



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110087672 A

(43)申请公布日 2019.08.02

(21)申请号 201780058404.8

(22)申请日 2017.07.28

(30)优先权数据

62/369,017 2016.07.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/044549 2017.07.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/023093 EN 2018.02.01

(71)申请人 朱诺治疗学股份有限公司

地址 美国华盛顿州

(72)发明人 C·豪金斯 A·埃本

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

A61K 38/19(2006.01)

C07K 14/52(2006.01)

C07K 14/54(2006.01)

C07K 14/535(2006.01)

C07K 14/61(2006.01)

C07K 14/575(2006.01)

C07K 14/705(2006.01)

C07K 14/71(2006.01)

C07K 14/725(2006.01)

权利要求书8页 说明书88页

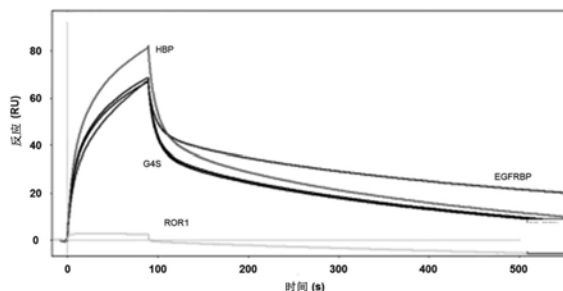
序列表74页 附图4页

(54)发明名称

免疫调节多肽及相关组合物和方法

(57)摘要

本文中提供了含有细胞因子或趋化因子的第一亚基和第二亚基的免疫调节多肽,所述亚基通过含有与靶分子结合的靶向模块的连接区连接。在一些方面,本公开进一步涉及包含免疫调节多肽的工程化细胞和组合物以及将其施用于受试者的方法。在一些实施方案中,经工程改造以含有免疫调节多肽的细胞(如T细胞)进一步含有与抗原特异性地结合的基因工程化抗原受体,如嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,例如通过减少细胞因子或趋化因子疗法的不良作用或增加过继细胞疗法的活性、功效和/或持久性或降低其免疫原性,所述多肽、工程化细胞和方法的特征对疾病或疾患的治疗提供了改善。



1. 一种免疫调节多肽,其包含:
 - a) 第一肽;
 - b) 第二肽;和
 - c) 连接所述第一肽和第二肽的连接区,其中所述连接区包含与靶分子结合的靶向模块。
2. 权利要求1的免疫调节多肽,其中所述第一肽和第二肽中的至少一者是细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或是细胞因子或趋化因子的功能部分。
3. 权利要求1或权利要求2的免疫调节多肽,其中所述第一肽是细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或是细胞因子或趋化因子的功能部分。
4. 权利要求1-3中任一项的免疫调节多肽,其中所述第二肽是细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或是细胞因子或趋化因子的功能部分。
5. 权利要求1-4中任一项的免疫调节多肽,其中所述第一肽和第二肽两者独立地是细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或细胞因子或趋化因子的功能部分。
6. 权利要求1-5中任一项的免疫调节多肽,其中所述第一肽和第二肽是相同的细胞因子或趋化因子或其功能部分,或者是相同细胞因子或趋化因子的相同亚基。
7. 权利要求1-5中任一项的免疫调节多肽,其中所述第一肽和第二肽是不同的细胞因子或趋化因子或其功能部分,或者是相同或不同细胞因子或趋化因子的不同亚基。
8. 权利要求1-7中任一项的免疫调节多肽,其中所述第一肽是细胞因子或趋化因子的第一亚基,并且所述第二肽是细胞因子或趋化因子的第二亚基。
9. 权利要求1-7中任一项的免疫调节多肽,其中所述细胞因子或趋化因子是单体。
10. 权利要求1-8中任一项的免疫调节多肽,其中所述第一和/或第二肽独立地包含细胞因子或趋化因子的亚基,所述细胞因子或趋化因子是多聚体蛋白质。
11. 权利要求1-4中任一项的免疫调节多肽,其中所述第一肽或第二肽是标签或标记物。
12. 一种免疫调节多肽,其包含:
 - a) 第一肽,其包含细胞因子或趋化因子的第一亚基或其功能部分;
 - b) 第二肽,其包含细胞因子或趋化因子的第二亚基或其功能部分;和
 - c) 连接所述第一肽和第二肽的连接区,其中所述连接区包含与靶分子结合的靶向模块。
13. 权利要求1-8、10和12中任一项的免疫调节多肽,其中所述细胞因子或趋化因子是同二聚体或异二聚体。
14. 权利要求1-13中任一项的免疫调节多肽,其中所述连接区进一步包含至少一个将靶向模块连接至所述第一肽或第二肽的多肽接头。
15. 权利要求2-14中任一项的免疫调节多肽,其中所述细胞因子或趋化因子或其亚基或功能部分选自下组,该组的组成为:IL-12、IL-15、IL-2、IL-18、GM-CSF、IL-7、IL-21、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IL-17、IL-23、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-11、IL-13、IL-27、促红细胞生成素、G-CSF、生长激素、催乳素、抑瘤素M和白血病抑制因子或其亚基或功能部分。
16. 权利要求1-15中任一项的免疫调节多肽,其中所述第一肽或第二肽独立地包含选自IL-12、IL-23、IL-27和IL-35的细胞因子或趋化因子的亚基或其功能部分。

17. 权利要求1-7和9-16中任一项的免疫调节多肽,其中所述第一肽或第二肽独立地是IL-12的亚基或其功能部分。

18. 权利要求17的免疫调节多肽,其中所述第一肽包含IL-12p35亚基或IL-12p40亚基或其功能部分,并且所述第二肽包含另一个IL-12p35亚基和IL-12p40亚基或其功能部分。

19. 一种免疫调节多肽,其包含:

a) 第一肽,其包含IL-12的p35亚基或其功能部分;

b) 第二肽,其包含IL-12的p40亚基或其功能部分;和

c) 连接所述第一肽和第二肽的连接区,其中所述连接区包含与靶分子结合的靶向模块。

20. 权利要求18或权利要求19的免疫调节肽,其中p35亚基包含在SEQ ID NO:10中列出的氨基酸序列或与其具有至少95%序列同一性的序列并且/或者p40亚基包含在SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列或与其具有至少95%序列同一性的序列。

21. 权利要求18-20中任一项的免疫调节多肽,其中所述连接区进一步包含至少一个将靶向模块连接至p35亚基或p40亚基的多肽接头。

22. 权利要求14-18和21中任一项的免疫调节多肽,其中所述多肽接头包含约2个至约20个氨基酸。

23. 权利要求14-18和21-22中任一项的免疫调节多肽,其中所述多肽接头包含序列GGGS(n),其中n为1-5(SEQ ID NO:29)。

24. 权利要求23的免疫调节多肽,其中所述多肽接头包含在SEQ ID NO:7-9的任一个中列出的序列。

25. 权利要求1-24中任一项的免疫调节多肽,其中所述连接区包含两个多肽接头。

26. 权利要求1-25中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块被包含在第一多肽接头和第二多肽接头之间。

27. 权利要求1-26中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶分子与疾病或疾患相关。

28. 权利要求27的免疫调节多肽,其中所述疾病或疾患是传染性疾病或疾患、自身免疫性疾病、炎性疾病或肿瘤或癌症。

29. 权利要求1-28中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶分子与肿瘤相关或存在于肿瘤上。

30. 权利要求1-29中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶分子是肿瘤抗原。

31. 权利要求1-30中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶分子选自下组,该组的组成为:肝细胞生长因子(HGF)、肝细胞生长因子受体(HGFR)、肝素、VEGF、VEGF-A、VEGFR2、VEGFR3、HER2、PD-1、肌腱蛋白C、CTLA-4、LAG3、PD-L1、EGFR、EPCAM、RANKL、NG2蛋白聚糖、CD20、CD52、CD19、CD3、CD30、IL-6、CD38、SLAMF7、GD2、CD13、CD274、CD279、CD40L和CD47。

32. 权利要求1-31中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块包含约3个至约300个氨基酸、约3个至约100个氨基酸、约3个至约20个氨基酸、约6个至约20个氨基酸或约10个氨基酸。

33. 权利要求1-32中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块表现出约 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $2 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $3 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $4 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1.5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、

约 $2 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $3 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $4 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 、约 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 1×10^{-2} 秒或更低、或约 $5 \times 10^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或更大的结合靶分子的 k_{off} 速率。

34. 权利要求1-33中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块是或包含抗体或抗体片段。

35. 权利要求34的免疫调节多肽,其中所述抗体片段是单链片段。

36. 权利要求34或权利要求35的免疫调节多肽,其中所述抗体片段是包含可变重链区的单结构域抗体。

37. 权利要求34或权利要求35的免疫调节多肽,其中所述抗体片段包含通过柔性接头连接的抗体可变区。

38. 权利要求34-37中任一项的免疫调节多肽,其中所述抗体片段包含scFv。

39. 权利要求1-38中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块包含选自下组的抗体的可变重链(VH)和/或可变轻链(VL),该组的组成为:曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、雷莫芦单抗(ramucirumab)、阿特殊单抗、贝伐珠单抗、帕尼单抗、西妥昔单抗、耐昔妥珠单抗、地诺单抗、纳武单抗、派姆单抗、利妥昔单抗、奥法木单抗、奥比妥珠单抗、阿伦单抗、博纳吐单抗、本妥昔单抗(brentuximab vedotin)、司妥昔单抗(siltuximab)、伊匹单抗、达雷木单抗、埃罗妥珠单抗、达妥昔单抗(dinutuximab)、卡妥索单抗(catumaxomab)。

40. 权利要求1-39中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块包含抗EPCAM抗体的V_H链和/或V_L链。

41. 权利要求1-40中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块包含在SEQ ID NO:17、24或25中列出的序列或与SEQ ID NO:17、24或25具有至少95%序列同一性并且与靶分子结合的序列。

42. 权利要求1-41中任一项的免疫调节多肽,其中所述免疫调节多肽包含在SEQ ID NO:6中列出的序列或与这样的序列具有至少95%序列同一性的序列。

43. 权利要求1-33中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块是或包含肽结合基序。

44. 权利要求1-33和43中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块是肝素结合肽。

45. 权利要求44的免疫调节多肽,其中所述肝素结合肽(HBP)衍生自纤连蛋白或BMP4,和/或是牛来源的。

46. 权利要求1-33和43中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块选自下组,该组的组成为:肝细胞生长因子(HGF)结合肽、VEGF结合肽、VEGF-A结合肽、VEGFR2结合肽、EPCAM结合肽、HER2结合肽、PD-1结合肽、肌腱蛋白C结合肽、CTLA-4结合肽、LAG3结合肽、PD-L1结合肽、EGFR结合肽、RANKL结合肽、CD20结合肽、CD52结合肽、CD19结合肽、CD3结合肽、CD30结合肽、IL-6结合肽、CD38结合肽、SLAMF7结合肽、GD2结合肽、CD274结合肽、CD279结合肽、CD40L结合肽和CD47结合肽。

47. 权利要求1-33、43和46中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块包含HGF结合肽或EGFR结合肽(EGFRBP)。

48. 权利要求1-33和43-47中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块包含在SEQ ID NO:13、14、15、16、26、27或28的任一个中列出的序列或与SEQ ID NO:13、14、15、16、26、27或28的任一个具有至少95%序列同一性并且与靶分子结合的序列。

49. 权利要求1-33和43-48中任一项的免疫调节多肽,其中所述免疫调节多肽包含在

SEQ ID NO:1-5的任一个中列出的序列或与SEQ ID NO:1-5的任一个具有至少95%序列同一性的序列。

50. 权利要求1-49中任一项的免疫调节多肽,其中所述免疫调节多肽与参考IL-12相比表现出增加的通过IL-12R刺激的活性。

51. 权利要求50的免疫调节多肽,其中所述参考IL-12不包含连接区或包含由在SEQ ID NO:7-9的任一个中列出的序列组成的连接区。

52. 权利要求1-51中任一项的免疫调节多肽,其中所述免疫调节多肽相比于它与不表达靶分子的细胞的结合表现出增加的与表达靶分子的靶细胞的结合。

53. 权利要求50-52中任一项的免疫调节多肽,其中所述活性和/或结合增加大于1.2倍、大于1.5倍、大于2.0倍、大于3.0倍、大于4.0倍、大于5.0倍或大于10.0倍。

54. 权利要求1-53中任一项的免疫调节多肽,其中所述免疫调节多肽相对于不含连接区的重组免疫调节多肽以增加、降低或相似的结合亲和力结合一种或多种同源受体。

55. 权利要求1-54中任一项的免疫调节多肽,其中,所述免疫调节多肽以范围从或从约 10^{-5} M至或至约 10^{-15} M、 10^{-6} M至或至约 10^{-12} M、从或从约 10^{-7} M至或至约 10^{-11} M、从或从约 10^{-6} M至或至约 10^{-8} M、或从或从约 10^{-7} M至或至约 10^{-8} M的平衡解离常数(K_D)结合一种或多种同源受体。

56. 权利要求1-54中任一项的免疫调节多肽,其中,所述免疫调节多肽结合一种或多种同源受体,其 K_D 为等于或约为、或小于或小于约100、50、40、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5或0.1nM;或

等于或约为、或小于或小于约1nM、100皮摩尔(pM)、90pM、80pM、70pM、60pM、50pM、40pM、30pM、25pM、20pM、15pM、10pM或1pM。

57. 一种多核核酸,其编码权利要求1-56中任一项的免疫调节多肽。

58. 权利要求57的多核苷酸,进一步包含信号序列。

59. 权利要求58的多核苷酸,其中所述信号序列编码衍生自CD33的信号肽。

60. 权利要求59的多核苷酸,其中所述信号肽包含在SEQ ID NO:18中列出的序列或与这样的序列具有至少95%序列同一性的序列。

61. 权利要求57-60中任一项的多核苷酸,其中所述多核苷酸进一步包含至少一个可操作连接的控制所述免疫调节多肽表达的启动子、增强子或反式激活因子。

62. 权利要求61的多核苷酸,其中所述免疫调节多肽的表达是诱导型或条件型的。

63. 权利要求61或62的多核苷酸,其中所述启动子、增强子或反式激活因子是T细胞活化因子。

64. 权利要求61-63中任一项的多核苷酸,其中所述启动子、增强子或反式激活因子含有一种或多种T细胞转录因子的结合位点。

65. 权利要求64的多核苷酸,其中所述T细胞转录因子是活化T细胞核因子(NFAT)、C/EBP、STAT1、STAT2和/或NF κ B。

66. 权利要求61或权利要求62的多核苷酸,其中所述启动子、增强子或反式激活因子的活化是条件性的,任选地为诱导型启动子、增强子或反式激活因子或阻抑型启动子、增强子或反式激活因子。

67. 权利要求61、62或66中任一项的多核苷酸,其中所述启动子、增强子或反式激活因

子在存在于肿瘤微环境中的一种或多种病症的存在下是有活性的。

68. 权利要求67的多核苷酸,其中存在于肿瘤微环境中的一种或多种病症选自缺氧、低葡萄糖、酸性pH或氧化应激。

69. 权利要求67或68的多核苷酸,其中存在于肿瘤微环境中的一种或多种病症是缺氧。

70. 权利要求61、62或66-69中任一项的多核苷酸,其中所述多核苷酸与启动子可操作连接,并且所述启动子是HIF-1- α 反应型启动子。

71. 权利要求61、62或66-70中任一项的多核苷酸,其中所述多核苷酸与启动子可操作连接,并且所述启动子包含一个或多个缺氧反应元件。

72. 权利要求71的多核苷酸,其中所述缺氧反应元件包含序列5'-(A/G)CGT(G/C)(G/C)-3'。

73. 权利要求70-72中任一项的多核苷酸,其中所述启动子是促红细胞生成素(Epo)、VEGF-A、磷酸甘油酸激酶1(PGK1)、乳酸脱氢酶A(LDH A)、醛缩酶A(ALDA)或甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)启动子。

74. 权利要求73的多核苷酸,其中所述启动子在SEQ ID NO:85-90的任一个中列出。

75. 权利要求67或68的多核苷酸,其中存在于肿瘤微环境中的一种或多种病症是低葡萄糖。

76. 权利要求61、62、66-68或75中任一项的多核苷酸,其中所述多核苷酸与启动子可操作连接,所述启动子为GRP78或己糖激酶II启动子。

77. 权利要求61、62或66中任一项的多核苷酸,其中所述启动子、增强子或反式激活因子可通过辐射、热量或在药物存在下诱导。

78. 权利要求77的多核苷酸,其中所述启动子是辐射诱导型启动子。

79. 权利要求77的多核苷酸,其中所述辐射诱导型启动子包含CArG元件或CC(富含A+T)₆GG基序。

80. 权利要求78或79的多核苷酸,其中所述辐射诱导型启动子是EGR-1、Waf-1、RecA或cIAP2启动子或是合成启动子。

81. 权利要求78-80中任一项的多核苷酸,其中所述辐射诱导型启动子是包含在SEQ ID NO:92-95中列出的任一序列的合成启动子。

82. 权利要求77的多核苷酸,其中所述启动子、增强子或反式激活因子是热诱导型启动子、增强子或反式激活因子。

83. 权利要求82的多核苷酸,其中所述热诱导型启动子、增强子或反式激活因子包含热激元件(HSE)。

84. 权利要求83的多核苷酸,其中所述热诱导型启动子、增强子或反式激活因子是热激启动子(HSP)。

85. 权利要求84的多核苷酸,其中所述HSP是HSP70B启动子。

86. 权利要求73的多核苷酸,其中所述热诱导型启动子、增强子或反式激活因子是Gadd153启动子。

87. 权利要求77的多核苷酸,其中所述启动子、增强子或反式激活因子是药物诱导型启动子、增强子或反式激活因子。

88. 权利要求66或权利要求87的多核苷酸,其中所述诱导型启动子、增强子或反式激活

因子包含Lac操纵子序列、四环素操纵子序列、半乳糖操纵子序列或多西环素操纵子序列、雷帕霉素操纵子序列、他莫昔芬操纵子序列或激素反应型操纵子序列或其类似物。

89. 权利要求66、87或88中任一项的多核苷酸,其中所述诱导型启动子包含四环素反应元件(TRE)。

90. 权利要求87的多核苷酸,其中所述药物诱导型启动子、增强子或反式激活因子包含多药耐药(mdr1)基因启动子。

91. 权利要求57-90中任一项的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含单个核酸序列。

92. 权利要求57-90中任一项的多核苷酸,其包含编码所述免疫调节多肽的第一核酸序列和编码重组受体的第二核酸序列。

93. 权利要求92的多核苷酸,其中所述重组受体是或包含嵌合抗原受体(CAR)。

94. 权利要求92或权利要求93的多核苷酸,其进一步包含至少一个可操作连接的控制所述免疫调节多肽和/或重组受体表达的启动子。

95. 权利要求92-94中任一项的多核苷酸,其进一步包含内部核糖体进入位点(IRES)或编码在所述第一和第二核酸序列之间的连接肽的核酸序列,其中所述连接肽在翻译期间或之后使所述第一和第二核酸序列的翻译产物分离。

96. 权利要求95的多核苷酸,其中所述连接肽包含自切割肽或引起核糖体跳跃的肽,任选地为T2A肽。

97. 权利要求57-96中任一项的多核苷酸,其被优化以去除CpG基序和/或经密码子优化。

98. 权利要求97的多核苷酸,其是经人密码子优化的。

99. 一种载体,其包含权利要求57-98中任一项的多核苷酸。

100. 权利要求99的载体,其为病毒载体。

101. 权利要求99或权利要求100的载体,其为逆转录病毒载体。

102. 权利要求99-101中任一项的载体,其为慢病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。

103. 一种工程化细胞,其包含权利要求1-56中任一项的免疫调节多肽。

104. 一种工程化细胞,其包含权利要求57-98中任一项的多核苷酸。

105. 一种工程化细胞,其包含权利要求99-102中任一项的载体。

106. 权利要求103-105中任一项的工程化细胞,其中所述工程化细胞分泌免疫调节多肽。

107. 权利要求103-106中任一项的工程化细胞,其进一步包含重组受体。

108. 权利要求107的工程化细胞,其中所述重组受体结合与疾病或疾患相关的靶抗原。

109. 权利要求108的工程化细胞,其中所述疾病或疾患是传染性疾病或疾患、自身免疫性疾病、炎性疾病或肿瘤或癌症。

110. 权利要求108或权利要求109的工程化细胞,其中所述靶抗原是肿瘤抗原。

111. 权利要求108-110中任一项的工程化细胞,其中所述靶抗原选自下组,该组的组成为:ROR1、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎

抗原、TAG72、VEGF-R2、VEGFR3、癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、维尔姆斯瘤1 (WT-1) 和细胞周期蛋白A1 (CCNA1)。

112. 权利要求103-111中任一项的工程化细胞,其中所述靶向模块是或衍生自人蛋白。

113. 权利要求103-112中任一项的工程化细胞,其中所述免疫调节蛋白在施用它的受试者中不具有免疫原性和/或不诱导免疫应答。

114. 权利要求107-113中任一项的工程化细胞,其中所述重组受体是功能性非TCR抗原受体或转基因TCR。

115. 权利要求107-114中任一项的工程化细胞,其中所述重组受体是嵌合抗原受体 (CAR)。

116. 权利要求107-115中任一项的工程化细胞,其中所述重组受体包含含有抗原结合结构域的细胞外部分。

117. 权利要求116的工程化细胞,其中所述抗原结合结构域是或包含抗体或抗体片段。

118. 权利要求117的工程化细胞,其中所述抗体片段是单链片段。

119. 权利要求117或权利要求118的工程化细胞,其中所述片段包含通过柔性接头连接的抗体可变区。

120. 权利要求117-119中任一项的工程化细胞,其中所述片段包含scFv。

121. 权利要求107-120中任一项的工程化细胞,其中所述重组受体包含细胞内信号转导区。

122. 权利要求121的工程化细胞,其中所述细胞内信号转导区包含细胞内信号转导结构域。

123. 权利要求122的工程化细胞,其中所述细胞内信号转导结构域是或包含初级信号转导结构域、能够在T细胞中诱导初级活化信号的信号转导结构域、T细胞受体 (TCR) 组分的信号转导结构域、和/或包含免疫受体酪氨酸活化基序 (ITAM) 的信号转导结构域。

124. 权利要求122的工程化细胞,其中所述细胞内信号转导结构域是或包含CD3链,任选地是CD3-zeta (CD3 ζ) 链的细胞内信号转导结构域或其信号转导部分。

125. 权利要求122-124中任一项的工程化细胞,其进一步包含置于所述细胞外部分和所述细胞内信号转导区之间的跨膜结构域。

126. 权利要求122-125中任一项的工程化细胞,其中所述细胞内信号转导区进一步包含共刺激信号转导结构域。

127. 权利要求126的工程化细胞,其中所述共刺激信号转导结构域包含T细胞共刺激分子的细胞内信号转导结构域或其信号转导部分。

128. 权利要求126或权利要求127的工程化细胞,其中所述共刺激信号转导结构域包含CD28、4-1BB或ICOS的细胞内信号转导结构域或其信号转导部分。

129. 权利要求126-128中任一项的工程化细胞,其中所述共刺激信号转导结构域位于所述跨膜结构域和所述细胞内信号转导结构域之间。

130. 权利要求103-129中任一项的工程化细胞,其中所述工程化细胞是T细胞。

131. 权利要求103-130中任一项的工程化细胞,其为CD8⁺T细胞或CD4⁺T细胞。

132. 权利要求103-131中任一项的工程化细胞,其中与未工程化的细胞相比或与包含

重组受体但不含免疫调节多肽的细胞相比,所述工程化细胞表现出增加的持久性和/或存活。

133. 权利要求103-132中任一项的工程化细胞,其中所述工程化细胞与参考IL-12相比表现出增加的通过IL-12R刺激的活性。

134. 权利要求133的工程化细胞,其中参考IL-12不包含连接区或包含由SEQ ID NO:7-9中列出的任一个序列组成的连接区。

135. 权利要求103-134中任一项的工程化细胞,其中所述工程化细胞分泌免疫调节多肽,所述免疫调节多肽相比于它与不表达靶分子的细胞的结合表现出增加的与表达靶分子的靶细胞的结合。

136. 权利要求103-135中任一项的工程化细胞,其中与对不表达靶分子的细胞的杀伤相比,所述工程化细胞实现了增加的对表达靶分子的靶细胞的杀伤。

137. 权利要求132-136中任一项的工程化细胞,其中所述增加的持久性、活性、结合和/或杀伤大于参考工程化细胞所实现的持久性、活性、结合和/或杀伤,所述参考工程化细胞表达或分泌在亚基之间的多肽接头但不含靶向模块的免疫调节多肽。

138. 一种组合物,其包含权利要求1-56中任一项的免疫调节多肽。

139. 一种组合物,其包含权利要求103-137中任一项的工程化细胞。

140. 权利要求138或权利要求139的组合物,其进一步包含药学上可接受的赋形剂。

141. 一种治疗方法,其包括将权利要求1-56中任一项的免疫调节多肽、权利要求103-137中任一项的工程化细胞、或权利要求138-140中任一项的组合物施用于患有疾病或疾患的受试者。

142. 权利要求141的方法,其中所述免疫调节多肽特异性地结合由与疾病或疾患相关的细胞表达的靶分子。

143. 权利要求141或权利要求142的治疗方法,其中所述工程化细胞表达特异性地结合与疾病或病症相关的抗原的重组受体。

144. 权利要求141-143中任一项的方法,其中所述疾病或疾患是癌症、肿瘤、自身免疫性疾病或疾患或传染性疾病。

免疫调节多肽及相关组合物和方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2016年7月29日提交的名称“免疫调节多肽以及相关组合物和方法”的美国临时申请号62/369,017的优先权,将其内容通过提述完整并入本文。

通过提述并入序列列表

[0002] 本申请以电子格式提交序列列表。提供的序列列表为2017年7月27日创建的名为735042004240seq1.txt的文件,其大小为139千字节。将序列列表电子格式信息通过提述完整并入。

领域

[0003] 本公开在一些方面涉及含有第一肽和第二肽的免疫调节多肽,所述第一肽和第二肽例如细胞因子或趋化因子的第一和第二亚基,所述亚基通过含有与靶分子结合的靶向模块的连接区连接。在一些方面,本公开进一步涉及包含免疫调节多肽的工程化细胞和组合物以及将其施用于受试者的方法。在一些实施方案中,经工程化以含有免疫调节多肽的细胞(如T细胞)进一步含有与抗原特异性地结合的基因工程化重组受体,如嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,例如通过减少细胞因子或趋化因子疗法的不良作用或增加细胞疗法的活性、功效和/或持久性,多肽、工程化细胞和方法的特征对疾病或病症(例如癌症)的治疗提供了改善。

背景

[0004] 可用于治疗诸如癌症或肿瘤的疾病或病症的策略有多种,包括细胞因子或趋化因子的施用。此外,可用的策略为工程化免疫细胞以表达基因工程重组受体,如嵌合抗原受体(CAR),并向受试者施用含有此类细胞的组合物。需要改进的策略来增加治疗功效,例如,通过减少细胞因子或趋化因子施用的不良作用,改善工程化细胞的持久性和/或存活,或在施用于受试者时降低此类疗法的免疫原性。提供了满足这些需要的组合物、细胞和方法。

概述

[0005] 本文中提供了免疫调节多肽,其含有第一肽;第二肽;以及连接所述第一肽和第二肽的连接区,其中所述连接区含有与靶分子结合的靶向模块。在一些实施方案中,所述第一肽和第二肽中的至少一者是细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或是细胞因子或趋化因子的功能部分。

[0006] 在任何这样的实施方案的一些中,所述第一肽是细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或是细胞因子或趋化因子的功能部分。在任何这样的实施方案的一些中,所述第二肽是细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或是细胞因子或趋化因子的功能部分。在任何这样的实施方案的一些中,所述第一肽和第二肽两者独立地是细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或细胞因子或趋化因子的功能部分。

[0007] 在任何这样的实施方案的一些中,所述第一肽和第二肽是相同的细胞因子或趋化因子或其功能部分,或者是相同细胞因子或趋化因子的相同亚基。在任何这样的实施方案的一些中,所述第一肽和第二肽是不同的细胞因子或趋化因子或其功能部分,或者是相同或不同细胞因子或趋化因子的不同亚基。在任何这样的实施方案的一些中,所述第一肽是

细胞因子或趋化因子的第一亚基,并且所述第二肽是细胞因子或趋化因子的第二亚基。

[0008] 在任何这样的实施方案的一些中,细胞因子或趋化因子是单体。在任何这样的实施方案的一些中,所述第一肽和/或第二肽独立地含有细胞因子或趋化因子的亚基,所述细胞因子或趋化因子是多聚体蛋白质。

[0009] 在任何这样的实施方案的一些中,所述第一肽或第二肽是标签或标记物。

[0010] 本文中提供了免疫调节多肽,其包含含有细胞因子或趋化因子的第一亚基或其功能部分的第一肽;含有细胞因子或趋化因子的第二亚基或其功能部分的第二肽;以及连接所述第一肽和第二肽的连接区,其中连接区含有与靶分子结合的靶向模块。在任何这样的实施方案的一些中,细胞因子或趋化因子是同二聚体或异二聚体。

[0011] 在任何这样的实施方案的一些中,连接区进一步含有至少一个将靶向模块连接至所述第一肽或第二肽的多肽接头。

[0012] 在任何这样的实施方案的一些中,细胞因子或趋化因子或其亚基或功能部分选自下组,该组的组成为:IL-12、IL-15、IL-2、IL-18、GM-CSF、IL-7、IL-21、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IL-17、IL-23、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-11、IL-13、IL-27、促红细胞生成素、G-CSF、生长激素、催乳素、抑瘤素M和白血病抑制因子或其亚基或功能部分。在任何这样的实施方案的一些中,所述第一肽或第二肽独立地含有选自IL-12、IL-23、IL-27和IL-35的细胞因子或趋化因子的亚基或其功能部分。

[0013] 在任何这样的实施方案的一些中,所述第一肽或第二肽独立地是IL-12的亚基或其功能部分。在一些实施方案中,所述第一肽含有IL-12p35亚基或IL-12p40亚基或其功能部分,并且所述第二肽含有另一个IL-12p35亚基和IL-12p40亚基或其功能部分。

[0014] 本文中提供了免疫调节多肽,其包含含有IL-12的p35亚基或其功能部分的第一肽;含有IL-12的p40亚基或其功能部分的第二肽;以及连接所述第一肽和第二肽的连接区,其中连接区含有与靶分子结合的靶向模块。在任何这样的实施方案的一些中,p35亚基含有在SEQ ID NO:10中列出的氨基酸序列或与其具有至少95%序列同一性的序列并且/或者p40亚基含有在SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列或与其具有至少95%序列同一性的序列。

[0015] 在任何这样的实施方案的一些中,连接区进一步含有至少一个将靶向模块连接至p35亚基或p40亚基的多肽接头。在任何这样的实施方案的一些中,多肽接头含有约2个至约20个氨基酸。在任何这样的实施方案的一些中,多肽接头含有序列GGGGS (n),其中n为1-5 (SEQ ID NO:29)。在任何这样的实施方案的一些中,多肽接头含有在SEQ ID NO:7-9的任一个中列出的序列。

[0016] 在任何这样的实施方案的一些中,连接区含有两个多肽接头。在任何这样的实施方案的一些中,靶向模块被包含在第一多肽接头和第二多肽接头之间。在任何这样的实施方案的一些中,靶分子与疾病或疾患相关。在一些方面,疾病或疾患是传染性疾病或疾患、自身免疫性疾病、炎性疾病或肿瘤或癌症。

[0017] 在任何这样的实施方案的一些中,靶分子与肿瘤相关或存在于肿瘤上。在任何这样的实施方案的一些中,靶分子是肿瘤抗原。在任何这样的实施方案的一些中,靶分子选自下组,该组的组成为:肝细胞生长因子(HGF)、肝素、VEGF、VEGF-A、VEGFR2、VEGFR3、HER2、PD-1、肌腱蛋白C、CTLA-4、LAG3、PD-L1、EGFR、EPCAM、RANKL、NG2蛋白聚糖、CD20、CD52、CD19、

CD3、CD30、IL-6、CD38、SLAMF7、GD2、CD13、CD274、CD279、CD40L和CD47。

[0018] 在任何这样的实施方案的一些中,靶向模块含有约3个至约300个氨基酸、约3个至约100个氨基酸、约3个至约20个氨基酸、约6个至约20个氨基酸或约10个氨基酸。在任何这样的实施方案的一些中,靶向模块表现出约 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更低、约 $1 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更低、约 $2 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更低、约 $3 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更低、约 $4 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更低、约 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更低、约 $1 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更低、约 $1.5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更低、约 $2 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更低、约 $3 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更低、约 $4 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更低、约 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更低、约 1×10^{-2} 秒或更低、或约 $5 \times 10^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或更低的结合靶分子的 k_{off} 速率。在任何这样的实施方案的一些中,靶向模块与靶分子的解离常数(K_{D})等于或约为(或小于或小于约)100nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1nM,比如在等于或约1nM和等于或约15nM之间,例如,在等于或约5nM和等于或约10nM之间。

[0019] 在任何这样的实施方案的一些中,靶向模块是或含有抗体或抗体片段。在一些方面,抗体片段是单链片段。在一些实施方案中,抗体片段是含有重链可变区的单结构域抗体。在一些方面,抗体片段含有通过柔性接头连接的抗体可变区。在任何这样的实施方案的一些中,抗体片段含有scFv。

[0020] 在任何这样的实施方案的一些中,靶向模块含有选自下组的抗体的可变重链(VH)和/或可变轻链(VL),该组的组成为:曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、雷莫芦单抗(ramucirumab)、阿特珠单抗、贝伐珠单抗、帕尼单抗、西妥昔单抗、耐昔妥珠单抗、地诺单抗、纳武单抗、派姆单抗、利妥昔单抗、奥法木单抗、奥比妥珠单抗、阿伦单抗、博纳吐单抗、本妥昔单抗(brentuximab vedotin)、司妥昔单抗(siltuximab)、伊匹单抗、达雷木单抗、埃罗妥珠单抗、达妥昔单抗(dinutuximab)、卡妥索单抗(catumaxomab)。在任何这样的实施方案的一些中,靶向模块含有抗EPCAM抗体的 V_{H} 链和/或 V_{L} 链。在任何这样的实施方案的一些中,靶向模块含有在SEQ ID NO:17、24或25中列出的序列或与SEQ ID NO:17、24或25具有至少95%序列同一性并且与靶分子结合的序列。

[0021] 在任何这样的实施方案的一些中,免疫调节多肽含有在SEQ ID NO:6中列出的序列或与这样的序列具有至少95%序列同一性的序列。

[0022] 在任何这样的实施方案的一些中,靶向模块是或含有肽结合基序。在任何这样的实施方案的一些中,靶向模块是肝素结合肽。在一些方面,肝素结合肽(HBP)衍生自纤连蛋白或BMP4,和/或是牛来源的。

[0023] 在任何这样的实施方案的一些中,靶向模块选自下组,该组的组成为:肝细胞生长因子(HGF)结合肽、VEGF结合肽、VEGF-A结合肽、VEGFR2结合肽、EPCAM结合肽、HER2结合肽、PD-1结合肽、肌腱蛋白C结合肽、CTLA-4结合肽、LAG3结合肽、PD-L1结合肽、EGFR结合肽、RANKL结合肽、CD20结合肽、CD52结合肽、CD19结合肽、CD3结合肽、CD30结合肽、IL-6结合肽、CD38结合肽、SLAMF7结合肽、GD2结合肽、CD274结合肽、CD279结合肽、CD40L结合肽和CD47结合肽。在任何这样的实施方案的一些中,靶向模块含有HGF结合肽或EGFR结合肽(EGFRBP)。

[0024] 在任何这样的实施方案的一些中,靶向模块含有在SEQ ID NO:13、14、15、16、26、27或28任一者中列出的序列或与这样的序列具有至少95%序列同一性并且与靶分子结合的序列。

[0025] 在任何这样的实施方案的一些中,免疫调节多肽含有在SEQ ID NO:1-5任一者中

列出的序列或与这样的序列具有至少95%序列同一性的序列。

[0026] 在任何这样的实施方案的一些中,与不含连接区的重组IL-12相比,免疫调节多肽表现出增加的通过IL-12R刺激的活性。在任何这样的实施方案的一些中,相比于它与不表达靶分子的细胞的结合,免疫调节多肽表现出增加的与表达靶分子的靶细胞的结合。在一些实施方案中,活性和/或结合增加大于1.2倍、大于1.5倍、大于2.0倍、大于3.0倍、大于4.0倍、大于5.0倍或大于10.0倍。在一些实施方案中,增加的活性和/或结合大于在亚基之间含有多肽接头但不含靶向模块的参考免疫调节多肽所表现出的活性和/或结合。

[0027] 本文中提供了编码根据上述任一个实施方案的免疫调节多肽的多核苷酸。在一些方面,多核苷酸进一步含有信号序列。在一些情况下,信号序列编码衍生自CD33的信号肽。在一些方面,信号肽含有在SEQ ID NO:18中列出的序列或与这样的序列具有至少95%序列同一性的序列。

[0028] 在任何这样的实施方案的一些中,多核苷酸进一步含有至少一个可操作连接的控制免疫调节多肽表达的启动子。在一些实施方案中,免疫调节多肽的表达是诱导型或条件型的。在任何这样的实施方案的一些中,多核苷酸进一步含有条件型启动子、增强子或反式激活因子。在一些方面,条件型启动子、增强子或反式激活因子是诱导型启动子、增强子或反式激活因子或阻抑型启动子、增强子或反式激活因子。

[0029] 在一些实施方案中,启动子、增强子或反式激活因子是T细胞活化因子。例如,启动子、增强子或反式激活因子含有一种或多种T细胞转录因子的结合位点。在一些实施方案中,启动子、增强子或反式激活因子含有活化T细胞核因子(NFAT)、C/EBP、STAT1、STAT2和/或NFκB的结合位点。

[0030] 在一些实施方案中,启动子、增强子或反式激活因子的活化是条件性的,任选地为诱导型启动子、增强子或反式激活因子或阻抑型启动子、增强子或反式激活因子。

[0031] 在一些实施方案中,启动子、增强子或反式激活因子在存在于肿瘤微环境中的一种或多种病症的存在下是有活性的。存在于肿瘤微环境中的一种或多种病症可选自缺氧、低葡萄糖、酸性pH和/或氧化应激。

[0032] 在一些实施方案中,存在于肿瘤微环境中的一种或多种病症是缺氧。在一些这样的实施方案中,多核苷酸与启动子可操作连接,并且启动子是HIF-1-α反应型启动子。在一些实施方案中,多核苷酸与启动子可操作连接,并且启动子含有一个或多个缺氧反应元件。示例性缺氧反应元件含有序列5'-(A/G)CGT(G/C)(G/C)-3'。在这样的实施方案中,启动子可以是促红细胞生成素(Epo)、VEGF-A、磷酸甘油酸激酶1(PGK1)、乳酸脱氢酶A(LDH A)、醛缩酶A(ALDA)或甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)启动子。启动子可具有在SEQ ID NO:85-90的任一个中列出的序列。

[0033] 在一些实施方案中,存在于肿瘤微环境中的一种或多种病症是低葡萄糖。在一些这样的实施方案中,多核苷酸与启动子可操作连接,所述启动子为GRP78或己糖激酶II启动子。

[0034] 在一些实施方案中,启动子、增强子或反式激活因子可通过辐射、热量或在药物存在下诱导。

[0035] 在一些实施方案中,启动子是辐射诱导型启动子。示例性辐射诱导型启动子可含有CArG元件或CC(富含A+T)₆GG基序。在一些实施方案中,辐射诱导型启动子是EGR-1、Waf-

1、RecA或cIAP2启动子或是合成启动子,比如具有在SEQ ID NO 92-95中列出的序列的启动子。

[0036] 在一些实施方案中,启动子、增强子或反式激活因子是热诱导型启动子、增强子或反式激活因子。在一些这样的实施方案中,热诱导型启动子、增强子或反式激活因子含有热激元件(HSE)。在一些实施方案中,热诱导型启动子、增强子或反式激活因子是热激启动子(HSP),比如HSP70B启动子或Gadd 153启动子。

[0037] 在一些实施方案中,启动子、增强子或反式激活因子是药物诱导型启动子、增强子或反式激活因子。在一些情况下,诱导型启动子、增强子或反式激活因子含有Lac操纵子序列、四环素操纵子序列、半乳糖操纵子序列、多西环素操纵子序列、雷帕霉素操纵子序列、他莫昔芬操纵子序列或激素反应型操纵子序列或其类似物。在一些实施方案中,诱导型启动子含有四环素反应元件(TRE)。在一些实施方案中,药物诱导型启动子、增强子或反式激活因子含有多药耐药(mdr1)基因启动子。

[0038] 在任何这样的实施方案的一些中,多核苷酸含有单个核酸序列。在任何这样的实施方案的一些中,多核苷酸含有编码免疫调节多肽的第一核酸序列和编码重组受体的第二核酸序列。在一些方面,重组受体是或含有嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,多核苷酸进一步含有至少一个可操作连接的控制免疫调节多肽和/或重组受体表达的启动子。

[0039] 在任何这样的实施方案的一些中,多核苷酸进一步含有在第一和第二核酸序列之间的内部核糖体进入位点(IRES),以在翻译后产生第一和第二核酸序列的翻译产物。在一些实施方案中,多核苷酸含有编码在第一和第二核酸序列之间的连接肽的核酸序列,其中连接肽在翻译期间或之后使第一和第二核酸序列的翻译产物分离。在一些方面,连接肽含有自切割肽或引起核糖体跳跃的肽,任选地为T2A肽。

可以优化任何具体化的多核苷酸以去除CpG基序和/或将其进行密码子优化。在一些实施方案中,多核苷酸是人密码子优化的。

[0040] 本文中提供了含有根据上述任一个实施方案的多核苷酸的载体。在一些实施方案中,载体是病毒载体。在一些方面,载体是逆转录病毒载体。在一些情况下,载体是慢病毒载体或 γ -逆转录病毒载体。

[0041] 本文中提供了含有根据上述任一个实施方案的免疫调节多肽的工程化细胞。在任何这样的实施方案的一些中,提供了含有根据上述任一个实施方案的多核苷酸的工程化细胞。在一些实施方案中,工程化细胞含有根据上述任一个实施方案的载体。

[0042] 在任何这样的实施方案的一些中,工程化细胞分泌免疫调节多肽。在一些实施方案中,工程化细胞进一步含有重组受体。在一些情况下,重组受体结合与疾病或疾患相关的靶抗原。在一些方面,疾病或疾患是传染性疾病或疾患、自身免疫性疾病、炎性疾病或肿瘤或癌症。在一些实施方案中,靶抗原是肿瘤抗原。

[0043] 在任何这样的实施方案的一些中,靶抗原选自下组,该组的组成为:ROR1、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、

CD123、CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、维尔姆斯瘤1 (WT-1) 和细胞周期蛋白A1 (CCNA1)。在某些实施方案中,靶向模块是或衍生自人蛋白。

[0044] 在任何这样的实施方案的一些中,免疫调节蛋白在施用它的受试者中不具有免疫原性和/或不诱导免疫应答。

[0045] 在任何这样的实施方案的一些中,重组受体是功能性非TCR抗原受体或转基因TCR。在一些实施方案中,重组受体是嵌合抗原受体(CAR)。在任何这样的实施方案的一些中,重组受体包含含有抗原结合结构域的细胞外部分。在一些情况下,抗原结合结构域是或含有抗体或抗体片段。在一些方面,抗体片段是单链片段。在一些实施方案中,片段含有通过柔性接头连接的抗体可变区。在任何这样的实施方案的一些中,片段含有scFv。

[0046] 在任何这样的实施方案的一些中,重组受体含有细胞内信号转导区。在一些方面,细胞内信号转导区能够在T细胞中诱导初级活化信号,其为T细胞受体(TCR)组分,并且/或者含有免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)。在一些情况下,细胞内信号转导区是或含有CD3-zeta (CD3ζ) 链的细胞内信号转导结构域或其信号转导部分。

[0047] 在任何这样的实施方案的一些中,工程化细胞进一步含有连接细胞外部分和细胞内信号转导区的跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞内区含有细胞内信号转导结构域。在任何这样的实施方案的一些中,重组受体进一步含有共刺激信号转导结构域。在一些情况下,共刺激信号转导结构域含有T细胞共刺激分子的细胞内信号转导结构域或其信号转导部分。在一些方面,共刺激信号转导结构域含有CD28、4-1BB或ICOS的细胞内信号转导结构域或其信号转导部分。在一些实施方案中,共刺激信号转导结构域位于跨膜结构域和细胞内信号转导区之间。

[0048] 在任何这样的实施方案的一些中,工程化细胞是T细胞。在任何这样的实施方案的一些中,工程化细胞是CD8⁺T细胞或CD4⁺T细胞。

[0049] 在任何这样的实施方案的一些中,与未工程化的细胞相比或与含有重组受体但不含免疫调节多肽的细胞相比,工程化细胞表现出增加的持久性和/或存活。在任何这样的实施方案的一些中,与不含连接区的重组IL-12相比,工程化细胞表现出增加的通过IL-12R刺激的活性。在一些实施方案中,参考IL-12不含连接区或含有由SEQ ID NO 7-9中列出的任何序列组成的连接区。

[0050] 在任何这样的实施方案的一些中,工程化细胞分泌免疫调节多肽,相比于它与不表达靶分子的细胞的结合,所述免疫调节多肽表现出增加的与表达靶分子的靶细胞的结合。在任何这样的实施方案的一些中,与对不表达靶分子的细胞的杀伤相比,工程化细胞实现了增加的对表达靶分子的靶细胞的杀伤。在任何这样的实施方案的一些中,增加的持久性、活性、结合和/或杀伤大于参考工程化细胞所实现的持久性、活性、结合和/或杀伤,所述参考工程化细胞表达或分泌在亚基之间含有多肽接头但不含靶向模块的免疫调节多肽。

[0051] 本文中提供了含有根据上述任一个实施方案的免疫调节多肽的组合物。本文中提供了含有根据上述任一个实施方案的工程化细胞的组合物。在一些实施方案中,组合物进一步含有药学上可接受的赋形剂。

[0052] 本文中提供了一种治疗方法,其包括对患有疾病或疾患的受试者施用根据上述任一个实施方案的免疫调节多肽、根据上述任一个实施方案的工程化细胞、或根据上述任一个实施方案的组合物。在一些情况下,免疫调节多肽特异性地结合由与疾病或疾患相关的

细胞表达的靶分子。在一些方面,工程化细胞表达特异性地结合与疾病或病症相关的抗原的重组受体。在一些实施方案中,疾病或疾患是癌症、肿瘤、自身免疫性疾病或疾患或传染性疾

附图简述

[0053] 图1描绘了用重组人IL-12 (rHuIL-12) (一种scIL-12) 或含有HBP靶向模块(IL-12HBP) 或EGFR靶向模块(IL-12EGFR) 的免疫调节多肽刺激后在PHA母细胞中的干扰素 γ (IFN- γ) 分泌。

[0054] 图2描绘了以不同的效靶细胞比用测试的IL-12免疫调节蛋白刺激细胞后细胞总数的倍数变化。

[0055] 图3描绘了以不同的效靶细胞比用测试的IL-12免疫调节蛋白刺激细胞后细胞的杀伤指数。

[0056] 图4描绘了通过表面等离子体共振评估的IL-12免疫调节蛋白的结合亲和力。

详细说明

[0057] 本文中提供了免疫调节多肽,包括那些含有通过连接区连接的第一肽和第二肽的免疫调节多肽,所述连接区含有与靶分子结合的靶向模块。在一些实施方案中,所述第一肽和第二肽独立地是第一和第二细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或细胞因子或趋化因子的功能部分。在一些实施方案中,免疫调节蛋白含有细胞因子或趋化因子的第一亚基和第二亚基,所述亚基通过含有与靶分子结合的靶向模块的连接区连接。在一些实施方案中,细胞因子是IL-12,并且免疫调节多肽含有IL-12的p35和p40亚基,所述亚基通过含有与靶分子结合的靶向模块的连接区连接。在一些实施方案中,靶分子是在病变环境中过表达或对其特异的分子,所述病变环境比如肿瘤微环境,比如在病变或肿瘤微环境中存在的细胞上。还提供了含有免疫调节多肽的组合物和工程化细胞以及施用这样的组合物和细胞的方法。

[0058] 施用诸如细胞因子和趋化因子的各种肽可有效治疗疾病和病症,比如癌症。然而,某些这样的治疗,比如涉及全身施用天然或未修饰的细胞因子的治疗,可能与不需要的作用相关,比如由于这些分子在疾病或病症的细胞或组织(例如肿瘤细胞)以外的部位的活性引起的那些作用。正因为如此,目前的方法可能不完全令人满意,并且改进的功效和安全性是期望的。

[0059] 在一些实施方案中,本文中提供的免疫调节多肽特异性地结合由与疾病或病症相关的细胞表达的靶分子。因此,在一些情况下,将免疫调节多肽靶向至表达已知靶分子的组织或细胞,例如肿瘤细胞。在一些情况下,与用不含接头或靶向模块的肽(比如细胞因子或趋化因子,例如重组人细胞因子或趋化因子) 处理相比,将免疫调节多肽靶向至含有靶分子的细胞与较少不需要的或更期望的结果相关。

[0060] 在一些方面,与参考治疗方案或组合物相比,例如与细胞因子或其相关或未修饰版本的基于细胞或基于局部递送的施用(通常设计为用于细胞因子的肿瘤定位) 相比,所提供的实施方案表现出相当的安全性和改善的功效。在某些方面,所提供的实施方案包括全身施用,其与天然或未修饰版本的细胞因子分子的全身施用相比具有增加的安全性。

[0061] 在一些方面,细胞因子是白细胞介素12(IL-12)。IL-12通常是先天免疫和细胞免疫的介质。在一些情况下,IL-12实现抗肿瘤和抗转移活性。通常,IL-12作用于T细胞和NK细

胞。IL-12的功能包括引发T辅助细胞1 (Th1) 免疫应答和NK细胞分泌IFN- γ 。通常,通过与抗原初始相遇期间促进幼稚T细胞分化成能够在激活后产生大量IFN- γ 的Th1细胞群,IL-12产生Th1应答。在一些情况下,IL-12通过应答于特异性抗原的分化的Th1细胞而用作最大程度分泌IFN- γ 的共刺激物。在一些情况下,IL-12刺激静息记忆T细胞群发育成产生IFN- γ 的Th1细胞,所述静息记忆T细胞与它们先前已经暴露于其下的抗原相互作用。因此,在一些方面,IL-12可以促进或介导免疫效应子功能以增强抗肿瘤免疫应答,包括在过继细胞疗法中与细胞施用相结合。

[0062] 然而,在一些情况下,与许多其他细胞因子一样,已经观察到涉及全身施用重组人天然IL-12的某些研究与毒性相关,比如全身毒性。在一些情况下,在癌症患者中的临床试验揭示了有希望的治疗活性,但通常也显示全身施用的天然重组人IL-12可具有副作用(Lasek等人(2014) *Cancer Immunol. Immunother.*, 63:419-435)。在一些方面,如根据国家癌症研究所的群体毒性标准量表(Creekmore等人(编辑): *Biologic Therapy of Cancer*. Philadelphia, PA, Lippincott, 1991, p. 76) 评估的,这种重组IL-12的这种某些类型的施用可导致3级或4级毒性。在一些情况下,毒性的临床症状可包括例如疲劳、呼吸困难、口腔炎、酸中毒或胃肠道出血中的一种或多种。在一些情况下,实验室不良事件可包括白细胞减少、中性粒细胞减少、高胆红素血症、AST升高、ALT升高、血小板减少、肌酐升高或碱性磷酸酶升高中的一种或多种。评估和确定潜在不良作用的存在或不存在的测定法是已知的(参见例如Leonard等人(1997) *Blood*, 90:2541-2548)。然而,已经观察到各种其他递送途径和修饰的构建体(比如局部,例如,IL-12的肿瘤部位施用和/或引入细胞比如T细胞,所述细胞例如以肿瘤靶向的方式天然分泌或被工程化为分泌IL-12)是安全的,并且与较少或没有毒性结果或其风险相关。在一些实例中,已经报道工程化T细胞(比如表达嵌合抗原受体也分泌表达重组或外源IL-12例如单链异二聚体形式的那些)具有令人鼓舞的结果(Pegram等人(2012) *Blood*, 119:4133-4141)。

[0063] 在一些实施方案中,与其他治疗(比如涉及重组人IL-12的施用(比如全身施用)的其他类型的疗法)相比,当施用所提供的免疫调节多肽比如IL-12免疫调节多肽时可导致毒性降低,比如全身毒性降低。在一些实施方案中,与其他治疗(比如涉及施用表达重组人IL-12的细胞的其他类型的疗法)相比,当将所提供的表达这种免疫调节多肽的细胞施用于患者时可导致毒性降低,比如全身毒性降低。在一些实施方案中,通过修饰产生重组或外源IL-12的多核苷酸,使得表达是诱导型或条件依赖性的,例如通过组入一种或多种如下文所述的诱导型或条件依赖性启动子和/或调节元件,降低或进一步降低了由提供的细胞产生的毒性。例如,可以将多核苷酸修饰为采用一个或多个诱导型启动子,使得IL-12表达在施用外源作用剂(比如辐射、热量或药物或小分子)后实现,否则不表达。在其他实例中,可以限制重组或外源IL-12的表达,使得表达仅发生在特定的微环境比如肿瘤微环境(例如,缺氧情况)中。调节IL-12表达使得重组IL-12仅在身体的靶向区中和/或仅在特定条件下表达可以减轻施用IL-12表达性细胞的毒性。

[0064] 在一些实施方案中,当与提供的含有靶向模块的免疫调节多肽或表达或分泌这样的免疫调节多肽(比如提供的含有靶向模块的IL-12免疫调节多肽)的细胞一起施用,受试者(施用的受试者平均而言)没有表现出3级或更高的严重毒性或IL-12相关毒性。在一些方面,与其他方法相比,受试者表现出相同或降低的毒性或没有毒性以及增加的功效,例如

本文中提供的IL-12的免疫调节作用的增加。

[0065] 在一些情况下,免疫调节多肽的结构使得当靶向模块结合例如在靶细胞的表面上的靶分子时,所述第一肽和第二肽(例如细胞因子或趋化因子的亚基)定向为离开靶细胞。在一些这样的情况下,细胞因子或趋化因子的亚基定向为朝向邻近的非靶细胞,比如免疫细胞。在一些实施方案中,这样的定向可以阻碍细胞因子或趋化因子与靶细胞上的它的受体结合。在一些方面,这样的定向可以促进细胞因子或趋化因子与免疫细胞(例如T细胞)上的它的受体结合。在一些情况下,与未设计成定向为离开靶细胞或设计成定向为朝向靶细胞的其他免疫调节多肽相比,这样的定向可以实现增强的T细胞刺激。在一些情况下,连接区的结构(例如组分的顺序和大小)被设计成促进靶向模块与靶细胞结合,同时促进第一肽和第二肽,例如第一和第二细胞因子或细胞因子的亚基朝向邻近的非靶细胞结合,例如,使得所述亚基定向为离开所述靶细胞。

[0066] 在一些方面,靶向模块与所述肽的一个或两个(比如所述亚基的一个或两个)连接。在一些实施方案中,靶向模块被配置在所述第一肽和第二肽之间,比如在细胞因子或趋化因子(例如IL-12)的第一亚基和第二亚基之间。在一些实施方案中,将靶向模块直接连接或例如经由一个或多个接头间接连接。在一些情况下,连接区进一步含有至少一个多肽接头,其将靶向模块连接至所述第一或第二肽,比如细胞因子或趋化因子的第一或第二亚基。在一些情况下,连接区含有两个或更多个多肽接头。例如,在一些方面,所述第一肽(例如第一亚基)附接至第一多肽接头,第一多肽接头附接至靶向模块的第一端,并且第二多肽接头附接至靶向模块的第二端和所述第二肽(例如第二亚基)。因此,在一些情况下,靶向模块侧接在两个或更多个多肽接头之间,所述多肽接头将其附接至所述肽的一个或两个(例如细胞因子或趋化因子的亚基)。在一些实施方案中,连接区组分的这种顺序促进所述肽(例如,细胞因子或趋化因子亚基)定向为离开靶细胞。

[0067] 在一些方面,连接区的大小(例如长度)使得所述第一肽和第二肽(例如细胞因子或趋化因子亚基)将以期望的方向定向。在一些实施方案中,连接区不超过400、300、250、200、150、100、50、40、30、25、20、15、10个或5个氨基酸。在一些方面,连接区的长度在(或在约)200至400个氨基酸之间,在(或在约)100至200个氨基酸之间,或在(或在约)5至50个氨基酸之间,比如在(或在约)10至50个氨基酸、10至40个氨基酸、10至30个氨基酸、10至20个氨基酸、20至50个氨基酸、20至40个氨基酸、20至30个氨基酸、30至50个氨基酸或30至40个氨基酸之间。

[0068] 在一些实施方案中,编码免疫调节多肽的核酸分子与启动子(比如诱导型、条件性或活化诱导型启动子)或增强子可操作连接。在一些实施方案中,启动子或增强子控制免疫调节多肽的表达。因此,在一些情况下,免疫调节多肽实质上仅在启动子或增强子有活性时才表达。例如,在一些情况下,条件型启动子可以通过共同施用分子或化合物而被活化,或者可以在与分子或化合物共同施用后被下调。

[0069] 在一些方面,免疫调节多肽的表达在免疫细胞(例如T细胞)活化(比如通过T细胞活化因子)的存在下完成。例如,在一些情况下,启动子、增强子或其他反应元件或其部分被转录因子识别,以驱动其活性通常通过T细胞活化而引发的基因的表达。在一些实施方案中,T细胞活化因子可以是转录因子的调节结构域或区域(例如启动子、增强子或其他反应元件),所述转录因子的活性通过T细胞活化而引发。在一些实施方案中,T细胞活化因子响

应于T细胞活化、TCR信号转导的信号强度和/或TCR信号转导的质量中的一者或多者。

[0070] 在一些实施方案中，T细胞活化因子可以是调控元件，比如启动子、增强子或一个或多个反应元件，其含有T细胞转录因子的结合位点，并由此与T细胞转录因子的下游活性相关。在一些实施方案中，转录因子是活化T细胞核因子(NFAT)、C/EBP、STAT1、STAT2或NF κ B。例如，在一些实施方案中，T细胞活化因子含有一个或多个被活化T细胞核因子(NFAT)、C/EBP、STAT1、STAT2和NF κ B识别的反应元件。在一些实施方案中，T细胞活化因子可含有一个或多个调控元件，所述调控元件被一种或两种(或在一些情况下三种或更多种)独特转录因子识别或对其作出反应。

[0071] 在一些方面，当免疫调节多肽的表达受到这种条件型、诱导型或活化诱导型启动子或增强子控制时，与重组人细胞因子或趋化因子或未与这种启动子或增强子可操作连接的免疫调节多肽相比，所述免疫调节多肽的功效得到改善。在一些方面，与重组人细胞因子或趋化因子或未与这种启动子或增强子可操作连接的免疫调节多肽相比，与这种启动子或增强子可操作连接的免疫调节多肽的潜在副作用或指示毒性的结果的风险降低。在一些方面，功效相比而言增加。例如，在一些情况下，所提供的其表达可受到诱导或条件控制的免疫调节多肽可以在非靶组织中具有降低的表达或不表达，但可在靶组织附近被激活。在一些实施方案中，编码所提供的与活化诱导型启动子可操作地连接的免疫调节多肽的核酸分子可以在非靶组织中具有降低的表达或不表达，但可在已经引出免疫应答的靶组织附近被激活。与其他组合物和方法相比，这样的途径可以导致不需要的结果的可能性降低或功效增加。

[0072] 在一些实施方案中，免疫调节多肽表现出刺激被所述第一肽或第二肽识别的受体(例如，细胞因子或趋化因子受体)的活性。在一些实施方案中，与不含靶向模块的免疫调节蛋白(比如不包含连接区的重组细胞因子或趋化因子)相比，所述免疫调节多肽刺激受体的活性增加。在一些方面，相比于它与不表达靶分子的细胞的结合，免疫调节多肽表现出增加的与表达靶分子的靶细胞的结合。在一些方面，增加的活性和/或结合大于在亚基之间含有多肽接头但不含靶向模块的参考免疫调节多肽所实现的活性和/或结合。在任何这样的方面，增加大于1.2倍、大于1.5倍、大于2.0倍、大于3.0倍、大于4.0倍、大于5.0倍或大于10.0倍。

[0073] 在一些实施方案中，免疫调节蛋白不具有免疫原性。在一些情况下，免疫调节多肽在施用它的受试者中不诱导免疫应答。在一些情况下，免疫调节多肽的免疫原性低于多肽分子，例如与较大的靶向模块连接和/或经由较大的连接区连接的细胞因子或趋化因子。在一些实施方案中，分别与施用这样的其他替代分子或施用表达这样的其他替代分子的细胞相比，被施用免疫调节蛋白或表达免疫调节蛋白的细胞的受试者对免疫调节蛋白没有表现出或表现出降低的免疫应答或特定类型或程度的免疫应答。被降低的免疫应答的类型可以是可检测的免疫应答、体液免疫应答和/或细胞介导的免疫应答。

[0074] 在一些实施方案中，将免疫调节多肽提供在编码重组受体(比如嵌合抗原受体(CAR))的细胞上或与其联合提供，所述重组受体结合了配体结合结构域(例如抗体或抗体片段)，所述配体结合结构域提供针对具有活化细胞内结构域部分(比如提供初级活化信号的T细胞活化结构域)的期望抗原(例如，肿瘤抗原)的特异性。在一些实施方案中，当经基因工程化进入免疫细胞中时，所提供的免疫调节多肽和重组受体可调节T细胞刺激和/或活

化,由此产生具有改进的体内寿命、存活和/或持久性的基因工程化细胞,以供例如在过继细胞治疗方法中使用。

[0075] 因此,还提供了细胞,比如含有免疫调节多肽和/或工程化重组受体的细胞,如本文所述。在一些实施方案中,细胞能够分泌或被设计成分泌免疫调节肽,比如细胞因子,如修饰的IL-12多肽。用于工程化细胞以分泌多肽的方法描述于例如Pegram等人(2012) Blood,119:4133-4141;美国公开号US20160045551和美国公开号US20100178276中。

[0076] 在一些实施方案中,工程化细胞分泌免疫调节多肽,所述免疫调节多肽相比于其与不表达靶分子的细胞的结合表现出与表达靶分子的靶细胞的结合增加,和/或相比于表达细胞因子(例如IL-12)的细胞表现出与靶细胞的结合增加和/或功效增加,所述细胞因子与所述免疫调节多肽在其他方面相同或基本相同或相似,但不含修饰,不是单链分子,不包括接头,不是异二聚体单链分子,和/或不具有靶向模块。在一些方面,与对不表达靶分子的细胞的杀伤相比,工程化细胞实现了增加的对表达靶分子的靶细胞的杀伤。

[0077] 在一些情况下,免疫调节多肽和重组受体可以在细胞中表达以产生基因工程化T细胞,当施用于受试者时,与不表达或分泌免疫调节蛋白的参考细胞组合物相比,所述基因工程化T细胞表现出改进的一种或多种性质。在一些情况下,增加的持久性、活性、结合和/或杀伤大于包含工程化细胞的参考组合物所实现的持久性、活性、结合和/或杀伤,所述工程化细胞不表达免疫调节多肽或表达或分泌在亚基之间包含多肽接头但不包含靶向模块的免疫调节多肽。因此,在一些情况下,与施用参考组合物的细胞相比,可以改善或增加或更好的施用的基因工程化细胞的一种或多种性质包括免疫原性降低、活化增加以及存活和/或持久性增加。

[0078] 在一些实施方案中,与未工程化的细胞相比或与包含重组受体但不包含免疫调节多肽的细胞相比,含有免疫调节多肽和重组受体的工程化细胞表现出增加的持久性和/或存活。在一些实施方案中,具有增加的持久性的基因工程化细胞在施用它的受试者中表现出更好的效力。在一些方面,施用细胞的持久性增加至少或约至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多倍。

[0079] 在一些实施方案中,可在施用于受试者之后检测或量化施用细胞的持久性的程度或范围。例如,在一些方面,使用定量PCR(qPCR)评估在受试者的血液或血清或器官或组织(例如,疾病部位)中表达重组受体的细胞(例如,表达CAR的细胞)的数量。在一些方面,将持久性量化为每微克DNA的编码受体(例如CAR)的DNA或质粒的拷贝,或者为每微升样品(例如,血液或血清)或按照每微升样品的外周血单核细胞(PBMC)或白细胞或T细胞总数的受体表达性(例如CAR表达性)细胞的数目。在一些实施方案中,还可以进行流式细胞术测定法,其通常使用对受体特异的抗体检测表达受体的细胞。也可以使用基于细胞的测定法来检测功能细胞的数量或百分比,所述功能细胞比如针对疾病或病症或表达被受体识别的抗原的细胞能够结合和/或中和和/或诱导反应(例如,细胞毒性反应)的细胞。在任何这样的实施方案中,与重组受体相关的另一种标志物(例如CAR表达细胞)的表达程度或水平可用于区分受试者中的施用细胞与内源细胞。

[0080] 还提供了免疫调节多肽和含有或分泌所述免疫调节多肽的工程化细胞的方法和用途,以供例如在癌症治疗的过继疗法中使用。进一步提供了用于工程化、制备和生产免疫调节多肽和细胞的方法,含有所述免疫调节多肽和细胞的组合物,以及容纳和使用、生产和

施用所述组合物或细胞的试剂盒和装置。还提供了用于生产工程化细胞的方法、化合物和组合物。提供了核酸,比如构建体,例如编码免疫调节多肽和/或基因工程重组受体的病毒载体,以及将这样的核酸引入细胞中的方法,例如通过转导。还提供了含有免疫调节多肽和工程化细胞的组合物,以及用于将细胞和组合物施用于受试者的方法、试剂盒和装置,例如用于过继细胞疗法。在一些方面,将细胞从受试者中分离、工程化并施用于同一受试者。在其他方面,将它们从一位受试者中分离、工程化并施用于另一位受试者。

免疫调节多肽

[0081] 在一些实施方案中提供了免疫调节多肽,比如含有第一肽、第二肽和连接所述第一肽和第二肽的连接区的免疫调节多肽。在一些实施方案中,所述第一肽和第二肽可以是或衍生自细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或细胞因子或趋化因子的功能部分。在一些实施方案中,所述第一肽是细胞因子或趋化因子的第一亚基或其功能部分,并且所述第二肽是细胞因子或趋化因子的第二亚基或其功能部分,两者通过连接第一和第二亚基的连接区连接。在一些实施方案中,术语“功能部分”可以表示细胞因子或趋化因子的足够部分或细胞因子或趋化因子的亚基,其能够与其同源受体结合以转导其信号,并且实现免疫调节活性。功能部分通常含有全长序列的至少或约至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多,比如缺乏信号肽的全长成熟序列。在一些实施方案中,与参考多肽相比,所提供的免疫调节多肽或含有这种肽的细胞表现出增加或降低的刺激或抑制同源受体活性或反应的活性,其中所述参考多肽是不含连接区的多肽,比如重组蛋白,或者所述参考多肽是含有连接区但不含靶向模块的重组蛋白。在一些实施方案中,与参考多肽相比,免疫调节多肽对一种或多种同源受体表现出增加的亲和力,并且表现出增加的经由一种或多种同源受体刺激的活性。在其他实施方案中,与参考多肽相比,免疫调节多肽对一种或多种同源受体表现出降低的亲和力,并且表现出降低的经由一种或多种同源受体的刺激。在一些实施方案中,与参考多肽相比,免疫调节受体通过表现出对同源受体的结合亲和力增加或降低来调节活性。

[0082] 在一些实施方案中,免疫调节多肽对靶分子表现出具有等于或小于 10^{-5} M的 K_D (即,具有M单位的特定结合相互作用的平衡解离常数;等于这个结合反应的解离速率 $[k_{off}$ 或 $k_d]$ 与结合速率 $[k_{on}$ 或 $k_a]$ 的比值,假定双分子相互作用)的结合亲和力。例如,平衡解离常数 K_D 的范围为从或从约 10^{-5} M至或至约 10^{-15} M,比如从或从约 10^{-6} M至或至约 10^{-12} M,从或从约 10^{-7} M至或至约 10^{-11} M,从或从约 10^{-6} M至或至约 10^{-8} M,或从或从约 10^{-7} M至或至约 10^{-8} M。在一些实施方案的中,靶向模块与靶分子的 K_D 等于或约为(或小于或小于约)100nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5或0.1nM,比如在等于或约0.1nM和等于或约15nM之间,例如,在等于或约1nM和等于或约10nM之间。在一些实施方案中,靶向模块与靶分子的 K_D 等于或约为(或小于或小于约)1nM、100皮摩尔(pM)、90pM、80pM、70pM、60pM、50pM、40pM、30pM、25pM、20pM、15pM、10pM或1pM,比如在等于或约10pM和等于或约100pM之间,例如在等于或约25pM和等于或约75pM之间。

[0083] 在一些方面,增加的活性和/或结合大于或小于在亚基之间含有多肽接头但不含靶向模块的参考免疫调节多肽所实现的活性和/或结合。在一些这样的方面,增加大于1.2倍、大于1.5倍、大于2.0倍、大于3.0倍、大于4.0倍、大于5.0倍或大于10.0倍。

[0084] 在一些实施方案中,免疫调节多肽特异性地或优先地结合由与疾病或疾患相关的

细胞表达的靶分子。在一些情况下,连接区含有与靶分子结合的靶向模块。在一些情况下,连接区进一步含有至少一个将靶向模块连接至第一或第二亚基的多肽接头。

细胞因子/趋化因子

[0085] 在一些实施方案中,细胞因子或趋化因子或其亚基或功能部分是结合免疫细胞上的受体的细胞因子或趋化因子,所述免疫细胞比如T细胞、NK细胞、巨噬细胞、树突细胞或其他免疫细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是T细胞,比如CD4+或CD8+T细胞。

[0086] 在一些实施方案中,第一或第二细胞因子或趋化因子或细胞因子或趋化因子的第一或第二亚基或其功能部分独立地选自IL-12、IL-15、IL-2、IL-18、GM-CSF、IL-7、IL-21、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IL-17、IL-23、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-11、IL-13、IL-27、促红细胞生成素、G-CSF、生长激素、催乳素、抑瘤素M、白血病抑制因子、IL-22和IL-10,或其亚基或功能部分。在一些实施方案中,它是哺乳动物,例如人。所提供的免疫调节蛋白的示例性细胞因子和趋化因子的非限制性实例在表1中列出。在一些实施方案中,所述第一肽和第二肽,比如第一和第二细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或其功能部分,不含信号肽或前肽。

[0087] 在一些实施方案中,所述第一肽或第二肽,比如第一或第二细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或其功能部分独立地含有在SEQ ID NO:10、11和30-69的任一个中列出的氨基酸序列或表现出与SEQ ID NO:10、11和30-69的任一个具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的氨基酸序列。

表1: 示例性细胞因子和趋化因子序列			
名称	序列	UniProt ID	SEQ ID NO.
IL-12 α (p35), IL-35 α	RNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSS LEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	P29459	10
IL-12 β (p40)	IWELKKDVYVVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYCHKGGEVLSHSL LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRG DNKEYEYSVEQCEDSACPAA EESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSFFIRDIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSK REKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW ASVPCS	P29460	11
IL-15	GIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHI DATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDAS IHD TVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQ SFVHIVQMFINTS	P40933	30
IL-2	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISNINVIIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFCQSIISTLT	P60568	31

IL-18	MAAEPVEDNCINFMKFI DNTLYFIAEDDENLESDFGK LESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPR TIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIIISFK EMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYF LACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE	Q14116	32
GM-CSF	APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDAAEMNETV EVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGLTKLKGPLTMM ASHYKQHCPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFD CWEPVQE	P04141	33
IL-7	DCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQLLDSMKEIGSNCLNNEFN FFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL KVSEGTIILLNCTGQVGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLK EQKLNLDLFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH	P13232	34
IL-21	QQQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVET NCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPS TNAGRRQKHRLTCPSCDSEKPPKEFLERFKSLLQKMIH QHLSSRTHGSEDS	Q9HBE4	35
IFN α -1/13	CDLPETHSLDNRRITLMLLAQMSRISPSSCLMDRHDFGFPQ EEFDGNQFQKAPAI SVLHELIQQIFNLFSTKDSSAAWDED LLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNADSI LAV KKYFRITLYL TEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQE RLRRKE	P01562	36
IFN α -2	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQ EEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETL LDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQES LRSKE	P01563	37

IFN α -4	CDLPQTHSLGNRRALILLAQMGRISHFSLKDRHDFGFPE EEFDGHQFQKAQAISVLHEMIQQTFNLFSTEDSSAAWEQS LLEKFSTELYQQNDLEACVIQEVGVEETPLMNEDSILAV RKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQK RLRRKD	P05014	38
IFN α -5	LGCDLPQTHSLSNRRITLMIMAQMGRISPFSLKDRHDFGF PQEEFDGNQFQKAQAISVLHEMIQQTFNLFSTKDSSATWD ETLLDKFYTELYQQNDLEACMMQEVGVEDTPLMNVDSIL TVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSANL QERLRRKE	P01569	39
IFN α -6	SLDCDLPQTHSLGHRRTMMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFR FPQEEFDGNQFQKAEAISVLHEVIQQTFNLFSTKDSSVAW DERLLDKLYTELYQQNDLEACVMQEVWVGGTPLMNEDSI LAVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSSSRN LQERLRRKE	P05013	40
IFN α -7	CDLPQTHSLRNRRALILLAQMGRISPFSLKDRHEFRFPE EEFDGHQFQKTQAISVLHEMIQQTFNLFSTEDSSAAWEQS LLEKFSTELYQQNDLEACVIQEVGVEETPLMNEDFILAV RKYFQRITLYLMEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSFSTNLKK GLRRKD	P01567	41
IFN α -8	CDLPQTHSLGNRRALILLAQMRRISPFSLKDRHDFEFPQ EEFDKQFQKAQAISVLHEMIQQTFNLFSTKDSSAALDET LLDEFYIELDQQNDLESCVMQEVGVIESPLMYEDSILAV RKYFQRITLYLTEKKYSSCAWEVVRAEIMRSFSLSINLQK RLKSKE	P32881	42

IFN α -10	CDLPQTHSLGNRRALILLGQMGRISPFSCCLKDRHDFRIPQ EEFDGNQFQKAQAISVLHEMIQQTFNLFSTEDSSAAWEQS LLEKFSTELYQQLNDLEACVIQEVGVEETPLMNEDSILAV RKYFQRITLYLIERKYSPEAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQK RLRRKD	P01566	43
IFN α -14	CNLSQTHSLNRRRTLMLMAQMRRISPFSCCLKDRHDFEFPQ EEFDGNQFQKAQAISVLHEMMQQTFNLFSTKNSSAAWDET LLEKFYIELFQQMNDLEACVIQEVGVEETPLMNEDSILAV KKYFQRITLYLMEKKYSPEAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQK RLRRKD	P01570	44
IFN α -16	CDLPQTHSLGNRRALILLAQMGRISHFSCCLKDRYDFGFPQ EVFDGNQFQKAQAISAFHEMIQQTFNLFSTKDSSAAWDET LLDKFYIELFQQLNDLEACVTQEVGVVEIALMNEDSILAV RKYFQRITLYLMGKKYSPEAWEVVRAEIMRSFSFSTNLQK GLRRKD	P05015	45
IFN α -17	CDLPQTHSLGNRRALILLAQMGRISPFSCCLKDRHDFGLPQ EEFDGNQFQKTQAISVLHEMIQQTFNLFSTEDSSAAWEQS LLEKFSTELYQQLNNDLEACVIQEVGMEETPLMNEDSILAV RKYFQRITLYLTEKKYSPEAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQK ILRRKD	P01571	46
IFN α -21	CDLPQTHSLGNRRALILLAQMGRISPFSCCLKDRHDFGFPQ EEFDGNQFQKAQAISVLHEMIQQTFNLFSTKDSSATWEQS LLEKFSTELNQQNDLEACVIQEVGVEETPLMNVDSILAV KKYFQRITLYLTEKKYSPEAWEVVRAEIMRSFSLSKIFQE RLRRKE	P01568	47

IFN β -1	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDI PEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWN ETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSL HLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRL TGYL RN	P01574	48
IFN γ	QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEES DRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVK FFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKA IHEL IQVMAEL SPA AKTGKRKRSQMLFRGRASQ	P01579	49
IL-17A	GITIPRNP GCPNSEDKNFPRVTVMVNLNIHNRNTNTNPKRS SDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINAD GNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVG CTCVTPIVHHVA	Q16552	50
IL-17F	RKIPKVGHTFFQKPESCPPVPGGSMKLDIGIINENQRVSM SRNIESRSTSPWNYTWTWDPNRYPSEVVQAQCRNLGCINA QGKEDISMNSVPIQQETLVVRRKHQGCVSFQLEKVLVTV GCTCVTPVIHHVQ	Q96PD4	51
IL-23 (p19)	α RAVPGGSSPAWTQCQQLS QKLCTLAWSAHLVGHMDLREE GDEETTNDVPHIQCGDGDQPGLRDNSQFCLQRIHQGLIF YEKLLGSDIFTGEP SLLPDSPVQLHASLLGLS QLLQPEG HHWETQQIPSLSPSQPWQRLLLRFKILRSLQAFVAVAARV FAHGAATLSP	Q9NPF7	52
IL-3	APMTQTTPLKTSWVNC SNMIDEIITHLKQPPLPLLD FNNL NGEDQDILMENNLRPNLEAFNRAVKSLQNASAI ESILKN LLPCLPLATAAPTRHP IHIKGDWNEFRKLT FYLKTLEN AQAQQTTLSLAIF	P08700	53

IL-4	HKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKNTT EKETFRCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLI RFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIM REKYSKCSS	P05112	54
IL-5	IPTEIPTSALVKETLALLSTHRTLLIANETLRIPVPVHKN HQLCTEEIFQGITLESQTVQGGTVERL FKNLSLIKKYID GQKKKCGEERRRVNQFLDYLQEF LGVMNTEWIIES	P05113	55
IL-6	VPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDG ISALRK ETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGC FQSGFNEE TCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNR FESSEEQARAVQMSTKV LIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDM TTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM	P05231	56
IL-9	QGCPTLAGILDINFLINKMQEDPASKCHCSANVT SCLCLG IPSDNCTRPCFSERLSQMTNTTMQTRYPLIFSRV KKSVEV LKNNKCPYFSCEQPCNQTTAGNAL TFLKSLEIFQKEKMR GMRGKI	P15248	57
IL-11	PGPPPGPPRVSPDPRAELDSTVLLTR SLLADTRQLAAQLR DKFPADGDHNLDSLPTLAMSAGALGALQ LPGVLRRLRADL LSYLRHVQWLRRAGGSSLKTLEPELGTLQARLD RLLRRLQ LLMSRLALPQPPDPPAPPLAPPSSAWGGIRAAHA ILGGL HLTDWAVRGLLLLKTRL	P20809	58
IL-13	LTCLGGFASPGVPPSTALRELIEELVNITQN QKAPLCNG SMVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSAIEKTQRMLS GFC PHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLK KLFREGR FN	P35225	59

IL-27 (p28)	α	FPRPPGRPQLSLQELRREFTVSLHLARKLLSEVRGQAHRF AESHLPGVNLYLLPLGEQLPDVSLTFQAWRRLSDPERLCF ISTTLQPFHALLGGLGTQGRWTNMEMQLWAMRLDLRDLQ RHLRFQVLAAGFNLPBBBBBBBBBBBBBBBBERKGLLPGALGSA LQGPAQVSWPQLLSTYRLLHSLELVLSRAVRELLLLSKAG HSVWPLGFPTLSPQP	Q8NEV9	60
IL-27 (EBI3) IL-35 β	β ,	RKGPPAALTLPVQCRASRYPIAVDCSWTLPPAPNSTSPV SFIATYRLGMAARGHSWPCLQQTPTSTSTCTITDVQLFSMA PYVLNVTAVHPWGSSSSSFVPFITEHI IKPDPPEGVRLSPL AERQLQVQWEPPGSWPFPEIFSLKYWIRYKRQGAARFHRV GPIEATSFILRAVRPRARYVQVAAQDLTDYGELSDWSLP ATATMSLGK	Q14213	61
促红细胞生 成素		APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENIT VPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAWEVWQGLALLSEAVLRGQAL LVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAIS PPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLLKLYTGEA CRTGDR	P01588	62
G-CSF		ATPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLIVSEC ATYKLCHEPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS QLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATT IWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASH LQSFLEVSRYRVLRLAQP	P09919	63
生长激素		FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQ KYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISL LLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEG IQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNY GLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF	P01241	64

催乳素	LPICPGGAARCQVTLRDLFDRAVVLSHYIHNLSSEMFSEF DKRYTHGRGFITKAINSCHTSSLATPEDKEQAQQMNQKDF LSLIVSILRSWNEPLYHLVTEVRGMQEAPAILSKAIVEIE EQTKRLLLEGMELIVSQVHPETKENEIYPVWSGLPSLQMADE EESRLSAYYNLLHCLRRDSHKIDNYLKLKLCRIIHNNNC	P01236	65
抑瘤素M	AAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQDTSRLDPYIRIQGL DVPKLRHCRERPGAFPSEETLRGLGRRGFLQTLNATLGC VLHRLADLEQRLPKAQLDERSGLNIEDLEKLQMARPNILG LRNNIYCMAQLLDNSDTAEPTKAGRGASQPPTPTPASDAF QRKLEGCFLHGYHRFMHSGRVFSKWGESPNRSRRHSPH QALRKGVRRTTRPSRKGRMLMTRGQLPR	P13725	66
白血病抑制因子	SPLPITPVNATCAIRHPCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANAL FILYYTAQGEPPNNDKLCGPNVDFPPFHANGTEKAKL VELYRIVVYLGTSLGNI TRDQKILNPSALSLHSKLNATAD ILRGLLSNVLCRLCSKYHVGHVDTYGPDTSGKDVFQKKK LGCQLLGKYKQIIAVLAQAF	P15018	67
IL-22	APISSHCRDLKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVR LIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQP YMQEVVFPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVK KLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNACI	Q9GZX6	68
IL-10	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMK DQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQA ENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRRLRCHRFLPCENKSKA VEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN	P22301	69

[0088] 在一些实施方案中,所述第一肽或第二肽中的至少一者是细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或其功能部分。在一些实施方案中,所述第一肽或第二肽中的另一者是标签或其他肽模块。

[0089] 在一些实施方案中,所述第一肽和第二肽两者都是细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或其功能部分。在一些实施方案中,细胞因子或趋化因子是单体。在一些实施方案中,细胞因子或趋化因子是同二聚体或异二聚体,并且第一或第二细胞因子是异二聚体的同二聚体的亚基。在一些实施方案中,所述第一肽和第二肽是相同的细胞因子或趋化因子或其功能部分,或者是相同细胞因子或趋化因子的相同亚基。在一些实施方案中,所述第一肽和第二肽是不同的细胞因子或趋化因子或其功能部分,或者是相同或不同细胞因子或趋化因子的不同亚基。

[0090] 在一些实施方案中,细胞因子或趋化因子是多聚体蛋白质,比如为同二聚体或异二聚体,其中所述第一肽是细胞因子或趋化因子的第一亚基,并且所述第二肽是细胞因子或趋化因子的第二亚基。在一些方面,含有靶向模块的连接区连接第一和第二亚基,比如细胞因子或趋化因子的第一和第二亚基,所述细胞因子或趋化因子是同二聚体或异二聚体。

[0091] 在一些实施方案中,细胞因子或趋化因子是白细胞介素-12 (IL-12)。通常,IL-12是异二聚体细胞因子,其含有通过二硫桥共价连接的p35和p40亚基。在一些实施方案中,IL-12免疫调节多肽的第一亚基是p35或p40或其功能部分,并且第二亚基是p35和p40的另一者或其功能部分。在一些这样的情况下,含有靶向模块的连接区连接或联结IL-12的p35和p40亚基。在一些方面,p35亚基具有在SEQ ID NO:10中列出的序列或与SEQ ID NO:10具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列。在一些方面,p40亚基具有在SEQ ID NO:11中列出的序列或与SEQ ID NO:11具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列。

[0092] 在一些实施方案中,细胞因子或趋化因子是白细胞介素-23 (IL-23)。通常,IL-23是含有IL-12p40和IL-23 α 亚基的异二聚体细胞因子。在一些实施方案中,IL-23免疫调节多肽的第一亚基是IL-12p40或IL-23 α 或其功能部分,并且第二亚基是IL-12p40和IL-23 α 的另一者或其功能部分。在一些这样的情况下,含有靶向模块的连接区连接或联结IL-12p40和IL-23的IL-23 α 亚基。在一些方面,IL-23 α 亚基具有在SEQ ID NO:52中列出的序列或与SEQ ID NO:52具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列。在一些方面,p40亚基具有在SEQ ID NO:11中列出的序列或与SEQ ID NO:11具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列。

[0093] 在一些实施方案中,细胞因子或趋化因子是白细胞介素-27 (IL-27)。通常,IL-27是含有IL-27 α (p28) 和IL-27 β (EBI3) 亚基的异二聚体细胞因子。在一些实施方案中,IL-27免疫调节多肽的第一亚基是p28或EBI3或其功能部分,并且第二亚基是p28和EBI3的另一者或其功能部分。在一些这样的情况下,含有靶向模块的连接区连接或联结IL-27的p28和EBI3亚基。在一些方面,p28亚基具有在SEQ ID NO:60中列出的序列或与SEQ ID NO:60具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列。在一些方面,EBI3亚基具有在SEQ ID NO:61中列出的序列或与SEQ ID NO:61具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列。

[0094] 在一些实施方案中,细胞因子或趋化因子是白细胞介素-35 (IL-35)。通常,IL-35是异二聚体细胞因子,其含有通过二硫桥共价连接的IL-12p35和IL-27 β (EBI 3) 亚基。在一些实施方案中,IL-35免疫调节多肽的第一亚基是p35或EBI3或其功能部分,并且第二亚基是p35和EBI 3的另一者或其功能部分。在一些这样的情况下,含有靶向模块的连接区连接或联结IL-35的p35和EBI3亚基。在一些方面,p35亚基具有在SEQ ID NO:10中列出的序列或与SEQ ID NO:10具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列。在一些方面,EBI3亚基具有在SEQ ID NO:61中列出的序列或与SEQ ID NO:61具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列。

[0095] 在一些实施方案中,细胞因子或趋化因子是或包含白细胞介素-15(IL-15)。通常,IL-15是细胞因子并且可以是可溶的或膜结合的。在一些实施方案中,IL-15是单体,而在其他实施方案中,IL-15是异二聚体。在一些实施方案中,IL-15与IL-15R α 相关。在一些实施方案中,IL-15免疫调节多肽的第一亚基是IL-15或IL-15R α 或其功能部分,并且第二亚基是IL-15或IL-15R α 的另一者或其功能部分。在一些这样的情况下,含有靶向模块的连接区连接或联结IL-15或IL-15R α 肽。

连接区

[0096] 在一些实施方案中,免疫调节多肽含有连接所述第一肽和第二肽的连接区,所述第一肽和第二肽比如第一和第二细胞因子或趋化因子或细胞因子或趋化因子的第一和第二亚基或其功能部分。在一些方面,连接区含有与靶分子结合的靶向模块,比如靶向肽。在一些实施方案中,靶向模块直接连接至所述第一肽和第二肽的至少一者,并且在一些情况下,连接至所述第一肽和第二肽两者。在一些实施方案中,靶向模块间接连接至所述第一肽和第二肽的至少一者,并且在一些情况下,连接至所述第一肽和第二肽两者,比如通过接头间接连接。在一些情况下,连接区进一步含有一个或多个将靶向模块连接至所述第一肽和第二肽的一者或两者的多肽接头。在一些方面,靶向模块的侧翼为连接所述第一肽和第二肽的两个多肽接头。

[0097] 在一些方面,免疫调节蛋白包含:第一肽、靶向模块和第二肽。在一些方面,免疫调节蛋白包含:第一肽、接头、靶向模块和第二肽。在一些方面,免疫调节蛋白包含:第一肽、靶向模块、接头和第二肽。在一些方面,免疫调节蛋白包含:第一肽、接头、靶向模块、接头和第二肽。在任何这样的实施方案中,所述第一肽和第二肽的位置可以是反向的。

[0098] 在一些实施方案中,连接区不超过最大长度。在一些情况下,连接区的最大长度为或约为不超过400、300、250、200、150、100、50、40、30、25、20、15、10个或5个氨基酸。在一些实施方案中,连接区的长度超过400个氨基酸。在一些方面,连接区(比如包括靶向模块和任选的一个或两个接头)的长度在或在约5至400个氨基酸之间,比如在或在约10至400个氨基酸、10至300个氨基酸、10至200个氨基酸、10至100个氨基酸、10至50个氨基酸、10至30个氨基酸、10至20个氨基酸、20至400个氨基酸、20至300个氨基酸、20至200个氨基酸、20至100个氨基酸、20至50个氨基酸、20至30个氨基酸、30至400个氨基酸、30至300个氨基酸、30至200个氨基酸、30至100个氨基酸、30至50个氨基酸、50至400个氨基酸、50至300个氨基酸、50至200个氨基酸、50至100个氨基酸、100至400个氨基酸、100至300个氨基酸、100至200个氨基酸、200至400个氨基酸或200至300个氨基酸之间。在一些实施方案中,连接区的长度在或在约5至50个氨基酸之间,比如5至40个氨基酸、5至30个氨基酸、5至20个氨基酸、5至10个氨基酸、10至50个氨基酸、10至40个氨基酸、10至30个氨基酸、10至20个氨基酸、20至50个氨基酸、20至40个氨基酸、20至30个氨基酸、30至50个氨基酸、30至40个氨基酸或40至50个氨基酸。

靶向模块

[0099] 在一些方面,连接区含有靶向模块,比如与细胞表面上的靶分子结合的靶向肽。在一些情况下,连接区含有两个或更多个靶向模块。在一些这样的情况下,两个或更多个靶向模块可以相同或不同。在一些情况下,靶向模块是或衍生自人蛋白。在一些实施方案中,靶

向模块是结合肽。在一些实施方案中,靶向模块是抗体或其抗原结合片段。

[0100] 在一些实施方案中,靶向模块与靶分子结合,所述靶分子是蛋白质、糖蛋白或脂质。在一些实施方案中,靶分子与疾病或疾患相关。在一些方面,疾病或疾患是传染性疾病或疾患、自身免疫性疾病、炎性疾病或肿瘤或癌症。在一些情况下,靶分子与肿瘤相关或存在于肿瘤上。在一些方面,靶分子是肿瘤抗原。在一些实施方案中,靶分子在细胞比如肿瘤细胞的表面上表达。

[0101] 在一些实施方案中,靶分子选自:肝细胞生长因子(HGF)、肝素、VEGF、VEGF-A、VEGFR2、VEGFR3、HER2、PD-1、肌腱蛋白C、CTLA-4、LAG3、PD-L1、EGFR、EPCAM、RANKL、NG2蛋白聚糖、CD20、CD52、CD19、CD3、CD30、IL-6、CD38、SLAMF7、GD2、CD13、CD274、CD279、CD40L和CD47。

[0102] 在一些方面,靶向模块具有不超过400、300、250、200、150、100、50、40、30、25、20、15、10个或5个氨基酸的长度。在一些方面,靶向模块的长度在或在约5至400个氨基酸之间,比如在或在约10至400个氨基酸、10至300个氨基酸、10至200个氨基酸、10至100个氨基酸、10至50个氨基酸、10至30个氨基酸、10至20个氨基酸、20至400个氨基酸、20至300个氨基酸、20至200个氨基酸、20至100个氨基酸、20至50个氨基酸、20至30个氨基酸、30至400个氨基酸、30至300个氨基酸、30至200个氨基酸、30至100个氨基酸、30至50个氨基酸、50至400个氨基酸、50至300个氨基酸、50至200个氨基酸、50至100个氨基酸、100至400个氨基酸、100至300个氨基酸、100至200个氨基酸、200至400个氨基酸或200至300个氨基酸之间。在一些实施方案中,连接区的长度在或在约5至50个氨基酸之间,比如5至40个氨基酸、5至30个氨基酸、5至20个氨基酸、5至10个氨基酸、10至50个氨基酸、10至40个氨基酸、10至30个氨基酸、10至20个氨基酸、20至50个氨基酸、20至40个氨基酸、20至30个氨基酸、30至50个氨基酸、30至40个氨基酸或40至50个氨基酸。

[0103] 在一些实施方案中,靶向模块以至少一定的亲和力结合靶分子,所述亲和力如通过许多已知方法中的任一种所测量。在一些实施方案中,亲和力以解离常数(K_D)或结合常数(K_A)表示。在一些实施方案中,亲和力以 EC_{50} 表示。在一些实施方案中,靶向模块以等于或大于 $10^5 M^{-1}$ 的亲和力或 K_A (即,具有1/M单位的特定结合相互作用的平衡结合常数;等于这个结合反应的结合速率 $[k_{on}$ 或 $k_a]$ 与解离速率 $[k_{off}$ 或 $k_d]$ 的比值,假定双分子相互作用)与靶分子结合(比如特异性地结合)。

[0104] 在一些实施方案中,靶向模块对靶分子表现出具有等于或小于 $10^{-5} M$ 的 K_D (即,具有M单位的特定结合相互作用的平衡解离常数;等于这个结合反应的解离速率 $[k_{off}$ 或 $k_d]$ 与结合速率 $[k_{on}$ 或 $k_a]$ 的比值,假定双分子相互作用)的结合亲和力。例如,平衡解离常数 K_D 的范围为从或从约 $10^{-5} M$ 至或至约 $10^{-15} M$,比如从或从约 $10^{-6} M$ 至或至约 $10^{-12} M$,从或从约 $10^{-7} M$ 至或至约 $10^{-11} M$,从或从约 $10^{-6} M$ 至或至约 $10^{-8} M$,或从或从约 $10^{-7} M$ 至或至约 $10^{-8} M$ 。在一些实施方案的中,靶向模块与靶分子的 K_D 等于或约为(或小于或小于约)100nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1nM,比如在等于或约1nM和等于或约15nM之间,例如,在等于或约5nM和等于或约10nM之间。在一些实施方案中,靶向模块与靶分子的 K_D 等于或约为(或小于或小于约)1nM、100皮摩尔(pM)、90pM、80pM、70pM、60pM、50pM、40pM、30pM、25pM、20pM、15pM、10pM或1pM,比如在等于或约10pM和等于或约100pM之间,例如在等于或约25pM和等于或约75pM之间。

[0105] 可以使用本领域已知的任何测定方法确定结合速率(结合速率常数; k_{on} 或 k_a ;单位为 $1/M \cdot sec$ 或 $M^{-1}sec^{-1}$)和解离速率(解离速率常数; k_{off} 或 k_d ;单位为 $1/s$ 或 sec^{-1}),例如,表面等离子体共振(SPR,例如,使用Biacore仪器)。在一些实施方案中,靶向模块以比细胞因子或趋化因子结合其受体更高的亲和力结合靶分子。

[0106] 在一些实施方案中,靶向模块表现出约 $0.5 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 或更低、约 $1 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 或更低、约 $2 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 或更低、约 $3 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 或更低、约 $4 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 或更低、约 $5 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 或更低、约 $1 \times 10^{-3}sec^{-1}$ 或更低、约 $1.5 \times 10^{-3}sec^{-1}$ 或更低、约 $2 \times 10^{-3}sec^{-1}$ 或更低、约 $3 \times 10^{-3}sec^{-1}$ 或更低、约 $4 \times 10^{-3}sec^{-1}$ 或更低、约 $5 \times 10^{-3}sec^{-1}$ 或更低、约 1×10^{-2} 秒或更低、或约 $5 \times 10^{-1}sec^{-1}$ 或更低的结合靶分子的 k_{off} 速率。

[0107] 在一些实施方案中,靶向模块是或含有肽结合基序。在一些方面,靶向模块是或源自肝细胞生长因子(HGF)结合肽(HGFBP)、肝素结合肽(HBP)(例如,BMP4或纤连蛋白)、VEGF结合肽、VEGF-A结合肽、VEGFR(例如VEGFR2或VEGFR3)结合肽、EPCAM结合肽、HER2结合肽、PD-1结合肽、肌腱蛋白C结合肽、CTLA-4结合肽、LAG3结合肽、PD-L1结合肽、EGFR结合肽、RANKL结合肽、CD20结合肽、CD52结合肽、CD19结合肽、CD3结合肽、CD30结合肽、IL-6结合肽、CD38结合肽、SLAMF7结合肽、GD2结合肽、CD274结合肽、CD279结合肽、CD40L结合肽、CD47结合肽、CD13结合肽、NGR基序、RGD基序或NG2蛋白聚糖结合肽。在一些情况下,靶向模块是或含有HGF结合肽(HGFBP)、HBP或EGFR结合肽(EGFRBP)。在一些情况下,肝素结合肽(HBP)衍生自纤连蛋白或BMP4,和/或是牛来源的。这样的结合肽的实例是已知的,参见例如Tam等人(2009) *Journal of Molecular Biology*, 385:79-90; Ahsan等人(2014) *Neoplasia*, 16:105-14; Binetruy-Tournaire等人(2000) *EMBO J.*, 19:1525-1533; Vicari等人(2011) *J. Biol. Chem.*, 286:13612-25; Andersson等人(2004) *FEBS J.*, 271:1219-1226; Abcam目录号ab152112(Cambridge, MA); Chen等人(2015) *BioMed Research International*, 文章编号237969; 美国专利No. 8,188,220。靶向模块也可以是在结合测定中鉴定的肽,其为结合选定靶分子的肽。

[0108] 表2提供了可以是靶向模块的肽结合基序的非限制性实例。在一些实施方案中,靶向模块是或包含在SEQ ID NO:13-16和27-28的任一个中列出的氨基酸序列或表现出与SEQ ID NO:13-16和27-28的任一个具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的氨基酸序列。

表2: 肽结合靶向模块		
名称	序列	SEQ ID NO.
肝素结合肽, BMP4	RKKNPNCRRH	13
肝素结合肽, 纤连蛋白	KNNQKSEPLIGRKKT	14
HGF结合肽	VWNWVCFRDVGCDWVL	15
EGFR结合肽 (EGFRBP)	SVDNPHVC	16
EGFR结合肽	YHWYGYTPQNVI	10 8
EGFR结合肽	YRWYGYTPQNVI	10 9
VEGF结合肽	ATWLPPR	26
VEGFR结合肽	ITMQCGIHQGQHPKIRMICEMSF	27
VEGFR结合肽	ITMQIMRIKPHQGQHIGEMSF	11 8
VEGFR3结合肽	PCAIWF	11 0

VEGFR3结合肽	WVCSGG	11 1
牛来源的肝素结合肽	WQPPRARI	28
NGR基序 (例如, CD13结合肽; 血管生成靶向肽)	NGRNGRNGR	11 2
RGD基序	RGDRGDRGD	11 3
NG2蛋白聚糖结合肽	TAASGVRSMH	11 4
NG2蛋白聚糖结合肽	LTLRWVGLMS	11 5
HER2结合肽	NKFNKGMRYWGALGGNGKRGIRGY M	11 6
EPCAM结合肽	YEVHTYYLD	11 7

[0109] 在一些方面, 靶向模块是或包含抗体或抗体片段。其中抗体为人抗体, 包括已知结合如所述的靶向分子的任何抗体。

[0110] 本文中的术语“抗体”以最广义的方式加以使用, 包括多克隆和单克隆抗体, 包括完整抗体和功能性(抗原结合)抗体片段, 包括片段抗原结合(Fab)片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、能够特异性结合抗原的可变重链(V_H)区、单链抗体片段, 包括单链可变片段(scFv)和单结构域抗体(例如sdAb、sdFv、纳米抗体)片段。该术语涵盖基因工程和其他修饰形式的免疫球蛋白, 比如胞内抗体、肽体、嵌合抗体、全人抗体、人源化抗体和异源偶联抗体、多特异性(例如双特异性)抗体、双抗体、三抗体和四抗体、串联di-scFv、串联tri-scFv。除非另外说明, 否则术语“抗体”应理解为涵盖其功能性抗体片段。该术语还涵盖完整或全长抗体, 包括任何类型或亚型的抗体, 包括IgG及其亚型、IgM、IgE、IgA和IgD。

[0111] 在一些实施方案中, 抗体的重链和轻链可以是全长的或者可以是抗原结合部分(Fab、F(ab')₂、Fv或单链Fv片段(scFv))。在其他实施方案中, 抗体重链恒定区选自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE, 特别是选自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4, 更特别地为IgG1(例如, 人IgG1)。在另一个实施方案中, 抗体轻链恒定区选自例如κ或λ, 特别是κ。

[0112] 其中提供的抗体为抗体片段。“抗体片段”指的是除了完整抗体之外的分子, 其包

含与完整抗体所结合的抗原结合的所述完整抗体的一部分。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；双抗体；线性抗体；可变重链(V_H)区、单链抗体分子如scFv和单结构域V_H单一抗体；和由抗体片段形成的多特异性抗体。在特定的实施方案中，抗体是包含可变重链区和/或可变轻链区的单链抗体片段，比如scFv。

[0113] 当用于提及抗体比如抗体片段时，术语“可变区”或“可变结构域”是指涉及抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为V_H和V_L)通常具有相似的结构，每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个CDR。(参见例如Kindt等人，Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., 第91页(2007)。单个V_H或V_L结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外，可以使用来自结合抗原的抗体的V_H或V_L结构域来分离结合特定抗原的抗体，以分别筛选互补的V_L或V_H结构域的文库。参见，例如，Portolano等人，J. Immunol. 150:880-887(1993)；Clarkson等人，Nature 352:624-628(1991)。

[0114] 单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中，单结构域抗体是人单结构域抗体。

[0115] 可以通过各种技术制造抗体片段，包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞产生。在一些实施方案中，抗体是重组产生的片段，比如包含非天然存在的排列的片段，比如具有通过合成接头(例如肽接头)连接的两个或更多个抗体区或链的片段，和/或不能通过酶消化天然存在的完整抗体来产生的片段。在一些方面，抗体片段是scFv。

[0116] 在一些这样的方面，靶向模块是或包含作为单链片段的抗体片段。在一些情况下，抗体片段包含通过柔性接头连接的抗体可变区，所述柔性接头比如在SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23中列出的接头。在一些实例中，抗体片段是或含有scFv。因此，在一些情况下，靶向模块含有可变重链(V_H)和可变轻链(V_L)。在一些实施方案中，靶向模块是或含有V_H链，但不含V_L链。在一些这样的方面，靶向模块是或含有高亲和力，例如超高亲和力的V_H链。在一些实施方案中，靶向模块是或含有抗体的可变重链(V_H)和/或可变轻链(V_L)。

[0117] 在一些实施方案中，抗体是抗肝细胞生长因子(HGF)抗体、抗肝素抗体和抗VEGF抗体，以及抗VEGF-A抗体、抗VEGFR抗体、抗VEGFR2抗体、抗HER2抗体、抗PD-1抗体、抗肌腱蛋白C抗体、抗CTLA-4、抗LAG3抗体、抗PD-L1抗体、抗EGFR抗体、抗EPCAM抗体、抗RANKL抗体、抗CD20抗体、抗CD52抗体、抗CD19抗体、抗CD3抗体、抗CD30抗体、抗IL-6抗体、抗CD38抗体、抗SLAMF7抗体、抗GD2抗体、抗CD274抗体、抗CD279抗体、抗CD40L抗体和抗CD47抗体或其抗原结合片段。

[0118] 在一些这样的情况下，抗体是或衍生自曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、雷莫芦单抗(ramucirumab)、阿特珠单抗、贝伐珠单抗、帕尼单抗、西妥昔单抗、耐昔妥珠单抗、地诺单抗、纳武单抗、派姆单抗、利妥昔单抗、奥法木单抗、奥比妥珠单抗、阿仑单抗、博纳吐单抗、本妥昔单抗(brentuximab vedotin)、司妥昔单抗(siltuximab)、伊匹单抗、达雷木单抗、埃罗妥珠单抗、达妥昔单抗(dinutuximab)或卡妥索单抗(catumaxomab)的V_H和/或V_L链或其抗原结合片段。

[0119] 在一些情况下，靶向模块是或含有抗EPCAM抗体。在一些实施方案中，靶向模块具有在SEQ ID NO:17中列出的序列或与这个序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性并且与靶分子

结合的序列。

多肽接头

[0120] 在一些实施方案中,连接区进一步含有至少一个多肽接头,其将靶向模块连接至所述第一或第二肽,比如细胞因子或趋化因子的第一或第二亚基。在一些情况下,连接区含有两个多肽接头。在一些这样的情况下,多肽接头之一将所述第一肽(比如细胞因子或趋化因子的第一亚基)连接至靶向模块,而另一个多肽接头将所述第二肽(比如细胞因子或趋化因子的第二亚基)连接至靶向模块。因此,在一些情况下,靶向模块被包含在第一和第二多肽接头之间,它们一起形成连接区。

[0121] 在一些实施方案中,多肽接头含有约2至约20个氨基酸,比如约5至约15个氨基酸,比如15或约15个氨基酸。在一些情况下,多肽接头具有序列GGGS(n),其中n大于或等于1。例如,在一些情况下,当n=1时,多肽接头具有在SEQ ID NO:7中列出的序列。在一些情况下,当n=2时,多肽接头具有在SEQ ID NO:8中列出的序列。在一些方面,当n=3时,多肽接头具有在SEQ ID NO:9中列出的序列。

示例性免疫调节多肽

[0122] 在一些方面,免疫调节多肽是或含有IL-12多肽。在一些实施方案中,免疫调节多肽含有IL-12的p35亚基、IL-12的p40亚基、和连接p35和p40亚基的连接区。在一些这样的实施方案中,连接区含有与靶分子结合的靶向模块。

[0123] 在一些情况下,连接区进一步含有至少一个将靶向模块连接至p35亚基或p40亚基的多肽接头。例如,在一些方面,p40亚基连接至第一多肽接头,所述第一多肽接头也附接至靶向模块的第一端,并且靶向模块的第二端连接至也连接至第二多肽接头,所述第二多肽接头也附接至p35亚基的一端。

[0124] 在一些实施方案中,与不包含连接区的重组IL-12相比,IL-12免疫调节多肽表现出增加的通过IL-12R刺激的活性。在一些方面,相比于它与不表达靶分子的细胞的结合,免疫调节多肽表现出增加的与表达靶分子的靶细胞的结合。在一些实施方案中,与不含连接区的重组IL-12相比,IL-12免疫调节多肽或含有这种肽的细胞表现出增加或降低的通过IL-12R刺激的活性。

[0125] 在一些实施方案中,IL-12免疫调节多肽表现出对IL-12R的增加了的结合亲和力。在一些实施方案中,IL-12免疫调节多肽表现出对IL-12R的降低的结合亲和力。在一些实例中,IL-12免疫调节多肽和IL-12R的平衡解离常数 K_D 为从或从约 $10^{-5}M$ 至或至约 $10^{-15}M$,比如从或从约 $10^{-6}M$ 至或至约 $10^{-12}M$,从或从约 $10^{-7}M$ 至或至约 $10^{-11}M$,从或从约 $10^{-6}M$ 至或至约 $10^{-8}M$,或从或从约 $10^{-7}M$ 至或至约 $10^{-8}M$ 。在一些实施方案的中,IL-12免疫调节多肽和IL-12R的 K_D 等于或约为(或小于或小于约)100nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1nM,比如在等于或约1nM和等于或约15nM之间,例如,在等于或约5nM和等于或约10nM之间。在一些实施方案中,IL-12免疫调节多肽和IL-12R的 K_D 等于或约为(或小于或小于约)1nM、100皮摩尔(pM)、90pM、80pM、70pM、60pM、50pM、40pM、30pM、25pM、20pM、15pM、10pM或1pM,比如在等于或约10pM和等于或约100pM之间,例如在等于或约25pM和等于或约75pM之间。

[0126] 在一些方面,增加的活性和/或结合大于在亚基之间含有多肽接头但不含靶向模块的参考免疫调节多肽所实现的活性和/或结合。在一些这样的方面,增加大于1.2倍、大于

1.5倍、大于2.0倍、大于3.0倍、大于4.0倍、大于5.0倍或大于10.0倍。

[0127] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白含有:p35亚基,其具有在SEQ ID NO:10中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:10具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列;连接区,其包含在SEQ ID NO:13中列出的靶向模块(HBP BMP4);和p40亚基,其具有在SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:11具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列。组分可以处于指定的顺序或相反的顺序。在一些实施方案中,连接区含有靶向模块,所述靶向模块在任一侧上侧接各自独立地在SEQ ID NO:29中列出(如在SEQ ID NO:7中列出)的接头。在一些实施方案中,免疫调节蛋白包含在SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列。

[0128] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白含有:p35亚基,其具有在SEQ ID NO:10中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:10具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列;连接区,其包含在SEQ ID NO:14中列出的靶向模块(HBP FBN);和p40亚基,其具有在SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:11具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列。组分可以处于指定的顺序或相反的顺序。在一些实施方案中,连接区含有靶向模块,所述靶向模块在任一侧上侧接各自独立地在SEQ ID NO:29中列出(如在SEQ ID NO:7中列出)的接头。在一些实施方案中,免疫调节蛋白包含在SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:3具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列。

[0129] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白含有:p35亚基,其具有在SEQ ID NO:10中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:10具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列;连接区,其包含在SEQ ID NO:15中列出的靶向模块(HGF结合肽);和p40亚基,其具有在SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:11具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列。组分可以处于指定的顺序或相反的顺序。在一些实施方案中,连接区含有靶向模块,所述靶向模块在任一侧上侧接各自独立地在SEQ ID NO:29中列出(如在SEQ ID NO:7中列出)的接头。在一些实施方案中,免疫调节蛋白包含在SEQ ID NO:4中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列。

[0130] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白含有:p35亚基,其具有在SEQ ID NO:10中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:10具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列;连接区,其包含在SEQ ID NO:16中列出的靶向模块(EGFRBP);和p40亚基,其具有在SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:11具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列。组分可以处于指定的顺序或相反的顺序。在一些实施方案中,连接区含有靶向模块,所述靶向模块在任一侧上侧接各自独立地在SEQ ID NO:29中列出(如在SEQ ID NO:7中列出)的接头。在一些实施方案中,免疫调节蛋白包含在

SEQ ID NO:5中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列。

[0131] 在一些实施方案中,免疫调节蛋白含有:p35亚基,其具有在SEQ ID NO:10中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:10具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列;连接区,其包含靶向模块,所述靶向模块是包含在SEQ ID NO:25中列出的VH链和/或在SEQ ID NO:24中列出的VL链的抗EPCAM抗体,比如在SEQ ID NO:17中列出的scFv或表现出与SEQ ID NO:17、24和25任一个的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列;和p40亚基,其具有在SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:11具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列。组分可以处于指定的顺序或相反的顺序。在一些实施方案中,连接区含有靶向模块,所述靶向模块在任一侧上侧接各自独立地在SEQ ID NO:29中列出(如在SEQ ID NO:7中列出)的接头。在一些实施方案中,免疫调节蛋白包含在SEQ ID NO:6中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列。

重组受体

[0132] 在一些实施方案中,将免疫调节多肽与表达重组受体的工程化细胞联合使用和/或使其在表达重组受体的工程化细胞中表达或所述免疫调节多肽从所述工程化细胞表达。

[0133] 因此,提供了工程化受体或重组受体和表达这些受体的细胞。在一些实施方案中,工程化受体或重组受体包括嵌合受体,包括含有配体结合结构域或其结合片段的嵌合受体,比如功能性非TCR抗原受体,比如嵌合抗原受体(CAR),并且还包括T细胞受体(TCR),比如转基因TCR及其组分。嵌合受体(比如CAR)通常包括与一种或多种细胞内信号转导组分连接(在一些方面,经由接头和/或跨膜结构域)的细胞外抗原(或配体)结合结构域。

[0134] 在特定的实施方案中,重组受体(比如嵌合受体)含有细胞内信号转导结构域,所述细胞内信号转导结构域包括活化性胞质信号转导结构域(也可互换地称为细胞内信号转导区),比如能够在T细胞中诱导初级活化信号的活化性胞质(细胞内)结构域,比如T细胞受体(TCR)组分的胞质信号转导结构域(例如CD3-zeta(CD3 ζ)链的 ζ 链的胞质信号转导结构域或其功能变体或信号转导部分),和/或所述细胞内信号转导结构域包含免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)。

[0135] 在一些实施方案中,嵌合受体进一步含有与配体(例如抗原)抗原特异性地结合的细胞外配体结合结构域。在一些实施方案中,嵌合受体是CAR,其含有与抗原特异性地结合的细胞外抗原识别结构域。在一些实施方案中,配体(比如抗原)是在细胞表面上表达的蛋白质。在一些实施方案中,CAR是TCR样CAR,并且抗原是加工的肽抗原,比如细胞内蛋白的肽抗原,其与TCR一样,在主要组织相容性复合体(MHC)分子的背景下在细胞表面上被识别。

[0136] 示例性重组受体(包括CAR和重组TCR)、以及用于将受体工程化和引入细胞中的方法包括例如在以下文献中描述的那些:国际专利申请公开号W0200014257、W02013126726、W02012/129514、W02014031687、W02013/166321、W02013/071154、W02013/123061,美国专利申请公开号US2002131960、US2013287748、US20130149337,美国专利号6,451,995、7,446,190、8,252,592、8,339,645、8,398,282、7,446,179、6,410,319、7,070,995、7,265,209、7,

354,762、7,446,191、8,324,353和8,479,118,和欧洲专利申请号EP2537416,和/或 Sadelain等人,Cancer Discov.2013April;3(4):388-398;Davila等人(2013)PLoS ONE8(4):e61338;Turtle等人,Curr.Opin.Immunol.,2012October;24(5):633-39;Wu等人,Cancer,2012March 18(2):160-75。在一些实施方案中,基因工程抗原受体包括如美国专利号7,446,190中描述的CAR、和国际专利申请公开号WO/2014055668A1中描述的那些。在一些实施方案中,对于提供的嵌合受体,可以采用用于构建和引入或转移到免疫细胞中的相似方法。

[0137] 在一些实施方案中,重组受体,比如嵌合受体(例如CAR),包括与抗原(或配体)结合(例如特异性地结合)的配体结合结构域。其中嵌合受体所靶向的抗原是在经由过继细胞疗法靶向的疾病、病症或细胞类型的背景下表达的抗原。其中疾病和病症是增殖性、肿瘤性以及恶性疾病和疾患,包括癌症和肿瘤,包括血液癌症、免疫系统的癌症,比如淋巴瘤、白血病和/或骨髓瘤,比如B、T和髓性白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

[0138] 在一些实施方案中,抗原(或配体)是多肽。在一些实施方案中,它是碳水化合物或其他分子。在一些实施方案中,与正常或非靶向细胞或组织相比,抗原(或配体)在疾病或病症的细胞(例如肿瘤或病原细胞)上选择性地表达或过表达。在其他实施方案中,抗原在正常细胞上表达和/或在工程化细胞上表达。

[0139] 在一些实施方案中,抗原(或配体)是肿瘤抗原或癌症标志物。

[0140] 在某些实施方案中,抗原是 $\alpha v\beta 6$ 整合素($\alpha v\beta 6$ 整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9,也称为CAIX或G250)、癌-睾丸抗原、癌/睾丸抗原1B(CTAG,也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、C-C基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、表皮生长因子蛋白(EGFR)、截短的表皮生长因子蛋白(tEGFR)、III型表皮生长因子受体突变(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2(EPha2)、雌激素受体、Fc受体样5(FCRL5;也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AChR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体 α 、胎儿乙酰胆碱受体、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erbB2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人类高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1(HLA-AI)、人白细胞抗原A2(HLA-A2)、IL-22受体 α (IL-22Ra)、IL-13受体 $\alpha 2$ (IL-13Ra2)、激酶插入结构域受体(kdr)、 κ 轻链、L1细胞粘附分子(L1CAM)、L1-CAM的CE7表位、含8个家族成员A的富含亮氨酸重复序列(LRRC8A)、Lewis Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、间皮素、c-Met、鼠巨细胞病毒(CMV)、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、自然杀伤组2成员D(NKG2D)配体、黑色素A(MART-1)、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、生存素、滋养层细胞糖蛋白(TPBG也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、维尔姆斯瘤11(WT-1)、病原体特异性抗原、或通用标签相关抗原、和/或生物素化分子,和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。在一些实施方案中,受体所靶向的抗原包括与B细胞恶性肿瘤相关的抗原,比如许多已知的B细胞标志物的任何一种。在一些实施方案中,受体所靶向的抗原是CD20、

CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig κ 、Ig λ 、CD79a、CD79b或CD30。

[0141] 在一些实施方案中,抗原是病原体特异性抗原。在一些实施方案中,抗原是病毒抗原(例如来自HIV、HCV、HBV等的病毒抗原)、细菌抗原和/或寄生虫抗原。

配体结合结构域

[0142] 在一些实施方案中,重组受体例如抗原受体含有配体结合结构域,如抗原结合结构域。在一些实施方案中,重组受体是嵌合抗原受体(CAR)。

[0143] 在一些实施方案中,CAR构建为对特定抗原(或标志物或配体)具有特异性,比如在过继治疗所靶向的特定细胞类型中表达的抗原,例如,旨在诱导抑制(dampening)反应的癌症标志物和/或抗原,比如在正常或非病变细胞类型上表达的抗原。因此,CAR通常在其细胞外部分包括一个或多个抗原结合分子,比如一个或多个抗原结合片段、结构域或部分,或一个或多个抗体可变结构域和/或抗体分子。在一些实施方案中,CAR包括抗体分子的一个或多个抗原结合部分,比如衍生自单克隆抗体(mAb)的可变重链(V_H)和可变轻链(V_L)的单链抗体片段(scFv)。

[0144] 本文中的术语“抗体”以最广义的方式加以使用,包括多克隆和单克隆抗体,包括完整抗体和功能性(抗原结合)抗体片段,包括片段抗原结合(Fab)片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、能够特异性结合抗原的可变重链(V_H)区、单链抗体片段,包括单链可变片段(scFv)和单结构域抗体(例如sdAb、sdFv、纳米抗体)片段。该术语涵盖基因工程和/或其他修饰形式的免疫球蛋白,比如胞内抗体、肽体、嵌合抗体、全人抗体、人源化抗体和异源偶联抗体、多特异性(例如双特异性)抗体、双抗体、三抗体和四抗体、串联di-scFv、串联tri-scFv。除非另外说明,否则术语“抗体”应理解为涵盖其功能性抗体片段。该术语还涵盖完整或全长抗体,包括任何类型或亚型的抗体,包括IgG及其亚型、IgM、IgE、IgA和IgD。

[0145] 在一些实施方案中,抗原结合蛋白、抗体及其抗原结合片段特异性识别全长抗体的抗原。在一些实施方案中,抗体的重链和轻链可以是全长的或者可以是抗原结合部分(Fab、F(ab')₂、Fv或单链Fv片段(scFv))。在其他实施方案中,抗体重链恒定区选自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE,特别是选自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,更特别地为IgG1(例如,人IgG1)。在另一个实施方案中,抗体轻链恒定区选自例如 κ 或 λ ,特别是 κ 。

[0146] 其中提供的抗体为抗体片段。“抗体片段”指的是除了完整抗体之外的分子,其包含与完整抗体所结合的抗原结合的所述完整抗体的一部分。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;可变重链(V_H)区、单链抗体分子如scFv和单结构域V_H单一抗体;和由抗体片段形成的多特异性抗体。在特定的实施方案中,抗体是包含可变重链区和/或可变轻链区的单链抗体片段,比如scFv。

[0147] 术语“可变区”或“可变结构域”是指涉及抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为V_H和V_L)通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个CDR。(参见例如Kindt等人,Kuby Immunology,6th ed.,W.H.Freeman和Co.,第91页(2007)。单个V_H或V_L结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用来自结合抗原的抗体的V_H或V_L结构域来分离结合特定抗原的抗体,以分别筛选互补的V_L或V_H结构域的文库。参见,例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);

Clarkson等人, Nature 352:624-628 (1991)。

[0148] 单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体。在一些实施方案中,CAR包含特异性结合抗原的抗体重链结构域,所述抗原比如癌症标志物或被靶向的细胞(比如肿瘤细胞或癌细胞)或疾病的细胞表面抗原,比如本文所述或本领域已知的任何靶抗原。

[0149] 可以通过各种技术制造抗体片段,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞产生。在一些实施方案中,抗体是重组产生的片段,比如包含非天然存在的排列的片段,比如具有通过合成接头(例如肽接头)连接的两个或更多个抗体区或链的片段,和/或不能通过酶消化天然存在的完整抗体来产生的片段。在一些实施方案中,抗体片段是scFv。

[0150] “人源化”抗体是其中所有或基本上所有CDR氨基酸残基衍生自非人CDR并且所有或基本上所有FR氨基酸残基衍生自人FR的抗体。人源化抗体任选地可以包括衍生自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。非人抗体的“人源化形式”是指经历了人源化的非人抗体的变体,通常为了降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。在一些实施方案中,用来自非人抗体(例如,自其衍生CDR残基的抗体)的相应残基取代人源化抗体中的一些FR残基,例如,用于恢复或提高抗体特异性或亲和力。

[0151] 在一些实施方案中,CAR含有特异性识别抗原的抗体或抗原结合片段(例如scFv),所述抗原比如在细胞表面上表达的完整抗原。

[0152] 在一些实施方案中,CAR含有特异性识别细胞内抗原的TCR样抗体,比如抗体或抗原结合片段(例如scFv),所述细胞内抗原比如肿瘤相关抗原,在细胞表面上呈现为MHC-肽复合物。在一些实施方案中,识别MHC-肽复合物的抗体或其抗原结合部分可以作为重组受体(比如抗原受体)的一部分在细胞上表达。其中抗原受体为功能性非TCR抗原受体,比如嵌合抗原受体(CAR)。通常,含有表现出针对肽-MHC复合物的TCR样特异性的抗体或抗原结合片段的CAR也可称为TCR样CAR。

[0153] 关于“主要组织相容性复合体”(MHC)是指一种蛋白质,通常为糖蛋白,其含有多态性肽结合位点或结合沟,在某些情况下,所述结合位点或结合沟可与多肽的肽抗原(包括由细胞机器加工的肽抗原)复合。在一些情况下,MHC分子可以在细胞表面上展示或表达,包括具有肽的复合物,即MHC-肽复合物,其用于以可被T细胞上的抗原受体识别的构象呈递抗原,所述抗原受体比如TCR或TCR样抗体。通常,MHC I类分子是异二聚体,其具有跨膜 α 链,在一些情况下具有三个 α 结构域和非共价结合的 $\beta 2$ 微球蛋白。通常,MHC II类分子由两种跨膜糖蛋白 α 和 β 组成,这两种糖蛋白通常都跨膜。MHC分子可包括MHC的有效部分,所述有效部分含有抗原结合位点或结合肽的位点以及被适当抗原受体识别所必需的序列。在一些实施方案中,MHC I类分子将起源于胞质溶胶的肽递送至细胞表面,MHC-肽复合物在这里被T细胞(比如通常为CD8⁺T细胞,但在一些情况下为CD4⁺T细胞)识别。在一些实施方案中,MHC II类分子将起源于囊泡系统的肽递送至细胞表面,它们在这里通常被CD4⁺T细胞识别。通常,MHC分子由一组连锁基因座编码,其在小鼠中统称为H-2,并且在人类中统称为人白细胞抗原(HLA)。因此,通常人MHC也可称为人白细胞抗原(HLA)。

[0154] 术语“MHC-肽复合物”或“肽-MHC复合物”或其变体是指肽抗原和MHC分子的复合物

或结合,例如其通常借助于MHC分子的结合沟或缝中的肽的非共价相互作用。在一些实施方案中,MHC-肽复合物呈现或展示在细胞表面上。在一些实施方案中,MHC-肽复合物可以被抗原受体特异性地识别,所述抗原受体比如TCR、TCR样CAR或其抗原结合部分。

[0155] 在一些实施方案中,多肽的肽(比如肽抗原或表位)可与MHC分子结合,例如以便被抗原受体识别。通常,肽衍生自或基于诸如多肽或蛋白质的较长生物分子的片段。在一些实施方案中,肽的长度通常为约8个至约24个氨基酸。在一些实施方案中,为了识别MHC II类复合物,肽具有(或具有大约)9至22个氨基酸的长度。在一些实施方案中,为了识别MHC I类复合物,肽具有(或具有大约)8至13个氨基酸的长度。在一些实施方案中,在MHC分子(比如MHC-肽复合物)的背景下识别肽时,抗原受体(比如TCR或TCR样CAR)产生或触发诱导T细胞活化信号,所述活化信号诱导T细胞应答,比如T细胞增殖、细胞因子产生、细胞毒性T细胞应答或其他应答。

[0156] 在一些实施方案中,可以通过用有效量的含有特异性MHC-肽复合物的免疫原免疫宿主来产生与MHC-肽复合物特异性地结合的抗体或其抗原结合部分。在一些情况下,MHC-肽复合物的肽是能够与MHC结合的抗原的表位,所述抗原比如肿瘤抗原,例如通用肿瘤抗原、骨髓瘤抗原或如下所述的其他抗原。在一些实施方案中,然后将有效量的免疫原施用于宿主以引出免疫应答,其中免疫原保持其三维形式持续一段时间,所述时间足以引出针对MHC分子结合沟中的肽的三维呈现的免疫应答。然后测定从宿主收集的血清,以确定是否产生了识别MHC分子结合沟中的肽的三维呈现的期望抗体。在一些实施方案中,可以评估产生的抗体,以证实抗体能够区分MHC-肽复合物与单独的MHC分子、单独的感兴趣的肽、以及MHC和无关肽的复合物。然后可以分离期望抗体。

[0157] 在一些实施方案中,可以通过采用抗体文库展示方法(比如噬菌体抗体文库)产生与MHC-肽复合物特异性地结合的抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,可以生成突变体Fab、scFV或其他抗体形式的噬菌体展示文库,例如,其中文库的成员在一个或多个CDR或CDR的一个或多个残基处被突变。此类方法的示例是本领域已知的(参见例如美国公开申请No.US20020150914、US2014/0294841;和Cohen CJ.等人(2003) *J Mol. Recogn.* 16:324-332)。

1. T细胞受体 (TCR)

[0158] 在一些实施方案中,重组受体包括从天然存在的T细胞克隆的重组T细胞受体(TCR)和/或TCR。

[0159] 在一些实施方案中,T细胞受体(TCR)含有可变 α 和 β 链(也分别称为TCR α 和TCR β)或可变 γ 和 δ 链(也分别称为TCR γ 和TCR δ)或其功能片段,使得所述分子能够与结合MHC受体的抗原肽特异性地结合。在一些实施方案中,TCR呈 $\alpha\beta$ 形式。通常,以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在的TCR通常在结构上相似,但表达它们的T细胞可具有不同的解剖位置或功能。TCR可见于细胞表面上或呈可溶形式。通常,TCR见于T细胞(或T淋巴细胞)表面上,它在这里通常负责识别与主要组织相容性复合体(MHC)分子结合的抗原。在一些实施方案中,TCR还可含有恒定结构域、跨膜结构域和/或短胞质尾(参见,例如,Janeway等人, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p.4:33, 1997)。例如,在一些实施方案中,TCR的每条链可具有一个N末端免疫球蛋白可变结构域、一个免疫球蛋白恒定结构域、跨膜区和在C末端的短胞质尾。在一些实施方案中,TCR与涉及介

导信号转导的CD3复合物的不变蛋白质相关。

[0160] 除非另外说明,否则术语“TCR”应理解为涵盖其功能性TCR片段。该术语还涵盖完整或全长TCR,包括 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式的TCR。因此,为了本文的目的,关于TCR包括任何TCR或功能片段,比如TCR的抗原结合部分,其与MHC分子(即MHC-肽复合物)中结合的特异性抗原肽结合。TCR的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”可以互换使用,是指含有TCR结构域的一部分但结合完整TCR所结合的抗原(例如MHC-肽复合物)的分子。在一些情况下,抗原结合部分含有TCR的可变结构域,比如TCR的可变 α 链和可变 β 链,其足以形成结合位点以与特异性MHC-肽复合物结合,例如通常在每条链含有三个互补决定区。

[0161] 在一些实施方案中,TCR链的可变结构域结合以形成环、或类似于免疫球蛋白的互补决定区(CDR),其赋予抗原识别并且通过形成TCR分子的结合位点来确定肽特异性,并确定肽特异性。通常,像免疫球蛋白一样,CDR被框架区(FR)分开(参见,例如, Jores等人, Proc.Nat'l Acad.Sci.U.S.A.87:9138,1990;Chothia等人,EMBO J.7:3745,1988;还参见 Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.27:55,2003)。在一些实施方案中,CDR3是负责识别加工的抗原的主要CDR,尽管还显示 α 链的CDR1与抗原肽的N端部分相互作用,而 β 链的CDR1与所述肽的C端部分相互作用。人们认为CDR2识别MHC分子。在一些实施方案中, β 链的可变区可含有另外的高变(HV4)区。

[0162] 在一些实施方案中,TCR链含有恒定结构域。例如,像免疫球蛋白一样,TCR链(例如, α -链, β -链)的细胞外部分可以含有两个免疫球蛋白结构域:在N末端的可变结构域(例如, V_α 或 V_β ;通常氨基酸1至116基于Kabat编号,Kabat等人,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services,Public Health Service National Institutes of Health,1991,5th ed.)和一个邻近细胞膜的恒定结构域(例如, α -链恒定结构域或 C_α ,通常氨基酸117至259基于Kabat, β -链恒定结构域或 C_β ,通常氨基酸117至295基于Kabat)。例如,在一些情况下,由两条链形成的TCR的细胞外部分含有两个膜近端恒定结构域和两个含有CDR的膜远端可变结构域。TCR结构域的恒定结构域含有短连接序列,其中半胱氨酸残基形成二硫键,从而在两条链之间形成连接。在一些实施方案中,TCR可以在 α 链和 β 链的每一个中具有另外的半胱氨酸残基,使得TCR在恒定结构域中含有两个二硫键。

[0163] 在一些实施方案中,TCR链可含有跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域带正电荷。在一些情况下,TCR链含有胞质尾。在一些情况下,该结构允许TCR与CD3等其他分子结合。例如,含有具有跨膜区的恒定结构域的TCR可以将蛋白质锚定在细胞膜中并与CD3信号转导装置或复合物的不变亚基结合。

[0164] 通常,CD3是多蛋白复合物,其可具有在哺乳动物中的三条不同的链(γ 、 δ 和 ϵ)和 ζ 链。例如,在哺乳动物中,复合物可含有CD3 γ 链、CD3 δ 链、两条CD3 ϵ 链和CD3 ζ 链的同二聚体。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链是含有单个免疫球蛋白结构域的免疫球蛋白超家族的高度相关的细胞表面蛋白。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链的跨膜区带负电荷,这是允许这些链与带正电荷的T细胞受体链结合的特征。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链的细胞内尾各自含有称为免疫受体酪氨酸活化基序或ITAM的单个保守基序,而每个CD3 ζ 链有三个。通常,ITAM涉及TCR复合物的信号转导能力。这些辅助分子具有带负电荷的跨膜区,并且在将信号从TCR传播到细胞中起作用。CD3-和 ζ -链与TCR一起形成所谓的T细胞受体复合物。

[0165] 在一些实施方案中,TCR可以是两条链 α 和 β (或任选地 γ 和 δ)的异二聚体,或者它可以是单链TCR构建体。在一些实施方案中,TCR是含有两条独立链(α 和 β 链或 γ 和 δ 链)的异二聚体,所述两条链例如通过一个或多个二硫键连接。

[0166] 在一些实施方案中,鉴定了针对靶抗原(例如,癌抗原)的TCR并将其引入细胞中。在一些实施方案中,编码TCR的核酸可以从多种来源获得,例如通过可公开获得的TCR DNA序列的聚合酶链反应(PCR)扩增。在一些实施方案中,TCR获自生物来源,比如来自细胞,比如来自T细胞(例如细胞毒性T细胞)、T细胞杂交瘤或其他可公开获得的来源。在一些实施方案中,可以从体内分离的细胞获得T细胞。在一些实施方案中,可从患者分离高亲和力T细胞克隆并分离TCR。在一些实施方案中,T细胞可以是培养的T细胞杂交瘤或克隆。在一些实施方案中,已经在用人免疫系统基因(例如人白细胞抗原系统或HLA)工程化的转基因小鼠中生成了针对靶抗原的TCR克隆。参见,例如,肿瘤抗原(参见,例如,Parkhurst等人(2009) Clin Cancer Res.15:169-180和Cohen等人(2005) J Immunol.175:5799-5808。在一些实施方案中,使用噬菌体展示来分离针对靶抗原的TCR(参见,例如,Varela-Rohena等人(2008) Nat Med.14:1390-1395和Li(2005) Nat Biotechnol.23:349-354。在一些实施方案中,可以根据TCR序列的知识来合成产生TCR或其抗原结合部分。

[0167] 在一些实施方案中,在获得T细胞克隆之后,分离TCR α 和 β 链并将其克隆到基因表达载体中。在一些实施方案中,TCR α 和 β 基因经由小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽连接,使得两条链共表达。在一些实施方案中,通过逆转录病毒或慢病毒载体或通过转座子完成TCR的基因转移(参见,例如,Baum等人(2006) Molecular Therapy:The Journal of the American Society of Gene Therapy.13:1050-1063;Frecha等人(2010) Molecular Therapy:The Journal of the American Society of Gene Therapy.18:1748-1757;an Hackett等人(2010) Molecular Therapy:The Journal of the American Society of Gene Therapy.18:674-683。

跨膜和细胞内结构域

[0168] 在一些实施方案中,重组受体,比如CAR,比如其抗体部分,进一步包括间隔物,其可以是或包括免疫球蛋白恒定区的至少一部分或其变体或修饰形式,比如铰链区,例如IgG4铰链区和/或CH1/CL和/或Fc区。在一些实施方案中,恒定区或部分是人IgG(比如IgG4或IgG1)的恒定区或部分。在一些方面,恒定区的部分用作抗原识别组分(例如scFv)和跨膜结构域之间的间隔区。间隔物的长度与不存在间隔物相比可以在抗原结合后提供增加的细胞反应性。在一些实例中,间隔物的长度为或约为12个氨基酸或其长度不超过12个氨基酸。示例性间隔物包括具有至少约10至229个氨基酸、约10至200个氨基酸、约10至175个氨基酸、约10至150个氨基酸、约10至125个氨基酸、约10至100个氨基酸、约10至75个氨基酸、约10至50个氨基酸、约10至40个氨基酸、约10至30个氨基酸、约10至20个氨基酸、或约10至15个氨基酸(并且包括任何列出范围的端点之间的任何整数)的那些间隔物。在一些实施方案中,间隔区具有约12个氨基酸或更少,约119个氨基酸或更少,或约229个氨基酸或更少。示例性间隔物包括单独的IgG4铰链、与CH2和CH3结构域连接的IgG4铰链、或与CH3结构域连接的IgG4铰链。示例性间隔物包括但不限于在Hudecek等人(2013) Clin.Cancer Res.,19:3153或国际专利申请公开号W02014031687中描述的那些。在一些实施方案中,间隔物具有在SEQ ID NO:70列出的序列,并且由SEQ ID NO:71中列出的序列编码。在一些实施方案中,

间隔物具有在SEQ ID NO:72中列出的序列。在一些实施方案中,间隔物具有在SEQ ID NO:73中列出的序列。

[0169] 在一些实施方案中,恒定区或部分为IgD的恒定区或部分。在一些实施方案中,间隔物具有在SEQ ID NO:74中列出的序列。在一些实施方案中,间隔物具有表现出与SEQ ID NO:70、72、73和74的任一个具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的氨基酸序列。

[0170] 抗原识别结构域通常与一种或多种细胞内信号转导组分连接,所述细胞内信号转导组分例如在CAR的情况下通过抗原受体复合物(比如TCR复合物)模拟激活和/或经由另一种细胞表面受体模拟信号的信号转导组分。因此,在一些实施方案中,抗原结合组分(例如,抗体)与一个或多个跨膜和细胞内信号转导结构域连接。在一些实施方案中,跨膜结构域与细胞外结构域融合。在一个实施方案中,使用与受体(例如CAR)中的结构域之一天然相关的跨膜结构域。在一些情况下,通过氨基酸取代选择或修饰跨膜结构域,以避免这样的结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,从而将与受体复合物的其他成员的相互作用最小化。

[0171] 在一些实施方案中,跨膜结构域衍生自天然或合成来源。在来源是天然的情况下,在一些方面,结构域衍生自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。跨膜区包括衍生自T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154(即至少包含其跨膜区)的那些跨膜区。或者,一些实施方案中的跨膜结构域是合成的。在一些方面,合成跨膜结构域主要包含疏水残基,比如亮氨酸和缬氨酸。在一些方面,苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体将见于合成跨膜结构域的每个末端。在一些实施方案中,通过接头、间隔物和/或跨膜结构域加以连接。

[0172] 其中细胞内信号转导结构域是通过天然抗原受体模拟或接近信号、通过这种受体与共刺激受体联合模拟或接近信号、和/或仅通过共刺激受体模拟或接近信号的那些细胞内信号转导结构域。在一些实施方案中,存在短的寡肽或多肽接头,例如长度为2至10个氨基酸的接头,比如含有甘氨酸和丝氨酸(例如甘氨酸-丝氨酸双联体)的接头,并且所述接头形成在CAR的跨膜结构域和细胞质信号转导结构域之间的连接。

[0173] 受体(例如CAR)通常包括至少一种细胞内信号转导组分。在一些实施方案中,受体包括TCR复合物的细胞内组分,比如介导T细胞活化和细胞毒性的TCR CD3链,例如CD3 ζ 链。因此,在一些方面,CAR与一个或多个细胞信号转导模块连接。在一些实施方案中,细胞信号转导模块包括CD3跨膜结构域、CD3细胞内信号转导结构域和/或其他CD跨膜结构域。在一些实施方案中,受体(例如CAR)进一步包括一种或多种另外的分子的一部分,所述分子比如Fc受体 γ 、CD8、CD4、CD25或CD16。例如,在一些方面,CAR包括在CD3-zeta(CD3- ζ)或Fc受体 γ 与CD8、CD4、CD25或CD16之间的嵌合分子。

[0174] 在一些实施方案中,在连接CAR时,CAR的细胞质结构域或细胞内信号转导结构域激活免疫细胞的正常效应子功能或应答中的至少一种,所述免疫细胞例如经工程化以表达CAR的T细胞。例如,在一些情况下,CAR诱导T细胞的功能,比如细胞溶解活性或T辅助活性,比如细胞因子或其他因子的分泌。在一些实施方案中,使用抗原受体组分或共刺激分子的细胞内信号转导结构域的截短部分代替完整的免疫刺激链,例如,条件是它转导效应子功能信号。在一些实施方案中,一个或多个细胞内信号转导结构域包括T细胞受体(TCR)的细

胞质序列,并且在一些方面还包括在自然情况下与这种受体协同作用以在抗原受体结合后启动信号转导的共受体的那些序列、和/或这样的分子的任何衍生物或变体、和/或具有相同功能能力的任何合成序列。

[0175] 在天然TCR的情况下,完全激活通常不仅需要通过TCR发信号,还需要共刺激信号。因此,在一些实施方案中,为了促进完全激活,用于生成二级信号或共刺激信号的组分也包括在CAR中。在其他实施方案中,CAR不包括用于生成共刺激信号的组分。在一些方面,另外的CAR在同一细胞中表达,并提供用于生成二级信号或共刺激信号的组分。

[0176] T细胞活化在一些方面被描述为由两类细胞质信号转导序列介导:通过TCR启动抗原依赖性初级活化的那些序列(初级细胞质信号转导序列),以及以抗原非依赖性方式起作用以提供二级信号或共刺激信号的那些序列(二级细胞质信号转导序列)。在一些方面,CAR包括这样的信号组分中的一者或两者。

[0177] 在一些方面,CAR包括调节TCR复合物的初级活化的初级细胞质信号转导序列。以刺激方式起作用的初级细胞质信号转导序列可含有信号转导基序,其被称为免疫受体酪氨酸活化基序或ITAM。含有初级细胞质信号转导序列的ITAM的实例包括衍生自TCR或CD3 ζ 、FcR γ 或FcR β 的那些序列。在一些实施方案中,CAR中的细胞质信号转导分子含有细胞质信号转导结构域、其部分或源自CD3 ζ 的序列。

[0178] 在一些实施方案中,CAR包括共刺激受体的信号转导结构域和/或跨膜部分,所述共刺激受体比如CD28、4-1BB、OX40、DAP10和ICOS。在一些方面,同一个CAR包括活化组分和共刺激组分两者。

[0179] 在一些实施方案中,活化结构域包含在一个CAR内,而共刺激组分由识别另一种抗原的另一个CAR提供。在一些实施方案中,CAR包括在同一个细胞上表达的活化或刺激性CAR和共刺激CAR(参见W02014/055668)。

[0180] 在某些实施方案中,细胞内信号转导结构域包含与CD3(例如CD3- ζ)细胞内结构域连接的CD28跨膜和信号转导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号转导结构域包含与CD3 ζ 细胞内结构域连接的嵌合CD28和CD137(4-1BB, TNFRSF9)共刺激结构域。

[0181] 在一些实施方案中,CAR在细胞质部分中包括一个或多个,例如两个或更多个共刺激结构域和活化结构域,例如初级活化结构域。示例性CAR包括CD3- ζ 、CD28和4-1BB的细胞内组分。

[0182] 在一些实施方案中,CAR或其他抗原受体可以进一步包括标志物,或者细胞可以进一步表达标志物,比如替代标志物,所述标志物可用于证实表达受体的细胞转导或工程化,所述受体比如截短形式的细胞表面受体,比如截短的EGFR(tEGFR)。在一些方面,标志物包括CD34、NGFR或表皮生长因子受体(例如,tEGFR)的全部或部分(例如,截短形式)。在一些实施方案中,编码标志物的核酸与编码接头序列的多核苷酸可操作连接,所述接头序列比如可切割的接头序列,例如T2A。参见W02014031687。在一些实施方案中,引入编码由T2A核糖体开关分离的CAR和EGFRt的构建体可以从同一个构建体表达两种蛋白质,使得EGFRt可以用作检测表达这种构建体的细胞的标志物。在一些实施方案中,标志物和任选的接头序列可以是在公开的专利申请号W02014031687中公开的任何一种。例如,标志物可以是任选地与接头序列(比如T2A可切割的接头序列)连接的截短的EGFR(tEGFR)。截短的EGFR(例如tEGFR)的示例性多肽包含在SEQ ID NO:75或101中列出的氨基酸序列或表现出与SEQ ID

N0:75或101具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的氨基酸序列。示范性T2A接头序列包含在SEQ ID N0:76或96中列出的氨基酸序列或表现出与SEQ ID N0:76或96具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的氨基酸序列。

[0183] 在一些实施方案中,标志物是非天然存在于T细胞上或非天然存在于T细胞表面上的分子(例如细胞表面蛋白)或其部分。

[0184] 在一些实施方案中,所述分子是非自身分子,例如非自身蛋白质,即未被其中有待过继转移细胞的宿主的免疫系统识别为“自身”的蛋白质。

[0185] 在一些实施方案中,除了用作基因工程的标志物(例如,用于选择成功工程化的细胞)之外,标志物没有治疗功能和/或不产生作用。在其他实施方案中,标志物可以是治疗分子或以别的方式发挥某一期望作用的分子,比如在体内将会遇到的细胞的配体,比如在过继转移和遇到配体后增强和/或抑制细胞应答的共刺激或免疫检查点分子。

[0186] 在某些情况下,CAR被称为第一代、第二代和/或第三代CAR。在一些方面,第一代CAR是在抗原结合后单独提供CD3链诱导的信号的CAR;在一些方面,第二代CAR是提供这种信号和共刺激信号的CAR,比如包括来自共刺激受体如CD28或CD137的细胞内信号转导结构域的信号;在一些方面,第三代CAR在一些方面是包括不同的共刺激受体的多个共刺激结构域的CAR。

[0187] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括含有本文所述抗体或片段的细胞外部分。在一些方面,嵌合抗原受体包括含有本文所述抗体或片段的细胞外部分和细胞内信号转导结构域。在一些实施方案中,抗体或片段包括scFv或单结构域V_H抗体,并且细胞内结构域含有ITAM。在一些方面,细胞内信号转导结构域包括CD3-zeta (CD3 ζ) 链的 ζ 链的信号转导结构域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括连接细胞外结构域和细胞内信号转导结构域的跨膜结构域。

[0188] 在一些方面,跨膜结构域含有CD28的跨膜部分。细胞外结构域和跨膜可以直接或间接连接。在一些实施方案中,细胞外结构域和跨膜通过间隔物连接,比如本文所述的任何间隔物。在一些实施方案中,嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的细胞内结构域,比如在跨膜结构域和细胞内信号转导结构域之间。在一些方面,T细胞共刺激分子是CD28或4-1BB。

[0189] 在一些实施方案中,CAR含有抗体(例如抗体片段)、作为或含有CD28的跨膜部分或其功能变体的跨膜结构域和细胞内信号转导结构域,所述细胞内信号转导结构域含有CD28的信号转导部分或其功能变体和CD3 ζ 的信号转导部分或其功能变体。在一些实施方案中,CAR含有抗体(例如抗体片段)、作为或含有CD28的跨膜部分或其功能变体的跨膜结构域和细胞内信号转导结构域,所述细胞内信号转导结构域含有4-1BB的信号转导部分或其功能变体和CD3 ζ 的信号转导部分或其功能变体。在一些这样的实施方案中,受体进一步包括含有Ig分子(比如人Ig分子)的一部分(比如Ig铰链,例如IgG4铰链)的间隔物,比如仅有铰链的间隔物。

[0190] 在一些实施方案中,受体(例如CAR)的跨膜结构域是人CD28或其变体的跨膜结构域,例如人CD28(登录号:P10747.1)的27-氨基酸跨膜结构域,或是这样的跨膜结构域,其包含在SEQ ID N0:77中列出的氨基酸序列或表现出与SEQ ID N0:77具有至少85%、86%、

87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的氨基酸序列；在一些实施方案中，重组受体的含有跨膜结构域的部分包含在SEQ ID NO:78列出的氨基酸序列或与其具有至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的氨基酸序列。

[0191] 在一些实施方案中，嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的细胞内结构域。在一些方面，T细胞共刺激分子是CD28或4-1BB。

[0192] 在一些实施方案中，细胞内信号转导结构域包含人CD28或其功能变体或部分的细胞内共刺激信号转导结构域，比如其41个氨基酸结构域和/或比如在天然CD28蛋白的位置186-187具有LL至GG取代的结构域。在一些实施方案中，细胞内信号转导结构域可包含在SEQ ID NO:79或80中列出的氨基酸序列或表现出与SEQ ID NO:79或80具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，细胞内结构域包含4-1BB或其功能变体或部分的细胞内共刺激信号转导结构域，比如人4-1BB(登录号Q07011.1)或其功能变体或部分的42-氨基酸细胞质结构域，比如在SEQ ID NO:81中列出的氨基酸序列或表现出与SEQ ID NO:81具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的氨基酸序列。

[0193] 在一些实施方案中，细胞内信号转导结构域包含人CD3 ζ 刺激信号转导结构域或其功能变体，比如人CD3 ζ (登录号:P20963.2)的同工型3的112AA细胞质结构域或CD3 ζ 信号转导结构域，如在美国专利No.7,446,190或美国专利No.8,911,993中描述。在一些实施方案中，细胞内信号转导结构域包含在SEQ ID NO:82、83或84中列出的氨基酸序列或表现出与SEQ ID NO:82、83或84具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的氨基酸序列。

[0194] 在一些方面，间隔物仅含有IgG的铰链区，比如仅有IgG4或IgG1的铰链，比如在SEQ ID NO:70中列出的仅有铰链的间隔物。在其他实施方案中，间隔物是Ig铰链，例如，与CH2和/或CH3结构域连接的IgG4铰链。在一些实施方案中，间隔物是Ig铰链，例如与CH2和CH3结构域连接的IgG4铰链，比如在SEQ ID NO:73列出。在一些实施方案中，间隔物是Ig铰链，例如仅与CH3结构域连接的IgG4铰链，比如在SEQ ID NO:72中列出。在一些实施方案中，间隔物是或包含富含甘氨酸-丝氨酸序列或其他柔性接头，比如已知的柔性接头。

[0195] 例如，在一些实施方案中，CAR包括抗原结合结构域(例如scFv)、间隔物(比如任何含有Ig铰链的间隔物)、CD28跨膜结构域、CD28细胞内信号转导结构域和CD3 ζ 信号转导结构域。在一些实施方案中，CAR包括抗原结合结构域(例如scFv)、间隔物(比如任何含有Ig铰链的间隔物)、CD28跨膜结构域、CD28细胞内信号转导结构域和CD3 ζ 信号转导结构域。在一些实施方案中，这样的CAR构建体进一步包括T2A核糖体跳跃元件和/或tEGFR序列，例如在CAR的下游。

核酸、载体、和工程化细胞

[0196] 还提供了编码免疫调节肽和重组受体的多核苷酸(核酸分子)、用于基因工程化细胞以表达这样的多肽和受体的载体、以及用于产生免疫调节多肽、重组受体和基因工程化细胞的方法。

多核苷酸

[0197] 在一些实施方案中,提供了编码本文中提供的任何免疫调节多肽的多核苷酸。在一些方面,多核苷酸含有信号核酸序列,比如编码免疫调节多肽的核酸序列。在其他情况下,多核苷酸含有编码免疫调节多肽的第一核酸序列和编码重组受体的第二核酸序列。在一些方面,重组受体是或含有嵌合抗原受体(CAR)。在一些方面,重组受体是或含有T细胞受体(TCR),例如转基因TCR。

[0198] 可以修饰任何所提供的多核苷酸以去除CpG基序和/或优化在特定物种(比如人、犬、猫、马、绵羊、牛等物种)中的翻译密码子。在一些实施方案中,针对人密码子使用优化多核苷酸(即,人密码子优化的)。在一些实施方案中,修饰多核苷酸以除去CpG基序。在其他实施方案中,修饰所提供的多核苷酸以去除CpG基序并进行密码子优化,比如人密码子优化。密码子优化以及CpG基序检测和修饰的方法是熟知的。通常,多核苷酸优化增强了转基因表达,增加了转基因稳定性并且保留了编码多肽的氨基酸序列。编码示例性免疫调节多肽的示例性优化的多核苷酸序列在SEQ ID NO:102-107中列出。

[0199] 在一些情况下,多核苷酸含有编码信号肽的信号序列。例如,信号序列可以编码衍生自CD33、IL-12p40或IL-12p35的信号肽。一些这样的CD33、IL-12p40或IL-12p35信号肽可分别具有在SEQ ID NO:18、12或19中列出的序列或与这样的序列具有至少95%序列同一性的序列。

[0200] 在一些实施方案中,编码免疫调节多肽和/或重组受体的多核苷酸含有至少一个可操作连接的控制免疫调节多肽和/或重组受体表达的启动子。在一些实例中,多核苷酸含有两个、三个或更多个可操作连接的控制免疫调节多肽和/或重组受体表达的启动子。

[0201] 在一些实施方案中,免疫调节多肽和/或重组受体的表达是诱导型或条件型的。因此,在一些方面,编码免疫调节多肽和/或重组受体的多核苷酸含有条件型启动子、增强子或反式激活因子。在一些这样的方面,条件型启动子、增强子或反式激活因子是诱导型启动子、增强子或反式激活因子或阻抑型启动子、增强子或反式激活因子。例如,在一些实施方案中,可以使用诱导型或条件型启动子将免疫调节多肽和/或重组受体的表达限制于特定的微环境(比如肿瘤微环境)。肿瘤微环境包括诸如缺氧和低葡萄糖的状况。在一些实施方案中,诱导型或条件型启动子在肿瘤微环境中的一种或多种病症存在下是有活性的,所述病症比如缺氧、低葡萄糖、酸性pH和/或氧化应激。在其他实施方案中,由诱导型或条件型启动子驱动的表达受到暴露于外源作用剂(比如热量、辐射或药物)的调节。

[0202] 在一些实施方案中,免疫调节多肽和/或重组受体的表达局限于缺氧状况。例如,缺氧诱导型转录因子-1 α (HIF-1 α)介导的转录在缺氧状况下与称为缺氧反应元件(HRE)的DNA基序结合。因此,可以使用HRE特异性地驱动在缺氧区域(比如肿瘤)内的转基因表达。例如,可以通过组合一个或多个缺氧反应元件(HRE)来构建产生缺氧诱导型基因表达的启动子,所述缺氧反应元件来自HIF-1反应基因,具有带有启动子的共有核心序列5'-(A/G)CGT(G/C)(G/C)-3',所述启动子比如基本启动子(例如,CMV、SV40或延伸因子-1(EF-1)启动子)。示例性HIF-1反应基因包括促红细胞生成素(Epo)、VEGF-A、磷酸甘油酸激酶1(PGK1)、乳酸脱氢酶A(LDH A)、醛缩酶A(ALDA)和甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH),并且将其对应的HRE在SEQ ID NO:85-90中列出。

[0203] 在一些实施方案中,免疫调节多肽和/或重组受体的表达局限于低葡萄糖状况。在这样的实例中,可使用葡萄糖反应性启动子来驱动暴露于低葡萄糖状况的细胞(比如存在

于肿瘤环境中的细胞)中的转基因表达。示例性葡萄糖反应性启动子包括葡萄糖调节蛋白GRP78启动子和己糖激酶II启动子。

[0204] 在一些实施方案中,可使用外源控制的诱导型启动子来调控调节多肽和/或重组受体的表达。例如,可使用辐射诱导型启动子、热诱导型启动子和/或药物诱导型启动子来选择性地驱动例如靶向区中的转基因表达。在这样的实施方案中,可通过施用外源性诱导源来调节转基因表达的位置、持续时间和水平。

[0205] 在一些实施方案中,使用辐射诱导型启动子,在应用放射疗法时使转基因表达局限于辐射场。可以利用放射疗法的方法,比如适形放射疗法、间质放射疗法、近距离放射疗法或放射性同位素的靶向递送,以诱导在辐射诱导型启动子的调节下的免疫调节多肽和/或重组受体的定位表达。响应于电离辐射,细胞激活多种基因的转录,比如c-jun、NFP、EGR-1和p21(WAF-1)。示例性辐射诱导型启动子包括:EGR-1、Waf-1、RecA和cIAP2启动子。EGR-1启动子的CArG元件含有共有序列CC(富含A+T)GG基序(例如,CCTTATTTGG;SEQ ID NO:91),并且也响应于暴露于辐射而赋予剂量依赖性表达。示例性合成启动子可含有1个或多个CArG元件,比如1、2、4、6、8、10、12、14个或更多个CArG元件。示例性含CArG的合成启动子在SEQ ID NO:92-95中列出。当采用辐射诱导型启动子时,本文中提供了含有本文中提供的构建体的细胞,所述构建体含有辐射诱导型启动子。

[0206] 在一些实施方案中,免疫调节多肽和/或重组受体的表达受到热诱导型启动子的调节。细胞对高热的反应与热休克蛋白(HSP)的合成有关。因此,调节多肽和/或重组受体的表达可以受到HSP启动子如HSP70B启动子的调节,其将在高温治疗后选择性地激活转基因表达,由此控制转基因表达的位置、持续时间和水平。在一些实施方案中,可以将热激元件(HSE)引入到HSP启动子或其他启动子中以增强对热的转录反应。Gadd 153是另一种示例性热诱导型启动子。还可使用超声和电磁场刺激在HSP启动子的调节下的转基因表达。可以凭经验确定在这样的系统中导致转基因表达的温度和其他外源形式的能量转移,比如超声和电磁辐射。在一些实施方案中,可以掺入反馈环以增强转基因表达(参见,例如,Emilusen等人,Urol Int.2001;67(3):216-223)。

[0207] 在一些实施方案中,使用或药物诱导型启动子调节免疫调节多肽和/或重组受体的表达。例如,在一些情况下,启动子、增强子或反式激活因子包含Lac操纵子序列、四环素操纵子序列、半乳糖操纵子序列、多西环素操纵子序列、雷帕霉素操纵子序列、他莫昔芬操纵子序列或激素反应型操纵子序列或其类似物。在一些情况下,诱导型启动子包含四环素反应元件(TRE)。在一些实施方案中,诱导型启动子包含雌激素反应元件(ERE),其可在他莫昔芬存在下激活基因表达。在一些情况下,诸如TRE的药物诱导型元件可以与选定的启动子联合以增强在药物(比如多西环素)存在下的转录。在一些实施方案中,药物诱导型启动子是小分子诱导型启动子。通常,药物诱导型操纵子(比如四环素操纵子)是变构开启(allosteric-on)系统,其中选定药物(比如多西环素)的施用启动原本沉默的转基因的转录。在一些实施方案中,可以采用含有药物诱导型反应元件的多药耐药(mdr1)基因启动子来驱动转基因的药物依赖性表达。可凭经验确定有效剂量的药物或激素以实现期望的转基因表达水平,并且确定有效剂量的方法是熟知的。

[0208] 在一些方面,免疫调节多肽的表达在免疫细胞(例如T细胞)活化(比如通过T细胞活化因子)的存在下完成。例如,在一些情况下,启动子、增强子或其他反应元件或其部分被

转录因子识别,以驱动其活性通常通过T细胞活化而引发的基因的表达。在一些实施方案中,T细胞活化因子可以是转录因子的调节结构域或区域(例如启动子、增强子或其他反应元件),所述转录因子的活性通过T细胞活化而引发。在一些实施方案中,T细胞活化因子响应于T细胞活化、TCR信号转导的信号强度和/或TCR信号转导的质量中的一者或多者。

[0209] 在一些实施方案中,T细胞活化因子可以是调控元件,比如启动子、增强子或一个或多个反应元件,其含有T细胞转录因子的结合位点,并由此与T细胞转录因子的下游活性相关。在一些实施方案中,转录因子是活化T细胞核因子(NFAT)、C/EBP、STAT1、STAT2或NF κ B。例如,在一些实施方案中,T细胞活化因子含有一个或多个被活化T细胞核因子(NFAT)、C/EBP、STAT1、STAT2和NF κ B识别的反应元件。在一些实施方案中,T细胞活化因子可含有一个或多个调控元件,所述调控元件被一种或两种(或在一些情况下三种或更多种)独特转录因子识别或对其作出反应。

[0210] 预期可以组合诱导型、条件依赖性和/或细胞特异性启动子和/或调节元件中的一种或多种,以限制和/或敏化本文中提供的免疫调节多肽和/或重组受体的表达。

[0211] 在一些实施方案中,比如其中多核苷酸含有第一和第二核酸序列的实施方案中,多核苷酸进一步含有编码在第一和第二核酸序列之间的连接肽的核酸序列。在一些这样的情况下,连接肽在翻译期间或之后使第一和第二核酸序列的翻译产物分离。在一些方面,连接肽含有内部核糖体进入位点(IRES)、自切割肽或引起核糖体跳跃的肽,比如T2A肽。

[0212] 在一些实施方案中,比如通过逆转录病毒转导、转染或转化,将编码免疫调节多肽和/或重组受体的多核苷酸引入到含有培养细胞的组合物中。

[0213] 在一些实施方案中,多核苷酸(核酸分子)是编码免疫调节多肽和/或重组受体(例如嵌合受体,比如上文所述的任何一种)的多核苷酸。还提供了含有这样的核酸分子的载体或构建体。在一些实施方案中,载体或构建体含有一个或多个与编码多肽或受体的核苷酸可操作连接的启动子,以驱动其表达。在一些实施方案中,启动子与一个或多个核酸分子可操作连接。

[0214] 因此,还提供了载体,比如含有本文中提供的任何多核苷酸的载体。在一些情况下,载体是病毒载体,比如逆转录病毒载体,例如慢病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。

[0215] 在一些实施方案中,载体或构建体可含有驱动一个或多个核酸分子表达的单个启动子。在一些实施方案中,这样的启动子可以是多顺反子的(双顺反子或三顺反子的,参见例如美国专利No.6,060,273)。例如,在一些实施方案中,转录单位可以被工程化为含有IRES(内部核糖体进入位点)的双顺反子单位,其允许通过来自单个启动子的信息共表达基因产物(例如编码第一和第二重组受体)。或者,在一些情况下,单个启动子可以指导RNA的表达,所述RNA在单个开放阅读框(ORF)中含有两个或三个基因(例如编码参与调节代谢途径的分子和编码重组受体),所述基因通过编码自切割肽(例如,2A序列)或蛋白酶识别位点(例如,弗林蛋白酶)的序列彼此分离。因此,ORF编码单个多肽,所述多肽在翻译期间(在2A的情况下)或之后被加工成单独的蛋白质。在一些情况下,肽(比如T2A)可引起核糖体在2A元件的C末端跳过(核糖体跳跃)肽键的合成,导致2A序列的末端与下一个下游肽之间的分离(参见,例如,de Felipe.Genetic Vaccines and Ther.2:13(2004)和deFelipe等人Traffic 5:616-626(2004))。许多2A元件在本领域中是已知的。可在本文中公开的方法和核酸中使用的2A序列的实例,包括但不限于,来自下列病毒的2A序列:口蹄疫病毒(F2A,例

如,SEQ ID NO:100)、马甲型鼻炎病毒(E2A,例如,SEQ ID NO:99)、明脉扁刺蛾β四体病毒(T2A,例如,SEQ ID NO:76或96)、和猪捷申病毒-1(P2A,例如,SEQ ID NO:97或98),如美国专利公开No.20070116690中所述。

细胞和用于工程化的细胞的制备

[0216] 还提供了细胞,比如含有免疫调节多肽和/或工程化重组受体的细胞,如本文所述。在一些实施方案中,细胞能够分泌或被设计成分泌免疫调节肽。在一些实施方案中,工程化细胞分泌免疫调节多肽,相比于它与不表达靶分子的细胞的结合,所述免疫调节多肽表现出增加的与表达靶分子的靶细胞的结合。在一些方面,与对不表达靶分子的细胞的杀伤相比,工程化细胞实现了增加的对表达靶分子的靶细胞的杀伤。在一些情况下,增加的持久性、活性、结合和/或杀伤大于参考工程化细胞所实现的持久性、活性、结合和/或杀伤,所述参考工程化细胞表达或分泌在亚基之间包含多肽接头但不包含靶向模块的免疫调节多肽。

[0217] 还提供了这种细胞的群、含有这种细胞和/或富集这种细胞的组合物,例如其中表达免疫调节多肽和/或嵌合受体的细胞构成组合物中的总细胞或某种类型的细胞(比如T细胞或CD8⁺或CD4⁺细胞)的至少50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多。其中这些组合物是药物组合物和给药制剂,比如用于过继细胞疗法。还提供了将细胞和组合物施用于受试者例如患者的治疗方法。

[0218] 因此,还提供了表达免疫调节多肽和/或重组受体例如CAR的基因工程化细胞。细胞通常是真核细胞,比如哺乳动物细胞,并且典型地是人细胞。在一些实施方案中,细胞来源于血液、骨髓、淋巴或淋巴器官,是免疫系统的细胞,比如先天性或适应性免疫的细胞,例如髓样细胞或淋巴样细胞,包括淋巴细胞,通常是T细胞和/或NK细胞。其他示例性细胞包括干细胞,例如多能和多能性干细胞,包括诱导的多能性干细胞(iPSC)。细胞通常是原代细胞,比如直接从受试者分离和/或从受试者分离并冷冻的细胞。在一些实施方案中,细胞包括T细胞的一个或多个亚群或其他细胞类型,比如整个T细胞群、CD4⁺细胞、CD8⁺细胞及其亚群,比如由功能、活化状态、成熟度、分化潜力、扩增、再循环、定位和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体类型、在特定器官或区室中的存在、标志物或细胞因子分泌谱、和/或分化程度定义的那些。参考待治疗的受试者,细胞可以是同种异体的和/或自体的。其中这些方法包括现成的方法。在一些方面,比如对于现成技术,细胞是多能性和/或多能的,比如干细胞,比如诱导的多能性干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,所述方法包括从受试者分离细胞,如本文所述制备、加工、培养和/或工程改造它们,并在冷冻保存之前或之后将它们重新引入到同一患者中。

[0219] 其中T细胞和/或CD4⁺和/或CD8⁺T细胞的亚型和亚群是幼稚T(T_N)细胞、效应T细胞(T_{EFF})、记忆T细胞及其亚型,比如干细胞记忆T(T_{SCM})、中枢记忆T(T_{CM})、效应记忆T(T_{EM})或终末分化效应记忆T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关不变T(MAIT)细胞、天然存在和适应性调节T(T_{reg})细胞、辅助T细胞,比如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡辅助细胞T细胞、α/βT细胞和δ/γT细胞。

[0220] 在一些实施方案中,细胞是自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,细胞是单核细胞或粒细胞,例如髓样细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞

和/或嗜碱性粒细胞。

[0221] 在一些实施方案中,细胞包含通过基因工程引入的一种或多种核酸,由此表达这样的核酸的重组或基因工程产物。在一些实施方案中,核酸是异源的,即通常在细胞或从细胞获得的样品中不存在,比如从另一生物或细胞获得的核酸,例如,通常在被工程化的细胞中和/或从中获得这种细胞的生物中未发现。在一些实施方案中,核酸不是天然存在的,比如在自然界未发现的核酸,包括编码来自多种不同细胞类型的各种结构域的核酸的嵌合组合的核酸。

[0222] 在一些实施方案中,工程化细胞的制备包括一个或多个培养和/或制备步骤。可以从样品中分离用于引入免疫调节多肽和/或重组受体(例如CAR)的细胞,所述样品比如生物样品,例如从受试者获得或衍生的样品。在一些实施方案中,从其分离细胞的受试者是患有疾病或病症或需要细胞疗法或将其施用细胞疗法的受试者。在一些实施方案中,受试者是需要特定治疗干预的人,所述治疗干预比如过继细胞疗法,其中细胞被分离、加工和/或工程化。

[0223] 因此,在一些实施方案中,细胞是原代细胞,例如原代人细胞。样品包括直接取自受试者的组织、液体和其他样品,以及由一个或多个加工步骤产生的样品,所述加工步骤比如分离、离心、基因工程(例如用病毒载体转导)、洗涤和/或温育。生物样品可以是直接从生物来源获得的样品或经过加工的样品。生物样品包括但不限于体液,比如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液、组织和器官样品,包括由其衍生的加工样品。

[0224] 在一些方面,从其衍生或分离细胞的样品是血液或血液衍生的样品,或者是或衍生自血液成分单采术或白细胞单采术产品。示例性样品包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾、其他淋巴组织、肝脏、肺、胃、肠、结肠、肾、胰腺、乳房、骨、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官、和/或由其衍生的细胞。在细胞疗法(例如过继细胞疗法)的背景下,样品包括来自自体 and 同种异体来源的样品。

[0225] 在一些实施方案中,细胞衍生自细胞系,例如T细胞系。在一些实施方案中,细胞获自异种来源,例如,来自小鼠、大鼠、非人灵长类动物或猪。

[0226] 在一些实施方案中,细胞的分离包括一个或多个制备步骤和/或基于非亲和力的细胞分离步骤。在一些实例中,在一种或多种试剂的存在下将细胞洗涤、离心和/或温育,例如,以去除不需要的组分,富集期望的组分,裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些实例中,基于一种或多种性质分离细胞,所述性质比如密度、粘附性质、大小、对特定组分的敏感性和/或抗性。

[0227] 在一些实例中,例如通过血液成分单采术或白细胞单采术获得来自受试者的循环血液的细胞。在一些方面,样品含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和/或血小板,并且在一些方面含有除红细胞和血小板之外的细胞。

[0228] 在一些实施方案中,洗涤从受试者收集的血细胞,例如以去除血浆部分,并将所述细胞置于适当的缓冲液或介质中,以备随后的处理步骤。在一些实施方案中,将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。在一些实施方案中,洗涤溶液缺乏钙和/或镁和/或许多或所有二价阳离子。在一些方面,使用半自动“直流”离心机(例如,Cobe 2991细胞处理器,Baxter)根据制造商的说明完成洗涤步骤。在一些方面,通过切向流过滤(TFF)根据制造商的说明完成洗

涤步骤。在一些实施方案中,洗涤后将细胞重悬于各种生物相容性缓冲液例如不含Ca⁺⁺/Mg⁺⁺的PBS中。在某些实施方案中,去除血细胞样品的组分并将细胞直接重悬于培养基中。

[0229] 在一些实施方案中,所述方法包括基于密度的细胞分离方法,例如通过裂解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心从外周血制备白细胞。

[0230] 在一些实施方案中,分离方法包括基于细胞中一种或多种特异性分子(比如表面标志物,例如表面蛋白、细胞内标志物或核酸)的表达或存在来分离不同的细胞类型。在一些实施方案中,可以使用任何已知的基于这样的标志物的分离方法。在一些实施方案中,分离是基于亲和力或基于免疫亲和力的分离。例如,在一些方面,分离包括基于细胞的表达或一种或多种标志物(通常是细胞表面标志物)的表达水平分离细胞和细胞群,例如通过用与这样的标志物特异性地结合的抗体或结合配偶体温育,随后通常为洗涤步骤以及将已经结合抗体或结合配偶体的细胞与未结合抗体或结合配偶体的细胞分离。

[0231] 这样的分离步骤可以基于其中保留已经结合试剂的细胞用于进一步使用的阳性选择、和/或其中保留未与抗体或结合配偶体结合的细胞的阴性选择。在一些实例中,两个部分都被保留以供进一步使用。在一些方面,在没有可用于特异性地鉴定异质群体中的细胞类型的抗体的情况下,阴性选择可能特别有用,使得基于由除期望群体之外的细胞表达的标志物最佳地进行分离。

[0232] 分离不必导致100%富集或去除特定细胞群或表达特定标志物的细胞。例如,特定类型的细胞(比如表达标志物的细胞)的阳性选择或富集是指增加这样的细胞的数量或百分比,但不必导致不表达所述标志物的细胞的完全不存在。同样,特定类型的细胞(比如表达标志物的细胞)的阴性选择、去除或耗竭是指减少这样的细胞的数量或百分比,但不必导致所有这样的细胞的完全去除。

[0233] 在一些实例中,进行了多轮分离步骤,其中使来自一个步骤的阳性或阴性选择的级分经历另一个分离步骤,比如随后的阳性或阴性选择。在一些实例中,比如通过将细胞与多种抗体或结合配偶体一起温育,单个分离步骤可以同时耗竭表达多种标志物的细胞,其中每种抗体或结合配偶体对于靶向阴性选择的标志物是特异的。同样,通过将细胞与各种细胞类型上表达的多种抗体或结合配偶体一起温育,可以同时进行多种细胞类型的阳性选择。

[0234] 例如,在一些方面,通过阳性或阴性选择技术分离特定的T细胞亚群,比如阳性或表达高水平的一种或多种表面标志物的细胞,所述细胞例如CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺T细胞。

[0235] 例如,可以使用抗CD3/抗CD28缀合的磁珠(例如, DYNABEADS® M-450CD3/CD28T Cell Expander)进行CD3⁺、CD28⁺T细胞的阳性选择。

[0236] 在一些实施方案中,通过阳性选择富集特定的细胞群、或通过阴性选择耗竭特定的细胞群来进行分离。在一些实施方案中,通过将细胞与一种或多种抗体或其他结合剂一起温育来完成阳性或阴性选择,所述抗体或其他结合剂与分别在阳性或阴性选择的细胞上表达(标志物⁺)或以较高水平表达(标志物^高)的一种或多种表面标志物特异性地结合。

[0237] 在一些实施方案中,通过非T细胞(比如B细胞、单核细胞或其他白细胞)上表达的标志物(比如CD14)的阴性选择,将T细胞从PBMC样品分离。在一些方面,使用CD4⁺或CD8⁺选择步骤来分离CD4⁺辅助细胞和CD8⁺细胞毒性T细胞。通过对一个或多个幼稚、记忆和/或效应

T细胞亚群上表达或以相对较高程度表达的标志物的阳性或阴性选择,可以将这样的CD4⁺和CD8⁺群体进一步分类成亚群。

[0238] 在一些实施方案中,例如通过基于与对应的亚群相关的表面抗原的阳性或阴性选择,从CD8⁺细胞进一步富集或耗竭幼稚、中枢记忆、效应记忆和/或中枢记忆干细胞。在一些实施方案中,进行中枢记忆T (T_{CM}) 细胞的富集以增加效力,比如改善施用后的长期存活、扩增和/或植入,这在一些方面在这样的亚群中特别稳健。参见Terakura等人(2012) Blood. 1: 72-82; Wang等人(2012) J Immunother. 35 (9) :689-701。在一些实施方案中,联合富含T_{CM}的CD8⁺T细胞和CD4⁺T细胞进一步增强效力。

[0239] 在实施方案中,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻亚群中。比如使用抗CD8和抗CD62L抗体,可以从PBMC富集或耗竭CD62L⁻CD8⁺和/或CD62L⁺CD8⁺级分。

[0240] 在一些实施方案中,中枢记忆T (T_{CM}) 细胞的富集基于CD45R0、CD62L、CCR7、CD28、CD3和/或CD127的阳性表达或高表面表达;在某些方面,它基于对表达或高度表达CD45RA和/或颗粒酶B的细胞的阴性选择。在一些方面,通过表达CD4、CD14、CD45RA的细胞的耗竭以及表达CD62L的细胞的阳性选择或富集,进行富含T_{CM}细胞的CD8⁺群体的分离。在一个方面,以基于CD4表达选择的阴性细胞级分开始进行中枢记忆T (T_{CM}) 细胞的富集,将所述阴性细胞级分进行基于CD14和CD45RA表达的阴性选择和基于CD62L的阳性选择。在一些方面,同时进行这样的选择,并且在其他方面,以任一顺序依次进行。在一些方面,用于制备CD8⁺细胞群或亚群的相同的基于CD4表达的选择步骤也用于生成CD4⁺细胞群或亚群,使得来自基于CD4的分离的阳性级分和阴性级分都被保留并用于这些方法的后续步骤中,任选地随后为一个或多个另外的阳性或阴性选择步骤。

[0241] 在特定的实例中,对PBMC样品或其他白细胞样品进行CD4⁺细胞选择,其中阴性级分和阳性级分两者都被保留。然后基于CD14和CD45RA或ROR1的表达对阴性级分进行阴性选择,并基于中枢记忆T细胞(如CD62L或CCR7)的标志物特征进行阳性选择,其中以任一顺序进行阳性选择和阴性选择。

[0242] 通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群,将CD4⁺T辅助细胞分类为幼稚、中枢记忆和效应细胞。可通过标准方法获得CD4⁺淋巴细胞。在一些实施方案中,幼稚CD4⁺T淋巴细胞是CD45R0⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD4⁺T细胞。在一些实施方案中,中枢记忆CD4⁺细胞是CD62L⁺和CD45R0⁺的。在一些实施方案中,效应CD4⁺细胞是CD62L⁻和CD45R0⁻的。

[0243] 在一个实例中,为了通过阴性选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在一些实施方案中,抗体或结合配偶体与固体支持物或基质(比如磁珠或顺磁珠)结合,以允许分离用于阳性和/或阴性选择的细胞。例如,在一些实施方案中,使用免疫磁性(或亲和磁性)分离技术(在Methods in Molecular Medicine, vol.58:Metastasis Research Protocols, Vol.2:Cell Behavior In Vitro and In Vivo,第17-25页,编辑:S.A.Brooks和U. Schumacher ©Humana Press Inc., Totowa,NJ中综述)来分开或分离细胞和细胞群。

[0244] 在一些方面,将待分离的细胞的样品或组合物与小的可磁化或磁响应材料一起温育,所述材料比如磁响应颗粒或微粒,比如顺磁珠(例如Dynabeads或MACS珠)。磁响应材料(例如颗粒)通常直接或间接地附着于结合配偶体(例如抗体),所述结合配偶体与存在于期望分离(例如,期望被阴性或阳性选择)的一个细胞、多个细胞或细胞群上的分子(例如表面

标志物) 特异性地结合。

[0245] 在一些实施方案中,磁性颗粒或珠子包含与特异性结合成员(比如抗体或其他结合配偶体)结合的磁响应材料。有许多熟知的在磁分离方法中使用的磁响应材料。适合的磁性颗粒包括在Molday的美国专利No. 4,452,773和欧洲专利说明书EP 452342B中描述的那些磁性颗粒,将其通过提述并入本文。胶体大小颗粒(如在Owen的美国专利No. 4,795,698和Liberti等人的美国专利No. 5,200,084中所述的那些)是其他的实例。

[0246] 温育通常在这样的条件下进行,抗体或结合配偶体或分子(比如二级抗体或其他试剂)借此条件与细胞表面分子(如果存在于样品中的细胞上)特异性地结合,所述二级抗体或其他试剂与附着于磁性颗粒或珠子的这样的抗体或结合配偶体特异性地结合。

[0247] 在一些方面,将样品置于磁场中,具有附着于其上的磁响应或可磁化颗粒的那些细胞将被吸引到磁体上并与未标记的细胞分离。对于阳性选择,保留被吸引到磁铁上的细胞;对于阴性选择,保留未被吸引的细胞(未标记的细胞)。在一些方面,在相同的选择步骤期间进行阳性和阴性选择的组合,其中阳性和阴性级分被保留并进一步处理或经受进一步的分离步骤。

[0248] 在某些实施方案中,磁响应颗粒被包被在一级抗体或其他结合配偶体、二级抗体、凝集素、酶或链霉亲和素中。在某些实施方案中,磁性颗粒通过对一种或多种标志物特异的一级抗体的包被而附着于细胞。在某些实施方案中,用一级抗体或结合配偶体标记细胞而不是珠子,然后加入细胞类型特异性二级抗体包被的或其他结合配偶体(例如链霉亲和素)包被的磁性颗粒。在某些实施方案中,将链霉亲和素包被的磁性颗粒与生物素化的一级抗体或二级抗体结合使用。

[0249] 在一些实施方案中,磁响应颗粒保持附着于细胞,所述细胞随后将被温育、培养和/或工程化;在一些方面,将颗粒附着于细胞,用于施用于患者。在一些实施方案中,从细胞去除可磁化或磁响应颗粒。从细胞去除可磁化颗粒的方法是已知的,包括例如使用竞争性非标记抗体、可磁化颗粒或与可切割接头缀合的抗体等。在一些实施方案中,可磁化颗粒是生物可降解的。

[0250] 在一些实施方案中,基于亲和力的选择通过磁激活细胞分选(MACS)(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)来进行。磁激活细胞分选(MACS)系统能够以高纯度选择其上具有附着的磁化颗粒的细胞。在某些实施方案中,MACS以这样的模式操作,其中在施加外部磁场之后依次洗脱非目标物质和目标物质。也就是说,附着在磁化颗粒上的细胞保持在适当的位置,而未附着的物质被洗脱。然后,在完成第一个洗脱步骤之后,以某种方式释放被捕获在磁场中并被免受洗脱的物质,使得它们可以被洗脱和回收。在某些实施方案中,将非靶细胞标记并从异质细胞群中去除。

[0251] 在某些实施方案中,使用系统、装置或设备进行分离或分开,所述系统、装置或设备进行分离、细胞制备、分开、处理、温育、培养和/或制剂方法步骤中的一个或多个。在一些方面,所述系统用于在封闭或无菌环境中进行这些步骤中的每一个,例如,以便将错误、用户操作和/或污染降到最低。在一个实例中,所述系统是如国际专利申请公开号W02009/072003或US 20110003380 A1中描述的系统。

[0252] 在一些实施方案中,所述系统或设备在一体化或自含式系统中和/或以自动或可编程方式进行分离、处理、工程化和制剂步骤中的一个或多个(例如全部)。在一些方面,所

述系统或设备包括与所述系统或设备通信的计算机和/或计算机程序,其允许用户对处理、分离、工程化和制剂步骤的各个方面进行编程、控制、评估结果和/或调整。

[0253] 在一些方面,使用CliniMACS系统(Miltenyi Biotec)进行分离和/或其他步骤,例如,用于在封闭和无菌系统中在临床规模水平上自动分离细胞。组件可包括集成微型计算机、磁分离单元、蠕动泵和各种夹管阀。在一些方面,集成计算机控制该仪器的所有组件并指导该系统以标准化顺序执行重复程序。在一些方面,磁分离单元包括可移动永磁体和用于选择柱的支架。蠕动泵控制管组各处的流速,并与夹管阀一起确保缓冲液通过该系统的流动受到控制和细胞的连续悬浮。

[0254] 在一些方面,CliniMACS系统使用提供在无菌、无热原溶液中的抗体偶联的可磁化颗粒。在一些实施方案中,在用磁性颗粒标记细胞之后,洗涤细胞以除去过量的颗粒。然后将细胞制备袋连接到管组,管组进而连接到含有缓冲液的袋和细胞收集袋。管组包括预组装的无菌管,包括预柱和分离柱,仅供一次性使用。在启动分离程序之后,系统自动将细胞样品施加到分离柱上。标记的细胞保留在柱内,而未标记的细胞通过一系列洗涤步骤去除。在一些实施方案中,与本文所述的方法一起使用的细胞群是未标记的并且未保留在柱中。在一些实施方案中,与本文所述的方法一起使用的细胞群是标记的并且保留在柱中。在一些实施方案中,在去除磁场后,将与本文所述方法一起使用的细胞群从柱中洗脱,并收集在细胞收集袋内。

[0255] 在某些实施方案中,使用CliniMACS Prodigy系统(Miltenyi Biotec)进行分离和/或其他步骤。在一些方面,CliniMACS Prodigy系统配备有细胞处理单元,其允许通过离心将细胞自动洗涤和分级分离。CliniMACS Prodigy系统还可以包括机载相机和图像识别软件,其通过辨别源细胞产品的宏观层来确定最佳细胞分级分离终点。例如,外周血可以自动分离成红细胞、白细胞和血浆层。CliniMACS Prodigy系统还可以包括集成细胞培养室,其完成细胞培养方案,例如细胞分化和扩增、抗原加载和长期细胞培养。输入端口可以允许无菌移除和补充培养基,并且可以使用集成显微镜监测细胞。参见,例如Klebanoff等人(2012) *J Immunother.* 35 (9) :651-660, Terakura等人(2012) *Blood.* 1:72-82和Wang等人(2012) *J Immunother.* 35 (9) :689-701。

[0256] 在一些实施方案中,通过流式细胞术收集和富集(或耗竭)本文所述的细胞群,其中在流体流中携带针对多个细胞表面标志物染色的细胞。在一些实施方案中,通过制备规模的(FACS)-分选收集和富集(或耗竭)本文所述的细胞群。在某些实施方案中,通过使用微机电系统(MEMS)芯片结合基于FACS的检测系统来收集和富集(或耗竭)本文所述的细胞群(参见例如W0 2010/033140, Cho等人(2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; 和Godin等人(2008) *J Biophoton.* 1 (5) :355-376。在两种情况下,可以用多种标志物标记细胞,从而允许以高纯度分离定义明确的T细胞亚群。

[0257] 在一些实施方案中,用一种或多种可检测标志物标记抗体或结合配偶体,以促进针对阳性和/或阴性选择的分离。例如,分离可以基于与荧光标记抗体的结合。在一些实例中,比如通过荧光激活细胞分选(FACS),包括例如与流式细胞检测系统联合的制备规模(FACS)和/或微机电系统(MEMS)芯片,基于对一种或多种细胞表面标志物特异的抗体或其他结合配偶体的结合来分离细胞,所述细胞表面标志物被携带在流体流中。这样的方法允许同时基于多个标志物进行阳性和阴性选择。

[0258] 在一些实施方案中,制备方法包括在分离、温育和/或工程化之前或之后冷冻例如冷冻保存细胞的步骤。在一些实施方案中,冷冻和随后的解冻步骤去除细胞群中的粒细胞,并在一定程度上去除单核细胞。在一些实施方案中,例如在洗涤步骤之后将细胞悬浮在冷冻溶液中以去除血浆和血小板。在一些方面可以使用各种已知的冷冻溶液和参数中的任何一种。一个实例涉及使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白(HSA)的PBS或其他适合的细胞冷冻培养基。然后用培养基1:1稀释,使得DMSO和HSA的终浓度分别为10%和4%。然后将细胞以1°/分钟的速率冷冻至-80°C并储存在液氮储罐的气相中。

[0259] 在一些实施方案中,提供的方法包括培育、温育、培养和/或基因工程步骤。例如,在一些实施方案中,提供了用于温育和/或工程化耗竭的细胞群和培养起始组合物的方法。

[0260] 因此,在一些实施方案中,在培养起始组合物中温育细胞群。温育和/或工程化可以在培养容器中进行,例如单元、室、孔、柱、管、管组、阀、小瓶、培养皿、袋或其他用于培养或培育细胞的容器。

[0261] 在一些实施方案中,在基因工程之前(或与基因工程相结合)温育和/或培养细胞。温育步骤可包括培养、培育、刺激、活化和/或增殖。在一些实施方案中,在刺激条件或刺激剂的存在下温育组合物或细胞。这样的条件包括设计诱导群体中细胞的增殖、扩增、活化和/或存活,模拟抗原暴露和/或引发细胞用于基因工程(比如用于引入重组抗原受体)的那些条件。

[0262] 所述条件可包括下列一种或多种:特定的介质、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、作用剂,例如营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子,如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和任何其他旨在激活细胞的作用剂。

[0263] 在一些实施方案中,刺激条件或作用剂包括一种或多种作用剂,例如配体,其能够激活TCR复合物的细胞内信号转导结构域。在一些方面,所述作用剂在T细胞中开启或启动TCR/CD3细胞内信号级联。这样的作用剂可以包括抗体,比如对TCR特异的抗体,例如抗CD3。在一些实施方案中,刺激条件包括一种或多种能够刺激共刺激受体的作用剂,例如配体,例如抗CD28。在一些实施方案中,这样的作用剂和/或配体可以与固体支持物如珠子和/或一种或多种细胞因子结合。任选地,扩增方法可以进一步包括向培养基中加入抗CD3和/或抗CD28抗体的步骤(例如,浓度至少约0.5ng/ml)。在一些实施方案中,刺激剂包括IL-2、IL-15和/或IL-7。在一些方面,IL-2浓度为至少约10单位/mL。

[0264] 在一些方面,根据例如在Riddell等人的美国专利No.6,040,177,Klebanoff等人(2012) J Immunother. 35 (9):651-660, Terakura等人(2012) Blood. 1:72-82和/或Wang等人(2012) J Immunother. 35 (9):689-701中描述的技术进行温育。

[0265] 在一些实施方案中,通过向培养起始组合物添加饲养细胞(比如非分裂外周血单核细胞(PBMC))来扩增T细胞(例如,使得所得细胞群针对待扩增的初始群体中的每个T淋巴细胞含有至少约5个、10个、20个或40个或更多个PBMC饲养细胞);并温育培养物(例如,持续足以扩增T细胞数量的时间)。在一些方面,非分裂饲养细胞可包含 γ 照射的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,用约3000至3600拉德范围的 γ 射线照射PBMC以阻止细胞分裂。在一些方面,在添加T细胞群之前将饲养细胞添加到培养基中。

[0266] 在一些实施方案中,刺激条件包括适合人T淋巴细胞生长的温度,例如,至少约25摄氏度,通常至少约30度,并且通常为或约为37摄氏度。任选地,温育可以进一步包括添加

非分裂的EBV转化的类淋巴母细胞 (LCL) 作为饲养细胞。可以用约6000至10,000拉德范围的 γ 射线照射LCL。在一些方面,以任何适合的量提供LCL饲养细胞,比如LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞的比例为至少约10:1。

[0267] 在实施方案中,通过用抗原刺激幼稚或抗原特异性T淋巴细胞而获得抗原特异性T细胞,比如抗原特异性CD4+和/或CD8+T细胞。例如,通过从感染的受试者中分离T细胞并用相同的抗原体外刺激所述细胞,可以产生针对巨细胞病毒抗原的抗原特异性T细胞系或克隆。

用于基因工程的载体和方法

[0268] 用于引入基因工程化组分(例如免疫调节多肽和重组受体,例如CAR或TCR)的各种方法是熟知的,并且可以与所提供的方法和组合物一起使用。示例性方法包括用于转移编码多肽或受体的核酸的方法,包括借助于病毒载体,例如逆转录病毒或慢病毒、非病毒载体或转座子,例如睡美人转座子系统。基因转移的方法可包括转导、电穿孔或导致基因转移到细胞中的其他方法。

[0269] 在一些实施方案中,通过首先刺激细胞来完成基因转移,比如通过将其与诱导诸如增殖、存活和/或活化的反应的刺激组合,所述反应例如通过细胞因子或活化标志物的表达来测量,然后转导活化的细胞,并在培养物中扩增至足以用于临床应用的数目。

[0270] 在一些情况下,可能期望防止这样的可能性:刺激因子(例如,淋巴因子或细胞因子)的过表达会导致受试者中的不希望的结果或较低的效力,比如与受试者中的毒性相关的因素。因此,在一些情况下,工程化细胞包括使细胞易于经历体内(比如在过继免疫疗法中施用)阴性选择的基因区段。例如,在一些方面,对细胞进行工程改造,使得它们可以由施用它们的患者的体内状况的变化而被消除。可以由插入赋予对施用药剂(例如化合物)的敏感性的基因而产生阴性选择表型。阴性选择基因包括单纯疱疹病毒I型胸苷激酶(HSV-1TK)基因(Wigler等人,Cell 2:223,1977),其赋予更昔洛韦敏感性;细胞次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(Hprt)基因、细胞腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(APRT)基因、细菌胞嘧啶脱氨酶(Mullen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.89:33(1992))。

[0271] 在一些实施方案中,使用重组感染性病毒颗粒,例如衍生自猴病毒40(SV40)、腺病毒、腺相关病毒(AAV)的载体,将重组核酸转移到细胞中。在一些实施方案中,使用重组慢病毒载体或逆转录病毒载体(比如 γ -逆转录病毒载体)将重组核酸转移到T细胞中(参见,例如,Koste等人(2014)Gene Therapy 2014Apr 3.doi:10.1038/gt.2014.25;Carlens等人(2000)Exp Hematol 28(10):1137-46;Alonso-Camino等人(2013)Mol Ther Nucl Acids 2,e93;Park等人,Trends Biotechnol.2011November 29(11):550-557。

[0272] 在一些实施方案中,逆转录病毒载体具有长末端重复序列(LTR),例如衍生自莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)、骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)、鼠胚胎干细胞病毒(MESV)、鼠干细胞病毒(MSCV)、脾病灶形成病毒(SFFV)或腺相关病毒(AAV)的逆转录病毒载体。大多数逆转录病毒载体衍生自鼠逆转录病毒。在一些实施方案中,逆转录病毒包括衍生自任何禽类或哺乳动物细胞来源的那些。逆转录病毒通常是双嗜性的,这意味着它们能够感染包括人在内的几个物种的宿主细胞。在一个实施方案中,有待表达的基因置换逆转录病毒gag、pol和/或env序列。已经描述了许多说明性逆转录病毒系统(例如,美国专利No.5,219,740;6,207,453;5,219,740;Miller和Rosman(1989)BioTechniques 7:980-990;Miller,A.D.

(1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa 等人 (1991) *Virology* 180:849-852; Burns 等人 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; 以及 Boris-Lawrie 和 Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109。

[0273] 慢病毒转导的方法是已知的。示例性方法描述于例如 Wang 等人 (2012) *J. Immunother.* 35 (9) :689-701; Cooper 等人 (2003) *Blood*.101:1637-1644; Verhoeyen 等人 (2009) *Methods Mol Biol.* 506:97-114; 和 Cavalieri 等人 (2003) *Blood*.102 (2) :497-505。

[0274] 在一些实施方案中,通过电穿孔将重组核酸转移到T细胞中(参见,例如, Chicaybam 等人 (2013) *PLoS ONE* 8 (3) :e60298 和 Van Tedeloo 等人 (2000) *Gene Therapy* 7 (16) :1431-1437)。在一些实施方案中,通过转座将重组核酸转移到T细胞中(参见,例如, Manuri 等人 (2010) *Hum Gene Ther* 21 (4) :427-437; Sharma 等人 (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; 和 Huang 等人 (2009) *Methods Mol Biol* 506:115-126)。在免疫细胞中引入和表达遗传物质的其他方法包括磷酸钙转染(例如,如 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y. 中所述)、原生质体融合、阳离子脂质体介导的转染; 钨颗粒促进的微粒轰击 (Johnston, *Nature*, 346:776-777 (1990)); 和磷酸锶DNA共沉淀 (Brash 等人, *Mol. Cell Biol.*, 7:2031-2034 (1987))。

[0275] 用于转移编码重组产物的核酸的其他方法和载体是例如在国际专利申请公开号 W02014055668 和美国专利 No. 7,446,190 中描述的那些。

[0276] 在一些实施方案中,可以在扩增期间或之后用例如免疫调节多肽、T细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR) 转染细胞(例如T细胞)。这种转染用于引入期望多肽或受体的基因,可以用例如任何适合的逆转录病毒载体来进行。然后可以从初始刺激物(例如CD3/CD28刺激物)释放遗传修饰的细胞群,随后用第二种类型的刺激物(通过从头引入的受体)刺激所述细胞群。这种第二类型的刺激物可包括肽/MHC分子形式的抗原刺激物、遗传引入的受体的同源(交联)配体(例如CAR的天然配体)或直接结合在新受体的框架内(例如通过识别受体内的恒定区)的任何配体(比如抗体)。参见,例如, Cheadle 等人, "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" *Methods Mol Biol.* 2012; 907:645-66 或 Barrett 等人, *Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65:333-347* (2014)。

[0277] 在另外的核酸中,例如,引入基因是比如通过促进转移细胞的活力和/或功能以改善治疗功效的基因; 提供用于选择和/或评估细胞(比如评估体内存活或定位)的遗传标志物的基因; 例如通过使细胞易于经历体内阴性选择以提高安全性的基因,如 Lupton S.D. 等人, *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991); 和 Riddell 等人, *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992) 所述; 另见 Lupton 等人的 PCT/US91/08442 和 PCT/US94/05601 的公开文本,其描述了通过显性阳性选择标志物与阴性选择标志物融合而衍生的双功能选择融合基因的用途。参见,例如, Riddell 等人, 美国专利 No. 6,040,177, 第14-17栏。

组合物、制剂和给药方法

[0278] 还提供了含有嵌合受体(比如CAR或TCR)的组合物、以及含有工程化细胞的组合物,包括药物组合物和制剂。还提供了所述组合物的使用方法以及比如在其中表达抗原的疾病、病症和疾患的治疗中或在检测、诊断和预后方法中的用途。

组合物/制剂

[0279] 术语“药物制剂”是指其为这样的形式的制剂,所述形式允许其中所含的活性成分的生物活性是有效的,并且所述制剂不含另外的对该制剂所施用的受试者具有不可接受的毒性的组分。

[0280] “药学上可接受的载体”是指药物制剂中除了活性成分以外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0281] 在一些方面,载体的选择部分地由特定的细胞和/或由施用方法决定。因此,有多种适合的制剂。例如,药物组合物可含有防腐剂。适合的防腐剂可包括,例如,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面,使用两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物通常以总组合物重量的约0.0001%至约2%的量存在。载体描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.Ed.(1980)。药学上可接受的载体通常在采用的剂量和浓度下对于接受者是无毒的,并且包括但不限于:诸如磷酸盐、柠檬酸盐、和其他有机酸的缓冲剂;包括抗坏血酸和甲硫氨酸在内的抗氧化剂;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;烷基对羟基苯甲酸酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、或赖氨酸;单糖类、二糖类、和其他碳水化合物类,包括葡萄糖、甘露糖、或糊精;螯合剂,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐反离子,如钠;金属复合物(例如,Zn-蛋白质复合物);和/或非离子型表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。

[0282] 在一些方面,缓冲剂被包括在组合物中。适合的缓冲剂包括,例如,柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾和各种其他酸和盐。在一些方面,使用两种或更多种缓冲剂的混合物。缓冲剂或其混合物通常以总组合物重量的约0.001%至约4%的量存在。用于制备可施用的药物组合物的方法是已知的。示例性方法更详细地描述于例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Lippincott Williams&Wilkins;第21版(2005年5月1日)。

[0283] 制剂或组合物还可含有多于一种对细胞治疗的特定适应症、疾病或病症有用的活性成分,优选那些具有与细胞互补的活性的活性成分,其中各自的活性彼此无不良影响。这样的活性成分以对预期目的有效的量适当地组合存在。因此,在一些实施方案中,药物组合物进一步包含其他药物活性剂或药物,比如化疗剂,例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱、长春新碱等。在一些实施方案中,细胞或抗体以盐的形式施用,例如药学上可接受的盐。适合的药学上可接受的酸加成盐包括衍生自无机酸和有机酸的那些,所述无机酸比如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、硝酸和硫酸,并且所述有机酸比如酒石酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸、苯甲酸、乙醇酸、葡萄糖酸、琥珀酸和芳基磺酸,例如对甲苯磺酸。

[0284] 活性成分可以包埋在微胶囊、胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗乳液中。在某些实施方案中,将药物组合物配制为包合复合物,比如环糊精包合复合物,或配制为脂质体。脂质体可用于将宿主细胞(例如,T细胞或NK细胞)靶向至特定组织。许多方法可用于制备脂质体,比如在例如Szoka等人,Ann.Rev.Biophys.Bioeng.,9:467(1980)和美国专利4,235,871、4,501,728、4,837,028和5,019,369中描述的那些方法。

[0285] 在一些方面,药物组合物可以采用定时释放、延迟释放和持续释放递送系统,使得组合物的递送发生在待治疗部位敏化之前,并且具有充足的时间引起待治疗部位的敏化。许多类型的释放递送系统是可用的并且是已知的。这样的系统可以避免重复施用组合物,由此增加受试者和医师的便利性。

[0286] 在一些实施方案中,药物组合物含有有效治疗或预防疾病或病症的量(比如治疗有效量或预防有效量)的免疫调节多肽和/或工程化细胞。一些实施方案中,通过定期评估被治疗的受试者来监测治疗或预防功效。对于多天或更长时间的重复给药,根据病情,重复治疗直到出现期望的疾病症状的抑制时为止。然而,其他剂量方案可能是有用的并且可以确定。可通过单次推注施用组合物、通过多次推注施用组合物、或通过连续输注施用组合物来递送期望的剂量。

[0287] 可以使用标准施用技术、制剂和/或装置施用免疫调节多肽和/或工程化细胞。提供了制剂以及用于储存和施用组合物的装置,比如注射器和小瓶。工程化细胞的施用可以是自体的或异源的。例如,免疫应答细胞或祖细胞可以从一位受试者获得,并施用于同一位受试者或不同的相容性受试者。可以通过局部注射(包括导管给药)、全身注射、局部注射、静脉注射或肠胃外给药来施用外周血衍生(例如,体内、离体或体外衍生)的免疫应答细胞或其后代。当施用治疗组合物(例如,含有遗传修饰的免疫应答细胞的药物组合物)时,通常将其配制成单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。

[0288] 制剂包括经口服、静脉内、腹膜内、皮下、肺、透皮、肌内、鼻内、口腔、舌下或栓剂给药的制剂。在一些实施方案中,经肠胃外施用细胞群。如本文中使用的术语“肠胃外”包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内给药。在一些实施方案中,使用通过静脉内、腹膜内或皮下注射的外周全身递送将细胞群施用于受试者。

[0289] 在一些实施方案中,将组合物提供为无菌液体制剂,例如等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散体或粘性组合物,其在一些方面可以缓冲至选定的pH。液体制剂通常比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更容易制备。另外,液体组合物稍微更便于施用,特别是通过注射。另一方面,可以将粘性组合物配制在适当的粘度范围内,以提供更长的与特异性组织接触的时间。液体或粘性组合物可包含载体,其可以是溶剂或分散介质,所述溶剂或分散介质含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及其适合的混合物。

[0290] 可以通过将细胞掺入溶剂中来制备无菌注射溶液,所述溶剂比如具有适合的载体、稀释剂或赋形剂的混合物,所述赋形剂比如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等。组合物也可以冻干。组合物可含有辅助物质,比如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝或粘度增强添加剂、防腐剂、调味剂、着色剂等,这取决于给药途径和期望的制剂。在一些方面可以查阅标准文本来制备适合的制剂。

[0291] 可以加入各种增强组合物稳定性和无菌性的添加剂,包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸等确保预防微生物作用。可通过使用吸收延迟剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现注射药物形式的延长吸收。

[0292] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的适合实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,所述基质呈成形物品的形式,例如薄膜、或微胶囊。

[0293] 用于体内给药的制剂通常是无菌的。可以例如通过无菌过滤膜进行过滤而容易地实现无菌性。

给药方法

[0294] 提供了施用免疫调节多肽、工程化细胞和组合物的方法,以及这样的免疫调节多肽、工程化细胞和组合物用于治疗或预防包括癌症在内的疾病、病症和疾患的用途。在一些实施方案中,例如通过过继性细胞疗法,比如过继性T细胞疗法,将免疫调节多肽、工程化细胞和组合物施用于患有待治疗的特定疾病或病症的受试者或患者。在一些实施方案中,将提供的细胞和组合物施用于受试者,比如患有疾病或病症或具有其风险的受试者。在一些方面,比如通过减轻表达被工程化T细胞识别的抗原的癌症中的肿瘤负荷,所述方法由此治疗,例如改善疾病或病症的一种或多种症状。

[0295] 用于过继细胞疗法的工程化细胞的施用方法是已知的,并且可以与所提供的方法和组合物结合使用。例如,过继T细胞治疗方法描述于例如Gruenberg等人的美国专利申请公开号2003/0170238;Rosenberg的美国专利No. 4,690,915;Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol.8 (10):577-85)。参见,例如Themeli等人(2013) Nat Biotechnol.31 (10):928-933;Tsukahara等人(2013) Biochem Biophys Res Commun 438 (1):84-9;Davila等人(2013) PLoS ONE 8 (4):e61338。

[0296] 如本文中使用的,“受试者”是哺乳动物,比如人或其他动物,并且通常是人。在一些实施方案中,对其施用免疫调节多肽、工程化细胞或组合物的受试者(例如患者)是哺乳动物,通常是灵长类动物,例如人。在一些实施方案中,灵长类动物是猴或猿。受试者可以是男性或女性,并且可为任何适合的年龄,包括婴儿、青年、青少年、成人和老年受试者。在一些实施方案中,受试者是非灵长类哺乳动物,比如啮齿动物。

[0297] 如本文中使用的,“治疗”(“treatment”) (及其语法变体,比如“治疗”(“treat”)或“治疗”(“treating”))是指疾病或病症或疾患或与之相关的症状、不良反应或结果或表型的完全或部分改善或减轻。期望的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、症状减轻、疾病的任何直接或间接病理结果的削减、预防转移、降低疾病进展速度、改善或减轻疾病状态、以及缓解或改善预后。所述术语并不意味着完全治愈疾病或完全消除症状或对所有症状或结果的影响。

[0298] 如本文中使用的,“延迟疾病的发展”意味着推迟、阻碍、减慢、延缓、稳定、抑制和/或推延疾病(比如癌症)的发展。这种延迟可以具有不同的时间长度,取决于病史和/或被治疗的个体。对于本领域技术人员显而易见的是,足够或显著的延迟实际上可以包括预防,因为个体不发生所述疾病。例如,可以延迟晚期癌症比如转移的发展。

[0299] 如本文中使用的,“预防”包括提供关于受试者中疾病的发生或复发的预防,所述受试者可能易患所述疾病但尚未被诊断患有所述疾病。在一些实施方案中,提供的细胞和组合物用于延迟疾病的发展或减慢疾病的进展。

[0300] 如本文中使用的,“抑制”功能或活性是当与除了感兴趣的条件或参数之外的其他相同的条件相比时或者与另一条件相比时降低了所述功能或活性。例如,抑制肿瘤生长的细胞与不存在所述细胞的肿瘤生长速率相比降低了肿瘤的生长速率。

[0301] 在给药的情况下,药剂(例如药物制剂、细胞或组合物)的“有效量”是指在剂量/量和时间段方面有效实现期望的结果(比如为治疗或预防结果)所需的量。

[0302] 药剂(例如药物制剂或工程化细胞)的“治疗有效量”是指在剂量和时间段方面有效实现期望的治疗结果(比如用于治疗疾病、病症或疾患)和/或治疗的药代动力学或药效学作用所需的量。治疗有效量可根据诸如受试者的疾病状态、年龄、性别和体重等因素以及施用的免疫调节多肽或工程化细胞而变化。在一些实施方案中,所提供的方法包括以有效量(例如治疗有效量)施用免疫调节多肽、工程化细胞或组合物。

[0303] “预防有效量”是指在剂量和时间段方面有效实现期望的预防结果所需的量。通常(但不一定),由于预防剂量是在疾病之前或早期的受试者中使用,因此预防有效量将小于治疗有效量。

[0304] 所治疗的疾病或病症可以是其中抗原表达与疾病状况或疾患的病因学相关和/或参与疾病状况或疾患的病因学(例如引起、加剧或以其他方式参与这种疾病、病症或疾患)的任何疾病或病症。示例性疾病和病症可包括与恶性肿瘤或细胞转化(例如癌症)、自身免疫性疾病或炎性疾病或传染性疾病(由细菌、病毒或其他病原体引起)相关的疾病或病症。以上描述了示例性抗原,其包括与可以治疗的各种疾病和病症相关的抗原。在具体的实施方案中,免疫调节多肽和/或重组受体(例如嵌合抗原受体或转基因TCR)特异性地结合与疾病或病症相关的抗原。

[0305] 在一些实施方案中,疾病或病症是肿瘤,比如实体瘤、淋巴瘤、白血病、血液肿瘤、转移性肿瘤或其他癌症或肿瘤类型。

[0306] 在一些实施方案中,疾病或病症是感染性疾病或病症,例如但不限于病毒、逆转录病毒、细菌和原生动物感染,免疫缺陷、巨细胞病毒(CMV)、EB病毒(Epstein-Barr virus (EBV))、腺病毒、BK多瘤病毒感染。在一些实施方案中,疾病或病症是自身免疫性或炎性疾病或病症,比如关节炎,例如类风湿性关节炎(RA)、I型糖尿病、系统性红斑狼疮(SLE)、炎性肠病、银屑病、硬皮病、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病、克罗恩病、多发性硬化、哮喘和/或与移植相关的疾病或病症。

[0307] 在一些实施方案中,与疾病或病症相关的抗原选自下组,该组的组成为:孤儿酪氨酸激酶受体ROR1、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、OEPHa2、ErbB2、3或4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、和MAGE A3、CE7、维尔姆斯瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白比如细胞周期蛋白A1(CCNA1)、和/或生物素化分子,和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。

[0308] 所提供的方法和用途包括过继细胞疗法的方法和用途。在一些实施方案中,所述方法包括将工程化细胞或含有所述细胞的组合物施用于受试者、组织或细胞,例如患有、有风险或怀疑患有疾病、病症或疾患的受试者。在一些实施方案中,例如通过过继性细胞疗法,比如过继性T细胞疗法,将细胞、细胞群和组合物施用于患有待治疗的特定疾病或病症的受试者。在一些实施方案中,将细胞或组合物施用于受试者,比如患有疾病或病症或具有其风险的受试者,以改善疾病或病症的一种或多种症状。

[0309] 在一些实施方案中,通过自体转移进行细胞疗法,例如过继性T细胞疗法,其中细

胞是从将要接受所述细胞疗法的受试者中分离和/或以其他方式制备的,或来自这位受试者来源的样品。因此,在一些方面,细胞来源于需要治疗的受试者,例如患者,并且在分离和处理后将细胞施用于同一位受试者。

[0310] 在一些实施方案中,通过同种异体转移进行细胞疗法,例如过继性T细胞疗法,其中细胞是从将要接受或最终接受所述细胞疗法的受试者(例如,第一受试者)以外的受试者分离和/或以其他方式制备的。在这样的实施方案中,然后将细胞施用于相同物种的不同受试者,例如第二受试者。在一些实施方案中,第一和第二受试者在遗传上是相同的。在一些实施方案中,第一和第二受试者在遗传上是相似的。在一些实施方案中,第二受试者表达与第一受试者相同的HLA类或超类型。可以通过任何适合的手段施用细胞。给药和施用可能部分地取决于施用是短暂的还是长期的。各种给药方案包括但不限于在各个时间点上的单次或多次施用、推注施用和脉冲输注。

[0311] 在某些实施方案中,细胞或细胞亚型的单独群体以范围约1百万个至约1000亿个细胞和/或每千克体重的该细胞量施用于受试者,例如像,100万个至约500亿个细胞(例如,约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞,或由前述任何两个值定义的范围),比如约1000万个至约1000亿个细胞(例如,约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞,或由前述任何两个值定义的范围),并且在一些情况下约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如,约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞)或这些范围之间的任何值和/或每千克体重的所述值。剂量可以根据疾病或疾患和/或患者和/或其他治疗特有的属性而变化。

[0312] 在一些实施方案中,例如,当受试者是人时,剂量包括少于约总共 1×10^8 个表达重组受体(例如,CAR)的细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC),例如,范围为约 1×10^6 个至 1×10^8 个这种细胞,比如总共 2×10^6 个、 5×10^6 个、 1×10^7 个、 5×10^7 个或 1×10^8 个这种细胞,或前述任何两个值之间的范围。

[0313] 在一些实施方案中,将细胞作为联合治疗的一部分施用,比如与另一治疗干预以任何顺序同时或依次施用,所述另一治疗干预比如抗体或工程化细胞或受体或药剂,比如细胞毒性剂或治疗剂。在一些实施方案中,以任何顺序同时或依次将细胞与一种或多种另外的治疗剂共同施用或结合另一治疗干预共同施用。在一些情况下,将细胞与另一种疗法在时间上足够接近地共同施用,使得细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的作用,反之亦然。在一些实施方案中,在一种或多种另外的治疗剂之前施用细胞。在一些实施方案中,在一种或多种另外的治疗剂之后施用细胞。在一些实施方案中,一种或多种另外的药剂包括细胞因子,比如IL-2,以便例如增强持久性。在一些实施方案中,所述方法包括施用化疗剂。

[0314] 在施用细胞后,在一些实施方案中,例如通过许多已知方法中的任何一种测量工程化细胞群的生物活性。要评估的参数包括工程化或天然T细胞或其他免疫细胞与抗原的特异性结合,例如采用体内成像,或例如采用离体ELISA或流式细胞术。在某些实施方案中,可以使用本领域已知的任何适合的方法测量工程化细胞破坏靶细胞的能力,例如在Kochenderfer等人,J. Immunotherapy, 32 (7) : 689-702 (2009) 和Herman等人

J. Immunological Methods, 285 (1) : 25-40 (2004) 中描述的细胞毒性测定。在某些实施方案中,通过测定一种或多种细胞因子(例如CD107a、IFN γ 、IL-2和TNF)的表达和/或分泌来测量细胞的生物活性。在一些方面,通过评估临床结果(比如肿瘤负荷或负载的降低)来测量生物活性。

[0315] 在某些实施方案中,以任何数量的方式进一步修饰工程化细胞,使得其治疗或预防功效增加。例如,由细胞群表达的工程化CAR或TCR可以通过接头直接或间接地与靶向模块缀合。将化合物(例如CAR或TCR)与靶向模块缀合的实践是本领域已知的。参见,例如, Wadwa等人, J. Drug Targeting 3:111 (1995) 和美国专利5,087,616。

定义

[0316] 如本文中使用的,单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“该(the)”包括复数指示物,除非上下文另外明确规定。例如,“一个(a)”或“一个(an)”表示“至少一个”或“一个或多个”。应当理解的是,在本文中描述的方面和变体包括“由...组成”和/或“基本上由...组成”的方面和变体。

[0317] 贯穿本公开内容,将要求保护的主题的各个方面以范围格式呈现。应当理解的是,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应该被解释为对要求保护的主题的范围的硬性限制。因此,应该认为范围的描述具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,在提供一系列值的情况下,应当理解的是,在该范围的上限和下限之间的每个中间值以及在该陈述范围内的任何其他陈述值或中间值都被包括在所要求保护的主题内。这些较小范围的上限和下限可以被独立地包括在所述较小范围内,并且还被包括在要求保护的主题内,受制于所陈述范围内的任何特别排除的极限值。当陈述范围包括极限值之一或两者时,排除这些被包括的极限值的任一者或两者的范围也被包括在要求保护的主题内。无论范围的宽度如何,这都是适用的。

[0318] 如本文中使用的术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知道的对应值的通常误差范围。在本文中提及的“大约”值或参数包括(并描述)针对该值或参数本身的实施方案。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0319] 如本文中使用的,组合物是指包括细胞在内的两种或更多种产物、物质或化合物的任何混合物。它可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊剂、水性的、非水性的或其任何组合。

[0320] 如本文中使用的,细胞或细胞群对于特定标志物是“阳性”的陈述是指特定标志物(通常是表面标志物)在细胞上或细胞中的可检测存在。当提及表面标志物时,该术语是指通过流式细胞术检测的表面表达的存在,例如,通过用与标志物特异性地结合的抗体染色并检测所述抗体,其中在基本上高于在其他条件都相同时用同种型匹配的对照进行相同的程序检测到的染色的水平和/或在与已知对标志物呈阳性的细胞基本上相似的水平、和/或在比已知对标志物呈阴性的细胞显著更高的水平可通过流式细胞术检测染色。

[0321] 如本文中使用的,细胞或细胞群对于特定标志物是“阴性”的陈述是指特定标志物(通常是表面标志物)在细胞上或细胞中的实质性可检测存在的缺乏。当提及表面标志物时,该术语是指通过流式细胞术检测的表面表达的缺乏,例如,通过用与标志物特异性地结合的抗体染色并检测所述抗体,其中在基本上高于在其他条件都相同时用同种型匹配的对照进行相同的程序检测到的染色的水平、和/或在比已知对标志物呈阳性的细胞显著更低的水平、和/或在与已知对标志物呈阴性的细胞相比基本上相似的水平通过流式细胞术未

检测到染色。

[0322] 如本文中使用的,术语“表达”是指基于核酸分子的编码序列(比如基因)借此产生多肽的过程。所述过程可包括转录、转录后控制、转录后修饰、翻译、翻译后控制、翻译后修饰或其任何组合。

[0323] 如本文中使用的,受试者包括任何活生物体,例如人和其他哺乳动物。哺乳动物包括但不限于人类和非人类动物,包括农场动物、运动动物、啮齿动物和宠物。

[0324] 如本文中使用的,对照是指与测试样品基本上相同的样品,例外之处在于它没有用测试参数处理,或者如果是血浆样品,它可以来自不受感兴趣的条件下影响的正常志愿者。对照也可以是内部对照。

[0325] 如本文中使用的,“可操作连接”或“可操作地连接”是指组件比如DNA序列(例如异源核酸)和调控序列以这样一种方式结合,当适当的分子(例如转录激活蛋白)与调控序列结合时允许基因表达。因此,这意味着所描述的组件处于允许它们以其预期方式起作用的关系。

[0326] 如本文中使用的,当针对核苷酸序列(参考核苷酸序列)或氨基酸序列(参考氨基酸序列)使用时,“序列同一性百分比(%)”和“同一性百分比”分别定义为在比对序列并引入空位(如果需要)以实现序列同一性最大百分比之后在候选序列中与参考序列中的残基相同的核苷酸残基或氨基酸残基的百分比。以本领域技术内的各种方法可实现为了确定序列同一性百分比的比对,例如,利用可公开获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需要的任何算法。

[0327] 如本文中使用的术语“载体”是指能够传送与其连接的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自身复制核酸结构的载体以及组入其已被引入的宿主细胞中的基因组中的载体。某些载体能够指导与它们可操作连接的核酸的表达。这样的载体在本文中被称为“表达载体”。其中载体是病毒载体,比如慢病毒载体。

[0328] 除非另外定义,本文中使用的术语、符号和其他技术和科学术语或用辞预期具有与所要求保护的主体所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。在一些情况下,为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义了具有通常理解的含义的术语,并且本文中包含的这些定义不应被解释为表示与本领域通常所理解的实质性差异。

[0329] 出于所有目的将本申请中提及的所有出版物,包括专利文献、科学论文和数据库在内,通过提述完整并入本文,其程度如同每一单独的出版物通过提述单独并入一样。如果本文中阐述的定义与通过提述并入本文的专利、申请、公开申请和其他出版物中阐述的定义相反或以别的方式不一致,则本文中阐述的定义优先于通过提述并入本文的定义。

[0330] 在本文中使用的章节标题仅仅是出于组织的目的,而不应当解释为限制所描述的主题。

示例性实施方案

[0331] 其中提供的实施方案为:

1. 一种免疫调节多肽,其包含:
 - a) 第一肽;
 - b) 第二肽;和

c) 连接所述第一肽和第二肽的连接区,其中所述连接区包含与靶分子结合的靶向模块。

2. 实施方案1的免疫调节多肽,其中所述第一肽和第二肽中的至少一者是细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或是细胞因子或趋化因子的功能部分。

3. 实施方案1或实施方案2的免疫调节多肽,其中所述第一肽是细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或是细胞因子或趋化因子的功能部分。

4. 实施方案1-3中任一项的免疫调节多肽,其中所述第二肽是细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或是细胞因子或趋化因子的功能部分。

5. 实施方案1-4中任一项的免疫调节多肽,其中所述第一肽和第二肽两者独立地是细胞因子或趋化因子、细胞因子或趋化因子的亚基或细胞因子或趋化因子的功能部分。

6. 实施方案1-5中任一项的免疫调节多肽,其中所述第一肽和第二肽是相同的细胞因子或趋化因子或其功能部分,或者是相同细胞因子或趋化因子的相同亚基。

7. 实施方案1-5中任一项的免疫调节多肽,其中所述第一肽和第二肽是不同的细胞因子或趋化因子或其功能部分,或者是相同或不同细胞因子或趋化因子的不同亚基。

8. 实施方案1-7中任一项的免疫调节多肽,其中所述第一肽是细胞因子或趋化因子的第一亚基,并且所述第二肽是细胞因子或趋化因子的第二亚基。

9. 实施方案1-7中任一项的免疫调节多肽,其中所述细胞因子或趋化因子是单体。

10. 实施方案1-8中任一项的免疫调节多肽,其中所述第一和/或第二肽独立地包含细胞因子或趋化因子的亚基,所述细胞因子或趋化因子是多聚体蛋白质。

11. 实施方案1-4中任一项的免疫调节多肽,其中所述第一肽或第二肽是标签或标记物。

12. 一种免疫调节多肽,其包含:

a) 第一肽,其包含细胞因子或趋化因子的第一亚基或其功能部分;

b) 第二肽,其包含细胞因子或趋化因子的第二亚基或其功能部分;和

c) 连接所述第一肽和第二肽的连接区,其中所述连接区包含与靶分子结合的靶向模块。

13. 实施方案1-8、10和12中任一项的免疫调节多肽,其中所述细胞因子或趋化因子是同二聚体或异二聚体。

14. 实施方案1-13中任一项的免疫调节多肽,其中所述连接区进一步包含至少一个将靶向模块连接至所述第一肽或第二肽的多肽接头。

15. 实施方案2-14中任一项的免疫调节多肽,其中所述细胞因子或趋化因子或其亚基或功能部分选自下组,该组的组成为:IL-12、IL-15、IL-2、IL-18、GM-CSF、IL-7、IL-21、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IL-17、IL-23、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-11、IL-13、IL-27、促红细胞生成素、G-CSF、生长激素、催乳素、抑瘤素M和白血病抑制因子或其亚基或功能部分。

16. 实施方案1-15中任一项的免疫调节多肽,其中所述第一肽或第二肽独立地包含选自IL-12、IL-23、IL-27和IL-35的细胞因子或趋化因子的亚基或其功能部分。

17. 实施方案1-7和9-16中任一项的免疫调节多肽,其中所述第一肽或第二肽独立地是IL-12的亚基或其功能部分。

18. 实施方案17的免疫调节多肽,其中所述第一肽包含IL-12p35亚基或IL-12p40亚基

或其功能部分,并且所述第二肽包含另一个IL-12p35亚基和IL-12p40亚基或其功能部分。

19.一种免疫调节多肽,其包含:

a) 第一肽,其包含IL-12的p35亚基或其功能部分;

b) 第二肽,其包含IL-12的p40亚基或其功能部分;和

c) 连接所述第一肽和第二肽的连接区,其中所述连接区包含与靶分子结合的靶向模块。

20.实施方案18或实施方案19的免疫调节肽,其中p35亚基包含在SEQ ID NO:10中列出的氨基酸序列或与其具有至少95%序列同一性的序列并且/或者p40亚基包含在SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列或与其具有至少95%序列同一性的序列。

21.实施方案18-20中任一项的免疫调节多肽,其中所述连接区进一步包含至少一个将靶向模块连接至p35亚基或p40亚基的多肽接头。

22.实施方案14-18和21中任一项的免疫调节多肽,其中所述多肽接头包含约2个至约20个氨基酸。

23.实施方案14-18和21-22中任一项的免疫调节多肽,其中所述多肽接头包含序列GGGS(n),其中n为1-5(SEQ ID NO:29)。

24.实施方案23的免疫调节多肽,其中所述多肽接头包含在SEQ ID NO:7-9的任一个中列出的序列。

25.实施方案1-24中任一项的免疫调节多肽,其中所述连接区包含两个多肽接头。

26.实施方案1-25中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块被包含在第一多肽接头和第二多肽接头之间。

27.实施方案1-26中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶分子与疾病或疾患相关。

28.实施方案27的免疫调节多肽,其中所述疾病或疾患是传染性疾病或疾患、自身免疫性疾病、炎性疾病或肿瘤或癌症。

29.实施方案1-28中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶分子与肿瘤相关或存在于肿瘤上。

30.实施方案1-29中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶分子是肿瘤抗原。

31.实施方案1-30中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶分子选自下组,该组的组成为:肝细胞生长因子(HGF)、肝细胞生长因子受体(HGFR)、肝素、VEGF、VEGF-A、VEGFR2、VEGFR3、HER2、PD-1、肌腱蛋白C、CTLA-4、LAG3、PD-L1、EGFR、EPCAM、RANKL、NG2蛋白聚糖、CD20、CD52、CD19、CD3、CD30、IL-6、CD38、SLAMF7、GD2、CD13、CD274、CD279、CD40L和CD47。

32.实施方案1-31中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块包含约3个至约300个氨基酸、约3个至约100个氨基酸、约3个至约20个氨基酸、约6个至约20个氨基酸或约10个氨基酸。

33.实施方案1-32中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块表现出约 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $2 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $3 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $4 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1.5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $2 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $3 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $4 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 、约 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 1×10^{-2} 秒或更低、或约 $5 \times 10^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或更大的结合靶分子的 k_{off} 速率。

34.实施方案1-33中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块是或包含抗体或抗体

片段。

35. 实施方案34的免疫调节多肽,其中所述抗体片段是单链片段。

36. 实施方案34或实施方案35的免疫调节多肽,其中所述抗体片段是包含可变重链区的单结构域抗体。

37. 实施方案34或实施方案35的免疫调节多肽,其中所述抗体片段包含通过柔性接头连接的抗体可变区。

38. 实施方案34-37中任一项的免疫调节多肽,其中所述抗体片段包含scFv。

39. 实施方案1-38中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块包含选自下组的抗体的可变重链(VH)和/或可变轻链(VL),该组的组成为:曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、雷莫芦单抗(ramucirumab)、阿特殊单抗、贝伐珠单抗、帕尼单抗、西妥昔单抗、耐昔妥珠单抗、地诺单抗、纳武单抗、派姆单抗、利妥昔单抗、奥法木单抗、奥比妥珠单抗、阿伦单抗、博纳吐单抗、本妥昔单抗(brentuximab vedotin)、司妥昔单抗(siltuximab)、伊匹单抗、达雷木单抗、埃罗妥珠单抗、达妥昔单抗(dinutuximab)、卡妥索单抗(catumaxomab)。

40. 实施方案1-39中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块包含抗EPCAM抗体的V_H链和/或V_L链。

41. 实施方案1-40中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块包含在SEQ ID NO:17、24或25中列出的序列或与SEQ ID NO:17、24或25具有至少95%序列同一性并且与靶分子结合的序列。

42. 实施方案1-41中任一项的免疫调节多肽,其中所述免疫调节多肽包含在SEQ ID NO:6中列出的序列或与这样的序列具有至少95%序列同一性的序列。

43. 实施方案1-33中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块是或包含肽结合基序。

44. 实施方案1-33和43中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块是肝素结合肽。

45. 实施方案44的免疫调节多肽,其中所述肝素结合肽(HBP)衍生自纤连蛋白或BMP4,和/或是牛来源的。

46. 实施方案1-33和43中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块选自下组,该组的组成为:肝细胞生长因子(HGF)结合肽、VEGF结合肽、VEGF-A结合肽、VEGFR2结合肽、EPCAM结合肽、HER2结合肽、PD-1结合肽、肌腱蛋白C结合肽、CTLA-4结合肽、LAG3结合肽、PD-L1结合肽、EGFR结合肽、RANKL结合肽、CD20结合肽、CD52结合肽、CD19结合肽、CD3结合肽、CD30结合肽、IL-6结合肽、CD38结合肽、SLAMF7结合肽、GD2结合肽、CD274结合肽、CD279结合肽、CD40L结合肽和CD47结合肽。

47. 实施方案1-33、43和46中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块包含HGF结合肽或EGFR结合肽(EGFRBP)。

48. 实施方案1-33和43-47中任一项的免疫调节多肽,其中所述靶向模块包含在SEQ ID NO:13、14、15、16、26、27或28的任一个中列出的序列或与SEQ ID NO:13、14、15、16、26、27或28的任一个具有至少95%序列同一性并且与靶分子结合的序列。

49. 实施方案1-33和43-48中任一项的免疫调节多肽,其中所述免疫调节多肽包含在SEQ ID NO:1-5的任一个中列出的序列或与SEQ ID NO:1-5的任一个具有至少95%序列同一性的序列。

50. 实施方案1-49中任一项的免疫调节多肽,其中所述免疫调节多肽与参考IL-12相比

表现出增加的通过IL-12R刺激的活性。

51. 实施方案50的免疫调节多肽,其中所述参考IL-12不包含连接区或包含由在SEQ ID NO:7-9的任一个中列出的序列组成的连接区。

52. 实施方案1-51中任一项的免疫调节多肽,其中所述免疫调节多肽相比于它与不表达靶分子的细胞的结合表现出增加的与表达靶分子的靶细胞的结合。

53. 实施方案50-52中任一项的免疫调节多肽,其中所述活性和/或结合增加大于1.2倍、大于1.5倍、大于2.0倍、大于3.0倍、大于4.0倍、大于5.0倍或大于10.0倍。

54. 实施方案1-53中任一项的免疫调节多肽,其中所述免疫调节多肽相对于不含连接区的重组免疫调节多肽以增加、降低或相似的结合亲和力结合一种或多种同源受体。

55. 实施方案1-54中任一项的免疫调节多肽,其中,所述免疫调节多肽以范围从或从约 10^{-5} M至或至约 10^{-15} M、 10^{-6} M至或至约 10^{-12} M、从或从约 10^{-7} M至或至约 10^{-11} M、从或从约 10^{-6} M至或至约 10^{-8} M、或从或从约 10^{-7} M至或至约 10^{-8} M的平衡解离常数(K_D)结合一种或多种同源受体。

56. 实施方案1-54中任一项的免疫调节多肽,其中,所述免疫调节多肽结合一种或多种同源受体,其 K_D 为等于或约为(或小于或小于约)100、50、40、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5或0.1nM;或

等于或约为(或小于或小于约)1nM、100皮摩尔(pM)、90pM、80pM、70pM、60pM、50pM、40pM、30pM、25pM、20pM、15pM、10pM或1pM。

57. 一种多核苷酸,其编码实施方案1-56中任一项的免疫调节多肽。

58. 实施方案57的多核苷酸,进一步包含信号序列。

59. 实施方案58的多核苷酸,其中所述信号序列编码衍生自CD33的信号肽。

60. 实施方案59的多核苷酸,其中所述信号肽包含在SEQ ID NO:18中列出的序列或与这样的序列具有至少95%序列同一性的序列。

61. 实施方案57-60中任一项的多核苷酸,其中所述多核苷酸进一步包含至少一个可操作连接的控制所述免疫调节多肽表达的启动子、增强子或反式激活因子。

62. 实施方案61的多核苷酸,其中所述免疫调节多肽的表达是诱导型或条件型的。

63. 实施方案61或62的多核苷酸,其中所述启动子、增强子或反式激活因子是T细胞活化因子。

64. 实施方案61-63中任一项的多核苷酸,其中所述启动子、增强子或反式激活因子含有一种或多种T细胞转录因子的结合位点。

65. 实施方案64的多核苷酸,其中所述T细胞转录因子是活化T细胞核因子(NFAT)、C/EBP、STAT1、STAT2和/或NF κ B。

66. 实施方案61或实施方案62的多核苷酸,其中所述启动子、增强子或反式激活因子的活化是条件性的,任选地为诱导型启动子、增强子或反式激活因子或阻抑型启动子、增强子或反式激活因子。

67. 实施方案61、62或66中任一项的多核苷酸,其中所述启动子、增强子或反式激活因子在存在于肿瘤微环境中的一种或多种病症的存在下是有活性的。

68. 实施方案67的多核苷酸,其中存在于肿瘤微环境中的一种或多种病症选自缺氧、低葡萄糖、酸性pH或氧化应激。

69. 实施方案67或68的多核苷酸,其中存在于肿瘤微环境中的一种或多种病症是缺氧。
70. 实施方案61、62或66-69中任一项的多核苷酸,其中所述多核苷酸与启动子可操作连接,并且所述启动子是HIF-1- α 反应型启动子。
71. 实施方案61、62或66-70中任一项的多核苷酸,其中所述多核苷酸与启动子可操作连接,并且所述启动子包含一个或多个缺氧反应元件。
72. 实施方案71的多核苷酸,其中所述缺氧反应元件包含序列5'- (A/G) CGT (G/C) (G/C) -3'。
73. 实施方案70-72中任一项的多核苷酸,其中所述启动子启动子是促红细胞生成素(Epo)、VEGF-A、磷酸甘油酸激酶1 (PGK1)、乳酸脱氢酶A (LDH A)、醛缩酶A (ALDA) 或甘油醛3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 启动子。
74. 实施方案73的多核苷酸,其中所述启动子在SEQ ID NO:85-90的任一个中列出。
75. 实施方案67或68的多核苷酸,其中存在于肿瘤微环境中的一种或多种病症是低葡萄糖。
76. 实施方案61、62、66-68或75中任一项的多核苷酸,其中所述多核苷酸与启动子可操作连接,所述启动子为GRP78或己糖激酶II启动子。
77. 实施方案61、62或66中任一项的多核苷酸,其中所述启动子、增强子或反式激活因子可通过辐射、热量或在药物存在下诱导。
78. 实施方案77的多核苷酸,其中所述启动子是辐射诱导型启动子。
79. 实施方案77的多核苷酸,其中所述辐射诱导型启动子包含CArG元件或CC (富含A+T) ₆GG基序。
80. 实施方案78或79的多核苷酸,其中所述辐射诱导型启动子是EGR-1、Waf-1、RecA或cIAP2启动子或是合成启动子。
81. 实施方案78-80中任一项的多核苷酸,其中所述辐射诱导型启动子是包含在SEQ ID NO:92-95中列出的任一序列的合成启动子。
82. 实施方案77的多核苷酸,其中所述启动子、增强子或反式激活因子是热诱导型启动子、增强子或反式激活因子。
83. 实施方案82的多核苷酸,其中所述热诱导型启动子、增强子或反式激活因子包含热激元件 (HSE)。
84. 实施方案83的多核苷酸,其中所述热诱导型启动子、增强子或反式激活因子是热激启动子 (HSP)。
85. 实施方案84的多核苷酸,其中所述HSP是HSP70B启动子。
86. 实施方案73的多核苷酸,其中所述热诱导型启动子、增强子或反式激活因子是Gadd 153启动子。
87. 实施方案77的多核苷酸,其中所述启动子、增强子或反式激活因子是药物诱导型启动子、增强子或反式激活因子。
88. 实施方案66或实施方案87的多核苷酸,其中所述诱导型启动子、增强子或反式激活因子包含Lac操纵子序列、四环素操纵子序列、半乳糖操纵子序列或多西环素操纵子序列、雷帕霉素操纵子序列、他莫昔芬操纵子序列或激素反应型操纵子序列或其类似物。
89. 实施方案66、87或88中任一项的多核苷酸,其中所述诱导型启动子包含四环素反应

元件 (TRE)。

90. 实施方案87的多核苷酸,其中所述药物诱导型启动子、增强子或反式激活因子包含多药耐药 (mdr1) 基因启动子。

91. 实施方案57-90中任一项的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含单个核酸序列。

92. 实施方案57-90中任一项的多核苷酸,其包含编码所述免疫调节多肽的第一核酸序列和编码重组受体的第二核酸序列。

93. 实施方案92的多核苷酸,其中所述重组受体是或包含嵌合抗原受体 (CAR)。

94. 实施方案92或实施方案93的多核苷酸,其进一步包含至少一个可操作连接的控制所述免疫调节多肽和/或重组受体表达的启动子。

95. 实施方案92-94中任一项的多核苷酸,其进一步包含内部核糖体进入位点 (IRES) 或编码在所述第一和第二核酸序列之间的连接肽的核酸序列,其中所述连接肽在翻译期间或之后使所述第一和第二核酸序列的翻译产物分离。

96. 实施方案95的多核苷酸,其中所述连接肽包含自切割肽或引起核糖体跳跃的肽,任选地为T2A肽。

97. 实施方案57-96中任一项的多核苷酸,其被优化以去除CpG基序和/或经密码子优化。

98. 实施方案97的多核苷酸,其是经人密码子优化的。

99. 一种载体,其包含实施方案57-98中任一项的多核苷酸。

100. 实施方案99的载体,其为病毒载体。

101. 实施方案99或实施方案100的载体,其为逆转录病毒载体。

102. 实施方案99-101中任一项的载体,其为慢病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。

103. 一种工程化细胞,其包含实施方案1-56中任一项的免疫调节多肽。

104. 一种工程化细胞,其包含实施方案57-98中任一项的多核苷酸。

105. 一种工程化细胞,其包含实施方案99-102中任一项的载体。

106. 实施方案103-105中任一项的工程化细胞,其中所述工程化细胞分泌免疫调节多肽。

107. 实施方案103-106中任一项的工程化细胞,其进一步包含重组受体。

108. 实施方案107的工程化细胞,其中所述重组受体结合与疾病或疾患相关的靶抗原。

109. 实施方案108的工程化细胞,其中所述疾病或疾患是传染性疾病或疾患、自身免疫性疾病、炎性疾病或肿瘤或癌症。

110. 实施方案108或实施方案109的工程化细胞,其中所述靶抗原是肿瘤抗原。

111. 实施方案108-110中任一项的工程化细胞,其中所述靶抗原选自下组,该组的组成为:ROR1、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚抗原、TAG72、VEGF-R2、VEGFR3、癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、维尔姆斯瘤1 (WT-1) 和细胞周期蛋白A1 (CCNA1)。

112. 实施方案103-111中任一项的工程化细胞,其中所述靶向模块是或衍生自人蛋白。
113. 实施方案103-112中任一项的工程化细胞,其中所述免疫调节蛋白在施用它的受试者中不具有免疫原性和/或不诱导免疫应答。
114. 实施方案107-113中任一项的工程化细胞,其中所述重组受体是功能性非TCR抗原受体或转基因TCR。
115. 实施方案107-114中任一项的工程化细胞,其中所述重组受体是嵌合抗原受体(CAR)。
116. 实施方案107-115中任一项的工程化细胞,其中所述重组受体包含含有抗原结合结构域的细胞外部分。
117. 实施方案116的工程化细胞,其中所述抗原结合结构域是或包含抗体或抗体片段。
118. 实施方案117的工程化细胞,其中所述抗体片段是单链片段。
119. 实施方案117或实施方案118的工程化细胞,其中所述片段包含通过柔性接头连接的抗体可变区。
120. 实施方案117-119中任一项的工程化细胞,其中所述片段包含scFv。
121. 实施方案107-120中任一项的工程化细胞,其中所述重组受体包含细胞内信号转导区。
122. 实施方案121的工程化细胞,其中所述细胞内信号转导区包含细胞内信号转导结构域。
123. 实施方案122的工程化细胞,其中所述细胞内信号转导结构域是或包含初级信号转导结构域、能够在T细胞中诱导初级活化信号的信号转导结构域、T细胞受体(TCR)组分的信号转导结构域、和/或包含免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)的信号转导结构域。
124. 实施方案122的工程化细胞,其中所述细胞内信号转导结构域是或包含CD3链(任选地CD3-zeta(CD3 ζ)链)的细胞内信号转导结构域或其信号转导部分。
125. 实施方案122-124中任一项的工程化细胞,其进一步包含置于所述细胞外部分和所述细胞内信号转导区之间的跨膜结构域。
126. 实施方案122-125中任一项的工程化细胞,其中所述细胞内信号转导区进一步包含共刺激信号转导结构域。
127. 实施方案126的工程化细胞,其中所述共刺激信号转导结构域包含T细胞共刺激分子的细胞内信号转导结构域或其信号转导部分。
128. 实施方案126或实施方案127的工程化细胞,其中所述共刺激信号转导结构域包含CD28、4-1BB或ICOS的细胞内信号转导结构域或其信号转导部分。
129. 实施方案126-128中任一项的工程化细胞,其中所述共刺激信号转导结构域位于所述跨膜结构域和所述细胞内信号转导结构域之间。
130. 实施方案103-129中任一项的工程化细胞,其中所述工程化细胞是T细胞。
131. 实施方案103-130中任一项的工程化细胞,其为CD8⁺T细胞或CD4⁺T细胞。
132. 实施方案103-131中任一项的工程化细胞,其中与未工程化的细胞相比或与包含重组受体但不含免疫调节多肽的细胞相比,所述工程化细胞表现出增加的持久性和/或存活。
133. 实施方案103-132中任一项的工程化细胞,其中所述工程化细胞与参考IL-12相比

表现出增加的通过IL-12R刺激的活性。

134. 实施方案133的工程化细胞,其中参考IL-12不包含连接区或包含由SEQ ID NO:7-9中列出的任一个序列组成的连接区。

135. 实施方案103-134中任一项的工程化细胞,其中所述工程化细胞分泌免疫调节多肽,所述免疫调节多肽相比于它与不表达靶分子的细胞的结合表现出增加的与表达靶分子的靶细胞的结合。

136. 实施方案103-135中任一项的工程化细胞,其中与对不表达靶分子的细胞的杀伤相比,所述工程化细胞实现了增加的对表达靶分子的靶细胞的杀伤。

137. 实施方案132-136中任一项的工程化细胞,其中所述增加的持久性、活性、结合和/或杀伤大于参考工程化细胞所实现的持久性、活性、结合和/或杀伤,所述参考工程化细胞表达或分泌在亚基之间包含多肽接头但不含靶向模块的免疫调节多肽。

138. 一种组合物,其包含实施方案1-56中任一项的免疫调节多肽。

139. 一种组合物,其包含实施方案103-137中任一项的工程化细胞。

140. 实施方案138或实施方案139的组合物,其进一步包含药学上可接受的赋形剂。

141. 一种治疗方法,其包括将实施方案1-56中任一项的免疫调节多肽、实施方案103-137中任一项的工程化细胞、或实施方案138-140中任一项的组合物施用于患有疾病或疾患的受试者。

142. 实施方案141的方法,其中所述免疫调节多肽特异性地结合由与疾病或疾患相关的细胞表达的靶分子。

143. 实施方案141或实施方案142的治疗方法,其中所述工程化细胞表达特异性地结合与疾病或病症相关的抗原的重组受体。

144. 实施方案141-143中任一项的方法,其中所述疾病或疾患是癌症、肿瘤、自身免疫性疾病或疾患或传染性疾病。

实施例

[0332] 下面的实施例仅仅是为了说明的目的而被包括在内,并非意在限制本发明的范围。

实施例1:IL-12免疫调节多肽的设计

[0333] 设计单链IL-12(scIL-12)免疫调节多肽,其包括一个或多个与特定的靶分子或基序特异性地结合的靶向模块,例如,用于将所述多肽靶向、定位或定向在表达所述靶分子或基序的细胞中或附近或相对于所述细胞的特定取向。将构建体合成为编码IL-12的p35亚基(在SEQ ID NO:10中列出)和p40亚基(在SEQ ID NO:11中列出)的单链序列,所述亚基通过含有靶向模块的多肽接头以及任选地一个或多个将靶向模块连接至IL-12亚基的G4S(3)肽接头(SEQ ID NO:7)连接。

[0334] 表3列出了含有各种靶向模块的示例性IL-12免疫调节多肽的序列,所述靶向模块衍生自:BMP4的肝素结合肽(HBP BMP4;SEQ ID NO:13)、纤连蛋白的肝素结合肽(HBP FBN, SEQ ID NO:14)、肝细胞生长因子结合肽(HGFBP,SEQ ID NO:15)、表皮生长因子受体结合肽(EGFRBP;SEQ ID NO:16)或抗EPCAM scFv抗体(SEQ ID NO:17)。还设计了其中多肽接头仅含G4S(3)接头(在SEQ ID NO:9中列出)并且没有连接亚基的靶向模块的对照多肽(命名为

scIL-12)。还将每个序列设计为编码从CD33 (MPLLLLLLPLLWAGALAM, SEQ ID NO:18) 衍生的N末端信号序列,用于在细胞中表达时分泌免疫调节蛋白。在一些情况下,在C末端包括一个或多个标签(例如6x His-标签,SEQ ID NO:20或Strep-tag® II,SEQ ID NO:21)。

表 3: 示例性 IL-12 免疫调节多肽

名称	一个/多个 靶向模块	序列	SEQ ID NO.
scIL-12	无	IWELKKDVYVVELDWYDPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTL TIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIK PDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLRLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEEIDHE DITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVP QKSSLEBPDFYKTIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	1
scIL-12- HBP BMP4	HBP, BMP4	IWELKKDVYVVELDWYDPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTL TIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR	2

		GDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLP I EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI I K PDPKLNQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGGSRKKNPNC RRHGGGSRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMM ALCLSS IYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVI DELMQALNFN SETVPQKSSLEEPDFYKTK I KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	
scIL-12- HBP FBN	HBP FBN	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTL TIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLP I EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI I K PDPKLNQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGGSKNNQKSE PLIGRKKTGGGSRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRK TSFMMALCLSS IYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVI DELMQ ALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTK I KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	3
scIL-12- HGFBP	HGFBP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTL TIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLP I EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI I K PDPKLNQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGGSVWNWVCF RDVGCWVLGGGSRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLRAVSNMLQKARQTLEF YPCTSEEDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASR KTSFMMALCLSS IYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVI DELM QALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTK I KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	4
scIL-12- EGFRBP	EGFRBP	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTL TIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR	5

		GDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIK PDPKLNQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGSSVDNPHV CGGGSRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEEI DHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMAL CLSSIIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSE TVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	
scIL-12- 抗 EPCAM	抗 EPCAM	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTL TIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIK PDPKLNQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGSSQVQLVQS GAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISVVVRQAPGGLEWGGIIPIFGTAN YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLLWNYWGQGLVT VSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSV SSNLAVVYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSE DFAVYYCQQYNWPPGFTFGPGTKVDIKGGGSRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQ NLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNES CLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMD PKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSE TVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	6

实施例2:通过免疫调节多肽的IL-12介导的细胞刺激的评估

[0335] 测试了如实施例1中所述的示例性IL-12免疫调节多肽scIL-12-HBP FBN (SEQ ID NO:3) 和scIL-12-EGFRBP (SEQ ID NO:5) 刺激从表达IL-12受体 (IL-12R) 的细胞分泌细胞因子的活性。作为对照,使用在其接头中不含整合的靶向模块的scIL-12 (SEQ ID NO:1) 或重组人IL-12 (rHuIL-12) (R&D Systems) 作为对照。

[0336] 用植物血凝素 (PHA) 刺激外周血单核细胞 (PBMC) 以产生PHA母细胞,以便上调IL-12受体 (IL-12R) 的表面表达。用浓度增加的各种免疫调节多肽或浓度范围为0-25ng/mL的对照刺激PHA母细胞。在细胞刺激后24小时和72小时,收集上清液并通过ELISA测量干扰素 γ (IFN γ) 或GM-CSF。结果显示在图1中。

[0337] 如图1所示,在用IL-12免疫调节多肽或对照刺激PHA母细胞后观察到IFN γ 和GM-CSF的剂量依赖性增加。在刺激后24小时,用测试多肽scIL-12-HBP FBN和scIL-12-EGFRBP以及scIL-12对照多肽处理的PHA母细胞与用各浓度的rHuIL-12处理的PHA母细胞显示出相

似的IFN γ 和GM-CSF水平。然而,在刺激后72小时,与用rHuIL-12刺激的PHA母细胞相比,用每种单链多肽(scIL-12-HBP FBN、scIL-12-EGFRBP或sc IL-12 G4S (3) 多肽) 刺激的PHA母细胞中IFN γ 和GM-CSF的水平显著更高。结果证明,相比于rHuIL-12,包含通过多肽接头连接的p35和p40亚基并且任选地包含靶向模块的IL-12免疫调节多肽的单链形式可以是更有效的免疫细胞激活剂。

实施例3:用IL-12免疫调节多肽刺激后T细胞增殖的评估

[0338] 通过基于免疫亲和力的富集从三位人供体受试者分离T细胞,激活来自每个供体的细胞并用编码抗CD19CAR的病毒载体转导。CAR含有抗CD19scFv、Ig衍生的间隔物、人CD28衍生的跨膜结构域、人4-1BB衍生的细胞内信号转导结构域和人CD3 ζ 衍生的信号转导结构域。将以每孔20,000个细胞一式三份在96孔聚-D-赖氨酸包被板中的表达CD19的靶细胞(转导以表达CD19、K562-CD19的K562细胞)与单独的各种表达CAR的T细胞(以不同的效:靶比(5:1、2.5:1、1:1)或在实施例1中描述的示例性scIL-12-HBP FBN(SEQ ID NO:3)免疫调节多肽(0.5ng/mL或5ng/mL)存在下一起温育。在没有scIL2的靶细胞存在下的温育被用作“未处理的”对照。

[0339] 确定刺激前第0天相比于刺激后第5天的细胞总数的倍数变化。如图2所示,与未处理的对照细胞相比,在scIL-12-HBP FBN存在下在以0.5或5ng/mL处理的细胞中在所有测试的E:T比都观察到细胞数量的更大增加,这与免疫调节多肽在表达抗原的靶细胞存在下增强细胞增殖和/或存活的能力一致。

实施例4:暴露于IL-12免疫调节多肽后的T细胞杀伤活性

[0340] 如实施例3中所述,将表达CD19的K562-CD19靶细胞与表达抗CD19-CAR的T细胞以不同的E:T比(包括5:1、2.5:1和1:1)共培养。如实施例1中所述,在scIL-12-HBP FBN(SEQ ID NO:3)存在下以0.5或5ng/mL温育共培养物,或者不处理所述共培养物。通过向共培养物中加入IncuCyteTM荧光半胱天冬酶3/7试剂以检测细胞(凋亡细胞),在0至约110小时的时间过程中实时监测细胞裂解。通过随时间的自动图像分析来定量靶细胞死亡。确定每一浓度的荧光信号随时间的曲线下面积(AUC)。使用下式确定杀伤指数:1/AUC。

[0341] 图3列出了每一测试条件的杀伤指数。如图3所示,与未处理对照细胞相比,在scIL-12-HBP FBN多肽存在下的细胞刺激增强了在所有E:T比的T细胞对靶细胞的杀伤。

实施例5:与IL-12受体(IL-12Rb)结合

[0342] 通过表面等离子体共振测试了如实施例1中所述的示例性单链IL-12(scIL-12)免疫调节多肽、scIL-12-G4S(SEQ ID NO:1)、scIL-12-HBP FBN(SEQ ID NO:3)和scIL-12-EGFRBP(SEQ ID NO:5)与IL-12受体 β 亚基(IL-12Rb)的功能性结合。还评估了ROR1-Fc与IL-12Rb的结合作为阴性对照。使用抗hIgG捕获芯片来固定IL-12Rb-hIgG1Fc(购自R&D Systems)。使用Biacore表面等离子体共振仪使大约30nM scIL-12分子流过固定的IL-12Rb来评估结合。结果显示在图4中。结果显示,仅含有接头序列(G4S)的scIL-12或含有包含靶向模块但不含ROR1-Fc的接头的scIL-12能够在功能上与IL-12受体(IL-12Rb)结合。

实施例6:与表达靶分子的细胞结合

[0343] 将实施例1中描述的示例性scIL-12免疫调节多肽进行可检测标记并与已知(或工程化)表达示例性靶分子(包括肝素、EGFR或HGFR)的靶细胞一起温育,所述靶分子单独地能够被包含在给定的scIL-12免疫调节多肽之一内的靶向模块结合。作为对照,还将所述细胞

与不含对应的靶向模块的对照scIL-12和/或rhIL-12和/或含有靶向模块的scIL-12一起在不表达被所述靶向模块识别的靶分子或基序的细胞存在下温育(或在较低水平上这样做)。

[0344] 通过流式细胞术或适当的其他方法评估结合,并在不同条件之间进行比较;在一些方面,与一种或多种对照相比,在涉及具有靶向模块的scIL-12的条件下的结合增加表明工程化的单链IL-12试剂对于被靶向模块识别的靶分子或基序的特异性,进一步支持scIL-12在靶标被表达或被怀疑表达或被优先表达的疾病、病症或环境中的效用。

[0345] 本发明并不意图限于特定公开的实施方案的范围,所提供的实施方案例如用于说明本发明的各个方面。根据本文中的描述和教导,对所述组合物和方法的各种修改将变得显而易见。可以在不脱离本公开的真实范围和精神的情况下实施这样的变化,并且这些变化预期落入本公开的范围內。

序列

SEQ ID NO.	序列	名称
1	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGG EVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ GVTCCAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDP KNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRA QDRYSSSWSEWASVPCSGGGSGGGSGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLRAVSNMLQKARQTLEF YPCTSEEDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKM YQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIR AVTIDRVMSYLNAS	Sc IL-12 G4S (3)
2	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGG EVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ GVTCCAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDP KNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRA QDRYSSSWSEWASVPCSGGGSRKKNPCRRHGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLRAVSNMLQKAR QTLEFYPTCTSEEDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIY EDLKMYPCTSEEDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIY AFRIRAVTIDRVMSYLNAS	Sc IL-12 HBP BMP4
3	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGG EVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ GVTCCAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDP KNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRA QDRYSSSWSEWASVPCSGGGSKNNQKSEPLIGRKKTGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLRAVSNM LQKARQTLEFYPTCTSEEDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALC LSSIYEDLKMYPCTSEEDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALC CILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	Sc IL-12 HBP FBN
4	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGG	Sc IL-12 HGFBP

	<p>EVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ GVTCCAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDP KNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRA QDRYSSSSWSEWASVPCSGGGGSVWNWVCFRDVGCWVLDGSGSRNLPVATPDPMFPLHHSQNLLRAVSN MLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMAL CLSSIIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPPQKSSLEEPDFYKTKIK LCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS</p>	
5	<p>IWELKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLTDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGG EVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ GVTCCAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDP KNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRA QDRYSSSSWSEWASVPCSGGGGSVDNPHVCGGGSRNLPVATPDPMFPLHHSQNLLRAVSNMLQKARQT LEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAF RIRAVTIDRVMSYLNAS</p>	Sc IL-12 EGFRBP
6	<p>IWELKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLTDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGG EVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ GVTCCAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDP KNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRA QDRYSSSSWSEWASVPCSGGGGSVQLVQSGAEVKKPCSSVKVSCASGGTFSSYAISVVVRQAPGQGLEWM GGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARGLLWNYWGQGLVTVSSKLSGS ASAPKLEEGEFSEARVETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAVVYQKPGQAPRLLIYGASTRA TGIPARFSGSGGTEFTLTISSLQSEDAVYYCQQYNNWPPGFTEGPGTKVDIKGGGSRNLPVATPDPMF PCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITN GSCLASRKTSFMMALCLSSIIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPPQ KSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS</p>	Sc IL-12 抗 EPCAM
7	GGGGS	G4S 接头
8	GGGSGGGGS	G4S(2) 接头
9	GGGSGGGSGGGGS	G4S(3) 接头
10	RNLPVATPDPMFPLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNE	IL-12 p35

	SCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSYIEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDEL MQALNFNSETVPPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	UniProt 号 P29459 残基 23-219
11	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGG EVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ GVTGGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIEVMDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPP KNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRA QDRYSSSSWSEWASVPCS	IL-12 p40 UniProt 号 P29460 残 基 23-328
12	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA	IL-12p40 信号序列
13	RKKNPNCRRH	肝素结合肽, BMP4
14	KNNQKSEPLIGRKKT	肝素结合肽, 纤连蛋白
15	VWNWVCFRDVGCWVL	HGF 结合肽
16	SVDNPHVC	EGFRBP
17	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISVVRQAPQGLEWGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGLLWNYWGQGLTVTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVETTLTQS PATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAVVYQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISL QSEDFAVYYCQYNNWPPGFTFGPGTKVDIK	抗 EPCAM scFv
18	MPLLLLLPLWAGALAM	CD33 信号序列
19	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLA	IL-12 p35 信号序列
20	HHHHHH	6x His 标签
21	WSHPQFEK	Strep-tag® II
22	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV	接头
23	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	接头
24	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISVVRQAPQGLEWGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGLLWNYWGQGLTVTVSS	抗 EPCAM 可变轻链 (VL)
25	ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAVVYQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEF TLTISLQSEDFAVYYCQYNNWPPGFTFGPGTKVDIK	抗 EPCAM 可变重链 (VH)
26	ATWLPPR	VEGF 结合肽
27	ITMQCGIHQGHKIRMICEMSF	VEGFR 结合肽
28	WQPPRARI	牛来源的肝素结合肽

29	GGGS (n)	接头 n 为 1 至 5
30	G IHVFILGCF SAGLPKTEANWVNI SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLE SGDASIHDTVENLIILANSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS	IL-15 前肽=氨基酸 1-19
31	APTSSSTKKTLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKATELKHLCLEBELKPLEEVLNL AQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	IL-2
32	MAAEPVEDNCIN FVAMK FIDNTLYFIAEDDENLESDFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDS DCRDNAPRTIFII SMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKII SFKEMNPPDNIKDTSDI IFFQRSVPG HDNKMQFESSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE D	IL-19 前肽=氨基酸 1-36
33	APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAEMNETVEVISEMFDLQEP TCLQTRLELYKQGLRGLTK LKGPLTMMASHYKQHCPTPETSCATQIITFESFKENLKD FLLVIPFDCWEPVQE	GM-CSF
34	DCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQLDMSKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNST GDFDLHLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKLNLCFLKRLLEIKTCWNK ILMGTKEH	IL-7
35	QGQDRHMI RMRQLIDI V DQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERII NVSIK KLRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMIHQHLSRTHGSEDS	IL-21
36	CDLPETHSLDNRR TMLLAQMSRI SPSSCLMDRHDGFPQEEFDGNQFQKAPAI SVLHELIQQIFNLF TTKD SSAAWDEDLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEBERVGETPLMNADSI LAVKKYFRRI TLYLTEKKYSPCAWEVV RAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE	IFN α -1/13
37	CDLPQTHSLGSRRTMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDS SAAWDETL LDKFYTELYQQLNDLEACV IQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVR AEIMRSFSLSTNLQESLRSKE	IFN α -2
38	CDLPQTHSLGNRRALILLAQMGRISHFSCLKDRHDFGPEEFDGHQFQKAQAI SVLHEMIQQTFNLFSTED SSAAWEQSLLEKFSTELYQQLNDLEACV IQEVGVEETPLMNEDSILAVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVV RAEIMRSLSFSTNLQKRLRRKD	IFN α -4
39	LGCDDL P QTHSLSNRR TLMIM AQMGRISPFSCLKDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAQAI SVLHEMIQQTFNLFST KDSSATWDETL LDKFYTELYQQLNDLEACMMQEVGVEDTPLMNVD S I LTVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWE VVRAEIMRSFSLSANLQERLRRKE	IFN α -5
40	SLDCDL P QTHSLGHRRTMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFRFPQEEFDGNQFQKAEAI SVLHEVIQQTFNLF S TKDSSVAWDERLLDKLYTELYQQLNDLEACVMQEVVGGTPLMNEDSILAVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAW	IFN α -6

	EVVRAEIMRSFSSSRNLQERLRRKE	
41	CDLPQTHSLNRRRALILLAQMGRISPFSCCLKDRHDFRFPPEEFDGQFQKTQAISVLHEMIQQTFLNLFSTED SSAAWEQSLLEKFSSTELYQQLNDLEACVIEVGVVEETPLMNEDFILAVRKYFQRITLYLMEKKYSPCAWEVV RAEIMRSFSFSTNLKKGLRRKD	IFN α -7
42	CDLPQTHSLGNRRRALILLAQMRRISPFSCCLKDRHDFEFPQEEFDDKQFQKAQAISVLHEMIQQTFLNLFSTKD SSAALDETLLEDFYIELDQQLNDLESCVMQEVGVIESPLMYEDSILAVRKYFQRITLYLTEKKYSSCAWEVV RAEIMRSFSLINLQKRLKSKE	IFN α -8
43	CDLPQTHSLGNRRRALILGQMGRISPFSCCLKDRHDFRIPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEMIQQTFLNLFSTED SSAAWEQSLLEKFSSTELYQQLNDLEACVIEVGVVEETPLMNEDSILAVRKYFQRITLYLIERKYSPCAWEVV RAEIMRSLSFSTNLQKRLRRKD	IFN α -10
44	CNLSQTHSLNRRRTLMLMAQMRRISPFSCCLKDRHDFEFPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEMMQQTFLNLFSTKN SSAAWDETLEKFYIELFQMQNDLEACVIEVGVVEETPLMNEDSILAVKKYFQRITLYLMEKKYSPCAWEVV RAEIMRSLSFSTNLQKRLRRKD	IFN α -14
45	CDLPQTHSLGNRRRALILLAQMGRISHFSCCLKDRYDFGFPQEVFDGNQFQKAQAISAFHEMIQQTFLNLFSTKD SSAAWDETLLDKFYIELFQQLNDLEACVTQEVGVVEEIALMNEDSILAVRKYFQRITLYLMGKKYSPCAWEVV RAEIMRSFSFSTNLQKGLRRKD	IFN α -16
46	CDLPQTHSLGNRRRALILLAQMGRISPFSCCLKDRHDFGLPQEEFDGNQFQKTQAISVLHEMIQQTFLNLFSTED SSAAWEQSLLEKFSSTELYQQLNNDLEACVIEVGMVEETPLMNEDSILAVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVV RAEIMRSLSFSTNLQKILRRKD	IFN α -17
47	CDLPQTHSLGNRRRALILLAQMGRISPFSCCLKDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEMIQQTFLNLFSTKD SSATWEQSLLEKFSSTELNQQQLNDLEACVIEVGVVEETPLMNVDSILAVKKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVV RAEIMRSFSLSKIPQERLRRKE	IFN α -21
48	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKLQQLQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQ DSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYGRILHYLKAKEYSHCAWT IVRVEILRNFFYFINRLTGYLNRN	IFN β -1
49	QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVET IKEDMNVKFFNSNKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIVMAELSPAATGKRKRSQMLFRGRASQ	IFN γ
50	GITIPRNPGPCNSEDKNFPRVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCR HLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHPCNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA	IL-17A
51	RKIPKVGHTFFQKPESCPPVPGGSMKLDIGIINENQRVMSRNIERSRSTSPWNYTVTWDPNRYPSEVVQAQC	IL-17F

	RNLGCINAQKEDI SMNSVPIQQETLVVRRKHQGCVSFQLEKVLVTVGCTCVTPVIHHVQ	
52	RAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLC TLAWSAHPLVGHMDLREEGDEETTNDVPHIQCGDGDQPGLRDNSQFCLQ RIHQGLIFYEKLLGSDIFTGEPSSLDPSPVGLHASLLGLSQLQPEGHHWETQQIPSLSPSQPWQRLLLR KILRSLQAFVAVAAARVFAHGAATLSP	IL-23 α (p19)
53	APMTQTTPPKTSWVNCNMI DEI I THLKQPPLPLDFNNGEDQDILMENLRRPNLEAFNRAVKSLQNAS AIESILKNLLPCLPLATAAPTRHP IHIKGDWNEFRRLTFYKLTLENAQAQQTTLAIF	IL-3
54	HKCDITLQEI IKTLSL TEQKTLCTELTVTDIFAASKNTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQ FHRHQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS	IL-4
55	IPTEIPTSALVKETLALLSTHRTLLIANETLRIPVPVHNHQLCTEEIFQIGITLESQTVQGGTVERLFKNL SLIKKYIDGQKKKCGEERRRVNQFLDYLQEF LGVMNTEWII ES	IL-5
56	VPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCSSKEALAENNLNPKMAEKDCC FQSGFNEETCLVK IITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQARAVQMSTKVL IQFLQKKAKNLDAITTPDPTNA SLLTKLQAQNWLDQMTTHLILRSFKEF LQSSLRALRQM	IL-6
57	QCPTLAGILDINFLINKMQEDPASKCHCSANVTSCLCGIPSDNCTRPCFSERLSQMTNTTMQTRYPLIFS RVKKSVEVLKNNKCPYFSCEQPCNQTTAGNALTF LKSLEIFQKEKMRGMRG I	IL-9
58	PGPPGPPRVSPDPRAELDSTVLLTRSLADTRQLAAQLRDKFPADGDHNLDSLPTLAMSAGALGALQLPGV LTRLRADLLSYLRHVQWLRRAGGSSLKTLEPELGT LQARLDRLRLRQ LLMSRLALPQPPDPPAPPLAPPSSAWGGIRAHA I LGGHLTLDWAVRGLLLKTRL	IL-11
59	LTCLGGFASPGVPPSTALRELIEELVNI TQNKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKFLFREGRFN	IL-13
60	FPRPPGRPQLSLQELRREFTVSLHLARKLLSEVRGQAHRAESHLPVNLVLLPLGEQLPDVSLTFQAWRRL SDPERLCFISTTLQPFHALLGGLGTQGRWNTMERMQLWAMRLDLRDLQRHLRFQVLAAGFNLPEEEEEEE EEEEERKGLLPGALGSALQCPAQVSWPQLLSTYRLLHSLELVLSRAVRELLLSKAGHSVWPLGFPTLSPQP	IL-27 α (p28)
61	RKGPPAALTLPVQCRASTRPIAVDCSWTLPPAPNSTSPVSFIATYRLGMAARGHSWPC LQQTPTSTSTCTIT DVQLFSMAPYVLNVTAVHPWGSSSSFPVFITEHIIKDPPEGVRLSPLAERQLQVQWEPGSPFPPEIFSLK YWIRYKRQGAARFHRVPIEATSFILRAVRPRARYVQVAAQDLTDYGELSDWSPATATMSLGK	IL-27 β (EBI3), IL-35 β
62	APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVQQAVEVWQGLALLSE AVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEATSPDAASAAPLRTITADTFRKLFV YSNFLRGKLLKLYTGEACRTGDR	促红细胞生成素
63	ATPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKI QDGAALQEKLVSECATYKLCHEPELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQA	G-CSF

	LQLAGCLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVAADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAF ASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSRYRVLRLHLAQP	
64	FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCPSES IPTPSNREETQQKSN LELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEG IQTLMGRLEDCSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCFRKMMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF	生长激素
65	LPICPGGAARCQVTLRDLFDRAVVLSHYIHNLSSEMFSEFDKRYTHGRGFITKAINSCHTSSLATPEDKEQA QQMNQKDFLSLIVSILRSWNEPLYHLVTEVRGMQEAPAEILSKAVEIEEQTKRLLGEMELIVSQVHPETKEN EIYPVWSGLPSLQMADEESRLSAYYNLLHCLRRDSHKIDNYLKLKCR I IHNNC	催乳素
66	AAIGSCSKEYRVLLGQLKQKQTDLMQDTSRLLDPYIRIQGLDVPKLRHCRERPGAFPSEETLRGLGRRGFLQ TLNATLGCVLHRLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKLMARPNI LGLRNNIYMAQLLDNSDTAEPKAG RGASQPPTPTASDAFQRKLEGCFLHGYHRFMHSVGRVFSKWGESPNRSRRHSPHQALRKGVRRTRPSRKG KRLMTRGQLPR	抑瘤素M
67	SPLPITPVNATCAIRHPCNNLMNQIRSQAQLNGSANALFILYYTAQGEPPNLDKLCGPNVDFPPFHA NGTEKAKLVELYRIVVYLGTSLGNI TRDQKILNPSALSLSKLNATADILRGLLSNVLCRLCSKYHVGHVDV TYGPDTSGBKDVFFQKKLGCQLLGKQYKQIIAVLAQAF	白血病抑制因子
68	APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVR LIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLF PQSDRFQPYMQEVPVFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNA CI	IL-22
69	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPMRLDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFY LEEVMQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFD IFINYEAYMTMKIRN	IL-10
70	ESKYGPPCPPCP	间隔物 (IgG4铰链)
71	GAATCTAAGTACGGACCCCTGCCCTTGGCCCT	间隔物 (IgG4铰链)
72	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	铰链-CH3间隔物
73	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK	铰链-CH2-CH3间隔物
74	RWPESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEEKEEERETKTPECPSTHTQPLGV	IgD-铰链-Fc

	YLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWN AGTSVCTLNHPQLPPQRLMALREPAQAQVKSLSNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQRE VNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVSHEDSRLLNASRSLEVSIVTDH	
75	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIIPKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCTSIISGDLHILPVAFRGDSFTH TPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKE ISDGDVVIISGNKLCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCR NVSRRGECVDKCNLLEGEPREFVENSECTIQHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGV MGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVGAALLLVVALGIGLFM	tEGFR
76	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A
77	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (登录号P10747的 氨基酸153-179)
78	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (登录号P10747的 氨基酸114-179)
79	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (P10747的氨基酸 180-220)
80	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL到GG)
81	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	4-1BB (Q07011.1 的氨 基酸214-255)
82	RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGDGLY QGLSTATKDYDALHMQUALP PR	CD3 ζ
83	RVKFSRSAEPPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGDGLY QGLSTATKDYDALHMQUALP PR	CD3 ζ
84	RVKFSRSADAPAYKQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGDGLY QGLSTATKDYDALHMQUALP PR	CD3 ζ
85	gccctacgtgctgctcaccacagcctgctgac	Epo HRE
86	ccacagtgatacgtgggctccaacaggtcctctt	VEGF-A HRE
87	gacgtgacaaacgaagccgacgtc	PGK1 HRE
88	acacgtgggttcccgcacgtccgc	LdhA HRE
89	gacgtgactcggaccacat	ALDA HRE
90	gccccacgctcgggtcgtgccagttgaac	GAPDH HRE

	<p>tcatatttcagcctgactttttgcgtgcaggtccagggcaagagtaaaagagagaagaagacaggggtgtc actgataaaaccagcggccacagtcacatctgtcggagaacgcctctattagtgtagcagctcaggatcggtac tatagttcaagctgggccgaatgggcttctgtgccttgttagtgaggaggaggagaagcggaggaggaggatcc ggaggaggcgggtctagaaatctgcctgtggcaacccagaccccgcatgttccatgcctgcaccattcc cagaacctgctgcgggcagtgctctaatatgctgcagaaggccagacagacctggagttttacccctgtaca tccgaggaatcgaccacgaggatattaccaaggataaaacctctacagtggagcttgcctgcctctggag ctgacaaagaacgaatcatgtctgaaatagcaggagacttcccttcatcaccaacggctcttgcctggccagt cgcaagaccagcttcatgatggctctgtgcctgtcctctatctacgaggacctgaagatgtaatcaggiggaa ttcaaaccatgaacccaagctgctgatggacctaaaaggcagatcttctggatcagaaatgctggct gtgattgacgagctgatgcaggcactgaactcaatagcgaacagctccccagaagattcactggaggaa cctgatttctacaagactaaaatcaagctgtgcatctgtgctcacgcttttaggatccgcagtgaccatt gaccgcgicatgagttatctgaaatgcctcacaccatcaccaicaccattggctccaicccacagtttgagaag tgataactcgag</p>	
103	<p>gctagcggccaccatgccccgtctgtctgtctgcctctgtctgtggctggcgcactggccatctgggagctg aagaaagacgtgtacgtggctggaactggactgggatcctgatgccccaggggagatgggtggctctgacttgc gacacccccgaggaagatggaatcacttggacctggatcagagctccgaggtgctgggtccggaaaaaca ctgactattcaggtaaggaattcggcgacgtgggcagtacacatgtcacaagggaggagaggtgctgagc cactccctgctgtctgctgcataagaaagaagacggaaatctggctactgacattctgaaagatcagaaggag cctaagaacaaaaccttcttgcggctgcaagcaaaaaattatagggccggtcacctgttggggctgacc acaaatctctacagatctgacttttagtgtagagcttagtagggctcaagcgaccacagggagtcacatgc ggagcagctactctgagcggcagaggggtgcgggggataacaaggagtacgaataatccgtcgagtccag gaagactctgcatgtctgcagccgaggaatccctgccaatcgaagtgtggctgcatgcccgtgcacaagctg aaatcagaaaactacacatcctcttctttattagggacatcatcaagccagatccccctaagaacctgag ctgaaaccttgaagaattcacccaggtggaggtcagctgggaaataccagacacctggagcacaccccat tcatatttcagcctgactttttgcgtgcaggtccagggcaagagcaaacgcgagaagaagaccgagtggtc actgataaaacctccgctacagtcacttgcggcaagaacgcctctattagtgtagagctcaggataggtac tatagttcaagctgggccgaatgggcatctgtgccaatgcagtggaggaggaggagaagccggaagaaaaacct aatgtcggagacacggcggggaggctccagaaatctgcctgtggctacccagaccccgagatgttcca tgctgcaccatagtcagaacctgctgaggcagtgctcaaaatgctgcagaaggcccagacctggag ttttacccatgtacatctgaggaaatcgaccacgaggatattaccaaggataaaaccagtacagtggagcc</p>	Sc IL-12 HBP BMP4

	<p>tgccctgccccctggagctgacaaaagaacgaatcatgtctigaatagccgagagacttccttcatcaccaacggc tcttgccitggccagctcgcaagaccagcttcatgattggctctgtgacctgctctatctacgaggacctgaag atgtatcaggtggaattcaaaacctgaacccaagctgctgatggaccccaaacggcagatctttctgga cagaatatgctggctgtgattgacgagctgatgcaggcactgaacttcaattctgaaacagtccccagaag agttcacitggaggaacctgatttctacaagactaaaaicaagctgtgcatctgctgcacgcttttcgaatc cgggcagtgaccattgacagagtcagagctatctgaaatgcccccacatcaccaacacattggagccat cctcagtttgagaagtgataactcgag</p>	
104	<p>gctagcgcaccatgccccctgctgctgctgctgctctgctgtggctggcgactggccatctgggagctg aagaagacgtgtacgtggctgcaactggactggatctctgattgccccaggggagatgggtggctgacttgc gacacccccgaggaagatggaatcacttggaccctggatcagagctccgaggtgctggggagcggaaaaaca ctgactattcaggtcaaggaattcggcgacgctgggcagtacacatgtcacaagggaggagaggtgctgagc cactccctgctgctgctgcataaagaagaagacgggacttggctctacagacattctgaaagatcagaaggag cctaagaacaaaacttccctgctgctgcaagcaaaaaatataagcggccggttcacctgttgggtgctgacc acaatctctacagatctgacttttagtgtgaagtctagtaggggatcaagcaccacagggagtcacatgc ggagcagctacictgagcgcgagcgggtgagaggcgataacaaggagtacgaataatagtgctgagtgccag gaagactcagcatgtcctgagcggaggaatccctgccaatcgaagtgtggtcgaatgccgtgcacaagctg aaatacgaaaactacacatcctctttctttattcgggacatcatcaagccagatccccctaagaacctgcag ctgaaacctgaagaattcaagacaggtggaggtcagctgggaaataccagacacctggtccacaccccat tcaatctcagcctgaccttttgcgtgcaggtccaggcaagctctaaaagagagaagaaagacaggggttc actgataaaaccagtctacagtcactctgtagaaagaacgctctatagtgctgagctcaggatcggtac tatagttcaagctggctcaggtggcactctgtgcccctgtagtgaggcgggggatccaaaacaatcagaag tctgaaacctctgactgcccggaaagaaactggcgggggagggcagcagaaatctgccigtggctacccagat cccggaatgttccatgctgacccatagccagaacctgctgagggcaggtccaatagctgcagaaggcc cgccagacctggagttttaccatgtacaagcaggaatcgaccacagagatattactaaggacaaaacc tccacagtggaaacctgctgccccctggagctgaccaagaacgaatcatgtctigaatagccgagagacttc ttcaicaccaacggctcttggctggccagctcgcaagaccagcttcatgattggctctgtgacctgctctatc tacgaggacctgaagatgtatcaggtggaattcaaaactatgaacccaagctgctgatggaccccaaaagg cagatctttctggatcagaatatgctggctgtgattgacgagctgatgcaggcactgaacttcaattctgaa accgtccccagaagagttcactggaggaacctgatttctacaagacaaaaicaagctgtgcatctgctg cacgcttttaggatccgcgcagtgaccattgaccgctcatgagctatctgaaatgcccccacatcaccaat</p>	Sc IL-12 HBP FBN

	caccattggagccatcctcagtttgagaagtataactcgag	
105	<p>gctagcgccaccatgccccigtctgctgctgctgcctctgctgtgggctggcgactggccatctgggagctg</p> <p>aagaaagacgtgtacgtggtcgaactggactggatcctgatgccccaggggagatgggtgctcctgacttgc</p> <p>gacacccccgaggaagatggaatcacttggaccctggatcagagctccgaggtgctgggggtccggaaaaaca</p> <p>ctgactattcaggtcaaggaaattcggcgacgctgggcagtacacatgtcacaagggaggagaggtgctgagc</p> <p>cactccctgctgctgctgcaataagaaagaagacgggacttggctactgacattctgaaagatcagaaggag</p> <p>ccaaagaacaaaaccttctgctgctgcaagcaaaaaattatagcggccggttcacctgttgggtgctgacc</p> <p>acaatctctacagatctgacttttagtgaagtctagtaggggctcaagcgaccacagggagtcacatgc</p> <p>ggagcagctactctgagcggcgggtgagaggggataacaaggagtacgaatactccgtcagtgccag</p> <p>gaagactctgcatgtcctgacccgaggaatccctgccaatcgaagtgatggtcgaatgccgtgcacaagctg</p> <p>aaatcgaaaactacacatcctcttctttattcgggacatcatcaagccagatccccctaagaacctgcag</p> <p>ctgaaacccctgaagaattcaagacaggtggaggctcagctgggaaataccagacacctggagcacaccccat</p> <p>tcatattcagcctgacttttgcgtgacaggtccagggcaagagcaaaaagagagaagaaagacaggggttctc</p> <p>actgataaaacctccgtacagtcactctgcagaaagaacgctctattagtgtgcgagctcaggatcggtac</p> <p>tatagttcaagctggicccgaatgggcactgtgctttagtggaggcgggggaagcgtgtggaactgggtc</p> <p>tgctttaggagctgggatgtgatgggtcctgggaggaggagctcccgaatctgctgtggctacccca</p> <p>gatcccggcatgttccatgctgcacca tagtcagaacctgctgcgggcagtgtaaatatgctgcagaag</p> <p>gccagacagacctggagttttacccctgtacatctgaggaatcgaccacaggatattaccaaggacaaa</p> <p>accagtacagtggaagcctgcctgctctggagctgacaaagaacgaatcactgtgaaatagccgagagact</p> <p>tccttcatcacaacggctcttgcctggccagtcgcaagaccagcttcatgatggctctgtgctgtcctct</p> <p>atctacgaggacctgaagatgtatcaggtggaattcaaaacctgaacccaagctgctgatggacctaaa</p> <p>aggcagatctttctggatcagaatactgctgctgtgattgacgagctgatgcaggcactgaacttcaattct</p> <p>gaaacagtccccagaagagttcactggggaacctgatttctacaagactaaaaatcaagctgtgcatctg</p> <p>ctgcacgcttttaggatccgcgactgaccattgaccgctcatgagctatctgaatgcctcccaccatcac</p> <p>catcaccaatggagccatccacagtttgagaagtataactcgag</p>	Sc IL-12 HGFBRP
106	<p>gctagcgccaccatgccccigtctgctgctgctgcctctgctgtgggctggcgactggccatctgggagctg</p> <p>aagaaagacgtgtacgtggtcgaactggactggatcctgatgccccaggggagatgggtgctcctgacttgc</p> <p>gacacccccgaggaagatggaatcacttggaccctggatcagagctccgaggtgctggggagcggaaaaaca</p> <p>ctgactattcaggtcaaggaaattcggcgacgctgggcagtacacatgtcacaagggcggggaggtgctgct</p> <p>cacagctgctgctgctgcaataagaaagaagacgggacttggctactgacattctgaaagatcagaaggag</p>	Sc IL-12 EGFRBP

	<p>cctaagaacaaaaccttccctgcgctgcgaagcaaaaaattatagcggccggttcacctgttggaggctgacc acaatctcaacagatctgacttttagcgtgaagictagtaggggctcaagcgacccacagggagtcacatgc ggagcagctactctgtagcgcgagcgggtgagaggggataacaaggagtacgaata tagtgtcgagtccag gaagactcagcatgtcctgcagccgaggaa tccctgccaatcgaagtgatggtcgatgccgtgcacaagctg aaatcgaaaactacacatcctctttctttatccgagacatcatcaagccagatccccctaagaacctgcag ctgaaacccctgaagaattcccgccaggtggaggctctctgggaa taccagacacctggccaaccccaat tcctatttctctgactttttgcgtgcaggtccagggcaagictaaaagagagaagaaagacaggggtgttc actgataaaaccagtgctacagictatctgccggaagaacgcctcaat tagcgtgcgagctcaggaccggtag tatagttcaagctggagtgaa tgggcatcagtgccatgcagcggaggaggagga tccctctgtggataacct cacgtctgtggcggaggaggcagcagaatctgcctgtggctacccagacccccgggatgttccatgcctg caccatagccagaacctgctgcgggcagtgccaata tgcctgcagaaggccagacagacctggagtttac ccaigtacaagcggagaaa tgcaccacgaggata t taccaaggataaaaacctccacagtggaagcctgcctg ccccggagctgacaagaacgaatcctgtctgaattctagggagactagtttcatcaccaacggctcatgc ctggccagcccgaaaacttctttatgatggctctgtgcctgagttcaatctacgaggacctgaagatgat caggtggaattcaaaaacctgaacccaagctgctgatggaccccaaaaggcagatcttctggatcagaat atgctggctgtgattgacgagctgatgcaggcactgaacttcaattctgaaacagctccccagaagagctcc ctggaggaacctgatttctacaagactaaaatcaagctgtgcatctgtctgcacgcttttaggatccgcgca gtgaccattgaccgctcatgtctta tctgaa tgcagtcacatcacatcacat tggagccatcctcag tttgagaagtataactcgag</p>	
107	<p>gctagcggccacctgcctctgctgctgctgctgccactgctgtgggctggcgactggccatctgggagctg aagaaagacgtgtacgtggctgaactggactgggtatcccgatgctcctggggagatgggtgtcctgacatgc gacactcccagggaagatggaatcacatggactctggatcagagctccgaggtcctgggaagcggcaaaacc ctgacaattcaggtgaaggaa ttcggggaccccgcagctacacatgtcacaagggcggggaggtgctgtct cacagctgtgctgctgctgataagaaagaagacgggactgtgtctaccgacatctgaaagatcagaaggag cccaagaacaaaacat tccctgagggtcgaagccaaaaattatagcggacgctttacctgttggaggctgacc acaatcagtagcctgacat tttcagctcaagictagctggggctcaagcgacccacagggagtgacatgc ggagcagctactctgtctgccgagcgggtcagaggggataacaaggagtacgaata tctgtggagtccag gaagacagtgcttgtccagcagccgaggaaagcctgcccatcagaggtcatggaggatgcagtgcaaacctg aaatcgaaaactacacatcctctttctttatccggacatcatcaagccagatccccctaagaacctgcag ctgaaacccctgaagaatagcagacaggtcgagggtcctgggaa taccagacacctggagcaacccctcat</p>	Sc IL-12 抗EPCAM

	<p>agttat tttctcactgaccttttgcgtccagggtgcagggcaagtc taaaagagagaagaaagacagggctctt c acagataagaccagcgccaccgtgatctgtagaaagaacgcatcaattagcgtgagagccaggatcggtac tatagttcaagctggagcagtgggcctccgtgccatgctctggaggaggaggaacacaggtccagctggg cagagcggagcagaagtgaagaaacccggctcctctgtcaaagtgagttgtaaggcctcaggcgggactttt agttcatacgaatctctgtggctgtagggcagggcaccaggacagggactggagtggaatgggaggcaicatt cctaicttggcaccgccaactacgctcagaagtttcaggggcgctgactattaccgccgatgagtccaca tctactgcttataatggagctgagctccctgagaagcgaagacaccgctgtactattgcgaagggcctg ctgtggaattactggggccaggggacactggtcaccgtgagcagcaactgagtggaagcggcagcggccct aagctggaggaaaggagagttcagtgaaagccgggtcgagactacctgaccagtcacctgctacactgtcc gttctccaggagaacgcgtacactgagctgtcagcaagtcagtcagtgcaagcaatctggctgtctg taccagcagaagccaggccagggcaccagactgctgatctatggggcaagcaccgggcccacaggaatcca gctagattcagcggatccggctctgggaccgagtttacctgacaatctcctctctcagtcaggaaacttc gccgtgactattgccagcagtaacaattggccaccgggttcacttttgaccggcaccacaaagtcat attaaggaggaggagggtcccgaacctgctgtggcaactcctgaccaggcatgttccatgcctgcac cattcccagaacctgctgagaccgtgagcaataigctgcagaagcacggcagacactggagttttatcct tgtactagcaggagaaatcgaccacaggataattacaaaggataaaaacttccaccgtggaagcctgcctgcca ctggagctgactaagaacgaaagctgtctgaattcccgcgagacttcttcatccaatggcagttgcctg gcatcacgaaaaaccagctttatgatggccctgtgacctgagttcaatciacaggacctgaagatgtaicag gtggaattcaaaacaatgaacccaagctgctgtaggacctaaaaggcagatcttctggatcagaatatg ctggccgtgattgacgagctgagcaggctctgaacttcaatagcgaactgtgccccagaagagctccctg gaggaacctgatttciacaagacaaaaatcaagctgtgcatctgtgacgcctttaggatccgctgtc accattgaccgctgtagtctctatctgaagcctctcaccatcaccatcaccatgggcccatccacagttt gagaagtgataactcgag</p>	
108	YHWYGYTPQNV I	EGFR结合肽
109	YRWYGYTPQNV I	EGFR结合肽
110	PCAIWF	VEGFR3结合肽
111	WVCSGG	VEGFR3结合肽
112	NGRNGRNGR	NGR基序
113	RGDRGDRGD	RGD基序
114	TAASGVRSMH	NG2蛋白聚糖结合肽

115	LTLRWGLMS	NG2蛋白聚糖结合肽
116	NKFNKGMRYWGALGGNGKRGIRGYM	HER2结合肽
117	YEVHTYYLD	EPCAM结合肽
118	ITMQIMRIKPHQQQHIGEMSF	VEGFR结合肽

序列表

<110> 朱诺治疗公司(Juno Therapeutics, Inc.)

Hauskins, Collin

Ebens, Allen

<120> 免疫调节多肽及相关组合物和方法

<130> 735042004240

<140> 尚未分配

<141> 与此同时提交

<150> US 62/369,017

<151> 2016-07-29

<160> 118

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 518

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Sc IL-12 G4S (3)

<400> 1

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
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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
305	310	315	320
Ser Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys			
	325	330	335
Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln			
	340	345	350
Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile			
	355	360	365
Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys			
	370	375	380
Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu			
385	390	395	400
Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser			
	405	410	415
Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met			
	420	425	430
Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro			
	435	440	445
Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu			
450	455	460	

Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser
 465 470 475 480
 Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile
 485 490 495
 Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met
 500 505 510
 Ser Tyr Leu Asn Ala Ser
 515
 <210> 2
 <211> 523
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Sc IL-12 HBP BMP4
 <400> 2
 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
 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 Gly Gly Gly Gly Ser Arg Lys Lys Asn Pro Asn Cys Arg Arg
 305 310 315 320
 His Gly Gly Gly Gly Ser Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro
 325 330 335
 Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val
 340 345 350
 Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys
 355 360 365
 Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser
 370 375 380
 Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys
 385 390 395 400
 Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala
 405 410 415
 Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr
 420 425 430
 Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys
 435 440 445
 Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu
 450 455 460
 Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr
 465 470 475 480
 Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys
 485 490 495
 Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr

	500		505		510
Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser					
	515		520		
<210> 3					
<211> 528					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> Sc IL-12 HBP FBN					
<400> 3					
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
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 Gly Gly Gly Gly Ser Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu						
305		310		315		320
Ile Gly Arg Lys Lys Thr Gly Gly Gly Gly Ser Arg Asn Leu Pro Val						
	325		330		335	
Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn						
	340		345		350	
Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu						
	355		360		365	
Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr						
	370		375		380	
Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr						
385		390		395		400
Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn						
	405		410		415	
Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys						
	420		425		430	
Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys						
	435		440		445	
Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu						
	450		455		460	
Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn						
465		470		475		480
Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp						
	485		490		495	
Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg						
	500		505		510	
Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser						
	515		520		525	

<210> 4

<211> 529

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Sc IL-12 HGFBP
 <400> 4
 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
 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 Gly Gly Gly Gly Ser Val Trp Asn Trp Val Cys Phe Arg Asp
 305 310 315 320
 Val Gly Cys Asp Trp Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Arg Asn Leu Pro
 325 330 335
 Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln
 340 345 350
 Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr
 355 360 365
 Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile
 370 375 380
 Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu
 385 390 395 400
 Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr
 405 410 415
 Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu
 420 425 430
 Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe
 435 440 445
 Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe
 450 455 460
 Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu
 465 470 475 480
 Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro
 485 490 495
 Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe
 500 505 510
 Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala
 515 520 525

Ser

<210> 5

<211> 521

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Sc IL-12 EGFRBP

<400> 5
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
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 Gly Gly Gly Gly Ser Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Gly
 305 310 315 320
 Gly Gly Gly Ser Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met
 325 330 335
 Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn
 340 345 350
 Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser
 355 360 365
 Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val
 370 375 380
 Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn
 385 390 395 400
 Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg
 405 410 415
 Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp
 420 425 430
 Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu
 435 440 445
 Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val
 450 455 460
 Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro
 465 470 475 480
 Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys
 485 490 495
 Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp
 500 505 510
 Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser
 515 520
 <210> 6
 <211> 760
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Sc IL-12 抗EPCAM
 <400> 6
 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
 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 305 310 315 320
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 325 330 335
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Val Val Val Arg Gln Ala

	340		345		350														
Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly				
	355						360					365							
Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala				
	370						375					380							
Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser				
385						390					395				400				
Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Leu	Leu	Trp	Asn	Tyr				
				405					410					415					
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Ser	Gly	Ser				
			420					425					430						
Ala	Ser	Ala	Pro	Lys	Leu	Glu	Glu	Gly	Glu	Phe	Ser	Glu	Ala	Arg	Val				
	435						440					445							
Glu	Thr	Thr	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly				
	450					455					460								
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Asn				
465					470					475					480				
Leu	Ala	Val	Val	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu				
				485					490					495					
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser				
			500					505					510						
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln				
	515						520					525							
Ser	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Asn	Trp	Pro				
	530					535			540										
Pro	Gly	Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Gly	Gly				
545					550				555					560					
Gly	Gly	Ser	Arg	Asn	Leu	Pro	Val	Ala	Thr	Pro	Asp	Pro	Gly	Met	Phe				
				565					570					575					
Pro	Cys	Leu	His	His	Ser	Gln	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Val	Ser	Asn	Met				
		580						585					590						
Leu	Gln	Lys	Ala	Arg	Gln	Thr	Leu	Glu	Phe	Tyr	Pro	Cys	Thr	Ser	Glu				
	595						600					605							
Glu	Ile	Asp	His	Glu	Asp	Ile	Thr	Lys	Asp	Lys	Thr	Ser	Thr	Val	Glu				
	610					615						620							
Ala	Cys	Leu	Pro	Leu	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Glu	Ser	Cys	Leu	Asn	Ser				
625					630				635					640					
Arg	Glu	Thr	Ser	Phe	Ile	Thr	Asn	Gly	Ser	Cys	Leu	Ala	Ser	Arg	Lys				
				645					650					655					

Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu
 660 665 670
 Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met
 675 680 685
 Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile
 690 695 700
 Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln
 705 710 715 720
 Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu
 725 730 735
 Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg
 740 745 750
 Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser
 755 760

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> G4S接头

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> G4S (2) 接头

<400> 8

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> G4S (3) 接头

<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 10
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IL-12 p35
 <400> 10
 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
 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> 11
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> IL-12 p40

<400> 11

```

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
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> 12

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IL-12p40信号序列

<400> 12

Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
 1 5 10 15

Ala Ser Pro Leu Val Ala
 20

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肝素结合肽,BMP4

<400> 13

Arg Lys Lys Asn Pro Asn Cys Arg Arg His
 1 5 10

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肝素结合肽,纤连蛋白

<400> 14

Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
 1 5 10 15

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HGF结合肽

<400> 15

Val Trp Asn Trp Val Cys Phe Arg Asp Val Gly Cys Asp Trp Val Leu
1 5 10 15

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFRBP

<400> 16

Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys
1 5

<210> 17

<211> 247

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗EPCAM scFv

<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Gly Leu Leu Trp Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Lys Leu Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Lys Leu Glu
115 120 125

Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser
130 135 140

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

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala Val Val Tyr Gln Gln
 165 170 175
 Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg
 180 185 190
 Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu
 195 200 205
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro Gly Phe Thr Phe Gly Pro
 225 230 235 240
 Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 245

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD33信号序列

<400> 18

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Met

<210> 19

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IL-12 p35信号序列

<400> 19

Met Cys Pro Ala Arg Ser Leu Leu Leu Val Ala Thr Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Asp His Leu Ser Leu Ala
 20

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 6x His标签

<400> 20

His His His His His His

1 5

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Strep-标签(r) II

<400> 21

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 22

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 22

Lys Leu Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe

1 5 10 15

Ser Glu Ala Arg Val

20

<210> 23

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 23

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 24

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗EPCAM

<400> 24

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

<210> 25

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗EPCAM可变重链 (VH)

<400> 25

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

<210> 26

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VEGF结合肽
 <400> 26
 Ala Thr Trp Leu Pro Pro Arg
 1 5
 <210> 27
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VEGFR结合肽
 <400> 27
 Ile Thr Met Gln Cys Gly Ile His Gln Gly Gln His Pro Lys Ile Arg
 1 5 10 15
 Met Ile Cys Glu Met Ser Phe
 20
 <210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 牛来源的肝素结合肽
 <400> 28
 Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile
 1 5
 <210> 29
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头 (GGGS)_n; n为1至5
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (6) .. (10)
 <223> (Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa) = (Gly Gly Gly Gly Ser) 或为空
 <220>

<221> 变体

<222> (11) .. (15)

<223> (Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa) = (Gly Gly Gly Gly Ser) 或为空

<220>

<221> 变体

<222> (16) .. (20)

<223> (Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa) = (Gly Gly Gly Gly Ser) 或为空

<220>

<221> 变体

<222> (21) .. (25)

<223> (Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa) = (Gly Gly Gly Gly Ser) 或为空

<400> 29

```
Gly Gly Gly Gly Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5           10           15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
           20           25
```

<210> 30

<211> 133

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IL-15

<400> 30

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

115	120	125
Phe Ile Asn Thr Ser		
130		
<210> 31		
<211> 133		
<212> PRT		
<213> 智人		
<220>		
<221> misc_特征		
<223> IL-2		
<400> 31		
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
1 5 10 15		
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys		
20 25 30		
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys		
35 40 45		
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys		
50 55 60		
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu		
65 70 75 80		
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
85 90 95		
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala		
100 105 110		
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile		
115 120 125		
Ile Ser Thr Leu Thr		
130		
<210> 32		
<211> 193		
<212> PRT		
<213> 智人		
<220>		
<221> misc_特征		
<223> IL-19		
<400> 32		
Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met		
1 5 10 15		

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

Asp

<210> 33

<211> 127

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> GM-CSF

<400> 33

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

Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
 65 70 75 80
 Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
 100 105 110
 Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 115 120 125

<210> 34

<211> 152

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IL-7

<400> 34

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

<210> 35

<211> 133

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IL-21

<400> 35

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

<210> 36

<211> 166

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IFN α -1/13

<400> 36

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

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

<210> 37

<211> 165

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IFN α -2

<400> 37

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

130	135	140
Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser		
145	150	155
Leu Arg Ser Lys Glu		160
	165	
<210> 38		
<211> 166		
<212> PRT		
<213> 智人		
<220>		
<221> misc_特征		
<223> IFN α -4		
<400> 38		
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile		
1	5	10
Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser His Phe Ser Cys Leu Lys Asp		
	20	25
Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Glu Glu Glu Phe Asp Gly His Gln Phe		30
	35	40
Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr		45
	50	55
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Glu Asp Ser Ser Ala Ala Trp Glu Gln Ser		60
65	70	75
Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu		80
	85	90
Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met		95
	100	105
Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr		110
	115	120
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val		125
	130	135
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Lys		140
145	150	155
Arg Leu Arg Arg Lys Asp		160
	165	
<210> 39		
<211> 168		
<212> PRT		
<213> 智人		

<220>

<221> misc_特征

<223> IFN α -5

<400> 39

```

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

```

<210> 40

<211> 169

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IFN α -6

<400> 40

```

Ser Leu Asp Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg
1           5           10           15
Thr Met Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys
           20           25           30
Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly

```

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

<210> 41

<211> 166

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IFN α -7

<400> 41

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

Asn Glu Asp Phe Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
 115 120 125
 Leu Tyr Leu Met Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 130 135 140
 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Lys Lys
 145 150 155 160
 Gly Leu Arg Arg Lys Asp
 165

<210> 42

<211> 166

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IFN α -8

<400> 42

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

<210> 43

<211> 166
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> misc_特征
 <223> IFN α -10
 <400> 43
 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile
 1 5 10 15
 Leu Leu Gly Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30
 Arg His Asp Phe Arg Ile Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
 35 40 45
 Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
 50 55 60
 Phe Asn Leu Phe Ser Thr Glu Asp Ser Ser Ala Ala Trp Glu Gln Ser
 65 70 75 80
 Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 85 90 95
 Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
 100 105 110
 Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
 115 120 125
 Leu Tyr Leu Ile Glu Arg Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 130 135 140
 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Lys
 145 150 155 160
 Arg Leu Arg Arg Lys Asp
 165

<210> 44
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> misc_特征
 <223> IFN α -14
 <400> 44
 Cys Asn Leu Ser Gln Thr His Ser Leu Asn Asn Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15

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

<210> 45

<211> 166

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IFN α -16

<400> 45

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

	85		90		95
Glu Ala Cys Val Thr Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Ile Ala Leu Met					
	100		105		110
Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr					
	115		120		125
Leu Tyr Leu Met Gly Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val					
	130		135		140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Lys					
145		150		155	160
Gly Leu Arg Arg Lys Asp					
	165				
<210> 46					
<211> 166					
<212> PRT					
<213> 智人					
<220>					
<221> misc_特征					
<223> IFN α -17					
<400> 46					
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile					
1		5		10	15
Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp					
	20		25		30
Arg His Asp Phe Gly Leu Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe					
	35		40		45
Gln Lys Thr Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr					
	50		55		60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Glu Asp Ser Ser Ala Ala Trp Glu Gln Ser					
65		70		75	80
Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asn Leu					
	85		90		95
Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Met Glu Glu Thr Pro Leu Met					
	100		105		110
Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr					
	115		120		125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val					
	130		135		140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Lys					
145		150		155	160

Ile Leu Arg Arg Lys Asp
165

<210> 47

<211> 166

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IFN α -21

<400> 47

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

<210> 48

<211> 166

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IFN β -1

<400> 48

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> 49

<211> 143

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IFN γ

<400> 49

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

Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65 70 75 80
 Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
 85 90 95
 Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
 100 105 110
 Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
 115 120 125
 Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 130 135 140
 <210> 50
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> misc_特征
 <223> IL-17A
 <400> 50
 Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys
 1 5 10 15
 Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn
 20 25 30
 Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr
 35 40 45
 Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser
 50 55 60
 Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp
 65 70 75 80
 Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile
 85 90 95
 Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu
 100 105 110
 Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val
 115 120 125
 His His Val Ala
 130
 <210> 51
 <211> 133
 <212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IL-17F

<400> 51

```

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

```

<210> 52

<211> 170

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IL-23α (p19)

<400> 52

```

Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln Cys Gln Gln
1           5           10           15
Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His Pro Leu Val
           20           25           30
Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr Thr Asn Asp
           35           40           45
Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln Gly Leu Arg
           50           55           60

```

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

<210> 53

<211> 133

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IL-3

<400> 53

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

130
 <210> 54
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> misc_特征
 <223> IL-4
 <400> 54
 His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser
 1 5 10 15
 Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile
 20 25 30
 Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala
 35 40 45
 Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg
 50 55 60
 Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile
 65 70 75 80
 Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu
 85 90 95
 Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe
 100 105 110
 Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser
 115 120 125
 Ser
 <210> 55
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 55
 Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Arg
 20 25 30
 Ile Pro Val Pro Val His Lys Asn His Gln Leu Cys Thr Glu Glu Ile
 35 40 45
 Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Thr Val Gln Gly Gly Thr
 50 55 60

```

Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp
65          70          75          80
Gly Gln Lys Lys Lys Cys Gly Glu Glu Arg Arg Arg Val Asn Gln Phe
          85          90          95
Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Asn Thr Glu Trp Ile
          100         105         110
Ile Glu Ser
          115
<210> 56
<211> 183
<212> PRT
<213> 智人
<220>
<221> misc_特征
<223> IL-6
<400> 56
Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln
1          5          10         15
Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu
          20         25         30
Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met
          35         40         45
Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro
          50         55         60
Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu
65         70         75         80
Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr
          85         90         95
Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg
          100        105        110
Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys
          115        120        125
Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala
          130        135        140
Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met
145         150        155        160
Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser
          165        170        175
Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met

```

180

<210> 57

<211> 126

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IL-9

<400> 57

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

<210> 58

<211> 178

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IL-11

<400> 58

Pro	Gly	Pro	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Arg	Val	Ser	Pro	Asp	Pro	Arg	Ala
1				5					10					15	
Glu	Leu	Asp	Ser	Thr	Val	Leu	Leu	Thr	Arg	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Thr
			20					25					30		
Arg	Gln	Leu	Ala	Ala	Gln	Leu	Arg	Asp	Lys	Phe	Pro	Ala	Asp	Gly	Asp
		35					40						45		

His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Ala Met Ser Ala Gly Ala Leu
 50 55 60
 Gly Ala Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg Leu Arg Ala Asp Leu
 65 70 75 80
 Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly Ser
 85 90 95
 Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Ala Arg Leu
 100 105 110
 Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu
 115 120 125
 Pro Gln Pro Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser
 130 135 140
 Ser Ala Trp Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu
 145 150 155 160
 His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr
 165 170 175

Arg Leu

<210> 59

<211> 122

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IL-13

<400> 59

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

Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe Asn
 115 120
 <210> 60
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> misc_特征
 <223> IL-27 α (p28)
 <400> 60
 Phe Pro Arg Pro Pro Gly Arg Pro Gln Leu Ser Leu Gln Glu Leu Arg
 1 5 10 15
 Arg Glu Phe Thr Val Ser Leu His Leu Ala Arg Lys Leu Leu Ser Glu
 20 25 30
 Val Arg Gly Gln Ala His Arg Phe Ala Glu Ser His Leu Pro Gly Val
 35 40 45
 Asn Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Gly Glu Gln Leu Pro Asp Val Ser Leu
 50 55 60
 Thr Phe Gln Ala Trp Arg Arg Leu Ser Asp Pro Glu Arg Leu Cys Phe
 65 70 75 80
 Ile Ser Thr Thr Leu Gln Pro Phe His Ala Leu Leu Gly Gly Leu Gly
 85 90 95
 Thr Gln Gly Arg Trp Thr Asn Met Glu Arg Met Gln Leu Trp Ala Met
 100 105 110
 Arg Leu Asp Leu Arg Asp Leu Gln Arg His Leu Arg Phe Gln Val Leu
 115 120 125
 Ala Ala Gly Phe Asn Leu Pro Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
 130 135 140
 Glu Glu Glu Glu Arg Lys Gly Leu Leu Pro Gly Ala Leu Gly Ser Ala
 145 150 155 160
 Leu Gln Gly Pro Ala Gln Val Ser Trp Pro Gln Leu Leu Ser Thr Tyr
 165 170 175
 Arg Leu Leu His Ser Leu Glu Leu Val Leu Ser Arg Ala Val Arg Glu
 180 185 190
 Leu Leu Leu Leu Ser Lys Ala Gly His Ser Val Trp Pro Leu Gly Phe
 195 200 205
 Pro Thr Leu Ser Pro Gln Pro
 210 215
 <210> 61

<211> 209
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> misc_特征
 <223> IL-27 β (EBI3) , IL-35 β
 <400> 61
 Arg Lys Gly Pro Pro Ala Ala Leu Thr Leu Pro Arg Val Gln Cys Arg
 1 5 10 15
 Ala Ser Arg Tyr Pro Ile Ala Val Asp Cys Ser Trp Thr Leu Pro Pro
 20 25 30
 Ala Pro Asn Ser Thr Ser Pro Val Ser Phe Ile Ala Thr Tyr Arg Leu
 35 40 45
 Gly Met Ala Ala Arg Gly His Ser Trp Pro Cys Leu Gln Gln Thr Pro
 50 55 60
 Thr Ser Thr Ser Cys Thr Ile Thr Asp Val Gln Leu Phe Ser Met Ala
 65 70 75 80
 Pro Tyr Val Leu Asn Val Thr Ala Val His Pro Trp Gly Ser Ser Ser
 85 90 95
 Ser Phe Val Pro Phe Ile Thr Glu His Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro
 100 105 110
 Glu Gly Val Arg Leu Ser Pro Leu Ala Glu Arg Gln Leu Gln Val Gln
 115 120 125
 Trp Glu Pro Pro Gly Ser Trp Pro Phe Pro Glu Ile Phe Ser Leu Lys
 130 135 140
 Tyr Trp Ile Arg Tyr Lys Arg Gln Gly Ala Ala Arg Phe His Arg Val
 145 150 155 160
 Gly Pro Ile Glu Ala Thr Ser Phe Ile Leu Arg Ala Val Arg Pro Arg
 165 170 175
 Ala Arg Tyr Tyr Val Gln Val Ala Ala Gln Asp Leu Thr Asp Tyr Gly
 180 185 190
 Glu Leu Ser Asp Trp Ser Leu Pro Ala Thr Ala Thr Met Ser Leu Gly
 195 200 205

Lys

<210> 62
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>

<221> misc_特征

<223> 促红细胞生成素

<400> 62

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

<210> 63

<211> 178

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> G-CSF

<400> 63

Ala Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
 20 25 30
 Gln Glu Lys Leu Val Ser Glu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro
 35 40 45

Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro
 50 55 60
 Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser
 65 70 75 80
 Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu
 85 90 95
 Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu
 100 105 110
 Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu
 115 120 125
 Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe
 130 135 140
 Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His
 145 150 155 160
 Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala
 165 170 175

Gln Pro

<210> 64

<211> 191

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> 生长激素

<400> 64

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

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

<210> 65

<211> 199

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> 催乳素

<400> 65

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

	165		170		175
Arg Asp Ser His Lys Ile Asp Asn Tyr Leu Lys Leu Leu Lys Cys Arg					
	180		185		190
Ile Ile His Asn Asn Asn Cys					
	195				
<210> 66					
<211> 227					
<212> PRT					
<213> 智人					
<220>					
<221> misc_特征					
<223> 抑瘤素M					
<400> 66					
Ala Ala Ile Gly Ser Cys Ser Lys Glu Tyr Arg Val Leu Leu Gly Gln					
1	5		10		15
Leu Gln Lys Gln Thr Asp Leu Met Gln Asp Thr Ser Arg Leu Leu Asp					
	20		25		30
Pro Tyr Ile Arg Ile Gln Gly Leu Asp Val Pro Lys Leu Arg Glu His					
	35		40		45
Cys Arg Glu Arg Pro Gly Ala Phe Pro Ser Glu Glu Thr Leu Arg Gly					
	50		55		60
Leu Gly Arg Arg Gly Phe Leu Gln Thr Leu Asn Ala Thr Leu Gly Cys					
65		70		75	80
Val Leu His Arg Leu Ala Asp Leu Glu Gln Arg Leu Pro Lys Ala Gln					
	85		90		95
Asp Leu Glu Arg Ser Gly Leu Asn Ile Glu Asp Leu Glu Lys Leu Gln					
	100		105		110
Met Ala Arg Pro Asn Ile Leu Gly Leu Arg Asn Asn Ile Tyr Cys Met					
	115		120		125
Ala Gln Leu Leu Asp Asn Ser Asp Thr Ala Glu Pro Thr Lys Ala Gly					
	130		135		140
Arg Gly Ala Ser Gln Pro Pro Thr Pro Thr Pro Ala Ser Asp Ala Phe					
145		150		155	160
Gln Arg Lys Leu Glu Gly Cys Arg Phe Leu His Gly Tyr His Arg Phe					
	165		170		175
Met His Ser Val Gly Arg Val Phe Ser Lys Trp Gly Glu Ser Pro Asn					
	180		185		190
Arg Ser Arg Arg His Ser Pro His Gln Ala Leu Arg Lys Gly Val Arg					
	195		200		205

Arg Thr Arg Pro Ser Arg Lys Gly Lys Arg Leu Met Thr Arg Gly Gln
 210 215 220
 Leu Pro Arg
 225
 <210> 67
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> misc_特征
 <223> 白血病抑制因子
 <400> 67
 Ser Pro Leu Pro Ile Thr Pro Val Asn Ala Thr Cys Ala Ile Arg His
 1 5 10 15
 Pro Cys His Asn Asn Leu Met Asn Gln Ile Arg Ser Gln Leu Ala Gln
 20 25 30
 Leu Asn Gly Ser Ala Asn Ala Leu Phe Ile Leu Tyr Tyr Thr Ala Gln
 35 40 45
 Gly Glu Pro Phe Pro Asn Asn Leu Asp Lys Leu Cys Gly Pro Asn Val
 50 55 60
 Thr Asp Phe Pro Pro Phe His Ala Asn Gly Thr Glu Lys Ala Lys Leu
 65 70 75 80
 Val Glu Leu Tyr Arg Ile Val Val Tyr Leu Gly Thr Ser Leu Gly Asn
 85 90 95
 Ile Thr Arg Asp Gln Lys Ile Leu Asn Pro Ser Ala Leu Ser Leu His
 100 105 110
 Ser Lys Leu Asn Ala Thr Ala Asp Ile Leu Arg Gly Leu Leu Ser Asn
 115 120 125
 Val Leu Cys Arg Leu Cys Ser Lys Tyr His Val Gly His Val Asp Val
 130 135 140
 Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Ser Gly Lys Asp Val Phe Gln Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Leu Gly Cys Gln Leu Leu Gly Lys Tyr Lys Gln Ile Ile Ala Val Leu
 165 170 175
 Ala Gln Ala Phe
 180
 <210> 68
 <211> 146
 <212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IL-22

<400> 68

```

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

```

Cys Ile

145

<210> 69

<211> 160

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> IL-10

<400> 69

```

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
1           5           10           15
Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
           20           25           30
Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
           35           40           45

```

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

<210> 70

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 间隔物 (IgG4铰链)

<400> 70

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 71

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 间隔物 (IgG4铰链)

<400> 71

Gly Ala Ala Thr Cys Thr Ala Ala Gly Thr Ala Cys Gly Gly Ala Cys
 1 5 10 15

Cys Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys Cys Cys Cys Cys Cys Thr Thr Gly
 20 25 30

Cys Cys Cys Thr
 35

<210> 72

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链-CH3间隔物

<400> 72

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

<210> 73

<211> 229

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链-CH2-CH3间隔物

<400> 73

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

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys
 225
 <210> 74
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IgD-铰链-Fc
 <400> 74
 Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala
 1 5 10 15
 Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala
 20 25 30
 Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys
 35 40 45
 Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro
 50 55 60
 Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln
 65 70 75 80
 Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly
 85 90 95
 Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val
 100 105 110

Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly
 115 120 125
 Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn
 130 135 140
 Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro
 145 150 155 160
 Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys
 165 170 175
 Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser
 180 185 190
 Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu
 195 200 205
 Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro
 210 215 220
 Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser
 225 230 235 240
 Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg
 260 265 270
 Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His
 275 280

<210> 75

<211> 357

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> tEGFR

<400> 75

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

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile		
	85	90
Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu		
	100	105
Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala		
	115	120
Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu		
	130	135
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr		
145	150	155
Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys		
	165	170
Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly		
	180	185
Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu		
	195	200
Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys		
	210	215
Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu		
225	230	235
Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met		
	245	250
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala		
	260	265
His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val		
	275	280
Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His		
	290	295
Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro		
305	310	315
Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala		
	325	330
Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly		
	340	345
Ile Gly Leu Phe Met		
	355	
<210> 76		
<211> 24		
<212> PRT		

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 76

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp

1 5 10 15

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg

20

<210> 77

<211> 27

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> CD28 (登录号P10747的氨基酸153-179)

<400> 77

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20

25

<210> 78

<211> 66

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> CD28 (登录号P10747的氨基酸114-179)

<400> 78

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

1 5 10 15

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

20

25

30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

35

40

45

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

50

55

60

Trp Val

65

<210> 79

<211> 41
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> misc_特征
 <223> CD28 (P10747的氨基酸180-220)
 <400> 79
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40
 <210> 80
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CD28 (LL至GG)
 <400> 80
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40
 <210> 81
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> misc_特征
 <223> 4-1BB (Q07011.1的氨基酸214-255)
 <400> 81
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

	35		40	
<210>	82			
<211>	112			
<212>	PRT			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	CD3ζ			
<400>	82			
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly				
1	5		10	15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr				
	20		25	30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys				
	35		40	45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys				
	50		55	60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg				
65	70		75	80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala				
	85		90	95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg				
	100		105	110
<210>	83			
<211>	112			
<212>	PRT			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	CD3ζ			
<400>	83			
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly				
1	5		10	15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr				
	20		25	30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys				
	35		40	45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys				
	50		55	60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg				
65	70		75	80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 84

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3ζ

<400> 84

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

<210> 85

<211> 33

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征

<223> Epo HRE

<400> 85

gccctacgtg ctgtctcaca cagcctgtct gac 33

<210> 86

<211> 35

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> misc_特征
<223> VEGF-A HRE
<400> 86
ccacagtgca tacgtgggct ccaacaggtc ctctt 35
<210> 87
<211> 24
<212> DNA
<213> 智人
<220>
<221> misc_特征
<223> PGK1 HRE
<400> 87
gacgtgacaa acgaagccga cgtc 24
<210> 88
<211> 24
<212> DNA
<213> 智人
<220>
<221> misc_特征
<223> LdhA HRE
<400> 88
acacgtgggt tcccgcacgt ccgc 24
<210> 89
<211> 19
<212> DNA
<213> 智人
<220>
<221> misc_特征
<223> ALDA HRE
<400> 89
gacgtgactc ggaccacat 19
<210> 90
<211> 31
<212> DNA
<213> 智人
<400> 90
gcccacacgc tcggtgcgtg cccagttgaa c 31
<210> 91
<211> 10

- <212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 示例性CArG
<400> 91
ccttatttgg 10
<210> 92
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 含有合成CArG序列的启动子
<400> 92
cgcgtgatat ccttatttgg ccttatttgg ccttatttgg ccttatttgg 50
<210> 93
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 含有合成CArG序列的启动子
<400> 93
cgcgtgatat ccttatttgg ccttatttgg ccttatttgg ccttatttgg ccttatttgg 60
ccttatttgg 70
<210> 94
<211> 90
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 含有合成CArG序列的启动子
<400> 94
cgcgtgatat ccttatttgg ccttatttgg ccttatttgg ccttatttgg ccttatttgg 60
ccttatttgg ccttatttgg ccttatttgg 90
<210> 95
<211> 110
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 含有合成CArG序列的启动子
<400> 95

cgcgtgatat ccttatttgg ccttatttgg ccttatttgg ccttatttgg ccttatttgg 60
 ccttatttgg ccttatttgg ccttatttgg ccttatttgg ccttatttgg 110

<210> 96

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 96

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 97

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 97

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 98

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 98

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 99

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> E2A

<400> 99

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 100

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F2A

<400> 100

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val
1 5 10 15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 101

<211> 335

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> tEGFR

<400> 101

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu
1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile
 20 25 30

Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe
 35 40 45

Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr
 50 55 60

Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn
65 70 75 80

Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg
 85 90 95

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

Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val
 115 120 125

Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp																			
130						135						140							
Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn																			
145						150						155							160
Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu																			
						165						170							175
Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser																			
						180						185							190
Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu																			
						195						200							205
Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln																			
						210						215							220
Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly																			
225						230						235							240
Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro																			
						245						250							255
His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr																			
						260						265							270
Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His																			
						275						280							285
Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro																			
						290						295							300
Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala																			
305						310						315							320
Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met																			
						325						330							335

<210> 102

<211> 1668

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Sc IL-12 G4S (3)

<400> 102

```

gctagcgcca ccatgccct getgetgetg ctgectctgc tgtgggctgg cgcactggcc 60
atctgggagc tgaagaaaga cgtgtactgt gtcgaactgg actggtatcc tgatgcccc 120
ggagagatgg tggctctgac ttgcgacacc cccgaggaag atggcatcac ttggaccctg 180
gatcagagct ccgaggtgct gggaagcggc aaaactga ctattcaggt caaggaattc 240
ggggacgctg gacagtacac atgtcacaag ggaggagagg tgctgagcca ctccctgctg 300
ctgctgcata agaaagaaga cggcatctgg agcactgaca ttctgaaaga tcagaaggag 360

```

ccaaagaaca aaaccttctt gcgctgcgaa gcaaaaaatt atagcggccg gttcacctgt 420
 tgggtggctga ccacaatcag cacagatctg actttttccg tgaagtctag tagggggtca 480
 agcgacccac agggagtcac atgcggagca gctactctgt ccgccgagcg ggtgagagga 540
 gataacaagg agtacgaata ttcagtcgag tgccaggaag acagcgcgatg tcctgcagcc 600
 gaggaatctc tgccaatcga agtgatggtc gatgccgtgc acaagctgaa atacgaaaac 660
 tacacatcct ctttctttat ccgagacatc atcaagccag atccccctaa gaacctgcag 720
 ctgaaacccc tgaagaattc tcgccagggtg gaggtcagtt gggaataccc agacacctgg 780
 agcacacccc attcatatct cagcctgact ttttgcgtgc aggtccaggg caagagtaaa 840
 agagagaaga aagacagggt gttcactgat aaaaccagcg ccacagtcac ctgtcggag 900
 aacgcctcta ttagtgtgag agctcaggat cggtactata gttcaagctg gtccgaatgg 960
 gcttctgtgc cttgtagtgg aggaggagga agcggaggag gaggatccgg aggaggcggg 1020
 tctagaaaac tgccctgtggc aaccccagac cccggcatgt tcccatgcct gcaccattcc 1080
 cagaacctgc tcggggcagc gtctaataatg ctgcagaagg ccagacagac cctggagttt 1140
 taccctgtga catccgagga aatcgaccac gaggatatta ccaaggataa aacctctaca 1200
 gtggaagctt gcctgcctct ggagctgaca aagaacgaat catgtctgaa tagcaggag 1260
 acttccttca tcaccaacgg ctcttgctg gccagtcgca agaccagctt catgatggct 1320
 ctgtgcctgt cctctatcta cgaggacctg aagatgtatc aggtggaatt caaaacctg 1380
 aacgccaagc tgctgatgga ccctaaaagg cagatcttcc tggatcagaa tatgctggct 1440
 gtgattgacg agctgatgca ggcaactaac ttcaatagcg aaacagtccc ccagaagagt 1500
 tcaactggagg aacctgattt ctacaagact aaaatcaagc tgtgcattct gctgcacgct 1560
 tttaggatcc gcgcagtgac cattgaccgc gtcatgagtt atctgaatgc ctacacccat 1620
 caccatcacc attggtccca tccacagttt gagaagtgat aactcgag 1668

<210> 103

<211> 1683

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Sc IL-12 HBP BMP4

<400> 103

gctagcgcca ccatgccctt gctgctgctg ctgcctctgc tgtgggctgg cgcactggcc 60
 atctgggagc tgaagaaaga cgtgtacgtg gtcgaactgg actggtatcc tgatgcccc 120
 ggggagatgg tggctctgac ttgcgacacc cccgaggaag atggaatcac ttggaccctg 180
 gatcagagct ccgaggtgct ggggtccgga aaaactga ctattcaggt caaggaattc 240
 ggcgacgctg ggcagtacac atgtcacaag ggaggagagg tgctgagcca ctccctgctg 300
 ctgctgcata agaaagaaga cggaatctgg tctactgaca ttctgaaaga tcagaaggag 360
 cctaagaaca aaaccttctt gcggtgcgaa gcaaaaaatt atagcggccg gttcacctgt 420
 tgggtggctga ccacaatctc tacagatctg acttttagtg tgaagtctag taggggctca 480
 agcgacccac agggagtcac atgcggagca gctactctga gcgccgagag ggtgcgcggg 540
 gataacaagg agtacgaata ttccgtcgag tgccaggaag actctgcatg tcctgcagcc 600

gaggaatccc tgccaatcga agtgatggtc gatgccgtgc acaagctgaa atacgaaaac 660
 tacacatcct ctttctttat tagggacatc atcaagccag atccccctaa gaacctgcag 720
 ctgaaacccc tgaagaattc acgccaggtg gaggtcagct gggaatacc agacacctgg 780
 agcacacccc attcatatth cagcctgact ttttgctgct aggtccagg caagagcaaa 840
 cgcgagaaga aagaccgagt gttcactgat aaaacctccg ctacagtcac ctgccgcaag 900
 aacgcctcta ttagtgtgag agctcaggat aggtactata gttcaagctg gtccgaatgg 960
 gcatctgtgc catgcagtgg aggaggagga agccggaaga aaaaccctaa ttgtcggaga 1020
 cacggcgggg gaggctccag aaatctgect gtggctaccc cagaccccgg gatgttccca 1080
 tgccctgcacc atagtcagaa cctgctgagg gcagtgtcaa atatgctgca gaaggccgc 1140
 cagaccctgg agttttacc atgtacatct gaggaaatcg accacgagga tattaccaag 1200
 gataaaaacca gtacagtgga agcctgectg cccctggagc tgacaaagaa cgaatcatgt 1260
 ctgaaatagcc gagagaactc cttcatcacc aacggctctt gctggccag tcgcaagacc 1320
 agcttcatga tggctctgtg cctgtctct atctacgagg acctgaagat gtatcaggtg 1380
 gaattcaaaa ccatgaacgc caagctgctg atggaccca aacggcagat ctttctggat 1440
 cagaatatgc tggctgtgat tgacgagctg atgcaggcac tgaacttcaa ttctgaaaca 1500
 gtccccaga agagttcact ggaggaacct gatttctaca agactaaaat caagctgtgc 1560
 attctgctgc acgcttttcg aatccgggca gtgaccattg acagagtcac gagctatctg 1620
 aatgcctccc accatcacca tcaccattgg agccatctc agtttgagaa gtgataactc 1680
 gag 1683

<210> 104

<211> 1698

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Sc IL-12 HBP FBN

<400> 104

gctagcgcca ccatgcccct gctgctgctg ctgcctctgc tgtgggctgg cgcactggcc 60
 atctgggagc tgaagaaaga cgtgtacgtg gtcgaactgg actggtatcc tgatgcccc 120
 ggggagatgg tggctctgac ttgcgacacc cccgaggaag atggaatcac ttggaccctg 180
 gatcagagct ccgaggtgct ggggagcggga aaaacactga ctattcaggt caaggaattc 240
 ggcgacgctg ggcagtacac atgtcacaag ggaggagagg tgctgagcca ctccctgctg 300
 ctgctgcata agaaagaaga cgggatctgg tctacagaca ttctgaaaga tcagaaggag 360
 cctaagaaca aaactttcct gcgctgcgaa gcaaaaaatt atagcggccg gttcacctgt 420
 tggtggtgta ccacaatctc tacagatctg acttttagtg tgaagtctag taggggatca 480
 agcgaccac agggagtcac atgcggagca gctactctga gcgccgagcg ggtgagaggc 540
 gataacaagg agtacgaata tagtgtcgag tgccaggaag actcagcatg tctgcagcc 600
 gaggaatccc tgccaatcga agtgatggtc gatgccgtgc acaagctgaa atacgaaaac 660
 tacacatcct ctttctttat tcgggacatc atcaagccag atccccctaa gaacctgcag 720
 ctgaaacccc tgaagaattc aagacaggtg gaggtcagct gggaatacc agacacctgg 780

tccacacccc attcatatth cagcctgacc ttttgcgtgc aggtccaggg caagtctaaa 840
 agagagaaga aagacagggt gttactgat aaaaccagtg ctacagtcac ctgtagaaag 900
 aacgcctcta ttagtgtgcg agctcaggat cggtactata gttcaagctg gtccgagtgg 960
 gcatctgtgc cctgtagtgg aggcggggga tccaaaaaca atcagaagtc tgaacctctg 1020
 atcggccgga agaaaactgg cgggggaggc agcagaaatc tgcctgtggc tacccagat 1080
 cccgggatgt tcccatgcct gcacatagc cagaacctgc tgagggcagt gtccaatag 1140
 ctgcagaagg cccgccagac cctggagttt tacccatgta caagcgagga aatcgaccac 1200
 gaggatatta ctaaggacaa aacctccaca gtggaagcct gcctgcccct ggagctgacc 1260
 aagaacgaat catgtctgaa tagccgagag acttcctca tcaccaacgg ctcttgacctg 1320
 gccagtcgca agaccagctt catgatggct ctgtgectgt cctctatcta cgaggacctg 1380
 aagatgtatc aggtggaatt caaaactatg aacgccaagc tgctgatgga ccccaaaagg 1440
 cagatctttc tggatcagaa tatgtgtgct gtgattgacg agctgatgca ggcactgaac 1500
 ttcaattctg aaaccgtccc ccagaagagt tcaactggagg aacctgattt ctacaagaca 1560
 aaaatcaagc tgtgcattct gctgcacgct ttaggatcc gcgcagtac cattgaccgc 1620
 gtcagagct atctgaatgc ctcccacat caccatcacc attggagcca tctcagttt 1680
 gagaagtgat aactcgag 1698

<210> 105

<211> 1701

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Sc IL-12 HGFBP

<400> 105

gctagcgcca ccatgcccct gctgctgctg ctgcctctgc tgtgggctgg cgcactggcc 60
 atctgggagc tgaagaaaga cgtgtactgt gtcgaactgg actggtatcc tgatgccccca 120
 ggggagatgg tggctctgac ttgcgacacc cccgaggaag atggaatcac ttgaccctg 180
 gatcagagct ccgagggtgct ggggtccgga aaaactga ctattcaggt caaggaattc 240
 ggcgacgctg ggcagtacac atgtcacaag ggaggagagg tgctgagcca ctccctgctg 300
 ctgctgcata agaaagaaga cgggatctgg tctactgaca ttctgaaaga tcagaaggag 360
 ccaaagaaca aaaccttctt gcgctgcgaa gcaaaaaatt atagcggccg gttcacctgt 420
 tgggtggctga ccacaatctc tacagatctg acttttagtg tgaagtctag taggggctca 480
 agcgaccac agggagtac atgcggagca gctactctga gcgccgagcg ggtgagaggg 540
 gataacaagg agtacgaata ttccgtcgag tgccaggaag actctgcatg tctgcagcc 600
 gaggaatccc tgccaatcga agtgatggtc gatgccgtgc acaagctgaa atacgaaac 660
 tacacatcct ctttctttat tcgggacatc atcaagccag atccccctaa gaacctgcag 720
 ctgaaacccc tgaagaattc aagacagggt gaggtcagct gggaataccc agacacctgg 780
 agcacacccc attcatatth cagcctgact ttttgcgtgc aggtccaggg caagagcaaa 840
 agagagaaga aagacagggt gttactgat aaaacctccg ctacagtcac ctgcagaaag 900
 aacgcctcta ttagtgtgcg agctcaggat cggtactata gttcaagctg gtccgaatgg 960

gcatctgtgc cttgtagtgg aggcggggga agcgtgtgga actgggtctg ctttagggac 1020
 gtgggatgtg attgggtcct gggaggagga ggctcccga atctgcctgt ggctacccca 1080
 gatccccgca tgttcccatg cctgcacat agtcagaacc tgctgcgggc agtgtcaaat 1140
 atgctgcaga aggccagaca gaccctggag ttttaccct gtacatctga ggaaatcgac 1200
 cacgaggata ttaccaagga caaaaccagt acagtggaag cctgcctgcc tctggagctg 1260
 acaaagaacg aatcatgtct gaatagccga gagacttct tcatcacca cggctcttg 1320
 ctggccagtc gcaagaccag cttcatgat gctctgtgcc tgtcctctat ctacgaggac 1380
 ctgaagatgt atcaggtgga attcaaaacc atgaacgcca agctgctgat ggaccctaa 1440
 aggcagatct ttctggatca gaatatgctg gctgtgattg acgagctgat gcaggcactg 1500
 aacttcaatt ctgaaacagt gccccagaag agttcactgg aggaacctga tttctacaag 1560
 actaaaatca agctgtgcat tctgtgcac gcttttagga tccgcgcagt gaccattgac 1620
 cgcgtcatga gctatctgaa tgctcccac catcaccatc accattggag ccatccacag 1680
 tttgagaagt gataactcga g 1701

<210> 106

<211> 1677

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Sc IL-12 EGFRBP

<400> 106

gctagcgcca ccatgcccct gctgctgctg ctgcctctgc tgtgggctgg cgcactggcc 60
 atctgggagc tgaagaaaga cgtgtacgtg gtcgaactgg actggtatcc tgatgcccc 120
 ggggagatgg tggctctgac ttgcgacacc cccgaggaag atggaatcac ttggaccctg 180
 gatcagagct ccgaggtgct ggggagcgga aaaacactga ctattcaggt caaggaattc 240
 ggcgacgctg ggcagtacac atgtcacaag ggcggggagg tgctgtctca cagtctgctg 300
 ctgctgcata agaaagaaga cggaatctgg tctactgaca ttctgaaaga tcagaaggag 360
 cctaagaaca aaaccttctc gcgctgcgaa gcaaaaaatt atagcggccg gttcacctgt 420
 tgggtggctga ccacaatctc aacagatctg acttttagcg tgaagtctag taggggctca 480
 agcgacccac agggagtcac atgcggagca gctactctga gcgccgagcg ggtgagaggg 540
 gataacaagg agtacgaata tagtgtcgag tgccaggaag actcagcatg tctgcagcc 600
 gaggaatccc tgccaatcga agtgatggtc gatgccgtgc acaagctgaa atacgaaaac 660
 tacacatcct ctttctttat ccgagacatc atcaagccag atccccctaa gaacctgcag 720
 ctgaaacccc tgaagaattc ccgccaggtg gaggtctctt gggaataccc agacacctgg 780
 tccacacccc attcctatct ctctctgaact ttttgcgtgc aggtccaggg caagtctaaa 840
 agagagaaga aagacagggt gttcactgat aaaaccagtg ctacagtcat ctgccggaag 900
 aacgcctcaa ttagcgtgcg agctcaggac cggtactata gttcaagctg gagtgaatgg 960
 gcatcagtgc catgcagcgg aggaggagga tcctctgtgg ataaccctca cgtctgtggc 1020
 ggaggaggca gcagaaatct gcctgtggct accccagacc ccgggatgtt ccatgcctg 1080
 caccatagcc agaacctgct gcgggcagtg tccaatatgc tgcagaaggc cagacagacc 1140

ctggagtttt acccatgtac aagcgaggaa atcgaccacg aggatattac caaggataaa 1200
 acctccacag tggaaagcctg cctgcccctg gagctgacaa agaacgaatc ctgtctgaat 1260
 tctagggaga ctagtttcat caccaacggc tcatgcctgg ccagccgcaa aacttccttt 1320
 atgatggctc tgtgcctgag ttcaatctac gaggacctga agatgtatca ggtggaattc 1380
 aaaacatga acgccaagct gctgatggac cccaaaaggc agatctttct ggatcagaat 1440
 atgctggctg tgattgacga gctgatgcag gcaactgaact tcaattctga aacagtcccc 1500
 cagaagagct ccctggagga acctgatttc tacaagacta aatcaagct gtgcattctg 1560
 ctgcacgctt ttaggatccg cgcagtgacc attgaccgcg tcatgtctta tctgaatgcc 1620
 agtcaccatc accatcacca ttggagccat cctcagtttg agaagtgata actcgag 1677

<210> 107

<211> 2394

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Sc IL-12 抗EPCAM

<400> 107

gctagcgcca ccatgcctct gctgctgctg ctgccactgc tgtgggctgg cgcactggcc 60
 atctgggagc tgaagaaaga cgtgtacgtg gtcgaactgg actggtatcc cgatgctcct 120
 ggggagatgg tggctctgac atgcgacact cccgaggaag atggaatcac atggactctg 180
 gatcagagct ccgaggtcct gggaagcggc aaaaccctga caattcaggt gaaggaattc 240
 ggggacgccg gacagtacac atgtcacaag ggcggggagg tgctgtctca cagtctgctg 300
 ctgctgcata agaaagaaga cgggatctgg tctaccgaca ttctgaaaga tcagaaggag 360
 cccaagaaca aaacattcct gaggtgcgaa gccaaaatt atagcggacg ctttacctgt 420
 tgggtggctga ccacaatcag taccgatctg acattttcag tcaagtctag tcggggctca 480
 agcgaccctc agggagtac atgcggagca gctactctgt ctgccgagcg ggtcagaggg 540
 gataacaagg agtacgaata ttctgtggag tgccaggaag acagtgcttg tccagcagcc 600
 gaggaaagcc tgcccatcga ggtcatggtg gatgcagtgc acaagctgaa atacgaaaac 660
 tacacatcct ctttctttat tcgggacatc atcaagccag atccccctaa gaacctgcag 720
 ctgaaacccc tgaagaatag cagacaggtc gaggtgtcct gggaataccc cgacacttgg 780
 agcaccctc atagttattt ctcaactgacc ttttgcgtcc aggtgcaggg caagtctaaa 840
 agagagaaga aagacagggt cttcacagat aagaccagcg ccaccgtgat ctgtagaaag 900
 aacgcatcaa ttagcgtgcg agcccaggat cggtactata gttcaagctg gagcgagtgg 960
 gcctccgtgc catgctctgg aggaggagga tcacaggtec agctggtgca gagcggagca 1020
 gaagtgaaga aacccggtc ctctgtcaaa gtgagttgta aggctcagg cgggactttt 1080
 agttcatacg caatctctgt ggtcgtgagg caggcaccag gacagggact ggagtggatg 1140
 ggaggcatca ttctatctt cggcaccgcc aactacgctc agaagtttca ggggcgctg 1200
 actattaccg ccgatgagtc cacatctact gcttatatgg agctgagctc cctgagaagc 1260
 gaagacaccg ccgtgtacta ttgcgcaagg ggctgctgt ggaattactg gggccagggg 1320
 aactggtca ccgtgagcag caaactgagt ggaagcgcca gcgccctaa gctggaggaa 1380

ggagagttca gtgaagcccc ggtcgagact accctgacce agtcccctgc tacactgtcc 1440
 gtgtctccag gagaacgcgc tacactgagc tgtcgagcaa gtcagtcagt gtcaagcaat 1500
 ctggctgtcg tgtaccagca gaagccaggc caggcaccca gactgctgat ctatggggca 1560
 agcaccggg ccacaggaat tccagctaga ttcagcggat ceggctctgg gaccgagttt 1620
 accctgacaa tctcctctct gcagtccgaa gacttcgccg tgtactattg ccagcagtac 1680
 aacaattggc caccgggtt cacttttggg cccggcacca aagtcgatat taagggagga 1740
 ggagggtccc ggaacctgcc tgtggcaact cctgaccagc gcatgttccc atgcctgcac 1800
 cattcccaga acctgtcgcg agccgtgagc aatatgctgc agaaagcacg gcagacactg 1860
 gagttttatc cttgtactag cgaggaaatc gaccacgagg atattacaaa ggataaaaact 1920
 tccaccgtgg aagcctgcct gccactggag ctgactaaga acgaaagctg tctgaattcc 1980
 cgcgagactt ctttcatcac caatggcagt tgectggcat cacgaaaaac cagctttatg 2040
 atggccctgt gcctgagttc aatctacgag gacctgaaga tgtatcaggt ggaattcaaa 2100
 acaatgaacg ccaagctget gatggaccct aaaaggcaga tctttctgga tcagaatatg 2160
 ctggccgtga ttgacgagct gatgcaggct ctgaacttca atagcgaac tgtgccccag 2220
 aagagctccc tggaggaacc tgatttctac aagacaaaa tcaagctgtg cattctgctg 2280
 cacgccttta ggatccgcgc tgtcaccatt gaccgcgtga tgtcctatct gaacgcctct 2340
 caccatcacc atcaccattg gtcccatcca cagtttgaga agtgataact cgag 2394

<210> 108

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFR结合肽

<400> 108

Tyr His Trp Tyr Gly Tyr Thr Pro Gln Asn Val Ile

1 5 10

<210> 109

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EGFR结合肽

<400> 109

Tyr Arg Trp Tyr Gly Tyr Thr Pro Gln Asn Val Ile

1 5 10

<210> 110

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> VEGFR3结合肽
<400> 110
Pro Cys Ala Ile Trp Phe
1 5
<210> 111
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VEGFR3结合肽
<400> 111
Trp Val Cys Ser Gly Gly
1 5
<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> NGR基序
<400> 112
Asn Gly Arg Asn Gly Arg Asn Gly Arg
1 5
<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> RGD基序
<400> 113
Arg Gly Asp Arg Gly Asp Arg Gly Asp
1 5
<210> 114
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> NG2蛋白聚糖结合肽
<400> 114

Thr Ala Ala Ser Gly Val Arg Ser Met His

1 5 10

<210> 115

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NG2蛋白聚糖结合肽

<400> 115

Leu Thr Leu Arg Trp Val Gly Leu Met Ser

1 5 10

<210> 116

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HER2结合肽

<400> 116

Asn Lys Phe Asn Lys Gly Met Arg Tyr Trp Gly Ala Leu Gly Gly Asn

1 5 10 15

Gly Lys Arg Gly Ile Arg Gly Tyr Met

20 25

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EPCAM结合肽

<400> 117

Tyr Glu Val His Thr Tyr Tyr Leu Asp

1 5

<210> 118

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VEGFR结合肽

<400> 118

Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile

1	5	10	15
Gly	Glu Met Ser Phe		
	20		

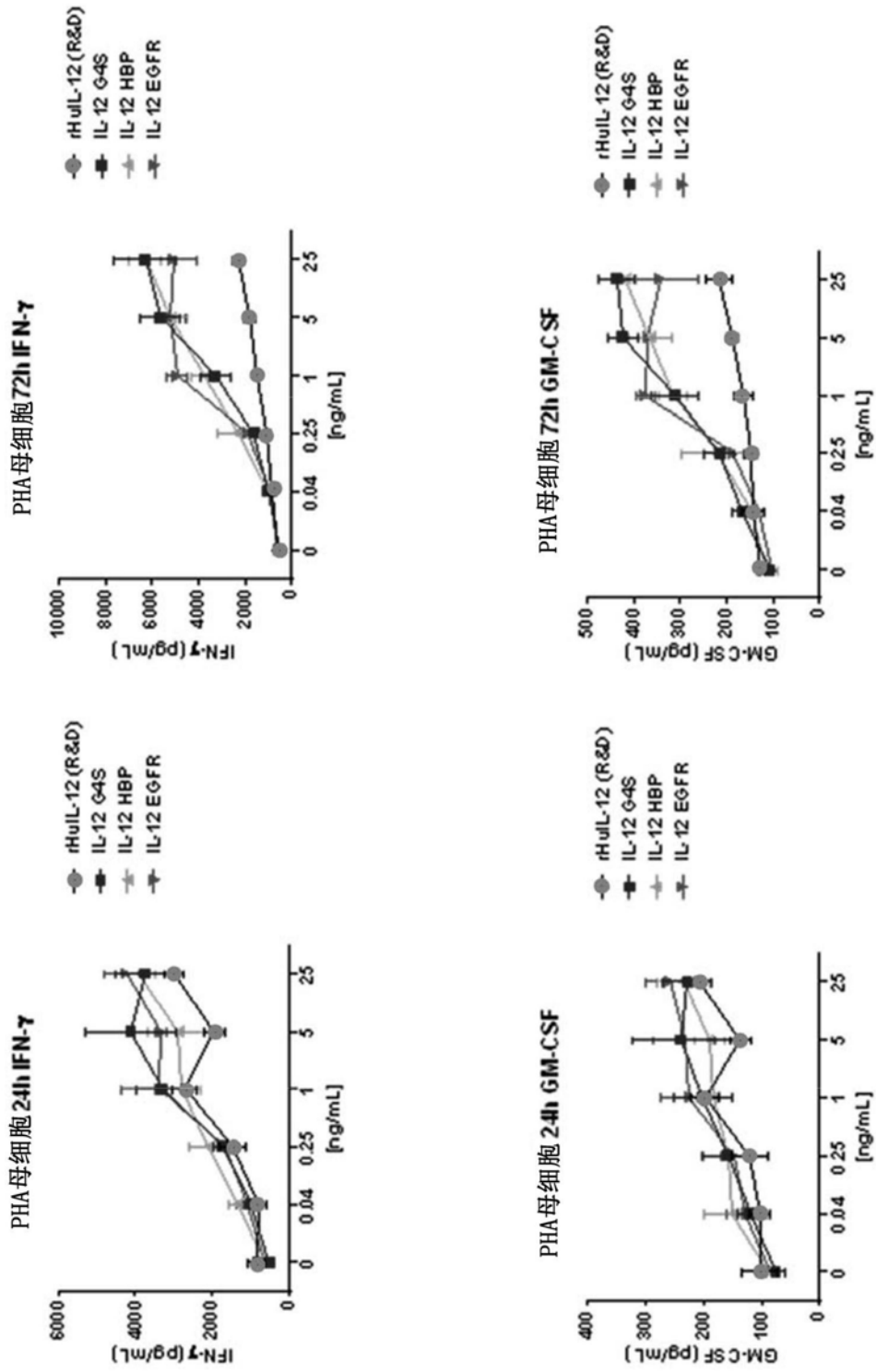


图1

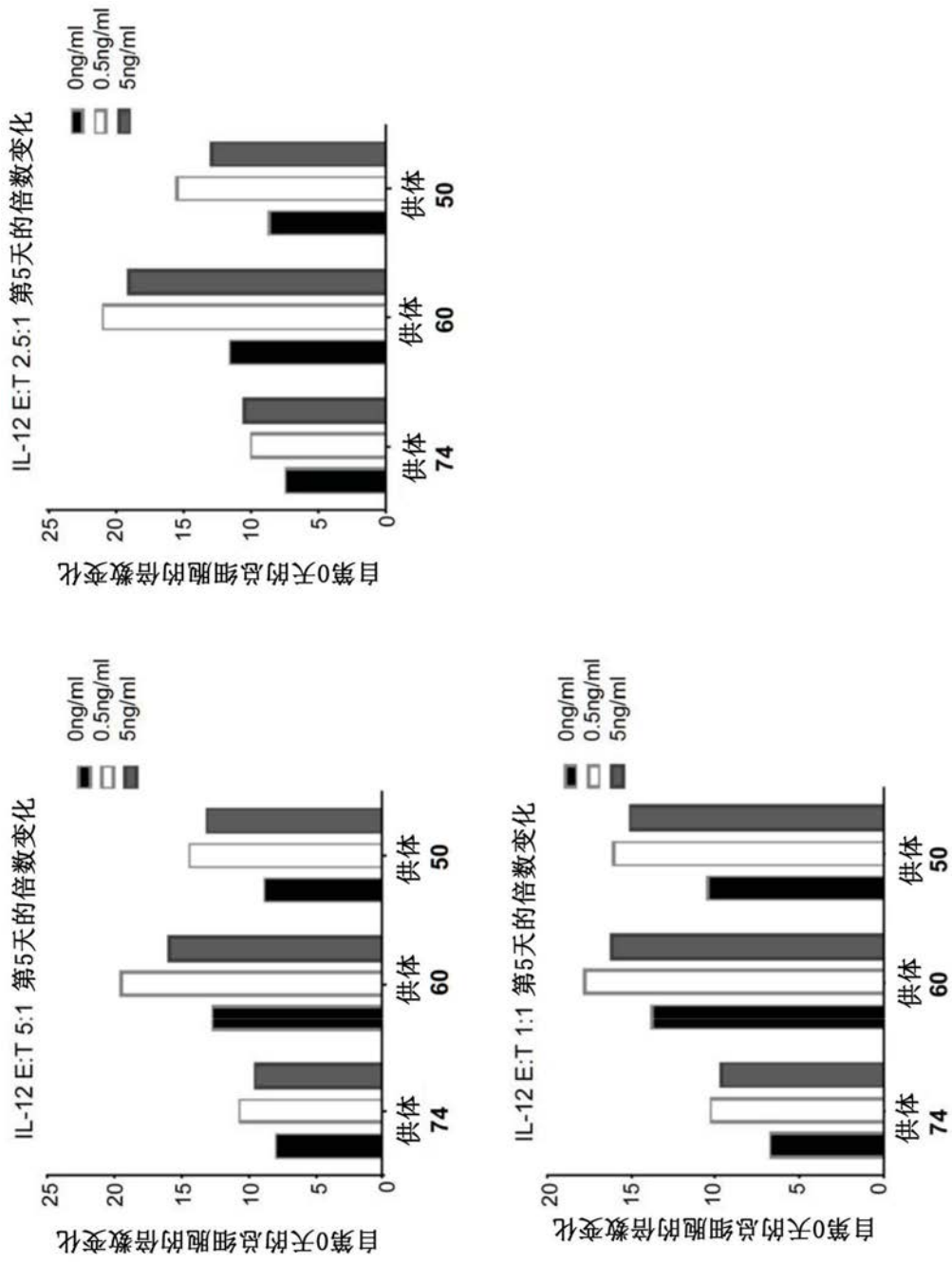


图2

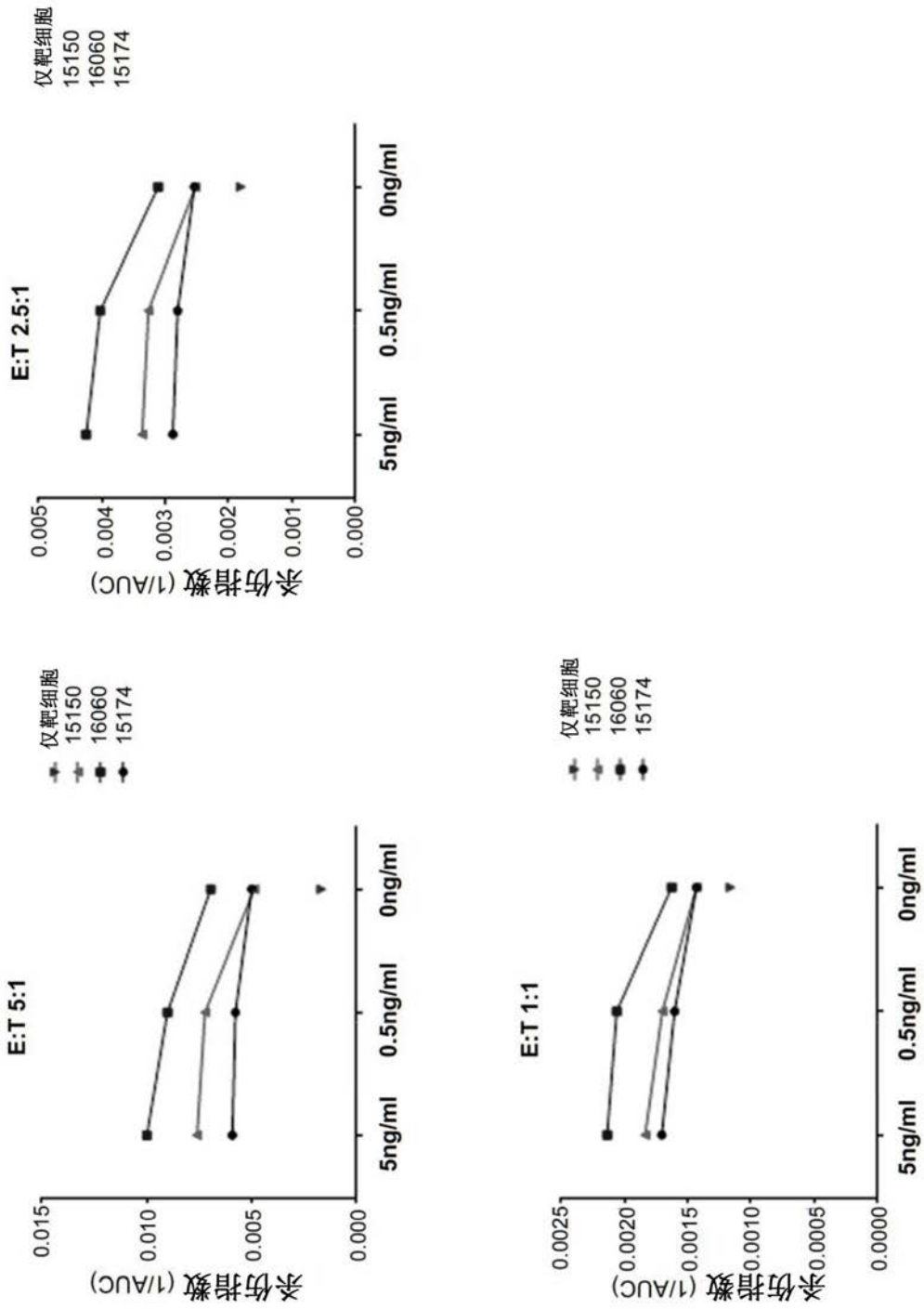


图3

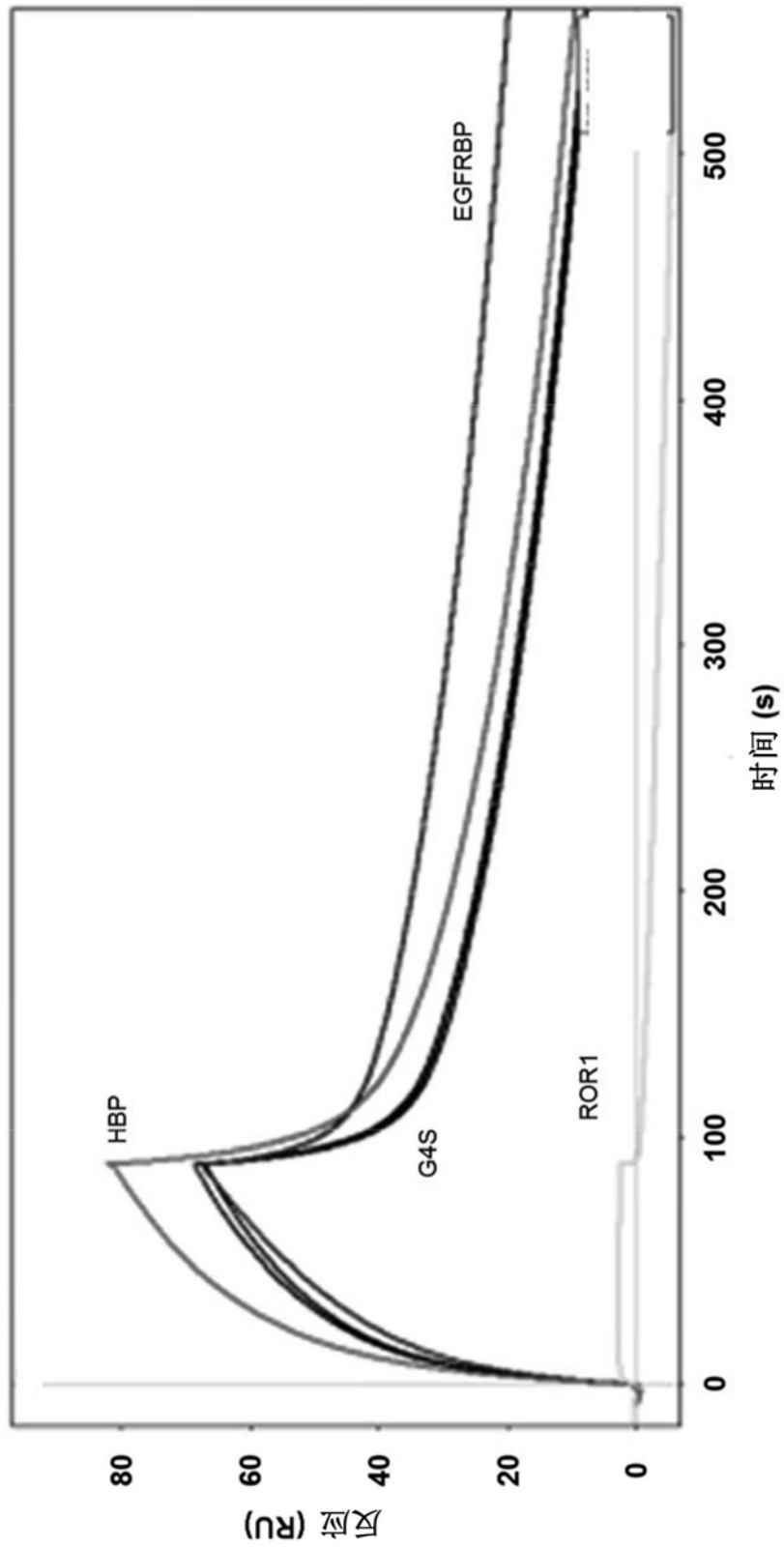


图4