



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112292391 A

(43) 申请公布日 2021.01.29

(21) 申请号 201980030391.2

梅洛迪·斯沃茨

(22) 申请日 2019.03.05

阿斯兰·曼苏罗夫

(30) 优先权数据

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务
所(普通合伙) 11413

62/638,520 2018.03.05 US

62/727,156 2018.09.05 US

代理人 邱俊霞 刘继富

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2020.11.04

C07K 14/55 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07K 14/755 (2006.01)

PCT/US2019/020685 2019.03.05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/173289 EN 2019.09.12

(71) 申请人 芝加哥大学

地址 美国伊利诺斯州

(72) 发明人 杰弗里·A·哈贝尔 石原纯

权利要求书3页 说明书49页

石原亚香 佐佐木光一

序列表50页 附图15页

(54) 发明名称

用与细胞因子连接的ECM亲和肽治疗癌症的方法和组合物

(57) 摘要

本文描述的方法和组合物通过提供用细胞因子治疗的组合物和方法来满足本领域的需要,所述细胞因子被特异性地靶向和/或保留在肿瘤内或肿瘤周围,限制了全身性暴露并减少了副作用。因此,本公开内容的方面涉及包含与细胞外基质(ECM)亲和肽可操作地连接的免疫治疗抗体的组合物。ECM亲和肽是一种对细胞外基质蛋白具有亲和力的肽。

1. 一种包含细胞因子多肽的多肽,所述细胞因子多肽可操作地连接至包含胶原蛋白结合域的细胞外基质 (ECM) 亲和肽,其中所述ECM亲和肽不特异性结合纤连蛋白。
2. 根据权利要求1所述的多肽,其中,所述ECM亲和肽包含血管性假血友病因子 (vWF) 或饰胶蛋白聚糖的100个至350个氨基酸的胶原蛋白结合结构域。
3. 根据权利要求2所述的多肽,其中所述vWF肽是vWF A1肽或vWF A3肽。
4. 根据权利要求2所述的多肽,其中所述肽与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:34具有至少85%的同一性。
5. 根据权利要求2所述的多肽,其中所述肽包含SEQ ID NO:34。
6. 根据权利要求2所述的多肽,其中所述vWF肽包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:34或其片段具有至少85%同一性的肽。
7. 根据权利要求6所述的多肽,其中所述vWF肽包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:34。
8. 根据权利要求6所述的多肽,其中所述vWF肽基本上由SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:34组成。
9. 根据权利要求1所述的多肽,其中所述肽包括饰胶蛋白聚糖肽。
10. 根据权利要求9所述的多肽,其中所述肽包含SEQ ID NO:15的10个至200个连续氨基酸。
11. 根据权利要求9或10所述的多肽,其中所述肽与SEQ ID NO:15具有至少85%的同一性。
12. 根据权利要求1至11中任一项所述的多肽,其中所述肽与细胞因子共价连接。
13. 根据权利要求1至12中任一项所述的多肽,其中所述肽通过双功能交联剂与细胞因子交联。
14. 根据权利要求1至13中任一项所述的多肽,其中所述细胞因子选自IL-2、IL-15、IL-15超激动剂、IL-21、IL-12 p35、IL-12 p40、CCL4、CCL21、CXCL9、CXCL10、VEGF-C、IFN α 2、IFN β 、XCL-1或其活性片段。
15. 根据权利要求1至14中任一项所述的多肽,其中所述细胞因子与SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:46具有至少85%的同一性。
16. 根据权利要求13或15所述的多肽,其中所述细胞因子是IL-2。
17. 根据权利要求1至16中任一项所述的多肽,其中所述肽与所述细胞因子的比例为约1:1至10:1。
18. 根据权利要求1所述的多肽,其中所述组合物包含与vWF肽可操作地连接的IL-2细胞因子。
19. 一种核酸载体,其包含编码权利要求1至18中任一项所述的多肽的异源编码区。
20. 一种包含在药物制剂中的权利要求1至18中任一项所述的多肽的组合物。
21. 根据权利要求20所述的组合物,其还包含至少一种抗癌化合物。

22. 一种用于治疗对象的癌症的方法,其包括向对象施用根据权利要求1至18中任一项所述的组合物。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述组合物通过血管内、全身或通过肿瘤内、肿瘤周围、动脉内或经导管注射来施用。

24. 根据权利要求22所述的方法,其中血管内是静脉内。

25. 根据权利要求22或23或24所述的方法,其中与肽可操作地连接的细胞因子的施用剂量小于不具有所述肽时所施用的细胞因子的最小有效剂量。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中与所述肽可操作地连接的细胞因子的施用剂量比不具有所述肽时所施用的细胞因子的最小有效剂量低至少10%。

27. 根据权利要求22至26中任一项所述的方法,其中所述患者先前已经用癌症免疫治疗剂治疗过。

28. 根据权利要求22至26中任一项所述的方法,其还包括施用抗癌治疗剂。

29. 根据权利要求27所述的方法,其中所述对象经历了来自先前癌症治疗剂的二级、三级或四级副作用。

30. 根据权利要求22至29中任一项所述的方法,其中所述对象已被诊断患有癌症。

31. 根据权利要求22至30中任一项所述的方法,其中所述癌症包括黑色素瘤、结肠癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌、睾丸癌、脑癌、成胶质细胞瘤、儿童肿瘤、生殖细胞肿瘤、直肠癌、胃癌、食道癌、气管癌、头颈癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、宫颈癌和外阴癌。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述癌症是黑色素瘤或结肠癌。

33. 根据权利要求22至30中任一项所述的方法,其中所述癌症是非血液学的。

34. 根据权利要求22至33中任一项所述的方法,其中所述癌症包括实体瘤。

35. 根据权利要求22至34中任一项所述的方法,其中所述方法还包括施用其他癌症疗法。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述其他癌症疗法包括放射疗法、疫苗接种、化学疗法、过继性T细胞治疗、细胞因子治疗、抗CD47抗体、抗GD2抗体或免疫佐剂。

37. 根据权利要求35所述的方法,其中在施用抗癌治疗剂之前、之后、之间、之前和之间、之前和之后、或之间和之后,施用权利要求1至18中任一项所述的多肽。

38. 根据权利要求35或36所述的方法,其中所述其他癌症疗法包括MUC-1抑制剂、CD40激活剂、IDO抑制剂和OX86激动剂中的一种或多于一种。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述其他癌症疗法包括吡啶昔莫德、GDC-0919、1-甲基-D-色氨酸、去甲哈尔满盐酸盐、去甲哈尔满、CAY10581、INCB024360和2-苄基-2-异硫脲盐酸盐中的一种或多于一种。

40. 根据权利要求22至39中任一项所述的方法,其中所述方法还包括施用第二多肽,所述第二多肽包含与细胞外基质(ECM)亲和肽可操作地连接的细胞因子。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中一起施用第一多肽和第二多肽。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述第一多肽和第二多肽是共配制的。

43. 一种制备根据权利要求1至18中任一项所述的多肽的方法,其包括在宿主细胞中表达所述多肽并分离所述宿主细胞表达的多肽。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述宿主细胞是哺乳动物宿主细胞。

45. 根据权利要求43所述的方法,其中分离所述多肽包括亲和柱纯化和/或分子排阻柱纯化。

用与细胞因子连接的ECM亲和肽治疗癌症的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年3月5日提交的美国临时专利申请第62/638520号和2018年9月5日提交的美国临时专利申请第62/727156号的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0003] I. 发明领域

[0004] 本发明总体上涉及医学领域。更具体地,本发明涉及与核苷酸构建体和蛋白质有关的组合物和方法,包括靶向与血管通透性相关的区域如肿瘤的工程化细胞因子。

[0005] II. 背景技术

[0006] 免疫系统在多种癌症的发病机理中起着至关重要的作用。人们普遍认为,当癌症进展时,免疫系统要么无法充分应答,要么无法适当应答,从而使得癌细胞生长。当前,针对癌症的标准医学疗法,包括化学疗法、手术、放射疗法和细胞疗法,在功效和毒性方面均具有明显的局限性。迄今为止,这些方法已经获得了不同程度的成功,这取决于癌症的类型、患者的一般健康状况、诊断时的疾病阶段等。将针对癌症免疫反应的特定操作与标准医学治疗相结合的改进策略可以提供一种增强癌症治疗的功效且降低其毒性的手段。

[0007] 已经显示出许多细胞因子在对肿瘤免疫应答的调节中起作用。但是,直接施用细胞因子进行癌症治疗可能是不切实际,因为全身性施用它们通常是有毒的(参见,例如,Asher等人,J. Immunol. 146:3227-3234,1991;Havell等人,J. Exp. Med. 167:1067-1085,1988)。仍然需要其他组合物和方法来针对癌症治疗提供更有效且毒性更低的细胞因子疗法。

发明内容

[0008] 本文所述的方法和组合物提供了通过提供细胞因子来在具有血管渗漏或渗透性的区域中靶向或定位治疗的所需组合物和方法,所述细胞因子特异性靶向胶原蛋白和/或被胶原蛋白保留,限制全身暴露并减少与细胞因子相关的副作用。某些实施方案针对由于肿瘤的血管渗透性而定位在肿瘤中的癌症治疗的施用。因此,本公开内容涉及一种组合物,其包含与细胞外基质(ECM)亲和肽如胶原蛋白结合域(CBD)可操作地连接的细胞因子。ECM亲和肽是一种对细胞外基质蛋白(例如胶原蛋白)具有亲和力并与之结合的肽。

[0009] 在一个实施方案中,ECM亲和肽包含来自血管性假血友病因子(vWF)或饰胶蛋白聚糖的肽。在一个实施方案中,ECM亲和肽包含、基本组成为或组成为vWF A3结构域(SEQ ID NO:3)、vWF A1结构域(SEQ ID NO:11)、vWF(SEQ ID NO:13)、饰胶蛋白聚糖(SEQ ID NO:15)或vWF A3结构域(SEQ ID NO:34)的至少、至多或约5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、110个、120个、130个、140个、150个、160个、170个、180个、190个、200个、210个、220个、230个、240

个、250个、250个、300个、400个、500个、600个、700个、800个、900个、1000个、1500个、2000个至2800个(包括其间的所有值和范围)连续氨基酸。在某些方面,ECM亲和肽可包含vWF A3结构域(SEQ ID NO:34)的第1至193位氨基酸。

[0010] ECM亲和肽可以包括与vWF A3结构域(SEQ ID NO:3)、vWF A1结构域(SEQ ID NO:11)、vWF(SEQ ID NO:13)、饰胶蛋白聚糖(SEQ ID NO:15)、或vWF A3结构域(SEQ ID NO:34)具有至少或约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的肽或蛋白质片段,片段包括:(A) SEQ ID NO:3的片段包括起始于第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199或200位氨基酸且终止于第10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204或205位氨基酸的区段的片段;(B) SEQ ID NO:11的片段包括起始于第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211或212位氨基酸且终止于第10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、

81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221或222位氨基酸的区段的片段；(C) SEQ ID NO:13的片段包括起始于第1、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1100、1110、1120、1130、1140、1150、1160、1170、1180、1190、1200、1210、1220、1230、1240、1250、1260、1270、1280、1290、1300、1310、1320、1330、1340、1350、1360、1370、1380、1390、1400、1410、1420、1430、1440、1450、1460、1470、1480、1490、1500、1510、1520、1530、1540、1550、1560、1570、1580、1590、1600、1610、1620、1630、1640、1650、1660、1670、1680、1690、1700、1710、1720、1730、1740、1750、1760、1770、1780、1790、1800、1810、1820、1830、1840、1850、1860、1870、1880、1890、1900、1910、1920、1930、1940、1950、1960、1970、1980、1990、2000、2010、2020、2030、2040、2050、2060、2070、2080、2090、2100、2110、2120、2130、2140、2150、2160、2170、2180、2190、2200、2210、2220、2230、2240、2250、2260、2270、2280、2290、2300、2310、2320、2330、2340、2350、2360、2370、2380、2390、2400、2410、2420、2430、2440、2450、2460、2470、2480、2490、2500、2510、2520、2530、2540、2550、2560、2570、2580、2590、2600、2610、2620、2630、2640、2650、2660、2670、2680、2690、2700、2710、2720、2730、2740、2750、2760、2770、2780、2790或2800位(包括其间的所有值或范围)氨基酸且终止于第10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1100、1110、1120、1130、1140、1150、1160、1170、1180、1190、1200、1210、1220、1230、1240、1250、1260、1270、1280、1290、1300、1310、1320、1330、1340、1350、1360、1370、1380、1390、1400、1410、1420、1430、1440、1450、1460、1470、1480、1490、1500、1510、1520、1530、1540、1550、1560、1570、1580、1590、1600、1610、1620、1630、1640、1650、1660、1670、1680、1690、1700、1710、1720、1730、1740、1750、1760、1770、1780、1790、1800、1810、1820、1830、1840、1850、1860、1870、1880、1890、1900、1910、1920、1930、1940、1950、1960、1970、1980、1990、2000、2010、2020、2030、2040、2050、2060、2070、2080、2090、2100、2110、2120、2130、2140、2150、2160、2170、2180、2190、2200、2210、2220、

2230、2240、2250、2260、2270、2280、2290、2300、2310、2320、2330、2340、2350、2360、2370、2380、2390、2400、2410、2420、2430、2440、2450、2460、2470、2480、2490、2500、2510、2520、2530、2540、2550、2560、2570、2580、2590、2600、2610、2620、2630、2640、2650、2660、2670、2680、2690、2700、2710、2720、2730、2740、2750、2760、2770、2780、2790、2800281或2813位(包括其间的所有值或范围)氨基酸的区段的片段; (D) SEQ ID NO:15的片段包括起始于第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332或333位氨基酸且终止于第10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342或343位氨基酸的区段的片段; (E) SEQ ID NO:34的片段包括起始于第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、

15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185或186位氨基酸且终止于第10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195或196位氨基酸的区段的片段。

[0011] 在某些方面,任何多肽、肽或其片段不需要包含参考序列标识符的所有氨基酸,并且可以具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50个左右的被移除或缺失的氨基酸,同时保持多肽或肽的至少一种活性,例如,ECM或胶原蛋白结合。在进一步的方面,任何多肽或肽可以在末端含有额外的氨基酸或含有在参考序列标识符的氨基酸序列内部插入的氨基酸,并且可以具有与氨基酸末端、羧基末端融合的、在氨基酸序列中插入的或其组合的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、30个、40个、50个左右的氨基酸,同时保持多肽或肽的至少一种活性,例如,ECM或胶原蛋白结合。特别预期可以从一些实施方案中排除本文公开的任何ECM亲和肽(例如,P1GF-2肽和CXCL-12 γ 肽)。在一个实施方案中,ECM亲和肽包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:34之一,或SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:34的肽段或片段具有至少或至多70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、96%、98%、99%或100%同一性(或其中可衍生的任何范围)的肽。肽段或片段可以包括SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:34的10个、20个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、110个、120个、130个、140个、150个、160个、170个、180个、190个、200个、210个、220个或多于220个连续氨基酸。在一些实施方案中,该肽与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:34具有至少85%的同一性。在一些实施方案中,该肽包含、组成为或基本组成为SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:34或其片段。在一个实施方案中,ECM亲和肽包含血管性假血友病因子(vWF)肽。在一些实施方案中,VWF肽是vWF A1肽或vWF A3肽。在一些实施方案中,VWF肽包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:34的全部或部分具

有至少85%同一性的肽。在一些实施方案中,VWF肽包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:34或其片段。

[0012] 在一些实施方案中,ECM亲和肽包含饰胶蛋白聚糖肽。在一些实施方案中,该肽与SEQ ID NO:15的全部或部分具有至少85%同一性。一些实施方案涉及重组的肽,所述肽包含5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、75个、100个、125个、150个、175个、200个、225个、250个、275个、300个、325个至343个(包括其间的所有值和范围)连续的氨基酸。在一个实施方案中,ECM亲和肽包含与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:15的肽段具有至少或至多70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、96%、98%、99%或100%同一性(或其中可衍生的任何范围)的肽。在一些实施方案中,该肽与SEQ ID NO:15具有至少85%同一性。在一些实施方案中,该肽包含、组成为或基本组成为SEQ ID NO:15或其片段。

[0013] 在一些实施方案中,肽与细胞因子共价连接。在某些方面,该肽是氨基末端或羧基末端与细胞因子多肽融合。在一些实施方案中,所述肽通过双功能交联剂与细胞因子交联。

[0014] 在其他实施方案中,细胞因子肽可以选自hIL-2 (SEQ ID NO:37)、mIL-2 (SEQ ID NO:37)、hIL-15 (SEQ ID NO:16)、mIL-15 (SEQ ID NO:17)、hIL-21 (SEQ ID NO:18)、mIL-21 (SEQ ID NO:19)、hIL-12 p35 (SEQ ID NO:20)、hIL-12 p40 (SEQ ID NO:21)、mIL-12 p35 (SEQ ID NO:22)、mIL-12 p35 (SEQ ID NO:23)、hCCL4 (SEQ ID NO:24)、mCCL4 (SEQ ID NO:25)、hCCL21 (SEQ ID NO:26)、mCCL21 (SEQ ID NO:27)、hCXCL9 (SEQ ID NO:28)、mCXCL9 (SEQ ID NO:29)、hCXCL10 (SEQ ID NO:30)、mCXCL10 (SEQ ID NO:31)、hVEGFC (SEQ ID NO:32)、mVEGF-C (SEQ ID NO:33)、mIFN β (SEQ ID NO:39)、hIFN β (SEQ ID NO:40)、mIFN α 2 (SEQ ID NO:41)、hIFN α 2 (SEQ ID NO:42)、mXCL1 (SEQ ID NO:43)、hXCL1 (SEQ ID NO:44)、mIL-15超激动剂 (SEQ ID NO:45) 或hIL-15超激动剂 (SEQ ID NO:46)。ECM亲和肽细胞因子缀合物的细胞因子部分可以包含hIL-15 (SEQ ID NO:16)、mIL-15 (SEQ ID NO:17)、hIL-21 (SEQ ID NO:18)、mIL-21 (SEQ ID NO:19)、hIL-12p35 (SEQ ID NO:20)、hIL-12 p40 (SEQ ID NO:21)、mIL-12 p35 (SEQ ID NO:22)、mIL-12 p35 (SEQ ID NO:23)、hCCL4 (SEQ ID NO:24)、mCCL4 (SEQ ID NO:25)、hCCL21 (SEQ ID NO:26)、mCCL21 (SEQ ID NO:27)、hCXCL9 (SEQ ID NO:28)、mCXCL9 (SEQ ID NO:29)、hCXCL10 (SEQ ID NO:30)、mCXCL10 (SEQ ID NO:31)、hVEGF-C (SEQ ID NO:32)、mVEGF-C (SEQ ID NO:33)、mIFN β (SEQ ID NO:39)、hIFN β (SEQ ID NO:40)、mIFN α 2 (SEQ ID NO:41)、hIFN α 2 (SEQ ID NO:42)、mXCL1 (SEQ ID NO:43)、hXCL1 (SEQ ID NO:44)、mIL-15超激动剂 (SEQ ID NO:45) 或hIL-15超激动剂 (SEQ ID NO:46) 的5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、105个、110个、115个、120个、125个、130个、135个、140个、145个、150个连续氨基酸。在一个实施方案中,细胞因子肽包含与hIL-15 (SEQ ID NO:16)、mIL-15 (SEQ ID NO:17)、hIL-21 (SEQ ID NO:18)、mIL-21 (SEQ ID NO:19)、hIL-12 p35 (SEQ ID NO:20)、hIL-12 p40 (SEQ ID NO:21)、mIL-12 p35 (SEQ ID NO:22)、mIL-12

p35 (SEQ ID NO:23)、hCCL4 (SEQ ID NO:24)、mCCL4 (SEQ ID NO:25)、hCCL21 (SEQ ID NO:26)、mCCL21 (SEQ ID NO:27)、hCXCL9 (SEQ ID NO:28)、mCXCL9 (SEQ ID NO:29)、hCXCL10 (SEQ ID NO:30)、mCXCL10 (SEQ ID NO:31)、hVEGF-C (SEQ ID NO:32)、mVEGF-C (SEQ ID NO:33)、mIFN β (SEQ ID NO:39)、hIFN β (SEQ ID NO:40)、mIFN α 2 (SEQ ID NO:41)、hIFN α 2 (SEQ ID NO:42)、mXCL1 (SEQ ID NO:43)、hXCL1 (SEQ ID NO:44)、mIL-15超激动剂 (SEQ ID NO:45) 或hIL-15超激动剂 (SEQ ID NO:46) 具有至少或至多70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、96%、98%、99%或100%同一性(或其中任何可衍生的范围)的肽,或与hIL-15 (SEQ ID NO:16)、mIL-15 (SEQ ID NO:17)、hIL-21 (SEQ ID NO:18)、mIL-21 (SEQ ID NO:19)、hIL-12 p35 (SEQ ID NO:20)、hIL-12 p40 (SEQ ID NO:21)、mIL-12 p35 (SEQ ID NO:22)、mIL-12 p35 (SEQ ID NO:23)、hCCL4 (SEQ ID NO:24)、mCCL4 (SEQ ID NO:25)、hCCL21 (SEQ ID NO:26)、mCCL21 (SEQ ID NO:27)、hCXCL9 (SEQ ID NO:28)、mCXCL9 (SEQ ID NO:29)、hCXCL10 (SEQ ID NO:30)、mCXCL10 (SEQ ID NO:31)、hVEGF-C (SEQ ID NO:32)、mVEGF-C (SEQ ID NO:33)、mIFN β (SEQ ID NO:39)、hIFN β (SEQ ID NO:40)、mIFN α 2 (SEQ ID NO:41)、hIFN α 2 (SEQ ID NO:42)、mXCL1 (SEQ ID NO:43)、hXCL1 (SEQ ID NO:44)、mIL-15超激动剂 (SEQ ID NO:45) 或hIL-15超激动剂 (SEQ ID NO:46) 的保留细胞因子活性的肽段具有至少或至多70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、96%、98%、99%或100%的同一性(或其中任何可衍生的范围)的肽。在一些实施方案中,该肽与hIL-15 (SEQ ID NO:16)、mIL-15 (SEQ ID NO:17)、hIL-21 (SEQ ID NO:18)、mIL-21 (SEQ ID NO:19)、hIL-12 p35 (SEQ ID NO:20)、hIL-12 p40 (SEQ ID NO:21)、mIL-12 p35 (SEQ ID NO:22)、mIL-12 p35 (SEQ ID NO:23)、hCCL4 (SEQ ID NO:24)、mCCL4 (SEQ ID NO:25)、hCCL21 (SEQ ID NO:26)、mCCL21 (SEQ ID NO:27)、hCXCL9 (SEQ ID NO:28)、mCXCL9 (SEQ ID NO:29)、hCXCL10 (SEQ ID NO:24) 30)、mCXCL10 (SEQ ID NO:31)、hVEGF-C (SEQ ID NO:32)、mVEGF-C (SEQ ID NO:33)、mIFN β (SEQ ID NO:39)、hIFN β (SEQ ID NO:40)、mIFN α 2 (SEQ ID NO:41)、hIFN α 2 (SEQ ID NO:42)、mXCL1 (SEQ ID NO:43)、hXCL1 (SEQ ID NO:44)、mIL-15超激动剂 (SEQ ID NO:45) 或hIL-15超激动剂 (SEQ ID NO:46) 具有至少85%同一性。在一些实施方案中,该肽包含、组成为或基本组成为hIL-15 (SEQ ID NO:16)、mIL-15 (SEQ ID NO:17)、hIL-21 (SEQ ID NO:18)、mIL-21 (SEQ ID NO:19)、hIL-12 p35 (SEQ ID NO:20)、hIL-12 p40 (SEQ ID NO:21)、mIL-12 p35 (SEQ ID NO:22)、mIL-12 p35 (SEQ ID NO:23)、hCCL4 (SEQ ID NO:24)、mCCL4 (SEQ ID NO:25)、hCCL21 (SEQ ID NO:26)、mCCL21 (SEQ ID NO:27)、hCXCL9 (SEQ ID NO:28)、mCXCL9 (SEQ ID NO:29)、hCXCL10 (SEQ ID NO:30)、mCXCL10 (SEQ ID NO:31)、hVEGF-C (SEQ ID NO:32)、mVEGF-C (SEQ ID NO:33)、mIFN β (SEQ ID NO:39)、hIFN β (SEQ ID NO:40)、mIFN α 2 (SEQ ID NO:41)、hIFN α 2 (SEQ ID NO:42)、mXCL1 (SEQ ID NO:43)、hXCL1 (SEQ ID NO:44)、mIL-15超激动剂 (SEQ ID NO:45)、或hIL-15超激动剂 (SEQ ID NO:46) 或其片段。

[0015] 在某些实施方案中,ECM亲和肽细胞因子缀合物的IL-2部分包含SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:37的5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、105个、110个、

115个、120个、125个、130个、135个、140个、145个、150个连续氨基酸。在一个实施方案中，IL-2肽包含与SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:37具有至少或至多70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、96%、98%、99%或100%的同一性(或其中可衍生的任何范围)的肽或与SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:37的保留IL-2活性的肽段具有至少或至多70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、96%、98%、99%或100%的同一性(或其中可衍生的任何范围)的肽。在一些实施方案中，该肽与SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:37具有至少85%同一性。在一些实施方案中，该肽包含、组成为或基本组成为SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:37或其片段。带有组氨酸标签的小鼠IL-2具有以下序列：

PTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRLTFK
 [0016] **FYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVVKLGSD**
NTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQHHHHH (SEQ ID NO:35)。

[0017] 人IL-2具有以下序列：

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEH
 [0018] **LLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA**
QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
(SEQ ID NO:37)。

[0019] 可以在肽和细胞因子序列之间插入接头，例如氨基酸或拟肽序列。接头可以具有一种或多种性质，包括柔性构象、不能形成有序的二级结构或疏水性或带电性，这可以促进任一结构域或与任一结构域相互作用。通常在柔性蛋白质区域中发现的氨基酸的实例可以包括Gly、Asn和Ser。其他接近中性的氨基酸例如Thr和Ala，也可以用于接头序列中。接头序列的长度可以变化而不会显著影响融合蛋白的功能或活性(参见美国专利6087329)。在一个特定的方面，肽和细胞因子通过具有约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个至25个氨基酸残基的肽序列连接。接头的实例还可包括化学部分和缀合剂，例如磺基-琥珀酰亚胺基衍生物(磺基-SMCC、磺基-SMPB)、辛二酸二琥珀酰亚胺基(DSS)、戊二酸二琥珀酰亚胺基(DSG)和酒石酸二琥珀酰亚胺基(DST)。接头还包括线性碳链，例如C_N(其中N=1个至100个碳原子，例如，C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈)。在一些实施方案中，接头可以是二肽接头，例如缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)、苯丙氨酸-赖氨酸(phe-lys)接头或马来酰亚胺基己二酸-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基(vc)接头。在一些实施方案中，接头是磺基琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸酯(smcc)。磺基-smcc的偶联是通过马来酰亚胺基团进行的，该基团与巯基(硫醇，-SH)反应，而其磺基-NHS酯则对伯胺具有反应性(例如赖氨酸和蛋白质或肽N端所示)。此外，接头可以是马来酰亚胺基己酰基(mc)。

[0020] 在一些实施方案中，肽与细胞因子的比例为约1:1至10:1。在一些实施方案中，肽与细胞因子的比例为至少、至多或约1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1或100:1(或其间的任何范围)。

[0021] 其他方面涉及在对象中治疗癌症的方法，该方法包括向对象施用包含与细胞因子偶联的ECM亲和肽的组合物。在一些实施方案中，该组合物是静脉内或通过肿瘤内、肿瘤周

围、动脉内或经导管注射施用的。在一些实施方案中，全身性施用本文描述的含有vWF或饰胶蛋白聚糖的多肽(即，其具有一个或多个具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:34的全部或部分的多肽)。全身性施用例如可以是肠胃外或静脉内施用。

[0022] 在一些实施方案中，与ECM亲和肽有效连接的细胞因子的施用剂量小于施用不具有ECM亲和肽的细胞因子的最小有效剂量。在一些实施方案中，与ECM亲和肽有效连接的细胞因子的施用剂量比施用不具有ECM亲和肽的细胞因子的最小有效剂量低至少10%。在一些实施方案中，与ECM亲和肽有效连接的细胞因子的施用剂量比不使用ECM亲和肽的细胞因子的最小有效剂量低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%(或其中的任何可衍生范围)。

[0023] 在一些实施方案中，对象已被诊断出患有癌症。在一些实施方案中，癌症是黑色素瘤、结肠癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌、睾丸癌、脑癌、成胶质细胞瘤、儿童肿瘤、生殖细胞肿瘤、直肠癌、胃癌、食道癌、气管癌、头颈癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、宫颈癌和外阴癌。在某些实施方案中，癌症是黑色素瘤或结肠癌。在一些实施方案中，癌症是非血液学的。在一些实施方案中，癌症包括实体肿瘤。在一些实施方案中，癌症是远端转移癌。在一些实施方案中，患者先前接受过癌症治疗。在一些实施方案中，对象对先前的癌症治疗有抗性。在一些实施方案中，对象被确定为对癌症治疗反应较差。

[0024] 该方法还可以包括施用其他癌症治疗。在一些实施方案中，其他癌症治疗包括放射疗法、疫苗接种、化学疗法、过继性T细胞疗法、细胞因子疗法、抗CD47抗体、抗GD2抗体或免疫佐剂。

[0025] 在一些实施方案中，该方法还包括施用与相同或不同的ECM亲和肽可操作连接的第二种细胞因子。

[0026] 本文所用的术语“细胞因子多肽”是指细胞因子或其受体结合结构域并保持细胞因子活性的多肽。

[0027] 本文所用的术语“细胞因子活性”是指细胞因子在体内具有或能够发挥的活性，包括但不限于促进B细胞的增殖、免疫球蛋白类别转换和抗体分泌；记忆B细胞的分化，或防止其凋亡；促进巨噬细胞分泌白介素-12，激活I型辅助性T细胞或分泌趋化因子；促进巨噬细胞产生一氧化氮，增强对微生物的防御能力；促进树突细胞的成熟和活化；调节T细胞的成熟和分化；促进自然杀伤细胞的细胞毒性和多种不同细胞因子的产生；单核细胞和巨噬细胞的活化和刺激T细胞和B细胞持续表达MHC等。

[0028] 如本文所用的术语“趋化因子多肽”是指趋化因子或其受体结合结构域的细胞因子多肽，其中趋化因子包括但不限于CXC趋化因子、CC趋化因子、C趋化因子和CX3C趋化因子。

[0029] 本文所用的术语“趋化因子活性”是指趋化因子在体内具有或能够发挥的活性，包括但不限于多种免疫细胞(包括单核细胞、巨噬细胞、T细胞、B细胞、天然杀伤细胞、树突状细胞和中性粒细胞等)的趋化性。

[0030] 当提及包含氨基酸聚合物的基因产物时，术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文可互换使用。

[0031] 术语“对象”、“哺乳动物”和“患者”可互换使用。在一些实施方案中，对象为哺乳动

物。在一些实施方案中,对象为人类。在一些实施方案中,对象为小鼠、大鼠、兔、狗、驴、或实验室测试动物如果蝇、斑马鱼等。

[0032] 预期方法和组合物包括本文所述的任何实施方案的排除。

[0033] 除非本公开另有明确要求,否则术语“一个”和“一种”被定义为一个/种或多于一个/种。

[0034] 如本领域普通技术人员所理解的,术语“基本上”定义为很大程度上但不必须是指定物全部(包括指定物全部)。在任意公开的实施方案中,术语“基本上”可以被“在[百分比]内”的指定物所替代,其中百分比包括0.1%、1%、5%和10%。

[0035] 术语“包括”、“具有”、“包含”和“含有”是开放式连接动词。因此,“包括”、“具有”、“包含”、“含有”一种或多种元素的本发明的方法和系统拥有那些一种或多种元素但不限制为仅拥有那些一种或多种元素。类似地,“包括”、“具有”、“包含”、“含有”一个或多个特征的本发明的方法和系统的元素拥有那些一个或多个特征但不限制为仅拥有那些一个或多个特征。

[0036] 即便没有描述或举例说明,除非本公开或实施方案的性质明确禁止,一个实施方案的一个或多个特征可以应用到其他实施方案。

[0037] 本发明的任何方法或系统可以由任何描述的元素和/或特征和/或步骤组成或基本上由任何描述的元素和/或特征和/或步骤组成,而不是包括/包含/含有/具有任何描述的元素和/或特征和/或步骤。因此,在任何权利要求中,术语“由.....组成”、“基本上由.....组成”、“组成为”或“基本组成为”可以代替上述任何开放式连接动词,以便改变给定权利要求的范围而不是使用开放式连接动词。基本上由所列举的元素组成的组合物不包括任何其他活性成分,但不排除药物赋形剂、缓冲剂、结构成分等。

附图说明

[0038] 以下附图形成本说明书的一部分,并被包含以进一步证实本发明的特定方面。通过参照一个或多个这些附图结合本文所提供的具体实施方案的详细说明可以更好地理解本发明。

[0039] 图1A至图1E:胶原蛋白结合域(CBD)蛋白融合的IL-2以高亲和力与胶原蛋白I和III结合。(1A) vWF A3重组蛋白与IL-2融合的示意图。(1B) 利用考马斯蓝染色在还原条件下通过SDS-PAGE分析IL-2和CBD-IL-2。(1C) IL-2和CBD-IL-2对I型和III型胶原的亲和力(显示出 K_D 值),通过ELISA测定重组小鼠(rm) IL-2R α 。N.D. = 因信号低而不确定。(1D) 显示了[浓度]与[信号]的关系图($n=4$)。(1E) 在IL-2或CBD-IL-2的存在下培养CTLL-2细胞。培养48小时后,分析细胞增殖。两个实验重复。统计分析是通过ANOVA与Tukey检验进行的。 $**p<0.01$ 。

[0040] 图2A至图2B: CBD融合减少了与治疗相关的IL-2的潜在毒性。(2A) 在第0天接种 8×10^5 个MMTV-PyMT细胞。当肿瘤体积达到 500mm^3 时,静脉注射 $50\mu\text{g}$ DyLight 800标记的CBD。每个器官的荧光分析揭示了注射48小时后CBD蛋白的生物分布。(2B) 在第0天接种 5×10^5 个B16F10细胞。在第4天静脉注射CBD-IL-2 ($12\mu\text{g}$) 或IL-2 ($6\mu\text{g}$)。在第5天收集血清,并测量IFN γ 的血清浓度(平均值 \pm SEM)。统计分析是通过ANOVA与Tukey检验进行的。两个实验重复。 $*p<0.05$; N.S. = 不显著。

[0041] 图3A至图3B: CBD-IL-2治疗可降低B16F10黑色素瘤和CT26结肠癌的生长速度。在第0天(3A)接种 5×10^5 个B16F10细胞(3B)接种 5×10^5 个CT26细胞。在(3A)第4天或(3B)第5天静脉内施用CBD-IL-2(12 μ g)、IL-2(6 μ g)或PBS。图形描绘了直到第一只小鼠死亡之前的肿瘤体积。肿瘤体积表示为平均值 \pm SEM。(3A) $n=6$ (3B) $n=6$ 。两个实验重复。使用ANOVA和Tukey检验,并使用每天的值对肿瘤大小进行统计分析。 $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ 。

[0042] 图4A至图4B: CBD与IL-12的融合改善了 α -PD-L1治疗。在第0天皮内接种 5×10^5 个B16F10细胞。在第7天、17天和27天静脉注射25 μ g IL-12、25 μ g (IL-12摩尔当量) CBD-IL-12或PBS。在第8天、18天和28天腹膜内施用100 μ g的 α -PD-L1或PBS。显示了(A)肿瘤生长速率和(B)存活率。PBS和 α -PD-L1, $n=7$ 。 α -PD-L1+IL-12和 α -PD-L1+CBD-IL-12, $n=12$ 。肿瘤体积表示为平均值 \pm SEM。使用不成对的Mann-Whitney检验(在 α -PD-L1+IL-12和 α -PD-L1+CBD-IL-12之间)进行肿瘤生长曲线的统计分析。使用对数秩检验进行生存曲线的统计分析。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。

[0043] 图5A至图5B: CBD-IL-12与检查点抑制剂可产生协同的抗肿瘤免疫力。在第0天皮内接种 5×10^5 个B16F10细胞。在第8天、13天和18天静脉注射25 μ g (IL-12摩尔当量) CBD-IL-12或PBS。在第9天、14天和19天腹膜内施用 α -PD-L1或 α -PD-1+ α -CTLA-4(每剂每抗体100 μ g)。显示了(A)肿瘤生长速率和(B)存活率。PBS、 α -PD-L1、 α -PD-1+ α -CTLA-4, $n=5$ 。CBD-IL-12、 α -PD-L1+CBD-IL-12, $n=10$ 。 α -PD-1+ α -CTLA-4+CBD-IL-12, $n=11$ 。肿瘤体积表示为平均值 \pm SEM。生存曲线的统计分析使用对数秩检验进行。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。

[0044] 图6A至6D: CBD-CCL4融合蛋白与胶原蛋白I和胶原蛋白III结合并保持其活性。(A)通过SDS-PAGE及随后的考马斯亮蓝染色分析WT CCL4和CBD-CCL4。(B、C)通过SPR测量CBD-CCL4对(B)胶原蛋白I和(C)胶原蛋白III的亲和力。用胶原蛋白I(约500RU)和胶原蛋白III(约700RU)对SPR芯片进行了功能化处理,并且CBD-CCL4以指定的浓度流过芯片。曲线代表获得的对CBD-CCL4的特异性响应(以共振单位(RU)表示)。实验曲线符合1:1朗缪尔拟合模型。显示了由拟合曲线确定的结合动力学值[解离常数(K_D)和速率常数(k_{on} 和 k_{off})]。(D)比较在ThP1单核细胞中WT CCL4和CBD-CCL4的信号传递的GPCR激活测定。使用非线性剂量反应曲线拟合模型计算 EC_{50} 值。每个点代表平均值 \pm SEM, $n=3$ 。

[0045] 图7A至图7B: 相对于WT CCL4, CBD-CCL4融合可延长血浆循环时间并改善肿瘤定位。(A)在B16F10黑色素瘤中使用DyLight 800标记的WT CCL4或CBD-CCL4分析血浆药理学。皮内接种 5×10^5 个细胞后4天,通过静脉注射向小鼠施用25 μ g WT CCL4或摩尔当量的CBD-CCL4(25 μ g CCL4基准或93 μ g CBD-CCL4)。在指定的时间点收集血液,分离血浆并分析CCL4浓度。每个点代表平均值 \pm SEM, $n=4$ 。(B)使用DyLight 647标记的WT CCL4或CBD-CCL4分析EMT6乳腺癌中的生物分布。将 5×10^5 个EMT6细胞接种在乳腺脂肪垫中。当肿瘤体积达到500 mm^3 时,通过静脉注射给予25 μ g WT CCL4或摩尔当量的CBD-CCL4(25 μ g CCL4基准,或93 μ g CBD-CCL4)。使用IVIS成像系统测量每个肿瘤的荧光强度,使用已知的标准系列将其转换为注射剂量的百分比,并根据肿瘤的重量进行标准化。每个条形表示平均值 \pm SEM, $n=3$ 。 $**p < 0.01$ 。

[0046] 图8A至图8H: CBD-CCL4融合可募集T细胞、DC,并提高CPI治疗B16F10黑色素瘤的疗效。向小鼠皮内注射 5×10^5 个细胞;4天后,小鼠接受WT CCL4(通过静脉注射给予25 μ g)或摩尔当量的CBD-CCL4(25 μ g CCL4基准、或93 μ g CBD-CCL4,通过静脉注射给予),并组合CPI抗

体治疗,其包括通过静脉注射给予各自100 μ g α PD-L1和 α CTLA4。单独施用CPI治疗作为对照。(A)随着时间的推移监测肿瘤的生长直至肿瘤接种后10天,此时收集肿瘤并进行处理以进行流式细胞术分析。(B至H)评估了免疫细胞的组成,其中的图描述了(B) CD45⁺白细胞、(C) CD103⁺CD11c⁺MHCII^{Hi}DC、(D) CD8⁺T细胞、(E) NK1.1⁺CD3⁻NK细胞、(F) 总CD11c⁺DC、(G) CD4⁺T细胞和(H) FoxP3⁺CD25⁺Treg (总CD4⁺T细胞的)的数量。条形表示平均值 \pm SEM, n=11-13。*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001;****p<0.0001。

[0047] 图9A至图9F: CBD-CCL4组合疗法在肿瘤生长与CD103⁺DC和CD8⁺T细胞浸润之间显示出很强的相关性。(A至F)使用图3中获得的结果进行回归分析,将肿瘤浸润细胞的数量与肿瘤体积进行比较。(A) 肿瘤体积与CD103⁺CD11c⁺MHCII^{Hi}DC之间的相关性,(B) 肿瘤体积与CD8⁺T细胞之间的相关性,(C) CD103⁺CD11c⁺MHCII^{Hi}DC和CD8⁺T细胞之间的相关性,(D) 肿瘤体积与NK1.1⁺CD3⁻NK细胞之间的相关性,(E) 肿瘤体积和总CD11c⁺DC之间的相关性,及(F) 肿瘤体积和总CD45⁺白细胞之间的相关性。

[0048] 图10A至图10H: CBD-CCL4组合治疗可募集T细胞、DC,并提高CPI治疗EMT6乳腺癌的疗效。向小鼠皮下注射5 \times 10⁵个细胞;接种后6天和9天,小鼠接受WT CCL4(通过静脉注射给予25 μ g)或摩尔当量的CBD-CCL4(25 μ g CCL4基准、或93 μ g CBD-CCL4,通过静脉注射给予),并组合CPI抗体治疗,其由通过静脉注射给予各自100 μ g α PD-L1和 α CTLA4组成。单独施用CPI治疗作为对照。(A)随着时间的推移监测肿瘤的生长直至肿瘤接种后10天,此时收集肿瘤并进行处理以进行流式细胞术分析。(B至H)评估了免疫细胞的组成,其中图表描述了(B) CD45⁺白细胞、(C) CD103⁺CD11c⁺MHCII^{Hi}DC、(D) CD8 α ⁺CD11c⁺MHCII^{Hi}DC、(E) CD8⁺T细胞、(F) 总CD11c⁺DC、(G) CD4⁺T细胞和(H) FoxP3⁺CD25⁺Treg (总CD4⁺T细胞的)的数量。条形表示平均值 \pm SEM, n=7-9。*p<0.05;**p<0.01。

[0049] 图11A至图11D: CBD-CCL4组合治疗可减慢已建立的B16F10黑色素瘤的生长,并显著延长生存期。向小鼠皮内注射5 \times 10⁵个细胞;7天后,一旦肿瘤体积超过50mm³,小鼠接受CBD-CCL4(25 μ g CCL4基准或93 μ g CBD-CCL4,通过静脉注射给予),并组合CPI抗体治疗,其由通过腹腔注射给予各自100 μ g的 α PD-L1和 α CTLA4组成。单独施用CPI治疗作为对照。(A)显示直至第一只小鼠死亡的肿瘤生长曲线,(B)存活曲线,(C)单独施用CPI治疗或(D) CBD-CCL4组合治疗的个体生长曲线。图表表示平均值 \pm SEM, n=5。**p<0.01;***p<0.001;****p<0.0001。

[0050] 图12A至图12B: CBD-CCL4治疗与 α PD-1免疫治疗协同作用,以减缓CT26和MC38结肠癌的生长。向小鼠皮内注射5 \times 10⁵个CT26或MC38细胞;接种后5天,小鼠接受WT CCL4(静脉注射给予25 μ g)或摩尔当量的CBD-CCL4(通过静脉注射给予25 μ g CCL4基准或93 μ g CBD-CCL4),并组合通过腹腔注射给予100 μ g α PD-1。单独施用100 μ g α PD-1作为对照。图表描述了(A) CT26和(B) MC38肿瘤模型直至第一只小鼠死亡的生长曲线。条形表示平均值 \pm SEM, n=5。*p<0.05;**p<0.01;****p<0.0001。

[0051] 图13A至图13D: CBD-CCL4结合CPI治疗可减慢自发性MMTV-PyMT乳腺癌的生长。监测MMTV-PyMT小鼠,直至总肿瘤负荷达到100mm³。此时,将小鼠用CBD-CCL4(25 μ g CCL4基准、或93 μ g CBD-CCL4,通过静脉注射给予),并组合CPI抗体治疗,其由通过腹腔注射给予各自100 μ g的 α PD-L1和 α CTLA4组成。单独施用CPI治疗作为对照。初次治疗后7天和14天给予相同剂量。(A)显示直至前两只小鼠死亡的肿瘤生长曲线,(B)存活曲线,和(C)单独施用CPI治疗

或(D) CBD-CCL4组合治疗的个体生长曲线。图表表示平均值±SEM, n=6。*p<0.05;**p<0.01。

具体实施方式

[0052] 细胞因子和趋化因子,在本文中通常被称为细胞因子,已经显示出相当大的抗肿瘤活性,但是先前的研究已经报道了狭窄治疗窗口和/或治疗相关不良事件的实例。本文所述的方法和组合物提供了使用细胞因子的局部治疗,该细胞因子保留在肿瘤内或肿瘤周围,这限制了全身暴露并减少了副作用,在某些情况下,所述副作用可能严重到不得不中断治疗或达不到有效剂量。本文提供的实施例证明了增强的肿瘤组织保留和在ECM亲和肽缀合后血浆中更低的浓度,降低了全身性副作用。与黑色素瘤和结肠癌的小鼠模型中的对照相比,静脉内(iv)注射本文所述的组合物显著延迟了肿瘤的生长、延长了存活期。工程化ECM结合细胞因子的这种简单而可转化的方法代表了癌症治疗中的一种新方法。

[0053] IL-2被用作代表性的细胞因子,以证明通过ECM亲和肽(例如胶原蛋白结合结构域(CBD))将细胞因子定位于肿瘤血管的概念。白介素2(IL-2)的细胞因子免疫疗法在动物模型和临床中表现出相当大的抗肿瘤活性。发明人已经通过将IL-2融合蛋白改造成来自血管性假血友病因子(vWF) A3结构域的CBD来测试CBD在靶向渗漏的血管中的用途;融合蛋白可以静脉内施用,并通过其渗漏的血管靶向肿瘤微环境。这证明了此类融合物/缀合物进入肿瘤基质的用途。在下面的实施例中,显示了CBD蛋白定位于肿瘤组织;注射后CBD-IL-2显示较低的血清浓度;并且与野生型IL-2相比,CBD-IL-2在小鼠黑色素瘤和结肠癌模型中显著延迟了肿瘤的生长。工程化的胶原蛋白结合细胞因子的这种简单且可转化的方法为癌症免疫治疗提供了一种新颖的方法。

[0054] 血管通常衬有紧密连接的细胞,称为内皮细胞,形成不可渗透的屏障。当小血管(通常是毛细管或小静脉)渗漏并释放出液体时,就会发生血管渗漏。血管渗漏可在多种条件下发生,包括肿瘤微环境或慢性炎症,并可影响几乎所有器官床。设想了用于治疗或靶向慢性炎症相关疾病如胰岛素抵抗、糖尿病、心血管疾病、代谢紊乱和癌症的血管渗透性区域的方法和组合物。

[0055] 在与血管渗透性增加有关的疾病的治疗中,本文所述的胶原蛋白结合结构域可有效地用作预防和/或治疗此类疾病的药物组合物。在这个方面,用于预防和/或治疗与血管渗透性有关的疾病的药物组合物可以包括将治疗剂定位在血管渗漏或渗透性区域。治疗剂可以是肽、多肽、化合物、抗体、基因(例如,反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、microRNA等)、适配体、治疗细胞、放射性药物。

[0056] I. 细胞因子和趋化因子

[0057] 细胞因子是细胞在发射后释放的一组蛋白质(在细胞膜上仅表达很少的细胞因子)。细胞产生的细胞因子可以以极低的浓度影响附近的靶细胞或通过血液循环影响靶细胞。它们在促进靶细胞的生长、分化和活化方面具有广泛的功能。许多细胞因子可以靶向免疫细胞并在免疫反应中发挥作用。根据结构和功能上的差异,细胞因子可大致分为趋化因子、白介素、生长因子、转化生长因子、集落刺激因子、肿瘤坏死因子和干扰素。

[0058] 白细胞介素是一组首先确定被白血细胞(白血球)表达的细胞因子。免疫系统的功能在很大程度上取决于白介素。大部分白介素是由辅助CD4 T淋巴细胞、单核细胞、巨噬细

胞和内皮细胞合成的。通常,白介素促进T和B淋巴细胞以及造血细胞的发育和分化。白细胞介素2 (IL-2) 归类为造血素家族,该家族包括许多与细胞生长相关的激素或其他细胞因子。IL-2的功能包括:调节T细胞的成熟和分化、刺激B细胞的增殖和抗体分泌、促进自然杀伤细胞的细胞毒性以及激活单核细胞和巨噬细胞。IL-2还可以刺激T细胞和B细胞继续表达MHC,还可以刺激自然杀伤细胞产生几种不同的细胞因子,包括TNF- α 、IFN- γ 和粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)。研究表明,IL-2具有抗肿瘤和疫苗增强作用。

[0059] 趋化因子是一组能够吸引白细胞的细胞因子。趋化因子通常是具有小分子量的带正电荷的分泌蛋白。它们的主要功能是将免疫细胞吸引到具有组织损伤或病原体感染的区域,使白细胞随后执行吞噬作用或引发针对该特定部位病原体的炎症。趋化因子吸引的白细胞可能包括具有先天免疫力的嗜中性粒细胞、单核细胞/巨噬细胞、自然杀伤细胞、树突细胞和其他白细胞;以及具有适应性免疫力的T淋巴细胞 (T细胞) 或B淋巴细胞 (B细胞)。通常,趋化因子具有四个高度保守的半胱氨酸 (C),形成两个二硫键以稳定其结构。基于前两个半胱氨酸之间的氨基酸数量不同以及是否存在第一个半胱氨酸,可以将它们分为CXC (或 α)、CC (或 β)、C (或 γ) 和CX3C四个亚家族。基质细胞衍生因子-1 (SDF-1) 被归类为趋化因子的CXC亚家族,也被称为CXC配体12 (CXCL12)。

[0060] 在特定实施方案中,细胞因子是IL-2。癌症免疫疗法已在临床上显示出可观的治疗效果。作为细胞因子药物,白介素2 (IL-2:阿地白介素) 已获得美国食品和药物管理局 (FDA) 的批准 (Jiang等, *Oncoimmunology* 5:e1163462, 2016), 以用于治疗晚期黑色素瘤和肾细胞癌。阿地白介素显示出高应答率、延长了生存期,而由于诱导了严重的不良事件,其治疗窗口狭窄 (Rosenberg等人, *N Engl J Med* 313:1485-1492, 1985)。IL-2主要从CD4⁺T细胞分泌,在较小程度上从CD8⁺T细胞和自然杀伤 (NK) 细胞分泌 (Boyman和Sprent, *Nature reviews. Immunology* 12:180-190, 2012)。IL-2诱导T细胞、B细胞和NK细胞的增殖和活化 (Boyman和Sprent, *Nature reviews. Immunology* 12:180-190)。尽管IL-2在高浓度下激活免疫系统,但IL-2在低浓度下会逆转其作用以诱导和维持调节性T细胞 (Tregs), 该调节性T细胞是免疫抑制细胞 (Jiang等人, *Oncoimmunology* 5:e1163462, 2016)。由于其在血液中的快速半衰期,已提出了对IL-2融合蛋白进行工程改造以提高其半衰期的建议,并且与野生型相比,其显示出更高的功效 (Zhu等人, *Cancer Cell* 27:489-501, 2015)。

[0061] 在另一个实施方案中,细胞因子可以选自IL-12、IL-15、IL-21、CC14、CCL21、CXCL9、CXCL10、VEGF-C或其他具有抗肿瘤特性的细胞因子。

[0062] 人IL-15的氨基酸序列为

MNWWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD

[0063] **ASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS**
(SEQ ID NO:16)。

[0064] 小鼠IL-15的氨基酸序列为

MNWDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLYTDSDFHPSCKVTAMNCFLELQVILHEYSNM

[0065] **TLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCKECELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTS**
(SEQ ID NO:17)。

[0066] 人IL-21的氨基酸序列为

- [0067] MQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKS
ANTGNNERIINVSIIKLLKRKPPSTNAGRROKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLL
QKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO:18)。
- [0068] 小鼠IL-21的氨基酸序列为
MHKSSPQGPDRLLIRLRHLIDIVEQLKIYENDLDPELLSAPQDVKGHCEHAACFQK
- [0069] AKLKPSNPGNNKTFIDLVAQLRRRLPARRGGKKQKHIACPCSCDSYEKRTPKEFLER
LKWLLQKMIHQHLS (SEQ ID NO:19)。
- [0070] 人IL-12 p35亚基的氨基酸序列为
RNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKT
STVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSMALCLSSIYEDLKMYQVE
- [0071] FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIK
LCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO:20)。
- [0072] 人IL-12 p40亚基的氨基酸序列为
IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLTLDQSSEVLGSGKTLTIQ
VKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAK
NYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSV
- [0073] ECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNSR
QVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASIS
VRAQDRYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO:21)。
- [0074] 小鼠IL-12 p35亚基的氨基酸序列为
RVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKT
CLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPQKTSMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAIN
- [0075] AALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCIL
LHAFSTRVVTINRVMGYLSSA (SEQ ID NO:22)。
- [0076] 小鼠IL-12 p40亚基的氨基酸序列为
MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGVIGSGKTLTIT
VKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSG
RFTCSWLQQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLQDRDYEKYSVSC
- [0077] QEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIKPDPPKNLQMKPLKNSQVE
VSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQGAFLEKSTSTEVQCK
GGNVCVQAQDRYNSSCSKWACVPCRVRVRS (SEQ ID NO:23)。
- [0078] 人CCL4的氨基酸序列为
APMGSDPPTACCFSYTARKLPHNFVVDYYETSSLCSQPAVVFQTKRGKQVCADPSES
- [0079] WVQ EYVYDLELN (SEQ ID NO:24)。
- [0080] 小鼠CCL4的氨基酸序列为
APMGSDPPTSCCFSYTSRQLHRSFVMDYYETSSLCSKPAVVFVLTGRGRQICANPSEP
- [0081] WVTEYMSDLELN (SEQ ID NO:25)。

- [0082] 人CCL21的氨基酸序列为
SDGGAQDCCLKYSQRKIPAKVVRSYRKQEPSLGC SIPAILFLPRKRSQAELCADPKEL
- [0083] WVQQLMQHLDKTPSPQKPAQGCRKDRGASKTGKKGKGSKGCRKTERSQTPKGP
(SEQ ID NO:26)。
- [0084] 小鼠CCL21的氨基酸序列为
SDGGGQDCCLKYSQKKIPYSIVRGYRKQEPSLGCPIAILFLPRKHSPKPELCANPEEG
- [0085] WVQNLMRRLDQPPAPGKQSPGCRKNRGTSGKKGKGSKGCKRTEQTQPSRG (SEQ
ID NO:27)。
- [0086] 人CXCL9的氨基酸序列为
TPVVVRKGRCSICISTNQGTHLQSLKDLKQFAPSPSCEKIEIIATLKNQVQTCLNPDSAD
- [0087] VKELIKKWEKQVSQKKKQKNGKKHQKKVLRKSRSRQK KTT (SEQ ID NO:28)。
- [0088] 小鼠CXCL9的氨基酸序列为
TLVIRNARCSCISTSRGTHYKSLKDLKQFAPSPNCNKTEIIATLKNQDQTCLDPDSAN
- [0089] VKKLMKEWEKINQKKKQKRGKKHQKNMKNRKP KTPQSRRRSRKTT (SEQ ID
NO:29)。
- [0090] 人CXCL10的氨基酸序列为
VPLSRTVRC TCISISNPVNPRSLKLEIIPASQFCPRVEIIATM KKKGEKRCLNPESKAI
- [0091] KNLLKAVSKERSKRSP (SEQ ID NO:30)。
- [0092] 小鼠CXCL10的氨基酸序列为
IPLARTVRCNCIHIDDGPVRMRAIGKLEIIPASLSCPRVEIIATM KKNDEQRCLNPESKT
- [0093] IKNLMKA FSQKR SKRAP (SEQ ID NO:31)。
- [0094] 人VEGF-C的氨基酸序列为
AHYNTEILKSIDNEW RKTQCMPREVCIDVGKEFGVATNTFFKPPCVSVYRCGGCCNS
- [0095] EGLQCMNTSTSYLSKTLFEITVPLSQGPKPVTISFANHTSCRCMSKLDVYRQVHSIIRR
(SEQ ID NO:32)。
- [0096] 小鼠VEGF-C的氨基酸序列为
TEETIKFAAAHYNTEILKSIDNEW RKTQCMPREVCIDVGKEFGVATNTFFKPPCVSVY
- [0097] RCGGCCNSEGLQCMNTSTSYLSKTLFEITVPLSQGPKPVTISFANHTSCRCMSKLDVY
RQVHSIIRR (SEQ ID NO:33)。
- [0098] 小鼠IFN β 的氨基酸序列为
MNNRWILHA AFLLCFSTTALSINYKQLQLQERTNIRKQELLEQLNGKINLTYRADF
- [0099] KIPMEMTEKMOKSYTAF AIQEMLQNVFLVFRN NFSSTGWNETIVVRLLDLHQQT V F
LKT VLEEKQEERLTWEMSSTALHLKSY YWRVQR YL KLMK YNSYAWMVVRAE IFRN
FLIIRRLTRNFQN (SEQ ID NO:39)。
- [0100] 人IFN β 的氨基酸序列为

MSYNLLGFLQ

- [0101] **RSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI
AIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKR
YYGRILHYLKAKEYSH CAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRLN (SEQ ID NO:40).**
- [0102] 小鼠IFN α 2的氨基酸序列为
- [0103] **CDLPHTYNLRNKRALKVLAQMRRLPFLSCLKDRQDFGFPLEKVDNQQIQKAQAIPV
LRDLTQQTLNLFSTKASSAAWNTLLDSFCNDLHQQLNDLQTCLMQQVGVQEPPLT
QEDALLAVRKYFHRITVYLREKKHSPCAWEVVRAEVWRALSSSVNLLPRLSEEKE
(SEQ ID NO:41).**
- [0104] 人IFN α 2的氨基酸序列为
- [0105] **MALTFALLVALLVLSCKSSCSVGCPLPQTHSLGSRRTLMMLLAQMRKISLFSCLKDRH
DFGFPQEEFGNQFQK (SEQ ID NO:42).**
- [0106] 小鼠XCL1的氨基酸序列为
- [0107] **VGTEVLEESSCVNLQTQRLPVQKIKTYIWEAGMRAVIFVTKRGLKICADPEAKWVK
AAIKTVDGRASTRKNMAETVPTGAQRSTSTAITLTG (SEQ ID NO:43).**
- [0108] 人XCL1的氨基酸序列为
- [0109] **GSEVSDKRTCVSLTTQRLPVSRIKTYTITEGSLRAVIFITKRGLKVCADPQATWVRDV
VRSMRKSNTNRN NMIQTKPTGTQQSTNTAVTLTG (SEQ ID NO:44).**
- [0110] 小鼠IL-15超激动剂的氨基酸序列为
- [0111] **GTTCPPPVSIEHADIRVKNYSVNSRERYVCNSGFKRKAGTSTLIECVINKNTNVAHWT
TPSLKCIDRPSLAHYSPVPTVVTPKVTSQPESPSPEAKEPEASGGSGGGSGGGSGGG
GSLQNWIDVRYDLEKIESLIQSIHIDTTLTYDSDFHPSCKVTAMNCFLELQVILHEYS
NMTLNETVRNVLYLANSTLSSNKNVAESGCKECELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINT
S (SEQ ID NO:45).**
- [0112] 人IL-15超激动剂的氨基酸序列为
- [0113] **ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWT
TPSLKCIDRVDDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSNWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESD
VHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTEGCKECE
ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:46).**
- [0114] II. ECM亲和肽
- [0115] 胶原蛋白是细胞外基质 (ECM) 蛋白,其可调节多种细胞生物学功能如正常组织和肿瘤组织中的增殖、分化和黏附 (Ricard-Blum, Cold Spring Harb Perspect Biol 3: a004978, 2011)。胶原蛋白是哺乳动物体内最丰富的蛋白质,在几乎以28种亚型中的一种或多于一种存在于所有组织中 (Ricard-Blum, Cold Spring Harb Perspect Biol 3:a

004978,2011)。血管内皮下间隙富含胶原蛋白。由于其在生理条件下的不溶性,胶原蛋白几乎不存在于血液中(Dubois等人,Blood 107:3902-06,2006;Bergmeier和Hynes,Cold Spring Harb Perspect Biol 4:a005132,2012)。据报道,由于异常的结构,肿瘤血管是可渗透的(Nagy等人,British journal of cancer 100:865,2009)。因此,由于其渗漏的血管,胶原蛋白暴露于肿瘤中(Liang等人,Journal of controlled release 209:101-109,2015;Liang等人,Sci Rep 6:18205,2016;Yasunaga等人,Bioconjugate chemistry 22:1776-83,2011;Xu等人,The Journal of cell biology 154:1069-80,2001;Swartz和Lund,Nat Rev Cancer 12:210-19)。而且,与正常组织相比,肿瘤组织中胶原蛋白的含量有所增加(Zhou等人,JCancer 8:1466-76,2017;Provenzano等人,BMC Med 6:11,2008)。

[0116] 血管性假血友病因子(vWF)作为凝血因子,可与I型和III型胶原蛋白以及血小板上的黏附受体GPIIb/IIIa结合(Lenting等人,Journal of thrombosis and haemostasis:JTH 10:2428-37,2012;Shahidi Advances in experimental medicine and biology 906:285-306,2017)。受伤时,内皮细胞下方的胶原蛋白暴露于血浆中,vWF-胶原蛋白结合引发血栓形成级联反应(Shahidi Advances in experimental medicine and biology 906:285-306,2017;Wu等人,Blood 99:3623-28,2002)。在已报道的非细菌来源的蛋白质/肽中,vWF A结构域对胶原蛋白的亲合力最高(Addi等人,Tissue Engineering Part B:Reviews,2016)。特别是在A结构域内,vWF的A3结构域已被报道为胶原蛋白结合结构域(CBD)(Ribba等人,Thrombosis and haemostasis 86:848-54,2001)。如上所述,发明人认为,具有vWF A3 CBD的融合蛋白可以实现靶向细胞因子免疫治疗,即使被全身注射时,由于通过渗漏的肿瘤血管暴露于胶原蛋白,也可实现。

[0117] 本公开的实施方案涉及ECM亲和肽。在一些实施方案中,ECM亲和肽是来自血管性假血友病因子(vWF)的肽。人类vWF的序列包含:

MIPARFAGVLLALALILPGTLCAEGTRGRSSTARCSLFGSDFVNTFDGSMYSFAGYCS
YLLAGGCQKRSFSIIGDFQNGKRVLSVYLGEFFDIHLFVNGTQTQGDQRVSMPLYAS
KGLYLETEAGYYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQVLLSDRYFNKTCGLCGNFNIFAEDD
FMTQEGTLTSDPYDFANSWALSSGEQWCERASPPSSSCNISSGEMQKGLWEQCQLL
KSTSVFARCHPLVDPEPFVALCEKTLCECAGGLECACPALLEYARTCAQEGMVLYG
WTDHSACSPVCPAGMEYRQCVSPCARTCQSLHINEMCQERCVDGCSCPEGQLLDEG
LCVESTTEPCVHSGKRYPPGTSLSRDCNTCICRNSQWICSNEECPGECLVTGQSHFKS
FDNRYFTFSGICQYLLARDCQDHSFSIVIETVQCADDRDAVCTRSVTVRLPGLHNSLV
KLKHGAGVAMDGDVQLPLLKGDRLRIQHTVTASVRLSYGEDLQMDWDGRGRLLV
KLSPVYAGKTCGLCGNYNGNQGDFFLTPSGLAEPRVEDFGNAWKLHGDCQDLQKQ
HSDPCALNPRMTRFSEEACA VLTSPTEACHRAVSPLPYLRNCRYDVCSCSDGRECL
CGALASYAAACAGRGVRVAWREPGRCELNCPKGQVYLQCGTPCNLTCRSLSYNDE
ECNEACLEGCFPPGLYMDERGDVCPKAQCPCYYDGEIFQPEDIFSDHHTMCYCEDG
FMHCTMSGVPGSLLPDAVLSSPLSHRSKRSLSCRPPMVKLVCPADNLRAEGLECTKT
CQNYDLECMMSGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQKEYAPGETVKIGC
[0118] NTCVCRDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSN
PGTFRILVGNKGC SHPSVKCKKRVTLVEGGEIELFDGEVNVKRPMKDETHFEVVES
GRYIILLGKALSVVWDRHLSISVVLKQTYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVE
EDPVDFGNSWKVSSQCADTRK VPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRILTSDVFQDC
NKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHKGKVVWRTATLCPQ
SCEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILD
ELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNL TCEACQEPG
GLVVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFV
VDMMERLRISQKWVRVA VVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSSELRRIASQVKYAGSQVA
STSEVLKYTLFQIFSKIDRPEASRITLLL MASQEPQRM SRNFVR YVQGLK KKKVIVIPV
GIGPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLSSVDELEQQRDEIVSYLCDLAPEAPPPTLPPDM
AQVTVGPGLLGVSTLGPKRNSMVLDAFVLEGS DKIGEADFNRSKEFMEEVIQRMD
VGQDSIHVTVLQYSYMVTVEYPFSEAQSKGDILQRVREIRYQGGNRTNTGLALRYLS
DHSFLVSQGDREQAPNLVYMVTGNPASDEIKRLPGDIQVVPVIGVGPANVQELERIG
WPNAPILIQDFETLPREAPDLVLQRCCSGEGLQIPTLSPAPDCSQPLDVILLLDGSSSFP
ASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQVSVLQYGSITTIDVPWNVPEKAHLLSLVDV

MQREGGPSQIGDALGFAVRYLTSEMHGARGASKAVVILVTDVSVDSVDAADAA
 RSNRVTVPFIGDRYDAAQLRILAGPAGDSNVVKLQRIEDLPTMVTLGNSFLHKLCS
 GFVVICMDEDGNEKRPGDVWTLPDQCHTVTCQPDGQTLKSHRVNCDRGLRPSCP
 SQSPVKVEETCGCRWTCPCVCTGSSTRHIVTFDQNFKLTGSCSYVLFQNKEQDLEV
 ILHNGACSPGARQGCMSIEVKHSALSVELHSDMEVTVNGRLVSPVYVGGNMEVN
 VYGAIMHEVRFNHLGHIFTFTPQNEFQLQLSPKTFASKTYGLCGICDENGANDFML
 RDGTVTTDWKTLVQEWTVQRPGQTCQPILEEQCLVPDSSHCVLLLPLFAECHKVL
 APATFYAICQQDSCHQEQVCEVIASIAHLCRTNGVCVDWRTPDFCAMSPPSLVYN
 HCEHGCPRHCDGNVSSCGDHPSEGCFPPDKVMLEGSCVPEEACTQCIGEDGVQHQ
 [0119] FLEAWVPDHQPCQICTCLSGRKVNCTTQPCPTAKAPTCLCEVARLRQNADQCCPE
 YECVCDPVSCDLPPVPHCERGLQPTLTNPGECPNFTCACRKEECKRVSPSPCPHRL
 PTLRKTQCCDEYECACNCVNSTVSCPLGYLASTATNDCGCTTTTCLPDKVCVHRSTI
 YPVGQFWEEGCDVCTCTDMEDAVMGLRVAQCSQKPCEDSCRSQFTYVLHEGECG
 RCLPSACEVVTGSPRGDSQSSWKSQVGSQWASPENPCLINECVRVKEEVFIQQRNVSC
 PQLEVPVCPSPGFQLSCKTSACCPSCRCERMEACMLNGTVIGPGKTMIDVCTTCRCM
 VQVGVISGFKLECRKTTNCPCLGYKEENNTGECGRCLPTACTIQLRGGQIMTLKR
 DETLQDGDTHFCKVNERGEYFWEKRVGTGPPFDEHKCLAEGGKIMKIPGTCCDTC
 EEPECNDITARLQYVKVGSCKSEVEVDIHYCQGKCASKAMYSIDINDVQDQCSCCSP
 TRTEPMQVALHCTNGSVVYHEVLNAMECKCSRKCSK (SEQ ID NO:13).

[0120] 在一些实施方案中,该肽来自vWF A3结构域。vWF A3结构域衍生自人序列残基第1670至1874位(成熟vWF的第907至1111位),并具有以下序列:

CSGEGQLQIPTLSPAPDCSQPLDVILLLDGSSSFPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQ
 VSVLQYGSITTIDVPWNVPEKAHLLSLVDMQREGGPSQIGDALGFAVRYLTSEM
 [0121] HARGPGASKAVVILVTDVSVDSVDAADAAARSNRVTVPFIGDRYDAAQLRILAGPA
 GDSNVVKLQRIEDLPTMVTLGNSFLHKLCSG (SEQ ID NO:3).

[0122] 肽的实例包括SEQ ID NO:13的全部或部分(即,片段)或SEQ ID NO:3的全部或部分。在一些实施方案中,该肽来自vWF A1结构域。vWF A1结构域衍生自人序列残基第1237至1458位(成熟vWF的第474至695位),并具有以下序列:

CQEPGGLVPPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSRLSEAEFEV
 LKAFVVDMMERLRISQKWVRAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSSELRRIASQVKYA
 [0123] GSQVASTSEVLKYTLFQIFSKIDRPEASRITLLMASQEPQRMSRNFVRYVQGLK
 VIVIPVGIGPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLSSVDELEQRDEIVSYLC (SEQ ID
 NO:11).

[0124] 在某些实施方案中,ECM亲和肽包含全部或部分的饰胶蛋白聚糖氨基酸序列。饰胶蛋白聚糖胶原蛋白结合域具有以下氨基酸序列:人饰胶蛋白聚糖

**GPFQQRGLFDFMLEDEASGIGPEVPDDRDFEPSLGPVCPFRQCCHLRVVQCSLDGLD
KVPKDLPPDTTLLDLQNNKITEIKDGDGFKNLKLNHALILVNNKISKVSPGAFTPLVKL
ERLYLSKNQLKELPEKMPKTLQELRAHENEITKVRKVTFNGLNQMIIVIELGTNPLKSS
[0125] GIENGAFQGMKKLSYIRIADTNITSIPQGLPPSLTELHLDGNKISRVAASLKGNNLA
KLGLSFNSISAVDNGSLANTPHLRELHLDNNKLTRVPGGLAEHKYIQVVYLHNNNIS
VVGSSDFCPPGHNTKKASYSGVSLFSNPVQYWEIQPSTFRVCVYVRSIQGLGNYK (SEQ
ID NO:15).**

[0126] 在一些实施方案中,ECM亲和肽包含来自P1GF-2的肽。P1GF-2具有以下序列:
**MPVMRLFPCFLQLLAGLALPAVPPQQWALSAGNGSSEVEVVPFQEVWGRSYCRAL
RLVDVVSEYPSEVEHMFSPSCVSLLRCTGCCGDENLHCVVETANVTMQLLKIRSGD**

[0127] **RPSYVELTFSQHVRCECRPLREKMKPERRRPPKGRGKRRREKQRPTDCHLCGDAVPR
R (SEQ ID NO:4).**

[0128] 示例性的P1GF-2ECM亲和肽包括:RRRPKGRGKRRREKQRPTDCHLCGDAVPRR (SEQ ID NO:5);RRRPKGRGKRRREKQRPTDCHL (SEQ ID NO:1);RRPKGRGKRRREKQRPTD (SEQ ID NO:6);RRRPKGRGKRRREKQ (SEQ ID NO:7);GKRRREKQ (SEQ ID NO:8);RRRPKGRG (SEQ ID NO:9);和RRKTKGKRKRSRNSQTEEPHP (SEQ ID NO:10)。

[0129] 在一些实施方案中,ECM亲和肽是来自CXCL-12 γ 的肽。CXCL-12 γ 的序列如下:
CXCL-12 γ :KPVLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKIWEYLEKAL
NKGRRREEKVGKKEKIGKKKRQKKRKAQAQRKN (SEQ ID NO:12)。

[0130] 一个示例性肽包括全部或部分的SEQ ID NO:12和以下的肽:
GRREEKVGKKEKIGKKKRQKKRKAQAQRKN (SEQ ID NO:2)。

[0131] ECM亲和肽可以是与ECM或CBD肽或上述肽的片段具有75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性(或其中的任何可衍生范围)的肽。肽或多肽可以具有一个或多个保守或非保守性替换。替换的变异体一般含有在蛋白质内一个或多个位点处一个氨基酸与另一个的交换,并可以设计为调整多肽的一种或多种性质,具有或没有其他功能或性质的损失。替换可以是保守性的,即一个氨基酸用一个相似形状和电荷的氨基酸取代。保守性替换在本领域是众所周知的,包括例如以下的变化:丙氨酸到丝氨酸;精氨酸到赖氨酸;天冬酰胺到谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸盐到谷氨酸盐;半胱氨酸到丝氨酸;谷氨酸到天冬酰胺;谷氨酸盐到天冬氨酸盐;甘氨酸到脯氨酸;组氨酸到天冬氨酸或谷氨酸;异亮氨酸到亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸到缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸到精氨酸;蛋氨酸到亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸到酪氨酸、亮氨酸或蛋氨酸;丝氨酸到苏氨酸;苏氨酸到丝氨酸;色氨酸到酪氨酸;酪氨酸到色氨酸或苯丙氨酸;以及缬氨酸到异亮氨酸或亮氨酸。或者,替换可以是非保守性的,使得影响多肽的功能或活性。非保守性的改变一般涉及用化学上不同的残基来替换残基,例如用极性 or 带电荷的氨基酸替换非极性的或不带电荷的氨基酸,反之亦然。

[0132] 本文中描述的多肽可以在本公开的肽或多肽的至少或至多3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、

23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个、101个、102个、103个、104个、105个、106个、107个、108个、109个、110个、111个、112个、113个、114个、115个、116个、117个、118个、119个、120个、121个、122个、123个、124个、125个、126个、127个、128个、129个、130个、131个、132个、133个、134个、135个、136个、137个、138个、139个、140个、141个、142个、143个、144个、145个、146个、147个、148个、149个、150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个、161个、162个、163个、164个、165个、166个、167个、168个、169个、170个、171个、172个、173个、174个、175个、176个、177个、178个、179个、180个、181个、182个、183个、184个、185个、186个、187个、188个、189个、190个、191个、192个、193个、194个、195个、196个、197个、198个、199个、200个、201个、202个、203个、204个、205个、206个、207个、208个、209个、210个、211个、212个、213个、214个、215个、216个、217个、218个、219个、220个、221个、222个、223个、224个、225个、226个、227个、228个、229个、230个、231个、232个、233个、234个、235个、236个、237个、238个、239个、240个、241个、242个、243个、244个、245个、246个、247个、248个、249个、250个、300个、400个、500个、550个、1000个或多于1000个连续氨基酸或其中任何可衍生的范围内包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或多于15个(或其中的任何可衍生范围)不同氨基酸。

[0133] 本文所述的多肽段或片段可包括本公开的肽或多肽的3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个、101个、102个、103个、104个、105个、106个、107个、108个、109个、110个、111个、112个、113个、114个、115个、116个、117个、118个、119个、120个、121个、122个、123个、124个、125个、126个、127个、128个、129个、130个、131个、132个、133个、134个、135个、136个、137个、138个、139个、140个、141个、142个、143个、144个、145个、146个、147个、148个、149个、150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个、161个、162个、163个、164个、165个、166个、167个、168个、169个、170个、171个、172个、173个、174个、175个、176个、177个、178个、179个、180个、181个、182个、183个、184个、185个、186个、187个、188个、189个、190个、191个、192个、193个、194个、195个、196个、197个、198个、199个、200个、201个、202个、203个、204个、205个、206个、207个、208个、209个、210个、211个、212个、213个、214个、215个、216个、217个、218个、219个、220个、221个、222个、223个、224个、225个、226个、227个、228个、229个、230个、231个、232个、233个、234个、235个、236个、237个、238个、239个、240个、241个、242个、243个、244个、245个、246个、247个、248个、249

个、250个、300个、400个、500个、550个、1000个或多于1000个连续氨基酸或其中任何可衍生的范围。

[0134] 本文所述的多肽可以具有至少、至多或恰好为5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个、101个、102个、103个、104个、105个、106个、107个、108个、109个、110个、111个、112个、113个、114个、115个、116个、117个、118个、119个、120个、121个、122个、123个、124个、125个、126个、127个、128个、129个、130个、131个、132个、133个、134个、135个、136个、137个、138个、139个、140个、141个、142个、143个、144个、145个、146个、147个、148个、149个、150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个、161个、162个、163个、164个、165个、166个、167个、168个、169个、170个、171个、172个、173个、174个、175个、176个、177个、178个、179个、180个、181个、182个、183个、184个、185个、186个、187个、188个、189个、190个、191个、192个、193个、194个、195个、196个、197个、198个、199个、200个、201个、202个、203个、204个、205个、206个、207个、208个、209个、210个、211个、212个、213个、214个、215个、216个、217个、218个、219个、220个、221个、222个、223个、224个、225个、226个、227个、228个、229个、230个、231个、232个、233个、234个、235个、236个、237个、238个、239个、240个、241个、242个、243个、244个、245个、246个、247个、248个、249个、250个、300个、400个、500个、550个、1000个或多于1000个氨基酸(或其中任何可衍生的范围)的固定长度。

[0135] 接头序列可包含在细胞因子-肽构建体中。例如,具有至少、至多或恰好3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个或多于100个氨基酸(或其中的任何可衍生范围)的接头可以分隔抗体和肽。

[0136] 本公开的ECM亲和肽可对细胞外基质的一种或多种组分具有亲和力,例如纤连蛋白、胶原蛋白(I型胶原蛋白、III型胶原蛋白和/或IV型胶原蛋白)、生腱蛋白C、纤维蛋白原和纤维蛋白。在某些方面,ECM亲和肽对胶原具有亲和力。在其他方面,ECM亲和肽不结合纤连蛋白。

[0137] III. 核酸

[0138] 在某些实施方案中,本公开涉及编码本发明的蛋白质、多肽和肽如可操作地连接至细胞因子或趋化因子的ECM亲和肽的重组多核苷酸。因此,某些实施方案涉及编码ECM亲和多肽和/或与细胞因子或其片段融合的ECM亲和多肽或其片段的核苷酸。

[0139] 如在本申请中所使用的,术语“多核苷酸”指的是重组的或已经从总基因组核酸中分离的核酸分子。包括在术语“多核苷酸”内的是寡核苷酸(在长度上具有100个或少于100个残基的核酸),重组载体,包括例如质粒、黏粒、噬菌体、病毒等。在特定方面,多核苷酸包括基本上从其天然存在的基因或蛋白编码序列中分离出来的调控序列。多核苷酸可以是单链的(编码或反义的)或双链的,并可以是RNA、DNA(基因组、cDNA或合成的)、其类似物或其组合。其他编码或非编码序列可以但不必存在于多核苷酸内。

[0140] 在这方面,术语“基因”、“多核苷酸”或“核酸”用来指编码蛋白质、多肽或肽的核酸(包括适当的转录、转译后改性或定位所需要的任何序列)。如本领域技术人员会理解的,该术语包括基因组序列、表达盒、cDNA序列和表达或可以适合于表达蛋白质、多肽、域、肽、融合蛋白和突变体的更小的工程化的核酸片段。对多肽的全部或部分编码的核酸可以含有以下连续核酸序列:编码本文描述或引用的一种或多于一种氨基酸序列的多核苷酸的10个、20个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、110个、120个、130个、140个、150个、160个、170个、180个、190个、200个、210个、220个、230个、240个、250个、260个、270个、280个、290个、300个、310个、320个、330个、340个、350个、360个、370个、380个、390个、400个、410个、420个、430个、440个、441个、450个、460个、470个、480个、490个、500个、510个、520个、530个、540个、550个、560个、570个、580个、590个、600个、610个、620个、630个、640个、650个、660个、670个、680个、690个、700个、710个、720个、730个、740个、750个、760个、770个、780个、790个、800个、810个、820个、830个、840个、850个、860个、870个、880个、890个、900个、910个、920个、930个、940个、950个、960个、970个、980个、990个、1000个、1010个、1020个、1030个、1040个、1050个、1060个、1070个、1080个、1090个、1095个、1100个、1500个、2000个、2500个、3000个、3500个、4000个、4500个、5000个、5500个、6000个、6500个、7000个、7500个、8000个、9000个、10000个或多于10000个核苷酸、核苷或碱基对,包括其间的所有值和范围的连续核酸序列。还预期特定的多肽可以由核酸进行编码,所述核酸含有具有稍微不同的氨基酸序列的变化但是对相同或基本上相似的蛋白质编码。

[0141] 在特定的实施方案中,本发明涉及分离的核酸区段和重组载体,该重组载体结合了编码本公开内容的多肽或肽的核酸序列。术语“重组”可以与多核苷酸或多肽一起使用,这通常指的是在体外生产和/或操纵的多肽或多核苷酸,或者为这种分子的复制产物。

[0142] 在其他的实施方案中,本发明涉及分离的核酸区段和重组载体,该重组载体结合了编码本公开内容的多肽或肽的核酸序列。

[0143] 本公开中使用的核酸片段可以与其他核酸序列如启动子、多腺苷酸化信号、其他限制酶位点、多克隆位点、其他编码片段等组合使用,使得其总长度可以明显地变化。因此,预期可以采用几乎任何长度的核酸片段,其中总长度优选地由制备以及在计划的重组核酸方案中的使用的简便性来限制。在一些情况下,核酸序列可以利用其他异源编码序列来编码多肽序列,例如以提供多肽的纯化、运输、分泌、转译后修饰,或提供治疗获益,例如靶向或功效。如以上所讨论的,可以将标记或其他异源的多肽添加到经修饰的多肽编码序列,其中“异源”指的是与经修饰的多肽不相同的多肽。

[0144] 在特定实施方案中,本公开明提供与本文公开的序列具有基本同一性的多核苷酸变体;使用本文所述方法(例如使用标准参数的BLAST分析),那些多核苷酸变体与本公开的多核苷酸序列相比,包含至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或

99%或更高,包括其间的所有值和范围的序列同一性。

[0145] 本公开还预期与所有以上描述的多核苷酸互补的多核苷酸的用途。

[0146] 1. 载体

[0147] 本公开的多肽可以由包含在载体中的核酸分子编码。术语“载体”用来指运载体核酸分子,异源的核酸序列可以插入到所述运载体核酸分子中用于引入到细胞中,在细胞中其可以被复制和表达。核酸序列可以是“异源的”,这表示该核酸序列处于对于其中引入载体的细胞而言或者对于被并入的核酸而言非原有的环境中,其包含与细胞或核酸中的序列同源的序列,但在宿主细胞或核酸内的位置中,通常找不到该核酸序列。载体包括DNA、RNA、质粒、黏粒、病毒(噬菌体、动物病毒和植物病毒)和人工染色体(例如YAC)。本领域技术人员应当有能力通过标准重组技术构建载体(例如Sambrook等人,2001;Ausubel等人,1996,两者都通过引用并入本文)。除了编码本公开的多肽,载体可以编码其他多肽序列,例如一种或多种其他细菌肽、标记物、或免疫原性增强的肽。编码这种融合蛋白有用的载体包括pIN载体(Inouye等人,1985)、编码一段组氨酸的载体和pGEX载体,用于产生谷胱甘肽S-转移酶(GST)可溶解的融合蛋白以用于之后的纯化和分离或裂解。

[0148] 术语“表达载体”指的是含有对能够被转录的基因产物的至少部分编码的核酸序列的载体。在一些情况下,然后RNA分子转译为蛋白质、多肽或肽。表达载体可以含有各种“控制序列”,所述“控制序列”指的是在特定宿主生物中有效连接的编码序列的转录和可能的转译所需要的核酸序列。除了管理转录和转译的控制序列之外,载体和表达载体还可以含有具有其他功能的核酸序列,并且在本文中进行描述。

[0149] 2. 启动子和增强子

[0150] “启动子”是控制序列。启动子一般是控制转录的启动和速度的核酸序列的区域。其可以含有遗传因子,在所述遗传因子处调节蛋白和分子可以结合例如RNA聚合酶和其他转录因子。短语“可操作地放置”、“可操作地连接”、“处于控制之下”和“处于转录控制之下”表示启动子处于正确的功能位置和/或相对于核酸序列的方向,以控制转录启动和该序列的表达。启动子可以或不可以与“增强子”一起使用,所述“增强子”指的是涉及核酸序列的转录激活的顺式作用调控序列。

[0151] 因此,在选择用于表达的细胞类型或生物体中采用有效地指挥DNA节段的表达的启动子和/或增强子可以是重要的。分子生物学技术领域的技术人员一般知道用于蛋白质表达的启动子、增强子、和细胞类型组合(参见Sambrook等人,2001,其通过引用并入本文)。所采用的启动子可以是组成型的、组织特异性的或诱导型的,且在特定实施方案中,在规定的条件下可以导致引入的DNA阶段的高水平表达,例如重组蛋白或肽的大规模生产。

[0152] 在本发明中可以采用各种因子/启动子以调节基因的表达。诱导型因子是响应于特异性刺激可以被激活的核酸序列的区域,这种诱导型因子的实例包括但不限于免疫球蛋白重链(Banerji等人,1983;Gilles等人,1983;Grosschedl等人,1985;Atchinson等人,1986,1987;Imler等人,1987;Weinberger等人,1984;Kiledjian等人,1988;Porton等人,1990)、免疫球蛋白轻链(Queen等人,1983;Picard等人,1984)、T细胞受体(Luria等人,1987;Winoto等人,1989;Redondo等人,1990)、HLA DQ α 和/或DQ β Sullivan等人,1987)、 β Interferon(Goodbourn等人,1986;Fujita等人,1987;Goodbourn等人,1988)、白介素-2(Greene等人,1989)、白介素-2受体(Greene等人,1989;Lin等人,1990)、MHC II类5(Koch等

人,1989)、MHCII类HLA-DR α (Sherman等人,1989)、 β -Actin(Kawamoto等人,1988;Ng等人,1989)、肌肉肌酸激酶(MCK)(Jaynes等人,1988;Horlick等人,1989;Johnson等人,1989)、前白蛋白(Transthyretin)(Costa等人,1988)、弹性蛋白酶I(Ornitz等人,1987)、金属硫蛋白(MTII)(Karin等人,1987;Culotta等人,1989)、胶原酶(Pinkert等人,1987;Angel等人,1987)、白蛋白(Pinkert等人,1987;Tronche等人,1989,1990)、 α -胎蛋白(Godbout等人,1988;Campere等人,1989)、 γ -球蛋白(Bodine等人,1987;Perez-Stable等人,1990)、 β -球蛋白(Trudel等人,1987)、c-fos(Cohen等人,1987)、c-Ha-Ras(Triesman等人,1986;Deschamps等人,1985)、Insulin(Edlund等人,1985)、神经细胞黏附分子(NCAM)(Hirsh等人,1990)、 α 1-抗胰蛋白酶(Latimer等人,1990)、H2B(TH2B)组蛋白(Hwang等人,1990)、小鼠和/或类型I胶原蛋白(Ripe等人,1989)、葡萄糖调控蛋白(GRP94和GRP78)(Chang等人,1989)、大鼠生长激素(Larsen等人,1986)、人类血清淀粉样蛋白A(SAA)(Edbrooke等人,1989)、肌钙蛋白I(TN I)(Yutzey等人,1989)、血小板衍生生长因子(PDGF)(Pech等人,1989)、杜氏肌营养不良(Klamut等人,1990)、SV40(Banerji等人,1981;Moreau等人,1981;Sleigh等人,1985;Firak等人,1986;Herr等人,1986;Imbra等人,1986;Kadesch等人,1986;Wang等人,1986;Ondek等人,1987;Kuhl等人,1987;Schaffner等人,1988)、多瘤病毒(Swartzendruber等人,1975;Vasseur等人,1980;Katinka等人,1980,1981;Tyndell等人,1981;Dandolo等人,1983;de Villiers等人,1984;Hen等人,1986;Satake等人,1988;Campbell等人,1988)、逆转录酶病毒(Kriegler等人,1982,1983;Levinson等人,1982;Kriegler等人,1983,1984a,b,1988;Bosze等人,1986;Miksicek等人,1986;Celander等人,1987;Thiesen等人,1988;Celander等人,1988;Choi等人,1988;Reisman等人,1989)、乳头状瘤病毒(Campo等人,1983;Lusky等人,1983;Spandidos和Wilkie,1983;Spalholz等人,1985;Lusky等人,1986;Cripe等人,1987;Gloss等人,1987;Hirochika等人,1987;Stephens等人,1987)、B型肝炎病毒(Bulla等人,1986;Jameel等人,1986;Shaul等人,1987;Spandau等人,1988;Vannice等人,1988)、人类免疫缺陷病毒(Muesing等人,1987;Hauber等人,1988;Jakobovits等人,1988;Feng等人,1988;Takebe等人,1988;Rosen等人,1988;Berkhout等人,1989;Laspia等人,1989;Sharp等人,1989;Braddock等人,1989)、巨细胞病毒(CMV)IE(Weber等人,1984;Boshart等人,1985;Foecking等人,1986)、长臂猿白血病病毒(Holbrook等人,1987;Quinn等人,1989)。

[0153] 诱导型因子包括但不限于MT II-佛波酯(TFA)/重金属(Palmiter等人,1982;Haslinger等人,1985;Searle等人,1985;Stuart等人,1985;Imagawa等人,1987;Karin等人,1987;Angel等人,1987b;McNeall等人,1989);MMTV(小鼠乳腺瘤病毒)-糖皮质激素(Huang等人,1981;Lee等人,1981;Majors等人,1983;Chandler等人,1983;Lee等人,1984;Ponta等人,1985;Sakai等人,1988); β -干扰素-poly(rI)x/poly(rc)(Tavernier等人,1983);腺病毒5 E2-E1A(Imperiale等人,1984);胶原酶-佛波酯(TPA)(Angel等人,1987a);溶基质素-佛波酯(TPA)(Angel等人,1987b);SV40-佛波酯(TPA)(Angel等人,1987b);鼠科MX基因-干扰素,新城疫病毒(Hug等人,1988);GRP78基因-A23187(Resendez等人,1988); α -2-巨球蛋白-IL-6(Kunz等人,1989);波形蛋白-血清(Rittling等人,1989);MHC I类基因H-2 κ b-干扰素(Blanar等人,1989);HSP70-E1A/SV40大T抗原(Taylor等人,1989,1990a,1990b);增殖蛋白-佛波酯/TPA(Mordacq等人,1989);肿瘤坏死因子-PMA(Hensel等人,

1989);和促甲状腺激素 α 基因-甲状腺激素(Chatterjee等人,1989)。

[0154] 不认为用于控制编码本发明的多核苷酸的肽或蛋白质表达的特定启动子是决定性的,只要其能够在靶细胞,优选细菌细胞中表达多核苷酸即可。当靶向人类细胞时,优选将多核苷酸编码区与启动子相邻放置,并处于启动子的控制之下,所述启动子能够在人类细胞中被表达。一般而言,这种启动子可以包括细菌、人类或病毒的启动子。

[0155] 3. 起始信号和内部核糖体结合位点(IRES)

[0156] 编码序列的有效转译还可能需要特定的启动信号。这些信号包括AGT启动密码子或相邻的序列。必须提供外源转译控制信号,包括ATG启动密码子。本领域普通技术人员应当容易地能够确定这点,并提供必需的信号。

[0157] 在本发明的特定实施方案中,内部核糖体结合位点(IRES)元件的用途被用来产生多基因或多顺反子的信息。IRES元件能够绕开核糖体扫描模型的依赖5'甲基化Cap的转译而在内部位点开始转译(Pelletier和Sonenberg,1988;Macejak和Sarnow,1991)。IRES元件也可以被连接至开放阅读框。多个开放阅读框可以一起转录,每一个被IRES分开,产生多顺反子的信息。利用单个启动子/增强子以转录单一信息可以有效地表达多个基因(参见美国专利第5925565号和第5935819号,在此通过引用并入)。

[0158] 4. 选择和筛选标记

[0159] 在本发明的特定实施方案中,通过在表达载体中编码选择或筛选标记可以在体外或体内鉴别含有当前公开的核酸结构的细胞。当被转录并转译时,标记对细胞提供可辨认的变化,这允许含有表达载体的细胞的简单鉴别。一般地,选择标记是提供允许选择的性质的标记。阳性选择标记是其中标记的存在允许其选择的标记,而阴性选择标记是其中标记的存在防止其选择的标记。阳性选择标记的实例是耐药性标记。

[0160] 5. 宿主细胞

[0161] 如本文所使用的,术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养”可以互换地使用。所有这些术语还包括其后代,所述后代是任何及全部后代。应理解全部后代由于有意或无意的突变可以不相同。在表达异源核酸序列的情况下,“宿主细胞”指的是原核细胞或真核细胞,且其包括能够复制载体或表达由载体编码的异源基因的任何可转化的生物体。宿主细胞可以并且已经用作载体或病毒的受体。宿主细胞可以被“转染”或“转化”,这指的是通过其将外源核酸,例如重组蛋白编码序列转移或引入到宿主细胞的过程。转化的细胞包括初级受试细胞及其后代。

[0162] 宿主细胞可以来源于原核生物或真核生物,包括用于载体的复制或核酸序列的部分或全部的表达的细菌、酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。许多细胞系和培养是可用作宿主细胞的,且它们可以通过American Type Culture Collection(ATCC)获得,ATCC是作为活培养物和基因材料的档案馆的组织(www.atcc.org)。

[0163] 6. 表达系统

[0164] 存在包含上述组合物的至少部分或全部的许多表达系统。可以采用基于原核的和/或真核的系统用于本发明以生产核酸序列或其同源的多肽、蛋白质和肽。许多这类系统是可商购的或可容易获得的。

[0165] 昆虫细胞/杆状病毒系统可以产生异源核酸节段的高水平的蛋白表达,例如在美国专利第5871986号、第4879236号中所述的,两者都通过引用并入本文,且所述系统可以例

如从INVITROGEN®以名称MAXBAC®2.0购得和从CLONTECH®以名称BACPACK™杆状病毒表达系统购得。

[0166] 除了所公开的本发明的表达系统之外,表达系统的其他实例包括STRATAGENE®的COMPLETE CONTROL™哺乳动物诱导表达系统,其涉及合成蜕皮素诱导受体或其pET表达系统,即一种大肠杆菌表达系统。诱导型表达系统的另一实例可从INVITROGEN®获得,其携带T-REX™(四环素调节表达)系统,一种使用全长CMV启动子的哺乳动物诱导表达系统。INVITROGEN®还提供叫做甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)表达系统的酵母表达系统,其设计用于在甲基营养型酵母甲醇毕赤酵母中重组蛋白的高水平生产。本领域技术人员应当知道如何表达载体,例如表达构造,以生产核酸序列或其同源多肽、蛋白质或肽。

[0167] IV. 组合治疗

[0168] 本公开的组合物和相关方法,特别是与细胞因子可操作地连接的EMC亲和肽的施用,也可以与其它治疗方法如本文所述的其它治疗方法的施用结合使用,或者与本领域已知的其它传统治疗方法结合使用。

[0169] 本文公开的治疗性组合物和疗法可以在另一种疗法或药物之前、与之并行和/或之后进行,间隔为数分钟至数周。在实施方案中,当分别向细胞、组织或生物体应用试剂时,通常会确保在各次递送的时间之间的重要时段内不过期,使得治疗剂会一直能够发挥对细胞、组织或生物体有利的组合效果。例如,在这种情况下,预期人们可以使细胞、组织或生物体与两种、三种、四种或多于四种试剂或疗法基本上同时(即少于约一分钟内)接触。在其他方面,在施用其他治疗剂或疗法之前和/或之后,可以在1分钟、5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、45分钟、60分钟、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、25小时、26小时、27小时、28小时、29小时、30小时、31小时、32小时、33小时、34小时、35小时、36小时、37小时、38小时、39小时、40小时、41小时、42小时、43小时、44小时、45小时、46小时、47小时、48小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周或8周或多于8周以及其中可导出的任意范围内施用或提供一种或多于一种治疗剂或疗法。

[0170] 可以采用治疗剂和疗法的各种组合方案。此类组合的非限制性实例如下所示,其中本文所述或本领域已知的治疗剂(如本文所公开的组合物)为“A”,第二试剂(如本文所述或本领域已知的其他试剂、化学疗法试剂或检查点抑制剂)为“B”:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0171] **B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A**

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0172] 在某些实施方案中,可以应用多于一个疗程。预期可以实施多个疗程。

[0173] 1. 化学治疗

[0174] 术语“化学治疗剂”是指尤其可以用于治疗癌症的治疗化合物和/或药物。例如,化学治疗剂可包括但不限于干扰细胞分裂、破坏微管的正常功能、抑制代谢物的利用、将核苷

酸类似物替代到细胞DNA或抑制DNA复制所必需的酶的任何试剂。

[0175] 合适的化学治疗剂类别包括：(a) 烷基化剂，例如氮芥（例如二氯甲基二乙胺、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥）、亚乙基亚胺和甲基三聚氰胺（例如六甲基三聚氰胺、塞替派）、烷基磺酸盐（例如白消安）、亚硝基脲（例如卡莫斯汀、洛莫斯汀、吡葡亚硝脲（chlorozotocin）、链脲菌素）和三嗪（例如二卡巴嗪），(b) 抗代谢药，例如叶酸类似物（例如甲氨蝶呤）、嘧啶类似物（例如5-氟尿嘧啶、氟尿嘧啶、阿糖胞苷、氮杂嘧啶）以及嘌呤类似物和相关物质（例如6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、喷司他丁），(c) 天然产物，例如长春花碱（例如长春碱，长春新碱）、表鬼臼毒素（例如依托泊苷，替尼泊苷）、抗生素（例如放线菌素、柔红霉素、阿霉素、博来霉素、普卡霉素和米托蒽醌）、酶（例如L-天冬酰胺酶）和生物反应调节剂（例如干扰素- α ）和(d) 其他试剂，例如铂类配合物（例如顺铂、卡铂）、经取代的尿素（例如羟基脲）、甲基胍衍生物（例如甲基胍）和肾上腺皮质激素抑制剂（例如紫杉醇和米托坦）。在一些实施方案中，顺铂是特别合适的化学治疗剂。

[0176] 其他合适的化疗剂包括抗微管剂，例如紫杉醇（“紫杉醇”）和盐酸阿霉素（“阿霉素”）。

[0177] 氮芥是在本公开的方法中有用的另一类合适的化学治疗剂。氮芥可包括但不限于二氯甲基二乙胺（HN₂）、环磷酰胺和/或异环磷酰胺、美法仑（L-溶肉瘤素）和苯丁酸氮芥。环磷酰胺(CYTOXAN®)可从Mead Johnson获得，而NEOSTAR®(可从Adria获得)是另一种合适的化学治疗剂。成人的合适口服剂量包括例如约1mg/kg/天至约5mg/kg/天，静脉注射剂量包括例如最初分剂量为约2天至约5天约40mg/kg至约50mg/kg、或约每7天至约10天约10mg/kg至约15mg/kg、或每周两次约3mg/kg至约5mg/kg、或约1.5mg/kg/天至约3mg/kg/天。由于不利的胃肠道作用，因此优选静脉内途径。该药物有时也可通过渗透或体腔肌肉注射施用。

[0178] 其他合适的化学治疗剂包括嘧啶类似物，例如阿糖胞苷（胞嘧啶阿拉伯糖苷）、5-氟尿嘧啶（氟尿嘧啶；5-FU）和氟尿苷（氟脱氧尿苷；FudR）。5-FU可以以约7.5mg/m²至约1000mg/m²的任何剂量施用于对象。此外，5-FU剂量时间表可以是各种时间段，例如至多六个星期，或由本公开所属领域的普通技术人员确定。

[0179] 推荐另一种合适的化学治疗剂吉西他滨二磷酸盐(GEMZAR®, Eli Lilly&Co., “吉西他滨”)用于治疗晚期和转移性胰腺癌，因此也将在本公开中用于这些癌症。

[0180] 递送给患者的化学治疗剂的量可以是可变的。在一个合适的实施方案中，当化学疗法与构建体一起施用时，化学治疗剂可以以有效地引起宿主中癌症的阻止或消退的量施用。在其他实施方案中，可以以比化学治疗剂的化学治疗有效剂量低2倍到10000倍的量来施用化学治疗剂。例如，可以以比化学治疗剂的化学治疗有效剂量低约20倍、约500倍或甚至约5000倍的量来施用化学治疗剂。可以在体内与组合物一起测试本发明的化学治疗剂的所需治疗活性，以及确定有效剂量。例如，这些化合物可以在人体试验之前在合适的动物模型系统中进行试验，包括但不限于大鼠、小鼠、鸡、牛、猴、兔等。如实施例中所所述，体外试验也可用于确定合适的组合和剂量。

[0181] 可以改变本公开内容的方法中活性成分的实际剂量水平，以获得有效达到特定患者、组合物和给药方式所需治疗反应的活性成分的量，且对患者没有毒性（或不可接受的毒性）。所选剂量水平将取决于多种因素，包括所选化学治疗剂的活性、施用途径、施用时间、

化学治疗剂的排泄率、治疗时间、与特定化学治疗剂结合使用的其他药物、化合物和/或材料、所治疗患者的年龄、性别、体重、环境、一般健康状况和既往病史、以及医学领域众所周知的类似因素。

[0182] 可以预见,如果单独使用(即,如果治疗多肽是直接施用的,并且不是由化疗剂的存在诱导的),结合化疗的效果和治疗多肽的表达可以增强这些药物中每一种的抗肿瘤效果。本领域普通技术人员可以容易地确定和开出所需构建体和化疗剂的有效量。例如,医生可以以低于所需水平的水平开始构建体和/或化疗的剂量,以达到期望的治疗效果,并逐渐增加剂量,直到达到期望的效果。

[0183] 2. 电离辐射

[0184] 如本文所用,“电离辐射”是指包括具有足够能量或可通过核相互作用产生足够能量以产生电离(电子的获得或损失)的粒子或光子的辐射。示例性和优选的电离辐射是x射线。用于向靶组织或细胞递送x射线的手段是本领域众所周知的。

[0185] 在一些实施方案中,电离辐射的量大于20戈瑞并且以一剂施用。在一些实施方案中,电离辐射的量为18戈瑞(Gy)并且以三剂施用。在一些实施例中,电离辐射的量至少、至多或恰好为2Gy、4Gy、6Gy、8Gy、10Gy、15Gy、16Gy、17Gy、18Gy、19Gy、20Gy、21Gy、22Gy、23Gy、24Gy、25Gy、26Gy、27Gy、18Gy、19Gy、30Gy、31Gy、32Gy、33Gy、34Gy、35Gy、36Gy、37Gy、38Gy、39Gy、40Gy、41Gy、42Gy、43Gy、44Gy、45Gy、46Gy、47Gy、48Gy、49Gy或40Gy(或其中任何可衍生的范围)。在一些实施方案中,以至少、至多或恰好1剂、2剂、3剂、4剂、5剂、6剂、7剂、8剂、9剂或10剂(或其中的任何可衍生的范围)施用电离辐射。如果施用多于一剂,则施用间隔可以约为1小时、4小时、8小时、12小时或24小时、或1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天、或1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、12周、14周或16周、或其中的任何可衍生的范围。

[0186] 在一些实施方案中,IR的量可以表示为IR的总剂量,然后以分次剂量施用。例如,在一些实施方案中,总剂量是50Gy,分10次施用,每次5Gy。在一些实施方案中,总剂量为50Gy至90Gy,分20至60次施用,每次2Gy至3Gy。在一些实施例中,IR的总剂量为至少、至多或约20Gy、21Gy、22Gy、23Gy、24Gy、25Gy、26Gy、27Gy、28Gy、29Gy、30Gy、31Gy、32Gy、33Gy、34Gy、35Gy、36Gy、37Gy、38Gy、39Gy、40、41Gy、42Gy、43Gy、44Gy、45Gy、46Gy、47Gy、48Gy、49Gy、50Gy、51Gy、52Gy、53Gy、54Gy、55Gy、56Gy、57Gy、58Gy、59Gy、60Gy、61Gy、62Gy、63Gy、64Gy、65Gy、66Gy、67Gy、68Gy、69Gy、70Gy、71Gy、72Gy、73Gy、74Gy、75Gy、76Gy、77Gy、78Gy、79Gy、80Gy、81Gy、82Gy、83Gy、84Gy、85Gy、86Gy、87Gy、88Gy、89Gy、90Gy、91Gy、92Gy、93Gy、94Gy、95Gy、96Gy、97Gy、98Gy、99Gy、100Gy、101Gy、102Gy、103Gy、104Gy、105Gy、106Gy、107Gy、108Gy、109Gy、110Gy、111Gy、112Gy、113Gy、114Gy、115Gy、116Gy、117Gy、118Gy、119Gy、120Gy、125Gy、130Gy、135Gy、140Gy或150Gy(或其中任何可衍生的范围)。在一些实施方案中,总剂量以每次至少、至多或恰好1Gy、2Gy、3Gy、4Gy、5Gy、6Gy、7Gy、8Gy、9Gy、10Gy、12Gy、14Gy、15Gy、20Gy、25Gy、30Gy、35Gy、40Gy、45Gy或50Gy(或其中任何可衍生的范围)的分次剂量施用。在一些实施方案中,分至少、至多或恰好2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次、12次、13次、14次、15次、16次、17次、18次、19次、20次、21次、22次、23次、24次、25次、26次、27次、28次、29次、30次、31次、32次、33次、34次、35次、36次、37次、38次、39次、40、41次、42次、43次、44次、45次、46次、47次、48次、49次、50次、51次、52次、53次、54次、55次、56

次、57次、58次、59次、60次、61次、62次、63次、64次、65次、66次、67次、68次、69次、70次、71次、72次、73次、74次、75次、76次、77次、78次、79次、80次、81次、82次、83次、84次、85次、86次、87次、88次、89次、90次、91次、92次、93次、94次、95次、96次、97次、98次、99次或100次(或其中任何可衍生的范围)施用剂量。在一些实施方案中,每天分至少、至多或恰好1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次或12次(或其中任何可衍生的范围)施用剂量。在一些实施方案中,每周分至少、至多或恰好1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次、12次、13次、14次、15次、16次、17次、18次、19次、20次、21次、22次、23次、24次、25次、26次、27次、28次、29次或30次(或其中任何可衍生的范围)施用剂量。

[0187] 在一些实施方案中,IR方案和/或总IR剂量由医生或主治医疗专业人员开出。在IR的整个施用过程中,医疗专业人员可以监视和/或访问患者的进度、和/或在规定的IR剂量完成施用后,医学专业人员可以访问患者并根据评估开出新的IR剂量/方案。

[0188] 3. 其他试剂

[0189] 在一些实施方案中,该方法还包括施用其他试剂。在一些实施方案中,其他试剂是免疫刺激剂。如本文所用,术语“免疫刺激剂”是指可以刺激对象的免疫应答的化合物,并且可以包括佐剂。在一些实施方案中,免疫刺激剂是不构成特异性抗原但可以增强对抗原的免疫应答的强度和时间的试剂。这种免疫刺激剂可以包括但不限于模式识别受体的刺激剂,例如Toll样受体、RIG-1和NOD样受体(NLR)、矿物盐如明矾、与肠细菌(例如大肠杆菌、明尼苏达沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌或福氏志贺氏菌)的单磷酸脂质(MPL)A组合的明矾、或特别是与MPL.RTM.(AS04)组合的明矾、与上述细菌的MPLA单独组合的明矾、皂昔如QS-21、Quil-A、ISCOMs、ISOCAMITX、乳液如MF59、Montanide、ISA 51和ISA 720、AS02(QS21+角鲨烯+MPL.)、脂质体和脂质体制剂如AS01、合成的或专门制备的微粒和微载体如N.gonorrhoeae、沙眼衣原体等的细菌来源的外膜囊泡(OMV)、或壳聚糖颗粒、储库形成剂如普朗尼克嵌段共聚物、特异性修饰或制备的肽如胞壁酰二肽、氨基烷基氨基葡萄糖苷4-磷酸酯如RC529、或蛋白质如细菌类毒素或毒素片段。

[0190] 在一些实施方案中,其他试剂包含用于模式识别受体(PRR)的激动剂,包括但不限于Toll样受体(TLR),特别是TLR 2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8、TLR9和/或其组合。在一些实施方案中,其他试剂包括用于Toll样受体3的激动剂、用于Toll样受体7和Toll样受体8的激动剂、或用于Toll样受体9的激动剂;优选地,免疫刺激剂包含咪唑并喹啉,例如R848;腺嘌呤衍生物,例如美国专利第6329381号、美国公开专利申请2010/0075995或W0 2010/018132中所公开的那些;免疫刺激DNA或免疫刺激性RNA。在一些实施方案中,其他试剂还可以包含免疫刺激性RNA分子,例如但不限于dsRNA、poly I:C或poly I:poly C12U(可作为Ampligen.RTM.获得,poly I:C和poly I:polyC12U均被称为TLR3刺激物),和/或在F.Heil等人,“Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8”*Science* 303(5663),1526-1529(2004);J.Vollmer等人,“Immune modulation by chemically modified ribonucleosides and oligoribonucleotides”W0 2008033432 A2;A.Forsbach等人,“Immunostimulatory oligoribonucleotides containing specific sequence motif(s)and targeting the Toll-like receptor 8 pathway”W0 2007062107 A2;E.Uhlmann等人,“Modified oligoribonucleotide analogs with enhanced immunostimulatory activity”美国专利申请公开US 2006241076;

G.Lipford等人,“Immunostimulatory viral RNA oligonucleotides and use for treating cancer and infections”WO 2005097993 A2;G.Lipford等人,“Immunostimulatory G,U-containing oligoribonucleotides,compositions,and screening methods”WO 2003086280 A2中公开的那些。在一些实施方案中,其他试剂可以是TLR-4激动剂,例如细菌脂多糖(LPS)、VSV-G和/或HMGB-1。在一些实施方案中,其他试剂可包含TLR-5激动剂,例如鞭毛蛋白或其部分或衍生物,包括但不限于美国专利第6130082号、第6585980号和第7192725号中公开的那些。

[0191] 在一些实施方案中,其他试剂可以是从小细胞释放的促炎刺激物(例如,尿酸盐晶体)。在一些实施方案中,其他试剂可以是补体级联的活化成分(例如,CD21、CD35等)。在一些实施方案中,其他试剂可以是免疫复合物的活化成分。其他试剂还包括补体受体激动剂,例如与CD21或CD35结合的分子。在一些实施方案中,补体受体激动剂诱导合成纳米载体的内源性补体调理作用。在一些实施方案中,免疫刺激剂是细胞因子,其是细胞释放的小蛋白质或生物学因子(5kDa至20kDa),并且对细胞间相互作用、通讯和其他细胞的行为具有特定作用。在一些实施方案中,细胞因子受体激动剂是小分子、抗体、融合蛋白或适配体。

[0192] 在一些实施方案中,其他试剂是抗体-药物缀合物。在一些实施方案中,抗体-药物缀合物选自吉妥珠单抗奥唑米星、本妥昔单抗和曲妥珠单抗美坦新。

[0193] 在一些实施方案中,其他试剂是嵌合抗原受体(CAR)。CAR是人工T细胞受体,可将特异性移植到免疫效应细胞上。这些分子最常见的形式是来自单克隆抗体的单链可变片段(scFv)的融合,其与CD3- ζ 跨膜结构域和内域(endodomain)融合。此类分子响应于其靶标的scFv识别而导致 ζ 信号的传输。此类构建体的实例是14g2a- ζ ,它是衍生自杂交瘤14g2a(识别二唾液酸神经节苷脂GD2)的scFv的融合体。当T细胞表达此分子时(通常是通过核转录病毒载体转导实现),它们会识别并杀死表达GD2的靶细胞(例如成神经细胞瘤细胞)。免疫球蛋白重链和轻链的可变部分通过柔性接头融合以形成scFv。该scFv之前是信号肽,以将新生蛋白引导至内质网和随后的表面表达(将其剪切)。柔性间隔基团允许scFv沿不同方向取向以实现抗原结合。跨膜结构域是典型的疏水性 α 螺旋,通常衍生自信号内域的原始分子,其突出至细胞并传输所需信号。

[0194] V. 治疗方法

[0195] 当前的方法和组合物涉及治疗癌症的方法。在一些实施方案中,癌症包括实体肿瘤。在一些实施方案中,癌症是非淋巴的。在一些实施方案中,癌症是黑色素瘤或结肠癌。

[0196] 本公开内容的组合物可用于体内、体外或离体施用。组合物的施用途径可以是例如肿瘤内、皮内、皮下、静脉内、淋巴内和腹膜内施用。在一些实施方案中,施用是静脉内施用或肿瘤内施用或淋巴内施用或肿瘤周围施用。在一些实施方案中,将组合物直接施用到癌组织或淋巴结中。

[0197] 如本文所用,“肿瘤”是指所有赘生性细胞的生长和增殖,无论是恶性还是良性,以及所有癌前和癌性细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”、“细胞增殖性疾病”、“增殖性疾病”和“肿瘤”在本文中并不互相排斥。

[0198] 适于治疗的癌症包括但不限于所有类型、位置、大小和特征的肿瘤。本公开内容的方法和组合物适用于治疗例如黑色素瘤、结肠癌、胰腺癌、结肠癌、急性髓细胞性白血病、肾上腺皮质癌、AIDS相关的癌症、AIDS相关的淋巴瘤、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、儿童小脑

或脑基底细胞癌、胆管癌、肝外膀胱癌、骨癌、骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤、脑干神经胶质瘤、脑瘤、小脑星形细胞瘤脑瘤、脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤脑瘤、室管膜上皮瘤脑瘤、髓母细胞瘤脑肿瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、脑肿瘤、视觉通路和下丘脑胶质瘤、乳腺癌、特定的乳腺癌如原位导管癌、浸润性导管癌、乳腺管状癌、乳腺髓样癌、乳腺黏液性癌、乳头状癌、乳状筛状癌、浸润性小叶癌、炎性乳腺癌、原位小叶癌、男性乳腺癌、乳头佩吉特病、乳腺叶状肿瘤、复发和/或转移性乳腺癌、癌症、A型或B型管腔型乳腺癌、三阴性/基底样乳腺癌和富含HER2的乳腺癌、淋巴瘤、支气管腺瘤/类癌、气管癌、伯基特淋巴瘤、类癌、童年类癌、未知原发性胃肠道癌、中枢神经系统淋巴瘤、原发性小脑星形细胞瘤、儿童脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤、儿童宫颈癌、儿童癌症、慢性淋巴细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病、慢性骨髓增生性疾病、皮肤T细胞淋巴瘤、结缔组织增生性小圆形细胞瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、尤因氏病、儿童性腺外生殖细胞瘤、肝外胆管癌、眼癌、成视网膜细胞瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌、胃肠道间质瘤(GIST)、生殖细胞肿瘤：颅内、性腺外或卵巢、妊娠滋养细胞肿瘤、脑干神经胶质瘤、神经胶质瘤、儿童期脑星形细胞瘤、儿童视力通路和下丘脑胶质瘤、胃类癌、毛细胞白血病、头颈癌、心脏癌、肝细胞(肝)癌、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、下丘脑和视觉通路胶质瘤、儿童眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌(内分泌胰腺)、卡波西肉瘤、肾癌(肾细胞)癌症)、喉癌、白血病、急性淋巴细胞白血病(也称为急性淋巴细胞性白血病)、急性髓样白血病(也称为急性骨髓性白血病)、慢性淋巴细胞白血病(也称为慢性淋巴细胞性白血病)、慢性髓细胞性白血病(也称为慢性粒细胞性白血病)、毛细胞唇和口腔癌、脂肪肉瘤、肝癌(原发性)、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、与艾滋病相关的淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(除霍奇金氏以外的所有淋巴瘤的旧分类)淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、骨/骨肉瘤恶性纤维组织细胞瘤、儿童成年髓母细胞瘤、眼内(眼)黑色素瘤、默克尔细胞癌、成人恶性间皮瘤、儿童间皮瘤、转移性鳞状上皮癌、口腔癌、多发性内分泌肿瘤、多发性骨髓瘤/浆细胞瘤、蕈样霉菌病、骨髓增生异常综合症、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、慢性骨髓性白血病、成人急性骨髓性白血病、儿童急性髓性白血病、多发性骨髓瘤、慢性骨髓增生性疾病、鼻腔和鼻旁鼻窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤、卵巢癌、卵巢上皮癌(表面上皮间质瘤)、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢低恶性潜能肿瘤、胰腺癌、胰岛细胞鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽喉癌、嗜铬细胞瘤、松果体星形细胞瘤、松果体生殖瘤、成纤维细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、儿童垂体腺瘤、浆细胞瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发中枢神经系统淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌(肾癌)、肾盂和输尿管移行细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、儿童唾液腺癌肉瘤、尤因家族肿瘤、卡波西肉瘤、软组织肉瘤、子宫塞扎综合征肉瘤、皮肤癌(非黑色素瘤)、皮肤癌(黑色素瘤)、皮肤癌、默克尔细胞小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、鳞状上皮癌伴隐匿性原发性、转移性胃癌、幕上原始神经外胚层肿瘤、儿童T细胞淋巴瘤、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤、儿童胸腺瘤、胸腺癌、甲状腺癌、尿道癌、子宫癌、子宫内膜子宫肉瘤、阴道癌、视觉通路和下丘脑神经胶质瘤、儿童期外阴癌和肾母细胞瘤(肾脏癌)。

[0199] VI. 药物组合物和方法

[0200] 在一些实施方案中,将药物组合物施用至对象。不同的方面涉及对对象施用有效量的组合物。在一些实施方案中,可以将包含抗癌剂的组合物施用于对象或患者以治疗癌

症或减小肿瘤的大小。此外,这些化合物可以与其他癌症疗法组合施用。

[0201] 组合物可以配制成肠胃外施用,例如配制成通过静脉内、经导管注射、动脉注射、肌内、皮下或甚至腹膜内途径。一般地,这种组合物可以制备为货物液体溶液或为悬浮液的注射剂;也可以制备适用于在注射前靠添加液体来制备溶液或悬浮液的固体形式;并且剂型还可以是乳化的。根据本公开内容,这种制剂的制备对于本领域技术人员来说是已知的。其他施用途径包括肿瘤内、肿瘤周围、淋巴内、进入癌组织的注射和进入淋巴结的注射。在一些实施方案中,施用为全身施用。

[0202] 也可以考虑其他施用途径。例如,构建体和试剂可以与载剂组合施用。在一些实施方案中,载剂是纳米颗粒或微粒。在一些实施方案中,纳米颗粒或微粒是肿瘤导向的纳米颗粒或微粒。例如,载剂还可以包括将载剂引导至肿瘤的靶向部分。靶向部分可以是特异性识别肿瘤细胞的结合剂(例如抗体,包括scFv等)或其他抗原结合剂。在一些实施方案中,构建体被包封在载剂内。在一些实施方案中,构建体共价或非共价附于载剂的表面。在一些实施方案中,载剂为脂质体。

[0203] 颗粒可以具有可变尺寸的结构,并被称为微球、微粒、纳米颗粒、纳米球或脂质体。这样的颗粒制剂可以通过将构建体与颗粒共价或非共价偶联而形成。

[0204] 本文中的“颗粒”、“微粒”、“珠”、“微球”和语法等同物是指可施用于对象的小的离散颗粒。在某些实施方案中,颗粒是基本上球形的。如本文所用,术语“基本上球形”是指颗粒的形状与球形的偏离不超过约10%。

[0205] 颗粒通常由基本球形的核和任选的一个或多于一个层组成。核心的大小和组成可能有所不同。除了核之外,颗粒可以具有一个或多于一个层,以提供适合于感兴趣的应用的功能。如果存在,层的厚度可以根据特定应用的需要而变化。例如,层可以赋予有用的光学性质。

[0206] 层还可以赋予化学或生物学功能,在本文中称为化学活性或生物活性层,并且对于这些功能,一个或多于一个层的厚度通常可以在约0.001微米(1纳米)至约10微米或更大的范围内(取决于所需的颗粒直径),这些层通常被施加在颗粒的外表面上。

[0207] 核和层的组成可以变化。用于颗粒或核的合适材料包括但不限于聚合物、陶瓷、玻璃、矿物等。实例包括但不限于标准和专用玻璃、二氧化硅、聚苯乙烯、聚酯、聚碳酸酯、丙烯酸聚合物、聚丙烯酰胺、聚丙烯腈、聚酰胺、含氟聚合物、硅酮、纤维素、硅、金属(例如铁、金、银)、矿物(例如红宝石)、纳米粒子(例如金纳米粒子、胶体粒子、金属氧化物、金属硫化物、金属硒化物和磁性材料例如氧化铁)及其复合物。取决于所需的性质,芯可以是同种的组合物,或是两种或多于两种材料的复合物。在某些方面,将使用金属纳米颗粒。这些金属颗粒或纳米颗粒可由Au,Pt,Pd,Cu,Ag,Co,Fe,Ni,Mn,Sm,Nd,Pr,Gd,Ti,Zr,Si和In、前驱体、其二元合金、其三元合金及其金属间化合物形成。参见美国专利第6712997号,其全部内容通过引用合并于此。

[0208] 如前所述,该颗粒除芯外还可包括一个或多于一个层。在微粒中包括层的目的是可以改变的。或者,可以将颗粒表面直接官能化。层可提供合适的表面以附接用于化学键合或偶联位点的化学官能度。

[0209] 可以以本领域技术人员已知的多种方式在微粒上产生层。实例包括溶胶凝胶化学技术,例如Iler(1979);Brinker和Scherer(1990)中所述的。在颗粒上产生层的其他方法包

括表面化学和包封技术,例如Partch和Brown(1998);Pekarek等人(1994);Hanprasopwattana(1996);Davies(1998);和其中的参考文献所述。也可以使用气相沉积技术;参见例如Golman和Shinohara(2000);和美国专利第6387498号。其他方法还包括逐层自组装技术,例如Sukhorukov等人(1998);Caruso等人(1998);Caruso等人(1999);美国专利第6103379和其中引用的参考文献。

[0210] 如美国专利第4589330号或第4818542号中所教导的,可以通过使包含构建体和聚合物的水相与非水相接触,然后蒸发非水相以引起颗粒从水相聚结,来形成颗粒。用于此类制剂的优选聚合物是天然或合成共聚物或选自明胶琼脂、淀粉、阿拉伯半乳聚糖、白蛋白、胶原蛋白、聚乙醇酸、聚乳酸、乙交酯-L(-)丙交酯、聚(ϵ -己内酯)、聚(ϵ -己内酯-CO-乳酸)、聚(ϵ -己内酯-CO-乙醇酸)、聚(β -羟基丁酸)、聚环氧乙烷、聚乙烯、聚(烷基-2-氰基丙烯酸烷基酯)、聚(甲基丙烯酸羟乙酯)、聚酰胺、聚(氨基酸)、聚(2-羟乙基DL-天冬酰胺)、聚(酯脲)、聚(L-苯丙氨酸/乙二醇/1,6-二异氰酸根合己烷)和聚(甲基丙烯酸甲酯)。特别优选的聚合物是聚酯,例如聚乙醇酸、聚乳酸、乙交酯-L(-)丙交酯聚、聚(ϵ -己内酯)、聚(ϵ -己内酯-CO-乳酸)和聚(ϵ -己内酯-CO-乙醇酸)。可用于溶解聚合物的溶剂包括:水、六氟异丙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、己烷、苯或六氟丙酮倍半水合物。

[0211] 适合于注射用的药物形式包括无菌水溶液或分散剂;包含芝麻油、花生油或水性丙二醇的制剂;以及用于临时制备无菌溶液或分散剂的无菌散剂。在所有情况下,形式必须是无菌的,并且必须是一定程度上可以容易地注射的流体。其还应是在制造和储存的条件下稳定的,并且必须在防微生物,例如细菌和真菌的污染作用的条件下保存。

[0212] 载剂也可以是含有以下的溶剂或分散介质,例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)、其合适的混合物和植物油。可以通过以下方式来保持适当的流动性:例如通过使用包衣,例如卵磷脂,通过在分散剂的情况下保持需要的粒径,和通过使用表面活性剂。微生物作用的预防可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫汞撒等来实现。在许多情况下,优选包含等渗剂,例如糖或氯化钠。可注射组合物的持久的吸收可以通过在组合物中使用延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0213] 注射用无菌溶液通过以下方法来制备:在适当溶剂中将活性化合物以所需量与以上列举的各种其他成分合并,如果需要的话然后进行过滤除菌。通常,分散剂通过将各种无菌的活性成分并入到无菌载剂中来制备,所述无菌载剂含有基本的分散介质和来自以上列举的那些的所需的其他成分。在用于制备注射用无菌溶液的无菌散剂的情况下,制备的优选方法为真空干燥和冷冻干燥技术,其产生活性成分和任何额外的期望成分的粉末,所述额外的期望成分来自其预先无菌过滤的溶液。

[0214] 如本文中使用的,术语“药学上可接受的”指的是在可靠的医学判断的范围内,适合与人类和动物的组织接触而没有过多毒性、刺激性、过敏反应或与合理的受益/风险比相当的其他问题并发症的那些化合物、物质、组合物、和/或剂型。术语“药学上可接受的载剂”是指药学上可接受的物质、组合物或载剂,例如液态或固态填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封物质,其涉及运载或运输化学剂。

[0215] 如本文所用,“药学上可接受的盐”是指所公开化合物的衍生物,其中母体化合物通过将现有的酸或碱部分转化为其盐形式而被修饰。药学上可接受的盐的实例包括但不限

于碱性残基如胺的无机或有机酸盐；酸性残基如羧酸的碱金属或有机盐；等等。药学上可接受的盐包括例如由无毒的无机或有机酸形成的母体化合物的常规无毒盐或季铵盐。药学上可接受的盐可以通过常规化学方法从含有碱性或酸性部分的母体化合物合成。

[0216] 根据对象的情况，剂量必将会发生一些变化。负责施用的人将在任何情况下确定对于个体对象合适的剂量。基于预期的目标来确定治疗或预防组合物的有效量。术语“单位剂量”或“剂量”是指适用在对象中使用的物理不连续的单位，各单位含有计算以产生与其施用、即适当途径和方案相关的上述期望应答的预定量的组合物。待施用的量，根据处理的次数和单位剂量两者，取决于期望的效果。组合物的精确量还取决于医师的判断，并且对每一个体都是独特的。影响剂量的因素包括对象的身体和临床状态、施用的途径、处理的预期目标（症状的缓和与治愈）和特定组合物的效力、稳定性以及毒性。

[0217] 在配制后，溶液会以与剂型相容的方式和在治疗或预防上有效的量来施用。以各种剂型，例如上述注射用溶液的类型容易地施用制剂。

[0218] 通常，对于成人（重约70公斤），施用约0.1mg至约3000mg（包括其间的所有值和范围）、或约5mg至约1000mg（包括其间的所有值和范围）、或约10mg至约100mg（包括其间的所有值和范围）的化合物。应当理解的是，这些剂量范围仅作为实例，并且可以根据技术人员已知的因素来调节施用。

[0219] 在某些实施方案中，向对象施用约、至少约或至多约0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、15.5、16.0、16.5、17.0、17.5、18.0、18.5、19.0、19.5、20.0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、410、420、425、430、440、441、450、460、470、475、480、490、500、510、520、525、530、540、550、560、570、575、580、590、600、610、620、625、630、640、650、660、670、675、680、690、700、710、720、725、730、740、750、760、770、775、780、790、800、810、820、825、830、840、850、860、870、875、880、890、900、910、920、925、930、940、950、960、970、975、980、990、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、6000、7000、8000、9000、10000毫克（mg）或微克（mcg）或 μ g/kg或微克/kg/分钟或mg/kg/分钟或微克/kg/小时或mg/kg/小时，或其中任何可衍生的范

围。

[0220] 剂量可以根据需要或每1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、18小时或24小时(或其中任何可衍生的范围)施用,或每天施用1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次或9次(或其中任何可衍生的范围)。可以在病症迹象之前或之后首先施用剂量。在一些实施方案中,在患者经历或表现出病症迹象或症状后1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时(或其中任何可衍生的范围)或1天、2天、3天、4天或5天(或其中任何可衍生的范围),向患者施用第一剂量的方案。患者可接受1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或多于10天时间(或其中任何可衍生的范围)的治疗,或直至症状消失或减轻的治疗,或在感染症状消失或减轻后6小时、12小时、18小时或24小时或1天、2天、3天、4天或5天的治疗。

[0221] VII. 实施例

[0222] 包括以下实施例以说明本公开的优选实施方案。本领域技术人员应理解以下实施例中公开的技术能代表本发明人发现的在本公开的实践中发挥良好作用的技术,因此能够认为其构成用于其实践的优选实施方式。然而,根据本公开内容,本领域技术人员应当理解,在不脱离本公开的精神和范围的情况下,可以对所公开的具体实施方案进行许多改变并仍然获得相同或相似的结果。

[0223] 实施例1

[0224] 工程化的胶原蛋白结合白介素2显示出增强的抗肿瘤功效并减少了不良事件

[0225] 白介素2(IL-2)的细胞因子免疫疗法在动物模型和临床中表现出相当大的抗肿瘤活性。在此,发明人将IL-2的融合蛋白工程化改造为来自血管性假血友病因子(vWF)A3结构域的胶原蛋白结合结构域(CBD);融合蛋白可以静脉内施用,并通过其渗漏的血管靶向肿瘤微环境,从而允许血液中的蛋白质进入肿瘤基质。在此,发明人显示了CBD蛋白的肿瘤组织定位。CBD-IL-2注射后显示血清中血清炎症细胞因子浓度降低。在小鼠黑色素瘤和结肠癌模型中,与野生型IL-2相比,CBD-IL-2显著延迟了肿瘤的生长。工程化的胶原蛋白结合细胞因子的这种简单且可转化的方法为癌症免疫治疗提供了一种新颖的方法。

[0226] A. 结果

[0227] CBD融合的IL-2与胶原蛋白及其受体结合。发明人首先检查了CBD融合的IL-2重组蛋白(CBD-IL-2)在体外结合胶原蛋白的能力。设计并重组表达了CBD融合的IL-2(图1A)。SDS-PAGE显示CBD融合增加了IL-2的分子量(图1B)。CBD-IL-2以强结合亲和力(nM范围解离常数(K_D)值)与I型和III型胶原蛋白结合(图1C至图1D)。相比之下,野生型IL-2不与这些胶原蛋白结合。重要的是,CBD-IL-2以与野生型IL-2相似的 K_D 值结合到IL-2R。而且,CBD-IL-2诱导CTLL-2细胞系(其是IL-2依赖性NK细胞系)的细胞增殖,其作用与其野生型相似(图1E)。综上所述,这些数据表明CBD-IL-2与胶原蛋白结合而没有损害CBD或IL-2结构域的靶结合能力。

[0228] CBD蛋白位于肿瘤中。发明人进行了体内生物分布分析,以确定静脉内(i.v.)注射后CBD是否通过结合至内源性胶原蛋白而定位在肿瘤微环境中。在FVB小鼠中接种了MMTV-PyMT乳腺癌。当肿瘤体积达到500mm³时,注入DyLight 800标记的CBD蛋白。注射后两天,收集肿瘤和器官,包括心脏、肺、肾、肝、脾和胃。荧光检测显示,CBD蛋白优先位于肿瘤中(图2A)。

[0229] CBD融合减少了与治疗相关的不良事件。由于CBD蛋白位于肿瘤内,因此可以推测注射后CBD-IL-2的副作用要比IL-2小,这是由于肿瘤的竞争和相应的全身性暴露降低所致。B16F10黑色素瘤接种后4天给予CBD-IL-2和IL-2,然后在注射后24小时检查血清中的细胞因子浓度。野生型IL-2施用增加了血清中的IFN γ 浓度,而CBD-IL-2则没有(图2B)。该结果表明,CBD融合体可以降低IL-2的全身毒性。

[0230] 与IL-2相比,CBD-IL-2显著抑制B16F10和CT-26肿瘤的生长。发明人用B16F10黑色素瘤和CT26结肠癌检查了CBD-IL-2的抗肿瘤功效。B16F10细胞接种后四天,注射6 μ g IL-2或12 μ g (当量摩尔) CBD-IL-2。在该剂量下,野生型IL-2处理未显示出明显的抗肿瘤作用,而CBD-IL-2处理诱导了较小的肿瘤大小(图3A)。接种CT26细胞五天后,注射6 μ g IL-2或12 μ g (当量摩尔) CBD-IL-2。CBD-IL-2再次减慢了CT26的肿瘤生长,而IL-2并未减慢(图3B)。这些数据表明,与野生型相比,CBD-IL-2治疗具有卓越的抗肿瘤作用。

[0231] 局部癌症治疗的策略可以分为主动靶向和被动靶向(Danhier等人,J Control Release 148:135-46,2010)。抗体-药物偶联物是主动靶向的实例。靶向基于药物与对肿瘤或肿瘤细胞具有特异性的特异性配体(例如抗体)的结合(Chari等人,Angew Chem Int Ed Engl 53:3796-827,2014),有助于癌症药物的特异性递送到肿瘤细胞表面。被动靶向的实例是嵌入纳米颗粒载剂中的药物。纳米粒子有望在血液中具有延长的半衰期,从而通过增强的通透性和保留(EPR)效应导致在肿瘤中的血管渗漏的累积(Maeda等人,J Control Release 65:271-84,2000;Swartz和Fleury,Annu Rev Biomed Eng 9:229-56,2007)。因此,被动靶向是基于药物载剂在血液中的寿命及其在具有不规则血管的病理部位的积累,从而增强积累。

[0232] 本申请中提出的基于胶原蛋白结合结构域(CBD)的药物靶向方法与主动靶向相似,但也利用了肿瘤血管的渗漏结构(Nagy等人,British journal of cancer 100:865,2009);在正常组织中,几乎没有胶原蛋白暴露(Dubois等人,Blood 107:3902-06,2006;Bergmeier and Hynes,Cold Spring Harb Perspect Biol 4:a005132,2012),但是在肿瘤中,由于其渗漏的血管,胶原蛋白实际上是暴露的(Liang等人,Journal of controlled release 209:101-09,2015;Liang等人,Sci Rep 6:18205,2016;Yasunaga等人,Bioconjugate chemistry 22:1776-83,2011;Xu等人,The Journal of cell biology 154:1069-80,2001;Swartz and Lund,Nat Rev Cancer 12:210-19,2012)。因此,CBD融合物是特异于肿瘤微环境的,但不是通过靶向专门位于肿瘤中的分子(实际上,胶原蛋白几乎无处不在),而是仅通过渗漏的肿瘤血管暴露。同样,这可以是利用两种优点的混合方法。

[0233] vWF A3结构域和胶原蛋白的结合是血栓形成级联的引发剂,因此这种结合通常发生在人体中(Shahidi,Advances in experimental medicine and biology 906:285-306,2017)。在这项研究中,发明人已经开发出了以vWF A3结构域作为CBD靶向癌症微环境的癌症免疫疗法。

[0234] 以前,已经在动物模型和临床试验中测试了将单链抗体片段与肿瘤特异性纤连蛋白域和细胞因子融合的肿瘤基质靶向方法(Carnemolla等人,Blood 99:1659-65,2002;Eigentler等人,Clinical cancer research 17:7732-42,2011;Ferrari等人,Drug Discov Today 21:172-79,2016)。纤连蛋白外结构域A(EDA)和EDB结构域在肿瘤中表达,但不在正常组织中表达(Rybak等人,Cancer Res 67:10948-957,2007;Villa等人,Int J

Cancer 122:2405-13,2008)。在全身注射后,针对纤连蛋白EDA和EDB结构域的单链抗体通过EDA和EDB靶标的肿瘤特异性定位而在肿瘤内定位(Carnemolla等人,Blood 99:1659-65,2002;Rybak等人,Cancer Res 67:10948-957,2007)。与小鼠模型中的正常IL-2相比,单链抗体和IL-2的融合蛋白显示出增强的抗肿瘤功效(Carnemolla等人,Blood 99:1659-65,2002)。

[0235] 胶原蛋白是人体中最丰富的蛋白质(Addi等人,Tissue Engineering Part B: Reviews,2016;Di Lullo等人,Journal of Biological Chemistry 277:4223-31,2002),特别是肿瘤比正常组织含有更多的胶原蛋白(Zhou等人,J Cancer 8:1466-76,2017;Provenzano等人,BMC Med 6:11,2008)。因此,在CBD方法中,与纤连蛋白的EDA和EDB结构域相比,目标蛋白应更丰富。Liang等人报道了当静脉注射时,与天然抗EGFR Fab抗体相比,将胶原蛋白结合短肽(TKKLRT (SEQ ID NO:14))与抗上皮生长因子受体(EGFR) Fab或单链抗体融合可改善抗体的肿瘤组织定位(Liang等人,Journal of controlled release 209:101-09,2015;Liang等人,Sci Rep 6:18205,2016)。该TKKLRT肽是通过噬菌体展示发现的,报道的 K_D 值或针对I型胶原的半最大有效浓度(EC50)为0.5-6 μ M(Addi等人,Tissue Engineering Part B:Reviews,2016)。而且,与天然抗EGFR抗体相比,TKKLRT-抗EGFR Fab表现出增强的抗肿瘤功效。对于EGFR,该机制由癌细胞增殖的直接抑制而不是免疫调节介导(Martinelli等人,Clin Exp Immunol 158:1-9,2009)。发明人的方法使用了人体中天然存在的CBD蛋白,因此没有免疫原性。与更具特异性的配体(例如肽、抗体或抗体片段)不同,CBD蛋白(例如vWF A3蛋白)与多种胶原蛋白结合。同样,vWF A3结构域蛋白对多种类型的胶原蛋白具有高亲和力(nM范围 K_D)(Addi等人,Tissue Engineering Part B:Reviews,2016)。因此,该方法在方法学(衍生自体内天然存在的蛋白质的高亲和力蛋白质结构域,相对于低亲和肽结构域)和生物学方法(靶向体内丰富但仅通过其渗漏的脉管系统暴露于肿瘤中的蛋白质)两方面都是新颖的。

[0236] 发明人已经表明,CBD-IL-2融合体不增加血清中的IFN γ 浓度,而野生型IL-2却增加了该浓度。考虑到CBD介导的肿瘤靶向,这可能是由于竞争中的肿瘤内IL-2的隔离。CBD-IL-2定位在肿瘤内,因此降低了血液循环中的浓度,从而通过避免全身性免疫细胞活化而潜在地维持全身性免疫稳态。CBD融合甚至可能允许减少施用剂量,因为发明人观察到低剂量的肿瘤生长延迟,其中未修饰的IL-2无效。对于由于不良事件而中止癌症免疫治疗的患者的治疗,这些数据令人鼓舞。

[0237] 在两个肿瘤模型中,与野生型相比,CBD融合的IL-2具有更高的抗肿瘤作用。这些数据表明,vWF A3结构域的胶原蛋白靶向方法通常适用于多种肿瘤。已知IL-2通过扩增CD8⁺T细胞和NK细胞而具有抗肿瘤作用。因此,通过靶向肿瘤,CBD-IL-2可能比其未修饰形式更有效地增加肿瘤浸润性T细胞和NK细胞的数量。

[0238] 由于检查点抑制剂已被批准用于黑色素瘤患者,而B16F10黑色素瘤是检查点无反应模型,因此发明人对CBD-IL-12是否可以增加 α -PD-L1抗体的抗肿瘤功效感兴趣。从第7天开始,每10天进行三个周期的小鼠治疗。连续几天进行IL-12和 α -PD-L1注射,首先施用IL-12。单独的 α -PD-L1对肿瘤生长几乎没有影响(图4A)。尽管与PBS治疗组或抗体治疗组相比,IL-12和CBD-IL-12与 α -PD-L1组合均显著降低了肿瘤的生长,但CBD-IL-12的作用更为有效。用CBD-IL-12治疗的小鼠具有显著延长的总生存期(图4B),其中12只小鼠中有1只完全

治愈了该疾病。

[0239] 为了研究CBD-IL-12是否与检查点阻断抗体协同作用,将CBD-IL-12单一疗法与CBD-IL-12与单独的 α -PD-L1或 α -PD-1+ α -CTLA-4的组合进行了比较。小鼠对 α -PD-L1或 α -PD-1+ α -CTLA-4均无响应,而在早期时间点,观察到单独的CBD-IL-12和CBD-IL-12与检查点阻断抗体组合时肿瘤大小显著缩小(图5A)。但是,当小鼠接受CBD-IL-12与 α -PD-1+ α -CTLA-4组合治疗时,总生存期得到了显著改善,在11个小鼠中有6个完全响应者(图5B)。当CBD-IL-12与 α -PD-L1组合使用时,十分之四的小鼠被完全治愈了该疾病,而CBD-IL-12单药治疗组中只有十分之一的小鼠被治愈。

[0240] 总之,发明人发现当设置胶原蛋白结合特性时,IL-2的抗肿瘤作用增强。 ν WF A3 CBD的融合增强了IL-2。CBD-IL-2在多种肿瘤模型中显著延迟了肿瘤的生长。这种工程化胶原蛋白结合细胞因子免疫疗法的简单方法可能具有作为靶向癌症治疗的临床转化潜力。

[0241] B. 材料和方法

[0242] 重组 ν WF A3结构域和小鼠IL-2蛋白的制备和纯化。如先前所述进行蛋白质制备和纯化(Martino等人,Science 343:885-88,2014)。合成编码人 ν WF A3结构域残基Cys1670至Gly1874(成熟 ν WF的第907至1111位)、小鼠IL-2、人 ν WF A3结构域和小鼠IL-2融合蛋白的序列,并通过Genscript将其亚克隆到哺乳动物表达载体pcDNA3.1(+)中。在N端添加了编码6His的序列,以进一步纯化重组蛋白。悬浮液适应的HEK-293F细胞通常保留在无血清的FreeStyle 293表达培养基(Gibco)中。转染当天,将细胞以 1×10^6 细胞/ml的密度接种到新鲜培养基中。依次加入 $2 \mu\text{g/ml}$ 质粒DNA、 $2 \mu\text{g/ml}$ 线性25kDa聚乙烯亚胺(Polysciences)和OptiPRO SFM培养基(终浓度4%,Thermo Fisher)。通过在5%CO₂的存在下于37°C以135rpm的轨道摇动来摇动培养瓶。转染六天后,离心收集细胞培养基,并通过 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器过滤。使用ÄKTApure 25(GE Healthcare)将培养基负载到HisTrap HP 5ml色谱柱(GE Healthcare)中。用洗涤缓冲液(20mM咪唑、20mM NaH₂PO₄、0.5M NaCl,pH 7.4)洗涤色谱柱后,用500mM咪唑(在20mM NaH₂PO₄中,0.5M NaCl,pH 7.4)梯度洗脱蛋白质。使用HiLoad Superdex 200PG色谱柱(GE Healthcare),通过分子排阻层析进一步纯化洗脱液。所有纯化步骤均在4°C下进行。使用抗His标签抗体(BioLegend)通过蛋白质印迹确定层黏连蛋白LG结构域的表达,并通过SDS-PAGE证实蛋白质的纯度>90%。

[0243] ν WF A3域蛋白-

CSQPLDVILLLDGSSSPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQVSVLQYGSITTIDVP
WNVVPEKAHLLSLVDVMQREGGPSQIGDALGFVRYLTSEMHGARP GASKAVVILV
 [0244] **TDVSVDSVDAAADAARSNRVTVFPIGIGDRYDAAQLRILAGPAGDSNVVVKLQRIEDL**
PTMVTLGNSFLHKLCSGFVRICTGHHHHHHH (SEQ ID NO:34).

[0245] 小鼠IL-2-

PTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQHQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRLT

[0246] **FKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKG**
SDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQH HHHHHH (SEQ ID NO:35).

[0247] ν WF A3结构域和小鼠IL-2融合蛋白-

**CSQPLDVILLLDGSSSPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQVSVLQYGSITTIDVP
WNVVPEKAHLLSLVDVMQREGGSPQIGDALGFVRYLTSEMHGARGASKAVVILV
TDVSVDSVDAADAARSNRVTVFPIGIGDRYDAAQLRILAGPAGDSNVVKLQRIEDL
[0248] PTMVTLGNSFLHKLCSGFVRIGGGSGGGSPSSSTSSSTAQAQQQQQQQQQQHLE
QLLMDLQELLSRMENYRNKLPRLTFKPYLPKQATELKDLCLEDELGPLRHVLD
LTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIH
STSPQHSHHHH (SEQ ID NO:36)。**

[0249] 十二烷基硫酸钠丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。如先前所述进行测量 (Ishihara 等人, *Sci Transl Med* 9:doi:10.1126/scitranslmed.aan0401,2017)。在4%至20%梯度凝胶 (Bio-Rad) 上进行 SDS-PAGE。电泳后,根据制造商的说明,使用 SimplyBlue SafeStain (Thermo Fisher Scientific) 对凝胶进行染色。凝胶图像是用 ChemiDoc XRS+ 系统 (Bio-Rad) 获得的。

[0250] 检测 CBD-IL-2 与胶原蛋白的结合。如先前所述进行测量 (Ishihara 等人, *Sci Transl Med* 9:doi:10.1126/scitranslmed.aan0401,2017)。将 96 孔 ELISA 板 (Greiner Bio One) 用在 PBS 中的 10 μ g/mL 胶原 I (EMD Millipore)、胶原 III (EMD Millipore) 或 1 μ g/mL 重组小鼠 IL-2R (SinoBiological) 包覆 1h 持续 37 $^{\circ}$ C, 然后在室温下用含 0.05% Tween 20 (PBS-T) 的 2% BSA 的 PBS 溶液封闭 1 小时。然后,将孔用 PBS-T 洗涤,再与 10 μ g/mL CBD-或未修饰的 IL-2 于室温孵育 1 小时。用 PBS-T 洗涤 3 次后,将孔与抗大鼠 IgG 的 HRP 偶联抗体在室温下孵育 1 小时 (Jackson ImmunoResearch)。洗涤后,通过测量减去 570nm 下的 450nm 吸光度,用四甲基联苯胺底物检测结合的 CBD-IL2 和 IL-2。表观解离常数 (K_D) 值是通过在 Prism 软件 (v7, GraphPad 软件) 中假设一个位点特异性结合的非线性回归分析而获得的。

[0251] 增殖测定。在补充有热灭活的胎牛血清、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、青霉素-链霉素和重组的小鼠 IL-2 (PeproTech) 的 RPMI 1640 (ATCC) 中培养 CTLL-2 细胞 (ATCC)。细胞每周两次传代至 10000 个细胞/mL 的密度。为了进行增殖测定,将细胞以 100000 个细胞/mL 的量接种,并以 IL-2 为基础以指定的浓度添加小鼠 IL-2 和 CBD-IL-2,最终体积为 100 μ L。细胞生长 48 小时。根据制造商的说明,使用 CyQUANT 细胞增殖检测试剂盒 (Invitrogen) 进行增殖检测。使用 BioTek Cytation 3 细胞成像多模式读取器 (fisher science) 测量荧光。使用 GraphPad Prism 7 软件 (GraphPad) 通过非线性回归拟合剂量响应曲线。

[0252] 小鼠和细胞系。如先前所述准备小鼠和细胞系 (Ishihara 等人, *Sci Transl Med* 9:doi:10.1126/scitranslmed.aan0401,2017)。从杰克逊实验室获得 8 至 12 周龄的 C57BL/6、FVB 和 Balb/c 小鼠。实验是在芝加哥大学机构动物护理和使用委员会的批准下进行的。B16F10 细胞和 CT26 细胞获自美国典型培养物保藏中心,并根据说明进行培养。通过病原体测试 IMPACT I (IDEXX BioResearch) 检查所有细胞系的支原体污染情况。

[0253] 体内生物分布研究。使用 DyLight 800 NHS 酯 (Thermo Fisher) 对 vWF A3 域蛋白进行荧光标记,并根据制造商的说明通过 Zebaspin 旋转柱 (Thermo Fisher) 去除未反应的染料。将共重悬于 50 μ L PBS 中的 8×10^5 个 MMTV-PyMT 细胞皮下注射到每只 FVB 小鼠右侧的乳腺脂肪垫中。当肿瘤达到 500mm³ 时,静脉注射 50 μ g DyLight 800 标记的 CBD。Xenogen IVIS Imaging System 100 (Xenogen) 注射后 48 小时,提取小鼠器官并在以下条件下成像:f/stop:2;滤光片发射 740nm;发射 800nm;接触时间:5 秒;小分箱。

[0254] 血清细胞因子浓度分析。如先前所述进行测量 (Ishihara 等人, *Sci Transl Med* 9:doi:10.1126/scitranslmed.aan0401, 2017)。在每只12周的C57BL/6小鼠 (杰克逊实验室) 的背部左侧皮内注射 5×10^5 个B16F10黑色素瘤细胞。4天后, 小鼠接受 $6 \mu\text{g}$ IL-2 和 $12 \mu\text{g}$ CBD-IL-2。在第5天, 将血液样品收集在试管中, 然后在 4°C 下孵育过夜。血清中的细胞因子浓度根据制造商的规程通过Ready-SET-Go! ELISA试剂盒 (eBioscience) 测量。

[0255] CBD-IL-2对B16F10肿瘤的抗肿瘤功效。如先前所述进行测量 (Ishihara 等人, *Sci Transl Med* 9:doi:10.1126/scitranslmed.aan0401, 2017)。在每只C57BL/6小鼠背部左侧的皮内接种重悬于 $50 \mu\text{L}$ PBS中的总计 5×10^5 个B16F10细胞。4天后, 向小鼠静脉注射IL-2 ($6 \mu\text{g}$) 或CBD-IL-2 ($12 \mu\text{g}$)。接种肿瘤后4天开始用数字卡尺测量肿瘤, 并以椭圆体形式计算体积, 其中 $V = 4/3 \times 3.14 \times \text{深度}/2 \times \text{宽度}/2 \times \text{高度}/2$ 。当任一肿瘤体积已超过 500mm^3 时, 处死小鼠。

[0256] CBD-IL-2对CT26肿瘤的抗肿瘤功效。在每只Balb/c小鼠背部左侧的皮内接种重悬于 $50 \mu\text{L}$ PBS中的总计 5×10^5 个CT26细胞。5天后, 向小鼠静脉注射IL-2 ($6 \mu\text{g}$) 或CBD-IL-2 ($12 \mu\text{g}$)。如上所述, 在肿瘤接种后5天开始用数字卡尺测量肿瘤。当任一肿瘤体积已超过 500mm^3 时, 处死小鼠。

[0257] 统计分析。所有实验至少重复两次。对于动物研究, 在即将注射IL-2和CBD-IL-2之前, 小鼠被随机分成笼内的治疗组, 并以相同的方式进行治疗。当B16F10和CT26肿瘤的肿瘤大小超过 500mm^3 时, 达到生存终点。图例中显示了用于计算统计量的n值。使用Prism软件 (v7, GraphPad) 确定实验组之间的统计学差异。在使用单向ANOVA和Tukey的HSD事后检验的情况下, 通过Brown-Forsythe检验发现两组之间的差异相似。对于单次比较, 使用了双尾学生t检验。使用对数秩 (Mantel-Cox) 检验分析生存曲线。图例中显示了用于计算统计量的n值。符号*和**分别表示P值小于0.05和0.01; N.S. 表示不显著。

[0258] 待测试的其他细胞因子。除IL-2外, 多种细胞因子 (包括趋化因子) 已显示具有抗肿瘤功效, 目前正在临床试验中进行测试 (Tokunaga 等人, *Cancer treatment reviews* 63:40-47, 2017; Lin 等人, *Cancers (Basel)* 6:1098-110, 2014; Akdis 等人, *The Journal of allergy and clinical immunology* 127:701-21, 2011; Waldmann, *Nature reviews. Immunology* 6:595-601, 2006)。发明人期望在细胞因子的N-或C-末端添加CBD序列能够实现有效的肿瘤靶向, 如发明人在先前部分中关于CBD-IL-2所示的。发明人将测试可繁殖T细胞的细胞因子: IFN α 、IFN β 、IL-15、IL-15超激动剂 (IL-15和IL-15R α 的融合蛋白) 和IL-21或NK细胞: IL-12 (Akdis 等人 *The Journal of allergy and clinical immunology* 127:701-21, 2011; Waldmann, *Nature reviews. Immunology* 6:595-601, 2006)。发明人还将测试VEGF-C, 它是一种诱导淋巴管生成、导致免疫细胞浸润增加的细胞因子 (Fankhauser 等人, *Sci Transl Med* 9:doi:10.1126/scitranslmed.aal4712, 2017; Lund 等人, *Cell Rep* 1:191-99, 2012)。类似地, 发明人将测试据报道募集抗肿瘤免疫细胞进入肿瘤微环境的趋化因子 (例如XCL1、CCL4、CCL21、CXCL9、和CXCL10) (Tokunaga 等人, *Cancer treatment reviews* 63:40-47, 2017; Lin 等人, *Cancers (Basel)* 6:1098-110, 2014)。

[0259] 待测试的其他CBD。除vWF A3结构域外, 蛋白质 (vWF A1结构域 (SEQ ID NO:11) 和饰胶蛋白聚糖 (SEQ ID NO:15)) 和肽 (TKKLRT (SEQ ID NO:14)) 已显示与胶原蛋白结合 (Addi 等人, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2016)。因为vWF A1结构域和饰胶蛋白

聚糖是与vWF A3结构域蛋白相似的分子量蛋白质,并且显示出与vWF A3结构域相似的高结合亲和力,所以预期在细胞因子的N-或C-末端添加这些vWF A1结构域和核心蛋白聚糖序列也靶向肿瘤微环境,类似于关于CBD-IL-2所示的。然而,由于其分子量小和胶原蛋白亲和力低(K_D 的 μM 范围),预期在细胞因子的N-或C-末端添加TKKLRT序列不会显示出肿瘤微环境靶向能力(Addi等人, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2016)。因此,添加TKKLRT序列不会改变细胞因子的抗肿瘤活性。

[0260] CBD融合细胞因子的制备和纯化。如上文CBD-IL-2部分所述,编码CBD的序列将被克隆并亚克隆到哺乳动物表达载体pcDNA3.1(+)中。组氨酸标签将添加到蛋白质序列的N-或C-末端。CBD融合的细胞因子重组蛋白将在无血清的FreeStyle 293表达培养基中在适应悬浮液的HEK-293F细胞中表达。制备的重组蛋白将使用组氨酸标签的蛋白纯化柱和分子排阻法进行纯化。

[0261] 通过静脉注射进行肿瘤接种和免疫调节抗体治疗。皮内接种(id)肿瘤细胞(例如, B16F10)。肿瘤可见后,小鼠将通过尾静脉接受CBD或野生型细胞因子的静脉注射。肿瘤大小将被监测直至达到安乐死标准。在此,发明人期望静脉注射CBD细胞因子将通过结合至肿瘤微环境中的胶原蛋白而显示出增强的肿瘤组织定位和保留。通过与以上在IL-2部分所述的类似机制,CBD融合将增加肿瘤微环境中细胞因子的浓度,从而减少副作用的发生并增强细胞因子/趋化因子的抗肿瘤功效。

[0262] 实施例2

[0263] 通过靶向肿瘤的趋化因子递送来募集CD103⁺DC可增强检查点抑制剂免疫疗法的功效

[0264] A. 结果

[0265] CBD-CCL4重组蛋白是使用类似于先前报道的哺乳动物蛋白表达技术产生的(Ishihara等人, *Sci Transl Med*, 2019)。使用亲和色谱和分子排阻层析法制备和纯化后,使用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)评估CBD-CCL4。与天然(WT) CCL4相比,与CBD的融合使CCL4的分子大小增加了约20kDa,这与vWF的A3结构域的大小一致(图6A)。使用表面等离子体共振(SPR),胶原蛋白I和胶原蛋白III的亲和力分别被计算为33.4nM和14.5nM(图6B、6C)。这些结果与先前对CBD修饰的免疫疗法的胶原蛋白亲和力相符(Ishihara等人, *Sci Transl Med*, 2019)。接下来,使用钙通量分析评估WT CCL4和CBD-CCL4的活性,因为CCL4通过G蛋白偶联受体(GPCR) CCR5发出信号(Alkhatib, *Curr Opin HIV AIDS* 4, 96-103, 2009),活化后钙释放(图6D)。天然CCL4和CBD-CCL4均表现出相似的GPCR激活水平,这突显了CBD融合并没有改变其通过CCR5发出信号的能力。

[0266] 接下来,在带有B16F10肿瘤的小鼠中静脉内施用后,评估了WT CCL4和CBD-CCL4的血浆药代动力学。有趣的是,与WT CCL4相比,CBD-CCL4表现出延迟的清除(图7A)。分子的分子大小增加可能会减慢其从血液中的清除;这可能对靶向肿瘤具有重要意义,因为延长血液循环时间通常对于增强大分子向肿瘤的递送具有吸引力(Pisal等人, *J Pharm Sci* 99, 2557-75, 2010)。此外,增强的循环时间可以允许额外的机会结合到泄漏的肿瘤微血管系统中暴露的胶原蛋白(Ruoslahti等人, *J Cell Biol* 188, 759-68, 2010)。为了确认CBD融合增强了CCL4的肿瘤传递,在静脉内施用后对EMT6乳腺癌小鼠进行了生物分布研究。重要的是,施用后30分钟,CBD-CCL4融合体在肿瘤积累中显示出2.4倍的增加(图7B)。这些数据证明了

CBD-CCL4有效递送至肿瘤微环境。

[0267] 接下来,发明人研究了它是否能增强肿瘤免疫浸润,这是驱动对CPI治疗成功反应的关键因素。在随后的所有实验中,CCL4趋化因子疗法与包含 α CTLA4+ α PD-L1的CPI疗法共同使用,这是临床上针对晚期黑色素瘤和非小细胞肺癌的组合治疗策略(Chae等人,J Immunother Cancer 6,39,2018;Gong等人,J Immunother Cancer 6,8,2018)。将单独CPI治疗纳入基线比较。在B16F10黑色素瘤中评估了CCL4和CPI的组合治疗,该肿瘤模型显示仅对CPI的治疗效果较差(Lechner等人,J Immunother 36,477-89,2013)。如图8A所示,仅CBD-CCL4(通过静脉注射施用)和CPI疗法(通过腹腔(i.p.)注射施用)的组合显示出肿瘤生长速率的显著降低。WT CCL4与CPI治疗组合使用,并未显示出肿瘤生长率的任何降低。这些结果证实需要靶向趋化因子递送以从CCL4引起治疗益处。

[0268] 因为观察到肿瘤生长显著减慢,所以假设募集到肿瘤的CD103⁺DC的增加可能有助于抗肿瘤免疫反应。在施用治疗方案后6天,处死小鼠,并收集肿瘤并进行处理以用于流式细胞术分析肿瘤中的免疫细胞浸润。与单独的CPI治疗和与WT CCL4组合给予CPI相比,与CBD-CCL4组合给予CPI的治疗显著增加了肿瘤中CD45⁺免疫细胞的数量(图8B),表明微环境发炎。专门观察免疫细胞的组成,观察到用CBD-CCL4进行的CPI治疗导致抗肿瘤免疫反应的关键驱动因素的最大浸润,包括CD103⁺DC(图8C)、CD8⁺T细胞(图8D)、自然杀伤(NK)细胞(图8E)以及总CD11c⁺DC(图8F)。相对于CPI治疗和WT CCL4的组合,CD4⁺T细胞也得到了显著的改善(图8G)。重要的是,未观察到CD4⁺T细胞的调节性T细胞(Treg)部分增加(图8H),表明肿瘤炎症的增加也没有显著改变Treg募集。

[0269] 在免疫细胞浸润和肿瘤生长之间进行了相关分析,以突出每个细胞群对驱动抗肿瘤免疫力的贡献。对于CD103⁺DC和CD8⁺T细胞,肿瘤体积和细胞浸润之间的相关性最强(图9A、9B),最大的细胞浸润数导致最小的肿瘤体积。如预期的那样,观察到CD103⁺DC和CD8⁺T细胞之间存在显著的正相关性(图9C),因为以前已经表明CD103⁺DC分泌了T细胞浸润进入肿瘤所必需的趋化因子(Spranger等人,Cancer Cell 31,711-23 e714,2017)。在NK细胞和CD11c⁺DC之间观察到了较弱的趋势(图9D、9E),突出表明这些细胞类型对肿瘤生长控制很重要,尽管不如CD103⁺DC和CD8⁺T细胞重要。此外,在总CD45⁺免疫细胞与肿瘤生长之间观察到了不太明显的相关性(图9F),表明仅总的免疫浸润不足以驱动抗肿瘤免疫。相反,必须募集驱动抗肿瘤免疫力的特定细胞类型以最大化治疗效果。

[0270] 为了跟踪在B16F10黑色素瘤中观察到的免疫浸润反应,在EMT6乳腺癌模型中进行了类似的分析。EMT6模型虽然对CPI治疗有中度响应,但被归类为免疫排斥的肿瘤模型(Mariathasan等人,Nature 554,544-48,2018)。因此,假设肿瘤靶向的CCL4递送可以进一步增强CD103⁺DC募集并进一步提高CPI治疗的功效。与在B16F10黑色素瘤中观察到的结果相似,仅CPI治疗和CBD-CCL4的组合显示肿瘤生长显著减少(图10A)。WT CCL4与CPI治疗组合,相对于单独的CPI治疗无明显改善。使用流式细胞术对免疫细胞浸润进行的详细分析发现,组合CPI治疗的CBD-CCL4表现出CD45⁺免疫细胞总数的显著增加(图10B)。具体而言,CBD-CCL4组合疗法介导了CD103⁺DC、CD8 α ⁺交叉呈递的DC、和CD8⁺T细胞的最高募集(图10C-10E)。还观察到总CD11c⁺DC的显著增加(图10F)。CBD-CCL4治疗没有增加CD4⁺T细胞的募集,也没有增加CD4⁺T细胞区室中Treg的比例(图10G、10H)。综上所述,这些结果再次凸显了靶向CCL4传递在关键细胞群募集中的重要性,以增强CPI治疗的功效。

[0271] 受早期在治疗肿瘤时B16F10黑色素瘤组合治疗所见结果的鼓舞,进一步研究了CPI治疗与CBD-CCL4组合治疗是否可以减缓已建立的B16F10肿瘤的生长。允许肿瘤进展直至其体积大于 50mm^3 ,之后再单独施用CPI治疗或CPI+CBD-CCL4治疗肿瘤。重要的是,组合治疗可显著减缓单次施用后的肿瘤生长;此外,联合治疗延长了小鼠的生存期,与单独进行CPI治疗的14天相比,与CBD-CCL4组合进行CPI治疗的小鼠平均存活了22天(图11)。根据这些结果,本发明人研究了CBD-CCL4是否可以与抗程序性细胞死亡蛋白1($\alpha\text{PD-1}$, CD279)协同作用,该蛋白是另一种经临床批准的针对多种适应症的免疫疗法,所述适应症包括黑色素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、肾细胞癌和肝细胞癌等(Gong等人, *J Immunother Cancer* 6,8, 2018)。使用两种同基因结肠癌模型CT26和MC38,发现 $\alpha\text{PD-1}$ 治疗和CBD-CCL4的组合在两种模型中介导的肿瘤生长速率最慢,相对于单独的抗体治疗或与WT CCL4的组合,治疗效果显著增强(图12)。这些结果表明,CBD-CCL4可与多种CPI抗体疗法组合使用以改善治疗效果。此外,由于用于CBD-CCL4治疗的靶向方法利用了肿瘤细胞外基质,而不是肿瘤细胞表面上的特定蛋白质,因此该治疗可应用于多种不同的肿瘤模型,以提高CPI治疗的疗效。

[0272] 最后,研究了组合治疗在自发性乳腺癌模型中的功效。至此,已经在多种可植入的肿瘤模型中证明了CBD-CCL4的抗肿瘤功效。虽然引人注目,但这些模型发展迅速,可能会影响肿瘤微血管的渗漏和无序性质(Nakamura等人, *Bioconjug Chem* 27,2225-38,2016),使其更容易通过我们的胶原蛋白结合方法靶向。另一方面,缓慢发展的肿瘤可能不会表现出相同的无序脉管系统(Golombek等人, *Adv Drug Deliv Rev* 130,17-38,2018),限制了CBD-CCL4治疗的有效性。在这项研究中,使用了雌性FVB/N-Tg (MMTV-PyVT) 634Mu1/J (MMTV-PyMT) 小鼠,它们在出生后约6-7周在其乳腺脂肪垫中发生浸润性导管癌(Fantozzi和Christofori, *Breast Cancer Res* 8,212,2006;Guy等人, *Mol Cell Biol* 12,954-61, 1992)。该模型在组织学上也与人类乳腺癌相似(Lin等人, *Am J Pathol* 163,2113-26, 2003),使其成为证明CBD-CCL4组合疗法具有转化潜力的合适模型。再者,与单独的CPI治疗相比,CBD-CCL4与CPI治疗组合减缓了肿瘤的生长(图13)。尽管生存结果没有显著差异,但组合治疗初始治疗后的中位生存时间确实增加至29天,而CPI治疗仅为23天。这些结果表明,除了可植入的肿瘤模型外,CBD靶向还可以应用于自发发展的肿瘤,突出了这种方法的转化潜力。施用方案的进一步优化可以进一步改善CBD-CCL4组合治疗所提供的益处。

[0273] 发明人已经证明了通过使用趋化因子CCL4将 $\text{CD103}^+\text{DC}$ 募集到肿瘤微环境中来增强CPI免疫疗法(例如PD-1、PD-L1和CTLA-4)的功效的新颖方法。CBD-CCL4组合CPI治疗,而不是单独施用WT CCL4或CPI治疗,可显著增强B16F10和EMT6肿瘤的免疫浸润并减缓肿瘤的生长。肿瘤免疫细胞组成的详细表征证实,在CBD-CCL4组合治疗后, $\text{CD103}^+\text{DC}$ 和 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞显著增加。该方法适合与多种CPI抗体疗法组合使用,并可应用于多种肿瘤类型,突出了其在临床转化中改善癌症免疫疗法的巨大潜力。

[0274] B. 材料和方法

[0275] 重组VWF A3结构域-CCL4融合蛋白的制备和纯化。合成了编码人vWF A3结构域残基Cys1670至Gly1874(成熟vWF的第907至1111位)、(GGGS)₂接头和鼠CCL4的融合体的序列,并通过Genscript将其克隆到pcDNA3.1 (+) CMV驱动的哺乳动物表达载体中。在N末端添加了编码6x His-标签的序列,用于下游纯化重组蛋白。悬浮液适应的HEK-293F细胞保留在无血清的FreeStyle293 Expression Medium™ (Gibco)中。根据先前的方案制备蛋白质

(Ishihara等人, *Sci Transl Med*, 2019; Ishihara等人, *Nat Commun* 9, 2163, 2018)。简而言之, 在转染当天, 将细胞以 1×10^6 细胞/mL的密度转移到新鲜培养基中。将 $1 \mu\text{g/mL}$ 质粒DNA与 $2 \mu\text{g/mL}$ 线性25kDa聚乙烯亚胺 (Polysciences) 混合, 在OptiPRO™SFM培养基 (Thermo Fisher) 中稀释, 孵育20分钟, 然后逐滴添加到细胞中 (终浓度为4% 体积/体积)。将培养瓶在加湿的轨道摇动培养箱中在5% CO₂的存在下于37°C以135rpm搅拌。转染后6天, 收集细胞培养基, 离心, 并通过 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器过滤。使用ÄKTA pure 25 (GE Healthcare) 将培养基加载到HisTrap™ HP 5mL色谱柱 (GE Healthcare) 中。用洗涤缓冲液 (20mM咪唑、20mM NaH₂PO₄、0.5M NaCl, pH 7.4) 洗涤色谱柱后, 用500mM咪唑 (在20mM NaH₂PO₄中, 0.5M NaCl, pH 7.4) 梯度洗脱蛋白质。使用HiLoad™ Superdex 200PG色谱柱 (GE Healthcare), 通过分子排阻层析法进一步纯化洗脱的蛋白质。所有纯化步骤均在4°C下进行。使用抗His标签抗体 (BioLegend, 克隆J099B12) 通过蛋白质印迹法测定CBD-CCL4的表达, 并通过SDS-PAGE证实蛋白质的纯度>90%。天然形式的鼠CCL4蛋白商购自Biolegend。

[0276] 小鼠CCL4-

APMGSDPPTSCCFSYTSRQLHRSFVMDYYETSSLCSKPAVVFLTKRGRQICANPSEP

[0277]

WVTEYMSDLELN (SEQ ID NO:25)。

[0278] 人vWF A3结构域和小鼠CCL4融合蛋白-

**CSQPLDVILLLDGSSSPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQVSVLQYGSITTIDVP
WNVVPKHAHLLSLVDVMQREGGSPQIGDALGFVRYLTSEMHGARGASKAVVILV
TDVSVDSVDAAADAARSNRVTVPFPIGIGDRYDAAQLRILAGPAGDSNVVKLQRIEDL**

[0279]

**PTMVTLGNSFLHKLCSGFVRIGGGGGSGGGGSAPMGSDPPTSCCFSYTSRQLHRSFVM
DYYETSSLCSKPAVVFLTKRGRQICANPSEPWVTEYMSDLELNHHHHHH (SEQ ID
NO:47)。**

[0280] SDS-PAGE分析蛋白质的分子量和纯度。如先前所述进行测量 (Ishihara等人, *Sci Transl Med* 9, 2017)。用β-巯基乙醇还原CCL4或CBD-CCL4后, 在4%至20%梯度凝胶 (Bio-Rad) 上进行SDS-PAGE。电泳后, 根据制造商的建议, 使用SimplyBlue SafeStain™ (Thermo Fisher Scientific) 对凝胶进行染色。凝胶图像是用ChemiDoc XRS+system™ (Bio-Rad) 采集的。

[0281] 使用SPR进行CBD-CCL4胶原蛋白结合测量。SPR测量是使用Biacore X100 SPR system™ (GE Healthcare) 进行的。根据制造商的说明, 胶原蛋白I或胶原蛋白III通过胺偶联固定在CM5芯片 (GE Healthcare) 上, 具有约1000个共振单位 (RU)。CBD-CCL4在运行缓冲液中以逐渐增加的浓度以 $30 \mu\text{L/min}$ 的流速流动90s (胶原蛋白I) 和30s (胶原蛋白III)。每个循环用50mM NaOH再生传感器芯片。使用对非功能化通道的响应作为参考, 自动计算CBD-CCL4与胶原蛋白的特异性结合。使用BLAevaluation™软件 (GE Healthcare) 拟合结合曲线。CBD-CCL4结合结果符合Langmuir结合动力学 (1:1结合)。

[0282] GPCR钙通量信号测定。使用钙通量分析 (FLUOFORTE™钙分析试剂盒, Enzo Life Sciences) 分析了与天然形式CCL4或CBD-CCL4相互作用后的GPCR信号传导。根据制造商的规程进行了稍作修改的测定。在使用前, 将试剂重新配制, 按照指示进行混合, 并使其升至室温。在24小时之前, 将 1.5×10^5 个hP1人单核细胞 (已知表达CCR5) (Gouwy等人, *Eur J*

Immunol 41,963-73,2011) 铺在经组织培养处理的96孔圆底板中的每个孔中。在测定当天,将细胞以2000RPM离心2分钟,除去培养基,并将细胞重悬于100 μ L的测定缓冲液中。随后在测定之前将细胞在37 $^{\circ}$ C下孵育45分钟,然后在室温下孵育15分钟。然后分别在PBS中一式三份地制备样品,然后在添加到细胞中后以1:4的比例稀释以得到CCL4的指定摩尔浓度。加入化合物后,用多道移液器将样品混合几次以确保充分混合,然后将它们转移到黑色透明底部的96孔板中。然后,使用CytationTM 3多模式读取器(BioTek)使用增益设置为100的底部读取光学器件在490nm的发射波长和525nm的发射波长下测量钙信号传导。使用非线性剂量-反应曲线拟合模型计算EC50值,在GraphPad PrismTM中比较log(测试化合物)与响应。

[0283] 肿瘤细胞系的培养和保持以及动物来源。将所有细胞维持在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂的潮湿培养箱中。细胞达到80%至90%汇合度后,使用TrypLE ExpressTM(Thermo Fisher)常规传代细胞。B16F10黑色素瘤和MC38结肠癌细胞在补充有10%(体积/体积)胎牛血清(FBS,经认证,US原产地,热灭活,Gibco)和500U/mL(1%体积/体积)青霉素链霉素(P/S,Gibco)的Dulbecco's Modified Eagle MediumTM(DMEM)中保存。在补充了10%(体积/体积)FBS和1%(体积/体积)P/S的RPMI1640中保存EMT6乳腺癌、CT26结肠癌和ThP1单核细胞。使用MycAlert PlusTM支原体测定法(Lonza)确认所有细胞均无支原体。从杰克逊实验室获得8周至12周的雌性C57BL/6和Balb/C小鼠。从杰克逊实验室获得4周至6周的雌性FVB/N-Tg(MMTV-PyVT)634Mu1/J(MMTV-PyMT)小鼠。每周检查MMTV-PyMT小鼠,直到在至少4个乳腺脂肪垫中可触摸到肿瘤为止。在使用前,将所有小鼠在笼中适应72小时。在笼子内将治疗随机化,以最大程度地减少笼子特有的治疗效果。所有动物实验均在获得批准并根据芝加哥大学机构动物护理和使用委员会的政策下进行。

[0284] 血浆半衰期表征。在每只小鼠的背部左侧皮内注射 5×10^5 个B16F10黑色素瘤细胞。使用DyLightTM800-NHS(Thermo Fisher)对WT CCL4和CBD-CCL4进行荧光标记,并根据制造商的说明通过ZebaspinTM旋转柱(Thermo Fisher)去除未反应的染料。4天后,通过静脉注射向小鼠注射25 μ g WT CCL4-DyLightTM800或摩尔当量(25 μ g CCL4基,或93 μ g总蛋白)。在施用后1分钟、5分钟、10分钟和30分钟,通过表面流血将血液样品收集到含EDTA的试管中。然后将样品以2000rpm离心5分钟以收集血浆。使用LI-CORTM红外OdysseyTM成像仪测量血浆中CCL4的浓度,并由标记的WT CCL4或CBD-CCL4的标准稀释系列计算浓度。使用GraphPad Prism软件(版本7)的单相衰变模型来确定血浆半衰期。

[0285] EMT6荷瘤小鼠的生物分布分析。使用DyLightTM647 NHS酯(Thermo Fisher)对WT CCL4或CBD-CCL4蛋白进行荧光标记,并根据制造商的说明通过ZebaspinTM旋转柱(Thermo Fisher)除去未反应的染料。将共重悬于50 μ L PBS中的 5×10^5 个EMT6细胞皮下注射到每只Balb/C小鼠右侧的乳腺脂肪垫中。当肿瘤达到约500mm³时,静脉注射25 μ g DyLightTM647标记的CCL4或25 μ g(6.7 μ g CCL4基准)的DyLightTM647标记的CBD-CCL4。注射后30分钟,处死小鼠,提取肿瘤并在以下条件下用Xenogen IVIS Imaging SystemTM100(Xenogen)成像:f/stop:2;滤光片发射640nm;发射670nm;接触时间:0.5秒;小分箱。根据用DyLightTM647标记的WT CCL4或CBD-CCL4的标准稀释系列计算每个肿瘤中的CCL4浓度,并根据肿瘤的重量进行标准化。

[0286] 在B16F10黑色素瘤中的抗肿瘤功效。在每只C57BL/6小鼠背部左侧的皮内接种重悬于50 μ L PBS中的总计 5×10^5 个B16F10细胞。4天(或建立肿瘤治疗研究的7天)后,向小鼠

注射WT CCL4(通过静脉注射给予25 μ g)或摩尔当量的CBD-CCL4(25 μ g CCL4基准、或93 μ g CBD-CCL4,通过静脉注射给予),并组合CPI抗体治疗,其由通过静脉注射给予各自100 μ g α PD-L1和 α CTLA4组成。单独施用CPI治疗作为对照。接种肿瘤后4天开始用数字卡尺测量肿瘤,并以椭圆柱形式计算体积,其中 $V=4/3\times\pi\times\text{深度}/2\times\text{宽度}/2\times\text{高度}/2$ 。当肿瘤体积超过500 mm^3 或由于小鼠健康状况不佳而达到早期切除标准时,处死小鼠。对于细胞浸润分析,在肿瘤接种后10天处死小鼠。

[0287] 在EMT6乳腺癌中的抗肿瘤功效。接种肿瘤后6天和9天,向肿瘤施用WT CCL4(通过静脉注射给予25 μ g)或摩尔当量的CBD-CCL4(25 μ g CCL4基准、或93 μ g CBD-CCL4,通过静脉注射给予),并组合CPI抗体治疗,其由通过静脉注射给予各自100 μ g α PD-L1和 α CTLA4组成。单独施用CPI治疗作为对照。如上所述,在肿瘤接种后4天开始用数字卡尺测量肿瘤。肿瘤接种后10天处死小鼠以评估免疫细胞浸润。

[0288] 在CT26和MC38结肠癌中的抗肿瘤功效。在每只Balb/c(对于CT26)或C57BL/6(对于MC38)小鼠的背部左侧皮内接种重悬于50 μ L PBS中的总计 5×10^5 个CT26或MC38细胞。5天后,向小鼠注射未修饰的CCL4(通过静脉注射给予25 μ g)或摩尔当量的CBD-CCL4(25 μ g CCL4基准或93 μ g CBD-CCL4,通过静脉注射给予),并组合通过腹腔注射给予100 μ g α PD-1的抗体治疗。如上所述,在肿瘤接种后5天开始用数字卡尺测量肿瘤。当肿瘤体积超过500 mm^3 时,处死小鼠。

[0289] 在MMTV-PyMT乳腺癌中的抗肿瘤功效。一旦总肿瘤体积达到约100 mm^3 ,将小鼠用CBD-CCL4(25 μ g CCL4基准、或93 μ g CBD-CCL4,通过静脉注射给予)处理,并组合CPI抗体治疗,其由通过腹腔注射给予各自100 μ g的 α PD-L1和 α CTLA4组成。初始治疗后7天和14天进行相同的治疗。如上所述,使用数字卡尺每两周测量一次肿瘤,一旦肿瘤体积超过1000 mm^3 或由于肿瘤负担而遭受不良影响,则将小鼠处死。

[0290] 用于免疫细胞分析的组织 and 单细胞制备。初次接种肿瘤10天后收获B16F10和EMT6肿瘤。所有细胞分离程序均采用先前报道的方法改编(Ishihara等人,Sci Transl Med 9, 2017;Ishihara等人,Sci Transl Med,2019)。将肿瘤切成小块,然后在37 $^{\circ}$ C温和搅拌下,在含有2%FBS的DMEM中,由2mg/mL胶原酶D和40 μ g/mL DNase I(Roche)组成的酶消化30分钟。单细胞悬液是通过用70 μ m细胞过滤器轻轻破碎经酶处理的肿瘤而获得的。用ACK裂解缓冲液(Quality Biological)裂解红细胞,然后将细胞离心并重悬于流式细胞仪染色缓冲液中,该缓冲液由含有2%FBS的PBS组成,用于下游分析。

[0291] 流式细胞仪分析和所用的抗体。如上所述制备来自肿瘤的单细胞悬液。在所有实验中都使用了针对以下分子的抗体:抗小鼠CD3(145-2C11,BD Biosciences)、抗小鼠CD4(RM4-5,BD Biosciences)、抗小鼠CD8 α (53-6.7,BD Biosciences)、抗小鼠CD25(PC61,BD Biosciences)、抗小鼠CD45(30-F11,Biolegend)、抗小鼠CD44(IM7,Biolegend)、抗小鼠CD62L(MEL-14,BD Biosciences)、抗小鼠PD-1(29F.1A12,Biolegend)、抗小鼠NK1.1(PK136,Biolegend)、抗小鼠Foxp3(MF23,BD Biosciences)、抗小鼠F4/80(BM8,Biolegend)、抗小鼠MHCII(M5/114.15.2,BioLegend)、抗小鼠CD11b(M1/70,BioLegend)、抗小鼠CD11c(N418,Biolegend)、抗小鼠CD19(1D3,BD Biosciences)、抗小鼠Gr-1(RB6-8C5,Biolegend)和抗小鼠CD103(M290,BD Biosciences),根据制造商的说明,使用Fixable Viability Dye eFluor 455(eBioscience)进行活/死细胞鉴别;还包括Fc受体阻断步骤

(抗小鼠CD16/32,克隆93,Biolegend),以最大程度地减少非特异性抗体结合。在冰上进行表面染色20分钟,并根据制造商的说明(eBioscience)使用FoxP3转录因子染色试剂盒进行细胞内染色。另外,将样品固定在PBS中的2%低聚甲醛中。所有的流式细胞术分析均使用Fortessa™(BD Biosciences)流式细胞仪进行,并使用FlowJo™软件(Tree Star)进行分析。

[0292] 统计分析。使用Prism™软件(v7,GraphPad)评估治疗组之间的统计学显著性。为了进行多重比较,通过Brown-Forsythe检验发现两组之间相似时,使用ANOVA和Tukey的HSD事后检验。对于非参数数据,先使用Kruskal-Wallis检验,再使用Dunn的多重比较检验。为了进行两组之间的比较,使用了双尾学生t检验。使用对数秩(Mantel-Cox)检验分析生存曲线。 $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$ 。

[0293] *****

[0294] 尽管上面已经在某种程度上特别地或参考一个或多个单独的实施方案描述了某些实施方案,但是本领域技术人员可以在不脱离本发明的范围的情况下对所公开的实施方案进行多种改变。此外,在适当的情况下,上述任何实施例的方面可以与所描述的任何其他实施例的方面相结合,以形成具有可比或不同属性并解决相同或不同问题的进一步实施例。类似地,应该理解的是,上述优点和优点可以涉及一个实施方案,或者可以涉及多个实施方案。对专利出版物或其他出版物的任何引用在本文中都是通过引用该出版物的公开内容而进行的特定合并。权利要求不应被解释为包括装置加功能或步骤加功能的限制,除非这样的限制在给定的权利要求中分别使用短语“装置”或“步骤”来明确陈述。

序列表

<110> 芝加哥大学

<120> 用与细胞因子连接的ECM亲和肽治疗癌症的方法和组合物

<130> ARCD.P0652W0

<150> 62/638, 520

<151> 2018-03-05

<150> 62/727, 156

<151> 2018-09-05

<160> 47

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg
1 5 10 15

[0001]

Pro Thr Asp Cys His Leu
20

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

Gly Arg Arg Glu Glu Lys Val Gly Lys Lys Glu Lys Ile Gly Lys Lys
1 5 10 15

Lys Arg Gln Lys Lys Arg Lys Ala Ala Gln Lys Arg Lys Asn
20 25 30

<210> 3

<211> 205

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

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

Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser
20 25 30

Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe
35 40 45

Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu
50 55 60

Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro
65 70 75 80

Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly
85 90 95

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

Thr Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val
115 120 125

[0002]

Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp
130 135 140

Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp
145 150 155 160

Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp
165 170 175

Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val
180 185 190

Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly
195 200 205

<210> 4
<211> 170
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 4

Met Pro Val Met Arg Leu Phe Pro Cys Phe Leu Gln Leu Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly
 20 25 30
 Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly
 35 40 45
 Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu
 50 55 60
 Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu
 65 70 75 80
 Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro
 85 90 95
 Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
 100 105 110
 [0003] Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys
 115 120 125
 Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Arg Arg Pro
 130 135 140
 Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys
 145 150 155 160
 His Leu Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg
 165 170
 <210> 5
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 5
 Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg
 1 5 10 15
 Pro Thr Asp Cys His Leu Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg
 20 25 30

<210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6

Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro
 1 5 10 15

Thr Asp

<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 7

Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln
 1 5 10 15

[0004]

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 8

Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln
 1 5

<210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 9

Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly
 1 5

<210> 10
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 10

Arg Arg Lys Thr Lys Gly Lys Arg Lys Arg Ser Arg Asn Ser Gln Thr
 1 5 10 15

Glu Glu Pro His Pro
 20

<210> 11
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 11

Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val
 1 5 10 15

Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His
 20 25 30

Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly
 35 40 45

[0005] Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val
 50 55 60

Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val
 65 70 75 80

Ala Val Val Glu Tyr His Asp Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys
 85 90 95

Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys
 100 105 110

Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr
 115 120 125

Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile
 130 135 140

Thr Leu Leu Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn
 145 150 155 160

Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile
 165 170 175

Pro Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile
180 185 190

Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp
195 200 205

Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys
210 215 220

<210> 12
<211> 98
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 12

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30

[0006] Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Lys Gly Arg Arg Glu Glu Lys Val Gly Lys Lys Glu Lys
65 70 75 80

Ile Gly Lys Lys Lys Arg Gln Lys Lys Arg Lys Ala Ala Gln Lys Arg
85 90 95

Lys Asn

<210> 13
<211> 2813
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 13

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile

	1	5	10	15
	Leu Pro Gly Thr	Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr		
		20	25	30
	Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly			
		35	40	45
	Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly			
		50	55	60
	Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys			
		65	70	75
	Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu			
		85	90	95
	Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro			
		100	105	110
[0007]	Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys			
		115	120	125
	Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly			
		130	135	140
	Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly			
		145	150	155
	Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln			
		165	170	175
	Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala			
		180	185	190
	Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser			
		195	200	205
	Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln			
		210	215	220
	Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu			
		225	230	235
				240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu
245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala
260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His
275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys
290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met
305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu
325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His
340 345 350

[0008]

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn
355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys
370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp
385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
565 570 575

[0009]

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
 690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
 705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
 725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
 740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
 755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
 770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
 785 790 795 800

[0010] Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
 805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
 820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
 835 840 845

Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
 850 855 860

Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly
 865 870 875 880

Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
 885 890 895

Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys
 900 905 910

Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu

	915	920	925
	Val Glu Gly Gly Glu Ile 930	Glu Leu Phe Asp Gly 935	Glu Val Asn Val Lys 940
	Arg Pro Met Lys Asp 945	Glu Thr His Phe Glu 950	Val Val Glu Ser Gly Arg 955 960
	Tyr Ile Ile Leu Leu Leu 965	Gly Lys Ala Leu Ser 970	Val Val Trp Asp Arg 975
	His Leu Ser Ile Ser Val 980	Val Leu Lys Gln Thr 985	Tyr Gln Glu Lys Val 990
	Cys Gly Leu Cys Gly Asn 995	Phe Asp Gly Ile Gln 1000	Asn Asn Asp Leu Thr 1005
	Ser Ser Asn Leu Gln Val 1010	Glu Glu Asp Pro Val 1015	Asp Phe Gly Asn 1020
[0011]	Ser Trp Lys Val Ser Ser 1025	Gln Cys Ala Asp Thr 1030	Arg Lys Val Pro 1035
	Leu Asp Ser Ser Pro Ala 1040	Thr Cys His Asn Asn 1045	Ile Met Lys Gln 1050
	Thr Met Val Asp Ser Ser 1055	Cys Arg Ile Leu Thr 1060	Ser Asp Val Phe 1065
	Gln Asp Cys Asn Lys Leu 1070	Val Asp Pro Glu Pro 1075	Tyr Leu Asp Val 1080
	Cys Ile Tyr Asp Thr Cys 1085	Ser Cys Glu Ser Ile 1090	Gly Asp Cys Ala 1095
	Cys Phe Cys Asp Thr Ile 1100	Ala Ala Tyr Ala His 1105	Val Cys Ala Gln 1110
	His Gly Lys Val Val Thr 1115	Trp Arg Thr Ala Thr 1120	Leu Cys Pro Gln 1125
	Ser Cys Glu Glu Arg Asn 1130	Leu Arg Glu Asn Gly 1135	Tyr Glu Cys Glu 1140

Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln
1145 1150 1155

His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys
1160 1165 1170

His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln
1175 1180 1185

Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly
1190 1195 1200

Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp
1205 1210 1215

Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr
1220 1225 1230

Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr
1235 1240 1245

[0012]

Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser
1250 1255 1260

Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu
1265 1270 1275

Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe
1280 1285 1290

Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg
1295 1300 1305

Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp
1310 1315 1320

Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser
1325 1330 1335

Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln
1340 1345 1350

Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile
 1355 1360 1365

Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu
 1370 1375 1380

Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val
 1385 1390 1395

Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro
 1400 1405 1410

Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile
 1415 1420 1425

Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val
 1430 1435 1440

Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys
 1445 1450 1455

[0013]

Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro Asp Met
 1460 1465 1470

Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu
 1475 1480 1485

Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu
 1490 1495 1500

Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys
 1505 1510 1515

Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp
 1520 1525 1530

Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val
 1535 1540 1545

Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln
 1550 1555 1560

Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr
 1565 1570 1575
 Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser
 1580 1585 1590
 Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr
 1595 1600 1605
 Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile
 1610 1615 1620
 Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu
 1625 1630 1635
 Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp
 1640 1645 1650
 Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg
 1655 1660 1665
 [0014] Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala
 1670 1675 1680
 Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly
 1685 1690 1695
 Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe
 1700 1705 1710
 Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr
 1715 1720 1725
 Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val
 1730 1735 1740
 Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val
 1745 1750 1755
 Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala
 1760 1765 1770
 Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala

Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser
 2000 2005 2010
 Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu
 2015 2020 2025
 Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr
 2030 2035 2040
 Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile
 2045 2050 2055
 Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser
 2060 2065 2070
 Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys
 2075 2080 2085
 Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val
 2090 2095 2100
 [0016]
 Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg
 2105 2110 2115
 Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys Leu Val
 2120 2125 2130
 Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ala
 2135 2140 2145
 Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala Ile Cys
 2150 2155 2160
 Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val Ile Ala
 2165 2170 2175
 Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp Trp
 2180 2185 2190
 Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val
 2195 2200 2205

Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp Gly Asn
2210 2215 2220

Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe Cys Pro
2225 2230 2235

Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu Glu Ala
2240 2245 2250

Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu
2255 2260 2265

Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys
2270 2275 2280

Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr
2285 2290 2295

Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg
2300 2305 2310

[0017]

Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp
2315 2320 2325

Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly
2330 2335 2340

Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe
2345 2350 2355

Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro
2360 2365 2370

Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys
2375 2380 2385

Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val
2390 2395 2400

Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys
2405 2410 2415

Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His
 2420 2425 2430

Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys
 2435 2440 2445

Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu
 2450 2455 2460

Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg
 2465 2470 2475

Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg
 2480 2485 2490

Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro Arg Gly
 2495 2500 2505

Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp Ala Ser
 2510 2515 2520

[0018] Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val Lys Glu
 2525 2530 2535

Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu
 2540 2545 2550

Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser
 2555 2560 2565

Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala Cys Met
 2570 2575 2580

Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met Ile Asp
 2585 2590 2595

Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val Ile Ser
 2600 2605 2610

Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro Cys Pro
 2615 2620 2625

Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys Gly Arg

	2630		2635		2640
	Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr	Ile Gln Leu Arg Gly Gly Gln Ile			
	2645	2650		2655	
	Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys Asp Thr				
	2660	2665		2670	
	His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys				
	2675	2680		2685	
	Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala				
	2690	2695		2700	
	Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr				
	2705	2710		2715	
	Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr				
	2720	2725		2730	
[0019]	Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His				
	2735	2740		2745	
	Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp				
	2750	2755		2760	
	Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg				
	2765	2770		2775	
	Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val				
	2780	2785		2790	
	Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro				
	2795	2800		2805	
	Arg Lys Cys Ser Lys				
	2810				
	<210> 14				
	<211> 6				
	<212> PRT				
	<213> 智人(Homo sapiens)				
	<400> 14				

Thr Lys Lys Leu Arg Thr
 1 5

<210> 15
 <211> 343
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 15

Gly Pro Phe Gln Gln Arg Gly Leu Phe Asp Phe Met Leu Glu Asp Glu
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Ile Gly Pro Glu Val Pro Asp Asp Arg Asp Phe Glu Pro
 20 25 30

Ser Leu Gly Pro Val Cys Pro Phe Arg Cys Gln Cys His Leu Arg Val
 35 40 45

Val Gln Cys Ser Asp Leu Gly Leu Asp Lys Val Pro Lys Asp Leu Pro
 50 55 60

[0020] Pro Asp Thr Thr Leu Leu Asp Leu Gln Asn Asn Lys Ile Thr Glu Ile
 65 70 75 80

Lys Asp Gly Asp Phe Lys Asn Leu Lys Asn Leu His Ala Leu Ile Leu
 85 90 95

Val Asn Asn Lys Ile Ser Lys Val Ser Pro Gly Ala Phe Thr Pro Leu
 100 105 110

Val Lys Leu Glu Arg Leu Tyr Leu Ser Lys Asn Gln Leu Lys Glu Leu
 115 120 125

Pro Glu Lys Met Pro Lys Thr Leu Gln Glu Leu Arg Ala His Glu Asn
 130 135 140

Glu Ile Thr Lys Val Arg Lys Val Thr Phe Asn Gly Leu Asn Gln Met
 145 150 155 160

Ile Val Ile Glu Leu Gly Thr Asn Pro Leu Lys Ser Ser Gly Ile Glu
 165 170 175

Asn Gly Ala Phe Gln Gly Met Lys Lys Leu Ser Tyr Ile Arg Ile Ala

	180		185		190														
	Asp	Thr	Asn	Ile	Thr	Ser	Ile	Pro	Gln	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Leu	Thr			
			195					200					205						
	Glu	Leu	His	Leu	Asp	Gly	Asn	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Asp	Ala	Ala	Ser			
		210					215					220							
	Leu	Lys	Gly	Leu	Asn	Asn	Leu	Ala	Lys	Leu	Gly	Leu	Ser	Phe	Asn	Ser			
	225				230						235				240				
	Ile	Ser	Ala	Val	Asp	Asn	Gly	Ser	Leu	Ala	Asn	Thr	Pro	His	Leu	Arg			
					245					250					255				
	Glu	Leu	His	Leu	Asp	Asn	Asn	Lys	Leu	Thr	Arg	Val	Pro	Gly	Gly	Leu			
				260					265					270					
	Ala	Glu	His	Lys	Tyr	Ile	Gln	Val	Val	Tyr	Leu	His	Asn	Asn	Asn	Ile			
			275					280					285						
[0021]	Ser	Val	Val	Gly	Ser	Ser	Asp	Phe	Cys	Pro	Pro	Gly	His	Asn	Thr	Lys			
		290					295					300							
	Lys	Ala	Ser	Tyr	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Phe	Ser	Asn	Pro	Val	Gln	Tyr			
	305					310					315				320				
	Trp	Glu	Ile	Gln	Pro	Ser	Thr	Phe	Arg	Cys	Val	Tyr	Val	Arg	Ser	Ala			
					325					330					335				
	Ile	Gln	Leu	Gly	Asn	Tyr	Lys												
				340															
	<210>	16																	
	<211>	115																	
	<212>	PRT																	
	<213>	智人(Homo sapiens)																	
	<400>	16																	
	Met	Asn	Trp	Val	Asn	Val	Ile	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Ile	Glu	Asp	Leu			
	1				5					10					15				
	Ile	Gln	Ser	Met	His	Ile	Asp	Ala	Thr	Leu	Tyr	Thr	Glu	Ser	Asp	Val			
				20					25					30					

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
50 55 60

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
65 70 75 80

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
85 90 95

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
100 105 110

Asn Thr Ser
115

<210> 17

<211> 115

<212> PRT

[0022] <213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 17

Met Asn Trp Ile Asp Val Arg Tyr Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ser Leu
1 5 10 15

Ile Gln Ser Ile His Ile Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Asp Ser Asp Phe
20 25 30

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Asn Cys Phe Leu Leu Glu Leu
35 40 45

Gln Val Ile Leu His Glu Tyr Ser Asn Met Thr Leu Asn Glu Thr Val
50 55 60

Arg Asn Val Leu Tyr Leu Ala Asn Ser Thr Leu Ser Ser Asn Lys Asn
65 70 75 80

Val Ala Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Thr
85 90 95

Phe Thr Glu Phe Leu Gln Ser Phe Ile Arg Ile Val Gln Met Phe Ile

	100	105	110
	Asn Thr Ser 115		
	<210> 18		
	<211> 132		
	<212> PRT		
	<213> 智人(Homo sapiens)		
	<400> 18		
	Met Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val 1 5 10 15		
	Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro 20 25 30		
	Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys 35 40 45		
[0023]	Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg 50 55 60		
	Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr 65 70 75 80		
	Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp 85 90 95		
	Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser 100 105 110		
	Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly 115 120 125		
	Ser Glu Asp Ser 130		
	<210> 19		
	<211> 130		
	<212> PRT		
	<213> 小家鼠(Mus musculus)		
	<400> 19		

Met His Lys Ser Ser Pro Gln Gly Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu
 1 5 10 15
 Arg His Leu Ile Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp
 20 25 30
 Leu Asp Pro Glu Leu Leu Ser Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly His Cys
 35 40 45
 Glu His Ala Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser
 50 55 60
 Asn Pro Gly Asn Asn Lys Thr Phe Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu
 65 70 75 80
 Arg Arg Arg Leu Pro Ala Arg Arg Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile
 85 90 95
 Ala Lys Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu
 100 105 110
 [0024] Phe Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His
 115 120 125
 Leu Ser
 130
 <210> 20
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 20
 Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu
 1 5 10 15
 His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys
 20 25 30
 Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp
 35 40 45
 His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu
 50 55 60

Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr
65 70 75 80

Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe
85 90 95

Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr
100 105 110

Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys
115 120 125

Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu
130 135 140

Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser
145 150 155 160

Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu
165 170 175

[0025]

Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser
180 185 190

Tyr Leu Asn Ala Ser
195

<210> 21
<211> 306
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 21

Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr
1 5 10 15

Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu
20 25 30

Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly
35 40 45

Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly
 50 55 60

Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu
 65 70 75 80

Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys
 85 90 95

Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys
 100 105 110

Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr
 115 120 125

Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln
 130 135 140

Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly
 145 150 155 160

[0026] Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala
 165 170 175

Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala
 180 185 190

Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg
 195 200 205

Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu
 210 215 220

Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp
 225 230 235 240

Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln
 245 250 255

Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr
 260 265 270

Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala

	275	280	285
	Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro 290	295	300
	Cys Ser 305		
	<210> 22 <211> 193 <212> PRT <213> 小家鼠 (Mus musculus)		
	<400> 22		
	Arg Val Ile Pro Val Ser Gly Pro Ala Arg Cys Leu Ser Gln Ser Arg 1	5	10 15
	Asn Leu Leu Lys Thr Thr Asp Asp Met Val Lys Thr Ala Arg Glu Lys 20	25	30
[0027]	Leu Lys His Tyr Ser Cys Thr Ala Glu Asp Ile Asp His Glu Asp Ile 35	40	45
	Thr Arg Asp Gln Thr Ser Thr Leu Lys Thr Cys Leu Pro Leu Glu Leu 50	55	60
	His Lys Asn Glu Ser Cys Leu Ala Thr Arg Glu Thr Ser Ser Thr Thr 65	70	75 80
	Arg Gly Ser Cys Leu Pro Pro Gln Lys Thr Ser Leu Met Met Thr Leu 85	90	95
	Cys Leu Gly Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Thr Glu Phe 100	105	110
	Gln Ala Ile Asn Ala Ala Leu Gln Asn His Asn His Gln Gln Ile Ile 115	120	125
	Leu Asp Lys Gly Met Leu Val Ala Ile Asp Glu Leu Met Gln Ser Leu 130	135	140
	Asn His Asn Gly Glu Thr Leu Arg Gln Lys Pro Pro Val Gly Glu Ala 145	150	155 160

Asp Pro Tyr Arg Val Lys Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe
165 170 175

Ser Thr Arg Val Val Thr Ile Asn Arg Val Met Gly Tyr Leu Ser Ser
180 185 190

Ala

<210> 23
<211> 313
<212> PRT
<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 23

Met Trp Glu Leu Glu Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Val Asp Trp Thr
1 5 10 15

Pro Asp Ala Pro Gly Glu Thr Val Asn Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu
20 25 30

[0028] Glu Asp Asp Ile Thr Trp Thr Ser Asp Gln Arg His Gly Val Ile Gly
35 40 45

Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Thr Val Lys Glu Phe Leu Asp Ala Gly
50 55 60

Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Thr Leu Ser His Ser His Leu
65 70 75 80

Leu Leu His Lys Lys Glu Asn Gly Ile Trp Ser Thr Glu Ile Leu Lys
85 90 95

Asn Phe Lys Asn Lys Thr Phe Leu Lys Cys Glu Ala Pro Asn Tyr Ser
100 105 110

Gly Arg Phe Thr Cys Ser Trp Leu Val Gln Arg Asn Met Asp Leu Lys
115 120 125

Phe Asn Ile Lys Ser Ser Ser Ser Ser Pro Asp Ser Arg Ala Val Thr
130 135 140

Cys Gly Met Ala Ser Leu Ser Ala Glu Lys Val Thr Leu Asp Gln Arg

	145		150		155		160
	Asp Tyr Glu Lys Tyr Ser Val Ser Cys Gln Glu Asp Val Thr Cys Pro		165		170		175
	Thr Ala Glu Glu Thr Leu Pro Ile Glu Leu Ala Leu Glu Ala Arg Gln		180		185		190
	Gln Asn Lys Tyr Glu Asn Tyr Ser Thr Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile		195		200		205
	Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Met Lys Pro Leu Lys Asn		210		215		220
	Ser Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Ser Trp Ser Thr Pro		225		230		235
	His Ser Tyr Phe Ser Leu Lys Phe Phe Val Arg Ile Gln Arg Lys Lys		245		250		255
[0029]	Glu Lys Met Lys Glu Thr Glu Glu Gly Cys Asn Gln Lys Gly Ala Phe		260		265		270
	Leu Val Glu Lys Thr Ser Thr Glu Val Gln Cys Lys Gly Gly Asn Val		275		280		285
	Cys Val Gln Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Asn Ser Ser Cys Ser Lys Trp		290		295		300
	Ala Cys Val Pro Cys Arg Val Arg Ser		305		310		
	<210> 24						
	<211> 69						
	<212> PRT						
	<213> 智人(Homo sapiens)						
	<400> 24						
	Ala Pro Met Gly Ser Asp Pro Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr		5		10		15
	Ala Arg Lys Leu Pro His Asn Phe Val Val Asp Tyr Tyr Glu Thr Ser		20		25		30

Ser Leu Cys Ser Gln Pro Ala Val Val Phe Gln Thr Lys Arg Gly Lys
 35 40 45

Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Ser Trp Val Gln Glu Tyr Val Tyr
 50 55 60

Asp Leu Glu Leu Asn
 65

<210> 25
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 25

Ala Pro Met Gly Ser Asp Pro Pro Thr Ser Cys Cys Phe Ser Tyr Thr
 1 5 10 15

Ser Arg Gln Leu His Arg Ser Phe Val Met Asp Tyr Tyr Glu Thr Ser
 20 25 30

[0030] Ser Leu Cys Ser Lys Pro Ala Val Val Phe Leu Thr Lys Arg Gly Arg
 35 40 45

Gln Ile Cys Ala Asn Pro Ser Glu Pro Trp Val Thr Glu Tyr Met Ser
 50 55 60

Asp Leu Glu Leu Asn
 65

<210> 26
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 26

Ser Asp Gly Gly Ala Gln Asp Cys Cys Leu Lys Tyr Ser Gln Arg Lys
 1 5 10 15

Ile Pro Ala Lys Val Val Arg Ser Tyr Arg Lys Gln Glu Pro Ser Leu
 20 25 30

Gly Cys Ser Ile Pro Ala Ile Leu Phe Leu Pro Arg Lys Arg Ser Gln
 35 40 45

Ala Glu Leu Cys Ala Asp Pro Lys Glu Leu Trp Val Gln Gln Leu Met
50 55 60

Gln His Leu Asp Lys Thr Pro Ser Pro Gln Lys Pro Ala Gln Gly Cys
65 70 75 80

Arg Lys Asp Arg Gly Ala Ser Lys Thr Gly Lys Lys Gly Lys Gly Ser
85 90 95

Lys Gly Cys Arg Lys Thr Glu Arg Ser Gln Thr Pro Lys Gly Pro
100 105 110

<210> 27

<211> 110

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 27

Ser Asp Gly Gly Gly Gln Asp Cys Cys Leu Lys Tyr Ser Gln Lys Lys
1 5 10 15

[0031] Ile Pro Tyr Ser Ile Val Arg Gly Tyr Arg Lys Gln Glu Pro Ser Leu
20 25 30

Gly Cys Pro Ile Pro Ala Ile Leu Phe Leu Pro Arg Lys His Ser Lys
35 40 45

Pro Glu Leu Cys Ala Asn Pro Glu Glu Gly Trp Val Gln Asn Leu Met
50 55 60

Arg Arg Leu Asp Gln Pro Pro Ala Pro Gly Lys Gln Ser Pro Gly Cys
65 70 75 80

Arg Lys Asn Arg Gly Thr Ser Lys Ser Gly Lys Lys Gly Lys Gly Ser
85 90 95

Lys Gly Cys Lys Arg Thr Glu Gln Thr Gln Pro Ser Arg Gly
100 105 110

<210> 28

<211> 103

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 28

Thr Pro Val Val Arg Lys Gly Arg Cys Ser Cys Ile Ser Thr Asn Gln
1 5 10 15

Gly Thr Ile His Leu Gln Ser Leu Lys Asp Leu Lys Gln Phe Ala Pro
20 25 30

Ser Pro Ser Cys Glu Lys Ile Glu Ile Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly
35 40 45

Val Gln Thr Cys Leu Asn Pro Asp Ser Ala Asp Val Lys Glu Leu Ile
50 55 60

Lys Lys Trp Glu Lys Gln Val Ser Gln Lys Lys Lys Gln Lys Asn Gly
65 70 75 80

Lys Lys His Gln Lys Lys Lys Val Leu Lys Val Arg Lys Ser Gln Arg
85 90 95

[0032] Ser Arg Gln Lys Lys Thr Thr
100

<210> 29

<211> 105

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 29

Thr Leu Val Ile Arg Asn Ala Arg Cys Ser Cys Ile Ser Thr Ser Arg
1 5 10 15

Gly Thr Ile His Tyr Lys Ser Leu Lys Asp Leu Lys Gln Phe Ala Pro
20 25 30

Ser Pro Asn Cys Asn Lys Thr Glu Ile Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly
35 40 45

Asp Gln Thr Cys Leu Asp Pro Asp Ser Ala Asn Val Lys Lys Leu Met
50 55 60

Lys Glu Trp Glu Lys Lys Ile Asn Gln Lys Lys Lys Gln Lys Arg Gly
65 70 75 80

Lys Lys His Gln Lys Asn Met Lys Asn Arg Lys Pro Lys Thr Pro Gln
85 90 95

Ser Arg Arg Arg Ser Arg Lys Thr Thr
100 105

<210> 30
<211> 77
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 30

Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn
1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu Glu Ile Ile Pro Ala
20 25 30

Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys Lys
35 40 45

[0033] Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu
50 55 60

Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Arg Ser Lys Arg Ser Pro
65 70 75

<210> 31
<211> 77
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 31

Ile Pro Leu Ala Arg Thr Val Arg Cys Asn Cys Ile His Ile Asp Asp
1 5 10 15

Gly Pro Val Arg Met Arg Ala Ile Gly Lys Leu Glu Ile Ile Pro Ala
20 25 30

Ser Leu Ser Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys Asn
35 40 45

Asp Glu Gln Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Thr Ile Lys Asn Leu
50 55 60

Met Lys Ala Phe Ser Gln Lys Arg Ser Lys Arg Ala Pro
65 70 75

<210> 32
<211> 116
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 32

Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg
1 5 10 15

Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu
20 25 30

Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val
35 40 45

Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn
50 55 60

[0034] Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro
65 70 75 80

Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr
85 90 95

Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val His Ser
100 105 110

Ile Ile Arg Arg
115

<210> 33
<211> 125
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 33

Thr Glu Glu Thr Ile Lys Phe Ala Ala Ala His Tyr Asn Thr Glu Ile
1 5 10 15

Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys Thr Gln Cys Met Pro Arg

	20	25	30
	Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu Phe Gly Val Ala Thr Asn Thr 35 40 45		
	Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr Arg Cys Gly Gly Cys Cys 50 55 60		
	Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Leu Ser 65 70 75 80		
	Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu Ser Gln Gly Pro Lys Pro 85 90 95		
	Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser Cys Arg Cys Met Ser Lys 100 105 110		
	Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val His Ser Ile Ile Arg Arg 115 120 125		
[0035]	<210> 34 <211> 196 <212> PRT <213> 智人(Homo sapiens)		
	<400> 34		
	Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser 1 5 10 15		
	Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe 20 25 30		
	Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu 35 40 45		
	Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro 50 55 60		
	Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly 65 70 75 80		
	Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu 85 90 95		

Thr Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val
 100 105 110
 Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp
 115 120 125
 Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp
 130 135 140
 Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp
 145 150 155 160
 Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val
 165 170 175
 Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg
 180 185 190
 Ile Cys Thr Gly
 195

[0036]

<210> 35
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 35

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

	85	90	95
	Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg Val Thr Val Val Lys Leu Lys Gly 100	105	110
	Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys Gln Phe Asp Asp Glu Ser Ala Thr Val 115	120	125
	Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp Ile Ala Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser 130	135	140
	Thr Ser Pro Gln 145		
	<210> 36		
	<211> 349		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> Synthetic peptide		
[0037]	<400> 36		
	Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser 1 5 10 15		
	Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe 20 25 30		
	Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu 35 40 45		
	Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro 50 55 60		
	Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly 65 70 75 80		
	Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu 85 90 95		
	Thr Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val 100 105 110		

Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp
 115 120 125

Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp
 130 135 140

Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp
 145 150 155 160

Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val
 165 170 175

Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg
 180 185 190

Ile Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser
 195 200 205

Ser Ser Thr Ala Glu Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 210 215 220

[0038] Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Leu Met Asp Leu Gln Glu Leu Leu Ser
 225 230 235 240

Arg Met Glu Asn Tyr Arg Asn Leu Lys Leu Pro Arg Met Leu Thr Phe
 245 250 255

Lys Phe Tyr Leu Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys
 260 265 270

Leu Glu Asp Glu Leu Gly Pro Leu Arg His Val Leu Asp Leu Thr Gln
 275 280 285

Ser Lys Ser Phe Gln Leu Glu Asp Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile
 290 295 300

Arg Val Thr Val Val Lys Leu Lys Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys
 305 310 315 320

Gln Phe Asp Asp Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp
 325 330 335

Ile Ala Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Ser Pro Gln

340

345

<210> 37
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 37

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80

[0039]

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
 130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 145 150

<210> 38
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 38

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

Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe
20 25 30

Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu
35 40 45

Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro
50 55 60

Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly
65 70 75 80

Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu
85 90 95

Thr Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val
100 105 110

[0040]

Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp
115 120 125

Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp
130 135 140

Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp
145 150 155 160

Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val
165 170 175

Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg
180 185 190

Ile Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala
195 200 205

Leu Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln
210 215 220

Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly
225 230 235 240

Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys
245 250 255

Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu
260 265 270

Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser
275 280 285

Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val
290 295 300

Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr
305 310 315 320

Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr
325 330 335

[0041]

Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
340 345

<210> 39

<211> 182

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 39

Met Asn Asn Arg Trp Ile Leu His Ala Ala Phe Leu Leu Cys Phe Ser
1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Ile Asn Tyr Lys Gln Leu Gln Leu Gln Glu Arg
20 25 30

Thr Asn Ile Arg Lys Cys Gln Glu Leu Leu Glu Gln Leu Asn Gly Lys
35 40 45

Ile Asn Leu Thr Tyr Arg Ala Asp Phe Lys Ile Pro Met Glu Met Thr
50 55 60

Glu Lys Met Gln Lys Ser Tyr Thr Ala Phe Ala Ile Gln Glu Met Leu
65 70 75 80

Gln Asn Val Phe Leu Val Phe Arg Asn Asn Phe Ser Ser Thr Gly Trp
85 90 95

Asn Glu Thr Ile Val Val Arg Leu Leu Asp Glu Leu His Gln Gln Thr
100 105 110

Val Phe Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Gln Glu Glu Arg Leu Thr
115 120 125

Trp Glu Met Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Lys Ser Tyr Tyr Trp Arg
130 135 140

Val Gln Arg Tyr Leu Lys Leu Met Lys Tyr Asn Ser Tyr Ala Trp Met
145 150 155 160

Val Val Arg Ala Glu Ile Phe Arg Asn Phe Leu Ile Ile Arg Arg Leu
165 170 175

[0042] Thr Arg Asn Phe Gln Asn
180

<210> 40
<211> 166
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 40

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 41

<211> 167

[0043] <212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 41

Cys Asp Leu Pro His Thr Tyr Asn Leu Arg Asn Lys Arg Ala Leu Lys
1 5 10 15

Val Leu Ala Gln Met Arg Arg Leu Pro Phe Leu Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg Gln Asp Phe Gly Phe Pro Leu Glu Lys Val Asp Asn Gln Gln Ile
35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Ile Pro Val Leu Arg Asp Leu Thr Gln Gln Thr
50 55 60

Leu Asn Leu Phe Thr Ser Lys Ala Ser Ser Ala Ala Trp Asn Thr Thr
65 70 75 80

Leu Leu Asp Ser Phe Cys Asn Asp Leu His Gln Gln Leu Asn Asp Leu
85 90 95

Gln Thr Cys Leu Met Gln Gln Val Gly Val Gln Glu Pro Pro Leu Thr
 100 105 110

Gln Glu Asp Ala Leu Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Ile Thr
 115 120 125

Val Tyr Leu Arg Glu Lys Lys His Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 130 135 140

Arg Ala Glu Val Trp Arg Ala Leu Ser Ser Ser Val Asn Leu Leu Pro
 145 150 155 160

Arg Leu Ser Glu Glu Lys Glu
 165

<210> 42
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 42

[0044] Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
 1 5 10 15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
 20 25 30

Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser
 35 40 45

Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
 50 55 60

Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys
 65 70

<210> 43
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 43

Val Gly Thr Glu Val Leu Glu Glu Ser Ser Cys Val Asn Leu Gln Thr
 1 5 10 15

Gln Arg Leu Pro Val Gln Lys Ile Lys Thr Tyr Ile Ile Trp Glu Gly
 20 25 30

Ala Met Arg Ala Val Ile Phe Val Thr Lys Arg Gly Leu Lys Ile Cys
 35 40 45

Ala Asp Pro Glu Ala Lys Trp Val Lys Ala Ala Ile Lys Thr Val Asp
 50 55 60

Gly Arg Ala Ser Thr Arg Lys Asn Met Ala Glu Thr Val Pro Thr Gly
 65 70 75 80

Ala Gln Arg Ser Thr Ser Thr Ala Ile Thr Leu Thr Gly
 85 90

<210> 44
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 44

[0045] Gly Ser Glu Val Ser Asp Lys Arg Thr Cys Val Ser Leu Thr Thr Gln
 1 5 10 15

Arg Leu Pro Val Ser Arg Ile Lys Thr Tyr Thr Ile Thr Glu Gly Ser
 20 25 30

Leu Arg Ala Val Ile Phe Ile Thr Lys Arg Gly Leu Lys Val Cys Ala
 35 40 45

Asp Pro Gln Ala Thr Trp Val Arg Asp Val Val Arg Ser Met Asp Arg
 50 55 60

Lys Ser Asn Thr Arg Asn Asn Met Ile Gln Thr Lys Pro Thr Gly Thr
 65 70 75 80

Gln Gln Ser Thr Asn Thr Ala Val Thr Leu Thr Gly
 85 90

<210> 45
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 45
 Gly Thr Thr Cys Pro Pro Pro Val Ser Ile Glu His Ala Asp Ile Arg
 1 5 10 15
 Val Lys Asn Tyr Ser Val Asn Ser Arg Glu Arg Tyr Val Cys Asn Ser
 20 25 30
 Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Thr Leu Ile Glu Cys Val Ile
 35 40 45
 Asn Lys Asn Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
 50 55 60
 Ile Arg Asp Pro Ser Leu Ala His Tyr Ser Pro Val Pro Thr Val Val
 65 70 75 80
 Thr Pro Lys Val Thr Ser Gln Pro Glu Ser Pro Ser Pro Ser Ala Lys
 85 90 95
 Glu Pro Glu Ala Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 100 105 110
 [0046]
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Gln Asn Trp Ile Asp Val Arg Tyr Asp
 115 120 125
 Leu Glu Lys Ile Glu Ser Leu Ile Gln Ser Ile His Ile Asp Thr Thr
 130 135 140
 Leu Tyr Thr Asp Ser Asp Phe His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met
 145 150 155 160
 Asn Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Leu His Glu Tyr Ser Asn
 165 170 175
 Met Thr Leu Asn Glu Thr Val Arg Asn Val Leu Tyr Leu Ala Asn Ser
 180 185 190
 Thr Leu Ser Ser Asn Lys Asn Val Ala Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys
 195 200 205
 Glu Glu Leu Glu Glu Lys Thr Phe Thr Glu Phe Leu Gln Ser Phe Ile
 210 215 220

Arg Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
 225 230

<210> 46
 <211> 424
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 46

Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
 1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
 35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60

[0047] Arg Asp Val Asp Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 65 70 75 80

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 85 90 95

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 100 105 110

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 115 120 125

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 130 135 140

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 145 150 155 160

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 165 170 175

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

	180	185	190
	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu 195	Pro Pro Ser Arg 200	Glu Glu Met Thr Lys 205
	Asn Gln Val Ser Leu Thr 210	Cys Leu Val Lys 215	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 220
	Ile Ala Val Glu Trp 225	Glu Ser Asn Gly 230	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 235 240
	Thr Thr Pro Pro Val 245	Leu Asp Ser Asp 250	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 255
	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg 260	Trp Gln Gln Gly 265	Asn Val Phe Ser 270
	Cys Ser Val Met His Glu Ala 275	Leu His Asn His 280	Tyr Thr Gln Lys Ser 285
[0048]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 290	Gly Gly Gly Gly 295	Ser Gly Gly Gly Gly 300
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp Val 305	Asn Val Ile 310 315	Ile Ser Asp Leu Lys 320
	Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met 325	His Ile Asp Ala Thr 330 335	Leu Tyr
	Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser 340	Cys Lys Val Thr Ala Met 345 350	Lys Cys
	Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser 355	Ile Ser Leu Glu Ser 360 365	Gly Asp Ala Ser
	Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu 370	375 380	
	Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu 385	390 395	400
	Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile 405	410	415

Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
420

<210> 47
<211> 278
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成多肽

<400> 47

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

Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe
20 25 30

Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu
35 40 45

[0049] Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro
50 55 60

Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly
65 70 75 80

Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu
85 90 95

Thr Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val
100 105 110

Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp
115 120 125

Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp
130 135 140

Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp
145 150 155 160

Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val

	165	170	175
	Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg 180	185	190
	Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Met Gly Ser 195	200	205
	Asp Pro Pro Thr Ser Cys Cys Phe Ser Tyr Thr Ser Arg Gln Leu His 210	215	220
[0050]	Arg Ser Phe Val Met Asp Tyr Tyr Glu Thr Ser Ser Leu Cys Ser Lys 225	230	235
	Pro Ala Val Val Phe Leu Thr Lys Arg Gly Arg Gln Ile Cys Ala Asn 245	250	255
	Pro Ser Glu Pro Trp Val Thr Glu Tyr Met Ser Asp Leu Glu Leu Asn 260	265	270
	His His His His His His 275		

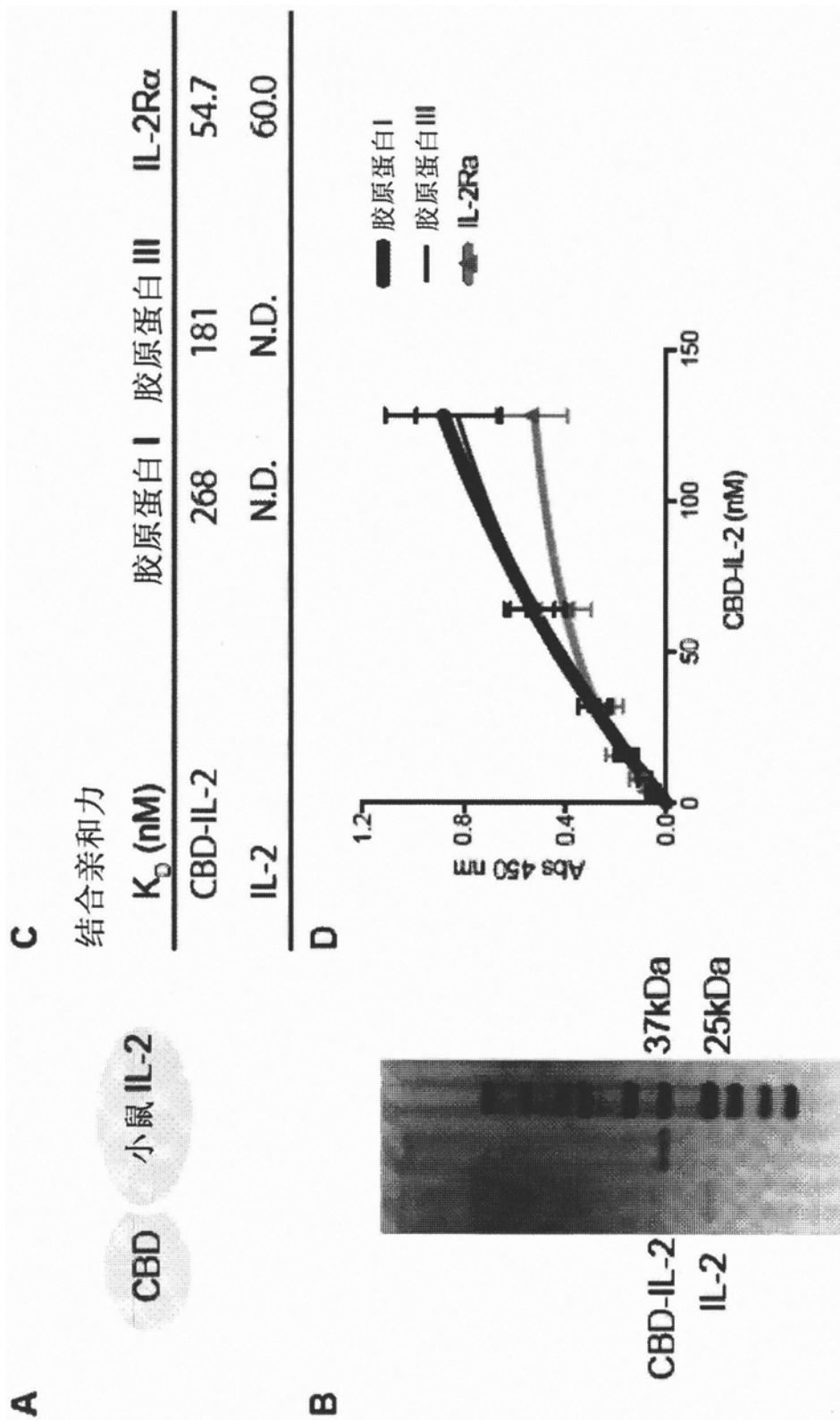


图1A-D

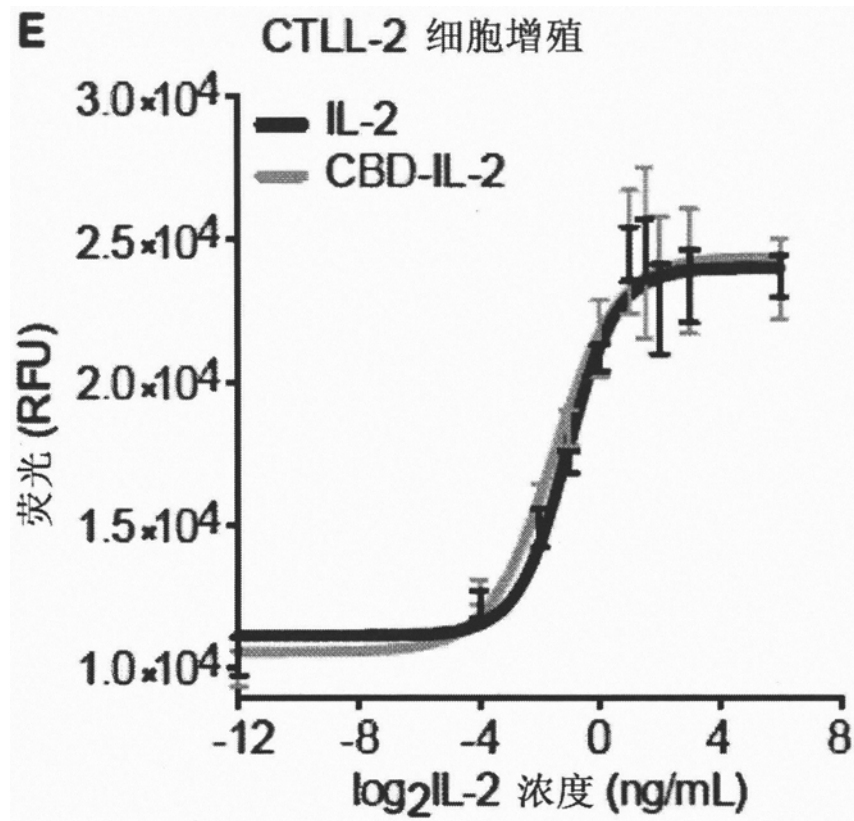


图1E

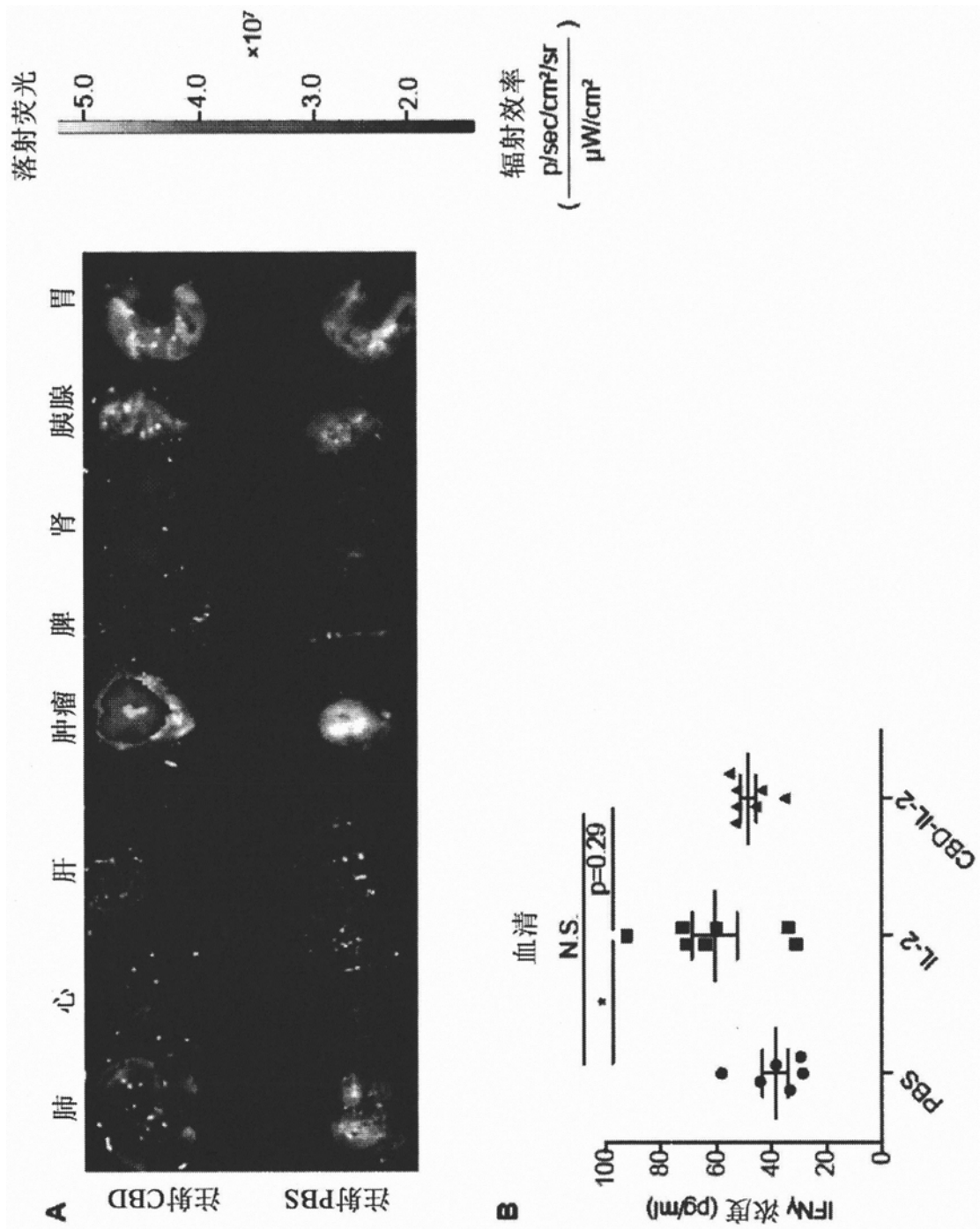


图2A-B

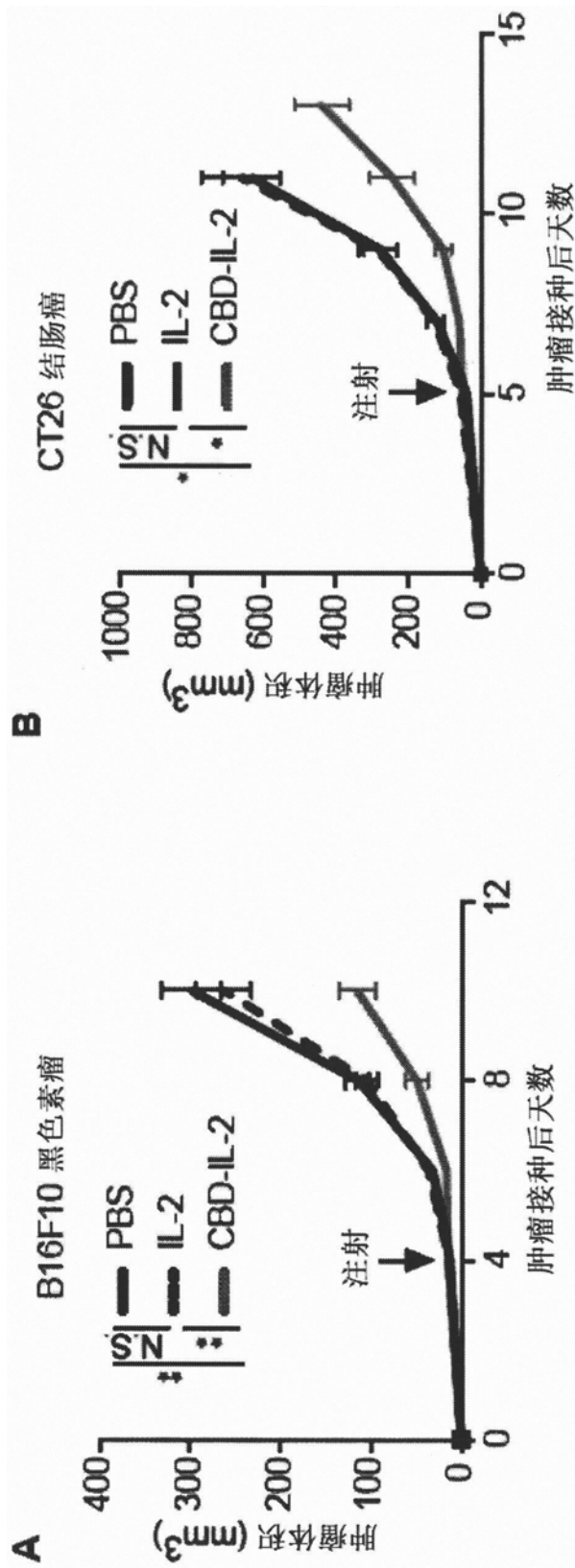


图3A-B

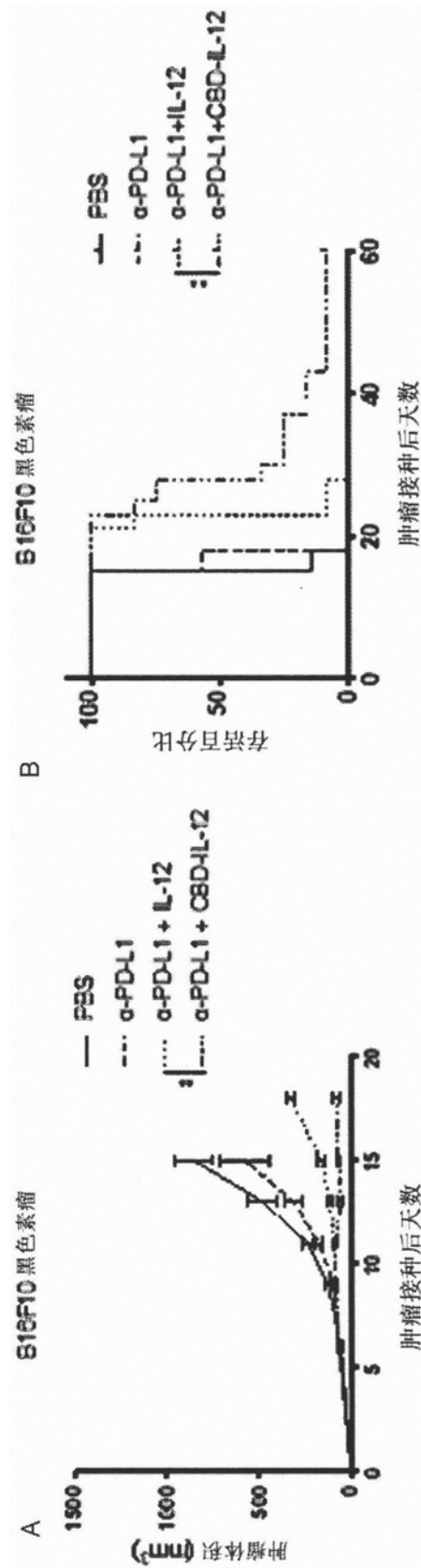


图4A-B

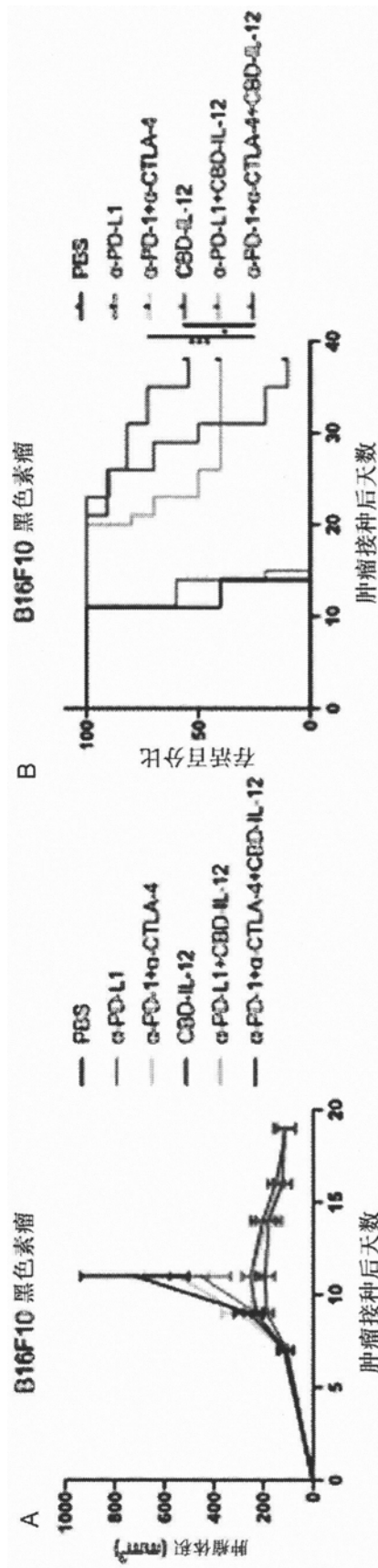


图5A-B

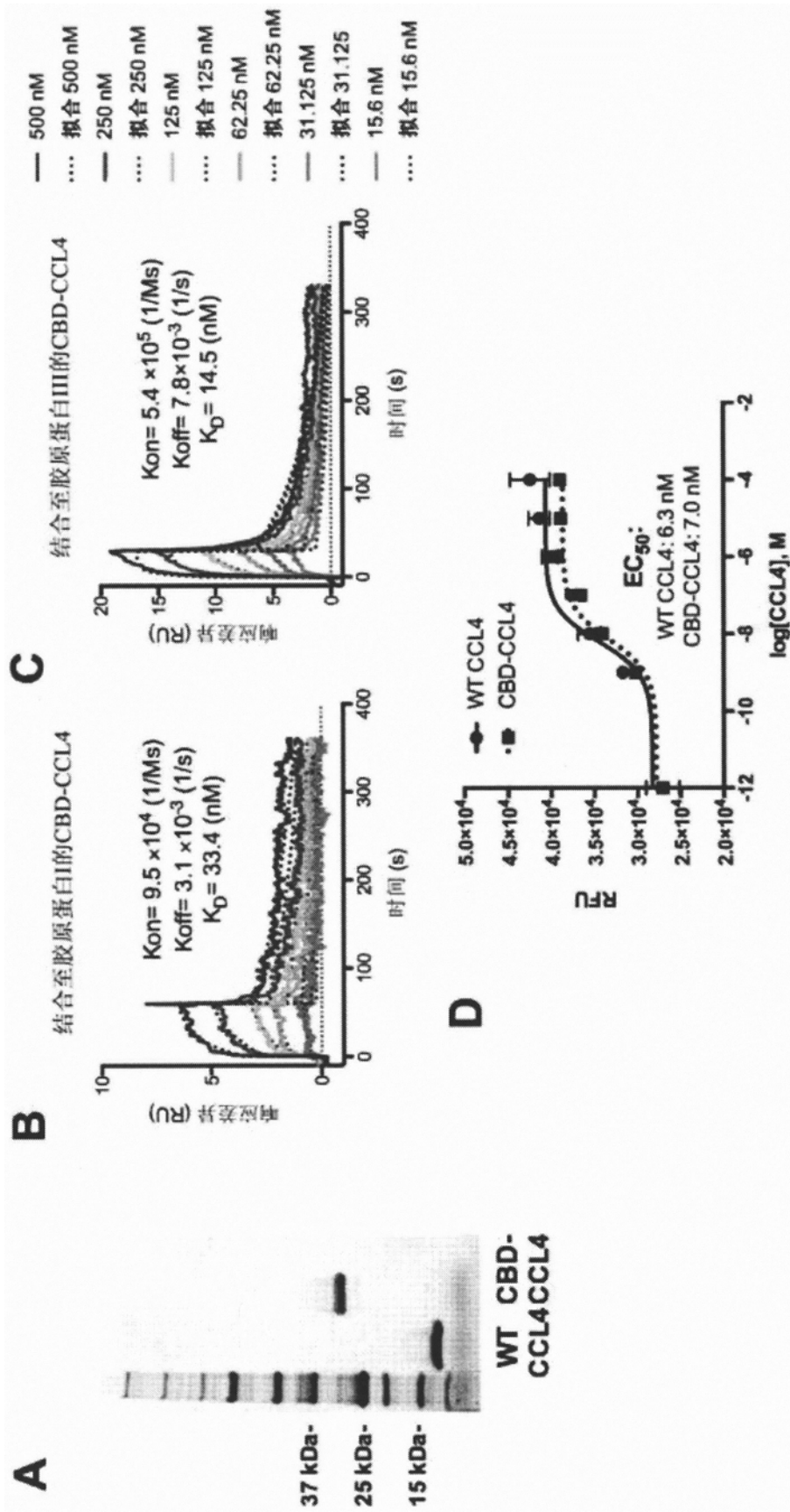


图6A-D

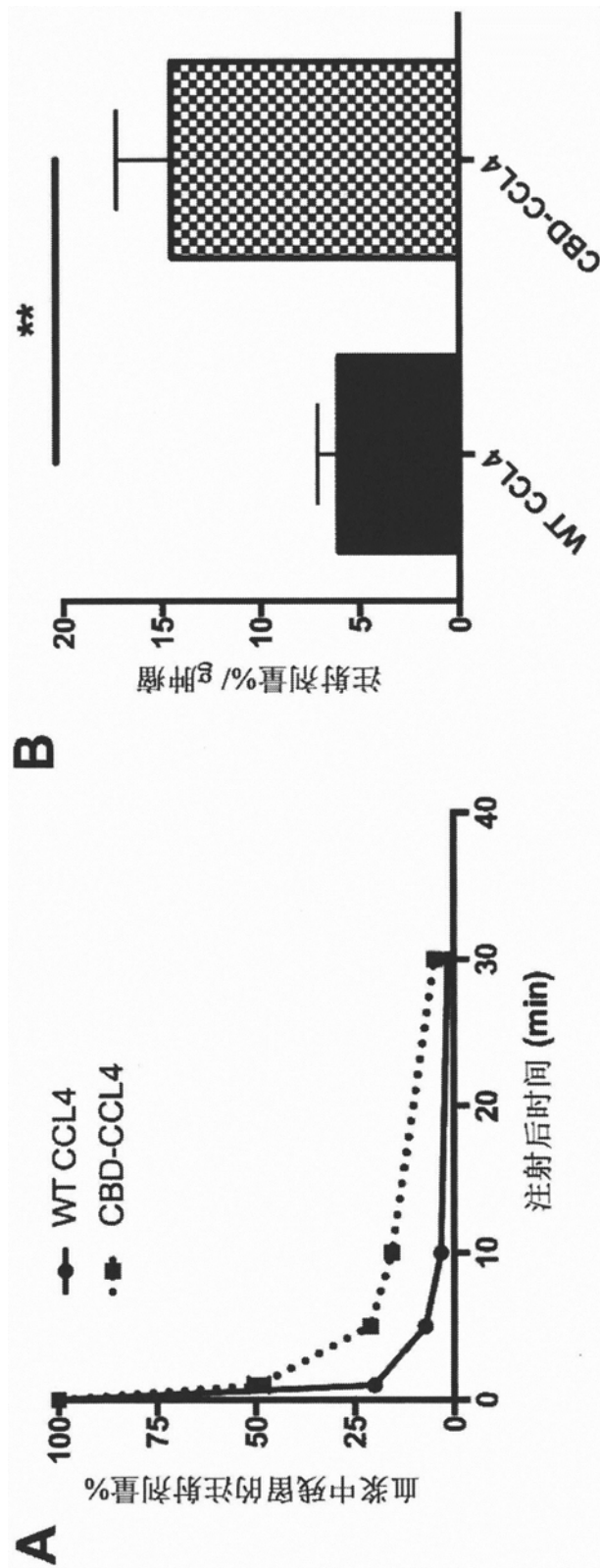


图7A-B

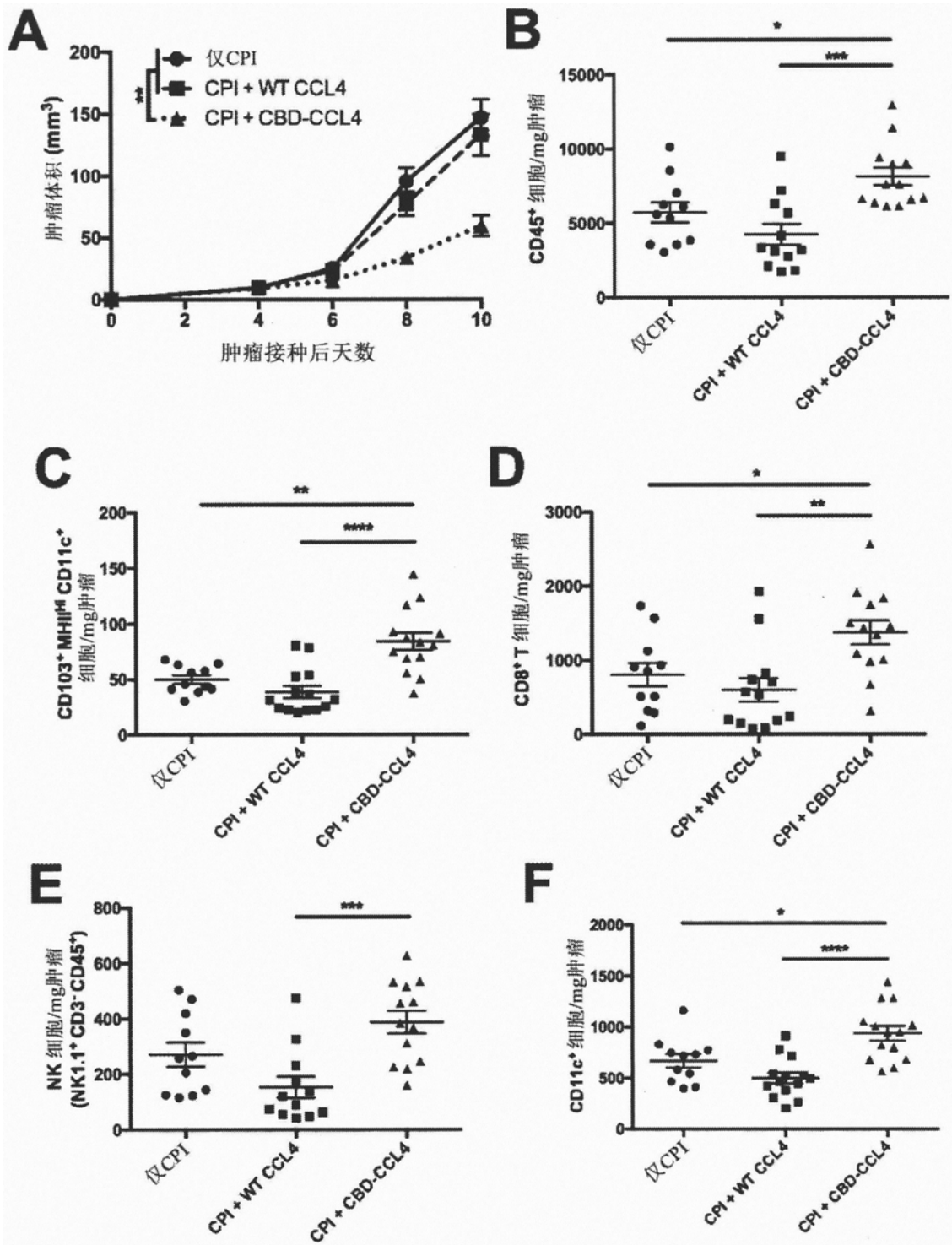


图8A-F

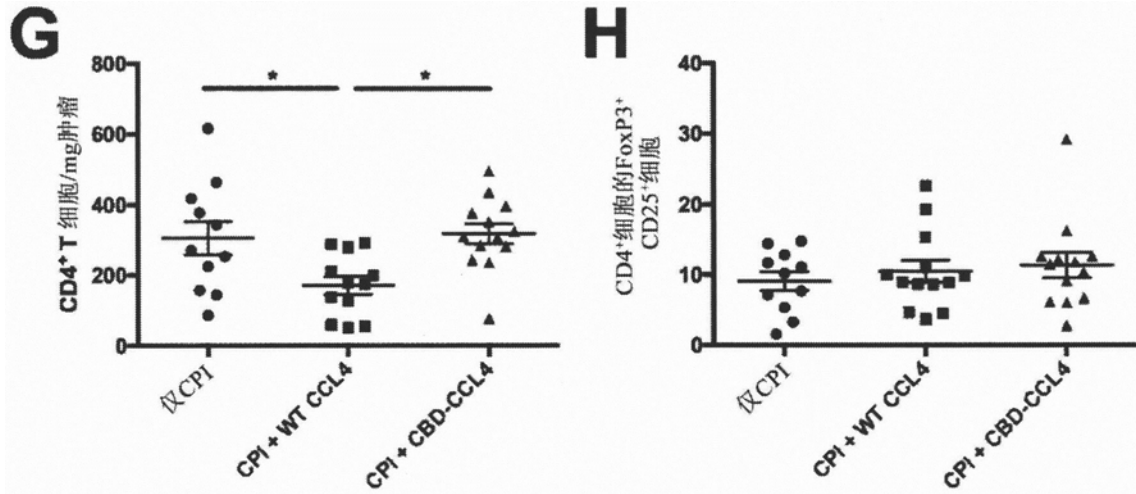


图8G-H

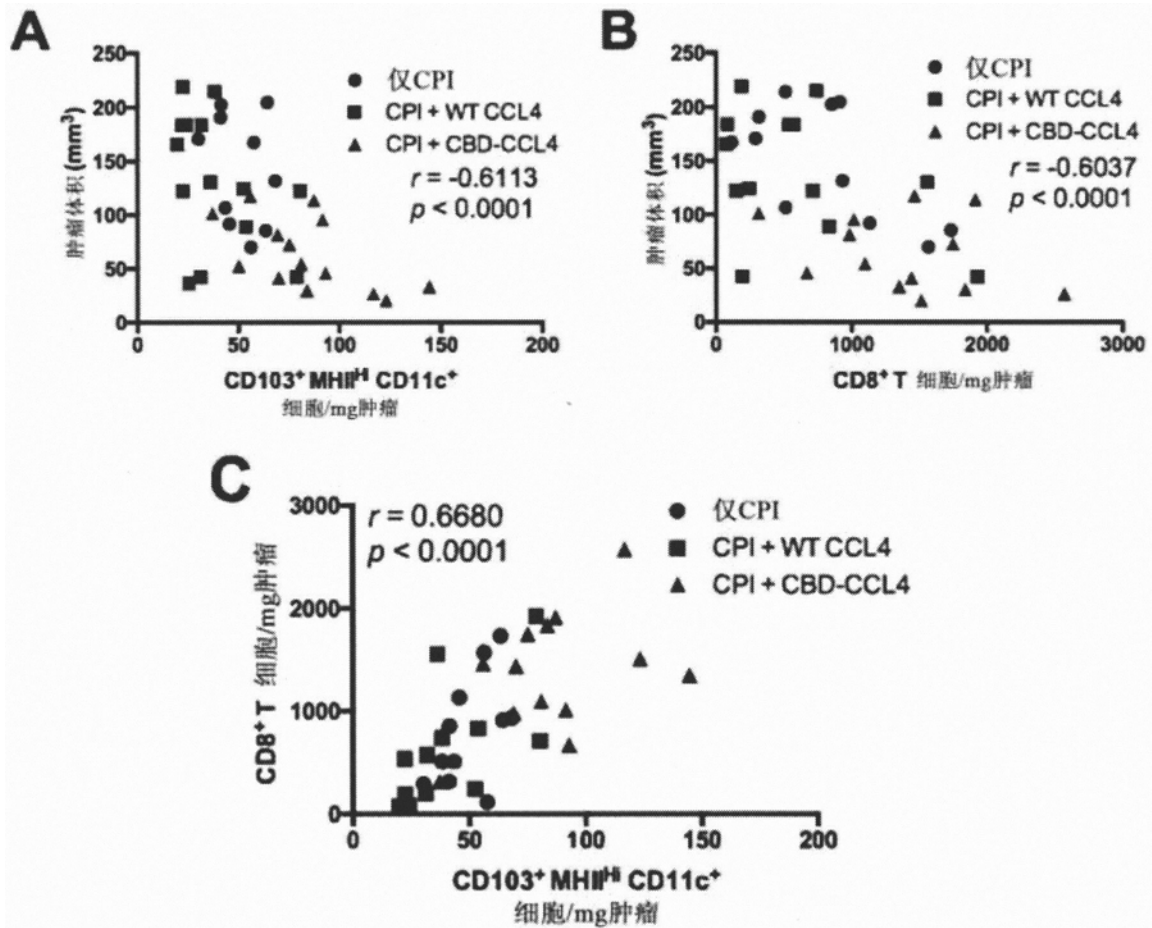


图9A-C

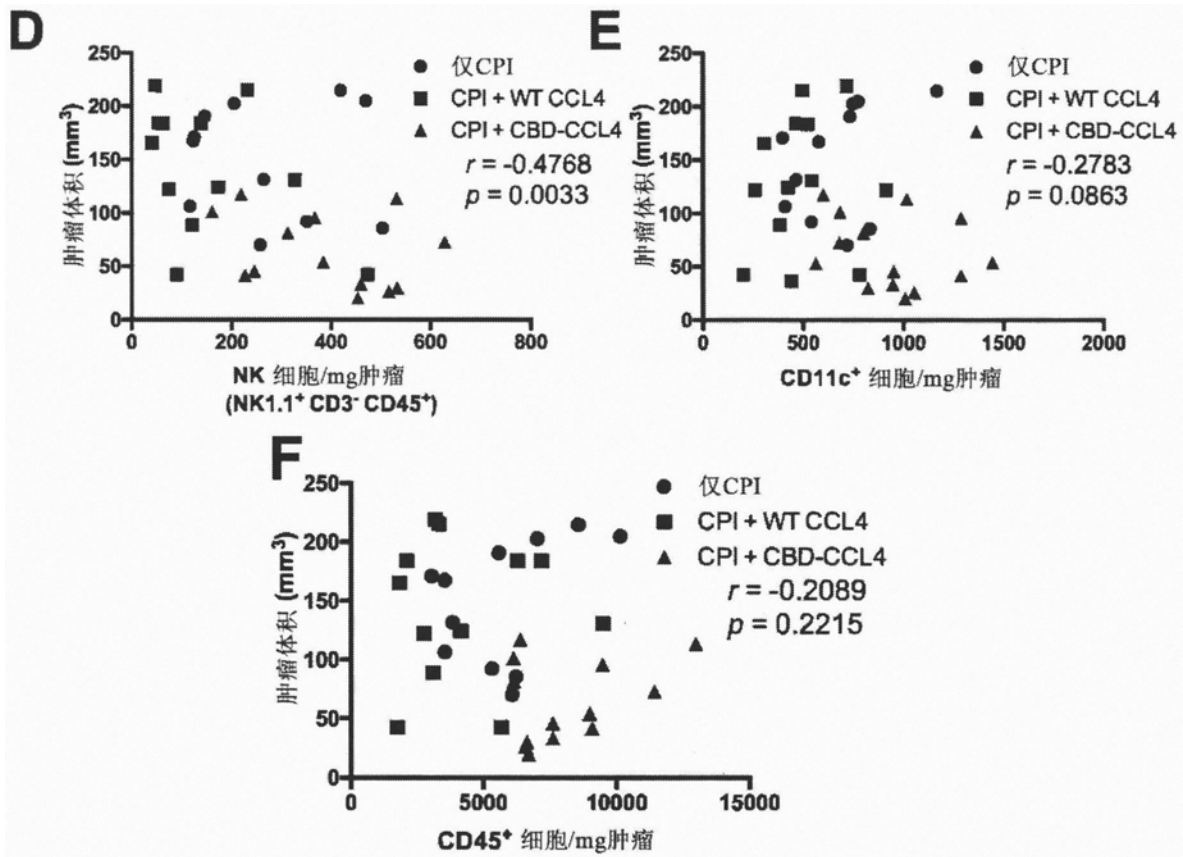


图9D-F

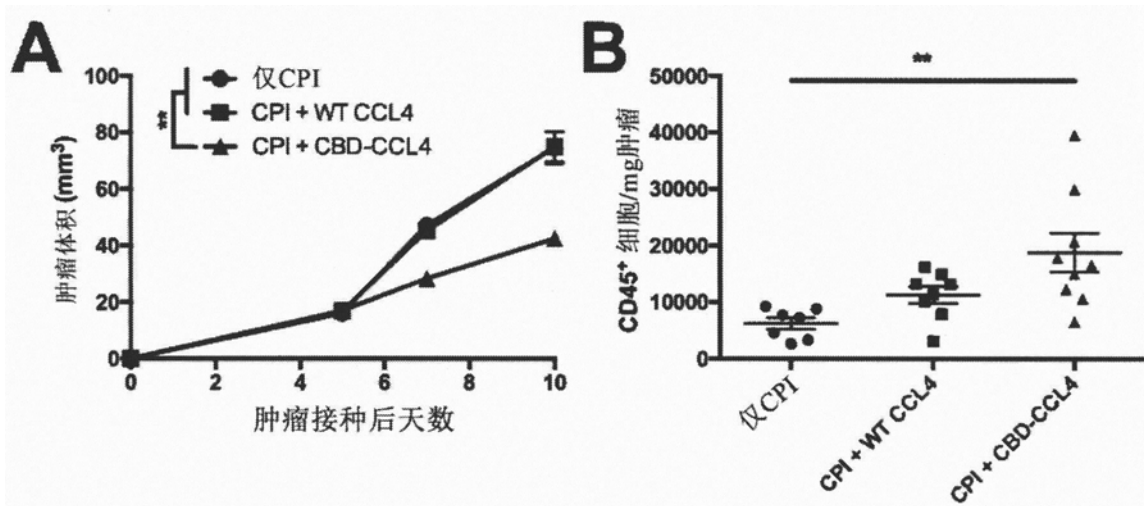


图10A-B

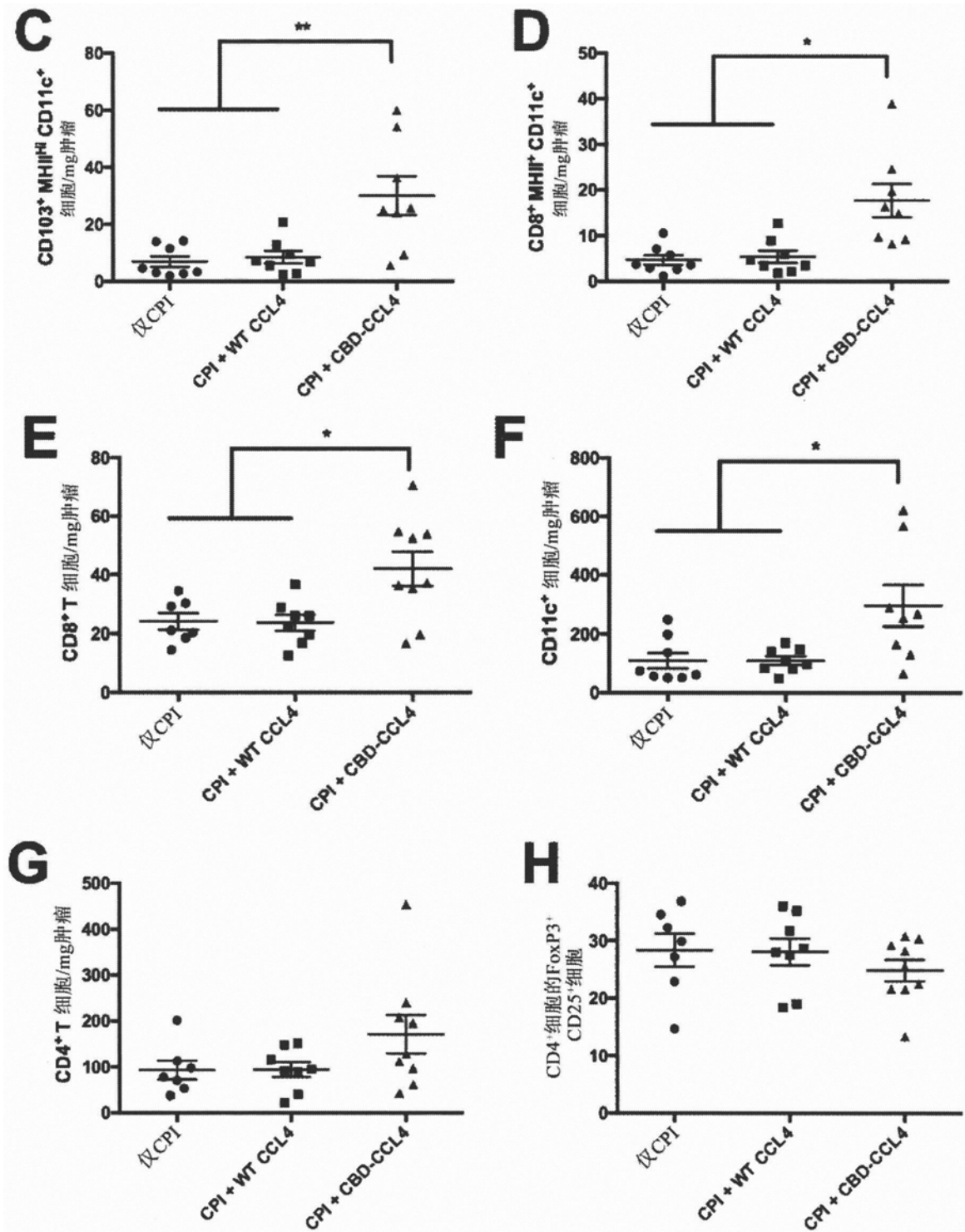


图10C-H

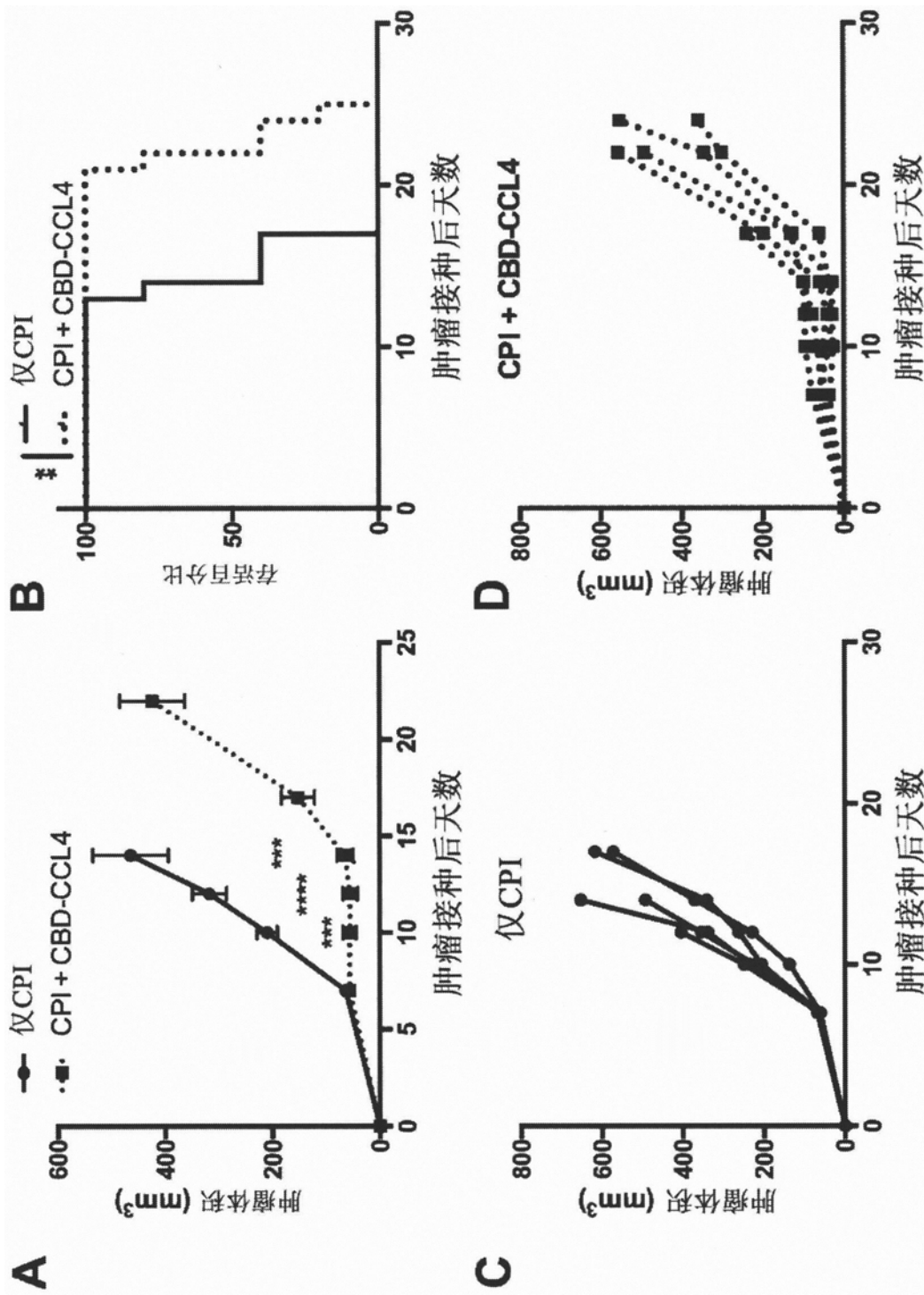


图11A-D

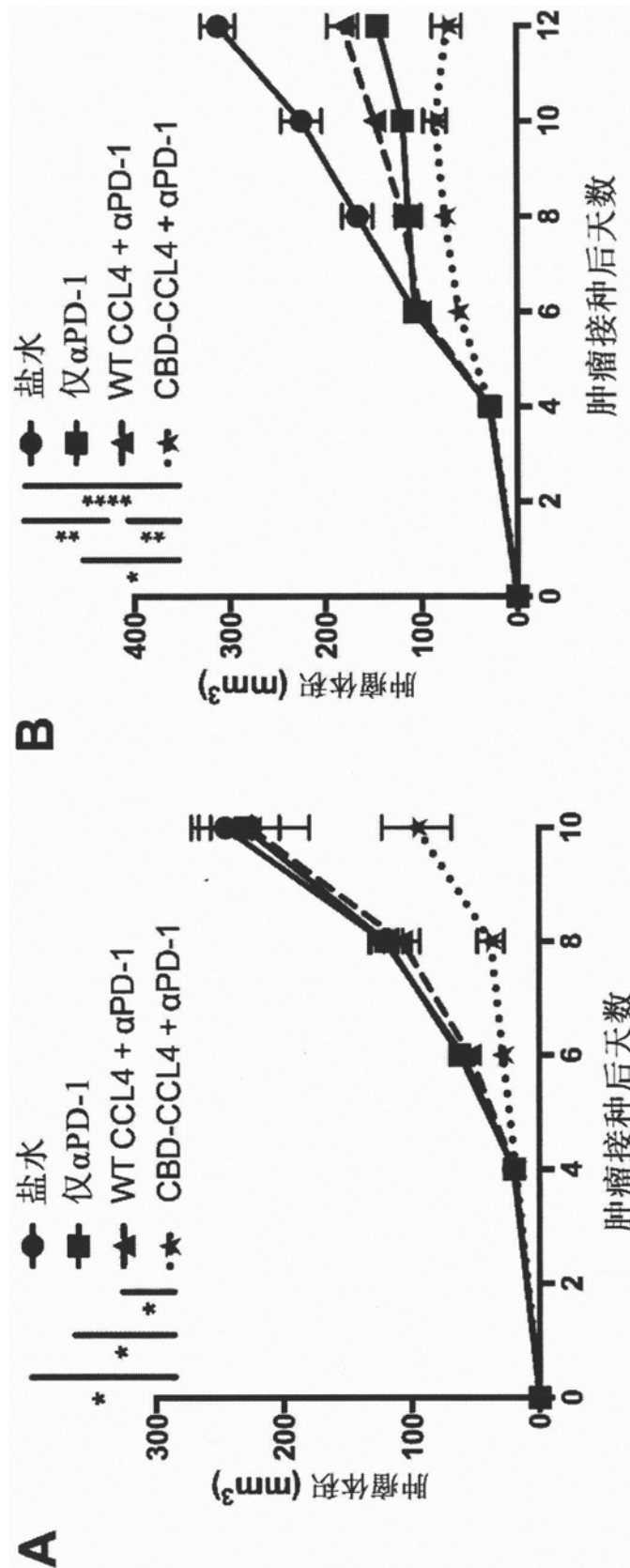


图12A-B

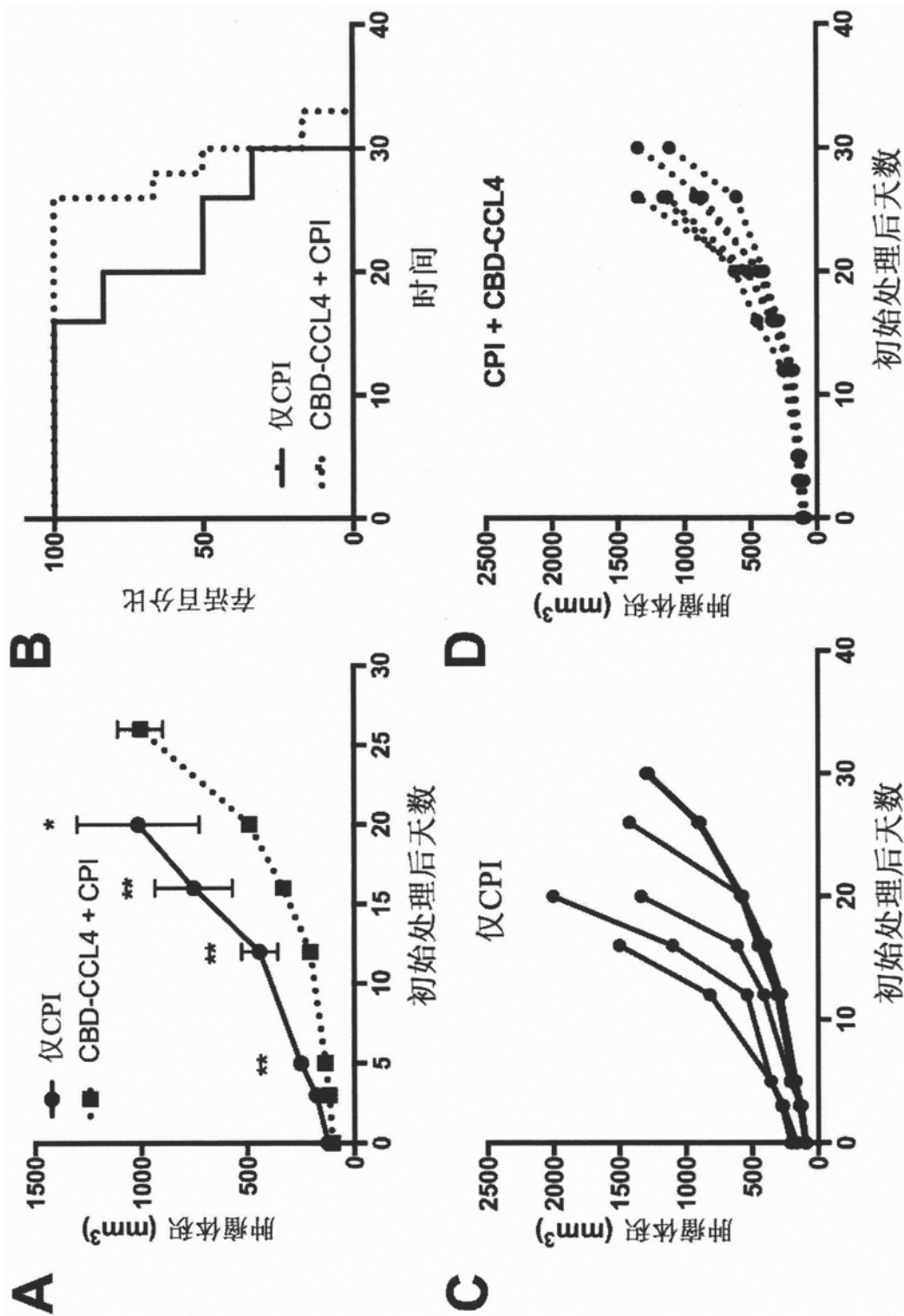


图13A-D