



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112771071 A

(43) 申请公布日 2021.05.07

(21) 申请号 201980063880.8

(22) 申请日 2019.07.26

(30) 优先权数据

62/738,981 2018.09.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/043805 2019.07.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/068261 EN 2020.04.02

(71) 申请人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 K·D·维特拉普 N·穆明

J·帕尔梅里 M·钦

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int.Cl.

C07K 14/52 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

权利要求书15页 说明书148页 附图49页

(54) 发明名称

胶原蛋白定位的免疫调节分子及其方法

(57) 摘要

本公开内容提供了免疫调节融合蛋白,其包含与免疫调节结构域可操作地连接的胶原蛋白结合结构域。本公开内容还涉及使用其例如治疗癌症的组合物和方法。

1. 一种免疫调节融合蛋白,其包含:

(i) 免疫调节结构域;

(ii) 胶原蛋白结合结构域,其中所述胶原蛋白结合结构域特异性结合I型和/或IV型胶原蛋白且以 $K_D \leq 500\text{nM}$ 结合I型胶原蛋白,并且其中所述胶原蛋白结合结构域的等电点 $pI < 10$ 且分子量(MW) $\geq 5\text{kDa}$;和

(iii) 任选地,接头,

其中所述免疫调节结构域使用或不使用所述接头与所述胶原蛋白结合结构域可操作地连接。

2. 根据权利要求1所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域针对I型和/或IV型胶原蛋白的 K_D 小于所述胶原蛋白结合结构域针对选自纤连蛋白、玻连蛋白、骨桥蛋白、腱生蛋白C或纤维蛋白原的细胞外基质组分的 K_D 。

3. 根据权利要求1-2中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域具有约5-100kDa、约10-80kDa、约20-60kDa、约30-50kDa或约10kDa、约20kDa、约30kDa、约40kDa、约50kDa、约60kDa、约70kDa、约80kDa、约90kDa或约100kDa的MW。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含一个或多个结合胶原蛋白的富含亮氨酸的重复序列。

5. 根据权利要求4所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个结合胶原蛋白的富含亮氨酸的重复序列。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含一个或多个来自富含亮氨酸的小蛋白聚糖(SLRP)家族的II类人蛋白聚糖成员的富含亮氨酸的重复序列。

7. 根据权利要求6所述的免疫调节融合蛋白,其中所述SLRP选自基膜聚糖、核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、纤维调节蛋白、软骨蛋白、无孢蛋白、PRELP、骨粘附蛋白聚糖/骨调蛋白、旋光蛋白、骨甘蛋白聚糖/mimecan、podocan、基底膜聚糖和巢蛋白。

8. 根据权利要求7所述的免疫调节融合蛋白,其中所述SLRP是基膜聚糖。

9. 根据权利要求1-5中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含人SLRP。

10. 根据权利要求9所述的免疫调节融合蛋白,其中所述SLRP选自基膜聚糖、核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、纤维调节蛋白、软骨蛋白、无孢蛋白、PRELP、骨粘附蛋白聚糖/骨调蛋白、旋光蛋白、骨甘蛋白聚糖/mimecan、podocan、基底膜聚糖和巢蛋白。

11. 根据权利要求10所述的免疫调节融合蛋白,其中所述SLRP是基膜聚糖。

12. 根据权利要求11所述的免疫调节融合蛋白,其中基膜聚糖包含SEQ ID NO:107所示的氨基酸序列。

13. 根据权利要求1-3中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含具有Ig样结构域的人I型糖蛋白或结合胶原蛋白的其细胞外部分。

14. 根据权利要求13所述的免疫调节融合蛋白,其中所述I型糖蛋白与基膜聚糖竞争结合I型胶原蛋白。

15. 根据权利要求13-14中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述人I型糖蛋白选自LAIR1、LAIR2和糖蛋白IV。

16. 根据权利要求14所述的免疫调节融合蛋白,其中所述人I型糖蛋白是LAIR1。
17. 根据权利要求13所述的免疫调节融合蛋白,其中所述人I型糖蛋白是LAIR1,并且所述胶原蛋白结合结构域包含SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-122。
18. 根据权利要求1-3中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含LAIR1变体,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白包含一个或多个氨基酸置换、添加或缺失,任选地两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸置换、添加或缺失。
19. 根据权利要求1-3中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含LAIR1变体,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有增加的结合亲和力。
20. 根据权利要求1-3中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含LAIR1变体,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有降低的结合亲和力。
21. 根据权利要求1-20中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述免疫调节结构域包含激活、增强或促进免疫细胞的应答的多肽。
22. 根据权利要求1-20中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述免疫调节结构域包含抑制、降低或阻遏免疫细胞的应答的多肽。
23. 根据权利要求21-22中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述免疫细胞是淋巴样细胞,所述淋巴样细胞选自先天淋巴样细胞、T细胞、B细胞、NK细胞及其组合。
24. 根据权利要求21-23中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述免疫细胞是髓系细胞,所述髓系细胞选自单核细胞、中性粒细胞、粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞、树突状细胞及其组合。
25. 根据权利要求21-24中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述免疫细胞的所述应答包括细胞因子的产生、抗体的产生、抗原特异性免疫细胞的产生、增加的效应子功能和/或细胞毒性及其组合。
26. 根据权利要求21-25中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述免疫调节结构域包含选自细胞因子、趋化因子、激活配体/受体、抑制性配体/受体或其组合的一种或多种。
27. 根据权利要求26所述的免疫调节融合蛋白,其中所述免疫调节结构域包含一种或多种细胞因子。
28. 根据权利要求27所述的免疫调节融合蛋白,其中所述细胞因子是人 γ 共用链受体白介素,所述人 γ 共用链受体白介素选自IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13、IL-15、IL-15/IL-15RA、IL-21及其组合。
29. 根据权利要求28所述的免疫调节融合蛋白,其中所述细胞因子是IL-2。
30. 根据权利要求27所述的免疫调节融合蛋白,其中所述细胞因子是人IL-12家族成员,所述人IL-12家族成员选自IL-12 (p35)、IL-12 (p40)、IL-12 (p35)/IL-12 (p40)、IL-23、IL-27、IL-35及其组合。
31. 根据权利要求30所述的免疫调节融合蛋白,其中所述细胞因子是IL-12 (p35)/IL-12 (p40)的单链融合体。
32. 根据权利要求27所述的免疫调节融合蛋白,其中所述细胞因子是人IL-1家族成员,

所述人IL-1家族成员选自IL-1、IL-18、IL-33及其组合。

33. 根据权利要求32所述的免疫调节融合蛋白,其中所述细胞因子是IL-18。

34. 根据权利要求27所述的免疫调节融合蛋白,其中所述细胞因子选自TNF α 、INF α 、IFN- γ 、GM-CSF、FLT3L、G-CSF、M-CSF及其组合。

35. 根据权利要求26所述的免疫调节融合蛋白,其中所述免疫调节结构域包含一种或多种趋化因子。

36. 根据权利要求35所述的免疫调节融合蛋白,其中所述趋化因子选自LIF、MIP-2、MIP-1 α 、MIP-1 β 、CXCL1、CXCL9、CXCL10、MCP-1、嗜酸性粒细胞趋化因子(Eotaxin)、RANTES、LIX及其组合。

37. 根据权利要求35所述的免疫调节融合蛋白,其中所述趋化因子选自CCL3、CCL4、CCL5、嗜酸性粒细胞趋化因子及其组合。

38. 根据权利要求26所述的免疫调节融合蛋白,其中所述免疫调节结构域包含一种或多种激活配体/受体。

39. 根据权利要求38所述的免疫调节融合蛋白,其中所述激活配体/受体选自TNF超家族、CD28受体超家族、B7配体家族和T细胞受体。

40. 根据权利要求39所述的免疫调节融合蛋白,其中所述激活配体/受体是TNF超家族配体,所述TNF超家族配体选自TNF α 、CD40L、4-1BBL、OX40及其组合。

41. 根据权利要求39所述的免疫调节融合蛋白,其中所述激活配体/受体是TNF超家族受体且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗TNFR1抗体、抗TNFR2抗体、抗CD40抗体、抗4-1BB抗体和抗OX40抗体。

42. 根据权利要求39所述的免疫调节融合蛋白,其中所述激活配体/受体是选自ICOS配体、CD80和CD86及其组合的CD28超家族成员或B7家族成员。

43. 根据权利要求39所述的免疫调节融合蛋白,其中所述激活配体/受体是CD28超家族成员且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗ICOS抗体和抗CD28抗体。

44. 根据权利要求39所述的免疫调节融合蛋白,其中所述激活配体/受体是T细胞受体且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗CD3 γ 抗体、抗CD3 δ 抗体、抗CD3 ζ 抗体和抗CD3 ϵ 抗体。

45. 根据权利要求26所述的免疫调节融合蛋白,其中所述免疫调节结构域包含一种或多种抑制性配体/受体。

46. 根据权利要求45所述的免疫调节融合蛋白,其中所述抑制性配体/受体选自CD28受体超家族、TNF超家族和检查点抑制剂。

47. 根据权利要求46所述的免疫调节融合蛋白,其中所述抑制性配体/受体是CD28超家族成员且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗CTLA4抗体。

48. 根据权利要求46所述的免疫调节融合蛋白,其中所述抑制性配体/受体是TNF超家族成员且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗TIGIT抗体和抗BTLA抗体。

49. 根据权利要求46所述的免疫调节融合蛋白,其中所述抑制性配体/受体是检查点抑

制剂且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗VISTA抗体、抗TIM-3抗体、抗LAG-3抗体、抗CD47抗体和抗SIRP α 抗体。

50. 根据权利要求1-49中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述免疫调节结构域通过接头与所述胶原蛋白结合结构域可操作地连接。

51. 根据权利要求50所述的免疫调节融合蛋白,其中所述接头具有足够的长度或质量以减少所述免疫调节结构域在胶原纤维上的吸附。

52. 根据权利要求50所述的免疫调节融合蛋白,其中所述接头为所述融合蛋白提供减少从组织扩散的足够的分子量。

53. 根据权利要求50所述的免疫调节融合蛋白,其中所述接头允许所述免疫调节结构域与胶原纤维的空间分离以促进受体/配体接合。

54. 根据权利要求51-53中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400。

55. 根据权利要求50所述的免疫调节融合蛋白,其中所述接头是人血清白蛋白或其片段。

56. 根据权利要求50所述的免疫调节融合蛋白,其中所述接头包含Fc结构域或具有降低的FcR相互作用的突变Fc结构域。

57. 根据权利要求1-56中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述融合蛋白具有足够的质量以减少体内施用之后通过扩散或对流的尺寸依赖性逃逸。

58. 根据权利要求50所述的免疫调节融合蛋白,其中所述融合蛋白 ≥ 60 kDa。

59. 根据权利要求50所述的免疫调节融合蛋白,其中所述融合蛋白在体内施用之后结合I型和/或IV型胶原蛋白,从而减少所述免疫调节融合蛋白的全身性暴露。

60. 一种免疫调节融合蛋白,其包含:

(i) 至少一种细胞因子;

(ii) 胶原蛋白结合结构域,其中所述胶原蛋白结合结构域特异性结合I型和/或IV型胶原蛋白且以 $K_D \leq 500$ nM结合I型胶原蛋白,并且其中所述胶原蛋白结合结构域的等电点 $pI < 10$ 且分子量(MW) ≥ 5 kDa;和

(iii) 接头,其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中 $N = 1-1000$ 、 $10-900$ 、 $30-800$ 、 $40-700$ 、 $50-600$ 、 $100-500$ 或 $200-400$,

其中所述细胞因子通过所述接头与所述胶原蛋白结合结构域可操作地连接且其中所述融合蛋白 ≥ 60 kDa。

61. 根据权利要求60所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域针对I型和/或IV型胶原蛋白的 K_D 小于所述胶原蛋白结合结构域针对选自纤连蛋白、玻连蛋白、骨桥蛋白、腱生蛋白C或纤维蛋白原的细胞外基质组分的 K_D 。

62. 根据权利要求60-61中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含人SLRP,所述人SLRP选自基膜聚糖、核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、纤维调节蛋白、软骨蛋白、无孢蛋白、PRELP、骨粘附蛋白聚糖/骨调蛋白、旋光蛋白、骨甘蛋白聚糖/mimecan、podocan、基底膜聚糖和巢蛋白。

63. 根据权利要求62所述的免疫调节融合蛋白,其中所述SLRP是基膜聚糖。

64. 根据权利要求63所述的免疫调节融合蛋白,其中基膜聚糖包含SEQ ID NO:107所示的氨基酸序列。

65. 根据权利要求60-61中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域选自LAIR1、LAIR2和糖蛋白IV。

66. 根据权利要求65所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域是LAIR1。

67. 根据权利要求66所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-122。

68. 根据权利要求66所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含LAIR1变体,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白包含一个或多个氨基酸置换、添加或缺失,任选地两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸置换、添加或缺失。

69. 根据权利要求66所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含LAIR1变体,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有增加的结合亲和力。

70. 根据权利要求66所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含LAIR1变体,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有降低的结合亲和力。

71. 根据权利要求60-70中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述细胞因子是人 γ 共用链受体白介素,所述人 γ 共用链受体白介素选自IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13、IL-15、IL-15/IL-15RA、IL-21及其组合。

72. 根据权利要求71所述的免疫调节融合蛋白,其中所述细胞因子是IL-2。

73. 根据权利要求60-70中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述细胞因子是人IL-12家族成员,所述人IL-12家族成员选自IL-12(p35)、IL-12(p40)、IL-12(p35)/IL-12(p40)、IL-23、IL-27、IL-35及其组合。

74. 根据权利要求73所述的免疫调节融合蛋白,其中所述细胞因子是IL-12(p35)/IL-12(p40)的单链融合体。

75. 根据权利要求74所述的免疫调节融合蛋白,其包含第二细胞因子,其中所述第二细胞因子是IL-2。

76. 根据权利要求60-70中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述细胞因子是人IL-1家族成员,所述人IL-1家族成员选自IL-1、IL-18、IL-33及其组合。

77. 根据权利要求60-70中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述细胞因子选自TNF α 、INF α 、IFN- γ 、GM-CSF、FLT3L、G-CSF、M-CSF及其组合。

78. 根据权利要求60-77中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述接头具有足够的长度或质量以减少所述免疫调节结构域在胶原纤维上的吸附,和/或为所述融合蛋白提供减少从组织扩散的足够的分子量,和/或允许所述免疫调节结构域与胶原纤维的空间分离以促进受体/配体接合。

79. 根据权利要求60-77中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述接头是人血清白蛋白或其片段。

80. 根据权利要求60-77中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述接头包含Fc结构域或具有降低的FcR相互作用的突变Fc结构域。

81. 根据权利要求60-80中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述融合蛋白具有足够的质量以减少体内施用之后通过扩散或对流的尺寸依赖性逃逸。

82. 根据权利要求60-80中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述融合蛋白在体内施用之后结合I型和/或IV型胶原蛋白,从而减少所述免疫调节融合蛋白的全身性暴露。

83. 一种免疫调节融合蛋白,其包含:

(i) 至少一种趋化因子;

(ii) 胶原蛋白结合结构域,其中所述胶原蛋白结合结构域特异性结合I型和/或IV型胶原蛋白且以 $K_D \leq 500\text{nM}$ 结合I型胶原蛋白,并且其中所述胶原蛋白结合结构域的等电点 $pI < 10$ 且分子量(MW) $\geq 5\text{kDa}$;和

(iii) 接头,其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中 $N = 1-1000$ 、 $10-900$ 、 $30-800$ 、 $40-700$ 、 $50-600$ 、 $100-500$ 或 $200-400$,

其中所述趋化因子通过所述接头与所述胶原蛋白结合结构域可操作地连接且其中所述融合蛋白 $\geq 60\text{kDa}$ 。

84. 根据权利要求83所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域针对I型和/或IV型胶原蛋白的 K_D 小于所述胶原蛋白结合结构域针对选自纤连蛋白、玻连蛋白、骨桥蛋白、腱生蛋白C或纤维蛋白原的细胞外基质组分的 K_D 。

85. 根据权利要求83-84中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含人SLRP,所述人SLRP选自基膜聚糖、核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、纤维调节蛋白、软骨蛋白、无孢蛋白、PRELP、骨粘附蛋白聚糖/骨调蛋白、旋光蛋白、骨甘蛋白聚糖/mimecan、podocan、基底膜聚糖和巢蛋白。

86. 根据权利要求85所述的免疫调节融合蛋白,其中所述SLRP是基膜聚糖。

87. 根据权利要求86所述的免疫调节融合蛋白,其中基膜聚糖包含SEQ ID NO:107所示的氨基酸序列。

88. 根据权利要求83-84中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域选自LAIR1、LAIR2和糖蛋白IV。

89. 根据权利要求88所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域是LAIR1。

90. 根据权利要求89所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-122。

91. 根据权利要求89所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含LAIR1变体,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白包含一个或多个氨基酸置换、添加或缺失,任选地两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸置换、添加或缺失。

92. 根据权利要求89所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含LAIR1变体,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有增加的结合亲和力。

93. 根据权利要求89所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含

LAIR1变体,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力和对胶原蛋白具有降低的结合亲和力。

94.根据权利要求83-93中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述趋化因子选自LIF、MIP-2、MIP-1 α 、MIP-1 β 、CXCL1、CXCL9、CXCL10、MCP-1、嗜酸性粒细胞趋化因子、RANTES、LIX及其组合。

95.根据权利要求83-93中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述趋化因子选自CCL3、CCL4、CCL5、嗜酸性粒细胞趋化因子及其组合。

96.根据权利要求83-95中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述接头具有足够的长度或质量以减少所述免疫调节结构域在胶原纤维上的吸附,和/或为所述融合蛋白提供减少从组织扩散的足够的分子量,和/或允许所述免疫调节结构域与胶原纤维的空间分离以促进受体/配体接合。

97.根据权利要求83-95中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述接头是人血清白蛋白或其片段。

98.根据权利要求83-95中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述接头包含Fc结构域或具有降低的FcR相互作用的突变Fc结构域。

99.根据权利要求83-98中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述融合蛋白具有足够的质量以减少体内施用之后通过扩散或对流的尺寸依赖性逃逸。

100.根据权利要求83-98中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述融合蛋白在体内施用之后结合I型和/或IV型胶原蛋白,从而减少所述免疫调节融合蛋白的全身性暴露。

101.一种免疫调节融合蛋白,其包含:

(i)结合激活配体/受体的激动剂抗体,所述激动剂抗体包含Fc结构域或具有降低的FcR相互作用的突变Fc结构域;和

(ii)胶原蛋白结合结构域,其中所述胶原蛋白结合结构域特异性结合I型和/或IV型胶原蛋白且以 $K_D \leq 500\text{nM}$ 结合I型胶原蛋白,并且其中所述胶原蛋白结合结构域的等电点 $pI < 10$ 且分子量(MW) $\geq 5\text{kDa}$;

其中所述胶原蛋白结合结构域与所述Fc结构域或突变Fc结构域的C末端可操作地连接。

102.根据权利要求101所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域针对I型和/或IV型胶原蛋白的 K_D 小于所述胶原蛋白结合结构域针对选自纤连蛋白、玻连蛋白、骨桥蛋白、腱生蛋白C或纤维蛋白原的细胞外基质组分的 K_D 。

103.根据权利要求101-102中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含人SLRP,所述人SLRP选自基膜聚糖、核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、纤维调节蛋白、软骨蛋白、无孢蛋白、PRELP、骨粘附蛋白聚糖/骨调蛋白、旋光蛋白、骨甘蛋白聚糖/mimecan、podocan、基底膜聚糖和巢蛋白。

104.根据权利要求103所述的免疫调节融合蛋白,其中所述SLRP是基膜聚糖。

105.根据权利要求104所述的免疫调节融合蛋白,其中基膜聚糖包含SEQ ID NO:107所示的氨基酸序列。

106.根据权利要求101-102中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域选自LAIR1、LAIR2和糖蛋白IV。

107. 根据权利要求106所述的免疫调节融合蛋白, 其中所述胶原蛋白结合结构域是LAIR1。

108. 根据权利要求107所述的免疫调节融合蛋白, 其中所述胶原蛋白结合结构域包含SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-122。

109. 根据权利要求107所述的免疫调节融合蛋白, 其中所述胶原蛋白结合结构域包含LAIR1变体, 所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白包含一个或多个氨基酸置换、添加或缺失, 任选地两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸置换、添加或缺失。

110. 根据权利要求107所述的免疫调节融合蛋白, 其中所述胶原蛋白结合结构域包含LAIR1变体, 所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有增加的结合亲和力。

111. 根据权利要求107所述的免疫调节融合蛋白, 其中所述胶原蛋白结合结构域包含LAIR1变体, 所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有降低的结合亲和力。

112. 根据权利要求101-111中任一项所述的免疫调节融合蛋白, 其中所述激动剂抗体选自抗TNFR1抗体、抗TNFR2抗体、抗CD40抗体、抗4-1BB抗体和抗OX40抗体。

113. 根据权利要求101-111中任一项所述的免疫调节融合蛋白, 其中所述激动剂抗体选自抗ICOS抗体和抗CD28抗体。

114. 根据权利要求101-111中任一项所述的免疫调节融合蛋白, 其中所述抗体选自抗CD3 γ 抗体、抗CD3 δ 抗体、抗CD3 ζ 抗体和抗CD3 ϵ 抗体。

115. 根据权利要求101-114中任一项所述的免疫调节融合蛋白, 其中所述融合蛋白具有足够的质量以减少体内施用之后通过扩散或对流的尺寸依赖性逃逸。

116. 根据权利要求101-114中任一项所述的免疫调节融合蛋白, 其中所述融合蛋白在体内施用之后结合I型和/或IV型胶原蛋白, 从而减少所述免疫调节融合蛋白的全身性暴露。

117. 一种免疫调节融合蛋白, 其包含:

(i) 结合抑制性配体/受体的拮抗剂抗体, 所述拮抗剂抗体包含Fc结构域或具有降低的FcR相互作用的突变Fc结构域; 和

(ii) 胶原蛋白结合结构域, 其中所述胶原蛋白结合结构域特异性结合I型和/或IV型胶原蛋白且以 $K_D \leq 500\text{nM}$ 结合I型胶原蛋白, 并且其中所述胶原蛋白结合结构域的等电点 $pI < 10$ 且分子量(MW) $\geq 5\text{kDa}$;

其中所述胶原蛋白结合结构域与所述Fc结构域或变体Fc结构域的C末端可操作地连接。

118. 根据权利要求117所述的免疫调节融合蛋白, 其中所述胶原蛋白结合结构域针对I型和/或IV型胶原蛋白的 K_D 小于所述胶原蛋白结合结构域针对选自纤连蛋白、玻连蛋白、骨桥蛋白、腱生蛋白C或纤维蛋白原的细胞外基质组分的 K_D 。

119. 根据权利要求117-118中任一项所述的免疫调节融合蛋白, 其中所述胶原蛋白结合结构域包含人SLRP, 所述人SLRP选自基膜聚糖、核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、纤维调节蛋白、软骨蛋白、无孢蛋白、PRELP、骨粘附蛋白聚糖/骨调蛋白、旋光蛋白、骨甘蛋白聚糖/

mimecan、podocan、基底膜聚糖和巢蛋白。

120. 根据权利要求119所述的免疫调节融合蛋白,其中所述SLRP是基膜聚糖。

121. 根据权利要求120所述的免疫调节融合蛋白,其中基膜聚糖包含SEQ ID NO:107所示的氨基酸序列。

122. 根据权利要求117-118中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域选自LAIR1、LAIR2和糖蛋白IV。

123. 根据权利要求122所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域是LAIR1。

124. 根据权利要求111所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-122。

125. 根据权利要求123所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含LAIR1变体,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白包含一个或多个氨基酸置换、添加或缺失,任选地两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸置换、添加或缺失。

126. 根据权利要求123所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含LAIR1变体,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有增加的结合亲和力。

127. 根据权利要求123所述的免疫调节融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域包含LAIR1变体,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有降低的结合亲和力。

128. 根据权利要求117-127中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述拮抗剂抗体选自抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗CTLA4抗体、抗TIGIT抗体、抗BTLA抗体、抗VISTA抗体、抗TIM-3抗体、抗LAG-3抗体、抗CD47抗体和抗SIRP α 抗体。

129. 根据权利要求117-128中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述融合蛋白具有足够的质量以减少体内施用之后通过扩散或对流的尺寸依赖性逃逸。

130. 根据权利要求117-128中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述融合蛋白在体内施用之后结合I型和/或IV型胶原蛋白,从而减少所述免疫调节融合蛋白的全身性暴露。

131. 一种免疫调节融合蛋白,其包含:

(i) 人IL-2;

(ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体;和

(iii) 接头,其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400,

其中IL-2通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接且其中所述融合蛋白 $\geq$ 60kDa。

132. 一种免疫调节融合蛋白,其包含:

(i) 人IL-12 (p35) /IL-12 (p40) 的单链融合体;

(ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体;和

(iii) 接头,其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中N=1-1000、10-

900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400，

其中所述IL-12 (p35) /IL-12 (p40) 的单链融合体通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接，且其中所述融合蛋白 ≥ 60 kDa。

133. 一种免疫调节融合蛋白，其包含：

(i) 人CCL-3；

(ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体；和

(iii) 接头，其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽，其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400，

其中CCL-3通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接，且其中所述融合蛋白 ≥ 60 kDa。

134. 一种免疫调节融合蛋白，其包含：

(i) 人CCL-4；

(ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体；和

(iii) 接头，其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽，其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400，

其中CCL-4通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接，且其中所述融合蛋白 ≥ 60 kDa。

135. 一种免疫调节融合蛋白，其包含：

(i) 人CCL-5；

(ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体；和

(iii) 接头，其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽，其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400，

其中CCL-5通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接，且其中所述融合蛋白 ≥ 60 kDa。

136. 一种免疫调节融合蛋白，其包含：

(i) 人嗜酸性粒细胞趋化因子；

(ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体；和

(iii) 接头，其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽，其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400，

其中嗜酸性粒细胞趋化因子通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接，且其中所述融合蛋白 ≥ 60 kDa。

137. 根据权利要求131-136中任一项所述的免疫调节融合蛋白，其中基膜聚糖包含SEQ ID NO:107所示的氨基酸序列。

138. 根据权利要求131-136中任一项所述的免疫调节融合蛋白，其中胶原蛋白结合结构域LAIR1包含SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列，或相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白包含一个或多个氨基酸置换、添加或缺失，任选地两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸置换、添加或缺失。

139. 根据权利要求131-138中任一项所述的免疫调节融合蛋白，其中所述接头具有足够的长度或质量以减少所述免疫调节结构域在胶原纤维上的吸附，和/或为所述融合蛋白

提供减少从组织扩散的足够的分子量,和/或允许所述免疫调节结构域与胶原纤维的空间分离以促进受体/配体接合。

140. 根据权利要求131-138中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述接头是人血清白蛋白或其片段。

141. 根据权利要求131-138中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述接头包含Fc结构域或具有降低的FcR相互作用的突变Fc结构域。

142. 根据权利要求131-141中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述融合蛋白具有足够的质量以减少体内施用之后通过扩散或对流的尺寸依赖性逃逸。

143. 根据权利要求131-142中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述融合蛋白在体内施用之后结合I型和/或IV型胶原蛋白,从而减少所述免疫调节融合蛋白的全身性暴露。

144. 一种免疫调节融合蛋白,其包含:

(i) 激动剂抗体,所述激动剂抗体包含Fc结构域或具有降低的FcR相互作用的突变Fc结构域,其中所述激动剂抗体选自抗CD3抗体、抗4-1-BB抗体、抗CD40抗体和抗OX40抗体;和

(ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体;

其中基膜聚糖或LAIR1与所述Fc结构域或突变Fc结构域的C末端可操作地连接。

145. 根据权利要求144所述的免疫调节融合蛋白,其中所述融合蛋白具有足够的质量以减少体内施用之后通过扩散或对流的尺寸依赖性逃逸。

146. 根据权利要求144-145中任一项所述的免疫调节融合蛋白,其中所述融合蛋白在体内施用之后结合I型和/或IV型胶原蛋白,从而减少所述免疫调节融合蛋白的全身性暴露。

147. 一种药物组合物,其包含根据前述权利要求中任一项所述的免疫调节融合蛋白和药学上可接受的载体。

148. 一种核酸,其包含编码根据权利要求1-146中任一项所述的免疫调节融合蛋白的核苷酸序列。

149. 一种表达载体,其包含根据权利要求148所述的核酸。

150. 一种用根据权利要求149所述的表达载体转化的细胞。

151. 一种用于生产免疫调节融合蛋白的方法,所述方法包括在允许所述免疫调节融合蛋白的表达的条件下维持根据权利要求150所述的细胞。

152. 根据权利要求151所述的方法,其进一步包括获得所述免疫调节融合蛋白。

153. 一种用于在受试者中激活、增强或促进免疫细胞的应答的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1-146中任一项所述的免疫调节融合蛋白或根据权利要求147所述的药物组合物。

154. 一种在受试者中抑制、降低或阻遏免疫细胞的应答的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1-146中任一项所述的免疫调节融合蛋白或根据权利要求147所述的药物组合物。

155. 根据权利要求153-154中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是淋巴样细胞,所述淋巴样细胞选自先天淋巴样细胞、T细胞、B细胞、NK细胞及其组合。

156. 根据权利要求153-154中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是髓系细胞,所述

髓系细胞选自单核细胞、中性粒细胞、粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞、树突状细胞及其组合。

157. 根据权利要求153-156中任一项所述的方法, 其中所述免疫细胞的所述应答包括细胞因子的产生、抗体的产生、抗原特异性免疫细胞的产生、增加的效应子功能和/或细胞毒性及其组合。

158. 根据权利要求153-157中任一项所述的方法, 其中所述免疫细胞的所述应答发生在肿瘤微环境中。

159. 一种用于减少或抑制肿瘤生长的方法, 其包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1-146中任一项所述的免疫调节融合蛋白或根据权利要求147所述的药物组合物。

160. 一种用于在受试者中治疗癌症的方法, 其包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1-146中任一项所述的免疫调节融合蛋白或根据权利要求147所述的药物组合物。

161. 根据权利要求159-160中任一项所述的方法, 其中在所述免疫调节融合蛋白或所述药物组合物的施用之后在所述受试者中诱导抗肿瘤免疫反应。

162. 根据权利要求161所述的方法, 其中所述抗肿瘤免疫反应是T细胞应答, 所述T细胞应答包括由CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞中的一者或两者产生IFN γ 和/或IL-2。

163. 根据权利要求159-162中任一项所述的方法, 其中在所述免疫调节融合蛋白或所述药物组合物的施用之后, 免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润增加。

164. 根据权利要求159-163中任一项所述的方法, 其中在所述免疫调节融合蛋白或所述药物组合物的施用之后, 肿瘤微环境中调节性T (Treg) 细胞的量减少或肿瘤微环境中T细胞耗竭减少。

165. 根据权利要求153-164中任一项所述的方法, 其中所述免疫调节融合蛋白或药物组合物是肿瘤内施用的。

166. 一种用于在有需要的受试者中治疗癌症或推迟癌症进展或者减少或抑制肿瘤生长的试剂盒, 所述试剂盒包括容器和包装插页, 所述容器包含根据权利要求1-146中任一项所述的免疫调节蛋白和任选的药学上可接受的载体或者根据权利要求147所述的药物组合物, 所述包装插页包括关于施用所述融合蛋白或药物组合物的说明书。

167. 一种用于在有需要的受试者中治疗癌症或推迟癌症进展或者减少或抑制肿瘤生长的试剂盒, 所述试剂盒包括容器和包装插页, 所述容器包含根据权利要求1-146中任一项所述的免疫调节融合蛋白和任选地药学上可接受的载体或者根据权利要求147所述的药物组合物, 所述包装插页包括关于单独或与另一药剂联合施用所述抗体或药物组合物的说明书。

168. 根据权利要求1-146中任一项所述的免疫调节融合蛋白和任选的药学上可接受的载体或者根据权利要求147所述的药物组合物制备用于在有需要的受试者中治疗癌症或推迟癌症进展或者减少或抑制肿瘤生长的药物的用途。

169. 根据权利要求1-146中任一项所述的免疫调节融合蛋白和任选的药学上可接受的载体或者根据权利要求147所述的药物组合物, 其用于制备用于在有需要的受试者中治疗癌症或推迟癌症进展或者减少或抑制肿瘤生长的药物。

170. 根据权利要求1-146中任一项所述的免疫调节融合蛋白和任选的药学上可接受的

载体或者根据权利要求147所述的药物组合物,其被用作药物。

171. 一种用于在受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1-146中任一项所述的免疫调节融合蛋白或根据权利要求147所述的药物组合物,和有效量的包含肿瘤抗原靶向抗体或其抗原结合片段的第二组合物,从而在所述受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症。

172. 根据权利要求156所述的方法,其中所述肿瘤抗原是肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤新抗原。

173. 根据权利要求171-172中任一项所述的方法,其中所述肿瘤抗原靶向抗体特异性结合人HER-2/neu、EGFR、VEGFR、CD20、CD33或CD38。

174. 一种用于在受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求146中任一项所述的免疫调节融合蛋白或根据权利要求147所述的药物组合物,和有效量的包含癌症疫苗的第二组合物,从而在所述受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症。

175. 根据权利要求174所述的方法,其中所述癌症疫苗是在体外用肿瘤抗原进行免疫并向所述受试者施用的细胞群体。

176. 根据权利要求174所述的方法,其中所述癌症疫苗是包含一种或多种肿瘤相关抗原的肽。

177. 根据权利要求174所述的方法,其中所述癌症疫苗是包含肿瘤相关抗原、脂质和任选地接头的两亲性肽缀合物,其中所述两亲性肽缀合物在生理条件下结合白蛋白。

178. 根据权利要求174-177中任一项所述的方法,其中所述癌症疫苗进一步包含佐剂。

179. 一种用于在受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1-146中任一项所述的免疫调节融合蛋白或根据权利要求147所述的药物组合物,和有效量的包含免疫检查点抑制剂的第二组合物,从而在所述受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症。

180. 根据权利要求179所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂包含结合PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG3或TIM3的抗体或其抗原结合片段。

181. 一种用于在受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1-146中任一项所述的免疫调节融合蛋白或根据权利要求147所述的药物组合物,和有效量的包含过继细胞疗法的第二组合物,从而在所述受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症。

182. 根据权利要求181所述的方法,其中所述过继细胞疗法包含免疫效应细胞,所述免疫效应细胞包含结合肿瘤抗原的嵌合抗原受体(CAR)分子。

183. 根据权利要求181-182中任一项所述的方法,其中所述CAR分子包含抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内域,所述胞内域包含共刺激结构域和/或主要信号传导结构域。

184. 根据权利要求183所述的方法,其中所述抗原结合结构域结合与所述疾病相关的肿瘤抗原。

185. 根据权利要求183所述的方法,其中所述肿瘤抗原选自CD19、EGFR、Her2/neu、CD30和BCMA。

186. 根据权利要求182-185中任一项所述的方法,其中所述免疫效应细胞是T细胞,例

如CD8⁺T细胞。

187. 根据权利要求182-185中任一项所述的方法, 其中所述免疫效应细胞是自然杀伤(NK)细胞。

188. 根据权利要求182-185中任一项所述的方法, 其中所述免疫调节融合蛋白或所述药物组合物是肿瘤内施用的。

189. 根据权利要求171-188中任一项所述的方法, 其中所述免疫调节融合蛋白或所述药物组合物和所述第二组合物是同时或按顺序施用的。

190. 一种用于在受试者中减少或抑制肿瘤生长或者治疗癌症的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的免疫调节融合蛋白, 所述免疫调节融合蛋白包含:

(i) 人IL-2;

(ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体; 和

(iii) 接头, 其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽, 其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400,

其中IL-2通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接, 且其中所述融合蛋白>60kDa,

从而在所述受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症。

191. 一种用于在受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的免疫调节融合蛋白, 所述免疫调节融合蛋白包含:

(i) 人IL-12 (p35) /IL-12 (p40) 的单链融合体;

(ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体; 和

(iii) 接头, 其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽, 其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400,

其中所述IL-12 (p35) /IL-12 (p40) 的单链融合体通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接, 且其中所述融合蛋白>60kDa,

从而在所述受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症。

192. 根据权利要求190所述的方法, 其进一步包括施用第二组合物, 所述第二组合物包含有效量的免疫调节融合蛋白, 所述免疫调节融合蛋白包含:

(i) 人IL-12 (p35) /IL-12 (p40) 的单链融合体;

(ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体; 和

(iii) 接头, 其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽, 其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400,

其中所述IL-12 (p35) /IL-12 (p40) 的单链融合体通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接, 且其中所述融合蛋白>60kDa。

193. 根据权利要求190-192中任一项所述的方法, 其进一步包括施用第二组合物, 所述第二组合物包含有效量的肿瘤抗原靶向抗体或其抗原结合片段。

194. 根据权利要求190-193中任一项所述的方法, 其进一步包括施用第二组合物, 所述第二组合物包含有效量的包含癌症疫苗的组合物。

195. 根据权利要求190-194中任一项所述的方法, 其进一步包括施用第二组合物, 所述第二组合物包含有效量的包含免疫检查点抑制剂的组合物。

196. 根据权利要求195所述的方法, 其中所述免疫检查点抑制剂包含结合PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG3或TIM3的抗体或其抗原结合片段。

197. 根据权利要求190-196中任一项所述的方法, 其进一步包括施用第二组合物, 所述第二组合物包含有效量的包含过继细胞疗法的第二组合物, 从而在所述受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症。

198. 根据权利要求197所述的方法, 其中所述过继细胞疗法包含免疫效应细胞, 所述免疫效应细胞包含结合肿瘤抗原的嵌合抗原受体 (CAR) 分子。

199. 根据权利要求198所述的方法, 其中所述免疫效应细胞是T细胞 (例如CD8+T细胞) 或NK细胞。

200. 根据权利要求190-199中任一项所述的方法, 其中所述免疫调节融合蛋白或所述药物组合物是肿瘤内施用的。

201. 根据权利要求190-200中任一项所述的方法, 其中所述免疫调节融合蛋白或所述药物组合物和所述第二组合物是同时或按顺序施用的。

胶原蛋白定位的免疫调节分子及其方法

[0001] 相关信息

[0002] 本申请要求享有于2018年09月28日提交的美国临时申请号62/738,981的优先权日的权益,其全部内容通过引用在此并入。

[0003] 政府资助

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院 (NIH) 授予的基金号R01 CA096504和R01 CA174795的政府支持下完成的。政府享有本发明的某些权利。

背景技术

[0005] 尽管免疫疗法已在少数患者中以持久的治愈应答改变了肿瘤学,但是免疫相关的不良事件(irAE)限制了其最广泛的应用(Michot等,2016,Eur J Cancer,54:139-148)。希望将最有效的免疫激活事件限制在肿瘤组织上,同时不伤害非肿瘤健康组织。新的免疫疗法的公认目标是“加热”免疫学上“冷的”肿瘤,驱动炎症和免疫细胞浸润(Chen和Mellman 2017,Nature,541:321-330)。已经提出了多种肿瘤定位方法:将免疫调节剂与免疫细胞因子中的肿瘤靶向模块连接(Hutmacher和Neri 2018,Adv Drug Deliv Rev);全身活性掩蔽剂,具有肿瘤定位的蛋白水解激活作用(Thomas和Daugherty 2009,Protein Sci 18:2053-2059);药剂肿瘤内注射(Singh和Overwijk 2015,Nat Commun 8:1447;Ager等,2017,Cancer Immunol Res 5:676-684;Bommareddy等,2017,Cancer J 23:40-47;Milling等,2017,Adv Drug Deliv Rev 114:79-101;Singh等,2017,Nat Commun 8:1447;Sagiv-Barfi等,2018,Sci Transl Med 10:eaan4488);肿瘤周围注射固体生物材料以捕获药剂(Park等,2018,Sci Transl Med,10:eaar1916);缀合至固体颗粒(Kwong等,2013,Cancer Res 73:1547-1558)或与碱性带电肽缀合,以驱动药剂的一些非特异性粘附至肿瘤细胞外基质(Ishihara等,2017,Sci Transl Med 9:eaan0401;Ishihara等,2018,Mol Cancer Ther 17:2399-2411)。一种相关但独特的方法是在组织中定位生长因子以驱动组织再生(Nishi等,1998,Proc Natl Acad Sci 95:7018-7023;Martino等,2014,Science 343:885-888;Mitchell等,2016,Acta Biomater 30:1-12)。

[0006] 上述的每种当前方法都存在严重问题。免疫细胞因子全身性地使免疫细胞暴露于免疫调节剂(Tzeng等,2015,Proc Natl Acad Sci 112:3320-3325)。掩蔽剂可能在靶组织外部未被掩蔽,并且掩蔽剂可能使生产和免疫原性复杂化。肿瘤内注射通常导致迅速扩散出肿瘤腔室。肽在随机位点的缀合难以复制,可能对比活性产生负面影响,不能完全阻止肿瘤的退出,并且由于随机缀合方法的异质产物而导致显著的CMC问题。

[0007] 因此,仍对新型免疫疗法的方法存在需求,以促进肿瘤定位并增加有效性,同时防止全身性毒性。

发明内容

[0008] 本公开内容至少部分地基于以下发现:可以将免疫调节结构域(例如细胞因子、抗免疫受体抗体、抗肿瘤相关抗原抗体等)缀合至胶原蛋白结合结构域,导致相对于未缀合的

免疫调节结构域抗肿瘤有效性增强。不希望受到理论的束缚,免疫调节结构域的胶原蛋白定位导致抗肿瘤有效性增强,因为T细胞被包裹在肿瘤周围富含胶原蛋白的区域中,因此使得这些位点对于靶向免疫调节剂是合乎需要的。几乎半数的人类肿瘤表现出免疫排斥表型,其中CD8+T细胞显然被困在富含胶原蛋白的增生基质中 (Mariathasan等,Nature,2018,554:544-548)。鉴于CD8+T细胞在免疫治疗有效性中的首要重要性,人们希望将免疫调节剂定位于这种富含胶原蛋白、富含CD8+T细胞的肿瘤腔室。特异性之所以重要,是因为此前的药剂利用小型非结构化肽中的非特异性静电相互作用来滞留 (Martino等,Science,2014,343:885-888),与大多数带负电荷的细胞外基质组分混杂结合,而不是在特定的富含胶原蛋白的目标腔室内结合。这种无结构的带正电荷的肽也会导致相对较弱的滞留动力学,其中在一些情况下,注射的缀合物有效载荷的一半泄露到体循环中 (Ishihara,等,Mol Cancer Ther.2018,17:2399-2411)。

[0009] 因此,本文提供的是与对胶原蛋白具有特异性亲和力的结构蛋白的免疫调节融合体,导致在特定的富含胶原蛋白的目标腔室中有更大的滞留。在本文所述的一些方面中,免疫调节融合蛋白包含细胞因子,其中在临床前动物模型中肿瘤内施用之后,胶原蛋白结合结构域增加了肿瘤滞留并阻止了细胞因子的全身性暴露,从而降低了与治疗相关的毒性。此外,与缺乏胶原蛋白结合结构域的等同融合蛋白相比,当与一种或多种其他免疫疗法(例如肿瘤靶向抗体、检查点阻断、癌症疫苗和T细胞疗法)结合时,免疫调节融合蛋白具有增加的抗肿瘤有效性和降低的毒性。

[0010] 如本文所提供的,这些免疫调节融合蛋白显示出持久的和全身性的抗肿瘤应答,使得能够针对注射的肿瘤进行局部免疫,并且对有效治疗对侧未注射肿瘤进行全身性免疫。免疫调节融合蛋白的新辅施用还可以通过预防残留原发性肿瘤手术切除后的转移来改善存活,进一步证明了免疫调节融合蛋白促进全身性抗肿瘤免疫力。因此,本公开内容的免疫调节融合蛋白可用于治疗转移性肿瘤和/或介导在治疗(例如抗癌)模式中的远端效应 (abscopal effect)。

[0011] 本文还提了已改变(例如增加或减少)对胶原蛋白的结合亲和力的变体胶原蛋白结合结构域。通过公开具有不同胶原蛋白结合亲和力的变体胶原蛋白结合结构域的选择,本文的公开内容提供了针对富含胶原蛋白的腔室(例如表达胶原蛋白的肿瘤)选择具有不同结合亲和力的免疫调节融合蛋白的选择。

[0012] 本文提供的胶原蛋白结合组合物和方法允许活性疗法的肿瘤和有效载荷无关的局部靶向。胶原蛋白结合组合物还显示出增加的有效性,同时伴随着与全身性免疫疗法相关的毒性降低。

[0013] 在一些方面中,本公开内容提供了一种免疫调节融合蛋白,其包含:

[0014] (i) 免疫调节结构域;

[0015] (ii) 胶原蛋白结合结构域,其中所述胶原蛋白结合结构域特异性结合I型和/或IV型胶原蛋白且以 $K_D \leq 500\text{nM}$ 结合I型胶原蛋白,并且其中所述胶原蛋白结合结构域的等电点 $pI < 10$ 且分子量(MW) $\geq 5\text{kDa}$;和

[0016] (iii) 任选地,接头,

[0017] 其中所述免疫调节结构域使用或不使用所述接头与所述胶原蛋白结合结构域可操作地连接。

[0018] 在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域针对I型和/或IV型胶原蛋白的 K_D 小于所述胶原蛋白结合结构域针对选自纤连蛋白、玻连蛋白、骨桥蛋白、腱生蛋白C或纤维蛋白原的细胞外基质组分的 K_D 。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域具有约5-100kDa、约10-80kDa、约20-60kDa、约30-50kDa、或约10kDa、约20kDa、约30kDa、约40kDa、约50kDa、约60kDa、约70kDa、约80kDa、约90kDa或约100kDa的MW。

[0019] 在一些方面中,所述免疫调节融合蛋白包含胶原蛋白结合结构域,所述胶原蛋白结合结构域包含一个或多个结合胶原蛋白的富含亮氨酸的重复序列。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个结合胶原蛋白的富含亮氨酸的重复序列。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域包含一个或多个来自富含亮氨酸的小蛋白聚糖(SLRP)家族的II类人蛋白聚糖成员的富含亮氨酸的重复序列。在一些方面中,所述SLRP选自基膜聚糖、核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、纤维调节蛋白、软骨蛋白、无孢蛋白、PRELP、骨粘附蛋白聚糖/骨调蛋白、旋光蛋白、骨甘蛋白聚糖/mimecan、podocan、基底膜聚糖和巢蛋白。在一些方面中,所述SLRP是基膜聚糖。

[0020] 在一些方面中,所述免疫调节融合蛋白包含胶原蛋白结合结构域,所述胶原蛋白结合结构域包含人SLRP。在一些方面中,所述SLRP选自基膜聚糖、核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、纤维调节蛋白、软骨蛋白、无孢蛋白、PRELP、骨粘附蛋白聚糖/骨调蛋白、旋光蛋白、骨甘蛋白聚糖/mimecan、podocan、基底膜聚糖和巢蛋白。在一些方面中,所述SLRP是基膜聚糖。在一些方面中,基膜聚糖包含SEQ ID NO:107所示的氨基酸序列。

[0021] 在一些方面中,所述免疫调节融合蛋白包含胶原蛋白结合结构域,所述胶原蛋白结合结构域包含具有Ig样结构域的人I型糖蛋白或结合胶原蛋白的其细胞外部分。在一些方面中,所述I型糖蛋白与基膜聚糖竞争结合I型胶原蛋白。在一些方面中,所述人I型糖蛋白选自LAIR1、LAIR2和糖蛋白IV。在一些方面中,所述人I型糖蛋白是LAIR1。在一些方面中,所述人I型糖蛋白是LAIR1和所述胶原蛋白结合结构域包含SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-122。在一些实施方式中,所述LAIR1是相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白包含一个或多个氨基酸置换、添加或缺失,任选地两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸置换、添加或缺失的变体。在一些实施方式中,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有增加的结合亲和力。在其他进一步的实施方式中,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有降低的结合亲和力。

[0022] 在任何前述方面中,所述免疫调节结构域包含激活、增强或促进免疫细胞的应答的多肽。在其他方面中,所述免疫调节结构域包含抑制、降低或阻遏免疫细胞的应答的多肽。

[0023] 在一些方面中,所述免疫细胞是淋巴样细胞,所述淋巴样细胞选自先天淋巴样细胞、T细胞、B细胞、NK细胞及其组合。在其他方面中,所述免疫细胞是髓系细胞,所述髓系细胞选自单核细胞、中性粒细胞、粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞、树突状细胞及其组合。

[0024] 在一些方面中,所述免疫细胞的所述应答包括细胞因子的产生、抗体的产生、抗原特异性免疫细胞的产生、增加的效应子功能和/或细胞毒性及其组合。

[0025] 在任何前述方面中,所述免疫调节结构域包含选自细胞因子、趋化因子、激活配

体/受体、抑制性配体/受体或其组合的一种或多种。在一些方面中,所述免疫调节结构域包含一种或多种细胞因子。

[0026] 在一些方面中,所述细胞因子是人 γ 共用链受体白介素,所述人 γ 共用链受体白介素选自IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13、IL-15、IL-15/IL-15RA、IL-21及其组合。在一些方面中,所述细胞因子是IL-2。

[0027] 在一些方面中,所述细胞因子是人IL-12家族成员,所述人IL-12家族成员选自IL-12(p35)、IL-12(p40)、IL-12(p35)/IL-12(p40)、IL-23、IL-27、IL-35及其组合。在一些方面中,所述细胞因子是IL-12(p35)/IL-12(p40)的单链融合体。

[0028] 在其他方面中,所述细胞因子是人IL-1家族成员,所述人IL-1家族成员选自IL-1、IL-18、IL-33及其组合。在一些方面中,所述细胞因子是IL-18。

[0029] 在另外其他方面中,所述细胞因子选自TNF α 、INF α 、IFN- γ 、GM-CSF、FLT3L、G-CSF、M-CSF及其组合。

[0030] 在一些方面中,所述免疫调节结构域包含一种或多种趋化因子。在一些方面中,所述趋化因子选自LIF、MIP-2、MIP-1 α 、MIP-1 β 、CXCL1、CXCL9、CXCL10、MCP-1、嗜酸性粒细胞趋化因子(Eotaxin)、RANTES、LIX及其组合。在其他方面中,所述趋化因子选自CCL3、CCL4、CCL5、嗜酸性粒细胞趋化因子及其组合。

[0031] 在任何前述方面中,所述免疫调节结构域包含一种或多种激活配体/受体。在一些方面中,所述激活配体/受体选自TNF超家族、CD28受体超家族、B7配体家族和T细胞受体。在其他方面中,所述激活配体/受体是TNF超家族配体,所述TNF超家族配体选自TNF α 、CD40L、4-1BBL、OX40及其组合。在另外其他方面中,所述激活配体/受体是TNF超家族受体且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段选自抗TNFR1抗体、抗TNFR2抗体、抗CD40抗体、抗4-1BB抗体和抗OX40抗体。在其他方面中,所述激活配体/受体是选自ICOS配体、CD80和CD86及其组合的CD28超家族成员或B7家族成员。在另外其他方面中,所述激活配体/受体是CD28超家族成员且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗ICOS抗体和抗CD28抗体。在进一步的方面中,所述激活配体/受体是T细胞受体且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗CD3 γ 抗体、抗CD3 δ 抗体、抗CD3 ζ 抗体和抗CD3 ϵ 抗体。

[0032] 在一些方面中,所述激活配体/受体选自TNF超家族、CD28受体超家族、B7配体家族、T细胞受体、杀伤细胞Ig样受体、白细胞Ig样受体、CD94/NKG2受体家族和Fc受体。在其他方面中,所述激活配体/受体是杀伤细胞Ig样受体配体且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗KIR2DS1抗体、抗KIR 2DS2抗体、抗KIR 2DS3抗体、抗KIR 2DS4抗体、抗KIR 2DS5抗体和抗KIR 3DS1抗体。在进一步的方面中,所述激活配体/受体是白细胞Ig样受体且所述免疫调节结构域包含抗LIRA2抗体或其抗原结合片段。在其他方面中,所述激活配体/受体是CD94/NKG2受体家族成员,其选自MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5(亚型1)、ULBP5(亚型2)和ULBP6。在另外其他方面中,所述激活配体/受体是CD94/NKG2受体家族成员且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗CD94/NKG2D抗体、抗CD94/NKG2C抗体、抗CD94/NKG2E抗体和抗CD94/NKG2H抗体。在进一步的方面中,所述激活配体/受体是Fc受体家族成员且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗

Fc γ RI抗体、抗Fc γ RIIC抗体、抗Fc γ RIIIA抗体、抗Fc γ RIIIB抗体、抗Fc ϵ RI抗体、抗Fc ϵ RII抗体、抗Fc α R抗体和抗Fc μ R抗体。

[0033] 在任何前述方面中,所述免疫调节结构域包含一种或多种抑制性配体/受体。在一些方面中,所述抑制性配体/受体选自CD28受体超家族、TNF超家族和检查点抑制剂。在其他方面中,所述抑制性配体/受体是CD28超家族成员且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗CTLA4抗体。在更进一步的方面中,所述抑制性配体/受体是TNF超家族成员且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗TIGIT抗体和抗BTLA抗体。在一些方面中,所述抑制性配体/受体是检查点抑制剂且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗VISTA抗体、抗TIM-3抗体、抗LAG-3抗体、抗CD47抗体和抗SIRP α 抗体。

[0034] 在一些方面中,所述抑制性配体/受体选自CD28受体超家族、TNF超家族、Siglec家族、CD94/NKG2A家族、白细胞Ig样受体家族、杀伤细胞Ig样受体配体、Fc受体、腺苷通路分子和检查点抑制剂。在其他方面中,所述抑制性配体/受体包含Siglec家族成员且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗Siglec 1抗体、抗Siglec 2抗体、抗Siglec 3抗体、抗Siglec 4a抗体、抗Siglec 5抗体、抗Siglec 6抗体、抗Siglec 7抗体、抗Siglec 8抗体、抗Siglec 9抗体、抗Siglec 10抗体、抗Siglec 11抗体和抗Siglec 12抗体。在另外其他方面中,所述抑制性配体/受体包含CD94/NKG2受体家族抑制性受体或抑制性配体且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗CD94/NKG2A抗体和抗CD94/NKG2B抗体。在一些方面中,所述抑制性配体/受体包含白细胞Ig样受体且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗LIRB1抗体、抗LIRB2抗体、抗LIRB3抗体、抗LIRB4抗体。在其他方面中,所述抑制性配体/受体包含杀伤细胞Ig样受体配体且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗KIR 2DL1抗体、抗KIR 2DL2抗体、抗KIR 2DL3抗体、抗KIR 2DL4抗体、抗KIR 2DL5A抗体、抗KIR 2DL5B抗体、抗KIR 3DL1抗体、抗KIR 3DL2抗体和抗KIR 3DL3抗体。在另外其他方面中,所述抑制性配体/受体包含Fc受体且所述免疫调节结构域包含抗Fc γ RIIIB抗体或抗原结合片段。在一些方面中,所述抑制性配体/受体包含腺苷通路分子且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗CD39抗体和抗CD73抗体。在其他方面中,所述抑制性配体/受体包含检查点抑制剂且所述免疫调节结构域包含抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选自抗VISTA抗体、抗TIM-3抗体、抗LAG-3抗体、抗CD47抗体和抗SIRP α 抗体。

[0035] 在任何前述方面中,所述免疫调节结构域通过接头与所述胶原蛋白结合结构域可操作地连接。在一些方面中,所述接头具有足够的长度或质量以减少所述免疫调节结构域在胶原蛋白纤维上的吸附。在一些方面中,所述接头为所述融合蛋白提供减少从组织扩散的足够的分子量。在一些方面中,所述接头允许所述免疫调节结构域与胶原蛋白纤维的空间分离以促进受体/配体接合。在一些方面中,所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400。在一些方面中,所述接头是人血清白蛋白或其片段。在其他方面中,所述接头包含Fc结构域或具有降低的FcR相互作用的突变Fc结构域。

[0036] 在任何前述方面中,所述免疫调节融合蛋白具有足够的质量以减少体内施用之后通过扩散或对流的尺寸依赖性逃逸。在一些方面中,所述融合蛋白是 ≥ 60 kDa。在一些方面中,所述免疫调节融合蛋白在体内施用之后结合I型和/或IV型胶原蛋白,从而减少所述免疫调节融合蛋白的全身性暴露。

[0037] 在一些方面中,本公开内容提供了一种免疫调节融合蛋白,其包含:

[0038] (i) 至少一种细胞因子;

[0039] (ii) 胶原蛋白结合结构域,其中所述胶原蛋白结合结构域特异性结合I型和/或IV型胶原蛋白且以 $K_D \leq 500$ nM结合I型胶原蛋白,并且其中所述胶原蛋白结合结构域的等电点 $pI < 10$ 且分子量(MW) ≥ 5 kDa;和kDa;和

[0040] (iii) 接头,其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中 $N = 1 - 1000$ 、 $10 - 900$ 、 $30 - 800$ 、 $40 - 700$ 、 $50 - 600$ 、 $100 - 500$ 或 $200 - 400$,

[0041] 其中所述细胞因子通过所述接头与所述胶原蛋白结合结构域可操作地连接且其中所述融合蛋白是 ≥ 60 kDa。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域针对I型和/或IV型胶原蛋白的 K_D 小于所述胶原蛋白结合结构域针对选自纤连蛋白、玻连蛋白、骨桥蛋白、腱生蛋白C或纤维蛋白原的细胞外基质组分的 K_D 。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域包含人SLRP,所述人SLRP选自基膜聚糖、核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、纤维调节蛋白、软骨蛋白、无孢蛋白、PRELP、骨粘附蛋白聚糖/骨调蛋白、旋光蛋白、骨甘蛋白聚糖/mimecan、podocan、基底膜聚糖和巢蛋白。在一些方面中,所述SLRP是基膜聚糖。在一些方面中,所述基膜聚糖包含SEQ ID NO:107所示的氨基酸序列。在其他方面中,所述胶原蛋白结合结构域选自LAIR1、LAIR2和糖蛋白IV。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域是LAIR1。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域包含SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-122。在一些实施方式中,LAIR1是相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白包含一个或多个氨基酸置换、添加或缺失,任选地两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸置换、添加或缺失的变体。在一些实施方式中,LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有增加的结合亲和力。在其他进一步的实施方式中,LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有降低的结合亲和力。

[0042] 在一些方面中,所述细胞因子是人 γ 共用链受体白介素,所述人 γ 共用链受体白介素选自IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13、IL-15、IL-15/IL-15RA、IL-21及其组合。在一些方面中,所述细胞因子是IL-2。在一些方面中,所述细胞因子是人IL-12家族成员,所述人IL-12家族成员选自IL-12(p35)、IL-12(p40)、IL-12(p35)/IL-12(p40)、IL-23、IL-27、IL-35及其组合。在一些方面中,所述细胞因子是IL-12(p35)/IL-12(p40)的单链融合体。在一些方面中,所述免疫调节融合蛋白包含第二细胞因子。在一些方面中,所述第二细胞因子是IL-2。

[0043] 在其他方面中,所述细胞因子是人IL-1家族成员,所述人IL-1家族成员选自IL-1、IL-18、IL-33及其组合。在另外其他方面中,所述细胞因子选自TNF α 、INF α 、IFN- γ 、GM-CSF、FLT3L、G-CSF、M-CSF及其组合。

[0044] 在一些方面中,所述接头具有足够的长度或质量以减少所述免疫调节结构域在胶原蛋白纤维上的吸附,和/或为所述融合蛋白提供减少从组织扩散的足够的分子量,和/或

允许所述免疫调节结构域与胶原蛋白纤维的空间分离以促进受体/配体接合。在一些方面中,所述接头是人血清白蛋白或其片段。在其他方面中,所述接头包含Fc结构域或具有降低的FcR相互作用的突变Fc结构域。

[0045] 在一些方面中,所述融合蛋白具有足够的质量以减少体内施用之后通过扩散或对流的尺寸依赖性逃逸。在一些方面中,在体内施用之后所述融合蛋白结合I型和/或IV型胶原蛋白,从而减少所述免疫调节融合蛋白的全身性暴露。

[0046] 在其他方面中,本公开内容提供了一种免疫调节融合蛋白,其包含:

[0047] (i) 至少一种趋化因子;

[0048] (ii) 胶原蛋白结合结构域,其中所述胶原蛋白结合结构域特异性结合I型和/或IV型胶原蛋白且以 $K_D \leq 500\text{nM}$ 结合I型胶原蛋白,并且其中所述胶原蛋白结合结构域的等电点 $pI < 10$ 且分子量(MW) $\geq 5\text{kDa}$;和 kDa ;和

[0049] (iii) 接头,其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中 $N = 1 - 1000$ 、 $10 - 900$ 、 $30 - 800$ 、 $40 - 700$ 、 $50 - 600$ 、 $100 - 500$ 或 $200 - 400$,

[0050] 其中所述趋化因子通过所述接头与所述胶原蛋白结合结构域可操作地连接,且其中所述融合蛋白 $\geq 60\text{kDa}$ 。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域针对I型和/或IV型胶原蛋白的 K_D 小于所述胶原蛋白结合结构域针对选自纤连蛋白、玻连蛋白、骨桥蛋白、腱生蛋白C或纤维蛋白原的细胞外基质组分的 K_D 。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域包含人SLRP,所述人SLRP选自基膜聚糖、核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、纤维调节蛋白、软骨蛋白、无孢蛋白、PRELP、骨粘附蛋白聚糖/骨调蛋白、旋光蛋白、骨甘蛋白聚糖/mimecan、podocan、基底膜聚糖和巢蛋白。在一些方面中,所述SLRP是基膜聚糖。在一些方面中,所述基膜聚糖包含SEQ ID NO:107所示的氨基酸序列。在其他方面中,所述胶原蛋白结合结构域选自LAIR1、LAIR2和糖蛋白IV。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域是LAIR1。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域包含SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-122。在一些实施方式中,LAIR1是相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白包含一个或多个氨基酸置换、添加或缺失,任选地两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸置换、添加或缺失的变体。在一些实施方式中,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有增加的结合亲和力。在其他进一步的实施方式中,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有降低的结合亲和力。

[0051] 在一些方面中,所述趋化因子选自LIF、MIP-2、MIP-1 α 、MIP-1 β 、CXCL1、CXCL9、CXCL10、MCP-1、嗜酸性粒细胞趋化因子、RANTES、LIX及其组合。在一些方面中,所述趋化因子选自CCL3、CCL4、CCL5、嗜酸性粒细胞趋化因子及其组合。

[0052] 在一些方面中,所述接头具有足够的长度或质量以减少所述免疫调节结构域在胶原蛋白纤维上的吸附,和/或为所述融合蛋白提供减少从组织扩散的足够的分子量,和/或允许所述免疫调节结构域与胶原蛋白纤维的空间分离以促进受体/配体接合。在一些方面中,所述接头是人血清白蛋白或其片段。在其他方面中,所述接头包含Fc结构域或具有降低的FcR相互作用的突变Fc结构域。

[0053] 在一些方面中,所述融合蛋白具有足够的质量以减少体内施用之后通过扩散或对流的尺寸依赖性逃逸。在一些方面中,在体内施用之后所述融合蛋白结合I型和/或IV型胶

原蛋白,从而减少所述免疫调节融合蛋白的全身性暴露。

[0054] 在另外其他方面中,本公开内容提供了一种免疫调节融合蛋白,其包含:

[0055] (i) 激动剂抗体,其结合激活配体/受体,所述激动剂抗体包含Fc结构域或具有降低的FcR相互作用的突变Fc结构域;和

[0056] (ii) 胶原蛋白结合结构域,其中所述胶原蛋白结合结构域特异性结合I型和/或IV型胶原蛋白且以 $K_D \leq 500\text{nM}$ 结合I型胶原蛋白,并且其中所述胶原蛋白结合结构域的等电点 $pI < 10$ 且分子量(MW) $\geq 5\text{kDa}$;和

[0057] 其中所述胶原蛋白结合结构域与所述Fc结构域或突变Fc结构域的C末端可操作地连接。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域针对I型和/或IV型胶原蛋白的 K_D 小于所述胶原蛋白结合结构域针对选自纤连蛋白、玻连蛋白、骨桥蛋白、腱生蛋白C或纤维蛋白原的细胞外基质组分的 K_D 。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域包含人SLRP,所述人SLRP选自基膜聚糖、核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、纤维调节蛋白、软骨蛋白、无孢蛋白、PRELP、骨粘附蛋白聚糖/骨调蛋白、旋光蛋白、骨甘蛋白聚糖/mimecan、podocan、基底膜聚糖和巢蛋白。在一些方面中,所述SLRP是基膜聚糖。在一些方面中,所述基膜聚糖包含SEQ ID NO: 107所示的氨基酸序列。在其他方面中,所述胶原蛋白结合结构域选自LAIR1、LAIR2和糖蛋白IV。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域是LAIR1。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域包含SEQ ID NO: 98所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-122。在一些实施方式中,LAIR1是相对于包含SEQ ID NO: 98的氨基酸序列的LAIR1蛋白包含一个或多个氨基酸置换、添加或缺失,任选地两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸置换、添加或缺失的变体。在一些实施方式中,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO: 98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有增加的结合亲和力。在其他进一步的实施方式中,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO: 98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有降低的结合亲和力。

[0058] 在一些方面中,所述激动剂抗体选自抗TNFR1抗体、抗TNFR2抗体、抗CD40抗体、抗4-1BB抗体和抗OX40抗体。在其他方面中,所述激动剂抗体选自抗ICOS抗体和抗CD28抗体。在一些方面中,所述激动剂抗体选自抗CD3 γ 抗体、抗CD3 δ 抗体、抗CD3 ζ 抗体和抗CD3 ϵ 抗体。

[0059] 在一些方面中,所述融合蛋白具有足够的质量以减少体内施用之后通过扩散或对流的尺寸依赖性逃逸。在一些方面中,在体内施用之后所述融合蛋白结合I型和/或IV型胶原蛋白,从而减少所述免疫调节融合蛋白的全身性暴露。

[0060] 在进一步的方面中,本公开内容提供了一种免疫调节融合蛋白,其包含:

[0061] (i) 拮抗剂抗体,其结合抑制性配体/受体,所述拮抗剂抗体包含Fc结构域或具有降低的FcR相互作用的突变Fc结构域;和

[0062] (ii) 胶原蛋白结合结构域,其中所述胶原蛋白结合结构域特异性结合I型和/或IV型胶原蛋白且以 $K_D \leq 500\text{nM}$ 结合I型胶原蛋白,并且其中所述胶原蛋白结合结构域的等电点 $pI < 10$ 且分子量(MW) $\geq 5\text{kDa}$;和

[0063] 其中所述胶原蛋白结合结构域与所述Fc结构域或突变Fc结构域的C末端可操作地连接。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域针对I型和/或IV型胶原蛋白的 K_D 小于所述胶原蛋白结合结构域针对选自纤连蛋白、玻连蛋白、骨桥蛋白、腱生蛋白C或纤维蛋白原的细胞外基质组分的 K_D 。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域包含人SLRP,所述人SLRP选

自基膜聚糖、核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、纤维调节蛋白、软骨蛋白、无孢蛋白、PRELP、骨粘附蛋白聚糖/骨调蛋白、旋光蛋白、骨甘蛋白聚糖/mimecan、podocan、基底膜聚糖和巢蛋白。在一些方面中,所述SLRP是基膜聚糖。在一些方面中,所述基膜聚糖包含SEQ ID NO: 107所示的氨基酸序列。在其他方面中,所述胶原蛋白结合结构域选自LAIR1、LAIR2和糖蛋白IV。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域是LAIR1。在一些方面中,所述胶原蛋白结合结构域包含SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-122。在一些实施方式中,LAIR1是相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白包含一个或多个氨基酸置换、添加或缺失,任选地两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸置换、添加或缺失的变体。在一些实施方式中,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有增加的结合亲和力。在其他进一步的实施方式中,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有降低的结合亲和力。

[0064] 在一些方面中,所述拮抗剂抗体选自抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗CTLA4抗体、抗TIGIT抗体、抗BTLA抗体、抗VISTA抗体、抗TIM-3抗体、抗LAG-3抗体、抗CD47抗体和抗SIRP α 抗体。

[0065] 在一些方面中,所述融合蛋白具有足够的质量以减少体内施用之后通过扩散或对流的尺寸依赖性逃逸。在一些方面中,在体内施用之后所述融合蛋白结合I型和/或IV型胶原蛋白,从而减少所述免疫调节融合蛋白的全身性暴露。

[0066] 在其他方面中,本公开内容提供了一种免疫调节融合蛋白,其包含:

[0067] (i) 人IL-2;

[0068] (ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体;和

[0069] (iii) 接头,其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400,

[0070] 其中IL-2通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接且其中所述融合蛋白 $\geq$ 60kDa。

[0071] 在进一步的方面中,本公开内容提供了一种免疫调节融合蛋白,其包含:

[0072] (i) 人IL-12 (p35) /IL-12 (p40) 的单链融合体;

[0073] (ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体;和

[0074] (iii) 接头,其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400,

[0075] 其中所述IL-12 (p35) /IL-12 (p40) 的单链融合体通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接,且其中所述融合蛋白 $\geq$ 60kDa。

[0076] 在更进一步的方面中,本公开内容提供了一种免疫调节融合蛋白,其包含:

[0077] (i) 人CCL-3;

[0078] (ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体;和

[0079] (iii) 接头,其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400,

[0080] 其中CCL-3通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接,且其中所述融合蛋白 $\geq$ 60kDa。

[0081] 在其他方面中,本公开内容提供了一种免疫调节融合蛋白,其包含:

[0082] (i) 人CCL-4;

[0083] (ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体;和

[0084] (iii) 接头,其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400,

[0085] 其中CCL-4通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接,且其中所述融合蛋白 $\geq 60\text{kDa}$ 。

[0086] 在一些方面中,本公开内容提供了一种免疫调节融合蛋白,其包含:

[0087] (i) 人CCL-5;

[0088] (ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体;和

[0089] (iii) 接头,其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400,

[0090] 其中CCL-5通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接,且其中所述融合蛋白 $\geq 60\text{kDa}$ 。

[0091] 在其他方面中,本公开内容提供了一种免疫调节融合蛋白,其包含:

[0092] (i) 人嗜酸性粒细胞趋化因子;

[0093] (ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体;和

[0094] (iii) 接头,其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400,

[0095] 其中嗜酸性粒细胞趋化因子通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接,且其中所述融合蛋白 $\geq 60\text{kDa}$ 。

[0096] 在任何前述方面中,基膜聚糖包含SEQ ID NO:107所示的氨基酸序列。

[0097] 在任何前述方面中,LAIR1包含SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,LAIR1是相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白包含一个或多个氨基酸置换、添加或缺失,任选地两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸置换、添加或缺失的变体。在一些实施方式中,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有增加的结合亲和力。在其他进一步的实施方式中,所述LAIR1变体相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力对胶原蛋白具有降低的结合亲和力。

[0098] 在任何前述方面中,所述接头具有足够的长度或质量以减少所述免疫调节结构域在胶原蛋白纤维上的吸附,和/或为所述融合蛋白提供减少从组织扩散的足够的分子量,和/或允许所述免疫调节结构域与胶原蛋白纤维的空间分离以促进受体/配体接合。在一些方面中,所述接头是人血清白蛋白或其片段。在其他方面中,所述接头包含Fc结构域或具有降低的FcR相互作用的突变Fc结构域。

[0099] 在一些方面中,所述融合蛋白具有足够的质量以减少体内施用之后通过扩散或对流的尺寸依赖性逃逸。在一些方面中,在体内施用之后所述融合蛋白结合I型和/或IV型胶原蛋白,从而减少所述免疫调节融合蛋白的全身性暴露。

[0100] 在另外其他方面中,本公开内容提供了一种免疫调节融合蛋白,其包含:

[0101] (i) 激动剂抗体,所述激动剂抗体包含Fc结构域或具有降低的FcR相互作用的突变

Fc结构域,其中所述激动剂抗体选自抗CD3抗体、抗4-1-BB抗体、抗CD40抗体和抗OX40抗体;和

[0102] (ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体;

[0103] 其中基膜聚糖或LAIR1与所述Fc结构域或突变Fc结构域的C末端可操作地连接。

[0104] 在一些方面中,所述融合蛋白具有足够的质量以减少体内施用之后通过扩散或对流的尺寸依赖性逃逸。在一些方面中,在体内施用之后所述融合蛋白结合I型和/或IV型胶原蛋白,从而减少所述免疫调节融合蛋白的全身性暴露。

[0105] 在一些方面中,本公开内容提供了一种药物组合物,其包含本文公开的免疫调节融合蛋白,和药学上可接受的载体。

[0106] 在其他方面中,本公开内容提供了一种核苷酸序列,其编码本文公开的免疫调节融合蛋白。在一些方面中,本公开内容提供了一种表达载体,其包含本文公开的核酸。在其他方面中,本公开内容提供了一种使用本文公开的表达载体转化的细胞。

[0107] 在另一个方面中,本公开内容提供了一种用于生产免疫调节融合蛋白的方法,所述方法包括在允许所述免疫调节融合蛋白表达的条件下维持本文所述的细胞。在进一步的方面中,所述方法包含获得所述免疫调节融合蛋白。

[0108] 在其他方面中,本公开内容提供了一种在受试者中激活、增强或促进免疫细胞的应答的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的本文公开的免疫调节融合蛋白或药物组合物。

[0109] 在更进一步的方面中,本公开内容提供了一种在受试者中抑制、降低或阻遏免疫细胞的应答的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的本文公开的免疫调节融合蛋白或药物组合物。

[0110] 在任何前述方面中,所述免疫细胞是淋巴样细胞,所述淋巴样细胞选自先天淋巴样细胞、T细胞、B细胞、NK细胞及其组合。在其他方面中,所述免疫细胞是髓系细胞,所述髓系细胞选自单核细胞、中性粒细胞、粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞、树突状细胞及其组合。在一些方面中,所述免疫细胞的所述应答包括细胞因子的产生、抗体的产生、抗原特异性免疫细胞的产生、增加的效应子功能和/或细胞毒性及其组合。在一些方面中,所述免疫细胞发生在肿瘤微环境中。

[0111] 在其他方面中,本公开内容提供了一种用于减少或抑制肿瘤生长的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的本文公开的免疫调节融合蛋白或药物组合物。

[0112] 在进一步的方面中,本公开内容提供了一种用于在受试者中治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的本文公开的免疫调节融合蛋白或药物组合物。

[0113] 在任何前述方面中,施用所述免疫调节融合蛋白或所述药物组合物后,在所述受试者中诱导抗肿瘤免疫应答。在一些方面中,所述抗肿瘤免疫应答是T细胞应答,所述T细胞应答包含由CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的一者或两者产生的IFN γ 和/或IL-2。

[0114] 在任何前述方面中,在所述免疫调节融合蛋白或所述药物组合物的施用之后,免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润增加。

[0115] 在任何前述方面中,在所述免疫调节融合蛋白或所述药物组合物的施用之后,肿瘤微环境中调节性T (Treg) 细胞的量减少。在任何前述方面中,施用所述免疫调节融合蛋白或所述药物组合物后,肿瘤微环境中T细胞耗竭减少。

[0116] 在任何前述方面中,所述免疫调节融合蛋白或药物组合物是肿瘤内施用的。

[0117] 在任何前述方面中,所述免疫调节融合蛋白或药物组合物是通过病毒载体、电穿孔、表达所述免疫调节融合蛋白的细胞的移植或复制子施用的。

[0118] 在其他方面中,本公开内容提供了一种用于在有需要的受试者中治疗癌症或推迟癌症进展或者减少或抑制肿瘤生长的试剂盒,所述试剂盒包括容器和包装插页,所述容器包含本文所述的免疫调节蛋白和任选的药学上可接受的载体或者本文所述的药物组合物,所述包装插页包括关于施用所述融合蛋白或药物组合物的说明书。

[0119] 在更进一步的方面中,本公开内容提供了一种用于在有需要的受试者中治疗癌症或推迟癌症进展或者减少或抑制肿瘤生长的试剂盒,所述试剂盒包括容器和包装插页,所述容器包含本文所述的免疫调节融合蛋白和任选的药学上可接受的载体或者本文所述的药物组合物,所述包装插页包括关于单独或与另一药剂联合施用所述抗体或药物组合物的说明书。

[0120] 在一些方面中,本公开内容提供了本文所述的免疫调节融合蛋白和任选的药学上可接受的载体或者本文所述的药物组合物制备用于在有需要的受试者中治疗癌症或推迟癌症进展或者减少或抑制肿瘤生长的药物的用途。

[0121] 在其他方面中,本公开内容提供了本文所述的免疫调节融合蛋白和任选的药学上可接受的载体或者本文所述的药物组合物,其用于制备用于在有需要的受试者中治疗癌症或推迟癌症进展或者减少或抑制肿瘤生长的药物。

[0122] 在更进一步的方面中,本公开内容提供了本文所述的免疫调节融合蛋白和任选的药学上可接受的载体或者本文所述的药物组合物,其被用作药物。

[0123] 在其他方面中,本公开内容提供了一种用于在受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的本文所述的免疫调节融合蛋白或药物组合物和有效量的包含肿瘤抗原靶向抗体或其抗原结合片段的第二组合物,从而在所述受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症。在一些方面中,所述肿瘤抗原是肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤新抗原。在其他方面中,所述肿瘤抗原靶向抗体特异性结合人HER-2/neu、EGFR、VEGFR、CD20、CD33或CD38。

[0124] 在另外其他方面中,本公开内容提供了一种用于在受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的本文所述的免疫调节融合蛋白或药物组合物和有效量的包含癌症疫苗的第二组合物,从而在所述受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症。在一些方面中,所述癌症疫苗是在体外用肿瘤抗原进行免疫并向所述受试者施用的细胞群体。在其他方面中,所述癌症疫苗是包含一种或多种肿瘤相关抗原的肽。在一些方面中,癌症疫苗是包含肿瘤相关抗原、脂质和任选地接头的两亲性肽缀合物,其中所述两亲性肽缀合物在生理条件下结合白蛋白。在一些方面中,所述癌症疫苗进一步包含佐剂。

[0125] 在一些方面中,本公开内容提供了一种用于在受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的本文所述的免疫调节融合蛋白或药物组合物和有效量的包含免疫检查点抑制剂的第二组合物,从而在所述受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症。在一些方面中,所述免疫检查点抑制剂包含结合PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG3或TIM3的抗体或其抗原结合片段。

[0126] 在进一步的方面中,本公开内容提供了一种用于在受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的本文所述的免疫调节融合蛋白或药物组合物和有效量的包含过继细胞疗法的第二组合物,从而在所述受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症。在一些方面中,所述过继细胞疗法包含免疫效应细胞,所述免疫效应细胞包含结合肿瘤抗原的嵌合抗原受体(CAR)分子。在一些方面中,所述CAR分子包含抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内域,所述胞内域包含共刺激结构域和/或主要信号传导结构域。在一些方面中,所述抗原结合结构域结合与所述疾病相关的所述肿瘤抗原。在一些方面中,所述肿瘤抗原选自CD19、EGFR、Her2/neu、CD30和BCMA。在一些方面中,所述免疫效应细胞是T细胞,例如CD8⁺T细胞。在一些方面中,所述免疫效应细胞是自然杀伤(NK)细胞。

[0127] 在任何前述方法中,所述免疫调节融合蛋白或所述药物组合物是肿瘤内施用的。在一些方面中,所述免疫调节融合蛋白或所述药物组合物和所述第二组合物是同时或按顺序施用的。

[0128] 在其他方面中,本公开内容提供了一种用于在受试者中减少或抑制肿瘤生长或者治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的免疫调节融合蛋白,其包含:

[0129] (i) 人IL-2;

[0130] (ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体;和

[0131] (iii) 接头,其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400,

[0132] 其中IL-2通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接,且其中所述融合蛋白>60kDa,

[0133] 从而在所述受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症。

[0134] 在一些方面中,本公开内容提供了一种用于在受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的免疫调节融合蛋白,所述免疫调节融合蛋白包含:

[0135] (i) 人IL-12(p35)/IL-12(p40)的单链融合体;

[0136] (ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体;和

[0137] (iii) 接头,其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400,

[0138] 其中所述IL-12(p35)/IL-12(p40)的单链融合体通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接,且其中所述融合蛋白>60kDa,

[0139] 从而在所述受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症。

[0140] 在一些方面中,本公开内容提供了一种用于在受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的第一组合物,所述第一组合物包含免疫调节融合蛋白,其包含:

[0141] (i) 人IL-2;

[0142] (ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体;和

[0143] (iii) 接头,其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中N=1-

1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400，

[0144] 其中IL-2通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接，且其中所述融合蛋白>60kDa，以及第二组合物，所述第二组合物包含有效量的免疫调节融合蛋白，其包含：

[0145] (i) 人IL-12 (p35) /IL-12 (p40) 的单链融合体；

[0146] (ii) 人基膜聚糖、人LAIR1或人LAIR1变体；和

[0147] (iii) 接头，其中所述接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽，其中N=1-1000、10-900、30-800、40-700、50-600、100-500或200-400，

[0148] 其中所述IL-12 (p35) /IL-12 (p40) 的单链融合体通过所述接头与基膜聚糖或LAIR1可操作地连接，且其中所述融合蛋白>60kDa，

[0149] 从而在所述受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症。

[0150] 在一些方面中，所述方法还包括施用第二(或第三，或第四)组合物，所述组合物包含有效量的肿瘤抗原靶向抗体或其抗原结合片段。在其他方面中，所述方法还包括施用第二组合物，所述第二组合物包含有效量的包含癌症疫苗的组合物。在另外其他方面中，所述方法还包括施用第二组合物，所述第二组合物包含有效量的包含免疫检查点抑制剂的第二组合物。在一些方面中，所述免疫检查点抑制剂包含结合PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG3或TIM3的抗体或其抗原结合片段。

[0151] 在另一个方面中，所述方法还包括施用第二组合物，所述第二组合物包含有效量的包含过继细胞疗法的第二组合物，从而在所述受试者中减少或抑制肿瘤生长或治疗癌症。在一些方面中，所述过继细胞疗法包含免疫效应细胞，所述免疫效应细胞包含结合肿瘤抗原的嵌合抗原受体(CAR)分子。在一些方面中，所述免疫效应细胞是T细胞(如CD8⁺T细胞)或NK细胞。

[0152] 在任何前述方面中，所述免疫调节融合蛋白或所述药物组合物是肿瘤内施用的。

[0153] 在任何前述方面中，所述免疫调节融合蛋白或所述药物组合物和所述第二组合物是同时或按顺序施用的。

附图说明

[0154] 本专利或申请文件包含以彩色执行的至少一个附图。专利局将在请求和支付必要费用时，提供带有彩色附图的本专利或专利申请公开的副本。

[0155] 图1A提供了显示作为浓度的函数的单独的(Gluc)或与胶原蛋白结合多肽融合的(基膜聚糖-Gluc、ColG s3a/s3b-Gluc、ColH s3-Gluc)高斯荧光素酶与I型胶原蛋白结合的图。通过ELISA确定结合。

[0156] 图1B提供了显示作为浓度的函数的单独的(Gluc)或与胶原蛋白结合多肽融合的(基膜聚糖-Gluc、ColG s3a/s3b-Gluc、ColH s3-Gluc)高斯荧光素酶与IV型胶原蛋白结合的图。通过ELISA确定结合。

[0157] 图1C提供了显示作为浓度的函数的His标记的小鼠LAIR-1(mLAIR1-His)和His标记的生物素化的基膜聚糖(Lwt-HIS-b)与I型胶原蛋白结合的图。通过ELISA，使用与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗HIS抗体确定结合。

[0158] 图1D提供了显示作为mLAIR1浓度的函数的His标记的小鼠LAIR-1(mLAIR1)和His标记的生物素化的基膜聚糖之间与I型胶原蛋白竞争性结合的图。在存在各种浓度mLAIR1

的情况下,使用与辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的链霉亲和素,通过竞争ELISA确定与I型胶原蛋白结合的基膜聚糖。

[0159] 图2A提供了通过体内荧光成像确定的,在B16F10-Trp2K0肿瘤内进行肿瘤内注射之后,与荧光标记的MSA相比,荧光标记的基膜聚糖或基膜聚糖-MSA随着时间的推移的定量相对肿瘤荧光的图。

[0160] 图2B提供了以注射剂量百分比计的来自注射荧光标记的基膜聚糖-MSA或应该标记的MSA的B16F10-Trp2K0荷瘤小鼠血清的定量荧光的图。通过对含有小鼠血液样品的微量红细胞压积肝素涂覆试管进行荧光成像确定血清荧光。

[0161] 图3A提供了使用PBS (对照) (i.tu.)、MSA-IL2 (i.tu.)、基膜聚糖-MSA-IL2 (i.tu.) 或基膜聚糖 (i.tu.) 治疗的B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠的Mantel-Cox生存曲线。在第6天和第12天,如所示的(箭头),对小鼠 (每个治疗组n=5或7只) 进行治疗。通过对数秩Mantel-Cox检验确定存活统计量。显著性用** (P<0.002) 表示。

[0162] 图3B提供了使用PBS (n=7, i.tu.)、抗TYRP1抗体 (TA99) (i.p.) 联合MSA-IL2 (n=17, i.tu.)、基膜聚糖-MSA-IL2 (n=17, i.tu.) 或使用基膜聚糖 (n=17, i.tu.) 肿瘤内治疗的B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠的Mantel-Cox生存曲线。在第6天、第12天和第18天,如所示的(箭头),对小鼠进行治疗。通过对数秩Mantel-Cox检验确定存活统计量。显著性用* (P<0.03)、** (P<0.002)、*** (P<0.0002)、**** (P<0.0001) 表示, n.s., 不具有显著性。

[0163] 图3C提供了使用PBS (对照) (i.tu.) 或使用抗TYRP1抗体 (TA99) (i.p.) 与基膜聚糖-MSA-IL2肿瘤内 (i.tu.)、癌旁 (peri.tu) (即,与肿瘤相邻) 或靠近尾根部的皮下 (s.c. 尾根部) 施用组合治疗的B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠的Mantel-Cox生存曲线。在第6天、第12天和第18天,如所示的(箭头),对小鼠进行治疗。通过对数秩Mantel-Cox检验确定存活统计量。显著性用* (P<0.03)、** (P<0.002)、*** (P<0.0002)、**** (P<0.0001) 表示, n.s., 不具有显著性。

[0164] 图3D提供了使用PBS (对照) 通过 (i.tu.) 和腹股沟肿瘤引流淋巴结 (i.tdLN) 两者,使用抗TYRP1抗体 (TA99) (i.p.) 与基膜聚糖-MSA-IL2 (i.tu.) 和PBS (i.tdLN) 的组合,或使用抗TYRP1抗体 (TA99) (i.p.) 与基膜聚糖-MSA-IL2 (i.tdLN) 和PBS (i.tu) 的组合治疗的B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠的Mantel-Cox生存曲线。在第6天和第12天,如所示的(箭头),对小鼠 (每个治疗组n=7只) 进行治疗。通过对数秩Mantel-Cox检验确定存活统计量。显著性用** (P<0.002) 表示。

[0165] 图4提供了使用PBS (对照) (i.tu.) 或抗TYRP1抗体 (TA99) (i.p.) 与基膜聚糖-MSA-IL2 (i.tu) 和如所示的免疫细胞耗竭或细胞因子中和抗体的组合治疗的B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠BatF3^{-/-}或野生型 (WT) 小鼠的Mantel-Cox生存曲线。在第6天、第12天和第18天,如所示的,对小鼠 (每个治疗组n=5只) 进行治疗。通过对数秩Mantel-Cox检验确定存活统计量。显著性用* (P<0.03)、** (P<0.002)、*** (P<0.0002)、**** (P<0.0001) 表示, n.s., 不具有显著性。

[0166] 图5A提供了来源于 (如图3B中所述治疗的) 小鼠第10天切除的,在存在布雷菲德菌素A的条件下使用经辐射的B16F10或4T1细胞刺激12小时,随后针对表面标记物和胞内IFN γ 染色的脾细胞的活CD45+CD3+CD8+T细胞中IFN γ +细胞的定量的图 (每个治疗组n=5只小鼠)。通过单因素ANOVA结合Tukey多重比较检验进行数据分析。

[0167] 图5B提供了随着时间的推移监测的来自治疗的B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠的对侧(未治疗)(左图)和同侧(治疗)(中图)病变的平均肿瘤面积以及存活率百分比(右图)的定量的图($n=7$ 只/组)。在第0天,在小鼠右侧肋腹部(同侧)接种B16F10细胞和左侧肋腹部(对侧)接种B16F10细胞。在第6天和第12天,与TA99(i.p.)一起对同侧肿瘤进行肿瘤内治疗。随着时间的推移,监测对侧(未治疗)和同侧(治疗)病变的肿瘤面积(平均值+S.D.)(左图)和存活率(右图)($n=7$ 只/组)。对于每组,显示肿瘤面积直至小鼠达到安乐死标准为止。通过对数秩Mantel-Cox检验确定存活统计量。假定的显著性用*, $P<0.03$;**, $P<0.002$;***, $P<0.0002$;****, $P<0.0001$ 表示;n.s.,不具有显著性。

[0168] 图6A提供了使用PBS(i.tu.)($n=6$)、基膜聚糖(i.tu.)($n=7$)、IL12-MSA(i.tu.)($n=7$)、IL12-MSA-基膜聚糖(i.tu.)($n=7$)或IL12-MSA(i.p.)($n=7$)治疗后的B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠体重变化的定量的图。在第6天和第12天,如图所示的(箭头),对小鼠进行治疗。

[0169] 图6B提供了在第0天使用B16F10黑色素瘤接种小鼠并在第6天和第12天使用PBS(对照)、基膜聚糖(i.tu.)、IL12-MSA(i.tu.)、IL12-MSA(i.p.)或IL12-MSA-基膜聚糖(i.tu.)治疗小鼠的生存曲线。

[0170] 图7提供了表示在第5天和第11天使用PBS($n=5$)、MSA-IL2和IL12-MSA($n=5$),或者基膜聚糖-MSA-IL2和IL12-MSA-基膜聚糖($n=5$)肿瘤内(i.tu.)注射治疗的B16F10肿瘤荷瘤小鼠的随着时间的推移的与基线相比的体重变化(左图)和相应存活率(右图)的图。箭头表示治疗时间。通过对数秩Mantel-Cox检验确定存活统计量。显著性用*($P<0.03$)、**($P<0.002$)、***($P<0.0002$)、****($P<0.0001$)表示,n.s.,不具有显著性。

[0171] 图8A提供了使用PBS(对照)(i.tu.)或基膜聚糖-MSA-IL2(i.tu.)与IL12-MSA-基膜聚糖(i.tu.)和如图所示的免疫细胞耗竭或细胞因子中和抗体的组合治疗的B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠BatF3^{-/-}或野生型(WT)小鼠的Mantel-Cox生存曲线。在第6天、第12天和第18天如图所示的对小鼠(每个治疗组 $n=5$ 只)进行治疗。通过对数秩Mantel-Cox检验确定存活统计量。显著性用*($P<0.03$)、**($P<0.002$)、***($P<0.0002$)、****($P<0.0001$)表示,n.s.,不具有显著性。

[0172] 图8B提供了使用PBS(对照)(i.tu.)或基膜聚糖-MSA-IL2(i.tu.)与IL12-MSA-基膜聚糖(i.tu.)和如图所示的免疫细胞耗竭抗体的组合治疗的B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠BatF3^{-/-}或野生型(WT)小鼠的Mantel-Cox生存曲线。在第6天、第12天和第18天如图所示的对小鼠(每个治疗组 $n=5$ 只)进行治疗。通过对数秩Mantel-Cox检验确定存活统计量。显著性用*($P<0.03$)、**($P<0.002$)、***($P<0.0002$)、****($P<0.0001$)表示,n.s.,不具有显著性。

[0173] 图8C提供了显示相对于使用PBS治疗使用IL12-MSA-基膜聚糖和基膜聚糖-MSA-IL2(基膜聚糖形式)的组合或IL12-MSA+MSA-IL2(MSA形式)的组合肿瘤内治疗的B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠的肿瘤浸润物中免疫细胞倍数变化的热图。

[0174] 图8D-8E提供了在肿瘤细胞注射之后第5天如图8C中所示的治疗后,在肿瘤细胞注射之后第11天从B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠分离的肿瘤浸润CD8⁺T细胞(图8D)及其表面PD-1的相应中位荧光强度(MFI)(图8E)的定量的图。

[0175] 图9提供了表示在第5天和第11天使用PBS($n=5$)、抗PD-1抗体联合MSA-IL2和IL12-MSA($n=5$),或者抗PD-1抗体联合基膜聚糖-MSA-IL2和IL12-MSA-基膜聚糖($n=5$)肿瘤内(i.tu.)注射治疗的B16F10黑色素瘤肿瘤荷瘤小鼠的随着时间的推移的与基线相比的

体重变化(左图)和相应存活率(右图)的图。箭头表示治疗时间。通过单因素ANOVA结合Tukey多重比较检验确定体重变化和比较统计量。通过对数秩Mantel-Cox检验确定存活统计量。显著性用* ($P<0.03$)、** ($P<0.002$)、*** ($P<0.0002$)、**** ($P<0.0001$)表示,n.s.,不具有显著性。

[0176] 图10A-10B提供了表示EMT6荷瘤小鼠(图10A)或MC38荷瘤小鼠(图10B)以及如所示的(箭头)在第5、11和17天如所示的(箭头)进行治疗的肿瘤面积(左图)和存活率百分比(右图)的图。通过单因素ANOVA结合Tukey多重比较检验确定体重变化和比较统计量。通过对数秩Mantel-Cox检验确定存活统计量。所示显著性用*, $P<0.03$; **, $P<0.002$; ***, $P<0.0002$; ****, $P<0.0001$ 表示;n.s.,不具有显著性。

[0177] 图11提供了表示如所示的(箭头)在第5天、第11天和第17天使用PBS ($n=12$) 或IL-12(针对IL12-MSA, $n=10$; 针对IL12-MSA-基膜聚糖, $n=10$), 或者仅癌症疫苗 ($n=7$), 或者癌症疫苗和IL-12(针对IL12-MSA, $n=7$; 针对IL12-MSA-基膜聚糖, $n=7$) 肿瘤内(i.tu.)注射治疗的B16F10黑色素瘤肿瘤荷瘤小鼠的与基线相比的体重变化(左图, 平均值+S.D.)、相应肿瘤面积(中图, 平均值+S.D.)和存活率(右图)的图。显示直至小鼠达到安乐死标准($>100\text{mm}^2$)的肿瘤面积。通过单因素ANOVA结合Tukey多重比较检验确定图中显示的体重变化统计量。通过对数秩Mantel-Cox检验确定与图例相邻的存活统计量。假定的显著性用*, $P<0.03$; **, $P<0.002$; ***, $P<0.0002$; ****, $P<0.0001$ 表示;n.s.,不具有显著性。

[0178] 图12提供了表示如所示的(箭头)在第5天和第11天和使用PBS ($n=11$) 或IL-12(针对IL12-MSA, $n=9$; 针对IL12-MSA-基膜聚糖, $n=5$), 或者仅CAR-T ($n=11$), 或者CAR-T和IL12(针对IL12-MSA, $n=9$; 针对IL12-MSA-基膜聚糖, $n=5$) 肿瘤内(i.tu.)注射治疗的B16F10黑色素瘤肿瘤荷瘤小鼠的与基线相比的体重变化(左图, 平均值+S.D.)、相应肿瘤面积(中图, 平均值+S.D.)和存活率百分比(右图)的图。在第0天使用B16F10细胞接种小鼠, 并在第4天通过全身照射进行淋巴耗竭。在第5天, 单次推注尾静脉注射(i.v.)施用CAR-T治疗。显示直至小鼠达到安乐死标准($>100\text{mm}^2$)的肿瘤面积。通过单因素ANOVA结合Tukey多重比较检验确定图中显示的体重变化统计量。通过对数秩Mantel-Cox检验确定与图例相邻的存活统计量。假定的显著性用*, $P<0.03$; **, $P<0.002$; ***, $P<0.0002$; ****, $P<0.0001$ 表示;n.s.,不具有显著性。

[0179] 图13提供了表示在第7天和第13天用肿瘤内(i.tu.)注射IL-12(针对IL12, $n=5$; 针对IL12-MSA-基膜聚糖, $n=5$)和腹腔(i.p.)注射抗PD-1治疗的4T1乳腺癌荷瘤小鼠在新辅治疗期间的总体重(左图)、原发性肿瘤生长和重量(中图)和存活率(右图)的图。箭头表示治疗时间, 十字表示手术时间。在第0天, 在小鼠乳腺脂肪垫中接种4T1-Luc细胞。在第7天和第13天施用新辅疗法, 并在第16天手术切除原发性肿瘤。术后小鼠通过体内成像(IVIS)监测转移情况。对于每组, 显示肿瘤面积, 直至切除原发性肿瘤为止。通过单因素ANOVA结合Tukey多重比较检验确定图中显示的体重变化统计量。通过对数秩Mantel-Cox检验确定与图例相邻的存活统计量。假定的显著性用*, $P<0.03$; **, $P<0.002$; ***, $P<0.0002$; ****, $P<0.0001$ 表示;n.s.,不具有显著性。

[0180] 图14A提供了表示在第7天和第13天使用基膜聚糖-GLuc或基膜聚糖-CCL3、基膜聚糖-CCL4和基膜聚糖-CCL5的组合肿瘤内治疗的4T1乳腺癌荷瘤小鼠的平均肿瘤面积的图。在第9天和第15天腹腔内施用IFN α 。每隔一天监测一次肿瘤生长(平均值+SEM)。

[0181] 图14B提供了表示在第7天和第13天使用基膜聚糖-GLuc或基膜聚糖-CCL3、基膜聚糖-CCL4和基膜聚糖-CCL5的组合肿瘤内治疗的B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠的平均肿瘤面积的图。在第9天和第15天腹腔内施用IFN α 。每隔一天监测一次肿瘤生长(平均值+SEM)。

[0182] 图14C提供了表示各种浓度的融合蛋白基膜聚糖-GLuc (Lum GLuc)、基膜聚糖-CCL3 (Lum CCL3)、基膜聚糖-CCL5 (Lum CCL5) 在体外对4T1乳腺肿瘤细胞增殖影响的图。通过在450nm处的吸光度测量WST-1增殖试剂来确定增殖。

[0183] 图14D提供了表示各种浓度的融合蛋白基膜聚糖-GLuc (Lum GLuc)、基膜聚糖-CCL3 (Lum CCL3)、基膜聚糖-CCL5 (Lum CCL5) 在体外对B16F10黑色素瘤肿瘤细胞增殖影响的图。通过在450nm处的吸光度测量WST-1增殖试剂来确定增殖。

[0184] 图15提供了表示在肿瘤细胞注射之后第5天初免以及在第11天和第17天激发在尾根部皮下(s.c.)施用癌症疫苗治疗的B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠中肿瘤病变的平均肿瘤面积的图。单独施用癌症疫苗,或者如所示的在第11、17、23和29天与肿瘤内施用CCL11-基膜聚糖、TNF α 、IFN γ 或基膜聚糖联用。每隔一天监测一次肿瘤面积(平均值+SD)。

[0185] 图16A-16B提供了表示在肿瘤细胞注射之后第5、11和17天使用肿瘤靶向抗体2.5F-Fc(i.p.)和MSA-IL2(i.p.)组合在第5天和第11天施用基膜聚糖(Lwt)(i.tu.) (图16B)或CCL11-基膜聚糖(11L)(i.tu.) (图16A)治疗的B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠中单个肿瘤病变的肿瘤面积。每隔一天监测一次肿瘤面积

[0186] 图17A提供了显示作为浓度的函数的激动剂抗体-基膜聚糖融合蛋白与I型胶原蛋白结合的图。通过ELISA确定结合。

[0187] 图17B提供了如通过体内荧光成像确定的随着时间的推移mic肿瘤内注射进入4T1肿瘤后使用Alexa **Fluor**® 647荧光标记的单独的或与基膜聚糖融合的小鼠抗FITC抗体(4420)体内荧光的定量的图。以总辐射效率(p/s)/(μ W/cm²)为单位提供了体内荧光测量结果。

[0188] 图18A提供了显示作为浓度的函数的如所示的His标记的基膜聚糖-IgG结合融合蛋白子集与I型胶原蛋白(左图)或IV胶原蛋白(右图)的结合的图。通过ELISA确定结合。

[0189] 图18B提供了表示作为浓度的函数的His标记的基膜聚糖-IgG结合融合蛋白与小鼠IgG2a同种型对照(克隆C1.18.4)的结合的图。通过ELISA确定结合。将抗His(克隆ab1187)用于检测每个构建体。

[0190] 图19提供了来自OVCA433人卵巢荷瘤小鼠的小鼠大网膜组织的3D显微图像,显示了在小鼠大网膜组织中表达RFP的OVCA433人卵巢肿瘤细胞微集落(红色)周围Alexa Fluor 647标记的基膜聚糖(黄色)的特异性累积,通过SHG显微镜将胶原蛋白成像为灰色。在荷瘤小鼠中腹腔内注射标记的基膜聚糖。

[0191] 图20A提供了表示如通过流式细胞术所确定的来自B16F10细胞中自我复制RNA的如所示的单独的或与荧光蛋白(mCherry)融合的IL-12融合蛋白的表达的图。

[0192] 图20B提供了表示如通过IL-12ELISA所确定的来自B16F10细胞中自我复制RNA的如所示的单独的或与荧光蛋白(mCherry)融合的IL-12融合蛋白的表达的图。

[0193] 图21A提供了显示在第25、31、37、43、49、55和61天使用肿瘤内注射PBS(n=4)或使用肿瘤内胶原蛋白锚定细胞因子基膜聚糖-MSA-IL2和IL12-MSA-基膜聚糖和腹腔内TA99和抗PD-1(n=5)治疗的荷瘤小鼠的肿瘤体积(平均值+SD)的图。对于每组,显示直至小鼠达到

安乐死标准 ($>1200\text{mm}^3$) 的肿瘤体积。

[0194] 图21B提供了在第25、31、37、43、49、55和61天使用肿瘤内PBS ($n=10$) ,使用肿瘤内基膜聚糖-MSA-IL2和IL12-MSA-基膜聚糖和腹腔内TA99和抗PD-1 ($n=14$) ,使用肿瘤内基膜聚糖-MSA-IL2和IL12-MSA-基膜聚糖和腹腔内抗PD-1 ($n=10$) ,使用肿瘤内MSA-IL2和IL12-MSA和腹腔内TA99和抗PD-1 ($n=9$) ,或使用肿瘤内MSA-IL2和IL12-MSA和腹腔内抗PD-1 ($n=8$) 治疗的荷瘤小鼠的Mantel-Cox生存曲线。箭头表示治疗时间。总生存期图列举了死于肿瘤负荷 ($>1200\text{mm}^3$) 或治疗相关的体重减轻 ($>20\%$) 的小鼠;针对每只小鼠后者用蓝色“×”表示。通过对数秩Mantel-Cox检验比较存活率。 $*P<0.03$, $***P<0.0002$, $****P<0.0001$ 。

[0195] 图22A提供了用于测量在B16F10肿瘤中的LAIR结合能力的示意图。

[0196] 图22B提供了显示切除的肿瘤及其细胞外基质的重量的图。

[0197] 图22C提供了显示与基质组分相比B16F10细胞组分的羟脯氨酸含量的图。

[0198] 图22D提供了显示将B16F10衍生的基质组分置于1mL AF647标记的LAIR中的LAIR-荧光耗竭的图。

[0199] 图22E提供了显示基质组分羟脯氨酸含量和B16F10衍生的基质组分的LAIR结合能力之间的相关性的图。

[0200] 图23A提供了显示在第6天和第13天使用PBS对照 (i.tu) ($n=5$) 或LAIR-MSA-IL2 (i.tu) TA99 (i.p.) ($n=7$) 治疗的B16F10黑色素瘤肿瘤 (在第0天接种 1×10^6 个细胞) 的肿瘤面积的图。

[0201] 图23B提供了显示在第6天和第13天使用PBS对照 (i.tu) ($n=5$) 或LAIR-MSA-IL2 (i.tu) T+A99 (i.p.) ($n=7$) 治疗的B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠 (在第0天接种 1×10^6 个细胞) 的Mantel-Cox生存曲线的图。

[0202] 图24A提供了与野生型LAIR (LAIR) 相比低亲和力胶原蛋白结合物LAIR.30.w.A、LAIR.30.w.B、LAIR.30.w.C和LAIR.30.w.D的序列比对。

[0203] 图24B-E提供了显示为灰带的野生型LAIR (PDB 4ETY) 的晶体结构的描述,低亲和力胶原蛋白结合物LAIR.30.w.A (图24B)、LAIR.30.w.B (图24C)、LAIR.30.w.C (图24D) 和LAIR.30.d.D (图24E) 的选择的突变的氨基酸残基突出显示为键合的球体。

[0204] 图24F提供了显示在ELISA测定 ($n=2$) 中WT LAIR、WT LAIR-MSA、MSA-IL-2 (非特异性结合对照) 和突变LAIR-MSA融合体与1型胶原蛋白的结合的图。还显示了根据非线性单点结合拟合计算的每个LAIR构建体的结合亲和力 (Kd)。

[0205] 图25A提供了与野生型LAIR相比低亲和力胶原蛋白结合物LAIR.30.w.E和LAIR.30.w.F的序列比对。

[0206] 图25B-C提供了显示为灰带的野生型LAIR (PDB 4ETY) 的晶体结构的描述,低亲和力胶原蛋白结合物LAIR.30.w.E (图25B) 和LAIR.30.w.F (图25C) 的选择的突变的氨基酸残基突出显示为键合的球体。

[0207] 图25D提供了显示在ELISA测定 ($n=2$) 中WT LAIR、WT LAIR-MSA、MSA-IL-2 (非特异性结合对照) 和突变LAIR-MSA融合体与1型胶原蛋白的结合的图。还显示了根据非线性单点结合拟合模拟的每个LAIR构建体的结合亲和力 (Kd)。

[0208] 图26A提供了与野生型LAIR相比高亲和力胶原蛋白结合物LAIR.30.2.K1.B的序列比对。

[0209] 图26B提供了显示为灰带的野生型LAIR (PDB 4ETY) 的晶体结构的描述,高亲和和力胶原蛋白结合物LAIR.30.2.K1.B的选择的突变的氨基酸残基突出显示为键合的球体。

[0210] 图26C-D提供了显示在100nM(图26C)或0.01nM(图26D)的CRP-XL-生物素中孵育的CRP-XL-生物素结合(链霉亲和素-AF647)对带有野生型LAIR(黑色)或LAIR30.2.K1.B(青色)的酵母的蛋白展示(山羊抗鸡AF488)的流式细胞术图。

[0211] 图26E-F提供了显示在与过量非生物素化CRP-XL竞争后在不同时间点(竞争0小时、16小时和40小时),剩余表面CRP-XL生物素信号(链霉亲和素-AF647)对带有LAIR30.2.K1.B(图26E)或野生型LAIR(图26F)的酵母的蛋白展示(山羊抗鸡AF488)的流式细胞术图。

[0212] 图26G提供了显示在图26E-F中描绘的动力学解离实验中随着时间的推移结合的CRP-XL-生物素的中位荧光强度的图。还显示了以一相指数衰减拟合为模型的估计的解离速率。

具体实施方式

[0213] 本文提供了免疫调节融合蛋白,所述免疫调节融合蛋白包含与胶原蛋白结合结构域可操作地连接的免疫调节结构域。此类融合蛋白定位于所述免疫调节结构域(例如细胞因子、抗体),以使得其不全身性播散。免疫调节结构域的全身性播散可由于从目标部位(例如肿瘤)快速清除而导致有效性降低,和/或由于对肿瘤以外非靶细胞的作用而导致毒性。因此,免疫调节结构域与胶原蛋白结合蛋白的连接使所述免疫调节结构域局部化,以防止全身性扩散,从而将免疫调节结构域保持在目标位点并减少可能导致毒性的潜在脱靶效应。

[0214] 定义

[0215] 除非另有说明,否则权利要求和说明书中使用的术语定义如下。在与母临时专利申请中使用的术语直接冲突的情况下,以本申请中使用的术语为准。

[0216] 必须注意的是,如在说明书和所附权利要求中使用的单数形式“一个”、“一个”和“该”包括复数指示物,除非上下文另外明确指出。

[0217] 如本文所用,“约”将被普通技术人员通常理解并将在一定程度上根据其使用的上下文而变化。如果在给定使用上下文的情况下存在对普通技术人员而言不清楚的术语,则“约”表示特定值的正负10%。

[0218] 如本文所用,术语“激动剂”指部分或完全促进、增加或激活本文公开的天然多肽的生物活性的任何分子(例如抗体或其抗原结合片段)。适宜的激动剂分子具体包括激动剂抗体或抗体片段,天然多肽、肽、反义寡核苷酸、有机小分子等的片段或氨基酸序列变体。在一些实施方式中,在激动剂存在下以剂量依赖性方式观察到激活。在一些实施方式中,测量的信号(例如生物活性)与相当条件下使用阴性对照测量的信号相比高至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约100%。本文还公开了鉴定适于在本公开内容的方法中使用的激动剂的方法。例如,这些方法包括但不限于结合测定,如酶联免疫吸附测定(ELISA),ForteBio©系统和放射免疫测定(RIA)。这些测定确定了激动剂结合目

标多肽(例如受体或配体)的能力,从而表明了激动剂促进、增加或激活所述多肽的活性的能力。激动剂的有效性也可以使用功能测定来确定,如激动剂激活或促进多肽功能的能力。例如,功能测定可以包括使多肽与候选激动剂分子接触并测量通常与所述多肽相关的一种或多种生物活性的可检测变化。通常通过其 EC_{50} 值(激活50%激动剂应答所需的浓度)定义激动剂的效力。 EC_{50} 值越低,激动剂的效力越高且激活最大生物应答所需的浓度越低。

[0219] 术语“白蛋白”指与人白蛋白(SEQ ID NO:42)具有相同或非常相似的三维结构且具有较长血清半衰期的蛋白。示例性白蛋白的蛋白包括人血清白蛋白(HAS;SEQ ID NO:42和43)、灵长类血清白蛋白(如黑猩猩血清白蛋白)、大猩猩血清白蛋白或猕猴血清白蛋白、啮齿类血清白蛋白(如仓鼠血清白蛋白)、豚鼠血清白蛋白、小鼠血清白蛋白和大鼠血清白蛋白、牛血清白蛋白(如奶牛血清白蛋白)、马血清白蛋白(如马血清白蛋白或驴血清白蛋白)、家兔血清白蛋白、山羊血清白蛋白、绵羊血清白蛋白、犬血清白蛋白、鸡血清白蛋白和猪血清白蛋白。

[0220] 术语“改善”指在疾病状态(例如癌症)的治疗中的任何治疗有益结果,包括预防、减轻其严重程度或进展、缓解或治愈。

[0221] “氨基酸”指天然存在和合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸相似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些,以及后来被修饰的氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即与氢、羧基、氨基和R基团键合的碳,例如高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这种类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽主链,但保留了与天然存在氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构但与天然存在氨基酸相似的方式起作用的化合物。

[0222] 氨基酸在本文中可以用它们众所周知的三个字母符号或IUPAC-IUB生化命名委员会推荐的一个字母符号来表示。同样,核苷酸可指用它们普遍接受的单字母代码表示。

[0223] “氨基酸置换”指用第二个不同的“置换”氨基酸残基置换预定氨基酸序列(起始多肽的氨基酸序列)中的至少一个现有氨基酸残基。“氨基酸插入”指将至少一个另外的氨基酸掺入预定的氨基酸序列中。虽然插入通常由一个或两个氨基酸残基的插入组成,但是目前可以进行更大的“肽插入”,例如约三个至约五个或甚至多达约十个、十五个、或二十个氨基酸残基的插入。插入的残基可以是如上所述的天然存在或非天然存在的。“氨基酸缺失”指从预定氨基酸序列中去除至少一个氨基酸残基。

[0224] 如本文所用,术语“拮抗剂”指部分或完全阻断、抑制或中和文公开的天然多肽的生物活性的任何分子(例如抗体或其抗原结合片段)。适宜的拮抗剂分子具体包括拮抗剂抗体或抗体片段,天然多肽、肽、反义寡核苷酸、有机小分子等的片段或氨基酸序列变体。在一些实施方式中,在拮抗剂存在下以剂量依赖性方式观察到抑制。在一些实施方式中,测量的信号(例如生物活性)与相当条件下使用阴性对照测量的信号相比低至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约100%。本文还公开了鉴定适于在本公开内容的方法中使用的拮抗剂的方法。例如,这些方法包括但不限于结合测定,如酶联免疫

吸附测定 (ELISA), ForteBio®系统和放射免疫测定 (RIA)。这些测定确定了拮抗剂结合目标多肽 (例如受体或配体) 的能力, 从而表明了拮抗剂抑制、中和或阻断所述多肽的活性的能力。拮抗剂的有效性也可以使用功能测定来确定, 如拮抗剂抑制多肽或激动剂功能的能力。例如, 功能测定可以包括使多肽与候选拮抗剂分子接触并测量通常与所述多肽相关的一种或多种生物活性的可检测变化。通常通过其 IC_{50} 值 (抑制50%激动剂应答所需的浓度) 定义拮抗剂的效力。 IC_{50} 值越低, 拮抗剂的效力越高且抑制最大生物应答所需的浓度越低。

[0225] 如本文所用, 术语“抗体”指包含两个轻链多肽和两个重链多肽的完整抗体。完整抗体包括不同的抗体同种型, 包括IgM、IgG、IgA、IgD和IgE抗体。术语“抗体”包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合的或嵌合抗体、人源化抗体、灵长类抗体、去免疫抗体和全人抗体。抗体可以在多个物种中的任何一种中制备或衍生自多个物种中的任何一种, 例如, 哺乳动物, 如人、非人灵长类 (例如猩猩、狒狒或黑猩猩)、马、牛、猪、绵羊、山羊、犬、猫、家兔、豚鼠、沙鼠、仓鼠、大鼠和小鼠。抗体可以是纯化的或重组抗体。

[0226] 如本文所用, 术语“抗体片段”、“抗原结合片段”或类似术语指保留结合至一个或多个靶抗原的能力并促进、诱导和/或增加所述靶抗原的活性的抗体片段。此类片段包括, 例如, 单链抗体、单链Fv片段 (scFv)、Fd片段、Fab片段、Fab' 片段或 $F(ab')_2$ 片段。scFv片段是包含作为所述scFv来源的抗体的重链和轻链可变区的单一多肽链。此外, 抗体的定义中也包括抗体、微型抗体、三体和双体, 并且其可用于本文所述的方法。参见, 例如, Todorovska等, (2001) *J Immunol Methods* 248 (1):47-66; Hudson和Kortt (1999) *J Immunol Methods* 231 (1):177-189; Poljak (1994) *Structure* 2 (12):1121-1123; Rondon和Marasco (1997) *Annual Review of Microbiology* 51:257-283, 其每一个的公开内容的全部内容通过引用并入本文。

[0227] 如本文所用, 术语“抗体片段”还包括, 例如, 单域抗体, 如骆驼化的单域抗体。参见, 例如, Muyldermans等, (2001) *Trends Biochem Sci* 26:230-235; Nuttall等, (2000) *Curr Pharm Biotech* 1:253-263; Reichmann等, (1999) *J Immunol Meth* 231:25-38; PCT申请公开号W0 94/04678和W0 94/25591; 和美国专利号6,005,079, 其全部内容均通过引用并入本文。在一些实施方式中, 本公开内容提供了单域抗体, 其包含具有修饰两个VH结构域, 以使得形成单域抗体。

[0228] “B7家族”指激活和抑制性配体。B7家族至少包含激活配体B7-1和B7-2, 以及抑制性配体B7-H1、B7-H2、B7-H3和B7-H4。B7-1和B7-2结合至CD28, B7-H1 (即, PD-L1) 结合至PD-1和B7-H2结合至ICOS。B7-H3和B7-H4结合未知受体。此外, 已经显示B7-H3和B7-H4在肿瘤细胞和肿瘤浸润细胞上被上调。完整的hB7-H3和hB7-H4序列可以分别参见GenBank登录号Q5ZPR3和AAZ17406 (SEQ ID NO:49和50)。

[0229] 如本文所用, 术语“嵌合抗原受体 (CAR)”指人工跨膜蛋白受体, 其包含 (i) 能够结合至少一种预定的CAR配体或抗原的细胞外结构域, 或预定的CAR配体和抗原; (ii) 细胞内区段, 其包含一个或多个衍生自信号转导蛋白的细胞质结构域, 所述信号转导蛋白不同于从其衍生细胞外结构域的多肽; 和 (iii) 跨膜结构域。“嵌合抗原受体 (CAR) 有时称为“嵌合受体”、“T体”或“嵌合免疫受体 (CIR)”。

[0230] 与“CAR抗原”可互换使用的短语“CAR配体”指可特异性地结合至CAR (例如CAR的细胞外结构域) 的天然或合成的分子 (例如小分子、蛋白质、肽、脂质、碳水化合物、核酸) 或其

部分或其片段。在一些实施方式中，CAR配体是肿瘤相关抗原或其片段。在一些实施方式中，CAR配体是标签。

[0231] “细胞内信号传导结构域”指已知能起传递信号功能的任何寡肽或多肽结构域，其引起细胞中生物过程的激活或抑制，例如免疫细胞例如，T细胞或NK细胞的激活。实例包括ILR链、CD28和/或CD3 ζ 。

[0232] 如本文所用，“癌抗原”指(i)肿瘤特异性抗原，(ii)肿瘤相关抗原，(iii)表达肿瘤特异性抗原的细胞，(iv)表达肿瘤相关抗原的细胞，(v)肿瘤上的胚胎抗原，(vi)自体肿瘤细胞，(vii)肿瘤特异性膜抗原，(viii)肿瘤相关膜抗原，(ix)生长因子受体，(x)生长因子配体，和(xi)与癌症相关的任何其他类型的抗原或抗原呈递细胞或材料。

[0233] 如本文所用，“癌症疫苗”指诱导免疫系统攻击具有一个或多个肿瘤相关抗原的细胞的治疗。疫苗能够治疗现有癌症(例如治疗性癌症疫苗)或在某些个体中阻止癌症进展(例如预防性癌症疫苗)。疫苗产生的记忆细胞将识别带有抗原的肿瘤细胞，从而阻止肿瘤生长。

[0234] 如本文所用，术语“趋化因子”指诱导定向趋化性的小细胞因子或信号传导蛋白家族成员。趋化因子分为四个亚家族：CXC、CC、(X)C和CX3C。

[0235] 如本文所用，术语“胶原蛋白”指位于细胞外空间内的主要结构蛋白，并维持很多不同组织的机械完整性。胶原蛋白的分子结构决定了其功能。目前已鉴定出20多种胶原蛋白，其中最常见的是I型。

[0236] 如本文所用，术语“胶原蛋白结合结构域”指与胶原蛋白结合的多肽或其部分。胶原蛋白结合结构域可以是较大融合蛋白、生物活性剂或药物的一部分。可以通过本领域公知的方法确定组合物、多肽或其部分、融合蛋白、或药物或生物活性剂与胶原蛋白的结合(例如胶原蛋白结合测定；参见例如，Turecek等，(2002) *Semin Thromb Hemost* 28(2):149-160)。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域是由其与已知或参考胶原蛋白结合蛋白竞争结合胶原蛋白的能力确定的。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域来源于天然存在的胶原蛋白结合蛋白或胶原蛋白受体。包含胶原蛋白结合结构域的胶原蛋白结合蛋白和胶原蛋白受体是本领域公知的(参见例如，Svensson等，(2001) *Osteoarthritis Cartilage* 9Suppl A:S23-28；Leitinger和Hohenester E(2007) *Matrix Biol* 26(3):146-155)。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域来源于原核胶原蛋白结合蛋白。原核胶原蛋白结合蛋白是本领域公知的(参见例如，Symersky等，(1997) *Nat Struct Biol* 4:833-838)。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域包含一个或多个增加其对胶原蛋白亲和力的突变。

[0237] 如本文所用，“组合疗法”包括以将提供组合的有益效果的方案的顺序或同时方式施用每种药物或疗法，以及以基本上同时的方式共同施用这些药剂或疗法，如在具有固定比例的这些活性剂的单个胶囊中，或在每种药剂的多个单独的胶囊中。组合疗法还包括这样的组合，其中可以在不同时间和/或通过不同途径施用单独的元件，但是其可以联合发挥作用，以通过每种药物的协同作用或药代动力学和药效学作用或组合疗法的肿瘤治疗方法提供有益的作用。

[0238] 如本文所用，“共刺激信号”指与主要信号如TCR/CD3连接结合而导致T细胞增殖和/或关键分子上调或下调的信号。

[0239] “细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4 (CTLA-4)”是一种T细胞表面分子并且是免疫球

蛋白超家族成员。该蛋白通过结合至CD80和CD86下调免疫系统。如本文所用,术语“CTLA-4”包括人CTLA-4(hCTLA-4),hCTLA-4的变体、亚型和物种同源物,以及与hCTLA-4具有至少一个共同表位的类似物。完整的hCTLA-4序列可以参见GenBank登录号P16410(SEQ ID NO: 46)。

[0240] “衍生自”指定多肽或蛋白的多肽或氨基酸序列指多肽的来源。优选地,衍生自特定序列的多肽或氨基酸序列具有与该序列或其部分基本上相同的氨基酸序列,其中该部分由至少10-20个氨基酸,优选地至少20-30个氨基酸,更优先地至少30-50个氨基酸组成,或本领域的普通技术人员可以确定其起源于序列。相对于起始多肽,衍生自另一种肽的多肽可具有一个或多个突变,例如一个或多个氨基酸残基已被另一个氨基酸残基置换或具有一个或多个氨基酸残基插入或缺失。

[0241] 多肽可包含非天然存在的氨基酸序列。这样的变体必须与起始分子具有小于100%序列同一性或相似性。在某些实施方式中,变体将具有与起始多肽的氨基酸序列约75%至小于100%氨基酸序列同一性或相似性的氨基酸序列,更优选约80%至小于100%,更优选约85%至小于100%,更优选约90%至小于100%,(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)和最优选约95%至小于100%,例如,在变体分子的长度上。

[0242] 在某些实施方式中,起始多肽序列和从其衍生的序列之间存在一种氨基酸差异。相对于该序列的同一性或相似性在本文中定义为在比对序列并在必要时引入缺口以达到最大序列同一性百分比后,候选序列中与起始氨基酸残基相同(即相同残基)的氨基酸残基的百分比。在某些实施方式中,多肽由其组成或基本上由其组成,或包含选自序列总结表中的氨基酸序列。在某些实施方式中,多肽包含与选自序列总结表中的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,多肽包含与选自序列总结表中的连续氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的连续氨基酸序列。在某些实施方式中,多肽包含具有至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、300、400或500个(或这些数量中的任何整数)选自序列总结表中的氨基酸序列的连续氨基酸序列的氨基酸序列。

[0243] 在某些实施方式中,本公开内容的肽由核苷酸序列编码。本公开内容的核苷酸序列可以用于很多应用,包括:克隆、基因疗法、蛋白表达和纯化、突变导入、有需要的宿主的DNA疫苗接种、用于例如被动免疫的抗体产生、PCR、产生引物和探针等。在某些实施方式中,本公开内容的核苷酸序列包含选自SEQ ID NO:3、5、7、9、11、15、17、19、21、23、25、27、29、31和33的核苷酸序列,由其组成或者基本上由其组成。在某些实施方式中,核苷酸序列包含与序列总结表中所示的核苷酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列。在某些实施方式中,核苷酸序列包含与在序列总结表中所示的连续核苷酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的连续核苷酸序列。在某些实施方式中,核苷酸序列包括具有在序列总结表中所示的核苷酸序列的至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、300、400或500个(或这些数量中的任何整数)连续核苷酸

的核苷酸序列。

[0244] 本领域普通技术人员还将理解的是,可以改变适用于在本文公开的免疫调节融合蛋白中使用的多肽,以使得其序列与天然存在的或者其衍生自的天然序列不同,但是保留天然序列的所需活性。例如,可以进行导致保守性置换或在“非必需”氨基酸残基改变的核苷酸或氨基酸置换。可以通过标准技术引入突变,如位点定向诱变和PCR介导的诱变。

[0245] 适于在本文公开的免疫调节融合蛋白中使用的多肽在一个或多个氨基酸残基(例如在必需或非必需氨基酸残基)可以包含保守性氨基酸置换。“保守性氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基置换的氨基酸。在本领域中已定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族,包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β 支链侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,优选将结合多肽中的非必需氨基酸残基替换为来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基。在某些实施方式中,可以使用侧链家族成员的顺序和/或组成不同的结构相似的串替代一串氨基酸。或者,在某些实施方式中,可以沿编码序列的全部或部分随机引入突变,例如通过饱和诱变,并且可以将所得突变体引入本公开内容的结合多肽中,并筛选其结合所需靶点的能力。

[0246] 如本文所用,术语“效应细胞”或“效应免疫细胞”指参与免疫应答例如促进免疫效应应答的细胞。在一些实施方式中,免疫效应细胞特异性地识别抗原。免疫效应细胞的实例包括但不限于自然杀伤(NK)细胞、B细胞、单核细胞、巨噬细胞、T细胞(例如细胞毒性T淋巴细胞(CTL))。在一些实施方式中,效应细胞是T细胞。如本文所用,术语“免疫效应子功能”或“免疫效应应答”指促进对靶标的免疫应答的免疫效应细胞的功能或应答。

[0247] 如本文所用,术语“Fc区”指由其两条重链各自的Fc结构域(或Fc部分)形成的天然免疫球蛋白的部分。在一些实施方式中,术语“Fc结构域”指单一免疫球蛋白(Ig)重链的一部分,其中所述Fc结构域不包含Fv结构域。在一些实施方式中,术语“Fc结构域”指单一免疫球蛋白(Ig)重链的一部分,其还包含Fv结构域。这样,也可以将Fc结构域称为“Ig”或“IgG”。在某些实施方式中,Fc结构域始于木瓜蛋白酶切割位点上游的铰链区,终止于抗体的C末端。因此,完整Fc结构域至少包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。在某些实施方式中,Fc结构域包含下述中的至少一者:铰链(例如上部、中部和/或下部铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域、CH4结构域,或其变体、部分或片段。在某些实施方式中,Fc结构域包含完整Fc结构域(即,铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域)。在某些实施方式中,Fc结构域包含与CH3结构域(或其部分)融合的铰链结构域(或其部分)。在某些实施方式中,Fc结构域包含与CH3结构域(或其部分)融合的CH2结构域(或其部分)。在某些实施方式中,Fc结构域由CH3结构域或其部分组成。在某些实施方式中,Fc结构域由铰链结构域(或其部分)和CH3结构域(或其部分)组成。在某些实施方式中,Fc结构域由CH2结构域(或其部分)和CH3结构域组成。在某些实施方式中,Fc结构域由铰链结构域(或其部分)和CH2结构域(或其部分)组成。在某些实施方式中,Fc结构域缺乏CH2结构域的至少一部分(例如CH2结构域的全部或部分)。本文的Fc结构域通常指包含免疫球蛋白重链的全部或部分Fc结构域的多肽。这包括但不限于包含完整CH1、铰链、CH2和/或CH3结构域的多肽,以及仅包含例如铰链、CH2和CH3结构域的

此类肽。Fc结构域可以来自任何物种和/或任何亚型的免疫球蛋白,包括但不限于人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE或IgM抗体。人IgG1恒定区可以参见Uniprot P01857和SEQ ID NO:114。人IgG1的Fc结构域可以参见SEQ ID NO:115。Fc结构域包括天然Fc和Fc变体分子。与Fc变体和天然Fc一样,术语Fc结构域包括单体形式或多聚体形式的分子,无论是从完整抗体中消化还是通过其他方式产生的。根据Kabat的定义分配对Fc结构域氨基酸残基的编号。参见,例如,Sequences of Proteins of Immunological Interest (Table of Contents, Introduction and Constant Region Sequences sections), 第5版, Bethesda, MD: NIH vol.1:647-723 (1991); Kabat等, "Introduction" Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept of Health and Human Services, NIH, 第5版, Bethesda, MD vol.1:xiii-xcvi (1991); Chothia&Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia等, Nature 342:878-883 (1989), 其每一个出于所有目的通过引用并入本文。

[0248] 如本文所述,本领域普通技术人员将理解的是,可以修饰任何Fc结构域,以使得其氨基酸序列与天然存在的免疫球蛋白分子的天然Fc结构域的氨基酸序列不同。在某些实施方式中,Fc结构域具有降低的效应子功能(例如Fc γ 结合)。

[0249] 适于在本文公开的免疫调节融合蛋白中使用的Fc结构域可以来源于不同免疫球蛋白分子。例如,多肽的Fc结构域可以包含来源于IgG1分子的CH2和/或CH3结构域和来源于IgG3分子的铰链区。在另一个实例中,Fc结构域可以包含部分来源于IgG1分子和部分来源于IgG3分子的嵌合铰链区。在另一个实例中,Fc结构域可以包含部分来源于IgG1分子和部分来源于IgG4分子的嵌合铰链。

[0250] 如本文所用,术语“gly-ser多肽接头”或“gly-ser接头”指由甘氨酸和丝氨酸残基组成的肽。示例性gly-ser多肽接头包含氨基酸序列Ser (Gly4Ser) n 。在某些实施方式中, $n=1$ 。在某些实施方式中, $n=2$ 。在某些实施方式中, $n=3$,即,Ser (Gly4Ser) ^{3} 。在某些实施方式中, $n=4$,即,Ser (Gly4Ser) ^{4} 。在某些实施方式中, $n=5$ 。在某些实施方式中, $n=6$ 。在某些实施方式中, $n=7$ 。在某些实施方式中, $n=8$ 。在某些实施方式中, $n=9$ 。在某些实施方式中, $n=10$ 。另一种示例性gly-ser多肽接头包含氨基酸序列(Gly4Ser) n 。在某些实施方式中, $n=1$ 。在某些实施方式中, $n=2$ 。在某些实施方式中, $n=3$ 。在某些实施方式中, $n=4$ 。在某些实施方式中, $n=5$ 。在某些实施方式中, $n=6$ 。另一种示例性gly-ser多肽接头包含氨基酸序列(Gly3Ser) n 。在某些实施方式中, $n=1$ 。在某些实施方式中, $n=2$ 。在某些实施方式中, $n=3$ 。在某些实施方式中, $n=4$ 。在某些实施方式中, $n=5$ 。在某些实施方式中, $n=6$ 。

[0251] 如本文所用,术语“人抗体”包括具有人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(如果存在的话)的抗体。本公开内容的人抗体可以包含不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或位点特异性诱变或体内体细胞突变引入的突变)(参见,Lonberg,N.等,(1994) Nature 368 (6474):856-859;Lonberg,N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101;Lonberg,N.和Huszar,D. (1995) Intern.Rev.Immunol.Vol.13:65-93,以及Harding,F.和Lonberg,N. (1995) Ann.N.Y.Acad.Sci 764:536-546)。然而,术语“人抗体”不包括其中来源于另一哺乳动物物种(如小鼠)种系的CDR序列已被移植到人框架序列上的抗体(即,人源化抗体)。

[0252] 如本文所用,术语“异源抗体”是相对于产生此类抗体的转基因非人生物体的定义。该术语指具有与在不由转基因非人动物组成的生物体中发现的对应氨基酸序列或编码

核酸序列的抗体,该抗体通常来自于非转基因非人类动物的物种。

[0253] 如本文所用,“免疫细胞”是造血起源的细胞并在免疫应答中起作用。免疫细胞包括淋巴细胞(例如B细胞和T细胞)、自然杀伤细胞和髓样细胞(例如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和粒细胞)。

[0254] 如本文所用,“免疫检查点”指调节免疫细胞的共刺激和抑制信号。在某些实施方式中,免疫检查点抑制剂是抑制信号。在某些实施方式中,抑制信号是在PD-1和PD-L1之间的相互作用。在某些实施方式中,抑制信号是在CTLA-4和CD80或CD86之间的相互作用,以替代CD28结合。在某些实施方式中,抑制信号是在LAG3和II类MHC分子之间的相互作用。在某些实施方式中,抑制信号是在TIM3和半乳糖凝集素9之间的相互作用。

[0255] 如本文所用,“免疫检查点阻断剂”指完全或部分减少、抑制、干扰或调节一种或多种检查点蛋白的分子。在某些实施方式中,检查点阻断剂阻止与免疫检查点相关的抑制信号。在某些实施方式中,免疫检查点阻断剂是破坏与免疫检查点相关的抑制性信号传导的抗体或其片段。在某些实施方式中,免疫检查点阻断剂是破坏抑制性信号传导的小分子。在某些实施方式中,免疫检查点阻断剂是阻止检查点阻断剂蛋白之间的相互作用的抗体、其片段或抗体模拟物,例如,阻止PD-1和PD-L1之间的相互作用的抗体或其片段。在某些实施方式中,免疫检查点阻断剂是阻止CTLA-4和CD80或CD86之间的相互作用的抗体或其片段。在某些实施方式中,免疫检查点阻断剂是阻止LAG3及其配体或TIM-3及其配体之间的相互作用的抗体或其片段。

[0256] 如本文所用,术语“免疫调节融合蛋白”指包含与至少一个免疫调节结构域可操作地连接的胶原蛋白结合结构域的多肽。在一些实施方式中,所述胶原蛋白结合结构域通过接头与所述免疫调节结构域可操作地连接。

[0257] 如本文所用,术语“免疫调节结构域”指赋予导致免疫应答(例如CD8+T细胞的刺激)的激活或抑制的活性的多肽(例如细胞因子、激动或拮抗性抗体)。在一些实施方式中,所述免疫调节结构域指结合至其同源配体或受体从而导致免疫应答的激活或抑制的多肽。

[0258] 术语“诱导免疫应答”和“增强免疫应答”可互换使用,并且指对特定抗原的免疫应答(即,被动或适应性)的刺激。关于诱导CDC或ADCC所用的术语“诱导”指特定的直接细胞杀伤机制的刺激。

[0259] 如本文所用,“需要预防”、“需要治疗”或“需要其”的受试者指由合适的医生(例如就人类而言,医生、护士或执业护士;就非人哺乳动物而言,兽医)判断的受试者,将合理地受益于给定的治疗(如用包含本文所述的融合蛋白的组合物治疗)。

[0260] 术语“体内”指在活生物体中发生的过程。

[0261] 如本文所用,“白介素(IL)-2”指激活并诱导T细胞和自然杀伤(NK)细胞的增殖的多效性细胞因子。IL-2通过结合其受体IL-2R发出信号,所述IL-2R由 α 、 β 和 γ 亚基组成。IL-2信号传导刺激抗原激活T细胞的增殖。

[0262] 如本文所用,术语“分离的抗体”指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如与免疫检查点阻断剂或共刺激分子结合的分离的抗体)基本上不含与目标靶点以外的抗原特异性结合的抗体。然而,与表位特异性结合的分离的抗体可以与来自不同物种的其他靶点具有交叉反应性。此外,分离的抗体通常基本上不含其他细胞物质和/或化学物质。

[0263] 如本文所用,术语“分离的核酸分子”指编码本文公开的融合蛋白、多肽、抗体或抗体部分的核酸,其旨在指核酸分子,其中编码所述融合蛋白、多肽、抗体或抗体部分的核苷酸序列不含其他核苷酸序列,该其他序列可以天然地位于人基因组DNA中核酸的侧翼。

[0264] 如本文所用,“同种型”指由重链恒定区基因编码的抗体类型(例如IgM或IgG1)。在一些实施方式中,本公开内容的抗体是IgG1同种型。在一些实施方式中,本公开内容的抗体是IgG2同种型。在一些实施方式中,本公开内容的抗体是IgG3同种型。在一些实施方式中,本公开内容的抗体是IgG4同种型。

[0265] 如本文所用,术语“KD”或“ K_D ”指例如配体和受体、抗原和抗体或胶原蛋白结合蛋白和胶原蛋白之间的结合反应的平衡解离常数。 K_D 的值是结合蛋白解离速率常数(kd)与结合蛋白结合速率常数(ka)之比的数值表示。 K_D 的值与结合蛋白与其结合伴侣的结合亲和力成反比。 K_D 值越小,结合蛋白针对其结合伴侣的亲和力越大。亲和力是单个分子与其配体结合的强度,通常通过平衡解离常数(K_D)进行测量和报告,所述平衡解离常数用于评价和排序双分子相互作用的强度。

[0266] 如本文所用,术语“kd”或“ k_d ”(或者“koff”或“ k_{off} ”)旨在指结合蛋白从结合蛋白/伴侣复合物中解离的解离速率常数。Kd的值是每秒衰减或解离的复合物分数的数值表示,并以 sec^{-1} 单位表示。

[0267] 如本文所用,术语“ka”或“ k_a ”(或者“kon”或“ k_{on} ”)旨在指结合蛋白与结合伴侣结合的结合速率常数。ka的值是在1摩尔(1M)结合伴侣溶液中每秒形成的抗体/抗原复合物数量的数值表示,并以 $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 单位表示。

[0268] 如本文所用,术语“连接”、“可操作地连接”、“融合的”或“融合”可互换使用。这些术语指通过包括化学缀合、非共价组合物形成或重组方式在内的任何方式将两个或更多元件或组分或结构域连接在一起。化学缀合方法(例如使用异双功能交联剂)是本领域已知的。

[0269] 如本文所用,“局部施用”或“局部递送”指不依赖于将组合物或药剂经由血管系统运输至其预期的靶组织或部位的递送。例如,免疫调节融合蛋白或包含融合蛋白的组合物可以通过融合蛋白或组合物的注射或植入,或者包含融合蛋白或组合物的装置的注射或植入递送。在靶组织或部位附近局部施用之后,所述组合物或药剂,或其一个或多个组分可以扩散至预期的靶组织或部位。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白通过病毒载体、电穿孔、表达免疫调节融合蛋白的细胞的移植或复制子局部施用。

[0270] “淋巴细胞激活基因-3(LAG-3)”是与II类MHC分子结合而与抑制淋巴细胞活性相关的抑制性受体。该受体增强Treg细胞的功能并抑制CD8+效应T细胞功能。如本文所用,术语“LAG3”包括人LAG3(hLAG3),hLAG3的变体、亚型和物种同源物,以及具有至少一个共同表位的类似物。完整hLAG3序列可以参见GenBank登录号P18627(SEQ ID NO:47)。

[0271] 如本文所用,术语“哺乳动物”或“受试者”或“患者”包括人类和非人类,并且包括但不限于人类、非人灵长类、犬科动物、猫科动物、鼠、牛、马类和猪。

[0272] “核酸”指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。除非特别限定,术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,其具有与参考核酸相似的结合特性并且以与天然存在核苷酸类似的方式被代谢。除非另有说明,特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如简并密码子替换)和互补序列以及明确指出的序列。具体而言,

简并密码子替换可通过产生序列来实现,其中一个或多个选择的(或全部)密码子的第三位位置被混合的碱基和/或脱氧肌苷残基置换(Batzer等,Nucleic Acid Res.19:5081,1991;Ohtsuka等,Biol.Chem.260:2605-2608,1985;和Cassol等,1992;Rossolini等,Mol.Cell.Probes 8:91-98,1994)。对于精氨酸和亮氨酸,在第二碱基处的修饰也可以是保守的。术语核酸可与基因、cDNA和基因编码的mRNA互换使用。

[0273] 本文使用的多核苷酸可以由任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸组成,其可以是未修饰的RNA或DNA或修饰的RNA或DNA。例如,多核苷酸可以由单链和双链DNA组成,DNA是单链和双链区域、单链和双链RNA的混合物,并且RNA是单链和双链区域的混合物,包含抗原是单链或更通常是双链或单链和双链区域的混合物的DNA和RNA的杂合分子。另外,多核苷酸可以由包含RNA或DNA或RNA和DNA的三链区域组成。多核苷酸还可以包含一个或多个修饰的碱基或出于稳定性或出于其他原因修饰的DNA或RNA主链。“修饰的”碱基包括例如三苯甲基化碱基和不常见碱基如肌苷。可以对DNA和RNA进行多种修饰;因此,“多核苷酸”包括化学、酶或代谢修饰的形式。

[0274] 如本文所用,“肠胃外施用”、“非肠道施用”和其他语法上等价的短语指除肠内和局部施用外的给药方式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、鼻内、眼内、肌肉内、动脉内、囊内的、囊内的、眶内的、心脏内的、皮内的、腹膜内的、经气管壁的、皮下的、表皮下的、关节内的、被膜下的、蛛网膜下的、脊柱内的、硬膜外、大脑内的、颅内的、颈内动脉、结肠内/肠内、宫颈管内/阴道内和胸骨内注射和输注。

[0275] 在两条或更多条核酸或多肽序列的背景下,术语“同一性百分比”指如使用下文所述的序列比对算法之一(例如BLASTP和BLASTN或本领域技术人员可用的其他算法)或通过目测检查所测量的,当针对最大对应进行比较和比对时,具有相同的核苷酸或氨基酸残基的特定百分比的两条或更多条序列或子序列。取决于应用,“同一性百分比”可以存在于所比较的序列的区域上,例如,存在于功能结构域上,或者,存在于所比较的两条序列的全长上。为了进行序列比较,通常将一条序列作为与待测序列进行比较的参照序列。当使用序列比较算法时,将待测和参照序列输入计算机,必要时指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法根据指定的程序参数,计算待测序列相对于参照序列的序列同一性百分比。

[0276] 可以通过以下进行用于比较的最佳序列比对,例如,通过Smith&Waterman, Adv.Appl.Math.2:482(1981)的局部同源性算法,通过Needleman&Wunsch,J.Mol.Biol.48:443(1970)的同源性比对算法,通过Pearson&Lipman,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 85:2444(1988)的相似性算法研究,通过计算机化执行这些算法(在Wisconsin遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group,575Science Dr.,Madison,Wis.),或通过目测检查(通常参见Ausubel等,见下文)。

[0277] 适于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的一个实例是BLAST算法,在Altschul等,J.Mol.Biol.215:403-410(1990)中对其进行了描述。可通过国家生物技术信息中心网站公开获得进行BLAST分析的软件。

[0278] 如在本文中通常所使用的,“药学上可接受的”指那些化合物、材料、组合物和/或剂型,其在合理的医学判断范围内,适用于与人和动物的组织、器官和/或体液接触,而没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症与合理的受益/风险比相称。

[0279] “多肽”、“肽”和“蛋白”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在氨基酸的人工化学模拟物,以及天然存在氨基酸聚合物和非天然存在氨基酸聚合物。

[0280] “程序性死亡-1 (PD-1)”受体指属于CD28家族的免疫抑制性受体。PD-1在体内主要在此前激活的T细胞上表达,并结合至两个配体PD-L1和PD-L2。如本文所用,术语“PD-1”包括人PD-1 (hPD-1), hPD-1的变体、亚型和物种同源物,以及与hPD-1具有至少一个共同表位的类似物。完整hPD-1序列可以参见GenBank登录号AAC51773 (SEQ ID NO:44)。

[0281] “程序性死亡配体-1 (PD-L1)”是针对PD-1的两种细胞表面糖蛋白配体之一(另一种是PD-L2),其在与PD-1结合后下调T细胞激活和细胞因子分泌。如本文所用,术语“PD-L1”包括人PD-L1 (hPD-L1), hPD-L1的变体、亚型和物种同源性,以及与hPD-L1具有至少一个共同表位的类似物。完整hPD-L1序列可以参见GenBank登录号Q9NZQ7 (SEQ ID NO:45)。

[0282] 如本文所用,应用于本文所述的任何蛋白(融合蛋白、抗体或片段)的术语“纯化的”或“分离的”指已从组分(例如蛋白或其他天然存在的生物学或有机分子)中分离或纯化的多肽,其天然伴随其,例如在表达蛋白的原核生物中的其他蛋白、脂质和核酸。通常,当多肽构成样品中总蛋白质量的至少60(例如至少65、70、75、80、85、90、92、95、97或99)%时,将其纯化。

[0283] 如本文所用,术语“特异性结合”和“选择性结合”指通过胶原蛋白结合结构域与胶原蛋白的结合,或者通过抗体与预先确定的抗原上的表位的结合。在一些实施方式中,基于针对胶原蛋白的 K_D ,胶原蛋白结合结构域特异性结合或选择性结合胶原蛋白(即针对结合胶原蛋白的 K_D 低于至少针对纤连蛋白、玻连蛋白、骨桥蛋白、腱生蛋白C或纤维蛋白原的 K_D)。

[0284] 术语“有效量”或“足以……的量”指足以产生所需效果的量,例如,足以减小肿瘤直径的量。

[0285] 术语“T细胞”指白细胞的一种,其通过细胞表面存在T细胞受体可以将其与其他白细胞区分开。T细胞有几个子集,包括但不限于T辅助细胞(即 T_H 细胞或 $CD4^+$ T细胞)和亚型,其包括 T_H1 、 T_H2 、 T_H3 、 T_H17 、 T_H9 和 T_{FH} 细胞、细胞毒性T细胞(即 T_C 细胞、 $CD8^+$ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞、T杀伤细胞、杀伤性T细胞)、记忆T细胞和亚型,其包括中央记忆T细胞(T_{CM} 细胞)、效应记忆T细胞(T_{EM} 和 T_{EMRA} 细胞)和常驻记忆T细胞(T_{RM} 细胞),调节性T细胞(即 T_{reg} 细胞或抑制性T细胞)和亚型,其包括 $CD4^+FOXP3^+T_{reg}$ 细胞、 $CD4^+FOXP3^-T_{reg}$ 细胞、Tr1细胞、Th3细胞、和 $T_{reg}17$ 细胞、自然杀伤性T细胞(即NKT细胞)、粘膜相关不变T细胞(MAIT)和 $\gamma\delta$ T细胞($\gamma\delta$ T细胞),其包括 $V\gamma9/V\delta2$ T细胞。前述或未提及的T细胞中的任何一个或多个可以是用于本发明的使用方法的靶细胞类型。

[0286] 术语“T细胞细胞毒性”包括由 $CD8^+$ T细胞激活介导的任何免疫应答。示例性免疫应答包括细胞因子产生, $CD8^+$ T细胞增殖,颗粒酶或穿孔素的产生和感染剂的清除。

[0287] “T细胞膜蛋白-3 (TIM-3)”是通过抑制 T_H1 细胞应答而参与抑制淋巴细胞活性的抑制性受体。其配体是半乳糖凝集素9,其在多种癌症类型中上调。如本文所用,术语“TIM3”包括人TIM3 (hTIM3), hTIM3的变体、亚型和物种同源物,以及具有至少一个共同表位的类似物。完整hTIM3序列可以参见GenBank登录号Q8TDQo (SEQ ID NO:48)。

[0288] “治疗性抗体”是抗体、抗体的片段、或衍生自抗体的构建体,并且可以结合靶细胞上的细胞表面抗原以引起治疗效果。这样的抗体可以是嵌合、人源化或完全人源的抗体。用

于产生这样的抗体的方法是本领域已知的。这样的抗体包括抗体、小抗体和双抗体的单链Fc片段。本领域已知可用于癌症治疗的任何治疗性抗体均可用于适合用于本文公开的方法的联合疗法中。治疗性抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。在优选的实施方式中，治疗性抗体靶向癌症抗原。

[0289] 术语“治疗有效量”是有效改善疾病症状的量。治疗有效量可以是“预防有效量”，因为预防可以视为治疗。

[0290] 如本文所用，术语“载体”旨在指能够转运已与其连接的另一核酸的核酸分子。载体的一种类型是“质粒”，其指其中可以连接其他DNA区段的环状双链DNA环。载体的另一种类型是病毒载体，其中可以将其他DNA区段连接至病毒基因组中。某些载体能够在引入其的宿主细胞中自主复制（例如具有细菌复制原点的细菌载体和游离型哺乳动物载体）。在导入宿主细胞中后，可以将其他载体（例如非游离型哺乳动物载体）整合到宿主细胞的基因组中，从而与宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够引导与其可操作地连接的基因的表达。在本文中将此载体称为“重组表达载体”（或简称为“表达载体”）。在通常情况下，在重组DNA技术中有用的表达载体通常是质粒形式。在本说明书中，“质粒”和“载体”可以互换使用，因为质粒是最常用的载体形式。然而，本公开内容旨在包括具有等效功能的此类其他形式的表达载体，如病毒载体（例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒）。

[0291] 免疫调节融合蛋白

[0292] 在一些方面中，本公开内容提供了一种免疫调节融合蛋白，其包含与免疫调节结构域可操作地连接的胶原蛋白结合结构域。在一些实施方式中，所述免疫调节融合蛋白还包含接头，以使得所述胶原蛋白结合结构域与所述接头可操作地连接并使所述接头与所述免疫调节结构域可操作地连接。

[0293] I. 胶原蛋白结合结构域

[0294] 在一些实施方式中，本公开内容提供了包含胶原蛋白结合结构域的免疫调节融合蛋白。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域具有约5-100kDa、约10-80kDa、约20-60kDa、约30-50kDa、或约10kDa、约20kDa、约30kDa、约40kDa、约50kDa、约60kDa、约70kDa、约80kDa、约90kDa或约100kDa的MW。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域是约5kDa、约10kDa、约20kDa、约30kDa、约40kDa、约50kDa、约60kDa、约70kDa、约80kDa、约90kDa或约100kDa。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域是约30kDa。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域是约40kDa。

[0295] 在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域的长度是约10-350、约10-300、约10-250、约10-200、约10-150、约10-100、约10-50或约10-20个氨基酸。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域的长度是约10个氨基酸。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域的长度是约15个氨基酸。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域的长度是约20个氨基酸。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域的长度是约30个氨基酸。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域的长度是约40个氨基酸。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域的长度是约50个氨基酸。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域的长度是约60个氨基酸。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域的长度是约70个氨基酸。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域的长度是约80个氨基酸。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域的长度是约90个氨基酸。在一些实施方式中，胶原蛋白结合结构域的长度是约100个氨基酸。在一些实施方式中，

胶原蛋白结合结构域的长度是约120个氨基酸。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域的长度是约150个氨基酸。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域的长度是约200个氨基酸。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域的长度是约250个氨基酸。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域的长度是约300个氨基酸。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域的长度是约350个氨基酸。

[0296] A. 等电点

[0297] 等电点 (pI、pH(I)、IEP) 是特定分子 (例如胶原蛋白结合结构域) 不带净电荷或为电中性的pH。表1提供了针对本文所述的示例性胶原蛋白结合结构域计算的pI。将瑞士生物信息学研究所 (https://web.expasy.org/compute_pi/) 的ExPASy工具用于计算表1中所示的胶原蛋白结合结构域的等电点 (pI)。

[0298] 在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域具有小于 (<) 约10、约8、约6、约4、约2或约1的等电点。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域具有小于 (<) 10的等电点。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域具有小于 (<) 10的等电点和大于 (>) 5kDa的分子量 (MW)。

[0299] 表1:针对示例性胶原蛋白结合结构域计算的pI

	胶原蛋白结合结构域		
	计算的 pI	SEQ ID NO	
[0300]	LAIR1	5.23	98
	LAIR2	4.88	99
	糖蛋白 IV	7.68	100
	巢蛋白	5.05	101
	基底膜聚糖	6.03	102
	双糖链蛋白聚糖	8.13	103
	核心蛋白聚糖	8.76	104
	无孢蛋白	6.1	105
	纤维调节蛋白	5.66	106
	基膜聚糖	6.17	107
	PRELP	9.45	108
	骨粘附蛋白聚糖/骨调蛋白	5.22	109
	旋光蛋白	5.38	110
	骨甘蛋白聚糖/Mimecan	5.22	111
[0301]	软骨蛋白	9.14	112
	Podcan	6.41	113
	基膜聚糖 (小鼠)	6.01	195

[0302] B. I型胶原蛋白

[0303] 胶原蛋白是位于细胞外空间的主要结构蛋白,I型胶原蛋白是哺乳动物中丰度最高的蛋白 (Di Lullo等, (2002) J Biol Chem 277 (6):4223-4231)。I型胶原蛋白的基本结构单元是长 (300-nm) 而薄 (1.5-nm直径) 的蛋白,其由三个卷曲的亚基组成:两个 $\alpha 1$ (I) 链和一个 $\alpha 2$ (I)。每条链均包含1050个氨基酸,其以独特的右手三螺旋方式彼此缠绕。在人类中,I

型胶原蛋白由COL1A1和COL1A2基因编码。COL1A1基因编码I型胶原蛋白的前 $\alpha 1$ 链。COL1A2基因编码I型胶原蛋白的前 $\alpha 2$ 链,其三螺旋包含两个 $\alpha 1$ 链和一个 $\alpha 2$ 链。I型胶原蛋白是存在于大多数结缔组织中的原纤维形成胶原蛋白,其在骨骼、角膜、真皮和肌腱中丰度最高。

[0304] I型胶原蛋白的人 $\alpha 1$ 链前体的示例性氨基酸序列如SEQ ID NO:90中所示(NCBI参考序列:NP_000079.2)。

[0305] I型胶原蛋白的人 $\alpha 2$ 链前体的示例性氨基酸序列如SEQ ID NO:91中所示(NCBI参考序列:NP_000080.2)。

[0306] C.IV型胶原蛋白

[0307] IV型胶原蛋白由多肽家族组成,其是哺乳动物基底膜的主要成分(Timpl(1989) Eur J Biochem 180:487-502;Paulsson(1992) Crit Rev Biochem Mol Biol 27:93-127)。 $\alpha 1$ (IV) 和 $\alpha 2$ (IV) 链是不同基因(分别为COL4A1和COL4A2)的产物,其以头对头的方式成对位于人13号染色体上(Hudson等,(1993) J Biol Chem 268:26033-26036)。 $\alpha 3$ (IV) 和 $\alpha 4$ (IV) 链(分别由COL4A3和COL4A4基因编码)以相同取向存在于人2号染色体上,以及 $\alpha 5$ (IV) 和 $\alpha 6$ (IV) 链(分别由COL4A5和COL4A6基因编码)位于人X染色体上(Hudson等,(1991) in Pathobiochemistry, ed Kang A. (CRC Press, Boca Raton, FL), pp 17-30)。

[0308] IV型胶原蛋白的人 $\alpha 1$ 链的示例性氨基酸序列如SEQ ID NO:92中所示(NCBI参考序列:XP_011519350.1)。

[0309] IV型胶原蛋白的人 $\alpha 2$ 链的示例性氨基酸序列如SEQ ID NO:93中所示(NCBI参考序列:NP_001837.2)。

[0310] IV型胶原蛋白的人 $\alpha 3$ 链的示例性氨基酸序列如SEQ ID NO:94中所示(NCBI参考序列:NP_000082.2)。

[0311] IV型胶原蛋白的人 $\alpha 4$ 链的示例性氨基酸序列如SEQ ID NO:95中所示(NCBI参考序列:NP_000083.3)。

[0312] IV型胶原蛋白的人 $\alpha 5$ 链的示例性氨基酸序列如SEQ ID NO:96中所示(NCBI参考序列:XP_011529151.2)。

[0313] IV型胶原蛋白的人 $\alpha 6$ 链的示例性氨基酸序列如SEQ ID NO:97中所示(NCBI参考序列:XP_006724680.1)。

[0314] 因此,在一些实施方式中,本公开内容提供了免疫调节融合蛋白,其包含特异性结合胶原蛋白的胶原蛋白结合结构域。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域特异性结合人I型胶原蛋白和/或人IV型胶原蛋白。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域结合人I型胶原蛋白。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域结合人IV型胶原蛋白。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域特异性结合人I型胶原蛋白和人IV型胶原蛋白。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域特异性结合人I型胶原蛋白或人IV型胶原蛋白。

[0315] D.对胶原蛋白的结合亲和力

[0316] 在一些实施方式中,本公开内容提供了免疫调节融合蛋白,其包含如通过胶原蛋白结合测定所确定的以小于约0.5nM的亲和力(K_D)特异性结合胶原蛋白的胶原蛋白结合结构域。在一些实施方式中,本公开内容提供了免疫调节融合蛋白,其包含如通过胶原蛋白结合测定所确定的以小于约5nM的亲和力(K_D)特异性结合胶原蛋白的胶原蛋白结合结构域。在一些实施方式中,本公开内容提供了免疫调节融合蛋白,其包含如通过胶原蛋白结合测

定所确定的以小于约50nM的亲和力(K_D)特异性结合胶原蛋白的胶原蛋白结合结构域。在一些实施方式中,本公开内容提供了免疫调节融合蛋白,其包含如通过胶原蛋白结合测定所确定的以小于约500nM的亲和力(K_D)特异性结合胶原蛋白的胶原蛋白结合结构域。在一些实施方式中,如通过胶原蛋白结合测定所确定的,胶原蛋白结合结构域以约0.5-5nM、5-50nM或50-500nM的亲和力(K_D)特异性结合胶原蛋白。在一些实施方式中,如通过胶原蛋白结合测定所确定的,胶原蛋白结合结构域以约50-100nM、100-200nM、200-300nM、300-400nM或400-500nM的亲和力(K_D)特异性结合胶原蛋白。

[0317] 在一些实施方式中,胶原蛋白结合测定确定针对胶原蛋白的胶原蛋白结合结构域的结合亲和力。在一些实施方式中,胶原蛋白结合测定确定针对I型胶原蛋白的结合亲和力。在一些实施方式中,胶原蛋白结合测定确定针对IV型胶原蛋白的结合亲和力。

[0318] 在一些实施方式中,胶原蛋白结合测定是ELISA。进行胶原蛋白结合ELISA的方法和技术是本领域公知的(参见例如,Smith等,(2000) J Biol Chem 275:4205-4209)。因此,在一些实施方式中,本公开内容提供了免疫调节融合蛋白,其包含如通过ELISA确定的以小于约0.5nM的亲和力(K_D)特异性结合胶原蛋白的胶原蛋白结合结构域。因此,在一些实施方式中,本公开内容提供了免疫调节融合蛋白,其包含如通过ELISA确定的以小于约5nM的亲和力(K_D)特异性结合胶原蛋白的胶原蛋白结合结构域。因此,在一些实施方式中,本公开内容提供了免疫调节融合蛋白,其包含如通过ELISA确定的以小于约50nM的亲和力(K_D)特异性结合胶原蛋白的胶原蛋白结合结构域。因此,在一些实施方式中,本公开内容提供了免疫调节融合蛋白,其包含如通过ELISA确定的以小于约500nM的亲和力(K_D)特异性结合胶原蛋白的胶原蛋白结合结构域。在一些实施方式中,如通过ELISA确定的,胶原蛋白结合结构域以约0.5-5nM、4-40nM或50-500nM的亲和力(K_D)特异性结合胶原蛋白。在一些实施方式中,如通过ELISA确定的,胶原蛋白结合结构域以约50-100nM、100-200nM、200-300nM、300-400nM或400-500nM的亲和力(K_D)特异性结合胶原蛋白。

[0319] 在一些实施方式中,胶原蛋白结合测定是表面等离子体共振 (SPR) 测定。进行胶原蛋白结合SPR测定的方法和技术是本领域公知的(参见例如,Saenko等,(2002) Anal Biochem 302 (2):252-262)。因此,在一些实施方式中,本公开内容提供了免疫调节融合蛋白,其包含如通过SPR测定确定的以小于约500nM的亲和力(K_D)特异性结合胶原蛋白的胶原蛋白结合结构域。在一些实施方式中,如通过SPR测定确定的,胶原蛋白结合结构域以约50-500nM的亲和力(K_D)特异性结合胶原蛋白。在一些实施方式中,如通过SPR测定确定的,胶原蛋白结合结构域以约50-100nM、100-200nM、200-300nM、300-400nM或400-500nM的亲和力(K_D)特异性结合胶原蛋白。

[0320] 短语“表面等离子体共振”包括一种光学现象,可通过检测生物传感器矩阵中蛋白浓度的变化来分析实时生物特异性相互作用,例如使用BIAcore系统 (Pharmacia Biosensor AB,Uppsala,Sweden and Piscataway,NJ)。进一步的描述参见Jönsson,U.,等,(1993) Ann.Biol.Clin.51:19-26; Jönsson,U.,等,(1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson,B.,等,(1995) J.Mol.Recognit.8:125-131;和Johnsson,B.,等,(1991) Anal.Biochem.198:268-277。

[0321] E.对胶原蛋白的结合特异性

[0322] 在一些实施方式中,本公开内容提供了免疫调节融合蛋白,其包含特异性结合胶原蛋白且不特异性结合至一种或多种以下非胶原蛋白细胞外基质(ECM)组分的胶原蛋白结合结构域,所述非胶原蛋白细胞外基质组分包括但不限于纤连蛋白、玻连蛋白、腱生蛋白C、骨桥蛋白和纤维蛋白原。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域以与一种或多种非胶原蛋白ECM组分相比更低的 K_D 与胶原蛋白结合。在一些实施方式中,所述胶原蛋白结合结构域针对I型胶原蛋白的 K_D 低于所述胶原蛋白结合结构域针对选自纤连蛋白、玻连蛋白、骨桥蛋白、腱生蛋白C或纤维蛋白原的细胞外基质组分的 K_D 。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域以与一种或多种非胶原蛋白ECM组分相比约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约99%更低的 K_D 与胶原蛋白结合。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域以与一种或多种非胶原蛋白ECM组分相比约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约10倍更低的 K_D 结合胶原蛋白。

[0323] 在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域不是ECM组分的混杂结合物。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域不包含肝素结合结构域。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域不是结合细胞外基质的生长因子或其部分。

[0324] 在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域以与IV型胶原蛋白相比更低的 K_D 与I型胶原蛋白结合。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域以与I型胶原蛋白相比更低的 K_D 与IV型胶原蛋白结合。

[0325] 在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域与参照胶原蛋白结合结构域竞争与胶原蛋白结合。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域与参照胶原蛋白结合结构域竞争与I型胶原蛋白结合。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域与参照胶原蛋白结合结构域竞争与IV型胶原蛋白结合。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域与参照胶原蛋白结合结构域竞争与I型胶原蛋白结合和IV型胶原蛋白。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域与参照胶原蛋白结合结构域竞争与I型胶原蛋白结合,而非IV型胶原蛋白。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域与参照胶原蛋白结合结构域竞争与IV型胶原蛋白结合,而非I型胶原蛋白。

[0326] 在一些实施方式中,参照胶原蛋白结合结构域包含结合胶原蛋白的一个或多个(例如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)富含亮氨酸的重复序列。在一些实施方式中,参照胶原蛋白结合结构域包含蛋白聚糖。在一些实施方式中,参照胶原蛋白结合结构域包含蛋白聚糖,其中所述蛋白聚糖选自以下:核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、纤维调节蛋白、基膜聚糖、软骨蛋白、无孢蛋白、PRELP、骨粘附蛋白聚糖/骨调蛋白、旋光蛋白、骨甘蛋白聚糖/mimecan、podocan、基底膜聚糖、巢蛋白。在一些实施方式中,参照胶原蛋白结合结构域是基膜聚糖。在一些实施方式中,参照胶原蛋白结合结构域包含I类富含亮氨酸的小蛋白聚糖(SLRP)。SLRP已知结合胶原蛋白(Chen和Birk(2013)FEBS Journal 2120-2137)。在一些实施方式中,参照胶原蛋白结合结构域包含II类SLRP。在一些实施方式中,参照胶原蛋白结合结构域包含III类SLRP。在一些实施方式中,参照胶原蛋白结合结构域包含IV类SLRP。在一些实施方式中,参照胶原蛋白结合结构域包含V类SLRP。在Schaefer& Iozzo(2008)J Biol Chem 283(31):21305-21309中公开了对SLRP类型的进一步描述,其全部内容通过引用并入本文。

[0327] 在一些实施方式中,参照胶原蛋白结合结构域包含白细胞相关的免疫球蛋白样受

体1 (LAIR-1) 蛋白。在一些实施方式中,参照胶原蛋白结合结构域包含白细胞相关的免疫球蛋白样受体2 (LAIR-2) 蛋白。在一些实施方式中,参照胶原蛋白结合结构域包含糖蛋白IV。

[0328] F. 示例性胶原蛋白结合结构域

[0329] 在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域包含一个或多个(例如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)结合胶原蛋白的富含亮氨酸的重复序列。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域包含蛋白聚糖。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域包含蛋白聚糖,其中所述蛋白聚糖选自以下:核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、鞣丸聚糖、双库尼茨抑制剂(bikunin)、纤维调节蛋白、基膜聚糖、软骨蛋白、角蛋白、ECM2、骀蛋白聚糖、无孢蛋白、PRELP、角膜蛋白、骨粘附蛋白聚糖、旋光蛋白、骨聚糖、夜盲蛋白、Tsukushi、podocan、podocan样蛋白1多功能蛋白聚糖、基底膜聚糖、巢蛋白、神经聚糖、可聚蛋白聚糖和短小蛋白聚糖。

[0330] 在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域包含I类富含亮氨酸的小蛋白聚糖(SLRP)。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域包含II类SLRP。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域包含III类SLRP。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域包含IV类SLRP。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域包含V类SLRP。在Schaefer&Iozzo (2008) J Biol Chem 283 (31):21305-21309中公开了对SLRP类型的进一步描述,其全部内容通过引用并入本文。

[0331] 在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域包含来自富含亮氨酸的小蛋白聚糖(SLRP)家族的人II类蛋白聚糖成员的一个或多个富含亮氨酸的重复序列。在一些实施方式中,SLRP选自基膜聚糖、核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、纤维调节蛋白、角蛋白、骀蛋白聚糖、无孢蛋白和骨甘蛋白聚糖。在一些实施方式中,SLRP是基膜聚糖。在一些实施方式中,基膜聚糖包含SEQ ID NO:107中所示的氨基酸序列。

[0332] 基膜聚糖

[0333] 基膜聚糖(也称为LUM)是一种细胞外基质蛋白,其在人类中由12号染色体上的LUM基因编码(Chakravarti等,(1995) Genomics 27 (3):481-488)。基膜聚糖是富含亮氨酸的小蛋白聚糖(SLRP)家族的II类蛋白聚糖成员,其包括核心蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、纤维调节蛋白、角膜蛋白、骀蛋白聚糖和骨甘蛋白聚糖(Iozzo&Schaefer (2015) Matrix Biology 42:11-55)。

[0334] 与其他SLRP一样,基膜聚糖的分子量约40kDa并且具有四个主要的分子内结构域:1) 16个氨基酸残基的信号肽,2) 含有硫酸化酪氨酸和一个或多个二硫键的带负电荷的N末端结构域,3) 10个富含亮氨酸的串联重复序列,以使得基膜聚糖能够与胶原蛋白结合,和4) 含有间隔32个残基的两个保守的半胱氨酸的50个氨基酸残基的羧基末端结构域。Kao等,(2006) Experimental Eye Research 82 (1):3-4)。蛋白核心的富含亮氨酸重复结构域中有四个N连接位点,其可以被硫酸角质素置换。基膜聚糖的核心蛋白(与核心蛋白聚糖和纤维调节蛋白一样)是马蹄形的。这使其能够与胶原蛋白纤维中的胶原蛋白分子结合,从而帮助使相邻的胶原蛋白纤维保持分开(Scott (1996) Biochemistry 35 (27):8795-8799)。

[0335] 白细胞相关的免疫球蛋白样受体 (LAIR-1和LAIR-2)

[0336] 白细胞相关的Ig样受体 (LAIR) -1是一种胶原蛋白受体,其在结合胶原蛋白后抑制免疫细胞功能。在LAIR-1旁边,人基因组编码LAIR-2(一种可溶性同源物)。人(h) LAIR-1在

大多数PBMC和胸腺细胞中表达 (Maasho等, (2005) *Mol Immunol* 42:1521-1530)。hLAIR-1在体外通过mAb交联可提供有效的抑制信号,该信号能够抑制免疫细胞功能(4、10-15)。已知胶原蛋白是LAIR分子的天然、高亲和力配体。hLAIR-1与胶原蛋白的相互作用直接抑制体外免疫细胞的激活。(Meyaard等, (1997) *Immunity* 7:283-290;Poggi (1998) *Eur J Immunol* 28:2086-2091;Van der Vuurst de Vries等, (1999) *Eur J Immunol* 29:3160-3167;Lebbink等, (2006) *J Exp Med* 203:1419-1425)。

[0337] 在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域包含人I型糖蛋白,其具有Ig样结构域或结合胶原蛋白的其细胞外部分。在一些实施方式中,I型糖蛋白与基膜聚糖竞争结合与I型胶原蛋白的结合。在一些实施方式中,人I型糖蛋白选自LAIR1、LAIR2和糖蛋白IV。在一些实施方式中,人I型糖蛋白是LAIR1。在一些实施方式中,人I型糖蛋白是LAIR1和所述胶原蛋白结合结构域包含SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列的氨基酸残基22-122。

[0338] 在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域是LAIR1、LAIR2或糖蛋白IV的变体。在一些实施方式中,相对于野生型LAIR1、LAIR2或糖蛋白IV的蛋白序列,LAIR1变体、LAIR2变体或糖蛋白IV变体包含一个或多个氨基酸置换、添加或缺失(例如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域是LAIR1变体,其相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白包含一个或多个氨基酸置换、添加或缺失(例如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域是LAIR1变体,其在LAIR1结合口袋(例如LAIR1结合位点包含一个或多个残基E61、S66、Y68、I102、W109、Y115、R59、E63、R100、E111和Q112及其组合)包含一个或多个氨基酸置换、添加或缺失(例如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)(Brondijk等, (2010) *Blood* 115:1364-1373)。在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域是LAIR1变体,其在LAIR1结合口袋以外包含一个或多个氨基酸置换、添加或缺失(例如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)。

[0339] 在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域是相对于野生型LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力具有增加的胶原蛋白结合亲和力的LAIR1变体。在一些实施方式中,相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力,LAIR1变体显示出与胶原蛋白增加的结合亲和力。在一些实施方式中,相对于野生型LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力,LAIR1变体具有降低的胶原蛋白结合亲和力。在一些实施方式中,相对于包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列的LAIR1蛋白的胶原蛋白结合亲和力,LAIR1变体显示出与胶原蛋白降低的结合亲和力。

[0340] 糖蛋白IV (CD36)

[0341] 在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域包含糖蛋白IV (GPIV)。糖蛋白IV结合包括胶原蛋白在内的很多配体(Tandon (1989) *J Biol Chem* 264 (13):7576-7583)。多功能糖蛋白GPIV可以作为多种配体的受体,包括血小板反应蛋白、纤连蛋白、胶原蛋白或β淀粉样蛋白以及脂性的,如氧化低密度脂蛋白(oxLDL)、阴离子磷脂、长链脂肪酸和细菌二酰基脂肽。GPIV是一种在人类中由CD36基因编码的蛋白。CD36抗原是一种存在于脊椎动物的很多细胞类型表面上的整合膜蛋白。其可以将脂肪酸导入细胞内部,并且是细胞表面蛋白的B类清道夫受体家族成员。在一些实施方式中,CD36包含SEQ ID NO:100中所示的氨基酸序列。

[0342] II. 免疫调节结构域

[0343] 本文公开的免疫调节融合蛋白包含至少一个与胶原蛋白结合结构域可操作地连接的免疫调节结构域。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含一个、两个、三个、四个或五个免疫调节结构域。在一些实施方式中,当在融合蛋白中存在一个以上免疫调节结构域时,所述免疫调节结构域是相同的。在一些实施方式中,当在融合蛋白中存在一个以上免疫调节结构域时,所述免疫调节结构域是不同的。在一些实施方式中,当在融合蛋白中存在一个以上免疫调节结构域时,每个结构域位于胶原蛋白结合结构域的N末端。在一些实施方式中,当在融合蛋白中存在一个以上免疫调节结构域时,每个结构域位于胶原蛋白结合结构域的C末端。在一些实施方式中,当在融合蛋白中存在一个以上免疫调节结构域时,至少一个结构域位于胶原蛋白结合结构域的N末端和至少一个结构域位于胶原蛋白结合结构域的C末端。

[0344] 在一些实施方式中,所述免疫调节结构域激活免疫系统的细胞的活性。例如,在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是免疫应答刺激,例如但不限于,细胞因子,如白介素、趋化因子、TNF家族成员、激动性抗体、免疫检查点阻断剂或其组合。在一些实施方式中,所述免疫调节结构域增强免疫应答。在一些实施方式中,增强免疫应答包括刺激T细胞、刺激B细胞、刺激树突状细胞应答或其组合。在一些实施方式中,免疫应答的增强导致细胞因子产生、抗体产生、抗原特异性免疫细胞(例如CD8⁺T细胞或CD4⁺T细胞)产生、刺激I型干扰素应答或其组合。

[0345] 在一些实施方式中,所述免疫调节结构域包含激活、增强或促进免疫细胞的应答的多肽。在一些实施方式中,所述免疫调节结构域包含抑制、降低或阻遏免疫细胞的应答的多肽。在一些实施方式中,免疫细胞是淋巴样细胞,包括但不限于T细胞、B细胞、NK细胞和先天淋巴样细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是髓系细胞,包括但不限于单核细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞、肥大细胞和粒细胞。

[0346] 在一些实施方式中,免疫细胞的应答是细胞因子产生、抗体产生、抗原特异性免疫细胞的产生或其组合。

[0347] A. 白介素

[0348] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是白介素(IL)。白介素是分泌蛋白,其结合其特异性受体,并在白细胞之间的通信中发挥作用。适于作为免疫调节融合蛋白的免疫调节结构域使用的白介素包括但不限于:IL-2、IL-12、IL-15、IL-15超激动剂(IL-15SA)、IL-21、IL-6、IL-5、IL-8、IL-7、IL-17、IL-23、IL-18、IL-1、IL-4、IL-3、IL-10、IL-13和IL-9。在一些实施方式中,适于作为免疫调节结构域使用的白介素包含选自SEQ ID NO:1-5和9-24的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是IL-2多肽。在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是IL-12多肽。在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是IL-15多肽。在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是IL-15SA多肽。

[0349] 在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是结合共用 γ 链受体的白介素多肽。结合共用 γ 链受体的白介素包括但不限于IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13、IL-15、IL-15/IL-15R α 和IL-21。

[0350] 在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是属于IL-12家族的多肽。IL-12家族包含异二聚体配体,其由具有螺旋结构的 α 亚基(例如IL-12p35、IL-23p19、IL-27p28)和 β 亚基

(例如IL-12p40、IL-23p40(其与IL-12p40相同)、EBI3)组成。示例性成员包括IL-12、IL-23、IL-27和IL-35。

[0351] 在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是属于IL-1超家族的多肽。白介素-1(IL-1)家族由11个结构相关的家族成员(IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1Ra、IL-18、IL-33和IL-1F5至IL-1F10)组成,其是最有效的免疫系统信号传导分子,通过一组密切相关的受体发挥作用。所有IL-1受体均具有相似的激活模式:配体与主要受体亚基(即,针对IL-1 α 和 β 为IL-1R1、针对IL-18为IL-18R和针对IL-33为ST2)结合后,募集第二受体亚基(即,针对IL-1 α 和 β 为IL-1RAP、针对IL-18为IL-18RAP和针对IL-33为IL-1RAP)和通过受体亚基的胞质Toll/IL-1受体(TIR)结构域的并置(juxtaposition)启动信号传导。二聚化的TIR结构域为MYD88适体蛋白提供了一个停靠平台,该平台通过募集其他中间体导致促炎性核因子- κ B(NF- κ B)和丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)途径的激活。IL-1家族成员主要由先天性免疫细胞产生,并且在免疫应答过程中作用于多种细胞类型。因此,在一些实施方式中,免疫调节结构域是IL-18多肽。

[0352] 白介素-2(IL-2)

[0353] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含任选地通过接头与胶原蛋白结合结构域可操作地连接的IL-2家族成员。在一些实施方式中,IL-2家族成员是IL-2。白介素-2(IL-2)是诱导抗原激活的T细胞增殖并刺激自然杀伤(NK)细胞的细胞因子。IL-2的生物活性是通过跨细胞膜的三个多肽亚基的多亚基IL-2受体复合物(IL-2R):p55(IL-2R α , α 亚基,在人类中也称为CD25)、p75(IL-2R β , β 亚基,在人类中也称为CD122)和p64(IL-2R γ , γ 亚基,在人类中也称为CD132)。T细胞对IL-2的应答取决于多种因素,包括:(1)IL-2的浓度;(2)在细胞表面上IL-2R分子的数量;和(3)IL-2占据的IL-2R数量(即,IL-2和IL-2R之间的结合相互作用的亲和力(Smith,"Cell Growth Signal Transduction is Quantal" In Receptor Activation by Antigens,Cytokines,Hormones,and Growth Factors 766:263-271, 1995))。在配体结合后IL-2:IL-2R复合物被内化,并且对不同组分进行差异分选。IL-2R α 循环到细胞表面,而与IL-2:IL-2R β γ 复合物相关的IL-2则被送至溶酶体并降解。当以静脉(i.v.)推注方式施用,IL-2具有快速的全身清除(初始清除相,半衰期为12.9分钟,随后是缓慢清除相,半衰期85分钟)(Konrad等,Cancer Res.50:2009-2017,1990)。

[0354] 在癌症患者中全身施用IL-2的结局远非理想。尽管15%至20%的患者对大剂量IL-2产生客观缓解,但是大多数患者没有应答,且很多患者遭受严重的、危及生命的副作用,包括恶心、意识模糊、低血压和败血性休克。与大剂量IL-2治疗相关的严重毒性在很大程度上归因于自然杀伤(NK)细胞的活性。NK细胞表达中间亲和力受体IL-2R β γ ,因此其在大剂量IL-2治疗期间实际上导致患者血清中产生纳摩尔浓度IL-2时受到刺激。已经尝试通过降低剂量和调整给药方案来降低血清浓度,从而选择性地刺激携带IL-2R β γ 的细胞,尽管毒性较低,但这种治疗的效果也较差。考虑到与高剂量IL-2癌症治疗相关的毒性问题,很多研究小组试图通过同时施用治疗性抗体来改善IL-2的抗癌有效性。然而,这种努力在很大程度上是不成功的,与单独的IL-2疗法相比,其没有产生额外的临床获益或临床获益有限。因此,需要新的IL-2疗法来更有效地对抗各种癌症。

[0355] 在一些实施方式中,IL-2与胶原蛋白结合结构域的连接将细胞因子定位于细胞,从而防止其全身毒性。此外,在一些实施方式中,当直接施用于肿瘤或病变时,胶原蛋白结

合结构域将细胞因子定位于肿瘤或病变微环境,从而防止与IL-2治疗相关的全身毒性。

[0356] 在一些实施方式中,IL-2是人重组IL-2,如**Proleukin®**(阿地白介素)。

Proleukin®是一种在E.coli中生产的人重组白介素-2产品。**Proleukin®**在以下方面不同于天然白介素-2:a)其没有被糖基化;b)其不具有N末端丙氨酸;和c)其在氨基酸位置125处的丝氨酸被半胱氨酸置换。**Proleukin®**以具有生物活性的非共价键合微聚集体形式存在,其平均尺寸为27个重组白介素-2分子。**Proleukin®**(阿地白介素)通过静脉输注施用。在一些实施方式中,IL-2是野生型IL-2(例如其前体形式的人IL-2或成熟IL-2)。在一些实施方式中,IL-2包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列。

[0357] 在某些实施方式中,对IL-2进行突变,以使得其与未修饰的IL-2相比具有改变的对IL-2R α 受体的亲和力(例如更高的亲和力)。可以将位点定向诱变用于分离IL-2突变体,所述IL-2突变体与野生型IL-2相比显示出对CD25(即,IL-2R α)以更高的结合亲和力结合。在细胞表面增加IL-2对IL-2R α 的亲和力将在有限的IL-2浓度范围内增加受体占据率,并提高细胞表面IL-2的局部浓度。

[0358] 在一些实施方式中,本公开内容涉及IL-2突变体,其可以但不一定是基本上纯化的,并且可以充当高亲和力的CD25结合物。IL-2一种是诱导抗原激活的T细胞增殖和刺激NK细胞的T细胞生长因子。作为高亲和力结合物的示例性IL-2突变体包括在W02013/177187A2中描述的那些(其全部内容通过引用并入本文)。在US7,569,215中公开了对CD25具有增加的亲和力的其他示例性IL-2突变体,其内容通过引用并入本文。

[0359] 在一些实施方式中,本公开内容涉及相对于野生型IL-2具有对CD25降低的结合亲和力的IL-2突变体。在一些实施方式中,IL-2突变体不与CD25结合。

[0360] 在一些实施方式中,IL-2突变体包含与结合CD25的SEQ ID NO:1具有至少80%同一性的氨基酸序列。例如,在一些实施方式中,IL-2突变体具有至少一个突变(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个氨基酸残基的缺失、添加或置换),其与野生型IL-2相比对IL-2受体的 α 亚基具有增加的亲和力。应当理解的是,在小鼠IL-2中鉴定出的突变可以在全长人IL-2(核酸序列(登录号:NM000586);氨基酸序列(登录号:P60568))或不具有信号肽的人IL-2的相应残基制备。因此,在一些实施方式中,IL-2是人IL-2。在其他实施方式中,IL-2是突变人IL-2。

[0361] 在一些实施方式中,IL-2突变体在氨基酸序列上与野生型IL-2(以其前体形式,或者,优选地,成熟形式)至少或约50%、至少或约65%、至少或约70%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约87%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约97%、至少或约98%或者至少或约99%相同。突变可以由氨基酸残基数量或含量方面的改变组成。例如,与野生型IL-2相比,IL-2突变体可以具有更多或更少的氨基酸残基数量。或者,或此外,IL-2突变体可以含有在野生型IL-2中存在的一个或多个氨基酸残基的置换。

[0362] 举例来说,包含与SEQ ID NO:1的参照氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列的多肽是一种多肽,其包含除了在SEQ ID NO:1的参照序列中引入最多5个改变以外与参照序列相同的序列。例如,在参照序列中至多5%的氨基酸残基可以被缺失或被另一种氨基酸置换,或者可以将参照序列中不超过氨基酸残基总数5%的多个氨基酸插入参照序列中。参照序列中的这些改变可以出现在参照氨基酸序列的氨基(N-)或羧基(C-)末端位置或者这些

末端位置之间的任何位置,既可以散布在参照序列的残基中,也可以散布在参照序列内一个或多个连续基团中。

[0363] 置换的一个或多个氨基酸残基可以是但不一定是保守性置换,其通常包括下述组内的置换:甘氨酸,丙氨酸;缬氨酸,异亮氨酸,亮氨酸;天冬氨酸,谷氨酸;天冬酰胺,谷氨酰胺;丝氨酸,苏氨酸;赖氨酸,精氨酸;和苯丙氨酸,酪氨酸。这些突变可以发生在与IL-2R α 接触的氨基酸残基上。

[0364] 白介素-12 (IL-12)

[0365] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含通过接头与胶原蛋白结合结构域可操作地连接的IL-12多肽。白介素-12 (IL-12) 是一种促炎性细胞因子,其在先天性和适应性免疫中起重要作用。Gately, MK等, *Annu Rev Immunol*. 16:495-521 (1998)。IL-12主要起70kDa异二聚体蛋白的作用,该蛋白由两个二硫键连接的p35和p40亚基组成。IL-12p40亚基的前体形式 (NM_002187; P29460; 也称为IL-12B, 自然杀伤细胞刺激因子2, 细胞毒性淋巴细胞突变因子2) 长度为328个氨基酸,而其成熟形式的长度为306个氨基酸。IL-12p35亚基的前体形式 (NM_000882; P29459; 也称为IL-12A, 自然杀伤细胞刺激因子1, 细胞毒性淋巴细胞成熟因子1) 的长度为219个氨基酸,成熟形式的长度是197个氨基酸。IL-12p35和p40亚基的基因位于不同染色体上,并且彼此独立地受到调控。Gately, MK等, *Annu Rev Immunol*. 16:495-521 (1998)。很多不同免疫细胞 (例如树突状细胞、巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞和B细胞) 在受到抗原刺激后会产生IL-12。活性IL-12异二聚体是在蛋白合成后形成的。

[0366] 由于其具有激活NK细胞和细胞毒性T细胞的能力,自1994年以来就一直在研究IL-12蛋白作为一种有前途的抗癌治疗剂。参见Nastala, C.L.等, *J Immunol* 153:1697-1706 (1994)。尽管有很高的期望,但早期的临床研究并未取得令人满意的结果。Lasek W.等, *Cancer Immunol Immunother* 63:419-435, 424 (2014)。在大多数患者中,重复施用IL-12会导致适应性应答,并导致血液中IL-12诱导的干扰素 γ (IFN γ) 水平逐渐下降。此外,尽管已经认识到IL-2诱导的抗癌活性主要由IFN γ 的继发分泌介导,但由IL-12对IFN γ 以及其他细胞因子 (例如TNF- α) 或趋化因子 (IP-10或MIG) 的伴随诱导导致严重毒性。

[0367] 除了负反馈和毒性以外,IL-12治疗在临床环境中的边际效应可能是由人体强烈的免疫抑制环境引起的。为了最大程度降低IFN γ 的毒性并提高IL-12的有效性,科学家们尝试了不同方法,如针对IL-12疗法的不同剂量和时间方案。参见, Sacco, S.等, *Blood* 90:4473-4479 (1997); Leonard, J.P.等, *Blood* 90:2541-2548 (1997); Coughlin, C.M.等, *Cancer Res.* 57:2460-2467 (1997); Asselin-Paturel, C.等, *Cancer* 91:113-122 (2001); 和 Saudemont, A.等, *Leukemia* 16:1637-1644 (2002)。尽管如此,这些方法并未显著影响患者的存活。Kang, W.K.等, *Human Gene Therapy* 12:671-684 (2001)。

[0368] 使用逆转录病毒和腺病毒载体在肿瘤细胞中表达,已经研究了膜锚定形式的IL-12作为减少与全身性给药相关的毒性的手段。参见Pan, W-Y.等, *Mol. Ther.* 20 (5):927-937 (2012)。但是,使用病毒载体存在潜在的健康风险,因为潜在的病毒可以充当致癌基因,并且病毒载体可能具有免疫原性。

[0369] 因此,在一些实施方式中,本文公开的免疫调节融合蛋白包含与胶原蛋白结合结构域可操作地连接的IL-12多肽。在一些实施方式中,IL-12多肽与胶原蛋白结合结构域的连接将细胞因子定位于细胞,因此防止了全身毒性。此外,在一些实施方式中,当直接施用

于肿瘤或病变时,胶原蛋白结合结构域将细胞因子定位于肿瘤或病变微环境,从而防止了全身毒性。

[0370] 在一些实施方式中,IL-12多肽包含IL-12A(例如SEQ ID NO:3)。在一些实施方式中,IL-12多肽包含IL-12B(例如SEQ ID NO:2)。在一些实施方式中,IL-12多肽包含IL-12A和IL-12B。

[0371] 在一些实施方式中,IL-12B位于IL-12多肽中IL-12A的N末端。在一些实施方式中,IL-12A位于IL-12多肽中IL-12B的N末端。短语“位于……的N末端”表示相对于多肽的N末端,相对于多肽中的其他序列而言在多肽中的位置。例如,IL-12B在IL-12A的“N末端”指IL-12B比IL-12A更靠近IL-12多肽的N末端。

[0372] 在一些实施方式中,IL-12多肽包含含有IL-12B和IL-12A的单一多肽链,其彼此之间直接融合或通过接头(在本文中称为“亚基接头”)彼此连接。在本文的其他地方公开了接头的非限制性实例。

[0373] 在一些实施方式中,本公开内容的IL-12多肽包含的IL-12A和/或IL-12B与野生型IL-12A或IL-12B序列相比是变体、是功能性片段或者包含置换、插入和/或添加、缺失和/或共价修饰。在一些实施方式中,位于IL-12多肽羧基、氨基末端或内部区域的氨基酸残基被缺失,从而提供了片段。

[0374] 在一些实施方式中,IL-12多肽包含IL-12A和/或IL-12B氨基酸序列的置换变体,其可以包含一个、两个、三个或者三个以上置换。在一些实施方式中,置换的变体可以包含一个或多个保守性氨基酸置换。在其他实施方式中,变体是插入变体。在其他实施方式中,变体是缺失变体。

[0375] 如本领域技术人员所知晓的,IL-12蛋白片段、功能性蛋白结构域、变体和同源蛋白(直系同源物)也被认为在本公开内容的IL-12多肽的范围内。适于在本文公开的免疫调节融合蛋白中使用的IL-12多肽的非限制性实例如SEQ ID NO:2-3中所示。

[0376] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含IL-12多肽,其包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含IL-12多肽,其包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含IL-12多肽,其包含SEQ ID NO:2和3中所示的氨基酸序列。

[0377] 白介素-15 (IL-15)

[0378] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含任选地通过接头与胶原蛋白结合结构域可操作地连接的IL-15多肽。IL-15是4 α -螺旋束细胞因子家族的成员,在有效免疫应答的发展中起重要作用。Waldmann, T.A., *Cancer Immunol. Res.* 3:219-227 (2015)。IL-15对于NK细胞的正常发育和记忆CD8⁺T细胞的长期维持至关重要。IL-15基因编码具有48个氨基酸的信号肽的162个氨基酸的前蛋白,其成熟蛋白的长度为114个氨基酸。Bamford, R.N. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2897-2902 (1996)。亦参见,例如,GenBank登录号NM_000585(智人IL-15转录物变体3mRNA序列)和NP_000576(相应的IL15亚型1前蛋白)。

[0379] IL-15与白介素-2 (IL-2) 具有某些结构相似性。与IL-2一样,IL-15通过IL-2受体 β 链(CD122)和共用 γ 链(CD132)发出信号。但是,与IL-2不同的是,IL-15自身不能有效结合CD122和CD132。IL-15必须首先结合IL-15 α 受体亚基(IL-15R α)。IL-15R α 基因编码具有30个氨基酸的信号肽的267个氨基酸的前蛋白,其成熟蛋白的长度为237个氨基酸。参见,例如,

GenBank登录号NM_002189(智人IL-15R α 转录物变体1mRNA)和NP_002180(智人IL-15R α 亚型1前体氨基酸序列)。

[0380] 人IL-15R α 主要是跨膜蛋白,可与诸如激活的树突状细胞和单核细胞的细胞表面上的IL-15结合。Waldmann,T.A.,Cancer Immunol.Res.3:219-227(2015)。然后,IL-15/IL-15R α 的膜结合复合物将IL-15亚基反式呈递至CD122和CD132亚基。因此,IL-15R α 是IL-15活性的重要组成部分。

[0381] 为了克服全身注射的IL-15半衰期短的问题,已证明将IL-15与可溶性重组IL-15R α 的预复合可导致IL-15超激动剂(IL-15SA)增强IL-15的全身效力约50倍,并且还将全身注射之后血清中细胞因子的半衰期延长至约20hr(Stoklasek等,J Immunol 177(9):6072,2006;Dubois等,J Immunol 180(4):2099,2008;Rubinstein et.al.Proc Natl Acad Sci U S A 103(24):9166,2006)。

[0382] 因此,在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白的免疫调节结构域是IL-15多肽。在一些实施方式中,IL-15多肽包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,IL-15多肽包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,IL-15多肽是IL-15超激动剂,包含IL-15和IL-15R α 。在一些实施方式中,IL-15超激动剂包含SEQ ID NO:4和5中所示的氨基酸序列。

[0383] B. 干扰素

[0384] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是干扰素(IFN)。干扰素包含一类分泌蛋白,所述蛋白是通过刺激toll样受体(TLR)来响应特定细胞外刺激而诱导的。在一些实施方式中,干扰素可真强免疫系统的抗病毒防御能力(例如抗原呈递)。通过高亲和力细胞表面受体,IFN使用信号传导分子刺激基因。适于作为免疫调节融合蛋白的免疫调节结构域使用的干扰素包括但不限于:IFN γ 和IFN α 。

[0385] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含与胶原蛋白结合结构域可操作地连接的IFN γ 多肽。IFN γ 由多种免疫细胞产生,如激活的T细胞和NK细胞。IFN γ 在细胞表面上与特定受体相互作用并激活产生免疫调节作用的信号传导途径。因此,在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是IFN γ 多肽。在一些实施方式中,IFN γ 多肽包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列。

[0386] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含与胶原蛋白结合结构域可操作地连接的IFN α 多肽。IFN α 由B淋巴细胞、无表面标记淋巴细胞和巨噬细胞产生,并激活NK细胞,同时具有抗病毒和抗肿瘤活性。因此,在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是IFN α 多肽。在一些实施方式中,IFN α 多肽包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

[0387] C. 免疫细胞分化刺激因子

[0388] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是免疫细胞分化刺激因子。在一些实施方式中,免疫细胞分化刺激因子激活细胞内信号传导途径,从而驱动造血祖细胞分化、发育和增殖为免疫细胞的特定亚型。适于在本文公开的免疫调节融合蛋白中使用的免疫细胞分化刺激因子包括但不限于:GM-CSF(粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)、G-CSF(粒细胞集落刺激因子)和FLT3L(FMS样酪氨酸激酶3配体)。

[0389] 在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是GM-CSF多肽。GM-CSF是一种由巨噬细胞、T细胞、肥大细胞、NK细胞、内皮细胞和成纤维细胞分泌的单体糖蛋白。除了具有在造血

祖细胞中刺激生长和分化的功能以外,GM-CSF在表达GM-CSF受体的免疫细胞上具有多种作用。在一些实施方式中,GM-CSF多肽包含在SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列。

[0390] 在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是FLT3L多肽。FLT3是一种受体酪氨酸激酶(RTK),其由不成熟的造血前体细胞表达。FLT3L是一种跨膜蛋白或可溶性蛋白,由大量细胞表达,包括骨髓中的造血细胞和基质细胞。与其他生长因子组合,FLT3L刺激各种细胞类型的增殖和发育,包括髓系和淋巴样前体细胞、树突状细胞和NK细胞。在一些实施方式中,FLT3L多肽包含SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列。

[0391] 在一些实施方式中,免疫调节结构域是G-CSF多肽。在一些实施方式中,G-CSF调节中性粒细胞的增殖、分化 and 功能性激活。在一些实施方式中,G-CSF多肽包含SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列。

[0392] D.趋化因子

[0393] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是趋化因子。在一些实施方式中,趋化因子是诱导反应性细胞(例如白细胞)的定向趋化性的蛋白。在通常情况下,将趋化因子分成四个亚家族:CXC、CC、(X)C和CX3C。在CXC趋化因子中,一个氨基酸分隔了前两个半胱氨酸(“CXC基序”)。ELR+CXC趋化因子是CXCR1和/或CXCR2趋化因子受体的配体,CXCR1和/或CXCR2趋化因子受体是G蛋白偶联的七个跨膜结构域型受体,其特异性结合ELR+CXC趋化因子。七个人ELR+CXC趋化因子是人Gro α (也称为CXCL1)、人Gro- β (也称为CXCL2)、人Gro γ (也称为CXCL3)、人ENA-78(也称为CXCL5)、人GCP-2(也称为CXCL6)、人NAP-2(也称为CXCL7)和人IL-8(也称为CXCL8)。所有ELR+CXC趋化因子均结合CXCR2受体;此外,一些ELR+CXC趋化因子结合CXCR1和CXCR2受体(即,CXCL6和CXCL8)两者,所有这些均有助于激活途径中的冗余。五个小鼠ELR+CXC趋化因子是角化细胞趋化因子(KC)(也称为CXCL1)、巨噬细胞炎性蛋白2(MIP-2)(也称为CXCL2)、树突状细胞炎性蛋白1(DCIP-1)(也称为CXCL3)、脂多糖诱导CXC趋化因子(LIX)(也称为CXCL5)和中性粒细胞激活肽2(NAP-2)(也称为CXCL7)。

[0394] 适于在本文公开的免疫调节融合蛋白中使用的趋化因子包括但不限于:LIF、M-CSF、MIP-2、MIP-1 β 、KP(CXCL1)、MIG(CXCL9)、IP-10(CXCL10)、MCP-1、嗜酸性粒细胞趋化因子、RANTES、LIX和MIP-1 α 。

[0395] 编码适于作为本文公开的免疫调节融合蛋白的免疫调节结构域使用的示例性趋化因子的氨基酸序列如下所示:

[0396]

趋化因子	氨基酸序列 (SEQ ID NO)
LIF	30
M-CSF	31

[0397]

MIP-2	32
MIP-1 β	33
KP (CXCL1)	34
MIG (CXCL9)	35
IP-10 (CXCL10)	36
MCP-1	37
嗜酸性粒细胞趋化因子	38
RANTES	39
LIX	40
MIP-1 α	41

[0398] E. 肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族

[0399] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族成员的细胞外域。肿瘤坏死因子配体和受体的超家族是一系列结构同源的细胞表面蛋白,其通过形成配体-受体复合物的三聚体簇发出信号。激活的TNF超家族受体的连接能够导致广泛的促免疫应答,包括增殖、增强效应子功能以及产生趋化因子和细胞因子。一些配体(如Fas)可以导致诱导凋亡,以及在免疫细胞表面上表达。此外,其他配体起抑制性受体的作用,其削弱免疫应答。在一些实施方式中,细胞外域来源于:TNF α 、LIGHT、LT α 、LT- β 、BTLA、CD160、CD40L、FasL、CD30L、4-1BBL、CD27L、OX40L、TWEAK、APRIL、BAFF、RANKL、TRAIL、EDA1、EDA2或GITRL。细胞外域能够结合选择的TNF超家族成员的受体,从而诱导或刺激免疫应答。

[0400] 下表显示了对应于衍生的细胞外结构域的受体:

[0401]

配体	受体	配体细胞外域的氨基酸序列 (SEQ ID NO)
TNF α	TNFR1, TNFR2	51
LIGHT	HEVM, LT- β R	52
LT α	TNFR1, TNFR2, HEVM	53
LT- β	LT-BR	54
CD160	HVEM	56

[0402]	CD40L	CD40	57
	FasL	Fas	58
	CD30L	CD30	59
	4-1BBL	4-1BB	60
	CD27L	CD27	61
	OX40L	OX40	62
	TWEAK	Fn14	63
	APRIL	BCMA, TACI	64
	BAFF	BCMA, TACI, BAFFR	65
	RANKL	RANK, OPG	66
	TRAIL	OPG, TRAIL R1 (DR4), TRAIL R2 (DR5), DcR1, DcR2	67
	EDA1	EDAR	68
	EDA2	XEDAR	69
	GITRL	GITR	70

[0403] F. CD28家族

[0404] 在一些实施方式中,适于本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是CD28家族成员的细胞外域。CD28家族是与B7配体家族成员结合的抑制性 (PD1, CTLA-4) 和激活 (CD28, ICOS) 受体家族。CD28是一种共刺激受体,其提供激活幼稚T细胞 (连同TCR的连接) 所需的第二信号,并且具有两个天然配体CD80和CD86。CD28信号传导可用于增加增殖、效应子功能和抗凋亡信号传导。最近显示,在有效的PD1/PDL1阻断中需要CD28信号传导。ICOS (诱导性T细胞共刺激物) 是一种密切相关的表面受体,其在激活的T细胞上表达并与CD28显示相似的功能。

[0405] 因此,在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是CD80 (B7-1) 的细胞外域。在一些实施方式中,所述免疫调节结构域包含SEQ ID NO:71中所示的氨基酸序列。

[0406] 因此,在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是能够结合CD28的CD86 (B7-2) 的细胞外域。在一些实施方式中,所述免疫调节结构域包含SEQ ID NO:72中所示的氨基酸序列。

[0407] 因此,在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是ICOSLG的细胞外域。在一些实施方式中,所述免疫调节结构域包含SEQ ID NO:73中所示的氨基酸序列。

[0408] G. 激动性抗体

[0409] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是激动性抗体或其抗原结合片段。与阻断其靶点功能的拮抗性抗体相反,激动性抗体激活其目标靶点。在一些实施方式中,激动性抗体或其抗原结合片段与免疫激活受体结合。在一些实施方式中,免疫激活受体包括但不限于:肿瘤坏死因子 (TNF) 受体、CD28家族成员、T细胞受体 (TCR)、杀伤细胞Ig样受体 (KIR)、白细胞Ig样受体 (LIR)、CD94/NKG2受体、Fc受体、信号传导淋巴细胞激活分子 (SLAM) 和激活Siglec受体。

[0410] 肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族

[0411] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结

构域是与肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族成员受体结合的激动性抗体或其抗原结合片段。TNF超家族如上文所述。例如, 在一些实施方式中, 所述免疫调节结构域是与TNFR1结合的激动性抗体或其抗原结合片段, 从而激活所述受体。

[0412] 下表提供了可以产生激动性抗体或其抗原结合片段以靶向的适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的TNF超家族成员受体的列表:

配体	受体	受体 Uniprot KB
TNF α	TNFR1	P19438
	TNFR2	P20333
LIGHT	HEVM	Q92956
	LT- β R	Q06643
LT α	TNFR1	P19438
	TNFR2	P20333
	HEVM	Q92956
LT- β	LT-BR	Q06643
CD160	HVEM	Q92956
CD40L	CD40	P25942
FasL	Fas	P25445
CD30L	CD30	P28908
4-1BBL	4-1BB	Q07011
CD27L	CD27	P26842
OX40L	OX40	P43489
TWEAK	Fn14	Q9NP84
APRIL	BCMA	Q02223
	TACI	O14836
BAFF	BCMA	Q02223
	TACI	O14836
	BAFFR	Q96RJ3
RANKL	RANK	Q9Y6Q6
	OPG	O00300
TRAIL	OPG	O00300
	TRAIL R1 (DR4)	O00220
	TRAIL R2 (DR5)	O14763
	DcR1	O14798
	DcR2	Q9UBN6
EDA1	EDAR	Q9UNE0
EDA2	XEDAR	Q9HAV5
GITRL	GITR	Q9Y5U5

[0415] 在一些实施方式中, 所述免疫调节结构域是抗4-1BB激动剂抗体。在一些实施方式中, 所述免疫调节结构域是抗OX40激动剂抗体。在一些实施方式中, 所述免疫调节结构域是CD40激动剂抗体。

[0416] CD28受体超家族

[0417] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是与CD28超家族受体结合的激动性抗体或其抗原结合片段。CD28超家族如上文所述。例如,在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是与CD28结合的激动性抗体或抗原结合片段,从而激活所述受体。

[0418] 下表提供了可以产生激动性抗体或其抗原结合片段以靶向的适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的CD28超家族成员受体的列表:

配体	受体	受体Uniprot KB
CD80 (B7-1)	CD28	P10747
CD86 (B7-2)	CD28	P10747
ICOSLG	ICOS	Q9Y6W8

[0420] T细胞受体 (TCR) 复合物

[0421] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是与T细胞受体 (TCR) 复合物结合的激动性抗体或其抗原结合片段。T细胞受体 (TCR) 是负责赋予T细胞抗原特异性的细胞表面受体。每个TCR对I类MHC (对于CD8+T细胞) 或II类MHC (对于CD4+T细胞) 呈递的特定肽具有特异性。对于幼稚T细胞,TCR的连接提供了激活T细胞所需的两个信号的第一个。CD8+T细胞的TCR连接导致通过释放可溶性因子 (如穿孔素和颗粒酶B) 以及上调凋亡诱导配体 (如Fas配体) 而导致展示同源pMHC的细胞 (以及潜在的旁观者细胞) 死亡。对于CD4+辅助T细胞,TCR与其同源pMHC的连接会导致细胞因子的释放。

[0422] 因此,在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是结合至TCR的激动性抗体或其抗原结合片段。例如,在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是结合至CD3 γ 的激动性抗体或抗原结合片段,从而激活所述受体。

[0423] 下表提供了可以产生激动性抗体或其抗原结合片段以靶向的适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的TCR复合物成员的列表:

TCR结合物	TCR复合物成员	成员Uniprot KB
pMHC	CD3 γ	P09693
pMHC	CD3 δ	P04234
pMHC	CD3 ζ	P20963
pMHC	CD3 ϵ	P07766

[0425] 杀伤细胞Ig样受体 (KIR)

[0426] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是结合至杀伤细胞Ig样受体 (KIR) 的激动性抗体或其抗原结合片段。杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR) 是主要在NK细胞上和在某些T细胞的一些子集上表达的一类受体。通过结合I类MHC (HLA-A、HLA-B和HLA-C) 分子,这些受体主要通过识别自身 (并因此具有抑制性功能) 来负责。这些受体可以是激活的或抑制性的,其取决于胞质尾的长度。抑制性受体具有更长的尾部,并包含ITIM结构域。激活的KIR具有更短的胞质结构域,并与DAP12结合以介导信号传导。

[0427] 下表提供了可以产生激动性抗体或其抗原结合片段以靶向的适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的激活的KIR:

[0428]	配体	受体	受体Uniprot KB
	HLA分子	KIR 2DS1	Q14954
	HLA分子	KIR 2DS2	P43631
	HLA分子	KIR 2DS3	Q14952
	HLA分子	KIR 2DS4	P43632
	HLA分子	KIR 2DS5	Q14953
	HLA分子	KIR 3DS1	Q14943

[0429] 白细胞Ig样受体 (LIR)

[0430] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是结合至白细胞Ig样受体 (LIR) 的激动性抗体或其抗原结合片段。LIR受体是主要在先天性免疫细胞上表达的一类免疫受体。其主要配体是I类MHC分子,尽管其中一些具有激动活性,但其在很大程度上表现出抑制性功能。例如,LIRA2充当已被微生物蛋白酶切割的免疫球蛋白片段的先天性传感器。

[0431] 在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是结合至LIRA2的激动性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,可以基于Uniprot ID Q8N149产生能够结合至LIRA2的抗体。

[0432] CD94/NKG2受体家族

[0433] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是结合至CD94/NKG2受体的激动性抗体或其抗原结合片段。CD94/NKG2是在NK细胞和CD8 T细胞一些子集的表面上表达的异二聚体C型凝集素受体。其与HLA-E分子(非经典I类MHC分子)结合,可以将抑制和激活信号传递至NK细胞。抑制性受体在其胞质尾中包含ITIM结构域,而激活受体与包含ITAM结构域的DAP12和DAP10结合。

[0434] 下表提供了可以产生激动性抗体或其抗原结合片段以靶向的适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的激活的CD94/NKG2受体:

[0435] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是CD94/NKG2配体的细胞外域。下表显示了对应于衍生的细胞外域的受体。

[0436]

配体	受体	受体 Uniprot KB	配体细胞外域的氨基酸序列 (SEQ ID NO)
MICA	CD94	Q13241	74
	NKG2D	P26718	
MICB	CD94	Q13241	75
	NKG2D	P26718	
ULBP1	CD94	Q13241	76
	NKG2D	P26718	
ULBP2	CD94	Q13241	77
	NKG2D	P26718	
ULBP3	CD94	Q13241	78
	NKG2D	P26718	
ULBP4	CD94	Q13241	79
	NKG2D	P26718	
ULBP5, 亚型 1	CD94	Q13241	80
	NKG2D	P26718	
ULBP5, 亚型 2	CD94	Q13241	81
	NKG2D	P26718	
ULBP6	NKG2D	P26718	82
	NKG2C	P26717	

[0437]

	NKG2E	Q07444	
	NKG2H	O43908	
	CD94	Q13241	

[0438] Fc受体

[0439] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是结合至Fc受体的激动性抗体或其抗原结合片段。Fc受体是主要是在先天性免疫细胞上表达的免疫细胞受体,其与抗体的恒定区结合并引发广泛的功能。Fc受体几乎是完全激活的 (Fc γ RIIB除外,其传递抑制性信号)。Fc受体连接可导致ADCC、吞噬作用、脱颗粒和激活信号的传递,从而增加效应子功能。

[0440] 下表提供了可以产生激动性抗体或其抗原结合片段以靶向的适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的Fc受体的列表:

[0441]

配体	受体	受体Uniprot KB
IgG	Fc γ RI	P12314
IgG	Fc γ RIIC	P31995
IgG	Fc γ RIICIA	P12318
IgG	Fc γ RIICIB	P31994
IgE	Fc ϵ RI	P30273
IgE	Fc ϵ RII	P06734
IgA	Fc α R	P24071
IgA/IgM	Fc μ R	Q8WWV6

[0442] 信号传导淋巴细胞激活分子 (SLAM)

[0443] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是结合至信号传导淋巴细胞激活分子 (SLAM) 受体的激动性抗体或其抗原结合片段。SLAM受体是一系列既充当受体又充当配体的分子。SLAM分子在相邻细胞上彼此相互作用,以发送激活或抑制信号。SLAM分子在其胞质尾包含基于免疫受体酪氨酸的Swth基序,从而使其在细胞内与激活和抑制信号传导分子结合。

[0444] 下表提供了可以产生激动性抗体或其抗原结合片段以靶向的适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的SLAM受体的列表:

[0445] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是SLAM配体的细胞外域。下表显示了对应于衍生的细胞外域的受体。

[0446]	配体	受体	受体 Uniprot KB	配体细胞外域的氨基酸序列 (SEQ ID NO)
	SLAMF1	SLAMF1	Q13291	83
	SLAMF2	SLAMF2	P09326	84
	SLAMF3	SLAMF3	Q9HBG7	85
	SLAMF4	SLAMF4	Q9BZW8	86
	SLAMF5	SLAMF5	Q9UIB8	87
	SLAMF6	SLAMF6	Q96DU3	88
	SLAMF7	SLAMF7	Q9NQ25	89

[0447] Siglec家族受体

[0448] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是结合至Siglec家族受体的激动性抗体或其抗原结合片段。Siglecs是主要存在于免疫细胞上的表面受体家族,其是凝集素家族(糖结合蛋白)的一部分。这些受体结合至含有唾液酸的配体。这些受体主要用作多种免疫细胞类型的抑制性受体,但一些(siglec 14、15和16)含有ITAM激活结构域。

[0449] 下表提供了可以产生激动性抗体或其抗原结合片段以靶向的适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的激活的Siglec受体:

[0450]	受体	受体Uniprot KB
	Siglec 14	Q08ET2
	Siglec 15	Q6ZMC9
	Siglec 16	A6NMB1

[0451] H. 拮抗性抗体

[0452] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是拮抗性抗体或其抗原结合片段。拮抗性抗体阻断其靶点的功能。在一些实施方式中,拮抗性抗体或其抗原结合片段结合至免疫抑制性受体,从而使得诱导免疫应答。在一些实施方式中,拮抗性抗体或其抗原结合片段结合至免疫抑制性配体,从而使得诱导免疫应答。在一些实施方式中,免疫抑制剂受体和配体包括但不限于:CD28受体、肿瘤坏死因子(TNF)超家族受体、Siglec受体、CD94/NKG2受体、白细胞Ig样受体(LIR)、杀伤细胞Ig样受体(KIR)、Fc受体、腺苷通路分子、其他检查点抑制剂和LAIR1。

[0453] CD28分子

[0454] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域结合CD28分子的拮抗性抗体或其抗原结合片段。如上文所述,CD28家族包含激活和抑制性分子两者。因此,在一些实施方式中,拮抗所述抑制性分子导致免疫应答的诱导或刺激。

[0455] 下表提供了可以产生拮抗性抗体或其抗原结合片段以靶向的适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的CD28分子的列表:

[0456]

分子	分子Uniprot KB
PD1	Q15116
PDL1	Q9NZQ7
PDL2	Q9BQ51
CTLA-4	P16410
B7-H4	Q7Z7D3
B7-H3	Q5ZPR3

[0457] 在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是结合至PD-1的拮抗性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,所述免疫调节结构域结合至PD-L1的拮抗性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是结合至CTLA-4的拮抗性抗体或其抗原结合片段。

[0458] TNF超家族分子

[0459] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是结合TNF超家族成员的拮抗性抗体或其抗原结合片段。如上文所述,TNF超家族包含激活和抑制性分子两者。因此,在一些实施方式中,拮抗所述抑制性分子导致免疫应答的诱导或刺激。

[0460] 下表提供了可以产生拮抗性抗体或其抗原结合片段以靶向的适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的TNF超家族分子的列表:

[0461]

分子	分子Uniprot KB
TIGIT	Q495A1
BTLA	Q7Z6A9

[0462] Siglec受体

[0463] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是结合Siglec受体的拮抗性抗体或其抗原结合片段。如上文所述,Siglec家族包含激活和抑制性分子两者。因此,在一些实施方式中,拮抗所述抑制性分子导致免疫应答的诱导或刺激。

[0464] 下表提供了可以产生拮抗性抗体或其抗原结合片段以靶向的适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的Siglec受体的列表:

[0465]	受体	受体 Uniprot KB
	Siglec 1 (唾液酸粘附素)	Q9BZZ2
	Siglec 2 (CD22)	P20273
	Siglec 3 (CD33)	P20138
[0466]	Siglec 4a (MAG)	P20916
	Siglec 5	O15389
	Siglec 6	O43699
	Siglec 7	Q9Y286
	Siglec 8	Q9NYZ4
	Siglec 9	Q9Y336
	Siglec 10	Q96LC7
	Siglec 11	Q96RL6
	Siglec 12	Q96PQ1

[0467] CD94/NKG2受体

[0468] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是结合CD94/NKG2受体的拮抗性抗体或其抗原结合片段。如上文所述,CD94/NKG2家族包含激活和抑制性分子两者。因此,在一些实施方式中,拮抗所述抑制性分子导致免疫应答的诱导或刺激。

[0469] 因此,在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是结合CD94/NKG2A的拮抗性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,此类抗体是基于UniProt ID P26715产生的。

[0470] 在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是结合CD94/NKG2B的拮抗性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,此类抗体是基于UniProt ID Q13241产生的。

[0471] 白细胞Ig样受体 (LIR)

[0472] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是结合白细胞Ig样受体 (LIR) 的拮抗性抗体或其抗原结合片段。如上文所述,LIR家族包含激活和抑制性分子两者。因此,在一些实施方式中,拮抗所述抑制性分子导致免疫应答的诱导或刺激。

[0473] 下表提供了可以产生拮抗性抗体或其抗原结合片段以靶向的适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的LIR的列表。

[0474]	受体	受体Uniprot KB
	LIRB1	Q8NHL6
	LIRB2	Q8N423
	LIRB3	075022
	LIRB4	Q8NHJ6

[0475] 杀伤细胞Ig样受体 (KIR)

[0476] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是结合杀伤细胞Ig样受体 (KIR) 的拮抗性抗体或其抗原结合片段。如上文所述,KIR家

族包含激活和抑制性分子两者。因此,在一些实施方式中,拮抗所述抑制性分子导致免疫应答的诱导或刺激。

[0477] 下表提供了可以产生拮抗性抗体或其抗原结合片段以靶向的适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的KIR的列表。

受体	受体Uniprot KB
KIR 2DL1	P43626
KIR 2DL2	P43627
KIR 2DL3	P43628
KIR 2DL4	Q99706
KIR 2DL5A	Q8N109
KIR 2DL5B	Q8NHK3
KIR 3DL1	P43629
KIR 3DL2	P43630
KIR 3DL3	Q8N743

[0479] Fc受体

[0480] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是结合Fc受体的拮抗性抗体或其抗原结合片段。如上文所述,Fc受体家族包含激活和抑制性分子两者。因此,在一些实施方式中,拮抗所述抑制性分子导致免疫应答的诱导或刺激。

[0481] 在一些实施方式中,抑制剂Fc受体是Fc γ RIIB。在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是结合Fc γ RIIB的拮抗性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,此类抗体是基于UniProt ID P31994产生的。

[0482] 腺苷通路分子

[0483] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是结合腺苷通路成员的拮抗性抗体或其抗原结合片段。例如,CD39和CD73是在细胞表面上表达的催化ATP转化成腺苷的酶。细胞外ATP是引发免疫应答的危险分子,而腺苷具有免疫抑制作用。这些分子通过产生腺苷有助于局部免疫抑制环境。

[0484] 因此,在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是结合CD39的拮抗性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,此类抗体是基于UniProt ID P49961产生的。

[0485] 在一些实施方式中,所述免疫调节结构域是结合CD73的拮抗性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,此类抗体是基于UniProt ID P21589产生的。

[0486] 其他检查点抑制剂

[0487] 在一些实施方式中,适于在本公开内容的免疫调节融合蛋白中使用的免疫调节结构域是结合免疫检查点抑制剂的拮抗性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,通过拮抗此类免疫检查点抑制剂,免疫应答被诱导或被刺激。

[0488] 下表提供了可以产生拮抗性抗体或其抗原结合片段以靶向的适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的免疫检查点抑制剂的列表。

分子	分子Uniprot KB
VISTA	Q9H7M9

TIM-3	Q8TDQ0
LAG-3	P18627
CD47	Q08722
SIRP α	P78324

[0490] III. 接头

[0491] 在一些实施方式中,所述免疫调节融合蛋白包含通过接头与胶原蛋白结合蛋白可操作地连接的免疫调节结构域。在一些实施方式中,在免疫调节结构域和胶原蛋白结合蛋白之间的接头提供了空间的分离,以使得免疫调节结构域保持其活性(例如促进受体/配体接合)。在一些实施方式中,免疫调节结构域和胶原蛋白结合蛋白之间的接头具有足够的长度或质量,以减少免疫调节结构域在胶原蛋白纤维上的吸附。用于测量吸附的方法是本领域技术人员公知的。例如,可以通过椭圆偏振术(ELM)、表面等离子体共振(SPR)、光波导光模光谱(OWLS)、衰减全内反射红外光谱(ATR-IR)、圆二色谱(CD)、全内反射红外光谱(TIRF)和其他高分辨率显微镜技术测量吸附。在一些实施方式中,这些方法显示了免疫调节融合蛋白结构域之间的空间排列。

[0492] 在一些实施方式中,免疫调节结构域和胶原蛋白结合蛋白之间的接头提供足够的分子量,以减慢或减少从组织的扩散。用于测量从组织扩散的方法是本领域技术人员公知的。例如,可以通过随着时间的推移的体内成像或通过组织切片显微镜来测量扩散。至少在Schmidt&Wittrup,Mol Canc Ther.2009'和Wittrup等,Methods in Enzymol 2012中描述了示例性方法,其每一个的全部内容通过引用并入本文。

[0493] 在一些实施方式中,接头是长度包含“N”个氨基酸的亲水性多肽,其中N=1-1000、50-800、100-600或200-500。

[0494] A. 血清白蛋白

[0495] 在一些实施方式中,接头是血清白蛋白或其片段。在例如US2010/0144599、US2007/0048282和US2011/0020345中公开了将血清白蛋白融合至蛋白的方法,其全部内容通过引用并入本文。在一些实施方式中,接头是人血清白蛋白(HSA)或者其变体或片段,如在US 5,876,969、WO 2011/124718、WO 2013/075066和WO 2011/0514789中公开的那些。

[0496] 用于免疫调节融合蛋白的适宜白蛋白可以来自人、灵长类、啮齿类、牛、马、驴、家兔、山羊、绵羊、犬、鸡或猪。在一些实施方式中,白蛋白是血清白蛋白,例如,人血清白蛋白(SEQ ID NO:42)、灵长类血清白蛋白(例如黑猩猩血清白蛋白、大猩猩血清白蛋白)、啮齿类血清白蛋白(例如仓鼠血清白蛋白、豚鼠血清白蛋白、小鼠血清白蛋白和大鼠血清白蛋白)、牛血清白蛋白、马血清白蛋白、驴血清白蛋白、家兔血清白蛋白、山羊血清白蛋白、绵羊血清白蛋白、犬血清白蛋白、鸡血清白蛋白和猪血清白蛋白。

[0497] 在一些实施方式中,白蛋白或者其变体或片段与SEQ ID NO:42中所示的野生型HAS的序列具有至少50%、如至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0498] 在一些实施方式中,与相应野生型白蛋白(例如HSA)相比,在白蛋白变体中改变(例如置换、插入或缺失)的数量是1-20个,例如1-10个和1-5个,如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个改变。

[0499] 在一些实施方式中,白蛋白片段或者其变体的片段适于在免疫调节融合蛋白中使用。在WO 2011/124718中公开了示例性白蛋白片段。在一些实施方式中,白蛋白片段(例如HAS片段)的长度为至少20个氨基酸,如长度至少40个氨基酸、至少60个氨基酸、至少80个氨基酸、至少100个氨基酸、至少150个氨基酸、至少200个氨基酸、至少300个氨基酸、至少400个氨基酸或者至少500个氨基酸。

[0500] 在一些实施方式中,白蛋白片段可以包含至少一个白蛋白的完整子结构域。已将HAS的结构域表达为重组蛋白(Dockal等,JBC 1999;274:9303-10),其中将HAS(SEQ ID NO:42)的结构域I定义为由氨基酸1-197组成(SEQ ID NO:116),将结构域II定义为由氨基酸189-385组成(SEQ ID NO:117),以及将结构域III定义为由氨基酸381-585组成(SEQ ID NO:118)。结构域的部分重叠出现给定扩展的 α -螺旋结构(h10-h1),其存在于结构域I和II之间,以及结构域II和III之间(Peters,1996,op.cit,表2-4)。HAS还包含六个子结构域(子结构域IA、IB、NA、NB、INA和NIB)。子结构域IA包含SEQ ID NO:42的氨基酸6-105,子结构域IB包含SEQ ID NO:42的氨基酸120-177,子结构域NA包含SEQ ID NO:42的氨基酸200-291,子结构域NB包含SEQ ID NO:42的氨基酸316-369,子结构域INA包含SEQ ID NO:42的氨基酸392-491和子结构域NIB包含SEQ ID NO:42的氨基酸512-583。

[0501] 在一些实施方式中,片段包含上文所定义的一个或多个结构域或子结构域的全部或部分,或者那些结构域和/或子结构域的任何组合。在一些实施方式中,白蛋白片段包含白蛋白或白蛋白结构域,或者其变体或片段的至少50、60、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%。

[0502] B.Fc结构域

[0503] 在一些实施方式中,适于在本文公开的免疫调节融合蛋白中使用的接头是Fc结构域。在一些实施方式中,Fc结构域是上文所述的激动剂或拮抗剂抗体的组分,因此不需要单独的Fc结构域。

[0504] 在某些实施方式中,Fc结构域包含SEQ ID NO:115中所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,Fc结构域不包含结合至抗原的可变区。在一些实施方式中,Fc结构域包含结合至抗原的可变区。适于本文公开的免疫调节融合蛋白的Fc结构域可以从多种不同来源获得。在某些实施方式中,Fc结构域来自人免疫球蛋白。在某些实施方式中,Fc结构域来自人IgG1恒定区。人IgG1的Fc结构域如SEQ ID NO:115中所示。然而,应当理解的是,Fc结构域可以来自另一哺乳动物物种的免疫球蛋白,包括例如,啮齿类(例如小鼠、大鼠、家兔、豚鼠)或非人灵长类(例如黑猩猩、猕猴)物种。而且,Fc结构域或其部分可以来自任何免疫球蛋白类型,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,以及任何免疫球蛋白同种型,包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0505] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含突变的Fc结构域。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含突变的IgG1 Fc结构域。在一些实施方式中,突变Fc结构域在铰链、CH2和/或CH3结构域包含一个或多个突变。在一些方面中,突变Fc结构域包含D265A突变。

[0506] 各种Fc结构域基因序列(例如小鼠和人恒定区基因序列)可以从公众可访问的资源获得。可以选择缺乏特定效应子功能和/或具有特定修饰的包含Fc结构域序列的恒定区结构域以降低免疫原性。已经公开了很多抗体和抗体编码基因的序列,并且可以使用本领域公知的技术从这些序列衍生出适宜的Fc结构域序列(例如铰链、CH2和/或CH3序列或其部分)。然后,可以改变或合成使用任何前述方法获得的遗传物质,以获得适于本文公开的方

法中使用的多肽。还将认识到的是,本公开内容的范围涵盖恒定区DNA序列的等位基因、变体和突变。

[0507] 可以例如使用聚合酶链反应和选择用于扩增目标结构域的引物来克隆Fc结构域序列。为了从抗体中克隆Fc结构域序列,可以从杂交瘤、脾脏或淋巴细胞中分离mRNA,逆转录进入DNA并通过PCR扩增抗体基因。在美国专利号4,683,195;4,683,202;4,800,159;4,965,188;和在,例如,“PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications”Innis等编著,Academic Press,San Diego,Calif.(1990);Ho等,1989.Gene 77:51;Horton等,1993.Methods Enzymol.217:270中详细描述了PCR扩增方法。PCR可通过共有恒定区引物或基于已公开的重链和轻链DNA和氨基酸序列的更特异的引物来引发。如上文所讨论的,还可以将PCR用于分离编码抗体轻链和重链的DNA克隆。在这种情况下,可以通过共有引物或更大的同源探针(如小鼠恒定区探针)筛选文库。适于抗体基因扩增的多种引物是本领域公知的(例如基于纯化抗体的N末端序列的5'引物(Benhar和Pastan.1994.Protein Engineering 7:1509);cDNA末端的快速扩增(Ruberti,F.等,1994.J.Immunol.Methods 173:33);抗体前导序列(Larrick等,Biochem Biophys Res Commun 1989;160:1250))。在Newman等,于1995年01月25日提交的美国专利号5,658,570中进一步描述了抗体序列的克隆,其通过引用并入本文。

[0508] 在一些实施方式中,所公开的免疫调节融合蛋白包含一个或多个Fc结构域(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个Fc结构域)。在某些实施方式中,Fc结构域可以是不同类型。在某些实施方式中,在免疫调节融合蛋白中存在的至少一个Fc结构域包含铰链结构域或其部分。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含至少一个Fc结构域,其包含至少一个CH2结构域或其部分。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含至少一个Fc结构域,其包含至少一个CH3结构域或其部分。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含至少一个Fc结构域,其包含至少一个CH4结构域或其部分。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含至少一个Fc结构域,其包含至少一个铰链结构域或其部分和至少一个CH2结构域或其部分(例如在铰链-CH2取向)。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含至少一个Fc结构域,其包含至少一个CH2结构域或其部分和至少一个CH3结构域或其部分(例如在CH2-CH3取向)。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含至少一个Fc结构域,其包含至少一个铰链结构域或其部分、至少一个CH2结构域或其部分和至少一个CH3结构域或其部分,例如,在铰链-CH2-CH3、铰链CH3-CH3或CH2-CH3铰链取向。

[0509] 在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含来源于一个或多个免疫球蛋白重链的至少一个完整Fc结构域(例如Fc结构域包含铰链、CH2、CH3结构域,但这些不需要来自相同抗体)。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含来源于一个或多个免疫球蛋白重链的至少两个完整Fc结构域。在某些实施方式中,完整Fc结构域来源于人IgG免疫球蛋白重链(例如人IgG1)。

[0510] 在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含至少一个Fc结构域,其包含完整CH3结构域。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含至少一个Fc结构域,其包含完整CH2结构域。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含至少一个Fc结构域,其包含至少一个CH3结构域,和至少一个铰链区,和CH2结构域。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含至少一个Fc结构域,其包含铰链和CH3结构域。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含至少一

个Fc结构域,其包含铰链、CH2和CH3结构域。在某些实施方式中,Fc结构域来源于人IgG免疫球蛋白重链(例如人IgG1)。

[0511] 构成免疫调节融合蛋白的Fc结构域的恒定区结构域或其片段可以来源于不同免疫球蛋白分子。例如,适于在本文公开的免疫调节融合蛋白中使用的多肽可以包含来源于IgG1分子的CH2结构域或其片段和来源于IgG3分子的CH3区或其部分。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含Fc结构域,其包含部分来源于IgG1分子和部分来源于IgG3分子的铰链结构域。如本文所述,本领域普通技术人员将理解,可以改变Fc结构域,使得其氨基酸序列与天然存在的抗体分子不同。

[0512] 在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白缺乏完整Fc结构域的一个或多个恒定区,即,其部分或完全被缺失。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白缺乏整个CH2结构域。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含CH2结构域,其缺失了来源于编码IgG1人恒定区结构域的载体(例如来自IDEC Pharmaceuticals, San Diego)的Fc区(例如W002/060955A2和W002/096948A2)。该示例性载体被工程化以缺失CH2结构域,并提供表达结构域缺失的IgG1恒定区的合成载体。应当注意的是,这些示例性构建体优选被工程化为将结合的CH3结构域直接融合至相应Fc结构域的铰链区。

[0513] 在其他构建体中,在一个或多个组成Fc结构域之间提供肽间隔区可能是理想的。例如,肽间隔区可以位于铰链区和CH2结构域之间和/或CH2和CH3结构域之间。例如,将表达相容的构建体,其中CH2结构域被缺失,其余的CH3结构域(合成的或非合成的)以1-20、1-10或1-5个氨基酸肽间隔物与铰链区连接。例如,可以添加此类肽间隔物,以确保恒定区结构域的调控元件仍游离和可接近,或者铰链区仍是柔性的。优选地,本公开内容中使用的相容的任何接头肽将是相对非免疫原性的,并且不会阻止Fc的正确折叠。

[0514] 在某些实施方式中,在免疫调节融合蛋白中使用Fc结构域被改变或修饰,例如,通过氨基酸突变(例如添加、缺失或置换)。如本文所用,术语“Fc结构域变体”指与所述Fc结构域的来源的野生型Fc相比,具有至少一个氨基酸修饰(如氨基酸置换)的Fc结构域。例如,其中所述Fc结构域来源于人IgG1抗体,其是与在人IgG1 Fc区相应位置的野生型氨基酸相比包含至少一个氨基酸突变(例如置换)的变体。

[0515] 在某些实施方式中,Fc变体包含在位于铰链结构域或其部分的氨基酸位置的置换。在某些实施方式中,Fc变体包含在位于CH2结构域或其部分的氨基酸位置的置换。在某些实施方式中,Fc变体包含在位于CH3结构域或其部分的氨基酸位置的置换。在某些实施方式中,Fc变体包含在位于CH4结构域或其部分的氨基酸位置的置换。

[0516] 在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含含有一个以上氨基酸置换的Fc变体。免疫调节融合蛋白可以在Fc结构域包含例如2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸置换。优选地,氨基酸置换在空间上彼此间隔至少1个或更多个氨基酸位置,例如,至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸位置或更多。更优选地,工程化的氨基酸在空间上彼此间隔至少5、10、15、20或25个或更多个氨基酸位置。

[0517] 在一些实施方式中,Fc结构域包含在氨基酸234-238之间区域的改变,包括在CH2结构域起始的序列LLGPP。在一些实施方式中,Fc变体改变Fc介导的效应子功能,特别是ADCC,和/或降低Fc受体的结合亲和力。在一些方面中,在诸如K322或P331的位置,接近于CH2-CH3连接的序列改变能够消除补体介导的细胞毒性和/或改变FcR结合的亲和力。在一

些实施方式中,Fc结构域在残基P238和P331引入改变,例如,将在这些位置的野生型脯氨酸改变为丝氨酸。在一些实施方式中,三个铰链半胱氨酸中一个或多个在铰链区改变以在这些残基编码CCC、SCC、SSC、SCS或SSS也可能影响FcR结合和分子同质性,例如通过消除可能使折叠蛋白不稳定的不成对的半胱氨酸。

[0518] 预期Fc结构域中的其他氨基酸突变可减少与Fc γ 受体和Fc γ 受体亚型的结合。例如,在Fc区的位置238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、279、280、283、285、298、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、312、315、322、324、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、356、360、373、376、378、379、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438或439的突变能够改变结合,如在2004年05月18日提交的美国专利号6,737,056中所述的,其全部内容通过引用并入本文。该专利报道了与未突变的IgG3相比,在IgG3中Pro331变为Ser导致亲和力降低6倍,表明Pro331参与Fc γ RI结合。此外,在1997年04月29日提交的U.S.5,624,821中将在位置234、235、236和237、297、318、320和322中的氨基酸修饰公开为可能改变受体结合亲和力,其全部内容通过引用并入本文。

[0519] 预期使用的其他突变包括例如在美国专利申请公开号2006/0235208中描述的那些,2006年10月19日公开,其全部内容通过引用并入本文。此外,预期使用在美国专利申请公开号2006/0235208中描述的突变,其全部内容通过引用并入本文。在例如美国专利申请公开号2003/0108548中描述了突变L234A/L235A,2003年06月12日公开的,其全部内容通过引用并入本文。在实施方式中,所描述的修饰可以单独或组合地包括在内。在某些实施方式中,突变是人IgG1中的D265A。

[0520] 在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含Fc变体,例如,与野生型Fc区相比,所述Fc变体包含氨基酸置换,其改变了多肽的抗原依赖性效应子功能,特别是ADCC或补体激活。当与野生型多肽比较时,此类免疫调节融合蛋白显示出与FcR γ 的结合减少,因此,介导降低的效应子功能。具有降低的FcR γ 结合亲和力的Fc变体预期降低效应子功能,并且此类分子也是有用的,例如,用于治疗不希望靶细胞破坏的疾病,例如,其中正常细胞可以表达靶细胞,或者其中长期施用多肽可能导致有害的免疫系统激活。

[0521] 在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白显示出与激活Fc γ R(例如Fc γ 1、Fc γ 11a或Fc γ RIIIa)改变的结合。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白显示出与抑制性Fc γ R(例如Fc γ RIIb)改变的结合亲和力。在国际PCT公开号W005/063815中公开了改变FcR或补体结合活性的示例性氨基酸置换,其通过引用并入本文。

[0522] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含改变融合蛋白的糖基化的氨基酸置换。例如,在一些实施方式中,Fc结构域包含导致糖基化减少(例如N-或O-连接的糖基化)的突变或包含野生型Fc结构域的糖型改变(例如低岩藻糖或无岩藻糖的聚糖)。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白在糖基化基序附近或之内具有氨基酸置换,例如,N-连接的糖基化基序,其包含氨基酸序列NXT或NXS。在W005/018572和US2007/0111281中公开了减少或改变糖基化的示例性氨基酸置换,其内容通过引用并入本文。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含至少一个具有工程化半胱氨酸残基或其类似物的Fc结构域,其位于暴露于溶剂的表面。在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含Fc结构域,其包含至少一个工程化的游离半胱氨酸残基或其类似物,其基本上不与第二个半胱氨酸残基形成二硫键。随后可以使用

本领域公知的技术(例如与硫醇反应性异双功能接头缀合)将任何上述工程化的半胱氨酸残基或其类似物缀合至功能性结构域。

[0523] 在某些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含具有两个或更多个独立地选自本文所述的Fc结构域的组成Fc结构域的遗传融合的Fc结构域。在某些实施方式中,Fc结构域是相同的。在某些实施方式中,至少两个Fc结构域是不同的。例如,Fc结构域包含相同数量的氨基酸残基,或者其的长度可以相差一个或多个氨基酸残基(例如约5个氨基酸残基(例如1、2、3、4或5个氨基酸残基)、约10个残基、约15个残基、约20个残基、约30个残基、约40个残基或约50个残基)。在某些实施方式中,Fc结构域在一个或多个氨基酸位置的序列不同。例如,至少两个Fc结构域可以在约5个氨基酸位置(例如1、2、3、4或5个氨基酸位置)、约10个位置、约15个位置、约20个位置、约30个位置、约40个位置或约50个位置不同。

[0524] C. 其他接头

[0525] 在一些实施方式中,适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的接头是聚乙二醇(PEG)结构域。PEG是众所周知的水溶性聚合物,可商购获得,或者可以根据本领域熟知的方法通过聚乙二醇的开环聚合反应制备(Sandler和Karo, *Polymer Synthesis*, Academic Press, New York, Vol. 3, 第138-161页)。术语“PEG”广泛地用于涵盖任何聚乙二醇分子,并且可以由下式表示: $X-O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH$, 其中n是20至2300, 且X是H或末端修饰,例如, C_{1-4} 烷基。在某些实施方式中,适于在本文公开的方法中使用的PEG的一个末端以羟基或甲氧基终止,即,X是H或 CH_3 (“甲氧基PEG”)。PEG可以包含结合反应所需的其他化学基团;这是由于分子的化学合成的结果;或者其是间隔物,用于分子的部分之间的最佳距离。此外,此类PEG可以由连接在一起的一个或多个PEG侧链组成。具有一个以上PEG链的PEG称为多臂或支链PEG。例如,可以通过将聚环氧乙烷加入各种多元醇(包括甘油、季戊四醇和山梨糖醇)中来制备支链PEG。例如,可以从季戊四醇和环氧乙烷制备四臂支链PEG。在例如EP-A 0 473 084和US5,932,462中描述了支链PEG,这两者均通过引用并入本文。PEG的一种形式包括通过赖氨酸的伯氨基连接的两条PEG侧链(PEG2) (Monfardini等, *Bioconjugate Chem* 1995;6:62-9)。

[0526] 在某些实施方式中,PEG在免疫调节融合蛋白的结构域(例如免疫调节结构域和胶原蛋白结合结构域)的N-或C-末端缀合至半胱氨酸部分。PEG部分也可以通过其他化学方法连接,包括与胺缀合。PEG与肽或蛋白的缀合通常涉及PEG的激活以及激活的PEG中间体直接与目标蛋白/肽或接头的偶联,随后将其激活并与目标蛋白/肽偶联(参见,Abuchowski等, *JBC* 1977;252:3571和 *JBC* 1977;252:3582, 以及Harris等,在 *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*; (J.M.Harris ed.) Plenum Press: New York, 1992; 第21和22章中)。可以选自PEG的各种分子量形式,例如,从约1,000道尔顿(Da)至100,000Da (n为20至2300)。PEG中重复单元“n”的数量近似于以道尔顿描述的分子量。

[0527] 本领域技术人员可以例如至少基于不含PEG的免疫调节融合蛋白的分子量来选择适合于PEG的分子量。

[0528] 在某些实施方式中,可以将PEG分子激活以与结构域上的氨基反应,如与赖氨酸反应(Bencham C.O.等, *Anal. Biochem.*, 131, 25 (1983); Veronese, F.M.等, *Appl. Biochem.*, 11, 141 (1985); Zalipsky, S.等, *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, adrs 9-

110ACS Symposium Series 469 (1999); Zalipsky, S. 等, Europ. Polym. J., 19, 1177-1183 (1983); Delgado, C. 等, Biotechnology and Applied Biochemistry, 12, 119-128 (1990)。

[0529] 在某些实施方式中, 可以将PEG的碳酸酯用于缀合PEG。N, N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)可用于与PEG反应以形成活性的混合PEG-琥珀酰亚胺基碳酸酯, 其随后可与接头的亲核基团或IL-2的氨基反应(参见美国专利号5,281,698和美国专利号5,932,462)。在相似类型的反应中, 可以将1,1'-(二苯并三唑基)碳酸酯和二-(2-吡啶基)碳酸酯与PEG反应以分别形成PEG-苯并三唑基和PEG-吡啶基混合碳酸酯(美国专利号5,382,657)。聚乙二醇化可以根据现有技术的方法进行, 例如通过使IL-2与亲电活性PEG反应(Shearwater Corp., USA, www.shearwatercorp.com)。适于在本文公开的方法中使用的优选PEG试剂是例如N-羟基琥珀酰亚胺基丙酸酯(PEG-SPA)、丁酸酯(PEG-SBA)、PEG-琥珀酰亚胺丙酸酯或支链N-羟基琥珀酰亚胺, 如mPEG2-NHS (Monfardini, C等, Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69)。

[0530] 在一些实施方式中, 适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的接头是转铁蛋白, 如在US 7,176,278和US 8,158,579中所公开的, 其全部内容通过引用并入本文。

[0531] 在一些实施方式中, 适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的接头是血清免疫球蛋白结合蛋白, 如在US2007/0178082中所述的那些, 其全部内容通过引用并入本文。

[0532] 在一些实施方式中, 适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的接头是球蛋白, 如甲状腺素结合球蛋白、 α_2 巨球蛋白或结合球蛋白。

[0533] 在一些实施方式中, 适于在本文所述的免疫调节融合蛋白中使用的接头是基于纤连蛋白(Fn)的支架结构域蛋白, 如在US2012/0094909中公开的那些, 其全部内容通过引用并入本文。在US2012/0094909中也公开了基于纤连蛋白的支架结构域蛋白的制备方法。基于Fn3的扩展PK基团的非限制性实例是Fn3 (HAS)。

[0534] D. 其他接头

[0535] 在一些实施方式中, 所述免疫调节结构域通过接头(例如gly-ser接头)与胶原蛋白结合结构域可操作地连接。在一些实施方式中, 所述免疫调节结构域通过接头(例如血清白蛋白)与胶原蛋白结合结构域可操作地连接, 其中通过其他接头(例如gly-ser接头)使所述接头与胶原蛋白结合结构域和免疫调节结构域连接。适于将胶原蛋白结合结构域和免疫调节结构域融合, 或者将胶原蛋白结合结构域、免疫调节结构域和接头(例如血清白蛋白)融合的接头是本领域熟知的, 并且在例如US2010/0210511、US2010/0179094和US2012/0094909中公开, 其全部内容通过引用并入本文。示例性接头包括gly-ser多肽接头、甘氨酸-脯氨酸多肽接头和脯氨酸-丙氨酸多肽接头。在某些实施方式中, 接头是gly-ser多肽接头, 即, 由甘氨酸和丝氨酸残基组成的肽。

[0536] 示例性gly-ser多肽接头包含氨基酸序列Ser (Gly₄Ser)_n。在某些实施方式中, n=1。在某些实施方式中, n=2。在某些实施方式中, n=3, 即, Ser (Gly₄Ser)₃。在某些实施方式中, n=4, 即, Ser (Gly₄Ser)₄。在某些实施方式中, n=5。在某些实施方式中, n=6。在某些实施方式中, n=7。在某些实施方式中, n=8。在某些实施方式中, n=9。在某些实施方式中, n=10。另一示例性gly-ser多肽接头包含氨基酸序列Ser (Gly₄Ser)_n。在某些实施方式中, n=1。在某些实施方式中, n=2。在某些实施方式中, n=3。在某些实施方式中, n=4。在某些实施方式中, n=5。在某些实施方式中, n=6。另一示例性gly-ser多肽接头包含 (Gly₄Ser)

n。在某些实施方式中，n=1。在某些实施方式中，n=2。在某些实施方式中，n=3。在某些实施方式中，n=4。在某些实施方式中，n=5。在某些实施方式中，n=6。另一示例性gly-ser多肽接头包含(Gly₃Ser)_n。在某些实施方式中，n=1。在某些实施方式中，n=2。在某些实施方式中，n=3。在某些实施方式中，n=4。在某些实施方式中，n=5。在某些实施方式中，n=6。

[0537] 适于在免疫调节融合蛋白中使用的其他接头是本领域公知的，例如，在US 5,525,491中公开的富含丝氨酸的接头，在Arai等，Protein Eng 2001;14:529-32中公开的形成螺旋的肽接头(例如A(EAAAK)_nA(n=2-5))，以及在Chen等，Mol Pharm 2011;8:457-65中公开的稳定接头，即，二肽接头LE、凝血酶敏感的二硫环肽接头，以及形成α螺旋的接头LEA(EAAAK)₄ALEA(EAAAK)₄ALE(SEQ ID NO:119)。

[0538] 其他示例性接头包括GS接头(即，(GS)_n)、GGSG接头(即，(GGSG)_n)、GSAT接头、SEG接头和GGS接头(即，(GGS₂GS)_n)，其中n是正整数(例如1、2、3、4或5)。可以使用公众可获得的数据库，如接头数据库(ibi.vu.nl/programs/linkerdbwww)，找到用于杂交核酸酶-白蛋白分子的其他适接头。接头数据库是多功能酶中结构域间接头的数据库，该酶充当新型融合蛋白中的潜在接头(参见，例如，George等，Protein Engineering 2002;15:871-9)。

[0539] 应当理解，这些示例性多肽接头的变体形式可以通过将一种或多种核苷酸置换、添加或缺失引入编码多肽接头的核苷酸序列中来产生，从而将一种或多种氨基酸置换、添加或缺失引入多肽接头中。可以通过标准技术引入突变，如位点定向诱变和PCR介导的诱变。

[0540] 本公开内容的多肽接头的长度是至少一个氨基酸并且其长度可以改变。在一个实施方式中，本公开内容的多肽接头的长度是从约1至约50个氨基酸。如本文所用，术语“约”表示+/-两个氨基酸残基。由于接头长度必须是正整数，因而长度为约1至约50个氨基酸，是指长度为1至48-52个氨基酸。在另一个实施方式中，本公开内容的多肽接头的长度是约10-20个氨基酸。在另一个实施方式中，本公开内容的多肽接头的长度是约15至约50个氨基酸。

[0541] 在另一个实施方式中，本公开内容的多肽接头的长度是约20至约45个氨基酸。在另一个实施方式中，本公开内容的多肽接头的长度是约15至约25个氨基酸。在另一个实施方式中，本公开内容的多肽接头的长度是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60或61个或者更多个氨基酸。

[0542] 使用本领域公知的技术可以将多肽接头引入多肽序列。可以通过DNA序列分析确证修饰。质粒DNA可用于转化宿主细胞以稳定产生所生产的多肽。

[0543] IV. 示例性免疫调节融合蛋白

[0544] 本公开内容提供了免疫调节融合蛋白，其包含免疫调节结构域和胶原蛋白结合结构域，任选地接头，其中免疫调节结构域使用或不使用接头与胶原蛋白结合结构域可操作地连接。本公开内容的免疫调节融合蛋白是模块化的，并且可以被配置为引入各种单独的结构域。

[0545] A. IL-2融合蛋白

[0546] 在一些实施方式中，免疫调节融合蛋白包含IL-2和基膜聚糖，其中IL-2与基膜聚糖可操作地连接。在一些实施方式中，使用白蛋白IL-2与基膜聚糖。在一些实施方式中，IL-2与基膜聚糖的N末端可操作地连接。在一些实施方式中，IL-2与基膜聚糖的C末端可操作地

连接。

[0547] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含与SEQ ID NO:107中所示的人基膜聚糖序列可操作地连接的SEQ ID NO:1中所示的人IL-2序列。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含使用选自SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43的人血清白蛋白序列与SEQ ID NO:107中所示的人基膜聚糖序列可操作地连接的SEQ ID NO:1中所示的人IL-2序列。

[0548] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含IL-2和LAIR-1,其中IL-2与LAIR-1可操作地连接。在一些实施方式中,使用白蛋白IL-2与LAIR-1可操作地连接。在一些实施方式中,IL-2与LAIR-1的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,IL-2与LAIR-1的C末端可操作地连接。

[0549] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含与SEQ ID NO:98中所示的人LAIR-1序列可操作地连接的SEQ ID NO:1中所示的人IL-2序列。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含使用选自SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43的人血清白蛋白序列与SEQ ID NO:98中所示的人LAIR-1序列可操作地连接的SEQ ID NO:1中所示的人IL-2序列。

[0550] B. IL-12融合蛋白

[0551] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含IL-12和基膜聚糖,其中IL-12与基膜聚糖可操作地连接。在一些实施方式中,使用白蛋白IL-12与基膜聚糖可操作地连接。在一些实施方式中,IL-12与基膜聚糖的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,IL-12与基膜聚糖可操作地连接的C末端。

[0552] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含与SEQ ID NO:107中所示的人基膜聚糖序列可操作地连接的SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所示的人IL-12序列。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含使用选自SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43的人血清白蛋白序列与SEQ ID NO:107中所示的人基膜聚糖序列可操作地连接的SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所示的人IL-12序列。

[0553] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含IL-12和LAIR-1,其中IL-12与LAIR-1可操作地连接。在一些实施方式中,使用白蛋白IL-12与LAIR-1可操作地连接。在一些实施方式中,IL-12与LAIR-1的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,IL-12与LAIR-1的C末端可操作地连接。

[0554] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含与SEQ ID NO:98中所示的人LAIR-1序列可操作地连接的SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所示的人IL-12序列。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含使用选自SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43的人血清白蛋白序列与SEQ ID NO:98中所示的人LAIR-1序列可操作地连接的SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所示的人IL-12序列。

[0555] C. CCL-3融合蛋白

[0556] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含CCL-3和基膜聚糖,其中CCL-3与基膜聚糖可操作地连接。在一些实施方式中,使用白蛋白CCL-3与基膜聚糖可操作地连接。在一些实施方式中,CCL-3与基膜聚糖的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,CCL-3与基膜聚糖可操作地连接的C末端。

[0557] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含与SEQ ID NO:107中所示的人基膜聚糖序列可操作地连接的SEQ ID NO:41中所示的人CCL-3序列。在一些实施方式中,免疫调节

融合蛋白包含使用选自SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43的人血清白蛋白序列与SEQ ID NO:107中所示的人基膜聚糖序列可操作地连接的SEQ ID NO:41中所示的人CCL-3序列。

[0558] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含CCL-3和LAIR-1,其中CCL-3与LAIR-1可操作地连接。在一些实施方式中,使用白蛋白CCL-3与LAIR-1可操作地连接。在一些实施方式中,CCL-3与LAIR-1的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,CCL-3与LAIR-1的C末端可操作地连接。

[0559] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含与SEQ ID NO:98中所示的人LAIR-1序列可操作地连接的SEQ ID NO:41中所示的人CCL-3序列。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含使用选自SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43的人血清白蛋白序列与SEQ ID NO:98中所示的人LAIR-1序列可操作地连接的SEQ ID NO:41中所示的人CCL-3序列。

[0560] D.CCL-4融合蛋白

[0561] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含CCL-4和基膜聚糖,其中CCL-4与基膜聚糖可操作地连接。在一些实施方式中,使用白蛋白CCL-4与基膜聚糖可操作地连接。在一些实施方式中,CCL-4与基膜聚糖的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,CCL-4与基膜聚糖可操作地连接的C末端。

[0562] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含与SEQ ID NO:107中所示的人基膜聚糖序列可操作地连接的SEQ ID NO:33中所示的人CCL-4序列。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含使用选自SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43的人血清白蛋白序列与SEQ ID NO:107中所示的人基膜聚糖序列可操作地连接的SEQ ID NO:33中所示的人CCL-4序列。

[0563] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含CCL-4和LAIR-1,其中CCL-4与LAIR-1可操作地连接。在一些实施方式中,使用白蛋白CCL-4与LAIR-1可操作地连接。在一些实施方式中,CCL-4与LAIR-1的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,CCL-4与LAIR-1的C末端可操作地连接。

[0564] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含与SEQ ID NO:98中所示的人LAIR-1序列可操作地连接的SEQ ID NO:33中所示的人CCL-4序列。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含使用选自SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43的人血清白蛋白序列与SEQ ID NO:98中所示的人LAIR-1序列可操作地连接的SEQ ID NO:33中所示的人CCL-4序列。

[0565] E.CCL-5融合蛋白

[0566] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含CCL-5和基膜聚糖,其中CCL-5与基膜聚糖可操作地连接。在一些实施方式中,使用白蛋白CCL-5与基膜聚糖可操作地连接。在一些实施方式中,CCL-5与基膜聚糖的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,CCL-5与基膜聚糖可操作地连接的C末端。

[0567] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含与SEQ ID NO:107中所示的人基膜聚糖序列可操作地连接的SEQ ID NO:39中所示的人CCL-5序列。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含使用选自SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43的人血清白蛋白序列与SEQ ID NO:107中所示的人基膜聚糖序列可操作地连接的SEQ ID NO:39中所示的人CCL-5序列。

[0568] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含CCL-5和LAIR-1,其中CCL-5与LAIR-1可操作地连接。在一些实施方式中,使用白蛋白CCL-5与LAIR-1可操作地连接。在一些实施方式中,CCL-5与LAIR-1的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,CCL-5与LAIR-1的C末端

可操作地连接。

[0569] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含与SEQ ID NO:98中所示的人LAIR-1序列可操作地连接的SEQ ID NO:39中所示的人CCL-5序列。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含使用选自SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43的人血清白蛋白序列与SEQ ID NO:98中所示的人LAIR-1序列可操作地连接的SEQ ID NO:39中所示的人CCL-5序列。

[0570] F.嗜酸性粒细胞趋化因子融合蛋白

[0571] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含嗜酸性粒细胞趋化因子和基膜聚糖,其中嗜酸性粒细胞趋化因子与基膜聚糖可操作地连接。在一些实施方式中,使用白蛋白嗜酸性粒细胞趋化因子与基膜聚糖可操作地连接。在一些实施方式中,嗜酸性粒细胞趋化因子与基膜聚糖的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,嗜酸性粒细胞趋化因子与基膜聚糖可操作地连接的C末端。

[0572] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含与SEQ ID NO:107中所示的人基膜聚糖序列可操作地连接的SEQ ID NO:38中所示的人嗜酸性粒细胞趋化因子序列。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含使用选自SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43的人血清白蛋白序列与SEQ ID NO:107中所示的人基膜聚糖序列可操作地连接的SEQ ID NO:38中所示的人嗜酸性粒细胞趋化因子序列。

[0573] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含嗜酸性粒细胞趋化因子和LAIR-1,其中嗜酸性粒细胞趋化因子与LAIR-1可操作地连接。在一些实施方式中,使用白蛋白嗜酸性粒细胞趋化因子与LAIR-1可操作地连接。在一些实施方式中,嗜酸性粒细胞趋化因子与LAIR-1的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,嗜酸性粒细胞趋化因子与LAIR-1的C末端可操作地连接。

[0574] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含与SEQ ID NO:98中所示的人LAIR-1序列可操作地连接的SEQ ID NO:38中所示的人嗜酸性粒细胞趋化因子序列。在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含使用选自SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43的人血清白蛋白序列与SEQ ID NO:98中所示的人LAIR-1序列可操作地连接的SEQ ID NO:38中所示的人嗜酸性粒细胞趋化因子序列。

[0575] G.抗体融合蛋白

[0576] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含抗CD3抗体和基膜聚糖,其中抗CD3抗体与基膜聚糖可操作地连接。在一些实施方式中,抗CD3抗体与基膜聚糖的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,抗CD3抗体与基膜聚糖可操作地连接的C末端。

[0577] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含抗CD3抗体和LAIR-1,其中抗CD3抗体与LAIR-1可操作地连接。在一些实施方式中,抗CD3抗体与LAIR-1的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,抗CD3抗体与LAIR-1的C末端可操作地连接。

[0578] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含抗4-1-BB抗体和基膜聚糖,其中抗4-1BB抗体与基膜聚糖可操作地连接。在一些实施方式中,抗4-1BB抗体与基膜聚糖的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,抗4-1-BB抗体与基膜聚糖可操作地连接的C末端。

[0579] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含抗4-1-BB抗体和LAIR-1,其中抗4-1BB抗体与LAIR-1可操作地连接。在一些实施方式中,抗4-1BB抗体与LAIR-1的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,抗4-1BB抗体与LAIR-1的C末端可操作地连接。

[0580] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含抗CD40抗体和基膜聚糖,其中抗CD40抗体与基膜聚糖可操作地连接。在一些实施方式中,抗CD40抗体与基膜聚糖的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,抗CD40抗体与基膜聚糖可操作地连接的C末端。

[0581] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含抗CD40抗体和LAIR-1,其中抗CD40抗体与LAIR-1可操作地连接。在一些实施方式中,抗CD40抗体与LAIR-1的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,抗CD40抗体与LAIR-1的C末端可操作地连接。

[0582] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含抗OX40抗体和基膜聚糖,其中抗OX40抗体与基膜聚糖可操作地连接。在一些实施方式中,抗OX40抗体与基膜聚糖的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,抗OX40抗体与基膜聚糖可操作地连接的C末端。

[0583] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白包含抗OX40抗体和LAIR-1,其中抗OX40抗体与LAIR-1可操作地连接。在一些实施方式中,抗OX40抗体与LAIR-1的N末端可操作地连接。在一些实施方式中,抗OX40抗体与LAIR-1的C末端可操作地连接。

[0584] V. 制备免疫调节融合蛋白的方法

[0585] 在一些方面中,使用重组DNA技术在转化的宿主细胞中制备本文所述的多肽(例如胶原蛋白结合结构域、细胞因子、抗体)。为此,制备了编码该肽的重组DNA分子。制备这种DNA分子的方法是本领域众所周知的。例如,可以使用合适的限制酶从DNA上切除编码肽的序列。或者,抗原使用化学合成技术,例如磷酸胺法合成DNA分子。同样,可以使用这些技术的组合。

[0586] 制备多肽的方法还包括能够在合适的宿主中表达肽的载体。载体包含编码与适当的表达控制序列有效地连接的肽的DNA分子。在将DNA分子插入载体之前或之后,影响这种有效连接的方法是众所周知的。表达控制序列包括启动子、激活子、增强子、操纵子、核糖体核酸酶结构域、起始信号、终止信号、帽信号、聚腺苷酸化信号和参与转录或翻译控制的其他信号。

[0587] 其上具有DNA分子的所得载体用于转化合适的宿主。可以使用本领域公知的方法进行该转化。

[0588] 大量可用的和众所周知的宿主细胞中的任何一种都适用于本公开的方法。特定宿主的选择取决于本领域公认的许多因素。这些包括例如与所选表达载体的相容性、由DNA分子编码的肽的毒性、转化率、肽的回收容易性、表达特性、生物安全性和成本。在理解并非所有宿主对于特定DNA序列的表达可能都同样有效的前提下,必须在这些因素之间取得平衡。在这些通用准则中,有用的微生物宿主包括细菌(例如大肠杆菌)、酵母(例如酿酒酵母)和其他真菌、昆虫、织物、培养的哺乳动物(例如人)的细胞、或本领域已知的其他宿主。

[0589] 接着,培养并纯化转化的宿主。可以在常规发酵条件下培养宿主细胞以便表达所需化合物。这样的发酵条件是本领域众所周知的。最后,通过本领域众所周知的方法从培养物中纯化肽。

[0590] 化合物也可以通过合成方法制备。例如,可以使用固相合成技术。合适的技术是本领域众所周知的,并且包括描述于Merrifield(1973),*Chem. Polypeptides*, pp. 335-61 (Katsoyannis和Panayotis编著);Merrifield(1963),*J. Am. Chem. Soc.* 85:2149;Davis等,(1985),*Biochem. Intl.* 10:394-414;Stewart和Young(1969),*Solid Phase Peptide Synthesis*;美国专利号3,941,763;Finn等,(1976),*The Proteins* (第3版) 2:105-253;和

Erickson等,(1976),The Proteins (第3版) 2:257-527的那些。固相合成是制备单个肽的优选技术,因为它是制备小肽的最具成本效益的方法。可以通过众所周知的有机化学技术合成含有衍生化肽或含有非肽基团的化合物。

[0591] 分子表达/合成的其他方法是本领域普通技术人员通常已知的。

[0592] 上述核酸分子可以包含在载体中,其能够指导其表达在例如已被载体转导的细胞中表达。因此,除了多肽突变体之外,某些实施方式中还包括含有编码突变体的核酸分子的表达载体和用这些载体转染的细胞。

[0593] 适合使用的载体包括用于细菌的基于T7的载体(参见例如,Rosenberg等,Gene 56:125,1987),用于哺乳动物细胞的pMSXND表达载体(Lee和Nathans,J.Biol.Chem.263:3521,1988),和用于昆虫细菌的杆状病毒来源的载体(例如Clontech,Palo Alto,Calif的表达载体pBacPAKS)。可以将这样的载体中编码目的多肽的核酸插入物与启动子可操作地连接,该启动子例如基于寻求表达的细胞类型来选择。例如,可以用于细菌中的T7启动子,可以用于昆虫细胞的多面体蛋白启动子,和可用于哺乳动物细胞的巨细胞病毒或金属硫蛋白启动子。同样,在高级真核生物的情况下,阻止特异型和细胞类型特异性启动子是广泛可用的。这些启动子因其指导核酸分子在体内给定组织或细胞类型中表达的能力而得名。技术人员非常了解可用于指导核酸表达的许多启动子和其他调节元件。

[0594] 除了有助于插入的核酸分子转录的序列之外,载体可以包含复制起点和其他编码选择标记的基因。例如,新霉素抗性(neor)基因将G418抗性赋予表达它的细胞,并且因此允许转染细胞的表型选择。本领域技术人员可以容易地确定给定的调节元件或选择标记是否适合用于特定的实验环境。

[0595] 适用的病毒载体包括例如逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒载体、疱疹病毒、猿猴病毒40(SV40)和牛乳头瘤病毒载体(参见例如,Gluzman(Ed.),Eukaryotic Viral Vectors,CSH Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.)。

[0596] 包含并表达编码多肽突变体的核酸分子的原核或真核细胞也适用。细胞是转染的细胞,即,已经通过重组DNA技术将核酸分子例如编码突变多肽的核酸分子引入细胞中。这种细胞的后代也被认为适用于本公开的方法。

[0597] 表达系统的精确组分并不重要。例如,多肽突变体可以在原核宿主(例如大肠杆菌)中或在真核宿主(例如昆虫细胞(例如Sf21细胞))或哺乳动物细胞(例如COS细胞、NIH 3T3细胞或HeLa细胞)。这些细胞可从许多来源获得,包括American Type Culture Collection(Manassas,Va.)。在选择一种表达系统时,仅重要的是组分之间相互兼容。技术人员或普通人员能够做出这样的决定。此外,如果在选择表达系统时需要指导,技术人员可以咨询Ausubel等(Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley and Sons,New York,N.Y.,1993)和Pouwels等(Cloning Vectors:A Laboratory Manual,1985Suppl.1987)。

[0598] 表达的多肽可以使用常规生化程序从表达系统中纯化,并且可以例如用作本文所述的治疗剂。

[0599] 药物组合物和施用模式

[0600] 在某些实施方式中,本公开内容提供了药物组合物,其包含免疫调节融合蛋白以及药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂。

[0601] 在某些实施方式中,可接受的制剂材料优选地是在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒。在某些实施方式中,制剂材料用于皮下注射和/或静脉注射。在某些实施方式中,制剂材料用于局部施用,例如肿瘤内施用。在某些实施方式中,药物组合物可以包含用于修饰、维持或保持组合物的例如pH、渗透度、粘度、澄清度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸附或渗透的组分。在某些实施方式中,合适的制剂材料包括但不限于氨基酸(例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、精氨酸或赖氨酸);抗菌素;抗氧化剂(例如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲液(例如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸);填充剂(例如甘露醇或甘氨酸);螯合剂(例如乙二胺四乙酸(EDTA));络合剂(例如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精);填料;单糖;二糖;和其他碳水化合物(例如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色、调味和稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(例如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐抗衡离子(例如钠);防腐剂(例如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、双氯苯双胍己烷、山梨酸或过氧化氢);溶剂(例如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(例如甘露醇或山梨糖醇);悬浮剂;表面活性剂或湿润剂(例如普朗尼克、PEG、脱水山梨糖醇酯、聚山梨酯如聚山梨酯20、聚山梨酯80、triton、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、替罗沙星);稳定性增强剂(例如蔗糖或山梨糖醇);张力增强剂(例如碱金属卤化物,优选氯化钠或氯化钾、甘露醇山梨醇);运载工具;稀释剂;赋形剂和/或药物佐剂。Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,A.R.Gennaro,ed.,Mack Publishing Company (1995)。在某些实施方式中,制剂包含PBS;20mM NaOAC,pH 5.2,50mM NaCl;和/或10mM NaOAC,pH 5.2,9%蔗糖。在某些实施方式中,最佳药物组合物由本领域技术人员根据例如预期的给药途径、递送形式和所需剂量确定。参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,如上所述。在某些实施方式中,这种组合物可影响免疫调节融合蛋白的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。

[0602] 在一些实施方式中,当向受试者施用时,包含本文所述的免疫调节融合蛋白的制剂是4℃至37℃。

[0603] 在一些实施方式中,药物组合物中的主要载剂或载体本质上可以是水性或非水性的。例如,在一些实施方式中,合适的工具或载体是注射用水、生理盐水溶液或人工脑脊液,可能补充了肠胃外给药组合物中常见的其他物质。盐水包括等渗磷酸盐缓冲盐水。在一些实施方式中,中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是进一步的示例性载体。在一些实施方式中,药物组合物包含约pH 7.0-8.5的Tris缓冲液,或约pH 4.0-5.5的乙酸盐缓冲液,其可以进一步包括山梨糖醇或其合适的替代物。在一些实施方式中,包含免疫调节融合蛋白的组合物可以通过将具有所需纯度的所选组合物与冻干并或水溶液形式的任选制剂试剂(Remington's Pharmaceutical Sciences,如上所述)混合来制备用于储存。此外,在一些实施方式中,包含免疫调节融合蛋白的组合物可以使用合适的赋形剂例如蔗糖来配制成冻干物。

[0604] 在一些实施方式中,可以选择药物组合物用于肠胃外递送。在一些实施方式中,可以选择组合物用于吸入或通过消化道例如口服递送。这种药学上可接受的组合物的制备在本领域技术人员的能力范围内。

[0605] 在一些实施方式中,制剂组分以给药部位可接受的浓度存在。在一些实施方式中,

使用缓冲液以维持组合物在生理pH或稍低的pH,通常在约5至约8的pH范围内。

[0606] 在一些实施方式中,当考虑肠胃外给药时,治疗组合物可以是药学上可接受的载体中的无热原的、包含免疫调节融合蛋白的肠胃外可接受的水溶性的形式。在一些实施方式中,肠胃外注射的载剂是无菌蒸馏水,其中免疫调节融合蛋白被配制成适当保存的无菌等渗溶液。在一些实施方式中,制备可以包括用试剂配制所需分子,例如可注射的微球、可生物蚀解的颗粒、高分子化合物(例如聚乳酸或聚乙醇酸)、珠或脂质体,其可以提供产品的受控释放或持续释放,然后通过长效注射进行递送。在一些实施方式中,还可以使用透明质酸,并且可以具有促进循环中持续时间的作用。在一些实施方式中,可植入药物递送装备可用于引入所需分子。

[0607] 在一些实施方式中,可以配制药组合物用于吸入。在一些实施方式中,可以配制免疫调节融合蛋白用于吸入的干粉。在一些实施方式中,可以将包含免疫调节融合蛋白的吸入溶液与推进剂一起配制以用于气雾剂递送。在一些实施方式中,溶液可以被雾化。肺部给药进一步描述于PCT申请PCT/US94/001875,其中描述了化学修饰蛋白质的肺部递送。

[0608] 在一些实施方式中,预期制剂可以口服给药。在一些实施方式中,以这种方式给药的免疫调节融合蛋白可以与或不与通常用于复合固体剂型例如片剂和胶囊剂的那些载体一起配制。在一些实施方式中,可以设计胶囊以在生物利用度最大化并且全身前降解最小化时在胃肠道中的点释放制剂的活性部分。在一些实施方式中,可以包括至少一种另外的试剂以促进免疫调节融合蛋白的吸收。在某些实施方式中,也可以使用稀释剂、调味剂、低熔点蜡、植物油、润滑剂、助悬剂、片剂崩解剂和粘合剂。

[0609] 在一些实施方式中,药物组合物可以包含有效量的免疫调节融合蛋白与适用于片剂制造的无毒赋形剂的混合物。在一些实施方式中,通过将片剂溶解于无菌水或另一种合适的载体中,可以将溶液制成单位剂量形式。在一些实施方式中,合适的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂例如碳酸钙、碳酸钠或碳酸氢钠、乳糖或磷酸钙;或结合剂,例如淀粉、明胶或阿拉伯胶;或润滑剂例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。

[0610] 其他药物组合物对本领域技术人员将是显而易见的,其包括在持续或可控递送制剂中包括免疫调节融合蛋白的制剂。在一些实施方式中,用于制备多种其他持续或可控递送方式的技术,例如脂质体载体、可生物蚀解的微粒或多孔珠和储库注射剂,也是本领域技术人员已知的。参见例如PCT申请PCT/US93/00829,其描述了用于药物组合物递送的多孔聚合物微粒的控制释放。在一些实施方式中,缓释制剂可包括截面形状形式的半透性聚合物基质,例如薄膜或微胶囊。缓释基质可以包括聚酯、水凝胶、聚丙交酯(美国专利号3,773,919和EP 058,481)、L-谷氨酸和 γ -L-谷氨酸的共聚物(Sidman等,Biopolymers,22:547-556(1983))、聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)(Langer等,J.Biomed.Mater.Res.,15:167-277(1981)和Langer,Chem.Tech.,12:98-105(1982))、乙烯醋酸乙烯酯(Langer等,同上)或聚-D(-)-3-羟基丁酸(EP 133,988)。在一些实施方式中,缓释组合物还可包括脂质体,其可通过本领域已知的几种方法的任何一种来制备。参见,例如,Eppstein等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:3688-3692(1985);EP 036,676;EP 088,046和EP 143,949。

[0611] 用于体内给药的药物组合物是无菌的。在一些实施方式中,无菌是通过无菌滤膜过滤来实现的。在某些实施方式中,组合物是冻干的时,在冻干和重构之前或之后施用这种方法进行灭菌。在一些实施方式中,肠胃外施用的组合物以冻干形式或溶液形式储存。在一

些实施方式中,肠胃外组合物被置于具有无菌进出口的容器中,例如具有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶。

[0612] 在某些实施方式中,一旦配制了药物组合物,就将其以溶液、悬浮液、凝胶、乳剂、固体或脱水或冻干粉末储存在无菌小瓶中。在一些实施方式中,这样的制剂以现用现配形式或以在给药前重构的形式(例如冻干)储存。

[0613] 在一些实施方式中,提供了用于产生单剂量给药单位的试剂盒。在一些实施方式中,试剂盒可以包含干燥蛋白质的第一容器和具有水性制剂的第二容器。在一些实施方式中,包括了包含单腔室和多腔室预填充注射器的试剂盒(例如液体注射器和溶血注射器)。

[0614] 在一些实施方式中,包含免疫调节融合蛋白的药物组合物的有效量将取决于例如治疗背景和目的。本领域的技术人员经理解,根据某些实施方式,用于治疗的合适剂量水平将因此部分地取决于所递送的分子,使用免疫调节融合蛋白的指示、给药途径、和患者的身材(体重、体表或器官大小)和/或病情(年龄和总体健康)。在一些实施方式中,临床医生可以滴定剂量并改变给药途径以获得最佳治疗效果。

[0615] 在一些实施方式中,在所用制剂中,给药频率将考虑到免疫调节融合蛋白的药代动力学参数。在一些实施方式中,临床医生将施用组合物直至达到所需效果的剂量。在一些实施方式中,组合物因此可以随着时间推移以单剂量、或以两剂或更多剂量(其可以包含或不包含相同量的所需分子)、或通过植入装置或导管的连续输注的形式给药。本领域普通技术人员常规地进一步精炼合适的剂量,并且在她们常规执行的任务范围内。在一些实施方式中,可以通过使用适当剂量反应数据来确定合适的剂量。

[0616] 在一些实施方式中,药物组合物的给药途径与已知方法一致,例如口服、通过静脉内、腹膜内、脑内(实质内)、脑室内、肌内、皮下、眼内、动脉内、门静脉内或病变内途径注射;通过持续释放系统或通过植入装置。在某些实施方式中,可以通过推注或连续地通过输注或通过植入装置来施用组合物。在某些实施方式中,可以通过不同途径施用联合疗法的各个组件。

[0617] 在一些实施方式中,可以通过植入所需分子已被吸收或封装的膜、海绵或另一种合适的材料来局部地施用组合物。在一些实施方式中,施用植入装置时,该装置可以被植入任何合适的组织或器官中,并且所期望的分子的递送可以通过输注、定时释放的推注或连续施用。在一些实施方式中,可以期望以离体方式使用包含免疫调节融合蛋白的药物组合物。在这种情况下,将已从患者体内取出的细胞、组织和/或器官暴露于包含免疫调节融合蛋白的药物组合物中,然后将细胞、组织和/或器官随后植入回患者体内。

[0618] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白可以通过使用本文所述的那些方法植入已遗传工程改造的表达和多肽的某些细胞来递送。在一些实施方式中,这种细胞可以是动物或人细胞,并且可以是自体的、异源的或异种的。在一些实施方式中,细胞可以被永生。在一些实施方式中,为了减少免疫应答的机会,将细胞包封以避免周围组织的浸润。在一些实施方式中,包封材料通常是生物相容的、半透性的聚合物外壳或膜,其允许蛋白质产物的释放但阻止患者的免疫系统或周围组织的其他有害因素破坏的细胞。

[0619] 治疗方法

[0620] 本文所述的免疫调节融合蛋白和/或表达其的核酸用于治疗与异常凋亡或分化过程相关的病症(例如细胞增殖性病症(例如过度增殖性病症)或细胞分化病症,如癌症)。下

文描述了适于用本公开的方法治疗的癌症的非限制性实例。

[0621] 细胞增殖性和/或分化性疾病的实例包括癌症(例如癌、肉瘤、转移性疾病或造血肿瘤疾病,例如白血病)。转移性肿瘤可源自多种原发性肿瘤类型,其包括但不限于前列腺癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌和肝癌。因此,本文所用的包含例如免疫调节融合蛋白的组合物可以施用于患有癌症的患者。

[0622] 如本文所用,术语“癌症”(或“癌性”)、“过度增殖”、“和”肿瘤性”来指具有自主生长能力的细胞(即以快速增殖的细胞为特征的异常状态或状况)。过度增殖和肿瘤性疾病状态可以分类为病理性(即表征或构成疾病状态),或它们可以分类为非病理性(即偏离正常但与疾病状态无关)。该术语旨在包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移性组织或恶性转化的细胞、组织、或器官,而与组织病理学类型或侵入性阶段无关。“病理性过度增殖”细胞发生在以恶性肿瘤生长为特征的疾病状态中。非病理性过度增殖细胞的实例包括与伤口修复相关的细胞的增殖。

[0623] 术语“癌症”或“肿瘤”用于指各种器官系统的恶性肿瘤,包括影响肺、乳腺、甲状腺、淋巴管和淋巴组织、胃肠道器官和泌尿生殖道的那些,以及通常被认为包括恶性肿瘤例如大多数结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、肺的非小细胞癌、小肠癌和食道癌的腺癌。

[0624] 术语“癌”是本领域公认的,并且是指上皮或内分泌组织的恶性肿瘤,其包括呼吸系统癌、胃肠道系统癌、泌尿生殖系统癌、睾丸癌、乳腺癌、前列腺癌、内分泌系统癌和黑色素瘤。免疫调节融合蛋白可用于治疗患有、怀疑患有、或可能具有高风险发展为包括肾癌或黑色素瘤或任何病毒疾病的任何类型癌症的患者。示例性癌包括由子宫颈、肺、前列腺、乳腺、头和颈、结肠和卵巢的组织形成的那些。术语还包括癌肉瘤,其包括由癌组织和肉瘤组织组成的恶性肿瘤。“腺癌”指源自腺组织或其中肿瘤细胞形成可识别的腺结构的癌。

[0625] 增殖性疾病的其他实例包括造血肿瘤疾病。如在本文中所使用的,术语“造血肿瘤疾病”包括涉及造血起源的增殖/肿瘤细胞的疾病,例如源自髓样、淋巴或幼红细胞系谱系或其前体细胞的疾病。优选地,该疾病源自分化差的急性白血病(例如成红细胞白血病和急性巨核细胞白血病)。其他示例性骨髓疾病包括但不限于急性早幼粒细胞白血病(APML)、急性骨髓性白血病(AML)和慢性粒细胞性白血病(CML)(综述于Vaickus, L. (1991) Crit. Rev. in Oncol./Hematol. 11:267-97);淋巴恶性肿瘤包括但不限于急性淋巴细胞白血病(ALL),其包括B谱系ALL和T谱系ALL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、前淋巴细胞性白血病(PLL)、毛细胞白血病(HLL)和Waldenstrom氏巨球蛋白血症(WM)。恶性淋巴瘤的其他形式包括但不限于非霍奇金淋巴瘤及其变体、外周T细胞淋巴瘤、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、大颗粒淋巴细胞白血病(LGF)、霍奇金氏病和里德斯特恩伯格病。

[0626] 本领域技术人员将认识到,足以减少肿瘤生长和大小的免疫调节融合蛋白的量或治疗有销量不仅会因为所选择的特定化合物或组合物而异,而且还取决于给药途径、所治疗疾病的性质以及患者的年龄和状态,并最终将由患者的医师或药剂师决定。在本方法中使用的化合物给出的时间长度会因个人而异。

[0627] 本领域技术人员将意识到的是,本文中使用的B16黑色素瘤模型是用于实体瘤的通用模型。也就是说,在该模型中的治疗有效性也预示了在其他非黑色素瘤实体瘤中的治

疗有效性。例如,如在Baird等(J Immunology 2013;190:469-78;Epub Dec 7,2012)中所述,发现cps(一种诱导适应性免疫应答的寄生虫株)介导针对B16F10肿瘤的抗肿瘤免疫的有效性能推广到其他实体瘤,包括肺癌和卵巢癌模型。在另一个实例中,来自针对VEGF靶向淋巴细胞的一系列研究的结果还表明,B16F10肿瘤的结果可推广到其他研究的肿瘤类型(Chinnasamy等,JCI 2010;120:3953-68;Chinnasamy等,Clin Cancer Res 2012;18:1672-83)。在又一个实例中,涉及LAG-3和PD-1的免疫疗法可降低肿瘤负荷,并在纤维肉瘤和结肠腺癌细胞系中产生普遍的结果(Woo等,Cancer Res 2012;72:917-27)。

[0628] 在某些实施方式中,本文公开的免疫调节融合蛋白用于治疗癌症。在某些实施方式中,本文公开的免疫调节融合蛋白用于治疗黑色素瘤、白血病、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、结肠癌和脑癌。

[0629] 在某些实施方式中,本文公开的免疫调节融合蛋白抑制肿瘤细胞的生长和/或增殖。在某些实施方式中,本文公开的免疫调节融合蛋白缩小肿瘤尺寸。在某些实施方式中,本文公开的免疫调节融合蛋白抑制原发性肿瘤的转移。

[0630] 本领域技术人员将意识到的是,本文中提及的治疗扩展到所指出的癌症和症状的预防以及治疗。

[0631] 联合疗法

[0632] 在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白用于与其他疗法联用。例如,在一些实施方式中,免疫调节融合蛋白用于与其他免疫疗法联用。示例性免疫疗法包括但不限于嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法、肿瘤相关抗原靶向抗体、免疫检查点抑制剂和癌症疫苗。

[0633] I. 嵌合抗原受体(CAR)效应细胞

[0634] 在一些方面中,本公开内容提供了与嵌合抗原受体(CAR)效应细胞疗法(例如CAR T细胞)联合使用或进行的免疫调节融合蛋白。

[0635] 嵌合抗原受体(CAR)是基因工程的人工跨膜受体,其赋予免疫效应细胞(例如T细胞、自然杀伤细胞或其他免疫细胞)配体任意特异性并且其导致其识别和结合配体后激活效应细胞。通常这些受体用于将单克隆抗体的抗原特异性赋予T细胞。

[0636] 在一些实施方式中,CAR包含三个结构域:1)细胞外结构域,其通常包含信号肽、配体或抗原识别区(例如scFv)和柔性间隔物;2)跨膜(TM)结构域;3)胞内结构域(也称为“激活结构域”),其通常包含一个或多个细胞内信号传导结构域。CAR的细胞外结构域位于细胞外部,并暴露于细胞外空间,因此它易于与其关联配体相互作用。TM结构域允许CAR锚定在效应细胞的细胞膜中。第三个胞内结构域(也称为“激活结构域”)有助于在与CAR与其特异性配体结合后效应细胞激活。在一些实施方式中,效应细胞激活包括细胞因子的诱导和趋化因子的产生,以及细胞的溶细胞活性的激活。在一些实施方式中,CAR重定向细胞毒性至肿瘤细胞。

[0637] 在一些实施方式中,CAR包含与特异性靶配体或抗原结合的配体或抗原特异性识别结构域(也称为结合结构域)。在一些实施方式中,结合结构域是单链抗体可变片段(scFv)、即系锁配体或共受体的细胞外结构域,融合至跨膜结构域,其又与信号传导结构域连接。在一些实施方式中,信号传导结构域衍生自CD3 ζ 或FcR γ 。在一些实施方式中,CAR包含衍生自例如CD28、CD137(也称为4-1BB)、CD134(也称为OX40)和CD278(也称为ICOS)的蛋白质的一个或多个共刺激结构域。

[0638] CAR的抗原结合结构域与其靶抗原在靶细胞表面上的结合导致CAR的聚集并将激活刺激传递至含CAR的细胞。在一些实施方式中,CAR的主要特征是其重定向免疫效应细胞特异性的能力,从而触发增殖、细胞因子产生、吞噬作用或分子的产生,所述分子可以利用主要组织相容性(MHC)独立的方式介导表达靶抗原细胞的细胞凋亡,从而利用单克隆抗体、可溶性配体或细胞特异性共受体的细胞特异性靶向能力。尽管已显示工程改造的,包含来自CD3 ζ 或FcR γ 的信号传导结构域的基于scFv的CAR能够为T细胞激活和效应物功能递送有效的信号,但是在没有伴随共刺激信号存在下,它们不足以引发促进T细胞存活和扩增的信号。新一代的CAR,其包含结合结构域、铰链、跨膜和衍生自CD3 ζ 或FcR γ 的信号传导结构域以及一个或多个共刺激信号结构域(例如衍生自CD28、CD137、CD134和CD278的胞内共刺激结构域)已显示在动物模型和癌症患者中更有效地指导抗肿瘤活性以及增强表达CAR的T细胞体外细胞因子分泌、裂解活性、存活和增殖(Milone等,Molecular Therapy,2009;17:1453-1464;Zhong等,Molecular Therapy,2010;18:413-420;Carpenito等,PNAS,2009;106:3360-3365)。

[0639] 在一些实施方式中,表达嵌合抗原受体的效应细胞(例如CAR-T细胞)是衍生自患有疾病或病症的患者并通常在体外修饰以表达至少一个对配体具有特异性的CAR的细胞。细胞执行至少一种效应子功能(例如细胞因子的诱导),其通过配体与CAR特异性结合被刺激或诱导并且其对于相同患者的疾病或病症的治疗有用。效应细胞是T细胞(例如细胞毒性T细胞或辅助T细胞)。本领域技术人员将理解,其他细胞类型(例如自然杀伤细胞或干细胞)可表达CAR,并且嵌合抗原受体效应细胞可包含除T细胞以外的效应细胞。在一些实施方式中,效应细胞是T细胞(例如细胞毒性T细胞),当与靶或靶细胞(例如癌细胞)接触或接近时,其在靶细胞上发挥其效应物功能(例如细胞毒性T细胞应答)(参见例如,Chang和Chen(2017) Trends Mol Med 23(5):430-450)。

[0640] T细胞长时间暴露于它们的同源抗原可导致效应子功能衰竭,从而使感染或转化的细胞得以持久存在。最近开发的使用诱导免疫检查点阻断试剂以刺激或复原宿主效应子功能的策略已成功治疗多种癌症。新兴证据表明T细胞衰竭也可代表表达嵌合抗原受体的T细胞(CAR-T细胞)维持长寿抗肿瘤活性的重大障碍。在一些实施方式中,CAR转导之前患者采集的T细胞的分化状态以及患者在重新引入CAR-T细胞之前所经历的调理方案(例如添加或排除烷基化剂、氟达拉滨、全身辐照)可以深刻地影响CAR-T细胞的持久性和细胞毒性潜力。通过(抗CD3/CD28或刺激细胞)刺激和(通过细胞因子,例如IL-2)扩增T细胞群的体外培养条件也可以改变CAR-T细胞的分化状态和效应子功能(Ghoneim等,(2016) Trends in Molecular Medicine 22(12):1000-1011)。

[0641] 在一些实施方式中,特别是对于ALL和/或NHL的治疗,合适的CAR靶向CD19或CD20。非限制性实例包括CAR,其包含以下结构:(i)抗CD19 scFv、CD8 H/TM结构域、4-1BB CS结构域和CD3 ζ TCR信号传导结构域;(ii)抗CD19 scFv、CD28铰链和跨膜结构域、CD28共刺激结构域和CD3 TCR信号传导结构域;和(iii)抗CD20 scFv、IgG铰链和跨膜结构域、CD28/4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ TCR信号传导结构域。在一些实施方式中,适用于与本文公开的组合物和方法组合的CAR效应细胞靶向CD19或CD20,其包括但不限于KymriahTM(tisagenlecleucel;Novartis;此前为CTL019)和YescartaTM(axicabtagene ciloleucel;Kite Pharma)。

[0642] A. 重靶向CAR T细胞

[0643] 在一些实施方式中,适于与免疫调节融合蛋白联用的CAR-T疗法是重靶向CAR-T细胞。在一些实施方式中,修饰效应细胞(例如T细胞)以表达与免疫球蛋白上的通用免疫受体、标签、开关或Fc区结合的CAR适用于本文所述的方法。

[0644] 在一些实施方式中,修饰效应细胞(例如T细胞)以表达通用免疫受体或UnivIR。一种类型的UnivIR是生物素结合免疫受体(BBIR)(参见例如美国专利公开号US20140234348A1,通过引用整体并入本文)。与通用嵌合受体和/或表达通用嵌合受体的效应细胞相关的方法和组合物的其他实例描述于国际专利申请号W02016123122A1、W02017143094A1、W02013074916A1、美国专利申请号US20160348073A1,其所有均用引用整体并入本文。

[0645] 在一些实施方式中,修饰效应细胞(例如T细胞)以表达通用、模块化的、抗标签的嵌合抗原受体(UniCAR)。该系统允许针对多种抗原的UniCAR植入免疫细胞重新靶向(参见例如,通过引用整体并入本文的美国专利公开US20170240612A1;通过引用整体并入本文的Cartellieri等,(2016)Blood Cancer Journal 6,e458)。

[0646] 在一些实施方式中,修饰效应细胞(例如T细胞)以表达可切换的嵌合抗原受体和嵌合抗原受体效应细胞(CAR-ES)开关。在该系统中,CAR-ES开关具有一个由CAR-EC上的嵌合抗原受体结合的第一区域和一个与靶细胞上细胞表面分子结合的第二区域,从而刺激来自CAR-EC的免疫应答,其对结合的靶细胞有细胞毒性。在一些实施方式中,CAR-EC是T细胞,其中CAR-EC开关可以充当CAR-EC活性的“分子开关”。活性可以通过减少或停止开关的管理来“关闭”。这些CAR-EC开关可与本公开的CAR-EC以及现有的CAR T细胞一起使用,用于疾病或病症的治疗,例如癌症,其中靶细胞是恶性细胞。这种治疗在本文中可称为可切换的免疫疗法(美国专利公开US9624276B2,其通过引用整体并入本文)。

[0647] 在一些实施方式中,修饰效应细胞(例如T细胞)以表达结合人免疫球蛋白的Fc部分的受体(例如CD16V-BB- ζ)(Kudo等,(2014)Cancer Res 74(1):93-103,其通过引用整体并入本文)。

[0648] 在一些实施方式中,修饰效应细胞(例如T细胞)以表达结合肽新表位(PNE)的通用免疫受体(例如可切换的CAR,sCAR)。在一些实施方式中,肽新表位(PNE)已经被引入靶向抗原的抗体(抗体开关)内限定的不同位置。因此,sCAR-T细胞特异性仅针对PNE重定向,不会发生在人蛋白质组中,因此允许sCAR-T细胞和抗体开关之间的正交相互作用。以此方式,sCAR-T细胞严格地依赖于抗体开关的存在以被完全激活,因此排除了在没有抗体开关的情况下内源组织或抗原的CAR T细胞脱靶识别(Arcangeli等,(2016)Transl Cancer Res 5 (Suppl 2):S174-S177,其全部内容通过引用并入本文)。可切换的CAR的其他实例由美国专利申请US20160272718A1提供,其通过引用整体并入本文。

[0649] 如本文所用,术语“标签”涵盖如上所述的免疫球蛋白的通用免疫受体、标签、开关或Fc区域。在一些实施方式中,修饰效应细胞以表达包含标签结合结构域的CAR。在一些实施方式中,CAR结合异硫氰酸荧光素(FITC)、链霉抗生物素蛋白、生物素、二硝基苯酚、多甲藻素叶绿素蛋白复合物、绿色荧光蛋白、藻红蛋白(PE)、辣根过氧化物酶、棕榈酰化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶或麦芽糖结合蛋白。

[0650] B.抗TAG嵌合抗原受体(AT-CAR)

[0651] 在一些实施方式中,适于与免疫调节融合蛋白联用的CAR-T疗法是抗标签CAR T细

胞。CAR T细胞的一般临床应用存在一些局限性。例如,由于不存在所有癌症类型都普遍表达的单一肿瘤抗原,因此需要对CAR中的每个scFv针对所需肿瘤抗原的特异性工程改造。此外,由CAR靶向的肿瘤抗原可响应于导致肿瘤逃逸的治疗而被下调或突变。

[0652] 作为替代方案,已经开发了通用的抗标签嵌合抗原受体(AT-CAR)和CAR-T细胞。例如,人T细胞已被工程化以表达抗异硫氰酸荧光素(FITC) CAR(称为抗FITC-CAR)。该平台利用了抗FITC scFv(在细胞表面)和FITC之间的高亲和力相互作用以及FITC分子(或其他标签)与任何抗癌单克隆抗体例如西妥昔单抗(抗EGFR)、雷妥昔单抗(抗CD20)和赫赛汀(抗Her2)结合能力的优势。

[0653] 因此,在一些实施方式中,修饰效应细胞(例如T细胞)以表达通用抗标签嵌合抗原受体(AT-CAR),如至少在WO 2012082841和US20160129109A1所述,其通过引用整体并入本文。在这种AT-CAR系统中,T细胞识别并结合标记蛋白质,例如抗体。例如,在一些实施方式中,AT-CAR T细胞识别标签标记的抗体,例如FITC标记的抗体。在一些实施方式中,将抗肿瘤抗原抗体缀合至标签(例如FITC),并在AT-CAR疗法之前、同时或之后施用。抗肿瘤抗原抗体是本领域技术人员已知的。

[0654] 如所指出的,标签结合结构域的结合特异性取决于用于结合靶细胞的蛋白质缀合的标签的同一性。例如,在本公开的一些方面,标签是FITC,标签结合结构域是抗FITC scFv。或者,在本公开的一些方面,标签是生物素或PE(藻红蛋白)并且标签结合结构域是抗生物素scFv或抗PE scFv。

[0655] 在一些实施方式中,标记蛋白的每个制剂的蛋白质是相同的或不同的,并且蛋白质是抗体或其抗原结合片段。在一些方面,抗体或其抗原结合片段是西妥昔单抗(抗EGFR)、尼莫托珠单抗(抗EGFR)、帕尼单抗(抗EGFR)、利妥昔单抗(抗CD20)、奥马珠单抗(抗CD20)、托西莫单抗(抗CD20)、曲妥珠单抗(抗Her2)、吉妥珠单抗(抗CD33)、阿仑单抗(抗CD52)和贝伐单抗(抗VEGF)。

[0656] 因此,在一些实施方式中,标记蛋白包括FITC缀合的抗体、生物素缀合的抗体、PE缀合的抗体、组氨酸缀合的抗体和链霉抗生物素蛋白缀合的抗体,其中抗体结合至由靶细胞表达的TAA或TSA。例如,标记蛋白包括但不限于FITC缀合的西妥昔单抗、FITC缀合的雷妥昔单抗、FITC缀合的赫赛汀、生物素缀合的西妥昔单抗、生物素缀合的雷妥昔单抗、生物素缀合的赫赛汀、PE缀合的西妥昔单抗、PE缀合的雷妥昔单抗、PE缀合的赫赛汀、组氨酸缀合的西妥昔单抗、组氨酸缀合的雷妥昔单抗、组氨酸缀合的赫赛汀、链霉抗生物素蛋白缀合的西妥昔单抗、链霉抗生物素蛋白缀合的利妥昔单抗、和链霉抗生物素蛋白缀合的赫赛汀。

[0657] 在一些实施方式中,表达AT-CAR的T细胞的每个群体的AT-CAR是相同的或不同的,并且AT-CAR包含标签结合结构域、跨膜结构与和激活结构域。在一些实施方式中,标签结合结构域是抗体或其抗原结合片段。在一些方面,标签结合结构域特异性地结合FITC、生物素、PE、组氨酸或链霉抗生物素蛋白。在一些实施方式中,标签结合结构域是抗原结合片段并且抗原结合片段是单链可变片段(scFv),例如特异性结合FITC、生物素、PE、组氨酸或链霉抗生物素蛋白的scFv。在一些实施方式中,跨膜结构与是人CD8 α 链的铰链和跨膜区域。在一些实施方式中,激活结构域包含CD28的细胞质区域、CD137(41BB)的细胞质区域、OX40、HVEM、CD3 ζ 和Fc ϵ 中的一个或多个。

[0658] 在一些实施方式中,标记蛋白的每个制剂的标签是相同的或不同的,并且标签选

自异硫氰酸荧光素 (FITC)、链霉抗生物素蛋白、生物素、二硝基苯酚、多甲藻素叶绿素蛋白复合物、绿色荧光蛋白、藻红蛋白 (PE)、辣根过氧化物酶、棕榈酰化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶和麦芽糖结合蛋白。

[0659] 可以使用例如化学缀合和化学交联剂的技术将标签缀合至蛋白质。或者,可以制备将标记蛋白质作为融合蛋白的多核苷酸载体。然后可以将细胞系工程化以表达标记蛋白质,并且标记蛋白质可以从培养基中分离、纯化并用于本文公开的方法中。

[0660] 在一些实施方式中,在施用表达AT-CAR的T细胞之前、同时或之后,将标记蛋白质施用于受试者。在一些实施方式中,本公开提供了一种治疗受试者的癌症的方法,其包括:
(a) 将标记蛋白的制剂施用于需要治疗的受试者,其中标记蛋白结合受试者中的癌细胞;和
(b) 将治疗有效的表达抗标签嵌合抗原受体 (AT-CAR) 的T细胞施用于受试者,其中表达AT-CAR的T细胞结合标记蛋白并诱导癌细胞死亡,从而治疗受试者的癌症。

[0661] C. 串联CAR (TanCAR) 效应细胞

[0662] 在一些实施方式中,适于与免疫调节融合蛋白联用的CAR-T疗法是串联CAR效应细胞。已经观察到使用CAR方法进行癌症治疗时,肿瘤异质性和免疫编辑可导致从CAR治疗逃脱(Grupp等, New Eng. J. Med (2013) 368:1509-1518)。作为一种替代方法,已经开发出双特异性CAR,也称为串联CAR或TanCAR,以尝试同时靶向多种癌症特异性标记。在TanCAR中,细胞外结构域包含串联的两个抗原结合特异性,通过接头连接。因此两个结合特异性(scFv)都与单个跨膜部分连接:一个scFv与膜并列,另一个位于远侧位置。示例性TanCAR, Grada等 (Mol Ther Nucleic Acids (2013) 2, e105) 描述了TanCAR,其包括CD19特异性scFv,然后是Gly-Ser接头和HER2特异性scFv。HER2-scFv位于近膜位置,和CD19-scFv位于远端位置。TanCAR被证明诱导针对两种肿瘤限制性抗原均有不同的T细胞反应性。

[0663] 因此,本公开的一些方面涉及介导T细胞的双特异性激活和靶向的串联嵌合抗原受体。尽管本公开涉及CAR的双特异性,在一些方面,CAR能够靶向三种、四种或更多种肿瘤抗原。使用CAR T细胞靶向多种抗原可增强T细胞激活和/或通过抗原丢失抵消肿瘤逃逸。TanCAR还可以靶向多种表达的抗原,使用具有广泛特异性的相同细胞产物靶向多种肿瘤,和/或提供更好的毒性研究进展和不太强烈的信号传导CAR,由于多种特异性达到相同的结果。

[0664] 在一些实施方式中,本公开内容提供了诱导两个靶向结构域的TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了诱导三个或更多个靶向结构域的多特异性TanCAR。在另一个实施方式中,本公开提供了在细胞表面的第一CAR和第二CAR,每个CAR包含抗原结合结构域,其中第一CAR的抗原结合结构域结合至第一肿瘤抗原(例如CD19、CD20、CD22、HER2) 和第二CAR的抗原结合结构域结合至另一个(不同的)肿瘤抗原。在US20160303230A1和US20170340705A1中描述了TanCAR,其通过引用并入本文。

[0665] 在一些实施方式中,本公开的TanCAR靶向两个或更多个肿瘤抗原。示例性肿瘤抗原包括CD19、CD20、CD22、 κ 轻链、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbB3/4、EGFr vIII、癌胚抗原、EGP2、EGP40、间皮素、TAG72、PSMA、NKG2D配体、B7-H6、IL-13受体 α 2、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、Lewis Y、G250/CALX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2 NY-ESO-1、PSC1、叶酸受体- α 、CD44v7/8、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AChR、NKG2D配体、CD44v6、TEM1和/或TEM8中的一种或多种。

[0666] 在一些实施方式中,本公开提供了靶向CD19和另一个肿瘤抗原的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了靶向CD22和另一个肿瘤抗原的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了靶向HER2和另一个肿瘤抗原的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了靶向IL13R- α 2和另一个肿瘤抗原的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了靶向VEGF-A和另一个肿瘤抗原的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了靶向Tem8和另一个肿瘤抗原的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了靶向FAP和另一个肿瘤抗原的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了靶向EphA2和另一个肿瘤抗原的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了一种双特异性TanCAR,其靶向一种或多种、两种或多种、三种或多种、或四种或多种以下肿瘤抗原:CD19、CD22、HER2、IL13R- α 2、VEGF-A、Tem8、FAP或EphA及其任何组合。在一些实施方式中,本公开提供了靶向HER2和IL13R- α 2的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了靶向CD19和CD22的双特异性TanCAR。

[0667] D. 产生嵌合抗原受体和CAR效应细胞的方法

[0668] 在一些实施方式中,受试者的效应细胞(例如T细胞)用嵌合抗原受体遗传修饰(Sadelain等,Cancer Discov.3:388-398,2013)。例如,提供了效应细胞(例如T细胞),并且将编码嵌合抗原受体的重组核酸引入患者来源的效应细胞(例如T细胞)以产生CAR细胞。在一些实施方式中,不是来源受试者的效应细胞(例如T细胞)用嵌合抗原受体遗传修饰。例如,在一些实施方式中,效应细胞(例如T细胞)是已被工程化用作“现成的”过继细胞疗法的同种异基因细胞,例如通用嵌合抗原受体T细胞(UCART),由Collectis开发。UCART是同种异基因CAR T细胞,其已被工程化以用于治疗最多的特定癌症类型的患者。Collectis正在开发的UCART的非限制性实例包括靶向以下肿瘤抗原的那些:CD19、CD123、CD22、CS1和CD38。

[0669] 可以使用本领域已知的多种不同方法将本公开的任何核酸或表达载体引入至效应细胞(例如T细胞)。用于将核酸引入效应细胞(例如T细胞)的方法的非限制性实例包括:脂质转染、转染(磷酸钙转染、使用高支化有机化合物转染、使用阳离子聚合物转染、树枝行分子转染、光学转染、基于粒子转染(例如纳米颗粒转染)、或使用脂质体转染(例如阳离子脂质体))、显微镜下注射、电穿孔、细胞挤压、声穿孔、原生质体融合、不完美、流体动力输送、基因枪、磁转染、病毒转染和核转染。此外,本领域已知的CRISPR/Cas9基因组编辑技术可用于将CAR核酸引入至效应细胞(例如T细胞)和/或将其他遗传修饰(例如,如下所述)引入至效应细胞(例如T细胞)以增强CAR细胞活性(将CRISPR/Cas9技术与CAR T细胞结合使用,参见例如美国9,890,393;美国9,855,297;美国2017/0175128;美国2016/0184362;美国2016/0272999;WO 2015/161276;WO 2014/191128;CN 106755088;CN 106591363;CN 106480097;CN 106399375;CN 104894068)。

[0670] 本文提供了可用于产生本文所述的任何细胞或组合物的方法,其中每个细胞可表达CAR(例如本文所述的任何CAR)。

[0671] 嵌合抗原受体(CAR)包括抗原结合结构域,跨膜结构域和细胞质信号传导结构域,其包括当抗原结合结构域结合至抗原时足以刺激T细胞的CD3 ζ 序列的细胞质序列,和任选地一种或多种(例如两个、三个或四个)共刺激蛋白的细胞质序列(例如B7-H3、BTLA、CD2、CD7、CD27、CD8、CD30、CD40、CD40L、CD80、CD160、CD244、ICOS、LAG3、LFA-1、LIGHT、NKG2C、4-1BB、OX40、PD-1、PD-L1、TIM3和特异性结合至CD83的配体中的一种或多种的细胞质序列),

其当抗原结合结构域结合至抗原时,提供了对T细胞的共刺激。在一些实施方式中,CAR还可以包含接头。CAR的非限制性方面和特征描述如下。CAR和CAR细胞的其他方面,其包括示例性抗原结合结构域、接头、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域,描述于例如Kakarla等,Cancer J.20:151-155,2014;Srivastava等,Trends Immunol.36:494-502,2015;Nishio等,Oncoimmunology 4(2):e988098,2015;Ghorashian等,Br.J.Haematol.169:463-478,2015;Levine,Cancer Gene Ther.22:79-84,2015;Jensen等,Curr.Opin.Immunol.33:9-15,2015;Singh等,Cancer Gene Ther.22:95-100,2015;Li等,Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 22:1753-1756,2014;Gill等,Immunol.Rev.263:68-89,2015;Magee等,Discov.Med.18:265-271,2014;Gargett等,Front.Pharmacol.5:235,2014;Yuan等,Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 22:1137-1141,2014;Pedgram等,Cancer J.20:127-133,2014;Eshhar等,Cancer J.20:123-126,2014;Ramos等,Cancer J.20:112-118,2014;Maus等,Blood 123:2625-2635,2014;Jena等,Curr.Hematol.Malig.Rep.9:50-56,2014;Maher等,Curr.Gene Ther.14:35-43,2014;Riches等,Discov.Med.16:295-302,2013;Cheadle等,Immunol.Rev.257:83-90,2014;Davila等,Int.J.Hematol.99:361-371,2014;Xu等,Cancer Lett.343:172-178,2014;Kochenderfer等,Nat.Rev.Clin.Oncol.10:267-276,2013;Hosing等,Curr.Hematol.Malig.Rep.8:60-70,2013;Hombach等,Curr.Mol.Med.13:1079-1088,2013;Xu等,Leuk.Lymphoma 54:255-260,2013;Gilham等,Trends Mol.Med.18:377-384,2012;Lipowska-Bhalla等,Cancer Immunol.Immunother.61:953-962,2012;Chmielewski等,Cancer Immunol.Immunother.61:1269-1277,2013;Jena等,Blood 116:1035-1044,2010;Dotti等,Immunology Reviews 257(1):107-126,2013;Dai等,Journal of the National Cancer Institute 108(7):djv439,2016;Wang和Riviere,Molecular Therapy-Oncolytics 3:16015,2016;美国专利申请公开号2018/0057609;2018/0037625;2017/0362295;2017/0137783;2016/0152723;2016/0206656;2016/0199412;2016/0208018;2015/0232880;2015/0225480;2015/0224143;2015/0224142;2015/0190428;2015/0196599;2015/0152181;2015/0140023;2015/0118202;2015/0110760;2015/0099299;2015/0093822;2015/0093401;2015/0051266;2015/0050729;2015/0024482;2015/0023937;2015/0017141;2015/0017136;2015/0017120;2014/0370045;2014/0370017;2014/0369977;2014/0349402;2014/0328812;2014/0322275;2014/0322216;2014/0322212;2014/0322183;2014/0314795;2014/0308259;2014/0301993;2014/0296492;2014/0294784;2014/0286973;2014/0274909;2014/0274801;2014/0271635;2014/0271582;2014/0271581;2014/0271579;2014/0255363;2014/0242701;2014/0242049;2014/0227272;2014/0219975;2014/0170114;2014/0134720;2014/0134142;2014/0120622;2014/0120136;2014/0106449;2014/0106449;2014/0099340;2014/0086828;2014/0065629;2014/0050708;2014/0024809;2013/0344039;2013/0323214;2013/0315884;2013/0309258;2013/0288368;2013/0287752;2013/0287748;2013/0280221;2013/0280220;2013/0266551;2013/0216528;2013/0202622;2013/0071414;2012/0321667;2012/0302466;2012/0301448;2012/0301447;2012/0060230;2011/0213288;2011/0158957;2011/0104128;2011/0038836;2007/0036773;和2004/0043401。CAR和CAR细胞的其他方面,

其包括示例性抗原结合结构域、接头、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域,描述于WO 2016/168595;WO 12/079000;2015/0141347;2015/0031624;2015/0030597;2014/0378389;2014/0219978;2014/0206620;2014/0037628;2013/0274203;2013/0225668;2013/0116167;2012/0230962;2012/0213783;2012/0093842;2012/0071420;2012/0015888;2011/0268754;2010/0297093;2010/0158881;2010/0034834;2010/0015113;2009/0304657;2004/0043401;2014/0322253;2015/0118208;2015/0038684;2014/0024601;2012/0148552;2011/0223129;2009/0257994;2008/0160607;2008/0003683;2013/0121960;2011/0052554;和2010/0178276。

[0672] 抗原结合结构域

[0673] 嵌合抗原受体(CAR)中包含的抗原结合结构域可以特异性地结合至抗原(例如肿瘤相关抗原(TAA)或在非癌细胞上表达的抗原)或通用受体(例如标签)。抗原结合结构域的非限制性实例包括:单克隆抗体(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgE和IgD)(例如全人或嵌合(例如人源化)抗体)、抗体的抗原结合片段(例如Fab、Fab'、或F(ab')₂片段)(例如全人或嵌合(例如人源化)抗体的片段)、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、scFv、scFv-Fc、(scFv)₂、scFab、bis-scFv、hc-IgG、BiTE、单结构域抗体(例如V-NAR结构域或V_HH结构域)、IgNAR和多特异性(例如双特异性抗体)抗体。制备这些抗原结合结构域的方法是本领域已知的。

[0674] 在一些实施方式中,抗原结合结构域包括能够特异性地结合至靶抗原的抗体的至少一个(例如一个、两个、三个、四个、五个或六个)CDR(例如来自免疫球蛋白轻链可变区的单个CDR的任何一个,或来自免疫球蛋白重链可变区的三个CDR中的任何一个),例如免疫球蛋白分子(例如轻链或重链免疫球蛋白分子)和免疫球蛋白分子的免疫活性(抗原结合)片段。

[0675] 在一些实施方式中,抗原结合结构域是单链抗体(例如V-NAR结构域或V_HH结构域,或本文所述的任何单链抗体)。在一些实施方式中,抗原结合结构域是完整抗体分子(例如人、人源化或嵌合抗体)或多聚抗体(例如双特异性抗体)。

[0676] 在一些实施方式中,抗原结合结构域包括抗体片段和多特异性(例如双特异性)抗体或抗体片段。抗体和其抗原结合片段的实例包括但不限于:单链Fv(scFv)、Fab片段、F(ab')₂、二硫键链接的Fv(sdFv)、Fv和包含VL或VH结构域的片段。

[0677] 本文提供的其他抗原结合结构域是多克隆、单克隆、多特异性(多聚体,例如双特异性)、人抗体、嵌合抗体(例如人-小鼠嵌合体)、单链抗体、细胞内抗体(例如胞内抗体)和其抗原结合片段。抗体或其抗原结合片段可以是任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚型。在一些实施方式中,抗原结合结构域是IgG1抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,抗原结合结构域是IgG4抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,抗原结合结构域是包含重链和轻链的免疫球蛋白。

[0678] 抗原结合结构域的其他实例是IgG的抗原结合片段(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的抗原结合片段)(例如人或人源化IgG的抗原结合片段,例如人或人源化IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgA的抗原结合片段(例如IgA1或IgA2的抗原结合片段)(例如人或人源化IgA的抗原结合片段,例如人或人源化IgA1或IgA2)、IgD的抗原结合片段(例如人或人源化IgD的抗原结合片段)、IgE的抗原结合片段(例如人或人源化IgE的抗原结合片段)、或IgM的抗原结

合片段(例如人或人源化IgM的抗原结合片段)。

[0679] 在一些实施方式中,抗原结合结构域可以以约或小于 1×10^{-7} M(例如约或小于 1×10^{-8} M、约或小于 5×10^{-9} M、约或小于 2×10^{-9} M、或约或小于 1×10^{-9} M)的亲和力(K_D) 在例如盐水或磷酸盐缓冲盐水中结合至特定抗原(例如肿瘤相关抗原)。

[0680] 在一些实施方式中,CAR效应细胞(例如CAR T细胞)包含结合至肿瘤抗原(例如包含肿瘤抗原结合结构域)的CAR分子。在一些实施方式中,CAR分子包含识别实体瘤(例如乳腺癌、结肠癌等)的肿瘤抗体的抗原结合结构域。在一些实施方式中,CAR分子是如上所述的串联CAR分子,其包含至少两个抗原结合结构域。在一些实施方式中,CAR分子包含识别血液恶性肿瘤(例如白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性粒细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性白血病、慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病、慢性淋巴细胞白血病、套细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和边缘区B细胞淋巴瘤、真性红细胞增多、淋巴肉芽肿病、非霍奇金病、多发性骨髓瘤等)的肿瘤抗原的抗原结合结构域。

[0681] 在一些实施方式中,肿瘤抗原是肿瘤特异性抗原(TSA)。TSA对肿瘤细胞是唯一的,并不发生在体内其他细胞上。在一些实施方式中,肿瘤抗原是肿瘤相关抗原(TAA)。TAA对肿瘤细胞不是唯一的,而是在不能诱导针对抗原的免疫耐受状态的条件下在正常细胞上表达。抗原在肿瘤上的表达抗原发生使免疫系统能够对抗原有应答的条件下。在一些实施方式中,当免疫系统不成熟且不能应答时,TAA在胎儿发育期间表达在正常细胞上,或通常在正常细胞上以极低的水平存在,但在肿瘤细胞上以高得多的水平表达。

[0682] 在某些实施方式中,通过对患者肿瘤细胞测序并鉴定仅在肿瘤中发现的突变蛋白来确定肿瘤相关抗原。这些抗原也称为“新抗原”。一旦鉴定出新抗原,就可以产生针对其的治疗性抗体并用于本文所述的方法中。

[0683] 在一些实施方式中,肿瘤抗原是上皮癌抗原(例如乳腺、胃肠道、肺)、前列腺特异性癌抗原(PSA)或前列腺特异性膜抗原(PSMA)、膀胱癌抗原、肺(例如小细胞肺)癌抗原、结肠癌抗原、卵巢癌抗原、脑癌抗原、胃癌抗原、肾细胞癌抗原、胰腺癌抗原、肝癌抗原、食管癌抗原、头和颈部癌抗原或结直肠癌抗原。在某些实施方式中,肿瘤抗原是淋巴瘤抗原(例如非霍奇金淋巴瘤或霍奇金淋巴瘤)、B细胞淋巴瘤癌抗原、白血病抗原、骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤或浆细胞性骨髓瘤)抗原、急性淋巴细胞白血病抗原、慢性粒细胞白血病抗原或急性髓性白血病抗原。

[0684] 可以被CAR效应细胞(例如CAR T细胞)靶向的肿瘤抗原(例如肿瘤相关抗原(TAA)和肿瘤特异性抗原(TSA)包括但不限于1GH-IGK、43-9F、5T4、791Tgp72、亲环蛋白C相关蛋白、甲胎蛋白(AFP)、 α -肌动蛋白4、A3、A33抗体特异性抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BCR-ABL、 β -连环蛋白、 β -HCG、BrE3抗原、BCA225、BTAA、CA125、CA 15-3\CA 27.29\BCAA、CA195、CA242、CA-50、CAM43、CAMEL、CAP-1、碳酸酐酶IX、c-Met、CA19-9、CA72-4、CAM 17.1、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD68、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK4、CDK4m、CDKN2A、CO-029、CTLA4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1a、结肠特异性抗原-p(CSAp)、CEA(CEACAM5)、CEACAM6、c-Met、DAM、E2A-PRL、EGFR、EGFRvIII、EGP-1(TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、成

纤维细胞生长因子 (FGF)、FGF-5、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250抗原、Ga733VEpCAM、GAGE、gp100、GR0-β、H4-RET、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 及其亚基、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导因子 (HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、HTgp-175、Ia、IGF-1R、IFN-γ、IFN-α、IFN-β、IFN-λ、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、KC4-抗原、KSA、KS-1-抗原、KS1-4、LAGE-1a、Le-Y、LDR/FUT、M344、MA-50、巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF)、MAGE、MAGE-1、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、MART-1、MART-2、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MG7-Ag、MOV18、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、MYL-RAR、NB/70K、Nm23H1、NuMA、NCA66、NCA95、NCA90、NY-ESO-1、p15、p16、p185erbB2、p180erbB3、PAM4抗原、胰腺癌粘蛋白、PD1受体 (PD-1)、PD-1受体配体 (PD-L1)、PD-1受体配体2 (PD-L2)、PI5、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、Pmel17前列腺酸磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RCAS1、RS5、RAGE、RANTES、Ras、T101、SAGE、S100、生存素、生存素-2B、SDDCAG16、TA-90\Mac2结合蛋白、TAAL6、TAC、TAG-72、TLP、腱生蛋白、TRAIL受体、TRP-1、TRP-2、TSP-180、TNF-α、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、酪氨酸酶、VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A-抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标志物、bcl-2、bcl-6和K-ras、癌基因标志物和癌基因产物 (参见,例如,Sensi等,Clin Cancer Res 2006,12:5023-32;Parmiani等,J Immunol 2007,178:1975-79;Novellino等,Cancer Immunol Immunother 2005,54:187-207)。

[0685] 在一些实施方式中,肿瘤抗原是源自与人慢性疾病或癌症 (例如宫颈癌) 相关的病毒的病毒抗原。例如,在一些实施方式中,病毒抗原衍生自爱泼斯坦-巴尔病毒 (EBV)、HPV抗原E6和/或E7、丙型肝炎病毒 (HCV)、甲型肝炎病毒 (HBV) 或巨细胞病毒 (CMV)。

[0686] 示例性的癌症或肿瘤和与此类肿瘤相关的特异性肿瘤抗原 (但不仅限于此) 包括急性淋巴细胞白血病 (etv6、aml1、亲环蛋白b)、B细胞淋巴瘤 (Ig遗传型)、神经胶细胞瘤 (E-钙粘蛋白、α连环蛋白、β连环蛋白、γ连环蛋白、p120ctn)、膀胱癌 (p21ras)、胆道癌 (p21ras)、乳腺癌 (MUC家族、HER2/neu、c-erbB-2)、宫颈癌 (p53、p21ras)、结肠癌 (p21ras、HER2/neu、c-erbB-2、MUC家族)、结直肠癌 (大肠相关抗原 (CRC) -CO17-1A/GA733、APC)、绒毛膜癌 (CEA)、上皮细胞癌 (亲环蛋白b)、胃癌 (HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖蛋白)、肝细胞癌 (甲胎蛋白)、霍奇金淋巴瘤 (Imp-1、EBNA-1)、肺癌 (CEA、MAGE-3、NY-ESO-1)、淋巴细胞源性白血病 (亲环蛋白b)、黑色素瘤 (p53蛋白、gp75、癌胚抗原、GM2和GD2神经节苷脂、Melan-A/MART-1、cdc27、MAGE-3、p21ras、gp100)、粘液瘤 (MUC家族、p21ras)、非小细胞肺癌 (HER2/neu、c-erbB-2)、鼻咽癌 (Imp-1、EBNA-1)、卵巢癌 (MUC家族、HER2/neu、c-erbB-2)、前列腺癌 (前列腺特异性抗原 (PSA) 及其抗原表位PSA-1、PSA-2和PSA-3、PSMA、HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖蛋白)、肾癌 (HER2/neu、c-erbB-2)、宫颈和食道鳞状细胞癌、睾丸癌 (NY-ESO-1) 和T细胞白血病 (HTLV-1表位) 和病毒产物或蛋白质。

[0687] 在一些实施方式中,包含用于本公开的方法中的CAR分子 (例如CAR T细胞) 的免疫效应细胞表达包含结合结构域的CAR (即CAR T细胞特异性地识别间皮素)。间皮素是一种在多种癌症 (包括卵巢癌、肺癌和胰腺癌) 中过表达的肿瘤抗原。

[0688] 在一些实施方式中,包含用于本公开的方法中的CAR分子 (例如CAR T细胞) 的免疫效应细胞表达包含CD19结合结构域的CAR。在一些实施方式中,包含用于本公开的方法中的

CAR分子(例如CAR T细胞)的免疫效应细胞表达包含HER2结合结构域的CAR。在一些实施方式中,包含用于本公开的方法中的CAR分子(例如CAR T细胞)的免疫效应细胞表达包含EGFR结合结构域的CAR。

[0689] 在一些实施方式中,表达包含CD19靶向或结合结构域的CAR的CAR效应细胞是 Kymriah™ (tisagenlecleucel; Novartis; 参见W02016109410,通过引用整体并入本文) 或 Yescarta™ (axicabtagene ciloleucel; Kite; 参见US 20160346326,通过引用整体并入本文)。

[0690] 接头

[0691] 本文提供的CAR可以任选地包括抗原结合结构域和跨膜结构域之间的接头(1), 和/或跨膜结构域和胞质信号传导结构域之间的接头(2)。在一些实施方式中,接头可以使多肽接头。例如,接头可以具有约1个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸、约30个氨基酸、约25个氨基酸、约20个氨基酸、约18个氨基酸、约16个氨基酸、约14个氨基酸、约12个氨基酸、约10个氨基酸、约8个氨基酸、约6个氨基酸、约4个氨基酸或约2个氨基酸;约2个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸、约30个氨基酸、约25个氨基酸、约20个氨基酸、约18个氨基酸、约16个氨基酸、约14个氨基酸、约12个氨基酸、约10个氨基酸、约8个氨基酸、约6个氨基酸或约4个氨基酸;约4个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸、约30个氨基酸、约25个氨基酸、约20个氨基酸、约18个氨基酸、约16个氨基酸、约14个氨基酸、约12个氨基酸、约10个氨基酸、约8个氨基酸或约6个氨基酸;约6个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸、约30个氨基酸、约25个氨基酸、约20个氨基酸、约18个氨基酸、约16个氨基酸、约14个氨基酸、约12个氨基酸或约10个氨基酸;约10个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸、约30个氨基酸、约25个氨基酸、约20个氨基酸、约18个氨基酸、约16个氨基酸或约14个氨基酸;约14个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸、约30个氨基酸、约25个氨基酸、约20个氨基酸、约18个氨基酸、约16个氨基酸或约14个氨基酸。

酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸、约30个氨基酸、约25个氨基酸、约20个氨基酸、约18个氨基酸或约16个氨基酸；约16个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸、约30个氨基酸、约25个氨基酸、约20个氨基酸或约18个氨基酸；约18个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸、约30个氨基酸、约25个氨基酸或约20个氨基酸；约20个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸、约30个氨基酸或约25个氨基酸；约25个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸或约30个氨基酸；约30个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸或约35个氨基酸；约35个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸或约40个氨基酸；约40个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸或约50个氨基酸；约50个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸或约60个氨基酸；约60个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约150个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸或约70个氨基酸；约70个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸或约80个氨基酸；约80个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸或约90个氨基酸；约90个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸或约100个氨基酸；约100个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸、约300个氨基酸或约200个氨基酸；约200个氨基酸至约500个氨基酸、约400个氨基酸或约300个氨基酸；约300个氨基酸至约500个氨基酸或约400个氨基酸或约400个氨基酸至约500个氨基酸之间的长度。

[0692] 接头的另外实例和方面在本文引用的参考文献中描述，因此全文并入本文。

[0693] 跨膜结构域

[0694] 在一些实施方式中，本文所述的CAR也包括跨膜结构域。在一些实施方式中，跨膜结构域与细胞质结构域中的序列天然相关。在一些实施方式中，跨膜结构域可以被一个或多个（例如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个）氨基酸置换基修饰以避免该结构域与其他跨膜结构域的结合（例如相同或不同的表面膜蛋白的跨膜结构域），以尽量减少与受体复合物其他成员的相互作用。

[0695] 在一些实施方式中，跨膜结构域可以衍生自天然来源。在一些实施方式中，跨膜结构域可以衍生自任何膜结合或跨膜蛋白。可用于本文的跨膜结构域的非限制性实例可以衍生自（例如至少包含以下的跨膜序列或部分跨膜序列）：T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、

CD33、CD37、CD64、CD80、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD86、CD134、CD137或CD154。

[0696] 在一些实施方式中,跨膜结构域可以是合成的。例如,在一些实施方式中,如果跨膜结构域来自合成来源,则跨膜结构域可以包括(例如主要包括)疏水性残基(例如亮氨酸和缬氨酸)。在一些实施方式中,合成的跨膜结构域将在合成跨膜结构域的末端包括至少一个(例如至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、或至少六个)丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三元组。在一些实施方式中,CAR的跨膜结构域可以包括CD8铰链结构域。

[0697] 跨膜结构域的其他具体实例在本文引用的参考文献中描述。

[0698] 胞质结构域

[0699] 本文还提供了包含例如胞质信号传导结构域的CAR分子,所述胞质信号传导结构域包括当抗原结合结构域与抗原结合时足以刺激T细胞的CD3 ζ 的胞质序列,和任选地一种或多种共刺激蛋白的胞质序列(例如CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40L、CD40、PD-1、PD-L1、ICOS、LFA-1、CD2、CD7、CD160、LIGHT、BTLA、TIM3、CD244、CD80、LAG3、NKG2C、B7-H3、特异性结合至CD83的配体、和本文所述或本领域已知的任何ITAM序列中一个或多个的胞质序列),其提供T细胞的共刺激。CAR免疫效应细胞的刺激可以导致CAR免疫效应细胞的一种或多种抗癌活性的激活。例如,在一些实施方式中,CAR免疫效应细胞的刺激可以导致CAR免疫效应细胞的溶细胞活性或辅助活性增加,其包括细胞因子的分泌。在一些实施方式中,共刺激蛋白的整个胞内信号传导结构域包括在胞质信号传导结构域中。在一些实施方式中,胞质信号传导结构域包括共刺激蛋白的胞内信号传导结构域的截短部分(例如胞内信号传导结构域的截短部分,其可在CAR免疫效应细胞中转导效应子功能信号)。可以包括胞质信号传导结构域中的胞内信号传导结构域的非限制性实例包括T细胞受体(TCR)和在抗原受体参与后共同启动信号转导的共同受体,以及包括至少一个(例如一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)置换基的这些序列的任何变体,并且具有相同或大约相同的功能能力。

[0700] 在一些实施方式中,胞质信号传导结构域包括两类不同的胞质信号传导序列:信号传导序列和一种或多种共刺激蛋白的胞质序列,所述信号传导序列通过TCR(主要胞质信号传导序列)(例如CD3 ζ 胞质信号传导序列)启动抗原依赖性激活,所述共刺激蛋白以抗原依赖性方式发挥作用,以提供次级或共刺激信号(次级胞质信号传导序列)。

[0701] 在一些实施方式中,设计CAR的胞质结构域以包括CD3 ζ 信号传导结构域本身或与在CAR的情况下有用的其他任何所期望的胞质信号传导序列组合。在一些实例中,CAR的胞质结构域可以包括CD3 ζ 链部分和共刺激胞质信号传导序列。共刺激胞质信号传导序列指CAR的部分,其包括共刺激蛋白(例如CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和特异性结合CD83的配体)的胞质信号传导序列。

[0702] 在一些实施方式中,CAR的胞质信号传导结构域内的胞质信号传导序列以随机顺序定位。在一些实施方式中,CAR的胞质信号传导结构域内的胞质信号传导序列以特定顺序彼此连接。在一些实施方式中,接头(例如本文所述的任何接头)可用于形成不同胞质信号传导序列之前的连接。

[0703] 在一些实施方式中,设计胞质信号传导结构域以包括CD3 ζ 信号传导序列和共刺激蛋白CD28的胞质信号传导序列。在一些实施方式中,设计胞质信号传导结构域以包括CD3 ζ

信号传导序列和共刺激蛋白4-1BB的胞质信号传导序列。在一些实施方式中,设计胞质信号传导结构域以包括CD3 ζ 信号传导序列和共刺激蛋白CD28和4-1BB的胞质信号传导序列。在一些实施方式中,胞质信号传导结构域不包括4-1BB的胞质信号传导序列。

[0704] CAR T细胞的其他修饰

[0705] 在另一个实施方式中,CAR效应细胞(例如CAR T细胞)的治疗功效通过甲基胞嘧啶双加氧酶基因(例如Tet1、Tet2、Tet3)的破坏而增强,如PCT公开WO 2017/049166中所述,其导致5-羟甲基胞嘧啶的总水平降低与增殖增强、效应细胞因子产生和脱颗粒的调节相关,并从而增加CAR效应细胞(例如CAR T细胞)增殖和/或功能。因此,可以工程化效应细胞(例如T细胞)以表达CAR,并且其中所述笑一个细胞(例如T细胞)中的Tet1、Tet2和/或Tet3的表达和/或功能已经被减少或消除。

[0706] 在另一个实施方式中,CAR效应细胞(例如CAR T细胞)的治疗功效通过使用组成性表达CAR(称为非条件CAR)并有条件地表达另一种可用于治疗癌症的药物的效应细胞(例如T细胞)来增强,如在PCT公开WO 2016/126608和美国专利2018/0044424中所述。在这样的实施方式中,有条件地表达的药物在效应细胞(例如T细胞)激活时表达,例如非条件CAR与其靶标的结合。在一个实施方式中,有条件地表达的药物是CAR(本文称为条件CAR)。在另一个实施方式中,有条件地表达的药物抑制免疫应答的检查点抑制剂。在另一个实施方式中,有条件地表达的药物改善或增强了CAR的功效,并可以包括细胞因子。

[0707] 在另一个实施方式中,CAR T细胞的治疗功效通过用能够或改变(例如下调)内源基因表达的核酸修饰CAR T细胞来增强,所述内源基因选自TCR α 链、TCR β 链、 β -2微球蛋白、HLA分子、CTLA-4、PD1和FAS,如在PCT公开WO 2016/069282和美国专利号2017/0335331中所述。

[0708] 在另一个实施方式中,CAR T细胞的治疗有效性通过在T细胞中共表达CAR和一种或多种T细胞启动("ETP")增强子来增强,如在PCT公开WO 2015/112626和美国公开号2016/0340406中所述。向CAR T细胞中添加ETP组分可增强"专业"抗原呈递细胞(APC)功能。在一个实施方式中,CAR和一个或多个EPT在T细胞中瞬时共表达。因此,工程化的T细胞是安全的(考虑到CAR/ETP表达的瞬时性质),并通过APC功能诱导延长的免疫力。

[0709] 在另一个实施方式中,CAR T细胞的治疗功效通过在T细胞中共表达CAR和包含结合(或二聚)结构域的抑制膜蛋白(IMP)来增强,如在PCT公开WO 2016/055551和美国公开号2017/0292118中所述。使CAR和IMP都对可溶性化合物具有反应性,特别是通过包含在CAR中的第二结合结构域,从而通过二聚化或配体识别允许IMP携带的抑制性信号传导结构域和CAR携带的信号转到结构域共同定位,其具有降低CAR激活的效果。抑制性信号传导结构域优选地是程序性死亡1(PD-1),其减弱T细胞受体(TCP)介导的IL-2产生和T细胞增殖的激活。

[0710] 在另一个实施方式中,使用系统来增强CAR T细胞的治疗有效性,所述系统通过添加小分子获得含有抗原结合结构域与的CAR细胞外部分构象的受控变化,如在PCR公开WO 2017/032777中所述。该集成系统在开/关状态之间切换抗原和抗原结合结构域之间的相互作用。通过能够控制CAR的细胞外部分的构象,抗原直接调节CAR T细胞的下游功能,例如细胞毒性。因此,CAR的特征在于其包含:a)至少一个细胞外域,其包含:i)细胞外抗原结合结构域;和ii)包含至少第一多聚配体结合结构域和第二多聚配体结合结构域的开关结构域,

其能够结合预定的多价配体以形成包含所述第二结合结构域和它们能够结合的多价配体的多聚体;b)至少一个跨膜结构域;和c)至少一个包含信号转导结构域和任选地共刺激结构域的内域;其中开关结构域位于细胞外抗原结合结构域和跨膜结构域之间。

[0711] II.肿瘤相关抗原靶向抗体

[0712] 在一些方面中,本公开内容提供了与靶向肿瘤抗原的抗体联合使用或进行的免疫调节融合蛋白。

[0713] 已经将治疗性单克隆抗体设想为一类药物活性剂,其应通过靶向肿瘤选择性抗原或表位来进行肿瘤选择性治疗。

[0714] 生产抗体及其抗原结合片段的方法是本领域众所周知的,并且在例如美国专利号7,247,301、7,923,221和美国专利申请2008/0138336中公开,其全部内容通过引用并入本文。

[0715] 可以在本公开内容的方法中使用的治疗性抗体包括但不限于经批准用于临床试验或用于开发临床用途的任何本领域公认的抗癌抗体。在某些实施方式中,可以在本公开内容的联合疗法中包括一种以上抗癌抗体。

[0716] 抗癌抗体的非限制性实例包括下述但不限于:曲妥珠单抗(赫赛汀™,Genentech, South San Francisco, Calif.),其用于治疗HER-2/neu阳性乳腺癌或转移性乳腺癌;贝伐单抗(AVASTIN™,Genentech),其用于治疗结直肠癌、转移性结直肠癌、乳腺癌、转移性乳腺癌、非小细胞肺癌或肾细胞癌;利妥昔单抗(RITUXAN™,Genentech),其用于治疗非霍奇金氏淋巴瘤或慢性淋巴细胞白血病;帕妥珠单抗(OMNITARG™,Genentech),其用于治疗乳腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌或卵巢癌;西妥昔单抗(ERBITUX™,ImClone Systems Incorporated, New York, N.Y.),其用于治疗结直肠癌、转移性结直肠癌、肺癌、头颈癌、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、胃癌、卵巢癌、脑癌、胰腺癌、食道癌、肾细胞癌、前列腺癌、宫颈癌或膀胱癌;IMC-1C11(ImClone Systems Incorporated),其用于治疗结直肠癌、头颈癌以及其他潜在癌症靶点;托西莫单抗以及托西莫单抗和碘I 131(BEXXAR XM, Corixa Corporation, Seattle, Wash.),其用于治疗非霍奇金氏淋巴瘤,所述淋巴瘤可以是CD20阳性、滤泡性非霍奇金氏淋巴瘤,具有或不具有转化,其疾病利妥昔单抗难治且化疗后已复发;In¹¹¹替伊莫单抗(ibirtumomab tiuxetan);Y⁹⁰替伊莫单抗;In¹¹¹替伊莫单抗和Y⁹⁰替伊莫单抗(ZEVALIN™, Biogen Idec, Cambridge, Mass.),其用于治疗淋巴瘤或非霍奇金氏淋巴瘤,可以包括复发的滤泡性淋巴瘤;复发或难治性,低分级或滤泡性非霍奇金氏淋巴瘤;或转化的B细胞非霍奇金氏淋巴瘤;EMD 7200(EMD Pharmaceuticals, Durham, N.C.),其用于治疗非小细胞肺癌或宫颈癌;SGN-30(靶向CD30抗原的基因工程化单克隆抗体,Seattle Genetics, Bothell, Wash.),其用于治疗霍奇金氏淋巴瘤或非霍奇金氏淋巴瘤;SGN-15(与阿霉素缀合的靶向Lewisy相关抗原的基因工程化单克隆抗体,Seattle Genetics),其用于治疗非小细胞肺癌;SGN-33(靶向CD33抗原的人源化抗体,Seattle Genetics),其用于治疗急性髓性白血病(AML)和骨髓增生异常综合征(MDS);SGN-40(靶向CD40的人源化单克隆抗体,Seattle Genetics),其用于治疗多发性骨髓瘤或非霍奇金氏淋巴瘤;SGN-35(与澳瑞他汀E缀合的靶向CD30抗原的基因工程化单克隆抗体,Seattle Genetics),其用于治疗非霍奇金氏淋巴瘤;SGN-70(靶向CD70的人源化抗体,Seattle Genetics),其用于治疗肾癌和鼻咽癌;SGN-75(由SGN70抗体和澳瑞他汀衍生物组成的缀合物,Seattle Genetics);和SGN-

17/19(缀合至美法仑前药的包含抗体和酶的融合蛋白,Seattle Genetics),其用于治疗黑色素瘤和转移性黑色素瘤。

[0717] 应当理解的是,在本公开内容的方法中使用的治疗性抗体不限于上文所述的那些。例如,也可以将下述已获批的治疗性抗体用于本公开内容的方法中:用于间变性大细胞淋巴瘤和霍奇金氏淋巴瘤的本妥昔单抗(brentuximab vedotin) (ADCETRIS™),用于黑色素瘤的伊匹单抗(MDX-101;YERVOY™),用于慢性淋巴细胞性白血病的奥法木单抗(ARZERRA™),用于结直肠癌的帕尼单抗(VECTIBIX™),用于慢性淋巴细胞性白血病的阿仑单抗(CAMPATH™),用于慢性淋巴细胞性白血病的奥法木单抗(ARZERRA™),用于急性髓性白血病的吉妥单抗(gemtuzumab ozogamicin) (MYLOTARG™)。

[0718] 适用于本文公开的方法的抗体也可以是免疫细胞表达的靶分子,例如但不限于OX86,其靶向OX40并在肿瘤部位增加抗原特异性CD8+T细胞和增强肿瘤排斥;BMS-663513,其靶向CD137并导致已建立的肿瘤消退,以及CD8+T细胞的扩增和维持,和达克珠单抗(ZENAPAX™),其靶向CD25并导致CD4+CD25+FOXP3+Treg的瞬时耗竭和增强肿瘤消退和增加效应T细胞的数量。对这些抗体更详细的讨论可以参见例如Weiner等,Nature Rev.Immunol 2010;10:317-27。

[0719] 可以鉴定出靶向肿瘤抗原(例如与不同类型癌症相关的肿瘤抗原,如癌、肉瘤、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤及其组合)的其他治疗性抗体。例如,在本文公开的方法中,下述肿瘤抗原可以被治疗性抗体靶向。

[0720] 肿瘤抗原可以是上皮癌抗原(例如乳腺、胃肠道、肺)、前列腺特异性癌抗原(PSA)或前列腺特异性膜抗原(PSMA)、膀胱癌抗原、肺(例如小细胞肺)癌抗原、结肠癌抗原、卵巢癌抗原、脑癌抗原、胃癌抗原、肾细胞癌抗原、胰腺癌抗原、肝癌抗原、食道癌抗原、头颈癌抗原或结直肠癌抗原。在某些实施方式中,肿瘤抗原是淋巴瘤抗原(例如非霍奇金氏淋巴瘤或霍奇金氏淋巴瘤)、B细胞淋巴瘤癌抗原、白血病抗原、骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤或浆细胞淋巴瘤)抗原、急性淋巴细胞白血病抗原、慢性髓性白血病抗原或急性髓性白血病抗原。应当理解的是,所描述的肿瘤抗原仅是示例性的,并且用于本文公开的方法中任何肿瘤抗原都是可以靶向的。

[0721] 在某些实施方式中,肿瘤抗原是粘蛋白-1蛋白或肽(MUC-1),其存在于大多数或所有人腺癌中:胰腺、结肠、乳腺、卵巢、肺、前列腺、头颈,包括多发性骨髓瘤和一些B细胞淋巴瘤。患有炎性肠病(克隆氏病或溃疡性结肠炎)的患者患结直肠癌的风险增加。MUC-1是I型跨膜糖蛋白。MUC-1的主要细胞外部分具有大量由20个氨基酸组成的串联重复序列,其包含免疫原性表位。在一些癌症中,其以非糖基化形式暴露,这种形式可以被免疫系统识别(Gendler等,J Biol Chem 1990;265:15286-15293)。

[0722] 在某些实施方式中,肿瘤抗原是突变的B-Raf抗原,其与黑色素瘤和结肠癌相关。这些突变中的绝大多数代表核苷酸1796处T-A的单核苷酸变化,导致B-Raf激活片段中残基599的缬氨酸变成谷氨酸。作为激活Ras蛋白的效应物,Raf蛋白还与癌症间接相关,其致癌形式存在于所有人类癌症的约三分之一中。正常的非突变B-Raf参与细胞信号传导,将信号从细胞膜传导到细胞核。所述蛋白通常仅在需要中继信号时才有活性。而相比之下,据报道突变体B-Raf一直处于活跃状态,破坏了信号转导。(Merce和Pritchard,Biochim Biophys Acta (2003) 1653 (1):25-40;Sharkey等,Cancer Res. (2004) 64 (5):1595-1599)。

[0723] 在某些实施方式中,肿瘤抗原是人表皮生长因子受体-2 (HER-2/neu) 抗原。将具有过表达HER-2/neu的细胞的癌症称为HER-2/neu⁺癌症。示例性HER-2/neu⁺癌症包括前列腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、皮肤癌、肝癌(例如肝细胞腺癌)、肠癌和膀胱癌。

[0724] HER-2/neu具有约645aa的细胞外结合结构域(ECD),其与表皮生长因子受体(EGFR)具有40%同源性、高度疏水性的跨膜锚定结构域(TMD)以及与EGFR具有80%同源性的约580个aa的羧基端胞内域(ICD)。HER-2/neu的核苷酸序列可以从GENBANKTM获得。登录号AH002823(人HER-2基因,启动子区和外显子1);M16792(人HER-2基因,外显子4);M16791(人HER-2基因,外显子3);M16790(人HER-2基因,外显子2);和M16789(人HER-2基因,启动子区和外显子1)。HER-2/neu蛋白的氨基酸序列可以从GENBANKTM获得。登录号AAA58637。基于这些序列,本领域技术人员能够使用已知测定法开发HER-2/neu抗原,以知道产生有效免疫应答的合适表位。示例性HER-2/neu抗原包括p369-377(HER-2/neu衍生的HLA-A2肽);dHER2(Corixa Corporation);li-Key II类MHC表位杂交(Generex Biotechnology Corporation);肽P4(氨基酸378-398);肽P7(氨基酸610-623);肽P6(氨基酸544-560)和肽P7的混合物;肽P4、P6和P7的混合物;HER2[9754]等。

[0725] 在某些实施方式中,肿瘤抗原是表皮生长因子受体(EGFR)抗原。EGFR抗原可以是EGFR变体1抗原、EGFR变体2抗原、EGFR变体3抗原和/或EGFR变体4抗原。将具有过表达EGFR的细胞的癌症称为EGFR⁺癌症。示例性EGFR⁺癌症包括肺癌、头颈癌、结肠癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、胃癌、卵巢癌、脑癌和膀胱癌。

[0726] 在某些实施方式中,肿瘤抗原是血管内皮生长因子受体(VEGFR)抗原。认为VEGFR是癌症诱导的血管生成的调节剂。将具有过表达VEGFR的细胞的癌症称为VEGFR⁺癌症。示例性VEGFR⁺癌症包括乳腺癌、肺癌、小细胞肺癌、结肠癌、结直肠癌、肾癌、白血病和淋巴细胞白血病。

[0727] 在某些实施方式中,肿瘤抗原是前列腺特异性抗原(PSA)和/或前列腺特异性膜抗原(PSMA),其在不依赖于雄激素的前列腺癌中普遍表达。

[0728] 在某些实施方式中,肿瘤抗原是糖蛋白100(gp 100),这是一种与黑色素瘤相关的肿瘤特异性抗原。

[0729] 在某些实施方式中,肿瘤相关抗原是癌胚(CEA)抗原。将具有过表达CEA的细胞的癌症称为CEA⁺癌症。示例性CEA⁺癌症包括结直肠癌、胃癌和胰腺癌。示例性CEA抗原包括CAP-1(即,CEA aa 571-579)、CAP1-6D、CAP-2(即,CEA aa 555-579)、CAP-3(即,CEA aa 87-89)、CAP-4(CEA aa 1-11)、CAP-5(即,CEA aa345-354)、CAP-6(即,CEA aa 19-28)和CAP-7。

[0730] 在某些实施方式中,肿瘤抗原是糖抗原10.9(CA 19.9)。CA 19.9是一种与Lewis A血型物质相关的寡糖,与结直肠癌相关。

[0731] 在某些实施方式中,肿瘤抗原是黑色素瘤癌抗原。黑色素瘤癌抗原用于治疗黑色素瘤。示例性黑色素瘤癌抗原包括MART-1(例如MART-1 26-35肽,MART-1 27-35肽);MART-1/Melan A;pMel17;pMel17/gp100;gp100(例如gp 100肽280-288,gp 100肽154-162,gp 100肽457-467);TRP-1;TRP-2;NY-ESO-1;p16; β -连环蛋白;mum-1等。

[0732] 在某些实施方式中,肿瘤抗原是突变或野生型ras肽。突变ras肽可以是突变K-ras肽、突变N-ras肽和/或突变H-ras肽。在ras蛋白中的突变通常发生在位置12(例如精氨酸或缬氨酸置换为甘氨酸)、13(例如天冬酰胺置换为甘氨酸)、61(例如谷氨酰胺转化为亮氨酸)

和/或59。突变ras肽可以用作肺癌抗原、胃肠道癌症抗原、肝癌抗原、骨髓癌抗原(例如急性白血病、骨髓增生异常)、皮肤癌抗原(例如黑色素瘤、基底细胞、鳞状细胞)、膀胱癌抗原、结肠癌抗原、结直肠癌抗原和肾细胞癌抗原。

[0733] 在某些实施方式中,肿瘤抗原是突变和/或野生型p53肽。p53肽可以用作结肠癌抗原、肺癌抗原、乳腺癌抗原、肝细胞癌抗原、淋巴瘤癌抗原、前列腺癌抗原、甲状腺癌抗原、膀胱癌抗原、胰腺癌抗原和卵巢癌抗原。

[0734] 其他肿瘤抗原是本领域熟知的并且包括例如胶质瘤相关抗原、癌胚抗原(CEA)、 β -人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白(AFP)、凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、蛋白酶、前列腺特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、酪氨酸酶、prostein、PSMA、ras、Her2/neu、TRP-1、TRP-2、TAG-72、KSA、CA-125、PSA、BRCI、BRC-II、bcr-abl、pax3-fkhr、ews-fli-1、生存素和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、MAGE、GAGE、GP-100、MUC-1、MUC-2、ELF2M、中性弹性蛋白酶、肝配蛋白B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF)-I、IGF-II、IGF-I受体和间皮素。

[0735] 在某些实施方式中,肿瘤抗原包含与恶性肿瘤相关的一个或多个抗原性癌表位。恶性肿瘤表达多种蛋白,可以将其作为免疫攻击的靶抗原。这些分子包括但不限于组织特异性抗原,如黑色素瘤中的MART-1、酪氨酸酶和GP 100,以及前列腺癌中的前列酸磷酸酶(PAP)和前列腺特异性抗原(PSA)。其他靶分子属于与转化相关的分子,如癌基因ene HER-2/Neu ErbB-2。又一组靶抗原是癌胎抗原,如癌胚抗原(CEA)。在B细胞淋巴瘤中,肿瘤特异性独特型免疫球蛋白构成了真正的肿瘤特异性免疫球蛋白抗原,该抗原对于单个肿瘤是独特的。B细胞分化抗原(如CD19、CD20和CD37)是B细胞淋巴瘤中靶抗原的其他候选物。已将这些抗原中的一些(CEA、HER-2、CD19、CD20、独特型)用作单克隆抗体被动免疫疗法的靶点,但是成功率有限。

[0736] 肿瘤抗原还可以是肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)。TSA是肿瘤细胞中独特的,并且不出现在机体的其他细胞中。TAA相关抗原不是肿瘤细胞特有的,而是在无法诱导对该抗原的免疫耐受状态的条件下在正常细胞上表达。抗原在肿瘤上的表达可以在使免疫系统能够对抗原做出应答的条件下发生。TAA可能是在胎儿发育过程中免疫系统不成熟且无法应答时在正常细胞上表达的抗原,也可能是正常细胞上通常以极低水平存在但在肿瘤细胞上以高得多的水平表达的抗原。

[0737] TSA或TAA抗原的非限制性实例包括以下:分化抗原,如MART-1/MelanA(MART-1)、Pmel 17、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2和肿瘤特异性多谱系抗原,如MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、pi 5;过表达的胚胎抗原,如CEA;过表达的癌基因和突变的肿瘤抑制基因,如p53、Ras、HER-2/neu;由染色体易位产生的独特肿瘤抗原,如BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR;和病毒抗原,如爱泼斯坦巴尔病毒抗原EBVA和人乳头瘤病毒(HPV)抗原E6和E7。其他基于蛋白的大型抗原包括TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p 180erbB-3、c-met、nm-23H 1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 β -连环蛋白、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4(791Tgp72)、甲胎蛋白、 β -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3\CA 27.29\BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68\I、CO-029、FGF-5、G250、Ga733VEpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV 18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS 1、SDCCAG16、TA-90\Mac-2结合蛋白、亲环蛋白C相关蛋白、TAAL6、TAG72、TLP和

TPS。

[0738] 在某些实施方式中,通过对患者的肿瘤细胞进行测序并鉴定仅在肿瘤中发现的突变蛋白来确定与肿瘤相关的抗原。将这些抗原称为“新抗原”。一旦鉴定出新抗原,就可以产生针对其的治疗性抗体并将其用于本文所述的方法中。

[0739] 治疗性抗体可以是抗体片段;包含抗体的复合物;或包含抗体的缀合物。抗体可以任选地是嵌合的或人源化的或全人的。

[0740] III. 免疫检查点阻断

[0741] 在一些方面中,本公开内容提供了与免疫检查点抑制剂或免疫检查点阻断剂联合使用或进行的免疫调节融合蛋白。

[0742] T细胞激活和效应子功能是通过称为“免疫检查点”的共刺激和抑制信号平衡的。调控T细胞效应子功能的抑制性配体和受体在肿瘤细胞上是过表达的。随后,共刺激受体的激动剂或抑制性信号的拮抗剂导致抗原特异性T细胞应答的扩增。与直接靶向肿瘤细胞的治疗性抗体不同的是,免疫检查点阻断剂增强内源性抗肿瘤活性。在某些实施方式中,适于在本文公开的方法中使用的免疫检查点阻断剂是抑制性信号的拮抗剂,例如,靶向例如PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG3、B7-H3、B7-H4或TIM3的抗体。在Pardoll, D., Nature. 12:252-264, 2012中综述了这些配体和受体。

[0743] 在某些实施方式中,免疫检查点阻断剂是破坏或抑制来自抑制性免疫调节剂的信号传导的抗体或其抗原结合部分。在某些实施方式中,免疫检查点阻断剂是破坏或抑制来自抑制性免疫调节剂的小分子。

[0744] 在某些实施方式中,抑制性免疫调节剂(免疫检查点阻断剂)是PD-1/PD-L1信号传导通路的组成部分。因此,本公开内容的某些实施方式提供了用于免疫治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分破坏PD-1受体和其配体PD-L1之间的相互作用。本领域公知的结合至PD-1并破坏PD-1及其配体PD-L1之间的相互作用,以及刺激抗肿瘤免疫应答的抗体适于在本文公开的方法中使用。在某些实施方式中,抗体或其抗原结合部分特异性结合至PD-1。例如,靶向PD-1并且在临床试验中的抗体包括例如纳武单抗(BMS-936558, Bristol-Myers Squibb)和派姆单抗(lambrolizumab, MK03475, Merck)。在本文公开的方法中使用的其他适宜抗体是在美国专利号8,008,449中公开的抗PD-1抗体,其通过引用并入本文。在某些实施方式中,抗体或其抗原结合部分特异性结合至PD-L1并抑制其与PD-1相互作用,从而增加免疫活性。本领域公知的结合至PD-L1并破坏PD-1和PD-L1之间的相互作用,以及刺激抗肿瘤免疫应答的抗体适于在本文公开的方法中使用。例如,靶向PD-L1并且在临床试验中的抗体包括BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) 和MPDL3280A (Genetech)。在美国专利号7,943,743中公开了靶向PD-L1的其他适宜抗体。本领域普通技术人员将理解的是,结合至PD-1或PD-L1、破坏PD-1/PD-L1相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的任何抗体适于在本文公开的方法中使用。

[0745] 在某些实施方式中,抑制性免疫调节剂是CTLA-4信号传导通路的组成部分。因此,本公开内容的某些实施方式提供了用于免疫治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分靶向CTLA-4并破坏其与CD80和CD86的相互作用。靶向CTLA-4的示例性抗体包括伊匹单抗(MDX-

010,MDX-101,Bristol-Myers Squibb),其是FDA已批准的,和tremelimumab(ticilimumab,CP-675,206,Pfizer),目前正在人体试验中。在WO 2012/120125、美国专利号6,984720、6,682,7368和美国专利申请2002/0039581、2002/0086014和2005/0201994中公开了靶向CTLA-4的其他适宜抗体,其通过引用并入本文。本领域普通技术人员将理解的是,结合至CTLA-4、破坏其与CD80和CD86相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的任何抗体适于在本文公开的方法中使用。

[0746] 在某些实施方式中,抑制性免疫调节物是LAG3(淋巴细胞激活基因3)信号传导通路的组成部分。因此,本公开内容的某些实施方式提供了用于免疫治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分靶向LAG3并破坏其与II类MHC分子的相互作用。靶向LAG3的示例性抗体是IMP321(Immutep),目前正在进行人体试验。在美国专利申请2011/0150892中公开了靶向LAG3的其他适宜抗体,其通过引用并入本文。本领域普通技术人员将理解的是,结合至LAG3、破坏其与II类MHC分子相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的任何抗体适于在本文公开的方法中使用。

[0747] 在某些实施方式中,抑制性免疫调节剂是B7家族信号传导通路的组成部分。在某些实施方式中,B7家族成员是B7-H3和B7-H4。因此,本公开内容的某些实施方式提供了用于免疫治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分靶向B7-H3或H4。B7家族没有任何确定的受体,但是这些配体在肿瘤细胞或肿瘤浸润细胞上被上调。临床前小鼠模型已证明阻断这些配体能够增强抗肿瘤免疫。靶向B7-H3的示例性抗体是MGA271(MacroGenics),目前正在进行人体试验。在美国专利申请2013/0149236中公开了靶向LAG3的其他适宜抗体,其通过引用并入本文。本领域普通技术人员将理解的是,结合至B7-H3或H4并刺激抗肿瘤免疫应答的任何抗体适于在本文公开的方法中使用。

[0748] 在某些实施方式中,抑制性免疫调节剂是TIM3(T细胞膜蛋白3)信号传导通路的组成部分。因此,本公开内容的某些实施方式提供了用于免疫治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分靶向LAG3并破坏其与半乳糖凝集素9的相互作用。在美国专利申请2013/0022623中公开了靶向TIM3的适宜抗体,其通过引用并入本文。本领域普通技术人员将理解的是,结合至TIM3,破坏其与半乳糖凝集素9相互作用,并刺激抗肿瘤免疫应答的任何抗体适于在本文公开的方法中使用。

[0749] 应当理解的是,适于在本文公开的方法中使用的抗体靶向免疫检查点不限于上文所述的那些。此外,本领域普通技术人员将理解的是,其他免疫检查点靶点也能够被本文所述方法中的拮抗剂或抗体靶向,前提条件是该靶向刺激了抗肿瘤免疫应答,这反映在例如T细胞增殖的增加,T细胞激活的增强和/或细胞因子产生的增加(例如IFN- γ 、IL-2)上。

[0750] IV. 癌症疫苗

[0751] 在一些方面中,本公开内容提供了与癌症疫苗联合使用或进行的免疫调节融合蛋白。在某些实施方式中,癌症疫苗针对特异性靶点(如肿瘤相关抗原)刺激特异性免疫应答。

[0752] 在某些实施方式中,癌症疫苗包括病毒、细菌或酵母载体,以将重组基因递送至抗原呈递细胞(APC)。

[0753] 在某些实施方式中,癌症疫苗使用自体或同种异体肿瘤细胞。在某些实施方式中,可以对这些肿瘤细胞进行修饰以表达MHC、共刺激分子或细胞因子。

[0754] 在某些实施方式中,通过对患者的肿瘤细胞进行测序并鉴定仅在肿瘤中发现的突变蛋白来确定与肿瘤相关的抗原。将这些抗原称为“新抗原”。一旦鉴定出新抗原,就可以产生针对其的治疗性抗体并将其用于本文所述的方法中。就可以将其用作疫苗的抗原或开发与新抗原特异性反应的单克隆抗体。

[0755] 在某些实施方式中,疫苗包括使用细胞因子(如GM-CSF)转导或使用佐剂化合物负载的经辐射的肿瘤细胞,如分泌GM-CSF的肿瘤细胞疫苗GVAX (Immunological Reviews, 222 (1):287-298, 2008)。在某些实施方式中,疫苗包含免疫员组合物行驶的一种或多种肿瘤相关抗原,任选地与佐剂组合。例如,针对HPV-16癌蛋白的疫苗接种导致外阴上皮内赘生物阳性临床结局(The New England Journal of Medicine, 361(19), 1838-1847, 2012)。同样,单剂量给予环磷酰胺后对癌症疫苗IMA901的多肽免疫应答可以延长患者的生存期(Nature Medicine, 18(8):1254-61, 2012)。或者,可以将基于DNA的方法用于免疫具有一种或多种肿瘤相关抗原的患者。在小鼠黑色素瘤中使用DNA疫苗联合抗酪氨酸酶相关蛋白-1单克隆抗体观察到了改善的肿瘤免疫(Cancer Research, 68(23), 9884-9891, 2008)。

[0756] 其他疫苗方法利用患者的免疫细胞,如树突状细胞,可以将其与肿瘤相关抗原一起培养,以产生抗原呈递细胞,所述细胞将刺激免疫系统并靶向目标抗原。目前FDA批准的使用该方法的癌症治疗疫苗是**Provenge®** (Dendreon),已批准将其用于一些男性转移性前列腺癌中。该疫苗刺激对前列酸磷酸酯(PAP)(一种存在于大部分前列腺癌细胞上的抗原)的免疫应答。该疫苗由从特定患者的免疫细胞中分离和培养带有PAP的树突状细胞以产生将刺激免疫系统并靶向PAP的抗原呈递细胞制备。可以将这些和其他癌症疫苗用于与本文所述的其他治疗联用。

[0757] A. 两亲性疫苗

[0758] 在一些实施方式中,适于与本文所述的免疫调节融合蛋白一起使用的癌症疫苗是两亲性疫苗,如在US 2013/0295129中所描述的,其通过引用并入本文。两亲性疫苗组合了白蛋白结合脂质和肽抗原或分子佐剂,以有效地将肽或佐剂在体内靶向淋巴结。脂质缀合物结合至内源性白蛋白,由于抗原呈递细胞对白蛋白的过滤,脂质缀合物将其靶向淋巴管和引流淋巴结,并在那里聚集。当脂质缀合物包括抗原肽或分子佐剂时,缀合物诱导或增强强大的免疫应答。

[0759] 淋巴结靶向缀合物通常包括三个结构域:高度亲脂性的白蛋白结合结构域(例如白蛋白结合脂质)、货物(如分子佐剂或肽抗原)和极性嵌段接头,其促进缀合物的溶解性并降低脂质插入细胞质膜的能力。因此,在某些实施方式中,缀合物的通用结构是L-P-C,其中“L”是结合白蛋白的脂质,“P”是极性嵌段,和“C”是货物例如分子佐剂或多肽。在一些实施方式中,货物本身也可以用作极性嵌段结构域,并且不需要单独的极性嵌段结构域。因此,在某些实施方式中,缀合物仅有两个结构域:结合白蛋白的脂质和货物。

[0760] 适于在本文公开的方法中使用的缀合物的货物通常是分子佐剂,如免疫调节寡核苷酸,或肽抗原。然而,货物也可以是其他寡核苷酸、肽、Toll样受体激动剂或其他免疫调节化合物、染料、MRI造影剂、荧光团或需要有效运输至淋巴结的小分子药物。

[0761] 在某些实施方式中,脂质-寡核苷酸缀合物包括直接与脂质缀合或与脂质缀合的

接头连接的免疫刺激性寡核苷酸。其他实施方式涉及脂质-肽缀合物,其包括直接缀合至脂质或与缀合至脂质的接头连接的抗原肽。

[0762] 脂质

[0763] 脂质缀合物通常包括疏水性脂质。脂质可以是直链的、支链的或环状的。脂质的长度优选为至少17至18个碳,但是如果其显示出良好的白蛋白结合和对淋巴结的充分靶向,则可以更短。淋巴结靶向缀合物包括脂质-寡核苷酸缀合物和脂质肽缀合物,其可以从递送部位经淋巴转移到淋巴结。在某些实施方式中,活性部分地取决于缀合物与受试者血液中白蛋白结合的能力。因此,靶向淋巴结的缀合物通常包括可以在生理条件下结合白蛋白的脂质。可以基于脂质或包含脂质的脂质缀合物结合白蛋白的能力来选择适合于靶向淋巴结的脂质。用于检测脂质或脂质缀合物结合至白蛋白能力的适宜方法是本领域公知的。

[0764] 例如,在某些实施方式中,允许多种脂质缀合物在水溶液中自发地形成胶束。将胶束与白蛋白或含白蛋白的溶液(例如胎牛血清(FBS))一起孵育。可以例如通过ELISA、尺寸排阻色谱法或其他方法分析样品以确定结合是否发生。如果存在白蛋白或含白蛋白的溶液(例如胎牛血清(FBS)),胶束解离并且脂质缀合物如上所述结合至白蛋白,则脂质缀合物可以选择为淋巴结靶向缀合物。

[0765] 用于靶向淋巴结的脂质缀合物中的优选脂质的实例包括但不限于具有8-30个碳原子的脂肪族尾部的脂肪酸,其包括但不限于线性不饱和和饱和脂肪酸、支链饱和和不饱和脂肪酸,和脂肪酸衍生物,例如脂肪酸酯、脂肪酸酰胺、和脂肪酸硫酯、二酰基脂质、胆固醇、胆固醇衍生物、和类固醇酸例如胆汁酸、脂质A或其组合。

[0766] 在某些实施方式中,脂质是二酰基脂质或两尾脂质。在一些实施方式中,二酰基脂质中的尾部包含约8个至30个碳原子并且可以是饱和的、不饱和的或其组合。尾部可以通过酯键、酰胺键、硫酯键或其组合与头基偶联。在一个特定实施方式中,二酰基脂质是磷脂质、糖脂、鞘脂或其组合。

[0767] 优选地,淋巴结靶向缀合物包含长度为8个或更多个碳单元的脂质。据信,增肌脂质单元的数量可以减少脂质向细胞质膜的插入,从而使脂质缀合物保持自由结合白蛋白并运输至淋巴结。

[0768] 例如,脂质可以由两个C18烃尾部组成的二酰基脂质。

[0769] 在某些实施方式中,用于制备靶向淋巴结的脂质缀合物的脂质不是单链烃(例如C18)或胆固醇。已经研究了胆固醇缀合物以增强分子佐剂(如CPG)的免疫调节和肽的免疫原性,但是与脂蛋白联合结合但与白蛋白不良结合的胆固醇缀合物与最佳靶蛋白结合缀合物相比在疫苗中显示出较差的淋巴结靶向和较低免疫原性。

[0770] 分子佐剂

[0771] 在某些实施方式中,将脂质寡核苷酸缀合物用于疫苗中。挂核苷酸缀合物通常含有免疫刺激性寡核苷酸。

[0772] 在某些实施方式中,免疫刺激性寡核苷酸可以用作模式识别受体(PRR)的配体。PRR的实例包括Toll样家族信号分子,其在先天免疫应答中起作用并且还影响后来的和更多的抗原特异性适应性免疫应答。因此,寡核苷酸可以用作Toll样家族信号分子的配体,例如Toll样受体9(TLR9)。

[0773] 例如,可以通过TLR9在人的浆细胞样树突细胞和B细胞上检测未甲基化的CpG位点

(Zaida等, *Infection and Immunity*, 76 (5):2123-2129, (2008))。因此,寡核苷酸的序列可以包括一个或多个未甲基化的胞嘧啶-鸟嘌呤 (CG或CpG,可互换使用) 而核苷酸基序。“p”指DNA的磷酸二酯主链,如以下更详细所讨论,一些包含CG的寡核苷酸可以具有修饰的主链,例如硫代磷酸 (PS) 主链。

[0774] 在某些实施方式中,免疫刺激性寡核苷酸可以包含多于一个CG二核苷酸,其被连续地排列或被居中核苷酸分隔。CpG基序可以在寡核苷酸序列的内部。许多核苷酸序列以CG二核苷酸的数量和位置以及CG二聚体侧翼的精确碱基序列刺激TLR9。

[0775] 通常,CG ODN根据其序列、二级结构、和对人外周血单核细胞 (PBMC) 的影响进行分类。这五个类别是A类 (D型)、B类 (K型)、C类、P类和S类 (Vollmer, J&Krieg, A M, *Advanced drug delivery reviews* 61 (3):195-204 (2009), 其通过引用并入本文)。CG ODN可以刺激I型干扰素 (例如IFN α) 的产生并诱导树突细胞 (DC) 成熟。一些类别的ODN通过间接细胞因子信号传导也是自然杀伤 (NK) 细胞的强激活剂。一些类别是人B细胞和单核成熟的强刺激剂 (Weiner, G L, *PNAS USA* 94 (20):10833-7 (1997); Dalpke, A H, *Immunology* 106 (1):102-12 (2002); Hartmann, G, *J of Immun.* 164 (3):1617-2 (2000), 其每一个通过引用并入本文)。

[0776] 根据一些实施方式,亲脂性CpG寡核苷酸缀合物可用于增强对抗原的免疫应答。亲脂性-CpG寡核苷酸由以下表述,其中“L”是亲脂性化合物,例如二酰基脂质,“Gn”是鸟嘌呤重复接头和“n”代表1、2、3、4或5。

[0777] 5'-L-G_nTCCATGACGTTCTGACGTT-3'

[0778] 其他PRR Toll样受体包括TLR3和TLR7,其可分别识别双链RNA、单链和短双链RNA,和维甲酸诱导基因I (RIG-1) 样受体、即RIG-I和黑色素瘤分化相关基因5 (MDA5),其最广为人知的是胞质中的RNA感应受体。因此,在某些实施方式中,寡核苷酸包含TLR3、TLR7或RIG-I样受体或其组合的功能配体。

[0779] 免疫刺激性寡核苷酸的实例,以及制备方法是本领域已知的,参见例如Bodera, P. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 5 (1):87-93 (2011), 其通过引用并入本文。

[0780] 在某些实施方式中,寡核苷酸货物包括两个或更多个免疫刺激性序列。

[0781] 寡核苷酸的长度可以在2-100个核苷酸碱基之间,其包括例如5个核苷酸碱基长度、10个核苷酸碱基长度、15个核苷酸碱基长度、20个核苷酸碱基长度、25个核苷酸碱基长度、30个核苷酸碱基长度、35个核苷酸碱基长度、40个核苷酸碱基长度、45个核苷酸碱基长度、50个核苷酸碱基长度、60个核苷酸碱基长度、70个核苷酸碱基长度、80个核苷酸碱基长度、90个核苷酸碱基长度、95个核苷酸碱基长度、98个核苷酸碱基长度、100个核苷酸碱基长度或更多。

[0782] 寡核苷酸的3'末端或5'末端可以缀合至极性嵌段或脂质。在某些实施方式中,寡核苷酸的5'末端与极性嵌段或脂质连接。

[0783] 寡核苷酸可以是DNA或RNA核苷酸,其通常包括杂环碱基 (核酸碱基)、与杂环碱基连接的糖部分、和磷酸酯部分,其酯化糖部分的羟基官能团。主要天然存在的核苷酸包括尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤作为杂环碱基,以及通过磷酸二酯键连接的核糖或脱氧核糖。在某些实施方式中,寡核苷酸由核苷酸类似物组成,其相对于DNA或RNA配对物,已经被化学修饰以改善对靶受体的稳定性、半衰期或特异性或亲和力。化学修饰包括核碱基、糖部分、核苷酸键或其组合的化学修饰。如在本文中所使用的,“修饰的核苷酸”或“化

学修饰的核苷酸”定义了具有对杂环碱基、糖部分或磷酸酯部分组成中的一个或多个化学修饰的核苷酸。在某些实施方式中,与相同核碱基序列的DNA或RNA寡核苷酸相比,修饰的核苷酸的电荷减少。例如,寡核苷酸可以具有低的负电荷,不带电或正电荷。

[0784] 通常,核苷类似物支持能够通过Watson-Crick碱基配对与标准多核苷酸碱基氢键键合的碱基,其中类似物主链以允许寡核苷酸类似物分子与标准多核苷酸中的碱基之间以序列特异性方式进行氢键键合的方式提供碱基(例如单链RNA或单链DNA)。在某些实施方式中,类似物具有基本不带电的含磷主链。

[0785] 肽抗原

[0786] 适于在本文公开的方法中使用的肽缀合物通常包括抗原蛋白或多肽,如肿瘤相关抗原或其部分。

[0787] 肽可以是2-100个氨基酸,其包括例如5个氨基酸、10个氨基酸、15个氨基酸、20个氨基酸、25个氨基酸、30个氨基酸、35个氨基酸、40个氨基酸、45个氨基酸、或50个氨基酸。在一些实施方式中,肽可以大于50个氨基酸。在一些实施方式中,肽可以大于100个氨基酸。

[0788] 蛋白质/肽是线性的、分支的或环状的。肽可以包括D氨基酸、L氨基酸或其组合。肽或蛋白质可以在肽或蛋白质的N-末端或C-末端缀合至极性嵌段或脂质。

[0789] 蛋白质或多肽可以是可诱导或增加免疫系统以产生对蛋白质或肽的抗体和T细胞应答的任何蛋白质或肽。癌抗原是通常优先由癌细胞(即,其在癌细胞中的表达水平高于在非癌细胞上的表达),并且在某些情况下仅由癌细胞表达的抗原。癌抗原可以在癌细胞内或在癌细胞表面上表达。癌抗原可以是,但不限于,TRP-1、TRP-2、MART-1/Melan-A、gp100、腺苷脱氨酶结合蛋白(ADAbp)、FAP、亲环蛋白b、结直肠相关抗原(CRC)—C017-1A/GA733、癌胚抗原(CEA)、CAP-1、CAP-2、etv6、AML1、前列腺特异性抗原(PSA)、PSA-1、PSA-2、PSA-3、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、T细胞受体/CD3 ζ 链和CD20。癌抗原可以选自以下:MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2(MAGE-B2)、MAGE-Xp3(MAGE-B3)、MAGE-Xp4(MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-05、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、酪氨酸酶、p53、MUC家族、HER2/neu、p21ras、RCAS1、甲胎蛋白、E-钙粘蛋白、 α -连环蛋白、 β -连环蛋白、 γ -连环蛋白、p120ctn、gp100Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺瘤性结肠息肉病蛋白(APC)、胞衬蛋白、连接蛋白37、Ig独特型、p15、gp75、GM2神经节苷脂、GD2神经节苷脂、人乳头瘤病毒蛋白、Smad肿瘤抗原家族、lmp-1、P1A、EBV编码的核抗原(EBNA)-1、脑糖原磷酸化酶、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1和CT-7、CD20或c-erbB-2。其他癌抗原包括本文所述的肿瘤抗原。

[0790] 合适的抗原是本领域已知的,并且可以从商业政府和科学来源获得。在某些实施方式中,抗原是完整的灭活或辐射的肿瘤细胞。抗原可以是源自肿瘤的纯化的或部分纯化的多肽。抗原可以通过在异源表达系统中表达编码多肽抗原的DNA来产生的重组多肽。抗原可以是编码全部或部分抗原蛋白的DNA。DNA可以是载体DNA的形式,例如质粒DNA。

[0791] 在某些实施方式中,抗原可以作为单一抗原提供或可以组合提供。抗原也可以多肽或核酸的复杂混合物形式提供。

[0792] 极性嵌段/接头

[0793] 为了将缀合物有效地运输至淋巴结,缀合物应保持可溶。因此,极性嵌段接头是包括在货物和脂质之间以增加缀合物的溶解度。极性嵌段降低或阻止脂质插入细胞质膜的能力,例如邻近注射部位的组织中的细胞。极性嵌段也可以降低或阻止货物的能力,例如含有PS主链的合成寡核苷酸在给药部位与细胞外基质蛋白质非特异性结合。极性嵌段增加缀合物的溶解度而不阻止其与白蛋白结合的能力。据信这种特征的组合物允许缀合物结合至存在于血清或间质液中的白蛋白上,并保持循环直到白蛋白被运输到或滞留于淋巴结中。

[0794] 极性嵌段的长度和组合物可以根据所选择的脂质和货物进行调节。例如,对于寡核苷酸缀合物,寡核苷酸本身可以是足够极性的以确保缀合物的溶解度,例如长度为10个、15个、20个或更多个核苷酸的寡核苷酸。因此,在某些实施方式中,不需要另外的剂型嵌段接头。但是,根据氨基酸序列,一些脂化肽可能基本不溶。在这些情况下,可能需要包括模拟极性寡核苷酸作用的极性嵌段。

[0795] 极性嵌段用作适用于本公开的方法中的任何脂质缀合物的一部分,例如,脂质寡核苷酸缀合物和脂质肽缀合物,其减少白蛋白上的细胞膜插入/优先分配。合适的极性嵌段包括但不限于例如以上讨论的寡核苷酸、亲水性聚合物,其包括但不限于聚乙二醇(MW:500Da至20,000Da)、聚丙烯酰胺(MW:500Da至20,000Da)、聚丙烯酸;一串亲水性氨基酸,例如丝氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸或其组合多糖,其包括但不限于葡聚糖(MW:1,000Da至2,000,000Da),或其组合。

[0796] 疏水性脂质和接头/货物共价连接。共价键是不可裂解的键或可裂解的键。不可裂解的键包括酰胺键或磷酸键,和可裂解的键包括二硫键、酸可裂解的键、酯键、酸酐键、可生物降解的键或酶可裂解的键。

[0797] a. 乙二醇接头

[0798] 在某些实施方式中,极性嵌段是一个或多个乙二醇(EG)单元,优选地两个或多个EG单元(例如聚乙二醇(PEG))。例如,在某些实施方式中,肽缀合物包括蛋白或肽(例如肽抗原)和通过聚乙二醇(PEG)分子或其衍生物或其类似物连接的两亲性脂质。

[0799] 在某些实施方式中,适用于本公开的方法的蛋白缀合物包含与PEG连接的蛋白康云,其反过来与疏水性脂质或脂质-Gn-ON缀合物连接,共价地或通过与寡聚物杂交的蛋白质-寡核苷酸缀合物的形成连接。EG单元的精确数目取决于脂质和货物,但是,通常极性嵌段可具有约1至约100、约20至约80、约30至约70、或约40和约60个EG单元。在某些实施方式中,极性嵌段具有约45至约55个EG单元。例如,在某些实施方式中,极性嵌段具有48个EG单元。

[0800] b. 寡核苷酸接头

[0801] 如上所述,在某些实施方式中,极性嵌段是寡核苷酸。极性嵌段接头可以具有任何序列,例如寡核苷酸序列可以是随机序列,或针对其分子或生化特性特别地选择的序列(例如高极性)。在某些实施方式中,极性嵌段接头包括一个或多个系列的连续腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、尿嘧啶(U)或其类似物。在某些实施方式中,极性嵌段接头由一些列连续的腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、尿嘧啶(U)或其类似物组成。

[0802] 在某些实施方式中,接头是一个或多个鸟嘌呤,例如在1-10个鸟嘌呤之间。已经发现在血清蛋白存在下,改变货物例如CpG寡核苷酸和脂质尾部之间的鸟嘌呤数目控制了胶

束稳定性。因此,可以基于缀合物对血清蛋白例如白蛋白的所需亲和力来选择接头中鸟嘌呤的数量。当货物是CpG免疫刺激性寡核苷酸并且脂质尾部是二酰基脂质时,鸟嘌呤的数量影响在血清存在下水溶液中形成的胶束解离的能力:20%的不稳定胶束(lipo-G₀T₁₀-CG)完好无损,而其余80%的胶束被破坏并与FBS组分结合。在鸟嘌呤的存在下,完整胶束的百分比从36%(lipo-G₂T⁸-CG)增加至73%(lipo-G₄T₆-CG),并最终达到90%(lipo-G₆T₄-CG)。鸟嘌呤的数量增加到八个(lipo-G₈T₂-CG)和十个(lipo-G₁₀T₀-CG)不会进一步提高胶束稳定性。

[0803] 因此,在某些实施方式中,适用于本公开的方法的靶向淋巴结缀合物中的接头可以包括0、1或2个鸟嘌呤。如下更详细讨论的,包括3个或更多个连续鸟嘌呤的接头可用于形成具有适用于本公开方法的性质的胶束稳定缀合物。

[0804] B. 免疫原性组合物

[0805] 适用于本公开的方法的缀合物可用于免疫原性组合物或用作疫苗中的组分。通常,本文公开的免疫原性组合物包括佐剂、抗原或其组合。佐剂和抗原的组合可以称为疫苗。当组合施用于受试者时,佐剂和抗原可以在分开的药物组合物中施用,或它们可以在相同的药物组合物中一起施用。当组合施用时,佐剂可以是脂质缀合物,抗原可以是脂质缀合物,或者佐剂和抗原可以都是脂质缀合物。

[0806] 适用于本公开的方法的免疫原性组合物包括单独或与佐剂组合施用的脂质缀合物,其是抗原,如抗原性多肽-脂质缀合物。佐剂可以是但不限于明矾(例如氢氧化铝、磷酸铝);从*Q. saponaria*树的树皮中纯化的皂苷,例如QS21(通过HPLC分级洗脱在第21个峰中洗脱的糖脂;Antigenics, Inc., Worcester, Mass.);聚(双(羧基苯氧基)膦腈)(PCPP聚合物;Virus Research Institute, USA)、Flt3配体、利什曼原虫延伸因子(纯化的利什曼原虫蛋白;Corixa Corporation, Seattle, Wash.)、ISCOMS(免疫刺激复合物,其包含混合的皂苷、脂质并形成病毒大小的颗粒,并带有可容纳抗原的孔;CSL, Melbourne, Australia)、Pam3Cys、SB-AS4(SmithKline Beecham佐剂系统#4,其包含明矾和MPL;SBB, Belgium)、形成胶束的非离子嵌段共聚物例如CRL 1005(这些包含疏水性聚氧丙烯的线性链,侧接聚氧乙烯的链,Vaxcel, Inc., Norcross, Ga.),和Montanide IMS(例如IMS 1312,水性纳米颗粒与可溶性免疫刺激剂的结合,Seppic)。

[0807] 佐剂可以是TLR配体,例如如上讨论的那些。通过TLR3起作用的佐剂包括但不限于双链RNA。通过TLR4起作用的佐剂包括但不限于脂多糖的衍生物,例如单磷酸脂质A(MPLA;Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont)和嘧啶二肽(MDP;Ribi)和苏氨酸基-嘧啶二肽(t-MDP;Ribi);OM-174(与脂质A有关的葡萄糖胺二糖;OM Pharma SA, OM Pharma SA, Switzerland)。通过TLR5起作用的佐剂包括但不限于鞭毛蛋白。通过TLR7和/或TLR8起作用的佐剂包括单链RNA、寡核糖核苷酸(ORN)、合成的低分子量化合物例如咪唑啉胺(例如咪唑莫特(R-837),雷西莫德(R-848))。通过TLR9起作用的佐剂包括病毒或细菌来源的DNA,或合成的寡脱氧核苷酸(ODN),例如CpG ODN。另一类佐剂是含有硫代磷酸酯的分子,例如硫代磷酸核苷酸类似物和含有硫代磷酸酯主链的核酸。

[0808] 佐剂选自油乳剂(例如弗氏佐剂);皂甙制剂;病毒体和病毒样颗粒;细菌和微生物衍生物;免疫刺激性寡核苷酸;ADP-核糖基化毒素和解毒衍生物;明矾;BCG;含矿物质的成分(例如矿物盐,例如铝盐和钙盐、氢氧化物、磷酸盐、硫酸盐等);生物粘合剂和/或粘膜粘

合剂;微粒;脂质体;聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯制剂;聚磷腈;鼠酰胺基肽;咪唑并喹诺酮化合物;和表面活性物质(例如溶血卵磷脂、普朗尼克多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、匙孔血蓝蛋白和二硝基苯酚)。

[0809] 佐剂还可以包括免疫调节剂,如细胞因子、白介素(例如IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12等)、干扰素(例如 γ 干扰素)、巨噬细胞集落刺激因子和肿瘤坏死因子。

[0810] 试剂盒

[0811] 在一些方面中,本公开内容提供了试剂盒,其至少包含本文所述的免疫调节融合蛋白和使用说明书。在一些实施方式中,试剂盒在适宜容器中包含免疫调节融合蛋白、一个或多个对照以及本领域众所周知的各种缓冲液、试剂、酶和其他标准成分。在一些实施方式中,试剂盒还包含用于与免疫疗法联用的说明书。

[0812] 在一些实施方式中,容器是至少一个小瓶、孔、试管、烧瓶、瓶、注射器或其他容器装置,两亲性配体缀合物置于其中,并且在某些情况下适当地等分。当提供了其他组分时,试剂盒可包含其他抗原放置该化合物的容器。试剂盒还可包括用于容纳两亲性配体缀合物的装置,以及密封封闭的任何其他试剂容器,以用于商业销售。这种容器可包括将期望的小瓶保留在其中的注射或吹塑塑料容器。容器和/或试剂盒可以包括带有使用说明和/或警告的标签。

[0813] 在一些实施方式中,本公开内容提供了一种试剂盒,其包含容器,所述容器包含本文所述的免疫调节融合蛋白,任选地药学上可接受的载体,以及包装说明书,所述包装说明书包含用于在接受免疫疗法(例如CAR-T细胞、癌症疫苗、抗肿瘤相关抗原抗体和/或免疫检查点阻断)的个体中治疗癌症或延迟其进展的组合物的施用说明。

[0814] 在一些实施方式中,本公开内容提供了一种试剂盒,其包含药物,所述药物包含本文所述的免疫调节融合蛋白,任选地药学上可接受的载体,以及包装说明书,所述包装说明书包含用于单独或与免疫疗法(例如CAR-T细胞、癌症疫苗、抗肿瘤相关抗原抗体和/或免疫检查点阻断)联合施用药物以在接受CAR-T细胞疗法的个体中治疗癌症或推迟其进展的说明书。

[0815] 其他实施方式-胶原蛋白结合IgG结合融合蛋白

[0816] 在另一个方面中,本公开内容提供了胶原蛋白结合IgG结合融合蛋白,其包含Ig结合结构域和胶原蛋白结合结构域。本公开内容提供的胶原蛋白结合IgG结合融合蛋白结合至IgG(例如免疫调节IgG)和胶原蛋白,从而当施用时将IgG定位和螯合在肿瘤中。

[0817] 在一些实施方式中,胶原蛋白结合结构域是如上文所述的胶原蛋白结合结构域。示例性IgG结合结构域包括二聚化Z结构域(蛋白A的五个IgG结合结构域之一,本文称为“ZZ”)(Jendeberg等,(1995) J Mol Recognit 8:270-278)、蛋白G的二聚化IgG结合结构域(本文称为“SpG2”)(Jung等,(2009) Anal Chem 81:936-942),从Sso7d酵母展示文库分离的IgG结合物(Gera等,(2011) J Mol Biol 409:601-616),从III型纤连蛋白结构域(Fn3)酵母展示文库分离的IgG结合物(Hackel等,(2010) J Mol Biol 401:84-96)以及设计为结合至IgG Fc区的两个小肽(本文中称为“Fc-III-4C”和“RRGW”)(Gong等,(2015) Bioconjug Chem 27:1569-1573;Tsai等,(2014) Anal Chem 86:2931-2938)。

[0818] 在一些实施方式中,胶原蛋白结合IgG结合融合蛋白适于在本文所述的任何方法中使用。在一些实施方式中,胶原蛋白结合IgG结合融合蛋白用于与治疗性抗体(例如免疫

调节抗体)联用。在一些实施方式中,胶原蛋白结合IgG结合融合蛋白与用于治疗癌症的治疗性抗体联合施用。

[0819] 实施例

[0820] 尽管已经参考本公开内容的特定实施方式描述了本公开内容,但是本领域技术人员应当理解,在不脱离本公开的真实精神和范围的情况下,可以进行各种改变并且可以替换等同物。此外,可以做出许多修改以使特定情况、材料、物质组成、过程、一个或多个步骤适应本公开内容的目的、精神和范围。所有这些修改旨在落入本公开内容的范围内。

[0821] 实施例1:在哺乳动物细胞中胶原蛋白结合融合蛋白的重组表达

[0822] 为了评价在哺乳动物细胞中表达胶原蛋白结合免疫调节分子的能力,将与高斯荧光素酶(Gluc)(胶原蛋白成像探针(CNA35-Gluc))、细菌胶原蛋白酶ColG结构域s3a/s3b(ColG s3a/s3b-Gluc)、小鼠胎盘生长因子-2的肝素结合结构域(PLGF2HBD-Gluc)、细菌胶原蛋白酶ColH结构域s3(ColH s3-Gluc)和小鼠蛋白基膜聚糖(基膜聚糖-Gluc)融合的五個His标记的胶原蛋白结合多肽在人胚肾293(HEK293)细胞中瞬时表达。这些构建体的氨基酸序列如SEQ ID NO:128-132中所示。简言之,使用聚乙烯亚胺(每升细胞培养物2mg),在OptiPro无血清培养基(每升细胞培养物20mL)(Thermo Fisher)中,使用无菌过滤的质粒DNA(每升细胞培养物1mg)转染HEK293细胞(密度为100万个细胞/mL)。如此前所述,使用rProtein A Sepharose Fast Flow树脂(GE Healthcare)纯化TA99(Zhu等,2015)。使用TALON Metal亲和力树脂(Takara Bio Inc.)从HEK293上清液中分离His标记的蛋白。然后,通过体积排阻色谱,使用HiLoad 16/600Superdex 200pg柱在ÄKTA FPLC系统(GE Healthcare)上进一步纯化细胞因子融合蛋白,所述系统已使用1M NaOH预处理4小时以除去内毒素并且随后在无菌PBS(Corning)中平衡。纯化后,将所有蛋白缓冲液交换至无菌PBS(Corning),0.2微米无菌过滤(Pall Corporation),并使用发色LAL测定(Lonza)确认其所含内毒素水平最低(每次注射<0.1EU)。为确证其分子量,将蛋白质Novex Prestained Sharp Protein Ladder一起在含1%MES运行缓冲液的4-12%NuPAGE Bis-Tris蛋白凝胶(Life Technologies)上运行。将所有蛋白在4℃下保存,但在治疗性注射前,将细胞因子融合蛋白复温至室温,以挽救显示出可逆的冷变性的基膜聚糖。在对TALON纯化的洗脱液进行体积排阻色谱后,通过SDS-PAGE和吸收分光光度法评价所得洗脱液中His标记的胶原蛋白结合融合蛋白的相对表达水平。

[0823] 如通过对来自HEK细胞裂解物的纯化的His标记蛋白的SDS-PAGE分析所确定的,在HEK293细胞中实现了单独的Gluc(19.8kDa)以及Gluc融合的胶原蛋白结合多肽ColG s3a/s3b-Gluc(46.1kDa)、ColH s3-Gluc(32.8kDa)和基膜聚糖-Gluc(56.6kDa)的瞬时表达。观察到在每种融合蛋白的各自预期分子量处或附近的蛋白染色(数据未显示)。然而,如通过对来自HEK细胞裂解物的纯化蛋白的SDS-PAGE所测量的,未观察到CNA35-Gluc(54.4kDa)或PLGF2HBD-Gluc(22.8kDa)的表达(数据未显示)。

[0824] 如通过在重组表达和纯化的His标记蛋白的体积排阻色谱期间的吸收分光光度法所测量的,在HEK293细胞中实现了Gluc、ColG s3a/s3b-Gluc、ColH s3-Gluc和基膜聚糖-Gluc的瞬时表达。对于每种融合蛋白,在280nm(A280)处均观察到UV辐射吸收的单体峰(数据未显示)。未检测到针对CNA35-Gluc或PLGF2HBD-Gluc的吸收峰。

[0825] 除了基膜聚糖以外,其他哺乳动物胶原蛋白结合多肽可以表达为胶原蛋白结合融

合蛋白。已知哺乳动物白细胞相关免疫球蛋白样受体1 (LAIR-1) 蛋白的细胞外域结合胶原蛋白 (Lebbink等, (2006) J Exp Med 203 (6):1419-1425)。如上文所述,已经实现了在HEK293中His标记的小鼠LAIR-1细胞外域(氨基酸序列如SEQ ID NO:181中所示)的瞬时表达,如通过在重组表达蛋白的体积排阻色谱期间的吸收分光光度法所测定的。如通过在280nm (A280) 处的UV辐射吸收所测量的,LAIR-1洗脱为单峰(数据未显示)。

[0826] 这些结果表明,包含原核或哺乳动物胶原蛋白结合多肽的胶原蛋白结合融合蛋白在哺乳动物细胞中表达。在HEK293细胞中实现了His标记的胶原蛋白结合融合蛋白ColG s3a/s3b-Gluc、ColH s3-Gluc和基膜聚糖-Gluc以及单独Gluc的表达,但是未观察到CNA35-Gluc或PLGF2HBD-Gluc的表达。此外,在HEK293细胞中表达了His标记的LAIR-1的细胞外域并进行了纯化。这些结果表明包含原核或哺乳动物胶原蛋白结合多肽(例如ColG s3a/s3b、ColH s3、基膜聚糖或LAIR)的胶原蛋白结合免疫调节分子将在哺乳动物细胞中表达。

[0827] 实施例2:重组胶原蛋白结合融合蛋白在体外结合胶原蛋白

[0828] 为评价胶原蛋白结合免疫调节分子结合胶原蛋白的能力,通过ELISA检测如实施例1中所述表达和纯化的胶原蛋白结合融合蛋白与I型胶原蛋白结合和IV胶原蛋白包被的板的能力。简言之,在室温下,使用PBS+0.1%wt/vol牛血清白蛋白(BSA)+0.05%wt/vol吐温20(PBSTA),将I型胶原蛋白(Gibco)和IV型胶原蛋白(Corning)包被的96孔板封闭1小时,然后,使用含各种浓度基膜聚糖的PBSTA在室温下孵育3小时。将基膜聚糖在37℃下预热10分钟,以逆转其由低温介导的变性。使用PBSTA洗涤孔,然后以在PBSTA中以1:4000稀释的辣根过氧化物酶缀合的多克隆抗6xHis (ab1187, Abcam) 在室温下孵育1小时。再次使用PBSTA洗涤孔,然后加入1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(Thermo Fisher Scientific)作用10min,随后加入1M硫酸终止显色反应。使用M1000酶标仪(Tecan)测量在450nm处的吸光度(使用在570nm下的参照吸光度校正)。将滴定MSA的孔作为阴性对照。

[0829] 通过ELISA,在I型胶原蛋白包被的板上评价纯化的His标记的胶原蛋白结合融合蛋白基膜聚糖-Gluc、ColG s3a/s3b-Gluc和ColH s3-Gluc。如图1A中所示,仅基膜聚糖-Gluc和ColG s3a/s3b-Gluc与I型胶原蛋白结合,其KD分别为130nM和139nM。ColH s3-Gluc无超过Gluc本底结合的与I型胶原蛋白的特异性结合。

[0830] 通过ELISA,在IV型胶原蛋白包被的板上评价纯化的His标记的胶原蛋白结合融合蛋白基膜聚糖-Gluc、ColG s3a/s3b-Gluc和ColH s3-Gluc。如图1B中所示,基膜聚糖-Gluc以KD 600nM与IV型胶原蛋白结合。ColG s3a/s3b-Gluc或ColH s3-Gluc无超过Gluc本底结合的与IV型胶原蛋白的特异性结合。

[0831] 作为浓度的函数,通过ELISA评价纯化的His标记的小鼠LAIR-1(表示为mLAIR1-His)和His标记的生物素化的基膜聚糖(表示为Lwt-His-b)与I型胶原蛋白的结合。通过ELISA,使用与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗His抗体确定结合。如图1C中所示,LAIR-1和基膜聚糖与I型胶原蛋白具有相似的结合亲和力。还通过ELISA评价了使用牛血清白蛋白封闭的板的结合。两种蛋白均未观察到结合,表明与I型胶原蛋白的结合具有特异性。

[0832] 为进一步证实上文所述的哺乳动物胶原蛋白结合多肽的胶原蛋白结合活性,检测了实施例1中所述的纯化的His标记的LAIR-1和基膜聚糖胶原蛋白结合多肽竞争结合胶原蛋白的能力。简言之,在室温下,使用PBS+0.1%wt/vol牛血清白蛋白(BSA)+0.05%wt/vol吐温20(PBSTA),将I型胶原蛋白(Gibco)包被的96孔板封闭1小时,然后,在存在50nM生物素

化的基膜聚糖的条件下,使用含各种浓度LAIR的PBSTA在室温下孵育3小时。将基膜聚糖和LAIR在37℃下预热10分钟,以逆转其由低温介导的变性。使用PBSTA洗涤孔,然后以在PBSTA中以1:400稀释的辣根过氧化物酶缀合的多克隆链霉亲和素-HRP在室温下孵育1小时。再次使用PBSTA洗涤孔,然后加入1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(Thermo Fisher Scientific)作用10min,随后加入1M硫酸终止显色反应。使用M1000酶标仪(Tecan)测量在450nm处的吸光度(使用在570nm下的参照吸光度校正)。将滴定MSA的孔作为阴性对照。图1D中显示了竞争ELISA检测的在胶原蛋白包被板上不同浓度的LAIR存在下基膜聚糖结合的结果。

[0833] 为评价纯化后胶原蛋白结合多肽的稳定性,检测了从溶液冷冻状态解冻后基膜聚糖的胶原蛋白结合活性。简言之,解冻后在不同条件下与各种辅料(海藻糖(T)、BSA(B)、胶原蛋白(C)、仅蛋白(P))一起孵育的基膜聚糖的I型胶原蛋白亲和力(K_D):37℃下3周(蓝色),4℃下3周(灰色),4℃下2周随后37℃下1周(红色)。如此前所述,通过ELISA确定了冷冻解冻后,在存在辅料的情况下(海藻糖、牛血清白蛋白和胶原蛋白),基膜聚糖与I型胶原蛋白的结合亲和力。尽管使用了敷料,但是结合亲和力(K_D)仍是相似的。然而,如果在测量前未将基膜聚糖复温至37℃,则结合亲和力降低约50倍(数据未显示)。

[0834] 这些结果显示了包含原核(例如ColG s3a/s3b)或哺乳动物(例如基膜聚糖)胶原蛋白结合多肽的胶原蛋白结合融合蛋白与I型胶原蛋白的结合(图1A)。这些结果还表明,包含哺乳动物胶原蛋白结合多肽(例如基膜聚糖)的胶原蛋白结合融合蛋白结合I型胶原蛋白和IV型胶原蛋白两者(图1B)。此外,这些结果表明,LAIR-1的细胞外域与基膜聚糖竞争同I型胶原蛋白的结合(图1C、1D)。这些结果提示,包含原核或真核胶原蛋白结合多肽(例如ColG s3a/s3b、基膜聚糖和LAIR-1)的胶原蛋白结合免疫调节分子将与胶原蛋白结合。

[0835] 实施例3:肿瘤内注射之后重组胶原蛋白结合融合蛋白被滞留

[0836] I型和IV型胶原蛋白分别是围绕肿瘤和血管周围基底膜的厚纤维化囊的组成部分。为评价I型和IV型胶原蛋白在小鼠中的表达,在第0天,给小鼠接种1百万个4T1、MC38或B16F10肿瘤细胞。在第10天切除肿瘤,并在10%中性福尔马林缓冲液中固定过夜,然后在石蜡中包埋,并切成5微米厚度的切片(CryoStar NX70)。利用免疫组化,评价肿瘤切片中I型和IV型胶原蛋白的存在情况。简言之,使用在含有0.1%vol/vol吐温-20的Tris缓冲盐中按照1:500稀释的针对I型胶原蛋白(ab34710,Abcam)和IV型胶原蛋白(ab6586,Abcam)的家兔抗体对切片进行染色,然后使用山羊HRP缀合的抗家兔抗体(ab6721,Abcam)进行二次染色。4T1(左)、MC38(中)和B16F10(右)肿瘤的切片观察到了针对I型胶原蛋白(上部)和IV型胶原蛋白(下部)的阳性染色(数据未显示)。因此,I型胶原蛋白和IV型胶原蛋白在很多同系小鼠肿瘤模型中大量表达。

[0837] 为评价胶原蛋白结合免疫调节分子的肿瘤内滞留情况,通过体内荧光成像,检测了在实施例2中与I型胶原蛋白结合的胶原蛋白结合融合蛋白(基膜聚糖-Gluc和ColG s3a/s3b-Gluc)在肿瘤内注射部位保持结合的能力。简言之,将 5×10^5 个4T1细胞(小鼠乳腺肿瘤细胞)注射至BALB/c小鼠的乳腺脂肪垫,随后在肿瘤细胞注射之后第7天肿瘤内注射仅Gluc、ColG s3a/s3b-Gluc或基膜聚糖-Gluc,通过体内生物发光成像(落射照明,自动曝光设置)对每只小鼠进行监测。

[0838] 来自注射仅Gluc的小鼠的生物发光信号在注射之后约36hr降至本底水平(数据未

显示)。使用ColG s3a/s3b-Gluc注射的小鼠的信号在注射之后约8.5天降至本底水平(数据未显示)。在实验期间,来自使用基膜聚糖-Gluc注射的小鼠的信号未降低低于本底水平(注射之后约16.5天,数据未显示)。

[0839] 这些结果表明,随着时间的推移,胶原蛋白结合融合蛋白ColG s3a/s3b-Gluc和基膜聚糖-Gluc被物理滞留于肿瘤内注射部位处。这些结果提示,包含原核或哺乳动物胶原蛋白结合多肽(例如ColG s3a/s3b或基膜聚糖)的胶原蛋白结合免疫调节分子将显示出肿瘤内滞留和有限的全身性播散。

[0840] 实施例4:胶原蛋白结合融合蛋白的肿瘤内滞留取决于分子量和胶原蛋白结合活性

[0841] 几个因素可能决定了胶原蛋白结合融合蛋白的肿瘤内滞留:对胶原蛋白的亲合力、胶原蛋白浓度、通过扩散或对流产生的尺寸依赖性逃逸以及蛋白更新。作为一种低于60kDa的蛋白,基膜聚糖(37kDa)具有穿过血管内皮的高通透性,很容易吸收到循环系统中,这可能有助于从注射部位分布并减少肿瘤内滞留(McLennan等,(2005) Drug Discov Today Technol 2:89-96;Egawa等,(2013) Sci Rep 3:1932)。

[0842] 为评价分子量对胶原蛋白结合免疫调节分子的肿瘤内滞留和全身性分布的影响,通过体内荧光成像确定了肿瘤内注射之后与67kDa小鼠血清白蛋白(MSA)蛋白融合的胶原蛋白结合多肽基膜聚糖的滞留。简言之,为了接种B16F10-Trp2K0肿瘤,将混悬在50uL无菌PBS中的 10^6 个细胞皮下注射至C57BL/6雌性小鼠的右侧肋腹部。使用5摩尔过量的Alexa Fluor 647NHS酯(Life Technologies)在调节至pH8的PBS中标记融合蛋白30分钟。使用PD10脱盐柱(GE Healthcare)除去多余的染料,并计算每种蛋白的标记度(DOL)。在滞留研究中比较的蛋白包含等摩尔量的染料。对于基膜聚糖-MSA(SEQ ID NO:126)和MSA(SEQ ID NO:183),接种5天后将0.11nmol每种构建体(施用110ug基膜聚糖-MSA和71.7ug MSA)肿瘤内注射至B16F10-Trp2K0荷瘤小鼠。

[0843] 为了评估融合蛋白的滞留,在指定时间点,在自动曝光落射照明荧光设置下,用Xenogen IVIS成像系统100(Xenogen)对小鼠进行成像。在此期间,保持给予小鼠无苜蓿的酪蛋白饲料(检测饮食),以使得胃肠道背景荧光最小化。使用Living Image(Caliper Life Sciences)进行图像分析仪确定总辐射效率。将缺乏酪氨酸酶相关蛋白2的B16F10细胞B16F10-Trp2K0用于接种无色素肿瘤,以最大化荧光信噪比。

[0844] 肿瘤内注射荧光标记的基膜聚糖、基膜聚糖-MSA或MSA,并监测小鼠的总辐射效率随时间的变化情况。尽管基膜聚糖具有更小的分子量,但是在注射之后前5小时期间,来自基膜聚糖(37kDa)的荧光信号比来自MSA(67kDa)的荧光信号具有更大程度的滞留(数据未显示)。这些数据提示基膜聚糖的肿瘤内滞留至少部分地取决于其胶原蛋白结合活性。来自基膜聚糖-MSA的荧光信号也比来自MSA的荧光信号具有更大程度的滞留(图2A)。基膜聚糖-MSA(104kDa)明显大于基膜聚糖(37kDa),尽管它们各自具有相同的胶原蛋白结合位点,但基膜聚糖-MSA的滞留程度要高于单独的基膜聚糖(图2A),这可能是由于更小的基膜聚糖构建体的清除速度更快。

[0845] 为进一步评价全身性分布对分子量的影响,确定了来自使用与MSA融合的荧光标记的基膜聚糖注射小鼠的血清的荧光的量随时间的变化情况。将荧光标记的MSA作为阳性对照剂。为了评估注射之后的血清荧光,在指定时间点通过毛细作用将少量血液(<10uL)从

尾尖端吸入玻璃微量红细胞压积肝素涂覆试管 (VWR) 中。使用石蜡膜将试管的一端密封,并在4℃下避光直立放置,以使血清在重力作用下与凝结的血液分离。使用平板式Typhoon Trio可变模式成像仪 (GE Healthcare) (激发激光:633nm;发射滤光片:670BP;PMT:450-500V) 扫描试管,并使用Fiji图像分析软件对血清荧光进行定量。

[0846] 如图2B中所示,与注射MSA的小鼠血清产生的荧光信号(占注射剂量的百分比)相比,用基膜聚糖-MSA注射的小鼠血清产生的荧光信号随时间推移而更低。这些结果表明,基膜聚糖-MSA显示出比单独的MSA更低的全局性分布。

[0847] 通过免疫荧光成像,在肿瘤内施用之后,评估了基膜聚糖与I型和IV型胶原蛋白的共定位。简言之,在肿瘤内注射荧光标记的基膜聚糖后,切除B16F10肿瘤。将肿瘤在4℃的高碘酸-赖氨酸-多聚甲醛中保存过夜,然后在4℃用PBS中的30%蔗糖冷冻保护8小时,然后在放在干冰上的含有100%OCT化合物 (Sakura Finetek USA Inc.) 的低温模具中缓慢冷冻。将冷冻肿瘤模具切成50微米厚的切片 (CryStar NX70),将切片在室温下干燥一小时,然后抗原修复。为了进行抗原修复,在60℃下在含0.05%吐温20的10mM柠檬酸钠中加热切片1小时,在PBS中洗涤,然后在室温下使用2mg/mL透明质酸酶处理30分钟。在免疫混合物 (immunomix) (含0.2%wt/vol牛血清白蛋白、0.05%wt/vol叠氮化钠、0.3%vol/vol Triton X-10,10%vol/vol驴血清的PBS) 中洗涤切片,然后使用冷丙酮在-20℃下透化10分钟,然后在室温下在Immunomix中封闭1小时。在保湿盒中在室温下,使用在Immunomix中以1:200稀释的针对I型胶原蛋白 (ab34710, Abcam) 和IV型 (ab6586, Abcam) 胶原蛋白的家兔抗体染色过夜。几次PBS洗涤后,将切片在Immunomix中用AF488缀合的山羊抗家兔二抗 (以1:500稀释) 染色,在室温下于保湿盒中过夜。几次洗涤后,将切片固定在含1%中性福尔马林缓冲液的PBS中,并固定在VECTASHIELD抗褪色固定介质中。通过共聚焦显微镜对切片成像。将I型胶原蛋白或IV型胶原蛋白的荧光信号叠加,可以确定基膜聚糖在B16F10肿瘤中与I型和IV型胶原蛋白共定位的程度很高 (数据未显示)。

[0848] 这些结果表明,对胶原蛋白的亲合力和增加的分子量均有助于肿瘤内滞留和胶原蛋白结合融合蛋白的全局性分布。这些结果提示,对胶原蛋白的亲合力和胶原蛋白结合免疫调节分子量的增加将增加肿瘤内滞留并降低全局性分布,从而增加治疗作用。

[0849] 实施例5:靠近结合的胶原蛋白降低了胶原蛋白结合融合蛋白的有效载荷活性

[0850] 为评价胶原蛋白结合对有效载荷活性的影响,在体内比较了基膜聚糖-Gluc与Col1G-Gluc的肿瘤内生物发光。简言之,将等摩尔 (0.3nmol) 基膜聚糖-Gluc或Col1G-Gluc肿瘤内注射至B16F10黑色素瘤荷瘤小鼠。尽管等摩尔 (0.3nmol) 注射,与Col1G-Gluc相比,使用基膜聚糖-Gluc观察到了更低的肿瘤内生物发光。具体地,使用Col1G-Gluc注射的4/5只小鼠具有可检测的超过本底的生物发光,而使用基膜聚糖-Gluc注射的仅有1/5只小鼠具有可检测的超过本底的生物发光 (数据未显示)。有趣的是,仅在肿瘤外部检测到了生物发光信号,大概是从泄露出肿瘤的构建体中检测到的。缺乏来自胶原蛋白结合构建体的肿瘤内生物发光信号提示,当被迫紧贴胶原蛋白时,该酶不是最佳功能。该结果表明需要间隔蛋白 (例如MSA),以帮助更好地将胶原蛋白与将来的有效载荷分离。

[0851] 由于胶原蛋白是一种不溶性蛋白,因而易受固相行为 (如近端可溶性蛋白的表面吸附) 的影响,因此MSA充当有效载荷和基膜聚糖之间的大型亲水性间隔蛋白,以保护有效载荷免受吸附和功能破坏。对于我们的定位方法,任何可溶的有效载荷都会被基膜聚糖强

迫进入固液界面,并且被吸附到胶原蛋白纤维上,从而可能使其呈功能惰性(如使用Gluc所见)。为防止有效载荷吸附到胶原蛋白上,我们使小鼠血清白蛋白(MSA)与基膜聚糖可操作地连接以作为有效载荷和胶原蛋白之间的大间隔蛋白。

[0852] 实施例6:在小鼠黑色素瘤肿瘤模型中免疫调节胶原蛋白结合分子和抗肿瘤抗原抗体的协同作用

[0853] 抗肿瘤抗原抗体预白介素-2(IL-2)之间的协同作用已得到很好表征(Zhu等,(2015)Cancer Cell 27:489-501)。通过制备融合到基膜聚糖-MSA的C末端的IL-2评价了IL-2融合至胶原蛋白结合分子的作用。引入MSA以确保当结合至胶原蛋白纤维时受体对IL-2的空间进入,并且还可以增加构建体的分子量,从而减少肿瘤的扩散通量。作为具有同等生物活性的阳性对照,将IL-2表达为与MSA融合(MSA-IL2),从而使胶原蛋白结合的作用与基于尺寸的野生型IL-2等小细胞因子在肿瘤滞留方面的改善作用大大地分离开来。因此,使用实施例1中所述的方法,将IL-2表达为仅与MSA融合或与基膜聚糖-MSA的C末端融合。如实施例1中所述,通过TALON金属亲和力数据纯化His标记的细胞因子融合蛋白。然后,通过FPLC(AKTA,GE Healthcare)使用体积排阻色谱柱(HiLoad 16/600Superdex 200pg)对细胞因子-融合蛋白进行进一步纯化,所述色谱柱已使用1M NaOH预处理4小时以除去内毒素,随后在无菌PBS中平衡。纯化后,将蛋白缓冲液交换至无菌PBS,0.2微米膜滤器(Pall Corporation)无菌过滤,并使用发色LAL测定(Lonza)确认其所含内毒素最低(每剂<0.1EU)。当通过体积排阻色谱法在280nm处通过吸光度评价时,蛋白表现出>90%的单体表达(数据未显示)。此外,评价了蛋白诱导细胞增殖的能力。以5000个细胞/孔的密度,将CTLL-2细胞接种在未使用或使用IV型胶原蛋白包被的组织培养板上。使用各种浓度的MSA-IL2、基膜聚糖-MSA-IL2或基膜聚糖刺激细胞48小时。根据生产厂商的说明书,通过基于WST-1的比色测定(Roche)确定细胞增殖。尽管基膜聚糖不能导致增殖,但是无论是否存在IV型胶原蛋白,使用MSA-IL2和基膜聚糖-MSA-IL2治疗导致相似水平的细胞增殖(数据未显示)。因此,MSA-IL2和基膜聚糖-MSA-IL2具有等同的生物活性。

[0854] 此外,如实施例4中所述,对肿瘤内注射后IL-2融合物的血清水平进行定量。将荧光标记的基膜聚糖-MSA-IL2和MSA-IL2注射至B16F10-Trp2K0肿瘤,在注射后不同时间点对血清荧光水平进行定量。当以注射剂量的百分比测量时,与来自使用MSA-IL2注射小鼠血清的荧光信号相比,来自使用基膜聚糖-MSA-IL2注射小鼠血清的荧光信号随着时间的推移更低(数据未显示)。这些结果表明基膜聚糖-MSA-IL2在体内结合至肿瘤内胶原蛋白,结果显示与单独的MSA-IL2相比更低的全身性分布。

[0855] 为了表征免疫调节胶原蛋白结合分子与肿瘤抗原靶向抗体的组合的抗肿瘤有效性,在B16-F10黑色素瘤模型中评估了包含与细胞因子IL-2融合的胶原蛋白结合多肽的融合蛋白与小鼠单克隆抗TYRP1抗体(TY99)的协同作用。

[0856] 简言之,将在50μL无菌PBS中的 1×10^6 个B16-F10小鼠黑色素瘤细胞(ATCC)皮下注射至6-8周龄C57BL/6小鼠的右侧肋腹部。通过腹腔(i.p.)注射全身性给予100μg/剂抗TYRP-1抗体(TA99)和通过肿瘤内注射(i.tu.)给予13μg/剂胶原蛋白结合IL-2融合蛋白基膜聚糖-MSA-IL2对已建立B16-F10黑色素瘤肿瘤的小鼠进行治疗。将注射MSA-IL2(SEQ ID NO:121)(9μg/剂)或基膜聚糖(SEQ ID NO:182)(4μg/剂)的小鼠作为阳性对照。使用IL-2融合蛋白(基膜聚糖-MSA-IL2(SEQ ID NO:120)或MSA-IL2)注射的小鼠接受相当于0.11nmol/

剂的IL-2。在安乐死终点处对动物实施安乐死,即总体重减轻20%或肿瘤面积超过100mm²(长x宽)。

[0857] 在图3A-3B中显示了单独使用MSA-IL2、基膜聚糖-MSA-IL2、基膜聚糖或与TA99联合治疗的荷瘤小鼠的存活百分比。单独给予基膜聚糖-MSA-IL2或MSA-IL2的小鼠进行单药治疗具有有限的生存获益(图3A)。TA99与基膜聚糖的组合未提供生存获益(图3B),然而,施用TA99与MSA-IL-2或基膜聚糖-MSA-IL2的组合对小鼠显示出协同生存获益(图3B)。同与MSA-IL2的组合相比,与基膜聚糖-MSA-IL2的组合具有更大的生存获益(图3B)。

[0858] 停止治疗后,几只小鼠出现了局部皮肤脱色或白癜风,这表明黑色素细胞特异性T细胞应答。几乎所有使用基膜聚糖-MSA-IL2和TA99注射的小鼠均出现了位于注射部位的白癜风斑块(17只小鼠中的16只),而用MSA-IL2和TA99治疗的17只小鼠中只有一只表现出该副作用。总之,这些观察结果表明,基膜聚糖-MSA-IL2通过增加抗肿瘤T细胞应答和总体存活,在肿瘤内锚定IL-2并增强IL-2与TA99的协同作用。

[0859] 为了确定当与TA99组合使用时肿瘤内注射基膜聚糖-MSA-IL-2是否是改善结局所必需的,我们评价了当将基膜聚糖-MSA-IL2注射至其他对侧部位时该组合的有效性。当将基膜聚糖-MSA-IL2瘤旁(peritumor) (即,与病灶相邻)(图3C)或结节内(即,向肿瘤引流线腹股沟淋巴结)(图3D)施用时,有效性减弱。当将基膜聚糖-MSA-IL2在尾根部(距离肿瘤部位2cm)皮下施用时,组合的所有生存获益均降低(图3C)。

[0860] 这些结果表明,用基膜聚糖-MSA-IL2与TA99联合治疗的荷瘤小鼠提供了协同抗肿瘤作用,而IL-2的肿瘤内定位是这种联合疗法的最大有效性所需的。

[0861] 实施例7:免疫调节胶原蛋白结合分子和抗肿瘤抗原抗体的协同作用取决于CD8⁺T细胞、树突状细胞和IFN γ

[0862] 高剂量IL-2支持T细胞和NK细胞的增殖和效应子功能,但也会促进中性粒细胞增多和嗜酸性粒细胞增多(Macdonald等,(1990) Br J Haematol 76(2):168-173;Li等,(1996) Inflammation 20(4):361-372)。考虑到IL-2对免疫细胞多种多样的已知作用,通过抗体介导的细胞耗竭确定了不同类型的白细胞对基膜聚糖-MSA-IL2的治疗有效性的贡献。通过在第一次治疗前一天至最后一次治疗后一周内通过腹腔内(i.p.)施用消耗抗体来清除免疫细胞子集或IFN γ 。如图3B所述施用TA99和基膜聚糖-MSA-IL2。分别每四天使用400 μ g抗CD8 α (2.43, BioXCell)、抗NK1.1(PK136, BioXCell)或抗Ly6G(1A8, BioXCell)抗体耗竭CD8⁺T细胞、NK细胞或中性粒细胞。分别隔日使用300 μ g抗CSF1R(AFS98, BioXCell)或200 μ g抗IFN γ (XMG1.2, BioXCell)耗竭巨噬细胞或可溶性IFN γ 。使用1mg抗IL-5(TRFK5, BioXCell)耗竭嗜酸性粒细胞。

[0863] 为评估免疫细胞子集的贡献,将在50 μ L无菌PBS中的1 $\times$ 10⁶个B16-F10小鼠黑色素瘤细胞(ATCC)皮下注射至6-8周龄C57BL/6野生型(WT)或BatF3^{-/-}小鼠(B6.129S(C)-Batf3^{tm1Kmm}/J; Jackson Laboratory)(其是交叉呈递树突状细胞(DC)缺陷的)的右侧肋腹部。在WT小鼠中耗竭自然杀伤(NK)细胞不会改变基膜聚糖-MSA-IL2与TA99联用的有效性(图4)。在野生型小鼠中耗竭中性粒细胞、嗜酸性粒细胞或巨噬细胞不会改变基膜聚糖-MSA-IL2与TA99联用的有效性(数据未显示),表明没有单个先天细胞群体单独负责肿瘤控制。然而,CD8⁺T细胞(抗CD8 α),交叉呈递DC(BatF3^{-/-})和IFN γ (抗IFN γ)的耗竭确实改变了治疗有效性,表明其对于肿瘤排斥是必不可少的(图4)。通过对数秩Mantel-Cox检验确定存

活统计量。

[0864] 这些结果表明使用基膜聚糖-MSA-IL2联合TA99治疗荷瘤小鼠提供了依赖于CD8⁺T细胞、树突状细胞和IFN γ 的协同抗肿瘤作用。

[0865] 实施例8:免疫调节胶原蛋白结合分子与抗肿瘤抗原抗体的组合建立了保护性记忆并诱导全身性肿瘤特异性细胞免疫

[0866] 如上所示,在用基膜聚糖-MSA-IL2联合TA99治疗后观察到的持久性无病存活和对适应性免疫组分的依赖表明,治愈的无肿瘤小鼠可能对肿瘤的再攻击具有抗性。为了确定是否用基膜聚糖-MSA-IL2联合TA99治疗的小鼠是治愈的无肿瘤小鼠,在第100天将 1×10^6 个B16-F10细胞接种在对侧肋腹部对来自图3B中所示实验的治愈C57BL/6小鼠进行再攻击。大部分用基膜聚糖-MSA-IL2联合TA99治疗的长期存活者排除了在对侧肋腹部接种的B16-F10的再攻击(9/15只小鼠)。

[0867] 尽管通过细胞介导的免疫力的肿瘤根治需要全身性免疫激活(Spitzer等,(2017) Cell 168:487-502),但在用基膜聚糖-MSA-IL2联合TA99治疗后观察到白癜风斑块的严格定位(见实施例6),提示对治疗的肿瘤病变之外的肿瘤特异性T细胞应答的评价。为确定是否使用基膜聚糖-MSA-IL2联合TA99治疗诱导协同性抗肿瘤T细胞应答,如图3B中使用使用小鼠治疗后4天收集的脾细胞进行IFN γ ELISPOT。将使用TA99联合MSA-IL2或基膜聚糖治疗作为阳性对照。对响应于使用B16F10靶细胞刺激的IFN γ 斑点形成单位(SFU)的数量进行定量。与同MSA-IL2的组合相比,使用TA99联合基膜聚糖-MSA-IL2的治疗产生了更多表达IFN γ 的外周脾细胞。具体地,使用TA99+基膜聚糖-MSA-IL2治疗导致产生约20SFU/100万个脾细胞,而使用TA99+MSA-IL2治疗,使用TA99+基膜聚糖治疗或不治疗导致产生少于约7SFU/100万个脾细胞。

[0868] 为了证实在脾细胞上的胞内IFN γ 染色是由肿瘤特异性CD8⁺T细胞产生的,如图3B中所示在治疗小鼠后4天收集脾细胞。在存在布雷菲德菌素A的情况下,用照射的B16-F10或4T1刺激收获的脾细胞12小时,然后对表面标记(CD4、CD3和CD8)和细胞内IFN γ 染色(n=5只小鼠/组)。图5A显示了通过流式细胞术确定的在活CD45+CD3+CD8⁺T细胞中IFN γ +细胞的定量。通过单因素ANOVA结合Tukey多重比较检验对数据进行分析。

[0869] 图5A中所示的结果表明,使用照射的B16-F10肿瘤细胞而非4T1肿瘤细胞刺激在脾细胞中诱导IFN γ 的表达,这证实了在脾脏中的外周B16F10-特异性CD8⁺T细胞应答是由使用基膜聚糖-MSA-IL2联合TA99治疗荷瘤小鼠诱导的。这些结果还表明,同与未锚定的MSA-IL2联合相比,使用TA99联合肿瘤胶原蛋白锚定的基膜聚糖-MSA-IL2治疗荷瘤小鼠诱导更大的肿瘤特异性全身性应答。

[0870] 为了确定由使用TA99联合基膜聚糖-MSA-IL2的治疗诱导的外周效应物(例如外周肿瘤特异性T细胞)控制远端未治疗肿瘤病变的能力,外源性细胞因子对所述病变的支持是有限的,向小鼠皮下接种 1×10^6 个B16-F10细胞以便在双侧肋腹部建立肿瘤,并全身性(i.p)施用TA99和仅在右侧或同侧肿瘤内(i.tu)施用IL-2(以基膜聚糖-MSA-IL2或MSA-IL2形式)。图5B显示了随着时间的推移未注射对侧肿瘤和肿瘤内注射同侧肿瘤的平均肿瘤面积。图5B中的结果表明,TA99与MSA-IL2的组合可以泄漏出同侧肿瘤并在注射后泄漏至对侧病变,给予了一些对侧肿瘤控制,但是大多数小鼠屈服于肿瘤负荷。而相反的是,TA99与基膜聚糖-MSA-IL2(其与同侧肿瘤是分离的)的组合组织了同侧和对侧肿瘤的生长,从而导致

了数只小鼠的持久治愈。这些结果表明,在控制和根治播散性疾病中,通过肿瘤胶原蛋白结合锚定IL-2激发的全身性抗肿瘤应答由于弥散性IL-2刺激。

[0871] 实施例9:使用胶原蛋白结合IL-12融合蛋白治疗荷瘤小鼠不会诱导IL-12相关的体重减轻

[0872] 如上述实施例所示,在观察到通过IL-2的胶原蛋白锚定的抗肿瘤治疗作用的改善之后,评价了将另一种剂量限制性细胞因子IL-12锚定至胶原蛋白的作用。IL-12在1型细胞介导的免疫中起关键调控因子左右,已知该通路对有效的抗肿瘤应答至关重要 (Green等, (2017) J Biol Chem 292:13925-13933)。尽管临床前的工作是有前景的,但是严重的毒性和致死性终止了全身性施用IL-12的早期临床试验 (Lasek等, (2014) Cancer Immunol Immunother 63 (5):419-435)。IL-12刺激NK细胞和T细胞诱导的IFN γ 涉及毒性,但是,IL-12也与其有效性密不可分 (Leonard等, (1997) Blood 90:2541-2548)。

[0873] 因此,使用实施例1和实施例6中所述的方法,作为与单独的MSA的融合体或作为与基膜聚糖-MSA的N末端的融合体 (IL12-MSA-基膜聚糖) 表达和纯化IL-12。简言之,小鼠IL-12以单链形式表达,在p40和p35亚基之间具有15个氨基酸的甘氨酸-丝氨酸接头 (scIL12)。为产生IL-2的胶原蛋白锚定形式,使用MSA间隔物将scIL12融合至基膜聚糖的N末端,后文将其称为IL12-MSA-基膜聚糖 (SEQ ID NO:123)。将非锚定形式的IL-12, IL12-MSA (SEQ ID NO:122) 作为阳性对照。当在体积排阻色谱期间通过在280nm处的吸光度评价时, IL12-MSA和IL12-MSA-基膜聚糖蛋白显示出>90%的单体表达 (数据未显示)。

[0874] 此外,如实施例4中所述,对肿瘤内注射后IL-12融合体的血清水平进行定量。将荧光标记的IL12-MSA-基膜聚糖和IL12-MSA注射至B16F10-Trp2K0肿瘤,在注射后不同时间点血清荧光水平进行定量。当以注射剂量的百分比测量时,与来自使用IL12-MSA注射小鼠血清的荧光信号相比,来自使用IL12-MSA-基膜聚糖注射小鼠血清的荧光信号随着时间的推移更低 (数据未显示)。这些结果表明,IL12-MSA-基膜聚糖在体内结合至肿瘤内胶原蛋白,并且作为结果与单独的IL12-MSA相比显示出更低的全身性分布。

[0875] 为评估是否通过胶原蛋白结合将IL-12滞留在肿瘤将减轻IL-12介导的毒性,在小鼠黑色素瘤肿瘤模型中评估了与基膜聚糖-MSA融合的IL-12。在第0天,将 1×10^6 个B16-F10黑色素瘤细胞植入6-8周龄的C57BL/6小鼠。在第6天和第12天,用肿瘤内 (i.tu.) 注射PBS (n=6)、17.8 μ g/剂IL12-MSA (n=7) 或23.1 μ g/剂IL12-MSA-基膜聚糖 (n=7),或腹腔内 (i.p.) 注射17.8 μ g/剂IL12-MSA (n=7) 治疗后,检测这些小鼠相对于基线的重量变化。使用IL-12融合蛋白 (IL12-MSA-基膜聚糖或IL12-MSA) 注射的小鼠接受了相当于140pmol/剂的IL-12。

[0876] 如图6A中所示,在B16-F10荷瘤小鼠中肿瘤内施用IL12-MSA导致显著的体重减轻,这是对全身性细胞因子 (例如IFN γ) 的毒性的无创读取。通过腹腔注射全身性施用IL12-MSA导致相同的体重减轻曲线。而相反的是,等摩尔IL12-MSA-基膜聚糖的肿瘤内注射不会导致体重减轻。总的来说,这些结果表明,在没有通过胶原蛋白结合来实现肿瘤内滞留的努力中,局部施用不足以减轻IL-2介导的毒性,并且胶原蛋白锚定提供了足够的肿瘤内抑制作用,以抑制IL-12的显著全身毒性,从而改善治疗指数。

[0877] 如图6A中所示还评价了治疗动物的存活。根据实施例6中所述的标准将小鼠安乐死。如图6B中所示,与未治疗的对照小鼠或使用基膜聚糖治疗的小鼠相比,使用IL-12融合体治疗改善存活。与IL12-MSA相比,使用IL12-MSA-基膜聚糖治疗导致适度的存活改善。

[0878] 滴定用于治疗B16F10肿瘤的IL12剂量,以确定对毒性和抗肿瘤有效性的剂量依赖性作用。在第5天使用不同剂量的IL12-MSA或IL12-MSA-基膜聚糖肿瘤内注射对如上文所述第0天接种B16F10肿瘤的小鼠进行治疗。未治疗对照小鼠接受PBS肿瘤内注射。评价剂量对肿瘤面积(例如有效性指标)和体重变化%(例如毒性指标)的作用。评价的IL12-MSA和IL12-MSA-基膜聚糖的剂量包括140pmol IL12、14pmol IL12、1.4pmol IL12或0.14pmol IL12的质量当量。在所检测的任何剂量下IL12-MSA-基膜聚糖均显示出无毒性,但是在IL12为1.4或0.4pmol剂量下显示出降低的有效性(数据未显示)。而IL12-MSA随着剂量降低显示出毒性降低和有效性降低(数据未显示)。因此,为评价与其他治疗剂联用的IL12融合体,将14pmol IL12剂量鉴定为具有可耐受的毒性指数同时保持治疗有效性。

[0879] 实施例10:在小鼠肿瘤模型中胶原蛋白结合IL-2和IL-12融合蛋白的协同抗肿瘤作用

[0880] 人们已经对增强IL-12抗肿瘤作用的组合进行了理论研究,但出于安全性方面的考虑,在很大程度上排除了其实现的可能性(Lasek等,(2014) *Cancer Immunol Immunother* 63 (5):419-435)。如实施例9中不存在与治疗有关的体重减轻所表明的,IL12-MSA-基膜聚糖改善的治疗指数促使对该细胞因子与其他治疗剂组合的评价。已知IL-2和IL-12参与补体信号传导通路以刺激NK细胞和T细胞(Wigginton&Wiltrot (2002) *Expert Opin Biol Ther* 2:513-524)。此外,IL-2上调IL-12受体亚基 $\beta 2$ 的表达(Wang等,(2000) *Blood* 95:3183)和IL-12持续表面表达高亲和力IL-2受体CD25(Starbeck-Miller等,(2013) *J Exp Med* 211:105-120)。通过倒数正反馈,IL-2和IL-12增加并延长彼此的作用(Wigginton等,(1996) *J Natl Cancer Inst* 88:38-43)。尽管有效性令人鼓舞,但是围绕该组合的一些临床试验已经终止(Wigginton&Wiltrot (2002) *Expert Opin Biol Ther* 2:513-524;Gollob等,(2003) *J Clin Oncol* 21:2564-2573;Addison等,(1998) *Gene Ther* 5:1400-1409;Wigginton等,(2001) *J Immunol* 166:1156-1168)。值得注意的是,IL-2和IL-12的组合还可以显著增强T细胞和NK细胞产生IFN- γ (Wigginton&Wiltrot (2002) *Expert Opin Biol Ther* 2:513-524)。

[0881] 为评价包含IL-2或IL-12的免疫调节胶原蛋白结合分子的组合的治疗作用,基本如实施例9中所述,在小鼠黑色素瘤肿瘤模型中组合检测了基膜聚糖-MSA-IL2和IL12-MSA-基膜聚糖。然而,鉴于上述非胶原蛋白锚定细胞因子联合施用所引起的已知毒性,将IL12-MSA-基膜聚糖和IL12-MSA-IL-12的剂量降至此前在实施例9中施用的1/10,至14pmol/剂。与实施例6中一样,施用基膜聚糖-MSA-IL2的小鼠接受13 μ g/剂。施用MSA-IL2的小鼠接受9 μ g/剂。注射IL-2融合蛋白(基膜聚糖-MSA-IL2或MSA-IL2)的小鼠接受相当于0.11nmol/剂的IL-2。

[0882] 在B16-F10荷瘤小鼠中,单独IL12-MSA或单独MSA-IL2降低剂量(14pmol/剂)的肿瘤内注射不会导致体重减轻或显著的肿瘤生长延迟(数据未显示)。而相反的是,IL12-MSA与MSA-IL2的联合施用导致体重减轻和存活增加(图7)。而相反的是,使用胶原蛋白锚定形式的IL12-MSA-基膜聚糖和基膜聚糖-MSA-IL2的联合治疗,与IL12-MSA和MSA-IL2的组合相比,存活极大程度增加,且不会导致伴随的体重减轻(图7)。

[0883] 这些结果表明,使用胶原蛋白结合的IL12-MSA-基膜聚糖和基膜聚糖-MSA-IL2的组合治疗荷瘤小鼠,与使用非胶原蛋白结合的IL12-MSA和MSA-IL2的组合治疗相比,极大程

度地增加了小鼠的存活。此外,这些结果表明,使用胶原蛋白结合的IL12-MSA-基膜聚糖和基膜聚糖-MSA-IL2的组合治疗小鼠阻止了与IL-12和IL-2的共同施用相关的治疗相关性毒性,从而提供了针对该细胞因子组合的治疗模式。

[0884] 实施例11:胶原蛋白结合IL-2和IL-12融合蛋白的协同作用取决于CD8⁺T细胞和树突状细胞

[0885] 基本上如实施例7中所述,通过抗体介导的细胞耗竭确定了负责肿瘤内IL12-MSA-基膜聚糖和基膜聚糖-MSA-IL2联合疗法的有效性的免疫细胞类型。如图8A中所示,CD8⁺T细胞和交叉呈递树突状细胞针对有效性不可或缺,因为这些细胞类型的耗竭会降低经IL12-MSA-基膜聚糖和基膜聚糖-MSA-IL2组合肿瘤内治疗的荷瘤小鼠的存活率。而相反的是,耗竭NK细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞或巨噬细胞不会显著影响存活结局(图8B)。抗体介导的IFN γ (一种已知由IL-2和IL-12的伴随刺激扩增的细胞因子)的耗竭(Gollob等,(1999) J Immunol 162 (8):4472-4481),也不会显著改变存活(图8A),但是,缺乏疗效可能归因于IFN γ 的耗竭不足。

[0886] 为了评价免疫细胞类型对在荷瘤小鼠中由IL12-MSA-基膜聚糖和基膜聚糖-MSA-IL2的组合提供的抗肿瘤有效性的贡献,进行了肿瘤浸润免疫细胞的免疫表型分析。在第0天使用1百万个B16F10肿瘤细胞接种小鼠,并且在第5天使用PBS、IL12-MSA和MSA-IL2、或者IL12-MSA-基膜聚糖和基膜聚糖-MSA-IL2肿瘤内注射进行治疗。在第11天切除肿瘤。如此前所述分析肿瘤的免疫细胞浸润。(Moynihan等,(2016) Nat Med 22:1402-1410);Zhu等,(2015) Cancer Cell 27:489-501)。简言之,将切除的肿瘤称重,剪成小块,在含有1mg/mL胶原蛋白酶和分散酶(Roche)和25 μ g/mL DNase I (Roche)的RPMI-1640中于37C孵育30分钟。将进一步的机械解离用于产生单个细胞悬液,以供染色。在BD FACS LSRFortessa™上对细胞进行分析,使用**FlowJo®** (FlowJo, Inc)对数据进行分析。对细胞进行表面和胞内标记物染色,以描述细胞类型,如下所示:

[0887] NK细胞 (活CD45⁺CD3⁻NK1.1⁺)

[0888] Treg细胞 (活CD45⁺CD3⁺NK1.1⁻CD4⁺CD8⁻CD25⁺FoxP3⁺)

[0889] CD4细胞 (活CD45⁺CD3⁺NK1.1⁻CD4⁺CD8⁻CD25⁺/F_{ox}P3⁻)

[0890] CD8⁺T细胞 (活CD45⁺CD3⁺NK1.1⁻CD4⁻CD8⁺)

[0891] 单核细胞/巨噬细胞 (活CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻CD11c⁻F4/80⁺)

[0892] CD11b⁺DC (活CD45⁺CD11b⁺MHCII⁺CD11c⁺)

[0893] CD11b⁻DC (活CD45⁺CD11b⁻MHCII⁺CD11c⁺)

[0894] 中性粒细胞 (活CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺)

[0895] 如图8C中所示,在来自使用IL12-MSA-基膜聚糖和基膜聚糖-MSA-IL2 (基膜聚糖形式)的组合治疗相对于使用PBS治疗小鼠的肿瘤浸润中CD8⁺T细胞的倍数变化高于使用IL12-MSA+MSA-IL2 (MSA形式)治疗相对于使用PBS治疗小鼠的倍数变化。此外,在初始治疗后6天,使用基膜聚糖-MSA细胞因子融合体治疗的肿瘤与使用MSA细胞因子融合体治疗的肿瘤具有更多的浸润CD8⁺T细胞(图8D),以及更高的表面PD-1表达(图8E)。

[0896] 通过IFN γ ELISPOT,在治疗后6天分离的脾细胞中进一步评价了响应于治疗的肿瘤特异性T细胞的产生。对响应于B16F10靶细胞刺激的IFN γ 斑点形成单位(SFU)的数量进行了定量。使用基膜聚糖-MSA细胞因子融合体治疗产生了约20SFU/1百万个脾细胞,而相比

之下,针对MSA融合体为约15SFU/1百万个脾细胞,或针对未治疗动物为约2SFU/1百万个脾细胞。因此,与未治疗或使用MSA细胞因子融合体治疗相比,使用基膜聚糖-MSA细胞因子融合体治疗导致外周肿瘤特异性T细胞数量增加。

[0897] 这些结果表明,由IL12-MSA-基膜聚糖和基膜聚糖-MSA-IL2的组合提供的抗肿瘤有效性(例如增加的存活)取决于CD8+T细胞和树突状细胞。此外,这些结果证实了使用IL12-MSA-基膜聚糖and基膜聚糖-MSA-IL2的组合对荷瘤小鼠进行肿瘤内治疗至少部分地是通过诱导激活的CD8+T细胞进入肿瘤并诱导产生外周肿瘤特异性T细胞提供抗肿瘤有效性。

[0898] 实施例12:在小鼠黑色素瘤肿瘤模型中胶原蛋白结合IL-2和IL-12融合蛋白与抗PD-1抗体的组合的协同作用

[0899] 如实施例11中所述,在肿瘤浸润CD8 T细胞上响应于基膜聚糖-细胞因子治疗的表面PD-1的上调促使在小鼠黑色素瘤肿瘤模型中对抗PD-1抗体(克隆29F.1A12,BioXCell)、IL12-MSA-基膜聚糖和基膜聚糖-MSA-IL2的组合的抗肿瘤有效性进行评价。简言之,在第0天将 1×10^6 个B16-F10肿瘤细胞皮下接种至6-8周龄C57BL/6小鼠的右侧肋腹部。在第5天和第11天,以实施例10中所述的剂量使用基膜聚糖-MSA-IL2和IL12-MSA-基膜聚糖的组合或者MSA-IL2和IL12-MSA的组合肿瘤内施用,以及使用抗PD-1抗体(200 μ g/剂)腹腔内施用治疗荷瘤小鼠。监测相对于基线的体重变化百分比和存活百分比,并且如图9中所示。

[0900] 如图9中所示,将抗PD-1抗体引入与IL12-MSA和MSA-IL2联用或者与IL12-MSA-基膜聚糖和基膜聚糖-MSA-IL2联用不会改变此前观察到的体重减轻趋势(图7)。然而,对于使用IL12-MSA+MSA-IL2的组合治疗的小鼠而言,添加抗PD-1抗体改善了存活结局,但是对于使用IL12-MSA-基膜聚糖+基膜聚糖-MSA-IL2的组合治疗的小鼠而言没有进一步改善存活。

[0901] 与使用抗PD-1抗体、IL12-MSA和MSA-IL2(1/5的小鼠在注射部位具有白癜风)治疗的小鼠相比,在使用抗PD-1抗体、IL12-MSA-基膜聚糖和基膜聚糖-MSA-IL2(4/5的小鼠在注射部位具有白癜风)治疗的小鼠中局部白癜风发生率更高。此外,针对随后使用B16-F10肿瘤的肿瘤再攻击,与来自IL12-MSA-基膜聚糖+基膜聚糖-MSA-IL2治疗但不存在抗PD-1治疗的存活者相比,来自细胞因子(IL12-MSA+MSA-IL2或IL12-MSA-基膜聚糖+基膜聚糖-MSA-IL2)和抗PD-1治疗的存活者更多。尽管使用基膜聚糖-MSA细胞因子+抗PD-1治疗的4/4只小鼠和使用MSA细胞因子+抗PD-1治疗的2/2只小鼠抵御了再攻击肿瘤,但是仅使用基膜聚糖-MSA细胞因子治疗的仅1/3只小鼠抵御了再攻击。

[0902] 这些结果表明,使用抗PD-1、IL12-MSA-基膜聚糖和基膜聚糖-MSA-IL2的组合治疗荷瘤小鼠增加了治疗诱导的白癜风的发生和有效的免疫记忆,因此显示了在增强由局部IL-2和IL-12治疗产生的T细胞应答中的协同作用。

[0903] 实施例13:在小鼠乳腺和结肠癌肿瘤模型中胶原蛋白结合IL-2和IL-12融合蛋白与抗PD-1抗体的组合的协同作用

[0904] 在EMT6乳腺癌模型中进一步评价了胶原蛋白结合IL-2和IL-12融合蛋白与抗PD-1抗体的组合的抗肿瘤作用。简言之,在第0天,将混悬在50 μ L无菌PBS中的 1×10^6 个EMT6小鼠乳腺癌细胞(ATCC)或 1×10^6 个MC38小鼠结肠癌细胞(National Cancer Institute, Bethesda, MD)皮下注射至C57BL/6雌性小鼠的右侧肋腹部。在第5天、第11天和第17天,以如实施例10中所述的剂量,使用基膜聚糖-MSA-IL2+IL12-MSA-基膜聚糖(i.tu.),单独的抗

PD-1抗体(i.p., 200 μ g/剂)或者抗PD-1抗体与基膜聚糖-MSA-IL2和IL12-MSA-基膜聚糖(i.tu.)的组合治疗EMT6荷瘤小鼠。在第5天、第11天和第17天,以如实施例10中所述的剂量,使用基膜聚糖-MSA-IL2+IL12-MSA-基膜聚糖(i.tu.)的组合,单独的抗PD-1抗体(i.p., 200 μ g/剂)或者基膜聚糖-MSA-IL2+IL12-MSA-基膜聚糖(i.tu.)的组合治疗MC38荷瘤小鼠。对于每个肿瘤模型,监测随着时间推移的肿瘤面积(mm²)和存活百分比,并且如图10A-10B中所示。通过对数秩Mantel-Cox检验确定存活统计量。

[0905] 如图10A中所示,使用抗PD-1抗体与基膜聚糖-MSA-IL2和IL12-MSA-基膜聚糖的组合治疗EMT6乳腺癌肿瘤荷瘤小鼠导致与单独使用抗PD-1抗体治疗的荷瘤小鼠相比,肿瘤病变消除(通过没有可检测的肿瘤面积表示)以及很大程度地增加存活。

[0906] 如图10B中所示,使用抗PD-1抗体与基膜聚糖-MSA-IL2和IL12-MSA-基膜聚糖的组合治疗MC38结肠癌肿瘤荷瘤小鼠导致与仅使用抗-PD-1抗体或仅使用IL12-MSA-基膜聚糖+基膜聚糖-MSA-IL2组合治疗的荷瘤小鼠相比肿瘤面积减少以及很大程度地增加存活。

[0907] 这些结果表明,在EMT6乳腺癌和MC38结肠癌模型中,使用抗PD-1抗体与IL12-MSA-基膜聚糖+基膜聚糖-MSA-IL2的组合治疗荷瘤小鼠均能够产生协同抗肿瘤作用。

[0908] 实施例14: 在小鼠黑色素瘤肿瘤模型中胶原蛋白结合IL-12融合蛋白和癌症疫苗的协同作用

[0909] 为进一步评估胶原蛋白结合IL-12融合蛋白协同增强抗肿瘤治疗的能力,在B16-F10小鼠黑色素瘤模型中评估了胶原蛋白结合IL-12融合蛋白IL12-MSA-基膜聚糖与癌症疫苗的组的抗肿瘤作用。简言之,在第0天,将混悬在50 μ L无菌PBS中的1x 10⁶个B16-F10细胞(ATCC)皮下接种至6-8周龄C57BL/6雌性小鼠的右侧肋腹部。在第5天使用初免剂量以及在第11天和第17天使用激发剂量在尾根部皮下施用癌症疫苗,所述癌症疫苗包含90 μ g与来源于B16-F10相关抗原TYRP-1的肽和经修饰的gp100肽(PEG)融合的淋巴结靶向部分,和50 μ g环状二核苷酸佐剂(Invivogen)。皮下施用环状二核苷酸佐剂和癌症疫苗可评价抗原特异性CD8⁺ T细胞应答的引发。简言之,在第16天收集外周血并使用肽抗原Trp1和EGP刺激6小时。在孵育的最后4小时中包含布雷菲德菌素A。随后针对表面标记物和胞内IFN γ 对外周血细胞进行染色,并通过流式细胞术分析。评价活CD45+CD3+CD8+T细胞中IFN γ +细胞的百分比。单独的疫苗或者与IL12-MSA-基膜聚糖的组合改善抗原特异性CD8⁺ T细胞的引发(数据未显示)。

[0910] 监测随着时间的推移在第5天、第7天和第17天使用PBS(n=12)或IL-12(n=10,针对IL12-MSA;n=10,针对IL12-MSA-基膜聚糖),或单独的疫苗(n=7)或者疫苗和IL12(n=7,针对IL12-MSA;n=7,针对IL12-MSA-基膜聚糖)肿瘤内(i.tu.)注射治疗小鼠的每只小鼠的相对于基线的重量变化、肿瘤面积和存活(图11,从左到右)。

[0911] 如图11中所示,相对于用PBS治疗的小鼠,单独接种疫苗不会影响体重(左图),适度延迟B16F10肿瘤生长(中图)和适度增加小鼠的存活率(右图)。而相反的是,共同施用癌症疫苗和IL-12(使用IL12-MSA或IL12-MSA-基膜聚糖)导致肿瘤生长协同降低(中图)和存活增加(右图)。同与IL12-MSA组合相比,将癌症疫苗与IL12-MSA-基膜聚糖组合施用具有更长的存活。此外,将疫苗与IL12-MSA联用导致治疗诱导的体重减轻,而与IL12-MSA-基膜聚糖联用未检测到(右图)。

[0912] 这些结果表明,向荷瘤小鼠施用癌症疫苗与胶原蛋白锚定的IL-12(IL12-MSA-基

膜聚糖)的组合,与单独施用癌症疫苗或IL12-MSA-基膜聚糖相比,导致协同抗肿瘤作用,使得肿瘤生长减少和存活百分比极大程度地增加。这些结果表明,细胞因子(例如IL-12)的肿瘤内胶原蛋白锚定协同地改善了癌症疫苗的肿瘤控制。

[0913] 实施例15:在小鼠黑色素瘤肿瘤模型中胶原蛋白结合IL12融合蛋白和CAR-T细胞的协同作用

[0914] 为进一步评估胶原蛋白结合IL-12融合蛋白协同增强抗肿瘤治疗的能力,在B16-F10小鼠黑色素瘤模型中评估了胶原蛋白结合IL-12融合蛋白IL12-MSA-基膜聚糖与CAR-T细胞的组合的抗肿瘤作用。简言之,在第0天,将混悬在50 μ L无菌PBS中的 0.5×10^6 个B16-F10细胞(ATCC)皮下接种至6-8周龄C57BL/6雌性小鼠的右侧肋腹部。通过转导CD3⁺脾细胞以表达CAR产生B16F10特异性CAR-T细胞,所述CAR由与CD28和CD3 ζ 共刺激信号传导结构域融合的TA99的单链可变片段(scFv)组成。为确保CAR-T细胞植入,在静脉内(i.v.)推注1000万个CAR-T细胞的前一天,用全身照射对所有小鼠进行预处理。监测随着时间的推移在第5天和第11天使用PBS(n=9)或IL-12(n=6,针对IL12-MSA;n=5,针对IL12-MSA-基膜聚糖),或单独的CAR-T(n=12),或CAR-T和IL12(n=7,针对IL12-MSA;n=5,针对IL12-MSA-基膜聚糖)肿瘤内(i.tu.)注射治疗小鼠的相对于基线的重量变化、肿瘤面积和存活(图12,从左到右)。

[0915] 如图12中所示,单独使用CAR-T细胞或IL12-MSA-基膜聚糖(2.3 μ g/剂)治疗减小肿瘤面积(中图)和增加存活(右图)。然而,与单独施用CAR-T细胞或IL12-MSA-基膜聚糖治疗相比,向荷瘤小鼠施用CAR-T cells and IL12-MSA-基膜聚糖的组合导致持久的肿瘤消退,导致肿瘤面积减小和极大程度地增加存活。使用CAR-T细胞与IL12-MSA的组合治疗也导致肿瘤消退和适度的存活改善。然而,如治疗后动物体重更大程度的减轻所示的,组合治疗显示出显著的毒性。在CAR-T细胞和IL-12-MSA-基膜聚糖的组合中未观察到此类毒性。

[0916] 这些结果表明,与单独施用CAR-T细胞或IL12-MSA-基膜聚糖治疗相比,向荷瘤小鼠施用肿瘤抗原特异性CAR-T细胞与胶原蛋白锚定的IL-12(IL12-MSA-基膜聚糖)的组合导致协同的抗肿瘤作用,使得肿瘤生长减少和存活百分比极大程度地增加。这些结果表明,细胞因子(例如IL-12)的肿瘤内胶原蛋白锚定协同地改善了肿瘤抗原特异性CAR-T细胞的肿瘤控制。

[0917] 实施例16:在小鼠乳腺肿瘤切除模型中胶原蛋白结合IL-12融合蛋白联合PD-1检查点阻断的新辅施用阻止转移性复发

[0918] 为进一步评估胶原蛋白结合IL-12融合蛋白协同增强抗肿瘤治疗的能力,在4T1小鼠乳腺肿瘤切除模型中评估了胶原蛋白结合IL-12融合蛋白IL12-MSA-基膜聚糖与抗PD-1抗体(克隆29F.1A12,BioXCell)的组合的抗肿瘤作用,并与scIL12与抗PD-1的组合进行了比较。简言之,在第0天,将混悬在100 μ L无菌PBS中的 0.5×10^6 个表达荧光素酶的4T1-Luc细胞(MIT,Cambridge,MA)注射至6-8周龄BALB/c雌性小鼠的乳腺脂肪垫中。手术切除原发灶之前,使用IL12-MSA-基膜聚糖或scIL12肿瘤内施用和抗PD-1全身施用(新辅疗法)对小鼠进行治疗。在第7天和第13天施用新辅疗法(抗PD-1,200 μ g/剂,i.p.施用+IL12-MSA-基膜聚糖,4.6 μ g/剂(30pmol IL12/剂)或scIL12,1.9 μ g/剂(30pmol IL12/剂)),以及在第16天手术切除原发肿瘤。手术后小鼠通过体内成像(IVIS)监测转移情况。图13显示了在第7天和第13天使用IL-12(n=5,针对scIL12;n=5,针对IL12-MSA-基膜聚糖)肿瘤内(i.tu.)注射和

使用抗PD-1腹腔(i.p.)注射治疗小鼠的新辅治疗期间的体重变化(左图),原发肿瘤生长和重量(中图)以及存活百分比(右图)。箭头表示治疗时间,十字表示手术时间。

[0919] 如图13中所示,根据没有体重减轻认为,两种形式IL-12(scIL12或IL12-MSA-基膜聚糖)与抗PD-1抗体的组合均无明显毒性(左图)。然而,与非锚定形式的scIL-12相比,使用IL12-MSA-基膜聚糖的新辅疗法导致更多的原发肿瘤缩小(中图)。手术后,通过体内生物发光成像监测小鼠的转移。IL12-MSA-基膜聚糖完全保护了小鼠免于转移性生长,而使用scIL-12治疗的几只小鼠复发。

[0920] 这些结果表明,向荷瘤小鼠施用抗PD-1抗体与胶原蛋白锚定IL-12(IL12-MSA-基膜聚糖)的组合,与施用非胶原蛋白结合IL-12(scIL12)和抗PD-1抗体的组合相比,导致了协同抗肿瘤作用,使得原发肿瘤生长减少和手术切除肿瘤后的存活百分比极大程度地增加。这些结果表明,在新辅疗法背景下,胶原蛋白锚定IL-12改善术后结局。

[0921] 实施例17:胶原蛋白结合趋化因子融合蛋白诱导免疫细胞迁移和肿瘤浸润

[0922] T细胞浸润对于持久的抗肿瘤免疫至关重要。T细胞浸润与肿瘤细胞衍生的CCL3、CCL4和CCL5表达之间存在相关性。Spranger等,(2015) *Nature* 523:231-235 (2015); Spranger等,(2016) *Proc Natl Acad Sci USA* 113:E7759-E7768 (2016)。CCL3(MIP-1a)与CCR1具有高亲和力,而与CCR5具有低亲和力,从而介导了T细胞、B细胞和单核细胞的募集。CCL4(MIP-1b)与CCR5结合,介导一般淋巴细胞募集。CCL5(RANTES)与多种趋化因子受体(CCR1、CCR3、CCR4、CCR5)结合,从而吸引单核细胞、T细胞、嗜酸性粒细胞和其他免疫细胞。T细胞募集趋化因子在进行生产性免疫介导消退的肿瘤中也更为普遍。Liang等,(2016) *Proc Natl Acad Sci USA* 113:5000-5005; Schlecker等,(2012) *J Immunol* 189:5602-5611; Brewitz等,(2017) *Immunity* 46:205-219; Kanegasaki等,(2014) *Cancer Res* 74:5070-5078; Wittrup(2017) *Trends Cancer Res* 3:615-620。

[0923] 为评价在哺乳动物细胞中表达胶原蛋白结合的趋化因子的能力,在人胚肾293(HEK293)细胞中瞬时表达包含与CCL3、CCL4或CCL5融合的基膜聚糖的三种His标记的胶原蛋白结合的细胞因子。简言之,使用聚乙烯亚胺(每升细胞培养物2mg),在OptiPro无血清培养基(每升细胞培养物20mL)(Thermo Fisher)中,使用无菌过滤的质粒DNA(每升细胞培养物1mg)转染HEK293细胞(密度为100万个细胞/mL)。如此前所述,使用rProtein A Sepharose Fast Flow树脂(GE Healthcare)纯化TA99(Zhu等,2015)。使用TALON Metal亲和力和树脂(Takara Bio Inc.)从HEK293上清液中分离His标记的蛋白。然后,通过体积排阻色谱,使用HiLoad 16/600Superdex 200pg柱在ÄKTA FPLC系统(GE Healthcare)上进一步纯化细胞因子融合蛋白,所述系统已使用1M NaOH预处理4小时以除去内毒素并且随后在无菌PBS(Corning)中平衡。纯化后,将所有蛋白缓冲液交换至无菌PBS(Corning),0.2微米无菌过滤(Pall Corporation),并使用发色LAL测定(Lonza)确认其所含内毒素水平最低(每次注射<0.1EU)。为确证其分子量,将蛋白质Novex Prestained Sharp Protein Ladder一起在含1%MES运行缓冲液的4-12%NuPAGE Bis-Tris蛋白凝胶(Life Technologies)上运行。通过SDS-PAGE评价所得洗脱液中His标记的胶原蛋白结合融合蛋白的相对表达水平(数据未显示)。

[0924] 如通过SDS-PAGE分析所确定的,在HEK293细胞中实现了基膜聚糖、基膜聚糖D213A(SEQ ID NO:125)、基膜聚糖-Gluc、基膜聚糖-CCL3(SEQ ID NO:153)、基膜聚糖-CCL4(SEQ

ID NO:156) 和基膜聚糖-CCL5 (SEQ ID NO:160) 的瞬时表达,观察到在每种融合蛋白的各自预期分子量处或附近的蛋白染色。

[0925] 这些结果表明,能够表达包含趋化因子的胶原蛋白结合融合蛋白,并将其从哺乳动物细胞中纯化。

[0926] 为评价如上文所述产生的基膜聚糖-趋化因子融合蛋白诱导炎症(例如免疫细胞迁移)的能力,如上文所述进行了体内炎性腹膜炎测定(Proudfoot等,(2003)Proc Natl Acad Sci USA 100:1885-1890)。简言之,腹膜腔内衬着富含胶原蛋白和脉管系统的间皮。当腹腔内注射时,基质结合构建体(例如胶原蛋白结合趋化因子融合蛋白)粘附于该内衬。在基膜聚糖-趋化因子的情况下,间皮定位可产生一个浓度梯度,介导免疫细胞从附近血管渗出并进入腹膜腔。通过腹腔灌洗回收这些浸润液,用于离体免疫表型分析。因此,使用在200uL无菌PBS中的1nmol当量的基膜聚糖-GLuc、基膜聚糖-CCL3、基膜聚糖-CCL4或基膜聚糖-CCL5对BALB/c小鼠进行腹腔注射,并在注射后18小时处死小鼠。通过在腔中轻轻按摩5mL冰冷的PBS,将腹膜腔清洗3次,并合并灌洗液。使用Accuri流式细胞仪对收集的细胞进行计数。

[0927] 与注射基膜聚糖-GLuc相比,包含CCL3、CCL4或CCL5的基膜聚糖-趋化因子融合蛋白能够介导总体细胞浸润(数据未显示)。当通过表面标记物染色对浸润液进行免疫表型分析时,与使用PBS或基膜聚糖-GLuc处理的小鼠的灌洗液相比,使用基膜聚糖-CCL3、基膜聚糖-CCL4或基膜聚糖-CCL5处理的小鼠的灌洗液中含有大量的巨噬细胞,其次是嗜中性白细胞、NK细胞、DC、B细胞和T细胞(数据未显示)。

[0928] 这些结果表明,腹腔施用胶原蛋白结合趋化因子(例如基膜聚糖-CCL3、基膜聚糖-CCL4或基膜聚糖-CCL5)诱导免疫细胞(包括T细胞)迁移进入小鼠腹腔。这些结果提示,肿瘤内施用基膜聚糖-趋化因子融合蛋白将诱导炎症(例如免疫细胞浸润),从而模拟免疫应答性肿瘤。

[0929] 为评估在肿瘤背景下使用基膜聚糖-趋化因子诱导炎症的治疗性作用,如此前所述,在4T1乳腺癌模型和B16F10黑色素瘤模型中对基膜聚糖-CCL3 (Lum CCL3) 和基膜聚糖-CCL5 (Lum CCL5) 进行了检测。在第7天和第13天,在存在或不存在IFN α 的情况下,使用基膜聚糖-GLuc (20ug/剂),或者基膜聚糖-CCL3 (5.5ug/剂)、基膜聚糖-CCL4 (5.4ug/剂) 和基膜聚糖-CCL5 (5.5ug/剂) 的组合对荷瘤小鼠进行肿瘤内治疗。在第9天和第15天腹腔施用IFN α (50ug/剂)。

[0930] 如图14A中所示,在存在全身性IFN α 的情况下,肿瘤内注射基膜聚糖-CCL3、基膜聚糖-CCL4和基膜聚糖-CCL5的组合略微延迟了4T1肿瘤的生长。最终,在B16F10荷瘤小鼠中进行相同治疗表明,单独或组合施用的IFN α 和基膜聚糖-趋化因子等效地延迟了生长(图14B)。为确定是否基膜聚糖-趋化因子直接影响肿瘤细胞的存活,将增加浓度的融合蛋白基膜聚糖-GLuc (Lum GLuc)、基膜聚糖-CCL3 (Lum CCL3)、基膜聚糖-CCL5 (Lum CCL5) 与4T1细胞或B16F10在细胞培养基中培养48小时。在与10uL细胞增殖检测试剂WST-1 (Sigma Aldrich) 另外孵育4小时后,通过在450nm(参考700nm)处的吸光度测量增殖。如图14C和14D中所示,膜聚糖细胞因子对4T1细胞或B16F10细胞的增殖没有影响,表明在体内观察到的任何肿瘤生长延迟都是由免疫介导的而不是直接的杀肿瘤作用引起的。

[0931] 实施例18:在小鼠黑色素瘤肿瘤模型中胶原蛋白结合CCL11趋化因子融合蛋白和

癌症疫苗的协同作用

[0932] 已知嗜酸性粒细胞分泌T细胞趋化因子并使肿瘤血管正常化,从而减轻肿瘤内浸润。Carretero等,(2015) Nat Immunol 16:609-617。已知趋化因子CCL11(eotaxin)募集嗜酸性粒细胞(Menzies-Gow等,(2002) J Immunol 169(5):2712-2718)。因此,将在实施例14中描述的CCL11-基膜聚糖融合蛋白(SEQ ID NO:172)与癌症疫苗的组合用于检测在存在全身性TNF α 和IFN γ 的情况下其募集嗜酸性粒细胞进入肿瘤从而介导随后的肿瘤控制的能力。简言之,在第0天,使用 3×10^5 个B16F10细胞接种至C57BL/6小鼠的右侧肋腹部。在第5天初免以及在第11天和第17天强化,在尾根部皮下(s.c.)进行疫苗接种。疫苗接种由90ug TTR-Trp1-EGP和50ug环状二核苷酸组成,以激发肿瘤特异性CD8 $^+$ T细胞应答。在第11天、第17天、第23天和第29天,施用CCL11-基膜聚糖(5ug/剂/小鼠)、TNF α (5.8pmol/剂/小鼠)和IFN γ (6.3pmol/剂/小鼠)进行肿瘤内治疗。隔日测量随着时间的推移的肿瘤面积(平均值+SD)。

[0933] 如图15中所示,与仅使用癌症疫苗或者与全身性TNF α 和IFN γ 组合相比,使用CCL11-基膜聚糖与B16F10特异性癌症疫苗、TNF α 和IFN γ 组合治疗的荷瘤小鼠具有更小的肿瘤面积。

[0934] 实施例19:在小鼠黑色素瘤肿瘤模型中胶原蛋白结合CCL11趋化因子融合蛋白和癌症疫苗的协同作用

[0935] 为进一步评估胶原蛋白结合趋化因子融合蛋白协同增强抗肿瘤治疗的能力,在B16-F10小鼠黑色素瘤模型中评估了胶原蛋白结合趋化因子融合蛋白CCL11-基膜聚糖与MSA-IL2(30 μ g/剂)和靶向A-V类整合素的肿瘤靶向抗体(2.5F-Fc;参见Kwan等,(2017) J Exp Med 215(9):10.1084/jem.20160831)的组的抗肿瘤作用。简言之,在第0天,使用混悬在50 μ L无菌PBS中的 0.5×10^6 个B16-F10细胞(ATCC)皮下接种至6-8周龄C57BL/6雌性小鼠的右侧肋腹部。在第5天、第11天和第17天,腹腔(i.p.)施用肿瘤靶向抗体2.5F-Fc和MSA-IL2。在第5天和第11天使用CCL11-基膜聚糖(5ug/剂/小鼠)进行肿瘤内治疗。隔日监测随着时间的推移的肿瘤生长,并且单个肿瘤面积(mm ^{2})如图16A中所示。

[0936] 如图16B所示,与未使用CCL11(仅基膜聚糖)治疗相比,使用CCL11-基膜聚糖与肿瘤靶向抗体2.5F-Fc和MSA-IL-2治疗的荷瘤小鼠具有在很大程度上降低的肿瘤面积。

[0937] 总体而言,实施例17、实施例18和实施例19中的结果表明,基膜聚糖-趋化因子诱导局部炎症,将免疫细胞募集至局部施用部位,并且可以将基膜聚糖-趋化因子与其他抗肿瘤治疗方式联用以增强其作用并提供协同肿瘤控制。

[0938] 实施例20:胶原蛋白结合抗体融合蛋白的重组表达

[0939] 为评价在哺乳动物细胞中表达胶原蛋白结合抗体融合蛋白的能力,产生与五种不同抗体融合的基膜聚糖(4420-基膜聚糖(SEQ ID NO:142和143;抗荧光素)、LOB12.3-基膜聚糖(SEQ ID NO:146和147;抗4-1BB)、3/23-基膜聚糖(SEQ ID NO:184和185;抗CD40)、2C11-基膜聚糖(SEQ ID NO:150和151;抗CD3)和OX86-基膜聚糖(SEQ ID NO:148和149;抗OX40)),并将其在人胚肾293(HEK293F)细胞中瞬时表达。所有IgG-基膜聚糖融合体均在单一质粒上编码(数据未显示)。所有IgG-基膜聚糖构建体均表达为首先带有小鼠 κ 恒定区(mK)的轻链(VL),随后是T2A肽(SEQ ID NO:152;T2A)和最后是带有小鼠IgG2c恒定区(mIgG2c)的重链(VH),其融合至带有短接头((G4S) $_3$)的基膜聚糖(LUM)。T2A肽使核糖体跳

过了肽的最后两个残基之间形成的键,从而允许在一个开放阅读框内表达两种不同的蛋白。将弗林蛋白酶切割位点(F)包含在T2A肽的上游,从而使得可以将T2A肽从轻链末端除去。此外,将GSG接头(GSG)包括在T2A肽的上游,其已显示出增加T2A肽的切割效率(Chng等,(2015)mAbs 7(2):403-412)。轻链和重链两者均包含前导序列,以确保蛋白向分泌通路的正确运输。所有构建体均具有LALA-PG效应子功能沉默突变,可消除与Fc γ 受体的结合和与C1q的结合(Lo等,(2017)J Biol Chem 292:3900-3908)。

[0940] 如通过SDS-PAGE分析所示的,实现了单独的或与基膜聚糖融合的抗荧光素酶(4420)抗体的表达和纯化,该分析在还原(R)和非还原(NR)条件下均显示出位于预测分子量的蛋白条带(数据未显示)。类似地,如通过SDS-PAGE分析所示的,实现了激动剂IgG-基膜聚糖融合蛋白LOB12.3-基膜聚糖(抗4-1BB)、3/23-基膜聚糖(抗CD40)、2C11-基膜聚糖(抗CD3)和OX86-基膜聚糖(抗OX40)的表达,该分析在还原(R)和非还原(NR)条件下均显示出位于预测分子量的蛋白条带(数据未显示)。根据生产厂商的建议,使用重组蛋白A树脂(rProtein A Sepharose, Fast Flow resin (GE Healthcare))对所有IgG-基膜聚糖融合蛋白进行纯化。

[0941] 这些结果表明,在哺乳动物细胞中表达胶原蛋白结合抗体融合蛋白(例如IgG-基膜聚糖),并且胶原蛋白结合多肽融合体不影响纯化。

[0942] 实施例21:重组胶原蛋白结合抗体融合蛋白在体外结合胶原蛋白并在体内在肿瘤内滞留

[0943] 为评价胶原蛋白结合抗体融合蛋白结合胶原蛋白的能力,通过ELISA,针对其结合至包被I型胶原蛋白的板的能力,对如实施例20中所述表达和纯化的IgG-基膜聚糖融合蛋白进行了检测。简言之,在室温下,使用PBS+0.1%wt/vol牛血清白蛋白(BSA)+0.05%wt/vol吐温20(PBSTA),将I型胶原蛋白(Gibco)包被的96孔板封闭1小时,然后,使用含各种浓度基膜聚糖的PBSTA在室温下孵育2小时。使用PBSTA洗涤孔,然后以在PBSTA中以1:1000稀释的辣根过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠IgG2c重链(ab98722, Abcam)(终浓度.5 μ g/ml)在室温下孵育1小时。再次使用PBSTA洗涤孔,然后加入1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(Thermo Fisher Scientific)作用10min,随后加入1M硫酸终止显色反应。使用M1000酶标仪(Tecan)测量在450nm处的吸光度(使用在570nm下的参照吸光度校正)。通过ELISA,在胶原蛋白I包被的板上对纯化的胶原蛋白结合抗体融合蛋白LOB12.3-基膜聚糖(抗4-1BB)、3/23-基膜聚糖(抗CD40)、2C11-基膜聚糖(抗CD3)和OX86-基膜聚糖(抗OX40)进行评价。如图17A中所示,所有IgG-基膜聚糖融合蛋白均保留了以相似的亲和力与胶原蛋白结合的能力。这些结果表明,与IgG的重链融合的基膜聚糖保留了结合I型胶原蛋白的能力。

[0944] 还评估了4420-基膜聚糖融合蛋白和4420抗体在体内的肿瘤内滞留能力。使用体积排阻色谱对这两种蛋白进行纯化,然后根据生产厂商的说明书使用NHS-AlexaFluor 647(Thermo Fisher)进行标记。在第0天,使用 1×10^6 个4T1乳腺癌细胞皮下注射至6至8周龄雌性BALB/c小鼠。在第7天,将等摩尔量的荧光标记的4420抗体和4420-基膜聚糖肿瘤内注射至小鼠,每种三只小鼠,设置PBS对照小鼠。通过在0、0.5、1、2、4、6、12、24、48、72、96、100、124和148小时,在IVIS Spectrum仪器(Perkin Elmer)上测量荧光评价在肿瘤中的滞留(图17B)。

[0945] 如图17B中所示,与来自4420-基膜聚糖融合蛋白(4420-LUM LALA-PG)的荧光信号

相比,来自使用荧光标记的4420抗体(4420LALA-PG)注射的小鼠的荧光信号减弱更快且幅度更大。

[0946] 这些结果表明,随着时间的推移,胶原蛋白结合抗体融合蛋白(例如4420-基膜聚糖融合蛋白)被物理滞留于肿瘤内注射部位处。这些结果提示,包含治疗性抗体或抗原结合片段的胶原蛋白结合免疫调节分子将显示出肿瘤内滞留和有限的全身性播散。

[0947] 实施例22:胶原蛋白结合IgG结合融合蛋白的重组表达

[0948] 作为一种将所有IgG定位在肿瘤内而无需将抗体直接作为基膜聚糖融合体进行再生的策略,可以将几种不同的IgG结合蛋白融合到基膜聚糖上。与本文所述的其他基膜聚糖融合蛋白一样,将小鼠血清白蛋白(MSA)间隔物用于确保基膜聚糖-胶原蛋白结合不会干扰IgG结合结构域的功能。选择几种不同IgG结合物进行筛选,包括二聚化Z结构域(蛋白A的五个IgG结合结构域之一,本文称为“ZZ”)(Jendeberg等,(1995) *J Mol Recognit* 8:270-278)、蛋白G的二聚化IgG结合结构域(本文称为“SpG2”)(Jung等,(2009) *Anal Chem* 81:936-942),从Sso7d酵母展示文库分离的IgG结合物(Gera等,(2011) *J Mol Biol* 409:601-616),从III型纤连蛋白结构域(Fn3)酵母展示文库分离的IgG结合物(Hackel等,(2010) *J Mol Biol* 401:84-96)以及设计为结合至IgG Fc区的两个小肽(本文中称为“Fc-III-4C”和“RRGW”)(Gong等,(2015) *Bioconjug Chem* 27:1569-1573;Tsai等,(2014) *Anal Chem* 86:2931-2938)。此外,还克隆和表达了融合至4m5.3的基膜聚糖-MSA。4m5.3是一种与荧光素具有飞摩结合亲和力的scFv(Midelfort等,(2004) *J Mol Biol* 343:685-701)。荧光素可以通过抗体药物缀合物(ADC)领域的广泛缀合策略与抗体缀合(Carter&Lazar(2017) *Nat Rev Drug Discov* 17:197-223)。将具有荧光素标记抗体的4m5.3-MSA-基膜聚糖作为将IgG定位至肿瘤的替代策略。该构建体还作为通用平台,其牢固地结合并定位任何荧光素(或FITC)标记的蛋白质或小分子。

[0949] 为评价在哺乳动物细胞中表达胶原蛋白结合IgG结合融合蛋白的能力,产生了与8种不同IgG结合多肽融合的基膜聚糖(基膜聚糖-MSA-Fc-III-4C(SEQ ID NO:136;105.7kDa)、基膜聚糖-MSA-Fn3(SEQ ID NO:137;113.7kDa)、基膜聚糖-MSA-SpG2(SEQ ID NO:138;117.7kDa)、ZZ-MSA-基膜聚糖(SEQ ID NO:135;117.5kDa)、WGRR-MSA-基膜聚糖(SEQ ID NO:140;104.6kDa)、RRGW-MSA-基膜聚糖(SEQ ID NO:139;104.6kDa)、Sso7d-MSA-基膜聚糖(SEQ ID NO:134;111.5kDa)和4m5.3-MSA-基膜聚糖(SEQ ID NO:133;132.2kDa)),并在人胚肾293(HEK293)细胞中瞬时表达。根据生产厂商的说明书,对所有基膜聚糖-IgG结合融合蛋白进行His标记,以便于使用TALON金属亲和力树脂(Takara Bio Inc.)从HEK293裂解物中纯化。

[0950] 如通过SDS-PAGE分析所示,实现了所有8种基膜聚糖-IgG结合融合蛋白的表达和纯化,,该分析在还原和非还原条件下均显示出位于预测分子量的蛋白条带(数据未显示)。

[0951] 这些结果表明,在哺乳动物细胞中表达His标记的胶原蛋白结合IgG结合融合蛋白(例如IgG-基膜聚糖)并且能够对其进行纯化。

[0952] 实施例23:重组胶原蛋白结合IgG结合融合蛋白在体外结合胶原蛋白和IgG

[0953] 为评价胶原蛋白结合IgG结合融合蛋白结合胶原蛋白的能力,通过ELISA,针对其结合至包被I型胶原蛋白和IV型胶原蛋白的板的能力,对如实施例22中所述表达和纯化的基膜聚糖-IgG结合融合蛋白进行了检测。简言之,使用小鼠IgG2a同种型对照抗体(100μL,

2.5 μ g/mL, BioXCell C1.18.4) 包被的Nunc MaxiSorp平底96孔板(ThermoFisher)在4℃下包被过夜。然后,在室温下,使用PBS+0.1%wt/vol牛血清白蛋白(BSA)+0.05%wt/vol吐温20(PBSTA)封闭1小时,随后使用含各种浓度基膜聚糖的PBSTA在室温下孵育2小时。使用PBSTA洗涤孔,然后以在PBSTA中以1:2000稀释的辣根过氧化物酶缀合的多克隆抗6xHis(ab1187, Abcam)(终浓度.5 μ g/ml)在室温下孵育1小时。再次使用PBSTA洗涤孔,然后加入1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(Thermo Fisher Scientific)作用10min,随后加入1M硫酸终止显色反应。使用M1000酶标仪(Tecan)测量在450nm处的吸光度(使用在570nm下的参照吸光度校正)。

[0954] 通过ELISA在I型胶原蛋白包被的板上和IV型胶原蛋白包被的板上对纯化的基膜聚糖-IgG-结合融合蛋白基膜聚糖-MSA-Fn3、基膜聚糖-MSA-SpG2、ZZ-MSA-基膜聚糖和4m5.3-MSA-基膜聚糖进行了评价。将基膜聚糖作为阳性对照。如图18A中所示,所有基膜聚糖-IgG-结合融合蛋白均保留了以相似的亲和力与胶原蛋白结合的能力。这些结果表明,与各种IgG结合多肽融合的基膜聚糖保留了结合至I型胶原蛋白和IV型胶原蛋白的能力。

[0955] 如通过ELISA所测量的,针对其结合小鼠IgG2a同种型对照(克隆C1.18.4)的能力,对来自实施例22的纯化的基膜聚糖-IgG-结合融合蛋白进行检测。简言之,将与HRP缀合的抗His二抗(Abcam, ab1187),以及1步Ultra TMB-ELISA底物(Thermo Fischer)用于检测IgG结合物-基膜聚糖融合体。

[0956] 如图18B中所示,所有检测的基膜聚糖-IgG-结合融合蛋白均以一定范围的亲和力(K_D)结合至小鼠IgG2a。

[0957] 这些结果共同表明,基膜聚糖-IgG-结合融合蛋白结合至I型胶原蛋白和IV型胶原蛋白两者以及结合至IgGs。这些结果提示,将基膜聚糖-IgG-结合融合蛋白用于与IgG(例如治疗性抗体)组合将结合两种胶原蛋白和IgG,并在局部施用部位保留IgG。

[0958] 实施例24:腹腔注射后胶原蛋白结合基膜聚糖在腹腔中滞留

[0959] 前述实施例已经证实了使用基膜聚糖在肿瘤内(i.tu.)施用后的肿瘤内滞留。腹腔也被富含胶原蛋白的间皮衬里。为评价在腹腔(i.p)注射后,基膜聚糖在腹腔中滞留的能力,使用单独的(GLuc; 20 μ g/剂)或与基膜聚糖融合(基膜聚糖-GLuc; 40 μ g/剂)的高斯荧光素酶对BALB/c小鼠进行腹腔注射。注射后立即通过体内荧光(落射照明,自动曝光设置)对小鼠进行成像。注射后24小时,对小鼠进行再次成像。

[0960] 基膜聚糖-GLuc滞留于腔内,而单独的GLuc在注射后迅速在腹腔中扩散,导致初始信号较低(数据未显示)。注射后24小时,观察到基膜聚糖滞留于腔内。

[0961] 嵌在该内膜或腹膜大网膜上的肿瘤也富含胶原蛋白。为确定是否腹腔施用基膜聚糖将导致肿瘤偏向在大网膜上累积,将用Alexa Fluor 647荧光标记的基膜聚糖施用到小鼠网膜组织中具有卵巢肿瘤微集落的小鼠。简言之,使用OVCA433细胞(人卵巢肿瘤细胞)腹腔注射至小鼠,并使其在大网膜上形成微集落3周。腹腔注射20 μ g标记的基膜聚糖。通过荧光显微镜对切除的网膜组织成像。将标记的基膜聚糖腹腔注射至荷瘤小鼠。在注射后1小时、6小时和24小时,对切下的小鼠网膜组织成像。

[0962] 如图19中所示,当将基膜聚糖腹腔内注射至大网膜内衬有卵巢肿瘤的小鼠中时,基膜聚糖偏向于在这些肿瘤微集落中累积。注射后1小时(左图),来自基膜聚糖的荧光信号均匀分布(以黄色表示)。注射后6小时(中),其仅保持在大网膜的肿瘤微集落周围(以红色

表示) (中图)。在24小时 (右图), 观察到基膜聚糖保持在大肿瘤周围。这些结果表明, 腹腔注射的基膜聚糖能够累积在富含胶原蛋白的部位, 并且基膜聚糖适合以包括腹腔注射在内的几种方式施用。

[0963] 实施例25: 来自哺乳动物细胞中自我复制RNA的胶原蛋白结合IL-12融合蛋白的表达

[0964] 为评价使用RNA的胶原蛋白结合免疫调节分子的表达, 使用单独的或与荧光蛋白 (mCherry) 融合的编码IL12-MSA和IL12-MSA-基膜聚糖的自我复制RNA分子 (复制子) 检测了其在B16F10小鼠黑色素瘤细胞中表达的能力。在本实施例中使用的复制子来自甲病毒。复制子确实衣壳结构蛋白, 但是保留非结构蛋白。非结构蛋白对应于基于RNA的RNA复制和RNA转录。Ab1c1是与野生型复制子相比在体外和体内显示出更强大的表达的突变复制子。Ab1c1复制子在nsP2和nsP3基因中包含四个突变, 可延长复制子在细胞和亚基因组转录中的存在。

[0965] 简言之, 使用NEOnN转染试剂 (电穿孔) 和Ab1c1复制子转染在DMEM+10%FBS中培养的 0.5×10^6 个B16F10细胞。24小时后通过FACS分析仪使用光学设置检测mCherry检测转染效率。转染24小时后, 使用细胞上清液和商业化的IL-12ELISA对IL-12的表达进行定量 (根据生产厂商的说明书)。通过流式细胞术, 通过确定mCherry, 在B16F10细胞中对复制子的表达进行评价 (图20A)。将商品化IL-12ELISA用于在B16F10细胞中定量IL-12 (图20B)。

[0966] 如图20A中所示, 通过流式细胞术对使用IL12-MSA-mCherry或IL12-MSA-基膜聚糖-mCherry转染的mCherry+B16F10细胞进行观察。在这些复制中, mCherry荧光蛋白是C末端编码的, 因此, 检测到mCherry的表达表明了编码蛋白的全长表达。

[0967] 如图20B中所示, 细胞上清液显示了转染了IL-12编码复制的B16F10细胞中这些构建体的表达, 但未显示Ab1c1-GIM对照。

[0968] 这些结果表明, 使用包括如所示的复制子在内的注射以外的方式能够实现基膜聚糖-融合蛋白的递送。

[0969] 实施例26: 在Braf^{V600E}/Pten^{f1/f1}小鼠模型中胶原蛋白结合细胞因子融合蛋白、抗PD-1抗体和TA99的协同作用

[0970] 为评价基膜聚糖-细胞因子与抗PD-1阻断的组合在难治性小鼠黑色素瘤模型中的作用, 使用了Braf^{V600E}/Pten^{f1/f1}基因修饰的小鼠模型 (GEMM) (Spranger等, (2015) Nature 523:231-235; Momin等, (2019) Sci. Transl. Med. 11, eeaw2614)。在该GEMM中黑色素瘤是由他莫昔芬调控的黑色素细胞中Cre表达诱导的, 该表达驱动致癌性Braf^{V600E}的激活和肿瘤抑制因子Pten的双等位基因缺失。Braf^{V600E}/Pten^{f1/f1}黑色素瘤比B16F10肿瘤具有更少的新抗原和更高的异质性。该模型具有适度T细胞浸润, 但是通过PD-1和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 的双重检查点阻断, 肿瘤的生长只会略微减慢。

[0971] 为确定是否使用胶原蛋白结合IL-2和IL-12以及抗PD-1检查点阻断能够重启正在进行的应答和激发新的T细胞应答, 如在B16F10肿瘤中所观察到的 (图9、图10和图13), 以及是否通过引入免疫原性细胞死亡诱导剂 (如肿瘤靶向抗体TA99) 能够增强从头T细胞激发和任何远端效应, 在第0天, 通过在Braf^{V600E}/Pten^{f1/f1}小鼠的右侧肋腹部应用4-羟基他莫昔芬诱导黑色素瘤。诱导后, 形成扁平的黑色病变。在不进行治疗的情况下, 该病变将进展成大块 (数据未显示)。从第25天开始, 在第25、31、37、43、49、55和61天使用PBS对照 (i. tu), 使

用基膜聚糖-MSA-IL2 (i.tu)+IL12-MSA-基膜聚糖 (i.tu)+TA99 (i.p.)+抗PD-1 (i.p.) ,使用基膜聚糖-MSA-IL2 (i.tu)+IL12-MSA-基膜聚糖 (i.tu)+抗PD-1 (i.p.) ,使用MSA-IL2 (i.tu)+IL12-MSA (i.tu)+TA99 (i.p.)+抗PD-1 (i.p.) ,或者使用MSA-IL2 (i.tu)+IL12-MSA (i.tu)+抗PD-1 (i.p.) 对荷瘤小鼠进行治疗。

[0972] 如图21A中所示,使用MSA-IL2 (i.tu)+IL12-MSA (i.tu)+TA99 (i.p.)+抗PD-1 (i.p.) 治疗的Braf^{V600E}/Pten^{f1/f1}荷瘤小鼠显示出病变进展抑制。

[0973] 如图21B中所示,在使用或不使用TA99的情况下,使用抗PD-1和胶原蛋白结合的IL-2和IL-12治疗的Braf^{V600E}/Pten^{f1/f1}荷瘤小鼠的总生存期相当。因此,TA99不是有效性所必需的。这些结果证实了IL-2,IL-12和检查点阻断可以是有效的肿瘤激动性组合治疗(图9、图10和图13)。

[0974] 该模型中的肿瘤控制也可以使用未锚定的细胞因子代替胶原蛋白锚定的细胞因子来实现,但要付出重大和潜在的致命毒性的代价。三分之一的使用IL12-MSA和MSA-IL2治疗的小鼠由于体重减轻>20%而进行了安乐死,而使用IL12-MSA-基膜聚糖和基膜聚糖-MSA-IL2治疗的小鼠均未出现治疗相关的毒性(图21B)。这些结果表明,在这种有效肿瘤激动性组合治疗中,胶原蛋白结合融合蛋白能够安全地改善总生存期(图21B)。

[0975] 实施例27:LAIR结合体内肿瘤的能力

[0976] 在本实施例中,测量了LAIR结合切除的B16F10肿瘤的能力。B16F10肿瘤几乎没有可检测的胶原蛋白蛋白,因此,对于LAIR对肿瘤的结合能力而言,这是一个较低的估算值。简言之,将 1×10^6 个B16F10细胞皮下接种至C57/小鼠的左侧肋腹部。七天后,仔细期初肿瘤并将其与所有残留的皮肤和皮下脂肪分离。然后,将切下的肿瘤与温和去垢剂(PBS+0.1% v/v吐温20)在37℃下孵育2小时,然后通过70微米过滤器进行解离/压碎(图22A)。如图22B所示,基质占肿瘤重量的三分之一。

[0977] 过滤的组分不含细胞外基质(即细胞组分),而未通过过滤器的组分则富含基质(即基质组分),如根据生产厂商的说明书,通过羟脯氨酸测定(MAK008-1KT,Millipore Sigma)所证实的(图22C)。羟脯氨酸(4-羟脯氨酸)是由脯氨酸的翻译后羟基化形成的非蛋白氨基酸。羟脯氨酸是胶原蛋白蛋白的主要成分,在胶原蛋白蛋白中起到稳定螺旋结构的作用。由于羟脯氨酸在很大程度上限于胶原蛋白蛋白,因此羟脯氨酸水平的测量被用作胶原蛋白蛋白含量的指标。在该测定中,通过氧化的羟脯氨酸与4-(二甲基氨基)苯甲醛(DMAB)的反应检测羟脯氨酸的浓度,这导致比色(560nm)产物的生成与所存在的羟脯氨酸成比例。

[0978] 然后,将每种肿瘤基质组分与抗原过量浓度(10μM)或抗原耗竭浓度(10μM)的AF647标记的LAIR孵育,以定量在基质组分中的LAIR结合位点。监测溶液荧光随时间的变化情况直至达到稳态。如图22D中所示,用1μM标记的LAIR观察到荧光的降低,这对应于与基质组分中的胶原蛋白结合后从洗液中去除LAIR。溶液浓度降低20%表明0.2nmol摄入肿瘤基质。因此,来自 1×10^6 个细胞接种物的第7天B16F10肿瘤具有0.2nmol的LAIR结合位点(图22D)。如通过羟脯氨酸含量所确定的,该数量与肿瘤的胶原蛋白含量相关(图22E)。该试验表明LAIR能够结合B1610,因为B1610基质是富含胶原蛋白的。

[0979] 实施例28:与使用基膜聚糖相比使用LAIR的胶原蛋白结合融合蛋白具有相似的获益

[0980] 与基膜聚糖一样,LAIR能够结合至I型胶原蛋白。将LAIR细胞因子融合蛋白用于确定胶原蛋白结合融合蛋白是否可以增强融合细胞因子的有效性。如针对基膜聚糖-MSA-IL2(实施例1)所描述的,表达和纯化LAIR-细胞因子融合蛋白LAIR-MSA-IL2(SEQ ID NO:186)。如实施例6中所述使用B16F10黑色素瘤小鼠模型,LAIR-MSA-IL2在缩小肿瘤尺寸方面至少与基膜聚糖-MSA-IL2一样有效(对图3B至图23A进行比较)。LAIR-MSA-IL2也能够增加小鼠的存活,其水平与使用基膜聚糖-MSA-IL2与腹腔内施用TA99的组治疗小鼠的存活水平相当(对图3B和图3C至图23B进行比较)。这些结果表明,能够使用基膜聚糖、LAIR以及该类别中的其他胶原蛋白结合蛋白进行胶原蛋白结合策略。

[0981] 实施例29:LAIR工程化产生亲和力更高和更低的胶原蛋白结合物

[0982] 在本实施例中,将酵母展示平台用于工程化LAIR更高和更低亲和力的变体。简言之,使用易错PCR扩增小鼠LAIR基因,以产生LAI突变体文库。使用线性化的pCTCON2载体(41843,Addgene)转化RJY200酵母(EBY100内部修饰形式,ATCC),并收集易错PCR产物,并进行体内同源重组事件以产生最终的展示质粒。格式化pCTCON2质粒,以使LAIR突变体与Aga2蛋白融合,后者通过与膜结合Aga1蛋白的二硫键与酵母表面结合。LAIR基因后面还有一个c-myc标签,可以用来探测突变LAIR蛋白的完整表达。一旦在表面上表达后,可以使用标记抗原和针对c-myc标签的抗体(ACMYC,Exa)对酵母染色。然后可以使用FACS对通过c-myc染色强度确定的表达LAIR的克隆进行分选,以得到更低或更高的亲和力。(Chao等,(2006) Nat. Protoc. 1 (2):755-768)。

[0983] 可溶性胶原蛋白肽模拟物(CRP,胶原蛋白相关肽)被用作FACS测定的抗原,因为LAIR天然配体胶原蛋白I不溶。该模拟物的蛋白序列是GCO-(GPO)₁₀-GCOG-NH₂,其中O表示羟脯氨酸氨基酸。与胶原蛋白I类似,这些肽在溶液中自发形成螺旋结构。使用交联剂(目录号(Cat#),公司)将这些螺旋结构固定在适当的位置。纯化后,将交联肽用作我们的抗原(CRP-XL)。值得注意的是,该肽以生物素化(CRP-XL-生物素)和非生物素化(CRP-XL)形式使用。(可以从CambCollab Inc.获得有关这些肽及其功能化为三螺旋形式的详细说明)。

[0984] 将两种不同策略用于分离高亲和力和低亲和力胶原蛋白结合突变体。为了选择低亲和力突变体,采用平衡分选。在该策略中,在酵母文库的表面上诱导了LAIR表达。将该文库依次用CPP-XL-生物素和鸡抗c-myc(ACMYC,Exa)孵育,随后用二抗(链霉亲和素-AF647(S21374,Thermo Fisher))和山羊抗鸡AF488(A-1139,Invitrogen)孵育,直至达到平衡。在BD FACS Aria机器上,对显示出弱的AF647信号或没有AF647信号但对AF488呈阳性,表明它们表达LAIR但不结合胶原蛋白蛋白模拟物的酵母进行分选。经过几轮分选后,将酵母进行微量制备以分离展示质粒,转化为细菌菌落,然后进行测序。选择流行的克隆(以比其他克隆更高的频率(至少两次)出现在测序中的克隆)和/或在胶原蛋白结合口袋中含有突变的克隆进行下游分析。(Brondijk等,(2010) Blood 115:1364-1373)。将这些突变体克隆到哺乳动物表达载体中,以与小鼠血清白蛋白(MSA)融合的形式可溶表达,并在ELISA分析中测试其结合胶原蛋白I的能力。如图24A-E和图25A-C中所示,弱结合克隆(图24F、图24D)在LAIR结合口袋中含有突变。SEQ ID NOS:187-192。

[0985] 为分离更高亲和力的突变,使用了动力学分选策略。诱导表达后,如上文所述使用CRP-XL-生物素标记文库。达到平衡后,洗涤酵母克隆,然后在300:1过量的CRP-XL(未生物素化)中孵育3-5天。未标记的CRP-XL将取代解离的CRP-XL-生物素用于LAIR结合(图26C-

D)。只有关闭率最低,即亲和力最高的克隆才会被标记。然后,使用FACS分选具有最高AF647信号的酵母克隆。经过几轮分选后,在竞争测定中对选出的高亲和力克隆进行下游分析。使用CRP-XL-生物素对分离的酵母克隆进行标记,然后与未标记的CRP-XL一起孵育。随着时间的推移采集样品并对AF647信号进行分析(图26E-F)。如图26G中所示,与WT LAIR相比,高亲和力突变LAIR(LAIR30.2.K1.B)具有更低的解离速率。在此克隆中可见的突变位于LAIR结合口袋之外(图26B,SEQ ID NO:193)。这些结果表明,可以分离具有与胶原蛋白的一系列结合亲和力的突变LAIR。这些LAIR1变体提供了工程改造包含治疗剂的免疫调节融合蛋白的机会,所述治疗剂对富含胶原蛋白的肿瘤具有不同的结合亲和力。

[0986] 序列总结表

[0987]

SEQ ID NO	描述	序列
1	IL-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A Q S K N F H L R P R D L I S N I N V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R W I T F C Q S I I S T L T
2	野生型 IL12B, 无信号 (IL12B) 氨基酸	IWELKKDVYVVELDWYDPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRCEAK N Y S G R F T C W W L T T I S T D L T F S V K S S R G S S D P Q G V T C G A A T L S A E R V R G D N K E Y E Y S V E C Q E D S A C P A A E E S L P I E V M V D A V H K L K Y E N Y T S S F F I R D I I K P D P P K N L Q L K P L K N S R Q V E V S W E Y P D T W S T P H S Y F S L T F C V Q V Q G K S K R E K K D R V F T D K T S A T V I C R K N A S I S V R A Q D R Y Y S S W S E W A S V P C S
3	野生型 IL12A, 无信号肽氨基酸	RNLFPVATPDPGMFPC L H H S Q N L L R A V S N M L Q K A R Q T L E F Y P C T S E E I D H E D I T K D K T S T V E A C L P L E L T K N E S C L N S R E T S F I T N G S C L A S R K T S F M M A L C L S S I Y E D L K M Y Q V E F K T M N A K L L M D P K R Q I F L D Q N M L A V I D E L M Q A L N F N S E T V P Q K S S L E E P D F Y K T K I K L C I L L H A F R I R A V T I D R V M S Y L N A S
4	IL-15Ra	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW T T P S L K C I R D P A L V H Q R P A P P S T V T T A G V T P Q P E S L S P S G K E P A A S S P S S N N T A A T T A A I V P G S Q L M P S K S P S T G T T E I S S H E S S H G T P S Q T T A K N W E L T A S A S H Q P P G V Y P Q G H S D T T
5	IL-15	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKV TAMKCFLEELQVISLES GD A S I H D T V E N L I I L A N N S L S S N G N V T E S G C K E C E E L E E K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S
6	TNF α	VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRANALLANGVELRDNLVVPSEGLY L I Y S Q V L F K G Q G C P S T H V L L T H T I S R I A V S Y Q T K V N L L S A I K S P C Q R E T P E G A E A K P W Y E P I Y L G G V F Q L E K G D R L S A E I N R P D Y L D F A E S G Q V Y F G I I A L
7	IFN γ	QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKL F K N F K D D Q S I Q K S V E T I K E D M N V K F F N S N K K R D D F E K L T N Y S V T D L N V Q R K A I H E L I Q V M A E L S P A A K T G K R K R S Q M L F R G
8	IFN α	CDLPQTHSLGSRRTMLLAQMRKISLFSLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVL H E M I Q Q I F N L F S T K D S S A A W D E T L L D K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C V I Q G V G T E T P L M K E D S I L A V R K Y F Q R I T L Y L K E K K Y S P C A W E V V R A E I M R S F S L S T N L Q E S L R S K E
9	IL-21	QQQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLK S A N T G N N E R I I N V S I K K L K R K P P S T N A G R R Q K H R L T C P S C D S Y E K K P P K E F L E R F K S L L Q K M I H Q H L S S R T H G S E D S
10	IL-6	LAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPGVEPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWA G M G R R L L R S V Q L H D S G N Y S C Y R A G R P A G T V H L L V D V P P E E P Q L S C F R K S P L S N V V C E W G P R S T P S L T T K A V L L V R K F Q N S P A E D F Q E P C Q Y S Q E S Q K F S C Q L A V P E G D S S F Y I V S M C V A S S V G S K F S K T Q T F Q G C G I L Q P D P P A N I T V T A V A R N P R W L S V T W Q D P H S W N S S F Y R L R F E L R Y R A E R S K T F T T W M V K D L Q H H C V I H D A W S G L R H V V Q L R A Q E E F G Q G E W S E W S P E A M G T P W T E S R S P P A E N E V S T P M Q A L T N K D D D N I L F R D S A N A T S L P V Q D S S S V P L P T F L V A G G S L A F G T L L C I A I V L R F K K T W K L R A L K E G K T S M H P P Y S L G Q L V P E R P R P T P V L V P L I S P P V S P S S L G S D N T S S H N R P D A R D P R S P Y D I S N T D Y F F P R
11	IL-5	DLLPDEKISLLPPVNFTIKVTGLAQVLLQWKPNPDQEQRNVNLEYQVKINAPKEDD Y E T R I T E S K C V T I L H K G F S A S V R T I L Q N D H S L L A S S W A S A E L H A P P G S P G T S I V N L T C T T N T T E D N Y S R L R S Y Q V S L H C T W L V G T D A P E D T Q Y F L Y Y R Y G S W T E E C Q E Y S K D T L G R N I A C W F P R T F I L S K G R D W L A V L V N G S S K H S A I R P F D Q L F A L H A I D Q I N P P L N V T A E I E G T R L S I Q W E K P V S A F P I H C F D Y E V K I H N T R N G Y L Q I E K L M T N A F I S I I D D L S K Y D V Q V R A A V S S M C R E A G L W S E W S Q P I Y V G N D E H K P L R E W F V I V I M A T I C F I L L I L S L I C K I C H L W I K L F P P I P A P K S N I K D L F V T T N Y E K A G S S E T E I E V I C Y I E K P G V E T L E D S V F
12	IL-8	AVLPRSAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELCL D P K E N W V Q R V V E K F L K R A E N S
13	IL-7	DCDIEGKDQKQYESVLMVSI D Q L L D S M K E I G S N C L N N E F N F F K R H I C D A N K E G M F L F R A A R K L R Q F L K M N S T G D F D L H L L K V S E G T T I L L N C T G Q V K G R K P A A L G E A Q P T K S L E E N K S L K E Q K K L N D L C F L K R L L Q E I K T C W N K I L M G T K E H
14	IL-17A	GITIPRNP G C P N S E D K N F P R T V M V N L N I H N R N T N T N P K R S S D Y N R S T S P W N L H R N E D P E R Y P S V I W E A K C R H L G C I N A D G N V D Y H M N S V P I Q Q E I L V L R R E P P H C P N S F R L E K I L V S V G C T C V T P I V H H V A
15	IL-23 α	RAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPLVGHMDLREEGDEETNDVPHIQCGD

[0988]

		GCDPQGLRDNSSQFCLQRIHQGLIFYEKLKSGSDIFTGEPSSLPDSPVQQLHASLLGL SQLLQPEGHWWETQQIPSLSPSQPWQRLLLRKILRSLQAFVAVAAARVFAHGAATL SP
16	IL-18	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTSDCDRDNAPRTIFIISMYKDSQ PRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHNDK MQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDE
17	IL-1 α	SAPFSFLSNVKYNFMRIIKYEFILNDALNQSIIRANDQYLTAAALHNLDIAVKFDM GAYKSSKDDAKITVILRISKTLQLYVTAQDEQDPVLLKEMPEIPKTIITGSETNLLFF WETHGTKNYFTSVAHPNLFIA TKQDYWVCLAGGPPSITDFQILENQA
18	IL-1 β	APVRSNLCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGDMEQQVVFMSFVQGEESNDKI PVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEINNKLFE ESAQFPNWYISTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS
19	IL-4	HKCDITLQEI IKTLSLSTEQKTLCTELTVTDIFAASKNTTEKETFCRAATVLRQFY SHHEKDRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENF LERLKTIMREKYSKCSS
20	IL-3	APMTQTTPLKTSWVNCNMIDEIITHLKQPLPLLDNFNNLNGEDQDILMENNLRP NLEAFNRAVKSQNASAIESILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHIKGDWNEFRKRLT FYLKTLENAQAQQTTLSLAIF
21	IL-10	SPGQGTQSENSCTHFPNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDF KGYLGCCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTIRLRRLRRCHFL PCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYEAYMTMKIRN
22	IL-13	PVPPSTALRELIEELVNITQNKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESINIVSGCS AIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKLFREGFRN
23	IL-17a	GITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDYNRSTSPWNLHRN EDPERYPVSIWEAKRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRL EKILVSVGCTCVTPIVHHVA
24	IL-9	QGCPTLAGILDINFLINKMQEDPASKCHCSANVTSCLCGLIPSDNCTRPFCSERLS QMTNTTMTQTRYPLIFSRVKKSVEVLKNNKCPYFSCEQPCNQTTAGNALTFKLSLLE IFQKEKMRGMRGKI
25	IFN γ	QDPYVKEAENLKIFYNAGHSDVADNGTFLGLILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKL FKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRRDDEKLTNYSVTDLNVQRKAIHE LIQVMAELSPA AKTGKRRRSQMLFRG
26	IFN α	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVL HEMIQIIFNLSTKDDSAAWDETLLDKFYTELYQQNLNDLEACVIGVGVTETPLMK EDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLSRKE
27	GM-CSF	APARSPSPSTQPEHVNATQEAARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPCTCQ TRLELYKQGLRGLSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLKD FLLVIPFDCWEPVQE
28	FLT3L	TQDCSFQHSPISSDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLQDEELCGGLWRLVLQAQRW MERLKTVAGSKMQGLLERVNTIEHFVTKCAFQPPPSCLRFVQTNISRLQETSEQL VALKPWITRQNF SRCLQCQPDSSLT PPPWSPRPLEATAPTAPQPPLLLLLLLLLPV GLLLAAAWCLHWQTRRRTRPRPGEQVPPVPSPQDLLLLVEH
29	G-CSF	ATPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQDGAALQEKLIVSECATYKLCHEPEELVLLGH SLGIPWAPLSSCPSQALQLAGLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQL DVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVS YRVLRHLAQF
30	LIF	SPLPITPVNATCAIRHPCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANALFILYYTAQGEFPNNL DKLCGPNVTDFFPPFHANGTEKAKLVELYRIVVYLGTSIGNITRDQKILNPSALSLH SKLNATADILRGLLSNVLCRLCSKYHVGHVDVTYGPDTSKGKDVQKKKLGCLLGK YKQIIAVLAQAF
31	M-CSF	EEVSEYCSHMI GSGHLQSLQRLIDSQMETSCQITFEFVDQEQLKDPVCYLKKAFL VQDIMEDTMRFRDNTPNATIAIVQLQELSLRLKSCFTKDYEEHDKACVRTFYETPLQ LLEKVKNVFNETKNLLDKDWNIFSKNCNNSFAECSSQDVVTKPCDNCCLYPKAI PSS DPASVSPHQPLAPSMAPVAGLTWEDSEGTEGSSLLPGEQPLHTVDPGSAKQRP TCQSFEPPEPVPVKDSTIGGSPQPRPSVGA FNPGMEDILDSAMGTNWVPEEASGEA SEIPVPQGTDELSPSRPGGSGMQTEPARPSNFLSASSPLPASAKGQPADVTGTALP RVGPVRPTGQDWNHTPQKTDHPSALLRDPPEPGSPRISSLRPQGLSNPSTLSAQ LSRSHSSGSVLPLGELEGRRSTRDRRSPAEPEGGPASEGAARPLPRFNSVPLTDTG HERQSEGFSPLQESVFHLLVPSVILVLLAVGGLLFYRWRRRSHQEPQRADSPLE QPEGSPLTQDDRQVELPV
32	MIP-2	APLATELRCQCLQTLQGIHLKNIQSVKVKSPGPHCAQTEVIATLKNGQKACLN PMVKKIIEKMLKNGKSN
33	MIP-1 β	APMGSDPPTACCFSTARKLPRNFVVDYETSSLSQPAVVFTKRSKQVCADPSE SWVQYEVYDLELN
34	KP (又名	ASVATELRCQCLQTLQGIHPKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKNGRKACLN PIVKKIIEKMLNSDKSN

[0989]

	CXCL1)	
35	MIG (又名 CXCL9)	TPVVRKGRCSICISTNQGTIHLQSLKDLKQFAPSPSCKEIEIIATLKNVQTCNLNPD SADVKELIKKEWQVVSQKKKQKNGKKHQQKKVLRKRSQRSRQKKTT
36	IP-10 (CXCL10)	VPLSRTVRCTCISISNPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIIATMKKKGEKRCINP ESKAIKNLLKAVSKERSKRSP
37	MCP-1	QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPK QKWVQDSMDHLDKQTQTPKT
38	嗜酸性粒细胞 趋化因子	GPASVPTTCCFNLANRKIPQLRLESYRRITSGKCPQKAVIFKTKLAKDICADPKKK WVQDSMKYLDQKSPTPKP
39	RANTES	SPYSSDTTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSKGKSNPAVVVFVTRKNRQVCANPEKK WVREYINSLEMS
40	LIX	AGPAAVLRRLRCVCLQTTQGVHPKMISNLQVFAIGPQCSKVEVVASLKNKEICL DPEAPFLKKVIQKILDGKNEN
41	MIP-1a	SLAADTPTACCFYSYTSRQIPQNFIAFYFETSSQCSKPGVIFLTRSRQVCADPSEE WVQKYVSDLELSA
42	人血清白蛋白 (氨基酸序 列)	MDMRVPAQLLGLLLWLPGARCAHAHSEVAHFRKDLGEENFKALVLIQFAQYLQO CPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMAD CCAKQEPERNECFQHKDDNPNLRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARR HPYFYAPELLEFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKCA SLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLLECADDR ADLAKYICENQDSISSKLKECEKPLEKSHCIAEVENDEMPADPLSLAADFVESK DVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHEC YAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVE VSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESL VNRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQALVELVKHKP KATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGSAPTS SSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLE EELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFCQSIISTLTGGS
43	Mature HSA (氨基酸序 列)	DAHKSEVAHFRKDLGEENFKALVLIQFAQYLQOCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD ESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFQHKDDNPNL RLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLEFFAKRYKAAFTTEC CQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKCAALQKFGERAFAKAWAVARLSQRFP KAEFAEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECE KPLEKSHCIAEVENDEMPADPLSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYAR RHPDYSVVLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMP AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRPCFSALEVDETYVPKEFNA ETFTFHADICTLSEKERQIKKQALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGSAPTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNNG INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGS
44	PD-1	MQIPQAPWVAVLQGLWRPGWFLDSPDPWNPPTFFPALLVVTEDGNATFTCSFS NTSESFVLNWRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRA RRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTL VVGVGGLGLSLVLLVWLAVICSRARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGE LDFQWREKTPPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPED GHCSWPL
45	PD-L-1	MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALIVY WEMEDKNI IQFVHGEEDLKVQHSSYRQARLLKQSLGNAALQITDVKLQDAGVY RCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTQAEYGPKEVIWT SSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRFLDPEENHTAEL VIPELPLAHPNERTHLVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMMDVKKCGIQDTNSK KQSDTHLEET
46	CTLA-4	MACLGFRHKAQLNLARTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLASS RGIASVFCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYM MGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPY LGIGNGTQIY VIDPEPCPDS DFLWLILAAVSSGLFFYSFL LTAVSLSKML KKRSPLTGTVYVKMPPEPE CEKQFQPYFI PIN
47	LAG3	MWEAQFLGLFLQPLWVAPVKPLQPGAEPVWVWAQEGAPALPCSPPTIPLQDLSLL RRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSWGFRPRRYTVLSVGPGLRSG RLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPAR RADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLR ASDWILNCSFSRPDRPASVHFRNRGQGRVPVRESPPHHLAESFLFPQVSPMDS GPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTSS

[0990]

		FLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRL EDVSQAQAGT YTCHIHLEQEQ QLNATVTLAI ITVTPKSFSG PGSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQ GERLLGAAYFTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL LLFLILGLVLS LLLLVGTGAFG FHLWRRQWRPRRFSALEQGI HPPQAQSKIE ELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL
48	TIM3	MFSLHPFDCVLLLLLLLLLSTRSSEVEYRAEVGNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKG ACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNQDFRKGDSLTIENTVLADSGIYCCRI QIPGIMNDEKFNKLKVIKPAKVTPAPTR QRDFTAAFP MLTTRGHGPA ETQTLGSLPD INLTQISTLA NELRDSRLANDLRDSGATIRGIYIGAGICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNL SLISLANLPPSGLANAVAEGIRSEENIYTIENVYVEVEEPNEYCYVSSRQPSQP LGCRFAMP
49	B7-H3	MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCC SFSPEPGFSLQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLLAQGNASRLRQVRVVADEGSFCFVSIRDGSAAVSLQVAA PYSKPSMTLE PNKDLRPGDT VTITCSSYQG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNVTSQMANEQGLFDVHSLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQDQD AHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSF SPEPGFSLAQNLNIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQ GNASRLRQVR VVADEGSFTC FVSIRDGSA AVSLQVAAPY SKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDQGVPLTGNVTT SQMANEQGLFDVHSLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQDQDAH GSVTITGQPMTFPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFVCWRKIKQSCEEN AGAEDQDGESEKSTALQPLKHSKEDDGQEIA
50	B7-H4	MASLGQILFWSIIISIIILAGATIALIIGFGISAFSMPEVNVNVDYNASSETLRCEAPR WFPQPTVWVASQVDQGANFSEVSNSTSEFNSENVTMKVVSVLN VTINNTYSCM IENDIAKATGDIKVTESEIKRRSHLQLLNS KASLCVSSFFAISWALLPLSPYMLK
51	TNF α 细胞外域	GPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAVHVPANPQAEQQLQWLNRRANAL LANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVN LLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYILGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESG QVYFGIIAL
52	LIGHT 细胞外域	LQLHWRLGEMVTRLPDGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAHLTGANSSLTGSGGPLLW ETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTAKAGYYYIYSKVQLGGVGCPLGLASTITHGLYKRT PRYPHEELLVSSQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVLDLRLVR LRDGRSYFGAFMV
53	LT α 细胞外域	LPQVGLTPSAAQTARQHPKMHASHLTKPAAHLIGDPSKQNSLLWRANTDRAFLQD GFSLSNNSLLVPTSGIYFVYSQVVFSGKAYSPKATSSPLYLAHEVQLFSSQYPFHV PLLSSQKMVYPGLQEPWLHSMYHGAALQTLQGDQLSTHTDGIPHLVLPSTVFFGA FAL
54	LT- β 细胞外域	QDQGGVLTETADPGAQAQQLGFGKLPEEPETDLSPLPAAHLIGAPLKGQGLGW ETTKEQAFLTSGTQFSDAEGALPDQDGLYYLYCLVGYRGRAPPGGDPQGRSVTLR SSLYRAGGAYGPGTPELLEGAETVTPVLDPARRQGYGPLWYTSVGFGLVQLRRG ERVYVNI SHPDMVDFARGKTFFGAVMVG
55	BTLA 细胞外域	KESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCKLNGTTCVKLEDRO TSWKEEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLVTDVKSASER PSKDEMASRPWLLYR
56	CD160 细胞外域	INITSSASQEGTRLNLICTVWHKKEEAEGFVFLCKDRSGDCSPETSLKQLRLKRD PGIDVGGEISSQLMFTISQVTPHSGTYQCCARSQKSGIRLQGHFFSILFTETGNY TVTGLKQRQHLEFSHNEGTL
57	CD40L 细胞外域	MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVLTENGKQLTVKRQGL YYIYAQVTFCSNREASSQAFPIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIH LGGVFELQPGASVFVNVDPSQVSHGTGFTSFGLLKL
58	FasL 细胞外域	QIGHPSPPPEKKELRKVAHLTGKSNRSRSMLEWEDTYGIVLLSGVKYKKGGLVINE TGLYFVYSKVYFRGQSCNNLPLSHKVYMRNSKYPQDLVMMEGKMSYCTTGQMWAR SSYLGAVFNLTADHLYVNVSELSLVNFEESQTFGLYKL
59	CD30L 细胞外域	FPQDRPFEDTCHGNPSHYDCAVRRCCYRCPMGLFPTQCCPQRPTDCRKQCEPDYY LDEADRCTACVTCRDDLVEKTPCAWNSSRVCECRPGMFCSTSAVNSCARCFHSHV CPAGMIVKFPGTAQKNVCEPASPGVSPACASPENCKEPSSGTIPQAKPTPVSPAT SSASTMPVRGGTRLAQEAASKLTRAPDSPSSVGRPSDPLSPTQPCPEGSGDCRK QCEPDYYLDEAGRCTACVCSRDDLEKTPCAWNSSRTCECRPGMICATSATNSCA RCVPYPICAAETVTKPDMAEKDTTFEAPPLGTQPCDNPTPENGEAPASTSPTQSL LVDSQASKTLPIPTSAVALSSTGKPVLDAGPVLFVILVLVVVGSSAFLLCHRR ACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRSSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQ PLMETCHSVGAAYLESPLQDASAPGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKA

[0991]

		DTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLS VEEGKEDPLPTAASGK
60	4-1BBL 细胞 外域	ACPWAVSGARASPGSAASPRREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDG PLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRVAVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
61	CD27L 细胞 外域	ATPAPKSCPERHYWAQGLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDH HTRPHCESCRHCNSGLLVNRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECPDLPNPSLTAR SSQALSHPHPQPTLPHYVSEMLEARTAGHMOTLADFRQLPARTLSTHWPQRSLCSS DFIR
62	OX40L 细胞 外域	LHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCPC TWCNLRSGSERKQLCTATQDQTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQA CKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPPQETQGGPARPITVQPTAEP RTSQGPSTRPVEVPGGRA
63	TWEAK 细胞 外域	SAPKGRKTRARRAIAAHYEVHPRPGQDGAQAGVDGTVSGWEEARINSSSPLRYNRQ IGEFIVTRAGLYLYCYVHFDEGKAVYKLDLLVDGVLALRCLEEFSAATAASSLGP QLRLCQVSGLLALRPSSLRIRTLPAWLKAAPFLTYFGLFQVH
64	APRIL 细胞外 域	AVLTQKQKQHSVLHLPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRRGRGLQAQGYGVRIQDA GVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHPDRAYNSCYSAGV FHLHQDILSVIIPRRAKLNLSPHGTFLGFVKL
65	BAFF 细胞外 域	AVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSAALEEKENKILVKE TGYFFIYGQVLYTDKTYAMGHLIQRKKVHVFGDELSLVTLFRCIQNMPETLPNNSC YSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALKLL
66	RANKL 细胞 外域	YFRAQMDPNRISDGTCHCIYRILRLHENADFQDTTLESQDTKLIPDSCRRIKQAFQ GAVQKELQHIVGSQHIRAEKAMVDGSLDLAKRSKLEAQPFAHLTINATDIPSGSH KVSLSWYHDRGWAKISNMTFSNGKLIVNQDGFYLYANICFRHHETSGDLATEYL QLMVYVTKTSIKIPSSHTLMKGGSTKYWSGNSEFHFYSINVGGFFKLRSAGEEISIE VSNPSLLDPDQDATYFGAFKVRDID
67	TRAIL 细胞外 域	TNELKQMCKYSKSGIACFLKEDDSYWDPNDEESMNSPCWQVKWQLRQLVRKMILR TSEETISTVQEKQONISPLVRERGPQVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRK INSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQM VQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTN EHLIDMDHEASFFGAFLVG
68	EDA1 细胞外 域	ELRSELRRERGAESRLGGSGTPGTSGLTSSLGGLDPDSPITSHLGQPSPKQPLEP GEAALHSDSQDGHQMALNFFFPDEKPYSEESRRVRNRKRSKNEGADGPVKNKK KGKKAGPPGPNPGRPGRPGPGPGPIPGIPGIPGTTVMGPPGPPGPPGPGPGPG LQGPSSGAADKAGTRENQPAVVHLQGGQSAIQVKNLDSGGVLNDWSRITMNPVKFKL HPRSGELEVLVDGTYFIYSQVEVYINFTDFASYEVVDEKPFQCTRSIETGKTN YNTCYTAGVCLLKARQKIAVKMVHADISINMSKHTTFFGAIRLGEAPAS
69	EDA2 细胞外 域	ELRSELRRERGAESRLGGSGTPGTSGLTSSLGGLDPDSPITSHLGQPSPKQPLEP GEAALHSDSQDGHQGHQ
70	GITRL 细胞外 域	QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNA NYNDVAPFEVRLYKKNKDMIQTLTNKSQIQNVGGTYELHVGDITDILFNSEHQVLKN NTYWGIIILANPQFIS
71	CD80 (B7-1) 细胞外域	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNR TIFDITNNLSIVILALRPSDEGTIECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPTPS ISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSS KLDFNMTTNHSMCLIKYGHRLVNQTFNWNNTKQEHFPDN
72	CD86 (B7-2) 细胞外域	APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNSLSSELVVFWDQENLVNLNEVYLKKEKFDVSH SKYMGRTSFDSDSWTLRLHLNLIKDKGLYQCIHHKKPTGMIRIHQMNSLSVLAN FSQPEIVPISNITENVYINLTCSIIHGYPEPKMSVLLRTKNSTIEYDGMVQKSQD NVTELYDVSISLSVSPDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPPPPDHIP
73	ICOSLG 细胞 外域	DTQEKEVRAMVGSDELSCACPEGSFRFDLNDVYVYWTSESKTVVYTHIPQNSSLE NVDSRYNRNALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTQDEQKFHCLVLSQSLGFGQEVLSVEV TLHVAANFSPVVSAPHSPSQDELFTCTTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQN DTVFLNMRGLYDVSVLRIARTPSVNI GCCIENVLLQQNLTVGSGQTGNDIGERDKI TENPVSTGEKNAAT
74	MICA 细胞外 域	EPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPFRLCRDQKCRAPQGQWAEDVLGN KTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIIRVCEIHEDNSTRSSQHFY DGELFSLQNLETKEWTMPQSSRAQTLAMNVRNFKEDAMKTKTHYHAMHADCLQEL RRYLKSGVLRRTVPPMVNVRSEASEGNI TVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSL HDTQQWGDVLPDNGTYQTWVATRICQGEQRFCTYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVL QSHW
75	MICB 细胞外 域	AEPHSLRYNLMVLSQDESQSGFLAEGHLDGQPFRLRYDRQKRRAPQGQWAEDVLG AKTWDTEDELTENGQDLRRTLTHIKDKGGLHSLQEIIRVCEIHEDSSSTRGSRHFY YDGELFSLQNLETQESTVPQSSRAQTLAMNVTNFWKEDAMKTKTHYRAMQADCLQK

[0992]

		LQRYLKSGVAIRRTVPPMVNVTCSSEVSEGNITVTCRASSFYPRNITLTWRQDGVSL SHNTQQWGDVLPDNGTYQTWVATRIRQGEQRFCTCYMEHSGNHGTHPVPSGKVLV LQSQRTD
76	ULBP1 细胞 外域	GWVDTHCLCYDFIITPKSRPEPQWCEVQGLVDERPFLHYDCVNHKAKAFASLGGKV NVTKTWEEQTETLRDVDFLKGQLLDIQVENLIPIEPLTLQARMSCEHEAHGHRG SWQFLFNGQKFLFDSENNRKTALHPGAKMTEKWEKNRDVTFMQKISLGDCKMW LEEFMYWEQMLDPTKPPSLAPG
77	ULBP2 细胞 外域	GRADPHSLCYDITVPIKFRPGPRWCQVQGVDEKTFLLHYDCGNKTVTPVSPLGKKL NVTTAWKAQNPVLRVVDILTEQLRDIQLENYTPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSG SWQFSFDGQIFLLFDSENNRMTTVHPGARKMKEKWENDKVVAMSFHYFSMGDCIGW LEDFLMGMDSTLEPSAGAPLAMS
78	ULBP3 细胞 外域	DAHSLWYNFTIIHLPRHQWQCEVQSQVDQKNFLSYDCGSDKVLMSGHLEEQLYAT DAWGKQLEMLREVGQRRLLELADTELEDFTPSGPLTLQVRMSCECEADGYIRGSWQ FSFDGRKFLFDSENNRKTWVHVAGARRMKEKWEKDSGLTTFKVMVSMRDKSWLRD FLMHRKKRLEPTAPPTMAPG
79	ULBP4 细胞 外域	HSLCFNFTIKSLSRPGQPWCEAQVFLNKNLFLQYNSDNNMVKPLGLLGGKKVYATST WGELTQTLGEVGRDLRMLLCDIKPQIKTSDPSTLQVEMFCQREARCTGASWQFAT NGEKSLLDAMNMTWTVINHEASKIKETWKKDRGLEKYFRKLSKGDCHWLREFLG HWEAMPEPTVSPVNASDIHWSSSSSLPD
80	ULBP5, 亚型 1 细胞外域	GLADPHSLCYDITVPIKFRPGPRWCQVQGVDEKTFLLHYDCGSKTVTPVSPLGKKL NVTTAWKAQNPVLRVVDILTEQLLDIQLENYIPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSG SWQLSFDGQIFLLFDSENNRMTTVHPGARKMKEKWENDKDMTMSFHYISMGCCTGW LEDFLMGMDSTLEPSAGAPPTMSSG
81	ULBP5, 亚型 2 细胞外域	GLADPHSLCYDITVPIKFRPGPRWCQVQGVDEKTFLLHYDCGSKTVTPVSPLGKKL NVTTAWKAQNPVLRVVDILTEQLLDIQLENYIPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSG SWQLSFDGQIFLLFDSENNRMTTVHPGARKMKEKWENDKDMTMSFHYISMGCCTGW LEDFLMGMDSTLEPSAGGTV
82	ULBP6 细胞 外域	RRDDPHSLCYDITVPIKFRPGPRWCQVQGVDEKTFLLHYDCGNKTVTPVSPLGKKL NVTMAWKAQNPVLRVVDILTEQLLDIQLENYTPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSG SWQFSIDGQTFLFDSEKRMWTTVHPGARKMKEKWENDKDVAMSFHYISMGCCTGW LEDFLMGMDSTLEPSAGAPLAMSSG
83	SLAMF1 细胞 外域	ASYGTGGRMMNCPKILRQLGSKVLLPLTYERINKSMNKSIIHVVTMAKSLNSVEN KIVSLDPSEAGPPRYLGDYKFFYLENLTLGIRESRKEDEGWYLMTEKNVSVQRFC LQRLRYEQVSTPEIKVLNKTQENGCTLILGCTVEKGDHVAYSWSKAGATHPLNPA NSSHLLSLTLGPQHADNIYICTVSNPISNNSQTFSPWPGCRTDPSETKP
84	SLAMF2 细胞 外域	QGHVLVHMTVVSGSNVTLNISESLPENYKQLTWFTYFDQKIVEWDSRKSKEYFESKFK GRVRLDPQSGALYISKVQKEDNSTYIMRVLKKTGNEQEWKIKLQVLDVPVKPKVIKI EKIEDMDNDCYLKLSCLVPIGESVNYTWYGDKRFPKELQNSVLETTLMPHNYSRCY TCQVSNVSSKNGTVCLSPPTLARS
85	SLAMF3 细胞 外域	KDSAPTIVSGILGGSVTLPLNISVDTEIENVIWIGPKNALAFARPKNVNTIMVKS YLGRLDITKWSYSLCISNLTLNDAGSYKAQINQRNFVTEEEFTLFVYEQQLQEPQV TMKSVKVSSENFSCNITLMCSVKGAESVLYSWTPREPHASESNGGSILTVSRTPCD PDLPICTAQNVPVSQRSSLPVHVGGCTDPGASRGTTGETVVGVLGEPVTLPLAL PACRDTEKVVWLFNTSIIISKEREAAATADPLIKSRDPYKNRVWVSSQDCSLKISQL KIEDAGPYHAYVCSEASVTSMTHVTLTIYRRLRKPKITWSLRHSEDGICRISLTC SVEDGGNTVMYTWTPLOKEAVVSQGESHLNVSWRSSSEHNPNLTCTASNVPVSRSSHQ FLSENICSGPERNTK
86	SLAMF4 细胞 外域	CQGSADHVVISISGVPLQLQPNISIQTKVDSIAWKLLPSQNGFHHILKWENGSLPSN TSNDRFSFIVKNLSLLIKAAQQQDSGLYCLEVTSISGKVQTATFQVVFESLLPDK VEKPRLQGGKILDRGRQVALSCLVSRDGNVSYAWYRGSKLIQTAGNLTYLDEEV DINGHTYTCNVSNPVSWESHTLNLTDQCQNAHQEFWF
87	SLAMF5 细胞 外域	KDSEIFTVNGILGESVTFPVNIQEPQVKIIAWTSKTSVAYVTPGDSETAPVVTVT HRNYYERIHAGPNYNLVIDSLRMDAGDYKADINTQADPYTTTKRYNLQIYRRLG KPKITQSLMASVNSTCNVTLTCSVEKEEKNVTYNWSPLEEGNVQLQIFQTPEDQEL TYTCTAQNVPVSNNSDSISARQLCADIAMGFRTHHTG
88	SLAMF6 细胞 外域	QSSLTPLMVNGILGESVTLPLFEPPAGEKVNFTLWLFNETSLAFIVPHETKSPEIHV TNPKQGKRLNFTQSYSLQSLNLMEDTGSYRAQISTKTSAKLSSYTLRILRQLRNI QVTNHSQFLQNMTCELHLTCSVEDADDNVSFWRWEALGNTLSSQPNLTVSWDPRISS EQDYTCIAENAVSNLSFSVSAQKLCEVDVKIQYTDTKM
89	SLAMF7 细胞 外域	SGPVKELVGSVGGAVTFPLKSKVKQVDSIVWTFNTTPLVTIQPEGGTIIIVTQNRNR ERVDFPDGGYSLKLSLKNDSGIYYVGIYSSSLQPPSTQEYVLHVYEHLSKPKVT MGLQSNKNGTCVTNLTCMEHGEEDVIYTWKALGQAANESHNGSILPISWRWGESD MTFICVARNPVSRNFSSPILARKLCEGAADDPDSSM
90	I 型胶原蛋白 的 $\alpha 1$ 链前	MFSFVDLRLLLLAATALLTHGQEEGQVEGQDEDIPITCVQNGRLRYHDRVWKPE PCRICVCDNGKVLCDVICDETKNCPGAEVPEGECCPVCPCDGSSEPTDQETTGVGE PKGDTGPRGPRGAPPPGRDGI PGQPLPGPPGPPGPPGPPGPGGLGNFAPQLSYGYD

[0993]

	体 (NCBI 参考 序列: NP_000079.2)	EKSTGGISVPGMGPSPGRGLPGPPGAPGPQGFQGPPEPGEAGSGPMGPRGPPG PPGKNGDDGEAGKPRGERGPPGPQAGRLPGTAGLPGMKGHRGFSGLDGAKGDA GPAGPKGEPGSPGENGAPGQMGPRLPGERGRPGAPGAGARGNDGATGAAGPPGP TGPAGPPGFPFAGVAKGEAGPQGGPRGSEGPQGVREGEPPGPAGAGPAGNPGADG QPGAAGANGAPGIAGAPGFPARGPSGPQGGGPPGPKGNSGEPGAPGSKGDTGAK GEPGPVQGGPPGAGEGKRGARGEPGTGLPGPPGERGGPGSRGFPAGDVAGP KGPAGERGSPGPAGPKGSPGEAGRPGEAGLPAGAKGLTGSFSGSPGDPGKTGPPGPAG QDGRPGPPGPPGARGQAGVMGFPGPKGAAGEPGKAGERGVPGPPGAVGPAGKDG EAQGGPPGAPGAGERGEQGPAGSPGFQGLPGPAGPPGEAGKPEQGVPGDLGAPGP SGARGERGFPGERGVQGPAGPRGANGAPGNDGAKGDAGAPGAPGSGQAGPLQG MPGERGAAGLPKPKGDRGDAGPKGADGSPGKDGVRGLTGPIGPPGPAGAPGDKGES GSPGPAGPTGARGAPGDRGEPGPPGAGFAGPPGADQPGAKGEPGDAGAKGDAGP PGPAGPAGPPGPIGNVGAAPGAKGARGSGAPPGATGFFGAAGRVGPPGSGNAGPPG PPGPAGKEGKGRGETGPAGRPGEVGPFGPPGAGEKGSAGADGPAGAPGTGPQ GIAGQRGVGLPGQGRGERGFPGLPGPSGEPGKQGPSSGASGERGPPGMPGGLAGP PGESGREGAPGAEGSPGRDGSAGAKGDRGETGPAGPPGAPGAPGAPGVPVGPAGKSG DRGETGPAGPAGVPVGPARGPAGPQGPGRGDKGETGEQGDRIKGRHGFSGLQGGP GPPGSPGEQGPAGSGPAGPRGPPGSGAGAPGKDGGLNGLPGPIGPPGPRGRGTG DAGPVGPPGPPGPPGPPSAGFDFSLPQPPQEKADHGGRYRADDANVVRDLEVD TTLKSLSQQIENIRSPESGRKNPARTCRDLKMCSDWKSSEYWDPNQGCNLDAIK VFCNMETGETCVYPTQPSVAQKNWYISKNPDKRHVWFGESEMTDGFQFEYGGQGS PADVAIQLTFLRLMSTEASQNIITYHCKNSVAYMDQQTGNLKKALLLQGSNEIEIRA EGNRSFTYSVTVDGCTSHTGAWGKTIVIEYKTTKTSRLPIIDVAPLDVGAAPDQEF GFDVGPVCF
91	I 型胶原蛋白 的人 $\alpha 2$ 链前 体 (NCBI 参考 序列: NP_000080.2)	MLSFVDTRTLLLLAVTLCLATCQSLQEETVRKGPAGDRGPRGERGPPGPPGRDGED GPTGPPGPPGPPGPPGLGNGFAAQYDGGKGVGLGPGMGLMGPGRGPPGAAGAPGQ FQGPAGEPEGEPGQTGPAGARGPAGPPGKAGEDGHPKPRGERGVVGPQARGFP GTPGLPGFKGIRGHNGLDGLKQPGAPGVKGEPAAGENGTPGQTGARGLPGERGR VGAPGPAGARGSDGSGVGPVGPAGPIGSAGPPGFPAGPGKGEIGAVGNAGPAGPAG PRGEVGLPGLSGPVGPNGNPGANGLTGAAGAAGLPVAGAPGLPGRGIPGPVGA GATGARGLVGEPPGAGSKGESGNKGEPSAGPQGGPPGSGEEGKRGPNGEAGSAGP PGPPGLRGSPPGSRGLPGADGRAGVMGPPGSRGASGAPVRGPNAGRGPPGEPGLM PRGLPGSGNIGPAGKEGFPVGLPGIDGRPGPIGPAGARGEPNIGFPKPGPTGDP GKNKGKAGHAGLAGARGAPGPDGNGAQGPFGPQGVQGGKGEQGPFGPQGLPGP SGPAGEVGPGERGLHGEFGLPGPAGPRGERGPPGESGAAGPTGPIGSRGSPGPPG PDGNKGEPPGVAVGTAGPSGSPGLPGERGAAGIPGGKGEKGEPLRGEIGNPRD GARGAPGAVGAPGAPGATGDRGEAGAAGPAGPAGPRGSPGERGEVGPAGPNGFAGP AGAAGQPGAKGERGAKGPKGENGVVGPPTGPVGAAGPAGPAGPPGAGSRGDGGPPG MTGFPGAAGRTGPPGPGSISGPPGPPGAGKEGLRGRGDQGPVGTGEVAVGPP GFAGEKGPSPGEAGTAGPPGTPGPQGLLAPGILGLPGSRGERGLPGVAGAVGEPGP LGIAGPPGARGPPGAVGSPGVNAGPEAGRDGNPNNDGPPGRDQPGHKGERGYPG NIGPVGAAGAPGPHGVPVGPAGKHGNGRGETGSPGVPVGPAGPRGSPGQGIKRGD GEPGEKGRGLPGLKGHNGLQGLPGIAGHHGDQAGPSVGPAGPRGAPGSPGAGK DGRTGHPGTVPAGIRGQGHQGPAGPPGPPGPPGPPGVSGGGYDFGYDGDYFRAD QPRSAFSLRPKDYEDATLKSNNQIETLLTPEGSRKNPARTCRDLRLSHPEWSSG YYWIDPNQGTMDAIAKVCDFSTGETCIRAOPENIPAKNHSRDKKHVWLGETI NAGSQFEYNVEGVTSKEMATQLAFMRLANYASQNIITYHCKNSIAYMDEETGNLKK AVILQGSNDVELVAEGNSRFTYTVLVDGCSKKTNEWGKTIIEYKTNKPSRLPFLDI APLDIGGADQEFFVDIGPVCFK
92	IV 型胶原蛋 白的人 $\alpha 1$ 链 (NCBI 参考 序列: XP_01151935 0.1)	MQGPEGPQGPQKQKGTGEPGLPGTKGTRGPPGASGYPGNPLPGIPGQDGP GIPGCNGTKGERGPLGPPGLPGFAGNPGPPGLPGMKGDPGEILGHVPGMLLKGERG FPGIPGTPGPPGLPGLQGPVGPFGFTGPPGPPGPPGPPGKEGQMGSLFQGP QGVSGPPGVPQAQVQEKGFATKGEKQKGEPPGFGMPGVGEKGEPPGKPGPRGK PGKDGKGEKGSPPGEPGYPGLIGRQGPQGEKEAGPPGPPGIVGTGPLGEK ERGYPGTGPRGEPGPKGFPGLPGQGPGLPVPGQAGAPGFPGERGEKGDGRGFP TSLPGPSGRDGLPGPPGSPGPPGQPGYTNGIVECPGPPGDQGPPIGPQPGFIGE IGEKQKGESCLICDIDGYRGPPGPPGPPGEGIFGPPGPAKGDRLPGRDGVAVP GPQGTPLIGQPAKGEPEGEFYFDLRLKGDGKDPGFPQPGMPGRAGSPGRDGH LPGPKGSPGVSGLKGERGPPGVPVGPGRGDTGPPGPPGYPGAPIGDKQAGFP GPGSPGLPGPKGEPGKIVPLPGPPGAEGLPSPGFPQGDGRGFPGTGPRPGLPGE KGAVGQPGIGFPGPPGPKGVDGLPGDMGPPGTGPRPGFNGLPNPGVQGGKGE GLPGLKGLPGLPGIPGTGPEKGSIGVPGVPGEHGAIGPPGLQGIIRGEPGPPGL VSPGVPVIGFPGARPPGQGGPPGLSGPPGKGEKGFPGFPLDMPGPKGDKGAQ GLPGITGQSLPLPGQQAAGPIPGFPGSKGEMGMGTGPGQPGSGPVGAPGLPGE KGDHGFPGSSGPRGDPGLKGDGVDGLPGKPGSMDKVDMSGMKQKGDQGEKQIG PIGEKSGRDPGTGVPKDGQAGQPGQPGPKGDPGISTGTPAGPLPGPKGSVGM GLPGTPGEKGVPIPGPQGSPLPGDKGAKGEKQAGPPGIGIPGLRGEKGDQGI

[0994]

		GFPSPGEGKEKSGISIGPMGPSGLKSGSPGSVGYPGSPGLPGEKGDKGLPLDGI PGVKGEAGLPPTPGTGPAGQKGEPSDGI PGSAGEKGEPLPGRGFPFGPAKGD KSGKGEVGFPLAGSPGIPGSKGEQGFMPGPQGPGLPGSPGHATEGPKGDRGP QQQPLPLPGPMGPPGLPIDGVKGDKNPWPAPGVPGPKGDPGFQGMPIGG SPGITGSKGDMGPPGVPGFQGPGLPGLQGIKGDQDQGVPAKGLPGPPGPPGY DIKGEPLPGPEGPPGLKGLQGLPGPKGQGVTLVGI PPGPIPGFDGAPGQK EMGPAGPTGPRGFPGPPDGLPGSMGPPGTPSVDHGFLVTRHSQTIDDPQCPST KILYHGYSLLYVQGNRAHGQDLGTAGSCLRKFSMPFLFCNINNVCNFASTRNDYS YWLSTPEPMPMSMAITGENIRPFISRCACEAPAMVMAVHSQTIQIPPCPSGWSS LWIGYSFVMHTSAGAEGSGQALASPGSCLEEFSAFIECHGRGTCHYANAYSEFW LATIERSEMFKKPTSTLKAGELRTHVSRQVCMRRT
93	IV 型胶原蛋白的 $\alpha 2$ 链 (NCBI 参考 序列: NP_001837.2)	MGRDQRAVAGPALRRWLLGTVTVGFLAQSVLAGVKKFDVPCGGRDCSGGCQCYPE KGGRGQGPVGPQGYNGPPGLQGFPLQGRKGDKGERGAPGVTGPKGDVGARGVSG FPGADGIPGHPPGQGGPRGRPGYDGCNGTQDSDGPQGPGEFTGPPGPQGPQKQK GEPYALPKEERDRYRGEPEGLVGFQGPGRPGHVGMGPVAGPRGPPGPPGP KGQQGNRGLGFYGVKGEKGDVGQPGPNIPSDTLHPITAPTGVTFHPDQYKGEKGS EGEPGIRGISLKGEEGIMGFPLRGYPGLSSEKSGSPQKGSRLDGYQGGPDGPRGP KGEAGDPGPPPLPAYSPHPSLAKGARGDPGFPGAQGEPSQGEPPDPLPGPPGLS IGDGDQRRGLPGEMGPKGFIGDPGIPALYGGPPGPDGKRGPVGPGLPGPPGDPGF LFGKLGAKGRAGFPGLPGSPGARGPKGWKGDAECRCETGEDEAIKGLPLPGPKGF AGINGEPGRKGRDGPQHGLPGFPGLKGVPGNIGAPGPKAKGDSRTITTKGERG QPGVPGVPGMKGDDGSPGRDGLDGFPLPGPPGDGIKPPGDPGYPIPGTKGTPG EMGPPGLPLGLKQGRGFPDAGLPGPPGLPGPPGAGTPGQIDCDTVDKRAVGDD RQEAIQPGCIGGPKGLPLPGPPGPTGAKGLRGI PGFAGADGGPGPRGLPGDAGRE GFPGPPGFIGPRGSKGAVGLPGPDGSPGFIGLPGPDGPPGERGLPGEVLGAQPGPR GDAGVPGQPLKGLPGDRGPPGFRGSGQMPGMPGLKQGPGLPGPSQGPGLYGPPLG HGFPAGPQGEGLPLGPIPGREGLPGDRGPDGTGAPGVPMKGLSGDRGDAGFTG EQGHPPGSGFKGIDGMPGTPLKGDGRSPGMDGFQGMPLKGRGPGPSKGEAGFF GIPGLKGLAGEPGFKGSRGDPGPPGPPVILPGMKDIKGEKGDGPMGLKGYLGAK GIQGMPIPLSGIPGLPGRPGHIKGVKGDIGVPGIPGLPGFPVAGPPGITGFP FIGSRGDKGAPGRAGLYGEIGATGDFGDI GDTINLPGRPLKGERGTTGIPGLKGF FGEKTEGDI GFGITGVTGVQGPGLKQGTGFPGLTGPSPQGLGRIGLPGGKG DDGWPGAPGLPGFPGLRGLHGLPGTKGFPSPGSDIHGDPGPPGERGDPG EANTLPGVPVGPQKGDQAGPGERGPPGSPGLQGFPGITPPSNISGAPGDKGAPGI FGLKGYRGP GPPGSAALPGSKGDTGNPGAPGTPGTGWAGDSGQGRPGVFGPLPG EKGRGEQGFMGNTGPTGAVGDRGPKGKGDGFPGAPGTVGAPGIAGIPQKIAVQ PGTVGPQGRRGPPGAPGEMGPQGPPEGPFGRGAPGKAGPQGRGGVSAVPGFRGDEG PIGHQGP IQEGAPGRPGSPGLPGMPGRSVSIGYLLVKHSQTDQEPMPVGMNKLW SGYSLLYFEGQEKAHNQDLGLAGSCLARFSTMPFLYCNPGDVCIYASRNDKSYWLS TTAPLPMMPVAEDEIKPIYISRCSVCEAPAIAIAVHSQDVSI PHCPAGWRSWLWIGYS FLMHTAAGDEGGGQSLVSPGSCLEDFRATPFIECNNGRGTCCHYANKYSFWLTITP EQSFQGSPSADTLKAGLIRTHISRCQVCMKNL
94	IV 型胶原蛋白的 $\alpha 3$ 链 (NCBI 参考 序列: NP_000082.2)	MSARTAPRPQVLLPLLLVLLAAAPAASKGCVCKDKGQCFCDGAKGEKGEKGFPGP PGSPGQKGTGPEGLPGPQGPKGFPGLPGLTSGKGVRSISGLPGFSGSPGLPGTPG NTGPGYGLVGPVPGCSGSKGEQGFPLPGTLGYPGIPGAAGLKGQKGAPEKEEDIELD AKGDPGLPGAPGPQGLPGPPGPGFPGVGPVGP GPFPGAMGPRGPKGHMGERVIG HKGERGVKGLTGPPPGPTVIVTLTGPDNRDLDKGEKGDKGAMGEPGPPGPGSLPG ESYGSEKAPGDPGLQKPKGDGVPGFPGSEGKGNRGPGLMGEDGKQKGDIG PPGFRGPTEYYDTYQEKGEDEGTPGPPGPRGARGPQGPSPGPPGVPGSPGSSRPLRG APGWPLGKSGKGERGRPKDAMGTPGSPGCAGSPGLPGSPGPPGPDIVFRKGPP GDHGLPGYLGSPGIPGVDGPKGEPGLLCTQCPYIPGPPGLPLGLHGVKGI PRGQ GAAGLKGSPGSPGNTGLPGFPFGFPGAQDPLGKGEKGETLQPEGQVGPVPGDPLRG QPRKGLDGIPTGPGVKGLPGPKGELALSSEKGDQPPGDPGSPGSPGAPGAGPP GYGPQGEPLQGTQGVPGAPGPPGEAGPRGELSVSTVPVGP GPPGPPGPHGPPQGP PGIPGSLKCGDPLPGPDGEPGIPGIGFPGPPGPKDQGFPGTKGSLGCPGKMG PGLPGKPLPGAKGEP AVAMPGGPTGFPGERGNSGEHGEIGLPLGLPLGTPGN EGLDGPGRDGPQPGPPGEGGPPGRCIEGPRGAQGLPLNGLKQGGRRGKTGPKGD PGIPGLDRSGFPGETGSPGIPGHQGEMLGQRGYPGNPILGPPGEDGVIGMMGF PGAIGPPGPPGNTPGQRGSPGIPGVKGQRTGAKGEQDKGNPGSEISHVIG DKGEPGLKGFAGNPGEKGNRGVPGMPGLKGLKGLPGPAGPPGPRGDLGSTGNPGE GLRGIPGSMGNMMPGSKGKRGTLGFPGRAGRPLPGIHLGQDKGEPGYSEGTRP GPPGPTGDPGLPGDMGKKGEMQPGPPGHLGPAGPEGAPSGSPGLPGKPGPHGD LGFKGIKGLLGPPIRGPPGLPGFPSPGPMGIRDQGRDGI PGPAGEKGETGLLR APPGPRGNPGAQKAGKDRGAPGFPGLPGRKKGAMGDAGRGTGIEGFPGPPGLPGA IIPGQGTGNRGPPGSRGSPGAPGPPGPPGSHVIGIKDKGSMGHPGPKGPPGTAGDM GPPGRLGAPGTPGLPGRGPDPGFQGFPGVKGEKGNPGLGSI GPPGPIGPKGPPGV RGDPGT LKIIISLPGSPGPPGTGPEPGMQGEPGPPGPPGNLPGCPGRKPKGDKGPKG

[0995]

		TPGPAGEKGNKSGKEPAGSDGLPGLKGRGDSGSPATWTTTRGFVFTRHSTTA IPSCPEGTVPFLYSGFSFLVQGNQRAHQDLGLTGLSCLQRFTTMMPLFCNVNDVCN FASRNDYSYWLSTPALMPNMMAPIITGRALEPYISRCTVCEGPAIAIAVHSQTTDIP PCPHGWISLWKGFSTFMFTSAGSEGTQALASPGSCLEEFRAFPLECHGRGTCNY YSNSYSFWLASLNPFRMERKPIIPSTVKAGELEKIIISRCQVCMKKRH
95	IV 型胶原蛋白的人 $\alpha 4$ 链 (NCBI 参考 序列: NP_000083.3)	MWSLHIVLMRCSFRLTKSLATGPWSLILILFSVQYVYSGSKKYIGPCGGRDCSVCH CVPEKGSRGPPGPPGPGQPIGLGAPGPIGLSSEKGMGRDGRPPGAAGDKGDKGPT GVPGFPGLDGIPGHPPGPPGPRGKPGMSGHNGSRGDPGFPGGRGALPGGGPLGHPGE KGEKGNVVFILGAVKGIQGDGRDPLGLPGLPGSWGAGGPAGPTGYPGEPGLVGGPPGQ PGRPGLKGNPGVGVKGQMGDPGEVGGQGSPPGPTLLVEPPDFCLYKGEKGIKGIKIPGM VGLPGPPGRKGESGIGAKGEKGIPIPGFPGPRGDPGSYSGSPGFPGLKGLGLVGDPLG FGLIGPKGDPGNRHPGPPGVLVTPPLPLKGPDPGDPGPRYGETGDVGGPPGPPGL LGRPGAEACAGMIGPPGPGQFPGLPGLPGEAGIPGRPDSAPGKPGKPGSPGLPGAPG LQGLPGSSVIYCSVGNPGPQGIKGVGPPGGRGPKGEKNEGLCACEPGPMGPPGP PGLPGRQGSKGLGLPGWLGTGKDPGPPGAEGPPGLPGKHGASGPPGNKGAAGDMV VSRVKGHKGERGPDGPPGFPQPGSHGRDGHAGEKDPGPPGDHEDATPGGKGFP PLGPPGKAGPVGPPGLGFPGPPGERGHPGVPHGPGVRGPDGLKGQKGTDISCNVTY PGRHGPFGDGPFGPKGFPFGQAPGLSGSDGHKGRPGTPTGTAIEIPGPPGFRGDMG DPGFGGEKGSPPVGGPPGPGSPGVNGQKGI PGDPAFGLHGGPKRGLSGVPKIKP RGDPGCPGAEGPAGIPGFLGLKGPKGREGHAGFPVGPFGHSCERGAPGPIPGQPG LPGYPGSPGAPGGKQPGDVGGPPGAGMKGLPGLPGRPGAHGPPGLPIPGFPFGDD GLPGPPGPKGPRGLPGFPFGPGERGKPGAEGCPGAKGEPGEKGMSSGLPGDRGLRGA KGAIGPPGDEGEMAIISQKGTGEPGPPGDDGFPGERGDKGTGPMQGRRGEPGRY PPGFHRRGEPGEKQPGPPGPPGPGSTGLRGFIGFPGLPGDGEPGSPGPPGFSGI DGARGPKGNKGDPAHFPGPKGEPGSPGCPGHFGASGEQGLPGIQGPRGSPGR GPPGSSGPPGCPGDHGMPLRGQPGEMGDPGRGLQGDPIPGPPIKGPSGSPGL NGLHGLKGQKGTKGASGLHDVGGPPGVGIPGLKGERGDPGSPGISPPGPRGKKGPP GPPGSSGPPGAPAGATGRAPKDI PDGPPGDQGGPPGDPGRGAPGPPGLPGSDLLR GEPGDCGLPGPPGPPGPPGPGYKGFPGCDGKDGQKGPVGFPGPQPGHGFPGPPGE KGLPGPPGRKGTGLPGRGEPGPPADVDDCPRIPLPGAPGMRGPEGAMGLPGMR GSPGPGCKGEPGLDGRRGVDGVPGSPGPPGRKGTGEGDGYPGGPPGPPGIDGPGPK GFGPGYLGFFLLVLHSQTDQEPTCPLGMPRLWTGYSLLYLEGQEKAHNQDLGLAGS CLPVFSTLFFAYCNIIHQVCHYAQRNDRSYWLASAAPLPMMLSEAI RPYVSRCAV CEAPAQAVAVHSQDQSI PPCPQTWRSLWIGYSFLMHTGAGDQGGGQALMSPGSCLE DFRAAPFLECQGRQGTCHFFANKYSFWLTTVKADLQFSSAPADTLKESQAQRQKI SRCQVCVKYS
96	IV 型胶原蛋白的人 $\alpha 5$ 链 (NCBI 参考 序列: XP_01152915 1.2)	MEVDSGKTENRDWEGFCYSTSAYWKNLYDGLLACYGCSPGSKCDCSGIKGEKGERG FPGLEGHPGLPGFPPEGPPGPRGQKGDGIPGPPGPKGIRGPPGLPGFPPTPLG GMPGHDGAPGPQGI PGCNCTKGERGFPSPGFPGLQGPFGPPGPIPGMKGEPGSIIM SSLPGPKGNPGYPPGPIQGLPGPTGIPGPIPGPPGPPGLMPPGPPGLPGPKGNMG LNFQGPKEKGEQGLQGPFGPPGQISEQKRPIDVEFQKGDGLPGDRGPPGPPGIR GPPGPPGGEKGEKGEQGEPPGKRGKPGKDGENGQPGIPGLPGDPGYGPPGPRDGEKG QKGDTPPPGPPGLVIPRPGTGITIGEKGNIGLPLGLPGEKGERGFPPIQGPPLPGP PGAAMVMPGPPGFPGERGQKGDGEGPPGISIPGPPGLDQPGAPGLPGPPGAPGH IPPSDEICEPFPPPGPPSPGDKGLQGEQGVKGDGKDTFCNCIGTGISGPPGQPLG LPGPPGSLGFPQKGEKQAGATGPKGLPGIPGAPGAPGFPGSKGEPGDIPTFG MKGDKGELGSPGAPGLPLPGTGGDGLPLPGPKGEPGGITFKGERGPPGNPLG GLPGNIGPMGPPGFPFGVGEKGIQGVAGNPGQPGIPGPKGDPGQTITQPGKPL PGNPRGDGDVGLPGDPLGPGQPLPGIPGSKGEPGPIPGIPLPGPPGPKGFPPIPGP PGAPGTPGRIGLEGPPGPPGFPGPKGEPGFALPGPPGPPGLPGFKALGPKGDRGF PGPPGPPGRTGLDGLPGKGDVGPNGQPGPMGPPGLPGIGVQGPFGPPGPIPGIQ PGLHGIPGEKGDPPGGLDVPGPPGERGSPGIPGAPGPIGPPGSPGLPGKAGASGF PGTKGEMGMMGPPGPPGLGIPGRSGVPGLKGDGLQGPGLPGPTGEKSGKEPG LPGPPGMPDNLGSKGEKGEPLGPIPGVSGPKGYQGLPGDPGQPLSGQPLG PPGPKGNPLGPGQPLIGPPGLKGTIGDMGFPGPQGVGPPGSPGVPGQPGSPGLP GQKGDGDPGIISSIGLPLGLPGPKGEPGLPGYPGNPGIKGSGVDPLGLPGTPGA GQPLPGFPPTGPPGPKGISGPPGNPLPGEPGPVGGGHPGQPGPPGEKKGKPGQ DGIPGPAQKGEPPGQFGNPGPPGLPLGSGQKGDGGLPGIPGNPLPGPKGEPGF HGFPVQGPFGPPGSPGPALEGPKGNPGPQGPGRPGPTGFQGLPGPEGPPGLPGN GGIKGEKGNPGQPLPLPLGLKGDQGPGLQGNPGRPLNGMKGDPGLPGVPFGFP MKGPSVPGSAGPEGEPLIGPPGPPGLPGPSGQSIIKGDAGPPGPIPGQPLKGL PGPQGPQGLPGPTGPPGDPRNGLPGFDGAGGRKGDPLPGQPGTRGLDGPFGPDG LQGPFGPPGTSSVAHGFLITRHSTTDAQCQGTQVYEGFSLLYVQGNKRAHQ DLGTAGSCLRRFSTMPFMFCNINNVCFASRNDYSYWLSTPEPMPMMSQPLKQSI QFFISRCVCEAPAVVIAVHSQTIQIPHCPQGWDSLWIGYSFMMHTSAGAEGSGQA LASPGSCLEEFRAFPLECHGRGTCNYANSYSFWLATVDVSDMFSKPPQSETLKAG DLRTRISRCQVCMKRT

[0996]

97	IV 型胶原蛋白的 $\alpha 6$ 链 (NCBI 参考序列: XP_00672468 0.1)	MLINKLWLLVLTCLTEELAAAGEKSYGKPCGGQDCSGSCQCFPEKGARGRPGPIG IQGPTGPGQFTGSTGLSLKGERGFPGLLGPGYGPKGDKGPMGVPGFLGNGIPGHP GQPGPRGPPGLDGCNGTQGA VGFPDGPGLLPGPLPGQKSGKDPVLAPGSFK GMKGDPLGLDGITGPGAPGFPAGVPGAGPPGLQGPPGPPGLPGDGNMGLGFQ GEKGVKGDVGLPGPAGPPSTGELEFMGFPGKKGSKGEPGPKGFPGISGPPGFP LGTTEKGEKGEKGIPLGPRGPMGSEGVQGGPPGQGGKGLTGLPGLNGFQGLEG QKGDIGLPGPDVFIDIDGAVISGNPGDPGVPLGLKGDDEGIQGLRGPSPVPLPA LSGVPGALGPQGFPGLKGDQGNPGRTTIGAAGLPGRDGLPGPPGPPGPPSPFEFTE TLHNKESGFPGLRGEQGPKNLGLKGIKGDSGFCACDGGVPNTGPPGEPGPPGPPW LIGLPLGLKGARGDRSGGAQGPAGAPGLVGLPGSPGPKGKKEPILSTIQGMPGDR GDSGSQGRGVIGEPKGDGVPLGLPLGLPGDGGQGFPEKGLPLGPEKGHPGPP GLPGNGLPLPGPRGLPGDKGDGLPGQQGLPGSKGDCCCREVGKGLDTERGITL PCIIPGSYGPSPGFPPTGFPFGPKGSRGLPGTPGQPGSSSGSKGEPSPGLVHLPELF GFPGRGEKGLPGFPGLPGKDG LPMIGSPGLPGSKGATDIFGAENGAPGEQGLQ GLTGKGLGDSGLPLGLKGVHGPGLLGPKGERSGPTPGVQGPPTGPGSSGPGYGI KGKSGLPAGPFPGISGHPGKKGTRGKKGPPGSIVKKG LPLGLKGLPGNPLVGLKG SPGSPGVAGLPALSGPKGEKGSVGFVGPPIPLGLPIPGTRGLKPIPGSTGKMGPS GRAGTPGEKGDGRNPGVPVGI PSRRPMSNLWLKGDKGSQGSAGSNGFPGRGDKGE AGRPGPPPLPGAPGLPGI IKGVSGKPGPPGFMGIRGLPLGLKSSGITGFPMPGES GSQGIRGSPGLPGASGLPLKGDNGQTVEISGSPGKQPGESGFGKTKGRDGLIG NIGFPGNKGEDGKVGVSVDVGLPGAPGFPVAGMRGEPGLPGSSGHQGAIGPLGSP GLIGPKGFPFPGLHGLNGLPGTKGTHGTPGPSITGVPGAGLPGPKEKGYPGIG IGAPGKPLRGQKGDGRFPGLQGPA GLPGAPGISLPSLIAGQPDGPRGLDGERG RPGPAGPPGPPGSSNQDGTDPGFPPIPGPKGPKGDQGI PGFSLG LPLGLKGM GEPGFMGTPGKVGPPDPGFPGMKGKAGPRGSSGLQGDPGQTPTAEAVQVPPGPLG LPGIDGIPGLTGDPGAQGPVGLQGSGLPLGPIPGKDGPSGLPGPPGALGDPGLPLQ GPPGFEGAPGQQGPPGMPGMPQSMRVGYTLVKHSQSEQVPPCPIGMSQLWVGYS LFVEGQEKAHNQDLGFAGSCLPRFSTMPFIYCNINEVCHYARRNDKSYWLSTTAPI PMMPVSQTQIPQYISRCSVCEAPSQAI AVHSQDITIPQCPLGWRSLWIGYSFLMHT AAGAEGGGQSLVSPGSCLEDFRATPFIECSGARGTCHYFANKYSFWLTTVEERQQF GELPVSETLKAGQLHTRVSRQCVCMSL
98	LAIR-1	QEEDLPRPSISAEPGTVPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNDTEDVSQA SPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRCIYKPPKWSEQSDYLELLVKETSGGPDSPDTE PGSSAGPTQRPSDN SHNEHAPASQGLKAEHLIYILIGSVVFLC LLLLVLFLCHRQ NQIKQGP PRSKDEEQKQQRPD LAVDV LERTADKATV NGLPEKDRETDTSALAAGS SQEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPMAESITYAAVARH
99	LAIR-2	QEGALPRPSISAEPGTVSPGSHVTFMCRGPVGVQTFRLEREDRAKYKDSYNVRL GPSESEARFHIDSVSEGNAGLYRCLYKPPGWSEHSDFLELLVKESSGGPDSPDTE PGSSAGTVPGTEASGFDAF
100	糖蛋白 IV (CD36 细胞 外域)	GDLLIQKTIKKQVVLEEGTIAFKNWKVTGTEVYRQFWIFDVQNPQEVMMNSSNIQV KQRGPYTYRVRFLAKENVTQDAEDNTVSFLQPNGAIFEP SLSVGTEADNFTVLNLA VAAASHIYQNQFVQMI LNSLINKSKSMFQVRTLRELLWGYRDPFLSLVPYPTTT VGLFYYPNNTADGVYKVFNGKDNISKVAIIDTYKGRNLSYWESHCDMINGTDAAS FPPFVEKSQLVQFFSSDICRSIYAVFESDVNLKGI PVYRFVLP SKAFASPVENPDN YCFCTEKIISKNCTSYGVLDISKCKEGRPVYISLPHFLYASPDVSEPIDGLNPNEE EHRTYLDIEPITGFTLQFAKRLQV NLLVKPSEKIQVLKLNLRNYIVPILWLNETGTIGDEKANMFRSQVTGKIN
101	巢蛋白	LSRQELFPFGPGQGDLELEDGDDFVSPAELSGALRFYDRSDIDAVYVTTNGIIAT SEPPAKESHPLFPPTFGAVAPFLADLDTTDLGLKVYYREDLSPITQRAAECVHR GFPEISFQSSAVVVTWESVAPYQGPSRDPDQKGRNTFQAVLASSDSSSYAIFLY PEDGLQFHTTFSKKENNVPAVVAFSQGSVGLWKSNGAYNIFANDRESVENLAKS SNSGQQGVWVFEIGSPATNGVVPADVILGTEDGAEYDDEDEDYDLATTRLGLEDV GTTPFYSKALRRGGADTYSVPSVLSPRRAATERPLGPPTERTSRFQLAVETFHQQH PQVIDVDEVEETGVVFSYNTDSRQTCANNRHQCSVHAECRDYATGFCSCSVAGYTG NGRQCVAEGSPQRVNGKVKGRI FVGSSQVP I VFENTDLHSYVMNHGRSYTAISTI PETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLV IKQRFSGIDEHGHLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTRE YTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQITTFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVFVLYNQ EEKILRYALSNSIGPVREGSPDALQNPCYIGTHGCDTNAACRPGRPTQFTCECSIG FRGDGRTCYDIDECSEQPSVCGSHTICNNHPGTFRCCEVGEYQFSDDEGTCAVAVDQ RPINYCETGLHNCDIPQRAQCIYTGSSYTCSCLPFGSGDQACQDVDECQPSRCH PDAFCYNTPGSFTCQCKPGYQGDGFRCPGVEVEKTRCQHEREHILGAAGATDPQRP IPPLFLVPECDAGHYAPTQCHGSTGYCWCVDRDGREVEGTRTRPGMTPPCLSTVA PPIHQGPAPVTA VIPLPPGTHLLFAQTGKIERLPLEGNTMRKTEAKAFLHVPKVI IGLAFDCVDKMYWTDITEPSIGRASLHGGEPTTIIRQDLGSPGEGIAVDHLGRNIF WTDNSLDRIEVAKLDGTQRRVLFETDLVNPRGIVTDSVRGNLYWTDWNRDNPKIET SYMGTNRRILVQDDLGLPGLTDFDAFSSQLCWVDAGTNRAECLNPSQPSRRKALE

[0997]

102

基底膜聚糖

GLQYPPFAVTSYGKNLYFTDWMNSVVALDLAISKETDAFQPHKQTRLYGITTALSQ
CPQGHNYCSVNNGGCTHLCLATPGSRTCRCPDNTLGVDCIEQK

VTHGLRAYDGLSLPEDIETVTASQMRWTHSYLSDDDEMLADSISSGDDLGSGLDGS
DFQMVFYFRALVNFTRSIEYSPQLEDAGSREFREVSEAVVDTLESEYLIKIPGDQVVS
VVFIKELDGWVVELDVGSEGNADGAQIQEMLLRVISSGSVASVYVTSPOGFQFRRL
GTVPPQFPRACTEAEFACHSYNECVALEYRCDDRRPDCRDMSEDLNCEEPVLGISPTF
SLLVETTSLLPPRPETTMRQPPVTHAPQPLPGSVRPLPCGPQEAACRNHGHCIPRD
YLCDGQEDCEDGSDDELDCGPPPPCEPNEFPCGNHGCALKLWRCDGDFDCEDRTDEA
NCPTKRPEEVCGPTQFRCVSTNMCI PASFHCDEESDCPDRSDEFGCMPPQVVTTPR
ESIQAASRGQTVTFTCVAIGVPTPIINWRLNWGHIPSHPRVTVTSEGGRTLIIRDV
KESDQGAYTCEAMNARGMVFGIPDGVLELVPQRGPCPDGHFYLEHSAACLPFCFCG
ITSVCQSTRFRDQIRLRFDPDDFKGVNVTMPAQGTPPLSSTQLQIDPSLHEFQ
LVDLSRRFLVHDSFWALPEQFLGNKVDSYGGSLRYNVRYELARGMLEPVQRPDVVL
MGAGYRLLSRGHTPTQPGALNQRQVQFSEEHVHVESGRPVQRAELLQVLQSLAVL
IQTVYNTKMASVGLSDIAMDDTTVTHATSHGRAHSEECRCPIGYSGLSCESDAHF
TRVPGGPYLGTCSCGNCNGHASSCDPVYGHCLNCQHNTGEPQCNCCKAGFFGDAMK
ATATSCRPCPCPYIDASRRFSDTCFLDTDGQATCDACAPGYTGRRCESCAPGYEGN
PIQPGGKCRPVNQEIIVRCDERGSMTSGEACRCNNNVGRLCNECADGSHFLSTRN
PDGCLKCFMGSVRHCTSSWSRAQLHGASEEPGHFSLTNAASTHTNEGIFSPTP
GELGFSSFHRLLSGPYFWSLPSRFLGDKVTSYGGELRFTVTQSRQPGSTPLHGQPL
VVLQGNIIIEHHVAQEPSPGQPSTFIVPFREQAWQRPDGPATREHLLMALAGID
TLLIRASYAQQPAESRVSGISMDVAVPEETGQDPALEVEQCSCPPGYRGPSQCQCD
TGYTRTPSGLYLGTCECSCCHGHSEACEPETGACQCGQHHTGPRCEQCQPGYVYGD
AQRGTPODCQLPCPYGDPAAAGQAAHTCFLDTDGHPCTDACSPGHSGRHCERCAPGY
YGNPSQGPQCRDSQVPGPIGCNCDPQGSVSSQCDAAAGQCCKAQVEGLTCSHCRP
HHFHLASNPDGCLPCFCMGITQQCASSAYTRHLISTHFAFGDFQGFALVNPQRNS
RLTGEFTVEPVPEGAQLSFGNFAQLGHESFYWQLPETYQGDKVAAYGGKRLRYTSLY
TAGPQGSPLSDPDVQITGNIMLVASQPALQGPERRSYEIMFREEFWRRPDGQPAT
REHLLMALADLDELLIRATFSSVPLAASISAVSLEVAQPGPSNRPRALEVEECCRP
PGYIGLSCQDCAPGYTRTGSGLYLGHCELCENGHSDLCHPETGACSQCQHNAAGE
FCELCAPGYGDATAAGTTPEDCQPCACPLTNPENMFSRTCESLGAGGYRCTACEPGY
TGQYCEQCGPGYVGNPSVQGGQCLPETNQAPLVVEVHPARSIVPQGSNLSRLCQVS
GSPPHYFWSREDGRPVPSGGTQQRHQGSELHFPSPVQPSDAGVYICTRNLHQSNTS
RAELLVTEAPSKPITVTVVEEQRSQSVRPGADVTFICTAKSKSPAYTLVWTRLHNGK
LPTRAMDNGILITIRNVQLSDAGTYVCTGSNMFMADQGTATLHVQASGTLSAPVVS
IHPPQLTVQPGQLAEFRCSATGSPTPTLEWTGGPGGQLPAKQIHGGILRLPAVEP
TDQAQYLCRAHSSAGQQVARAVLHVHGGGGPRVQVSPERTVWHAGRTVRLYCRAAG
VPSATITWRKEGGSLLPQARSERTDIATLLIPAITTADAGFYLCVATSPAGTAQAR
IQVVVLSASDASPPPVKIESSSPSVTEGQTLDLNLCVVAGSAHAQVTWYRRGGSLLP
HTQVHGSRRLRLPQVSPADSGEYVCRVENGSGPKEASITVSVLHGTHSGPSYTPVPG
STRPIRIEPSSSHVAEGQTLDLNLCVPGQAHAQVTHHKRGGSLPARHQTHGSLRL
HQVTPADSGEYVCHVVTSGPLEASVLVTIEASVIPGPIPPVRIESSSTVLEGGT
LDLSCVVAGQAHAQVTWYKRGGSLPARHQVRSRLYIFQASPADAGQYVCRASNGM
EASITVTVTGTQGANLAYPAGSTQPIRIEPSSSQVAEQGTDLNLCVVPQSHAQVT
WHKRGGSLPVRHQTHGSLRLRYQASPADSGEYVCRVLGSSVPLEASVLVTIEPAGS
VPALGVTPTVRIESSSQVAEQGTDLNLCVAGQAHAQVTHHKRGGSLPARHQVHG
SRLRLQVTPADSGEYVCRVVGSSGTQEASVLVTIQRLSGSHSQGVAYPVRIESS
SASLANGHTLDLNLCLVASQAPHTITWYKRGGSLPSRHQIVGSRLRIPQVTPADSGE
YVCHVSNAGSRETSILVITIQSGSSSHVPSVSPPIRIESSSPTVVEGQTLDLNLCV
ARQPQAIITWYKRGGSLPSRHQTHGSHRLRHQMSVADSGEYVCRANNNIDALEASI
VISVSPSAGSPSAPGSSMPIRIESSSSHVAEGETLDLNCVVPQQAHAQVTWHKRGG
SLPSHHQTRGSRLRLHHVSPADSGEYVCRVMGSSGPLEASVLVTIEASGSSAVHVP
APGGAPPIRIEPSSSRVAEQGTDLKCVVPQQAHAQVTWHKRGGNLPARHQVHGPI
LRLNQVSPADSGEYSCQVTGSSGTLEASVLVTIEPSSPGPIAPGLAQPIYIEASS
SHVTEGQTLDLNLCVVPQQAHAQVTWYKRGGSLPARHQTHGSLRLHLVSPADSGEY
VCRAASGPGPEQEAFTVTVPPSEGSSYRLRSPVISIDPPSSTVQQGDASFKCLI
HDGAAPISLEWKTRNQLEDNVHISPNGSIITIVGTRPSNHGTYRCVASNAYGVAQ
SVVNLVHGPPTVSVLPEGPVWVKVAVTLECVSAGEPRSSARWTRISSTPAKLE
QRTYGLMDSHAVLQISSAKPSDAGTYVCLAQNALGTAQKQGEVIVDTGAMAPGAPQ
VQAEAEELTVEAGHTATLRCSATGSPAPTIHWSKLSPLPWQHRLEGDTLIIIPRVA
QQDSGQYICNATSPAGHAEATIIHVESPPYATTVPEHASVQAGETVQLQCLAHGT
PPLTFQWSRVGSSLPGRATARNELLHFERAAPEDSGRYRCRVTNKVGSAEAFQALL
VQGPFGSLPATSIAGSTPTVQVTPQLETKSIGASVEFHCAVPSTRGTQLRWFKEG
GQLPPGHVQDGVLRIQNLDDQSCQGTYICQAHGPWGKAQASQALVIALPSVLINI
RTSVQTVVVGHAVEFECLALGDPKPQVTWSKVGGHLRPGIVQSGGVVRIAHVELAD
AGQYRCTATNAAGTTQSHVLLLQALPQISMPQEVVRVPAGSAAVFCIASGYPTPD
ISWSKLDGSLPPDSRLNNMLMLPSVRPQDAGTYVCTATNRQGVKAKFAHLQVPER

[0998]

		VVPYFTQTPYSFLPLPTIKDAYRKFEIKITFRPDSADGMLLYNGQKRVPGSPTNLA NRQPDFISFGLVGGPRPEFRFDAGSGMATIRHPTPLALGHFHTVTLRLSLTQGSLLV GDLAPVNGTSQGGKQGLDLNEELYLGGYPDYGAIPKAGLSSGFIGVRELRIQGE IVFHDNLNTAHGISHCPTCRDRPCQNGGQCHDSESSSYVCVCPAGFTGSRCEHSQA LHCHPEACGPDATCVNRPDGRGYTCRCHLGRSGLRCEEGVTVTTPSLSGAGSYLAL PALTNTHHELRLDVEFKPLAPDGVLLFSGGKSGPVEDFVSLAMVGGHLEFPHYELGS GLAVLRSAEPLALGRWHRVSAERLNKDGSLRVNGGRPVLRSSPGKSQGLNLHTLLY LGGVEPSVPLSPATNMSAHFRGCVGEVSVNGKRLDLTYSFLGSQGIQGCYDSSPCE RQPCQHGAATCMPAGEYEFQCLCRDGFKGDLCEHEENPCQLREPLHGGTCQGTREL CLPGFSGPRCQQSGSGHGAESDWHLEGGSGNDAPGQYGAFFHDDGFLAFPGHVFSR SLPEVPETIELEVRTSTASGLLLWQGVVEVGEAGQKDFISLGLQDGHVFRYQLGS GEARLVSEDPINDGEWHRVTALREGRRSIQVDGEELVSGRSPGNVAVNAKGSVY IGGAPDVATLTGGRFSSGITGCVKNLVLSARPGAPPPQPLDLQHRAQAGANTRPC PS
103	双糖链蛋白聚糖	DEEASGADTSGVLDPDSTPTYSAMCPFGCHCHLRVVQCSLDGLKSVKPEISPDTT LLDLQNNDISELRKDDFKGLQHLALVLVNNKISKIHEKAFSPLRKQLKLYISKNH LVEIPPNLPSLVELRIHDNRIRKVPKGVFSGLRNMNCIEMGGNPLENSGFEPGAF DGLKLNLYRISEAKLTGIPKDLPETLNLHLDHNKIQAIELEDLLRYSKLYRLGLG HNQIRMIENGSLSLFLPTLRELHLDNNKLARVPSGLPDLKLLQVVYLHNSNITKGV NDFCPMGFGVKRAYNGISLFNNPVVYWEVQPATFRCVTDRLAIQFGNYKK
104	核心蛋白聚糖	DEASGIGPEVPDDRDFEPSLGPVCPFRQCCHLRVVQCSLDGLDKVPKDLPPDPTLL DLQNNKITIKDGDGFKNLKLNHALILVNNKISKVSGAFTPLVKLERLYLSKNQLK ELPEKMPKTLQELRAHENEITKVRKVTFNGLNQMIIVIELGTNPLKSSGIENGAFQG MKKLSYIRIADTNITSIPQGLPPSLTELHLDGKNISRVDAASLKEGLNNLAKLGLSF NSISAVDNGSLANTPHLRELHLDNNKLTRVPGGLAEHKYIQVVYLHNNNISVVGSS DFCPPGHNTKKASYSVSVLSFNPVQYWEIQPSTFRVCVYVRSALQGLNYK
105	无孢蛋白	DMEDTDDDDDDDDDDDDDDNSLFTPREPRSHFFPFDLFPMPFGQCQCYSRVHC SDLGLTSVPTNIPFDTMLDLQNNKIKEIKENDFKGLTSLYGLILNNNKLTKIHPK AFLTTKKLRLRYLSHNQLSEIPLNLPKSLAELRIHENKVKIKQDFTKGMNALHVL EMSANPLDNGIEPAGAFEGVTVFHIRIAEAKLTSVPKGLPPTLLEHLHDYNKISTV ELEDFKRYKELQRLGLGNNKITIDIENGLANI PRVREIHLENNKLKIPSGLPPELK YLQIIFLHSNRIARVGVNDFCPTVPKMKKSLYSAISLFNNPVKYWEMQPATFRCVL SRMSVQLGNFGM
106	纤维调节蛋白	QYEDDPHWWFHYLRSQQSTYYDPYDPPYETYEYEPYPYGVDEGPAYTYGSPSPDPR DCPQECDCPPNFPTAMYCDNRNLKYLFPVPSRMKYVYFQNNQITSIQEGVFDNATG LLWIALHGNQITSDKVGRKVFSLRHLERLYLDHNNLTRMPGGLPRSLRELHLDHN QISRVPNNALEGLNLTALYLQHNEIQEVGSSMRGLRSLILLDSYNHLRKVPDGL PSALEQLYMEHNNVYTVPSDFRGAPKLLYVRLSHNSLTNNGGLNNTFNSSSLELE DLSYNQLQKIPPVNTNLENLYLQGNRINEFSISSFCTVVDVNVFSLQVLRLDGNE IKRSAMPADAPLCLRLASLIEI
107	基膜聚糖	QYYDYDFPLSIYQSSPNCAPCNCPEYPSAMYCDELKLSVPMVPPGIKYLYLR NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGRVFSKLKQLKLLHNNNLTE SVGPLPKSLEDLQLTHNKITKLGSFEGLVNLTFIHLQHNRKEDAVSAAFKGLKSL EYLDLSFNQIARLPGLPVSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFNALQYLRLSHNELA DSGIPGNSFNVSLLVELDLSYNKLKNIPTVNENLENNYLEVNQLEKFDIKSFCKIL GPLSYSKIKHLRLDGNRISETSLPPDMYECLRVANEVTLN
108	PRELP	QPTRRRPRGTGPGRRPRPRPRPTPSFPQDEPAEPTDLPPPLPPGPSIFPDPCPRE CYCPPDFPSALYCDNRNLKVPVIPPRIHYLYLQNNFITELPVESFQATGLRWIN LDNNRIRKIDQRVLEKLPGLVFLYMEKNQLEEVPSALPRNLEQLRLSQNHISRIIP GVFSKLENLLLDLQHNRLSDGVFKPDTFHGLKNLMQLNLAHNILRKMPRPVPTAI HQLYLDNSNKIETIPNGYFKSFPNLAFIRLNYNKLTDRGLPKNSFNISNLLVLHLSH NRISSVPAINNRLEHLYLNNNSIEKINGTQICPNDLVAHFHDFSSDLENVPHRLYLR LDGNYLKPPIPDLMMCFRLQSV VI
109	骨粘附蛋白聚糖/骨调蛋白	QYETYQWDEDYDQEPDDDYQTGFPPFRQNVYGVFPHQYTLGCVSECFCTNFPSSM YCDNRKLKTI PNIPMHQQLYLQFNEIEAVTANSFINATHLKEINLSHNKIKSQKI DYGVFAKLPNLLQLHLEHNNLEEFPPPLPKSLERLLLGYNIEISKLTQNAMDGLVNL TMLDLCYNYLHDSLLKDKIFAKMEKLMQLNLCSNRLESMPGGLPSSLMYLSLENN ISSIPEKYFDKLPKLHLTRMSHNKLQDIPYNIFNLPNIVELSVGHKNLQAFYIPR NLEHLYLQNNIEIKMNLTMCPSIDPLHYHHLTYIRVDQNKLEPISSYIFFCFPH IHTIYYGEQRSTNGQTIQLKTQVFRFPDDDDDESDHDDPDNAHESPEQEGAEHGF DLHYENQE
110	旋光蛋白	ASLPRKERRREEQMPREGDSFEVLPLRNDVLNPDNYGEVIDLSNYEELTDYGDQL PEVKVTSIAPATSIIPAKSTTAPGTPSSNPTMTRPTAGLLSSQPNHGLPTCLVC VCLGSSVYCDIDLEDIPPLPRRTAYLYARFNIRISRAEDFKGLTKLRIDLNN LISSIDNDAFRLLHALQDLILPENQLEALPVLPSGIEFLDVRLNRLQSSGIQPAAF

[0999]

		RAMEKLQFLYLSNDLLDSIPGPLPLSLRSVHLQNNLIETMQRDVFCDPPEEHKHTRR QLEDIRLDGNPINLSLSPSAYFCLPRLPIGRFT
111	骨甘蛋白聚糖 /Mimecan	PPTQQDSRIYDYGTDNFEESIFSQDYEDKYLDGKNIKEKETVIIIPNEKSLQLQKD EAITPLPPKKENDEMPTECLLCVCLSGSVYCEEVDIDAVPPLPKESAYLYARFNKIK KLTAKFADIPNLRRLDFTGNLIEDIEDGTFSKLSLEELSLSAENQLLKLPVLPKP LTLFNAKYNKIKSRGIKANAFKKLNNLTFLYLDHNALESVPLNLPESLRVHLQFN NIASITDDTFCKANDTSYIRDRIEIRLEGNPIVLGKHPNSFICLKRLPIGSYF
112	软骨蛋白	QRCPQACICDNSRRHVACRYQNLTEVPDAIPELTQRLDLQGNLLKVI PAAAFQGV HLTHLDLRHCEVELVAEGAFRGLGRLLLLNLASNHLRELQPEALDGLGSLRRLELE GNALEELRPGTFGALGALATLNLAHNALVYLPAMAFQGLLRVRWRLSHNALSVA PEALAGLPALRRSLSHHNEQLALPGPVLSQARGLARLELGHNPITYAGEEDGLALP GLRELLLDGGALQALGPRAFAHCPRHLTDLRGNQLDTPPLQGPQGLRRRLRQGN PLWCGCQARPLLEWLARARVSDGACQGPRLRGEALDALRPWDLRCPGDAAQEEE ELEERAVAGPRAPPRGPPRGPEERAVAPCPACVCPESRHSCEGCGLQAVPRG FPSDTQLLDLRRNHFPSPRAAFPGGLHVLVSLHLQHCGLAELEAGALAGLGRLLYL YLSDNQLAGLSAAALEGAPRLGYLYLERNRFLQVPGAALRALPSLFSHLQDNAV RLAPGDLGRTRALRWVYLSGNRITEVSLGALGPARELEKLHLDRNLQREVPTGALE GLPALLELQLSGNPLRALRDGAFQPVGRSLQHLFLNSSGLEQICPGAFSGGLGPG SLHLQKNQLRALPALPSLSQLELIDLSSNPFHCDQQLPLHRWLTGLNLRVGTCA TPPNARGQVRKAAAASFEDCPGWAARKAKRTPASRPSARRTPIKGRQCAGDKVGKE KGRL
113	Podocan	GPVLAVRAPGFGRRSGGHSLSPEENEFAEEEPVLVLSPEEPGPGPAAVSCPRDCACS QEGVVDCCGIDLREFPGDLPEHTNHLSLQNNQLEKIYPEELSRLHRLETNLQNNR LTSRGLPEKAFEHNTLNLYLYLANNKLTAPRFLPNALISVDFAAANYLTKIYGLTF GQKPNLRSVYLHNNKLADAGLPDNMFMNGSSNVEVLILSSNFLRHVPKHLPPALYKL HLKNNKLEKIPPGAFSELSSRLRELYLQNNYLTDEGLDNETFWKLSLEYLDLSSNN LSRVPAGLPRSLVLLHLEKNAIRSV DANVLTPIRSLEYLLHLSNQLREQGIHPLAF QGLKRLHTVHLYNNALERVPSGLPRRVRTLMILHNQITGIGREDFATTYFLEENL SYNRITSQVHRDAFRKRLRLSLDLSGNRLHTLPPGLPRNVHVLKVRNELAALA RGALVGMAQLRELYLTSNRLSRALGPRAWVDLAHLQLLDIAGNQLTEIPEGLPES LEYLYLQNNKISAVPANAFDSTPNLKGIFLRFNKLAVGSVVDASAFRLKHLQVLDI EGNLEFGDISKDRGLGKEKEEEEEEEEEEEETR
114	人 IgG1 恒定 区 (氨基酸序 列)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
115	人 IgG1 Fc 结 构域 (氨基酸 序列)	EPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQK SLSLSPGK
116	HAS 结构域 I	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFDHVKLVNEVTEFAKTCVAD ESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT CQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQR
117	HAS 结构域 II	GKASSAKQRLKCSLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT CCHGDLLECADRADLAKYICENQDSISSKLECECKP LLEKSHCIAEVENDEMP DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETT LEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ
118	HAS 结构域 III	NLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHP EAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVD EYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA FVEKCCADDKETCF AE EGKLVAAASQAALGL
119	接头	LEA (EAAK) ₄ ALEA (EAAK) ₄ ALE
120	基膜聚糖 -MSA-IL2 (基 膜聚糖用粗体 表示; 接头用 斜体表示; MSA 用下划 线表示; IL2 用粗体和下划	<u>QYDYDIPLFMYGQISPNCAPECNCPHSYPTAMYCDLKLKSVPMVPPGIKYLYLR</u> <u>NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNNLENSKIKGVFSKLKQLKKLHINYNL</u> <u>TE SVGPLPKSIQDLQLTNNKISKLSGFDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASL</u> <u>KGLKSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNI</u> <u>PDEYFKRFTGLQYLRLSHNELA DSGVPNGSNFNISSLELDLSYNKLKSI</u> <u>PTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFC</u> <u>KIL GPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDPMYECLRVANEITVN</u> <u>GGGSGGGSEAHKSEIA HRYNDLGEQHFKGLVLI</u> <u>AFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESA</u> <u>ANCCK SLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECF</u> <u>LQHKDDNPSPPPFERPEA EAMCTSFKENPTTFMGHYL</u> <u>HEVARRHPYFYAPELLYAEQYNEILTQCCAEADKES</u> <u>CLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTF</u> <u>PNADFAEIT</u>

[1000]

	线表示; HIS 标签用虚线下划线表示)	KLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRALAKYMCENQATISSKLQTCCKDPLKKAH CLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVS LLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKLNVTNCDLYEKLGE YGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCKCTLPEDQRLPCVEDYLSAI LNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDITYVPKEFKAETFTFHSD ICTLPEKEKQIKKQTALAEVLVHKPKATAEQKLTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCF STEGPNLVTRCKDALAGGGSAPTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQ ELLSRMENYRNKLPRMLTFKFYLPKQATELKDQLCEDELGPLRHVLDLTQSKSF QLEDAENFISNIRVTVVKLGSDNTFECQFDDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSP QHSHHHH
121	MSA-IL2 (MSA 用粗体表示; 接头用斜体表示; IL2 用下划线表示; HIS 标签用虚线下划线表示)	EAHKSEIAHRYNDLGEQHFGLVLIASFQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVAD ESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCCKQEPERNECFLOHKDDNPSL PPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQC CAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFP NADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRALAKYMCENQATISSKLQTCCKD KPLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSR RHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKLNVTNCD LYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCKCTLPEDQRLPC VEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDITYVPKEFKA ETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAEVLVHKPKATAEQKLTVMDDFAQFLDTCCCK AADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSAPTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQHLE EQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRMLTFKFYLPKQATELKDQLCEDELGPLRHVLD DLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLGSDNTFECQFDDDESATVVDFLRRWIAFC QSIISTSPQHSHHHH
122	IL12-MSA (IL12p40 用粗体表示; 接头用斜体表示; IL12p34 用下划线表示; MSA 用粗体和下划线表示; HIS 标签用虚线下划线表示)	MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSQDHRGVIGSGKTLTIT VKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTLKCEAPNYS GRFTCSWLVRNMDLKFNKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLQDRDYEKYSVS CQEDVTCPTAEETLPIELALEARQONKYENYSTSFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKN SQVEVSWEYDPSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTE VQCKGGNVCVQAQDRYNNSSCSKWACVPCRVS GSGSGSGSGSGSGSRVIPVSGP ARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHSCTAEDIDHEDITRDQSTLKTCLPLEL HKNESCLATRETSSSTRGSCLPQKTSMLMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQ NNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAF STRVVTINRVMGYLSSAGSGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFGLVLIASFQYLQK CSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELAD CCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARR HPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCS SMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDR AELAKYMCENQATISSKLQTCCKDPLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQ EVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPAC YGTVLAEFQPLVEEPKLNVTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVE AARNLGRVGTCKCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSL VERRPCFSALTVDITYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAEVLVHKP KATAEQKLTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAHSHHHH
123	IL12-MSA-基膜聚糖 (IL12p40 用粗体表示; 接头用斜体表示; IL12p34 用下划线表示; MSA 用粗体和下划线表示; 基膜聚糖用粗体、下划线和斜体表示; HIS 标签用虚线下划线表示)	MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSQDHRGVIGSGKTLTIT VKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTLKCEAPNYS GRFTCSWLVRNMDLKFNKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLQDRDYEKYSVS CQEDVTCPTAEETLPIELALEARQONKYENYSTSFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKN SQVEVSWEYDPSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTE VQCKGGNVCVQAQDRYNNSSCSKWACVPCRVS GSGSGSGSGSGSGSRVIPVSGP ARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHSCTAEDIDHEDITRDQSTLKTCLPLEL HKNESCLATRETSSSTRGSCLPQKTSMLMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQ NNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAF STRVVTINRVMGYLSSAGSGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFGLVLIASFQYLQK CSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELAD CCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARR HPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCS SMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDR AELAKYMCENQATISSKLQTCCKDPLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQ EVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPAC

[1001]

	表示)	YGTVLAEFQPLVEEPKLNVTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVE AARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSL VERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSIDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKP KATAEQKLVTMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSGGGGQ YYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDLKLKSVPMVPPGIKYLYLRN NQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLNSKIKGVFSKLKQLKKLHINYNNLTES VGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGKLSL YLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELAD SGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCCKILG PLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNNHHHHH
124	基膜聚糖 -GGGS-(H) ₆	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDLKLKSVPMVPPGIKYLYLR NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLNSKIKGVFSKLKQLKKLHINYNNLTES SVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGKLSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELA DSGVPNGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCCKIL GPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGGGSHHHHHH
125	基膜聚糖 D213A	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDLKLKSVPMVPPGIKYLYLR NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLNSKIKGVFSKLKQLKKLHINYNNLTES SVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGKLSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELA DSGVPNGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCCKIL GPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGGGSHHHHHH
126	基膜聚糖 -MSA	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDLKLKSVPMVPPGIKYLYLR NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLNSKIKGVFSKLKQLKKLHINYNNLTES SVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGKLSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELA DSGVPNGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCCKIL GPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGGGSGGGSEAHKSEIA HRYNDLGEQHFGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDK SLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEA EAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKES CLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFABET KLATDLTKVNKECCHGDLLECADRAELAKYMCENQATISSKLQTCDDKPLKKAH CLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVS LLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKLNVTNCDLYEKLGE YGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAI LNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSID ICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQKLVTMDDFAQFLDTCCKAADKDTCF STEGPNLVTRCKDALAHHHHHH
127	Gluc	KPTENNEDFNIVAVASNFATTDLDADRGLPGKKLPLEVLKEMEANARKAGCTRGCL LICLSHIKCTPKMKKFIPGRCHTYEGDKESAQGGIGEAIVDIPEIPGFKDLEPMEQ FIAQVDLCVDCTTGCLKGLANVQCSDLLKKWLPQRCATFASKIQGQVDKIKGAGGD GGGSHHHHHH
128	基膜聚糖 -Gluc	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDLKLKSVPMVPPGIKYLYLR NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLNSKIKGVFSKLKQLKKLHINYNNLTES SVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGKLSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELA DSGVPNGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCCKIL GPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGGGSGGGSGGGSKPTE NNEDFNIVAVASNFATTDLDADRGLPGKKLPLEVLKEMEANARKAGCTRGCLICL SHIKCTPKMKKFIPGRCHTYEGDKESAQGGIGEAIVDIPEIPGFKDLEPMEQFIAQ VDLCVDCTTGCLKGLANVQCSDLLKKWLPQRCATFASKIQGQVDKIKGAGGDGGGS HHHHH
129	CNA35-Gluc	ARDISSTNVDTLTVSPSKIEDGGKTTVKMTFDDKNGKIQNGDMIKVWPTSGTVKI EGYSKTVPLTVKGEQVQAVITPDGATITFNDKVEKLSDVSGFAEFVQGRNLTQT NTSDDKVATITSGNKSTNVTVHKSEAGTSSVFYKTDGMLPEDTTHVRWFLNINNE KSYVSKDITIKDQIQGGQQLDSTLNINVTGTHSNYYSGQSAITDFEKAFFPGSKIT VDNTKNTIDVTIPQGYGSYNSFSINYKTKITNEQQKEFVNNSQAWYQEHGKEEVNG KSFNHTVHNINANAGIEGTVKGELKVLKQDKDTKGGGSGGGSGGGSKPTENNEDFN IVAVASNFATTDLDADRGLPGKKLPLEVLKEMEANARKAGCTRGCLICLSHIKCT

[1002]

		PKMKKFI PGRCHTYEGDKESAQGGIGEAIVDIPEIPGFKDLEPMEQFIAQVDLCVD CTTGCLKGLANVQCSDDLKKWLPQRCATFASKIQGQVDKIKGAGGDDGGGSHHHHHH
130	ColG s3a/s3b-Gluc	PITKEMEPND DIKEANGPIVEGVTVKGLNGSDDADTFYFDVKEDGDVTIELPYSG SSNFTWL VYKEGDDQNHASGIDKNNSKVGTFKSTKGRHYVFIYKHDSASNISYSL NIKGLGNEKLKEKENNDSDDKATVINFNFTTMQGSLLGDDSRDYYSFEVKEEGEVN IELDKKDEFGVTWTLHPESNINDRITYGQVDGNKVSNNKVKLRPGKYLLVYKYSGS GNYELRVN GGGSGGGSGGGSKPTENNEDFNIVAVASNFAATDLDADRGLPGKKLP LEV LKEMEANARKAGCTRGCLICLSHIKCTPKMKKFI PGRCHTYEGDKESAQGGIG EAIVDIPEIPGFKDLEPMEQFIAQVDLCVDCTTGCLKGLANVQCSDDLKKWLPQRC ATFASKIQGQVDKIKGAGGDDGGGSHHHHHH
131	ColH_s3-Gluc	GTEKEPNNSKETASGPVPGIPVSGTIENTSDQDYFYFDVITPGEVKIDINKLGYG GATWVVYDENNNNAVSYATDDGQNLSGKFADKPGRIYIHLMYFNNGSYMPYRINIEG GGSGGGSGGGSKPTENNEDFNIVAVASNFAATDLDADRGLPGKKLPLEV LKEMEA NARKAGCTRGCLICLSHIKCTPKMKKFI PGRCHTYEGDKESAQGGIGEAIVDIPEI PGFKDLEPMEQFIAQVDLCVDCTTGCLKGLANVQCSDDLKKWLPQRCATFASKIQG QVDKIKGAGGDDGGGSHHHHHH
132	PLGF2 HBD-Gluc	RRRPKGRGKRRREKQRPDSDLGGSGGGSGGGSKPTENNEDFNIVAVASNFAATD LDADRGLPGKKLPLEV LKEMEANARKAGCTRGCLICLSHIKCTPKMKKFI PGRCH TYEGDKESAQGGIGEAIVDIPEIPGFKDLEPMEQFIAQVDLCVDCTTGCLKGLANV QCSDDLKKWLPQRCATFASKIQGQVDKIKGAGGDDGGGSHHHHHH
133	4M5.3-MSA- 基膜聚糖	ADVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVIYK VSNRVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVFCSQSTHVPWTFGGGTGLEI KSSADDAKDAAKDDAKDDAKDDGGVKLDETGGGLVQPGGAMKLSCVTSGFTFG HYWMNWVRQSPKGLWVAQFRNKPYNIEYYSVSKGRFTISRDDSKSSVYLQMN NLRVEDTGIIYCTGASYGMEYLGQGTSVTVSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKG LVLI AFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAI PNLRENYGELADCC TKQEPERNECF LQHKDDNPSLP PFERPEAEAMCTSFKENPTT FMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKA LVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKEC CHGDLLECADDRAEALAKYMCENQATISSKLQTCCKP LLLKHAHCLSEVEHDTMPAD LPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATL EKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAIILVRYTQ KAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCKCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPV SEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVD ETVVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKK QTALAEVLKHKPKATAEQ LKTVMD DFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKD ALAGGGSGGGSYYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPM VPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGKVFSLKQLK KLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSFGLVNLTFIYLQHNQLKEDA VSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGL QYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLSIPTVNENLENYYLEVNELE KFDVKSFCILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDMECLRVANEITVNGGGSH HHHHH
134	Ss07d-MSA- 基膜聚糖	ATVKFKYKGEEKQVDISKIYLVRLGKFIYFYDLDGGGKLGLGHVSEKDAPKELLQ MLEKQKKGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLI AFSQYLQKCSYDEHAKLVQE VTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAI PNLRENYGELADCC TKQEPERNEC FLQHKDDNPSLP PFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYY AEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFA WAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAEALAKYMCENQA TISSKLQTCCKP LLLKHAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDV FLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLV EEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAIILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCK CTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVD DETVVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQ TALAEVLKHKPKATAEQ LKTVMD DFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSGGGSYYYDYDIPLFMYG QISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFE NVTDLQWLILDHNLLENSKIKGKVFSLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQ LTNNKISKLGSFGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSK PAGLPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNIS LLELDLSYNKLSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCILGPLSYSKIKHLRL DGNPLTQSSLPDMECLRVANEITVNGGGSHHHHHH

[1003]

135	ZZ-MSA 基膜聚糖	MRVPAQLLGLLLWLPGARCAVDNKNKEQQNAFYIEILHLPNLNEEQRNAFIQSLK DDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKVDNKNKEQQNAFYIEILHLPNLNEEQRNAFIQS LKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIASF SQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLREN YGELADCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYL HEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVR QRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDL ECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAA DFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAE ANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVS TPTLVEAARNLGRVGTCKCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVT CCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSICTLPEKEKQIKKQTALAE LVKHKPKATAEQKLTVMDDFAQFLDTCCAADKDTCTFSTEGPNLVTRCKDALAGGG SGGGSQYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGKIK YLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGKVFSLKQLKKLHINYN NNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKGL GLKSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRSL HNEADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKS FCKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDMECLRVANEITVNGGGSHHHHHH
136	基膜聚糖 -MSA-FcIII4C	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGKIKYLYLR NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGKVFSLKQLKKLHINYNLT SVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKGLKSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRSLHNE DSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFC GILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDMECLRVANEITVNGGGSGGGSEAHKSEIA HRYNDLGEQHFKGLVLIASFQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDK SLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEA EAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKES CLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEIT KLATDLTKVNKECCHGDLLECCADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKPLLKKAH CLSEVEHDTMPADLPAIAADDFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSV LLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGE YGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCKCTLPEDQRLPCVEDYLSAI LNRVCLLHEKTPVSEHVTCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHS ICTLPEKEKQIKKQTALAEVLKHKPKATAEQKLTVMDDFAQFLDTCCAADKDTCTF STEGPNLVTRCKDALAGGGSCDCAWHLGELVWCTCHHHHHH
137	基膜聚糖 -MSA-Fn3	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGKIKYLYLR NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGKVFSLKQLKKLHINYNLT SVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKGLKSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRSLHNE DSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFC GILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDMECLRVANEITVNGGGSGGGSEAHKSEIA HRYNDLGEQHFKGLVLIASFQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDK SLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEA EAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKES CLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEIT KLATDLTKVNKECCHGDLLECCADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKPLLKKAH CLSEVEHDTMPADLPAIAADDFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSV LLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGE YGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCKCTLPEDQRLPCVEDYLSAI LNRVCLLHEKTPVSEHVTCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHS ICTLPEKEKQIKKQTALAEVLKHKPKATAEQKLTVMDDFAQFLDTCCAADKDTCTF STEGPNLVTRCKDALAGGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWCCSDNCSNSYRITY GETGGNSPVQEFTVPRSCFMATISGLKPGVDYITITAYAVTDSNGPHPIISINRTHH HHHH
138	基膜聚糖 -MSA-SpG2	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGKIKYLYLR NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGKVFSLKQLKKLHINYNLT SVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKGLKSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRSLHNE DSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFC GILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDMECLRVANEITVNGGGSGGGSEAHKSEIA HRYNDLGEQHFKGLVLIASFQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDK SLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEA

[1004]

		EAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKES CLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEIT KLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKDPLLKKAH CLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVS LLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGE YGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCCCTLPEDQRLPCVEDYLSAI LNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSD ICTLPEKEKQIKQTALAEVLVKKHPKATAEQLKTMDDFAQFLDTCKAADKDTCF STEGPNLVTRCKDALAGGGSTYKLIVINGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDY GVDGEWYDDATKTFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLIVINGKTLKGETTTKAVDA ETAEKAFKQYANDYGVDGVWYDDATKTFTVTEHHHHHH
139	基膜聚糖 -MSA-RRGW	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPECNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLYLR NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGKVFSSKLKQLKHLHINYNNLTE SVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSGFDGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKGLKSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLTYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELA DSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYLEVNELEKFDVKSFCCKIL GPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDPMYECLRVANEITVNGGGSGGGSEAHKSEIA HRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDK SLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCCKQEPERNECFQHKDDNPSLPPFERPEA EAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKES CLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEIT KLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKDPLLKKAH CLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVS LLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGE YGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCCCTLPEDQRLPCVEDYLSAI LNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSD ICTLPEKEKQIKQTALAEVLVKKHPKATAEQLKTMDDFAQFLDTCKAADKDTCF STEGPNLVTRCKDALAGGGSRRGWHHHHHH
140	基膜聚糖 -MSA-WGRR	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPECNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLYLR NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGKVFSSKLKQLKHLHINYNNLTE SVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSGFDGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKGLKSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLTYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELA DSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYLEVNELEKFDVKSFCCKIL GPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDPMYECLRVANEITVNGGGSGGGSEAHKSEIA HRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDK SLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCCKQEPERNECFQHKDDNPSLPPFERPEA EAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKES CLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEIT KLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKDPLLKKAH CLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVS LLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGE YGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCCCTLPEDQRLPCVEDYLSAI LNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSD ICTLPEKEKQIKQTALAEVLVKKHPKATAEQLKTMDDFAQFLDTCKAADKDTCF STEGPNLVTRCKDALAGGGSWGRRHHHHHH
141	4420 LC-小鼠 κ 链	DVVMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVLIIYKV SNRFGSGVDRFSGSGSTDTLTKISRVEAEDLGVIYFCSQSTHVPWTFGGGKLEIK RADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSW TDQDSKSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNREK
142	4220 HC-基膜 聚糖 (LALA-PG)	DVKLDETGGGLVQPGRPMLKSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPKGLLEWVAQIRNKPY NYETIYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDMGIIYCTGSYYGMDYWGQGT SVTVSAKTTPASVYPLAPVCGGTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVH TFPALLQSGLYTLSSSVTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVDKKIEPRVPITQNP CPPLKECPPCAAPDAAGGSPVFIFPPKIKDVLMIISLSPMVTGVVDVSDDDPDVQI SWFVNNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNRALGSP IEKTIKPRGPVRAPOVYVLPPEAEEMTKKEFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRT EQNYKNTATVLDSDGSYFMYSKLRVQKSTWERGSLFACSVVHEGLHNLTKTISR SLGKGGGSGGGSGGGSGGQYYDYDIPLFMYGQISPNCAPECNCPHSYPTAMYCDD LKLKSVPMVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGKVF FSKLKQLKHLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSGFDGLVNLTFIYLQ HNQKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLTYLDNNKISNIPDE YFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENY YLEVNELEKFDVKSFCCKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDPMYECLRVANEI TVN

[1005]

143	4220 HC-mIgG2c	DVKLDETGGGLVQPGPRMKLSVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPY NYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGT SVTVSAKTAPSVYPLAPVCGGTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVH TFPALLQSGLYTLSSSVTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVDKKIEPRVPITQNP CPPLKECPPCAAPDAAGGPSVFIFPPKIKDVLMIISLSPMVTCTVVVDVSEDDPDVQI SWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNRALGSP IEKTISKPRGPVRAPQVYVLPPEAEEMTKKEFSLTCTMITGFLPAEIAVDWTSNGRT EQNYKNTATVLDSDGSYFMYSKLRVQKSTWERSLFCASVVHEGLHNLHTTKTISR SLGK
144	3/23 LC-小鼠 κ	METDTLLLVLLWVPGSTGDTVLTQSPALAVSPGERVTISCRASESVSTRMHWYQ QRPGQPPKLLIYVASRLESGVPARFSGGGSGTDFTLTIDPVEANDTATYFCQQSWN DPWTFGGGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWK IDGSRQNGVLNSWTDQDSKSDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI VKSFNRNEC
145	3/23 HC-基膜 聚糖	MDIWLSSLVFLVLFIKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSKLKSCAASGFTLSDYYMAWV RQAPKKGLEWVASINYESSTYYGESVKGRFTISRDNASTLYLQMNLSRSEDATAT YYCVRHNDNYFDYWGQGVLTVTSSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSSVTLGCLVKGYF PEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPALLQSGLYTLSSSVTVTSNTWPSQTITCNVAHPAS STKVDKKIEPRVPITQNPCCPLKECPPCAAPDAAGGPSVFIFPPKIKDVLMIISLSP MVTCTVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW MSGKEFKCKVNNRALGSPIEKTISKPRGPVRAPQVYVLPPEAEEMTKKEFSLTCTMI TGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSKLRVQKSTWERSLFCAS SVVHEGLHNLHTTKTISRSLGKGGGSGGGSGGGSGGGGQYYDYDIPLFMYGQISPNK APECNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLRLNNQIDHIDEKAFENVTDLQ WLILDHNLLENSKIKGVFSKLKQLKHLINYNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKI SKLGSFDGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKGKLSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPT SLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDL SYNKLKSIPTVNENLENYLEVNELEKFDVKSFCILGPLSYSKIKHLRLDGNPLT QSSLPPDMYECLRVANEITVN
146	LOB12.3 LC- 小鼠 κ	DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQASQDIGNWLAWYHQKPGKSPQLLIYGSTSLAD GVPSRFSGSSGSQYSLKISRQLQVEDIGIYYCLQAYGAPWTFGGGTKLELKRADA PTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDS KSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNNEC
147	LOB12.3 HC- 基膜聚糖	DVQLVESGGGLVQPGRSKLKSCAASGFIFSYFDMAWVRQAPTKGLEWVASISPDGS IPYYRDSVKGRFTVSRENAKSSLYLQMDSLRSEDATATYCCARRSYGGYSEIDYWGQ GVMVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSS GVHTFPALLQSGLYTLSSSVTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVDKKIEPRVPIT QNPCCPLKECPPCAAPDAAGGPSVFIFPPKIKDVLMIISLSPMVTCTVVVDVSEDDPD VQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNRAL GSPIEKTISKPRGPVRAPQVYVLPPEAEEMTKKEFSLTCTMITGFLPAEIAVDWTSN GRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSKLRVQKSTWERSLFCASVVHEGLHNLHTTKT ISRSLGKGGGSGGGSGGGSGGGGQYYDYDIPLFMYGQISPNCAPECNCPHSYPTAMY CDDLKLSVPMVPPGIKYLRLNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIK GKVFSLKQLKHLINYNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSFDGLVNLTFI YLQHNQKEDAVSASLKGKLSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLLTLYLDNNKISN PDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENL ENYYLEVNELEKFDVKSFCILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMYECLRVA NEITVN
148	OX86 LC-小 鼠 κ	DIVMTQAGALPNVPVPSGESASITCRSSQSLVYKDGQTYLWNFLQRPQSPQLLTYWM STRASGVSDRFSGSGSYFTLKISRVAEDAGVYQCQVREYPTFGSGTKLEIK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSW TDQDSKSDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNNEC
149	OX86 HC-基 膜聚糖	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTGYNLHWVRQPPGKGLEWMGRMRYDGD TYYNVLSKLSRSLISRDTSKNQVFLKMNSLQTDITAIYYCTDRGRGDSFDYWGQGV VTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVH TFPALLQSGLYTLSSSVTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVDKKIEPRVPITQNP CPPLKECPPCAAPDAAGGPSVFIFPPKIKDVLMIISLSPMVTCTVVVDVSEDDPDVQI SWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNRALGSP IEKTISKPRGPVRAPQVYVLPPEAEEMTKKEFSLTCTMITGFLPAEIAVDWTSNGRT

[1006]

		EQNYKNTATVLDSDGSYFMYSKLRVQKSTWERGSLFACSVVHEGLHNHLLTTKTISR SLGKGGGGSGGGSGGGGQYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDD LKLKSVPMVPPGIKYLRLNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLENSKIKGV FSKLKQLKKLHINYNLNTESVGLPKSLQDLQLTNNKISKLGSFDGLVNLTFIYLQ HNQKEDAVSASLKGKLSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDE YFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENY YLEVNELEKFDVKSFCILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMYECLRVANEI TVN
150	2C11 LC-小鼠 κ	DIQMTQSPSSLPASLGDRVTINCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTNKLAD GVPSRFGSGSGRDSSTISSLESEDIGSYQCQYYNYPWTFGPGTKLEIKRRADA APTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQD SKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
151	2C11 HC-基 膜聚糖	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFSGYGMHWVRQAPGRGLESVAYITSSSI NIKYADAVKGRFTVSRDNAKLLFLQMNILKSEDAMYYCARFDWDKNYWGQGTMY TVSSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSSGLSSGVHT FPALLQSGLYTLSSSVTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVDDKIEPRVPITQNPC PPLKECPPCAAPDAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLSPMVTCVVVDVSEDDPDVQIS WFWNNVEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSSGKEFKCKVNNRALSPI EKTISKPRGPPVRAPOVYVLPPEAEEMTKKEFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTE QNYKNTATVLDSDGSYFMYSKLRVQKSTWERGSLFACSVVHEGLHNHLLTTKTISR LGKGGGGSGGGSGGGGQYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDL KLKSVPMVPPGIKYLRLNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLENSKIKGV SKLKQLKKLHINYNLNTESVGLPKSLQDLQLTNNKISKLGSFDGLVNLTFIYLQ NQLKEDAVSASLKGKLSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEY FKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENY LEVNELEKFDVKSFCILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMYECLRVANEIT VN
152	T2A 肽（弗林 蛋白酶切割位 点— GSG-T2A）	RRKRGSSEGRGSLTTCGDVEENPGP
153	CCL3-基膜聚 糖	APYGADTPTACCFYSYRKIPRQFIVDYFETSSLCSQPGVIFLTKRNRQICADSKET WVQEYITDLELNAAGGSGGGSGGGGQYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPT AMYCDDLKLKSVPMVPPGIKYLRLNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLENS KIKGVFSKLKQLKKLHINYNLNTESVGLPKSLQDLQLTNNKISKLGSFDGLVNL TFIYLQHNQKEDAVSASLKGKLSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKI SNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVN ENLENYYLEVNELEKFDVKSFCILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMYECL RVANEITVNGGGSHHHHHH
154	基膜聚糖 -CCL3	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLKSVPMVPPGIKYLRL NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLENSKIKGVFSKLKQLKKLHINYNLNT SVGLPKSLQDLQLTNNKISKLGSFDGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKGKLS EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELA DSGVPNGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCIL GPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMYECLRVANEITVNGGGSGGGSGGGGAPYG ADTPTACCFYSYRKIPRQFIVDYFETSSLCSQPGVIFLTKRNRQICADSKETWVQE YITDLELNAAGGSHHHHHH
155	CCL3	APYGADTPTACCFYSYRKIPRQFIVDYFETSSLCSQPGVIFLTKRNRQICADSKET WVQEYITDLELNAAGGSHHHHHH
156	CCL4-基膜聚 糖	APMGSDPPTSCCFYSYTSRQLHRSFVMDYYETSSLCSKPAVVFLTKRGRQICANPSE PWVTEYMSDLELNGGGSGGGSGGGGQYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPT AMYCDDLKLKSVPMVPPGIKYLRLNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLENS KIKGVFSKLKQLKKLHINYNLNTESVGLPKSLQDLQLTNNKISKLGSFDGLVNL TFIYLQHNQKEDAVSASLKGKLSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKI SNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVN ENLENYYLEVNELEKFDVKSFCILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMYECL RVANEITVNGGGSHHHHHH

[1007]

157	基膜聚糖-CCL4	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDLKLKSVPMVPPGIKYLRLR NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLENSKIKGVFSKLKQLKHLHINYNLLE SVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKLKSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRSLSHNELA DSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCIL GPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGGSGGGSGGGG AFMG SDPPTSCCFSYTSRQLHRSFVMDYYETSSLCSKPAVVFLTKRGRQICANPSEPWVT EYMSDLELN GGGSHHHHHH
158	CCL4	APMGSDPPTSCCFSYTSRQLHRSFVMDYYETSSLCSKPAVVFLTKRGRQICANPSE PWVTEYMSDLELN GGGSHHHHHH
159	CCL5-基膜聚糖	SPYGSDDTPCCFAYLSLALPRAHVKEYFYTSSKCSNLAVVFVTRNRQVCANPEKK WVQEIYINYLEMS GGGSGGGSGGGGQYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTA MYCDDLKLKSVPMVPPGIKYLRLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLENSK IKGVFSKLKQLKHLHINYNLLETSVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNL TFIYLQHNQLKEDAVSASLKLKSLLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKIS NIPDEYFKRFTGLQYLRSLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNE NLENYYLEVNELEKFDVKSFCILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLR VANEITVNGGSGGGSHHHHHH
160	基膜聚糖-CCL5	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDLKLKSVPMVPPGIKYLRLR NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLENSKIKGVFSKLKQLKHLHINYNLLE SVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKLKSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRSLSHNELA DSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCIL GPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGGSGGGSGGGG SPYQ SDTTPCCFAYLSLALPRAHVKEYFYTSSKCSNLAVVFVTRNRQVCANPEKKWVQ EYINYLEMS GGGSHHHHHH
161	CCL5	SPYGSDDTPCCFAYLSLALPRAHVKEYFYTSSKCSNLAVVFVTRNRQVCANPEKK WVQEIYINYLEMS GGGSHHHHHH
162	CCL19-基膜聚糖	GANDAEDCCLSVTQRPPIPGNIVKAFRYLLNEDGCRVPAVVFTTLRGYQLCAPPDQP WVDRIIRRLKKSSAKNKGSTRSPVS GGGSGGGSGGGGQYYDYDIPLFMYGQISP NCAPECNCPSYPTAMYCDLKLKSVPMVPPGIKYLRLRNNQIDHIDEKAFENVTD LQWLILDHNLENSKIKGVFSKLKQLKHLHINYNLLETSVGPLPKSLQDLQLTNN KISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKLKSLLEYLDLSFNQMSKLPAGL PTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRSLSHNELADSGVPGNSFNISLLELD LSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCILGPLSYSKIKHLRLDGNP LTQSSLPPDMECLRVANEITVNGGSGGGSHHHHHH
163	基膜聚糖-CCL19	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDLKLKSVPMVPPGIKYLRLR NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLENSKIKGVFSKLKQLKHLHINYNLLE SVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKLKSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRSLSHNELA DSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCIL GPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGGSGGGSGGGG GANDA EDCCLSVTQRPPIPGNIVKAFRYLLNEDGCRVPAVVFTTLRGYQLCAPPDQPWVDRI IRRLKKSSAKNKGSTRSPVS GGGSHHHHHH
164	CCL19	GANDAEDCCLSVTQRPPIPGNIVKAFRYLLNEDGCRVPAVVFTTLRGYQLCAPPDQP WVDRIIRRLKKSSAKNKGSTRSPVS GGGSHHHHHH
165	CCL21c-基膜聚糖	SDGGGQDCCLKYSQKKIPYSIVRGYRKQEPSLGCPIPAILFLPRKHSKPELCANPE EGWVQNLMRRLDQPPAPGKQSPGCRKNRGTSKSGKKGKSGKCKRTEQTQPSRG GG GGGGSGGGGQYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDLKLKSVPMV PPGIKYLRLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLENSKIKGVFSKLKQLK LHINYNLLETSVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAV SASLKLKSLLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQ YLRSLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEK FDVKSFCILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGGSGSH HHHH
166	基膜聚糖-CCL21c	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDLKLKSVPMVPPGIKYLRLR NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLENSKIKGVFSKLKQLKHLHINYNLLE SVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKLKSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRSLSHNELA DSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCIL GPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGGSGGGSGGGG SDGGG QDCCLKYSQKKIPYSIVRGYRKQEPSLGCPIPAILFLPRKHSKPELCANPEEGWVQ

[1008]

		NLMRRLDQPPAPGKQSPGCRKNRGTSKSGKKGKSGKCKRTEQTQPSRGGGGSHHH HHH
167	CCL21c	SDGGGQDCCLKYSQKKIPYSIVRGYRKQEPSLGCPIPAIFLPRKHSKPELCANPE EGWVQNLMMRRLDQPPAPGKQSPGCRKNRGTSKSGKKGKSGKCKRTEQTQPSRGGG GSHHHHHH
168	截短的 CCL21c-基膜 聚糖	SDGGGQDCCLKYSQKKIPYSIVRGYRKQEPSLGCPIPAIFLPRKHSKPELCANPE EGWVQNLMMRRLDQPPAPGKGGGSGGGSGGGSQYYDYDIPLFMYGQISPNCAPECNC PHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDH NLENSKIKGVFSKLKQLKHLHINYNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSF DGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKGKLSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLLTLY LDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLG SIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCILGPLSYSKIHLRLDGNPLTQSSLP DMYECLRVANEITVNGGGSHHHHHH
169	基膜聚糖-截 短的 CCL21c	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPECNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLYLR NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGVFSKLKQLKHLHINYNLT ESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKGKLS EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELA DSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLGSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCIL GPLSYSKIHLRLDGNPLTQSSLPDMYECLRVANEITVNGGGSGGGSGGGSDGG GQDCCLKYSQKKIPYSIVRGYRKQEPSLGCPIPAIFLPRKHSKPELCANPEEGWV QNLMMRRLDQPPAPGKGGGSHHHHHH
170	截短的 CCL21c	SDGGGQDCCLKYSQKKIPYSIVRGYRKQEPSLGCPIPAIFLPRKHSKPELCANPE EGWVQNLMMRRLDQPPAPGKGGGSHHHHHH
171	CCL11	HPGSIPTSCCFIMTSKKIPNTLLKSYKRITNNRCTLKAIVFKTRLGKEICADPKKK WVQDATKHLQKLQTPKPGGGSHHHHHH
172	CCL11-基膜 聚糖	HPGSIPTSCCFIMTSKKIPNTLLKSYKRITNNRCTLKAIVFKTRLGKEICADPKKK WVQDATKHLQKLQTPKPGGGSGGGSGGGSQYYDYDIPLFMYGQISPNCAPECNC PHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDH NLENSKIKGVFSKLKQLKHLHINYNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSD GLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKGKLSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLLTLYL LDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLG SIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCILGPLSYSKIHLRLDGNPLTQSSLP DMYECLRVANEITVNGGGSHHHHHH
173	CLEC2-MSA- 基膜聚糖	QQKYLLAEKENLSATLQQLAKKFCQELIRQSEIKTKSTFEHKCSPCATKWRYHGDS CYGFFRRNLTWEEKQYCTEQNATLVKTASQSTLDYIAERITSVRWIGLSRQNSKK DWMWEDSSVLRKNGINLSGNTENNMNCAYLHNGKIHPASCKERHYLICERNAGMTR VDQLLGGGSGGGSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFGLVLIASFQYLQKCSYDEH AKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQE PERNECFLOHKDDNPSLPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYA PELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFG ERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKY MCENQATISSKLQTCCKPDKLKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNY AEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLA EFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLG RVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTCCSGSLVERRPQ FSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSIDITLPEKEKQIKKQALAEVLVKKPKATAEQ LKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSGGGSQYYDYDI PLFMYGQISPNCAPECNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLYLRNNQIDH IDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGVFSKLKQLKHLHINYNLTESVGPLPK SLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKGKLSLEYLDLSF NQMSKLPAGLPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGN SFNISLLELDLSYNKLGSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCILGPLSYSK IKHLRLDGNPLTQSSLPDMYECLRVANEITVNGGGSHHHHHH
174	CLEC2-MSA	QQKYLLAEKENLSATLQQLAKKFCQELIRQSEIKTKSTFEHKCSPCATKWRYHGDS CYGFFRRNLTWEEKQYCTEQNATLVKTASQSTLDYIAERITSVRWIGLSRQNSKK DWMWEDSSVLRKNGINLSGNTENNMNCAYLHNGKIHPASCKERHYLICERNAGMTR VDQLLGGGSGGGSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFGLVLIASFQYLQKCSYDEH AKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQE PERNECFLOHKDDNPSLPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYA PELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFG ERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKY MCENQATISSKLQTCCKPDKLKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNY AEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLA

[1009]

		EFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCKCTLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSIDICTLPEKEKQIKKQTALAEVLVKKHPKATAEQQLKTVMDDFQAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAHHHHHH
175	IFNg-MSA-基膜聚糖	HGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKSFLDIWRNWQKDGMKILQSQIISFYLRLEF EVLKDQNAISNNISVIESHLITTTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNEL IRVVHQLLPESSLRKRKRSRCGGSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQ YLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYG ELADCCCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPFFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHE VARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLEC ADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADF VEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEAN PPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCKCTLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSIDICTLPEKEKQIKKQTALAEVLV KHKPKATAEQQLKTVMDDFQAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSG GGSQYYDYDIPLFMYGQISPNCAPECNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKYL YLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNNLENSKIKGKVFSLKQLKLLHINYNL LTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSFDGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKLKSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRSLSHN ELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFC KILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSSLPPDMECLRVANEITVNGGGSHHHHHH
176	IFNg-IFNg-MSA-基膜聚糖	HGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKSFLDIWRNWQKDGMKILQSQIISFYLRLEF EVLKDQNAISNNISVIESHLITTTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNEL IRVVHQLLPESSLRKRKRSRCGGSGGGSGGGSGGGSHGTVIESLES LN NYFNSSG IDVEEKSFLDIWRNWQKDGMKILQSQIISFYLRLEF EVLKDQNAISNNISVIESH LITTTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESSLRKRKRS RC GGSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTD FAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCCTKQEPERNECFLO HKDDNPSLPFFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQ YNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAV ARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATIS SKLQTCCKDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLG TFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEP KNLVKTNCNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCKCTL PEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTCCSGSLVERRPCFSALTVDETY VPKEFKAETFTFHSIDICTLPEKEKQIKKQTALAEVLVKKHPKATAEQQLKTVMDDFQA QFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSGGGSGGGSYDYDIPLFMYGQIS PNCAPCNCNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLRLNNQIDHIDEKAFENVTD LQWLILDHNNLENSKIKGKVFSLKQLKLLHINYNL LTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSFDGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKLKSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRSLSHNLEADSGVPGNSFNISLLE LDLSYNKLSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFC KILGPLSYSKIKHLRLDGN PLTQSSSLPPDMECLRVANEITVNGGGSHHHHHH
177	IFNg-IFNg-MSA	HGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKSFLDIWRNWQKDGMKILQSQIISFYLRLEF EVLKDQNAISNNISVIESHLITTTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNEL IRVVHQLLPESSLRKRKRSRCGGSGGGSGGGSGGGSHGTVIESLES LN NYFNSSG IDVEEKSFLDIWRNWQKDGMKILQSQIISFYLRLEF EVLKDQNAISNNISVIESH LITTTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESSLRKRKRS RC GGSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTD FAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCCTKQEPERNECFLO HKDDNPSLPFFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQ YNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAV ARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATIS SKLQTCCKDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLG TFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEP KNLVKTNCNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCKCTL PEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTCCSGSLVERRPCFSALTVDETY VPKEFKAETFTFHSIDICTLPEKEKQIKKQTALAEVLVKKHPKATAEQQLKTVMDDFQA QFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAHHHHHH
178	基膜聚糖-MSA-IFNg	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPECNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLRL NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNNLENSKIKGKVFSLKQLKLLHINYNL LTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSFDGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKLKSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRSLSHNLEADSGVPGNSFNISLLE LDLSYNKLSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFC KILGPLSYSKIKHLRLDGN PLTQSSSLPPDMECLRVANEITVNGGGSHHHHHH

[1010]

		SVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKGKLSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLTYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELA DSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCIL GPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDMECLRVANEITVNGGGSGGGSEAHKSEIA HRYNDLGEQHFQKGLVLIASFQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDK SLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCCKQEPERNECFLOHKDDNPSLPFERPEA EAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCAEADKES CLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADF AEIT KLATDLTKVNKECCHGDLECCADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKDPLKKAH CLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVLGTFLEYYSRRHPDYSVS LLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKPNLVKTNC DLYEKLGE YGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGT KCCTLPEDQRLPCVEDYLSAI LNRVCLLHEKTPVSEHVTCCSGSLVERRPCFSALTVD ETYVPKEFKAETFTFHSD ICTLPEKEKQIKKQ TALAEVLVKKPKATAEQ LKTVMDFAQFLDTCCKAADKDTCF STEGPNLVTRCKDALAGGGSGHGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKS LFLDIWRNWQ KDGMKILQSQIISFYLR LFEVLKDNQAISNNISVIESHLITTTFFSNSKAKKDAFM SIKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLPESSLRKRKRSRCHHHHHH
179	基膜聚糖 -MSA-IFNg - IFNg	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPECNCPSYPTAMYCDLKLKSVMVPPGIKYLYLR NNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGVFSKLKQLKKLHINYNLLE SVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKGKLSL EYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLTYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELA DSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCIL GPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDMECLRVANEITVNGGGSGGGSEAHKSEIA HRYNDLGEQHFQKGLVLIASFQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDK SLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCCKQEPERNECFLOHKDDNPSLPFERPEA EAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCAEADKES CLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADF AEIT KLATDLTKVNKECCHGDLECCADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKDPLKKAH CLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVLGTFLEYYSRRHPDYSVS LLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKPNLVKTNC DLYEKLGE YGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGT KCCTLPEDQRLPCVEDYLSAI LNRVCLLHEKTPVSEHVTCCSGSLVERRPCFSALTVD ETYVPKEFKAETFTFHSD ICTLPEKEKQIKKQ TALAEVLVKKPKATAEQ LKTVMDFAQFLDTCCKAADKDTCF STEGPNLVTRCKDALAGGGSGHGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKS LFLDIWRNWQ KDGMKILQSQIISFYLR LFEVLKDNQAISNNISVIESHLITTTFFSNSKAKKDAFM SIKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLPESSLRKRKRSRCHHHHHH SHGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKS LFLDIWRNWQKDGMKILQSQIISFYLR L FEVLKDNQAISNNISVIESHLITTTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNE LIRVVHQLPESSLRKRKRSRCHHHHHH
180	MSA- IFNg - IFNg	EAHKSEIAHRYNDLGEQHFQKGLVLIASFQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVAD ESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCCKQEPERNECFLOHKDDNPSL PPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQC CAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFP NADF AEITKLATDLTKVNKECCHGDLECCADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKD KPLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVLGTFLEYYSR RHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKPNLVKTNC DLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGT KCCTLPEDQRLPC VEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTCCSGSLVERRPCFSALTVD ETYVPKEFKA ETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQ TALAEVLVKKPKATAEQ LKTVMDFAQFLDTCCK AADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSGHGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKS LFL DIWRNWQKDGMKILQSQIISFYLR LFEVLKDNQAISNNISVIESHLITTTFFSNS KAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLPESSLRKRKRSRCHHHHHH SGGGSGGGSGHGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKS LFLDIWRNWQKDGMKILQSQ IISFYLR LFEVLKDNQAISNNISVIESHLITTTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQ VQRQAFNELIRVVHQLPESSLRKRKRSRCHHHHHH
181	LAIR-(H) ₆	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVCSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMEKSTEP YKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWRSERKTLELKVIKENVIQTAPAGPTS DTSWLKTYSIYHHHHH
182	基膜聚糖 (小 鼠)	YYDYDIPLFMYGQISPNCAPECNCPSYPTAMYCDLKLKSVMVPPGIKYLYLRN NQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGVFSKLKQLKKLHINYNLLE VGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKGKLSLE YLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLTYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELAD SGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCILG PLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDMECLRVANEITVN

[1011]

183	小鼠 MSA	EAHKSEIAHRYNDLGEQHFGLVLIASFQYLQKCSYDEHAKLVQEVTFDAKTCVAD ESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCCTKQEPERNECFLOHKDDNPSL PPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQC CAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFP NADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDILLECADDRAEALAKYMCENQATISSKLQTCDD KPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSR RHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKPNLVKTNC DLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPC VEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKA ETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQATALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFQAQFLDTCCK AADKDTCTFSTEGPNLVTRCKDALA
184	3/23 LC-小鼠 κ (3/23 LC 粗 体; 小鼠 κ 链 下划线)	DTVLTQSPALAVSPGERVTISCRASESVSTRMHVYQQRPGQPPKLLIYVASRLESG VPARFSGGGSGTDFTLTIDPVEANDTATYFCQSWNDPWTFGGGTKLELRADAAP TVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
185	3/23 HC-基膜 聚糖 (LALA-PG) (3/23 HC 粗 体; mIgG2c 下划线; LALA-PG 沉 默突变粗体下 划线; 基膜聚 糖虚线下划 线)	EVQLVESGGGLVQPGSRSLKLSAASGFTLSDYYMAWVRQAPKKGLEWVASINYEES STYYGESVKGRTISRDNASTLYLQMNLSRSEDATYYCVRHDNYFDYWGQGVIV TVSSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSSGSLSSGVHT FPALLQSGLYTLSSSVTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVDKKEIPRPVITQNPC PPLKECPCAAPDAAGGPSVFIFPPKIKDVLMSISLPMVTCVVVDVSEDDPDVQIS WFWNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNRALGSP EKTISKPRGFPVRAPQVYVLPPEAEEMTKKEFSLTCMTGFLPAEIAVDWTSNGRTE QNYKNTATVLDSDGSYFMSKLRVQKSTWERSLFCASVVHEGLHNHLLTKTISRS LGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG KLKSVPMVPPGIKYLRLNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNNLENSKIKGVF SKLKQLKHLHINYNNTESVGLPKSLQDLQLTNNKISKLGSGFDGLVNLTFIYLQH NQLKEDAVSASLKGLKSLLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEY FKRFTGLQYLRSLHNEADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLSIPTVNENLENYY LEVNELEKFDVKSFKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDDMYECLRVANEIT VN
186	LAIR-MSA-IL 2 (LAIR 粗体; -(GGGS)1 斜 体; MSA 下划 线; (GGGS)1 斜体; IL-2; (H)6 虚线下划 线)	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVCSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMEKSTEP YKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERSKTLELKVIKENVIQTPAGPPTS DTSWLKTYSIYGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFGLVLIASFQYLQKCSYDEHAKL VQEVTFDAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCCTKQEPER NECFLOHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPEL LYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERA FKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDILLECADDRAEALAKYMCE NQATISSKLQTCDDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEA KDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQ PLVEEPKPNLVKTNC DLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVG TKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSA LTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQATALAELVKHKPKATAEQLK VMDDFQAQFLDTCCKAADKDTCTFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSAPTSSSTSSSTA EAQQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRLMTFKFYLPKQATELKD LQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNTFECQFDES ATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQHSHHHHH
187	LAIR30.w.A	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVCSYSDKHDLYNMVRLEKGGSTFMEKSTEP YKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERSKTLELKVIKENVIQTPAGPPTS DTSWLKTYSIY
188	LAIR30.w.B	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVCSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTSMKSTEP YKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERSKTLELKVIKENVIQTPAGPPTS DTSWLKTYSIY
189	LAIR30.w.C	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVCSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMGKSTEP YKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERSKTLELKVIKENVIQTPAGPPTS DTSWLKTYSIY
190	LAIR30.d.D	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVCSYSDKHDLYNMVRLAKDGSTFMEKSTEP YKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERSKTLELKVIKENVIQTPAGPPTS DTSWLKTYSIY
191	LAIR30.w.E	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVCSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMEKSTEP YKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERSKTLELKVIKENVIQTPAGPPTS DTSWLKTYSIY
192	LAIR30.w.F	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVCSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMEKSTEP YKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERAKTLELKVIKENVIQTPAGPPTS DTSWLKTYSIY

[1012]

193	LAIR30.2.K1.B	QEGSLPDITIFPNSSLVISQGTFTVTVCSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMEKSTAP YKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERSKTLELKVIKENVIQTPAPGPTS DTLWLKTYSIY
194	LAIR-MSA (LAIR 粗 体; (GGGS)1 斜体- IL-2-(H)6 虚 线下划线)	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVCSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMEKSTEP YKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERSKTLELKVIKENVIQTPAPGPTS DTSWLKTYSIY GGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKL VQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCCKQEPER NECFQLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPEL LYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERA FKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCGDLLECADDRAEALAKYMCE NQATISSKLQTCCKPLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEA KDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQ PLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVG TKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTCCSSGSLVERRPCFSA LTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKQTALAEVLKHKPKATAEQCLKT VMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSHHHHHH
195	4420 HC-LAIR (4420 HC 粗 体; mIgG1; (GGGS)3 斜 体; LAIR 下划 线)	DVKLDETGGGLVQPGRMKLSVASGFTFSDYWMNVWRQSPKEGLEWVAQIRNKPY NYETIYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGT SVTVS ATTKGPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVH TFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPC ICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHT AQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGR PKGGGSGGGSGGGSGGGSGEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVCSYSDKHDLYNM VRLEKDGSTFMEKSTEPYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERSKTLEL KVIKENVIQTPAPGPTSDTSWLKTYSIY
196	3/23 HC-LAIR (3/23 HC 粗 体; mIgG1; (GGGS)3 斜 体; LAIR 下划 线)	EVQLVESGGGLVQPGRLSLKLSAASGFTLSDYMAWVRQAPKKGLEWVASINYEES STYYGESVKGRFTISRDNASTLYLQMNLSRSEDATYYCVRHDNYFDYWGQGVIV TVSS ATTKGPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCI CTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHT AQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGR KGGGSGGGSGGGSGGGSGEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVCSYSDKHDLYNMV RLEKDGSTFMEKSTEPYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERSKTLEL VIKENVIQTPAPGPTSDTSWLKTYSIY
197	LOB12.3 HC-LAIR (LOB12.3 HC 粗体; mIgG1; (GGGS)3 斜 体; LAIR 下划 线)	DVQLVESGGGLVQPGRLSLKLSAASGFIFSYFDMAWVRQAPTKGLEWVASISPDGS IPYYRDSVKGRFTVSRENKSSLYLQMDLSRSEDATYYCARRSYGGYSEIDYWGQ GVM TVSSATTKGPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSS GVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGC KPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVE VHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISK KGRPKGGGSGGGSGGGSGGGSGEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVCSYSDKHD LYNMVRLEKDGSTFMEKSTEPYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERSKT LELKVIKENVIQTPAPGPTSDTSWLKTYSIY
198	OX86 HC-LAIR (OX86 HC 粗体; mIgG1; (GGGS)3 斜 体; LAIR 下划 线)	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTGYNLHWVRQPPGKGLEWMGRMRYDGD TYYNVSLKSRLSISRDTSKNQVFLKMNSLQTDATYYCTRDRGDSFDYWGQGV VTV SSATTKGPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVH TFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPC ICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHT AQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGR PKGGGSGGGSGGGSGGGSGEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVCSYSDKHDLYNM VRLEKDGSTFMEKSTEPYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERSKTLEL KVIKENVIQTPAPGPTSDTSWLKTYSIY
199	2C11 HC-LAIR (2C11 HC 粗 体; mIgG1; (GGGS)3 斜 体; LAIR 下划 线)	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFSGYGMHWVRQAPGRGLESVAYITSSSI NIKYADAVKGRFTVSRDNKNLLFLQMNILKSEDAMYYCARFDWDKNYWGQGT MV TVSSATTKGPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCI CTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHT AQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGR KGGGSGGGSGGGSGGGSGEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVCSYSDKHDLYNMV RLEKDGSTFMEKSTEPYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERSKTLEL VIKENVIQTPAPGPTSDTSWLKTYSIY

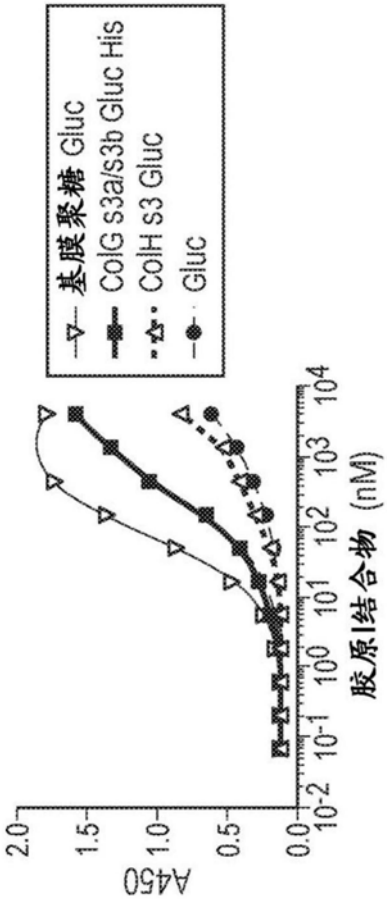


图1A

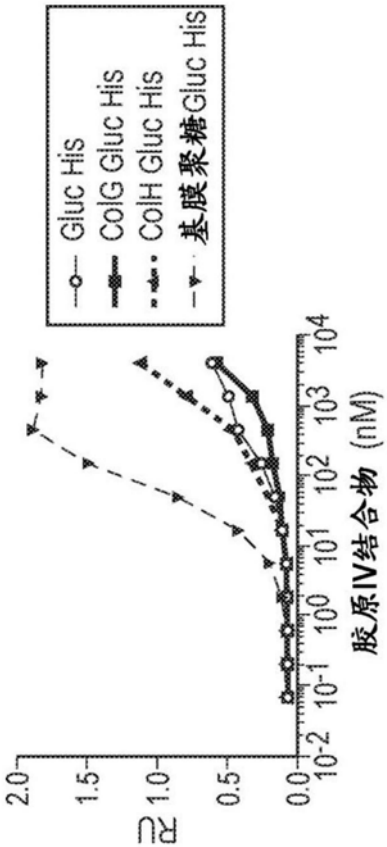


图1B

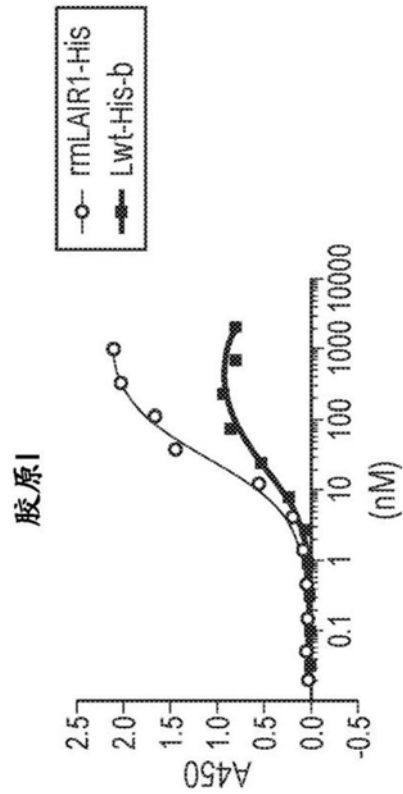


图1C

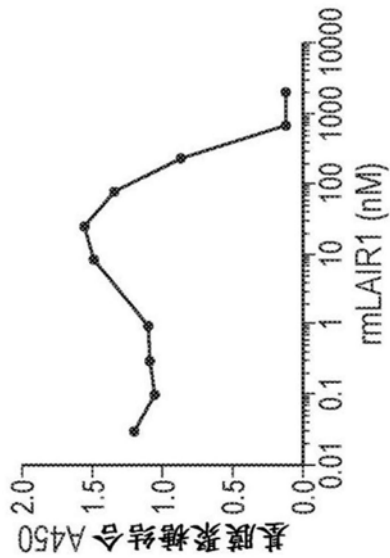


图1D

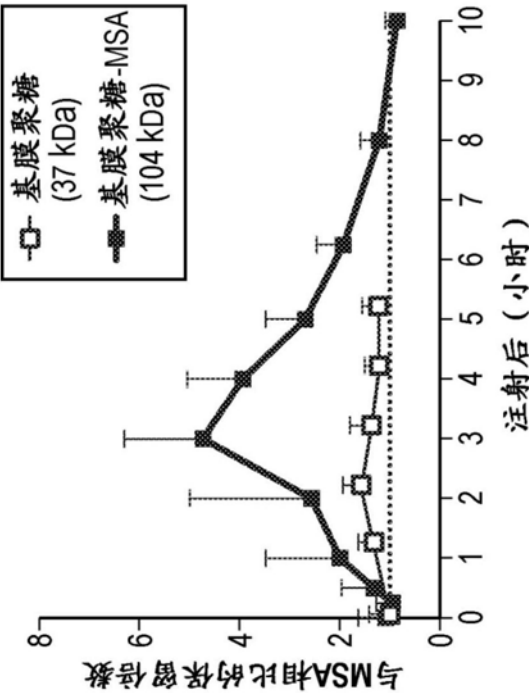


图2A

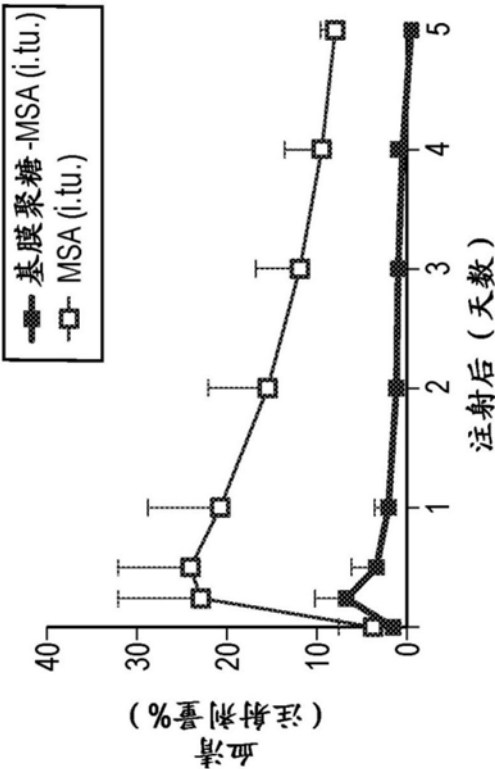


图2B

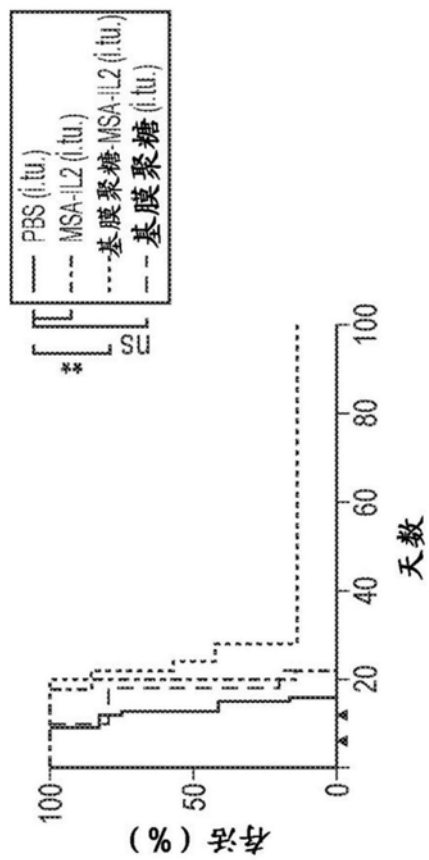


图3A

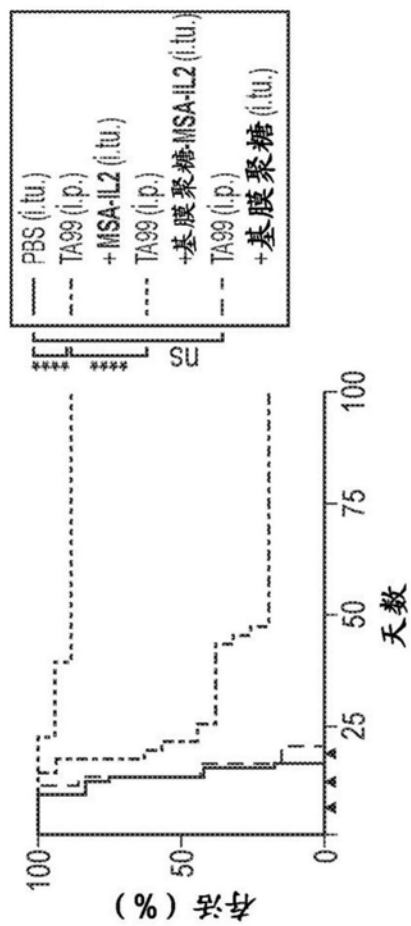


图3B

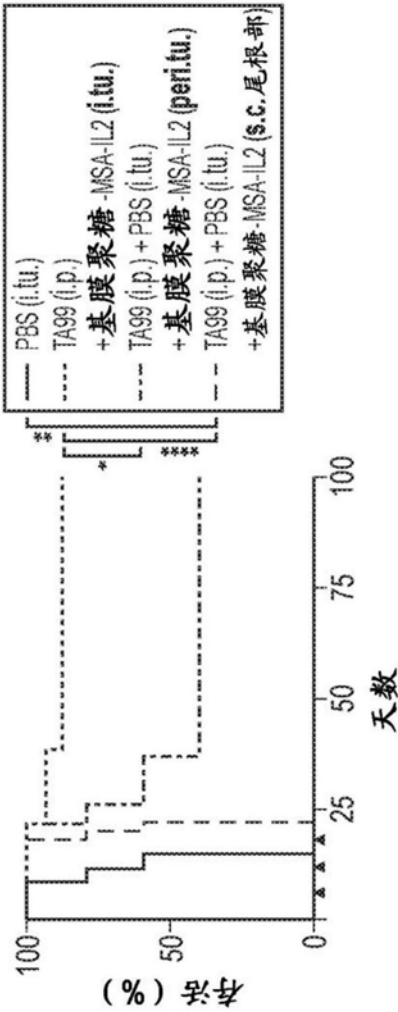


图3C

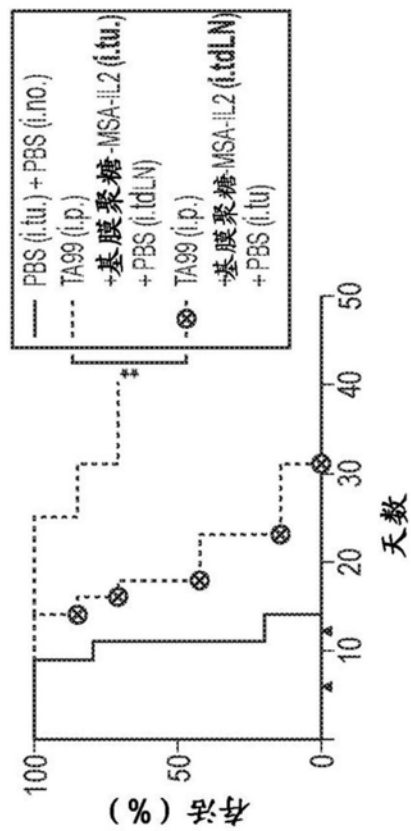


图3D

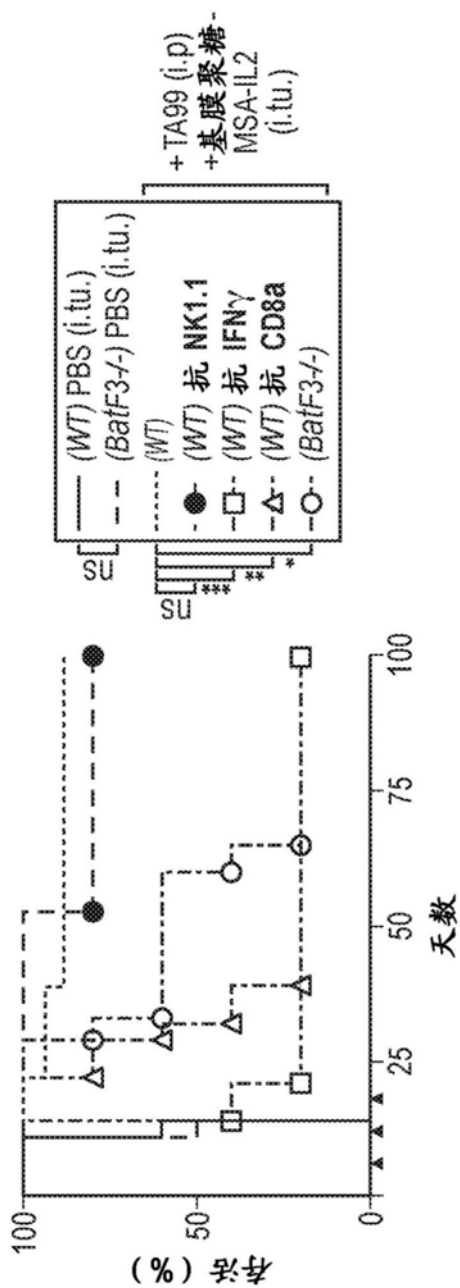


图4

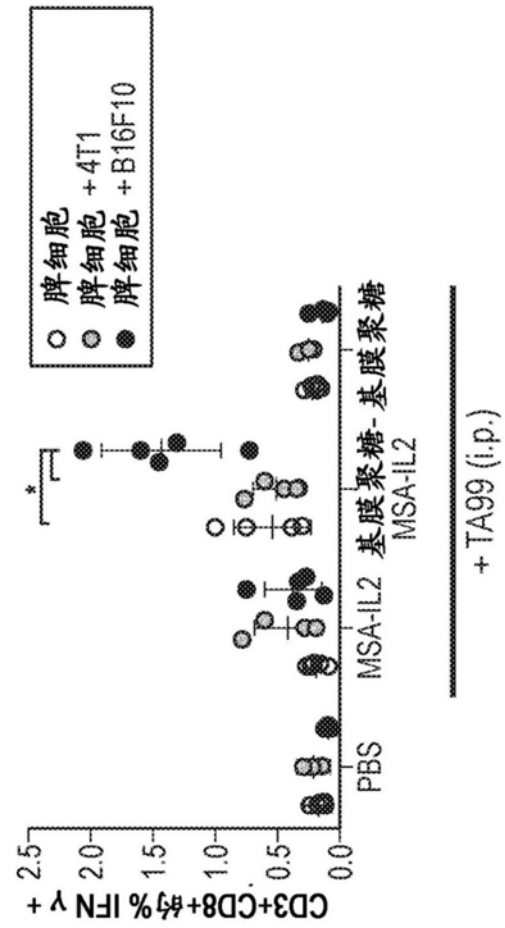


图5A

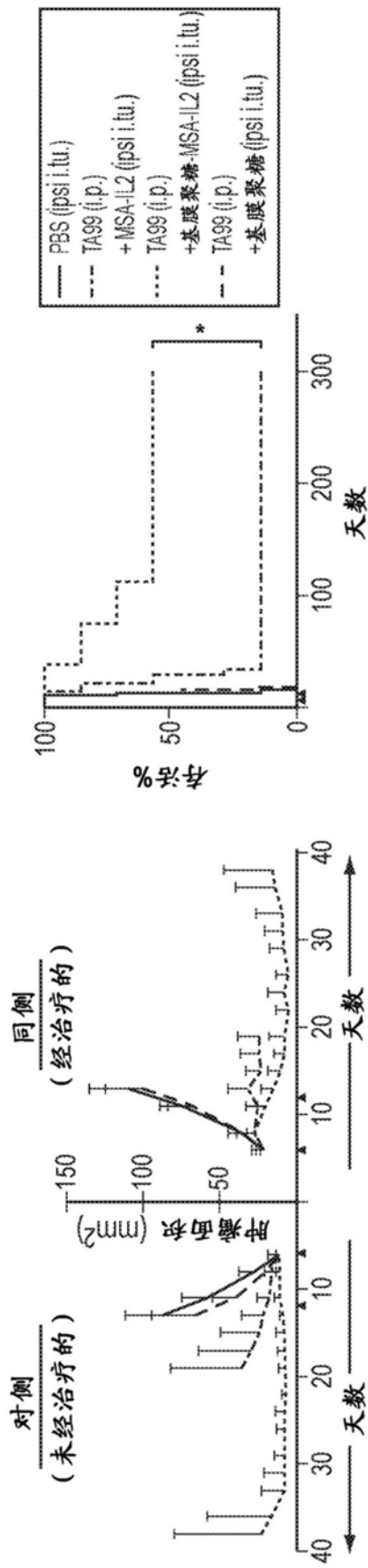


图5B

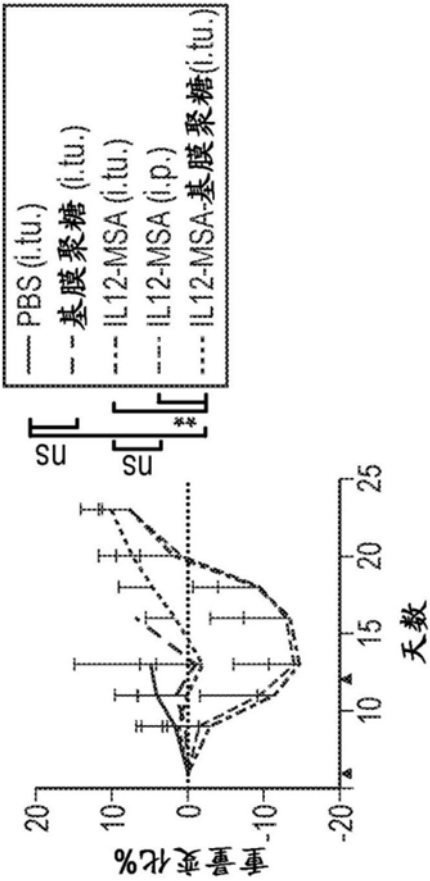


图6A

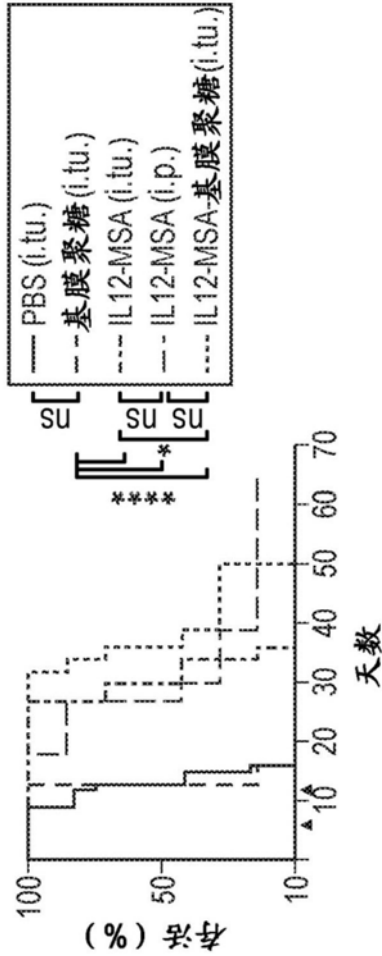


图6B

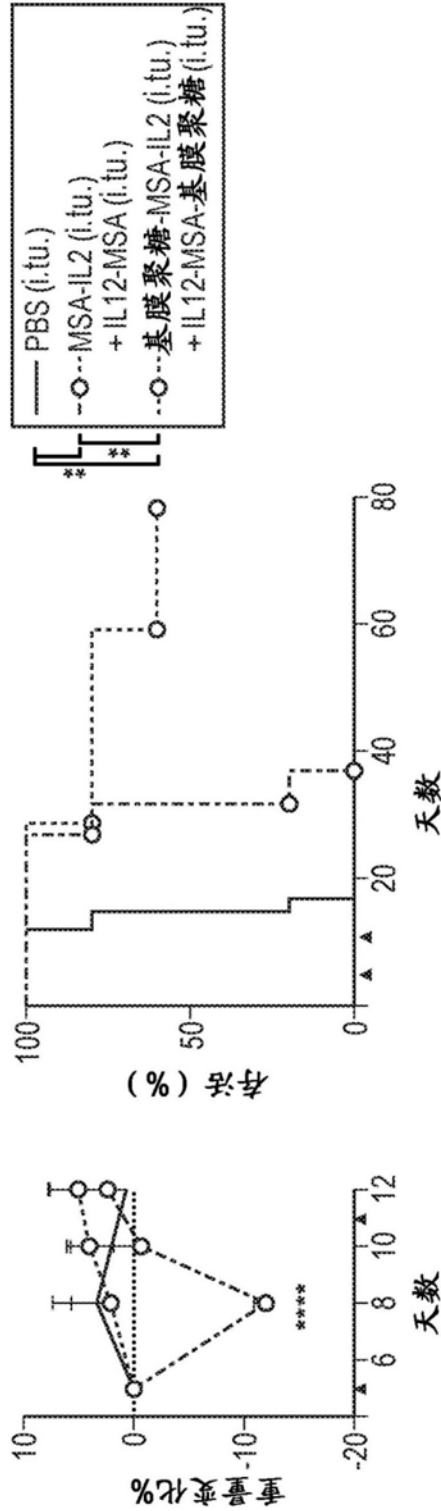


图7

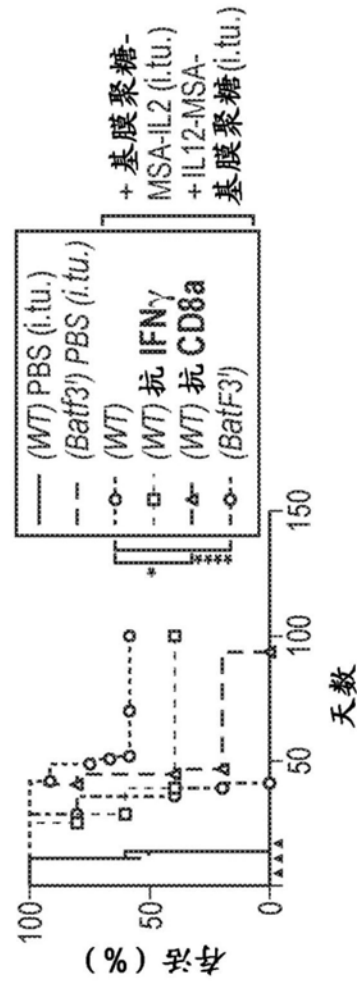


图8A

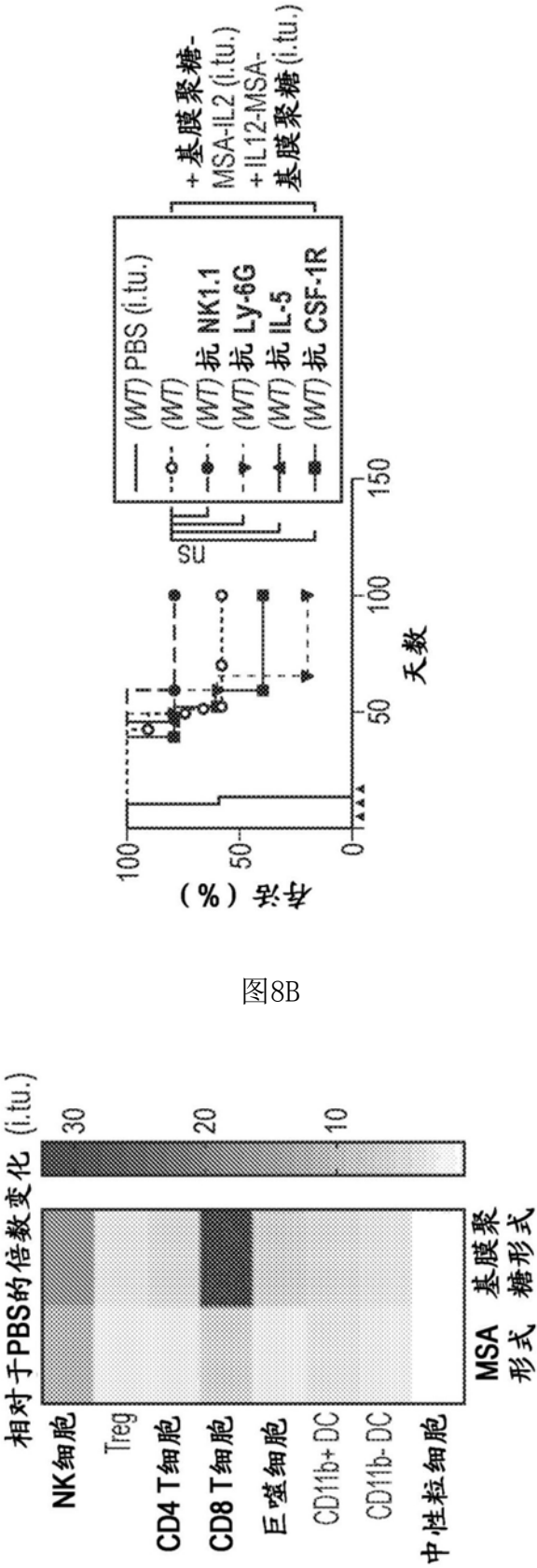


图8C

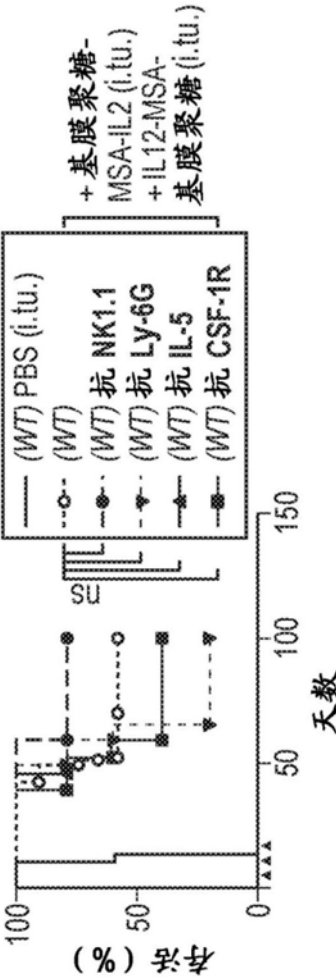
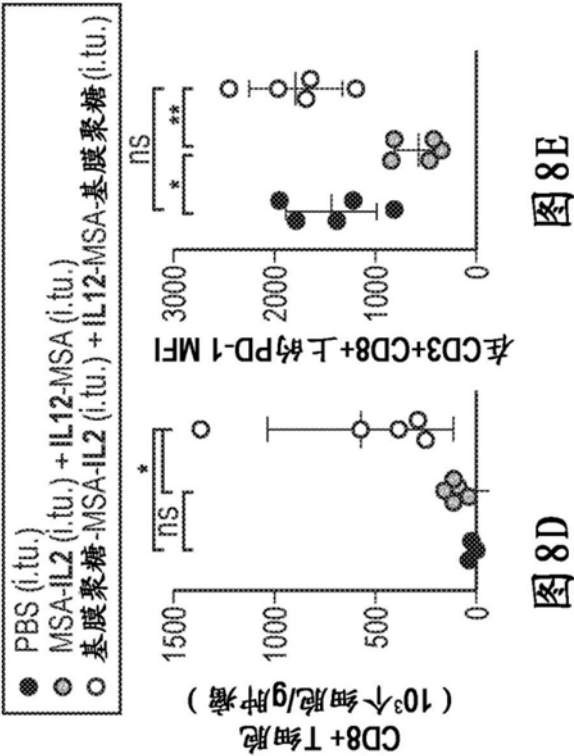


图8B



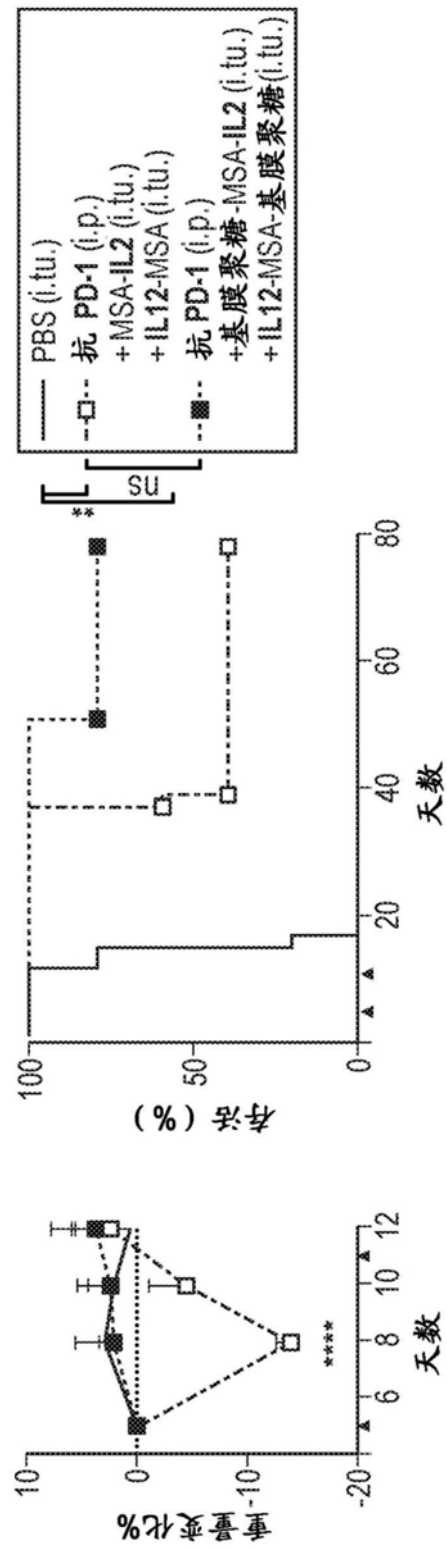


图9

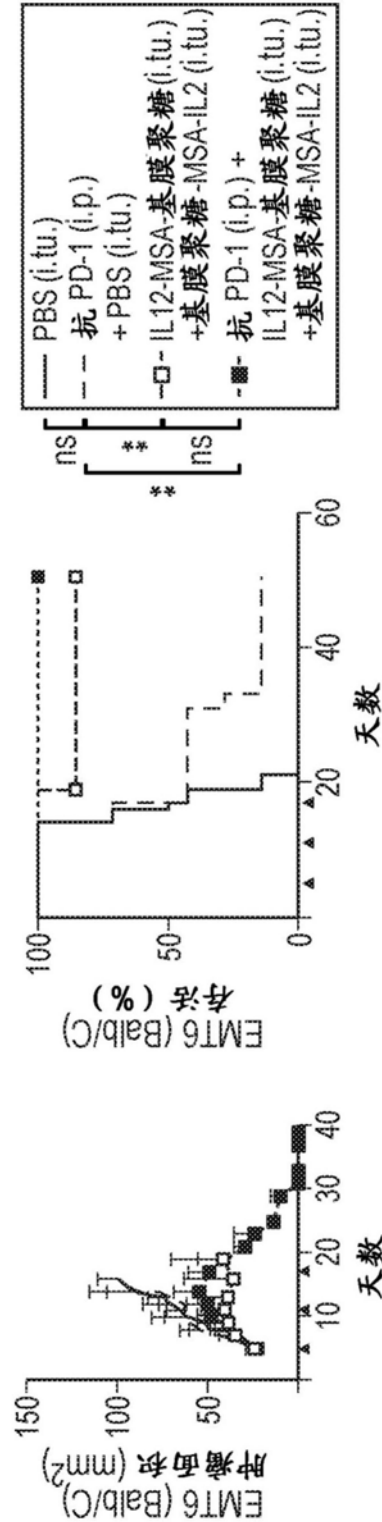


图10A

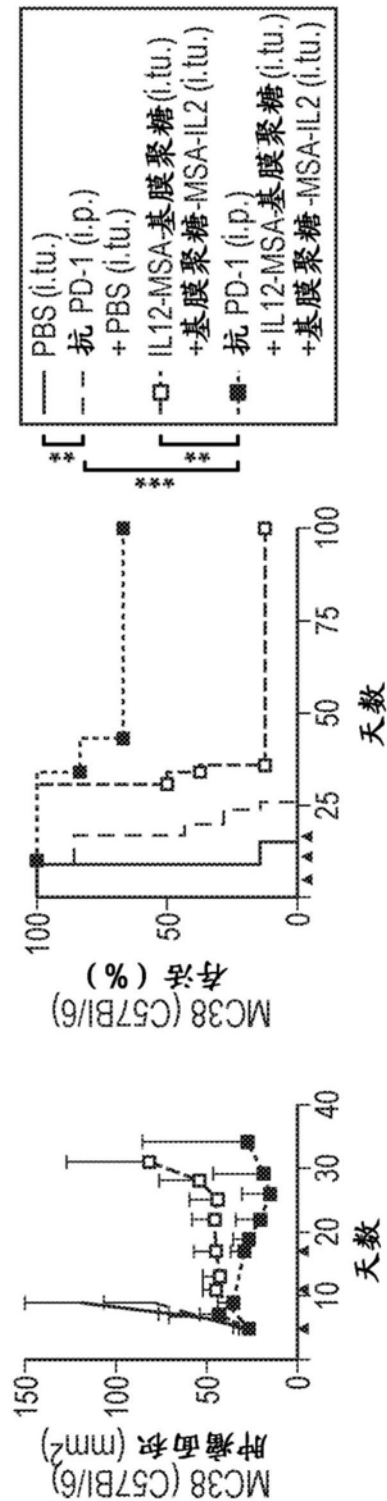


图10B

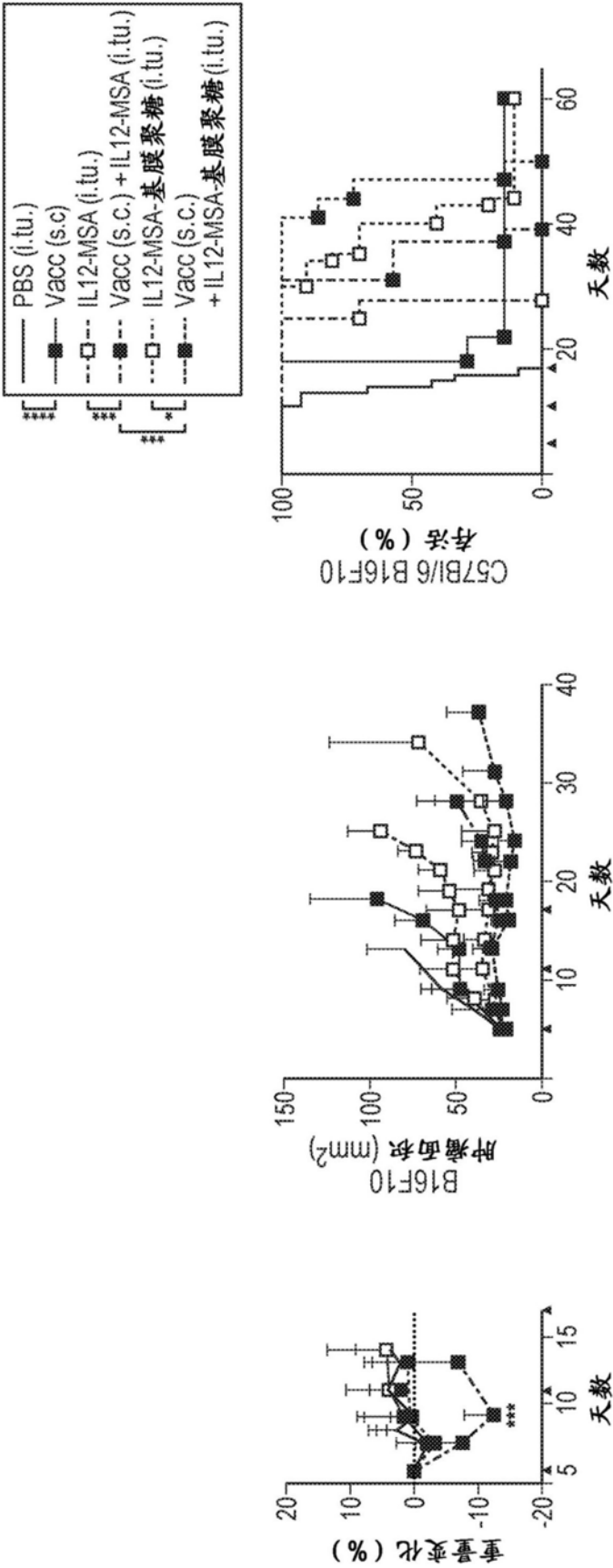


图11

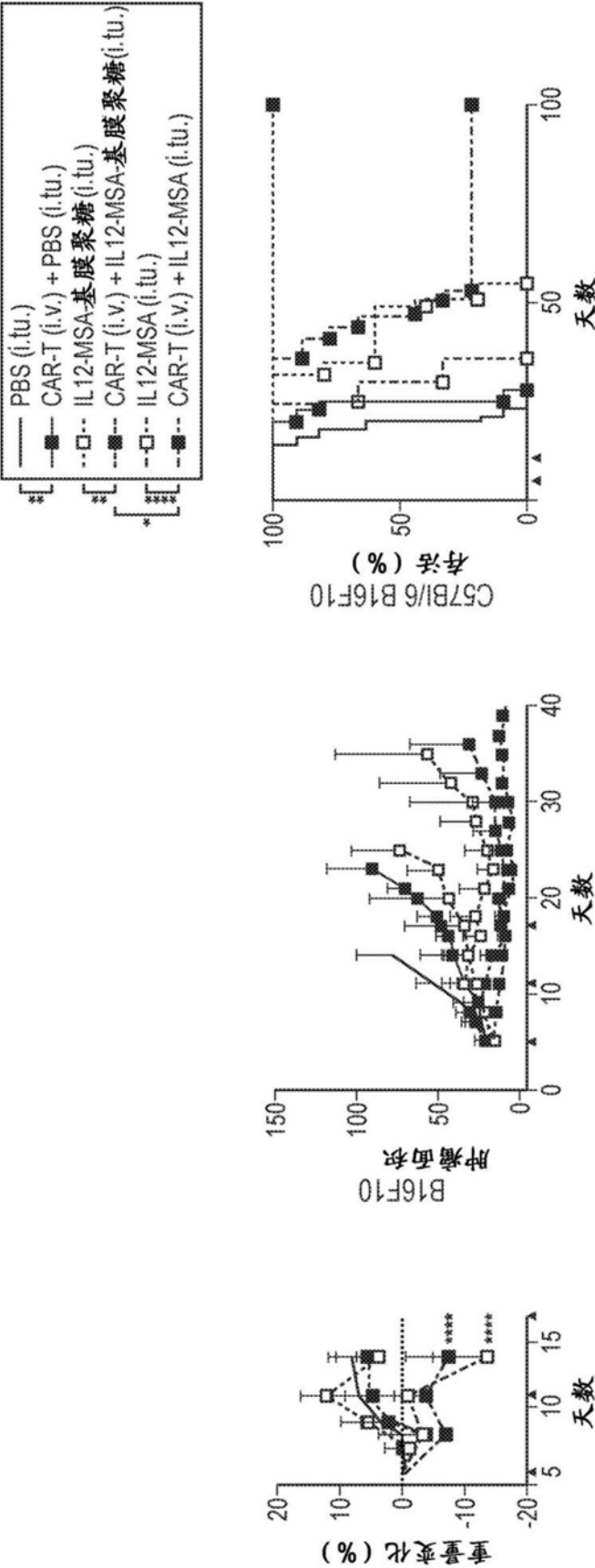


图12

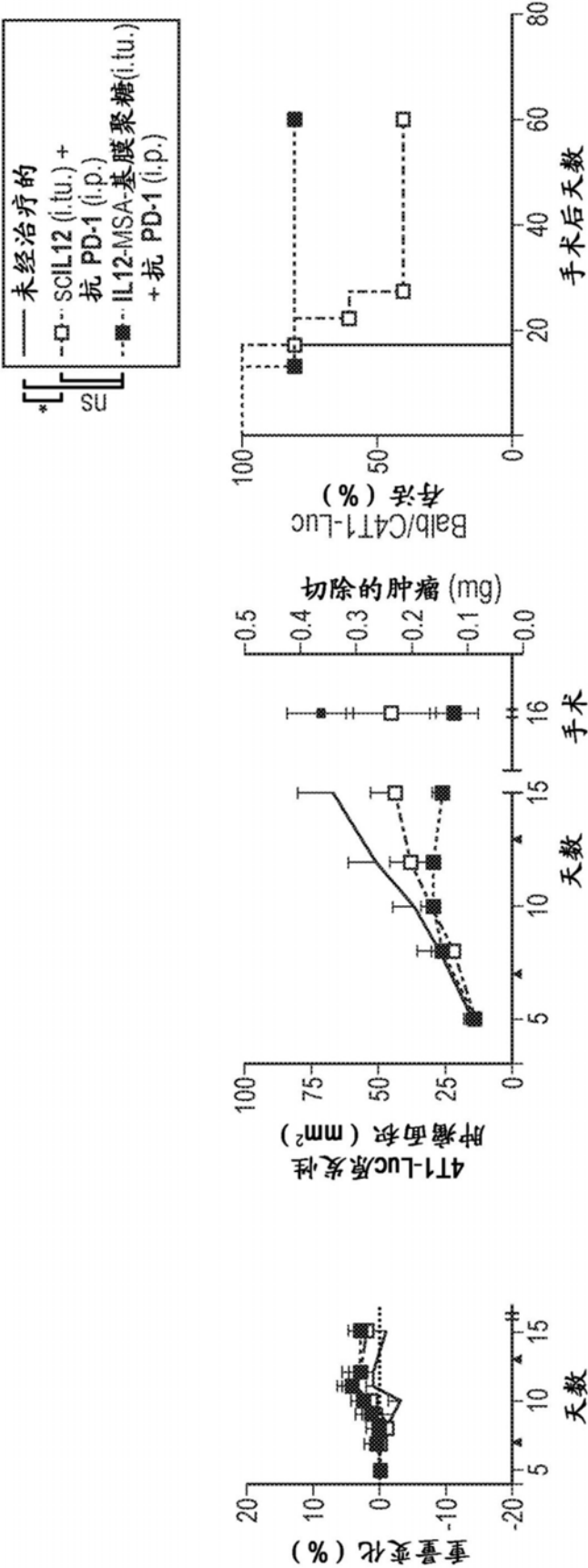


图13

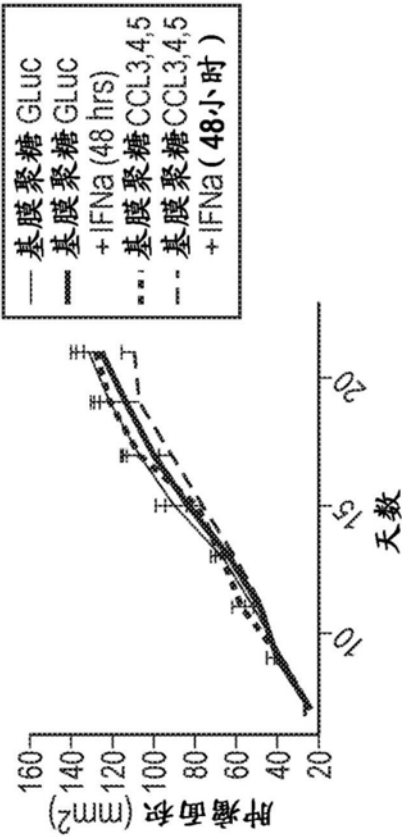


图14A

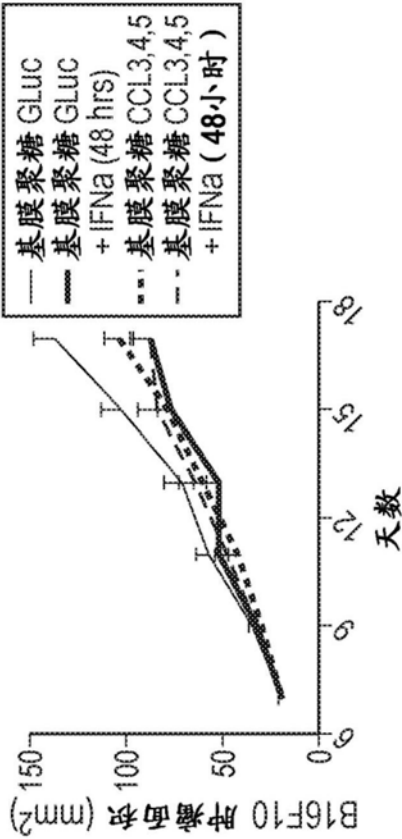


图14B

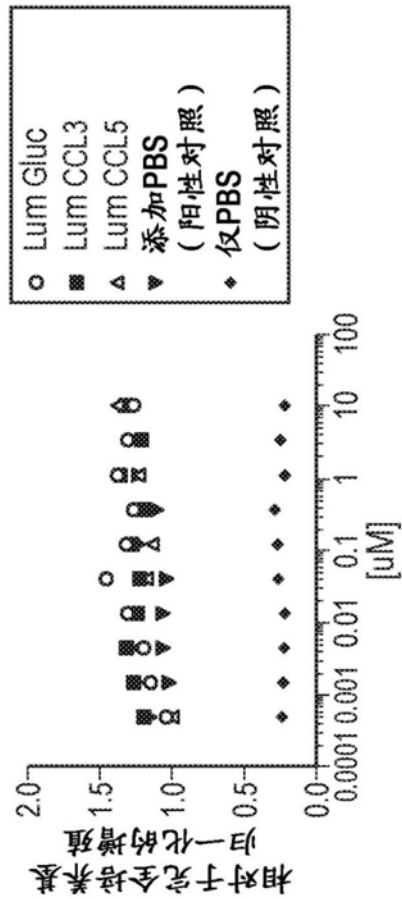


图14C

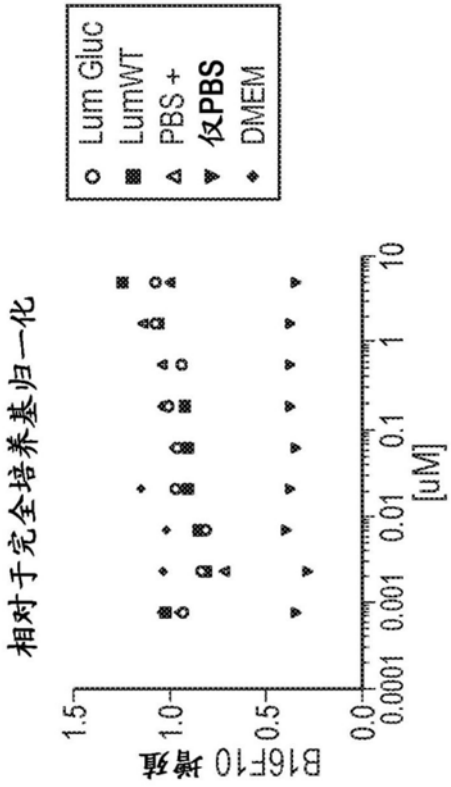


图14D

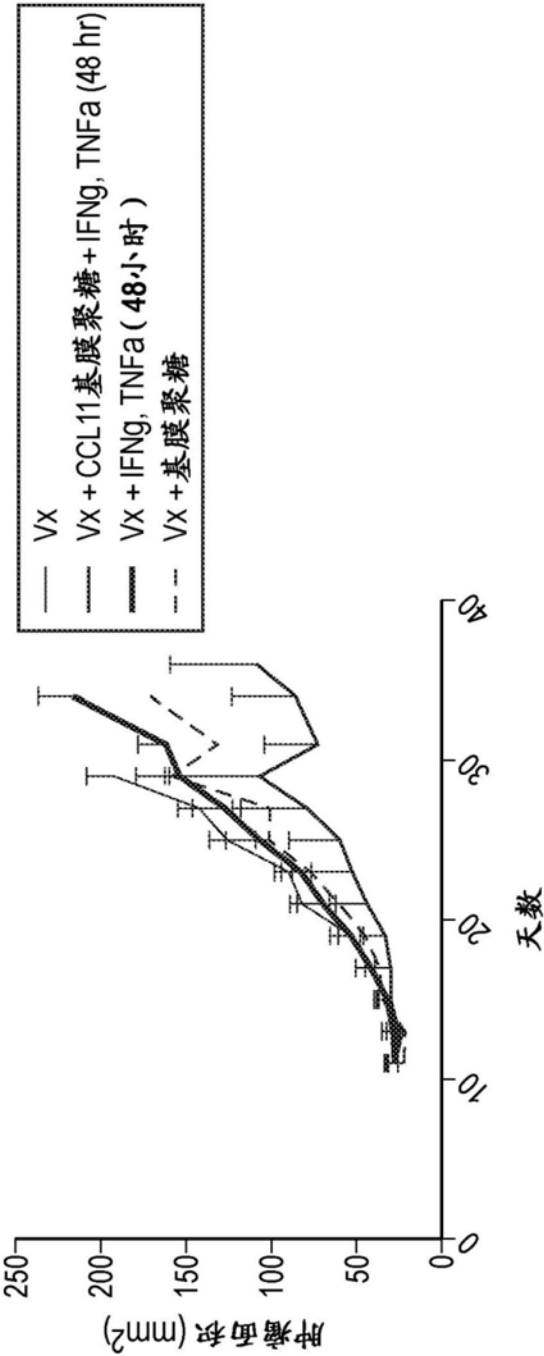


图15

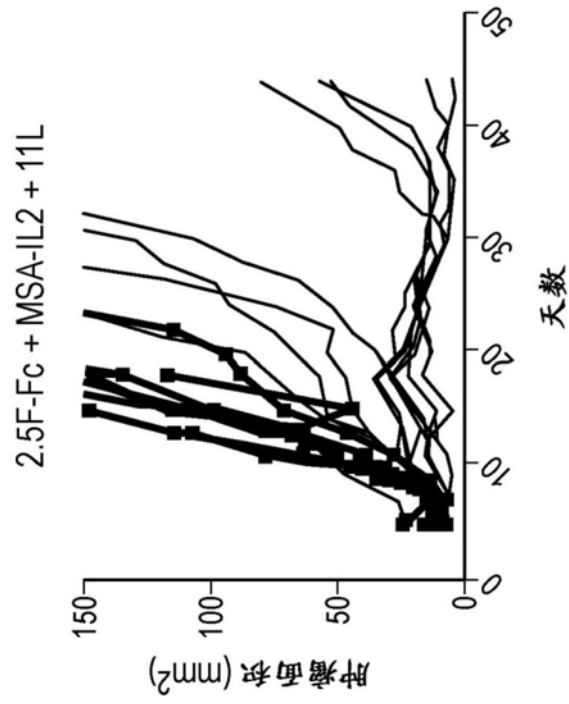


图16A

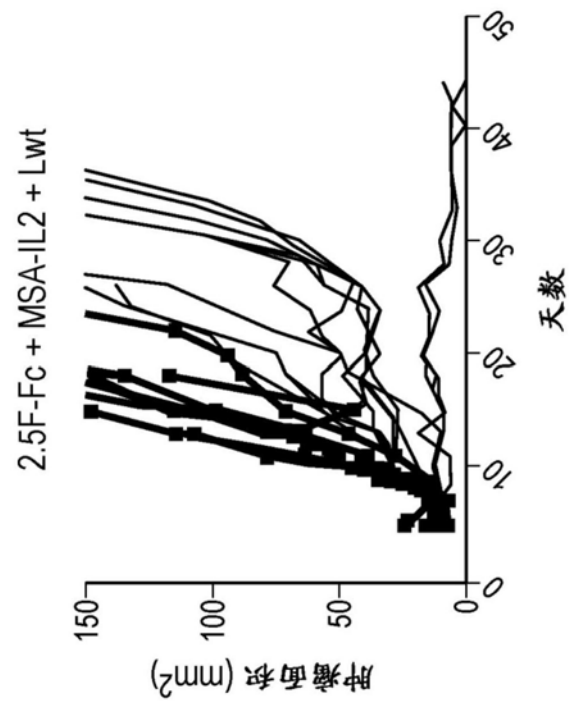


图16B

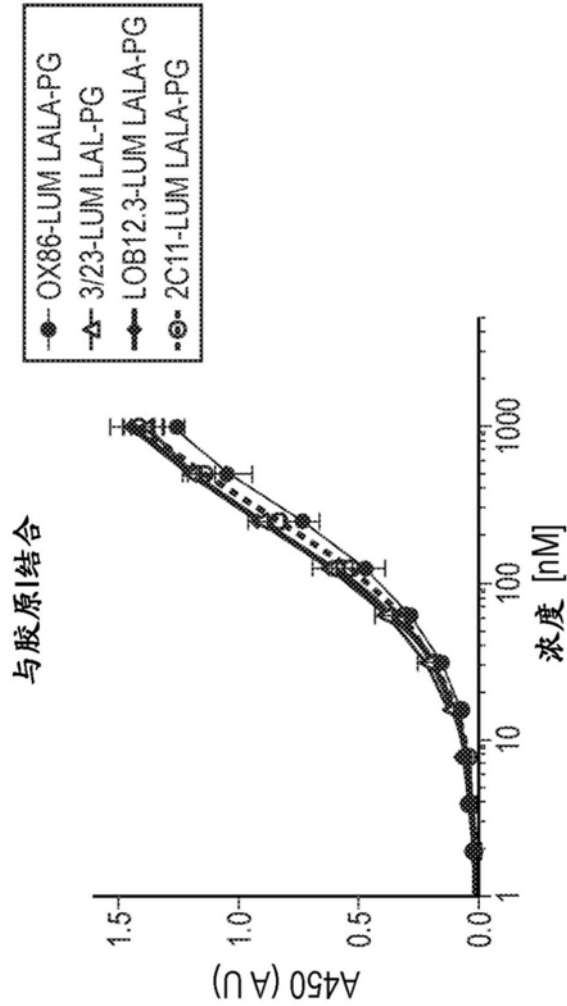


图17A

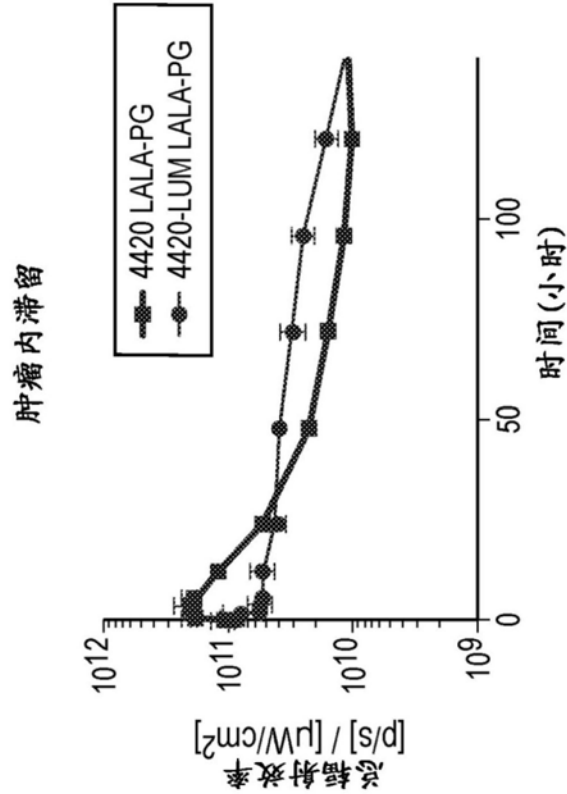


图17B

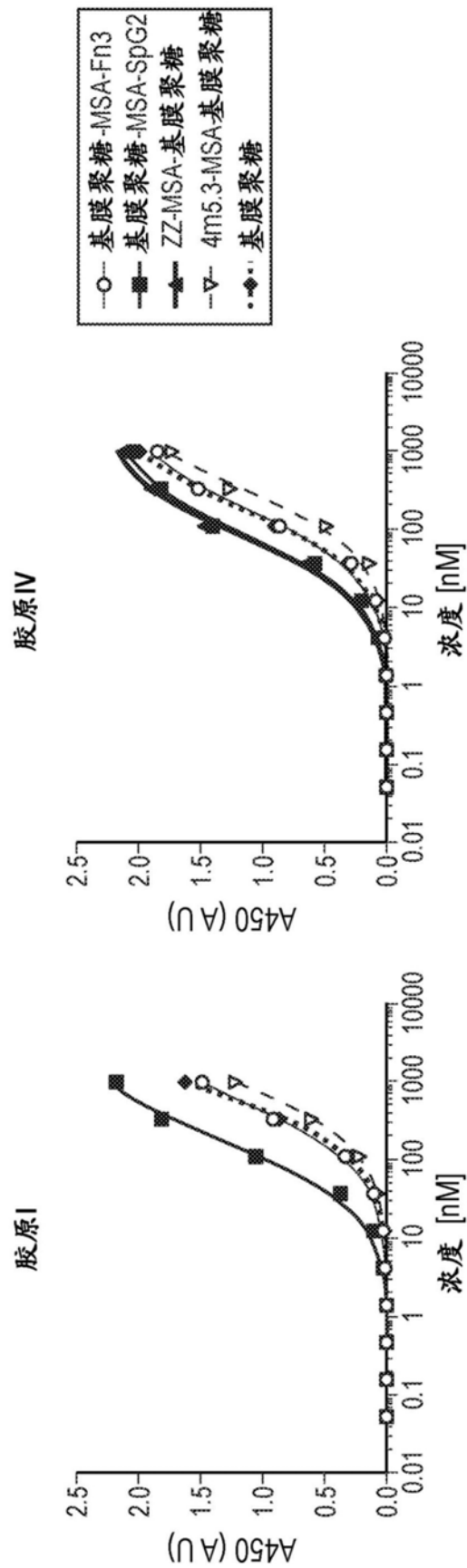


图18A

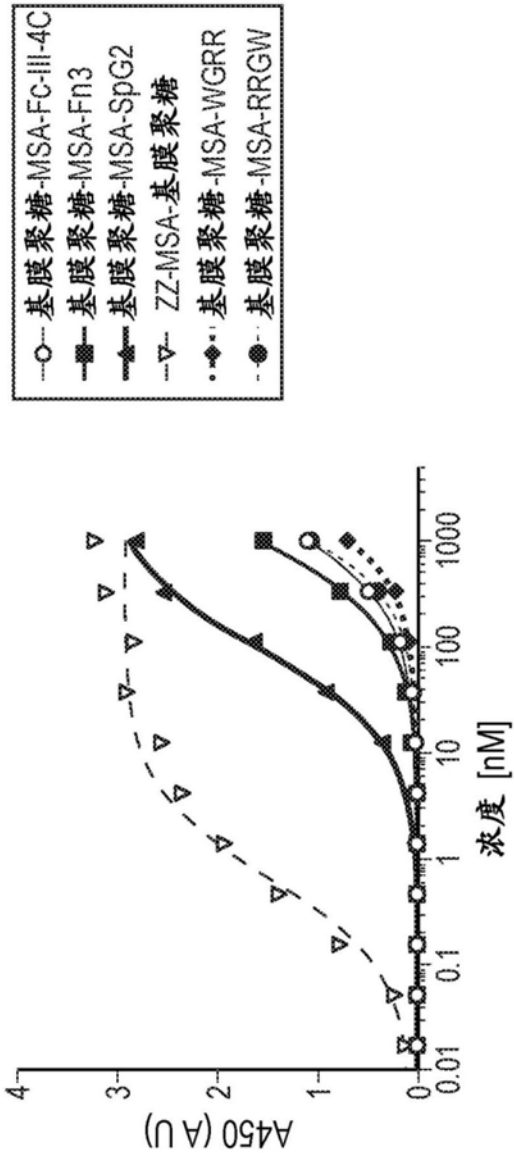


图18B

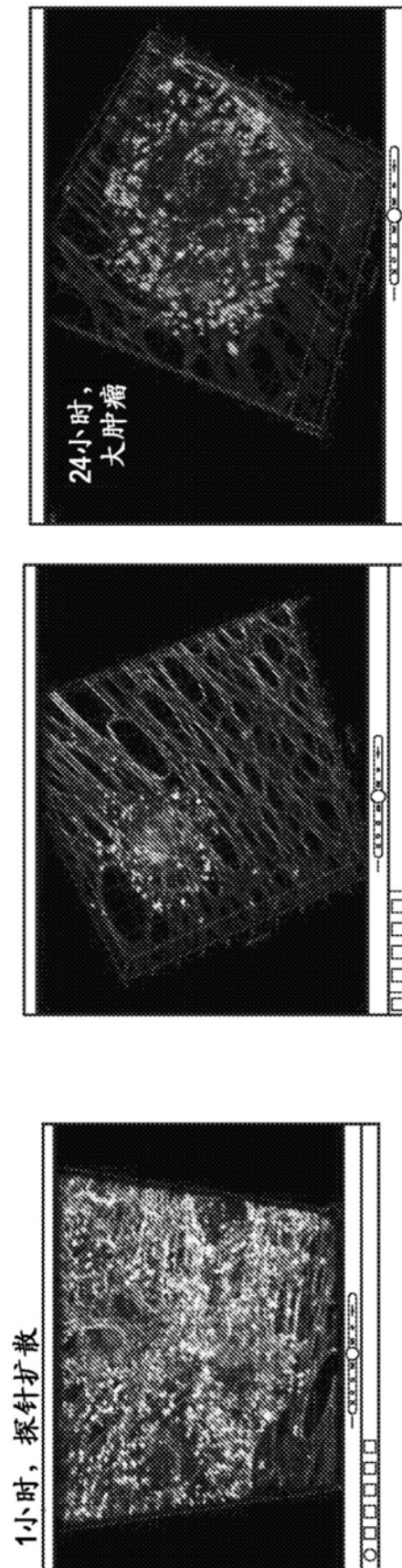


图19

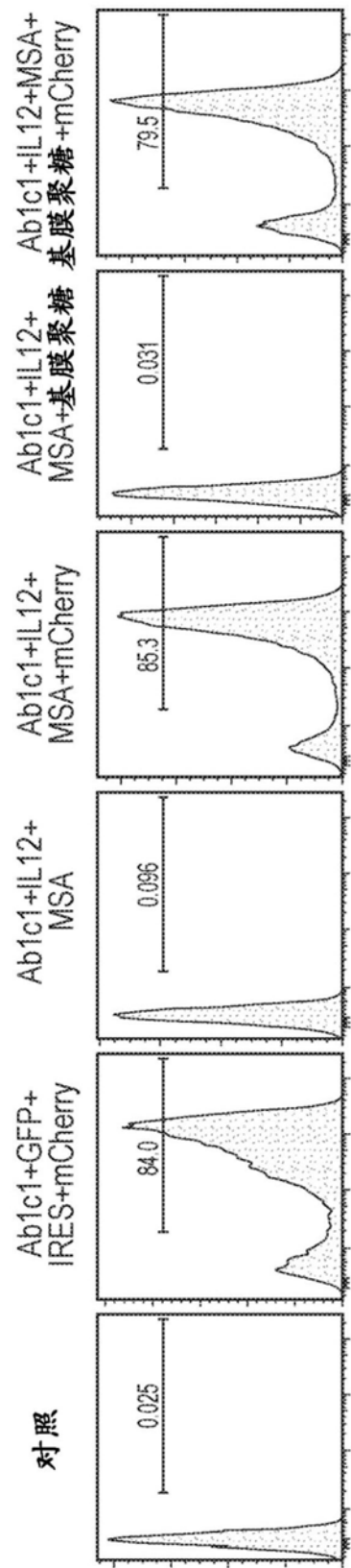


图20A

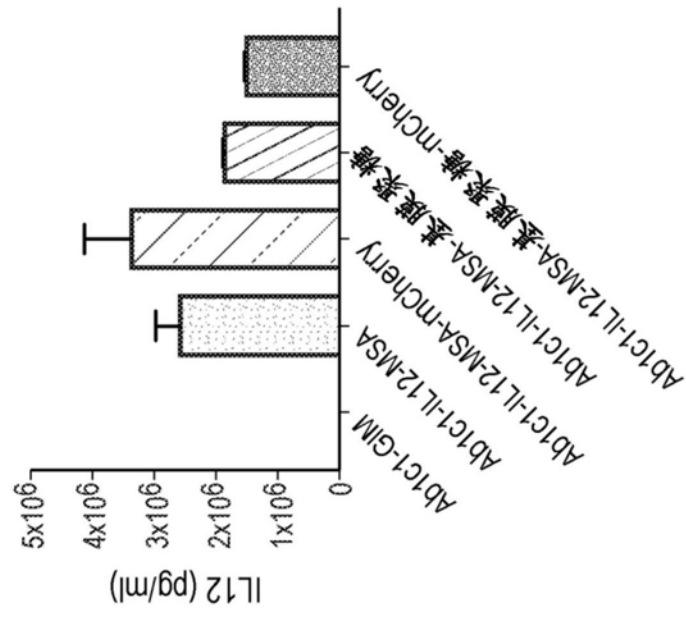


图20B

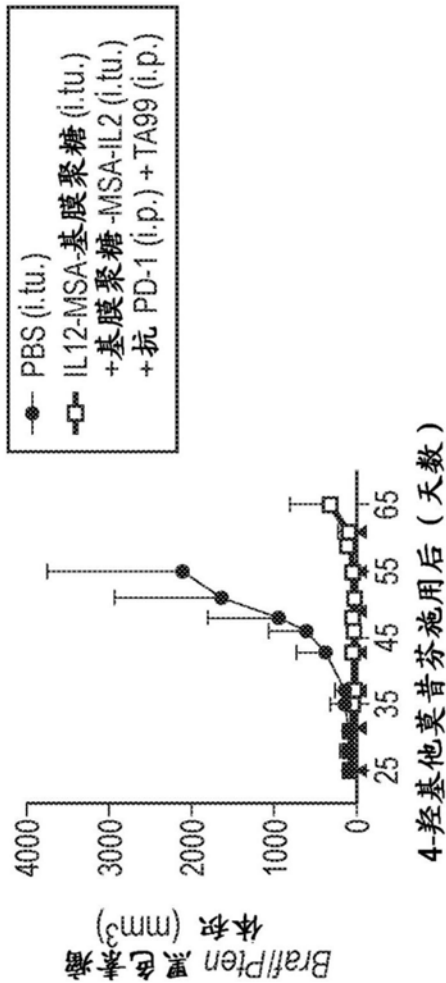


图21A

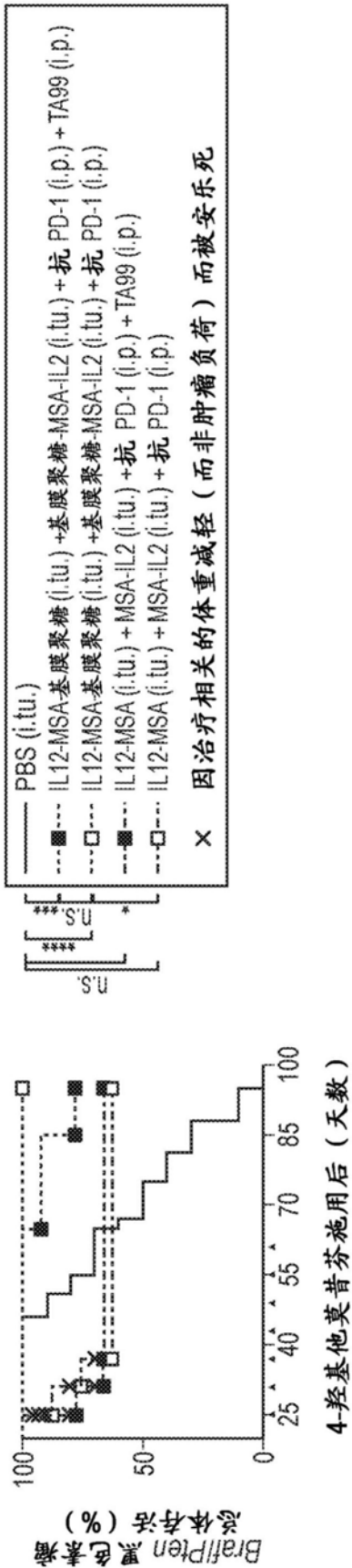


图21B

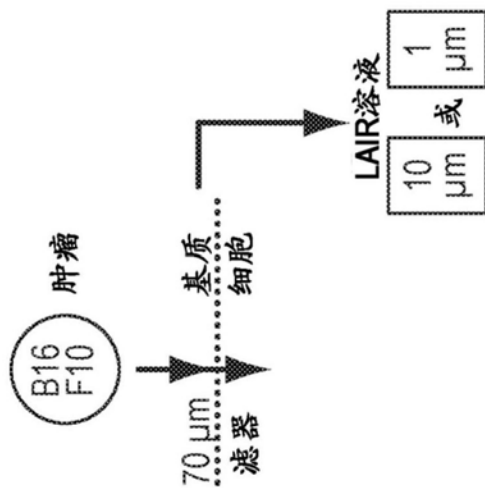


图22A

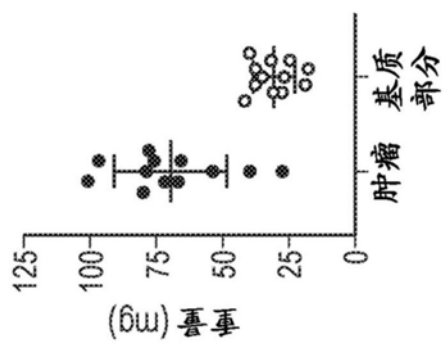


图22B

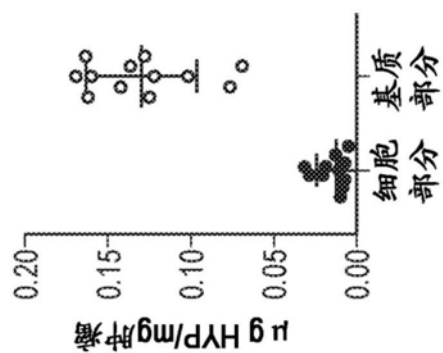


图22C

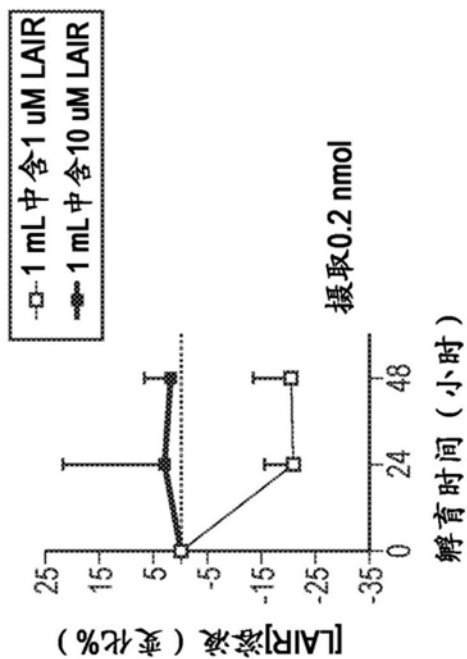


图22D

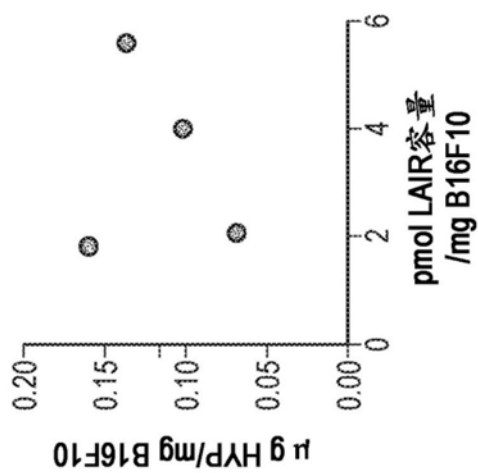


图22E

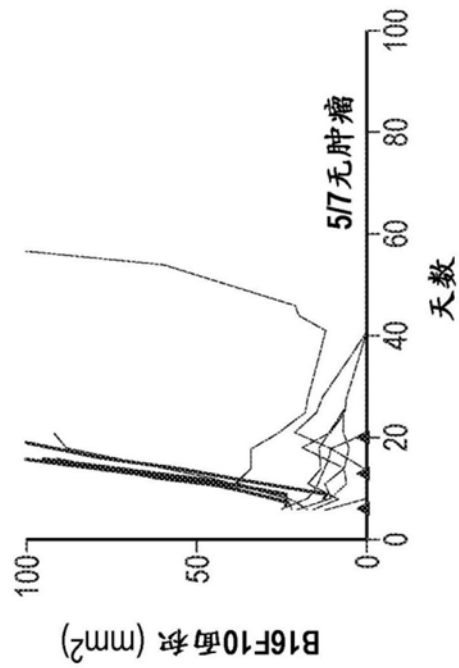


图23A

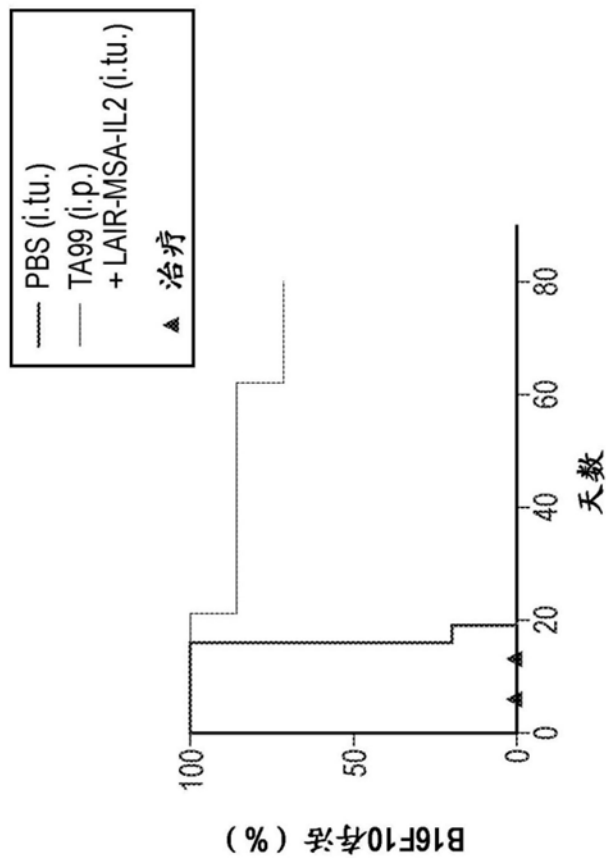


图23B

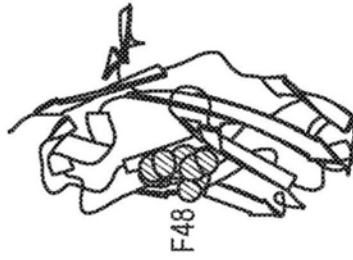


图24C

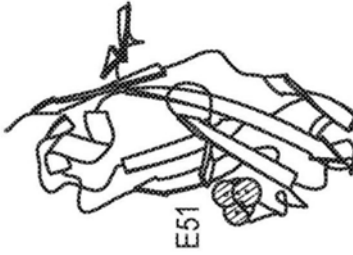


图24D

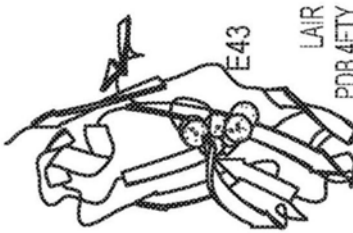


图24E

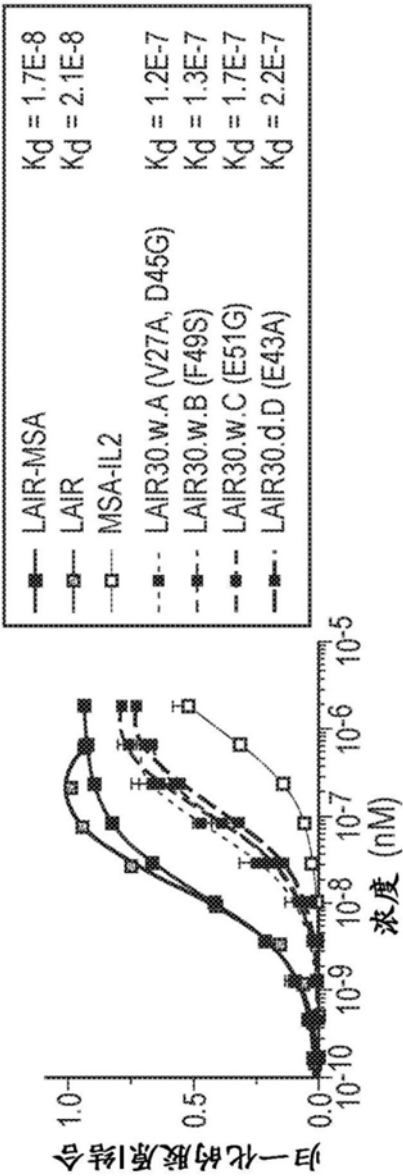


图24F

LAIR30.w.E LAIR30.w.F LAIR	QEGSLPDITIFPNSSLM ISQGTFTVWCYSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMEKSTE QEGSLPDITIFPNSSLM ISQGTFTVWCYSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMEKSTE QEGSLPDITIFPNSSLM ISQGTFTVWCYSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMEKSTE	6390	PYKTEDELEIGPVNETITGHYSCIYSGITWSERSKLTLELKVIKENVIQTPAPGPTSD PYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSGITWSERAKTLELKVIKENVIQTPAPGPTSD PYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSGITWSERSKLTLELKVIKENVIQTPAPGPTSD	TSWLKTYSIY TSWLKTYSIY TSWLKTYSIY
----------------------------------	--	------	---	--

图25A

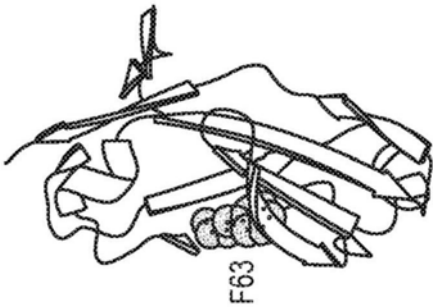


图25B

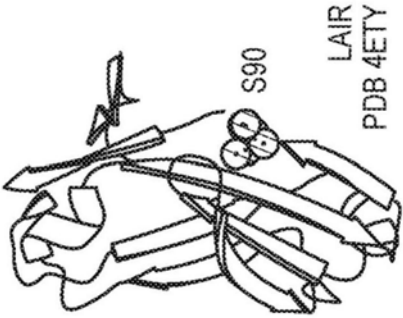


图25C

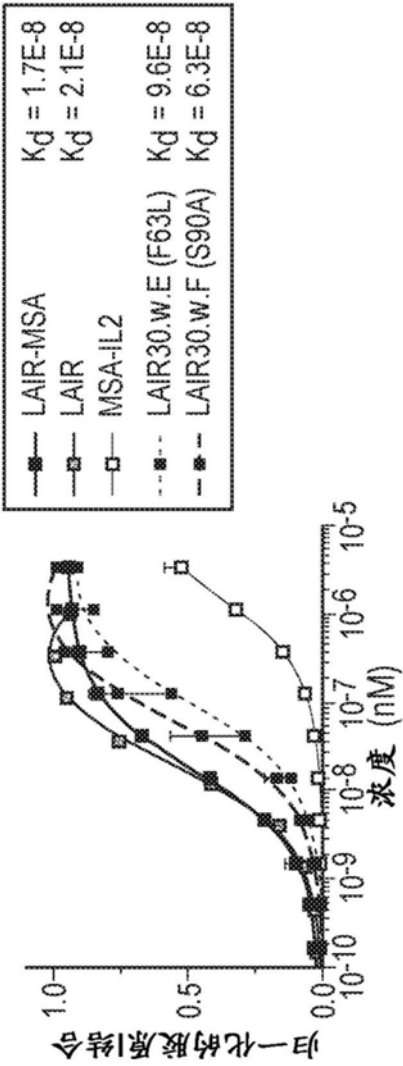


图25D

LAIR30.2.K1.B LAIR	17	QEGSLPDITIFPNSSLV	ISQGTFTVWCYSYDKHDLYNMVRLKDGSTFMEKSTA
		QEGSLPDITIFPNSSL■	ISQGTFTVWCYSYDKHDLYNMVRLKDGSTFMEKSTE
LAIR30.2.K1.B LAIR		PYKTEDEFEIGPVNETITGHYS	SCIYSGITWRSERSKTLELKVIKENVIQTPAPGPTSD
		PYKTEDEFEIGPVNETITGHYS	SCIYSGITWRSERSKTLELKVIKENVIQTPAPGPTSD
LAIR30.2.K1.B LAIR	115	TLWLKTSYIY	
		TSWLKTSYIY	

图26A

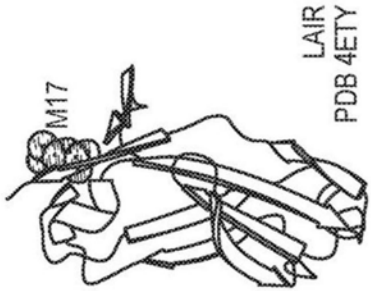


图26B

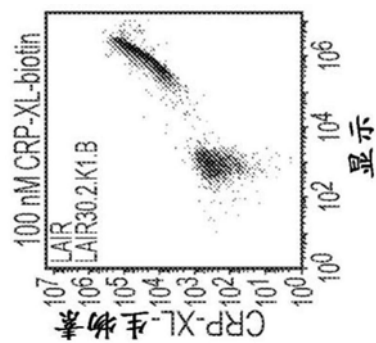


图26C

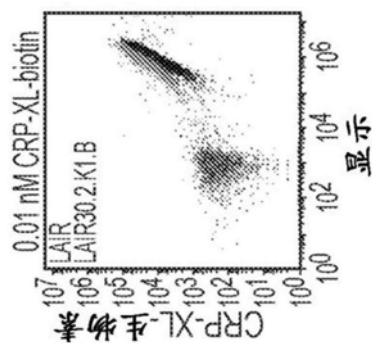


图26D

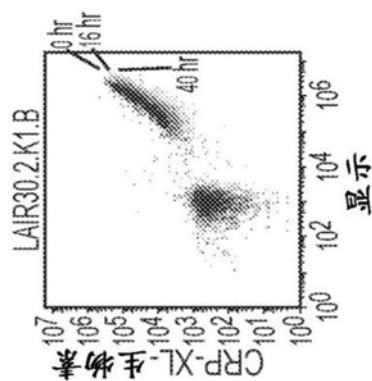


图26E

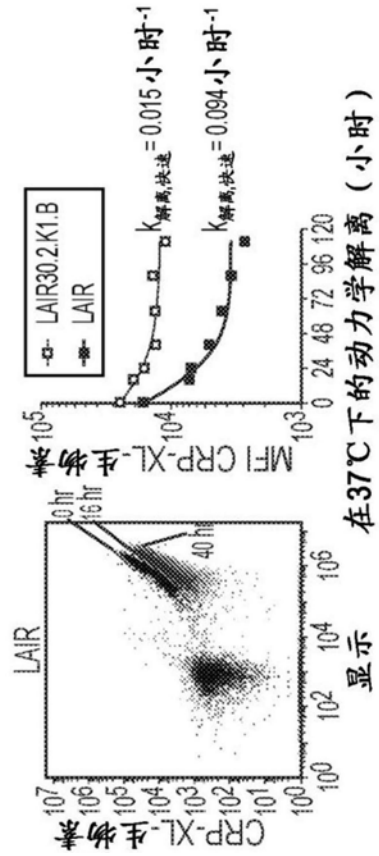


图26F

在37°C下的动力学解离 (小时)

图26G