



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110290798 B

(45) 授权公告日 2024. 04. 05

(21) 申请号 201880010430.8

S · 达西瓦

(22) 申请日 2018.02.27

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所

(65) 同一申请的已公布的文献号

11313

申请公布号 CN 110290798 A

专利代理师 刘文娜 郗名悦

(43) 申请公布日 2019.09.27

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 38/00 (2006.01)

62/463,999 2017.02.27 US

C07K 14/705 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 19/00 (2006.01)

2019.08.06

C12N 15/11 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/US2018/020038 2018.02.27

CN 104602707 A, 2015.05.06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/157163 EN 2018.08.30

US 2016159927 A1, 2016.06.09

US 2016250322 A1, 2016.09.01

US 2016256527 A1, 2016.09.08

(73) 专利权人 沙塔克实验室有限公司

审查员 李小晶

地址 美国德克萨斯州

权利要求书4页 说明书39页

(72) 发明人 T · 施赖伯 G · 弗罗姆

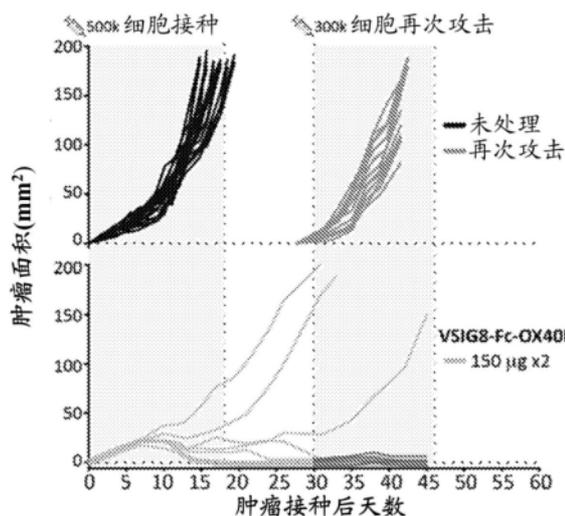
序列表44页 附图18页

(54) 发明名称

基于VSIG8的嵌合蛋白

(57) 摘要

本发明部分涉及包含含有V型和免疫球蛋白结构域的蛋白质8 (VSIG8) 的细胞外结构域的嵌合蛋白及其用于治疗疾病的用途, 诸如针对癌症和/或炎症疾病的免疫疗法。



1. 一种异源嵌合蛋白,其包含一般结构:  
N末端- (a) - (b) - (c) -C末端,  
其中:  
(a) 是第一结构域,其包含能够结合VSIG8配体的含有V型和免疫球蛋白结构域的蛋白质8 (VSIG8) 的细胞外结构域;  
(c) 是第二结构域,其包含能够结合OX40L受体的OX40配体 (OX40L) 的细胞外结构域;以及  
(b) 是接头,其连接所述第一结构域和所述第二结构域,其中接头包含衍生自IgG4的铰链-CH2-CH3 Fc结构域,并且  
接头侧接一个或多个连接接头,所述连接接头独立地选自SEQ ID NO:28至74的氨基酸序列。
2. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述异源嵌合蛋白能够抑制免疫抑制信号。
3. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述异源嵌合蛋白能够:  
(a) 当所述VSIG8的细胞外结构域与其配体结合时减少、破坏或消除免疫抑制信号,并且/或者  
(b) 当所述OX40L的细胞外结构域与其受体结合时增加、刺激或活化免疫刺激信号。
4. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述OX40L受体是OX40。
5. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述异源嵌合蛋白能够同时结合VSIG8配体和所述OX40L受体,其中所述OX40L受体是OX40。
6. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述铰链-CH2-CH3Fc结构域衍生自人IgG4。
7. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述嵌合蛋白由哺乳动物宿主细胞表达为可分泌的和功能性的单一多肽链。
8. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述VSIG8的细胞外结构域包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的氨基酸序列。
9. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述OX40L的细胞外结构域包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的氨基酸序列。
10. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述接头包括包含SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27的氨基酸序列的氨基酸序列。
11. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述接头包含两个或更多个连接接头,每个连接接头独立地选自SEQ ID NO:28至74;其中一个连接接头在所述铰链-CH2-CH3 Fc结构域的N末端,并且另一个连接接头在所述铰链-CH2-CH3 Fc结构域的C末端。
12. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述嵌合蛋白是重组融合蛋白。
13. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述嵌合蛋白增强CD8+T细胞的肿瘤抗原识别。
14. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述嵌合蛋白与OX40激动剂抗体和/或VSIG8拮抗性抗体相比表现出增强的抗肿瘤效果。
15. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述异源嵌合蛋白能够增加CD4+和/或CD8+T细胞亚群或预防CD4+和/或CD8+T细胞亚群的减少。
16. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述异源嵌合蛋白能够增强T细胞的肿瘤

杀伤活性。

17. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述异源嵌合蛋白能够提供持续的免疫调节效果。

18. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述异源嵌合蛋白能够引起抗原呈递细胞的活化。

19. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述异源嵌合蛋白能够增强抗原呈递细胞呈递抗原的能力。

20. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述嵌合蛋白将免疫细胞的比率向有利于能够杀死肿瘤细胞、相反于保护肿瘤细胞偏移。

21. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述嵌合蛋白增加效应T细胞与调节T细胞的比率。

22. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述嵌合蛋白提供免疫抑制信号的持续掩蔽效果。

23. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述嵌合蛋白提供与所述嵌合蛋白的血清 $t_{1/2}$ 相比更长的靶上半衰期( $t_{1/2}$ )。

24. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述嵌合蛋白与用针对VSIG8和OX40的抗体进行的治疗相比降低毒性。

25. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述嵌合蛋白能够在细胞之间形成稳定突触。

26. 如权利要求25所述的异源嵌合蛋白,其中所述细胞之间的稳定突触提供有利于肿瘤减少的空间取向。

27. 如权利要求26所述的异源嵌合蛋白,其中所述空间取向定位T细胞以攻击肿瘤细胞和/或在空间上防止肿瘤细胞递送负信号,包括超出本发明的嵌合蛋白掩蔽的那些信号的负信号。

28. 如权利要求1所述的异源嵌合蛋白,其中所述细胞外结构域中的一者或两者与其各自的结合配偶体的结合以低解离速率(Koff)发生,其提供受体与其配体的长相互作用。

29. 如权利要求28所述的异源嵌合蛋白,其中所述长相互作用递送更长的正信号效果。

30. 如权利要求29所述的异源嵌合蛋白,其中所述更长的正信号效果允许效应细胞被足够地刺激以用于抗肿瘤效果。

31. 如权利要求29所述的异源嵌合蛋白,其中所述长相互作用提供T细胞增殖并允许抗肿瘤攻击。

32. 如权利要求28所述的异源嵌合蛋白,其中所述长相互作用允许足够的信号传递以提供刺激信号的释放。

33. 如权利要求32所述的异源嵌合蛋白,其中所述刺激信号是细胞因子。

34. 一种核酸,其编码如权利要求1至33中任一项所述的异源嵌合蛋白。

35. 一种表达载体,其包含编码如权利要求1至33中任一项所述的异源嵌合蛋白的核酸。

36. 一种宿主细胞,其包含如权利要求35所述的表达载体。

37. 一种药物组合物,其包含治疗有效量的如权利要求1至33中任一项所述的异源嵌合

蛋白或如权利要求34所述的核酸。

38. 异源嵌合蛋白在制造用于治疗有需要的受试者中的癌症或炎性疾病的药物中的用途,其中所述异源嵌合蛋白具有一般结构:

N末端- (a) - (b) - (c) -C末端,

其中:

(a) 是第一结构域,其包含能够结合VSIG8配体的含有V型和免疫球蛋白结构域的蛋白质8 (VSIG8) 的细胞外结构域,

(c) 是第二结构域,其包含能够结合OX40L受体的OX-40配体 (OX40L) 的细胞外结构域,以及

(b) 是接头,其连接所述第一结构域和所述第二结构域,其中接头包含源自IgG4的铰链-CH2-CH3 Fc结构域,并且

接头侧接一个或多个连接接头,所述连接接头独立地选自SEQ ID NO:28至74的氨基酸序列。

39. 如权利要求38所述的用途,其中当与所述异源嵌合蛋白的所述第二结构域结合时,所述受试者的T细胞被活化,并且:

(a) 当与所述异源嵌合蛋白的所述第一结构域结合时,预防一种或多种肿瘤细胞传递免疫抑制信号,

(b) 所述受试者的外周血中的可定量的细胞因子应答被活化,并且/或者

(c) 与用OX40阻断抗体治疗的受试者相比,所述有需要的受试者中的肿瘤生长减少。

40. 如权利要求38或权利要求39所述的用途,其中所述异源嵌合蛋白能够刺激OX40信号传导并活化抗原呈递细胞。

41. 如权利要求38或权利要求39所述的用途,其中与未治疗的受试者或用靶向OX40/OX40L和VSIG8中的一种的剂治疗的受试者相比,所述异源嵌合蛋白能够降低调节T细胞 (Treg) 的量或活性。

42. 如权利要求38或权利要求39所述的用途,其中与未治疗的受试者或用靶向OX40/OX40L和VSIG8中的一种的剂治疗的受试者相比,所述异源嵌合蛋白能够增加所述受试者的引流淋巴结中效应T细胞的引发。

43. 如权利要求38或权利要求39所述的用途,其中与未治疗的受试者或用靶向OX40/OX40L和VSIG8中的一种的剂治疗的受试者相比,所述异源嵌合蛋白能够引起免疫抑制细胞的总体降低和朝向更具炎性的肿瘤环境的转移。

44. 如权利要求1至33中任一项所述的异源嵌合蛋白或如权利要求34所述的核酸在制造用于治疗癌症的药物中的用途。

45. 如权利要求1至33中任一项所述的异源嵌合蛋白或如权利要求34所述的核酸在制造用于治疗炎性疾病的药物中的用途。

46. 如权利要求1至33中任一项所述的异源嵌合蛋白在制造药物中的用途。

47. 一种重组融合蛋白,其具有以下一般结构:

N末端- (a) - (b) - (c) -C末端,

其中:

(a) 是第一结构域,其包括包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列并且能够结合VSIG8配体的

VSIG8的细胞外结构域,

(b) 是接头,其连接所述第一结构域和第二结构域并且包含衍生自人IgG4的铰链-CH2-CH3 Fc结构域和来自SEQ ID NO:28至74的连接接头序列,并且

(c) 是第二结构域,其包括包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列并且能够结合OX40L受体的OX-40配体(OX40L)的细胞外结构域。

48. 如权利要求47所述的重组融合蛋白,其中所述接头包括包含SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27的氨基酸序列的序列。

49. 如权利要求47或权利要求48所述的重组融合蛋白在制造用于治疗癌症的药物中的用途。

50. 如权利要求47或权利要求48所述的重组融合蛋白在制造用于治疗炎症性疾病的药物中的用途。

51. 如权利要求47或权利要求48所述的重组融合蛋白在制造药物中的用途。

## 基于VSIG8的嵌合蛋白

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求2017年2月27日提交的美国临时申请号62/463,999的权益和优先权,所述临时申请的内容特此以引用的方式整体并入。

[0003] 电子提交的文本文件的描述

[0004] 本申请包含序列列表。它已作为名称为“SHK-003PC\_SequenceListing\_ST25”的ASCII文本文件通过EFS-Web以电子方式提交。序列列表的大小为81,752字节,并且创建于2018年2月27日左右。序列列表特此以引用的方式整体并入。

### 技术领域

[0005] 本发明部分涉及包含含有V型和免疫球蛋白结构域的蛋白质8 (VSIG8) 的细胞外结构域的嵌合蛋白及其用于治疗疾病的用途,诸如针对癌症和/或炎性疾病的免疫疗法。

### 背景技术

[0006] 最新的临床数据已经证明对于靶向免疫共抑制分子的剂的优异患者应答,包括例如引起YERVOY、KEYTRUDA和OPDIVO的批准的临床试验。这些免疫疗法统称为检查点抑制剂,并且遗憾的是,这些疗法仅为~15%-30%的癌症患者提供临床益处。改善更广泛癌症患者群体的临床应答率的一种潜在方法包括将检查点抑制剂治疗剂与另一种疗法组合。当使用多种个体治疗剂应用时,此类组合可能引起改善的临床益处,但是开发起来很麻烦。此外,许多免疫疗法由于使患者对于治疗的治疗窗口显著变窄的严重副作用而变得复杂。

[0007] 仍然需要提供有效免疫疗法,包括将多种治疗机制合并到单一药物中的新型方法和组合物。

### 发明内容

[0008] 因此,本发明部分提供可例如通过克服肿瘤微环境中的多种抑制机制并且刺激免疫抗肿瘤机制来进行癌症治疗的组合物和方法。相似地,所述组合物和方法可用于治疗炎性疾病。

[0009] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白掩蔽单个构建体中的免疫抑制信号和/或增强免疫刺激信号。在实施方案中,此类免疫调节效果通过直接受体/配体相互作用实现。

[0010] 例如,本发明部分提供允许在抗原呈递细胞中同时抑制VISTA/VISIG8信号传导并刺激OX40/OX40L信号传导的组合物和方法。这种并存的VISIG8阻断和OX40激动尤其导致免疫抑制细胞的总体降低和向更具炎性的环境的转移和增加的抗肿瘤效果。

[0011] 在各方面,本发明提供一种异源嵌合蛋白,其包含:(a) 第一结构域,其包含能够结合VSIG8配体的含有V型和免疫球蛋白结构域的蛋白质8 (VSIG8) 的一部分;(b) 第二结构域,其包含能够结合OX40L受体的OX40配体 (OX40L) 的一部分;以及(c) 接头,其连接所述第一结构域和所述第二结构域。在各方面,本发明提供用此异源嵌合蛋白治疗癌症的方法。在各方面,本发明提供用此异源嵌合蛋白治疗炎性疾病的方法。

[0012] 在各方面,本发明提供一种重组融合蛋白,其具有以下一般结构:N末端-(a)-(b)-(c)-C末端,其中(a)是包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少95%相同并且能够结合VSIG8配体的VSIG8的细胞外结构域的第一结构域,(b)是连接所述第一结构域和所述第二结构域并且包含衍生自人IgG4的铰链-CH2-CH3Fc结构域(例如,与SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27的氨基酸序列95%相同)的接头,并且(c)是包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少95%相同并且能够结合OX40L受体的OX40配体(OX40L)的细胞外结构域的第二结构域。在实施方案中,本发明提供用此异源嵌合蛋白治疗癌症的方法。在实施方案中,本发明提供用此异源嵌合蛋白治疗炎性疾病的方法。

[0013] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白能够将免疫细胞的平衡向有利于肿瘤或任何其他不想要的细胞的免疫攻击偏移或可用于涉及所述偏移的方法。例如,本发明的嵌合蛋白可以将具有临床重要性的部位处的免疫细胞的比率向有利于可以杀死肿瘤细胞(例如,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细胞和树突细胞)且相反于保护肿瘤的细胞(例如,髓样抑制细胞(MDSC)、调节T细胞(Treg)、肿瘤相关嗜中性粒细胞(TAN)、M2巨噬细胞和肿瘤相关巨噬细胞(TAM))偏移。在实施方案中,嵌合蛋白增加CD8<sup>+</sup> T细胞的肿瘤抗原识别并且/或者增强这些T细胞的肿瘤浸润。

[0014] 在各方面,本发明的嵌合蛋白和/或重组融合蛋白用于治疗癌症或炎性疾病的方法,其包括向有需要的患者施用有效量的包含嵌合蛋白的药物组合物。在癌症治疗实施方案中,例如,本发明的嵌合蛋白和/或重组融合蛋白产生免疫记忆应答。

[0015] 各方面包括本发明的嵌合蛋白和/或重组融合蛋白在制造例如用于治疗癌症和/或免疫疾病的药物中的用途。

[0016] 本文描述的任何方面或实施方案都可以与如本文所公开的任何其他方面或实施方案结合。

## 附图说明

[0017] 图1A不希望受理论束缚地示出了人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的计算机模拟预测的二级结构,其中其三个结构域中的每个都呈其预测的天然状态。嵌合蛋白的预测的分子量为大约68.1kDa。图1B示出了由肿瘤细胞与T细胞之间的嵌合蛋白形成的突触。

[0018] 图2示出了在非还原、还原和还原/去糖基化(PNGase)条件下通过蛋白质印迹分析进行的人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的表征。具体地,使用抗VSIG8、抗Fc或抗OX40L抗体探测嵌合构建体的每个个体结构域。将所有印迹中未处理的hVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白样品(例如对照)加载到泳道2中(无 $\beta$ -巯基乙醇或PNGase)。将所有印迹的泳道3中的样品用还原剂 $\beta$ -巯基乙醇处理,而将所有印迹的泳道4中的样品用酰胺酶肽:N-糖苷酶处理。条带大小确认预测的单体分子量为大约68.1kDa,并且表明嵌合蛋白的天然状态为糖基化二聚体

[0019] 图3示出了功能性ELISA的图,其证明了人VSIG8-Fc-OX40L与人IgG(左图)和重组OX40(右图)的结合。

[0020] 图4是示出人VSIG8-Fc-OX40L与过表达OX40的细胞系(即,进行工程化以过表达人OX40的Jurkat细胞)的体外细胞结合的图。结合在体外进行并通过流式细胞术分析。

[0021] 图5是示出对人VSIG8-Fc-OX40L的八隅体结合亲和力的图。VSIG8-Fc-OX40L对于

OX40的结合亲和力通过生物膜干涉技术(八隅体)进行测量,与可商购获得的单侧人Fc-OX40L对照或tavolixumab(抗人OX40抗体)进行比较。数据指示VSIG8-Fc-OX40L以测量为767pM的高亲和力与人OX40结合(上部曲线:tavolixumab,中部曲线:VSIG8-Fc-OX40L,下部曲线:单侧人Fc-OX40L)。

[0022] 图6是示出使用人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白进行体外NF- $\kappa$ B/NIK信号传导测定的图。将来自DiscoverX NIK信号传导测定的U2OS细胞与30 $\mu$ g/mL的可商购获得的单侧Fc-OX40L、抗OX40抗体、抗OX40L抗体或hVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白一起培养。从左到右的条是:单侧Fc-OX40L、抗OX40L抗体、抗OX40抗体和hVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白。

[0023] 图7是示出葡萄球菌肠毒素B(staphylococcus enterotoxin B) (SEB)超抗原活化/细胞因子释放测定的图。将人PBMC与葡萄球菌肠毒素B(200ng/mL)+/-可商购获得的单侧人Fc-OX40L、可商购获得的单侧VSIG8-Fc、两种单侧分子的组合或人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的滴定一起培养。三天后,使用对于人IL2特异性的ELISA评估上清液。

[0024] 图8示出了在非还原、还原和还原/去糖基化(PNGase)条件下通过蛋白质印迹分析进行的鼠VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的表征。条带大小确认预测的单体分子量为大约68.1kDa,并且表明嵌合蛋白的天然状态为糖基化二聚体。

[0025] 图9A至图9C示出了证明鼠VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的不同结构域对其各自的结合配偶体的结合亲和力的ELISA测定。图9A示出了mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白与VISTA(VSIG8的结合配偶体)的结合和检测。可商购获得的mVSIG8-Fc标准物是不可用的;因此,未生成标准曲线。图9B示出了mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的Fc部分与平板结合的抗人IgG抗体的结合和检测。小鼠Ig(mIg)用作标准物(圆形符号)。检测通过HRP缀合的抗人IgG抗体进行。一般来讲,观察到在ELISA测定中,使用中心Fc区检测嵌合蛋白倾向于低估样品中的实际蛋白质含量。因此,与标准物(圆形符号)相比,检测到低水平的VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白(方形符号)。图9C示出了mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白与平板结合的重组鼠OX40(OX40L的结合配偶体)的结合和检测并通过OX40L特异性抗体进行检测。鼠OX40L用作标准物(圆形符号)。

[0026] 图10A和图10B是示出鼠VSIG8-Fc-OX40L与过表达VISTA的细胞系和过表达OX40的细胞系的体外细胞结合测定。将永生化细胞系工程化以稳定表达(图10A)鼠VISTA(EL4-mVISTA)或(图10B)鼠OX40(CHOK1-mOX40)。将增加浓度的mVSIG8-Fc-OX40L与每种亲本和过表达细胞系一起温育2小时。将细胞收集,洗涤并用抗体染色,用于通过流式细胞术检测嵌合蛋白结合。所有工程化的细胞系以浓度依赖性方式以低nM体外细胞结合亲和力结合mVSIG8-Fc-OX40L;mVSIG8-Fc-OX40L以16nM结合CHOK1/mOX40,并且mVSIG8-Fc-OX40L以56nM结合EL4/mVISTA。

[0027] 图11是示出鼠VSIG8-Fc-OX40L与鼠OX40-His的结合亲和力的基于八隅体的评估的图。10 $\mu$ g/mL的可商购获得的mFc-OX40L(下部曲线)或mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白(上部曲线)结合到涂覆有重组鼠OX40-his的五-his生物传感器。

[0028] 图12是示出使用鼠VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白进行体外NF- $\kappa$ B-荧光素酶信号传导测定的图。将进行工程化以表达NF- $\kappa$ B-荧光素酶和OX40的Jurkat细胞与18nM的非相关蛋白(阴性对照,左条)、可商购获得的单侧Fc-OX40L(中间条)或mVSIG8-Fc-OX40L(右条)一起培养。

[0029] 图13A至图13C示出了来自用鼠VSIG8-Fc-OX40L处理的荷瘤小鼠的免疫表型分析。在第0天用CT26肿瘤接种小鼠。一旦肿瘤可感知且直径为至少4至6mm,用两个剂量的150 $\mu$ g的mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白处理小鼠。在肿瘤植入后第13天对来自每个处理组小鼠的子组针对收集的各种组织进行免疫表型分析。此数据证明,用mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白处理的小鼠在脾脏、肿瘤引流淋巴结(TDLN)和肿瘤中表现出更高百分比的总CD4<sup>+</sup> T细胞(图13A),并且此增加主要包括CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T细胞的增加(图13B)。通过四聚体染色进行进一步分析,以分析识别CT26肿瘤天然表达的AH1肿瘤抗原的CD8<sup>+</sup> T细胞的分数。在脾脏和肿瘤两者内,发现与其他组相比,更高比例的这些T细胞识别用mVSIG8-Fc-OX40L处理的小鼠中的AH1肿瘤抗原(图13C)。对于图13A至图13C中的每个图,情况是未处理的或用鼠VSIG8-Fc-OX40L处理的。

[0030] 图14A至图14C示出了鼠VSIG8-Fc-OX40L针对结肠直肠CT26肿瘤的抗肿瘤功效。在第0天用CT26肿瘤接种Ba1b/c小鼠。肿瘤生长4天之后,当肿瘤直径达到4至5mm时,用对照抗体或mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白处理小鼠。然后在第7天再次重复处理。图14A示出了每个处理组的个体肿瘤生长曲线,图14B示出了实验50天内的总体存活率,并且图14C是总结每个组的组大小和处理结果的表。

[0031] 图15是示出使用鼠VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的基于ELISA的抗药物抗体(ADA)测定的图。

[0032] 图16示出了例示性嵌合蛋白(PD1-Fc-OX40L)的四种潜在构型。

[0033] 图17示出了在非还原条件下、在还原条件下以及在还原条件下并用肽-N-糖苷酶F(PNGaseF)处理的在SDS-PAGE上运行的PD1-Fc-OX40L嵌合蛋白的蛋白质印迹。

[0034] 图18示出了在尺寸排阻色谱(SEC)上运行的PD1-Fc-OX40L嵌合蛋白的色谱图。

[0035] 图19示出了在非还原条件(“-”)或还原条件(“+”)下运行的PD1-Fc-OX40L嵌合蛋白的SDS-PAGE凝胶和天然(非SDS)PAGE凝胶。

[0036] 图20示出了接头中缺乏Fc结构域的PD1-No Fc-OX40L嵌合蛋白的天然(非SDS)PAGE凝胶。

[0037] 图21不希望受理论束缚地示出了六聚体和多联体如何由本发明的嵌合蛋白形成的模型。

[0038] 图22是示出可以组合成示例性模块接头的连接接头和Fc接头的表。所示的示例性模块接头可以与本文所述的I型蛋白和II型蛋白和/或本文所述的I型蛋白和II型蛋白的细胞外结构域组合,以形成本发明的嵌合蛋白。

## 具体实施方式

[0039] 本发明部分基于包含在氨基末端附近的含有V型和免疫球蛋白结构域的蛋白质8(VSIG8)的细胞外结构域的工程化嵌合蛋白的发现。在实施方案中,嵌合蛋白还包含在羧基末端附近的OX40配体(OX40L)的细胞外结构域。在实施方案中,两个细胞外结构域通过接头连接。在实施方案中,本发明的嵌合蛋白掩蔽肿瘤细胞上的免疫抑制信号,用免疫刺激信号替换免疫抑制信号以用于癌症的有效治疗。

[0040] 嵌合蛋白

[0041] 在实施方案中,本发明涉及进行工程化以包含免疫抑制受体,含有V型和免疫球蛋

白结构域的蛋白质8 (VSIG8) 的细胞外结构域的嵌合蛋白。VSIG8是单通I型膜蛋白,其充当T细胞活化的含有V区免疫球蛋白的抑制因子 (VISTA) 的受体。具体地,人VSIG8蛋白包含414个氨基酸,其包括21个氨基酸信号序列、242个氨基酸细胞外结构域 (ECD) (含有2个Ig样V型(免疫球蛋白样) 结构域)、21个氨基酸跨膜结构域和130个氨基酸胞质结构域。

[0042] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含人VSIG8的结构域,例如细胞外结构域。人VSIG8包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列(其中细胞外结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:2)。

[0043] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白可以包含如本文所述的VSIG8的细胞外结构域(例如,SEQ ID NO:2)或其变体或功能片段。例如,嵌合蛋白可以包含如以上提供的VSIG8的细胞外结构域的序列或其变体或功能片段,所述变体或功能片段与如本文所述的VSIG8的细胞外结构域的氨基酸序列具有至少约60%、或至少约61%、或至少约62%、或至少约63%、或至少约64%、或至少约65%、或至少约66%、或至少约67%、或至少约68%、或至少约69%、或至少约70%、或至少约71%、或至少约72%、或至少约73%、或至少约74%、或至少约75%、或至少约76%、或至少约77%、或至少约78%、或至少约79%、或至少约80%、或至少约81%、或至少约82%、或至少约83%、或至少约84%、或至少约85%、或至少约86%、或至少约87%、或至少约88%、或至少约89%、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%序列同一性。

[0044] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白可以包含VSIG8的变体细胞外结构域,其中用替代性信号肽替换信号肽(例如,如SEQ ID NO:1中提供的)。在实施方案中,本发明的嵌合蛋白可以包含VSIG8的变体细胞外结构域,其由已进行密码子优化以在产生蛋白质的细胞(诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或人胚肾(HEK)细胞)中表达的cDNA表达。

[0045] 在实施方案中,VSIG8的细胞外结构域是指能够与细胞外环境相互作用的蛋白质的一部分。在实施方案中,VSIG8的细胞外结构域是在细胞或细胞膜外部的蛋白质的整个氨基酸序列。在实施方案中,VSIG8的细胞外结构域是在细胞或细胞膜外部的蛋白质的氨基酸序列的一部分,并且对于信号转导和/或配体结合是所需的,如可以使用本领域已知的方法测定(例如,体外配体结合和/或细胞活化测定)。

[0046] 在实施方案中,VSIG8的细胞外结构域是指能够结合T细胞活化的含有V区免疫球蛋白的抑制因子 (VISTA) 的蛋白质的一部分。VISTA是参与抑制静息T细胞(包括CD4+或CD8+ T细胞)的活化的负检查点调节子。VSIG8与VISTA的结合诱导对T细胞活化、增殖和/或免疫细胞因子产生的抑制作用。在实施方案中,嵌合蛋白与人VISTA结合,其中 $K_D$ 为小于约1 $\mu$ M、约900nM、约800nM、约700nM、约600nM、约500nM、约400nm、约300nm、约200nm、约100nm、约90nm、约80nm、约70nm、约60nm、约55nm、约50nm、约45nm、约40nm、约35nm、约30nm、约25nm、约20nm、约15nm、约10nm或约5nm或约1nm(如例如通过表面等离子体共振或生物膜干涉技术测量的)。在实施方案中,嵌合蛋白与人VISTA结合,其中 $K_D$ 为小于约1nM、约900pM、约800pM、约700pM、约600pM、约500pM、约400pM、约300pM、约200pM、约100pM、约90pM、约80pM、约70pM、约60pM、约55pM、约50pM、约45pM、约40pM、约35pM、约30pM、约25pM、约20pM、约15pM或约10pM或约1pM(如例如通过表面等离子体共振或生物膜干涉技术测量的)。在实施方案中,嵌合蛋白与人VISTA结合,其中 $K_D$ 为约200pM至约600pM(如例如通过表面等离子体共振或生物膜干涉

技术测量的)。

[0047] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白还包含免疫刺激分子OX40配体(OX40L)的结构域,例如细胞外结构域。OX40L是II型跨膜糖蛋白,其属于肿瘤坏死因子(TNF)超家族。具体地,人OX40L蛋白包含183个氨基酸,其包括氨基末端胞质结构域(氨基酸1-23)和羧基末端细胞外结构域(氨基酸51-183)。

[0048] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含人OX40L的细胞外结构域。人OX40L包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列(其中细胞外结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:4)。

[0049] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白可以包含如本文所述的OX40L的细胞外结构域(例如,SEQ ID NO:4)或其变体或功能片段。例如,嵌合蛋白可以包含如以上提供的OX40L的细胞外结构域或其变体或功能片段的序列,所述变体或功能片段的序列与如本文所述的OX40L的细胞外结构域的氨基酸序列具有至少约60%、或至少约61%、或至少约62%、或至少约63%、或至少约64%、或至少约65%、或至少约66%、或至少约67%、或至少约68%、或至少约69%、或至少约70%、或至少约71%、或至少约72%、或至少约73%、或至少约74%、或至少约75%、或至少约76%、或至少约77%、或至少约78%、或至少约79%、或至少约80%、或至少约81%、或至少约82%、或至少约83%、或至少约84%、或至少约85%、或至少约86%、或至少约87%、或至少约88%、或至少约89%、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%)序列同一性。

[0050] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白可以包含OX40L的变体细胞外结构域,其中用替代性信号肽替换信号肽(例如,如SEQ ID NO:3中提供的)。在实施方案中,本发明的嵌合蛋白可以包含OX40L的变体细胞外结构域,其由已进行密码子优化以在产生蛋白质的细胞(诸如CHO细胞或HEK细胞)中表达的cDNA表达。

[0051] 在实施方案中,OX40L的细胞外结构域是指能够与细胞外环境相互作用的蛋白质的一部分。在实施方案中,OX40L的细胞外结构域是在细胞或细胞膜外部的蛋白质的整个氨基酸序列。在实施方案中,OX40L的细胞外结构域是在细胞或细胞膜外部的蛋白质的氨基酸序列的一部分,并且对于信号转导和/或配体结合是所需的,如可以使用本领域已知的方法测定。

[0052] 在实施方案中,OX40L的细胞外结构域是指能够与OX40受体结合的蛋白质的一部分。与其他TNF超家族成员相似,膜结合的OX40L作为同源三聚体存在。OX40L与OX40结合,OX40是主要在CD4<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup> T细胞以及多种淋巴细胞和非淋巴细胞上表达的TNF受体超家族的成员。有证据表明,OX40-OX40L相互作用的主要功能是传递晚期共刺激信号来促进活化T细胞的存活和增殖并延长免疫应答。

[0053] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白与人OX40结合,其中 $K_D$ 为小于约1 $\mu$ M、约900nM、约800nM、约700nM、约600nM、约500nM、约400nm、约300nm、约200nm、约100nm、约90nM、约80nM、约70nM、约60nM、约55nM、约50nM、约45nM、约40nM、约35nM、约30nM、约25nM、约20nM、约15nM、约10nM或约5nM或约1nM(如例如通过表面等离子体共振或生物膜干涉技术测量的)。在实施方案中,嵌合蛋白与人OX40结合,其中 $K_D$ 为小于约1nM、约900pM、约800pM、约700pM、约600pM、约500pM、约400pM、约300pM、约200pM、约100pM、约90pM、约80pM、约70pM、约60pM、约55pM、约50pM、约45pM、约40pM、约35pM、约30pM、约25pM、约20pM、约15pM或约10pM或约1pM

(如例如通过表面等离子体共振或生物膜干涉技术测量的)。在实施方案中,嵌合蛋白与人OX40结合,其中 $K_D$ 为约200pM至约600pM(如例如通过表面等离子体共振或生物膜干涉技术测量的)。

[0054] 在实施方案中,嵌合蛋白可以包含相对于本文所述的任何蛋白质序列具有一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列。在实施方案中,嵌合蛋白包含相对于本文所公开的嵌合蛋白的氨基酸序列中的任一个具有约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100或更多个氨基酸突变的序列。

[0055] 在实施方案中,一个或多个氨基酸突变可以独立地选自取代、插入、缺失和截短。

[0056] 在实施方案中,氨基酸突变是氨基酸取代,并且可以包括保守取代和/或非保守取代。

[0057] 例如,“保守取代”可以基于所涉及的氨基酸残基的极性、电荷、大小、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性质的相似性来完成。20种天然存在的氨基酸可以分为以下六个标准氨基酸组:(1)疏水性:Met、Ala、Val、Leu、Ile;(2)中性亲水的:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;(3)酸性的:Asp、Glu;(4)碱性的:His、Lys、Arg;(5)影响链取向的残基:Gly、Pro;和(6)芳族的:Trp、Tyr、Phe。

[0058] 如本文所用,“保守取代”定义为氨基酸被上文所示的六个标准氨基酸组的相同组中列出的另一种氨基酸交换。例如,由Glu交换Asp在如此修饰的多肽中保留一个负电荷。此外,甘氨酸和脯氨酸可以基于它们破坏 $\alpha$ -螺旋的能力而彼此取代。

[0059] 如本文所用,“非保守取代”定义为氨基酸被上文所示的六个标准氨基酸组(1)至(6)的不同组中列出的另一种氨基酸交换。

[0060] 在实施方案中,取代还可以包括非经典氨基酸(一般例如,硒代半胱氨酸、吡咯赖氨酸、N-甲酰甲硫氨酸 $\beta$ -丙氨酸、GABA和 $\delta$ -氨基乙酰丙酸、4-氨基苯甲酸(PABA)、常见氨基酸的D型异构体、2,4-二氨基丁酸、 $\alpha$ -氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、 $\gamma$ -Abu、 $\epsilon$ -Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟基脯氨酸、肌氨酸(sarcosine)、瓜氨酸、高瓜氨酸、磺丙氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、 $\beta$ -丙氨酸、氟代氨基酸、设计产生氨基酸(designer amino acids)(诸如 $\beta$ 甲基氨基酸、C  $\alpha$ -甲基氨基酸、N  $\alpha$ -甲基氨基酸)以及氨基酸类似物)。

[0061] 还可以通过参考遗传密码(包括考虑密码子简并性)对嵌合蛋白的核苷酸序列进行突变。

[0062] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白可以是本文所述的变体,例如,本发明的嵌合蛋白可以具有与本发明的嵌合蛋白的氨基酸序列(例如SEQ ID No 5和6中的一个或多个)具有至少约60%、或至少约61%、或至少约62%、或至少约63%、或至少约64%、或至少约65%、或至少约66%、或至少约67%、或至少约68%、或至少约69%、或至少约70%、或至少约71%、或至少约72%、或至少约73%、或至少约74%、或至少约75%、或至少约76%、或至少约77%、或至少约78%、或至少约79%、或至少约80%、或至少约81%、或至少约82%、或至少约83%、或至少约84%、或至少约85%、或至少约86%、或至少约87%、或至少约88%、或至少约89%、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%)序列同一性的序列。

[0063] 在实施方案中,嵌合蛋白包含接头。在实施方案中,接头包含至少一个能够形成二硫键的半胱氨酸残基。如本文其他地方所述,不希望受理论束缚,这种至少一个能够形成二硫键的半胱氨酸残基负责维持嵌合蛋白的适当多聚体状态并允许有效生产。

[0064] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含:(a) 第一结构域,其包含能够结合VISTA的含有V型和免疫球蛋白结构域的蛋白质8(VSIG8)的一部分,例如VSIG8的细胞外结构域;(b) 第二结构域,其包含能够结合OX40的OX40L的一部分,例如OX40L的细胞外结构域;以及任选地(c) 接头,其连接所述第一结构域和所述第二结构域。

[0065] 在实施方案中,嵌合蛋白是重组融合蛋白,例如具有本文所述的细胞外结构域的单-多肽(和任选地接头)。例如,在实施方案中,嵌合蛋白在细胞中被翻译为单个单元。在实施方案中,嵌合蛋白是指多个多肽的重组蛋白,所述多个多肽例如是本文所述的多个细胞外结构域,其例如在体外(例如,用本文所述的一个或多个合成接头)连接以产生单个单元。在实施方案中,嵌合蛋白作为一个多肽进行化学合成,或者可以单独化学合成每个结构域,然后组合。在实施方案中,翻译嵌合蛋白的一部分,并化学合成一部分。

[0066] 在实施方案中,嵌合蛋白包含接头。在实施方案中,接头可以衍生自天然存在的多结构域蛋白或者是经验接头,如例如在Chichili等,(2013),*Protein Sci.*22(2):153-167,Chen等,(2013),*Adv Drug Deliv Rev.*65(10):1357-1369中所述,所述文献的全部内容特此以引用的方式并入。在实施方案中,接头可以使用接头设计数据库和计算机程序来设计,诸如Chen等,(2013),*Adv Drug Deliv Rev.*65(10):1357-1369和Crasto等,(2000),*Protein Eng.*13(5):309-312中所述的那些数据库和计算机程序,所述文献的全部内容特此以引用的方式并入。

[0067] 在实施方案中,接头是合成接头,诸如PEG。

[0068] 在实施方案中,接头包含多肽。在实施方案中,多肽长度小于约500个氨基酸、长约450个氨基酸、长约400个氨基酸、长约350个氨基酸、长约300个氨基酸、长约250个氨基酸、长约200个氨基酸、长约150个氨基酸或长约100个氨基酸。例如,接头长度可以小于约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。在实施方案中,接头是柔性的。在实施方案中,接头是刚性的。

[0069] 在实施方案中,接头基本上包含甘氨酸和丝氨酸残基(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%、或约98%、或约99%、或约100%的甘氨酸和丝氨酸)。

[0070] 在实施方案中,接头包含抗体的铰链区(例如IgG、IgA、IgD和IgE的铰链区,包括亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4以及IgA1和IgA2))。存在于IgG、IgA、IgD和IgE类抗体中的铰链区充当柔性间隔区,从而允许Fab部分在空间中自由移动。与恒定区相反,铰链结构域在结构上是多样的,在免疫球蛋白类和亚类中在序列和长度二者方面均变化。例如,铰链区的长度和柔性在IgG亚类中变化。IgG1的铰链区包含氨基酸216-231,并且因为它是自由柔性的,所以Fab片段可以围绕它们的对称轴旋转并在以两个重链间二硫桥中的第一个为中心的球内移动。IgG2具有比IgG1更短的铰链,具有12个氨基酸残基和4个二硫桥。IgG2的铰链区缺少甘氨酸残基,相对较短,并含有通过额外的重链间二硫桥稳定的刚性聚脯氨酸双螺旋。这些特性限制了IgG2分子的柔性。IgG3与其他亚类的不同之处在于其独特的延伸的

铰链区(约为IgG1铰链长度的4倍),其含有62个氨基酸(包括21个脯氨酸和11个半胱氨酸),从而形成非柔性的聚脯氨酸双螺旋。在IgG3中,Fab片段离Fc片段相对较远,从而使分子具有更大的柔性。与其他亚类相比,IgG3中的细长铰链也是其较高分子量的原因。IgG4的铰链区比IgG1的铰链区更短,并且其柔性介于IgG1与IgG2之间。据报道,铰链区的柔性按IgG3>IgG1>IgG4>IgG2的顺序降低。在实施方案中,接头可以衍生自人IgG4并含有一个或多个突变以增强二聚化(包括S228P)或FcRn结合。

[0071] 根据晶体学研究,免疫球蛋白铰链区可以进一步在功能上细分为三个区域:上铰链区、核心区和下铰链区。参见Shin等,1992Immunological Reviews 130:87。上铰链区包括从C<sub>H1</sub>的羧基末端到限制运动的铰链中的第一个残基(通常是在两个重链之间形成链间二硫键的第一个半胱氨酸残基)的氨基酸。上铰链区的长度与抗体的节段柔性相关。核心铰链区含有重链间二硫键,并且下铰链区连接C<sub>H2</sub>结构域的氨基末端并包括C<sub>H2</sub>中的残基。同上。野生型人IgG1的核心铰链区含有序列CPPC(SEQ ID NO:48),当通过二硫键形成二聚化时,其产生被认为充当枢轴的环状八肽,从而赋予柔性。在实施方案中,本发明的接头包含任何抗体(例如IgG、IgA、IgD和IgE,包括亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4以及IgA1和IgA2))的上铰链区、核心区和下铰链区中的一个或两个或三个。铰链区还可以含有一个或多个糖基化位点,其包括许多结构上不同类型的碳水化合物附着位点。例如,IgA1在铰链区的17个氨基酸的区段内含有五个糖基化位点,从而赋予铰链区多肽对肠蛋白酶的抗性,被认为是分泌型免疫球蛋白的有利特性。在实施方案中,本发明的接头包含一个或多个糖基化位点。

[0072] 在实施方案中,接头包含抗体的Fc结构域(例如IgG、IgA、IgD和IgE的铰链区,包括亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4以及IgA1和IgA2))。在实施方案中,接头包含衍生自人IgG4抗体的铰链-CH2-CH3Fc结构域。在实施方案中,接头包含衍生自人IgG1抗体的铰链-CH2-CH3Fc结构域。在实施方案中,Fc结构域表现出对新生儿Fc受体(FcRn)的增加的亲和力和增强的结合。在实施方案中,Fc结构域包括一个或多个突变,其增加与FcRn的亲和力并增强与FcRn的结合。不希望受理论束缚,据信与FcRn的增加的亲和力和增强的结合增加了本发明的嵌合蛋白的体内半衰期。

[0073] 在实施方案中,Fc结构域接头在氨基酸残基250、252、254、256、308、309、311、416、428、433或434(根据Kabat编号,如在Kabat,等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)中所述,其以引用的方式明确并入本文)或其等同物处含有一个或多个氨基酸取代。在实施方案中,氨基酸残基250处的氨基酸取代是用谷氨酰胺进行的取代。在实施方案中,氨基酸残基252处的氨基酸取代是用酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或苏氨酸进行的取代。在实施方案中,氨基酸残基254处的氨基酸取代是用苏氨酸进行的取代。在实施方案中,氨基酸残基256处的氨基酸取代是用丝氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、天冬氨酸或苏氨酸进行的取代。在实施方案中,氨基酸残基308处的氨基酸取代是用苏氨酸进行的取代。在实施方案中,氨基酸残基309处的氨基酸取代是用脯氨酸进行的取代。在实施方案中,氨基酸残基311处的氨基酸取代是用丝氨酸进行的取代。在实施方案中,氨基酸残基385处的氨基酸取代是用精氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、组氨酸、赖氨酸、丙氨酸或甘氨酸进行的取代。在实施方案中,氨基酸残基386处的氨基酸取代是用苏氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、赖氨酸、精氨酸、异亮氨酸或甲硫氨酸进行的取代。在实施方案中,氨基酸残基

387处的氨基酸取代是用精氨酸、脯氨酸、组氨酸、丝氨酸、苏氨酸或丙氨酸进行的取代。在实施方案中,氨基酸残基389处的氨基酸取代是用脯氨酸、丝氨酸或天冬酰胺进行的取代。在实施方案中,氨基酸残基416处的氨基酸取代是用丝氨酸进行的取代。在实施方案中,氨基酸残基428处的氨基酸取代是用亮氨酸进行的取代。在实施方案中,氨基酸残基433处的氨基酸取代是用精氨酸、丝氨酸、异亮氨酸、脯氨酸或谷氨酰胺进行的取代。在实施方案中,氨基酸残基434处的氨基酸取代是用组氨酸、苯丙氨酸或酪氨酸进行的取代。

[0074] 在实施方案中,Fc结构域接头(例如,包含IgG恒定区)包含一个或多个突变,诸如在氨基酸残基252、254、256、433、434或436(根据Kabat编号,如在Kabat,等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)中所述,其以引用的方式明确并入本文)处的取代。在实施方案中,IgG恒定区包括三重M252Y/S254T/T256E突变或YTE突变。在实施方案中,IgG恒定区包括三重H433K/N434F/Y436H突变或KFH突变。在实施方案中,IgG恒定区包括组合的YTE和KFH突变。

[0075] 在实施方案中,本发明的修饰的人源化抗体包含IgG恒定区,其含有在氨基酸残基250、253、307、310、380、428、433、434和435(根据Kabat编号,如在Kabat,等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)中所述,其以引用的方式明确并入本文)处的一个或多个突变。例示性突变包括T250Q、M428L、T307A、E380A、I253A、H310A、M428L、H433K、N434A、N434F、N434S和H435A。在实施方案中,IgG恒定区包括M428L/N434S突变或LS突变。在实施方案中,IgG恒定区包括M428L/N434S突变或LS突变。在实施方案中,IgG恒定区包括T250Q/M428L突变或QL突变。在实施方案中,IgG恒定区包括N434A突变。在实施方案中,IgG恒定区包括T307A/E380A/N434A突变或AAA突变。在实施方案中,IgG恒定区包括I253A/H310A/H435A突变或IHH突变。在实施方案中,IgG恒定区包括H433K/N434F突变。在实施方案中,IgG恒定区包括组合的M252Y/S254T/T256E和H433K/N434F突变。

[0076] IgG恒定区中的另外的示例性突变描述于以下中:例如,Robbie,等,Antimicrobial Agents and Chemotherapy(2013),57(12):6147-6153,Dall'Acqua等,JBC(2006),281(33):23514-24,Dall'Acqua等,Journal of Immunology(2002),169:5171-80,Ko等Nature(2014)514:642-645,Grevys等Journal of Immunology.(2015),194(11):5497-508,和美国专利号7,083,784,其全部内容特此以引用的方式并入。

[0077] 在实施方案中,接头中Fc结构域包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列(参见下表),或与其具有至少90%、或93%、或95%、或97%、或98%、或99%同一性的氨基酸序列。在实施方案中,对SEQ ID NO:25进行突变以增加稳定性和/或半衰期。例如,在实施方案中,接头中Fc结构域包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列(参见下表),或与其具有至少90%、或93%、或95%、或97%、或98%、或99%同一性的氨基酸序列。例示性Fc稳定化突变体是S228P。例示性Fc半衰期延长突变体是T250Q、M428L、V308T、L309P和Q311S,并且本发明的接头可以包含这些突变体中的1个、或2个、或3个、或4个、或5个。在实施方案中,接头中Fc结构域包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列(参见下表),或与其具有至少90%、或93%、或95%、或97%、或98%、或99%同一性的氨基酸序列。

[0078] 此外,可以采用一个或多个连接接头来连接接头中的Fc结构域(例如,SEQ ID NO:

25、26或27中的一个,或与其具有至少90%、或93%、或95%、或97%、或98%、或99%同一性的结构域)和细胞外结构域。例如,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:33中的任一个或其变体可以连接如本文所述的细胞外结构域和如本文所述的接头。任选地,SEQ ID NO:28-74中的任一个或其变体在如本文所述的细胞外结构域与如本文所述的接头之间置换。

[0079] SEQ ID NO:25-74的氨基酸序列在以下表1中提供。

[0080] 表1:例示性接头(Fc结构域接头和连接接头)

SEQ ID NO.	序列
25	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLS GKEYKCKVSSKGLPSSIEKTISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK
26	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTPHSDWLS GKEYKCKVSSKGLPSSIEKTISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLS LGK
27	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLS GKEYKCKVSSKGLPSSIEKTISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLS LGK
28	SKYGPPCPSCP
29	SKYGPPCPPCP
30	SKYGPP
31	IEGRMD
32	GGGVPRDCG
33	IEGRMDGGGGAGGGG
34	GGSGGGS
35	GGSGGGGGSGGG
36	EGKSSGSGSESKST
37	GGSG
38	GGSGGGSGGGSG
39	EAAAKEAAAKEAAAK
40	EAAAREAAAREAAAREAAAR
41	GGGGSGGGGGSGGGGSAS

[0081]

[0082]

42	GGGGAGGGG
43	GS 或 GGS 或 LE
44	GSGSGS
45	GSGSGSGSGS
46	GGGGSAS
47	APAPAPAPAPAPAPAPAP
48	CPPC
49	GGGGS
50	GGGGSGGGGS
51	GGGGSGGGGSGGGGS
52	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
53	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
54	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
55	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
56	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
57	GGSGSGGGGSGGGGS
58	GGGGGGGG
59	GGGGGG
60	EAAAK
61	EAAAKEAAAK
62	EAAAKEAAAKEAAAK
63	AEAAAKEAAAKA
64	AEAAAKEAAAKEAAAKA
65	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA
66	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA
67	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAK EAAAKA
68	PAPAP
69	KESGSVSSEQLAQFRSLD
70	GSAGSAAGSGEF

[0083]	71	GGGSE
	72	GSESG
	73	GSEGS
	74	GEGGS GEGSS GEGSS SEGGG SEGGG SEGGG SEGGSS

[0084] 在实施方案中,连接接头基本上包含甘氨酸和丝氨酸残基(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%、或约98%、或约99%、或约100%甘氨酸和丝氨酸)。例如,在实施方案中,连接接头是 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ ,其中n为约1至约8,例如1、2、3、4、5、6、7或8(分别为SEQ ID NO:49至SEQ ID NO:56)。在实施方案中,连接接头序列是GGSGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:57)。另外的例示性连接接头包括但不限于具有以下序列的接头:LE、 $(\text{Gly})_8$ (SEQ ID NO:58)、 $(\text{Gly})_6$ (SEQ ID NO:59)、 $(\text{EAAAK})_n$ ( $n=1-3$ )(SEQ ID NO:60-SEQ ID NO:62)、 $\text{A}(\text{EAAAK})_n$ ( $n=2-5$ )(SEQ ID NO:63-SEQ ID NO:66)、 $\text{A}(\text{EAAAK})_4\text{ALEA}(\text{EAAAK})_4\text{A}$ (SEQ ID NO:67)、PAPAP(SEQ ID NO:68)、KESGSVSSEQLAQFRSLD(SEQ ID NO:69)、GSAGSAAGSGEF(SEQ ID NO:70)和 $(\text{XP})_n$ ,其中X表示任何氨基酸,例如Ala、Lys或Glu。在实施方案中,连接接头是GGS。

[0085] 在实施方案中,连接接头是以下中的一个或多个:GGGSE(SEQ ID NO:71)、GSESG(SEQ ID NO:72)、GSEGS(SEQ ID NO:73)、GEGGS GEGSS GEGSS SEGGG SEGGG SEGGG SEGGSS(SEQ ID NO:74)以及每4个氨基酸间隔随机放置G、S和E的连接接头。

[0086] 在实施方案中,嵌合蛋白包含模块接头,如图22所示。

[0087] 在实施方案中,接头可以是功能性的。例如但不限于,接头可以起到改善本发明的嵌合蛋白的折叠和/或稳定性、改善表达、改善药代动力学和/或改善其生物活性的作用。在另一个实例中,接头可以起到将嵌合蛋白靶向特定细胞类型或位置的作用。

[0088] 在实施方案中,嵌合蛋白表现出增强的稳定性和蛋白质半衰期。在实施方案中,嵌合蛋白以高亲和力与FcRn结合。在实施方案中,嵌合蛋白可以与FcRn结合,其中 $K_D$ 为约1nM至约80nM。例如,嵌合蛋白可以与FcRn结合,其中 $K_D$ 为约1nM、约2nM、约3nM、约4nM、约5nM、约6nM、约7nM、约8nM、约9nM、约10nM、约15nM、约20nM、约25nM、约30nM、约35nM、约40nM、约45nM、约50nM、约55nM、约60nM、约65nM、约70nM、约71nM、约72nM、约73nM、约74nM、约75nM、约76nM、约77nM、约78nM、约79nM或约80nM。在实施方案中,嵌合蛋白可以与FcRn结合,其中 $K_D$ 为约9nM。在实施方案中,嵌合蛋白基本上不与具有效应子功能的其他Fc受体(即,除FcRn之外的受体)结合。

[0089] 在实施方案中,具有式ECD 1-连接接头1-Fc结构域-连接接头2-ECD 2的嵌合蛋白(其中ECD 1是VSIG8,并且ECD 2是OX40L)在本公开中可以称为VSIG8-Fc-OX40L。在实施方案中,嵌合蛋白缺乏一个或两个连接接头,这种嵌合蛋白在本公开中也可以称为VSIG8-Fc-OX40L。这些嵌合蛋白可能缺乏连接接头中的一个或两个。示例性连接接头1、Fc结构域和连接接头2在以上表1中描述;用于形成嵌合蛋白并包含特异性连接接头1、Fc结构域和连接接头2的模块接头在图22中示出。

[0090] 在实施方案中,所述方法产生记忆应答,其例如能够预防复发。

[0091] 在实施方案中,嵌合蛋白是具有式N末端-(a)-(b)-(c)-C末端的融合蛋白,其中(a)是VSIG8,(b)是包含Fc结构域的至少一部分的接头,并且(c)是OX40L,所述融合蛋白在

本公开中可以称为VSIG8-Fc-OX40L。

[0092] 在实施方案中,嵌合蛋白针对鼠配体/受体优化/导向到鼠配体/受体;这种嵌合蛋白的实例是鼠VSIG8-Fc-OX40L,其在本文中还称为mVSIG8-Fc-OX40L。

[0093] 在实施方案中,嵌合蛋白针对人配体/受体优化/导向到人配体/受体;这种嵌合蛋白的实例是人VSIG8-Fc-OX40L,其在本文中还称为hVSIG8-Fc-OX40L。

[0094] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白靶向VISTA/VSIG8免疫抑制信号传导通路。在实施方案中,嵌合蛋白破坏、阻断、减少和/或抑制通过VISTA与VSIG8的结合介导的免疫抑制信号的传递。在实施方案中,免疫抑制信号是指减弱或消除免疫应答的信号。例如,在肿瘤学的背景下,此类信号可以减弱或消除抗肿瘤免疫。在正常生理条件下,抑制信号可用于维持自身耐受性(例如,预防自身免疫性疾病),并且还可在免疫系统对病原性感染作出应答时保护组织免受损伤。例如但不限于,当阻断这种抑制信号时,可以通过检测细胞增殖、细胞因子产生、细胞杀伤活性或吞噬活性的增加来鉴定免疫抑制信号。

[0095] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白破坏、阻断、减少和/或抑制通过VISTA或其他结合配偶体与VSIG8的结合介导的免疫抑制信号的传递。在实施方案中,嵌合蛋白与VISTA结合,但是破坏、阻断、减少和/或抑制抑制信号向免疫细胞(例如,T细胞)的传递。在实施方案中,嵌合蛋白作用于例如表达VISTA的淋巴细胞,并且破坏、阻断、减少和/或抑制抑制信号向免疫细胞(例如,T细胞)的传递。

[0096] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白能够减少、破坏或消除免疫抑制受体/配体对VISTA/VSIG8的结合或可用于包括这些的方法。在实施方案中,本发明的嵌合蛋白阻断、减少和/或抑制VSIG8和/或VSIG8与VISTA或与其他结合配偶体的结合。

[0097] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白靶向通过OX40L与OX40的结合介导的免疫刺激信号。在实施方案中,嵌合蛋白增强、增加和/或刺激通过OX40L与OX40的结合介导的免疫刺激信号的传递。在实施方案中,免疫刺激信号是指增强免疫应答的信号。例如,在肿瘤学的背景下,此类信号可以增强抗肿瘤免疫。例如但不限于,可以通过直接刺激白细胞(包括T细胞的子组)的增殖、细胞因子产生、杀伤活性或吞噬活性来鉴定免疫刺激信号。

[0098] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白增强、增加和/或刺激通过OX40L与OX40的结合介导的免疫刺激信号的传递。在实施方案中,包含OX40L的细胞外结构域的本发明的嵌合蛋白作用于表达OX40的免疫细胞(例如,T细胞),并且增强、增加和/或刺激刺激信号向免疫细胞(例如,T细胞)的传递。

[0099] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白能够刺激或增强免疫刺激受体/配体对OX-40:OX40L的结合或可用于包括这些的方法。在实施方案中,本发明的嵌合蛋白增加和/或刺激OX40和/或OX40与OX40L中的一种或多种的结合。

[0100] 在实施方案中,嵌合蛋白包含II型蛋白而非OX40L的细胞外结构域。示例性II型蛋白包括4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A和TRAIL。本发明还包括嵌合蛋白和使用以下嵌合蛋白的方法:VISIG8/4-1BBL、VISIG8/CD30L、VISIG8/CD40L、VISIG8/FasL、VISIG8/GITRL、VISIG8/LIGHT、VISIG8/TL1A和VISIG8/TRAIL。在实施方案中,嵌合蛋白具有VISIG8-Fc-4-1BBL、VISIG8-Fc-CD30L、VISIG8-Fc-CD40L、VISIG8-Fc-FasL、VISIG8-Fc-GITRL、VISIG8-Fc-LIGHT、VISIG8-Fc-TL1A和VISIG8-Fc-TRAIL中的一种的一般结构。

[0101] 4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A和TRAIL的氨基酸序列分别包括

SEQ ID NO:7、9、11、13、15、17、21和23。

[0102] 在实施方案中,嵌合蛋白包含4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A和TRAIL的细胞外结构域,其分别包括SEQ ID NO:8、10、12、14、16、18、22和24。在实施方案中,本发明的嵌合蛋白可以包含如本文所述的4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A或TRAIL的细胞外结构域或其变体或功能片段。例如,嵌合蛋白可以包含如以上提供的4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A或TRAIL的细胞外结构域或其变体或功能片段的序列,所述变体或功能片段的序列与如本文所述的4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A或TRAIL的细胞外结构域的氨基酸序列具有至少约60%、或至少约61%、或至少约62%、或至少约63%、或至少约64%、或至少约65%、或至少约66%、或至少约67%、或至少约68%、或至少约69%、或至少约70%、或至少约71%、或至少约72%、或至少约73%、或至少约74%、或至少约75%、或至少约76%、或至少约77%、或至少约78%、或至少约79%、或至少约80%、或至少约81%、或至少约82%、或至少约83%、或至少约84%、或至少约85%、或至少约86%、或至少约87%、或至少约88%、或至少约89%、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%序列同一性。

[0103] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白可以包含本文所述的细胞外结构域的变体,例如,与细胞外结构域的已知氨基酸或核酸序列具有至少约60%、或至少约61%、或至少约62%、或至少约63%、或至少约64%、或至少约65%、或至少约66%、或至少约67%、或至少约68%、或至少约69%、或至少约70%、或至少约71%、或至少约72%、或至少约73%、或至少约74%、或至少约75%、或至少约76%、或至少约77%、或至少约78%、或至少约79%、或至少约80%、或至少约81%、或至少约82%、或至少约83%、或至少约84%、或至少约85%、或至少约86%、或至少约87%、或至少约88%、或至少约89%、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%)序列同一性的序列,所述细胞外结构域例如人细胞外结构域,例如SEQ ID NO:2、4、8、10、12、14、16、18、20、22和24中的一个或多个。

[0104] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含VSIG8的细胞外结构域(SEQ ID NO:2)。

[0105] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含OX40L的细胞外结构域(SEQ ID NO:4)。

[0106] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含CD40L的细胞外结构域(SEQ ID NO:12)。

[0107] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含VSIG8的细胞外结构域(SEQ ID NO:2)和OX40L的细胞外结构域(SEQ ID NO:4)。

[0108] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含VSIG8的细胞外结构域(SEQ ID NO:2)和CD40L的细胞外结构域(SEQ ID NO:12)。

[0109] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含来自人IgG4抗体序列的铰链-CH2-CH3结构域(SEQ ID NO:25、26或27)。

[0110] 在实施方案中,嵌合蛋白包含模块接头,如图22所示。

[0111] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含VSIG8的细胞外结构域和OX40L的细胞外结构域,使用来自人IgG4抗体序列的铰链-CH2-CH3结构域作为接头(此VSIG8-Fc-OX40L嵌合体是SEQ ID NO:5)。

[0112] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含VSIG8的细胞外结构域和CD40L的细胞外结

构域,使用来自人IgG4抗体序列的铰链-CH2-CH3结构域作为接头(此VSIG8-Fc-CD40L嵌合体是SEQ ID NO:6)。

[0113] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白向免疫细胞(例如,T细胞)递送免疫刺激,同时掩蔽免疫抑制信号。在实施方案中,嵌合蛋白递送具有免疫活化(例如,T细胞活化)的最终结果的信号。

[0114] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白能够促进免疫活化(例如,针对肿瘤)并且可以用于包括促进免疫活化(例如,针对肿瘤)的方法。在实施方案中,本发明的嵌合蛋白能够抑制免疫抑制(例如,允许肿瘤存活)并且可以用于包括抑制免疫抑制(例如,允许肿瘤存活)的方法。本发明的嵌合蛋白由于构建体的嵌合性质提供的信号传导的近似性而提供改善的免疫活化和/或改善的对免疫抑制的抑制。

[0115] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白能够或可以用于包括调节免疫应答的幅度的方法中,例如,调节效应子输出的水平。在实施方案中,例如,当用于治疗癌症和/或炎性疾病时,与免疫抑制相比,本发明的嵌合蛋白改变免疫刺激的程度以增加T细胞应答的幅度,其包括但不限于刺激细胞因子产生、增殖或靶向杀伤潜力的水平增加。

[0116] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白能够或可用于涉及掩蔽抑制配体以及用免疫刺激配体替换所述免疫抑制配体的方法中。例如,包含(i)VSIG8的细胞外结构域和(ii)OX40L的细胞外结构域的本发明的嵌合蛋白构建体允许破坏抑制性VISTA/VSIG8信号并且用刺激OX40L/OX40信号替换抑制性VISTA/VSIG8信号。因此,本发明的嵌合蛋白在实施方案中能够或可用于涉及降低或消除抑制免疫信号和/或增加或活化免疫刺激信号的方法中。例如,携带抑制信号(并因此逃避免疫应答)的淋巴细胞或其他细胞可以被结合在T细胞上的正信号取代,然后T细胞可以攻击肿瘤细胞。因此,在实施方案中,本发明的构建体掩蔽抑制免疫信号并活化刺激免疫信号。通过本发明的嵌合蛋白的单一构建方法增强了此类有益特性。例如,信号替换可以几乎同时实现,并且信号替换被定制为在临床重要部位(例如,肿瘤微环境)处是局部的。在实施方案中,构建体将正免疫刺激信号定位在阻断或抑制信号附近,以更好地偶联这些官能团。此局部偶联作用可以解释与例如VISTA阻断和OX40激动剂抗体的组合相比VSIG8-Fc-OX40L构建体的优异性能。

[0117] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白能够或可用于涉及增强、恢复、促进和/或刺激免疫调节的方法中。在实施方案中,本文所述的本发明的嵌合蛋白恢复、促进和/或刺激一种或多种针对肿瘤细胞的免疫细胞的活性或活化,所述免疫细胞包括但不限于: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细胞和树突细胞。在实施方案中,本发明的嵌合蛋白增强、恢复、促进和/或刺激T细胞的活性和/或活化,作为非限制性实例,包括活化和/或刺激一种或多种T细胞固有信号,其包括促存活信号;自分泌或旁分泌生长信号;p38MAPK-、ERK-、STAT-、JAK-、AKT-或PI3K-介导的信号;抗细胞凋亡信号;和/或促进以下中的一种或多种和/或以下中的一种或多种必需的信号:促炎细胞因子产生、或T细胞迁移、或T细胞肿瘤浸润。

[0118] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白能够或可用于涉及引起进入肿瘤或肿瘤微环境内的一种或多种T细胞(包括但不限于细胞毒性T淋巴细胞、T辅助细胞、自然杀伤T(NKT)细胞)、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、树突细胞、单核细胞和巨噬细胞(例如,M1和M2中的一种或多种)增加的方法中。在实施方案中,嵌合蛋白增强CD8+ T细胞的肿

瘤抗原识别,特别是浸润到肿瘤微环境中的那些T细胞的肿瘤抗原识别。

[0119] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白能够或可用于涉及抑制和/或致使降低免疫抑制细胞(例如,髓样抑制细胞(MDSC)、调节T细胞(Treg)、肿瘤相关嗜中性粒细胞(TAN)、M2巨噬细胞和肿瘤相关巨噬细胞(TAM)的募集,并且特别是在肿瘤和/或肿瘤微环境(TME)内的募集的方法中。在实施方案中,本发明的疗法可以改变肿瘤部位和/或TME中M1巨噬细胞相对于M2巨噬细胞的比例,以有利于M1巨噬细胞。

[0120] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白能够并且可以用于包括抑制和/或降低T细胞失活和/或对肿瘤的免疫耐受性的方法中,所述方法包括向受试者施用有效量的本文所述的嵌合蛋白。在实施方案中,本发明的嵌合蛋白能够增加各种细胞因子的血清水平,所述细胞因子包括但不限于IFN  $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13、IL-17A、IL-17F和IL-22中的一种或多种。在实施方案中,本发明的嵌合蛋白能够增强治疗的受试者血清中的IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-17A、IL-22、TNF $\alpha$ 或IFN  $\gamma$ 。检测这种细胞因子应答可以提供确定所指示的嵌合蛋白的最佳给药方案的方法。

[0121] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白抑制、阻断和/或减少抗肿瘤CD8<sup>+</sup>和/或CD4<sup>+</sup> T细胞的细胞死亡;或者刺激、诱导和/或增加促肿瘤T细胞的细胞死亡。T细胞耗竭是T细胞功能障碍的一种状态,其特征在于增殖和效应子功能的进行性丧失,从而最终导致克隆缺失。因此,促肿瘤T细胞是指在许多慢性感染、炎症疾病和癌症期间出现的T细胞功能障碍的一种状态。这种功能障碍被定义为较差的增殖和/或效应子功能、抑制受体的持续表达以及与功能效应T细胞或记忆T细胞的转录状态不同的转录状态。耗尽防止感染和肿瘤的最佳控制。此外,抗肿瘤CD8<sup>+</sup>和/或CD4<sup>+</sup> T细胞是指可以对肿瘤产生免疫应答的T细胞。例示性促肿瘤T细胞包括但不限于Treg、表达一种或多种检查点抑制受体的CD4<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup> T细胞、Th2细胞和Th17细胞。检查点抑制受体是指在免疫细胞上表达的预防或抑制非受控免疫应答的受体。

[0122] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白能够并且可以用于包括增加效应T细胞与调节T细胞的比例的方法中。例示性效应T细胞包括ICOS<sup>+</sup>效应T细胞;细胞毒性T细胞(例如, $\alpha\beta$ TCR、CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>);CD4<sup>+</sup>效应T细胞(例如, $\alpha\beta$ TCR、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD62Lhi、IL<sup>-</sup>7R/CD127<sup>+</sup>);CD8<sup>+</sup>效应T细胞(例如, $\alpha\beta$ TCR、CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD62Lhi、IL<sup>-</sup>7R/CD127<sup>+</sup>);效应记忆T细胞(例如,CD62L低、CD44<sup>+</sup>、TCR、CD3<sup>+</sup>、IL<sup>-</sup>7R/CD127<sup>+</sup>、IL-15R<sup>+</sup>、CCR7低);中枢记忆T细胞(例如,CCR7<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>;或CCR7hi、CD44<sup>+</sup>、CD62Lhi、TCR、CD3<sup>+</sup>、IL-7R/CD127<sup>+</sup>、IL-15R<sup>+</sup>);CD62L<sup>+</sup>效应T细胞;CD8<sup>+</sup>效应记忆T细胞(TEM),包括早期效应记忆T细胞(CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>)和晚期效应记忆T细胞(CD27<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>)(分别为TemE和TemL);CD127<sup>(+)</sup>CD25(低/-)效应T细胞;CD127<sup>(-)</sup>CD25<sup>(-)</sup>效应T细胞;CD8<sup>+</sup>干细胞记忆效应细胞(TSCM)(例如,CD44(低)CD62L(高)CD122(高)sca<sup>(+)</sup>);TH1效应T细胞(例如,CXCR3<sup>+</sup>、CXCR6<sup>+</sup>和CCR5<sup>+</sup>;或 $\alpha\beta$ TCR、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、IL-12R<sup>+</sup>、IFN  $\gamma$  R<sup>+</sup>、CXCR3<sup>+</sup>);TH2效应T细胞(例如,CCR3<sup>+</sup>、CCR4<sup>+</sup>和CCR8<sup>+</sup>;或 $\alpha\beta$ TCR、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、IL-4R<sup>+</sup>、IL-33R<sup>+</sup>、CCR4<sup>+</sup>、IL-17RB<sup>+</sup>、CRTH2<sup>+</sup>);TH9效应T细胞(例如, $\alpha\beta$ TCR、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>);TH17效应T细胞(例如, $\alpha\beta$ TCR、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、IL-23R<sup>+</sup>、CCR6<sup>+</sup>、IL-1R<sup>+</sup>);CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>效应T细胞,CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>(-)</sup>效应T细胞;以及分泌IL-2、IL-4和/或IFN- $\gamma$ 的效应T细胞。例示性调节T细胞包括ICOS<sup>+</sup>调节T细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>调节T细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节T细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>调节T细胞、CD4<sup>+</sup>CD25高调节T细胞、TIM-3<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>调节T细胞、淋巴细胞活化基因-3(LAG-3)<sup>+</sup>调节T

细胞、CTLA-4/CD152<sup>+</sup>调节T细胞、神经纤毛蛋白-1 (Nrp-1)<sup>+</sup>调节T细胞、CCR4<sup>+</sup>CCR8<sup>+</sup>调节T细胞、CD62L (L-选择素)<sup>+</sup>调节T细胞、CD45RB低调节T细胞、CD127低调节T细胞、LRRC32/GARP<sup>+</sup>调节T细胞、CD39<sup>+</sup>调节T细胞、GITR<sup>+</sup>调节T细胞、LAP<sup>+</sup>调节T细胞、1B11<sup>+</sup>调节T细胞、BTLA<sup>+</sup>调节T细胞、1型调节T细胞 (Tr1细胞)、T辅助3型 (Th3) 细胞、自然杀伤T细胞表型的调节细胞 (NKTreg)、CD8<sup>+</sup>调节T细胞、CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>调节T细胞和/或分泌IL-10、IL-35、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、半乳凝素-1、IFN- $\gamma$  和/或MCP1的调节T细胞。

[0123] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白引起效应T细胞(例如,CD4+CD25<sup>-</sup>T细胞)的增加。在实施方案中,嵌合蛋白引起调节T细胞(例如,CD4+CD25<sup>+</sup>T细胞)的减少。

[0124] 在实施方案中,嵌合蛋白产生记忆应答,其可以例如能够预防复发,或保护动物免于复发,和/或预防或降低转移的可能性。因此,用嵌合蛋白处理的动物稍后能够在用嵌合蛋白初始处理之后暴露于相关抗原时攻击肿瘤细胞和/或预防肿瘤发展。因此,本发明的嵌合蛋白刺激活性肿瘤破坏,也刺激肿瘤抗原的免疫识别,这对于设计能够预防复发的记忆应答是必需的。

[0125] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白能够并且可以用于包括瞬时刺激效应免疫细胞不超过约12小时、约24小时、约48小时、约72小时或约96小时或者约1周或约2周的方法中。在实施方案中,本发明的嵌合蛋白能够并且可以用于包括瞬时消耗或抑制调节或免疫抑制细胞不超过约12小时、约24小时、约48小时、约72小时或约96小时或者约1周或约2周的方法中。在实施方案中,效应T细胞的瞬时刺激和/或免疫抑制细胞的瞬时消耗或抑制基本上发生在患者的血液或特定组织/位置(包括淋巴组织,例如像骨髓、淋巴结、脾脏、胸腺、粘膜相关淋巴组织(MALT),非淋巴组织)中或肿瘤微环境中。

[0126] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白质提供包括但不限于易于施用和易于生产的优点。这是因为将两种不同的免疫治疗剂组合成了单一产品,这允许单一制造过程代替两个独立的制造过程。此外,施用单一剂代替两种单独的剂允许更容易的施用和更大的患者依从性。

[0127] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白可作为可分泌的和完全功能的单一多肽链在哺乳动物宿主细胞中产生。

[0128] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白意外地提供细胞外结构域组分以缓慢的解离速率( $K_d$ 或 $K_{off}$ )与其各自的结合配偶体的结合。在实施方案中,这提供了受体与配体(并且反之亦然)的意外长的相互作用。这种效果允许持续的负信号掩蔽效果。此外,在实施方案中,这提供了更长的正信号效果,例如,以允许效应细胞被充分刺激用于抗肿瘤效果。例如,本发明的嵌合蛋白,例如通过长解离速率结合,允许足够的信号传递以提供T细胞增殖并允许抗肿瘤攻击。作为另一实例,本发明的嵌合蛋白,例如通过长解离速率结合,允许足够的信号传递以提供刺激信号(例如像细胞因子)的释放。

[0129] 由本发明的剂促进的细胞的稳定突触(例如,具有负信号的细胞和可以被刺激以攻击肿瘤的T细胞)提供空间取向以有利于肿瘤减少-诸如定位T细胞以攻击肿瘤细胞和/或在空间上防止肿瘤细胞递送负信号,其包括超出本发明的嵌合蛋白掩蔽的那些信号的负信号。

[0130] 在实施方案中,与嵌合蛋白的血清 $t_{1/2}$ 相比,这提供了更长的靶上(例如,肿瘤内)半衰期( $t_{1/2}$ )。此类特性可以具有降低脱靶毒性的组合优点,这与嵌合蛋白的全身分布有

关。

[0131] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白提供双相免疫效应,其提供快速和潜在应答。例如,通过OX40进行的直接T细胞共刺激或通过VSIG8进行的信号传导的抑制可以导致由T细胞(或其他免疫细胞)介导的抗肿瘤活性的立即增强,并且增强肿瘤生长和排斥的短期控制。在实施方案中,免疫细胞与VSIG8-Fc-OX40L之间的初始双重相互作用可以改变免疫致敏的强度或质量,并且有助于增强长期记忆T细胞免疫的产生。这种事件可以在肿瘤模型中通过增强的长期控制或平衡或建立的肿瘤而变得明显。在一些情况下,通过用VSIG8-Fc-OX40L处理程序化的免疫应答可以有助于在施用分子之后长时间延迟肿瘤排斥。

[0132] 此外,在实施方案中,本发明的嵌合蛋白提供协同治疗效果,因为它允许改善两种免疫治疗剂的位点特异性相互作用。

[0133] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白提供用于降低位点外毒性和/或全身毒性的潜力。

[0134] 在实施方案中,相对于目前的免疫疗法,例如如本文所述的针对检查点分子的抗体,本发明的嵌合蛋白提供减少的副作用,例如GI并发症。例示性GI并发症包括腹痛、食欲减退、自身免疫效应、便秘、痉挛、脱水、腹泻、进食问题、疲劳、胃肠胀气、腹腔积液或腹水、胃肠道(GI)生态失调、GI粘膜炎、炎性肠病、肠易激综合征(IBS-D和IBS-C)、恶心、疼痛、粪便或尿液变化、溃疡性结肠炎、呕吐、保留液重量增加和/或虚弱。

[0135] 疾病;治疗方法和患者选择

[0136] 在实施方案中,本发明涉及癌症和/或肿瘤;例如,癌症和/或肿瘤的治疗或预防。如本文其他地方所述,在实施方案中,癌症的治疗可以涉及用本发明的嵌合蛋白调节免疫系统以相对于免疫抑制有利于免疫刺激。

[0137] 癌症或肿瘤是指不受控制的细胞生长和/或异常增加的细胞存活和/或细胞凋亡的抑制,这干扰身体器官和系统的正常功能。包括良性和恶性肿瘤、息肉、增生、以及休眠肿瘤或微转移。还包括具有不受免疫系统阻碍的异常增殖的细胞(例如,病毒感染的细胞)。癌症可以是原发性癌症或转移性癌症。原发性癌症可以是在临床上可检测的起源部位的癌细胞区域,并且可以是原发性肿瘤。相比之下,转移性癌症可以是疾病从一个器官或部分到另一个非相邻器官或部分的扩散。转移性癌症可能由癌细胞引起,所述癌细胞获得穿透并浸润局部区域中的周围正常组织的能力,从而形成新肿瘤,其可以是局部转移。癌症还可能由癌细胞引起,所述癌细胞获得穿透淋巴管和/或血管壁的能力,之后癌细胞能够通过血液(由此成为循环肿瘤细胞)循环到身体的其他部位和组织。癌症可以是由于诸如淋巴或血液扩散等的过程。癌症还可能由肿瘤细胞引起,所述肿瘤细胞到达以停留在另一个部位,再次穿透血管或壁,继续繁殖,并最终形成另一个临床上可检测的肿瘤。癌症可以是这种新的肿瘤,其可以是转移性(或继发性)肿瘤。

[0138] 癌症还可能由已经转移的肿瘤细胞引起,其可以是继发性或转移性肿瘤。肿瘤细胞可以与原始肿瘤中的细胞相似。例如,如果乳腺癌或结肠癌转移到肝脏,则存在于肝脏中的继发性肿瘤由异常的乳腺细胞或结肠细胞组成,而不是由异常的肝细胞组成。因此,肝脏中的肿瘤可以是转移性乳腺癌或转移性结肠癌,而不是肝癌。

[0139] 癌症可能来源于任何组织。癌症可能来源于黑色素瘤、结肠、乳腺或前列腺,并因此可能分别由最初是皮肤、结肠、乳腺或前列腺的细胞组成。癌症也可以是血液恶性肿瘤,

其可以是白血病或淋巴瘤。癌症可能侵入诸如肝脏、肺、膀胱或肠道等组织。

[0140] 本发明的代表性癌症和/或肿瘤包括但不限于基底细胞癌,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;结直肠癌;结缔组织癌;消化系统的癌症;子宫内膜癌;食道癌;眼癌;头颈癌;胃癌(包括胃肠癌);胶质母细胞瘤;肝癌;肝细胞癌;上皮内肿瘤;肾癌;喉癌;白血病;肝癌;肺癌(例如,小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌);黑色素瘤;骨髓瘤;神经母细胞瘤;口腔癌(唇、舌、口和咽);卵巢癌;胰腺癌;前列腺癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;直肠癌;呼吸系统癌症;唾液腺癌;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;淋巴瘤包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞(SL)NHL;中级/滤泡性NHL;中级弥漫性NHL;高级免疫母细胞NHL;高级淋巴细胞NHL;高级小非裂解细胞NHL;巨大肿块NHL;套细胞淋巴瘤;艾滋病相关淋巴瘤;和华氏巨球蛋白血症;慢性淋巴细胞白血病(CLL);急性淋巴细胞白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性髓细胞白血病;以及其他癌和肉瘤;和移植后淋巴组织增生性障碍(PTLD)以及与癩痣病、水肿(诸如与脑肿瘤相关的水肿)和麦格综合征相关的异常血管增生。

[0141] 在实施方案中,嵌合蛋白用于治疗患有治疗难治性癌症的受试者。在实施方案中,嵌合蛋白用于治疗用一种或多种免疫调节剂难以治疗的受试者。例如,在实施方案中,嵌合蛋白用于治疗在治疗12周左右之后对治疗没有应答或甚至进展的受试者。例如,在实施方案中,受试者用PD-1和/或PD-L1和/或PD-L2剂难以治疗,包括例如纳武单抗(ONO-4538/BMS-936558、MDX1106、OPDIVO, BRISTOLMYERS SQUIBB)、派姆单抗(KEYTRUDA, MERCK)、匹地利珠单抗(pidilizumab)(CT-011, CURE TECH)、MK-3475(MERCK)、BMS 936559(BRISTOL MYERS SQUIBB)、依鲁替尼(PHARMACYCLICS/ABBVIE)、阿特珠单抗(TECENTRIQ, GENENTECH)和/或MPDL3280A(ROCHE)难治性患者。例如,在实施方案中,受试者用抗CTLA-4剂难以治疗,例如易普利姆玛(YERVOY)难治性患者(例如,黑色素瘤患者)。因此,在实施方案中,本发明提供了癌症治疗方法,其拯救对各种疗法(包括一种或多种免疫调节剂的单一疗法)无应答的患者。

[0142] 在实施方案中,本发明的方法提供了在另外的剂难以治疗的患者中使用嵌合蛋白的治疗,此类在本文其他地方描述的“另外的剂”包括但不限于本文所述的各种化学治疗剂。

[0143] 在实施方案中,嵌合蛋白用于治疗、控制或预防一种或多种炎性疾病或病状。炎性疾病的非限制性实例包括寻常痤疮、急性炎症、过敏性鼻炎、哮喘、动脉粥样硬化、特应性皮炎、自身免疫性疾病、自身炎症性疾病、常染色体隐性痉挛性共济失调、支气管扩张、乳糜泻、慢性胆囊炎、慢性炎症、慢性前列腺炎、结肠炎、憩室炎、家族性嗜酸性粒细胞增多症(fe)、肾小球肾炎、甘油激酶缺乏症、化脓性汗腺炎、过敏、炎症、炎性肠病、炎性盆腔疾病、间质性膀胱炎、喉炎性疾病、Leigh综合征、扁平苔癣、肥大细胞活化综合征、肥大细胞增多症、眼部炎性疾病、中耳炎、疼痛、盆腔炎性疾病、再灌注损伤、呼吸系统疾病、再狭窄、风湿热、类风湿性关节炎、鼻炎、结节病、感染性休克、矽肺病和其他尘肺病、移植排斥、肺结核和血管炎。

[0144] 在各种实施方案中,炎性疾病是自身免疫性疾病或病状,诸如多发性硬化、糖尿病、狼疮、乳糜泻、克罗恩病、溃疡性结肠炎、格林-巴利综合征、硬皮病、古德帕斯彻氏综合

症、韦格纳肉芽肿病、自身免疫性癫痫、拉斯穆森脑炎、原发性胆汁硬化、硬化性胆管炎、自身免疫性肝炎、艾迪生病、桥本氏甲状腺炎、纤维肌痛、梅尼尔综合征、移植排斥(例如,预防同种异体移植物排斥)、恶性贫血、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、皮炎、干燥综合征、红斑狼疮、多发性硬化症、重症肌无力、赖特氏综合症、格雷夫氏病和其他自身免疫性疾病。

[0145] 在各方面,本发明的嵌合剂用于例如通过OX40L的细胞外结构域活化T细胞的方法中。

[0146] 在各方面,本发明的嵌合剂用于通过VSIG8的细胞外结构域防止免疫抑制信号的细胞传递的方法中。

[0147] 组合疗法和缀合

[0148] 在实施方案中,本发明提供了嵌合蛋白和方法,所述方法还包括向受试者施用另外的剂。在实施方案中,本发明涉及共同施用和/或共制剂。本文所述的任何组合物可以共同配制和/或共同施用。

[0149] 在实施方案中,本文所述的任何嵌合蛋白在与另一种剂共同施用或以协同方式起作用,并且以低于在此类剂用作单一疗法时通常采用的剂量进行施用。在实施方案中,本文提及的任何剂都可以与本文所述的任何嵌合蛋白组合使用。

[0150] 在实施方案中,包含如本文所述的VSIG8的细胞外结构域的本发明的嵌合蛋白与另一种嵌合蛋白共同施用。在实施方案中,包含如本文所述的VSIG8的细胞外结构域的本发明的嵌合蛋白与另一种嵌合蛋白(例如,调节适应性免疫应答的嵌合蛋白)共同施用。在实施方案中,包含如本文所述的VSIG8的细胞外结构域的本发明的嵌合蛋白与包含CSF1R、CD40L、PD-1、GITRL、4-1BBL、SIRP $\alpha$ 、TIM3、TIGIT和LIGHT中的一种或多种的嵌合蛋白共同施用。不希望受理论束缚,据信涉及施用本发明的诱导适应性免疫应答的嵌合蛋白和一种或多种诱导先天免疫应答的嵌合蛋白的组合方案可以提供协同效应(例如,协同抗肿瘤效果)。

[0151] 任何诱导先天免疫应答的嵌合蛋白都可以用于本发明。例如,嵌合蛋白可以是U.S. 62/464,002中公开的诱导先天免疫应答的嵌合蛋白中的任一种。在此类实施方案中,嵌合蛋白在N-末端处或附近包含I型跨膜蛋白的第一细胞外结构域并且在C-末端处或附近包含II型跨膜蛋白的第二细胞外结构域,其中第一细胞外结构域和第二细胞外结构域中的一种提供免疫抑制信号,并且第一细胞外结构域和第二细胞外结构域中的一种提供免疫刺激信号,如U.S. 62/464,002中公开的,其全部内容特此以引用的方式并入。在示例性实施方案中,诱导先天免疫应答的嵌合蛋白是在N-末端包含CSF1R的细胞外结构域并且在C-末端包含CD40L的细胞外结构域的嵌合蛋白。在实施方案中,诱导先天免疫应答的嵌合蛋白是在N-末端包含SIRP $\alpha$ 的细胞外结构域并且在C-末端包含CD40L的细胞外结构域的嵌合蛋白。

[0152] 在实施方案中,包含如本文所述的VSIG8的细胞外结构域的本发明的嵌合蛋白向先前已施用嵌合蛋白以刺激先天免疫应答(例如,基于CSF1R的嵌合蛋白)的患者施用。例如,包含VSIG8的细胞外结构域的本发明的嵌合蛋白可以在刺激先天免疫应答的嵌合蛋白(例如,基于CSF1R的嵌合蛋白)之后,包括1天后、或2天后、或3天后、或4天后、或5天后、或6天后、或1周后、或2周后、或3周后、或4周后施用。

[0153] 在包括但不限于癌症应用的实施方案中,本发明涉及化学治疗剂作为另外的剂。化学治疗剂的实例包括但不限于烷化剂,诸如噻替派和CYTOXAN环磷酰胺;烷基磺酸盐,诸

如白消安、英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (piposulfan); 氮丙啶, 诸如苯佐替哌 (benzodopa)、卡波醌 (carboquone)、美妥替哌 (meturedopa) 和乌瑞替哌 (uredopa); 乙烯亚胺和甲基三聚氰胺, 包括六甲蜜胺、三乙烯三聚氰胺、三乙烯磷酰胺、三乙烯硫代磷酰胺和三羟甲基三聚氰胺; 多聚乙酰 (例如, 布拉它辛 (bullatacin) 和布拉它辛酮 (bullatacinone)); 喜树碱 (包括合成类似物拓扑替康); 苔藓抑素; 卡莉他汀 (callystatin); 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); 念珠藻素 (例如, 念珠藻素1和念珠藻素8); 尾海兔素; 多卡霉素 (duocarmycin) (包括合成类似物KW-2189和CB 1-TM1); 艾榴塞洛素 (eleutherobin); 水鬼蕉碱 (pancratistatin); 匍枝珊瑚醇 (sarcodictyin); 海绵抑制素 (spongistatin); 氮芥, 诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺、雌氮芥、异环磷酰胺、盐酸氮芥 (mechlorethamine)、盐酸甲氧氮芥、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、泼尼氮芥、三芥环磷酰胺、乌拉莫司汀; 亚硝基脲类, 诸如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀; 抗生素, 诸如烯二炔抗生素 (例如, 加利车霉素, 特别是加利车霉素  $\gamma$  和加利车霉素  $\omega$  (参见例如, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))); 达内霉素, 包括达内霉素A; 二膦酸盐, 诸如氯膦酸盐; 拉霉素; 以及新制癌菌素生色团和有关色蛋白烯二炔抗生素生色团)、阿克拉霉素、放射菌素、氨基霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡柔比星、洋红霉素、嗜癌素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN阿霉素 (包括吗啉-阿霉素、氰基吗啉-阿霉素、2-吡咯啉-阿霉素和脱氧阿霉素)、表阿霉素、依索比星、去甲氧基柔红霉素、麻西罗霉素、丝裂霉素 (诸如丝裂霉素C)、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星; 抗代谢物, 诸如甲氨喋呤和5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸、甲氨喋呤、蝶罗呤、曲美沙特; 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物, 诸如环胞苷、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他宾、氟尿苷; 雄激素, 诸如卡鲁睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷、睾内脂; 抗肾上腺素, 诸如氨鲁米特 (minoglutethimide)、米托坦、曲洛司坦; 叶酸补充物, 诸如亚叶酸 (frolinic acid); 醋葡萄糖内酯; 醛磷酰胺糖苷; 氨基乙酰丙酸; 恩尿嘧啶; 安吡啶; 倍思塔布 (bestrabucil); 比山群; 依达曲沙 (edatraxate); 地美可辛; 地吡醌 (diaziquone); 依氟鸟氨酸; 依利醋铵; 埃博霉素; 依托格鲁; 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖; 氯尼达明; 美登素类化合物, 诸如美登素和安丝菌素; 米托胍脲; 米托蒽醌; 莫哌达醇; 硝胺; 喷司他丁; 苯来美特; 吡柔比星; 洛索蒽醌; 鬼臼酸; 2-乙基酰肼; 甲基苄肼; PSK多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); 雷佐生; 根霉菌素; 西佐喃 (sizofuran); 锗螺胺; 细交链孢菌酮酸; 三亚胺醌; 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢霉烯 (例如, T-2毒素、疣孢菌素A (verracurin A)、漆斑菌素A和蛇形毒素 (anguidine)); 尿烷; 长春地辛; 达卡巴嗪; 甘露醇氮芥; 二溴甘露醇; 二溴卫矛醇; 哌泊溴烷; 加西托新 (gacytosine); 阿拉伯糖苷 ("Ara-C"); 环磷酰胺; 噻替派; 紫杉烷类, 例如 TAXOL紫杉醇 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、无氢化蓖麻油的 ABRAXANE、紫杉醇的白蛋白工程化的纳米颗粒制剂 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, 111.) 和 TAXOTERE多烯紫杉醇 (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥; GEMZAR吉西他滨; 6-硫鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 甲氨喋呤; 铂类似物, 诸如顺铂、奥沙利铂

和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;NAVELBINE长春瑞滨;盐酸米托恩醌;替尼泊苷;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;伊立替康(Camptosar,CPT-11)(包括伊立替康与5-FU和甲酰四氢叶酸的治疗方案);拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类维生素A,诸如视黄酸;卡培他滨;康普瑞汀;甲酰四氢叶酸(LV);奥沙利铂,包括奥沙利铂治疗方案(FOLFOX);拉帕替尼(TYKERB);降低细胞增殖的PKC- $\alpha$ 、Raf、H-Ras、EGFR(例如厄洛替尼(Tarceva))和VEGF-A的抑制剂以及以上任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。此外,治疗方法还可以包括使用放射。此外,治疗方法还可以包括使用光动力治疗。

[0154] 在包括但不限于癌症应用的实施方案中,本发明的另外的剂是一种或多种免疫调节剂,其选自阻断、降低和/或抑制PD-1和PD-L1或PD-L2和/或PD-1与PD-L1或PD-L2的结合的剂(非限制性地例如以下中的一种或多种:纳武单抗(ONO-4538/BMS-936558、MDX1106、OPDIVO, BRISTOL MYERS SQUIBB)、派姆单抗(KEYTRUDA, Merck)、匹地利珠单抗(CT-011, CURE TECH)、MK-3475(MERCK)、BMS-936559(BRISTOL MYERS SQUIBB)、阿特殊单抗(TECENTRIQ, GENENTECH)、MPDL3280A(ROCHE)),增加和/或刺激CD137(4-1BB)和/或CD137(4-1BB)与一种或多种4-1BB配体的结合的剂(非限制性地例如,urelumab(BMS-663513和抗4-1BB抗体),以及阻断、降低和/或抑制CTLA-4的活性和/或CTLA-4与AP2M1、CD80、CD86、SHP-2和PPP2R5A中的一种或多种的结合和/或OX40与OX40L的结合的剂(非限制性地例如,GBR-830(GLENMARK)、MEDI-6469(MEDIMMUNE))。

[0155] 在包括但不限于感染性疾病应用的实施方案中,本发明涉及抗感染药物作为另外的剂。在实施方案中,抗感染药物是抗病毒剂,包括但不限于阿巴卡韦、阿昔洛韦、阿德福韦、安普那韦、阿扎那韦、西多福韦、地瑞那韦、地拉夫定、地达诺新、二十二烷醇、依法韦仑、埃替格韦、恩曲他滨、恩夫韦肽、依曲韦林、泛昔洛韦和膦甲酸。在实施方案中,抗感染药物是抗菌剂,包括但不限于,头孢菌素类抗生素(头孢氨苄、头孢呋辛、头孢羟氨苄、头孢唑啉、头孢噻吩、头孢克罗、头孢孟多、头孢西丁、头孢丙烯和头孢托罗);氟喹诺酮类抗生素(环丙沙星、左氟沙星、氧氟沙星、加替沙星、莫西沙星和诺氟沙星);四环素类抗生素(四环素、米诺环素、土霉素和多西环素);青霉素类抗生素(阿莫西林、氨苄西林、青霉素V、双氯青霉素、羧苄西林、万古霉素和甲氧西林);单环类抗生素(氨基糖苷);和碳青霉烯类抗生素(厄他培南、多利培南、亚胺培南/西司他丁和美罗培南)。在实施方案中,抗感染药物包括抗疟疾剂(例如氯喹、奎宁、甲氟喹、伯氨喹、多西环素、蒿甲醚/苯芴醇、阿托夸酮/氯胍和磺胺多辛/乙胺嘧啶)、甲硝唑、替硝唑、伊维菌素、双羟萘酸噻嘧啶和阿苯达唑。

[0156] 在包括但不限于自身免疫性疾病应用的实施方案中,另外的剂是免疫抑制剂。在实施方案中,免疫抑制剂是抗炎剂,诸如甾体抗炎剂或非甾体抗炎剂(NSAID)。类固醇,特别是肾上腺皮质类固醇及其合成类似物,是本领域熟知的。可用于本发明的皮质类固醇的实例包括但不限于羟基曲安西龙、 $\alpha$ -甲基地塞米松、 $\beta$ -甲基倍他米松、二丙酸倍氯米松、苯甲酸倍他米松、二丙酸倍他米松、戊酸倍他米松、戊酸氯倍他素、羟泼尼缩松、去羟米松、地塞米松、双乙酸双氟拉松、戊酸双氟可龙、氟雄诺龙(fludrenolone)、氟氯缩松、特戊酸氟米松、氟轻松缩丙酮(flusinolone acetonide)、氟轻松乙酸酯、氟可丁酯(flucortine butylesters)、氟可龙(flucortolone)、乙酸氟泼尼定(fluprednidene/fluprednylidene)、氟氢缩松(flurandrenolone)、哈西奈德、乙酸氢化可的松、丁酸氢化可

的松、甲基泼尼松龙、曲安奈德、可的松、可托多松、肤轻松 (flucetonide)、氟氢可的松、双乙酸双氟若松 (difluorosone diacetate)、氟若卓龙缩丙酮 (fluradrenolone acetone)、甲羟松、安西那飞、安西非特、倍他米松以及其平衡酯、氯泼尼松、可洛替龙 (clocortelone)、可洛西龙 (clescinolone)、双氯松、二氟泼尼酯、氟氯奈德 (flucloronide)、氟尼缩松、氟米龙、氟培龙、氟泼尼龙、氢化可的松、甲泼尼松、帕拉米松、泼尼松龙、泼尼松、二丙酸倍氯米松。可用于本发明的 (NSAIDS) 包括但不限于水杨酸、乙酰水杨酸、水杨酸甲酯、水杨酸乙二醇酯、水杨酰胺、苄基-2,5-二乙酰氧基苯甲酸、布洛芬、富林酸、萘普生、酮洛芬、依托芬那酯、保泰松和吲哚美辛。在实施方案中,免疫抑制剂可以是细胞抑制剂,诸如烷化剂、抗代谢物 (例如,咪唑硫嘌呤、甲氨蝶呤)、细胞毒性抗生素、抗体 (例如巴利昔单抗、达克珠单抗和莫罗单抗 (muromonab))、抗免疫亲和素 (例如环孢菌素、他克莫司、西罗莫司)、干扰素、阿片类药物、TNF结合蛋白、霉酚酸酯和小生物剂 (例如,芬戈莫德、多球壳菌素 (myriocin))。

[0157] 在实施方案中,本文所述的嵌合蛋白 (和/或另外的剂) 包括经修饰的衍生物,即通过任何类型的分子与组合物的共价连接,使得共价连接不会妨碍组合物的活性。例如但不限于,衍生物包括通过尤其是糖基化、脂化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团的衍生化、蛋白水解性裂解、与细胞配体或其他蛋白质的连接等进行修饰的组合物。可以通过已知技术进行许多化学修饰中的任一种,所述技术包括但不限于特定的化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素 (turicamycin) 的代谢合成等。另外,衍生物可以含有一种或多种非经典氨基酸。在实施方案中,本文所述的嵌合蛋白 (和/或另外的剂) 还包括细胞毒性剂,在例示性实施方案中,其包括毒素、化学治疗剂、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述的组合物缀合。

[0158] 因此本文所述的嵌合蛋白 (和/或另外的剂) 可以经翻译后修饰以添加效应子部分 (诸如化学接头)、可检测部分 (例如像荧光染料、酶、底物、生物发光物质、放射性物质和化学发光部分)、或功能性部分 (例如像抗生蛋白链菌素、抗生物素蛋白、生物素、细胞毒素、细胞毒性剂和放射性物质)。

[0159] 制剂

[0160] 本文所述的嵌合蛋白 (和/或另外的剂) 可以具有足够的可以与无机酸或有机酸反应以形成药学上可接受的盐的碱性官能团,或者可以与无机碱或有机碱反应以形成药学上可接受的盐的羧基基团。药学上可接受的酸加成盐由药学上可接受的酸形成,如本领域已熟知的。此类盐包括例如以下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),Verlag,Zurich(Switzerland)2002,其特此以引用的方式整体并入。

[0161] 在某些实施方案中,本文所述的组合物呈药学上可接受的盐的形式。

[0162] 此外,本文所述的任何嵌合蛋白 (和/或另外的剂) 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向受试者施用。此类组合物可以任选地包含合适量的药学上可接受的赋形剂以便提供用于适当施用的形式。药物赋形剂可以是液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或者合成来源的那些,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等等。药物赋形剂可以是例如盐水、阿拉伯树胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白、硅胶、尿素等等。此外,可以使

用助剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂以及着色剂。在实施方案中,当向受试者施用,药学上可接受的赋形剂是无菌的。当静脉内施用本文所述的任何剂时,水是可行的赋形剂。盐溶液和葡萄糖水溶液以及甘油溶液也可以用作液体赋形剂,特别是对于可注射的溶液而言。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、脱脂乳粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等等。如果需要,本文所述的任何剂还可以包含少量的润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。

[0163] 在实施方案中,本文所述的组合物悬浮在盐水缓冲液(包括但不限于TBS、PBS等)中。

[0164] 在实施方案中,嵌合蛋白可以通过与另一种剂缀合和/或融合来延长半衰期或以其他方式改善药效动力学和药代动力学特性。在实施方案中,嵌合蛋白可以与PEG、XTEN(例如,作为rPEG)、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种或多种融合或缀合。在实施方案中,每个个体嵌合蛋白与BioDrugs(2015)29:215-239中描述的一种或多种剂融合,所述文献的全部内容特此以引用的方式并入。

[0165] 施用、给药和治疗方案

[0166] 本发明包括呈各种制剂形式的所述嵌合蛋白(和/或另外的剂)。本文所述的任何嵌合蛋白(和/或另外的剂)可以采取以下形式:溶液、悬浮剂、乳剂、滴剂、片剂、丸剂、微丸剂、胶囊、含有液体的胶囊、散剂、缓释制剂、栓剂、乳剂、气雾剂、喷雾剂、悬浮剂或适合使用的任何其他形式。也可以使用编码蛋白质序列的DNA或RNA构建体。在实施方案中,所述组合物呈胶囊的形式(参见例如,美国专利号5,698,155)。合适的药物赋形剂的其他实例描述于Remington's Pharmaceutical Sciences 1447-1676(Alfonso R.Gennaro编,第19版,1995)中,其以引用的方式并入本文。

[0167] 必要时,包含嵌合蛋白(和/或另外的剂)的制剂还可以包含增溶剂。另外,可以用本领域已知的合适的媒介物或递送装置来递送所述剂。本文概述的组合法可以在单个递送媒介物或递送装置中共同递送。用于施用的组合物可以任选地包含局部麻醉剂,例如像利多卡因,以减轻注射部位的疼痛。

[0168] 包含本发明的嵌合蛋白(和/或另外的剂)的制剂可以方便地以单位剂量的形式提供并且可以通过制药领域所熟知的任何方法进行制备。此类方法一般包括使治疗剂与由一种或多种附加成分所构成的载体缔合的步骤。通常,通过将治疗剂均一旦紧密地与液态载体、细化的固态载体或两者缔合,然后在必要时将产品成型为所需制剂的剂量形式(例如,湿法或干法制粒、粉末共混等,然后使用本领域已知的常规方法压片),来制备所述制剂。

[0169] 在实施方案中,本文所述的任何嵌合蛋白(和/或另外的剂)根据常规程序作为适合于本文所述的施用模式的组合物进行配制。

[0170] 施用路径包括例如:皮内、肿瘤内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、口服、舌下、鼻内、脑内、阴道内、经皮、直肠、通过吸入、或局部,特别是施用到耳、鼻、眼、或皮肤。在实施方案中,所述施用通过口服或通过肠胃外注射实现。在一些情况下,施用导致本文所述的任何剂释放到血流中,或可替代地,所述剂直接施用到活动性疾病的部位。

[0171] 本文所述的任何嵌合蛋白(和/或另外的剂)可以通过口服施用。此类嵌合蛋白(和/或另外的剂)也可以通过任何其他常规途径施用,例如通过静脉内输注或推注、通过经

上皮或粘膜皮肤衬层(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,并且可以与另一种生物活性剂一起施用。施用可为全身性或局部的。不同递送系统为已知的,例如脂质体、微粒、微胶囊、胶囊等中的包囊化,并且可以用于施用。

[0172] 在具体实施方案中,可能希望向需要治疗的区域局部施用。在实施方案中,例如在癌症的治疗中,嵌合蛋白(和/或另外的剂)在肿瘤微环境(例如,围绕肿瘤细胞和/或为肿瘤细胞提供营养的细胞、分子、细胞外基质和/或血管,其包括例如肿瘤脉管系统;肿瘤浸润淋巴细胞;成纤维细胞网状细胞;内皮祖细胞(EPC);癌症相关成纤维细胞;周细胞;其他基质细胞;细胞外基质(ECM)的组分;树突细胞;抗原呈递细胞;T细胞;调节T细胞;巨噬细胞;嗜中性粒细胞;和位于肿瘤附近的其他免疫细胞)或淋巴结中进行施用并且/或者靶向肿瘤微环境或淋巴结。在实施方案中,例如在癌症的治疗中,嵌合蛋白(和/或另外的剂)在肿瘤内施用。

[0173] 在实施方案中,本发明的嵌合蛋白允许双重效果,其提供的副作用比常规免疫疗法(例如,使用OPDIVO、KEYTRUDA、YERVOY和TECENTRIQ中的一种或多种的治疗)中所见的更少。例如,本发明的嵌合蛋白降低或预防通常观察到的影响各种组织和器官的免疫相关不良事件,所述组织和器官包括皮肤、胃肠道、肾脏、外周和中枢神经系统、肝脏、淋巴结、眼睛、胰腺和内分泌系统;所述免疫相关不良事件诸如垂体炎、结肠炎、肝炎、肺炎、皮疹和风湿性疾病。此外,本发明的局部施用,例如肿瘤内施用,避免了与常规免疫疗法(例如,使用OPDIVO、KEYTRUDA、YERVOY和TECENTRIQ中的一种或多种的治疗)一起使用时标准全身施用(例如静脉内输注)中所见的不良事件。

[0174] 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、悬浮剂、分散体、乳剂等。它们也可以制造成无菌固体组合物(例如,冻干组合物)的形式,其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已知的悬浮剂或分散剂。

[0175] 本文所述的任何嵌合蛋白(和/或另外的剂)的剂量以及给药方案可以取决于各种参数,其包括但不限于所治疗的疾病、受试者的一般健康状况和施用医师的判断。可以在向有需要的受试者施用另外的剂之前(例如,之前5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周)、同时、或之后(例如,之后5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周)施用本文所述的任何嵌合蛋白。在实施方案中,本文所述的任何嵌合蛋白和另外的剂的施用间隔1分钟、间隔10分钟、间隔30分钟、间隔小于1小时、间隔1小时、间隔1小时至2小时、间隔2小时至3小时、间隔3小时至4小时、间隔4小时至5小时、间隔5小时至6小时、间隔6小时至7小时、间隔7小时至8小时、间隔8小时至9小时、间隔9小时至10小时、间隔10小时至11小时、间隔11小时至12小时、间隔1天、间隔2天、间隔3天、间隔4天、间隔5天、间隔6天、间隔1周、间隔2周、间隔3周、或间隔4周。

[0176] 在实施方案中,本发明涉及包含VSIG8的细胞外结构域的本发明的嵌合蛋白和诱导先天免疫应答的另一种嵌合蛋白的共同施用。在此类实施方案中,本发明的嵌合蛋白可以在施用诱导先天免疫应答的嵌合蛋白之前、同时或之后施用。例如,嵌合蛋白的施用可以间隔1分钟、间隔10分钟、间隔30分钟、间隔小于1小时、间隔1小时、间隔1小时至2小时、间隔

2小时至3小时、间隔3小时至4小时、间隔4小时至5小时、间隔5小时至6小时、间隔6小时至7小时、间隔7小时至8小时、间隔8小时至9小时、间隔9小时至10小时、间隔10小时至11小时、间隔11小时至12小时、间隔1天、间隔2天、间隔3天、间隔4天、间隔5天、间隔6天、间隔1周、间隔2周、间隔3周、或间隔4周。在示例性实施方案中,包含VSIG8的细胞外结构域的本发明的嵌合蛋白和诱导先天免疫应答的嵌合蛋白间隔1周施用,或者在隔周施用(即,施用包含VSIG8的细胞外结构域的本发明的嵌合蛋白1周后施用诱导先天免疫应答的嵌合蛋白,等等)。

[0177] 本文所述的任何嵌合蛋白(和/或另外的剂)的剂量可以取决于若干种因素,其包括病状的严重性,病状是否被治疗或预防以及待治疗的受试者的年龄、体重和健康。另外,关于具体受试者的药物基因组(基因型对治疗剂的药代动力学、药效动力学或功效的曲线的作用)信息可以影响所使用的剂量。此外,精确的个体剂量可以根据多种因素稍微调整,所述因素包括正在施用的剂的特定组合、施用的时间、施用的路径、制剂的性质、排泄的速率、所治疗的特定疾病、病症的严重性以及病症的解剖学位置。可以预期一些剂量变化。

[0178] 对于通过肠胃外注射施用本文所述的任何嵌合蛋白(和/或另外的剂),剂量可以是每天约0.1mg至约250mg、每天约1mg至约20mg、或每天约3mg至约5mg。一般来讲,当通过口服或肠胃外施用时,本文所述的任何剂的剂量可以是每天约0.1mg至约1500mg、或每天约0.5mg至约10mg、或每天约0.5mg至约5mg、或每天约200至约1,200mg(例如,每天约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg、约1,000mg、约1,100mg、约1,200mg)。

[0179] 在实施方案中,本文所述的嵌合蛋白(和/或另外的剂)的施用是通过肠胃外注射,其剂量为每次治疗约0.1mg至约1500mg、或每次治疗约0.5mg至约10mg、或每次治疗约0.5mg至约5mg、或每次治疗约200至约1,200mg(例如,每次治疗约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg、约1,000mg、约1,100mg、约1,200mg)。

[0180] 在实施方案中,嵌合蛋白(和/或另外的剂)的合适剂量在约0.01mg/kg至约100mg/kg体重、或约0.01mg/kg至约10mg/kg受试者体重的范围内,例如,约0.01mg/kg、约0.02mg/kg、约0.03mg/kg、约0.04mg/kg、约0.05mg/kg、约0.06mg/kg、约0.07mg/kg、约0.08mg/kg、约0.09mg/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,包括它们之间的所有值和范围。

[0181] 在实施方案中,递送可以是在囊泡中,具体地是在脂质体中(参见,Langer,1990, Science 249:1527-1533;Treat等,in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer,Lopez-Berestein和Fidler(编),Liss,New York,第353-365页(1989))。

[0182] 本文所述的任何嵌合蛋白(和/或另外的剂)可以通过控释或缓释方式或者通过本领域普通技术人员熟知的递送装置进行施用。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中所述的那些;所述专利中各自以引

用的方式并入本文。此类剂型可以适用于使用例如羟丙基甲基纤维素、其他聚合物基质、凝胶、可渗透性膜、渗透系统、多层包衣、微粒、脂质体、微球体或其组合来提供一种或多种活性成分的控释或缓释,从而以不同比例提供所需的释放曲线。活性成分的控释或缓释可以通过各种条件来刺激,所述条件包括但不限于pH的变化、温度的变化、通过适当波长的光的刺激、酶的浓度或利用度、水的浓度或利用度或者其他生理学条件或化合物。

[0183] 在实施方案中,可以使用聚合材料(参见Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise(编),CRC Pres.,Boca Raton,Florida(1974);Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance,Smolen和Ball(编),Wiley,New York(1984);Ranger和Peppas,1983,J.Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.23:61;还参见Levy等,1985,Science 228:190;During等,1989,Ann.Neuro 1.25:351;Howard等,1989,J.Neurosurg.71:105)。

[0184] 在实施方案中,控释系统可以放置在待治疗的靶标区域附近,由此仅需要全身剂量的一部分(参见例如,Goodson,在Medical Applications of Controlled Release中,同上,第2卷,第115-138页(1984))。可以使用在综述Langer,1990,Science 249:1527-1533)中讨论的其他控释系统。

[0185] 本文所述的任何嵌合蛋白(和/或另外的剂)的施用可以独立地为每天一至四次,或每月一至四次,或每年一至六次,或者每两年、三年、四年或五年一次。施用可以持续一天或一个月、两个月、三个月、六个月、一年、两年、三年的持续时间,并且可以甚至持续受试者的一生。

[0186] 利用本文所述的任何嵌合蛋白(和/或另外的剂)的给药方案可以根据多种因素进行选择,所述因素包括受试者的类型、种族、年龄、体重、性别以及医学病状;待治疗的病状的严重性;施用的路径;受试者的肾功能或肝功能;个体的药物基因组组成;以及所采用的本发明的特定化合物。本文所述的任何嵌合蛋白(和/或另外的剂)可以单一日剂量进行施用,或者总日剂量可以每日两次、三次或四次的分剂量进行施用。此外,本文所述的任何嵌合蛋白(和/或另外的剂)可以贯穿剂量方案连续地而不是间歇地进行施用。

[0187] 细胞和核酸

[0188] 在实施方案中,本发明提供了一种表达载体,其包含编码本文所述的嵌合蛋白的核酸。在实施方案中,表达载体包含DNA或RNA。在实施方案中,表达载体是哺乳动物表达载体。

[0189] 原核载体和真核载体均可以用于表达嵌合蛋白。原核载体包括基于大肠杆菌序列的构建体(参见例如,Makrides,Microbiol Rev 1996,60:512-538)。可以用于在大肠杆菌中表达的调节区的非限制性实例包括lac、trp、lpp、phoA、recA、tac、T3、T7和 $\lambda P_L$ 。原核表达载体的非限制性实例可以包括 $\lambda$ gt载体系列诸如如 $\lambda$ gt11(Huynh等,在“DNA Cloning Techniques,Vol.I:A Practical Approach,”中1984,(D.Glover编),第49-78页,IRL Press,Oxford),以及pET载体系列(Studier等,Methods Enzymol 1990,185:60-89)。然而,原核宿主-载体体系不能对哺乳动物细胞进行大量的翻译后加工。因此,真核宿主-载体体系可能特别有用。多种调节区可以用于在哺乳动物宿主细胞中表达嵌合蛋白。例如,可以使用SV40早期和晚期启动子、巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子和劳斯肉瘤病毒长末端重复序列(RSV-L TR)启动子。可以用于哺乳动物细胞的诱导型启动子包括但不限于与金属硫蛋

白II基因、小鼠乳腺肿瘤病毒糖皮质激素反应性长末端重复序列(MMTV-LTR)、 $\beta$ -干扰素基因和hsp70基因相关的启动子(参见,Williams等,Cancer Res 1989,49:2735-42;和Taylor等,Mol Cell Biol 1990,10:165-75)。热休克启动子或应激启动子也可能有利于驱动重组宿主细胞中嵌合蛋白的表达。

[0190] 在实施方案中,本发明的表达载体包含编码嵌合蛋白(和/或另外的剂)的核酸或其互补物,其可操作地连接到在哺乳动物细胞中是功能性的表达控制区或其互补物。表达控制区能够驱动可操作地连接的阻断剂和/或刺激剂编码核酸的表达,使得在经所述表达载体转化的人细胞中产生所述阻断剂和/或刺激剂。

[0191] 表达控制区是影响可操作地连接的核酸的表达的调节聚核苷酸(在本文中有时称为元件),诸如启动子和增强子。本发明的表达载体的表达控制区能够使可操作地连接的编码核酸在人细胞中表达。在实施方案中,细胞是肿瘤细胞。在实施方案中,细胞是非肿瘤细胞。在实施方案中,表达控制区使得可操作地连接的核酸的表达可调节。信号(有时称为刺激物)可以增加或减少可操作地连接到这种表达控制区的核酸的表达。响应于信号而增加表达的此类表达控制区通常称为诱导性。响应于信号而减少表达的此类表达控制区通常称为阻遏性。通常,由此类元件所赋予的增加或减少的量与所存在信号的量成比例;信号量越大,表达的增加或减少越大。

[0192] 在实施方案中,本发明考虑使用能够响应于提示瞬时实现高水平表达的诱导型启动子。例如,当与肿瘤细胞接近时,通过将转化细胞暴露于适当的提示,诱导经包含这种表达控制序列的嵌合蛋白(和/或另外的剂)的表达载体转化的细胞,以瞬时产生高水平的剂。例示性诱导型表达控制区包括包含用提示(诸如小分子化合物)刺激的诱导型启动子的诱导型表达控制区。具体的实例可以见于例如美国专利号5,989,910、5,935,934、6,015,709和6,004,941中,所述专利各自以引用的方式整体并入本文。

[0193] 表达控制区和基因座控制区包括全长启动子序列(诸如天然启动子和增强子元件),以及保留全部或部分全长或非变异型功能的子序列或聚核苷酸变体。如本文所用,术语“功能性”和其语法变体当在提及核酸序列、子序列或片段的情况下使用时,意指所述序列具有天然核酸序列(例如非变异型或未修饰序列)的一种或多种功能。

[0194] 如本文所用,“可操作的连接”是指所述组分的实体并置关系允许其以预定方式起作用。在表达控制元件与核酸可操作地连接的实例中,所述关系使得控制元件调节所述核酸的表达。通常,调节转录的表达控制区并置于所转录核酸的5'端附近(即“上游”)。表达控制区还可以位于所转录序列的3'端(即“下游”)或在转录物内(例如在内含子中)。表达控制元件可以位于离所转录序列一定距离处(例如离所述核酸100至500、500至1000、2000至5000或更多个核苷酸)。表达控制元件的特定实例是启动子,其通常位于所转录序列的5'。表达控制元件的另一个实例是增强子,其可以位于所转录序列的5'或3',或在所转录序列的内部。

[0195] 在人细胞中具功能性的表达体系在本领域中是熟知的,并且包括病毒体系。一般来讲,在人细胞中具功能性的启动子是能够结合哺乳动物RNA聚合酶并起始下游(3')编码序列转录成mRNA的任何DNA序列。启动子将具有转录起始区,其通常置于编码序列5'端附近,并且TATA盒通常位于转录起始位点上游25-30个碱基对处。认为TATA盒引导RNA聚合酶II在正确位点开始RNA合成。启动子通常还含有上游启动子元件(增强子元件),其通常位于

TATA盒上游100至200个碱基对内。上游启动子元件决定转录起始速率并且可以任何取向起作用。来自哺乳动物病毒基因的启动子特别适合用作启动子,因为病毒基因通常是高表达的并且具有广泛的宿主范围。实例包括SV40早期启动子、小鼠哺乳动物肿瘤病毒LTR启动子、腺病毒主要晚期启动子、单纯疱疹病毒启动子和CMV启动子。

[0196] 通常,由哺乳动物细胞识别的转录终止和聚腺苷酸化序列是位于转录终止密码子3'的调节区,并且因此连同启动子元件一起侧接编码序列。成熟mRNA的3'末端由位点特异性翻译后裂解和聚腺苷酸化形成。转录终止子和聚腺苷酸化信号的实例包括来源于SV40的那些。表达构建体中还可以包括内含子。

[0197] 存在多种可用于将核酸引入活细胞中的技术。适用于在体外将核酸转移至哺乳动物细胞中的技术包括使用脂质体、电穿孔、微注射、细胞融合、基于聚合物的体系、DEAE-葡聚糖、病毒转导、磷酸钙沉淀法等。对于体内基因转移,也可以使用多种技术和试剂,包括脂质体;基于天然聚合物的递送媒介物,诸如壳聚糖和明胶;病毒载体也适用于体内转导。在一些情况下,希望提供靶向剂,诸如对于肿瘤细胞表面膜蛋白具有特异性的抗体或配体。在采用脂质体的情况下,结合与内吞作用相关联的细胞表面膜蛋白的蛋白质可以用于靶向和/或促进摄取,例如亲近特定细胞类型的衣壳蛋白或其片段、在循环中进行内化的蛋白质的抗体、靶向细胞内定位并增强细胞内半衰期的蛋白质。例如,受体介导的内吞作用的技术描述于,例如,Wu等,J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987);和Wagner等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)。

[0198] 适当时,还可以采用基因递送剂,例如像整合序列。许多整合序列在本领域中是已知的(参见例如,Nunes-Duby等,Nucleic Acids Res. 26:391-406,1998;Sadwoski, J. Bacteriol., 165:341-357,1986;Bestor, Cell, 122(3):322-325,2005;Plasterk等,TIG 15:326-332,1999;Kootstra等,Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439,2003)。这些包括重组酶和转座酶。实例包括Cre (Sternberg和Hamilton, J. Mol. Biol., 150:467-486,1981)、 $\lambda$  (lambda) (Nash, Nature, 247, 543-545,1974)、Flp (Broach, 等, Cell, 29:227-234,1982)、R (Matsuzaki, 等, J. Bacteriology, 172:610-618,1990)、cpC31 (参见例如,Groth等, J. Mol. Biol. 335:667-678,2004)、mariner家族的转座子睡美人(sleeping beauty) (Plasterk等,同上)以及用于整合病毒(诸如AAV、逆转录病毒和抗病毒)的部件,其具有提供病毒整合的部件,诸如逆转录病毒或慢病毒的LTR序列和AAV的ITR序列(Kootstra等, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439,2003)。此外,可以使用直接和靶向遗传整合策略来插入编码嵌合融合蛋白的核酸序列,所述策略包括CRISPR/CAS9、锌指、TALEN和大范围核酸酶基因编辑技术。

[0199] 在一方面,本发明提供用于表达嵌合蛋白(和/或另外的剂)的表达载体,其为病毒载体。许多可用于基因疗法的病毒载体是已知的(参见例如,Lundstrom, Trends Biotechnol., 21:117,122,2003)。例示性病毒载体包括选自抗病毒(LV)、逆转录病毒(RV)、腺病毒(AV)、腺相关病毒(AAV)和 $\alpha$ 病毒的载体,但是也可以使用其他病毒载体。对于体内用途,适合使用不整合到宿主基因组中的病毒载体,诸如 $\alpha$ 病毒和腺病毒。 $\alpha$ 病毒的例示性类型包括辛德毕斯病毒(Sindbis virus)、委内瑞拉马脑炎(Venezuelan equine encephalitis;VEE)病毒和塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus;SFV)。对于体外使用,整合到宿主基因组中的病毒载体是合适的,诸如逆转录病毒、AAV和抗病毒。在实施方案

中,本发明提供体内转导人细胞的方法,其包括在体内使实体肿瘤与本发明的病毒载体接触。

[0200] 在实施方案中,本发明提供一种宿主细胞,其包含表达载体,所述表达载体包含本文所述的嵌合蛋白。

[0201] 可以将表达载体引入宿主细胞中,用于产生本发明的嵌合蛋白。例如,可以在体外培养细胞或对细胞进行遗传工程化。可用的哺乳动物宿主细胞包括但不限于衍生自人、猴和啮齿动物的细胞(参见例如,Kriegler在“Gene Transfer and Expression:A Laboratory Manual,”中1990,New York,Freeman&Co.)。这些包括由SV40转化的猴肾细胞系(例如,COS-7、ATCC CRL 1651);人胚胎肾细胞系(例如,293、293-EBNA或用于悬浮培养生长的亚克隆的293细胞,Graham等,J Gen Virol 1977,36:59);幼仓鼠肾细胞(例如,BHK、ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞-DHFR(例如,CHO,Urlaub和Chasin,Proc Natl Acad Sci USA 1980,77:4216);DG44CHO细胞、CHO-K1细胞、小鼠塞托利细胞(Mather,Biol Reprod 1980,23:243-251);小鼠成纤维细胞(例如,NIH-3T3)、猴肾细胞(例如,CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(例如,VERO-76、ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(例如,HELA、ATCC CCL 2);犬肾细胞(例如,MDCK、ATCC CCL 34);布法罗大鼠肝细胞(例如,BRL 3A、ATCC CRL 1442);人肺细胞(例如,W138、ATCC CCL 75);人肝细胞(例如,Hep G2、HB 8065);和小鼠乳腺肿瘤细胞(例如,MMT 060562、ATCC CCL51)。用于表达本文所述的嵌合蛋白的例示性癌细胞类型包括小鼠成纤维细胞系NIH3T3、小鼠Lewis肺癌细胞系LLC、小鼠肥大细胞瘤细胞系P815、小鼠淋巴瘤细胞系EL4及其卵清蛋白转染子E.G7、小鼠黑色素瘤细胞系B16F10、小鼠纤维肉瘤细胞系MC57以及人小细胞肺癌细胞系SCLC#2和SCLC#7。

[0202] 宿主细胞可以从正常受试者或受影响的受试者(包括健康人、癌症患者以及患有感染性疾病的患者)、私人实验室存储物、诸如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)的公共培养物收集物、或商业供应商获得。

[0203] 可以用于体外、离体和/或体内产生本发明的嵌合蛋白的细胞包括但不限于上皮细胞、内皮细胞、角质细胞、成纤维细胞、肌细胞、肝细胞;血细胞诸如T淋巴细胞、B淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨核细胞、粒细胞;各种干细胞或祖细胞,特别是造血干细胞或祖细胞(例如,从骨髓、脐带血、外周血、胎肝等获得)。细胞类型的选择取决于所治疗或预防的肿瘤或感染性疾病的类型,并且可以由本领域技术人员确定。

[0204] 受试者和/或动物

[0205] 在实施方案中,受试者和/或动物是哺乳动物,例如人、小鼠、大鼠、豚鼠、狗、猫、马、牛、猪、兔、绵羊或非人灵长类动物,诸如猴、黑猩猩或狒狒。在实施方案中,受试者和/或动物是非哺乳动物,例如像斑马鱼。在实施方案中,受试者和/或动物可以包含荧光标记的细胞(例如用GFP)。在实施方案中,受试者和/或动物是包含荧光细胞的转基因动物。

[0206] 在实施方案中,受试者和/或动物是人。在实施方案中,人是幼儿。在实施方案中,人是成人。在实施方案中,人是老年人。在实施方案中,人可以称为患者。

[0207] 在某些实施方案中,人的年龄范围为约0个月至约6个月、约6至约12个月、约6至约18个月、约18至约36个月、约1至约5岁、约5至约10岁、约10至约15岁、约15至约20岁、约20至约25岁、约25至约30岁、约30至约35岁、约35至约40岁、约40至约45岁、约45至约50岁、约50

至约55岁、约55至约60岁、约60至约65岁、约65至约70岁、约70至约75岁、约75至约80岁、约80至约85岁、约85至约90岁、约90至约95岁或约95至约100岁。

[0208] 在实施方案中,受试者是非人动物,并且因此本发明涉及兽医用途。在一个具体实施方案中,非人动物是家庭宠物。在另一个具体实施方案中,非人动物是家畜动物。

[0209] 试剂盒

[0210] 本发明提供了可以简化本文所述的任何剂的施用的试剂盒。本发明的例示性试剂盒包含单位剂型的本文所述的任何组合物。在实施方案中,单位剂型是容器,诸如预填充注射器,其可以是无菌的,含有本文所述的任何剂和药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或媒介物。试剂盒可以进一步包含指示本文所述的任何剂的使用的标签或印刷说明书。试剂盒还可以包含开睑器、局部麻醉剂和用于施用位置的清洁剂。试剂盒还可以进一步包含一种或多种本文所述的另外的剂。在实施方案中,试剂盒包含容器,其含有有效量的本发明的组合物和有效量的另一种组合物,诸如本文所述的那些组合物。

[0211] 本文描述的任何方面或实施方案都可以与如本文所公开的任何其他方面或实施方案结合。

[0212] 本发明将在以下实施例中进一步描述,这些实施例不限制权利要求书中所述的本发明范围。

[0213] 实施例

[0214] 实施例1:人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的计算机模拟预测二级结构

[0215] 具有603个氨基酸残基的人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的计算机模拟结构预测,其p值为 $5.36 \times 10^{-16}$ 。预测单体蛋白质的分子量为大约68.1kDa。嵌合蛋白的结构在图1A中提供。图1B示出了由肿瘤细胞与T细胞之间的嵌合蛋白形成的突触。

[0216] 嵌合蛋白的整个序列的二级结构预测显示所述蛋白质具有0% $\alpha$ -螺旋(H)、58% $\beta$ -折叠(E)和41%卷曲(C)的组成。还计算了嵌合蛋白的绝对全局质量的GDT(全局距离测试)和uGDT(未标准化的GDT),以得到362(60)的总uGDT(GDT)。蛋白质残基的溶剂可及性的三态预测是33%暴露(E)、47%中间(M)和19%埋入(B)。

[0217] 实施例2:人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的表征

[0218] 如以上具体实施方式和U.S.62/464,002中所述构建人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白,所述文献的内容特此以引用的方式整体并入。通过针对嵌合蛋白的每个结构域(即,通过抗VSIG8、抗Fc和抗OX40L抗体)进行蛋白质印迹分析,来表征嵌合蛋白。

[0219] 蛋白质印迹指示在非还原泳道中存在占优势的二聚体条带(无 $\beta$ -巯基乙醇或PNGase;图2,每个印迹中的泳道2),其在还原剂 $\beta$ -巯基乙醇的存在下被还原为糖基化的单体条带(图2,每个印迹中的泳道3)。如图2每个印迹中的泳道4所示,在还原剂( $\beta$ -巯基乙醇)和内切糖苷酶肽:N-糖苷酶(PNGase)两者的存在下,嵌合蛋白作为预测分子量为大约68.1kDa的单体分离。

[0220] 实施例3:使用ELISA表征人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的不同结构域的结合亲和力

[0221] 开发酶联免疫吸附测定(ELISA)测定以表明人VSIG8-Fc-OX40L的不同结构域与各自的hIgG或重组OX40L的结合亲和力。具体地,通过捕获到平板结合的人IgG并通过HRP缀合的抗人IgG抗体检测来检测嵌合蛋白的Fc部分(图3左图)。通过捕获到平板结合的重组人OX40蛋白并通过抗OX40特异性抗体检测来检测嵌合蛋白的OX40结构域(图3右图)。观察到

在ELISA测定中,使用中心Fc区检测嵌合蛋白倾向于低估样品中的实际蛋白质含量。因此,与此测定中的标准物相比,检测到低水平的hVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白。

[0222] 实施例4:人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的体外细胞结合亲和力的表征

[0223] 进行细胞结合测定以证明人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的不同结构域对其各自在哺乳动物细胞膜表面上的结合配偶体的结合亲和力。

[0224] 对于细胞结合测定,将永生化细胞系工程化以稳定表达人OX40 (Jurkat/hOX40)。将增加浓度的VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白与过表达 (Jurkat/hOX40) 细胞系一起温育2小时。将细胞收集,洗涤并用抗体染色,用于通过流式细胞术检测嵌合蛋白结合。

[0225] 如图4所示,VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白以浓度依赖性方式并以低nM亲和力与细胞表面上存在的OX40结合。具体地,如图4所示,细胞结合测定证明VSIG8-Fc-OX40L以约30nM的亲和力(根据EC<sub>50</sub>计算)与OX40结合。

[0226] 实施例5:通过表面等离子体共振 (SPR) 表征人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的结合亲和力

[0227] 使用BioRad ProteOn XPR 360系统通过表面等离子体共振 (SPR) 测量人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的OX40L结构域的结合亲和力。具体地,确定嵌合蛋白对人OX40的亲和力,并且与重组对照蛋白和tavolixumab (抗人OX40抗体) 进行比较;结果在图5和下表示出:

[0228]

样品ID	配体	浓度 (nm)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)	KD (nM)
Fc-OX40L	hOX40-His	222.2	4.17E+04	2.54E-03	61
Tavolixumab	hOX40-His	66.7	3.32E+05	5.03E-05	0.152
V5IG8-Fc-OX40L	hOX40-His	117.6	3.31E+05	2.54E-04	0.767

[0229] 确定了VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白以高亲和力与hOX40结合。具体地,注意到,hVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的解离速率比对照Fc-OX40L蛋白慢得多。例如,嵌合蛋白与OX40L的解离速率是Fc-OX40L蛋白的10倍慢。

[0230] 实施例6. 体外诱导OX40信号传导

[0231] 人OX40活化导致信号传导级联的诱导,其涉及NF- $\kappa$ B和NIK活化两者。图6示出来自使用人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白进行体外NF- $\kappa$ B/NIK信号传导测定的示例性数据。将来自DiscoverX NIK信号传导测定的U2OS细胞与可商购获得的单侧hFc-OX40L、抗OX40L抗体(欧西鲁单抗(Oxelumab))、抗OX40抗体(Tavolixumab)或人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的滴定一起培养。相对萤光素酶单位(RLU)指示用指示的方案进行处理后活化的NF- $\kappa$ B/NIK信号传导的相对强度。显示VSIG8-Fc-OX40L强烈活化通过NF- $\kappa$ B和NIK进行的信号传导,并且活化至比任何其他指示方案更大的程度。

[0232] 实施例7:超抗原细胞因子释放测定中人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的功能活性

[0233] 表征人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的功能活性而实施的另一个功能性测定是超抗原细胞因子释放测定。在此测定中,在各种浓度的测试剂(即,单侧人Fc-OX40L、可商购获得的单侧VSIG8-Fc、两种单侧分子的组合或人VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白)的存在下使用200ng/ml的葡萄球菌肠毒素B(SEB)活化人外周血白细胞。三天后,使用对于人IL2特异性的ELISA评估上清液。

[0234] 如图7所示,监测分泌到培养上清液中的IL-2的量作为测试剂阻断抑制性信号传

导事件或共刺激免疫活化信号的能力的功能性读数。在高于0.5nM的浓度下,VSIG8-Fc-0X40L嵌合蛋白以比任何其他测试剂或剂的组合更高的水平并以任何浓度(高达50nM)诱导IL2的分泌。使用培养基和IgG对照。总之,这些结果表明hVSIG8-Fc-0X40L嵌合蛋白在体外功能性地活化原代人白细胞。

[0235] 实施例8:使用ELISA表征VSIG8-Fc-0X40L嵌合蛋白的不同结构域的结合亲和力

[0236] 开发ELISA(酶联免疫吸附测定)测定以表明鼠VSIG8-Fc-0X40L的不同结构域与其各自的结合配偶体(即,VISTA、人IgG(hIgG)或0X40)的结合亲和力。具体地,通过捕获到平板结合的重组鼠VISTA蛋白并使用0X40L特异性抗体检测来检测mVSIG8-Fc-0X40L嵌合蛋白的VSIG8结构域。通过捕获到平板结合的hIgG并通过HRP缀合的抗hIgG抗体检测来检测嵌合蛋白的Fc部分。通过捕获到平板结合的重组鼠0X40蛋白并通过0X40L特异性抗体检测来检测嵌合蛋白的0X40L结构域。

[0237] 如图8所示,mVSIG8-Fc-0X40L嵌合蛋白的不同结构域以高亲和力有效地与其各自的结合配偶体相互作用。然而,观察到在ELISA测定中,使用中心Fc区检测嵌合蛋白倾向于低估样品中的实际蛋白质含量。因此,与此测定中的标准物相比,检测到低水平的VSIG8-Fc-0X40L嵌合蛋白。条带大小确认预测的单体分子量为大约68.1kDa,并且表明嵌合蛋白的天然状态为糖基化二聚体。

[0238] 实施例9:鼠VSIG8-Fc-0X40L嵌合蛋白的表征

[0239] 如以上具体实施方式和U.S.62/464,002中所述构建鼠VSIG8-Fc-0X40L嵌合蛋白,所述文献的内容特此以引用的方式整体并入。

[0240] 图9A至图9C示出了证明鼠VSIG8-Fc-0X40L嵌合蛋白的不同结构域对其各自的结合配偶体的结合亲和力的ELISA测定。具体地,通过捕获到平板结合的重组鼠VISTA蛋白(VSIG8的结合配偶体)并通过HRP缀合的抗小鼠IgG抗体检测来检测mVSIG8-Fc-0X40L嵌合蛋白的VSIG8结构域(图9A)。可商购获得的mVSIG8-Fc标准物是不可用的;因此,未生成标准曲线。通过捕获到平板结合的小鼠IgG并通过HRP缀合的抗小鼠IgG抗体检测来检测嵌合蛋白的Fc部分(图9B)。通过捕获到平板结合的重组小鼠0X40蛋白并通过0X40L特异性抗体检测来检测嵌合蛋白的0X40L结构域(图9C)。图9A至图9C示出mVSIG8-Fc-0X40L嵌合蛋白的不同结构域以高亲和力有效地与其各自的结合配偶体相互作用。然而,观察到在ELISA测定中,使用中心Fc区检测嵌合蛋白倾向于低估样品中的实际蛋白质含量。因此,与此测定中的标准物相比,检测到低水平的mVSIG8-Fc-0X40L嵌合蛋白。

[0241] 实施例10:VSIG8-Fc-0X40L嵌合蛋白的体外细胞结合亲和力的表征

[0242] 进行细胞结合测定以证明鼠VSIG8-Fc-0X40L嵌合蛋白的不同结构域对其各自在哺乳动物细胞膜表面上的结合配偶体的结合亲和力。

[0243] 对于细胞结合测定,将永生化细胞系工程化以稳定表达鼠VISTA(EL4-mVISTA)和鼠受体0X40(CHOK1-m0X40)。将增加浓度的mVSIG8-Fc-0X40L与每种亲本(对照)和过表达细胞系一起温育2小时。将细胞收集,洗涤并用抗体染色,用于通过流式细胞术检测嵌合蛋白结合。

[0244] 如图10A和图10B所示,mVSIG8-Fc-0X40L嵌合蛋白以浓度依赖性方式并以低nM亲和力与细胞表面上存在的mVISTA和m0X40结合。具体地,如图10A所示,EL4-亲本细胞系(下部曲线)对于增加浓度的mVSIG8-Fc-0X40L嵌合蛋白没有应答,因为它不过表达VISTA。相比

之下,进行工程化以过表达mVISTA的EL4-mVISTA细胞系(上部曲线)以浓度依赖性方式与mVSIG8-Fc-OX40L结合。相似地,如图10B所示,CHOK1-亲本细胞系(下部曲线)对于增加浓度的mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白没有应答,因为它不过表达mOX40。相比之下,进行工程化以过表达mOX40的CHOK1-mOX40细胞系(上部曲线)以浓度依赖性方式与mVSIG8-Fc-OX40L结合。细胞结合测定还指示mVSIG8-Fc-OX40L以16nM的亲合力与mOX40结合,并且以56nM的亲合力(根据 $EC_{50}$ 计算)与mVISTA结合。

[0245] 实施例11:通过表面等离子体共振 (SPR) 表征鼠VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的结合亲合力

[0246] 使用BioRad ProteOn XPR 360系统通过表面等离子体共振 (SPR) 测量鼠VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的OX40L结构域的结合亲合力。具体地,确定嵌合蛋白对鼠OX40的亲合力,并且与可商购获得的重组对照蛋白(mFc-OX40L)进行比较;结果在图11中示出。确定了mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白以高亲合力与mOX40结合。

[0247] 实施例12:体外诱导OX40信号传导

[0248] 鼠OX40活化导致信号传导级联的诱导,其涉及NF- $\kappa$ B和NIK活化两者。图12示出来自使用鼠VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白进行体外NF- $\kappa$ B/NIK信号传导测定的示例性数据。将来自DiscoverX NIK信号传导测定的U2OS细胞与非相关蛋白,可商购获得的单侧hFc-OX40L或mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的滴定一起培养。相对萤光素酶单位(RLU)指示用指示的方案进行处理后活化的NF- $\kappa$ B/NIK信号传导的相对强度。显示VSIG8-Fc-OX40L强烈活化通过NF- $\kappa$ B和NIK进行的信号传导,并且活化至比其他指示方案更大的程度。

[0249] 实施例13:VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的功能性测定

[0250] 进行体内功能性测定以证明鼠VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的功能活性。在第0天用CT26肿瘤接种小鼠。一旦肿瘤可感知且直径为至少4至6mm,用两个剂量的150 $\mu$ g的mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白处理小鼠。在植入后第13天对从小鼠收集的各种组织进行免疫表型分析。

[0251] 图13A至图13C示出来自体内功能性测定的结果。对用mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白处理的荷瘤小鼠进行免疫分析。如图13A所示,与未处理的对照小鼠相比时,用mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白处理的小鼠在脾脏、外周淋巴结和肿瘤中表现出更高的总CD4<sup>+</sup>T细胞百分比。在脾脏和肿瘤内,CD4<sup>+</sup>T细胞群的这种增加主要是由于CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>效应T细胞的增加,这表明涉及非调节T细胞的活化(图13B)。处理的小鼠还表现出较低百分比的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节T细胞,这表明调节T细胞可以被嵌合蛋白抑制(图13B)。

[0252] 还分析了嵌合蛋白刺激CD8<sup>+</sup>T细胞识别肿瘤抗原的能力。具体地,图13C示出用于确定识别CT26肿瘤天然表达的AH1肿瘤抗原的CD8<sup>+</sup>T细胞的分数的四聚体染色分析。在脾脏内,发现与未处理的对照小鼠相比,更高比例的CD8<sup>+</sup>T细胞识别用mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白处理的小鼠中的AH1肿瘤抗原。值得注意的是,与未处理的对照小鼠相比,用嵌合蛋白处理的小鼠在肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中观察到更高比例的AH1四聚体阳性CD8<sup>+</sup>T细胞。

[0253] 实施例14:VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的体内抗肿瘤活性的表征

[0254] 使用CT26小鼠结肠直肠肿瘤模型分析VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的体内抗肿瘤活性。

[0255] 在一组实验中,使Balb/c小鼠在第0天接种CT26肿瘤细胞,并且/或者在第30天第

二次接种CT26肿瘤细胞进行再次攻击。肿瘤生长4天之后,当肿瘤直径达到4至5mm时,用对照抗体或150 $\mu$ g的鼠VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白处理小鼠。在第7天重复处理。对肿瘤接种之后45天内肿瘤大小的演变进行分析。

[0256] 如图14A所示,未处理的小鼠发展显著的肿瘤,而用mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白处理的大部分小鼠未发展可检测大小的肿瘤。图14B示出肿瘤接种50天内小鼠的总体存活百分比。所有未处理的小鼠在肿瘤接种后21天内死亡,而用mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白处理的小鼠在肿瘤接种后30天显示100%存活率。在肿瘤接种后50天,超过75%的mVSIG8-Fc-OX40L处理小鼠仍然存活。图14C总结了每组的处理结果。如图14C所示,用嵌合蛋白进行的处理比用对照抗体进行的处理产生显著更高的肿瘤排斥。值得注意的是,一些小鼠表现出延长的肿瘤稳定,这与肿瘤生长与抗肿瘤免疫之间的平衡效果一致。此时间段大大超过嵌合蛋白处理的时间,并且表明记忆免疫可能被活化。有趣的是,观察到免疫平衡的一些小鼠经历延迟的完全肿瘤排斥。更具体地,在再次攻击期间施用的用嵌合蛋白进行的处理产生原代肿瘤的排斥以及肿瘤细胞的完全排斥,从而表明可能涉及记忆T细胞。

[0257] 以上数据表明用VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白进行的处理在体内产生免疫记忆效果。因此,处理的动物稍后在用嵌合蛋白初始处理之后再次攻击时能够攻击肿瘤细胞和/或预防肿瘤发展。

[0258] 实施例15:鼠VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白的基于ELISA的抗药物抗体测定

[0259] 使用鼠VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白进行基于ELISA的抗药物抗体(ADA)测定。将高结合ELISA平板用动物血清(蓝线;开始未稀释(“纯”),并且然后以1:2、1:4和1:8稀释)或重组鼠Fc(黑线;以5 $\mu$ g/mL开始,并且然后以1:2、1:4、1:8、1:16和1:32稀释)涂覆,用mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白以10 $\mu$ g/mL探测。从排斥原代和继发性CT26肿瘤两者的小鼠收集血清,并且然后在第91天通过腹膜内(IP)注射用第三个剂量的150 $\mu$ g mVSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白再次攻击。在第98天在一周后收集血清。使用山羊-抗小鼠OX40L抗体,接着抗山羊-HRP第三抗体检测嵌合蛋白。吸光度值(OD<sub>450</sub>)和每个曲线的非线性拟合在图15中示出。

[0260] 实施例16:接头中Fc结构域对嵌合蛋白功能性的贡献的表征

[0261] 在此实施例中,测定了接头中的Fc结构域对本发明的嵌合蛋白功能性的贡献。在此,PD1-Fc-OX40L用作含Fc的嵌合蛋白的模型。因此,下文呈现的数据与本发明的嵌合蛋白有关。

[0262] 在其天然状态下,PD1作为单体存在,而OX40L由于OX40L结构域之间的静电相互作用而倾向于二聚化;Fc结构域通过二硫键彼此缔合。总之,若干种分子间相互作用可能有助于PD1-Fc-OX40L的四级结构。存在至少四种PD1-Fc-OX40L的潜在构型,其中嵌合蛋白作为单体、二聚体、三聚体或六聚体存在。参见图16。

[0263] 通过将嵌合蛋白暴露于还原条件和非还原条件,然后在SDS-PAGE上分离蛋白质,来测试嵌合蛋白的单体和二聚体构型的存在。在非还原条件下(还原的:“-”),嵌合蛋白在SDS-PAGE中迁移到约200kDa处。在此,分别用针对PD1、Fc或OX40L的抗体探测蛋白质印迹,如图17中所示的左、中和右印迹。由于嵌合蛋白的预测单体分子量为57.6kDa,预计200kDa的物质是至少二聚体。但是,在还原条件下(还原的:“+”),其还原二硫键(例如,位于Fc结构域之间),嵌合蛋白在SDS-PAGE中迁移到约100kDa处。由于100kDa的物质比预期重,因此预测额外质量是由于糖基化。最后,用肽-N-糖苷酶F(PNGaseF“+”)处理嵌合蛋白,并在还原条

件下在SDS-PAGE上分离。在这些条件下,嵌合蛋白迁移到约57.6kDa处。这些数据表明嵌合蛋白是糖基化的并且至少作为二聚体天然存在;其中二聚化可能是由于Fc结构域之间的二硫键。

[0264] SDS-PAGE凝胶方法不能准确预测高电荷和/或大分子量的蛋白质的分子量。因此,接下来使用尺寸排阻色谱法 (SEC) 表征嵌合蛋白。与其中带负电荷的SDS降低肽之间基于电荷的相互作用的SDS-PAGE不同,SEC不使用去污剂或还原剂。当PD1-Fc-0X40L嵌合蛋白在SEC上分离时,在约200kDa处没有峰。这表明,嵌合蛋白不作为二聚体天然存在。相反,检测到大小大于670kDa的峰。参见图18。此数据和先前数据表明PD1-Fc-0X40L嵌合蛋白作为六聚体以其天然状态存在。

[0265] 如上所示,当在非还原条件下或在还原条件下在SDS-PAGE上分离时,样品和/或运行缓冲液中的SDS分别在不存在和存在还原剂的情况下将六聚体PD1-Fc-0X40L嵌合蛋白转化为主要的二聚体或单体。参见图19(左侧凝胶)。当在缺乏SDS的天然PAGE上分离,并且在不存在还原剂的情况下,嵌合蛋白作为六聚体存在。然而,当在天然PAGE上分离,并且在还原剂(其还原二硫键)的存在下,嵌合蛋白迁移比预期的更重;如图19所示(右侧凝胶,泳道#2),其中嵌合蛋白质基本上不能从加样孔中迁移出来。此数据表明嵌合蛋白寡聚化成更高级的蛋白质。因此,在嵌合蛋白中,二硫键似乎对于控制高级寡聚化是很重要的。

[0266] 为了进一步证实这一点,构建了缺乏Fc结构域的嵌合蛋白,例如“PD1-No Fc-0X40L”。此类嵌合蛋白不会具有在前述嵌合蛋白中的Fc结构域之间出现的二硫键。如图20所示,当缺乏Fc结构域的嵌合蛋白在天然PAGE上分离时,基本上没有一种蛋白质从其加样孔中迁移出来(泳道#1至#4示出增加加样浓度的PD1-No Fc-0X40L);再次表明“无Fc”嵌合蛋白已经形成了包含许多蛋白质的多联体样复合物。因此,在嵌合蛋白中省略Fc结构域导致蛋白质聚集体的形成。这些数据指示,例如,在不同嵌合蛋白上的Fc结构域之间的二硫键使嵌合蛋白稳定并确保它们各自作为六聚体存在而不是作为更高级的蛋白质/多联体存在。换句话说,Fc结构域令人惊讶地将次序置于嵌合蛋白复合物上。泳道#1至#4分别包括2.5 $\mu$ g的PD1-No Fc-0X40L、5 $\mu$ g的PD1-No Fc-0X40L、7.5 $\mu$ g的PD1-No Fc-0X40L和10 $\mu$ g的PD1-No Fc-0X40L。

[0267] 图21中示出的是总结上述数据的模型,并且示出了如何由本发明的嵌合蛋白形成六聚体和多联体。示例性嵌合蛋白(PD1-Fc-0X40L)天然形成六聚体(由于0X40L结构域之间的静电相互作用和Fc结构域的二聚化)。然而,在不存在对Fc结构域之间的二硫键的控制作用的情况下,在PD1-Fc-0X40L蛋白的还原条件下并且由于PD1-No Fc-0X40L中不存在Fc结构域,这些后者的嵌合蛋白形成多联体。

[0268] 另外,构建嵌合蛋白,其中Fc结构域(如本文所述)被纤维胶凝蛋白(Ficolin)(其缺乏嵌合蛋白之间的二硫键必需的半胱氨酸残基)替换。与“无Fc”嵌合蛋白和包含Fc的嵌合蛋白一样,并且在天然PAGE上分离且在还原剂的存在下(其两者都形成不迁移到凝胶中的聚集体),包含Ficolin的嵌合蛋白似乎也形成更高级的晶格,其不会迁移到凝胶中。这些数据强化了以下结论,即二硫键对于本发明的嵌合蛋白的正确折叠和功能是很重要的。

[0269] 最后,使用卷曲的Fc结构域(CCDFc)制备嵌合蛋白。在功能性评估下递送非常少的纯化蛋白。

[0270] 因此,在嵌合蛋白的接头中包含Fc结构域(其能够在嵌合蛋白之间形成二硫键),

有助于避免形成不可溶的并且可能是非功能性的蛋白质多联体和/或聚集体。

[0271] 实施例17:包含其他II型蛋白的细胞外结构域的另外的含有VSIG8的嵌合蛋白的产生

[0272] 在此实施例中,描述了本发明的另外的嵌合蛋白。以与制备VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白相似的方式制备此类另外的嵌合蛋白,例如,如以上具体实施方式和U.S.62/464,002中所述,所述文献的内容特此以引用的方式整体并入。

[0273] 这些另外的嵌合蛋白将具有以下通式:ECD 1-连接接头1-Fc结构域-连接接头2-ECD 2,其中ECD 1是VSIG8的细胞外结构域,并且ECD 2是除了OX40L以外的II型蛋白的细胞外结构域。示例性II型蛋白包括4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A和TRAIL。这些嵌合蛋白可能缺乏连接接头中的一个或两个。示例性连接接头1、Fc结构域和连接接头2在以上表1中描述;用于形成嵌合蛋白并包含特异性连接接头1、Fc结构域和连接接头2的模块接头在图22示出。

[0274] 可替代地,另外的嵌合蛋白是具有以下通式的融合蛋白:N末端-(a)-(b)-(c)-C末端,其中(a)是VSIG8,(b)是包含Fc结构域的至少一部分的接头,并且(c)是除了OX40L以外的II型蛋白的细胞外结构域。示例性II型蛋白包括4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A和TRAIL。示例性接头在以上表1中描述;用于形成嵌合蛋白并包含特异性连接接头1、Fc结构域和连接接头2的模块接头在图22中示出。

[0275] 4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A和TRAIL的氨基酸序列分别包括SEQ ID NO:7、9、11、13、15、17、21和23。4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A和TRAIL的细胞外结构域的氨基酸序列分别包括SEQ ID NO:8、10、12、14、16、18、22和24。VSIG8的氨基酸序列包括SEQ ID NO:1,并且VSIG8的细胞外结构域包括SEQ ID NO:2。嵌合蛋白可以包含以上提及的序列的变体,例如与以上提及的序列至少约95%相同。

[0276] 因此,本发明还包括以下另外的嵌合蛋白和使用另外的嵌合蛋白的方法(例如,在治疗癌症和/或治疗炎症性疾病中):VSIG8-Fc-4-1BBL、VSIG8-Fc-CD30L、VSIG8-Fc-CD40L、VSIG8-Fc-FasL、VSIG8-Fc-GITRL、VSIG8-Fc-LIGHT、VSIG8-Fc-TL1A和VSIG8-Fc-TRAIL。

[0277] 另外的嵌合蛋白将如上所述在实施例1至15中针对CSF1R-Fc-CD40L进行表征,不同的是用对另外的嵌合蛋白特异性的并非对于表征VSIG8-Fc-OX40L所需要的试剂(例如,结合配偶体、重组靶细胞和癌细胞/肿瘤类型)。因此,使用VSIG8-Fc-4-1BBL作为实例,可以使用除了对于VSIG8-Fc-OX40L所需要的抗VSIG8、抗Fc和抗OX40L抗体以外的抗VSIG8、抗Fc和抗4-1BBL抗体进行类似于实施例2的VSIG8-Fc-4-1BBL的表征。

[0278] 与VSIG8-Fc-OX40L嵌合蛋白一样,另外的嵌合蛋白通过阻断VSIG8(其抑制免疫抑制信号的传递)并且通过活化4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A和TRAIL中的一个的受体/配体增强、增加和/或刺激免疫抑制信号的传递来有效治疗癌症和/或治疗炎症性疾病。此外,另外的嵌合蛋白有效治疗癌症和/或炎症性疾病,但是没有由包括多种抗体(例如,VISTA阻断抗体以及4-1BBL、CD30L、CD40L、FasL、GITRL、LIGHT、TL1A和TRAIL中的一个的受体/配体的激动剂抗体)的治疗引起的毒性。



[0039]		180		185		190													
[0040]	Gly	Ser	Tyr	Thr	Ser	Gln	His	Ser	Tyr	His	Ser	Glu	Leu	Ser	Tyr	Gln			
[0041]																			
[0042]	Glu	Ser	Phe	His	Ser	Ser	Ile	Asn	Gln	Gly	Leu	Asn	Asn	Gly	Asp	Leu			
[0043]																			
[0044]	Val	Leu	Lys	Asp	Ile	Ser	Arg	Ala	Asp	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Cys	Thr			
[0045]																			
[0046]	Val	Ala	Asn	Asn	Val	Gly	Tyr	Ser	Val	Cys	Val	Val	Glu	Val	Lys	Val			
[0047]																			
[0048]	Ser	Asp	Ser	Arg	Arg	Ile	Gly	Val	Ile	Ile	Gly	Ile	Val	Leu	Gly	Ser			
[0049]																			
[0050]	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Ala	Val	Gly	Ile	Trp	Gly	Leu	Val	Cys			
[0051]																			
[0052]	Cys	Cys	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Arg	Gly	Ala	Phe	Gly			
[0053]																			
[0054]	Tyr	Gly	Asn	Gly	Gly	Gly	Val	Gly	Gly	Gly	Ala	Cys	Gly	Asp	Leu	Ala			
[0055]																			
[0056]	Ser	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Ala	Val	Ala	Pro	Gly	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly			
[0057]																			
[0058]	Arg	Gly	Ser	Arg	Val	Thr	His	Leu	Leu	Gly	Tyr	Pro	Thr	Gln	Asn	Val			
[0059]																			
[0060]	Ser	Arg	Ser	Leu	Arg	Arg	Lys	Tyr	Ala	Pro	Pro	Pro	Cys	Gly	Gly	Pro			
[0061]																			
[0062]	Glu	Asp	Val	Ala	Leu	Ala	Pro	Cys	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Cys	Glu	Ala			
[0063]																			
[0064]	Gly	Pro	Ser	Pro	Val	Tyr	Val	Lys	Val	Lys	Ser	Ala	Glu	Pro	Ala	Asp			
[0065]																			
[0066]	Cys	Ala	Glu	Gly	Pro	Val	Gln	Cys	Lys	Asn	Gly	Leu	Leu	Val					
[0067]																			
[0068]	<210>	2																	
[0069]	<211>	242																	
[0070]	<212>	PRT																	
[0071]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)																	
[0072]	<220>																		
[0073]	<223>	合成多肽																	
[0074]	<400>	2																	
[0075]	Val	Arg	Ile	Asn	Gly	Asp	Gly	Gln	Glu	Val	Leu	Tyr	Leu	Ala	Glu	Gly			
[0076]																			
[0077]	Asp	Asn	Val	Arg	Leu	Gly	Cys	Pro	Tyr	Val	Leu	Asp	Pro	Glu	Asp	Tyr			

[0078]		20		25		30										
[0079]	Gly	Pro	Asn	Gly	Leu	Asp	Ile	Glu	Trp	Met	Gln	Val	Asn	Ser	Asp	Pro
[0080]			35					40					45			
[0081]	Ala	His	His	Arg	Glu	Asn	Val	Phe	Leu	Ser	Tyr	Gln	Asp	Lys	Arg	Ile
[0082]			50					55					60			
[0083]	Asn	His	Gly	Ser	Leu	Pro	His	Leu	Gln	Gln	Arg	Val	Arg	Phe	Ala	Ala
[0084]	65						70				75					80
[0085]	Ser	Asp	Pro	Ser	Gln	Tyr	Asp	Ala	Ser	Ile	Asn	Leu	Met	Asn	Leu	Gln
[0086]					85						90					95
[0087]	Val	Ser	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Glu	Cys	Arg	Val	Lys	Lys	Thr	Thr	Met
[0088]					100						105					110
[0089]	Ala	Thr	Arg	Lys	Val	Ile	Val	Thr	Val	Gln	Ala	Arg	Pro	Ala	Val	Pro
[0090]					115						120					125
[0091]	Met	Cys	Trp	Thr	Glu	Gly	His	Met	Thr	Tyr	Gly	Asn	Asp	Val	Val	Leu
[0092]					130						135					140
[0093]	Lys	Cys	Tyr	Ala	Ser	Gly	Gly	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Tyr	Lys	Trp	Ala
[0094]	145										150					155
[0095]	Lys	Ile	Ser	Gly	His	His	Tyr	Pro	Tyr	Arg	Ala	Gly	Ser	Tyr	Thr	Ser
[0096]					165						170					175
[0097]	Gln	His	Ser	Tyr	His	Ser	Glu	Leu	Ser	Tyr	Gln	Glu	Ser	Phe	His	Ser
[0098]					180						185					190
[0099]	Ser	Ile	Asn	Gln	Gly	Leu	Asn	Asn	Gly	Asp	Leu	Val	Leu	Lys	Asp	Ile
[0100]					195						200					205
[0101]	Ser	Arg	Ala	Asp	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Cys	Thr	Val	Ala	Asn	Asn	Val
[0102]					210						215					220
[0103]	Gly	Tyr	Ser	Val	Cys	Val	Val	Glu	Val	Lys	Val	Ser	Asp	Ser	Arg	Arg
[0104]	225										230					235
[0105]	Ile	Gly														
[0106]	<210>	3														
[0107]	<211>	183														
[0108]	<212>	PRT														
[0109]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
[0110]	<220>															
[0111]	<223>	合成多肽														
[0112]	<400>	3														
[0113]	Met	Glu	Arg	Val	Gln	Pro	Leu	Glu	Glu	Asn	Val	Gly	Asn	Ala	Ala	Arg
[0114]	1				5						10					15
[0115]	Pro	Arg	Phe	Glu	Arg	Asn	Lys	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ser	Val	Ile	Gln
[0116]					20						25					30

[0117]	Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
[0118]	35 40 45
[0119]	Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
[0120]	50 55 60
[0121]	Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
[0122]	65 70 75 80
[0123]	Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
[0124]	85 90 95
[0125]	Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
[0126]	100 105 110
[0127]	Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
[0128]	115 120 125
[0129]	Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
[0130]	130 135 140
[0131]	Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
[0132]	145 150 155 160
[0133]	Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
[0134]	165 170 175
[0135]	Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
[0136]	180
[0137]	<210> 4
[0138]	<211> 133
[0139]	<212> PRT
[0140]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0141]	<220>
[0142]	<223> 合成多肽
[0143]	<400> 4
[0144]	Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
[0145]	1 5 10 15
[0146]	Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu
[0147]	20 25 30
[0148]	Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
[0149]	35 40 45
[0150]	Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn
[0151]	50 55 60
[0152]	Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
[0153]	65 70 75 80
[0154]	Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
[0155]	85 90 95

[0156]	Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
[0157]	100                                    105                                    110
[0158]	Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly
[0159]	115                                    120                                    125
[0160]	Glu Phe Cys Val Leu
[0161]	130
[0162]	<210> 5
[0163]	<211> 603
[0164]	<212> PRT
[0165]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0166]	<220>
[0167]	<223> 合成多肽
[0168]	<400> 5
[0169]	Val Arg Ile Asn Gly Asp Gly Gln Glu Val Leu Tyr Leu Ala Glu Gly
[0170]	1                                    5                                    10                                    15
[0171]	Asp Asn Val Arg Leu Gly Cys Pro Tyr Val Leu Asp Pro Glu Asp Tyr
[0172]	20                                    25                                    30
[0173]	Gly Pro Asn Gly Leu Asp Ile Glu Trp Met Gln Val Asn Ser Asp Pro
[0174]	35                                    40                                    45
[0175]	Ala His His Arg Glu Asn Val Phe Leu Ser Tyr Gln Asp Lys Arg Ile
[0176]	50                                    55                                    60
[0177]	Asn His Gly Ser Leu Pro His Leu Gln Gln Arg Val Arg Phe Ala Ala
[0178]	65                                    70                                    75                                    80
[0179]	Ser Asp Pro Ser Gln Tyr Asp Ala Ser Ile Asn Leu Met Asn Leu Gln
[0180]	85                                    90                                    95
[0181]	Val Ser Asp Thr Ala Thr Tyr Glu Cys Arg Val Lys Lys Thr Thr Met
[0182]	100                                    105                                    110
[0183]	Ala Thr Arg Lys Val Ile Val Thr Val Gln Ala Arg Pro Ala Val Pro
[0184]	115                                    120                                    125
[0185]	Met Cys Trp Thr Glu Gly His Met Thr Tyr Gly Asn Asp Val Val Leu
[0186]	130                                    135                                    140
[0187]	Lys Cys Tyr Ala Ser Gly Gly Ser Gln Pro Leu Ser Tyr Lys Trp Ala
[0188]	145                                    150                                    155                                    160
[0189]	Lys Ile Ser Gly His His Tyr Pro Tyr Arg Ala Gly Ser Tyr Thr Ser
[0190]	165                                    170                                    175
[0191]	Gln His Ser Tyr His Ser Glu Leu Ser Tyr Gln Glu Ser Phe His Ser
[0192]	180                                    185                                    190
[0193]	Ser Ile Asn Gln Gly Leu Asn Asn Gly Asp Leu Val Leu Lys Asp Ile
[0194]	195                                    200                                    205

[0195]	Ser Arg Ala Asp Asp Gly Leu Tyr Gln Cys Thr Val Ala Asn Asn Val
[0196]	210 215 220
[0197]	Gly Tyr Ser Val Cys Val Val Glu Val Lys Val Ser Asp Ser Arg Arg
[0198]	225 230 235 240
[0199]	Ile Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
[0200]	245 250 255
[0201]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg
[0202]	260 265 270
[0203]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
[0204]	275 280 285
[0205]	Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[0206]	290 295 300
[0207]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[0208]	305 310 315 320
[0209]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr
[0210]	325 330 335
[0211]	Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
[0212]	340 345 350
[0213]	Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[0214]	355 360 365
[0215]	Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[0216]	370 375 380
[0217]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[0218]	385 390 395 400
[0219]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[0220]	405 410 415
[0221]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
[0222]	420 425 430
[0223]	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala
[0224]	435 440 445
[0225]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0226]	450 455 460
[0227]	Ile Glu Gly Arg Met Asp Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln
[0228]	465 470 475 480
[0229]	Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile
[0230]	485 490 495
[0231]	Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser
[0232]	500 505 510
[0233]	Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr

[0234]	515	520	525
[0235]	Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu		
[0236]	530	535	540
[0237]	Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val		
[0238]	545	550	555
[0239]	Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp		
[0240]	565	570	575
[0241]	Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu		
[0242]	580	585	590
[0243]	Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu		
[0244]	595	600	
[0245]	<210> 6		
[0246]	<211> 685		
[0247]	<212> PRT		
[0248]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0249]	<220>		
[0250]	<223> 合成多肽		
[0251]	<400> 6		
[0252]	Val Arg Ile Asn Gly Asp Gly Gln Glu Val Leu Tyr Leu Ala Glu Gly		
[0253]	1	5	10
[0254]	Asp Asn Val Arg Leu Gly Cys Pro Tyr Val Leu Asp Pro Glu Asp Tyr		
[0255]	20	25	30
[0256]	Gly Pro Asn Gly Leu Asp Ile Glu Trp Met Gln Val Asn Ser Asp Pro		
[0257]	35	40	45
[0258]	Ala His His Arg Glu Asn Val Phe Leu Ser Tyr Gln Asp Lys Arg Ile		
[0259]	50	55	60
[0260]	Asn His Gly Ser Leu Pro His Leu Gln Gln Arg Val Arg Phe Ala Ala		
[0261]	65	70	75
[0262]	Ser Asp Pro Ser Gln Tyr Asp Ala Ser Ile Asn Leu Met Asn Leu Gln		
[0263]	85	90	95
[0264]	Val Ser Asp Thr Ala Thr Tyr Glu Cys Arg Val Lys Lys Thr Thr Met		
[0265]	100	105	110
[0266]	Ala Thr Arg Lys Val Ile Val Thr Val Gln Ala Arg Pro Ala Val Pro		
[0267]	115	120	125
[0268]	Met Cys Trp Thr Glu Gly His Met Thr Tyr Gly Asn Asp Val Val Leu		
[0269]	130	135	140
[0270]	Lys Cys Tyr Ala Ser Gly Gly Ser Gln Pro Leu Ser Tyr Lys Trp Ala		
[0271]	145	150	155
[0272]	Lys Ile Ser Gly His His Tyr Pro Tyr Arg Ala Gly Ser Tyr Thr Ser		

[0273]		165		170		175
[0274]	Gln His Ser Tyr His Ser Glu Leu Ser Tyr Gln Glu Ser Phe His Ser					
[0275]		180		185		190
[0276]	Ser Ile Asn Gln Gly Leu Asn Asn Gly Asp Leu Val Leu Lys Asp Ile					
[0277]		195		200		205
[0278]	Ser Arg Ala Asp Asp Gly Leu Tyr Gln Cys Thr Val Ala Asn Asn Val					
[0279]		210		215		220
[0280]	Gly Tyr Ser Val Cys Val Val Glu Val Lys Val Ser Asp Ser Arg Arg					
[0281]		225		230		240
[0282]	Ile Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser					
[0283]		245		250		255
[0284]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg					
[0285]		260		265		270
[0286]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro					
[0287]		275		280		285
[0288]	Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala					
[0289]		290		295		300
[0290]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val					
[0291]		305		310		320
[0292]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr					
[0293]		325		330		335
[0294]	Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr					
[0295]		340		345		350
[0296]	Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu					
[0297]		355		360		365
[0298]	Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys					
[0299]		370		375		380
[0300]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser					
[0301]		385		390		400
[0302]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp					
[0303]		405		410		415
[0304]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser					
[0305]		420		425		430
[0306]	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala					
[0307]		435		440		445
[0308]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys					
[0309]		450		455		460
[0310]	Ile Glu Gly Arg Met Asp His Arg Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu					
[0311]		465		470		480

[0312]	Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys
[0313]	485 490 495
[0314]	Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys
[0315]	500 505 510
[0316]	Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu
[0317]	515 520 525
[0318]	Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro
[0319]	530 535 540
[0320]	Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser
[0321]	545 550 555 560
[0322]	Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu
[0323]	565 570 575
[0324]	Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu
[0325]	580 585 590
[0326]	Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser
[0327]	595 600 605
[0328]	Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg
[0329]	610 615 620
[0330]	Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys
[0331]	625 630 635 640
[0332]	Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln
[0333]	645 650 655
[0334]	Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser
[0335]	660 665 670
[0336]	His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu
[0337]	675 680 685
[0338]	<210> 7
[0339]	<211> 254
[0340]	<212> PRT
[0341]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0342]	<220>
[0343]	<223> 合成多肽
[0344]	<400> 7
[0345]	Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
[0346]	1 5 10 15
[0347]	Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val
[0348]	20 25 30
[0349]	Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe
[0350]	35 40 45

[0351]	Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser
[0352]	50 55 60
[0353]	Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
[0354]	65 70 75 80
[0355]	Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
[0356]	85 90 95
[0357]	Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
[0358]	100 105 110
[0359]	Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
[0360]	115 120 125
[0361]	Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
[0362]	130 135 140
[0363]	Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
[0364]	145 150 155 160
[0365]	Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
[0366]	165 170 175
[0367]	Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
[0368]	180 185 190
[0369]	Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
[0370]	195 200 205
[0371]	Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
[0372]	210 215 220
[0373]	Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
[0374]	225 230 235 240
[0375]	Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
[0376]	245 250
[0377]	<210> 8
[0378]	<211> 205
[0379]	<212> PRT
[0380]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0381]	<220>
[0382]	<223> 合成多肽
[0383]	<400> 8
[0384]	Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala
[0385]	1 5 10 15
[0386]	Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro
[0387]	20 25 30
[0388]	Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala
[0389]	35 40 45

[0390]	Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro
[0391]	50 55 60
[0392]	Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp
[0393]	65 70 75 80
[0394]	Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe
[0395]	85 90 95
[0396]	Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val
[0397]	100 105 110
[0398]	Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala
[0399]	115 120 125
[0400]	Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg
[0401]	130 135 140
[0402]	Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly
[0403]	145 150 155 160
[0404]	Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala
[0405]	165 170 175
[0406]	Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr
[0407]	180 185 190
[0408]	Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
[0409]	195 200 205
[0410]	<210> 9
[0411]	<211> 234
[0412]	<212> PRT
[0413]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0414]	<220>
[0415]	<223> 合成多肽
[0416]	<400> 9
[0417]	Met Asp Pro Gly Leu Gln Gln Ala Leu Asn Gly Met Ala Pro Pro Gly
[0418]	1 5 10 15
[0419]	Asp Thr Ala Met His Val Pro Ala Gly Ser Val Ala Ser His Leu Gly
[0420]	20 25 30
[0421]	Thr Thr Ser Arg Ser Tyr Phe Tyr Leu Thr Thr Ala Thr Leu Ala Leu
[0422]	35 40 45
[0423]	Cys Leu Val Phe Thr Val Ala Thr Ile Met Val Leu Val Val Gln Arg
[0424]	50 55 60
[0425]	Thr Asp Ser Ile Pro Asn Ser Pro Asp Asn Val Pro Leu Lys Gly Gly
[0426]	65 70 75 80
[0427]	Asn Cys Ser Glu Asp Leu Leu Cys Ile Leu Lys Arg Ala Pro Phe Lys
[0428]	85 90 95

[0429]	Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His Leu Asn Lys Thr Lys
[0430]	100 105 110
[0431]	Leu Ser Trp Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly Val Arg Tyr Gln Asp
[0432]	115 120 125
[0433]	Gly Asn Leu Val Ile Gln Phe Pro Gly Leu Tyr Phe Ile Ile Cys Gln
[0434]	130 135 140
[0435]	Leu Gln Phe Leu Val Gln Cys Pro Asn Asn Ser Val Asp Leu Lys Leu
[0436]	145 150 155 160
[0437]	Glu Leu Leu Ile Asn Lys His Ile Lys Lys Gln Ala Leu Val Thr Val
[0438]	165 170 175
[0439]	Cys Glu Ser Gly Met Gln Thr Lys His Val Tyr Gln Asn Leu Ser Gln
[0440]	180 185 190
[0441]	Phe Leu Leu Asp Tyr Leu Gln Val Asn Thr Thr Ile Ser Val Asn Val
[0442]	195 200 205
[0443]	Asp Thr Phe Gln Tyr Ile Asp Thr Ser Thr Phe Pro Leu Glu Asn Val
[0444]	210 215 220
[0445]	Leu Ser Ile Phe Leu Tyr Ser Asn Ser Asp
[0446]	225 230
[0447]	<210> 10
[0448]	<211> 172
[0449]	<212> PRT
[0450]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0451]	<220>
[0452]	<223> 合成多肽
[0453]	<400> 10
[0454]	Gln Arg Thr Asp Ser Ile Pro Asn Ser Pro Asp Asn Val Pro Leu Lys
[0455]	1 5 10 15
[0456]	Gly Gly Asn Cys Ser Glu Asp Leu Leu Cys Ile Leu Lys Arg Ala Pro
[0457]	20 25 30
[0458]	Phe Lys Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His Leu Asn Lys
[0459]	35 40 45
[0460]	Thr Lys Leu Ser Trp Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly Val Arg Tyr
[0461]	50 55 60
[0462]	Gln Asp Gly Asn Leu Val Ile Gln Phe Pro Gly Leu Tyr Phe Ile Ile
[0463]	65 70 75 80
[0464]	Cys Gln Leu Gln Phe Leu Val Gln Cys Pro Asn Asn Ser Val Asp Leu
[0465]	85 90 95
[0466]	Lys Leu Glu Leu Leu Ile Asn Lys His Ile Lys Lys Gln Ala Leu Val
[0467]	100 105 110

[0468]	Thr Val Cys Glu Ser Gly Met Gln Thr Lys His Val Tyr Gln Asn Leu
[0469]	115 120 125
[0470]	Ser Gln Phe Leu Leu Asp Tyr Leu Gln Val Asn Thr Thr Ile Ser Val
[0471]	130 135 140
[0472]	Asn Val Asp Thr Phe Gln Tyr Ile Asp Thr Ser Thr Phe Pro Leu Glu
[0473]	145 150 155 160
[0474]	Asn Val Leu Ser Ile Phe Leu Tyr Ser Asn Ser Asp
[0475]	165 170
[0476]	<210> 11
[0477]	<211> 261
[0478]	<212> PRT
[0479]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0480]	<220>
[0481]	<223> 合成多肽
[0482]	<400> 11
[0483]	Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
[0484]	1 5 10 15
[0485]	Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
[0486]	20 25 30
[0487]	Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
[0488]	35 40 45
[0489]	Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
[0490]	50 55 60
[0491]	Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
[0492]	65 70 75 80
[0493]	Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
[0494]	85 90 95
[0495]	Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
[0496]	100 105 110
[0497]	Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
[0498]	115 120 125
[0499]	Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
[0500]	130 135 140
[0501]	Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
[0502]	145 150 155 160
[0503]	Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
[0504]	165 170 175
[0505]	Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
[0506]	180 185 190

[0507]	Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
[0508]	195 200 205
[0509]	Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
[0510]	210 215 220
[0511]	Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
[0512]	225 230 235 240
[0513]	Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
[0514]	245 250 255
[0515]	Gly Leu Leu Lys Leu
[0516]	260
[0517]	<210> 12
[0518]	<211> 215
[0519]	<212> PRT
[0520]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0521]	<220>
[0522]	<223> 合成多肽
[0523]	<400> 12
[0524]	His Arg Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp
[0525]	1 5 10 15
[0526]	Phe Val Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser
[0527]	20 25 30
[0528]	Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe
[0529]	35 40 45
[0530]	Val Lys Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser
[0531]	50 55 60
[0532]	Phe Glu Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val
[0533]	65 70 75 80
[0534]	Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu
[0535]	85 90 95
[0536]	Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly
[0537]	100 105 110
[0538]	Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln
[0539]	115 120 125
[0540]	Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile
[0541]	130 135 140
[0542]	Ala Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu
[0543]	145 150 155 160
[0544]	Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser
[0545]	165 170 175

[0546]	Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe
[0547]	180 185 190
[0548]	Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr
[0549]	195 200 205
[0550]	Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu
[0551]	210 215
[0552]	<210> 13
[0553]	<211> 281
[0554]	<212> PRT
[0555]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0556]	<220>
[0557]	<223> 合成多肽
[0558]	<400> 13
[0559]	Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Pro Gln Ile Tyr Trp Val Asp
[0560]	1 5 10 15
[0561]	Ser Ser Ala Ser Ser Pro Trp Ala Pro Pro Gly Thr Val Leu Pro Cys
[0562]	20 25 30
[0563]	Pro Thr Ser Val Pro Arg Arg Pro Gly Gln Arg Arg Pro Pro Pro Pro
[0564]	35 40 45
[0565]	Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro
[0566]	50 55 60
[0567]	Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu Lys Lys Arg Gly Asn His Ser Thr Gly
[0568]	65 70 75 80
[0569]	Leu Cys Leu Leu Val Met Phe Phe Met Val Leu Val Ala Leu Val Gly
[0570]	85 90 95
[0571]	Leu Gly Leu Gly Met Phe Gln Leu Phe His Leu Gln Lys Glu Leu Ala
[0572]	100 105 110
[0573]	Glu Leu Arg Glu Ser Thr Ser Gln Met His Thr Ala Ser Ser Leu Glu
[0574]	115 120 125
[0575]	Lys Gln Ile Gly His Pro Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg
[0576]	130 135 140
[0577]	Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu
[0578]	145 150 155 160
[0579]	Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr
[0580]	165 170 175
[0581]	Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr
[0582]	180 185 190
[0583]	Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser
[0584]	195 200 205

[0585]	His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met
[0586]	210 215 220
[0587]	Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala
[0588]	225 230 235 240
[0589]	Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His
[0590]	245 250 255
[0591]	Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser
[0592]	260 265 270
[0593]	Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu
[0594]	275 280
[0595]	<210> 14
[0596]	<211> 179
[0597]	<212> PRT
[0598]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0599]	<220>
[0600]	<223> 合成多肽
[0601]	<400> 14
[0602]	Gln Leu Phe His Leu Gln Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu Ser Thr
[0603]	1 5 10 15
[0604]	Ser Gln Met His Thr Ala Ser Ser Leu Glu Lys Gln Ile Gly His Pro
[0605]	20 25 30
[0606]	Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg Lys Val Ala His Leu Thr
[0607]	35 40 45
[0608]	Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr
[0609]	50 55 60
[0610]	Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val
[0611]	65 70 75 80
[0612]	Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg
[0613]	85 90 95
[0614]	Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg
[0615]	100 105 110
[0616]	Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met
[0617]	115 120 125
[0618]	Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly
[0619]	130 135 140
[0620]	Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser
[0621]	145 150 155 160
[0622]	Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu
[0623]	165 170 175

[0624] Tyr Lys Leu  
 [0625] <210> 15  
 [0626] <211> 199  
 [0627] <212> PRT  
 [0628] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0629] <220>  
 [0630] <223> 合成多肽  
 [0631] <400> 15  
 [0632] Met Thr Leu His Pro Ser Pro Ile Thr Cys Glu Phe Leu Phe Ser Thr  
 [0633] 1 5 10 15  
 [0634] Ala Leu Ile Ser Pro Lys Met Cys Leu Ser His Leu Glu Asn Met Pro  
 [0635] 20 25 30  
 [0636] Leu Ser His Ser Arg Thr Gln Gly Ala Gln Arg Ser Ser Trp Lys Leu  
 [0637] 35 40 45  
 [0638] Trp Leu Phe Cys Ser Ile Val Met Leu Leu Phe Leu Cys Ser Phe Ser  
 [0639] 50 55 60  
 [0640] Trp Leu Ile Phe Ile Phe Leu Gln Leu Glu Thr Ala Lys Glu Pro Cys  
 [0641] 65 70 75 80  
 [0642] Met Ala Lys Phe Gly Pro Leu Pro Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser  
 [0643] 85 90 95  
 [0644] Glu Pro Pro Cys Val Asn Lys Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu  
 [0645] 100 105 110  
 [0646] Gln Asn Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn  
 [0647] 115 120 125  
 [0648] Tyr Asn Asp Val Ala Pro Phe Glu Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp  
 [0649] 130 135 140  
 [0650] Met Ile Gln Thr Leu Thr Asn Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly  
 [0651] 145 150 155 160  
 [0652] Thr Tyr Glu Leu His Val Gly Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser  
 [0653] 165 170 175  
 [0654] Glu His Gln Val Leu Lys Asn Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu  
 [0655] 180 185 190  
 [0656] Ala Asn Pro Gln Phe Ile Ser  
 [0657] 195  
 [0658] <210> 16  
 [0659] <211> 128  
 [0660] <212> PRT  
 [0661] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0662] <220>

[0663]	<223>	合成多肽
[0664]	<400>	16
[0665]	Gln Leu Glu Thr Ala Lys Glu Pro Cys Met Ala Lys Phe Gly Pro Leu	
[0666]	1	5 10 15
[0667]	Pro Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser Glu Pro Pro Cys Val Asn Lys	
[0668]		20 25 30
[0669]	Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu Gln Asn Gly Leu Tyr Leu Ile	
[0670]		35 40 45
[0671]	Tyr Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn Tyr Asn Asp Val Ala Pro Phe	
[0672]		50 55 60
[0673]	Glu Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp Met Ile Gln Thr Leu Thr Asn	
[0674]		65 70 75 80
[0675]	Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly Thr Tyr Glu Leu His Val Gly	
[0676]		85 90 95
[0677]	Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser Glu His Gln Val Leu Lys Asn	
[0678]		100 105 110
[0679]	Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu Ala Asn Pro Gln Phe Ile Ser	
[0680]		115 120 125
[0681]	<210>	17
[0682]	<211>	240
[0683]	<212>	PRT
[0684]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0685]	<220>	
[0686]	<223>	合成多肽
[0687]	<400>	17
[0688]	Met Glu Glu Ser Val Val Arg Pro Ser Val Phe Val Val Asp Gly Gln	
[0689]	1	5 10 15
[0690]	Thr Asp Ile Pro Phe Thr Arg Leu Gly Arg Ser His Arg Arg Gln Ser	
[0691]		20 25 30
[0692]	Cys Ser Val Ala Arg Val Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Met Gly	
[0693]		35 40 45
[0694]	Ala Gly Leu Ala Val Gln Gly Trp Phe Leu Leu Gln Leu His Trp Arg	
[0695]		50 55 60
[0696]	Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp Gly Pro Ala Gly Ser Trp	
[0697]		65 70 75 80
[0698]	Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His Glu Val Asn Pro Ala Ala	
[0699]		85 90 95
[0700]	His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu	
[0701]		100 105 110

[0702]	Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr
[0703]	115 120 125
[0704]	His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala Gly Tyr Tyr Ile Tyr
[0705]	130 135 140
[0706]	Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys Pro Leu Gly Leu Ala Ser
[0707]	145 150 155 160
[0708]	Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu
[0709]	165 170 175
[0710]	Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro Cys Gly Arg Ala Thr Ser
[0711]	180 185 190
[0712]	Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu Gly Gly Val Val His
[0713]	195 200 205
[0714]	Leu Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu
[0715]	210 215 220
[0716]	Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val
[0717]	225 230 235 240
[0718]	<210> 18
[0719]	<211> 182
[0720]	<212> PRT
[0721]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0722]	<220>
[0723]	<223> 合成多肽
[0724]	<400> 18
[0725]	Leu Gln Leu His Trp Arg Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp
[0726]	1 5 10 15
[0727]	Gly Pro Ala Gly Ser Trp Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His
[0728]	20 25 30
[0729]	Glu Val Asn Pro Ala Ala His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr
[0730]	35 40 45
[0731]	Gly Ser Gly Gly Pro Leu Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe
[0732]	50 55 60
[0733]	Leu Arg Gly Leu Ser Tyr His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala
[0734]	65 70 75 80
[0735]	Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys
[0736]	85 90 95
[0737]	Pro Leu Gly Leu Ala Ser Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr
[0738]	100 105 110
[0739]	Pro Arg Tyr Pro Glu Glu Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro
[0740]	115 120 125

[0741]	Cys Gly Arg Ala Thr Ser Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe
[0742]	130 135 140
[0743]	Leu Gly Gly Val Val His Leu Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val Arg
[0744]	145 150 155 160
[0745]	Val Leu Asp Glu Arg Leu Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr
[0746]	165 170 175
[0747]	Phe Gly Ala Phe Met Val
[0748]	180
[0749]	<210> 19
[0750]	<400> 19
[0751]	000
[0752]	<210> 20
[0753]	<400> 20
[0754]	000
[0755]	<210> 21
[0756]	<211> 251
[0757]	<212> PRT
[0758]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0759]	<220>
[0760]	<223> 合成多肽
[0761]	<400> 21
[0762]	Met Ala Glu Asp Leu Gly Leu Ser Phe Gly Glu Thr Ala Ser Val Glu
[0763]	1 5 10 15
[0764]	Met Leu Pro Glu His Gly Ser Cys Arg Pro Lys Ala Arg Ser Ser Ser
[0765]	20 25 30
[0766]	Ala Arg Trp Ala Leu Thr Cys Cys Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala
[0767]	35 40 45
[0768]	Gly Leu Thr Thr Tyr Leu Leu Val Ser Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu
[0769]	50 55 60
[0770]	Ala Cys Val Gln Phe Gln Ala Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser
[0771]	65 70 75 80
[0772]	His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg
[0773]	85 90 95
[0774]	Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn
[0775]	100 105 110
[0776]	Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr
[0777]	115 120 125
[0778]	Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser
[0779]	130 135 140

[0780]	Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser
[0781]	145 150 155 160
[0782]	Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser
[0783]	165 170 175
[0784]	Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr
[0785]	180 185 190
[0786]	Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp
[0787]	195 200 205
[0788]	Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp
[0789]	210 215 220
[0790]	Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys
[0791]	225 230 235 240
[0792]	Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu
[0793]	245 250
[0794]	<210> 22
[0795]	<211> 192
[0796]	<212> PRT
[0797]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0798]	<220>
[0799]	<223> 合成多肽
[0800]	<400> 22
[0801]	Arg Ala Gln Gly Glu Ala Cys Val Gln Phe Gln Ala Leu Lys Gly Gln
[0802]	1 5 10 15
[0803]	Glu Phe Ala Pro Ser His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp
[0804]	20 25 30
[0805]	Gly Asp Lys Pro Arg Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr
[0806]	35 40 45
[0807]	Gln His Phe Lys Asn Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu
[0808]	50 55 60
[0809]	Gly Leu Ala Phe Thr Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu
[0810]	65 70 75 80
[0811]	Leu Ile Pro Glu Ser Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val Thr Phe
[0812]	85 90 95
[0813]	Arg Gly Met Thr Ser Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg Pro
[0814]	100 105 110
[0815]	Asn Lys Pro Asp Ser Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser
[0816]	115 120 125
[0817]	Tyr Pro Glu Pro Thr Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu
[0818]	130 135 140

[0819]	Val Gly Ser Asn Trp Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser
[0820]	145 150 155 160
[0821]	Leu Gln Glu Gly Asp Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu
[0822]	165 170 175
[0823]	Val Asp Tyr Thr Lys Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu
[0824]	180 185 190
[0825]	<210> 23
[0826]	<211> 281
[0827]	<212> PRT
[0828]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0829]	<220>
[0830]	<223> 合成多肽
[0831]	<400> 23
[0832]	Met Ala Met Met Glu Val Gln Gly Gly Pro Ser Leu Gly Gln Thr Cys
[0833]	1 5 10 15
[0834]	Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys Val Ala
[0835]	20 25 30
[0836]	Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys
[0837]	35 40 45
[0838]	Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr
[0839]	50 55 60
[0840]	Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val
[0841]	65 70 75 80
[0842]	Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser
[0843]	85 90 95
[0844]	Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro
[0845]	100 105 110
[0846]	Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
[0847]	115 120 125
[0848]	Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
[0849]	130 135 140
[0850]	Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
[0851]	145 150 155 160
[0852]	His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
[0853]	165 170 175
[0854]	His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
[0855]	180 185 190
[0856]	Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
[0857]	195 200 205

[0858]	Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
[0859]	210 215 220
[0860]	Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
[0861]	225 230 235 240
[0862]	Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
[0863]	245 250 255
[0864]	Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
[0865]	260 265 270
[0866]	Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
[0867]	275 280
[0868]	<210> 24
[0869]	<211> 243
[0870]	<212> PRT
[0871]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0872]	<220>
[0873]	<223> 合成多肽
[0874]	<400> 24
[0875]	Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys Tyr Ser Lys Ser Gly Ile
[0876]	1 5 10 15
[0877]	Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr Trp Asp Pro Asn Asp Glu
[0878]	20 25 30
[0879]	Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val Lys Trp Gln Leu Arg Gln
[0880]	35 40 45
[0881]	Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr
[0882]	50 55 60
[0883]	Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly
[0884]	65 70 75 80
[0885]	Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn
[0886]	85 90 95
[0887]	Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys
[0888]	100 105 110
[0889]	Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn
[0890]	115 120 125
[0891]	Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr
[0892]	130 135 140
[0893]	Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu
[0894]	145 150 155 160
[0895]	Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr
[0896]	165 170 175

[0897]	Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys
[0898]	180 185 190
[0899]	Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly
[0900]	195 200 205
[0901]	Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn
[0902]	210 215 220
[0903]	Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe
[0904]	225 230 235 240
[0905]	Leu Val Gly
[0906]	<210> 25
[0907]	<211> 217
[0908]	<212> PRT
[0909]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0910]	<220>
[0911]	<223> 合成多肽
[0912]	<400> 25
[0913]	Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
[0914]	1 5 10 15
[0915]	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
[0916]	20 25 30
[0917]	Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
[0918]	35 40 45
[0919]	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
[0920]	50 55 60
[0921]	Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
[0922]	65 70 75 80
[0923]	Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys
[0924]	85 90 95
[0925]	Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln
[0926]	100 105 110
[0927]	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
[0928]	115 120 125
[0929]	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
[0930]	130 135 140
[0931]	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
[0932]	145 150 155 160
[0933]	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
[0934]	165 170 175
[0935]	Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val

[0936]	180	185	190
[0937]	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
[0938]	195	200	205
[0939]	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[0940]	210	215	
[0941]	<210> 26		
[0942]	<211> 217		
[0943]	<212> PRT		
[0944]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0945]	<220>		
[0946]	<223> 合成多肽		
[0947]	<400> 26		
[0948]	Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
[0949]	1	5	10
[0950]	Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
[0951]	20	25	30
[0952]	Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr		
[0953]	35	40	45
[0954]	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
[0955]	50	55	60
[0956]	Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Thr Pro His		
[0957]	65	70	75
[0958]	Ser Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys		
[0959]	85	90	95
[0960]	Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln		
[0961]	100	105	110
[0962]	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met		
[0963]	115	120	125
[0964]	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
[0965]	130	135	140
[0966]	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
[0967]	145	150	155
[0968]	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
[0969]	165	170	175
[0970]	Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val		
[0971]	180	185	190
[0972]	Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
[0973]	195	200	205
[0974]	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		

[0975]	210	215
[0976]	<210> 27	
[0977]	<211> 217	
[0978]	<212> PRT	
[0979]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0980]	<220>	
[0981]	<223> 合成多肽	
[0982]	<400> 27	
[0983]	Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	
[0984]	1 5 10 15	
[0985]	Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val	
[0986]	20 25 30	
[0987]	Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr	
[0988]	35 40 45	
[0989]	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	
[0990]	50 55 60	
[0991]	Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	
[0992]	65 70 75 80	
[0993]	Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys	
[0994]	85 90 95	
[0995]	Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln	
[0996]	100 105 110	
[0997]	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met	
[0998]	115 120 125	
[0999]	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	
[1000]	130 135 140	
[1001]	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	
[1002]	145 150 155 160	
[1003]	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu	
[1004]	165 170 175	
[1005]	Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val	
[1006]	180 185 190	
[1007]	Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln	
[1008]	195 200 205	
[1009]	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys	
[1010]	210 215	
[1011]	<210> 28	
[1012]	<211> 11	
[1013]	<212> PRT	



- [1053] <400> 32  
 [1054] Gly Gly Gly Val Pro Arg Asp Cys Gly  
 [1055] 1 5  
 [1056] <210> 33  
 [1057] <211> 15  
 [1058] <212> PRT  
 [1059] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1060] <220>  
 [1061] <223> 合成多肽  
 [1062] <400> 33  
 [1063] Ile Glu Gly Arg Met Asp Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly  
 [1064] 1 5 10 15  
 [1065] <210> 34  
 [1066] <211> 8  
 [1067] <212> PRT  
 [1068] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1069] <220>  
 [1070] <223> 合成多肽  
 [1071] <400> 34  
 [1072] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 [1073] 1 5  
 [1074] <210> 35  
 [1075] <211> 12  
 [1076] <212> PRT  
 [1077] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1078] <220>  
 [1079] <223> 合成多肽  
 [1080] <400> 35  
 [1081] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 [1082] 1 5 10  
 [1083] <210> 36  
 [1084] <211> 14  
 [1085] <212> PRT  
 [1086] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1087] <220>  
 [1088] <223> 合成多肽  
 [1089] <400> 36  
 [1090] Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr  
 [1091] 1 5 10



[1131]	<211>	17		
[1132]	<212>	PRT		
[1133]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[1134]	<220>			
[1135]	<223>	合成多肽		
[1136]	<400>	41		
[1137]		Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala		
[1138]		1	5	10 15
[1139]		Ser		
[1140]	<210>	42		
[1141]	<211>	9		
[1142]	<212>	PRT		
[1143]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[1144]	<220>			
[1145]	<223>	合成多肽		
[1146]	<400>	42		
[1147]		Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly		
[1148]		1	5	
[1149]	<210>	43		
[1150]	<400>	43		
[1151]		000		
[1152]	<210>	44		
[1153]	<211>	6		
[1154]	<212>	PRT		
[1155]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[1156]	<220>			
[1157]	<223>	合成多肽		
[1158]	<400>	44		
[1159]		Gly Ser Gly Ser Gly Ser		
[1160]		1	5	
[1161]	<210>	45		
[1162]	<211>	10		
[1163]	<212>	PRT		
[1164]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[1165]	<220>			
[1166]	<223>	合成多肽		
[1167]	<400>	45		
[1168]		Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser		
[1169]		1	5	10

- [1170] <210> 46  
[1171] <211> 7  
[1172] <212> PRT  
[1173] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[1174] <220>  
[1175] <223> 合成多肽  
[1176] <400> 46  
[1177] Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser  
[1178] 1 5  
[1179] <210> 47  
[1180] <211> 20  
[1181] <212> PRT  
[1182] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[1183] <220>  
[1184] <223> 合成多肽  
[1185] <400> 47  
[1186] Ala Pro  
[1187] 1 5 10 15  
[1188] Ala Pro Ala Pro  
[1189] 20  
[1190] <210> 48  
[1191] <211> 4  
[1192] <212> PRT  
[1193] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[1194] <220>  
[1195] <223> 合成多肽  
[1196] <400> 48  
[1197] Cys Pro Pro Cys  
[1198] 1  
[1199] <210> 49  
[1200] <211> 5  
[1201] <212> PRT  
[1202] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[1203] <220>  
[1204] <223> 合成多肽  
[1205] <400> 49  
[1206] Gly Gly Gly Gly Ser  
[1207] 1 5  
[1208] <210> 50



- [1248] <210> 54  
 [1249] <211> 30  
 [1250] <212> PRT  
 [1251] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1252] <220>  
 [1253] <223> 合成多肽  
 [1254] <400> 54  
 [1255] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 [1256] 1 5 10 15  
 [1257] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 [1258] 20 25 30  
 [1259] <210> 55  
 [1260] <211> 35  
 [1261] <212> PRT  
 [1262] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1263] <220>  
 [1264] <223> 合成多肽  
 [1265] <400> 55  
 [1266] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 [1267] 1 5 10 15  
 [1268] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 [1269] 20 25 30  
 [1270] Gly Gly Ser  
 [1271] 35  
 [1272] <210> 56  
 [1273] <211> 40  
 [1274] <212> PRT  
 [1275] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1276] <220>  
 [1277] <223> 合成多肽  
 [1278] <400> 56  
 [1279] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 [1280] 1 5 10 15  
 [1281] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 [1282] 20 25 30  
 [1283] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 [1284] 35 40  
 [1285] <210> 57  
 [1286] <211> 16



- [1326] <223> 合成多肽
- [1327] <400> 61
- [1328] Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
- [1329] 1 5 10
- [1330] <210> 62
- [1331] <211> 15
- [1332] <212> PRT
- [1333] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1334] <220>
- [1335] <223> 合成多肽
- [1336] <400> 62
- [1337] Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
- [1338] 1 5 10 15
- [1339] <210> 63
- [1340] <211> 12
- [1341] <212> PRT
- [1342] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1343] <220>
- [1344] <223> 合成多肽
- [1345] <400> 63
- [1346] Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala
- [1347] 1 5 10
- [1348] <210> 64
- [1349] <211> 17
- [1350] <212> PRT
- [1351] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1352] <220>
- [1353] <223> 合成多肽
- [1354] <400> 64
- [1355] Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
- [1356] 1 5 10 15
- [1357] Ala
- [1358] <210> 65
- [1359] <211> 22
- [1360] <212> PRT
- [1361] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1362] <220>
- [1363] <223> 合成多肽
- [1364] <400> 65





[1443]	<220>
[1444]	<223> 合成多肽
[1445]	<400> 73
[1446]	Gly Ser Glu Gly Ser
[1447]	1                    5
[1448]	<210> 74
[1449]	<211> 35
[1450]	<212> PRT
[1451]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1452]	<220>
[1453]	<223> 合成多肽
[1454]	<400> 74
[1455]	Gly Glu Gly Gly Ser Gly Glu Gly Ser Ser Gly Glu Gly Ser Ser Ser
[1456]	1                    5                    10                    15
[1457]	Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu
[1458]	20                    25                    30
[1459]	Gly Gly Ser
[1460]	35
[1461]	<210> 75
[1462]	<211> 234
[1463]	<212> PRT
[1464]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1465]	<220>
[1466]	<223> 合成多肽
[1467]	<400> 75
[1468]	Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
[1469]	1                    5                    10                    15
[1470]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[1471]	20                    25                    30
[1472]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[1473]	35                    40                    45
[1474]	Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[1475]	50                    55                    60
[1476]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
[1477]	65                    70                    75                    80
[1478]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser
[1479]	85                    90                    95
[1480]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser
[1481]	100                    105                    110

[1482]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[1483]	115 120 125
[1484]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[1485]	130 135 140
[1486]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[1487]	145 150 155 160
[1488]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[1489]	165 170 175
[1490]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
[1491]	180 185 190
[1492]	Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[1493]	195 200 205
[1494]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[1495]	210 215 220
[1496]	Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp
[1497]	225 230
[1498]	<210> 76
[1499]	<211> 234
[1500]	<212> PRT
[1501]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1502]	<220>
[1503]	<223> 合成多肽
[1504]	<400> 76
[1505]	Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
[1506]	1 5 10 15
[1507]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu
[1508]	20 25 30
[1509]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[1510]	35 40 45
[1511]	Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[1512]	50 55 60
[1513]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
[1514]	65 70 75 80
[1515]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Thr Pro His Ser Asp Trp Leu Ser
[1516]	85 90 95
[1517]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser
[1518]	100 105 110
[1519]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[1520]	115 120 125

[1521]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[1522]	130 135 140
[1523]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[1524]	145 150 155 160
[1525]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[1526]	165 170 175
[1527]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
[1528]	180 185 190
[1529]	Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[1530]	195 200 205
[1531]	Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[1532]	210 215 220
[1533]	Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp
[1534]	225 230
[1535]	<210> 77
[1536]	<211> 234
[1537]	<212> PRT
[1538]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1539]	<220>
[1540]	<223> 合成多肽
[1541]	<400> 77
[1542]	Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
[1543]	1 5 10 15
[1544]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu
[1545]	20 25 30
[1546]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[1547]	35 40 45
[1548]	Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[1549]	50 55 60
[1550]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
[1551]	65 70 75 80
[1552]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser
[1553]	85 90 95
[1554]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser
[1555]	100 105 110
[1556]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[1557]	115 120 125
[1558]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[1559]	130 135 140

[1560]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[1561]	145 150 155 160
[1562]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[1563]	165 170 175
[1564]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
[1565]	180 185 190
[1566]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[1567]	195 200 205
[1568]	Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[1569]	210 215 220
[1570]	Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp
[1571]	225 230
[1572]	<210> 78
[1573]	<211> 234
[1574]	<212> PRT
[1575]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1576]	<220>
[1577]	<223> 合成多肽
[1578]	<400> 78
[1579]	Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
[1580]	1 5 10 15
[1581]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[1582]	20 25 30
[1583]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[1584]	35 40 45
[1585]	Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[1586]	50 55 60
[1587]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
[1588]	65 70 75 80
[1589]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser
[1590]	85 90 95
[1591]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser
[1592]	100 105 110
[1593]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[1594]	115 120 125
[1595]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[1596]	130 135 140
[1597]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[1598]	145 150 155 160

[1599]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[1600]	165 170 175
[1601]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
[1602]	180 185 190
[1603]	Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[1604]	195 200 205
[1605]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[1606]	210 215 220
[1607]	Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp
[1608]	225 230
[1609]	<210> 79
[1610]	<211> 234
[1611]	<212> PRT
[1612]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1613]	<220>
[1614]	<223> 合成多肽
[1615]	<400> 79
[1616]	Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
[1617]	1 5 10 15
[1618]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu
[1619]	20 25 30
[1620]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[1621]	35 40 45
[1622]	Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[1623]	50 55 60
[1624]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
[1625]	65 70 75 80
[1626]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Thr Pro His Ser Asp Trp Leu Ser
[1627]	85 90 95
[1628]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser
[1629]	100 105 110
[1630]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[1631]	115 120 125
[1632]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[1633]	130 135 140
[1634]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[1635]	145 150 155 160
[1636]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[1637]	165 170 175

[1638]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
[1639]	180 185 190
[1640]	Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[1641]	195 200 205
[1642]	Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[1643]	210 215 220
[1644]	Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp
[1645]	225 230
[1646]	<210> 80
[1647]	<211> 234
[1648]	<212> PRT
[1649]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1650]	<220>
[1651]	<223> 合成多肽
[1652]	<400> 80
[1653]	Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
[1654]	1 5 10 15
[1655]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu
[1656]	20 25 30
[1657]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[1658]	35 40 45
[1659]	Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[1660]	50 55 60
[1661]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
[1662]	65 70 75 80
[1663]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser
[1664]	85 90 95
[1665]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser
[1666]	100 105 110
[1667]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[1668]	115 120 125
[1669]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[1670]	130 135 140
[1671]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[1672]	145 150 155 160
[1673]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[1674]	165 170 175
[1675]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
[1676]	180 185 190

---

[1677]	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val
[1678]			195					200						205		
[1679]	Leu	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
[1680]			210					215						220		
[1681]	Ser	Leu	Gly	Lys	Ile	Glu	Gly	Arg	Met	Asp						
[1682]			225					230								

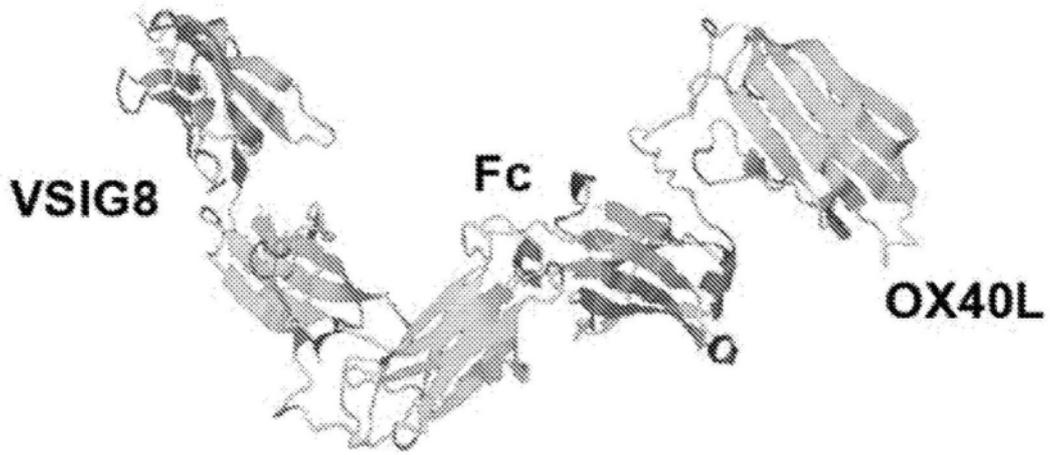


图1A

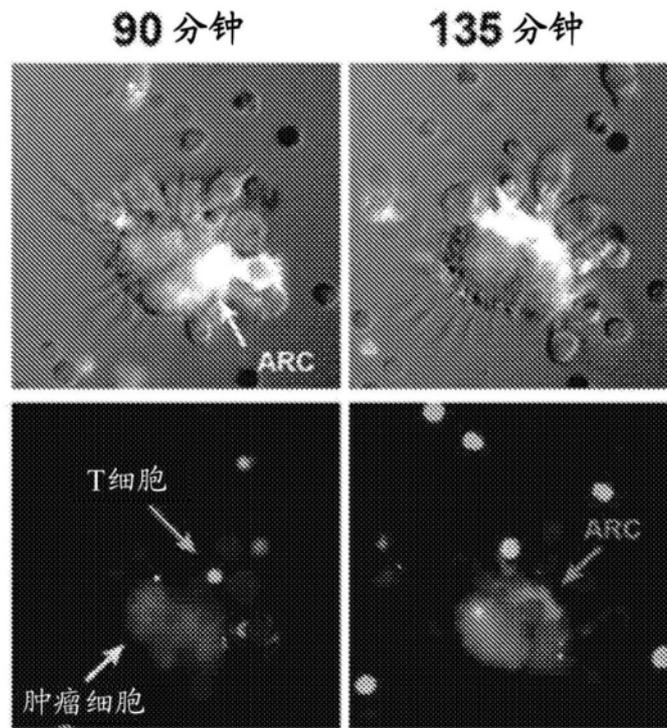


图1B

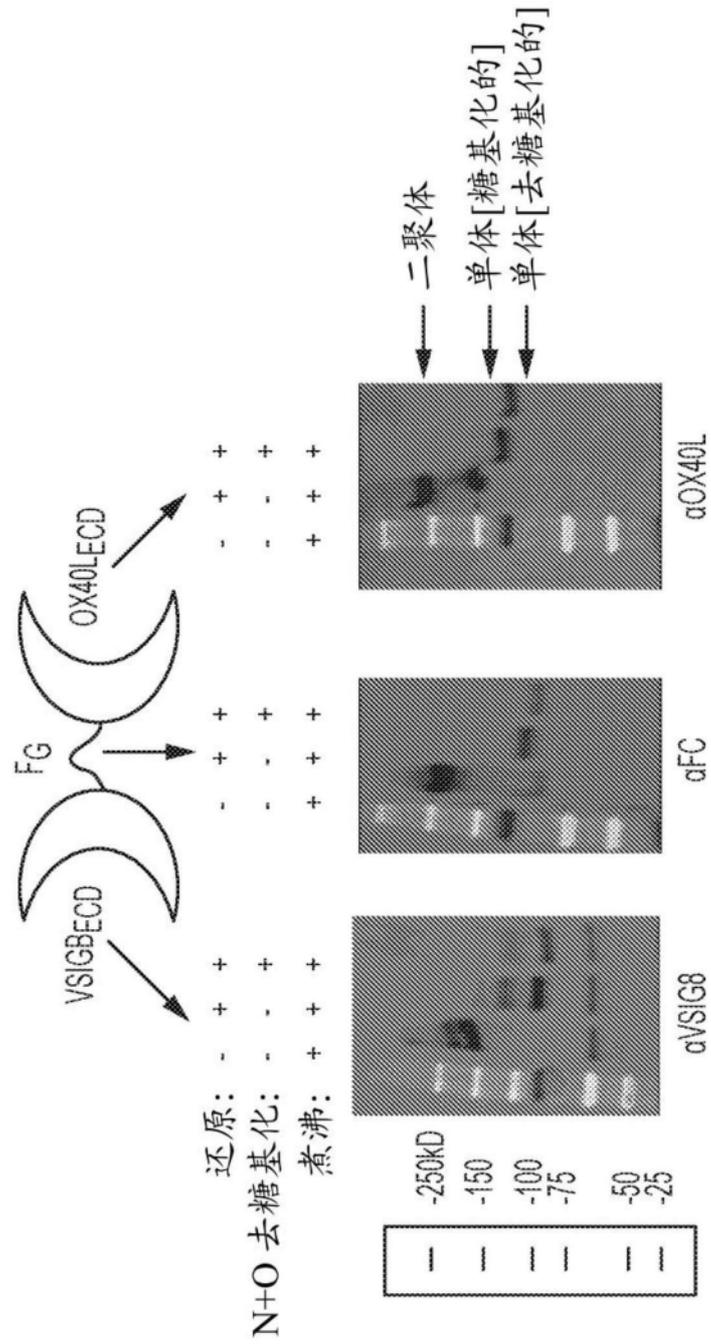


图2

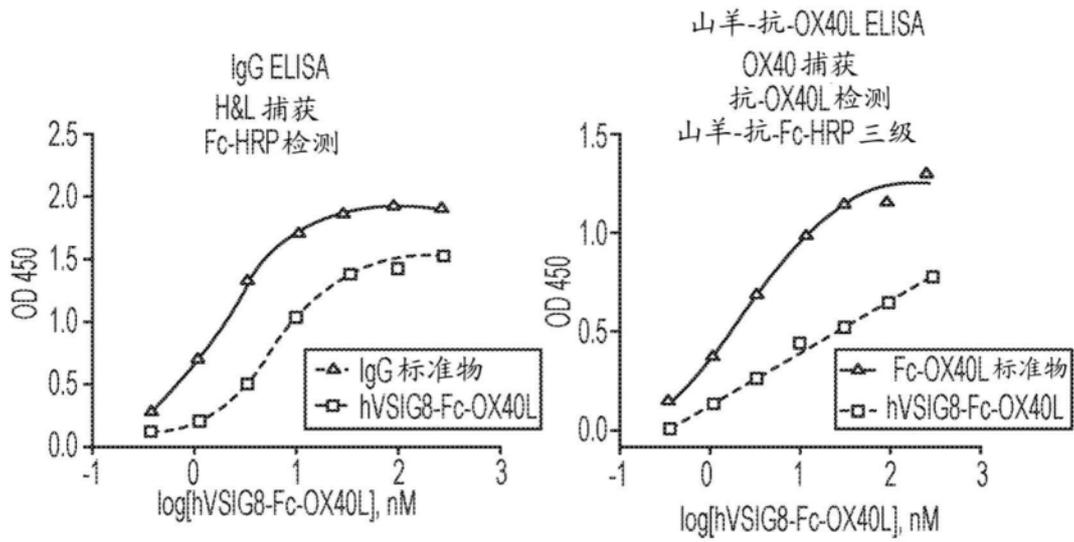


图3

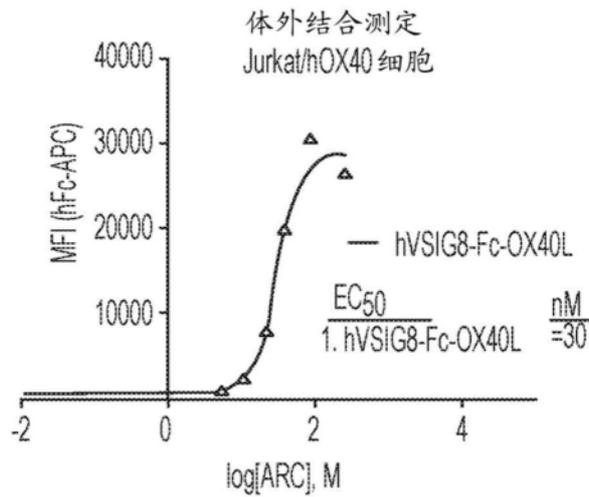


图4

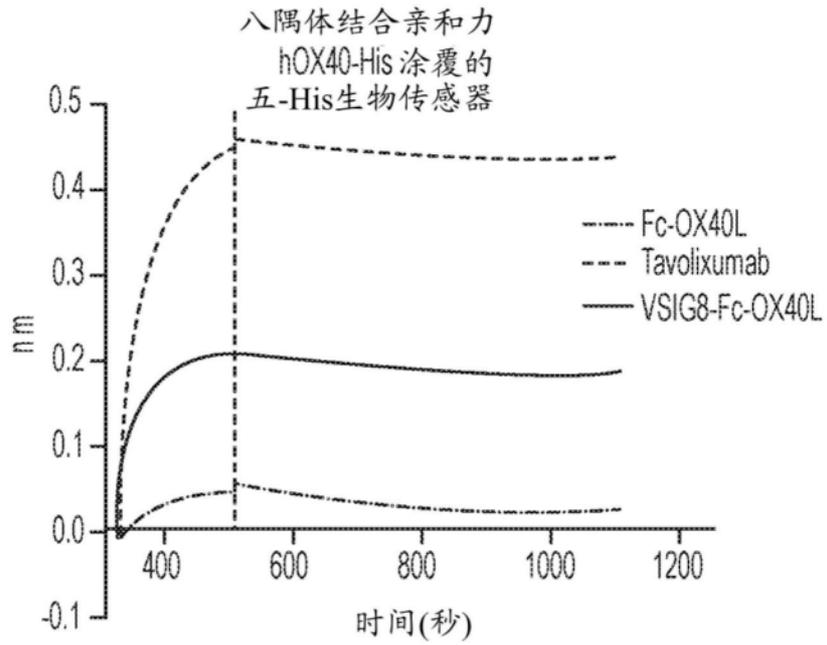


图5

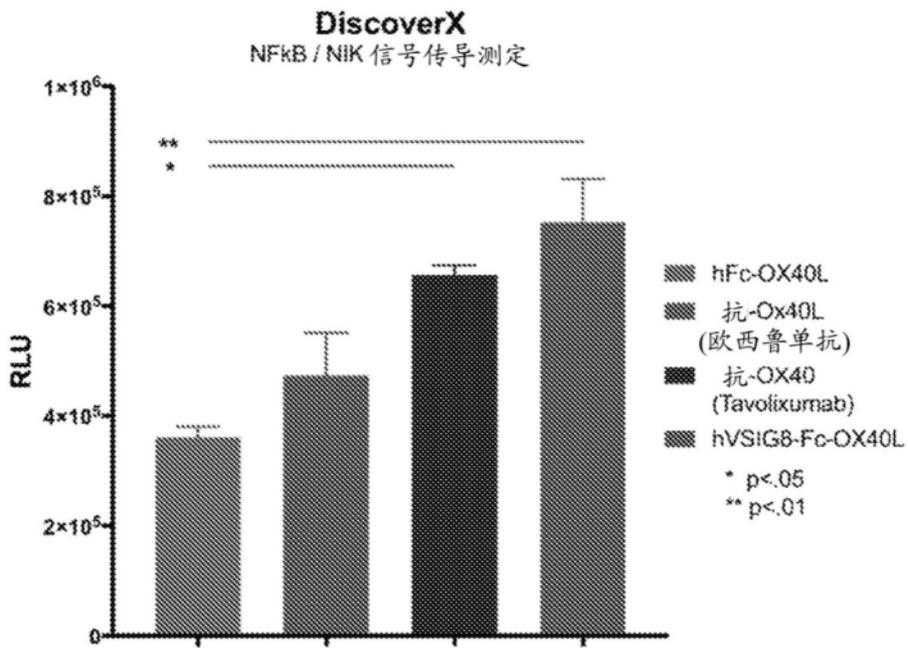


图6

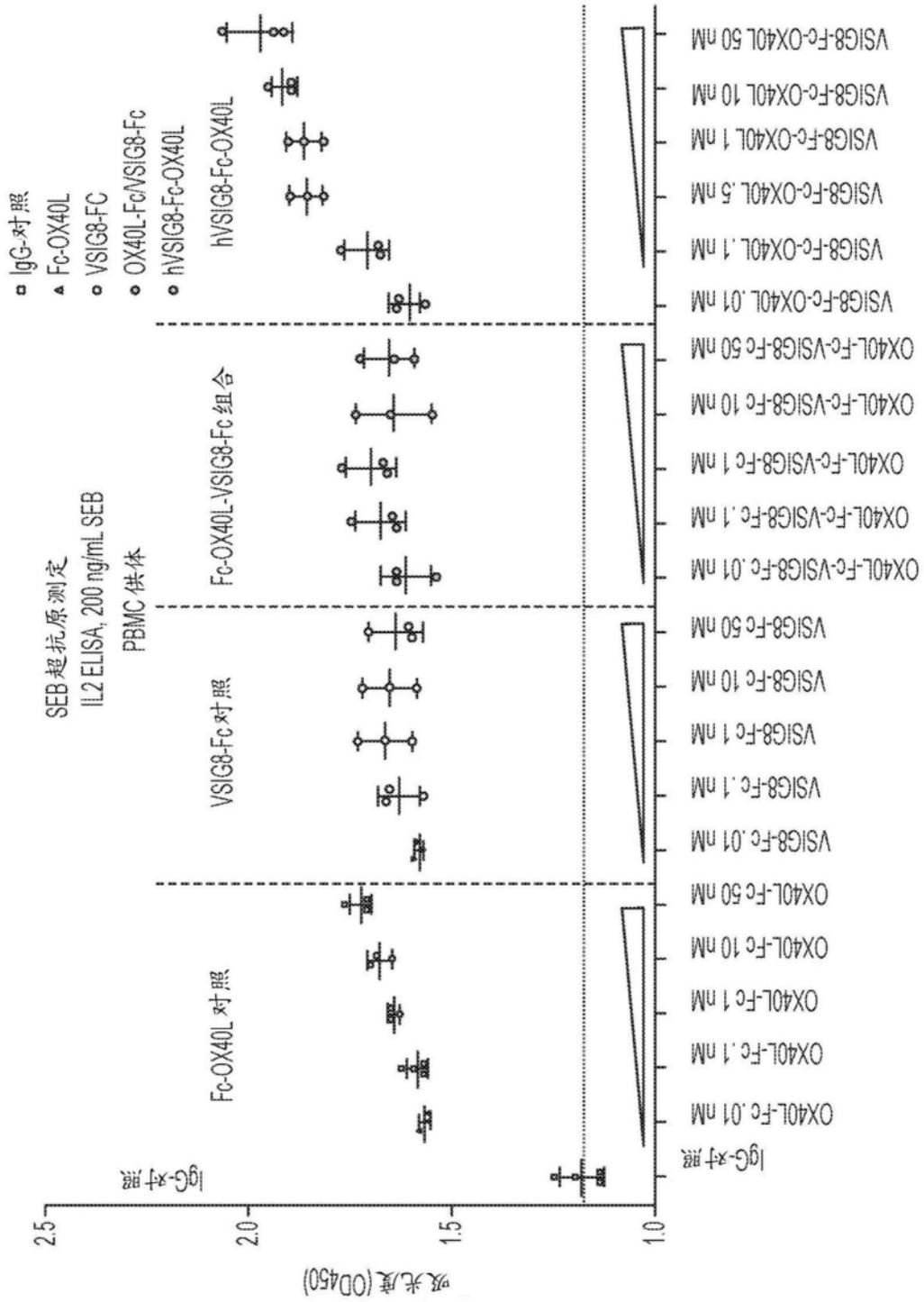


图7

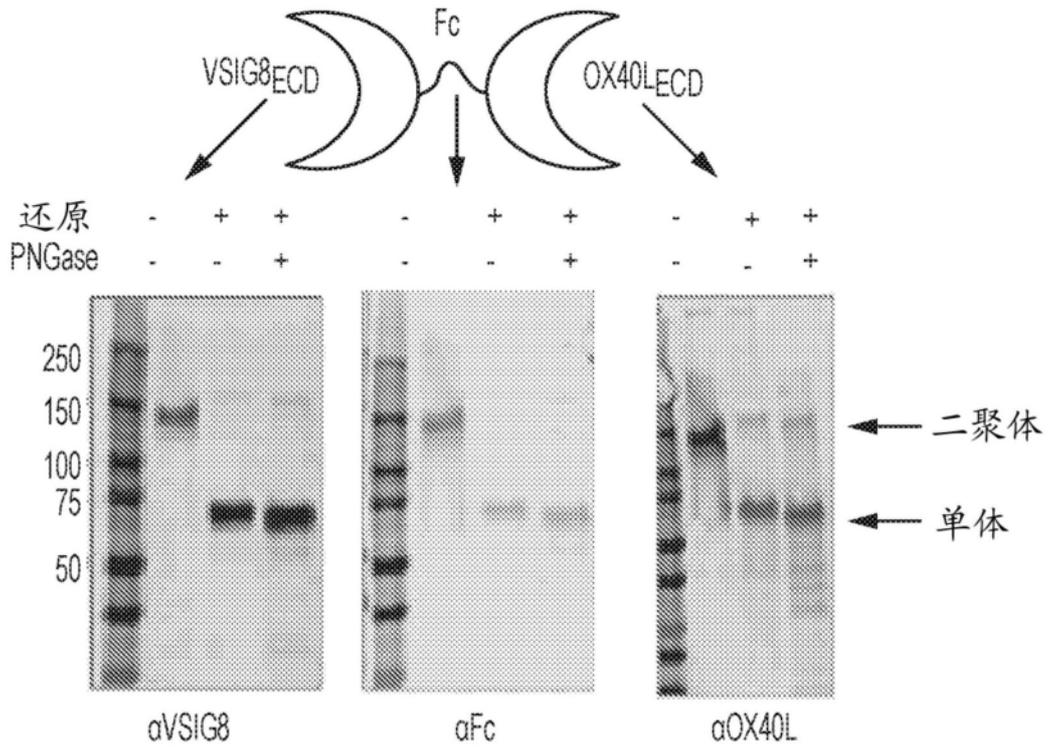


图8

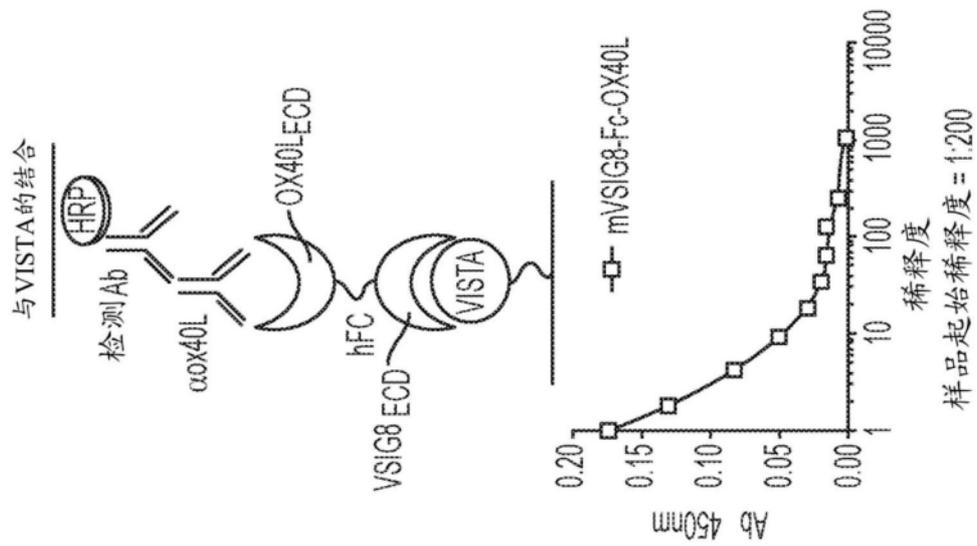


图9A

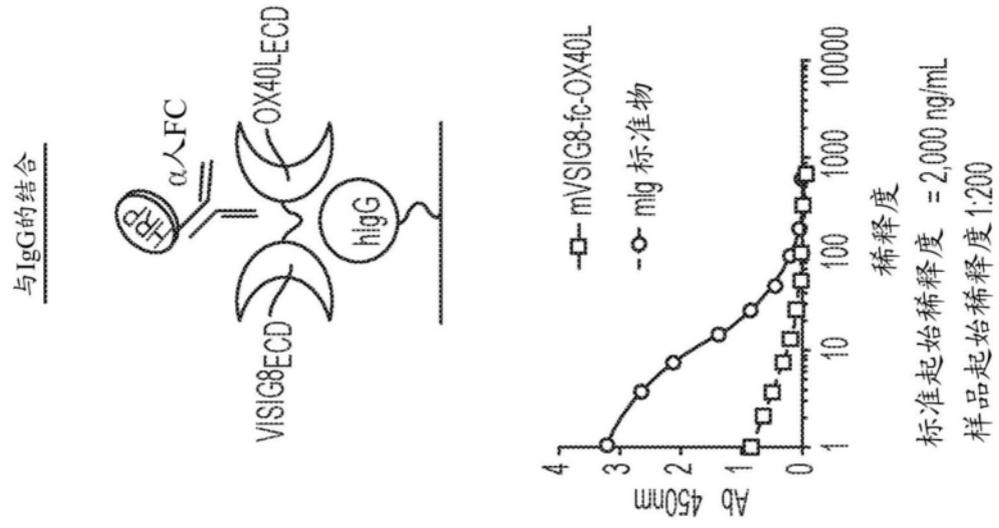


图9B

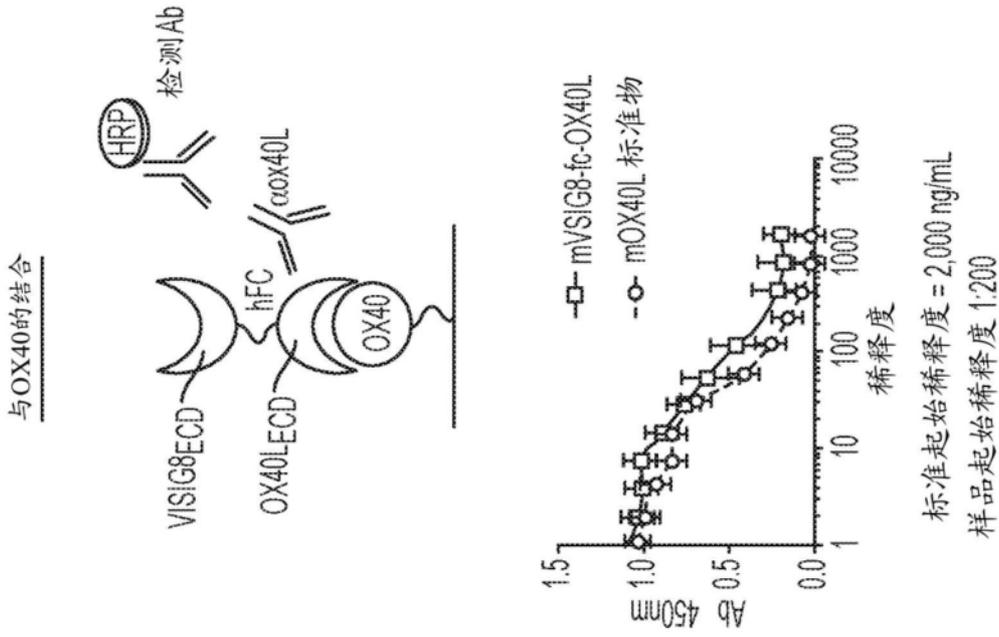


图9C

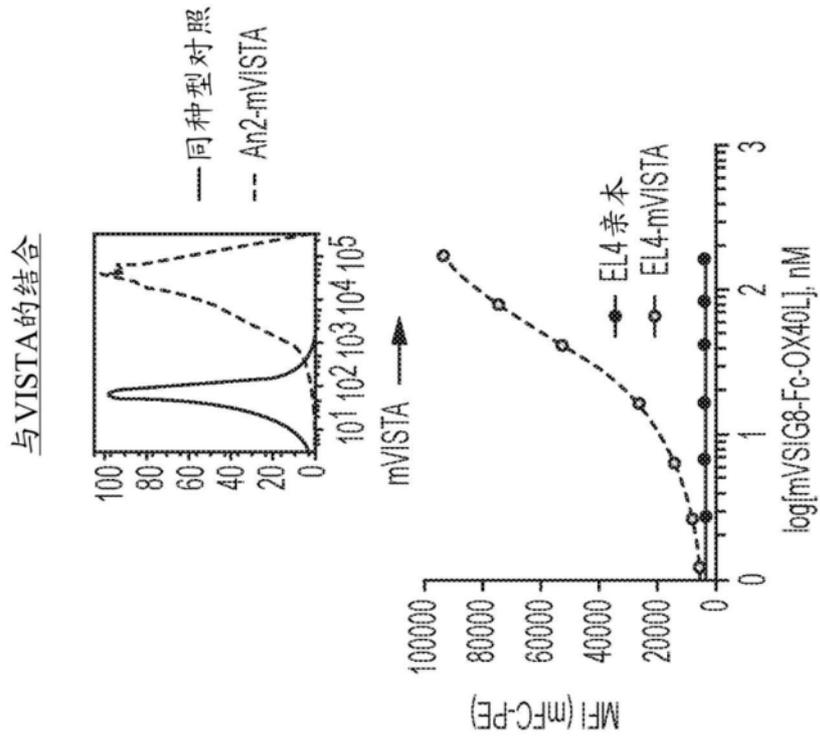


图10A

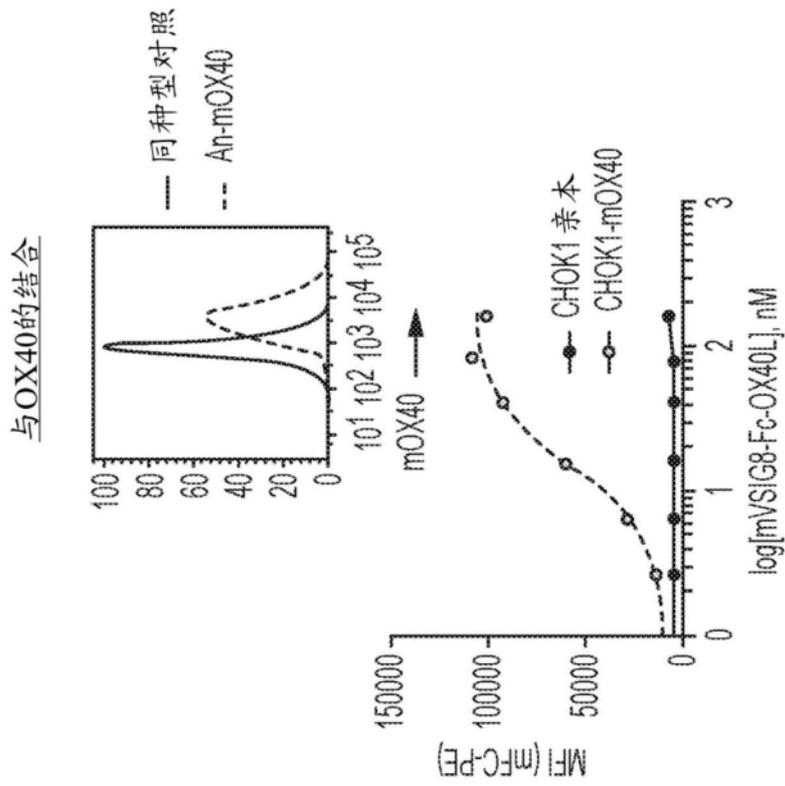


图10B

八隅体结合亲和力  
配体: 小鼠OX40-His

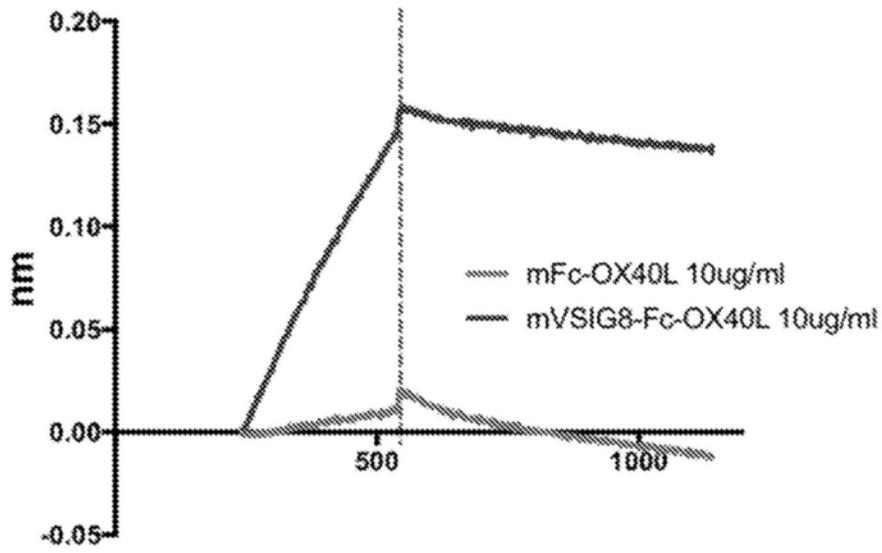


图11

NFkB荧光素酶信号传导测定  
Jurkat/NFkB-Luc/OX40

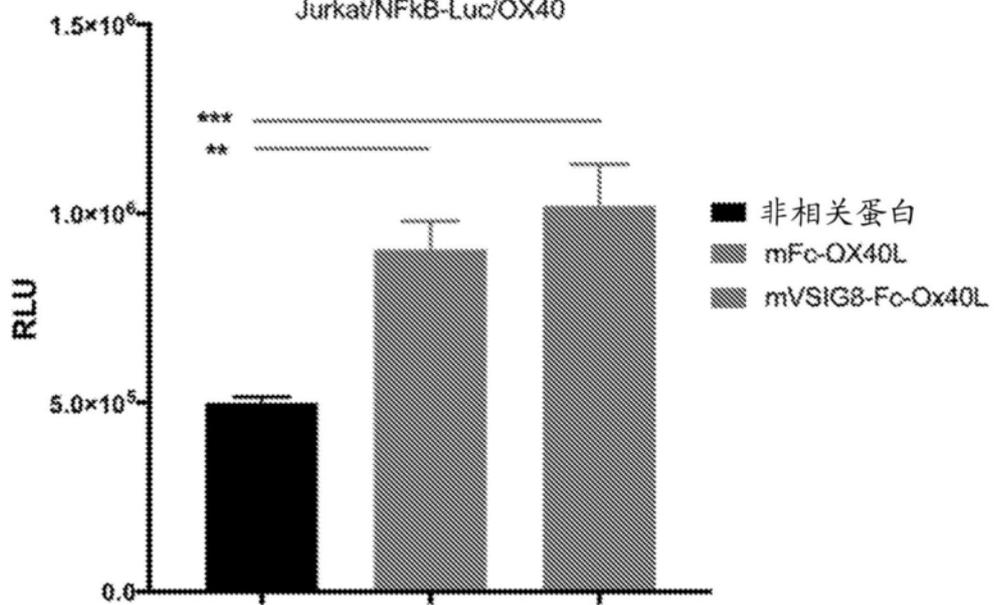


图12

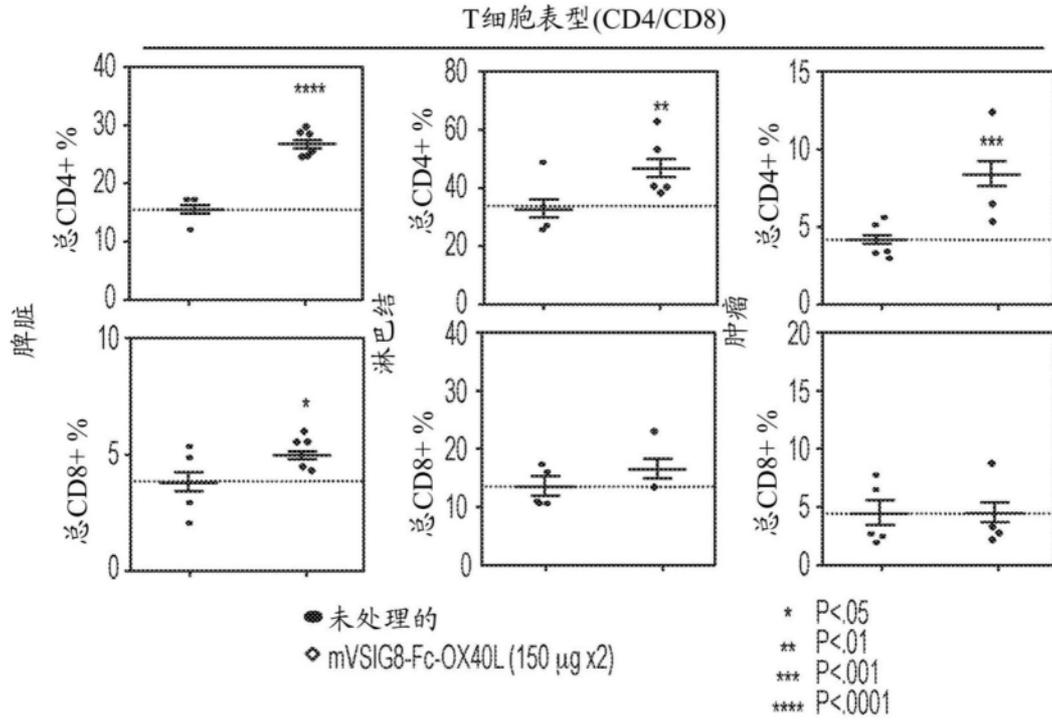


图13A

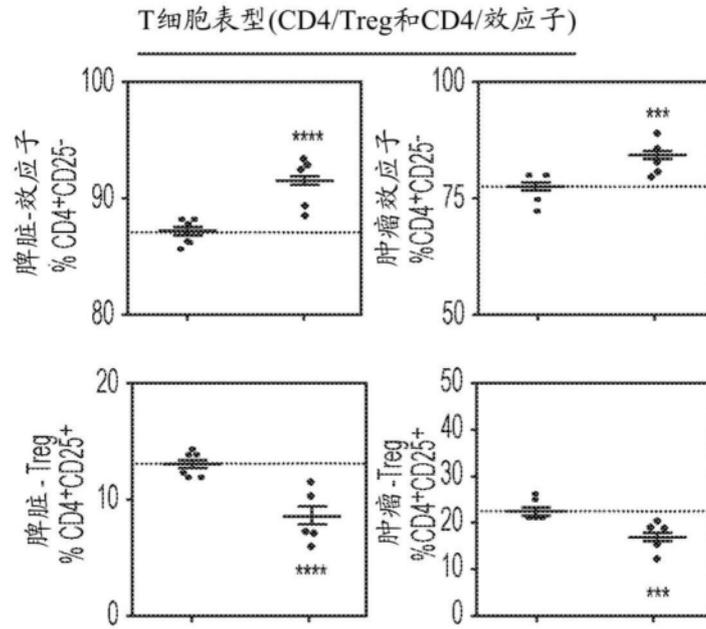


图13B

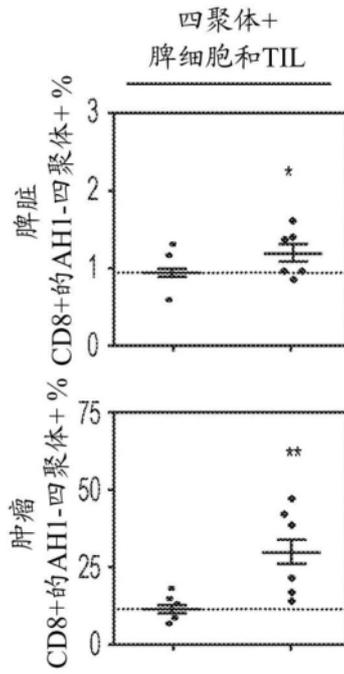


图13C

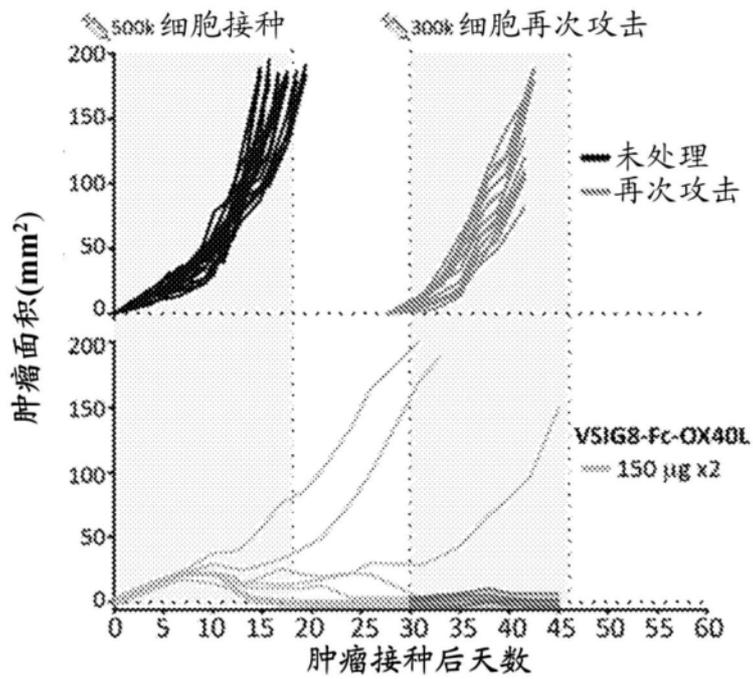


图14A

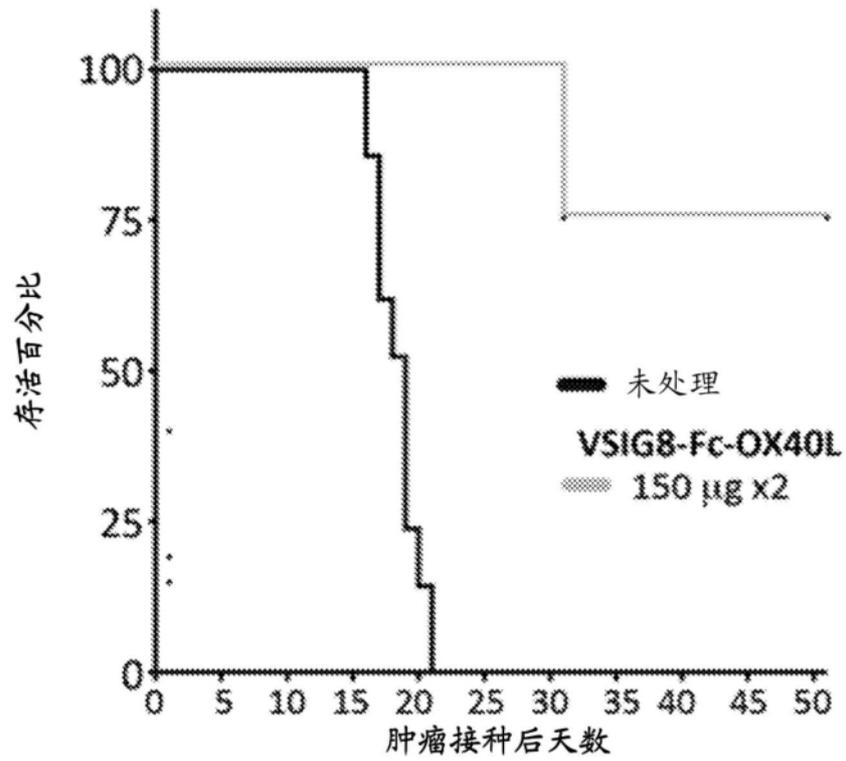


图14B

组	总计, N	短期, N (免疫分析)	长期, N (肿瘤生长/存活)	排斥% (原发性肿瘤)	排斥% (再次攻击)
未处理	33	12	21	0.0	0.0
VSIG8-Fc-OX40L (150μg x2)	16	8	8	75.0	100

图14C

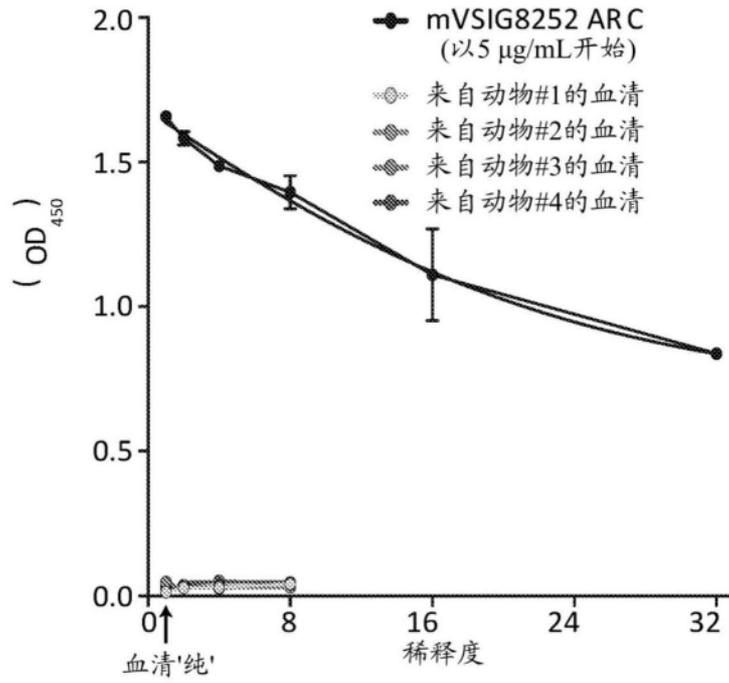


图15

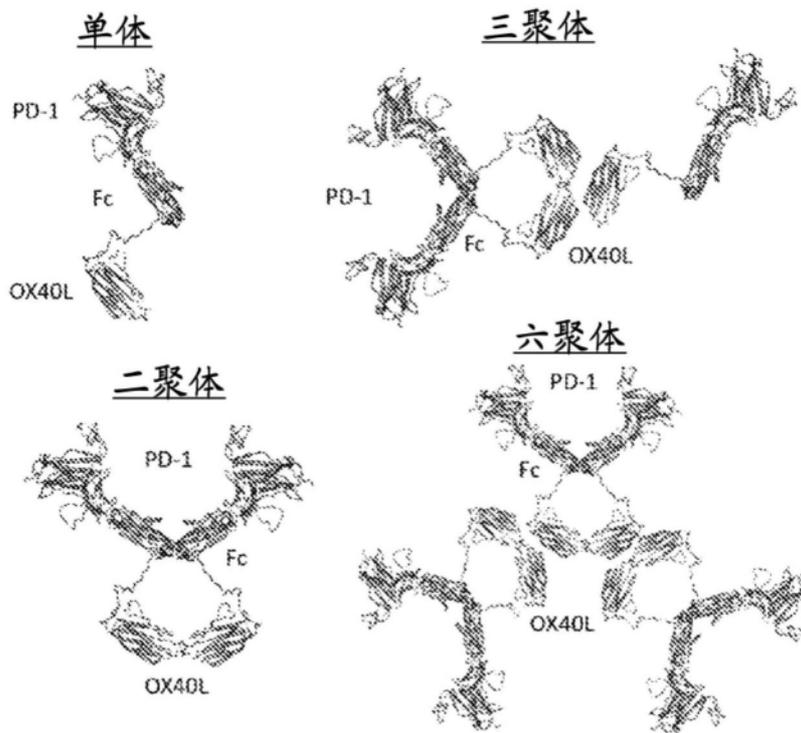


图16

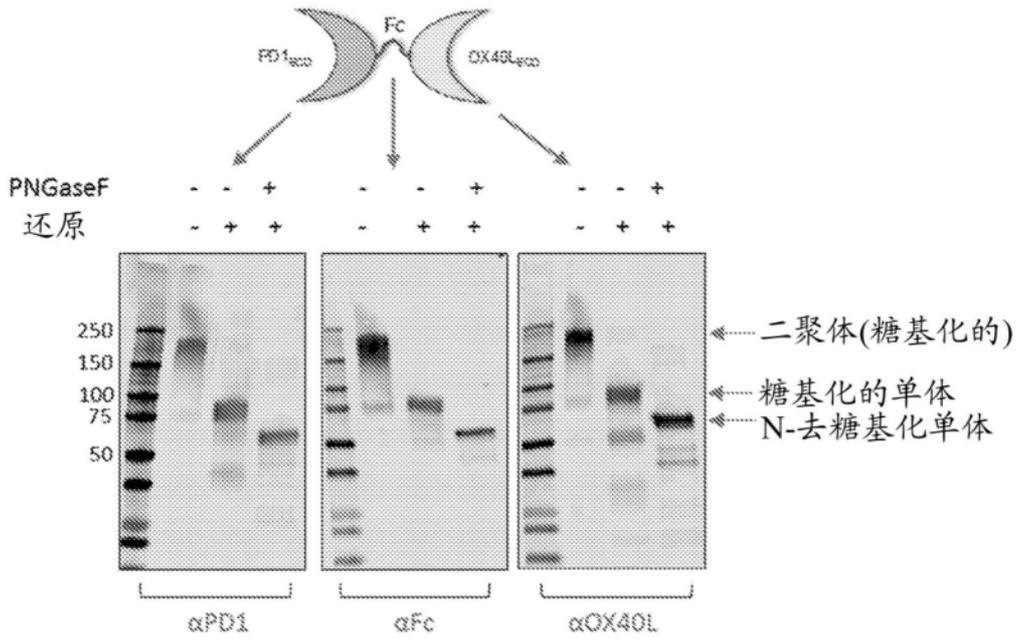


图17

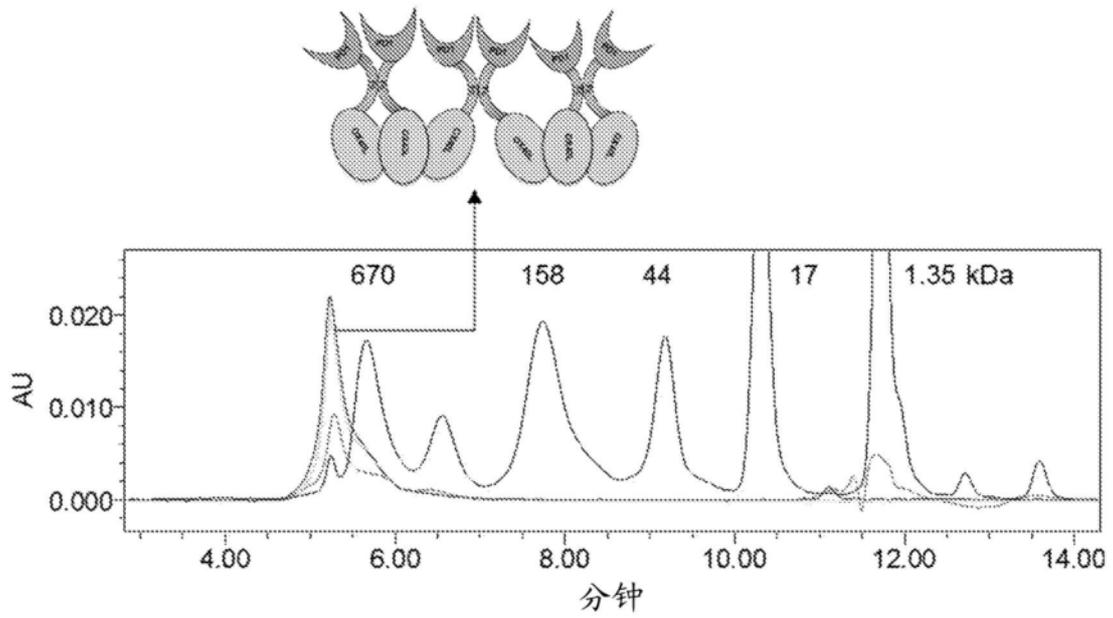


图18

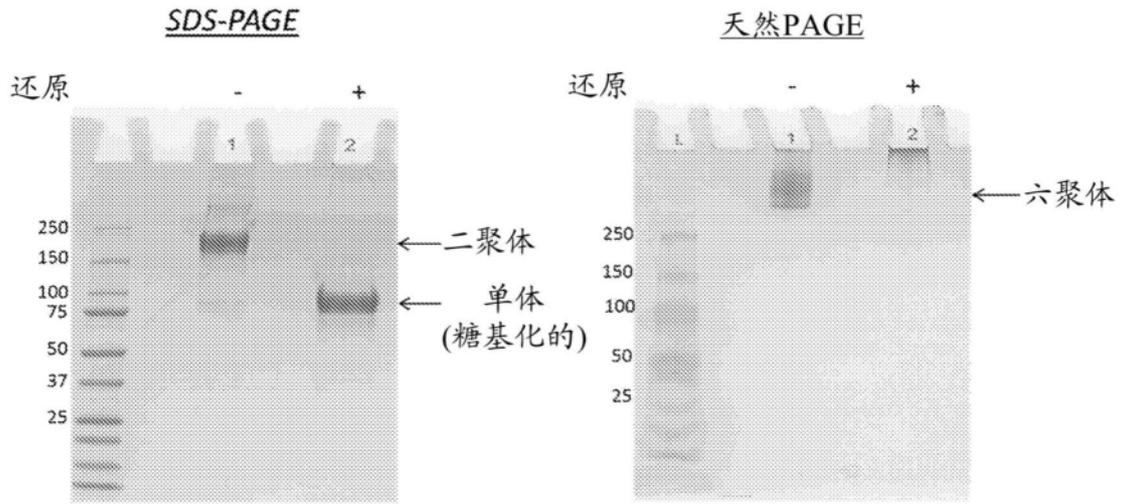


图19

天然PAGE

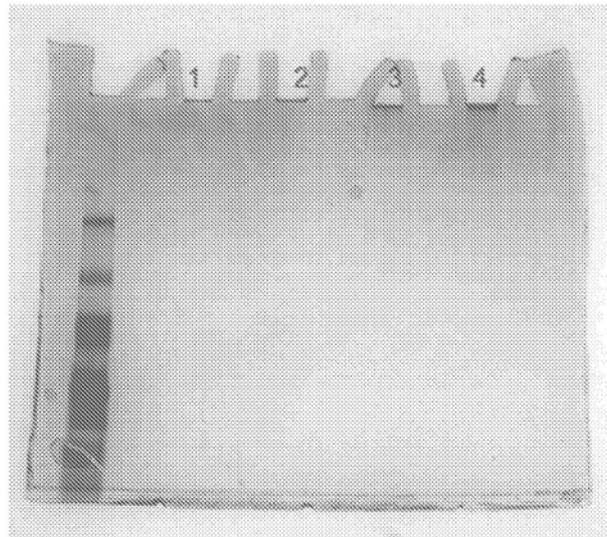


图20

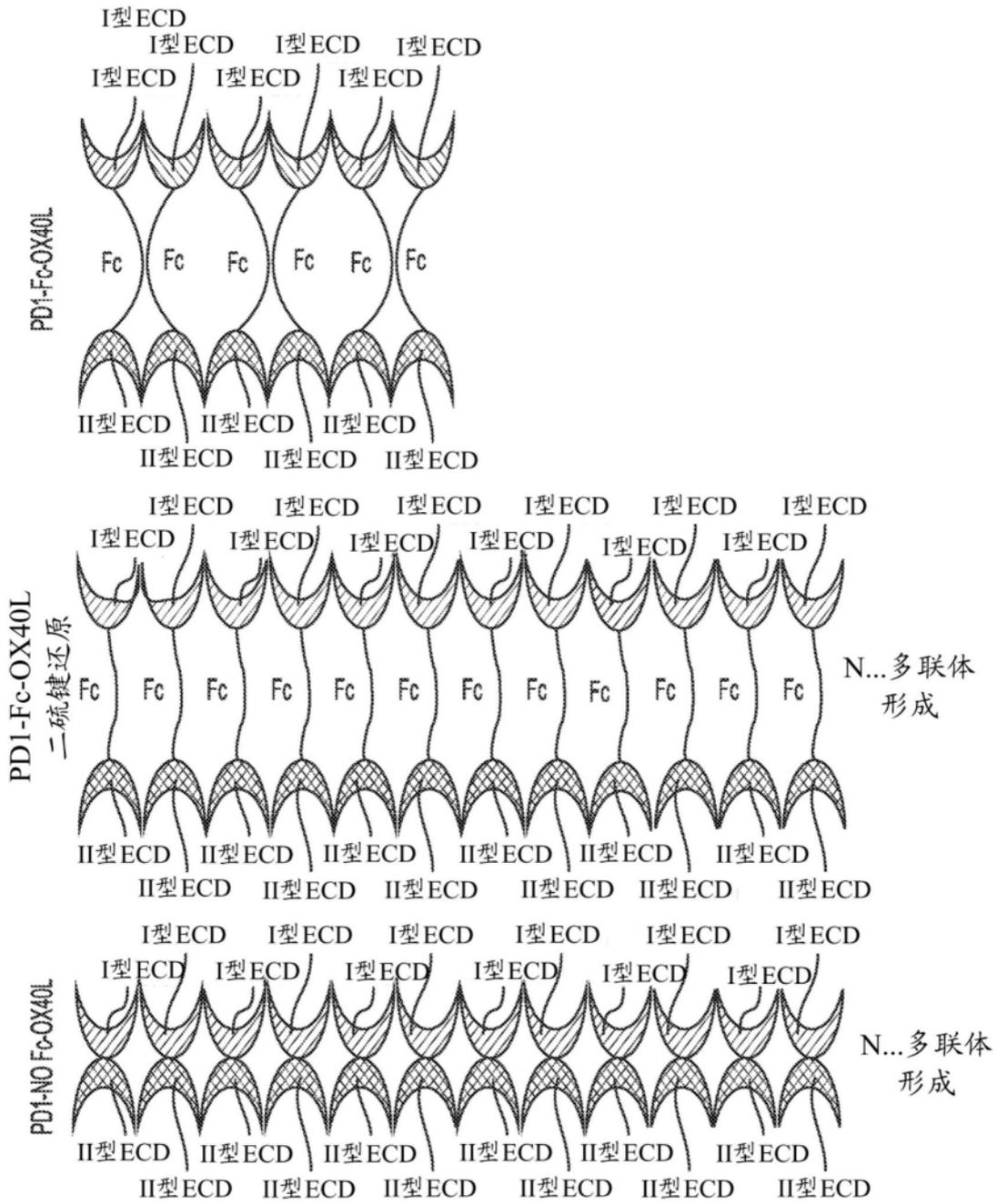


图21

连接接头1	Fc	连接接头2	接头分子=连接接头1 + Fc + 连接接头2
SKYGPCPSCP (SEQ ID NO: 28)	APEILGGPSVFLFPPKPKDQIMISRTPEVTCVWVDVSOE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTIISNATGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 25)	IEGRMD (SEQ ID NO: 31)	SKYGPCPSCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDQIMISRTPEVTCVWVDV QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLS GKEYCKVSSKGLPSSIEKTIISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ SLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLT VDKSSWQEGNVFSCVMEALHNHYTQKSLSLGLKIEGRMD (SEQ ID NO: 75)
SKYGPCPSCP (SEQ ID NO: 28)	APEILGGPSVFLFPPKPKDQIMISRTPEVTCVWVDVSOE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV PHSDWLSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTIISNATGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSC SVLHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 26)	IEGRMD (SEQ ID NO: 31)	SKYGPCPSCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDQIMISRTPEVTCVWVDV QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVPHSDWLS GKEYCKVSSKGLPSSIEKTIISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ SLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLT VDKSSWQEGNVFSCVLEALHNHYTQKSLSLGLKIEGRMD (SEQ ID NO: 76)
SKYGPCPSCP (SEQ ID NO: 28)	APEILGGPSVFLFPPKPKDQIMISRTPEVTCVWVDVSOE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTIISNATGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVLHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 27)	IEGRMD (SEQ ID NO: 31)	SKYGPCPSCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDQIMISRTPEVTCVWVDV QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLS GKEYCKVSSKGLPSSIEKTIISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ SLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCVLEALHNHYTQKSLSLGLKIEGRMD (SEQ ID NO: 77)

图22

<p>SKYGPCCPCP (SEQ ID NO: 29)</p>	<p>APELGGPSVFLFPPKPKDQIMISRTPETCVVVDVDSOE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDLGSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTIISNATGQPRPEPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSSWQEGNWFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 25)</p>	<p>IEGRMD (SEQ ID NO: 31)</p>	<p>SKYGPCCPCPEFLGGPSVFLFPPKPKDQIMISRTPETCVVVDVDS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDLWLS GKEYCKVSSKGLPSSIEKTIISNATGQPRPEVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLT VDKSSWQEGNWFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKIEGRMD (SEQ ID NO: 78)</p>
<p>SKYGPCCPCP (SEQ ID NO: 29)</p>	<p>APELGGPSVFLFPPKPKDQIMISRTPETCVVVDVDSOE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV PHSDWLSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTIISNATGQPRPEPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSSWQEGNWFSC SVLHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 26)</p>	<p>IEGRM (SEQ ID NO: 31)</p>	<p>SKYGPCCPCPEFLGGPSVFLFPPKPKDQIMISRTPETCVVVDVDS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVPHSDWLS GKEYCKVSSKGLPSSIEKTIISNATGQPRPEVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLT VDKSSWQEGNWFSCVLHEALHNHYTQKSLSLGLKIEGRMD (SEQ ID NO: 79)</p>
<p>SKYGPCCPCP (SEQ ID NO: 29)</p>	<p>APELGGPSVFLFPPKPKDQIMISRTPETCVVVDVDSOE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDLGSGKEYCKVSSKGLPSSIEKTIISNATGQPRPEPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSSWQEGNWFSC SVLHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 27)</p>	<p>IEGRMD (SEQ ID NO: 31)</p>	<p>SKYGPCCPCPEFLGGPSVFLFPPKPKDQIMISRTPETCVVVDVDS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDLWLS GKEYCKVSSKGLPSSIEKTIISNATGQPRPEVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLT VDKSSWQEGNWFSCVLHEALHNHYTQKSLSLGLKIEGRMD (SEQ ID NO: 80)</p>

图22(续)