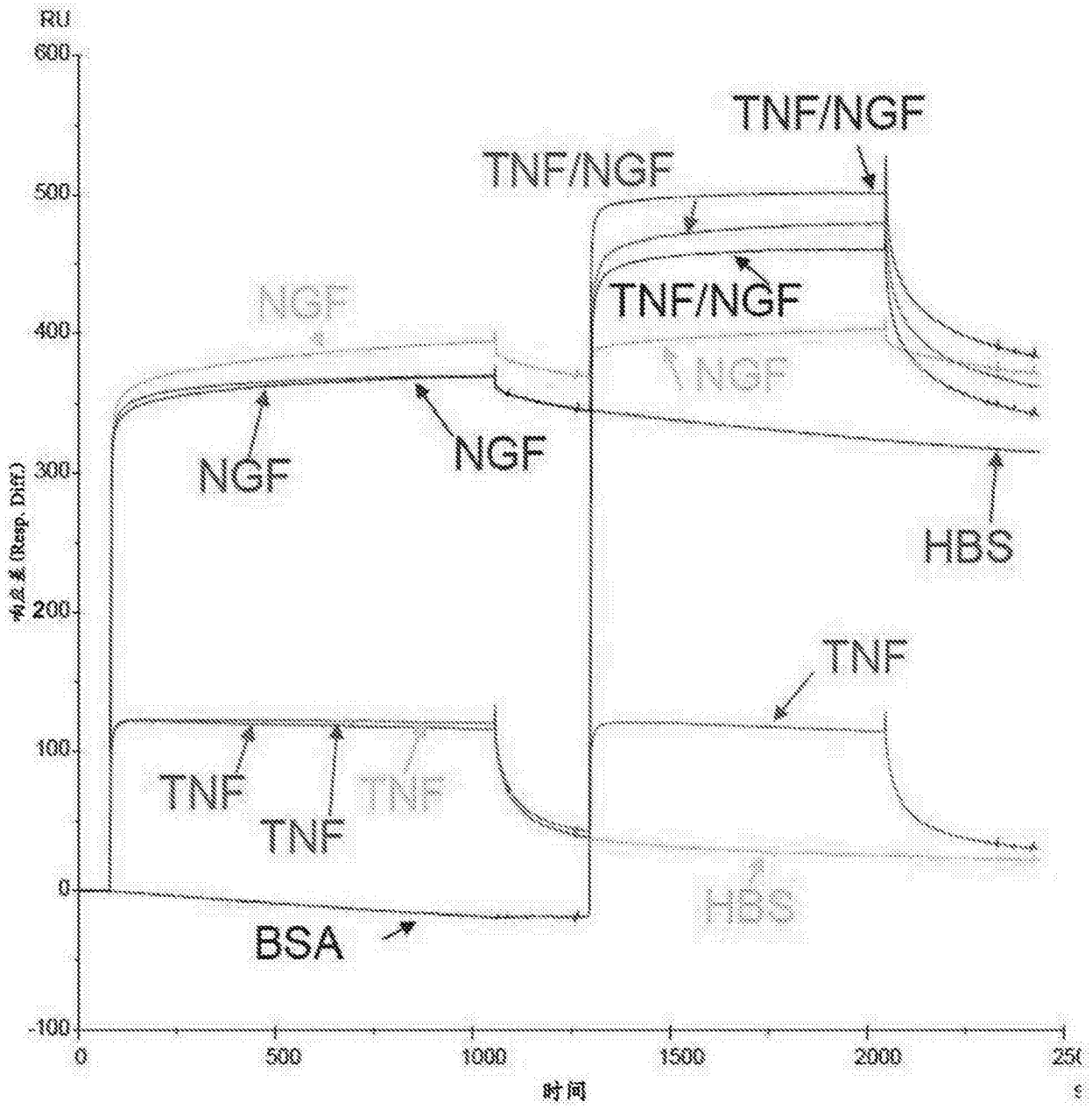

RU
600
500
400
300
200
100
0
-100
响应差 (Resp. Diff.)
0
500
1000
1500
2000
250
时间
s
TNF/NGF
TNF/NGF
TNF/NGF
NGF
NGF
NGF
NGF
HBS
TNF
TNF
TNF
TNF
TNF
HBS
BSA

图6

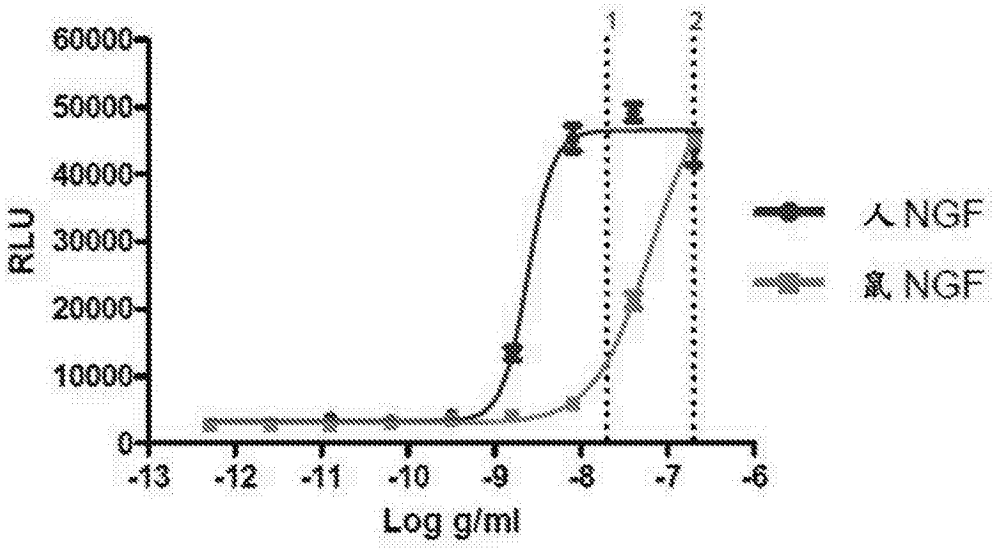

60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
RLU
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log g/ml
人NGF
鼠NGF

图7A

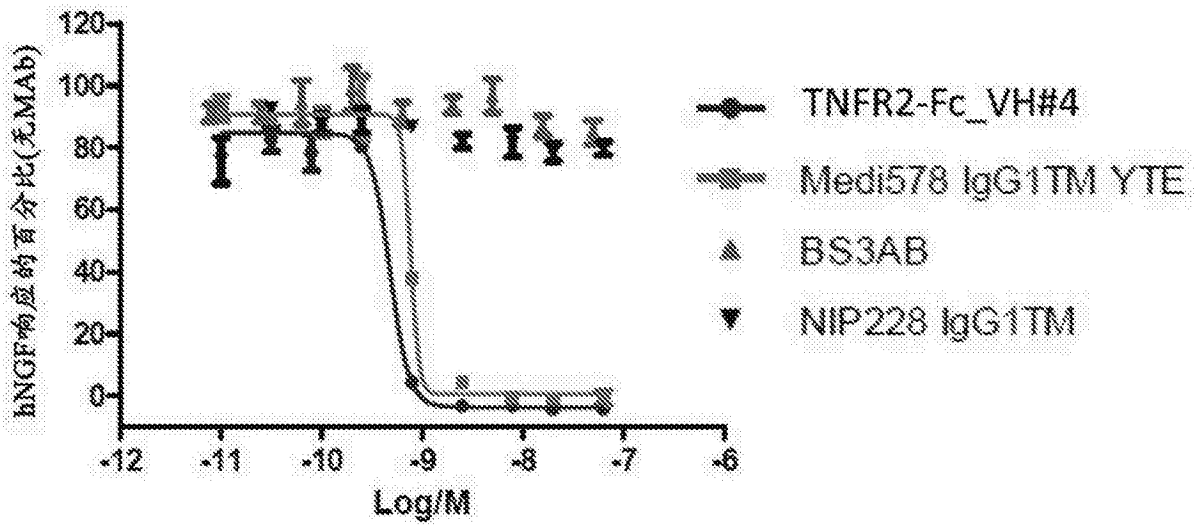

120
100
80
60
40
20
0
hNGF响应的百分比(无MAb)
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log/M
TNFR2-Fc_VH#4
Medi578 IgG1TM YTE
BS3AB
NIP228 IgG1TM

图7B

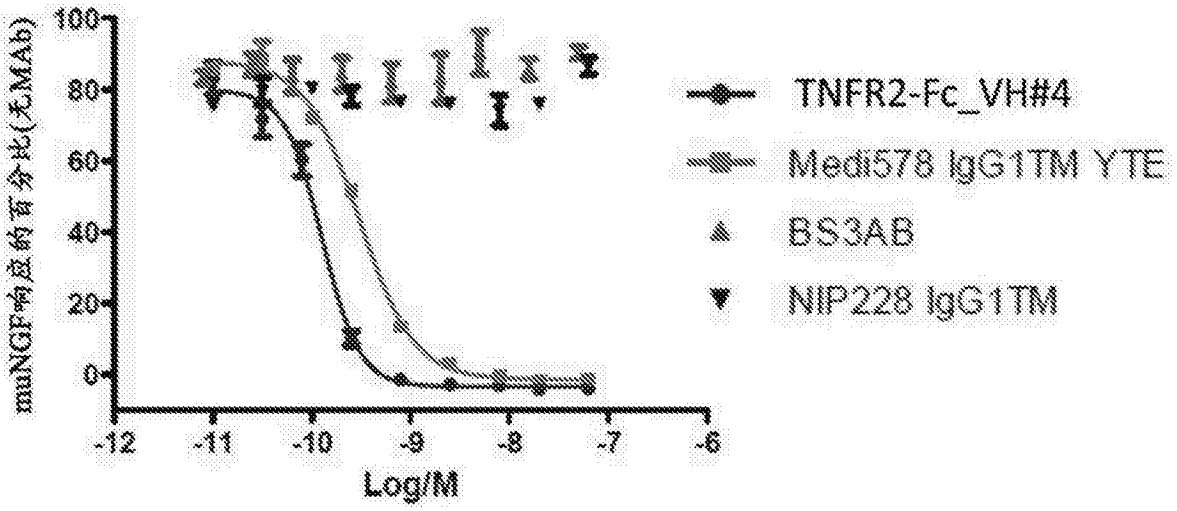
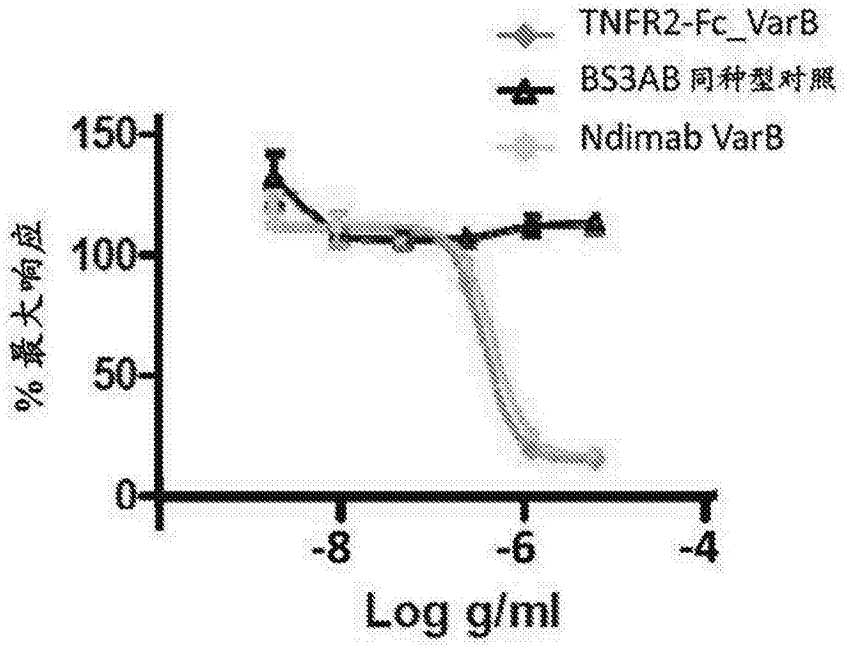
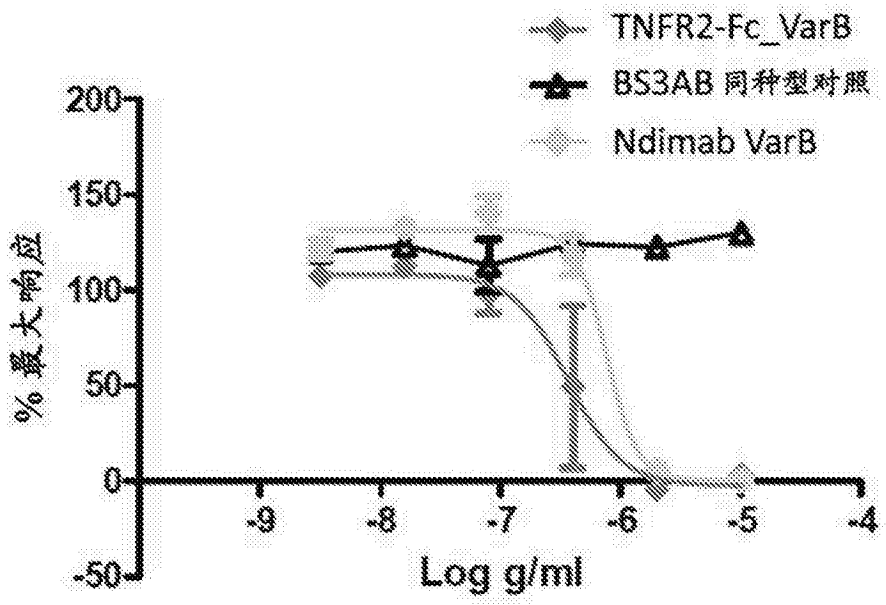


图7C



	TNFR2-Fc_VarB	ndimab VarB
IC50	3.134e-007	3.934e-007

图7D



	TNFR2-Fc_VarB	ndimab VarB
IC50	3.642e-007	7.602e-007

图7E

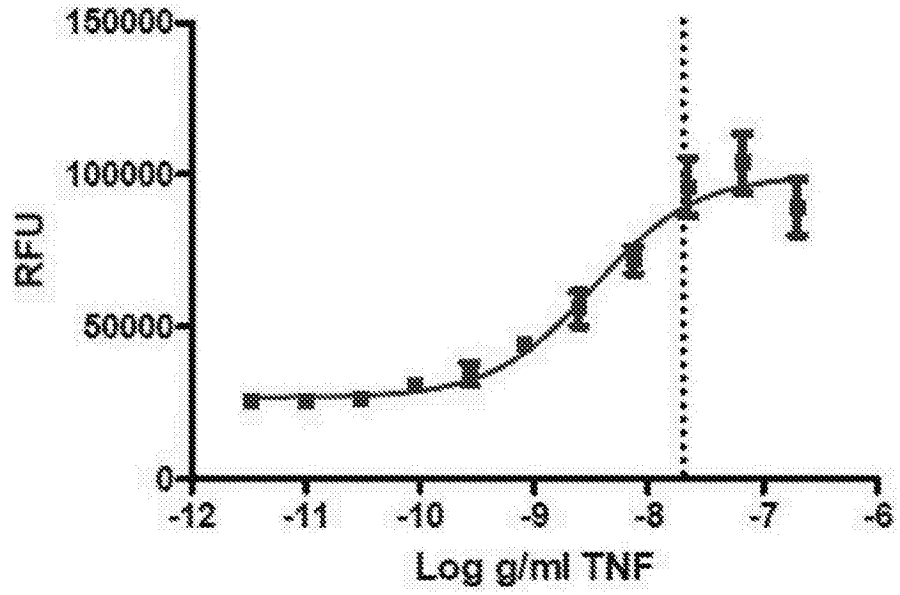


图8A

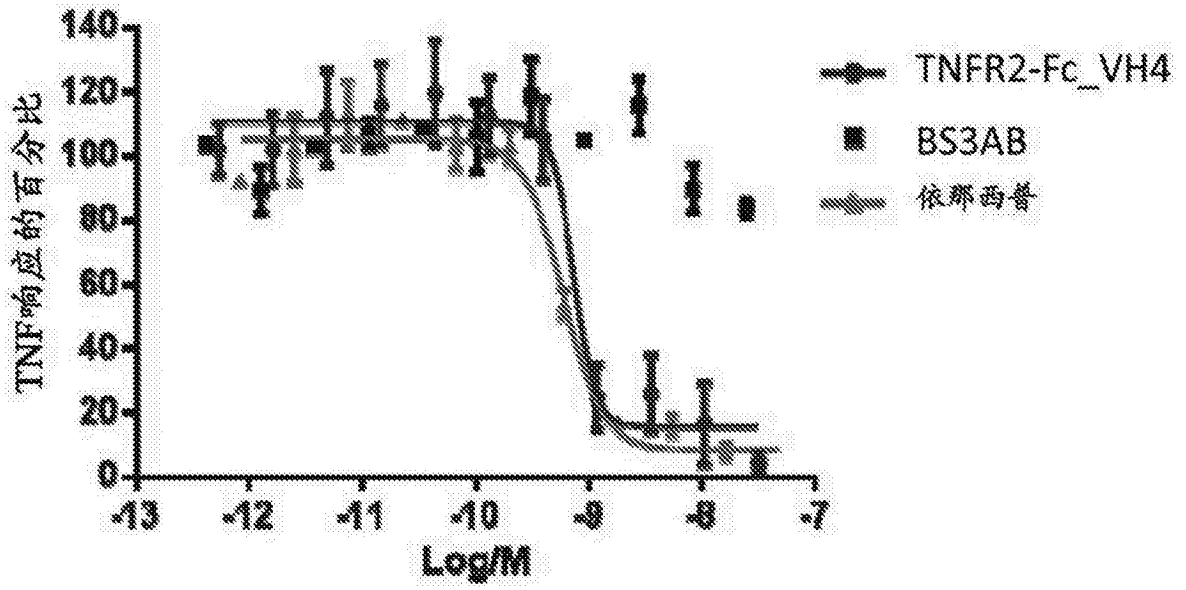
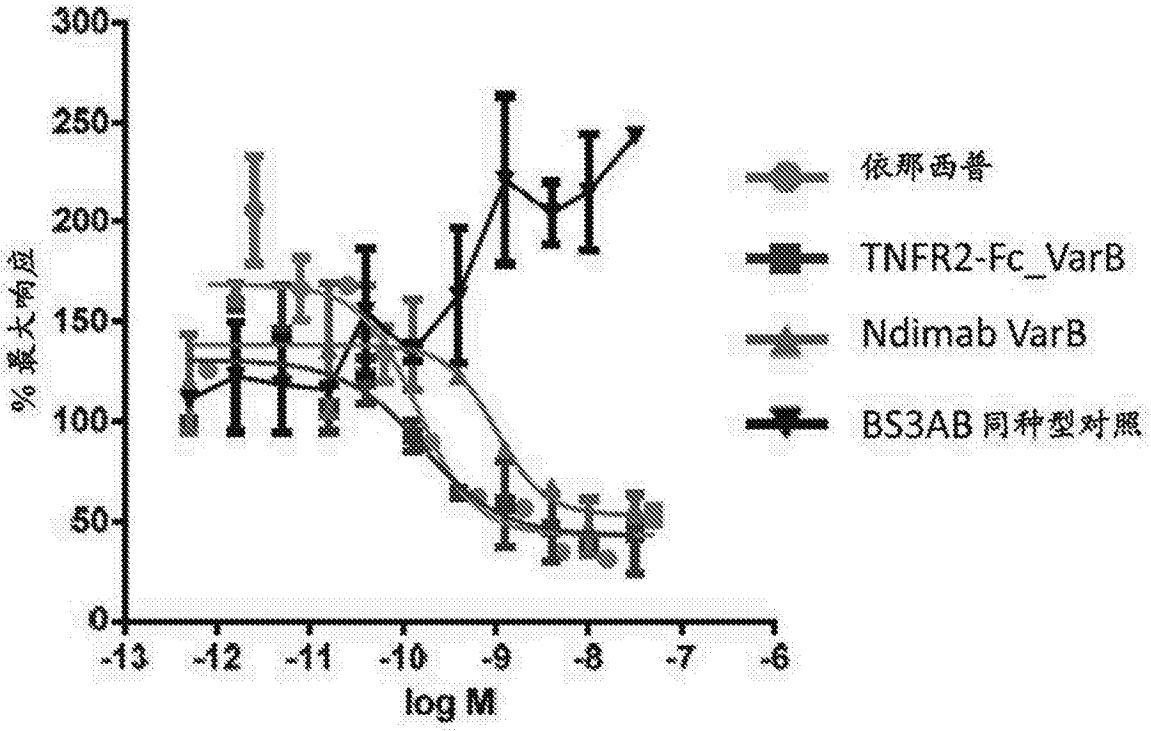
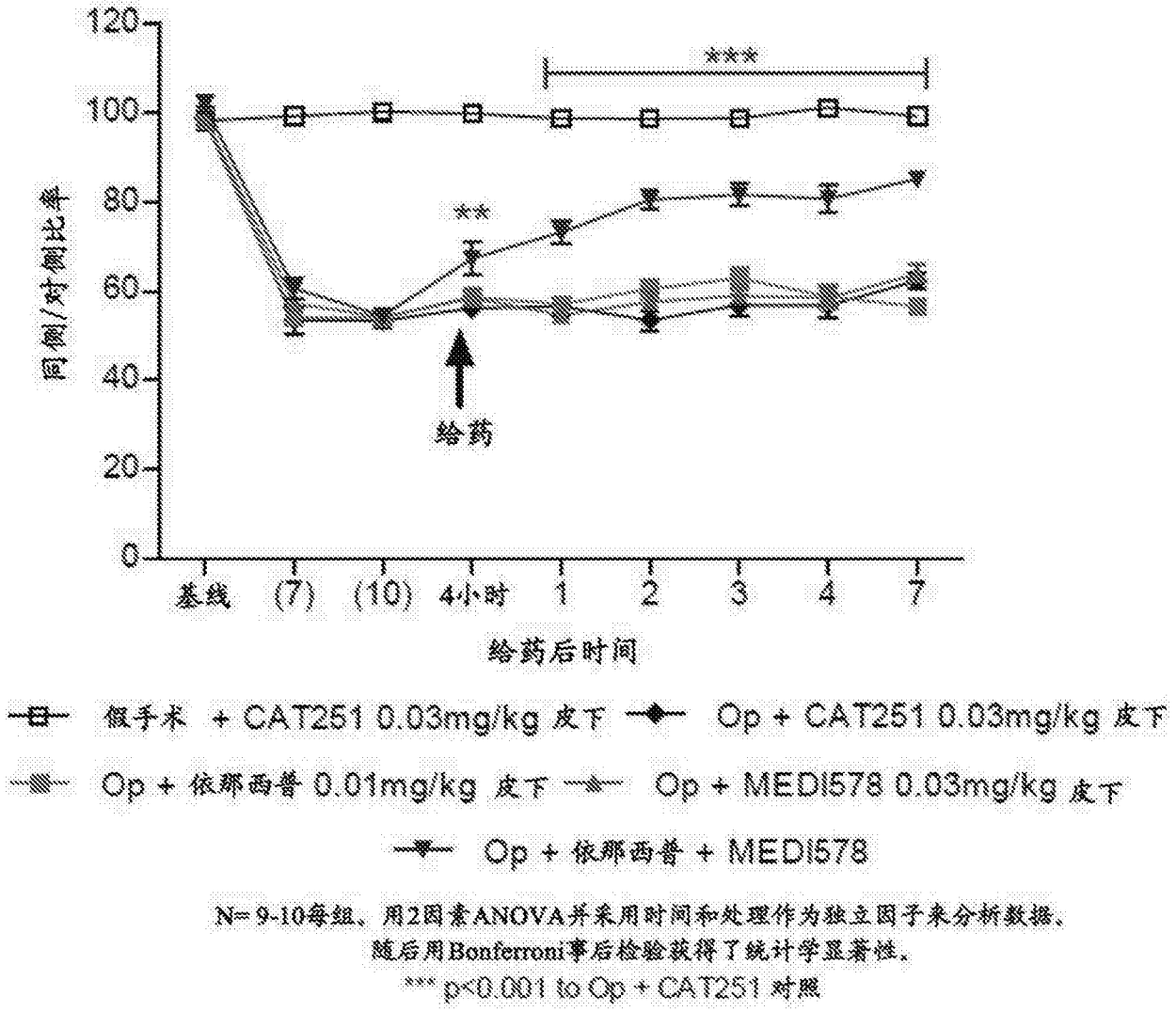


图8B



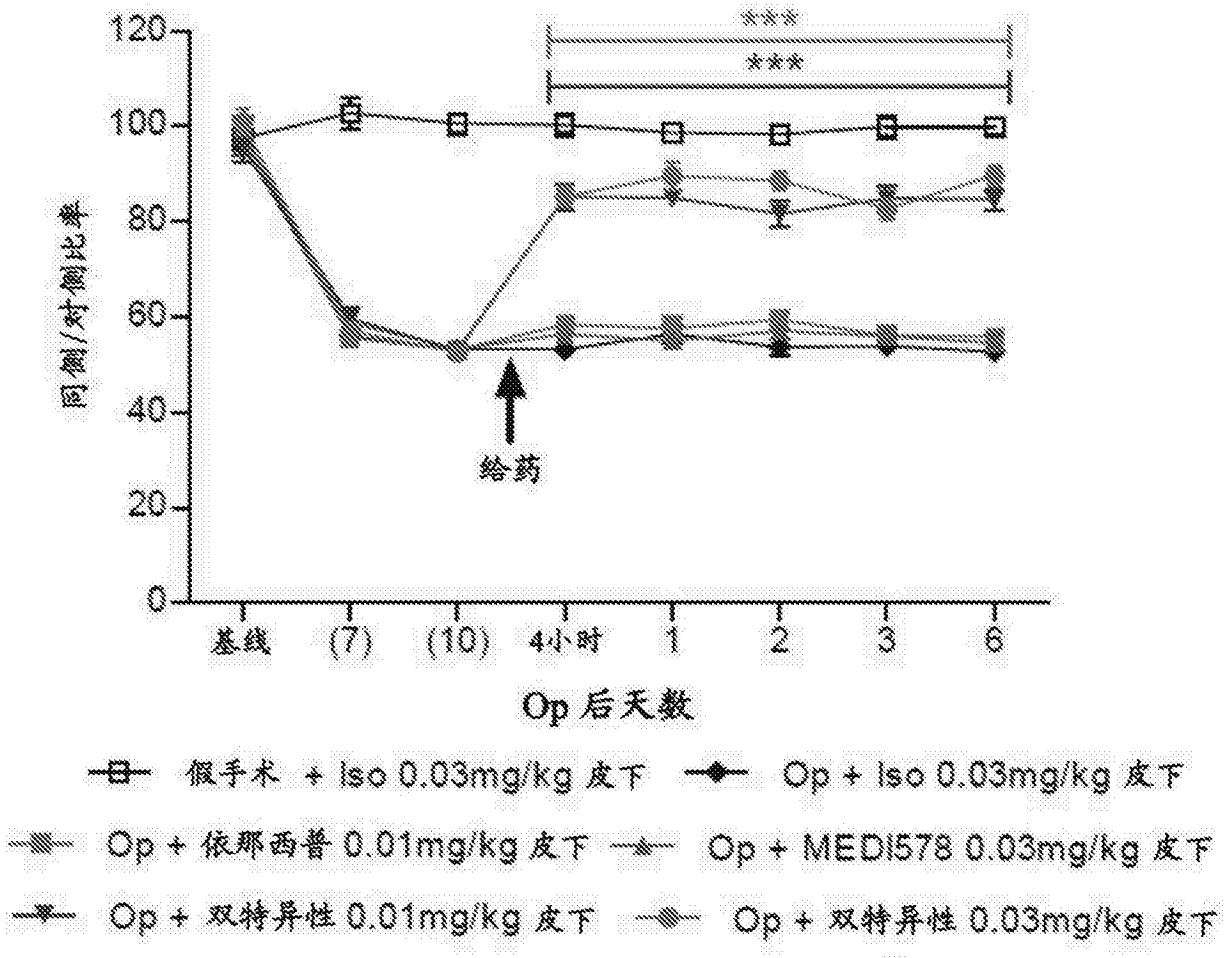
	依那西普	TNFR2-Fc_VarB	ndimab VarB
IC50	1.444e-010	1.652e-010	1.004e-009

图8C



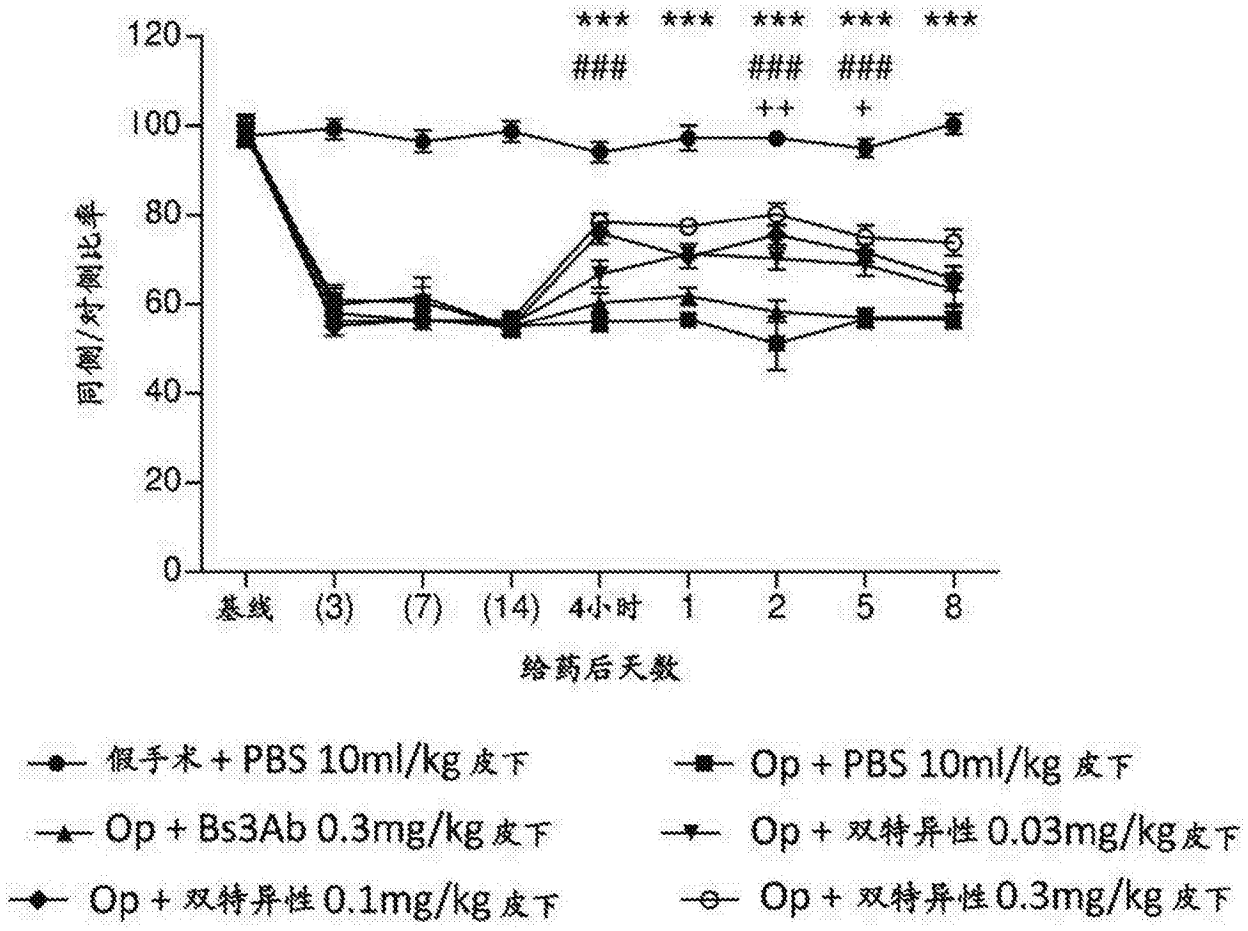
N= 9-10每组。用2因素ANOVA并采用时间和处理作为独立因子来分析数据。
随后用Bonferroni事后检验获得了统计学显著性。
*** p<0.001 to Op + CAT251 对照

图9



N= 10每组。用2因素ANOVA并采用时间和处理作为独立因子来分析数据。
随后用Bonferroni事后检验获得了统计学显著性。
*** p<0.001 对比双特异性同种型 (0.03mg/kg 皮下)

图10A



在合适情况下，用2因素方差分析然后是Bonferroni事后检验来分析数据。

+ P<0.05; ++ P<0.01 PNL + 双特异性 (0.03mg/kg 皮下); ### P<0.01 PNL + 双特异性 (0.1mg/kg 皮下); *** P<0.001 PNL + 双特异性 (0.3mg/kg 皮下) 所有对比 PNL + R347

图10B

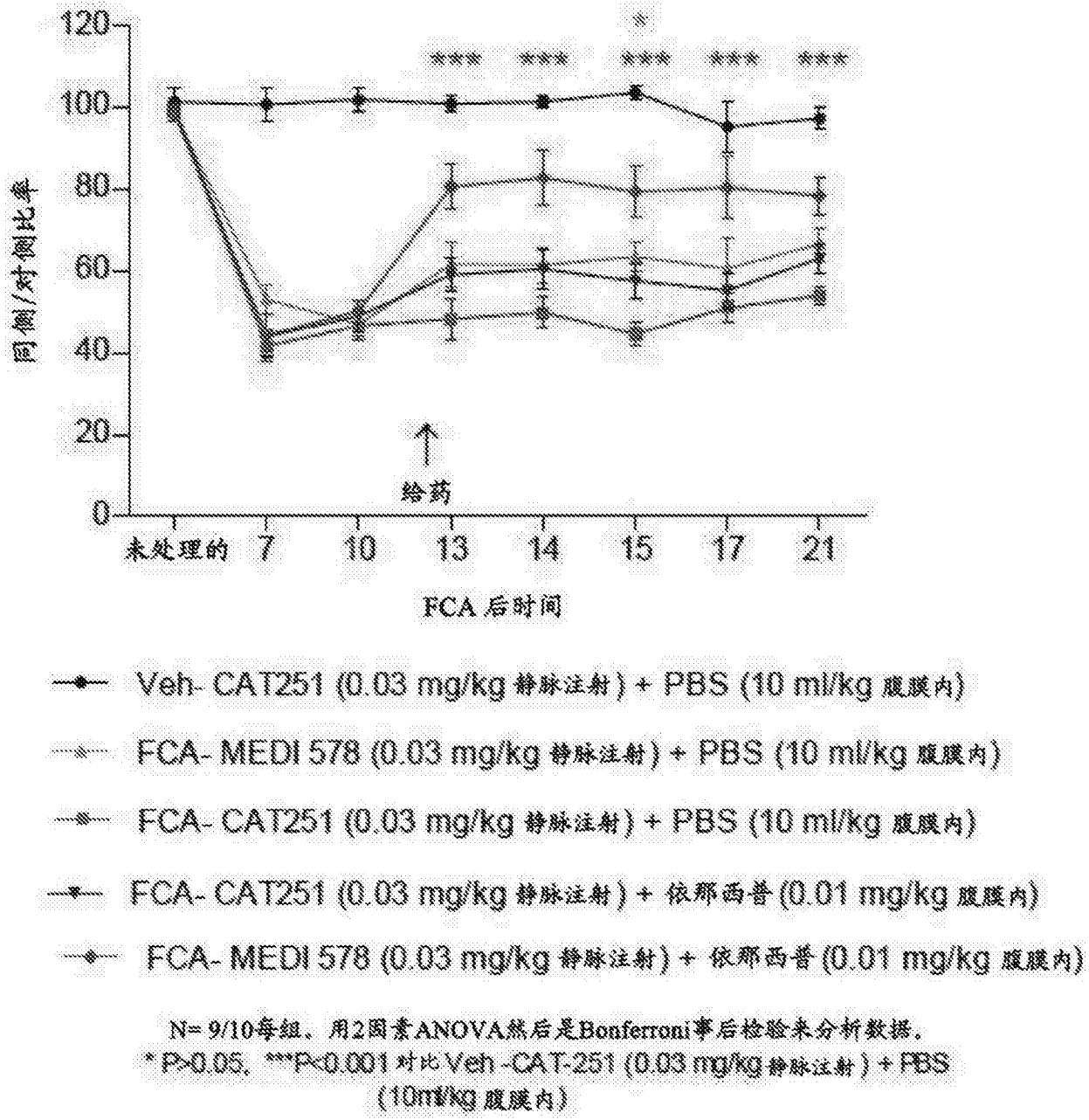
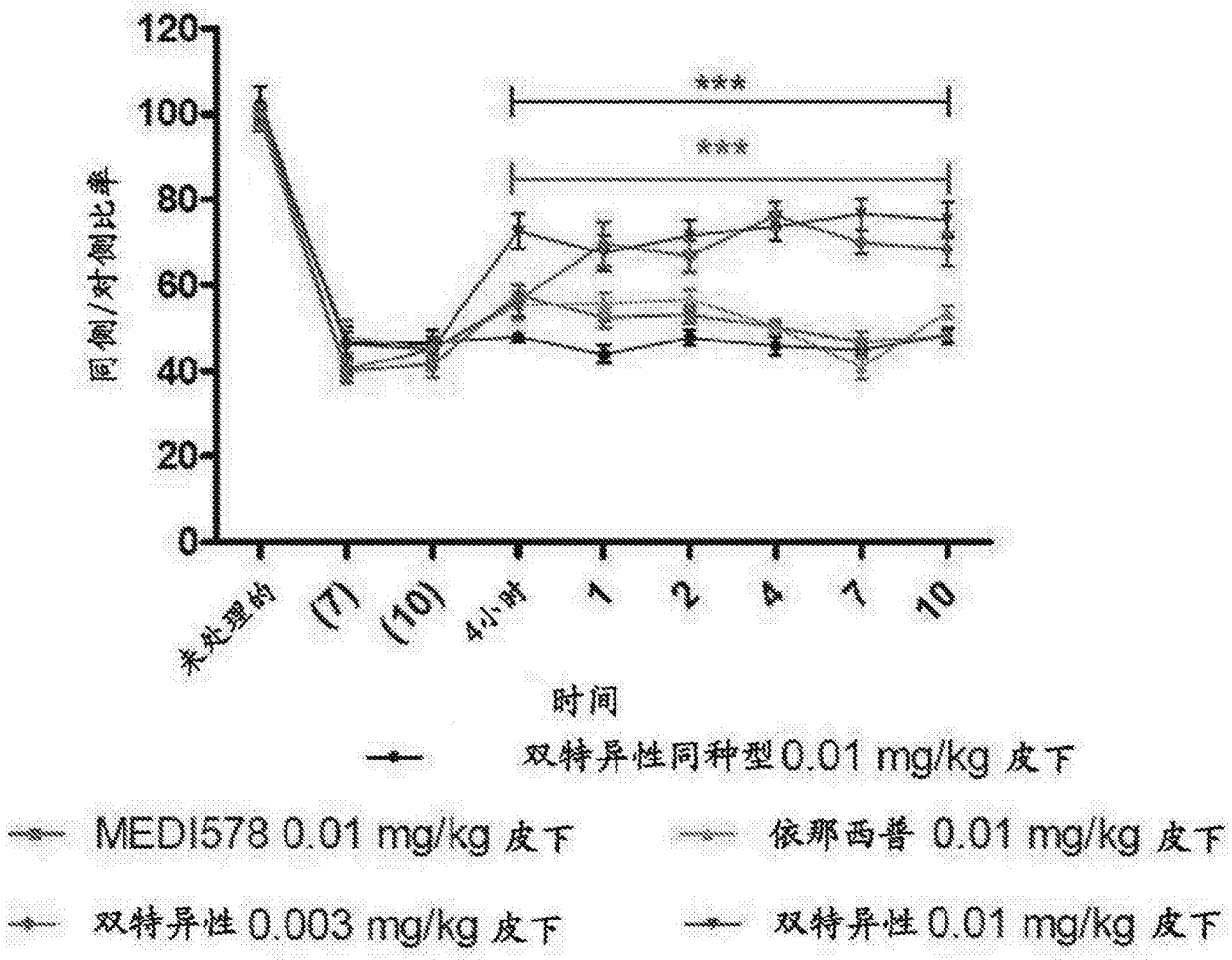

120
100
80
60
40
20
0
同侧/对侧比率
*
***
***
***
***
***
给药
未处理的
7
10
13
14
15
17
21
FCA 后时间
Veh- CAT251 (0.03 mg/kg 静脉注射) + PBS (10 ml/kg 腹膜内)
FCA- MEDI 578 (0.03 mg/kg 静脉注射) + PBS (10 ml/kg 腹膜内)
FCA- CAT251 (0.03 mg/kg 静脉注射) + PBS (10 ml/kg 腹膜内)
FCA- CAT251 (0.03 mg/kg 静脉注射) + 依那西普 (0.01 mg/kg 腹膜内)
FCA- MEDI 578 (0.03 mg/kg 静脉注射) + 依那西普 (0.01 mg/kg 腹膜内)
N= 9/10每组。用2因素ANOVA然后是Bonferroni事后检验来分析数据。
* P>0.05, ***P<0.001 对比 Veh -CAT-251 (0.03 mg/kg 静脉注射) + PBS
(10ml/kg 腹膜内)

图11



用2因素ANOVA并采用时间和处理作为独立因子来分析数据。
随后用Bonferroni事后检验获得了统计学显著性。
***P<0.001 对比双特异性同种型 (0.01 mg/kg 皮下) n= 9-10

图12

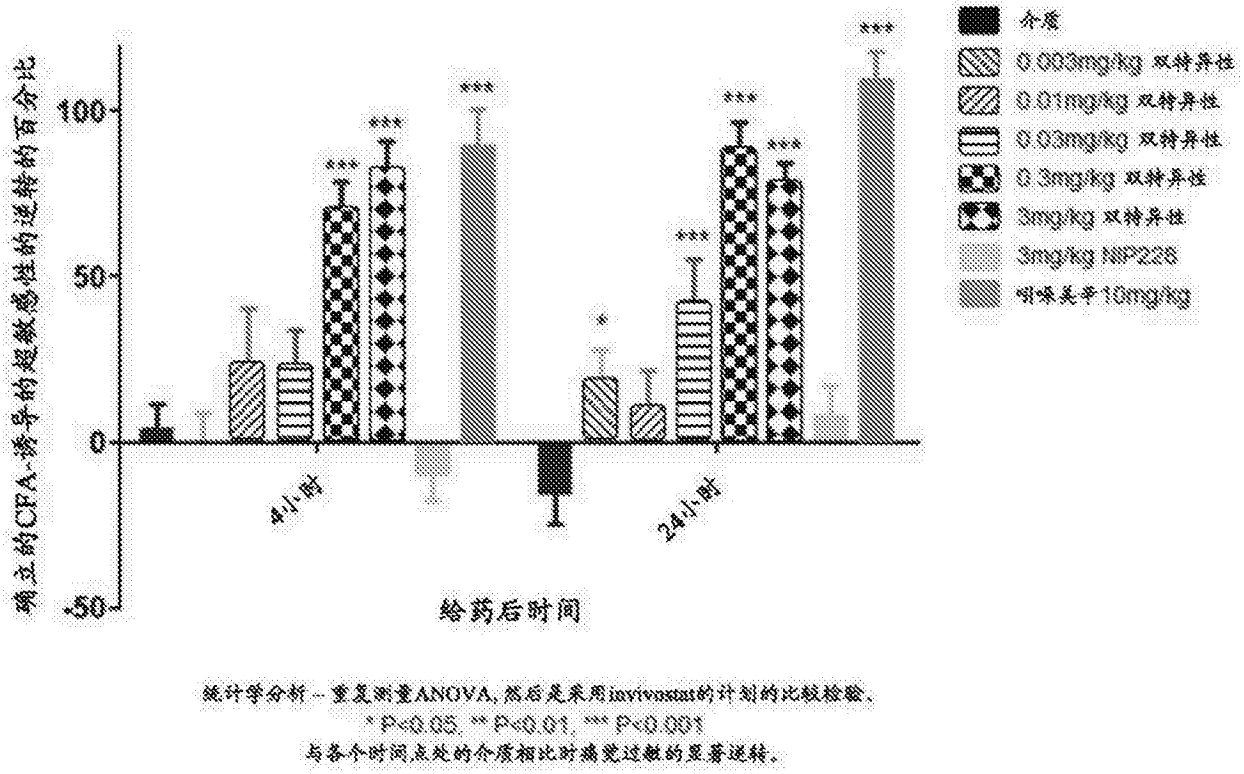

媒介质
0.003mg/kg 双特异性
0.01mg/kg 双特异性
0.03mg/kg 双特异性
0.3mg/kg 双特异性
3mg/kg 双特异性
3mg/kg NIP228
利妥美平10mg/kg
确立的CPA-诱导的超敏感性的逆转的百分比
100
50
0
-50
4小时
24小时
给药后时间
统计学分析 – 重复测量ANOVA, 然后是采用Invivostat的计划的比较检验。
* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001
与各个时间点处的介质相比时感觉过敏的显著逆转。

图13

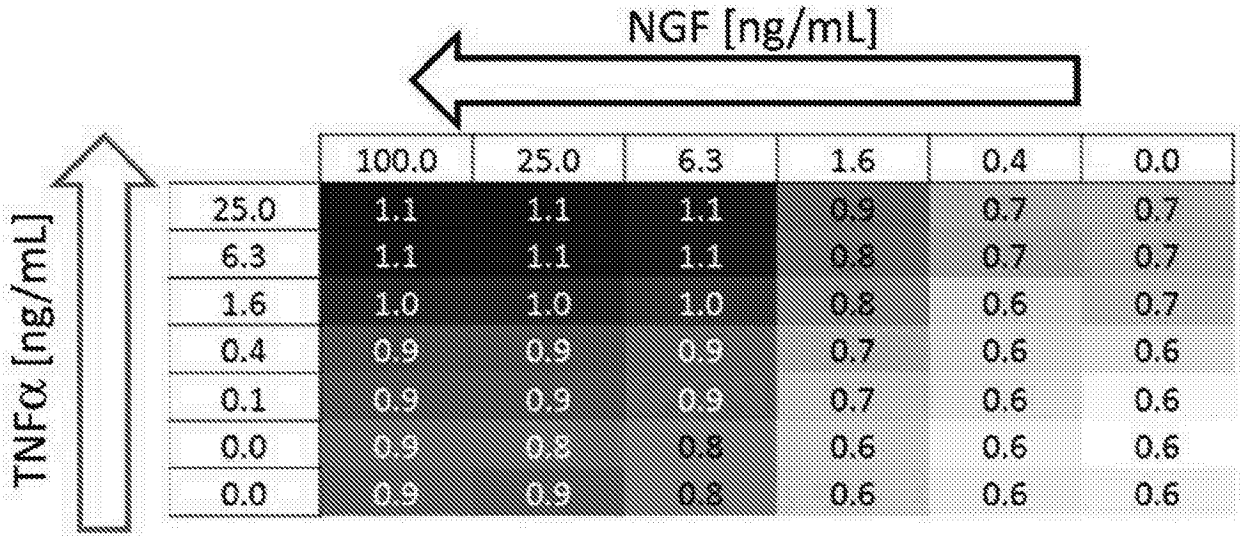

NGF [ng/mL]
TNFα [ng/mL]
100.0 25.0 6.3 1.6 0.4 0.0
25.0 1.1 1.1 1.1 0.9 0.7 0.7
6.3 1.1 1.1 1.1 0.8 0.7 0.7
1.6 1.0 1.0 1.0 0.8 0.6 0.7
0.4 0.9 0.9 0.9 0.7 0.6 0.6
0.1 0.9 0.9 0.9 0.7 0.6 0.6
0.0 0.9 0.8 0.8 0.6 0.6 0.6
0.0 0.9 0.9 0.8 0.6 0.6 0.6

图14

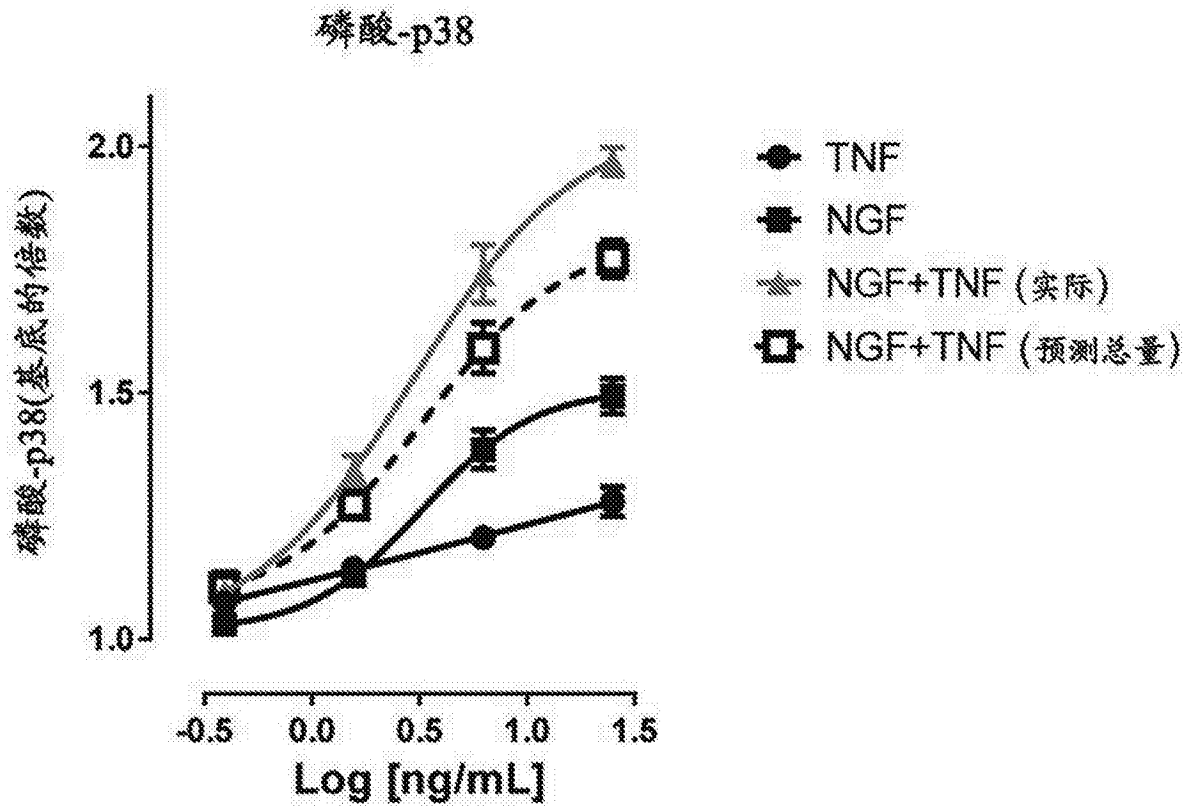
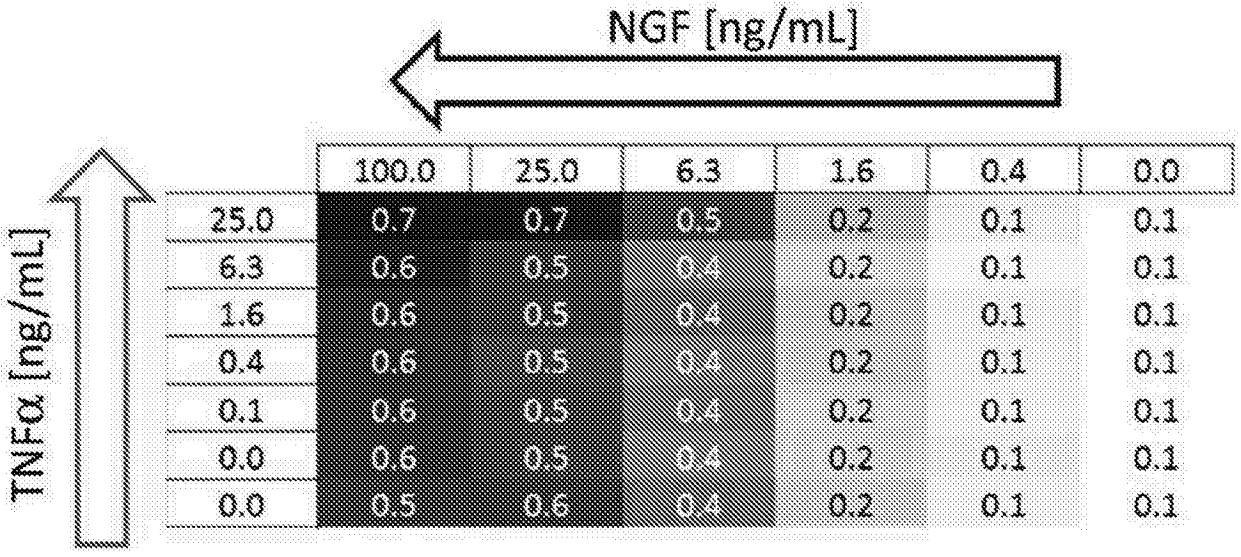


图15



	100.0	25.0	6.3	1.6	0.4	0.0
25.0	0.7	0.7	0.5	0.2	0.1	0.1
6.3	0.6	0.5	0.4	0.2	0.1	0.1
1.6	0.6	0.5	0.4	0.2	0.1	0.1
0.4	0.6	0.5	0.4	0.2	0.1	0.1
0.1	0.6	0.5	0.4	0.2	0.1	0.1
0.0	0.6	0.5	0.4	0.2	0.1	0.1
0.0	0.5	0.6	0.4	0.2	0.1	0.1

图16

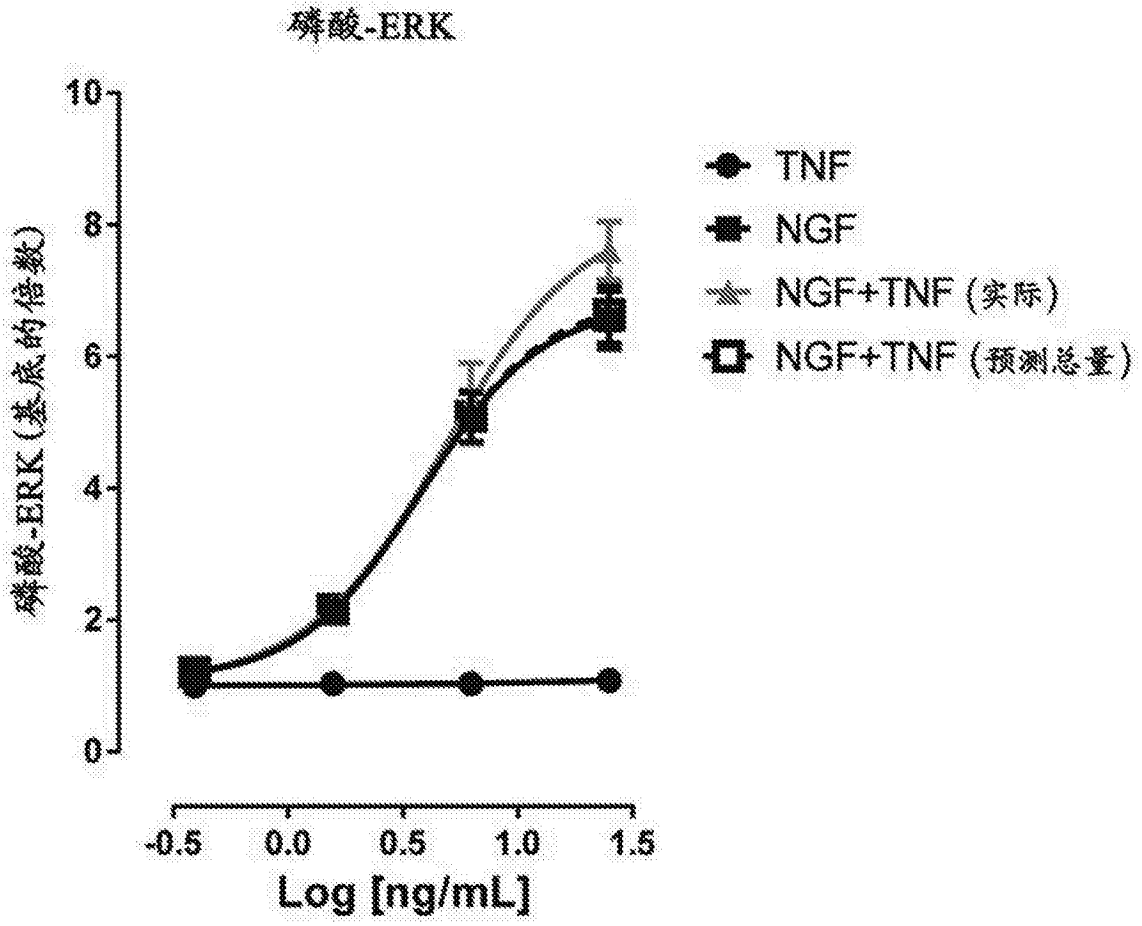

磷酸-ERK
磷酸-ERK(基底的倍数)
10
8
6
4
2
0
-0.5
0.0
0.5
1.0
1.5
Log [ng/mL]
TNF
NGF
NGF+TNF (实际)
NGF+TNF (预测总量)

图17