(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113645988 A
(43)申请公布日 2021.11.12

(21)申请号 202080025812.5
(22)申请日 2020.03.27
(30)优先权数据
62/825,579 2019.03.28 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.09.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/025419 2020.03.27
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/198659 EN 2020.10.01
(71)申请人 奥里尼斯生物科学股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州
申请人 弗拉芒区生物技术研究所
根特大学
(72)发明人 N·克雷 J·塔威尼尔 A·范帕里斯
(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313
代理人 王珺 段丹辉
(51)Int.Cl.
A61K 38/00(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)

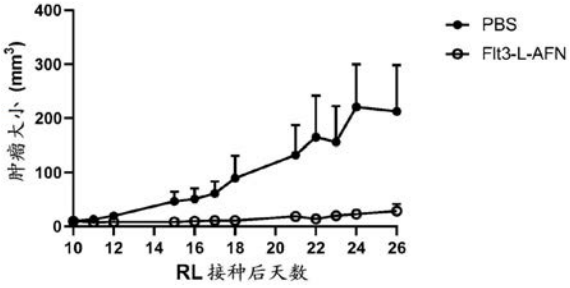
权利要求书4页 说明书33页
序列表17页 附图2页

(54)发明名称

基于FMS样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的嵌合蛋白

(57)摘要

描述了融合至人细胞因子的FMS样酪氨酸激酶3L(FLT3L),其可用于例如癌症治疗。因此,在一些方面,本发明涉及一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含靶向部分,所述靶向部分包含FMS样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)或其部分的单一拷贝。在各个实施方案中,所述靶向部分在功能上调节目标抗原或受体。在一些实施方案中,所述靶向部分结合目标抗原或受体但不在功能上调节目标抗原或受体。



CN 113645988 A

1.一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含:

(i)靶向部分,所述靶向部分包含FMS样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)或其部分的单一拷贝;

(ii)一个或多个连接元件(i)和元件(iii)的柔性接头;和

(iii)信号传导剂或其修饰形式。

2.如权利要求1所述的嵌合蛋白,其中所述靶向部分包含为SEQ ID NO:1的截短的氨基酸序列。

3.如权利要求1或2所述的嵌合蛋白,其中所述靶向部分包含FLT3L的细胞外结构域或其部分。

4.如权利要求1-3中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述靶向部分包含FLT3L的细胞外结构域。

5.如权利要求4所述的嵌合蛋白,其中所述靶向部分包含与SEQ ID NO:2-5中的任一者具有至少90%同一性的氨基酸序列。

6.如权利要求5所述的嵌合蛋白,其中所述靶向部分包含与SEQ ID NO:2-5中的任一者具有至少95%同一性的氨基酸序列。

7.如权利要求5所述的嵌合蛋白,其中所述靶向部分包含与SEQ ID NO:2-5中的任一者具有至少97%同一性的氨基酸序列。

8.如权利要求1-7中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述信号传导剂是野生型人IFNα2、IFNβ或IL-1β。

9.如权利要求1-8中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述信号传导剂包含与SEQ ID NO:6、7、38或39中的任一者具有至少95%同一性的氨基酸序列。

10.如权利要求1-9中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述信号传导剂包含SEQ ID NO:6、7、38或39中的任一者的氨基酸序列。

11.如权利要求1-10中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述信号传导剂经过修饰以包含一个或多个突变。

12.如权利要求11所述的嵌合蛋白,其中与野生型信号传导剂相比,所述一个或多个突变赋予提高的安全性。

13.如权利要求11所述的嵌合蛋白,其中所述一个或多个突变赋予对所述信号传导剂的受体的降低的亲和力。

14.如权利要求11所述的嵌合蛋白,其中所述一个或多个突变赋予对所述信号传导剂的受体的降低的生物活性。

15.如权利要求11-14中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述一个或多个突变允许所述信号传导剂的活性的减弱。

16.如权利要求15所述的嵌合蛋白,其中所述信号传导剂的激动或拮抗活性减弱。

17.如权利要求11-16中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述经修饰的信号传导剂包含一个或多个将其活性从激动性转化成拮抗性的突变。

18.如权利要求11-17中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述一个或多个突变赋予降低的亲和力或活性,所述降低的亲和力或活性能够通过连接至一个或多个靶向部分而恢复。

19.如权利要求11-18中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述一个或多个突变赋予基本上

降低或消除的亲和力或活性，所述基本上降低或消除的亲和力或活性基本上不能通过连接至靶向部分而恢复。

20.如权利要求1-19中任一项所述的嵌合蛋白，其中所述信号传导剂是包含与SEQ ID NO:6或7具有至少95％同一性的氨基酸序列的突变人IFNα2，并且其中所述突变人IFNα2与具有氨基酸序列SEQ ID NO:6或7的野生型IFNα2相比具有一个或多个赋予提高的安全性的突变。

21.如权利要求20所述的嵌合蛋白，其中相对于SEQ ID NO:6或7，所述人IFNα2在位置144至154处具有一个或多个突变。

22.如权利要求21所述的嵌合蛋白，其中相对于SEQ ID NO:6或7，所述人IFNα2在位置L15、A19、R22、R23、L26、F27、L30、L30、K31、D32、R33、H34、D35、Q40、H57、E58、Q61、F64、N65、T69、L80、Y85、Y89、D114、L117、R120、R125、K133、K134、R144、A145、M148、R149、S152、L153和N156处具有一个或多个突变。

23.如权利要求21所述的嵌合蛋白，其中相对于SEQ ID NO:6或7，所述突变人IFNα2在位置R33、T106、R144、A145、M148、R149和L153处具有一个或多个突变。

24.如权利要求22所述的嵌合蛋白，其中相对于SEQ ID NO:6或7，所述突变是L15A、A19W、R22A、R23A、L26A、F27A、L30A、L30V、K31A、D32A、R33K、R33A、R33Q、H34A、D35A、Q40A、H57Y、E58N、Q61S、F64A、N65A、T69A、L80A、Y85A、Y89A、D114R、L117A、R120A、R125A、K133A、K134A、R144A、A145G、A145M、M148A、R149A、S152A、L153A和N156A中的一者或多者。

25.如权利要求23所述的嵌合蛋白，其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:6或7，所述突变人IFNα2具有一个或多个选自R33A、T106X_3、R120E、R144X_1 A145X_2、M148A、R149A和L153A的突变，其中X_1选自A、S、T、Y、L和I，其中X_2选自G、H、Y、K和D，并且其中X_3选自A和E。

26.如权利要求1-19中任一项所述的嵌合蛋白，其中所述信号传导剂是包含与SEQ ID NO:38具有至少95％同一性的氨基酸序列的突变人IFNβ，并且其中所述突变人IFNβ与具有氨基酸序列SEQ ID NO:38的野生型IFNβ相比具有一个或多个赋予提高的安全性的突变。

27.如权利要求26所述的嵌合蛋白，其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:38，所述突变是W22G、R27G、L32A、L32G、R35A、R35G、V148G、L151G、R152A、R152G中的一者或多者。

28.如权利要求1-19中任一项所述的嵌合蛋白，其中所述信号传导剂是包含与SEQ ID NO:39具有至少95％同一性的氨基酸序列的突变人IL-1β，并且其中所述突变人IL-1β与具有氨基酸序列SEQ ID NO:39的野生型IL-1β相比具有一个或多个赋予提高的安全性的突变。

29.如权利要求28所述的嵌合蛋白，其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:39，所述突变是A117G/P118G、R120G、R120A、L122A、T125G/L126G、R127G、Q130A、Q130W、Q131G、K132A、S137G/Q138Y、L145G、H146A、H146G、H146E、H146N、H146R、L145A/L147A、Q148E、Q148G、Q148L、Q148G/Q150G、Q150G/D151A、M152G、F162A、F162A/Q164E、F166A、Q164E/E167K、N169G/D170G、I172A、V174A、K208E、K209A、K209D、K209A/K210A、K219S、K219Q、E221S、E221K、E221S/N224A、N224S/K225S、E244K和N245Q中的一者或多者。

30.如以上权利要求中任一项所述的嵌合蛋白，其中所述靶向部分针对免疫细胞，任选地是树突状细胞。

31.如权利要求30所述的嵌合蛋白，其中所述树突状细胞是常规树突状细胞(cDC)，任

选地是cDC-1、迁移性DC和Flt3+DC。

32.如权利要求31所述的嵌合蛋白，其中所述靶向部分针对造血干细胞(HSC)、早期祖细胞、未成熟胸腺细胞或稳态树突状细胞(DC)。

33.如以上权利要求中任一项所述的嵌合蛋白，其中所述靶向部分在功能上调节目标抗原或受体。

34.如以上权利要求中任一项所述的嵌合蛋白，其中所述靶向部分结合目标抗原或受体但不在功能上调节目标抗原或受体。

35.如以上权利要求中任一项所述的嵌合蛋白，其中所述靶向部分直接或间接地将免疫细胞募集至肿瘤细胞或肿瘤微环境。

36.如以上权利要求中任一项所述的嵌合蛋白，其中所述靶向部分增加树突状细胞的数量。

37.如以上权利要求中任一项所述的嵌合蛋白，其中所述靶向部分增强肿瘤抗原呈递，任选地是树突状细胞的肿瘤抗原呈递。

38.如以上权利要求中任一项所述的嵌合蛋白，所述嵌合蛋白包含两个靶向部分，所述两个靶向部分是相同的或不同的。

39.如以上权利要求中任一项所述的嵌合蛋白，所述嵌合蛋白包含另外的信号传导剂。

40.如以上权利要求中任一项所述的嵌合蛋白，所述嵌合蛋白包含两个信号传导剂。

41.如以上权利要求中任一项所述的嵌合蛋白，其中所述柔性接头基本上由甘氨酸和丝氨酸残基组成。

42.如以上权利要求中任一项所述的嵌合蛋白，其中所述柔性接头包含$(Gly_4Ser)_n$，其中n是约1至约8。

43.如以上权利要求中任一项所述的嵌合蛋白，其中所述柔性接头包含SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:17中的一者或多者。

44.如以上权利要求中任一项所述的嵌合蛋白，其中所述蛋白是二聚体。

45.如权利要求44所述的嵌合蛋白，其中所述蛋白是非共价连接的二聚体。

46.如以上权利要求中任一项所述的嵌合蛋白，所述嵌合蛋白包含氨基酸序列SEQ ID NO:9，或与所述氨基酸序列SEQ ID NO:9具有至少约90％、95％、97％、98％或99％同一性的变体。

47.一种重组核酸组合物，所述重组核酸组合物编码以上权利要求中任一项所述的一种或多种嵌合蛋白。

48.一种宿主细胞，所述宿主细胞包含权利要求47所述的核酸。

49.如权利要求1-46中任一项所述的嵌合蛋白，其中所述嵌合蛋白适用于患有以下一种或多种疾病的患者：癌症、感染、免疫病症、自身免疫性疾病和/或神经退行性疾病、心血管疾病、创伤、缺血相关疾病和/或代谢性疾病。

50.一种用于治疗或预防癌症的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的权利要求1-46中任一项所述的嵌合蛋白。

51.如权利要求50所述的方法，其中所述癌症选自以下一项或多项：基底细胞癌；胆道癌；膀胱癌；骨癌；脑和中枢神经系统癌症；乳腺癌；腹膜癌；宫颈癌；绒毛膜癌；结肠和直肠癌；结缔组织癌；消化系统癌症；子宫内膜癌；食道癌；眼癌；头颈癌；胃癌(包括胃肠癌)；成

胶质细胞瘤;肝癌;肝细胞瘤;上皮内赘瘤;肾脏癌或肾癌;喉癌;白血病;肝癌;肺癌(例如,小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌);黑素瘤;骨髓瘤;成神经细胞瘤;口腔癌(唇、舌、口和咽);卵巢癌;胰腺癌;前列腺癌;成视网膜细胞瘤;横纹肌肉瘤;直肠癌;呼吸系统癌症;唾液腺癌;肉瘤(例如卡波西肉瘤);皮肤癌;鳞状细胞癌;胃癌;睾丸癌;甲状腺癌;子宫或子宫内膜癌;泌尿系统癌症;外阴癌;淋巴瘤,包括霍奇金氏淋巴瘤和非霍奇金氏淋巴瘤,以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞性(SL)NHL;中级/滤泡性NHL;中级弥漫性NHL;高级成免疫细胞性NHL;高级成淋巴细胞性NHL;高级小非核裂细胞NHL;巨大肿块性NHL;套细胞淋巴瘤;AIDS相关淋巴瘤;和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症;慢性淋巴细胞性白血病(CLL);急性成淋巴细胞性白血病(ALL);毛细胞性白血病;慢性成髓细胞性白血病;以及其他癌瘤和肉瘤;和移植后淋巴组织增生性病症(PTLD),以及与斑痣性错构瘤相关的异常血管增生;水肿(例如与脑肿瘤相关的水肿);和梅格斯氏综合征。

52.如权利要求51所述的方法,其中所述癌症是急性骨髓性白血病(AML)。

53.一种用于治疗或预防自身免疫性疾病和/或神经退行性疾病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的权利要求1-46中任一项所述的嵌合蛋白。

54.如权利要求53所述的方法,其中所述自身免疫性疾病和/或神经退行性疾病选自多发性硬化、糖尿病、狼疮、乳糜泻、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、格林-巴利综合征、硬皮病、古德帕斯彻氏综合征、韦格纳氏肉芽肿病、自身免疫性癫痫、拉斯马森氏脑炎、原发性胆汁性硬化、硬化性胆管炎、自身免疫性肝炎、艾迪森氏病、桥本氏甲状腺炎、纤维肌痛症、美尼尔氏综合征;移植排斥(例如,预防同种异体移植排斥)恶性贫血、类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮、皮肌炎、修格连氏综合征、红斑狼疮、重症肌无力、瑞特氏综合征和格雷夫氏病。

基于FMS样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的嵌合蛋白

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年3月28日提交的美国临时专利申请号62/825,579的权益和优先权,所述申请的内容特此以引用方式整体并入。

技术领域

[0003] 描述了融合至信号传导剂(例如但不限于人IFNα2、IFNβ和IL-1β)的FMS样酪氨酸激酶3配体(FLT3L),其可用于例如癌症治疗。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包含已通过EFS-Web以ASCII格式提交的序列表,所述序列表特此以引用方式整体并入。所述ASCII副本创建于2020年3月23日,名称为ORN-062PC_A_Sequence_Listing_ST25.txt且大小为28,672字节。

背景技术

[0006] FMS样酪氨酸激酶3(FLT3)在许多造血祖细胞的表面表达。FLT3的信号传导对于造血干细胞和祖细胞的正常发育很重要。FLT3基因是急性骨髓性白血病(AML)中最常见的突变基因之一。此外,FMS样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)剂可用于启动免疫系统,例如改变树突状细胞的数量。

[0007] 细胞因子是天然存在的能够调节细胞生长和分化的物质。细胞因子在各种生理过程中发挥重要作用,这些生理过程包括例如代谢、呼吸、睡眠、排泄、愈合、运动、繁殖、情绪、压力、组织功能、免疫功能、感官知觉以及生长与发育。

[0008] 在临床上,细胞因子似乎适用于治疗多种疾病和病症,包括例如癌症。然而,施用这些可溶性剂并非没有风险。细胞因子的治疗应用通常与全身性毒性和有害副作用相关联,因此限制了这些剂可使用的剂量水平。

发明内容

[0009] 因此,在一些方面,本发明涉及一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含:靶向部分,所述靶向部分包含FMS样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)或其部分的单一拷贝。在各个实施方案中,所述靶向部分在功能上调节目标抗原或受体。在一些实施方案中,所述靶向部分结合目标抗原或受体但不在功能上调节目标抗原或受体。在一些实施方案中,所述靶向部分包含FLT3L的细胞外结构域或其相应部分的单一拷贝。根据本发明实施方案的嵌合蛋白还包含信号传导剂或其修饰形式,如本文所描述的信号传导剂,例如但不限于人IFNα2、IFNβ和IL-1β。所述嵌合蛋白还包含一个或多个连接嵌合蛋白与信号传导剂的柔性接头。

[0010] 在一些实施方案中,所述信号传导剂可以是如本文所描述的野生型信号传导剂,例如但不限于人IFNα2、IFNβ和IL-1β。在其他实施方案中,所述信号传导剂可经过修饰以包含一个或多个突变。与具有未经修饰的(例如野生型)信号传导剂的嵌合蛋白相比,引入至信号传导剂中的一个或多个突变可以赋予嵌合蛋白各种改进的特性。举例来说,所述信号

传导剂可以是与如本文所描述的野生型信号传导剂(例如但不限于人IFNα2、IFNβ和IL-1β)相比,具有一个或多个赋予提高的安全性的突变的如本文所描述的突变人信号传导剂(例如但不限于人IFNα2、IFNβ和IL-1β)。在各个实施方案中,所述一个或多个突变可以赋予与野生型信号传导剂相比提高的安全性、对信号传导剂受体的降低的亲和力或对信号传导剂受体的降低的生物活性。在一些实施方案中,所述一个或多个突变允许信号传导剂活性的减弱;例如,信号传导剂的激动活性或拮抗活性可减弱。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂的一个或多个突变将信号传导剂的活性从激动性的转化成拮抗性的。在各个实施方案中,所述一个或多个突变赋予降低的亲和力或活性,所述降低的亲和力或活性可通过连接至一个或多个靶向部分而恢复。此外,在各个实施方案中,所述一个或多个突变赋予基本上降低或消除的亲和力或活性,所述基本上降低或消除的亲和力或活性基本上不能通过连接至靶向部分而恢复。

[0011] 在各个实施方案中,所述靶向部分针对免疫细胞,使得其直接或间接地将免疫细胞募集至肿瘤细胞或肿瘤微环境。免疫细胞的非限制性实例包括树突状细胞、T细胞、B细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、骨髓来源的阻抑细胞或NK细胞。在一些实施方案中,靶向部分针对造血干细胞(HSC)、早期祖细胞、未成熟胸腺细胞或稳态树突状细胞(DC)。在多个实施方案中,所述靶向是针对树突状细胞,诸如常规树突状细胞(cDC)或浆细胞样树突状细胞(pDC)。在多个实施方案中,所述靶向是针对cDC,任选地是cDC-1、迁移性DC和Flt3+DC。在一些实施方案中,所述靶向部分可以增加树突状细胞的数量。在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白的靶向部分增强肿瘤抗原呈递,任选地树突状细胞的肿瘤抗原呈递。

[0012] 在各个实施方案中,本发明的嵌合蛋白可用于患有各种疾病或病症的患者,所述疾病或病症诸如以下一项或多项:癌症、感染、免疫病症、自身免疫性疾病和/或神经退行性疾病、心血管疾病、创伤、缺血相关疾病、代谢性疾病和/或许多其他疾病和病症。本发明涵盖治疗或预防疾病和病症(例如,各种类型的癌症和自身免疫性疾病和/或神经退行性疾病)的各种方法。在一些实施方案中,所述癌症是急性骨髓性白血病(AML)。

附图说明

[0013] 图1示出了用缓冲液或Flt3L-AcTaferon(即Flt3L ECD与IFNα2、R149A突变体的嵌合体)治疗后人源化小鼠的肿瘤生长曲线。绘制了每个时间点时间的5或6只动物的平均值(mm^3)(+SEM)。

[0014] 图2是纯化的FLT3L-AFN(黑线)的SEC(尺寸排阻色谱法)图谱,其中蛋白标记物以灰线显示。

[0015] 图3是SEC柱的级分2、3、4在非还原条件下的SDS-PAGE凝胶。

具体实施方式

[0016] 在一些方面,提供了一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含靶向部分,所述靶向部分包含FMS样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)或其部分的单一拷贝。所述嵌合蛋白还包含野生型信号传导剂或其修饰形式,所述信号传导剂信号是本文所描述的那些之一,例如但不限于人IFNα2、IFNβ和IL-1β,其在各个实施方案中可以是野生型人形式或突变形式。在嵌合蛋白中,一个或多个柔性接头连接靶向部分与信号传导剂。

[0017] 在一些实施方案中,所述靶向部分包含FLT3L的部分的单一拷贝。在其他实施方案中,所述靶向部分包含FLT3L的细胞外结构域或其部分的单一拷贝。在一些实施方案中,所述靶向部分包含为SEQ ID NO:1的截短的氨基酸序列。SEQ ID NO:1(Flt3L全长)的氨基酸序列是:

[0018] **MTVLAPAWSPTTYLLLLLLLSSGLSG**TQDCSFQHSPISSDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELCGGLWRLVLAQRWMERLKTVAGSKMQGLLERVNTEIHFVTKCAFQPPPSCLRFVQTNISRLLQETSEQLVALKPWITRQNFSRCLELQCQPDSSTLPPPWSPRPLEATAPTAPQP*PLLLLLLLPVGLLLLAAAWCLHWQRTRRRTPRPGEQVPPVPSPQDLLLVEH*

[0019] 其中粗体=前导序列,下划线:细胞外区域,非受体结合结构域部分,斜体=跨膜和细胞内结构域。

[0020] 在一些实施方案中,所述靶向部分包含与SEQ ID NO:2-5中的任一者具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2-5中的任一者具有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施方案中,所述靶向部分包含与SEQ ID NO:2-5中的任一者具有至少90%同一性的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:2-5中的任一者具有至少95%同一性的氨基酸序列的单一拷贝。

[0022] SEQ ID NO:2(成熟Flt3L-ec(细胞外结构域))的氨基酸序列是:

[0023] TQDCSFQHSPISSDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELCGGLWRLVLAQRWMERLKTVAGSKMQGLLERVNTEIHFVTKCAFQPPPSCLRFVQTNISRLLQETSEQLVALKPWITRQNFSRCLELQCQPDSSTLPPPWSPRPLEATAPTAPQP。

[0024] SEQ ID NO:3(成熟Flt3L-ec(细胞外结构域)功能较短变体商业来源(Prospecbio))的氨基酸序列是:

[0025] TQDCSFQHSPISSDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELCGGLWRLVLAQRWMERLKTVAGSKMQGLLERVNTEIHFVTKCAFQPPPSCLRFVQTNISRLLQETSEQLVALKPWITRQNFSRCLELQCQPDSSTLPPPWSPRPLEATAPTA

[0026] SEQ ID NO:4成熟Flt3L-ec(细胞外结构域)最小功能结构域(Savvides等人,2000,Nature Structural Biology)的氨基酸序列是:

[0027] TQDCSFQHSPISSDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELCGGLWRLVLAQRWMERLKTVAGSKMQGLLERVNTEIHFVTKCAFQPPPSCLRFVQTNISRLLQETSEQLVALKPWITRQNFSRCLELQCQP

[0028] 通过从第一个半胱氨酸开始到最后一个半胱氨酸结束而缩短的SEQ ID NO:5成熟Flt3L-ec(细胞外结构域)最小功能结构域(Savvides等人,2000,Nature Structural Biology)的氨基酸序列是:

[0029] CSFQHSPISSDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELCGGLWRLVLAQRWMERLKTVAGSKMQGLLERVNTEIHFVTKCAFQPPPSCLRFVQTNISRLLQETSEQLVALKPWITRQNFSRCLELQC

[0030] 在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白是二聚体。在多个实施方案中,所述嵌合蛋白是非共价连接的二聚体。在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含氨基酸序列SEQ ID NO:9,或与其具有至少约90%、95%、97%、98%或99%同一性的变体。

[0031] 在一些实施方案中,所述信号传导剂包含与SEQ ID NO:6、7、38或39中的一者具有至少95%同一性的氨基酸序列,或者所述信号传导剂可以包含SEQ ID NO:6、7、38或39中的

一者的氨基酸序列。

[0032] 在各个实施方案中,所述信号传导剂是具有一个或多个突变的信号传导剂的修饰(例如突变)形式。在各个实施方案中,所述突变允许经修饰的信号传导剂相对于信号传导剂的未经修饰或未突变,即野生型形式具有一种或多种减弱的活性,诸如降低的结合亲和力、降低的内源活性和降低的特异性生物活性中的一者或多者(例如,比较同一种信号传导剂的野生型形式对比修饰(例如突变)形式)。在各个实施方案中,所述突变允许所述经修饰的信号传导剂相对于未经修饰或未突变,例如野生型IFNα2、IFNβ或IL-1β具有一种或多种减弱的活性,诸如降低的结合亲和力、降低的内源活性和降低的特异性生物活性中的一者或多者。在一些实施方案中,减弱或降低结合或亲和力的突变包括基本上降低或消除结合或活性的那些突变。在一些实施方案中,减弱或降低结合或亲和力的突变不同于基本上降低或消除结合或活性的那些突变。结果,在各个实施方案中,所述突变允许信号传导剂相对于未突变,即野生型信号传导剂更安全,例如,具有降低的全身性毒性、减少的副作用和减少的脱靶效应(例如,比较同一种信号传导剂的野生型形式对比修饰(例如突变)形式)。在各个实施方案中,所述突变允许信号传导剂相对于未突变的干扰素,例如IFNα2、IFNβ或IL-1β的未突变序列更安全,例如,具有降低的全身毒性、减少的副作用和减少的脱靶效应。

[0033] 在各个实施方案中,所述信号传导剂经过修饰以具有一个或多个降低其对其受体中的一者或多者的结合亲和力或活性的突变。在一些实施方案中,所述信号传导剂经过修饰以具有一个或多个基本上降低或消除对所述受体的结合亲和力或活性的突变。在一些实施方案中,所述野生型信号传导剂提供的活性是在所述受体处的激动作用(例如,激活治疗部位的细胞效应)。举例来说,所述野生型信号传导剂可以激活其受体。在此类实施方案中,所述突变使得经修饰的信号传导剂在所述受体处的激活活性被降低或消除。举例来说,所述突变可以使得所述经修饰的信号传导剂向靶细胞递送减弱的激活信号,或者可以消除所述激活信号。在一些实施方案中,所述野生型信号传导剂提供的活性是在所述受体处的拮抗作用(例如阻断或阻遏治疗部位的细胞效应)。举例来说,所述野生型信号传导剂可以拮抗或抑制所述受体。在这些实施方案中,所述突变使得所述经修饰的信号传导剂在所述受体处的拮抗活性被降低或消除。举例来说,所述突变可以使得所述经修饰的信号传导剂向靶细胞递送减弱的抑制信号,或者可以消除所述抑制信号。在各个实施方案中,所述信号传导剂由于一个或多个突变而具有拮抗性,例如将激动性信号传导剂转化成拮抗性信号传导剂(例如,如WO 2015/007520中所描述,所述文献的全部内容特此以引用方式并入),并且任选地,这种经转化的信号传导剂还携带一个或多个降低其对其受体中的一者或多者的结合亲和力或活性,或者基本上降低或消除对其受体中的一者或多者的结合亲和力或活性的突变。

[0034] 在一些实施方案中,通过与一个或多个靶向部分连接可恢复所述受体处的降低的亲和力或活性。在其他实施方案中,一个或多个所述靶向部分的活性基本上不能恢复所述受体处被降低的亲和力或活性。

[0035] 在各个实施方案中,所述信号传导剂对靶细胞具有活性,因为所述靶向部分补偿了实质性激活所需的结合(例如但不限于和/或亲合力)的缺失/不足。在各个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对治疗活性位点的途径基本上无活性,并且其效应基本上针对特异性靶向的细胞类型,从而大大减少了不希望的副作用。

[0036] 在一些实施方案中，所述信号传导剂可以包括一个或多个减弱或减少对一个受体(即，治疗受体)的结合或亲和力的突变以及一个或多个基本上降低或消除第二受体处的结合或活性的突变。在此类实施方案中，这些突变可以处在相同或不同的位置上(即，相同突变或多个突变)。在一些实施方案中，减少一个受体处的结合和/或活性的一个或多个突变与基本上降低或消除另一个受体处的结合和/或活性的一个或多个突变不同。在一些实施方案中，减少一个受体处的结合和/或活性的一个或多个突变与基本上降低或消除另一个受体处的结合和/或活性的一个或多个突变相同。在一些实施方案中，本发明的嵌合蛋白具有经修饰的信号传导剂，所述经修饰的信号传导剂兼具减弱治疗受体处的结合和/或活性且因此允许更受控制的中靶治疗效果(例如相对于野生型信号传导剂)的突变与基本上降低或消除另一个受体处的结合和/或活性且因此减少副作用(例如相对于野生型信号传导剂)的突变。

[0037] 在一些实施方案中，利用靶向部分基本上不能恢复结合或活性的实质性降低或消除。在一些实施方案中，利用靶向部分能恢复结合或活性的实质性降低或消除。在各个实施方案中，基本上降低或消除第二受体处的结合或活性还可以防止另一个受体介导的不利效应。可选地或另外地，基本上降低或消除另一个受体处的结合或活性改善了治疗效果，因为治疗性嵌合蛋白的降低或消除的螯合远离治疗作用位点。举例来说，在一些实施方案中，这就回避了对高剂量的能补偿另一个受体处的损失的本发明嵌合蛋白的需要。这种降低剂量的能力还提供了较低的副作用可能性。

[0038] 在各个实施方案中，所述经修饰的信号传导剂包含一个或多个突变，所述一个或多个突变致使所述信号传导剂对其受体中的一者或多者具有降低、基本上降低或消除的亲和力，例如结合(例如K_D)和/或激活(例如，当所述经修饰的信号传导剂是其受体的激动剂时，可以测量为例如K_A和/或EC_{50})和/或抑制(例如，当所述经修饰的信号传导剂是其受体的拮抗剂时，可以测量为例如K_I和/或IC_{50})。在各个实施方案中，信号传导剂受体处降低的亲和力允许减弱活性(包括激动或拮抗)。在此类实施方案中，相对于野生型信号传导剂，所述经修饰的信号传导剂对受体具有约1％、或约3％、约5％、约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％，或约10％-20％、约20％-40％、约50％、约40％-60％、约60％-80％、约80％-100％的亲和力。在一些实施方案中，相对于所述野生型信号传导剂(包括但不限于，相对于未突变的IFNα2、IFNβ或IL-1β)，所述结合亲和力至少低约2倍、低约3倍、低约4倍、低约5倍、低约6倍、低约7倍、低约8倍、低约9倍、低至少约10倍、低至少约15倍、低至少约20倍、低至少约25倍、低至少约30倍、低至少约35倍、低至少约40倍、低至少约45倍、低至少约50倍、低至少约100倍、低至少约150倍，或低约10-50倍、低约50-100倍、低约100-150倍、低约150-200倍或低超过200倍。

[0039] 在所述嵌合蛋白具有降低一个受体处的结合且基本上降低或消除第二受体处的结合的突变的实施方案中，经修饰的信号传导剂对一个受体的结合亲和力的减弱或降低程度低于对另一个受体的亲和力的实质性降低或消除。在一些实施方案中，经修饰的信号传导剂对一个受体的结合亲和力的减弱或降低比对另一个受体的亲和力的实质性降低或消除低约1％、或约3％、约5％、约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％或约95％。在各个实

施方案中,实质性降低或消除是指在结合亲和力和/或活性方面存在比减弱或降低更大程度的降低。

[0040] 在各个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含一个或多个突变,所述一个或多个突变使所述信号传导剂的内源活性例如相对于所述野生型信号传导剂(包括但不限于,相对于未突变的IFNα2、IFNβ或IL-1β)降至约75%、或约70%、或约60%、或约50%、或约40%、或约30%、或约25%、或约20%、或约10%、或约5%、或约3%、或约1%。

[0041] 在各个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含一个或多个突变,所述一个或多个突变使所述信号传导剂对本文所描述的细胞因子、生长因子和激素中的任一者的受体具有降低的亲和力和/或活性。

[0042] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含一个或多个突变,所述一个或多个突变致使所述信号传导剂对其受体具有降低的亲和力,比所述靶向部分对其一个或多个受体的结合亲和力更低。在一些实施方案中,这种结合亲和力差异存在于相同细胞上的信号传导剂/受体与靶向部分/受体之间。在一些实施方案中,这种结合亲和力差异允许所述信号传导剂(例如突变的信号传导剂)具有局部化中靶效应并且使构成在野生型信号传导剂情况下观察到的副作用的基础的脱靶效应最小化。在一些实施方案中,这种结合亲和力低至少约2倍、或至少约5倍、或至少约10倍、或至少约15倍、或低至少约25倍、或至少约50倍、或至少约100倍、或至少约150倍。

[0043] 可以使用本领域中已知的方法来测量受体结合活性。举例来说,可以通过对结合数据进行斯卡查德图分析和计算机拟合(例如Scatchard,1949Annals of the New York Academy of Sciences.51(4):660-672)或通过如Brecht等人(1993),Biosens Bioelectron 1993;8:387-392所描述在流经条件下进行反射干涉光谱法来评定亲和力和/或结合活性,所有文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0044] 在多个实施方案中,所述野生型或经修饰的信号传导剂是干扰素,是I型干扰素。在多个实施方案中,所述野生型或经修饰的信号传导剂选自IFNα2、IFN-α1、IFN-β、IFN-γ、共有IFN、IFN-ε、IFN-κ、IFN-τ、IFN-δ和IFN-v。

[0045] 在多个实施方案中,所述野生型或经修饰的信号传导剂是干扰素α。在此类实施方案中,所述经修饰的IFNα2剂对IFN-α/β受体(IFNAR),即IFNAR1和/或IFNAR2链具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的IFNα2剂对IFN-α/β受体(IFNAR),即IFNAR1和/或IFNAR2链具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0046] 干扰素α2的突变形式对本领域技术人员是已知的。在一个说明性实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是具有以下氨基酸序列的等位基因形式IFNα2a:

[0047] CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAA WDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSF SLSTNLQESLRSKE(SEQ ID NO:6)。

[0048] 在一个说明性实施方案中,所述野生型或经修饰的信号传导剂是具有以下氨基酸序列的等位基因形式IFNα2b:

[0049] CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAA WDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEWRAEIMRSF SLSTNLQESLRSKE(SEQ ID NO:7,它在氨基酸位置23处与IFNα2a不同)。

[0050] 在一些实施方案中,所述IFNα2突变体(IFNα2a或IFNα2b)在144-154位的一个或多个氨基酸,诸如氨基酸位置148、149和/或153处发生突变。在一些实施方案中,所述IFNα2突变体包含选自L153A、R149A和M148A的一个或多个突变。此类突变体描述于例如WO2013/107791和Piehler等人,(2000)J.Biol.Chem,275:40425-33中,所有文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0051] 在一些实施方案中,所述IFNα2突变体对IFNAR1具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述IFNα2突变体包含选自如WO2010/030671中所描述的F64A、N65A、T69A、L80A、Y85A和Y89A的一个或多个突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0052] 在一些实施方案中,所述IFNα2突变体包含选自如WO2008/124086中所描述的K133A、R144A、R149A和L153A的一个或多个突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0053] 在一些实施方案中,所述IFNα2突变体包含选自如WO2015/007520和WO2010/030671中所描述的R120E和R120E/K121E的一个或多个突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在此类实施方案中,所述IFNα2突变体拮抗野生型IFNα2活性。在此类实施方案中,所述突变IFNα2对IFNAR1具有降低的亲和力和/或活性,而保留对IFNR2的亲和力和/或活性。

[0054] 在一些实施方案中,所述人IFNα2突变体包含(1)选自R120E和R120E/K121E的一个或多个突变,不希望受理论束缚,所述突变能产生拮抗效应;和(2)选自K133A、R144A、R149A和L153A的一个或多个突变,不希望受理论束缚,所述突变允许减弱例如IFNAR2处的效应。在一个实施方案中,所述人IFNα2突变体包含R120E和L153A。

[0055] 在一些实施方案中,所述人IFNα2突变体包含一个或多个突变,所述一个或多个突变选自如WO 2013/059885中所公开的L15A、A19W、R22A、R23A、L26A、F27A、L30A、L30V、K31A、D32A、R33K、R33A、R33Q、H34A、D35A、Q40A、D114R、L117A、R120A、R125A、K134A、R144A、A145G、A145M、M148A、R149A、S152A、L153A和N156A,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中,所述人IFNα2突变体包含如WO 2013/059885中所公开的突变H57Y、E58N、Q61S和/或L30A。在一些实施方案中,所述人IFNα2突变体包含如WO 2013/059885中所公开的突变H57Y、E58N、Q61S和/或R33A。在一些实施方案中,所述人IFNα2突变体包含如WO 2013/059885中所公开的突变H57Y、E58N、Q61S和/或M148A。在一些实施方案中,所述人IFNα2突变体包含如WO 2013/059885中所公开的突变H57Y、E58N、Q61S和/或L153A。在一些实施方案中,所述人IFNα2突变体包含如WO 2013/059885中所公开的突变N65A、L80A、Y85A和/或Y89A。在一些实施方案中,所述人IFNα2突变体包含如WO 2013/059885中所公开的突变N65A、L80A、Y85A、Y89A和/或D114A。

[0056] 在各个实施方案中,所述信号传导剂是突变人IFNα2。在一些实施方案中,所述突变人IFNα2包含与SEQ ID NO:6或7具有至少95%同一性的氨基酸序列,其中所述突变人IFNα2与具有氨基酸序列SEQ ID NO:6或7的野生型IFNα2相比具有一个或多个赋予提高的安全性的突变。在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:6或7,所述IFNα2在位置144至154处具有一个或多个突变。在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:6或7,所述人IFNα2在位置L15、A19、R22、R23、L26、F27、L30、L30、K31、D32、R33、H34、D35、Q40、H57、E58、Q61、F64、N65、T69、L80、Y85、Y89、D114、L117、R120、R125、K133、K134、R144、A145、M148、R149、S152、L153和N156

处具有一个或多个突变。在一些实施方案中，相对于SEQ ID NO:6或7，所述突变IFNα2在位置R149、M148或L153处具有一个或多个突变。在一些实施方案中，相对于SEQ ID NO:6或7，所述一个或多个突变是L15A、A19W、R22A、R23A、L26A、F27A、L30A、L30V、K31A、D32A、R33K、R33A、R33Q、H34A、D35A、Q40A、H57Y、E58N、Q61S、F64A、N65A、T69A、L80A、Y85A、Y89A、D114R、L117A、R120A、R125A、K133A、K134A、R144A、A145G、A145M、M148A、R149A、S152A、L153A和N156A中的一者或多者。在一些实施方案中，相对于SEQ ID NO:6或7，所述突变人IFNα2具有R149A突变。

[0057] 在一些实施方案中，相对于SEQ ID NO:6或7，所述突变人IFNα2在位置R33、R144、A145、M148、R149和L153处具有一个或多个突变。在一些实施方案中，相对于SEQ ID NO:6或7，所述突变人IFNα2具有R33A、R144A、R144I、R144L、R144S、R144T、R144Y、A145D、A145G、A145H、A145K、A145Y、M148A、R149A和L153A突变。

[0058] 在一些实施方案中，相对于SEQ ID NO:6或7，所述突变人IFNα2在位置R33、T106、R144、A145、M148、R149和L153处具有一个或多个突变。在一些实施方案中，相对于氨基酸序列SEQ ID NO:6或7，所述突变人IFNα2具有一个或多个选自R33A、T106X_3、R120E、R144X_1 A145X_2、M148A、R149A和L153A的突变，其中X_1选自A、S、T、Y、L和I，其中X_2选自G、H、Y、K和D，并且其中X_3选自A和E。

[0059] 在多个实施方案中，所述野生型或经修饰的信号传导剂是IFN-β。在一些实施方案中，所述IFN-β是具有如下所示序列的人：

[0060] MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIY EMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSL HLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRN (SEQ ID NO: 38)

[0061] 在各个实施方案中，所述IFN-β涵盖IFN-β的功能性衍生物、类似物、前体、同种型、剪接变体或片段。在各个实施方案中，所述IFN-β涵盖来源于任何物种的IFN-β。在一个实施方案中，嵌合蛋白包含小鼠IFN-β的修饰型式。在另一个实施方案中，嵌合蛋白包含人IFN-β的修饰型式。人IFN-β是包含166个氨基酸残基的分子量为约22kDa的多肽。人IFN-β的氨基酸序列是SEQ ID NO:38。

[0062] 在一些实施方案中，所述人IFN-β是呈人IFN-β的糖基化形式的IFN-β-1a。在一些实施方案中，所述人IFN-β是呈人IFN-β的非糖基化形式的IFN-β-1b，它具有Met-1缺失和Cys-17至Ser突变。

[0063] 在各个实施方案中，所述经修饰的IFN-β具有一个或多个突变，所述一个或多个突变降低了所述经修饰的IFN-β对IFNAR的IFNAR1亚单位的结合或亲和力。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β在IFNAR1处具有降低的亲和力和/或活性。在各个实施方案中，所述经修饰的IFN-β是人IFN-β，并且在位置F67、R71、L88、Y92、I95、N96、K123和R124处具有一个或多个突变。在一些实施方案中，所述一个或多个突变是选自F67G、F67S、R71A、L88G、L88S、Y92G、Y92S、I95A、N96G、K123G和R124G的取代。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含F67G突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含K123G突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含F67G和R71A突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含L88G和Y92G突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含Y92G、I95A和N96G突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含K123G和R124G突变。在一个实施方案中，所述经修饰的

IFN-β包含F67G、L88G和Y92G突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含F67S、L88S和Y92S突变。

[0064] 在一些实施方案中，所述经修饰的IFN-β具有一个或多个突变，所述一个或多个突变降低了所述经修饰的IFN-β对IFNAR的IFNAR2亚单位的结合或亲和力。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β在IFNAR2处具有降低的亲和力和/或活性。在各个实施方案中，所述经修饰的IFN-β是人IFN-β，并且在位置W22、R27、L32、R35、V148、L151、R152和Y155处具有一个或多个突变。在一些实施方案中，所述一个或多个突变是选自W22G、R27G、L32A、L32G、R35A、R35G、V148G、L151G、R152A、R152G和Y155G的取代。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含W22G突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含L32A突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含L32G突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含R35A突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含R35G突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含V148G突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含R152A突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含R152G突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含Y155G突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含W22G和R27G突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含L32A和R35A突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含L151G和R152A突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-β包含V148G和R152A突变。

[0065] 在一些实施方案中，所述经修饰的IFN-β具有以下突变中的一者或多者：R35A、R35T、E42K、M62I、G78S、A141Y、A142T、E149K和R152H。在一些实施方案中，所述经修饰的IFN-β具有以下突变中的一者或多者：R35A、R35T、E42K、M62I、G78S、A141Y、A142T、E149K和R152H，结合C17S或C17A。

[0066] 在一些实施方案中，所述经修饰的IFN-β具有以下突变中的一者或多者：R35A、R35T、E42K、M62I、G78S、A141Y、A142T、E149K和R152H，结合本文所描述的任何其他IFN-β突变。

[0067] 人IFN-β的晶体结构是已知的，并且描述于Karpusas等人，(1998)PNAS，94(22)：11813-11818中。具体而言，已显示人IFN-β的结构包括五个α螺旋(即A、B、C、D和E)和四个连接这些螺旋的环区(即AB、BC、CD和DE环)。在各个实施方案中，所述经修饰的IFN-β在A、B、C、D、E螺旋和/或AB、BC、CD和DE环中具有一个或多个突变，所述一个或多个突变降低了所述经修饰的IFN-β在治疗受体诸如IFNAR处的结合亲和力或活性。示例性突变描述于WO2000/023114和US20150011732中，所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一个示例性实施方案中，所述经修饰的IFN-β是在氨基酸位置15、16、18、19、22和/或23处包含丙氨酸取代的人IFN-β。在一个示例性实施方案中，所述经修饰的IFN-β是在氨基酸位置28-30、32和33处包含丙氨酸取代的人IFN-β。在一个示例性实施方案中，所述经修饰的IFN-β是在氨基酸位置36、37、39和42处包含丙氨酸取代的人IFN-β。在一个示例性实施方案中，所述经修饰的IFN-β是人IFN-β，所述人IFN-β在氨基酸位置64和67处包含丙氨酸取代并且在位置68处包含丝氨酸取代。在一个示例性实施方案中，所述经修饰的IFN-β是在氨基酸位置71-73处包含丙氨酸取代的人IFN-β。在一个示例性实施方案中，所述经修饰的IFN-β是在氨基酸位置92、96、99和100处包含丙氨酸取代的人IFN-β。在一个示例性实施方案中，所述经修饰的IFN-β是在氨基酸位置128、130、131和134处包含丙氨酸取代的人IFN-β。在一个示例性实施方案中，所述经修饰的IFN-β是在氨基酸位置149、153、156和159处包含丙氨酸取代的人

IFN-β。

[0068] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在W22处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0069] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在R27处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0070] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在W22处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在R27处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0071] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在L32处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0072] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在R35处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0073] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在L32处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在R35处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0074] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在F67处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0075] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在R71处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0076] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在F67处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在R71处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0077] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在L88处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0078] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在Y92处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0079] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在F67处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在L88处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在Y92处的突变,所述突变是选自甘氨酸

(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0080] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在L88处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在Y92处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0081] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在I95处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在Y92处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0082] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在N96处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在Y92处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0083] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在Y92处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在I95处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在N96处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0084] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在K123处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0085] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在R124处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0086] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在K123处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在R124处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0087] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在L151处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0088] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在R152处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0089] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在L151处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在R152处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0090] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在V148处的突变,所述突

变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)和甲硫氨酸(M)的脂族疏水性残基。

[0091] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在V148处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在R152处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0092] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:38和在Y155处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0093] 在一个实施方案中,所述野生型或经修饰的信号传导剂是IL-1β。在一个实施方案中,所述野生型IL-1β具有以下氨基酸序列:

[0094] APVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGQDMEQQVVFSMSFVQGEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLK DDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEINNKLEFESAQFPNWYISTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQ FVSS (SEQ ID NO: 39)。

[0095] IL-1β是促炎性细胞因子和重要的免疫系统调控剂。它是CD4 T细胞应答的有效激活剂,能增加Th17细胞的比例以及产生IFNγ和IL-4的细胞的扩增。IL-1β还是CD8+T细胞的有效调控剂,从而增强抗原特异性CD8+T细胞扩增、分化、移行至外围和记忆。IL-1β受体包含IL-1R1和IL-1R2。结合至IL-1R1和经由IL-1R1进行信号传导构成了IL-1β借以介导许多种其生物学(和病理学)活性的机制。IL1-R2可以起诱饵受体的作用,从而降低IL-1β用于相互作用和经由IL-1R1进行信号传导的可用性。

[0096] 在一些实施方案中,所述野生型或经修饰的信号传导剂IL-1β对IL-1R1具有降低的亲和力和/或活性(例如激动活性)。在一些实施方案中,所述经修饰的IL-1β对IL-1R2具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在此类实施方案中,存在可恢复的IL-1β/IL-1R1信号传导,并且防止了IL-R2处治疗性嵌合蛋白的损失,并且因此减少了所需IL-1β的剂量(例如,相对于野生型或仅携带针对IL-R1的减毒突变的嵌合蛋白)。此类构建体可用于例如治疗癌症,包括例如刺激免疫系统以建立抗癌应答的方法中。

[0097] 在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂具有氨基酸52-54缺失,这就产生了对I型IL-1R具有降低的结合亲和力并且具有降低的生物活性的经修饰的人IL-1β。参见例如WO 1994/000491,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中,所述经修饰的人IL-1β具有选自A117G/P118G、R120X、L122A、T125G/L126G、R127G、Q130X、Q131G、K132A、S137G/Q138Y、L145G、H146X、L145A/L147A、Q148X、Q148G/Q150G、Q150G/D151A、M152G、F162A、F162A/Q164E、F166A、Q164E/E167K、N169G/D170G、I172A、V174A、K208E、K209X、K209A/K210A、K219X、E221X、E221 S/N224A、N224S/K225S、E244K、N245Q的一个或多个取代突变(其中X可以是任何氨基酸变化,例如非保守变化),从而表现出降低的与IL-1R的结合,如例如WO2015/007542和WO/2015/007536中所描述,所述文献的全部内容特此以引用方式并入(编号基于人IL-1β序列,Genbank登记号NP_000567,版本NP-000567.1,GI:10835145)。在一些实施方案中,所述经修饰的人IL-1β可以具有选自R120A、R120G、Q130A、Q130W、H146A、H146G、H146E、H146N、H146R、Q148E、Q148G、Q148L、K209A、K209D、K219S、K219Q、E221S和E221K的一个或多个突变。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1β包含突

变Q131G和Q148G。在一个实施方案中，所述经修饰的人IL-1β包含突变Q148G和K208E。在一个实施方案中，所述经修饰的人IL-1β包含突变R120G和Q131G。在一个实施方案中，所述经修饰的人IL-1β包含突变R120G和H146A。在一个实施方案中，所述经修饰的人IL-1β包含突变R120G和H146N。在一个实施方案中，所述经修饰的人IL-1β包含突变R120G和H146R。在一个实施方案中，所述经修饰的人IL-1β包含突变R120G和H146E。在一个实施方案中，所述经修饰的人IL-1β包含突变R120G和H146G。在一个实施方案中，所述经修饰的人IL-1β包含突变R120G和K208E。在一个实施方案中，所述经修饰的人IL-1β包含突变R120G、F162A和Q164E。经修饰的人IL-1β突变是相对于SEQ ID NO:39而言。

[0098] 在各个实施方案中，与野生型信号传导剂相比，所述信号传导剂的一个或多个突变可以赋予嵌合蛋白提高的安全性。所述突变可以赋予各种其他有益特性，包括但不限于对信号传导剂的受体的亲和力降低和/或对信号传导剂的受体的生物活性降低。在一些实施方案中，所述信号传导剂的一个或多个突变允许信号传导剂的活性减弱。举例来说，信号传导剂的激动或拮抗活性可被减弱。此外，在一些实施方案中，所述经修饰的信号传导剂包含一个或多个将其活性从激动性转化成拮抗性的突变。

[0099] 在一些实施方案中，所述信号传导剂包含一个或多个赋予降低的亲和力或活性的突变，所述降低的亲和力或活性可通过连接至一个或多个靶向部分而恢复。在其他实施方案中，所述信号传导剂的一个或多个突变赋予基本上降低或消除的亲和力或活性，所述基本上降低或消除的亲和力或活性基本上不能通过连接至靶向部分而恢复。

[0100] 在一些实施方案中，所述靶向部分针对免疫细胞，所述免疫细胞可以选自树突状细胞、T细胞、B细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、骨髓来源的阻抑细胞和NK细胞。在一些实施方案中，所述靶向部分针对造血干细胞(HSC)、早期祖细胞、未成熟胸腺细胞或稳态树突状细胞(DC)。靶向部分可以在功能上调节目标抗原或受体。在一些实施方案中，所述靶向部分结合目标抗原或受体但不在功能上调节目标抗原或受体。

[0101] 在各个实施方案中，所述嵌合蛋白，除其他特征外，直接或间接地将一种或多种免疫细胞募集至疾病细胞，例如经由靶向部分。因此，在一些实施方案中，所述靶向部分直接或间接地将免疫细胞募集至肿瘤细胞或肿瘤微环境。这样，所述靶向部分可以增加树突状细胞的数量。在一些实施方案中，所述靶向部分增强肿瘤抗原呈递，任选地树突状细胞的肿瘤抗原呈递。

[0102] 在各个实施方案中，所述嵌合蛋白适用于患有以下一种或多种疾病的患者：癌症、感染、免疫病症、自身免疫性疾病和/或神经退行性疾病、心血管疾病、创伤、缺血相关疾病和/或代谢性疾病。在一些方面，提供了一种用于治疗或预防癌症的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的根据本公开的各个实施方案的嵌合蛋白。

[0103] 在各个实施方案中，所述癌症选自以下一项或多项：基底细胞癌；胆道癌；膀胱癌；骨癌；脑和中枢神经系统癌症；乳腺癌；腹膜癌；宫颈癌；绒毛膜癌；结肠和直肠癌；结缔组织癌；消化系统癌症；子宫内膜癌；食道癌；眼癌；头颈癌；胃癌(包括胃肠癌)；成胶质细胞瘤；肝癌；肝细胞瘤；上皮内赘瘤；肾脏癌或肾癌；喉癌；白血病；肝癌；肺癌(例如，小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌)；黑素瘤；骨髓瘤；成神经细胞瘤；口腔癌(唇、舌、口和咽)；卵巢癌；胰腺癌；前列腺癌；成视网膜细胞瘤；横纹肌肉瘤；直肠癌；呼吸系统癌症；唾液腺癌；肉瘤(例如卡波西肉瘤)；皮肤癌；鳞状细胞癌；胃癌；睾丸癌；甲状腺癌；子宫或子宫

内膜癌;泌尿系统癌症;外阴癌;淋巴瘤,包括霍奇金氏淋巴瘤和非霍奇金氏淋巴瘤,以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞性(SL)NHL;中级/滤泡性NHL;中级弥漫性NHL;高级成免疫细胞性NHL;高级成淋巴细胞性NHL;高级小非核裂细胞NHL;巨大肿块性NHL;套细胞淋巴瘤;AIDS相关淋巴瘤;和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症;慢性淋巴细胞性白血病(CLL);急性成淋巴细胞性白血病(ALL);毛细胞性白血病;慢性成髓细胞性白血病;以及其他癌瘤和肉瘤;和移植后淋巴组织增生性病症(PTLD),以及与斑痣性错构瘤相关的异常血管增生;水肿(例如与脑肿瘤相关的水肿);和梅格斯氏综合征。在某些实施方案中,所述癌症是急性骨髓性白血病(AML)。

[0104] 此外,在一些方面,本发明包括一种用于治疗或预防自身免疫性疾病和/或神经退行性疾病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的根据本公开的各个实施方案的嵌合蛋白。所述自身免疫性疾病和/或神经退行性疾病可以选自多发性硬化、糖尿病、狼疮、乳糜泻、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、格林-巴利综合征、硬皮病、古德帕斯彻氏综合征、韦格纳氏肉芽肿病、自身免疫性癫痫、拉斯马森氏脑炎、原发性胆汁性硬化、硬化性胆管炎、自身免疫性肝炎、艾迪森氏病、桥本氏甲状腺炎、纤维肌痛症、美尼尔氏综合征;移植排斥(例如,预防同种异体移植排斥)恶性贫血、类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮、皮肌炎、修格连氏综合征、红斑狼疮、重症肌无力、瑞特氏综合征和格雷夫氏病。

[0105] 在一些实施方案中,提供了一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含与SEQ ID NO:9具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:9具有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0106] 在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白任选地包含一个或多个柔性接头。在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含连接靶向部分和信号传导剂(例如IFNα2、IFNβ或IL-1β或其变体)的柔性接头。在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白在信号传导剂(例如IFNα2、IFNβ或IL-1β或其变体)内包含柔性接头。在一些实施方案中,所述柔性接头可以用于连接如本文所描述的各个官能团、残基或部分与嵌合蛋白。在一些实施方案中,所述柔性接头是不影响或降低结合区和结合蛋白的稳定性、取向、结合、中和和/或清除率特征的多个氨基酸。

[0107] 在一些实施方案中,所述嵌合蛋白包含一个或多个另外的信号传导剂,例如但不限于干扰素、白介素,如本文所描述,它们可以是野生型或经修饰的。在各个实施方案中,本发明的嵌合蛋白具有经修饰的信号传导剂并且与未经修饰的野生型相比提供提高的安全性。为清楚起见,在多个实施方案中,本发明包括具有一个、或两个或三个信号传导剂的嵌合蛋白。

[0108] 在各个实施方案中,所述嵌合蛋白包含一个或多个靶向部分,所述一个或多个靶向部分具有特异性地结合至目标靶标(例如抗原、受体)的靶向部分(例如但不限于各种抗体形式,包括单结构域抗体)。在各个实施方案中,所述靶向部分特异性地结合至目标靶标(例如抗原、受体),包括可见于一个或多个免疫细胞上的靶标,所述免疫细胞可以包括但不限于T细胞、细胞毒性T淋巴细胞、T辅助细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、抗肿瘤巨噬细胞(例如M1巨噬细胞)、B细胞和树突状细胞。在一些实施方案中,所述靶向部分特异性地结合至目标靶标(例如抗原、受体)并且有效地募集一种或多种免疫细胞。在一些实施方案中,所述目标靶标(例如抗原、受体)可见于一种或多种肿瘤细胞上。在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白可以直接或间接地将免疫细胞,例如可以杀死和/或阻抑肿瘤细胞

的免疫细胞募集至作用位点(作为非限制性实例,诸如肿瘤微环境)。在一些实施方案中,所述靶向部分特异性地结合至目标靶标(例如抗原、受体),所述靶标是非细胞结构的一部分。为清楚起见,在多个实施方案中,本发明包括具有一个、或两个或三个靶向部分的嵌合蛋白。

[0109] 在一些实施方案中,提供了编码以单一核苷酸序列形式连接至本文所描述的任何柔性接头的本发明嵌合蛋白的载体,并且所述载体可以用于制备此类嵌合蛋白。

[0110] 在一些实施方案中,所述柔性接头的长度允许靶向部分和所述信号传导剂(例如IFNα2、IFNβ或IL-1β或其变体)与其受体的有效结合。举例来说,在一些实施方案中,所述柔性接头的长度允许所述靶向部分中的一个和所述信号传导剂与相同细胞上的受体的有效结合。

[0111] 在一些实施方案中,所述柔性接头的长度至少等于所述靶向部分中的一个和所述信号传导剂与相同细胞上的受体的结合位点之间的最小距离。在一些实施方案中,所述柔性接头的长度是所述靶向部分中的一个和所述信号传导剂与相同细胞上的受体的结合位点之间的最小距离的至少两倍、或三倍、或四倍、或五倍、或十倍、或二十倍、或25倍、或50倍、或一百倍、或更多倍。

[0112] 如本文所描述,所述柔性接头的长度允许所述靶向部分中的一个和所述信号传导剂与相同细胞上的受体的有效结合,结合是依序的,例如靶向部分/受体结合先于信号传导剂/受体结合。

[0113] 在一些实施方案中,在单个嵌合体中有两个柔性接头,每个柔性接头连接信号传导剂与靶向部分。在各个实施方案中,所述柔性接头的长度允许形成具有疾病细胞和效应细胞的位点,而没有会阻止调节任一细胞的位阻。

[0114] 本发明设想多种柔性接头序列的用途。在各个实施方案中,所述柔性接头可以是功能性的。举例来说但不限于,所述柔性接头可以发挥功能以改善本发明嵌合蛋白的折叠和/或稳定性,改善表达,改善药物动力学,并且/或者改善生物活性。

[0115] 在一些实施方案中,所述接头是多肽。在一些实施方案中,所述柔性接头少于约100个氨基酸长。举例来说,所述柔性接头可以是少于约100、约95、约90、约85、约80、约75、约70、约65、约60、约55、约50、约45、约40、约35、约30、约25、约20、约19、约18、约17、约16、约15、约14、约13、约12、约11、约10、约9、约8、约7、约6、约5、约4、约3、或约2个氨基酸长。在一些实施方案中,所述柔性接头是多肽。在一些实施方案中,所述柔性接头超过约100个氨基酸长。举例来说,所述柔性接头可以是超过约100、约95、约90、约85、约80、约75、约70、约65、约60、约55、约50、约45、约40、约35、约30、约25、约20、约19、约18、约17、约16、约15、约14、约13、约12、约11、约10、约9、约8、约7、约6、约5、约4、约3、或约2个氨基酸长。

[0116] 在各个实施方案中,所述柔性接头基本上由甘氨酸和丝氨酸残基构成(例如约30%、或约40%、或约50%、或约60%、或约70%、或约80%、或约90%、或约95%、或约97%甘氨酸和丝氨酸)。举例来说,在一些实施方案中,所述柔性接头是$(Gly_4Ser)_n$,其中n是约1至约8,例如1、2、3、4、5、6、7或8(分别是SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:17)。在一个实施方案中,所述柔性接头序列是GGSGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:18)。其他说明性柔性接头包括但不限于具有序列LE、GGGGS(SEQ ID NO:10)、$(GGGGS)_n$(n=1-4)(SEQ ID NO:10-SEQ ID NO:13)、$(Gly)_8$(SEQ ID NO:19)、$(Gly)_6$(SEQ ID NO:20)、$(EAAAK)_n$(n=1-3)(SEQ ID NO:21-SEQ ID

NO:23)、A(EAAAK)$_n$A(n＝2-5)(SEQ ID NO:24-SEQ ID NO:27)、AEAAAKEAAAKA(SEQ ID NO:24)、A(EAAAK)$_4$ALEA(EAAAK)$_4$A(SEQ ID NO:28)、PAPAP(SEQ ID NO:29)、KESGSVSSEQLAQFRSLD(SEQ ID NO:30)、EGKSSGSGSESKST(SEQ ID NO:31)、GSAGSAAGSGEF(SEQ ID NO:32)和(XP)$_n$的柔性接头,其中X表示任何氨基酸,例如Ala、Lys或Glu。在各个实施方案中,所述柔性接头是GGS。

[0117] 在一些实施方案中,所述柔性接头是GGGSE(SEQ ID NO:33)、GSESG(SEQ ID NO:34)、GSEGS(SEQ ID NO:35)、GEGGSGEGSSGEGSSSEGGGSEGGGSEGGGSEGGS(SEQ ID NO:36)和每4个氨基酸间隔随机放置G、S和E的柔性接头中的一者或多者。

[0118] 在各个实施方案中,所述柔性接头可以是功能性的。举例来说但不限于,所述柔性接头可以发挥功能以改善本发明嵌合蛋白的折叠和/或稳定性,改善表达,改善药物动力学,并且/或者改善生物活性。在另一个实例中,所述柔性接头可以发挥功能以使所述嵌合蛋白靶向特定的细胞类型或位置。

[0119] 在各个实施方案中,本发明的嵌合蛋白可以包括一个或多个官能团、残基或部分。在各个实施方案中,所述一个或多个官能团、残基或部分连接或基因融合至本文所描述的信号传导剂或靶向部分中的任一者。在一些实施方案中,此类官能团、残基或部分赋予本发明的嵌合蛋白以一种或多种所期望的性质或功能性。此类官能团和用于将它们引入至嵌合蛋白中的技术的实例在本领域中是已知的,举例来说,参见Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.(1980)。

[0120] 在各个实施方案中,所述嵌合蛋白中的每一者可以通过与另一种剂缀合和/或融合以延长半衰期或以其他方式改善药效学和药物动力学特性。在一些实施方案中,所述嵌合蛋白可以与PEG、XTEN(例如呈rPEG形式)、聚唾液酸(POLYXEN)、白蛋白(例如,人血清白蛋白或HAS)、弹性蛋白样蛋白(ELP)、PAS、HAP、GLK、CTP、转铁蛋白等等中的一者或多者融合或缀合。

[0121] 在各个实施方案中,个别嵌合蛋白中的每一者与BioDrugs(2015)29:215-239中所描述的剂中的一者或多者融合,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0122] 在一些实施方案中,所述官能团、残基或部分包含合适的药理学上可接受的聚合物,诸如聚(乙二醇)(PEG)或其衍生物(诸如甲氧基聚(乙二醇)或mPEG)。在一些实施方案中,PEG部分的连接增加半衰期和/或降低嵌合蛋白的免疫原性。一般来说,可以使用聚乙二醇化的任何合适的形式,诸如本领域中用于抗体和抗体片段的聚乙二醇化(包括但不限于单结构域抗体,诸如VHH);参见例如Chapman,Nat.Biotechnol.,54,531-545(2002);Veronese和Harris,Adv.Drug Deliv.Rev.54,453-456(2003);Harris和Chess,Nat.Rev.Drug.Discov.,2,(2003)和WO04060965,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。用于蛋白质的聚乙二醇化的各种试剂还可以得自市面,例如,得自美国的Nektar Therapeutics。在一些实施方案中,使用定点聚乙二醇化,具体而言,经由半胱氨酸残基(参见例如Yang等人,Protein Engineering,16,10,761-770(2003),所述文献的全部内容特此以引用方式并入)。在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白经过修饰以便适当地引入一个或多个供连接PEG用的半胱氨酸残基,或者包含一个或多个供连接PEG用的半胱氨酸残基的氨基酸序列可以使用本领域中已知的技术融合至所述嵌合蛋白的氨基和/或羧基端。

[0123] 在一些实施方案中,所述官能团、残基或部分包含N连接或O连接的糖基化。在一些

实施方案中，引入所述N连接或O连接的糖基化作为共翻译和/或翻译后修饰的一部分。

[0124] 在一些实施方案中，所述官能团、残基或部分包含一个或多个可检测标记或其他信号产生基团或部分。合适的标记和适用于连接、使用和检测它们的技术在本领域中是已知的，并且包括但不限于荧光标记(诸如荧光素、异硫氰酸酯、罗丹明、藻红素、藻青素、别藻蓝素、邻苯二甲醛以及荧光胺和荧光金属诸如Eu或其他镧系金属)、磷光标记、化学发光标记或生物发光标记(诸如鲁米那(luminal)、异鲁米诺(isoluminol)、热性吖啶酯(theromatic acridinium ester)、咪唑、吖啶盐、草酸酯、二氧杂环丁烷或GFP以及它们的类似物)、放射性同位素、金属、金属螯合物或金属阳离子或者特别适用于体内、体外或原位诊断和成像的其他金属或金属阳离子，以及发色团和酶(诸如苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、δ-V-类固醇异构酶、酵母乙醇脱氢酶、α-甘油磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、生物素亲和素过氧化物酶、辣根过氧化酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、β-半乳糖苷酶、核糖核酸酶、尿素酶、催化酶、葡萄糖-VI-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰化胆碱脂酶)。其他合适的标记包括可以使用NMR或ESR光谱加以检测的部分。本发明的此类标记的多肽可以例如用于体外、体内或原位测定(包括本身已知的免疫测定，诸如ELISA，RIA、EIA和其他“夹心测定”等)以及体内诊断和成像目的，取决于对具体标记的选择。

[0125] 在一些实施方案中，所述官能团、残基或部分包含附接或基因融合至所述嵌合蛋白的标签。在一些实施方案中，所述嵌合蛋白可以包括单个标签或多个标签。举例来说，所述标签是不抑制或防止嵌合蛋白与其靶标或其他目标抗原诸如肿瘤抗原的结合的肽、糖或DNA分子。在各个实施方案中，所述标签是至少约：三个至五个氨基酸长、五个至八个氨基酸长、八个至十二个氨基酸长、十二个至十五个氨基酸长或十五个至二十个氨基酸长。说明性标签描述于诸如美国专利公布号US2013/0058962。在一些实施方案中，所述标签是亲和力标签，诸如谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和组氨酸(His)标签。在一个实施方案中，所述嵌合蛋白包含His标签。

[0126] 在一些实施方案中，所述官能团、残基或部分包含螯合基团，例如，以螯合金属或金属阳离子之一。合适的螯合基团例如包括但不限于二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0127] 在一些实施方案中，所述官能团、残基或部分包含作为特异性结合对，诸如生物素-(链霉)亲和素结合对的一个部分的官能团。这种官能团可以用来连接本发明的嵌合蛋白与跟所述结合对的另一半结合(即，通过形成结合对)的另一个蛋白质、多肽或化学化合物。举例来说，本发明的嵌合蛋白可以缀合至生物素，并且连接至与亲和素或链霉亲和素缀合的另一个蛋白质、多肽、化合物或载体。举例来说，这种缀合的嵌合蛋白可以用作例如诊断系统中的报告子，其中可检测信号产生剂缀合至亲和素或链霉亲和素。此类结合对还可以例如用于使所述嵌合蛋白结合至载体，包括适用于药物目的的载体。一个非限制性实例是Cao和Suresh，Journal of Drug Targeting，8，4，257(2000)所描述的脂质体制剂。此类结合对还可以用于连接治疗活性剂与本发明的嵌合蛋白。

[0128] 本文中描述了用于产生本发明的嵌合蛋白的方法。举例来说，可以使用本领域中已知的方法以化学方式合成编码本发明的嵌合蛋白的DNA序列(例如，编码信号传导剂(例如IFNα2、IFNβ或IL-1β或其变体)和靶向部分和柔性接头的DNA序列)。合成DNA序列可以连接至其他适当的核苷酸序列，包括例如表达控制序列，以产生编码所期望的嵌合蛋白的基

因表达构建体。因此，在各个实施方案中，本发明提供了包含编码本发明的嵌合蛋白的核苷酸序列的分离的核酸。

[0129] 编码本发明的嵌合蛋白的核酸可以并入(连接)至表达载体中，所述表达载体可以通过转染、转化或转导技术而引入宿主细胞中。举例来说，可以通过反转录病毒转导将编码本发明的嵌合蛋白的核酸引入至宿主细胞中。说明性宿主细胞是大肠杆菌细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚肾293(HEK 293)细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如Hep G2)和骨髓瘤细胞。可以使转化的宿主细胞在允许宿主细胞表达编码本发明的嵌合蛋白的基因的条件下生长。因此，在各个实施方案中，本发明提供了包含编码本发明的嵌合蛋白的核酸的表达载体。在各个实施方案中，本发明额外提供了包含此类表达载体的宿主细胞。

[0130] 具体的表达和纯化条件将取决于所采用的表达系统而变化。举例来说，如果在大肠杆菌中表达基因，那么首先通过将工程化的基因置于合适的细菌启动子例如Trp或Tac和原核信号序列的下游而将它克隆至表达载体中。在另一个实例中，如果将要在真核宿主细胞，例如CHO细胞中表达工程化的基因，那么首先将它插入含有例如合适的真核启动子、分泌信号、增强子和各种内含子的表达载体中。可以使用转染、转化或转导技术将基因构建体引入至宿主细胞中。

[0131] 本发明的嵌合蛋白可以通过使经编码所述嵌合蛋白的表达载体转染的宿主细胞在允许表达所述蛋白质的条件下生长来产生。在表达后，可以使用本领域中众所周知的技术，例如亲和力标签诸如谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和组氨酸标签或通过色谱法来收集并且纯化所述蛋白质。

[0132] 因此，在各个实施方案中，本发明提供了一种编码本发明的嵌合蛋白的核酸。在各个实施方案中，本发明提供了一种包含编码本发明的嵌合蛋白的核酸的宿主细胞。在各个实施方案中，本发明提供了编码本发明的嵌合蛋白的核酸，其适于在非细胞体系中生产(例如体外转录和/或体外翻译)。

[0133] 在各个实施方案中，IFNα2、IFNβ或IL-1β，其变体，或包含IFNα2、IFNβ或IL-1β或其变体的嵌合蛋白可以在体内表达，例如在患者体内表达。举例来说，在各个实施方案中，所述IFNα2、IFNβ或IL-1β，其变体，或包含IFNα2、IFNβ或IL-1β或其变体的嵌合蛋白可以编码所述IFNα2、IFNβ或IL-1β或其变体或包含IFNα2、IFNβ或IL-1β或其变体的嵌合蛋的核酸形式施用。在各个实施方案中，所述核酸是DNA或RNA。在一些实施方案中，所述IFNα2、IFNβ或IL-1β，其变体，或包含IFNα2、IFNβ或IL-1β或其变体的嵌合蛋白是由经修饰的mRNA，即包含一个或多个经修饰的核苷酸的mRNA编码。在一些实施方案中，所述经修饰的mRNA包含一个或多个在美国专利号8,278,036中发现的修饰，所述专利的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中，所述经修饰的mRNA包含m5C、m5U、m6A、s2U、Ψ和2'-O-甲基-U中的一者或多者。在一些实施方案中，本发明涉及施用编码一种或多种本发明的嵌合蛋白的经修饰的mRNA。在一些实施方案中，本发明涉及包含所述经修饰的mRNA的基因治疗载体。在一些实施方案中，本发明涉及包括所述基因治疗载体的基因治疗方法。在各个实施方案中，所述核酸呈溶瘤病毒，例如腺病毒、呼肠孤病毒、麻疹、单纯疱疹、新城疫病毒或牛痘的形式。

[0134] 本文所描述的嵌合蛋白可以具有能与无机或有机酸反应的充分碱性的官能团，或能与无机或有机碱反应的羧基，以形成药学上可接受的盐。如本领域中众所周知，药学上可

接受的酸加成盐是由药学上可接受的酸形成。此类盐包括例如以下文献中列出的药学上可接受的盐:Journal of Pharmaceutical Science,66,2-19(1977)和The Handbook of Pharmaceutical Salts;Properties,Selection,and Use.P.H.Stahl和C.G.Wermuth(编辑),Verlag,Zurich(Switzerland)2002,所述文献特此以引用方式整体并入。

[0135] 作为非限制性实例,药学上可接受的盐包括硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、樟脑磺酸盐、双羟萘酸盐、苯基乙酸盐、三氟乙酸盐、丙烯酸盐、氯代苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、邻乙酰氧基苯甲酸盐、萘-2-苯甲酸盐、异丁酸盐、苯基丁酸盐、α-羟基丁酸盐、丁炔-1,4-二甲酸盐、己炔-1,4-二甲酸盐、癸酸盐、辛酸盐、肉桂酸盐、乙醇酸盐、庚酸盐、马尿酸盐、苹果酸盐、羟基马来酸盐、丙二酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、烟酸盐、酞酸盐、对苯二酸盐、丙炔酸盐、丙酸盐、苯基丙酸盐、癸二酸盐、辛二酸盐、对溴代苯磺酸盐、氯代苯磺酸盐、乙基磺酸盐、2-羟乙基磺酸盐、甲基磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、萘-1,5-磺酸盐、二甲苯磺酸盐和酒石酸盐。

[0136] 术语“药学上可接受的盐”还指具有酸性官能团,诸如羧酸官能团的本发明组合物与碱形成的盐。合适的碱包括但不限于碱金属诸如钠、钾和锂的氢氧化物;碱土金属诸如钙和镁的氢氧化物;其他金属诸如铝和锌的氢氧化物;氨和有机胺,诸如未经取代或经羟基取代的单烷基胺、二烷基胺或三烷基胺、二环己基胺;三丁胺;吡啶;N-甲基,N-乙基胺;二乙基胺;三乙基胺;单(2-OH-低级烷基胺)、双(2-OH-低级烷基胺)或三(2-OH-低级烷基胺)(诸如单(2-羟基乙基)胺、双(2-羟基乙基)胺或三(2-羟基乙基)胺)、2-羟基-叔丁胺或三(羟甲基)甲胺、N,N-二-低级烷基-N-(羟基-低级烷基)-胺(诸如N,N-二甲基-N-(2-羟基乙基)胺)或三(2-羟基乙基)胺;N-甲基-D-葡萄糖胺;和氨基酸,诸如精氨酸、赖氨酸等等。

[0137] 在一些实施方案中,本文所描述的组合物呈药学上可接受的盐的形式。

[0138] 在各个实施方案中,本发明有关于包含本文所描述的嵌合蛋白和药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。本文所描述的任何药物组合物都可以作为包含药学上可接受的载体或媒介物的组合物的组分施用至受试者。此类组合物可以任选地包含适量的药学上可接受的赋形剂以提供用于适当施用的形式。

[0139] 在各个实施方案中,药物赋形剂可以是液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些液体,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等等。所述药物赋形剂可以是例如生理盐水、阿拉伯树胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白、胶体二氧化硅、脲等等。另外,可以使用助剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂。在一个实施方案中,当施用至受试者时,所述药学上可接受的赋形剂是无菌的。当经静脉内施用本文所描述的任何剂时,水是可用的赋形剂。还可以采用生理盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液作为液体赋形剂,具体来说,用于可注射溶液。合适的药物赋形剂还包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等等。本文所描述的任何剂在需要时还可以包含微量润湿剂或乳化剂或pH值缓冲剂。合适的药物赋形剂的其他实例描述于Remington’sPharmaceutical Sciences 1447-1676

(Alfonso R.Gennaro编辑,第19版1995)中,所述文献以引用方式并入本文。

[0140] 本发明包括所描述的药物组合物(和/或其他治疗剂)的各种制剂形式。本文所描述的任何发明药物组合物(和/或其他治疗剂)可以呈溶液、悬浮液、乳液、滴剂、片剂、丸剂、丹剂、胶囊剂、含有液体的胶囊剂、明胶胶囊、粉剂、持续释放制剂、栓剂、乳液、气雾剂、喷雾剂、悬浮液、冻干粉剂、冷冻悬浮液、干燥粉剂的形式或任何其他合用的形式。在一个实施方案中,所述组合物呈胶囊剂形式。在另一个实施方案中,所述组合物呈片剂形式。在另一个实施方案中,所述药物组合物被配制为呈软凝胶胶囊形式。在另一个实施方案中,所述药物组合物被配制为呈明胶胶囊形式。在另一个实施方案中,所述药物组合物被配制为液体。

[0141] 在必要时,本发明的药物组合物(和/或其他剂)还可以包括增溶剂。所述剂还可以与如本领域中已知的合适的媒介物或递送装置一起递送。本文概述的组合疗法可以在单个递送媒介物或递送装置中共同递送。

[0142] 本发明的包含本发明药物组合物(和/或其他剂)的制剂可能适宜呈单位剂型的形式存在,并且可以通过制药领域中众所周知的任何方法来制备。此类方法一般包括使所述治疗剂与构成一种或多种辅助成分的载体缔合的步骤。典型地,所述制剂是通过使所述治疗剂均匀地并且密切地与液体载体、细粉状固体载体或二者缔合,然后在必要时将产物成形为所期望的制剂的剂型(例如湿式或干式造粒、粉末掺合物等,随后使用本领域中已知的常规方法进行制片)来制备。

[0143] 在各个实施方案中,本文所描述的任何药物组合物(和/或其他剂)根据常规程序配制为适合于本文所描述的施用模式的组合物。

[0144] 施用途径包括例如:口服、皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、舌下、鼻内、脑内、阴道内、经皮、直肠、通过吸入或局部。施用可以是局部的或全身的。在一些实施方案中,所述施用是通过口服实现。在另一个实施方案中,所述施用是通过肠胃外注射。施用模式可以留给医师判断,并且部分取决于医学病状的部位。在大部分情况下,施用使得本文所描述的任何剂释放至血流中。

[0145] 在一个实施方案中,本文所描述的嵌合蛋白根据常规程序配制为适合于口服施用的组合物。举例来说,用于口服递送的组合物可以呈片剂、糖锭、水性或油性悬浮液、颗粒剂、粉剂、乳液、胶囊剂、糖浆或酏剂形式。口服施用的组合物可以包含一种或多种剂,例如甜味剂,诸如果糖、阿斯巴特(aspartame)或糖精;调味剂,诸如薄荷油、冬青油或樱桃油;着色剂;和防腐剂,以提供药学上可口的制剂。此外,在呈片剂或丸剂形式时,所述组合物可以经过包衣以延迟胃肠道中的崩解和吸收,从而在较长时间段内提供持续作用。在本文所描述的渗透活性驱动的任何嵌合蛋白周围的选择性渗透膜还适用于口服施用的组合物。在后面的这些平台中,来自于所述胶囊剂周围的环境的流体被驱动化合物吸入,所述驱动化合物膨胀从而通过孔口置换所述剂或剂组合物。与立即释放制剂的尖峰分布相反,这些递送平台可以提供本质上零阶的递送分布。时间延迟材料诸如单硬脂酸甘油酯或硬脂酸甘油酯也是可用的。口服组合物可以包括标准赋形剂,诸如甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素和碳酸镁。在一个实施方案中,所述赋形剂属于药物等级。悬浮液以及活性化合物可以含有悬浮剂,诸如例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧化乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、皂土、琼脂、黄芪胶等以及它们的混合物。

[0146] 适用于肠胃外施用(例如静脉内、肌肉内、腹膜内、皮下和关节内注射和输注)的剂

型包括例如溶液、悬浮液、分散液、乳液等等。它们还可以制造为呈无菌固体组合物(例如冻干组合物)形式,所述形式可以在即将使用前溶解或悬浮在无菌可注射介质中。它们可以含有例如本领域中已知的悬浮剂或分散剂。适用于肠胃外施用的制剂组分包括无菌稀释剂诸如注射用水、生理盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗细菌剂诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂诸如EDTA;缓冲液诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;和张力调节剂诸如氯化钠或葡萄糖。

[0147] 对于静脉内施用而言,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、克列莫佛(Cremophor)ELTM(BASF,Parsippany,NJ)或磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)。所述载体在制造和存储条件下应当是稳定的,并且应当经过防腐以免受微生物影响。所述载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)以及它们的合适的混合物的溶剂或分散介质。

[0148] 本文所提供的组合物可以单独或与其他合适的组分组合而制成气雾剂制剂(即,“喷雾”)以便经由吸入施用。气雾剂制剂可以放入加压可接受的推进剂诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等等中。

[0149] 本文所描述的任何发明药物组合物(和/或其他剂)可以通过控制释放或持续释放手段或通过本领域普通技术人员众所周知的递送装置施用。实例包括但不限于美国专利号3,845,770、3,916,899、3,536,809、3,598,123、4,008,719、5,674,533、5,059,595、5,591,767、5,120,548、5,073,543、5,639,476、5,354,556和5,733,556中所描述的那些,各美国专利以引用的方式整体并入本文。此类剂型可用于使用例如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、其他聚合物基质、凝胶、渗透膜、渗透系统、多层涂层、微粒、脂质体、微球体或它们的组合提供一种或多种活性成分的控制释放或持续释放,从而在变化的比例下提供所期望的释放分布。可以容易地选择本领域技术人员已知的合适的控制释放或持续释放制剂,包括本文所描述的那些,以便与本文所描述的剂的活性成分一起使用。本发明因此提供了适合口服施用的单个单位剂型,诸如但不限于适合于控制释放或持续释放的片剂、胶囊剂、囊形片和胶囊片。

[0150] 可以通过各种条件包括但不限于pH值变化、温度变化来刺激、通过适当的光的波长、酶的浓度或可用性、水的浓度或可用性或者其他生理条件或化合物来刺激活性成分的控制释放或持续释放。

[0151] 在另一个实施方案中,控制释放系统可以放在欲治疗的目标区域的附近,因此仅需要全身剂量的一部分(参见例如Goodson,Medical Applications of Controlled Release,同上,第2卷,第115-138页(1984))。可以使用Langer,1990,Science 249:1527-1533)的综述中讨论的其他控制释放系统。

[0152] 药物制剂优选地是无菌的。可以例如通过经无菌过滤膜过滤来实现灭菌。在组合物被冻干的情况下,可以在冻干和复水之前或之后进行过滤灭菌。

[0153] 应当了解,根据本发明施用的本文所描述的嵌合蛋白的实际剂量将根据具体剂型和施用模式而变化。本领域技术人员可以考虑能调节嵌合蛋白的作用的许多因素(例如体重、性别、饮食、施用时间、施用途径、排泄速率、受试者的状况、药物组合、遗传倾向和反应敏感性)。可以连续地或者以最大耐受剂量内的一个或多个离散剂量进行施用。本领域技术人员可以使用常规剂量施用测试来确定给定条件组的最佳施用速率。

[0154] 在一些实施方案中,本文所描述的嵌合蛋白的合适的剂量在约0.01μg/kg至约

100mg/kg受试者体重、约0.01μg/kg至约10mg/kg受试者体重、或约0.01μg/kg至约1mg/kg受试者体重的范围内，例如约0.01μg/kg、约0.02μg/kg、约0.03μg/kg、约0.04μg/kg、约0.05μg/kg、约0.06μg/kg、约0.07μg/kg、约0.08μg/kg、约0.09μg/kg、约0.1mg/kg、约0.2mg/kg、约0.3mg/kg、约0.4mg/kg、约0.5mg/kg、约0.6mg/kg、约0.7mg/kg、约0.8mg/kg、约0.9mg/kg、约1mg/kg、约1.1mg/kg、约1.2mg/kg、约1.3mg/kg、约1.4mg/kg、约1.5mg/kg、约1.6mg/kg、约1.7mg/kg、约1.8mg/kg、1.9mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg、约8mg/kg、约9mg/kg、约10mg/kg体重、或约100mg/kg体重，包括所有值和介于这些值之间的范围。

[0155] 所述嵌合蛋白的个别剂量可以呈含有例如每个单位剂型约1μg至约100mg、约1μg至约90mg、约1μg至约80mg、约1μg至约70mg、约1μg至约60mg、约1μg至约50mg、约1μg至约40mg、约1μg至约30mg、约1μg至约20mg、约1μg至约10mg、约1μg至约5mg、约1μg至约3mg、约1μg至约1mg或每个单位剂型约1μg至约50μg的单位剂型(例如片剂、胶囊剂或液体制剂)的形式施用。举例来说，单位剂型可以是约1μg、约2μg、约3μg、约4μg、约5μg、约6μg、约7μg、约8μg、约9μg、约10μg、约11μg、约12μg、约13μg、约14μg、约15μg、约16μg、约17μg、约18μg、约19μg、约20μg、约21μg、约22μg、约23μg、约24μg、约25μg、约26μg、约27μg、约28μg、约29、约30μg、约35μg、约40μg、约45μg、约50μg、约60μg、约70μg、约80μg、约90μg、约0.1mg、约0.2mg、约0.3mg、约0.4mg、约0.5mg、约0.6mg、约0.7mg、约0.8mg、约0.9mg、约1mg、约2mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg或约100mg，包括所有值和介于这些值之间的范围。

[0156] 在一个实施方案中，所述嵌合蛋白是以每天约1μg至约100mg、每天约1μg至约90mg、每天约1μg至约80mg、每天约1μg至约70mg、每天约1μg至约60mg、每天约1μg至约50mg、每天约1μg至约40mg、每天约1μg至约30mg、每天约1μg至约20mg、每天约01μg至约10mg、每天约1μg至约5mg、每天约1μg至约3mg或每天约1μg至约1mg的量施用。在各个实施方案中，所述嵌合蛋白是以如下每日剂量施用:约1μg、约2μg、约3μg、约4μg、约5μg、约6μg、约7μg、约8μg、约9μg、约10μg、约11μg、约12μg、约13μg、约14μg、约15μg、约16μg、约17μg、约18μg、约19μg、约20μg、约21μg、约22μg、约23μg、约24μg、约25μg、约26μg、约27μg、约28μg、约29、约30μg、约35μg、约40μg、约45μg、约50μg、约60μg、约70μg、约80μg、约90μg、约0.1mg、约0.2mg、约0.3mg、约0.4mg、约0.5mg、约0.6mg、约0.7mg、约0.8mg、约0.9mg、约1mg、约2mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg或约100mg，包括所有值和介于这些值之间的范围。

[0157] 根据本发明的某些实施方案，包含所述嵌合蛋白的药物组合物可以施用例如每天超过一次(例如每天约两次、约三次、约四次、约五次、约六次、约七次、约八次、约九次或约十次)、约每天一次、约每隔一天一次、约每第三天一次、约一周一次、约每两周一次、约每个月一次、约每两个月一次、约每三个月一次、约每六个月一次或约每年一次。在一个实施方案中，包含嵌合蛋白的药物组合物每周施用约三次。

[0158] 在各个实施方案中，本发明的嵌合蛋白可长期施用。举例来说，所述嵌合蛋白可以如本文所描述施用至少约1周、至少约2周、至少约3周、至少约4周、至少约5周、至少约6周、

至少约7周、至少约8周、至少约9周、至少约10周、至少约11周或至少约12周。举例来说，所述嵌合蛋白可以施用12周、24周、36周或48周。在一些实施方案中，所述嵌合蛋白施用至少约1个月、至少约2个月、至少约3个月、至少约4个月、至少约5个月、至少约6个月、至少约7个月、至少约8个月、至少约9个月、至少约10个月、至少约11个月或至少约12个月。在一些实施方案中，所述嵌合蛋白可以施用至少约1年、至少约2年、至少约3年、至少约4年或至少约5年。

[0159] 在各个实施方案中，将本发明的药物组合物与一种或多种另外的治疗剂联合共同施用。共同施用可以同时或依序进行。

[0160] 在一个实施方案中，将所述其他治疗剂和本发明的嵌合蛋白同时施用至受试者。如本文所使用，术语“同时”意指所述其他治疗剂和所述嵌合蛋白的施用时间间隔不超过约60分钟，诸如不超过约30分钟、不超过约20分钟、不超过约10分钟、不超过约5分钟或不超过约1分钟。所述其他治疗剂和所述嵌合蛋白的施用可以通过同时施用单一制剂(例如包含所述其他治疗剂和所述嵌合蛋白的制剂)或独立的制剂(例如包括所述其他治疗剂的第一制剂和包括所述嵌合蛋白的第二制剂)来进行。

[0161] 共同施用不需要同时施用各治疗剂，只要其施用时程使得所述其他治疗剂和嵌合蛋白的药理学活性在时间上重叠，由此发挥组合治疗作用即可。举例来说，所述其他治疗剂和所述嵌合蛋白可以依序施用。如本文所使用，术语“依序”意指所述其他治疗剂和所述嵌合蛋白的施用时间间隔超过约60分钟。举例来说，依序施用所述其他治疗剂与所述嵌合蛋白之间的时间可以间隔超过约60分钟、超过约2小时、超过约5小时、超过约10小时、超过约1天、超过约2天、超过约3天、超过约1周、间隔超过约2周或间隔超过约一个月。最佳的施用时间将取决于代谢速率、排泄速率和/或所施用的其他治疗剂和嵌合蛋白的药物动力学活性。可以先施用所述其他治疗剂或嵌合蛋白细胞。

[0162] 共同施用也不需要通过相同施用途径向受试者施用所述治疗剂。实际上，各治疗剂可以通过任何适当的途径，例如经肠胃外或非肠胃外施用。

[0163] 在一些实施方案中，本文所描述的嵌合蛋白当与另一种治疗剂共同施用时协同起作用。在此类实施方案中，所述嵌合蛋白和其他治疗剂的施用剂量可以低于当各剂用于单一疗法情形时所采用的剂量。

[0164] 在一些实施方案中，本发明有关于化学治疗剂作为其他治疗剂。举例来说但不限于，本发明的嵌合蛋白与化学治疗剂的这种组合可用于治疗癌症，如本文中其他部分所描述。化学治疗剂的实例包括但不限于烷化剂，诸如噻替派(thiotepa)和CYTOXAN环磷酰胺；烷基磺酸酯，诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶，诸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa)；乙烯亚胺和甲基蜜胺，包括六甲蜜胺(altretamine)、曲他胺(triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine)；多聚乙酰(acetogenin)(例如布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone))；喜树碱(camptothecin)(包括合成类似物拓扑替康(topotecan))；苔藓抑素(bryostatin)；海绵抑素(cally statin)；CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物)；念珠藻环肽(cryptophycin)(例如，念珠藻环肽1和念珠藻环肽8)；海兔抑素(dolastatin)；倍癌霉素(duocarmycin)(包括合成类似物，KW-2189和CB 1-TM1)；伊斯罗宾(eleutherobin)；水鬼蕉

碱(pancratistatin)；匍枝珊瑚醇(sarcodictyin)；海绵抑素(spongistatin)；氮芥，诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、氮芥氧化物盐酸盐(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、乌拉莫司汀(uracil mustard)；亚硝基脲，诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫斯汀(ranimnustine)；抗生素，诸如烯二炔类抗生素(例如卡利奇霉素(calicheamicin)，尤其是卡利奇霉素γ1和卡利奇霉素ω1(参见例如Agnew，Chem.Intl.Ed.Engl.,33:183-186(1994)))；达内霉素(dynemicin)，包括达内霉素A；双膦酸盐，诸如氯屈膦酸盐(clodronate)；埃斯波霉素(esperamicin)；以及新制癌菌素发色团(neocarzinostatin chromophore)和相关色素蛋白烯二炔类抗生素发色团、阿克拉霉素(aclacinomysin)、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C(cactinomycin)、卡拉比星(carabicin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN多柔比星(doxorubicin)(包括吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素类(mitomycins)诸如丝裂霉素C、霉芬酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泼非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、奎那霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代谢物，诸如甲氨蝶呤(methotrexate)和5-氟尿嘧啶(5-FU)；叶酸类似物，诸如迪诺特宁(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、曲美沙特(trimetrexate)；嘌呤类似物，诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、噻咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤；嘧啶类似物，诸如环胞苷(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮杂尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、脱氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)；雄激素，诸如卡芦睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone)；抗肾上腺药，诸如氨鲁米特(minoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；叶酸补充剂，诸如亚叶酸(frolinic acid)；醋葡醛内酯(aceglatone)；醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid)；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吖啶(amsacrine)；贝斯布西(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；依达曲沙(edatraxate)；秋水仙胺(demecolcine)；地吖醌(diaziquone)；依洛尼塞(elformithine)；依利醋铵(elliptinium acetate)；埃博霉素(epothilone)；依托格鲁(etoglucid)；硝酸镓；羟基脲；蘑菇多糖(lentinan)；氯尼达明(lonidainine)；类美登素(maytansinoid)，诸如美登素(maytansine)和安丝菌素

(ansamitocins)；米托胍腙(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫哌达醇(mopidanmol)；二胺硝吖啶(nitraerine)；喷司他汀(pentostatin)；蛋氨氮芥(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；2-乙基酰肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,Oreg.)；雷佐生(razoxane)；根霉素(rhizoxin)；西佐喃(sizofuran)；锗螺胺(spirogermanium)；替奴佐酸(tenuazonic acid)；三亚胺醌(triaziquone)；2,2',2″-三氯三乙胺；单端孢霉烯(trichothecenes)(例如T-2毒素、粘液霉素A(verracurin A)、杆孢菌素A(roridin A)和蛇形菌素(anguidine))；乌拉坦(urethan)；长春地辛(vindesine)；达卡巴嗪(dacarbazine)；甘露氮芥(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴卫矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；加西托星(gacytosine)；阿糖胞苷(arabinoside)(“Ara-C”)；环磷酰胺；噻替派；类紫杉醇(taxoid)，例如TAXOL太平洋紫杉醇(paclitaxel)(Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)、ABRAXANE太平洋紫杉醇的不含聚氧乙烯化蓖麻油(Cremophor)的经白蛋白工程化的纳米粒子制剂(American Pharmaceutical Partners,Schaumberg,111.)以及TAXOTERE多西他赛(doxetaxel)(Rhone-Poulenc Rorer,Antony,France)；苯丁酸氮芥；GEMZAR吉西他滨(gemcitabine)；6-硫鸟嘌呤；巯基嘌呤；甲氨蝶呤；铂类似物，诸如顺铂(cisplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)和卡铂(carboplatin)；长春碱(vinblastine)；铂；依托泊苷(etoposide)(VP-16)；异环磷酰胺；米托蒽醌；长春新碱(vincristine)；NAVELBINE.长春瑞滨(vinorelbine)；诺消灵(novantrone)；替尼泊苷(teniposide)；依达曲沙(edatrexate)；柔红霉素(daunomycin)；氨基蝶呤(aminopterin)；希罗达(xeloda)；伊班膦酸盐(ibandronate)；伊立替康(irinotecan)(Camptosar、CPT-11)(包括伊立替康与5-FU的治疗方案和亚叶酸(leucovorin))；拓扑异构酶抑制剂RFS 2000；二氟甲基鸟氨酸(DMFO)；类视黄素(retinoid)，诸如视黄酸(retinoic acid)；卡培他滨(capecitabine)；康普瑞汀(combretastatin)；亚叶酸(LV)；奥沙利铂(oxaliplatin)，包括奥沙利铂治疗方案(FOLFOX)；拉帕替尼(lapatinib)(Tykerb)；减少细胞增殖的PKC-α、Raf、H-Ras、EGFR的抑制剂(例如埃罗替尼(erlotinib)(Tarceva))和VEGF-A的抑制剂；以及以上任一者的药学上可接受的盐、酸或衍生物。另外，所述治疗方法还可以包括使用辐射。另外，所述治疗方法还可以包括使用光动力疗法。

[0165] 在一些实施方案中，本文所描述的嵌合蛋白包括经过修饰的衍生物，即通过将任何类型的分子共价附接至该组合物以使得共价附接不会妨碍该组合物的活性。举例来说但不限于，衍生物包括通过特别是糖基化、脂化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、利用已知的保护基团/阻断基团衍生化、蛋白水解裂解、连接至细胞配体或其他蛋白质等进行修饰的组合物。可以利用已知技术，包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等进行众多化学修饰中的任一种。

[0166] 在其他实施方案中，本文所描述的嵌合蛋白还包含细胞毒性剂，在说明性实施方案中，所述细胞毒性剂包含毒素、化疗剂、放射性同位素以及引起细胞凋亡或细胞死亡的剂。此类剂可以与本文所描述的组合物缀合。

[0167] 因此，本文所描述的嵌合蛋白可以经历翻译后修饰以添加效应子部分，诸如化学接头；可检测部分，诸如荧光染料、酶、底物、生物发光材料、放射性材料和化学发光部分；或功能性部分，诸如链霉亲合素、抗生物素蛋白、生物素、细胞毒素、细胞毒性剂和放射性材

料。

[0168] 说明性细胞毒性剂包括但不限于甲氨蝶呤、氨基蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪;烷化剂,诸如氮芥、噻替派、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、丝裂霉素C、洛莫司汀(CCNU)、1-甲基亚硝基脲、环磷酰胺、氮芥、白消安、二溴甘露醇、链佐星、丝裂霉素C、顺-二氯二胺铂(II)(DDP)、顺铂和卡铂(伯尔定);蒽环霉素,包括柔红霉素(先前的道诺霉素)、多柔比星(阿霉素)、地托比星、卡米诺霉素、伊达比星、表柔比星、米托蒽醌和比生群;抗生素,包括放线菌素D(dactinomycin/actinomycin D)、博来霉素、刺孢霉素、光辉霉素和安曲霉素(AMC);以及抗有丝分裂剂,诸如长春生物碱类(vinca alkaloid)、长春新碱(vincristine)和长春花碱(vinblastine)。其他细胞毒性剂包括太平洋紫杉醇(紫杉醇)、蓖麻毒素、假单胞菌外毒素、吉西他滨、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴乙锭、依米丁(emetine)、依托泊苷、替尼泊苷、秋水仙素、二羟基蒽二酮、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、丙卡巴肼、羟基脲、天冬酰胺酶、皮质类固醇、米托坦(O,P'-(DDD))、干扰素,以及这些细胞毒性剂的混合物。

[0169] 其他细胞毒性剂包括但不限于化疗剂,诸如卡铂、顺铂、太平洋紫杉醇、吉西他滨、刺孢霉素、多柔比星、5-氟尿嘧啶、丝裂霉素C、放线菌素D、环磷酰胺、长春新碱、博来霉素、VEGF拮抗剂、EGFR拮抗剂、铂、紫杉醇、伊立替康、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、亚叶酸、类固醇、环磷酰胺、美法仑、长春生物碱类(例如长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨)、莫司汀类、酪氨酸激酶抑制剂、放射疗法、性激素拮抗剂、选择性雄激素受体调节剂、选择性雌激素受体调节剂、PDGF拮抗剂、TNF拮抗剂、IL-1拮抗剂、白介素(例如IL-12或IL-2)、IL-12R拮抗剂、毒素缀合的单克隆抗体、肿瘤抗原特异性单克隆抗体、爱必妥(Erbitux)、阿瓦斯丁(Avastin)、帕妥珠单抗(Pertuzumab)、抗CD20抗体、美罗华(Rituxan)、奥瑞珠单抗、奥法木单抗、DXL625、HERCEPTIN®或它们的任何组合。来自植物和细菌的有毒酶,诸如蓖麻毒素、白喉毒素和假单胞菌毒素可以与这些治疗剂(例如抗体)缀合以产生细胞类型特异性杀伤试剂(Youle等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 77:5483(1980);Gilliland等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 77:4539(1980);Krolick等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 77:5419(1980))。

[0170] 其他细胞毒性剂包括如Goldenberg在美国专利号6,653,104中所描述的细胞毒性核糖核酸酶。本发明的实施方案还涉及放射免疫缀合物,其中在使用或不使用复合物形成剂的情况下,发射α或β粒子的放射性核种稳定偶合至嵌合蛋白。此类放射性核素包括β-发射体,诸如磷-32、钪-47、铜-67、镓-67、钇-88、钇-90、碘-125、碘-131、钐-153、镥-177、铼-186或铼-188;以及α发射体,诸如砹-211、铅-212、铋-212、铋-213或锕-225。

[0171] 说明性可检测部分还包括但不限于辣根过氧化物酶、乙酰胆碱酯酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶和荧光素酶。其他说明性荧光材料包括但不限于罗丹明、荧光素、异硫氰酸荧光素、伞形酮、二氯三嗪基胺、藻红蛋白和丹磺酰氯。其他说明性化学发光部分包括但不限于鲁米诺。其他说明性生物发光材料包括但不限于荧光素和水母发光蛋白。其他说明性放射性材料包括但不限于碘-125、碳-14、硫-35、氚和磷-32。

[0172] 在一些实施方案中,包括但不限于自身免疫应用的一些实施方案中,其他治疗剂是免疫阻抑剂,所述免疫阻抑剂是消炎剂,诸如类固醇类消炎剂或非类固醇类消炎剂(NSAID)。类固醇,特别是肾上腺皮质类固醇及其合成类似物在本领域中是众所周知的。可

用于本发明中的皮质类固醇的实例包括但不限于羟基曲安西龙(hydroxyltriamcinolone)、α-甲基地塞米松(alpha-methyldexamethasone)、β-甲基地塞米松、二丙酸倍氯米松(beclomethasone dipropionate)、苯甲酸倍他米松(betamethasone benzoate)、二丙酸倍他米松、戊酸倍他米松、戊酸氯倍他索(clobetasol valerate)、地奈德(desonide)、去羟米松(desoxymethasone)、地塞米松(dexamethasone)、二乙酸二氟拉松(diflorasone diacetate)、戊酸二氟可龙(diflucortolone valerate)、氟氢缩松(fluadrenolone)、氟氯奈德(fluclorolone acetonide)、特戊酸氟美松(flumethasone pivalate)、氟轻松(fluosinolone acetonide)、醋酸氟轻松(fluocinonide)、氟可丁酯(flucortine butylester)、氟可龙(fluocortolone)、醋酸氟泼尼定(fluprednidene/fluprednylidene)、氟氢缩松(flurandrenolone)、哈西奈德(halcinonide)、醋酸氢化可的松(hydrocortisone acetate)、丁酸氢化可的松(hydrocortisone butyrate)、甲泼尼龙(methylprednisolone)、曲安奈德(triamcinolone acetonide)、可的松(cortisone)、可托多松(cortodoxone)、醋酸氟轻松、氟氢可的松(fludrocortisone)、二醋酸二氟拉松(difluorosonediacetate)、丙酮化氟雄诺龙(fluradrenolone acetonide)、甲羟松(medrysone)、安西缩松(amcinafel)、安西非特(amcinafide)、倍他米松及其相应酯、氯泼尼松(chloroprednisone)、氯可托龙(clocortelone)、克西诺龙(clescinolone)、二氯松(dichlorisone)、二氟泼尼酯(difluprednate)、氟氯奈德(flucloronide)、氟尼缩松(flunisolide)、氟米龙(fluoromethalone)、氟培龙(fluperolone)、氟泼尼龙(fluprednisolone)、氢化可的松(hydrocortisone)、甲泼尼松(meprednisone)、帕拉米松(paramethasone)、泼尼松龙(prednisolone)、泼尼松(prednisone)、二丙酸倍他米松。可以用于本发明中的(NSAID)包括但不限于水杨酸、乙酰水杨酸、水杨酸甲酯、乙二醇水杨酸酯、水杨酰胺、苯甲基-2,5-二乙酰氧基苯甲酸、布洛芬(ibuprofen)、舒林酸(fulindac)、萘普生(naproxen)、酮洛芬(ketoprofen)、依托芬那酯(etofenamate)、保泰松(phenylbutazone)和吲哚美辛(indomethacin)。在一些实施方案中,所述免疫阻抑剂可以是细胞抑制剂,诸如烷化剂、抗代谢物(例如硫唑嘌呤、甲氨蝶呤)、细胞毒性抗生素、抗体(例如巴利昔单抗(basiliximab)、达克珠单抗(daclizumab)和莫罗单抗(muromonab))、抗免疫亲和素(anti-immunophilin)(例如环孢素(cyclosporine)、他克莫司(tacrolimus)、西罗莫司(sirolimus))、干扰素、阿片类、TNF结合蛋白、霉酚酸酯以及小生物剂(例如芬戈莫德、多球壳素(myriocin))。其他消炎剂描述于例如美国专利号4,537,776中,所述文献的完整内容特此以引用方式并入。

[0173] 在一些实施方案中,所述嵌合蛋白与本文所描述的一种或多种疾病修饰疗法(DMT)(例如,表A的剂)组合用于治疗多发性硬化的方法中。在一些实施方案中,本发明提供了与使用本文所描述的一种或多种DMT(例如,下表A中列出的剂)而不使用一种或多种所公开的结合剂相比有所改善的治疗效果。在一个实施方案中,所述嵌合蛋白与所述一种或多种DMT的组合产生了协同治疗效果。

[0174] 说明性疾病修饰疗法包括但不限于:

[0175]

表 A		
通用名称	**商标名称/公司**	**频率/递送途径/常用剂量**
特立氟胺	AUBAGIO (GENZYME)	每天; 口服丸剂; 7 mg 或 14 mg.

[0176]

表 A		
通用名称	**商标名称/公司**	**频率/递送途径/常用剂量**
干扰素 β-1a	AVONEX (BIOGEN IDEC)	每周一次；肌肉内(向肌肉中)注射；30 mcg
干扰素 β-1b	BETASERON (BAYER HEALTHCARE PHARMACEUTICALS, INC.)	每隔一天；皮下(皮肤下)注射；250 mcg.
醋酸格拉替雷	COPAXONE (TEVA NEUROSCIENCE)	每天；皮下(皮肤下)注射；20 mg (20,000 mcg)或者每周三次；皮下(皮肤下)注射；40 mg (40,000 mcg)
干扰素 β-1b	EXTAVIA (NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.)	每隔一天；皮下(皮肤下)注射；250 mcg.
芬戈莫德	GILENYA (NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.)	每天；口服胶囊；0.5 mg.
阿仑单抗(抗 CD52 单克隆抗体)	LEMTRADA (GENZYME)	静脉内输液连续五天，然后在一年后静脉内输液连续三天(12 mg)
米托蒽醌	NOVANTRONE (EMD SERONO)	一年四次在医疗机构中静脉内输液。终生累积剂量界限是 2-3 年内大约 8-12 个剂量(140 mg/m2)。
聚乙二醇化干扰素 β-1a	PLEGRIDY (BIOGEN IDEC)	每 14 天；皮下(皮肤下)注射；125 mcg
干扰素 β-1a	REBIF (EMD SERONO, INC.)	每周三次；皮下(皮肤下)注射；44 mcg
富马酸二甲酯(BG-12)	TECFIDERA (BIOGEN IDEC)	每天两次；口服胶囊；120 mg 持续一周，此后 240 mg
那他珠单抗(人源化单克隆抗体 VLA-4 拮抗剂)	TYSABRI (BIOGEN IDEC)	在注册的输液机构中每四周静脉内输液一次；300 mg
开发中的 DMT		
阿米洛利(靶向酸敏感离子通道 1 上皮钠通道 Na+/H+交换剂)	PAR PHARMACEUTICAL, PERRIGO COMPANY, SIGMAPHARM LABORATORIES	口服
ATX-MS-1467 (使 II 类主要组织相容性复合体 T 细胞应答靶向髓鞘碱性蛋白)	APITOPE / MERCK SERONO	皮内皮下
BAF312 (靶向鞘氨醇 1-磷酸盐(S1P)受体亚型 S1P1 和 S1P5 B 细胞分布 T 细胞分布)	NOVARTIS PHARMA	口服
BGC20-0134 (靶向促炎性和抗炎性细胞因子)	BTG PLC	口服
BIIB033 (靶向 LINGO-1 ("含有富亮氨酸重复序列和免疫球蛋白样结构域的 Nogo 受体相互作用	BIOGEN	第 I 期和第 II 期试验使用静脉内输液，第 I 期试验使用皮下注射

[0177]

表 A		
通用名称	**商标名称/公司**	**频率/递送途径/常用剂量**
蛋白"))		
克拉屈滨(靶向 CD4+ T 细胞 DNA 合成和修复 E-选择素细胞内粘附分子 1 促炎性细胞因子白介素 2 和白介素 2R 促炎性细胞因子白介素 8 和 RANTES 细胞因子分泌单核细胞和淋巴细胞移动)	MERCK SERONO	口服
环磷酰胺(靶向 T 细胞，特别是 CD4+辅助 T 细胞 B 细胞)	BAXTER HEALTHCARE CORPORATION	口服，每个月一次静脉内冲击
达克珠单抗(靶向 T 细胞的 CD25 免疫调节剂的人源化单克隆抗体)	BIOGEN IDEC/ABBVIE BIOTHERAPEUTICS	计划每个月一次肌肉内注射
达氟吡啶(靶向电压门控钾通道退化蛋白/含有亚单位 Cavβ3 的上皮钠通道 L 型钙通道)	ACORDA THERAPEUTICS / BIOGEN IDEC	每 12 小时一片(延长释放)，每天两次 10 mg
屈大麻酚(靶向大麻素受体 CB1 大麻素受体 CB2)	ABBVIE INC.	口服
非拉司特(靶向 α4β1 整合素)	GLAXOSMITHKLINE	口服
GNbAC1MSRV-Env (靶向 MS 相关逆转录病毒的包膜蛋白)	GENEURO SA / SERVIER	静脉内输液
艾地苯醌(靶向反应性氧物质)	SANTHERA PHARMACEUTICALS	PPMS 的临床试验中的口服剂量是每天 2250 mg (750 mg 剂量，每天三次)
Imilecleucel-T (靶向髓磷脂特异性自身反应性 T 细胞)	OPEXA THERAPEUTICS / MERCK SERONO	根据得自制造商的信息，每年皮下给药 5 次
拉喹莫德	TEVA	预计每天服用 0.6 mg 或 1.2 mg 口服片剂
马赛替尼(靶向 KIT (干细胞因子，也称为 c-KIT)受体以及选择其他酪氨酸激酶肥大细胞)	AB SCIENCE	口服
MEDI-551 (靶向 CD19，即 B 细胞特异性抗原，它是 B 细胞受体复合物的一部分并且功能在于决定 B	MEDIMMUNE	静脉内皮下

[0178]

表 A		
通用名称	**商标名称/公司**	**频率/递送途径/常用剂量**
细胞激活的阈值;B 细胞;浆母细胞;表达 CD19(但不表达 CD20)并且分泌大量抗体的 B 细胞;浆母细胞的耗竭可用于涉及病原性自身抗体的自身免疫性疾病)		
米诺环素(靶向 T 细胞、小胶质细胞、白细胞移动基质金属蛋白酶)	各不相同	可作为微粒填充胶囊和口服悬浮液口服
MIS416 (靶向先天免疫系统,先天免疫系统的病原体相关分子模式识别受体、先天免疫系统的骨髓细胞,可能能够重建 SPMS 中发生的失调的免疫系统活性)	INNATE IMMUNOTHERAPEUTICS	静脉内
霉酚酸酯(靶向嘌呤合成)	由 GENENTECH 制造	口服
纳曲酮(靶向阿片受体 Toll 样受体 4)	各不相同	以低剂量(每天 3 至 4.5 mg)呈口服形式“低剂量纳曲酮”(或“LDN”)给药
奥瑞珠单抗和奥法木单抗(靶向 CD20 B 细胞阻抑的人源化单克隆抗体	ROCHE / GSK	计划静脉内输液
ONO-4641 (靶向鞘氨醇 1-磷酸盐受体)	ONO PHARMACEUTICAL CO.	口服
苯妥英(靶向钠通道)	PFIZER	静脉内肌肉内(不太受欢迎的选项)口服
芬奈莫德(Ponesimod)	ACTELION	有待确定
雷特格韦(靶向逆转录病毒整合酶疱疹病毒 DNA 包封末端酶)	MERCK	根据得自制造商的信息,每天两次口服 400 mg 片剂
RHB-104	REDHILL BIOPHARMA LIMITED	95 mg 克拉霉素,45 mg 利福布丁和 10 mg 氯法齐明
利鲁唑(靶向谷氨酸能神经传递谷氨酸摄取和释放电压门控钠通道蛋白激酶 C)	COVIS PHARMA / SANOFI	口服

[0179] 本发明还提供了用于施用本文所描述的任何剂(例如具有或没有各种其他治疗剂的嵌合蛋白)的药盒。所述药盒是包括至少一种本文所描述的本发明药物组合物在内的材料或组分的组合体。因此,在一些实施方案中,所述药盒含有至少一种本文所描述的药物组合物。

[0180] 配置在药盒中的组分的确切特性取决于其预定目的。在一个实施方案中,所述药盒被配置用于治疗人受试者的目的。

[0181] 在所述药盒中可以包括使用说明书。使用说明书典型地包括有形表示，其描述了使用所述药盒的组分实现所期望的结果，诸如治疗癌症时将要采用的技术。任选地，所述药盒还含有本领域技术人员容易了解的其他有用组分，诸如稀释剂、缓冲剂、药学上可接受的载体、注射器、导管、敷涂器、吸移工具或测量工具、包扎材料或其他有用的附件。

[0182] 装配在药盒中的材料和组分可以提供给从业人员，以保持其可操作性和效用的任何便利且适合的方式储存。举例来说，这些组分可以在室温、冷藏温度或冷冻温度下提供。这些组分典型地包含在合适的包装材料中。在各个实施方案中，包装材料是由众所周知的方法构造，优选地以提供无菌、无污染的环境。包装材料可以具有指示所述药盒和/或其组分的内含物和/或目的的外部标签。

[0183] 定义

[0184] 如本文所使用，“一个/一种(a/an)”或“所述(the)”可以意指一个或多于一个。

[0185] 除非特别说明或从上下文显而易见，否则如本文所使用，术语“或”被理解为包含性的并且涵盖“或”与“和”两者。

[0186] 此外，术语“约”当与引用的数值指示结合使用时意指所引用的数值指示加或减所述引用的数值指示的至多10％，例如在(加或减)所述值的10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％、1％、0.5％、0.1％、0.05％或0.01％之内。举例来说，语言“约50”覆盖45至55的范围。

[0187] “有效量”当与医学用途结合使用时是有效提供目标疾病的发病率的可测量治疗、预防或降低的量。

[0188] 如本文所使用，如果活性和/或效应的读出在剂或刺激物存在下相对于不存在此类调节降低了显著量，诸如降低了至少约10％、至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约97％、至少约98％或更多、多达并且包括至少约100％，那么某性质“降低”。如本领域普通技术人员所理解，在一些实施方案中，活性降低并且一些下游读出将降低但其他下游读出可以增加。

[0189] 相反地，如果活性和/或效应的读出在剂或刺激物存在下相对于不存在此类剂或刺激物增加了显著量，例如增加了至少约10％、至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约97％、至少约98％或更多、多达并且包括至少约100％或更多、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约50倍、至少约100倍，那么活性“增加”。

[0190] 如本文所提及，除非另外规定，否则全部组成百分比都以总组合物的重量计。如本文所使用，词语“包括”及其变化形式旨在是非限制性的，使得在列表中对项目的列举不应排除也可以用于这项技术的组合物和方法中的其他类似项目。类似地，术语“可以(can/may)”及其变化形式旨在是非限制性的，使得一个实施方案可以包含某些要素或特征的列举不排除本发明技术的不含有那些要素或特征的其他实施方案。

[0191] 尽管开放性的术语“包含”作为术语诸如包括、含有或具有的同义词在本文中用以描述和要求本发明，但本发明或其实施方案可以可选地使用替代性术语如“由……组成”或“基本上由……组成”加以描述。

[0192] 如本文所使用，词语“优选的”和“优选地”是指所述技术的在某些情况下提供某些

益处的实施方案。然而，其他实施方案在相同或其他情况下也可以是优选的。此外，列举一个或多个优选实施方案不意指其他实施方案是无用的，并且不打算将其他实施方案从所述技术的范围中排除。

[0193] 用于实现治疗效果所需要的本文所描述的组合物的量可以出于特定目的根据常规程序凭经验确定。一般来说，对于出于治疗目的而施用治疗剂而言，治疗剂是以药理学有效剂量给予。“药理学有效量”、“药理学有效剂量”、“治疗有效量”或“有效量”是指足以产生所期望的生理效应的量或能够实现所期望的结果、特别是用于治疗病症或疾病的量。如本文所使用，有效量将包括足以例如延迟病症或疾病的症状的发展、改变病症或疾病的症状的过程(例如，减缓疾病的症状的进展)、减少或消除病症或疾病的一种或多种症状或表现形式，以及逆转病症或疾病的症状的量。治疗益处还包括中断或减缓潜在疾病或病症的进展，无关于是否实现了改善。

[0194] 有效量、毒性和治疗功效可以通过标准药物程序在细胞培养物或实验动物中测定，例如测定LD50(约50％群体的致死剂量)和ED50(在约50％群体中具有治疗有效性的剂量)。剂量可以取决于所用剂型和所用施用途径而变化。毒性与治疗效果之间的剂量比率是治疗指数并且可以表示为比率LD50/ED50。在一些实施方案中，展现较大治疗指数的组合物和方法是优选的。治疗有效剂量最初可以由体外测定(包括例如细胞培养物测定)加以估算。此外，剂量可以在动物模型中配制以实现包括如在细胞培养物中或在适当动物模型中测定的IC50的循环血浆浓度范围。所描述的组合物在血浆中的含量可以例如通过高效液相色谱法加以测量。任何特定剂量的效应都可以通过合适的生物测定来监测。剂量可以由医师确定并且根据需要调整以适应观察到的治疗效果。

[0195] 在某些实施方案中，效应将引起至少约10％、至少约20％、至少约30％、至少约50％、至少约70％或至少约90％的可定量变化。在一些实施方案中，效应将引起约10％、约20％、约30％、约50％、约70％或甚至约90％或更大的可定量变化。治疗益处还包括中断或减缓潜在疾病或病症的进展，无关于是否实现了改善。

[0196] 如本文所使用，“治疗方法”同样适用于组合物用于治疗本文所描述的疾病或病症的用途和/或组合物用于制造用以治疗本文所描述的疾病或病症的药物的一种和/或多种用途。通过以下非限制性实施例进一步说明本发明。

[0197] 实施例

[0198] “AFN”或“AcTaferon”在本文中偶尔用于指代本文所描述的基于干扰素的嵌合蛋白。

[0199] 实施例1:Flt3靶向的AcTaferon体内研究

[0200] 为了评估Flt3靶向的AcTaferon的体内功效，在HEKT细胞中表达Flt3L_接头_人IFNa2(R149A)_GGS_his9融合蛋白，并通过金属亲和色谱法纯化。随后在人源化小鼠的肿瘤模型中评估纯化的蛋白质。简单来说，对新生NSG小鼠(1-2天大)进行100cGy亚致死照射，然后肝内递送10^5个CD34+人干细胞(来自HLA-A2阳性脐带血)。在干细胞转移后第13周，给小鼠皮下接种25.10E5个人RL滤泡性淋巴瘤细胞(ATCC CRL-2261;对IFN的直接抗增殖效应不敏感)。从肿瘤接种后的第8天至第18天，每天用30μg的人Flt3L蛋白腹膜内治疗小鼠。在肿瘤接种后第10天，当可见可触知的肿瘤时，开始每天病灶周注射缓冲液或Flt3L-AFN(30μg)(n＝5或6只小鼠/组)。每天评定肿瘤大小(卡尺测量)、体重和温度。图1中的数据显示直至

最后一次治疗后2天的肿瘤生长，并表明Flt3靶向的AcTaferon强烈阻抑肿瘤生长。体重和温度的数据未显示缓冲液治疗与AFN治疗之间有任何重大差异，这确证AFN治疗具有良好的耐受性。

[0201] 本实施例中使用的成熟Flt3L(粗体)_接头(斜体)_人IFNa2(R149A)(斜体和粗体)GGS_his9序列是：

[0202] **TQDCSFQHSPISSDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELCGGLWRLVLAQRWMERLKTVAGSKMQGLL ERVNTEIHFVTKCAFQPPPSCLRFVQTNISRLLQETSEQLVALKPWITRQNFSRCLELQCQPDSSTLPPPWSPR PLEATAPTA***VDGGSGGSGGSGGSGGSGGSRSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSG GSAAAM CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFS TKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEV VRAEIMASFSLSTNLQESLRSKELE*GGSHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 8)。

[0203] 没有His9的话，该序列是：

[0204] **TQDCSFQHSPISSDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELCGGLWRLVLAQRWMERLKTVAGSKMQGLL ERVNTEIHFVTKCAFQPPPSCLRFVQTNISRLLQETSEQLVALKPWITRQNFSRCLELQCQPDSSTLPPPWSPR PLEATAPTA***VDGGSGGSGGSGGSGGSGGSRSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSG GSAAAM CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFS TKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEV VRAEIMASFSLSTNLQESLRSKELE*GGS (SEQ ID NO: 9)。

[0205] 实施例2:FLT3L-AFN融合形成二聚体

[0206] 将实施例1的Flt3L_接头_人IFNa2(R149A)_GGS_his9融合蛋白重新克隆到pcDNA 3.4载体中用于在CHO细胞中表达，产生质粒P-2373。根据制造商的说明在ExpiCHO细胞(ThermoFisher)中进行生产。转染后七天，收获上清液并通过离心除去细胞。在AKTA pure仪器(GE Healthcare)上的1ml HisTrap Excel柱(GE Healthcare)上纯化蛋白质。将洗脱的蛋白质通过Sephadex G25(5ml柱)脱盐到PBS-H 8.0缓冲液中。最后，使用尺寸排阻色谱法在AKTA上的Superdex 75Increase 10/300柱(GE Healthcare)上在含有123.5mM NaCl的10mM NH_4-乙酸盐pH 5.0缓冲液中进一步分析样品。SEC谱及后续通过SDS-PAGE对峰级分的分析表明，该蛋白质在SEC(图2)中表现为约150kD的蛋白质(即在158kD标记物处洗脱)，在SDS-PAGE中表现为约55kD的蛋白质(图3)。这些数据证实非共价连接的二聚体的形成。此类二聚体在基于VHH的AFN中未见，因此是FLT3L受体结合和信号传导所需的FLT3L二聚化的结果。

序列表

<110> 奥里尼斯生物科学股份有限公司(Orionis Biosciences, Inc.)
根特大学(Universiteit Gent)
弗拉芒区生物技术研究所(VIB VZW)
尼古拉·克雷(Kley, Nikolai)
简·塔威尼尔(Tavernier, Jan)
亚历山大·范·帕雷斯(Van Parys, Alexander)
<120> 基于FMS样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的嵌合蛋白
<130> ORN-062PC_A/114384-5062
<150> US 62/825,579
<151> 2019-03-28
<160> 39
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 235
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 1

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

Ile Thr Arg Gln Asn Phe Ser Arg Cys Leu Glu Leu Gln Cys Gln Pro
145 150 155 160
Asp Ser Ser Thr Leu Pro Pro Pro Trp Ser Pro Arg Pro Leu Glu Ala
165 170 175
Thr Ala Pro Thr Ala Pro Gln Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
180 185 190
Pro Val Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Trp Cys Leu His Trp Gln
195 200 205
Arg Thr Arg Arg Arg Thr Pro Arg Pro Gly Glu Gln Val Pro Pro Val
210 215 220
Pro Ser Pro Gln Asp Leu Leu Leu Val Glu His
225 230 235

<210> 2
<211> 158
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 2

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

<210> 3
<211> 155
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 3

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

<210> 4
<211> 134
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 4

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

35 40 45

Arg Leu Val Leu Ala Gln Arg Trp Met Glu Arg Leu Lys Thr Val Ala
50 55 60

Gly Ser Lys Met Gln Gly Leu Leu Glu Arg Val Asn Thr Glu Ile His
65 70 75 80

Phe Val Thr Lys Cys Ala Phe Gln Pro Pro Pro Ser Cys Leu Arg Phe
85 90 95

Val Gln Thr Asn Ile Ser Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Glu Gln Leu
100 105 110

Val Ala Leu Lys Pro Trp Ile Thr Arg Gln Asn Phe Ser Arg Cys Leu
115 120 125

Glu Leu Gln Cys Gln Pro
130

<210> 5

<211> 129

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 5

Cys Ser Phe Gln His Ser Pro Ile Ser Ser Asp Phe Ala Val Lys Ile
1 5 10 15

Arg Glu Leu Ser Asp Tyr Leu Leu Gln Asp Tyr Pro Val Thr Val Ala
20 25 30

Ser Asn Leu Gln Asp Glu Glu Leu Cys Gly Gly Leu Trp Arg Leu Val
35 40 45

Leu Ala Gln Arg Trp Met Glu Arg Leu Lys Thr Val Ala Gly Ser Lys
50 55 60

Met Gln Gly Leu Leu Glu Arg Val Asn Thr Glu Ile His Phe Val Thr
65 70 75 80

Lys Cys Ala Phe Gln Pro Pro Pro Ser Cys Leu Arg Phe Val Gln Thr
85 90 95

Asn Ile Ser Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Glu Gln Leu Val Ala Leu
100 105 110

Lys Pro Trp Ile Thr Arg Gln Asn Phe Ser Arg Cys Leu Glu Leu Gln
115 120 125

Cys

<210> 6

<211> 165

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 6

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

<210> 7
<211> 164
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 7

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

35 40 45

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

<210> 8
<211> 399
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 8

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

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

<210> 9
<211> 390
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成序列

<400> 9

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

290 295 300

Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile
305 310 315 320
Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile
325 330 335
Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu
340 345 350
Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met
355 360 365
Ala Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys
370 375 380
Glu Leu Glu Gly Gly Ser
385 390

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 10
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 11
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10
<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 12
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 13

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser
20

<210> 14

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 14

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

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 16

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列
<400> 16
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser
35
<210> 17
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 17
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40
<210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 18
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 19
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 20
Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5
<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 21
Glu Ala Ala Ala Lys
1 5
<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 22
Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10
<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 23
Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15
<210> 24
<211> 12
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 24
Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala
1 5 10
<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 25
Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15
Ala
<210> 26
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 26
Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15
Glu Ala Ala Ala Lys Ala
20
<210> 27
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 27
Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15
Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala
20 25
<210> 28

<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 28
Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15
Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala
20 25 30
Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala
35 40 45
<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 29
Pro Ala Pro Ala Pro
1 5
<210> 30
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 30
Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser
1 5 10 15
Leu Asp
<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 31
Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr

1 5 10

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 32

Gly Ser Ala Gly Ser Ala Ala Gly Ser Gly Glu Phe

1 5 10

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 33

Gly Gly Gly Ser Glu

1 5

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 34

Gly Ser Glu Ser Gly

1 5

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 35

Gly Ser Glu Gly Ser

1 5

<210> 36

<211> 35

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 36

Gly Glu Gly Gly Ser Gly Glu Gly Ser Ser Gly Glu Gly Ser Ser Ser
1 5 10 15
Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu
20 25 30
Gly Gly Ser
35

<210> 37
<400> 37
000
<210> 38
<211> 166
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 38

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

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160
Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 39
<211> 153
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 39

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

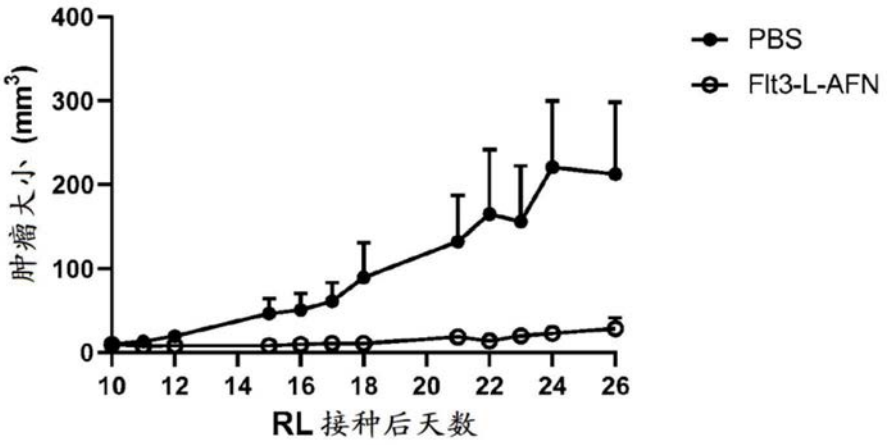

400
300
200
100
0
肿瘤大小 (mm3)
10
12
14
16
18
20
22
24
26
RL 接种后天数
PBS
Flt3-L-AFN

图1

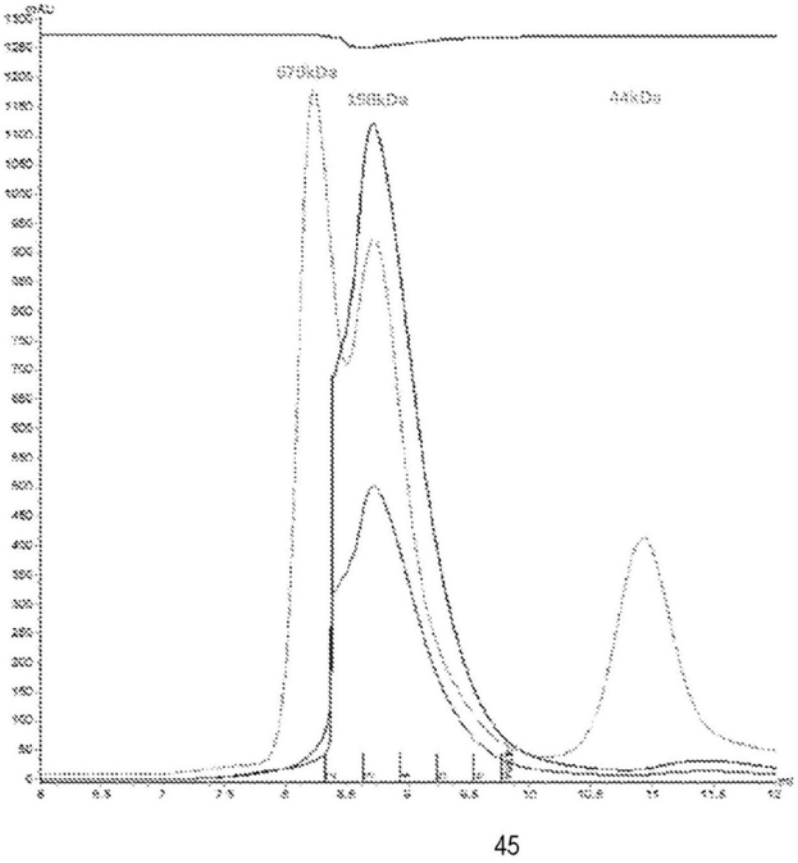

670kDa
158kDa
44kDa
45

图2

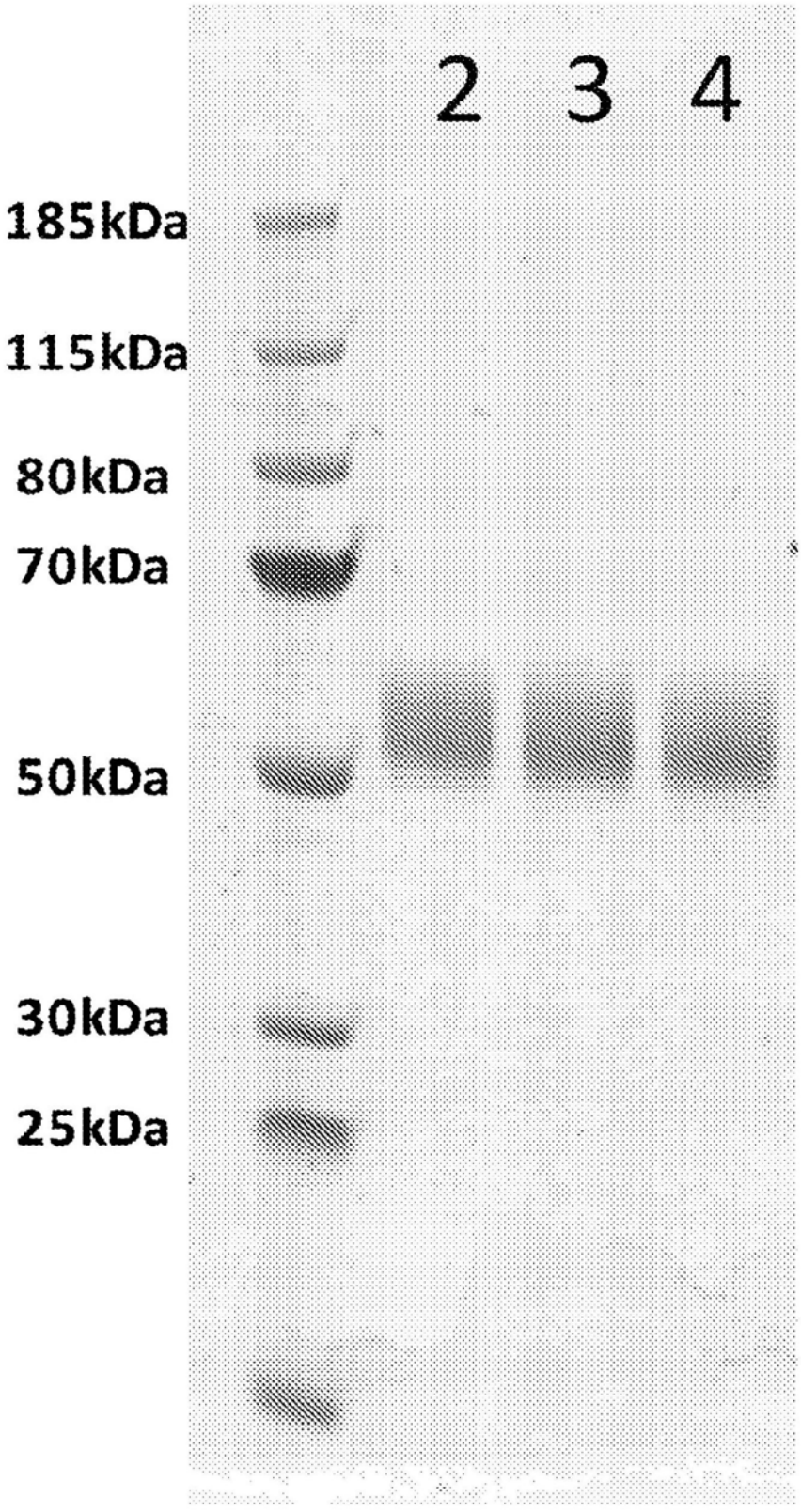


图3