



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 113286609 B

(45) 授权公告日 2025. 01. 21

(21) 申请号 201980080657.4

(22) 申请日 2019.12.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113286609 A

(43) 申请公布日 2021.08.20

(30) 优先权数据
62/782,167 2018.12.19 US
62/814,684 2019.03.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.06.04

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/067575 2019.12.19

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/132297 EN 2020.06.25

(73) 专利权人 库尔生物制药有限公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 罗纳德·D·赛德尔三世
鲁道夫·J·查帕罗

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258
专利代理师 肖善强

(51) Int.Cl.
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 106456733 A, 2017.02.22
CN 108431022 A, 2018.08.21
W0 2018119114 A1, 2018.06.28

审查员 董旭婷

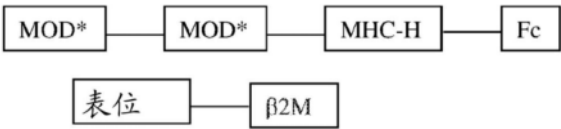
权利要求书4页 说明书123页 附图67页

(54) 发明名称

多聚体T细胞调节多肽及其使用方法

(57) 摘要

本公开提供T细胞调节多聚体多肽,其包含免疫调节多肽且包含表位递呈的威尔姆氏瘤(Wilms tumor)肽。所述T细胞调节多聚体多肽适用于调节T细胞的活性且适用于调节个体中的免疫反应。



1. 一种T细胞调节多聚体多肽 (TMMP), 其包含:
至少一种异二聚体, 所述至少一种异二聚体包含:
 - a) 第一多肽, 所述第一多肽包含:
 - i) 威尔姆氏瘤-1 (Wilms tumor-1, WT-1) 肽表位, 其中所述WT-1肽的长度为4至25个氨基酸; 和
 - ii) 第一I类主要组织相容性复合物 (MHC) 多肽;
其中所述第一I类MHC多肽为 β 2微球蛋白 (β 2M) 多肽;
 - b) 第二多肽, 所述第二多肽包含:
 - i) 第二I类MHC多肽, 其中所述第二I类MHC多肽为I类MHC重链多肽;
 - ii) 一种或多种免疫调节多肽, 其中所述一种或多种免疫调节多肽是呈现出对IL-2受体的亲和力减小并包含基于SEQ ID NO:15的氨基酸编号的H16的取代、或H16的取代和F42的取代的一种或多种变异IL-2多肽; 和
 - iii) 免疫球蛋白 (Ig) Fc多肽,
其中所述第一多肽和所述第二多肽彼此至少经由第一二硫键和第二二硫键共价连接, 其中所述第一二硫键形成于: (i) 存在于所述WT-1肽表位与所述 β 2M多肽之间的含Cys接头中的Cys残基, 与(ii) 存在于所述I类MHC重链多肽中的Cys残基之间; 并且所述第二二硫键形成于: 所述 β 2M多肽中的Cys残基与所述I类MHC重链多肽中的Cys残基之间。
2. 如权利要求1所述的TMMP, 其中:
 - a) 所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:
 - i) 所述WT-1肽表位;
 - ii) 所述含Cys接头; 和
 - iii) 所述 β 2M多肽; 且
 - b) 所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:
 - i) 所述一种或多种变异IL-2多肽;
 - ii) 接头;
 - iii) 所述I类MHC重链多肽;
 - iv) 接头; 和
 - v) 所述 Ig Fc多肽;其中所述TMMP包含多于一个变异IL-2多肽, 插入所述变异IL-2多肽之间的接头。
3. 如权利要求1所述的TMMP, 其中:
 - a) 所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:
 - i) 所述WT-1肽表位;
 - ii) 所述含Cys接头; 和
 - iii) 所述 β 2M多肽; 且
 - b) 所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:
 - i) 所述I类MHC重链多肽;
 - ii) 接头;
 - iii) 所述Ig Fc多肽;
 - iv) 接头; 和

v) 所述一种或多种变异IL-2多肽;

其中所述TMMP包含多于一个变异IL-2多肽,插入所述变异IL-2多肽之间的接头。

4.如权利要求1-3中任一权利要求所述的TMMP,其中所述变异IL-2多肽包含:i) H16A取代和F42A取代;或ii) H16T取代和F42A取代。

5.如权利要求1-3中任一权利要求所述的TMMP,其中所述I类MHC重链多肽的氨基酸序列是如SEQ ID NO:199、SEQ ID NO:201或SEQ ID NO:203所示的氨基酸序列。

6.如权利要求2所述的TMMP,其中所述TMMP包含两个串联且经由接头连接的变异IL-2多肽,且其中每一变异IL-2的氨基酸序列是SEQ ID NO:188所示的氨基酸序列,其中X₁为Ala,X₂为Ala,或者其中X₁为Thr,X₂为Ala,

其中所述β2M多肽的氨基酸序列是如SEQ ID NO:314所示的氨基酸序列,并且其中,第一二硫键形成于(i)所述WT-1肽表位和所述β2M多肽之间的接头中的Cys残基和(ii)所述I类MHC重链多肽中84位的Cys残基之间,且其中,第二二硫键形成于所述β2M多肽12位的Cys残基和所述I类MHC重链多肽236位的Cys残基之间,

其中,所述I类MHC重链多肽的氨基酸序列是如SEQ ID NO:41-43和198-206中的任一项所示的氨基酸序列,该氨基酸序列中,氨基酸84为Cys,氨基酸236为Cys,且

其中,所述Ig Fc多肽的氨基酸序列是SEQ ID NO:418-421中任一项所示的氨基酸序列。

7.如权利要求6所述的TMMP,其中所述变异IL-2多肽通过接头连接,并且其中每个变异IL-2多肽的氨基酸序列是SEQ ID NO:188所示的氨基酸序列,其中X₁为Ala,X₂为Ala。

8.如权利要求6或7所述的TMMP,其中所述I类MHC重链多肽的氨基酸序列是SEQ ID NO:199的所示的氨基酸序列,且其中所述表位为VLDFAPPGA (SEQ ID NO:259)。

9.如权利要求3所述的TMMP,其中所述TMMP包含两个串联且经由接头连接的变异IL-2多肽,且其中每一变异IL-2的氨基酸序列是SEQ ID NO:188所示的氨基酸序列,其中X₁为Ala,X₂为Ala,或者其中X₁为Thr,X₂为Ala,

其中所述β2M多肽的氨基酸序列是如SEQ ID NO:314所示的氨基酸序列,且其中,第一二硫键形成于(i)所述WT-1肽表位和所述β2M多肽之间的接头中的Cys残基和(ii)所述I类MHC重链多肽中84位的Cys残基之间,且其中,第二二硫键形成于所述β2M多肽12位的Cys残基和所述I类MHC重链多肽236位的Cys残基之间,

其中,所述I类MHC重链多肽的氨基酸序列是如SEQ ID NO:41-43和198-206中的任一项所示的氨基酸序列,该氨基酸序列中,氨基酸84为Cys,氨基酸236为Cys,且

其中,所述Ig Fc多肽的氨基酸序列是SEQ ID NO:418-421中任一项所示的氨基酸序列。

10.如权利要求9所述的TMMP,其中所述变异IL-2多肽通过接头连接,并且每个变异IL-2多肽的氨基酸序列是SEQ ID NO:188所示的氨基酸序列,其中X₁为Ala,X₂为Ala。

11.如权利要求1-3中任一权利要求所述的TMMP,其中所述WT-1肽表位与所述β2M多肽之间的接头的氨基酸序列是SEQ ID NO:316或SEQ ID NO:317所示的氨基酸序列。

12.如权利要求7所述的TMMP,其中所述第一多肽的氨基酸序列是SEQ ID NO:423所示的氨基酸序列,

所述I类MHC重链多肽的序列是以下氨基酸序列:GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDT

QFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRQVKAHSQTHRVDLGLRGYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWD
RFLRGYHQYAYDQKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRLYLENGKETLQRTD
APKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVPSGQEQRITC
HVQHEGLPKPLTLRWE,且

所述Ig Fc多肽的氨基酸序列是SEQ ID NO:421所示的氨基酸序列。

13.如权利要求1至3、6或9中任一项所述的TMMP,其包含第一异二聚体和第二异二聚体,其中所述第一异二聚体与所述第二异二聚体在氨基酸序列上相同,并且通过所述第一异二聚体与所述第二异二聚体的Ig Fc多肽之间的一个或多个二硫键来共价结合。

14.如权利要求12所述的TMMP,其包含第一异二聚体和第二异二聚体,其中所述第一异二聚体与所述第二异二聚体在氨基酸序列上相同,并且通过所述第一异二聚体与所述第二异二聚体的Ig Fc多肽之间的一个或多个二硫键来共价结合。

15.如权利要求14所述的TMMP,其中两个二硫键连接一个异二聚体的Ig Fc多肽与另一个异二聚体的Ig Fc多肽。

16.一种药物组合物,其包含如权利要求1-14中任一权利要求所述的TMMP。

17.一种药物组合物,其包含如权利要求15所述的TMMP。

18.一种组合物,其包含一个或多个核酸,所述核酸包含编码权利要求1-15中任一权利要求所述TMMP的第一和第二多肽的核苷酸序列。

19.一种组合物,其包含一个或多个表达载体,其中所述一个或多个表达载体包含编码权利要求1-15中任一权利要求所述TMMP的第一和第二多肽的核苷酸序列。

20.用于生产如权利要求1-15中任一权利要求所述的TMMP的方法,所述方法包括培养经一个或多个表达载体遗传修饰的宿主细胞,所述表达载体包含编码所述多聚体多肽的第一和第二多肽的核苷酸序列,且所述培养在使所述转基因宿主细胞产生TMMP的条件下进行。

21.一种基因修饰的宿主细胞的组合物,其中所述宿主细胞包含一个或多个核酸,所述核酸包含编码权利要求1-15中任一权利要求所述TMMP的第一和第二多肽的核苷酸序列。

22.如权利要求16或17所述的药物组合物,用于在治疗个体癌症的方法中。

23.如权利要求16或17所述的药物组合物,用于治疗个体癌症的方法中,其中所述个体也正在接受治疗有效量的免疫检查点抑制剂的疗法。

24.如权利要求16或17所述的药物组合物,用于治疗个体癌症的方法中,其中所述个体还使用治疗有效量的免疫检查点抑制剂进行治疗,并且其中所述检查点抑制剂是针对PD-1、PD-L1、CTLA4或TIGIT的抗体。

25.一种检测从个体获得的混合的T细胞群中结合WT-1表位的靶T细胞的存在的方法,所述方法包括:

- a) 使所述混合的T细胞群与如权利要求1至15中任一项所述的TMMP在体外接触;及
- b) 检测WT-1表位特异性T细胞的活化和/或增殖。

26.如权利要求16或17所述的药物组合物,其用于治疗个体的癌症的方法中,其中所述个体还使用治疗有效量的免疫检查点抑制剂进行治疗,并且其中所述检查点抑制剂是针对PD-1的抗体。

27.如权利要求16或17所述的药物组合物,其用于治疗个体的癌症的方法中,其中所述

个体还使用治疗有效量的免疫检查点抑制剂进行治疗,并且其中所述检查点抑制剂是帕博利珠单抗。

28.如权利要求16或17所述的药物组合物,其用于治疗个体的癌症的方法中,其中所述个体还使用治疗有效量的免疫检查点抑制剂进行治疗,并且其中所述检查点抑制剂是纳武单抗。

29.如权利要求16或17所述的药物组合物,其用于治疗个体的癌症的方法中,其中所述个体还使用治疗有效量的免疫检查点抑制剂进行治疗,并且其中所述检查点抑制剂是针对PD-L1的抗体。

30.如权利要求16或17所述的药物组合物,其用于治疗个体的癌症的方法中,其中所述个体还使用治疗有效量的免疫检查点抑制剂进行治疗,并且其中所述检查点抑制剂是阿特珠单抗。

31.根据权利要求16或17所述的药物组合物,其用于治疗个体的癌症的方法中,其中所述个体还使用治疗有效量的免疫检查点抑制剂进行治疗,并且其中所述检查点抑制剂是德瓦鲁单抗。

多聚体T细胞调节多肽及其使用方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2018年12月19日提交的美国临时专利申请号62/782,167和2019年3月6日提交的美国临时专利申请号62/814,684的优先权,这些申请的公开内容以引用方式整体并入本文。

背景技术

[0003] 适应性免疫反应涉及存在于T细胞表面上的T细胞受体(TCR)与抗原递呈细胞(APC)表面上非共价递呈的小肽抗原通过主要组织相容性复合物(MHC;在人中也称为人白细胞抗原(HLA)复合物)进行的接合。此接合表示免疫系统的靶向机制且为T细胞调节(活化或抑制)及效应物功能的必需分子相互作用。在表位特异性细胞靶向之后,通过使APC上所见的共刺激蛋白与T细胞上的对应物共刺激蛋白接合来激活所靶向的T细胞。驱动T细胞特异性及活化或抑制需要两种信号,即表位/TCR结合及APC共刺激蛋白与T细胞共刺激蛋白的接合。TCR对于给定表位具有特异性;然而,共刺激蛋白并非表位特异性的且相反通常在全部T细胞上或大T细胞子集上表达。

发明内容

[0004] 本公开提供T细胞调节多聚体多肽(TMMP),其包含免疫调节多肽且包含表位递呈的威尔姆氏瘤(Wilms tumor)肽。T细胞调节多聚体多肽适用于调节T细胞的活性且适用于调节个体中的免疫反应。

附图说明

[0005] 图1A-1F为本公开的各种TMMP的示意性描绘。

[0006] 图2A-2F为本公开的各种二硫键连接的TMMP的示意性描绘。

[0007] 图3A-3E提供WT-1多肽的氨基酸序列。图3A-3E的序列分别列于SEQ ID NO:399-403中。

[0008] 图4A-4E提供本公开的TMMP的示例性多肽链的氨基酸序列。图4A-4E的示例性多肽链的序列分别列于SEQ ID NO:405-409中。表位序列列出如下:图4D:CMTWNQMNL(SEQ ID NO:266);图4E:CYTWNQMNL(SEQ ID NO:267)。

[0009] 图5A-5G提供免疫球蛋白Fc多肽的氨基酸序列。图5A-5G的序列分别列于SEQ ID NO:410-421中。

[0010] 图6提供来自以下各项的 β -2微球蛋白(β 2M)前体(即,包括前导序列)的多重氨基酸序列比对:智人(*Homo sapiens*) (NP_004039.1;SEQ ID NO:19)、黑猩猩(*Pan troglodytes*) (NP_001009066.1;SEQ ID NO:19)、恒河猕猴(*Macaca mulatta*) (NP_001040602.1;SEQ ID NO:20)、欧洲牛(*Bos taurus*) (NP_776318.1;SEQ ID NO:21)及小鼠(*Mus musculus*) (NP_033865.2;SEQ ID NO:22)。氨基酸1-20是信号肽。

[0011] 图7A-7C提供等位基因A*0101(SEQ ID NO:23)、A*1101(SEQ ID NO:24)、A*2402

(SEQ ID NO:25) 及A*3303(SEQ ID NO:26) (图7A)的全长人HLA重链的氨基酸序列;等位基因B*0702(SEQ ID NO:27) (图7B)的全长人HLA重链的氨基酸序列;以及全长人HLA-C重链(SEQ ID NO:28) (图7C)的氨基酸序列。

[0012] 图8提供十一种无前导序列、跨膜结构域及细胞内结构域的成熟I类MHC重链氨基酸序列的比对。顶部至底部:SEQ ID NO:41-51。

[0013] 图9A-9B提供HLA-A重链氨基酸序列(图9A;分别为SEQ ID NO:198-206)和共有序列(图9B;SEQ ID NO:29)的比对。

[0014] 图10A-10B提供HLA-B重链氨基酸序列(图10A;分别为SEQ ID NO:207-213)和共有序列(图10B;SEQ ID NO:30)的比对。

[0015] 图11A-11B提供HLA-C重链氨基酸序列(图11A;分别为SEQ ID NO:214-222)和共有序列(图11B;SEQ ID NO:31)的比对。

[0016] 图12提供HLA-E、HLA-F及HLA-G重链(分别为SEQ ID NO:32-34)中各者的共有氨基酸序列。各种氨基酸(aa)位置指示为依次编号的“X”残基;氨基酸84、139及236的位置加双下划线。

[0017] 图13提供HLA-A(SEQ ID NO:35)、HLA-B(SEQ ID NO:36)、HLA-C(SEQ ID NO:37)、HLA-E(SEQ ID NO:38)、HLA-F(SEQ ID NO:39)及HLA-G(SEQ ID NO:40)的共有氨基酸序列的比对。

[0018] 图14A-14I提供本公开的双二硫键连接的TMMP的多肽链的氨基酸序列。图14A-14I的多肽链的序列分别列于SEQ ID NO:422-430中。表位序列列出如下:图14B:VLDFAPPGA(SEQ ID NO:259);图14C:RMFPNAPYL(SEQ ID NO:260);图14F:VLDFAPPGA(SEQ ID NO:259);图14G:RMFPNAPYL(SEQ ID NO:260);图14H:YMFPNAPYL(SEQ ID NO:264);图14I:YMFPNAPYL(SEQ ID NO:264)。

[0019] 图15描绘本公开的含有WT1(37-45)表位的TMMP的表达和稳定性数据。

[0020] 图16描绘本公开的含有WT1(126-134)表位的TMMP的表达和稳定性数据。

[0021] 图17A-17D提供本公开的双二硫键连接的TMMP的示意性描绘。

[0022] 图18A-18C提供本公开的二硫键连接的TMMP的构型的实例的示意性描绘。

[0023] 图19提供免疫调节多肽于本公开的TMMP中的位置的实例的示意性描绘。

[0024] 图20A-20R提供本公开的TMMP的示例性多肽链的氨基酸序列。图20A-20R的示例性多肽链的序列分别列于SEQ ID NO:431-448中。表位序列列出如下:图20H:CYTWNQMNL(SEQ ID NO:262);图20I:CYTWNQMNL(SEQ ID NO:262);图20J:CYTWNQMNL(SEQ ID NO:262);图20K:CYTWNQMNL(SEQ ID NO:262);图20L:CYTWNQMNL(SEQ ID NO:262);图20M:NYMNLGATL(SEQ ID NO:263);图20N:NYMNLGATL(SEQ ID NO:263);图20O:NYMNLGATL(SEQ ID NO:263);图20P:NYMNLGATL(SEQ ID NO:263);图20Q:NYMNLGATL(SEQ ID NO:263);图20R:NYMNLGATL(SEQ ID NO:263)。

[0025] 图21描绘含有WT1肽表位及HLA-A*02重链的TMMP对抗原特异性CD8+T细胞扩增的作用。

[0026] 图22描绘在10天促发培养后的8天再刺激培养过程中含有WT1肽表位的TMMP对来自总PBMC的WT1-特异性CD8+T细胞的扩增的作用。

[0027] 图23描绘由以具有G2C或R12C/G2C构架的含有WT1 37-45的TMMP扩增的WT1-特异

性CD8+T细胞进行的TNF- α 和IFN- γ 产生。

[0028] 图24描绘由以具有R12C/G2C构架的含有WT1 126-134的TMMP扩增的WT1-特异性CD8+T细胞进行的TNF- α 和IFN- γ 产生。

[0029] 图25描绘二硫键对IL-2驱动的免疫细胞活化的作用。

[0030] 图26描绘与阿地白介素 (proleukine) 相比,含有变体IL-2作为免疫调节多肽的TMMP对CGLL-2增殖的作用。

[0031] 图27描绘“1715+2380”TMPP与各种Fc受体的结合。

[0032] 定义

[0033] 如本文中可互换使用的术语“多核苷酸”与“核酸”是指具有任何长度的核苷酸的聚合物形式,即核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。因此,此术语包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂合体、或包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然、化学或生物化学修饰、非天然或衍生化核苷酸碱基的聚合物。

[0034] 术语“肽”、“多肽”及“蛋白质”在本文中可互换使用,且是指具有任何长度的氨基酸的聚合物形式,其可包括编码及非编码氨基酸、化学或生物化学修饰或衍生化的氨基酸、及具有修饰肽主链的多肽。

[0035] 多核苷酸或多肽与另一个多核苷酸或多肽具有一定百分比的“序列同一性”意指在比对时在比较两个序列时碱基或氨基酸的百分比相同且处于相同相对位置中。序列同一性可以许多不同方式测定。为了测定序列同一性,可使用各种便利方法及在万维网之网址上可获得的计算机程序(例如BLAST、T-COFFEE、MUSCLE、MAFFT等)来比对序列,这些网址包括ncbi.nlm.nih.gov/BLAST、ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/、ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/、mafft.cbrc.jp/alignment/software/。参见,例如Altschul等人(1990), J.Mol.Biol.215:403-10。

[0036] 术语“保守氨基酸取代”是指在蛋白质中具有类似侧链的氨基酸残基的可互换性。例如,具有脂族侧链的氨基酸组由甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸组成;具有脂族羟基侧链的氨基酸组由丝氨酸和苏氨酸组成;具有含酰胺侧链的氨基酸组由天冬酰胺和谷氨酰胺组成;具有芳族侧链的氨基酸组由苯丙氨酸、酪氨酸及色氨酸组成;具有碱性侧链的氨基酸组由赖氨酸、精氨酸及组氨酸组成;具有酸性侧链的氨基酸组由谷氨酸和天冬氨酸组成;且具有含硫侧链的氨基酸组由半胱氨酸和甲硫氨酸组成。示例性保守氨基酸取代基为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸-甘氨酸及天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0037] 如本文所用,术语“免疫学突触”或“免疫突触”通常是指适应性免疫反应的两个相互作用免疫细胞之间的自然界面,包括例如抗原递呈细胞(APC)或靶细胞与效应细胞例如淋巴细胞、效应T细胞、自然杀手细胞等之间的界面。APC与T细胞之间的免疫学突触通常通过T细胞抗原受体与主要组织相容性复合物分子之间的相互作用来起始,例如,如Bromley等人,Annu Rev Immunol.2001;19:375-96中所述,该文献的公开内容以引用方式整体并入本文。

[0038] “T细胞”包括所有类型的表达CD3的免疫细胞,包括T-辅助细胞(CD4⁺细胞)、细胞毒性T-细胞(CD8⁺细胞)、T-调节性细胞(Treg)及NK-T细胞。

[0039] 如本文所用,术语“免疫调节多肽”也称为“共刺激多肽”)包括在抗原递呈细胞

(APC) (例如,树突状细胞、B细胞等)上的多肽,其特异性结合T细胞上的同源共免疫调节多肽,从而提供一个信号,除了通过例如TCR/CD3复合物与以肽装载的主要组织相容性复合物(MHC)多肽的结合提供的主要信号之外,该信号还介导T细胞反应,包括但不限于增殖、活化、分化等反应。免疫调节多肽可包括但不限于CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、Fas配体 (FasL)、诱导性共刺激配体 (ICOS-L)、细胞内粘附分子 (ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素 β 受体、3/ TR6、ILT3、ILT4、HVEM、结合Toll配体受体的激动剂或抗体、以及与B7-H3特异性结合的配体。

[0040] 如上文所述,“免疫调节多肽”(在本文中也称为“MOD”)特异性结合T细胞上的同源共免疫调节多肽。

[0041] 本公开的TMMP的“免疫调节结构域”(“MOD”)结合可存在于靶T细胞上的同源共免疫调节多肽。

[0042] 如本文所用,“异源”意指核苷酸或多肽分别不可见于天然核酸或蛋白质中。

[0043] 如本文所用,“重组”意指特定核酸(DNA或RNA)为克隆、限制、聚合酶链反应(PCR)和/或连接步骤的各种组合的产物,这些组合产生具有与见于自然系统中的内源性核酸可区分的结构性编码或非编码序列的构建体。编码多肽的DNA序列可由cDNA片段或一系列合成寡核苷酸组装以提供合成核酸,该合成核酸能够从细胞或无细胞转录及转译系统中所含的重组转录单元表达。

[0044] 术语“重组表达载体”或“DNA构建体”在本文中可互换使用以指代包含载体和至少一个插入物的DNA分子。重组表达载体通常出于表达和/或繁殖插入物的目的或出于构建其他重组核苷酸序列的目的而生成。插入物可以可操作地连接或不连接至启动子序列且可以可操作地连接或不连接至DNA调节序列。

[0045] 如本文所用,术语“亲和力”是指两种试剂(例如抗体与抗原)的可逆结合的平衡常数且表示为解离常数(K_D)。亲和力可比抗体对不相关氨基酸序列的亲和力大至少1倍、大至少2倍、大至少3倍、大至少4倍、大至少5倍、大至少6倍、大至少7倍、大至少8倍、大至少9倍、大至少10倍、大至少20倍、大至少30倍、大至少40倍、大至少50倍、大至少60倍、大至少70倍、大至少80倍、大至少90倍、大至少100倍、或大至少1,000倍或更多倍。抗体对靶蛋白的亲和力可为例如约100纳摩尔(nM)至约0.1nM、约100nM至约1皮摩尔(pM)、约100nM至约1飞摩尔(femtomolar) (fM)或更大。如本文所用,术语“亲合力”是指两种或更多种试剂的复合物在稀释后对解离的抵抗。术语“免疫反应性”和“优先结合”在本文中关于抗体和/或抗原结合片段可互换使用。

[0046] 如本文所用,术语“结合”(例如关于TMMP与T细胞上的多肽(例如T细胞受体)的结合)是指两个分子之间的非共价相互作用。非共价结合是指两个分子之间由于例如静电、疏水性、离子和/或氢键相互作用(包括诸如盐桥和水桥的相互作用)而直接缔合。非共价结合相互作用的特征通常在于解离常数(K_D)小于 $10^{-6}M$ 、小于 $10^{-7}M$ 、小于 $10^{-8}M$ 、小于 $10^{-9}M$ 、小于 $10^{-10}M$ 、小于 $10^{-11}M$ 、小于 $10^{-12}M$ 、小于 $10^{-13}M$ 、小于 $10^{-14}M$ 或小于 $10^{-15}M$ 。“亲和力”是指非共价结合强度,结合亲和力的增加与较低 K_D 相关联。“特异性结合”通常是指以至少约 $10^{-7}M$ 或更大,例如 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、及更大亲和力结合。“非特异性结合”通常是指以小于约 $10^{-7}M$ 的亲和力结合(例如,配体与除了其指定结合位点或受体以外的部分的结合)(例如以 $10^{-6}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $10^{-4}M$ 的亲和力结合)。然而,在一些情况下,例如TCR与肽/MHC复合物之间的结

合,“特异性结合”可在 $1\mu\text{M}$ 至 $100\mu\text{M}$ 或 $100\mu\text{M}$ 至 1mM 范围内。如本文所用,“共价结合”或“共价键”是指两个不同分子之间的一个或多个共价化学结合的形成。

[0047] 术语“治疗(treatment/treating)”等在本文中用于通常意指获得所要药理学和/或生理学作用。该作用可在完全或部分预防疾病或其症状方面为预防性的,且/或可在疾病和/或因疾病引起的不良效应的部分或完全治愈方面为治疗性的。如本文所用,“治疗”涵盖哺乳动物中疾病或症状的任何治疗,且包括:(a) 预防疾病或症状出现于可能倾向于获得该疾病或症状但尚未诊断为患有该疾病的受试者中;(b) 抑制疾病或症状,即阻止其发展;和/或(c) 缓解疾病,即引起疾病消退。治疗剂可在疾病或损伤发作之前、期间或之后施用。尤其关注正在发展的疾病的治疗,其中所述治疗使患者的不希望有的临床症状稳定或减轻。此类治疗理想地在患病组织中的功能完全丧失之前进行。目标疗法将理想地在疾病之有症状阶段期间且在一些情况下在疾病的有症状阶段之后施用。

[0048] 术语“个体(individual)”、“受试者(subject)”、“宿主(host)”及“患者(patient)”在本文中可互换使用且是指需要诊断、处理或治疗的任何哺乳动物受试者。哺乳动物包括例如人、非人灵长类动物、啮齿动物(例如大鼠;小鼠)、兔类动物(例如兔)、有蹄类动物(例如奶牛、绵羊、猪、马、山羊等)等。

[0049] 在进一步描述本发明之前,应了解本发明不限于所述特定实施方案,因此所述实施方案当然可变化。还应理解,本文所用的术语仅是为了描述具体实施方案,并不旨在限制,因为本发明的范围仅受所附申请专利范围的限制。

[0050] 当提供数值范围时,应了解在那个范围的上限与下限之间的直至下限的十分之一单位的各间插值(除非上下文另外明确规定)以及在那个所述范围内的任何其他陈述值或间插值皆涵盖在本发明内。这些较小范围的上限及下限可独立地包括在较小范围中,且也涵盖在本发明内,属于陈述的范围内的任何明确排除的界限。在所陈述范围包括界限的一个或两个时,排除那些包括的界限的任一个或两个的范围也可包括在本发明内。

[0051] 除非另外定义,本文所用的所有技术和科学术语均具有熟习本发明所属技术者通常理解相同含义。虽然类似于或等效于本文所述的那些的任何方法和材料也可用于实践或测试本发明,但现在描述优选方法和材料。本文提及的所有出版物均以引用的方式并入本文中以公开及描述与出版物引用的内容关联的方法和/或材料。

[0052] 必须注意的是,除非上下文另外明确规定,如本文和所附权利要求书中所用,单数形式“一”和“所述”包括多个指示物。因此,举例来说,提及“T细胞调节多聚体多肽”包括多个此类多肽且提及“免疫调节多肽”包括提及一种或多种免疫调节多肽及其为本领域技术人员所知的等效物等。应进一步注意可起草权利要求书的范围以排除任何任选的要素。因此,此陈述旨在充当与叙述申请专利范围要素关联使用诸如“唯一”、“仅”等的排除性术语或使用“否定性”限制的前提基础。

[0053] 应了解,为明确起见在单独实施方案的情形下描述的本发明的某些特征也可于单一实施方案中组合提供。相反,为简洁起见在单一实施方案的情形下描述的本发明的各种特征也可单独或以任何适合子组合提供。本发明所涉及的实施方案的全部组合明确由本发明包括,且就如同各个及每个组合个别地及明确地在本文中公开一般来公开于本文中。此外,各种实施方案及其要素的所有子组合也由本发明明确包括,且就如同各个及每个此子组合个别地及明确地在本文中公开一般来公开于本文中。

[0054] 本文论述之出版物仅因其公开内容在本申请的申请日期之前而加以提供。本文中
没有内容应解释为承认本发明由于先前发明而无权先于此出版物。此外,提供的公开日期
可不同于可能需要独立确认的实际公开日期。

具体实施方式

[0055] 本公开提供T细胞调节多聚体多肽,其包含免疫调节多肽且包含表位递呈的威尔
姆氏瘤-1(WT-1)肽。TMMP适用于调节T细胞的活性且适用于调节个体中的免疫反应。

[0056] T细胞调节多聚体多肽

[0057] 本公开提供一种T细胞调节多聚体多肽(TMMP),其包含:a)第一多肽;和b)第二多
肽,其中所述TMMP包含表位;第一主要组织相容性复合物(MHC)多肽;第二MHC多肽;一种或
多种免疫调节多肽;以及任选的免疫球蛋白(Ig)Fc多肽或非Ig支架。本公开提供一种TMMP,
其中所述TMMP为异二聚体,其包含:a)包含第一MHC多肽的第一多肽;和b)包含第二MHC多肽
的第二多肽,其中第一多肽或第二多肽包含表位(例如,递呈表位的肽);其中所述第一多肽
和/或所述第二多肽包含一种或多种可以相同或不同的免疫调节多肽;及任选的Ig Fc多
肽或非Ig支架。本公开的TMMP在本文中也称为“本公开的多聚体多肽”或“synTac”。在一些
情况下,存在于本公开的TMMP中的肽表位是WT-1肽。

[0058] 本公开提供一种TMMP,其包含异二聚体多肽,所述多肽包含:a)第一多肽,所述第
一多肽包含:i)肽表位;和ii)第一MHC多肽;b)第二多肽,所述第二多肽包含第二MHC多肽;
以及c)至少一种免疫调节多肽,其中所述第一多肽和/或所述第二多肽包含至少一种(即一
种或多种)免疫调节多肽。任选地,第一多肽或第二多肽包含Ig Fc多肽或非Ig支架。所述一
种或多种免疫调节多肽中的至少一个为呈现出对同源共免疫调节多肽的亲和力比相应野
生型免疫调节多肽对同源共免疫调节多肽的亲和力有所减小的变异免疫调节多肽。存在于
本公开的TMMP中的表位以如下亲和力结合至T细胞上的T细胞受体(TCR):至少100 μ M(例如
至少10 μ M、至少1 μ M、至少100nM、至少10nM或至少1nM)。本公开的TMMP结合至第一T细胞的亲
和力比TMMP结合第二T细胞的亲和力高至少25%,其中第一T细胞在其表面上表达同源共免
疫调节多肽及以至少100 μ M的亲和力结合表位的TCR,且其中第二T细胞在其表面上表达同
源共免疫调节多肽但在其表面上不表达以至少100 μ M(例如,至少10 μ M、至少1 μ M、至少
100nM、至少10nM或至少1nM)的亲和力结合表位的TCR。在一些情况下,存在于本公开的TMMP
中的肽表位是WT-1肽。

[0059] 本公开提供一种TMMP,其中所述TMMP为:

[0060] A) 异二聚体,其包含:a)包含第一MHC多肽的第一多肽;及b)包含第二MHC多肽的第
二多肽,其中所述第一多肽或所述第二多肽包含表位(例如,将表位递呈至T细胞的肽);其
中第一多肽和/或第二多肽包含一种或多种可以相同或不同的免疫调节多肽,且其中所述
一种或多种免疫调节多肽中的至少一个可为野生型免疫调节多肽或野生型免疫调节多肽
的变体,其中所述变异免疫调节多肽与相应野生型免疫调节多肽的氨基酸序列相比包含1、
2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸取代;且其中所述第一
多肽或所述第二多肽任选包含Ig Fc多肽或非Ig支架;或

[0061] B) 异二聚体,其包含:a)包含第一MHC多肽的第一多肽;及b)包含第二MHC多肽的第
二多肽,其中第一多肽或第二多肽包含表位;其中所述第一多肽和/或所述第二多肽包含一

种或多种可以相同或不同的免疫调节多肽,

[0062] 其中所述一种或多种免疫调节多肽中的至少一个为野生型免疫调节多肽的变体,其中所述变异免疫调节多肽与相应野生型免疫调节多肽的氨基酸序列相比包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸取代,

[0063] 其中所述一个或多个免疫调节结构域中的至少一个为变异免疫调节多肽,其呈现出对同源共免疫调节多肽的亲合力与相应野生型免疫调节多肽对同源共免疫调节多肽的亲合力相比有所减小,且其中表位以至少 10^{-7} M的亲合力结合至T细胞上的TCR,使得:i)所述TMMP多肽结合至第一T细胞的亲合力比TMMP结合第二T细胞的亲合力高至少25%,其中第一T细胞在其表面上表达同源共免疫调节多肽及以至少 10^{-7} M的亲合力结合表位的TCR,且其中第二T细胞在其表面上表达同源共免疫调节多肽,但在其表面上不表达以至少 10^{-7} M的亲合力结合表位的TCR;且/或ii)当通过生物层干涉术测量时,对照TMMP与同源共免疫调节多肽的结合亲合力与包含野生型免疫调节多肽变体的TMMP与同源共免疫调节多肽的结合亲和力的比率范围为 $1.5:1$ 至 $10^6:1$,其中所述对照包含野生型免疫调节多肽;且其中所述变异免疫调节多肽与相应野生型免疫调节多肽的氨基酸序列相比包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸取代;且

[0064] 其中所述第一多肽或所述第二多肽任选包含Ig Fc多肽或非Ig支架;或

[0065] C) 异二聚体,其包含:a) 第一多肽,所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i) 表位;ii) 第一MHC多肽;及b) 第二多肽,所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i) 第二MHC多肽;及ii) 任选的免疫球蛋白(Ig)Fc多肽或非Ig支架,其中所述TMMP包含一个或多个可以相同或不同的免疫调节结构域,其中所述一个或多个免疫调节结构域中的至少一个:A) 在第一多肽的C端;B) 在第二多肽的N端;C) 在第二多肽的C端;或D) 在第一多肽的C端且在第二多肽的N端,且其中所述一个或多个免疫调节结构域中的至少一个可为野生型免疫调节多肽或野生型免疫调节多肽的变体,其中所述变异免疫调节多肽与相应野生型免疫调节多肽的氨基酸序列相比包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸取代;且

[0066] 任选地其中所述一个或多个免疫调节结构域中的至少一个为变异免疫调节多肽,其呈现出对同源共免疫调节多肽的亲合力与相应野生型免疫调节多肽对同源共免疫调节多肽的亲合力相比有所减小,且其中表位以至少 10^{-7} M的亲合力结合至T细胞上的TCR,使得:i) 所述TMMP结合至第一T细胞的亲合力比TMMP结合第二T细胞的亲合力高至少25%,其中第一T细胞在其表面上表达同源共免疫调节多肽及以至少 10^{-7} M的亲合力结合表位的TCR,且其中第二T细胞在其表面上表达同源共免疫调节多肽,但在其表面上不表达以至少 10^{-7} M的亲合力结合表位的TCR;且/或ii) 当通过生物层干涉术测量时,对照TMMP与同源共免疫调节多肽的结合亲合力与包含野生型免疫调节多肽变体的TMMP与同源共免疫调节多肽的结合亲和力的比率范围为 $1.5:1$ 至 $10^6:1$,其中所述对照包含野生型免疫调节多肽;且其中所述变异免疫调节多肽与相应野生型免疫调节多肽的氨基酸序列相比包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸取代。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的肽表位是WT-1肽。

[0067] 本公开提供一种TMMP,其包含:a) 第一多肽,所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i) 表位;ii) 第一MHC多肽;和b) 第二多肽,所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i) 第

二MHC多肽;及ii)任选的Ig Fc多肽或非Ig支架。本公开的TMMP包含一种或多种免疫调节多肽,其中所述一种或多种免疫调节多肽中的至少一个:A)在第一多肽的C端;B)在第二多肽的N端;C)在第二多肽的C端;或D)在第一多肽的C端且在第二多肽的N端。所述一种或多种免疫调节多肽中的至少一个为呈现出对同源共免疫调节多肽的亲合力与相应野生型免疫调节多肽对同源共免疫调节多肽的亲合力相比有所减小的变异免疫调节多肽。存在于本公开的TMMP中的表位以如下亲合力结合至T细胞上的T细胞受体(TCR):至少100 μ M(例如至少10 μ M、至少1 μ M、至少100nM、至少10nM或至少1nM)。本公开的TMMP结合至第一T细胞的亲合力比TMMP结合第二T细胞的亲合力高至少25%,其中第一T细胞在其表面上表达同源共免疫调节多肽及以至少100 μ M的亲合力结合表位的TCR,且其中第二T细胞在其表面上表达同源共免疫调节多肽但在其表面上不表达以至少100 μ M(例如,至少10 μ M、至少1 μ M、至少100nM、至少10nM或至少1nM)的亲合力结合表位的TCR。

[0068] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的表位结合至T细胞上的TCR的亲合力为约 10^{-4} M至约 5×10^{-4} M、约 5×10^{-4} M至约 10^{-5} M、约 10^{-5} M至约 5×10^{-5} M、约 5×10^{-5} M至约 10^{-6} M、约 10^{-6} M至约 5×10^{-6} M、约 5×10^{-6} M至约 10^{-7} M、约 10^{-7} M至约 5×10^{-7} M、约 5×10^{-7} M至约 10^{-8} M、或约 10^{-8} M至约 10^{-9} M。换句话说,在一些情况,存在于本公开的TMMP中的表位结合至T细胞上的TCR的亲合力为约1nM至约5nM、约5nM至约10nM、约10nM至约50nM、约50nM至约100nM、约0.1 μ M至约0.5 μ M、约0.5 μ M至约1 μ M、约1 μ M至约5 μ M、约5 μ M至约10 μ M、约10 μ M至约25 μ M、约25 μ M至约50 μ M、约50 μ M至约75 μ M、约75 μ M至约100 μ M。

[0069] 存在于本公开的TMMP中的免疫调节多肽结合至其同源共免疫调节多肽的亲合力比相应野生型免疫调节多肽对同源共免疫调节多肽的亲合力小至少10%、小至少15%、小至少20%、小至少25%、小至少30%、小至少35%、小至少40%、小至少45%、小至少50%、小至少55%、小至少60%、小至少65%、小至少70%、小至少75%、小至少80%、小至少85%、小至少90%、小至少95%或小大于95%。

[0070] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽对同源共免疫调节多肽具有的结合亲合力为1nM至100nM或100nM至100 μ M。举例来说,在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽对同源共免疫调节多肽具有的结合亲合力为约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 μ M至约1 μ M至约5 μ M、约5 μ M至约10 μ M、约10 μ M至约15 μ M、约15 μ M至约20 μ M、约20 μ M至约25 μ M、约25 μ M至约50 μ M、约50 μ M至约75 μ M、或约75 μ M至约100 μ M。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽对同源共免疫调节多肽具有的结合亲合力为约1nM至约5nM、约5nM至约10nM、约10nM至约50nM、约50nM至约100nM。

[0071] 免疫调节多肽对其同源共免疫调节多肽的减小的亲合力与表位对TCR的亲合力的组合提供了本公开的TMMP的提高了的选择性。举例来说,本公开的TMMP与结合至第二T细胞相比选择性地结合至第一T细胞,所述第一T细胞呈现出:i)对存在于TMMP中的表位具有特异性的TCR;及ii)结合至存在于TMMP中的免疫调节多肽的共免疫调节多肽,所述第二T细胞呈现出:i)对除了存在于TMMP中的表位以外的表位具有特异性的TCR;及ii)结合至存在于TMMP中的免疫调节多肽的共免疫调节多肽。举例来说,本公开的TMMP结合至第一T细胞的亲合力比其结合第二T细胞的亲合力高至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、

至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少2倍、至少2.5倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍、至少100倍或大于100倍。

[0072] 在一些情况下,本公开的TMMP当向有需要的个体施用诱导表位特异性T细胞反应及表位非特异性T细胞反应。换句话说,在一些情况下,本公开的TMMP当向有需要的个体施用通过调节第一T细胞的活性来诱导表位特异性T细胞反应,所述第一T细胞呈现出:i)对存在于TMMP中的表位具有特异性的TCR;ii)结合至存在于TMMP中的免疫调节多肽的共免疫调节多肽;且通过调节第二T细胞的活性来诱导表位非特异性T细胞反应,所述第二T细胞呈现出:i)对除了存在于TMMP中的表位以外的表位具有特异性的TCR;及ii)结合至存在于TMMP中的免疫调节多肽的共免疫调节多肽。表位特异性T细胞反应与表位非特异性T细胞反应的比率为至少2:1、至少5:1、至少10:1、至少15:1、至少20:1、至少25:1、至少50:1、或至少100:1。表位特异性T细胞反应与表位非特异性T细胞反应的比率为约2:1至约5:1、约5:1至约10:1、约10:1至约15:1、约15:1至约20:1、约20:1至约25:1、约25:1至约50:1、或约50:1至约100:1、或大于100:1。“调节T细胞的活性”可包括以下各项中的一个或多个:i)激活细胞毒性(例如CD8⁺)T细胞;ii)诱导细胞毒性(例如CD8⁺)T细胞的细胞毒性活性;iii)诱导细胞毒性(例如CD8⁺)T细胞对细胞毒素(例如穿孔蛋白;颗粒酶;粒溶蛋白)的产生及释放;iv)抑制自身反应性T细胞的活性;等等。

[0073] 免疫调节多肽对其同源共免疫调节多肽的减小的亲和力与表位对TCR的亲和力的组合提供了本公开的TMMP的提高了的选择性。因此,举例来说,本公开的TMMP与其结合至第二T细胞的亲合力相比以更高亲合力结合至第一T细胞,所述第一T细胞呈现出:i)对存在于TMMP中的表位具有特异性的TCR;及ii)结合至存在于TMMP中的免疫调节多肽的共免疫调节多肽,所述第二T细胞呈现出:i)对除了存在于TMMP中的表位以外的表位具有特异性的TCR;及ii)结合至存在于TMMP中的免疫调节多肽的共免疫调节多肽。

[0074] 免疫调节多肽与其同源共免疫调节多肽之间的结合亲和力可通过生物层干涉术(BLI),使用纯化的免疫调节多肽及纯化的同源共免疫调节多肽来确定。TMMP与其同源共免疫调节多肽之间的结合亲和力可通过BLI,使用纯化的TMMP及同源共免疫调节多肽来确定。BLI方法为本领域技术人员公知。参见,例如Lad等人.(2015)J.Biomol.Screen.20(4):498-507;以及Shah和Duncan(2014)J.Vis.Exp.18:e51383。

[0075] BLI测定可使用Octet RED 96(Pal FortéBio)仪器或如下类似仪器进行。TMMP(例如,本公开的TMMP;对照TMMP(其中对照TMMP包含野生型免疫调节多肽))固定于不溶性支撑物(“生物检测器”)。固定的TMMP为“靶标”。固定可通过将捕获抗体固定至不溶性支撑物上来实现,其中捕获抗体固定TMMP。例如,固定可通过将抗Fc(例如,抗人IgG Fc)抗体固定至不溶性支撑物上来实现,其中固定的抗Fc抗体结合至且固定TMMP(其中TMMP包含IgFc多肽)。共免疫调节多肽以若干种不同浓度施加于固定的TMMP,且记录仪器的反应。测定在包含25mM HEPES pH 6.8、5%聚(乙二醇)6000、50mM KCl、0.1%牛血清白蛋白及0.02%Tween 20非离子清洁剂的液体介质中进行。共免疫调节多肽与固定的TMMP的结合在30℃下进行。作为结合亲和力的阳性对照,可使用抗I类MHC单克隆抗体。例如,可使用抗HLA I类单克隆抗体W6/32(美国模式培养物保藏中心(American Type Culture Collection)编号HB-95;Parham等人(1979)J.Immunol.123:342),其具有7nM的K_d。标准曲线可使用抗I类MHC单克隆抗体的连续稀释液来生成。共免疫调节多肽或抗I类MHC mAb为“分析物”。BLI分析从以下两

个表面反射的白光的干涉图型:i)固定的多肽(“靶标”);及ii)内部参考层。结合至生物感测器尖端的分子(“分析物”;例如,共免疫调节多肽;抗HLA抗体)的数目的变化引起干涉图型的偏移;干涉图型中的此偏移可即时测量。描述靶标/分析物相互作用的亲和力的两个动力学学术语为缔合常数(k_a)和解离常数(k_d)。这两个术语的比率(k_d/k_a)产生亲和力常数 K_D 。

[0076] BLI测定在多孔板中进行。为了操作该测定,限定板布局,限定测定步骤,且在Octet Data Acquisition软件中指派生物感测器。使生物感测器组件水合。将水合的生物感测器组件和测定板在Octet仪器上平衡10分钟。一旦采集数据,便将所采集数据加载至Octet Data Analysis软件中。在处理窗口中通过指定参考减法、y轴对准、步间校正及Savitzky-Golay滤波的方法来处理数据。在分析窗口中通过指定分析(缔合和解离)、选择曲线拟合模型(1:1)、拟合方法(全域)及目标窗口(以秒计)的步骤来分析数据。评价拟合品质。如果在3倍范围内,则对各数据追踪(分析物浓度)的 K_D 值取平均值。 K_D 误差值应处于亲和力常数值的约一个数量级之内; R^2 值应高于0.95。参见,例如Abdiche等人(2008) J.Anal.Biochem.377:209。

[0077] 除非本文另外说明,本公开的TMMP对同源共免疫调节多肽的亲和力或对照TMMP(其中对照TMMP包含野生型免疫调节多肽)对同源共免疫调节多肽的亲和力使用如上文所述的BLI测定。

[0078] 在一些情况下,i)对照TMMP(其中对照包含野生型免疫调节多肽)与同源共免疫调节多肽的结合亲和力同ii)本公开的包含野生型免疫调节多肽变体的TMMP与同源共免疫调节多肽的结合亲和力的比率当通过BLI(如上文所述)测量时为至少1.5:1、至少2:1、至少5:1、至少10:1、至少15:1、至少20:1、至少25:1、至少50:1、至少100:1、至少500:1、至少 10^2 :1、至少 5×10^2 :1、至少 10^3 :1、至少 5×10^3 :1、至少 10^4 :1、至少 10^5 :1、或至少 10^6 :1。在一些情况下,i)对照TMMP(其中对照包含野生型免疫调节多肽)与同源共免疫调节多肽的结合亲和力同ii)本公开的包含野生型免疫调节多肽变体的TMMP与同源共免疫调节多肽的结合亲和力的比率当通过BLI测量时范围在1.5:1至 10^6 :1内,例如1.5:1至10:1、10:1至50:1、50:1至 10^2 :1、 10^2 :1至 10^3 :1、 10^3 :1至 10^4 :1、 10^4 :1至 10^5 :1、或 10^5 :1至 10^6 :1。

[0079] 作为实例,在对照TMMP包含野生型IL-2多肽时,且在本公开的TMMP包含变异IL-2多肽(相对于野生型IL-2多肽的氨基酸序列包含1至10个氨基酸取代)作为免疫调节多肽时,i)对照TMMP与IL-2受体(即,同源共免疫调节多肽)的结合亲和力同ii)本公开的TMMP与IL-2受体的结合亲和力的比率当通过BLI测量时为至少1.5:1、至少2:1、至少5:1、至少10:1、至少15:1、至少20:1、至少25:1、至少50:1、至少100:1、至少500:1、至少 10^2 :1、至少 5×10^2 :1、至少 10^3 :1、至少 5×10^3 :1、至少 10^4 :1、至少 10^5 :1、或至少 10^6 :1。在一些情况下,在对照TMMP包含野生型IL-2多肽时,且在本公开的TMMP包含变异IL-2多肽(相对于野生型IL-2多肽的氨基酸序列包含1至10个氨基酸取代)作为免疫调节多肽时,i)对照TMMP与IL-2受体(即,同源共免疫调节多肽)的结合亲和力同ii)本公开的TMMP与IL-2受体的结合亲和力的比率当通过BLI测量时范围在1.5:1至 10^6 :1内,例如1.5:1至10:1、10:1至50:1、50:1至 10^2 :1、 10^2 :1至 10^3 :1、 10^3 :1至 10^4 :1、 10^4 :1至 10^5 :1、或 10^5 :1至 10^6 :1。

[0080] 作为另一实例,在对照TMMP包含野生型PD-L1多肽时,且在本公开的TMMP包含变体PD-L1多肽(相对于野生型PD-L1多肽的氨基酸序列包含1至10个氨基酸取代)作为免疫调节多肽时,i)对照TMMP与PD-1多肽(即,同源共免疫调节多肽)的结合亲和力同ii)本公开的

TMMP与PD-1多肽的结合亲和力的比率当通过BLI测量时为至少1.5:1、至少2:1、至少5:1、至少10:1、至少15:1、至少20:1、至少25:1、至少50:1、至少100:1、至少500:1、至少 10^2 :1、至少 5×10^2 :1、至少 10^3 :1、至少 5×10^3 :1、至少 10^4 :1、至少 10^5 :1、或至少 10^6 :1。

[0081] 作为另一实例,在对照TMMP包含野生型CD80多肽时,且在本公开的TMMP包含变体CD80多肽(相对于野生型CD80多肽的氨基酸序列包含1至10个氨基酸取代)作为免疫调节多肽时,i)对照TMMP与CTLA4多肽(即,同源共免疫调节多肽)的结合亲和力同ii)本公开的TMMP与CTLA4多肽的结合亲和力的比率当通过BLI测量时为至少1.5:1、至少2:1、至少5:1、至少10:1、至少15:1、至少20:1、至少25:1、至少50:1、至少100:1、至少500:1、至少 10^2 :1、至少 5×10^2 :1、至少 10^3 :1、至少 5×10^3 :1、至少 10^4 :1、至少 10^5 :1、或至少 10^6 :1。

[0082] 作为另一实例,在对照TMMP包含野生型CD80多肽时,且在本公开的TMMP包含变体CD80多肽(相对于野生型CD80多肽的氨基酸序列包含1至10个氨基酸取代)作为免疫调节多肽时,i)对照TMMP与CD28多肽(即,同源共免疫调节多肽)的结合亲和力同ii)本公开的TMMP与CD28多肽的结合亲和力的比率当通过BLI测量时为至少1.5:1、至少2:1、至少5:1、至少10:1、至少15:1、至少20:1、至少25:1、至少50:1、至少100:1、至少500:1、至少 10^2 :1、至少 5×10^2 :1、至少 10^3 :1、至少 5×10^3 :1、至少 10^4 :1、至少 10^5 :1、或至少 10^6 :1。

[0083] 作为另一实例,在对照TMMP包含野生型4-1BBL多肽时,且在本公开的TMMP包含变异4-1BBL多肽(相对于野生型4-1BBL多肽的氨基酸序列包含1至10个氨基酸取代)作为免疫调节多肽时,i)对照TMMP与4-1BB多肽(即,同源共免疫调节多肽)的结合亲和力同ii)本公开的TMMP与4-1BB多肽的结合亲和力的比率当通过BLI测量时为至少1.5:1、至少2:1、至少5:1、至少10:1、至少15:1、至少20:1、至少25:1、至少50:1、至少100:1、至少500:1、至少 10^2 :1、至少 5×10^2 :1、至少 10^3 :1、至少 5×10^3 :1、至少 10^4 :1、至少 10^5 :1、或至少 10^6 :1。

[0084] 作为另一实例,在对照TMMP包含野生型CD86多肽时,且在本公开的TMMP包含变异CD86多肽(相对于野生型CD86多肽的氨基酸序列包含1至10个氨基酸取代)作为免疫调节多肽时,i)对照TMMP与CD28多肽(即,同源共免疫调节多肽)的结合亲和力同ii)本公开的TMMP与CD28多肽的结合亲和力的比率当通过BLI测量时为至少1.5:1、至少2:1、至少5:1、至少10:1、至少15:1、至少20:1、至少25:1、至少50:1、至少100:1、至少500:1、至少 10^2 :1、至少 5×10^2 :1、至少 10^3 :1、至少 5×10^3 :1、至少 10^4 :1、至少 10^5 :1或至少 10^6 :1。

[0085] 本公开的TMMP与靶T细胞的结合亲和力可以下列方式测量:A)使本公开的TMMP与在其表面上表达以下各物的靶T细胞接触:i)结合亲本野生型免疫调节多肽的同源共免疫调节多肽;及ii)结合至表位的T细胞受体,其中TMMP包含表位标签,使得TMMP结合至靶T细胞;B)使靶T细胞结合的TMMP与结合至表位标签的荧光标记的结合剂(例如,荧光标记的抗体)接触,从而生成TMMP/靶T细胞/结合剂复合物;C)使用流动式细胞测量术测量TMMP/靶T细胞/结合剂复合物的平均荧光强度(MFI)。表位标签可为例如FLAG标签、凝集素标签、c-myc标签、聚(组氨酸)标签等。在TMMP文库成员的浓度范围上测量的MFI提供亲和力的量度。在TMMP文库成员的浓度范围上测量的MFI提供TMMP的半最大有效浓度(EC_{50})。在一些情况下,本公开的TMMP对于靶T细胞的 EC_{50} 在nM范围内;且TMMP对于对照T细胞(其中对照T细胞在其表面上表达:i)结合亲本野生型免疫调节多肽的同源共免疫调节多肽;及ii)并未结合至TMMP中存在的表位的T细胞受体)的 EC_{50} 在 μ M范围内。在一些情况下,本公开的TMMP对于对照T细胞的 EC_{50} 同TMMP对于靶T细胞的 EC_{50} 的比率为至少1.5:1、至少2:1、至少5:1、至少10:1、

至少15:1、至少20:1、至少25:1、至少50:1、至少100:1、至少500:1、至少 10^2 :1、至少 5×10^2 :1、至少 10^3 :1、至少 5×10^3 :1、至少 10^4 :1、至少 10^5 :1、或至少 10^6 :1。本公开的TMMP对于对照T细胞的 EC_{50} 同TMMP对于靶T细胞的 EC_{50} 的比率为对TMMP的选择性的表述。

[0086] 在一些情况下,当如前述段落中所述进行测量时,与TMMP文库成员与包含以下各物的对照T细胞的结合相比,本公开的TMMP呈现出与靶T细胞的选择性结合:i)结合亲本野生型免疫调节多肽的同源共免疫调节多肽;及ii)结合至除了TMMP文库成员中存在的表位以外的表位的T细胞受体。

[0087] 二聚化TMMP

[0088] 本公开的TMMP可被二聚化;即,本公开提供包含本公开的TMMP的二聚体的多聚体多肽。因此,本公开提供一种TMMP,其包含:A)第一异二聚体,所述第一异二聚体包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含:i)肽表位;及ii)第一主要组织相容性复合物(MHC)多肽;和b)第二多肽,所述第二多肽包含:i)第二MHC多肽,其中所述第一异二聚体包含一种或多种免疫调节多肽;及B)第二异二聚体,所述第二异二聚体包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含:i)肽表位;及ii)第一MHC多肽;和b)第二多肽,所述第二多肽包含:i)第二MHC多肽,其中所述第二异二聚体包含一种或多种免疫调节多肽,且其中所述第一异二聚体与所述第二异二聚体彼此共价连接。在一些情况下,两个TMMP的氨基酸序列彼此相同。在一些情况下,第一异二聚体与第二异二聚体经由第一异二聚体的第二多肽的C端区域及第二异二聚体的第二多肽的C端区域彼此共价连接。在一些情况下,第一异二聚体与第二异二聚体经由第一异二聚体的第二多肽的C端氨基酸及第二异二聚体的第二多肽的C端区域彼此共价连接;例如,在一些情况下,第一异二聚体的第二多肽的C端氨基酸与第二异二聚体的第二多肽的C端区域直接或经由接头彼此连接。接头可为肽接头。肽接头可具有的长度为1个氨基酸至200个氨基酸(例如,1个氨基酸(aa)至5aa、5aa至10aa、10aa至25aa、25aa至50aa、50aa至100aa、100aa至150aa、或150aa至200aa)。在一些情况下,第一异二聚体的肽表位与第二异二聚体的肽表位包含相同氨基酸序列。在一些情况下,第一异二聚体和第二异二聚体的第一MHC多肽为I类MHC β 2-微球蛋白,且其中第一异二聚体及第二异二聚体的第二MHC多肽为I类MHC重链。在一些情况下,第一异二聚体的免疫调节多肽与第二异二聚体的免疫调节多肽包含相同氨基酸序列。在一些情况下,第一异二聚体的免疫调节多肽和第二异二聚体的免疫调节多肽为与相应亲本野生型免疫调节多肽相比包含1至10个氨基酸取代的变异免疫调节多肽,且其中这1至10个氨基酸取代导致变异免疫调节多肽与同源共免疫调节多肽的亲合力结合减小。在一些情况下,第一异二聚体的免疫调节多肽和第二异二聚体的免疫调节多肽各自独立地选自以下组成的组:IL-2、4-1BBL、PD-L1、CD80、CD86、ICOS-L、OX-40L、FasL、JAG1(CD339)、TGF β 、CD70及ICAM。下文描述适合的MHC多肽、免疫调节多肽及肽表位的实例。

[0089] MHC多肽

[0090] 如上文所述,本公开的TMMP包括MHC多肽。出于本公开的目的,术语“主要组织相容性复合物(MHC)多肽”旨在包括不同物种的MHC多肽,包括人MHC(也称为人白细胞抗原(HLA))多肽、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠等)MHC多肽、及其他哺乳动物物种的MHC多肽(例如,兔类动物、非人灵长类动物、犬科动物、猫科动物、有蹄类动物(例如,马、牛、绵羊、山羊等)等。术语“MHC多肽”旨在包括I类MHC多肽(例如, β -2微球蛋白和I类MHC重链)。

[0091] 在一些情况下,第一MHC多肽为I类MHC β 2M(β 2M)多肽,且第二MHC多肽为I类MHC重

链(H链) (“MHC-H”)。在其他情况下,第一MHC多肽为I类MHC重链多肽;且第二MHC多肽为 β 2M多肽。在一些情况下, β 2M和MHC-H链均为人来源;即,MHC-H链为HLA重链或其变体。除非另外明确说明,本公开的TMMP不包括I类MHC重链的膜锚定结构域(跨膜结构域)或足以将所得TMMP锚定至表达其的细胞(例如,真核细胞,诸如哺乳动物细胞)的I类MHC重链的一部分。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的I类MHC重链不包括与天然I类MHC重链缔合的信号肽、跨膜结构域或细胞内结构域(细胞质尾部)。因此,例如,在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的I类MHC重链仅包括I类MHC重链的 α 1、 α 2及 α 3结构域。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的I类MHC重链具有的长度为约270个氨基酸(aa)至约290aa。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的I类MHC重链具有的长度为270aa、271aa、272aa、273aa、274aa、275aa、276aa、277aa、278aa、279aa、280aa、281aa、282aa、283aa、284aa、285aa、286aa、287aa、288aa、289aa或290aa。

[0092] 在一些情况下,TMMP之MHC多肽为人MHC多肽,其中人MHC多肽也称为“人白细胞抗原”(“HLA”)多肽。在一些情况下,TMMP的MHC多肽为I类HLA多肽,例如, β 2-微球蛋白多肽或I类HLA重链多肽。I类HLA重链多肽包括HLA-A重链多肽、HLA-B重链多肽、HLA-C重链多肽、HLA-E重链多肽、HLA-F重链多肽及HLA-G重链多肽。

[0093] I类MHC重链

[0094] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的I类MHC重链多肽包含与图7-13中描绘的任何人HLA重链多肽的全部或部分氨基酸序列(例如,50、75、100、150、200、或250个连续氨基酸)具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,I类MHC重链具有的长度为270aa、271aa、272aa、273aa、274aa、275aa、276aa、277aa、278aa、279aa、280aa、281aa、282aa、283aa、284aa、285aa、286aa、287aa、288aa、289aa或290aa。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的I类MHC重链多肽包含图7-13中描绘的任一氨基酸序列的1-30、1-5、5-10、10-15、15-20、20-25或25-30个氨基酸插入、缺失和/或取代(除了指示为在重链共有序列中可变之那些位置)。在一些情况下,I类MHC重链不包括跨膜结构域或细胞质域。作为一个实例,本公开的TMMP的I类MHC重链多肽可包含与图7A、7B及7C中任一描绘的人HLA-A重链多肽的氨基酸25-300(缺乏全部或大体上全部前导序列、跨膜序列及细胞质序列)或氨基酸25-365(缺乏前导序列)具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0095] 图7A、7B和7C提供人白细胞抗原(HLA) I类重链多肽的氨基酸序列。将信号序列氨基酸1-24加粗且加下划线。图7A条目:3A.1为HLA-A重链(HLA-A*01:01:01:01或A*0101)(NCBI登录NP_001229687.1) SEQ ID NO:23;条目3A.2来自HLA-A*1101 SEQ ID NO:24;条目3A.3来自HLA-A*2402 SEQ ID NO:25且条目3A.4来自HLA-A*3303 SEQ ID NO:26。图7B提供序列HLA-B*07:02:01(HLA-B*0702) NCBI GenBank登录NP_005505.2(也参见GenBank登录AUV50118.1.)。图7C提供序列HLA-C*0701(GenBank登录NP_001229971.1)(HLA-C*07:01:01:01或HLA-Cw*070101,HLA-Cw*07参见GenBank登录CA078194.1)。

[0096] 图8提供十一种无前导序列或跨膜结构域或细胞内结构域的成熟I类MHC重链氨基酸序列的比对。所比对序列为人HLA-A、HLA-B及HLA-C、小鼠H2K蛋白序列、三种HLA-A变体(var.1、var.2C及var.2CP)、以及3种人HLA-A变体(HLA-A*1101;HLA-A*2402;及HLA-A*

3303)。在比对中指出位置(成熟蛋白的84和139),其中半胱氨酸残基可被引入(例如,通过取代)以用于形成二硫键以使MHC H链- β 2M复合物稳定。比对中还展示位置236(成熟多肽的位置),其可由半胱氨酸残基取代,从而可与 β 2M形成链间二硫键(例如,在aa12处)。箭头出现于那些位置各自的上方且将残基加粗。比对(var.2c)中所示的第七HLA-A序列展示以C残基在位置84、139及236处取代的变体2的序列。框侧翼残基84、139及236展示在五个残基的那些六组的任一侧上的五个氨基酸的群,所述六组表示为aac1(对于“氨基酸簇1”)、aac2(对于“氨基酸簇2”)、aac3(对于“氨基酸簇3”)、aac4(对于“氨基酸簇4”)、aac5(对于“氨基酸簇5”)及aac6(对于“氨基酸簇6”),所述残基可被独立地选自以下的1至5个氨基酸置换:(i)任何天然存在的氨基酸或(ii)或除脯氨酸或甘氨酸以外的任何天然存在的氨基酸。

[0097] 关于图8,在一些情况下:i)aac1(氨基酸簇1)可为氨基酸序列GTLRG(SEQ ID NO:287)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,L被I、V、A或F置换)的序列;ii)aac2(氨基酸簇2)可为氨基酸序列YNQSE(SEQ ID NO:288)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,N被Q置换,Q被N置换,且/或E被D置换)的序列;iii)aac3(氨基酸簇3)可为氨基酸序列TAADM(SEQ ID NO:289)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,T被S置换,A被G置换,D被E置换,且/或M被L、V或I置换)的序列;iv)aac4(氨基酸簇4)可为氨基酸序列AQTTK(SEQ ID NO:290)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,A被G置换,Q被N置换,或T被S置换,且/或K被R或Q置换)的序列;v)aac5(氨基酸簇5)可为氨基酸序列VETRP(SEQ ID NO:291)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,V被I或L置换,E被D置换,T被S置换,且/或R被K置换)的序列;且/或vi)aac6(氨基酸簇6)可为氨基酸序列GDGTF(SEQ ID NO:292)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,D被E置换,T被S置换,或F被L、W或Y置换)的序列。

[0098] 图9-11提供成熟HLA I类重链氨基酸序列(无前导序列或跨膜结构域或细胞内结构域)的比对。图9A中比对的氨基酸序列为以下等位基因的HLA-A I类重链:A*0101、A*0201、A*0301、A*1101、A*2301、A*2402、A*2407、A*3303及A*3401。图10A中比对的氨基酸序列为以下等位基因的HLA-B I类重链:B*0702、B*0801、B*1502、B*3802、B*4001、B*4601及B*5301。图11A中比对的氨基酸序列为以下等位基因的HLA-C I类重链:C*0102、C*0303、C*0304、C*0401、C*0602、C*0701、C*0801及C*1502。在比对中指出位置(成熟蛋白的84和139),其中半胱氨酸残基可被引入(例如,通过取代)以用于形成二硫键以使HLA H链- β 2M复合物稳定。比对中还展示位置236(成熟多肽的位置),其可由半胱氨酸残基取代,从而可与 β 2M形成链间二硫键(例如,在aa 12处)。框侧翼残基84、139及236展示在五个残基的那些六组之任一侧上的五个氨基酸的群,该六组表示为aac1(对于“氨基酸簇1”)、aac2(对于“氨基酸簇2”)、aac3(对于“氨基酸簇3”)、aac4(对于“氨基酸簇4”)、aac5(对于“氨基酸簇5”)及aac6(对于“氨基酸簇6”),这些残基可独立地选自以下的1至5个氨基酸置换:(i)任何天然存在的氨基酸或(ii)或除脯氨酸或甘氨酸以外的任何天然存在的氨基酸。

[0099] 图9A、10A及11A分别提供成熟HLA-A、HLA-B及HLA-C I类重链的氨基酸序列的比对。提供成熟蛋白的细胞外部分(无前导序列或跨膜结构域或细胞内结构域)的序列。如图8所述,还展示aa残基84、139及236以及其侧翼残基(aac1至aac6)的位置,这些残基可独立地选自以下的1至5个氨基酸置换:(i)任何天然存在的氨基酸或(ii)除了脯氨酸或甘氨酸以

外的任何天然存在的氨基酸。图9B、10B及11B提供分别在图9A、10A及11A中所提供的HLA-A、HLA-B及HLA-C序列的共有氨基酸序列。共有序列将可变氨基酸位置展示为依次编号的“X”残基且将氨基酸84、139及236的位置加双下划线。

[0100] 关于图9A,在一些情况下:i)aac1(氨基酸簇1)可为氨基酸序列GTLRG(SEQ ID NO:287)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,L被I、V、A或F置换)的序列;ii)aac2(氨基酸簇2)可为氨基酸序列YNQSE(SEQ ID NO:288)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,N被Q置换,Q被N置换,且/或E被D置换)的序列;iii)aac3(氨基酸簇3)可为氨基酸序列TAADM(SEQ ID NO:289)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,T被S置换,A被G置换,D被E置换,且/或M被L、V或I置换)的序列;iv)aac4(氨基酸簇4)可为氨基酸序列AQTTK(SEQ ID NO:290)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,A被G置换,Q被N置换,或T被S置换,且或K被R或Q置换)的序列;v)aac5(氨基酸簇5)可为氨基酸序列VETRP(SEQ ID NO:291)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,V被I或L置换,E被D置换,T被S置换,且/或R被K置换)的序列;且/或vi)aac6(氨基酸簇6)可为氨基酸序列GDGTF(SEQ ID NO:292)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,D被E置换,T被S置换,或F被L、W或Y置换)的序列。

[0101] 关于图10A,在一些情况下:i)aac1(氨基酸簇1)可为氨基酸序列RNLRG(SEQ ID NO:293)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,N被T或I置换;且/或L被A置换;且/或第二R被L置换;且/或G被R置换)的序列;ii)aac2(氨基酸簇2)可为氨基酸序列YNQSE(SEQ ID NO:288)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,N被Q置换,Q被N置换,且/或E被D置换)的序列;iii)aac3(氨基酸簇3)可为氨基酸序列TAADT(SEQ ID NO:294)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,第一T被S置换;且/或A被G置换;且/或D被E置换;且/或第二T被S置换)的序列;iv)aac4(氨基酸簇4)可为氨基酸序列AQITQ(SEQ ID NO:295)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,A被G置换;且/或第一Q被N置换;且/或I被L或V置换;且/或T被S置换;且/或第二Q被N置换)的序列;v)aac5(氨基酸簇5)可为氨基酸序列VETRP(SEQ ID NO:291)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,V被I或L置换,E被D置换,T被S置换,且/或R被K置换)的序列;且/或vi)aac6(氨基酸簇6)可为氨基酸序列GDRTF(SEQ ID NO:296)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,D被E置换;且/或T被S置换;且/或R被K或H置换;且/或F被L、W或Y置换)的序列。

[0102] 关于图11A,在一些情况下:i)aac1(氨基酸簇1)可为氨基酸序列RNLRG(SEQ ID NO:293)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,N被K置换;且/或L被A或I置换;且/或第二R被H置换;且/或G被T或S置换)的序列;ii)aac2(氨基酸簇2)可为氨基酸序列YNQSE(SEQ ID NO:288)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,N被Q置换,Q被N置换,且/或E被D置换)的序列;iii)aac3(氨基酸簇3)可为氨基酸序列TAADT(SEQ ID NO:294)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,第一T被S置换;且/或A被G置换;且/或D被E置换;且/或第二T被S置换)的序列;iv)aac4(氨基酸簇4)可为氨基酸序列AQITQ(SEQ ID NO:295)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,A被G置换;且/或第一Q被N置换;且/或I被L置换;且/或第

二Q被N或K置换)的序列;v)aac5(氨基酸簇5)可为氨基酸序列VETRP(SEQ ID NO:291)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,V被I或L置换,E被D置换,T被S置换,且/或R被K或H置换)的序列;且/或vi)aac6(氨基酸簇6)可为氨基酸序列GDGTF(SEQ ID NO:292)或有一或两个氨基酸缺失或被其他天然存在的氨基酸取代(例如,D被E置换;且/或T被S置换;且/或F被L、W或Y置换)的序列。

[0103] HLA-A

[0104] 在一些情况下,本公开的TMMP包含HLA-A重链多肽。可并入本公开的TMMP中的HLA-A重链肽序列或其部分包括但不限于以下等位基因:A*0101、A*0201、A*0301、A*1101、A*2301、A*2402、A*2407、A*3303及A*3401,其在无全部或大体上全部图9A中的前导序列、跨膜序列及细胞质序列的情况下比对。那些等位基因中的任一个可包含在位置84、139和/或236(如图9A所示)的一个或多个处的选自以下的突变:在位置84处酪氨酸至丙氨酸(Y84A);在位置84处酪氨酸至半胱氨酸(Y84C);在位置139处丙氨酸至半胱氨酸(A139C);及在位置236处丙氨酸至半胱氨酸的取代(A236C)。另外,也可采用与那些HLA-A等位基因的序列的全部或一部分(例如,50、75、100、150、200或250个连续氨基酸)具有至少75%(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%)或100%氨基酸序列同一性的HLA-A序列(例如,其可包含1-25、1-5、5-10、10-15、15-20、20-25、或25-30个氨基酸插入、缺失和/或取代)。

[0105] 在一些情况下,本公开的TMMP包含HLA-A重链多肽,其包含以下HLA-A共有氨基酸序列:

GSHSMRYFX1TSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAA
 [0106] SQX2MEPRAPWIEQEGPEYWDX3X4TX5X6X7KAX8SQX9X10RX1
1X12LX13X14X15X16X17YYNQSEX18GSHTX19QX20MX21GCDV
GX22DX23RFLRGYX24QX25AYDGKDYIALX26EDLRSWTAADM
AAQX27TX287X29KWEX30X31X32EAEQX33RX34YLYX35GX36CV
X37X38LRRYLENGKETLQRTDX39PKTHMTHHX40X41SDHEATL
RCWALX42FYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFQK
WAX43VVVPSGX44EQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEXX45 (SEQ ID

NO:29),其中X1为F、Y、S或T;X2为K或R;X3为Q、G、E或R;X4为N或E;X5为R或G;X6为N或K;X7为M或V;X8为H或Q;X9为T或I;X10为D或H;X11为A、V或E;X12为N或D;X13为G或R;X14为T或I;X15为L或A;X16为R或L;X17为G或R;X18为A或D;X19为I、L或V;X20为I、R或M;X21为F或Y;X22为S或P;X23为W或G;X24为R、H、或Q;X25为D或Y;X26为N或K;X27为T或I;X28为K或Q;X29为R或H;X30为A或T;X31为A或V;X32为H或R;X33为R、L、Q或W;X34为V或A;X35为D或E;X36为R或T;X37为D或E;X38为W或G;X39为P或A;X40为P或A;X41为V或I;X42为S或G;X43为A或S;X44为Q或E;且X45为P或L。

[0107] 作为一个实例,TMMP的I类MHC重链多肽可包含与以下人HLA-A重链氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸

序列同一性的氨基酸序列:GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLTGRGYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTHKHWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTQKWA AVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:297)。

[0108] 在一些情况下,适用于包含在本公开的TMMP中的HLA-A重链多肽包含以下氨基酸序列:GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLTGRGYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTHKHWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTQKWA AVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:297)。此HLA-A重链多肽也称为“HLA-A*0201”或简称为“HLA-A02”。在一些情况下,C端Pro不包括在本公开的TMMP中。举例来说,在一些情况下,适用于包含在本公开的TMMP中的HLA-A02多肽包含以下氨基酸序列:GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLTGRGYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTHKHWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTQKWA AVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:449)。

[0109] HLA-A (Y84A;A236C)

[0110] 在一些情况下,I类MHC重链多肽包含Y84A和A236C取代。举例来说,在一些情况下,I类MHC重链多肽包含与以下人HLA-A重链(Y84A;A236C)氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLTGRGAYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTHKHWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTQKWA AVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:298),其中氨基酸84为Ala且氨基酸236为Cys。在一些情况下,Cys-236与包含R12C取代的变体 β 2M多肽的Cys-12形成链间二硫键。

[0111] 在一些情况下,适用于包含在本公开的TMMP中的HLA-A重链多肽为包含以下氨基酸序列的HLA-A02 (Y84A;A236C) 多肽:GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLTGRGAYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTHKHWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTQKWA AVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:298)。

[0112] 在一些情况下,适用于包含在本公开的TMMP中的HLA-A重链多肽为包含以下氨基酸序列的HLA-A02 (Y84A;A236C) 多肽:GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLTGRGAYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTHKHWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTQKWA AVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:450)。

[0113] HLA-A (Y84C;A139C)

[0114] 在一些情况下, I类MHC重链多肽包含Y84C和A139C取代。举例来说, 在一些情况下, I类MHC重链多肽包含与以下人HLA-A重链(Y84C; A139C)氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列: GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKYKAHSQTHRVDLGLTRGCYNQSEAGSHTVQRM YGCDVGS DWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMCAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRLYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPAGDGT FQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO: 299), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸139为Cys。在一些情况下, Cys-84与Cys-139形成链内二硫键。

[0115] HLA-A11 (HLA-A*1101)

[0116] 作为一个非限制性实例, TMMP的I类MHC重链多肽可包含与以下人HLA-A11重链氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列: GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDQETRNVKAQSQTDRVDLGLTRGYNQSE DGSHTIQIMYGCDVGP DGRFLRGYRQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHAAEQRAYLEGTCVEWLRRLYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPAGDGT FQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO: 300)。此类I类MHC重链在亚洲人群中可为突出的, 该亚洲人群包括亚洲人种的个体群体。

[0117] HLA-A11 (Y84A; A236C)

[0118] 作为一个非限制性实例, 在一些情况下, I类MHC重链多肽为包含Y84A和A236C取代的HLA-A11等位基因。举例来说, 在一些情况下, I类MHC重链多肽包含与以下人HLA-A A11重链(Y84A; A236C)氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列: GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDQETRNVKAQSQTDRVDLGLTRGAYNQSE DGSHTIQIMYGCDVGP DGRFLRGYRQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHAAEQRAYLEGTCVEWLRRLYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPCGDGT FQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO: 301), 其中氨基酸84为Ala且氨基酸236为Cys。在一些情况下, Cys-236与包含R12C取代的变体 β 2M多肽的Cys-12形成链间二硫键。

[0119] HLA-A24 (HLA-A*2402)

[0120] 作为一个非限制性实例, 本公开的TMMP的I类MHC重链多肽可包含与以下人HLA-A24重链氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列: GSHSMRYFSTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWD EETGKVKHAHSQTDRENLR IALRYNQSEAGSHTLQMMFGCDVGS DGRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHVAEQQRAYLEGTCVDGLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPAGDGT FQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPSQPTVPIVGIIAGLVLLGAVITGAVVA VMWRRNSSDRKGGSYSQAASSDSAQGS DVS LTA CKV (SEQ ID NO: 302)。此类I类MHC重链在亚洲人群中可为突出的, 该亚洲人群包括亚洲人种的个体群体。在一些情况下, 氨基酸84为Ala。在一些情况下, 氨基酸84为Cys。在一些情况下, 氨基酸236为Cys。在一些情况下, 氨基酸84为Ala且氨基酸236为Cys。在一些情况下, 氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0121] HLA-A33 (HLA-A*3303)

[0122] 作为一个非限制性实例,本公开的TMMP的I类MHC重链多肽可包含与以下人HLA-A33重链氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:GSHSMRYFTTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDRNTRNVKAHSQIDRVDLGTLRGYYNQSEAGSHTIQMMYGCDVGS DGRFLRGYQQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITQRKWEAARVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTQKQWASVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPSQPTIPIVGIIAGLVLFAGAVVAAVRWRKSSDRKGGSYSQAASSDSAQGS DMSLTA CKV (SEQ ID NO:303)。此类I类MHC重链在亚洲人群中可为突出的,该亚洲人群包括亚洲人种的个体群体。在一些情况下,氨基酸84为Ala。在一些情况下,氨基酸84为Cys。在一些情况下,氨基酸236为Cys。在一些情况下,氨基酸84为Ala且氨基酸236为Cys。在一些情况下,氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0123] HLA-B

[0124] 在一些情况下,本公开的TMMP包含HLA-B重链多肽。可并入本公开的TMMP中的HLA-B重链肽序列或其部分包括但不限于以下等位基因:B*0702、B*0801、B*1502、B*3802、B*4001、B*4601及B*5301,其在无全部或大体上全部图10A中的前导序列、跨膜序列及细胞质序列的情况下比对。那些等位基因中的任一个可包含在位置84、139和/或236(如图10A所示)的一个或多个处的选自以下的突变:在位置84处酪氨酸至丙氨酸(Y84A);在位置84处酪氨酸至半胱氨酸(Y84C);在位置139处丙氨酸至半胱氨酸(A139C);及在位置236处丙氨酸至半胱氨酸的取代(A236C)。另外,也可采用包含与那些HLA-B等位基因的全部或部分序列(例如,50、75、100、150、200或250个连续氨基酸)具有至少75%(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%)或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的HLA-B多肽(例如,其可包含1-25、1-5、5-10、10-15、15-20、20-25、或25-30个氨基酸插入、缺失和/或取代)。

[0125] 在一些情况下,本公开的TMMP包含HLA-B重链多肽,其包含以下HLA-B共有氨基酸序列:

[0126] GSHSMRYFX1TX2X3SRPGRGEPRIX4VG YVDDTX5FVRFDS DAX6SPRX7X8PRAPWIEQEGPEYWDRX9TQX10X11KT X12X13TQX14YX15X16NLX17X18X19X20YYNQSEAGSHX21X22QX23MYGCDLGPDGRLLRGHDQSAYDGKDYIALNEDLX24SWTAADTAAQIX25QRKX26EAARX27AEQX28RX29YLEGX30CVEWLRYLENGKX31X32LX33RADPPKTHVTHHPX34SDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDRTFQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPSQPTIPIVGIIAGLVLFAGAVVAAVRWRKSSDRKGGSYSQAASSDSAQGS DMSLTA CKV (SEQ ID NO:30),其中X1为H、Y或D;X2为A或S;X3为M或V;X4为A、S或T;X5为Q或L;X6为A或T;X7为E、M、K或T;X8为A或T;X9为E或N;X10为I或K;X11为Y、F、S或C;X12为N或Q;X13为A或T;X14为D或Y;X15为E或V;X16为S或N;X17为T、N或I;X18为A或L;X19为L或R;X20为R或G;X21为T或I;X22为L或I;X23为R或S;X24为R或S;X25为S或T;X26为L或W;X27为E或V;X28为R、D、L或W;X29为A或T;X30为L、E或T;X31为E或D;X32为K或T;X33为E或Q;且X34为I或V。

[0127] 作为一个实例,本公开的TMMP的I类MHC重链多肽可包含与以下人HLA-B重链氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRFISVGYVDDTQFVRFDSDAAS

PREEPRAPWIEQEGPEYWRNTQIYKAQAQTDRESLRNLRGYNQSEAGSHTLQSMYGCDVGPDRLLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQRRAYLEGECEVWLRRLRYLENGKDKLERADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDRTFQKWAAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:304)。

[0128] HLA-B (Y84A;A236C)

[0129] 作为一个非限制性实例,在一些情况下,I类MHC重链多肽为包含Y84A和A236C取代的HLA-B多肽。举例来说,在一些情况下,I类MHC重链多肽包含与以下人HLA-B重链(Y84A;A236C)氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPFISVGYVDDTQFVRFDSDAASPREEPRAPWIEQEGPEYWRNTQIYKAQAQTDRESLRNLRGAYNQSEAGSHTLQSMYGCDVGPDRLLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQRRAYLEGECEVWLRRLRYLENGKDKLERADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDRTFQKWAAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:305),其中氨基酸84为Ala且氨基酸236为Cys。在一些情况下,Cys-236与包含R12C取代的变体 β 2M多肽的Cys-12形成链间二硫键。

[0130] HLA-B (Y84C;A139C)

[0131] 在一些情况下,I类MHC重链多肽包含Y84C和A139C取代。举例来说,在一些情况下,I类MHC重链多肽包含与以下人HLA-B重链(Y84C;A139C)氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPFISVGYVDDTQFVRFDSDAASPREEPRAPWIEQEGPEYWRNTQIYKAQAQTDRESLRNLRGCYNQSEAGSHTLQSMYGCDVGPDRLLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTCAQITQRKWEAAREAEQRRAYLEGECEVWLRRLRYLENGKDKLERADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDRTFQKWAAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:306),其中氨基酸84为Cys且氨基酸139为Cys。在一些情况下,Cys-84与Cys-139形成链内二硫键。

[0132] HLA-B*0702

[0133] 作为一个实例,在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的I类MHC重链多肽包含图10A中的HLA-B*0702 (SEQ ID NO:207)的氨基酸序列或与该序列的全部或一部分(例如,50、75、100、150、200或250个连续氨基酸)具有至少75%(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%)或100%氨基酸序列同一性的序列(例如,其可包含1-25、1-5、5-10、10-15、15-20、20-25、或25-30个氨基酸插入、缺失和/或取代)。在一些情况下,在本公开的TMMP的HLA-B重链多肽与图8中的序列标记的HLA-B或图10A中的标记的“B*0702具有小于100%同一性时,其可包含在位置84、139和/或236中的一个或多个处的选自以下的突变:在位置84处酪氨酸至丙氨酸的取代(Y84A);在位置84处酪氨酸至半胱氨酸的取代(Y84C);在位置139处丙氨酸至半胱氨酸(A139C);及在位置236处丙氨酸至半胱氨酸的取代(A236C)。在一些情况下,本公开的TMMP的HLA-B重链多肽包含Y84A和A236C取代。在一些情况下,本公开的TMMP的HLA-B*0702重链多肽包含Y84C和A139C取代。在一些情况下,本公开的TMMP的HLA-B重链多肽包含Y84C、A139C及A236C取代。

[0134] HLA-C

[0135] 在一些情况下,本公开的TMMP包含HLA-C重链多肽。可并入本公开的TMMP中的HLA-C重链多肽或其部分包括但不限于以下等位基因:C*0102、C*0303、C*0304、C*0401、C*0602、

C*0701、C*0801及C*1502,其在无全部或大体上全部图11A中的前导序列、跨膜序列及细胞质序列的情况下比对。那些等位基因中的任一个可包含在位置84、139和/或236(如图11A所示)中的一个或多个处的选自以下的突变:在位置84处酪氨酸至丙氨酸的取代(Y84A);在位置84处酪氨酸至半胱氨酸的取代(Y84C);在位置139处丙氨酸至半胱氨酸的取代(A139C);及在位置236处丙氨酸至半胱氨酸的取代(A236C)。另外,也可采用包含与那些HLA-C等位基因的全部或一部分序列(例如,50、75、100、150、200或250个连续氨基酸)具有至少75%(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%)或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的HLA-C多肽(例如,其可包含1-25、1-5、5-10、10-15、15-20、20-25、或25-30个氨基酸插入、缺失和/或取代)。

[0136] 在一些情况下,本公开的TMMP包含HLA-C重链多肽,其包含以下HLA-C共有氨基酸序列:

**X1SHSMX2YFX3TAVSX4PGRGEPX5FIX6VG YVDDTQFVX7F
DSDAASPRGEPRX8PWVEQEGPEYWDRETQX9YKRQAQX10DRV
X11LRX12LRGYYNQSEX13X14SHX15X16QX17MX18GCDX19GP
[0137] DGRLLRGX20X21QX22AYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQ
RKX23EAARX24AEQX25RAYLEGX26CVEWLRRYLX27NGKX28T
LQRAEX29PKTHVTHHPX30SDHEATLRCWALGFYP AEITLTWQX
31DGEDQTQDTEL VETRPAGDGTFQKWA AVX32VPSGX33EQRYT
CHX34QHEGLX35EPLTLX36WX37P** (SEQ ID NO:31),其中X1为C或G;X2

为R或K;X3为F、Y、S或D;X4为R或W;X5为H或R;X6为A或S;X7为Q或R;X8为A或E;X9为N或K;X10为T或A;X11为S或N;X12为N或K;X13为A或D;X14为G或R;X15为T或I;X16为L或I;X17为W或R;X18为C、Y、F或S;X19为L或V;X20为Y或H;X21为D或N;X22为Y、F、S或L;X23为L或W;X24为E、A或T;X25为R、L或W;X26为L或T;X27为E或K;X28为E或K;X29为H或P;X30为R或V;X31为W或R;X32为V或M;X33为E或Q;X34为M或V;X35为P或Q;X36为R或S;且X37为P或G。

[0138] 作为一个实例,本公开的TMMP的I类MHC重链多肽可包含与以下人HLA-C重链氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:CSHSMRYFDTAVSRPGRGEP RFISVG YVDDTQFVRFDSDAAS PRGEP RAPWVEQEGPEYWDRETQNYKRQAQADRVSLRNLRGYYNQSE DGSHTLQRMYGCDLGP DGRLLRGYDQSAY DGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKLEAARAAEQ LRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRAEPPKTHVTHHPL SDHEATLRCWALGFYP AEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPAGDGTFQKWA AVVPSGQE QRYTCHMQHEGLQEPL TLSWEP (SEQ ID NO:307)。

[0139] HLA-C (Y84A;A236C)

[0140] 作为一个非限制性实例,在一些情况下,I类MHC重链多肽为包含Y84A和A236C取代的HLA-C多肽。举例来说,在一些情况下,I类MHC重链多肽包含与以下人HLA-C重链(Y84A;A236C)氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:CSHSMRYFDTAVSRPGRGEP RFISVG YVDDTQFV

RFDSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQNYKRQAQADRVSLRNLRGAYNQSEDGSHTLQRMYGCDLGPDRLLRGYDQSAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKLEAARAAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVPSGQEQRYTCHMQHEGLQEPLTLSWEP (SEQ ID NO:308), 其中氨基酸84为Ala且氨基酸236为Cys。在一些情况下, Cys-236与包含R12C取代的变体 β 2M多肽的Cys-12形成链间二硫键。

[0141] HLA-C (Y84C; A139C)

[0142] 在一些情况下, I类MHC重链多肽包含Y84C和A139C取代。举例来说, 在一些情况下, I类MHC重链多肽包含与以下人HLA-C重链 (Y84C; A139C) 氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列: CSHSMRYFDTA VSRPGRGEPRI SVGYVDDTQFVRFDSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQNYKRQAQADRVSLRNLRGAYNQSEDGSHTLQRMYGCDLGPDRLLRGYDQSAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTCAQITQRKLEAARAAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVPSGQEQRYTCHMQHEGLQEPLTLSWEP (SEQ ID NO:397), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸139为Cys。在一些情况下, Cys-84与Cys-139形成链内二硫键。

[0143] HLA-C*0701

[0144] 在一些情况下, 本公开的TMMP的I类MHC重链多肽包含图11A中的HLA-C*0701的氨基酸序列 (图8中的标记的HLA-C) 或与该序列的全部或一部分 (例如, 50、75、100、150、200或250个连续氨基酸) 具有至少75% (例如, 至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%) 或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列 (例如, 其可包含1-25、1-5、5-10、10-15、15-20、20-25、或25-30个氨基酸插入、缺失和/或取代)。在一些情况下, 在本公开的TMMP的HLA-C重链多肽与图11A中的序列标记的HLA-C*0701具有小于100%同一性时, 其可包含在位置84、139和/或236中的一个或多个处的选自以下的突变: 在位置84处酪氨酸至丙氨酸的取代 (Y84A); 在位置84处酪氨酸至半胱氨酸的取代 (Y84C); 在位置139处丙氨酸至半胱氨酸 (A139C); 及在位置236处丙氨酸至半胱氨酸的取代 (A236C)。在一些情况下, 本公开的TMMP的HLA-C重链多肽包含Y84A和A236C取代。在一些情况下, T-细胞-MMP或其表位缀合物之HLA-C*0701重链多肽包含Y84C和A139C取代。在一些情况下, 本公开的TMMP的HLA-C重链多肽包含Y84C、A139C及A236C取代。

[0145] 非经典HLA-E、HLA-F及HLA-G I类MHC重链

[0146] 在一些情况下, 本公开的TMMP包含非经典I类MHC重链多肽。可并入本公开的TMMP中的非经典HLA重链多肽或其部分包括但不限于HLA-E、HLA-F及HLA-G等位基因的那些。HLA-E、HLA-F及HLA-G重链多肽的氨基酸序列 (以及HLA-A、HLA-B和HLA-C等位基因) 可见于万维网 hla.alleles.org/nomenclature/index.html、欧洲生物信息研究所 (www.ebi.ac.uk), 该研究所为欧洲分子生物学实验室 (EMBL) 的一部分) 及美国国家生物技术信息中心 (www.ncbi.nlm.nih.gov)。

[0147] 适合的HLA-E等位基因的非限制性实例包括但不限于HLA-E*0101 (HLA-E*01:01:01:01)、HLA-E*01:03 (HLA-E*01:03:01:01)、HLA-E*01:04、HLA-E*01:05、HLA-E*01:06、HLA-E*01:07、HLA-E*01:09及HLA-E*01:10。适合的HLA-F等位基因的非限制性实例包括但不限于HLA-F*0101 (HLA-F*01:01:01:01)、HLA-F*01:02、HLA-F*01:03 (HLA-F*01:03:01:01)、HLA-F*01:04、HLA-F*01:05及HLA-F*01:06。适合的HLA-G等位基因的非限制性实例包

括但不限于HLA-G*01:01 (HLA-G*01:01:01:01)、HLA-G*01:02、HLA-G*01:03 (HLA-G*01:03:01:01)、HLA-G*01:04 (HLA-G*01:04:01:01)、HLA-G*01:06、HLA-G*01:07、HLA-G*01:08、HLA-G*01:09:HLA-G*01:10、HLA-G*01:10、HLA-G*01:11、HLA-G*01:12、HLA-G*01:14、HLA-G*01:15、HLA-G*01:16、HLA-G*01:17、HLA-G*01:18:HLA-G*01:19、HLA-G*01:20及HLA-G*01:22。无前导序列、跨膜序列及细胞质序列中的全部或大体上全部的那些HLA E、HLA-F及HLA-G等位基因的共有序列提供于图12中,且将其与图13中的上文提及的HLA-A、HLA-B及HLA-C等位基因的共有序列进行比对。

[0148] 图12提供HLA-E、HLA-F及HLA-G中各者的共有序列,其中可变aa位置指示为依次编号的“X”残基且aa 84、139及236的位置加双下划线。

[0149] 图13提供在图9-13中给出的HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F及HLA-G的共有氨基酸序列的比对。各序列中的可变残基列出为“X”,其中序列编号已被除去。如图8所示,指示aa 84、139及236及其侧翼的五氨基酸簇的位置,该五氨基酸簇可独立地选自以下的1至5个氨基酸置换:(i)任何天然存在的氨基酸或(ii)除了脯氨酸或甘氨酸以外的任何天然存在的氨基酸。

[0150] 上文提及的HLA-E、HLA-F和/或HLA-G等位基因中的任一个可包含如图13所示的共有序列在位置84、139和/或236中的一个或多个处的取代。在一些情况下,这些取代可选自:位置84酪氨酸至丙氨酸(Y84A)或半胱氨酸(Y84C),或在HLA-F情况下,为R84A或R84C取代;位置139丙氨酸至半胱氨酸(A139C),或在HLA-F情况下,为V139C;及在位置236处丙氨酸至半胱氨酸的取代(A236C)。另外,也可采用与图13所列的共有序列中任一个的全部或一部分(例如,50、75、100、150、200或250个连续氨基酸)具有至少75%(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%)或100%氨基酸序列同一性的HLA-E、HLA-F和/或HLA-G序列(例如,除了其中列出的可变残基的变化以外,这些序列还可包含1-25、1-5、5-10、10-15、15-20、20-25或25-30个氨基酸插入、缺失和/或取代)。

[0151] 小鼠H2K

[0152] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的I类MHC重链多肽包含小鼠H2K (SEQ ID NO:45) (图8中的小鼠H2K)的氨基酸序列或与该序列的全部或一部分(例如,50、75、100、150、200或250个连续氨基酸)具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的序列(例如,其可包含1-25、1-5、5-10、10-15、15-20、20-25、或25-30个氨基酸插入、缺失和/或取代)。在一些情况下,在本公开的TMMP的小鼠H2K重链多肽与图8中的序列标记的小鼠H2K具有小于100%同一性时,其可包含在位置84、139和/或236中的一个或多个处的选自以下的突变:在位置84处酪氨酸至丙氨酸(Y84A);在位置84处酪氨酸至半胱氨酸(Y84C);在位置139处丙氨酸至半胱氨酸(A139C);及在位置236处丙氨酸至半胱氨酸的取代(A236C)。在一些情况下,本公开的TMMP的小鼠H2K重链多肽包含Y84A和A236C取代。在一些情况下,本公开的TMMP的小鼠H2K重链多肽包含Y84C和A139C取代。在一些情况下,本公开的TMMP的小鼠H2K重链多肽包含Y84C、A139C及A236C取代。

[0153] 示例性组合

[0154] 以下表1呈现可并入本公开的TMMP中的I类MHC重链序列修饰的各种组合。

[0155] 表1

[0156]

图例	HLA 重链序列	序列 同一性 范围%	特异性 在位置 84、139 和/ 或 236 处的取代
1	HLA-A 共有 (图 9B)	75%-99.8% 、 80%-99.8% 、 85%-99.8% 、 90%-99.8% 、 95%-99.8% 、 98%-99.8% 、 或 99%-99.8%; 或 1-25、1-5、5-10、 10-15、15-20、或 20-25 aa 插入、 缺失和/或取代(未计数可变残基)	无; Y84C; Y84A; A139C; A236C; (Y84A 及 A236C); (Y84C 及 A139C) ; 或 (Y84C、A139C 及 A236C)
2	A*0101、A*0201、 A*0301、A*1101、 A*2402、A*2301、 A*2402、A*2407、	75%-99.8% 、 80%-99.8% 、 85%-99.8% 、 90%-99.8% 、 95%-99.8% 、 98%-99.8% 、 或 99%-99.8%; 或 1-25、1-5、5-10、	无; Y84C; Y84A; A139C; A236C; (Y84A 及 A236C); (Y84C 及

[0157]

图例	HLA 重链序列	序列 同一性 范围%	特异性 在位置 84、139 和/ 或 236 处的取代
	A*3303 或 A*3401 (图 9A)	10-15、15-20、或 20-25 aa 插入、 缺失和/或取代	A139C) ; 或 (Y84C、A139C 及 A236C)
3	HLA-B 共有 (图 10B)	75%-99.8% 、 80%-99.8% 、 85%-99.8% 、 90%-99.8% 、 95%-99.8% 、 98%-99.8% 、 或 99%-99.8%; 或 1-25、1-5、5-10、 10-15、15-20、或 20-25 aa 插入、 缺失和/或取代(未计数可变残基)	无; Y84C; Y84A; A139C; A236C; (Y84A 及 A236C); (Y84C 及 A139C) ; 或 (Y84C、A139C 及 A236C)
4	B*0702、B*0801、 B*1502、B*3802、 B*4001、B*4601 或 B*5301。 (图 10A)	75%-99.8% 、 80%-99.8% 、 85%-99.8% 、 90%-99.8% 、 95%-99.8% 、 98%-99.8% 、 或 99%-99.8%; 或 1-25、1-5、5-10、 10-15、15-20、或 20-25 aa 插入、 缺失和/或取代	无; Y84C; Y84A; A139C; A236C; (Y84A 及 A236C); (Y84C 及 A139C) ; 或 (Y84C、A139C 及 A236C)
5	HLA-C 共有 (图 11B)	75%-99.8% 、 80%-99.8% 、 85%-99.8% 、 90%-99.8% 、 95%-99.8% 、 98%-99.8% 、 或 99%-99.8%; 或 1-25、1-5、5-10、 10-15、15-20、或 20-25 aa 插入、 缺失和/或取代(未计数可变残基)	无; Y84C; Y84A; A139C; A236C; (Y84A 及 A236C); (Y84C 及 A139C) ; 或 (Y84C、A139C 及 A236C)
6	C*0102、C*0303、 C*0304、C*0401、 C*0602、C*0701、 C*0801 或 C*1502 (图 11A)	75%-99.8% 、 80%-99.8% 、 85%-99.8% 、 90%-99.8% 、 95%-99.8% 、 98%-99.8% 、 或 99%-99.8%; 或 1-25、1-5、5-10、 10-15、15-20、或 20-25 aa 插入、 缺失和/或取代	无; Y84C; Y84A; A139C; A236C; (Y84A 及 A236C); (Y84C 及 A139C) ; 或 (Y84C、A139C 及 A236C)
7	HLA-E、HLA-F 或 HLA-G 共有 (图 12)	75%-99.8% 、 80%-99.8% 、 85%-99.8% 、 90%-99.8% 、 95%-99.8% 、 98%-99.8% 、 或 99%-99.8%; 或 1-25、1-5、5-10、 10-15、15-20、或 20-25 aa 插入、 缺失和/或取代(未计数可变残基)	无; Y84C; Y84A; A139C; A236C; (Y84A 及 A236C); (Y84C 及 A139C) ; 或 (Y84C、A139C 及 A236C)
8	小鼠 H2K (图 8)	75%-99.8% 、 80%-99.8% 、 85%-99.8% 、 90%-99.8% 、	无; Y84C; Y84A; A139C; A236C;

	HLA 重链序列	序列 同一性 范围 [*]	特异性 在位置 84、139 和/ 或 236 处的取代
[0158]		95%-99.8%、98%-99.8%、或 99%-99.8%；或 1-25、1-5、5-10、 10-15、15-20、或 20-25 aa 插入、 缺失和/或取代	(Y84A 及 A236C)； (Y84C 及 A139C)；或 (Y84C、A139C 及 A236C)

[0159] ^{*}序列同一性范围为并入TMMP中的MHC-H多肽序列相对于图8-13中列出的序列相应部分的序列同一性的可允许范围，未计数共有序列中的可变残基。

[0160] β -2微球蛋白

[0161] 本公开的TMMP的 β 2-微球蛋白(β 2M)多肽可为人 β 2M多肽、非人灵长类动物 β 2M多肽、鼠类 β 2M多肽等。在一些情况下， β 2M多肽包含与图6中描绘的 β 2M多肽氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下， β 2M多肽包含与图6中描绘的 β 2M氨基酸序列的氨基酸21至119具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0162] 在一些情况下，适合的 β 2M多肽包含以下氨基酸序列：

[0163] IQRTPKIQVY SCHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLK NGERIEKVE HSDLFSKDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVN HVTLSQP KIVKWDRDM(SEQ ID NO:311)；且HLA I类重链多肽包含以下氨基酸序列：

[0164] GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYYDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVK AHSQTHRVDL(aa1){C}(aa2)AGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSW(aa3){C}(aa4))HKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRLRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL(aa5)(C)(aa6)QKWA AVVPSGQEQRVYCHVQHEGLPKPLTLRWEP(SEQ ID NO:309)，其中指示为{C}的半胱氨酸残基在 α 1与 α 2-1螺旋之间形成二硫键且(C)残基与位置12处的 β 2M多肽半胱氨酸形成二硫键。在以上序列中，“aa1”为“氨基酸簇1”；“aa2”为“氨基酸簇2”；“aa3”为“氨基酸簇3”；“aa4”为“氨基酸簇4”；“aa5”为“氨基酸簇5”；且“aa6”为“氨基酸簇6”；参见，例如图10。aa1、aa2、aa3、aa4、aa5及aa6在每次出现时被选出且独立地选择为1-5个氨基酸残基，其中氨基酸残基i)独立地选自任何天然存在(例如编码)的氨基酸或ii)除了脯氨酸或甘氨酸以外的任何天然存在的氨基酸。

[0165] 在一些情况下，MHC多肽相对于参考MHC多肽(其中参考MHC多肽可为野生型MHC多肽)包含单一氨基酸取代，其中单一氨基酸取代以半胱氨酸(Cys)残基取代一氨基酸。此类半胱氨酸残基当存在于本公开的TMMP的第一多肽的MHC多肽中时，可以与存在于本公开的TMMP的第二多肽链中的半胱氨酸残基形成二硫键。

[0166] 在一些情况下，本公开的TMMP的第一多肽中的第一MHC多肽和/或本公开的TMMP的第二多肽中的第二MHC多肽包括氨基酸取代以用半胱氨酸取代氨基酸，其中第一MHC多肽中的取代的半胱氨酸与第二MHC多肽中的半胱氨酸形成二硫键，其中第一MHC多肽中的半胱氨酸

酸与第二MHC多肽中的取代的半胱氨酸形成二硫键,或其中第一MHC多肽中的取代的半胱氨酸与第二MHC多肽中的取代的半胱氨酸形成二硫键。

[0167] 举例来说,在一些情况下,HLA β 2-微球蛋白和HLA I类重链中的以下残基对之一被半胱氨酸取代(其中残基编号为成熟多肽的那些):1) β 2M残基12,HLA I类重链残基236;2) β 2M残基12,HLA I类重链残基237;3) β 2M残基8,HLA I类重链残基234;4) β 2M残基10,HLA I类重链残基235;5) β 2M残基24,HLA I类重链残基236;6) β 2M残基28,HLA I类重链残基232;7) β 2M残基98,HLA I类重链残基192;8) β 2M残基99,HLA I类重链残基234;9) β 2M残基3,HLA I类重链残基120;10) β 2M残基31,HLA I类重链残基96;11) β 2M残基53,HLA I类重链残基35;12) β 2M残基60,HLA I类重链残基96;13) β 2M残基60,HLA I类重链残基122;14) β 2M残基63,HLA I类重链残基27;15) β 2M残基Arg3,HLA I类重链残基Gly120;16) β 2M残基His31,HLA I类重链残基Gln96;17) β 2M残基Asp53,HLA I类重链残基Arg35;18) β 2M残基Trp60,HLA I类重链残基Gln96;19) β 2M残基Trp60,HLA I类重链残基Asp122;20) β 2M残基Tyr63,HLA I类重链残基Tyr27;21) β 2M残基Lys6,HLA I类重链残基Glu232;22) β 2M残基Gln8,HLA I类重链残基Arg234;23) β 2M残基Tyr10,HLA I类重链残基Pro235;24) β 2M残基Ser11,HLA I类重链残基Gln242;25) β 2M残基Asn24,HLA I类重链残基Ala236;26) β 2M残基Ser28,HLA I类重链残基Glu232;27) β 2M残基Asp98,HLA I类重链残基His192;及28) β 2M残基Met99,HLA I类重链残基Arg234。MHC/HLA I类重链的氨基酸编号是参考成熟MHC/HLA I类重链,无信号肽。举例来说,在一些情况下,成熟HLA-A氨基酸序列之残基236被Cys取代。在一些情况下,成熟HLA-B氨基酸序列之残基236被Cys取代。在一些情况下,成熟HLA-C氨基酸序列之残基236被Cys取代。在一些情况下,图6中描绘的氨基酸序列的残基32(对应于成熟 β 2M之Arg-12)被Cys取代。

[0168] 在一些情况下, β 2M多肽包含以下氨基酸序列:IQRTPKIQVY SRHPAENGKSNFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGERIEKVE HSD LSF $\overline{\text{S}}$ KDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVNHVTL $\overline{\text{S}}$ QPKIVKW DRDM(SEQ ID NO:310)。在一些情况下, β 2M多肽包含以下氨基酸序列:IQRTPKIQVY SCHPAENGKSNFLNCYVSGF HPSDIEVD LLKNGERIEKVE HSDLSFSKDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVNHVTL $\overline{\text{S}}$ QPKIVKWDRDM(SEQ ID NO:311)。

[0169] 在一些情况下,HLA I类重链多肽包含以下氨基酸序列:GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVG $\overline{\text{Y}}$ VDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETR $\overline{\text{K}}$ VKAHSQTHRVDLGT $\overline{\text{L}}$ RGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLR $\overline{\text{S}}$ WTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGT $\overline{\text{F}}$ QKWA $\overline{\text{A}}$ VVVPSGQEQR $\overline{\text{Y}}$ TCHVQHEGLPKPLTLR $\overline{\text{W}}$ EP(SEQ ID NO:297)。

[0170] 在一些情况下,HLA I类重链多肽包含以下氨基酸序列:

[0171] GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVG $\overline{\text{Y}}$ VDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETR $\overline{\text{K}}$ VKAHSQTHRVDLGT $\overline{\text{L}}$ RGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLR $\overline{\text{S}}$ WTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRP $\overline{\text{C}}$ DGT $\overline{\text{F}}$ QKWA $\overline{\text{A}}$ VVVPSGQEQR $\overline{\text{Y}}$ TCHVQHEGLPKPLTLR $\overline{\text{W}}$ EP(SEQ ID NO:312)。

[0172] 在一些情况下,HLA I类重链多肽包含以下氨基酸序列:GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVG $\overline{\text{Y}}$ VDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETR $\overline{\text{K}}$ VKAHSQTHRVDLGT $\overline{\text{L}}$ RG $\overline{\text{A}}$ Y $\overline{\text{N}}$ QSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLR $\overline{\text{S}}$ WTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLE

NGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVV
PSGQEQRYSCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:313)。

[0173] 在一些情况下,β2M多肽包含以下氨基酸序列:

[0174] IQRTPKIQVY SCHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLK NGERIEKVE HSDLFSKDW
SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVN HVTLSQP KIVKWRDM (SEQ ID NO:311);且本公开的TMMP的
HLA I类重链多肽包含以下氨基酸序列:

GSLSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDDTQFVRFDSDAAS
QRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKASHSQTHRVDLGLTRGYY
NQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYLALKE
[0175] DLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRR
YLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT
LTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVVPSGQEQRYS
TCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:312),其中加下划线且呈粗体的

Cys残基在TMMP中彼此形成二硫键。

[0176] 在一些情况下,β2M多肽包含以下氨基酸序列: IQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSG
FHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLFSKDW SFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWRDM (SEQ ID
NO:314)。

[0177] 在一些情况下,本公开的TMMP的第一多肽与第二多肽通过以下各物彼此经由二硫
键连接: i) 存在于连接第一多肽链中的肽表位与β2M多肽的接头中的Cys残基;和ii) 存在于
第二多肽链中的I类MHC重链中的Cys残基。在一些情况下,存在于I类MHC重链中的Cys残基
为作为Y84C取代引入的Cys。在一些情况下,连接第一多肽链中的肽表位与β2M多肽的接头
为GCGGS(G4S)_n (SEQ ID No:315),其中n为1、2、3、4、5、6、7、8或9。举例来说,在一些情况下,
接头包含氨基酸序列GCGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:316)。作为另一实例,接头包含氨
基酸序列GCGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:317)。本公开的TMMP的二硫键连接的第一多肽与第
二多肽的实例示意性描绘于图2A-2F中。

[0178] 多二硫键键合的TMMP

[0179] 在一些情况下,本公开的TMMP的第一多肽与第二多肽通过至少两个二硫键(即,两
个链间二硫键)彼此连接。此类多二硫键连接的TMMP的实例示意性描绘于图17A和17B及图
18A-18C中。另外,在本公开的TMMP包含IgFc多肽时,异二聚体TMMP可被二聚化,使得二硫键
连接两个异二聚体TMMP中的IgFc多肽。此种排列示意性描绘于图17C和17D中,其中二硫键
由虚线表示。除非另外说明,在此部分中的多二硫键连接的TMMP中所述的至少两个二硫键
并非指代连接二聚化TMMP中的IgFc多肽的二硫键。

[0180] 如上文所述,在一些情况下,本公开的TMMP的第一多肽与第二多肽通过至少两个
二硫键(即,两个链间二硫键)彼此连接。举例来说,在一些情况下,本公开的TMMP的第一多
肽与第二多肽通过2个链间二硫键彼此连接。作为另一实例,在一些情况下,本公开的TMMP
的第一多肽与第二多肽通过3个链间二硫键彼此连接。作为另一实例,在一些情况下,本公
开的TMMP的第一多肽与第二多肽通过4个链间二硫键彼此连接。

[0181] 在一些情况下,在本公开的第一多肽中的肽表位通过包含Cys的接头连接至 β 2M多肽时,至少两个二硫键中的至少一个连接所述接头中的Cys与第二多肽的I类MHC重链中的Cys。在一些情况下,在本公开的第一多肽中的肽表位通过接头连接至I类MHC重链多肽时,至少两个二硫键中的至少一个连接所述接头中的Cys与存在于第二多肽的 β 2M多肽中的Cys。

[0182] 在一些情况下,本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)与包括该至少两个二硫键中仅一个的对照TMMP相比呈现出增加的稳定性。在一些情况下,本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)与包括该至少两个二硫键中仅一个的对照TMMP相比呈现出增加的体外稳定性。举例来说,在一些情况下,本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)与包括该至少两个二硫键中仅一个的对照TMMP相比呈现出至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少50%、至少2倍、至少5倍或至少10倍更大的体外稳定性。

[0183] 本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)与包括所述至少两个二硫键中仅一个的对照TMMP相比是否呈现出增加的体外稳定性,可通过随时间且/或在指定条件下且/或在TMMP纯化期间测量存在于样品中的二硫键连接的异二聚体TMMP的量来确定。

[0184] 举例来说,在一些情况下,当TMMP在37℃下保存一段时间(例如,约1周至约2周、约2周至约4周、或约4周至约2个月的时间段)时,本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)与包括该至少两个二硫键中仅一个的对照TMMP相比呈现出至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少50%、至少2倍、至少5倍、或至少10倍更大的体外稳定性。例如,在一些情况下,在37℃下在体外保存本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)达28天之后剩余的二硫键连接的异二聚体TMMP的量与在37℃下在体外保存对照TMMP(包括存在于多二硫键连接的TMMP中的至少两个二硫键中仅一个的TMMP)达28天之后剩余的二硫键连接的异二聚体TMMP的量相比是至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少50%、至少2倍、至少5倍、或至少10倍更多。

[0185] 作为一个实例,包含如图14A和14B中所描绘的多肽1715和2380的双二硫键连接的TMMP与包含多肽2405和2380的TMMP相比呈现出更大的体外稳定性,其中多肽2405描绘于图14D中,其中此类TMMP包含仅一个二硫键联,其中单一二硫键在以下各物之间形成:i)在表位与 β 2M之间的G2C接头的Cys;与ii)通过I类MHC重链中的Y84C取代提供的Cys。作为另一实例,包含如图14A及14B中所描绘的多肽1715及2380的双二硫键连接的TMMP与包含多肽1380及2380的TMMP相比呈现出更大的体外稳定性,其中多肽1380描绘于图14E中,其中此类TMMP包含仅一个二硫键联,其中单一二硫键在以下各物之间形成:i)通过 β 2M多肽中的R12C取代提供的Cys;与ii)通过I类MHC重链中的A236C取代提供的Cys。

[0186] 在一些情况下,本公开的多二硫键连接的TMMP与包括该至少两个二硫键中仅一个的对照TMMP相比呈现出增加的体内稳定性。举例来说,在一些情况下,本公开的多二硫键连接的TMMP与包括该至少两个二硫键中仅一个的对照TMMP相比呈现出至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少50%、至少2倍、至少5倍、或至少10倍更大的体内稳定性。

[0187] 在一些情况下,在本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)中存在两个二硫键使得二硫键连接的异二聚体TMMP的产生与在TMMP为包括所述至少两个二

硫键中仅一个的对照TMMP时产生的二硫键连接的异二聚体TMMP的量相比有所增加。举例来说,本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)可在体外细胞培养的哺乳动物细胞中产生,其中哺乳动物细胞在液体细胞培养基中培养。TMMP可分泌至细胞培养基中。细胞可裂解,从而生成细胞裂解物,且TMMP可存在于细胞裂解物中。TMMP可自细胞培养基和/或细胞裂解物中纯化。举例来说,在TMMP包含IgG1 Fc多肽时,细胞培养基和/或细胞裂解物可与固定的蛋白A接触(例如,细胞培养基和/或细胞裂解物可施用于蛋白A柱,其中蛋白A固定于珠粒上)。存在于细胞培养基和/或细胞裂解物中的TMMP结合至固定的蛋白A。在洗涤柱以除去未结合的材料后,使结合的TMMP洗脱,从而生成蛋白A洗脱物。存在于蛋白A洗脱物中的二硫键连接的异二聚体TMMP的量与在TMMP为包括存在于多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)中的至少两个二硫键中仅一个的对照TMMP时存在于蛋白A洗脱物中的二硫键连接的异二聚体TMMP的量相比至少0.5%、至少1%、至少2%、至少3%、至少4%、至少5%、至少6%、至少7%、至少8%、至少9%或至少10%更多。在一些情况下,洗脱物中为非聚集的二硫键连接的异二聚体TMMP的总TMMP蛋白的百分比为至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%。蛋白A洗脱物可经受尺寸排阻色谱(SEC)和/或一个或多个其他额外纯化步骤。

[0188] 在一些情况下,本公开的T细胞调节多聚体多肽包含至少一种异二聚体,其包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含:i)WT1肽表位,其中所述WT1肽的长度为至少4个氨基酸(例如,4个氨基酸至25个氨基酸;例如WT1肽具有的长度为4、5、6、7、8、9、10-15、15-20、或20-25个氨基酸);及ii)第一MHC多肽;b)第二多肽,所述第二多肽包含第二MHC多肽,及c)至少一种免疫调节多肽,其中所述第一多肽和/或所述第二多肽包含免疫调节多肽,且其中所述异二聚体在第一多肽与第二多肽之间包含2个二硫键(即,所述异二聚体包含:i)连接第一多肽与第二多肽的第一二硫键;及ii)连接第一多肽与第二多肽的第二二硫键)。换句话说,第一多肽包含的第一Cys残基与第二多肽中的第一Cys残基形成二硫键(第一二硫键);且第一多肽包含的第二Cys残基与第二多肽中的第二Cys残基形成二硫键(第二二硫键)。

[0189] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽,所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)肽表位;ii)肽接头;及iii) β 2M多肽;和b)第二多肽,所述第二多肽包含I类MHC重链多肽,其中所述第一多肽及所述第二多肽中的一个或两个包含至少一种免疫调节多肽,其中所述TMMP包含:a)以下各物之间的第一二硫键联:i)存在于肽表位与 β 2M多肽之间的接头中的Cys;与ii)引入至I类MHC重链多肽中的第一Cys;及b)第一多肽与第二多肽之间的至少一个第二二硫键联,其中该至少一个第二二硫键联是在以下各物之间:i)第一多肽中在存在于接头中的Cys的C端的Cys;与ii)第二多肽中在引入I类MHC重链多肽中的第一Cys的C端的Cys。

[0190] 在一些情况下,在本公开的TMMP的第一多肽或第二多肽中的第一二硫键形成Cys残基与第二二硫键形成Cys残基彼此间隔约10个氨基酸至约200个氨基酸。例如,在一些情况下,在TMMP的第一多肽或第二多肽中的第一二硫键形成Cys残基与第二二硫键形成Cys残基间隔约10个氨基酸(aa)至约15aa、约15aa至约20aa、约20aa至约25aa、约25aa至约30aa、约30aa至约40aa、约40aa至约50aa、约50aa至约60aa、约60aa至约70aa、约70aa至约80aa、约80aa至约90aa、约90aa至约100aa、约100aa至约110aa、约110aa至约120aa、约120aa至约130aa、约130aa至约140aa、约140aa至约150aa、约150aa至约160aa、约160aa至约170aa、约

170aa至约180aa、约180aa至约190aa、或约190aa至约200aa。

[0191] 作为一个实例,在一些情况下,在本公开的TMMP的第一多肽中的第一二硫键形成Cys残基与第二二硫键形成Cys残基彼此间隔约10个氨基酸至约80个氨基酸残基。举例来说,在一些情况下,第一多肽中的第二二硫键形成Cys残基在第一多肽中的第一二硫键形成Cys残基的C端的约10个氨基酸至约80个氨基酸(例如,约10个氨基酸(aa)至约15aa、约15aa至约20aa、约20aa至约25aa、约25aa至约30aa、约30aa至约40aa、约40aa至约50aa、约50aa至约60aa、约60aa至约70aa、或约70aa至约80aa)处。在一些情况下,第一多肽中的第二二硫键形成Cys残基在第一多肽中的第一二硫键形成Cys残基的C端的10aa、11aa、12aa、13aa、14aa、15aa、16aa、17aa、18aa、19aa、20aa、21aa、22aa、23aa、24aa或25aa处。在一些情况下,第一多肽中的第二二硫键形成Cys残基在第一多肽中的第一二硫键形成Cys残基的C端的15aa处。在一些情况下,第一多肽中的第二二硫键形成Cys残基在第一多肽中的第一二硫键形成Cys残基的C端的20aa处。在一些情况下,第一多肽中的第二二硫键形成Cys残基在第一多肽中的第一二硫键形成Cys残基的C端的25aa处。

[0192] 在一些情况下,在本公开的TMMP的第二多肽中的第一二硫键形成Cys残基与第二二硫键形成Cys残基彼此间隔约140个氨基酸至约160个氨基酸。举例来说,在一些情况下,第二多肽中的第二二硫键形成Cys残基在第二多肽中的第一二硫键形成Cys残基的C端的约140个氨基酸至约160个氨基酸处。在一些情况下,第二多肽中的第二二硫键形成Cys残基在第二多肽中的第一二硫键形成Cys残基的C端的140个氨基酸(aa)、141aa、142aa、143aa、144aa、145aa、146aa、147aa、148aa、149aa、150aa、151aa、152aa、153aa、154aa、155aa、156aa、157aa、158aa、159aa或160aa处。

[0193] 本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)可包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含:i)WT1肽(例如,具有4个氨基酸至约25个氨基酸的WT1肽);和ii)第一MHC多肽,其中所述第一多肽包含介于WT1肽与第一MHC多肽之间的肽接头,其中所述肽接头包含Cys残基,且其中所述第一MHC多肽为包含引入Cys残基的氨基酸取代的 β 2M多肽;b)及第二多肽,所述第二多肽包含第二MHC多肽,其中所述第二MHC多肽为I类重链,其包含基于HLA-A*0201(图9A中描绘)的氨基酸编号或在另一种I类重链等位基因中的相应位置处的Y84C取代和A236C取代,其中所述TMMP包含介于肽接头中的Cys残基与I类重链的氨基酸位置84或另一种I类重链等位基因的相应位置处的Cys残基之间的二硫键,且其中所述TMMP包含介于 β 2M多肽中引入的Cys残基与I类重链的氨基酸位置236或另一种I类重链等位基因的相应位置处的Cys之间的二硫键;及c)至少一种免疫调节多肽,其中所述第一多肽和/或第二多肽包含所述至少一种免疫调节多肽。实例示意性地描绘于图17A和图17B中。

[0194] 在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列GCGGS(SEQ ID NO:318)。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列GCGGS(GGGGS) n (SEQ ID NO:319),其中 n 为1至10的整数。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列GCGGS(GGGGS) n (SEQ ID NO:398),其中 n 为1。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列GCGGS(GGGGS) n (SEQ ID NO:320),其中 n 为2。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列GCGGS(GGGGS) n (SEQ ID NO:321),其中 n 为3。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列GCGGS(GGGGS) n (SEQ ID NO:322),其中 n 为4。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列GCGGS(GGGGS) n (SEQ ID NO:323),其中 n 为5。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列GCGGS(GGGGS) n (SEQ ID NO:324),其中 n 为6。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列GCGGS(GGGGS)

n (SEQ ID NO:325), 其中n为7。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列GCGGS (GGGS)n (SEQ ID NO:326), 其中n为8。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列GCGGS (GGGS)n (SEQ ID NO:327), 其中n为9。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列GCGGS (GGGS)n (SEQ ID NO:328), 其中n为10。

[0195] 在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列CGGGS (SEQ ID NO:329)。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列CGGGS (GGGS)n (SEQ ID NO:330), 其中n为1至10的整数。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列CGGGS (GGGS)n (SEQ ID NO:331), 其中n为1。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列CGGGS (GGGS)n (SEQ ID NO:332), 其中n为2。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列CGGGS (GGGS)n (SEQ ID NO:333), 其中n为3。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列CGGGS (GGGS)n (SEQ ID NO:334), 其中n为4。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列CGGGS (GGGS)n (SEQ ID NO:335), 其中n为5。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列CGGGS (GGGS)n (SEQ ID NO:336), 其中n为6。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列CGGGS (GGGS)n (SEQ ID NO:337), 其中n为7。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列CGGGS (GGGS)n (SEQ ID NO:338), 其中n为8。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列CGGGS (GGGS)n (SEQ ID NO:339), 其中n为9。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列CGGGS (GGGS)n (SEQ ID NO:340), 其中n为10。

[0196] 以下为包含基于HLA-A*0201 (图9A中描绘) 的氨基酸编号或在另一种I类重链等位基因的相应位置处的Y84C取代和A236C取代的I类MHC重链的非限制性实例。

[0197] HLA-A

[0198] 在一些情况下, 本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 包含: a) 第一多肽, 所述第一多肽包含: i) WT1肽 (例如, 具有4个氨基酸至约25个氨基酸的WT1肽); 及ii) 第一MHC多肽, 其中所述第一多肽包含介于WT1肽与第一MHC多肽之间的肽接头, 其中所述肽接头包含Cys残基, 且其中所述第一MHC多肽为包含引入Cys残基的氨基酸取代的 β 2M多肽; 和b) 第二多肽, 所述第二多肽包含HLA-A I类MHC重链, 所述重链包含与以下氨基酸序列具有至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列: GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRA PWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLRGYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRLYENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPCDGTGTFQKWA AVVPSGQEQR YTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:341), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys; 及c) 至少一种免疫调节多肽, 其中所述第一多肽和/或所述第二多肽包含所述至少一种免疫调节多肽。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列GCGGS (SEQ ID NO:318)。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列GCGGS (GGGS)n (SEQ ID NO:319), 其中n为1至10的整数。在一些情况下, β 2M多肽包含R12C取代。举例来说, β 2M多肽可包含与以下氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列: IQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWDRDM (SEQ ID NO:314), 其中氨基酸12为Cys。所述至少一种免疫调节多肽可为对靶T细胞发挥活化/刺激作用或对靶T细胞发挥抑制/抑制性 (suppressing/inhibitory) 作用的多肽。举例来说, 所述至少一种免疫调节多肽可为细胞因子 (例如, IL2多肽、IL7多肽、IL12多肽、IL15多肽、IL17多肽、IL21多

肽、IL27多肽、IL-23多肽、TGF β 多肽等；且包括全部家族成员，例如IL17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、IL-17F、IL-17E)、4-1BBL多肽、ICOS-L多肽、OX-40L多肽、CD80多肽、CD86多肽(CD80及CD86亦分别称为B7-1及B7-2)、CD40多肽、CD70多肽、JAG1(CD339)多肽、ICAM(CD54)多肽、PD-L1多肽、FasL多肽、PD-L2多肽、PD-1H(VISTA)多肽、ICOS-L(CD275)多肽、GITRL多肽、HVEM多肽、CXCL10多肽、CXCL9多肽、CXCL11多肽、CXCL13多肽、及CX3CL1多肽、半乳糖凝集素-9多肽、CD83多肽、CD30L多肽、HLA-G多肽、MICA多肽、MICB多肽、HVEM(CD270)多肽、淋巴毒素 β 受体多肽、3/TR6多肽、ILT3多肽、ILT4多肽、CXCL10多肽、CXCL9多肽、CXCL11多肽、CXCL13多肽或CX3CL1多肽。这些免疫调节多肽可为野生型多肽或野生型多肽的变体。在一些情况下，免疫调节多肽为活化(“刺激”)免疫调节多肽；例如，免疫调节多肽可对T细胞产生活化/刺激效应。活化免疫调节多肽的实例包括例如CD80、CD86、4-1BBL、OX40L、CD70、ICOS-L、CD40、ICAM(CD54)、IL2、IL7、IL12、IL15、IL17、IL21、IL27、IL23、GITRL、TGF β 及淋巴毒素 β 受体。在一些情况下，免疫调节多肽为抑制(“抑制性”)免疫调节多肽；例如，免疫调节多肽可对T细胞产生抑制/抑制性效应。抑制性免疫调节多肽的实例包括例如PD-1H、PD-L1、PD-L2、TGF β 、FasL、HVEM、半乳糖凝集素-9、ILT3及ILT4。视情形而定，TGF β 多肽可产生活化/刺激效应或抑制/抑制性效应。

[0199] 在一些情况下，所述至少一种免疫调节多肽为亲和力减小的变体，如本文别处所述。在一些情况下，第一多肽或第二多肽包含Ig Fc多肽。

[0200] 在一些情况下，本公开的多二硫键连接的TMMP(例如，双二硫键连接的TMMP)包含HLA-A I类重链多肽。在一些情况下，存在于本公开的多二硫键连接的TMMP(例如，双二硫键连接的TMMP)中的HLA-A重链多肽包含与图9A中描绘的HLA-A*0101、HLA-A*0201、HLA-A*0202、HLA-A*1101、HLA-A*2301、HLA-A*2402、HLA-A*2407、HLA-A*3303或HLA-A*3401氨基酸序列具有至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中HLA-A重链多肽包含Y84C和A236C取代。

[0201] HLA-A*0101(Y84C;A236C)

[0202] 在一些情况下，存在于本公开的多二硫键连接的TMMP(例如，双二硫键连接的TMMP)中的HLA-A重链多肽包含与以下HLA-A*0101(Y84C;A236C)氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列：

[0203] GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFDSDAASQKMEPRAPWIEQEGPEYWDQETRNMKAHSQTDRANLGTLRGCYNQSEDSHTIQIMYGCDVGPDRFLRGYRQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITRKWEAVHAAEQRRVYLEGRCDGLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPCGDGTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO: 343)，其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0204] HLA-A*0201(Y84C;A236C)

[0205] 在一些情况下，存在于本公开的多二硫键连接的TMMP(例如，双二硫键连接的TMMP)中的HLA-A重链多肽包含与以下HLA-A*0201(Y84C;A236C)氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列：GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFDSDAASQKMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKKVKAHSQTHRVDLGTLRGCYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRLYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPCGDGTFQKWA AVVVPS

GQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:341), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0206] HLA-A*0202 (Y84C;A236C)

[0207] 在一些情况下, 存在于本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 中的HLA-A重链多肽包含与以下HLA-A*0202 (Y84C;A236C) 氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFI
AVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGCYNQSEAGSHTVQRM
Y GCDVGS DWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKKHWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRLYLENG
KETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPCGDGTFQKWA AVVVP
S GQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:341), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0208] HLA-A*1101 (Y84C;A236C)

[0209] 在一些情况下, 存在于本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 中的HLA-A重链多肽包含与以下HLA-A*1101 (Y84C;A236C) 氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRFI
AVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDQETRNKAQSQTDRVDLGTLRGCYNQSE DGSHTIQIM
Y GCDVGP DGRFLRGYRQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHAAEQRAYLEGRCVEWLRRLYLENG
KETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPCGDGTFQKWA AVVVP
S GEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:344), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0210] HLA-A*2301 (Y84C;A236C)

[0211] 在一些情况下, 存在于本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 中的HLA-A重链多肽包含与以下HLA-A*2301 (Y84C;A236C) 氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:GSHSMRYFSTSVSRPGRGEPRFI
AVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDEETGKVKAH SQTDRNLRIALRCYNQSEAGSHTLQMMF
Y GCDVGS DGRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQITQRKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVDGLRRYLENG
KETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPCGDGTFQKWA AVVVP
S GEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:345), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0212] HLA-A*2402 (Y84C;A236C)

[0213] 在一些情况下, 存在于本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 中的HLA-A重链多肽包含与以下HLA-A*2402 (Y84C;A236C) 氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:GSHSMRYFSTSVSRPGRGEPRFI
AVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDEETGKVKAH SQTDRNLRIALRCYNQSEAGSHTLQMMF
Y GCDVGS DGRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVDGLRRYLENG
KETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPCGDGTFQKWA AVVVP
S GEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:346), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0214] HLA-A*2407 (Y84C;A236C)

[0215] 在一些情况下, 存在于本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 中的HLA-A重链多肽包含与以下HLA-A*2407 (Y84C;A236C) 氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:GSHSMRYFSTSVSRPGRGEPRFI
AVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDEETGKVKAH SQTDRNLRIALRCYNQSEAGSHTLQMMF
Y GCDVGS DGRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVDGLRRYLENG

KETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTFQKWA AVVPS
GEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO: 347), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0216] HLA-A*3303 (Y84C; A236C)

[0217] 在一些情况下, 存在于本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 中的HLA-A重链多肽包含与以下HLA-A*3303 (Y84C; A236C) 氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0218] GSHSMRYFTTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDRNTRNVK
AHSQIDRVDLGTLRG CYNQSEAGSHTIQMMYGCDVGS DGRFLRGYQQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITQ
RKWEAARVAEQRLAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALS FYP AEITLTWQRD
GEDQTQDTELVETRPCGDGTFQK WASVVVPSGQE QRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO: 348), 其中氨
基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0219] HLA-A*3401 (Y84C; A236C)

[0220] 在一些情况下, 存在于本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 中的HLA-A重链多肽包含与以下HLA-A*3401 (Y84C; A236C) 氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列: GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRFI
AVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDRNTRKVKAQSQTDRVDLGT LRG CYNQSE DGSHTIQRM Y
GCDVGP DGRFLRGYQQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITQRKWEAHEAEQWRAYLEGTCVEWLRRYLENG
KETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALS FYP AEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTFQK WASVVVPS
GQE QRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO: 349), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0221] HLA-B

[0222] 在一些情况下, 本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 包含:
a) 第一多肽, 所述第一多肽包含: i) WT1肽 (例如, 具有4个氨基酸至约25个氨基酸的WT1肽);
及ii) 第一MHC多肽, 其中所述第一多肽包含介于WT1肽与第一MHC多肽之间的肽接头, 其中
所述肽接头包含Cys残基, 且其中所述第一MHC多肽为包含引入Cys残基的氨基酸取代的 β 2M
多肽; 和b) 第二多肽, 所述第二多肽包含HLA-B I类MHC重链, 所述重链包含与以下氨基酸序
列具有至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨
基酸序列同一性的氨基酸序列: GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRFISVG YVDDTQFVRFDSDAASPREEPR A
PWIEQEGPEYWDRNTQIYKAQAQTDRESLRNLRG CYNQSEAGSHTLQSMYGCDVGP DGRLLRGHDQYAYDGKDYIA
LNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQRRAYLEGTCVEWLRRYLENGKDKLERADPPKTHVTHHPISDHEATL
RCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDRTFQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE P
(SEQ ID NO: 350), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys; 及c) 至少一种免疫调节多肽, 其
中所述第一多肽和/或所述第二多肽包含所述至少一个免疫调节多肽。在一些情况下, 肽接
头包含氨基酸序列GCGGS (SEQ ID NO: 318)。在一些情况下, 肽接头包含氨基酸序列GCGGS
(GGGS)_n (SEQ ID NO: 342), 其中n为1至10的整数。在一些情况下, β 2M多肽包含R12C取代。
举例来说, β 2M多肽可包含与以下氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%
或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列: IQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLL
KNGERIEKVEHSDLSFSKDSFYLLYYTEFTPTKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWDRDM (SEQ ID NO: 314), 其
中氨基酸12为Cys。所述至少一种免疫调节多肽可为对靶T细胞发挥活化/刺激作用或对靶T
细胞发挥抑制/抑制性 (suppressing/inhibitory) 作用的多肽。举例来说, 所述至少一种免

疫调节多肽可为细胞因子(例如,IL2多肽、IL7多肽、IL12多肽、IL15多肽、IL17多肽、IL21多肽、IL27多肽、IL-23多肽、TGF β 多肽等;且包括全部家族成员,例如IL17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、IL-17F、IL-17E)、4-1BBL多肽、ICOS-L多肽、OX-40L多肽、CD80多肽、CD86多肽(CD80和CD86也分别称为B7-1和B7-2)、CD40多肽、CD70多肽、JAG1(CD339)多肽、ICAM(CD54)多肽、PD-L1多肽、FasL多肽、PD-L2多肽、PD-1H(VISTA)多肽、ICOS-L(CD275)多肽、GITRL多肽、HVEM多肽、CXCL10多肽、CXCL9多肽、CXCL11多肽、CXCL13多肽、及CX3CL1多肽、半乳糖凝集素-9多肽、CD83多肽、CD30L多肽、HLA-G多肽、MICA多肽、MICB多肽、HVEM(CD270)多肽、淋巴毒素 β 受体多肽、3/TR6多肽、ILT3多肽、ILT4多肽、CXCL10多肽、CXCL9多肽、CXCL11多肽、CXCL13多肽或CX3CL1多肽。这些免疫调节多肽可为野生型多肽或野生型多肽的变体。在一些情况下,免疫调节多肽为活化(“刺激”)免疫调节多肽;例如,免疫调节多肽可对T细胞产生活化/刺激效应。活化免疫调节多肽的实例包括例如CD80、CD86、4-1BBL、OX40L、CD70、ICOS-L、CD40、ICAM(CD54)、IL2、IL7、IL12、IL15、IL17、IL21、IL27、IL23、GITRL、TGF β 及淋巴毒素 β 受体。在一些情况下,免疫调节多肽为抑制(“抑制性”)免疫调节多肽;例如,免疫调节多肽可对T细胞产生抑制/抑制性效应。抑制性免疫调节多肽的实例包括例如PD-1H、PD-L1、PD-L2、TGF β 、FasL、HVEM、半乳糖凝集素-9、ILT3及ILT4。视情形而定,TGF β 多肽可产生活化/刺激效应或抑制/抑制性效应。

[0223] 在一些情况下,所述至少一种免疫调节多肽为亲和力减小的变体,如本文别处所述。在一些情况下,第一多肽或第二多肽包含Ig Fc多肽。

[0224] 在一些情况下,本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)包含HLA-B I类重链多肽。在一些情况下,存在于本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)中的HLA-B重链多肽包含与图10A中描绘的HLA-B*0702、HLA-B*0801、HLA-B*1502、HLA-B*3802、HLA-B*4001、HLA-B*4601或HLA-B*5301氨基酸序列具有至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中HLA-B重链多肽包含Y84C和A236C取代。

[0225] HLA-B*0702(Y84C;A236C)

[0226] 在一些情况下,存在于本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)中的HLA-B重链多肽包含与以下HLA-B*0702(Y84C;A236C)氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0227] GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRFISVG YVDDTQFVRFDSDAASPREEPRAPWIEQEGPEYWDRNTQIYK
AQAQTDRESLRNLRGCYNQSEAGSHTLQSMYGCDVGP DGRLLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQ
RKWEAAREAEQRRAYLEGECEVWLRRLYENGKDKLERADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYP AEITLTWQRD
GEDQTQDTELVETRPCGDRTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:350),其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0228] HLA-B*0801(Y84C;A236C)

[0229] 在一些情况下,存在于本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)中的HLA-B重链多肽包含与以下HLA-B*0801(Y84C;A236C)氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0230] GSHSMRYFDTAMSRPGRGEPRFISVG YVDDTQFVRFDSDAASPREEPRAPWIEQEGPEYWDRNTQIFK
TNTQTDRESLRNLRGCYNQSEAGSHTLQSMYGCDVGP DGRLLRGHNQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQ

RKWEAARVAEQDRAYLEGTCVEWLRRYLENGKDTLERADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRD
GEDQTQDTELVETRPGDRTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:351), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0231] HLA-B*1502 (Y84C;A236C)

[0232] 在一些情况下, 存在于本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 中的HLA-B重链多肽包含与以下HLA-B*1502 (Y84C;A236C) 氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0233] GSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFDSDAASPRMAPRAPWIEQEGPEYWDRNTQISK
TNTQTYRESLRNLRGCYNQSEAGSHIIQRM YGCDVGP DGRLLRGYDQSAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQ
RKWEAAREAEQLRAYLEGLCVEWLRRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRD
GEDQTQDTELVETRPGDRTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:352), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0234] HLA-B*3802 (Y84C;A236C)

[0235] 在一些情况下, 存在于本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 中的HLA-B重链多肽包含与以下HLA-B*3802 (Y84C;A236C) 氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0236] GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRFISVG YVDDTQFVRFDSDAASPREEPRAPWIEQEGPEYWDRNTQICK
TNTQTYRENLR TALRCYNQSEAGSHTLQRM YGCDVGP DGRLLRGHNQFAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQ
RKWEAARVAEQLR TYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRD
GEDQTQDTELVETRPGDRTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:353), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0237] HLA-B*4001 (Y84C;A2346C)

[0238] 在一些情况下, 存在于本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 中的HLA-B重链多肽包含与以下HLA-B*4001 (Y84C;A236C) 氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0239] GSHSMRYFHTAMSRPGRGEPRFITVG YVDDTLFVRFDSDATSPRKEPRAPWIEQEGPEYWDRETQISK
TNTQTYRESLRNLRGCYNQSEAGSHTLQRM YGCDVGP DGRLLRGHNQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQISQ
RKLEAARVAEQLRAYLEGECEVEWLRRYLENGKDKLERADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRD
GEDQTQDTELVETRPGDRTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:354), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0240] HLA-B*4601 (Y84C;A236C)

[0241] 在一些情况下, 存在于本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 中的HLA-B重链多肽包含与以下HLA-B*4601 (Y84C;A236C) 氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0242] GSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFDSDAASPRMAPRAPWIEQEGPEYWDRETQKYK
RQAQTDVRSLRNLRGCYNQSEAGSHTLQRM YGCDVGP DGRLLRGHDQSAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQ
RKWEAAREAEQWRAYLEGLCVEWLRRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRD
GEDQTQDTELVETRPGDRTFQKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:355), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0243] HLA-B*5301 (Y84C;A236C)

[0244] 在一些情况下,存在于本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)中的HLA-B重链多肽包含与以下HLA-B*5301(Y84C;A236C)氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0245] GSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRFIAVGYYDDTQFVRFDSDAASPRTEPRAPWIEQEGPEYWDRTNQIFK
TNTQTYRENLRALRCYNQSEAGSHIIQRMYGCDLGPDRLLRGHDQSAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQ
RKWEAARVAEQLRAYLEGLCWEVLRRLRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRD
GEDQTQDTELVETRPGDRTFQKWAADVVPSPGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:356),其中氨
基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0246] HLA-C

[0247] 在一些情况下,本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)包含:
a) 第一多肽,所述第一多肽包含:i) WT-1肽(例如,具有4个氨基酸至约25个氨基酸的1WT-1肽);及ii) 第一MHC多肽,其中所述第一多肽包含介于WT-1肽与第一MHC多肽之间的肽接头,其中所述肽接头包含Cys残基,且其中所述第一MHC多肽为包含引入Cys残基的氨基酸取代的 β 2M多肽;和b) 第二多肽,其包含HLA-C I类MHC重链,所述重链包含与以下氨基酸序列具有至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:CSHSMRYFDTA VSRPGRGEPRFISVGYYDDTQFVRFDSDAASPRGEPRAPWVE
QEGPEYWDRETQNYKRQAQADRVSLRNLRGCYNQSEDSHTLQRMYGCDLGPDRLLRGYDQSAYDGKDYIALNED
LRSWTAADTAAQITQRKLEAARAAEQLRAYLEGTCWEVLRRLRYLENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATLRCWA
LGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPGDRTFQKWAADVVPSPGEEQRYTCHMQHEGLQEPLTLSEWP (SEQ
ID NO:357),其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys;及c) 至少一种免疫调节多肽,其中所
述第一多肽和/或所述第二多肽包含所述至少一种免疫调节多肽。在一些情况下,肽接头包
含氨基酸序列GCGGS (SEQ ID NO:318)。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列GCGGS
(GGGS)n (SEQ ID NO:342),其中n为1至10的整数。在一些情况下, β 2M多肽包含R12C取代。
举例来说, β 2M多肽可包含与以下氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%
或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:IQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLL
KNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDM (SEQ ID NO:314),其
中氨基酸12为Cys。所述至少一种免疫调节多肽可为对靶T细胞发挥活化/刺激作用或对靶T
细胞发挥抑制/抑制性(suppressing/inhibitory)作用的多肽。举例来说,所述至少一种免
疫调节多肽可为细胞因子(例如,IL2多肽、IL7多肽、IL12多肽、IL15多肽、IL17多肽、IL21多
肽、IL27多肽、IL-23多肽、TGF β 多肽等;且包括全部家族成员,例如IL17A、IL-17B、IL-17C、
IL-17D、IL-17E、IL-17F、IL-17E)、4-1BBL多肽、ICOS-L多肽、OX-40L多肽、CD80多肽、CD86多
肽(CD80和CD86也分别称为B7-1和B7-2)、CD40多肽、CD70多肽、JAG1 (CD339)多肽、ICAM
(CD540多肽、PD-L1多肽、FasL多肽、PD-L2多肽、PD-1H (VISTA)多肽、ICOS-L (CD275)多肽、
GITRL多肽、HVEM多肽、CXCL10多肽、CXCL9多肽、CXCL11多肽、CXCL13多肽、及CX3CL1多肽、半
乳糖凝集素-9多肽、CD83多肽、CD30L多肽、HLA-G多肽、MICA多肽、MICB多肽、HVEM (CD270)多
肽、淋巴毒素 β 受体多肽、3/ TR6多肽、ILT3多肽、ILT4多肽、CXCL10多肽、CXCL9多肽、CXCL11
多肽、CXCL13多肽或CX3CL1多肽。这些免疫调节多肽可为野生型多肽或野生型多肽的变体。
在一些情况下,免疫调节多肽为活化(“刺激”)免疫调节多肽;例如,免疫调节多肽可对T细

胞产生活化/刺激效应。活化免疫调节多肽的实例包括例如CD80、CD86、4-1BBL、OX40L、CD70、ICOS-L、CD40、ICAM(CD54)、IL2、IL7、IL12、IL15、IL17、IL21、IL27、IL23、GITRL、TGF β 及淋巴毒素 β 受体。在一些情况下,免疫调节多肽为抑制(“抑制性”)免疫调节多肽;例如,免疫调节多肽可对T细胞产生抑制/抑制性效应。抑制性免疫调节多肽的实例包括例如PD-1H、PD-L1、PD-L2、TGF β 、FasL、HVEM、半乳糖凝集素-9、ILT3及ILT4。视情形而定,TGF β 多肽可产生活化/刺激效应或抑制/抑制性效应。

[0248] 在一些情况下,所述至少一种免疫调节多肽为亲和力减小的变体,如本文别处所述。在一些情况下,第一多肽或第二多肽包含Ig Fc多肽。

[0249] 在一些情况下,本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)包含HLA-C I类重链多肽。在一些情况下,存在于本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)中的HLA-C重链多肽包含与图11A中描绘的HLA-C*0102、HLA-C*0303、HLA-C*0304、HLA-C*0401、HLA-C*0602、HLA-C*0701、HLA-C*0702、HLA-C*0801或HLA-C*1502氨基酸序列具有至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中HLA-C重链多肽包含Y84C和A236C取代。

[0250] HLA-C*01:02(Y84C;A236C)

[0251] 在一些情况下,存在于本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)中的HLA-C重链多肽包含与以下HLA-C*01:02(Y84C;A236C)氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0252] CSHSMKYFFTSVSRPGRGEPRLFISVG YVDDTQFVRFDSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQKYK RQAQTDRVSLRNLRGCYNQSEAGSHTLQWMCGLDGPDRLLRGYDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQ RKWEAAREAEQRRAYLEGTCVEWLRRLYENGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQWD GEDQTQDTELVETRPGDGTQKWAAMVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEPL(SEQ ID NO:358),其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0253] HLA-C*0303(Y84C;A236C)

[0254] 在一些情况下,存在于本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)中的HLA-C重链多肽包含与以下HLA-C*03:03(Y84C;A236C)氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0255] GSHSMRYFYTA VSRPGRGEPHFIAVG YVDDTQFVRFDSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQKYK RQAQTDRVSLRNLRGCYNQSEARSHIIQRM YGCDVGPDRLLRGYDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQ RKWEAAREAEQLRAYLEGLCWEWLRRLKNGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQWD GEDQTQDTELVETRPGDGTQKWAAMVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEPL(SEQ ID NO:359),其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0256] HLA-C*0304(Y84C;A236C)

[0257] 在一些情况下,存在于本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)中的HLA-C重链多肽包含与以下HLA-C*03:04(Y84C;A236C)氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0258] GSHSMRYFYTA VSRPGRGEPHFIAVG YVDDTQFVRFDSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQKYK RQAQTDRVSLRNLRGCYNQSEAGSHIIQRM YGCDVGPDRLLRGYDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQ RKWEAAREAEQLRAYLEGLCWEWLRRLKNGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQWD

GEDQTQDTELVETRPGDGTGFKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP (SEQ ID NO:360), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0259] HLA-C*0401 (Y84C;A236C)

[0260] 在一些情况下, 存在于本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 中的HLA-C重链多肽包含与以下HLA-C*04:01 (Y84C;A236C) 氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0261] GSHSMRYFSTSVSWPGRGEPRFIAVGYYDDTQFVRFSDAASPRGEPRPWVEQEGPEYWDRETQKYK
RQAQADRVNLRKLRGCYNQSEDGSHTLQRMFGCDLGPDRLLRGYNQFAYDGGDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQ
RKWEAAREAEQRRAYLEGTCVEWLRRLYENGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQWD
GEDQTQDTELVETRPGDGTGFKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWKP (SEQ ID NO:361), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0262] HLA-C*0602 (Y84C;A236C)

[0263] 在一些情况下, 存在于本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 中的HLA-C重链多肽包含与以下HLA-C*06:02 (Y84C;A236C) 氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0264] CSHSMRYFDTA VSRPGRGEPRFISVGYYDDTQFVRFSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQKYK
RQAQADRVNLRKLRGCYNQSEDGSHTLQWMYGCDLGPDRLLRGYDQSAYDGGDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQ
RKWEAAREAEQWRAYLEGTCVEWLRRLYENGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRD
GEDQTQDTELVETRPGDGTGFKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP (SEQ ID NO:362), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0265] HLA-C*0701 (Y84C;A236C)

[0266] 在一些情况下, 存在于本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 中的HLA-C重链多肽包含与以下HLA-C*07:01 (Y84C;A236C) 氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0267] CSHSMRYFDTA VSRPGRGEPRFISVGYYDDTQFVRFSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQNYK
RQAQADRVSLRNLRGYNQSEDGSHTLQRMYGCDLGPDRLLRGYDQSAYDGGDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQ
RKLEAARAAEQRLAYLEGTCVEWLRRLYENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRD
GEDQTQDTELVETRPGDGTGFKWAAVVVPSGEEQRYTCHMQHEGLQEPLTLRWEP (SEQ ID NO:357), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0268] HLA-C*0702 (Y84C;A236C)

[0269] 在一些情况下, 存在于本公开的多二硫键连接的TMMP (例如, 双二硫键连接的TMMP) 中的HLA-C重链多肽包含与以下HLA-C*07:02 (Y84C;A236C) 氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0270] CSHSMRYFDTA VSRPGRGEPRFISVGYYDDTQFVRFSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQKYK
RQAQADRVSLRNLRGYNQSEDGSHTLQRMSGCDLGPDRLLRGYDQSAYDGGDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQ
RKLEAARAAEQRLAYLEGTCVEWLRRLYENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRD
GEDQTQDTELVETRPGDGTGFKWAAVVVPSGEEQRYTCHMQHEGLQEPLTLRWEP (SEQ ID NO:404), 其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0271] HLA-C*0801 (Y84C;A236C)

[0272] 在一些情况下,存在于本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)中的HLA-C重链多肽包含与以下HLA-C*08:01(Y84C;A236C)氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0273] CSHSMRYFYTAVSRPGRGEPFRFIAVG YVDDTQFVQFDS DAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQKYK RQAQTDRVSLRNLRG CYNQSEAGSHTLQRM YGCDLGP DGRLLRGYNQFAYD GKDYIALNEDLR SWTAADTAAQITQ RKWEAARTAEQLRAYLEGT CVEWLRRLYENGK KTLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLR CWALGFYP AEITLTWQRD GEDQTQDTELVETR PCGDGTFQKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWGP (SEQ ID NO:363),其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0274] HLA-C*1502(Y84C;A236C)

[0275] 在一些情况下,存在于本公开的多二硫键连接的TMMP(例如,双二硫键连接的TMMP)中的HLA-C重链多肽包含与以下HLA-C*15:02(Y84C;A236C)氨基酸序列具有至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0276] CSHSMRYFYTAVSRPGRGEPHFIAVG YVDDTQFVRFDSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQNYK RQAQTDRVNLRLKLRG CYNQSEAGSHI IQRM YGCDLGP DGRLLRGHDQLAYD GKDYIALNEDLR SWTAADTAAQITQ RKWEAAREAEQLRAYLEGT CVEWLRRLYENGK ETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLR CWALGFYP AEITLTWQRD GEDQTQDTELVETR PCGDGTFQKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP (SEQ ID NO:364),其中氨基酸84为Cys且氨基酸236为Cys。

[0277] 支架多肽

[0278] TMMP可包含Fc多肽或可包含另一种适合的支架多肽。

[0279] 适合的支架多肽包括基于抗体之支架多肽及非基于抗体的支架。非基于抗体的支架包括例如白蛋白、XTEN(延长重组)多肽、运铁蛋白、Fc受体多肽、弹性蛋白样多肽(参见,例如Hassouneh等人(2012)Methods Enzymol.502:215;例如,包含五肽重复单元(Val-Pro-Gly-X-Gly;SEQ ID NO:59)的多肽,其中X为除了脯氨酸以外的任何氨基酸)、白蛋白结合多肽、丝样多肽(参见,例如Valluzzi等人(2002)Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.357:165),丝-弹性蛋白-样多肽(SELP;参见,例如Megeed等人(2002)Adv Drug Deliv Rev.54:1075)等。适合的XTEN多肽包括例如WO 2009/023270、WO 2010/091122、WO 2007/103515、US 2010/0189682及US 2009/0092582中公开的那些;还参见Schellenberger等人(2009)Nat Biotechnol.27:1186)。适合的白蛋白多肽包括例如人血清白蛋白。

[0280] 适合的支架多肽在一些情况下将为半衰期延长的多肽。因此,在一些情况下,与缺乏支架多肽的对照TMMP相比,适合的支架多肽增加TMMP的体内半衰期(例如,血清半衰期)。举例来说,在一些情况下,与缺乏支架多肽的对照TMMP相比,支架多肽使TMMP的体内半衰期(例如,血清半衰期)增加了至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约50%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍、至少约25倍、至少约50倍、至少约100倍或大于100倍。作为一个实例,在一些情况下,与缺乏Fc多肽的对照TMMP相比,Fc多肽使TMMP的体内半衰期(例如,血清半衰期)增加了至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约50%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍、至少约25倍、至少约50倍、至少约100倍或大于100倍。

[0281] Fc多肽

[0282] 在一些情况下,本公开的TMMP的第一多肽链和/或第二多肽链包含Fc多肽。本公开

的TMMP的Fc多肽可为人IgG1 Fc、人IgG2 Fc、人IgG3 Fc、人IgG4 Fc等。在一些情况下,Fc多肽包含与图5A-5G中描绘的Fc区的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,Fc区包含与图5A中描绘的人IgG1 Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,Fc区包含与图5A中描绘的人IgG1 Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;且包含N77取代;例如,Fc多肽包含N77A取代。在一些情况下,Fc多肽包含与图5A中描绘的人IgG2 Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;例如,Fc多肽包含与图5A中描绘的人IgG2 Fc多肽的氨基酸99-325具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,Fc多肽包含与图5A中描绘的人IgG3 Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;例如,Fc多肽包含与图5A中描绘的人IgG3 Fc多肽的氨基酸19-246具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,Fc多肽包含与图5B中描绘的人IgM Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;例如,Fc多肽包含与图5B中描绘的人IgM Fc多肽的氨基酸1-276具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,Fc多肽包含与图5C中描绘的人IgA Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;例如,Fc多肽包含与图5C中描绘的人IgA Fc多肽的氨基酸1-234具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0283] 在一些情况下,Fc多肽包含与图5C中描绘的人IgG4 Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,Fc多肽包含与图5C中描绘的人IgG4 Fc多肽的氨基酸100至327具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0284] 在一些情况下,IgG4 Fc多肽包含以下氨基酸序列:PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:365)。

[0285] 在一些情况下,存在于TMMP中的Fc多肽包含图5A中描绘的氨基酸序列(人IgG1 Fc)。在一些情况下,存在于TMMP中的Fc多肽包含图5A中描绘的氨基酸序列(人IgG1 Fc),例

外之处为以除天冬酰胺以外的氨基酸进行的N297取代(图5A中描绘的氨基酸序列的N77)。在一些情况下,存在于TMMP中的Fc多肽包含图5C中描绘的氨基酸序列(包含N297A取代的人IgG1 Fc,所述取代为图5A中描绘的氨基酸序列的N77)。在一些情况下,存在于TMMP中的Fc多肽包含图5A中描绘的氨基酸序列(人IgG1 Fc),例外之处为以除亮氨酸以外的氨基酸进行的L234取代(图5A中描绘的氨基酸序列的L14)。在一些情况下,存在于TMMP中的Fc多肽包含图5A中描绘的氨基酸序列(人IgG1 Fc),例外之处为以除亮氨酸以外的氨基酸进行的L235取代(图5A中描绘的氨基酸序列的L15)。

[0286] 在一些情况下,存在于TMMP中的Fc多肽包含图5E中描绘的氨基酸序列。在一些情况下,存在于TMMP中的Fc多肽包含图5F中描绘的氨基酸序列。在一些情况下,存在于TMMP中的Fc多肽包含图5G中描绘的氨基酸序列(包含L234A取代和L235A取代的人IgG1 Fc,这些取代对应于图5G中描绘的氨基酸序列的位置14和15)。在一些情况下,存在于TMMP中的Fc多肽包含图5A中描绘的氨基酸序列(人IgG1 Fc),例外之处为以除脯氨酸以外的氨基酸进行的P331取代(图5A中描绘的氨基酸序列的P111);在一些情况下,所述取代为P331S取代。在一些情况下,存在于TMMP中的Fc多肽包含图5A中描绘的氨基酸序列(人IgG1 Fc),例外之处为以除亮氨酸以外的氨基酸进行的L234和L235取代(图5A中描绘的氨基酸序列的L14和L15)。在一些情况下,存在于TMMP中的Fc多肽包含图5A中描绘的氨基酸序列(人IgG1 Fc),例外之处为以除亮氨酸以外的氨基酸进行的L234和L235取代(图5A中描绘的氨基酸序列的L14和L15)及以除脯氨酸以外的氨基酸进行的P331取代(图5A中描绘的氨基酸序列的P111)。在一些情况下,存在于TMMP中的Fc多肽包含图5E中描绘的氨基酸序列(包含L234F、L235E及P331S取代(对应于图5E中描绘的氨基酸序列的氨基酸位置14、15及111)的人IgG1 Fc)。在一些情况下,存在于TMMP中的Fc多肽为包含L234A和L235A取代(以A1a对图5A中描绘的氨基酸序列的L14和L15进行的取代)的IgG1 Fc多肽,如图5G所描绘。

[0287] 接头

[0288] 本公开的TMMP可包括一个或多个接头,其中所述一个或多个接头介于以下一个或多个之间:i) I类MHC多肽和Ig Fc多肽,其中此接头在本文中称为“L1”;ii) 免疫调节多肽和I类MHC多肽,其中此接头在本文中称为“L2”;iii) 第一免疫调节多肽和第二免疫调节多肽,其中此接头在本文中称为“L3”;iv) 肽抗原(“表位”)和I类MHC多肽;v) I类MHC多肽和二聚化多肽(例如,二聚化对的第一成员或第二成员);以及vi) 二聚化多肽(例如,二聚化对的第一成员或第二成员)和IgFc多肽。

[0289] 适合的接头(也称为“间隔子”)可容易选择且可具有许多适合长度中的任一个,诸如1个氨基酸至25个氨基酸、3个氨基酸至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸、或7个氨基酸至8个氨基酸。适合的接头长度可为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。在一些情况下,接头具有的长度为25个氨基酸至50个氨基酸,例如长度为25至30、30至35、35至40、40至45、或45至50个氨基酸。

[0290] 示例性接头包括甘氨酸聚合物($(G)_n$)、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:366)及 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:367),其中n为至少1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物及本领域中已知的其他柔性接头。可使用甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物;Gly和Ser皆相对未结构化,且因此可充当组分之间的中性系链。可使用

甘氨酸聚合物;甘氨酸甚至比丙氨酸显著更易进入phi-psi空间,且比具有更长侧链的残基受限少得多(参见Scheraga,Rev.Computational Chem.11173-142(1992))。示例性接头可包含氨基酸序列,包括但不限于GGSG(SEQ ID NO:368)、GGSGG(SEQ ID NO:369)、GSGSG(SEQ ID NO:370)、GSGGG(SEQ ID NO:371)、GGGSG(SEQ ID NO:372)、GSSSG(SEQ ID NO:373)等。示例性接头可包括例如Gly(Ser₄)_n(SEQ ID NO:374),其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GSSSS)_n(SEQ ID NO:375),其中n为4。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GSSSS)_n(SEQ ID NO:376),其中n为5。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:377),其中n为1。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:378),其中n为2。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:379),其中n为3。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:380),其中n为4。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:381),其中n为5。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:382),其中n为6。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:383),其中n为7,在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:384),其中n为8,在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:385),其中n为9,在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:386),其中n为10。在一些情况下,接头包含氨基酸序列AAAGG(SEQ ID NO:387)。

[0291] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP的第一多肽中的接头多肽所包括的半胱氨酸残基可与存在于本公开的TMMP的第二多肽中的半胱氨酸残基形成二硫键。在一些情况下,举例来说,适合的接头包含氨基酸序列GCGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:317)。作为另一实例,适合的接头可包含氨基酸序列GCGGS(G4S)_n(SEQ ID NO:315),其中n为1、2、3、4、5、6、7、8或9。举例来说,在一些情况下,接头包含氨基酸序列GCGGSGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:316)。作为另一实例,接头包含氨基酸序列GCGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:317)。

[0292] 表位

[0293] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的表位(递呈一个或多个表位的肽)为WT-1肽,例如,连同MHC一起向TCR递呈表位的WT-1肽。WT-1亚型的氨基酸序列呈现于图3A-3E中。递呈一个或多个表位的WT-1肽在本文中称为“WT-1肽”或“WT-1表位”。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表位可为与图3A-3E中任一描绘的WT-1氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的4至25个连续氨基酸(例如,4个氨基酸(aa)、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10-15aa、15-20aa、或20-25aa)的肽。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表位可为与图3A中描绘的WT-1氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的4至25个连续氨基酸(例如,4个氨基酸(aa)、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10-15aa、15-20aa、或20-25aa)的肽。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表位可为与图3B中描绘的WT-1氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的4至25个连续氨基酸(例如,4个氨基酸(aa)、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10-15aa、15-20aa、或20-25aa)的肽。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表位可为与图3C中描绘的WT-1氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的4至25个连续氨基酸(例如,4个氨基酸(aa)、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10-15aa、15-20aa、或20-25aa)的肽。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表

位可为与图3D中描绘的WT-1氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的4至25个连续氨基酸(例如,4个氨基酸(aa)、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10-15aa、15-20aa、或20-25aa)的肽。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表位可为与图3E中描绘的WT-1氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的4至25个连续氨基酸(例如,4个氨基酸(aa)、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10-15aa、15-20aa、或20-25aa)的肽。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表位的长度为6个氨基酸。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表位的长度为7个氨基酸。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表位的长度为8个氨基酸。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表位的长度为9个氨基酸。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表位的长度为10个氨基酸。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表位的长度为11个氨基酸。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表位的长度为6个氨基酸至25个氨基酸。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表位的长度为6个氨基酸至20个氨基酸。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表位的长度为7个氨基酸至25个氨基酸。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表位的长度为7个氨基酸至20个氨基酸。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1表位的长度为至少4个氨基酸,长度为至少6个氨基酸,或长度为至少7个氨基酸。

[0294] 存在于本公开的TMMP中的表位可具有的长度为约4个氨基酸至约25个氨基酸,例如,表位可具有的长度为4个氨基酸(aa)至10aa、10aa至15aa、15aa至20aa、或20aa至25aa。举例来说,存在于本公开的TMMP中的表位可具有的长度为4个氨基酸(aa)、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10aa、11aa、12aa、13aa、14aa、15aa、16aa、17aa、18aa、19aa、20aa、21aa、22aa、23aa、24aa或25aa。在一些情况下,存在于TMMP中的表位具有的长度为5个氨基酸至10个氨基酸,例如5aa、6aa、7aa、8aa、9aa或10aa。

[0295] 存在于本公开的TMMP中的WT-1表位为T细胞特异性结合的肽,即,表位由WT-1表位特异性T细胞特异性结合。表位特异性T细胞结合具有参考氨基酸序列的表位,但大体上不结合与参考氨基酸序列不同的表位。举例来说,表位特异性T细胞结合具有参考氨基酸序列的表位,且结合与参考氨基酸序列不同的表位,如果有的话,则其亲和力小于 10^{-6} M、小于 10^{-5} M或小于 10^{-4} M。表位特异性T细胞可结合对其具有特异性的表位,其亲和力为至少 10^{-7} M、至少 10^{-8} M、至少 10^{-9} M或至少 10^{-10} M。

[0296] 适于包含在本公开的TMMP中的WT-1肽的实例包括但不限于CMTWNQMNLGATLKG(SEQ ID NO:223)、WNQMNLGATLKGVA(SEQ ID NO:224)、CMTWNYMNLGATLKG(SEQ ID NO:225)、WNYMNLGATLKGVA(SEQ ID NO:226)、MTWNQMNLGATLKG(SEQ ID NO:227)、TWNMNLGATLKGVA(SEQ ID NO:228)、CMTWNLMNLGATLKG(SEQ ID NO:229)、MTWNLMNLGATLKG(SEQ ID NO:230)、TWNLMLGATLKGVA(SEQ ID NO:231)、WNLMLGATLKGVA(SEQ ID NO:232)、MNLGATLKG(SEQ ID NO:233)、MTWNYMNLGATLKG(SEQ ID NO:234)、TWNYMNLGATLKGVA(SEQ ID NO:235)、CMTWNQMNLGATLKGVA(SEQ ID NO:236)、CMTWNLMNLGATLKGVA(SEQ ID NO:237)、CMTWNYMNLGATLKGVA(SEQ ID NO:238)、GYLRNPTAC(SEQ ID NO:239)、GALRNPTAL(SEQ ID NO:240)、YALRNPTAC(SEQ ID NO:241)、GLLRNPTAC(SEQ ID NO:242)、RYRPHPGAL(SEQ ID NO:243)、YQRPHPGAL(SEQ ID NO:244)、RLRPHPGAL(SEQ ID NO:245)、RIRPHPGAL(SEQ ID NO:246)、QFPNHSFKHEDPMGQ(SEQ ID NO:247)、HSFKHEDPY(SEQ ID NO:248)、QFPNHSFKHEDPM

(SEQ ID NO:249)、QFPNHSFKHEDPY (SEQ ID NO:250)、KRPFMCAYPGCNK (SEQ ID NO:251)、KRPFMCAYPGCYK (SEQ ID NO:252)、FMCAYPGCY (SEQ ID NO:253)、FMCAYPGCK (SEQ ID NO:254)、KRPFMCAYPGCNKRY (SEQ ID NO:255)、SEKRPFMCAYPGCNK (SEQ ID NO:256)、KRPFMCAYPGCYKRY (SEQ ID NO:257)、NLMNLGATL (SEQ ID NO:258)、VLDFAPPGA (SEQ ID NO:259)、RMFPNAPYL (SEQ ID NO:260)、CMTWNQMN (SEQ ID NO:261)、CYTWNQMNL (SEQ ID NO:269)、NYMNLGATL (SEQ ID NO:263)、YMFPNAPYL (SEQ ID NO:264)、SLGEQQYSV (SEQ ID NO:265)、CMTWNQMNL (SEQ ID NO:266)及NQMNLGATL (SEQ ID NO:267)。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1肽为CMTWNQMN (SEQ ID NO:261)。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1肽为CYTWNQMNL (SEQ ID NO:269)。

[0297] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1肽递呈HLA-A*2402限制性表位。递呈HLA-A*2402限制性表位的WT-1肽包括例如CMTWNQMN (SEQ ID NO:261)、NYMNLGATL (SEQ ID NO:263) (WT-1 239-247;Q240Y)、CYTWNQMNL (SEQ ID NO:269) (WT-1 235-243)、CMTWNQMNL (SEQ ID NO:266) (WT-1 235-243)、NQMNLGATL (SEQ ID NO:267) (WT-1 239-247)及NLMNLGATL (SEQ ID NO:258) (WT-1 239-247;Q240L)。

[0298] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的WT-1肽递呈HLA-A*0201限制性表位。递呈HLA-A*0201限制性表位的WT-1肽包括例如VLDFAPPGA (SEQ ID NO:259) (WT-1 37-45)、RMFPNAPYL (SEQ ID NO:260) (WT-1 126-134)、YMFPNAPYL (SEQ ID NO:264) (WT-1 126-134;R126Y)、SLGEQQYSV (SEQ ID NO:265) (WT-1 187-195)及NLMNLGATL (SEQ ID NO:258) (WT-1 239-247;Q240L)。

[0299] HLA/肽结合测定

[0300] 给定肽(例如,WT-1肽)是否结合I类HLA(包含HLA重链和 β 2M多肽)及在结合至HLA复合物时是否可有效递呈表位至TCR可使用许多公知方法中的任一种来确定。测定包括结合测定和T细胞活化测定。

[0301] 基于细胞的结合测定

[0302] 作为一个实例,基于细胞的肽诱导稳定性测定可用于确定肽-HLA I类结合。在此测定中,允许目标肽结合至TAP缺陷型细胞,即具有与抗原加工(TAP)机构相关的缺陷型转运蛋白且因此具有更少表面I类分子的细胞。此类细胞包括例如人T2细胞系(T2 (174xCEM.T2;美国模式培养物保藏中心(ATCC)编号CRL-1992)。Henderson等人(1992) Science 255:1264。在未将胞质肽缺陷型TAP介导转运至内质网中的情况下,组装的I类复合物是结构上不稳定的,且在细胞表面上仅瞬时保留。然而,当T2细胞与能够结合I类的外源肽一起培育时,表面肽-HLA I类复合物为稳定的且可通过流动式细胞测量术,使用例如泛抗I类单克隆抗体来检测。通过添加肽使细胞表面上的肽-HLA复合物具有稳定性及随之而来的延长的寿命,由此验证了其身份。分析可使用流动式细胞测量术进行,例如其中pan-HLA I类抗体包含荧光标记。肽与HLA H链的各种等位基因形式的结合可通过基因修饰T2细胞以表达目标等位基因HLA H链来进行测试。

[0303] 以下为T2测定评定肽与HLA A*0201的结合的用途的非限制性实例。将T2细胞在细胞培养基中洗涤,且浓缩至 10^6 个细胞/ml。将目标肽在细胞培养基中制备且连续稀释,从而提供浓度200 μ M、100 μ M、20 μ M及2 μ M。将细胞与各肽稀释液1:1混合以得到200 μ L最终体积及100 μ M、50 μ M、10 μ M及1 μ M最终肽浓度。HLA A*0201结合肽、GILGFVFTL (SEQ ID NO:395)及非-

HLA A*0201-限制性肽、HPVGEADYF (SEQ ID NO:396) (HLA-B*3501) 分别作为阳性对照和阴性对照包括在内。将细胞/肽混合物保持在37℃5%CO₂下十分钟;接着在室温下培育过夜。随后将细胞在37℃下培育2小时且用荧光标记的抗人HLA抗体染色。接着将细胞用磷酸盐缓冲盐水洗涤两次且使用流动式细胞测量术分析。使用抗-HLA抗体染色的平均荧光强度(MFI)测量结合强度。

[0304] 生物化学结合测定

[0305] 可在无细胞的体外测定系统对HLA多肽(HLA重链多肽与β2M多肽的复合物)与目标肽的结合进行测试。举例来说,使标记的参考肽(例如,荧光标记)结合至HLA多肽(HLA重链多肽与β2M多肽之复合物),以形成HLA-参考肽复合物。对目标测试肽置换来自HLA-参考肽复合物的标记的参考肽的能力进行测试。相对结合亲和力被计算为置换所结合的参考肽所需的测试肽的量。参见,例如van der Burg等人(1995)Human Immunol.44:189。

[0306] 作为另一实例,目标肽可与HLA分子(HLA重链与β2M多肽的复合物)一起培育,且可以免疫测定形式测量HLA/肽复合物的稳定性。将目标肽稳定化HLA分子的能力与递呈已知T细胞表位的对照肽的能力相比较。稳定性的检测是基于使用抗HLA抗体所检测的HLA/肽复合物的天然构象的存在或不存在。参见,例如Westrop等人(2009)J.Immunol.Methods 341:76;Steinitz等人(2012)Blood 119:4073;及美国专利号9,205,144。

[0307] T细胞活化测定

[0308] 给定肽是否结合I类HLA(包含HLA重链和β2M多肽)及在结合至HLA复合物时是否可有效递呈表位至TCR可通过评定T细胞对肽-HLA复合物的反应来确定。可测量的T细胞反应包括例如干扰素-γ (IFN γ)产生、细胞毒性活性等。

[0309] ELISPOT测定

[0310] 适合的测定包括例如酶联免疫斑点(ELISPOT)测定。在此测定中,在递呈目标肽与HLA I类的复合物的抗原递呈细胞(APC)之后测量CD8⁺T细胞的IFN γ产生。将IFN γ的抗体固定多孔板的孔上。将APC添加至孔中,且将其与目标肽一起培育一段时间,使得该肽结合APC表面上的HLA I类。将该肽具有特异性的CD8⁺T细胞添加至孔中,且将该板培育约24小时。接着洗涤这些孔,且使用可检测标记的抗IFN γ抗体检测结合至固定的抗IFN γ抗体的任何IFN γ。可使用比色测定。举例来说,可检测标记的抗IFN γ抗体可为生物素标记的抗IFN γ抗体,其可使用例如缀合至碱性磷酸酶的链亲和素来检测。添加BCIP/NBT (5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸酯/硝基蓝四唑鎓)溶液,以使测定显色。IFN γ分泌T细胞的存在通过色斑来鉴定。阴性对照包括未与该肽接触的APC。可使用表达各种HLA H链等位基因的APC来确定目标肽是否有效结合至包含特定HLA H链的HLA I类分子。

[0311] 细胞毒性测定

[0312] 给定肽是否结合至特定HLA I类H链及在结合至包含H链的HLA I类复合物时是否可有效递呈表位至TCR也可使用细胞毒性测定来确定。细胞毒性测定涉及将靶细胞与细胞毒性CD8⁺T细胞一起培育。靶细胞在其表面上展示出包含目标肽的肽/HLA I类复合物及包含有待测试的HLA H链的HLA I类分子。靶细胞可被放射性标记,例如⁵¹Cr放射性标记。靶细胞是否有效递呈表位至细胞毒性CD8⁺T细胞上的TCR,从而由CD8⁺T细胞诱导针对靶细胞的细胞毒性活性,是通过测量⁵¹Cr从裂解的靶细胞的释放来确定。特异性细胞毒性可被计算为肽存在下细胞毒性活性的量减去肽不存在下细胞毒性活性的量。

[0313] 用肽-HLA四聚体检测抗原特异性T细胞

[0314] 作为另一实例,使用荧光或重金属标签生成肽-HLA复合物的多聚体(例如,四聚体)。接着可使用多聚体经由流动式细胞测量术(FACS)或质量细胞计数(CyTOF)鉴别及定量特异性T细胞。表位特异性T细胞之检测提供肽结合的HLA分子能够结合至抗原特异性T细胞子集上的特异性TCR的直接证据。参见,例如Klenerman等人(2002)Nature Reviews Immunol.2:263。

[0315] 免疫调节多肽

[0316] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的免疫调节多肽为野生型免疫调节多肽。在其他情况下,存在于本公开的TMMP中的免疫调节多肽为对共免疫调节多肽的亲合力与相应野生型免疫调节多肽对共免疫调节多肽的亲合力相比有所减小的变异免疫调节多肽。呈现出对共免疫调节结构域的减小亲和力的适合的免疫调节结构域可具有与野生型免疫调节结构域相比的1个氨基酸(aa)至20aa差异。举例来说,在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽的氨基酸序列与相应野生型免疫调节多肽相差1aa、2aa、3aa、4aa、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa或10aa。作为另一实例,在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽的氨基酸序列与相应野生型免疫调节多肽相差11aa、12aa、13aa、14aa、15aa、16aa、17aa、18aa、19aa或20aa。作为一个实例,在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括单一氨基酸取代。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括2个氨基酸取代(例如,不多于2个氨基酸取代)。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括3个氨基酸取代(例如,不多于3个氨基酸取代)。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括4个氨基酸取代(例如,不多于4个氨基酸取代)。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括5个氨基酸取代(例如,不多于5个氨基酸取代)。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括6个氨基酸取代(例如,不多于6个氨基酸取代)。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括7个氨基酸取代(例如,不多于7个氨基酸取代)。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括8个氨基酸取代(例如,不多于8个氨基酸取代)。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括9个氨基酸取代(例如,不多于9个氨基酸取代)。在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括10个氨基酸取代(例如,不多于10个氨基酸取代)。

[0317] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括11个氨基酸取代(例如,不多于11个氨基酸取代)。

[0318] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括12个氨基酸取代(例如,不多于12个氨基酸取代)。

[0319] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括13个氨基酸取代(例如,不多于13个氨基酸取代)。

[0320] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括14个氨基酸取代(例如,不多于14个氨基酸取代)。

[0321] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括15个氨基酸取代(例如,不多于15个氨基酸取代)。

[0322] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括16个氨基酸取代(例如,不多于16个氨基酸取代)。

[0323] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括17个氨基酸取代(例如,不多于17个氨基酸取代)。

[0324] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括18个氨基酸取代(例如,不多于18个氨基酸取代)。

[0325] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括19个氨基酸取代(例如,不多于19个氨基酸取代)。

[0326] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽与相应参考(例如野生型)免疫调节多肽相比包括20个氨基酸取代(例如,不多于20个氨基酸取代)。

[0327] 如上文所讨论,适于包含在本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽呈现出的对同源共免疫调节多肽的亲合力与相应野生型免疫调节多肽对同源共免疫调节多肽的亲合力相比有所减小。

[0328] 免疫调节多肽与同源共免疫调节多肽的示例性对包括但不限于:

[0329] a) 4-1BBL(免疫调节多肽)与4-1BB(同源共免疫调节多肽);

[0330] b) PD-L1(免疫调节多肽)与PD1(同源共免疫调节多肽);

[0331] c) IL-2(免疫调节多肽)与IL-2受体(同源共免疫调节多肽);

[0332] d) CD80(免疫调节多肽)与CD86(同源共免疫调节多肽);

[0333] e) CD86(免疫调节多肽)与CD28(同源共免疫调节多肽);

[0334] f) OX40L(CD252)(免疫调节多肽)与OX40(CD134)(同源共免疫调节多肽);

[0335] g) Fas配体(免疫调节多肽)与Fas(同源共免疫调节多肽);

[0336] h) ICOS-L(免疫调节多肽)与ICOS(同源共免疫调节多肽);

[0337] i) ICAM(免疫调节多肽)与LFA-1(同源共免疫调节多肽);

[0338] j) CD30L(免疫调节多肽)与CD30(同源共免疫调节多肽);

[0339] k) CD40(免疫调节多肽)与CD40L(同源共免疫调节多肽);

[0340] l) CD83(免疫调节多肽)与CD83L(同源共免疫调节多肽);

[0341] m) HVEM(CD270)(免疫调节多肽)与CD160(同源共免疫调节多肽);

[0342] n) JAG1(CD339)(免疫调节多肽)与Notch(同源共免疫调节多肽);

[0343] o) JAG1(免疫调节多肽)与CD46(同源共免疫调节多肽);

[0344] p) CD80(免疫调节多肽)与CTLA4(同源共免疫调节多肽);

[0345] q) CD86(免疫调节多肽)与CTLA4(同源共免疫调节多肽);及

[0346] r) CD70(免疫调节多肽)与CD27(同源共免疫调节多肽)。

[0347] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽对同源共免疫调节多

肽具有的结合亲和力为100nM至100 μ M。举例来说,在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽对同源共免疫调节多肽具有的结合亲和力为约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 μ M至约1 μ M至约5 μ M、约5 μ M至约10 μ M、约10 μ M至约15 μ M、约15 μ M至约20 μ M、约20 μ M至约25 μ M、约25 μ M至约50 μ M、约50 μ M至约75 μ M、或约75 μ M至约100 μ M。

[0348] 存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽呈现出对同源共免疫调节多肽的减小的亲和力。类似地,本公开的包含变异免疫调节多肽的TMMP呈现出对同源共免疫调节多肽的减小的亲和力。因此,举例来说,本公开的包含变异免疫调节多肽的TMMP对同源共免疫调节多肽具有的结合亲和力为100nM至100 μ M。举例来说,在一些情况下,本公开的包含变异免疫调节多肽的TMMP对同源共免疫调节多肽具有以下结合亲和力:约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 μ M至约1 μ M至约5 μ M、约5 μ M至约10 μ M、约10 μ M至约15 μ M、约15 μ M至约20 μ M、约20 μ M至约25 μ M、约25 μ M至约50 μ M、约50 μ M至约75 μ M、或约75 μ M至约100 μ M。

[0349] 如图19示意性示出,免疫调节多肽(即,一种或多种免疫调节多肽)可存在于本公开的TMMP的多个位置中的任一个处。图19描绘变异IL-2多肽的两个副本的位置;然而,免疫调节多肽可为如本文所述的多种免疫调节多肽中的任一种。如图19所描绘,免疫调节多肽可:1)在I类MHC重链的N端;2)在I类MHC重链的C端和Ig Fc多肽的N端;换句话说,介于I类MHC重链与Ig Fc多肽之间;3)在Ig Fc多肽的C端;4)在肽表位的N端;或5)在 β 2M多肽的C端。

[0350] PD-L1变体

[0351] 作为一非限制性实例,在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽为变体PD-L1多肽。野生型PD-L1结合至PD1。

[0352] 野生型人PD-L1多肽可包含以下氨基酸序列:MRIFAVFIFM TYWHLNNAFT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRLIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVIPGNI LNVSIIKICLT LSPST(SEQ ID NO:1)。

[0353] 野生型人PD-L1胞外结构域可包含以下氨基酸序列:FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRLIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVIPGNI LNVSIIKI(SEQ ID NO:2)。

[0354] 野生型PD-1多肽可包含以下氨基酸序列:PGWFLDSPDR PWNPTFSPA LLVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWMYR SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCFRFVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPSMGSTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL(SEQ ID NO:3)。在一些情况下,在本公开的TMMP包含变体PD-L1多肽时,“同源共免疫调节多肽”为包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的PD-1多肽。

[0355] 在一些情况下,变体PD-L1多肽呈现出与PD-1(例如,包含SEQ ID NO:3中列出的氨

氨基酸序列的PD-1多肽)的结合亲和力与包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽的结合亲和力相比有所减小。举例来说,在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽结合PD-1(例如,包含SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列的PD-1多肽)的结合亲和力比包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列的PD-L1多肽的结合亲和力小至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、小至少50%、小至少55%、小至少60%、小至少65%、小至少70%、小至少75%、小至少80%、小至少85%、小至少90%、小至少95%或小大于95%。

[0356] 在一些情况下,变体PD-L1多肽对PD-1具有的结合亲和力为1nM至1mM。在一些情况下,本公开的变体PD-L1多肽对PD-1具有的结合亲和力为100nM至100μM。作为另一实例,在一些情况下,变体PD-L1多肽对PD1(例如,包含SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列的PD1多肽)具有的结合亲和力为约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1μM至约1μM至约5μM、约5μM至约10μM、约10μM至约15μM、约15μM至约20μM、约20μM至约25μM、约25μM至约50μM、约50μM至约75μM、或约75μM至约100μM。

[0357] 在一些情况下,变体PD-L1多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列相比具有单一氨基酸取代。在一些情况下,变体PD-L1多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列相比具有2至10个氨基酸取代。在一些情况下,变体PD-L1多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列相比具有2个氨基酸取代。在一些情况下,变体PD-L1多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列相比具有3个氨基酸取代。在一些情况下,变体PD-L1多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列相比具有4个氨基酸取代。在一些情况下,变体PD-L1多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列相比具有5个氨基酸取代。在一些情况下,变体PD-L1多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列相比具有6个氨基酸取代。在一些情况下,变体PD-L1多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列相比具有7个氨基酸取代。在一些情况下,变体PD-L1多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列相比具有8个氨基酸取代。在一些情况下,变体PD-L1多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列相比具有9个氨基酸取代。在一些情况下,变体PD-L1多肽与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中列出的PD-L1氨基酸序列相比具有10个氨基酸取代。

[0358] 适合的PD-L1变体包括一种多肽,其包含与以下氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0359] FT VTPKXLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVY WEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNA ALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKIN QR ILVVDPTSE HELTCQAEgy PKAEVIWTSS DHQVLGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAE LVIPGNI LNVSIKI (SEQ ID NO:52),其中X为除了Asp以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala。在一些情况下,X为Arg。

[0360] 适合的PD-L1变体包括一种多肽,其包含与以下氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0361] FT VTPKDLVYV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALXVY WEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNA ALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKIN QR ILVVDPTSE HELTCQAEY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAE LVIPGNI LNVSIIKI (SEQ ID NO:53), 其中X为除了Ile以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Asp。

[0362] 适合的PD-L1变体包括一种多肽,其包含与以下氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0363] FT VTPKDLVYV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVY WEME DKNIIQFVHG EXDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNA ALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKIN QR ILVVDPTSE HELTCQAEY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAE LVIPGNI LNVSIIKI (SEQ ID NO:54), 其中X为除了Glu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Arg。

[0364] CD80变体

[0365] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽为变体CD80多肽。野生型CD80结合至CD28。野生型CD80还结合至CD86。

[0366] 人CD80的胞外结构域的野生型氨基酸序列可为如下:

[0367] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSV EELA QTRIIWQKEK KM VLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGYE CVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRR I ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SS KLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN (SEQ ID NO:4)。

[0368] 野生型CD28氨基酸序列可为如下:MLRLLLALNL FPSIQVTG NK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSK KYSYNLFSRE FRASLHKGL D SAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLL Q NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR SKR SRLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS (SEQ ID NO:5)。在一些情况下,在本公开的TMMP包含变体CD80多肽时,“同源共免疫调节多肽”为包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的CD28多肽。

[0369] 野生型CD28氨基酸序列可为如下:MLRLLLALNL FPSIQVTG NK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSW KHLCPSP LFP GPSKPFWVL V VVGGLACYS LLVTVAFIIF WVRSKRSRLL HSDYMNMTPR RPGPTRKHYQ PYAPPRDFAA YRS (SEQ ID NO:6)

[0370] 野生型CD28氨基酸序列可为如下:MLRLLLALNL FPSIQVTG KH LCPSP LFPGP SKPFWVLVVV GVLACYSLL VTVAFIIFWV RSKRSRLLHS DYMNMTPRRP GPTRKHYQPY APPRDFAAYRS (SEQ ID NO:7)。

[0371] 在一些情况下,变体CD80多肽表现出对CD28的结合亲和力与包含SEQ ID NO:4中列出的氨基酸序列的CD80多肽对CD28的结合亲和力相比有所减小。举例来说,在一些情况下,变体CD80多肽结合CD28的结合亲和力比包含SEQ ID NO:4中列出的氨基酸序列的CD80多肽对CD28(例如,包含SEQ ID NO:5、6或7中的一个列出的氨基酸序列的CD28多肽)的结合亲和力小至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、小至少50%、小至少55%、小至少60%、小至少65%、小至少70%、小至少75%、小至少80%、小至少85%、小至少90%、小至少95%或小大于95%。

[0372] 在一些情况下,变体CD80多肽对CD28具有的结合亲和力为100nM至100μM。作为另一实例,在一些情况下,本公开的变体CD80多肽对CD28(例如,包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中列出的氨基酸序列的CD28多肽)具有的结合亲和力为约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1μM至约1μM至约5μM、约5μM至约10μM、约10μM至约15μM、约15μM至约20μM、约20μM至约25μM、约25μM至约50μM、约50μM至约75μM、或约75μM至约100μM。

[0373] 在一些情况下,变体CD80多肽与SEQ ID NO:4中列出的CD80氨基酸序列相比具有单一氨基酸取代。在一些情况下,变体CD80多肽与SEQ ID NO:4中列出的CD80氨基酸序列相比具有2至10个氨基酸取代。在一些情况下,变体CD80多肽与SEQ ID NO:4中列出的CD80氨基酸序列相比具有2个氨基酸取代。在一些情况下,变体CD80多肽与SEQ ID NO:4中列出的CD80氨基酸序列相比具有3个氨基酸取代。在一些情况下,变体CD80多肽与SEQ ID NO:4中列出的CD80氨基酸序列相比具有4个氨基酸取代。在一些情况下,变体CD80多肽与SEQ ID NO:4中列出的CD80氨基酸序列相比具有5个氨基酸取代。在一些情况下,变体CD80多肽与SEQ ID NO:4中列出的CD80氨基酸序列相比具有6个氨基酸取代。在一些情况下,变体CD80多肽与SEQ ID NO:4中列出的CD80氨基酸序列相比具有7个氨基酸取代。在一些情况下,变体CD80多肽与SEQ ID NO:4中列出的CD80氨基酸序列相比具有8个氨基酸取代。在一些情况下,变体CD80多肽与SEQ ID NO:4中列出的CD80氨基酸序列相比具有9个氨基酸取代。在一些情况下,变体CD80多肽与SEQ ID NO:4中列出的CD80氨基酸序列相比具有10个氨基酸取代。

[0374] 适合的CD80变体包括一种多肽,其包含与以下氨基酸序列中的任一个具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0375] VIHVTK EVKEVATLSC GHXVSVEELA QTRIIYWQKEK KM VLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGYE CVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRR I ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SS KLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:55),其中X为除了Asn以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0376] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVSEELA QTRIIYWQKEK KM VLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITXNLS IVILALRPSD EGYE CVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRR I ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SS KLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:56),其中X为除了Asn以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0377] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVSEELA QTRIIYWQKEK KM VLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS XVILALRPSD EGTY ECVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIR RI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV S SKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:57),其中X为除了Ile以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0378] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVSEELA QTRIIYWQKEK KM VLTMMSGD MNIWPEYKNR

TIFDITNNLS IVILALRPSD EGYE CVVLX YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRR
I ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SS KLDFNMTT NHSFMCLIKY
GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:58),其中X为除了Lys以外的任何氨基酸。在一些
情况下,X为Ala;

[0379] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIWQKEK KM VLTMMSGD MNIWPEYKNR
TIFDITNNLS IVILALRPSD EGYE CVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRR
I ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS XDPETELYAV SS KLDFNMTT NHSFMCLIKY
GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:60),其中X为除了Gln以外的任何氨基酸。在一些
情况下,X为Ala;

[0380] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIWQKEK KM VLTMMSGD MNIWPEYKNR
TIFDITNNLS IVILALRPSD EGYE CVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRR
I ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QXPETELYAV SS KLDFNMTT NHSFMCLIKY
GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:61),其中X为除了Asp以外的任何氨基酸。在一些
情况下,X为Ala;

[0381] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEEXA QTRIWQKEK KM VLTMMSGD MNIWPEYKNR
TIFDITNNLS IVILALRPSD EGYE CVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRR
I ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SS KLDFNMTT NHSFMCLIKY
GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:62),其中X为除了Leu以外的任何氨基酸。在一些
情况下,X为Ala;

[0382] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIXWQKEK KM VLTMMSGD MNIWPEYKNR
TIFDITNNLS IVILALRPSD EGYE CVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRR
I ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SS KLDFNMTT NHSFMCLIKY
GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:63),其中X为除了Tyr以外的任何氨基酸。在一些
情况下,X为Ala;

[0383] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIW_XKEK KM VLTMMSGD MNIWPEYKNR
TIFDITNNLS IVILALRPSD EGYE CVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRR
I ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SS KLDFNMTT NHSFMCLIKY
GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:64),其中X为除了Gln以外的任何氨基酸。在一些
情况下,X为Ala;

[0384] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIWQKEK K_X VLTMMSGD MNIWPEYKNR
TIFDITNNLS IVILALRPSD EGYE CVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRR
I ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SS KLDFNMTT NHSFMCLIKY
GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:65),其中X为除了Met以外的任何氨基酸。在一些
情况下,X为Ala;

[0385] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIWQKEK KM XLTMMSGD MNIWPEYKNR
TIFDITNNLS IVILALRPSD EGYE CVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRR
I ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SS KLDFNMTT NHSFMCLIKY
GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:66),其中X为除了Val以外的任何氨基酸。在一些
情况下,X为Ala;

[0386] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK KM VLTMMSGD MNXWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTY ECVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIR RI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV S SKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:67),其中X为除了Ile以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0387] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK KM VLTMMSGD MNIWPEXKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTYE CVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRR I ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SS KLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:68),其中X为除了Tyr以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0388] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK KM VLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFXITNNLS IVILALRPSD EGTYE CVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRR I ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV SS KLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:69),其中X为除了Asp以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0389] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK KM VLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTYE CVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DXPTPSISDF EIPTSNIR RI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV S SKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:70),其中X为除了Phe以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0390] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK KM VLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTYE CVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRR I ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVX QDPETELYAV SS KLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:71),其中X为除了Ser以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;且

[0391] VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA QTRIIYWQKEK KM VLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTYE CVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTXSISDF EIPTSNIR RI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV S SKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DN(SEQ ID NO:72),其中X为除了Pro以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala。

[0392] CD86变体

[0393] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽为变异CD86多肽。野生型CD86结合至CD28。在一些情况下,在本公开的TMMP包含变异CD86多肽时,“同源共免疫调节多肽”为包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的CD28多肽。

[0394] 野生型人CD86的全胞外结构域的氨基酸序列可为如下:APLKIQAYFNETADLPCQFAN SQNQSLSELVVFWDQDENLVLNEVYLGEKFDVSHSKYMNRTSFDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCI IHHKKPTGM IRIHQMNSELSVLNFSQPEIVPISNITENVYINLTCSIIHGYPEPKKMSVLLRTKNSTIEYDGMQKSQDNVTEL YDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPPPPDHIP (SEQ ID NO:8)。

[0395] 野生型人CD86的IgV结构域的氨基酸序列可为如下:APLKIQAYFNETADLPCQFANSQN

QSLSELVVFWDQENLVLNE VYLGKEKFDSVH SKYMNRTSFDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCII
HHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (SEQ ID NO:9)。

[0396] 在一些情况下,变异CD86多肽呈现出对CD28的结合亲和力与包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9中列出的氨基酸序列的CD86多肽对CD28的结合亲和力相比有所减小。举例来说,在一些情况下,变异CD86多肽结合CD28的结合亲和力比包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9中列出的氨基酸序列的CD86多肽对CD28(例如,包含SEQ ID NO:5、6或7中的一个列出的氨基酸序列的CD28多肽)的结合亲和力小至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、小至少50%、小至少55%、小至少60%、小至少65%、小至少70%、小至少75%、小至少80%、小至少85%、小至少90%、小至少95%或小大于95%。

[0397] 在一些情况下,变异CD86多肽对CD28具有的结合亲和力为100nM至100μM。作为另一实例,在一些情况下,本公开的变异CD86多肽对CD28(例如,包含SEQ ID NO:5、6或7中的一个列出的氨基酸序列的CD28多肽)具有的结合亲和力为约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1μM至约1μM至约5μM、约5μM至约10μM、约10μM至约15μM、约15μM至约20μM、约20μM至约25μM、约25μM至约50μM、约50μM至约75μM、或约75μM至约100μM。

[0398] 在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:8中列出的CD86氨基酸序列相比具有单一氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:8中列出的CD86氨基酸序列相比具有2至10个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:8中列出的CD86氨基酸序列相比具有2个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:8中列出的CD86氨基酸序列相比具有3个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:8中列出的CD86氨基酸序列相比具有4个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:8中列出的CD86氨基酸序列相比具有5个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:8中列出的CD86氨基酸序列相比具有6个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:8中列出的CD86氨基酸序列相比具有7个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:8中列出的CD86氨基酸序列相比具有8个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:8中列出的CD86氨基酸序列相比具有9个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:8中列出的CD86氨基酸序列相比具有10个氨基酸取代。

[0399] 在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:9中列出的CD86氨基酸序列相比具有单一氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:9中列出的CD86氨基酸序列相比具有2至10个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:9中列出的CD86氨基酸序列相比具有2个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:9中列出的CD86氨基酸序列相比具有3个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:9中列出的CD86氨基酸序列相比具有4个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:9中列出的CD86氨基酸序列相比具有5个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:9中列出的CD86氨基酸序列相比具有6个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:9中列出的CD86氨基酸序列相比具有7个氨基酸取代。在一些情况下,变

异CD86多肽与SEQ ID NO:9中列出的CD86氨基酸序列相比具有8个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:9中列出的CD86氨基酸序列相比具有9个氨基酸取代。在一些情况下,变异CD86多肽与SEQ ID NO:9中列出的CD86氨基酸序列相比具有10个氨基酸取代。

[0400] 适合的CD86变体包括一种多肽,其包含与以下氨基酸序列中的任一个具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0401] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHISKYMXRTSFDS
SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLNFSQPEIVPISNITENVYINLTCSIIHGYPEPK
KMSVLLRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSPFSIELEDPPPP
DHIP (SEQ ID NO:73),其中X为除了Asn以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0402] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHISKYMNRTSFXSD
SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLNFSQPEIVPISNITENVYINLTCSIIHGYPEPK
KMSVLLRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSPFSIELEDPPPP
DHIP (SEQ ID NO:74),其中X为除了Asp以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0403] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHISKYMNRTSFDS
SXTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLNFSQPEIVPISNITENVYINLTCSIIHGYPEPK
KMSVLLRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSPFSIELEDPPPP
DHIP (SEQ ID NO:75),其中X为除了Trp以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0404] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHISKYMNRTSFDS
SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHXKKPTGMIRIHQMNSELSVLNFSQPEIVPISNITENVYINLTCSIIHGYPEPK
KMSVLLRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSPFSIELEDPPPP
DHIP (SEQ ID NO:76),其中X为除了His以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0405] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHISKYMXRTSFDS
SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (SEQ ID NO:77),其中X为除了Asn以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0406] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHISKYMNRTSFXSD
SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (SEQ ID NO:78),其中X为除了Asp以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0407] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHISKYMNRTSFDS
SXTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (SEQ ID NO:79),其中X为除了Trp以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0408] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHISKYMNRTSFDS
SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHXKKPTGMIRIHQMNSELSVL (SEQ ID NO:80),其中X为除了His以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0409] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLXLNEVYLGKEKFDSVHISKYMNRTSFDS
SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLNFSQPEIVPISNITENVYINLTCSIIHGYPEPK
KMSVLLRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSPFSIELEDPPPP
DHIP (SEQ ID NO:81),其中X为除了Val以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0410] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLXLNEVYLGKEKFDSVHISKYMNRTSFDS

SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (SEQ ID NO:82), 其中X为除了Val以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0411] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVVFWDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSFDSD
SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANSQPEIVPISNITENVYINLTCSIIHGYPEPK
KMSVLLRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPPPP
DHIP (SEQ ID NO:83), 其中X为除了Gln以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0412] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVVFWDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSFDSD
SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (SEQ ID NO:84), 其中X为除了Gln以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0413] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVXXWDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSFDSD
SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANSQPEIVPISNITENVYINLTCSIIHGYPEPK
KMSVLLRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPPPP
DHIP (SEQ ID NO:85), 其中X为除了Phe以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0414] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVXXWDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSFDSD
SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (SEQ ID NO:86), 其中X为除了Phe以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0415] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSFDSD
SWTXRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANSQPEIVPISNITENVYINLTCSIIHGYPEPK
KMSVLLRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPPPP
DHIP (SEQ ID NO:87), 其中X为除了Leu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0416] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSFDSD
SWTXRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (SEQ ID NO:88), 其中X为除了Leu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0417] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSKXMNRTSFDSD
SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVLANSQPEIVPISNITENVYINLTCSIIHGYPEPK
KMSVLLRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPPPP
DHIP (SEQ ID NO:89), 其中X为除了Tyr以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0418] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSKXMNRTSFDSD
SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSELSVL (SEQ ID NO:90), 其中X为除了Tyr以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0419] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMXRTSFDSD
SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHXKKPTGMIRIHQMNSELSVLANSQPEIVPISNITENVYINLTCSIIHGYPEPK
KMSVLLRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPPPP
DHIP (SEQ ID NO:91), 其中第一X为除了Asn以外的任何氨基酸且第二X为除了His以外的任何氨基酸。在一些情况下,第一X和第二X两者皆为Ala;

[0420] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMXRTSFDSD
SWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHXKKPTGMIRIHQMNSELSVL (SEQ ID NO:92), 其中第一X为除了Asn以外的任何氨基酸且第二X为除了His以外的任何氨基酸。在一些情况下,第一X和第二X两者皆为Ala;

[0421] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSFX₁S
DSWTLRLHNLQIKDKGLYQCI IHX₂KKPTGMIRIHQMNSELSVLNFSQPEIVPISNITENVYINLTCSIIHGYPE
PKKMSVLLRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPQP
PPDHIP (SEQ ID NO:93), 其中X₁为除了Asp以外的任何氨基酸且X₂为除了His以外的任何氨基酸。在一些情况下,X₁为Ala且X₂为Ala;

[0422] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMNRTSFX₁S
DSWTLRLHNLQIKDKGLYQCI IHX₂KKPTGMIRIHQMNSELSVL (SEQ ID NO:94), 其中第一X为除了Asn以外的任何氨基酸且第二X为除了His以外的任何氨基酸。在一些情况下,第一X和第二X两者皆为Ala;

[0423] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMX₁RTSFX₂S
DSWTLRLHNLQIKDKGLYQCI IHX₃KKPTGMIRIHQMNSELSVLNFSQPEIVPISNITENVYINLTCSIIHGYPE
PKKMSVLLRTKNSTIEYDGIMQKSQDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPQP
PPDHIP (SEQ ID NO:95), 其中X₁为除了Asn以外的任何氨基酸,X₂为除了Asp以外的任何氨基酸,且X₃为除了His以外的任何氨基酸。在一些情况下,X₁为Ala,X₂为Ala,且X₃为Ala;且

[0424] APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDSVHSKYMX₁RTSFX₂S
DSWTLRLHNLQIKDKGLYQCI IHX₃KKPTGMIRIHQMNSELSVL (SEQ ID NO:96), 其中X₁为除了Asn以外的任何氨基酸,X₂为除了Asp以外的任何氨基酸,且X₃为除了His以外的任何氨基酸。在一些情况下,X₁为Ala,X₂为Ala,且X₃为Ala。

[0425] 4-1BBL变体

[0426] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽为变异4-1BBL多肽。野生型4-1BBL结合至4-1BB (CD137)。

[0427] 野生型4-1BBL氨基酸序列可为如下:MEYASDASLD PEAPWP PAPR ARACRVLPWA
LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSG ARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQ
NV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAG V YYVFFQLELR RVVAGEGSGS
VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA R ARHAWQLTQ
GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:10)。

[0428] 在一些情况下,变异4-1BBL多肽为人4-1BBL的肿瘤坏死因子 (TNF) 同源结构域 (THD) 的变体。

[0429] 人4-1BBL的THD的野生型氨基酸序列可为例如如下SEQ ID NO:11-13中的一个:

[0430] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:11)。

[0431] D PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAG VSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGS GS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:12)。

[0432] D PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAG VSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGS GS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPA (SEQ ID NO:13)。

[0433] 野生型4-1BB氨基酸序列可为如下:MGNSCYNIVA TLLLVLN FER TRSLQDPCSN

CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR TCDICRQCKG VFRTKRCSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS
M CEQDCKQGQ ELTKKGCKDC CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LD GKSVLVNG TKERDVVCGP
SPADLSPGAS SVTPPAPARE PGHS PQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPF
MR PVQTTQEEDG CSCRFPEDD GGCEL (SEQ ID NO:14)。在一些情况下,在本公开的TMMP包含
变异4-1BBL多肽时,“同源共免疫调节多肽”为包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的4-1BB多肽。

[0434] 在一些情况下,变异4-1BBL多肽呈现出对4-1BB的结合亲和力与包含SEQ ID NO:10-13中的一个列出的氨基酸序列的4-1BBL多肽的结合亲和力相比有所减小。举例来说,在一些情况下,当在相同条件下测定时,本公开的变异4-1BBL多肽结合4-1BB的结合亲和力比包含SEQ ID NO:10-13中的一个列出的氨基酸序列的4-1BBL多肽对4-1BB多肽(例如,包含SEQ ID NO:14中列出的氨基酸序列的4-1BB多肽)的结合亲和力小至少10%、小至少15%、小至少20%、小至少25%、小至少30%、小至少35%、小至少40%、小至少45%、小至少50%、小至少55%、小至少60%、小至少65%、小至少70%、小至少75%、小至少80%、小至少85%、小至少90%、小至少95%或小大于95%。

[0435] 在一些情况下,变异4-1BBL多肽对4-1BB具有的结合亲和力为100nM至100μM。作为另一实例,在一些情况下,变异4-1BBL多肽对4-1BB(例如,包含SEQ ID NO:14中列出的氨基酸序列的4-1BB多肽)具有的结合亲和力为约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1μM、约1μM至约5μM、约5μM至约10μM、约10μM至约15μM、约15μM至约20μM、约20μM至约25μM、约25μM至约50μM、约50μM至约75μM、或约75μM至约100μM。

[0436] 在一些情况下,变异4-1BBL多肽与SEQ ID NO:10-13中的一个列出的4-1BBL氨基酸序列相比具有单一氨基酸取代。在一些情况下,变异4-1BBL多肽与SEQ ID NO:10-13中的一个列出的4-1BBL氨基酸序列相比具有2至10个氨基酸取代。在一些情况下,变异4-1BBL多肽与SEQ ID NO:10-13中的一个列出的4-1BBL氨基酸序列相比具有2个氨基酸取代。在一些情况下,变异4-1BBL多肽与SEQ ID NO:10-13中的一个列出的4-1BBL氨基酸序列相比具有3个氨基酸取代。在一些情况下,变异4-1BBL多肽与SEQ ID NO:10-13中的一个列出的4-1BBL氨基酸序列相比具有4个氨基酸取代。在一些情况下,变异4-1BBL多肽与SEQ ID NO:10-13中的一个列出的4-1BBL氨基酸序列相比具有5个氨基酸取代。在一些情况下,变异4-1BBL多肽与SEQ ID NO:10-13中的一个列出的4-1BBL氨基酸序列相比具有6个氨基酸取代。在一些情况下,变异4-1BBL多肽与SEQ ID NO:10-13中的一个列出的4-1BBL氨基酸序列相比具有7个氨基酸取代。在一些情况下,变异4-1BBL多肽与SEQ ID NO:10-13中的一个列出的4-1BBL氨基酸序列相比具有8个氨基酸取代。在一些情况下,变异4-1BBL多肽与SEQ ID NO:10-13中的一个列出的4-1BBL氨基酸序列相比具有9个氨基酸取代。在一些情况下,变异4-1BBL多肽与SEQ ID NO:10-13中的一个列出的4-1BBL氨基酸序列相比具有10个氨基酸取代。

[0437] 适合的4-1BBL变体包括一种多肽,其包含与以下氨基酸序列中的任一个具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0438] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYXEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:97),其中X为除了

Lys以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0439] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWXLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:98),其中X为除了
Gln以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0440] PAGLLDLRQG XFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:99),其中X为除了
Met以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0441] PAGLLDLRQG MXAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGV SL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSG S VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:100),其中X为除了
Phe以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0442] PAGLLDLRQG MFAXLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:101),其中X为除了
Gln以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0443] PAGLLDLRQG MFAQXVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:102),其中X为除了
Leu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0444] PAGLLDLRQG MFAQLXAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:103),其中X为除了
Val以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0445] PAGLLDLRQG MFAQLVAXNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:104),其中X为除了
Gln以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0446] PAGLLDLRQG MFAQLVAQXV LLIDGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:105),其中X为除了
Asn以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0447] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNX LLIDGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:106),其中X为除了
Val以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0448] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV XLIDGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ

RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:107),其中X为除了Leu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0449] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LXIDGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:108),其中X为除了Leu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0450] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLXDGPLSWY SDPGLAGV SL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSG S VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:109),其中X为除了Ile以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0451] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIXGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:110),其中X为除了Asp以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0452] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDXPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:111),其中X为除了Gly以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0453] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGXLSWY SDPGLAGV SL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSG S VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:112),其中X为除了Pro以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0454] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPXSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:113),其中X为除了Leu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0455] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLXWY SDPGLAGV SL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSG S VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:114),其中X为除了Ser以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0456] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSXY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:115),其中X为除了Trp以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0457] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWX SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:116),其中X为除了Tyr以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0458] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY XDPGLAGV SL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV

YYVFFQLELR RVVAGEGSG S VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:117), 其中X为除了Ser以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0459] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SXPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:118), 其中X为除了Asp以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0460] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDXGLAGV SL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSG S VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:119), 其中X为除了Pro以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0461] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPXLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:120), 其中X为除了Gly以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0462] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGXAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:121), 其中X为除了Leu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0463] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAXVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:122), 其中X为除了Gly以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0464] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGXS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:123), 其中X为除了Val以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0465] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGV XL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSG S VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:124), 其中X为除了Ser以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0466] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS X TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:125), 其中X为除了Leu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0467] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L XGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE (SEQ ID NO:126), 其中X为除了Thr以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0468] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TXGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:127),其中X为除了Gly以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0469] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGXLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:128),其中X为除了Gly以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0470] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGXSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:129),其中X为除了Leu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0471] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLXYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:130),其中X为除了Ser以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0472] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSXKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:131),其中X为除了Tyr以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0473] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKXDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:132),其中X为除了Glu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0474] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEXT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:133),其中X为除了Asp以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0475] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDX KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:134),其中X为除了Thr以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0476] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT XELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:135),其中X为除了Lys以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0477] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KXLVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:136),其中X为除了

Glu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0478] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVXFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:137),其中X为除了
Phe以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0479] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFXQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:138),其中X为除了
Phe以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0480] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFXLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:139),其中X为除了
Gln以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0481] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQXELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:140),其中X为除了
Leu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0482] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLXLR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:141),其中X为除了
Glu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0483] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLEXR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:142),其中X为除了
Leu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0484] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELX RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:143),其中X为除了
Arg以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0485] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR XVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:144),其中X为除了
Arg以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0486] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RXVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:145),其中X为除了
Val以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0487] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVXAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ

RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:146),其中X为除了Val以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0488] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAAGV YVFFQLELR RVVAXEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:147),其中X为除了Gly以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0489] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAAGV YVFFQLELR RVVAGXSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:148),其中X为除了Glu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0490] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAAGV YVFFQLELR RVVAGEXSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:149),其中X为除了Gly以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0491] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAAGV YVFFQLELR RVVAGEGXGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:150),其中X为除了Ser以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0492] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAAGV YVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVXLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:151),其中X为除了Asp以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0493] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAAGV YVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDXPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:152),其中X为除了Leu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0494] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAAGV YVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLXPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:153),其中X为除了Pro以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0495] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAAGV YVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPAXS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:154),其中X为除了Ser以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0496] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAAGV YVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASX EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:155),其中X为除了Ser以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0497] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAAGV

YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS XARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:156),其中X为除了
Glu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0498] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EAXNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:157),其中X为除了
Arg以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0499] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARXSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:158),其中X为除了
Asn以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0500] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNXAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:159),其中X为除了
Ser以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0501] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAXGFQ G RLLHLSAGQ
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:160),其中X为除了
Phe以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0502] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGX
RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:161),其中X为除了
Gln以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0503] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
XLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:162),其中X为除了
Arg以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0504] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RXGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV T PEIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:163),其中X为除了
Leu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0505] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLXVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:164),其中X为除了
Gly以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0506] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV
YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ
RLGXHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:165),其中X为除了
Val以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0507] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:166),其中X为除了His以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0508] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV T PEIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:167),其中X为除了Leu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0509] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:168),其中X为除了His以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0510] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV T PEIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:169),其中X为除了Thr以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0511] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV T PEIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:170),其中X为除了Glu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0512] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:171),其中X为除了Arg以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0513] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:172),其中X为除了Arg以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0514] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:173),其中X为除了His以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0515] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:174),其中X为除了Trp以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0516] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV T PEIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:175),其中X为除了

Leu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0517] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLXQ GATVLGLFRV T PEIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:176),其中X为除了Thr以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0518] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTX GATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:177),其中X为除了Gln以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0519] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ XATVLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:178),其中X为除了Gly以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0520] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GAXVLGLFRV T PEIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:179),其中X为除了Thr以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;且

[0521] PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIGGPLSWY SDPGLAGVS L TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ G RLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATXLGLFRV TP EIPAGLPS PRSE(SEQ ID NO:180),其中X为除了Val以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala。

[0522] IL-2变体

[0523] 在一些情况下,存在于本公开的TMMP中的变异免疫调节多肽为变异IL-2多肽。野生型IL-2结合至IL-2受体(IL-2R),即包含IL-2R α 、IL-2R β 及IL-2R γ 的异三聚体多肽。

[0524] 野生型IL-2氨基酸序列可为如下:APTSSSTKKT QLQLEHLLL D LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTF MCEYADE TATIVEFLNRWITFCQSIIS TLT(SEQ ID NO:15)。

[0525] 野生型IL2结合至细胞表面上的IL2受体(IL2R)。在一些情况下,IL2受体为包含 α 链(IL-2R α ;也称为CD25)、 β 链(IL-2R β ;也称为CD122;及 γ 链(IL-2R γ ;也称为CD132)的异三聚体多肽。人IL-2R α 、IL2R β 及IL-2R γ 的氨基酸序列可为如下。

[0526] 人IL-2R α :ELCDDDPPE IPHATFKAMA YKEGTMLNCE CKR GFRRIKS GSLYMLCTGN SSHSSWDNQC QCTSSATRNT TKQVT PQPEE QKERKTTEMQ SPMQPVDAQS LPGHCREPPP WENEAT ERIY HFVVGQMVYY QCVQGYRALH RGPASVCKM THGKTR WTQP QLICTGEMET SQFPGEKPKQ ASPEGRPESE TSCLVTTTD F QIQTEMAATM ETSIFTTEYQ VAVAGCVFLL ISVLLLSGLT W QRRQRKSRR TI(SEQ ID NO:16)。

[0527] 人IL-2R β :VNG TSQFTCFYNS RANISCVWSQ DGALQDTSC Q VHAWPDRRRW NQTCELLPVS QASWACNLIL GAPDSQKLTT VDIVTLRVLC REGVRWRVMA IQDFKPFENL RLMAPISLQV V HVETHRCNI SWEISQASHY FERHLEFEAR TLSPGHTWEE APLL TLKQKQ EWICLETLP DTQYEFQVRV KPLQGEFTTW SPWSQP LAFR TKPAALGKDT IPWLGHLLVG LSGAFGFIL VYLLINCRN T GPWLKKVLKC

NTPDPSKFFS QLSSEHGGDV QKWLSSPFPS SSFSPGGLAP EISPLEVLER DKVTQLLLQQ DKVPEPASLS
SNHS LTSCFT NQGYFFHLP DALEIEACQV YFTYDPYSEE DPDEGVA GAP TGSSPQPLQP
LSGEDDAYCT FPSRDDLLLF SPSLLGGPSP PSTAPGGSGA GEERMPPSLQ ERVPRDWDQP PLGPPTPGVP
DL VDFQPPPE LVLREAGEEV PDAGPREGVS FPWSRPPGQG EFRA LNARLP LNTDAYLSLQ
ELQGQDPTHL V(SEQ ID NO:17)。

[0528] 人IL-2R γ :LNTTILTP NGNEDTTADF FLTTMPTDSL SVSTLP LPEV QCFVFVNVEYM
NCTWNSSSEP QPTNLTLYHW YKNSDND KVQ KCSHYLFSEE ITSGCQLQKK EIHLVYQTFVV QLQDPREPR
R QATQMLKLQN LVIPWAPENL TLHKLSESQL ELNWNRRFLN HCLEHLVQYR TDWDHSWTEQ
SVDYRHKFSL PSVDGQKRYT FRVRSRNFPL CGSAQHWSEW SHPIHWGSNT SKENPFLFAL E AVVISVGS
GLIISLLCVY FWLERTMPRI PTLKNLEDLV TEYH GNFSAW SGVSKGLAES LQPDYSERLC LVSEIPPKGG
ALGEGP GASP CNQHSPYWAP PCYTLKPET(SEQ ID NO:18)。

[0529] 在一些情况下,在本公开的TMMP包含变异IL-2多肽时,“同源共免疫调节多肽”为包含有包含氨基酸序列SEQ ID NO:16、17及18的多肽的IL-2R。

[0530] 在一些情况下,变异IL-2多肽呈现出对IL-2R的结合亲和力与包含SEQ ID NO:15中列出的氨基酸序列的IL-2多肽的结合亲和力相比有所减小。举例来说,在一些情况下,当在相同条件下测定时,变异IL-2多肽结合IL-2R的结合亲和力比包含SEQ ID NO:15中列出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL-2R多肽(例如,包含有包含SEQ ID NO:16-18中列出的氨基酸序列的多肽的IL-2R)的结合亲和力小至少10%、小至少15%、小至少20%、小至少25%、小至少30%、小至少35%、小至少40%、小至少45%、小至少50%、小至少55%、小至少60%、小至少65%、小至少70%、小至少75%、小至少80%、小至少85%、小至少90%、小至少95%或小大于95%。

[0531] 在一些情况下,变异IL-2多肽对IL-2R具有的结合亲和力为100nM至100 μ M。作为另一实例,在一些情况下,变异IL-2多肽对IL-2R(例如,包含有包含SEQ ID NO:16-18中列出的氨基酸序列的多肽的IL-2R)具有的结合亲和力为约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 μ M至约1 μ M至约5 μ M、约5 μ M至约10 μ M、约10 μ M至约15 μ M、约15 μ M至约20 μ M、约20 μ M至约25 μ M、约25 μ M至约50 μ M、约50 μ M至约75 μ M、或约75 μ M至约100 μ M。

[0532] 在一些情况下,变异IL-2多肽与SEQ ID NO:15中列出的IL-2氨基酸序列相比具有单一氨基酸取代。在一些情况下,变异IL-2多肽与SEQ ID NO:15中列出的IL-2氨基酸序列相比具有2至10个氨基酸取代。在一些情况下,变异IL-2多肽与SEQ ID NO:15中列出的IL-2氨基酸序列相比具有2个氨基酸取代。在一些情况下,变异IL-2多肽与SEQ ID NO:15中列出的IL-2氨基酸序列相比具有3个氨基酸取代。在一些情况下,变异IL-2多肽与SEQ ID NO:15中列出的IL-2氨基酸序列相比具有4个氨基酸取代。在一些情况下,变异IL-2多肽与SEQ ID NO:15中列出的IL-2氨基酸序列相比具有5个氨基酸取代。在一些情况下,变异IL-2多肽与SEQ ID NO:15中列出的IL-2氨基酸序列相比具有6个氨基酸取代。在一些情况下,变异IL-2多肽与SEQ ID NO:15中列出的IL-2氨基酸序列相比具有7个氨基酸取代。在一些情况下,变异IL-2多肽与SEQ ID NO:15中列出的IL-2氨基酸序列相比具有8个氨基酸取代。在一些情况下,变异IL-2多肽与SEQ ID NO:15中列出的IL-2氨基酸序列相比具有9个氨基酸取代。在

一些情况下,变异IL-2多肽与SEQ ID NO:15中列出的IL-2氨基酸序列相比具有10个氨基酸取代。

[0533] 适合的IL-2变体包括一种多肽,其包含与以下氨基酸序列中的任一个具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0534] APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT(SEQ ID NO:181),其中X为除了Phe以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala。在一些情况下,X为Met。在一些情况下,X为Pro。在一些情况下,X为Ser。在一些情况下,X为Thr。在一些情况下,X为Trp。在一些情况下,X为Tyr。在一些情况下,X为Val。在一些情况下,X为His;

[0535] APTSSSTKKT QLQLEHLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL R PRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT(SEQ ID NO:182),其中X为除了Asp以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0536] APTSSSTKKT QLQLXHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL R PRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT(SEQ ID NO:183),其中X为除了Glu以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala。

[0537] APTSSSTKKT QLQLEXLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL R PRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT(SEQ ID NO:184),其中X为除了His以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala。在一些情况下,X为Thr。在一些情况下,X为Asn。在一些情况下,X为Cys。在一些情况下,X为Gln。在一些情况下,X为Met。在一些情况下,X为Val。在一些情况下,X为Trp;

[0538] APTSSSTKKT QLQLEXLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL R PRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT(SEQ ID NO:185),其中X为除了His以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala。在一些情况下,X为Arg。在一些情况下,X为Asn。在一些情况下,X为Asp。在一些情况下,X为Cys。在一些情况下,X为Glu。在一些情况下,X为Gln。在一些情况下,X为Gly。在一些情况下,X为Ile。在一些情况下,X为Lys。在一些情况下,X为Leu。在一些情况下,X为Met。在一些情况下,X为Phe。在一些情况下,X为Pro。在一些情况下,X为Ser。在一些情况下,X为Thr。在一些情况下,X为Tyr。在一些情况下,X为Trp。在一些情况下,X为Val;

[0539] APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFXMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL R PRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT(SEQ ID NO:186),其中X为除了Tyr以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0540] APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL R PRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCXSIIS TLT(SEQ ID NO:187),其中X为除了Gln以外的任何氨基酸。在一些情况下,X为Ala;

[0541] APTSSSTKKT QLQLEX1LLLD LQMILNGINN YKNPKLTRM L TX₂KFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WIT FCQSIIS TLT(SEQ ID NO:188),其中X₁为除了His以外的任何氨基酸,且其中X₂为除了Phe以外的任何氨基酸。在一些情况下,X₁为Ala。在一些情况下,X₂为Ala。在一些情况下,X₁为Ala;且X₂为

Ala。在一些情况下, X_1 为 Thr; 且 X_2 为 Ala;

[0542] APTSSSTKKT QLQLEHLLX₁ LQMILNGINN YKNPKLTRM L TX₂KFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WIT FCQSIIS TLT (SEQ ID NO:189), 其中 X_1 为除了 Asp 以外的任何氨基酸; 且其中 X_2 为除了 Phe 以外的任何氨基酸。在一些情况下, X_1 为 Ala。在一些情况下, X_2 为 Ala。在一些情况下, X_1 为 Ala; 且 X_2 为 Ala;

[0543] APTSSSTKKT QLQLX₁HLLX₂ LQMILNGINN YKNPKLTRM L TX₃KFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WIT FCQSIIS TLT (SEQ ID NO:190), 其中 X_1 为除了 Glu 以外的任何氨基酸; 其中 X_2 为除了 Asp 以外的任何氨基酸; 且其中 X_3 为除了 Phe 以外的任何氨基酸。在一些情况下, X_1 为 Ala。在一些情况下, X_2 为 Ala。在一些情况下, X_3 为 Ala。在一些情况下, X_1 为 Ala; X_2 为 Ala; 且 X_3 为 Ala;

[0544] APTSSSTKKT QLQLEX₁LLX₂ LQMILNGINN YKNPKLTRM L TX₃KFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WIT FCQSIIS TLT (SEQ ID NO:191), 其中 X_1 为除了 His 以外的任何氨基酸; 其中 X_2 为除了 Asp 以外的任何氨基酸; 且其中 X_3 为除了 Phe 以外的任何氨基酸。在一些情况下, X_1 为 Ala。在一些情况下, X_2 为 Ala。在一些情况下, X_3 为 Ala。在一些情况下, X_1 为 Ala; X_2 为 Ala; 且 X_3 为 Ala;

[0545] APTSSSTKKT QLQLEHLLX₁ LQMILNGINN YKNPKLTRM L TX₂KFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WIT FCX₃SIIS TLT (SEQ ID NO:192), 其中 X_1 为除了 Asp 以外的任何氨基酸; 其中 X_2 为除了 Phe 以外的任何氨基酸; 且其中 X_3 为除了 Gln 以外的任何氨基酸。在一些情况下, X_1 为 Ala。在一些情况下, X_2 为 Ala。在一些情况下, X_3 为 Ala。在一些情况下, X_1 为 Ala; X_2 为 Ala; 且 X_3 为 Ala;

[0546] APTSSSTKKT QLQLEHLLX₁ LQMILNGINN YKNPKLTRM L TX₂KFX₃MPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WIT FCQSIIS TLT (SEQ ID NO:193), 其中 X_1 为除了 Asp 以外的任何氨基酸; 其中 X_2 为除了 Phe 以外的任何氨基酸; 且其中 X_3 为除了 Tyr 以外的任何氨基酸。在一些情况下, X_1 为 Ala。在一些情况下, X_2 为 Ala。在一些情况下, X_3 为 Ala。在一些情况下, X_1 为 Ala; X_2 为 Ala; 且 X_3 为 Ala;

[0547] APTSSSTKKT QLQLEX₁LLX₂ LQMILNGINN YKNPKLTRM L TX₃KFX₄MPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WIT FCQSIIS TLT (SEQ ID NO:194), 其中 X_1 为除了 His 以外的任何氨基酸; 其中 X_2 为除了 Asp 以外的任何氨基酸; 其中 X_3 为除了 Phe 以外的任何氨基酸; 且其中 X_4 为除了 Tyr 以外的任何氨基酸。在一些情况下, X_1 为 Ala。在一些情况下, X_2 为 Ala。在一些情况下, X_3 为 Ala。在一些情况下, X_4 为 Ala。在一些情况下, X_1 为 Ala; X_2 为 Ala; X_3 为 Ala; 且 X_4 为 Ala;

[0548] APTSSSTKKT QLQLEHLLX₁ LQMILNGINN YKNPKLTRM L TX₂KFX₃MPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WIT FCX₄SIIS TLT (SEQ ID NO:195), 其中 X_1 为除了 Asp 以外的任何氨基酸; 其中 X_2 为除了 Phe 以外的任何氨基酸; 其中 X_3 为除了 Tyr 以外的任何氨基酸; 且其中 X_4 为除了 Gln 以外的任何氨基酸。在一些情况下, X_1 为 Ala。在一些情况下, X_2 为 Ala。在一些情况下, X_3 为 Ala。在一些情况下, X_4 为 Ala。在一些情况下, X_1 为 Ala; X_2 为 Ala; X_3 为 Ala; 且 X_4 为 Ala;

[0549] APTSSSTKKT QLQLEX₁LLX₂ LQMILNGINN YKNPKLTRM L TX₃KFX₄MPKKA TELKHLQCLE

EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WIT FCX₅SIIS TLT(SEQ ID NO:196),其中X₁为除了His以外的任何氨基酸;其中X₂为除了Asp以外的任何氨基酸;其中X₃为除了Phe以外的任何氨基酸;其中X₄为除了Tyr以外的任何氨基酸;且其中X₅为除了Gln以外的任何氨基酸。在一些情况下,X₁为Ala。在一些情况下,X₂为Ala。在一些情况下,X₃为Ala。在一些情况下,X₄为Ala。在一些情况下,X₅为Ala。在一些情况下,X₁为Ala;X₂为Ala;X₃为Ala;X₄为Ala;X₅为Ala;且

[0550] APTSSSTKKT QLQLEX₁LLLD LQMILNGINN YKNPKLTRM L TX₂KFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WIT FCX₃SIIS TLT(SEQ ID NO:197),其中X₁为除了His以外的任何氨基酸;其中X₂为除了Phe以外的任何氨基酸;且其中X₃为除了Gln以外的任何氨基酸。在一些情况下,X₁为Ala。在一些情况下,X₂为Ala。在一些情况下,X₃为Ala。在一些情况下,X₁为Ala;X₂为Ala;且X₃为Ala。

[0551] 额外多肽

[0552] 除了上文所述的那些多肽之外,本公开的TMMP的多肽还可包括一种或多种多肽。适合的额外多肽包括表位标签和亲和力结构域。所述一种或多种额外多肽可包括在TMMP的多肽链的N端、在TMMP的多肽链的C端、或在TMMP的多肽链内部。

[0553] 表位标签

[0554] 适合的表位标签包括但不限于血球凝集素(HA;例如,YPYDVPDYA(SEQ ID NO:271);FLAG(例如,DYKDDDDK(SEQ ID NO:272);c-myc(例如,EQKLISEEDL;SEQ ID NO:273)等。

[0555] 亲和力结构域

[0556] 亲和力结构域包括可与结合配偶体,诸如固定在固体支撑物上可用于鉴别或纯化的结合配偶体相互作用的肽序列。编码多个连续单一氨基酸诸如组氨酸的DNA序列当融合至所表达的蛋白时可用于通过与树脂柱诸如镍琼脂糖的高亲和力结合来一步纯化重组蛋白。示例性亲和力结构域包括His5(HHHHH)(SEQ ID NO:271)、HisX6(HHHHHH)(SEQ ID NO:275)、C-myc(EQKLISEEDL)(SEQ ID NO:276)、Flag(DYKDDDDK)(SEQ ID NO:277)、StrepTag(WSHPQFEK)(SEQ ID NO:278)、血球凝集素例如HA Tag(YPYDVPDYA)(SEQ ID NO:279)、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、硫氧化还原蛋白、纤维素结合结构域、RYIRS(SEQ ID NO:280)、Phe-His-His-Thr(SEQ ID NO:281)、甲壳素结合结构域、S-肽、T7肽、SH2域、C端RNA标签、WEAAAREACCRECCARA(SEQ ID NO:282)、金属结合结构域,例如锌结合结构域或钙结合结构域,诸如来自钙结合蛋白的那些,例如钙调蛋白、肌钙蛋白C、钙调磷酸酶B、肌凝蛋白轻链、恢复蛋白、S-调控蛋白、视锥蛋白、VILIP、神经钙蛋白、海马钙结合蛋白、神经元钙传感蛋白(frequenin)、钙牵蛋白(caltractin)、钙蛋白酶次单元、S100蛋白、小清蛋白、钙结合蛋白D9K、钙结合蛋白D28K、及钙网膜蛋白、内含肽、生物素、链亲和素、MyoD、Id、亮氨酸拉链序列及麦芽糖结合蛋白。

[0557] 药物缀合物

[0558] 本公开的TMMP的多肽链可包含连接(例如,共价附接)至多肽链的小分子药物。举例来说,在本公开的TMMP包含Fc多肽时,Fc多肽可包含共价连接的小分子药物。在一些情况下,小分子药物为癌症化学治疗剂,例如细胞毒性剂。本公开的TMMP的多肽链可包含连接(例如,共价附接)至多肽链的细胞毒性剂。举例来说,在本公开的TMMP包含Fc多肽时,Fc多

肽可包含共价连接的细胞毒性剂。细胞毒性剂包括前药。

[0559] 药物(例如,癌症化学治疗剂)可直接或间接连接至本公开的TMMP的多肽链。举例来说,在本公开的TMMP包含Fc多肽时,药物(例如,癌症化学治疗剂)可直接或间接连接至Fc多肽。直接键联可涉及直接键联至氨基酸侧链。间接键联可为经由接头的键联。药物(例如,癌症化学治疗剂)可经由硫醚键、酰胺键、氨基甲酸酯键、二硫键或醚键来连接至本公开的TMMP的多肽链(例如,Fc多肽)。

[0560] 接头包括可裂解接头和不可裂解接头。在一些情况下,接头为蛋白酶可裂解的接头。适合的接头包括例如肽(例如,长度为2至10个氨基酸;例如,长度为2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)、烷基链、聚(乙二醇)、二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团及酯酶不稳定基团。适合的接头的非限制性实例为:i) N-琥珀酰亚胺基-[(N-马来酰亚胺基丙酰胺基)-四乙二醇]酯(NHS-PEG4-马来酰亚胺);ii) 4-(2-吡啶基二硫代)丁酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDB);4-(2-吡啶基二硫代)2-磺基丁酸N-琥珀酰亚胺酯(磺基-SPDB);4-(2-吡啶基二硫代)戊酸N-琥珀酰亚胺酯(SPP);N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰胺基己酸酯)(LC-SMCC); κ -马来酰亚胺基十一烷酸N-琥珀酰亚胺酯(KMUA); γ -马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺酯(GMBS); ϵ -马来酰亚胺基己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS);m-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS);N-(α -马来酰亚胺基乙酰氧基)-琥珀酰亚胺酯(AMAS);琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺基丙酰胺)己酸酯(SMPH);4-(p-马来酰亚胺基苯基)丁酸N-琥珀酰亚胺酯(SMPB);N-(p-马来酰亚胺基苯基)异氰酸酯(PMPI);4(2-吡啶基硫代)戊酸N-琥珀酰亚胺酯(SPP);N-琥珀酰亚胺基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB);6-马来酰亚胺基己酰基(MC);马来酰亚胺基丙酰基(MP);对氨基苯甲氧基羰基(PAB);4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷甲酸N-琥珀酰亚胺酯(SMCC);N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰胺基己酸酯),SMCC的“长链”类似物(LC-SMCC);3-马来酰亚胺基丙酸N-琥珀酰亚胺酯(BMPS);碘乙酸N-琥珀酰亚胺酯(SIA);溴乙酸N-琥珀酰亚胺酯(SBA);及3-(溴乙酰胺基)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SBAP)。

[0561] 多肽(例如,Fc多肽)可被交联试剂修饰,以引入1-10个反应基团,这些交联试剂是诸如4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)、磺基-SMCC、马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、磺基-MBS或琥珀酰亚胺基-碘乙酸酯,如文献中所述。接着使修饰的Fc多肽与含硫醇的细胞毒性剂反应以产生缀合物。

[0562] 举例来说,在本公开的TMMP包含Fc多肽时,包含Fc多肽的多肽链可具有式(A)-(L)-(C),其中(A)为包含Fc多肽的多肽链;其中(L)如果存在,则为接头;且其中(C)为细胞毒性剂。(L)如果存在,则将(A)连接至(C)。在一些情况下,包含Fc多肽的多肽链可包含多于一种细胞毒性剂(例如,2、3、4或5种或更多种细胞毒性剂)。

[0563] 适合的药物包括例如雷帕霉素。适合的药物包括例如类视黄醇,诸如全反式视黄酸(ATRA);维生素D3;维生素D3类似物;等等。如上文所述,在一些情况下,药物为细胞毒性剂。细胞毒性剂为本领域中已知的。适合的细胞毒性剂可为导致细胞死亡、或诱导细胞死亡、或以某种方式降低细胞活力的任何化合物,且包括例如美登木素和美登木素类似物、苯二氮卓、类紫杉醇、CC-1065和CC-1065类似物、倍癌霉素(duocarmycin)和倍癌霉素类似物、烯二炔诸如卡利奇霉素(calicheamicin)、尾海兔素和尾海兔素类似物(包括澳瑞他汀(auristatin))、茅屋霉素(tomaymycin)衍生物、细霉素(leptomycin)衍生物、胺甲喋呤、顺

铂、卡铂、道诺霉素、阿霉素、长春新碱、长春碱、美法仑、丝裂霉素C、氮芥苯丁酸及吗啉代阿霉素。

[0564] 例如,在一些情况下,细胞毒性剂为抑制真核细胞中的微管形成的化合物。此类试剂包括例如美登木素、苯二氮卓、类紫杉醇、CC-1065、倍癌霉素、倍癌霉素类似物、卡利奇霉素、尾海兔素、尾海兔素类似物、澳瑞他汀、茅屋霉素及细霉素、或前述任一种的前药。美登木素化合物包括例如N(2')-脱乙酰基-N(2')-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素(DM1);N(2')-脱乙酰基-N(2')-(4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM3);及N(2')-脱乙酰基-N2-(4-巯基-4-甲基-1-氧代戊基)-美登素(DM4)。苯二氮卓包括例如吲哚啉并苯二氮卓和噁唑烷并苯二氮卓。

[0565] 细胞毒性剂包括紫杉醇;细胞迟缓素B;短杆菌肽D;溴化乙锭;依米丁;丝裂霉素;依托泊苷;替尼泊苷;长春新碱;长春花碱;秋水仙碱;多柔比星;道诺霉素;二羟基炭疽菌素二酮;美登素或其类似物或衍生物;澳瑞他汀或其功能肽类似物或衍生物;尾海兔素10或15或其类似物;依立替康或其类似物;米托蒽醌;光神霉素;放线菌素D;1-去氢睾酮;糖皮质激素;普鲁卡因;丁卡因;利多卡因;普萘洛尔;嘌呤霉素;卡利奇霉素或其类似物或衍生物;抗代谢物;6-巯嘌呤;6-硫鸟嘌呤;阿糖胞苷;氟达拉滨;5-氟尿嘧啶;达卡巴嗪;羟基脲;天冬酰胺酶;吉西他滨;克拉屈滨;烷化剂;铂衍生物;倍癌霉素A;倍癌霉素SA;拉奇霉素(rachelmycin,CC-1065)或其类似物或衍生物;抗生素;吡咯并[2,1-c][1,4]-苯二氮卓(PDB);白喉毒素;蓖麻毒素;霍乱毒素;志贺样毒素;LT毒素;C3毒素;志贺毒素;百日咳毒素;破伤风毒素;大豆Bowman-Birk蛋白酶抑制剂;假单胞菌外毒素;alorin;皂素;莫迪素(modeccin);gelanin;相思子毒素(abrin)A链;莫迪素A链; α -帚曲菌素;油桐(Aleurites fordii)蛋白;石竹素(dianthin)蛋白;美洲商陆(Phytolacca americana)蛋白;苦瓜(momordica charantia)抑制剂;麻疯树毒蛋白(curcin);巴豆毒素;肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制剂;白树毒素(gelonin);丝裂吉菌素(mitogellin);局限曲菌素(restrictocin);酚霉素(phenomycin);伊诺霉素(enomycin)毒素;核糖核酸酶(RNA酶);DNA酶I;葡萄球菌肠毒素A;美洲商陆抗病毒蛋白;白喉毒素;及假单胞菌外毒素。

[0566] 示例性TMMP

[0567] 本公开的TMMP包含至少一种异二聚体,其包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含:i)WT-1肽表位;和ii)第一MHC多肽;b)第二多肽,所述第二多肽包含第二MHC多肽;及c)至少一种免疫调节多肽,其中所述第一多肽和/或所述第二多肽包含免疫调节多肽。因此,在一些情况下,本公开的TMMP包含至少一种异二聚体,其包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含:i)WT-1肽表位;ii)第一MHC多肽;和iii)至少一种免疫调节多肽;及b)第二多肽,所述第二多肽包含第二MHC多肽。在其他情况下,本公开的TMMP包含至少一种异二聚体,其包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含:i)WT-1肽表位;及ii)第一MHC多肽;和b)第二多肽,所述第二多肽包含:i)第二MHC多肽;及ii)至少一种免疫调节多肽。在一些情况下,本公开的TMMP包含至少一种异二聚体,其包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含:i)WT-1肽表位;ii)第一MHC多肽;及iii)至少一种免疫调节多肽;及b)第二多肽,所述第二多肽包含:i)第二MHC多肽;及ii)至少一种免疫调节多肽。在一些情况下,所述至少一种免疫调节多肽为野生型免疫调节多肽。在其他情况下,所述至少一种免疫调节多肽为呈现出与共免疫调节多肽的亲合力与相应野生型免疫调节多肽对共免疫调节多肽的亲合力相比有所减小的变异免疫调节多肽。

在一些情况下,本公开的TMMP包含两种免疫调节多肽,其中这两种免疫调节多肽具有相同氨基酸序列。

[0568] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽,所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)WT-1肽表位;ii)第一MHC多肽;及iii)至少一种免疫调节多肽;和b)第二多肽,所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)第二MHC多肽;及ii)Ig Fc多肽。在一些情况下,第一MHC多肽为 β 2M多肽;且第二MHC多肽为HLA重链多肽。在一些情况下,HLA重链多肽为HLA-A24多肽。在一些情况下,HLA重链多肽为具有A236C取代的HLA-A24多肽。在一些情况下,第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)WT-1肽表位;ii)第一MHC多肽;及iii)两种免疫调节多肽,其中这两种免疫调节多肽具有相同氨基酸序列。在一些情况下,Ig Fc多肽为人IgG1 Fc多肽。在一些情况下,Ig Fc多肽为包含L234A及L235A取代的IgG1 Fc多肽。在一些情况下,第一多肽与第二多肽两者彼此间以二硫键连接。在一些情况下,免疫调节多肽为包含H16A及F42A取代的变异IL-2多肽。在一些情况下,免疫调节多肽为包含H16T和F42A取代的变异IL-2多肽。在一些情况下,肽接头介于以下中的一个或多个之间:i)第二MHC多肽与Ig Fc多肽;ii)表位与第一MHC多肽;iii)第一MHC多肽与免疫调节多肽;及(当TMMP在第一多肽链上包含两种免疫调节多肽时)iv)介于两种免疫调节多肽之间。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列AAAGG(SEQ ID NO:283)。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:284),其中n为1至10的整数(例如,其中n为2、3或4)。在一些情况下,WT-1肽表位为CMTWNQMN(SEQ ID NO:261)。在一些情况下,WT-1肽表位为CYTWNQMNL(SEQ ID NO:286)。

[0569] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽,所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)WT-1肽表位;及ii)第一MHC多肽;和b)第二多肽,所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)至少一种免疫调节多肽;ii)第二MHC多肽;及iii)Ig Fc多肽。在一些情况下,第一MHC多肽为 β 2M多肽;且第二MHC多肽为HLA重链多肽。在一些情况下,HLA重链多肽为HLA-A24多肽。在一些情况下,HLA重链多肽为具有A236C取代的HLA-A24多肽。在一些情况下,第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)两种免疫调节多肽,其中这两种免疫调节多肽具有相同氨基酸序列;ii)第二MHC多肽;及iii)Ig Fc多肽。在一些情况下,Ig Fc多肽为人IgG1 Fc多肽。在一些情况下,Ig Fc多肽为包含L234A和L235A取代的IgG1 Fc多肽。在一些情况下,第一多肽与第二多肽两者彼此间以二硫键连接。在一些情况下,免疫调节多肽为包含H16A和F42A取代的变异IL-2多肽。在一些情况下,免疫调节多肽为包含H16T和F42A取代的变异IL-2多肽。在一些情况下,肽接头介于以下中的一个或多个之间:i)第二MHC多肽与Ig Fc多肽;ii)表位与第一MHC多肽;iii)第一MHC多肽与免疫调节多肽;及(当TMMP在第二多肽链上包含两种免疫调节多肽时)iv)介于两种免疫调节多肽之间。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列AAAGG(SEQ ID NO:283)。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:284),其中n为1至10的整数(例如,其中n为2、3或4)。在一些情况下,WT-1肽表位为CMTWNQMN(SEQ ID NO:261)。在一些情况下,WT-1肽表位为CYTWNQMNL(SEQ ID NO:286)。

[0570] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽,所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)WT-1肽表位;及ii)第一MHC多肽;及b)第二多肽,所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)第二MHC多肽;ii)Ig Fc多肽;及iii)至少一种免疫调节多肽。在一些情况下,第一MHC多肽为 β 2M多肽;且第二MHC多肽为HLA重链多肽。在一些情况下,HLA重链多肽为

HLA-A24多肽。在一些情况下,HLA重链多肽为具有A236C取代的HLA-A24多肽。在一些情况下,第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)第二MHC多肽;ii)Ig Fc多肽;及iii)两种免疫调节多肽,其中这两种免疫调节多肽具有相同氨基酸序列。在一些情况下,Ig Fc多肽为人IgG1 Fc多肽。在一些情况下,Ig Fc多肽为包含L234A和L235A取代的IgG1 Fc多肽。在一些情况下,第一多肽与第二多肽两者彼此间以二硫键连接。在一些情况下,免疫调节多肽为包含H16A和F42A取代的变异IL-2多肽。在一些情况下,免疫调节多肽为包含H16T和F42A取代的变异IL-2多肽。在一些情况下,肽接头介于以下中的一个或多个之间:i)第二MHC多肽与Ig Fc多肽;ii)表位与第一MHC多肽;iii)Ig Fc多肽与免疫调节多肽;及(当TMMP在第二多肽链上包含两种免疫调节多肽时)iv)介于这两种免疫调节多肽之间。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列AAAGG(SEQ ID NO:283)。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:284),其中n为1至10的整数(例如,其中n为2、3或4)。在一些情况下,WT-1肽表位为CMTWNQMN(SEQ ID NO:261)。在一些情况下,WT-1肽表位为CYTWNQMNL(SEQ ID NO:286)。

[0571] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽,所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)WT-1肽表位;及ii)第一MHC多肽;和b)第二多肽,所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)至少一种免疫调节多肽;ii)第二MHC多肽;及iii)Ig Fc多肽。在一些情况下,第一MHC多肽为 β 2M多肽;且第二MHC多肽为HLA重链多肽。在一些情况下,HLA重链多肽为HLA-A24多肽。在一些情况下,HLA重链多肽为具有A236C取代的HLA-A24多肽。在一些情况下,Ig Fc多肽为人IgG1 Fc多肽。在一些情况下,Ig Fc多肽为包含L234A和L235A取代的IgG1 Fc多肽。在一些情况下,第一多肽与第二多肽两者彼此间以二硫键连接。在一些情况下,免疫调节多肽为包含H16A及F42A取代的变异IL-2多肽。在一些情况下,免疫调节多肽为包含H16T及F42A取代的变异IL-2多肽。在一些情况下,WT-1肽表位为CMTWNQMN(SEQ ID NO:261)。在一些情况下,WT-1肽表位为CYTWNQMNL(SEQ ID NO:286)。

[0572] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽,所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)至少一种免疫调节多肽;ii)WT-1肽表位;及iii)第一MHC多肽;及b)第二多肽,所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)第二MHC多肽;及ii)Ig Fc多肽。在一些情况下,第一MHC多肽为 β 2M多肽;且第二MHC多肽为HLA重链多肽。在一些情况下,HLA重链多肽为HLA-A24多肽。在一些情况下,HLA重链多肽为具有A236C取代的HLA-A24多肽。在一些情况下,第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)两种免疫调节多肽,其中这两种免疫调节多肽具有相同氨基酸序列;ii)WT-1肽表位;及iii)第一MHC多肽。在一些情况下,Ig Fc多肽为人IgG1 Fc多肽。在一些情况下,Ig Fc多肽为包含L234A和L235A取代的IgG1 Fc多肽。在一些情况下,第一多肽与第二多肽两者彼此间以二硫键连接。在一些情况下,免疫调节多肽为包含H16A和F42A取代的变异IL-2多肽。在一些情况下,免疫调节多肽为包含H16T和F42A取代的变异IL-2多肽。在一些情况下,肽接头介于以下中的一个或多个之间:i)第二MHC多肽与Ig Fc多肽;ii)表位与第一MHC多肽;iii)免疫调节多肽与表位;及(当TMMP在第一多肽链上包含两种免疫调节多肽时)iv)介于两种免疫调节多肽之间。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列AAAGG(SEQ ID NO:283)。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:284),其中n为1至10的整数(例如,其中n为2、3或4)。在一些情况下,WT-1肽表位为CMTWNQMN(SEQ ID NO:261)。在一些情况下,WT-1肽表位为CYTWNQMNL(SEQ ID NO:286)。

[0573] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽,所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)WT-1肽表位;及ii)第一MHC多肽;及b)第二多肽,所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)第二MHC多肽;ii)至少一种免疫调节多肽;及iii)Ig Fc多肽。在一些情况下,第一MHC多肽为 β 2M多肽;且第二MHC多肽为HLA重链多肽。在一些情况下,HLA重链多肽为HLA-A24多肽。在一些情况下,HLA重链多肽为具有A236C取代的HLA-A24多肽。在一些情况下,第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)第二MHC多肽;ii)两种免疫调节多肽,其中这两种免疫调节多肽具有相同氨基酸序列;及iii)Ig Fc多肽。在一些情况下,Ig Fc多肽为人IgG1 Fc多肽。在一些情况下,Ig Fc多肽为包含L234A和L235A取代的IgG1 Fc多肽。在一些情况下,第一多肽与第二多肽两者彼此间以二硫键连接。在一些情况下,免疫调节多肽为包含H16A及F42A取代的变异IL-2多肽。在一些情况下,免疫调节多肽为包含H16T及F42A取代的变异IL-2多肽。在一些情况下,肽接头介于以下中的一个或多个之间:i)第二MHC多肽与免疫调节多肽;ii)免疫调节多肽与Ig Fc多肽;iii)表位与第一MHC多肽;iii)第一MHC多肽与免疫调节多肽;及(当TMMP在第二多肽链上包含两种免疫调节多肽时)iv)介于这两种免疫调节多肽之间。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列AAAGG(SEQ ID NO:283)。在一些情况下,肽接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:284),其中n为1至10的整数(例如,其中n为2、3或4)。在一些情况下,WT-1肽表位为CMTWNQMN(SEQ ID NO:261)。在一些情况下,WT-1肽表位为CYTWNQMNL(SEQ ID NO:286)。

[0574] 如上文所述且如图19示意性示出,免疫调节多肽(即,一种或多种免疫调节多肽)可存在于本公开的TMMP的多个位置中的任一个处。图19描绘变异IL-2多肽的两个副本的位置;然而,免疫调节多肽可为如本文所述的多种免疫调节多肽中的任一种。如图19所描绘,免疫调节多肽可:1)在I类MHC重链的N端(位置1);2)在I类MHC重链的C端及Ig Fc多肽的N端;换句话说,介于I类MHC重链与Ig Fc多肽之间(位置2);3)在Ig Fc多肽的C端(位置3);4)在肽表位的N端(位置4);或5)在 β 2M多肽的C端(位置5)。“位置1”是指免疫调节多肽在与I类MHC重链相同的多肽链上且在I类MHC重链的N端的位置;例如,其中TMMP包含:a)第一多肽,所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)肽表位(例如,WT-1肽);及ii) β 2M多肽;及b)第二多肽,所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)一种或多种免疫调节多肽;及ii)I类MHC重链多肽。“位置2”是指免疫调节多肽在与I类MHC重链相同的多肽链上且在I类MHC重链的C端而非多肽链的C端的位置;例如,其中TMMP包含:a)第一多肽,所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)肽表位(例如,WT-1肽);及ii) β 2M多肽;和b)第二多肽,所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)I类MHC重链多肽;ii)一种或多种免疫调节多肽;及iii)Ig Fc多肽。“位置3”是指免疫调节多肽在与I类MHC重链相同的多肽链上且在多肽链的C端的位置;例如,其中TMMP包含:a)第一多肽,所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)肽表位(例如,WT-1肽);及ii) β 2M多肽;及b)第二多肽,所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)I类MHC重链多肽;ii)Ig Fc多肽;及iii)一种或多种免疫调节多肽。“位置4”是指免疫调节多肽在与 β 2M多肽相同的多肽链上且在肽表位及 β 2M多肽的N端的位置;例如,其中TMMP包含:a)第一多肽,所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)一种或多种免疫调节多肽;ii)肽表位(例如,WT-1肽);及iii) β 2M多肽;及b)第二多肽,所述第二多肽包含I类MHC重链多肽(例如,第二多肽,所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)I类MHC重链多肽;及ii)Ig Fc多肽。“位置5”是指免疫调节多肽在与 β 2M多肽相同的多肽链上且在 β 2M多肽的C端(例如,多肽

链的C端)的位置;例如,其中TMMP包含:a)第一多肽,所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)肽表位(例如,WT-1肽);及ii)β2M多肽;及iii)一种或多种免疫调节多肽;和b)第二多肽,所述第二多肽包含I类MHC重链多肽(例如,第二多肽,所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)I类MHC重链多肽;及ii)Ig Fc多肽。

[0575] 另外,如上文所讨论且如图18A-18C示意性描绘,本公开的TMMP的第一多肽链与第二多肽链可由一个或多个二硫键连接。举例来说,本公开的TMMP可包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含具有R12C取代的β2M多肽;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含具有A236C取代的I类MHC重链多肽,使得二硫键在第一多肽链中β2M多肽的位置12处的Cys与第二多肽链中I类MHC重链多肽的位置236处的Cys之间形成。作为另一实例,本公开的TMMP可包含:a)第一多肽,所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)肽表位;ii)肽接头,所述肽接头包含GCGG(G4S)_n(SEQ ID NO:393)序列,其中n为1、2或3;及iii)β2M多肽;和b)第二多肽,所述第二多肽包含具有Y84C取代的I类MHC重链多肽,使得二硫键在第一多肽链的肽接头中的Cys与第二多肽链的I类MHC重链多肽的位置84处的Cys之间形成。在其他实例中,本公开的TMMP可包含:a)第一多肽,所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)肽表位;ii)肽接头,所述肽接头包含GCGG(G4S)_n(SEQ ID NO:393)序列,其中n为1、2或3;及iii)β2M多肽,所述多肽具有R12C取代;和b)第二多肽,所述第二多肽包含具有Y84C取代和A236C取代的I类MHC重链多肽,使得:i)第一二硫键在第一多肽链的肽接头中的Cys与第二多肽链的I类MHC重链多肽的位置84处的Cys之间形成;且ii)第二二硫键在第一多肽链的β2M多肽的位置12处的Cys与第二多肽链的I类MHC重链多肽的位置236处的Cys之间形成。为简明起见,第一二硫键称为“G2C/Y84C”;且第二二硫键称为“R12C/A236C”。本公开的TMMP可包括:a)G2C/Y84C二硫键而无R12C/A236C二硫键;b)R12C/A236C二硫键而无G2C/Y84C二硫键;或c)G2C/Y84C二硫键和R12C/A236C二硫键。

[0576] 本公开的TMMP可包括:a)G2C/Y84C二硫键而无R12C/A236C二硫键;和b)在位置1处的至少一种免疫调节多肽。本公开的TMMP可包括:a)G2C/Y84C二硫键而无R12C/A236C二硫键;和b)在位置2处的至少一种免疫调节多肽。本公开的TMMP可包括:a)G2C/Y84C二硫键而无R12C/A236C二硫键;及b)在位置3处的至少一种免疫调节多肽。本公开的TMMP可包括:a)G2C/Y84C二硫键而无R12C/A236C二硫键;和b)在位置4处的至少一种免疫调节多肽。本公开的TMMP可包括:a)G2C/Y84C二硫键而无R12C/A236C二硫键;和b)在位置5处的至少一种免疫调节多肽。

[0577] 本公开的TMMP可包括:a)R12C/A236C二硫键而无G2C/Y84C二硫键;和在位置1处的至少一种免疫调节多肽。本公开的TMMP可包括:a)R12C/A236C二硫键而无G2C/Y84C二硫键;和在位置2处的至少一种免疫调节多肽。本公开的TMMP可包括:a)R12C/A236C二硫键而无G2C/Y84C二硫键;和b)在位置3处的至少一种免疫调节多肽。本公开的TMMP可包括:a)R12C/A236C二硫键而无G2C/Y84C二硫键;和b)在位置4处的至少一种免疫调节多肽。本公开的TMMP可包括:a)R12C/A236C二硫键而无G2C/Y84C二硫键;和b)在位置5处的至少一种免疫调节多肽。

[0578] 本公开的TMMP可包括:a)G2C/Y84C二硫键和R12C/A236C二硫键;和b)及在位置1处的至少一种免疫调节多肽。本公开的TMMP可包括:a)G2C/Y84C二硫键和R12C/A236C二硫键;及)及在位置2处的至少一种免疫调节多肽。本公开的TMMP可包括:a)G2C/Y84C二硫键和

R12C/A236C二硫键;及b)及在位置3处的至少一种免疫调节多肽。本公开的TMMP可包括:a) G2C/Y84C二硫键和R12C/A236C二硫键;及b)及在位置4处的至少一种免疫调节多肽。本公开的TMMP可包括:a) G2C/Y84C二硫键和R12C/A236C二硫键;及b)及在位置5处的至少一种免疫调节多肽。

[0579] 本公开的TMMP的第一多肽链和第二多肽链的氨基酸序列的非限制性实例提供于图4A-4K和图20A-20R中。

[0580] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图4D所描绘的指示为“2752”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图4C所描绘的指示为“3159”的氨基酸序列。

[0581] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图4E所描绘的指示为“2753”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图4C所描绘的指示为“3159”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置3处的免疫调节多肽;和b)R12C/A236C二硫键(而非G2C/Y84C二硫键)。

[0582] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图4D所描绘的指示为“2752”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图4B所描绘的指示为“2750”的氨基酸序列。

[0583] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图4E所描绘的指示为“2753”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图4B所描绘的指示为“2750”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置1处的免疫调节多肽;和b)R12C/A236C二硫键(而非G2C/Y84C二硫键)。

[0584] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图4D所描绘的指示为“2752”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图4A所描绘的指示为“3158”的氨基酸序列。

[0585] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图4E所描绘的指示为“2753”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图4A所描绘的指示为“3158”的氨基酸序列。

[0586] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图14B所描绘的指示为“2380”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图14A所描绘的指示为“1715”的氨基酸序列。

[0587] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图14B所描绘的指示为“2381”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图14A所描绘的指示为“1715”的氨基酸序列。

[0588] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图14B所描绘的指示为“2380”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图14D所描绘的指示为“2405”的氨基酸序列。

[0589] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图14B所描绘的指示为“2381”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图14D所描绘的指示为“2405”的氨基酸序列。在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图14F所描绘的指示为“2762”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二

多肽链包含如图14D所描绘的指示为“2405”的氨基酸序列。

[0590] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图14B所描绘的指示为“2380”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图14E所描绘的指示为“1380”的氨基酸序列。

[0591] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图14B所描绘的指示为“2381”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图14E所描绘的指示为“1380”的氨基酸序列。

[0592] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20A所描绘的指示为“3592”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20H所描绘的指示为“3188”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置1处的免疫调节多肽;和b)G2C/Y84C二硫键和R12C/A236C二硫键两者。

[0593] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20B所描绘的指示为“3425”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20H所描绘的指示为“3188”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置3处的免疫调节多肽;和b)G2C/Y84C二硫键和R12C/A236C二硫键两者。

[0594] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20C所描绘的指示为“3196”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20I所描绘的指示为“3604”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置5处的免疫调节多肽;和b)G2C/Y84C二硫键和R12C/A236C二硫键两者。

[0595] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20D所描绘的指示为“2764”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20J所描绘的指示为“3603”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置5处的免疫调节多肽;和b)R12C/A236C二硫键(而非G2C/Y84C二硫键)。

[0596] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20E所描绘的指示为“3593”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20K所描绘的指示为“3192”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置1处的免疫调节多肽;和b)G2C/Y84C二硫键(而非R12C/A236C二硫键)。

[0597] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20F所描绘的指示为“3426”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20K所描绘的指示为“3192”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置3处的免疫调节多肽;和b)G2C/Y84C二硫键(而非R12C/A236C二硫键)。

[0598] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20G所描绘的指示为“3197”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20L所描绘的指示为“3605”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置5处的免疫调节多肽;和b)G2C/Y84C二硫键(而非R12C/A236C二硫键)。

[0599] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20A所描绘的指示为“3592”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20M所描绘的指示为“3529”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置1处的免疫调节多肽;和b)G2C/Y84C二硫键及R12C/A236C二硫键两者。

[0600] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20B所描绘的指示为“3425”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20M所描绘的指示为“3529”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置3处的免疫调节多肽;和b)G2C/Y84C二硫键和R12C/A236C二硫键两者;且还包含WT1 239-247(Q240Y)表位。

[0601] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20C所描绘的指示为“3196”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20N所描绘的指示为“3709”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置3处的免疫调节多肽;和b)G2C/Y84C二硫键和R12C/A236C二硫键两者。

[0602] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图4B所描绘的指示为“2750”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图200所描绘的指示为“3528”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置1处的免疫调节多肽;和b)R12C/A236C二硫键(而非G2C/Y84C二硫键)。

[0603] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图4C所描绘的指示为“3159”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图200所描绘的指示为“3528”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置3处的免疫调节多肽;和b)R12C/A236C二硫键(而非G2C/Y84C二硫键)。

[0604] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20D所描绘的指示为“2764”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20P所描绘的指示为“3708”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置5处的免疫调节多肽;和b)R12C/A236C二硫键(而非G2C/Y84C二硫键)。

[0605] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20E所描绘的指示为“3593”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20Q所描绘的指示为“3530”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置1处的免疫调节多肽;和b)G2C/Y84C二硫键(而非R12C/A236C二硫键)。

[0606] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20F所描绘的指示为“3426”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20Q所描绘的指示为“3530”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置3处的免疫调节多肽;和b)G2C/Y84C二硫键(而非R12C/A236C二硫键)。

[0607] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20G所描绘的指示为“3197”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20R所描绘的指示为“3710”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置5处的免疫调节多肽;和b)G2C/Y84C二硫键(而非R12C/A236C二硫键)。

[0608] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20F所描绘的指示为“3426”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20M所描绘的指示为“3529”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置3处的免疫调节多肽;和b)G2C/Y84C二硫键(而非R12C/A236C二硫键);且还包括WT1 239-247(Q240Y)表位。

[0609] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20B所描绘的指示为“3425”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图200所描绘的指示为“3528”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置3处的免疫调节多

肽;和b)R12C/A236C二硫键(而非G2C/Y84C二硫键);且还包括WT1 239-247(Q240Y)表位。

[0610] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图20B所描绘的指示为“3425”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20Q所描绘的指示为“3530”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置3处的免疫调节多肽;和b)G2C/Y84C二硫键(而非R12C/A236C二硫键);且还包括WT1 239-247(Q240Y)表位。

[0611] 在一些情况下,本公开的TMMP包含:a)第一多肽链,所述第一多肽链包含如图4C所描绘的指示为“3159”的氨基酸序列;和b)第二多肽链,所述第二多肽链包含如图20H所描绘的指示为“3188”的氨基酸序列。此种TMMP包含:a)如图19描绘的在位置3处的免疫调节多肽;和b)R12C/A236C二硫键(而非G2C/Y84C二硫键);且还包括WT1 235-243(M236Y)表位。

[0612] 生成多聚体T细胞调节多肽的方法

[0613] 本公开提供一种获得包含一种或多种变异免疫调节多肽的TMMP的方法,所述一种或多种变异免疫调节多肽呈现出对同源共免疫调节多肽的亲合力与相应亲本野生型免疫调节多肽对共免疫调节多肽的亲合力相比更低,所述方法包括:A)生成包含多个成员的TMMP文库,其中各成员包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含:i)表位;及ii)第一主要MHC多肽;和b)第二多肽,所述第二多肽包含:i)第二MHC多肽;及ii)任选的Ig Fc多肽或非Ig支架,其中各成员在第一多肽、第二多肽、或第一多肽和第二多肽两者上包含不同变异免疫调节多肽;B)确定所述文库的各成员对同源共免疫调节多肽的亲合力;以及C)选择呈现出对同源共免疫调节多肽的亲合力有所减小的成员。在一些情况下,亲合力是通过生物层干涉术(BLI),使用纯化的TMMP文库成员及同源共免疫调节多肽来确定。BLI方法为本领域技术人员所公知。BLI测定在上文中描述。参见,例如Lad等人(2015)J.Biomol.Screen.20(4):498-507;以及Shah和Duncan(2014)J.Vis.Exp.18:e51383。

[0614] 本公开提供一种获得呈现出与T细胞的选择性结合的TMMP的方法,所述方法包括:A)生成包含多个成员的TMMP文库,其中各成员包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含:i)表位;及ii)第一MHC多肽;和b)第二多肽,所述第二多肽包含:i)第二MHC多肽;及ii)任选的免疫球蛋白(Ig)Fc多肽或非Ig支架,其中各成员在第一多肽、第二多肽、或第一多肽和第二多肽两者上包含不同变异免疫调节多肽,其中所述变异免疫调节多肽的氨基酸序列与亲本野生型免疫调节多肽相差1个氨基酸至10个氨基酸;B)使TMMP文库成员与在其表面上表达以下各物的靶T细胞接触:i)结合亲本野生型免疫调节多肽之同源共免疫调节多肽;及ii)结合至表位的T细胞受体,其中所述TMMP文库成员包含表位标签,使得TMMP文库成员结合至靶T细胞;C)使结合至靶T细胞的TMMP文库成员与结合至表位标签的荧光标记的结合剂接触,从而生成TMMP文库成员/靶T细胞/结合剂复合物;D)使用流动式细胞测量术测量TMMP文库成员/靶T细胞/结合剂复合物的平均荧光强度(MFI),其中在TMMP文库成员的浓度范围上测量的MFI提供亲合力及表观亲合力的量度;以及E)选择TMMP文库成员,与TMMP文库成员与对照T细胞的结合相比,所述TMMP文库成员选择性结合靶T细胞,所述对照T细胞包含i)结合亲本野生型免疫调节多肽的同源共免疫调节多肽;及ii)结合至除了存在于TMMP文库成员中的表位以外的表位的T细胞受体。在一些情况下,将鉴别为选择性结合至靶T细胞的TMMP文库成员从所述文库中分离。

[0615] 在一些情况下,亲本野生型免疫调节多肽与同源免疫调节多肽对选自:

[0616] IL-2与IL-2受体;

- [0617] 4-1BBL与4-1BB;
- [0618] PD-L1与PD-1;
- [0619] CD70与CD27;
- [0620] TGF β 与TGF β 受体;
- [0621] CD80与CD28;
- [0622] CD86与CD28;
- [0623] OX40L与OX40;
- [0624] FasL与Fas;
- [0625] ICOS-L与ICOS;
- [0626] ICAM与LFA-1;
- [0627] JAG1与Notch;
- [0628] JAG1与CD46;
- [0629] CD80与CTLA4;及
- [0630] CD86与CTLA4。

[0631] 本公开提供一种获得包含一种或多种变异免疫调节多肽的TMMP的方法,所述变异免疫调节多肽呈现出对同源共免疫调节多肽的亲合力与相应亲本野生型免疫调节多肽对共免疫调节多肽的亲合力相比有所减小,所述方法包括自包含多个成员的TMMP文库中选择呈现出对同源共免疫调节多肽的亲合力有所减小的成员,其中所述多个成员包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含:i)表位;及ii)第一MHC多肽;和b)第二多肽,所述第二多肽包含:i)第二MHC多肽;及ii)任选的Ig Fc多肽或非Ig支架,其中所述文库的成员包含存在于第一多肽、第二多肽、或第一多肽和第二多肽两者中的多个变异免疫调节多肽。在一些情况下,选择步骤包含使用生物层干涉术确定TMMP文库成员与同源共免疫调节多肽之间的结合亲合力。在一些情况下,TMMP如上文所述。

[0632] 在一些情况下,所述方法进一步包括:a)使选出的TMMP文库成员与在其表面上表达以下各物的靶T细胞接触:i)结合亲本野生型免疫调节多肽的同源共免疫调节多肽;及ii)结合至表位的T细胞受体,其中TMMP文库成员包含表位标签,使得所述TMMP文库成员结合至靶T细胞;b)使结合至靶T细胞的选出的TMMP文库成员与结合至表位标签的荧光标记的结合剂接触,从而生成选出的TMMP文库成员/靶T细胞/结合剂复合物;以及c)使用流动式细胞测量术测量选出的TMMP文库成员/靶T细胞/结合剂复合物的平均荧光强度(MFI),其中在选出的TMMP文库成员的浓度范围上测量的MFI提供亲合力及表观亲合力的量度。与TMMP文库成员与包含以下的对照T细胞的结合相比,选择性结合靶T细胞的选出的TMMP文库成员鉴别为选择性结合至靶T细胞:i)结合亲本野生型免疫调节多肽的同源共免疫调节多肽;及ii)结合至除了TMMP文库成员中存在的表位以外的表位的T细胞受体。在一些情况下,结合剂为对表位标签具有特异性的抗体。在一些情况下,变异免疫调节多肽与相应亲本野生型免疫调节多肽相比包含1至20个氨基酸取代(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸取代)。在一些情况下,TMMP包含两种变异免疫调节多肽。在一些情况下,这两种变异免疫调节多肽包含相同氨基酸序列。在一些情况下,第一多肽包含这两种变异免疫调节多肽中的一种且其中第二多肽包含这两种变异免疫调节多肽中的第二种。在一些情况下,这两种变异免疫调节多肽处于TMMP的相同多肽链上。在一些情况下,

这两种变异免疫调节多肽处于TMMP的第一多肽上。在一些情况下,这两种变异免疫调节多肽处于TMMP的第二多肽上。

[0633] 在一些情况下,所述方法进一步包括从文库中分离选出的TMMP文库成员。在一些情况下,所述方法进一步包括提供包含编码选出的TMMP文库成员的核苷酸序列的核酸。在一些情况下,所述核酸存在于重组表达载体中。在一些情况下,核苷酸序列可操作连接至在真核细胞中起作用的转录控制元件。在一些情况下,所述方法进一步包括将核酸引入真核宿主细胞中及在液体培养基中培养细胞以在细胞中合成所编码的选出的TMMP文库成员。在一些情况下,所述方法进一步包括从细胞或从包含所述细胞的液体培养基中分离所合成的选出的TMMP文库成员。在一些情况下,所选择的TMMP文库成员包含Ig Fc多肽。在一些情况下,所述方法进一步包括将药物缀合至Ig Fc多肽。在一些情况下,药物为选自以下的细胞毒性剂:美登木素、苯二氮卓、类紫杉醇、CC-1065、倍癌霉素、倍癌霉素类似物、卡利奇霉素、尾海兔素、尾海兔素类似物、澳瑞他汀、茅屋霉素、及细霉素、或前述任一种的前药。在一些情况下,药物为类视黄醇。在一些情况下,亲本野生型免疫调节多肽和同源免疫调节多肽选自:IL-2和IL-2受体;4-1BBL和4-1BB;PD-L1和PD-1;CD70和CD27;TGF β 和TGF β 受体;CD80和CD28;CD86和CD28;OX40L和OX40;FasL和Fas;ICOS-L和ICOS;ICAM和LFA-1;JAG1和Notch;JAG1和CD46;CD80和CTLA4;以及CD86和CTLA4。

[0634] 本公开提供一种获得包含一种或多种变异免疫调节多肽的TMMP的方法,所述一种或多种变异免疫调节多肽呈现出对同源共免疫调节多肽的亲合力与相应亲本野生型免疫调节多肽对共免疫调节多肽的亲合力相比有所减小,所述方法包括:A) 提供包含多个成员的TMMP文库,其中所述多个成员包含:a) 第一多肽,所述第一多肽包含:i) 表位;及ii) 第一MHC多肽;和b) 第二多肽,所述第二多肽包含:i) 第二MHC多肽;及ii) 任选的Ig Fc多肽或非Ig支架,其中所述文库的成员包含存在于第一多肽、第二多肽、或第一多肽和第二多肽两者中的多个变异免疫调节多肽;以及B) 从文库中选择呈现出对同源共免疫调节多肽的亲合力有所减小的成员。在一些情况下,选择步骤包含使用生物层干涉术确定TMMP文库成员与同源共免疫调节多肽之间的结合亲合力。在一些情况下,TMMP如上文所述。

[0635] 在一些情况下,所述方法进一步包括:a) 使选出的TMMP文库成员与在其表面上表达以下各物的靶T细胞接触:i) 结合亲本野生型免疫调节多肽的同源共免疫调节多肽;及ii) 结合至表位的T细胞受体,其中TMMP文库成员包含表位标签,使得所述TMMP文库成员结合至靶T细胞;b) 使结合至靶T细胞的选出的TMMP文库成员与结合至表位标签的荧光标记的结合剂接触,从而生成选出的TMMP文库成员/靶T细胞/结合剂复合物;以及c) 使用流动式细胞测量术测量选出的TMMP文库成员/靶T细胞/结合剂复合物的平均荧光强度(MFI),其中在选出的TMMP文库成员的浓度范围上测量的MFI提供亲合力及表观亲合力的量度。同TMMP文库成员与包含以下的对照T细胞的结合相比,选择性结合靶T细胞的选出的TMMP文库成员被鉴别为选择性结合至靶T细胞:i) 结合亲本野生型免疫调节多肽的同源共免疫调节多肽;及ii) 结合至除了TMMP文库成员中存在的表位以外的表位的T细胞受体。在一些情况下,结合剂为对表位标签具有特异性的抗体。在一些情况下,变异免疫调节多肽与相应亲本野生型免疫调节多肽相比包含1至20个氨基酸取代(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸取代)。在一些情况下,TMMP包含两种变异免疫调节多肽。在一些情况下,这两种变异免疫调节多肽包含相同氨基酸序列。在一些情况下,第一多肽包含

这两种变异免疫调节多肽中的一种且其中第二多肽包含这两种变异免疫调节多肽中的第二种。在一些情况下,这两种变异免疫调节多肽处于TMMP的相同多肽链上。在一些情况下,这两种变异免疫调节多肽处于TMMP的第一多肽上。在一些情况下,这两种变异免疫调节多肽处于TMMP的第二多肽上。

[0636] 在一些情况下,所述方法进一步包括从文库中分离选出的TMMP文库成员。在一些情况下,所述方法进一步包括提供包含编码选出的TMMP文库成员的核苷酸序列的核酸。在一些情况下,所述核酸存在于重组表达载体中。在一些情况下,核苷酸序列可操作连接至在真核细胞中起作用的转录控制元件。在一些情况下,所述方法进一步包括将核酸引入真核宿主细胞中及在液体培养基中培养细胞以在细胞中合成所编码的选出的TMMP文库成员。在一些情况下,所述方法进一步包括自细胞或自包含该细胞的液体培养基中分离所合成的选出的TMMP文库成员。在一些情况下,所选的TMMP文库成员包含Ig Fc多肽。在一些情况下,所述方法进一步包括将药物缀合至Ig Fc多肽。在一些情况下,药物为选自以下的细胞毒性剂:美登木素、苯二氮卓、类紫杉醇、CC-1065、倍癌霉素、倍癌霉素类似物、卡利奇霉素、尾海兔素、尾海兔素类似物、澳瑞他汀、茅屋霉素及细霉素、或前述任一者的前药。在一些情况下,药物为类视黄醇。在一些情况下,亲本野生型免疫调节多肽和同源免疫调节多肽选自IL-2和IL-2受体;4-1BBL和4-1BB;PD-L1和PD-1;TGF β 和TGF β 受体;CD80和CD28;CD86和CD28;OX40L和OX40;FasL和Fas;ICOS-L和ICOS;CD70和CD27;ICAM和LFA-1;JAG1和Notch;JAG1和CD46;CD80和CTLA4;以及CD86和CTLA4。

[0637] 核酸

[0638] 本公开提供一种核酸,其包含编码本公开的TMMP的核苷酸序列。本公开提供一种核酸,其包含编码本公开的TMMP的核苷酸序列。

[0639] 本公开提供包含编码本公开的TMMP的核苷酸序列的核酸。在一些情况下,本公开的TMMP的个别多肽链在单独的核酸中编码。在一些情况下,本公开的TMMP的全部多肽链均在单一核酸中编码。在一些情况下,第一核酸包含编码本公开的TMMP的第一多肽的核苷酸序列;且第二核酸包含编码本公开的TMMP的第二多肽的核苷酸序列。在一些情况下,单一核酸包含编码本公开的TMMP的第一多肽和本公开的TMMP的第二多肽的核苷酸序列。

[0640] 编码多聚体多肽的个别多肽链的单独核酸

[0641] 本公开提供包含编码本公开的TMMP的核苷酸序列的核酸。如上文所述,在一些情况下,本公开的TMMP的个别多肽链在单独的核酸中编码。在一些情况下,编码本公开的TMMP的单独多肽链的核苷酸序列可操作地连接至转录控制元件,例如启动子,诸如在真核细胞中起作用的启动子,其中所述启动子可为组成型启动子或诱导型启动子。

[0642] 本公开提供第一核酸和第二核酸,其中第一核酸包含编码本公开的TMMP的第一多肽的核苷酸序列,其中第一多肽以从N端至C端的次序包含:a)表位(例如,T细胞表位);b)第一MHC多肽;及c)免疫调节多肽(例如,如上文所述的亲和力减小的变体);且其中第二核酸包含编码本公开的TMMP的第二多肽的核苷酸序列,其中第二多肽以从N端至C端的次序包含:a)第二MHC多肽;及b)Ig Fc多肽。适合的T细胞表位、MHC多肽、免疫调节多肽及Ig Fc多肽如上文所述。在一些情况下,编码第一多肽和第二多肽的核苷酸序列可操作地连接至转录控制元件。在一些情况下,转录控制元件为在真核细胞中起作用的启动子。在一些情况下,核酸存在于单独的表达载体中。

[0643] 本公开提供第一核酸和第二核酸,其中第一核酸包含编码本公开的TMMP的第一多肽的核苷酸序列,其中第一多肽以从N端至C端的次序包含:a)表位(例如,T细胞表位);和b)第一MHC多肽;且其中第二核酸包含编码本公开的TMMP的第二多肽的核苷酸序列,其中第二多肽以从N端至C端的次序包含:a)免疫调节多肽(例如,如上文所述的亲和力减小的变体);b)第二MHC多肽;及c)Ig Fc多肽。适合的T细胞表位、MHC多肽、免疫调节多肽及Ig Fc多肽如上文所述。在一些情况下,编码第一多肽和第二多肽的核苷酸序列可操作地连接至转录控制元件。在一些情况下,转录控制元件为在真核细胞中起作用的启动子。在一些情况下,核酸存在于单独的表达载体中。

[0644] 编码存在于多聚体多肽中的两种或更多种多肽的核酸

[0645] 本公开提供一种核酸,其包含至少编码本公开的TMMP的第一多肽和第二多肽的核苷酸序列。在一些情况下,在本公开的TMMP包括第一多肽、第二多肽及第三多肽时,核酸包括编码第一多肽、第二多肽及第三多肽的核苷酸序列。在一些情况下,编码本公开的TMMP的第一多肽和第二多肽的核苷酸序列包括插入编码第一多肽的核苷酸序列与编码第二多肽的核苷酸序列之间的蛋白水解可裂解的接头。在一些情况下,编码本公开的TMMP的第一多肽和第二多肽的核苷酸序列包括插入编码第一多肽的核苷酸序列与编码第二多肽的核苷酸序列之间的内部核糖体进入位点(IRES)。在一些情况下,编码本公开的TMMP的第一多肽和第二多肽的核苷酸序列包括插入编码第一多肽的核苷酸序列与编码第二多肽的核苷酸序列之间的核糖体跳跃信号(或顺式作用水解酶元件,CHYSEL (SEQ ID NO:394))。核酸的实例在下文中描述,在蛋白水解可裂解的接头提供于编码本公开的TMMP的第一多肽与第二多肽的核苷酸序列之间;在这些实施方案的任一个中,IRES或核糖体跳跃信号可用于代替编码蛋白水解可裂解的接头的核苷酸序列。

[0646] 在一些情况下,第一核酸(例如,重组表达载体、mRNA、病毒RNA等)包含编码本公开的TMMP的第一多肽链的核苷酸序列;且第二核酸(例如,重组表达载体、mRNA、病毒RNA等)包含编码本公开的TMMP的第二多肽链的核苷酸序列。在一些情况下,编码第一多肽的核苷酸序列和编码第二多肽的第二核苷酸序列各自可操作地连接至转录控制元件,例如启动子,诸如在真核细胞中起作用的启动子,其中所述启动子可为组成型启动子或诱导型启动子。

[0647] 本公开提供一种核酸,所述核酸包含编码重组多肽的核苷酸序列,其中所述重组多肽以从N端至C端的次序包含:a)表位(例如,T细胞表位);b)第一MHC多肽;c)免疫调节多肽(例如,如上文所述的亲和力减小的变体);d)蛋白水解可裂解的接头;e)第二MHC多肽;及f)免疫球蛋白(Ig)Fc多肽。本公开提供一种核酸,所述核酸包含编码重组多肽的核苷酸序列,其中所述重组多肽以从N端至C端的次序包含:a)第一前导肽;b)表位;c)第一MHC多肽;d)免疫调节多肽(例如,如上文所述的亲和力减小的变体);e)蛋白水解可裂解的接头;f)第二前导肽;g)第二MHC多肽;及h)Ig Fc多肽。本公开提供一种核酸,所述核酸包含编码重组多肽的核苷酸序列,其中所述重组多肽以从N端至C端的次序包含:a)表位;b)第一MHC多肽;c)蛋白水解可裂解的接头;d)免疫调节多肽(例如,如上文所述的亲和力减小的变体);e)第二MHC多肽;及f)Ig Fc多肽。在一些情况下,第一前导肽和第二前导肽为 β 2-M前导肽。在一些情况下,核苷酸序列可操作地连接至转录控制元件。在一些情况下,转录控制元件为在真核细胞中起作用的启动子。

[0648] 适合的MHC多肽在上文中描述。在一些情况下,第一MHC多肽为 β 2-微球蛋白多肽;

且其中第二MHC多肽为I类MHC重链多肽。在一些情况下,β2-微球蛋白多肽包含与图6中描绘的β2M氨基酸序列具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,I类MHC重链多肽为HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、HLA-K或HLA-L重链。在一些情况下,I类MHC重链多肽包含与图3A-3C中任一个所描绘的氨基酸序列具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0649] 适合的Fc多肽在上文中描述。在一些情况下,Ig Fc多肽为IgG1Fc多肽、IgG2 Fc多肽、IgG3 Fc多肽、IgG4 Fc多肽、IgA Fc多肽或IgM Fc多肽。在一些情况下,Ig Fc多肽包含与图5A-5G中描绘的氨基酸序列具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0650] 适合的免疫调节多肽在上文中描述。

[0651] 适合的蛋白水解可裂解的接头在上文中描述。在一些情况下,蛋白水解可裂解的接头包含选自以下的氨基酸序列:a) LEVLFQGP (SEQ ID NO:388); b) ENLYTQS (SEQ ID NO:389); c) DDDDK (SEQ ID NO:390); d) LVPR (SEQ ID NO:391); 及e) GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:392)。

[0652] 在一些情况下,介于表位与第一MHC多肽之间的接头包含第一Cys残基,且第二MHC多肽包含提供第二Cys残基的氨基酸取代,使得第一Cys残基及第二Cys残基提供接头与第二MHC多肽之间的二硫键联。在一些情况下,第一MHC多肽包含提供第一Cys残基的氨基酸取代,且第二MHC多肽包含提供第二Cys残基的氨基酸取代,使得第一Cys残基及第二Cys残基提供第一MHC多肽与第二MHC多肽之间的二硫键联。

[0653] 重组表达载体

[0654] 本公开提供包含本公开的核酸的重组表达载体。在一些情况下,重组表达载体为非病毒载体。在一些情况下,重组表达载体为病毒构建体,例如重组腺相关病毒构建体(参见,例如美国专利号7,078,387)、重组腺病毒构建体、重组慢病毒构建体、重组逆转录病毒构建体、非整合病毒载体等。

[0655] 适合的表达载体包括但不限于病毒载体(例如,基于以下的病毒载体:牛痘病毒;脊髓灰质炎病毒;腺病毒(参见,例如Li等人,Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543 2549,1994;Borrás等人,Gene Ther 6:515524,1999;Li和Davidson,PNAS 92:7700 7704,1995;Sakamoto等人,H Gene Ther 5:1088 1097,1999;WO 94/12649、WO 93/03769;WO93/19191;WO 94/28938;WO 95/11984及WO 95/00655);腺相关病毒(参见,例如Ali等人,Hum Gene Ther 9:81 86,1998,Flannery等人,PNAS 94:6916 6921,1997;Bennett等人,Invest Ophthalmol Vis Sci38:2857 2863,1997;Jomary等人,Gene Ther 4:683 690,1997,Rolling等人,Hum Gene Ther 10:641 648,1999;Ali等人,Hum Mol Genet5:591 594,1996;Srivastava in WO 93/09239,Samulski等人,J.Vir. (1989) 63:3822-3828;Mendelson等人,Virol. (1988) 166:154-165;以及Flotte等人,PNAS (1993) 90:10613-10617);SV40;单纯疱疹病毒;人免疫缺陷病毒(参见,例如Miyoshi等人,PNAS 94:10319 23,1997;Takahashi等人,J Virol 73:7812 7816,1999);逆转录病毒载体(例如,鼠类白血病病毒、脾坏死病毒及源自逆转录病毒诸如劳斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus)、哈维肉瘤病毒(Harvey Sarcoma Virus)、禽白血病病毒、慢病毒、人免疫缺陷病毒、骨髓增殖性肉瘤病毒及乳腺肿瘤病毒的载体);等等。

[0656] 大量适合的表达载体为本领域技术人员所知,且许多表达载体为市售的。以下载

体作为实例提供;对于真核宿主细胞:pXT1、pSG5 (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG及pSVLSV40 (Pharmacia)。然而,可使用任何其他载体,只要其与宿主细胞相容。

[0657] 取决于所利用的宿主/载体系统,在表达载体中可使用许多适合的转录及转译控制元件中的任一个,包括组成型和诱导型启动子、转录增强子元件、转录终止子等(参见,例如Bitter等人(1987)Methods in Enzymology,153:516-544)。

[0658] 在一些情况下,编码DNA靶向RNA和/或定点修饰多肽的核苷酸序列可操作地连接至控制元件,例如转录控制元件,诸如启动子。转录控制元件可在真核细胞例如哺乳动物细胞;或原核细胞(例如细菌或古细菌细胞)中起作用。在一些情况下,编码DNA靶向RNA和/或定点修饰多肽的核苷酸序列可操作地连接至允许编码DNA靶向RNA和/或定点修饰多肽的核苷酸序列在原核细胞和真核细胞中表达的多个控制元件。

[0659] 适合的真核细胞启动子(在真核细胞中起作用的启动子)的非限制性实例包括来自以下的那些启动子:巨细胞病毒(CMV)即刻早期、单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶、早期及晚期SV40、来自逆转录病毒的长末端重复序列(LTR)及小鼠金属硫蛋白-I。适当载体及启动子的选择正处于一般本领域技术人员的水平内。表达载体还可含有用于转译起始的核糖体结合位点和转录终止子。表达载体还可包括用于扩增表达的适当序列。

[0660] 基因修饰的宿主细胞

[0661] 本公开提供一种基因修饰的宿主细胞,其中所述宿主细胞被本公开的核酸基因修饰。

[0662] 适合的宿主细胞包括真核细胞,诸如酵母细胞、昆虫细胞及哺乳动物细胞。在一些情况下,宿主细胞为哺乳动物细胞系的细胞。适合的哺乳动物细胞系包括人细胞系、非人灵长类动物细胞系、啮齿动物(例如小鼠、大鼠)细胞系等。适合的哺乳动物细胞系包括但不限于HeLa细胞(例如,美国模式培养物保藏中心(ATCC)号CCL-2)、CHO细胞(例如,ATCC号CRL9618、CCL61、CRL9096)、293细胞(例如,ATCC号CRL-1573)、Vero细胞、NIH 3T3细胞(例如,ATCC号CRL-1658)、Huh-7细胞、BHK细胞(例如,ATCC号CCL10)、PC12细胞(ATCC号CRL1721)、COS细胞、COS-7细胞(ATCC号CRL1651)、RAT1细胞、小鼠L细胞(ATCC号CCL1.3)、人胚胎肾(HEK)细胞(ATCC号CRL1573)、HLHepG2细胞等。

[0663] 在一些情况下,宿主细胞为已被基因修饰使得其并未合成内源性MHC β 2-M的哺乳动物细胞。

[0664] 在一些情况下,宿主细胞为已被基因修饰使得其并未合成内源性I类MHC重链的哺乳动物细胞。在一些情况下,宿主细胞为已被基因修饰使得其并未合成内源性MHC β 2-M且使得其并未合成内源性I类MHC重链的哺乳动物细胞。

[0665] 组合物

[0666] 本公开提供包含本公开的TMMP(synTac)的组合物,包括药物组合物。本公开提供包含本公开的TMMP的组合物,包括药物组合物。本公开提供包含本公开的核酸或重组表达载体的组合物,包括药物组合物。

[0667] 包含多聚体多肽的组合物

[0668] 除了本公开的TMMP以外,本公开的组合物还可包含以下中的一种或多种:盐,例如NaCl、MgCl₂、KCl、MgSO₄等;缓冲剂,例如Tris缓冲液、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙烷磺酸)(HEPES)、2-(吗啉代)乙烷磺酸(MES)、2-(吗啉代)乙烷磺酸钠盐(MES)、3-(吗啉代)丙烷磺

酸(MOPS)、N-三[羟乙基]甲基-3-氨基丙烷磺酸(TAPS)等;增溶剂;清洁剂,例如非离子性清洁剂,诸如Tween-20等;蛋白酶抑制剂;甘油;等等。

[0669] 组合物可包含药学上可接受的赋形剂,多种赋形剂为本领域中已知的且不必在本文中详细论述。药学上可接受的赋形剂已充分描述于多个出版物中,包括例如“Remington: The Science and Practice of Pharmacy”,第19版(1995)或最新版本,Mack Publishing Co;A.Gennaro(2000)“Remington:The Science and Practice of Pharmacy”,第20版,Lippincott,Williams,&Wilkins;Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(1999)H.C.Ansel等人编,第7版,Lippincott,Williams,&Wilkins;及Handbook of Pharmaceutical Excipients(2000)A.H.Kibbe等人编,第3版.Amer.Pharmaceutical Assoc。

[0670] 药物组合物可包含本公开的TMMP及药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,本药物组合物将适用于向受试者施用,例如将为无菌的。例如,在一些情况下,本药物组合物将适用于向人受试者施用,例如其中组合物为无菌的且不含可检测的热原和/或其他毒素。

[0671] 蛋白质组合物可包含其他组分,诸如医药级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、镁、碳酸盐等。组合物可含有接近生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,诸如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠、盐酸盐、硫酸盐、溶剂合物(例如,混合型离子盐、水、有机物)、水合物(例如,水)等。

[0672] 举例来说,组合物可包括水溶液、粉末形式、颗粒、片剂、丸剂、栓剂、胶囊剂、混悬液、喷雾剂等。组合物可根据下文所述的各种施用途径配制。

[0673] 在本公开的TMMP作为可注射物(例如,皮下、腹膜内、肌肉内和/或静脉内)直接施用于组织中时,制剂可以即用剂型或以非水性形式(例如,可复水的保存稳定的粉末)或水性形式(诸如,由药学上可接受的载剂和赋形剂构成的液体)提供。也可提供含蛋白质的制剂以便在施用后延长TMMP的血清半衰期。举例来说,TMMP可提供于脂质体制剂中,制备为胶体,或使用用于延长血清半衰期的其他常规技术。多种方法可用于制备脂质体,如例如Szoka等人1980Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9:467,美国专利号4,235,871、4,501,728及4,837,028中所述。制剂也可以受控释放或缓慢释放形式提供。

[0674] 适用于胃肠外施用的制剂的其他实例包括等张无菌注射溶液、抗氧化剂、抑菌剂、及使制剂与预定接受者的血液等张的溶质、悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂及防腐剂。举例来说,本药物组合物可存在于容器,例如无菌容器,诸如注射器中。制剂可于单位剂量或多剂量密封容器(诸如安瓿及小瓶)中提供,且可储存于冷冻干燥(冻干)条件下,其仅需要在临使用前添加无菌液体赋形剂,例如注射用水。临时注射溶液和混悬液可从无菌粉剂、颗粒及片剂制备。

[0675] 本公开的TMMP在制剂中的浓度可广泛变化(例如,自小于约0.1重量%(通常为或至少约2重量%)至多达20重量%至50重量%或更大)且通常将主要基于流体体积、粘度及基于患者的因素,根据所选的特定施用模式及患者需求而选择。

[0676] 本公开提供包含本公开的组合物(例如液体组合物)的容器。容器可为例如注射器、安瓿等。在一些情况下,容器为无菌的。在一些情况下,容器和组合物二者皆为无菌的。

[0677] 本公开提供包含本公开的TMMP的组合物,包括药物组合物。组合物可包含:a)本公

开的TMMP;和b)如上文所述的赋形剂。在一些情况下,赋形剂为药学上可接受的赋形剂。

[0678] 在一些情况下,本公开的TMMP存在于液体组合物中。因此,本公开提供包含本公开的TMMP的组合物(例如液体组合物,包括药物组合物)。在一些情况下,本公开的组合物包含:a)本公开的TMMP;和b)盐水(例如,0.9%NaCl)。在一些情况下,组合物为无菌的。在一些情况下,组合物适用于向人受试者施用,例如其中组合物为无菌的且不含可检测的热原和/或其他毒素。因此,本公开提供一种组合物,其包含:a)本公开的TMMP;和b)盐水(例如,0.9%NaCl),其中所述组合物为无菌的且不含可检测的热原和/或其他毒素。

[0679] 包含核酸或重组表达载体的组合物

[0680] 本公开提供包含本公开的核酸或重组表达载体的组合物,例如药物组合物。多种药学上可接受的赋形剂为本领域中已知且不必在本文中详细论述。药学上可接受的赋形剂已充分描述于多个出版物中,包括例如A.Gennaro(2000)“Remington:The Science and Practice of Pharmacy”,第20版,Lippincott,Williams,&Wilkins;Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(1999)H.C.Ansel等人编,第7版,Lippincott,Williams,&Wilkins;以及Handbook of Pharmaceutical Excipients(2000)A.H.Kibbe等人编,第3版.Amer.Pharmaceutical Assoc.

[0681] 本公开的组合物可包括:a)一种或多种核酸或一种或多种重组表达载体,其包含编码TMMP的核苷酸序列;和b)以下中的一种或多种:缓冲剂、表面活性剂、抗氧化剂、亲水性聚合物、糊精、螯合剂、悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂、抑菌剂、润湿剂及防腐剂。适合的缓冲剂包括但不限于(诸如N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙烷磺酸(BES)、双(2-羟乙基)氨基-三(羟甲基)甲烷(BIS-Tris)、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'3-丙烷磺酸(EPPS或HEPPS)、双甘氨酸、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸(HEPES)、3-(吗啉代)丙烷磺酸(MOPS)、哌嗪-N,N'-双(2-乙烷磺酸)(PIPES)、碳酸氢钠、3-(N-三(羟甲基)-甲基-氨基)-2-羟基-丙烷磺酸(TAPSO)、(N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙烷磺酸(TES)、N-三(羟甲基)甲基-甘氨酸(Tricine)、三(羟甲基)-氨基甲烷(Tris)等)。适合的盐包括例如NaCl、MgCl₂、KCl、MgSO₄等。

[0682] 本公开的药物制剂可包括约0.001%至约90%(w/w)的量的本公开的核酸或重组表达载体。在制剂的以下描述中,“本核酸或重组表达载体”应理解为包括本公开的核酸或重组表达载体。举例来说,在一些情况下,本制剂包含本公开的核酸或重组表达载体。

[0683] 本核酸或重组表达载体可与其他化合物或化合物混合物掺合,以其他化合物或化合物混合物包封,与其他化合物或化合物混合物缀合,或以其他方式与其他化合物或化合物混合物缔合;此类化合物可包括例如脂质体或受体靶向分子。本核酸或重组表达载体可与帮助摄取、分布和/或吸收的一种或多种组分一起组合于制剂中。

[0684] 本核酸或重组表达载体组合物可被配制成许多可能剂型中的任一个,诸如但不限于片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆、软凝胶、栓剂及灌肠剂。本核酸或重组表达载体组合物亦可被配制成水性、非水性或混合介质中的混悬液。水性混悬液可进一步含有增加混悬液粘度的物质,包括例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇和/或葡聚糖。混悬液还可含有稳定剂。

[0685] 包含本核酸或重组表达载体的制剂可为脂质体制剂。如本文所用,术语“脂质体”意指由以一个或多个球形双层排列的两亲性脂质构成的囊泡。脂质体为单层或多层囊泡,其具有由亲脂性材料形成的膜及含有待递送的组合物水性内腔。阳性脂质体为带正电脂质体,其可与带负电DNA分子相互作用以形成稳定复合物。据信pH敏感性或带负电之脂质体

截留DNA,而非与其复合。阳离子和非阳离子脂质体皆可用于递送本核酸或重组表达载体。

[0686] 脂质体还包括“空间上稳定的”脂质体,如本文所用,该术语是指包含一种或多种特化脂质的脂质体,所述特化脂质当并入脂质体中时导致其循环寿命相对于缺乏此类特化脂质的脂质体有所增加。空间上稳定的脂质体的实例为如下的那些,其中脂质体之囊泡形成脂质的一部分包含一种或多种糖脂或以一种或多种亲水性聚合物诸如聚乙二醇(PEG)部分衍生化。脂质体及其用途进一步描述于美国专利号6,287,860中,其以引用方式整体并入本文。

[0687] 本公开的制剂和组合物还可包括表面活性剂。表面活性剂于药物产品、制剂及乳液中的用途为本领域中所公知。表面活性剂及其用途进一步描述于美国专利号6,287,860中。

[0688] 在一实施方案中,包括各种渗透增强剂以实现核酸的有效递送。除了帮助非亲脂性药物扩散穿过细胞膜以外,渗透增强剂还增强亲脂性药物的渗透性。渗透增强剂可被分类为属五大类别之一,即表面活性剂、脂肪酸、胆盐、螯合剂及非螯合非表面活性剂。渗透增强剂及其用途进一步描述于美国专利号6,287,860中,其以引用方式整体并入本文。

[0689] 用于经口施用的组合物和制剂包括粉剂或颗粒、微粒、纳米微粒、水或非水性介质中的混悬液或溶液、胶囊、凝胶胶囊、小药囊、片剂或微型片剂。可期望增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂。适合的口服制剂包含如下的那些,其中本反义核酸与渗透增强剂表面活性剂及螯合剂中的一种或多种一起施用。适合的表面活性剂包括但不限于脂肪酸和/或其酯或盐、胆酸和/或其盐。适合的胆酸/盐及脂肪酸及其用途进一步描述于美国专利号6,287,860中。渗透增强剂,例如脂肪酸/盐与胆酸/盐组合的组合亦为适合的。示例性适合组合为月桂酸、癸酸及UDCA的钠盐。其他渗透增强剂包括但不限于聚氧乙烯-9-月桂基醚及聚氧乙烯-20-十六烷基醚。适合的渗透增强剂还包括丙二醇、二甲亚砜、三乙醇胺、N,N-二甲基乙酰胺、N,N-二甲基甲酰胺、2-吡咯啉酮及其衍生物、四氢糠醇及AZONE™。

[0690] 调节T细胞活性的方法

[0691] 本公开提供一种选择性调节表位特异性T细胞的活性的方法,所述方法包括使T细胞与本公开的TMMP接触,其中使T细胞与本公开的TMMP接触选择性调节表位特异性T细胞的活性。在一些情况下,所述接触在体外发生。在一些情况下,所述接触在体内发生。在一些情况下,所述接触离体发生。

[0692] 在一些情况下,例如,在靶T细胞为CD8⁺T细胞时,TMMP包含I类MHC多肽(例如, β 2-微球蛋白和I类MHC重链)。

[0693] 在本公开的TMMP包括作为活化多肽的免疫调节多肽时,T细胞与TMMP的接触激活表位特异性T细胞。在一些情况下,表位特异性T细胞为对存在于癌细胞上的表位有特异性的T细胞,且表位特异性T细胞与TMMP的接触提高T细胞对癌细胞的细胞毒性活性。在一些情况下,表位特异性T细胞为对存在于癌细胞上的表位有特异性的T细胞,且表位特异性T细胞与TMMP的接触增加表位特异性T细胞的数目。

[0694] 在一些情况下,表位特异性T细胞为对存在于病毒感染细胞上的表位有特异性的T细胞,且表位特异性T细胞与TMMP的接触提高T细胞对病毒感染细胞的细胞毒性活性。在一些情况下,表位特异性T细胞为对存在于病毒感染细胞上的表位有特异性的T细胞,且表位特异性T细胞与TMMP的接触增加表位特异性T细胞的数目。

[0695] 在本公开的TMMP包括作为抑制性多肽的免疫调节多肽时,T细胞与TMMP的接触抑制表位特异性T细胞。在一些情况下,表位特异性T细胞为对存在于自体抗原上的表位有特异性的自身反应性T细胞,且所述接触减少自身反应性T细胞的数量。

[0696] 本公开提供一种调节个体中的免疫反应的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的本公开的TMMP。施用TMMP诱导表位特异性T细胞反应(例如,WT-1表位特异性T-细胞反应)和表位非特异性T细胞反应,其中表位特异性T细胞反应与表位非特异性T细胞反应的比率为至少2:1。在一些情况下,表位特异性T细胞反应与表位非特异性T细胞反应的比率为至少5:1。在一些情况下,表位特异性T细胞反应与表位非特异性T细胞反应的比率为至少10:1。在一些情况下,表位特异性T细胞反应与表位非特异性T细胞反应的比率为至少25:1。在一些情况下,表位特异性T细胞反应与表位非特异性T细胞反应的比率为至少50:1。在一些情况下,表位特异性T细胞反应与表位非特异性T细胞反应的比率为至少100:1。在一些情况下,个体为人。在一些情况下,所述调节增加对癌细胞(例如表达WT-1的癌细胞)的细胞毒性T细胞反应。在一些情况下,所述施用为静脉内、皮下、肌肉内、全身性、淋巴管内、治疗部位远端、局部或治疗部位处或附近的施用。

[0697] 本公开提供一种选择性递送共刺激(即,免疫调节)多肽至靶T细胞的方法,所述方法包括使混合T细胞群与本公开的TMMP接触,其中所述混合T细胞群包含靶T细胞和非靶T细胞,其中靶T细胞对存在于TMMP内的表位有特异性(例如,其中靶T细胞对存在于TMMP内的WT-1表位有特异性),且其中所述接触步骤递送存在于TMMP内的一种或多种共刺激多肽(免疫调节多肽)至靶T细胞。在一些情况下,所述T细胞群在体外。在一些情况下,所述T细胞群在个体体内。在一些情况下,所述方法包括向个体施用TMMP。在一些情况下,T细胞为细胞毒性T细胞。在一些情况下,混合的T细胞群是从个体获得的体外混合的T细胞群,且接触步骤导致靶T细胞的活化和/或增殖,从而生成活化和/或增殖的靶T细胞群;在这些情况的一些下,所述方法进一步包括向个体施用活化和/或增殖的靶T细胞群。

[0698] 本公开提供一种检测从个体获得的混合T细胞群中结合目标表位(例如,WT-1表位)的靶T细胞的存在的方法,所述方法包括:a)使混合T细胞群与本公开的TMMP在体外接触,其中TMMP包含目标表位(例如,WT-1表位);及b)检测T细胞响应于所述接触的活化和/或增殖,其中活化和/或增殖的T细胞指示靶T细胞的存在。

[0699] 治疗方法

[0700] 本公开提供一种治疗个体的方法,所述方法包括向个体施用有效治疗个体的量的本公开的TMMP或一种或多种编码TMMP的核酸。还提供本公开的TMMP,其是用于治疗人或动物体的方法中。在一些情况下,本公开的治疗方法包括向有需要的个体施用包含编码本公开的TMMP的核苷酸序列的一种或多种重组表达载体。在一些情况下,本公开的治疗方法包括向有需要的个体施用包含编码本公开的TMMP的核苷酸序列的一种或多种mRNA分子。在一些情况下,本公开的治疗方法包括向有需要的个体施用本公开的TMMP。可治疗的病状包括例如如下文所述的癌症和自身免疫性疾病。

[0701] 在一些情况下,本公开的TMMP当向有需要的个体施用时诱导表位特异性T细胞反应及表位非特异性T细胞反应。换句话说,在一些情况下,本公开的TMMP当向有需要的个体施用时通过调节第一T细胞的活性来诱导表位特异性T细胞反应,所述第一T细胞呈现出:i)对存在于TMMP中的表位有特异性的TCR;ii)结合至存在于TMMP中的免疫调节多肽的共免疫

调节多肽;且通过调节第二T细胞的活性来诱导表位非特异性T细胞反应,所述第二T细胞呈现出:i)对除了存在于TMMP中的表位以外的表位有特异性的TCR;及ii)结合至存在于TMMP中的免疫调节多肽的共免疫调节多肽。表位特异性T细胞反应与表位非特异性T细胞反应的比率为至少2:1、至少5:1、至少10:1、至少15:1、至少20:1、至少25:1、至少50:1、或至少100:1。表位特异性T细胞反应与表位非特异性T细胞反应的比率为约2:1至约5:1、约5:1至约10:1、约10:1至约15:1、约15:1至约20:1、约20:1至约25:1、约25:1至约50:1、或约50:1至约100:1、或大于100:1。“调节T细胞的活性”可包括以下各项中的一个或多个:i)激活细胞毒性(例如CD8⁺)T细胞;ii)诱导细胞毒性(例如CD8⁺)T细胞的细胞毒性活性;iii)诱导细胞毒性(例如CD8⁺)T细胞对细胞毒素(例如穿孔蛋白;颗粒酶;粒溶蛋白)的产生及释放;iv)抑制自身反应性T细胞的活性;等等。

[0702] 免疫调节多肽对其同源共免疫调节多肽的减小的亲和力与表位对TCR的亲合力的组合提供了本公开的TMMP的提高了的选择性。因此,举例来说,本公开的TMMP与其结合至第二T细胞的亲合力相比以更高亲合力结合至第一T细胞,所述第一T细胞呈现出:i)对存在于TMMP中的表位具有特异性的TCR;及ii)结合至存在于TMMP中的免疫调节多肽的共免疫调节多肽,所述第二T细胞呈现出:i)对除了存在于TMMP中的表位以外的表位具有特异性的TCR;及ii)结合至存在于TMMP中的免疫调节多肽的共免疫调节多肽。

[0703] 本公开提供一种选择性调节个体中表位特异性T细胞的活性的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的本公开的TMMP或一种或多种包含编码TMMP的核苷酸序列的核酸(例如,表达载体;mRNA;等),其中TMMP选择性调节个体中表位特异性T细胞的活性。选择性调节表位特异性T细胞的活性可治疗个体的疾病或病症。因此,本公开提供一种治疗方法,其包含向有需要的个体施用有效量的本公开的TMMP。

[0704] 在一些情况下,免疫调节多肽(“MOD”)为活化多肽,且TMMP激活表位特异性T细胞。在一些情况下,表位为癌症相关表位,且TMMP提高对于癌症相关表位有特异性的T细胞的活性。在一些情况下,MOD为活化多肽,且TMMP激活WT-1表位特异性T细胞。在一些情况下,T细胞为T辅助细胞(CD4⁺细胞)、细胞毒性T细胞(CD8⁺细胞)、或NK-T-细胞。在一些情况下,表位为WT-1表位,且TMMP提高对表达WT-1表位的癌细胞有特异性的T细胞(例如,T辅助细胞(CD4⁺细胞)、细胞毒性T细胞(CD8⁺细胞)和/或NK-T-细胞)的活性。CD4⁺T细胞的活化可包括增加CD4⁺T细胞的增殖和/或诱导或增加由CD4⁺T细胞释放的细胞因子。NK-T细胞和/或CD8⁺细胞的活化可包括:增加NK-T-细胞和/或CD8⁺细胞之增殖;和/或诱导由NK-T-细胞和/或CD8⁺细胞释放细胞因子诸如干扰素 γ 。在一些情况下,本公开的TMMP减少调节性T(Treg)细胞之增殖和/或活性。Treg为FoxP3⁺、CD4⁺T细胞。在一些情况下,例如,在本公开的TMMP包含抑制性免疫调节多肽(例如,PD-L1、FasL等)时,TMMP减少Treg的增殖和/或活性。

[0705] 在一些情况下,免疫调节多肽为活化多肽,且TMMP激活表位特异性T细胞。在一些情况下,表位为癌症相关表位,且TMMP提高对于癌症相关表位有特异性的T细胞的活性。

[0706] 在本公开的TMMP包含WT-1肽表位时,可向患有表达WT-1的癌症的个体施用TMMP。表达WT1的癌症包括白血病、结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、胃癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、生殖细胞肿瘤、卵巢癌、子宫癌、甲状腺癌、肝癌、肾癌、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、肉瘤、肝细胞癌、威尔姆氏瘤、急性骨髓性白血病(AML)、骨髓增生异常症候群(MDS)、非小细胞肺癌(NSCLC)、骨髓瘤、胰腺癌、结肠直肠癌、间皮瘤、软组织肉瘤、成神经细胞瘤及肾母细胞

瘤。

[0707] 在本公开的TMMP包含WT-1肽表位时,可向有需要的个体施用TMMP以治疗个体的急性骨髓性白血病(AML)。在本公开的TMMP包含WT-1肽表位时,可向有需要的个体施用TMMP以治疗个体的骨髓瘤。在本公开的TMMP包含WT-1肽表位时,可向有需要的个体施用TMMP以治疗个体的卵巢癌。在本公开的TMMP包含WT-1肽表位时,可向有需要的个体施用TMMP以治疗个体的胰腺癌。在本公开的TMMP包含WT-1肽表位时,可向有需要的个体施用TMMP以治疗个体的非小细胞肺癌(NSCLC)。在本公开的TMMP包含WT-1肽表位时,可向有需要的个体施用TMMP以治疗个体的结肠直肠癌(CRC)。在本公开的TMMP包含WT-1肽表位时,可向有需要的个体施用TMMP以治疗个体的乳腺癌。在本公开的TMMP包含WT-1肽表位时,可向有需要的个体施用TMMP以治疗个体的威尔姆氏瘤。在本公开的TMMP包含WT-1肽表位时,可向有需要的个体施用TMMP以治疗个体的间皮瘤。在本公开的TMMP包含WT-1肽表位时,可向有需要的个体施用TMMP以治疗个体的软组织肉瘤。在本公开的TMMP包含WT-1肽表位时,可向有需要的个体施用TMMP以治疗个体的成神经细胞瘤。在本公开的TMMP包含WT-1肽表位时,可向有需要的个体施用TMMP以治疗个体的肾母细胞瘤。

[0708] 本公开提供一种治疗个体的癌症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的本公开的TMMP或一种或多种包含编码TMMP的核苷酸序列的核酸(例如,表达载体;mRNA;等),其中TMMP包含作为癌症表位的T细胞表位,且其中TMMP包含刺激性免疫调节多肽。在一些情况下,本公开的TMMP的“有效量”为当以一个或多个剂量向有需要的个体施用减少个体中癌细胞的数目的量。举例来说,在一些情况下,本公开的TMMP的“有效量”为以下的量:当以一个或多个剂量向有需要的个体施用,与在施用TMMP之前或在未以TMMP施用个体中癌细胞的数目相比使个体中癌细胞的数目减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一些情况下,本公开的TMMP的“有效量”为当以一个或多个剂量向有需要的个体施用减少个体中癌细胞的数目至不可检测水平的量。

[0709] 在一些情况下,本公开的TMMP的“有效量”为当以一个或多个剂量向有需要的个体施用减少个体中的肿瘤质量的量。举例来说,在一些情况下,本公开的TMMP的“有效量”为以下的量:当以一个或多个剂量向有需要的个体(患有肿瘤之个体)施用,与在施用TMMP之前或在未以TMMP施用个体中的肿瘤质量相比使个体中的肿瘤质量减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一些情况下,本公开的TMMP的“有效量”为当以一个或多个剂量向有需要的个体(患有肿瘤的个体)施用减小个体中的肿瘤体积的量。举例来说,在一些情况下,本公开的TMMP的“有效量”为以下的量:当以一个或多个剂量向有需要的个体(患有肿瘤的个体)施用,与在施用TMMP之前或在未以TMMP施用个体中的肿瘤体积相比使个体中的肿瘤体积减小至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一些情况下,本公开的TMMP的“有效量”为当以一个或多个剂量向有需要的个体施用增加个体的生存时间的量。举例来说,在一些情况下,本公开的TMMP的“有效量”为以下的量:当以一个或多个剂量向有需要的个体施用,与在未以TMMP施用个体的预期生存时间相比使个体的生存时间增加至少1个月、至少2个月、至少3个月、3个月至6个月、6个月至1年、1年至2年、2年至5年、5年至10年

或大于10年。

[0710] 在一些情况下,表位特异性T细胞为对存在于病毒感染细胞上的表位有特异性的T细胞,且表位特异性T细胞与TMMP的接触提高T细胞对病毒感染细胞的细胞毒性活性。在一些情况下,表位特异性T细胞为对存在于病毒感染细胞上的表位有特异性的T细胞,且表位特异性T细胞与TMMP的接触增加表位特异性T细胞的数目。

[0711] 因此,本公开提供一种治疗个体的病毒感染的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的本公开的TMMP或一种或多种包含编码TMMP的核苷酸序列的核酸,其中TMMP包含作为病毒表位的T细胞表位,且其中TMMP包含刺激性免疫调节多肽。在一些情况下,TMMP的“有效量”为当以一个或多个剂量向有需要的个体施用减少个体中病毒感染细胞的数目的量。举例来说,在一些情况下,本公开的TMMP的“有效量”为以下的量:当以一个或多个剂量向有需要的个体施用,与在施用TMMP之前或在未以TMMP施用个体中病毒感染细胞的数目相比使个体中病毒感染细胞的数目减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一些情况下,本公开的TMMP的“有效量”为当以一个或多个剂量向有需要的个体施用减少个体中病毒感染细胞的数目至不可检测水平的量。

[0712] 因此,本公开提供一种治疗个体的感染的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的本公开的TMMP或一种或多种包含编码TMMP的核苷酸序列的核酸,其中TMMP包含作为病原体相关表位的T细胞表位,且其中TMMP包含刺激性免疫调节多肽。在一些情况下,本公开的TMMP的“有效量”为当以一个或多个剂量向有需要的个体施用减少个体中病原体的数目的量。举例来说,在一些情况下,本公开的TMMP的“有效量”为以下的量:当以一个或多个剂量向有需要的个体施用,与在施用TMMP之前或在未以TMMP施用个体中病原体的数目相比使个体中病原体的数目减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一些情况下,本公开的TMMP的“有效量”为当以一个或多个剂量向有需要的个体施用减少个体中病原体的数目至不可检测水平的量。病原体包括病毒、细菌、原虫等。

[0713] 在一些情况下,免疫调节多肽为抑制性多肽,且TMMP抑制表位特异性T细胞的活性。在一些情况下,表位为自身表位,且TMMP选择性抑制对自身表位有特异性的T细胞的活性。

[0714] 本公开提供一种治疗个体之自身免疫性病症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的本公开的TMMP或一种或多种包含编码TMMP的核苷酸序列的核酸,其中TMMP包含作为自身表位的T细胞表位,且其中TMMP包含抑制性免疫调节多肽。在一些情况下,本公开的TMMP的“有效量”为以下的量:当以一个或多个剂量向有需要的个体施用,与在施用TMMP之前或在未以TMMP施用个体中自身反应性T细胞的数目相比使个体中自身反应性T细胞的数目减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一些情况下,TMMP的“有效量”为当以一个或多个剂量向有需要的个体施用减少个体中Th2细胞因子的产生的量。在一些情况下,本公开的TMMP的“有效量”为当以一个或多个剂量向有需要的个体施用减轻个体中的一种或多种与自体免疫疾病相关的症状的量。

[0715] 如上文所述,在一些情况下,在进行本治疗方法时,作为TMMP本身向有需要的个体

施用本公开的TMMP。在其他情况下,在进行本治疗方法时,向有需要的个体施用一种或多种包含编码本公开的TMMP的核苷酸序列的核酸。因此,在其他情况下,向有需要的个体施用本公开的一种或多种核酸,例如,本公开的一种或多种重组表达载体。

[0716] 制剂

[0717] 适合的制剂在上文中描述,其中适合的制剂包括药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,适合的制剂包含:a)本公开的TMMP;和b)药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,适合的制剂包含:a)包含编码本公开的TMMP的核苷酸序列的核酸;和b)药学上可接受的赋形剂;在一些情况下,核酸为mRNA。在一些情况下,适合的制剂包含:a)第一核酸,所述第一核酸包含编码本公开的TMMP的第一多肽的核苷酸序列;b)第二核酸,所述第二核酸包含编码本公开的TMMP的第二多肽的核苷酸序列;及c)药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,适合的制剂包含:a)包含编码本公开的TMMP的核苷酸序列的重组表达载体;及b)药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,适合的制剂包含:a)第一重组表达载体,其包含编码本公开的TMMP的第一多肽的核苷酸序列;b)第二重组表达载体,其包含编码本公开的TMMP的第二多肽的核苷酸序列;及c)药学上可接受的赋形剂。

[0718] 适合的药学上可接受的赋形剂在上文中所述。

[0719] 剂量

[0720] 适合的剂量可由主治医师或其他合格医务人员基于各种临床因素来确定。如医学技术中所公知,用于任一患者的剂量取决于许多因素,包括患者的体型、身体表面积、年龄、待施用的特定多肽或核酸、患者的性别、施用时间和途径、一般健康状况及同时施用的其他药物。本公开的TMMP可施用的量介于1ng/kg体重与20mg/kg体重/剂量之间,例如在0.1mg/kg体重至10mg/kg体重之间,例如在0.5mg/kg体重至5mg/kg体重之间;然而,设想低于或高于此示例性范围之剂量,特别是考虑到上述因素。如果方案为连续输注,则其也可处于1μg至10mg/kg体重/min的范围内。本公开的TMMP可施用的量为约1mg/kg体重至50mg/kg体重,例如约1mg/kg体重至约5mg/kg体重、约5mg/kg体重至约10mg/kg体重、约10mg/kg体重至约15mg/kg体重、约15mg/kg体重至约20mg/kg体重、约20mg/kg体重至约25mg/kg体重、约25mg/kg体重至约30mg/kg体重、约30mg/kg体重至约35mg/kg体重、约35mg/kg体重至约40mg/kg体重、或约40mg/kg体重至约50mg/kg体重。

[0721] 在一些情况下,本公开的TMMP之适合剂量为0.01μg至100g/kg体重、0.1μg至10g/kg体重、1μg至1g/kg体重、10μg至100mg/kg体重、100μg至10mg/kg体重、或100μg至1mg/kg体重。一般本领域技术人员可容易基于所测量的滞留时间及所施用的药剂在体液或组织中的浓度来估计给药之重复率。在成功治疗之后,可能期望使患者经历维持疗法以预防疾病状态的复发,其中本公开的TMMP的所施用的维持剂量的范围为0.01μg至100g/kg体重、0.1μg至10g/kg体重、1μg至1g/kg体重、10μg至100mg/kg体重、100μg至10mg/kg体重、或100μg至1mg/kg体重。

[0722] 本领域技术人员将易于了解,剂量水平可随特定TMMP、症状严重程度和受试者对副作用的易感性而变化。给定化合物的优选剂量可易于由本领域技术人员通过多种方式确定。

[0723] 在一些情况下,施用多个剂量的本公开的TMMP、本公开的核酸、或本公开的重组表达载体。本公开的TMMP、本公开的核酸、或本公开的重组表达载体之施用频率可根据多种因

素中的任一种而变化,这些因素为例如症状的严重性等。举例来说,在一些情况下,本公开的TMMP、本公开的核酸、或本公开的重组表达载体每月一次、每月两次、每月三次、每隔一周一次(qow)、每周一次(qw)、每周两次(biw)、每周三次(tiw)、每周四次、每周五次、每周六次、每隔一天一次(qod)、每天一次(qd)、每天两次(qid)、或每天三次(tid)施用。

[0724] 本公开的TMMP、本公开的核酸、或本公开的重组表达载体的施用持续时间,例如施用本公开的TMMP、本公开的核酸、或本公开的重组表达载体的时间段,可根据多种因素中的任一种而变化,这些因素为例如患者反应等。举例来说,本公开的TMMP、本公开的核酸、或本公开的重组表达载体可施用的时间段的范围为约一天至约一周、约两周至约四周、约一个月至约两个月、约两个月至约四个月、约四个月至约六个月、约六个月至约八个月、约八个月至约1年、约1年至约2年、或约2年至约4年、或更长时间。

[0725] 施用途径

[0726] 活性剂(本公开的TMMP、本公开的核酸、或本公开的重组表达载体)是使用任何可用的方法及适用于药物递送的途径(包括体内和离体方法以及全身性及局部施用途径)向个体施用。

[0727] 常规及药学上可接受的施用途径包括肿瘤内、肿瘤周围、肌肉内、淋巴管内、气管内、颅内、皮下、皮内、局部施用、静脉内、动脉内、经直肠、经鼻、经口以及其他经肠及胃肠外施用途径。施用途径在需要时可被组合或根据TMMP和/或所要效果而调整。本公开的TMMP或本公开的核酸或重组表达载体可以单一剂量或以多个剂量施用。

[0728] 在一些情况下,静脉内施用本公开的TMMP、本公开的核酸、或本公开的重组表达载体。在一些情况下,肌肉内施用本公开的TMMP、本公开的核酸、或本公开的重组表达载体。在一些情况下,淋巴管内施用本公开的TMMP、本公开的核酸、或本公开的重组表达载体。在一些情况下,局部施用本公开的TMMP、本公开的核酸、或本公开的重组表达载体。在一些情况下,肿瘤内施用本公开的TMMP、本公开的核酸、或本公开的重组表达载体。在一些情况下,肿瘤周围施用本公开的TMMP、本公开的核酸、或本公开的重组表达载体。在一些情况下,颅内施用本公开的TMMP、本公开的核酸、或本公开的重组表达载体。在一些情况下,皮下施用本公开的TMMP、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。

[0729] 在一些情况下,静脉内施用本公开的TMMP。在一些情况下,肌肉内施用本公开的TMMP。在一些情况下,局部施用本公开的TMMP。在一些情况下,肿瘤内施用本公开的TMMP。在一些情况下,肿瘤周围施用本公开的TMMP。在一些情况下,颅内施用本公开的TMMP。在一些情况下,皮下施用TMMP。在一些情况下,淋巴管内施用本公开的TMMP。

[0730] 本公开的TMMP、本公开的核酸、或本公开的重组表达载体可使用任何可用的常规方法及适用于递送常规药物的途径(包括全身性或局部途径)向宿主施用。一般而言,预期用于本公开的方法中的施用途径包括但不限于经肠、胃肠外及吸入途径。

[0731] 除了吸入施用以外的胃肠外施用途径包括但不限于局部、经皮、皮下、肌肉内、眼眶内、囊内、脊柱内、胸骨内、肿瘤内、淋巴管内、肿瘤周围及静脉内途径,即除通过消化道以外的任何施用途径。可进行胃肠外施用以实现本公开的TMMP、本公开的核酸、或本公开的重组表达载体的全身性或局部递送。在需要全身性递送时,递送通常涉及药物制剂的侵袭性或全身性吸附性局部或粘膜施用。

[0732] 组合疗法

[0733] 在一些情况下,本公开的用于治疗个体的癌症的方法包括:a)施用本公开的TMMP;和b)施用至少一种额外治疗剂或治疗性治疗。适合的额外治疗剂包括但不限于小分子癌症化学治疗剂和免疫检查点抑制剂。适合的额外治疗性治疗包括例如辐射、手术(例如,手术切除肿瘤)等。

[0734] 本公开的治疗方法可包含共施用本公开的TMMP和至少一种额外治疗剂。“共施用”意指向个体施用本公开的TMMP和至少一种额外治疗剂两者,但不一定在同一时间施用,以便实现治疗作用,该治疗作用为已施用TMMP和至少一种额外治疗剂的结果。TMMP及至少一种额外治疗剂的施用可为大体上同时的,例如,可在施用至少一种额外治疗剂的约1分钟至约24小时内(例如,在约1分钟内、在约5分钟内、在约15分钟内、在约30分钟内、在约1小时内、在约4小时内、在约8小时内、在约12小时内、或在约24小时内)向个体施用TMMP。在一些情况下,向正经历使用至少一种额外治疗剂的治疗或已经历使用至少一种额外治疗剂的治疗的个体施用本公开的TMMP。TMMP的施用可在不同时间和/或以不同频率发生。

[0735] 作为一个实例,本公开的治疗方法可包含共施用本公开的TMMP和免疫检查点抑制剂,诸如对免疫检查点有特异性的抗体。“共施用”意指向个体施用本公开的TMMP和免疫检查点抑制剂(例如,对免疫检查点多肽有特异性的抗体)两者,但不一定在同一时间施用,以便实现治疗作用,该治疗作用为已施用TMMP和免疫检查点抑制剂(例如,对免疫检查点多肽有特异性的抗体)的结果。TMMP和免疫检查点抑制剂(例如,对免疫检查点多肽有特异性的抗体)的施用可为大体上同时的,例如,可在施用免疫检查点抑制剂(例如,对免疫检查点多肽有特异性的抗体)的约1分钟至约24小时内(例如,在约1分钟内、在约5分钟内、在约15分钟内、在约30分钟内、在约1小时内、在约4小时内、在约8小时内、在约12小时内、或在约24小时内)向个体施用TMMP。在一些情况下,向正经历使用免疫检查点抑制剂(例如,对免疫检查点多肽有特异性的抗体)的治疗或已经历使用该免疫检查点抑制剂的治疗的个体施用本公开的TMMP。TMMP和免疫检查点抑制剂(例如,对免疫检查点多肽有特异性的抗体)的施用可在不同时间和/或以不同频率发生。

[0736] 示例性免疫检查点抑制剂包括靶向以下免疫检查点多肽的抑制剂:诸如CD27、CD28、CD40、CD122、CD96、CD73、CD47、OX40、GITR、CSF1R、JAK、PI3K δ 、PI3K γ 、TAM、精氨酸酶、CD137(也称为4-1BB)、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、LAG3、TIM3、VISTA、CD96、TIGIT、CD122、PD-1、PD-L1及PD-L2。在一些情况下,免疫检查点多肽为选自以下的刺激性检查点分子:CD27、CD28、CD40、ICOS、OX40、GITR、CD122及CD137。在一些情况下,免疫检查点多肽为选自以下的抑制性检查点分子:A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM3、CD96、TIGIT及VISTA。

[0737] 在一些情况下,免疫检查点抑制剂为对免疫检查点多肽有特异性的抗体。在一些情况下,抗免疫检查点抗体为单克隆抗体。在一些情况下,抗免疫检查点抗体被人源化或去人源化,使得抗体大体上未在人中引发免疫反应。在一些情况下,抗免疫检查点抗体为人源化单克隆抗体。在一些情况下,抗免疫检查点抗体为去人源化单克隆抗体。在一些情况下,抗免疫检查点抗体为全人单克隆抗体。在一些情况下,抗免疫检查点抗体抑制免疫检查点多肽与免疫检查点多肽的配体的结合。在一些情况下,抗免疫检查点抗体抑制免疫检查点多肽与免疫检查点多肽的受体的结合。

[0738] 适合的抗免疫检查点抗体包括但不限于纳武单抗(nivolumab)(Bristol-Myers

Squibb)、派姆单抗(pembrolizumab)(Merck)、披地单抗(pidilizumab)(Curetech)、AMP-224(GlaxoSmithKline/Amplimmune)、MPDL3280A(Roche)、MDX-1105(Medarex, Inc./Bristol Myer Squibb)、MEDI-4736(Medimmune/AstraZeneca)、阿维鲁单抗(arelumab)(Merck Serono)、伊匹珠单抗(ipilimumab)(YERVOY, (Bristol-Myers Squibb)、曲利木单抗(tremelimumab)(Pfizer)、披地单抗(CureTech, Ltd.)、IMP321(Immutep S.A.)、MGA271(MacroGenics)、BMS-986016(Bristol-Meyers Squibb)、利鲁单抗(lirilumab)(Bristol-Myers Squibb)、乌瑞鲁单抗(urelumab)(Bristol-Meyers Squibb)、PF-05082566(Pfizer)、IPH2101(Innate Pharma/Bristol-Myers Squibb)、MEDI-6469(MedImmune/AZ)、CP-870,893(Genentech)、莫木利珠单抗(Mogamulizumab)(Kyowa Hakko Kirin)、瓦利鲁单抗(Varlilumab)(CelIDex Therapeutics)、阿维单抗(Avelumab)(EMD Serono)、加利昔单抗(Galiximab)(Biogen Idec)、AMP-514(Amplimmune/AZ)、AUNP 12(Aurigene及Pierre Fabre)、伊多莫德(Indoximod)(NewLink Genetics)、NLG-919(NewLink Genetics)、INCB024360(Incyte);KN035;及其组合。举例来说,在一些情况下,免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体。适合的抗PD-1抗体包括例如纳武单抗、派姆单抗(也称为MK-3475)、披地单抗、SHR-1210、PDR001及AMP-224。在一些情况下,抗PD-1单克隆抗体为纳武单抗、派姆单抗或PDR001。适合的抗PD1抗体描述于美国专利公布第2017/0044259号中。关于披地单抗,参见,例如Rosenblatt等人(2011)J.Immunother.34:409-18。在一些情况下,免疫检查点抑制剂为抗CTLA-4抗体。在一些情况下,抗CTLA-4抗体为伊匹珠单抗或曲利木单抗。关于曲利木单抗,参见,例如Ribas等人(2013)J.Clin.Oncol.31:616-22。在一些情况下,免疫检查点抑制剂为抗PD-L1抗体。在一些情况下,抗PD-L1单克隆抗体为BMS-935559、MEDI4736、MPDL3280A(也称为RG7446)、KN035或MSB0010718C。在一些实施方案中,抗PD-L1单克隆抗体为MPDL3280A(阿特珠单抗)或MEDI4736(德瓦鲁单抗)。关于德瓦鲁单抗,参见,例如WO 2011/066389。关于阿特珠单抗,参见,例如美国专利号8,217,149。

[0739] 适于治疗的受试者

[0740] 适于以本公开的方法进行治疗的受试者包括患有癌症的个体,包括已被诊断为患有癌症的个体、已对癌症进行治疗但未能响应于该治疗的个体、及已对癌症进行治疗且最初响应于该治疗但随后变成该治疗难治的个体。适于以本公开的方法进行治疗的受试者包括患有感染(例如,病原体诸如细菌、病毒、原虫等的感染)的个体,包括已被诊断为患有感染的个体和已对感染进行治疗但未能响应于该治疗的个体。适于以本公开的方法进行治疗的受试者包括患有细菌感染的个体,包括已被诊断为患有细菌感染的个体和已对细菌感染进行治疗但未能响应于该治疗的个体。适于以本公开的方法进行治疗的受试者包括患有病毒感染的个体,包括已被诊断为患有病毒感染的个体和已对病毒感染进行治疗但未能响应于该治疗的个体。适于以本公开的方法进行治疗的受试者包括患有自体免疫疾病的个体,包括已被诊断为患有自体免疫疾病的个体和已对自体免疫疾病进行治疗但未能响应于该治疗的个体。

[0741] 本公开的非限制性方面的实例

[0742] 方面组A

[0743] 上文所述的本发明主题之方面(包括实施方案)单独或在与一个或多个其他方面或实施方案组合时可为有益的。不限于以上描述,下文提供本公开的编号1-95的某些非限

制性方面。如本领域技术人员在阅读本公开的后将显而易见,可使用个别编号的方面中的各者或将其与前述或以下个别编号的方面中的任一个组合。此旨在提供全部此等方面组合的支持且不限于下文明确提供的方面的组合:

[0744] 方面1.一种T细胞调节多聚体多肽,其包含:至少一种异二聚体,所述异二聚体包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含:i)威尔姆氏瘤-1(WT-1)肽表位;及ii)第一主要组织相容性复合物(MHC)多肽;b)第二多肽,所述第二多肽包含第二MHC多肽;及c)至少一种免疫调节多肽,其中所述第一多肽和/或所述第二多肽包含所述免疫调节多肽。

[0745] 方面2.如方面1的T细胞调节多聚体多肽,其中一个或多个免疫调节结构域中的至少一个为变异免疫调节多肽,其呈现出对同源共免疫调节多肽的亲合力与相应野生型免疫调节多肽对所述同源共免疫调节多肽的亲合力相比有所减小,且其中所述表位以至少 10^{-7} M的亲合力结合至T细胞上的T细胞受体(TCR),使得:i)所述T细胞调节多聚体多肽结合至第一T细胞的亲合力比所述T细胞调节多聚体多肽结合第二T细胞的亲合力高至少25%,其中所述第一T细胞在其表面上表达所述同源共免疫调节多肽及以至少 10^{-7} M的亲合力结合所述表位的TCR,且其中所述第二T细胞在其表面上表达所述同源共免疫调节多肽,但在其表面上不表达以至少 10^{-7} M的亲合力结合所述表位的TCR;且/或ii)当通过生物层干涉术测量时,对照T细胞调节多聚体多肽与同源共免疫调节多肽的结合亲合力与包含野生型免疫调节多肽变体的所述T细胞调节多聚体多肽与所述同源共免疫调节多肽的结合亲和力的比率范围为1.5:1至 10^6 :1,其中所述对照包含所述野生型免疫调节多肽。

[0746] 方面3.如方面2的T细胞调节多聚体多肽,其中:a)所述T细胞调节多聚体多肽结合至所述第一T细胞的亲合力比其结合所述第二T细胞的亲合力高至少50%、至少2倍、至少5倍或至少10倍;且/或b)所述变异免疫调节多肽结合所述共免疫调节多肽的亲合力为约 10^{-4} M至约 10^{-7} M、约 10^{-4} M至约 10^{-6} M、约 10^{-4} M至约 10^{-5} M;且/或c)其中当通过生物层干涉术测量时,对照T细胞调节多聚体多肽与同源共免疫调节多肽的结合亲合力与包含野生型免疫调节多肽的变体的所述T细胞调节多聚体多肽与所述同源共免疫调节多肽的结合亲和力的比率为至少10:1、至少50:1、至少 10^2 :1或至少 10^3 :1,其中所述对照包含所述野生型免疫调节多肽。

[0747] 方面4.如方面1-3中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述第一多肽或所述第二多肽包含免疫球蛋白(Ig)Fc多肽。

[0748] 方面5.如方面4的T细胞调节多聚体多肽,其中所述Ig Fc多肽为IgG1 Fc多肽。

[0749] 方面6.如方面5的T细胞调节多聚体多肽,其中IgG1 Fc多肽包含选自以下的一个或多个氨基酸取代:N297A、L234A、L235A、L234F、L235E及P331S。

[0750] 方面7.如方面1-6中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中:a1)所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)所述WT-1肽表位;ii)所述第一MHC多肽;及iii)至少一种免疫调节多肽;且b2)所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)所述第二MHC多肽;及ii)免疫球蛋白(Ig)Fc多肽;或a2)所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)所述WT-1肽表位;及ii)所述第一MHC多肽;且b2)所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)至少一种免疫调节多肽;ii)所述第二MHC多肽;及iii)Ig Fc多肽;或a3)所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)所述WT-1肽表位;及ii)所述第一MHC多肽;且b3)所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)所述第二MHC多肽;及ii)Ig Fc多肽;及iii)至少一种免疫调节多肽;或a4)所述第一多肽

以从N端至C端的次序包含:i)所述WT-1肽表位;及ii)所述第一MHC多肽;且b4)所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)所述第二MHC多肽;及ii)至少一种免疫调节多肽;或a5)所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)所述WT-1肽表位;及ii)所述第一MHC多肽;且b5)第二多肽以从N端至C端的次序包含:i)至少一种免疫调节多肽;及ii)所述第二MHC多肽;或a6)所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:i)所述WT-1肽表位;ii)所述第一MHC多肽;及iii)至少一种免疫调节多肽;且b6)所述第二多肽包含:i)所述第二MHC多肽。

[0751] 方面8.如方面1-7中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述第一多肽包含介于所述WT-1表位与所述第一MHC多肽之间的肽接头且/或其中所述第二多肽包含介于所述免疫调节多肽与所述第二MHC多肽之间的肽接头。

[0752] 方面9.如方面8的T细胞调节多聚体多肽,其中所述肽接头包含氨基酸序列(GGGGS)_n(SEQ ID NO:284),其中n为1至10的整数。

[0753] 方面10.如方面1-9中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述第一MHC多肽为 β 2-微球蛋白多肽;且其中所述第二MHC多肽为I类MHC重链多肽。

[0754] 方面11.如方面1-10中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述至少一种免疫调节多肽选自自由以下组成的组:细胞因子(例如,IL2多肽、IL7多肽、IL12多肽、IL15多肽、IL17多肽、IL21多肽、IL27多肽、IL-23多肽、TGF β 多肽等;且包括全部家族成员,例如IL17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、IL-17F、IL-17E)、4-1BBL多肽、ICOS-L多肽、OX-40L多肽、CD80多肽、CD86多肽(CD80及CD86亦分别称为B7-1及B7-2)、CD40多肽、CD70多肽、JAG1(CD339)多肽、ICAM(CD540多肽、PD-L1多肽、FasL多肽、PD-L2多肽、PD-1H(VISTA)多肽、ICOS-L(CD275)多肽、GITRL多肽、HVEM多肽、CXCL10多肽、CXCL9多肽、CXCL11多肽、CXCL13多肽、及CX3CL1多肽、半乳糖凝集素-9多肽、CD83多肽、CD30L多肽、HLA-G多肽、MICA多肽、MICB多肽、HVEM(CD270)多肽、淋巴毒素 β 受体多肽、3/TR6多肽、ILT3多肽、ILT4多肽、CXCL10多肽、CXCL9多肽、CXCL11多肽、CXCL13多肽、及CX3CL1多肽、及其组合。

[0755] 方面12.如方面1-11中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述至少一种免疫调节多肽为IL-2多肽。

[0756] 方面13.如方面1-12中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述多聚体多肽包含至少两种免疫调节多肽,且其中这些免疫调节多肽中的至少两个是相同的。

[0757] 方面14.如方面13的T细胞调节多聚体多肽,其中所述两种或更多种免疫调节多肽是串联的。

[0758] 方面15.如方面1-14中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述第一多肽与所述第二多肽彼此共价连接。

[0759] 方面16.如方面15的T细胞调节多聚体多肽,其中所述共价键是经由二硫键。

[0760] 方面17.如方面1-16中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述第一MHC多肽或介于所述表位与所述第一MHC多肽之间的接头包含提供第一Cys残基的氨基酸取代,其中所述第二MHC多肽包含提供第二Cys残基的氨基酸取代,且其中所述二硫键联在所述第一Cys残基与所述第二Cys残基之间。

[0761] 方面18.如方面1-17中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述WT-1肽表位具有的长度为约4个氨基酸至约25个氨基酸。

[0762] 方面19.如方面1-18中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述WT-1肽表位包含

选自由以下组成的组的氨基酸序列: NLMNLGATL (SEQ ID NO: 258)、NYMNLGATL (SEQ ID NO: 263)、CMTWNQMNLGATLKG (SEQ ID NO: 223)、WNQMNLGATLKGVA (SEQ ID NO: 224)、CMTWNYMNLGATLKG (SEQ ID NO: 225)、WNYMNLGATLKGVA (SEQ ID NO: 226)、MTWNQMNLGATLKG (SEQ ID NO: 227)、TWNQMNLGATLKGVA (SEQ ID NO: 228)、CMTWNLMNLGATLKG (SEQ ID NO: 229)、MTWNLMNLGATLKG (SEQ ID NO: 230)、TWNLMNLGATLKGVA (SEQ ID NO: 231)、WNLMLGATLKGVA (SEQ ID NO: 232)、MNLGATLKG (SEQ ID NO: 233)、MTWNYMNLGATLKG (SEQ ID NO: 234)、TWNMNLGATLKGVA (SEQ ID NO: 235)、CMTWNQMNLGATLKGVA (SEQ ID NO: 236)、CMTWNLMNLGATLKGVA (SEQ ID NO: 237)、CMTWNYMNLGATLKGVA (SEQ ID NO: 238)、GYLRNPTAC (SEQ ID NO: 239)、GALRNPTAL (SEQ ID NO: 240)、YALRNPTAC (SEQ ID NO: 241)、GLLRNPTAC (SEQ ID NO: 242)、RYRPHPGAL (SEQ ID NO: 243)、YQRPHPGAL (SEQ ID NO: 244)、RLRPHPGAL (SEQ ID NO: 245)、RIRPHPGAL (SEQ ID NO: 246)、QFPNHSFKHEDPMGQ (SEQ ID NO: 247)、HSFKHEDPY (SEQ ID NO: 248)、QFPNHSFKHEDPM (SEQ ID NO: 249)、QFPNHSFKHEDPY (SEQ ID NO: 250)、KRPFMCAYPGCNK (SEQ ID NO: 251)、KRPFMCAYPGCYK (SEQ ID NO: 252)、FMCAYPGCY (SEQ ID NO: 253)、FMCAYPGCK (SEQ ID NO: 254)、KRPFMCAYPGCNKRY (SEQ ID NO: 255)、SEKRPFMCAYPGCNK (SEQ ID NO: 256)、KRPFMCAYPGCYKRY (SEQ ID NO: 257)、NLMNLGATL (SEQ ID NO: 258)、VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 259)、RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 260)、CMTWNQMN (SEQ ID NO: 261)、CYTWNQMN (SEQ ID NO: 269)、NYMNLGATL (SEQ ID NO: 263)、YMFPNAPYL (SEQ ID NO: 264)、SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 265)、CMTWNQMN (SEQ ID NO: 266) 及 NQMNLGATL (SEQ ID NO: 267)。

[0763] 方面20. 如方面1-18中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述WT-1肽包含氨基酸序列CMTWNQMN (SEQ ID NO: 266) 或CYTWNQMN (SEQ ID NO: 269)。

[0764] 方面21. 如方面1-20中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述第一MHC多肽或所述第二MHC多肽包含: a) 与图9A中描绘的HLA-A*0101、HLA-A*0201、HLA-A*0201、HLA-A*1101、HLA-A*2301、HLA-A*2402、HLA-A*2407、HLA-A*3303或HLA-A*3401氨基酸序列具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列; 或b) 与图10A中描绘的HLA-B*0702、HLA-B*0801、HLA-B*1502、HLA-B*3802、HLA-B*4001、HLA-B*4601或HLA-B*5301氨基酸序列具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列; 或c) 与图11A中描绘的HLA-C*0102、HLA-C*0303、HLA-C*0304、HLA-C*0401、HLA-C*0602、HLA-C*0701、HLA-C*0702、HLA-C*0801或HLA-C*1502具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0765] 方面22. 如方面1-20中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述第一MHC多肽为 β 2M多肽, 且其中所述第二MHC多肽包含与HLA-A*2402多肽具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0766] 方面23. 如方面1-20中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述第一MHC多肽为 β 2M多肽, 且其中所述第二MHC多肽为HLA-A*1101多肽。

[0767] 方面24. 如方面1-20中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述第一MHC多肽为 β 2M多肽, 且其中所述第二MHC多肽包含与HLA-A*3303多肽具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0768] 方面25. 如方面1-20中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述第一MHC多肽为 β 2M多肽, 且其中所述第二MHC多肽包含与HLA-A*0201多肽具有至少95%氨基酸序列同一性

的氨基酸序列。

[0769] 方面26.如方面21-25中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述MHC重链多肽包含在位置236处的Cys。

[0770] 方面27.如方面21-26中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述 β 2M多肽包含在位置12处的Cys。

[0771] 方面28.如方面1-27中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述免疫调节多肽为包含以下的变异IL-2多肽:i)H16A取代和F42A取代;或ii)H16T取代和F42A取代。

[0772] 方面29.如方面4-28中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述多聚体多肽包含第一异二聚体和第二异二聚体,且其中所述第一异二聚体与所述第二异二聚体通过介于所述第一异二聚体与所述第二异二聚体的Ig Fc多肽之间的一个或多个二硫键来共价结合。

[0773] 方面30.一种核酸,其包含编码根据方面1-28中任一项的第一多肽或第二多肽的核苷酸序列,其中所述第一多肽或所述第二多肽包含至少一个免疫调节结构域。

[0774] 方面31.一种表达载体,其包含如方面30的核酸。

[0775] 方面32.一种选择性调节对于威尔姆氏瘤-1(WT-1)表位具有特异性的T细胞的活性的方法,所述方法包括使所述T细胞与根据方面1-29中任一项的T细胞调节多聚体多肽接触,其中所述接触选择性调节所述WT-1表位特异性T细胞的活性。

[0776] 方面22.一种治疗患有癌症之患者的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的包含根据方面1-29中任一项的T细胞调节多聚体多肽的药物组合物。

[0777] 方面34.如方面33的方法,其中所述癌症为肝细胞癌、胰腺癌、胃癌、结肠直肠癌、肝母细胞瘤或卵巢卵黄囊瘤。

[0778] 方面35.如方面33或方面34的方法,其中所述施用是肌肉内施用的。

[0779] 方面36.如方面33或方面34的方法,其中所述施用是静脉内施用的。

[0780] 方面37.一种调节个体的免疫反应的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的如方面1-29中任一项的T细胞调节多聚体多肽(TMMP),其中所述施用诱导表位特异性T细胞反应(例如,对于存在于所述TMMP中的所述WT-1表位有特异性的T细胞反应)及表位非特异性T细胞反应,其中所述表位特异性T细胞反应与所述表位非特异性T细胞反应的比率为至少2:1。

[0781] 方面38如方面37的方法,其中所述表位特异性T细胞反应与所述表位非特异性T细胞反应的比率为至少5:1。

[0782] 方面39.如方面37的方法,其中所述表位特异性T细胞反应与所述表位非特异性T细胞反应的比率为至少10:1。

[0783] 方面40.如方面37的方法,其中所述表位特异性T细胞反应与所述表位非特异性T细胞反应的比率为至少25:1。

[0784] 方面41.如方面37的方法,其中所述表位特异性T细胞反应与所述表位非特异性T细胞反应的比率为至少50:1。

[0785] 方面42.如方面37的方法,其中所述表位特异性T细胞反应与所述表位非特异性T细胞反应的比率为至少100:1。

[0786] 方面43.如方面37-42中任一项的方法,其中所述个体为人。

[0787] 方面44.如方面37-43中任一项的方法,其中所述调节包含增强对癌细胞(例如表

达WT-1的癌细胞)的细胞毒性T细胞反应。

[0788] 方面45.如方面37-44中任一项的方法,其中所述施用为静脉内、皮下、肌肉内、全身性、淋巴管内、治疗部位远端、局部、或治疗部位处或附近的施用。

[0789] 方面46.如方面37-45中任一项的方法,其中所述表位非特异性T细胞反应小于由包含相应野生型免疫调节多肽的对照T细胞调节多聚体多肽诱导的表位非特异性T细胞反应。

[0790] 方面47.一种选择性递送共刺激(即,免疫调节)多肽至靶T细胞的方法,所述方法包括使混合的T细胞群与如方面1-29中任一项的T细胞调节多聚体多肽(TMMP)接触,其中所述混合的T细胞群包含所述靶T细胞和非靶T细胞,其中所述靶T细胞对存在于所述TMMP内的所述表位有特异性(例如,其中所述靶T细胞对存在于所述TMMP内的所述WT-1表位有特异性),且其中所述接触递送存在于所述TMMP内的所述一种或多种共刺激多肽至所述靶T细胞。

[0791] 方面48.如方面47的方法,其中所述T细胞群在体外。

[0792] 方面49.如方面47的方法,其中所述T细胞群在个体体内。

[0793] 方面50.如方面49的方法,其包含向所述个体施用所述多聚体多肽。

[0794] 方面51.如方面47-50中任一项的方法,其中所述靶T细胞为细胞毒性T细胞。

[0795] 方面52.如方面47的方法,其中所述混合的T细胞群为从个体获得的体外混合的T细胞群,且其中所述接触导致所述靶T细胞的活化和/或增殖,从而生成活化和/或增殖的靶T细胞群。

[0796] 方面53.如方面52的方法,其进一步包括向所述个体施用所活化和/或增殖的靶T细胞群。

[0797] 方面54.一种检测从个体获得的混合T细胞群中结合目标WT-1表位的靶T细胞的存在的方法,所述方法包括:a)使所述混合T细胞群与如方面1-29中任一项的T细胞调节多聚体多肽(TMMP)在体外接触,其中所述TMMP包含目标WT-1表位;及b)检测T细胞响应于所述接触的活化和/或增殖,其中活化和/或增殖的T细胞指示靶T细胞的存在。

[0798] 方面55.一种T细胞调节多聚体多肽,其包含:至少一种异二聚体,所述异二聚体包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含:i)威尔姆氏瘤-1(WT-1)肽表位,其中所述WT-1肽具有的长度为约4个氨基酸至约25个氨基酸;及ii)第一主要组织相容性复合物(MHC) I类多肽;b)第二多肽,所述第二多肽包含第二I类MHC多肽,及c)至少一种免疫调节多肽,其中所述第一多肽和/或所述第二多肽包含所述免疫调节多肽,且其中所述第一多肽与所述第二多肽经由至少2个二硫键彼此共价连接。

[0799] 方面56.如方面55的T细胞调节多聚体多肽,其中所述至少一种免疫调节多肽中的至少一个为变异免疫调节多肽,其呈现出对同源共免疫调节多肽的亲合力与相应野生型免疫调节多肽对所述同源共免疫调节多肽的亲合力相比有所减小,且其中所述表位以至少 10^{-7} M的亲合力结合至T细胞上的T细胞受体(TCR),使得:i)所述T细胞调节多聚体多肽结合至第一T细胞的亲合力比所述T细胞调节多聚体多肽结合第二T细胞的亲合力高至少25%,其中所述第一T细胞在其表面上表达所述同源共免疫调节多肽及以至少 10^{-7} M的亲合力结合所述表位的TCR,且其中所述第二T细胞在其表面上表达所述同源共免疫调节多肽,但在其表面上不表达以至少 10^{-7} M的亲合力结合所述表位的TCR;且/或ii)当通过生物层干涉术测

量时,对照T细胞调节多聚体多肽与同源共免疫调节多肽的结合亲和力与包含野生型免疫调节多肽变体的所述T细胞调节多聚体多肽与所述同源共免疫调节多肽的结合亲和力的比率范围为1.5:1至 10^6 :1,其中所述对照包含所述野生型免疫调节多肽。

[0800] 方面57.如方面56的T细胞调节多聚体多肽,其中:a)所述T细胞调节多聚体多肽结合至所述第一T细胞的亲和力比其结合所述第二T细胞的亲和力高至少50%、至少2倍、至少5倍或至少10倍;且/或b)所述变异免疫调节多肽结合所述共免疫调节多肽的亲和力为约 10^{-4} M至约 10^{-7} M、约 10^{-4} M至约 10^{-6} M、约 10^{-4} M至约 10^{-5} M;且/或c)其中当通过生物层干涉术测量时,对照T细胞调节多聚体多肽与同源共免疫调节多肽的结合亲和力与包含野生型免疫调节多肽变体的所述T细胞调节多聚体多肽与所述同源共免疫调节多肽的结合亲和力的比率为至少10:1、至少50:1、至少 10^2 :1或至少 10^3 :1,其中所述对照包含所述野生型免疫调节多肽。

[0801] 方面58.如方面55-57中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述第一多肽或所述第二多肽包含免疫球蛋白(Ig)Fc多肽。

[0802] 方面59.如方面58的T细胞调节多聚体多肽,其中所述Ig Fc多肽为IgG1 Fc多肽。

[0803] 方面60.如方面58的T细胞调节多聚体多肽,其中所述Ig Fc多肽为IgG4 Fc多肽。

[0804] 方面61.如方面59的T细胞调节多聚体多肽,其中IgG1 Fc多肽包含选自以下的一个或多个氨基酸取代:N297A、L234A、L235A、L234F、L235E及P331S。

[0805] 方面62.如方面55-61中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中

[0806] a1)所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:

[0807] i)所述WT-1肽表位;

[0808] ii)所述第一I类MHC多肽;及

[0809] iii)至少一种免疫调节多肽;且

[0810] b1)所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:

[0811] i)所述第二I类MHC多肽;及

[0812] ii)免疫球蛋白(Ig)Fc多肽;或

[0813] a2)所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:

[0814] i)所述WT-1肽表位;及

[0815] ii)所述第一I类MHC多肽;且

[0816] b2)所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:

[0817] i)至少一种免疫调节多肽;

[0818] ii)所述第二I类MHC多肽;及

[0819] iii)Ig Fc多肽;或

[0820] a3)所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:

[0821] i)所述WT-1肽表位;及

[0822] ii)所述第一I类MHC多肽;且

[0823] b3)所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:

[0824] i)所述第二I类MHC多肽;及

[0825] ii)Ig Fc多肽;及

[0826] iii)至少一种免疫调节多肽;或

[0827] a4) 所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:

[0828] i) 所述WT-1肽表位;及

[0829] ii) 所述第一I类MHC多肽;且

[0830] b4) 所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:

[0831] i) 所述第二I类MHC多肽;及

[0832] ii) 至少一种免疫调节多肽;或

[0833] a5) 所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:

[0834] i) 所述WT-1肽表位;及

[0835] ii) 所述第一I类MHC多肽;且

[0836] b5) 第二多肽以从N端至C端的次序包含:

[0837] i) 至少一种免疫调节多肽;及

[0838] ii) 所述第二I类MHC多肽;或

[0839] a6) 所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:

[0840] i) 所述WT-1肽表位;

[0841] ii) 所述第一I类MHC多肽;及

[0842] iii) 至少一种免疫调节多肽;且

[0843] b6) 所述第二多肽包含:

[0844] i) 所述第二I类MHC多肽。

[0845] 方面63. 如方面55-62中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述第一MHC多肽为 β 2-微球蛋白多肽; 且其中所述第二MHC多肽为I类MHC重链多肽。

[0846] 方面64. 如方面55-63中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述至少一种免疫调节多肽选自由以下组成的组: 细胞因子 (例如, IL2多肽、IL7多肽、IL12多肽、IL15多肽、IL17多肽、IL21多肽、IL27多肽、IL-23多肽、TGF β 多肽等; 且包括全部家族成员, 例如IL17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、IL-17F、IL-17E)、4-1BBL多肽、ICOS-L多肽、OX-40L多肽、CD80多肽、CD86多肽 (CD80及CD86亦分别称为B7-1及B7-2)、CD40多肽、CD70多肽、JAG1 (CD339) 多肽、ICAM (CD540多肽、PD-L1多肽、FasL多肽、PD-L2多肽、PD-1H (VISTA) 多肽、ICOS-L (CD275) 多肽、GITRL多肽、HVEM多肽、CXCL10多肽、CXCL9多肽、CXCL11多肽、CXCL13多肽、及CX3CL1多肽、半乳糖凝集素-9多肽、CD83多肽、CD30L多肽、HLA-G多肽、MICA多肽、MICB多肽、HVEM (CD270) 多肽、淋巴毒素 β 受体多肽、3/ TR6多肽、ILT3多肽、ILT4多肽、CXCL10多肽、CXCL9多肽、CXCL11多肽、CXCL13多肽及CX3CL1多肽、及其组合。

[0847] 方面65. 如方面55-63中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述至少一种免疫调节多肽为IL-2多肽。

[0848] 方面66. 如方面55-65中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述多聚体多肽包含至少两种免疫调节多肽, 且其中所述免疫调节多肽中的至少两个为相同的。

[0849] 方面67. 如方面66的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述两种或更多种免疫调节多肽是串联的。

[0850] 方面68. 如方面55-67中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中: a) 第一二硫键在以下各物之间: i) 存在于所述WT-1肽表位与所述第一I类MHC多肽之间的接头中的Cys, 其中所述第一I类MHC多肽为 β 2M多肽; 与ii) 经由Y84C取代引入所述第二I类MHC多肽中的Cys残基,

其中所述第二I类MHC多肽为I类MHC重链多肽;且b)第二二硫键在以下各物之间:i)经由R12C取代引入所述 β 2M多肽中的Cys残基;与ii)经由A236C取代引入所述I类MHC重链多肽中的Cys残基。

[0851] 方面69.如方面68的T细胞调节多聚体多肽,其中所述接头包含氨基酸序列GCGGS (SEQ ID NO:318)。

[0852] 方面70.如方面69的T细胞调节多聚体多肽,其中所述接头包含氨基酸序列GCGGS (GGGS)_n (SEQ ID NO:342),其中n为1至10的整数。

[0853] 方面71.如方面55-70中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述WT-1肽表位具有的长度为约4个氨基酸至约15个氨基酸。

[0854] 方面72.如方面55-71中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述WT-1肽表位包含选自以下组成的组的氨基酸序列:NLNMLGATL (SEQ ID NO:258)、NYMNLGATL (SEQ ID NO:263)、CMTWNQMNLGATLKG (SEQ ID NO:223)、WNQMNLGATLKGVA (SEQ ID NO:224)、CMTWNYMNLGATLKG (SEQ ID NO:225)、WNYMNLGATLKGVA (SEQ ID NO:226)、MTWNQMNLGATLKG (SEQ ID NO:227)、TWNQMNLGATLKGVA (SEQ ID NO:228)、CMTWNLMNLGATLKG (SEQ ID NO:229)、MTWNLMNLGATLKG (SEQ ID NO:230)、TWNLMNLGATLKGVA (SEQ ID NO:231)、WNLNMLGATLKGVA (SEQ ID NO:232)、MNLGATLKG (SEQ ID NO:233)、MTWNYMNLGATLKG (SEQ ID NO:234)、TWNYMNLGATLKGVA (SEQ ID NO:235)、CMTWNQMNLGATLKGVA (SEQ ID NO:236)、CMTWNLMNLGATLKGVA (SEQ ID NO:237)、CMTWNYMNLGATLKGVA (SEQ ID NO:238)、GYLRNPTAC (SEQ ID NO:239)、GALRNPTAL (SEQ ID NO:240)、YALRNPTAC (SEQ ID NO:241)、GLLRNPTAC (SEQ ID NO:242)、RYRPHPGAL (SEQ ID NO:243)、YQRPHPGAL (SEQ ID NO:244)、RLRPHPGAL (SEQ ID NO:245)、RIRPHPGAL (SEQ ID NO:246)、QFPNHSFKHEDPMGQ (SEQ ID NO:247)、HSFKHEDPY (SEQ ID NO:248)、QFPNHSFKHEDPM (SEQ ID NO:249)、QFPNHSFKHEDPY (SEQ ID NO:250)、KRPFMCAYPGCNK (SEQ ID NO:251)、KRPFMCAYPGCYK (SEQ ID NO:252)、FMCAYPGCY (SEQ ID NO:253)、FMCAYPGCK (SEQ ID NO:254)、KRPFMCAYPGCNKRY (SEQ ID NO:255)、SEKRPFMCAYPGCNK (SEQ ID NO:256)、KRPFMCAYPGCYKRY (SEQ ID NO:257)、NLNMLGATL (SEQ ID NO:258)、VLDFAPPGA (SEQ ID NO:259)、RMFPNAPYL (SEQ ID NO:260)、CMTWNQMN (SEQ ID NO:261)、CYTWNQMN (SEQ ID NO:269)、NYMNLGATL (SEQ ID NO:263)、YMFPNAPYL (SEQ ID NO:264)、SLGEQQYSV (SEQ ID NO:265)、CMTWNQMN (SEQ ID NO:266)及NQMNGLATL (SEQ ID NO:267)。

[0855] 方面73.如方面55-71中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述WT-1肽包含氨基酸序列VLDFAPPGA (SEQ ID NO:259)或RMFPNAPYL (SEQ ID NO:260)。

[0856] 方面74.如方面55-73中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述第一I类MHC多肽或所述第二I类MHC多肽包含:a)与图9A中描绘的HLA-A*0101、HLA-A*0201、HLA-A*0201、HLA-A*1101、HLA-A*2301、HLA-A*2402、HLA-A*2407、HLA-A*3303或HLA-A*3401氨基酸序列具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;b)与图10A中描绘的HLA-B*0702、HLA-B*0801、HLA-B*1502、HLA-B*3802、HLA-B*4001、HLA-B*4601或HLA-B*5301氨基酸序列具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;或c)与图11A中描绘的HLA-C*0102、HLA-C*0303、HLA-C*0304、HLA-C*0401、HLA-C*0602、HLA-C*0701、HLA-C*0702、HLA-C*0801或HLA-C*1502具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0857] 方面75.如方面55-74中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述第一MHC多肽为 β 2M多肽,且其中所述第二MHC多肽包含与HLA-A*2402多肽具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0858] 方面76.如方面55-74中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述第一MHC多肽为 β 2M多肽,且其中所述第二MHC多肽为HLA-A*1101多肽。

[0859] 方面77.如方面55-74中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述第一MHC多肽为 β 2M多肽,且其中所述第二MHC多肽包含与HLA-A*3303多肽具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0860] 方面78.如方面55-74中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述第一MHC多肽为 β 2M多肽,且其中所述第二MHC多肽包含与HLA-A*0201多肽具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0861] 方面79.如方面55-78中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述至少一种免疫调节多肽为包含以下的变异IL-2多肽:i) H16A取代和F42A取代;或ii) H16T取代和F42A取代。

[0862] 方面80.如方面55-79中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述多聚体多肽包含第一异二聚体和第二异二聚体。

[0863] 方面81.一种核酸,其包含编码根据方面55-80中任一项的第一多肽或第二多肽的核苷酸序列,其中所述第一多肽或所述第二多肽包含至少一个免疫调节结构域。

[0864] 方面82.一种表达载体,其包含如方面81的核酸。

[0865] 方面83.一种选择性调节对于威尔姆氏瘤-1(WT-1)表位具有特异性的T细胞的活性的方法,所述方法包括使所述T细胞与根据方面55-80中任一项的T细胞调节多聚体多肽接触,其中所述接触选择性调节所述WT-1表位特异性T细胞的活性。

[0866] 方面84.一种治疗患有癌症之患者的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的包含根据方面55-80中任一项的T细胞调节多聚体多肽的药物组合物。

[0867] 方面85.如方面84的方法,其中所述癌症表达WT-1蛋白。

[0868] 方面86.如方面84或方面85的方法,其中所述癌症为急性骨髓性白血病、骨髓瘤、卵巢癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、结肠直肠癌、乳腺癌、威尔姆氏瘤、间皮瘤、软组织肉瘤、成神经细胞瘤或肾母细胞瘤。

[0869] 方面87.如方面84-86中任一项的方法,其中所述施用是肌肉内施用的。

[0870] 方面88.如方面84-86中任一项的方法,其中所述施用是静脉内施用的。

[0871] 方面89.如方面84-88中任一项的方法,其进一步包括向所述个体施用一种或多种检查点抑制剂。

[0872] 方面90.如方面89的方法,其中所述检查点抑制剂为结合至选自以下组成的组的多肽的抗体:CD27、CD28、CD40、CD122、CD96、CD73、CD47、OX40、GITR、CSF1R、JAK、PI3K δ 、PI3K γ 、TAM、精氨酸酶、CD137、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、LAG3、TIM3、VISTA、CD96、TIGIT、CD122、PD-1、PD-L1及PD-L2。

[0873] 方面91.如方面90的方法,其中所述检查点抑制剂为对PD-1、PD-L1或CTLA4有特异性的抗体。

[0874] 方面92.如方面89的方法,其中所述一种或多种检查点抑制剂选自以下组成的

组：纳武单抗、派姆单抗、披地单抗、AMP-224、MPDL3280A、MDX-1105、MEDI-4736、阿维鲁单抗、伊匹珠单抗、曲利木单抗、披地单抗、IMP321、MGA271、BMS-986016、利鲁单抗、乌瑞鲁单抗、PF-05082566、IPH2101、MEDI-6469、CP-870,893、莫木利珠单抗、瓦利鲁单抗、阿维单抗、加利昔单抗、AMP-514、AUNP 12、伊多莫德、NLG-919、INCB024360、KN035及其组合。

[0875] 方面93.一种调节个体的免疫反应的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的如方面55-80中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述施用诱导表位特异性T细胞反应和表位非特异性T细胞反应,其中所述表位特异性T细胞反应与所述表位非特异性T细胞反应的比率为至少2:1。

[0876] 方面94.一种选择性递送免疫调节多肽至靶T细胞的方法,所述方法包括使混合T细胞群与如方面55-80中任一项的T细胞调节多聚体多肽接触,其中所述混合T细胞群包含所述靶T细胞和非靶T细胞,其中所述靶T细胞对存在于所述T细胞调节多聚体多肽内的所述WT-1表位具有特异性,且其中所述接触递送存在于所述T细胞调节多聚体多肽内的所述一种或多种免疫调节多肽至所述靶T细胞。

[0877] 方面95.一种检测从个体获得的混合T细胞群中结合威尔姆氏瘤-1 (WT-1) 表位的靶T细胞的存在的方法,所述方法包括:a)使所述混合T细胞群与如方面55-80中任一项的T细胞调节多聚体多肽在体外接触,其中所述T细胞调节多聚体多肽包含所述WT-1表位;及b)检测T细胞响应于所述接触的活化和/或增殖,其中活化和/或增殖的T细胞指示所述靶T细胞的存在。

[0878] 方面组B

[0879] 上文所述的本发明主题的方面(包括实施方案)单独或在与一个或多个其他方面或实施方案组合时可有益。不限于以上描述,下文提供本公开的编号1-36的某些非限制性方面。如本领域技术人员在阅读本公开的后将显而易见,可使用个别编号的方面中的各者或将其与前述或以下个别编号的方面中的任一个组合。此旨在提供全部此等方面组合的支持且不限于下文明确提供的方面的组合:

[0880] 方面1.一种T细胞调节多聚体多肽,其包含:至少一种异二聚体,所述异二聚体包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含:i)威尔姆氏瘤-1 (WT-1) 肽表位,其中所述WT-1肽的长度为至少4个氨基酸;和ii)第一I类主要组织相容性复合物 (MHC) 多肽;b)第二多肽,所述第二多肽包含第二I类MHC多肽,及c)至少一种活化免疫调节多肽,其中所述第一多肽和/或所述第二多肽包含所述免疫调节多肽,且其中所述WT-1肽表位包含选自以下组成的组的氨基酸序列:NLMNLGATL (SEQ ID NO:258)、NYMNLGATL (SEQ ID NO:263)、CMTWNQMNLGATLKG (SEQ ID NO:223)、WNQMNLGATLKGVA (SEQ ID NO:224)、CMTWNYMNLGATLKG (SEQ ID NO:225)、WNYMNLGATLKGVA (SEQ ID NO:226)、MTWNQMNLGATLKG (SEQ ID NO:227)、TWNQMNLGATLKGVA (SEQ ID NO:228)、CMTWNLMLGATLKG (SEQ ID NO:229)、MTWNLMLGATLKG (SEQ ID NO:230)、TWNLMNLGATLKGVA (SEQ ID NO:231)、WNLMLGATLKGVA (SEQ ID NO:232)、MNLGATLKG (SEQ ID NO:233)、MTWNYMNLGATLKG (SEQ ID NO:234)、TWNYMNLGATLKGVA (SEQ ID NO:235)、CMTWNQMNLGATLKGVA (SEQ ID NO:236)、CMTWNLMLGATLKGVA (SEQ ID NO:237)、CMTWNYMNLGATLKGVA (SEQ ID NO:238)、GYLRNPTAC (SEQ ID NO:239)、GALRNPTAL (SEQ ID NO:240)、YALRNPTAC (SEQ ID NO:241)、GLLRNPTAC (SEQ ID NO:242)、RYRPHPGAL (SEQ ID NO:243)、YQRPHPGAL (SEQ ID NO:244)、RLRPHPGAL (SEQ ID NO:245)、RIRPHPGAL (SEQ ID

NO:246)、QFPNHSFKHEDPMGQ(SEQ ID NO:247)、HSFKHEDPY(SEQ ID NO:248)、QFPNHSFKHEDPM(SEQ ID NO:249)、QFPNHSFKHEDPY(SEQ ID NO:250)、KRPFMCAYPGCNK(SEQ ID NO:251)、KRPFMCAYPGCYK(SEQ ID NO:252)、FMCAYPGCY(SEQ ID NO:253)、FMCAYPGCK(SEQ ID NO:254)、KRPFMCAYPGCNKRY(SEQ ID NO:255)、SEKRPFMCAYPGCNK(SEQ ID NO:256)、KRPFMCAYPGCYKRY(SEQ ID NO:257)、NLMNLGATL(SEQ ID NO:258)、VLDFAPPGA(SEQ ID NO:259)、RMFPNAPYL(SEQ ID NO:260)、CMTWNQMN(SEQ ID NO:261)、CYTWNQMNL(SEQ ID NO:269)、NYMNLGATL(SEQ ID NO:263)、YMFPNAPYL(SEQ ID NO:264)、SLGEQQYSV(SEQ ID NO:265)、CMTWNQMNL(SEQ ID NO:266)及NQMNLGATL(SEQ ID NO:267),任选地其中所述第一多肽或所述第二多肽包含免疫球蛋白(Ig)Fc多肽。

[0881] 方面2.如方面1的T细胞调节多聚体多肽,其中所述一个或多个免疫调节结构域中的至少一个为变异免疫调节多肽,其呈现出对同源共免疫调节多肽的亲合力与相应野生型免疫调节多肽对所述同源共免疫调节多肽的亲合力相比有所减小,且其中所述表位以至少 10^{-7} M的亲合力结合至T细胞上的T细胞受体(TCR),使得:

[0882] i)所述T细胞调节多聚体多肽结合至第一T细胞的亲合力比所述T细胞调节多聚体多肽结合第二T细胞的亲合力高至少25%,其中所述第一T细胞在其表面上表达所述同源共免疫调节多肽及以至少 10^{-7} M的亲合力结合所述表位的TCR,且其中所述第二T细胞在其表面上表达所述同源共免疫调节多肽但在其表面上不表达以至少 10^{-7} M的亲合力结合所述表位的TCR;且/或

[0883] ii)当通过生物层干涉术测量时,对照T细胞调节多聚体多肽对同源共免疫调节多肽的结合亲合力与包含野生型免疫调节多肽的变体的所述T细胞调节多聚体多肽对所述同源共免疫调节多肽的结合亲和力的比率范围为1.5:1至 10^6 :1,其中所述对照包含所述野生型免疫调节多肽。

[0884] 方面3.如方面2的T细胞调节多聚体多肽,其中:

[0885] a)所述T细胞调节多聚体多肽结合至所述第一T细胞的亲合力比其结合所述第二T细胞的亲合力高至少50%、至少2倍、至少5倍或至少10倍;且/或

[0886] b)所述变异免疫调节多肽结合所述共免疫调节多肽的亲合力为约 10^{-4} M至约 10^{-7} M、约 10^{-4} M至约 10^{-6} M、约 10^{-4} M至约 10^{-5} M;且/或

[0887] c)其中当通过生物层干涉术测量时,对照T细胞调节多聚体多肽对同源共免疫调节多肽的结合亲合力与包含野生型免疫调节多肽的变体的所述T细胞调节多聚体多肽对所述同源共免疫调节多肽的结合亲和力的比率为至少10:1、至少50:1、至少 10^2 :1或至少 10^3 :1,其中所述对照包含所述野生型免疫调节多肽。

[0888] 方面4.如方面1-3中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中

[0889] a1)所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:

[0890] i)所述WT-1肽表位;

[0891] ii)所述第一MHC多肽;及

[0892] iii)至少一种免疫调节多肽;且

[0893] b1)所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:

[0894] i)所述第二MHC多肽;及

[0895] ii)免疫球蛋白(Ig)Fc多肽;或

- [0896] a2) 所述第一多肽以从N端至C端的次序包含：
- [0897] i) 所述WT-1肽表位；及
- [0898] ii) 所述第一MHC多肽；且
- [0899] b2) 所述第二多肽以从N端至C端的次序包含：
- [0900] i) 至少一种免疫调节多肽；
- [0901] ii) 所述第二MHC多肽；及
- [0902] iii) Ig Fc多肽；或
- [0903] a3) 所述第一多肽以从N端至C端的次序包含：
- [0904] i) 所述WT-1肽表位；及
- [0905] ii) 所述第一MHC多肽；且
- [0906] b3) 所述第二多肽以从N端至C端的次序包含：
- [0907] i) 所述第二MHC多肽；及
- [0908] ii) Ig Fc多肽；及
- [0909] iii) 至少一种免疫调节多肽；或
- [0910] a4) 所述第一多肽以从N端至C端的次序包含：
- [0911] i) 所述WT-1肽表位；及
- [0912] ii) 所述第一MHC多肽；且
- [0913] b4) 所述第二多肽以从N端至C端的次序包含：
- [0914] i) 所述第二MHC多肽；及
- [0915] ii) 至少一种免疫调节多肽；或
- [0916] a5) 所述第一多肽以从N端至C端的次序包含：
- [0917] i) 所述WT-1肽表位；及
- [0918] ii) 所述第一MHC多肽；且
- [0919] b5) 第二多肽以从N端至C端的次序包含：
- [0920] i) 至少一种免疫调节多肽；及
- [0921] ii) 所述第二MHC多肽；或
- [0922] a6) 所述第一多肽以从N端至C端的次序包含：
- [0923] i) 所述WT-1肽表位；
- [0924] ii) 所述第一MHC多肽；及
- [0925] iii) 至少一种免疫调节多肽；且
- [0926] b6) 所述第二多肽包含：
- [0927] i) 所述第二MHC多肽。
- [0928] 方面5. 如方面1-4中任一项的T细胞调节多聚体多肽，其中：
- [0929] a) 所述第一MHC多肽为 β 2-微球蛋白多肽；且所述第二MHC多肽为I类MHC重链多肽；
或
- [0930] b) 所述第一MHC多肽为I类MHC重链多肽；且所述第二MHC多肽为 β 2-微球蛋白多肽。
- [0931] 方面6. 如方面5的T细胞调节多聚体多肽，其中：
- [0932] a) 所述第一多肽以从N端至C端的次序包含：
- [0933] i) 所述WT-1肽表位；及

- [0934] ii) 所述 β 2-微球蛋白多肽;且
- [0935] b) 所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:
- [0936] i) 至少一种免疫调节多肽;
- [0937] ii) 所述I类MHC重链多肽;及
- [0938] iii) Ig Fc多肽。
- [0939] 方面7. 如方面5的T细胞调节多聚体多肽, 其中:
- [0940] a) 所述第一多肽以从N端至C端的次序包含:
- [0941] i) 所述WT-1肽表位;及
- [0942] ii) 所述 β 2-微球蛋白多肽;且
- [0943] b) 所述第二多肽以从N端至C端的次序包含:
- [0944] i) 所述I类MHC重链多肽;及
- [0945] ii) Ig Fc多肽;及
- [0946] iii) 至少一种免疫调节多肽。
- [0947] 方面8. 如方面1-7中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述至少一种免疫调节多肽选自以下组成的组: 细胞因子、4-1BBL多肽、ICOS-L多肽、OX-40L多肽、CD80多肽、CD86多肽、CD40多肽、CD70多肽及其组合。
- [0948] 方面9. 如方面1-8中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述至少一种免疫调节多肽为IL-2多肽。
- [0949] 方面10. 如方面1-9中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述多聚体多肽包含至少两种免疫调节多肽, 且其中所述免疫调节多肽中的至少两个是相同的, 任选地其中所述两种或更多种免疫调节多肽是串联的。
- [0950] 方面11. 如方面1-10中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述免疫调节多肽为变异IL-2多肽, 其呈现出对IL-2受体的亲和力与野生型IL-2多肽对所述IL-2受体的亲和力相比有所减小。
- [0951] 方面12. 如方面11的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述变异IL-2多肽包含: i) H16A取代和F42A取代;或ii) H16T取代和F42A取代。
- [0952] 方面13. 如方面1-12中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述第一多肽与所述第二多肽彼此共价连接, 任选地其中所述共价键联是经由二硫键。
- [0953] 方面14. 如方面1-13中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述第一MHC多肽或介于所述表位与所述第一MHC多肽之间的接头包含提供第一Cys残基的氨基酸取代, 其中所述第二MHC多肽包含提供第二Cys残基的氨基酸取代, 且其中所述二硫键联在所述第一Cys残基与所述第二Cys残基之间。
- [0954] 方面15. 如方面1-14中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述多肽包含在以下各物之间的二硫键: i) 存在于所述WT-1肽表位与所述第一I类MHC多肽之间的接头中的Cys, 其中所述第一I类MHC多肽为 β 2M多肽;与ii) 经由Y84C取代引入所述第二I类MHC多肽中的Cys残基, 其中所述第二I类MHC多肽为I类MHC重链多肽。
- [0955] 方面16. 如方面1-14中任一项的T细胞调节多聚体多肽, 其中所述多肽包含在以下各物之间的二硫键: i) 经由R12C取代引入所述第一I类MHC多肽中的Cys残基, 其中所述第一I类MHC多肽为 β 2M多肽;与ii) 经由A236C取代引入所述第二I类MHC多肽中的Cys残基, 其中

第二I类MHC多肽为I类MHC重链多肽。

[0956] 方面17.如方面1-14中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述多肽包含在以下各物之间的第一二硫键:i)存在于所述WT-1肽表位与所述第一I类MHC多肽之间的接头中的Cys,其中所述第一I类MHC多肽为 β 2M多肽;与ii)经由Y84C取代引入所述第二I类MHC多肽中的Cys残基,其中所述第二I类MHC多肽为I类MHC重链多肽;及在以下各物之间的第二二硫键:i)经由R12C取代引入所述 β 2M多肽中的Cys残基;与ii)经由A236C取代引入所述I类MHC重链多肽中的Cys残基。

[0957] 方面18.如方面15或方面17的T细胞调节多聚体多肽,其中介于所述WT-1肽表位与所述第一MHC之间的所述接头为GCGGS(G4S)_n(SEQ ID NO:315),其中n为1、2、3、4、5、6、7、8或9。

[0958] 方面19.如方面1-18中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述WT-1肽表位的长度为约4个氨基酸至约25个氨基酸。

[0959] 方面20.如方面1-19中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述WT-1肽包含氨基酸序列CMTWNQMNL(SEQ ID NO:266)、CYTWNQMNL(SEQ ID NO:269)、NYMNLGATL(SEQ ID NO:263)、VLDFAPPGA(SEQ ID NO:259)、YMFNPAPYL(SEQ ID NO:264)、SLGEQQYSV(SEQ ID NO:265)、RMFPNAPYL(SEQ ID NO:260)及NLMNLGATL(SEQ ID NO:258)。

[0960] 方面21.如方面1-20中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述第一MHC多肽或所述第二MHC多肽包含:

[0961] a)与图9A中描绘的HLA-A*0101、HLA-A*0201、HLA-A*0201、HLA-A*1101、HLA-A*2301、HLA-A*2402、HLA-A*2407、HLA-A*3303或HLA-A*3401氨基酸序列具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;或

[0962] b)与图10A中描绘的HLA-B*0702、HLA-B*0801、HLA-B*1502、HLA-B*3802、HLA-B*4001、HLA-B*4601或HLA-B*5301氨基酸序列具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;或

[0963] c)与图11A中描绘的HLA-C*0102、HLA-C*0303、HLA-C*0304、HLA-C*0401、HLA-C*0602、HLA-C*0701、HLA-C*0702、HLA-C*0801或HLA-C*1502具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0964] 方面22.如方面1-21中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述第一MHC多肽为 β 2M多肽,且其中所述第二MHC多肽包含与HLA-A*2402多肽具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,且其中所述表位选自由以下组成的组:RMFPNAPYL(SEQ ID NO:260)、CYTWNQMNL(SEQ ID NO:269)及NYMNLGATL(SEQ ID NO:263)。

[0965] 方面23.如方面1-21中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述第一MHC多肽为 β 2M多肽,且其中所述第二MHC多肽包含与HLA-A*0201多肽具有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,且其中所述表位选自由以下组成的组:VLDFAPPGA(SEQ ID NO:259)、RMFPNAPYL(SEQ ID NO:260)及YMFNPAPYL(SEQ ID NO:264)。

[0966] 方面24.如方面1-23中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述多聚体多肽包含第一异二聚体和第二异二聚体,且其中所述第一异二聚体与所述第二异二聚体通过介于所述第一异二聚体与所述第二异二聚体的Ig Fc多肽之间的一个或多个二硫键来共价结合。

[0967] 方面25.一种核酸,其包含编码如方面1-24中任一项的第一多肽或第二多肽的核

苷酸序列。

[0968] 方面26.一种表达载体,其包含如方面25的核酸。

[0969] 方面27.一种选择性调节对于威尔姆氏瘤-1(WT-1)表位具有特异性的T细胞的活性的方法,所述方法包括使所述T细胞与根据方面1-24中任一项的T细胞调节多聚体多肽接触,其中所述接触选择性调节所述WT-1表位特异性T细胞的活性。

[0970] 方面28.一种治疗患有癌症之患者的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的包含根据方面1-24中任一项的T细胞调节多聚体多肽的药物组合物。

[0971] 方面29.如方面28的方法,其中所述癌症为急性骨髓性白血病、骨髓瘤、卵巢癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、结肠直肠癌、乳腺癌、威尔姆氏瘤、间皮瘤、软组织肉瘤、成神经细胞瘤或肾母细胞瘤。

[0972] 方面30.如方面28或方面29的方法,其进一步包括向所述个体施用一种或多种检查点抑制剂。

[0973] 方面31.如方面30的方法,其中所述检查点抑制剂为结合至选自以下组成的组的多肽的抗体:CD27、CD28、CD40、CD122、CD96、CD73、CD47、OX40、GITR、CSF1R、JAK、PI3K δ 、PI3K γ 、TAM、精氨酸酶、CD137、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、LAG3、TIM3、VISTA、CD96、TIGIT、CD122、PD-1、PD-L1及PD-L2。

[0974] 方面32.如方面31的方法,其中所述检查点抑制剂为对PD-1、PD-L1或CTLA4有特异性的抗体。

[0975] 方面33.如方面30的方法,其中所述一种或多种检查点抑制剂选自以下组成的组:纳武单抗、派姆单抗、披地单抗、AMP-224、MPDL3280A、MDX-1105、MEDI-4736、阿维鲁单抗、伊匹珠单抗、曲利木单抗、披地单抗、IMP321、MGA271、BMS-986016、利鲁单抗、乌瑞鲁单抗、PF-05082566、IPH2101、MEDI-6469、CP-870,893、莫木利珠单抗、瓦利鲁单抗、阿维单抗、加利昔单抗、AMP-514、AUNP 12、伊多莫德、NLG-919、INCB024360、KN035、及其组合。

[0976] 方面34.一种调节个体的免疫反应的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的如方面1-24中任一项的T细胞调节多聚体多肽,其中所述施用诱导表位特异性T细胞反应及表位非特异性T细胞反应,且其中所述表位特异性T细胞反应与所述表位非特异性T细胞反应的比率为至少2:1。

[0977] 方面35.一种选择性递送免疫调节多肽至靶T细胞的方法,所述方法包括使混合T细胞群与如方面1-24中任一项的T细胞调节多聚体多肽接触,其中所述混合T细胞群包含所述靶T细胞和非靶T细胞,其中所述靶T细胞对存在于所述T细胞调节多聚体多肽内的所述WT-1表位有特异性,且其中所述接触递送存在于所述T细胞调节多聚体多肽内的所述一种或多种免疫调节多肽至所述靶T细胞。

[0978] 方面36.一种检测从个体获得的混合T细胞群中结合WT-1表位的靶T细胞的存在的方法,所述方法包括:a)使所述混合T细胞群与如方面1-24中任一项的T细胞调节多聚体多肽在体外接触,其中所述T细胞调节多聚体多肽包含所述WT-1表位;及b)检测T细胞响应于所述接触的活化和/或增殖,其中活化和/或增殖的T细胞指示所述靶T细胞的存在。

[0979] 实施例

[0980] 提出以下实例以便向一般技艺人士提供如何制备及使用本发明的完全公开和描述,且以下实例不意图限制发明人视为其发明的事物的范围,也不意图表示以下实验为进

行的所有或仅有实验。已努力确保关于所用数值(例如,量、温度等)的准确性,但应虑及一些实验误差和偏差。除非另外指示,份为重量份,分子量为重量平均分子量,温度以摄氏度表示,且压力为大气压或接近大气压。可使用标准缩写,例如,bp,碱基对;kb,千碱基;pL,皮升;s或sec,秒;min,分钟;h或hr,小时;aa,氨基酸;kb,千碱基;bp,碱基对;nt,核苷酸;i.m.,肌肉内;i.p.,腹膜内;s.c.,皮下;等等。

[0981] 实施例1

[0982] 测试经由两个二硫键连接TMMP异二聚体的两个多肽链对稳定性及产生的影响。

[0983] 生成以下TMMP:a)包含1715+2380多肽的TMMP;及b)包含1715多肽和2381多肽的TMMP。多肽链的氨基酸序列提供于图14A-14C中。如图15和图16所示,TMMP包括:i)A02:01等位基因的I类HLA-A重链多肽;和ii)IL2(H16A;F42A)免疫调节(“MOD”)多肽的两个拷贝。2380多肽包含WT1肽WT1(37-45),而2381多肽包含WT1肽WT1(126-134)。1715-2380TMMP为包含1715多肽及2380多肽的异二聚体的同二聚体。同样,1715-2381TMMP为包含1715多肽和2381多肽的异二聚体的同二聚体。因此,TMMP包括:i)1715+2380异二聚体的2个拷贝,由存在于1715多肽中的IgFc多肽之间的2个二硫键连接;或ii)1715+2381异二聚体的2个拷贝,由存在于1715多肽中的IgFc多肽之间的2个二硫键连接。此排列示意性描绘于图17C中。

[0984] TMMP 1715+2380为双二硫键连接的异二聚体:a)第一二硫键联在以下各物之间:i)存在于WT1肽与2380多肽的 β 2M链之间的接头中的Cys;与ii)通过Y84C取代引入存在于1715多肽中的I类重链中的Cys;且b)第二二硫键联在以下各物之间:i)通过R12C取代引入存在于2380多肽中的 β 2M多肽中的Cys;与ii)通过A236C取代引入存在于1715多肽中的I类重链中的Cys。

[0985] TMMP 1715+2381为二硫键连接的异二聚体:a)第一二硫键联在以下各物之间:i)存在于WT1肽与2381多肽的 β 2M链之间的接头中的Cys;与ii)通过Y84C取代引入存在于1715多肽中的I类重链中的Cys;且b)第二二硫键联在以下各物之间:i)通过R12C取代引入存在于2381多肽中的 β 2M多肽中的Cys;与ii)通过A236C取代引入存在于1715多肽中的I类重链中的Cys。

[0986] 在ExpiCHO细胞(其改自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞;ThermoFisher;参见例如Jain等人(2017)Protein Expr.Purif.134:38)中产生TMMP且将其自这些细胞生长的细胞培养基中纯化。进行两个纯化步骤。在第一步骤中,使细胞培养基变澄清,且使澄清的细胞培养基经历蛋白A柱纯化。在第二纯化步骤中,使来自蛋白A柱的洗脱物经历尺寸排阻色谱。

[0987] 对纯化的TMMP的稳定性进行测试。在将纯化的TMMP保存于液体溶液(含有365mM NaCl的磷酸盐缓冲盐水(PBS),pH 7.4)中在37°C下达28天或在42°C下达28天之后,确定所存在的异二聚体TMMP的量。

[0988] 另外,使纯化的TMMP经历3次冷冻/解冻循环。

[0989] 结果描绘于图15和图16中。

[0990] 如图15所示,1715-2380异二聚体(在图15中也称为“单体”)的同二聚体占来自蛋白A柱的洗脱物的80%。如图16所示,1715-2381异二聚体(在图16中也称为“单体”)的同二聚体占来自蛋白A柱的洗脱物的79%。

[0991] 发现异二聚体1715-2380和1715-2381的同二聚体对于3次冷冻/解冻循环是稳定的。

[0992] 各种TMMP的肽/HLA、IL-2及Fc结构域的解折叠温度表示为 T_m (°C),其提供于图15和图16中。另外,发生聚集的温度(T_m °C)提供于图15和图16中。

[0993] 实施例2:包含WT1表位、HLA-A*02重链、异二聚体的2个多肽链之间的一个或两个二硫键、及位置1处的变体IL-2免疫调节多肽的TMMP的生物化学表征

[0994] 此项研究中所用的构建体汇总于表2中。

[0995] 表2

构建体	表位	S-S键	IL-2位置
2405+2762	WT-1 (37-45)	G2C	1
1715+2380	WT-1 (37-45)	G2C+R12C	1
2405+2763	WT-1 (126-134)	G2C	1
1715+2381	WT-1 (126-134)	G2C+R12C	1
2405+3626	WT-1 (126-134 (R126Y))	G2C	1
1715+3625	WT-1 (126-134 (R126Y))	G2C+R12C	1

[0997] 所述构建体的多肽链的氨基酸序列提供于图14A-14I中。

[0998] “G2C”指示TMMP包括以下各物之间的二硫键:i)在肽表位与 β 2M多肽之间的肽接头中的Cys;与ii)在I类MHC重链的位置84处的Cys,其中I类MHC重链具有Y84C取代。

[0999] “R12C”指示TMMP包括以下各物之间的二硫键:i)在 β 2M多肽的位置12处的Cys,其中 β 2M多肽具有R12C取代;与ii)在I类MHC重链的位置236处的Cys,其中I类MHC重链具有A236C取代。

[1000] “G2C+R12C”指示TMMP包括“G2C”二硫键和“R12C”二硫键。

[1001] WT-1 (37-45)为VLDFAPPGA (SEQ ID NO:259)。

[1002] WT-1 (126-134)为RMFPNAPYL (SEQ ID NO:260)。

[1003] WT-1 (126-134 (R126Y))为YMFNPAPYL (SEQ ID NO:264)且也称为“126-134模拟表位”。

[1004] IL-2“位置1”示意性描绘于图19中。

[1005] 结果

[1006] 测试TMMP模拟CD8⁺T细胞的抗原特异性增殖的能力。TMMP包括以下各物作为表位:i)WT1 37-45;ii)WT1 126-134;或iii)WT1 126-134 (R126Y)。全部TMMP包括A02等位基因I类MHC重链。

[1007] 将从人供体获得的外周血单核细胞(PBMC)在体外与不同浓度(0nM、10nM、100nM、300nM或1000nM)的TMMP一起培育10天。在10天培育期之后,测定对表位有特异性的细胞的数目。来自两个供体(“Leukopak 7和Leukopak 12”)的PBMC的数据示于图21中。

[1008] 图21中提供的数据表明,在两个供体中,WT1特异性TMMP可在10天刺激培养期间诱导来自总PBMC的WT1特异性CD8⁺T细胞的扩增。此扩增在具有低或不可检测的WT1特异性T细胞前躯体的PBMC中达成,表明TMMP能够在来自未促发或纯真库的供体中诱导抗原特异性反应。数据表明对3个选择的WT1肽(37-45、126-134及126-134R126Y)中的任一个有特异性且在两个所测试的二硫键构架(G2C和R12C/G2C)的任一个上的TMMP诱导来自总PBMC的WT1特异性CD8⁺T细胞的扩增。

[1009] 在体外在重组人IL-2存在下以所指示的WT1肽刺激来自不同人供体(L7、L10及

L12)的PBMC达10天且接着以含有相同肽且含有G2C二硫键或R12C和G2C二硫键两者的TMMP再刺激8天。数据描绘于图22中。

[1010] 图22中提供的数据表明在来自三个供体的PBMC中,含有WT1的TMMP可在10天促发培养之后的8天再刺激培养期间自总PBMC扩增WT1特异性CD8⁺T细胞。此扩增自具有可检测数目的WT1特异性T细胞前躯体的细胞发生,表明TMMP能够在具有促发/预先存在的WT-1特异性T细胞库的供体中扩增抗原特异性T细胞。数据表明对3种WT1肽(37-45、126-134和126-134R126Y)中的任一个有特异性且在两个测试的二硫键构架(G2C和R12C/G2C)的任一个上的TMMP诱导此类扩增。

[1011] 测试通过与含有WT1 37-45肽且含有G2C二硫键或R12C和G2C二硫键两者的TMMP接触来进行扩增的CD8⁺T细胞响应于递呈WT1-37-45肽或不相关肽(SL9)的靶细胞(T2细胞)而产生TNF- α 和IFN- γ 的能力。使用佛波醇12-肉豆蔻酸盐13-乙酸盐(PMA)和离子霉素(ionomycin) (“iono”)作为阳性对照。使用以培养基处理的CD8⁺T细胞作为阴性对照。将通过TMMP扩增的CD8⁺T细胞与以WT1肽或不相关肽(来自HIV的SL9肽)装载的‘靶细胞’(T2细胞)一起培育。将CD8⁺T细胞对以WT 37-45肽脉冲处理的T2细胞的反应(如通过IFN- γ 和TNF- α 的产生所指示)与对以SL9肽脉冲处理的T2细胞的反应相比较。数据示于图23中。

[1012] 图23中提供的数据证明以含有具有G2C或R12C/G2C构架的TMMP的WT1 37-45扩增的WT1 37-45-特异性CD8⁺T细胞的选择性多官能性。仅在识别递呈WT1 37-45肽而非SL9肽的靶细胞时观测到所测量的反应(TNF- α 及IFN- γ 产生)。阳性及阴性对照孔显示在不存在刺激时(如在仅有培养基的孔中所见)CD8⁺T细胞不存在基线活性且抗原特异性细胞及非抗原特异性细胞能够在强抗原非特异性刺激(PMA+离子霉素)后显示功能性反应。

[1013] 使用相同测定,测试通过含有WT1 126-134肽(“WT1 126”)且含有R12C和G2C二硫键的TMMP扩增的CD8⁺T细胞响应于递呈WT1-126-134肽、WT1-126-134R126Y肽或不相关肽(SL9)的靶细胞(T2细胞)而产生TNF- α 和IFN- γ 的能力。数据示于图24中。

[1014] 图24中提供的数据证明以R12C/G2C构架上的WT1 126-134特异性Immuno-STAT扩增的WT1 126-134特异性CD8⁺T细胞的选择性多官能性。仅在识别递呈WT1 126-134肽或WT1 126-134 R126Y肽而非SL9肽的靶细胞时观测到所测量的反应(TNF- α 和IFN- γ 产生)。阳性和阴性对照孔显示在不存在刺激时(如在仅有培养基的孔中所见)CD8⁺T细胞不存在基线活性且抗原特异性细胞及非抗原特异性细胞能够在强抗原非特异性刺激(PMA+离子霉素)后显示功能性反应。

[1015] 测试二硫键对IL-2驱动的免疫细胞活化的作用。CD69为大部分淋巴细胞及一些其他免疫细胞上的早期活化标记物。在不同类型的刺激条件(包括IL-2刺激)下,细胞上调CD69。评定在NK细胞、CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞上的CD69上调。CD69上调表明存在于TMMP中的IL-2多肽为有活性的且其功能与对照(重组人IL-2)相比有所减弱。将来自不同人供体的PBMC与表中列出的各种TMMP(“IST”)一起培育。包括包含CMV表位或MART-1表位的TMMP作为对照。展示来自一人供体(Leukopak 6)的数据。数据示于图25中。图25展示作为容易响应于IL-2而上调CD69的细胞的相关及代表性实例的NK细胞上的CD69上调。在CD8⁺T细胞闸(cell gate)和CD4⁺T细胞闸上观测到类似数据。

[1016] 图25中提供的数据表明在位置1上被工程化至在各种二硫键构架(R12C、G2C及R12C/G2C)上建立的HLA-A02特异性Immuno-STAT中的IL-2免疫调节多肽为功能性的(如通

过在相关免疫细胞表面上诱导CD69所观测到的)且与野生型重组人IL-2相比有所减弱。

[1017] 为了评价存在于TMMP中的变体IL-2免疫调节多肽的效力,进行CTLL-2增殖测定。CTLL-2细胞依赖于IL-2进行生长;因此,CTLL-2增殖为存在于培养基中的IL-2的量和/或功效的量度(例如,其中IL-2由与TMMP接触的T细胞产生)。Gillis等人(1978)J. Immunol. 120: 2027。

[1018] 数据示于图26中。图26中提供的数据表明在位置1上工程化至在各种二硫键构架(R12C、G2C及R12C/G2C)上建立的HLA-A02特异性Immuno-STAT(TMMP)中的IL-2免疫调节多肽为功能性的(如通过CTLL-2增殖的诱导所观测到的)且与阿地白介素相比有所减弱。

[1019] 测试这些实验中所用的TMMP结合至FcRn的能力。TMMP包括可结合至FcRn的Ig Fc区。结合至FcRn为体内半衰期延长的指示。Souder等人(2015)MAbs 7:912。“1715+2380”TMPP的数据示于图27中。

[1020] 测试“1715+2380”TMPP结合至其他Fc受体的能力。“1715+2380”TMPP包括具有LALA取代的Ig Fc区,其减少Ig Fc与FcRI、RIIA、IIB、IIIA-F及IIIB的结合,从而减弱Ig Fc介导的效应物功能。数据示于图27中。

[1021] 材料和方法

[1022] 图21

[1023] 使用分离术仪器获得来自两个健康供体的Leukopak。将Leukopak以等体积的室温磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释。通过如下密度梯度离心从稀释的leukopak分离PBMC。在50mL锥形管中以13mL Ficoll-Paque使30mL稀释的leukopak处于下层,且在400g下在室温下在无制动器的摆动桶式转子中离心30分钟。从血浆-Ficoll界面收集单核细胞层(淋巴细胞、单核细胞及血小板),将其转移至新的50mL锥形管中且通过在室温下在300g下离心10分钟来以3倍过量PBS洗涤。在小心除去上清液后,使细胞再悬浮且通过在室温下在200g下离心10分钟来以50mL PBS洗涤以除去血小板。在洗涤及血小板除去后,将所获得的PBMC自50mL管中汇集,在PBS中再悬浮,计数,通过在300g下离心10分钟来沉淀,且使其以 50×10^6 个细胞/ml的最终浓度再悬浮于细胞冷冻培养基中。

[1024] 由如上文所述的两个leukopak制备人健康供体PBMC。在实验当天,在37℃水浴中使细胞解冻且在温热的ImmunoCult™-XF Cell Expansion Media(Stemcell Technologies)中通过在350x g下离心6分钟来洗涤。除去上清液,且使细胞再悬浮于ImmunoCult™培养基中。使用Countess自动化细胞计数器(Invitrogen,CA)来评定活细胞计数。调整培养基体积以使细胞浓度为 5×10^6 个细胞/ml且在6孔板中每孔接种2mL细胞(等同于 10×10^6 个细胞)。在4mL培养基的总体积中,将PBMC以指定量的Immuno-STAT或仅以培养基刺激。将细胞在37℃、5%CO₂下刺激10天,其中在第5天和第7天通过从孔中抽吸2mL培养上清液且再添加2mL新鲜培养基来更换培养基。

[1025] 在培养后,收获细胞且通过在350x g下离心5分钟来沉淀,通过Countess自动化细胞计数器(Invitrogen,CA)确定活细胞计数,且通过用以下各物染色来处理细胞以用于流动式细胞测量术:活力染剂、适当的WT1肽特异性HLA-A*0201四聚体(MBL International)及针对CD69、CD3、CD14、CD19、CD127、CD56、CD4(Biolegend)、CD8、CD25(BD Biosciences)的抗体。洗涤染色的细胞且通过流动式细胞测量术进行分析。

[1026] 使用Attune NxT流动式细胞测量仪(Invitrogen)进行数据采集。将所采集的数据

输出为fcs文档且使用Flowjo软件(Tree Star,OR)进行分析。

[1027] 基于通过流动式细胞测量术分析的抗原特异性T细胞的频率、体积及事件及在培养结束时收获的细胞的总体积和数目,计算每孔抗原特异性T细胞的数目且绘制为所示曲线图。

[1028] 图22

[1029] 将来自两个供体的PBMC用10 μ g/ml指定肽和50U/ml重组人IL-2扩增10天。在6孔板中在每孔4ml Immunocult培养基中以总计1千万个细胞进行扩增。将细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下刺激10天,其中在第5天和第7天通过从孔中抽吸2mL培养上清液且再添加具有50U/ml重组人IL-2的2mL新鲜培养基来更换培养基。在培养后,收获细胞且通过在350g下离心5分钟来沉淀,通过Countess自动化细胞计数器(Invitrogen,CA)确定活细胞计数。在六孔板的至少3个孔中进行每种刺激条件。使用来自一个孔的PBMC来在用以下各物染色后通过流动式细胞测量术评估培养物中WT1特异性CD8⁺T细胞的频率/量:活力染剂、适当的WT1肽特异性HLA-A*0201四聚体(MBL International)及针对CD69、CD3、CD14、CD19、CD127、CD56、CD4(Biolegend)、CD8、CD25(BD Biosciences)的抗体。洗涤染色的细胞且通过流动式细胞测量术进行分析。使用至少两个孔,使用来自Stem Cell Technologies的CD8⁺T细胞阴性选择套组富集CD8⁺T细胞。在先前用丝裂霉素C以1:2比率处理的自体PBMC存在下,将纯化的CD8⁺T细胞用指定TMMP再刺激8天,其中在每孔4ml体积的Immunocult培养基中具有最终5百万-1千万个细胞。以先前确定对于供体与特定TMMP的组合而言最佳的浓度使用TMMP。

[1030] 在培养时,收获细胞且通过在350g下离心5分钟来沉淀,通过Countess自动化细胞计数器(Invitrogen,CA)测定活细胞计数,且通过用以下各物染色来处理以用于流动式细胞测量术:活力染剂、适当的WT1肽特异性HLA-A*0201四聚体(MBL International)及针对CD69、CD3、CD14、CD19、CD127、CD56、CD4(Biolegend)、CD8、CD25(BD Biosciences)的抗体。洗涤染色的细胞且通过流动式细胞测量术进行分析。

[1031] 使用Attune NxT流动式细胞测量仪(Invitrogen)进行数据采集。将所采集的数据输出为fcs文档且使用Flowjo软件(Tree Star,OR)进行分析。

[1032] 基于通过流动式细胞测量术分析的抗原特异性T细胞之频率、体积及事件及在培养结束时收获的细胞的总体积及数目,计算每孔抗原特异性T细胞的数目且绘制为所示曲线图。

[1033] 图23

[1034] 将来自两个供体的PBMC用10 μ g/ml WT1 37-45肽和50U/ml重组人IL-2扩增10天。在6孔板中在每孔4ml Immunocult培养基中以总计1千万个细胞进行扩增。将细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下刺激10天,其中在第5天和第7天通过从孔中抽吸2mL培养上清液且再添加具有50U/ml重组人IL-2的2mL新鲜培养基来更换培养基。在培养后,收获细胞且通过在350g下离心5分钟来沉淀,通过Countess自动化细胞计数器(Invitrogen,CA)确定活细胞计数。在六孔板的至少3个孔中进行该刺激。使用来自一个孔的PBMC来在用以下各物染色后通过流动式细胞测量术评估培养物中WT1 37-45肽特异性CD8⁺T细胞之频率/量:活力染剂、适当的WT1 37-45肽特异性HLA-A*0201四聚体(MBL International)及针对CD69、CD3、CD14、CD19、CD127、CD56、CD4(Biolegend)、CD8、CD25(BD Biosciences)的抗体。洗涤染色的细胞且通过流动式细胞测量术进行分析。使用Attune NxT流动式细胞测量仪(Invitrogen)进行数据采

集。将所采集的数据输出为fcs文档且使用Flowjo软件(Tree Star,OR)进行分析。

[1035] 使用至少两个孔,使用来自Stem Cell Technologies的CD8+T细胞阴性选择套组富集CD8+T细胞。在先前用丝裂霉素C以1:2比率处理的自体PBMC存在下,将纯化的CD8+T细胞用G2C或R12C/G2C构架上的指定WT1 37-45特异性Immuno-STAT再刺激8天,其中在每孔4ml体积的Immunocult培养基中具有最终5百万-1千万个细胞。以先前确定对于该供体而言最佳的浓度使用G2C或R12C/G2C构架上的WT1 37-45特异性Immuno-STAT。

[1036] 在培养后,收获细胞且通过在350g下离心5分钟来沉淀,通过Countess自动化细胞计数器(Invitrogen,CA)确定活细胞计数,且使用来自Stem Cell Technologies的CD8+T细胞阴性选择套组富集CD8+T细胞。

[1037] 将靶细胞T2细胞(ATCC)在37℃、5%CO₂下用5μg/mL WT137-45肽或人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)Gag₇₇₋₈₅ SL9肽脉冲处理2小时。在肽装载后,将T2细胞洗涤两次且将其再悬浮于ImmunoCult™-XF Cell Expansion Media(Stemcell Technologies)中。

[1038] 将富集的CD8⁺T细胞和装载有肽的T2细胞以1:1比率(各自1x10⁶个细胞)混合于96孔板中,每孔200μL的总体积。将培养基和佛波醇12-肉豆蔻酸盐13-乙酸盐(PMA)/离子霉素分别作为阴性对照和阳性对照添加至对照孔中。在刺激后0.5至1小时,将针对CD107a之染色抗体直接添加至孔中。将细胞刺激5小时,用PBS洗涤且在冰上使用FVS780针对活力进行染色10分钟。将细胞洗涤,在室温下用WT1 37-45肽特异性四聚体(以APC和PE标记)染色15分钟。随后,将细胞洗涤,且在冰上用针对CD3和CD8的抗体染色30分钟。将染色的细胞洗涤两次且在4℃下再悬浮于细胞内(IC)固定缓冲液中过夜。次日,将细胞洗涤且再悬浮于渗透缓冲液中且在室温下培育5分钟。将渗透的细胞洗涤且用针对干扰素-γ(IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的抗体染色,在室温下再悬浮于渗透缓冲液中达30分钟。将染色的细胞洗涤,再悬浮于2mL FACS缓冲液中,且将其转移至96孔深板中。使用Attune NxT流动式细胞测量仪(Thermofisher Scientific,MA)进行数据采集。将所采集的数据输出为fcs文档且使用Flowjo软件(Tree Star,OR)进行分析。

[1039] 图24

[1040] 将来自两个供体的PBMC用10μg/ml WT1 126-134肽及50U/ml重组人IL-2扩增10天。在6孔板中在每孔4ml Immunocult培养基中以总计1千万个细胞进行扩增。将细胞在37℃、5%CO₂下刺激10天,其中在第5天和第7天通过从孔中抽吸2mL培养上清液且再添加具有50U/ml重组人IL-2的2mL新鲜培养基来更换培养基。在培养后,收获细胞且通过在350g下离心5分钟来沉淀,通过Countess自动化细胞计数器(Invitrogen,CA)确定活细胞计数。在六孔板的至少3个孔中进行该刺激。使用来自一个孔的PBMC来在用以下各物染色后通过流动式细胞测量术评估培养物中WT1 126-134肽特异性CD8+T细胞之频率/量:活力染剂、适当的WT1 126-134肽特异性HLA-A*0201四聚体(MBL International)及针对CD69、CD3、CD14、CD19、CD127、CD56、CD4(Biolegend)、CD8、CD25(BD Biosciences)的抗体。洗涤染色的细胞且通过流动式细胞测量术进行分析。使用Attune NxT流动式细胞测量仪(Invitrogen)进行数据采集。将所采集的数据输出为fcs文档且使用Flowjo软件(Tree Star,OR)进行分析。

[1041] 使用至少两个孔,使用来自Stem Cell Technologies的CD8+T细胞阴性选择套组富集CD8+T细胞。在先前用丝裂霉素C以1:2比率处理的自体PBMC存在下,将纯化的CD8+T细胞用R12C/G2C构架上的WT1 126-134特异性Immuno-STAT再刺激8天,其中在每孔4ml体积的

Immunocult培养基中有最终5百万-1千万个细胞。以先前确定对于该供体而言最佳的浓度使用R12C/G2C构架上的WT1 126-134特异性Immuno-STAT。

[1042] 在培养后,收获细胞且通过在350g下离心5分钟来沉淀,通过Countess自动化细胞计数器(Invitrogen,CA)确定活细胞计数,且使用来自Stem Cell Technologies的CD8+T细胞阴性选择套组富集CD8+T细胞。

[1043] 将靶细胞T2细胞(ATCC)在37℃、5%CO₂下用5μg/mL WT1126-134肽、WT1 126-134R126Y肽或人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)Gag₇₇₋₈₅ SL9肽脉冲处理2小时。在肽装载后,将T2细胞洗涤两次且再悬浮于ImmunoCult™-XF Cell Expansion Media(Stemcell Technologies)中。

[1044] 将富集的CD8⁺T细胞与装载有肽的T2细胞以1:1比率(各自1x10⁶个细胞)混合于96孔板中,每孔200μL的总体积。将培养基和佛波醇12-肉豆蔻酸盐13-乙酸盐(PMA)/离子霉素分别作为阴性对照和阳性对照添加至对照孔中。在刺激后0.5至1小时,将针对CD107a的染色抗体直接添加至孔中。将细胞刺激5小时,用PBS洗涤且在冰上使用FVS780针对活力进行染色10分钟。将细胞洗涤,在室温下用WT1 126-134肽特异性四聚体(以APC和PE标记)染色15分钟。随后,将细胞洗涤,且在冰上用针对CD3及CD8的抗体染色30分钟。将染色的细胞洗涤两次且在4℃下再悬浮于细胞内(IC)固定缓冲液中过夜。次日,将细胞洗涤且再悬浮于渗透缓冲液中且在室温下培育5分钟。将渗透的细胞洗涤且用针对干扰素-γ(IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的抗体染色,在室温下再悬浮于渗透缓冲液中达30分钟。将染色的细胞洗涤,再悬浮于2mL FACS缓冲液中,且将其转移至96孔深板中。使用Attune NxT流动式细胞测量仪(Thermofisher Scientific,MA)进行数据采集。将所采集的数据输出为fcs文档且使用Flowjo软件(Tree Star,OR)进行分析。

[1045] 图25

[1046] 由从Hemacare(Northridge,CA)获得的leukopak制备人健康供体PBMC且在-150℃下保持低温保存,直至实验当天。

[1047] 在实验当天在水浴中解冻细胞1分钟,将其用10mL温热的ImmunoCult™-XF Cell Expansion Media(Stemcell Technologies,Vancouver,Canada)洗涤,通过离心(350g,5分钟)沉淀,且使其再悬浮于10mL培养基中。使用Countess自动化细胞计数器(Invitrogen,CA)计数细胞,调整培养基体积以使细胞浓度达3.8x10⁶个细胞/mL且将237.5μL细胞悬液添加至圆底96孔板中。

[1048] 于Immunocult培养基中制备指定Immuno-STAT及rh-IL-2之20X稀释液系列。为了刺激PBMC,将12.5μL 20X稀释液系列添加至含有细胞的孔中且混合以获得最终测定药物浓度。将PBMC在37℃、5%CO₂下培育20至24小时。

[1049] 在刺激后,通过在350g下离心5分钟来使细胞沉淀。收集上清液,将其冷冻并保存在-20℃下,直至进一步分析。将沉淀的PBMC用PBS洗涤两次且在4℃下在50μL可固定的活细胞/死细胞FVS780染剂中染色10分钟。用200μL染色缓冲液淬灭染色且通过离心(350x g,5分钟)来使细胞沉淀。将细胞在4℃下用50μL体积中针对CD3、CD4、CD8、CD14、CD19、CD56及CD69的抗体染色30分钟。在染色后,将细胞用染色缓冲液洗涤,通过离心(350x g,5分钟)沉淀,使其再悬浮于130μL染色缓冲液中且通过流动式细胞测量术,使用Attune®流动式细胞测量仪进行分析。将所采集的数据输出为fcs文档且使用Flowjo软件(Tree Star,OR)进行

分析。

[1050] 对在IL-2刺激后上调CD69敏感的不同细胞子集评定CD69上调。基于染色中所用的表面标记物的表达水平,形成闸门以鉴别NK细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞。

[1051] 图26

[1052] 在测定前一天,将CTLL-2细胞用培养基洗涤且以 1×10^5 个细胞/ml在75-T烧瓶中在37C、5%CO₂下培养24小时以用于IL-2饥饿。在24小时饥饿培养后,将细胞以5000个细胞/孔接种在100微升/孔的具有盖的96孔细胞培养簇平底板(Costar corning,目录号3599)中。在刺激前使用Vi细胞活力分析仪(Beckman-Coulter)检查细胞活力和计数。

[1053] 于补充有10%HI FBS的完全RPMI中制备指定的Immuno-STAT (TMMP) 或阿地白介素(Prometheus Therapeutics)的稀释液系列(10点;3倍稀释步骤)作为最终测定浓度的2X储备液。将100μL此2X稀释液系列添加至先前接种在96孔板中的细胞中且混合以获得最终测定药物浓度。重复三次测试各浓度。在37C、5%CO₂下将细胞培育三天。

[1054] 在培养三天后,将来自各孔的100μL细胞转移至平底白色用组织培养物处理的96孔板中。根据由制造商提供说明书,使用CellTiter-Glo Luminescent细胞活力测定套组(Promega目录号G7571)来制备100μL **CellTiter-Glo®**试剂,且将其添加至细胞中。通过将板置于回转式振荡器上2分钟来混合细胞与**CellTiter-Glo®**试剂以诱导细胞裂解。接着在室温下将板培育10分钟以使发光信号稳定。测量发光且在Biotek synergy neo2多模式读取器软件Gen5 3.04上记录。

[1055] 图27

[1056] 在Octet HTX系统(ForteBio)上进行所有实验。在测定缓冲液中使Anti-pentahis (HIS1K) 动力学级别生物感测器(ForteBio,#18-5122)水合且在pH 1.7甘氨酸中预调节。对除了FcRn以外的全部测定使用测定缓冲液。用于FcRn的缓冲液为PBS、0.1%牛血清白蛋白(BSA)、0.02%Tween-20pH 7.2。用于FcRn试剂的测定缓冲液为PBS、0.1%BSA、0.02%Tween-20pH 6。

[1057] 将各His标记的受体以5μg/mL (FcRI例外:10ug/mL)的浓度固定于HIS1K生物感测器上120秒。接着将装载有抗原的HIS1K生物感测器浸入各个别抗体以300nM开始的7点1:3稀释液系列中。使用仅含有测定缓冲液的孔来测试缓冲液与装载的生物感测器之间的非特异性结合。观测缔合达60秒,随后观测解离60秒。在HIS1K装载后,使用解离缓冲液建立短基线(60秒)。

[1058] 尽管本发明已关于其具体实施方案加以描述,但本领域技术人员应了解的是可在不脱离本发明的实际精神和范围下进行各种变化且可用等效物进行替代。此外,可进行许多修改以使特定情况、材料、物质组成、方法、一个或多个方法步骤适合于本发明的目标、精神和范围。所有这些修改皆意图在随附于此的专利申请范围的范围内。

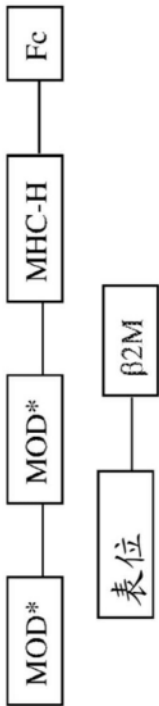


图1A

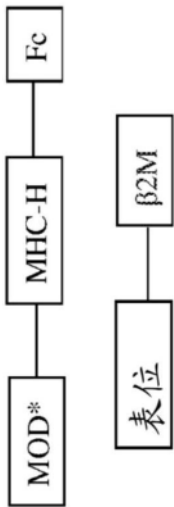


图1B

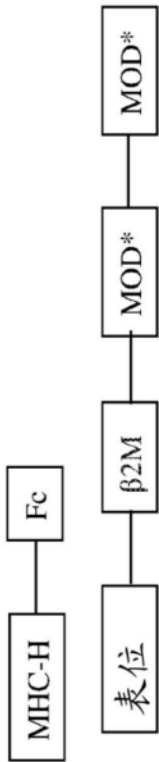


图1C

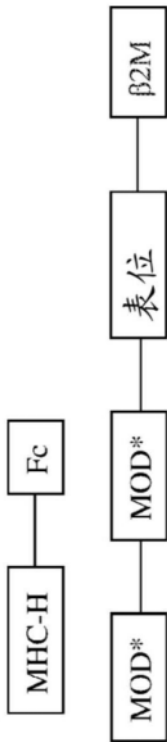


图1D

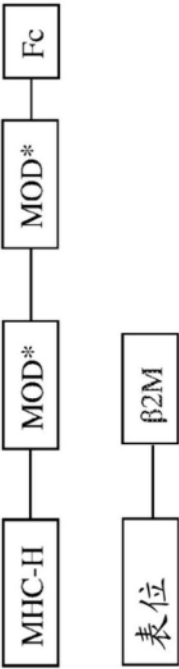


图1E

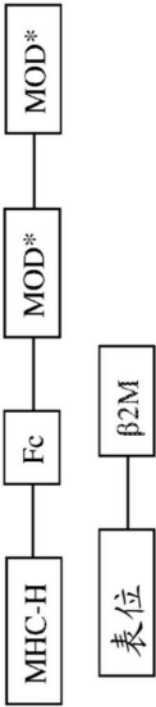


图1F

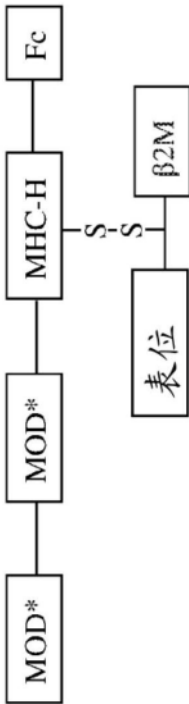


图2A

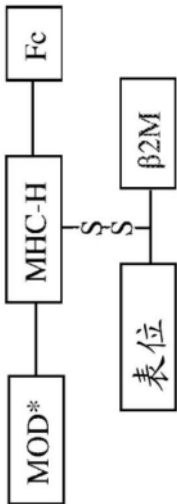


图2B

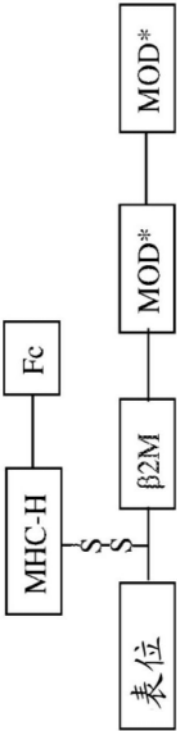


图2C

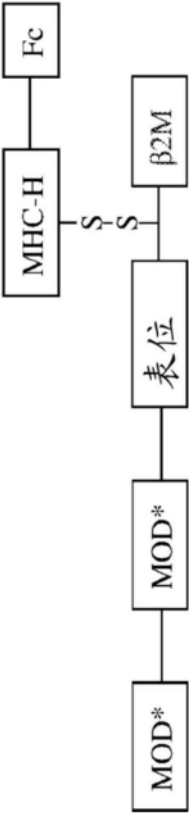


图2D

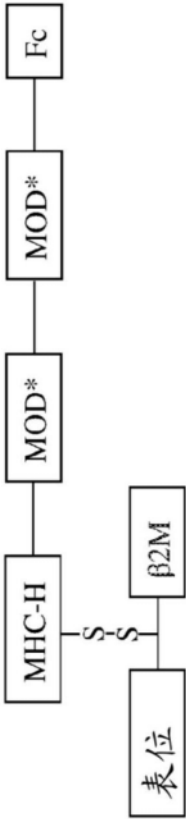


图2E

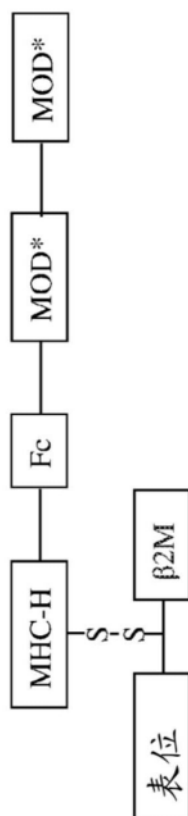


图2F

WT-1亚型A

```

1  MDFLLLLQDPA STCVPEPASQ HTLRSGPGCL QQPEQQGVDRD PGGIWAKLGA AEASAERLQG
61  RRSRGASGSE PQQMGSDVRD LNALLPAVPS LGGGGGCALP VSGAAQWAPV LDFAPPGASA
121 YGSLGGPAPP PAPPPIPPPP PHSFIKQEPS WGGAEPEHEEQ CLSAFTVHFS GQFTGTAGAC
181 RYGPFGPPPP SQASSGQARM FPNAPYLPSC LESQPAIRNQ GYSTVTFDGT PSYGHTPSHH
241 AAQFPNHSFK HEDPMGQQGS LGEQQYSVPP PVYGCHTPTD SCTGSQALLL RTPYSSDNLY
301 QMTSQLECMT WNQMNLGATL KGHSTGYESD NHTTPILCGA QYRIHTHGVE RGIQDVRRVP
361 GVAPTLVRSA SETSEKRPFM CAYPGCNKRY FKLSHLQMHS RKHTGEKPYQ CDFKDCERRF
421 SRSDQLKRHQ RRHTGVKPFQ CKTCQRKFSR SDHLKTHTRT HTGEKPFSCR WPSCQKKFAR
481 SDELVRHHNM HQRNMTKLQL AL

```

图3A

WT-1 亚型B

```

1  MDFLLLQDPA  STCVPEPASQ  HTLRSGPGCL  QQPEQQGVRD  PGGIWAKLGA  AEASAERLQG
61  RRSRGASGSE  PQQMGSDVRD  LNALLPAVPS  LGGGGGCALP  VSGAAQWAPV  LDFAPPGASA
121 YGSLGGPAPP  PAPPPPPPPP  PHSFIKQEPS  WGGAEPEHEEQ  CLSAFTVHFS  GQFTGTAGAC
181 RYGPFGPAPP  SQASSGQARM  FPNAPYLPSC  LESQPAIRNQ  GYSTVTFDGT  PSYGHTPSHH
241 AAQFPNHSFK  HEDPMGQQGS  LGEQQYSVPP  PVYGCHTPTD  SCTGSQALLL  RTPYSSDNLY
301 QMTSQLECMT  WNQMNLGATL  KGVAAGSSSS  VKWTEGQSNH  STGYESDNHT  TPILCGAQYR
361 IHTHGVFRGI  QDVRRVPGVA  PTLVRSASET  SEKRPFMCAY  PGCNKRYFKL  SHLQMHSRKH
421 TGEKPYQCDF  KDCERRFSRS  DQLKRHQRRH  TGVKPFQCKT  CQRKFSRSDH  LKTHTRTHTG
481 EKPFSRWPS  CQKKFARSDE  LVRHHNMHQR  NMTKLQAL

```

图3B

WT-1 亚型D

```

1  MDFLLLQDPA  STCVPEPASQ  HTLRSGPGCL  QQPEQQGVRD  PGGIWAKLGA  AEASAERLQG
61  RRSRGASGSE  PQQMGSDVRD  LNALLPAVPS  LGGGGGCALP  VSGAAQWAPV  LDFAPPGASA
121 YGSLGGPAPP  PAPPPPPPPP  PHSFIKQEPS  WGGAEPEHEEQ  CLSAFTVHFS  GQFTGTAGAC
181 RYGPFGPAPP  SQASSGQARM  FPNAPYLPSC  LESQPAIRNQ  GYSTVTFDGT  PSYGHTPSHH
241 AAQFPNHSFK  HEDPMGQQGS  LGEQQYSVPP  PVYGCHTPTD  SCTGSQALLL  RTPYSSDNLY
301 QMTSQLECMT  WNQMNLGATL  KGVAAGSSSS  VKWTEGQSNH  STGYESDNHT  TPILCGAQYR
361 IHTHGVFRGI  QDVRRVPGVA  PTLVRSASET  SEKRPFMCAY  PGCNKRYFKL  SHLQMHSRKH
421 TGEKPYQCDF  KDCERRFSRS  DQLKRHQRRH  TGVKPFQCKT  CQRKFSRSDH  LKTHTRTHTG
481 KTSEKPFSCR  WPSCQKKFAR  SDELVRHHNM  HQRNMTKLQL  AL

```

图3C

WT-1 亚型E

```

1  MEKGYSTVTF  DGTPSYGHTP  SHHAAQFPNH  SFKHEDPMGQ  QGSLGEQQYS  VPPPVYGCHT
61  PTDSCGSA  LLLRTPYSSD  NLYQMTSQLE  CMTWNQMNLG  ATLKGVAAGS  SSSVKWTEGQ
121 SNHSTGYESD  NHTTPILCGA  QYRIHTHGVF  RGIQDVRRVP  GVAPTLVRS  SETSEKRPFM
181 CAYPGCNKRY  FKLSHLQMS  RKHTGEKPYQ  CDFKDCERRF  SRSDQLKRHQ  RRHTGVKPFQ
241 CKTCQRKFSR  SDHLKTHTRT  HTGEKPFSCR  WPSCQKKFAR  SDELVRHHNM  HQRNMTKLQL
301 AL

```

图3D

WT-1 亚型F

1 MEKGYSTVTF DGTPSYGHTP SHHAAQFPNH SFKHEDPMGQ QGSLGEQQYS VPPPVYGCHT
 61 PTDSC TGSQA LLLRTPYSSD NLYQMTSQLE CMTWNQMNLG ATLKGHSTGY ESDNHTTPIL
 121 CGAQYRIH TH GVFRGIQDVR RVPGVAPTLV RSASETSEKR PFMCAYPGCN KRYFKLSHLQ
 181 MHSRKHTGEK PYQCDFKDCE RRFSRSDQLK RHQRRHTGVK PFQCKTCQRK FSRSDHLKTH
 241 TRHTGKTSE KPFSCRWPSC QKKFARSDEL VRHHNMHQ RN MTKLQLAL

图3E

构建体3158

GSHSMRYFSTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFDSDAASORMEPRAPWIEQE
GPEYWDEETGKVKKAHSQTDRENLRALRAYNQSEAGSHTLQMMFGCDVGSDGR
ELRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHVAEQORAYL
EGTCVDGLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITL
TWORDGEDOTQDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVVPSGEEORYTCHVOHEGLP
KPLTLRWEGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEALLDLQMILNGIN
NYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFH
LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEALLDLQMILNGINNYKN
PKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR
DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGGS
GGGSGGGGSGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV MHEALHNHYTQK
SLSLSPG

HLA-A*24:02 – 加双下划线
 (G4S)₃和(G4S)₄ – 加下划线
 IL-2 (H16A; F42A) – 粗体
 人 IgG1 Fc (LALA) – 斜体

图4A

构建体2750

APTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCL
EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
NRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMI
LNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR
DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGG
SGGGSGGGSGSGSHSMRYFSTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFDSDAASQRM EPR
APWIEQEGPEYWDEETGKVKKAHSQTDRENLRALRAYNQSEAGSHTLQMMFGCDVGS DG
RFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHVAEQQRAYLEGTCVD
GLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYP AEITLTWQRDGEDQT
QDTELVETRPCGDGTFOKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE**AAAGGDKTH**
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

IL2(H16A; F42A) –粗体
 (G4S)₄接头 - 斜体
 HLA-A*2402 (Y84A; A236C) –加双下划线
 AAAGG 接头 - 粗体和斜体
 hIgG1 Fc (L234A; L235A) –粗体并加下划线

图4B

构建体3159

GSHSMRYFSTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFDSDAASQRM EPRAPWIEQE
GPEYWDEETGKVKKAHSQTDRENLRALRAYNQSEAGSHTLQMMFGCDVGS DGR
FLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHVAEQQRAYL
EGTCVDGLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYP AEITL
TWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTFOKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLP
KPLTLRWEAAAGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHN
 HYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LN
 GINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK
 NFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIS
 TLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMI LN
 NYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFH
 LRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

HLA-A*24:02 –加双下划线
 人 IgG1 Fc (LALA) –斜体
 (G4S)₃和(G4S)₄ –加下划线
 IL-2 (H16A; F42A) –粗体

图4C

构建体2752

CMTWNQMNLGGGGSGGGSGGGGS *IQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDI*
EVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVK
WDRDM

表位 : CMTWNQMNL – WT1 (235-243)
(G4S)3 – 加下划线
 β 2M (R12C) – 斜体

图4D

构建体2753

CYTWNQMNLGGGGSGGGSGGGGS *IQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIE*
VDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVKW
DRDM

表位 : CYTWNQMNL – WT1 (235-243)
(G4S)3 – 加下划线
 β 2M (R12C) – 斜体

图4E

GenBank 3S7G_A
智人 **IgG1** Fc (SEQ ID NO: //)
227 aa

```

1 dkthtcppcp apellggpsv flfppkpkdt lmsrtpevt cvvvdvshed pevkfnwyvd
61 gvevhnaktk preeqynsty rvsvltvlh qdwlngkeyk ckvsnkappa piektiskak
121 gqprepqvvt lpsrldeltk ngvsltclvk gfypsdiave wesngqpenn ykttppvlds
181 dgsfflyskl tvdksrwqgg nvfscsvmhe alhnhytqks lslspgk

```

GenBank AAN76044
智人 **IgG2** Fc (氨基酸99-325) (SEQ ID NO: //)
227 aa

```

1 stkgpsvfpl apcsrstses taalgcclvkd yfpepvtvsw nsgaltsgvh tfpavltqssg
61 lyslssvvtv pssnfgtqty tcnvdhkpsn tkvdktkverk ccvecppcpa ppvagpsvfl
121 fppkpkdtlm isrtpevtcv vdvshedpe vqfnwyvdgv evhnaktkpr eeqfnstfrv
181 vsvltvvhqd wlngkeykck vsnkglpapi ektisktkgq prepqvylp psreemtknq
241 vsltclvkgf ypsdiavewe sngqpennyk ttpmldsdg sfflyskltv dksrwqqgnv
301 fscsvmheal hnhytqksls lspgk

```

GenBank AAW65947
智人 **IgG3** Fc (氨基酸19-246) (SEQ ID NO: //)
238 aa

```

1 hkpsntkvdk rvelktplgd tthtcppcpa pellggpsvf lfppkpkdtl misrtpevtc
61 vvvdvshedp evkfnwyvdg vevhnaktkp reeqynstyr vsvltvlh qdwlngkeykc
121 kvsnkappa iektiskakg qprepqvyl ppsrdeltkn qvsltclvk gfypsdiavev
181 esngqpenny kttppvlds gsflysklt vdksrwqqgn vfscsvmhea lnhytqksl
241 slspgk

```

图5A

GenBank AAA52770
 智人 **IgD** Fc (氨基酸 162-383) (SEQ ID NO: //)
 222 aa

```

1  ptkapdvfpi isgrhpkdn spvllaclit gyhptsvtvt wymgtqsqpq rtfpeiqrdr
61  syymtssqls tplqwrqge ykcvvqhtas kskkeifrwsp espkagassv ptaqpqaegs
121 lakattapat trntgrggee kkekekeeq eeretktpec pshtqplgvy lltpavqdlw
181 lrdkatftcf vvgdldkdh ltwevagkvp tggveeglle rhsngsqsqh srltlprslw
241 nagtsvtctl nhpslppqrl malrepaaqa pvklslnlla ssdppeaasw llcevsgfsp
301 pnillmwled qrevntsgfa parppqpqr ttfwawsvlr vpappspqpa tytccvvhed
361 srllnasrs levsyvtldhg pmk

```

GenBank 0308221A
 智人 **IgM** Fc (SEQ ID NO: //)
 276 aa

```

1  vtstltikzs dwlgesmftc rvdhrgrltfq qnassmcpvd qdtairvfai ppsfasiflt
61  kstkltclvt dltybsvti swtreengav kthtnisesh pnatfsavge asicedbdws
121 gerftctvth tdlpsplkqt isrpkgvalh rpbvylppa rzlnlnresa titclvtgfs
181 padvfewmq rgeplspqky vtsapmpepq apgryfahsi ltvseeewnt ggtytccvah
241 ealpnrvter tvdkstgkpt lynvslvmsd tagtcy

```

图5B

GenBank P01876
 智人 **IgA Fc** (氨基酸120-353) (SEQ ID NO: //)
 234 aa

```

1 asptspkvfp lslcstqpdg nvviacvlvqg ffpqeplsvt wsesggqvta rnfpqsqdas
61 gdlyttssq1 tlpatqclag ksvtchvkhy tnpsqdvtpv cpvpstpptp spstpptpsp
121 scchprlslh rpaledlllg seanltctlt glrdasgvtf twtpssgksa vggpperdlc
181 gcysvssvlp gcaepwnhgk tftctaaype sktpltatls ksgntfrpev hl1pppseel
241 alnelvtltc largfspkdv lvrwlqgsqe lprekyltwa srqepsqgtt tfavtsilrv
301 aaedwkkgdt fscmvgheal plaftqktid rlagkpthvn vsvmaevdg tcy

```

GenBank 1F6A_B
 智人 **IgE Fc** (氨基酸6-222) (SEQ ID NO: //)
 212 aa

```

1 adpcdsnprg vsaylsrpsp fdlfirkst itclvvdlap skgtvnltws rasgkpvnhs
61 trkeekqng tltvtstlpv gtrdwieget yqcrvthph1 pralmrsttk tsgpraapev
121 yafatpewpg srdkrtlac1 ignfmpedis vqwlhnevq1 pdarhsttqp rktkgsqffv
181 fsrlevtrae weqkdeficr avheaaspsq tvgravsvnp gk

```

GenBank P01861
 智人 **IgG4 Fc** (氨基酸100-327) (SEQ ID NO: //)
 228 aa

```

1 astkgpsvfp lapcsrstse staaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv htfpavlqss
61 glyslssvvt vpssslgtkt ytcnvdhkps ntkvdkrves kygppcpscp apeflgppsv
121 flfppkpkdt lmsirtpevt cvvdvsqed pevqfnwyvd gvevhnaktk preeqfnsty
181 rvsvltvlh qdwlngkeyk ckvsnkglps siektiskak gqprepvyt lppsqeemtk
241 nqvsltclvk gfypsdiave wesngqpenn ykttppvlds dgsfflysr1 tvdksrwqeg
301 nvfscsvmhe alnhhytqks ls1slgk

```

图5C

WT人IgG1 Fc序列: (SEQ ID NO: //)
DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVSVLTVLTQHQLWGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图5D

人IgG1 Fc突变体: L234F/L235E/P331S (三重突变体“TM”) (SEQ ID NO: 1)

DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPASPSEKISKAKGPQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图5E

人IgG1 Fc突变体: N297A (SEQ ID NO: /)

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD^TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY
RVSVLT^TVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图5F

人IgG1 Fc突变体: L234A/L235A (“LALA”)(SEQ ID NO: //)
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

残基是根据EU索引(Kabat编号)进行编号

图5G

NP_004039.1	msrsvalavallslsgleaiqrtpkiqvsyrhpaengksnflncyvsghpsdievdl1	60	
NP_001009066.1	msrsvalavallslsgleaiqrtpkiqvsyrhpaengksnflncyvsghpsdievdl1	60	
NP_001040602.1	msrsvalavallslsgleaiqrtpkiqvsyrhpaengksnflncyvsghpsdievdl1	60	
NP_776318.1	marfvalvllgslsgldaiqrpkpiqvsyrhppedgkpnynlncyvyghppqieidl1	60	
NP_033865.2	marsvtlvflvsltglyaiqrtpkiqvsyrhpaengksnflncyvtqfhpheiqml	60	
	: *:.*.* *:.*.* *:.*.* *:.*.* *:.*.* *:.*.* *:.*.* *:.*.* *:.*.*		
NP_004039.1	kngeriekvehsdlsfskdwsfylllytftptekdeyacrnhvtlsqpkivkwdrdm	119	(SEQ ID NO: //)
NP_001009066.1	kngeriekvehsdlsfskdwsfylllytftptekdeyacrnhvtlsqpkivkwdrdm	119	(SEQ ID NO: //)
NP_001040602.1	kngekmgkvehsdlsfskdwsfylllytftptekdeyacrnhvtlsgprtvkwdrdm	119	(SEQ ID NO: //)
NP_776318.1	kngekik-seqsdlsfskdwsfyllshaeftpnkskdqyscrvkhtleqprvkwdrdl	118	(SEQ ID NO: //)
NP033865	kngkkipkvemdmsfskdwsfyilahtftptetdtayacrkvkhasmaepktvywdrdm	119	(SEQ ID NO: //)
	****:.. * **:******:* **:*.....* **:*.....* **:*.....* **:*.....*		

图6

智人 HLA-A

7A.1 HLA-A*01:01:01 NCBI (国家生物技术信息中心) 登录 NP_001229687.1 (SEQ ID NO: //)

```

1  MAVMAPRTLL LLLSGALALT QTWAGSHSMR YFTSVSRPG RGEPRFI AVG YVDDTQFVRF
61 DSDAASQKME PRAPWIEQEG PEYWDQETRN MKAHSQTDRA NLGTLRGYNN QSEAGSHTIQ
121 IMYGCDVGPD GRFLRGYRQD AYDGKDYIAL NEDLRSWTAA DAAQITKRK WEAAHAAEQQ
181 RYLEGRCVD GLRRYLENGK ETLQRTDPPK THMTHHPISD HEATLRCWAL GFYPAEITLT
241 WORDGEDQTQ DTELVETRPA GDGTFQKWAA VVVPSGEEQR YTCHVQHEGL PKPLTLRWEL
301 SSQPTIPIVG IIAGLVLLGA VITGAVVAAV MWRRKSSDRK GGSYTQAASS DSAQGSDVSL
361 TACKV

```

7A.2 HLA-A*1101 NCBI 登录 P13746.1 (SEQ ID NO: //)

```

1  MAVMAPRTLL LLLSGALALT QTWAGSHSMR YFTSVSRPG RGEPRFI AVG YVDDTQFVRF
61 DSDAASQKME PRAPWIEQEG PEYWDQETRN VKAQSQTDRV DLGTLRGYNN QSEAGSHTIQ
121 IMYGCDVGPD GRFLRGYRQD AYDGKDYIAL NEDLRSWTAA DAAQITKRK WEAAHAAEQQ
181 RYLEGRCVE WLRRYLENGK ETLQRTDPPK THMTHHPISD HEATLRCWAL GFYPAEITLT
241 WORDGEDQTQ DTELVETRPA GDGTFQKWAA VVVPSGEEQR YTCHVQHEGL PKPLTLRWEL
301 SSQPTIPIVG IIAGLVLLGA VITGAVVAAV MWRRKSSDRK GGSYTQAASS DSAQGSDVSL
361 TACKV

```

7A.3 HLA-A*2402 NCBI 登录 P05534.2 (SEQ ID NO: //)

```

1  MAVMAPRTLV LLLSGALALT QTWAGSHSMR YFTSVSRPG RGEPRFI AVG YVDDTQFVRF
61 DSDAASQKME PRAPWIEQEG PEYWDEETGK VKAHSQTDRE NLRIALRYNN QSEAGSHTIQ
121 MMFGCDVGSD GRFLRGYHQY AYDGKDYIAL KEDLRSWTAA DAAQITKRK WEAAHAAEQQ
181 RYLEGTCVD GLRRYLENGK ETLQRTDPPK THMTHHPISD HEATLRCWAL GFYPAEITLT
241 WORDGEDQTQ DTELVETRPA GDGTFQKWAA VVVPSGEEQR YTCHVQHEGL PKPLTLRWEL
301 SSQPTVPIVG IIAGLVLLGA VITGAVVAAV MWRRNSSDRK GGSYSQAASS DSAQGSDVSL
361 TACKV

```

图7A

7A.4 HLA-A*3303 NCBI 登录 AAA79865.1 (SEQ ID NO:1)

```

1  MAVMAPRTLL LLLLGALALT QTWAGSHSMR YFTTSVSRPG RGEPRFIAVG YVDDTQFVRF
61 DSDAASQRM E PRAPWIEQEG PEYWDNRNTRN VKAHSQIDRV DLGTLRGYNN QSEAGSHTIQ
121 MMYGCDVGSD GRFLRGYQQD AYDGKDYIAL NEDLRSWTAA DMAAQITQRK WEARVAEQ L
181 RAYLEGTCVE WLRRYLENGK ETLQRTDPPK THMTHHAVSD HEATLRCWAL SFYPAEITLT
241 WQRDGEDQTQ DTELVEIRPA GDGTFQKWAS VVVPSSGQEQR YTCHVQHEGL PKPLTLRWE P
301 SSQPTIPIVG IIAGLVLFGA VFAGAVVAAV RWRKSSDRK GGSYSQAASS DSAQGSMSL
361 TACKV

```

图7wA, 续

智人 HLA-B*07:02:01 HLA-B GenBank 登录 NP_005505.2
(SEQ ID NO: //)

```

1  mlvmaprtvl lllsaalalt etwagshsmr yfytvszrpg rgeprfivsg yvddtqfvrf
61 dsdaaspre prapwiegeg peywdrntqi ykaqaqtdre slnrlrgyyn qseagshtlq
121 smygcdvvpd grllrghdqy aydgkdyial nedlrswtaa dtaaqitqrk weaareaeqr
181 raylegecve wlrrylengk dkleradppk thvthhpisd heatlrcwal gfypaeitlt
241 wqrdgedgtq dtelvetrpa gdrtfqkwaa vvpvsgeeqr ytchvqhegl pkpltlrwep
301 ssqstvpivg ivaglavlav vvigavvaav mcrkssggk ggsysqaacs dsaqgsdvs1
361 ta

```

图7B

智人 HLA-C
HLA-C GenBank 登录 NP_001229971.1,
w (SEQ ID NO://)

1 **mrvmaprall** **lllsgglalt** **etwa** cshsmr yfdtavsrpg rgeprfisvg yvddtqfvrf
61 dsdaasprge prapwveqg peywdretqn ykrqaqadv slnrlrgyyn qsedgshtlq
121 rmygcdlgpd grllrgyds aydgkdyial nedlrswtaa dtaaqitqrk leaaraaeql
181 raylegtcve wlrrylengk etlgraepk thvthplsd heatlrcwal gfypaeitlt
241 wqrddgedtq dtelvetrpa^a gdtfqkwa vvpssgqqr ytchmqhegl qepltlswep
301 ssqptipimg ivaglavlv lavlgavta mmcrkssgg kggscsqaac snsaaqgsdes
361 litck

图7C

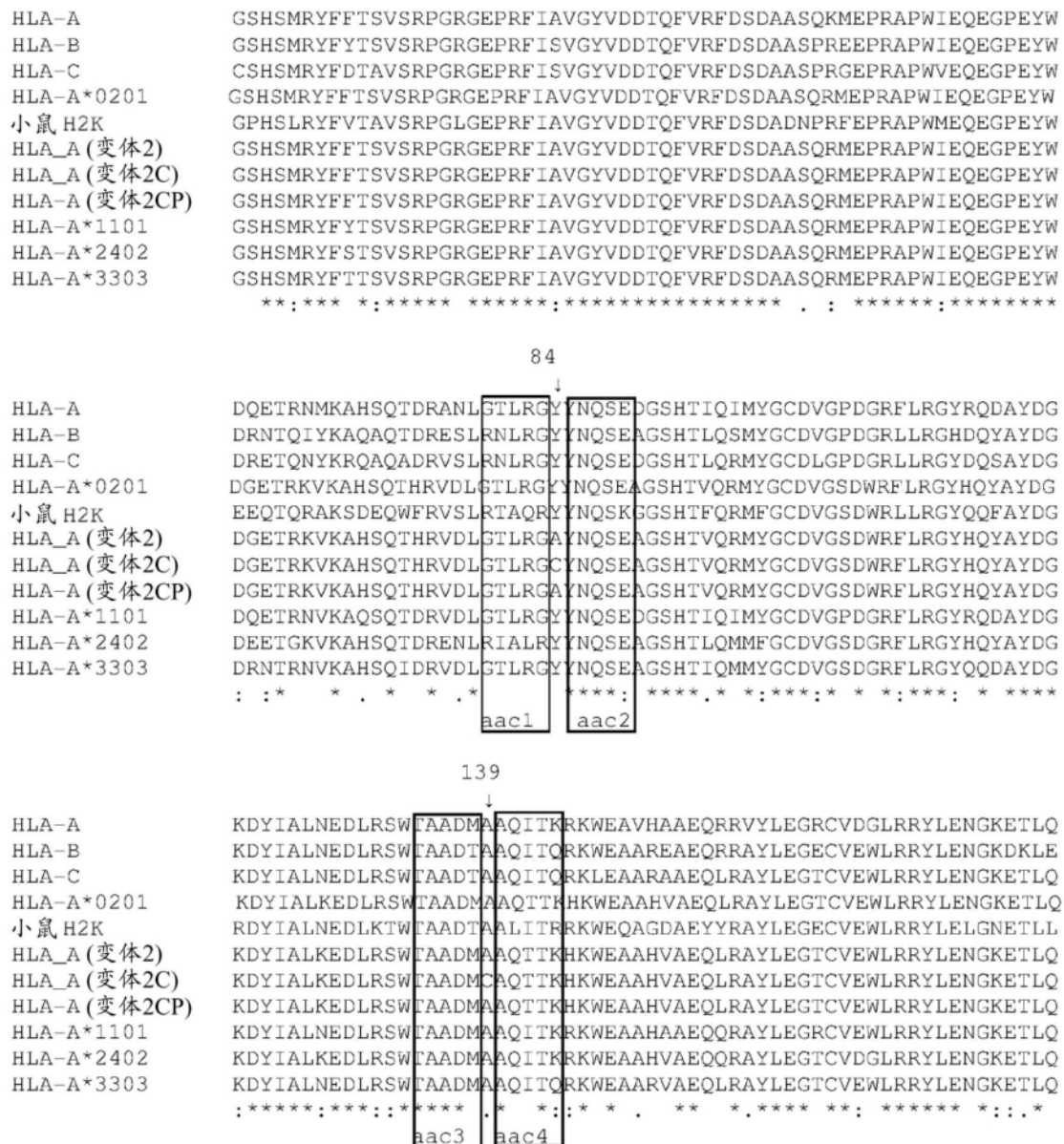


图8

236
↓

HLA-A	RTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGTF
HLA-B	RADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDRTF
HLA-C	RAEPPKTHVTHHPLSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGTF
HLA-A*0201	RTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGTF
小鼠 H2K	RTDSPKAHVITYHPRSQVDVTLRCWALGFYPADITLTWQLNGEDLTQDMEL	VETRPAGDGTF
HLA_A(变体2)	RTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGTF
HLA_A(变体2C)	RTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGTF
HLA-A(变体2CP)	RTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGTF
HLA-A*1101	RTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGTF
HLA-A*2402	RTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGTF
HLA-A*3303	RTDPPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQTQDTEL	VETRPAGDGTF

*:: **:*:*:*: * : :.*****.*****:***** :*** ** *****.* **
aac5 aac6

HLA-A	QKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO://)
HLA-B	QKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO://)
HLA-C	QKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO://)
HLA-A*0201	QKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO://)
小鼠 H2K	QKWAAVVVPLGKEQNYTCHVHHKGLPEPLTLRW (SEQ ID NO://)
HLA_A(变体2)	QKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO://)
HLA_A(变体2C)	QKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO://)
HLA-A(变体2CP)	QKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO://)
HLA-A*1101	QKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEL (SEQ ID NO://)
HLA-A*2402	QKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO://)
HLA-A*3303	QKWAASVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO://)

****:**** *:*.****:*.*** :***** *

图8(续)

图9A

GSHSMRYFX1TSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQFVRFDSDAASQX2MEPRAPWIEQEGPEYWDX
3X4TX5X6X7KAX8SQX9X10RX11X12LX13X14X15X16X17YYNQSEX18GSHTX19QX20
MX21GCDVGX22DX23RFLRGYX24QX25AYDGKDYIALX26EDLRSWTAADMAAQX27TX287
X29KWEX30X31X32EAEQX33RX34YLX35GX36CVX37X38LRRYLENGKETLQRTDX39PK
 THMTHHX40X41SDHEATLRCWALX42FYPAEITLTWQRDGEDQTQDIETLVETRPAGDGTFQKW
AX43VVVPSGX44EQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEXX45

X1为F、Y、S、或T；X2为K或R；X3为Q、G、E、或R；X4为N或E；
 X5为R或G；X6为N或K；X7为M或V；X8为H或Q；X9为T或I；X10为D
 或H；X11为A、V、或E；X12为N或D；X13为G或R；X14为T或I；X15为
 L或A；X16为R或L；X17为G或R；X18为A或D；X19为I、L、或V；X20
 为I、R或M；X21为F或Y；X22为S或P；X23为W或G；X24为R、H、或
 Q；X25为D或Y；X26为N或K；X27为T或I；X28为K或Q；X29为R或H；
 X30为A或T；X31为A或V；X32为H或R；X33为R、L、Q、或W；X34为
 V或A；X35为D或E；X36为R或T；X37为D或E；X38为W或G；X39为P或
 A；X40为P或A；X41为V或I；X42为S或G；X43为A或S；X44为Q或E；
 且X45为P或L。

图9B

图10A

GSHSMRYFX1TX2X3SRPGRGEPRFIX4VG YVDDTX5FVRFDSDAX6SPRX7X8PRAPWIEQEG
PEYWDRX9TQX10X11KTX12X13TQX14YX15X16NLX17X18X19X20YYNQSEAGSHX21X
22QX23MYGCDLGPDRLLRGHDQSAYDGKDYIALNEDLX24SWTAADTAAQIX25QRKX26EA
ARX27AEQX28RX29YLEGX30CVEWLRRYLENGKX31X32LX33RADPPKTHVTHHPX34SDH
EATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQIQDTELVEITRPAGDRTFQKWA AVVVP SGEEQRYTCHV
QHEGLPKPLTLRWEF

X1为H、Y或D；X2为A或S；X3为M或V；X4为A、S或T；X5为Q或L；
X6为A或T；X7为E、M K或T；X8为A或T；X9为E或N；X10为I或K；X11
为Y、F、S或C；X12为N或Q；X13为A或T；X14为D或Y；X15为E或V；
X16为S或N；X17为T、N或I；X18为A或L；X19为L或R；X20为R或G；
X21为T或I；X22为L或I；X23为R或S；X24为R或S；X25为S或T；X26为L
或W；X27为E或V；X28为R、D、L或W；X29为A或T；X30为L、E或T；
X31为E或D；X32为K或T；X33为E或Q；且X34为I或V。

图10B

C*0102	CSHSMRYFFYTSVSRPGRGEPHFISVGYVDDTQFVRFDSDAASPRGEPAPWVEQEGPEYW	60
C*0303	GSHSMRYFFYTSVSRPGRGEPHFISVGYVDDTQFVRFDSDAASPRGEPAPWVEQEGPEYW	60
C*0304	GSHSMRYFFYTSVSRPGRGEPHFISVGYVDDTQFVRFDSDAASPRGEPAPWVEQEGPEYW	60
C*0401	GSHSMRYFFYTSVSRPGRGEPHFISVGYVDDTQFVRFDSDAASPRGEPAPWVEQEGPEYW	60
C*0602	CSHSMRYFFYTSVSRPGRGEPHFISVGYVDDTQFVRFDSDAASPRGEPAPWVEQEGPEYW	60
C*0701	CSHSMRYFFYTSVSRPGRGEPHFISVGYVDDTQFVRFDSDAASPRGEPAPWVEQEGPEYW	60
C*0702	CSHSMRYFFYTSVSRPGRGEPHFISVGYVDDTQFVRFDSDAASPRGEPAPWVEQEGPEYW	60
C*0801	CSHSMRYFFYTSVSRPGRGEPHFISVGYVDDTQFVRFDSDAASPRGEPAPWVEQEGPEYW	60
C*1502	CSHSMRYFFYTSVSRPGRGEPHFISVGYVDDTQFVRFDSDAASPRGEPAPWVEQEGPEYW	60
****:*:*:* *****;*****;*****;*****;*****;*****		
84		
C*0102	DRETQYKQRQAQTDVSLNLRGTYNQSHAGSHTLQWMCGLGPDGRLLRGYDQYAYDG	120
C*0303	DRETQYKQRQAQTDVSLNLRGTYNQSHARSHIIQRMYGCDVGFDPGRLLRGYDQYAYDG	120
C*0304	DRETQYKQRQAQTDVSLNLRGTYNQSHAGSHTLQRMFGCDLGFDPGRLLRGYDQYAYDG	120
C*0401	DRETQYKQRQAQADRVNLRKLRGTYNQSHAGSHTLQRMFGCDLGFDPGRLLRGYDQYAYDG	120
C*0602	DRETQYKQRQAQADRVNLRKLRGTYNQSHAGSHTLQWMYGCDLGFDPGRLLRGYDQYAYDG	120
C*0701	DRETQYKQRQAQADRVSLNLRGTYNQSHAGSHTLQRMFGCDLGFDPGRLLRGYDQYAYDG	120
C*0702	DRETQYKQRQAQADRVSLNLRGTYNQSHAGSHTLQRMFGCDLGFDPGRLLRGYDQYAYDG	120
C*0801	DRETQYKQRQAQTDVSLNLRGTYNQSHAGSHTLQRMFGCDLGFDPGRLLRGYDQYAYDG	120
C*1502	DRETQYKQRQAQTDVSLNLRGTYNQSHAGSHTLQRMFGCDLGFDPGRLLRGYDQYAYDG	120
*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****		
aac1 aac2		
139		
C*0102	KDYIALNEDLRSWTAADTAQITQKWEAAREAEQRRAYLEGTCEVWLKRYLENGKETLQ	180
C*0303	KDYIALNEDLRSWTAADTAQITQKWEAAREAEQLRAYLEGLCEVWLKRYLENGKETLQ	180
C*0304	KDYIALNEDLRSWTAADTAQITQKWEAAREAEQLRAYLEGLCEVWLKRYLENGKETLQ	180
C*0401	KDYIALNEDLRSWTAADTAQITQKWEAAREAEQRRAYLEGTCEVWLKRYLENGKETLQ	180
C*0602	KDYIALNEDLRSWTAADTAQITQKWEAAREAEQWRAYLESTCEVWLKRYLENGKETLQ	180
C*0701	KDYIALNEDLRSWTAADTAQITQKWEAAREAEQLRAYLEGTCEVWLKRYLENGKETLQ	180
C*0702	KDYIALNEDLRSWTAADTAQITQKWEAAREAEQLRAYLEGTCEVWLKRYLENGKETLQ	180
C*0801	KDYIALNEDLRSWTAADTAQITQKWEAAREAEQLRAYLEGTCEVWLKRYLENGKETLQ	180
C*1502	KDYIALNEDLRSWTAADTAQITQKWEAAREAEQLRAYLEGTCEVWLKRYLENGKETLQ	180
*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****		
aac3 aac4		
236		
C*0102	RAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQWDGEDQTQDTELVEHRAAGDGT	241
C*0303	RAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQWDGEDQTQDTELVEHRAAGDGT	241
C*0304	RAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQWDGEDQTQDTELVEHRAAGDGT	241
C*0401	RAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQWDGEDQTQDTELVEHRAAGDGT	241
C*0602	RAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQWDGEDQTQDTELVEHRAAGDGT	241
C*0701	RAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQWDGEDQTQDTELVEHRAAGDGT	241
C*0702	RAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQWDGEDQTQDTELVEHRAAGDGT	241
C*0801	RAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQWDGEDQTQDTELVEHRAAGDGT	241
C*1502	RAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQWDGEDQTQDTELVEHRAAGDGT	241
*** *****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****		
aac5 aac6		
C*0102	QKWAAYVVPFGGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP	276
C*0303	QKWAAYVVPFGGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP	276
C*0304	QKWAAYVVPFGGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP	276
C*0401	QKWAAYVVPFGGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP	276
C*0602	QKWAAYVVPFGGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP	276
C*0701	QKWAAYVVPFGGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP	276
C*0702	QKWAAYVVPFGGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP	276
C*0801	QKWAAYVVPFGGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP	276
C*1502	QKWAAYVVPFGGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP	276
*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****		

图11A

X1SHSMX2YFX3TAVSX4PGRGEPX5FIX6VG YVDDTQFVX7FDSDAASPRGEPRX8PWVEQEG
 PEYWDRETQX9YKRQAQX10DRVX11LRX12LRGYYNQSEX13X14SHX15X16QX17MX18GC
 DX19GPDGRLLRGX20X21QX22AYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAQITQRKX23EAARX24A
 EQX25RAYLEGX26CVEWLRRYLX27NGKX28TLQRAEX29PKTHVTHHPX30SDHEATLRCWA
 LGFYPAEITLTWQX31DGEDQIQDTELVEITRPAGDGTFOKWAAVX32VPSGX33EQRYTCHX34
 QHEGLX35EPLTLX36WX37P

X1为C或G；X2为R或K；X3为F、Y、S或D；X4为R或W；X5为H或R；X6为A或S；X7为Q或R；X8为A或E；X9为N或K；X10为T或A；X11为S或N；X12为N或K；X13为A或D；X14为G或R；X15为T或I；X16为L或I；X17为W或R；X18为C、Y、F或S；X19为L或V；X20为Y或H；X21为D或N；X22为Y、F、S或L；X23为L或W；X24为E、A或T；X25为R、L或W；X26为L或T；X27为E或K；X28为E或K；X29为H或P；X30为R或V；X31为W或R；X32为V或M；X33为E或Q；X34为M或V；X35为P或Q；X36为R或S；且X37为P或G。

图11B

HLA-E				
GSHSLKYFHT	SVSRPGRGEP	RFISVGIVDD	TQFVRFDNDA	ASPRMVPRAP
WMEQEGSEYW	DRETRSARDT	AQIFRVNLRT	LRG <u>Y</u> YNQS <u>X1</u> A	GSHTLQWMHG
CELGPD <u>X2</u> RFL	RGYEQFAYDG	KDYLTINEDL	RSWTAVD <u>TAA</u>	QISEQKSND
SEAEHQ <u>X3X4</u> YL	EDTCVEWLHK	YLEKGKETLL	HLEPPKTHVT	HHPIDSDHEAT
LRCWALGFYP	AEITLTWQQD	GEGHTQDTEL	VETRP <u>A</u> GDGT	FQKWAADVVP
SGEE <u>X5</u> RYTCH	VQHEGL <u>X6</u> EPV	TLRWKPASQP	TIP	
X1= K或E; X2= R或G; X3= R或G; X4= A或V; X5= Q或P; 且X6= P或S				
涵盖: HLA-E*0101 (HLA-E*01:01:01:01); HLA-E*01:03 (HLA-E*01:03:01:01); HLA-E*01:04; HLA-E*01:05; HLA-E*01:06; HLA-E*01:07; HLA-E*01:09; HLA-E*01:10				
HLA-F				
GSHSLR <u>X1</u> FST	AVSRPGRGEP	RYIAVEYVDD	TQFLRFDS	AIAPRMEPRE <u>X2</u>
WVEQEGPQYW	EWTTGYAKAN	AQTDRLALRN	LLR <u>R</u> YNQSEA	GSHTLQGMNG
CDMGPDGRLL	RGYHQHAYDG	KDYISLNEDL	RSWTAAD <u>TVA</u>	QITQRFYEA
EYAEFRTYL	EGECLELLRR	YLENGKETLQ	RADPPKAHVA	HHPIDSDHEAT
LRCWALGFYP	AEITLTWQRD	GEEQTQDTEL	VETRP <u>A</u> GDGT	FQKWAADVVP
<u>X3</u> GEEQRYTCH	VQHEGLPQPL	ILRWEQS <u>X4</u> QP	TIP	
X1= Y或F; X2= P或Q; X3= S或P; 且X4= P或L				
涵盖: HLA-F*0101 (HLA-F*01:01:01:01); HLA-F*01:02; HLA-F*01:03 (HLA-F*01:03:01:01); HLA-F*01:04; HLA-F*01:05; HLA-F*01:06;				
HLA-G				
GSHSMRYFSA	AV <u>X1</u> RPGRGEP	RFIAMG <u>X2</u> VDD	<u>X3</u> QF <u>X4</u> RFDS	ACPRMEPRAP
WVE <u>X5</u> EGPEYW	EEETRNTKAH	AQTDRLNLQT	<u>X6</u> RG <u>Y</u> YNQSEA	SSHTLQWMI <u>X7</u>
CDL <u>X8X9</u> DGRL <u>X10</u>	RGYEQYAYDG	KDYLAALNEDL	RSWTAAD <u>TAA</u>	QISKRKCEAA
NVAEQRRAX <u>X11</u> L	EGTCVEWL <u>X12</u> R	<u>X13</u> LENGKE <u>X14</u> LQ	RADP <u>X15</u> KTHVT	HHPVFDYEAT
LRCWALGFYP	AEIILTQW <u>X16</u> D	GEDQTQDVEL	VETRP <u>A</u> GDGT	FQKWAADVVP
SGEEQRY <u>X17</u> CH	VQHEGLPEPL	MLRW <u>X18</u> QSSLP	TIP	
X1= S或F; X2= Y或H; X3= T、S或M; X4= L或V; X5= Q或R; X6= P或L; X7= G或D; X8= G或V; X9= S或C; X10= L或I; X11= Y或H; X12= H或R; X13= Y或H; X14= M或T; X15= P或A; X16= R、W或Q; X17= T或M; X18= K或E;				
涵盖: HLA-G*0101 (HLA-G*01:01:01:01); HLA-G*01:02; HLA-G*01:03 (HLA-G*01:03:01:01); HLA-G*01:04 (HLA-G*01:04:01:01); HLA-G*01:06; HLA-G*01:07; HLA-G*01:08; HLA-G*01:09; HLA-G*01:10; HLA-G*01:10; HLA-G*01:11; HLA-G*01:12; HLA-G*01:14; HLA-G*01:15; HLA-G*01:16; HLA-G*01:17; HLA-G*01:18; HLA-G*01:19; HLA-G*01:20; HLA-G*01:22				

图12

```

HLA-A  GSHSMRYFXTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQXMEPRAPWIEQEGPEYW 60
HLA-B  GSHSMRYFXTXXSRPGRGEPRIIXVGYVDDTQFVRFDSDAAXSPRXXPRAPWIEQEGPEYW 60
HLA-C  XSHSMXYFXTAVSXPRGEPXFIIXVGYVDDTQFVXFDSDAASPRGEPXPWVEQEGPEYW 60
HLA-E  GSHSLKYFHTSVSRPGRGEPRIISVGYVDDTQFVRFDNDAASPRMVPAPWMEQEGSEYW 60
HLA-F  GSHSLRXFSTAVSRPGRGEPRIIAVEYVDDTQFLRFDSDAAIIPRMEPREXWVEQEGPQYW 60
HLA-G  GSHSMRYFSAAVXRPGRGEPRIAMGXVDDXQFXRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYW 60
      ***: * : ***** : * : *** * **.*: ** :* ** :**

      84
HLA-A  DXXTXXXKAXSQXXRXIXXXXXYINQSEKGSHTXQXMXGCDVGXD XRFLRGYXQXAYDG 120
HLA-B  DRXTQXXKTXXTQYXXIXLXXXXYINQSEAGSHXXQXMYGCDLGPDPGRLLRGHDQSAYDG 120
HLA-C  DRETQXYKRQAQXDRVXIXRLRCYINQSEKXSHXXQXMXGCDXGPDGRLLRGXXQXAYDG 120
HLA-E  DRETRSAQTAQIFRVNIRTLRCYINQSXAGSHTLQWMHGCELGPDXRFLRGYEQFAYDG 120
HLA-F  EWTTYGAKANAQTDRVALRNLLRYINQSEAGSHTLQGMNGCDMGPDGRLLRGYHQHAYDG 120
HLA-G  EEETRNTKAHAQTDRMNIQTXRQYINQSEASSHTLQWMIKCDLXXDGRLLRGYEQYAYDG 120
      : * : ***** ** * * *: ** : ** * ****
      aac1 aac2

      139
HLA-A  KDYIALXEDLRSWTAADMAAQXTXKXWEXXXEAEQXRXYLXGXCXVXXLRRLYLENGKETLQ 180
HLA-B  KDYIALNEDLXSWTAADTAAQIXQRKXEAAARXAEQXRXYLEGXCVEWLRRLYLENGKXXLX 180
HLA-C  KDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKXEAAARXAEQXRAYLEGXCVEWLRRLYLXNGKXTLQ 180
HLA-E  KDYLTLNEDLRSWTAVDTAAQISEQKSNDAEAEHQXXYLEDTCEWLHLKYLEKGKETLL 180
HLA-F  KDYISLNEDLRSWTAADTVAQITQRFYEAEEYAEFEFTYLEGECLELLRRLYLENGKETLQ 180
HLA-G  KDYLALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEAANVAEQRRAXLEGTCVEWLXRXLENGKEXLQ 180
      ***:* ** * **.*.*** : ** . * .*: * : * :** *
      aac3 aac4

      236
HLA-A  RTDXPKTHMTHHXXSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEIVETRPAGDGTTF 241
HLA-B  RADPPKTHVTHHPXSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTEIVETRPAGDRTF 241
HLA-C  RAEXPKTHVTHHPXSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQXDGEDQTQDTEIVETRPAGDGTTF 241
HLA-E  HLEPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQDGEDGTQDTEIVETRPAGDGTTF 241
HLA-F  RADPPKAHVAHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEETQDTEIVETRPAGDGTTF 241
HLA-G  RADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTQXDGEDQTQDVEIVETRPAGDGTTF 241
      : : *::** *:***** ***** ** * * :***.****** **
      ac5 aac6

HLA-A  QKWAXVVVPSGXEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEX----- 276
HLA-B  QKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEP----- 276
HLA-C  QKWA AVVVPSGXEQRYTCHXQHEGLXEPPLTLXWXP----- 276
HLA-E  QKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLXEPVTLRWKPASQPTIPI 284
HLA-F  QKWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPQPLILRWEQSQPTIPI 284
HLA-G  QKWA AVVVPSGEEQRYXCHVQHEGLPEPLMLRWXQSSLPTIPI 284
      ***** * * * * * :* : * *

```

图13

1715

APTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVILELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIS
TLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTA
KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVILELKGSETTFMCEY
ADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRYFFTSVSRPGRGE
PRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGC
YNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEA
AHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT
LTWQRDGEDQTDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEAAAG
GDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWOOGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK

hIL2 (H16A; F42A) --加下划线
 (G4S)_n -粗体
 HLA A0202 (Y84C; A236C) -加双下划线
 AAAGG -粗体
 IgG1 Fc (LALA) --斜体

图14A

2380

VLDFAPPGAGCGGSGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSG
FHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSEFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNH
VTLSQPKIVKWDRDM

WT1(37-45) 表位: VLDFAPPGA (SEQ ID NO://)
G2C接头-粗体
 β 2M (R12C)-加下划线

图14B

2381

RMFPNAPYL**GCGGSGGGGSGGGGSI**QRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSG
FHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPEKDEYACRVNH
VTLSQPKIVKWDRDM

WT1(126-134) 表位 : RMFPNAPYL (SEQ ID NO://)

G2C 接头 --粗体

β 2M (R12C) - 加下划线

图14C

2405

APTSSSTKKTQLQLEALLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIS
TLT**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**APTSSSTKKTQLQLEALLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTA
KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEY
ADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**GSHSMRYFFTSVSRPGRGE
PRFIAVGyvDDTQFVRFDSDAASQRMETPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGC
YNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEA
AHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYPAEIT
LTWQRDGEDQTQDTELVE TRP**AGDGT**FQKWA VVVP SGQEQRY TCHVQHEGLPKPLTLRWE**AAAG**
GDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIL2 (H16A; F42A) --加下划线

(G4S)_n -粗体

HLA A0202 (Y84C) -加双下划线

AAAGG -粗体

IgG1 Fc (LALA) --斜体

图14D

1380

APTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIS
TLTGGGGSGGGSGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTA
KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEY
ADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGGSGSHSMRYFFTSVSRPGRGE
PRFIAVGyvDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGA
YNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEA
AHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT
LTWQRDGEDQTQDIELVETRPCGDGTFQKWAAVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEAAAG
GDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

hIL2 (H16A; F42A) --加下划线
 (G4S)_n -粗体
 HLA A0202 (A236C) -加双下划线
 AAAGG -粗体
 IgG1 Fc (LALA) --斜体

图14E

2762

VLDFAPPGAGCGGSGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSG
FHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNH
VTLSQPKIVKWDRDM

WT1(37-45) 表位 : VLDFAPPGA (SEQ ID NO://)
 G2C 接头 -粗体
 β2M -加下划线

图14F

2763

RMFPNAPYL**GCGGSGGGGSGGGGSI**QRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSG
FHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNH
VTLSQPKIVKWDRDM

WT1 (126-134) 表位 : RMFPNAPYL (SEQ ID NO://)
G2C 接头-粗体
 β 2M-加下划线

图14G

3625

YMFPNAPYL**GCGGSGGGGSGGGGSI**QRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSG
FHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNH
VTLSQPKIVKWDRDM

WT1 (126-134; R126Y) 表位 : YMFPNAPYL (SEQ ID NO://)
G2C 接头-粗体
 β 2M (R12C)-加下划线

图14H

3626

YMFPNAPYL**GCGGSGGGGSGGGGSI**QRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSG
FHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNH
VTLSQPKIVKWDRDM

WT1 (126-134; R126Y) 表位 : YMFPNAPYL (SEQ ID NO://)
G2C 接头-粗体
 β 2M-加下划线

图14I

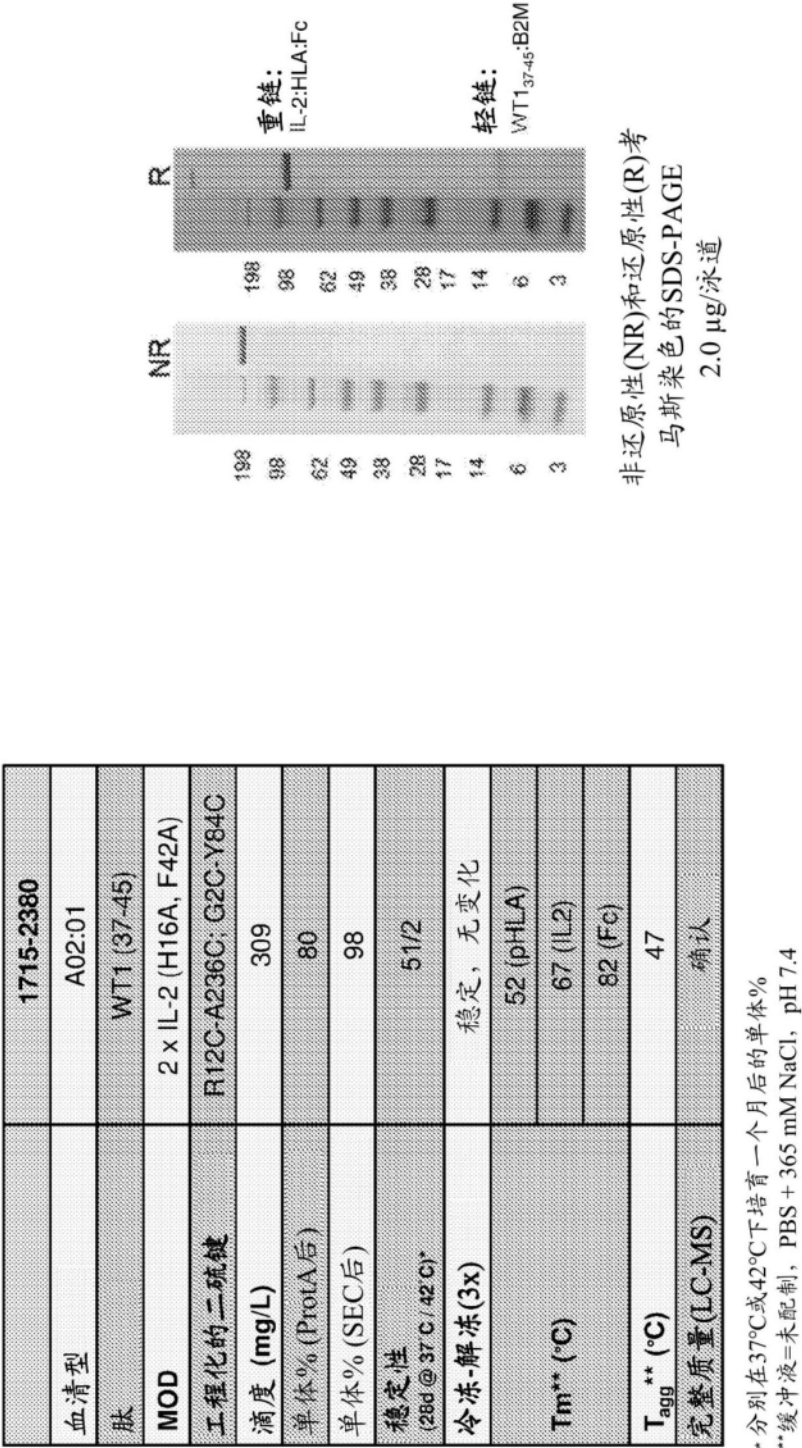


图15

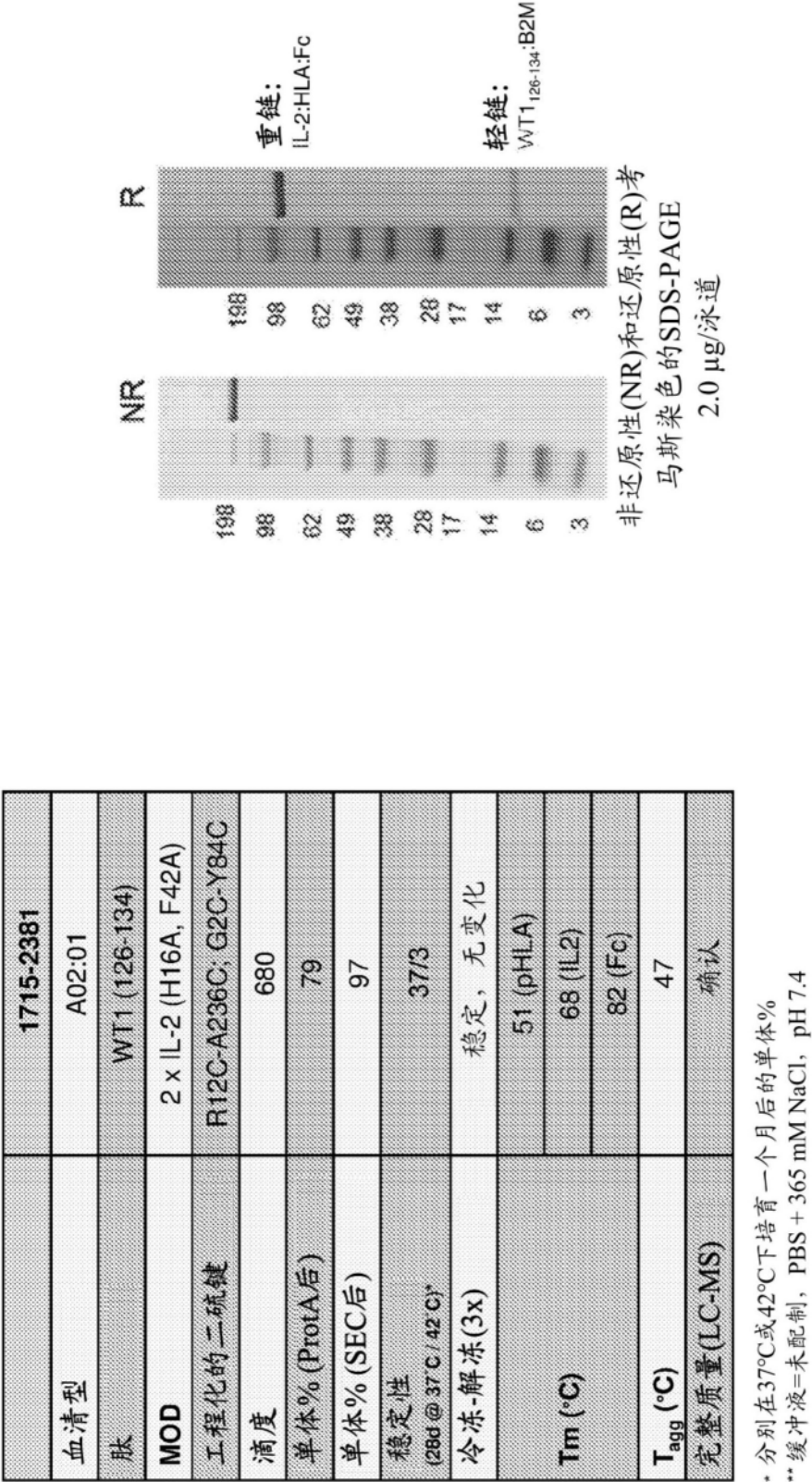


图16

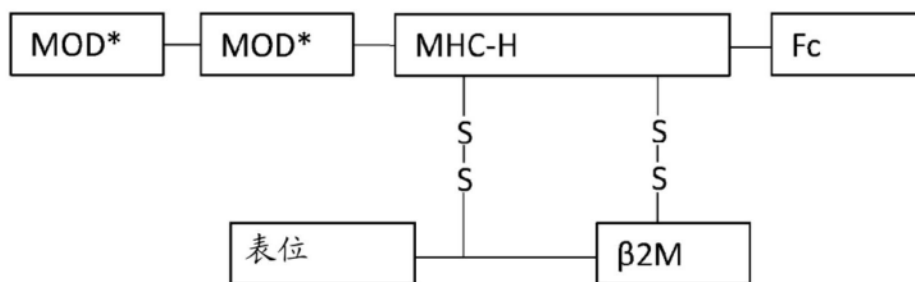


图17A

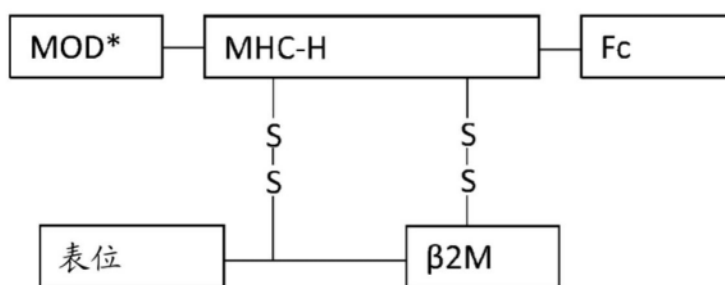


图17B

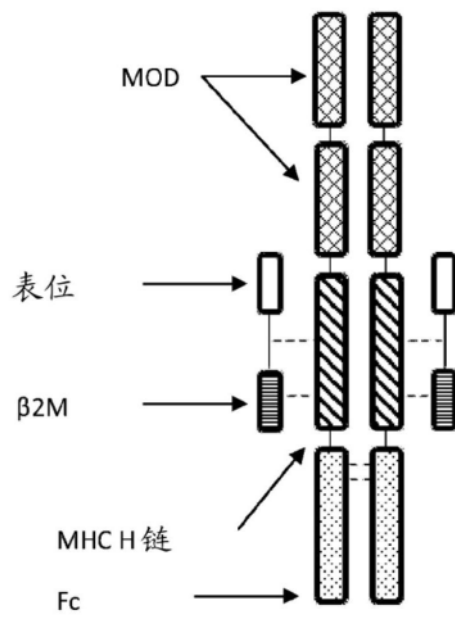


图17C

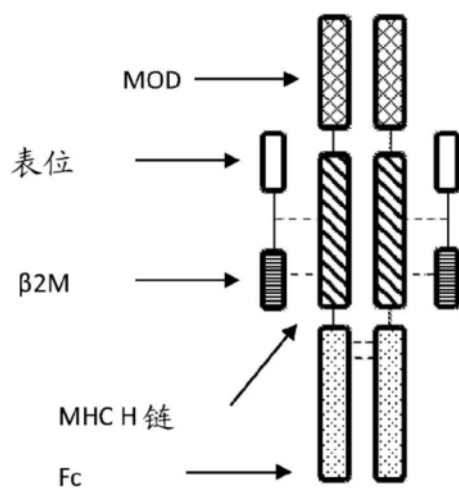


图17D

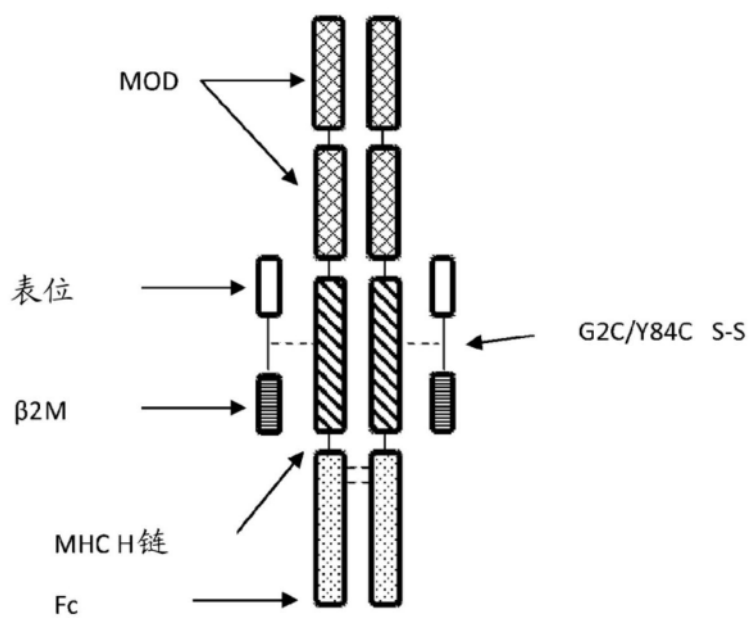


图18A

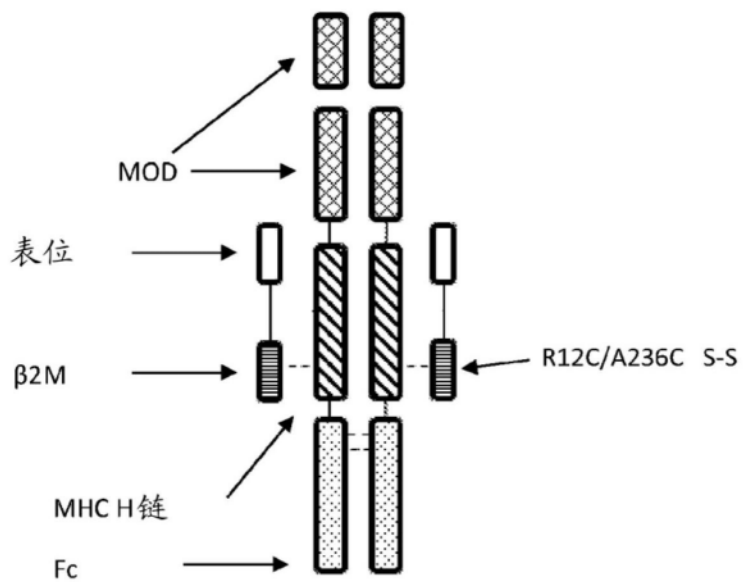


图18B

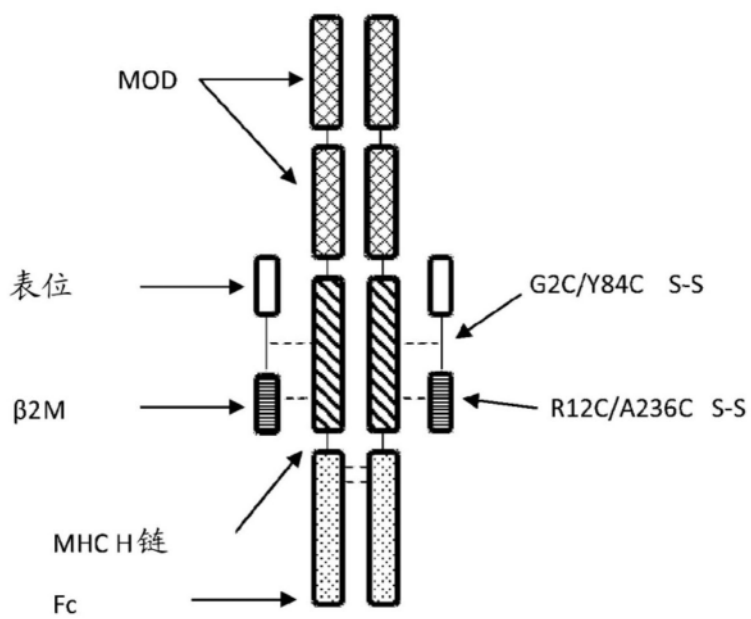


图18C

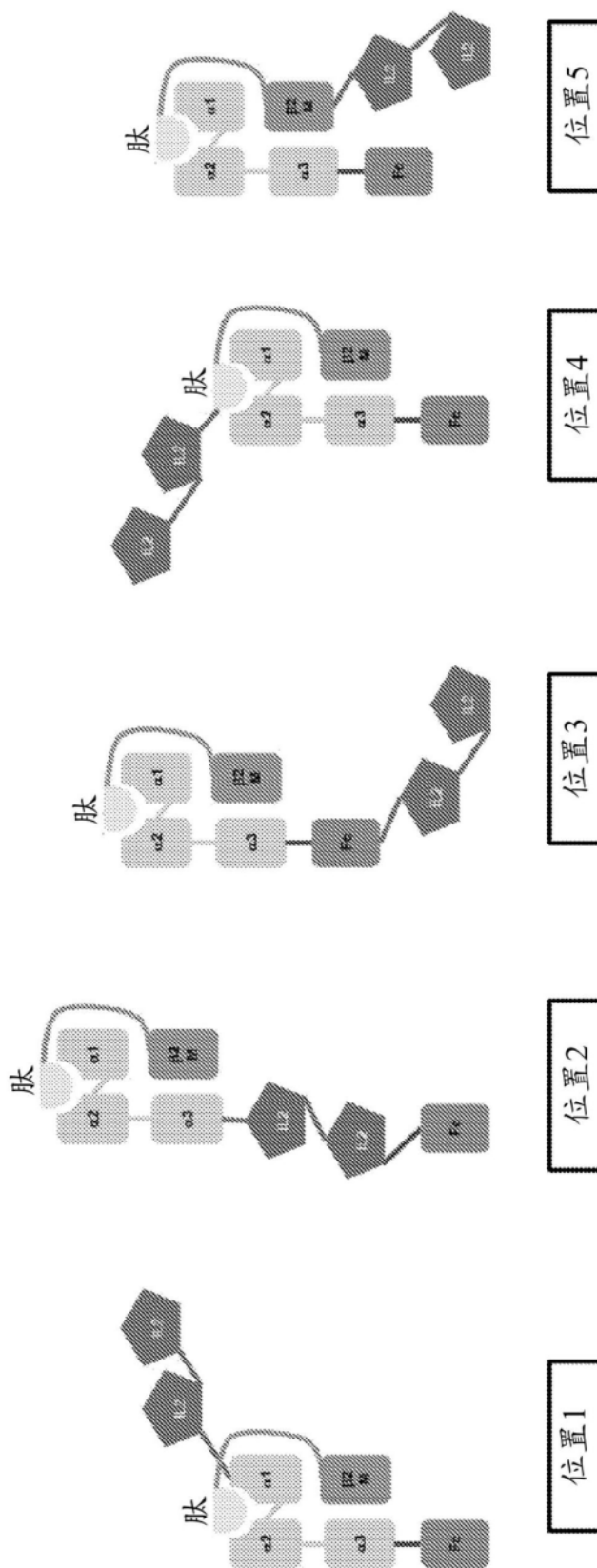


图19

3592

APTSSSTKKTQLQLE**A****ALLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT****A****KFYMPKKAT**
ELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFM
CEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT**G****G****G****G****S****G****G****G****S****G****G****G****S****A****P****T****S**
STKKTQLQLE**A****ALLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKH**
LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA
DETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT**G****G****G****G****S****G****G****G****S****G****G****G****S****G****S****H****S****M****R****Y****E****S**
T**S****V****S****R****P****G****R****G****E****P****R****F****I****A****V****G****Y****V****D****D****T****Q****F****V****R****E****D****S****D****A****A****S****Q****R****M****E****P****R****A****P****W****I****E****Q****E****G****P****E****Y****W****D****E**
T**G****K****V****K****A****H****S****Q****T****D****R****E****N****L****R****I****A****L****R****C****Y****N****Q****S****E****A****G****S****H****T****L****Q****M****M****F****G****C****D****V****G****S****D****G****R****F****L****R****G****Y****H****Q****Y**
A**Y****D****G****K****D****Y****I****A****L****K****E****D****L****R****S****W****T****A****A****D****M****A****A****Q****I****T****K****R****K****W****E****A****A****H****V****A****E****Q****R****A****Y****L****E****G****T****C****V****D****G****L**
R**R****Y****L****E****N****G****K****E****T****L****Q****R****T****D****P****P****K****T****H****M****T****H****P****I****S****D****H****E****A****T****L****R****C****W****A****L****G****F****Y****P****A****E****I****T****L****T****W****Q****R****D****G****E**
D**Q****T****D****T****E****L****V****E****T****R****P****C****G****D****G****T****F****Q****K****W****A****A****V****V****V****P****S****G****E****E****Q****R****Y****T****C****H****V****Q****H****E****G****L****P****K****P****L****T****R****W****E**
A**A****A****G****G****D****K****T****H****T****C****P****P****C****P****A****P****E****A****A****G****G****P****S****V****F****L****F****P****P****K****P****K****D****T****L****M****I****S****R****T****P****E****V****T****C****V****V****D****V****S**
H**E****D****P****E****V****K****F****N****W****Y****V****D****G****V****E****V****H****N****A****K****T****K****P****R****E****E****Q****Y****N****S****T****Y****R****V****V****S****V****L****T****V****L****H****Q****D****W****L****N****G**
K**E****Y****K****C****K****V****S****N****K****A****L****P****A****P****I****E****K****T****I****S****K****A****K****G****Q****P****R****E****P****Q****V****Y****T****L****P****P****S****R****E****E****M****T****K****N****Q****V****S****L****T****C****L**
V**K****G****F****Y****P****S****D****I****A****V****E****W****E****S****N****G****O****P****E****N****N****Y****K****T****T****P****P****V****L****D****S****D****G****S****F****F****L****Y****S****K****L****T****V****D****K****S****R****W****Q****Q**
G**N****V****F****S****C****S****V****M****H****E****A****L****H****N****H****Y****T****Q****K****S****L****S****L****S****P****G**

IL-2 (H16A; F42A) –粗体

(G4S)₄ –加下划线

HLA-A*24:02 (Y84C; A236C) –加双下划线

AAAGG接头 - 粗体和斜体

hlgG1 Fc (L234A; L235A) –粗体并加下划线

图20A

3425

GSHSMRYFSTSVSRPGRGEPFIAVGYYDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQE
GPEYWDEETGKVKAHSQTDRENLRIALRCYNQSEAGSHTLQMMFGCDVGSDGR
FLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHVAEQQRAYL
EGTCVDGLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITL
TWORDGEDQTQDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLP
KPLTLRWE**AAAGGDK**THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSAPT
SSSTKKTQLQLEALLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELK
HLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEY
ADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTK
KTQLQLEALLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQC
LEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET
ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

HLA-A*24:02 (Y84C; A236C) –加双下划线

AAAGG 接头 - 粗体和斜体

hlgG1 Fc (L234A; L235A) –粗体并加下划线

(G4S)₃ 和 (G4S)₄ –加下划线

IL-2 (H16A; F42A) –粗体

图20B

3196

GSHSMRYFSTSVSRPGRGEPFIAVGYVDDTQFVREDSDAASQORMEPRAPWIEQE
GPEYWDEETGKVKAHSQTDRENLRIALRCYNQSEAGSHTLQMMFGCDVGSDGR
FLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHVAEQQRAYL
EGTCVDGLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITL
TWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLP
KPLTLRWE**AAAGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT**
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTOKLSLSPG

HLA-A*24:02 (Y84C; A236C) –加双下划线
AAAGG 接头 - 粗体和斜体
hlgG1 Fc (L234A; L235A) –粗体并加下划线

图20C

2764

GSHSMRYFSTSVSRPGRGEPFIAVGYVDDTQFVREDSDAASQORMEPRAPWIEQE
GPEYWDEETGKVKAHSQTDRENLRIALRAYNQSEAGSHTLQMMFGCDVGSDGR
FLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHVAEQQRAYL
EGTCVDGLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITL
TWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLP
KPLTLRWE**AAAGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT**
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTOKLSLSPGK

HLA-A*24:02 (Y84A; A236C) –加双下划线
AAAGG 接头 - 粗体和斜体
hlgG1 Fc (L234A; L235A) –粗体并加下划线

图20D

3593

APTSSSTKKTQLQLE**A****ALLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT****A****KFYMPKKAT**
ELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFM
CEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT**G****G****G****G****G****G****G****G****G****G****S****A****P****T****S**
STKKTQLQLE**A****ALLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT****A****KFYMPKKAT****E****L****K****H**
LQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFM**C****E****Y****A**
DETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT**G****G****G****G****G****G****G****G****G****G****S****G****S****H****S****M****R****Y****E****S**
T**S****V****S****R****P****G****R****G****E****P****R****F****I****A****V****G****Y****V****D****D****T****Q****F****V****R****E****D****S****D****A****A****S****Q****R****M****E****P****R****A****P****W****I****E****Q****E****G****P****E****Y****W****D****E**
T**G****K****V****K****A****H****S****Q****T****D****R****E****N****L****R****I****A****L****R****C****Y****N****Q****S****E****A****G****S****H****T****L****Q****M****M****F****G****C****D****V****G****S****D****G****R****E****L****R****G****Y****H****Q****Y**
A**Y****D****G****K****D****Y****I****A****L****K****E****D****L****R****S****W****T****A****A****D****M****A****A****Q****I****T****K****R****K****W****E****A****A****H****V****A****E****Q****R****A****Y****L****E****G****T****C****V****D****G****L**
R**R****Y****L****E****N****G****K****E****T****L****Q****R****T****D****P****P****K****T****H****M****T****H****P****I****S****D****H****E****A****T****L****R****C****W****A****L****G****F****Y****P****A****E****I****T****L****T****W****Q****R****D****G****E**
D**Q****T****Q****D****E****L****V****E****T****R****P****A****G****D****G****T****F****Q****K****W****A****A****V****V****V****P****S****G****E****E****Q****R****Y****T****C****H****V****Q****H****E****G****L****P****K****P****L****T****R****W****E**
A**A****A****G****G****D****K****T****H****T****C****P****P****C****P****A****P****E****A****A****G****G****P****S****V****F****L****F****P****P****K****P****K****D****T****L****M****I****S****R****T****P****E****V****T****C****V****V****D****V****S**
H**E****D****P****E****V****K****F****N****W****Y****V****D****G****V****E****V****H****N****A****K****T****K****P****R****E****E****Q****Y****N****S****T****Y****R****V****V****S****V****L****T****V****L****H****Q****D****W****L****N****G**
K**E****Y****K****C****K****V****S****N****K****A****L****P****A****P****I****E****K****T****I****S****K****A****K****G****Q****P****R****E****P****Q****V****Y****T****L****P****S****R****E****E****M****T****K****N****Q****V****S****L****T****C****L**
V**K****G****F****Y****P****S****D****I****A****V****E****W****E****S****N****G****O****P****E****N****N****Y****K****T****T****P****P****V****L****D****S****D****G****S****F****F****L****Y****S****K****L****T****V****D****K****S****R****W****Q****Q**
G**N****V****F****S****C****S****V****M****H****E****A****L****H****N****H****Y****T****O****K****S****L****S****L****S****P****G**

IL-2 (H16A; F42A) –粗体

(G4S)₄ –加下划线

HLA-A*24:02 (Y84C; A236) –加双下划线

AAAGG接头 - 粗体和斜体

hIgG1 Fc (L234A; L235A) –粗体并加下划线

图20E

3426

GSHSMRYFESTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVREDSDAASQRMEPRAPWIEQE
GPEYWDEETGKVKAHSQTDRENLRIALRCYNQSEAGSHTLQMMFGCDVGSDGR
FLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAAHVAEQQRAYL
EGTCVDGLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHPISDHEATLRCWALGEYPAEITL
TWQRDGEDQTODTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLP
KPLTLRWEAAAGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGOPREPQVTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGSAPT
SSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELK
HLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEY
ADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSAPTSSSTK
KTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQ
LEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET
ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

HLA-A*24:02 (Y84C; A236) - 加双下划线
AAAGG接头 - 粗体和斜体
hIgG1 Fc (L234A; L235A) - 粗体并加下划线
(G4S)₃ 和 (G4S)₄ - 加下划线
IL-2 (H16A; F42A) - 粗体

图20F

3197

GSHSMRYESTSVSRPGRGEPREIAVG YVDDTQFVREDSDAASQRM EPRAPWIEQE
GPEYWDEETGKVK AHSQTDRENLR IALRCYNQSEAGSHTLQMMFGCDVGS DGR
FLRGYHQYAYDGKD YIALKEDLR SWTAADMAAQITKRKWEAAHVAEQQRAYL
EGTCVDGLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGEYPAEITL
TWORDGEDQTQDTEL VETRPAGDGTFOKWA AVVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLP
KPLTLRWEAAAGGDKTHTC PPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

HLA-A*24:02 (Y84C; A236) –加双下划线
AAAGG接头 - 粗体和斜体
hIgG1 Fc (L234A; L235A) –粗体并加下划线

图20G

3188

CYTWNQMNL GCGGSGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFH
PSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL SQP
KIVKWDRDM

表位: CYTWNQMNL – WT1 (235-243; M236Y)
(GCGGS)(G4S)₂ –加下划线
β2M (R12C) –斜体

图20H

3604

CYTWNQMNLGCGGSGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFH
PSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSP
KIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEALLDLQMILNGIN
NYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFH
LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEALLDLQMILNGINNYKN
PKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR
DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

表位: CYTWNQMNL – WT1 (235-243; M236Y)
(G4S)₂、(G4S)₃和(G4S)₄ - 加下划线
β2M (R12C) – 斜体
IL-2 (H16A; F42A) – 粗体

图20I

3603

CYTWNQMNLGGGGSGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFH
PSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSP
KIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEALLDLQMILNGIN
NYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFH
LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEALLDLQMILNGINNYKN
PKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR
DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

表位: CYTWNQMNL – WT1 (235-243; M236Y)
(G4S)₃ 和 (G4S)₄ – 加下划线
β2M (R12C) – 斜体
IL-2 (H16A; F42A) – 粗体

图20J

3192

CYTWNQMNLGCGGSGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFH
PSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL SQP
KIVKWDRDM

表位: CYTWNQMNL – WT1 (235-243; M236Y)
(GCGGS)(G4S)₂ – 加下划线
β2M (R12) – 斜体

图20K

3605

CYTWNQMNLGCGGSGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFH
PSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL SQP
KIVKWDRDMGCGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGIN
NYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFH
LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
GCGGSGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYK
NPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP
RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

表位: CYTWNQMNL – WT1 (235-243; M236Y)
(GCGGS) (G4S)₂、(G4S)₃和(G4S)₄ – 加下划线
β2M (R12) – 斜体
IL-2 (H16A; F42A) – 粗体

图20L

3529

NYMNLGATLGCGGSGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFH
PSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL SQP
KIVKWDRDM

表位: NYMNLGATL – WT1 (239-247; Q240Y)
(GCGGS)(G4S)₂ – 加下划线
β2M (R12C) – 斜体

图20M

3709

NYMNLGATLGCGGSGGGGSGGGGSI*QRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFH*
PSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSP
*KIVKWDRDM*GGGGSGGGGSGGGGSA**PTSSSTKKTQLQLEA**ALLDLQMILNGIN
NYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFH
LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIHSTLTG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSA**PTSSSTKKTQLQLEA**ALLDLQMILNGINNYKN
PKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR
DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIHSTLT

表位: NYMNLGATL – WT1 (239-247; Q240Y)
(GCGGS) (G4S)₂、(G4S)₃和(G4S)₄ - 加下划线
β2M (R12C) – 斜体
IL-2 (H16A; F42A) – 粗体

图20N

3528

NYMNLGATLGGGGSGGGGSGGGGSI*QRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFH*
PSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSP
KIVKWDRDM

表位: NYMNLGATL – WT1 (239-247; Q240Y)
(G4S)₃ – 加下划线
β2M (R12C) – 斜体

图200

3708

NYMNLGATLGGGGSGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFH
PSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL SQP
KIVKWDRDMGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGIN
NYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFH
LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPK
LTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN
VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

表位: NYMNLGATL (SEQ ID NO://) – WT1 (239-247; Q240Y)
(G4S)₃ 和 (G4S)₄ – 加下划线
 β 2M (R12C) – 斜体
IL-2 (H16A; F42A) – 粗体

图20P

3530

NYMNLGATLGCGGSGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFH
PSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL SQP
KIVKWDRDM

表位: NYMNLGATL – WT1 (239-247; Q240Y)
(GCGGS)(G4S)₂ – 加下划线
 β 2M (R12) – 斜体

图20Q

3710

*NYMNLGATL***GCGGSGGGGSGGGGSI***QRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFH*
PSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSP
*KIVKWDRDM***GCGGSGGGGSGGGGSA***PTSSSTKKTQLQLE***ALLDLQMILNGIN**
NYKNPKLTRMLT**A***KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFH*
LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIHSTLT**G**
GCGGSGGGGSGGGGSGGGGSA*PTSSSTKKTQLQLEALLDLQMILNGINNYKN*
PKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR
DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIHSTLT

表位: NYMNLGATL – WT1 (239-247; Q240Y)
(GCGGS) (G4S)₂、(G4S)₃和(G4S)₄ - 加下划线
β2M (R12) – 斜体
IL-2 (H16A; F42A) – 粗体

图20R

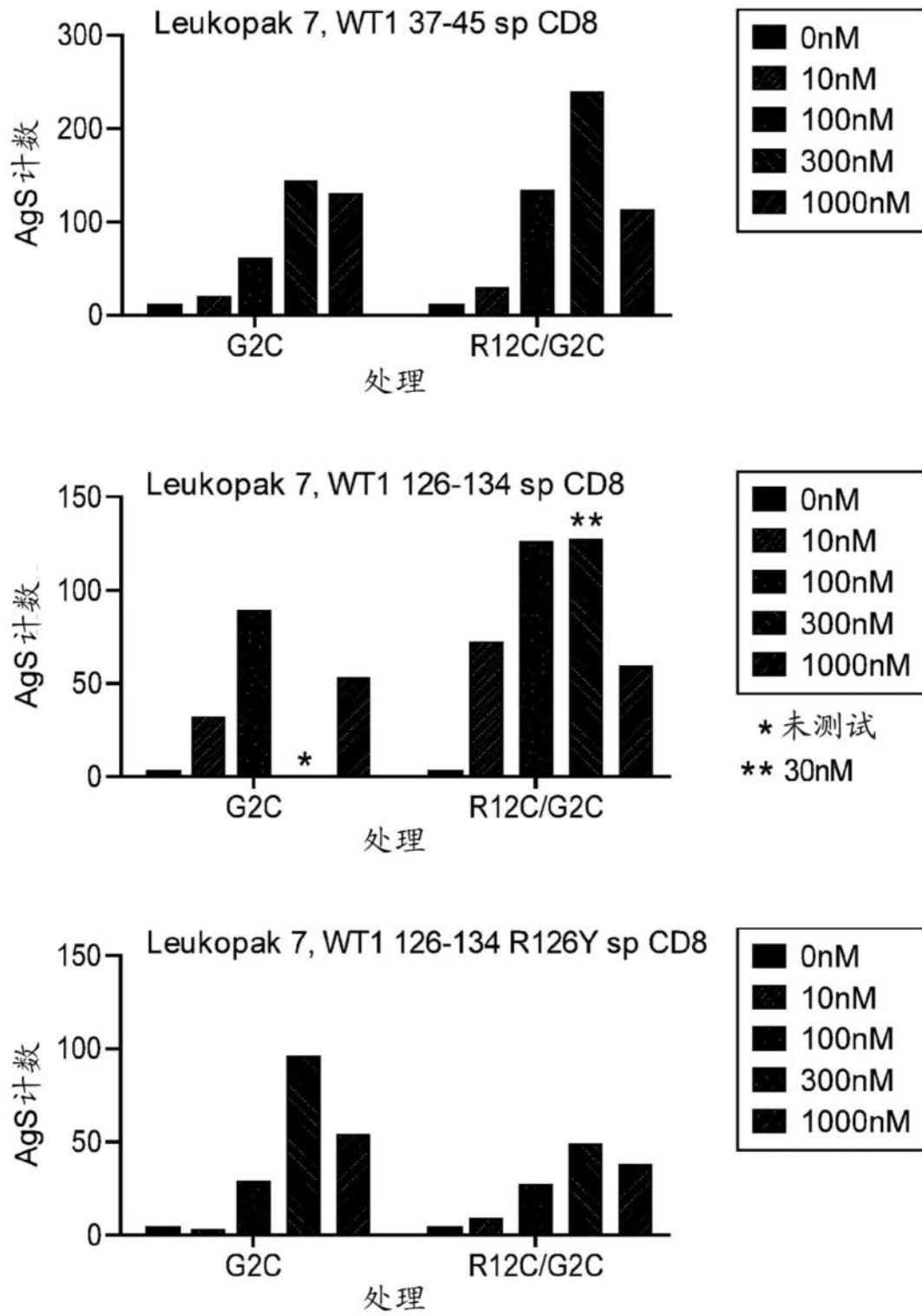


图21

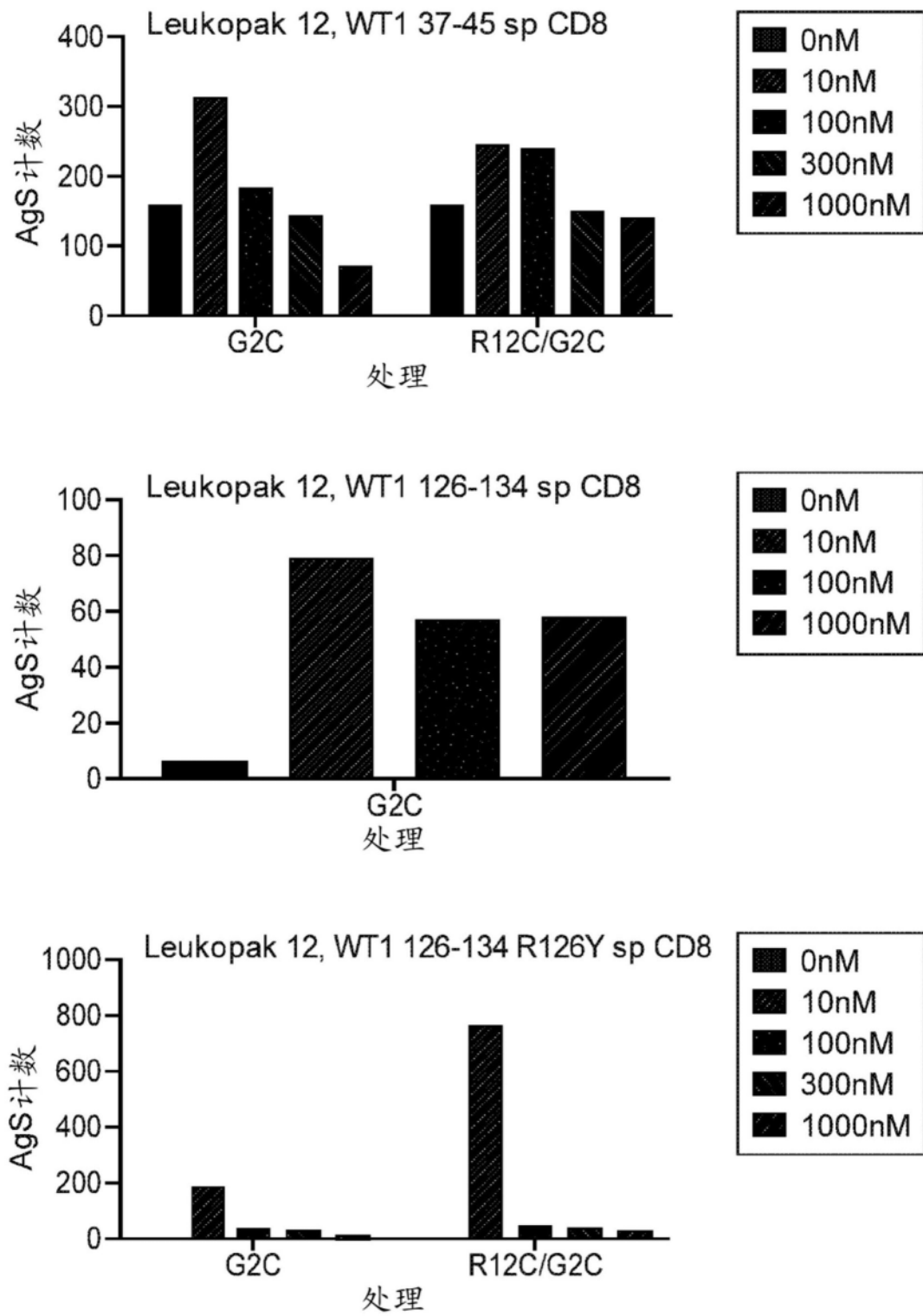


图21(续)

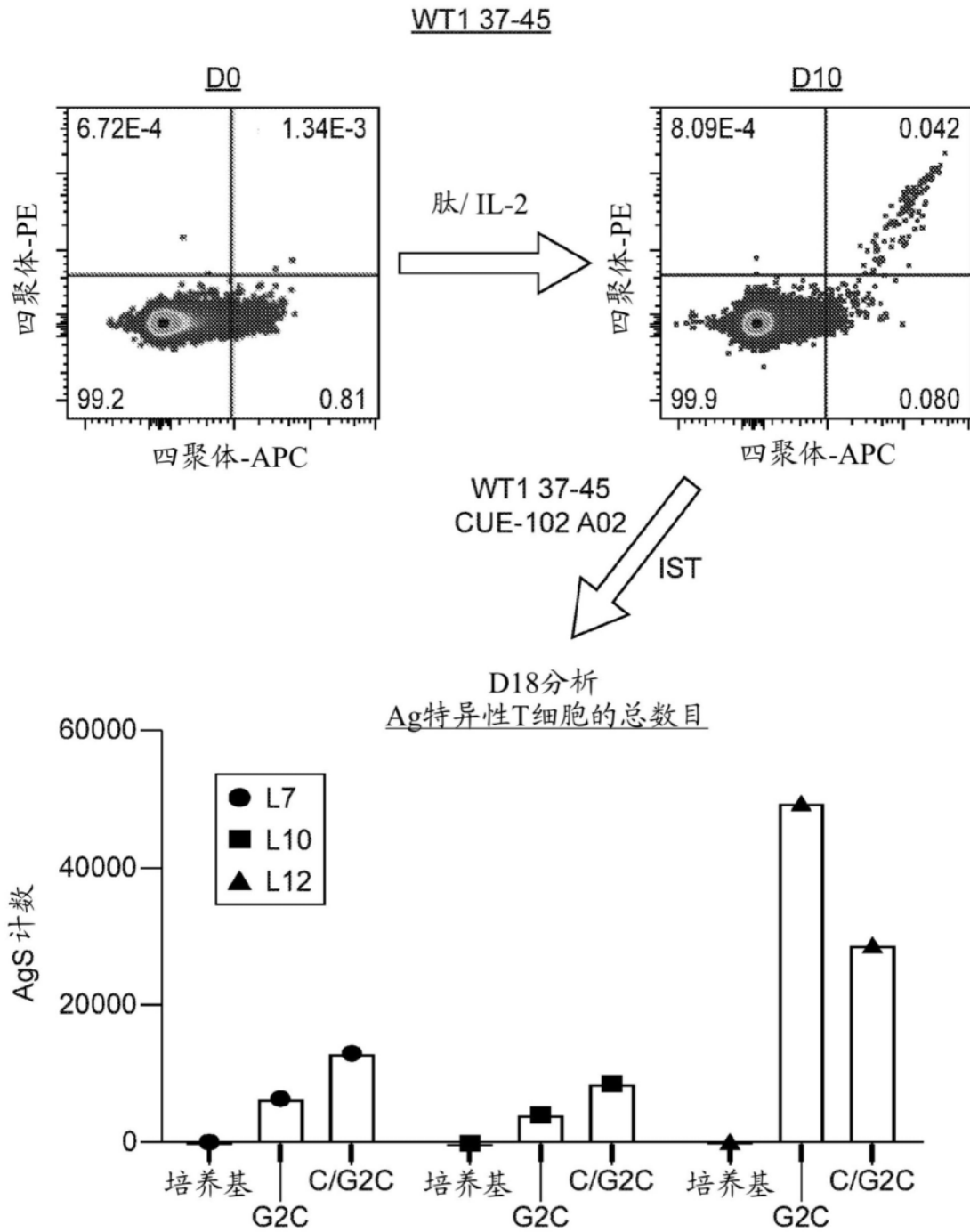


图22

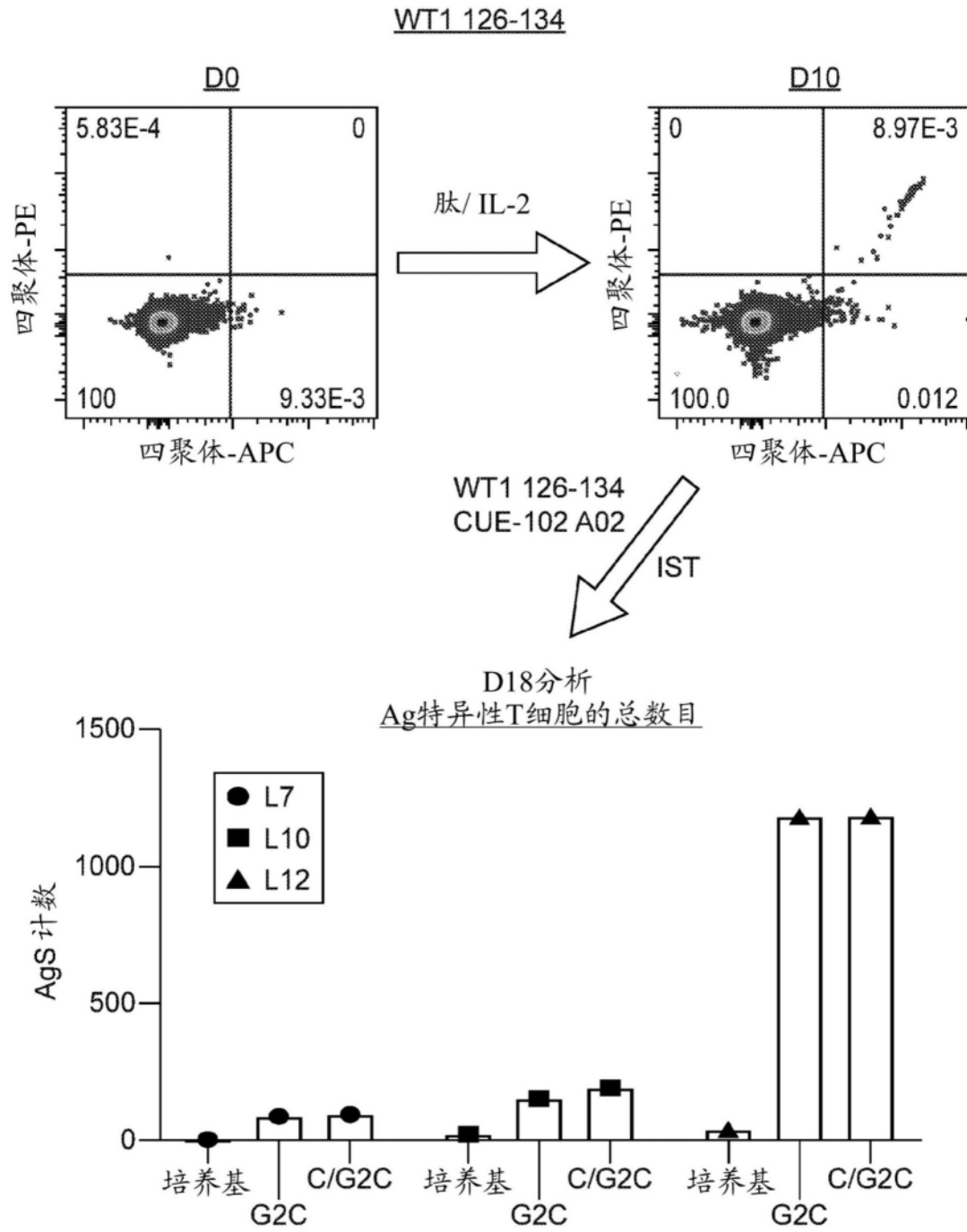


图22(续)

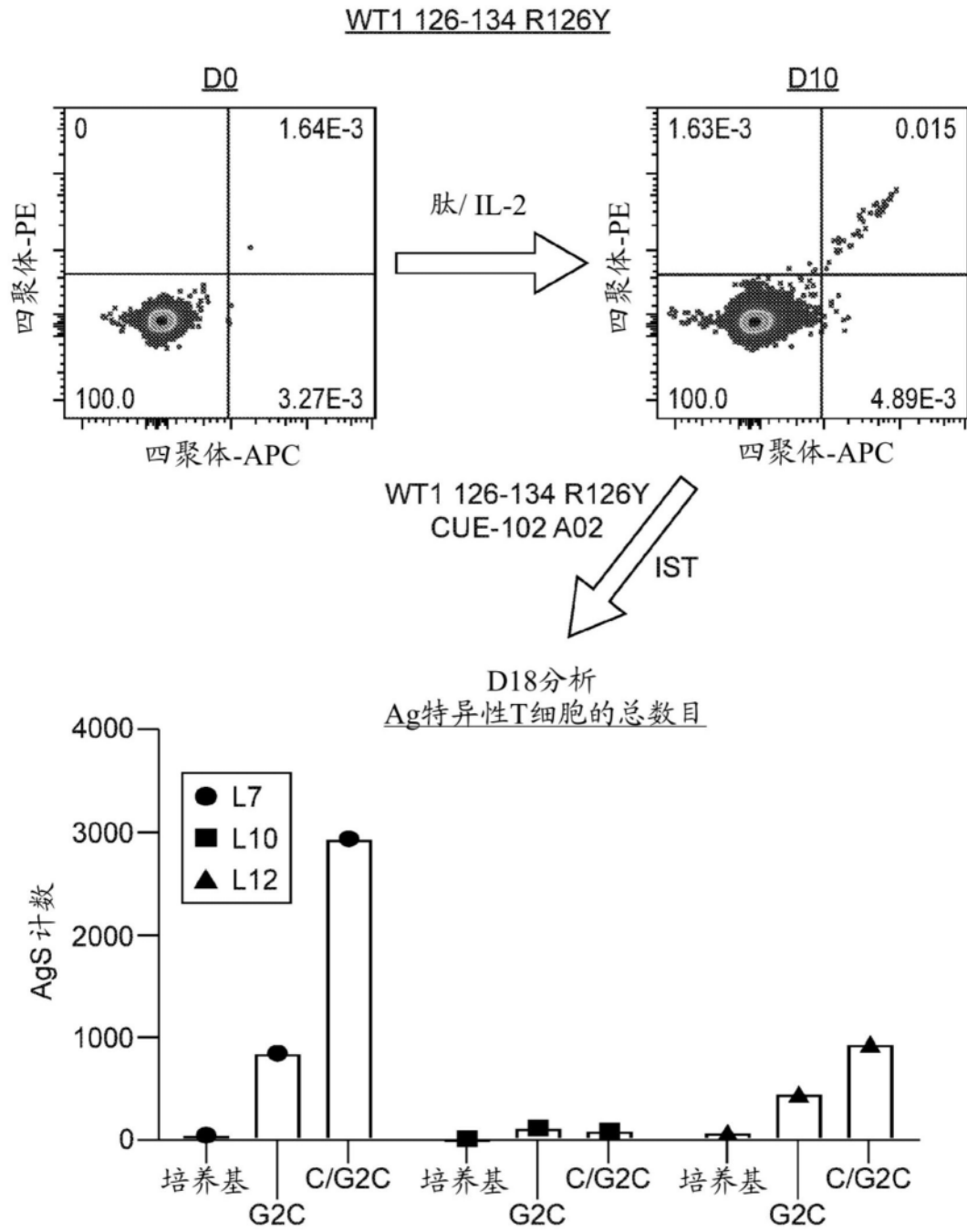


图22(续)

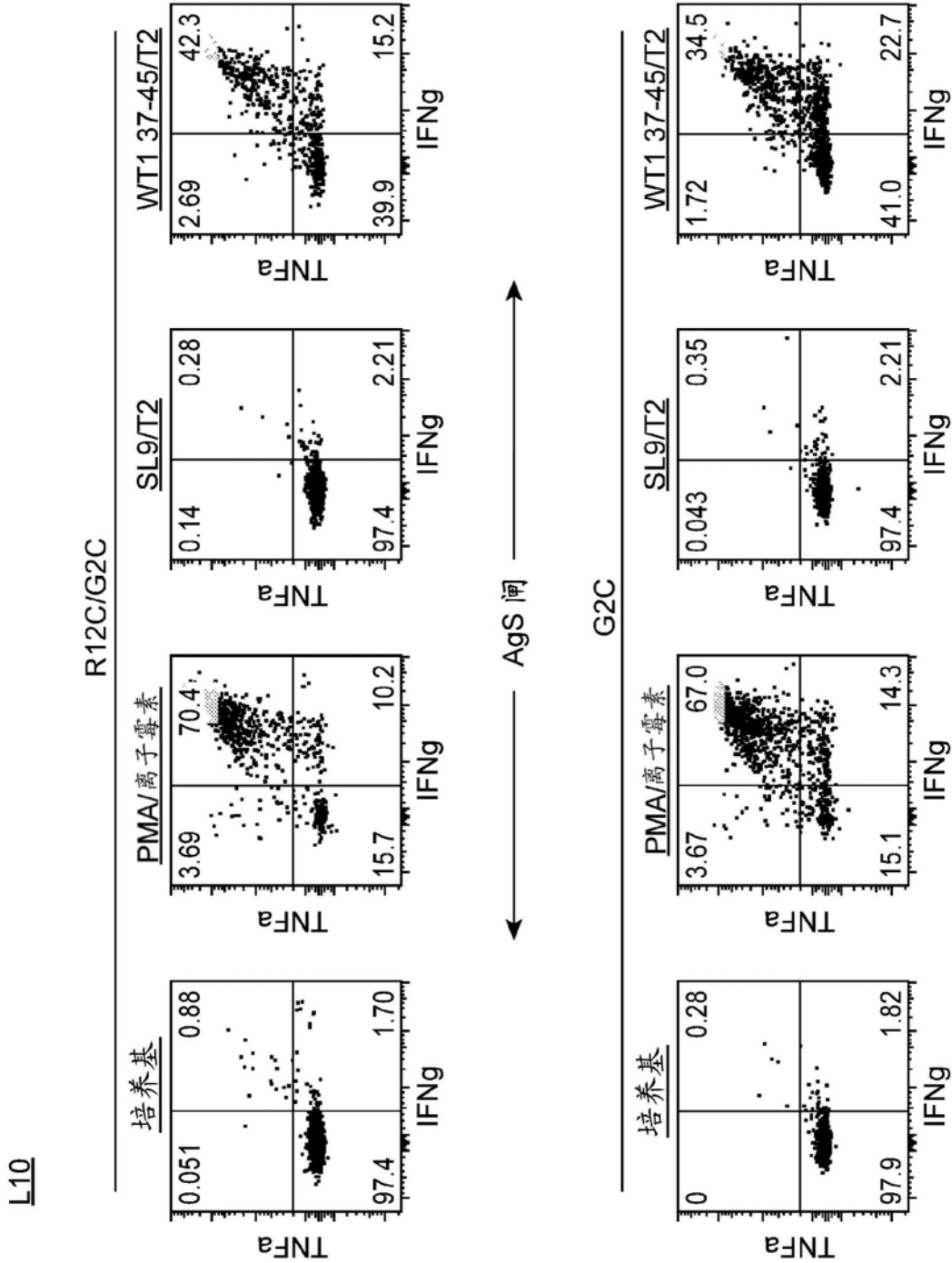


图23

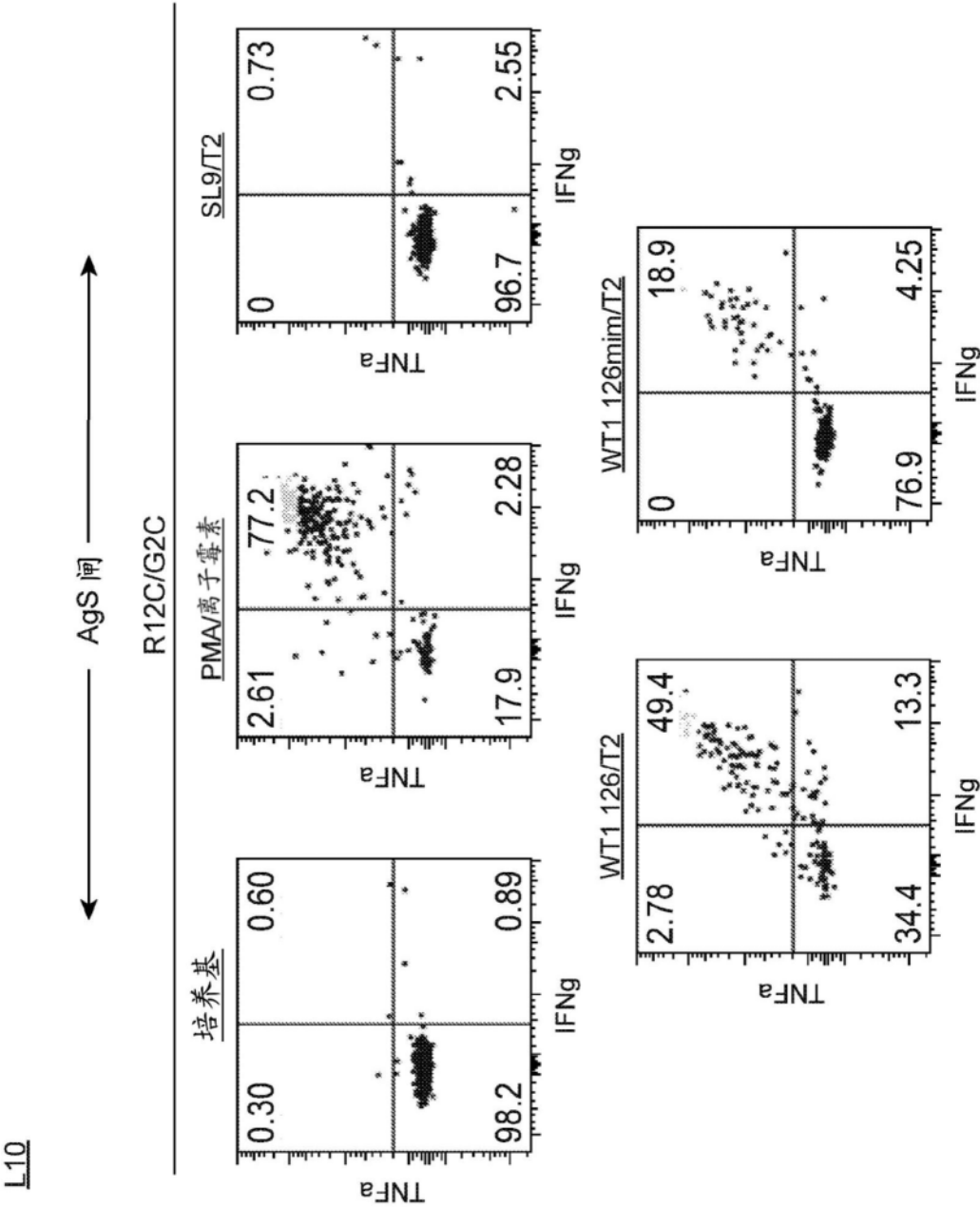
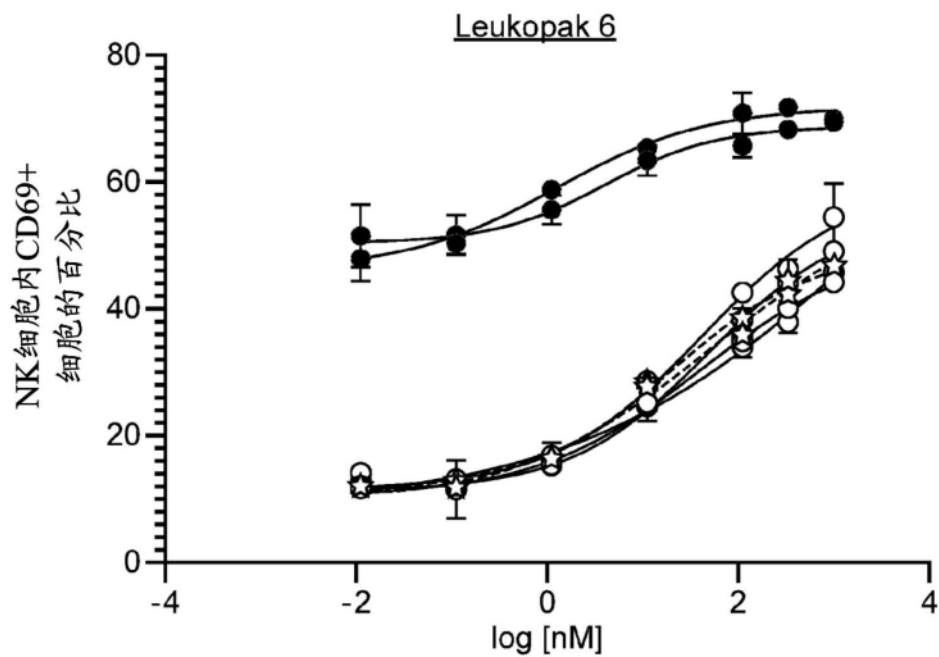


图24



特异性	IST #	Mod位置	构架	Prism颜色图例
CMV	IST-1380-839-016	1	R12C	☆
MART-1	IST-1380-1571-011	1	R12C	☆
WT-1 A02 构建体	IST-1715-2380-005	37-45	R12C/G2C	○
	IST-2045-2762-004	37-45	G2C	○
	IST-1715-2381-003	126-134	R12C/G2C	○
	IST-1715-3625-004	126-134 R126Y	R12C/G2C	○
阿地白介素				●
rhIL-2				●

图25

CUE-102 A02 前导候选物

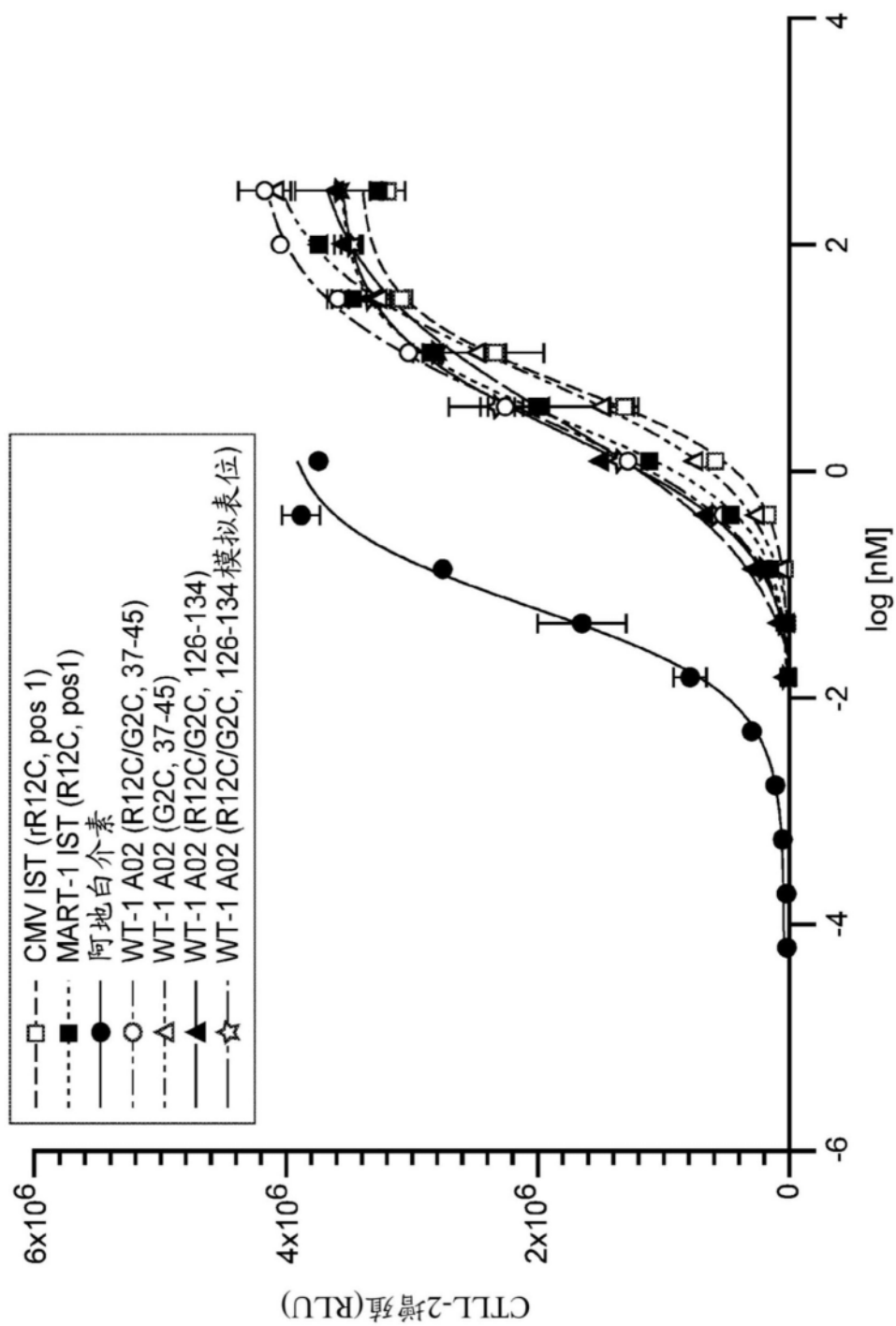


图26

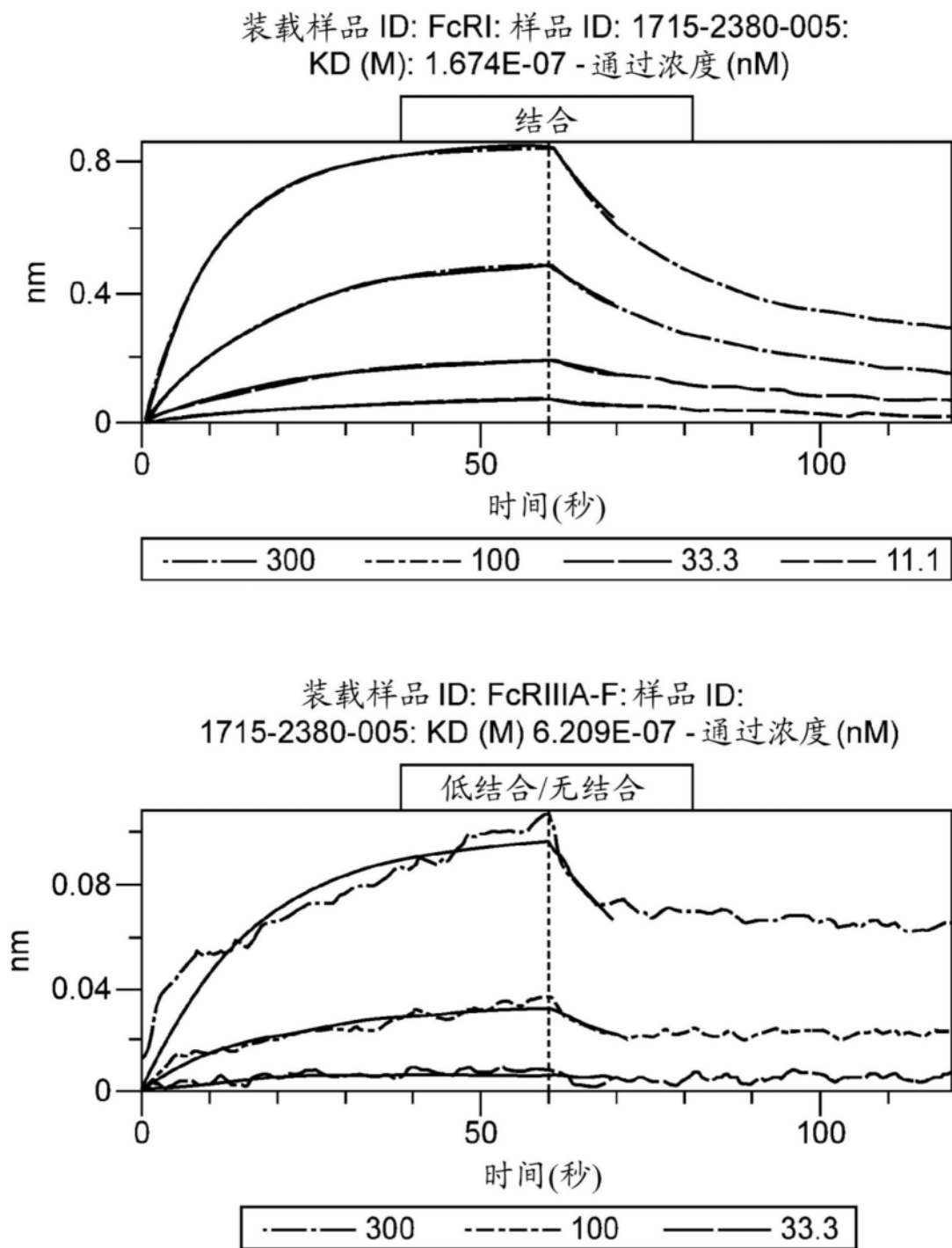
37-45 双二硫键

图27

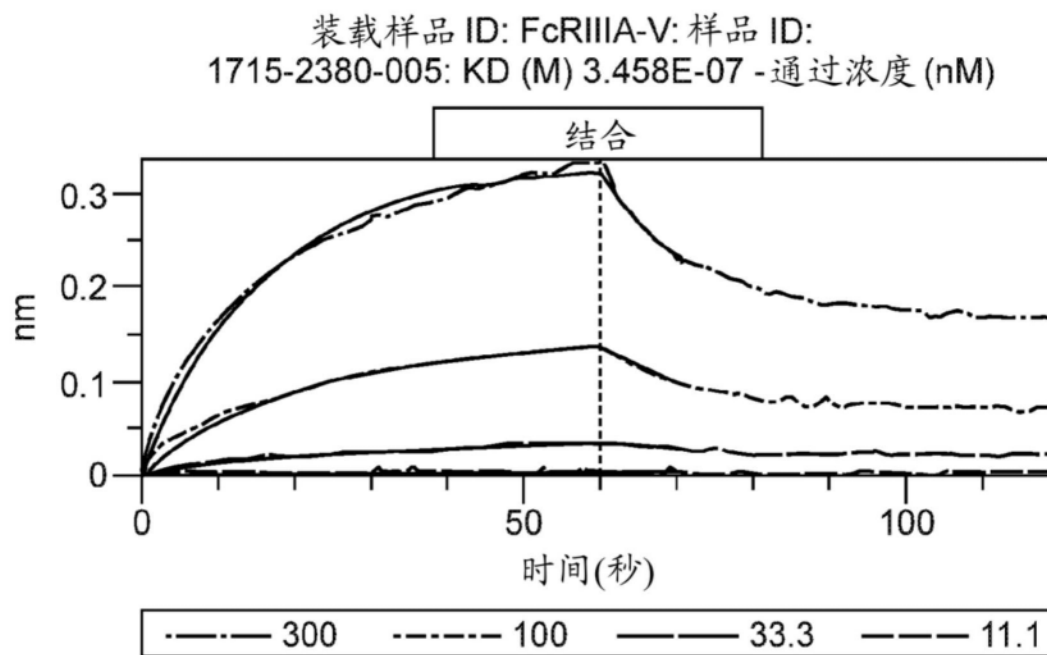
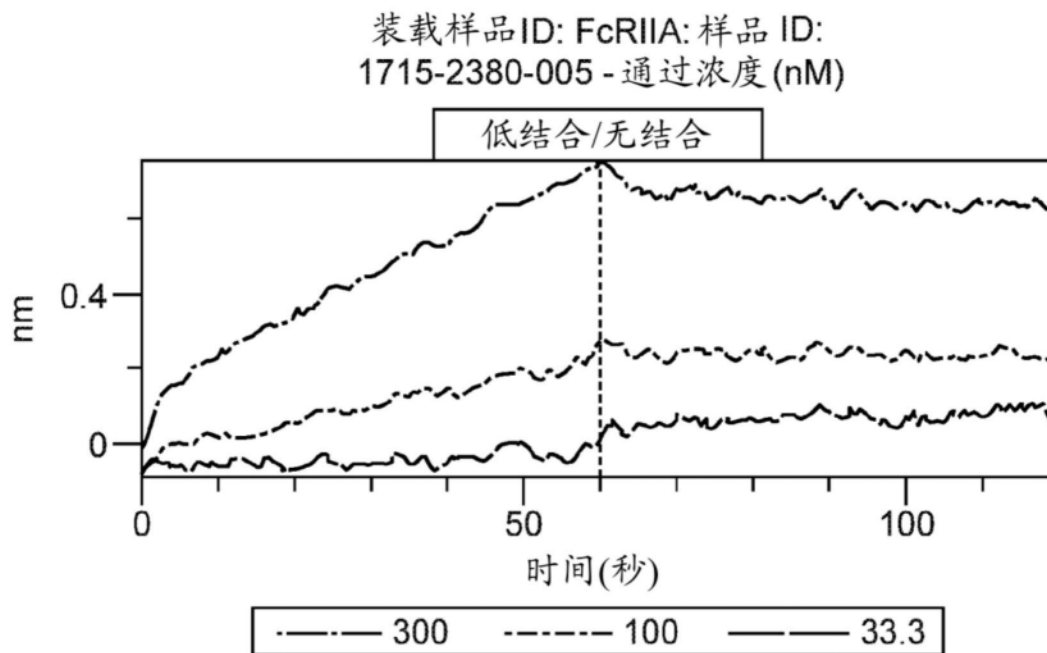
37-45 双二硫键

图27(续)

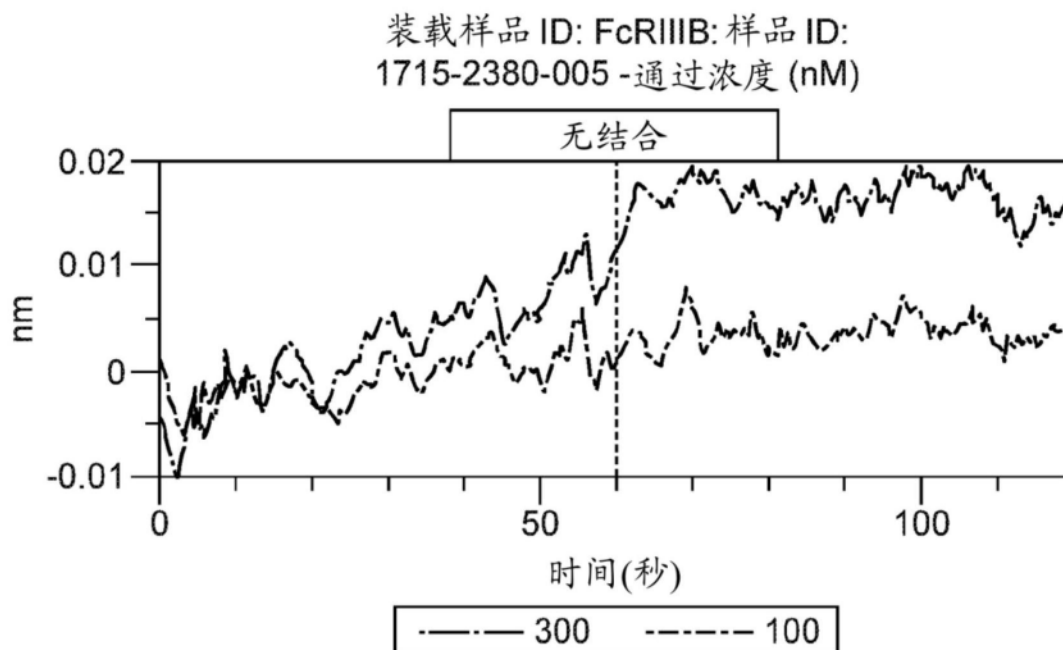
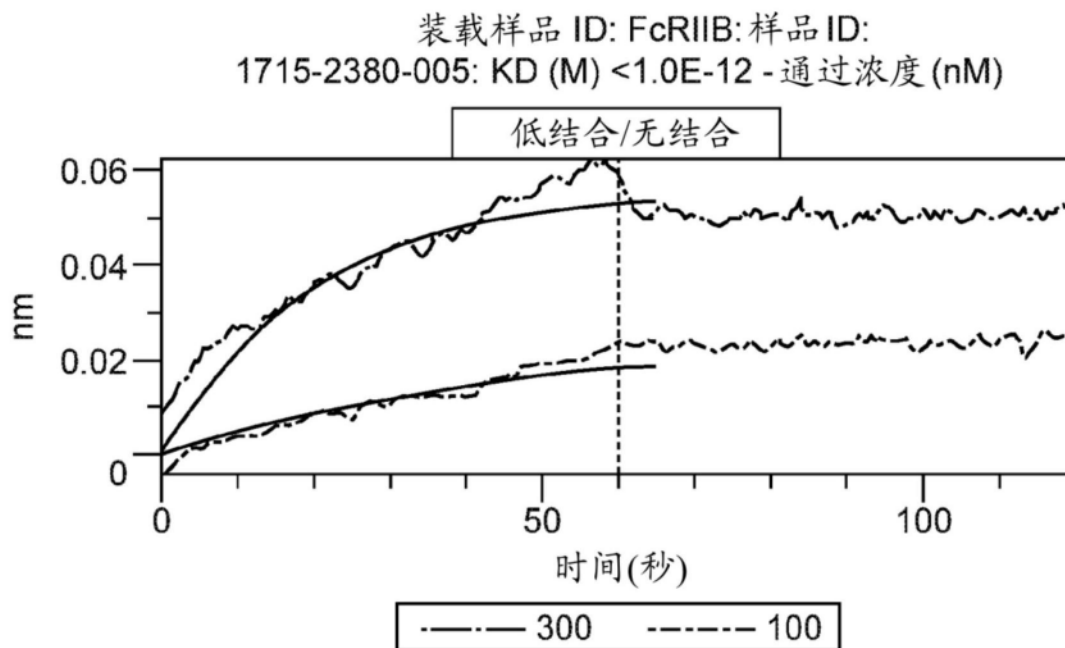
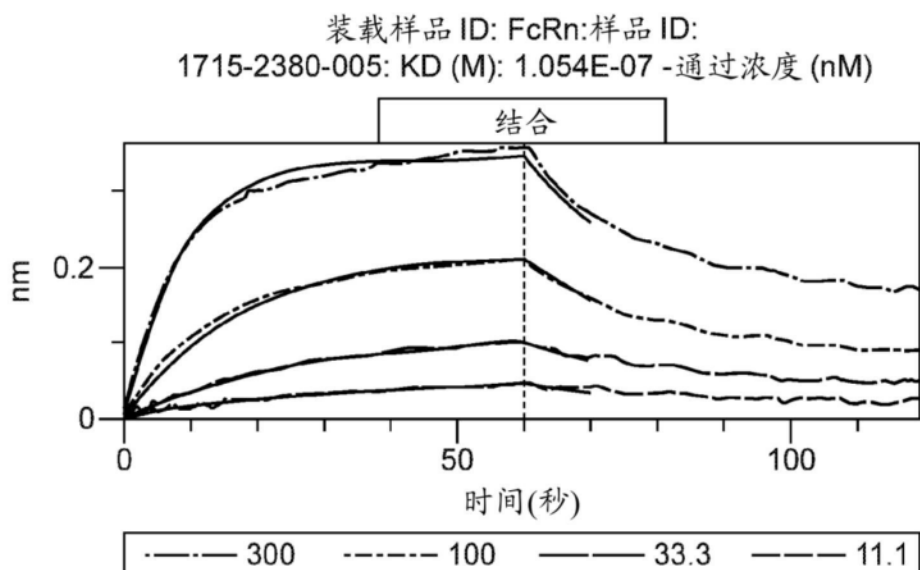
37-45 双二硫键

图27(续)

37-45 双二硫键

装载 样品ID	样品ID	KD (M)	k结合 (1/Ms)	k解离 (1/s)	完全 X ²	完全 R ²
FcRI	1715-2380-005	1.67E-07	1.92E+05	0.03209	0.0063	0.9997
FcRIIA	1715-2380-005	无结合	--	--	--	--
FcRIIB	1715-2380-005	<1.0E-12*	1.61E+05	<1.0E+05	0.0018	0.9608
FcRIIIA-F	1715-2380-005	6.21E-07	6.61E+04	4.11E-02	0.0046	0.9793
FcRIIIA-V	1715-2380-005	3.46E-07	9.83E+04	3.40E-02	0.0089	0.9973
FcRIIIB	1715-2380-005	无结合	--	--	--	--
FcRn (pH 6.0)	1715-2380-005	1.05E-07	2.83E+05	2.98E-02	0.0139	0.9963

图27(续)