(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107580499 A
(43)申请公布日 2018.01.12

(21)申请号 201680027143.9

(22)申请日 2016.03.17

(30)优先权数据
62/134,523 2015.03.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.11.10

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/022981 2016.03.17

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2016/149562 EN 2016.09.22

(71)申请人 欧姆尼奥克斯公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 S·P·L·卡里 A·克尔托利察
N·勒摩恩 J·A·温格
K·G·梁

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 王永伟 颜芳

(51)Int.Cl.
A61K 39/39(2006.01)
A61K 38/16(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/04(2006.01)

权利要求书7页 说明书52页
序列表20页 附图17页

(54)发明名称

通过蛋白质介导的O2递送调节肿瘤免疫性

(57)摘要

本发明提供了通过给予O_2载体多肽(例如,H-NOX蛋白)来调节低氧介导的肿瘤免疫性的方法。本发明的方法靶向肿瘤免疫性的低氧诱导因子1α(HIF-1α)途径和非HIF-1α途径。这种方法可用于治疗多种癌症,并且单独或或组合其它抗癌治疗应用。

CN 107580499 A

1.治疗个体的癌症的方法,包括向所述个体给予有效量的O_2载体多肽。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症是脑癌、成胶质细胞瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、黑素瘤、肺癌、子宫癌、卵巢癌、结肠直肠癌、肛门癌、肝癌、肝细胞癌、胃癌、睾丸癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食管癌、肠癌、甲状腺癌、肾上腺癌、膀胱癌、肾癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、肉瘤、或鳞状细胞癌。

3.调节携肿瘤个体的肿瘤免疫性的方法,包括向所述个体给予有效量的O_2载体多肽。

4.根据权利要求3所述的方法,其中调节肿瘤免疫性包括增强对肿瘤的免疫响应。

5.增加对个体的肿瘤的淋巴细胞浸润的方法,包括向所述个体给予有效量的O_2载体多肽。

6.根据权利要求5所述的方法,其中对肿瘤的淋巴细胞浸润增加包括CD4细胞、CD8细胞、或NK细胞中的一种或多种的浸润增加。

7.根据权利要求5或6所述的方法,其中对肿瘤的淋巴细胞浸润增加伴随有肿瘤中Treg细胞、肿瘤相关的巨噬细胞或骨髓衍生的抑制细胞中的一种或多种的抑制。

8.根据权利要求5-7中任一项所述的方法,其中对肿瘤的淋巴细胞浸润增加伴随有肿瘤细胞上的MHC1表达增加。

9.减少个体的肿瘤中的低氧诱导因子1α(HIF-1α)和/或2α(HIF-2α)的表达的方法,包括向所述个体给予有效量的O_2载体多肽。

10.减少个体的肿瘤中的程序性死亡配体-1(PD-L1)的表达的方法,包括向所述个体给予有效量的O_2载体多肽。

11.减少个体的肿瘤中的A2A腺苷受体(A2AR)的表达的方法,包括向所述个体给予有效量的O_2载体多肽。

12.根据权利要求3-11中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是脑肿瘤、成胶质细胞瘤、骨肿瘤、胰肿瘤、皮肤肿瘤、头或颈肿瘤、黑素瘤、肺肿瘤、子宫肿瘤、卵巢肿瘤、结肠直肠肿瘤、肛门肿瘤、肝肿瘤、肝细胞癌、胃肿瘤、睾丸肿瘤、子宫内膜肿瘤、子宫颈肿瘤、阴道肿瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、食管肿瘤、肠肿瘤、甲状腺肿瘤、肾上腺肿瘤、膀胱肿瘤、肾肿瘤、乳腺肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肉瘤、或鳞状细胞肿瘤。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述个体是哺乳动物。

14.根据权利要求13所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

15.根据权利要求14所述的方法,其中所述哺乳动物是宠物、实验室研究动物、或农场动物。

16.根据权利要求15所述的方法,其中所述宠物、研究动物或农场动物是狗、猫、马、猴、兔、大鼠、小鼠、豚鼠、仓鼠、猪、或牛。

17.根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述O_2载体多肽通过静脉内、动脉内、肿瘤内、囊内、吸入、腹膜内、肺内、肌内、皮下、气管内、经粘膜、眼内、鞘内、或经皮给予被给予。

18.根据权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述O_2载体多肽的给予重复进行。

19.根据权利要求18所述的方法,其中所述O_2载体多肽的给予一日一次、一日两次或一周约1-4次重复进行约4周至约8周。

20.根据权利要求18或19所述的方法,其中所述O_2载体多肽每4小时、每8小时、每12小时

或每24小时被给予，给予约1至约10天的时期。

21.根据权利要求1-20中任一项所述的方法，其中所述O_2载体多肽被弹丸式给予。

22.根据权利要求1-20中任一项所述的方法，其中所述O_2载体多肽通过输注被给予。

23.根据权利要求22所述的方法，其中所述O_2载体多肽在个体中被输注约15分钟、约30分钟、约1小时、约2小时、约3小时、约6小时、约12小时或约24小时。

24.根据权利要求1-23中任一项所述的方法，其中所述O_2载体多肽与放射治疗组合给予。

25.根据权利要求24所述的方法，其中所述放射治疗在给予所述O_2载体多肽后1、2、3、4、5、6、8、10、12、14、16、18、20或24小时被给予所述个体。

26.根据权利要求24或25所述的方法，其中所述放射是X-放射。

27.根据权利要求26所述的方法，其中约0.5戈瑞至约75戈瑞的X-放射被给予。

28.根据权利要求24-27中任一项所述的方法，其中所述O_2载体多肽的给予和/或所述放射的给予重复进行。

29.根据权利要求28所述的方法，其中所述给予重复约2次至约40次之间或更多的任何次数。

30.根据权利要求28或29所述的方法，其中所述给予在1周、2周、3周、或4周或更久后重复进行。

31.根据权利要求1-23中任一项所述的方法，其中所述O_2载体多肽与化学治疗或免疫治疗组合给予。

32.根据权利要求31所述的方法，其中所述化学治疗包括细胞毒素。

33.根据权利要求32所述的方法，其中所述O_2载体多肽的给予和/或所述化学治疗的给予重复进行。

34.根据权利要求31所述的方法，其中所述免疫治疗是抗癌疫苗、过继性免疫细胞治疗或靶向免疫检查点调节因子的药剂中的一种或多种。

35.根据权利要求31或34所述的方法，其中所述免疫治疗靶向CTLA-4、PD1、PD-L1、或免疫检查点调节因子中的一种或多种。

36.根据权利要求31或34所述的方法，其中所述过继性免疫治疗是嵌合抗原受体表达T细胞或工程TCR-T细胞。

37.根据权利要求31或34-36中任一项所述的方法，其中所述O_2载体多肽的给予和/或所述免疫治疗的给予重复进行。

38.根据权利要求1-37中任一项所述的方法，其中所述O_2载体多肽在药物组合物中。

39.根据权利要求38所述的方法，其中所述药物组合物进一步包括药学上可接受的载体。

40.根据权利要求1-39中任一项所述的方法，其中所述O_2载体多肽是H-NOX蛋白。

41.治疗个体的癌症的方法，包括向所述个体给予有效量的H-NOX蛋白。

42.根据权利要求41所述的方法，其中所述癌症是脑癌、成胶质细胞瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、黑素瘤、肺癌、子宫癌、卵巢癌、结肠直肠癌、肛门癌、肝癌、肝细胞癌、胃癌、睾丸癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食管癌、肠癌、甲状腺癌、肾上腺癌、膀胱癌、肾癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、肉瘤、或鳞状细胞癌。

43.调节携肿瘤个体的肿瘤免疫性的方法，包括向所述个体给予有效量的H-NOX蛋白。

44.根据权利要求43所述的方法，其中调节肿瘤免疫性包括增强对肿瘤的免疫响应。

45.增加对个体的肿瘤的淋巴细胞浸润的方法，包括向所述个体给予有效量的H-NOX蛋白。

46.根据权利要求45所述的方法，其中对肿瘤的淋巴细胞浸润增加包括CD4细胞、CD8细胞、或NK细胞中的一种或多种的浸润增加。

47.根据权利要求45或46所述的方法，其中对肿瘤的淋巴细胞浸润增加伴随有肿瘤中Treg细胞、肿瘤相关的巨噬细胞或骨髓衍生的抑制细胞中的一种或多种的抑制。

48.根据权利要求45-47中任一项所述的方法，其中对肿瘤的淋巴细胞浸润增加伴随有肿瘤细胞上的MHC1表达增加。

49.减少个体的肿瘤中的HIF-1α和/或HIF-2α的表达的方法，包括向所述个体给予有效量的H-NOX蛋白。

50.减少个体的肿瘤中的PD-L1表达的方法，包括向所述个体给予有效量的H-NOX蛋白。

51.减少个体的肿瘤中的A2AR表达的方法，包括向所述个体给予有效量的H-NOX蛋白。

52.根据权利要求41-51中任一项所述的方法，其中所述肿瘤是脑肿瘤、成胶质细胞瘤、骨肿瘤、胰肿瘤、皮肤肿瘤、头或颈肿瘤、黑素瘤、肺肿瘤、子宫肿瘤、卵巢肿瘤、结肠直肠肿瘤、肛门肿瘤、肝肿瘤、肝细胞癌、胃肿瘤、睾丸肿瘤、子宫内膜肿瘤、子宫颈肿瘤、阴道肿瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、食管肿瘤、肠肿瘤、甲状腺肿瘤、肾上腺肿瘤、膀胱肿瘤、肾肿瘤、乳腺肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肉瘤、或鳞状细胞肿瘤。

53.根据权利要求41-52中任一项所述的方法，其中所述个体是哺乳动物。

54.根据权利要求53所述的方法，其中所述哺乳动物是人。

55.根据权利要求52所述的方法，其中所述哺乳动物是宠物、实验室研究动物、或农场动物。

56.根据权利要求55所述的方法，其中所述宠物、研究动物或农场动物是狗、猫、马、猴、兔、大鼠、小鼠、豚鼠、仓鼠、猪、或牛。

57.根据权利要求41-56中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白通过静脉内、动脉内、肿瘤内、囊内、吸入、腹膜内、肺内、肌内、皮下、气管内、经粘膜、眼内、鞘内、或经皮给予被给予。

58.根据权利要求41-57中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白的给予重复进行。

59.根据权利要求58所述的方法，其中所述H-NOX蛋白的给予一日一次或两次重复进行约4周至约8周。

60.根据权利要求58或59所述的方法，其中所述H-NOX蛋白每4小时、每8小时、每12小时或每24小时被给予，给予约1至约10天的时期。

61.根据权利要求41-60中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白被弹丸式给予。

62.根据权利要求41-60中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白通过输注被给予。

63.根据权利要求62所述的方法，其中所述H-NOX蛋白在所述个体中被输注约15分钟、约30分钟、约1小时、约1小时、约2小时、约3小时、约6小时、约12小时或约24小时。

64.根据权利要求41-63中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白与放射治疗组合给予。

65.根据权利要求64所述的方法，其中所述放射治疗在给予所述H-NOX蛋白后1、2、3、4、5、6、8、10、12、14、16、18、20、22或24小时被给予所述个体。

66.根据权利要求64或65所述的方法，其中所述放射是X-放射。

67.根据权利要求66所述的方法，其中约0.5戈瑞至约75戈瑞的X-放射被给予。

68.根据权利要求64-67中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白的给予和/或所述放射的给予重复进行。

69.根据权利要求68所述的方法，其中所述给予重复约2次至约40次之间或更多的任何次数。

70.根据权利要求68或69所述的方法，其中所述给予在1周、2周、3周、或4周或更久后重复进行。

71.根据权利要求41-63中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白与化学治疗或免疫治疗组合给予。

72.根据权利要求71所述的方法，其中所述化学治疗包括细胞毒素。

73.根据权利要求72所述的方法，其中所述H-NOX蛋白的给予和/或所述化学治疗的给予重复进行。

74.根据权利要求71所述的方法，其中所述免疫治疗是抗癌疫苗、过继性免疫细胞治疗或靶向免疫检查点调节因子的药剂中的一种或多种。

75.根据权利要求71或74所述的方法，其中所述免疫治疗靶向CTLA-4、PD1、PD-L1、或免疫检查点调节因子中的一种或多种。

76.根据权利要求71、74或75所述的方法，其中所述过继性免疫治疗是嵌合抗原受体表达T细胞或工程TCR-T细胞。

77.根据权利要求71、或74-76中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白的给予和/或所述免疫治疗的给予重复进行。

78.根据权利要求41-77中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白是腾冲嗜热厌氧菌(T.tengcongensis)H-NOX、嗜肺军团菌2(L.pneumophilia 2)H-NOX、智人(H.sapiens)β1、褐家鼠(R.norvegicus)β1、狼(C.lupus)H-NOX、黑腹果蝇(D.melangaster)β1、黑腹果蝇CG14885-PA、秀丽隐杆线虫(C.elegans)GCY-35、点形念珠藻(N.punctiforme)H-NOX、新月柄杆菌(C.crescentus)H-NOX、奥奈达希瓦氏菌(S.oneidensis)H-NOX、或丙酮丁醇梭菌(C.acetobutylicum)H-NOX。

79.根据权利要求41-77中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白包括相应于SEQ ID NO:2中所示的腾冲嗜热厌氧菌的H-NOX结构域的H-NOX结构域。

80.根据权利要求41-78中任一项所述的方法，其中所述H-NOX包括一种或多种远侧袋突变。

81.根据权利要求80所述的方法，其中所述远侧袋突变是腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的L144的相应位点处的氨基酸取代。

82.根据权利要求80或81所述的方法，其中所述H-NOX是包括第144位氨基酸取代的腾冲嗜热厌氧菌H-NOX。

83.根据权利要求82所述的方法，其中所述第144位氨基酸取代是L144F取代。

84.根据权利要求41-83中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白是多聚H-NOX蛋白。

85.根据权利要求84所述的方法，其中所述多聚H-NOX蛋白包括单体，其中所述单体包括H-NOX结构域和聚合结构域。

86.根据权利要求85所述的方法，其中所述H-NOX结构域共价连接至所述聚合结构域。

87.根据权利要求84-86中任一项所述的方法，其中所述多聚H-NOX蛋白是三聚H-NOX蛋白。

88.根据权利要求87所述的方法，其中所述三聚H-NOX蛋白包括一个或多个三聚结构域。

89.根据权利要求88所述的方法，其中所述三聚H-NOX蛋白包括3个单体，其中所述单体包括H-NOX结构域和三聚结构域，其中所述三聚结构域是噬菌体T4三聚结构域。

90.根据权利要求88或89所述的方法，其中所述三聚结构域是折叠子结构域。

91.根据权利要求90所述的方法，其中所述折叠子结构域包括SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

92.根据权利要求41-91中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白融合至免疫球蛋白的Fc结构域。

93.根据权利要求41-92中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白共价结合至聚乙二醇。

94.根据权利要求41-93中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白的O_2解离常数在血红蛋白的O_2解离常数的2个数量级之内，并且其中H-NOX蛋白的NO反应性比血红蛋白的NO反应性低至少10倍。

95.根据权利要求41-94中任一项所述的方法，其中所述多聚H-NOX蛋白的O_2解离常数在20℃下在约1nM和约1000nM之间。

96.根据权利要求41-95中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白的O_2解离常数在20℃下在约1μM和约10μM之间。

97.根据权利要求41-96中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白的O_2解离常数在20℃下在约10μM和约50μM之间。

98.根据权利要求41-97中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白的NO反应性在20℃下小于约700s^{-1}。

99.根据权利要求41-98中任一项所述的方法，其中H-NOX蛋白的NO反应性比血红蛋白的NO反应性低至少100倍。

100.根据权利要求99所述的方法，其中所述H-NOX蛋白的NO反应性比血红蛋白的NO反应性低至少1,000倍。

101.根据权利要求41-100中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白的氧气$k_{解离}$在20℃下小于或等于约0.65s^{-1}。

102.根据权利要求41-101中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白的氧气$k_{解离}$在20℃下在约0.21s^{-1}和约0.65s^{-1}之间。

103.根据权利要求41-102中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白的氧气$k_{解离}$在20℃下在之间约1.35s^{-1}和约2.9s^{-1}。

104.根据权利要求41-103中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白的血红素自氧化速率在37℃下小于约1h^{-1}。

105.根据权利要求41-104中任一项所述的方法，其中所述H-NOX蛋白在药物组合物中。

106.根据权利要求105所述的方法，其中所述药物组合物进一步包括药学上可接受的载体。

107.O_2载体蛋白用于治疗个体的癌症的应用。

108.根据权利要求107所述的应用，其中所述癌症是脑癌、成胶质细胞瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、黑素瘤、肺癌、子宫癌、卵巢癌、结肠直肠癌、肛门癌、肝癌、肝细胞癌、胃癌、睾丸癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食管癌、肠癌、甲状腺癌、肾上腺癌、膀胱癌、肾癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、肉瘤、或鳞状细胞癌。

109.O_2载体蛋白用于调节个体的肿瘤免疫性的应用。

110.根据权利要求109所述的应用，其中调节肿瘤免疫性包括增强对肿瘤的免疫响应。

111.O_2载体多肽用于增加对个体的肿瘤的淋巴细胞浸润的应用。

112.根据权利要求111所述的应用，其中对肿瘤的淋巴细胞浸润增加包括CD4细胞、CD8细胞、或NK细胞中的一种或多种的浸润增加。

113.根据权利要求111或112所述的应用，其中对肿瘤的淋巴细胞浸润增加伴随有肿瘤中Treg细胞、肿瘤相关的巨噬细胞或骨髓衍生的抑制细胞中的一种或多种的抑制。

114.根据权利要求111-113中任一项所述的应用，其中对肿瘤的淋巴细胞浸润增加伴随有肿瘤细胞上的MHC1表达增加。

115.O_2载体多肽用于减少个体的肿瘤中的HIF-1α和/或HIF-2α的表达的应用。

116.O_2载体多肽用于减少个体的肿瘤中的PD-L1表达的应用。

117.O_2载体多肽用于减少个体的肿瘤中的A2AR表达的应用。

118.根据权利要求109-117中任一项所述的应用，其中所述肿瘤是脑肿瘤、成胶质细胞瘤、骨肿瘤、胰肿瘤、皮肤肿瘤、头或颈肿瘤、黑素瘤、肺肿瘤、子宫肿瘤、卵巢肿瘤、结肠直肠肿瘤、肛门肿瘤、肝肿瘤、肝细胞癌、胃肿瘤、睾丸肿瘤、子宫内膜肿瘤、子宫颈肿瘤、阴道肿瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、食管肿瘤、肠肿瘤、甲状腺肿瘤、肾上腺肿瘤、膀胱肿瘤、肾肿瘤、乳腺肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肉瘤、或鳞状细胞肿瘤。

119.根据权利要求107-118中任一项所述的应用，其中所述个体是哺乳动物。

120.根据权利要求119所述的应用，其中所述哺乳动物是人。

121.根据权利要求107-120中任一项所述的应用，其中所述O_2载体多肽是H-NOX蛋白。

122.根据权利要求121所述的应用，其中所述H-NOX蛋白是腾冲嗜热厌氧菌H-NOX、嗜肺军团菌2H-NOX、智人β1、褐家鼠β1、狼H-NOX结构域、黑腹果蝇β1、黑腹果蝇CG14885-PA、秀丽隐杆线虫GCY-35、点形念珠藻H-NOX、新月柄杆菌H-NOX、奥奈达希瓦氏菌H-NOX、或丙酮丁醇梭菌H-NOX。

123.根据权利要求121-122中任一项所述的应用，其中所述H-NOX蛋白包括相应于SEQ ID NO:2中所示的腾冲嗜热厌氧菌的H-NOX结构域的H-NOX结构域。

124.根据权利要求121-123中任一项所述的应用，其中所述H-NOX包括一种或多种远侧袋突变。

125.根据权利要求124所述的应用，其中所述远侧袋突变是腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的L144的相应位点处的氨基酸取代。

126.根据权利要求124或125所述的应用，其中所述H-NOX是包括第144位氨基酸取代的

腾冲嗜热厌氧菌H-NOX。

127.根据权利要求126所述的应用，其中所述第144位氨基酸取代是L144F取代。

128.根据权利要求121-127中任一项所述的应用，其中所述H-NOX蛋白是多聚H-NOX蛋白。

129.根据权利要求128所述的应用，其中所述多聚H-NOX蛋白包括单体，其中所述单体包括H-NOX结构域和聚合结构域。

130.根据权利要求129所述的应用，其中所述H-NOX结构域共价连接至所述聚合结构域。

131.根据权利要求128-130中任一项所述的应用，其中所述多聚H-NOX蛋白是三聚H-NOX蛋白。

132.根据权利要求131所述的应用，其中所述三聚H-NOX蛋白包括一个或多个三聚结构域。

133.根据权利要求132所述的应用，其中所述三聚H-NOX蛋白包括3个单体，其中所述单体包括H-NOX结构域和三聚结构域，其中所述三聚结构域是噬菌体T4三聚结构域。

134.根据权利要求132或133所述的应用，其中所述三聚结构域是折叠子结构域。

135.根据权利要求134所述的应用，其中所述折叠子结构域包括SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

136.根据权利要求131-135中任一项所述的应用，其中所述H-NOX蛋白融合至免疫球蛋白的Fc结构域。

137.根据权利要求121-136中任一项所述的应用，其中所述H-NOX蛋白共价结合至聚乙二醇。

138.用于调节个体的肿瘤免疫性的试剂盒，包括用于根据权利要求1-106中任一项所述的方法的O_2载体蛋白。

139.根据权利要求138所述的试剂盒，其中所述试剂盒进一步包括小瓶、容器、安瓿瓶、瓶、罐、或柔性包装中的一种或多种。

140.根据权利要求138或139所述的试剂盒，其中所述试剂盒进一步包括一种或多种缓冲剂。

141.根据权利要求138-140中任一项所述的试剂盒，其中所述试剂盒进一步包括使用说明书。

通过蛋白质介导的O_2递送调节肿瘤免疫性

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2015年3月17日提交的美国临时专利申请号62/134,523的权益，其公开内容整体通过引用被并入本文，用于所有目的。

[0003] ASCII文本文件的序列表的提交

[0004] 基于ASCII文本文件的以下提交内容整体通过引用被并入本文：序列表的计算机可读形式(CRF)(文件名称：627042000940SeqList.txt，记录日期：2016年3月17日，大小：41KB)。

技术领域

[0005] 本申请涉及经由蛋白质O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)通过递送氧气至肿瘤的肿瘤免疫性调节。

[0006] 发明背景

[0007] 低氧肿瘤微环境通过调节多种信号传导途径而抑制宿主的免疫抗肿瘤防御，该信号传导途径包括但不限于低氧诱导因子(HIF-1)信号传导(Codo et al.,2014Oncotarget,5(17),7651-7662;Lee,Mace,&Repasky,2010Int J Hyperthermia,26(3),232-246;Wei et al.,2011PLoS One,6(1),e16195)。主要的低氧免疫调节途径总结在图1中。简言之，HIF-1已显示：a)激活腺苷能A2和PD-L1途径，该途径抑制辅助和杀伤性T细胞和NK细胞——抗肿瘤响应的关键效应器——的募集和激活(Noman et al.,2014J Exp Med,211(5),781-790;Ohta et al.,2006Proc Natl Acad Sci U S A,103(35),13132-13137)；b)募集和激活抑制性调节性T细胞(Treg)、肿瘤相关的巨噬细胞(TAM)和其它骨髓衍生的抑制细胞(MDSC)(Chaturvedi et al.,2014Proc Natl Acad Sci U S A,111(20),E2120-2129;Corzo et al.,2010J Exp Med,207(11),2439-2453;Wei et al.,2011)；c)直接抑制肿瘤细胞被免疫系统识别的能力(Siemens et al.,2008Cancer Res,68(12),4746-4753)。另外，HIF-1依赖性和非依赖性后生机制有助于抑制抗肿瘤免疫响应和增强肿瘤生长、血管形成和转移(Codo et al.,2014;Mimura et al.,2011J Pharmacol Sci,115(4),453-458)。

[0008] 在小鼠转移性肿瘤模型中，持续补充性充氧(氧合，oxygenation)已显示抑制肿瘤生长和防止肿瘤免疫逃逸——通过抑制A2AR(A2A腺苷受体)腺苷能途径，导致T和NK细胞激活(Hatfield et al.,2015Sci Transl Med,7(277),277ra230)。具体地，用60％呼吸氧气持续治疗携带MCA205、B16或4T1肺转移的小鼠导致转移性病灶集中点数量>2倍减少和存活率增加。这些数据与肿瘤和淋巴细胞低氧减少、活化CD8T细胞(CD8+CD69+CD44+)肿瘤浸润增加、免疫刺激细胞因子和趋化因子上调有关，并且取决于完整的A2AR信号传导。同时，呼吸高氧显示减少肺肿瘤微环境(TME)中Treg的数量和抑制其活性——因Foxp3、CD39/CD73(A2AR上游的腺苷生成酶)和CTLA-4表达减少。最后，持续呼吸高氧增强了肺肿瘤的CTLA-4/PD-1双阻断引起的肿瘤消退。

[0009] 尽管有说服力的临床前证据证实了肿瘤充氧逆转免疫抑制性TME和抑制肿瘤生长的能力，但在人类临床试验中利用高比重或等比重氧气的补充性充氧产生了有限的效果

(Overgaard,2007J Clin Oncol,25(26),4066-4074)。这可能是因为可溶性氧气不能有效扩散到距血管～80μm之外,限制了其深入低氧肿瘤组织的渗透。因此,需要这样的氧气递送剂:渗透到患者的肿瘤中以运输氧气超过正常扩散限制,从而充氧低氧微环境以阻碍免疫抑制性途径。这将导致最大限度刺激抗肿瘤免疫响应——无论单独还是组合其它免疫检查点抑制剂和其它癌症免疫治疗方法。

[0010] H-NOX蛋白(命名血红素-一氧化氮和氧气结合域)是高度保守的、充分表征的血红素蛋白家族的成员(Iyer,LM et al.(2003)BMC Genomics 4(1):5;Karow,DS et al.(2004)Biochemistry 43(31):10203-10211;Boon,EM et al.(2005)Nature Chem.Biol.1:53-59;Boon,EM et al.(2005)Curr.Opin.Chem.Biol.9(5):441-446;Boon,EM et al.(2005)J.Inorg.Biochem.99(4):892-902;Cary,SP et al.(2005)Proc Natl Acad Sci USA102(37):13064-9;Karow DS et al.(2005)Biochemistry 44(49):16266-74;Cary,SP et al.(2006)Trends Biochem Sci 31(4):231-9;Boon,EM et al.(2006)J Biol Chem 281(31):21892-902;Winger,JA et al.(2007)J Biol Chem.282(2):897-907)。H-NOX蛋白是一氧化氮中立的,不同于此前的基于血红蛋白的氧气载体,H-NOX不清除循环的一氧化氮(NO),因此与高血压或肾副作用不相关。固有的低NO反应性(和高NO稳定性)是使得野生型和突变型H-NOX蛋白成为期望的血液代替品,因为H-NOX蛋白因内源NO而失活的概率较低并且通过H-NOX蛋白清除内源NO的概率较低。重要地,一些H-NOX蛋白中远侧袋(distal pocket)酪氨酸的存在(Pellicena,P.et al.(2004)Proc Natl.Acad Sci USA101(35):12854-12859)暗示了不期望的高NO反应性,不宜用作血液代替品。例如,通过类推,结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)血红蛋白——具有结构类似的远侧袋酪氨酸——与NO极其快速地反应,并且被分枝杆菌(Mycobacterium)用来有效清除和避免受感染宿主产生的防御性NO(Ouellet,H.et al.(2002)Proc.Natl.Acad.Sci.U S A99(9):5902-5907)。然而,惊讶地发现,H-NOX蛋白的NO反应性实际上远低于血红蛋白,这使得其用作血液代替品成为可能。

[0011] 用于递送治疗和其它用途的O_2和/或NO的H-NOX蛋白被描述于美国专利号8,404,631和8,404,632;WO 2007/139791、WO 2007/139767和WO 2014/107171;和US专利申请序号14/530,569,其内容均整体通过引用并入。

[0012] 本文引用的包括专利申请和出版物在内的所有参考文献其整体均通过引用被并入本文。

发明内容

[0013] 本发明提供了调节携肿瘤个体的肿瘤免疫性的方法,包括向个体给予有效量的O_2载体多肽。在一些实施方式中,本发明提供了增强对肿瘤的免疫响应的方法。在一些实施方式中,本发明提供了增加对个体的肿瘤的淋巴细胞浸润的方法,包括向个体给予有效量的O_2载体多肽。在一些实施方式中,对肿瘤的淋巴细胞浸润增加包括CD4细胞、CD8细胞、或NK细胞中的一种或多种的浸润增加。在一些实施方式中,对肿瘤的淋巴细胞浸润增加伴随有肿瘤中Treg细胞、肿瘤相关的巨噬细胞或骨髓衍生的抑制细胞中的一种或多种的抑制。在一些实施方式中,对肿瘤的淋巴细胞浸润增加伴随有肿瘤细胞上的MHC1表达增加。在一些实施方式中,肿瘤免疫性调节包括增加抗原加工。在一些实施方式中,肿瘤免疫性调节包括

增加树突状细胞(DC)的呈递能力。

[0014] 在一些实施方式中，本发明提供了减少个体的肿瘤中的低氧诱导因子1α(HIF-1α)和/或低氧诱导因子2α(HIF-2α)表达的方法，包括向个体给予有效量的O_2载体多肽。在一些实施方式中，本发明提供了减少个体的肿瘤中的程序性死亡配体-1(PD-L1)表达的方法，包括向个体给予有效量的O_2载体多肽。在一些实施方式中，本发明提供了减少个体的肿瘤中的A2A腺苷受体(A2AR)表达的方法，包括向个体给予有效量的O_2载体多肽。

[0015] 在上述实施方式中的一些实施方式中，肿瘤是脑肿瘤、成胶质细胞瘤、骨肿瘤、胰肿瘤、皮肤肿瘤、头或颈肿瘤、黑素瘤、肺肿瘤、子宫肿瘤、卵巢肿瘤、结肠直肠肿瘤、肝肿瘤、肝细胞癌、胃肿瘤、睾丸肿瘤、子宫内膜肿瘤、子宫颈肿瘤、阴道肿瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、食管肿瘤、肠肿瘤、甲状腺肿瘤、肾上腺肿瘤、膀胱肿瘤、肾肿瘤、乳腺肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肉瘤、或鳞状细胞肿瘤。

[0016] 在一些方面，本发明提供了治疗个体癌症的方法，包括向个体给予有效量的O_2载体多肽。在一些实施方式中，癌症是脑癌、成胶质细胞瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、黑素瘤、肺癌、子宫癌、卵巢癌、结肠直肠癌、肛门癌、肝癌、肝细胞癌、胃癌、睾丸癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食管癌、肠癌、甲状腺癌、肾上腺癌、膀胱癌、肾癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、肉瘤、肛门癌或鳞状细胞癌。

[0017] 在上述方面和实施方式中的一些实施方式中，个体是哺乳动物。在进一步实施方式中，哺乳动物是人(例如，人患者)。在其它实施方式中，哺乳动物是宠物、实验室研究动物、或农场动物。在一些实施方式中，宠物、研究动物或农场动物是狗、猫、马、猴、兔、大鼠、小鼠、豚鼠、仓鼠、猪、或牛。

[0018] 在上述方面和实施方式中的一些实施方式中，O_2载体多肽通过静脉内、动脉内、肿瘤内、囊内、吸入、腹膜内、肺内、肌内、皮下、气管内、经粘膜、眼内、鞘内、或经皮给药被给予。在一些实施方式中，O_2载体多肽的给予重复进行。在一些实施方式中，O_2载体多肽的给予重复一日一次或一日两次，重复约4周至约8周。在一些实施方式中，O_2载体多肽每4每小时、每8每小时、每12小时或每24小时被给予，给予约1至约10天的时间。在一些实施方式中，O_2载体多肽被弹丸式(推注式，bolus)给予。在其它实施方式中，O_2载体多肽通过输注被给予。在一些实施方式中，O_2载体多肽在个体中被输注约15分钟、约30分钟、约1小时、约2小时、约3小时、约6小时、约12小时、约24小时或长于24小时。

[0019] 在一些实施方式中，本发明提供了调节肿瘤免疫性或治疗个体的癌症的方法，其中O_2载体多肽与放射治疗组合给予。在一些实施方式中，放射治疗在给予O_2载体多肽后1、2、3、4、5、6、8、10、12、14、16、18、20或24小时被给予个体。在一些实施方式中，放射是X-放射。在一些实施方式中，约0.5戈瑞(gray)至约75戈瑞的X-放射被给予。在一些实施方式中，O_2载体多肽的给予和/或放射的给予重复进行。在一些实施方式中，给予(给药，administration)重复多于约2次、3次、4次、5次、10次、15次、20次、25次或30次中的任一者。在一些实施方式中，给予在1周、2周、3周、或4周后重复。

[0020] 在一些实施方式中，本发明提供了调节肿瘤免疫性或治疗个体癌症的方法，其中O_2载体多肽与化学治疗或免疫治疗组合给予。在一些实施方式中，化学治疗包括细胞毒素。在一些实施方式中，O_2载体多肽的给予和/或化学治疗的给予重复进行。在一些实施方式中，免疫治疗是抗癌疫苗、过继性免疫细胞治疗或靶向免疫检查点调节因子的药剂中的一

种或多种。在一些实施方式中，免疫治疗靶向CTLA-4、PD1、PD-L1、或免疫检查点调节因子中的一种或多种。在一些实施方式中，过继性免疫治疗是嵌合抗原受体表达T细胞或工程TCR-T细胞。在一些实施方式中，免疫治疗是溶瘤病毒或双特异性T细胞衔接体(BiTE)。在一些实施方式中，O_2载体多肽的给予和/或免疫治疗的给予重复进行。

[0021] 在上述实施方式中的一些实施方式中，O_2载体多肽在药物组合物中。在一些实施方式中，药物组合物进一步包括药学上可接受的载体。在任一上述实施方式的一些实施方式中，O_2载体多肽是H-NOX蛋白。

[0022] 在一些方面，本发明提供了调节携肿瘤个体的肿瘤免疫性的方法，包括向个体给予有效量的H-NOX蛋白。在一些实施方式中，本发明提供了增强对肿瘤的免疫响应的方法。在一些实施方式中，本发明提供了增加对个体的肿瘤的白细胞浸润的方法，包括向个体给予有效量的H-NOX蛋白。在一些实施方式中，本发明提供了增加对个体的肿瘤的淋巴细胞浸润的方法，包括向个体给予有效量的H-NOX蛋白。在一些实施方式中，对肿瘤的淋巴细胞浸润增加包括CD4细胞、CD8细胞、或NK细胞中的一种或多种的浸润增加。在一些实施方式中，对肿瘤的淋巴细胞浸润增加伴随有肿瘤中的Treg细胞、肿瘤相关的巨噬细胞或骨髓衍生的抑制细胞中的一种或多种的抑制。在一些实施方式中，对肿瘤的淋巴细胞浸润增加伴随有肿瘤细胞上的MHC1表达增加。在一些实施方式中，肿瘤免疫性调节包括增加抗原加工。在一些实施方式中，肿瘤免疫性调节包括增加淋巴细胞激活。在一些实施方式中，肿瘤免疫性调节包括增加树突状细胞(DC)的呈递能力。

[0023] 在一些实施方式中，本发明提供了减少个体的肿瘤中的低氧诱导因子1α(HIF-1α)和/或低氧诱导因子2α(HIF-2α)表达的方法，包括向个体给予有效量的H-NOX蛋白。在一些实施方式中，本发明提供了减少个体的肿瘤中的程序性死亡配体-1(PD-L1)表达的方法，包括向个体给予有效量的H-NOX蛋白。在一些实施方式中，本发明提供了减少个体的肿瘤中的A2A腺苷受体(A2AR)表达的方法，包括向个体给予有效量的H-NOX蛋白。

[0024] 在上述实施方式中的一些实施方式中，肿瘤是脑肿瘤、成胶质细胞瘤、骨肿瘤、胰肿瘤、皮肤肿瘤、头或颈肿瘤、黑素瘤、肺肿瘤、子宫肿瘤、卵巢肿瘤、结肠直肠肿瘤、肛门肿瘤、肝肿瘤、肝细胞癌、胃肿瘤、睾丸肿瘤、子宫内膜肿瘤、子宫颈肿瘤、阴道肿瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、食管肿瘤、肠肿瘤、甲状腺肿瘤、肾上腺肿瘤、膀胱肿瘤、肾肿瘤、乳腺肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肉瘤、或鳞状细胞肿瘤。

[0025] 在一些方面，本发明提供了治疗个体癌症的方法，包括向个体给予有效量的H-NOX蛋白。在一些实施方式中，癌症是脑癌、成胶质细胞瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、黑素瘤、肺癌、子宫癌、卵巢癌、结肠直肠癌、肛门癌、肝癌、肝细胞癌、胃癌、睾丸癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食管癌、肠癌、甲状腺癌、肾上腺癌、膀胱癌、肾癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、肉瘤或鳞状细胞癌。

[0026] 在上述方面和实施方式中的一些实施方式中，个体是哺乳动物。在进一步实施方式中，哺乳动物是人(例如，人患者)。在其它实施方式中，哺乳动物是宠物、实验室研究动物、或农场动物。在一些实施方式中，宠物、研究动物或农场动物是狗、猫、马、猴、兔、大鼠、小鼠、豚鼠、仓鼠、猪、或牛。

[0027] 在上述方面和实施方式中的一些实施方式中，H-NOX蛋白通过静脉内、动脉内、肿瘤内、囊内、吸入、腹膜内、肺内、肌内、皮下、气管内、经粘膜、眼内、鞘内、或经皮给药被给

予。在一些实施方式中，H-NOX蛋白的给予重复进行。在一些实施方式中，H-NOX蛋白的给予重复一日一次或一日两次，重复约4周至约8周。在一些实施方式中，H-NOX蛋白每4小时、每8小时、每12小时、每24小时、或每48小时被给予，给予约1至约10天的时间。在一些实施方式中，H-NOX蛋白被弹丸式给予。在其它实施方式中，H-NOX蛋白通过输注被给予。在一些实施方式中，H-NOX蛋白在个体中输注约15分钟、约30分钟、约1小时、约2小时、约3小时、约6小时、约12小时、约24小时或长于24小时。

[0028] 在一些实施方式中，本发明提供了调节肿瘤免疫性或治疗个体癌症的方法，其中H-NOX蛋白与放射治疗组合给予。在一些实施方式中，放射治疗在给予H-NOX蛋白后1、2、3、4、5、6、8、10、12、14、16、18、20或24小时被给予个体。在一些实施方式中，放射是X-放射。在一些实施方式中，约0.5戈瑞至约75戈瑞的X-放射被给予。在一些实施方式中，H-NOX蛋白的给予和/或放射的给予重复进行。在一些实施方式中，给药重复多于约2次、3次、4次、5次、10次、15次、20次、25次、30次或40次中的任一者。在一些实施方式中，给予在1周、2周、3周、或4周或更久后重复。

[0029] 在一些实施方式中，本发明提供了调节肿瘤免疫性或治疗个体癌症的方法，其中H-NOX蛋白与化学治疗或免疫治疗组合给予。在一些实施方式中，化学治疗包括细胞毒素。在一些实施方式中，H-NOX蛋白的给予和/或化学治疗的给予重复进行。在一些实施方式中，免疫治疗是抗癌疫苗、过继性免疫细胞治疗或靶向免疫检查点调节因子的药剂中的一种或多种。在一些实施方式中，免疫治疗靶向CTLA-4、PD1、PD-L1、或免疫检查点调节因子中的一种或多种。在一些实施方式中，过继性免疫治疗是嵌合抗原受体表达T细胞或工程TCR-T细胞。在一些实施方式中，免疫治疗是溶瘤病毒或双特异性T细胞衔接体(BiTE)。在一些实施方式中，H-NOX蛋白的给予和/或免疫治疗的给予重复进行。

[0030] 在上述方面和实施方式中的一些实施方式中，H-NOX蛋白是腾冲嗜热厌氧菌(T.tengcongensis)H-NOX、嗜肺军团菌(L.pneumophilia)2H-NOX、智人(H.sapiens)β1、褐家鼠(R.norvegicus)β1、狼(C.lupus)H-NOX、黑腹果蝇(D.melangaster)β1、黑腹果蝇CG14885-PA、秀丽隐杆线虫(C.elegans)GCY-35、点形念珠藻(N.punctiforme)H-NOX、新月柄杆菌(C.crescentus)H-NOX、奥奈达希瓦氏菌(S.oneidensis)H-NOX、或丙酮丁醇梭菌(C.acetobutylicum)H-NOX。在一些实施方式中，H-NOX蛋白包括相应于SEQ ID NO:2中所示的腾冲嗜热厌氧菌的H-NOX结构域的H-NOX结构域。

[0031] 在一些实施方式中，H-NOX包括一种或多种远侧袋突变。在一些实施方式中，远侧袋突变是腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的L144的相应位点处的氨基酸取代。在一些实施方式中，H-NOX是包括第144位氨基酸取代的腾冲嗜热厌氧菌H-NOX。在一些实施方式中，第144位氨基酸取代是L144F取代。

[0032] 在一些实施方式中，H-NOX蛋白是多聚H-NOX蛋白。在一些实施方式中，多聚H-NOX蛋白包括单体，其中单体包括H-NOX结构域和聚合结构域。在一些实施方式中，H-NOX结构域共价连接至聚合结构域。在一些实施方式中，多聚H-NOX蛋白是三聚H-NOX蛋白。在一些实施方式中，三聚H-NOX蛋白包括一个或多个三聚结构域。在一些实施方式中，三聚H-NOX蛋白包括3个单体，其中单体包括H-NOX结构域和三聚结构域，其中三聚结构域是噬菌体T4三聚结构域。在一些实施方式中，三聚结构域是折叠子结构域。在一些实施方式中，折叠子结构域包括SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0033] 在一些实施方式中，H-NOX蛋白融合至免疫球蛋白的Fc结构域。在一些实施方式中，H-NOX蛋白共价结合至聚乙二醇。

[0034] 在一些实施方式中，H-NOX蛋白的O_2解离常数在血红蛋白的2数量级之内，并且其中H-NOX蛋白的NO反应性比血红蛋白的低至少10倍。在一些实施方式中，在20℃下多聚H-NOX蛋白的O_2解离常数在约1nM和约1000nM之间。在一些实施方式中，在20℃下H-NOX蛋白的O_2解离常数在约1μM和约10μM之间。在一些实施方式中，在20℃下H-NOX蛋白的O_2解离常数在约10μM和约50μM之间。在一些实施方式中，在20℃下H-NOX蛋白的NO反应性小于约700s^{-1}。在一些实施方式中，H-NOX蛋白的NO反应性比血红蛋白的低至少100倍。在一些实施方式中，H-NOX蛋白的NO反应性比血红蛋白的低至少1,000倍。在一些实施方式中，在20℃下H-NOX蛋白的氧气$k_{解离}$小于或等于约0.65s^{-1}。在一些实施方式中，在20℃下H-NOX蛋白的氧气$k_{解离}$在约0.21s^{-1}和约0.65s^{-1}之间。在一些实施方式中，在20℃下H-NOX蛋白的氧气$k_{解离}$在约1.35s^{-1}和约2.9s^{-1}之间。在一些实施方式中，在37℃下H-NOX蛋白的血红素自氧化速率小于约1h^{-1}。

[0035] 在上述实施方式中的一些实施方式中，H-NOX蛋白在药物组合物中。在一些实施方式中，药物组合物进一步包括药学上可接受的载体。

[0036] 在一些方面，本发明提供了O_2载体蛋白用于调节个体的肿瘤免疫性的应用。在一些实施方式中，调节肿瘤免疫性包括增强对肿瘤的免疫响应。在一些实施方式中，本发明提供了O_2载体多肽用于增加对个体的肿瘤的白细胞浸润的应用。在一些实施方式中，本发明提供了O_2载体多肽用于增加对个体的肿瘤的淋巴细胞浸润的应用。在一些实施方式中，对肿瘤的淋巴细胞浸润增加包括CD4细胞、CD8细胞、或NK细胞中的一种或多种的浸润增加。在一些实施方式中，对肿瘤的淋巴细胞浸润增加伴随有肿瘤中Treg细胞、肿瘤相关的巨噬细胞或骨髓衍生的抑制细胞中的一种或多种的抑制。在一些实施方式中，对肿瘤的白细胞浸润增加伴随有肿瘤细胞上的MHC1表达增加。在一些实施方式中，对肿瘤的淋巴细胞浸润增加伴随有肿瘤细胞上的MHC1表达增加。

[0037] 在一些实施方式中，本发明提供了O_2载体多肽用于减少个体的肿瘤中的HIF-1α和/或HIF-2α表达的应用。在一些实施方式中，本发明提供了O_2载体多肽用于减少个体的肿瘤中的PD-L1表达的应用。在一些实施方式中，本发明提供了O_2载体多肽用于减少个体的肿瘤中的A2AR表达的应用。

[0038] 在上述应用的一些实施方式中，肿瘤是脑肿瘤、成胶质细胞瘤、骨肿瘤、胰肿瘤、皮肤肿瘤、头或颈肿瘤、黑素瘤、肺肿瘤、子宫肿瘤、卵巢肿瘤、结肠直肠肿瘤、肛门肿瘤、肝肿瘤、肝细胞癌、胃肿瘤、睾丸肿瘤、子宫内膜肿瘤、子宫颈肿瘤、阴道肿瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、食管肿瘤、肠肿瘤、甲状腺肿瘤、肾上腺肿瘤、膀胱肿瘤、肾肿瘤、乳腺肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肉瘤、或鳞状细胞肿瘤。

[0039] 在一些实施方式中，本发明提供了O_2载体蛋白用于治疗个体癌症的应用。在一些实施方式中，癌症是脑癌、成胶质细胞瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、黑素瘤、肺癌、子宫癌、卵巢癌、结肠直肠癌、肛门癌、肝癌、肝细胞癌、胃癌、睾丸癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食管癌、肠癌、甲状腺癌、肾上腺癌、膀胱癌、肾癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、肉瘤、或鳞状细胞癌。

[0040] 在上述应用的一些实施方式中，个体是哺乳动物。在一些实施方式中，哺乳动物是人。

[0041] 在上述应用的一些实施方式中，O_2载体多肽是H-NOX蛋白。在一些实施方式中，H-NOX蛋白是腾冲嗜热厌氧菌H-NOX、嗜肺军团菌2H-NOX、智人β1、褐家鼠β1、狼H-NOX、黑腹果蝇β1、黑腹果蝇CG14885-PA、秀丽隐杆线虫GCY-35、点形念珠藻H-NOX、新月柄杆菌H-NOX、奥奈达希瓦氏菌H-NOX、或丙酮丁醇梭菌H-NOX。在一些实施方式中，H-NOX蛋白包括相应于SEQ ID NO:2中所示的腾冲嗜热厌氧菌的H-NOX结构域的H-NOX结构域。在一些实施方式中，H-NOX包括一种或多种远侧袋突变。在一些实施方式中，远侧袋突变是腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的L144的相应位点处的氨基酸取代。在一些实施方式中，H-NOX是包括第144位氨基酸取代的腾冲嗜热厌氧菌H-NOX。在一些实施方式中，第144位氨基酸取代是L144F取代。

[0042] 在一些实施方式中，H-NOX蛋白是多聚H-NOX蛋白。在一些实施方式中，多聚H-NOX蛋白包括单体，其中单体包括H-NOX结构域和聚合结构域。在一些实施方式中，H-NOX结构域共价连接至聚合结构域。在一些实施方式中，多聚H-NOX蛋白是三聚H-NOX蛋白。在一些实施方式中，三聚H-NOX蛋白包括一个或多个三聚结构域。在一些实施方式中，三聚H-NOX蛋白包括3个单体，其中单体包括H-NOX结构域和三聚结构域，其中三聚结构域是噬菌体T4三聚结构域。在一些实施方式中，三聚结构域是折叠子结构域。在一些实施方式中，折叠子结构域包括SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0043] 在一些实施方式中，H-NOX蛋白融合至免疫球蛋白的Fc结构域。在一些实施方式中，H-NOX蛋白共价结合至聚乙二醇。

[0044] 在一些方面，本发明提供了调节个体的肿瘤免疫性的试剂盒，包括用于本文上述方法的O_2载体蛋白。在一些实施方式中，试剂盒进一步包括小瓶、容器、安瓿瓶、瓶、罐、或柔性包装中的一种或多种。在一些实施方式中，试剂盒进一步包括一种或多种缓冲剂。在一些实施方式中，试剂盒进一步包括使用说明。

附图说明

[0045] 图1A和1B显示被低氧促进的主要免疫抑制性途径的模型(图1A)和可通过O_2载体多肽治疗施加的治疗干预点(图1B)。

[0046] 图2A-2C显示通过哌莫硝唑(pimonidazole)和HIF-1ELISA评估的、在PEG化三聚体Tt H-NOX L144F单次弹丸剂量后的肿瘤充氧。图2A显示通过竞争性ELISA测量的哌莫硝唑水平。图2B显示通过夹心ELISA测量的HIF-1α水平。各图显示在PEG化三聚体Tt H-NOX L144F给予后的哌莫硝唑和HIF-1α信号定量。平均值+/-SEM。***$p<0.001$，**$p<0.01$，通过单程ANOVA和Bonferroni事后检验。图2C显示通过夹心H-NOX ELISA进行的肿瘤的PEG化三聚体Tt H-NOX L144F积累评估和以每克肿瘤组织表示的结果。

[0047] 图3A-3D显示在PEG化三聚体Tt H-NOX L144F给予后肿瘤组织充氧的直接测量结果。利用PEG化三聚体Tt H-NOX L144F(图3A)、无功能对照Tt H-NOX蛋白(图3C)、或始于pO_2＝0.44mmHg的100％氧气(图3B)和始于pO_2＝5mmHg的100％氧气(图3D)治疗肿瘤。

[0048] 图4显示携带H460肿瘤的小鼠在PEG化三聚体Tt H-NOX L144F治疗后的放射效力增强。携带H460皮下异种移植肿瘤(150-300mm^3)的小鼠用PEG化三聚体Tt H-NOX L144F预先治疗或单独以10Gy治疗，照射，提取肿瘤，并处理用于克隆形成分析(clonogenic assay)。7天后在每个肿瘤的三份样品中对细胞数量计数。图上各点表示一种肿瘤的平均存活分数。

[0049] 图5A-5C显示PEG化三聚体Tt H-NOX L144F下调了免疫抑制中涉及的HIF-1α靶。携带H460皮下异种移植肿瘤(150-300mm^3)的小鼠用PEG化三聚体Tt H-NOX L144F预先治疗或单独用介质治疗,并被收集用于qRT-PCR分析。图5A显示VEGF的表达。图5B显示GLUT1的表达。图5C显示PD-L1的表达。

[0050] 图6A显示融合至腾冲嗜热厌氧菌(Thermoanaerobacter tengcongensis)L144F H-NOX序列C端并且包括His6标签的噬菌体T4fibritin的折叠子结构域的核酸(SEQ ID NO:5)和氨基酸序列(SEQ ID NO:6)。图6B显示无His6标签的L144F H-NOX-折叠子单体的核酸(SEQ ID NO:7)和氨基酸序列(SEQ ID NO:8)。

[0051] 图7A-7C显示B16F10皮下肿瘤(图7A)、CT26皮下肿瘤(图7B)和GL261颅内肿瘤(图7C)的肿瘤低氧和T细胞浸润的代表性图像。低氧(上部)和T细胞浸润(中部)通过免疫组织化学显示。下部显示多个肿瘤部分的定量分析结果。显著较少的CD4和CD8T细胞浸润肿瘤的低氧区域。

[0052] 图8显示在H-NOX治疗(OMX)或介质对照治疗(Veh)后肿瘤低氧区中CD8T细胞的定量。显示代表性图像。低氧区通过免疫组织化学分析用哌莫硝唑标记。在OMX治疗后,OMX给予前的肿瘤低氧区域中的CD4(数据未显示)和CD8T细胞浸润增加。

[0053] 图9A和9B显示在H-NOX治疗(OMX)或介质对照治疗(Veh)后肿瘤常氧区和低氧区中的T细胞定量。CD4和CD8T细胞均被评价。评价的肿瘤区域包括肿瘤外周和肿瘤中心的区域。多个部分的定量图像分析结果显示在图9A中,并且代表性图像显示在图9B中。利用碳酸酐酶IX(CAIX)表达的免疫组织化学分析标记低氧区。在OMX治疗后,OMX给予前的低氧肿瘤区域中的CD4和CD8T细胞浸润增加。

[0054] 图10显示作为GL261肿瘤模型的低氧(哌莫硝唑)和CD3血管的免疫组织化学结果。

[0055] 图11显示犬口腔黑素瘤肿瘤中的H-NOX肿瘤渗透、肿瘤低氧和CD8T细胞定位的免疫组织化学分析。组织用苏木精和曙红(H&E)、DNA相互螯合染料(DAPI)以及抗H-NOX(OMX)、抗碳酸酐酶IX(CAIX)和抗CD8的抗体染色,以评估在H-NOX(OMX)治疗以前的低氧肿瘤区域中的CD8淋巴细胞定位。图像揭示CD8阳性T细胞遍及在H-NOX(OMX)治疗以前的低氧肿瘤区域定位(CAIX阳性)。

[0056] 图12A-12K显示,较大肿瘤尺寸与皮下4T1-Luc同系小鼠肿瘤中的低氧增强和淋巴细胞浸润减少相关。图12A显示植入后第10天和第14天的肿瘤体积。图12B显示活细胞群中的淋巴细胞分数。图12C显示活群体中的绝对淋巴细胞细胞数量。图12D显示肿瘤体积与淋巴细胞百分比之间的负相关。图12E显示肿瘤体积与低氧百分比之间的正相关。图12F显示低氧百分比与淋巴细胞百分比之间的负相关。图12G显示肿瘤体积与CD3-阳性T细胞百分比之间的负相关。图12H显示肿瘤体积与CD4-阳性T细胞百分比之间的负相关。图12I显示肿瘤体积与CD8-阳性T细胞百分比之间的负相关。图12J显示肿瘤体积与CD3-CD4双阳性T细胞百分比之间的负相关。图12K显示肿瘤体积与CD3-CD8双阳性T细胞百分比之间的负相关。

[0057] 图13A-13F显示,低氧肿瘤区域具有免疫抑制性并且呈现皮下4T1-Luc同系小鼠肿瘤中的T细胞浸润减少。(图13A)哌莫硝唑阳性低氧区和(图13B)CD8-阳性T细胞的肿瘤区域#1的免疫荧光染色,(图13C)用DAPI复染来突出核。(图13D)哌莫硝唑阳性低氧区和(图13E)CD4-阳性T细胞的肿瘤区域#2的免疫荧光染色,(图13F)用DAPI复染来突出核。

具体实施方式

[0058] 本发明提供了治疗个体癌症的方法，包括向个体给予有效量的O_2载体多肽，如H-NOX蛋白。在某些方面，本发明提供了调节个体的低氧介导的肿瘤免疫性的方法，包括向个体给予有效量的O_2载体多肽，如H-NOX蛋白。O_2载体多肽被递送至肿瘤，在此其增强对肿瘤的免疫响应。可通过靶向低氧诱导因子1α(HIF-1α)介导的肿瘤免疫性途径和/或非HIF-1α-介导的肿瘤免疫性途径来介导肿瘤免疫响应增强。在一些方面，本发明提供了增加对个体的肿瘤的淋巴细胞浸润的方法，包括向个体给予有效量的O_2载体多肽。在一些实施方式中，对肿瘤的淋巴细胞浸润增加包括CD4细胞、CD8细胞、或NK细胞中的一种或多种的浸润增加。在一些实施方式中，对肿瘤的淋巴细胞浸润增加伴随有肿瘤中TREG细胞、肿瘤相关的巨噬细胞或骨髓衍生的抑制细胞中的一种或多种的抑制。在一些实施方式中，对肿瘤的淋巴细胞浸润增加伴随有肿瘤细胞上的MHC1表达增加。在一些实施方式中，本发明提供了减少个体的肿瘤中的低氧诱导因子1α(HIF-1α)表达的方法，包括向个体给予有效量的O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)。在一些实施方式中，本发明提供了减少个体的肿瘤中的程序性死亡配体-1(PD-L1)的表达的方法，包括向个体给予有效量的O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)。在一些实施方式中，本发明提供了减少个体的肿瘤中的A2A腺苷受体(A2AR)的表达的方法，包括向个体给予有效量的O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)。

[0059] 定义

[0060] 除非另外限定，本文使用的所有技术和科学术语的含义是本发明所属领域技术人员普遍理解的含义。本领域技术人员还将理解，与本文所述相似或等同的任何方法和材料也可用于实践或检验本发明。

[0061] 用于本文时，除非明确另外指出，术语“一个”、“一种”和类似术语的使用指代一种(个)或多种(个)。

[0062] 在本申请中，除非明确说明或被本领域技术人员理解，“或”的使用意为“和/或”。在多项从属权利要求的环境中，“或”回指多于一个在前独立或从属权利要求。

[0063] “大约”一个数值或参数的提及在本文中包括(和描述)针对该数值或参数本身的实施方式。例如，提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0064] 要理解，本文所述发明的方面和实施方式包括“包括”该方面和实施方式、“由该方面和实施方式组成”和“主要由该方面和实施方式组成”。

[0065] 术语“多肽”和“蛋白质”可互换地用来指代氨基酸残基的多聚体，并且不限于最小长度。这种氨基酸残基多聚体可包含天然或非天然氨基酸残基，并且包括但不限于肽、寡肽、氨基酸残基的二聚体、三聚体、和多聚体。全长蛋白和其片段均被包括在该定义之内。该术语还包括多肽的表达后修饰，例如，糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化、及类似修饰。此外，对于本发明的目的，“多肽”指代包括天然序列的修饰如删除、添加、和取代(性质上总体上是保守的)的蛋白质，只要蛋白质保持期望的活性。这些修饰可以是有意的——如通过定点诱变，或可以是偶然的，如通过产生该蛋白质的宿主的突变或PCR扩增导致的错误。如本文所用，蛋白质可包括共价或非共价结合的2个或更多个亚单位；例如，蛋白质可包括2个或更多个结合的单体。

[0066] 术语“核酸分子”、“核酸”和“多核苷酸”可以可互换地使用，并且指代核苷酸多聚

体。这种核苷酸多聚体可包含天然和/或非天然核苷酸，并且包括但不限于DNA、RNA、和PNA。“核酸序列”指代构成核酸分子或多核苷酸的核苷酸线性序列。

[0067] 如本文所用，术语“低氧诱导因子”或“HIF”指代响应细胞环境中氧气减少或低氧的转录因子家族。人HIF家族成员包括HIF-1α、HIF-1β、HIF-2α、HIF-2β、HIF3α、HIF3β。HIF-1通过激活多种基因的转录，充当对低氧的稳态响应的主调节因子，该基因包括在能量代谢、血管形成、凋亡中涉及的基因、和其蛋白质产物增加氧气递送或促进低氧代谢适应的其它基因。HIF-1在胚胎血管化、肿瘤血管形成和缺血性疾病病理生理学中发挥作用。人低氧诱导因子1α亚单位或人HIF-1α与多种多肽相互作用，该多肽包括但不限于ARNTL、ARNT、CREBB、EP300、HIF-1AN、Mdm2、NR4A、p53、PSMA7、STAT3、UBC、VH和pVHL。人HIF-1α由HIF-1A基因编码。人HIF-1α的氨基酸序列由GenBank登录号NP_001230013提供，并且人HIF-1αmRNA的核苷酸序列由GenBank登录号NM_001243084提供。小鼠HIF-1α的氨基酸序列由GenBank登录号NP_010431提供，并且小鼠HIF-1αmRNA的核苷酸序列由GenBank登录号NM_034561提供。

[0068] 如本文所用，“程序性死亡配体1”或“PD-L1”指代作为在抑制免疫系统中起作用的免疫检查点途径的一部分的跨膜蛋白质。PDL1与PD1受体或B7.1受体的相互作用抑制T细胞受体介导的IL-2激活和T细胞增殖。人PD-L1由CD274基因编码。人PD-L1的氨基酸序列由GenBank登录号NP_001254635提供，并且人PD-L1mRNA的核苷酸序列由GenBank登录号NM_001267706提供。小鼠PD-L1的氨基酸序列由GenBank登录号NP_021893提供，并且小鼠PD-L1mRNA的核苷酸序列由GenBank登录号NM_068693提供。

[0069] 如本文所用，“腺苷A2A受体”或“A2AR”指代G蛋白偶联受体超家族的受体。A2AR是在氧气消耗中发挥作用并且被认为通过cAMP水平增加在抑制过度反应性免疫细胞中发挥作用的腺苷受体。人A2AR由ADORA2A基因编码。人A2AR的氨基酸序列由GenBank登录号NP_000666提供，并且人A2AR mRNA的核苷酸序列由GenBank登录号NM_000675提供。小鼠A2AR的氨基酸序列由GenBank登录号NP_033760提供，并且小鼠A2AR mRNA的核苷酸序列由GenBank登录号NM_09630提供。

[0070] 如本文所用，“H-NOX蛋白”意为具有H-NOX结构域(命名血红素-一氧化氮和氧气结合域)的蛋白质。H-NOX蛋白可包含或可不包含H-NOX结构域以外的一种或多种其它结构域。在一些实例中，H-NOX蛋白不包括鸟苷酸环化酶结构域。H-NOX蛋白可包括或可不包括聚合结构域。

[0071] 如本文所用，“多聚H-NOX蛋白”是包括2个或更多个H-NOX结构域的H-NOX蛋白。H-NOX结构域可以共价或非共价结合。

[0072] 如本文所用，“H-NOX结构域”是通过血红素结合一氧化氮和/或氧气的蛋白质的全部或部分。H-NOX结构域可包括血红素，或可被发现是能够结合血红素的脱辅基蛋白(apoproprotein)。在一些实例中，H-NOX结构域包括6个α螺旋，然后2个β链，然后1个α-螺旋，然后2个β链。在一些实例中，H-NOX结构域相应于SEQ ID NO:2中所示的腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的H-NOX结构域。例如，H-NOX结构域可与SEQ ID NO:2中所示的腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的H-NOX结构域具有至少约10％、15％、20％、25％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、或99％的同一性。在一些实施方式中，H-NOX结构域可与SEQ ID NO:2中所示的腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的H-NOX结构域具有10％-20％、20％-30％、30％-40％、40％-50％、50％-60％、60％-70％、70％-80％、80％-90％、90％-95％、95％-99％或100％的同一性。

[0073] 如本文所用，“聚合结构域”是促进单体部分结合形成多聚结构的结构域(例如，多肽结构域)。例如，聚合结构域可促进单体H-NOX结构域结合生成多聚H-NOX蛋白。示例性聚合结构域是T4噬菌体的折叠子结构域，其促进三聚多肽形成。聚合结构域的其它实例包括但不限于Arc、POZ、卷曲螺旋结构域(包括GCN4、亮氨酸拉链(leucine zippers)、Velcro)、子宫珠蛋白、胶原蛋白、3链卷曲螺旋(胞外基质蛋白-1)、血小板反应蛋白(thrombosporins)、TRPV1-C、P53、Mnt、avadin、抗生蛋白链菌素、Bcr-Abl、COMP、维罗毒素(verotoxin)亚单位B、CamKII、RCK、和来自N乙基马来酰亚胺敏感性融合蛋白的结构域、STM3548、KaiC、TyrR、Hcp1、CcmK4、GP41、炭疽保护抗原、气单胞菌溶素、a-溶血素、C4b-结合蛋白、Mi-CK、芳基硫酸酯酶A、和病毒衣壳蛋白。

[0074] 如本文所用，“氨基酸连接序列”或“氨基酸间隔序列”是可用于连接蛋白质的2个结构域的短多肽序列。在一些实施方式中，氨基酸连接序列的长度是1、2、3、4、5、6，7，8，9，10个或多于10个氨基酸。示例性氨基酸连接序列包括但不限于Gly-Ser-Gly序列和Arg-Gly-Ser序列。

[0075] 如本文所用，“His_6标签”指代附接至多肽的包括6个His残基的肽。His_6标签可用于促进蛋白质纯化；例如利用针对His_6标签的色谱。在纯化后，可利用肽链端解酶切割His_6标签。

[0076] 本文所用的术语“基本上相似的”或“基本上相同的”表示2个或更多个数值之间的相似度足够高，使得本领域技术人员认为在所述数值度量的生物学特征的环境中这2个或更多个数值之间的差异几乎没有或没有生物学和/或统计学显著性。在一些实施方式中，2个或更多个基本上相似的数值相差不大于约5％、10％、15％、20％、25％、或50％中的任一个。

[0077] 本文所用的短语“基本上减少的”或“基本上不同的”表示2个数值之间的差异度足够高，使得本领域技术人员认为在所述数值度量的生物学特征的环境这2个数值之间的差异具有统计学显著性。在一些实施方式中，2个基本上不同的数值相差大于约10％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、60％、70％、80％、或90％中的任一个。在一些实施方式中，2个基本上不同的数值相差约10％-20％、20％-30％、30％-40％、40％-50％、50％-60％、60％-70％、70％-80％、80％-90％、90％-95％、95％-99％或100％中的任一个。

[0078] “天然序列”多肽包括与自然界发现的多肽具有相同氨基酸序列的多肽。因此，天然序列多肽可具有来自任何生物体的天然存在的多肽的氨基酸序列。这种天然序列多肽可从自然界分离，或可通过重组或合成方式生成。术语“天然序列”多肽具体地包括该多肽的天然存在的截短形式或分泌形式(例如，胞外结构域序列)、该多肽的天然存在的变体形式(例如，可选拼接形式)和天然存在的等位变体。

[0079] 多肽“变体”意为在对齐序列和引入间隙(如需，以实现最大百分比序列同一性，而不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分)后，与天然序列多肽具有至少约80％氨基酸序列同一性的生物学活性多肽。这种变体包括例如这样的多肽：其中在多肽的N端或C端添加、或删除一个或多个氨基酸残基。在一些实施方式中，变体将与天然序列多肽具有至少约80％、90％或95％氨基酸序列同一性中的任一个。在一些实施方式中，变体将与天然序列多肽具有约80％-90％、90％-95％或95％-99％氨基酸序列同一性中的任一个。

[0080] 如本文所用，“突变蛋白”意为与自然界存在的蛋白质相比具有一个或多个突变的

蛋白质。在一个实施方式中，突变蛋白的序列不同于自然界存在的所有蛋白质。在不同实施方式中，突变蛋白的氨基酸序列与自然界存在的蛋白质的相应区域具有至少约10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、95、97、98、99、或99.5％同一性中的任一个。在一些实施方式中，突变蛋白的氨基酸序列与自然界存在的蛋白质的相应区域具有至少约10％-20％、20％-30％、30％-40％、40％-50％、50％-60％、60％-70％、70％-80％、80％-90％、90％-95％、95％-99％或100％同一性中的任一个。在一些实施方式中，突变蛋白是包含来自全长蛋白的至少约25、50、75、100、150、200、300、或400个连续氨基酸中任一者的蛋白质片段。在一些实施方式中，突变蛋白是包含来自全长蛋白的约25-50、50-75、75-100、100-150、150-200、200-300、或300-400个连续氨基酸中任一者的的蛋白质片段。序列同一性可被测量——例如，利用序列分析软件，以其中指定的默认参数(例如，Genetics Computer Group，University of Wisconsin Biotechnology Center，1710University Avenue，Madison，WI 53705的序列分析软件包)。该软件程序通过给不同氨基酸置换、删除和其它修饰指定同源性程度来匹配相似序列。

[0081] 如本文所用，“突变”意为自然界存在的参考核酸或氨基酸序列中的变化。示例性核酸突变包括插入、删除、移码突变、沉默突变、无义突变、或错义突变。在一些实施方式中，核酸突变不是沉默突变。示例性蛋白质突变包括一个或多个氨基酸的插入(例如，2、3、4、5、6、7、8、9、或10个氨基酸的插入)、一个或多个氨基酸的删除(例如，N端、C端、和/或内部残基的删除，如至少约5、10、15、25、50、75、100、150、200、300、或更多个氨基酸中任一种的删除或约5-10、10-15、15-25、25-50、50-75、75-100、100-150、150-200、200-300、或300-400个氨基酸中任一种的删除)、一个或多个氨基酸的置换(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个氨基酸的置换)、或前述2种或更多种的组合。提及具体氨基酸突变时所用的命名法首先确定野生型氨基酸，然后是残基数量，最后是取代氨基酸。例如，Y140L意为第140个残基处的酪氨酸被亮氨酸置换。同样，变体H-NOX蛋白可通过H-NOX蛋白的氨基酸变动来命名。例如，腾冲嗜热厌氧菌Y140L H-NOX蛋白指代其中第140位数的酪氨酸残基已被亮氨酸残基置换的腾冲嗜热厌氧菌H-NOX蛋白，并且腾冲嗜热厌氧菌W9F/Y140L H-NOX蛋白指代其中第9位的色氨酸残基已被苯丙氨酸残基置换并且第140位数的酪氨酸残基已被亮氨酸残基置换的腾冲嗜热厌氧菌H-NOX蛋白。

[0082] “进化保守突变”是一种蛋白质中的氨基酸被相同蛋白质家族中的另一种蛋白质的相应位置处的氨基酸置换。

[0083] 如本文所用，“衍生自”指代其中引入了一个或多个突变的蛋白质的来源。例如，“衍生自哺乳动物蛋白”的蛋白质指代由在野生型哺乳动物蛋白的序列(即，自然界存在的序列)中引入一个或多个突变而产生的目标蛋白质。

[0084] 如本文所用，相对于肽、多肽或抗体序列的“百分比(％)氨基酸序列同一性”和“同源性”被定义为，在对齐序列和引入间隙(如需，以实现最大百分比序列同一性，并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分)后，候选序列中的氨基酸残基与具体肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的百分比。以确定百分比氨基酸序列同一性为目的的对齐可以本领域技术内的不同方式实现，例如，利用公众可获得的计算机软件，如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGNTM(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定适于测量对齐的参数，包括跨越被比较序列全长实现最大对齐所需的任何算法。

[0085] 如本文所用，“$k_{解离}$”指代解离速率，如O_2或NO从蛋白质的释放速率。数值较低的$k_{解离}$表示较慢的解离速率。

[0086] 如本文所用，“$k_{结合}$”指代结合速率，如O_2或NO与蛋白质的结合速率。数值较低的$k_{结合}$表示较慢的结合速率。

[0087] 如本文所用，“解离常数”指代“动力学解离常数”或“计算的解离常数”。“动力学解离常数”或“K_D”是动力学解离速率($k_{解离}$)与动力学结合速率($k_{结合}$)的比，如利用包括技术人员已知的和/或本文描述的方法在内的标准方法(例如，标准光谱、停流(stopped-flow)、或闪光光解(flash-photolysis)方法)以绝对值确定的K_D值。“计算的解离常数”或“计算的K_D”指代基于测量的$k_{解离}$的动力学解离常数近似值。$k_{结合}$值通过本文描述的动力学K_D与$k_{解离}$之间的相关性获得。

[0088] 如本文所用，“氧气亲和力”是指代氧气结合至蛋白质的血红素部分的强度的定性术语。这种亲和力受氧气的$k_{解离}$和$k_{结合}$两者影响。数值较低的氧气k_D值意味着较高亲和力。

[0089] 如本文所用，“NO亲和力”是指代NO结合至蛋白质(如结合至与蛋白质相关的血红素基团或结合至与蛋白质相关的血红素基团结合的氧气)的强度的定性术语。此亲和力受NO的$k_{解离}$和$k_{结合}$两者影响。数值较低的NO K_D值意味着较高的亲和力。

[0090] 如本文所用，“NO稳定性”指代在存在氧气的情况下蛋白质对于NO导致的氧化的稳定性或耐受性。例如，蛋白质在存在氧气的情况下结合至NO时不被氧化的能力指示蛋白质的NO稳定性。在一些实施方式中，小于约50、40、30、10、或5％中任一者的H-NOX蛋白在20℃下培育约1、2、4、6、8、10、15、或20小时中任一者后被氧化。

[0091] 如本文所用，“NO反应性”指代血红素结合蛋白的血红素中的铁在存在氧气的情况下被NO氧化的速率。以s^{-1}为单位的NO反应性的较低数值表示较低的NO反应性。

[0092] 如本文所用，“自氧化速率”指代血红素结合蛋白的血红素中的铁自氧化的速率。以s^{-1}为单位的数值较低的自氧化速率表示较低的自氧化速率。

[0093] 术语“载体”用于描述可经改造以包含可在宿主细胞中传播(繁殖，propagated)的克隆多核苷酸或多核苷酸的多核苷酸。载体可包括下列元素中的一种或多种：复制起点、调控目标多肽的表达的一种或多种调控序列(如，例如，启动子和/或增强子)、和/或一种或多种可选择的标记基因(如，例如，抗生素抗性基因和可用于比色测定的基因，例如，β-半乳糖苷酶)。术语“表达载体”指代用于在宿主细胞中表达目标多肽的载体。

[0094] “宿主细胞”指代可以是或已经是载体或分离的多核苷酸的接受者的细胞。宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞。示例性真核细胞包括哺乳动物细胞，如灵长类或非灵长类动物细胞；真菌细胞，如酵母；植物细胞；和昆虫细胞。示例性原核细胞包括细菌细胞；例如，大肠杆菌(E.coli)细胞。

[0095] 本文所用的术语“分离的”指代这样的分子：已经与一般与分子一起在自然界发现或产生的组分中的至少一些分开的分子。例如，多肽在其与产生其的细胞的组分中的至少一些分开时被称为“分离的”。当多肽在表达后被细胞分泌时，将包含多肽的上清液与产生多肽的细胞物理分开被认为是“分离”多肽。类似地，多核苷酸在其不是其一般在自然界被发现所在的较大多核苷酸(如，例如，基因组DNA或线粒体DNA，在DNA多核苷酸的情况下)的部分、或与产生其的细胞的组分中的至少一些分开(例如，在RNA多核苷酸的情况下)时被称为“分离的”。因此，在宿主细胞中载体包含的DNA多核苷酸可被称为“分离的”。

[0096] 术语“个体”或“对象”在本文中可互换地用于指代动物;例如,哺乳动物。在一些实施方式中,提供治疗哺乳动物的方法,该哺乳动物包括但不限于,人、啮齿动物、猿猴、猫科动物、犬科动物、马科动物、牛科动物、猪类、绵羊类、山羊类、哺乳动物实验室动物、哺乳动物农场动物、哺乳动物运动动物(sport animals)、和哺乳动物宠物。在一些实例中,“个体”或“对象”指代需要疾病或障碍治疗的个体或对象。

[0097] 本文所用的“疾病”或“障碍”指代需要疗的状况。

[0098] 术语“癌症”指代细胞增殖不受控、细胞生长无限制、和通过凋亡的细胞死亡减少相关的恶性增殖性障碍。

[0099] 术语“肿瘤”在本文中用于指代呈现异常高增殖和生长水平的细胞群。肿瘤可以是良性的、恶变前的、或恶性的;恶性肿瘤细胞是癌性的。肿瘤细胞可以是实体肿瘤细胞或白血病肿瘤细胞。术语“肿瘤生长”在本文中用于指代构成肿瘤的一个或多个细胞的增殖或生长,导致肿瘤尺寸相应增加。

[0100] 如本文所用,“治疗”是获得有益的或期望的临床结果的方法。本文所用的“治疗”涵盖疾病治疗剂在包括人类在内的哺乳动物中的任何给予或施用。为了本发明的目的,有益的或期望的临床结果包括但不限于症状减轻、疾病程度降低、疾病状态稳定化(例如,不恶化)、防止(例如,转移)疾病蔓延、延迟或减缓疾病进程、疾病状态改善或缓和、和缓解(部分或全部)——无论可检测的或是不可检测的。“治疗”还可意为与若不接受治疗的预期生命相比延长生命。“治疗”还包括增殖性疾病的病理后果减少。本发明的方法考虑这些方面治疗中的任意一种或多种。

[0101] 在癌症的环境中,术语“治疗”包括下列的任意种或全部:抑制肿瘤细胞或癌细胞生长、抑制肿瘤细胞或癌细胞复制、减少总体肿瘤负荷和改善一种或多种疾病相关症状。

[0102] 术语“抑制”(“inhibition”或“inhibit”)指代任何表型特征的减少或停止或该特征的发生、程度、或可能性的减少或停止。“降低”或“抑制”是与参考相比,减少、降低或阻止活性、功能、和/或数量。在某些实施方式中,“降低”或“抑制”意为能够导致总体减少20%或更多。在另一实施方式中,“降低”或“抑制”意为能够导致总体减少50%或更多。在再另一实施方式中,“降低”或“抑制”意为能够导致总体减少75%、85%、90%、95%、或99%。

[0103] 如本文所用,“延迟疾病发展”意为推迟、妨碍、减缓、阻碍、稳定化、抑制和/或延缓疾病(如癌症)的发展(发生,development)。此延迟可以是不同时间长度——取决于病史和/或被治疗个体。对于本领域技术人员显而易见的是,充分或显著的延迟实际上可包括预防,因为个体不发展疾病。例如,晚期癌症如转移的发展可被延迟。

[0104] 本文所用的“参考”指代用于比较目的的任何样品、标准、或水平。参考可获自健康和/或无疾病样品。在一些实例中,参考可获自无治疗样品。在一些实例中,参考获自对象个体的无疾病或无治疗样品。在一些实例中,参考获自非对象或患者的一个或多个健康个体。

[0105] 本文所用的“预防”包括提供关于可易患疾病但还未被诊断患有该疾病的对象的疾病发生或复发的预防。

[0106] “有效量”的试剂指代在必要的剂量和时间下有效实现期望的治疗或预防效果的量。

[0107] 本发明的物质/分子、激动剂或拮抗剂的“治疗有效量”可根据诸如下列的因素而改变:疾病状态、个体年龄、性别、和体重、和物质/分子、激动剂或拮抗剂在个体中引起期望

的响应的能力。治疗有效量还是治疗有益效果重于物质/分子、激动剂或拮抗剂的任何毒性或有害作用的量。治疗有效量可在一种或多种给予中递送。

[0108] “预防有效量”指代在必要的剂量和时间下有效实现期望的预防效果的量。一般，但非必须，由于预防剂量在疾病之前或早期在对象中采用，预防有效量将小于治疗有效量。

[0109] 术语“药物制剂”和“药物组合物”指代这样的制剂：其形式使活性成分(一种或多种)的生物学活性有效，并且其不包含对于该制剂所给予的对象有不可接受的毒性的额外组分。这种制剂可以是无菌的和基本上不含内毒素的。

[0110] “药学上可接受的载体”指代本领域通常与治疗剂一起应用共同构成给予对象的“药物组合物”的无毒固体、半固体、或液体填充剂、稀释剂、封装材料、制剂辅料、或载体。药学上可接受的载体在所用剂量和浓度下对于接受者是无毒的，并且与制剂的其它成分是可相容的。药学上可接受的载体适于所用制剂。

[0111] “无菌”制剂是无菌的或基本上不含活体微生物及其孢子。

[0112] 与一种或多种进一步治疗剂“组合”给予包括同时(并行)和连续或以任何顺序相继给予。

[0113] 术语“并行”在本文中用于指代2种或更多种治疗剂的给予，其中至少部分给予在时间上重叠或其中一种治疗剂的给予相对于另一种治疗剂的给予在短时间段内进行。例如，2种或更多种治疗剂不长于约60分钟如不长于约30、15、10、5、或1分钟中的任一者的时间间隔被给予。

[0114] 术语“相继”在本文中用于指代2种或更多种治疗剂的给予，其中一种或多种剂的给予在一种或多种其它剂的给予中断后继续。例如，2种或更多种治疗剂的给予被给予的时间间隔长于约15分钟、如约20、30、40、50、或60分钟、1天、2天、3天、1周、2周、或1个月中的任一者。

[0115] 如本文所用，“结合”指代一种治疗模式附加另一治疗模式的给予。由此，“结合”指代一种治疗模式在另一种治疗模式给予之前、期间或之后给予个体。

[0116] 术语“包装插入物”用于指代治疗产品的商品包装中通常包括的、包含关于适应症、用法、用量、给药、组合治疗、涉及这种治疗产品使用的禁忌症和/或警告的信息的说明书。

[0117] “制造制品”是包括至少一种试剂——例如，治疗疾病或障碍(例如，癌症)的药物、或特异性检测本文描述的生物标记物的探针——的任何制造品(例如，包装或容器)或试剂盒。在某些实施方式中，制造品或试剂盒作为执行本文描述的方法的单元被促进、分配、或销售。

[0118] H-NOX蛋白

[0119] H-NOX蛋白家族概述

[0120] U除非另外指出，任何野生型或突变型H-NOX蛋白可用于本文描述的组合物、试剂盒、和方法。如本文所用，“H-NOX蛋白”意为具有H-NOX结构域(命名血红素-一氧化氮和氧气结合域)的蛋白质。H-NOX蛋白可包含或可不包含H-NOX结构域以外的一种或多种其它结构域。H-NOX蛋白是高度保守的、充分表征的血红素蛋白家族的成员(Iyer,L.M.et al.(2003年2月3日).BMC Genomics 4(1):5;Karow,D.S.et al.(2004年8月10日).Biochemistry 43(31):10203-10211;Boon,E.M.et al.(2005).Nature Chem.Biol.1:53-59;Boon,E.M.et

al.(2005年10月).Curr.Opin.Chem.Biol.9(5):441-446;Boon,E.M.et al.(2005).J.Inorg.Biochem.99(4):892-902)。H-NOX蛋白也被称为Pfam 07700蛋白或HNOB蛋白(Pfam-蛋白质结构域家族对齐和Hidden Markov模型的数据库,版权(C)1996-2006The Pfam Consortium;GNU LGPL Free Software Foundation,Inc.,59Temple Place-Suite 330,Boston,MA 02111-1307,USA)。在一些实施方式中,H-NOX蛋白具有或预期具有如下二级结构:包括6个α-螺旋,然后2个β链,然后1个α-螺旋,然后2个β链。H-NOX蛋白可以是能够结合血红素的脱辅基蛋白或与血红素结合的全蛋白。H-NOX蛋白可共价或非共价结合血红素基团。一些H-NOX蛋白结合NO,但不结合O_2,而其它的结合NO和O_2两者。来自兼性需氧菌的已分离的H-NOX结构域结合NO,但不结合O_2。来自专性需氧原核生物——秀丽隐杆线虫和黑腹果蝇(D.melanogaster)——的H-NOX蛋白结合NO和O_2。哺乳动物具有2种H-NOX蛋白:β1和β2。小鼠、大鼠、牛和人H-NOX序列的对齐显示,这些物种具有>99%的同一性。在一些实施方式中,H-NOX蛋白的H-NOX结构域或完整H-NOX蛋白与天然存在的腾冲嗜热厌氧菌H-NOX蛋白(例如,SEQ ID NO:2)或天然存在的sGC蛋白(例如,天然存在的sGCβ1蛋白)的相应区域具有至少约10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、95、97、98、99、或99.5%同一性中的任一者。在一些实施方式中,H-NOX蛋白的H-NOX结构域或完整H-NOX蛋白与天然存在的腾冲嗜热厌氧菌H-NOX蛋白(例如,SEQ ID NO:2)或天然存在的sGC蛋白(例如,天然存在的sGCβ1蛋白)的相应区域具有至少约10-20%、20-30%、30-40%、40-50%、50-60%、60-70%、70-80%、80-90%、90-95%、95-99、或99-99.9%同一性中的任一者。如本文进一步讨论,H-NOX蛋白相对于相应的天然存在的H-NOX蛋白可任选地包含一个或多个突变。在一些实施方式中,H-NOX蛋白包括H-NOX结构域以外的一种或多种结构域。在具体实施方式中,H-NOX蛋白包括来自另一种蛋白质的一种或多种结构域或完整序列。例如,H-NOX蛋白可以是包括H-NOX结构域和部分或全部另一蛋白质如白蛋白(例如,人血清白蛋白)的融合蛋白。在一些实施方式中,仅存在H-NOX结构域。在一些实施方式中,H-NOX蛋白不包括鸟苷酸环化酶结构域。在一些实施方式中,H-NOX蛋白包括标签;例如,His_6标签。

[0121] 多聚H-NOX蛋白

[0122] 在一些方面,本发明提供了多聚H-NOX蛋白,其包括2个或更多个H-NOX结构域。2个或更多个H-NOX结构域可共价连接或非共价连接。在一些实施方式中,多聚H-NOX蛋白是二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体形式。在一些实施方式中,多聚H-NOX蛋白包括同源H-NOX结构域。在一些实施方式中,多聚H-NOX蛋白包括异源H-NOX结构域;例如,H-NOX结构域可包括H-NOX结构域的具体物种的氨基酸变体,或可包括来自不同物种的H-NOX结构域。在一些实施方式中,多聚H-NOX蛋白的H-NOX结构域中的至少一个包括相应于腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的L144F突变的突变。在一些实施方式中,多聚H-NOX蛋白的H-NOX结构域中的至少一个包括相应于腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的W9F/L144F突变的突变。在一些实施方式中,多聚H-NOX蛋白包括一个或多个聚合结构域。在一些实施方式中,多聚H-NOX蛋白是三聚H-NOX蛋白。在一些实施方式中,多聚H-NOX蛋白包括至少一个三聚结构域。在一些实施方式中,三聚H-NOX蛋白包括3个腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域。在一些实施方式中,三聚H-NOX结构域包括3个腾冲嗜热厌氧菌L144F H-NOX结构域(三聚Tt H-NOX L144F)。在一些实施方式中,三聚H-NOX结构域包括3个腾冲嗜热厌氧菌W9F/L144F H-NOX结构域。

[0123] 在本发明的一些方面，多聚H-NOX蛋白包括2个或更多个结合的单体。单体可共价连接或非共价连接。在一些实施方式中，生成多聚H-NOX蛋白的单体亚单位，其中该单体亚单位体外或体内结合，形成多聚H-NOX蛋白。在一些实施方式中，单体包括H-NOX结构域和聚合结构域。在一些实施方式中，聚合结构域共价连接至H-NOX结构域；例如，H-NOX结构域的C端共价连接至聚合结构域的N端或C端。在其它实施方式中，H-NOX结构域的N端共价连接至聚合结构域的N端或C端。在一些实施方式中，氨基酸间隔体共价连接在H-NOX结构域与聚合结构域之间。“氨基酸间隔体”和“氨基酸连接体”在本文中可互换地使用。在一些实施方式中，多聚H-NOX蛋白的单体亚单位中的至少一个包括相应于腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的L144F突变的突变。在一些实施方式中，多聚H-NOX蛋白的单体亚单位中的至少一个包括相应于腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的W9F/L144F突变的突变。在一些实施方式中，多聚H-NOX蛋白是三聚H-NOX蛋白。在一些实施方式中，三聚H-NOX蛋白的单体包括H-NOX结构域和T4噬菌体的折叠子结构域。在一些实施方式中，三聚H-NOX蛋白的单体包括腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域和折叠子结构域。在一些实施方式中，三聚H-NOX蛋白的单体包括腾冲嗜热厌氧菌L144F H-NOX结构域和折叠子结构域。在一些实施方式中，三聚H-NOX蛋白的单体包括腾冲嗜热厌氧菌W9F/L144F H-NOX结构域和折叠子结构域。在一些实施方式中，三聚体H-NOX蛋白包括3个单体，每个单体包括腾冲嗜热厌氧菌L144F H-NOX结构域和折叠子结构域。在一些实施方式中，H-NOX结构域通过氨基酸连接体连接至折叠子结构域；例如，Gly-Ser-Gly连接体。在一些实施方式中，至少一个H-NOX结构域包括标签。在一些实施方式中，至少一个H-NOX结构域包括His_6标签。在一些实施方式中，His_6标签通过氨基酸连接体连接至折叠子结构域；例如，Arg-Gly-Ser连接体。在一些实施方式中，所有H-NOX结构域均包括His_6标签。在一些实施方式中，三聚H-NOX蛋白包括SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列。

[0124] 来自腾冲嗜热厌氧菌的示例性H-NOX结构域为约26.7kDal。在一些实施方式中，多聚H-NOX蛋白具有大于约50kDal、75kDal、100kDal、125kDal，至约150kDal中任一者的原子质量。

[0125] 本发明提供了这样的多聚H-NOX蛋白：在给予H-NOX蛋白至个体后，与包括单个H-NOX结构域的相应单体H-NOX蛋白相比，该多聚H-NOX蛋白显示在个体的一个或多个组织中积累较多。相应的H-NOX蛋白指代包括多聚H-NOX蛋白的H-NOX结构域中的至少一个的H-NOX蛋白单体形式。多聚H-NOX积累优先的组织包括但不限于肿瘤和血管损伤组织。在一些实施方式中，多聚H-NOX蛋白在哺乳动物中在给予H-NOX蛋白至个体后维持至少约1、2、3、4、6、12或24小时。在一些实施方式中，多聚H-NOX蛋白在哺乳动物中在给予H-NOX蛋白至个体后维持约1-2、2-3、3-4、4-6、6-12或12-24小时。在一些实施方式中，小于约10％的多聚H-NOX在给予H-NOX蛋白至个体后的少于约1小时、2小时或3小时中的任一者之内通过肾从哺乳动物清除。

[0126] H-NOX蛋白和H-NOX结构域的来源

[0127] 来自任何种属或物种的H-NOX蛋白和H-NOX结构域可用于本文描述的组合物、试剂盒、和方法中。在不同实施方式中，H-NOX蛋白或多聚H-NOX蛋白的H-NOX结构域是来自哺乳动物(例如，灵长类(例如，人、猴、大猩猩(gorilla)、猿(ape)、狐猴(lemur)等)、牛科、马科、猪、犬科、或猫科)、昆虫、酵母、或细菌的蛋白质或结构域，或衍生自这种蛋白质。示例性哺乳动物H-NOX蛋白包括野生型人和大鼠可溶性鸟苷酸环化酶(如β1亚单位)。H-NOX蛋白的非

限制性实例包括野生型哺乳动物H-NOX蛋白，例如，智人、小家鼠(M.musculus)、家犬(C.familiaris)、家牛(B.Taurus)、狼和褐家鼠，并且原核野生型H-NOX蛋白的实例包括腾冲嗜热厌氧菌、霍乱弧菌(V.cholera)、V.fischerii、点形念珠藻、脱硫脱硫弧菌(D.desulfuricans)、嗜肺军团菌1、嗜肺军团菌2、和丙酮丁醇梭菌。H-NOX蛋白的实例——包括其NCBI登录号——可在美国专利号8,404,631和8,404,632、WO 2007/139791和WO 2007/139767中找到；其内容均整体通过引用被并入本文。

[0128] 可适用于本文描述的药物组合物和方法的其它H-NOX蛋白、多聚H-NOX蛋白的H-NOX结构域、和核酸可利用标准方法来鉴定。例如，标准序列对齐和/或结构预测程序可用于鉴定其它H-NOX蛋白和核酸——基于其一级结构和/或预测蛋白质二级结构与已知H-NOX蛋白和核酸的相似性。例如，Pfam数据库利用规定的对齐算法和Hidden Markov模型(如Pfam 21.0)将蛋白质划分家族，如H-NOX蛋白家族(Pfam-蛋白质结构域家族对齐和Hidden Markov模型的数据库，版权(C)1996-2006The Pfam Consortium；GNU LGPL Free Software Foundation,Inc.,59Temple Place-Suite 330,Boston,MA02111-1307,USA)。标准数据库如the swissprot-trembl数据库(万维网，“expasy.org”，Swiss Institute of Bioinformatics Swiss-Prot group CMU-1rue Michel Servet CH-1211Geneva 4，瑞士)也可用于鉴定H-NOX蛋白家族的成员。H-NOX蛋白的二级和/或三级结构可利用标准结构预测程序的默认设置来预测，如PredictProtein(630West,168Street,BB217,纽约，N.Y.10032,USA)。可选地，H-NOX蛋白的实际二级和/或三级结构可利用标准方法来确定。

[0129] 在一些实施方式中，H-NOX结构域在相应位置具有与腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的下列远侧袋残基中的任一种相同的氨基酸：Thr4、Ile5、Thr8、Trp9、Trp67、Asn74、Ile75、Phe78、Phe82、Tyr140、Leu144、或前述2种或更多种的任意组合。在一些实施方式中，H-NOX结构域在相应于腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的Pro115或Arg135的位置处分别具有脯氨酸或精氨酸——基于其氨基酸序列的序列对齐。在一些实施方式中，H-NOX结构域具有组氨酸——相应于褐家鼠β1H-NOX的His105。在一些实施方式中，H-NOX结构域具有或预期具有如下二级结构：包括6个α-螺旋，然后2个β链，然后1个α-螺旋，然后2个β链。对于H-NOX蛋白，这种二级结构已被报告。

[0130] 如需，可利用标准方法测试新鉴定的H-NOX蛋白或H-NOX结构域以确定其是否结合血红素。可利用标准方法——如本文描述的那些、通过确定H-NOX结构域是否结合O_2来测试H-NOX结构域充当O_2载体的能力。如需，可将本文描述的突变中的一种或多种引入H-NOX结构域，以优化其作为O_2载体的特性。例如，可引入一个或多个突变以改变其O_2解离常数、氧气$k_{解离}$、血红素自氧化速率、NO反应性、NO稳定性或前述2种或更多种的任意组合。标准技术，如本文描述的那些，可用于测量这些参数。

[0131] 突变型H-NOX蛋白

[0132] 如本文进一步讨论，H-NOX蛋白或多聚H-NOX蛋白的H-NOX结构域与相应的野生型蛋白相比可包含一个或多个突变，如改变O_2解离常数、氧气$k_{解离}$、血红素自氧化速率、NO反应性、NO稳定性、或前述2种或更多种的任意组合的突变。在一些实施方式中，本发明提供了多聚H-NOX蛋白，其包括一个或多个H-NOX结构域，该H-NOX结构域可与相应的野生型蛋白相比包含一个或多个突变，如改变O_2解离常数、氧气$k_{解离}$、血红素自氧化速率、NO反应性、NO稳定性、或前述2种或更多种的任意组合的突变。改造的H-NOX结构域分组(panels)可利用本文

描述的以及另外技术人员已知的技术，基于本文提供的教导，通过如下生成：随机诱变，然后针对需要的或期望的解离常数、解离速率、NO-反应性、稳定性、生理相容性、或前述2种或更多种的任意组合进行经验筛选(empirical screening)。可选地，诱变可选择性地靶向根据实验确定的或预测的H-NOX蛋白三维结构显而易见的具体区域或残基，如远侧袋残基(参见，例如，Boon,E.M.et al.(2005).Nature Chemical Biology 1:53-59，其整体通过引用被并入本文，尤其关于野生型和突变型H-NOX蛋白的序列)或根据序列对齐鉴定的进化保守残基(参见，例如，Boon E.M.et al.(2005).Nature Chemical Biology 1:53-59，其整体通过引用被并入本文，尤其关于野生型和突变型H-NOX蛋白的序列)。

[0133] 在本发明的一些实施方式中，多聚H-NOX蛋白的突变型H-NOX蛋白或突变型H-NOX结构域的序列不同于自然界存在的所有H-NOX蛋白或结构域。在不同实施方式中，突变蛋白的氨基酸序列与自然界存在的H-NOX蛋白的相应区域具有至少约10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、95、97、98、99、或99.5％同一性中的任一者。在不同实施方式中，突变蛋白的氨基酸序列与自然界存在的H-NOX蛋白的相应区域具有约10-20％、20-30％、30-40％、40-50％、50-60％、60-70％、70-80％、80-90％、90-95％、95-99％、或99.5％的同一性。在一些实施方式中，突变蛋白是包含来自全长蛋白的至少约25、50、75、100、150、200、300、或400个连续氨基酸中的任一者的蛋白质片段。在一些实施方式中，突变蛋白是包含来自全长蛋白的25-50、50-75、75-100、100-150、150-200、200-300、或300-400个连续氨基酸的蛋白质片段。序列同一性可被测量——例如，利用序列分析软件，以其中指定的默认参数(例如，the Genetics Computer Group,University of Wisconsin Biotechnology Center,1710University Avenue,Madison,WI 53705的序列分析软件包)。该软件程序通过给不同氨基酸置换、删除和其它修饰指定同源性程度来匹配相似序列。

[0134] 在本发明的一些实施方式中，突变型H-NOX蛋白或多聚H-NOX蛋白的突变型H-NOX结构域包括一个或多个氨基酸的插入(例如，2、3、4、5、6、7、8、9、或10个氨基酸的插入)。在本发明的一些实施方式中，突变型H-NOX蛋白或突变型H-NOX结构域包括一个或多个氨基酸的删除(例如，N端、C端、和/或内部残基的删除，如至少约5、10、15、25、50、75、100、150、200、300、或更多个氨基酸中的任一者的删除或5-10、10-15、15-25、25-50、50-75、75-100、100-150、150-200、200-300、或300-400个氨基酸的删除)。在本发明的一些实施方式中，突变型H-NOX蛋白或突变型H-NOX结构域包括一个或多个氨基酸的置换(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个氨基酸的置换)、或前述2种或更多种的组合。在一些实施方式中，突变蛋白与自然界存在的蛋白质相比具有至少一个氨基酸变化。在一些实施方式中，突变型核酸序列编码与自然界存在的蛋白质相比具有至少一个氨基酸变化的蛋白质。在一些实施方式中，核酸不是编码氨基酸序列与自然界存在的蛋白质相同的蛋白质的、自然界存在的核酸的简并形式。

[0135] 在一些实施方式中，H-NOX蛋白或多聚H-NOX蛋白的H-NOX结构域中的突变是进化保守突变(也称I类突变)。I类突变的实例列举在表1A中。在表1A中，突变根据人β1H-NOX的序列来编号/注释，但所有H-NOX序列的突变都是相似的。因此，任何其它H-NOX蛋白中的相应位置可突变成所示残基。例如，人β1H-NOX的Phe4可突变成酪氨酸，因为其它H-NOX蛋白在该位置处具有酪氨酸。相应的苯丙氨酸残基可突变成任何其它H-NOX蛋白中的酪氨酸。在具体实施方式中，一个或多个突变受限于进化保守残基。在一些实施方式中，一个或多个突变

可包括至少一种进化保守突变和至少一种非进化保守突变。如需，基于本文提供的教导，对这些突变型H-NOX蛋白进行针对NO/O_2解离常数、NO-反应性、稳定性、和生理相容性的经验筛选。

[0136] 表1A.靶向进化保守残基的示例性I类H-NOX突变

F4Y	Q30G	I145Y
F4L	E33P	I145H

[0137]

H7G	N61G	K151E
A8E	C78H	I157F
L9W	A109F	E183F

[0138] 在一些实施方式中，突变是远侧袋突变，如α-螺旋A、D、E、或G中的残基的突变(Pellicena,P.et al.(2004年8月31日).Proc Natl.Acad Sci USA 101(35):12854-12859)。示例性远侧袋突变(也称II类突变)列举在表1B中。在表1B中，突变根据人β1H-NOX的序列来编号/注释，但所有H-NOX序列都是相似的。由于在各所述残基处数种取代提供可变的突变，各所示位置处的残基可变成任何其它天然存在或非天然存在的氨基酸(表示为“X”)。这种突变可产生具有多种期望的亲和力、稳定性、和反应性特性的H-NOX蛋白。

[0139] 表1B.靶向远侧袋残基的示例性II类H-NOX突变

V8X	M73X	I145X

[0140]

L9X	F77X	I149X
F70X	C78X	

[0141] 在具体实施方式中，突变是血红素远侧袋突变。如本文所述，在H-NOX家族的NO结合成员中阻止O_2结合的关键分子决定因素是血红素远侧袋中缺少H键供体。因此，在一些实施方式中，突变改变了H-NOX结构域与远侧袋内的配体之间的H键合。在一些实施方式中，突变破坏了远侧袋的H键供体，和/或相对于相应的野生型H-NOX结构域使O_2配体结合减少。示例性远侧袋残基包括腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的Thr4、Ile5、Thr8、Trp9、Trp67、Asn74、Ile75、Phe78、Phe82、Tyr140、和Leu144和任何其它H-NOX蛋白的相应残基。在一些实施方式中，H-NOX蛋白或多聚H-NOX蛋白的H-NOX结构域包括一个或多个远侧袋突变。在一些实施方式中，H-NOX蛋白或多聚H-NOX蛋白的H-NOX结构域包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10个远侧袋突变。在一些实施方式中，远侧袋突变相应于腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的L144F突变。在一些实施方式中，远侧袋突变是腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的L144F突变。在一些实施方式中，H-NOX蛋白或多聚H-NOX蛋白的H-NOX结构域包括2个远侧袋突变。在一些实施方式中，H-NOX蛋白或多聚H-NOX蛋白的H-NOX结构域相应于腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的W9F/L144F突变。在一些实施方式中，H-NOX蛋白或多聚H-NOX蛋白的H-NOX结构域是腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的W9F/L144F突变。

[0142] 不在远侧袋中的残基也可影响血红素基团的三维结构；此结构进而影响O_2和NO与血红素基团中的铁的结合。因此，在一些实施方式中，H-NOX蛋白或多聚H-NOX蛋白的H-NOX结构域具有远侧袋之外的一个或多个突变。可突变但不在远侧袋中的残基的实例包括腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的Pro115和Arg135。在一些实施方式中，突变在包括His105作为连接血红素铁的残基的近侧袋中。

[0143] 在一些实施方式中，当存在2个或更多个突变时；至少一个突变在远侧袋之中，并

且至少一个突变在远侧袋之外(例如,近侧袋中的突变)。在一些实施方式中,所有突变均在远侧袋中。

[0144] 为降低源自非人来源的H-NOX蛋白或H-NOX结构域的免疫原性,可将H-NOX蛋白或H-NOX结构域中的氨基酸突变成人H-NOX中的相应氨基酸。例如,可将非人H-NOX蛋白或H-NOX结构域的三级结构表面上的一个或多个氨基酸突变成人H-NOX蛋白或H-NOX结构域中的相应氨基酸。在一些变异中,一个或多个表面氨基酸的突变可与下列组合:2个或更多个远侧袋残基的突变、远侧袋之外的一个或多个残基的突变(例如,近侧袋中的突变)、或前述2种或更多种的组合。

[0145] 本发明还涉及本文描述的突变的任意组合,如双突变,三突变、或更高的多突变。例如,本文描述的任何突变的组合可在相同H-NOX蛋白中进行。注意,本发明还包括其它哺乳动物或非哺乳动物H-NOX蛋白中的同等位置处的突变。示例性突变型H-NOX蛋白或突变型H-NOX结构域包括使O_2或NO配体结合相对于相应的野生型H-NOX结构域改变的一个或多个突变,并且作为生理相容性哺乳动物O_2血液气体载体而工作。

[0146] 突变的残基编号表示在所述具体H-NOX蛋白的序列中的位置。例如,腾冲嗜热厌氧菌I5A指代腾冲嗜热厌氧菌H-NOX中第五位的异亮氨酸被丙氨酸置换。相同的异亮氨酸向丙氨酸的突变可在任何其它H-NOX蛋白或H-NOX结构域中的相应残基处进行(该残基可以是或可以不是其它H-NOX蛋白序列中的第五残基)。由于哺乳动物β1H-NOX结构域的氨基酸序列相差至多2个氨基酸,在被引入野生型大鼠β1H-NOX蛋白时产生期望的突变型H-NOX蛋白或H-NOX结构域的突变,在被引入诸如人的其它哺乳动物的野生型β1H-NOX蛋白或H-NOX结构域时,也被预期产生期望的突变型H-NOX蛋白或H-NOX结构域。

[0147] 在一些实施方式中,H-NOX蛋白是包括3个腾冲嗜热厌氧菌L144F H-NOX结构域和3个折叠子结构域的三聚体。在一些实施方式中,H-NOX蛋白是包括3个腾冲嗜热厌氧菌W9F/L144F H-NOX结构域和3个折叠子结构域的三聚体。在一些实施方式中,H-NOX蛋白是包括3个腾冲嗜热厌氧菌野生型H-NOX结构域和3个折叠子结构域的三聚体。

[0148] H-NOX蛋白的修饰

[0149] 野生型或突变型H-NOX蛋白中的任一种——包括多聚H-NOX蛋白——可利用标准方法来修饰和/或配制,以增强治疗或工业应用。例如,具体地,应用于异源改造H-NOX蛋白时,本领域已知多种方法使这种试剂隔绝免疫监视,包括交联、PEG化、碳水化合物装饰等(例如,Rohlfs,R.J.et al.(1998年5月15日).J.Biol.Chem.273(20):12128-12134;Migita,R.et al.(1997年6月).J.Appl.Physiol.82(6):1995-2002;Vandegriff,K.D.et al.(2004年8月15日).Biochem J.382(Pt 1):183-189,其整体均通过引用被并入本文,具体地关于蛋白质修饰)以及技术人员已知的其它技术。融合H-NOX蛋白(包括多聚H-NOX蛋白)与人蛋白质(如人血清白蛋白)可增加血清半衰期、粘度、和胶粒渗透压。在一些实施方式中,H-NOX蛋白在其合成期间或之后被修饰,以降低其免疫原性和/或增加其血浆保留时间。H-NOX蛋白也可被封装(如封装在脂质体或纳米颗粒内)。

[0150] 在一些实施方式中,H-NOX蛋白包括多种标签中的一种;例如协助H-NOX蛋白纯化。标签的实例包括但不限于His_6、FLAG、GST、和MBP。在一些实施方式中,H-NOX蛋白包括多个His_6标签中的一个。一个或多个His_6标签可在多聚H-NOX蛋白使用前被去除;例如,通过用肽链端解酶处理。在一些实施方式中,H-NOX蛋白是包括3个腾冲嗜热厌氧菌L144F H-NOX结构

域、3个折叠子结构域、和3个His_6标签的三聚体。在一些实施方式中，H-NOX蛋白是包括3个腾冲嗜热厌氧菌W9F/L144F H-NOX结构域、3个折叠子结构域、和3个His_6标签的三聚体。在一些实施方式中，H-NOX蛋白是包括3个腾冲嗜热厌氧菌野生型H-NOX结构域、3个折叠子结构域、和3个His_6标签的三聚体。

[0151] 在一些实施方式中，H-NOX蛋白包括一个或多个聚乙二醇(PEG)分子(即，被PEG化)。在一些实施方式中，H-NOX蛋白是包括3个腾冲嗜热厌氧菌L144F H-NOX结构域、3个折叠子结构域、和一个或多个聚乙二醇分子的三聚体(PEG化三聚体Tt H-NOX L144F)。在一些实施方式中，H-NOX蛋白是包括3个腾冲嗜热厌氧菌W9F/L144F H-NOX结构域、3个折叠子结构域、和一个或多个聚乙二醇分子的三聚体。在一些实施方式中，H-NOX蛋白是包括3个腾冲嗜热厌氧菌野生型H-NOX结构域、3个折叠子结构域、和一个或多个聚乙二醇分子的三聚体。在一些实施方式中，PEG的分子量在约1kDa与约50kDa之间。在一些实施方式中，PED的分子量在约1kDa与50kDa、1kDa与40kDa、1kDa与30kDa、1kDa与25kDa、1kDa与20kDa、1kDa与15kDa、1kDa与10kDa、1kDa与5kDa、5kDa与50kDa、5kDa与40kDa、5kDa与30kDa、5kDa与25kDa、5kDa与20kDa、5kDa与15kDa、5kDa与10kDa、10kDa与50kDa、10kDa与40kDa、10kDa与30kDa、10kDa与25kDa、10kDa与20kDa、10kDa与15kDa、15kDa与50kDa、15kDa与40kDa、15kDa与35kDa、15kDa与30kDa、15kDa与25kDa、15kDa与20kDa、20kDa与50kDa、20kDa与40kDa、20kDa与30kDa、20kDa与25kDa、25kDa与50kDa、25kDa与40kDa、25kDa与30kDa、30kDa与50kDa、30kDa与40kDa、或40kDa与50kDa中的任一种之间。在一些实施方式中，H-NOX蛋白包括每个H-NOX单体多于约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、或50个PEG分子或其间的任何数量中的任一种。在一些实施方式中，H-NOX蛋白包括每个H-NOX单体平均1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、或50个PEG分子或其间的任何数量。

[0152] 聚合结构域

[0153] 在一些方面，本发明提供了包括2个或更多个H-NOX结构域和一个或多个聚合结构域的多聚H-NOX蛋白。聚合结构域用于连接2个或更多个H-NOX结构域，以形成多聚H-NOX蛋白。一个或多个聚合结构域可用于产生H-NOX蛋白的二聚体、三聚体、四聚体、五聚体等。聚合结构域在本领域已知，如：T4噬菌体fibritin的折叠子、Arc、POZ、卷曲螺旋结构域(包括GCN4、亮氨酸拉链、Velcro)、子宫珠蛋白、胶原蛋白、3链卷曲螺旋(胞外基质蛋白-1)、血小板反应蛋白(thrombosporins)、TRPV1-C、P53、Mnt、avadin、抗生蛋白链菌素、Bcr-Abl、COMP、维罗毒素亚单位B、CamKII、RCK、和来自N乙基马来酰亚胺-敏感性融合蛋白的结构域、STM3548、KaiC、TyrR、Hcp1、CcmK4、GP41、炭疽保护抗原、气单胞菌溶素、a-溶血素、C4b结合蛋白、Mi-CK、芳基硫酸酯酶A、和病毒衣壳蛋白。聚合结构域可共价或非共价连接至H-NOX结构域。在一些实施方式中，聚合结构域连接至H-NOX结构域以形成单体亚单位，使得来自多个单体亚单位的聚合结构域结合形成多聚H-NOX结构域。在一些实施方式中，H-NOX结构域的C端连接至聚合结构域的N端。在其它实施方式中，H-NOX结构域的N端连接至聚合结构域的N端。在再其它实施方式中，H-NOX结构域的C端连接至聚合结构域的C端。在一些实施方式中，H-NOX结构域的N端连接至聚合结构域的C端。

[0154] 连接体可用于将聚合结构域接合至H-NOX结构域；例如，例如，氨基酸连接体。在一些实施方式中，包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10个氨基酸中的任一者的连接体可布置在聚合结构域与H-NOX结构域之间。示例性连接体包括但不限于Gly-Ser-Gly和Arg-Gly-

Ser连接体。

[0155] 噬菌体T4fibritin三聚结构域

[0156] 示例性聚合结构域是噬菌体T4的折叠子结构域。来自噬菌体T4的Wac基因编码fibritin蛋白——具有C端三聚结构域(残基457-483)的486个氨基酸的蛋白质(Efimov,V.P.et al.(1994)J Mol Biol 242:470-486)。该结构域能够在体外和体内使fibritin三聚(Boudko,S.P.et al.(2002)Eur J Biochem 269:833-841;Letarov,A.V.,et al.,(1999)Biochemistry(Mosc)64:817-823;Tao,Y.,et al.,(1997)Structure 5:789-798)。分离的27残基三聚结构域,常被称为"折叠子结构域",已被用于在多种不同蛋白质(包括HIV包膜糖蛋白(Yang,X.et al.,(2002)J Virol 76:4634-4642)、腺病毒粘附素(Papanikolopoulou,K.,et al.,(2004)J Biol Chem 279:8991-8998;Papanikolopoulou,K.et al.(2004)J Mol Biol 342:219-227)、胶原蛋白(Zhang,C.,et al.(2009)Biotechnol Prog 25:1660-1668)、噬菌体P22gp26(Bhardwaj,A.,et al.(2008)Protein Sci 17:1475-1485)、和狂犬病病毒糖蛋白(Sissoeff,L.,et al.(2005)J Gen Virol 86:2543-2552)中构建嵌合三聚体。折叠子结构域的示例性序列显示在图1中并通过SEQ ID NO:4提供。

[0157] 分离的折叠子结构域折叠成单个β-发夹结构并且三聚成为包括3个发夹的β-螺旋桨结构(Guthe,S.et al.(2004)J Mol Biol 337:905-915)。单独折叠子结构域的结构已通过NMR确定(Guthe,S.et al.(2004)J Mol Biol 337:905-915),并且数个蛋白质与折叠子结构域三聚的结构以通过X射线晶体学解决(Papanikolopoulou,K.,et al.,(2004)J Biol Chem279:8991-8998;Stetefeld,J.et al.(2003)Structure 11:339-346;Yokoi,N.et al.(2010)Small6:1873-1879)。结构域折叠并且三聚,迅速降低错折叠中间体或离途低聚(off-pathway oligomerization)产物的可能性(Guthe,S.et al.(2004)J Mol Biol 337:905-915)。折叠子结构域非常稳定,能够在>10%SDS、6.0M盐酸胍、或80℃时保持三级结构和低聚(Bhardwaj,A.,et al.(2008)Protein Sci 17:1475-1485;Bhardwaj,A.,et al.(2007)J Mol Biol 371:374-387),并且可提高融合至折叠子结构域的序列的稳定性(Du,C.et al.(2008)Appl Microbiol Biotechnol 79:195-202)。

[0158] 在一些实施方式中,H-NOX结构域的C端连接至折叠子结构域的N端。在其它实施方式中,H-NOX结构域的N端连接至折叠子结构域的N端。在再其它实施方式中,H-NOX结构域的C端连接至折叠子结构域的C端。在一些实施方式中,H-NOX结构域的N端连接至折叠子结构域的C端。

[0159] 在一些实施方式中,连接体用于接合折叠子结构域至H-NOX结构域。在一些实施方式中,包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10个氨基酸中任一者的连接体可布置在聚合结构域与H-NOX结构域之间。示例性连接体包括但不限于Gly-Ser-Gly和Arg-Gly-Ser连接体。在一些实施方式中,本发明提供了三聚H-NOX蛋白,其从N端至C端包括:腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域、Gly-Ser-Gly氨基酸连接体、和折叠子结构域。在一些实施方式中,本发明提供了三聚H-NOX蛋白,其从N端至C端包括:腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域、Gly-Ser-Gly氨基酸连接体、折叠子结构域、Arg-Gly-Ser氨基酸连接体、和His_6标签。在一些实施方式中,腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域包括L144F突变。在一些实施方式中,腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域包括W9F突变和L144F突变。在一些实施方式中,腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域是野生型H-NOX结

构域。

[0160] 单体H-NOX结构域亚单位

[0161] 一方面，本发明提供了可结合形成多聚H-NOX蛋白的重组单体H-NOX蛋白(即，多聚H-NOX蛋白的单体H-NOX亚单位)。在一些实施方式中，本发明提供了重组H-NOX蛋白，其包括本文描述的H-NOX结构域和聚合结构域。H-NOX结构域和聚合结构域可共价连接或非共价连接。在一些实施方式中，重组单体H-NOX蛋白的H-NOX结构域的C端连接至聚合结构域的N端。在其它实施方式中，重组单体H-NOX蛋白的H-NOX结构域的N端连接至聚合结构域的N端。在再其它实施方式中，重组单体H-NOX蛋白的H-NOX结构域的C端连接至聚合结构域的C端。在一些实施方式中，重组单体H-NOX蛋白的H-NOX结构域的N端连接至聚合结构域的C端。在一些实施方式中，重组单体H-NOX蛋白不包括鸟苷酸环化酶结构域。

[0162] 在一些实施方式中，单体H-NOX蛋白包括野生型H-NOX结构域。在本发明的一些实施方式中，单体H-NOX蛋白包括H-NOX结构域中的一个或多个突变。在一些实施方式中，与相应的野生型H-NOX结构域相比，一个或多个突变改变O_2解离常数、氧气$k_{解离}$、血红素自氧化速率、NO反应性、NO稳定性或前述2种或更多种的任意组合。在一些实施方式中，突变是远侧袋突变。在一些实施方式中，突变包括不在远侧袋中的突变。在一些实施方式中，远侧袋突变相应于腾冲嗜热厌氧菌的L144突变(例如，L144F突变)。在一些实施方式中，重组单体H-NOX蛋白包括相应于腾冲嗜热厌氧菌的W9和L144突变的2个远侧袋突变(例如，W9F/L144F突变)。

[0163] 在一些方面，本发明提供了结合形成三聚H-NOX蛋白的重组单体H-NOX蛋白。在一些实施方式中，重组H-NOX蛋白包括H-NOX结构域和三聚结构域。在一些实施方式中，三聚结构域是本文讨论的折叠子结构域。在一些实施方式中，H-NOX结构域是腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域。在一些实施方式中，腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域的C端共价连接至折叠子结构域的N端。在一些实施方式中，腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域的C端共价连接至折叠子结构域的C端。在一些实施方式中，腾冲嗜热厌氧菌结构域是L144F H-NOX结构域。在一些实施方式中，腾冲嗜热厌氧菌结构域是W9F/L144F H-NOX结构域。在一些实施方式中，腾冲嗜热厌氧菌结构域是野生型H-NOX结构域。

[0164] 在一些实施方式中，H-NOX结构域利用氨基酸连接序列共价连接至聚合结构域。在一些实施方式中，氨基酸连接序列的长度是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10个氨基酸。示例性氨基酸连接序列包括但不限于Gly-Ser-Gly序列和Arg-Gly-Ser序列。在一些实施方式中，多聚H-NOX蛋白是三聚H-NOX蛋白，其包括3个H-NOX结构域和3个三聚序列，其中H-NOX结构域通过氨基酸连接序列共价连接至三聚结构域。在一些实施方式中，单体H-NOX蛋白从N端至C端包括下列：L144F腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域、Gly-Ser-Gly氨基酸连接序列、和折叠子结构域。在一些实施方式中，单体H-NOX蛋白从N端至C端包括下列：W9F/L144F腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域、Gly-Ser-Gly氨基酸连接序列、和折叠子结构域。在一些实施方式中，单体H-NOX蛋白从N端至C端包括下列：野生型腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域、Gly-Ser-Gly氨基酸连接序列、和折叠子结构域。

[0165] 在一些实施方式中，重组单体H-NOX蛋白包括标签；例如，His_6、FLAG、GST、或MBP标签。在一些实施方式中，重组单体H-NOX蛋白包括His_6标签。在一些实施方式中，重组单体H-NOX蛋白不包括标签。在一些实施方式中，标签(例如，His_6标签)利用氨基酸间隔序列共价

连接至聚合结构域。在一些实施方式中，氨基酸连接序列的长度是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10个氨基酸。示例性氨基酸连接序列包括但不限于Gly-Ser-Gly序列和Arg-Gly-Ser序列。在一些实施方式中，多聚H-NOX蛋白是三聚H-NOX蛋白，其包括3个H-NOX结构域、3个三聚序列、和3个His_6标签，其中H-NOX结构域通过氨基酸连接序列共价连接至三聚结构域，并且三聚结构域通过氨基酸连接序列共价连接至His_6标签。在一些实施方式中，单体H-NOX蛋白从N端至C端包括下列：L144F腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域、Gly-Ser-Gly氨基酸连接序列、折叠子结构域、Arg-Gly-Ser连接序列、和His_6标签。在一些实施方式中，单体H-NOX蛋白从N端至C端包括下列：W9F/L144F腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域、Gly-Ser-Gly氨基酸连接序列、折叠子结构域、Arg-Gly-Ser连接序列、和His_6标签。在一些实施方式中，单体H-NOX蛋白从N端至C端包括下列：野生型腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域、Gly-Ser-Gly氨基酸连接序列、折叠子结构域、Arg-Gly-Ser连接序列、和His_6标签。

[0166] 在一些实施方式中重组单体H-NOX蛋白包括SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0167] 野生型和突变型H-NOX蛋白的特征

[0168] 本发明提供了O_2载体多肽用于增强肿瘤免疫原性的应用；例如，通过抑制肿瘤低氧相关的免疫抑制活性。O_2载体多肽的非限制性示例性家族是O_2载体多肽的H-NOX家族。如本文所述，已生成大量多种H-NOX突变蛋白，包括多聚H-NOX蛋白，提供各种NO和O_2解离常数、$O_2k_{解离}$、NO反应性、和稳定性。为提供生效的(operative)血液气体载体，可利用H-NOX蛋白在功能上代替或补充内源O_2载体，如血红蛋白。在一些实施方式中，H-NOX蛋白如多聚H-NOX蛋白用于递送O_2至低氧肿瘤组织(例如，成胶质细胞瘤)作为放射治疗或化学治疗的佐剂。因此，在一些实施方式中，H-NOX蛋白，与内源O_2载体如血红蛋白相比，具有相似或提高的O_2结合速率、O_2解离速率、O_2结合的解离常数、NO稳定性、NO反应性、自氧化速率、血浆保留时间、或前述2种或更多种的任意组合。在一些实施方式中，H-NOX蛋白是多聚H-NOX蛋白。在一些实施方式中，多聚H-NOX蛋白是包括3个单体的三聚H-NOX蛋白，每个单体均包括腾冲嗜热厌氧菌L144F H-NOX结构域和折叠子结构域。在一些实施方式中，多聚H-NOX蛋白是包括3个单体的三聚H-NOX蛋白，每个单体均包括腾冲嗜热厌氧菌W9F/L144F H-NOX结构域和折叠子结构域。在一些实施方式中，多聚H-NOX蛋白是包括3个单体的三聚H-NOX蛋白，每个单体均包括腾冲嗜热厌氧菌L144F H-NOX结构域和折叠子结构域。

[0169] 在不同实施方式中，包括多聚H-NOX蛋白在内的H-NOX蛋白的$O_2k_{解离}$在20℃下在约0.01至约200s^{-1}之间，如约0.1至约200^{-1}、约0.1至100s^{-1}、约1.0至约16.0s^{-1}、约1.35至约23.4s^{-1}、约1.34至约18s^{-1}、约1.35至约14.5s^{-1}、约0.21至约23.4s^{-1}、约1.35至约2.9s^{-1}、约2至约3s^{-1}、约5至约15s^{-1}、或约0.1至约1s^{-1}。在一些实施方式中，H-NOX蛋白的氧气$k_{解离}$在20℃下小于或等于约0.65s^{-1}(如在20℃下约0.21s^{-1}至约0.65s^{-1}之间)。

[0170] 在不同实施方式中，包括多聚H-NOX蛋白在内的H-NOX蛋白的$O_2k_{结合}$在20℃下在约0.14至约60$\mu M^{-1}s^{-1}$之间，如约6至约60$\mu M^{-1}s^{-1}$、约6至12$\mu M^{-1}s^{-1}$、约15至约60$\mu M^{-1}s^{-1}$、约5至约18$\mu M^{-}s^{-1}$、或约6至约15$\mu M^{-1}s^{-1}$。

[0171] 在不同实施方式中，包括多聚H-NOX蛋白在内的H-NOX蛋白的动力学或计算的O_2结合K_D在约1nM至1mM、约1μM至约10μM、或约10μM至约50μM之间。在一些实施方式中，计算的O_2结合K_D在20℃下是约2nM至约2μM、约2μM至约1mM、约100nM至约1μM、约9μM至约50μM、约100μ

M至约1mM、约50nM至约10μM、约2nM至约50μM、约100nM至约1.9μM、约150nM至约1μM、或约100nM至约255nM、约20nM至约2μM、20nM至约75nM、约1μM至约2μM、约2μM至约10μM、约2μM至约9μM、或约100nM至500nM中的任一者。在一些实施方式中，动力学或计算的O_2结合K_D在20℃下小于约100nM、80nM、50nM、30nM、25nM、20nM、或10nM中的任一者。

[0172] 在不同实施方式中，包括多聚H-NOX蛋白在内的H-NOX蛋白的动力学或计算的O_2结合K_D在相同条件下(如在20℃下)的血红蛋白的约0.01至约100倍之内，如在相同条件下(如在20℃下)的血红蛋白的约0.1至约10倍之间或约0.5至约2倍之间。在不同实施方式中，H-NOX蛋白的动力学或计算的NO结合K_D在相同条件下(如在20℃下)的血红蛋白的0.01至约100倍之内，如相同条件下(如在20℃下)的血红蛋白的约0.1至约10倍之间或约0.5至约2倍之间。

[0173] 在一些实施方式中，小于约50、40、30、10、或5％的包括多聚H-NOX蛋白在内的H-NOX蛋白中的任一者在20℃下培育约1、2、4、6、8、10、15、或20小时中的任一者后被氧化。

[0174] 在不同实施方式中，包括多聚H-NOX蛋白在内的H-NOX蛋白的NO反应性在20℃下小于约700s^{-1}，如在20℃下小于约600s^{-1}、500s^{-1}、400s^{-1}、300s^{-1}、200s^{-1}、100s^{-1}、75s^{-1}、50s^{-1}、25s^{-1}、20s^{-1}、10s^{-1}、50s^{-1}、3s^{-1}、2s^{-1}、1.8s^{-1}、1.5s^{-1}、1.2s^{-1}、1.0s^{-1}、0.8s^{-1}、0.7s^{-1}、或0.6s^{-1}。在不同实施方式中，H-NOX蛋白的NO反应性在20℃下在约0.1至约600s^{-1}之间，如在20℃下约0.5至约400s^{-1}、约0.5至约100s^{-1}、约0.5至约50s^{-1}、约0.5至约10s^{-1}、约1至约5s^{-1}、或约0.5至约2.1s^{-1}之间。在不同实施方式中，H-NOX蛋白的反应性比相同条件下如在20℃下的血红蛋白的低至少约10、100、1,000、或10,000倍。

[0175] 在不同实施方式中，包括多聚H-NOX蛋白在内的H-NOX蛋白的血红素自氧化速率在37℃下小于约1.0h^{-1}，如在37℃下小于约0.9h^{-1}、0.8h^{-1}、0.7h^{-1}、0.6h^{-1}、0.5h^{-1}、0.4h^{-1}、0.3h^{-1}、0.2h^{-1}、0.1h^{-1}、或0.05h^{-1}中的任一者。在不同实施方式中，H-NOX蛋白的血红素自氧化速率在37℃下在约0.006至约5.0h^{-1}之间，如在37℃下在约0.006至约1.0h^{-1}、0.006至约0.9h^{-1}、或约0.06至约0.5h^{-1}之间。

[0176] 在不同实施方式中，包括多聚H-NOX蛋白在内的突变型H-NOX蛋白具有(a)在血红蛋白的2个数量级之内的O_2或NO解离常数、结合速率(O_2或NO的$k_{结合}$)、或解离速率(O_2或NO的$k_{解离}$)；(b)具有分别比sGCβ1更弱的NO亲和力(例如，至少约10倍，100倍、或1000倍弱)；(c)比血红蛋白小至少1000倍的、结合有O_2的NO反应性；(d)比血红蛋白高至少2、10、100、或1000倍的体内血浆保留时间；或(e)前述2种或更多种的任意组合。

[0177] 示例性的适当O_2载体提供在血红蛋白的2个数量级之内的解离常数，即，血红蛋白的约0.01和100倍之间，如约0.1和10倍之间、或约0.5和2倍之间。多种已建立的技术可用于定量解离常数，如本文描述的技术(Boon,E.M.et al.(2005).Nature Chem.Biol.1:53-59;Boon,E.M.et al.(2005年10月).Curr.Opin.Chem.Biol.9(5):441-446;Boon,E.M.et al.(2005).J.Inorg.Biochem.99(4):892-902;Vandegriff,K.D.et al.(2004年8月15日).Biochem J.382(Pt 1):183-189,其均整体通过引用被并入本文，具体地关于解离常数的测量)以及技术人员已知的技术。示例性O_2载体提供结合有O_2的H-NOX蛋白的低的或最小化的NO反应性，如低于血红蛋白的NO反应性。在一些实施方式中，NO反应性显著较低，如比血红蛋白的低至少约10、100、1,000、或10,000倍。多种已建立的技术可用于定量NO反应性(Boon,E.M.et al.(2005).Nature Chem.Biol.1:53-59;Boon,E.M.et al.(2005年10月)

.Curr.Opin.Chem.Biol.9(5):441-446;Boon,E.M.et al.(2005).J.Inorg.Biochem.99(4):892-902;Vandegriff,K.D.et al.(2004年8月15日).Biochem J.382(Pt 1):183-189),其均整体通过引用被并入本文其整体,具体地关于NO反应性的测量)以及技术人员已知的技术。由于野生型腾冲嗜热厌氧菌H-NOX具有这种低NO反应性,其它野生型H-NOX蛋白和突变型H-NOX蛋白可具有类似的低NO反应性。例如,腾冲嗜热厌氧菌H-NOX Y140H具有类似于野生型腾冲嗜热厌氧菌H-NOX的NO反应性。

[0178] 另外,适当的O_2载体提供高的或最大化的稳定性,具体地体内稳定性。多种稳定性量度(metrics)可用,如氧化稳定性(例如,自氧化或NO氧化的稳定性)、温度稳定性、和体内稳定性。多种已建立的技术可用于定量稳定性,如本文描述的技术(Boon,E.M.et al.(2005).Nature Chem.Biol.1:53-59;Boon,E.M.et al.(October 2005).Curr.Opin.Chem.Biol.9(5):441-446;Boon,E.M.et al.(2005).J.Inorg.Biochem.99(4):892-902)以及技术人员已知的技术。关于血浆、血液、或组织中的体内稳定性,示例性稳定性量度包括保留时间、清除速率、和半衰期。预期来自嗜热生物体的H-NOX蛋白在高温下是稳定的。在不同实施方式中,血浆保留时间比血红蛋白的长至少约2倍、10倍、100倍、或1000倍(例如,Bobofchak,K.M.et al.(August 2003).Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.285(2):H549-H561)。本领域技术人员将理解,血红蛋白系血液代替品受限于无细胞血红蛋白从血浆快速清除——因为存在从血浆移除无细胞血红蛋白的血红蛋白受体。由于血浆中不存在H-NOX蛋白的受体,预期野生型和突变型H-NOX蛋白具有比血红蛋白更长的血浆保留时间。如需,可通过利用标准方法(如本文描述的方法和技术人员已知的方法)PEG化或交联H-NOX蛋白或融合H-NOX蛋白与另一蛋白质来增加血浆保留时间。

[0179] 在不同实施方式中,包括多聚H-NOX蛋白在内的H-NOX蛋白在20℃下具有约1nM至约1mM之间的O_2解离常数和比相同条件下如在20℃下的血红蛋白的低至少约10倍的NO反应性。在一些实施方式中,H-NOX蛋白具有在20℃下约1nM至约1mM之间的O_2解离常数和在20℃下小于约700s^{-1}的NO反应性(例如,在20℃下小于约600s^{-1}、500s^{-1}、100s^{-1}、20s^{-1}、或1.8s^{-1})。在一些实施方式中,H-NOX蛋白具有在血红蛋白的2个数量级之内的O_2解离常数和比相同条件下如在20℃下的血红蛋白的低至少约10倍的NO反应性。在一些实施方式中,H-NOX蛋白具有在20℃下约0.01至约200s^{-1}之间的氧气$k_{解离}$和比相同条件下如在20℃下的血红蛋白的低至少约10倍的NO反应性。在一些实施方式中,H-NOX蛋白具有在20℃下小于约0.65s^{-1}(如在20℃下约0.21s^{-1}至约0.64s^{-1}之间)的氧气$k_{解离}$和比相同条件下如在20℃下的血红蛋白的低至少约10倍的NO反应性。在本发明的一些实施方式中,H-NOX蛋白的O_2解离常数在约1nM至约1μM(1000nM)、约1μM至约10μM、或约10μM至约50μM之间。在具体实施方式中,H-NOX蛋白的O_2解离常数在20℃下在约2nM至约50μM、约50nM至约10μM、约100nM至约1.9μM、约150nM至约1μM、或约100nM至约255nM之间。在不同实施方式中,H-NOX蛋白的O_2解离常数在20℃下小于约80nM、如在20℃下在约20nM至约75nM之间。在一些实施方式中,H-NOX蛋白的NO反应性比相同条件下如在20℃下的血红蛋白的低至少约100倍或约1,000倍。在一些实施方式中,H-NOX蛋白的NO反应性在20℃下小于约700s^{-1},如在20℃下小于约600s^{-1}、500s^{-1}、400s^{-1}、300s^{-1}、200s^{-1}、100s^{-1}、75s^{-1}、50s^{-1}、25s^{-1}、20s^{-1}、10s^{-1}、50s^{-1}、3s^{-1}、2s^{-1}、1.8s^{-1}、1.5s^{-1}、1.2s^{-1}、1.0s^{-1}、0.8s^{-1}、0.7s^{-1}、或0.6s^{-1}。在一些实施方式中,H-NOX蛋白的氧气$k_{解离}$在20℃下在0.01至200s^{-1}之间,如约0.1至约200s^{-1}、约0.1至100s^{-1}、约1.35至约23.4s^{-1}、约1.34至约18s^{-1}、

约1.35至约14.5s^{-1}、约0.21至约23.4s^{-1}、约2至约3s^{-1}、约5至约15s^{-1}、或约0.1至约1s^{-1}。在一些实施方式中，H-NOX蛋白的O_2解离常数在20℃下在约100nM至约1.9μM之间，并且H-NOX蛋白的氧气$k_{解离}$在20℃下在约1.35s^{-1}至约14.5s^{-1}之间。在一些实施方式中，H-NOX蛋白的血红素自氧化速率在37℃下小于约1h^{-1}，如小于约0.9h^{-1}、0.8h^{-1}、0.7h^{-1}、0.6h^{-1}、0.5h^{-1}、0.4h^{-1}、0.3h^{-1}、0.2h^{-1}、或0.1h^{-1}中的任一者。在一些实施方式中，H-NOX蛋白的氧气$k_{解离}$在20℃下在约1.35s^{-1}至约14.5s^{-1}之间，并且H-NOX蛋白的血红素自氧化速率在37℃下小于约1h^{-1}。在一些实施方式中，H-NOX蛋白的氧气$k_{解离}$在20℃下在约1.35s^{-1}至约14.5s^{-1}之间，并且H-NOX蛋白的NO反应性在20℃下小于约700s^{-1}(例如，在20℃下小于约600s^{-1}、500s^{-1}、100s^{-1}、20s^{-1}、或1.8s^{-1})。在一些实施方式中，H-NOX蛋白的血红素自氧化速率在37℃下小于约1h^{-1}，并且H-NOX蛋白的NO反应性在20℃下小于约700s^{-1}(例如，在20℃下小于约600s^{-1}、500s^{-1}、100s^{-1}、20s^{-1}、或1.8s^{-1})。

[0180] 在一些实施方式中，包括多聚H-NOX蛋白溶液在内的H-NOX蛋白溶液的粘度在1和4厘泊(cP)之间。在一些实施方式中，H-NOX蛋白溶液的胶粒渗透压在20和50mm Hg之间。

[0181] O_2和/或NO结合的测量

[0182] 本领域技术人员可容易通过本领域已知的方法和下文描述的非限制性示例性方法确定包括多聚H-NOX蛋白如三聚H-NOX蛋白在内的任何H-NOX蛋白的氧气和一氧化氮结合特征。

[0183] 动力学K_D:$k_{解离}$与$k_{结合}$的比

[0184] 确定包括多聚H-NOS蛋白在内的野生型和突变型H-NOX蛋白的动力学K_D值，基本上如Boon,E.M.et al.(2005).Nature Chemical Biology 1:53-59所述，其整体通过引用被并入本文，具体地关于O_2结合速率、O_2解离速率、O_2结合的解离常数、自氧化速率、和NO解离速率的测量。

[0185] $K_{结合}$(O_2结合速率)

[0186] O_2与血红素的结合在20℃下利用闪光光解来测量。由于非常快速的孪生复合动力学(geminate recombination kinetics)，不可能闪蒸掉(flash off)Fe^{II}-O_2复合体；因此，Fe^{II}-CO复合体经历560nm激光的闪光光解(Hewlett-Packard,Palo Alto,CA)，产生5-配位Fe^{II}中间体，然后在不同波长下使其与分子O_2结合。通过用10mM连二亚硫酸盐(dithionite)无氧还原来制备蛋白质样品，然后在PD-10柱(Millipore,Inc.,Billerica,MA)上脱盐。然后将样品稀释至在100μL至1mL尺寸和1-cm路径长度的受控气氛石英比色皿中50mM TEA、50mM NaCl、pH 7.5缓冲剂中的20μM血红素中。CO气体在此比色皿的顶空上吹扫10分钟以形成Fe^{II}-CO复合体，其形成通过UV-可见光光谱(Soret最大423nm)来检验。此样品然后用于在闪光光解后在仍处于1个大气压的CO气体下时测量CO-重结合动力学，或其被打开并在空气中搅拌30分钟至充分充氧缓冲剂，然后闪光光解以观察O_2-再结合事件。在多种波长vs时间下监测O_2与血红素的结合。利用Igor Pro软件(Wavemetrics,Inc.,Oswego,OR;最新2005版)将这些痕量(traces)以单一指数拟合。此速率无关于观测波长，但取决于O_2浓度。UV-可见光光谱全程用于确认所有复合体和中间体(Cary 3K,Varian,Inc.Palo Alto,CA)。利用Dmochowski,I.J.et al.(2000年8月31日).J Inorg Biochem.81(3):221-228(其整体通过引用被并入本文，具体地关于仪器)描述的仪器收集瞬态吸收数据。该仪器具有20ns的响应时间，并且数据在200兆次样品s^{-1}下数据化。

[0187] $K_{解离}$(O_2解离速率)

[0188] 为测量$k_{解离}$,将蛋白质(5μM血红素)的Fe^{II}-O_2复合体稀释在无氧50mM TEA、50mM NaCl、pH 7.5缓冲剂中,并与包含不同浓度的连二亚硫酸盐和/或饱和CO气体的等体积相同缓冲剂(无氧)快速混合。数据在配备有设定至20℃的Neslab RTE-100恒温浴的HI-TECH Scientific SF-61停流分光光度计(TGK Scientific LTD.,Bradford On Avon,英国)中上获得。作为在437nm下——Fe^{II}-Fe^{II}-O_2差光谱(difference spectrum)中的最大值——或在425nm下——Fe^{II}-Fe^{II}-CO差光谱中的最大值——的吸光度增加,监测O_2从血红素的解离。利用作为仪器一部分的软件,将最终痕量拟合至单一指数。每次实验进行最多6次,并且所得速率取平均。测量的解离速率无关于连二亚硫酸盐浓度并且无关于饱和CO——作为还原后物种的捕集器(trap),均存在和不存在10mM连二亚硫酸盐。

[0189] 动力学K_D

[0190] 利用$k_{解离}$和$k_{结合}$的测量,通过计算$k_{解离}$与$k_{结合}$的比,确定动力学K_D。

[0191] 计算的K_D

[0192] 为测量计算的K_D,将上述获得的$k_{解离}$和动力学K_D的值作图。$k_{解离}$与动力学K_D之间的线性关系通过方程式(y=mx+b)限定。然后将$k_{解离}$值沿直线内插,以利用Excel:MAC 2004(Microsoft,Redmond,WA)获得计算的K_D。在不存在测量的$k_{结合}$的情况下,这种内插法提供了将$k_{解离}$关联至K_D的途径。

[0193] 自氧化速率

[0194] 为测量自氧化速率,将蛋白质样品无氧还原,然后稀释至有氧50mM TEA、50mM NaCl、pH 7.5缓冲剂中的5μM血红素。然后将这些样品在配备有设定至37℃的Neslab RTE-100恒温浴的Cary 3E分光光度计中培育并周期性扫描(Cary 3E,Varian,Inc.,Palo Alto,CA)。根据针对时间作图的Fe^{III}-Fe^{II}差光谱中的最大值和最小值之差确定自氧化速率,并利用Excel:MAC 2004(Microsoft,Redmond,WA)将其以单一指数拟合。

[0195] 与NO反应的速率

[0196] 利用在缓冲剂A中以2μM制备的纯化蛋白(H-NOX,多聚H-NOX,智人(Homo sapiens)血红蛋白(Hs Hb)等)和在在缓冲剂A(缓冲剂A:50mM Hepes,pH 7.5、50mM NaCl)中以200μM制备的NO,测量NO反应性。数据在配备有设定至20℃的Neslab RTE-100恒温浴的HI-TECH Scientific SF-61停流分光光度计(TGK Scientific LTD.,Bradford On Avon,英国)上获得。将蛋白质与NO以1:1比例以0.00125秒的整合时间快速混合。利用作为分光计一部分的软件,将最大变化的波长拟合至单一指数,基本上测量NO氧化的速率限制步骤。HNOX蛋白的反应终产物是三价铁-NO,并且Hs Hb的反应终产物是三价铁-水。

[0197] p50测量

[0198] 如需,突变型或野生型H-NOX蛋白的p50值可如Guarnone,R.et al.(1995年9月/10月).Haematologica 80(5):426-430(其整体通过引用被并入本文,具体地关于p50值的测量)所述测量。p50值利用HemOx分析仪来确定。测量室始于0%氧气,并且向100%氧气缓慢地递增地上升。室内的氧气探针测量氧气饱和%。第二探针(UV-Vis光)测量2种波长的吸光度——调整至血红素蛋白(例如,与血红素复合的蛋白质如H-NOX)UV-Vis光谱的α和β峰。这些吸收峰在血红素蛋白结合氧气时线性地增加。然后将从未结合至100%结合的百分比变化针对%氧气值作图,生成曲线。p50是该曲线上50%血红素蛋白结合至氧气的点。

[0199] 具体地,Hemox-Analyzer(TCS Scientific Corporation,New Hope,PA)通过将50μL血液或血红素蛋白暴露于渐增的氧气分压和用氮气使其脱氧气来确定氧化血红素蛋白(oxyhemoprotein)解离曲线(ODC)。Clark氧气电极检测氧张力变化,氧张力变化被记录在x-y记录器的x轴上。所导致的氧化血红素蛋白分数增加同时通过560nm和576nm下的双波长分光光度法来监测并显示在y轴上。从前内侧静脉(antemedial vein)采集血液样品,用肝素抗凝,并在湿冰上保持在4℃直到测验。将50μL全血稀释在5μL Hemox-溶液(制造商提供的缓冲剂,使溶液pH保持在7.4±0.01的数值)中。将样品-缓冲剂吸入作为Hemox分析仪一部分的比色皿,并平衡混合物的温度和使之达到37℃;样品然后用空气充氧至100%。在调节pO_2值后,将样品用氮气脱氧;在脱氧过程中,将曲线记录在图纸上。利用作为Hemox分析仪一部分的软件,在x轴上推断作为在O_2饱和为50%时的点的P50值。完全记录所需的时间为约30分钟。

[0200] H-NOX核酸

[0201] 本发明还描述了编码本文所述的突变型H-NOX蛋白、多聚H-NOX、或重组单体H-NOX蛋白亚单位中的任一者的核酸。

[0202] 在具体实施方式中,核酸包括编码H-NOX蛋白或H-NOX结构域的核酸中的任一者的部分或完整核酸序列。在一些实施方式中,核酸包括来自H-NOX核酸的至少约50、100、150、200、300、400、500、600、700、800、或更多个连续核苷酸,并且包含一个或多个突变(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个突变)与其来源H-NOX核酸相比。在不同实施方式中,突变型H-NOX核酸与其来源H-NOX核酸相比包含小于约20、15、12、10、9、8、7、6、5、4、3、或2个突变。本发明还描述了编码突变型H-NOX蛋白的任何核酸的简并变体。

[0203] 在一些实施方式中,核酸包括编码2个或更多个H-NOX结构域的核酸。在一些实施方式中,包括2个或更多个H-NOX结构域的核酸连接,使得多聚H-NOX蛋白由该核酸表达。在进一步实施方式中,核酸包括编码一个或多个聚合结构域的核酸。在一些实施方式中,包括2个或更多个H-NOX结构域和一个或多个聚合结构域的核酸连接,使得多聚H-NOX蛋白由该核酸表达。

[0204] 在一些实施方式中,核酸包括编码聚合结构域的任何核酸的部分或完整核酸序列。在一些实施方式中,核酸包括编码H-NOX结构域和聚合结构域的核酸。在一些实施方式中,编码H-NOX结构域的核酸和编码聚合结构域的核酸连接,使得产生的多肽是包括H-NOX结构域和聚合结构域的融合蛋白。

[0205] 在一些实施方式中,核酸包括编码一个或多个His_6标签的核酸。在一些实施方式中,核酸进一步包括编码位于编码H-NOX结构域、聚合结构域和/或His_6标签的核酸之间的连接序列的核酸。

[0206] 在一些实施方式中,本发明提供了编码H-NOX结构域和折叠子结构域的核酸。在一些实施方式中,H-NOX结构域是腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域。在一些实施方式中,H-NOX结构域是野生型腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域。在一些实施方式中,H-NOX结构域是腾冲嗜热厌氧菌L144F H-NOX结构域。在一些实施方式中,H-NOX结构域是腾冲嗜热厌氧菌W9F/L144F H-NOX结构域。

[0207] 在一些实施方式中,本发明提供了编码下列的核酸(5'至3'):L144F腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域、Gly-Ser-Gly氨基酸连接序列、和折叠子结构域。在一些实施方式中,本发

明提供了编码下列的核酸(5'至3'):W9F/L144F腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域、Gly-Ser-Gly氨基酸连接序列、和折叠子结构域。在一些实施方式中,本发明提供了编码下列的核酸(5'至3'):野生型腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域、Gly-Ser-Gly氨基酸连接序列、和折叠子结构域。

[0208] 在一些实施方式中,本发明提供了编码下列的核酸(5'至3'):L144F腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域、Gly-Ser-Gly氨基酸连接序列、折叠子结构域、Arg-Gly-Ser连接序列、和His_6标签。在一些实施方式中,本发明提供了编码下列的核酸(5'至3'):W9F/L144F腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域、Gly-Ser-Gly氨基酸连接序列、折叠子结构域、Arg-Gly-Ser连接序列、和His_6标签。在一些实施方式中,本发明提供了编码下列的核酸(5'至3'):野生型腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域、Gly-Ser-Gly氨基酸连接序列、折叠子结构域、Arg-Gly-Ser连接序列、和His_6标签。

[0209] 在一些实施方式中,核酸包括SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7中所示的核酸序列。

[0210] 本发明还包括细胞或细胞群包含编码本文描述的突变型H-NOX蛋白的至少一种核酸。示例性细胞包括昆虫、植物、酵母、细菌、和哺乳动物细胞。这些细胞可用于利用标准方法如本文描述的那些方法生产突变型H-NOX蛋白。

[0211] 在一些实施方式中,本发明提供了包括编码H-NOX结构域和折叠子结构域的核酸的细胞。在一些实施方式中,H-NOX结构域是腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域。在一些实施方式中,H-NOX结构域是野生型腾冲嗜热厌氧菌H-NOX结构域。在一些实施方式中,H-NOX结构域是腾冲嗜热厌氧菌L144F H-NOX结构域。在一些实施方式中,H-NOX结构域是腾冲嗜热厌氧菌W9F/L144F H-NOX结构域。在一些实施方式中,本发明提供了包括包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7中所示的核酸序列的核酸的细胞。

[0212] H-NOX蛋白制剂

[0213] 本发明提供了用于增强肿瘤免疫原性的O_2载体多肽的制剂;例如,通过抑制肿瘤低氧相关的免疫抑制活性。O_2载体多肽的非限制性示例性家族是O_2载体多肽的H-NOX家族。本文描述的包括多聚H-NOX蛋白在内的任何野生型或突变型H-NOX蛋白可用于药物或非药物组合物的制剂。在一些实施方式中,制剂包括单体H-NOX蛋白,该单体H-NOX蛋白包括H-NOX结构域和聚合结构域,使得单体H-NOX蛋白在体外或体内结合以产生多聚H-NOX蛋白。如下文进一步讨论,这些制剂可用于多种治疗和工业应用。

[0214] 在一些实施方式中,药物组合物包括本文描述的一种或多种野生型或突变型H-NOX蛋白——包括多聚H-NOX蛋白——和药学上可接受的载体或赋形剂。药学上可接受的载体或赋形剂的实例包括但不限于,任何标准药物载体或赋形剂如磷酸缓冲盐水溶液、水、乳液如油/水乳液,和各种类型的润湿剂。用于气溶胶或胃肠外给予的示例性稀释剂为磷酸缓冲盐水或生理(0.9%)盐水。包括这种载体的组合物通过公知常规方法(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,18th edition,A.Gennaro,ed.,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1990;和Remington,The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed.Mack Publishing,2000,其均整体通过引用被并入本文其整体,具体地关于制剂)来配制。在一些实施方式中,制剂是无菌的。在一些实施方式中,制剂基本上不含内毒素。

[0215] 虽然本领域普通技术人员已知的任何适当载体可用于本发明的药物组合物,但载

体类型将取决于给予模式而不同。组合物可配制用于任何适当的给予方式，包括，例如，静脉内、动脉内、囊内、肿瘤内、吸入、腹膜内、肺内、肌内、皮下、气管内、经粘膜、眼内、鞘内、或经皮给予。关于胃肠外给予，如皮下注射，载体可包括，例如，水、盐水、醇、脂肪、蜡、或缓冲剂。关于口服给予，可采用任何上述载体或固体载体，如甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、或碳酸镁。可生物降解微球(例如，聚乳酸聚乙醇酸酯(polylactate polyglycolate))也可用作载体。

[0216] 在一些实施方式中，药物或非药物组合物包括缓冲剂(例如，中性缓冲盐水、磷酸缓冲盐水等)、碳水化合物(例如，葡萄糖、甘露糖、蔗糖、葡聚糖等)、抗氧化剂、螯合剂(例如，EDTA、谷胱甘肽等)、防腐剂、可用于结合和/或运输氧气的另一化合物、无活性成分(例如，稳定剂，填充剂等)、或前述2种或更多种的组合。在一些实施方式中，组合物被配制为冻干物。H-NOX蛋白还可利用公知的技术被封装在脂质体或纳米颗粒内。可用于H-NOX蛋白的其它示例性制剂被描述于，例如，美国专利号6,974,795、和6,432,918，其均整体通过引用被并入本文其整体，具体地关于蛋白质制剂。

[0217] 本文描述的组合物可作为持续释放制剂(例如，在给予后产生化合物缓慢释放的制剂，如胶囊或海绵(sponge))的一部分被给予。这种制剂总体上可利用公知的技术来制备和通过例如口服、直肠或皮下植入、或在期望目标位点植入来给予。持续释放制剂可包含分散在载体基质和中/或包含在速率控制膜包围的储器内的H-NOX蛋白。用于这种制剂中的载体是生物相容性的，并且还可以是可生物降解的。在一些实施方式中，制剂提供相对恒定的H-NOX蛋白释放水平。持续释放制剂内的H-NOX蛋白含量取决于植入位点、释放速率和预期持续时间、和待治疗或预防的状况的属性。

[0218] 在一些实施方式中，药物组合物包含有效量的野生型或突变型H-NOX蛋白。在一些实施方式中，药物组合物包含有效量的多聚H-NOX蛋白，该多聚H-NOX蛋白包括2个或更多个野生型或突变型H-NOX结构域。在一些实施方式中，药物组合物包含有效量的本文所述的重组单体H-NOX蛋白，该重组单体H-NOX蛋白包括野生型或突变型H-NOX结构域和聚合结构域。在一些实施方式中，制剂包括三聚H-NOX蛋白，该三聚H-NOX蛋白包括3个单体，每个单体均包括腾冲嗜热厌氧菌L144F H-NOX结构域和折叠子结构域。在一些实施方式中，制剂包括三聚H-NOX蛋白，该三聚H-NOX蛋白包括3个单体，每个单体均包括腾冲嗜热厌氧菌W9F/L144F H-NOX结构域和折叠子结构域。在一些实施方式中，制剂包括三聚H-NOX蛋白，该三聚H-NOX蛋白包括3个单体，每个单体均包括腾冲嗜热厌氧菌L144F H-NOX结构域和折叠子结构域。在一些实施方式中，制剂包括PEG化的三聚H-NOX蛋白，该三聚H-NOX蛋白包括3个单体，每个单体均包括腾冲嗜热厌氧菌L144F H-NOX结构域和折叠子结构域。在一些实施方式中，药物组合物包括有效调节肿瘤免疫性(例如，增强对肿瘤的免疫响应)的量的O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)。

[0219] 在一些实施方式中，给予人的H-NOX蛋白有效量在几克至超过约350克之间。H-NOX蛋白的其它示例性剂量包括在适当的输注速率如约0.5ml/min下约4.4.、5、10、或13G/DL中的任一者(其中G/DL是输注到循环中之前的H-NOX蛋白溶液的浓度)(参见，例如，Winslow，R.Chapter 12In Blood Substitutes)。将理解，每个剂型的个体剂量所包含的活性成分的单位含量无需自身构成有效量，因为必需的有效量可通过多次给予的组合效果来实现。构成药物组合物的H-NOX蛋白量的选择取决于根据本领域普通技术人员确定的所用剂型、所

治疗状况、和所实现具体目的。

[0220] 示例性组合物包括遗传改造(基因工程,genetically engineered)重组H-NOX蛋白,其可被分离或纯化,相对于相应的野生型H-NOX蛋白包括共同赋予改变的O_2或NO配体结合的一个或多个突变,并且作为生理相容性哺乳动物血液气体载体生效。例如,本文所述的突变型H-NOX蛋白。在一些实施方式中,H-NOX蛋白是多聚H-NOX蛋白。在一些实施方式中,H-NOX蛋白是本文所述的重组单体H-NOX蛋白,该重组单体H-NOX蛋白包括野生型或突变型H-NOX结构域和聚合结构域。在一些实施方式中,组合物包括三聚H-NOX蛋白,该三聚H-NOX蛋白包括3个单体,每个单体均包括腾冲嗜热厌氧菌L144F H-NOX结构域和折叠子结构域。在一些实施方式中,组合物包括三聚H-NOX蛋白,该三聚H-NOX蛋白包括3个单体,每个单体均包括腾冲嗜热厌氧菌W9F/L144F H-NOX结构域和折叠子结构域。在一些实施方式中,组合物包括三聚H-NOX蛋白,该三聚H-NOX蛋白包括3个单体,每个单体均包括腾冲嗜热厌氧菌L144F H-NOX结构域和折叠子结构域。在一些实施方式中,组合物包括PEG化的三聚H-NOX蛋白,该三聚H-NOX蛋白包括3个单体,每个单体均包括腾冲嗜热厌氧菌L144F H-NOX结构域和折叠子结构域。

[0221] 为降低或预防被给予药物组合物的人对象的免疫响应,可采用人H-NOX蛋白或结构域(其中已引入一个或多个突变的野生型人蛋白或人蛋白)或其它非抗原H-NOX蛋白或结构域(例如,哺乳动物H-NOX蛋白)。为降低或消除源自非人来源的H-NOX蛋白的免疫原性,可使H-NOX蛋白或H-NOX结构域中的氨基酸突变成人H-NOX中的相应氨基酸。例如,可使非人H-NOX蛋白的三级结构表面上的一个或多个氨基酸突变成人H-NOX蛋白中的相应氨基酸。

[0222] 调节肿瘤免疫性的方法

[0223] 在一些方面,本发明提供了调节肿瘤免疫性的方法,并且因此可用于抗癌治疗。低氧肿瘤微环境通过调节多个信号传导途径(图1)而抑制宿主的免疫抗肿瘤防御,该信号传导途径包括但不限于低氧诱导因子(HIF-1)信号传导(Codo et al.,2014Oncotarget,5(17),7651-7662;Lee,Mace,&Repasky,2010Int J Hyperthermia,26(3),232-246;Wei et al.,2011PLoS One,6(1),e16195)、抗肿瘤T细胞的miRNA表观遗传调控、肿瘤细胞上的MHC1表达、和肿瘤相关的巨噬细胞和骨髓衍生的抑制细胞(MDSC)的募集。HIF-1途径的低氧激活已被证实激活腺苷能A2和PD-L1途径,进而抑制辅助和杀伤性T细胞和NK细胞的募集和激活(Noman et al.,2014J Exp Med,211(5),781-790;Ohta et al.,2006Proc Natl Acad Sci U S A,103(35),13132-13137)。HIF-1途径的低氧激活还可导致抑制性调节性T细胞(Treg)、肿瘤相关的巨噬细胞(TAM)和其它骨髓衍生的抑制细胞(MDSC)的募集和激活(Chaturvedi et al.,2014Proc Natl Acad Sci U S A,111(20),E2120-2129;Corzo et al.,2010J Exp Med,207(11),2439-2453;Wei et al.,2011)。HIF-1途径激活还可通过增加MHC1受体的肿瘤脱落(shedding)而直接抑制肿瘤细胞被免疫系统识别的能力(Siemens et al.,2008Cancer Res,68(12),4746-4753)。

[0224] 在一些方面,本发明提供了调节携肿瘤个体的肿瘤免疫性的方法,包括向个体给予有效量的O_2载体多肽(例如,H-NOX蛋白)。在一些实施方式中,肿瘤免疫性调节包括增强对肿瘤的免疫响应。在一些实施方式中,本发明提供了增加对个体的肿瘤的白细胞浸润的方法,包括向个体给予有效量的O_2载体多肽。在一些实施方式中,本发明提供了增加对个体的肿瘤的淋巴细胞浸润的方法,包括向个体给予有效量的O_2载体多肽。在一些实施方式中,

对肿瘤的淋巴细胞浸润增加包括CD4细胞、CD8细胞、或NK细胞中的一种或多种的浸润增加。在一些实施方式中，肿瘤免疫性调节包括增加抗原加工。在一些实施方式中，肿瘤免疫性调节包括增加树突状细胞(DC)的呈递能力。在一些实施方式中，肿瘤免疫性调节包括增加对肿瘤的淋巴细胞浸润、增加抗原加工、或增加DC呈递能力中的一种或多种。在一些实施方式中，肿瘤免疫性调节包括淋巴细胞激活。在一些实施方式中，肿瘤免疫性调节包括细胞因子分泌。在一些实施方式中，O_2载体多肽是三聚Tt H-NOX L144F多肽。在一些实施方式中，O_2载体多肽是PEG化的三聚Tt H-NOX L144F多肽。

[0225] 在本发明的一些实施方式中，对肿瘤的淋巴细胞浸润增加伴随有肿瘤中Treg细胞、肿瘤相关的巨噬细胞或骨髓衍生的抑制细胞中的一种或多种的抑制。在一些实施方式中，对肿瘤的淋巴细胞浸润增加伴随有肿瘤细胞上的MHC1表达增加。

[0226] 在一些实施方式中，本发明提供了减少个体的肿瘤中的HIF-1α表达的方法，包括向个体给予有效量的O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)。在一些实施方式中，向个体给予有效量的O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)，导致HIF-1α表达减少。在一些实施方式中，与无O_2载体多肽治疗情况下的HIF-1α表达相比，HIF-1α表达的减少多于约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或100％中的任一者。在一些实施方式中，与无O_2载体蛋白治疗情况下的HIF-1α表达相比，HIF-1α表达减少多于约1hr、2hr、3hr、4hr、5hr、6hr、8hr、10hr、12hr、16hr、20hr、24hr、30hr、36hr、42hr或48hr中的任一者。在一些实施方式中，O_2载体多肽是三聚Tt H-NOX L144F多肽。在一些实施方式中，O_2载体多肽是PEG化的三聚Tt H-NOX L144F多肽。

[0227] 在一些实施方式中，本发明提供了减少个体的肿瘤中的HIF-1α表达的方法，包括向个体给予有效量的O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)，其中以血管上皮细胞生长因子(VEGF)表达减少来测量HIF-1α表达的减少。在一些实施方式中，有效量的O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)对个体的给予导致VEGF表达减少。在一些实施方式中，与无O_2载体多肽治疗情况下的VEGF表达相比，VEGF表达的减少多于约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或100％中的任一者。在一些实施方式中，VEGF表达减少——与无O_2载体蛋白治疗情况下的VEGF表达相比——多于约1hr、2hr、3hr、4hr、5hr、6hr、8hr、10hr、12hr、16hr、20hr、24hr、30hr、36hr、42hr或48hr中的任一者。在一些实施方式中，O_2载体多肽是三聚Tt H-NOX L144F多肽。在一些实施方式中，O_2载体多肽是PEG化的三聚Tt H-NOX L144F多肽。

[0228] 在一些实施方式中，本发明提供了减少个体的肿瘤中的HIF-1α表达的方法，包括向个体给予有效量的O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)，其中以1型葡萄糖转运体(Glut1)的表达减少测量HIF-1α表达的减少。在一些实施方式中，有效量的O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)对个体的给予导致Glut1表达减少。在一些实施方式中，与无O_2载体多肽治疗情况下的Glut1表达相比，Glut1表达的减少多于约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或100％中的任一者。在一些实施方式中，Glut1表达减少——与无O_2载体蛋白治疗情况下的Glut1表达相比——多于约1hr、2hr、3hr、4hr、5hr、6hr、8hr、10hr、12hr、16hr、20hr、24hr、30hr、36hr、42hr或48hr中的任一者。在一些实施方式中，O_2载体多肽是三聚Tt H-NOX L144F多肽。在一些实施方式中，O_2载体多肽是PEG化的三聚Tt H-NOX L144F多肽。

[0229] 在一些实施方式中，本发明提供了减少个体的肿瘤中的PD-L1表达的方法，包括向个体给予有效量的O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)。在一些实施方式中，有效量的O_2载体多肽

(例如,H-NOX蛋白)对个体的给予导致PD-L1表达减少。在一些实施方式中,与无O_2载体多肽治疗情况下的PD-L1表达相比,PD-L1表达的减少多于约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者。在一些实施方式中,有效量的O_2载体多肽(例如,H-NOX蛋白)对个体的给予导致PD-L1与PD-1的相互作用减少。在一些实施方式中,与无O_2载体多肽治疗情况下的PD-L1与PD1的相互作用相比,PD-L1与PD1的相互作用的减少多于约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者。在一些实施方式中,PD-L1表达减少——与无O_2载体蛋白治疗情况下的PD-L1表达相比——多于约1hr、2hr、3hr、4hr、5hr、6hr、8hr、10hr、12hr、16hr、20hr、24hr、30hr、36hr、42hr或48hr中的任一者。在一些实施方式中,O_2载体多肽是三聚Tt H-NOX L144F多肽。在一些实施方式中,O_2载体多肽是PEG化的三聚Tt H-NOX L144F多肽。

[0230] 在一些实施方式中,本发明提供了个体的肿瘤中的减少A2AR表达的方法,包括向个体给予有效量的O_2载体多肽(例如,H-NOX蛋白)。在一些实施方式中,有效量的O_2载体多肽(例如,H-NOX蛋白)对个体给予导致A2AR表达减少。在一些实施方式中,与无O_2载体多肽治疗情况下的A2AR表达相比,A2AR表达的减少多于约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者。在一些实施方式中,有效量的O_2载体多肽(例如,H-NOX蛋白)对个体的给予导致A2AR与腺苷的相互作用减少。在一些实施方式中,与无O_2载体多肽治疗情况下的A2AR与腺苷的相互作用相比,A2AR与腺苷的相互作用的减少多于约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者。在一些实施方式中,A2AR表达减少——与无O_2载体蛋白治疗情况下的A2AR表达相比——多于约中1hr、2hr、3hr、4hr、5hr、6hr、8hr、10hr、12hr、16hr、20hr、24hr、30hr、36hr、42hr或48hr的任一者。在一些实施方式中,O_2载体多肽是三聚Tt H-NOX L144F多肽。在一些实施方式中,O_2载体多肽是PEG化的三聚Tt H-NOX L144F多肽。

[0231] 在一些实施方式中,本发明提供了减少个体的肿瘤中的HIF-2α表达的方法,包括向个体给予有效量的O_2载体多肽(例如,H-NOX蛋白)。在一些实施方式中,有效量的O_2载体多肽(例如,H-NOX蛋白)对个体的给予导致HIF-2α表达减少。在一些实施方式中,与无O_2载体多肽治疗情况下的HIF-2α表达相比,HIF-2α表达的减少多于约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者。在一些实施方式中,有效量的O_2载体多肽(例如,H-NOX蛋白)对个体的给予导致HIF-2α表达减少。在一些实施方式中,与无O_2载体多肽治疗情况下的HIF-2α表达相比,HIF-2α表达的减少多于约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者。在一些实施方式中,HIF-2α表达减少——与无O_2载体蛋白治疗情况下的HIF-2α表达相比——多于约中1hr、2hr、3hr、4hr、5hr、6hr、8hr、10hr、12hr、16hr、20hr、24hr、30hr、36hr、42hr或48hr的任一者。在一些实施方式中,O_2载体多肽是三聚Tt H-NOX L144F多肽。在一些实施方式中,O_2载体多肽是PEG化的三聚Tt H-NOX L144F多肽。

[0232] 在一些实施方式中,本发明提供了通过本文描述的任何方法调节个体的肿瘤免疫性(例如,增强对肿瘤的免疫响应)的方法。肿瘤的实例包括但不限于脑肿瘤、成胶质细胞瘤、骨肿瘤、胰肿瘤、皮肤肿瘤、头或颈肿瘤、黑素瘤、肺肿瘤、子宫肿瘤、卵巢肿瘤、结肠直肠肿瘤、肛门肿瘤、肝肿瘤、肝细胞癌、胃肿瘤、睾丸肿瘤、子宫内膜肿瘤、子宫颈肿瘤、阴道肿瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、食管肿瘤、肠肿瘤、甲状腺肿瘤、肾上腺肿瘤、膀胱肿

瘤、肾肿瘤、乳腺肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肉瘤、或鳞状细胞肿瘤。

[0233] 在一些实施方式中，本发明提供了通过本文描述的任何方法调节个体的肿瘤免疫性(例如，增强对肿瘤的免疫响应)的方法，从而提供治疗个体的癌症的方法。可通过本发明的方法治疗的癌症的实例包括但不限于脑癌、成胶质细胞瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、黑素瘤、肺癌、子宫癌、卵巢癌、结肠直肠癌、肛门癌、肝癌、肝细胞癌、胃癌、睾丸癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食管癌、肠癌、甲状腺癌、肾上腺癌、膀胱癌、肾癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、肉瘤、或鳞状细胞癌。

[0234] 在一些实施方式中，本发明提供了通过本文描述的任何方法调节个体的肿瘤免疫性的方法。在一些实施方式中，个体是哺乳动物；例如，人。在一些实施方式中，哺乳动物是宠物、实验室研究动物、或农场动物。宠物、研究动物或农场动物的非限制性实例包括狗、猫、马、猴、兔、大鼠、小鼠、豚鼠、仓鼠、猪和牛。

[0235] O_2载体多肽可通过任何途径给予，包括但不限于静脉内、动脉内、肿瘤内、囊内、吸入、腹膜内、肺内、肌内、皮下、气管内、经粘膜、眼内、鞘内、或经皮给予。

[0236] 在一些方面，氧气至肿瘤的持续递送是抑制低氧介导的肿瘤免疫性和增强肿瘤免疫响应所期望的。在本发明的一些实施方式中，O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)的给予重复进行。O_2载体多肽的给予可重复直到建立起稳健的肿瘤免疫响应。在一些实施方式中，O_2载体多肽的给予重复至少约2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、12次、14次、20次、30次、40次、50次或100次中的任一者。在一些实施方式中，O_2载体多肽的给予重复约2次和约20次之间。在一些实施方式中，O_2载体多肽的给予重复约20次和约40次中的任一者、约40次和约60次中的任一者、约60次和约80次中的任一者、约80次和约100次中的任一者、或其间的任何次数之间。在一些实施方式中，O_2载体多肽的给予重复一日一次或两次，重复约42至约84次给予。

[0237] 示例性用药频率包括但不限于一周至少1、2、3、4、5、6、或7次(即，一日一次)。在一些实施方式中，O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)被给予一天至少2、3、4、或6次。在一些实施方式中，O_2载体多肽被每4小时、每8小时、每12小时、每24每小时、每48小时或一周2次或一周3次给予。在一些实施方式中，O_2载体多肽被给予下列中的任一者：1小时和2小时之间、2小时和4小时之间、4小时和8小时之间、8小时和12小时之间、或12小时和24小时之间。在一些实施方式中，O_2载体多肽每4小时、每8小时、每12小时或每24小时被给予，给予约1至约10天的时期。在一些实施方式中，O_2载体多肽可被给予，例如，经几天或几周的时期。在一些实施方式中，O_2载体多肽被给予更长时期，如几个月或几年。组合物的用药频率可基于给药医师的判断经各疗程调节。

[0238] 在一些实施方式中，O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)被弹丸式给予。在一些实施方式中，弹丸体积大于约1mL、2mL、3mL、4mL、5mL、6mL、7mL、8mL、9mL、10mL、15mL、20mL、25mL、50mL、75mL、或100mL中的任一者。在一些实施方式中，弹丸剂量的给予如上重复。

[0239] 在一些实施方式中，O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)通过输注被给予。在一些实施方式中，输注大于15分钟、30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、16小时、20小时或24小时约中的任一者。在一些实施方式中，输注在约15分钟和30分钟、30分钟和1小时、1小时和2小时、2小时和3小时、3小时和4小时、4小时和5小时、5小时和6小时、6小时和7小时、7小时和8小时、8小时和9小时、9小时和10小时、10小

时和12小时、12小时和16小时、16小时和20小时或20小时和24小时中的任一者之间。在一些实施方式中，输注速率大于约1mL/hr、2mL/hr、3mL/hr、4mL/hr、5mL/hr、6mL/hr、7mL/hr、8mL/hr、9mL/hr、10mL/hr、20mL/hr、30mL/hr、40mL/hr、50mL/hr、60mL/hr、70mL/hr、80mL/hr、90mL/hr、100mL/hr、200mL/hr、300mL/hr、400mL/hr、500mL/hr、600mL/hr、700mL/hr、800mL/hr、900mL/hr、1000mL/hr、2000mL/hr、3000mL/hr、4000mL/hr、5000mL/hr、6000mL/hr、7000mL/hr、8000mL/hr、9000mL/hr、10,000mL/hr或其间的任何速率中的任一者。在一些实施方式中，输注如上重复。

[0240] 在一些实施方式中，O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)被给予的剂量大于约1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、50mg/kg、55mg/kg、60mg/kg、65mg/kg、70mg/kg、75mg/kg、80mg/kg、85mg/kg、90mg/kg、95mg/kg、100mg/kg、200mg/kg、300mg/kg、400mg/kg、500mg/kg、600mg/kg、700mg/kg、800mg/kg、900mg/kg、1000mg/kg、或其间的任何剂量中的任一者。在一些实施方式中，剂量以一次或多次弹丸给予提供。在一些实施方式中，剂量以一次或多次输注提供。在一些实施方式中，剂量在多于一次给予中提供(例如，100mg/kg剂量可通过2剂50mg/kg提供)。

[0241] 在本发明的一些实施方式中，O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)与放射治疗组合应用。在一些实施方式中，O_2载体多肽在给予放射前至少1、2、3、4、5、6、8、10、12、14、16、18、20、22、或24小时中的任一者被给予个体。在一些实施方式中，放射X辐射。在一些实施方式中，X辐射剂量是约0.5Gy至约75Gy中的任一者。在一些实施方式中，O_2载体多肽给予和放射给予的循环重复1、2、3、4、5或6次中的任一者。在一些实施方式中，O_2载体多肽给予和放射给予的循环在约1周、2周、3周、4周、5周或6周中的任一者之后重复。在一些实施方式中，O_2载体多肽和放射治疗的给予与另一治疗结合应用；例如，化学治疗和/或免疫治疗。

[0242] 在本发明的一些实施方式中，O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)与化学治疗组合应用。在一些实施方式中，化学治疗是细胞毒素。包括细胞毒素的化学治疗剂在本领域已知。在一些实施方式中，细胞毒素是烷化剂。在一些实施方式中，细胞毒素是环磷酰胺或替莫唑胺(temozolomide)。在一些实施方式中，O_2载体多肽在化学治疗给予前被给予。在一些实施方式中，O_2载体多肽与化学治疗给予一起被给予。在一些实施方式中，O_2载体多肽在化学治疗给予后被给予。在一些实施方式中，O_2载体多肽在化学治疗给予前至少1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、14、16、18、20、22、或24小时中的任一者被给予个体，或在化学治疗给予前1、2、3、4、5、6、或7天被一日一次或两次给予。在一些实施方式中，O_2载体多肽在化学治疗给予后至少1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、或24小时中的任一者被给予个体。在一些实施方式中，O_2载体多肽的给予和/或化学治疗的给予重复1、2、3、4、5、6、7、8、9、10次或多于10次中的任一者。在一些实施方式中，O_2载体多肽的给予和/或化学治疗的给予在约1周、2周、3周、4周、5周或6周中的任一者之后重复。在一些实施方式中，O_2载体多肽和化学治疗的给予基于相同的用药循环。在一些实施方式中，O_2载体多肽和化学治疗的给予基于不同的用药循环。在一些实施方式中，H-NOX和放射治疗的给予与另一治疗结合应用；例如，放射治疗和/或免疫治疗。

[0243] 在一些实施方式中，O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)在免疫治疗以前和/或结合免疫治疗被给予癌症患者。在一些实施方式中，免疫治疗是抗癌疫苗、过继性免疫细胞治疗、靶向免疫检查点调节因子的药剂，溶瘤病毒或BiTE中的一种或多种。在一些实施方式中，免

疫治疗靶是CTLA-4、PD1、PD-L1、或免疫检查点调节因子中的一种或多种。在一些实施方式中，免疫治疗是双重PD1/CTLA-4封锁治疗。在一些实施方式中，免疫治疗是针对PDL1+肿瘤患者的PDL-1治疗或双重PD1/PD-L1封锁。非限制性实例包括但不限于PD-1和PDL-1拮抗剂，如抗体(例如，Nivolumab)。在一些实施方式中，检查点抑制剂是CTLA4拮抗剂，如抗体(例如，伊匹单抗(ipilumumab))。在一些实施方式中，免疫治疗是过继性T细胞治疗，包括但不限于嵌合抗原受体T细胞(例如，CAR-T细胞)或工程TCR-T细胞。在一些实施方式中，免疫治疗是双特异性T细胞衔接体(BiTE)。在一些实施方式中，免疫治疗包括下列中的一种或多种：抗淋巴细胞激活基因3(LAG-3)治疗、抗T细胞免疫球蛋白粘蛋白-3(TIM-3)治疗、抗杀伤性免疫球蛋白样受体(KIR)治疗、抗4-1BB(CD137)激动/刺激治疗、或糖皮质激素诱导的TNFR家族相关基因(GITR)激动/刺激治疗——每种单独或彼此组合、和/或组合PD1、PDL-1、CTLA-4或其它治疗中的一种或多种。

[0244] 靶向非PD-1/PDL-1和CTLA4负调节因子的检查点蛋白质的治疗的非限制性实例包括免疫响应的正和负(检查点抑制剂)调节因子，并且可以是抗体或小分子，如IDO(吲哚胺-2.3双加氧酶)途径抑制剂，如直接IDO酶促活性抑制剂(例如，NLG919)、IDO效应途径抑制剂(例如，D-1-甲基-色氨酸，Indoximod，NLG8189)、TDO(色氨酸2,3-双加氧酶)抑制剂、或IDO-TDO双重抑制剂；淋巴细胞-激活基因3(LAG-3、CD223)抗体拮抗剂(例如，IMP321、BMS-986016)；杀伤性免疫球蛋白样受体(KIR)拮抗剂，如抗体(例如，lirilumab，IPH2101)；T细胞免疫球蛋白粘蛋白-3(TIM-3)拮抗剂，如抗体；B-和T细胞弱化剂(attenuator)(BTLA，CD272)拮抗剂，如抗体；OX40(CD134)激动剂，如激活/刺激抗体；4-1BB(CD137)激动剂，如刺激抗体(例如，BMS-663513)；糖皮质激素诱导的TNFR家族相关基因(GITR)激动剂，如刺激抗体(例如，TRX518)；和溶瘤病毒。

[0245] 在一些实施方式中，O_2载体多肽在免疫治疗给予前被给予。在一些实施方式中，O_2载体多肽与免疫治疗给予一起被给予。在一些实施方式中，O_2载体多肽在免疫治疗给予后被给予。在一些实施方式中，O_2载体多肽在免疫治疗给予之前至少1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、24、或48小时中的任一者被给予个体。在一些实施方式中，O_2载体多肽在免疫治疗给予之前至少3、4、5、6、7或更多天中的任一者被给予个体。在一些实施方式中，O_2载体多肽在免疫治疗给予之后至少1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、24或48小时中的任一者被给予个体。在一些实施方式中，O_2载体多肽在免疫治疗给予之后至少3、4、5、6、7或更多天中的任一者被给予个体。在一些实施方式中，O_2载体多肽的给予和/或免疫治疗的给予重复1、2、3、4、5、6、7、8、9、10次或多于10次中的任一者。在一些实施方式中，O_2载体多肽的给予和/或免疫治疗的给予在约1周、2周、3周、4周、5周或6周中的任一者之后重复。在一些实施方式中，O_2载体多肽和免疫治疗的给予基于相同的用药循环。在一些实施方式中，O_2载体多肽和免疫治疗的给予基于不同的用药循环。在一些实施方式中，H-NOX和放射治疗的给予与另一治疗结合应用；例如，放射治疗和/或化学治疗。

[0246] 在一些实施方式中，监测O_2载体多肽(例如，H-NOX蛋白)的给予效力；例如，但不限于肿瘤低氧、表达低氧-相关的肿瘤抑制剂和/或激活剂、肿瘤相关的免疫细胞和/或针对肿瘤细胞的免疫细胞的存在和/或局部性(肿瘤活检，淋巴结活检)或全身性(例如，外周血)细胞因子和免疫细胞特征(profiles)。确定肿瘤低氧水平的方法在本领域已知。实例包括但不限于下列中的任一者的测量：^{18}F-氟米索硝唑(FMISO)肿瘤摄入、pimidazole摄入、^{18}F-阿

拉伯糖苷氟氮霉素(fluoroazomycin arabinoside)(FAZA)摄入、硝基咪唑摄入、铜(II)-二乙酰基-双(N4-甲基缩氨基硫脲)(Cu-ATSM)摄入、六氟苯(C6F6)摄入——通过^{19}F磁共振成像、六甲基二硅氧烷摄入——通过^{1}H MRI、肿瘤HIF-1α表达、肿瘤HIF-2α表达、肿瘤HIF-3α表达、肿瘤Glut-1表达、肿瘤pH(pH加权MRI)qBOLD、OE-MRI、MOBILE MRI肿瘤LDHA表达、肿瘤碳酸酐酶IX(CA-9)表达、VEGF表达、或乳酸跟和/或丙酮酸根水平。在上述监测、治疗、和治疗优化方法的一些实施方式中,通过^{18}F-FMISO摄入来测量肿瘤低氧。在一些实施方式中,通过正电子发射断层扫描(PET)、计算机断层扫描(CT)或计算机轴向断层扫描(CAT)来测量^{18}F-FMISO摄入。检测基因如HIF-1α、PD-L1和A2AR的表达的方法在本领域已知;例如,通过免疫测验、通过免疫组织化学、通过定量PCR、通过杂交(例如,在基因芯片上)、及类似方式。

[0247] 具有H-NOX蛋白的试剂盒

[0248] 还提供用于调节个体的肿瘤免疫性的的制造制品和试剂盒。在一些实施方式中,制造制品或试剂盒包括如下任何O_2载体多肽——该O_2载体多肽包括本文描述的任何H-NOX蛋白,该H-NOX蛋白包括多聚H-NOX蛋白和PEG化的多聚H-NOX蛋白;和适当的包装。在一些实施方式中,本发明包括具有下列的试剂盒:(i)H-NOX蛋白(如本文描述的野生型或突变型H-NOX蛋白或本文描述的其制剂)和(ii)将该试剂盒用于递送O_2至个体的说明书。

[0249] 本文描述的组合物的适当包装在本领域已知,并且包括,例如,小瓶(例如,密封小瓶)、容器、安瓿瓶、瓶、罐、柔性包装(例如,密封Mylar或塑料袋)、及类似物。这些制造制品可进一步被灭菌和/或密封。还提供了包括本文描述的组合物的单位剂型。这些单位剂型可以单个或多个单位剂量储存在适当的包装中,并且还可进一步被灭菌和密封。本发明的试剂盒中提供的说明书一般是在标签或包装插入物(例如,试剂盒中包括的纸页)上的书面说明书,但机器可读说明书(例如,磁存储盘或光存储盘上携带的说明书)也是可接受的。与H-NOX蛋白的使用相关的说明总体上包括关于用于目的治疗或工业应用的剂量、用药日程、和给予途径的信息。试剂盒可进一步包括关于选择适于治疗的个体的描述。

[0250] 容器可以是单位剂量、批量包装(bulk packages)(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。例如,还可提供这样的试剂盒:包含充足剂量的本文公开的H-NOX蛋白,以长期提供对个体有效的治疗,如约1周、2周、3周、4周、6周、8周、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、或更久中的任一者。试剂盒还可包括多个单位剂量的H-NOX蛋白和使用说明书,并以充足量包装以在药房中(例如,医院药房和合成药房)中储存和使用。在一些实施方式中,试剂盒包括干燥的(例如,冻干的)组合物,其可再构、再悬浮或再水合以形成总体上稳定的H-NOX蛋白水悬浮液。

[0251] H-NOX蛋白的示例性生产方法

[0252] 如上所述,几种野生型H-NOX蛋白和核酸的序列已知,并且用于生成本发明的突变型H-NOX结构域和核酸。重组H-NOX蛋白的突变、表达、和纯化技术已被描述于,例如,Boon,E.M.et al.(2005).Nature Chemical Biology 1:53-59和Karow,D.S.et al.(August 10,2004).Biochemistry 43(31):10203-10211、美国专利号8,404,631和8,404,632、WO2007/139791、和WO 2007/139767——其通过引用被并入本文其整体,具体地关于重组H-NOX蛋白的突变、表达和纯化。这些技术或其它标准技术可用于生成任何突变型H-NOX蛋白。

[0253] 可利用标准技术将突变型H-NOX核酸并入载体,如表达载体。例如,限制酶可用于切割突变型H-NOX核酸和载体。然后,可连接切割后的突变型H-NOX核酸和切割后的载体的

相容性末端。利用标准技术(例如,电穿孔),所得载体可被插入细胞(例如,昆虫细胞、植物细胞、酵母细胞、或细菌细胞),以表达编码的H-NOX蛋白。

[0254] 具体地,异源蛋白质已被表达在多种生物表达系统中,如昆虫细胞、植物细胞、酵母细胞、和细菌细胞。因此,任何适当的生物学蛋白质表达系统可用于生产大量重组H-NOX蛋白。在一些实施方式中,H-NOX蛋白(例如,突变型或野生型H-NOX蛋白)是分离的蛋白质。

[0255] 如需,可利用标准技术纯化H-NOX蛋白。在一些实施方式中,蛋白质至少约按重量计60%不含蛋白质生成时存在的其它组分。在不同实施方式中,蛋白质为至少约按重量计75%、90%、或99%纯。可获得纯化蛋白质——例如,通过从天然来源、重组表达系统、或化学合成反应混合物纯化(例如,提取)。示例性纯化方法包括免疫沉淀,柱层析如免疫亲和层析,磁珠免疫亲和纯化,和用平板结合抗体淘选,以及技术人员已知的其它技术。纯度可通过任何适当的方法测验——例如,通过柱层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳、或HPLC分析。在一些实施方式中,纯化蛋白质被并入本发明的药物组合物或用于本发明的方法中。本发明的药物组合物除纯化蛋白质外还可具有添加剂、载体或其它组分。

[0256] 在一些实施方式中,多聚H-NOX蛋白包括一个或多个His_6标签。包括至少一个His_6标签的H-NOX蛋白可利用层析来纯化;例如,利用Ni^{2+}-亲和层析。在纯化后,可去除His_6标签;例如,通过利用肽链端解酶。在一些实施方式中,本发明提供了纯化的多聚H-NOX蛋白,其中多聚H-NOX蛋白通过His_6标签的使用而纯化。在一些实施方式中,纯化的H-NOX蛋白经肽链端解酶处理去除His_6标签。

[0257] 在一些实施方式中,H-NOX蛋白包括一个或多个聚乙二醇分子(即,PEG化)。生产PEG化蛋白质的方法在本领域已知。

[0258] 实施例

[0259] 实施例——意图仅仅示例本发明并且因此不应以任何方式被认为限制本发明——也描述和详细说明了上述发明的方面和实施方式。实施例不意图代表下文实验是进行的全部或仅有的实验。除非另外描述,温度是摄氏度,并且压力处于或接近大气压。

[0260] 实施例1.H-NOX能够有效充氧低氧肿瘤微环境

[0261] 评价远侧袋中携带L144F取代的PEG化三聚腾冲嗜热厌氧菌(Thermoanaerobacter tengcongensis)(Tt.)H-NOX(图6B)的充氧肿瘤微环境和增加放射敏感性的能力。PEG化三聚Tt H-NOX L144F向携带低氧肿瘤的小鼠的给予引起肿瘤快速和持续充氧——通过外部低氧标记物——哌莫硝唑、低氧诱导转录因子1α——HIF-1-α、和OxyLite氧气检测纳米纤维(分别在图2和3)直接测量。

[0262] 在肿瘤体积达到~300-350mm^3时(肿瘤细胞皮下植入后~10-14天),对携带H460皮下异种移植肿瘤的小鼠i.v.注射以650mg/kg的PEG化三聚体H-NOX(L144F)。在安乐死前,对小鼠注射以60mg/kg的外源低氧标记物哌莫硝唑,并收集肿瘤。通过竞争性(哌莫硝唑)和夹心(HIF-1α,Abcam)ELISA分别测量哌莫硝唑(图2A)(Hypoxyprobe-1)和HIF-1α(图2B)水平。图形显示PEG化H-NOX(L144F)给予后的哌莫硝唑和HIF-1α信号定量。介质,1h和4h:n=22,7h:n=18,12h:n=16,24h:n=6。4次独立实验的结果。平均值+/-SEM。****$p<0.0001$,***$p<0.001$,**$p<0.01$,*$p<0.05$,通过单程ANOVA和Bonferroni事后检验。(图2C)通过夹心H-NOX ELISA评估肿瘤在注射后1、4、7、16和24小时的PEG化H-NOX(L144F)积累,结果以每克肿瘤组织表示。对7至8周龄Nu/Nu雌性小鼠皮下植入以3×10^6个H460人肺癌细胞,并

监测直到肿瘤达到～300mm^{3}的平均尺寸(肿瘤细胞植入后10-14天)。对携带200-350mm^{3}异种移植肿瘤的小鼠i.v.注射以弹丸介质(制剂缓冲剂:50mM琥珀酸盐、50mM NaCl、3.4mM EDTA、和10mM还原的谷胱甘肽,pH 7)或包含650mg/kg PEG化三聚体H-NOX(L144F)的制剂缓冲剂。为测量肿瘤低氧,在安乐死前,对小鼠注射以60mg/kg的外源低氧标记物哌莫硝唑。将肿瘤收集并在补充有抗蛋白酶的提取缓冲剂(Abcam试剂盒#ab117996)中均质化。利用Bradford测验,定量每个肿瘤中的蛋白质浓度。利用Omniox研发的竞争性ELISA测定,测验样品的哌莫硝唑(Hypoxyprobe-1)量,并且利用Abcam ELISA试剂盒(ab117996)测验HIF-1α。

[0263] 在H460肺癌小鼠模型中,在4h和8h之间实现了最大充氧,并且其与通过ELISA评估的H-NOX(L144F)肿瘤积累峰相关(图2C)。

[0264] 关于H-NOX(L144F)肿瘤积累评估,在注射后的不同时间点收集肿瘤。将肿瘤与补充有抗蛋白酶的提取缓冲剂(Abcam试剂盒#ab117996)一起均质化,并利用Bradford测验来定量每个肿瘤中的蛋白质浓度。通过Omniox研发的H-NOX夹心ELISA来定量PEG化H-NOX(L144F)浓度,并相对于肿瘤重量标准化。

[0265] 虽然动物的补充充氧成功增加了小鼠肿瘤组织5-10mmHg氧气浓度的充氧,但其对氧气水平较低(<5mmHg)的区域无效果。相比之下,PEG化三聚体Tt H-NOX L144F能够甚至在严重低氧肿瘤组织(<5mmHg)中也增加充氧。这可能是因为PEG化三聚体Tt H-NOX L144F的组织渗透较优,这能够使氧气递送至超过氧气梯度扩散极限的区域。此外,虽然在持续暴露动物于95%-100%呼吸氧气时实现了小鼠肿瘤的最大补充充氧[增加高氧和对正常组织炎性损伤的风险(Kallet&Matthay,2013Respir Care,58(1):123-141;Thiel et al.,2005PLoS Biol,3(6),e174)],单个弹丸i.v.剂量的PEG化三聚体Tt H-NOX L144F可使组织充氧保持多于7小时,而不增加正常组织中的氧气水平。对照Tt H-NOX蛋白(野生型变体)——在低氧组织中存在的氧气浓度下不能释放氧气——对肿瘤充氧不具有任何效果(图3C)。

[0266] 对7至8周龄Nu/Nu雌性小鼠皮下植入以3×10^{6}个H460人肺癌细胞,并监测直到肿瘤达到～500mm^{3}的平均尺寸(肿瘤细胞植入后10-18天)。将携带H460肿瘤的小鼠用混合在20%氧气中的异氟醚麻醉,并利用微操纵器将OxyLite™探针(Oxford Optronix,UK)植入H460皮下异种移植肿瘤。OxyLite™由氯化钌染料组成——持于末梢处直径230μm的多聚体基质中。在平衡～20-30分钟后,利用4-通道单元相邻的光学荧光传感器测量pO_2。经确认的低起始pO_2进入远离相邻血管的低氧组织(～0.2mmHg;在图3D中除5mmHg处以外)。在探针植入后,停留探针～20-30min以进行pO_2测量至稳定,并给予小鼠呼吸100%O_2(图3B,图3D)或注射以PEG化H-NOX(图3A中的L144F,图3C中的wt),并记录荧光淬灭。

[0267] 相对于高氧气体给予,PEG化三聚体Tt H-NOX L144F递送氧气至低氧肿瘤区域的较优能力通过更有效的放射肿瘤细胞杀伤被进一步证明(图4)。

[0268] 将携带H460皮下异种移植肿瘤(200-350mm^3)的小鼠用10Gy治疗——单独或组合650mg/kg PEG化三聚体H-NOX(L144F),在辐射前7小时i.v.注射。将肿瘤在辐射后提取并处理用于克隆形成分析。计数10-14天后每个肿瘤三份样品中的细胞数量。图上的每个点表示一个肿瘤的平均存活分数。平均值+/-SEM(每次实验n＝3)。对7至8周龄Nu/Nu雌性小鼠皮下植入以3×10^{6}个H460人肺癌细胞,并监测直到肿瘤达到～300mm^{3}的平均尺寸(肿瘤细胞植入

后10-14天)。对携带200-350mm^{3}异种移植肿瘤的小鼠用10Gy进行辐射——单独或组合静脉内递送弹丸介质(制剂缓冲剂:50mM琥珀酸盐、50mM NaCl、3.4mM EDTA、和10mM还原的谷胱甘肽,pH 7)或包含650mg/kg PEG化H-NOX(L144F)的制剂缓冲剂。在辐射后处死小鼠,并将肿瘤收集和处理用于离体克隆形成分析。简而言之,将肿瘤细胞用解剖刀切碎成小块,并用包含胶原蛋白酶(200U/ml)、透明质酸酶(200U/ml)和DNA酶的混合体的酶混合物(10ml混合物/g肿瘤)消化~30分钟。然后将提取的细胞计数,并在6孔板中对未治疗肿瘤样品以每孔500/125/25个细胞接种和对辐射后肿瘤样品以每孔2000/500/100个细胞接种,一式两份。在10-12天后,将细胞群落用PFA固定,并用水晶紫染色。计数群落数量(超过50个细胞),并计算未治疗样品的铺平板效率(孔中计数的细胞数量÷铺平板细胞数量×100)。计算所有样品的存活分数(计数的细胞数量÷铺平板效率×100)。

[0269] 在PEG化三聚体Tt H-NOX L144F给予后,所有PEG化三聚体Tt H-NOX L144F治疗的肿瘤的放射治疗效力有>15倍的增加,使肿瘤细胞的存活分数从单独10Gy治疗组的30%降低至H-NOX(L144F)预治疗肿瘤的<2%。在相同实验中,对携带肿瘤小鼠用100%氧气的治疗显示放射增强的可变增加(variable increase)(~3倍),可能是源于个体肿瘤之间肿瘤充氧不等,这可能是因为肿瘤之间血管密度不均。

[0270] 实施例2.H-NO充当增强宿主抗肿瘤响应的免疫激活剂

[0271] PEG化三聚体Tt H-NOX L144F诱导的充氧抑制了HIF-1α途径(图2B)并缓解了HIF-1α依赖性的和HIF-1α非依赖性的肿瘤免疫抑制。对携带H460皮下异种移植肿瘤(200-350mm^3)的小鼠用单独介质或用PEG化三聚体H-NOX(L144F)治疗,并在注射后7、16或24小时收集用于qRT-PCR分析。平均值+/-SEM。每组N=5-6,*p<0.05,通过t检验。单个剂量H-NOX的治疗导致HIF-1α和其效应体的显著下调,其效应体包括宿主免疫响应的直接和间接调节因子:PD/PDL-1和VEGF信号传导、代谢和生长因子调节因子(图5)。

[0272] 对7至8周龄Nu/Nu雌性小鼠皮下植入以3×10^{6}个H460人肺癌细胞,并监测直到肿瘤达到~300mm^{3}的平均尺寸(肿瘤细胞植入后10-14天)。对携带200-350mm^{3}异种移植肿瘤的小鼠注射以弹丸介质(制剂缓冲剂:50mM琥珀酸盐、50mM NaCl、3.4mM EDTA、和10mM还原的谷胱甘肽,pH 7)或包含650mg/kg PEG化三聚体H-NOX(L144F)的制剂缓冲剂。为制备用于qRT-PCR分析的样品,处死小鼠并切除肿瘤。利用RNeasy试剂盒(QIAGEN),按照制造商说明书,从肿瘤样品提取全RNA。如述在StepOnePlus™实时PCR系统(Applied Biosystems)上进行逆转录和实时PCR(RT-PCR)。制备25μL反应——利用2μL cDNA模板、12.5μL SYBR® Green PCR Master混合体(Applied Biosystems)和1μL下列正义和反义引物:VEGF:正向,5'-CAATCGAGACCCTGGTGGA-3'(SEQ ID NO:23);反向,5'-GCACACACTCCAGGCCCT-3'(SEQ ID NO:24);Glut1:正向,5'-CAACCAGACATGGGTCCAC-3'(SEQ ID NO:25);反向,5'-GTTAACGAAAAGGCCCACAGA-3'(SEQ ID NO:26);PDL1:正向,5'-GTTGTGGATCCAGTCACCTCT-3'(SEQ ID NO:27);反向,5'-GATTCTCAGTGTGCTGGTCAC-3'(SEQ ID NO:28);L7:正向,5'-CAAGGAGGAAGCTTATCTATGAA-3'(SEQ ID NO:29);反向,5'-ATTTGACGAAGGCGAAGAAGCT-3'(SEQ ID NO:30)。热循环条件如下:初始步骤为在95℃下10min,然后40个循环的15s在95℃下变性然后1min在60℃下退火和延伸。结果利用对比CT法用StepOne软件v2.0分析。将目标基因的转录物相对于小鼠核糖体蛋白L7管家基因的转录物标准化,并作为相对于L7转录物含量的倍数变化显示。

[0273] 例如,PEG化三聚体Tt H-NOX L144F介导的HIF-1α和A2AR腺苷能信号传导下调可导致激活和效应T细胞至肿瘤组织募集,造成淋巴细胞肿瘤浸润增加、转移性肿瘤生长减少和肿瘤消退。此外,H-NOX诱导的肿瘤充氧可通过抑制多种低氧依赖性机制来降低肿瘤细胞免疫规避,该低氧依赖性机制包括肿瘤细胞表面上的MHC1的下调和PDL-1表达的上调、和骨髓衍生的抑制细胞(MDSC)(包括直接抑制免疫效应细胞以及促进血管形成和转移的TAM)的激活和募集(参见图1B)。H-NOX治疗可通过下调VEGF、CSF1和其它HIF-1依赖性细胞因子信号传导(Chaturvedi et al.,2014Proc Natl Acad Sci USA,111(20):E2120-2129;Lewis&Hughes,2007Breast Cancer Res,9(3):209)以及HIF-1-和HIF-2介导的巨噬细胞激活(Fang et al.,2009Blood,114(4):844-859;Takeda et al.,2010Genes Dev,24(5):491-501)来抑制巨噬细胞至TME的募集。

[0274] 最后,在刺激宿主的抗肿瘤免疫响应时,H-NOX可充当共激活剂,增强其它目标癌症免疫治疗——如但不限于抗PD1(程序细胞死亡蛋白1)、抗PDL-1(程序细胞死亡蛋白配体1)、抗CTLA-4、或靶向其它免疫检查点的调节因子的治疗、抗癌症疫苗、过继性免疫细胞治疗或其组合。例如,在PDL1+肿瘤患者中,H-NOX可先于和结合双重PD1/CTLA-4封锁治疗或组合PDL-1治疗被给予癌症患者。其还可充当其它癌症治疗的辅助剂,其它癌症治疗包括但不限于,化学治疗、放射治疗或可受益于活性抗肿瘤免疫防御的其它非免疫靶向治疗或基于细胞的治疗。事实上,H-NOX可协同放射,通过同时刺激对来自损伤肿瘤组织的放射暴露肿瘤特异性抗原的抗肿瘤免疫响应(Demaria et al.,2005Int J Radiat Oncol Biol Phys,63(3),655-666)和氧气依赖性肿瘤细胞杀伤(Brown,2010Int J Radiat Biol,86(11),907-917)。在放射治疗期间,H-NOX还可通过改善放射致血管损伤带来的低氧而充当正常组织放射保护剂。

[0275] 实施例3.B16F10和CT26皮下肿瘤和颅内GL261-荧光素酶肿瘤中的低氧和T细胞的测量。

[0276] B16F10和CT26皮下肿瘤和颅内GL261-荧光素酶肿瘤的生成。对6至8周龄C57BL/6J雌性小鼠在侧面皮下植入以1×10^6个B16F10小鼠黑素瘤癌细胞(图7A)。对6至8周龄BALB/c雌性小鼠在侧面皮下植入以1×10^6个CT26结肠肿瘤细胞(图7B)。对重20g的雄性C57BL/6J在右侧尾状核中颅内注射以3×10^5个GL261-luc细胞(+0.5mm A/P,+2.3mm M/L和-3.2mm D/V)(图7C)。在处死前使颅内肿瘤生长21天。一周3次用卡尺测量皮下肿瘤,并基于下列公式计算肿瘤尺寸:(长度×宽度^2)÷0.5。在肿瘤达到~300mm^{3}的平均尺寸后(肿瘤细胞植入后10-14天),开始治疗。

[0277] 治疗。在处死前1-8小时对携带200-400mm^{3}皮下肿瘤或第21天颅内肿瘤的小鼠ip.注射以外源低氧标记物哌莫硝唑(60mg/kg,Hypoxyprobe,Burlington Massachusetts)。

[0278] 免疫组织化学。对啮齿动物进行安乐死,并切除肿瘤用于免疫组织化学(IHC)测验。将肿瘤在OCT中冷冻,并以12μM切片用于IHC加工。将切片用4%PFA在4℃下固定15分钟,然后阻断和在室温下用5%BSA、5%山羊血清、和0.1%吐温20透化1-2小时。然后将切片与兔抗哌莫硝唑抗体(Hypoxyprobe,1:100)(图7A,7B,7C,上图)和大鼠抗CD3抗体、大鼠抗CD4抗体(Biolegend,1:50)或大鼠抗CD8抗体(Biolegend,1:50)一起在4℃下培育过夜(图7A、7B、7C,中图),然后与抗兔二抗或抗大鼠二抗(1:1000,Jackson Immunoresearch Laboratories,West Grove,PA,USA)一起在室温下培育2小时。将切片安装在SlowFade

DAPI(Invitrogen)中。利用配备有CCD数码摄像机的HD AxioImager Zeiss显微镜使切片成像。定量。在每个动物中，计数跨越1-1.5mm肿瘤厚度的5个肿瘤切片中每个切片的2-4张照片中的哌莫硝唑阳性区域和哌莫硝唑阴性区域中的CD3+、CD4+或CD8+T细胞数量。每个区域中的CD4+和CD8+细胞总和除以哌莫硝唑阳性区域和哌莫硝唑阴性区域的总和，获得每mm^2肿瘤组织的T细胞总数(图7A、7B、和7C，下图)。肿瘤低氧区域(H)显示比常氧区域(N)低2.5至超过10倍的T细胞。

[0279] 实施例4.低氧肿瘤的H-NOX治疗。

[0280] B16F10皮下肿瘤的生成。对6至8周龄C57BL/6J雌性小鼠在侧面皮下植入以1×10^6个B16F10小鼠黑素瘤癌细胞。一周3次利用卡尺测量肿瘤，并基于下列公式计算肿瘤尺寸：(长度×宽度^2)÷0.5。在肿瘤达到～300mm^3的平均尺寸后(肿瘤细胞植入后10-14天)，开始治疗。

[0281] 治疗。基于肿瘤尺寸将携带200-400mm^3肿瘤的小鼠随机分到各治疗组并肿瘤内注射以介质(制剂缓冲剂：50mM琥珀酸盐、50mM NaCl、3.4mM EDTA、和10mM还原的谷胱甘肽，pH 7)或包含2mg PEG化H-NOX(L144F)的100μl制剂缓冲剂。在介质或H-NOX治疗前1小时，对小鼠ip.注射以外源低氧标记物哌莫硝唑(60mg/kg，Hypoxyprobe，Burlington Massachusetts)。

[0282] 免疫组织化学。H-NOX注射后6小时，对啮齿动物进行安乐死，并切除肿瘤用于免疫组织化学(IHC)测验。将肿瘤在OCT中冷冻，并以12μM切片用于IHC加工。将切片用4％PFA在4℃下固定15分钟，然后阻断和用5％BSA、5％山羊血清、和0.1％吐温20在室温下透化1-2小时。然后将切片与兔抗哌莫硝唑抗体(Hypoxyprobe，1:100)或兔抗碳酸酐酶IX抗体(CAIX，Novus Biological 1:1000)和大鼠抗CD4抗体(Biolegend，1:50)或大鼠抗CD8抗体(Biolegend，1:50)抗体一起在4℃下培育过夜，然后与抗兔二抗或抗大鼠二抗(1:1000，Jackson Immunoresearch Laboratories，West Grove，PA，USA)一起在室温下培育2小时。将切片安装在SlowFade DAPI(Invitrogen)中。利用配备有CCD数码摄像机的HD AxioImager Zeiss显微镜使切片成像(图8和9B)。

[0283] 定量。在每个动物中，计数跨越1-1.5mm肿瘤厚度的5个肿瘤切片中的每个切片的4张照片中的哌莫硝唑阳性、哌莫硝唑阴性、CAIX阳性和CAIX阴性区域中的CD4+和CD8+T细胞数量。每个区域中的CD4+和CD8+细胞的总和除以哌莫硝唑阳性、哌莫硝唑阴性、CAIX阳性和CAIX阴性区域的总和，获得每mm^2肿瘤组织的T细胞总数。图8和9A显示的结果证明，与介质对照(制剂缓冲剂)相比，OMX治疗增强了CD4+和CD8+淋巴细胞在标记为肿瘤低氧区域的之前的哌莫硝唑阴性(图8)或CAIX阴性(图9B)中的积累。

[0284] 实施例5.肿瘤低氧和肿瘤血管的测量。

[0285] H460、B16F10和CT26皮下肿瘤和颅内GL261-荧光素酶肿瘤的生成。对7至8周龄Nu/Nu雌性小鼠在后肢中皮下植入以3×10^6个H460人肺癌细胞。对6至8周龄C57BL/6J雌性小鼠在侧面皮下植入以1×10^6个B16F10小鼠黑素瘤癌细胞。6至8周龄BALB/c雌性小鼠在侧面皮下植入以1×10^6个CT26结肠肿瘤细胞。对重20g的雄性C57BL/6J在右侧尾状核中颅内注射以3×10^5个GL261-luc细胞(+0.5mm A/P，+2.3mm M/L和-3.2mm D/V)。使颅内肿瘤在处死前生长21天。一周3次利用卡尺测量皮下肿瘤，并基于下列公式计算肿瘤尺寸：(长度×宽度^2)÷0.5。在肿瘤达到～300mm^3的平均尺寸后(肿瘤细胞植入后10-14天)，开始治疗。治疗。在

处死前1-8小时对携带200-400mm^{3}皮下肿瘤或第21天颅内肿瘤的小鼠ip.注射以外源低氧标记物哌莫硝唑(60mg/kg,Hypoxyprobe,Burlington Massachusetts)。

[0286] 免疫组织化学和ELISA。对啮齿动物进行安乐死,并切除肿瘤用于免疫组织化学(IHC)和ELISA测定。关于ELISA,将B16F10、CT26和H460肿瘤在补充有抗蛋白酶的提取缓冲剂(Abcam试剂盒#ab117996)中均质化。利用Bradford测验定量每个肿瘤中的蛋白质浓度,并利用竞争性哌莫硝唑(Hypoxyprobe-1,Hypoxyprobe,Burlington Massachusetts)ELISA测定来测验样品的低氧水平。关于IHC,将GL261肿瘤在OCT中冷冻,并以12μM切片用于IHC加工。将切片用100%甲醇在-20℃下固定20分钟,然后阻断和用5%BSA、5%山羊血清、和0.1%吐温20在室温下透化1-2小时。然后将切片与兔抗哌莫硝唑抗体(Hypoxyprobe,1:100)和大鼠抗CD31抗体(BD Bioscience,1:50)一起在4℃下培育过夜,然后与抗兔二抗或抗大鼠二抗(1:1000,Jackson Immunoresearch Laboratories,West Grove,PA,USA)一起在室温下培育2小时。将切片安装在SlowFade DAPI(Invitrogen)中。利用配备有CCD数码摄像机的HD AxioImager Zeiss显微镜使切片成像(图10)。

[0287] 定量。关于哌莫硝唑ELISA,利用标准曲线的5参数拟合来进行IC_{50}值("Kd")的定量,并根据每个样品中的蛋白质浓度将数值标准化。关于GL261IHC,在每个动物中,利用ImageJ(跨越1mm肿瘤厚度的5个肿瘤切片中每个切片的1-2张照片)确定肿瘤组织内哌莫硝唑+区域的百分比(图10)。这些数据显示,虽然是个体动物之间和肿瘤类型之间低氧水平有一个范围,其存在在大部分所测尺寸的肿瘤中是显著的。

[0288] 实施例6.肿瘤中的H-NOX积累的测量。

[0289] B16F10和CT26皮下肿瘤和颅内GL261-荧光素酶肿瘤的生成。对6至8周龄C57BL/6J雌性小鼠在侧面皮下植入以1×10^6个B16F10小鼠黑素瘤癌细胞。对6至8周龄BALB/c雌性小鼠在侧面皮下植入以1×10^6个CT26结肠肿瘤细胞。对重20g的雄性C57BL/6J在右侧尾状核中颅内注射以3×10^5个GL261-luc细胞(+0.5mm A/P,+2.3mm M/L和-3.2mm D/V)。使颅内肿瘤在处死前生长21天。一周3次利用卡尺测量皮下肿瘤,并基于下列公式计算肿瘤尺寸:(长度×宽度^2)÷0.5。在肿瘤达到~300mm^{3}的平均尺寸后(肿瘤细胞植入后10-14天),开始治疗。

[0290] 治疗。基于肿瘤尺寸将携带200-400mm^{3}皮下肿瘤的小鼠随机分到各治疗组,并静脉内(650mg/kg)、皮下(650mg/kg)、或肿瘤内(2mg,100μl)注射以介质(制剂缓冲剂:50mM琥珀酸盐、50mM NaCl、3.4mM EDTA、和10mM还原的谷胱甘肽,pH 7)或包含PEG化H-NOX(L144F)的制剂缓冲剂。基于利用Xenogen IVIS光谱测量的生物发光信号将携带第21天颅内肿瘤的小鼠随机分到各治疗组,并静脉内注射以单独制剂缓冲剂或包含750mg/kg H-NOX(L144F)的制剂缓冲剂。

[0291] 皮下肿瘤组织中PEG化H-NOX(L144F)积累的测量。H-NOX或介质注射后6h(B16F10)或8h(CT26)收集肿瘤。将肿瘤在补充有抗蛋白酶的提取缓冲剂(Abcam试剂盒#ab117996)中均质化,并利用Bradford测验定量每个肿瘤中的蛋白质浓度。通过H-NOX夹心ELISA ELISA(检测灵敏度在1ng/ml)定量PEG化H-NOX(L144F)浓度,并相对于肿瘤重量标准化,以μg/g肿瘤组织表示H-NOX量。通过标准曲线的5参数拟合确定肿瘤溶解物中H-NOX水平的定量。

[0292] 通过IHC进行的GL261中H-NOX(L144F)的生物分布。H-NOX注射后2h,对啮齿动物进行安乐死,并切除肿瘤用于免疫组织化学(IHC)测验。将肿瘤在OCT中冷冻,并以12μM切片用

于IHC加工。将切片在-20℃下用100％甲醇固定20分钟，然后阻断和用5％BSA、5％山羊血清、和0.1％吐温20在室温下透化1-2小时。然后将切片与兔抗H-NOX抗体(1:500，定制兔多克隆，由AnaSpec Inc,Fremont,CA生产)和大鼠抗CD31抗体(BD Bioscience,1:50)一起在4℃下培育过夜，然后与抗兔二抗或抗大鼠二抗(1:1000，Jackson Immunoresearch Laboratories,West Grove,PA,USA)一起在室温下培育2小时。将切片安装在SlowFade DAPI(Invitrogen)中。利用配备有CCD数码摄像机的HD AxioImager Zeiss显微镜使切片成像。在每个动物中，利用ImageJ(跨越1mm肿瘤厚度的5个肿瘤切片中每个切片的1-2张照片)确定肿瘤组织内的H-NOX阳性区域百分比。

[0293] 实施例7.犬口腔黑素瘤肿瘤中的低氧和T细胞的测量。

[0294] 犬口腔黑素瘤。在所有者同意的情况下募集携带口腔黑素瘤肿瘤的宠物狗用于研究，并在手术前4h静脉内注射(缓慢输注)以PEG化H-NOX(L144F)。通过IHC分析从手术提取的组织。

[0295] 免疫组织化学。H-NOX注射后4小时，将肿瘤切除，在OCT中冷冻，并以12μM切片用于IHC加工。将切片用4％PFA在4℃下固定15分钟，然后阻断和用5％BSA、5％山羊血清、和0.1％吐温20在室温下透化1-2小时。然后将切片与兔抗碳酸酐酶IX抗体(CAIX,Novus Biological 1:1000)或兔抗H-NOX抗体(1:500，定制兔多克隆，由AnaSpec Inc,Fremont,CA生产)和大鼠抗CD4抗体(Abd Serotech,1:50)或大鼠抗CD8抗体(Abd Serotech,1:50)一起在4℃下培育过夜，然后与抗兔二抗或抗大鼠二抗(1:1000，Jackson Immunoresearch Laboratories,West Grove,PA,USA)一起在室温下培育2小时。将切片安装在SlowFade DAPI(Invitrogen)中。利用配备有CCD数码摄像机的HD AxioImager Zeiss显微镜使切片成像(图11)。图像揭示了在OMX给予前表达低氧标记物CAIX——指示低氧状态——的肿瘤区域中存在大量淋巴细胞，表明OMX治疗缓解免疫抑制性微环境和允许淋巴细胞浸润。

[0296] 实施例8.肿瘤体积、肿瘤低氧和T细胞浸润减少的相关性。

[0297] 4T1-Luc肿瘤模型。8周龄雌性BALB/c小鼠购自Charles River实验室。使表达荧光素酶的4T1小鼠乳腺肿瘤细胞(4T1-Fluc-Neo;Imanis Life Sciences)在补充有10％胎牛血清、1×青霉素/链霉素、和0.7mg/ml G-418(InvivoGen)的RPMI培养基中生长。使细胞经胰蛋白酶处理，并重新悬浮于培养基:Matrigel(Corning)的50:50混合物中，并且将100μl体积中的2×10^5个细胞皮下注射到小鼠中。在植入后第10天和第14天，测量肿瘤并计算体积(长度×宽度×高度×0.523)，对小鼠同时注射以120mg/kg i.p.哌莫硝唑(PIMO，Hypoxyprobe)和i.v.30mg/kg EF5(Hypoxia Imaging Center)，在PIMO/EF5注射后90min处死，并收集肿瘤。将收集的肿瘤在OCT中冷冻用于免疫染色，以及利用轻柔型MACS解离器解离成单个细胞，然后与0.75mg/ml胶原蛋白酶/分散酶(dispase)(Roche)一起在37℃下在振荡下培育45min。使解离的细胞经过70μm过滤器。

[0298] 流式细胞术。将未固定的解离细胞用T细胞的抗体(仓鼠抗小鼠CD3-AlexaFluor 488，克隆145-2C11，eBioscience;大鼠抗小鼠CD4-APC，克隆RM4-5，BD Biosciences;大鼠抗小鼠CD8-PE，克隆53-6.7，BD Biosciences)染色，并利用FACSCalibur进行流式细胞术。以选通(gating)为目的，脾用作T细胞阳性对照。还是在解离细胞通过70μm过滤器过滤后，将细胞用活力染料570(BD Biosciences)染色，用福尔马林和甲醇固定，用低氧标记物的抗体(兔抗哌莫硝唑，Hypoxyprobe，然后驴抗兔AlexaFluor 647;缀合至AlexaFluor 488的小

鼠抗EF5,Hypoxia Imaging Center)染色,并在FACSCalibur上进行分析。利用FlowJo分析流式细胞术数据。

[0299] 免疫荧光染色。将冷冻切片以10μM切割,用4%PFA固定,用一抗(大鼠抗小鼠CD4、大鼠抗小鼠CD8、兔抗PIMO)染色,然后用二抗(驴抗大鼠AlexaFluor 594、驴抗PIMO AlexaFluor 488)染色,和用DAPI复染。

[0300] 如图13A-13K所示,在皮下4T1-Luc同系肿瘤中,较大肿瘤尺寸与增强的低氧和减少的淋巴细胞浸润相关。图12A显示植入后第10天和第14天的肿瘤体积。图12B显示淋巴细胞在活细胞群中的分数,和图12C显示活群体中的绝对淋巴细胞细胞数量。证实了肿瘤体积与淋巴细胞百分比之间(图12D)以及低氧百分比与淋巴细胞百分比之间的负相关(图12F),而肿瘤体积与低氧百分比之间的关系显示正相关(图12E)。负相关还见于肿瘤体积与CD3-阳性T细胞百分比之间(图12G),肿瘤体积与CD4-阳性T细胞百分比之间(图12H)、肿瘤体积与CD8-阳性T细胞百分比之间(图12I)、肿瘤体积与CD3-CD4双阳性T细胞百分比之间(图12J)、和肿瘤体积和CD3-CD8双阳性T细胞百分比之间(图12K)。

[0301] 图13A-13F显示低氧肿瘤区域具有免疫抑制性并且呈现皮下4T1-Luc同系小鼠肿瘤中的T细胞浸润减少。

[0302] 序列

[0303] Tt.WT

[0304] ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGTGGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACCAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGGATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAACTGGTAAAAATGTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCAGAACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCCCTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACAGCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAGCCTGTTGCAAAAGATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAGAGGGTAGTTCTAAATTTTTCAAGGAAGAAATTTCAGTGGAAGAGGTCGAAAGAGGCGAAAAAGATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTTTGAGTGA

[0305] (SEQ ID NO:1)

[0306] MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDESLKSVGWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTGKNVNEIWREVGRQNIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEMEYVSKRKMYDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIKFKNPVFE

[0307] (SEQ ID NO:2)

[0308] 折叠子结构域

[0309] GGTTATATTCCTGAAGCTCCAAGAGATGGGCAAGCTTACGTTCGTAAAGATGGCGAATGGGTATTACTTTCTACCTTTTTA(SEQ ID NO:3)

[0310] GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL(SEQ ID NO:4)

[0311] L2 WT

[0312] ATGATGTCTATGAAAGGAATCATATTCAACGAATTTCTCAATTTTGTAGAAAAAAGTGAATCCTACACCCTGGTAGATCAAATTATTATGGATAGTCATTTGAAGTCCCATGGTGCCTACACGTCTATCGGTACATACTCTCCCAAAGAATTAT

TTCAATTGGTTAAAGCGCTTGCTATGAAAAATGGCAAACCAACATCAGTGATTTTACAAGAATATGGTGAGTATTTG
TTTGAGGTTTTTGCAAAAAAATATCCTCAATTTTTCAGGGAAAAAAAGTCGGTGTTTCAATTTTTGGAAGCGCTTGA
AACACATATTCATTTCGAAGTGAAAAAATTGTATGACTATACTGAACTACCCCATTTTGAATGCCAATATCACAGTC
AAAATCAAATGGAAATGATTTACACTTCTTCGCGTCCTTTGGCCGATTTTGCGGAAGGTTTAATAAAAGGTTGTATT
AAATATCATAAAGAAAACATGACTATTGTTCGTGAAAATCTGCCTGCAAAAACAGGCTTTAAGGTAAGATTTGTATT
AACAAAAGGCGATCCTGATGAGTGA(SEQ ID NO:9)

[0313]

MMSMKGIIFNEFLNFVEKSESYTLVDQIIMDSHLKSHGAYTSIGTYSPKELFQLVKALAMKNGKPTSVILQEYGEYL
FEVFAKKYPQFFREKKSVFQFLEALETHIHFEVKKLYDYTELPHFECQYHSQNQMEMIYTSSRPLADFAEGLIKGCI
KYHKENMTIVRENLPAKTGFKVRFVLTKGDPDE(SEQ ID NO:10)

[0314] L1 WT

[0315] ATGAAAGGTATCGTTTTTACCTCCTTAAATGACATGATTATAGAACAATTTGGCATAGAAACCTGGGAC
CAACTCGTATCCTCACTAGACCTTCCAAGTGGTGGAAGTTATACAGCAGGCGGCACTTACTCGGATACAGAATTTCA
GCAATTGATTAAGGCCATTGCGAAGAGGACCAATCAGCACGCTTCTGTTTTTTTAGAGGCCTTTGGTGAATACATGT
TTCCTATCTTATCGAGTAAGTGCGCAATTTTTTTAAAAAAGGACATGACATTAAAAGAATTTTTAAAAAGCATTGAT
GGAACAATTCATGTGGAAGTAGAAAAGTTATACCCAGATGAAACATTACCTACCATTAGCTATGAAGAGCCTGCTGC
AAACCAATTGGTTATGGTGTATCGATCGCATAGAAGACTCTGTCATTTTGCAATGGGGCTCATCCAGGGAGCAGCGC
AACATTTTAAAAAGAAAATTACCATTAAGCAGACTCACTGCATGTTAAAAAAAGATGATCATTGTCGTTTGGAGATT
ACCTTTGAGTGA

[0316] (SEQ ID NO:11)

[0317] MKGIVFTSLNDMIIEQFGIETWDQLVSSLDLPSGGSYTAGGTYSDTEFQQLIKAIAKRTNQHASVFLEA
FGEYMFPILSSKCAIFLKKDMTLKEFLKSIDGTIHVEVEKLYPDETLPTISYEEPAANQLVMVYRSHRRLCHFAMGL
IQGAAQHFKKKITIKQTHCMLKKDDHCRLEITFE

[0318] (SEQ ID NO:12)

[0319] 智人WT(1-385)

[0320] ATGTACGGATTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTGTGGGAA
GACATCAAAAAAGAGGCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTCAGAATAATATATGATGACTCCAAAACTTA
TGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAGTCCTCAATCTCAATGCTGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTT
TCGTCTTTTGCCAAGAATCTGGTTATGATACAATCTTGCGTGTCCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAAC
CTTGATGCTCTGCACGACCACCTTGCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTTCCTTTAGGTGCACTGATGCAGA
AAAGGGCAAAGGACTCATTTTGCACTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCATTGGAATCATCAAAA
CAGTGGCACAACAAATCCATGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCAGCAAAGAAATGAAGAATGTGATCATACT
CAATTTTTAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAGAGGATTTTTATGAAGATCTTGACAGATTTGAAGAAAATGGTAC
CCAGGAATCACGCATCAGCCCATATACATTCTGCAAAGCTTTTCCTTTTCATATAATATTTGACCGGGACCTAGTGG
TCACTCAGTGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCCAGCTCCAGCCTGGGAATTGCAGCCTTCTGTCTGTCTTC
TCGCTGGTTCGTCCTCATATTGATATTAGTTTCCATGGGATCCTTTCTCACATCAATACTGTTTTTGTATTGAGAAG
CAAGGAAGGATTGTTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATGAACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGCTTACGTC
TCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAGCAGATAGCATACTTTTTCTATGTTCACCAAGTGTCATGAACCTGGAC
GATTTGACAAGGAGAGGGCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACGCGCGATCTTGTTCTTTTGGGAGA

ACAATTTAGAGAGGAATACAAACTCACCCAAGAACTGGAAATCCTCACTGACAGGCTACAGCTCACGTTAAGAGCCC
TGGAAGATTGA

[0321] (SEQ ID NO:13)

[0322] MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGEILQM
FGKMFFVFCQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATIYPGMRAPSFRCTDAEKGKGLILHYYSEREGLQDIV
IGIIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNEECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFEENGTQESRISPYTFCKAFPFHIIF
DRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGNCSLLSVFSLVRPHIDISFHGILSHINTVFVLRSKEGLLDVEKLECEDELTGTE
ISCLRLKGQMIYLPEADSILFLCSPSVMNLDDLTRRGLYLSDIPLHDATRDLVLLGEQFREEYKLTQELEILTDRLQ
LTLRALED

[0323] (SEQ ID NO:14)

[0324] 智人β2(1-217)

[0325] ATGTATGGATTCATCAACACCTGCCTGCAGTCTCTTGTGACAGAGAAATTTGGTGAGGAGACATGGGAG
AAGCTGAAGGCTCCTGCAGAAGTGCAAGATGTCTTCATGACCTACACCGTGTATGATGACATCATCACCATTAAGCT
CATCCAAGAAGCCTGCAAGGTTCTGGATGTGTCCATGGAAGCCATTCTGAAGCTCTTTGGCGAATACTTCTTTAAGT
TCTGTAAGATGTCTGGCTATGACAGGATGCTGCGGACACTTGGAGGAAATCTCACCGAGTTTATTGAAAACCTAGAT
GCACTCCACAGTTACCTGGCACTGTCCTATCAGGAAATGAACGCACCATCCTTTCGAGTGGAGGAAGGAGCTGACGG
GGCGATGCTTCTCCACTACTACTCAGACAGACATGGTCTGTGTCACATTGTACCAGGTATCATTGAAGCTGTGGCCA
AGGACTTCTTTGACACTGATGTGGCCATGAGTATCCTGGATATGAACGAAGAGGTGGAAAGGACAGGGAAGAAAGAA
CATGTTGTGTTTCTGGTCGTGCAGAAGGCTCACAGACAGATAAGAGGAGCAAAGGCAAGCCGGCCACAAGGCAGTGA
GGACAGCCAGGCAGACCAGGAGGCTCTCCAGGGAACACTCCTT

[0326] (SEQ ID NO:15)

[0327] MYGFINTCLQSLVTEKFGEETWEKLKAPAEVQDVFMTYTVYDDIITIKLIQEACKVLDVSMEAILKLFG
EYFFKFCKMSGYDRMLRTLGGNLTEFIENLDALHSYLALSYQEMNAPSFRVEEGADGAMLLHYYSDRHGLCHIVPGI
IEAVAKDFFDTDVAMSILDMNEEVERTGKKEHVVFLVVQKAHRQIRGAKASRPQGSEDSQADQEALQGTLL

[0328] (SEQ ID NO:16)

[0329] 褐家鼠(Rattus norvegicus)β1(1-385)

[0330]

ATGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTGTGGGAAGACATCAA
AAAAGAGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTGAGAATAATCTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGG
TGGCTGCTGCGAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGCTGGTGAAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTC
TGTCAAGAGTCTGGCTATGATACCATCTTGCGTGTCCTGGGATCTAATGTCAGGGAGTTTTTGCAGAACCTCGACGC
CCTGCACGACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTTCCGGTGCACCGATGCAGAAAAAGGCA
AAGGGCTCATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGCTTCAGGACATTGTGATCGGGATTATCAAGACTGTAGCT
CAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCAGCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTT
AATTGAAGAAAAAGAATCAAAAGAAGAGGATTTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACT
CCCGTATCAGCCCGTACACCTTCTGCAAAGCGTTTCCTTTTCACATCATATTTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCAG
TGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGCTCCCCCAGCTCCAGCCTGGGAAGTGCAGCCTTCTGTCTGTCTTCTCTCTGGT
CCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACGGGATTCTTTCACACATCAATACCGTCTTTGTACTGAGAAGCAAGGAAG
GGTTGCTGGATGTTGAGAAACTTGAATGTGAGGATGAACTGACTGGGGCAGAGATTAGCTGCCTCCGTCTCAAAGGC

CAAATGATCTATTTACCGGAAGCAGATAGCATCCTCTTCCTCTGTTCACCAAGTGTGATGAACTTGGATGACCTAAC
AAGAAGAGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGTCCTTTTGGGAGAACAGTTCC
GGGAGGAGTACAAACTGACACAAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGCTCACACTGAGGGCTTTGGAGGAT
TGA(SEQ ID NO:17)

[0331]

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGEILQMFGKMFFVF
CQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATIYPGMRAPSFRCTDAEKGKGLILHYYSEREGLQDIVIGIIKTVA
QQIHGTEIDMKVIQQRSEECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFEENGTQDSRISPYTFCKAFPFHIIFDRDLVVTQ
CGNAIYRVLPQLQPGKCSLLSVFSLVRPHIDISFHGILSHINTVFVLRSKEGLLDVEKLECEDELTGAEISCLRLKG
QMIYLPEADSILFLCSPSVMNLDDLTRRGLYLSDIPLHDATRDLVLLGEQFREEYKLTQELEILTDRLQLTLRALED
(SEQ ID NO:18)

[0332] 褐家鼠β1(1-385)

[0333]

ATGTACGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTGTGGGAAGACATCAA
AAAAGAGGCGCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTGAGAATAATCTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGG
TGGCTGCTGCGAGCAAAGTCCTCAACCTCAATGCTGGTGAAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTTCGTCTTC
TGTCAAGAGTCTGGCTATGATACCATCTTGCGTGTCCTGGGATCTAATGTCAGGGAGTTTTTGCAGAACCTCGACGC
CCTGCACGACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACCTTCCTTCCGGTGCACCGATGCAGAAAAAGGCA
AAGGGCTCATTCTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGCTTCAGGACATTGTGATCGGGATTATCAAGACTGTAGCT
CAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCAGCAAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCCAATTTTT
AATTGAAGAAAAAGAATCAAAAGAAGAGGATTTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACT
CCCGTATCAGCCCGTACACCTTCTGCAAAGCGTTTCCTTTTCACATCATATTTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCAG
TGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGCTCCCCCAGCTCCAGCCTGGGAAGTGCAGCCTTCTGTCTGTCTTCTCTCTGGT
CCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACGGGATTCTTTCACACATCAATACCGTCTTTGTACTGAGAAGCAAGGAAG
GGTTGCTGGATGTTGAGAAACTTGAATGTGAGGATGAACTGACTGGGGCAGAGATTAGCTGCCTCCGTCTCAAAGGC
CAAATGATCTATTTACCGGAAGCAGATAGCATCCTCTTCCTCTGTTCACCAAGTGTGATGAACTTGGATGACCTAAC
AAGAAGAGGCCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGTCCTTTTGGGAGAACAGTTCC
GGGAGGAGTACAAACTGACACAAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGCTCACACTGAGGGCTTTGGAGGAT
TGA(SEQ ID NO:19)

[0334]

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGEILQMFGKMFFVF
CQESGYDTILRVLGSNVREFLQNLDALHDHLATIYPGMRAPSFRCTDAEKGKGLILHYYSEREGLQDIVIGIIKTVA
QQIHGTEIDMKVIQQRSEECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFEENGTQDSRISPYTFCKAFPFHIIFDRDLVVTQ
CGNAIYRVLPQLQPGKCSLLSVFSLVRPHIDISFHGILSHINTVFVLRSKEGLLDVEKLECEDELTGAEISCLRLKG
QMIYLPEADSILFLCSPSVMNLDDLTRRGLYLSDIPLHDATRDLVLLGEQFREEYKLTQELEILTDRLQLTLRALED
(SEQ ID NO:20)

[0335] 褐家鼠β2

[0336]

ATGTATGGATTCATCAACACCTGCCTGCAGTCTCTTGTGACAGAGAAATTTGGTGAGGAGACATGGGAGAAGCTGAA

GGCTCCTGCAGAAGTGCAAGATGTCTTCATGACCTACACCGTGTATGATGACATCATCACCATTAAGCTCATCCAAG
AAGCCTGCAAGGTTCTGGATGTGTCCATGGAAGCCATTCTGAAGCTCTTTGGCGAATACTTCTTTAAGTTCTGTAAG
ATGTCTGGCTATGACAGGATGCTGCGGACACTTGGAGGAAATCTCACCGAGTTTATTGAAAACCTAGATGCACTCCA
CAGTTACCTGGCACTGTCCTATCAGGAAATGAACGCACCATCCTTTCGAGTGGAGGAAGGAGCTGACGGGGCGATGC
TTCTCCACTACTACTCAGACAGACATGGTCTGTGTCACATTGTACCAGGTATCATTGAAGCTGTGGCCAAGGACTTC
TTTGACACTGATGTGGCCATGAGTATCCTGGATATGAACGAAGAGGTGGAAAGGACAGGGAAGAAAGAACATGTTGT
GTTTCTGGTCGTGCAGAAGGCTCACAGACAGATAAGAGGAGCAAAGGCAAGCCGGCCACAAGGCAGTGAGGACAGCC
AGGCAGACCAGGAGGCTCTCCAGGGAACACTCCTTCGGATGAAGGAGAGATATTTAAACATCCCTGTTTGCCCTGGG
GAGAAATCTCACTCAACTGCTGTGAGGGCATCGGTCCTTTTTGGAAAAGGGCCCCTCAGGGACACCTTCCAGCCCGT
CTATCCTGAGAGACTATGGGTCGAAGAGGAGGTGTTCTGTGATGCTTTTCCTTTCCACATTGTCTTTGATGAAGCAC
TAAGGGTCAAGCAAGCTGGAGTGAATATTCAGAAGTATGTCCCTGGAATCTTAACCCAGAAGTTTGCACTAGATGAG
TATTTTTCCATCATCCACCCTCAAGTTACTTTCAACATCTCCAGCATCTGCAAGTTCATTAACAGTCAGTTTGTCTT
GAAGACAAGAAAAGAAATGATGCCCAAAGCAAGGAAGAGCCAGCCGATGCTCAAACTCCGGGGTCAGATGATCTGGA
TGGAGTCTCTGAGGTGCATGATCTTCATGTGTTCCCCAAACGTCCGCAGCCTGCAAGAGCTGGAAGAGAGCAAGATG
CATCTTTCTGATATCGCTCCGCACGACACGACCAGGGATCTCATCCTCCTCAACCAGCAGAGGCTGGCAGAGATGGA
GCTGTCCTGCCAACTGGAAAAGAAGAAGGAGGAGTTGCGTGTCCTTTCCAATCACCTGGCCATCGAGAAGAAGAAGA
CAGAGACCTTGCTGTATGCCATGCTGCCTGAACATGTGGCCAACCAACTCAAGGAGGGCAGAAAGGTGGCTGCAGGA
GAATTTGAAACATGTACAATCCTTTTCAGCGATGTTGTGACATTTACCAACATCTGTGCAGCCTGTGAACCTATCCA
AATCGTGAACATGCTGAATTCAATGTACTCCAAGTTTGACAGGTTAACCAGTGTCCATGATGTCTACAAAGTAGAAA
CAATAGGGGATGCTTACATGGTGGTGGGTGGAGTACCAGTACCCGTTGAAAGCCATGCTCAAAGAGTCGCCAATTTT
GCTCTGGGGATGAGAATTTCTGCAAAAGAAGTGATGAATCCTGTCACTGGGGAACCTATCCAGATCAGAGTGGGAAT
CCACACTGGACCAGTCTTAGCAGGTGTTGTGGGAGACAAGATGCCTCGGTACTGCTTGTTTGGTGACACTGTAAACA
CAGCCTCTAGGATGGAAAGTCACGGGCTTCCCAGCAAAGTGCATCTGAGCCCCACAGCCCACAGAGCCCTGAAAAAC
AAAGGGTTTGAAATTGTCAGGAGAGGCGAGATCGAAGTGAAGGGGAAAGGAAAGATGACCACATACTTTCTGATCCA
GAACCTGAATGCCACCGAGGATGAGATAATGGGGCGACCTTCAGCCCCCGCTGATGGGAAGGAAGTATGTACTCCCG
GAAACCAAGTCAGGAAGTCCCCTGCTGTCCCGAGGAACACAGACCATCAGCAACAAGTCTACAAAGGAGACCCAGCA
GACGCTTCTAATGAAGTCACACTTGCTGGGAGCCCAGTGGCAGGGCGAAACTCCACAGATGCAGTCAATAACCAGCC
ATCACCAGATGAGACCAAGACAAGTGTCGTTGCTAGTGGCCCTGTGCTGTCTGCTTTCTGTGTTGTGCTGTGA (SEQ
ID NO:21)

[0337]

MYGFINTCLQSLVTEKFGEETWEKLKAPAEVQDVFMTYTVYDDIITIKLIQEACKVLDVSMEAILKLFGEYFFKFCK
MSGYDRMLRTLGGNLTEFIENLDALHSYLALSYQEMNAPSFRVEEGADGAMLLHYYSDRHGLCHIVPGIIEAVAKDF
FDTDVAMSILDMNEEVERTGKKEHVVFLVVQKAHRQIRGAKASRPQGSEDSQADQEALQGTLLRMKERYLNIPVCPG
EKSHSTAVRASVLFGKGPLRDTFQPVYPERLWVEEEVFCDAFPFHIVFDEALRVKQAGVNIQKYVPGILTQKFALDE
YFSIIHPQVTFNISSICKFINSQFVLKTRKEMMPKARKSQPMLKLRGQMIWMESLRCMIFMCSPNVRSLQELEESKM
HLSDIAPHDTTRDLILLNQQRLAEMELSCQLEKKKEELRVLSNHLAIEKKKTETLLYAMLPEHVANQLKEGRKVAAG
EFETCTILFSDVVTFTNICAACEPIQIVNMLNSMYSKFDRLTSVHDVYKVETIGDAYMVVGGVPVPVESHAQRVANF
ALGMRISAKEVMNPVTGEPIQIRVGIHTGPVLAGVVGDKMPRYCLFGDTVNTASRMESHGLPSKVHLSPTAHRALKN
KGFEIVRRGEIEVKGKGKMTTYFLIQNLNATEDEIMGRPSAPADGKEVCTPGNQVRKSPAVPRNTDHQQQVYKGDPA

DASNEVTLAGSPVAGRNSTDAVNNQPSPDETKTSVVASGPVLSAFCVVL(SEQ ID NO:22)。

序列表

<110> S?P?L?卡里
A?克尔托利察
N?勒摩恩
J?A?温格
K?G?梁

<120> 通过蛋白质介导的02递送调节肿瘤免疫性

<130> 627042000940

<140> PCT/US2016/022981

<141> 2016-03-17

<150> 62/134,523

<151> 2015-03-17

<160> 30

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 555

<212> DNA

<213> 腾冲嗜热厌氧菌

<400> 1

atgaagggga caatcgtcgg gacatggata aagaccctga gggaccttta cgggaatgat 60
gtggttgatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120
gaggatattg atgacgatga ggttaggaga atttttgcta aggtgagtga aaaaactggt 180
aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggta ggaaggcaga acataaaaac tttcagcgaa 240
tggtttccct cctattttgc agggagaagg ctagtgaatt ttttaatgat gatggatgag 300
gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360
cctgttgcaa aagatgccat tgaaatggag tacgtttcta aaagaaagat gtacgattac 420
tttttagggc ttatagaggg tagttctaaa tttttcaagg aagaaatttc agtggaagag 480
gtcgaaagag gcgaaaaaga tggcttttca aggctaaaag tcaggataaa atttaaaaac 540
cccgtttttg agtga 555

<210> 2

<211> 184

<212> PRT

<213> 腾冲嗜热厌氧菌

<400> 2

Met Lys Gly Thr Ile Val Gly Thr Trp Ile Lys Thr Leu Arg Asp Leu
1 5 10 15
Tyr Gly Asn Asp Val Val Asp Glu Ser Leu Lys Ser Val Gly Trp Glu
20 25 30

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

<210> 3
<211> 81
<212> DNA
<213> 腾冲嗜热厌氧菌
<400> 3
ggttatattc ctgaagctcc aagagatggg caagcttacg ttcgtaaaga tggcgaatgg 60
gtattacttt ctacctttt a 81

<210> 4
<211> 27
<212> PRT
<213> 腾冲嗜热厌氧菌
<400> 4
Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys
1 5 10 15
Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
20 25

<210> 5
<211> 690
<212> DNA

<213> 腾冲嗜热厌氧菌

<400> 5

atgaagggga caatcgtcgg gacatggata aagaccctga gggaccttta cgggaatgat 60
gtggttgatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120
gaggatattg atgacgatga ggttaggaga atttttgcta aggtgagtga aaaaactggt 180
aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggta ggaaggcaga acataaaaac tttcagcgaa 240
tggtttccct cctattttgc agggagaagg ctagtgaatt ttttaatgat gatggatgag 300
gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360
cctgttgcaa aagatgccat tgaaatggag tacgtttcta aaagaaagat gtacgattac 420
tttttagggt ttatagaggg tagttctaaa tttttcaagg aagaaatttc agtggaagag 480
gtcgaaagag gcgaaaaaga tggcttttca aggctaaaag tcaggataaa atttaaaaac 540
cccgtttttg agtataagaa aaatctcgag ggcagcggcg gttatattcc tgaagctcca 600
agagatgggc aggcttacgt tcgtaaagat ggcgaatggg tattactttc tacctttta 660
aggggtagtc accatcacca tcaccattga 690

<210> 6

<211> 225

<212> PRT

<213> 腾冲嗜热厌氧菌

<400> 6

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

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

<210> 7
<211> 663
<212> DNA
<213> 腾冲嗜热厌氧菌
<400> 7

atgaagggga caatcgtcgg gacatggata aagaccctga gggaccttta cgggaatgat 60
gtggttgatg aatctttaaa aagtgtgggt tgggaaccag atagggtaat tacacctctg 120
gaggatattg atgacgatga ggttaggaga atttttgcta aggtgagtga aaaaactggt 180
aaaaatgtca acgaaatatg gagagaggta ggaaggcaga acataaaaac tttcagcgaa 240
tggtttccct cctattttgc agggagaagg ctagtgaatt ttttaatgat gatggatgag 300
gtacacctac agcttaccaa gatgataaaa ggagccactc ctccaaggct tattgcaaag 360
cctgttgcaa aagatgccat tgaaatggag tacgtttcta aaagaaagat gtacgattac 420
tttttagggt ttatagaggg tagttctaaa tttttcaagg aagaaatttc agtggaagag 480
gtcgaaagag gcgaaaaaga tggcttttca aggctaaaag tcaggataaa atttaaaaac 540
cccgtttttg agtataagaa aaatctcgag ggcagcggcg gttatattcc tgaagctcca 600
agagatgggc aggcttacgt tcgtaaagat ggcgaatggg tattactttc tacctttta 660
tga 663

<210> 8
<211> 167
<212> PRT
<213> 腾冲嗜热厌氧菌
<400> 8

Met Lys Gly Thr Ile Gly Thr Ile Lys Thr Leu Arg Asp Leu Gly Asn
1 5 10 15
Asp Asp Glu Leu Lys Gly Glu Asp Arg Ile Thr Leu Glu Asp Ile Asp
20 25 30
Asp Asp Glu Arg Arg Ile Phe Ala Lys Glu Lys Thr Gly Lys Asn Asn
35 40 45
Glu Ile Arg Glu Gly Arg Gln Asn Ile Lys Thr Phe Glu Phe Phe Ala

50 55 60

Gly Arg Arg Leu Asn Phe Leu Met Met Met Asp Glu His Leu Gln Leu
65 70 75 80

Thr Lys Met Ile Lys Gly Ala Thr Arg Leu Ile Ala Lys Ala Lys Asp
85 90 95

Ala Ile Glu Met Glu Lys Arg Lys Met Asp Phe Leu Gly Phe Ile Glu
100 105 110

Gly Lys Phe Phe Lys Glu Glu Ile Glu Glu Glu Arg Gly Glu Lys Asp
115 120 125

Gly Phe Arg Leu Lys Arg Ile Lys Phe Lys Asn Phe Glu Lys Lys Asn
130 135 140

Leu Glu Gly Gly Gly Ile Glu Ala Arg Asp Gly Gln Ala Arg Lys Asp
145 150 155 160

Gly Glu Leu Leu Thr Phe Leu
165

<210> 9

<211> 564

<212> DNA

<213> 嗜肺军团菌

<400> 9

atgatgtcta tgaaaggaat catattcaac gaatttctca attttgtaga aaaaagtgaa 60

tcctacaccc tggtagatca aattattatg gatagtcatt tgaagtccca tggtgcctac 120

acgtctatcg gtacatactc tcccaaagaa ttatttcaat tggttaaagc gcttgctatg 180

aaaaatggca aaccaacatc agtgatttta caagaatatg gtgagtattt gtttgaggtt 240

tttgcaaaaa aatatcctca atttttcagg gaaaaaaagt cggtgtttca atttttggaa 300

gcgcttgaaa cacatattca tttcgaagtg aaaaaattgt atgactatac tgaactaccc 360

cattttgaat gccaatatca cagtcaaaat caaatggaaa tgatttacac ttcttcgcgt 420

cctttggccg attttgcgga aggtttaata aaaggttgta ttaaatatca taaagaaaac 480

atgactattg ttcgtgaaaa tctgcctgca aaaacaggct ttaaggtaag atttgtatta 540

acaaaaggcg atcctgatga gtga 564

<210> 10

<211> 187

<212> PRT

<213> 嗜肺军团菌

<400> 10

Met Met Ser Met Lys Gly Ile Ile Phe Asn Glu Phe Leu Asn Phe Val
1 5 10 15

Glu Lys Ser Glu Ser Tyr Thr Leu Val Asp Gln Ile Ile Met Asp Ser
20 25 30

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

<210> 11
<211> 543
<212> DNA
<213> 嗜肺军团菌
<400> 11
atgaaaggta tcgtttttac ctccttaaat gacatgatta tagaacaatt tggcatagaa 60
acctgggacc aactcgtatc ctcactagac cttccaagtg gtggaagtta tacagcaggc 120
ggcacttact cggatacaga atttcagcaa ttgattaagg ccattgcgaa gaggaccaat 180
cagcacgctt ctgttttttt agaggccttt ggtgaataca tgtttcctat cttatcgagt 240
aagtgcgcaa ttttttaaa aaaggacatg acattaaaag aatttttaaa aagcattgat 300
ggaacaattc atgtggaagt agaaaagtta tacccagatg aaacattacc taccattagc 360
tatgaagagc ctgctgcaaa ccaattggtt atggtgtatc gatcgcatag aagactctgt 420
cattttgcaa tggggctcat ccagggagca gcgcaacatt ttaaaaagaa aattaccatt 480
aagcagactc actgcatgtt aaaaaaagat gatcattgtc gtttggagat tacctttgag 540
tga 543
<210> 12
<211> 180
<212> PRT
<213> 嗜肺军团菌

<400> 12

Met Lys Gly Ile Val Phe Thr Ser Leu Asn Asp Met Ile Ile Glu Gln
1 5 10 15
Phe Gly Ile Glu Thr Trp Asp Gln Leu Val Ser Ser Leu Asp Leu Pro
20 25 30
Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Ala Gly Gly Thr Tyr Ser Asp Thr Glu Phe
35 40 45
Gln Gln Leu Ile Lys Ala Ile Ala Lys Arg Thr Asn Gln His Ala Ser
50 55 60
Val Phe Leu Glu Ala Phe Gly Glu Tyr Met Phe Pro Ile Leu Ser Ser
65 70 75 80
Lys Cys Ala Ile Phe Leu Lys Lys Asp Met Thr Leu Lys Glu Phe Leu
85 90 95
Lys Ser Ile Asp Gly Thr Ile His Val Glu Val Glu Lys Leu Tyr Pro
100 105 110
Asp Glu Thr Leu Pro Thr Ile Ser Tyr Glu Glu Pro Ala Ala Asn Gln
115 120 125
Leu Val Met Val Tyr Arg Ser His Arg Arg Leu Cys His Phe Ala Met
130 135 140
Gly Leu Ile Gln Gly Ala Ala Gln His Phe Lys Lys Lys Ile Thr Ile
145 150 155 160
Lys Gln Thr His Cys Met Leu Lys Lys Asp Asp His Cys Arg Leu Glu
165 170 175
Ile Thr Phe Glu
180

<210> 13

<211> 1158

<212> DNA

<213> 智人

<400> 13

atgtacggat ttgtgaatca cgccctggag ttgctggtga tccgcaatta cggccccgag 60
gtgtgggaag acatcaaaaa agaggcacag ttagatgaag aaggacagtt tcttgtcaga 120
ataatatatg atgactccaa aacttatgat ttggttgctg ctgcaagcaa agtcctcaat 180
ctcaatgctg gagaaatcct ccaaatgttt gggaagatgt ttttcgtctt ttgccaagaa 240
tctggttatg atacaatctt gcgtgtcctg ggctctaatg tcagagaatt tctacagaac 300
cttgatgctc tgcacgacca ccttgctacc atctacccag gaatgcgtgc accttccttt 360
aggtgcactg atgcagaaaa gggcaaagga ctcattttgc actactactc agagagagaa 420
ggacttcagg atattgtcat tggaatcatc aaaacagtgg cacaacaaat ccatggcact 480
gaaatagaca tgaaggttat tcagcaaaga aatgaagaat gtgatcatac tcaattttta 540

attgaagaaa aagagtcaaa agaagaggat ttttatgaag atcttgacag atttgaagaa 600
aatggtaccc aggaatcacg catcagccca tatacattct gcaaagcttt tccttttcat 660
ataatatttg accgggacct agtggtcact cagtgtggca atgctatata cagagttctc 720
ccccagctcc agcctgggaa ttgcagcctt ctgtctgtct tctcgctggt tcgtcctcat 780
attgatatta gtttccatgg gatcctttct cacatcaata ctgtttttgt attgagaagc 840
aaggaaggat tgttggatgt ggagaaatta gaatgtgagg atgaactgac tgggactgag 900
atcagctgct tacgtctcaa gggtcaaatg atctacttac ctgaagcaga tagcatactt 960
tttctatgtt caccaagtgt catgaacctg gacgatttga caaggagagg gctgtatcta 1020
agtgacatcc ctctgcatga tgccacgcgc gatcttgttc ttttgggaga acaatttaga 1080
gaggaataca aactcaccca agaactggaa atcctcactg acaggctaca gctcacgtta 1140
agagccctgg aagattga 1158

<210> 14
<211> 385
<212> PRT
<213> 智人
<400> 14

Met Tyr Gly Phe Val Asn His Ala Leu Glu Leu Leu Val Ile Arg Asn
1 5 10 15
Tyr Gly Pro Glu Val Trp Glu Asp Ile Lys Lys Glu Ala Gln Leu Asp
20 25 30
Glu Glu Gly Gln Phe Leu Val Arg Ile Ile Tyr Asp Asp Ser Lys Thr
35 40 45
Tyr Asp Leu Val Ala Ala Ala Ser Lys Val Leu Asn Leu Asn Ala Gly
50 55 60
Glu Ile Leu Gln Met Phe Gly Lys Met Phe Phe Val Phe Cys Gln Glu
65 70 75 80
Ser Gly Tyr Asp Thr Ile Leu Arg Val Leu Gly Ser Asn Val Arg Glu
85 90 95
Phe Leu Gln Asn Leu Asp Ala Leu His Asp His Leu Ala Thr Ile Tyr
100 105 110
Pro Gly Met Arg Ala Pro Ser Phe Arg Cys Thr Asp Ala Glu Lys Gly
115 120 125
Lys Gly Leu Ile Leu His Tyr Tyr Ser Glu Arg Glu Gly Leu Gln Asp
130 135 140
Ile Val Ile Gly Ile Ile Lys Thr Val Ala Gln Gln Ile His Gly Thr
145 150 155 160
Glu Ile Asp Met Lys Val Ile Gln Gln Arg Asn Glu Glu Cys Asp His
165 170 175
Thr Gln Phe Leu Ile Glu Glu Lys Glu Ser Lys Glu Glu Asp Phe Tyr

180 185 190

Glu Asp Leu Asp Arg Phe Glu Glu Asn Gly Thr Gln Glu Ser Arg Ile

195 200 205

Ser Pro Tyr Thr Phe Cys Lys Ala Phe Pro Phe His Ile Ile Phe Asp

210 215 220

Arg Asp Leu Val Val Thr Gln Cys Gly Asn Ala Ile Tyr Arg Val Leu

225 230 235 240

Pro Gln Leu Gln Pro Gly Asn Cys Ser Leu Leu Ser Val Phe Ser Leu

245 250 255

Val Arg Pro His Ile Asp Ile Ser Phe His Gly Ile Leu Ser His Ile

260 265 270

Asn Thr Val Phe Val Leu Arg Ser Lys Glu Gly Leu Leu Asp Val Glu

275 280 285

Lys Leu Glu Cys Glu Asp Glu Leu Thr Gly Thr Glu Ile Ser Cys Leu

290 295 300

Arg Leu Lys Gly Gln Met Ile Tyr Leu Pro Glu Ala Asp Ser Ile Leu

305 310 315 320

Phe Leu Cys Ser Pro Ser Val Met Asn Leu Asp Asp Leu Thr Arg Arg

325 330 335

Gly Leu Tyr Leu Ser Asp Ile Pro Leu His Asp Ala Thr Arg Asp Leu

340 345 350

Val Leu Leu Gly Glu Gln Phe Arg Glu Glu Tyr Lys Leu Thr Gln Glu

355 360 365

Leu Glu Ile Leu Thr Asp Arg Leu Gln Leu Thr Leu Arg Ala Leu Glu

370 375 380

Asp

385

<210> 15

<211> 651

<212> DNA

<213> 智人

<400> 15

atgtatggat tcatcaacac ctgcctgcag tctcttgtga cagagaaatt tggtgaggag 60

acatgggaga agctgaaggc tcctgcagaa gtgcaagatg tcttcatgac ctacaccgtg 120

tatgatgaca tcatcaccat taagctcatc caagaagcct gcaaggttct ggatgtgtcc 180

atggaagcca ttctgaagct ctttggcgaa tacttcttta agttctgtaa gatgtctggc 240

tatgacagga tgctgcggac acttggagga aatctcaccg agtttattga aaacctagat 300

gcactccaca gttacctggc actgtcctat caggaaatga acgcaccatc ctttcgagtg 360

gaggaaggag ctgacggggc gatgcttctc cactactact cagacagaca tggtctgtgt 420

cacattgtac caggtatcat tgaagctgtg gccaaggact tctttgacac tgatgtggcc 480
atgagtatcc tggatatgaa cgaagaggtg gaaaggacag ggaagaaaga acatgttgtg 540
tttctggtcg tgcagaaggc tcacagacag ataagaggag caaaggcaag ccggccacaa 600
ggcagtgagg acagccaggc agaccaggag gctctccagg gaacactcct t 651

<210> 16
<211> 217
<212> PRT
<213> 智人
<400> 16

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

<210> 17
<211> 1158

<212> DNA
<213> 褐家鼠
<400> 17
atgtacggtt ttgtgaacca tgccctggag ctgctggtga tccgcaatta cggtcccgag 60
gtgtgggaag acatcaaaaa agaggcgcag ctggatgaag aaggccagtt tcttgtgaga 120
ataatctacg atgattccaa aacctatgac ttggtggctg ctgcgagcaa agtcctcaac 180
ctcaatgctg gtgaaatcct gcagatgttt gggaagatgt ttttcgtctt ctgtcaagag 240
tctggctatg ataccatctt gcgtgtcctg ggatctaatg tcagggagtt tttgcagaac 300
ctcgacgccc tgcacgacca cctcgccacc atctacccag ggatgcgcgc accttccttc 360
cggtgcaccg atgcagaaaa aggcaaaggg ctcattctgc actactactc ggaaagagag 420
gggcttcagg acattgtgat cgggattatc aagactgtag ctcaacagat ccatggcact 480
gagatagaca tgaaggttat tcagcaaaga agtgaagaat gtgatcatac ccaattttta 540
attgaagaaa aagaatcaaa agaagaggat ttttatgaag atctggacag gtttgaagag 600
aacggtaccc aggactcccg tatcagcccg tacaccttct gcaaagcgtt tccttttcac 660
atcatatttg accgggacct agtagtcacg cagtgtggaa atgctatcta cagagtgctc 720
ccccagctcc agcctgggaa gtgcagcctt ctgtctgtct tctctctggt ccgccctcat 780
attgacatca gtttccacgg gattctttca cacatcaata ccgtctttgt actgagaagc 840
aaggaagggt tgctggatgt tgagaaactt gaatgtgagg atgaactgac tggggcagag 900
attagctgcc tccgtctcaa aggccaaatg atctatttac cggaagcaga tagcatcctc 960
ttcctctgtt caccaagtgt gatgaacttg gatgacctaa caagaagagg cctgtacctg 1020
agtgacatcc ctctccatga tgctacacga gacctggtcc ttttgggaga acagttccgg 1080
gaggagtaca aactgacaca agagctggaa atcctcacag acaggctgca gctcacactg 1140
agggctttgg aggattga 1158
<210> 18
<211> 385
<212> PRT
<213> 褐家鼠
<400> 18
Met Tyr Gly Phe Val Asn His Ala Leu Glu Leu Leu Val Ile Arg Asn
1 5 10 15
Tyr Gly Pro Glu Val Trp Glu Asp Ile Lys Lys Glu Ala Gln Leu Asp
20 25 30
Glu Glu Gly Gln Phe Leu Val Arg Ile Ile Tyr Asp Asp Ser Lys Thr
35 40 45
Tyr Asp Leu Val Ala Ala Ala Ser Lys Val Leu Asn Leu Asn Ala Gly
50 55 60
Glu Ile Leu Gln Met Phe Gly Lys Met Phe Phe Val Phe Cys Gln Glu
65 70 75 80
Ser Gly Tyr Asp Thr Ile Leu Arg Val Leu Gly Ser Asn Val Arg Glu

85 90 95

Phe Leu Gln Asn Leu Asp Ala Leu His Asp His Leu Ala Thr Ile Tyr
100 105 110

Pro Gly Met Arg Ala Pro Ser Phe Arg Cys Thr Asp Ala Glu Lys Gly
115 120 125

Lys Gly Leu Ile Leu His Tyr Tyr Ser Glu Arg Glu Gly Leu Gln Asp
130 135 140

Ile Val Ile Gly Ile Ile Lys Thr Val Ala Gln Gln Ile His Gly Thr
145 150 155 160

Glu Ile Asp Met Lys Val Ile Gln Gln Arg Ser Glu Glu Cys Asp His
165 170 175

Thr Gln Phe Leu Ile Glu Glu Lys Glu Ser Lys Glu Glu Asp Phe Tyr
180 185 190

Glu Asp Leu Asp Arg Phe Glu Glu Asn Gly Thr Gln Asp Ser Arg Ile
195 200 205

Ser Pro Tyr Thr Phe Cys Lys Ala Phe Pro Phe His Ile Ile Phe Asp
210 215 220

Arg Asp Leu Val Val Thr Gln Cys Gly Asn Ala Ile Tyr Arg Val Leu
225 230 235 240

Pro Gln Leu Gln Pro Gly Lys Cys Ser Leu Leu Ser Val Phe Ser Leu
245 250 255

Val Arg Pro His Ile Asp Ile Ser Phe His Gly Ile Leu Ser His Ile
260 265 270

Asn Thr Val Phe Val Leu Arg Ser Lys Glu Gly Leu Leu Asp Val Glu
275 280 285

Lys Leu Glu Cys Glu Asp Glu Leu Thr Gly Ala Glu Ile Ser Cys Leu
290 295 300

Arg Leu Lys Gly Gln Met Ile Tyr Leu Pro Glu Ala Asp Ser Ile Leu
305 310 315 320

Phe Leu Cys Ser Pro Ser Val Met Asn Leu Asp Asp Leu Thr Arg Arg
325 330 335

Gly Leu Tyr Leu Ser Asp Ile Pro Leu His Asp Ala Thr Arg Asp Leu
340 345 350

Val Leu Leu Gly Glu Gln Phe Arg Glu Glu Tyr Lys Leu Thr Gln Glu
355 360 365

Leu Glu Ile Leu Thr Asp Arg Leu Gln Leu Thr Leu Arg Ala Leu Glu
370 375 380

Asp
385

<210> 19
<211> 1158
<212> DNA
<213> 褐家鼠
<400> 19
atgtacggtt ttgtgaacca tgccctggag ctgctggtga tccgcaatta cggtcccgag 60
gtgtgggaag acatcaaaaa agaggcgcag ctggatgaag aaggccagtt tcttgtgaga 120
ataatctacg atgattccaa aacctatgac ttggtggctg ctgcgagcaa agtcctcaac 180
ctcaatgctg gtgaaatcct gcagatgttt gggaagatgt ttttcgtctt ctgtcaagag 240
tctggctatg ataccatctt gcgtgtcctg ggatctaatg tcagggagtt tttgcagaac 300
ctcgacgccc tgcacgacca cctcgccacc atctacccag ggatgcgcgc accttccttc 360
cggtgcaccg atgcagaaaa aggcaaaggg ctcattctgc actactactc ggaaagagag 420
gggcttcagg acattgtgat cgggattatc aagactgtag ctcaacagat ccatggcact 480
gagatagaca tgaaggttat tcagcaaaga agtgaagaat gtgatcatac ccaattttta 540
attgaagaaa aagaatcaaa agaagaggat ttttatgaag atctggacag gtttgaagag 600
aacggtaccc aggactcccg tatcagcccg tacaccttct gcaaagcgtt tccttttcac 660
atcatatttg accgggacct agtagtcacg cagtgtggaa atgctatcta cagagtgctc 720
ccccagctcc agcctgggaa gtgcagcctt ctgtctgtct tctctctggt ccgccctcat 780
attgacatca gtttccacgg gattctttca cacatcaata ccgtctttgt actgagaagc 840
aaggaagggt tgctggatgt tgagaaactt gaatgtgagg atgaactgac tggggcagag 900
attagctgcc tccgtctcaa aggccaaatg atctatttac cggaagcaga tagcatcctc 960
ttcctctgtt caccaagtgt gatgaacttg gatgacctaa caagaagagg cctgtacctg 1020
agtgacatcc ctctccatga tgctacacga gacctggtcc ttttgggaga acagttccgg 1080
gaggagtaca aactgacaca agagctggaa atcctcacag acaggctgca gctcacactg 1140
agggctttgg aggattga 1158
<210> 20
<211> 385
<212> PRT
<213> 褐家鼠
<400> 20
Met Tyr Gly Phe Val Asn His Ala Leu Glu Leu Leu Val Ile Arg Asn
1 5 10 15
Tyr Gly Pro Glu Val Trp Glu Asp Ile Lys Lys Glu Ala Gln Leu Asp
20 25 30
Glu Glu Gly Gln Phe Leu Val Arg Ile Ile Tyr Asp Asp Ser Lys Thr
35 40 45
Tyr Asp Leu Val Ala Ala Ala Ser Lys Val Leu Asn Leu Asn Ala Gly
50 55 60
Glu Ile Leu Gln Met Phe Gly Lys Met Phe Phe Val Phe Cys Gln Glu

65 70 75 80
Ser Gly Tyr Asp Thr Ile Leu Arg Val Leu Gly Ser Asn Val Arg Glu
85 90 95
Phe Leu Gln Asn Leu Asp Ala Leu His Asp His Leu Ala Thr Ile Tyr
100 105 110
Pro Gly Met Arg Ala Pro Ser Phe Arg Cys Thr Asp Ala Glu Lys Gly
115 120 125
Lys Gly Leu Ile Leu His Tyr Tyr Ser Glu Arg Glu Gly Leu Gln Asp
130 135 140
Ile Val Ile Gly Ile Ile Lys Thr Val Ala Gln Gln Ile His Gly Thr
145 150 155 160
Glu Ile Asp Met Lys Val Ile Gln Gln Arg Ser Glu Glu Cys Asp His
165 170 175
Thr Gln Phe Leu Ile Glu Glu Lys Glu Ser Lys Glu Glu Asp Phe Tyr
180 185 190
Glu Asp Leu Asp Arg Phe Glu Glu Asn Gly Thr Gln Asp Ser Arg Ile
195 200 205
Ser Pro Tyr Thr Phe Cys Lys Ala Phe Pro Phe His Ile Ile Phe Asp
210 215 220
Arg Asp Leu Val Val Thr Gln Cys Gly Asn Ala Ile Tyr Arg Val Leu
225 230 235 240
Pro Gln Leu Gln Pro Gly Lys Cys Ser Leu Leu Ser Val Phe Ser Leu
245 250 255
Val Arg Pro His Ile Asp Ile Ser Phe His Gly Ile Leu Ser His Ile
260 265 270
Asn Thr Val Phe Val Leu Arg Ser Lys Glu Gly Leu Leu Asp Val Glu
275 280 285
Lys Leu Glu Cys Glu Asp Glu Leu Thr Gly Ala Glu Ile Ser Cys Leu
290 295 300
Arg Leu Lys Gly Gln Met Ile Tyr Leu Pro Glu Ala Asp Ser Ile Leu
305 310 315 320
Phe Leu Cys Ser Pro Ser Val Met Asn Leu Asp Asp Leu Thr Arg Arg
325 330 335
Gly Leu Tyr Leu Ser Asp Ile Pro Leu His Asp Ala Thr Arg Asp Leu
340 345 350
Val Leu Leu Gly Glu Gln Phe Arg Glu Glu Tyr Lys Leu Thr Gln Glu
355 360 365
Leu Glu Ile Leu Thr Asp Arg Leu Gln Leu Thr Leu Arg Ala Leu Glu
370 375 380

Asp

385

<210> 21

<211> 2229

<212> DNA

<213> 褐家鼠

<400> 21

atgtatggat tcatcaacac ctgcctgcag tctcttgtga cagagaaatt tggtgaggag 60
acatgggaga agctgaaggc tcctgcagaa gtgcaagatg tcttcatgac ctacaccgtg 120
tatgatgaca tcatcaccat taagctcatc caagaagcct gcaaggttct ggatgtgtcc 180
atggaagcca ttctgaagct ctttggcgaa tacttcttta agttctgtaa gatgtctggc 240
tatgacagga tgctgcggac acttggagga aatctcaccg agtttattga aaacctagat 300
gcactccaca gttacctggc actgtcctat caggaaatga acgcaccatc ctttcgagtg 360
gaggaaggag ctgacggggc gatgcttctc cactactact cagacagaca tggtctgtgt 420
cacattgtac caggtatcat tgaagctgtg gccaaggact tctttgacac tgatgtggcc 480
atgagtatcc tggatatgaa cgaagaggtg gaaaggacag ggaagaaaga acatgttgtg 540
tttctggtcg tgcagaaggc tcacagacag ataagaggag caaaggcaag ccggccacaa 600
ggcagtgagg acagccaggc agaccaggag gctctccagg gaacactcct tcggatgaag 660
gagagatatt taaacatccc tgtttgccct ggggagaaat ctcactcaac tgctgtgagg 720
gcatcggtcc tttttggaaa agggcccctc agggacacct tccagcccgt ctatcctgag 780
agactatggg tcgaagagga ggtgttctgt gatgcttttc ctttccacat tgtctttgat 840
gaagcactaa gggtcaagca agctggagtg aatattcaga agtatgtccc tggaatctta 900
acccagaagt ttgcactaga tgagtatttt tccatcatcc accctcaagt tactttcaac 960
atctccagca tctgcaagtt cattaacagt cagtttgtct tgaagacaag aaaagaaatg 1020
atgcccaaag caaggaagag ccagccgatg ctcaaactcc ggggtcagat gatctggatg 1080
gagtctctga ggtgcatgat cttcatgtgt tccccaaacg tccgcagcct gcaagagctg 1140
gaagagagca agatgcatct ttctgatatc gctccgcacg acacgaccag ggatctcatc 1200
ctcctcaacc agcagaggct ggcagagatg gagctgtcct gccaactgga aaagaagaag 1260
gaggagttgc gtgtcctttc caatcacctg gccatcgaga agaagaagac agagaccttg 1320
ctgtatgcca tgctgcctga acatgtggcc aaccaactca aggagggcag aaaggtggct 1380
gcaggagaat ttgaaacatg tacaatcctt ttcagcgatg ttgtgacatt taccaacatc 1440
tgtgcagcct gtgaacctat ccaaatcgtg aacatgctga attcaatgta ctccaagttt 1500
gacaggttaa ccagtgtcca tgatgtctac aaagtagaaa caatagggga tgcttacatg 1560
gtggtgggtg gagtaccagt acccgttgaa agccatgctc aaagagtcgc caattttgct 1620
ctggggatga gaatttctgc aaaagaagtg atgaatcctg tcactgggga acctatccag 1680
atcagagtgg gaatccacac tggaccagtc ttagcaggtg ttgtgggaga caagatgcct 1740
cggtactgct tgtttggtga cactgtaaac acagcctcta ggatggaaag tcacgggctt 1800
cccagcaaag tgcatctgag ccccacagcc cacagagccc tgaaaaacaa agggtttgaa 1860
attgtcagga gaggcgagat cgaagtgaag gggaaaggaa agatgaccac atactttctg 1920

atccagaacc tgaatgccac cgaggatgag ataatggggc gaccttcagc ccccgctgat 1980
gggaaggaag tatgtactcc cggaaaccaa gtcaggaagt cccctgctgt cccgaggaac 2040
acagaccatc agcaacaagt ctacaaagga gacccagcag acgcttctaa tgaagtcaca 2100
cttgctggga gcccagtggc agggcgaaac tccacagatg cagtcaataa ccagccatca 2160
ccagatgaga ccaagacaag tgtcgttgct agtggccctg tgctgtctgc tttctgtgtt 2220
gtgctgtga 2229

<210> 22
<211> 742
<212> PRT
<213> 褐家鼠
<400> 22

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

Asn Ile Pro Val Cys Pro Gly Glu Lys Ser His Ser Thr Ala Val Arg
225 230 235 240
Ala Ser Val Leu Phe Gly Lys Gly Pro Leu Arg Asp Thr Phe Gln Pro
245 250 255
Val Tyr Pro Glu Arg Leu Trp Val Glu Glu Glu Val Phe Cys Asp Ala
260 265 270
Phe Pro Phe His Ile Val Phe Asp Glu Ala Leu Arg Val Lys Gln Ala
275 280 285
Gly Val Asn Ile Gln Lys Tyr Val Pro Gly Ile Leu Thr Gln Lys Phe
290 295 300
Ala Leu Asp Glu Tyr Phe Ser Ile Ile His Pro Gln Val Thr Phe Asn
305 310 315 320
Ile Ser Ser Ile Cys Lys Phe Ile Asn Ser Gln Phe Val Leu Lys Thr
325 330 335
Arg Lys Glu Met Met Pro Lys Ala Arg Lys Ser Gln Pro Met Leu Lys
340 345 350
Leu Arg Gly Gln Met Ile Trp Met Glu Ser Leu Arg Cys Met Ile Phe
355 360 365
Met Cys Ser Pro Asn Val Arg Ser Leu Gln Glu Leu Glu Glu Ser Lys
370 375 380
Met His Leu Ser Asp Ile Ala Pro His Asp Thr Thr Arg Asp Leu Ile
385 390 395 400
Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Ala Glu Met Glu Leu Ser Cys Gln Leu
405 410 415
Glu Lys Lys Lys Glu Glu Leu Arg Val Leu Ser Asn His Leu Ala Ile
420 425 430
Glu Lys Lys Lys Thr Glu Thr Leu Leu Tyr Ala Met Leu Pro Glu His
435 440 445
Val Ala Asn Gln Leu Lys Glu Gly Arg Lys Val Ala Ala Gly Glu Phe
450 455 460
Glu Thr Cys Thr Ile Leu Phe Ser Asp Val Val Thr Phe Thr Asn Ile
465 470 475 480
Cys Ala Ala Cys Glu Pro Ile Gln Ile Val Asn Met Leu Asn Ser Met
485 490 495
Tyr Ser Lys Phe Asp Arg Leu Thr Ser Val His Asp Val Tyr Lys Val
500 505 510
Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Val Gly Gly Val Pro Val Pro
515 520 525
Val Glu Ser His Ala Gln Arg Val Ala Asn Phe Ala Leu Gly Met Arg

530 535 540

Ile Ser Ala Lys Glu Val Met Asn Pro Val Thr Gly Glu Pro Ile Gln
545 550 555 560
Ile Arg Val Gly Ile His Thr Gly Pro Val Leu Ala Gly Val Val Gly
565 570 575
Asp Lys Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly Asp Thr Val Asn Thr Ala
580 585 590
Ser Arg Met Glu Ser His Gly Leu Pro Ser Lys Val His Leu Ser Pro
595 600 605
Thr Ala His Arg Ala Leu Lys Asn Lys Gly Phe Glu Ile Val Arg Arg
610 615 620
Gly Glu Ile Glu Val Lys Gly Lys Gly Lys Met Thr Thr Tyr Phe Leu
625 630 635 640
Ile Gln Asn Leu Asn Ala Thr Glu Asp Glu Ile Met Gly Arg Pro Ser
645 650 655
Ala Pro Ala Asp Gly Lys Glu Val Cys Thr Pro Gly Asn Gln Val Arg
660 665 670
Lys Ser Pro Ala Val Pro Arg Asn Thr Asp His Gln Gln Gln Val Tyr
675 680 685
Lys Gly Asp Pro Ala Asp Ala Ser Asn Glu Val Thr Leu Ala Gly Ser
690 695 700
Pro Val Ala Gly Arg Asn Ser Thr Asp Ala Val Asn Asn Gln Pro Ser
705 710 715 720
Pro Asp Glu Thr Lys Thr Ser Val Val Ala Ser Gly Pro Val Leu Ser
725 730 735
Ala Phe Cys Val Val Leu
740

<210> 23
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 23
Cys Ala Ala Thr Cys Gly Ala Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Gly Gly Ala
<210> 24
<211> 18

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 24
Gly Cys Ala Cys Ala Cys Ala Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys
1 5 10 15
Cys Thr
<210> 25
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 25
Cys Ala Ala Cys Cys Ala Gly Ala Cys Ala Thr Gly Gly Gly Thr Cys
1 5 10 15
Cys Ala Cys
<210> 26
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 26
Gly Thr Thr Ala Ala Cys Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Cys Cys Cys
1 5 10 15
Ala Cys Ala Gly Ala
20
<210> 27
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 27
Gly Thr Thr Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Cys Ala Gly Thr Cys Ala
1 5 10 15
Cys Cys Thr Cys Thr

20

<210> 28
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 28
Gly Ala Thr Thr Cys Thr Cys Ala Gly Thr Gly Thr Gly Cys Thr Gly
1 5 10 15
Gly Thr Cys Ala Cys
20

<210> 29
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 29
Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Ala Gly Cys Thr Thr Ala Thr
1 5 10 15
Cys Thr Ala Thr Gly Ala Ala
20

<210> 30
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 30
Ala Thr Thr Thr Gly Ala Cys Gly Ala Ala Gly Gly Cys Gly Ala Ala
1 5 10 15
Gly Ala Ala Gly Cys Thr
20

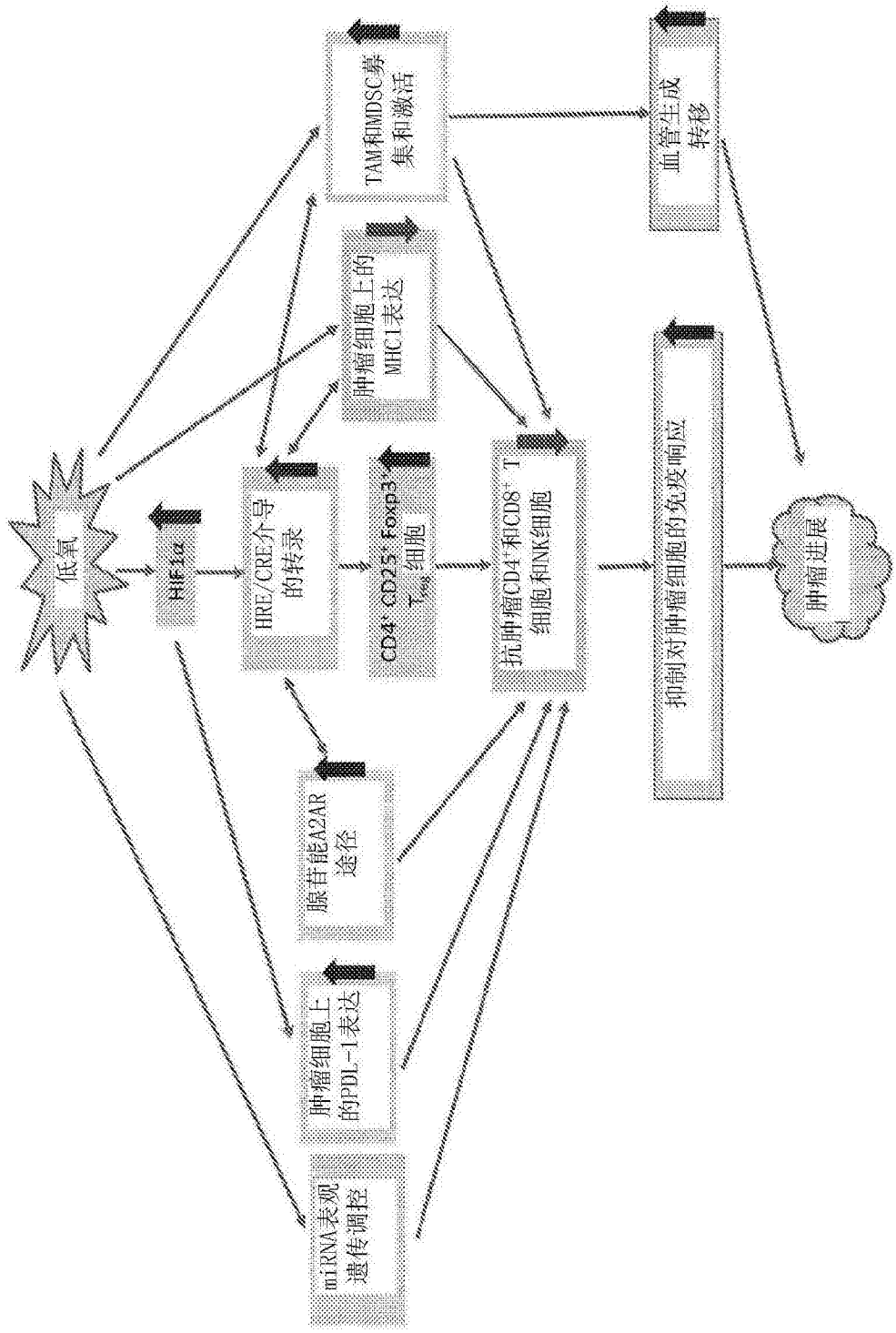

低氧
HIF1α
HRE/CRE介导的转录
腺苷能A2AR途径
miRNA表观遗传调控
肿瘤细胞上的PDL-1表达
CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg细胞
肿瘤细胞上的MHC1表达
TAM和MDSC募集和激活
抗肿瘤CD4+和CD8+ T细胞和NK细胞
抑制对肿瘤细胞的免疫响应
血管生成转移
肿瘤进展

图1A

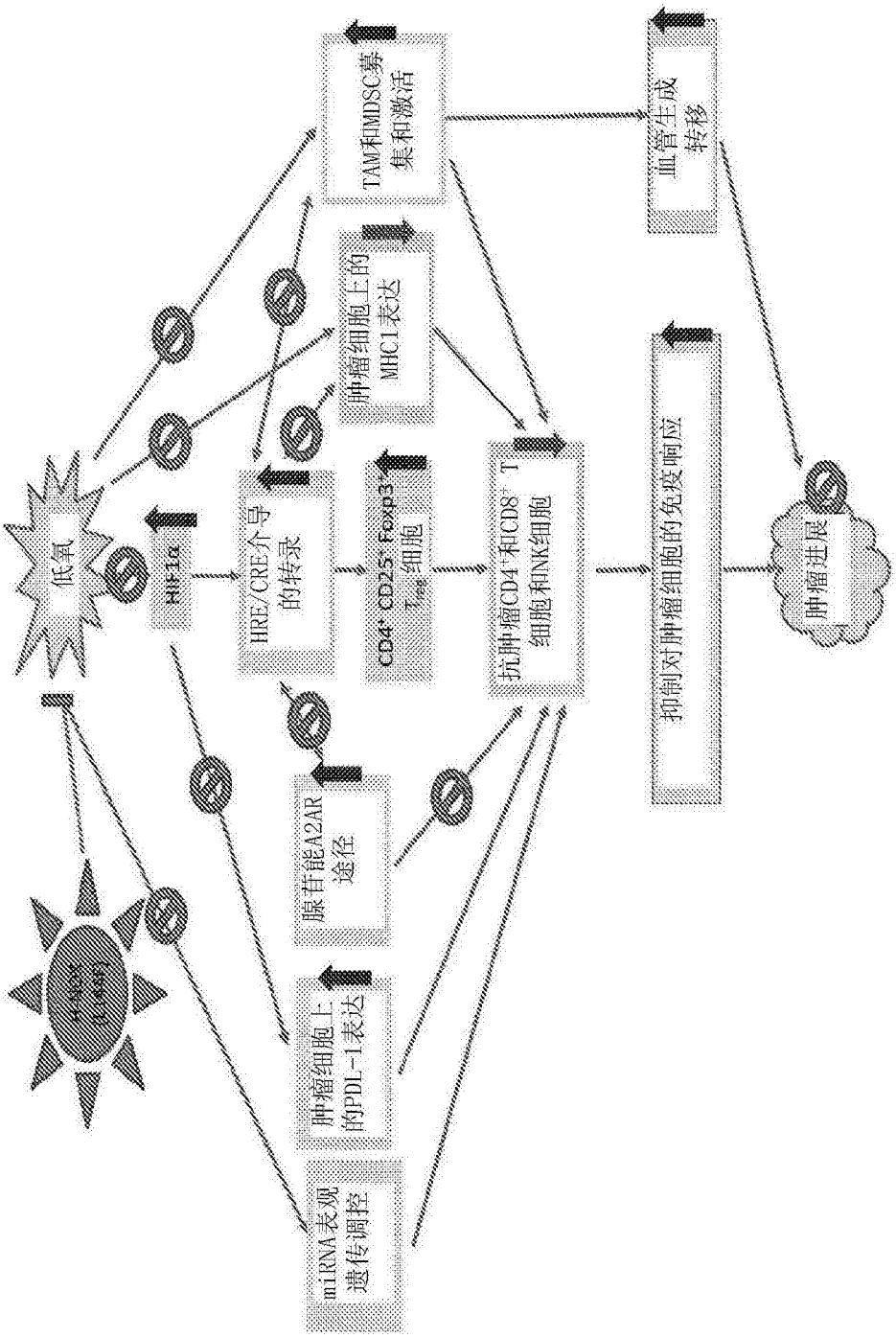

TAM和MDSC募集和激活
血管生成转移
肿瘤细胞上的MHC1表达
低氧
HIF-1α
HRE/CRE介导的转录
CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg细胞
抗肿瘤CD4+和CD8+ T细胞和NK细胞
抑制对肿瘤细胞的免疫响应
肿瘤进展
腺苷能A2AR途径
肿瘤细胞上的PDL-1表达
miRNA表观遗传调控

图1B

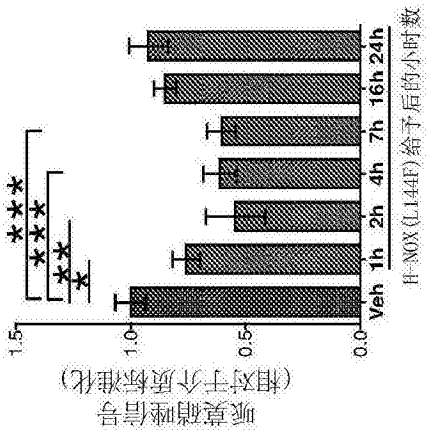

1.5
1.0
0.5
0.0
Veh
1h
2h
4h
7h
16h
24h
H-NOX(L144F)给予后的小时数
****
***
**
**
呋莫硝唑信号
(相对于小质标准化)

图2A

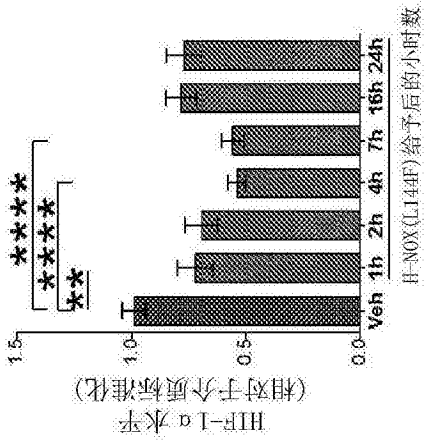

1.5
1.0
0.5
0.0
Veh
1h
2h
4h
7h
16h
24h
H-NOX(L144F)给予后的小时数
****
****
**
HIF-1α水平
(相对于小质标准化)

图2B

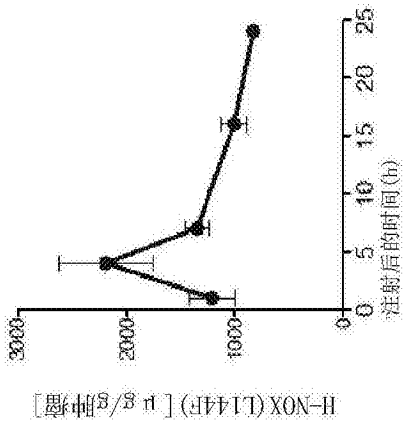

30000
20000
10000
0
0
5
10
15
20
25
注射后的时间(h)
H-NOX(L144F)[μg/g肿瘤]

图2C

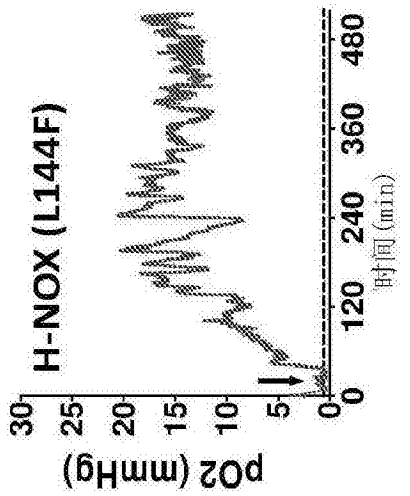

H-NOX (L144F)
pO2 (mmHg)
时间(min)

图3A

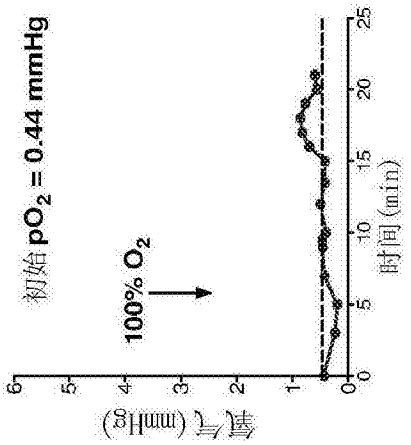

初始 pO2 = 0.44 mmHg
100% O2
氧气 (mmHg)
时间(min)

图3B

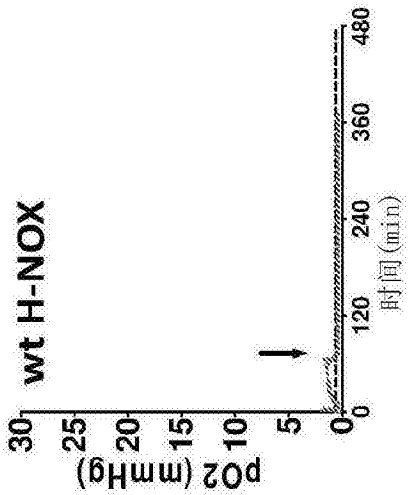

wt H-NOX
pO2 (mmHg)
时间(min)

图3C

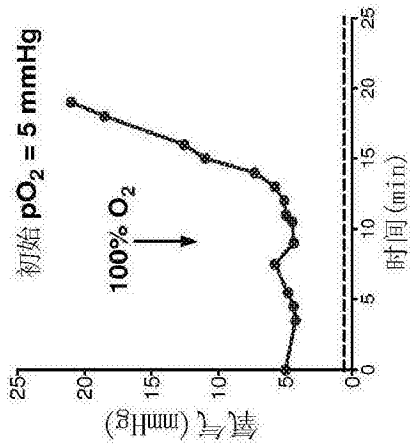

初始 pO_2 = 5 mmHg
100% O_2
氧气 (mmHg)
时间 (min)
0
5
10
15
20
25

图3D

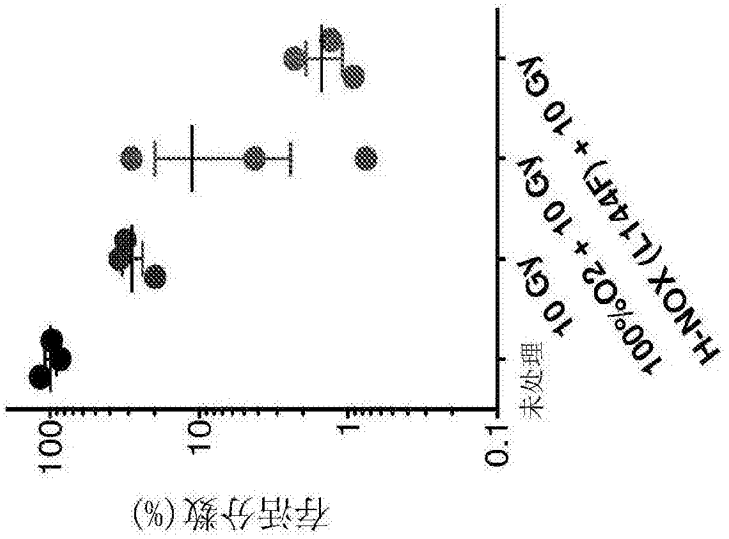

存活分数 (%)
100
10
1
0.1
未处理
10 Gy
100%O2 + 10 Gy
H-NOX (L144F) + 10 Gy

图4

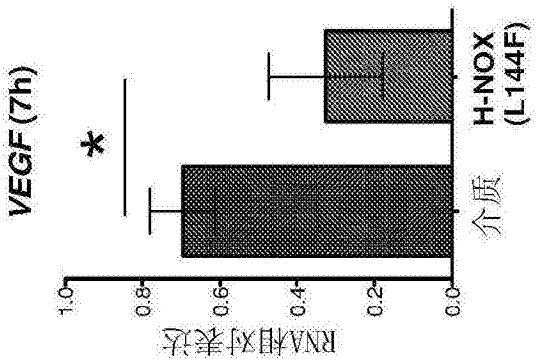

VEGF (7h)
*
RNA相对表达
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
介质
H-NOX (L144F)

图5A

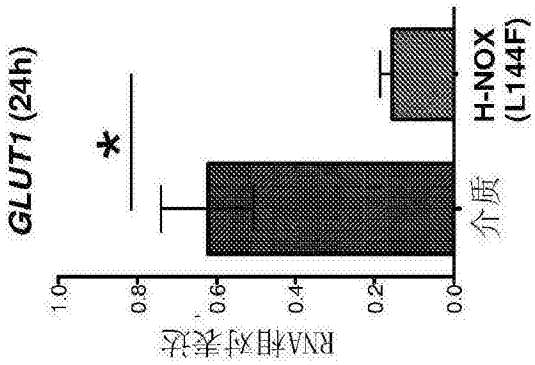

GLUT1 (24h)
*
介质
H-NOX (L144F)
RNA相对表达
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0

图5B

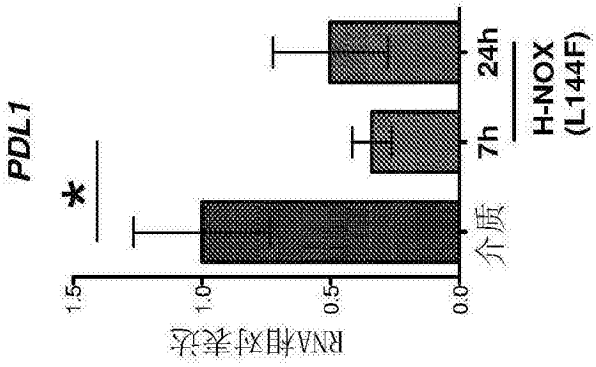

PDL1
*
介质
7h
24h
H-NOX (L144F)
RNA相对表达
1.5
1.0
0.5
0.0

图5C

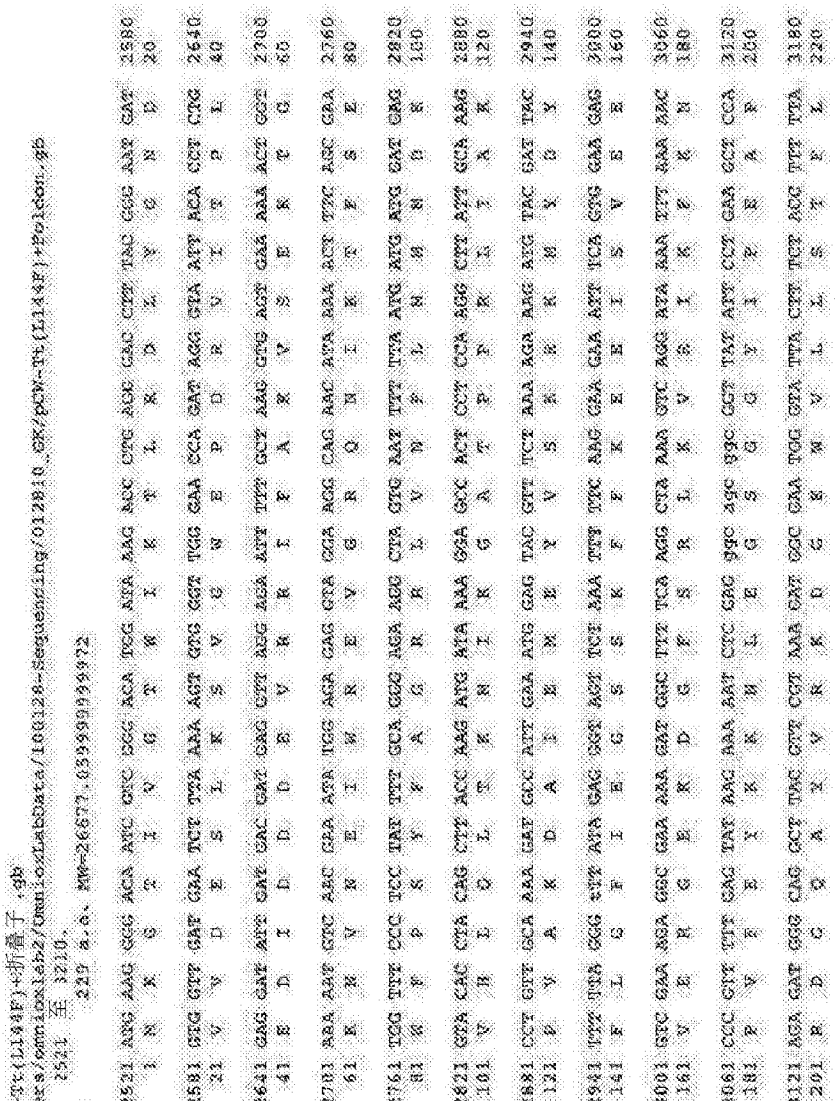

pCW-Tt(L144F)-折叠子.gb
/Users/sammiaolab2/OneDrive/LabData/100328-Sequencing/012810_GR/pCW-Tt(L144F)-Polcon.gb
从 2521 至 3210.
翻译 229 a.a. MW=26677.0399999999972

图6A

```
Mon Jan 03, 2013 12:36 PM
pCW-2002.5.gb
/Users/connie62/DNA/pCW-2002.5.gb
从 2521 至 3183.
翻译 220 a.a. MW=25553.899999999976

2521 ATG AAG CGG ACA ATC GTC CGC ACA TCG ATA AAG AGC CTG GCA GAC GAC CTT TAC GGG AAT CAT 2580
   1  M   K   R   T   I   V   R   T   S   I   K   S   L   A   D   D   L   Y   G   N   D  20

2581 GTG GTT GAT GAA TCT TTA AAA AGT GTC GGT TGG GAA GCA GCA GAT AAG GTA ATT AGA CCT CTG 2640
  21   V   V   D   E   S   L   K   S   V   G   W   E   A   A   D   K   V   I   R   P   L  40

2641 CAG GAT ATT GAT GAC GAC GAT GAC GAG AGA ATT TTT GCT AAG GTC AAT GAA AAA ACT CGT CGT 2700
  41   Q   D   I   D   D   D   D   E   R   I   F   A   K   V   N   E   K   T   R   R  60

2701 AAA AAT GTC AAC GAA ATA TGG AGA GAG GTA AGA GTA GGA AGG CAG AAC AGA AAA ACT TTC GAA 2760
  61   K   N   V   N   E   I   W   R   E   V   R   V   G   K   Q   N   R   K   T   F   E  80

2761 TGG TTT CCC TAT TTT GCA GGG AGA AGG AGA CTA AAT TTT GCG AAT TTT TTA AAG ATG AGT GAC CAG 2820
  81   W   F   P   Y   F   A   G   R   R   L   N   F   A   N   F   L   K   M   S   D   Q 100

2821 GTA CAC CTA CAG CTT ACC AAC AAG ATG ATA AAA CGA GCC ACC ACT CCT CCA AGC CTT ATT GCA AAC 2880
 101   V   H   L   Q   L   T   K   M   I   K   G   A   T   P   P   R   L   I   A   K 120

2881 CCT GTT GCA AAA GAT GCC ATT GAA AGG AGG CAG TAC GTT TCT AAA AGA GAA GAA AAG ATG TAC TAC 2940
 121   P   V   A   K   D   A   I   E   M   R   Q   Y   V   S   K   R   E   E   K   M   Y   Y 140

2941 TTA GGG TTT GTT ATA GAG GCC GCT AGT TCC AAA TTT TTC AAG GAA GAA GAT GTG GAA CAG 3000
 141   L   G   F   I   E   A   A   S   S   K   F   F   K   E   E   D   V   E   Q 160

3001 GTC AAA AGA GGC GAA AAA GAT GGC TTT TCA AGG CTA AAA GTC AGG AGA AAA TTT AAA AAC 3060
 161   V   K   R   G   E   K   D   G   F   S   R   L   K   V   R   R   K   F   K   N 180

3061 CCC GTT TTT GAG TAT AAG AAA AAT CTC GAG agc agc GGT TAT ATT CCT GAA GCT CCA 3120
 181   P   V   F   E   Y   K   K   N   L   E   S   S   G   Y   I   P   E   A   P 200

3121 ACA GAT GGG CAG GCT TAC GTT CGT AAA GAT GGC GAA TGG GTA TTA CTT TCT ACC TTT TTA 3180
 201   T   D   G   Q   A   Y   V   R   K   D   G   E   W   V   L   L   S   T   F   L 220

3181 tga 3183
 221   *   221
```

图6B

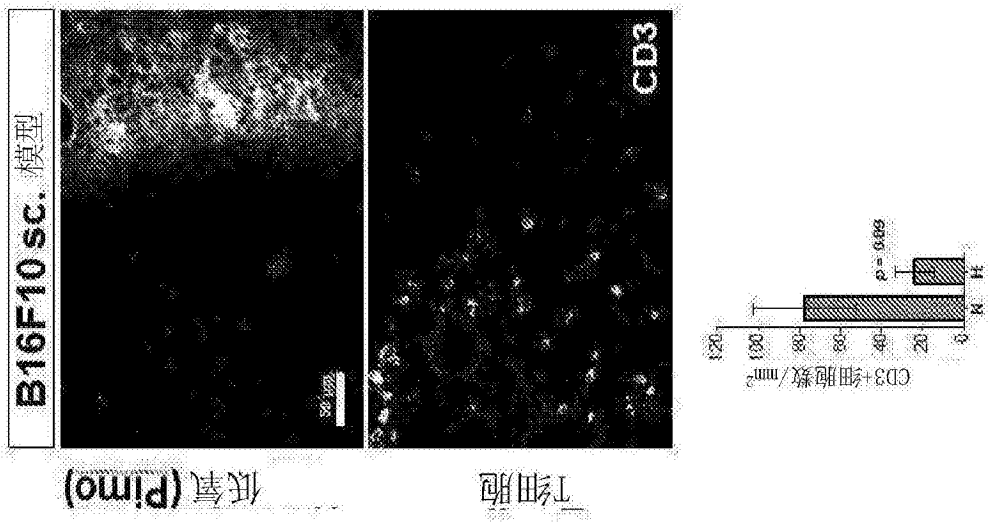

B16F10 sc. 模型
CD3
低氧(Pimo)
T细胞
CD3+细胞数/mm²
p = 0.09
H
N

图7A

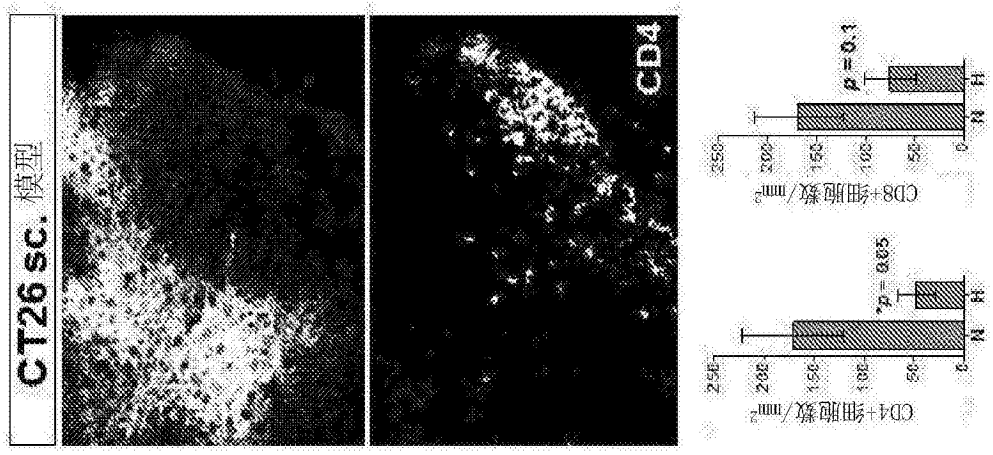

CT26 sc. 模型
CD4
CD4+细胞数/mm²
*p = 0.05
CD8+细胞数/mm²
p = 0.1
H
N

图7B

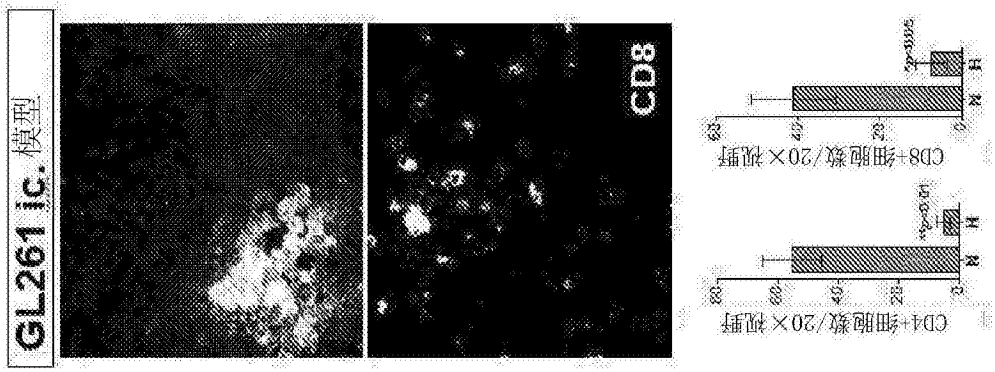

GL261 ic. 模型
CD8
CD4+细胞数/20×视野
*p=0.01
CD8+细胞数/20×视野
*p=0.05
H
N

图7C

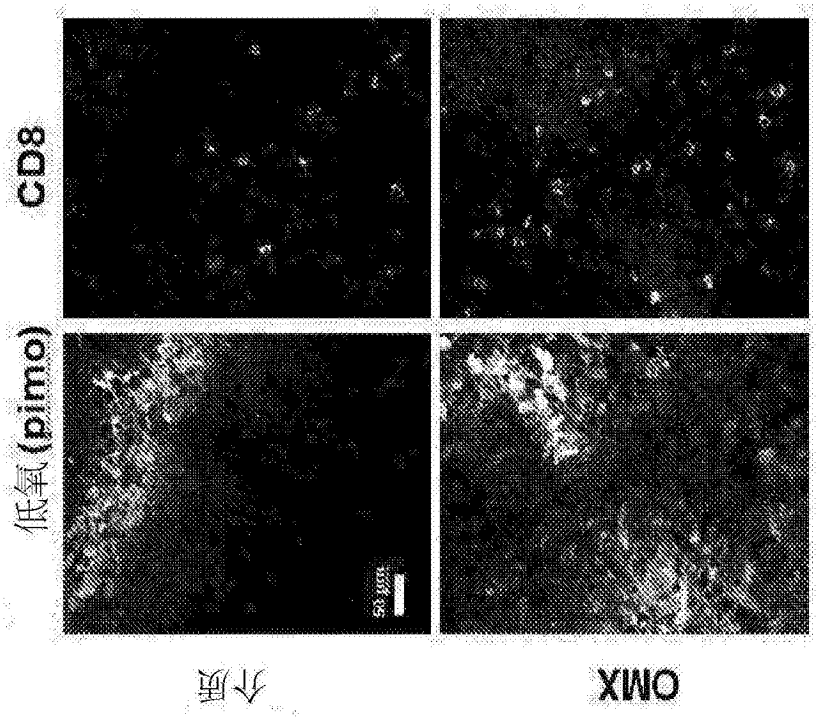

CD8
低氧(pimo)
50 μm
介质
OMX

图8

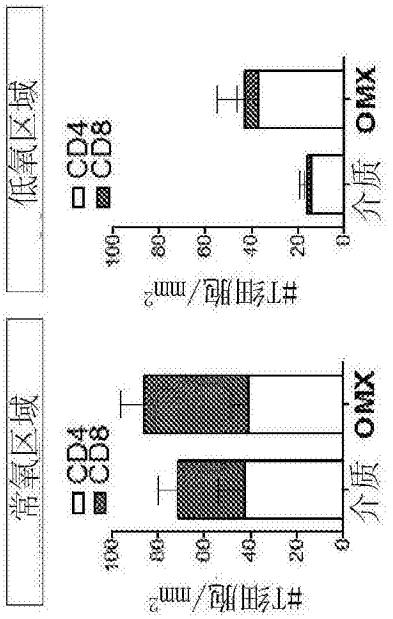

常氧区域
低氧区域
CD4
CD8
#T细胞/mm²
100
80
60
40
20
0
介质
OMX

图9A

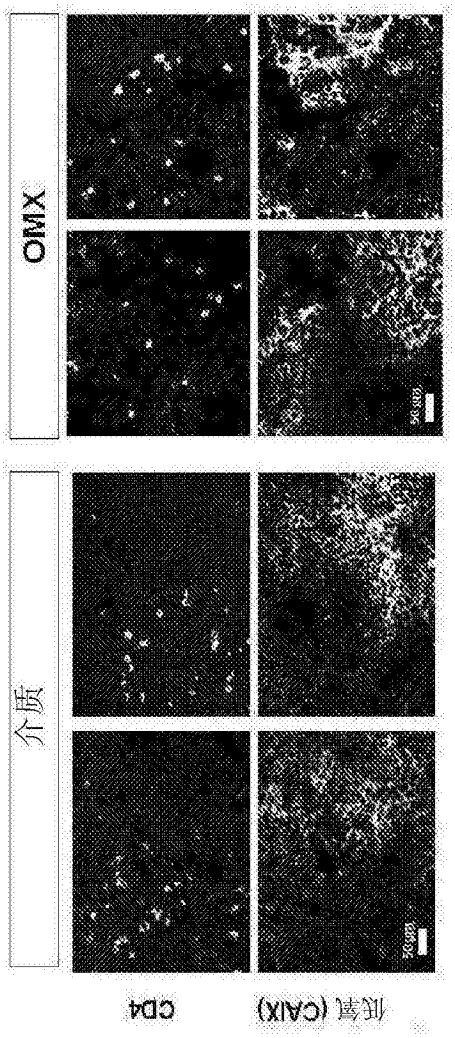


图9B

图10

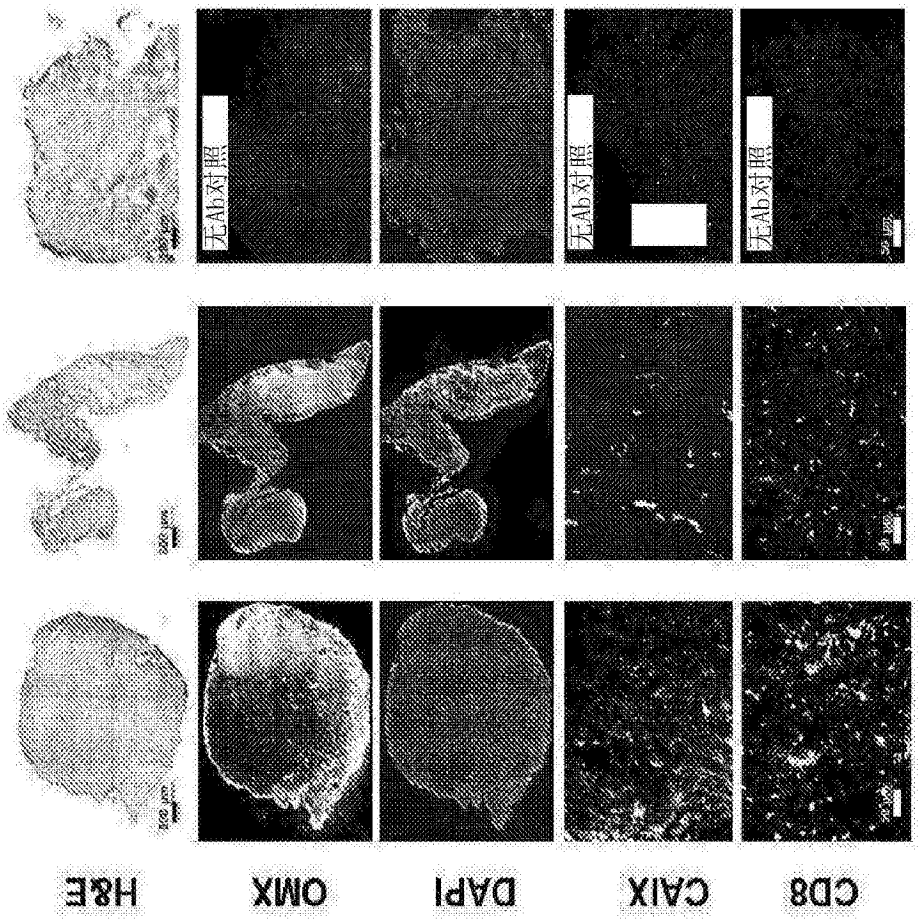

无Ab对照
无Ab对照
无Ab对照
CD8
CAIX
DAPI
OMX
H&E

图11

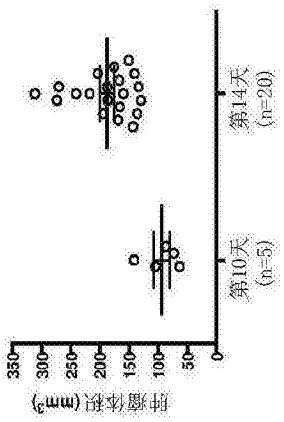

第14天
(n=20)
第10天
(n=5)
350
300
250
200
150
100
50
0

图12A

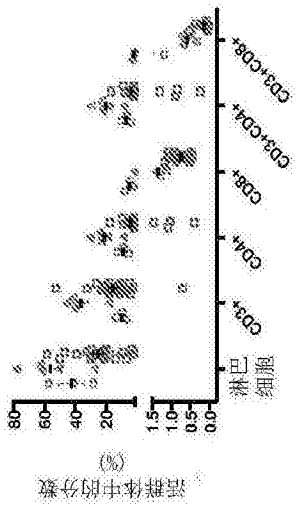


图12B

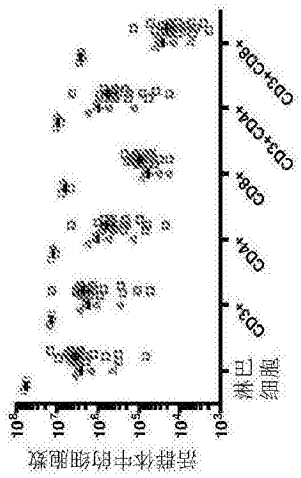


图12C

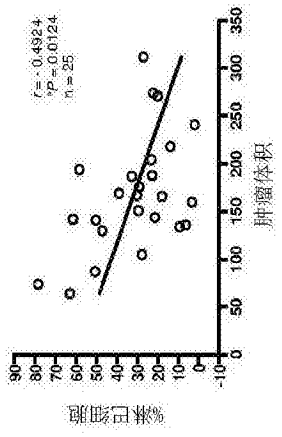


图12D

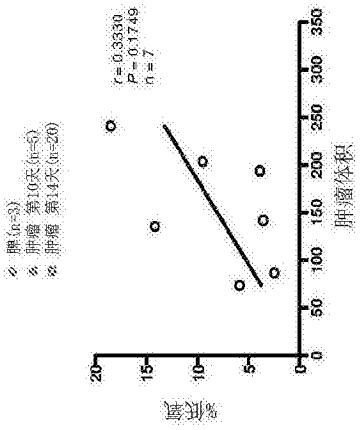

r = 0.3330
P = 0.1749
n = 7
肺 (n=3)
肿瘤 第10天(n=5)
肿瘤 第14天(n=20)
肿瘤体积
%低氧

图12E

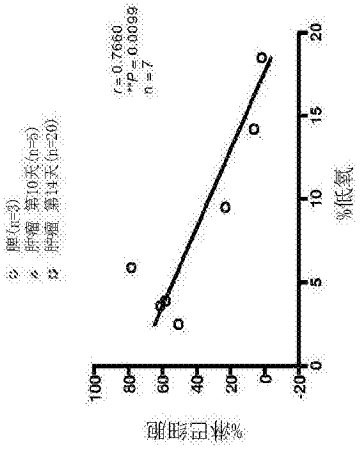
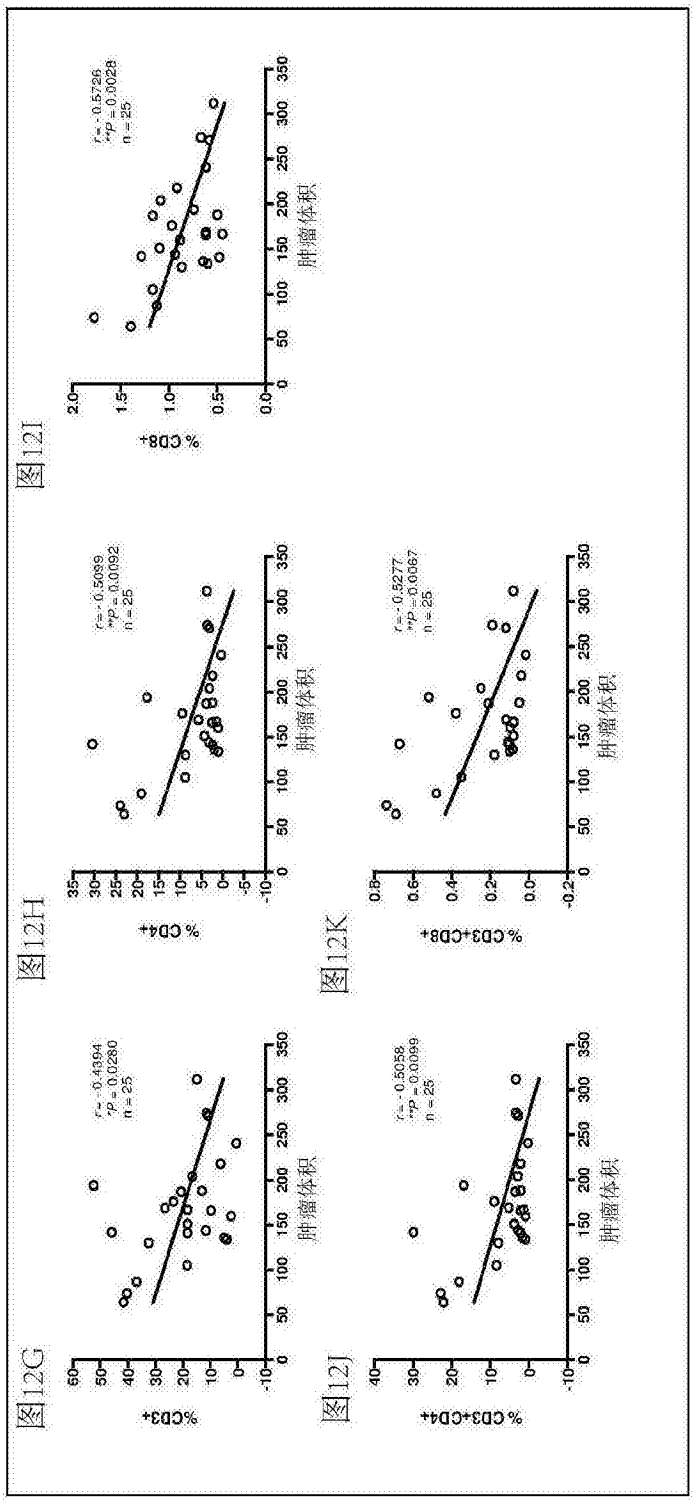
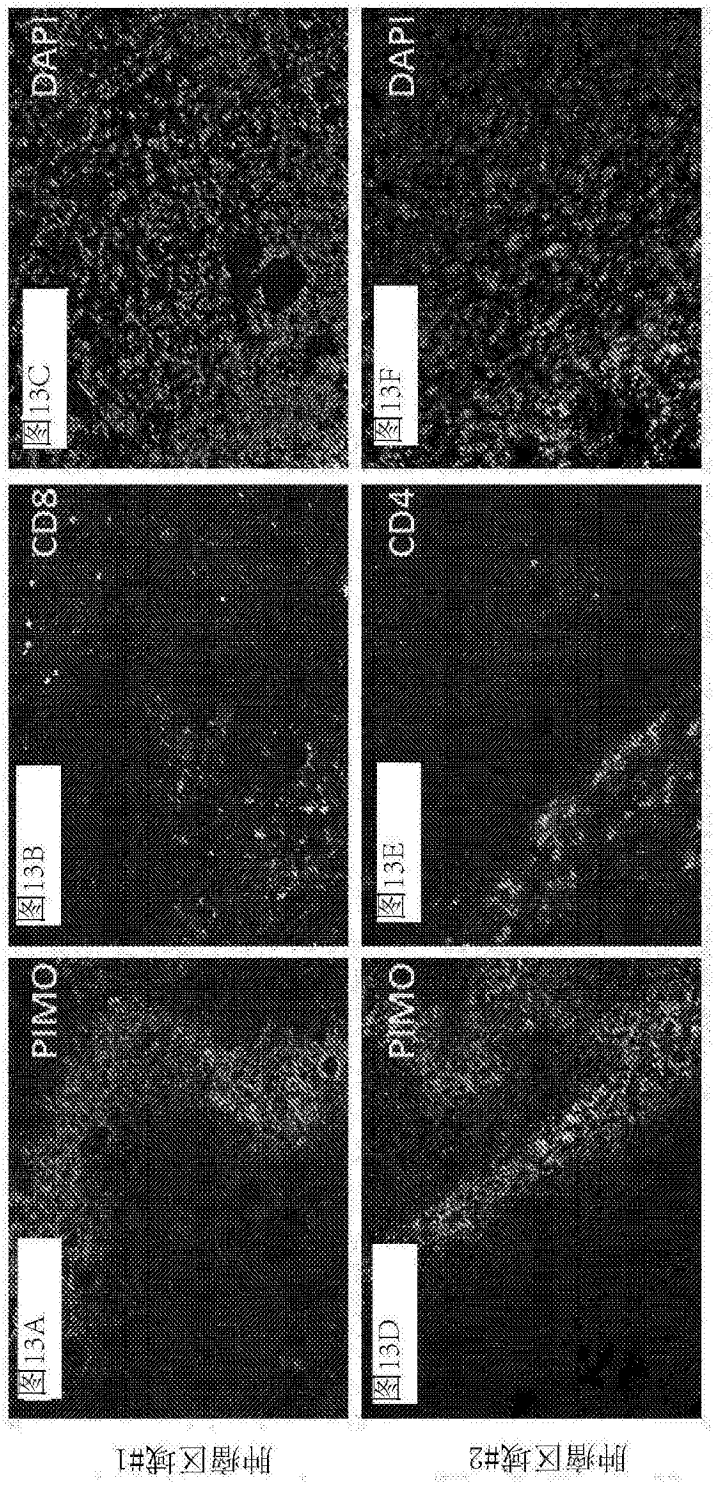

r = 0.7660
**p = 0.0099
n = 7
肺 (n=3)
肿瘤 第10天(n=5)
肿瘤 第14天(n=20)
%淋巴细胞
%低氧

图12F


图12G
r = -0.4394
**P = 0.0280
n = 25
%CD3+
肿瘤体积
图12H
r = -0.5099
**P = 0.0092
n = 25
%CD4+
肿瘤体积
图12I
r = -0.5726
**P = 0.0028
n = 25
%CD8+
肿瘤体积
图12J
r = -0.5058
**P = 0.0099
n = 25
%CD3+CD4+
肿瘤体积
图12K
r = -0.6277
**P = 0.0067
n = 25
%CD3+CD8+
肿瘤体积


DAPI
图13C
CD8
图13B
PIMO
图13A
DAPI
图13F
CD4
图13E
PIMO
图13D
肿瘤区域#1
肿瘤区域#2