(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120267819 A
(43)申请公布日 2025.07.08

(21)申请号 202510649367.4

(22)申请日 2019.08.30

(30)优先权数据
62/724969 2018.08.30 US
62/725010 2018.08.30 US
62/725038 2018.08.30 US
62/725043 2018.08.30 US
62/746832 2018.10.17 US
62/749007 2018.10.22 US
62/749506 2018.10.23 US
62/816683 2019.03.11 US
62/817230 2019.03.12 US
62/817241 2019.03.12 US
62/817244 2019.03.12 US
62/881039 2019.07.31 US
62/881088 2019.07.31 US

(62)分案原申请数据
201980070232.5 2019.08.30

(71)申请人 免疫生物公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 H·闻

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 罗文锋 彭昶

(51)Int.Cl.
A61K 40/42(2025.01)
A61K 40/15(2025.01)
A61K 40/10(2025.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 38/36(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
C07K 14/715(2006.01)
C07K 16/24(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C07K 16/22(2006.01)
C07K 14/555(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C07K 14/54(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
C07K 16/36(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

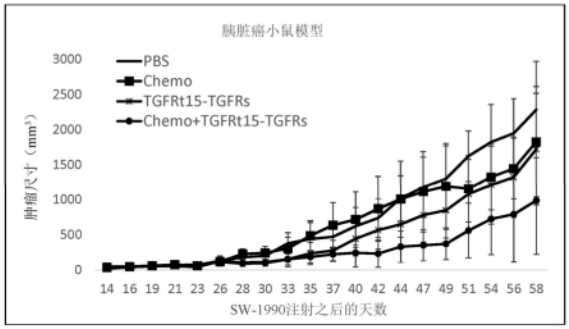
权利要求书1页 说明书431页
序列表（电子公布） 附图117页

(54)发明名称

治疗老年化相关病症的方法

(57)摘要

本发明涉及治疗老年化相关病症的方法。本文提供了治疗有需要的受试者的老年化相关疾病或病状、杀死或减少有需要的受试者的衰老细胞数量、改善有需要的受试者的皮肤和/或毛发的质地和/或外观以及有助于治疗有需要的受试者的肥胖症的方法，所述方法包括将治疗有效量的一种或多种自然杀手(NK)细胞活化剂和/或治疗有效数量的活化NK细胞施用于所述受试者。



CN 120267819 A

1.医药组合物在制备药物中的用途,所述药物用于杀死或减少患有癌症的受试者中的衰老细胞数量,所述组合物包含治疗有效量的多链嵌合多肽,所述多链嵌合多肽包含:(a)第一嵌合多肽,其包含:(i)第一靶标结合域,所述第一靶标结合域包含与SEQ ID NO:188至少90%一致的序列;(ii)可溶性组织因子域,所述可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少90%一致的序列;和(iii)亲和域对中的第一域,其中亲和域对中的所述第一域包含与SEQ ID NO:115至少90%一致的序列;和(b)第二嵌合多肽,其包含:(i)亲和域对中的第二域,其中亲和域对中的所述第二域包含与SEQ ID NO:113至少90%一致的序列;和(ii)第二靶标结合域,所述第二靶标结合域包含与SEQ ID NO:188至少90%一致的序列,其中所述第一嵌合多肽和所述第二嵌合多肽通过所述亲和域对中的所述第一域和所述第二域的结合而缔合。

2.根据权利要求1所述的用途,其中:所述第一靶标结合域包含与SEQ ID NO:188至少95%一致的序列;所述可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少95%一致的序列;亲和域对中的所述第一域包含与SEQ ID NO:115至少95%一致的序列;亲和域对中的所述第二域包含与SEQ ID NO:113至少95%一致的序列;和所述第二靶标结合域包含与SEQ ID NO:188至少95%一致的序列。

3.根据权利要求1所述的用途,其中:所述第一靶标结合域包含SEQ ID NO:188;所述可溶性组织因子域包含SEQ ID NO:93;亲和域对中的所述第一域包含SEQ ID NO:115;亲和域对中的所述第二域包含SEQ ID NO:113;和所述第二靶标结合域包含SEQ ID NO:188。

4.根据权利要求1所述的用途,其中:所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少95%一致的序列;和所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:193至少95%一致的序列。

5.根据权利要求1所述的用途,其中:所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:236;和所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:193。

6.根据权利要求1所述的用途,其中所述多链嵌合多肽引起TGF-β受体的活化减少。

7.根据权利要求1所述的用途,其中所述第一靶标结合域和所述可溶性组织因子域在所述第一嵌合多肽中彼此直接邻接。

8.根据权利要求1所述的用途,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于所述第一嵌合多肽中的所述第一靶标结合域与所述可溶性组织因子域之间的接头序列。

9.根据权利要求1所述的用途,其中所述可溶性组织因子域与所述亲和域对中的所述第一域在所述第一嵌合多肽中彼此直接邻接。

10.根据权利要求1所述的用途,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于所述第一嵌合多肽中的所述可溶性组织因子域与所述亲和域对中的所述第一域之间的接头序列。

治疗老年化相关病症的方法

[0001] 本申请为分案申请,原申请的申请日为2019年8月30日,申请号为201980070232.5(PCT/US2019/049142),发明名称为“治疗老年化相关病症的方法”。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求以下申请的优先权:2019年3月11日提交的美国专利申请第62/816,683号;2018年8月30日提交的美国专利申请第62/725,038号;2019年3月12日提交的美国专利申请第62/817,244号;2019年7月31日提交的美国专利申请第62/881,039号;2018年8月30日提交的美国专利申请第62/724,969号;2019年3月12日提交的美国专利申请第62/817,230号;2018年8月30日提交的美国专利申请第62/725,043号;2018年8月30日提交的美国专利申请第62/725,010号;2018年10月22日提交的美国专利申请第62/749,007号;2018年10月17日提交的美国专利申请第62/746,832号;2018年10月23日提交的美国专利申请第62/749,506号;2019年3月12日提交的美国专利申请第62/817,241号;和2019年7月31日提交的美国专利申请第62/881,088号,它们各自以全文引用的方式并入本文。

技术领域

[0004] 本公开涉及免疫学和细胞生物学领域。

背景技术

[0005] 衰老是不可逆的生长停滞的一种形式,伴随着表型变化、对细胞凋亡的抗性和损伤感测信号传导路径的活化。细胞衰老最初描述为培养的人纤维母细胞失去了增殖能力,在约50群体翻倍后到达永久停滞(称为海弗利克极限(Hayflicklimit))。衰老被认为是可由广泛范围的内在和外在伤害,包括氧化和遗传毒性应激、DNA损伤、端粒损耗、致癌活化、线粒体功能障碍或化疗剂诱导的应激反应。

[0006] 衰老细胞保持代谢活性,并且可通过其分泌表型影响组织止血、疾病和老年化。衰老被认为是生理过程,并且对促进伤口愈合、组织稳态、再生和纤维化调节很重要。例如,在伤口愈合期间观察到衰老细胞的瞬时诱导,并且其有助于伤口愈合。衰老还起着抑制肿瘤的作用。但是,衰老细胞的积累也驱动老年化以及老年化相关疾病和病状。衰老表型还可触发慢性炎性反应,并且因此增强慢性炎症病状以促进肿瘤生长。衰老与老年化之间的联系最初是基于衰老细胞在老年化组织中积累的观察结果。使用转基因模型已经能够在许多老年化相关病症中系统地检测衰老细胞。选择性消除衰老细胞的策略表明,衰老细胞在老年化相关病症中起着因果作用。

发明内容

[0007] 本发明基于以下发现:向患有癌症的哺乳动物施用NK细胞活化剂使得肿瘤被抑制,并且向糖尿病动物模型施用NK细胞活化剂显示出改善的皮肤和毛发外观和质地,以及降低的血液葡萄糖水平。鉴于此发现,本文提供了治疗有需要的受试者的老年化相关疾病或病状的方法,包括将治疗有效量的一种或多种自然杀手(NK)细胞活化剂和/或治疗有效

数量的活化NK细胞施用于经鉴定患有老年化相关疾病或病状的受试者。本文还提供了杀死或减少有需要的受试者中的衰老细胞数量的方法,其包括将治疗有效量的一种或多种NK细胞活化剂和/或治疗有效数量的活化NK细胞施用于受试者。本文还提供了在一段时间内改善有需要的受试者的皮肤和/或头发的质地和/或外观的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的一种或多种自然杀手(NK)细胞活化剂和/或治疗有效数量的活化NK细胞。本文还提供了有助于在一段时间内治疗有需要的受试者的肥胖症的方法,包括将治疗有效量的一种或多种自然杀手(NK)细胞活化剂和/或治疗有效数量的活化NK细胞施用于受试者。

[0008] 本文提供了治疗有需要的受试者的老年化相关疾病或病状的方法,包括将治疗有效量的一种或多种自然杀手(NK)细胞活化剂施用于经鉴定患有老年化相关疾病或病状的受试者。

[0009] 本文还提供了杀死或减少有需要的受试者的衰老细胞数量的方法,包括将治疗有效量的一种或多种NK细胞活化剂施用于受试者。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,衰老细胞是衰老的癌细胞、衰老的单核细胞、衰老的淋巴细胞、衰老的星形胶质细胞、衰老的微神经胶质细胞、衰老的神经元、衰老的组织纤维母细胞、衰老的真皮纤维母细胞、衰老的角质细胞,或其它分化组织特异性分裂功能细胞。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,衰老癌细胞是化学疗法诱导的衰老细胞或辐射诱导的衰老细胞。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,受试者已经鉴定或诊断患有老年化相关疾病或病状。

[0010] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,老年化相关疾病或病状选自以下群组:癌症、自体免疫疾病、代谢疾病、神经退化性疾病、心血管疾病、皮肤病、早衰疾病和脆性疾病。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,癌症选自以下群组:实体肿瘤、血液肿瘤、肉瘤、骨肉瘤、神经胶母细胞瘤、神经母细胞瘤、黑色素瘤、横纹肌肉瘤、尤文氏肉瘤、骨肉瘤、B细胞赘瘤、多发性骨髓瘤、B细胞淋巴瘤、B细胞非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、骨髓增生异常综合症(MDS)、皮肤T细胞淋巴瘤、视网膜母细胞瘤、胃癌、尿道上皮癌、肺癌、肾细胞癌、胃癌和食道癌、胰脏癌、前列腺癌、乳癌、结肠直肠癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、头颈部鳞状细胞癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、肝癌和肝细胞癌。

[0011] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,自体免疫疾病是1型糖尿病。

[0012] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,代谢疾病选自以下群组:肥胖症、脂质营养不良和2型糖尿病。

[0013] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,神经退化性疾病选自以下群组:阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)、帕金森氏病(Parkinson's disease)和痴呆症。

[0014] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,心血管疾病选自以下群组:冠状动脉疾病、动脉粥样硬化和肺动脉高压。

[0015] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,皮肤病选自以下群组:伤口愈合、秃发、皱纹、老年性雀斑痣、皮肤变薄、着色性干皮病和先天性角化不良。

[0016] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,早衰疾病选自以下群组:早衰和呼奇逊-吉尔福早衰综合症(Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome)。

[0017] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,脆性疾病选自以下群组:脆性、疫苗接种反应、骨质疏松症和肌肉减少症。

[0018] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,老年化相关疾病或病状选自以下群组:年龄相关黄斑变性、骨关节炎、脂肪萎缩、特发性肺纤维化、肾脏移植失败、肝纤维化、骨量损失、肌肉减少症、年龄相关的肺组织弹性丧失、骨质疏松症、年龄相关的肾功能障碍,和化学诱发的肾功能障碍。

[0019] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,老年化相关疾病或病状是2型糖尿病或动脉粥样硬化。

[0020] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,施药使得受试者的靶组织中的衰老细胞数量减少。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,靶组织选自:脂肪组织、胰组织、肝组织、肺组织、脉管系统、骨骼组织、中枢神经系统(CNS)组织、眼组织、皮肤组织、肌肉组织和二级淋巴器官组织。

[0021] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,施药使得活化NK细胞中CD25、CD69、mTORC1、SREBP1、IFN-γ和颗粒酶B的表达水平增加。

[0022] 本文还提供了治疗有需要的受试者的老年化相关疾病或病状的方法,包括将治疗有效数量的活化NK细胞施用于经鉴定患有老年化相关疾病或病状的受试者。

[0023] 本文还提供了杀死或减少有需要的受试者的衰老细胞数量的方法,包括将治疗有效数量的活化NK细胞施用于受试者。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,衰老细胞是衰老的癌细胞、衰老的单核细胞、衰老的淋巴细胞、衰老的星形胶质细胞、衰老的微神经胶质细胞、衰老的神经元、衰老的组织纤维母细胞、衰老的真皮纤维母细胞、衰老的角质细胞,或其它分化组织特异性分裂功能细胞。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,衰老癌细胞是化学疗法诱导的衰老细胞或辐射诱导的衰老细胞。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,受试者已经鉴定或诊断患有老年化相关疾病或病状。

[0024] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,老年化相关疾病或病状选自以下群组:癌症、自体免疫疾病、代谢疾病、神经退化性疾病、心血管疾病、皮肤病、早衰疾病和脆性疾病。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,癌症选自以下群组:实体肿瘤、血液肿瘤、肉瘤、骨肉瘤、神经胶母细胞瘤、神经母细胞瘤、黑色素瘤、横纹肌肉瘤、尤文氏肉瘤、骨肉瘤、B细胞赘瘤、多发性骨髓瘤、B细胞淋巴瘤、B细胞非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、骨髓增生异常综合症(MDS)、皮肤T细胞淋巴瘤、视网膜母细胞瘤、胃癌、尿道上皮癌、肺癌、肾细胞癌、胃癌和食道癌、胰脏癌、前列腺癌、乳癌、结肠直肠癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、头颈部鳞状细胞癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、肝癌和肝细胞癌。

[0025] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,自体免疫疾病是1型糖尿病。

[0026] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,代谢疾病选自以下群组:肥胖症、脂质营养不良和2型糖尿病。

[0027] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,神经退化性疾病选自以下群组:阿尔茨海默氏病、帕金森氏病和痴呆。

[0028] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,心血管疾病选自以下群组:冠状动脉疾病、动脉粥样硬化和肺动脉高压。

[0029] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,皮肤病选自以下群组:伤口愈合、秃发、皱纹、老年性雀斑痣、皮肤变薄、着色性干皮病和先天性角化不良。

[0030] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,早衰疾病选自以下群组:早衰和呼奇逊-吉尔福早衰综合症。

[0031] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,脆性疾病选自以下群组:脆性、疫苗接种反应、骨质疏松症和肌肉减少症。

[0032] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,老年化相关疾病或病状选自以下群组:年龄相关黄斑变性、骨关节炎、脂肪萎缩、特发性肺纤维化、肾脏移植失败、肝纤维化、骨量损失、肌肉减少症、年龄相关的肺组织弹性丧失、骨质疏松症、年龄相关的肾功能障碍,和化学诱发的肾功能障碍。

[0033] 本文所述的任一种方法的一些实施例进一步包括:获得休眠NK细胞;以及使休眠NK细胞在试管内、在包括一种或多种NK细胞活化剂的液体培养基中接触,其中所述接触引起活化NK细胞产生,随后将所述NK细胞施用于受试者。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,休眠NK细胞是获自受试者的自体NK细胞。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,休眠NK细胞是同种异体休眠NK细胞。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,休眠NK细胞是人工NK细胞。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,休眠NK细胞是单倍型休眠NK细胞。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,休眠NK细胞是携带嵌合抗原受体或重组T细胞受体的基因工程化NK细胞。本文所述的任一种方法的一些实施例进一步包括分离出活化NK细胞,随后将活化NK细胞施用于受试者。本文所述的任一种方法的一些实施例进一步包括将编码嵌合抗原受体或重组T细胞受体的核酸引入休眠NK细胞或活化NK细胞之后施用于受试者。

[0034] 本文还提供了在一段时间内改善有需要的受试者的皮肤和/或头发的质地和/或外观的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的一种或多种自然杀手(NK)细胞活化剂。

[0035] 本文还提供了在一段时间内改善有需要的受试者的皮肤和/或头发的质地和/或外观的方法,其包括向受试者施用治疗有效数量的活化NK细胞。本文所述的任一种方法的一些实施例进一步包括:获得休眠NK细胞;以及使休眠NK细胞在试管内、在包括一种或多种NK细胞活化剂的液体培养基中接触,其中所述接触引起活化NK细胞产生,随后将所述NK细胞施用于受试者。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,休眠NK细胞是获自受试者的自体NK细胞。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,休眠NK细胞是同种异体休眠NK细胞。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,休眠NK细胞是人工NK细胞。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,休眠NK细胞是单倍型休眠NK细胞。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,休眠NK细胞是携带嵌合抗原受体或重组T细胞受体的基因工程化NK细胞。本文所述的任一种方法的一些实施例进一步包括分离出活化NK细胞,随后将活化NK细胞施用于受试者。

[0036] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述方法在一段时间内提供受试者皮肤的质地和/或外观的改善。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的皮肤在一段时间内的皱纹形成速率降低。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的皮肤在一段时间内的着色改善。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的皮肤质地在一段时间内改善。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述方法使得受试者头发的质地和/或外观在一段时间内改善。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述方法使得受试者在一段时间内的白发形成速率降低。

在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的白发数量在一段时间内减少。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的脱发率随时间降低。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的头发质地在一段时间内改善。

[0037] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述时间段在约一个月与约10年之间。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述方法使得受试者皮肤中的衰老真皮纤维母细胞数量在一段时间内减少。

[0038] 本文还提供了有助于在一段时间内治疗有需要的受试者的肥胖症的方法,包括将治疗有效量的一种或多种自然杀手(NK)细胞活化剂施用于受试者。

[0039] 本文还提供了有助于在一段时间内治疗有需要的受试者的肥胖症的方法,包括将治疗有效数量的活化NK细胞施用于受试者。本文所述的任一种方法的一些实施例进一步包括:获得休眠NK细胞;以及使休眠NK细胞在试管内、在包括一种或多种NK细胞活化剂的液体培养基中接触,其中所述接触引起活化NK细胞产生,随后将所述NK细胞施用于受试者。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,休眠NK细胞是获自受试者的自体NK细胞。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,休眠NK细胞是同种异体休眠NK细胞。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,休眠NK细胞是人工NK细胞。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,休眠NK细胞是单倍型休眠NK细胞。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,休眠NK细胞是携带嵌合抗原受体或重组T细胞受体的基因工程化NK细胞。本文所述的任一种方法的一些实施例进一步包括分离出活化NK细胞,随后将活化NK细胞施用于受试者。

[0040] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的质量在一段时间内降低。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的身体质量指数(BMI)在一段时间内降低。在一些本文所述的任一种方法的实施例中,所述方法使得受试者的前期糖尿病恶化成2型糖尿病的速率降低。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的空腹血清葡萄糖水平降低。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的胰岛素敏感性增加。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的动脉粥样硬化严重程度降低。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,所述时间段在约两周与约10年之间。

[0041] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种引起以下中的一者或多者活化:IL-2的受体、IL-7的受体、IL-12的受体、IL-15的受体、IL-18的受体、IL-21的受体、IL-33的受体;CD16、CD69、CD25、CD59、CD352、NKp80、DNAM-1、2B4、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D、KIR2DS1、KIR2Ds2/3、KIR2DL4、KIR2DS4、KIR2DS5和KIR3DS1的受体。

[0042] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起IL-2受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-2受体的可溶性IL-2或激动性抗体。

[0043] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起IL-7受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-7受体的可溶性IL-7或激动性抗体。

[0044] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起IL-12受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-2受体的可溶性IL-12或激动性抗体。

[0045] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起IL-15受体活化的一种或多种NK

细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-15受体的可溶性IL-15或激动性抗体。

[0046] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起IL-21受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-21受体的可溶性IL-21或激动性抗体。

[0047] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起IL-33受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-33受体的可溶性IL-33或激动性抗体。

[0048] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起CD16受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到CD16受体的激动性抗体。

[0049] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起CD69受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到CD69的激动性抗体。

[0050] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起CD25或CD59受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到CD25或CD59的激动性抗体。

[0051] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起CD352受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到CD352的激动性抗体。

[0052] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起NKp80受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKp80的激动性抗体。

[0053] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起DNAM-1受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到DNAM-1的激动性抗体。

[0054] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起2B4受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到2B4的激动性抗体。

[0055] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起NKp30受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKp30的激动性抗体。

[0056] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起NKp44受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKp44的激动性抗体。

[0057] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起NKp46受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKp46的激动性抗体。

[0058] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起NKG2D受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKG2D的激动性抗体。

[0059] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起KIR2DS1受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DS1的激动性抗体。

[0060] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起KIR2DS2/3受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DS2/3的激动性抗体。

[0061] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起KIR2DL4受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DL4的激动性抗体。

[0062] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起KIR2DS4受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DS4的激动性抗体。

[0063] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起KIR2DS5受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DS5的激动性抗体。

[0064] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起KIR3DS1受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR3DS1的激动性抗体。

[0065] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种引起以下中的一种或多种的活化减少:PD-1、TGF-β受体、TIGIT、CD1、TIM-3、Siglec-7、IRP60、Tactile、IL1R8、NKG2A/KLRD1、KIR2DL1、KIR2DL2/3、KIR2DL5、KIR3DL1、KIR3DL2、ILT2/LIR-1和LAG-2。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起PD-1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到PD-1的拮抗性抗体、可溶性PD-1、可溶性PD-L1,或特异性结合到PD-L1的抗体。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起TGF-β受体活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是可溶性TGF-β受体、特异性结合到TGF-β的抗体,或特异性结合到TGF-β受体的拮抗性抗体。

[0066] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起TIGIT活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到TIGIT的拮抗性抗体、可溶性TIGIT,或特异性结合到TIGIT配体的抗体。

[0067] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起CD1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到CD1的拮抗性抗体、可溶性CD1,或特异性结合到CD1配体的抗体。

[0068] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起TIM-3活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到TIM-3的拮抗性抗体、可溶性TIM-3,或特异性结合到TIM-3配体的抗体。

[0069] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起Siglec-7活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到Siglec-7的拮抗性抗体,或特异性结合到Siglec-7配体的抗体。

[0070] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起IRP60活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IRP60的拮抗性抗体,或特异性结合到IRP60配体的抗体。

[0071] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起Tactile活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到Tactile的拮抗性抗体,或特异性结合到Tactile配体的抗体。

[0072] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起IL1R8活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL1R8的拮抗性抗体,或特异性结合到IL1R8配体的抗体。

[0073] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起NKG2A/KLRD1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKG2A/KLRD1的拮抗性抗体,或特异性结合到NKG2A/KLRD1配体的抗体。

[0074] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起KIR2DL1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DL1的拮抗性抗体,或特异性结合到KIR2DL1配体的抗体。

[0075] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起KIR2DL2/3活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DL2/3的拮抗性抗体,或特异性结合到KIR2DL2/3配体的抗体。

[0076] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起KIR2DL5活化减少的一种或多种

NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DL5的拮抗性抗体,或特异性结合到KIR2DL5配体的抗体。

[0077] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起KIR3DL1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR3DL1的拮抗性抗体,或特异性结合到KIR3DL1配体的抗体。

[0078] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起KIR3DL2活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR3DL2的拮抗性抗体,或特异性结合到KIR3DL2配体的抗体。

[0079] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起ILT2/LIR-1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到ILT2/LIR-1的拮抗性抗体,或特异性结合到ILT2/LIR-1配体的抗体。

[0080] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,引起LAG-2活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到LAG-2的拮抗性抗体,或特异性结合到LAG-2配体的抗体。

[0081] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是单链嵌合多肽,所述单链嵌合多肽包括:(i)第一靶标结合域;(ii)可溶性组织因子域;以及(iii)第二靶标结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域与可溶性组织因子域彼此直接邻接。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括介于第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性组织因子域与第二靶标结合域彼此直接邻接。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括介于可溶性组织因子域和第二靶标结合域之间的接头序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域与第二靶标结合域彼此直接邻接。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括介于第一靶标结合域和第二靶标结合域之间的接头序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第二靶标结合域与可溶性组织因子域直接彼此邻接。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括介于第二靶标结合域和可溶性组织因子域之间的接头序列。

[0082] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域与第二靶标结合域特异性结合到相同的抗原。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域与第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域与第二靶标结合域包括相同的氨基酸序列。

[0083] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域与第二靶标结合域特异性结合到不同的抗原。

[0084] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是抗原结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域与第二靶标结合域各自是抗原结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,抗原结合域包括scFv或单域抗体。

[0085] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个结合到选自以下群组的靶标:CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、

TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体,和CD122的受体。

[0086] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性白介素或细胞因子蛋白选自以下群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。

[0087] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子受体。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性白介素或细胞因子受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、TNFα的可溶性受体、IL-4的可溶性受体,或IL-10的可溶性受体。

[0088] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性组织因子域是人可溶性组织因子域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,人可溶性组织因子域包括与SEQ ID NO:93至少80%一致的序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,人可溶性组织因子域包括与SEQ ID NO:93至少90%一致的序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,人可溶性组织因子域包括与SEQ ID NO:93至少95%一致的序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,人可溶性组织因子域不包括以下中的一个或多个:位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[0089] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,人可溶性组织因子域不包括以下中的任一个:位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[0090] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性组织因子域不能够结合因子VIIa。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性组织因子域不将非活性因子X转化为因子Xa。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,单链嵌合多肽不刺激哺乳动物的血

液凝结。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括一个或多个位于其N端和/或C端的其它靶标结合域。

[0091] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,单链嵌合多肽包括一个或多个位于其N端的其它靶标结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,一个或多个其它靶标结合域直接邻接第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括介于至少一个其它靶标结合域之一与第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域之间的接头序列。

[0092] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,单链嵌合多肽包括一个或多个位于其C端的其它靶标结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,一个或多个其它靶标结合域之一直接邻接第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括介于至少一个其它靶标结合域之一与第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域之间的接头序列。

[0093] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,单链嵌合多肽包括一个或多个位于其N端和C端的其它靶标结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,位于N端的一个或多个其它抗原结合域之一直接邻接第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括介于N端的一个或多个其它抗原结合域之一与第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域之间的接头序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,位于C端的一个或多个其它抗原结合域之一直接邻接第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括介于C端的一个或多个其它抗原结合域之一与第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域之间的接头序列。

[0094] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性地结合到相同抗原。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性地结合到相同的表位。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个包括相同的氨基酸序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自特异性地结合到相同抗原。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自特异性地结合到相同的表位。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自包括相同的氨基酸序列。

[0095] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自特异性地结合到不同抗原。

[0096] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个靶标结合域中的一个或多个是抗原结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自是抗原结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,抗原结合域包括scFv或单域抗体。

[0097] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个靶标结合域中的一个或多个特异性地结合到选自以下群组的靶标:CD16a、

CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体,和CD122的受体。

[0098] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性白介素或细胞因子蛋白选自以下群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。

[0099] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子受体。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、TNFα的可溶性受体、IL-4的可溶性受体,或IL-10的可溶性受体。

[0100] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是多链嵌合多肽,所述多链嵌合多肽包括:(a)第一嵌合多肽,其包括:(i)第一靶标结合域、(ii)可溶性组织因子域,和(iii)一对亲和域中的第一域;以及(b)第二嵌合多肽,其包括:(i)一对亲和域中的第二域,和(ii)第二靶标结合域,其中第一嵌合多肽与第二嵌合多肽经由亲和域对的第一域与第二域的结合而发生缔合。

[0101] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域彼此直接邻接。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域彼此直接邻接。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域彼此直接邻接。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列。

[0102] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域与第二靶标结合域特异性结合到相同的抗原。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域与第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域与第二靶标结合域包括相同的氨基酸序列。

[0103] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域与第二靶标结合域特异性结合到不同的抗原。

[0104] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是抗原结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域

与第二靶标结合域各自是抗原结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,抗原结合域包括scFv或单域抗体。

[0105] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个特异性地结合到选自以下群组的靶标:CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体,和CD122的受体。

[0106] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性白介素或细胞因子蛋白选自以下群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。

[0107] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子受体。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、TNFα的可溶性受体、IL-4的可溶性受体,或IL-10的可溶性受体。

[0108] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括一个或多个其它靶标结合域,其中一个或多个其它抗原结合域中的至少一个定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于可溶性组织因子域与一个或多个其它抗原结合域中的至少一个之间的接头序列,和/或介于一个或多个其它抗原结合域中的至少一个与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[0109] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括一个或多个位于第一嵌合多肽N端和/或C端的其它靶标结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,在第一嵌合多肽中,一个或多个其它靶标结合域中的至少一个直接邻接亲和域对中的第一域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与亲和域对中的第一域之间的接头序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,在第一嵌合多肽中,一个或多个其它靶标结合域中的至少一个直接邻接第一靶标结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与第一靶标结合域之间的接头序列。

[0110] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,一个或多个其它靶标结合域中的至少一个安置于第一嵌合多肽的N端和/或C端,并且一个或多个其它靶标结合域中的至少一个定位于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,在第一嵌合多肽中,安置于N端的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个其它靶标结合域直接邻接第一靶标结合域或亲和域对中的第一域。在本文所述

的任一种方法一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括安置于第一嵌合多肽中的至少一个其它靶标结合域与第一靶标结合域或亲和域对中的第一域之间的接头序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,在第一嵌合多肽中,安置于C端的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个其它靶标结合域直接邻接第一靶标结合域或亲和域对中的第一域。在本文所述的任一种方法一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括安置于第一嵌合多肽中的至少一个其它靶标结合域与第一靶标结合域或亲和域对中的第一域之间的接头序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个直接邻接可溶性组织因子域和/或亲和域对中的第一域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括接头序列,所述接头序列安置于(i)可溶性组织因子域与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个之间,所述靶标结合域定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间;和/或(ii)亲和域对中的第一域与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个之间,所述靶标结合域定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[0111] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括一个或多个位于第二嵌合多肽N端和/或C端的其它靶标结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,在第二嵌合多肽中,一个或多个其它靶标结合域中的至少一个直接邻接亲和域对中的第二域。

[0112] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与亲和域对中的第二域之间的接头序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,在第二嵌合多肽中,一个或多个其它靶标结合域中的至少一个直接邻接第二靶标结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与第二靶标结合域之间的接头序列。

[0113] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性地结合到相同抗原。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性地结合到相同的表位。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个包括相同的氨基酸序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自特异性地结合到相同抗原。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自特异性地结合到相同的表位。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自包括相同的氨基酸序列。

[0114] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自特异性地结合到不同抗原。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个靶标结合域中的一个或多个是抗原结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自是抗原结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,抗原结合域包括scFv。

[0115] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个靶标结合域中的一个或多个特异性地结合到选自以下群组的靶标:CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体,和CD122的受体。

[0116] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性白介素或细胞因子蛋白选自以下群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。

[0117] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子受体。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性受体是可溶性TGF-β受体II

[0118] (TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、TNFα的可溶性受体、IL-4的可溶性受体,或IL-10的可溶性受体。

[0119] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性组织因子域是人可溶性组织因子域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,人可溶性组织因子域包括与SEQ ID NO:93至少80%一致的序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,人可溶性组织因子域包括与SEQ ID NO:93至少90%一致的序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,人可溶性组织因子域包括与SEQ ID NO:93至少95%一致的序列。

[0120] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,人可溶性组织因子域不包括以下中的一个或多个:位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[0121] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,人可溶性组织因子域不包括以下中的任一个:位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及位于与人成熟野生型组织因子蛋白

的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[0122] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性组织因子域不能够结合到因子VIIa。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性组织因子域不将非活性因子X转化为因子Xa。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,多链嵌合多肽不刺激哺乳动物的血液凝结。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,亲和域对是来自人IL-15受体α链的寿司域(IL-15Rα)和可溶性IL-15。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性IL-15具有D8N或D8A氨基酸取代。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,人IL-15Rα是成熟的全长IL-15Rα。

[0123] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,亲和域对选自以下群组:芽胞杆菌核糖核酸酶(barnase)和芽胞杆菌核糖核酸酶抑制子(barnstar)、PKA和AKAP、基于突变核糖核酸酶I片段的衔接子/对接标签模块,以及基于蛋白质突触蛋白、突触结合蛋白、突触泡蛋白和SNAP25的相互作用的SNARE模块。

[0124] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是多链嵌合多肽,所述多链嵌合多肽包括:(a)第一和第二嵌合多肽,其中每一者包括:(i)第一靶标结合域、(ii)Fc域和(iii)一对亲和域中的第一域;以及(b)第三和第四嵌合多肽,其中每一者包括:(i)一对亲和域中的第二域和(ii)第二靶标结合域,其中第一和第二嵌合多肽与第三和第四嵌合多肽经由亲和域对中的第一域和第二域的结合发生缔合,并且第一和第二嵌合多肽经由其Fc域发生缔合。

[0125] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一和第二嵌合多肽中的第一靶标结合域与Fc域彼此直接邻接。在本文所述的任一种方法一些实施例中,第一和第二嵌合多肽进一步包括介于第一和第二嵌合多肽中的第一靶标结合域与Fc域之间的接头序列。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一和第二嵌合多肽中的Fc域与亲和域对中的第一域彼此直接邻接。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于第一和第二嵌合多肽中的Fc域与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[0126] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第三和第四嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域彼此直接邻接。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第三和第四嵌合多肽进一步包括介于第三和第四嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列。

[0127] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域与第二靶标结合域特异性结合到相同的抗原。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域与第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域与第二靶标结合域包括相同的氨基酸序列。

[0128] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域与第二靶标结合域特异性结合到不同的抗原。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是抗原结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域与第二靶标结合域各自是抗原结合域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,抗原结合域包括scFv或单域抗体。

[0129] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个特异性地结合到选自以下群组的靶标:CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、

PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体,和CD122的受体。

[0130] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性白介素或细胞因子蛋白选自以下群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。

[0131] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子受体。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、TNFα的可溶性受体、IL-4的可溶性受体,或IL-10的可溶性受体。

[0132] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性组织因子域是不刺激血液凝结的人可溶性组织因子域。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,可溶性组织因子域包含或由人野生型可溶性组织因子的序列组成。

[0133] 如本文所用,术语“嵌合”是指多肽包括最初来源于两个不同来源(例如两种天然存在的不同蛋白质,例如来自相同或不同物种)的氨基酸序列(例如结构域)。举例而言,嵌合多肽可以包括来自至少两种天然存在的不同人蛋白质的结构域。在一些实例中,嵌合多肽可包括作为合成序列(例如scFv)的结构域和来源于天然存在的蛋白质(例如天然存在的人蛋白质)的结构域。在一些实施例中,嵌合多肽可以包括至少两个不同的作为合成序列(例如两个不同scFv)的结构域。

[0134] “活化NK细胞”是一种NK细胞,其展现CD25、CD69、MTOR-C1、SREBP、IFN-γ和颗粒酶(例如颗粒酶B)中的两种或更多种(例如三种、四种、五种或六种)的升高的表达水平,例如相较于休眠NK细胞。本文描述了用于鉴定CD25、CD69、MTOR-C1、SREBP、IFN-γ和颗粒酶(例如颗粒酶B)的表达水平的示例性方法。

[0135] “休眠NK细胞”是一种NK细胞,其对CD25、CD69、MTOR-C1、SREBP、IFN-γ和颗粒酶(例如颗粒酶B)中的两种或更多种(例如三种、四种、五种或六种)的表达减少,例如相较于活化NK细胞。

[0136] “NK细胞活化剂”是一种诱导或促进(单独或与其它NK细胞活化剂组合)休眠NK细胞发展成活化NK细胞的药剂。本文描述了NK细胞活化剂的非限制性实例和方面。

[0137] “抗原结合域”是能够特异性结合到一种或多种不同抗原的一个或多个蛋白质结构域(例如,由来自单一多肽的氨基酸形成或由来自两种或更多种多肽(例如相同或不同的多肽)的氨基酸形成)。在一些实例中,抗原结合域能够以与天然存在的抗体相似的特异性和亲和力结合到抗原或表位。在一些实施例中,抗原结合域可以是抗体或其片段。在一些实施例中,抗原结合域可包括替代支架。抗原结合域的非限制性实例在本文中描述。抗原结合域的其它实例是本领域已知的。

[0138] “可溶性组织因子域”是指与缺少跨膜域和胞内域的野生型哺乳动物组织因子蛋白(例如人野生型组织因子蛋白)的区段具有至少70%一致性((例如至少75%一致性、至少80%一致性、至少85%一致性、至少90%一致性、至少95%一致性、至少99%一致性或100%一致性)的多肽。本文描述了可溶性组织因子域的非限制性实例。

[0139] 术语“可溶性白介素蛋白”在本文中用于指成熟并且分泌的白介素蛋白或其生物活性片段。在一些实例中,可溶性白介素蛋白可包括与成熟和分泌的哺乳动物野生型白介素蛋白(例如人野生型白介素蛋白)至少70%一致、至少75%一致、至少80%一致、至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少99%一致或100%一致并且保持其生物活性的序列。可溶性白介素蛋白的非限制性实例在本文中描述。

[0140] 术语“可溶性细胞因子蛋白”在本文中用于指成熟和分泌的细胞因子蛋白或其生物活性片段。在一些实例中,可溶性细胞因子蛋白可包括与成熟和分泌的哺乳动物野生型白介素蛋白(例如人野生型白介素蛋白)至少70%一致、至少75%一致、至少80%一致、至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少99%一致或100%一致并且保持其生物活性的序列。可溶性细胞因子蛋白的非限制性实例在本文中描述。

[0141] 术语“可溶性白介素受体”在本文中以最广泛的意义使用,是指一种多肽,其缺乏能够结合一个或多个其天然配体(例如,在生理条件下,例如在室温下、在磷酸盐缓冲盐水中)的跨膜域(和任选的胞内域)。举例来说,可溶性白介素受体可包括与野生型白介素受体的胞外域至少70%一致(例如至少75%一致、至少80%一致、至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少99%一致或100%一致)并且保持其特异性结合到一个或多个其天然配体的能力、但缺少其跨膜域(并且任选地,还缺少其胞内域)的序列。本文描述了可溶性白介素受体的非限制性实例。

[0142] 术语“可溶性细胞因子受体”在本文中以最广泛的意义使用,是指一种多肽,其缺乏能够结合一个或多个其天然配体(例如在生理条件下,例如在室温下、在磷酸盐缓冲液中)的跨膜域(和任选的胞内域)。举例来说,可溶性细胞因子受体可包括与野生型细胞因子受体的胞外域至少70%一致(例如至少75%一致、至少80%一致、至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少99%一致或100%一致)并且保持其特异性结合到一个或多个其天然配体的能力、但缺少其跨膜域(并且任选地,还缺少其胞内域)的序列。本文描述了可溶性细胞因子受体的非限制性实例。

[0143] 术语“抗体”在本文中以其最广泛的意义使用,并且包括某些类型的免疫球蛋白分子,其包括一个或多个特异性结合到抗原或表位的抗原结合域。抗体具体包括例如完整抗体(例如完整免疫球蛋白)、抗体片段和多特异性抗体。抗原结合域的一个实例是由VH-VL二聚体形成的抗原结合域。本文描述了抗体的其它实例。抗体的其它实例是本领域已知的。

[0144] “亲和力”是指抗原结合位点与其结合伴侣(例如抗原或表位)之间的非共价相互作用力的总和。除非另有说明,否则如本文所用,“亲和力”是指固有结合亲和力,其反映了抗原结合域的成员与抗原或表位之间的1:1相互作用。分子X对其伴侣Y的亲和力可以用解离平衡常数(K_D)表示。对解离平衡常数有贡献的动力学组分在下文中更详细地描述。亲和力可以通过本领域已知的常规方法来测量,包括本文所述的方法。亲和力可以例如使用表面等离子体共振(SPR)技术(例如BIACORE®)或生物层干涉测量法(例如FORTEBIO®)来测定。测定对抗原结合域和其相应抗原或表位的亲和力的其它方法是本领域已知的。

[0145] 如本文所用,“单链多肽”是指单条蛋白质链。

[0146] 如本文所用,“多链多肽”是指包含两个或更多个(例如三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)蛋白链(例如至少第一嵌合多肽和第二多肽)的多肽,其中两个或更多个蛋白链通过非共价键缔合形成四级结构。

[0147] 术语“一对亲和域”是以小于1×10^{-7}M(例如小于1×10^{-8}M、小于1×10^{-9}M、小于1×10^{-10}M或小于1×10^{-11}M)的K_D彼此特异性结合的两个不同的蛋白质结构域。在一些实例中,一对亲和域可以是一对天然存在的蛋白质。在一些实施例中,一对亲和域可以是一对合成蛋白。亲和域对的非限制性实例在本文中描述。

[0148] 术语“表位”是指特异性结合到抗原结合域的抗原的一部分。表位可以例如由表面可及的氨基酸残基和/或糖侧链组成,并且可以具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象表位和非构象表位的区别在于,在存在变性溶剂的情况下,对前者的结合可能会消失,而对后者的结合则不会消失。表位可包含直接参与结合的氨基酸残基和不直接参与结合的其它氨基酸残基。鉴定与抗原结合域结合的表位的方法是本领域已知的。

[0149] 术语“治疗”是指改善病症的至少一种症状。在一些实例中,所治疗的病症是癌症,并且改善癌症的至少一种症状包括减少异常增殖、基因表达、信号传导、翻译和/或因子的分泌。一般来说,治疗方法包括向需要或已确定需要这种治疗的受试者施用治疗有效量的组合物,从而减少病症的至少一种症状。

[0150] 除非另外定义,否则本文中使用的所有技术术语和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。本文描述用于本发明的方法和材料;还可使用其它在本领域已知的合适的方法和材料。材料、方法和实例仅具说明性,而非旨在限制性。本文所提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其它参考文献通过引用以其整体并入。在发生冲突的情况下,应以本说明书(包括定义)为准。

[0151] 本发明的其它特征和优点将通过以下详细描述和附图以及通过权利要求变得显而易见。

附图说明

[0152] 图1A-1B显示了示例性多链多肽在C57BL/6小鼠中的免疫刺激结果。图1A显示了相较于对照溶液处理的小鼠,经递增剂量的示例性多链多肽处理的小鼠的脾脏重量。图1B显示了相较于对照溶液处理的小鼠,经递增剂量的示例性多链多肽处理的小鼠的脾脏中所存在的免疫细胞类型的百分比。

[0153] 图2A-2B显示了示例性多链多肽在C57BL/6小鼠中的免疫刺激持续时间。图2A显示了经3mg/kg示例性多链多肽处理的小鼠的脾脏在92小时期间的重量。图2B显示了经3mg/kg示例性多链多肽处理的小鼠的脾脏中所存在的免疫细胞类型在92小时期间的百分比。

[0154] 图3A-3B显示了示例性多链多肽诱导免疫细胞对Ki67和颗粒酶B的表达。图3A显示了多链多肽处理后,$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、自然杀手(NK)细胞和$CD19^+$B细胞在不同时间点对Ki67的表达。图3B显示了多链多肽处理后,$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、自然杀手(NK)细胞和$CD19^+$B细胞在不同时间点对颗粒酶B的表达。

[0155] 图4显示了处理之后,由示例性多链多肽处理的小鼠制备的脾细胞在不同时间点的肿瘤抑制效应。

[0156] 图5A-5B显示了饲喂对照饮食、高脂肪饮食且未处理的B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J小鼠(购自杰克逊实验室(JacksonLaboratory))以及饲喂高脂肪饮食且经TGFRt15-TGFR、2t2或21t15-TGFR处理的小鼠的血液中的CD4^{+}T细胞、CD8^{+}T细胞、自然杀手(NK)细胞和CD19^{+}B细胞的百分比和增殖速率。图5A显示了每个对照组和实验组中不同细胞类型的百分比。图5B显示了每个对照组和实验组中不同细胞类型的增殖速率。

[0157] 图6A-6E显示了饲喂对照饮食或高脂肪饮食且未处理或经TGFRt15-TGFR、2t2或21t15-TGFR处理的小鼠的示例性身体外观。

[0158] 图7显示了饲喂对照饮食或高脂肪饮食且未处理或经TGFRt15-TGFR、2t2或21t15-TGFR处理的小鼠的空腹体重。

[0159] 图8显示了饲喂对照饮食或高脂肪饮食且未处理或经TGFRt15-TGFR、2t2或21t15-TGFR处理的小鼠的空腹血糖水平。

[0160] 图9A-9F显示了化学疗法诱导的衰老B16F10细胞和衰老基因的表达。图9A显示了使用SAβ-gal染色可视化的经化学疗法诱导的衰老B16F10细胞。图9B-9F显示了化学疗法诱导的衰老B16F10细胞随时间对p21、IL6、DPP4、RATE1E和ULBP1的表达。

[0161] 图10A-10F显示了化学疗法诱导的衰老B16F10细胞的集落形成和干细胞标志物的表达。图10A显示了化学疗法诱导的衰老B16F10细胞的集落形成。图10B和10C显示了相较于对照B16F10细胞,化学疗法诱导的衰老B16F10细胞对Oct4 mRNA和Notch4 mRNA的表达。图10D-10F显示了化学疗法诱导的衰老B16F10细胞对三种干细胞标志物(包括CD44、CD24和CD133)中的两种呈双重阳性的百分比。

[0162] 图11A-11C显示了化学疗法诱导的衰老B16F10细胞的迁移和侵袭特性。图11A显示了迁移分析的结果,所述迁移分析对化学疗法诱导的具有干细胞特性的衰老细胞(B16F10-SNC-CSC)与对照B16F10细胞进行了比较。图11B和11C显示了侵袭分析的结果,所述侵袭分析对化学疗法诱导的具有干细胞特性的衰老细胞(B16F10-SNC-CSC)与对照B16F10细胞进行了比较。

[0163] 图12A和12B显示了试管内扩增的NK细胞和其对化学疗法诱导的具有干细胞特性的衰老细胞(B16F10-SNC-CSC)或对照B16F10细胞的细胞毒性。图12A显示了获得试管内扩增的NK细胞的示例性工艺示意图。图12B显示了所扩增的NK细胞对化学疗法诱导的具有干细胞特性的衰老细胞(B16F10-SNC-CSC)或对照B16F10细胞的细胞毒性。

[0164] 图13A-13C显示了使用小鼠黑色素瘤模型进行组合处理的结果。图13A显示了用于治疗小鼠模型的黑色素瘤的示例性示意图。图13B和13C显示了相较于化学疗法或单独的TA99处理,包括TGFRt15-TGFR在内的组合处理使肿瘤体积随时间发生的变化。

[0165] 图14显示了对人胰脏肿瘤细胞系SW1990衰老的诱导和衰老的SW1990细胞对CD44和CD24的表达(相较于对照SW1990细胞)。

[0166] 图15显示了化学疗法诱导的衰老SW1990细胞对衰老标志物的表达。

[0167] 图16显示了试管内活化的人NK细胞对化学疗法诱导的衰老SW1990细胞或对照SW1990细胞的细胞毒性。

[0168] 图17显示了示例性IL-12/IL-15RαSu DNA构建体的示意图。

[0169] 图18显示了示例性IL-18/TF/IL-15DNA构建体的示意图。

[0170] 图19显示了示例性IL-12/IL-15RαSu与IL-18/TF/IL-15DNA构建体之间的相互作

用的示意图。

[0171] 图20显示了示例性IL-12/IL-15RαSu与IL-18/TF/IL-15融合蛋白之间相互作用而产生IL-18/TF/IL-15:IL-12/IL-15RαSu复合物(18t15-12s)的示意图。

[0172] 图21显示了抗TF抗体亲和柱纯化洗脱18t15-12s的色谱。

[0173] 图22显示了在分析型尺寸排阻柱上洗脱后,抗TFAb/SEC纯化的18t15-12s蛋白的示例性色谱特征曲线,证明多蛋白单体18t15-12s复合物从蛋白质聚集体中分离出来。

[0174] 图23显示了二硫键还原后,18t15-12s复合物的4-12％SDS-PAGE的实例。泳道1:SeeBlue Plus2标志物;泳道2:抗TF Ab纯化的18t15-12s(0.5μg);泳道3:抗TF Ab纯化的18t15-12s(1μg)。

[0175] 图24显示了脱糖基化和未脱糖基化18t15-12s的SDS PAGE分析。泳道1:抗TF Ab纯化的18t15-12s(0.5μg),未脱糖基化;泳道2:抗TFAb纯化的18t15-12s(1μg),未脱糖基化;泳道3:18t15-12s(1μg),脱糖基化;泳道4:Mark12未染色标志物。

[0176] 图25显示了用于18t15-12s复合物的夹层ELISA,其包含抗人组织因子捕捉抗体和生物素化抗人IL-12检测抗体(BAF 219)。

[0177] 图26显示了用于18t15-12s复合物的夹层ELISA,其包含抗人组织因子捕捉抗体和生物素化抗人IL-15检测抗体(BAM 247)。

[0178] 图27显示了用于18t15-12s复合物的夹层ELISA,其包含抗人组织因子捕捉抗体和生物素化抗人IL-18检测抗体(D045-6)。

[0179] 图28显示了用于18t15-12s复合物的夹层ELISA,其包含抗人组织因子(I43)捕捉抗体和抗人组织因子检测抗体。

[0180] 图29显示了由18t15-12s复合物(空心方形)和重组IL-15(黑色方形)介导的IL-15依赖性32Dβ细胞的增殖。

[0181] 图30显示了18t15-12s复合物(空心方形)内的IL-18的生物活性,其中重组IL-18(黑色方形)和重组IL-12(黑色圆)分别充当阳性和阴性对照。

[0182] 图31显示了18t15-12s复合物(空心方形)内的IL-12的生物活性,其中重组IL-12(黑色圆)和重组IL-18(空心方形)分别充当阳性和阴性对照。

[0183] 图32A和32B显示了18t15-12s复合物诱导NK细胞在细胞表面上表达CD25以及18t15-12s复合物诱导NK细胞在细胞表面上表达CD69。

[0184] 图33显示了18t15-12s复合物诱导NK细胞在细胞内表达IFN-γ的流式细胞术图。

[0185] 图34显示了18t15-12s诱导的人NK细胞对K562细胞的细胞毒性。

[0186] 图35显示了示例性IL-12/IL-15RαSu/αCD16 DNA构建体的示意图。

[0187] 图36显示了示例性IL-18/TF/IL-15DNA构建体的示意图。

[0188] 图37显示了示例性IL-12/IL-15RαSu/αCD16scFv与IL-18/TF/IL-15DNA构建体之间的相互作用的示意图。

[0189] 图38显示示例性18t15-12s/αCD16蛋白复合物的示意图。

[0190] 图39显示了用于18t15-12s16复合物的夹层ELISA,其包含抗人组织因子抗体捕捉抗体和生物素化抗人IL-12(BAF 219)(深色线)或抗人组织因子检测抗体(浅色线)。

[0191] 图40显示示例性TGFβRII/IL-15RαSu DNA构建体的示意图。

[0192] 图41显示示例性IL-21/TF/IL-15构建体的示意图。

[0193] 图42显示示例性IL-IL-21/TF/IL-15与TGFβRII/IL-15RαSu构建体之间的相互作用的示意图。

[0194] 图43显示了示例性TGFβRII/IL-15RαSu与IL-21/TF/IL-15融合蛋白之间相互作用而产生IL-21/TF/IL-15/TGFβRII/IL-15RαSu复合物(21t15-TGFRs)的示意图。

[0195] 图44显示了抗TF抗体亲和柱纯化洗脱21t15-TGFRs的色谱。

[0196] 图45显示了示例性21t15-TGFRs尺寸排阻色谱,其显示了主要蛋白质峰和高分子量峰。

[0197] 图46显示了二硫键还原后,21t15-TGFRs复合物的4-12%SDS-PAGE的实例。泳道1:Mark12未染色标志物(左侧的数字表示分子量(kDa));泳道2:21t15-TGFRs(0.5μg);泳道3:21t15-TGFRs(1μg);泳道4:21t15-TGFRs,脱糖基化(1μg),其中MW是53kDa和39.08kDa的预期大小。

[0198] 图47显示了用于21t15-TGFRs复合物的夹层ELISA,其包含抗人组织因子捕捉抗体和生物素化抗人IL-21检测抗体(13-7218-81,BioLegend)。

[0199] 图48显示了用于21t15-TGFRs复合物的夹层ELISA,其包含抗人组织因子捕捉抗体和生物素化抗人IL-15检测抗体(BAM 247,安迪生物科技公司(R&D Systems))。

[0200] 图49显示了用于21t15-TGFRs复合物的夹层ELISA,其包含抗人组织因子捕捉抗体和生物素化抗人TGFβRII检测抗体(BAF241,安迪生物科技公司)。

[0201] 图50显示了用于21t15-TGFRs复合物的夹层ELISA,其包含抗人组织因子(I43)捕捉抗体和抗人组织因子检测抗体。

[0202] 图51显示相较于IL-15(黑色方形),21t15-TGFRs复合物(空心方形)介导32Dβ细胞发生IL-15依赖性增殖。

[0203] 图52显示了21t15-TGFRs复合物(空心方形)内的TGFβRII域的生物活性。TGFβRII/Fc(黑色方形)充当阳性对照。

[0204] 图53显示了21t15-TGFRs复合物诱导NK细胞在细胞表面上表达CD25的流式细胞术图。

[0205] 图54显示了21t15-TGFRs复合物诱导NK细胞在细胞表面上表达CD69的流式细胞术图。

[0206] 图55显示了21t15-TGFRs复合物诱导NK细胞在细胞内表达IFN-γ的流式细胞术图。

[0207] 图56显示了21t15-TGFRs诱导人NK细胞针对K562细胞的细胞毒性。

[0208] 图57是示例性αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽的示意图。

[0209] 图58是色谱,其显示了示例性αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽从抗组织因子亲和柱中的洗脱。

[0210] 图59是色谱,其显示了负载有示例性αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽的Superdex200Increase 10/300GL凝胶过滤柱的洗脱。

[0211] 图60是使用抗组织因子亲和柱纯化的示例性αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(4-12%NuPage Bis-Tris凝胶)电泳图。

[0212] 图61是显示了使用实例1所述方法执行的ELISA定量示例性αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽的曲线图。纯化的组织因子用作对照。

[0213] 图62是显示了示例性αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽刺激从两位供者的血液分离出的$CD4^+$T细胞表达CD25的能力的曲线图。如实例2所述进行实验。

[0214] 图63是显示了示例性αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽刺激从两位供者的血液分离出的$CD8^+$T细胞表达CD25的能力的曲线图。如实例2所述进行实验。

[0215] 图64是显示了示例性αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽刺激从两位供者的血液分离出的$CD4^+$T细胞表达CD69的能力的曲线图。如实例2所述进行实验。

[0216] 图65显示示例性IL-7/IL-15RαSu DNA构建体的示意图。

[0217] 图66显示示例性IL-21/TF/IL-15DNA构建体的示意图。

[0218] 图67显示示例性IL-7/IL-15RαSu与IL-21/TF/IL-15DNA构建体之间的相互作用的示意图。

[0219] 图68显示了示例性IL-7/IL-15RαSu与IL-21/TF/IL-15融合蛋白之间相互作用而产生IL-21/TF/IL-15:IL-7/IL-15RαSu复合物(21t15-7s)的示意图。

[0220] 图69显示示例性IL-21/IL-15RαSu DNA构建体的示意图。

[0221] 图70显示示例性IL-7/TF/IL-15DNA构建体的示意图。

[0222] 图71显示示例性IL-21/IL-15RαSu与IL-7/TF/IL-15DNA构建体之间的相互作用的示意图。

[0223] 图72显示了示例性IL-21/IL-15RαSu与IL-7/TF/IL-15融合蛋白之间相互作用而产生IL-7/TF/IL-15:IL-21/IL-15RαSu复合物(7t15-21s)的示意图。

[0224] 图73显示了从两个不同供者的血液中分离出的人NK细胞(2×10^6个细胞/毫升)的耗氧速率(OCR)(皮摩尔/分钟)。

[0225] 图74显示了

[0226] 从两个不同供者的血液中分离出的人NK细胞(2×10^6个细胞/毫升)的胞外酸化速率(ECAR)(mpH/min)。

[0227] 图75显示7t15-16s21构建体的示意图。

[0228] 图76显示7t15-16s21构建体的另一示意图。

[0229] 图77A和77B显示了相较于对照蛋白,7t15-16s21对表达人CD16b的CHO细胞的结合。

[0230] 图78A-78C是来自使用针对IL-15、IL-21和IL-7的抗体检测7t15-16s21的ELISA实验的结果。

[0231] 图79显示了用7t15-16s21或重组IL-15进行32Dβ细胞增殖分析的结果。

[0232] 图80显示了在抗TF抗体树脂上结合和洗脱后,含7t15-16s21蛋白的细胞培养上清液的色谱特征曲线。

[0233] 图81显示了7t15-16s21的分析型SEC特征曲线。

[0234] 图82显示TGFRt15-16s21构建体的示意图。

[0235] 图83显示TGFRt15-16s21构建体的另一示意图。

[0236] 图84A和84B显示了TGFRT15-16S21和7t15-21s与表达人CD16b的CHO细胞的结合亲和力。图84A显示了TGFRT15-16S21与表达人CD16b的CHO细胞的结合亲和力。图84B显示了7t15-21s与表达人CD16b的CHO细胞的结合亲和力。

[0237] 图85显示了TGFRt15-16s21和TGFR-Fc引起的TGFβ1抑制的结果。

[0238] 图86显示用TGFRt15-16s21或重组IL-15进行的32Dβ细胞增殖分析的结果。

[0239] 图87A-87C显示了使用ELISA、利用相应抗体检测TGFRt15-16s21中的IL-15、IL-21和TGFβRII的结果。

[0240] 图88显示了在抗TF抗体树脂上结合和洗脱后,含TGFRt15-16s21蛋白的细胞培养上清液的色谱特征曲线。

[0241] 图89显示TGFRt15-16s21的还原型SDS-PAGE分析的结果。

[0242] 图90显示7t15-7s构建体的示意图。

[0243] 图91显示7t15-7s构建体的另一示意图。

[0244] 图92显示了在抗TF抗体树脂上结合和洗脱后,含7t15-7s蛋白的细胞培养上清液的色谱特征曲线。

[0245] 图93显示使用ELISA检测7t15-7s中的TF、IL-15和IL-7。

[0246] 图94A和94B显示了经7t15-7s处理和经对照物处理的小鼠的脾脏重量和免疫细胞类型的百分比。图94A显示了相较于PBS对照组,经7t15-7s处理的小鼠的脾脏重量。图94B显示了相较于PBS对照组,经7t15-7s处理的小鼠中的$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞和NK细胞的百分比。

[0247] 图95显示TGFRt15-TGFRs构建体的示意图。

[0248] 图96显示TGFRt15-TGFRs构建体的另一示意图。

[0249] 图97显示了TGFRt15-TGFRs和TGFR-Fc引起的TGFβ1抑制的结果。

[0250] 图98显示用TGFRt15-TGFRs或重组IL-15进行32Dβ细胞增殖分析的结果。

[0251] 图99A和99B显示了使用ELISA、使用相应抗体检测TGFRt15-TGFRs中的IL-15和TGFβRII的结果。

[0252] 图100是曲线图,其显示了在抗TF抗体树脂上结合和洗脱后,含有TGFRt15-TGFRs蛋白的细胞培养上清液的色谱特征曲线。

[0253] 图101显示了TGFRt15-TGFRs的分析型SEC特征曲线。

[0254] 图102显示了脱糖基化之前和之后的TGFRt15-TGFRs,如还原型SDS-PAGE所分析。

[0255] 图103A和103B显示了经TGFRt15-TGFRs处理和经对照物处理的小鼠的脾脏重量和免疫细胞类型的百分比。图103A显示了相较于PBS对照组,经TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏重量。图103B显示了相较于PBS对照组,经TGFRt15-TGFRs处理的小鼠中的$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞和NK细胞的百分比。

[0256] 图104A和104B显示了经TGFRt15-TGFRs处理的小鼠在92小时期间的脾脏重量和免疫刺激。图104A显示了经TGFRt15-TGFRs处理的小鼠在处理之后的第16、24、48、72和92小时时的脾脏重量。图104B显示了经TGFRt15-TGFRs处理的小鼠在处理之后的第16、24、48、72和92小时时的免疫细胞百分比。

[0257] 图105A和105B显示了经TGFRt15-TGFRs处理的小鼠中的Ki67和颗粒酶B在一段时间内的表达。

[0258] 图106显示了TGFRt15-TGFRs对C57BL/6小鼠的脾细胞的细胞毒性增强。

[0259] 图107显示了在胰脏癌小鼠模型中,肿瘤尺寸响应于PBS处理、单独的化学疗法、单独的TGFRt15-TGFRs,或化学疗法与TGFRt15-TGFRs组合而发生的变化。

[0260] 图108显示从TGFRt15-TGFRs处理的小鼠分离出的NK细胞的细胞毒性。

[0261] 图109显示7t15-21s137L(长版)构建体的示意图。

[0262] 图110显示7t15-21s137L(长版)构建体的另一示意图。

[0263] 图111是曲线图,其显示了在抗TF抗体树脂上结合和洗脱后,含有7t15-21s137L(长版)蛋白的细胞培养上清液的色谱特征曲线。

[0264] 图112显示了7t15-21s137L(长版)的分析型SEC特征曲线。

[0265] 图113显示了7t15-21s137L(短版)对CD137L(4.1BBL)的结合。

[0266] 图114A-114C显示了用ELISA检测7t15-21s137L(短版)中的IL-15、IL21和IL7。图114A显示了用ELISA检测7t15-21s137L(短版)中的IL-15。图114B显示了用ELISA检测7t15-21s137L(短版)中的IL21。图114C显示了用ELISA检测7t15-21s137L(短版)中的IL7。

[0267] 图115显示了CTLL-2细胞增殖分析的结果。

[0268] 图116显示了7t15-1s137L(短版)促进含IL21R的B9细胞增殖的活性。

[0269] 图117显示了7t15-TGFRs构建体的示意图。

[0270] 图118显示了7t15-TGFRs构建体的另一示意图。

[0271] 图119显示了7t15-TGFR和TGFR-Fc引起的TGFβ1抑制的结果。

[0272] 图120A-120C显示了ELISA检测7t15-TGFRs中的IL-15、TGFβRII和IL-7。

[0273] 图121显示用7t15-TGFRs或重组IL-15进行的32Dβ细胞增殖分析的结果。

[0274] 图122是曲线图,其显示了在抗TF抗体树脂上结合和洗脱后,含有7t15-TGFRs蛋白的细胞培养上清液的色谱特征曲线。

[0275] 图123显示了脱糖基化之前和之后的7t15-TGFRs,如使用还原型SDS-PAGE所分析。

[0276] 图124显示了ELISA检测7t15-TGFRs蛋白中的IL-7、IL-15和TGFβRII。

[0277] 图125A和125B显示了经7t15-TGFRs处理和经对照物处理的小鼠的脾脏重量和免疫细胞类型的百分比。图125A显示了相较于PBS对照组,经不同剂量的7t15-TGFRs处理的小鼠的脾脏重量。图125B显示了相较于PBS对照组,经不同剂量的TGFRt15-TGFRs处理的小鼠中的$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞和NK细胞的百分比。

[0278] 图126A和126B显示了7t15-TGFRs使C57BL/6小鼠的CD4+和CD8+T细胞对CD44的表达上调。

[0279] 图127A和127B显示了7t15-TGFRs使C57BL/6小鼠的CD8+T细胞和NK细胞对Ki67的表达和对颗粒酶B的表达上调。

[0280] 图128显示了7t15-TGFRs增强C57BL/6小鼠的脾细胞的细胞毒性。

[0281] 图129显示了TGFRt15-21s137L构建体的示意图。

[0282] 图130显示了TGFRt15-21s137L构建体的另一示意图。

[0283] 图131是曲线图,其显示了在抗TF抗体树脂上结合和洗脱后,含有TGFRt15-21s137L蛋白的细胞培养上清液的色谱特征曲线。

[0284] 图132显示了TGFRt15-TGFRs21构建体的示意图。

[0285] 图133显示了TGFRt15-TGFRs21构建体的另一示意图。

[0286] 图134是曲线图,其显示了在抗TF抗体树脂上结合和洗脱后,含有TGFRt15-TGFRs21蛋白的细胞培养上清液的色谱特征曲线。

[0287] 图135显示了脱糖基化之前和之后的TGFRt15-TGFRs21,如还原型SDS-PAGE所分析。

[0288] 图136A和136B显示了使用ELISA检测TGFRt15-TGFRs21中的组分。

[0289] 图137A和137B显示了经对照物处理和经TGFRt15-TGFRs21处理的小鼠的脾脏中存在的$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞和自然杀手(NK)细胞的百分比和增殖。

[0290] 图138显示了经TGFRt15-TGFRs21处理的小鼠的脾细胞对颗粒酶B的表达上调。

[0291] 图139显示了TGFRt15-TGFRs21增强C57BL/6小鼠的脾细胞的细胞毒性。

[0292] 图140显示了TGFRt15-TGFRs16构建体的示意图。

[0293] 图141显示了TGFRt15-TGFRs16构建体的另一示意图。

[0294] 图142显示了TGFRt15-TGFRs137L构建体的示意图。

[0295] 图143显示了TGFRt15-TGFRs137L构建体的另一示意图。

[0296] 图144是示例性2t2单链嵌合多肽的示意图。

[0297] 图145显示了使用32Dβ细胞增殖分析测得的2t2中的IL-2活性与重组IL-2的比较。

[0298] 图146显示了使用CTLL-2细胞增殖分析测得的2t2中的IL-2活性与重组IL-2的比较。

[0299] 图147显示了饲喂标准食物或高脂肪饮食且经PBS对照物(未处理)或2t2处理的$ApoE^{-/-}$小鼠的空腹血糖水平。

[0300] 图148显示了饲喂标准食物或高脂肪饮食且经PBS对照物(未处理)或2t2处理的$ApoE^{-/-}$小鼠的血液淋巴细胞中的$CD4^+CD25^+FoxP3^+$T调控细胞比率。

[0301] 图149是曲线图,其显示了在抗TF抗体树脂上结合和洗脱后,含有2t2蛋白的细胞培养上清液的色谱特征曲线。

[0302] 图150显示了2t2的分析型SEC特征曲线。

[0303] 图151A和151B显示了2t2在脱糖基化之前和之后的还原型SDS-PAGE分析。图151A显示了2t2在脱糖基化之前的还原型SDS-PAGE分析。图151B显示了2t2在脱糖基化之后的还原型SDS-PAGE分析。

[0304] 图152A和152B显示了使用2t2对C57BL/6小鼠进行免疫刺激的结果。图152A显示了用2t2处理后的脾脏重量。图152B显示了2t2处理后的免疫细胞类型的百分比。

[0305] 图153显示了经2t2处理的小鼠中的$CD4^+$T细胞对CD25的表达上调。

[0306] 图154显示了2t2在C57BL/6小鼠中的药代动力学。

[0307] 图155A和155B显示了2t2减轻$ApoE^{-/-}$小鼠形成高脂肪诱导动脉粥样硬化斑的作用。图155A显示了饲喂标准食物或高脂肪饮食且经PBS对照物或2t2处理的$ApoE^{-/-}$小鼠的动脉粥样硬化斑的代表性视图。图155B显示了每组的动脉粥样硬化斑的定量分析结果。

[0308] 图156显示了相较于对照物处理的小鼠,2t2处理的小鼠的空腹葡萄糖水平。

[0309] 图157显示了经2t2处理的小鼠和经对照物处理的小鼠的血液淋巴细胞中的$CD4^+CD25^+FoxP3^+$Tregs百分比。

[0310] 图158是示例性15t15单链嵌合多肽的示意图。

[0311] 图159显示了通过32Dβ细胞增殖分析测得的15t15中的IL-15活性与重组IL-15的比较。

[0312] 图160是曲线图,其显示了在抗TF抗体树脂上结合和洗脱后,含有15t15蛋白的细胞培养上清液的色谱特征曲线。

[0313] 图161A和161B显示了15t15在脱糖基化之前和之后的还原型SDS-PAGE分析。图

161A显示了15t15在脱糖基化之前的还原型SDS-PAGE分析。图161B显示了15t15在脱糖基化之后的还原型SDS-PAGE分析。

[0314] 图162A和162B是一组直方图(图162A)和一组图示(图162B),其显示了在18t15-12s、18t15-12s16和7t15-21s+抗TF抗体刺激之后,NK细胞的表面表型变化。

[0315] 图163是一组图示,其显示了在18t15-12s、18t15-12s16和7t15-21s刺激之后,淋巴细胞群体的表面表型变化。

[0316] 图164是一组图示,其显示了18t15-12s处理之后,NK细胞的糖酵解增强。

[0317] 图165是一组图示,其显示了在18t15-12s刺激之后,NK细胞中的磷酸化STAT4和磷酸化STAT5水平提高。

[0318] 图166是一组图示,其显示了18t15-12s整夜刺激NK细胞使细胞代谢增强。

[0319] 图167A-C是一组图示,其显示了C57BL/6小鼠在2t2处理之后的免疫刺激。

[0320] 图168A-B是一组图示,其显示了C57BL/6小鼠在TGFRt15-TGFRs处理之后的免疫刺激。

[0321] 图169A-C是一组图示,其显示了饲喂西方饮食且经TGFRt15-TGFRs或2t2处理的$ApoE^{-/-}$小鼠中的Tregs、NK细胞和$CD8^{+}$T细胞的体内刺激。

[0322] 图170A-B是一组图示,其显示了2t2诱导C57BL/6小鼠的脾细胞增殖。

[0323] 图171A-C是一组图示,其显示了C57BL/6小鼠在TGFRt15-TGFRs处理之后的免疫刺激。

[0324] 图172A-B是一组图示,其显示了饲喂西方饮食且经TGFRt15-TGFRs或2t2处理的$ApoE^{-/-}$小鼠中的NK细胞和$CD8^{+}$T细胞在体内被诱导增殖。

[0325] 图173是示意图和一组图示,其显示了经7t15-21、TGFRt15-TGFRs或2t2处理之后,经7t15-21s和抗抗体扩增的NK细胞持久存在于NSG小鼠中。

[0326] 图174A-B是一组图示,其显示了NK细胞经TGFRt15-TGFRs处理之后,NK细胞的细胞毒性增强。

[0327] 图175A-B是一组图示,其显示了NK细胞经TGFRt15-TGFRs处理之后,NK细胞的ADCC活性增强。

[0328] 图176是经TGFRt15-TGFRs/2t2活化的小鼠NK细胞在试管内杀死衰老的B16F10黑色素瘤细胞的图示。

[0329] 图177A-H是一组图示,其显示了TGFRt15-TGFRs外加抗TRP1抗体(TA99)与化学疗法组合在黑色素瘤小鼠模型中的抗肿瘤活性。

[0330] 图178A-C是一组图示,其显示了2t2改善了$ApoE^{-/-}$小鼠被西方饮食诱导的高血糖症。

[0331] 图179是显示了细胞表面染色的一组图示,其概述了在18t15-12s刺激且在rhIL-15中培养之后,NK细胞分化成细胞因子诱导的记忆细胞,如NK细胞(CIML-NK细胞)。

[0332] 图180显示了CD44记忆T细胞的上调。上图显示了用TGFRt15-TGFRs处理后,CD44记忆T细胞的上调。下图显示了用2t2处理后,CD44记忆T细胞的上调。

[0333] 图181A和181B显示了用2t2或IL-2处理的小鼠在脱毛后的毛发再生长改善。图181A显示了经PBS、2t2或IL-2处理的小鼠在脱毛之后第10天的皮肤色素沉着。图181B显示了经PBS、2t2或IL-2处理的小鼠的色素沉着百分比,如使用ImageJ软件所分析。

[0334] 图182显示了经PBS、2t2或IL-2处理的小鼠在脱毛之后第14天的皮肤色素沉着。

[0335] 图183显示了用单链或多链嵌合多肽处理后,因子X(FX)活化的图示。

[0336] 图184显示了含有不同浓度的因诺维(Innovin)的缓冲液在凝血酶原时间(PT)测试中的凝结时间。

[0337] 图185显示了多链嵌合多肽在PT分析中的凝结时间。

[0338] 图186显示了多链嵌合多肽在PT分析中当与32DB细胞混合时的凝结时间。

[0339] 图187显示了多链嵌合多肽在PT分析中当与人PBMC混合时的凝结时间。

[0340] 图188显示了7t15-21s137L(长版)和7t15-21s137L(短版)对CD137(4.1BB)的结合。

[0341] 图189A-189D显示了使用ELISA、通过各别抗体检测7t15-21s137L(长版)中的IL7、IL21、IL15和4.1BBL。

[0342] 图190显示了7t15-21s137L(长版)和7t15-21s137L(短版)的IL-15活性,如通过含有IL2Rαβγ的CTLL2细胞增殖分析所评估。

[0343] 图191A-191C显示了响应于2t2或IL2处理的$CD4^{+}CD25^{hi}T_{reg}$细胞、$CD4^{+}CD25^{-}T_{con}$细胞或$CD8^{+}T_{con}$细胞中的人血液淋巴细胞pStat5a应答。图191A显示了$CD4^{+}CD25^{hi}T_{reg}$细胞中的pSTAT5应答。图C191B显示了$CD4^{+}CD25^{-}T_{con}$细胞中的pSTAT5应答。图191C显示了$CD8^{+}$Tcon细胞中的pSTAT5应答。

[0344] 图192A-192E是一组影像,其显示了小鼠模型在脱毛之后,基于IL-2的分子(2t2)的处理能够诱导毛囊形成。图192A是刮毛之后进行的仅对照小鼠脱毛的影像,图192B是脱毛之后施用低剂量IL-2(1mg/kg)的小鼠的影像,并且图192C-192E显示了脱毛之后施用0.3mg/kg(图192C)、1mg/kg(图192D)和3mg/kg(图192E)的2t2的小鼠的影像。黑色箭头表示生长期的毛囊,这些毛囊随后将延伸到真皮中并促进头发生长。

[0345] 图193显示了每个处理组每10个视野计数的生长期毛囊总数。

[0346] 图194图示了在用7t15-21s+抗组织因子(TF)抗体(IgG1)(50nM)扩增之后,来自两个不同供者的NK细胞(相对于未暴露的NK细胞)具有不同的DNA脱甲基化百分比。

具体实施方式

[0347] 本文提供了治疗有需要的受试者的老年化相关疾病或病状的方法,包括将治疗有效量的一种或多种自然杀手(NK)细胞活化剂和/或治疗有效数量的活化NK细胞施用于经鉴定患有老年化相关疾病或病状的受试者。本文还提供了杀死或减少有需要的受试者中的衰老细胞数量的方法,其包括将治疗有效量的一种或多种NK细胞活化剂和/或治疗有效数量的活化NK细胞施用于受试者。本文还提供了使有需要的受试者的皮肤和/或毛发的质地和/或外观在一段时间内改善的方法,包括将治疗有效量的一种或多种自然杀手(NK)细胞活化剂和/或治疗有效数量的活化NK细胞施用于受试者。本文还提供了有助于在一段时间内治疗有需要的受试者的肥胖症的方法,包括将治疗有效量的一种或多种自然杀手(NK)细胞活化剂和/或治疗有效数量的活化NK细胞施用于受试者。

[0348] 活化NK细胞

[0349] 本文所述的任一种方法的一些实施例可包括向受试者(例如本文所述的任何示例性受试者)施用治疗有效数量的活化NK细胞(例如人活化NK细胞)。活化NK细胞是一种NK细

胞(例如人NK细胞),其CD25、CD69、MTOR-C1、SREBP1、IFN-γ和颗粒酶(例如颗粒酶B)中的两种或更多种(例如三种、四种、五种或六种)的表达水平相较于休眠NK细胞(例如人休眠NK细胞)增加。举例来说,活化NK细胞(例如人活化NK细胞)中的CD25、CD69、MTOR-C1、SREBP1、IFN-γ和颗粒酶(例如颗粒酶B)中的两种或更多种(例如三种、四种、五种或六种)的表达水平可以增加至少10%(例如,至少增加15%,至少增加20%,至少增加25%,至少增加30%,至少增加35%,至少增加40%,至少增加45%,至少增加50%,至少增加55%,至少增加60%,至少增加65%,至少增加70%,至少增加75%,至少增加80%,至少增加85%,至少增加90%,至少增加95%,至少增加100%至少增加120%,至少增加140%,至少增加160%,至少增加180%,至少增加200%,至少增加220%,至少增加240%至少增加260%,至少增加280%或至少增加300%),例如相较于休眠NK细胞。

[0350] 在一些实施例中,活化NK细胞(例如人活化NK细胞)中的CD25、CD59、CD352、NKp80、DNAM-1、2B4、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D、CD16、KIR2DS1、KIR2Ds2/3、KIR2DL4、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DS1、NKG2C、CCR7、CXCR3、L-选择素、CXCR1、CXCR2、CX3CR1、ChemR23、CXCR4、CCR5、S1P5、c-Kit、mTORC1中的两种或更多种(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29种)的表达水平可以任选地进一步至少增加10%(例如,至少增加15%,至少增加20%,至少增加25%,至少增加30%,至少增加35%,至少增加40%,至少增加45%,至少增加50%,至少增加55%,至少增加60%,至少增加65%,至少增加70%,至少增加75%,至少增加80%,至少增加85%,至少增加90%,至少增加95%,至少增加100%,至少增加120%,至少增加140%,至少增加160%,至少增加180%,至少增加200%,至少增加220%,至少增加240%,至少增加260%,至少增加280%,或至少增加300%),例如相较于休眠NK细胞。

[0351] 举例来说,活化NK细胞(例如人活化NK细胞)中的CD25、CD69、mTORC1、SREBP1、IFN-γ和颗粒酶(例如颗粒酶B)中的两种或更多种(例如三种、四种、五种或六种)的表达水平可以大约增加10%至大约增加500%,大约增加10%至大约增加450%,大约增加10%至大约增加400%,大约增加10%至大约增加350%,大约增加10%至大约增加300%,大约增加10%至大约增加280%,大约增加10%至大约增加260%,大约增加10%至大约增加240%,大约增加10%至大约增加220%,大约增加10%到大约增加200%,大约增加10%至大约增加180%,大约增加10%至大约增加160%,大约增加10%至大约增加140%,大约增加10%至大约增加120%,大约增加10%到大约增加100%,大约增加10%到大约增加80%,大约增加10%至大约增加60%,大约增加10%到大约增加40%,大约增加10%至大约增加20%,增加20%至大约增加500%,大约增加20%至大约增加450%,大约增加20%至大约增加400%,大约增加20%至大约增加350%,大约增加20%至大约增加300%,大约增加20%至大约增加280%,大约增加20%至大约增加260%,大约增加20%至大约增加240%,大约增加20%至大约增加220%,大约增加20%到大约增加200%,大约增加20%至大约增加180%,大约增加20%至大约增加160%,大约增加20%至大约增加140%,大约增加20%至大约增加120%,大约增加20%到大约增加100%,大约增加20%至大约增加80%,大约增加20%至大约增加60%,大约增加20%至大约增加40%,增加40%至大约增加500%,大约增加40%至大约增加450%,大约增加40%至大约增加400%,大约增加40%至大约增加350%,大约增加40%至大约增加300%,大约增加40%至大约增加280%,大约增加40%至

大约增加260％,大约增加40％至大约增加240％,大约增加40％至大约增加220％,大约增加40％至大约增加200％,大约增加40％至大约增加180％,大约增加40％至大约增加160％,大约增加40％至大约增加140％,大约增加40％至大约增加120％,大约增加40％至大约增加100％,大约增加40％至大约增加80％,大约增加40％至大约增加60％,增加60％至大约增加500％,大约增加60％至大约增加450％,大约增加60％至大约增加400％,大约增加60％至大约增加350％,大约增加60％至大约增加300％,大约增加60％至大约增加280％,大约增加60％至大约增加260％,大约增加60％至大约增加240％,大约增加60％至大约增加220％,大约增加60％至大约增加200％,大约增加60％至大约增加180％,大约增加60％至大约增加160％,大约增加60％至大约增加140％,大约增加60％至大约增加120％,大约增加60％到大约增加100％,大约增加60％至大约增加80％,增加80％至大约增加500％,大约增加80％至大约增加450％,大约增加80％至大约增加400％,大约增加80％至大约增加350％,大约增加80％至大约增加300％,大约增加80％至大约增加280％,大约增加80％至大约增加260％,大约增加80％至大约增加240％,大约增加80％至大约增加220％,大约增加80％至大约增加200％,大约增加80％至大约增加180％,大约增加80％至大约增加160％,大约增加80％至大约增加140％,大约增加80％至大约增加120％,大约增加80％至大约增加100％,增加100％至大约增加500％,大约增加100％至大约增加450％,大约增加100％至大约增加400％,大约增加100％至大约增加350％,大约增加100％至大约增加300％,大约增加100％至大约增加280％,大约增加100％至大约增加260％,大约增加100％至大约增加240％,大约增加100％至大约增加220％,大约增加100％到大约增加200％,大约增加100％至大约增加180％,大约增加100％至大约增加160％,大约增加100％至大约增加140％,大约增加100％至大约增加120％,增加120％至大约增加500％,大约增加120％至大约增加450％,大约增加120％至大约增加400％,大约增加120％至大约增加350％,大约增加120％至大约增加300％,大约增加120％至大约增加280％,大约增加120％至大约增加260％,大约增加120％至大约增加240％,大约增加120％至大约增加220％,大约增加120％至大约增加200％,大约增加120％至大约增加180％,大约增加120％至大约增加160％,大约增加120％至大约增加140％,增加140％至大约增加500％,大约增加140％至大约增加450％,大约增加140％至大约增加400％,大约增加140％至大约增加350％,大约增加140％至大约增加300％,大约增加140％至大约增加280％,大约增加140％至大约增加260％,大约增加140％至大约增加240％,大约增加140％至大约增加220％,大约增加140％至大约增加200％,大约增加140％至大约增加180％,大约增加140％至大约增加160％,增加160％至大约增加500％,大约增加160％至大约增加450％,大约增加160％至大约增加400％,大约增加160％至大约增加350％,大约增加160％至大约增加300％,大约增加160％至大约增加280％,大约增加160％至大约增加260％,大约增加160％至大约增加240％,大约增加160％至大约增加220％,大约增加160％至大约增加200％,大约增加160％至大约增加180％,增加180％至大约增加500％,大约增加180％至大约增加450％,大约增加180％至大约增加400％,大约增加180％至大约增加350％,大约增加180％至大约增加300％,大约增加180％至大约增加280％,大约增加180％至大约增加260％,大约增加180％至大约增加240％,大约增加180％至大约增加220％,大约增加180％至大约增加200％,增加200％至大约增加500％,大约增加200％至大约增加450％,大约增加200％至大约增加400％,大约增

加200％至大约增加350％,大约增加200％至大约增加300％,大约增加200％至大约增加280％,大约增加200％至大约增加260％,大约增加200％至大约增加240％,大约增加200％至大约增加220％,增加220％至大约增加500％,大约增加220％至大约增加450％,大约增加220％至大约增加400％,大约增加220％至大约增加350％,大约增加220％至大约增加300％,大约增加220％至大约增加280％,大约增加220％至大约增加260％,大约增加220％至大约增加240％,增加240％至大约增加500％,大约增加240％至大约增加450％,大约增加240％至大约增加400％,大约增加240％至大约增加350％,大约增加240％至大约增加300％,大约增加240％至大约增加280％,大约增加240％至大约增加260％,增加260％至大约增加500％,大约增加260％至大约增加450％,大约增加260％至大约增加400％,大约增加260％至大约增加350％,大约增加260％至大约增加300％,大约增加260％至大约增加280％,增加280％至大约增加500％,大约增加280％至大约增加450％,大约增加280％至大约增加400％,大约增加280％至大约增加350％,大约增加280％至大约增加300％,增加300％至大约增加500％,大约增加300％至大约增加450％,大约增加300％至大约增加400％,大约增加300％至大约增加350％,增加350％至大约增加500％,大约增加350％至大约增加450％,大约增加350％至大约增加400％,增加400％至大约增加500％,大约增加400％至大约增加450％,或者增加400％到增加约500％,例如相较于休眠NK细胞(例如人休眠NK细胞)。

[0352] 在一些实施例中,活化NK细胞(例如人活化NK细胞)中的CD25、CD59、CD352、NKp80、DNAM-1、2B4、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D、CD16、KIR2DS1、KIR2Ds2/3、KIR2DL4、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DS1、NKG2C、CCR7、CXCR3、L-选择素、CXCR1、CXCR2、CX3CR1、ChemR23、CXCR4、CCR5、S1P5、c-Kit、mTORC1中的两种或更多种(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29种)的表达水平可以进一步增加大约10％至增加大约500％(例如本文所述的此范围的任一子范围),例如相较于休眠NK细胞。

[0353] 能够用于测定CD25、CD69、CD59、CD352、NKp80、DNAM-1、2B4、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D、CD16、KIR2DS1、KIR2Ds2/3、KIR2DL4、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DS1、NKG2C、CCR7、CXCR3、L-选择素、CXCR1、CXCR2、CX3CR1、ChemR23、CXCR4、CCR5、S1P5、c-Kit、mTORC1、MYC、SREBP1、IFN-γ和颗粒酶(例如颗粒酶B)的表达水平的非限制性分析实例包括例如免疫印迹法、荧光辅助式细胞分选、酶联免疫吸附分析和RT-PCR。

[0354] 能够用于测定CD25表达水平的商业ELISA分析的非限制性实例获自Diaclone、Covalab Biotechnology和Caltag Medsystems。成熟的人CD25的蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0355] 成熟的人CD25蛋白(SEQ ID NO:1)

[0356] elcdddppe iphatfkama ykegtmlnce ckrgfrriks gslymlctgn sshsswdnqc qctssatrnt

[0357] tkqvtpqpee qkerkttemq spmqpvdqas lpghcreppp weneateriy hfvvgqmvyy qcvqgyralh

[0358] rgpaesvckm thgktrwtqp qlictgemet sqfpgeekpq aspegrpese tsclvtttdf qiqtemaatm

[0359] etsiftteyq vavagcvfll isvlllsglt wqrrqrksrr ti

[0360] 人CD25 cDNA(SEQ ID NO:2)

[0361] gagctctg tgacgatgac ccgccagaga tcccacacgc cacattcaaa gccatggcct acaaggaagg

[0362] aaccatgttg aactgtgaat gcaagagagg tttccgcaga ataaaaagcg ggtcactcta tatgctctgt

[0363] acaggaaact ctagccactc gtcctgggac aaccaatgtc aatgcacaag ctctgccact cggaacacaa

[0364] cgaaacaagt gacacctcaa cctgaagaac agaaagaaag gaaaaccaca gaaatgcaaa gtccaatgca

[0365] gccagtggac caagcgagcc ttccaggtca ctgcagggaa cctccaccat gggaaaatga agccacagag

[0366] agaatttatc atttcgtggt ggggcagatg gtttattatc agtgcgtcca gggatacagg gctctacaca

[0367] gaggtcctgc tgagagcgtc tgcaaaatga cccacgggaa gacaaggtgg acccagcccc agctcatatg

[0368] cacaggtgaa atggagacca gtcagtttcc aggtgaagag aagcctcagg caagccccga aggccgtcct

[0369] gagagtgaga cttcctgcct cgtcacaaca acagattttc aaatacagac agaaatggct gcaaccatgg

[0370] agacgtccat atttacaaca gagtaccagg tagcagtggc cggctgtgtt ttcctgctga tcagcgtcct

[0371] cctcctgagt gggctcacct ggcagcggag acagaggaag agtagaagaa caatc

[0372] 能够用于测定CD69表达水平的商业ELISA分析的非限制性实例获自RayBiotech、Novus Biologicals和Aviscera Bioscience。成熟的人CD69的蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0373] 成熟的人CD69蛋白(SEQ ID NO:3)

[0374] mssencfvae nsslhpesgq endatsphfs trhegsfqvp vlcavmnvvf itiliialia

[0375] lsvgqyncpg qytfsmpsds hvsscsedwv gyqrkcyfis tvkrswtsaq nacsehgatl

[0376] avidsekdmn flkryagree hwvglkkepg hpwkwsngke fnnwfnvtgs dkcvflknte

[0377] vssmeceknl ywicnkpyk

[0378] 人CD69 cDNA(SEQ ID NO:4)

[0379] atgagctctg aaaattgttt cgtagcagag aacagctctt tgcatccgga gagtggacaa

[0380] gaaaatgatg ccaccagtcc ccatttctca acacgtcatg aagggtcctt ccaagttcct

[0381] gtcctgtgtg ctgtaatgaa tgtggtcttc atcaccattt taatcatagc tctcattgcc

[0382] ttatcagtgg gccaatacaa ttgtccaggc caatacacat tctcaatgcc atcagacagc

[0383] catgtttctt catgctctga ggactgggtt ggctaccaga ggaaatgcta ctttatttct

[0384] actgtgaaga ggagctggac ttcagcccaa aatgcttgtt ctgaacatgg tgctactctt

[0385] gctgtcattg attctgaaaa ggacatgaac tttctaaaac gatacgcagg tagagaggaa

[0386] cactgggttg gactgaaaaa ggaacctggt cacccatgga agtggtcaaa tggcaaagaa

[0387] tttaacaact ggttcaacgt tacagggtct gacaagtgtg tttttctgaa aaacacagag

[0388] gtcagcagca tggaatgtga gaagaattta tactggatat gtaacaaacc ttacaaataa

[0389] 成熟的人CD59的蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0390] 成熟的人CD59蛋白(SEQ ID NO:5)

[0391] lqcyncpnptadckt avncssdfda clitkaglqv ynkcwkfehc nfndvttrlr eneltyycck

[0392] kdlcnfneql en

[0393] 人CD59 cDNA(SEQ ID NO:6)

[0394] atgggaatcc aaggagggtc tgtcctgttc gggctgctgc tcgtcctggc tgtcttctgc cattcaggtc

[0395] atagcctgca gtgctacaac tgtcctaacc caactgctga ctgcaaaaca gccgtcaatt gttcatctga

[0396] ttttgatgcg tgtctcatta ccaaagctgg gttacaagtg tataacaagt gttggaagtt tgagcattgc

[0397] aatttcaacg acgtcacaac ccgcttgagg gaaaatgagc taacgtacta ctgctgcaag aaggacctgt

[0398] gtaactttaa cgaacagctt

[0399] gaaaatggtg ggacatcctt atcagagaaa acagttcttc tgctggtgac tccatttctg gcagcagcct

[0400] ggagccttca tccctaa

[0401] 成熟的人CD352的蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0402] 成熟的人CD352蛋白(SEQ ID NO:7)

[0403] qssltplmv ngilgesvtl plefpagekv nfitwlfnet slafivphet kspeihvtnp kqgkrlnftq

[0404] syslqlsnlk medtgsyraq istktsakls sytlrilrql rniqvtnhsq lfqnmtcelh ltcsvedadd

[0405] nvsfrwealg ntlssqpnlt vswdprisse qdytciaena vsnlsfsvsa qklcedvkiq ytdtkmilfm

[0406] vsgicivfgf iillllvlrk rrdslslstq rtqgpaesar nleyvsvspt nntvyasvth snreteiwtp

[0407] rendtitiys tinhskeskp tfsrataldn vv

[0408] 人CD352 cDNA(SEQ ID NO:8)

[0409] atgttgtggc tgttccaatc gctcctgttt gtcttctgct ttggcccagg gaatgtagtt tcacaaagca

[0410] gcttaacccc attgatggtg aacgggattc tgggggagtc agtaactctt cccctggagt ttcctgcagg

[0411] agagaaggtc aacttcatca cttggctttt caatgaaaca tctcttgcct tcatagtacc ccatgaaacc

[0412] aaaagtccag aaatccacgt gactaatccg aaacagggaa agcgactgaa cttcacccag

tcctactccc

[0413] tgcaactcag caacctgaag

[0414] atggaagaca caggctctta cagagcccag atatccacaa agacctctgc aaagctgtcc agttacactc

[0415] tgaggatatt aagacaactg aggaacatac aagttaccaa tcacagtcag ctatttcaga atatgacctg

[0416] tgagctccat ctgacttgct ctgtggagga tgcagatgac aatgtctcat tcagatggga ggccttggga

[0417] aacacacttt caagtcagcc aaacctcact gtctcctggg accccaggat ttccagtgaa caggactaca

[0418] cctgcatagc agagaatgct

[0419] gtcagtaatt tatccttctc tgtctctgcc cagaagcttt gcgaagatgt taaaattcaa tatacagata

[0420] ccaaaatgat tctgtttatg gtttctggga tatgcatagt cttcggtttc atcatactgc tgttacttgt

[0421] tttgaggaaa agaagagatt ccctatcttt gtctactcag cgaacacagg gccccgagtc cgcaaggaac

[0422] ctagagtatg tttcagtgtc tccaacgaac aacactgtgt atgcttcagt cactcattca aacagggaaa

[0423] cagaaatctg gacacctaga

[0424] gaaaatgata ctatcacaat ttactccaca attaatcatt ccaaagagag taaacccact ttttccaggg

[0425] caactgccct tgacaatgtc gtgtaa

[0426] 成熟的人NKp80的蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0427] 成熟的人NKp80蛋白(SEQ ID NO:9)

[0428] mqdeerymtl nvqskkrssa qtsqltfkdy svtlhwykil lgisgtvngi ltltlislil

[0429] lvsqgvllkc qkgscsnatq yedtgdlkvn ngtrrnisnk dlcasrsadq tvlcqsewlk

[0430] yqgkcywfsn emkswsdsyv yclerkshll iihdqlemaf iqknlrqlny vwiglnftsl

[0431] kmtwtwvdgs pidskiffik gpakenscaa ikeskifset cssvfkwicq y

[0432] 人NKp80 cDNA(SEQ ID NO:10)

[0433] atgcaagatg aagaaagata catgacattg aatgtacagt caaagaaaag gagttctgcc caaacatctc

[0434] aacttacatt taaagattat tcagtgacgt tgcactggta taaaatctta ctgggaatat ctggaaccgt

[0435] gaatggtatt ctcactttga ctttgatctc cttgatcctg ttggtactat gccaatcaga atggctcaaa

[0436] taccaaggga agtgttattg gttctctaat gagatgaaaa gctggagtga cagttatgtg tattgtttgg

[0437] aaagaaaatc tcatctacta

[0438] atcatacatg accaacttga aatggctttt atacagaaaa acctaagaca attaaactac gtatggattg

[0439] ggcttaactt tacctccttg aaaatgacat ggacttgggt ggatggttct ccaatagatt caaagatatt

[0440] cttcataaag ggaccagcta aagaaaacag ctgtgctgcc attaaggaaa gcaaaatttt ctctgaaacc

[0441] tgcagcagtg ttttcaaatg gatttgtcag tattag

[0442] 成熟的人DNAM-1蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0443] 成熟的人DNAM-1蛋白(SEQ ID NO:11)

[0444] ee vlwhtsvpfa enmslecvyp smgiltqvew fkigtqqdsi aifspthgmv irkpyaervy

[0445] flnstmasnn mtlffrnase ddvgyyscsl ytypqgtwqk viqvvqsdsf eaavpsnshi vsepgknvtl

[0446] tcqpqmtwpv qavrwekiqp rqidlltycn lvhgrnftsk fprqivsncs hgrwsvivip dvtvsdsgly

[0447] rcylqasage netfvmrltv aegktdnqyt lfvaggtvll llfvisittiiviflnrrrr rerrdlftes

[0448] wdtqkapnny rspistsqpt nqsmddtred iyvnyptfsr rpktrv

[0449] 人DNAM-1cDNA(SEQ ID NO:12)

[0450] atggattatc ctactttact tttggctctt cttcatgtat acagagctct atgtgaagag gtgctttggc

[0451] atacatcagt tccctttgcc gagaacatgt ctctagaatg tgtgtatcca tcaatgggca tcttaacaca

[0452] ggtggagtgg ttcaagatcg ggacccagca ggattccata gccattttca gccctactca tggcatggtc

[0453] ataaggaagc cctatgctga gagggtttac tttttgaatt caacgatggc ttccaataac atgactcttt

[0454] tctttcggaa tgcctctgaa

[0455] gatgatgttg gctactattc ctgctctctt tacacttacc cacagggaac ttggcagaag gtgatacagg

[0456] tggttcagtc agatagtttt gaggcagctg tgccatcaaa tagccacatt gtttcggaac ctggaaagaa

[0457] tgtcacactc acttgtcagc ctcagatgac gtggcctgtg caggcagtga ggtgggaaaa gatccagccc

[0458] cgtcagatcg acctcttaac ttactgcaac ttggtccatg gcagaaattt cacctccaag ttcccaagac

[0459] aaatagtgag caactgcagc

[0460] cacggaaggt ggagcgtcat cgtcatcccc gatgtcacag tctcagactc ggggctttac cgctgctact

[0461] tgcaggccag cgcaggagaa aacgaaacct tcgtgatgag attgactgta gccgagggta

aaaccgataa

[0462] ccaatatacc ctctttgtgg ctggagggac agttttattg ttgttgtttg ttatctcaat taccaccatc

[0463] attgtcattt tccttaacag aaggagaagg agagagagaa gagatctatt tacagagtcc tgggatacac

[0464] agaaggcacc caataactat

[0465] agaagtccca tctctaccag tcaacctacc aatcaatcca tggatgatac aagagaggat atttatgtca

[0466] actatccaac cttctctcgc agaccaaaga ctagagttta a

[0467] 成熟的人2B4蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0468] 成熟的人2B4蛋白(SEQ ID NO:13)

[0469] gk gcqgsadhvv sisgvplqlq pnsiqtkvds iawkkllpsq ngfhhilkwe ngslpsntsn

[0470] drfsfivknl sllikaaqqq dsglyclevt sisgkvqtat fqvfvfdkve kprlqgqgki ldrgrcqval

[0471] sclvsrdgnv syawyrgskl iqtagnltyl deevdingth tytcnvsnpv sweshtlnlt qdcqnahqef

[0472] rfwpflviiv ilsalflgtl acfcvwrrkr kekqsetspk efltiyedvk dlktrrnheq eqtfpgggst

[0473] iysmiqsqss aptsqepayt lysliqpsrk sgsrkrnhsp sfnstiyevi gksqpkaqnp arlsrkelen

[0474] fdvys

[0475] 人2B4 cDNA(SEQ ID NO:14)

[0476] atgctggggc aagtggtcac cctcatactc ctcctgctcc tcaaggtgta tcagggcaaa ggatgccagg

[0477] gatcagctga ccatgtggtt agcatctcgg gagtgcctct tcagttacaa ccaaacagca tacagacgaa

[0478] ggttgacagc attgcatgga agaagttgct gccctcacaa aatggatttc atcacatatt gaagtgggag

[0479] aatggctctt tgccttccaa tacttccaat gatagattca gttttatagt caagaacttg agtcttctca

[0480] tcaaggcagc tcagcagcag

[0481] gacagtggcc tctactgcct ggaggtcacc agtatatctg gaaaagttca gacagccacg ttccaggttt

[0482] ttgtatttga taaagttgag aaaccccgcc tacaggggca ggggaagatc ctggacagag ggagatgcca

[0483] agtggctctg tcttgcttgg tctccaggga tggcaatgtg tcctatgctt ggtacagagg gagcaagctg

[0484] atccagacag cagggaacct cacctacctg gacgaggagg ttgacattaa tggcactcac acatatacct

[0485] gcaatgtcag caatcctgtt

[0486] agctgggaaa gccacaccct gaatctcact caggactgtc agaatgccca tcaggaattc agattttggc

[0487] cgtttttggt gatcatcgtg attctaagcg cactgttcct tggcaccctt gcctgcttct gtgtgtggag

[0488] gagaaagagg aaggagaagc agtcagagac cagtcccaag gaatttttga caatttacga agatgtcaag

[0489] gatctgaaaa ccaggagaaa tcacgagcag gagcagactt ttcctggagg ggggagcacc atctactcta

[0490] tgatccagtc ccagtcttct

[0491] gctcccacgt cacaagaacc tgcatataca ttatattcat taattcagcc ttccaggaag tctggatcca

[0492] ggaagaggaa ccacagccct tccttcaata gcactatcta tgaagtgatt ggaaagagtc aacctaaagc

[0493] ccagaaccct gctcgattga gccgcaaaga gctggagaac tttgatgttt attcctag

[0494] 成熟的人NKp30蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0495] 成熟的人NKp30蛋白(SEQ ID NO:15)

[0496] lw vsqppeirtl egssaflpcs fnasqgrlai gsvtwfrdev vpgkevrngt pefrgrlapl

[0497] assrflhdhq aelhirdvrg hdasiyvcrv evlglgvgtg ngtrlvveke hpqlgagtvl llragfyavs

[0498] flsvavgstv yyqgkcltwk gprrqlpavv paplpppcgs sahllppvpg g

[0499] 人NKp30 cDNA(SEQ ID NO:16)

[0500] atggcctgga tgctgttgct catcttgatc atggtccatc caggatcctg tgctctctgg gtgtcccagc

[0501] cccctgagat tcgtaccctg gaaggatcct ctgccttcct gccctgctcc ttcaatgcca gccaagggag

[0502] actggccatt ggctccgtca cgtggttccg agatgaggtg gttccaggga aggaggtgag gaatggaacc

[0503] ccagagttca ggggccgcct ggccccactt gcttcttccc gtttcctcca tgaccaccag gctgagctgc

[0504] acatccggga cgtgcgaggc

[0505] catgacgcca gcatctacgt gtgcagagtg gaggtgctgg gccttggtgt cgggacaggg aatgggactc

[0506] ggctggtggt ggagaaagaa catcctcagc taggggctgg tacagtcctc ctccttcggg ctggattcta

[0507] tgctgtcagc tttctctctg tggccgtggg cagcaccgtc tattaccagg gcaaatgcca ctgtcacatg

[0508] ggaacacact gccactcctc agatgggccc cgaggagtga ttccagagcc cagatgtccc tag

[0509] 成熟的人NKp44蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0510] 成熟的人NKp44蛋白(SEQ ID NO:17)

[0511] qskaqvlqs vagqtltvrc qypptgslye kkgwckeasa lvcirlvtss kprtmawtsr ftiwddpdag

[0512] fftvtmtdlr eedsghywcr iyrpsdnsvs ksvrfylvvs pasastqtsw tprdlvssqt qtqscvppta

[0513] garqapesps tipvpsqpqn stlrpgpaap ialvpvfcgl lvakslvlsa llvwwgdiww ktmmelrsld

[0514] tqkatchlqq vtdlpwtsvs spvereilyh tvartkisdd ddehtl

[0515] 人NKp44 cDNA(SEQ ID NO:18)

[0516] atggcctggc gagccctaca cccactgcta ctgctgctgc tgctgttccc aggctctcag gcacaatcca

[0517] aggctcaggt acttcaaagt gtggcagggc agacgctaac cgtgagatgc cagtacccgc ccacgggcag

[0518] tctctacgag aagaaaggct ggtgtaagga ggcttcagca cttgtgtgca tcaggttagt caccagctcc

[0519] aagcccagga cgatggcttg gacctctcga ttcacaatct gggacgaccc tgatgctggc ttcttcactg

[0520] tcaccatgac tgatctgaga

[0521] gaggaagact caggacatta ctggtgtaga atctaccgcc cttctgacaa ctctgtctct aagtccgtca

[0522] gattctatct ggtggtatct ccagcctctg cctccacaca gacctcctgg actccccgcg acctggtctc

[0523] ttcacagacc cagacccaga gctgtgtgcc tcccactgca ggagccagac aagcccctga gtctccatct

[0524] accatccctg tcccttcaca gccacagaac tccacgctcc gccctggccc tgcagccccc attgccctgg

[0525] tgcctgtgtt ctgtggactc

[0526] ctcgtagcca agagcctggt gctgtcagcc ctgctcgtct ggtgggtttt aaggaatcgg cacatgcagc

[0527] atcaagggag gtctctgctg cacccagctc agcccaggcc ccaggcccat agacacttcc cactgagcca

[0528] cagggcacca ggggggacat atggtggaaa accatga

[0529] 成熟的人NKp46蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0530] 成熟的人NKp46蛋白(SEQ ID NO:19)

[0531] qqqtlpkpf iwaephfmvp kekqvticcq gnygaveyql hfegslfavd rpkpperink vqfyipdmns

[0532] rmagqysciy rvgelwseps nlldlvvtem ydtptlsvhp gpevisgekv tfycrldtat smflllkegr

[0533] sshvqrgygk vqaefplgpv ttahrgtyrc fgsynnhaws fpsepvkllv tgdientsla

pedptfpadt

[0534] wgtyllttet glqkdhalwd htaqnllrmg laflvlvalv wflvedwlsr krtrerasra stwegrrrln

[0535] tqtl

[0536] 人NKp46 cDNA(SEQ ID NO:20)

[0537] atggcctggc gagccctaca cccactgcta ctgctgctgc tgctgttccc aggctctcag gcacaatcca

[0538] aggctcaggt acttcaaagt gtggcagggc agacgctaac cgtgagatgc cagtacccgc ccacgggcag

[0539] tctctacgag aagaaaggct ggtgtaagga ggcttcagca cttgtgtgca tcaggttagt caccagctcc

[0540] aagcccagga cgatggcttg gacctctcga ttcacaatct gggacgaccc tgatgctggc ttcttcactg

[0541] tcaccatgac tgatctgaga

[0542] gaggaagact caggacatta ctggtgtaga atctaccgcc cttctgacaa ctctgtctct aagtccgtca

[0543] gattctatct ggtggtatct ccagcctctg cctccacaca gacctcctgg actccccgcg acctggtctc

[0544] ttcacagacc cagacccaga gctgtgtgcc tcccactgca ggagccagac aagcccctga gtctccatct

[0545] accatccctg tcccttcaca gccacagaac tccacgctcc gccctggccc tgcagccccc attgccctgg

[0546] tgcctgtgtt ctgtggactc

[0547] ctcgtagcca agagcctggt gctgtcagcc ctgctcgtct ggtgggtttt aaggaatcgg cacatgcagc

[0548] atcaagggag gtctctgctg cacccagctc agcccaggcc ccaggcccat agacacttcc cactgagcca

[0549] cagggcacca ggggggacat atggtggaaa accatga

[0550] 成熟的人NKG2D蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0551] 成熟的人NKG2D蛋白(SEQ ID NO:21)

[0552] mgwirgrrsr hswemsefhn ynldlkksdf strwqkqrcp vvkskcrena spfffccfia

[0553] vamgirfiim vaiwsavfln slfnqevqip ltesycgpcp knwicyknnc yqffdesknw

[0554] yesqascmsq nasllkvysk edqdllklvk syhwmglvhi ptngswqwed gsilspnllt

[0555] iiemqkgdca lyassfkgyi encstpntyi cmqrtv

[0556] 人NKG2D cDNA(SEQ ID NO:22)

[0557] atggggtgga ttcgtggtcg gaggtctcga cacagctggg agatgagtga atttcataat tataacttgg

[0558] atctgaagaa gagtgatttt tcaacacgat ggcaaaagca aagatgtcca gtagtcaaaa gcaaatgtag

[0559] agaaaatgca tctccatttt ttttctgctg cttcatcgct gtagccatgg gaatccgttt cattattatg

[0560] gtaacaatat ggagtgctgt attcctaaac tcattattca accaagaagt tcaaattccc ttgaccgaaa

[0561] gttactgtgg cccatgtcct

[0562] aaaaactgga tatgttacaa aaataactgc taccaatttt ttgatgagag taaaaactgg tatgagagcc

[0563] aggcttcttg tatgtctcaa aatgccagcc ttctgaaagt atacagcaaa gaggaccagg atttacttaa

[0564] actggtgaag tcatatcatt ggatgggact agtacacatt ccaacaaatg gatcttggca gtgggaagat

[0565] ggctccattc tctcacccaa cctactaaca ataattgaaa tgcagaaggg agactgtgca ctctatgcct

[0566] cgagctttaa aggctatata

[0567] gaaaactgtt caactccaaa tacgtacatc tgcatgcaaa ggactgtgta a

[0568] 成熟的人CD16a蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0569] 成熟的人CD16a蛋白(SEQ ID NO:23)

[0570] maegtlwqil cvssdaqpqt fegvkgadpp tlppgsflpg pvlwwgslar lqteksdevs

[0571] rkgnwwvtem gggagerlft ssclvglvpl glrislvtcp lqcgimwqll lptallllvs

[0572] agmrtedlpk avvflepqwy rvlekdsvtl kcqgaysped nstqwfhnes lissqassyf

[0573] idaatvddsg eyrcqtnlst lsdpvqlevh igwlllqapr wvfkeedpih lrchswknta

[0574] lhkvtylqng kgrkyfhhns dfyipkatlk dsgsyfcrgl fgsknvsset vnititqgla

[0575] vstissffpp gyqvsfclvm vllfavdtgl yfsvktnirs strdwkdhkf kwrkdpqdk

[0576] 人CD16a cDNA(SEQ ID NO:24)

[0577] atggctgagggcacactctggcagattctgtgtgtgtcctcagatgctca

[0578] gccacagacctttgagggagtaaaggggcagacccacccaccttgcctc

[0579] caggctctttccttcctggtcctgttctatggtggggctcccttgccaga

[0580] cttcagactgagaagtcagatgaagtttcaagaaaaggaaattggtgggt

[0581] gacagagatgggtggaggggctggggaaaggctgtttacttcctcctgtc

[0582] tagtcggtttggtccctttagggctccggatatctttggtgacttgtcca

[0583] ctccagtgtggcatcatgtggcagctgctcctcccaactgctctgctact

[0584] tctagtttcagctggcatgcggactgaagatctcccaaaggctgtggtgt

[0585] tcctggagcctcaatggtacagggtgctcgagaaggacagtgtgactctg

[0586] aagtgccagggagcctactcccctgaggacaattccacacagtggtttca

[0587] caatgagagcctcatctcaagccaggcctcgagctacttcattgacgctg

[0588] ccacagtcgacgacagtggagagtacaggtgccagacaaacctctccacc

[0589] ctcagtgacccggtgcagctagaagtccatatcggctggctgttgctcca

[0590] ggcccctcggtgggtgttcaaggaggaagaccctattcacctgaggtgtc

[0591] acagctggaagaacactgctctgcataaggtcacatatttacagaatggc

[0592] aaaggcaggaagtattttcatcataattctgacttctacattccaaaagc

[0593] cacactcaaagacagcggctcctacttctgcaggggctttttgggagta

[0594] aaaatgtgtcttcagagactgtgaacatcaccatcactcaaggtttggca

[0595] gtgtcaaccatctcatcattctttccacctgggtaccaagtctctttctg

[0596] cttggtgatggtactccttttgcagtggacacaggactatatttctctg

[0597] tgaagacaaacattcgaagctcaacaagagactggaaggaccataaattt

[0598] aaatggagaaaggaccctcaagacaaatga

[0599] 成熟的人CD16b蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0600] 成熟的人CD16b蛋白(SEQ ID NO:25)

[0601] mwqlllptal lllvsagmrt edlpkavvfl epqwysvlek dsvtlkcqga yspednstqw fhneslissq

[0602] assyfidaat vndsgeyrcq tnlstlsdpv qlevhigwll lqaprwvfke edpihlrchs wkntalhkvt

[0603] ylqngkdrky fhhnsdfhip katlkdsgsy fcrglvgskn vssetvniti tqglavstis sfsppgyqvs

[0604] fclvmvllfa vdtglyfsvk tni

[0605] 人CD16b cDNA(SEQ ID NO:26)

[0606] atgtggcagctgctcctcccaactgctctgctacttctagtttcagctgg

[0607] catgcggactgaagatctcccaaaggctgtggtgttcctggagcctcaat

[0608] ggtacagcgtgcttgagaaggacagtgtgactctgaagtgccagggagcc

[0609] tactcccctgaggacaattccacacagtggtttcacaatgagaacctcat

[0610] ctcaagccaggcctcgagctacttcattgacgctgccacagtcaacgaca

[0611] gtggagagtacaggtgccagacaaacctctccaccctcagtgacccggtg

[0612] cagctagaagtccatatcggctggctgttgctccaggcccctcggtgggt

[0613] gttcaaggaggaagaccctattcacctgaggtgtcacagctggaagaaca

[0614] ctgctctgcataaggtcacatatttacagaatggcaaagacaggaagtat

[0615] tttcatcataattctgacttccacattccaaaagccacactcaaagatag

[0616] cggctcctacttctgcaggggcttgttgggagtaaaaatgtgtcttcag

[0617] agactgtgaacatcaccatcactcaaggtttggcagtgtcaaccatctca

[0618] tcattctctccacctgggtaccaagtctctttctgcttggtgatggtact

[0619] ccttttgcagtggacacaggactatatttctctgtgaagacaaacattt

[0620] ga

[0621] 成熟的人KIR2DS1蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0622] 人KIR2DS1蛋白(SEQ ID NO:27)

[0623] msltvvsmac vgffllqgaw phegvhrkps llahpgrlvk seetvilqcw sdvmfehfll

[0624] hregmfndtl rligehhdgv skanfsisrm kqdlagtyrc ygsvthspyq vsapsdpldi

[0625] viiglyekps lsaqpgptvl agesvtlscs srssydmyhl sregeaherr lpagtkvngt

[0626] fqanfplgpa thggtyrcfg sfrdspyews kssdpllvsv tgnpsnswps ptepssetgn

[0627] prhlhvligt svvkipftil lffllhrwcs dkknaavmdq epagnrtvns edsdeqdhqe

[0628] vsya

[0629] 人KIR2DS1 cDNA(SEQ ID NO:28)

[0630] atgtcgctcacggtcgtcagcatggcgtgtgttgggttcttcttgctgca

[0631] gggggcctggccacatgagggagtccacagaaaaccttccctcctggccc

[0632] acccaggtcgcctggtgaaatcagaagagacagtcatcctgcaatgttgg

[0633] tcagatgtcatgtttgaacacttccttctgcacagagaggggatgtttaa

[0634] cgacactttgcgcctcattggagaacaccatgatggggtctccaaggcca

[0635] acttctccatcagtcgcatgaagcaagacctggcagggacctacagatgc

[0636] tacggttctgttactcactcccctatcagttgtcagctcccagtgaccc

[0637] tctggacatcgtgatcataggtctatatgagaaaccttctctctcagccc

[0638] agccgggccccacggttctggcaggagagaatgtgaccttgtcctgcagc

[0639] tcccggagctcctatgacatgtaccatctatccagggaaggggaggccca

[0640] tgaacgtaggctccctgcagggaccaaggtcaacggaacattccaggcca

[0641] actttcctctgggccctgccacccatggagggacctacagatgcttcggc

[0642] tctttccgtgactctccatacgagtggtcaaagtcaagtgacccactgct

[0643] tgtttctgtcacaggaaacccttcaaatagttggccttcacccactgaac

[0644] caagctccgaaaccggtaaccccagacacctacatgttctgattgggacc

[0645] tcagtggtcaaaatccctttcaccatcctcctcttctttctccttcatcg

[0646] ctggtgctccgacaaaaaaaatgctgctgtaatggaccaagagcctgcag

[0647] ggaacagaacagtgaacagcgaggattctgatgaacaagaccatcaggag

[0648] gtgtcatacgcataa

[0649] 成熟的人KIR2DS2蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0650] 人KIR2DS2蛋白(SEQ ID NO:29)

[0651] mslmvvsmvc vgffllqgaw phegvhrkps llahpgplvk seetvilqcw sdvrfehfll

[0652] hregkykdtl hligehhdgv skanfsigpm mqdlagtyrc ygsvthspyq lsapsdpldi

[0653] vitglyekps lsaqpgptvl agesvtlscs srssydmyhl sregeaherr fsagpkvngt

[0654] fqadfplgpa thggtyrcfg sfrdspyews nssdpllvsv tgnpsnswps ptepssktgn

[0655] prhlhvligt svvkipftil lfflhrwcs nkknaavmdq epagnrtvns edsdeqdhqe

[0656] vsya

[0657] 人KIR2DS2 cDNA(SEQ ID NO:30)

[0658] atgtcgctcatggtcgtcagcatggcgtgtgttgggttcttcttgctgca

[0659] gggggcctggccacatgagggagtccacagaaaaccttccctcctggccc

[0660] acccaggtcccctggtgaaatcagaagagacagtcatcctgcaatgttgg

[0661] tcagatgtcaggtttgagcacttccttctgcacagagaggggaagtataa

[0662] ggacactttgcacctcattggagagcaccatgatggggtctccaaggcca

[0663] acttctccatcggtcccatgatgcaagaccttgcagggacctacagatgc

[0664] tacggttctgttactcactcccctatcagttgtcagctcccagtgaccc

[0665] tctggacatcgtcatcacaggtctatatgagaaaccttctctctcagccc

[0666] agccgggccccacggttttggcaggagagagcgtgaccttgtcctgcagc

[0667] tcccggagctcctatgacatgtaccatctatccagggaggggaggccca

[0668] tgaacgtaggttctctgcagggcccaaggtcaacggaacattccaggccg

[0669] actttcctctgggccctgccacccacggaggaacctacagatgcttcggc

[0670] tctttccgtgactctccctatgagtggtcaaactcgagtgacccactgct

[0671] tgtttctgtcacaggaaacccttcaaatagttggccttcacccactgaac

[0672] caagctccaaaaccggtaaccccagacacctgcatgttctgattgggacc

[0673] tcagtggtcaaaatccctttcaccatcctcctcttctttctccttcatcg

[0674] ctggtgctccaacaaaaaaaatgctgctgtaatggaccaagagcctgcag

[0675] ggaacagaacagtgaacagcgaggactctgatgaacaagaccctcaggag

[0676] gtgacatacacacagttgaatcactgcgttttcacacagagaaaaatcac

[0677] tcgcccttctcagaggcccaagacacccccaacagatatcatcgtgtaca

[0678] cggaacttccaaatgctgagtccaga

[0679] 成熟的人KIR2DS3蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0680] 成熟的人KIR2DS3蛋白(SEQ ID NO:31)

[0681] mslmvismac vgffwlqgaw phegfrrkps llahpgrlvk seetvilqcw sdvmfehfll

[0682] hregtfndtl rligehidgv skanfsigrm rqdlagtyrc ygsvphspyq fsapsdpldi

[0683] vitglyekps lsaqpgptvl agesvtlscs swssydmyhl stegeaherr fsagpkvngt

[0684] fqadfplgpa tqggtyrcfg sfhdspyews kssdpllvsv tgnpsnswps ptepssktgn

[0685] prhlhvligt svvklpftil lfflhrwcs dkknasvmdq gpagnrtvnr edsdeqdhqe

[0686] vsya

[0687] 人KIR2DS3 cDNA(SEQ ID NO:32)

[0688] atgtcgctcatggtcatcagcatggcatgtgttgggttcttctggctgca

[0689] gggggcctggccacatgagggattccgcagaaaaccttccctcctggccc

[0690] acccaggtcgcctggtgaaatcagaagagacagtcatcctgcaatgttgg

[0691] tcagatgtcatgtttgagcacttccttctgcacagagaggggacgtttaa

[0692] cgacactttgcgcctcattggagagcacattgatggggtctccaaggcca

[0693] acttctccatcggtcgcatgaggcaagacctggcagggacctacagatgc

[0694] tacggttctgttcctcactccccctatcagttttcagctcccagtgaccc

[0695] tctggacatcgtgatcacaggtctatatgagaaaccttctctctcagccc

[0696] agccgggccccacggttctggcaggagagagcgtgaccttgtcctgcagc

[0697] tcctggagctcctatgacatgtaccatctatccacggaggggaggccca

[0698] tgaacgtaggttctctgcagggcccaaggtcaacggaacattccaggccg

[0699] actttcctctgggccctgccacccaaggaggaacctacagatgcttcggc

[0700] tctttccatgactctccctacgagtggtcaaagtcaagtgacccactgct

[0701] tgtttctgtcacaggaaacccttcaaatagttggccttcacccactgaac

[0702] caagctccaaaaccggtaaccccagacacctacacgttctgattgggacc

[0703] tcagtggtcaaactccctttcaccatcctcctcttctttctccttcatcg

[0704] ctggtgctccgacaaaaaaaatgcatctgtaatggaccaagggcctgcgg

[0705] ggaacagaacagtgaacagggaggattctgatgaacaggaccatcaggag

[0706] gtgtcatacgcataa

[0707] 成熟的人KIR2DL4蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0708] 成熟的人KIR2DL4蛋白(SEQ ID NO:33)

[0709] hvggqdk pfcsawpsav vpqgghatlr chcrrgfnif tlykkdgvpv pelynrifwn sflispvtpa

[0710] hagtyrcrgf hphsptewsa psnplvimvt glyekpslta rpgptvrage nvtlscssqs sfdiyhlsre

[0711] geahelrlpa vpsingtfqa dfplgpathg etyrcfgsfh gspyewsdps dplpvsvtgn pssswpspte

[0712] psfktgiarh lhavirysva iilftilpff llhrwcskkk naavmnqepa ghrtvnreds deqdpqevty

[0713] aqldhciftq rkitgpsqrs krpstdtsvc ielpnaepra lspahehhsq almgssrett alsqtqlass

[0714] nvpaagi

[0715] 人KIR2DL4 cDNA(SEQ ID NO:34)

[0716] atgtccccttcacatgttgtggtcaatgtgtcaactgcacgatccgggcc

[0717] cctcaccacatcctctgcaccggtcagtcgagccgagtcactgcgtcctg

[0718] gcagcagaagctgcaccatgtccatgtcacccacggtcatcatcctggca

[0719] tgtcttgggttcttcttggaccagagtgtgtgggcacacgtgggtggtca

[0720] ggacaagcccttctgctctgcctggcccagcgctgtggtgcctcaaggag

[0721] gacacgtgactcttcggtgtcactatcgtcgtgggtttaacatcttcacg

[0722] ctgtacaagaaagatggggtccctgtccctgagctctacaacagaatatt

[0723] ctggaacagtttcctcattagccctgtgaccccagcacacgcagggacct

[0724] acagatgtcgaggttttcacccgcactccccactgagtggtcggcaccc

[0725] agcaaccccctggtgatcatggtcacaggtctatatgagaaaccttcgct

[0726] tacagcccggccgggccccacggttcgcgcaggagagaacgtgaccttgt

[0727] cctgcagctcccagagctcctttgacatctaccatctatccagggagggg

[0728] gaagcccatgaacttaggctccctgcagtgcccagcatcaatggaacatt

[0729] ccaggccgacttccctctgggtcctgccacccacggagagacctacagat

[0730] gcttcggctctttccatggatctccctacgagtggtcagacccgagtgac

[0731] ccactgcctgtttctgtcacaggaaacccttctagtagttggccttcacc

[0732] cactgaaccaagcttcaaaactggtatcgccagacacctgcatgctgtga

[0733] ttaggtactcagtggccatcatcctctttaccatccttcccttctttctc

[0734] cttcatcgctggtgctccaaaaaaaaagatgctgctgtaatgaaccaaga

[0735] gcctgcgggacacagaacagtgaacagggaggactctgatgaacaagacc

[0736] ctcaggaggtgacatacgcacagttggatcactgcattttcacacagaga

[0737] aaaatcactggcccttctcagaggagcaagagaccctcaacagataccag

[0738] cgtgtgtatagaacttccaaatgctgagcccagagcgttgtctcctgccc

[0739] atgagcaccacagtcaggccttgatgggatcttctagggagacaacagcc

[0740] ctgtctcaaacccagcttgccagctctaatgtaccagcagctggaatctg

[0741] a

[0742] 成熟的人KIR2DS4蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0743] 成熟的人KIR2DS4蛋白(SEQ ID NO:35)

[0744] qegvhrkps flalpghlvk seetvilqcw sdvmfehfll hregkfnntl hligehhdgv skanfsigpm

[0745] mpvlagtyrc yssvphspyq lsapsdpldm viiglyekps lsaqpgptvq agenvslscs siypgrgrpm

[0746] nvgslqcaas tehsrptflw alpptegptd asalsvtlpt sgqtrvihcl fpsqetlqiv glhplnqapk

[0747] pvtpdtymf

[0748] 人KIR2DS4 cDNA(SEQ ID NO:36)

[0749] atgtcgctcatggtcatcatcatggcgtgtgttgggttcttcttgctgca

[0750] gggggcctggccacaggagggagtccacagaaaaccttccttcctggccc

[0751] tcccaggtcacctggtgaaatcagaagagacagtcatcctgcaatgttgg

[0752] tcggatgtcatgtttgagcacttccttctgcacagagaggggaagtttaa

[0753] caacactttgcacctcattggagagcaccatgatggggtttccaaggcca

[0754] acttctccattggtcccatgatgcctgtccttgcaggaacctacagatgc

[0755] tacggttctgttcctcactccccctatcagttgtcagctcccagtgaccc

[0756] tctggacatggtgatcataggtctatatgagaaaccttctctctcagccc

[0757] agccgggccccacggttcaggcaggagagaatgtgaccttgtcctgcagc

[0758] tccatctatccagggaaggggaggcccatgaacgtaggctccctgcagtg

[0759] cgcagcatcaacggaacattccaggccgactttcctctgggccctgccac

[0760] ccacggagggacctacagatgcttcggctctttccgtgacgctccctacg

[0761] agtggtcaaactcgagtgatccactgcttgtttccgtcacaggaaaccct

[0762] tcaaatagttggccttcacccactgaaccaagctccaaaaccggtaaccc

[0763] cagacacctacatgttctgattgggacctcagtggtcaaaatccctttca

[0764] ccatcctcctcttctttctccttcatcgctggtgctccgacaaaaaaaat

[0765] gctgctgtaatggaccaagagcctgcagggaacagaacagtgaacagcga

[0766] ggattctgatgaacaagaccatcaggaggtgtcatacgcataa

[0767] 成熟的人KIR2DS5蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0768] 成熟的人KIR2DS5(SEQ ID NO:37)

[0769] hegfrrkps llahpgplvk seetvilqcw sdvmfehfll hregtfnhtl rligehidgv skgnfsigrm

[0770] tqdlagtyrc ygsvthspyq lsapsdpldi vitglyekps lsaqpgptvl agesvtlscs srssydmyhl

[0771] sregeaherr lpagtkvngt fqadfpldpa thggtyrcfg sfrdspyews kssdpllvsv tgntsnswps

[0772] ptepssktgn prhlhvligt svvklpftil lffllhrwcs nkknasvmdq gpagnrtvnr

edsdeqdhqe

[0773] vsya

[0774] 人KIR2DS5 cDNA(SEQ ID NO:38)

[0775] atgtcgctcatggtcatcagcatggcgtgtgttgcgttcttcttgctgca

[0776] gggggcctggccacatgagggattccgcagaaaaccttccctcctggccc

[0777] acccaggtcccctggtgaaatcagaagagacagtcatcctgcaatgttgg

[0778] tcagatgtcatgtttgagcacttccttctgcacagagaggggacgtttaa

[0779] ccacactttgcgcctcattggagagcacattgatggggtctccaagggca

[0780] acttctccatcggtcgcatgacacaagacctggcagggacctacagatgc

[0781] tacggttctgttactcactcccctatcagttgtcagcgcccagtgaccc

[0782] tctggacatcgtgatcacaggtctatatgagaaaccttctctctcagccc

[0783] agccgggccccacggttctggcaggagagagcgtgaccttgtcctgcagc

[0784] tcccggagctcctatgacatgtaccatctatccagggaaggggaggccca

[0785] tgaacgtaggctccctgcagggcccaaggtcaacagaacattccaggccg

[0786] actttcctctggaccctgccacccacggagggacctacagatgcttcggc

[0787] tctttccgtgactctccatacgagtggtcaaagtcaagtgacccactgct

[0788] tgtttctgtcacaggaaactcttcaaatagttggccttcacccactgaac

[0789] caagctccgaaaccggtaaccccagacacctacacgttctgattgggacc

[0790] tcagtggtcaaactccctttcaccatcctcctcttctttctccttcatcg

[0791] ctggtgctccaacaaaaaaaaatgcatctgtaatggaccaagggcctgcgg

[0792] ggaacagaacagtgaacagggaggattctgatgaacaggaccatcaggag

[0793] gtgtcatacgcataa

[0794] 成熟的人KIR3DS1蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0795] 成熟的人KIR3DS1 cDNA(SEQ ID NO:39)

[0796] hmggqdkpf lsawpsavvp rgghvtlrch yrhrfnnfml ykedrihvpi fhgrifqegf nmspvttaha

[0797] gnytcrgshp hsptgwsaps npmvimvtgn hrkpsllahp gplvksgerv ilqcwsdimf ehfflhkegi

[0798] skdpsrlvgq ihdgvskanf sigsmmrala gtyrcygsvt htpyqlsaps dpldivvtgl yekpslsaqp

[0799] gpkvqagesv tlscssrssy dmyhlsregg aherrlpavr kvnrtfqadf plgpathggt yrcfgsfrhs

[0800] pyewsdpsdp llvsvtgnps sswpspteps sksgnlrhlh iligtsvvki pftillffll hrwcsnkkkc

[0801] ccngpracre qk

[0802] 人KIR3DS1 cDNA(SEQ ID NO:40)

[0803] atgttgctcatggtcgtcagcatggcgtgtgttgggttgttcttggtcca

[0804] gagggccggtccacacatgggtggtcaggacaagcccttcctgtctgcct

[0805] ggcccagcgctgtggtgcctcgcggaggacacgtgactcttcggtgtcac

[0806] tatcgtcataggtttaacaatttcatgctatacaaagaagacagaatcca

[0807] cgttcccatcttccatggcagaatattccaggagggcttcaacatgagcc

[0808] ctgtgaccacagcacatgcagggaactacacatgtcggggttcacaccca

[0809] cactcccccactgggtggtcggcacccagcaaccccatggtgatcatggt

[0810] cacaggaaaccacagaaaaccttccctcctggcccacccaggtcccctgg

[0811] tgaaatcaggagagagagtcatcctgcaatgttggtcagatatcatgttt

[0812] gagcacttctttctgcacaaagagtggatctctaaggacccctcacgcct

[0813] cgttggacagatccatgatggggtctccaaggccaatttctccatcggtt

[0814] ccatgatgcgtgcccttgcagggacctacagatgctacggttctgttact

[0815] cacacccccctatcagttgtcagctcccagtgatcccctggacatcgtggt

[0816] cacaggtctatatgagaaaccttctctctcagcccagccgggccccaagg

[0817] ttcaggcaggagagagcgtgaccttgtcctgtagctcccggagctcctat

[0818] gacatgtaccatctatccagggaggggggagcccatgaacgtaggctccc

[0819] tgcagtgcgcaaggtcaacagaacattccaggcagatttccctctgggcc

[0820] ctgccacccacggagggacctacagatgcttcggctctttccgtcactct

[0821] ccctacgagtggtcagacccgagtgacccactgcttgtttctgtcacagg

[0822] aaacccttcaagtagttggccttcacccacagaaccaagctccaaatctg

[0823] gtaacctcagacacctgcacattctgattgggacctcagtggtcaaaatc

[0824] cctttcaccatcctcctcttctttctccttcatcgctggtgctccaacaa

[0825] aaaaaaatgctgctgtaatggaccaagagcctgcagggaacagaagtga

[0826] 成熟的人NKG2C蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0827] 成熟的人NKG2C蛋白(SEQ ID NO:41)

[0828] mskqrgtfse vslaqdpkrq qrkpkgnkss isgteqeifq velnlqnpsl nhqgidkiyd

[0829] cqgllpppek ltaevlgiic ivlmatvlkt ivlipfleqn nsspntrtqk arhcghcpee

[0830] witysnscyy igkerrtwee sllactskns sllsidneee mkflasilps swigvfrnss

[0831] hhpwvtingl afkhkikdsd naelncavlq vnrlksaqcg ssmiyhckhk l

[0832] 人NKG2C cDNA(SEQ ID NO:42)

[0833] atgaataaacaaagaggaaccttctcagaagtgagtctggcccaggaccc

[0834] aaagcggcagcaaaggaaacctaaaggcaataaaagctccatttcaggaa

[0835] ccgaacaggaaatattccaagtagaattaaatcttcaaaatccttccctg

[0836] aatcatcaagggattgataaaatatatgactgccaaggtttactgccacc

[0837] tccagagaagctcactgccgaggtcctaggaatcatttgcattgtcctga

[0838] tggccactgtgttaaaaacaatagttcttattcctttcctggagcagaac

[0839] aatttttccccgaatacaagaacgcagaaagcacgtcattgtggccattg

[0840] tcctgaggagtggattacatattccaacagttgttattacattggtaagg

[0841] aaagaagaacttgggaagagagtttgctggcctgtacttcgaagaactcc

[0842] agtctgctttctatagataatgaagaagaaatgaaatttctggccagcat

[0843] tttaccttcctcatggattggtgtgtttcgtaacagcagtcatcatccat

[0844] gggtgacaataaatggtttggctttcaaacataagataaaagactcagat

[0845] aatgctgaacttaactgtgcagtgctacaagtaaatcgacttaaatcagc

[0846] ccagtgtggatcttcaatgatatatcattgtaagcataagctttag

[0847] 成熟的人CCR7蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0848] 成熟的人CCR7蛋白(SEQ ID NO:43)

[0849] qdevtd dyigdnttvd ytlfeslcsk kdvrnfkawf lpimysiicf vgllgnglvv ltyiyfkrlk

[0850] tmtdtyllnl avadilfllt lpfwaysaak swvfgvhfck lifaiykmsf fsgmllllci sidryvaivq

[0851] avsahrhrar vllisklscv giwilatvls ipellysdlq rssseqamrc slitehveaf itiqvaqmvi

[0852] gflvpllams fcylviirtl lqarnfernk aikviiavvv vfivfqlpyn gvvlaqtvan fnitsstcel

[0853] skqlniaydv tyslacvrcc vnpflyafig vkfrndlfkl fkdlgclsqe qlrqwsscrh irrssmsvea

[0854] ettttfsp

[0855] 人CCR7 cDNA(SEQ ID NO:44)

[0856] atggacctggggaaaccaatgaaaagcgtgctggtggtggctctccttgt

[0857] cattttccaggtatgcctgtgtcaagatgaggtcacggacgattacatcg

[0858] gagacaacaccacagtggactacactttgttcgagtctttgtgctccaag

[0859] aaggacgtgcggaactttaaagcctggttcctccctatcatgtactccat

[0860] catttgtttcgtgggcctactgggcaatgggctggtcgtgttgacctata

[0861] tctatttcaagaggctcaagaccatgaccgatacctacctgctcaacctg

[0862] gcggtggcagacatcctcttcctcctgacccttcccttctgggcctacag

[0863] cgcggccaagtcctgggtcttcggtgtccacttttgcaagctcatctttg

[0864] ccatctacaagatgagcttcttcagtggcatgctcctacttctttgcatc

[0865] agcattgaccgctacgtggccatcgtccaggctgtctcagctcaccgcca

[0866] ccgtgcccgcgtccttctcatcagcaagctgtcctgtgtgggcatctgga

[0867] tactagccacagtgctctccatcccagagctcctgtacagtgacctccag

[0868] aggagcagcagtgagcaagcgatgcgatgctctctcatcacagagcatgt

[0869] ggaggcctttatcaccatccaggtggcccagatggtgatcggctttctgg

[0870] tccccctgctggccatgagcttctgttaccttgtcatcatccgcaccctg

[0871] ctccaggcacgcaactttgagcgcaacaaggccatcaaggtgatcatcgc

[0872] tgtggtcgtggtcttcatagtcttccagctgccctacaatggggtggtcc

[0873] tggcccagacggtggccaacttcaacatcaccagtagcacctgtgagctc

[0874] agtaagcaactcaacatcgcctacgacgtcacctacagcctggcctgcgt

[0875] ccgctgctgcgtcaacccttttcttgtacgccttcatcggcgtcaagttcc

[0876] gcaacgatctcttcaagctcttcaaggacctgggctgcctcagccaggag

[0877] cagctccggcagtggtcttcctgtcggcacatccggcgctcctccatgag

[0878] tgtggaggccgagaccaccaccaccttctccccatag

[0879] 成熟的人CXCR3蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0880] 成熟的人CXCR3蛋白(SEQ ID NO:45)

[0881] mvlevsdhqv lndaevaall enfsssydyg enesdsccts ppcpqdfsln fdraflpaly

[0882] sllfllgllg ngavaavlls rrtalsstdt fllhlavadt llvltlplwa vdaavqwvfg

[0883] sglckvagal fninfyagal llacisfdry lnivhatqly rrgpparvtl tclavwglcl

[0884] lfalpdfifl sahhderlna thcqynfpqv grtalrvlql vagfllpllv maycyahila

[0885] vllvsrgqrr lramrlvvvv vvafalcwtp yhlvvlvdil mdlgalarnc gresrvdvak

[0886] svtsglgymh cclnpllyaf vgvkfrermw mlllrlgcpn qrglqrqpss srrdsswset

[0887] seasysgl

[0888] 人CXCR3 cDNA(SEQ ID NO:46)

[0889] atggagttgaggaagtacggccctggaagactggcggggacagttatagg

[0890] aggagctgctcagagtaaatcacagactaaatcagactcaatcacaaaag

[0891] agttcctgccaggcctttacacagcccttcctccccgttcccgccctca

[0892] caggtgagtgaccaccaagtgctaaatgacgccgaggttgccgccctcct

[0893] ggagaacttcagctcttcctatgactatggagaaaacgagagtgactcgt

[0894] gctgtacctccccgccctgcccacaggacttcagcctgaacttcgaccgg

[0895] gccttcctgccagccctctacagcctcctctttctgctggggctgctggg

[0896] caacggcgcggtggcagccgtgctgctgagccggcggacagccctgagca

[0897] gcaccgacaccttcctgctccacctagctgtagcagacacgctgctggtg

[0898] ctgacactgccgctctgggcagtggacgctgccgtccagtgggtctttgg

[0899] ctctggcctctgcaaagtggcaggtgccctcttcaacatcaacttctacg

[0900] caggagccctcctgctggcctgcatcagctttgaccgctacctgaacata

[0901] gttcatgccacccagctctaccgccgggggcccccggcccgcgtgaccct

[0902] cacctgcctggctgtctgggggctctgcctgcttttcgccctcccagact

[0903] tcatcttcctgtcggcccaccacgacgagcgcctcaacgccacccactgc

[0904] caatacaacttcccacaggtgggccgcacggctctgcgggtgctgcagct

[0905] ggtggctggctttctgctgcccctgctggtcatggcctactgctatgccc

[0906] acatcctggccgtgctgctggtttccaggggccagcggcgcctgcgggcc

[0907] atgcggctggtggtggtggtcgtggtggcctttgccctctgctggacccc

[0908] ctatcacctggtggtgctggtggacatcctcatggacctgggcgctttgg

[0909] cccgcaactgtggccgagaaagcagggtagacgtggccaagtcggtcacc

[0910] tcaggcctgggctacatgcactgctgcctcaacccgctgctctatgcctt

[0911] tgtaggggtcaagttccgggagcggatgtggatgctgctcttgcgcctgg

[0912] gctgccccaaccagagagggctccagaggcagccatcgtcttcccgccgg

[0913] gattcatcctggtctgagacctcagaggcctcctactcgggcttgtga

[0914] 成熟的人L-选择素蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0915] 成熟的人L-选择素蛋白(SEQ ID NO:47)

[0916] df lahhgtdcwt yhysekpmnw qrarrfcrdn ytdlvaiqnk aeieylektl pfsrsyywig

[0917] irkiggiwtw vgtnksltee aenwgdgepn nkknkedcve iyikrnkdag kwnddachkl

kaalcytasc

[0918] qpwscsghge cveiinnytc ncdvgyygpq cqfviqcepl eapelgtmdc thplgnfsfs sqcafscseg

[0919] tnltgieett cgpfgnwssp eptcqviqce plsapdlgim ncshplasfs ftsactfics egteligkkk

[0920] ticessgiws npspicqkld ksfsmikegd ynplfipvav mvtafsglaf iiwlarrlkk gkkskrsmnd

[0921] py

[0922] 人L-选择素cDNA(SEQ ID NO:48)

[0923] atgggctgcagaagaactagagaaggaccaagcaaagccatgatatttcc

[0924] atggaaatgtcagagcacccagagggacttatggaacatcttcaagttgt

[0925] gggggtggacaatgctctgttgtgatttcctggcacatcatggaaccgac

[0926] tgctggacttaccattattctgaaaaacccatgaactggcaaagggctag

[0927] aagattctgccgagacaattacacagatttagttgccatacaaaacaagg

[0928] cggaaattgagtatctggagaagactctgcctttcagtcgttcttactac

[0929] tggataggaatccggaagataggaggaatatggacgtgggtgggaaccaa

[0930] caaatctcttactgaagaagcagagaactggggagatggtgagcccaaca

[0931] acaagaagaacaaggaggactgcgtggagatctatatcaagagaaacaaa

[0932] gatgcaggcaaatggaacgatgacgcctgccacaaactaaaggcagccct

[0933] ctgttacacagcttcttgccagccctggtcatgcagtggccatggagaat

[0934] gtgtagaaatcatcaataattacacctgcaactgtgatgtggggtactat

[0935] gggccccagtgtcagtttgtgattcagtgtgagcctttggaggccccaga

[0936] gctgggtaccatggactgtactcacccttgggaaacttcagcttcagct

[0937] cacagtgtgccttcagctgctctgaaggaacaaacttaactgggattgaa

[0938] gaaaccacctgtggaccatttggaaactggtcatctccagaaccaacctg

[0939] tcaagtgattcagtgtgagcctctatcagcaccagatttggggatcatga

[0940] actgtagccatcccctggccagcttcagctttacctctgcatgtaccttc

[0941] atctgctcagaaggaactgagttaattgggaagaagaaaaccatttgtga

[0942] atcatctggaatctggtcaaatcctagtccaatatgtcaaaaattggaca

[0943] aaagtttctcaatgattaaggagggtgattataacccccctcttcattcca

[0944] gtggcagtcatggttactgcattctctgggttggcatttatcatttggct

[0945] ggcaaggagattaaaaaaaggcaagaaatccaagagaagtatgaatgacc

[0946] catattaa

[0947] 成熟的人CXCR1蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0948] 成熟的人CXCR1蛋白(SEQ ID NO:49)

[0949] msnitdpqmw dfddlnftgm ppadedyspc xletetlnky vviiayalvf llslgnslv

[0950] mlvilysrvg rsvtdvylln laladllfal tlpiwaaskv ngwifgtflc kvvsllkevn

[0951] fysgilllac isvdrylaiv hatrtltqkr hlvkfvclgc wglsmnlslp fflfrqayhp

[0952] nnsspvcyev lgndtakwrm vlrilphtfg fivplfvmlf cygftlrtlf kahmgqkhra

[0953] mrvifavvli fllcwlpynl vlladtlmrt qviqescerr nnigraldat eilgflhscl

[0954] npiiyafigq nfrhgflkil amhglvskef larhrvtsyt sssvnvssnl

[0955] 人CXCR1 cDNA(SEQ ID NO:50)

[0956] atgtcaaatattacagatccacagatgtgggattttgatgatctaaattt

[0957] cactggcatgccacctgcagatgaagattacagcccctgtatgctagaaa

[0958] ctgagacactcaacaagtatgttgtgatcatcgcctatgccctagtgttc

[0959] ctgctgagcctgctgggaaactccctggtgatgctggtcatcttatacag

[0960] cagggtcggccgctccgtcactgatgtctacctgctgaacctggccttgg

[0961] ccgacctactctttgccctgaccttgcccatctgggccgcctccaaggtg

[0962] aatggctggatttttggcacattcctgtgcaaggtggtctcactcctgaa

[0963] ggaagtcaacttctacagtggcatcctgctgttggcctgcatcagtgtgg

[0964] accgttacctggccattgtccatgccacacgcacactgacccagaagcgt

[0965] cacttggtcaagtttgtttgtcttggctgctggggactgtctatgaatct

[0966] gtccctgcccttcttccttttccgccaggcttaccatccaaacaattcca

[0967] gtccagtttgctatgaggtcctgggaaatgacacagcaaaatggcggatg

[0968] gtgttgcggatcctgcctcacacctttggcttcatcgtgccgctgtttgt

[0969] catgctgttctgctatggattcaccctgcgtacactgtttaaggcccaca

[0970] tggggcagaagcaccgagccatgagggtcatctttgctgtcgtcctcatc

[0971] ttcctgctttgctggctgccctacaacctggtcctgctggcagacaccct

[0972] catgaggacccaggtgatccaggagagctgtgagcgccgcaacaacatcg

[0973] gccgggccctggatgccactgagattctgggatttctccatagctgcctc

[0974] aaccccatcatctacgccttcatcggccaaaattttcgccatggattcct

[0975] caagatcctggctatgcatggcctggtcagcaaggagttcttggcacgtc

[0976] atcgtgttacctcctacacttcttcgtctgtcaatgtctcttccaacctc

[0977] tga

[0978] 成熟的人CXCR2蛋白质和cDNA序列如下所示。

[0979] 成熟的人CXCR2蛋白(SEQ ID NO:51)

[0980] medfnmesds fedfwkgedl snysysstlp pflldaapce pesleinkyf vviiyalvfl

[0981] lsllgnslvm lvilysrvgr svtdvyllnl aladllfalt lpiwaaskvn gwifgtflck

[0982] vvsllkevnf ysgilllaci svdrylaivh atrtltqkry lvkficlsiw glslllalpv

[0983] llfrrtvyss nvspacyedm gnntanwrml lrilpqsfgf ivpllimlfc ygftlrtlfk

[0984] ahmgqkhram rvifavvlif llcwlpynlv lladtlmrtq viqetcerrn hidraldate

[0985] ilgilhscln pliyafigqk frhgllkila ihgliskdsl pkdsrpsfvg sssghtsttl人CXCR2 cDNA(SEQ ID NO:52)

[0986] atggaagattttaacatggagagtgacagctttgaagatttctggaaagg

[0987] tgaagatcttagtaattacagttacagctctaccctgccccctttctac

[0988] tagatgccgccccatgtgaaccagaatccctggaaatcaacaagtatttt

[0989] gtggtcattatctatgccctggtattcctgctgagcctgctgggaaactc

[0990] cctcgtgatgctggtcatcttatacagcagggtcggccgctccgtcactg

[0991] atgtctacctgctgaacctagccttggccgacctactctttgccctgacc

[0992] ttgcccatctgggccgcctccaaggtgaatggctggatttttggcacatt

[0993] cctgtgcaaggtggtctcactcctgaaggaagtcaacttctatagtggca

[0994] tcctgctactggcctgcatcagtgtggaccgttacctggccattgtccat

[0995] gccacacgcacactgacccagaagcgctacttggtcaaattcatatgtct

[0996] cagcatctggggtctgtccttgctcctggccctgcctgtcttacttttcc

[0997] gaaggaccgtctactcatccaatgttagcccagcctgctatgaggacatg

[0998] ggcaacaatacagcaaactggcggatgctgttacggatcctgccccagtc

[0999] ctttggcttcatcgtgccactgctgatcatgctgttctgctacggattca

[1000] ccctgcgtacgctgtttaaggcccacatggggcagaagcaccgggccatg

[1001] cgggtcatctttgctgtcgtcctcatcttcctgctctgctggctgcccta

[1002] caacctggtcctgctggcagacaccctcatgaggacccaggtgatccagg

[1003] agacctgtgagcgccgcaatcacatcgaccgggctctggatgccaccgag

[1004] attctgggcatccttcacagctgcctcaacccccctcatctacgccttcat

[1005] tggccagaagtttcgccatggactcctcaagattctagctatacatggct

[1006] tgatcagcaaggactccctgcccaaagacagcaggccttcctttgttggc

[1007] tcttcttcagggcacacttccactactctctaa

[1008] 成熟的人CX3CR1蛋白质和cDNA序列如下所示。

[1009] 成熟的人CX3CR1蛋白(SEQ ID NO:53)

[1010] mdqfpesvte nfeyddlaea cyigdivvfg tvflsifysv ifaiglvgnl lvvfaltnsk

[1011] kpksvtdiyl lnlalsdllf vatlpfwthy linekglhna mckfttafff igffgsiffi

[1012] tvisidryla ivlaansmnn rtvqhgvtis lgvwaaailv aapqfmftkq keneclgdyp

[1013] evlqeiwpvl rnvetnflgf llpllimsyc yfriiqtlfs cknhkkakai klillvvivf

[1014] flfwtpynvm ifletlklyd ffpscdmrkd lrlalsvtet vafshcclnp liyafagekf

[1015] rrylyhlygk clavlcgrsv hvdfsssesq rsrhgsvlss nftyhtsdgd allll人CX3CR1 cDNA(SEQ ID NO:54)

[1016] atggatcagttccctgaatcagtgacagaaaactttgagtacgatgattt

[1017] ggctgaggcctgttatattggggacatcgtggtctttgggactgtgttcc

[1018] tgtccatattctactccgtcatctttgccattggcctggtgggaaatttg

[1019] ttggtagtgtttgccctcaccaacagcaagaagcccaagagtgtcaccga

[1020] catttacctcctgaacctggccttgtctgatctgctgtttgtagccactt

[1021] tgcccttctggactcactatttgataaatgaaaagggcctccacaatgcc

[1022] atgtgcaaattcactaccgccttcttcttcatcggcttttttggaagcat

[1023] attcttcatcaccgtcatcagcattgataggtacctggccatcgtcctgg

[1024] ccgccaactccatgaacaaccggaccgtgcagcatggcgtcaccatcagc

[1025] ctaggcgtctgggcagcagccattttggtggcagcaccccagttcatgtt

[1026] cacaaagcagaaagaaaatgaatgccttggtgactaccccgaggtcctcc

[1027] aggaaatctggcccgtgctccgcaatgtggaaacaaattttcttggcttc

[1028] ctactccccctgctcattatgagttattgctacttcagaatcatccagac

[1029] gctgttttcctgcaagaaccacaagaaagccaaagccattaaactgatcc

[1030] ttctggtggtcatcgtgtttttcctcttctggacaccctacaacgttatg

[1031] attttcctggagacgcttaagctctatgacttctttcccagttgtgacat

[1032] gaggaaggatctgaggctggccctcagtgtgactgagacggttgcattta

[1033] gccattgttgcctgaatcctctcatctatgcatttgctggggagaagttc

[1034] agaagatacctttaccacctgtatgggaaatgcctggctgtcctgtgtgg

[1035] gcgctcagtccacgttgatttctcctcatctgaatcacaaaggagcaggc

[1036] atggaagtgttctgagcagcaattttacttaccacacgagtgatggagat

[1037] gcattgctccttctctga

[1038] 成熟的人ChemR23蛋白质和cDNA序列如下所示。

[1039] 成熟的人ChemR23蛋白(SEQ ID NO:55)

[1040] mrmededynt sisygdeypd yldsivvled lsplearvtr iflvvvysiv cflgilgngl

[1041] viiiatfkmk ktvnmvwfln lavadflfnv flpihityaa mdyhwvfgta mckisnflli

[1042] hnmftsvfll tiissdrcis vllpvwsqnh rsvrlaymac mviwvlaffl sspslvfrdt

[1043] anlhgkiscf nnfslstpgs sswpthsqmd pvgysrhmvv tvtrflcgfl vpvliitacy

[1044] ltivcklqrn rlaktkkpfk iivtiiitff lcwcpyhtln llelhhtamp gsvfslglpl

[1045] atalaiansc mnpilyvfmg qdfkkfkval fsrlvnalse dtghssypsh rsftkmssmn

[1046] ertsmneret gml

[1047] 人ChemR23 cDNA(SEQ ID NO:56)

[1048] atgagaatggaggatgaagattacaacacttccatcagttacggtgatga

[1049] ataccctgattatttagactccattgtggttttggaggacttatcccccct

[1050] tggaagccagggtgaccaggatcttcctggtggtggtctacagcatcgtc

[1051] tgcttcctcgggattctgggcaatggtctggtgatcatcattgccaccttt

[1052] caagatgaagaagacagtgaacatggtctggttcctcaacctggcagtgg

[1053] cagatttcctgttcaacgtcttcctcccaatccatatcacctatgccgcc

[1054] atggactaccactgggttttcgggacagccatgtgcaagatcagcaactt

[1055] ccttctcatccacaacatgttcaccagcgtcttcctgctgaccatcatca

[1056] gctctgaccgctgcatctctgtgctcctccctgtctggtcccagaaccac

[1057] cgcagcgttcgcctggcttacatggcctgcatggtcatctgggtcctggc

[1058] tttcttcttgagttccccatctctcgtcttccgggacacagccaacctgc

[1059] atgggaaaatatcctgcttcaacaacttcagcctgtccacacctgggtct

[1060] tcctcgtggcccactcactcccaaatggaccctgtggggtatagccggca

[1061] catggtggtgactgtcacccgcttcctctgtggcttcctggtcccagtcc

[1062] tcatcatcacagcttgctacctcaccatcgtgtgcaaactgcagcgcaac

[1063] cgcctggccaagaccaagaagcccttcaagattattgtgaccatcatcat

[1064] taccttcttcctctgctggtgcccctaccacacactcaacctcctagagc

[1065] tccaccacactgccatgcctggctctgtcttcagcctgggtttgcccctg

[1066] gccactgcccttgccattgccaacagctgcatgaaccccattctgtatgt

[1067] tttcatgggtcaggacttcaagaagttcaaggtggccctcttctctcgcc

[1068] tggtcaatgctctaagtgaagatacaggccactcttcctaccccagccat

[1069] agaagctttaccaagatgtcatcaatgaatgagaggacttctatgaatga

[1070] gagggagaccggcatgctttga

[1071] 成熟的人CXCR4的蛋白质和cDNA序列如下所示。

[1072] 成熟的人CXCR4蛋白(SEQ ID NO:57)

[1073] megisiytsd nyteemgsgd ydsmkepcfr eenanfnkif lptiysiifl tgivgnglvi

[1074] lvmgyqkklr smtdkyrlhl svadllfvit lpfwavdava nwyfgnflck avhviytvnl

[1075] yssvlilafi sldrylaivh atnsqrprkl laekvvyvgv wipallltip dfifanvsea

[1076] ddryicdrfy pndlwvvvfq fqhimvglil pgivilscyc iiisklshsk ghqkrkalkt

[1077] tvililaffa cwlpyyigis idsfilleii kqgcefentv hkwisiteal affhcclnpi

[1078] lyaflgakfk tsaqhaltsv srgsslkils kgkrgghssv stesesssfh ss

[1079] 人CXCR4 cDNA(SEQ ID NO:58)

[1080] atgtccattcctttgcctcttttgcagatatacacttcagataactacac

[1081] cgaggaaatgggctcaggggactatgactccatgaaggaaccctgtttcc

[1082] gtgaagaaaatgctaatttcaataaaatcttcctgcccaccatctactcc

[1083] atcatcttcttaactggcattgtgggcaatggattggtcatcctggtcat

[1084] gggttaccagaagaaactgagaagcatgacggacaagtacaggctgcacc

[1085] tgtcagtggccgacctcctctttgtcatcacgcttcccttctgggcagtt

[1086] gatgccgtggcaaactggtactttgggaacttcctatgcaaggcagtcca

[1087] tgtcatctacacagtcaacctctacagcagtgtcctcatcctggccttca

[1088] tcagtctggaccgctacctggccatcgtccacgccaccaacagtcagagg

[1089] ccaaggaagctgttggctgaaaaggtggtctatgttggcgtctggatccc

[1090] tgccctcctgctgactattcccgacttcatctttgccaacgtcagtgagg

[1091] cagatgacagatatatctgtgaccgcttctaccccaatgacttgtgggtg

[1092] gttgtgttccagtttcagcacatcatggttggccttatcctgcctggtat

[1093] tgtcatcctgtcctgctattgcattatcatctccaagctgtcacactcca

[1094] agggccaccagaagcgcaaggccctcaagaccacagtcatcctcatcctg

[1095] gctttcttcgcctgttggctgccttactacattgggatcagcatcgactc

[1096] cttcatcctcctggaaatcatcaagcaagggtgtgagtttgagaacactg

[1097] tgcacaagtggatttccatcaccgaggccctagctttcttccactgttgt

[1098] ctgaaccccatcctctatgctttccttggagccaaatttaaaacctctgc

[1099] ccagcacgcactcacctctgtgagcagagggtccagcctcaagatcctct

[1100] ccaaaggaaagcgaggtggacattcatctgtttccactgagtctgagtct

[1101] tcaagttttcactccagctaa

[1102] 成熟的人CCR5蛋白质和cDNA序列如下所示。

[1103] 成熟的人CCR5蛋白(SEQ ID NO:59)

[1104] mdyqvsspiy dinyytsepc qkinvkqiaa rllpplyslv fifgfvgnml vililinckr

[1105] lksmtdiyll nlaisdlffl ltvpfwahya aaqwdfgntm cqlltglyfi gffsgiffii

[1106] lltidrylav vhavfalkar tvtfgvvtsv itwvvavfas lpgiiftrsq keglhytcss

[1107] hfpysqyqfw knfqtlkivi lglvlpllvm vicysgilkt llrcrnekkr hravrlifti

[1108] mivyflfwap ynivlllntf qeffglnncs ssnrldqamq vtetlgmthc cinpiiyafv

[1109] gekfrnyllv ffqkhiakrf ckccsifqqe aperassvyt rstgeqeisv gl

[1110] 人CCR5 cDNA(SEQ ID NO:60)

[1111] atggattatcaagtgtcaagtccaatctatgacatcaattattatacatc

[1112] ggagccctgccaaaaaatcaatgtgaagcaaatcgcagcccgcctcctgc

[1113] ctccgctctactcactggtgttcatctttggttttgtgggcaacatgctg

[1114] gtcatcctcatcctgataaactgcaaaaggctgaagagcatgactgacat

[1115] ctacctgctcaacctggccatctctgacctgtttttccttcttactgtcc

[1116] ccttctgggctcactatgctgccgcccagtgggactttggaaatacaatg

[1117] tgtcaactcttgacagggctctatttataggcttcttctctggaatctt

[1118] cttcatcatcctcctgacaatcgataggtacctggctgtcgtccatgctg

[1119] tgtttgctttaaaagccaggacggtcacctttggggtggtgacaagtgtg

[1120] atcacttgggtggtggctgtgtttgcgtctctcccaggaatcatctttac

[1121] cagatctcaaaaagaaggtcttcattacacctgcagctctcattttccat

[1122] acagtcagtatcaattctggaagaatttccagacattaaagatagtcatc

[1123] ttggggctggtcctgccgctgcttgtcatggtcatctgctactcgggaat

[1124] cctaaaaactctgcttcggtgtcgaaatgagaagaagaggcacagggctg

[1125] tgaggcttatcttcaccatcatgattgtttattttctcttctgggctccc

[1126] tacaacattgtccttctcctgaacaccttccaggaattctttggcctgaa

[1127] taattgcagtagctctaacaggttggaccaagctatgcaggtgacagaga

[1128] ctcttgggatgacgcactgctgcatcaaccccatcatctatgcctttgtc

[1129] ggggagaagttcagaaactacctcttagtcttcttccaaaagcacattgc

[1130] caaacgcttctgcaaatgctgttctattttccagcaagaggctcccgagc

[1131] gagcaagctcagtttacacccgatccactggggagcaggaaatatctgtg

[1132] ggcttgtga

[1133] 成熟的人S1P5蛋白质和cDNA序列如下所示。

[1134] 成熟的人S1P5蛋白(SEQ ID NO:61)

[1135] mesgllrpap vsevivlhyn ytgklrgary qpgaglrada vvclavcafi vlenlavllv

[1136] lgrhprfhap mflllgsltl sdllagaaya anillsgplt lklspalwfa reggvfvalt

[1137] asvlsllaia lersltmarr gpapvssrgr tlamaaaawg vslllgllpa lgwnclgrld

[1138] acstvlplya kayvlfcvla fvgilaaica lyariycqvr anarrlparp gtagttstra

[1139] rrkprslall rtlsvvllaf vacwgplfll llldvacpar tcpvllqadp flglamansl

[1140] lnpiiytltn rdlrhallrl vccgrhscgr dpsgsqqsas aaeasgglrr clppgldgsf

[1141] sgsersspqr dgldtsgstg spgaptaart lvsepaad

[1142] 人S1P5 cDNA(SEQ ID NO:62)

[1143] atggagtcggggctgctgcggccggcgccggtgagcgaggtcatcgtcct

[1144] gcattacaactacaccggcaagctccgcggtgcgcgctaccagccgggtg

[1145] ccggcctgcgcgccgacgccgtggtgtgcctggcggtgtgcgccttcatc

[1146] gtgctagagaatctagccgtgttgttggtgctcggacgccacccgcgctt

[1147] ccacgctcccatgttcctgctcctgggcagcctcacgttgtcggatctgc

[1148] tggcaggcgccgcctacgccgccaacatcctactgtcggggccgctcacg

[1149] ctgaaactgtcccccgcgctctggttcgcacgggagggaggcgtcttcgt

[1150] ggcactcactgcgtccgtgctgagcctcctggccatcgcgctggagcgca

[1151] gcctcaccatggcgcgcaggggcccgcgcccgtctccagtcgggggcgc

[1152] acgctggcgatggcagccgcggcctggggcgtgtcgctgctcctcgggct

[1153] cctgccagcgctgggctggaattgcctgggtcgcctggacgcttgctcca

[1154] ctgtcttgccgctctacgccaaggcctacgtgctcttctgcgtgctcgcc

[1155] ttcgtgggcatcctggccgctatctgtgcactctacgcgcgcatctactg

[1156] ccaggtacgcgccaacgcgcggcgcctgccggcacggcccgggactgcgg

[1157] ggaccacctcgacccgggcgcgtcgcaagccgcgctcgctggccttgctg

[1158] cgcacgctcagcgtggtgctcctggcctttgtggcatgttggggcccct

[1159] cttcctgctgctgttgctcgacgtggcgtgcccggcgcgcacctgtcctg

[1160] tactcctgcaggccgatcccttcctgggactggccatggccaactcactt

[1161] ctgaaccccatcatctacacgctcaccaaccgcgacctgcgccacgcgct

[1162] cctgcgcctggtctgctgcggacgccactcctgcggcagagacccgagtg

[1163] gctcccagcagtcggcgagcgcggctgaggcttccgggggcctgcgccgc

[1164] tgcctgcccccgggccttgatgggagcttcagcggctcggagcgctcatc

[1165] gccccagcgcgacgggctggacaccagcggctccacaggcagccccggtg

[1166] cacccacagccgcccggactctggtatcagaaccggctgcagactga

[1167] 成熟的人C-kit蛋白质和cDNA序列如下所示。

[1168] 成熟的人C-kit蛋白(SEQ ID NO:63)

[1169] qpsvs pgepsppsih pgksdlivrv gdeirllctd pgfvkwtfei ldetnenkqn ewitekaeat

[1170] ntgkytctnk hglsnsiyvf vrdpaklflv drslygkedn dtlvrcpltd pevtnyslkg cqgkplpkdl

[1171] rfipdpkagi miksvkrayh rlclhcsvdq egksvlsekf ilkvrpafka vpvvsvskas yllregeeft

[1172] vtctikdvss svystwkren sqtklqekyn swhhgdfnye rqatltissa rvndsgvfmc yanntfgsan

[1173] vtttlevvdk gfinifpmin ttvfvndgen vdliveyeaf pkpehqqwiy mnrtftdkwe dypksenesn

[1174] iryvselhlt rlkgteggty tflvsnsdvn aaiafnvyvn tkpeiltydr lvngmlqcva agfpeptidw

[1175] yfcpgteqrc sasvlpvdvq tlnssgppfg klvvqssids safkhngtve ckayndvgkt sayfnfafkg

[1176] nnkeqihpht lftplligfv ivagmmciiv miltykylqk pmyevqwkvv eeingnnyvy idptqlpydh

[1177] kwefprnrls fgktlgagaf gkvveatayg liksdaamtv avkmlkpsah lterealmse lkvlsylgnh

[1178] mnivnllgac tiggptlvit eyccygdlln flrrkrdsfi cskqedhaea alyknllhsk esscsdstne

[1179] ymdmkpgvsy vvptkadkrr svrigsyier dvtpaimedd elaldledll sfsyqvakgm aflaskncih

[1180] rdlaarnill thgritkicd fglardiknd snyvvkgnar lpvkwmapes ifncvytfes dvwsygiflw

[1181] elfslgsspy pgmpvdskfy kmikegfrml spehapaemy dimktcwdad plkrptfkqi vqliekqise

[1182] stnhiysnla ncspnrqkpv vdhsvrinsv gstasssqpl lvhddv

[1183] 人C-kit cDNA(SEQ ID NO:64)

[1184] atgagaggcgctcgcggcgcctgggattttctctgcgttctgctcctact

[1185] gcttcgcgtccagacaggctcttctcaaccatctgtgagtccaggggaac

[1186] cgtctccaccatccatccatccaggaaaatcagacttaatagtccgcgtg

[1187] ggcgacgagattaggctgttatgcactgatccgggctttgtcaaatggac

[1188] ttttgagatcctggatgaaacgaatgagaataagcagaatgaatggatca

[1189] cggaaaaggcagaagccaccaacaccggcaaatacacgtgcaccaacaaa

[1190] cacggcttaagcaattccatttatgtgtttgttagagatcctgccaagct

[1191] tttccttgttgaccgctccttgtatgggaaagaagacaacgacacgctgg

[1192] tccgctgtcctctcacagacccagaagtgaccaattattccctcaagggg

[1193] tgccaggggaagcctcttcccaaggacttgaggtttattcctgaccccaa

[1194] ggcgggcatcatgatcaaaagtgtgaaacgcgcctaccatcggctctgtc

[1195] tgcattgttctgtggaccaggagggcaagtcagtgctgtcggaaaaattc

[1196] atcctgaaagtgaggccagccttcaaagctgtgcctgttgtgtctgtgtc

[1197] caaagcaagctatcttcttagggaaggggaagaattcacagtgacgtgca

[1198] caataaaagatgtgtctagttctgtgtactcaacgtggaaaagagaaaac

[1199] agtcagactaaactacaggagaaatataatagctggcatcacggtgactt

[1200] caattatgaacgtcaggcaacgttgactatcagttcagcgagagttaatg

[1201] attctggagtgttcatgtgttatgccaataatacttttggatcagcaaat

[1202] gtcacaacaaccttggaagtagtagataaaggattcattaatatcttccc

[1203] catgataaacactacagtatttgtaaacgatggagaaaatgtagatttga

[1204] ttgttgaatatgaagcattccccaaacctgaacaccagcagtggatctat

[1205] atgaacagaaccttcactgataaatgggaagattatcccaagtctgagaa

[1206] tgaaagtaatatcagatacgtaagtgaacttcatctaacgagattaaaag

[1207] gcaccgaaggaggcacttacacattcctagtgtccaattctgacgtcaat

[1208] gctgccatagcatttaatgtttatgtgaatacaaaaccagaaatcctgac

[1209] ttacgacaggctcgtgaatggcatgctccaatgtgtggcagcaggattcc

[1210] cagagcccacaatagattggtatttttgtccaggaactgagcagagatgc

[1211] tctgcttctgtactgccagtggatgtgcagacactaaactcatctgggcc

[1212] accgtttggaaagctagtggttcagagttctatagattctagtgcattca

[1213] agcacaatggcacggttgaatgtaaggcttacaacgatgtgggcaagact

[1214] tctgcctattttaactttgcatttaaaggtaacaacaaagagcaaatcca

[1215] tccccacaccctgttcactcctttgctgattggtttcgtaatcgtagctg

[1216] gcatgatgtgcattattgtgatgattctgacctacaaatatttacagaaa

[1217] cccatgtatgaagtacagtggaaggttgttgaggagataaatggaaacaa

[1218] ttatgtttacatagacccaacacaacttccttatgatcacaaatgggagt

[1219] ttcccagaaacaggctgagttttgggaaaaccctgggtgctggagctttc

[1220] gggaaggttgttgaggcaactgcttatggcttaattaagtcagatgcggc

[1221] catgactgtcgctgtaaagatgctcaagccgagtgcccatttgacagaac

[1222] gggaagccctcatgtctgaactcaaagtcctgagttaccttggtaatcac

[1223] atgaatattgtgaatctacttggagcctgcaccattggagggcccaccct

[1224] ggtcattacagaatattgttgctatggtgatcttttgaatttttgagaa

[1225] gaaaacgtgattcatttatttgttcaaagcaggaagatcatgcagaagct

[1226] gcactttataagaatcttctgcattcaaaggagtcttcctgcagcgatag

[1227] tactaatgagtacatggacatgaaacctggagtttcttatgttgtcccaa

[1228] ccaaggccgacaaaaggagatctgtgagaataggctcatacatagaaaga

[1229] gatgtgactcccgccatcatggaggatgacgagttggccctagacttaga

[1230] agacttgctgagcttttcttaccaggtggcaaagggcatggctttcctcg

[1231] cctccaagaattgtattcacagagacttggcagccagaaatatcctcctt

[1232] actcatggtcggatcacaaagatttgtgattttggtctagccagagacat

[1233] caagaatgattctaattatgtggttaaaggaaacgctcgactacctgtga

[1234] agtggatggcacctgaaagcattttcaactgtgtatacacgtttgaaagt

[1235] gacgtctggtcctatgggatttttctttgggagctgttctctttaggaag

[1236] cagcccctatcctggaatgccggtcgattctaagttctacaagatgatca

[1237] aggaaggcttccggatgctcagccctgaacacgcacctgctgaaatgtat

[1238] gacataatgaagacttgctgggatgcagatcccctaaaaagaccaacatt

[1239] caagcaaattgttcagctaattgagaagcagatttcagagagcaccaatc

[1240] atatttactccaacttagcaaactgcagccccaaccgacagaagcccgtg

[1241] gtagaccattctgtgcggatcaattctgtcggcagcaccgcttcctcctc

[1242] ccagcctctgcttgtgcacgacgatgtctga

[1243] 成熟人mTOR的蛋白质和cDNA序列如下所示。

[1244] 成熟的人mTOR蛋白(SEQ ID NO:65)

[1245] mlgtgpaaat taattssnvs vlqqfasglk srneetraka akelqhyvtm elremsqees

[1246] trfydqlnhh ifelvsssda nerkggilai asligveggn atrigrfany lrnllpsndp

[1247] vvmemaskai grlamagdtf taeyvefevk ralewlgadr negrrhaavl vlrelaisvp

[1248] tfffqqvqpf fdnifvavwd pkqairegav aalraclilt tqrepkemqk pqwyrhtfee

[1249] aekgfdetla kekgmnrddr ihgallilne lvrissmege rlreemeeit qqqlvhdkyc

[1250] kdlmgfgtkp rhitpftsfq avqpqqsnal vgllgysshq glmgfgtsps pakstlvesr

[1251] ccrdlmeekf dqvcqwvlkc rnsknsliqm tilnllprla afrpsaftdt qylqdtmnhv

[1252] lscvkkeker taafqalgll svavrsefkv ylprvldiir aalppkdfah krqkamqvda

[1253] tvftcismla ramgpgiqqd ikellepmla vglspaltav lydlsrqipq lkkdiqdgll

[1254] kmlslvlmhk plrhpgmpkg lahqlaspgl ttlpeasdvg sitlalrtlg sfefeghslt

[1255] qfvrhcadhf lnsehkeirm eaartcsrll tpsihlisgh ahvvsqtavq vvadvlskll

[1256] vvgitdpdpd irycvlasld erfdahlaqa enlqalfval ndqvfeirel aictvgrlss

[1257] mnpafvmpfl rkmliqilte lehsgigrik eqsarmlghl vsnaprlirp ymepilkali

[1258] lklkdpdpdp npgvinnvla tigelaqvsg lemrkwvdel fiiimdmlqd ssllakrqva

[1259] lwtlgqlvas tgyvvepyrk yptllevlln flkteqnqgt rreairvlgl lgaldpykhk

[1260] vnigmidqsr dasavslses kssqdssdys tsemlvnmgn lpldefypav smvalmrifr

[1261] dqslshhhtm vvqaitfifk slglkcvqfl pqvmptflnv irvcdgaire flfqqlgmlv

[1262] sfvkshirpy mdeivtlmre fwvmntsiqs tiillieqiv valggefkly lpqliphmlr

[1263] vfmhdnspgr ivsikllaai qlfganlddy lhlllppivk lfdapeaplp srkaaletvd

[1264] rltesldftd yasriihpiv rtldqspelr stamdtlssl vfqlgkkyqi fipmvnkvlv

[1265] rhrinhqryd vlicrivkgy tladeeedpl iyqhrmlrsg qgdalasgpv etgpmkklhv

[1266] stinlqkawg aarrvskddw lewlrrlsle llkdssspsl rscwalaqay npmardlfna

[1267] afvscwseln edqqdelirs ielaltsqdi aevtqtllnl aefmehsdkg plplrddngi

[1268] vllgeraakc rayakalhyk elefqkgptp aileslisin nklqqpeaaa gvleyamkhf

[1269] geleiqatwy eklhewedal vaydkkmdtn kddpelmlgr mrclealgew gqlhqqccek

[1270] wtlvndetqa kmarmaaaaa wglgqwdsme eytcmiprdt hdgafyravl alhqdlfsla

[1271] qqcidkardl ldaeltamag esysraygam vschmlsele eviqyklvpe rreiirqiww

[1272] erlqgcqriv edwqkilmvr slvvsphedm rtwlkyaslc gksgrlalah ktlvlllgvd

[1273] psrqldhplp tvhpqvtyay mknmwksark idafqhmqhf vqtmqqqaqh aiatedqqhk

[1274] qelhklmarc flklgewqln lqginestip kvlqyysaat ehdrswykaw hawavmnfea

[1275] vlhykhqnqa rdekkklrha sganitnatt aattaatatt tastegsnse seaestensp

[1276] tpsplqkkvt edlsktllmy tvpavqgffr sislsrgnnl qdtlrvltlw fdyghwpdvn

[1277] ealvegvkai qidtwlqvip qliaridtpr plvgrlihql ltdigryhpq aliypltvas

[1278] kstttarhna ankilknmce hsntlvqqam mvseelirva ilwhemwheg leeasrlyfg

[1279] ernvkgmfev leplhammer gpqtlketsf nqaygrdlme aqewcrkymk sgnvkdltqa

[1280] wdlyyhvfrr iskqlpqlts lelqyvspkl lmcrdlelav pgtydpnqpiiriqsiapsl

[1281] qvitskqrpr kltlmgsngh efvfllkghe dlrqdervmq lfglvntlla ndptslrknl

[1282] siqryavipl stnsgligwv phcdtlhali rdyrekkkil lniehrimlr mapdydhltl

[1283] mqkvevfeha vnntagddla kllwlkspss evwfdrrtny trslavmsmv gyilglgdrh

[1284] psnlmldrls gkilhidfgd cfevamtrek fpekipfrlt rmltnamevt gldgnyritc

[1285] htvmevlreh kdsvmavlea fvydpllnwr lmdtntkgnk rsrtrtdsys agqsveildg

[1286] velgepahkk tgttvpesih sfigdglvkp ealnkkaiqiinrvrdkltg rdfshddtld

[1287] vptqvellik qatshenlcq cyigwcpfw

[1288] 人mTOR cDNA(SEQ ID NO:66)

[1289] atgcttgga accggacctg ccgccgccac caccgctgcc accacatcta gcaatgtgag

[1290] cgtcctgcag cagtttgcca gtggcctaaa gagccggaat gaggaaacca gggccaaagc

[1291] cgccaaggag ctccagcact atgtcaccat ggaactccga gagatgagtc aagaggagtc

[1292] tactcgcttc tatgaccaac tgaaccatca catttttgaa ttggtttcca gctcagatgc

[1293] caatgagagg aaaggtggca tcttggccat agctagcctc ataggagtgg aaggtgggaa

[1294] tgccacccga attggcagat ttgccaacta tcttcggaac ctcctcccct ccaatgaccc

[1295] agttgtcatg gaaatggcat ccaaggccat tggccgtctt gccatggcag gggacacttt

[1296] taccgctgag tacgtggaat ttgaggtgaa gcgagccctg gaatggctgg gtgctgaccg

[1297] caatgagggc cggagacatg cagctgtcct ggttctccgt gagctggcca tcagcgtccc

[1298] taccttcttc ttccagcaag tgcaaccctt ctttgacaac atttttgtgg ccgtgtggga

[1299] ccccaaacag gccatccgtg agggagctgt agccgcccct cgtgcctgtc tgattctcac

[1300] aacccagcgt gagccgaagg agatgcagaa gcctcagtgg tacaggcaca catttgaaga

[1301] agcagagaag ggatttgatg agaccttggc caaagagaag ggcatgaatc gggatgatcg

[1302] gatccatgga gccttgttga tccttaacga gctggtccga atcagcagca tggagggaga

[1303] gcgtctgaga gaagaaatgg aagaaatcac acagcagcag ctggtacacg acaagtactg

[1304] caaagatctc atgggcttcg gaacaaaacc tcgtcacatt acccccttca ccagtttcca

[1305] ggctgtacag ccccagcagt caaatgcctt ggtggggctg ctggggtaca gctctcacca

[1306] aggcctcatg ggatttggga cctcccccag tccagctaag tccaccctgg tggagagccg

[1307] gtgttgcaga gacttgatgg aggagaaatt tgatcaggtg tgccagtggg tgctgaaatg

[1308] caggaatagc aagaactcgc tgatccaaat gacaatcctt aatttgttgc cccgcttggc

[1309] tgcattccga ccttctgcct tcacagatac ccagtatctc caagatacca tgaaccatgt

[1310] cctaagctgt gtcaagaagg agaaggaacg tacagcggcc ttccaagccc tggggctact

[1311] ttctgtggct gtgaggtctg agtttaaggt ctatttgcct cgcgtgctgg acatcatccg

[1312] agcggccctg cccccaaagg acttcgccca taagaggcag aaggcaatgc aggtggatgc

[1313] cacagtcttc acttgcatca gcatgctggc tcgagcaatg gggccaggca tccagcagga

[1314] tatcaaggag ctgctggagc ccatgctggc agtgggacta agccctgccc tcactgcagt

[1315] gctctacgac ctgagccgtc agattccaca gctaaagaag gacattcaag atgggctact

[1316] gaaaatgctg tccctggtcc ttatgcacaa acccccttcgc cacccaggca tgcccaaggg

[1317] cctggcccat cagctggcct ctcctggcct cacgaccctc cctgaggcca gcgatgtggg

[1318] cagcatcact cttgccctcc gaacgcttgg cagctttgaa tttgaaggcc actctctgac

[1319] ccaatttgtt cgccactgtg cggatcattt cctgaacagt gagcacaagg agatccgcat

[1320] ggaggctgcc cgcacctgct cccgcctgct cacaccctcc atccacctca tcagtggcca

[1321] tgctcatgtg gttagccaga ccgcagtgca agtggtggca gatgtgctta gcaaactgct

[1322] cgtagttggg ataacagatc ctgaccctga cattcgctac tgtgtcttgg cgtccctgga

[1323] cgagcgcttt gatgcacacc tggcccaggc ggagaacttg caggccttgt ttgtggctct

[1324] gaatgaccag gtgtttgaga tccgggagct ggccatctgc actgtgggcc gactcagtag

[1325] catgaaccct gcctttgtca tgcctttcct gcgcaagatg ctcatccaga ttttgacaga

[1326] gttggagcac agtgggattg gaagaatcaa agagcagagt gcccgcatgc tggggcacct

[1327] ggtctccaat gccccccgac tcatccgccc ctacatggag cctattctga aggcattaat

[1328] tttgaaactg aaagatccag accctgatcc aaacccaggt gtgatcaata atgtcctggc

[1329] aacaatagga gaattggcac aggttagtgg cctggaaatg aggaaatggg ttgatgaact

[1330] ttttattatc atcatggaca tgctccagga ttcctctttg ttggccaaaa ggcaggtggc

[1331] tctgtggacc ctgggacagt tggtggccag cactggctat gtagtagagc cctacaggaa

[1332] gtaccctact ttgcttgagg tgctactgaa ttttctgaag actgagcaga accagggtac

[1333] acgcagagag gccatccgtg tgttagggct tttaggggct ttggatcctt acaagcacaa

[1334] agtgaacatt ggcatgatag accagtcccg ggatgcctct gctgtcagcc tgtcagaatc

[1335] caagtcaagt caggattcct ctgactatag cactagtgaa atgctggtca acatgggaaa

[1336] cttgcctctg gatgagttct acccagctgt gtccatggtg gccctgatgc ggatcttccg

[1337] agaccagtca ctctctcatc atcacaccat ggttgtccag gccatcacct tcatcttcaa

[1338] gtccctggga ctcaaatgtg tgcagttcct gccccaggtc atgcccacgt tccttaacgt

[1339] cattcgagtc tgtgatgggg ccatccggga atttttgttc cagcagctgg gaatgttggt

[1340] gtcctttgtg aagagccaca tcagacctta tatggatgaa atagtcaccc tcatgagaga

[1341] attctgggtc atgaacacct caattcagag cacgatcatt cttctcattg agcaaattgt

[1342] ggtagctctt gggggtgaat ttaagctcta cctgccccag ctgatcccac acatgctgcg

[1343] tgtcttcatg catgacaaca gcccaggccg cattgtctct atcaagttac tggctgcaat

[1344] ccagctgttt ggcgccaacc tggatgacta cctgcattta ctgctgcctc ctattgttaa

[1345] gttgtttgat gcccctgaag ctccactgcc atctcgaaag gcagcgctag agactgtgga

[1346] ccgcctgacg gagtccctgg atttcactga ctatgcctcc cggatcattc accctattgt

[1347] tcgaacactg gaccagagcc cagaactgcg ctccacagcc atggacacgc tgtcttcact

[1348] tgtttttcag ctggggaaga agtaccaaat tttcattcca atggtgaata aagttctggt

[1349] gcgacaccga atcaatcatc agcgctatga tgtgctcatc tgcagaattg tcaagggata

[1350] cacacttgct gatgaagagg aggatccttt gatttaccag catcggatgc ttaggagtgg

[1351] ccaaggggat gcattggcta gtggaccagt ggaaacagga cccatgaaga aactgcacgt

[1352] cagcaccatc aacctccaaa aggcctgggg cgctgccagg agggtctcca aagatgactg

[1353] gctggaatgg ctgagacggc tgagcctgga gctgctgaag gactcatcat cgccctccct

[1354] gcgctcctgc tgggccctgg cacaggccta caacccgatg gccagggatc tcttcaatgc

[1355] tgcatttgtg tcctgctggt ctgaactgaa tgaagatcaa caggatgagc tcatcagaag

[1356] catcgagttg gccctcacct cacaagacat cgctgaagtc acacagaccc tcttaaactt

[1357] ggctgaattc atggaacaca gtgacaaggg ccccctgcca ctgagagatg acaatggcat

[1358] tgttctgctg ggtgagagag ctgccaagtg ccgagcatat gccaaagcac tacactacaa

[1359] agaactggag ttccagaaag gccccacccc tgccattcta gaatctctca tcagcattaa

[1360] taataagcta cagcagccgg aggcagcggc cggagtgtta gaatatgcca tgaaacactt

[1361] tggagagctg gagatccagg ctacctggta tgagaaactg cacgagtggg aggatgccct

[1362] tgtggcctat gacaagaaaa tggacaccaa caaggacgac ccagagctga tgctgggccg

[1363] catgcgctgc ctcgaggcct tgggggaatg gggtcaactc caccagcagt gctgtgaaaa

[1364] gtggaccctg gttaatgatg agacccaagc caagatggcc cggatggctg ctgcagctgc

[1365] atggggttta ggtcagtggg acagcatgga agaatacacc tgtatgatcc ctcgggacac

[1366] ccatgatggg gcattttata gagctgtgct ggcactgcat caggacctct tctccttggc

[1367] acaacagtgc attgacaagg ccagggacct gctggatgct gaattaactg cgatggcagg

[1368] agagagttac agtcgggcat atggggccat ggtttcttgc cacatgctgt ccgagctgga

[1369] ggaggttatc cagtacaaac ttgtccccga gcgacgagag atcatccgcc agatctggtg

[1370] ggagagactg cagggctgcc agcgtatcgt agaggactgg cagaaaatcc ttatggtgcg

[1371] gtcccttgtg gtcagccctc atgaagacat gagaacctgg ctcaagtatg caagcctgtg

[1372] cggcaagagt ggcaggctgg ctcttgctca taaaacttta gtgttgctcc tgggagttga

[1373] tccgtctcgg caacttgacc atcctctgcc aacagttcac cctcaggtga cctatgccta

[1374] catgaaaaac atgtggaaga gtgcccgcaa gatcgatgcc ttccagcaca tgcagcattt

[1375] tgtccagacc atgcagcaac aggcccagca tgccatcgct actgaggacc agcagcataa

[1376] gcaggaactg cacaagctca tggcccgatg cttcctgaaa cttggagagt ggcagctgaa

[1377] tctacagggc atcaatgaga gcacaatccc caaagtgctg cagtactaca gcgccgccac

[1378] agagcacgac cgcagctggt acaaggcctg gcatgcgtgg gcagtgatga acttcgaagc

[1379] tgtgctacac tacaaacatc agaaccaagc ccgcgatgag aagaagaaac tgcgtcatgc

[1380] cagcggggcc aacatcacca acgccaccac tgccgccacc acggccgcca ctgccaccac

[1381] cactgccagc accgagggca gcaacagtga gagcgaggcc gagagcaccg agaacagccc

[1382] caccccatcg ccgctgcaga agaaggtcac tgaggatctg tccaaaaccc tcctgatgta

[1383] cacggtgcct gccgtccagg gcttcttccg ttccatctcc ttgtcacgag gcaacaacct

[1384] ccaggataca ctcagagttc tcaccttatg gtttgattat ggtcactggc cagatgtcaa

[1385] tgaggcctta gtggaggggg tgaaagccat ccagattgat acctggctac aggttatacc

[1386] tcagctcatt gcaagaattg atacgcccag acccttggtg ggacgtctca ttcaccagct

[1387] tctcacagac attggtcggt accacccccа ggccctcatc tacccactga cagtggcttc

[1388] taagtctacc acgacagccc ggcacaatgc agccaacaag attctgaaga acatgtgtga

[1389] gcacagcaac accctggtcc agcaggccat gatggtgagc gaggagctga tccgagtggc

[1390] catcctctgg catgagatgt ggcatgaagg cctggaagag gcatctcgtt tgtactttgg

[1391] ggaaaggaac gtgaaaggca tgtttgaggt gctggagccc ttgcatgcta tgatggaacg

[1392] gggcccccag actctgaagg aaacatcctt taatcaggcc tatggtcgag atttaatgga

[1393] ggcccaagag tggtgcagga agtacatgaa atcagggaat gtcaaggacc tcacccaagc

[1394] ctgggacctc tattatcatg tgttccgacg aatctcaaag cagctgcctc agctcacatc

[1395] cttagagctg caatatgttt ccccaaaact tctgatgtgc cgggaccttg aattggctgt

[1396] gccaggaaca tatgacccca accagccaat cattcgcatt cagtccatag caccgtcttt

[1397] gcaagtcatc acatccaagc agaggccccg gaaattgaca cttatgggca gcaacggaca

[1398] tgagtttgtt ttccttctaa aaggccatga agatctgcgc caggatgagc gtgtgatgca

[1399] gctcttcggc ctggttaaca cccttctggc caatgaccca acatctcttc ggaaaaacct

[1400] cagcatccag agatacgctg tcatcccttt atcgaccaac tcgggcctca ttggctgggt

[1401] tccccactgt gacacactgc acgccctcat ccgggactac agggagaaga agaagatcct

[1402] tctcaacatc gagcatcgca tcatgttgcg gatggctccg gactatgacc acttgactct

[1403] gatgcagaag gtggaggtgt ttgagcatgc cgtcaataat acagctgggg acgacctggc

[1404] caagctgctg tggctgaaaa gccccagctc cgaggtgtgg tttgaccgaa gaaccaatta

[1405] tacccgttct ttagcggtca tgtcaatggt tgggtatatt ttaggcctgg gagatagaca

[1406] cccatccaac ctgatgctgg accgtctgag tgggaagatc ctgcacattg actttgggga

[1407] ctgctttgag gttgctatga cccgagagaa gtttccagag aagattccat ttagactaac

[1408] aagaatgttg accaatgcta tggaggttac aggcctggat ggcaactaca gaatcacatg

[1409] ccacacagtg atggaggtgc tgcgagagca caaggacagt gtcatggccg tgctggaagc

[1410] ctttgtctat gacccttgc tgaactggag gctgatggac acaaatacca aaggcaacaa

[1411] gcgatcccga acgaggacgg attcctactc tgctggccag tcagtcgaaa ttttggacgg

[1412] tgtggaactt ggagagccag cccataagaa aacggggacc acagtgccag aatctattca

[1413] ttctttcatt ggagacggtt tggtgaaacc agaggcccta aataagaaag ctatccagat

[1414] tattaacagg gttcgagata agctcactgg tcgggacttc tctcatgatg acactttgga

[1415] tgttccaacg caagttgagc tgctcatcaa acaagcgaca tcccatgaaa acctctgcca

[1416] gtgctatatt ggctggtgcc ctttctggta a

[1417] 能够用于测定SREBP1表达水平的商业ELISA分析的非限制性实例获自Novus Biologicals和艾博抗(Abcam)。成熟的人SREBP1蛋白质和cDNA序列如下所示。

[1418] 成熟的人SREBP1蛋白(SEQ ID NO:67)

[1419] MDEPPFSEAALEQALGEPCDLDAALLTDIEDMLQLINNQDSDFPGLFDPPYAGSGAGGTDPASPDTSSP GSLSPP

[1420] PATLSSSLEAFLSGPQAAPSPLSPPQPAPTPLKMYPSMPAFSPGPGIKEESVPLSILQTPTPQPLPGAL LPQSFP

[1421] APAPPQFSSTPVLGYPSPPGGFSTGSPPGNTQQPLPGLPLASPPGVPPVSLHTQVQSVVPQQLLTVTAA PTAAPV

[1422] TTTVTSQIQQVPVLLQPHFIKADSLLLTAMKTDGATVKAAGLSPLVSGTTVQTGPLPTLVSGGTILATV PLVVDA

[1423] EKLPINRLAAGSKAPASAQSRGEKRTAHNAIEKRYRSSINDKIIELKDLVVGTEAKLNKSAVLRKAIDY IRFLQH

[1424] SNQKLKQENLSLRTAVHKSKSLKDLVSACGSGGNTDVLMEGVKTEVEDTLTPPPSDAGSPFQSSPLSLG SRGSGS

[1425] GGSGSDSEPDSPVFEDSKAKPEQRPSLHSRGMLDRSRLALCTLVFLCLSCNPLASLLGARGLPSPSDTT SVYHSP

[1426] GRNVLGTESRDGPGWAQWLLPPVVWLLNGLLVLVSLVLLFVYGEPVTRPHSGPAVYFWRHRKQADLDLA RGDFAQ

[1427] AAQQLWLALRALGRPLPTSHLDLACSLLWNLIRHLLQRLWVGRWLAGRAGGLQQDCALRVDASASARDA ALVYHK

[1428] LHQLHTMGKHTGGHLTATNLALSALNLAECAGDAVSVATLAEIYVAAALRVKTSLPRALHFLTRFFLSS ARQACL

[1429] AQSGSVPPAMQWLCHPVGHRFFVDGDWSVLSTPWESLYSLAGNPVDPLAQVTQLFREHLLERALNCVTQ PNPSPG

[1430] SADGDKEFSDALGYLQLLNSCSDAAGAPAYSFSISSSMATTTGVDPVAKWWASLTAVVIHWLRRDEEAA ERLCPL

[1431] VEHLPRVLQESERPLPRAALHSFKAARALLGCAKAESGPASLTICEKASGYLQDSLATTPASSSIDKAV

QLFLCD

[1432] LLLVVRTSLWRQQQPPAPAPAAQGTSSRPQASALELRGFQRDLSSLRRLAQSFRPAMRRVFLHEATARL MAGASP

[1433] TRTHQLLDRSLRRRAGPGGKGGAVAELEPRPTRREHAEALLLASCYLPPGFLSAPGQRVGMLAEAARTL EKLGDR

[1434] RLLHDCQQMLMRLGGGTTVTSS

[1435] 人SREBP1 cDNA(SEQ ID NO:68)

[1436] atggacgagccacccttcagcgaggcggctttggagcaggcgctgggcga

[1437] gccgtgcgatctggacgcggcgctgctgaccgacatcgaagacatgcttc

[1438] agcttatcaacaaccaagacagtgacttccctggcctatttgacccaccc

[1439] tatgctgggagtggggcaggggcacagaccctgccagccccgataccag

[1440] ctccccaggcagcttgtctccacctcctgccacattgagctcctctcttg

[1441] aagccttcctgagcgggccgcaggcagcgccctcacccctgtcccctccc

[1442] cagcctgcacccactccattgaagatgtacccgtccatgcccgctttctc

[1443] ccctgggcctggtatcaaggaagagtcagtgccactgagcatcctgcaga

[1444] cccccaccccacagcccctgccaggggccctcctgccacagagcttccca

[1445] gccccagccccaccgcagttcagctccacccctgtgttaggctaccccag

[1446] ccctccgggaggcttctctacaggaagccctcccgggaacacccagcagc

[1447] cgctgcctggcctgccactggcttccccgccaggggtcccgcccgtctcc

[1448] ttgcacacccaggtccagagtgtggtccccccagcagctactgacagtcac

[1449] agctgcccccacggcagcccctgtaacgaccactgtgacctcgcagatcc

[1450] agcaggtcccggtcctgctgcagccccacttcatcaaggcagactcgctg

[1451] cttctgacagccatgaagacagacggagccactgtgaaggcggcaggtct

[1452] cagtcccctggtctctggcaccactgtgcagacagggcctttgccgaccc

[1453] tggtgagtggcggaaccatcttggcaacagtcccactggtcgtagatgcg

[1454] gagaagctgcctatcaaccggctcgcagctggcagcaaggccccggcctc

[1455] tgcccagagccgtggagagaagcgcacagcccacaacgccattgagaagc

[1456] gctaccgctcctccatcaatgacaaaatcattgagctcaaggatctggtg

[1457] gtgggcactgaggcaaagctgaataaatctgctgtcttgcgcaaggccat

[1458] cgactacattcgctttctgcaacacagcaaccagaaactcaagcaggaga

[1459] acctaagtctgcgcactgctgtccacaaaagcaaatctctgaaggatctg

[1460] gtgtcggcctgtggcagtggagggaacacagacgtgctcatggagggcgt

[1461] gaagactgaggtggaggacacactgaccccacccccctcggatgctggct

[1462] caccttccagagcagccccttgtcccttggcagcaggggcagtggcagc

[1463] ggtggcagtggcagtgactcggagcctgacagcccagtctttgaggacag

[1464] caaggcaaagccagagcagcggccgtctctgcacagccggggcatgctgg

[1465] accgctcccgcctggccctgtgcacgctcgtcttcctctgcctgtcctgc

[1466] aacccctggcctccttgctgggggcccgggggcttcccagcccctcaga

[1467] taccaccagcgtctaccatagccctgggcgcaacgtgctgggcaccgaga

[1468] gcagagatggccctggctgggcccagtggctgctgcccccagtggtctgg

[1469] ctgctcaatgggctgttggtgctcgtctccttggtgcttctctttgtcta

[1470] cggtgagccagtcacacggccccactcaggccccgccgtgtacttctgga

[1471] ggcatcgcaagcaggctgacctggacctggcccggggagactttgcccag

[1472] gctgcccagcagctgtggctggccctgcgggcactgggccggcccctgcc

[1473] cacctcccacctggacctggcttgtagcctcctctggaacctcatccgtc

[1474] acctgctgcagcgtctctgggtgggccgctggctggcaggccgggcaggg

[1475] ggcctgcagcaggactgtgctctgcgagtggatgctagcgccagcgcccg

[1476] agacgcagccctggtctaccataagctgcaccagctgcacaccatgggga

[1477] agcacacaggcgggcacctcactgccaccaacctggcgctgagtgccctg

[1478] aacctggcagagtgtgcaggggatgccgtgtctgtggcgacgctggccga

[1479] gatctatgtggcggctgcattgagagtgaagaccagtctcccacgggcct

[1480] tgcattttctgacacgcttcttcctgagcagtgcccgccaggcctgcctg

[1481] gcacagagtggctcagtgcctcctgccatgcagtggctctgccaccccgt

[1482] gggccaccgtttcttcgtggatggggactggtccgtgctcagtaccccat

[1483] gggagagcctgtacagcttggccgggaacccagtggacccccctggcccag

[1484] gtgactcagctattccgggaacatctcttagagcgagcactgaactgtgt

[1485] gacccagcccaaccccagccctgggtcagctgatggggacaaggaattct

[1486] cggatgccctcgggtacctgcagctgctgaacagctgttctgatgctgcg

[1487] ggggctcctgcctacagcttctccatcagttccagcatggccaccaccac

[1488] cggcgtagacccggtggccaagtggtgggcctctctgacagctgtggtga

[1489] tccactggctgcggcgggatgaggaggcggctgagcggctgtgcccgctg

[1490] gtggagcacctgccccgggtgctgcaggagtctgagagacccctgcccag

[1491] ggcagctctgcactccttcaaggctgcccgggccctgctgggctgtgcca

[1492] aggcagagtctggtccagccagcctgaccatctgtgagaaggccagtggg

[1493] tacctgcaggacagcctggctaccacaccagccagcagctccattgacaa

[1494] ggccgtgcagctgttcctgtgtgacctgcttcttgtggtgcgcaccagcc

[1495] tgtggcggcagcagcagccccggccccggccccagcagcccagggcacc

[1496] agcagcaggccccaggcttccgcccttgagctgcgtggcttccaacggga

[1497] cctgagcagcctgaggcggctggcacagagcttccggcccgccatgcgga

[1498] gggtgttcctacatgaggccacggcccggctgatggcgggggccagcccc

[1499] acacggacacaccagctcctcgaccgcagtctgaggcggcgggcaggccc

[1500] cggtggcaaaggaggcgcggtggcggagctggagccgcggcccacgcggc

[1501] gggagcacgcggaggccttgctgctggcctcctgctacctgccccccggc

[1502] ttcctgtcggcgcccgggcagcgcgtgggcatgctggctgaggcggcgcg

[1503] cacactcgagaagcttggcgatcgccggctgctgcacgactgtcagcaga

[1504] tgctcatgcgcctgggcggtgggaccactgtcacttccagctag

[1505] 能够用于测定IFN-γ表达水平的商业ELISA分析的非限制性实例获自安迪生物科技公司、赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific)、艾博抗、恩佐生命科学公司(Enzo

Life Sciences)和瑞博奥生物科技公司(RayBiotech)。成熟的人IFN-γ蛋白质和cDNA序列如下所示。

[1506] 成熟的人IFN-γ(SEQ ID NO:69)

[1507] qdpyvke aenlkkyfna ghsdvadngt lflgilknwk eesdrkimqs qivsfyfklf knfkddqsiq

[1508] ksvetikedm nvkffnsnkk krddfekltn ysvtdlnvqr kaiheliqvm aelspaaktg krkrsqmlfr

[1509] g

[1510] 人IFN-γcDNA(SEQ ID NO:70)

[1511] caggac ccatatgtaa aagaagcaga aaaccttaag aaatatttta atgcaggtca ttcagatgta

[1512] gcggataatg gaactctttt cttaggcatt ttgaagaatt ggaaagagga gagtgacaga aaaataatgc

[1513] agagccaaat tgtctccttt tacttcaaac tttttaaaaa ctttaaagat gaccagagca tccaaaagag

[1514] tgtggagacc atcaaggaag acatgaatgt caagtttttc aatagcaaca aaaagaaacg agatgacttc

[1515] gaaaagctga ctaattattc ggtaactgac ttgaatgtcc aacgcaaagc aatacatgaa ctcatccaag

[1516] tgatggctga actgtcgcca gcagctaaaa cagggaagcg aaaaaggagt cagatgctgt ttcgaggt

[1517] 能够用于测定颗粒酶B表达水平的商业ELISA分析的非限制性实例获自瑞博奥生物科技公司、赛默飞世尔科技和安迪生物科技公司。成熟的人颗粒酶B蛋白质和cDNA序列如下所示。

[1518] 成熟的人颗粒酶B(SEQ ID NO:71)

[1519] iiggheakph srpymaylmi wdqkslkrcg gflirddfvl taahcwgssi nvtlgahnik eqeptqqfip

[1520] vkrpiphpay npknfsndim llqlerkakr travqplrlp snkaqvkpgq tcsvagwgqt aplgkhshtl

[1521] qevkmtvqed rkcesdlrhy ydstielcvg dpeikktsfk gdsggplvcn kvaqgivsyg rnngmpprac

[1522] tkvssfvhwi kktmkry

[1523] 人颗粒酶B cDNA(SEQ ID NO:72)

[1524] atcatcgggg gacatgaggc caagccccac tcccgcccct acatggctta tcttatgatc tgggatcaga

[1525] agtctctgaa gaggtgcggt ggcttcctga tacgagacga cttcgtgctg acagctgctc actgttgggg

[1526] aagctccata aatgtcacct tgggggccca caatatcaaa gaacaggagc cgacccagca gtttatccct

[1527] gtgaaaagac ccatccccca tccagcctat aatcctaaga acttctccaa cgacatcatg ctactgcagc

[1528] tggagagaaa ggccaagcgg accagagctg tgcagcccct caggctacct agcaacaagg cccaggtgaa

[1529] gccagggcag acatgcagtg tggccggctg ggggcagacg gccccctgg gaaaacactc acacacacta

[1530] caagaggtga agatgacagt gcaggaagat cgaaagtgcg aatctgactt acgccattat tacgacagta

[1531] ccattgagtt gtgcgtgggg gacccagaga ttaaaaagac ttcctttaag ggggactctg gaggccctct

[1532] tgtgtgtaac aaggtggccc agggcattgt ctcctatgga cgaaacaatg gcatgcctcc acgagcctgc

[1533] accaaagtct caagctttgt acactggata aagaaaacca tgaaacgcta c

[1534] 能够用于测定MYC表达水平的商业ELISA分析的非限制性实例获自英杰公司(Invitrogen)、LSBio、Biocodon Technologies和Elisa Genie。成熟的人MYC蛋白质和cDNA序列如下所示。

[1535] 人Myc蛋白(SEQ ID NO:329)

[1536] mdffrvvenq qppatmplnv sftnrnydld ydsvqpyfyc deeenfyqqq qqselqppap sediwkkfel

[1537] lptpplspsr rsglcspsyv avtpfslrgd ndggggsfst adqlemvtel lggdmvnqsf icdpddetfi

[1538] kniiiqdcmw sgfsaaaklv seklasyqaa rkdsgspnpa rghsvcstss lylqdlsaaa secidpsvvf

[1539] pyplndsssp kscasqdssa fspssdslls stesspqgsp eplvlheetp pttssdseee qedeeeidvv

[1540] svekrqapgk rsesgspsag ghskpphspl vlkrchvsth qhnyaappst rkdypaakrv kldsvrvlrq

[1541] isnnrkctsp rssdteenvk rrthnvlerq rrnelkrsff alrdqipele nnekapkvvi lkkatayils

[1542] vqaeeqklis eedllrkrre qlkhkleqlr nsca

[1543] 人Myc cDNA(SEQ ID NO:330)

[1544] ctggatt tttttcgggt agtggaaaac cagcagcctc ccgcgacgat gcccctcaac gttagcttca

[1545] ccaacaggaa ctatgacctc gactacgact cggtgcagcc gtatttctac tgcgacgagg aggagaactt

[1546] ctaccagcag cagcagcaga gcgagctgca gcccccggcg cccagcgagg atatctggaa gaaattcgag

[1547] ctgctgccca ccccgcccct gtcccctagc cgccgctccg ggctctgctc gccctcctac gttgcggtca

[1548] caccttctc ccttcgggga gacaacgacg gcggtggcgg gagcttctcc acggccgacc agctggagat

[1549] ggtgaccgag ctgctgggag gagacatggt gaaccagagt ttcatctgcg acccggacga cgagaccttc

[1550] atcaaaaaca tcatcatcca ggactgtatg tggagcggct tctcggccgc cgccaagctc gtctcagaga

[1551] agctggcctc ctaccaggct gcgcgcaaag acagcggcag cccgaacccc gcccgcggcc acagcgtctg

[1552] ctccacctcc agcttgtacc tgcaggatct gagcgccgcc gcctcagagt gcatcgaccc ctcggtggtc

[1553] ttcccctacc ctctcaacga cagcagctcg cccaagtcct gcgcctcgca agactccagc gccttctctc

[1554] cgtcctcgga ttctctgctc tcctcgacgg agtcctcccc gcagggcagc cccgagcccc tggtgctcca

[1555] tgaggagaca ccgcccacca ccagcagcga ctctgaggag gaacaagaag atgaggaaga aatcgatgtt

[1556] gtttctgtgg aaaagaggca ggctcctggc aaaaggtcag agtctggatc accttctgct ggaggccaca

[1557] gcaaacctcc tcacagccca ctggtcctca agaggtgcca cgtctccaca catcagcaca actacgcagc

[1558] gcctccctcc actcggaagg actatcctgc tgccaagagg gtcaagttgg acagtgtcag agtcctgaga

[1559] cagatcagca acaaccgaaa atgcaccagc cccaggtcct cggacaccga ggagaatgtc aagaggcgaa

[1560] cacacaacgt cttggagcgc cagaggagga acgagctaaa acggagcttt tttgccctgc gtgaccagat

[1561] cccggagttg gaaaacaatg aaaaggcccc caaggtagtt atccttaaaa aagccacagc atacatcctg

[1562] tccgtccaag cagaggagca aaagctcatt tctgaagagg acttgttgcg gaaacgacga gaacagttga

[1563] aacacaaact tgaacagcta cggaactctt gtgcgtaa

[1564] 在一些实施例中,活化NK细胞(例如人活化NK细胞)在受试者(例如本文所述的任一受试者)中或在试管内杀死衰老细胞(例如本文所述的任一种衰老细胞)的能力相较于休眠NK细胞(例如人休眠NK细胞)可以是增加的(例如,至少增加10%,至少增加20%,至少增加30%,至少增加40%,至少增加50%,至少增加60%,至少增加70%,至少增加80%,至少增加90%,至少增加100%至少增加120%,至少增加140%,至少增加160%,至少增加180%,至少增加200%,至少增加220%,至少增加240%至少增加260%,至少增加280%,或至少增加300%)。

[1565] 在一些实施例中,活化NK细胞(例如人活化NK细胞)在受试者(例如本文所述的任

一受试者)中或在体内杀死衰老细胞(例如本文所述的任一种衰老细胞)的能力相较于休眠NK细胞(例如人休眠NK细胞)可以增加大约10％到约增加500％(或本文所述的此范围的任一子范围)。

[1566] 在一些实施例中,活化NK细胞(例如人活化NK细胞)在接触式细胞毒性分析中,在特异性结合到存在于衰老细胞或靶细胞上的抗原的抗体存在下可以显示出增加(例如,至少增加10％,至少增加20％,至少增加30％,至少增加40％,至少增加50％,至少增加60％,至少增加70％,至少增加80％,至少增加90％,至少增加100％至少增加120％,至少增加140％,至少增加160％,至少增加180％,至少增加200％,至少增加220％,至少增加240％至少增加260％,至少增加280％,或至少增加300％)的细胞毒性活性,例如相较于休眠NK细胞(例如人休眠NK细胞)。

[1567] 在一些实施例中,活化NK细胞(例如人活化NK细胞)在接触式细胞毒性分析中,在特异性结合到存在于衰老细胞或靶细胞上的抗原的抗体存在下可以显示出增加(例如增加大约10％至增加大约500％,或本文所述的此范围的任一子范围)的细胞毒性活性,例如相较于休眠NK细胞(例如人休眠NK细胞)。

[1568] 在一些实施例中,活化NK细胞可以通过包括以下的方法产生:获得休眠NK细胞;以及使所述休眠NK细胞在试管内在包括一种或多种NK细胞活化剂的液体培养基中接触,其中所述接触引起活化NK细胞产生,随后施用于受试者。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是获自受试者的自体NK细胞。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是获自受试者的自体NK细胞。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是单倍体休眠NK细胞。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是同种异体休眠NK细胞。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是人造NK细胞。在这些方法中的任一种的一些实例中,休眠NK细胞是携带嵌合抗原受体或重组T细胞受体的基因工程化NK细胞。

[1569] 在这些方法的一些实例中,液体培养基是无血清液体培养基。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,液体培养基是化学成分确定的液体培养基。这些方法的一些实例进一步包括分离出活化NK细胞(和任选地进一步将治疗有效量的活化NK细胞施用于受试者,例如本文所述的任一受试者)。

[1570] 在这些方法的一些实施例中,接触步骤进行约2小时至约20天的时段(例如约2小时至约18天,约2小时至约16天,约2小时至约14天,约2小时至约12天,约2小时至约10天,约2小时至约8天,约2小时至约7天,约2小时至约6天,约2小时至约5天,约2小时至约4天,约2小时至约3天,约2小时至约2天,约2小时至约1天,约6小时至约18天,约6小时至约16天,约6小时至约14天,约6小时至约12天,约6小时至约10天,约6小时至约8天,约6小时至约7天,约6小时至约6天,约6小时至约5天,约6小时至约4天,约6小时至约3天,约6小时至约2天,约6小时至约1天,约12小时至约18天,约12小时至约16天,约12小时至约14天,约12小时至约12天,约12小时至约10天,约12小时至约8天,约12小时至约7天,约12小时至约6天,约12小时至约5天,约12小时至约4天,约12小时至约3天,约12小时至约2天,约12小时至约1天,约1天至约18天,约1天至约16天,约1天至约15天,约1天至约14天,约1天至约12天,约1天至约10天,约1天至约8天,约1天至约7天,约1天至约6天,约1天至约5天,约1天至约4天,约1天至约3天,约1天至约2天,约2天至约18天,约2天至约16天,约2天至约14天,约2天至约12天,约2天至约10天,约2天至约8天,约2天至约7天,约2天至约6天,约2天至约5天,约2天至约4天,

约2天至约3天,约3天至约18天,约3天至约16天,约3天至约14天,约3天至约12天,约3天至约10天,约3天至约8天,约3天至约7天,约3天至约6天,约3天至约5天,约3天至约4天,约4天至约18天,约4天至约16天,约4天至约14天,约4天至约12天,约4天至约10天,约4天至约8天,约4天至约7天,约4天至约6天,约4天至约5天,约5天至约18天,约5天至约16天,约5天至约14天,约5天至约12天,约5天至约10天,约5天至约8天,约5天至约7天,约5天至约6天,约6天至约18天,约6天至约16天,约6天至约14天,约6天至约12天,约6天至约10天,约6天至约8天,约6天至约7天,约7天至约18天,约7天至约16天,约7天至约14天,约7天至约12天,约7天至约10天,约7天至约8天,约8天至约18天,约8天至约16天,约8天至约14天,约8天至约12天,约8天至约10天,约9天至约18天,约9天至约16天,约9天至约14天,约9天至约12天,约12天至约18天,约12天至约16天,约12天至约14天,约14天至约18天,约14天至约16天,或约16天至约18天,

[1571] NK细胞活化剂

[1572] 本文提供的方法包括使用或施用一种或多种NK细胞活化剂。在一些实施例中,NK细胞活化剂可以是蛋白质。在一些实施例中,NK细胞活化剂可以是单链嵌合多肽(例如本文所述的任一种单链嵌合多肽)、多链嵌合多肽(例如本文所述的任一种多链嵌合多肽,例如本文所述的示例性A型和B型多链嵌合多肽)、抗体、重组细胞因子或白介素(例如本文所述的任一种重组细胞因子或白介素),以及可溶性白介素或细胞因子受体(例如本文所述的任一种可溶性白介素或细胞因子受体)。在一些实施例中,NK细胞活化剂可以是小分子(例如肝糖合成酶激酶-3(GSK3)抑制剂,例如Cichocki等人,《癌症研究(CancerRes.)》77:5664-5675,2017中所述的CHIR99021)或适体。

[1573] 在本文提供的一种或多种NK细胞活化剂中的任一种的一些实施例中,相较于在不存在一种或多种NK细胞活化剂的情况下的活化水平,一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种引起以下中的一种或多种(例如二、三、四、五、六、七或八种)活化:IL-2的受体、IL-7的受体、IL-12的受体、IL-15的受体、IL-18的受体、IL-21的受体、IL-33的受体、CD16、CD69、CD25、CD59、CD352、NKp80、DNAM-1、2B4、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D、KIR2DS1、KIR2Ds2/3、KIR2DL4、KIR2DS4、KIR2DS5和KIR3DS1(例如在免疫细胞中,例如人免疫细胞,例如人NK细胞)。

[1574] 在一些实施例中,引起IL-2受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-2受体的可溶性IL-2或激动性抗体。

[1575] 在一些实施例中,引起IL-7受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-7受体的可溶性IL-7或激动性抗体。

[1576] 在一些实施例中,引起IL-12受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-2受体的可溶性IL-2或激动性抗体。

[1577] 在一些实施例中,引起IL-15受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-15受体的可溶性IL-15或激动性抗体。

[1578] 在一些实施例中,引起IL-21受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-21受体的可溶性IL-21或激动性抗体。

[1579] 在一些实施例中,引起IL-33受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-33受体的可溶性IL-33或激动性抗体。

[1580] 在一些实施例中,引起CD16活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到CD16的激动性抗体。

[1581] 在一些实施例中,引起CD69活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到CD69的激动性抗体。

[1582] 在一些实施例中,引起CD25、CD59活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到CD25、CD59的激动性抗体。

[1583] 在一些实施例中,引起CD352活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到CD352的激动性抗体。

[1584] 在一些实施例中,引起NKp80活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKp80的激动性抗体。

[1585] 在一些实施例中,引起DNAM-1活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到DNAM-1的激动性抗体。

[1586] 在一些实施例中,引起2B4活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到2B4的激动性抗体。

[1587] 在一些实施例中,引起NKp30活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKp30的激动性抗体。

[1588] 在一些实施例中,引起NKp44活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKp44的激动性抗体。

[1589] 在一些实施例中,引起NKp46活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKp46的激动性抗体。

[1590] 在一些实施例中,引起NKG2D活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKG2D的激动性抗体。

[1591] 在一些实施例中,引起KIR2DS1活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIT2DS1的激动性抗体。

[1592] 在一些实施例中,引起KIR2DS2/3活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIT2DS2/3的激动性抗体。

[1593] 在一些实施例中,引起KIR2DL4活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIT2DL4的激动性抗体。

[1594] 在一些实施例中,引起KIR2DS4活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIT2DS4的激动性抗体。

[1595] 在一些实施例中,引起KIR2DS5活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIT2DS5的激动性抗体。

[1596] 在一些实施例中,引起KIR3DS1活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIT3DS1的激动性抗体。

[1597] 在本文提供的一种或多种NK细胞活化剂中的任一种的一些实施例中,相较于在一种或多种NK细胞活化剂不存在的情况下的活化水平,一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种(例如两种、三种、四种或五种)引起以下中的一种或多种的活化减少:PD-1、TGF-β受体、TIGIT、CD1、TIM-3、Siglec-7、IRP60、Tactile、IL1R8、NKG2A/KLRD1、KIR2DL1、KIR2DL2/3、KIR2DL5、KIR3DL1、KIR3DL2、ILT2/LIR-1,和LAG-2(例如在免疫细胞中,例如人免疫细胞,例

如人NK细胞)。

[1598] 在一些实施例中,引起TGF-β受体活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是可溶性TGF-β受体、特异性结合到TGF-β的抗体,或特异性结合到TGF-β受体的拮抗性抗体。

[1599] 在一些实施例中,引起TIGIT活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到TIGIT的拮抗性抗体、可溶性TIGIT,或特异性结合到TIGIT配体的抗体。

[1600] 在一些实施例中,引起CD1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到CD1的拮抗性抗体、可溶性CD1,或特异性结合到CD1配体的抗体。

[1601] 在一些实施例中,引起TIM-3活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到TIM-3的拮抗性抗体、可溶性TIM-3,或特异性结合到TIM-3配体的抗体。

[1602] 在一些实施例中,引起Siglec-7活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到Siglec-7的拮抗性抗体、可溶性Siglec-7,或特异性结合到Siglec-7配体的抗体。

[1603] 在一些实施例中,引起IRP-60活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IRP-60的拮抗性抗体、可溶性IRP-60,或特异性结合到IRP-60配体的抗体。

[1604] 在一些实施例中,引起Tactile活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到Tactile的拮抗性抗体、可溶性Tactile,或特异性结合到Tactile配体的抗体。

[1605] 在一些实施例中,引起IL1R8活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL1R8的拮抗性抗体、可溶性IL1R8,或特异性结合到IL1R8配体的抗体。

[1606] 在一些实施例中,引起NKG2A/KLRD1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKG2A/KLRD1的拮抗性抗体、可溶性NKG2A/KLRD1,或特异性结合到NKG2A/KLRD1配体的抗体。

[1607] 在一些实施例中,引起KIR2DL1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DL1的拮抗性抗体、可溶性KIR2DL1,或特异性结合到KIR2DL1配体的抗体。

[1608] 在一些实施例中,引起KIR2DL2/3活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DL2/3的拮抗性抗体、可溶性KIR2DL2/3,或特异性结合到KIR2DL2/3配体的抗体。

[1609] 在一些实施例中,引起KIR2DL5活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DL5的拮抗性抗体、可溶性KIR2DL5,或特异性结合到KIR2DL5配体的抗体。

[1610] 在一些实施例中,引起KIR3DL1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR3DL1的拮抗性抗体、可溶性KIR3DL1,或特异性结合到KIR3DL1配体的抗体。

[1611] 在一些实施例中,引起KIR3DL2活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR3DL2的拮抗性抗体、可溶性KIR3DL2,或特异性结合到KIR3DL2配体的抗体。

[1612] 在一些实施例中,引起ILT2/LIR-1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少

一种是特异性结合到ILT2/LIR-1的拮抗性抗体、可溶性ILT2/LIR-1,或特异性结合到ILT2/LIR-1配体的抗体。

[1613] 在一些实施例中,引起LAG2活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到LAG2的拮抗性抗体、可溶性LAG2,或特异性结合到LAG2配体的抗体。

[1614] NK细胞活化剂的非限制性实例在下文描述并且可以以任何组合使用。

[1615] 在一些实例中,NK细胞活化剂可以是可溶性PD-1、可溶性PD-L1、可溶性TIGIT、可溶性CD1,或可溶性TIM-3。下面提供了可溶性PD-1、PD-L1、TIGIT、CD1和TIM-3的非限制性实例。

[1616] 人可溶性PD-1(SEQ ID NO:73)

[1617] pgwfldspdr pwnpptfspa llvvtegdna tftcsfsnts esfvlnwyrm

[1618] spsnqtdkla afpedrsqpg qdcrfrvtql pngrdfhmsv vrarrndsgt

[1619] ylcgaislap kaqikeslra elrvterrae vptahpspsp rpagqfqtlv

[1620] vgvvggllgs lvllvwvlav icsraargti garrtgqplk edpsavpvfs

[1621] vdygeldfqw rektpeppvp cvpeqteyat ivfpsgmgts sparrgsadg

[1622] prsaqplrpe dghcswpl

[1623] 人可溶性PD-L1(SEQ ID NO:74)

[1624] ftvtvpkdlyvv eygsnmtiec kfpvekqldl aalivyweme dkniiqfvhg

[1625] eedlkvqhss yrqrarllkd qlslgnaalq itdvklqdag vyrcmisygg

[1626] adykritvkv napynkinqr ilvvdpvtse heltcqaegy pkaeviwtss

[1627] dhqvlsgktt ttnskreekl fnvtstlrin tttneifyct frrldpeenh

[1628] taelvipelp lahppnerth lvilgaillc lgvaltfifr lrkgrmmdvk

[1629] kcgiqdtnsk kqsdthleet

[1630] 人可溶性TIGIT(SEQ ID NO:75)

[1631] mmtgtiett gnisaekggs iilqchlsst taqvtqvnwe qqdqllaicn

[1632] adlgwhisps fkdrvapgpg lgltlqsltv ndtgeyfciy htypdgtytg

[1633] riflevless vaehgarfqi pllgamaatl vvictavivv valtrkkkal

[1634] rihsvegdlr rksagqeews psapsppgsc vqaeaapagl cgeqrgedca

[1635] elhdyfnvls yrslgncsff tetg

[1636] 人可溶性CD1A(SEQ ID NO:76)

[1637] nadglkeplsfhvt wiasfynhsw kqnlvsgwls dlqthtwdsn sstivflcpw

[1638] srgnfsneew keletlfrir tirsfegirr yahelqfeyp feiqvtggce

[1639] lhsgkvsgsf lqlayqgsdf vsfqnnswlp ypvagnmakh fckvlnqnqh

[1640] endithnlls dtcprfilgl ldagkahlqr qvkpeawlsh gpspgpghlq

[1641] lvchvsgfyp kpvwvmwmrg eqeqqgtqrg dilpsadgtw ylratlevaa

[1642] geaadlscrv khsslegqdi vlywehhssv gfiilavivp lllliglalw frkrcfc

[1643] 人可溶性TIM3(SEQ ID NO:77)

[1644] seveyraev gqnaylpcfy tpaapgnlvp vcwgkgacpv fecgnvvlrt derdvnywts

[1645] rywlngdfrk gdvsltienv tladsgiycc riqipgimnd ekfnlklvik

[1646] pakvtpaptr qrdftaafpr mlttrghgpa etqtlgslpd inltqistla

[1647] nelrdsrlan dlrdsgatir igiyigagic aglalalifg alifkwyshs

[1648] kekiqnlsli slanlppsgl anavaegirs eeniytieen vyeveepney

[1649] ycyvssrqqp sqplgcrfam

[1650] 在一些实施例中,可溶性PD-1蛋白可以包括与SEQ ID NO:73至少80%一致、至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致的序列。

[1651] 在一些实施例中,可溶性PD-L1蛋白可以包括与SEQ ID NO:74至少80%一致、至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致的序列。

[1652] 在一些实施例中,可溶性TIGIT蛋白可以包括与SEQ ID NO:75至少80%一致、至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致的序列。

[1653] 在一些实施例中,可溶性CD1A蛋白可以包括与SEQ ID NO:76至少80%一致、至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致的序列。

[1654] 在一些实施例中,可溶性TIM3蛋白可以包括与SEQ ID NO:77至少80%一致、至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致的序列。

[1655] 重组抗体

[1656] 在一些实例中,NK活化剂可以是:特异性结合到IL-2受体的激动性抗体(参见例如Gaulton等人,《临床免疫学和免疫病理学(Clinical Immunology and Immunopathology)》36(1):18-29,1985)、特异性结合到IL-7受体的激动性抗体、特异性结合到IL-12受体的激动性抗体(参见例如Rogge等人,《免疫学杂志(J.Immunol.)》162(7):3926-3932,1999中所述的那些)、特异性结合到IL-15受体的激动性抗体、特异性结合到IL-21受体的激动性抗体(参见例如美国专利申请公开第2006/159655号中所述的那些)、特异性结合到IL-33受体的激动性抗体(参见例如美国专利申请公开第2007/160579号中所述的那些)、特异性结合到PD-1的拮抗性抗体(参见例如美国专利第7,521,051号中所述的那些)、特异性结合到PD-L1的抗体(参见例如美国专利第8,217,149号中所述的那些)、特异性结合到TGF-β的抗体、特异性结合到TGF-β受体的拮抗性抗体(参见例如欧洲专利申请公开第1245676A1号中所述的那些)、特异性结合到TIGIT的拮抗性抗体(参见例如WO 2017/053748中所述的那些)、特异性结合到TIGIT配体的抗体(参见例如WO 2011/127324中所述的那些)、特异性结合到CD1的拮抗性抗体(参见例如Szalay等人,《免疫学杂志》162(12):6955-6958,1999中所述的那些)、特异性结合到CD1配体的抗体(参见例如Kain等人,《免疫(Immunity)》41(4):543-554,2014中所述的那些)、特异性结合到TIM-3的拮抗性抗体(参见例如美国专利申请公开第2015/218274号中所述的那些)、特异性结合到TIM-3配体的抗体(参见例如美国专利申请公开第2017/283499号中所述的那些)、特异性结合到CD69的激动性抗体(参见例如Moretta等人,《实验医药杂志(Journal ofExperimental Medicine)》174:1393,1991)、特异性结合到CD25、CD59的激动性抗体、特异性结合到CD352的激动性抗体(参见例如Yigit等人,《肿瘤靶标(Oncotarget)》7:26346-26360,2016中所述的那些)、特异性结合到NKp80的激动性抗体

(参见例如Peipp等人,《肿瘤靶标》6:32075-32088,2015中所述的那些)、特异性结合到DNAM-1的激动性抗体、特异性结合到2B4的激动性抗体(参见例如Sandusky等人,《欧洲免疫学杂志(EuropeanJ.Immunol.)》36:3268-3276,2006中中所述的那些)、特异性结合到NKp30的激动性抗体(参见例如Kellner等人,《肿瘤免疫学(OncoImmunology)》5:1-12,2016中所述的那些)、特异性结合到NKp44的激动性抗体、特异性结合到NKp46的激动性抗体(参见例如Xiong等人,《临床研究杂志(J.Clin.Invest.)》123:4264-4272,2013中所述的那些)、特异性结合到NKG2D的激动性抗体(参见例如Kellner等人,《肿瘤免疫学(OncoImmunology)》5:1-12,2016中所述的那些)、特异性结合到KIR2DS1的激动性抗体(参见例如Xiong等人,《临床研究杂志(J.Clin.Invest.)》123:4264-4272,2013中所述的那些)、特异性结合到KIR2Ds2/3的激动性抗体(参见例如Borgerding等人,《实验血液学(Exp.Hematology)》38:213-221,2010中所述的那些)、特异性结合到KIR2DL4的激动性抗体(参见例如Miah等人,《免疫学杂志(J.Immunol.)》180:2922-32,2008中所述的那些)、特异性结合到KIR2DS4的激动性抗体(参见例如Czaja等人,《基因和免疫(Genes andImmunity)》15:33-37,2014中所述的那些)、特异性结合到KIR2DS5的激动性抗体(参见例如Czaja等人,《基因和免疫》15:33-37,2014中所述的那些)、特异性结合到KIR3DS1的激动性抗体(参见例如Czaja等人,《基因和免疫》15:33-37,2014中所述的那些)、特异性结合到Siglec-7的拮抗性抗体(参见例如Hudak等人,《自然化学生物学(Nature ChemicalBiology)》10:69-75,2014中所述的那些)、特异性结合到IRP60的拮抗性抗体(参见例如Bachelet等人,《生物化学杂志》281:27190-27196,2006中所述的那些)、特异性结合到Tactile的拮抗性抗体(参见例如Brooks等人,《欧洲癌症杂志(Eur.J.Cancer)》61(增刊1):S189,2016中所述的那些)、特异性结合到IL1R8的拮抗性抗体(参见例如Molgora等人,《免疫学前沿(Frontiers Immunol.)》7:1,2016中所述的那些)、特异性结合到NKG2A/KLRD1的拮抗性抗体(参见例如Kim等人,《感染免疫(InfectionImmunity)》76:5873-5882,2008中所述的那些)、特异性结合到KIR2DL1的拮抗性抗体(参见例如Weiner等人,《细胞(Cell)》148:1081-1084,2012中所述的那些)、特异性结合到KIR2DL2/3的拮抗性抗体(参见例如Weiner等人,《细胞》148:1081-1084,2012中所述的那些)、特异性结合到KIR2DL5的拮抗性抗体(参见例如US 9,067,997中所述的那些),以及特异性地结合KIR3DL1的拮抗性抗体(参见例如US 9,067,997中所述的那些)、特异性结合到KIR3DL2的拮抗性抗体(参见例如US 9,067,997中所述的那些)、特异性结合到ILT2/LIR-1的拮抗性抗体(参见例如US 8,133,485中所述的那些),以及特异性结合到LAG-2的拮抗性抗体。

[1657] 作为NK细胞活化剂的重组抗体可以是任一种示例性类型的抗体(例如人抗体或人源化抗体)或本文所述的任一种示例性抗体片段。作为NK细胞活化剂的重组抗体可以包括例如本文所述的任一种抗原结合域。

[1658] 重组白介素或细胞因子

[1659] 在一些实例中,NK活化剂可以是例如可溶性IL-2、可溶性IL-7、可溶性IL-12、可溶性IL-15、可溶性IL-21和可溶性IL-33。可溶性IL-12、IL-15、IL-21和IL-33的非限制性实例在下文提供。

[1660] 人可溶性IL-2(SEQ ID NO:78)

[1661] aptssstkkt qlqlehlllld lqmilnginn yknpkltrml tfkfympkka telkhlqcle

eelkpleevl

[1662] nlaqsknfhl rprdlisnin vivlelkgse

[1663] ttfmceyade tativeflnr witfcqsiis tlt

[1664] 人可溶性IL-7(SEQ ID NO:79)

[1665] dcdiegkdgkqyesv lmvsidqlld smkeigsncl nnefnffkrh icdankegmf lfraarklrq

[1666] flkmnstgdf dlhllkvseg ttillnctgq vkgrkpaalg eaqptkslee nkslkeqkkl ndlcflkrll

[1667] qeiktcwnki lmgtkeh

[1668] 人可溶性IL-12亚单元α(SEQ ID NO:80)

[1669] rnlpvatp dpgmfpclhh sqnllravsn mlqkarqtle fypctseeid heditkdkts tveaclplel

[1670] tknesclnsr etsfitngsc lasrktsfmm alclssiyed lkmyqvefkt mnakllmdpk rqifldqnml

[1671] avidelmqal nfnsetvpqk ssleepdfyk tkiklcillh afriravtid rvmsylnas

[1672] 人可溶性IL-12亚单元β(SEQ ID NO:81)

[1673] iwelkkdv yvveldwypd apgemvvltc dtpeedgitw tldqssevlg sgktltiqvk efgdagqytc

[1674] hkggevlshs llllhkkedg iwstdilkdq kepknktflr ceaknysgrf tcwwlttist dltfsvkssr

[1675] gssdpqgvtc gaatlsaerv rgdnkeyeys vecqedsacp aaeeslpiev mvdavhklky enytssffir

[1676] diikpdppkn lqlkplknsr qvevsweypd twstphsyfs ltfcvqvqgk skrekkdrvf tdktsatvic

[1677] rknasisvra qdryysssws ewasvpcs

[1678] 人可溶性IL-15(SEQ ID NO:82)

[1679] Nwvnvisdlkki edliqsmhid atlytesdvh psckvtamkc fllelqvisl esgdasihdt

[1680] venliilann slssngnvte sgckeceele eknikeflqs fvhivqmfin ts

[1681] 人可溶性IL-21(SEQ ID NO:83)

[1682] qgqdrhmi rmrqlidivd qlknyvndlv peflpapedv etncewsafs cfqkaqlksa ntgnneriin

[1683] vsikklkrkp pstnagrrqk hrltcpscds yekkppkefl erfksllqkm ihqhlssrth gseds

[1684] 人可溶性IL-33(SEQ ID NO:84)

[1685] mkpkmkystn kistakwknt askalcfklg ksqqkakevc pmyfmklrsg

[1686] lmikkeacyf rrettkrpsl ktgrkhkrhl vlaacqqqst vecfafgisg

[1687] vqkytralhd ssitgispit eylaslstyn dqsitfaled esyeiyvedl

[1688] kkdekkdkvl lsyyesqhps nesgdgvdgk mlmvtlsptk dfwlhannke

[1689] hsvelhkcek plpdqaffvl hnmhsncvsf ecktdpgvfi gvkdnhlali

[1690] kvdssenlct enilfklset

[1691] 在一些实施例中,可溶性IL-2蛋白可以包括与SEQ ID NO:78至少80%一致、至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致的序列。

[1692] 在一些实施例中,可溶性IL-7蛋白可以包括与SEQ ID NO:79至少80%一致、至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致的序列。

[1693] 在一些实施例中,可溶性IL-2蛋白包括与SEQ ID NO:80至少80%一致、至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致的序列;以及与SEQ ID NO:81至少80%一致、至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致的序列。

[1694] 在一些实施例中,可溶性IL-15蛋白可以包括与SEQ ID NO:82至少80%一致、至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致的序列。

[1695] 在一些实施例中,可溶性IL-21蛋白可以包括与SEQ ID NO:83至少80%一致、至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致的序列。

[1696] 在一些实施例中,可溶性IL-33蛋白可以包括与SEQ ID NO:84至少80%一致、至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致的序列。

[1697] 可溶性细胞因子或白介素受体

[1698] 在本文所述的任一种可溶性细胞因子或白介素受体的一些实例中,可溶性细胞因子或白介素受体可以是可溶性TGF-β受体。在一些实例中,可溶性TGF-β受体是可溶性TGF-β受体I(TGF-βRI)(参见例如Docagne等人,《生物化学杂志(JournalofBiological Chemistry)》276(49):46243-46250,2001中所述的那些)、可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)(参见例如Yung等人,《美国呼吸与重症护理医学(Am.J.Resp.Crit.CareMed.)》194(9):1140-1151,2016中所述的那些)、可溶性TGF-βRIII(参见例如Heng等人,《胎盘(Placenta)》57:320,2017中所述的那些)。在一些实例中,可溶性TGF-β受体是TGF-β的受体“捕获器”(参见例如Zwaagstra等人,《分子癌症治疗学(Mol.CancerTher.)》11(7):1477-1487,2012中所述的那些;以及De Crescenzo等人,《癌症疗法中的转型生长因子-β(Transforming Growth Factor-βin Cancer Therapy)》第II卷,第671-684页中所述的那些)。

[1699] 可溶性细胞因子或可溶性白介素受体的其它实例在所属领域中已知。

[1700] 单链嵌合多肽

[1701] NK细胞活化剂的非限制性实例是单链嵌合多肽,其包括:(i)第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一个靶标结合域)、(ii)可溶性组织因子域(例如本文所述或所属领域中已知的任一个示例性可溶性组织因子域),以及(iii)第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一个靶标结合域)。

[1702] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实例中,单链嵌合多肽的总长度可以是约50个氨基酸至约3000个氨基酸,约50个氨基酸至约2500个氨基酸,约50个氨基酸至约2000个氨基酸,约50个氨基酸至约1500个氨基酸,约50个氨基酸至约1000个氨基酸,约50个氨基酸至约950个氨基酸,约50个氨基酸至约900个氨基酸,约50个氨基酸至约850个氨基酸,约50个氨基酸至约800个氨基酸,约50个氨基酸至约750个氨基酸,约50个氨基酸至约700个氨基酸,约50个氨基酸至约650个氨基酸,约50个氨基酸至约600个氨基酸,约50个氨基酸至约550个氨基酸,约50个氨基酸至约500个氨基酸,约50个氨基酸至约480个氨基酸,约50个氨基酸至约460个氨基酸,约50个氨基酸至约440个氨基酸,约50个氨基酸至约420个氨基酸,约50个氨基酸至约400个氨基酸,约50个氨基酸至约380个氨基酸,约50个氨基酸至约360个氨基酸,约50个氨基酸至约340个氨基酸,约50个氨基酸至约320个氨基酸,约50个氨基酸至约300个氨基酸,约50个氨基酸至约280个氨基酸,约50个氨基酸至约260个氨基酸,约50个氨基酸至约240个氨基酸,约50个氨基酸至约220个氨基酸,约50个氨基酸至约200个氨基酸,约50个氨基酸至约150个氨基酸,约50个氨基酸至约100个氨基酸,约100个氨基酸至约3000个氨基酸,约100个氨基酸至约2500个氨基酸,约100个氨基酸至约2000个氨基酸,约100个氨基酸至约1500个氨基酸,约100个氨基酸至约1000个氨基酸,约100个氨基酸至约950个氨基酸,约100个氨基酸至约900个氨基酸,约100个氨基酸至约850个氨基酸,约100个氨基酸至约800个氨基酸,约100个氨基酸至约750个氨基酸,约100个氨基酸至约700个氨基酸,约100个氨基酸至约650个氨基酸,约100个氨基酸至约600个氨基酸,约100个氨基酸至约550个氨基酸,约100个氨基酸至约500个氨基酸,约100个氨基酸至约480个氨基酸,约100个氨基酸至约460个氨基酸,约100个氨基酸至约440个氨基酸,约100个氨基酸至约420个氨基酸,约100个氨基酸至约400个氨基酸,约100个氨基酸至约380个氨基酸,约100个氨基酸至约360个氨基酸,约100个氨基酸至约340个氨基酸,约100个氨基酸至约320个氨基酸,约100个氨基酸至约300个氨基酸,约100个氨基酸至约280个氨基酸,约100个氨基酸至约260个氨基酸,约100个氨基酸至约240个氨基酸,约100个氨基酸至约220个氨基酸,约100个氨基酸至约200个氨基酸,约100个氨基酸至约150个氨基酸,约150个氨基酸至约3000个氨基酸,约150个氨基酸至约2500个氨基酸,约150个氨基酸至约2000个氨基酸,约150个氨基酸至约1500个氨基酸,约150个氨基酸至约1000个氨基酸,约150个氨基酸至约950个氨基酸,约150个氨基酸至约900个氨基酸,约150个氨基酸至约850个氨基酸,约150个氨基酸至约800个氨基酸,约150个氨基酸至约750个氨基酸,约150个氨基酸至约700个氨基酸,约150个氨基酸至约650个氨基酸,约150个氨基酸至约600个氨基酸,约150个氨基酸至约550个氨基酸,约150个氨基酸至约500个氨基酸,约150个氨基酸至约480个氨基酸,约150个氨基酸至约460个氨基酸,约150个氨基酸至约440个氨基酸,约150个氨基酸至约420个氨基酸,约150个氨基酸至约400个氨基酸,约150个氨基酸至约380个氨基酸,约150个氨基酸至约360个氨基酸,约150个氨基酸至约340个氨基酸,约150个氨基酸至约320个氨基酸,约150个氨基酸至约300个氨基酸,约150个氨基酸至约280个氨基酸,约150个氨基酸至约260个氨基酸,约150个氨基酸至约240个氨基酸,约150个氨基酸至约220个氨基酸,约150个氨基酸至约200个氨基酸,约200个氨基酸至约3000个氨基酸,约200个氨基酸至约2500个氨基酸,约200个氨基酸至约2000个氨基酸,约200个氨基酸至约1500个氨基酸,约200个氨基酸至约1000个氨基酸,约200个氨基酸至约950个氨基酸,约200个氨基酸至约900个氨基酸,约200

个氨基酸至约850个氨基酸,约200个氨基酸至约800个氨基酸,约200个氨基酸至约750个氨基酸,约200个氨基酸至约700个氨基酸,约200个氨基酸至约650个氨基酸,约200个氨基酸至约600个氨基酸,约200个氨基酸至约550个氨基酸,约200个氨基酸至约500个氨基酸,约200个氨基酸至约480个氨基酸,约200个氨基酸至约460个氨基酸,约200个氨基酸至约440个氨基酸,约200个氨基酸至约420个氨基酸,约200个氨基酸至约400个氨基酸,约200个氨基酸至约380个氨基酸,约200个氨基酸至约360个氨基酸,约200个氨基酸至约340个氨基酸,约200个氨基酸至约320个氨基酸,约200个氨基酸至约300个氨基酸,约200个氨基酸至约280个氨基酸,约200个氨基酸至约260个氨基酸,约200个氨基酸至约240个氨基酸,约200个氨基酸至约220个氨基酸,约220个氨基酸至约3000个氨基酸,约220个氨基酸至约2500个氨基酸,约220个氨基酸至约2000个氨基酸,约220个氨基酸至约1500个氨基酸,约220个氨基酸至约1000个氨基酸,约220个氨基酸至约950个氨基酸,约220个氨基酸至约900个氨基酸,约220个氨基酸至约850个氨基酸,约220个氨基酸至约800个氨基酸,约220个氨基酸至约750个氨基酸,约220个氨基酸至约700个氨基酸,约220个氨基酸至约650个氨基酸,约220个氨基酸至约600个氨基酸,约220个氨基酸至约550个氨基酸,约220个氨基酸至约500个氨基酸,约220个氨基酸至约480个氨基酸,约220个氨基酸至约460个氨基酸,约220个氨基酸至约440个氨基酸,约220个氨基酸至约420个氨基酸,约220个氨基酸至约400个氨基酸,约220个氨基酸至约380个氨基酸,约220个氨基酸至约360个氨基酸,约220个氨基酸至约340个氨基酸,约220个氨基酸至约320个氨基酸,约220个氨基酸至约300个氨基酸,约220个氨基酸至约280个氨基酸,约220个氨基酸至约260个氨基酸,约220个氨基酸至约240个氨基酸,约240个氨基酸至约3000个氨基酸,约240个氨基酸至约2500个氨基酸,约240个氨基酸至约2000个氨基酸,约240个氨基酸至约1500个氨基酸,约240个氨基酸至约1000个氨基酸,约240个氨基酸至约950个氨基酸,约240个氨基酸至约900个氨基酸,约240个氨基酸至约850个氨基酸,约240个氨基酸至约800个氨基酸,约240个氨基酸至约750个氨基酸,约240个氨基酸至约700个氨基酸,约240个氨基酸至约650个氨基酸,约240个氨基酸至约600个氨基酸,约240个氨基酸至约550个氨基酸,约240个氨基酸至约500个氨基酸,约240个氨基酸至约480个氨基酸,约240个氨基酸至约460个氨基酸,约240个氨基酸至约440个氨基酸,约240个氨基酸至约420个氨基酸,约240个氨基酸至约400个氨基酸,约240个氨基酸至约380个氨基酸,约240个氨基酸至约360个氨基酸,约240个氨基酸至约340个氨基酸,约240个氨基酸至约320个氨基酸,约240个氨基酸至约300个氨基酸,约240个氨基酸至约280个氨基酸,约240个氨基酸至约260个氨基酸,约260个氨基酸至约3000个氨基酸,约260个氨基酸至约2500个氨基酸,约260个氨基酸至约2000个氨基酸,约260个氨基酸至约1500个氨基酸,约260个氨基酸至约1000个氨基酸,约260个氨基酸至约950个氨基酸,约260个氨基酸至约900个氨基酸,约260个氨基酸至约850个氨基酸,约260个氨基酸至约800个氨基酸,约260个氨基酸至约750个氨基酸,约260个氨基酸至约700个氨基酸,约260个氨基酸至约650个氨基酸,约260个氨基酸至约600个氨基酸,约260个氨基酸至约550个氨基酸,约260个氨基酸至约500个氨基酸,约260个氨基酸至约480个氨基酸,约260个氨基酸至约460个氨基酸,约260个氨基酸至约440个氨基酸,约260个氨基酸至约420个氨基酸,约260个氨基酸至约400个氨基酸,约260个氨基酸至约380个氨基酸,约260个氨基酸至约360个氨基酸,约260个氨基酸至约340个氨基酸,约260个氨基酸至约320个氨基酸,约260个氨基酸至约300个氨基酸,约

260个氨基酸至约280个氨基酸,约280个氨基酸至约3000个氨基酸,约280个氨基酸至约2500个氨基酸,约280个氨基酸至约2000个氨基酸,约280个氨基酸至约1500个氨基酸,约280个氨基酸至约1000个氨基酸,约280个氨基酸至约950个氨基酸,约280个氨基酸至约900个氨基酸,约280个氨基酸至约850个氨基酸,约280个氨基酸至约800个氨基酸,约280个氨基酸至约750个氨基酸,约280个氨基酸至约700个氨基酸,约280个氨基酸至约650个氨基酸,约280个氨基酸至约600个氨基酸,约280个氨基酸至约550个氨基酸,约280个氨基酸至约500个氨基酸,约280个氨基酸至约480个氨基酸,约280个氨基酸至约460个氨基酸,约280个氨基酸至约440个氨基酸,约280个氨基酸至约420个氨基酸,约280个氨基酸至约400个氨基酸,约280个氨基酸至约380个氨基酸,约280个氨基酸至约360个氨基酸,约280个氨基酸至约340个氨基酸,约280个氨基酸至约320个氨基酸,约280个氨基酸至约300个氨基酸,约300个氨基酸至约3000个氨基酸,约300个氨基酸至约2500个氨基酸,约300个氨基酸至约2000个氨基酸,约300个氨基酸至约1500个氨基酸,约300个氨基酸至约1000个氨基酸,约300个氨基酸至约950个氨基酸,约300个氨基酸至约900个氨基酸,约300个氨基酸至约850个氨基酸,约300个氨基酸至约800个氨基酸,约300个氨基酸至约750个氨基酸,约300个氨基酸至约700个氨基酸,约300个氨基酸至约650个氨基酸,约300个氨基酸至约600个氨基酸,约300个氨基酸至约550个氨基酸,约300个氨基酸至约500个氨基酸,约300个氨基酸至约480个氨基酸,约300个氨基酸至约460个氨基酸,约300个氨基酸至约440个氨基酸,约300个氨基酸至约420个氨基酸,约300个氨基酸至约400个氨基酸,约300个氨基酸至约380个氨基酸,约300个氨基酸至约360个氨基酸,约300个氨基酸至约340个氨基酸,约300个氨基酸至约320个氨基酸,约320个氨基酸至约3000个氨基酸,约320个氨基酸至约2500个氨基酸,约320个氨基酸至约2000个氨基酸,约320个氨基酸至约1500个氨基酸,约320个氨基酸至约1000个氨基酸,约320个氨基酸至约950个氨基酸,约320个氨基酸至约900个氨基酸,约320个氨基酸至约850个氨基酸,约320个氨基酸至约800个氨基酸,约320个氨基酸至约750个氨基酸,约320个氨基酸至约700个氨基酸,约320个氨基酸至约650个氨基酸,约320个氨基酸至约600个氨基酸,约320个氨基酸至约550个氨基酸,约320个氨基酸至约500个氨基酸,约320个氨基酸至约480个氨基酸,约320个氨基酸至约460个氨基酸,约320个氨基酸至约440个氨基酸,约320个氨基酸至约420个氨基酸,约320个氨基酸至约400个氨基酸,约320个氨基酸至约380个氨基酸,约320个氨基酸至约360个氨基酸,约320个氨基酸至约340个氨基酸,约340个氨基酸至约3000个氨基酸,约340个氨基酸至约2500个氨基酸,约340个氨基酸至约2000个氨基酸,约340个氨基酸至约1500个氨基酸,约340个氨基酸至约1000个氨基酸,约340个氨基酸至约950个氨基酸,约340个氨基酸至约900个氨基酸,约340个氨基酸至约850个氨基酸,约340个氨基酸至约800个氨基酸,约340个氨基酸至约750个氨基酸,约340个氨基酸至约700个氨基酸,约340个氨基酸至约650个氨基酸,约340个氨基酸至约600个氨基酸,约340个氨基酸至约550个氨基酸,约340个氨基酸至约500个氨基酸,约340个氨基酸至约480个氨基酸,约340个氨基酸至约460个氨基酸,约340个氨基酸至约440个氨基酸,约340个氨基酸至约420个氨基酸,约340个氨基酸至约400个氨基酸,约340个氨基酸至约380个氨基酸,约340个氨基酸至约360个氨基酸,约360个氨基酸至约3000个氨基酸,约360个氨基酸至约2500个氨基酸,约360个氨基酸至约2000个氨基酸,约360个氨基酸至约1500个氨基酸,约360个氨基酸至约1000个氨基酸,约360个氨基酸至约950个氨基酸,约360个氨基酸至约

900个氨基酸,约360个氨基酸至约850个氨基酸,约360个氨基酸至约800个氨基酸,约360个氨基酸至约750个氨基酸,约360个氨基酸至约700个氨基酸,约360个氨基酸至约650个氨基酸,约360个氨基酸至约600个氨基酸,约360个氨基酸至约550个氨基酸,约360个氨基酸至约500个氨基酸,约360个氨基酸至约480个氨基酸,约360个氨基酸至约460个氨基酸,约360个氨基酸至约440个氨基酸,约360个氨基酸至约420个氨基酸,约360个氨基酸至约400个氨基酸,约360个氨基酸至约380个氨基酸,约380个氨基酸至约3000个氨基酸,约380个氨基酸至约2500个氨基酸,约380个氨基酸至约2000个氨基酸,约380个氨基酸至约1500个氨基酸,约380个氨基酸至约1000个氨基酸,约380个氨基酸至约950个氨基酸,约380个氨基酸至约900个氨基酸,约380个氨基酸至约850个氨基酸,约380个氨基酸至约800个氨基酸,约380个氨基酸至约750个氨基酸,约380个氨基酸至约700个氨基酸,约380个氨基酸至约650个氨基酸,约380个氨基酸至约600个氨基酸,约380个氨基酸至约550个氨基酸,约380个氨基酸至约500个氨基酸,约380个氨基酸至约480个氨基酸,约380个氨基酸至约460个氨基酸,约380个氨基酸至约440个氨基酸,约380个氨基酸至约420个氨基酸,约380个氨基酸至约400个氨基酸,约400个氨基酸至约3000个氨基酸,约400个氨基酸至约2500个氨基酸,约400个氨基酸至约2000个氨基酸,约400个氨基酸至约1500个氨基酸,约400个氨基酸至约1000个氨基酸,约400个氨基酸至约950个氨基酸,约400个氨基酸至约900个氨基酸,约400个氨基酸至约850个氨基酸,约400个氨基酸至约800个氨基酸,约400个氨基酸至约750个氨基酸,约400个氨基酸至约700个氨基酸,约400个氨基酸至约650个氨基酸,约400个氨基酸至约600个氨基酸,约400个氨基酸至约550个氨基酸,约400个氨基酸至约500个氨基酸,约400个氨基酸至约480个氨基酸,约400个氨基酸至约460个氨基酸,约400个氨基酸至约440个氨基酸,约400个氨基酸至约420个氨基酸,约420个氨基酸至约3000个氨基酸,约420个氨基酸至约2500个氨基酸,约420个氨基酸至约2000个氨基酸,约420个氨基酸至约1500个氨基酸,约420个氨基酸至约1000个氨基酸,约420个氨基酸至约950个氨基酸,约420个氨基酸至约900个氨基酸,约420个氨基酸至约850个氨基酸,约420个氨基酸至约800个氨基酸,约420个氨基酸至约750个氨基酸,约420个氨基酸至约700个氨基酸,约420个氨基酸至约650个氨基酸,约420个氨基酸至约600个氨基酸,约420个氨基酸至约550个氨基酸,约420个氨基酸至约500个氨基酸,约420个氨基酸至约480个氨基酸,约420个氨基酸至约460个氨基酸,约420个氨基酸至约440个氨基酸,约440个氨基酸至约3000个氨基酸,约440个氨基酸至约2500个氨基酸,约440个氨基酸至约2000个氨基酸,约440个氨基酸至约1500个氨基酸,约440个氨基酸至约1000个氨基酸,约440个氨基酸至约950个氨基酸,约440个氨基酸至约900个氨基酸,约440个氨基酸至约850个氨基酸,约440个氨基酸至约800个氨基酸,约440个氨基酸至约750个氨基酸,约440个氨基酸至约700个氨基酸,约440个氨基酸至约650个氨基酸,约440个氨基酸至约600个氨基酸,约440个氨基酸至约550个氨基酸,约440个氨基酸至约500个氨基酸,约440个氨基酸至约480个氨基酸,约440个氨基酸至约460个氨基酸,约460个氨基酸至约3000个氨基酸,约460个氨基酸至约2500个氨基酸,约460个氨基酸至约2000个氨基酸,约460个氨基酸至约1500个氨基酸,约460个氨基酸至约1000个氨基酸,约460个氨基酸至约950个氨基酸,约460个氨基酸至约900个氨基酸,约460个氨基酸至约850个氨基酸,约460个氨基酸至约800个氨基酸,约460个氨基酸至约750个氨基酸,约460个氨基酸至约700个氨基酸,约460个氨基酸至约650个氨基酸,约460个氨基酸至约600个氨基酸,约460个氨基酸至

约550个氨基酸,约460个氨基酸至约500个氨基酸,约460个氨基酸至约480个氨基酸,约480个氨基酸至约3000个氨基酸,约480个氨基酸至约2500个氨基酸,约480个氨基酸至约2000个氨基酸,约480个氨基酸至约1500个氨基酸,约480个氨基酸至约1000个氨基酸,约480个氨基酸至约950个氨基酸,约480个氨基酸至约900个氨基酸,约480个氨基酸至约850个氨基酸,约480个氨基酸至约800个氨基酸,约480个氨基酸至约750个氨基酸,约480个氨基酸至约700个氨基酸,约480个氨基酸至约650个氨基酸,约480个氨基酸至约600个氨基酸,约480个氨基酸至约550个氨基酸,约480个氨基酸至约500个氨基酸,约500个氨基酸至约3000个氨基酸,约500个氨基酸至约2500个氨基酸,约500个氨基酸至约2000个氨基酸,约500个氨基酸至约1500个氨基酸,约500个氨基酸至约1000个氨基酸,约500个氨基酸至约950个氨基酸,约500个氨基酸至约900个氨基酸,约500个氨基酸至约850个氨基酸,约500个氨基酸至约800个氨基酸,约500个氨基酸至约750个氨基酸,约500个氨基酸至约700个氨基酸,约500个氨基酸至约650个氨基酸,约500个氨基酸至约600个氨基酸,约500个氨基酸至约550个氨基酸,约550个氨基酸至约3000个氨基酸,约550个氨基酸至约2500个氨基酸,约550个氨基酸至约2000个氨基酸,约550个氨基酸至约1500个氨基酸,约550个氨基酸至约1000个氨基酸,约550个氨基酸至约950个氨基酸,约550个氨基酸至约900个氨基酸,约550个氨基酸至约850个氨基酸,约550个氨基酸至约800个氨基酸,约550个氨基酸至约750个氨基酸,约550个氨基酸至约700个氨基酸,约550个氨基酸至约650个氨基酸,约550个氨基酸至约600个氨基酸,约600个氨基酸至约3000个氨基酸,约600个氨基酸至约2500个氨基酸,约600个氨基酸至约2000个氨基酸,约600个氨基酸至约1500个氨基酸,约600个氨基酸至约1000个氨基酸,约600个氨基酸至约950个氨基酸,约600个氨基酸至约900个氨基酸,约600个氨基酸至约850个氨基酸,约600个氨基酸至约800个氨基酸,约600个氨基酸至约750个氨基酸,约600个氨基酸至约700个氨基酸,约600个氨基酸至约650个氨基酸,约650个氨基酸至约3000个氨基酸,约650个氨基酸至约2500个氨基酸,约650个氨基酸至约2000个氨基酸,约650个氨基酸至约1500个氨基酸,约650个氨基酸至约1000个氨基酸,约650个氨基酸至约950个氨基酸,约650个氨基酸至约900个氨基酸,约650个氨基酸至约850个氨基酸,约650个氨基酸至约800个氨基酸,约650个氨基酸至约750个氨基酸,约650个氨基酸至约700个氨基酸,约700个氨基酸至约3000个氨基酸,约700个氨基酸至约2500个氨基酸,约700个氨基酸至约2000个氨基酸,约700个氨基酸至约1500个氨基酸,约700个氨基酸至约1000个氨基酸,约700个氨基酸至约950个氨基酸,约700个氨基酸至约900个氨基酸,约700个氨基酸至约850个氨基酸,约700个氨基酸至约800个氨基酸,约700个氨基酸至约750个氨基酸,约750个氨基酸至约3000个氨基酸,约750个氨基酸至约2500个氨基酸,约750个氨基酸至约2000个氨基酸,约750个氨基酸至约1500个氨基酸,约750个氨基酸至约1000个氨基酸,约750个氨基酸至约950个氨基酸,约750个氨基酸至约900个氨基酸,约750个氨基酸至约850个氨基酸,约750个氨基酸至约800个氨基酸,约800个氨基酸至约3000个氨基酸,约800个氨基酸至约2500个氨基酸,约800个氨基酸至约2000个氨基酸,约800个氨基酸至约1500个氨基酸,约800个氨基酸至约1000个氨基酸,约800个氨基酸至约950个氨基酸,约800个氨基酸至约900个氨基酸,约800个氨基酸至约850个氨基酸,约850个氨基酸至约3000个氨基酸,约850个氨基酸至约2500个氨基酸,约850个氨基酸至约2000个氨基酸,约850个氨基酸至约1500个氨基酸,约850个氨基酸至约1000个氨基酸,约850个氨基酸至约950个氨基酸,约850个氨基酸至约900

个氨基酸,约900个氨基酸至约3000个氨基酸,约900个氨基酸至约2500个氨基酸,约900个氨基酸至约2000个氨基酸,约900个氨基酸至约1500个氨基酸,约900个氨基酸至约1000个氨基酸,约900个氨基酸至约950个氨基酸,约950个氨基酸至约3000个氨基酸,约950个氨基酸至约2500个氨基酸,约950个氨基酸至约2000个氨基酸,约950个氨基酸至约1500个氨基酸,约950个氨基酸至约1000个氨基酸,约1000个氨基酸至约3000个氨基酸,约1000个氨基酸至约2500个氨基酸,约1000个氨基酸至约2000个氨基酸,约1000个氨基酸至约1500个氨基酸,约1500个氨基酸至约3000个氨基酸,约1500个氨基酸至约2500个氨基酸,约1500个氨基酸至约2000个氨基酸,约2000个氨基酸至约3000个氨基酸,约2000个氨基酸至约2500个氨基酸,或约2500个氨基酸至约3000个氨基酸。

[1703] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)与可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)彼此直接邻接。在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包含介于第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性第一靶标结合域)与可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)之间的接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列)。在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)与第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)彼此直接邻接。在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包含介于可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)与第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)之间的接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列)。

[1704] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)与第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性示例性靶标结合域)彼此直接邻接。在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包含介于第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)与第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)之间的接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列)。在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,

[1705] 第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)与可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)彼此直接邻接。在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包含介于第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)与可溶性组织因子域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性可溶性组织因子域)之间的接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列)。

[1706] 在一些实施例中,单链嵌合多肽可以包括与以下至少70%一致(例如至少75%一致、至少80%一致、至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[1707] QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGT

SYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELARPGASVKMSC
KASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR
YYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDT
ECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDER
TLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPV
ECMGQEKGEFREVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFK
GKATLTSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIEMTQSPAIM
SASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGSTSYSLTISSMEAEDAATYF
CHQYHRSPTFGGGTKLETKR(SEQ ID NO:85)。

[1708] 在一些实施例中,单链嵌合多肽由核酸编码,所述核酸包括与CAGATCGTGCTGACCC
AAAGCCCCGCCATCATGAGCGCTAGCCCCGGTGAGAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCCAGCTCCGTGTCCTA
CATGAACTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACCAGCCCCAAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCTCCGGA
GTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGGCACCAGCTACTCTTTAACCATTTCCGGCATGGAAGCTGAAGACG
CTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACCCCTTCACATTCGGATCTGGCACCAAGCTCGAAATCAATCG
TGGAGGAGGTGGCAGCGGCGGCGGTGGATCCGGCGGAGGAGGAAGCCAAGTTCAACTCCAGCAGAGCGGCGCTGAA
CTGGCCCGGCCCGGCGCCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTCCGGCTATACATTTACTCGTTACACAATGCATT
GGGTCAAGCAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATCGGATATATCAACCCTTCCCGGGGCTACACCAACTATAA
CCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCACTGACAAGAGCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCTCTTTA
ACCAGCGAGGACTCCGCTGTTTACTACTGCGCTAGGTATTACGACGACCACTACTGTTTAGACTATTGGGGACAAG
GTACCACTTTAACCGTCAGCAGCTCCGGCACCACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACCAA
CTTCAAGACAATTCTGGAATGGGAACCCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGCAGATCTCCACCAAATCCGGA
GACTGGAAGAGCAAGTGCTTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCGACGAAATCGTCAAGGACGTCAAGC
AAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTA
CGAGAATTCCCCCGAATTCACCCCTTATTTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTT
GGCACCAAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGTGCGGCGGAATAACACATTTTTATCCCTCCGGG
ATGTGTTCGGCAAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACCGCTAAGAC
CAACACCAACGAGTTTTTAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCT
CGTACCGTCAACCGGAAGAGCACAGATTCCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGGTCC
AGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAACTCGTGAAACCCGGTGCTTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCCAGCGGATACAC
CTTCACCTCCTATGTGATCCAGTGGGTCAAACAGAAGCCCGGACAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATCAACCCT
TACAACGACTATACCAAATACAACGAGAAGTTTAAGGGAAAGGCTACTTTAACCTCCGACAAAAGCTCCATCACAG
CCTACATGGAGTTCAGCTCTTTAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTACTATTGCGCCCGGTGGGGCGACGGCAATTA
CTGGGGACGGGGCACAACACTGACCGTGAGCAGCGGAGGCGGAGGCTCCGGCGGAGGCGGATCTGGCGGTGGCGGC
TCCGACATCGAGATGACCCAGTCCCCCGCTATCATGTCCGCCTCTTTAGGCGAGCGGGTCACAATGACTTGTACAG
CCTCCTCCAGCGTCTCCTCCTCCTACTTCCATTGGTACCAACAGAAACCCGGAAGCTCCCCTAAACTGTGCATCTA
CAGCACCAGCAATCTCGCCAGCGGCGTGCCCCCTAGGTTTTCCGGAAGCGGAAGCACCAGCTACTCTTTAACCATC
TCCTCCATGGAGGCTGAGGATGCCGCCACCTACTTTTGTCACCAGTACCACCGGTCCCCCACCTTCGGAGGCGGCA
CCAAACTGGAGACAAAGAGG(SEQ ID NO:86)至少70%一致(例如至少75%一致、至少80%一致、至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少99%一致或100%一致)的序列。

[1709] 在一些实施例中,单链嵌合多肽可以包括与以下至少70%一致(例如至少75%一致、至少80%一致、至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[1710] MKWVTFISLLFLFSSAYSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDT SKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGGGSGGGGSGGGGSQVQL QQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQ ISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTI QSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSV QAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEW IGSINPYNDYTKYNEKFKGKATLTSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTLTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIEMTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGST SYSLTISSMEAEDAATYFCHQYHRSPTFGGGTKLETKR(SEQ ID NO:87)。

[1711] 在一些实施例中,单链嵌合多肽由核酸编码,所述核酸包括与以下至少70%一致(例如至少75%一致、至少80%一致、至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[1712] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCTTATTATTTTTATTCAGCTCCGCCTATTCCCAGATCGTGCTGAC CCAAAGCCCCGCCATCATGAGCGCTAGCCCCGGTGAGAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCCAGCTCCGTGTCC TACATGAACTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACCAGCCCCAAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCTCCG GAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGGCACCAGCTACTCTTTAACCATTTCCGGCATGGAAGCTGAAGA CGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACCCCTTCACATTCGGATCTGGCACCAAGCTCGAAATCAAT CGTGGAGGAGGTGGCAGCGGCGGCGGTGGATCCGGCGGAGGAGGAAGCCAAGTTCAACTCCAGCAGAGCGGCGCTG AACTGGCCCGGCCCCGGCGCCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTCCGGCTATACATTTACTCGTTACACAATGCA TTGGGTCAAGCAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATCGGATATATCAACCCTTCCCGGGGCTACACCAACTAT AACCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCACTGACAAGAGCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCTCTT TAACCAGCGAGGACTCCGCTGTTTACTACTGCGCTAGGTATTACGACGACCACTACTGTTTAGACTATTGGGGACA AGGTACCACTTTAACCGTCAGCAGCTCCGGCACCACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACC AACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGAACCCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGCAGATCTCCACCAAATCCG GAGACTGGAAGAGCAAGTGCTTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCGACGAAATCGTCAAGGACGTCAA GCAAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTC TACGAGAATTCCCCCGAATTCACCCCTTATTTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAG TTGGCACCAAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGTGCGGCGGAATAACACATTTTTATCCCTCCG GGATGTGTTCGGCAAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACCGCTAAG ACCAACACCAACGAGTTTTTAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTT CTCGTACCGTCAACCGGAAGAGCACAGATTCCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGGT CCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAACTCGTGAAACCCGGTGCTTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCCAGCGGATAC ACCTTCACCTCCTATGTGATCCAGTGGGTCAAACAGAAGCCCGGACAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATCAACC CTTACAACGACTATACCAAATACAACGAGAAGTTTAAGGGAAAGGCTACTTTAACCTCCGACAAAAGCTCCATCAC AGCCTACATGGAGTTCAGCTCTTTAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTACTATTGCGCCCGGTGGGGCGACGGCAAT

TACTGGGGACGGGGCACAACACTGACCGTGAGCAGCGGAGGCGGAGGCTCCGGCGGAGGCGGATCTGGCGGTGGCG
GCTCCGACATCGAGATGACCCAGTCCCCCGCTATCATGTCCGCCTCTTTAGGCGAGCGGGTCACAATGACTTGTAC
AGCCTCCTCCAGCGTCTCCTCCTCCTACTTCCATTGGTACCAACAGAAACCCGGAAGCTCCCCTAAACTGTGCATC
TACAGCACCAGCAATCTCGCCAGCGGCGTGCCCCCTAGGTTTTCCGGAAGCGGAAGCACCAGCTACTCTTTAACCA
TCTCCTCCATGGAGGCTGAGGATGCCGCCACCTACTTTTGTCACCAGTACCACCGGTCCCCCACCTTCGGAGGCGG
CACCAAACTGGAGACAAAGAGG(SEQ ID NO:88)。

[1713] 在一些实施例中,单链嵌合多肽可以包括与以下至少70%一致(例如至少75%一致、至少80%一致、至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[1714] VQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKAT
LTSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIEMTQSPAIMSASL
GERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGSTSYSLTISSMEAEDAATYFCHQY
HRSPTFGGGTKLETKRSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLT
DEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRR
NNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQ
EKGEFREQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTS
YSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELARPGASVKMSCK
ASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARY
YDDHYCLDYWGQGTTLTVSS(SEQ ID NO:89)。

[1715] 在一些实施例中,单链嵌合多肽由核酸编码,所述核酸包括与以下至少70%一致(例如至少75%一致、至少80%一致、至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[1716] GTGCAGCTGCAGCAGTCCGGACCCGAACTGGTCAAGCCCGGTGCCTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGC
TTCTGGCTACACCTTTACCTCCTACGTCATCCAATGGGTGAAGCAGAAGCCCGGTCAAGGTCTCGAGTGGATCGGC
AGCATCAATCCCTACAACGATTACACCAAGTATAACGAAAAGTTTAAGGGCAAGGCCACTCTGACAAGCGACAAGA
GCTCCATTACCGCCTACATGGAGTTTTCCTCTTTAACTTCTGAGGACTCCGCTTTATACTATTGCGCTCGTTGGGG
CGATGGCAATTATTGGGGCCGGGGAACTACTTTAACAGTGAGCTCCGGCGGCGGCGGAAGCGGAGGTGGAGGATCT
GGCGGTGGAGGCAGCGACATCGAGATGACACAGTCCCCCGCTATCATGAGCGCCTCTTTAGGAGAACGTGTGACCA
TGACTTGTACAGCTTCCTCCAGCGTGAGCAGCTCCTATTTCCACTGGTACCAGCAGAAACCCGGCTCCTCCCCTAA
ACTGTGTATCTACTCCACAAGCAATTTAGCTAGCGGCGTGCCTCCTCGTTTTAGCGGCTCCGGCAGCACCTCTTAC
TCTTTAACCATTAGCTCTATGGAGGCCGAAGATGCCGCCACATACTTTTGCCATCAGTACCACCGGTCCCCTACCT
TTGGCGGAGGCACAAAGCTGGAGACCAAGCGGAGCGGCACCACCAACACAGTGGCCGCCTACAATCTGACTTGGAA
ATCCACCAACTTCAAGACCATCCTCGAGTGGGAGCCCAAGCCCGTTAATCAAGTTTATACCGTGCAGATTTCCACC
AAGAGCGGCGACTGGAAATCCAAGTGCTTCTATACCACAGACACCGAGTGCGATCTCACCGACGAGATCGTCAAAG
ACGTGAAGCAGACATATTTAGCTAGGGTGTTCTCCTACCCCGCTGGAAACGTGGAGAGCACCGGATCCGCTGGAGA
GCCTTTATACGAGAACTCCCCCGAATTCACCCCCTATCTGGAAACCAATTTAGGCCAGCCCACCATCCAGAGCTTC
GAACAAGTTGGCACAAAGGTGAACGTCACCGTCGAAGATGAGAGGACTTTAGTGCGGAGGAACAATACATTTTTAT
CCTTACGTGACGTCTTCGGCAAGGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCTAGCTCCTCCGGCAAGAAGAC
CGCCAAGACCAATACCAACGAATTTTTAATTGACGTGGACAAGGGCGAGAACTACTGCTTCTCCGTGCAAGCTGTG

ATCCCCTCCCGGACAGTGAACCGGAAGTCCACCGACTCCCCCGTGGAGTGCATGGGCCAAGAGAAGGGAGAGTTTC
GTGAGCAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGCTATTATGAGCGCTAGCCCCGGTGAAAAGGTGACTATGACATGCAG
CGCCAGCTCTTCCGTGAGCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCAGCCCTAAAAGGTGGATCTACGAC
ACCAGCAAGCTGGCCAGCGGCGTCCCCGCTCACTTTCGGGGCTCCGGCTCCGGAACAAGCTACTCTCTGACCATCA
GCGGCATGGAAGCCGAGGATGCCGCTACCTATTACTGTCAGCAGTGGAGCTCCAACCCCTTCACCTTTGGATCCGG
CACCAAGCTCGAGATTAATCGTGGAGGCGGAGGTAGCGGAGGAGGCGGATCCGGCGGTGGAGGTAGCCAAGTTCAG
CTCCAGCAAAGCGGCGCCGAACTCGCTCGGCCCGGCGCTTCCGTGAAGATGTCTTGTAAGGCCTCCGGCTATACCT
TCACCCGGTACACAATGCACTGGGTCAAGCAACGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATTGGCTATATCAACCCCTC
CCGGGGCTATACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAAGCCACCCTCACCACCGACAAGTCCAGCAGCACCGCT
TACATGCAGCTGAGCTCTTTAACATCCGAGGATTCCGCCGTGTACTACTGCGCTCGGTACTACGACGATCATTACT
GCCTCGATTACTGGGGCCAAGGTACCACCTTAACAGTCTCCTCC(SEQ ID NO:90)。

[1717] 在一些实施例中,单链嵌合多肽可以包括与以下至少70%一致(例如至少75%一致、至少80%一致、至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[1718] MKWVTFISLLFLFSSAYSVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSI
NPYNDYTKYNEKFKGKATLTSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTLTVSSGGGGSGGGGSGG
GGSDIEMTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGSTSYSL
TISSMEAEDAATYFCHQYHRSPTFGGGTKLETKRSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKS
GDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQ
VGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIP
SRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTS
KLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQ
QSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYM
QLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS(SEQ ID NO:91)。

[1719] 在一些实施例中,单链嵌合多肽由核酸编码,所述核酸包括与以下至少70%一致(例如至少75%一致、至少80%一致、至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[1720] ATGAAATGGGTCACCTTCATCTCTTTACTGTTTTTATTTAGCAGCGCCTACAGCGTGCAGCTGCAGCA
GTCCGGACCCGAACTGGTCAAGCCCGGTGCCTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACCTCC
TACGTCATCCAATGGGTGAAGCAGAAGCCCGGTCAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATCAATCCCTACAACGATT
ACACCAAGTATAACGAAAAGTTTAAGGGCAAGGCCACTCTGACAAGCGACAAGAGCTCCATTACCGCCTACATGGA
GTTTTCCTCTTTAACTTCTGAGGACTCCGCTTTATACTATTGCGCTCGTTGGGGCGATGGCAATTATTGGGGCCGG
GGAACTACTTTAACAGTGAGCTCCGGCGGCGGCGGAAGCGGAGGTGGAGGATCTGGCGGTGGAGGCAGCGACATCG
AGATGACACAGTCCCCCGCTATCATGAGCGCCTCTTTAGGAGAACGTGTGACCATGACTTGTACAGCTTCCTCCAG
CGTGAGCAGCTCCTATTTCCACTGGTACCAGCAGAAACCCGGCTCCTCCCCTAAACTGTGTATCTACTCCACAAGC
AATTTAGCTAGCGGCGTGCCTCCTCGTTTTAGCGGCTCCGGCAGCACCTCTTACTCTTTAACCATTAGCTCTATGG
AGGCCGAAGATGCCGCCACATACTTTTGCCATCAGTACCACCGGTCCCCTACCTTTGGCGGAGGCACAAAGCTGGA
GACCAAGCGGAGCGGCACCACCAACACAGTGGCCGCCTACAATCTGACTTGGAAATCCACCAACTTCAAGACCATC
CTCGAGTGGGAGCCCAAGCCCGTTAATCAAGTTTATACCGTGCAGATTTCCACCAAGAGCGGCGACTGGAAATCCA

AGTGCTTCTATACCACAGACACCGAGTGCGATCTCACCGACGAGATCGTCAAAGACGTGAAGCAGACATATTTAGC
TAGGGTGTTCTCCTACCCCGCTGGAAACGTGGAGAGCACCGGATCCGCTGGAGAGCCTTTATACGAGAACTCCCCC
GAATTCACCCCCTATCTGGAAACCAATTTAGGCCAGCCCACCATCCAGAGCTTCGAACAAGTTGGCACAAAGGTGA
ACGTCACCGTCGAAGATGAGAGGACTTTAGTGCGGAGGAACAATACATTTTTATCCTTACGTGACGTCTTCGGCAA
GGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCTAGCTCCTCCGGCAAGAAGACCGCCAAGACCAATACCAACGAA
TTTTTAATTGACGTGGACAAGGGCGAGAACTACTGCTTCTCCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACAGTGAACC
GGAAGTCCACCGACTCCCCCGTGGAGTGCATGGGCCAAGAGAAGGGAGAGTTTCGTGAGCAGATCGTGCTGACCCA
GTCCCCCGCTATTATGAGCGCTAGCCCCGGTGAAAAGGTGACTATGACATGCAGCGCCAGCTCTTCCGTGAGCTAC
ATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCAGCCCTAAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCAGCGGCG
TCCCCGCTCACTTTCGGGGCTCCGGCTCCGGAACAAGCTACTCTCTGACCATCAGCGGCATGGAAGCCGAGGATGC
CGCTACCTATTACTGTCAGCAGTGGAGCTCCAACCCCTTCACCTTTGGATCCGGCACCAAGCTCGAGATTAATCGT
GGAGGCGGAGGTAGCGGAGGAGGCGGATCCGGCGGTGGAGGTAGCCAAGTTCAGCTCCAGCAAAGCGGCGCCGAAC
TCGCTCGGCCCGGCGCTTCCGTGAAGATGTCTTGTAAGGCCTCCGGCTATACCTTCACCCGGTACACAATGCACTG
GGTCAAGCAACGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATTGGCTATATCAACCCCTCCCGGGGCTATACCAACTACAAC
CAGAAGTTCAAGGACAAAGCCACCCTCACCACCGACAAGTCCAGCAGCACCGCTTACATGCAGCTGAGCTCTTTAA
CATCCGAGGATTCCGCCGTGTACTACTGCGCTCGGTACTACGACGATCATTACTGCCTCGATTACTGGGGCCAAGG
TACCACCTTAACAGTCTCCTCC(SEQ ID NO:92)。

[1721] 本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例可以进一步包括一个或多个(例如二、三、四、五、六、七、八、九或十个)位于其N端和/或C端的其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)。

[1722] 在一些实施例中,单链嵌合多肽可以包括一个或多个(例如二、三、四、五、六、七、八、九或十个)位于其N端的其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)。在一些实施例中,位于单链嵌合多肽N端的一个或多个其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)之一可以直接邻接第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域),或可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)。在一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列),所述接头序列介于单链嵌合多肽N端的至少一个其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)之一与第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)或可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)之间。

[1723] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽包括一个或多个(例如二、三、四、五、六、七、八、九或十个)位于其C端的其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)。在一些实施例中,位于单链嵌合多肽C端的一个或多个其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)之一直接邻接第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域),或可溶性组织因子域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性可溶性组织因子

域)。在一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包含接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列),所述接头序列介于单链嵌合多肽C端的至少一个其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)之一与第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)或可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)之间。

[1724] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽包含一个或多个(例如二、三、四、五、六、七、八、九或十个)位于其N端和其C端的其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)。在一些实施例中,位于单链嵌合多肽N端的一个或多个其它抗原结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)之一直接邻接第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域),或可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)。在一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列),所述接头序列介于N端的一个或多个其它抗原结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)之一与第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)或可溶性组织因子域(例如任一种示例性可溶性组织因子域)之间。在一些实施例中,位于C端的一个或多个其它抗原结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)之一直接邻接第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域),或可溶性组织因子域(例如任一种示例性可溶性组织因子域)。在一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列),所述接头序列介于C端的一个或多个其它抗原结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)之一与第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)或可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)之间。

[1725] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)和一个或多个其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)中的两个或更多个(例如三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)特异性地结合到相同抗原。在一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)和一个或多个其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)中的两个或更多个(例如三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)特异性地结合到相同的表位。在一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)和一个或多个

其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)中的两个或更多个(例如三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)包括相同的氨基酸序列。

[1726] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)和一个或多个(例如二、三、四、五、六、七、八、九或十个)其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)各自特异性地结合到相同抗原。在一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)和一个或多个(例如二、三、四、五、六、七、八、九或十个)其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)各自特异性地结合到相同的表位。在一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个(例如二、三、四、五、六、七、八、九或十个)其它靶标结合域各自包含相同的氨基酸序列。

[1727] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)和一个或多个(例如二、三、四、五、六、七、八、九或十个)其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)特异性地结合到不同抗原。

[1728] 在任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个靶标结合域中的一个或多个是抗原结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性抗原结合域)。在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自是抗原结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性抗原结合域)。在一些实施例中,抗原结合域包含scFv或单域抗体。

[1729] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)和一种或多种其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)中的一种或多种(例如二、三、四、五、六、七、八、九或十种)特异性地结合到选自由以下组成的群组的靶标:CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、IL-1的受体、IL-2的受体、IL-3的受体、IL-7的受体、IL-8的受体、IL-10的受体、IL-12的受体、IL-15的受体、IL-17的受体、IL-18的受体、IL-21的受体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体、CD122的受体,以及CD28的受体。

[1730] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文

所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)和一个或多个其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。可溶性白介素蛋白和可溶性细胞因子蛋白的非限制性实例包括:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。

[1731] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)和一个或多个其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子受体。可溶性白介素受体和可溶性细胞因子受体的非限制性实例包括:可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、可溶性NKG2D、可溶性NKP30、可溶性NKp44、可溶性NKp46、可溶性DNAM1、scMHCI、scMHCII、scTCR、可溶性CD155、可溶性CD122、可溶性CD3或可溶性CD28。

[1732] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述的任一种靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述的任一种靶标结合域)和一种或多种其它靶标结合域(例如本文所述的任一种靶标结合域)可以各自独立地特异性结合到选自以下群组的靶标:CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKP30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体和CD122的受体。

[1733] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)和一个或多个其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)和一个或多个其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性白介素或细胞因子蛋白选自以下群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。

[1734] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)和一个或多个其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因

子受体。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、TNFα的可溶性受体、IL-4的可溶性受体,或IL-10的可溶性受体。

[1735] A型多链嵌合多肽-

[1736] NK细胞活化剂的非限制性实例是多链嵌合多肽,其包括:(a)第一嵌合多肽,所述第一嵌合多肽包括:(i)第一靶标结合域、(ii)可溶性组织因子域和(iii)一对亲和域中的第一域;以及(b)第二嵌合多肽,所述第二嵌合多肽包括:(i)一对亲和域中的第二域和(ii)第二靶标结合域,其中第一嵌合多肽与第二嵌合多肽经由亲和域对中的第一域与第二域的结合而发生缔合。

[1737] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽和/或第二嵌合多肽的总长度可各自独立地是约50个氨基酸至约3000个氨基酸,约50个氨基酸至约2500个氨基酸,约50个氨基酸至约2000个氨基酸,约50个氨基酸至约1500个氨基酸,约50个氨基酸至约1000个氨基酸,约50个氨基酸至约950个氨基酸,约50个氨基酸至约900个氨基酸,约50个氨基酸至约850个氨基酸,约50个氨基酸至约800个氨基酸,约50个氨基酸至约750个氨基酸,约50个氨基酸至约700个氨基酸,约50个氨基酸至约650个氨基酸,约50个氨基酸至约600个氨基酸,约50个氨基酸至约550个氨基酸,约50个氨基酸至约500个氨基酸,约50个氨基酸至约480个氨基酸,约50个氨基酸至约460个氨基酸,约50个氨基酸至约440个氨基酸,约50个氨基酸至约420个氨基酸,约50个氨基酸至约400个氨基酸,约50个氨基酸至约380个氨基酸,约50个氨基酸至约360个氨基酸,约50个氨基酸至约340个氨基酸,约50个氨基酸至约320个氨基酸,约50个氨基酸至约300个氨基酸,约50个氨基酸至约280个氨基酸,约50个氨基酸至约260个氨基酸,约50个氨基酸至约240个氨基酸,约50个氨基酸至约220个氨基酸,约50个氨基酸至约200个氨基酸,约50个氨基酸至约150个氨基酸,约50个氨基酸至约100个氨基酸,约100个氨基酸至约3000个氨基酸,约100个氨基酸至约2500个氨基酸,约100个氨基酸至约2000个氨基酸,约100个氨基酸至约1500个氨基酸,约100个氨基酸至约1000个氨基酸,约100个氨基酸至约950个氨基酸,约100个氨基酸至约900个氨基酸,约100个氨基酸至约850个氨基酸,约100个氨基酸至约800个氨基酸,约100个氨基酸至约750个氨基酸,约100个氨基酸至约700个氨基酸,约100个氨基酸至约650个氨基酸,约100个氨基酸至约600个氨基酸,约100个氨基酸至约550个氨基酸,约100个氨基酸至约500个氨基酸,约100个氨基酸至约480个氨基酸,约100个氨基酸至约460个氨基酸,约100个氨基酸至约440个氨基酸,约100个氨基酸至约420个氨基酸,约100个氨基酸至约400个氨基酸,约100个氨基酸至约380个氨基酸,约100个氨基酸至约360个氨基酸,约100个氨基酸至约340个氨基酸,约100个氨基酸至约320个氨基酸,约100个氨基酸至约300个氨基酸,约100个氨基酸至约280个氨基酸,约100个氨基酸至约260个氨基酸,约100个氨基酸至约240个氨基酸,约100个氨基酸至约220个氨基酸,约100个氨基酸至约200个氨基酸,约100个氨基酸至约150个氨基酸,约150个氨基酸至约3000个氨基酸,约150个氨基酸至约2500个氨基酸,约150个氨基酸至约2000个氨基酸,约150个氨基酸至约1500个氨基酸,约150个氨基酸至约1000个氨基酸,约150个氨基酸至约950个氨基酸,约150个氨基酸至约900个氨基酸,约150个氨基酸至约850个氨基酸,约150个氨基酸至约800个氨基酸,约150个氨基酸至约750个氨基酸,约150个氨基酸至约700个氨基酸,约150个氨基酸至约650个氨基酸,约150个氨基酸至约600个氨基

酸,约150个氨基酸至约550个氨基酸,约150个氨基酸至约500个氨基酸,约150个氨基酸至约480个氨基酸,约150个氨基酸至约460个氨基酸,约150个氨基酸至约440个氨基酸,约150个氨基酸至约420个氨基酸,约150个氨基酸至约400个氨基酸,约150个氨基酸至约380个氨基酸,约150个氨基酸至约360个氨基酸,约150个氨基酸至约340个氨基酸,约150个氨基酸至约320个氨基酸,约150个氨基酸至约300个氨基酸,约150个氨基酸至约280个氨基酸,约150个氨基酸至约260个氨基酸,约150个氨基酸至约240个氨基酸,约150个氨基酸至约220个氨基酸,约150个氨基酸至约200个氨基酸,约200个氨基酸至约3000个氨基酸,约200个氨基酸至约2500个氨基酸,约200个氨基酸至约2000个氨基酸,约200个氨基酸至约1500个氨基酸,约200个氨基酸至约1000个氨基酸,约200个氨基酸至约950个氨基酸,约200个氨基酸至约900个氨基酸,约200个氨基酸至约850个氨基酸,约200个氨基酸至约800个氨基酸,约200个氨基酸至约750个氨基酸,约200个氨基酸至约700个氨基酸,约200个氨基酸至约650个氨基酸,约200个氨基酸至约600个氨基酸,约200个氨基酸至约550个氨基酸,约200个氨基酸至约500个氨基酸,约200个氨基酸至约480个氨基酸,约200个氨基酸至约460个氨基酸,约200个氨基酸至约440个氨基酸,约200个氨基酸至约420个氨基酸,约200个氨基酸至约400个氨基酸,约200个氨基酸至约380个氨基酸,约200个氨基酸至约360个氨基酸,约200个氨基酸至约340个氨基酸,约200个氨基酸至约320个氨基酸,约200个氨基酸至约300个氨基酸,约200个氨基酸至约280个氨基酸,约200个氨基酸至约260个氨基酸,约200个氨基酸至约240个氨基酸,约200个氨基酸至约220个氨基酸,约220个氨基酸至约3000个氨基酸,约220个氨基酸至约2500个氨基酸,约220个氨基酸至约2000个氨基酸,约220个氨基酸至约1500个氨基酸,约220个氨基酸至约1000个氨基酸,约220个氨基酸至约950个氨基酸,约220个氨基酸至约900个氨基酸,约220个氨基酸至约850个氨基酸,约220个氨基酸至约800个氨基酸,约220个氨基酸至约750个氨基酸,约220个氨基酸至约700个氨基酸,约220个氨基酸至约650个氨基酸,约220个氨基酸至约600个氨基酸,约220个氨基酸至约550个氨基酸,约220个氨基酸至约500个氨基酸,约220个氨基酸至约480个氨基酸,约220个氨基酸至约460个氨基酸,约220个氨基酸至约440个氨基酸,约220个氨基酸至约420个氨基酸,约220个氨基酸至约400个氨基酸,约220个氨基酸至约380个氨基酸,约220个氨基酸至约360个氨基酸,约220个氨基酸至约340个氨基酸,约220个氨基酸至约320个氨基酸,约220个氨基酸至约300个氨基酸,约220个氨基酸至约280个氨基酸,约220个氨基酸至约260个氨基酸,约220个氨基酸至约240个氨基酸,约240个氨基酸至约3000个氨基酸,约240个氨基酸至约2500个氨基酸,约240个氨基酸至约2000个氨基酸,约240个氨基酸至约1500个氨基酸,约240个氨基酸至约1000个氨基酸,约240个氨基酸至约950个氨基酸,约240个氨基酸至约900个氨基酸,约240个氨基酸至约850个氨基酸,约240个氨基酸至约800个氨基酸,约240个氨基酸至约750个氨基酸,约240个氨基酸至约700个氨基酸,约240个氨基酸至约650个氨基酸,约240个氨基酸至约600个氨基酸,约240个氨基酸至约550个氨基酸,约240个氨基酸至约500个氨基酸,约240个氨基酸至约480个氨基酸,约240个氨基酸至约460个氨基酸,约240个氨基酸至约440个氨基酸,约240个氨基酸至约420个氨基酸,约240个氨基酸至约400个氨基酸,约240个氨基酸至约380个氨基酸,约240个氨基酸至约360个氨基酸,约240个氨基酸至约340个氨基酸,约240个氨基酸至约320个氨基酸,约240个氨基酸至约300个氨基酸,约240个氨基酸至约280个氨基酸,约240个氨基酸至约260个氨基酸,约260个氨基酸至约3000个氨基

酸,约260个氨基酸至约2500个氨基酸,约260个氨基酸至约2000个氨基酸,约260个氨基酸至约1500个氨基酸,约260个氨基酸至约1000个氨基酸,约260个氨基酸至约950个氨基酸,约260个氨基酸至约900个氨基酸,约260个氨基酸至约850个氨基酸,约260个氨基酸至约800个氨基酸,约260个氨基酸至约750个氨基酸,约260个氨基酸至约700个氨基酸,约260个氨基酸至约650个氨基酸,约260个氨基酸至约600个氨基酸,约260个氨基酸至约550个氨基酸,约260个氨基酸至约500个氨基酸,约260个氨基酸至约480个氨基酸,约260个氨基酸至约460个氨基酸,约260个氨基酸至约440个氨基酸,约260个氨基酸至约420个氨基酸,约260个氨基酸至约400个氨基酸,约260个氨基酸至约380个氨基酸,约260个氨基酸至约360个氨基酸,约260个氨基酸至约340个氨基酸,约260个氨基酸至约320个氨基酸,约260个氨基酸至约300个氨基酸,约260个氨基酸至约280个氨基酸,约280个氨基酸至约3000个氨基酸,约280个氨基酸至约2500个氨基酸,约280个氨基酸至约2000个氨基酸,约280个氨基酸至约1500个氨基酸,约280个氨基酸至约1000个氨基酸,约280个氨基酸至约950个氨基酸,约280个氨基酸至约900个氨基酸,约280个氨基酸至约850个氨基酸,约280个氨基酸至约800个氨基酸,约280个氨基酸至约750个氨基酸,约280个氨基酸至约700个氨基酸,约280个氨基酸至约650个氨基酸,约280个氨基酸至约600个氨基酸,约280个氨基酸至约550个氨基酸,约280个氨基酸至约500个氨基酸,约280个氨基酸至约480个氨基酸,约280个氨基酸至约460个氨基酸,约280个氨基酸至约440个氨基酸,约280个氨基酸至约420个氨基酸,约280个氨基酸至约400个氨基酸,约280个氨基酸至约380个氨基酸,约280个氨基酸至约360个氨基酸,约280个氨基酸至约340个氨基酸,约280个氨基酸至约320个氨基酸,约280个氨基酸至约300个氨基酸,约300个氨基酸至约3000个氨基酸,约300个氨基酸至约2500个氨基酸,约300个氨基酸至约2000个氨基酸,约300个氨基酸至约1500个氨基酸,约300个氨基酸至约1000个氨基酸,约300个氨基酸至约950个氨基酸,约300个氨基酸至约900个氨基酸,约300个氨基酸至约850个氨基酸,约300个氨基酸至约800个氨基酸,约300个氨基酸至约750个氨基酸,约300个氨基酸至约700个氨基酸,约300个氨基酸至约650个氨基酸,约300个氨基酸至约600个氨基酸,约300个氨基酸至约550个氨基酸,约300个氨基酸至约500个氨基酸,约300个氨基酸至约480个氨基酸,约300个氨基酸至约460个氨基酸,约300个氨基酸至约440个氨基酸,约300个氨基酸至约420个氨基酸,约300个氨基酸至约400个氨基酸,约300个氨基酸至约380个氨基酸,约300个氨基酸至约360个氨基酸,约300个氨基酸至约340个氨基酸,约300个氨基酸至约320个氨基酸,约320个氨基酸至约3000个氨基酸,约320个氨基酸至约2500个氨基酸,约320个氨基酸至约2000个氨基酸,约320个氨基酸至约1500个氨基酸,约320个氨基酸至约1000个氨基酸,约320个氨基酸至约950个氨基酸,约320个氨基酸至约900个氨基酸,约320个氨基酸至约850个氨基酸,约320个氨基酸至约800个氨基酸,约320个氨基酸至约750个氨基酸,约320个氨基酸至约700个氨基酸,约320个氨基酸至约650个氨基酸,约320个氨基酸至约600个氨基酸,约320个氨基酸至约550个氨基酸,约320个氨基酸至约500个氨基酸,约320个氨基酸至约480个氨基酸,约320个氨基酸至约460个氨基酸,约320个氨基酸至约440个氨基酸,约320个氨基酸至约420个氨基酸,约320个氨基酸至约400个氨基酸,约320个氨基酸至约380个氨基酸,约320个氨基酸至约360个氨基酸,约320个氨基酸至约340个氨基酸,约340个氨基酸至约3000个氨基酸,约340个氨基酸至约2500个氨基酸,约340个氨基酸至约2000个氨基酸,约340个氨基酸至约1500个氨基酸,约340个氨基酸至约

1000个氨基酸,约340个氨基酸至约950个氨基酸,约340个氨基酸至约900个氨基酸,约340个氨基酸至约850个氨基酸,约340个氨基酸至约800个氨基酸,约340个氨基酸至约750个氨基酸,约340个氨基酸至约700个氨基酸,约340个氨基酸至约650个氨基酸,约340个氨基酸至约600个氨基酸,约340个氨基酸至约550个氨基酸,约340个氨基酸至约500个氨基酸,约340个氨基酸至约480个氨基酸,约340个氨基酸至约460个氨基酸,约340个氨基酸至约440个氨基酸,约340个氨基酸至约420个氨基酸,约340个氨基酸至约400个氨基酸,约340个氨基酸至约380个氨基酸,约340个氨基酸至约360个氨基酸,约360个氨基酸至约3000个氨基酸,约360个氨基酸至约2500个氨基酸,约360个氨基酸至约2000个氨基酸,约360个氨基酸至约1500个氨基酸,约360个氨基酸至约1000个氨基酸,约360个氨基酸至约950个氨基酸,约360个氨基酸至约900个氨基酸,约360个氨基酸至约850个氨基酸,约360个氨基酸至约800个氨基酸,约360个氨基酸至约750个氨基酸,约360个氨基酸至约700个氨基酸,约360个氨基酸至约650个氨基酸,约360个氨基酸至约600个氨基酸,约360个氨基酸至约550个氨基酸,约360个氨基酸至约500个氨基酸,约360个氨基酸至约480个氨基酸,约360个氨基酸至约460个氨基酸,约360个氨基酸至约440个氨基酸,约360个氨基酸至约420个氨基酸,约360个氨基酸至约400个氨基酸,约360个氨基酸至约380个氨基酸,约380个氨基酸至约3000个氨基酸,约380个氨基酸至约2500个氨基酸,约380个氨基酸至约2000个氨基酸,约380个氨基酸至约1500个氨基酸,约380个氨基酸至约1000个氨基酸,约380个氨基酸至约950个氨基酸,约380个氨基酸至约900个氨基酸,约380个氨基酸至约850个氨基酸,约380个氨基酸至约800个氨基酸,约380个氨基酸至约750个氨基酸,约380个氨基酸至约700个氨基酸,约380个氨基酸至约650个氨基酸,约380个氨基酸至约600个氨基酸,约380个氨基酸至约550个氨基酸,约380个氨基酸至约500个氨基酸,约380个氨基酸至约480个氨基酸,约380个氨基酸至约460个氨基酸,约380个氨基酸至约440个氨基酸,约380个氨基酸至约420个氨基酸,约380个氨基酸至约400个氨基酸,约400个氨基酸至约3000个氨基酸,约400个氨基酸至约2500个氨基酸,约400个氨基酸至约2000个氨基酸,约400个氨基酸至约1500个氨基酸,约400个氨基酸至约1000个氨基酸,约400个氨基酸至约950个氨基酸,约400个氨基酸至约900个氨基酸,约400个氨基酸至约850个氨基酸,约400个氨基酸至约800个氨基酸,约400个氨基酸至约750个氨基酸,约400个氨基酸至约700个氨基酸,约400个氨基酸至约650个氨基酸,约400个氨基酸至约600个氨基酸,约400个氨基酸至约550个氨基酸,约400个氨基酸至约500个氨基酸,约400个氨基酸至约480个氨基酸,约400个氨基酸至约460个氨基酸,约400个氨基酸至约440个氨基酸,约400个氨基酸至约420个氨基酸,约420个氨基酸至约3000个氨基酸,约420个氨基酸至约2500个氨基酸,约420个氨基酸至约2000个氨基酸,约420个氨基酸至约1500个氨基酸,约420个氨基酸至约1000个氨基酸,约420个氨基酸至约950个氨基酸,约420个氨基酸至约900个氨基酸,约420个氨基酸至约850个氨基酸,约420个氨基酸至约800个氨基酸,约420个氨基酸至约750个氨基酸,约420个氨基酸至约700个氨基酸,约420个氨基酸至约650个氨基酸,约420个氨基酸至约600个氨基酸,约420个氨基酸至约550个氨基酸,约420个氨基酸至约500个氨基酸,约420个氨基酸至约480个氨基酸,约420个氨基酸至约460个氨基酸,约420个氨基酸至约440个氨基酸,约440个氨基酸至约3000个氨基酸,约440个氨基酸至约2500个氨基酸,约440个氨基酸至约2000个氨基酸,约440个氨基酸至约1500个氨基酸,约440个氨基酸至约1000个氨基酸,约440个氨基酸至约950个氨基酸,约440

个氨基酸至约900个氨基酸,约440个氨基酸至约850个氨基酸,约440个氨基酸至约800个氨基酸,约440个氨基酸至约750个氨基酸,约440个氨基酸至约700个氨基酸,约440个氨基酸至约650个氨基酸,约440个氨基酸至约600个氨基酸,约440个氨基酸至约550个氨基酸,约440个氨基酸至约500个氨基酸,约440个氨基酸至约480个氨基酸,约440个氨基酸至约460个氨基酸,约460个氨基酸至约3000个氨基酸,约460个氨基酸至约2500个氨基酸,约460个氨基酸至约2000个氨基酸,约460个氨基酸至约1500个氨基酸,约460个氨基酸至约1000个氨基酸,约460个氨基酸至约950个氨基酸,约460个氨基酸至约900个氨基酸,约460个氨基酸至约850个氨基酸,约460个氨基酸至约800个氨基酸,约460个氨基酸至约750个氨基酸,约460个氨基酸至约700个氨基酸,约460个氨基酸至约650个氨基酸,约460个氨基酸至约600个氨基酸,约460个氨基酸至约550个氨基酸,约460个氨基酸至约500个氨基酸,约460个氨基酸至约480个氨基酸,约480个氨基酸至约3000个氨基酸,约480个氨基酸至约2500个氨基酸,约480个氨基酸至约2000个氨基酸,约480个氨基酸至约1500个氨基酸,约480个氨基酸至约1000个氨基酸,约480个氨基酸至约950个氨基酸,约480个氨基酸至约900个氨基酸,约480个氨基酸至约850个氨基酸,约480个氨基酸至约800个氨基酸,约480个氨基酸至约750个氨基酸,约480个氨基酸至约700个氨基酸,约480个氨基酸至约650个氨基酸,约480个氨基酸至约600个氨基酸,约480个氨基酸至约550个氨基酸,约480个氨基酸至约500个氨基酸,约500个氨基酸至约3000个氨基酸,约500个氨基酸至约2500个氨基酸,约500个氨基酸至约2000个氨基酸,约500个氨基酸至约1500个氨基酸,约500个氨基酸至约1000个氨基酸,约500个氨基酸至约950个氨基酸,约500个氨基酸至约900个氨基酸,约500个氨基酸至约850个氨基酸,约500个氨基酸至约800个氨基酸,约500个氨基酸至约750个氨基酸,约500个氨基酸至约700个氨基酸,约500个氨基酸至约650个氨基酸,约500个氨基酸至约600个氨基酸,约500个氨基酸至约550个氨基酸,约550个氨基酸至约3000个氨基酸,约550个氨基酸至约2500个氨基酸,约550个氨基酸至约2000个氨基酸,约550个氨基酸至约1500个氨基酸,约550个氨基酸至约1000个氨基酸,约550个氨基酸至约950个氨基酸,约550个氨基酸至约900个氨基酸,约550个氨基酸至约850个氨基酸,约550个氨基酸至约800个氨基酸,约550个氨基酸至约750个氨基酸,约550个氨基酸至约700个氨基酸,约550个氨基酸至约650个氨基酸,约550个氨基酸至约600个氨基酸,约600个氨基酸至约3000个氨基酸,约600个氨基酸至约2500个氨基酸,约600个氨基酸至约2000个氨基酸,约600个氨基酸至约1500个氨基酸,约600个氨基酸至约1000个氨基酸,约600个氨基酸至约950个氨基酸,约600个氨基酸至约900个氨基酸,约600个氨基酸至约850个氨基酸,约600个氨基酸至约800个氨基酸,约600个氨基酸至约750个氨基酸,约600个氨基酸至约700个氨基酸,约600个氨基酸至约650个氨基酸,约650个氨基酸至约3000个氨基酸,约650个氨基酸至约2500个氨基酸,约650个氨基酸至约2000个氨基酸,约650个氨基酸至约1500个氨基酸,约650个氨基酸至约1000个氨基酸,约650个氨基酸至约950个氨基酸,约650个氨基酸至约900个氨基酸,约650个氨基酸至约850个氨基酸,约650个氨基酸至约800个氨基酸,约650个氨基酸至约750个氨基酸,约650个氨基酸至约700个氨基酸,约700个氨基酸至约3000个氨基酸,约700个氨基酸至约2500个氨基酸,约700个氨基酸至约2000个氨基酸,约700个氨基酸至约1500个氨基酸,约700个氨基酸至约1000个氨基酸,约700个氨基酸至约950个氨基酸,约700个氨基酸至约900个氨基酸,约700个氨基酸至约850个氨基酸,约700个氨基酸至约800个氨基酸,约700个氨基酸至约

750个氨基酸,约750个氨基酸至约3000个氨基酸,约750个氨基酸至约2500个氨基酸,约750个氨基酸至约2000个氨基酸,约750个氨基酸至约1500个氨基酸,约750个氨基酸至约1000个氨基酸,约750个氨基酸至约950个氨基酸,约750个氨基酸至约900个氨基酸,约750个氨基酸至约850个氨基酸,约750个氨基酸至约800个氨基酸,约800个氨基酸至约3000个氨基酸,约800个氨基酸至约2500个氨基酸,约800个氨基酸至约2000个氨基酸,约800个氨基酸至约1500个氨基酸,约800个氨基酸至约1000个氨基酸,约800个氨基酸至约950个氨基酸,约800个氨基酸至约900个氨基酸,约800个氨基酸至约850个氨基酸,约850个氨基酸至约3000个氨基酸,约850个氨基酸至约2500个氨基酸,约850个氨基酸至约2000个氨基酸,约850个氨基酸至约1500个氨基酸,约850个氨基酸至约1000个氨基酸,约850个氨基酸至约950个氨基酸,约850个氨基酸至约900个氨基酸,约900个氨基酸至约3000个氨基酸,约900个氨基酸至约2500个氨基酸,约900个氨基酸至约2000个氨基酸,约900个氨基酸至约1500个氨基酸,约900个氨基酸至约1000个氨基酸,约900个氨基酸至约950个氨基酸,约950个氨基酸至约3000个氨基酸,约950个氨基酸至约2500个氨基酸,约950个氨基酸至约2000个氨基酸,约950个氨基酸至约1500个氨基酸,约950个氨基酸至约1000个氨基酸,约1000个氨基酸至约3000个氨基酸,约1000个氨基酸至约2500个氨基酸,约1000个氨基酸至约2000个氨基酸,约1000个氨基酸至约1500个氨基酸,约1500个氨基酸至约3000个氨基酸,约1500个氨基酸至约2500个氨基酸,约1500个氨基酸至约2000个氨基酸,约2000个氨基酸至约3000个氨基酸,约2000个氨基酸至约2500个氨基酸,或约2500个氨基酸至约3000个氨基酸。

[1738] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽中的第一靶标结合域(例如本文所述的任一种示例性靶标结合域)与可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)彼此直接邻接。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一靶标结合域(例如本文所述的任一种示例性第一靶标结合域)与可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)之间的接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列)。

[1739] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)与亲和域对中的第一域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的任一种示例性第一域)彼此直接邻接。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)与亲和域对中的第一域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的任一种示例性第一域)之间的接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列)。

[1740] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的任一种示例性第二域)与第二靶标结合域(例如本文所述的任一种示例性第二靶标结合域)彼此直接邻接。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,

[1741] 第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的一对亲和域中的第二域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的的任一种示例性第二域)与第二靶标结合域(例如本文所述的任一种示例性第二靶标结合域)之间的接头序列(例如本文所述或所属领域已知的任一种示例性接头序列)。

[1742] 在任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括一个或多个(例如二、三、四、五、六、七、八、九或十个)其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域),其中一个或多个其它抗原结合域中的至少一个定位于可溶性组织因子域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性可溶性组织因子域)与亲和域对中的第一域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的任一种示例性第一域)之间。在一些实施例中,第一嵌合多肽可进一步包括介于可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个(例如本文描述或本领域已知的任一种示例性靶标结合域)之间的接头序列(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性接头序列),和/或介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性靶标结合域)与一对亲和域中的第一域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的本文所述的任一种示例性第一域)之间的接头序列(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性接头序列)。

[1743] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽还包括位于第一嵌合多肽N端和/或C端的一个或多个(例如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)其它靶标结合域。在一些实施例中,在第一嵌合多肽中,一个或多个其它靶标结合域中的至少一个(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性靶标结合域)直接邻接亲和域对中的第一域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的本文所述的任一种示例性第一域)。在一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于一个或多个其它靶标结合结构域中的至少一个(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性靶标结合域)与一对亲和域中的第一域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的本文所述的任一种示例性第一域)之间的接头序列(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性接头序列)。在一些实施例中,在第一嵌合多肽中,一个或多个其它靶标结合域中的至少一个(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性靶标结合域)直接邻接第一靶标结合域(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性靶标结合域)。在一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包含介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)与第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)之间的接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列)。

[1744] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,一个或多个其它靶标结合域中的至少一个(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)安置于第一嵌合多肽的N端和/或C端,并且一个或多个其它靶标结合域中的至少一个(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)定位于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性可溶性组织因子域)与亲和域对中的第一域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的任一种示例性第一域)之间。在一些实施例中,在第一嵌合多肽中,安置于N端的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个其它靶标结合域(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性靶标结合域)直接邻接第一靶标结合域(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性靶标结合域)或亲和域对中的第一域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的任一种示例性第一域)。在一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包含接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种接头序列),所述接头序列安置于第一嵌合多肽中的至少一个其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知

的任一种示例性靶标结合域)与第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)或亲和域对中的第一域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的本文所述的任一种示例性第一域)之间。在一些实施例中,在第一嵌合多肽中,安置于C端的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个其它靶标结合域(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性靶标结合域)直接邻接第一靶标结合域(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性靶标结合域)或亲和域对中的第一域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的任一种示例性第一域)。在一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列),所述接头序列安置于第一嵌合多肽中的至少一个其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)与第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)或亲和域对中的第一域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的本文所述的任一种示例性第一域)之间。在一些实施例中,定位于可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)与亲和域对中的第一域(例如本文所述的任一种第一域或本文所述的任一种示例性亲和域对)之间的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)直接邻接可溶性组织因子域和/或亲和域对中的第一域。在一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包含接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列),所述接头序列安置于(i)可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)之间,所述一个或多个其它靶标结合域定位于可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)与亲和域对中的第一域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的任一种示例性第一域)之间;和/或(ii)亲和域对中的第一域与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个之间,所述一个或多个其它靶标结合域定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[1745] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括一个或多个(例如二、三、四、五、六、七、八、九或十个)位于第二嵌合多肽N端和/或C端的其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)。在一些实施例中,在第二嵌合多肽中,一个或多个其它靶标结合域中的至少一个(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性靶标结合域)直接邻接亲和域对中的第二域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的任一种示例性第二域)。在一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性靶标结合域)与亲和域对中的第二域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的本文所述的任一种示例性第二域)之间的接头序列(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性接头序列)。在一些实施例中,在第二嵌合多肽中,一个或多个其它靶标结合域中的至少一个(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性靶标结合域)直接邻接第二靶标结合域(例如本文所述或本领域已知的任一种示例性靶标结合域)。在一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)与第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)之间的接头序列(例如本文所述或所属领域中

已知的任一种示例性接头序列)。

[1746] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽中的的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个(例如三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个或十个或更多个)特异性结合到相同的抗原。在一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个(例如三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个或十个或更多个)特异性结合到相同的表位。在一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个(例如三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个或十个或更多个)包括相同的氨基酸序列。在一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自特异性结合到相同的抗原。在一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自特异性结合到相同的表位。在一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自包括相同的氨基酸序列。

[1747] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域特异性结合到不同的抗原。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个靶标结合域中的一个或多个(例如两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个或十个或更多个)是抗原结合域。在一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自是抗原结合域(例如scFv或单域抗体)。

[1748] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)和一个或多个其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)中的一个或多个(例如二、三、四、五、六、七、八、九或十个)特异性地结合到选自由以下组成的群组的靶标:CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKP30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、IL-1的受体、IL-2的受体、IL-3的受体、IL-7的受体、IL-8的受体、IL-10的受体、IL-12的受体、IL-15的受体、IL-17的受体、IL-18的受体、IL-21的受体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体、CD122的受体和CD28的受体。

[1749] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)和一个或多个其它靶标结合域(例如本文所述

或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。可溶性白介素蛋白和可溶性细胞因子蛋白的非限制性实例包括:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。

[1750] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)和一个或多个其它靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子受体。可溶性白介素受体和可溶性细胞因子受体的非限制性实例包括:可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、可溶性NKG2D、可溶性NKP30、可溶性NKp44、可溶性NKp46、可溶性DNAM1、scMHCI、scMHCII、scTCR、可溶性CD155、可溶性CD122、可溶性CD3或可溶性CD28。

[1751] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述的任一种靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述的任一种靶标结合域)和一个或多个其它靶标结合域(例如本文所述的任一种靶标结合域)可以各自独立地特异性结合到选自以下群组的靶标:CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体和CD122的受体。

[1752] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述的任一种靶标结合域)、第二靶标结合域(例如本文所述的任一种靶标结合域)和一个或多个其它结合域(例如本文所述的任一种靶标结合域)中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性白介素或细胞因子蛋白选自以下群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。

[1753] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子受体。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、TNFα的可溶性受体、IL-4的可溶性受体,或IL-10的可溶性受体。

[1754] B型多链嵌合多肽

[1755] NK细胞活化剂的非限制性实例是多链嵌合多肽,其包括:(a)第一和第二嵌合多肽,其各自包括:(i)第一靶标结合域、(ii)Fc域,和(iii)一对亲和域中的第一域;以及(b)第三和第四嵌合多肽,其各自包括:(i)一对亲和域中的第二域,和(ii)第二靶标结合域,其中第一和第二嵌合多肽与第三和第四嵌合多肽经由亲和域对中的第一域与第二域的结合而发生缔合,并且第一和第二嵌合多肽经由其Fc域发生缔合。

[1756] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一和第二嵌合多肽中的第

一靶标结合域(例如本文所述的任一种示例性靶标结合域)与Fc域(例如本文所述的任一种示例性Fc域)彼此直接邻接。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一和第二嵌合多肽进一步包含介于第一靶标结合域(例如本文所述的任一种示例性第一靶标结合域)与Fc域(例如本文所述的任一种示例性Fc域)之间的接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列)。

[1757] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一和第二嵌合多肽中的Fc域(例如本文所述的任一种示例性Fc域)与亲和域对中的第一域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的任一种示例性第一域)彼此直接邻接。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一和第二嵌合多肽进一步包含介于第一和第二嵌合多肽中的Fc域(例如本文所述的任一种示例性Fc域)与亲和域对中的第一域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的任一种示例性第一域)之间的接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列)。

[1758] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第三和第四嵌合多肽中的亲和域对中的第二域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的任一种示例性第二域)与第二靶标结合域(例如本文所述的任一种示例性第二靶标结合域)彼此直接邻接。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第三和第四嵌合多肽进一步包含介于第三和第四嵌合多肽中的亲和域对中的第二域(例如本文所述的任一种示例性亲和域对中的任一种示例性第二域)与第二靶标结合域(例如本文所述的任一种示例性第二靶标结合域)之间的接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列)。

[1759] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的抗原。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的抗原。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的抗原。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到不同的抗原。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是抗原结合域。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自是抗原结合域。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,抗原结合域(例如本文所述的任一种示例性第二靶标结合域)包括scFv或单域抗体。

[1760] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)和第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)中的一个或两个特异性地结合到选自由以下组成的群组的靶标:CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26a、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、IL-1的受体、IL-2的受体、IL-3的受体、IL-7的受体、IL-8的受体、IL-10的

受体、IL-12的受体、IL-15的受体、IL-17的受体、IL-18的受体、IL-21的受体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体、CD122的受体和CD28的受体。

[1761] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)与第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性示例性靶标结合域)彼此直接邻接。可溶性白介素蛋白和可溶性细胞因子蛋白的非限制性实例包括:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。

[1762] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)是可溶性白介素或细胞因子受体。可溶性白介素受体和可溶性细胞因子受体的非限制性实例包括:可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、可溶性NKG2D、可溶性NKP30、可溶性NKp44、可溶性NKp46、可溶性DNAM1、scMHCI、scMHCII、scTCR、可溶性CD155、可溶性CD122、可溶性CD3或可溶性CD28。

[1763] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域可以各自独立地特异性结合到选自以下群组的靶标:CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体,和CD122的受体。

[1764] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性白介素或细胞因子蛋白选自以下群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。

[1765] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素受体或细胞因子受体。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、TNFα的可溶性受体、IL-4的可溶性受体,或IL-10的可溶性受体。

[1766] 组织因子

[1767] 人组织因子是263个氨基酸的跨膜蛋白,其含有三个结构域:(1)219个氨基酸的N端胞外域(残基1-219);(2)22个氨基酸的跨膜域(残基220-242);和(3)21个氨基酸的胞质C端尾(残基242-263)((UniProtKB标识符编号:P13726)。胞质尾在Ser253和Ser258处含有两个磷酸化位点,在Cys245处含有一个S-棕榈酰化位点。没有发现胞质域的缺失或突变影响组织因子凝血活性。组织因子在蛋白质胞内域中Cys245处具有一个S-棕榈酰化位点。Cys245位于胞内域的氨基酸端,并且靠近膜表面。组织因子跨膜域由单跨α-螺旋构成。

[1768] 由两个纤连蛋白III型结构域构成的组织因子的胞外域通过六氨基酸接头与跨膜域连接。这一接头提供构象灵活性,以使组织因子胞外域与其跨膜域和胞质域解偶联。每个组织因子纤连蛋白III型模块均由两个重叠的β折叠构成,其中顶层折叠结构域含有三个反平行的β链,而底层折叠含有四个β链。β链通过β环在链βA和βB、βC和βD以及βE和βF之间连接,其在两个模块中均构象保守。有三个短的α螺旋段连接β链。组织因子的独特特征是链β10与链β11之间的17个氨基酸的β-发夹,这不是纤连蛋白超家族的常见成分。N端域还在β6F与β7G之间包含一个12个氨基酸的环,所述环不存在于C端域,并且是组织因子特有的。这种纤连蛋白III型结构域结构是免疫球蛋白样家族蛋白质折叠的的特征,并且在广泛多种细胞外蛋白中是保守的。

[1769] 一旦酶原FVII与组织结合形成活性组织因子-FVIIa复合物,就可通过有限的蛋白水解将其迅速转化为FVIIa。FVIIa以大约0.1nM(血浆FVII的1%)的浓度作为酶循环,也可直接结合到组织因子。组织因子与FVIIa在组织因子-FVIIa复合物上的变构相互作用极大地提高了FVIIa的酶促活性:小的发色肽基底物的水解速率提高约20到100倍,并且天然大分子底物FIX和FX的活化速率提高接近一百万倍。与结合到组织因子时FVIIa活性位点的变构活化相一致,磷脂双层上组织因子-FVIIa复合物的形成(即,当磷脂酰-L-丝氨酸暴露在膜表面时)以Ca^{2+}依赖的方式提高FIX或FX活化的速率1000倍。相对于游离FVIIa,组织因子-FVIIa-磷脂复合物对FX活化的大约百万倍总体增加是凝血级联反应的关键调节点。

[1770] FVII是约50kDa的单链多肽,由406个氨基酸残基组成,具有N端富含γ-羧基谷氨酸(GLA)的结构域,两个表皮生长因子样结构域(EGF1和EFG2)和C端丝氨酸蛋白酶域。FVII通过在EGF2与蛋白酶域之间的短接头区中Ile^{-154}-Arg^{152}键的特异性蛋白水解裂解而被活化为FVIIa。这种裂解使得轻链和重链通过Cys^{135}和Cys^{262}的单个二硫键连在一起。FVIIa通过其N端GLA域以Ca^{2+}依赖性方式结合磷脂膜。GLA域的C端紧邻芳香族堆叠和两个EGF域。芳香族堆叠将GLA连接到结合单个Ca^{2+}离子的EGF1域。占用这一Ca^{2+}结合位点会增加FVIIa酰胺分解活性和组织因子缔合。催化三联体由His^{193}、Asp^{242}和Ser^{344}组成,并且FVIIa蛋白酶域内单个Ca^{2+}离子的结合对其催化活性至关重要。FVII对FVIIa的蛋白水解活化释放了Ile^{153}处新形成的氨基端,使其向后折叠并且插入活化袋中,与Asp^{343}的羧酸盐形成盐桥,以生成氧阴离子孔。这一盐桥的形成对于FVIIa活性至关重要。但是,在蛋白水解活化后,游离的FVIIa中不会发生氧阴离子孔的形成。结果,FVIIa以酶原样状态循环,血浆蛋白酶抑制剂不能很好识别所述状态,使其以大约90分钟的半衰期循环。

[1771] FVIIa活性位点在膜表面上方的组织因子介导的定位对于FVIIa朝向同源底物很重要。游离FVIIa在结合到膜上时采用稳定扩展结构,其活性位点定位在膜表面上方约80Å。FVIIa与组织因子结合后,FVa活性位点将重新定位为更靠近膜约6 Å。这种调节可帮助FVIIa催化三联体与靶标底物裂解位点正确对齐。使用无GLA域的FVIIa,已显示活性位点仍位于膜上方相似的距离,证明即使在没有FVIIa-膜相互作用的情况下,组织因子也能够完全支持FVIIa活性位点定位。另外的数据显示,只要组织因子胞外域以某种方式系栓到膜表面,组织因子就支持完全FVIIa蛋白水解活性。但是,将FVIIa的活性位点提高到膜表面上方大于80 Å会大大降低组织因子-FVIIa复合物活化FX的能力,但不会降低组织因子-FVIIa的酰胺分解活性。

[1772] 丙氨酸扫描诱变已用于评定组织因子胞外域中特定氨基酸侧链对与FVIIa相互作

用的作用(Gibbs等人,《生物化学(Biochemistry)》33(47):14003-14010,1994;Schullek等人,《生物化学杂志(JBiol Chem)》269(30):19399-19403,1994)。丙氨酸取代鉴定出有限数量的残基位置,在这些位置处,丙氨酸置换引起对FVIIa结合的亲和力降低5到10倍。发现这些残基侧链中的大多数在晶体结构中充分暴露于溶剂,与大分子配体相互作用一致。FVIIa配体结合位点位于两个模块之间边界处的宽广区上。在C模块中,位于突出的B-C环上的残基Arg^{135}和Phe^{140}提供与FVIIa的独立接触。Leu^{133}位于手指状结构的基底部,并且挤入两个模块之间的裂缝中。这提供由Lys^{20}、Thr^{60}、Asp^{58}和Ile^{22}组成的重要结合残基的主要簇的连续性。Thr^{60}仅部分暴露于溶剂,并且可能起局部结构作用,而不是与配体显著接触。结合位点延伸到模块间角的凹面,其涉及Glu^{24}和Gln^{110},并且可能涉及更远的残基Val^{207}。结合区从Asp58延伸到由Lys^{48}、Lys^{46}、Gln^{37}、Asp^{44}和Trp^{45}形成的凸表面区。Trp^{45}和Asp^{44}不会独立地与FVIIa相互作用,表明Trp^{45}位置处的突变效应可能反映这一侧链对邻近Asp^{44}和Gln^{37}侧链的局部堆积的结构重要性。相互作用区进一步包括两个表面暴露的芳香族残基Phe^{76}和Tyr^{78},其在N模块中形成疏水簇的一部分。

[1773] 组织因子-FVIIa的已知生理底物是FVII、FIX和FX以及某些蛋白酶活化的受体。突变分析已鉴定出许多残基,当突变时,所述残基支持对小肽基底物的完全FVIIa酰胺分解活性,但缺少支持大分子底物(即,FVII、FIX和FX)活化的能力(Ruf等人,《生物化学杂志》267(31):22206-22210,1992;Ruf等人,《生物化学杂志》267(9):6375-6381,1992;Huang等人,《生物化学杂志》271(36):21752-21757,1996;Kirchhofer等人,《生物化学》39(25):7380-7387,2000)。已显示在残基159-165处的组织因子环区和在这一柔性环中或附近的残基对于组织因子-FVIIa复合物的蛋白水解活性至关重要。这定义了提出的组织因子的底物结合位点外区,所述区与FVIIa活性位点相距甚远。甘氨酸残基被稍大的残基丙氨酸取代会大大损害组织因子-FVIIa的蛋白水解活性。这表明甘氨酸提供的柔性对于用于组织因子大分子底物识别的残基159-165的环至关重要。

[1774] 还证明了残基Lys^{165}和Lys^{166}对于底物识别和结合很重要。这些残基中的任何一个突变为丙氨酸均会引起组织因子辅助因子功能的显著降低。在大多数组织因子-FVIIa结构中,Lys^{165}和Lys^{166}彼此背对,Lys^{165}指向的FVIIa,而Lys^{166}指向晶体结构中的底物结合位点外区。FVIIa的Lys^{165}和Gla^{35}之间的推定盐桥形成将支持组织因子与FVIIa的GLA域相互作用调节底物识别的观点。这些结果表明,组织因子胞外域的C端部分直接与FIX和FX的GLA域、可能的邻近EGF1域相互作用,并且FVIIa GLA域的存在可直接或间接调节这些相互作用。

[1775] 可溶性组织因子域

[1776] 在本文所述的任何多肽、组合物或方法的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是缺少信号序列、跨膜域和胞内域的野生型组织因子多肽。在一些实例中,可溶性组织因子域可以是组织因子突变体,其中野生型组织因子多肽缺少信号序列、跨膜域和胞内域,并且已在选定的氨基酸处被进一步修饰。在一些实例中,可溶性组织因子域可以是人可溶性组织因子域。在一些实例中,可溶性组织因子域可以是小鼠可溶性组织因子域。在一些实例中,可溶性组织因子域可以是大鼠可溶性组织因子域。人可溶性组织因子域、小鼠可溶性组织因子域、大鼠可溶性组织因子域和突变可溶性组织因子域的非限制性实例在下文显示。

[1777] 示例性人可溶性组织因子域(SEQ ID NO:93)

[1778] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTEC

[1779] DLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSF

[1780] EQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTN

[1781] EFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[1782] 编码人可溶性组织因子域的示例性核酸(SEQ ID NO:94)

[1783] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACT

[1784] TCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCA

[1785] GATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCG

[1786] AGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCG

[1787] GGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTT

[1788] TATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCC

[1789] ACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACG

[1790] AGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGG

[1791] CAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGA

[1792] CAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTA

[1793] CTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACC

[1794] GATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[1795] 示例性小鼠可溶性组织因子域(SEQ ID NO:95)

[1796] agipekafnltwistdfktilewqpkptnytytvqisdrsrnwknkcfsttdtecdltdeivk

[1797] dvtwayeakvlsvprrnsvhgdgdqlvihgeeppftnap

[1798] kflpyrdtnlgqpviqqfeqdgrklnvvvkdsltlvrkngtfltlrqvfgkdlgyiityrkgs

[1799] stgkktnitntnefsidveegvsycffvqamifsrktnqnspgsstvcteqwksflge

[1800] 示例性大鼠可溶性组织因子域(SEQ ID NO:96)

[1801] Agtppgkafnltwistdfktilewqpkptnytytvqisdrsrnwkykctgttdtecdltdeiv

[1802] kdvnwtyearvlsvpwrnsthgketlfgthgeeppftnarkflpyrdtkigqpviqkyeqggt

[1803] klkvtvkdsftlvrkngtfltlrqvfgndlgyiltyrkdsstgrktntthtneflidvekgvs

[1804] ycffaqavifsrktnhkspesitkcteqwksvlge

[1805] 示例性人突变型可溶性组织因子域(SEQ ID NO:97)

[1806] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFATALEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECALTDEI

[1807] VKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVT

[1808] VEDERTLVARNNTALSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSV

[1809] QAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[1810] 示例性人突变型可溶性组织因子域(SEQ ID NO:98)

[1811] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFATALEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDAKSKCFYTTDTECALTDEI

[1812] VKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLAENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVT

[1813] VEDERTLVARNNTALSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSV

[1814] QAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[1815] 在一些实施例中,可溶性组织因子域可以包括与SEQ ID NO:93、95、96、97或98至少70%一致、至少72%一致、至少74%一致、至少76%一致、至少78%一致、至少80%一致、至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一

致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致的序列。在一些实施例中,可溶性组织因子域可以包括SEQ ID NO:93、95、96、97或98的序列,其N端有一到二十个氨基酸(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸)已去除和/或其C端有一到二十个氨基酸(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸)已去除。

[1816] 如本领域中可了解,本领域技术人员将理解,在不同哺乳动物物种之间保守的氨基酸的突变更可能降低蛋白质的活性和/或结构稳定性,而在不同哺乳动物物种之间不保守的蛋白质的突变不太可能降低蛋白质的活性和/或结构稳定性。

[1817] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实例中,可溶性组织因子域不能结合到因子VIIa。在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实例中,可溶性组织因子域不将非活性因子X转化为因子Xa。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,多链嵌合多肽不刺激哺乳动物的凝血。

[1818] 在一些实例中,可溶性组织因子域可以是人可溶性组织因子域。在一些实施例中,可溶性组织因子域可以是小鼠可溶性组织因子域。在一些实施例中,可溶性组织因子域可以是大鼠可溶性组织因子域。

[1819] 在一些实例中,可溶性组织因子域不包括以下中的一个或多个(例如二、三、四、五、六或七个):位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。在一些实施例中,突变可溶性组织因子具有SEQ ID NO:97或SEQ ID NO:98的氨基酸序列。

[1820] 在一些实施例中,可溶性组织因子域可以由核酸编码,所述核酸包括与SEQ ID NO:94至少70％一致、至少72％一致、至少74％一致、至少76％一致、至少78％一致、至少80％一致、至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致的序列。

[1821] 在一些实施例中,可溶性组织因子域的总长度可以是约20个氨基酸至约220个氨基酸,约20个氨基酸至约215个氨基酸,约20个氨基酸至约210个氨基酸,约20个氨基酸至约205个氨基酸,约20个氨基酸至约200个氨基酸,约20个氨基酸至约195个氨基酸,约20个氨基酸至约190个氨基酸,约20个氨基酸至约185个氨基酸,约20个氨基酸至约180个氨基酸,约20个氨基酸至约175个氨基酸,约20个氨基酸至约170个氨基酸,约20个氨基酸至约165个氨基酸,约20个氨基酸至约160个氨基酸,约20个氨基酸至约155个氨基酸,约20个氨基酸至约150个氨基酸,约20个氨基酸至约145个氨基酸,约20个氨基酸至约140个氨基酸,约20个氨基酸至约135个氨基酸,约20个氨基酸至约130个氨基酸,约20个氨基酸至约125个氨基酸,约20个氨基酸至约120个氨基酸,约20个氨基酸至约115个氨基酸,约20个氨基酸至约110个氨基酸,约20个氨基酸至约105个氨基酸,约20个氨基酸至约100个氨基酸,约20个氨

基酸至约95个氨基酸,约20个氨基酸至约90个氨基酸,约20个氨基酸至约85个氨基酸,约20个氨基酸至约80个氨基酸,约20个氨基酸至约75个氨基酸,约20个氨基酸至约70个氨基酸,约20个氨基酸至约60个氨基酸,约20个氨基酸至约50个氨基酸,约20个氨基酸至约40个氨基酸,约20个氨基酸至约30个氨基酸,约30个氨基酸至约220个氨基酸,约30个氨基酸至约215个氨基酸,约30个氨基酸至约210个氨基酸,约30个氨基酸至约205个氨基酸,约30个氨基酸至约200个氨基酸,约30个氨基酸至约195个氨基酸,约30个氨基酸至约190个氨基酸,约30个氨基酸至约185个氨基酸,约30个氨基酸至约180个氨基酸,约30个氨基酸至约175个氨基酸,约30个氨基酸至约170个氨基酸,约30个氨基酸至约165个氨基酸,约30个氨基酸至约160个氨基酸,约30个氨基酸至约155个氨基酸,约30个氨基酸至约150个氨基酸,约30个氨基酸至约145个氨基酸,约30个氨基酸至约140个氨基酸,约30个氨基酸至约135个氨基酸,约30个氨基酸至约130个氨基酸,约30个氨基酸至约125个氨基酸,约30个氨基酸至约120个氨基酸,约30个氨基酸至约115个氨基酸,约30个氨基酸至约110个氨基酸,约30个氨基酸至约105个氨基酸,约30个氨基酸至约100个氨基酸,约30个氨基酸至约95个氨基酸,约30个氨基酸至约90个氨基酸,约30个氨基酸至约85个氨基酸,约30个氨基酸至约80个氨基酸,约30个氨基酸至约75个氨基酸,约30个氨基酸至约70个氨基酸,约30个氨基酸至约60个氨基酸,约30个氨基酸至约50个氨基酸,约30个氨基酸至约40个氨基酸,约40个氨基酸至约220个氨基酸,约40个氨基酸至约215个氨基酸,约40个氨基酸至约210个氨基酸,约40个氨基酸至约205个氨基酸,约40个氨基酸至约200个氨基酸,约40个氨基酸至约195个氨基酸,约40个氨基酸至约190个氨基酸,约40个氨基酸至约185个氨基酸,约40个氨基酸至约180个氨基酸,约40个氨基酸至约175个氨基酸,约40个氨基酸至约170个氨基酸,约40个氨基酸至约165个氨基酸,约40个氨基酸至约160个氨基酸,约40个氨基酸至约155个氨基酸,约40个氨基酸至约150个氨基酸,约40个氨基酸至约145个氨基酸,约40个氨基酸至约140个氨基酸,约40个氨基酸至约135个氨基酸,约40个氨基酸至约130个氨基酸,约40个氨基酸至约125个氨基酸,约40个氨基酸至约120个氨基酸,约40个氨基酸至约115个氨基酸,约40个氨基酸至约110个氨基酸,约40个氨基酸至约105个氨基酸,约40个氨基酸至约100个氨基酸,约40个氨基酸至约95个氨基酸,约40个氨基酸至约90个氨基酸,约40个氨基酸至约85个氨基酸,约40个氨基酸至约80个氨基酸,约40个氨基酸至约75个氨基酸,约40个氨基酸至约70个氨基酸,约40个氨基酸至约60个氨基酸,约40个氨基酸至约50个氨基酸,约50个氨基酸至约220个氨基酸,约50个氨基酸至约215个氨基酸,约50个氨基酸至约210个氨基酸,约50个氨基酸至约205个氨基酸,约50个氨基酸至约200个氨基酸,约50个氨基酸至约195个氨基酸,约50个氨基酸至约190个氨基酸,约50个氨基酸至约185个氨基酸,约50个氨基酸至约180个氨基酸,约50个氨基酸至约175个氨基酸,约50个氨基酸至约170个氨基酸,约50个氨基酸至约165个氨基酸,约50个氨基酸至约160个氨基酸,约50个氨基酸至约155个氨基酸,约50个氨基酸至约150个氨基酸,约50个氨基酸至约145个氨基酸,约50个氨基酸至约140个氨基酸,约50个氨基酸至约135个氨基酸,约50个氨基酸至约130个氨基酸,约50个氨基酸至约125个氨基酸,约50个氨基酸至约120个氨基酸,约50个氨基酸至约115个氨基酸,约50个氨基酸至约110个氨基酸,约50个氨基酸至约105个氨基酸,约50个氨基酸至约100个氨基酸,约50个氨基酸至约95个氨基酸,约50个氨基酸至约90个氨基酸,约50个氨基酸至约85个氨基酸,约50个氨基酸至约80个氨基酸,约50个氨基酸至约75个氨基酸,约50个氨基酸至约

70个氨基酸,约50个氨基酸至约60个氨基酸,约60个氨基酸至约220个氨基酸,约60个氨基酸至约215个氨基酸,约60个氨基酸至约210个氨基酸,约60个氨基酸至约205个氨基酸,约60个氨基酸至约200个氨基酸,约60个氨基酸至约195个氨基酸,约60个氨基酸至约190个氨基酸,约60个氨基酸至约185个氨基酸,约60个氨基酸至约180个氨基酸,约60个氨基酸至约175个氨基酸,约60个氨基酸至约170个氨基酸,约60个氨基酸至约165个氨基酸,约60个氨基酸至约160个氨基酸,约60个氨基酸至约155个氨基酸,约60个氨基酸至约150个氨基酸,约60个氨基酸至约145个氨基酸,约60个氨基酸至约140个氨基酸,约60个氨基酸至约135个氨基酸,约60个氨基酸至约130个氨基酸,约60个氨基酸至约125个氨基酸,约60个氨基酸至约120个氨基酸,约60个氨基酸至约115个氨基酸,约60个氨基酸至约110个氨基酸,约60个氨基酸至约105个氨基酸,约60个氨基酸至约100个氨基酸,约60个氨基酸至约95个氨基酸,约60个氨基酸至约90个氨基酸,约60个氨基酸至约85个氨基酸,约60个氨基酸至约80个氨基酸,约60个氨基酸至约75个氨基酸,约60个氨基酸至约70个氨基酸,约70个氨基酸至约220个氨基酸,约70个氨基酸至约215个氨基酸,约70个氨基酸至约210个氨基酸,约70个氨基酸至约205个氨基酸,约70个氨基酸至约200个氨基酸,约70个氨基酸至约195个氨基酸,约70个氨基酸至约190个氨基酸,约70个氨基酸至约185个氨基酸,约70个氨基酸至约180个氨基酸,约70个氨基酸至约175个氨基酸,约70个氨基酸至约170个氨基酸,约70个氨基酸至约165个氨基酸,约70个氨基酸至约160个氨基酸,约70个氨基酸至约155个氨基酸,约70个氨基酸至约150个氨基酸,约70个氨基酸至约145个氨基酸,约70个氨基酸至约140个氨基酸,约70个氨基酸至约135个氨基酸,约70个氨基酸至约130个氨基酸,约70个氨基酸至约125个氨基酸,约70个氨基酸至约120个氨基酸,约70个氨基酸至约115个氨基酸,约70个氨基酸至约110个氨基酸,约70个氨基酸至约105个氨基酸,约70个氨基酸至约100个氨基酸,约70个氨基酸至约95个氨基酸,约70个氨基酸至约90个氨基酸,约70个氨基酸至约85个氨基酸,约70个氨基酸至约80个氨基酸,约80个氨基酸至约220个氨基酸,约80个氨基酸至约215个氨基酸,约80个氨基酸至约210个氨基酸,约80个氨基酸至约205个氨基酸,约80个氨基酸至约200个氨基酸,约80个氨基酸至约195个氨基酸,约80个氨基酸至约190个氨基酸,约80个氨基酸至约185个氨基酸,约80个氨基酸至约180个氨基酸,约80个氨基酸至约175个氨基酸,约80个氨基酸至约170个氨基酸,约80个氨基酸至约165个氨基酸,约80个氨基酸至约160个氨基酸,约80个氨基酸至约155个氨基酸,约80个氨基酸至约150个氨基酸,约80个氨基酸至约145个氨基酸,约80个氨基酸至约140个氨基酸,约80个氨基酸至约135个氨基酸,约80个氨基酸至约130个氨基酸,约80个氨基酸至约125个氨基酸,约80个氨基酸至约120个氨基酸,约80个氨基酸至约115个氨基酸,约80个氨基酸至约110个氨基酸,约80个氨基酸至约105个氨基酸,约80个氨基酸至约100个氨基酸,约80个氨基酸至约95个氨基酸,约80个氨基酸至约90个氨基酸,约90个氨基酸至约220个氨基酸,约90个氨基酸至约215个氨基酸,约90个氨基酸至约210个氨基酸,约90个氨基酸至约205个氨基酸,约90个氨基酸至约200个氨基酸,约90个氨基酸至约195个氨基酸,约90个氨基酸至约190个氨基酸,约90个氨基酸至约185个氨基酸,约90个氨基酸至约180个氨基酸,约90个氨基酸至约175个氨基酸,约90个氨基酸至约170个氨基酸,约90个氨基酸至约165个氨基酸,约90个氨基酸至约160个氨基酸,约90个氨基酸至约155个氨基酸,约90个氨基酸至约150个氨基酸,约90个氨基酸至约145个氨基酸,约90个氨基酸至约140个氨基酸,约90个氨基酸至约135个氨基酸,约90个

氨基酸至约130个氨基酸,约90个氨基酸至约125个氨基酸,约90个氨基酸至约120个氨基酸,约90个氨基酸至约115个氨基酸,约90个氨基酸至约110个氨基酸,约90个氨基酸至约105个氨基酸,约90个氨基酸至约100个氨基酸,约100个氨基酸至约220个氨基酸,约100个氨基酸至约215个氨基酸,约100个氨基酸至约210个氨基酸,约100个氨基酸至约205个氨基酸,约100个氨基酸至约200个氨基酸,约100个氨基酸至约195个氨基酸,约100个氨基酸至约190个氨基酸,约100个氨基酸至约185个氨基酸,约100个氨基酸至约180个氨基酸,约100个氨基酸至约175个氨基酸,约100个氨基酸至约170个氨基酸,约100个氨基酸至约165个氨基酸,约100个氨基酸至约160个氨基酸,约100个氨基酸至约155个氨基酸,约100个氨基酸至约150个氨基酸,约100个氨基酸至约145个氨基酸,约100个氨基酸至约140个氨基酸,约100个氨基酸至约135个氨基酸,约100个氨基酸至约130个氨基酸,约100个氨基酸至约125个氨基酸,约100个氨基酸至约120个氨基酸,约100个氨基酸至约115个氨基酸,约100个氨基酸至约110个氨基酸,约110个氨基酸至约220个氨基酸,约110个氨基酸至约215个氨基酸,约110个氨基酸至约210个氨基酸,约110个氨基酸至约205个氨基酸,约110个氨基酸至约200个氨基酸,约110个氨基酸至约195个氨基酸,约110个氨基酸至约190个氨基酸,约110个氨基酸至约185个氨基酸,约110个氨基酸至约180个氨基酸,约110个氨基酸至约175个氨基酸,约110个氨基酸至约170个氨基酸,约110个氨基酸至约165个氨基酸,约110个氨基酸至约160个氨基酸,约110个氨基酸至约155个氨基酸,约110个氨基酸至约150个氨基酸,约110个氨基酸至约145个氨基酸,约110个氨基酸至约140个氨基酸,约110个氨基酸至约135个氨基酸,约110个氨基酸至约130个氨基酸,约110个氨基酸至约125个氨基酸,约110个氨基酸至约120个氨基酸,约110个氨基酸至约115个氨基酸,约115个氨基酸至约220个氨基酸,约115个氨基酸至约215个氨基酸,约115个氨基酸至约210个氨基酸,约115个氨基酸至约205个氨基酸,约115个氨基酸至约200个氨基酸,约115个氨基酸至约195个氨基酸,约115个氨基酸至约190个氨基酸,约115个氨基酸至约185个氨基酸,约115个氨基酸至约180个氨基酸,约115个氨基酸至约175个氨基酸,约115个氨基酸至约170个氨基酸,约115个氨基酸至约165个氨基酸,约115个氨基酸至约160个氨基酸,约115个氨基酸至约155个氨基酸,约115个氨基酸至约150个氨基酸,约115个氨基酸至约145个氨基酸,约115个氨基酸至约140个氨基酸,约115个氨基酸至约135个氨基酸,约115个氨基酸至约130个氨基酸,约115个氨基酸至约125个氨基酸,约115个氨基酸至约120个氨基酸,约120个氨基酸至约220个氨基酸,约120个氨基酸至约215个氨基酸,约120个氨基酸至约210个氨基酸,约120个氨基酸至约205个氨基酸,约120个氨基酸至约200个氨基酸,约120个氨基酸至约195个氨基酸,约120个氨基酸至约190个氨基酸,约120个氨基酸至约185个氨基酸,约120个氨基酸至约180个氨基酸,约120个氨基酸至约175个氨基酸,约120个氨基酸至约170个氨基酸,约120个氨基酸至约165个氨基酸,约120个氨基酸至约160个氨基酸,约120个氨基酸至约155个氨基酸,约120个氨基酸至约150个氨基酸,约120个氨基酸至约145个氨基酸,约120个氨基酸至约140个氨基酸,约120个氨基酸至约135个氨基酸,约120个氨基酸至约130个氨基酸,约120个氨基酸至约125个氨基酸,约125个氨基酸至约220个氨基酸,约125个氨基酸至约215个氨基酸,约125个氨基酸至约210个氨基酸,约125个氨基酸至约205个氨基酸,约125个氨基酸至约200个氨基酸,约125个氨基酸至约195个氨基酸,约125个氨基酸至约190个氨基酸,约125个氨基酸至约185个氨基酸,约125个氨基酸至约180个氨基酸,约125个氨基酸至约175个氨

基酸,约125个氨基酸至约170个氨基酸,约125个氨基酸至约165个氨基酸,约125个氨基酸至约160个氨基酸,约125个氨基酸至约155个氨基酸,约125个氨基酸至约150个氨基酸,约125个氨基酸至约145个氨基酸,约125个氨基酸至约140个氨基酸,约125个氨基酸至约135个氨基酸,约125个氨基酸至约130个氨基酸,约130个氨基酸至约220个氨基酸,约130个氨基酸至约215个氨基酸,约130个氨基酸至约210个氨基酸,约130个氨基酸至约205个氨基酸,约130个氨基酸至约200个氨基酸,约130个氨基酸至约195个氨基酸,约130个氨基酸至约190个氨基酸,约130个氨基酸至约185个氨基酸,约130个氨基酸至约180个氨基酸,约130个氨基酸至约175个氨基酸,约130个氨基酸至约170个氨基酸,约130个氨基酸至约165个氨基酸,约130个氨基酸至约160个氨基酸,约130个氨基酸至约155个氨基酸,约130个氨基酸至约150个氨基酸,约130个氨基酸至约145个氨基酸,约130个氨基酸至约140个氨基酸,约130个氨基酸至约135个氨基酸,约135个氨基酸至约220个氨基酸,约135个氨基酸至约215个氨基酸,约135个氨基酸至约210个氨基酸,约135个氨基酸至约205个氨基酸,约135个氨基酸至约200个氨基酸,约135个氨基酸至约195个氨基酸,约135个氨基酸至约190个氨基酸,约135个氨基酸至约185个氨基酸,约135个氨基酸至约180个氨基酸,约135个氨基酸至约175个氨基酸,约135个氨基酸至约170个氨基酸,约135个氨基酸至约165个氨基酸,约135个氨基酸至约160个氨基酸,约135个氨基酸至约155个氨基酸,约135个氨基酸至约150个氨基酸,约135个氨基酸至约145个氨基酸,约135个氨基酸至约140个氨基酸,约140个氨基酸至约220个氨基酸,约140个氨基酸至约215个氨基酸,约140个氨基酸至约210个氨基酸,约140个氨基酸至约205个氨基酸,约140个氨基酸至约200个氨基酸,约140个氨基酸至约195个氨基酸,约140个氨基酸至约190个氨基酸,约140个氨基酸至约185个氨基酸,约140个氨基酸至约180个氨基酸,约140个氨基酸至约175个氨基酸,约140个氨基酸至约170个氨基酸,约140个氨基酸至约165个氨基酸,约140个氨基酸至约160个氨基酸,约140个氨基酸至约155个氨基酸,约140个氨基酸至约150个氨基酸,约140个氨基酸至约145个氨基酸,约145个氨基酸至约220个氨基酸,约145个氨基酸至约215个氨基酸,约145个氨基酸至约210个氨基酸,约145个氨基酸至约205个氨基酸,约145个氨基酸至约200个氨基酸,约145个氨基酸至约195个氨基酸,约145个氨基酸至约190个氨基酸,约145个氨基酸至约185个氨基酸,约145个氨基酸至约180个氨基酸,约145个氨基酸至约175个氨基酸,约145个氨基酸至约170个氨基酸,约145个氨基酸至约165个氨基酸,约145个氨基酸至约160个氨基酸,约145个氨基酸至约155个氨基酸,约145个氨基酸至约150个氨基酸,约150个氨基酸至约220个氨基酸,约150个氨基酸至约215个氨基酸,约150个氨基酸至约210个氨基酸,约150个氨基酸至约205个氨基酸,约150个氨基酸至约200个氨基酸,约150个氨基酸至约195个氨基酸,约150个氨基酸至约190个氨基酸,约150个氨基酸至约185个氨基酸,约150个氨基酸至约180个氨基酸,约150个氨基酸至约175个氨基酸,约150个氨基酸至约170个氨基酸,约150个氨基酸至约165个氨基酸,约150个氨基酸至约160个氨基酸,约150个氨基酸至约155个氨基酸,约155个氨基酸至约220个氨基酸,约155个氨基酸至约215个氨基酸,约155个氨基酸至约210个氨基酸,约155个氨基酸至约205个氨基酸,约155个氨基酸至约200个氨基酸,约155个氨基酸至约195个氨基酸,约155个氨基酸至约190个氨基酸,约155个氨基酸至约185个氨基酸,约155个氨基酸至约180个氨基酸,约155个氨基酸至约175个氨基酸,约155个氨基酸至约170个氨基酸,约155个氨基酸至约165个氨基酸,约155个氨基酸至约160个氨基酸,约160

个氨基酸至约220个氨基酸,约160个氨基酸至约215个氨基酸,约160个氨基酸至约210个氨基酸,约160个氨基酸至约205个氨基酸,约160个氨基酸至约200个氨基酸,约160个氨基酸至约195个氨基酸,约160个氨基酸至约190个氨基酸,约160个氨基酸至约185个氨基酸,约160个氨基酸至约180个氨基酸,约160个氨基酸至约175个氨基酸,约160个氨基酸至约170个氨基酸,约160个氨基酸至约165个氨基酸,约165个氨基酸至约220个氨基酸,约165个氨基酸至约215个氨基酸,约165个氨基酸至约210个氨基酸,约165个氨基酸至约205个氨基酸,约165个氨基酸至约200个氨基酸,约165个氨基酸至约195个氨基酸,约165个氨基酸至约190个氨基酸,约165个氨基酸至约185个氨基酸,约165个氨基酸至约180个氨基酸,约165个氨基酸至约175个氨基酸,约165个氨基酸至约170个氨基酸,约170个氨基酸至约220个氨基酸,约170个氨基酸至约215个氨基酸,约170个氨基酸至约210个氨基酸,约170个氨基酸至约205个氨基酸,约170个氨基酸至约200个氨基酸,约170个氨基酸至约195个氨基酸,约170个氨基酸至约190个氨基酸,约170个氨基酸至约185个氨基酸,约170个氨基酸至约180个氨基酸,约170个氨基酸至约175个氨基酸,约175个氨基酸至约220个氨基酸,约175个氨基酸至约215个氨基酸,约175个氨基酸至约210个氨基酸,约175个氨基酸至约205个氨基酸,约175个氨基酸至约200个氨基酸,约175个氨基酸至约195个氨基酸,约175个氨基酸至约190个氨基酸,约175个氨基酸至约185个氨基酸,约175个氨基酸至约180个氨基酸,约180个氨基酸至约220个氨基酸,约180个氨基酸至约215个氨基酸,约180个氨基酸至约210个氨基酸,约180个氨基酸至约205个氨基酸,约180个氨基酸至约200个氨基酸,约180个氨基酸至约195个氨基酸,约180个氨基酸至约190个氨基酸,约180个氨基酸至约185个氨基酸,约185个氨基酸至约220个氨基酸,约185个氨基酸至约215个氨基酸,约185个氨基酸至约210个氨基酸,约185个氨基酸至约205个氨基酸,约185个氨基酸至约200个氨基酸,约185个氨基酸至约195个氨基酸,约185个氨基酸至约190个氨基酸,约190个氨基酸至约220个氨基酸,约190个氨基酸至约215个氨基酸,约190个氨基酸至约210个氨基酸,约190个氨基酸至约205个氨基酸,约190个氨基酸至约200个氨基酸,约190个氨基酸至约195个氨基酸,约195个氨基酸至约220个氨基酸,约195个氨基酸至约215个氨基酸,约195个氨基酸至约210个氨基酸,约195个氨基酸至约205个氨基酸,约195个氨基酸至约200个氨基酸,约200个氨基酸至约220个氨基酸,约200个氨基酸至约215个氨基酸,约200个氨基酸至约210个氨基酸,约200个氨基酸至约205个氨基酸,约205个氨基酸至约220个氨基酸,约205个氨基酸至约215个氨基酸,约205个氨基酸至约210个氨基酸,约210个氨基酸至约220个氨基酸,约210个氨基酸至约215个氨基酸,或约215个氨基酸至约220个氨基酸。

[1822] 接头序列

[1823] 在一些实施例中,接头序列可以是柔性接头序列。可使用的接头序列的非限制性实例描述于Klein等人,《蛋白质工程、设计和选择(Protein Engineering,Design&Selection)》27(10):325-330,2014;Priyanka等人,《蛋白质科学(Protein Sci.)》22(2):153-167,2013中。在一些实例中,接头序列是合成接头序列。

[1824] 在一些实施例中,本文所述的任一种单链嵌合多肽可以包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个接头序列(例如相同或不同的接头序列,例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列)。在一些实施例中,本文所述的任一种单链嵌合多肽可以包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个接头序列(例

如相同或不同的接头序列,例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列)。

[1825] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽可包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个接头序列(例如相同或不同的接头序列,例如本文所描述或本领域已知的任一种示例性接头序列)。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽可包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个接头序列(例如相同或不同的接头序列,例如本文所描述或本领域已知的任一种示例性接头序列)。

[1826] 在一些实施例中,接头序列的总长度可以是1个氨基酸至约100个氨基酸,1个氨基酸至约90个氨基酸,1个氨基酸至约80个氨基酸,1个氨基酸至约70个氨基酸,1个氨基酸至约60个氨基酸,1个氨基酸至约50个氨基酸,1个氨基酸至约45个氨基酸,1个氨基酸至约40个氨基酸,1个氨基酸至约35个氨基酸,1个氨基酸至约30个氨基酸,1个氨基酸至约25个氨基酸,1个氨基酸至约24个氨基酸,1个氨基酸至约22个氨基酸,1个氨基酸至约20个氨基酸,1个氨基酸至约18个氨基酸,1个氨基酸至约16个氨基酸,1个氨基酸至约14个氨基酸,1个氨基酸至约12个氨基酸,1个氨基酸至约10个氨基酸,1个氨基酸至约8个氨基酸,1个氨基酸至约6个氨基酸,1个氨基酸至约4个氨基酸,约2个氨基酸至约100个氨基酸,约2个氨基酸至约90个氨基酸,约2个氨基酸至约80个氨基酸,约2个氨基酸至约70个氨基酸,约2个氨基酸至约60个氨基酸,约2个氨基酸至约50个氨基酸,约2个氨基酸至约45个氨基酸,约2个氨基酸至约40个氨基酸,约2个氨基酸至约35个氨基酸,约2个氨基酸至约30个氨基酸,约2个氨基酸至约25个氨基酸,约2个氨基酸至约24个氨基酸,约2个氨基酸至约22个氨基酸,约2个氨基酸至约20个氨基酸,约2个氨基酸至约18个氨基酸,约2个氨基酸至约16个氨基酸,约2个氨基酸至约14个氨基酸,约2个氨基酸至约12个氨基酸,约2个氨基酸至约10个氨基酸,约2个氨基酸至约8个氨基酸,约2个氨基酸至约6个氨基酸,约2个氨基酸至约4个氨基酸,约4个氨基酸至约100个氨基酸,约4个氨基酸至约90个氨基酸,约4个氨基酸至约80个氨基酸,约4个氨基酸至约70个氨基酸,约4个氨基酸至约60个氨基酸,约4个氨基酸至约50个氨基酸,约4个氨基酸至约45个氨基酸,约4个氨基酸至约40个氨基酸,约4个氨基酸至约35个氨基酸,约4个氨基酸至约30个氨基酸,约4个氨基酸至约25个氨基酸,约4个氨基酸至约24个氨基酸,约4个氨基酸至约22个氨基酸,约4个氨基酸至约20个氨基酸,约4个氨基酸至约18个氨基酸,约4个氨基酸至约16个氨基酸,约4个氨基酸至约14个氨基酸,约4个氨基酸至约12个氨基酸,约4个氨基酸至约10个氨基酸,约4个氨基酸至约8个氨基酸,约4个氨基酸至约6个氨基酸,约6个氨基酸至约100个氨基酸,约6个氨基酸至约90个氨基酸,约6个氨基酸至约80个氨基酸,约6个氨基酸至约70个氨基酸,约6个氨基酸至约60个氨基酸,约6个氨基酸至约50个氨基酸,约6个氨基酸至约45个氨基酸,约6个氨基酸至约40个氨基酸,约6个氨基酸至约35个氨基酸,约6个氨基酸至约30个氨基酸,约6个氨基酸至约25个氨基酸,约6个氨基酸至约24个氨基酸,约6个氨基酸至约22个氨基酸,约6个氨基酸至约20个氨基酸,约6个氨基酸至约18个氨基酸,约6个氨基酸至约16个氨基酸,约6个氨基酸至约14个氨基酸,约6个氨基酸至约12个氨基酸,约6个氨基酸至约10个氨基酸,约6个氨基酸至约8个氨基酸,约8个氨基酸至约100个氨基酸,约8个氨基酸至约90个氨基酸,约8个氨基酸至约80个氨基酸,约8个氨基酸至约70个氨基酸,约8个氨基酸至约60个氨基酸,约8个氨基酸至约50个氨基酸,约8个氨基酸至约45个氨基酸,约8个氨基酸至约40个氨基酸,约8个氨基酸至约35个氨基酸,约

8个氨基酸至约30个氨基酸,约8个氨基酸至约25个氨基酸,约8个氨基酸至约24个氨基酸,约8个氨基酸至约22个氨基酸,约8个氨基酸至约20个氨基酸,约8个氨基酸至约18个氨基酸,约8个氨基酸至约16个氨基酸,约8个氨基酸至约14个氨基酸,约8个氨基酸至约12个氨基酸,约8个氨基酸至约10个氨基酸,约10个氨基酸至约100个氨基酸,约10个氨基酸至约90个氨基酸,约10个氨基酸至约80个氨基酸,约10个氨基酸至约70个氨基酸,约10个氨基酸至约60个氨基酸,约10个氨基酸至约50个氨基酸,约10个氨基酸至约45个氨基酸,约10个氨基酸至约40个氨基酸,约10个氨基酸至约35个氨基酸,约10个氨基酸至约30个氨基酸,约10个氨基酸至约25个氨基酸,约10个氨基酸至约24个氨基酸,约10个氨基酸至约22个氨基酸,约10个氨基酸至约20个氨基酸,约10个氨基酸至约18个氨基酸,约10个氨基酸至约16个氨基酸,约10个氨基酸至约14个氨基酸,约10个氨基酸至约12个氨基酸,约12个氨基酸至约100个氨基酸,约12个氨基酸至约90个氨基酸,约12个氨基酸至约80个氨基酸,约12个氨基酸至约70个氨基酸,约12个氨基酸至约60个氨基酸,约12个氨基酸至约50个氨基酸,约12个氨基酸至约45个氨基酸,约12个氨基酸至约40个氨基酸,约12个氨基酸至约35个氨基酸,约12个氨基酸至约30个氨基酸,约12个氨基酸至约25个氨基酸,约12个氨基酸至约24个氨基酸,约12个氨基酸至约22个氨基酸,约12个氨基酸至约20个氨基酸,约12个氨基酸至约18个氨基酸,约12个氨基酸至约16个氨基酸,约12个氨基酸至约14个氨基酸,约14个氨基酸至约100个氨基酸,约14个氨基酸至约90个氨基酸,约14个氨基酸至约80个氨基酸,约14个氨基酸至约70个氨基酸,约14个氨基酸至约60个氨基酸,约14个氨基酸至约50个氨基酸,约14个氨基酸至约45个氨基酸,约14个氨基酸至约40个氨基酸,约14个氨基酸至约35个氨基酸,约14个氨基酸至约30个氨基酸,约14个氨基酸至约25个氨基酸,约14个氨基酸至约24个氨基酸,约14个氨基酸至约22个氨基酸,约14个氨基酸至约20个氨基酸,约14个氨基酸至约18个氨基酸,约14个氨基酸至约16个氨基酸,约16个氨基酸至约100个氨基酸,约16个氨基酸至约90个氨基酸,约16个氨基酸至约80个氨基酸,约16个氨基酸至约70个氨基酸,约16个氨基酸至约60个氨基酸,约16个氨基酸至约50个氨基酸,约16个氨基酸至约45个氨基酸,约16个氨基酸至约40个氨基酸,约16个氨基酸至约35个氨基酸,约16个氨基酸至约30个氨基酸,约16个氨基酸至约25个氨基酸,约16个氨基酸至约24个氨基酸,约16个氨基酸至约22个氨基酸,约16个氨基酸至约20个氨基酸,约16个氨基酸至约18个氨基酸,约18个氨基酸至约100个氨基酸,约18个氨基酸至约90个氨基酸,约18个氨基酸至约80个氨基酸,约18个氨基酸至约70个氨基酸,约18个氨基酸至约60个氨基酸,约18个氨基酸至约50个氨基酸,约18个氨基酸至约45个氨基酸,约18个氨基酸至约40个氨基酸,约18个氨基酸至约35个氨基酸,约18个氨基酸至约30个氨基酸,约18个氨基酸至约25个氨基酸,约18个氨基酸至约24个氨基酸,约18个氨基酸至约22个氨基酸,约18个氨基酸至约20个氨基酸,约20个氨基酸至约100个氨基酸,约20个氨基酸至约90个氨基酸,约20个氨基酸至约80个氨基酸,约20个氨基酸至约70个氨基酸,约20个氨基酸至约60个氨基酸,约20个氨基酸至约50个氨基酸,约20个氨基酸至约45个氨基酸,约20个氨基酸至约40个氨基酸,约20个氨基酸至约35个氨基酸,约20个氨基酸至约30个氨基酸,约20个氨基酸至约25个氨基酸,约20个氨基酸至约24个氨基酸,约20个氨基酸至约22个氨基酸,约22个氨基酸至约100个氨基酸,约22个氨基酸至约90个氨基酸,约22个氨基酸至约80个氨基酸,约22个氨基酸至约70个氨基酸,约22个氨基酸至约60个氨基酸,约22个氨基酸至约50个氨基酸,约22个氨基酸至约45个氨基酸,约22个氨基酸至约40个氨基

酸,约22个氨基酸至约35个氨基酸,约22个氨基酸至约30个氨基酸,约22个氨基酸至约25个氨基酸,约22个氨基酸至约24个氨基酸,约25个氨基酸至约100个氨基酸,约25个氨基酸至约90个氨基酸,约25个氨基酸至约80个氨基酸,约25个氨基酸至约70个氨基酸,约25个氨基酸至约60个氨基酸,约25个氨基酸至约50个氨基酸,约25个氨基酸至约45个氨基酸,约25个氨基酸至约40个氨基酸,约25个氨基酸至约35个氨基酸,约25个氨基酸至约30个氨基酸,约30个氨基酸至约100个氨基酸,约30个氨基酸至约90个氨基酸,约30个氨基酸至约80个氨基酸,约30个氨基酸至约70个氨基酸,约30个氨基酸至约60个氨基酸,约30个氨基酸至约50个氨基酸,约30个氨基酸至约45个氨基酸,约30个氨基酸至约40个氨基酸,约30个氨基酸至约35个氨基酸,约35个氨基酸至约100个氨基酸,约35个氨基酸至约90个氨基酸,约35个氨基酸至约80个氨基酸,约35个氨基酸至约70个氨基酸,约35个氨基酸至约60个氨基酸,约35个氨基酸至约50个氨基酸,约35个氨基酸至约45个氨基酸,约35个氨基酸至约40个氨基酸,约40个氨基酸至约100个氨基酸,约40个氨基酸至约90个氨基酸,约40个氨基酸至约80个氨基酸,约40个氨基酸至约70个氨基酸,约40个氨基酸至约60个氨基酸,约40个氨基酸至约50个氨基酸,约40个氨基酸至约45个氨基酸,约45个氨基酸至约100个氨基酸,约45个氨基酸至约90个氨基酸,约45个氨基酸至约80个氨基酸,约45个氨基酸至约70个氨基酸,约45个氨基酸至约60个氨基酸,约45个氨基酸至约50个氨基酸,约50个氨基酸至约100个氨基酸,约50个氨基酸至约90个氨基酸,约50个氨基酸至约80个氨基酸,约50个氨基酸至约70个氨基酸,约50个氨基酸至约60个氨基酸,约60个氨基酸至约100个氨基酸,约60个氨基酸至约90个氨基酸,约60个氨基酸至约80个氨基酸,约60个氨基酸至约70个氨基酸,约70个氨基酸至约100个氨基酸,约70个氨基酸至约90个氨基酸,约70个氨基酸至约80个氨基酸,约80个氨基酸至约100个氨基酸,约80个氨基酸至约90个氨基酸,或约90个氨基酸至约100个氨基酸。

[1827] 在一些实施例中,接头富含甘氨酸(Gly或G)残基。在一些实施例中,接头富含丝氨酸(Ser或S)残基。在一些实施例中,接头富含甘氨酸和丝氨酸残基。在一些实施例中,接头具有一个或多个甘氨酸-丝氨酸残基对(GS),例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个GS对。在一些实施例中,接头具有一个或多个Gly-Gly-Gly-Ser(GGGS)(SEQ ID NO:99)序列,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个GGGS(SEQ ID NO:99)序列。在一些实施例中,接头具有一个或多个Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(GGGGS)序列,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个GGGGS(SEQ ID NO:100)序列。在一些实施例中,接头具有一个或多个Gly-Gly-Ser-Gly(GGSG)(SEQ ID NO:101)序列,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个GGSG(SEQ ID NO:101)序列。

[1828] 在一些实施例中,接头序列可包含以下或由以下组成:GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:102)。在一些实施例中,接头序列可由包含以下或由以下组成的核酸编码:GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCT(SEQ ID NO:103)。在一些实施例中,接头序列可包含以下或由以下组成:GGGSGGGS(SEQ ID NO:104),

[1829] 靶标结合域

[1830] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和/或一个或多个其它靶标结合域可以是抗原结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性抗原结合域)、可溶性白介素或细胞因子蛋白(例如本文所述的任一种示例性可溶性白介素蛋白或可溶性细胞因子蛋白),以及可溶性白介素或细胞因子受体(例

如本文所述的任一种示例性可溶性白介素受体或可溶性细胞因子受体)。

[1831] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和/或一个或多个其它靶标结合域的氨基酸总数可各自独立地是约5个氨基酸至约1000个氨基酸,约5个氨基酸至约950个氨基酸,约5个氨基酸至约900个氨基酸,约5个氨基酸至约850个氨基酸,约5个氨基酸至约800个氨基酸,约5个氨基酸至约750个氨基酸,约5个氨基酸至约700个氨基酸,约5个氨基酸至约650个氨基酸,约5个氨基酸至约600个氨基酸,约5个氨基酸至约550个氨基酸,约5个氨基酸至约500个氨基酸,约5个氨基酸至约450个氨基酸,约5个氨基酸至约400个氨基酸,约5个氨基酸至约350个氨基酸,约5个氨基酸至约300个氨基酸,约5个氨基酸至约280个氨基酸,约5个氨基酸至约260个氨基酸,约5个氨基酸至约240个氨基酸,约5个氨基酸至约220个氨基酸,约5个氨基酸至约200个氨基酸,约5个氨基酸至约195个氨基酸,约5个氨基酸至约190个氨基酸,约5个氨基酸至约185个氨基酸,约5个氨基酸至约180个氨基酸,约5个氨基酸至约175个氨基酸,约5个氨基酸至约170个氨基酸,约5个氨基酸至约165个氨基酸,约5个氨基酸至约160个氨基酸,约5个氨基酸至约155个氨基酸,约5个氨基酸至约150个氨基酸,约5个氨基酸至约145个氨基酸,约5个氨基酸至约140个氨基酸,约5个氨基酸至约135个氨基酸,约5个氨基酸至约130个氨基酸,约5个氨基酸至约125个氨基酸,约5个氨基酸至约120个氨基酸,约5个氨基酸至约115个氨基酸,约5个氨基酸至约110个氨基酸,约5个氨基酸至约105个氨基酸,约5个氨基酸至约100个氨基酸,约5个氨基酸至约95个氨基酸,约5个氨基酸至约90个氨基酸,约5个氨基酸至约85个氨基酸,约5个氨基酸至约80个氨基酸,约5个氨基酸至约75个氨基酸,约5个氨基酸至约70个氨基酸,约5个氨基酸至约65个氨基酸,约5个氨基酸至约60个氨基酸,约5个氨基酸至约55个氨基酸,约5个氨基酸至约50个氨基酸,约5个氨基酸至约45个氨基酸,约5个氨基酸至约40个氨基酸,约5个氨基酸至约35个氨基酸,约5个氨基酸至约30个氨基酸,约5个氨基酸至约25个氨基酸,约5个氨基酸至约20个氨基酸,约5个氨基酸至约15个氨基酸,约5个氨基酸至约10个氨基酸,约10个氨基酸至约1000个氨基酸,约10个氨基酸至约950个氨基酸,约10个氨基酸至约900个氨基酸,约10个氨基酸至约850个氨基酸,约10个氨基酸至约800个氨基酸,约10个氨基酸至约750个氨基酸,约10个氨基酸至约700个氨基酸,约10个氨基酸至约650个氨基酸,约10个氨基酸至约600个氨基酸,约10个氨基酸至约550个氨基酸,约10个氨基酸至约500个氨基酸,约10个氨基酸至约450个氨基酸,约10个氨基酸至约400个氨基酸,约10个氨基酸至约350个氨基酸,约10个氨基酸至约300个氨基酸,约10个氨基酸至约280个氨基酸,约10个氨基酸至约260个氨基酸,约10个氨基酸至约240个氨基酸,约10个氨基酸至约220个氨基酸,约10个氨基酸至约200个氨基酸,约10个氨基酸至约195个氨基酸,约10个氨基酸至约190个氨基酸,约10个氨基酸至约185个氨基酸,约10个氨基酸至约180个氨基酸,约10个氨基酸至约175个氨基酸,约10个氨基酸至约170个氨基酸,约10个氨基酸至约165个氨基酸,约10个氨基酸至约160个氨基酸,约10个氨基酸至约155个氨基酸,约10个氨基酸至约150个氨基酸,约10个氨基酸至约145个氨基酸,约10个氨基酸至约140个氨基酸,约10个氨基酸至约135个氨基酸,约10个氨基酸至约130个氨基酸,约10个氨基酸至约125个氨基酸,约10个氨基酸至约120个氨基酸,约10个氨基酸至约115个氨基酸,约10个氨基酸至约110个氨基酸,约10个氨基酸至约105个氨基酸,约10个氨基酸至约100个氨基酸,约10个氨基酸至约95个氨基酸,约10个氨基酸至约90个氨基酸,约10个氨基酸至约85个氨基酸,约10个氨基

酸至约80个氨基酸,约10个氨基酸至约75个氨基酸,约10个氨基酸至约70个氨基酸,约10个氨基酸至约65个氨基酸,约10个氨基酸至约60个氨基酸,约10个氨基酸至约55个氨基酸,约10个氨基酸至约50个氨基酸,约10个氨基酸至约45个氨基酸,约10个氨基酸至约40个氨基酸,约10个氨基酸至约35个氨基酸,约10个氨基酸至约30个氨基酸,约10个氨基酸至约25个氨基酸,约10个氨基酸至约20个氨基酸,约10个氨基酸至约15个氨基酸,约15个氨基酸至约1000个氨基酸,约15个氨基酸至约950个氨基酸,约15个氨基酸至约900个氨基酸,约15个氨基酸至约850个氨基酸,约15个氨基酸至约800个氨基酸,约15个氨基酸至约750个氨基酸,约15个氨基酸至约700个氨基酸,约15个氨基酸至约650个氨基酸,约15个氨基酸至约600个氨基酸,约15个氨基酸至约550个氨基酸,约15个氨基酸至约500个氨基酸,约15个氨基酸至约450个氨基酸,约15个氨基酸至约400个氨基酸,约15个氨基酸至约350个氨基酸,约15个氨基酸至约300个氨基酸,约15个氨基酸至约280个氨基酸,约15个氨基酸至约260个氨基酸,约15个氨基酸至约240个氨基酸,约15个氨基酸至约220个氨基酸,约15个氨基酸至约200个氨基酸,约15个氨基酸至约195个氨基酸,约15个氨基酸至约190个氨基酸,约15个氨基酸至约185个氨基酸,约15个氨基酸至约180个氨基酸,约15个氨基酸至约175个氨基酸,约15个氨基酸至约170个氨基酸,约15个氨基酸至约165个氨基酸,约15个氨基酸至约160个氨基酸,约15个氨基酸至约155个氨基酸,约15个氨基酸至约150个氨基酸,约15个氨基酸至约145个氨基酸,约15个氨基酸至约140个氨基酸,约15个氨基酸至约135个氨基酸,约15个氨基酸至约130个氨基酸,约15个氨基酸至约125个氨基酸,约15个氨基酸至约120个氨基酸,约15个氨基酸至约115个氨基酸,约15个氨基酸至约110个氨基酸,约15个氨基酸至约105个氨基酸,约15个氨基酸至约100个氨基酸,约15个氨基酸至约95个氨基酸,约15个氨基酸至约90个氨基酸,约15个氨基酸至约85个氨基酸,约15个氨基酸至约80个氨基酸,约15个氨基酸至约75个氨基酸,约15个氨基酸至约70个氨基酸,约15个氨基酸至约65个氨基酸,约15个氨基酸至约60个氨基酸,约15个氨基酸至约55个氨基酸,约15个氨基酸至约50个氨基酸,约15个氨基酸至约45个氨基酸,约15个氨基酸至约40个氨基酸,约15个氨基酸至约35个氨基酸,约15个氨基酸至约30个氨基酸,约15个氨基酸至约25个氨基酸,约15个氨基酸至约20个氨基酸,约20个氨基酸至约1000个氨基酸,约20个氨基酸至约950个氨基酸,约20个氨基酸至约900个氨基酸,约20个氨基酸至约850个氨基酸,约20个氨基酸至约800个氨基酸,约20个氨基酸至约750个氨基酸,约20个氨基酸至约700个氨基酸,约20个氨基酸至约650个氨基酸,约20个氨基酸至约600个氨基酸,约20个氨基酸至约550个氨基酸,约20个氨基酸至约500个氨基酸,约20个氨基酸至约450个氨基酸,约20个氨基酸至约400个氨基酸,约20个氨基酸至约350个氨基酸,约20个氨基酸至约300个氨基酸,约20个氨基酸至约280个氨基酸,约20个氨基酸至约260个氨基酸,约20个氨基酸至约240个氨基酸,约20个氨基酸至约220个氨基酸,约20个氨基酸至约200个氨基酸,约20个氨基酸至约195个氨基酸,约20个氨基酸至约190个氨基酸,约20个氨基酸至约185个氨基酸,约20个氨基酸至约180个氨基酸,约20个氨基酸至约175个氨基酸,约20个氨基酸至约170个氨基酸,约20个氨基酸至约165个氨基酸,约20个氨基酸至约160个氨基酸,约20个氨基酸至约155个氨基酸,约20个氨基酸至约150个氨基酸,约20个氨基酸至约145个氨基酸,约20个氨基酸至约140个氨基酸,约20个氨基酸至约135个氨基酸,约20个氨基酸至约130个氨基酸,约20个氨基酸至约125个氨基酸,约20个氨基酸至约120个氨基酸,约20个氨基酸至约115个氨基酸,约20个氨基酸至约

110个氨基酸,约20个氨基酸至约105个氨基酸,约20个氨基酸至约100个氨基酸,约20个氨基酸至约95个氨基酸,约20个氨基酸至约90个氨基酸,约20个氨基酸至约85个氨基酸,约20个氨基酸至约80个氨基酸,约20个氨基酸至约75个氨基酸,约20个氨基酸至约70个氨基酸,约20个氨基酸至约65个氨基酸,约20个氨基酸至约60个氨基酸,约20个氨基酸至约55个氨基酸,约20个氨基酸至约50个氨基酸,约20个氨基酸至约45个氨基酸,约20个氨基酸至约40个氨基酸,约20个氨基酸至约35个氨基酸,约20个氨基酸至约30个氨基酸,约20个氨基酸至约25个氨基酸,约25个氨基酸至约1000个氨基酸,约25个氨基酸至约950个氨基酸,约25个氨基酸至约900个氨基酸,约25个氨基酸至约850个氨基酸,约25个氨基酸至约800个氨基酸,约25个氨基酸至约750个氨基酸,约25个氨基酸至约700个氨基酸,约25个氨基酸至约650个氨基酸,约25个氨基酸至约600个氨基酸,约25个氨基酸至约550个氨基酸,约25个氨基酸至约500个氨基酸,约25个氨基酸至约450个氨基酸,约25个氨基酸至约400个氨基酸,约25个氨基酸至约350个氨基酸,约25个氨基酸至约300个氨基酸,约25个氨基酸至约280个氨基酸,约25个氨基酸至约260个氨基酸,约25个氨基酸至约240个氨基酸,约25个氨基酸至约220个氨基酸,约25个氨基酸至约200个氨基酸,约25个氨基酸至约195个氨基酸,约25个氨基酸至约190个氨基酸,约25个氨基酸至约185个氨基酸,约25个氨基酸至约180个氨基酸,约25个氨基酸至约175个氨基酸,约25个氨基酸至约170个氨基酸,约25个氨基酸至约165个氨基酸,约25个氨基酸至约160个氨基酸,约25个氨基酸至约155个氨基酸,约25个氨基酸至约150个氨基酸,约25个氨基酸至约145个氨基酸,约25个氨基酸至约140个氨基酸,约25个氨基酸至约135个氨基酸,约25个氨基酸至约130个氨基酸,约25个氨基酸至约125个氨基酸,约25个氨基酸至约120个氨基酸,约25个氨基酸至约115个氨基酸,约25个氨基酸至约110个氨基酸,约25个氨基酸至约105个氨基酸,约25个氨基酸至约100个氨基酸,约25个氨基酸至约95个氨基酸,约25个氨基酸至约90个氨基酸,约25个氨基酸至约85个氨基酸,约25个氨基酸至约80个氨基酸,约25个氨基酸至约75个氨基酸,约25个氨基酸至约70个氨基酸,约25个氨基酸至约65个氨基酸,约25个氨基酸至约60个氨基酸,约25个氨基酸至约55个氨基酸,约25个氨基酸至约50个氨基酸,约25个氨基酸至约45个氨基酸,约25个氨基酸至约40个氨基酸,约25个氨基酸至约35个氨基酸,约25个氨基酸至约30个氨基酸,约30个氨基酸至约1000个氨基酸,约30个氨基酸至约950个氨基酸,约30个氨基酸至约900个氨基酸,约30个氨基酸至约850个氨基酸,约30个氨基酸至约800个氨基酸,约30个氨基酸至约750个氨基酸,约30个氨基酸至约700个氨基酸,约30个氨基酸至约650个氨基酸,约30个氨基酸至约600个氨基酸,约30个氨基酸至约550个氨基酸,约30个氨基酸至约500个氨基酸,约30个氨基酸至约450个氨基酸,约30个氨基酸至约400个氨基酸,约30个氨基酸至约350个氨基酸,约30个氨基酸至约300个氨基酸,约30个氨基酸至约280个氨基酸,约30个氨基酸至约260个氨基酸,约30个氨基酸至约240个氨基酸,约30个氨基酸至约220个氨基酸,约30个氨基酸至约200个氨基酸,约30个氨基酸至约195个氨基酸,约30个氨基酸至约190个氨基酸,约30个氨基酸至约185个氨基酸,约30个氨基酸至约180个氨基酸,约30个氨基酸至约175个氨基酸,约30个氨基酸至约170个氨基酸,约30个氨基酸至约165个氨基酸,约30个氨基酸至约160个氨基酸,约30个氨基酸至约155个氨基酸,约30个氨基酸至约150个氨基酸,约30个氨基酸至约145个氨基酸,约30个氨基酸至约140个氨基酸,约30个氨基酸至约135个氨基酸,约30个氨基酸至约130个氨基酸,约30个氨基酸至约125个氨基酸,约30个氨基酸至约120个

氨基酸,约30个氨基酸至约115个氨基酸,约30个氨基酸至约110个氨基酸,约30个氨基酸至约105个氨基酸,约30个氨基酸至约100个氨基酸,约30个氨基酸至约95个氨基酸,约30个氨基酸至约90个氨基酸,约30个氨基酸至约85个氨基酸,约30个氨基酸至约80个氨基酸,约30个氨基酸至约75个氨基酸,约30个氨基酸至约70个氨基酸,约30个氨基酸至约65个氨基酸,约30个氨基酸至约60个氨基酸,约30个氨基酸至约55个氨基酸,约30个氨基酸至约50个氨基酸,约30个氨基酸至约45个氨基酸,约30个氨基酸至约40个氨基酸,约30个氨基酸至约35个氨基酸,约35个氨基酸至约1000个氨基酸,约35个氨基酸至约950个氨基酸,约35个氨基酸至约900个氨基酸,约35个氨基酸至约850个氨基酸,约35个氨基酸至约800个氨基酸,约35个氨基酸至约750个氨基酸,约35个氨基酸至约700个氨基酸,约35个氨基酸至约650个氨基酸,约35个氨基酸至约600个氨基酸,约35个氨基酸至约550个氨基酸,约35个氨基酸至约500个氨基酸,约35个氨基酸至约450个氨基酸,约35个氨基酸至约400个氨基酸,约35个氨基酸至约350个氨基酸,约35个氨基酸至约300个氨基酸,约35个氨基酸至约280个氨基酸,约35个氨基酸至约260个氨基酸,约35个氨基酸至约240个氨基酸,约35个氨基酸至约220个氨基酸,约35个氨基酸至约200个氨基酸,约35个氨基酸至约195个氨基酸,约35个氨基酸至约190个氨基酸,约35个氨基酸至约185个氨基酸,约35个氨基酸至约180个氨基酸,约35个氨基酸至约175个氨基酸,约35个氨基酸至约170个氨基酸,约35个氨基酸至约165个氨基酸,约35个氨基酸至约160个氨基酸,约35个氨基酸至约155个氨基酸,约35个氨基酸至约150个氨基酸,约35个氨基酸至约145个氨基酸,约35个氨基酸至约140个氨基酸,约35个氨基酸至约135个氨基酸,约35个氨基酸至约130个氨基酸,约35个氨基酸至约125个氨基酸,约35个氨基酸至约120个氨基酸,约35个氨基酸至约115个氨基酸,约35个氨基酸至约110个氨基酸,约35个氨基酸至约105个氨基酸,约35个氨基酸至约100个氨基酸,约35个氨基酸至约95个氨基酸,约35个氨基酸至约90个氨基酸,约35个氨基酸至约85个氨基酸,约35个氨基酸至约80个氨基酸,约35个氨基酸至约75个氨基酸,约35个氨基酸至约70个氨基酸,约35个氨基酸至约65个氨基酸,约35个氨基酸至约60个氨基酸,约35个氨基酸至约55个氨基酸,约35个氨基酸至约50个氨基酸,约35个氨基酸至约45个氨基酸,约35个氨基酸至约40个氨基酸,约40个氨基酸至约1000个氨基酸,约40个氨基酸至约950个氨基酸,约40个氨基酸至约900个氨基酸,约40个氨基酸至约850个氨基酸,约40个氨基酸至约800个氨基酸,约40个氨基酸至约750个氨基酸,约40个氨基酸至约700个氨基酸,约40个氨基酸至约650个氨基酸,约40个氨基酸至约600个氨基酸,约40个氨基酸至约550个氨基酸,约40个氨基酸至约500个氨基酸,约40个氨基酸至约450个氨基酸,约40个氨基酸至约400个氨基酸,约40个氨基酸至约350个氨基酸,约40个氨基酸至约300个氨基酸,约40个氨基酸至约280个氨基酸,约40个氨基酸至约260个氨基酸,约40个氨基酸至约240个氨基酸,约40个氨基酸至约220个氨基酸,约40个氨基酸至约200个氨基酸,约40个氨基酸至约195个氨基酸,约40个氨基酸至约190个氨基酸,约40个氨基酸至约185个氨基酸,约40个氨基酸至约180个氨基酸,约40个氨基酸至约175个氨基酸,约40个氨基酸至约170个氨基酸,约40个氨基酸至约165个氨基酸,约40个氨基酸至约160个氨基酸,约40个氨基酸至约155个氨基酸,约40个氨基酸至约150个氨基酸,约40个氨基酸至约145个氨基酸,约40个氨基酸至约140个氨基酸,约40个氨基酸至约135个氨基酸,约40个氨基酸至约130个氨基酸,约40个氨基酸至约125个氨基酸,约40个氨基酸至约120个氨基酸,约40个氨基酸至约115个氨基酸,约40个氨基酸至约110个氨基

酸,约40个氨基酸至约105个氨基酸,约40个氨基酸至约100个氨基酸,约40个氨基酸至约95个氨基酸,约40个氨基酸至约90个氨基酸,约40个氨基酸至约85个氨基酸,约40个氨基酸至约80个氨基酸,约40个氨基酸至约75个氨基酸,约40个氨基酸至约70个氨基酸,约40个氨基酸至约65个氨基酸,约40个氨基酸至约60个氨基酸,约40个氨基酸至约55个氨基酸,约40个氨基酸至约50个氨基酸,约40个氨基酸至约45个氨基酸,约45个氨基酸至约1000个氨基酸,约45个氨基酸至约950个氨基酸,约45个氨基酸至约900个氨基酸,约45个氨基酸至约850个氨基酸,约45个氨基酸至约800个氨基酸,约45个氨基酸至约750个氨基酸,约45个氨基酸至约700个氨基酸,约45个氨基酸至约650个氨基酸,约45个氨基酸至约600个氨基酸,约45个氨基酸至约550个氨基酸,约45个氨基酸至约500个氨基酸,约45个氨基酸至约450个氨基酸,约45个氨基酸至约400个氨基酸,约45个氨基酸至约350个氨基酸,约45个氨基酸至约300个氨基酸,约45个氨基酸至约280个氨基酸,约45个氨基酸至约260个氨基酸,约45个氨基酸至约240个氨基酸,约45个氨基酸至约220个氨基酸,约45个氨基酸至约200个氨基酸,约45个氨基酸至约195个氨基酸,约45个氨基酸至约190个氨基酸,约45个氨基酸至约185个氨基酸,约45个氨基酸至约180个氨基酸,约45个氨基酸至约175个氨基酸,约45个氨基酸至约170个氨基酸,约45个氨基酸至约165个氨基酸,约45个氨基酸至约160个氨基酸,约45个氨基酸至约155个氨基酸,约45个氨基酸至约150个氨基酸,约45个氨基酸至约145个氨基酸,约45个氨基酸至约140个氨基酸,约45个氨基酸至约135个氨基酸,约45个氨基酸至约130个氨基酸,约45个氨基酸至约125个氨基酸,约45个氨基酸至约120个氨基酸,约45个氨基酸至约115个氨基酸,约45个氨基酸至约110个氨基酸,约45个氨基酸至约105个氨基酸,约45个氨基酸至约100个氨基酸,约45个氨基酸至约95个氨基酸,约45个氨基酸至约90个氨基酸,约45个氨基酸至约85个氨基酸,约45个氨基酸至约80个氨基酸,约45个氨基酸至约75个氨基酸,约45个氨基酸至约70个氨基酸,约45个氨基酸至约65个氨基酸,约45个氨基酸至约60个氨基酸,约45个氨基酸至约55个氨基酸,约45个氨基酸至约50个氨基酸,约50个氨基酸至约1000个氨基酸,约50个氨基酸至约950个氨基酸,约50个氨基酸至约900个氨基酸,约50个氨基酸至约850个氨基酸,约50个氨基酸至约800个氨基酸,约50个氨基酸至约750个氨基酸,约50个氨基酸至约700个氨基酸,约50个氨基酸至约650个氨基酸,约50个氨基酸至约600个氨基酸,约50个氨基酸至约550个氨基酸,约50个氨基酸至约500个氨基酸,约50个氨基酸至约450个氨基酸,约50个氨基酸至约400个氨基酸,约50个氨基酸至约350个氨基酸,约50个氨基酸至约300个氨基酸,约50个氨基酸至约280个氨基酸,约50个氨基酸至约260个氨基酸,约50个氨基酸至约240个氨基酸,约50个氨基酸至约220个氨基酸,约50个氨基酸至约200个氨基酸,约50个氨基酸至约195个氨基酸,约50个氨基酸至约190个氨基酸,约50个氨基酸至约185个氨基酸,约50个氨基酸至约180个氨基酸,约50个氨基酸至约175个氨基酸,约50个氨基酸至约170个氨基酸,约50个氨基酸至约165个氨基酸,约50个氨基酸至约160个氨基酸,约50个氨基酸至约155个氨基酸,约50个氨基酸至约150个氨基酸,约50个氨基酸至约145个氨基酸,约50个氨基酸至约140个氨基酸,约50个氨基酸至约135个氨基酸,约50个氨基酸至约130个氨基酸,约50个氨基酸至约125个氨基酸,约50个氨基酸至约120个氨基酸,约50个氨基酸至约115个氨基酸,约50个氨基酸至约110个氨基酸,约50个氨基酸至约105个氨基酸,约50个氨基酸至约100个氨基酸,约50个氨基酸至约95个氨基酸,约50个氨基酸至约90个氨基酸,约50个氨基酸至约85个氨基酸,约50个氨基酸至约80个氨基酸,约50

个氨基酸至约75个氨基酸,约50个氨基酸至约70个氨基酸,约50个氨基酸至约65个氨基酸,约50个氨基酸至约60个氨基酸,约50个氨基酸至约55个氨基酸,约55个氨基酸至约1000个氨基酸,约55个氨基酸至约950个氨基酸,约55个氨基酸至约900个氨基酸,约55个氨基酸至约850个氨基酸,约55个氨基酸至约800个氨基酸,约55个氨基酸至约750个氨基酸,约55个氨基酸至约700个氨基酸,约55个氨基酸至约650个氨基酸,约55个氨基酸至约600个氨基酸,约55个氨基酸至约550个氨基酸,约55个氨基酸至约500个氨基酸,约55个氨基酸至约450个氨基酸,约55个氨基酸至约400个氨基酸,约55个氨基酸至约350个氨基酸,约55个氨基酸至约300个氨基酸,约55个氨基酸至约280个氨基酸,约55个氨基酸至约260个氨基酸,约55个氨基酸至约240个氨基酸,约55个氨基酸至约220个氨基酸,约55个氨基酸至约200个氨基酸,约55个氨基酸至约195个氨基酸,约55个氨基酸至约190个氨基酸,约55个氨基酸至约185个氨基酸,约55个氨基酸至约180个氨基酸,约55个氨基酸至约175个氨基酸,约55个氨基酸至约170个氨基酸,约55个氨基酸至约165个氨基酸,约55个氨基酸至约160个氨基酸,约55个氨基酸至约155个氨基酸,约55个氨基酸至约150个氨基酸,约55个氨基酸至约145个氨基酸,约55个氨基酸至约140个氨基酸,约55个氨基酸至约135个氨基酸,约55个氨基酸至约130个氨基酸,约55个氨基酸至约125个氨基酸,约55个氨基酸至约120个氨基酸,约55个氨基酸至约115个氨基酸,约55个氨基酸至约110个氨基酸,约55个氨基酸至约105个氨基酸,约55个氨基酸至约100个氨基酸,约55个氨基酸至约95个氨基酸,约55个氨基酸至约90个氨基酸,约55个氨基酸至约85个氨基酸,约55个氨基酸至约80个氨基酸,约55个氨基酸至约75个氨基酸,约55个氨基酸至约70个氨基酸,约55个氨基酸至约65个氨基酸,约55个氨基酸至约60个氨基酸,约60个氨基酸至约1000个氨基酸,约60个氨基酸至约950个氨基酸,约60个氨基酸至约900个氨基酸,约60个氨基酸至约850个氨基酸,约60个氨基酸至约800个氨基酸,约60个氨基酸至约750个氨基酸,约60个氨基酸至约700个氨基酸,约60个氨基酸至约650个氨基酸,约60个氨基酸至约600个氨基酸,约60个氨基酸至约550个氨基酸,约60个氨基酸至约500个氨基酸,约60个氨基酸至约450个氨基酸,约60个氨基酸至约400个氨基酸,约60个氨基酸至约350个氨基酸,约60个氨基酸至约300个氨基酸,约60个氨基酸至约280个氨基酸,约60个氨基酸至约260个氨基酸,约60个氨基酸至约240个氨基酸,约60个氨基酸至约220个氨基酸,约60个氨基酸至约200个氨基酸,约60个氨基酸至约195个氨基酸,约60个氨基酸至约190个氨基酸,约60个氨基酸至约185个氨基酸,约60个氨基酸至约180个氨基酸,约60个氨基酸至约175个氨基酸,约60个氨基酸至约170个氨基酸,约60个氨基酸至约165个氨基酸,约60个氨基酸至约160个氨基酸,约60个氨基酸至约155个氨基酸,约60个氨基酸至约150个氨基酸,约60个氨基酸至约145个氨基酸,约60个氨基酸至约140个氨基酸,约60个氨基酸至约135个氨基酸,约60个氨基酸至约130个氨基酸,约60个氨基酸至约125个氨基酸,约60个氨基酸至约120个氨基酸,约60个氨基酸至约115个氨基酸,约60个氨基酸至约110个氨基酸,约60个氨基酸至约105个氨基酸,约60个氨基酸至约100个氨基酸,约60个氨基酸至约95个氨基酸,约60个氨基酸至约90个氨基酸,约60个氨基酸至约85个氨基酸,约60个氨基酸至约80个氨基酸,约60个氨基酸至约75个氨基酸,约60个氨基酸至约70个氨基酸,约60个氨基酸至约65个氨基酸,约65个氨基酸至约1000个氨基酸,约65个氨基酸至约950个氨基酸,约65个氨基酸至约900个氨基酸,约65个氨基酸至约850个氨基酸,约65个氨基酸至约800个氨基酸,约65个氨基酸至约750个氨基酸,约65个氨基酸至约700个氨

基酸,约65个氨基酸至约650个氨基酸,约65个氨基酸至约600个氨基酸,约65个氨基酸至约550个氨基酸,约65个氨基酸至约500个氨基酸,约65个氨基酸至约450个氨基酸,约65个氨基酸至约400个氨基酸,约65个氨基酸至约350个氨基酸,约65个氨基酸至约300个氨基酸,约65个氨基酸至约280个氨基酸,约65个氨基酸至约260个氨基酸,约65个氨基酸至约240个氨基酸,约65个氨基酸至约220个氨基酸,约65个氨基酸至约200个氨基酸,约65个氨基酸至约195个氨基酸,约65个氨基酸至约190个氨基酸,约65个氨基酸至约185个氨基酸,约65个氨基酸至约180个氨基酸,约65个氨基酸至约175个氨基酸,约65个氨基酸至约170个氨基酸,约65个氨基酸至约165个氨基酸,约65个氨基酸至约160个氨基酸,约65个氨基酸至约155个氨基酸,约65个氨基酸至约150个氨基酸,约65个氨基酸至约145个氨基酸,约65个氨基酸至约140个氨基酸,约65个氨基酸至约135个氨基酸,约65个氨基酸至约130个氨基酸,约65个氨基酸至约125个氨基酸,约65个氨基酸至约120个氨基酸,约65个氨基酸至约115个氨基酸,约65个氨基酸至约110个氨基酸,约65个氨基酸至约105个氨基酸,约65个氨基酸至约100个氨基酸,约65个氨基酸至约95个氨基酸,约65个氨基酸至约90个氨基酸,约65个氨基酸至约85个氨基酸,约65个氨基酸至约80个氨基酸,约65个氨基酸至约75个氨基酸,约65个氨基酸至约70个氨基酸,约70个氨基酸至约1000个氨基酸,约70个氨基酸至约950个氨基酸,约70个氨基酸至约900个氨基酸,约70个氨基酸至约850个氨基酸,约70个氨基酸至约800个氨基酸,约70个氨基酸至约750个氨基酸,约70个氨基酸至约700个氨基酸,约70个氨基酸至约650个氨基酸,约70个氨基酸至约600个氨基酸,约70个氨基酸至约550个氨基酸,约70个氨基酸至约500个氨基酸,约70个氨基酸至约450个氨基酸,约70个氨基酸至约400个氨基酸,约70个氨基酸至约350个氨基酸,约70个氨基酸至约300个氨基酸,约70个氨基酸至约280个氨基酸,约70个氨基酸至约260个氨基酸,约70个氨基酸至约240个氨基酸,约70个氨基酸至约220个氨基酸,约70个氨基酸至约200个氨基酸,约70个氨基酸至约195个氨基酸,约70个氨基酸至约190个氨基酸,约70个氨基酸至约185个氨基酸,约70个氨基酸至约180个氨基酸,约70个氨基酸至约175个氨基酸,约70个氨基酸至约170个氨基酸,约70个氨基酸至约165个氨基酸,约70个氨基酸至约160个氨基酸,约70个氨基酸至约155个氨基酸,约70个氨基酸至约150个氨基酸,约70个氨基酸至约145个氨基酸,约70个氨基酸至约140个氨基酸,约70个氨基酸至约135个氨基酸,约70个氨基酸至约130个氨基酸,约70个氨基酸至约125个氨基酸,约70个氨基酸至约120个氨基酸,约70个氨基酸至约115个氨基酸,约70个氨基酸至约110个氨基酸,约70个氨基酸至约105个氨基酸,约70个氨基酸至约100个氨基酸,约70个氨基酸至约95个氨基酸,约70个氨基酸至约90个氨基酸,约70个氨基酸至约85个氨基酸,约70个氨基酸至约80个氨基酸,约70个氨基酸至约75个氨基酸,约75个氨基酸至约1000个氨基酸,约75个氨基酸至约950个氨基酸,约75个氨基酸至约900个氨基酸,约75个氨基酸至约850个氨基酸,约75个氨基酸至约800个氨基酸,约75个氨基酸至约750个氨基酸,约75个氨基酸至约700个氨基酸,约75个氨基酸至约650个氨基酸,约75个氨基酸至约600个氨基酸,约75个氨基酸至约550个氨基酸,约75个氨基酸至约500个氨基酸,约75个氨基酸至约450个氨基酸,约75个氨基酸至约400个氨基酸,约75个氨基酸至约350个氨基酸,约75个氨基酸至约300个氨基酸,约75个氨基酸至约280个氨基酸,约75个氨基酸至约260个氨基酸,约75个氨基酸至约240个氨基酸,约75个氨基酸至约220个氨基酸,约75个氨基酸至约200个氨基酸,约75个氨基酸至约195个氨基酸,约75个氨基酸至约190个氨基酸,约75个氨

基酸至约185个氨基酸,约75个氨基酸至约180个氨基酸,约75个氨基酸至约175个氨基酸,约75个氨基酸至约170个氨基酸,约75个氨基酸至约165个氨基酸,约75个氨基酸至约160个氨基酸,约75个氨基酸至约155个氨基酸,约75个氨基酸至约150个氨基酸,约75个氨基酸至约145个氨基酸,约75个氨基酸至约140个氨基酸,约75个氨基酸至约135个氨基酸,约75个氨基酸至约130个氨基酸,约75个氨基酸至约125个氨基酸,约75个氨基酸至约120个氨基酸,约75个氨基酸至约115个氨基酸,约75个氨基酸至约110个氨基酸,约75个氨基酸至约105个氨基酸,约75个氨基酸至约100个氨基酸,约75个氨基酸至约95个氨基酸,约75个氨基酸至约90个氨基酸,约75个氨基酸至约85个氨基酸,约75个氨基酸至约80个氨基酸,约80个氨基酸至约1000个氨基酸,约80个氨基酸至约950个氨基酸,约80个氨基酸至约900个氨基酸,约80个氨基酸至约850个氨基酸,约80个氨基酸至约800个氨基酸,约80个氨基酸至约750个氨基酸,约80个氨基酸至约700个氨基酸,约80个氨基酸至约650个氨基酸,约80个氨基酸至约600个氨基酸,约80个氨基酸至约550个氨基酸,约80个氨基酸至约500个氨基酸,约80个氨基酸至约450个氨基酸,约80个氨基酸至约400个氨基酸,约80个氨基酸至约350个氨基酸,约80个氨基酸至约300个氨基酸,约80个氨基酸至约280个氨基酸,约80个氨基酸至约260个氨基酸,约80个氨基酸至约240个氨基酸,约80个氨基酸至约220个氨基酸,约80个氨基酸至约200个氨基酸,约80个氨基酸至约195个氨基酸,约80个氨基酸至约190个氨基酸,约80个氨基酸至约185个氨基酸,约80个氨基酸至约180个氨基酸,约80个氨基酸至约175个氨基酸,约80个氨基酸至约170个氨基酸,约80个氨基酸至约165个氨基酸,约80个氨基酸至约160个氨基酸,约80个氨基酸至约155个氨基酸,约80个氨基酸至约150个氨基酸,约80个氨基酸至约145个氨基酸,约80个氨基酸至约140个氨基酸,约80个氨基酸至约135个氨基酸,约80个氨基酸至约130个氨基酸,约80个氨基酸至约125个氨基酸,约80个氨基酸至约120个氨基酸,约80个氨基酸至约115个氨基酸,约80个氨基酸至约110个氨基酸,约80个氨基酸至约105个氨基酸,约80个氨基酸至约100个氨基酸,约80个氨基酸至约95个氨基酸,约80个氨基酸至约90个氨基酸,约80个氨基酸至约85个氨基酸,约85个氨基酸至约1000个氨基酸,约85个氨基酸至约950个氨基酸,约85个氨基酸至约900个氨基酸,约85个氨基酸至约850个氨基酸,约85个氨基酸至约800个氨基酸,约85个氨基酸至约750个氨基酸,约85个氨基酸至约700个氨基酸,约85个氨基酸至约650个氨基酸,约85个氨基酸至约600个氨基酸,约85个氨基酸至约550个氨基酸,约85个氨基酸至约500个氨基酸,约85个氨基酸至约450个氨基酸,约85个氨基酸至约400个氨基酸,约85个氨基酸至约350个氨基酸,约85个氨基酸至约300个氨基酸,约85个氨基酸至约280个氨基酸,约85个氨基酸至约260个氨基酸,约85个氨基酸至约240个氨基酸,约85个氨基酸至约220个氨基酸,约85个氨基酸至约200个氨基酸,约85个氨基酸至约195个氨基酸,约85个氨基酸至约190个氨基酸,约85个氨基酸至约185个氨基酸,约85个氨基酸至约180个氨基酸,约85个氨基酸至约175个氨基酸,约85个氨基酸至约170个氨基酸,约85个氨基酸至约165个氨基酸,约85个氨基酸至约160个氨基酸,约85个氨基酸至约155个氨基酸,约85个氨基酸至约150个氨基酸,约85个氨基酸至约145个氨基酸,约85个氨基酸至约140个氨基酸,约85个氨基酸至约135个氨基酸,约85个氨基酸至约130个氨基酸,约85个氨基酸至约125个氨基酸,约85个氨基酸至约120个氨基酸,约85个氨基酸至约115个氨基酸,约85个氨基酸至约110个氨基酸,约85个氨基酸至约105个氨基酸,约85个氨基酸至约100个氨基酸,约85个氨基酸至约95个氨基酸,约85个氨基酸至

约90个氨基酸,约90个氨基酸至约1000个氨基酸,约90个氨基酸至约950个氨基酸,约90个氨基酸至约900个氨基酸,约90个氨基酸至约850个氨基酸,约90个氨基酸至约800个氨基酸,约90个氨基酸至约750个氨基酸,约90个氨基酸至约700个氨基酸,约90个氨基酸至约650个氨基酸,约90个氨基酸至约600个氨基酸,约90个氨基酸至约550个氨基酸,约90个氨基酸至约500个氨基酸,约90个氨基酸至约450个氨基酸,约90个氨基酸至约400个氨基酸,约90个氨基酸至约350个氨基酸,约90个氨基酸至约300个氨基酸,约90个氨基酸至约280个氨基酸,约90个氨基酸至约260个氨基酸,约90个氨基酸至约240个氨基酸,约90个氨基酸至约220个氨基酸,约90个氨基酸至约200个氨基酸,约90个氨基酸至约195个氨基酸,约90个氨基酸至约190个氨基酸,约90个氨基酸至约185个氨基酸,约90个氨基酸至约180个氨基酸,约90个氨基酸至约175个氨基酸,约90个氨基酸至约170个氨基酸,约90个氨基酸至约165个氨基酸,约90个氨基酸至约160个氨基酸,约90个氨基酸至约155个氨基酸,约90个氨基酸至约150个氨基酸,约90个氨基酸至约145个氨基酸,约90个氨基酸至约140个氨基酸,约90个氨基酸至约135个氨基酸,约90个氨基酸至约130个氨基酸,约90个氨基酸至约125个氨基酸,约90个氨基酸至约120个氨基酸,约90个氨基酸至约115个氨基酸,约90个氨基酸至约110个氨基酸,约90个氨基酸至约105个氨基酸,约90个氨基酸至约100个氨基酸,约90个氨基酸至约95个氨基酸,约95个氨基酸至约1000个氨基酸,约95个氨基酸至约950个氨基酸,约95个氨基酸至约900个氨基酸,约95个氨基酸至约850个氨基酸,约95个氨基酸至约800个氨基酸,约95个氨基酸至约750个氨基酸,约95个氨基酸至约700个氨基酸,约95个氨基酸至约650个氨基酸,约95个氨基酸至约600个氨基酸,约95个氨基酸至约550个氨基酸,约95个氨基酸至约500个氨基酸,约95个氨基酸至约450个氨基酸,约95个氨基酸至约400个氨基酸,约95个氨基酸至约350个氨基酸,约95个氨基酸至约300个氨基酸,约95个氨基酸至约280个氨基酸,约95个氨基酸至约260个氨基酸,约95个氨基酸至约240个氨基酸,约95个氨基酸至约220个氨基酸,约95个氨基酸至约200个氨基酸,约95个氨基酸至约195个氨基酸,约95个氨基酸至约190个氨基酸,约95个氨基酸至约185个氨基酸,约95个氨基酸至约180个氨基酸,约95个氨基酸至约175个氨基酸,约95个氨基酸至约170个氨基酸,约95个氨基酸至约165个氨基酸,约95个氨基酸至约160个氨基酸,约95个氨基酸至约155个氨基酸,约95个氨基酸至约150个氨基酸,约95个氨基酸至约145个氨基酸,约95个氨基酸至约140个氨基酸,约95个氨基酸至约135个氨基酸,约95个氨基酸至约130个氨基酸,约95个氨基酸至约125个氨基酸,约95个氨基酸至约120个氨基酸,约95个氨基酸至约115个氨基酸,约95个氨基酸至约110个氨基酸,约95个氨基酸至约105个氨基酸,约95个氨基酸至约100个氨基酸,约100个氨基酸至约1000个氨基酸,约100个氨基酸至约950个氨基酸,约100个氨基酸至约900个氨基酸,约100个氨基酸至约850个氨基酸,约100个氨基酸至约800个氨基酸,约100个氨基酸至约750个氨基酸,约100个氨基酸至约700个氨基酸,约100个氨基酸至约650个氨基酸,约100个氨基酸至约600个氨基酸,约100个氨基酸至约550个氨基酸,约100个氨基酸至约500个氨基酸,约100个氨基酸至约450个氨基酸,约100个氨基酸至约400个氨基酸,约100个氨基酸至约350个氨基酸,约100个氨基酸至约300个氨基酸,约100个氨基酸至约280个氨基酸,约100个氨基酸至约260个氨基酸,约100个氨基酸至约240个氨基酸,约100个氨基酸至约220个氨基酸,约100个氨基酸至约200个氨基酸,约100个氨基酸至约195个氨基酸,约100个氨基酸至约190个氨基酸,约100个氨基酸至约185个氨基酸,约100个氨基酸至

约180个氨基酸,约100个氨基酸至约175个氨基酸,约100个氨基酸至约170个氨基酸,约100个氨基酸至约165个氨基酸,约100个氨基酸至约160个氨基酸,约100个氨基酸至约155个氨基酸,约100个氨基酸至约150个氨基酸,约100个氨基酸至约145个氨基酸,约100个氨基酸至约140个氨基酸,约100个氨基酸至约135个氨基酸,约100个氨基酸至约130个氨基酸,约100个氨基酸至约125个氨基酸,约100个氨基酸至约120个氨基酸,约100个氨基酸至约115个氨基酸,约100个氨基酸至约110个氨基酸,约100个氨基酸至约105个氨基酸,约105个氨基酸至约1000个氨基酸,约105个氨基酸至约950个氨基酸,约105个氨基酸至约900个氨基酸,约105个氨基酸至约850个氨基酸,约105个氨基酸至约800个氨基酸,约105个氨基酸至约750个氨基酸,约105个氨基酸至约700个氨基酸,约105个氨基酸至约650个氨基酸,约105个氨基酸至约600个氨基酸,约105个氨基酸至约550个氨基酸,约105个氨基酸至约500个氨基酸,约105个氨基酸至约450个氨基酸,约105个氨基酸至约400个氨基酸,约105个氨基酸至约350个氨基酸,约105个氨基酸至约300个氨基酸,约105个氨基酸至约280个氨基酸,约105个氨基酸至约260个氨基酸,约105个氨基酸至约240个氨基酸,约105个氨基酸至约220个氨基酸,约105个氨基酸至约200个氨基酸,约105个氨基酸至约195个氨基酸,约105个氨基酸至约190个氨基酸,约105个氨基酸至约185个氨基酸,约105个氨基酸至约180个氨基酸,约105个氨基酸至约175个氨基酸,约105个氨基酸至约170个氨基酸,约105个氨基酸至约165个氨基酸,约105个氨基酸至约160个氨基酸,约105个氨基酸至约155个氨基酸,约105个氨基酸至约150个氨基酸,约105个氨基酸至约145个氨基酸,约105个氨基酸至约140个氨基酸,约105个氨基酸至约135个氨基酸,约105个氨基酸至约130个氨基酸,约105个氨基酸至约125个氨基酸,约105个氨基酸至约120个氨基酸,约105个氨基酸至约115个氨基酸,约105个氨基酸至约110个氨基酸,约110个氨基酸至约1000个氨基酸,约110个氨基酸至约950个氨基酸,约110个氨基酸至约900个氨基酸,约110个氨基酸至约850个氨基酸,约110个氨基酸至约800个氨基酸,约110个氨基酸至约750个氨基酸,约110个氨基酸至约700个氨基酸,约110个氨基酸至约650个氨基酸,约110个氨基酸至约600个氨基酸,约110个氨基酸至约550个氨基酸,约110个氨基酸至约500个氨基酸,约110个氨基酸至约450个氨基酸,约110个氨基酸至约400个氨基酸,约110个氨基酸至约350个氨基酸,约110个氨基酸至约300个氨基酸,约110个氨基酸至约280个氨基酸,约110个氨基酸至约260个氨基酸,约110个氨基酸至约240个氨基酸,约110个氨基酸至约220个氨基酸,约110个氨基酸至约200个氨基酸,约110个氨基酸至约195个氨基酸,约110个氨基酸至约190个氨基酸,约110个氨基酸至约185个氨基酸,约110个氨基酸至约180个氨基酸,约110个氨基酸至约175个氨基酸,约110个氨基酸至约170个氨基酸,约110个氨基酸至约165个氨基酸,约110个氨基酸至约160个氨基酸,约110个氨基酸至约155个氨基酸,约110个氨基酸至约150个氨基酸,约110个氨基酸至约145个氨基酸,约110个氨基酸至约140个氨基酸,约110个氨基酸至约135个氨基酸,约110个氨基酸至约130个氨基酸,约110个氨基酸至约125个氨基酸,约110个氨基酸至约120个氨基酸,约110个氨基酸至约115个氨基酸,约115个氨基酸至约1000个氨基酸,约115个氨基酸至约950个氨基酸,约115个氨基酸至约900个氨基酸,约115个氨基酸至约850个氨基酸,约115个氨基酸至约800个氨基酸,约115个氨基酸至约750个氨基酸,约115个氨基酸至约700个氨基酸,约115个氨基酸至约650个氨基酸,约115个氨基酸至约600个氨基酸,约115个氨基酸至约550个氨基酸,约115个氨基酸至约500个氨基酸,约115个氨基酸至约450个氨基

酸,约115个氨基酸至约400个氨基酸,约115个氨基酸至约350个氨基酸,约115个氨基酸至约300个氨基酸,约115个氨基酸至约280个氨基酸,约115个氨基酸至约260个氨基酸,约115个氨基酸至约240个氨基酸,约115个氨基酸至约220个氨基酸,约115个氨基酸至约200个氨基酸,约115个氨基酸至约195个氨基酸,约115个氨基酸至约190个氨基酸,约115个氨基酸至约185个氨基酸,约115个氨基酸至约180个氨基酸,约115个氨基酸至约175个氨基酸,约115个氨基酸至约170个氨基酸,约115个氨基酸至约165个氨基酸,约115个氨基酸至约160个氨基酸,约115个氨基酸至约155个氨基酸,约115个氨基酸至约150个氨基酸,约115个氨基酸至约145个氨基酸,约115个氨基酸至约140个氨基酸,约115个氨基酸至约135个氨基酸,约115个氨基酸至约130个氨基酸,约115个氨基酸至约125个氨基酸,约115个氨基酸至约120个氨基酸,约120个氨基酸至约1000个氨基酸,约120个氨基酸至约950个氨基酸,约120个氨基酸至约900个氨基酸,约120个氨基酸至约850个氨基酸,约120个氨基酸至约800个氨基酸,约120个氨基酸至约750个氨基酸,约120个氨基酸至约700个氨基酸,约120个氨基酸至约650个氨基酸,约120个氨基酸至约600个氨基酸,约120个氨基酸至约550个氨基酸,约120个氨基酸至约500个氨基酸,约120个氨基酸至约450个氨基酸,约120个氨基酸至约400个氨基酸,约120个氨基酸至约350个氨基酸,约120个氨基酸至约300个氨基酸,约120个氨基酸至约280个氨基酸,约120个氨基酸至约260个氨基酸,约120个氨基酸至约240个氨基酸,约120个氨基酸至约220个氨基酸,约120个氨基酸至约200个氨基酸,约120个氨基酸至约195个氨基酸,约120个氨基酸至约190个氨基酸,约120个氨基酸至约185个氨基酸,约120个氨基酸至约180个氨基酸,约120个氨基酸至约175个氨基酸,约120个氨基酸至约170个氨基酸,约120个氨基酸至约165个氨基酸,约120个氨基酸至约160个氨基酸,约120个氨基酸至约155个氨基酸,约120个氨基酸至约150个氨基酸,约120个氨基酸至约145个氨基酸,约120个氨基酸至约140个氨基酸,约120个氨基酸至约135个氨基酸,约120个氨基酸至约130个氨基酸,约120个氨基酸至约125个氨基酸,约125个氨基酸至约1000个氨基酸,约125个氨基酸至约950个氨基酸,约125个氨基酸至约900个氨基酸,约125个氨基酸至约850个氨基酸,约125个氨基酸至约800个氨基酸,约125个氨基酸至约750个氨基酸,约125个氨基酸至约700个氨基酸,约125个氨基酸至约650个氨基酸,约125个氨基酸至约600个氨基酸,约125个氨基酸至约550个氨基酸,约125个氨基酸至约500个氨基酸,约125个氨基酸至约450个氨基酸,约125个氨基酸至约400个氨基酸,约125个氨基酸至约350个氨基酸,约125个氨基酸至约300个氨基酸,约125个氨基酸至约280个氨基酸,约125个氨基酸至约260个氨基酸,约125个氨基酸至约240个氨基酸,约125个氨基酸至约220个氨基酸,约125个氨基酸至约200个氨基酸,约125个氨基酸至约195个氨基酸,约125个氨基酸至约190个氨基酸,约125个氨基酸至约185个氨基酸,约125个氨基酸至约180个氨基酸,约125个氨基酸至约175个氨基酸,约125个氨基酸至约170个氨基酸,约125个氨基酸至约165个氨基酸,约125个氨基酸至约160个氨基酸,约125个氨基酸至约155个氨基酸,约125个氨基酸至约150个氨基酸,约125个氨基酸至约145个氨基酸,约125个氨基酸至约140个氨基酸,约125个氨基酸至约135个氨基酸,约125个氨基酸至约130个氨基酸,约130个氨基酸至约1000个氨基酸,约130个氨基酸至约950个氨基酸,约130个氨基酸至约900个氨基酸,约130个氨基酸至约850个氨基酸,约130个氨基酸至约800个氨基酸,约130个氨基酸至约750个氨基酸,约130个氨基酸至约700个氨基酸,约130个氨基酸至约650个氨基酸,约130个氨基酸至约600个氨基

酸,约130个氨基酸至约550个氨基酸,约130个氨基酸至约500个氨基酸,约130个氨基酸至约450个氨基酸,约130个氨基酸至约400个氨基酸,约130个氨基酸至约350个氨基酸,约130个氨基酸至约300个氨基酸,约130个氨基酸至约280个氨基酸,约130个氨基酸至约260个氨基酸,约130个氨基酸至约240个氨基酸,约130个氨基酸至约220个氨基酸,约130个氨基酸至约200个氨基酸,约130个氨基酸至约195个氨基酸,约130个氨基酸至约190个氨基酸,约130个氨基酸至约185个氨基酸,约130个氨基酸至约180个氨基酸,约130个氨基酸至约175个氨基酸,约130个氨基酸至约170个氨基酸,约130个氨基酸至约165个氨基酸,约130个氨基酸至约160个氨基酸,约130个氨基酸至约155个氨基酸,约130个氨基酸至约150个氨基酸,约130个氨基酸至约145个氨基酸,约130个氨基酸至约140个氨基酸,约130个氨基酸至约135个氨基酸,约135个氨基酸至约1000个氨基酸,约135个氨基酸至约950个氨基酸,约135个氨基酸至约900个氨基酸,约135个氨基酸至约850个氨基酸,约135个氨基酸至约800个氨基酸,约135个氨基酸至约750个氨基酸,约135个氨基酸至约700个氨基酸,约135个氨基酸至约650个氨基酸,约135个氨基酸至约600个氨基酸,约135个氨基酸至约550个氨基酸,约135个氨基酸至约500个氨基酸,约135个氨基酸至约450个氨基酸,约135个氨基酸至约400个氨基酸,约135个氨基酸至约350个氨基酸,约135个氨基酸至约300个氨基酸,约135个氨基酸至约280个氨基酸,约135个氨基酸至约260个氨基酸,约135个氨基酸至约240个氨基酸,约135个氨基酸至约220个氨基酸,约135个氨基酸至约200个氨基酸,约135个氨基酸至约195个氨基酸,约135个氨基酸至约190个氨基酸,约135个氨基酸至约185个氨基酸,约135个氨基酸至约180个氨基酸,约135个氨基酸至约175个氨基酸,约135个氨基酸至约170个氨基酸,约135个氨基酸至约165个氨基酸,约135个氨基酸至约160个氨基酸,约135个氨基酸至约155个氨基酸,约135个氨基酸至约150个氨基酸,约135个氨基酸至约145个氨基酸,约135个氨基酸至约140个氨基酸,约140个氨基酸至约1000个氨基酸,约140个氨基酸至约950个氨基酸,约140个氨基酸至约900个氨基酸,约140个氨基酸至约850个氨基酸,约140个氨基酸至约800个氨基酸,约140个氨基酸至约750个氨基酸,约140个氨基酸至约700个氨基酸,约140个氨基酸至约650个氨基酸,约140个氨基酸至约600个氨基酸,约140个氨基酸至约550个氨基酸,约140个氨基酸至约500个氨基酸,约140个氨基酸至约450个氨基酸,约140个氨基酸至约400个氨基酸,约140个氨基酸至约350个氨基酸,约140个氨基酸至约300个氨基酸,约140个氨基酸至约280个氨基酸,约140个氨基酸至约260个氨基酸,约140个氨基酸至约240个氨基酸,约140个氨基酸至约220个氨基酸,约140个氨基酸至约200个氨基酸,约140个氨基酸至约195个氨基酸,约140个氨基酸至约190个氨基酸,约140个氨基酸至约185个氨基酸,约140个氨基酸至约180个氨基酸,约140个氨基酸至约175个氨基酸,约140个氨基酸至约170个氨基酸,约140个氨基酸至约165个氨基酸,约140个氨基酸至约160个氨基酸,约140个氨基酸至约155个氨基酸,约140个氨基酸至约150个氨基酸,约140个氨基酸至约145个氨基酸,约145个氨基酸至约1000个氨基酸,约145个氨基酸至约950个氨基酸,约145个氨基酸至约900个氨基酸,约145个氨基酸至约850个氨基酸,约145个氨基酸至约800个氨基酸,约145个氨基酸至约750个氨基酸,约145个氨基酸至约700个氨基酸,约145个氨基酸至约650个氨基酸,约145个氨基酸至约600个氨基酸,约145个氨基酸至约550个氨基酸,约145个氨基酸至约500个氨基酸,约145个氨基酸至约450个氨基酸,约145个氨基酸至约400个氨基酸,约145个氨基酸至约350个氨基酸,约145个氨基酸至约300个氨基酸,约145

个氨基酸至约280个氨基酸,约145个氨基酸至约260个氨基酸,约145个氨基酸至约240个氨基酸,约145个氨基酸至约220个氨基酸,约145个氨基酸至约200个氨基酸,约145个氨基酸至约195个氨基酸,约145个氨基酸至约190个氨基酸,约145个氨基酸至约185个氨基酸,约145个氨基酸至约180个氨基酸,约145个氨基酸至约175个氨基酸,约145个氨基酸至约170个氨基酸,约145个氨基酸至约165个氨基酸,约145个氨基酸至约160个氨基酸,约145个氨基酸至约155个氨基酸,约145个氨基酸至约150个氨基酸,约150个氨基酸至约1000个氨基酸,约150个氨基酸至约950个氨基酸,约150个氨基酸至约900个氨基酸,约150个氨基酸至约850个氨基酸,约150个氨基酸至约800个氨基酸,约150个氨基酸至约750个氨基酸,约150个氨基酸至约700个氨基酸,约150个氨基酸至约650个氨基酸,约150个氨基酸至约600个氨基酸,约150个氨基酸至约550个氨基酸,约150个氨基酸至约500个氨基酸,约150个氨基酸至约450个氨基酸,约150个氨基酸至约400个氨基酸,约150个氨基酸至约350个氨基酸,约150个氨基酸至约300个氨基酸,约150个氨基酸至约280个氨基酸,约150个氨基酸至约260个氨基酸,约150个氨基酸至约240个氨基酸,约150个氨基酸至约220个氨基酸,约150个氨基酸至约200个氨基酸,约150个氨基酸至约195个氨基酸,约150个氨基酸至约190个氨基酸,约150个氨基酸至约185个氨基酸,约150个氨基酸至约180个氨基酸,约150个氨基酸至约175个氨基酸,约150个氨基酸至约170个氨基酸,约150个氨基酸至约165个氨基酸,约150个氨基酸至约160个氨基酸,约150个氨基酸至约155个氨基酸,约155个氨基酸至约1000个氨基酸,约155个氨基酸至约950个氨基酸,约155个氨基酸至约900个氨基酸,约155个氨基酸至约850个氨基酸,约155个氨基酸至约800个氨基酸,约155个氨基酸至约750个氨基酸,约155个氨基酸至约700个氨基酸,约155个氨基酸至约650个氨基酸,约155个氨基酸至约600个氨基酸,约155个氨基酸至约550个氨基酸,约155个氨基酸至约500个氨基酸,约155个氨基酸至约450个氨基酸,约155个氨基酸至约400个氨基酸,约155个氨基酸至约350个氨基酸,约155个氨基酸至约300个氨基酸,约155个氨基酸至约280个氨基酸,约155个氨基酸至约260个氨基酸,约155个氨基酸至约240个氨基酸,约155个氨基酸至约220个氨基酸,约155个氨基酸至约200个氨基酸,约155个氨基酸至约195个氨基酸,约155个氨基酸至约190个氨基酸,约155个氨基酸至约185个氨基酸,约155个氨基酸至约180个氨基酸,约155个氨基酸至约175个氨基酸,约155个氨基酸至约170个氨基酸,约155个氨基酸至约165个氨基酸,约155个氨基酸至约160个氨基酸,约160个氨基酸至约1000个氨基酸,约160个氨基酸至约950个氨基酸,约160个氨基酸至约900个氨基酸,约160个氨基酸至约850个氨基酸,约160个氨基酸至约800个氨基酸,约160个氨基酸至约750个氨基酸,约160个氨基酸至约700个氨基酸,约160个氨基酸至约650个氨基酸,约160个氨基酸至约600个氨基酸,约160个氨基酸至约550个氨基酸,约160个氨基酸至约500个氨基酸,约160个氨基酸至约450个氨基酸,约160个氨基酸至约400个氨基酸,约160个氨基酸至约350个氨基酸,约160个氨基酸至约300个氨基酸,约160个氨基酸至约280个氨基酸,约160个氨基酸至约260个氨基酸,约160个氨基酸至约240个氨基酸,约160个氨基酸至约220个氨基酸,约160个氨基酸至约200个氨基酸,约160个氨基酸至约195个氨基酸,约160个氨基酸至约190个氨基酸,约160个氨基酸至约185个氨基酸,约160个氨基酸至约180个氨基酸,约160个氨基酸至约175个氨基酸,约160个氨基酸至约170个氨基酸,约160个氨基酸至约165个氨基酸,约165个氨基酸至约1000个氨基酸,约165个氨基酸至约950个氨基酸,约165个氨基酸至约900个氨基酸,约165个氨基酸至

约850个氨基酸,约165个氨基酸至约800个氨基酸,约165个氨基酸至约750个氨基酸,约165个氨基酸至约700个氨基酸,约165个氨基酸至约650个氨基酸,约165个氨基酸至约600个氨基酸,约165个氨基酸至约550个氨基酸,约165个氨基酸至约500个氨基酸,约165个氨基酸至约450个氨基酸,约165个氨基酸至约400个氨基酸,约165个氨基酸至约350个氨基酸,约165个氨基酸至约300个氨基酸,约165个氨基酸至约280个氨基酸,约165个氨基酸至约260个氨基酸,约165个氨基酸至约240个氨基酸,约165个氨基酸至约220个氨基酸,约165个氨基酸至约200个氨基酸,约165个氨基酸至约195个氨基酸,约165个氨基酸至约190个氨基酸,约165个氨基酸至约185个氨基酸,约165个氨基酸至约180个氨基酸,约165个氨基酸至约175个氨基酸,约165个氨基酸至约170个氨基酸,约170个氨基酸至约1000个氨基酸,约170个氨基酸至约950个氨基酸,约170个氨基酸至约900个氨基酸,约170个氨基酸至约850个氨基酸,约170个氨基酸至约800个氨基酸,约170个氨基酸至约750个氨基酸,约170个氨基酸至约700个氨基酸,约170个氨基酸至约650个氨基酸,约170个氨基酸至约600个氨基酸,约170个氨基酸至约550个氨基酸,约170个氨基酸至约500个氨基酸,约170个氨基酸至约450个氨基酸,约170个氨基酸至约400个氨基酸,约170个氨基酸至约350个氨基酸,约170个氨基酸至约300个氨基酸,约170个氨基酸至约280个氨基酸,约170个氨基酸至约260个氨基酸,约170个氨基酸至约240个氨基酸,约170个氨基酸至约220个氨基酸,约170个氨基酸至约200个氨基酸,约170个氨基酸至约195个氨基酸,约170个氨基酸至约190个氨基酸,约170个氨基酸至约185个氨基酸,约170个氨基酸至约180个氨基酸,约170个氨基酸至约175个氨基酸,约175个氨基酸至约1000个氨基酸,约175个氨基酸至约950个氨基酸,约175个氨基酸至约900个氨基酸,约175个氨基酸至约850个氨基酸,约175个氨基酸至约800个氨基酸,约175个氨基酸至约750个氨基酸,约175个氨基酸至约700个氨基酸,约175个氨基酸至约650个氨基酸,约175个氨基酸至约600个氨基酸,约175个氨基酸至约550个氨基酸,约175个氨基酸至约500个氨基酸,约175个氨基酸至约450个氨基酸,约175个氨基酸至约400个氨基酸,约175个氨基酸至约350个氨基酸,约175个氨基酸至约300个氨基酸,约175个氨基酸至约280个氨基酸,约175个氨基酸至约260个氨基酸,约175个氨基酸至约240个氨基酸,约175个氨基酸至约220个氨基酸,约175个氨基酸至约200个氨基酸,约175个氨基酸至约195个氨基酸,约175个氨基酸至约190个氨基酸,约175个氨基酸至约185个氨基酸,约175个氨基酸至约180个氨基酸,约180个氨基酸至约1000个氨基酸,约180个氨基酸至约950个氨基酸,约180个氨基酸至约900个氨基酸,约180个氨基酸至约850个氨基酸,约180个氨基酸至约800个氨基酸,约180个氨基酸至约750个氨基酸,约180个氨基酸至约700个氨基酸,约180个氨基酸至约650个氨基酸,约180个氨基酸至约600个氨基酸,约180个氨基酸至约550个氨基酸,约180个氨基酸至约500个氨基酸,约180个氨基酸至约450个氨基酸,约180个氨基酸至约400个氨基酸,约180个氨基酸至约350个氨基酸,约180个氨基酸至约300个氨基酸,约180个氨基酸至约280个氨基酸,约180个氨基酸至约260个氨基酸,约180个氨基酸至约240个氨基酸,约180个氨基酸至约220个氨基酸,约180个氨基酸至约200个氨基酸,约180个氨基酸至约195个氨基酸,约180个氨基酸至约190个氨基酸,约180个氨基酸至约185个氨基酸,约185个氨基酸至约1000个氨基酸,约185个氨基酸至约950个氨基酸,约185个氨基酸至约900个氨基酸,约185个氨基酸至约850个氨基酸,约185个氨基酸至约800个氨基酸,约185个氨基酸至约750个氨基酸,约185个氨基酸至约700个氨基酸,约185个氨基酸至约650个氨

基酸,约185个氨基酸至约600个氨基酸,约185个氨基酸至约550个氨基酸,约185个氨基酸至约500个氨基酸,约185个氨基酸至约450个氨基酸,约185个氨基酸至约400个氨基酸,约185个氨基酸至约350个氨基酸,约185个氨基酸至约300个氨基酸,约185个氨基酸至约280个氨基酸,约185个氨基酸至约260个氨基酸,约185个氨基酸至约240个氨基酸,约185个氨基酸至约220个氨基酸,约185个氨基酸至约200个氨基酸,约185个氨基酸至约195个氨基酸,约185个氨基酸至约190个氨基酸,约190个氨基酸至约1000个氨基酸,约190个氨基酸至约950个氨基酸,约190个氨基酸至约900个氨基酸,约190个氨基酸至约850个氨基酸,约190个氨基酸至约800个氨基酸,约190个氨基酸至约750个氨基酸,约190个氨基酸至约700个氨基酸,约190个氨基酸至约650个氨基酸,约190个氨基酸至约600个氨基酸,约190个氨基酸至约550个氨基酸,约190个氨基酸至约500个氨基酸,约190个氨基酸至约450个氨基酸,约190个氨基酸至约400个氨基酸,约190个氨基酸至约350个氨基酸,约190个氨基酸至约300个氨基酸,约190个氨基酸至约280个氨基酸,约190个氨基酸至约260个氨基酸,约190个氨基酸至约240个氨基酸,约190个氨基酸至约220个氨基酸,约190个氨基酸至约200个氨基酸,约190个氨基酸至约195个氨基酸,约195个氨基酸至约1000个氨基酸,约195个氨基酸至约950个氨基酸,约195个氨基酸至约900个氨基酸,约195个氨基酸至约850个氨基酸,约195个氨基酸至约800个氨基酸,约195个氨基酸至约750个氨基酸,约195个氨基酸至约700个氨基酸,约195个氨基酸至约650个氨基酸,约195个氨基酸至约600个氨基酸,约195个氨基酸至约550个氨基酸,约195个氨基酸至约500个氨基酸,约195个氨基酸至约450个氨基酸,约195个氨基酸至约400个氨基酸,约195个氨基酸至约350个氨基酸,约195个氨基酸至约300个氨基酸,约195个氨基酸至约280个氨基酸,约195个氨基酸至约260个氨基酸,约195个氨基酸至约240个氨基酸,约195个氨基酸至约220个氨基酸,约195个氨基酸至约200个氨基酸,约200个氨基酸至约1000个氨基酸,约200个氨基酸至约950个氨基酸,约200个氨基酸至约900个氨基酸,约200个氨基酸至约850个氨基酸,约200个氨基酸至约800个氨基酸,约200个氨基酸至约750个氨基酸,约200个氨基酸至约700个氨基酸,约200个氨基酸至约650个氨基酸,约200个氨基酸至约600个氨基酸,约200个氨基酸至约550个氨基酸,约200个氨基酸至约500个氨基酸,约200个氨基酸至约450个氨基酸,约200个氨基酸至约400个氨基酸,约200个氨基酸至约350个氨基酸,约200个氨基酸至约300个氨基酸,约200个氨基酸至约280个氨基酸,约200个氨基酸至约260个氨基酸,约200个氨基酸至约240个氨基酸,约200个氨基酸至约220个氨基酸,约220个氨基酸至约1000个氨基酸,约220个氨基酸至约950个氨基酸,约220个氨基酸至约900个氨基酸,约220个氨基酸至约850个氨基酸,约220个氨基酸至约800个氨基酸,约220个氨基酸至约750个氨基酸,约220个氨基酸至约700个氨基酸,约220个氨基酸至约650个氨基酸,约220个氨基酸至约600个氨基酸,约220个氨基酸至约550个氨基酸,约220个氨基酸至约500个氨基酸,约220个氨基酸至约450个氨基酸,约220个氨基酸至约400个氨基酸,约220个氨基酸至约350个氨基酸,约220个氨基酸至约300个氨基酸,约220个氨基酸至约280个氨基酸,约220个氨基酸至约260个氨基酸,约220个氨基酸至约240个氨基酸,约240个氨基酸至约1000个氨基酸,约240个氨基酸至约950个氨基酸,约240个氨基酸至约900个氨基酸,约240个氨基酸至约850个氨基酸,约240个氨基酸至约800个氨基酸,约240个氨基酸至约750个氨基酸,约240个氨基酸至约700个氨基酸,约240个氨基酸至约650个氨基酸,约240个氨基酸至约600个氨基酸,约240个氨基酸至约550个氨基酸,约240

个氨基酸至约500个氨基酸,约240个氨基酸至约450个氨基酸,约240个氨基酸至约400个氨基酸,约240个氨基酸至约350个氨基酸,约240个氨基酸至约300个氨基酸,约240个氨基酸至约280个氨基酸,约240个氨基酸至约260个氨基酸,约260个氨基酸至约1000个氨基酸,约260个氨基酸至约950个氨基酸,约260个氨基酸至约900个氨基酸,约260个氨基酸至约850个氨基酸,约260个氨基酸至约800个氨基酸,约260个氨基酸至约750个氨基酸,约260个氨基酸至约700个氨基酸,约260个氨基酸至约650个氨基酸,约260个氨基酸至约600个氨基酸,约260个氨基酸至约550个氨基酸,约260个氨基酸至约500个氨基酸,约260个氨基酸至约450个氨基酸,约260个氨基酸至约400个氨基酸,约260个氨基酸至约350个氨基酸,约260个氨基酸至约300个氨基酸,约260个氨基酸至约280个氨基酸,约280个氨基酸至约1000个氨基酸,约280个氨基酸至约950个氨基酸,约280个氨基酸至约900个氨基酸,约280个氨基酸至约850个氨基酸,约280个氨基酸至约800个氨基酸,约280个氨基酸至约750个氨基酸,约280个氨基酸至约700个氨基酸,约280个氨基酸至约650个氨基酸,约280个氨基酸至约600个氨基酸,约280个氨基酸至约550个氨基酸,约280个氨基酸至约500个氨基酸,约280个氨基酸至约450个氨基酸,约280个氨基酸至约400个氨基酸,约280个氨基酸至约350个氨基酸,约280个氨基酸至约300个氨基酸,约300个氨基酸至约1000个氨基酸,约300个氨基酸至约950个氨基酸,约300个氨基酸至约900个氨基酸,约300个氨基酸至约850个氨基酸,约300个氨基酸至约800个氨基酸,约300个氨基酸至约750个氨基酸,约300个氨基酸至约700个氨基酸,约300个氨基酸至约650个氨基酸,约300个氨基酸至约600个氨基酸,约300个氨基酸至约550个氨基酸,约300个氨基酸至约500个氨基酸,约300个氨基酸至约450个氨基酸,约300个氨基酸至约400个氨基酸,约300个氨基酸至约350个氨基酸,约350个氨基酸至约1000个氨基酸,约350个氨基酸至约950个氨基酸,约350个氨基酸至约900个氨基酸,约350个氨基酸至约850个氨基酸,约350个氨基酸至约800个氨基酸,约350个氨基酸至约750个氨基酸,约350个氨基酸至约700个氨基酸,约350个氨基酸至约650个氨基酸,约350个氨基酸至约600个氨基酸,约350个氨基酸至约550个氨基酸,约350个氨基酸至约500个氨基酸,约350个氨基酸至约450个氨基酸,约350个氨基酸至约400个氨基酸,约400个氨基酸至约1000个氨基酸,约400个氨基酸至约950个氨基酸,约400个氨基酸至约900个氨基酸,约400个氨基酸至约850个氨基酸,约400个氨基酸至约800个氨基酸,约400个氨基酸至约750个氨基酸,约400个氨基酸至约700个氨基酸,约400个氨基酸至约650个氨基酸,约400个氨基酸至约600个氨基酸,约400个氨基酸至约550个氨基酸,约400个氨基酸至约500个氨基酸,约400个氨基酸至约450个氨基酸,约450个氨基酸至约1000个氨基酸,约450个氨基酸至约950个氨基酸,约450个氨基酸至约900个氨基酸,约450个氨基酸至约850个氨基酸,约450个氨基酸至约800个氨基酸,约450个氨基酸至约750个氨基酸,约450个氨基酸至约700个氨基酸,约450个氨基酸至约650个氨基酸,约450个氨基酸至约600个氨基酸,约450个氨基酸至约550个氨基酸,约450个氨基酸至约500个氨基酸,约500个氨基酸至约1000个氨基酸,约500个氨基酸至约950个氨基酸,约500个氨基酸至约900个氨基酸,约500个氨基酸至约850个氨基酸,约500个氨基酸至约800个氨基酸,约500个氨基酸至约750个氨基酸,约500个氨基酸至约700个氨基酸,约500个氨基酸至约650个氨基酸,约500个氨基酸至约600个氨基酸,约500个氨基酸至约550个氨基酸,约550个氨基酸至约1000个氨基酸,约550个氨基酸至约950个氨基酸,约550个氨基酸至约900个氨基酸,约550个氨基酸至约850个氨基酸,约550个氨基

酸至约800个氨基酸,约550个氨基酸至约750个氨基酸,约550个氨基酸至约700个氨基酸,约550个氨基酸至约650个氨基酸,约550个氨基酸至约600个氨基酸,约600个氨基酸至约1000个氨基酸,约600个氨基酸至约950个氨基酸,约600个氨基酸至约900个氨基酸,约600个氨基酸至约850个氨基酸,约600个氨基酸至约800个氨基酸,约600个氨基酸至约750个氨基酸,约600个氨基酸至约700个氨基酸,约600个氨基酸至约650个氨基酸,约650个氨基酸至约1000个氨基酸,约650个氨基酸至约950个氨基酸,约650个氨基酸至约900个氨基酸,约650个氨基酸至约850个氨基酸,约650个氨基酸至约800个氨基酸,约650个氨基酸至约750个氨基酸,约650个氨基酸至约700个氨基酸,约700个氨基酸至约1000个氨基酸,约700个氨基酸至约950个氨基酸,约700个氨基酸至约900个氨基酸,约700个氨基酸至约850个氨基酸,约700个氨基酸至约800个氨基酸,约700个氨基酸至约750个氨基酸,约750个氨基酸至约1000个氨基酸,约750个氨基酸至约950个氨基酸,约750个氨基酸至约900个氨基酸,约750个氨基酸至约850个氨基酸,约750个氨基酸至约800个氨基酸,约800个氨基酸至约1000个氨基酸,约800个氨基酸至约950个氨基酸,约800个氨基酸至约900个氨基酸,约800个氨基酸至约850个氨基酸,约850个氨基酸至约1000个氨基酸,约850个氨基酸至约950个氨基酸,约850个氨基酸至约900个氨基酸,约900个氨基酸至约1000个氨基酸,约900个氨基酸至约950个氨基酸,或约950个氨基酸至约1000个氨基酸。

[1832] 本文所述的任一种靶标结合域可以小于1×10^{-7}M、小于1×10^{-8}M、小于1×10^{-9}M、小于1×10^{-10}M、小于1×10^{-11}M、小于1×10^{-12}M或小于1×10^{-13}M的解离平衡常数(K_D)结合到其靶标。在一些实施例中,本文提供的抗原结合蛋白构建体可以约1×10^{-3}M至约1×10^{-5}M、约1×10^{-4}M至约1×10^{-6}M、约1×10^{-5}M至约1×10^{-7}M、约1×10^{-6}M至约1×10^{-8}M、约1×10^{-7}M至约1×10^{-9}M、约1×10^{-8}M至约1×10^{-10}M、or约1×10^{-9}M至约1×10^{-11}M(包括端点)的K_D结合到识别抗原。

[1833] 本文所述的任一种靶标结合域可结合到其靶标,其K_D在约1pM至约30nM之间(例如,约1pM至约25nM,约1pM至约20nM,约1pM至约15nM,约1pM至约10nM,约1pM至约5nM,约1pM至约2nM,约1pM至约1nM,约1pM至约950pM,约1pM至约900pM,约1pM至约850pM,约1pM至约800pM,约1pM至约750pM,约1pM至约700pM,约1pM至约650pM,约1pM至约600pM,约1pM至约550pM,约1pM至约500pM,约1pM至约450pM,约1pM至约400pM,约1pM至约350pM,约1pM至约300pM,约1pM至约250pM,约1pM至约200pM,约1pM至约150pM,约1pM至约100pM,约1pM至约90pM,约1pM至约80pM,约1pM至约70pM,约1pM至约60pM,约1pM至约50pM,约1pM至约40pM,约1pM至约30pM,约1pM至约20pM,约1pM至约10pM,约1pM至约5pM,约1pM至约4pM,约1pM至约3pM,约1pM至约2pM,约2pM至约30nM,约2pM至约25nM,约2pM至约20nM,约2pM至约15nM,约2pM至约10nM,约2pM至约5nM,约2pM至约2nM,约2pM至约1nM,约2pM至约950pM,约2pM至约900pM,约2pM至约850pM,约2pM至约800pM,约2pM至约750pM,约2pM至约700pM,约2pM至约650pM,约2pM至约600pM,约2pM至约550pM,约2pM至约500pM,约2pM至约450pM,约2pM至约400pM,约2pM至约350pM,约2pM至约300pM,约2pM至约250pM,约2pM至约200pM,约2pM至约150pM,约2pM至约100pM,约2pM至约90pM,约2pM至约80pM,约2pM至约70pM,约2pM至约60pM,约2pM至约50pM,约2pM至约40pM,约2pM至约30pM,约2pM至约20pM,约2pM至约10pM,约2pM至约5pM,约2pM至约4pM,约2pM至约3pM,约5pM至约30nM,约5pM至约25nM,约5pM至约20nM,约5pM至约15nM,约5pM至约10nM,约5pM至约5nM,约5pM至约2nM,约5pM至约1nM,约5pM至约

950pM,约5pM至约900pM,约5pM至约850pM,约5pM至约800pM,约5pM至约750pM,约5pM至约700pM,约5pM至约650pM,约5pM至约600pM,约5pM至约550pM,约5pM至约500pM,约5pM至约450pM,约5pM至约400pM,约5pM至约350pM,约5pM至约300pM,约5pM至约250pM,约5pM至约200pM,约5pM至约150pM,约5pM至约100pM,约5pM至约90pM,约5pM至约80pM,约5pM至约70pM,约5pM至约60pM,约5pM至约50pM,约5pM至约40pM,约5pM至约30pM,约5pM至约20pM,约5pM至约10pM,约10pM至约30nM,约10pM至约25nM,约10pM至约20nM,约10pM至约15nM,约10pM至约10nM,约10pM至约5nM,约10pM至约2nM,约10pM至约1nM,约10pM至约950pM,约10pM至约900pM,约10pM至约850pM,约10pM至约800pM,约10pM至约750pM,约10pM至约700pM,约10pM至约650pM,约10pM至约600pM,约10pM至约550pM,约10pM至约500pM,约10pM至约450pM,约10pM至约400pM,约10pM至约350pM,约10pM至约300pM,约10pM至约250pM,约10pM至约200pM,约10pM至约150pM,约10pM至约100pM,约10pM至约90pM,约10pM至约80pM,约10pM至约70pM,约10pM至约60pM,约10pM至约50pM,约10pM至约40pM,约10pM至约30pM,约10pM至约20pM,约15pM至约30nM,约15pM至约25nM,约15pM至约20nM,约15pM至约15nM,约15pM至约10nM,约15pM至约5nM,约15pM至约2nM,约15pM至约1nM,约15pM至约950pM,约15pM至约900pM,约15pM至约850pM,约15pM至约800pM,约15pM至约750pM,约15pM至约700pM,约15pM至约650pM,约15pM至约600pM,约15pM至约550pM,约15pM至约500pM,约15pM至约450pM,约15pM至约400pM,约15pM至约350pM,约15pM至约300pM,约15pM至约250pM,约15pM至约200pM,约15pM至约150pM,约15pM至约100pM,约15pM至约90pM,约15pM至约80pM,约15pM至约70pM,约15pM至约60pM,约15pM至约50pM,约15pM至约40pM,约15pM至约30pM,约15pM至约20pM,约20pM至约30nM,约20pM至约25nM,约20pM至约20nM,约20pM至约15nM,约20pM至约10nM,约20pM至约5nM,约20pM至约2nM,约20pM至约1nM,约20pM至约950pM,约20pM至约900pM,约20pM至约850pM,约20pM至约800pM,约20pM至约750pM,约20pM至约700pM,约20pM至约650pM,约20pM至约600pM,约20pM至约550pM,约20pM至约500pM,约20pM至约450pM,约20pM至约400pM,约20pM至约350pM,约20pM至约300pM,约20pM至约250pM,约20pM至约20pM,约200pM至约150pM,约20pM至约100pM,约20pM至约90pM,约20pM至约80pM,约20pM至约70pM,约20pM至约60pM,约20pM至约50pM,约20pM至约40pM,约20pM至约30pM,约30pM至约30nM,约30pM至约25nM,约30pM至约30nM,约30pM至约15nM,约30pM至约10nM,约30pM至约5nM,约30pM至约2nM,约30pM至约1nM,约30pM至约950pM,约30pM至约900pM,约30pM至约850pM,约30pM至约800pM,约30pM至约750pM,约30pM至约700pM,约30pM至约650pM,约30pM至约600pM,约30pM至约550pM,约30pM至约500pM,约30pM至约450pM,约30pM至约400pM,约30pM至约350pM,约30pM至约300pM,约30pM至约250pM,约30pM至约200pM,约30pM至约150pM,约30pM至约100pM,约30pM至约90pM,约30pM至约80pM,约30pM至约70pM,约30pM至约60pM,约30pM至约50pM,约30pM至约40pM,约40pM至约30nM,约40pM至约25nM,约40pM至约30nM,约40pM至约15nM,约40pM至约10nM,约40pM至约5nM,约40pM至约2nM,约40pM至约1nM,约40pM至约950pM,约40pM至约900pM,约40pM至约850pM,约40pM至约800pM,约40pM至约750pM,约40pM至约700pM,约40pM至约650pM,约40pM至约600pM,约40pM至约550pM,约40pM至约500pM,约40pM至约450pM,约40pM至约400pM,约40pM至约350pM,约40pM至约300pM,约40pM至约250pM,约40pM至约200pM,约40pM至约150pM,约40pM至约100pM,约40pM至约90pM,约40pM至约80pM,约40pM至约70pM,约40pM至约60pM,约40pM至约50pM,约

50pM至约30nM,约50pM至约25nM,约50pM至约30nM,约50pM至约15nM,约50pM至约10nM,约50pM至约5nM,约50pM至约2nM,约50pM至约1nM,约50pM至约950pM,约50pM至约900pM,约50pM至约850pM,约50pM至约800pM,约50pM至约750pM,约50pM至约700pM,约50pM至约650pM,约50pM至约600pM,约50pM至约550pM,约50pM至约500pM,约50pM至约450pM,约50pM至约400pM,约50pM至约350pM,约50pM至约300pM,约50pM至约250pM,约50pM至约200pM,约50pM至约150pM,约50pM至约100pM,约50pM至约90pM,约50pM至约80pM,约50pM至约70pM,约50pM至约60pM,约60pM至约30nM,约60pM至约25nM,约60pM至约30nM,约60pM至约15nM,约60pM至约10nM,约60pM至约5nM,约60pM至约2nM,约60pM至约1nM,约60pM至约950pM,约60pM至约900pM,约60pM至约850pM,约60pM至约800pM,约60pM至约750pM,约60pM至约700pM,约60pM至约650pM,约60pM至约600pM,约60pM至约550pM,约60pM至约500pM,约60pM至约450pM,约60pM至约400pM,约60pM至约350pM,约60pM至约300pM,约60pM至约250pM,约60pM至约200pM,约60pM至约150pM,约60pM至约100pM,约60pM至约90pM,约60pM至约80pM,约60pM至约70pM,约70pM至约30nM,约70pM至约25nM,约70pM至约30nM,约70pM至约15nM,约70pM至约10nM,约70pM至约5nM,约70pM至约2nM,约70pM至约1nM,约70pM至约950pM,约70pM至约900pM,约70pM至约850pM,约70pM至约800pM,约70pM至约750pM,约70pM至约700pM,约70pM至约650pM,约70pM至约600pM,约70pM至约550pM,约70pM至约500pM,约70pM至约450pM,约70pM至约400pM,约70pM至约350pM,约70pM至约300pM,约70pM至约250pM,约70pM至约200pM,约70pM至约150pM,约70pM至约100pM,约70pM至约90pM,约70pM至约80pM,约80pM至约30nM,约80pM至约25nM,约80pM至约30nM,约80pM至约15nM,约80pM至约10nM,约80pM至约5nM,约80pM至约2nM,约80pM至约1nM,约80pM至约950pM,约80pM至约900pM,约80pM至约850pM,约80pM至约800pM,约80pM至约750pM,约80pM至约700pM,约80pM至约650pM,约80pM至约600pM,约80pM至约550pM,约80pM至约500pM,约80pM至约450pM,约80pM至约400pM,约80pM至约350pM,约80pM至约300pM,约80pM至约250pM,约80pM至约200pM,约80pM至约150pM,约80pM至约100pM,约80pM至约90pM,约90pM至约30nM,约90pM至约25nM,约90pM至约30nM,约90pM至约15nM,约90pM至约10nM,约90pM至约5nM,约90pM至约2nM,约90pM至约1nM,约90pM至约950pM,约90pM至约900pM,约90pM至约850pM,约90pM至约800pM,约90pM至约750pM,约90pM至约700pM,约90pM至约650pM,约90pM至约600pM,约90pM至约550pM,约90pM至约500pM,约90pM至约450pM,约90pM至约400pM,约90pM至约350pM,约90pM至约300pM,约90pM至约250pM,约90pM至约200pM,约90pM至约150pM,约90pM至约100pM,约100pM至约30nM,约100pM至约25nM,约100pM至约30nM,约100pM至约15nM,约100pM至约10nM,约100pM至约5nM,约100pM至约2nM,约100pM至约1nM,约100pM至约950pM,约100pM至约900pM,约100pM至约850pM,约100pM至约800pM,约100pM至约750pM,约100pM至约700pM,约100pM至约650pM,约100pM至约600pM,约100pM至约550pM,约100pM至约500pM,约100pM至约450pM,约100pM至约400pM,约100pM至约350pM,约100pM至约300pM,约100pM至约250pM,约100pM至约200pM,约100pM至约150pM,约150pM至约30nM,约150pM至约25nM,约150pM至约30nM,约150pM至约15nM,约150pM至约10nM,约150pM至约5nM,约150pM至约2nM,约150pM至约1nM,约150pM至约950pM,约150pM至约900pM,约150pM至约850pM,约150pM至约800pM,约150pM至约750pM,约150pM至约700pM,约150pM至约650pM,约150pM至约600pM,约150pM至约550pM,约150pM至约500pM,约150pM至约450pM,约150pM至约400pM,约150pM至约350pM,约

150pM至约300pM,约150pM至约250pM,约150pM至约200pM,约200pM至约30nM,约200pM至约25nM,约200pM至约30nM,约200pM至约15nM,约200pM至约10nM,约200pM至约5nM,约200pM至约2nM,约200pM至约1nM,约200pM至约950pM,约200pM至约900pM,约200pM至约850pM,约200pM至约800pM,约200pM至约750pM,约200pM至约700pM,约200pM至约650pM,约200pM至约600pM,约200pM至约550pM,约200pM至约500pM,约200pM至约450pM,约200pM至约400pM,约200pM至约350pM,约200pM至约300pM,约200pM至约250pM,约300pM至约30nM,约300pM至约25nM,约300pM至约30nM,约300pM至约15nM,约300pM至约10nM,约300pM至约5nM,约300pM至约2nM,约300pM至约1nM,约300pM至约950pM,约300pM至约900pM,约300pM至约850pM,约300pM至约800pM,约300pM至约750pM,约300pM至约700pM,约300pM至约650pM,约300pM至约600pM,约300pM至约550pM,约300pM至约500pM,约300pM至约450pM,约300pM至约400pM,约300pM至约350pM,约400pM至约30nM,约400pM至约25nM,约400pM至约30nM,约400pM至约15nM,约400pM至约10nM,约400pM至约5nM,约400pM至约2nM,约400pM至约1nM,约400pM至约950pM,约400pM至约900pM,约400pM至约850pM,约400pM至约800pM,约400pM至约750pM,约400pM至约700pM,约400pM至约650pM,约400pM至约600pM,约400pM至约550pM,约400pM至约500pM,约500pM至约30nM,约500pM至约25nM,约500pM至约30nM,约500pM至约15nM,约500pM至约10nM,约500pM至约5nM,约500pM至约2nM,约500pM至约1nM,约500pM至约950pM,约500pM至约900pM,约500pM至约850pM,约500pM至约800pM,约500pM至约750pM,约500pM至约700pM,约500pM至约650pM,约500pM至约600pM,约500pM至约550pM,约600pM至约30nM,约600pM至约25nM,约600pM至约30nM,约600pM至约15nM,约600pM至约10nM,约600pM至约5nM,约600pM至约2nM,约600pM至约1nM,约600pM至约950pM,约600pM至约900pM,约600pM至约850pM,约600pM至约800pM,约600pM至约750pM,约600pM至约700pM,约600pM至约650pM,约700pM至约30nM,约700pM至约25nM,约700pM至约30nM,约700pM至约15nM,约700pM至约10nM,约700pM至约5nM,约700pM至约2nM,约700pM至约1nM,约700pM至约950pM,约700pM至约900pM,约700pM至约850pM,约700pM至约800pM,约700pM至约750pM,约800pM至约30nM,约800pM至约25nM,约800pM至约30nM,约800pM至约15nM,约800pM至约10nM,约800pM至约5nM,约800pM至约2nM,约800pM至约1nM,约800pM至约950pM,约800pM至约900pM,约800pM至约850pM,约900pM至约30nM,约900pM至约25nM,约900pM至约30nM,约900pM至约15nM,约900pM至约10nM,约900pM至约5nM,约900pM至约2nM,约900pM至约1nM,约900pM至约950pM,约1nM至约30nM,约1nM至约25nM,约1nM至约20nM,约1nM至约15nM,约1nM至约10nM,约1nM至约5nM,约2nM至约30nM,约2nM至约25nM,约2nM至约20nM,约2nM至约15nM,约2nM至约10nM,约2nM至约5nM,约4nM至约30nM,约4nM至约25nM,约4nM至约20nM,约4nM至约15nM,约4nM至约10nM,约4nM至约5nM,约5nM至约30nM,约5nM至约25nM,约5nM至约20nM,约5nM至约15nM,约5nM至约10nM,约10nM至约30nM,约10nM至约25nM,约10nM至约20nM,约10nM至约15nM,约15nM至约30nM,约15nM至约25nM,约15nM至约20nM,约20nM至约30nM,和约20nM至约25nM)。

[1834] 本文所述的任一种靶标结合域可结合到其靶标,其K_D在约1nM至约10nM之间(例如,约1nM至约9nM,约1nM至约8nM,约1nM至约7nM,约1nM至约6nM,约1nM至约5nM,约1nM至约4nM,约1nM至约3nM,约1nM至约2nM,约2nM至约10nM,约2nM至约9nM,约2nM至约8nM,约2nM至约7nM,约2nM至约6nM,约2nM至约5nM,约2nM至约4nM,约2nM至约3nM,约3nM至约10nM,约3nM至约9nM,约3nM至约8nM,约3nM至约7nM,约3nM至约6nM,约3nM至约5nM,约3nM至约4nM,约

4nM至约10nM,约4nM至约9nM,约4nM至约8nM,约4nM至约7nM,约4nM至约6nM,约4nM至约5nM,约5nM至约10nM,约5nM至约9nM,约5nM至约8nM,约5nM至约7nM,约5nM至约6nM,约6nM至约10nM,约6nM至约9nM,约6nM至约8nM,约6nM至约7nM,约7nM至约10nM,约7nM至约9nM,约7nM至约8nM,约8nM至约10nM,约8nM至约9nM,和约9nM至约10nM)。

[1835] 可使用本领域中已知的多种不同方法来测定本文所述的任一种抗原结合蛋白构建体的K_D值(例如电泳迁移率迁移分析、滤膜结合分析、表面等离子体共振和生物分子结合动力学分析等)。

[1836] 抗原结合域

[1837] 在本文所述的任一种单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的抗原。在这些单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。在这些单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域包括相同的氨基酸序列。

[1838] 在本文所述的任一种单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到不同的抗原。

[1839] 在本文所述的任一种单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是抗原结合域。在本文所述的任一种单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自是抗原结合域。在本文所述的任一种单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,抗原结合域包括或是scFv或单域抗体(例如,VHH或VNAR结构域)。

[1840] 在一些实例中,抗原结合域(例如本文所述的任一种抗原结合域)可特异性结合到以下中的任一种:CD16a(参见例如美国专利第9,035,026号中所述的那些)、CD28(参见例如美国专利第7,723,482号中所述的那些)、CD3(参见例如美国专利第9,226,962号中所述的那些)、CD33(参见例如美国专利第8,759,494号中所述的那些)、CD20(参见例如WO 2014/026054中所述的那些)、CD19(参见例如美国专利第9,701,758号中所述的那些)、CD22(参见例如WO 2003/104425中所述的那些),CD123(参见例如WO 2014/130635中所述的那些)、IL-1R(参见例如美国专利第8,741,604号中所述的那些)、IL-1(参见例如WO2014/095808中所述的那些)、VEGF(参见例如美国专利第9,090,684号中所述的那些)、IL-6R(参见例如美国专利第7,482,436号中所述的那些)、IL-4(参见例如美国专利申请公开第2012/0171197号中所述的那些)、IL-10(参见例如美国专利申请公开第2016/0340413号中所述的那些)、PDL-1(参见例如Drees等人,《蛋白质表达和纯化(Protein Express.Purif.)》94:60-66,2014中所述的那些)、TIGIT(参见例如美国专利申请公开第2017/0198042号中所述的那些)、PD-1(参见例如美国专利第7,488,802号中所述的那些)、TIM3(参见例如美国专利第8,552,156号中所述的那些、CTLA4(参见例如WO2012/120125中所述的那些)、MICA(参见例如WO 2016/154585中所述的那些)、MICB(参见例如美国专利第8,753,640号中所述的那些)、IL-6(参见例如Gejima等人,《人抗体(HumanAntibodies)》11(4):121-129,2002中所述的那些)、IL-8(参见例如美国专利第6,117,980号中所述的那些)、TNFα(参见例如Geng等人,《免疫学研究(Immunol.Res.)》62(3):377-385,2015中所述的那些)、CD26a(参见例如WO 2017/189526中所述的那些)、CD36(参见例如美国专利申请公开第2015/0259429号中所述的那些)、ULBP2(参见例如美国专利第9,273,136号中所述的那些)、CD30(参见例如Homach等人,

《斯堪的纳维亚免疫学杂志(Scand.J.Immunol.)》48(5):497-501,1998中所述的那些)、CD200(参见例如美国专利第9,085,623号中所述的那些)、IGF-1R(参见例如美国专利申请公开第2017/0051063号中所述的那些)、MUC4AC(参见例如WO 2012/170470中所述的那些)、MUC5AC(参见例如美国专利第9,238,084号中所述的那些)、Trop-2(参见例如WO 2013/068946中所述的那些)、CMET(参见例如Edwardraja等人,《生物技术与生物工程(Biotechnol.Bioeng.)》106(3):367-375,2010中所述的那些)、EGFR(参见例如Akbari等人,《蛋白质表达和纯化》127:8-15,2016中所述的那些)、HER1(参见例如美国专利申请公开第2013/0274446号中所述的那些)、HER2(参见例如Cao等人,《生物技术快报(Biotechnol.Lett.)》37(7):1347-1354,2015中所述的那些)、HER3(参见例如美国专利第9,505,843号中所述的那些)、PSMA(参见例如Parker等人,《蛋白质表达和纯化》89(2):136-145,2013中所述的那些)、CEA(参见例如WO 1995/015341中所述的那些)、B7H3(参见例如美国专利第9,371,395号中所述的那些)、EPCAM(参见例如WO 2014/159531中描述的那些)、BCMA(参见例如Smith等人,《分子疗法(Mol.Ther.)》26(6):1447-1456,2018中所述的那些)、P-钙粘着蛋白(参见例如美国专利第7,452,537号中所述的那些)、CEACAM5(参见例如美国专利第9,617,345号中所述的那些)、UL16结合蛋白(参见例如WO2017/083612中所述)、HLA-DR(参见例如Pistillo等人,《实验和临床免疫遗传学(Exp.Clin.Immunogenet.)》14(2):123-130,1997中所述的那些)、DLL4(参见例如WO2014/007513中所述的那些)、TYRO3(参见例如WO2016/166348中所述的那些)、AXL(参见例如WO 2012/175692中所述的那些)、MER(参见例如WO 2016/106221中所述的那些)、CD122(参见例如美国专利申请公开第2016/0367664号中所述的那些)、CD155(参见例如WO2017/149538中所述的那些)或PDGF-DD(参见例如美国专利第9,441,034号中所述的那些)。

[1841] 存在于本文所述的任一种单链或多链嵌合多肽中的抗原结合域各自独立地选自以下组成的群组:VHH域、VNAR域和scFv。在一些实施例中,本文所述的任一种抗原结合域是BiTe、$(scFv)_2$、纳米抗体(nanobody)、纳米抗体-HAS、DART、TandAb、单链双功能抗体(scDiabody)、单链双功能抗体-CH3、scFv-CH-CL-scFv、HSAbody、单链双功能抗体-HAS或串联scFv。可用于任一种单链或多链嵌合多肽中的抗原结合域的另外实例是本领域已知的。

[1842] VH域是可在骆驼科动物中发现的单个单体抗体可变域。VNAR域是可在软骨鱼中发现的单个单体抗体可变域。V_HH域和V_{NAR}域的非限制性方面描述于例如Cromie等人,《医药化学当前话题(Curr.Top.Med.Chem.)》15:2543-2557,2016;DeGenst等人,《发育与比较免疫学(Dev.Comp.Immunol.)》30:187-198,2006;De Meyer等人,《生物技术趋势(Trends Biotechnol.)》32:263-270,2014;Kijanka等人,《纳米医学(Nanomedicine)》10:161-174,2015;Kovaleva等人,《生物疗法专家观点(Expert.Opin.Biol.Ther.)》14:1527-1539,2014;Krah等人,《免疫药理学和免疫毒理学(Immunopharmacol.Immunotoxicol.)》38:21-28,2016;Mujic-Delic等人,《药理科学趋势(TrendsPharmacol.Sci.)》35:247-255,2014;Muyldermans,《生物技术杂志(J.Biotechnol.)》74:277-302,2001;Muyldermans等人,《生物化学科学趋势(Trends Biochem.Sci.)》26:230-235,2001;Muyldermans,《生物化学年鉴(Ann.Rev.Biochem.)》82:775-797,2013;Rahbarizadeh等人,《免疫学研究(Immunol.Invest.)》40:299-338,2011;VanAudenhove等人,《E生物医学(EBioMedicine)》8:40-48,2016;Van Bockstaele等人,《研究药物当前观点(Curr.Opin.Investig.Drugs)》

10:1212-1224,2009;Vincke等人,《分子生物学方法(Methods Mol.Biol.)》911:15-26,2012;和Wesolowski等人,《医学微生物学和免疫学(Med.Microbiol.Immunol.)》198:157-174,2009。

[1843] 在一些实施例中,本文所述的单链或多链嵌合多肽中的每个抗原结合域都是VHH域,或至少一个抗原结合域是VHH域。在一些实施例中,本文所述的单链或多链嵌合多肽中的每个抗原结合域都是VNAR域,或至少一个抗原结合域是VNAR域。在一些实施例中,本文所述的单链或多链嵌合多肽中的每个抗原结合域都是scFv域,或至少一个抗原结合域是scFv域。

[1844] 在一些实施例中,存在于单链或多链嵌合多肽中的两种或更多种多肽可以组装(例如非共价组装)形成本文所述的任一种抗原结合域,例如抗体的抗原结合片段(例如本文所述抗体的任一种抗原结合片段)、VHH-scAb、VHH-Fab、双scFab、F(ab')2、双功能抗体、互换单抗、DAF(二合一)、DAF(四合一)、DutaMab、DT-IgG、臼包杵型共同轻链、臼包杵型组装体、电荷对、Fab臂交换、SEEDbody、LUZ-Y、Fcab、κλ体、正交Fab、DVD-IgG、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、Zybody、DVI-IgG、双功能抗体-CH3、三体、微型抗体(miniantibody)、微抗体(minibody)、TriBi微抗体、scFv-CH3KIH、Fab-scFv、F(ab')2-scFv2、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、单链双功能抗体-Fc、双功能抗体-Fc、串联scFv-Fc、胞内抗体、对接和锁定(dock and lock)、lmmTAC、IgG-IgG偶联物、Cov-X体和scFv1-PEG-scFv2。参见例如Spiess等人,《分子免疫学(Mol.Immunol.)》67:95-106,2015,其在此全文并入,以便描述这些元件。抗体的抗原结合片段的非限制性实例包括Fv片段、Fab片段、$F(ab')_2$片段和Fab'片段。抗体的抗原结合片段的其它实例是IgG的抗原结合片段(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的抗原结合片段)(例如人或人源化IgG,例如人或人源化IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的抗原结合片段);IgA的抗原结合片段(例如IgA1或IgA2的抗原结合片段)(例如人或人源化IgA,例如人或人源化IgA1或IgA2的抗原结合片段);IgD的抗原结合片段(例如人或人源化IgD的抗原结合片段);IgE的抗原结合片段(例如人或人源化IgE的抗原结合片段);或IgM的抗原结合片段(例如人或人源化IgM的抗原结合片段)。

[1845] "Fv"片段包括一个重链可变域和一个轻链可变域的非共价连接型二聚体。

[1846] 除Fv片段的重链和轻链可变域外,"Fab"片段还包括轻链的恒定域和重链的第一恒定域(C_{H1})。

[1847] "$F(ab')_2$"片段包括在铰链区附近通过二硫键接合的两个Fab片段。

[1848] "双可变域免疫球蛋白"或"DVD-Ig"是指多价且多特异性结合蛋白,如例如DiGiammarino等人,《分子生物学方法》899:145-156,2012;Jakob等人,《单抗(MABs)》5:358-363,2013;和美国专利第7,612,181号;第8,258,268号;第8,586,714号;第8,716,450号;第8,722,855号;第8,735,546号;和第8,822,645号中所述,其中的每一个均通过引用整体并入。

[1849] DART描述于例如Garber,《自然综述:药物发现(NatureReviewsDrugDiscovery)》13:799-801,2014中。

[1850] 在一些实施例中,本文所述的任一种抗原结合域可结合到选自以下组成的群组的抗原:蛋白质、碳水化合物、脂质和其组合。

[1851] 抗原结合域的其它实例和方面是本领域已知的。

[1852] 可溶性白介素或细胞因子蛋白

[1853] 在本文所述的任一种单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个可以是可溶性白介素蛋白或可溶性细胞因子蛋白。在一些实施例中,可溶性白介素或可溶性细胞因子蛋白选自以下群组:IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。可溶性IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF的非限制性实例提供于下文。

[1854] 人可溶性IL-3(SEQ ID NO:105)

[1855] apmtqttplkt swvncsnmid eiithlkqpp lplldfnnln gedqdilmen

[1856] nlrrpnleaf nravkslqna saiesilknl lpclplataa ptrhpihikd

[1857] gdwnefrrkl tfylktlena qaqqttlsla if

[1858] 人可溶性IL-8(SEQ ID NO:106)

[1859] egavlprsak elrcqcikty skpfhpkfik elrviesgph canteiivkl

[1860] sdgrelcldp kenwvqrvve kflkraens

[1861] 人可溶性IL-10(SEQ ID NO:107)

[1862] spgqgtqsensc thfpgnlpnm lrdlrdafsr vktffqmkdq ldnlllkesl

[1863] ledfkgylgc qalsemiqfy leevmpqaen qdpdikahvn slgenlktlr

[1864] lrlrrchrfl pcenkskave qvknafnklq ekgiykamse fdifinyiea ymtmkirn人可溶性IL-17(SEQ ID NO:108)

[1865] gitiprn pgcpnsedkn fprtvmvnln ihnrntntnp krssdyynrs tspwnlhrne

[1866] dperypsviw eakcrhlgci nadgnvdyhm nsvpiqqeil

[1867] vlrrepphcp nsfrlekilv svgctcvtpi vhhva

[1868] 人可溶性IL-18(SEQ ID NO:109)

[1869] yfgklesklsvirn lndqvlfidq gnrplfedmt dsdcrdnapr tifiismykd

[1870] sqprgmavti svkcekistl scenkiisfk emnppdnikd tksdiiffqr

[1871] svpghdnkmq fesssyegyf lacekerdlf klilkkedel gdrsimftvq ned

[1872] 人可溶性PDGF-DD(SEQ ID NO:110)

[1873] rdtsatpqsasi kalrnanlrr desnhltdly rrdetiqvkg ngyvqsprfp

[1874] nsyprnlllt wrlhsqentr iqlvfdnqfg leeaendicr ydfvevedis

[1875] etstiirgrw cghkevppri ksrtnqikit fksddyfvak pgfkiyysll

[1876] edfqpaaase tnwesvtssi sgvsynspsv tdptliadal dkkiaefdtv

[1877] edllkyfnpe swqedlenmy ldtpryrgrs yhdrkskvdl drlnddakry

[1878] sctprnysvn ireelklanv vffprcllvq rcggncgcgt vnwrsctcns

[1879] gktvkkyhev lqfepghikr rgraktmalv diqldhherc dcicssrppr

[1880] 人可溶性SCF(SEQ ID NO:111)

[1881] egicrnrvtnnvkdv tklvanlpkd ymitlkyvpg mdvlpshcwi semvvqlsds

[1882] ltdlldkfsn iseglsnysiidklvnivdd lvecvkenss kdlkksfksp

[1883] eprlftpeef frifnrsida fkdfvvaset sdcvvsstls pekdsrvsvt

[1884] kpfmlppvaa sslrndssss nrkaknppgd sslhwaamal palfsliigf

[1885] afgalywkkr qpsltraven iqineednei smlqekeref qev

[1886] 人可溶性FLT3L(SEQ ID NO:112)

[1887] tqdcsfqhspissd favkirelsd yllqdypvtv asnlqdeelc gglwrlvlaq

[1888] rwmerlktva gskmqgller vnteihfvtk cafqpppscl rfvqtnisrl

[1889] lqetseqlva lkpwitrqnf srclelqcqp dsstlpppws prpleatapt

[1890] apqppllllll llpvglllla aawclhwqrt rrrtprpgeq vppvpspqdl llveh

[1891] 可溶性白介素蛋白和可溶性细胞因子蛋白的其它实例是本领域已知的。

[1892] 可溶性受体

[1893] 在本文所述的任一种单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素受体或可溶性细胞因子受体。在一些实施例中,可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)(参见例如Yung等人,《美国呼吸与重症医学杂志(Am.J.Resp.Crit.CareMed.)》194(9):1140-1151,2016中所述的那些)、可溶性TGF-βRIII(参见例如Heng等人,《胎盘(Placenta)》57:320,2017中所述的那些)、可溶性NKG2D(参见例如Cosman等人,《免疫(Immunity)》14(2):123-133,2001;Costa等人,《免疫学前沿(Front.Immunol.)》,第9卷,第1150条,2018年5月29日;doi:10.3389/fimmu.2018.01150)、可溶性NKp30(参见例如Costa等人,《免疫学前沿》,第9卷,第1150条,2018年5月29日;doi:10.3389/fimmu.2018.01150)、可溶性NKp44(参见例如Costa等人,《免疫学前沿》,第9卷,第1150条,2018年5月29日;doi:10.3389/fimmu.2018.01150中所述的那些)、可溶性NKp46(参见例如Mandelboim等人,《自然(Nature)》409:1055-1060,2001;Costa等人,《免疫学前沿》,第9卷,第1150条,2018年5月29日;doi:10.3389/fimmu.2018.01150)、可溶性NKp44(参见例如Costa等人,《免疫学前沿》,第9卷,第1150条,2018年5月29日;doi:10.3389/fimmu.2018.01150中所述的那些)、scMHCI(参见例如Washburn等人,《公共科学图书馆·综合(PLoSOne)》6(3):e18439,2011中所述的那些)、scMHCII(参见例如Bishwajit等人,《细胞免疫学(Cellular Immunol.)》170(1):25-33,1996中所述的那些)、scTCR(参见例如Weber等人,《自然》356(6372):793-796,1992中所述的那些)、可溶性CD155(参见例如Tahara-Hanaoka等人,《国际免疫学(Int.Immunol.)》16(4):533-538,2004中所述的那些)或可溶性CD28(参见例如Hebbar等人,《临床与实验免疫学(Clin.Exp.Immunol.)》136:388-392,2004)。

[1894] 可溶性白介素受体和可溶性细胞因子受体的其它实例是本领域已知的。

[1895] 亲和域对

[1896] 在一些实施例中,多链嵌合多肽包括:1)包括一对亲和域中的第一域的第一嵌合多肽,和2)包括一对亲和域中的第二域的第二嵌合多肽,使得第一嵌合多肽和第二嵌合多肽通过亲和域对中的第一域和第二域的结合而缔合。在一些实施例中,所述亲和域对是来自人IL-15受体的α链(IL15Rα)的寿司域和可溶性IL-15。寿司域,也称为短共有重复序列或1型糖蛋白基序,是蛋白质-蛋白质相互作用中的共同基序。已在许多蛋白质结合分子(包括补体组分C1r、C1s、因子H和C2m以及非免疫分子因子XIII和β2-糖蛋白)上鉴定出寿司域。典型的寿司域具有大约60个氨基酸残基,并且包含四个半胱氨酸(Ranganathan,《太平洋生物计算专题讨论会(Pac.Symp Biocomput.)》2000:155-67)。第一半胱氨酸可与第三半胱氨酸形成二硫键,并且第二半胱氨酸可与第四半胱氨酸形成二硫桥键。在亲和域对中的一个成

员是可溶性IL-15的一些实施例中,可溶性IL15具有D8N或D8A氨基酸取代。在亲和域对中的一个成员是人IL-15受体的α链(IL15Rα)的一些实施例中,人IL15Rα是成熟全长IL15Rα。在一些实施例中,亲和域对是芽胞杆菌核糖核酸酶和芽胞杆菌核糖核酸酶抑制子。在一些实施例中,亲和域对是PKA和AKAP。在一些实施例中,所述一对亲和域是基于突变核糖核酸酶I片段的衔接子/对接标签模块(Rossi,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA.)》103:6841-6846,2006;Sharkey等人,《癌症研究(CancerRes.)》68:5282-5290,2008;Rossi等人,《药物科学趋势(Trends Pharmacol Sci.)》33:474-481,2012)或基于蛋白质突触蛋白、突触结合蛋白、突触泡蛋白和SNAP25相互作用的SNARE模块(Deyev等人,《自然·生物技术(NatBiotechnol.)》1486-1492,2003)。

[1897] 在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽包括一对亲和域中的第一域,并且多链嵌合多肽的第二嵌合多肽包括一对亲和域中的第二域,其中亲和域对中的第一域和亲和域对中的第二域以小于1×10^{-7}M、小于1×10^{-8}M、小于1×10^{-9}M、小于1×10^{-10}M、小于1×10^{-11}M、小于1×10^{-12}M或小于1×10^{-13}M的解离平衡常数(K_D)彼此结合。在一些实施例中,亲和域对中的第一域与亲和域对中的第二域彼此结合,其K_D为约1×10^{-4}M至约1×10^{-6}M、约1×10^{-5}M至约1×10^{-7}M、约1×10^{-6}M至约1×10^{-8}M、约1×10^{-7}M至约1×10^{-9}M、约1×10^{-8}M至约1×10^{-10}M、约1×10^{-9}M至约1×10^{-11}M、约1×10^{-10}M至约1×10^{-12}M、约1×10^{-11}M至约1×10^{-13}M、约1×10^{-4}M至约1×10^{-5}M、约1×10^{-5}M至约1×10^{-6}M、约1×10^{-6}M至约1×10^{-7}M、约1×10^{-7}M至约1×10^{-8}M、约1×10^{-8}M至约1×10^{-9}M、约1×10^{-9}M至约1×10^{-10}M、约1×10^{-10}M至约1×10^{-11}M、约1×10^{-11}M至约1×10^{-12}M或约1×10^{-12}M至约1×10^{-13}M(包括端点)。本领域已知的多种不同方法中的任一种均可用于测定一对亲和域中的第一域与一对亲和域中的第二域的结合的K_D值(例如,电泳迁移变动分析、滤膜结合分析、表面等离子体共振和生物分子结合动力学分析等)。

[1898] 在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽包括一对亲和域中的第一域,并且多链嵌合多肽的第二嵌合多肽包括一对亲和域中的第二域,其中一对亲和域中的第一域、一对亲和域中的第二域或这两者具有约10至100个氨基酸的长度。例如,一对亲和域中的第一域、一对亲和域中的第二域或这两者可具有约10至100个氨基酸的长度,约15至100个氨基酸的长度,约20至100个氨基酸的长度,约25至100个氨基酸的长度,约30至100个氨基酸的长度,约35至100个氨基酸的长度,约40至100个氨基酸的长度,约45至100个氨基酸的长度,约50至100个氨基酸的长度,约55至100个氨基酸的长度,约60至100个氨基酸的长度,约65至100个氨基酸的长度,约70至100个氨基酸的长度,约75至100个氨基酸的长度,约80至100个氨基酸的长度,约85至100个氨基酸的长度,约90至100个氨基酸的长度,约95至100个氨基酸的长度,约10至95个氨基酸的长度,约10至90个氨基酸的长度,约10至85个氨基酸的长度,约10至80个氨基酸的长度,约10至75个氨基酸的长度,约10至70个氨基酸的长度,约10至65个氨基酸的长度,约10至60个氨基酸的长度,约10至55个氨基酸的长度,约10至50个氨基酸的长度,约10至45个氨基酸的长度,约10至40个氨基酸的长度,约10至35个氨基酸的长度,约10至30个氨基酸的长度,约10至25个氨基酸的长度,约10至20个氨基酸的长度,约10至15个氨基酸的长度,约20至30个氨基酸的长度,约30至40个氨基酸的长度,约40至50个氨基酸的长度,约50至60个氨基酸的长度,约60至70个氨基酸的长度,约70至80个氨基酸的长度,约80至90个氨基酸的长度,约90至100个氨基酸的长度,约20至90个氨基酸的

长度,约30至80个氨基酸的长度,约40至70个氨基酸的长度,约50至60个氨基酸的长度,或介于两者之间的任何范围。在一些实施例中,一对亲和域中的第一域、一对亲和域中的第二域或这两者均具有约1015、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100个氨基酸的长度。

[1899] 在一些实施例中,本文公开的一对亲和域中的第一和/或第二域中的任一种可在其N端和/或C端包括一个或多个其它氨基酸(例如1、2、3、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸),只要一对亲和域中第一个和/或第二域的功能保持完整即可。举例来说,来自人IL-15受体的α链(IL15Rα)的寿司域可在N端和/或C端包括一个或多个其它氨基酸,同时仍保持结合到可溶性IL-15的能力。另外或可替代地,可溶性IL-15可以在N端和/或C端包括一个或多个其它氨基酸,同时仍保持结合到人IL-15受体α链(IL-15Rα)的寿司域的能力。

[1900] IL-15受体α的α链(IL-15Rα)的寿司域的非限制性实例可以包括与ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR(SEQ ID NO:113)至少70%一致、至少75%一致、至少80%一致、至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少99%一致或100%一致的序列。在一些实施例中,来自IL15Rα的α链的寿司域可由包括

[1901] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG(SEQ ID NO:114)的核酸编码。

[1902] 在一些实施例中,可溶性IL-15蛋白可以包括与NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:115)至少70%一致、至少75%一致、至少80%一致、至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少99%一致或100%一致的序列。在一些实施例中,可溶性IL-15可由包括AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:116)的序列的核酸编码。

[1903] 信号序列

[1904] 在一些实施例中,单链嵌合多肽在其N端包含信号序列。在一些实施例中,多链嵌合多肽包括第一嵌合多肽,所述第一嵌合多肽在其N端包括信号序列。在一些实施例中,多链嵌合多肽包括第二嵌合多肽,所述第二嵌合多肽在其N端包括信号序列。在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽和多链嵌合多肽的第二嵌合多肽均包括信号序列。如本领域普通技术人员将理解,信号序列是存在于许多内源产生的蛋白质的N端的氨基酸序列,其将蛋白质引导到分泌路径(例如,蛋白质被引导以存在于某些细胞内细胞器中、存在于细胞膜中或从细胞中分泌)。信号序列是异质的,并且其一级氨基酸序列差异很大。但是,信号序列的长度典型地为16至30个氨基酸,并且包括亲水、通常带正电荷的N端区,中央疏水域和含有信号肽酶的裂解位点的C端区。

[1905] 在一些实施例中,多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽中的第二嵌合多肽,或这两者,或单链嵌合多肽,包括具有氨基酸序列MKWVTFISLLFLFSSAYS(SEQ ID NO:

117)的信号序列。在一些实施例中,多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽中的第二嵌合多肽,或这两者,或单链嵌合多肽,包括由核酸序列ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTCCTCTTTAGCAGCGCCTACTCC(SEQ ID NO:118)、ATGAAGTGGGTCACATTTATCTCTTTACTGTTCCTCTTCTCCAGCGCCTACAGC(SEQ ID NO:119)或ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTCCTCTTTAGCAGCGCCTACTCC(SEQ ID NO:120)编码的信号序列。

[1906] 在一些实施例中,多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽中的第二嵌合多肽,或这两者,或单链嵌合多肽,包括具有氨基酸序列MKCLLYLAFLFLGVNC(SEQ ID NO:121)的信号序列。在一些实施例中,多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽中的第二嵌合多肽,或这两者,或单链嵌合多肽,包括具有氨基酸序列MGQIVTMFEALPHIIDEVINIVIIVLIIITSIKAVYNFATCGILALVSFLFLAGRSCG(SEQ ID NO:122)的信号序列。在一些实施例中,多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽中的第二嵌合多肽,或这两者,或单链嵌合多肽,包括具有氨基酸序列MPNHQSGSPTGSSDLLLSGKKQRPHLALRRKRRREMRKINRKVRRMNLAPIKEKTAWQHLQALISEAEEVLKTSQTPQNSLTLFLALLSVLGPPVTG(SEQ ID NO:123)的信号序列。在一些实施例中,多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽中的第二嵌合多肽,或这两者,或单链嵌合多肽,包括具有氨基酸序列MDSKGSSQKGSRLLLLLVVSNLLLCQGVVS(SEQ ID NO:124)的信号序列。本领域普通技术人员将了解用于本文所述的多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽和/或第二嵌合多肽、或单链嵌合多肽的其它适当信号序列。

[1907] 在一些实施例中,多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽中的第二嵌合多肽,或这两者,或单链嵌合多肽包括信号序列,所述信号序列具有约10至100个氨基酸的长度。举例来说,信号序列可具有约10至100个氨基酸的长度,约15至100个氨基酸的长度,约20至100个氨基酸的长度,约25至100个氨基酸的长度,约30至100个氨基酸的长度,约35至100个氨基酸的长度,约40至100个氨基酸的长度,约45至100个氨基酸的长度,约50至100个氨基酸的长度,约55至100个氨基酸的长度,约60至100个氨基酸的长度,约65至100个氨基酸的长度,约70至100个氨基酸的长度,约75至100个氨基酸的长度,约80至100个氨基酸的长度,约85至100个氨基酸的长度,约90至100个氨基酸的长度,约95至100个氨基酸的长度,约10至95个氨基酸的长度,约10至90个氨基酸的长度,约10至85个氨基酸的长度,约10至80个氨基酸的长度,约10至75个氨基酸的长度,约10至70个氨基酸的长度,约10至65个氨基酸的长度,约10至60个氨基酸的长度,约10至55个氨基酸的长度,约10至50个氨基酸的长度,约10至45个氨基酸的长度,约10至40个氨基酸的长度,约10至35个氨基酸的长度,约10至30个氨基酸的长度,约10至25个氨基酸的长度,约10至20个氨基酸的长度,约10至15个氨基酸的长度,约20至30个氨基酸的长度,约30至40个氨基酸的长度,约40至50个氨基酸的长度,约50至60个氨基酸的长度,约60至70个氨基酸的长度,约70至80个氨基酸的长度,约80至90个氨基酸的长度,约90至100个氨基酸的长度,约20至90个氨基酸的长度,约30至80个氨基酸的长度,约40至70个氨基酸的长度,约50至60个氨基酸的长度,或介于两者之间的任何范围。在一些实施例中,信号序列具有约1015、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100个氨基酸的长度。

[1908] 在一些实施例中,本文公开的任一种信号序列可在其N端和/或C端包括一个或多个另外的氨基酸(例如1、2、3、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸),只要信号序列的功能保持完整即可。举例来说,具有氨基酸序列MKCLLYLAFLFLGVNC(SEQ ID NO:125)的信号序列可在

N端或C端包括一个或多个其它氨基酸,同时仍保持将多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽中的第二嵌合多肽或这两者或单链嵌合多肽引导到分泌路径的能力。

[1909] 在一些实施例中,多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽中的第二嵌合多肽或这两者或单链嵌合多肽包括将多链嵌合多肽引导到细胞外空间中的信号序列。此类实施例适用于产生相对容易分离和/或纯化的单链或多链嵌合多肽。

[1910] 肽标签

[1911] 在一些实施例中,单链嵌合多肽包括肽标签(例如位于嵌合多肽的N端或C端)。在一些实施例中,多链嵌合多肽包括含有肽标签(例如位于第一嵌合多肽的N端或C端)的第一嵌合多肽。在一些实施例中,多链嵌合多肽包括含有肽标签(例如位于第二嵌合多肽的N端或C端)的第二嵌合多肽。在一些实施例中,多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽和多链嵌合多肽中的第二嵌合多肽均包括肽标签。在一些实施例中,多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽中的第二嵌合多肽,或这两者,或单链嵌合多肽包括两个或更多个肽标签。

[1912] 能够纳入多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或这两者或单链嵌合多肽中的示例性肽标签包括(不限于)AviTag(GLNDIFEAQKIEWHE;SEQ ID NO:126)、钙调蛋白标签(KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL;SEQ ID NO:127)、聚谷氨酸盐标签(EEEEEE;SEQ ID NO:128)、E标签(GAPVPYPDPLEPR;SEQ ID NO:129)、FLAG标签(DYKDDDDK;SEQ ID NO:130)、HA标签、来自血球凝集素的肽(YPYDVPDYA;SEQ ID NO:131)、his标签(HHHHH(SEQ ID NO:132);HHHHHH(SEQ ID NO:133);HHHHHHH(SEQ ID NO:134);HHHHHHHH(SEQ ID NO:135);HHHHHHHHHH(SEQ ID NO:136);或HHHHHHHHHHH(SEQ ID NO:137))、myc标签(EQKLISEEDL;SEQ ID NO:138)、NE标签(TKENPRSNQEESYDDNES;SEQ ID NO:139)、S标签(KETAAAKFERQHMDS;SEQ ID NO:140)、SBP标签(MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP;SEQ ID NO:141)、Softag 1(SLAELLNAGLGGS;SEQ ID NO:142)、Softag3(TQDPSRVG;SEQ ID NO:143)、Spot标签(PDRVRAVSHWSS;SEQ ID NO:144)、Strep标签(WSHPQFEK;SEQ ID NO:145)、TC标签(CCPGCC;SEQ ID NO:146)、Ty标签(EVHTNQDPLD;SEQ ID NO:147)、V5标签(GKPIPNPLLGLDST;SEQ ID NO:148)、VSV标签(YTDIEMNRLGK;SEQ ID NO:149),和Xpress标签(DLYDDDDK;SEQ ID NO:150)。在一些实施例中,组织因子蛋白是肽标签。

[1913] 能够纳入多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或这两者或单链嵌合多肽中的肽标签能够分别用于与多链或单链嵌合多肽有关的多种应用中的任一种。举例来说,肽标签能够用于纯化多链或单链嵌合多肽。作为一个非限制性实例,多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽(例如,以重组方式表达的第一嵌合多肽)、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽(例如,以重组方式表达的第二嵌合多肽)或这两者,或单链嵌合多肽可以包括myc标签;包括以myc标记的第一嵌合多肽、以myc标记的第二嵌合多肽或这两者的多链嵌合多肽,或以myc标记的单链嵌合多肽能够使用识别myc标签的抗体纯化。识别myc标签的抗体的一个非限制性实例是9E10,其可从非商业的开发研究融合瘤库(Developmental Studies Hybridoma Bank)获得。作为另一非限制性实例,多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽(例如,以重组方式表达的第一嵌合多肽)、多链嵌合多肽中的第二嵌合多肽(例如,以重组方式表达的第二嵌合多肽)或这两者,或单链嵌合多肽可以包括组氨酸标签;包括以组氨酸标记的第一嵌合多肽、以组氨酸标记的第二嵌合多肽或这两者的多链嵌合多肽,或以组氨酸标记的单链嵌合多肽能够使用镍或钴螯合剂纯化。所属领域的一般技术人员将了解其它适合的标

签和结合那些标签的药剂以用于纯化单链或多链嵌合多肽。在一些实施例中,纯化后,从多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽和/或第二嵌合多肽或从单链嵌合多肽去除肽标签。在一些实施例中,纯化后,不从多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽和/或第二嵌合多肽或单链嵌合多肽去除肽标签。

[1914] 能够纳入多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或这两者或单链嵌合多肽中的肽标签能分别用于例如多链嵌合多肽或单链嵌合多肽的免疫沉淀,分别用于多链嵌合多肽或单链嵌合多肽的成像(例如经由蛋白质印迹法、ELISA、流式细胞术和/或免疫细胞化学),和/或分别用于多链嵌合多肽或单链嵌合多肽的增溶。

[1915] 在一些实施例中,多链嵌合多肽中的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽中的第二嵌合多肽,或两者,或单链嵌合多肽包括肽标签,所述肽标签具有约10至100个氨基酸的长度。举例来说,肽标签可以具有约10至100个氨基酸的长度,约15至100个氨基酸的长度,约20至100个氨基酸的长度,约25至100个氨基酸的长度,约30至100个氨基酸的长度,约35至100个氨基酸的长度,约40至100个氨基酸的长度,约45至100个氨基酸的长度,约50至100个氨基酸的长度,约55至100个氨基酸的长度,约60至100个氨基酸的长度,约65至100个氨基酸的长度,约70至100个氨基酸的长度,约75至100个氨基酸的长度,约80至100个氨基酸的长度,约85至100个氨基酸的长度,约90至100个氨基酸的长度,约95至100个氨基酸的长度,约10至95个氨基酸的长度,约10至90个氨基酸的长度,约10至85个氨基酸的长度,约10至80个氨基酸的长度,约10至75个氨基酸的长度,约10至70个氨基酸的长度,约10至65个氨基酸的长度,约10至60个氨基酸的长度,约10至55个氨基酸的长度,约10至50个氨基酸的长度,约10至45个氨基酸的长度,约10至40个氨基酸的长度,约10至35个氨基酸的长度,约10至30个氨基酸的长度,约10至25个氨基酸的长度,约10至20个氨基酸的长度,约10至15个氨基酸的长度,约20至30个氨基酸的长度,约30至40个氨基酸的长度,约40至50个氨基酸的长度,约50至60个氨基酸的长度,约60至70个氨基酸的长度,约70至80个氨基酸的长度,约80至90个氨基酸的长度,约90至100个氨基酸的长度,约20至90个氨基酸的长度,约30至80个氨基酸的长度,约40至70个氨基酸的长度,约50至60个氨基酸的长度,或介于两者之间的任何范围。在一些实施例中,肽标签具有约1015、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100个氨基酸的长度。

[1916] 纳入多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或这两者或单链嵌合多肽中的肽标签可以具有任何适合的长度。例如,肽标签的长度可具有5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个氨基酸。在单链或多链嵌合多肽包括两个或更多个肽标签的实施例中,两个或更多个肽标签可具有相同或不同的长度。在一些实施例中,本文公开的任何肽标签可在N端和/或C端包括一个或多个其它氨基酸(例如1、2、3、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸),只要肽标签的功能保持完整即可。例如,具有氨基酸序列EQKLISEEDL(SEQ ID NO:138)的myc标签可包括一个或多个其它氨基酸(例如位于肽标签的N端和/或C端),同时仍保持与抗体(例如9E10)结合的能力。

[1917] A型单链嵌合多肽的示例性实施例

[1918] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和/或第二靶标结合域可独立地特异性结合到CD3(例如人CD3)或CD28(例如人CD28)。。在一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到CD3(例如人CD3),而第二靶标结合域特异性结合到CD28

(例如人CD28)。在一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到CD28(例如人CD28),而第二靶标结合域特异性结合到CD3(例如人CD3)。

[1919] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域彼此直接邻接。在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括介于第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[1920] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域与第二靶标结合域彼此直接邻接。在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括介于可溶性组织因子域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[1921] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是抗原结合域。在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自是抗原结合域(例如本文所述的任一种示例性抗原结合域)。在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,抗原结合域包括scFv或单域抗体。

[1922] 特异性结合到CD3的scFv的非限制性实例可以包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[1923] QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS(SEQ ID NO:151)。

[1924] 在一些实施例中,特异性结合到CD3的scFv可以由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[1925] CAGATCGTGCTGACCCAAAGCCCCGCCATCATGAGCGCTAGCCCCGGTGAGAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCCAGCTCCGTGTCCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACCAGCCCCAAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCTCCGGAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGGCACCAGCTACTCTTTAACCATTTCCGGCATGGAAGCTGAAGACGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACCCCTTCACATTCGGATCTGGCACCAAGCTCGAAATCAATCGTGGAGGAGGTGGCAGCGGCGGCGGTGGATCCGGCGGAGGAGGAAGCCAAGTTCAACTCCAGCAGAGCGGCGCTGAACTGGCCCGGCCCGGCGCCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTCCGGCTATACATTTACTCGTTACACAATGCATTGGGTCAAGCAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATCGGATATATCAACCCTTCCCGGGGCTACACCAACTATAACCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCACTGACAAGAGCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCTCTTTAACCAGCGAGGACTCCGCTGTTTACTACTGCGCTAGGTATTACGACGACCACTACTGTTTAGACTATTGGGGACAAGGTACCACTTTAACCGTCAGCAGC(SEQ ID NO:152)。

[1926] 特异性结合到CD28的scFv的非限制性实例可以包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[1927] VQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKATLTSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIEMTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGSTSYSLTISSMEAEDAATYFCHQYHRSPTFGGGTKLETKR(SEQ ID NO:153)。

[1928] 在一些实施例中,特异性结合到CD28的scFv可以由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[1929] GTCCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAACTCGTGAAACCCGGTGCTTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGC
CAGCGGATACACCTTCACCTCCTATGTGATCCAGTGGGTCAAACAGAAGCCCGGACAAGGTCTCGAGTGGATCGGC
AGCATCAACCCTTACAACGACTATACCAAATACAACGAGAAGTTTAAGGGAAAGGCTACTTTAACCTCCGACAAAA
GCTCCATCACAGCCTACATGGAGTTCAGCTCTTTAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTACTATTGCGCCCGGTGGGG
CGACGGCAATTACTGGGGACGGGGCACAACACTGACCGTGAGCAGCGGAGGCGGAGGCTCCGGCGGAGGCGGATCT
GGCGGTGGCGGCTCCGACATCGAGATGACCCAGTCCCCCGCTATCATGTCCGCCTCTTTAGGCGAGCGGGTCACAA
TGACTTGTACAGCCTCCTCCAGCGTCTCCTCCTCCTACTTCCATTGGTACCAACAGAAACCCGGAAGCTCCCCTAA
ACTGTGCATCTACAGCACCAGCAATCTCGCCAGCGGCGTGCCCCCTAGGTTTTCCGGAAGCGGAAGCACCAGCTAC
TCTTTAACCATCTCCTCCATGGAGGCTGAGGATGCCGCCACCTACTTTTGTCACCAGTACCACCGGTCCCCCACCT
TCGGAGGCGGCACCAAACTGGAGACAAAGAGG(SEQ ID NO:154)。

[1930] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和/或第二靶标结合域是可溶性受体(例如可溶性CD28受体或可溶性CD3受体)。。在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。

[1931] 在一些实施例中,单链嵌合多肽可以包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[1932] QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGT
SYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELARPGASVKMSC
KASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR
YYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDT
ECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDER
TLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPV
ECMGQEKGEFREVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFK
GKATLTSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIEMTQSPAIM
SASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGSTSYSLTISSMEAEDAATYF
CHQYHRSPTFGGGTKLETKR(SEQ ID NO:155)。

[1933] 在一些实施例中,单链嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[1934] CAGATCGTGCTGACCCAAAGCCCCGCCATCATGAGCGCTAGCCCCGGTGAGAAGGTGACCATGACATG
CTCCGCTTCCAGCTCCGTGTCCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACCAGCCCCAAAAGGTGGATCTAC
GACACCAGCAAGCTGGCCTCCGGAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGGCACCAGCTACTCTTTAACCA
TTTCCGGCATGGAAGCTGAAGACGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACCCCTTCACATTCGGATC
TGGCACCAAGCTCGAAATCAATCGTGGAGGAGGTGGCAGCGGCGGCGGTGGATCCGGCGGAGGAGGAAGCCAAGTT
CAACTCCAGCAGAGCGGCGCTGAACTGGCCCGGCCCGGCGCCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTCCGGCTATA
CATTTACTCGTTACACAATGCATTGGGTCAAGCAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATCGGATATATCAACCC

TTCCCGGGGCTACACCAACTATAACCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCACTGACAAGAGCTCCTCCACC
GCCTACATGCAGCTGTCCTCTTTAACCAGCGAGGACTCCGCTGTTTACTACTGCGCTAGGTATTACGACGACCACT
ACTGTTTAGACTATTGGGGACAAGGTACCACTTTAACCGTCAGCAGCTCCGGCACCACCAATACCGTGGCCGCTTA
TAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGAACCCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACC
GTGCAGATCTCCACCAAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTGCTTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCG
ACGAAATCGTCAAGGACGTCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCAC
CGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAATTCCCCCGAATTCACCCCTTATTTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCT
ACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGGCACCAAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGTGCGGCGGA
ATAACACATTTTTATCCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTC
CTCCGGCAAAAAGACCGCTAAGACCAACACCAACGAGTTTTTAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCTTC
AGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCGGAAGAGCACAGATTCCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAG
AAAAGGGCGAGTTCCGGGAGGTCCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAACTCGTGAAACCCGGTGCTTCCGTGAAAAT
GTCTTGTAAGGCCAGCGGATACACCTTCACCTCCTATGTGATCCAGTGGGTCAAACAGAAGCCCGGACAAGGTCTC
GAGTGGATCGGCAGCATCAACCCTTACAACGACTATACCAAATACAACGAGAAGTTTAAGGGAAAGGCTACTTTAA
CCTCCGACAAAAGCTCCATCACAGCCTACATGGAGTTCAGCTCTTTAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTACTATTG
CGCCCGGTGGGGCGACGGCAATTACTGGGGACGGGGCACAACACTGACCGTGAGCAGCGGAGGCGGAGGCTCCGGC
GGAGGCGGATCTGGCGGTGGCGGCTCCGACATCGAGATGACCCAGTCCCCCGCTATCATGTCCGCCTCTTTAGGCG
AGCGGGTCACAATGACTTGTACAGCCTCCTCCAGCGTCTCCTCCTCCTACTTCCATTGGTACCAACAGAAACCCGG
AAGCTCCCCTAAACTGTGCATCTACAGCACCAGCAATCTCGCCAGCGGCGTGCCCCCTAGGTTTTCCGGAAGCGGA
AGCACCAGCTACTCTTTAACCATCTCCTCCATGGAGGCTGAGGATGCCGCCACCTACTTTTGTCACCAGTACCACC
GGTCCCCCACCTTCGGAGGCGGCACCAAACTGGAGACAAAGAGG(SEQ ID NO:156)。

[1935] 在一些实施例中,单链嵌合多肽可以包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:MKWVTFISLLFLFS
SAYSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSL
TISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASG
YTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDD
HYCLDYWGQGTTLTVSSSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDL
TDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVR
RNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMG
QEKGEFREVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKAT
LTSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIEMTQSPAIMSASL
GERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGSTSYSLTISSMEAEDAATYFCHQY
HRSPTFGGGTKLETKR(SEQ ID NO:157)。

[1936] 在一些实施例中,单链嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[1937] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCTTATTATTTTTATTCAGCTCCGCCTATTCCCAGATCGTGCTGAC
CCAAAGCCCCGCCATCATGAGCGCTAGCCCCGGTGAGAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCCAGCTCCGTGTCC

TACATGAACTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACCAGCCCCAAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCTCCG
GAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGGCACCAGCTACTCTTTAACCATTTCCGGCATGGAAGCTGAAGA
CGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACCCCTTCACATTCGGATCTGGCACCAAGCTCGAAATCAAT
CGTGGAGGAGGTGGCAGCGGCGGCGGTGGATCCGGCGGAGGAGGAAGCCAAGTTCAACTCCAGCAGAGCGGCGCTG
AACTGGCCCGGCCCGGCGCCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTCCGGCTATACATTTACTCGTTACACAATGCA
TTGGGTCAAGCAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATCGGATATATCAACCCTTCCCGGGGCTACACCAACTAT
AACCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCACTGACAAGAGCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCTCTT
TAACCAGCGAGGACTCCGCTGTTTACTACTGCGCTAGGTATTACGACGACCACTACTGTTTAGACTATTGGGGACA
AGGTACCACTTTAACCGTCAGCAGCTCCGGCACCACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACC
AACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGAACCCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGCAGATCTCCACCAAATCCG
GAGACTGGAAGAGCAAGTGCTTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCGACGAAATCGTCAAGGACGTCAA
GCAAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTC
TACGAGAATTCCCCCGAATTCACCCCTTATTTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAG
TTGGCACCAAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGTGCGGCGGAATAACACATTTTTATCCCTCCG
GGATGTGTTCGGCAAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACCGCTAAG
ACCAACACCAACGAGTTTTTAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTT
CTCGTACCGTCAACCGGAAGAGCACAGATTCCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGGT
CCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAACTCGTGAAACCCGGTGCTTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCCAGCGGATAC
ACCTTCACCTCCTATGTGATCCAGTGGGTCAAACAGAAGCCCGGACAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATCAACC
CTTACAACGACTATACCAAATACAACGAGAAGTTTAAGGGAAAGGCTACTTTAACCTCCGACAAAAGCTCCATCAC
AGCCTACATGGAGTTCAGCTCTTTAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTACTATTGCGCCCGGTGGGGCGACGGCAAT
TACTGGGGACGGGGCACAACACTGACCGTGAGCAGCGGAGGCGGAGGCTCCGGCGGAGGCGGATCTGGCGGTGGCG
GCTCCGACATCGAGATGACCCAGTCCCCCGCTATCATGTCCGCCTCTTTAGGCGAGCGGGTCACAATGACTTGTAC
AGCCTCCTCCAGCGTCTCCTCCTCCTACTTCCATTGGTACCAACAGAAACCCGGAAGCTCCCCTAAACTGTGCATC
TACAGCACCAGCAATCTCGCCAGCGGCGTGCCCCCTAGGTTTTCCGGAAGCGGAAGCACCAGCTACTCTTTAACCA
TCTCCTCCATGGAGGCTGAGGATGCCGCCACCTACTTTTGTCACCAGTACCACCGGTCCCCCACCTTCGGAGGCGG
CACCAAACTGGAGACAAAGAGG(SEQ ID NO:158)。

[1938] B型单链嵌合多肽的示例性实施例

[1939] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和/或第二靶标结合域可独立地特异性结合到IL-2受体(例如人IL-2受体)。

[1940] 在这些单链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域彼此直接邻接。在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括介于第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[1941] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域与第二靶标结合域彼此直接邻接。在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括介于可溶性组织因子域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[1942] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域是可溶性人IL-2蛋白。特异性结合到IL-2受体的IL-2蛋白的非限制性实例可以包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一

致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[1943] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(SEQ ID NO:78)。

[1944] 在一些实施例中,特异性结合到IL-2受体的IL-2蛋白可以由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[1945] GCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCCAAACTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTAACT(SEQ ID NO:159)。

[1946] 在一些实施例中,特异性结合到IL-2受体的IL-2蛋白可以由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[1947] GCCCCCACCTCCTCCTCCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGCTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTAAACGGCATCAACAACTACAAGAACCCCAAGCTGACTCGTATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAGCATTTACAGTGTTTAGAGGAGGAGCTGAAGCCCCTCGAGGAGGTGCTGAATTTAGCCCAGTCCAAGAATTTCCATTTAAGGCCCCGGGATTTAATCAGCAACATCAACGTGATCGTTTTAGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACCGCCACCATCGTGGAGTTTTTAAATCGTTGGATCACCTTCTGCCAGTCCATCATCTCCACTTTAACC(SEQ ID NO:160)。

[1948] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。

[1949] 在一些实施例中,单链嵌合多肽可以包括与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[1950] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(SEQ ID NO:161)。

[1951] 在一些实施例中,单链嵌合多肽由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至

少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[1952] GCCCCCACCTCCTCCTCCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGCTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGAT
GATTTTAAACGGCATCAACAACTACAAGAACCCCAAGCTGACTCGTATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAG
AAGGCCACCGAGCTGAAGCATTTACAGTGTTTAGAGGAGGAGCTGAAGCCCCTCGAGGAGGTGCTGAATTTAGCCC
AGTCCAAGAATTTCCATTTAAGGCCCCGGGATTTAATCAGCAACATCAACGTGATCGTTTTAGAGCTGAAGGGCTC
CGAGACCACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACCGCCACCATCGTGGAGTTTTTAAATCGTTGGATCACCTTC
TGCCAGTCCATCATCTCCACTTTAACCAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCA
CCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTC
CGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTG
AAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTT
TATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCA
AGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTC
CGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTA
AAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCC
CTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG
GCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGA
ATGGAATTAATAATTACAAGAATCCCAAACTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCAC
AGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAA
AACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACTAAAGGGATCTGAAACAA
CATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAG
CATCATCTCAACACTAACT(SEQ ID NO:162)。

[1953] 在一些实施例中,单链嵌合多肽可以包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[1954] MKWVTFISLLFLFSSAYSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA
TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQ
SIISTLTSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRD
VFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREAP
TSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF
HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(SEQ ID NO:163)。

[1955] 在一些实施例中,单链嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[1956] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCGCCCCCACCTCCTC
CTCCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGCTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTAAACGGCATCAACAAC
TACAAGAACCCCAAGCTGACTCGTATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAGCATT
TACAGTGTTTAGAGGAGGAGCTGAAGCCCCTCGAGGAGGTGCTGAATTTAGCCCAGTCCAAGAATTTCCATTTAAG
GCCCCGGGATTTAATCAGCAACATCAACGTGATCGTTTTAGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACCTTCATGTGCGAG

TACGCCGACGAGACCGCCACCATCGTGGAGTTTTTAAATCGTTGGATCACCTTCTGCCAGTCCATCATCTCCACTT
TAACCAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGA
ATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGT
TTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGG
TGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATT
TACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTG
ACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATT
TAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTT
AATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAA
AGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGGCACCTACTTCAAGTTCTACAA
AGAAAACACAGCTACAACTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAA
TCCCAAACTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGT
CTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACTTTCACTTAAGACCCAGGG
ACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATATGCTGA
TGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTAACT(SEQ
ID NO:164)。

[1957] C型单链嵌合多肽的示例性实施例

[1958] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和/或第二靶标结合域可独立地特异性结合到IL-15受体(例如人IL-15受体)。。

[1959] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域彼此直接邻接。在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括介于第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[1960] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域与第二靶标结合域彼此直接邻接。在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包括介于可溶性组织因子域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[1961] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域是人可溶性IL-15蛋白。特异性结合到IL-15受体的IL-15蛋白的非限制性实例可以包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[1962] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLII
LANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQID NO:82)。

[1963] 在一些实施例中,特异性结合到IL-15受体的IL-15蛋白可以由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[1964] AACTGGGTGAACGTGATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAGGATTTAATCCAGAGCATGCACATCGACGC
CACTCTGTACACTGAGAGCGACGTGCACCCTAGCTGCAAGGTGACTGCCATGAAGTGCTTTTTACTGGAGCTGCAA
GTTATCTCTTTAGAGAGCGGCGATGCCAGCATCCACGACACTGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAACAACTCTT

TAAGCAGCAACGGCAACGTGACAGAGAGCGGCTGCAAGGAGTGCGAGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTTTACAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTCATCAACACTAGC(SEQ ID NO:165)。

[1965] 在一些实施例中,特异性结合到IL-15受体的IL-15蛋白可以由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[1966] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:166)。

[1967] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。

[1968] 在一些实施例中,单链嵌合多肽可以包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[1969] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:167)。

[1970] 在一些实施例中,单链嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[1971] AACTGGGTGAACGTGATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAGGATTTAATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACTCTGTACACTGAGAGCGACGTGCACCCTAGCTGCAAGGTGACTGCCATGAAGTGCTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGCGATGCCAGCATCCACGACACTGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAACAACTCTTTAAGCAGCAACGGCAACGTGACAGAGAGCGGCTGCAAGGAGTGCGAGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTTTACAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTCATCAACACTAGCAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGA

AAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATG
CATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTAC
TGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGC
CAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAAC
ATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:168)。

[1972] 在一些实施例中,单链嵌合多肽可以包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[1973] MKWVTFISLLFLFSSAYSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVI
SLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGTTNTVAAYNL
TWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGS
AGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSG
KKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHI
DATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIK
EFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:169)。

[1974] 在一些实施例中,单链嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[1975] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCAACTGGGTGAACGT
GATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAGGATTTAATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACTCTGTACACTGAGAGCGAC
GTGCACCCTAGCTGCAAGGTGACTGCCATGAAGTGCTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGCG
ATGCCAGCATCCACGACACTGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAACAACTCTTTAAGCAGCAACGGCAACGTGAC
AGAGAGCGGCTGCAAGGAGTGCGAGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTTTACAGAGCTTCGTGCACATC
GTGCAGATGTTCATCAACACTAGCAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCA
ACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGG
CGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAA
CAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTAT
ACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGT
TGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGG
GATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAA
CCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTC
CCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAAC
TGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACA
CAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTT
AGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAAC
GGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCT
TTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:170)。

[1976] 示例性的A型多链嵌合多肽

[1977] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标

结合域各自独立地特异性结合到IL-18的受体或IL-12的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[1978] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对中的第二域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括第二嵌合多肽中的一对亲和域中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如,本文所述的示例性接头中的任一种)。

[1979] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,所述一对亲和域可以是本文所述的任一种示例性亲和域对。

[1980] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是激动性抗原结合域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自是激动性抗原结合域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,抗原结合域包括scFv或单域抗体。

[1981] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性IL-15或可溶性IL-18。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地是可溶性IL-15或可溶性IL-18。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域均特异性结合到IL-18的受体或IL-12的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域包括相同的氨基酸序列。

[1982] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到IL-12的受体,而第二靶标结合域特异性结合到IL-18的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到IL-18的受体,而第二靶标结合域特异性结合到IL-12的受体。

[1983] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域包括可溶性IL-18(例如人可溶性IL-18)。

[1984] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-18包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[1985] YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO:109)。

[1986] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-18由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[1987] TACTTCGGCAAACTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGA

TCAAGGTAACCGGCCTCTGTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGACAATGCCCCCCGGACCATCTTCATT
ATCTCCATGTACAAGGACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAAGTGTGAGAAAATCAGCACTT
TATCTTGTGAGAACAAGATCATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCCGATAACATCAAGGACACCAAGTCCGATAT
CATCTTCTTCCAGCGGTCCGTGCCCGGTCACGATAACAAGATGCAGTTCGAATCCTCCTCCTACGAGGGCTACTTT
TTAGCTTGTGAAAAGGAGAGGGATTTATTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATCGTTCCATCA
TGTTCACCGTCCAAAACGAGGAT(SEQ ID NO:171)。

[1988] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域包括可溶性IL-12(例如人可溶性IL-12)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-15包括人可溶性IL-12β(p40)的序列和人可溶性IL-12α(p35)的序列。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人IL-15可溶性IL-15进一步包括介于可溶性IL-12β(p40)的序列与人可溶性IL-12α(p35)的序列之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头序列)。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,接头序列包含GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:102)。

[1989] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-12β(p40)的序列包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[1990] IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTC
HKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ
GVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ
LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS
WSEWASVPCS(SEQ ID NO:81)。

[1991] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-12β(p40)由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[1992] ATTTGGGAACTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTCGAACTGGACTGGTATCCCGATGCTCCCGGCGAAAT
GGTGGTGCTCACTTGTGACACCCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCCTCGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGC
TCCGGAAAGACCCTCACAATCCAAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACACATGCCACAAGGGAGGCGAGG
TGCTCAGCCATTCCTTATTATTATTACACAAGAAGGAAGACGGAATCTGGTCCACCGACATTTTAAAAGATCAGAA
GGAGCCCAAGAATAAGACCTTTTTAAGGTGTGAGGCCAAAAACTACAGCGGTCGTTTCACTTGTTGGTGGCTGACC
ACCATTTCCACCGATTTAACCTTCTCCGTGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCTCAAGGTGTGACATGTGGAG
CCGCTACCCTCAGCGCTGAGAGGGTTCGTGGCGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAGATAG
CGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAACTCAAGTACGAGAAC
TACACCTCCTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCCGATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAA
ATAGCCGGCAAGTTGAGGTCTCTTGGGAATATCCCGACACTTGGAGCACACCCCACAGCTACTTCTCTTTAACCTT
TTGTGTGCAAGTTCAAGGTAAAAGCAAGCGGGAGAAGAAAGACCGGGTGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTC
ATCTGTCGGAAGAACGCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACTCCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCA
GCGTGCCTTGTTCC(SEQ ID NO:172)。

[1993] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-12α(p35)包括与以下至少

80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[1994] RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS(SEQ ID NO:80)。

[1995] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-12α(p35)由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[1996] CGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGTTCCCTTGTTTACACCACAGCCAGAATTTACTGAGGGCCGTGAGCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAATTTTACCCTTGCACCAGCGAGGAGATCGACCATGAAGATATCACCAAGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTTTACCTCTGGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTCTCAACTCTCGTGAAACCAGCTTCATCACAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGAAGACCTCCTTTATGATGGCTTTATGCCTCAGCTCCATCTACGAGGATTTAAAGATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTCATGGACCCTAAACGGCAGATCTTTTTAGACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCAAGCTTTAAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCCTCCCTCGAGGAGCCCGATTTTTACAAGACAAAGATCAAACTGTGCATTTTACTCCACGCCTTTAGGATCCGGGCCGTGACCATTGACCGGGTCATGAGCTATTTAAACGCCAGC(SEQ ID NO:173)。

[1997] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可以包括与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[1998] YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:174)。

[1999] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2000] TACTTCGGCAAACTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGATCAAGGTAACCGGCCTCTGTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGACAATGCCCCCCGGACCATCTTCATTATCTCCATGTACAAGGACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAAGTGTGAGAAAATCAGCACTTTATCTTGTGAGAACAAGATCATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCCGATAACATCAAGGACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTGCCCGGTCACGATAACAAGATGCAGTTCGAATCCTCCTCCTACGAGGGCTACTTTTTAGCTTGTGAAAAGGAGAGGGATTTATTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATCGTTCCATCATGTTCACCGTCCAAAACGAGGATAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAA

CTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGC
GACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAAC
AGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATA
CGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTT
GGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGG
ATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAAC
CAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCC
CGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACT
GGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACAC
AGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTA
GAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACG
GCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTT
TGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:175)。

[2001] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可以包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2002] MKWVTFISLLFLFSSAYSYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIIS
MYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLA
CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDW
KSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGT
KVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRT
VNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLES
GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:176)。

[2003] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2004] ATGAAGTGGGTCACATTTATCTCTTTACTGTTCCTCTTCTCCAGCGCCTACAGCTACTTCGGCAAACT
GGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGATCAAGGTAACCGGCCTCTGTTC
GAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGACAATGCCCCCCGGACCATCTTCATTATCTCCATGTACAAGGACAGCC
AGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAAGTGTGAGAAAATCAGCACTTTATCTTGTGAGAACAAGATCAT
CTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCCGATAACATCAAGGACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTG
CCCGGTCACGATAACAAGATGCAGTTCGAATCCTCCTCCTACGAGGGCTACTTTTTAGCTTGTGAAAAGGAGAGGG
ATTTATTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATCGTTCCATCATGTTCACCGTCCAAAACGAGGA
TAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGG
GAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCT
ATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTT
TAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACC
CCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAG
TGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAAT

CTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCA
CCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTT
AAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCT
TGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCC
ACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTG
CAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTC
ATCAATACCTCC(SEQ ID NO:177)。

[2005] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可以包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2006] IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTC
HKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ
GVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ
LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS
WSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHED
ITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDP
KRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASITCPPP
MSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR(SEQ ID NO:178)。

[2007] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2008] ATTTGGGAACTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTCGAACTGGACTGGTATCCCGATGCTCCCGGCGAAAT
GGTGGTGCTCACTTGTGACACCCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCCTCGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGC
TCCGGAAAGACCCTCACAATCCAAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACACATGCCACAAGGGAGGCGAGG
TGCTCAGCCATTCCTTATTATTATTACACAAGAAGGAAGACGGAATCTGGTCCACCGACATTTTAAAAGATCAGAA
GGAGCCCAAGAATAAGACCTTTTTAAGGTGTGAGGCCAAAAACTACAGCGGTCGTTTCACTTGTTGGTGGCTGACC
ACCATTTCCACCGATTTAACCTTCTCCGTGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCTCAAGGTGTGACATGTGGAG
CCGCTACCCTCAGCGCTGAGAGGGTTCGTGGCGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAGATAG
CGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAACTCAAGTACGAGAAC
TACACCTCCTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCCGATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAA
ATAGCCGGCAAGTTGAGGTCTCTTGGGAATATCCCGACACTTGGAGCACACCCCACAGCTACTTCTCTTTAACCTT
TTGTGTGCAAGTTCAAGGTAAAAGCAAGCGGGAGAAGAAAGACCGGGTGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTC
ATCTGTCGGAAGAACGCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACTCCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCA
GCGTGCCTTGTTCCGGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCTCGTAACCTCCCCGTGGC
TACCCCCGATCCCGGAATGTTCCCTTGTTTACACCACAGCCAGAATTTACTGAGGGCCGTGAGCAACATGCTGCAG
AAAGCTAGGCAGACTTTAGAATTTTACCCTTGCACCAGCGAGGAGATCGACCATGAAGATATCACCAAGGACAAGA
CATCCACCGTGGAGGCTTGTTTACCTCTGGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTCTCAACTCTCGTGAAACCAGCTT
CATCACAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGAAGACCTCCTTTATGATGGCTTTATGCCTCAGCTCCATCTACGAG

GATTTAAAGATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTCATGGACCCTAAACGGCAGATCTTTT
TAGACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCAAGCTTTAAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAA
GTCCTCCCTCGAGGAGCCCGATTTTTACAAGACAAAGATCAAACTGTGCATTTTACTCCACGCCTTTAGGATCCGG
GCCGTGACCATTGACCGGGTCATGAGCTATTTAAACGCCAGCATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACG
CCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGC
CGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAG
TGCATCCGG(SEQ ID NO:179)。

[2009] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可以包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2010] MKWVTFISLLFLFSSAYSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTI
STDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYT
SSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC
RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKA
RQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDL
KMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAV
TIDRVMSYLNASITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR
(SEQ ID NO:180)。

[2011] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2012] ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTCCTCTTTAGCAGCGCCTACTCCATTTGGGAACTGAA
GAAGGACGTCTACGTGGTCGAACTGGACTGGTATCCCGATGCTCCCGGCGAAATGGTGGTGCTCACTTGTGACACC
CCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCCTCGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTCCGGAAAGACCCTCACAATCC
AAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACACATGCCACAAGGGAGGCGAGGTGCTCAGCCATTCCTTATTATT
ATTACACAAGAAGGAAGACGGAATCTGGTCCACCGACATTTTAAAAGATCAGAAGGAGCCCAAGAATAAGACCTTT
TTAAGGTGTGAGGCCAAAAACTACAGCGGTCGTTTCACTTGTTGGTGGCTGACCACCATTTCCACCGATTTAACCT
TCTCCGTGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCTCAAGGTGTGACATGTGGAGCCGCTACCCTCAGCGCTGAGAG
GGTTCGTGGCGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAGATAGCGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAA
TCTTTACCCATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAACTCAAGTACGAGAACTACACCTCCTCCTTCTTTATCC
GGGACATCATTAAGCCCGATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAAATAGCCGGCAAGTTGAGGTCTC
TTGGGAATATCCCGACACTTGGAGCACACCCCACAGCTACTTCTCTTTAACCTTTTGTGTGCAAGTTCAAGGTAAA
AGCAAGCGGGAGAAGAAAGACCGGGTGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTCATCTGTCGGAAGAACGCCTCCA
TCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACTCCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCAGCGTGCCTTGTTCCGGCGGTGG
AGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCTCGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGTTC
CCTTGTTTACACCACAGCCAGAATTTACTGAGGGCCGTGAGCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAAT
TTTACCCTTGCACCAGCGAGGAGATCGACCATGAAGATATCACCAAGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTTT
ACCTCTGGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTCTCAACTCTCGTGAAACCAGCTTCATCACAAATGGCTCTTGTTTA

GCTTCCCGGAAGACCTCCTTTATGATGGCTTTATGCCTCAGCTCCATCTACGAGGATTTAAAGATGTACCAAGTGG
AGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTCATGGACCCTAAACGGCAGATCTTTTTAGACCAGAACATGCTGGCTGT
GATTGATGAGCTGATGCAAGCTTTAAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCCTCCCTCGAGGAGCCCGAT
TTTTACAAGACAAAGATCAAACTGTGCATTTTACTCCACGCCTTTAGGATCCGGGCCGTGACCATTGACCGGGTCA
TGAGCTATTTAAACGCCAGCATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTA
TAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAG
TGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG(SEQ ID NO:
181)。

[2013] 示例性的B型多链嵌合多肽

[2014] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到IL-21的受体或TGF-β。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2015] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域和亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2016] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对中的第二域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2017] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对可以是本文所述的任一种示例性亲和域对。

[2018] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性IL-21(例如人可溶性IL-21多肽)或可溶性TGF-β受体(例如可溶性TGFRβRII受体)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地是可溶性IL-21或可溶性TGF-β受体(例如可溶性TGFRβRII受体)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域均特异性结合到IL-21的受体或TGF-β。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域包括相同的氨基酸序列。

[2019] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到IL-21的受体,而第二靶标结合域特异性结合到TGF-β。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合TGF-β,而第二靶标结合域特异性结合到IL-21的受体。

[2020] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域包括可溶性IL-21(例如人可溶性IL-21)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至

少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2021] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS(SEQ ID NO:83)。

[2022] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2023] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC(SEQ ID NO:182)。

[2024] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域包括可溶性TGF-β受体(例如可溶性TGFRβRII受体(例如人可溶性TGFRβRII受体))。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII包括人可溶性TGFRβRII的第一序列和人可溶性TGFRβRII的第二序列。。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII包括安置于人可溶性TGFRβRII的第一序列与人可溶性TGFRβRII的第二序列之间的接头。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,接头包括序列GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:102)。

[2025] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第一序列包含与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2026] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID NO:183)。

[2027] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第二序列包含与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2028] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID NO:184)。

[2029] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第一序列由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2030] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAA

GTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGC
ACGATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCC
TGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCAT
CATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATC
ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGAT(SEQ ID NO:185)。

[2031] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第二序列由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2032] ATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAA
ATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGC
ACAATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCC
TGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCAT
CATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATC
ATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:186)。

[2033] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2034] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAA
GTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGC
ACGATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCC
TGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCAT
CATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATC
ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTG
GGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATT
TCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCACA
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGG
AAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCAT
GAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATC
TTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:187)。

[2035] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人TGFβRII受体包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2036] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGG
GSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQID NO:

188)。

[2037] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2038] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDSSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:189)。

[2039] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCCTCCGGCACCACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGAACCCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGCAGATCTCCACCAAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTGCTTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCGACGAAATCGTCAAGGACGTCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAATTCCCCCGAATTCACCCCTTATTTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGGCACCAAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGTGCGGCGGAATAACACATTTTTATCCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACCGCTAAGACCAACACCAACGAGTTTTTAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCGGAAGAGCACAGATTCCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:190)。

[2040] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2041] MKWVTFISLLFLFSSAYSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDSSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ

TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRD
VFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENW
VNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNG
NVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:191)。

[2042] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2043] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCCAGGGCCAGGACAG
GCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAG
TTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGA
AGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCAC
AAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAG
TTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGG
ACTCCTCCGGCACCACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTGGA
ATGGGAACCCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGCAGATCTCCACCAAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTGC
TTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCGACGAAATCGTCAAGGACGTCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGG
TCTTTTCCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAATTCCCCCGAATT
CACCCCTTATTTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGGCACCAAGGTGAACGTC
ACCGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGTGCGGCGGAATAACACATTTTTATCCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGACC
TCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACCGCTAAGACCAACACCAACGAGTTTTT
AATTGACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCGGAAG
AGCACAGATTCCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCG
ATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCC
CTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGC
ATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCG
GCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGAT
GTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:192)。

[2044] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2045] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGG
GSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDITCPPPMSV
EHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR(SEQ ID NO:193)。

[2046] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2047] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAA

GTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGC
ACGATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCC
TGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCAT
CATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATC
ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTG
GGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATT
TCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCACA
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGG
AAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCAT
GAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATC
TTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACATCACGTGTCCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCT
GGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTC
CAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGTATTAGA
(SEQ ID NO:194)。

[2048] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如,至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2049] MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI
TSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF
SEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS
EEYNTSNPDITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR
(SEQ ID NO:195)。

[2050] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2051] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCATGT
GCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTC
TGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCACGATCACCTCCATCTGCGAGA
AGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCC
CAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCC
GGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACA
CCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCA
GAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGC
GATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCACAATCACCTCCATCTGTGAGAAGC
CTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAA
GCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGC
GAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCA
GCAACCCCGACATCACGTGTCCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTA

CTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTG AACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGTATTAGA(SEQ ID NO:196)。

[2052] 示例性的C型多链嵌合多肽

[2053] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到IL-7的受体或IL-21的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2054] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域和亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2055] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对中的第二域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2056] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对可以是本文所述的任一种示例性亲和域对。

[2057] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性IL-21(例如人可溶性IL-21多肽)或可溶性IL-7(例如人可溶性IL-7多肽)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地为可溶性IL-21或可溶性IL-7。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域均特异性结合到IL-21的受体或IL-7的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域包括相同的氨基酸序列。

[2058] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到IL-21的受体,而第二靶标结合域特异性结合到IL-7的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到IL-7的受体,而第二靶标结合域特异性结合到IL-21的受体。

[2059] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域包括可溶性IL-21(例如人可溶性IL-21)。

[2060] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2061] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIIN VSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS(SEQ ID NO: 83)。

[2062] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21由与以下至少80%一致(例

如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2063] CAAGGTCAAGATCGCCACATGATTAGAATGCGTCAACTTATAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTATGTGAATGACTTGGTCCCTGAATTTCTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGACAAACTGTGAGTGGTCAGCTTTTTCCTGTTTTCAGAAGGCCCAACTAAAGTCAGCAAATACAGGAAACAATGAAAGGATAATCAATGTATCAATTAAAAAGCTGAAGAGGAAACCACCTTCCACAAATGCAGGGAGAAGACAGAAACACAGACTAACATGCCCTTCATGTGATTCTTATGAGAAAAAACCACCCAAAGAATTCCTAGAAAGATTCAAATCACTTCTCCAAAAGATGATTCATCAGCATCTGTCCTCTAGAACACACGGAAGTGAAGATTCC(SEQ ID NO:197)。

[2064] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2065] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC(SEQ ID NO:182)。

[2066] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-7的序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2067] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEH(SEQ ID NO:79)。

[2068] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-7由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2069] GATTGTGATATTGAAGGTAAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATTATTGGACAGCATGAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCTGAATAATGAATTTAACTTTTTTAAAAGACATATCTGTGATGCTAATAAGGAAGGTATGTTTTTATTCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCTTAAAATGAATAGCACTGGTGATTTTGATCTCCACTTATTAAAAGTTTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACTGGCCAGGTTAAAGGAAGAAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGCCCAACCAACAAAGAGTTTGGAAGAAAATAAATCTTTAAAGGAACAGAAAAAACCTGAATGACTTGTGTTTCCTAAAGAGACTATTACAAGAGATAAAAACTTGTTGGAATAAAATTTTGATGGGCACTAAAGAACAC(SEQ ID NO:198)。

[2070] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2071] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDSSGTTNTVAAYN

LTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTG
SAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSS
GKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMH
IDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNI
KEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:199)。

[2072] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2073] CAAGGTCAAGATCGCCACATGATTAGAATGCGTCAACTTATAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTA
TGTGAATGACTTGGTCCCTGAATTTCTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGACAAACTGTGAGTGGTCAGCTTTTTCC
TGTTTTCAGAAGGCCCAACTAAAGTCAGCAAATACAGGAAACAATGAAAGGATAATCAATGTATCAATTAAAAAGC
TGAAGAGGAAACCACCTTCCACAAATGCAGGGAGAAGACAGAAACACAGACTAACATGCCCTTCATGTGATTCTTA
TGAGAAAAAACCACCCAAAGAATTCCTAGAAAGATTCAAATCACTTCTCCAAAAGATGATTCATCAGCATCTGTCC
TCTAGAACACACGGAAGTGAAGATTCCTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAATCAA
CTAATTTCAAGACAATTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTC
AGGAGATTGGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAGGATGTG
AAGCAGACGTACTTGGCACGGGTCTTCTCCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGTTCTGCTGGGGAGCCTC
TGTATGAGAACTCCCCAGAGTTCACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGACAGCCAACAATTCAGAGTTTTGAACA
GGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACGGACTTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCCTAAGCCTC
CGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTATACACTTTATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCA
AAACAAACACTAATGAGTTTTTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACTACTGTTTCAGTGTTCAAGCAGTGATTCC
CTCCCGAACAGTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAGAA
AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTAT
ACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTC
TTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGC
AACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAAT
CCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:200)。

[2074] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2075] MGVKVLFALICIAVAEAQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQ
KAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRT
HGSEDSSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQT
YLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWV
NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGN
VTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:201)。

[2076] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至

少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2077] ATGGGAGTGAAAGTTCTTTTTGCCCTTATTTGTATTGCTGTGGCCGAGGCCCAAGGTCAAGATCGCCA
CATGATTAGAATGCGTCAACTTATAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTATGTGAATGACTTGGTCCCTGAATTT
CTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGACAAACTGTGAGTGGTCAGCTTTTTCCTGTTTTCAGAAGGCCCAACTAAAGT
CAGCAAATACAGGAAACAATGAAAGGATAATCAATGTATCAATTAAAAAGCTGAAGAGGAAACCACCTTCCACAAA
TGCAGGGAGAAGACAGAAACACAGACTAACATGCCCTTCATGTGATTCTTATGAGAAAAAACCACCCAAAGAATTC
CTAGAAAGATTCAAATCACTTCTCCAAAAGATGATTCATCAGCATCTGTCCTCTAGAACACACGGAAGTGAAGATT
CCTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAATTTTGGAGTG
GGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAGATTGGAAAAGCAAATGCTTT
TACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAGGATGTGAAGCAGACGTACTTGGCACGGGTCT
TCTCCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGTTCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGAACTCCCCAGAGTTCAC
ACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGACAGCCAACAATTCAGAGTTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACC
GTAGAAGATGAACGGACTTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAA
TTTATACACTTTATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTTTTGAT
TGATGTGGATAAAGGAGAAAACTACTGTTTCAGTGTTCAAGCAGTGATTCCCTCCCGAACAGTTAACCGGAAGAGT
ACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAGAAAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATT
TAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTC
TTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATC
CACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCT
GCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTT
CATCAATACCTCC(SEQ ID NO:202)。

[2078] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2079] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLK
MNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNK
ILMGTKEHITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR(SEQ
ID NO:203)。

[2080] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2081] GATTGTGATATTGAAGGTAAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATT
ATTGGACAGCATGAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCTGAATAATGAATTTAACTTTTTTAAAAGACATATCTGTGAT
GCTAATAAGGAAGGTATGTTTTTATTCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCTTAAAATGAATAGCACTGGTG
ATTTTGATCTCCACTTATTAAAAGTTTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACTGGCCAGGTTAAAGGAAG
AAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGCCCAACCAACAAAGAGTTTGGAAGAAAATAAATCTTTAAAGGAACAGAAAAAA
CTGAATGACTTGTGTTTCCTAAAGAGACTATTACAAGAGATAAAAACTTGTTGGAATAAAATTTTGATGGGCACTA
AAGAACACATCACGTGCCCTCCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTC
CAGGGAGCGGTACATTTGTAACTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAAC

AAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA(SEQ ID NO:204)。

[2082] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2083] MGVKVLFALICIAVAEADCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANK EGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLND LCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEHITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKAT NVAHWTTPSLKCIR(SEQ ID NO:205)。

[2084] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2085] ATGGGAGTGAAAGTTCTTTTTGCCCTTATTTGTATTGCTGTGGCCGAGGCCGATTGTGATATTGAAGG TAAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATTATTGGACAGCATGAAAGAAATTGGT AGCAATTGCCTGAATAATGAATTTAACTTTTTTAAAAGACATATCTGTGATGCTAATAAGGAAGGTATGTTTTTAT TCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCTTAAAATGAATAGCACTGGTGATTTTGATCTCCACTTATTAAAAGT TTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACTGGCCAGGTTAAAGGAAGAAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGCC CAACCAACAAAGAGTTTGGAAGAAAATAAATCTTTAAAGGAACAGAAAAAACTGAATGACTTGTGTTTCCTAAAGA GACTATTACAAGAGATAAAAACTTGTTGGAATAAAATTTTGATGGGCACTAAAGAACACATCACGTGCCCTCCCCC CATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACTCT GGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGA CAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA(SEQ ID NO:206)。

[2086] 示例性的D型多链嵌合多肽

[2087] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到IL-7的受体或IL-21的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2088] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域和亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2089] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对中的第二域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2090] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对可以是本文所述的任一种示例性亲和域对。

[2091] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一

个或两个是可溶性IL-21(例如人可溶性IL-21多肽)或可溶性IL-7(例如人可溶性IL-7多肽)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地为可溶性IL-21或可溶性IL-7。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域均特异性结合到IL-21的受体或IL-7的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域包括相同的氨基酸序列。

[2092] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到IL-21的受体,并且第二靶标结合域特异性结合到IL-7的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到IL-7的受体,并且第二靶标结合域特异性结合到IL-21的受体。

[2093] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2094] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS(SEQ ID NO:83)。

[2095] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2096] CAAGGTCAAGATCGCCACATGATTAGAATGCGTCAACTTATAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTATGTGAATGACTTGGTCCCTGAATTTCTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGACAAACTGTGAGTGGTCAGCTTTTTCCTGTTTTCAGAAGGCCCAACTAAAGTCAGCAAATACAGGAAACAATGAAAGGATAATCAATGTATCAATTAAAAAGCTGAAGAGGAAACCACCTTCCACAAATGCAGGGAGAAGACAGAAACACAGACTAACATGCCCTTCATGTGATTCTTATGAGAAAAAACCACCCAAAGAATTCCTAGAAAGATTCAAATCACTTCTCCAAAAGATGATTCATCAGCATCTGTCCTCTAGAACACACGGAAGTGAAGATTCC(SEQ ID NO:197)。

[2097] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2098] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC(SEQ ID NO:182)。

[2099] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-7的序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2100] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLK MNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNK ILMGTKEH(SEQ ID NO:79)。

[2101] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-7由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2102] GATTGTGATATTGAAGGTAAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATT ATTGGACAGCATGAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCTGAATAATGAATTTAACTTTTTTAAAAGACATATCTGTGAT GCTAATAAGGAAGGTATGTTTTTATTCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCTTAAAATGAATAGCACTGGTG ATTTTGATCTCCACTTATTAAAAGTTTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACTGGCCAGGTTAAAGGAAG AAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGCCCAACCAACAAAGAGTTTGGAAGAAAATAAATCTTTAAAGGAACAGAAAAAA CTGAATGACTTGTGTTTCCTAAAGAGACTATTACAAGAGATAAAAACTTGTTGGAATAAAATTTTGATGGGCACTA AAGAACAC(SEQ ID NO:198)。

[2103] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2104] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLK MNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNK ILMGTKEHSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVK QTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLR DVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREN WVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSN GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:207)。

[2105] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2106] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCT GCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGAC GCCAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCG ACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCG GAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAG CTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCA AGGAGCATAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCT CGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAA TGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCC GGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGA ATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAAT GTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAG ATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTT

TTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGG
AAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCA
GCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCA
CCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCT
AGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGT
CCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCA
GATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:208)。

[2107] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2108] MKWVTFISLLFLFSSAYSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDAN
KEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLN
DLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEHSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCF
YTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVT
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKS
TDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASI
HDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:209)。

[2109] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:ATGAAGTGGGTGACCTT
CATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCGATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAG
AGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGT
TCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCG
GCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTG
CTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGG
AGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGAC
CTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCATAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACT
TGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCA
GCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGT
GAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCT
GGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAA
GCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTT
TCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAG
AAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAG
CTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGA
GTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGAC
GCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGC
AAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTC
TTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAG

TTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:210)。

[2110] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2111] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDSITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR(SEQ ID NO:211)。

[2112] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2113] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCCATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG(SEQ ID NO:212)。

[2114] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2115] MKWVTFISLLFLFSSAYSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDSITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR(SEQ ID NO:213)。

[2116] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2117] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCCAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCCATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG(SEQ ID NO:214)。

[2118] 示例性的E型多链嵌合多肽

[2119] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到IL-18(例如人可溶性IL-18)的受体、IL-12(例如人可溶性IL-12)的受体或CD16(例如,抗CD16 scFv)。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括另外的靶标结合域。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括另外的靶标结合域。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域特异性结合到CD16或IL-12的受体。

[2120] 在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2121] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域和亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2122] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对中的第二域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2123] 在一些实施例中,第二嵌合多肽在第二嵌合多肽的N端或C端进一步包含一个或多个其它靶标结合域。

[2124] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域和亲和域对中的第二域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与其它靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2125] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中直接彼此邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的第二靶标结合域与其它靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2126] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对可以是本文所述的任一种示例性亲和域对。

[2127] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和其它抗原结合域中的一个或多个是激动性抗原结合域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和其它抗原结合域各自是激动性抗原结合域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,抗原结合域包括scFv或单域抗体。

[2128] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性IL-15或可溶性IL-18。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地是可溶性IL-15或可溶性IL-18。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域均特异性结合到IL-18的受体或IL-12

的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域包括相同的氨基酸序列。

[2129] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到IL-12的受体,并且第二靶标结合域特异性结合到IL-18的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到IL-18的受体,而第二靶标结合域特异性结合到IL-12的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到CD16,而第二靶标结合域特异性结合到IL-18的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到IL-18的受体,而第二靶标结合域特异性结合到CD16。

[2130] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的抗原。在一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的表位。在一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个包含相同的氨基酸序列。

[2131] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域包括可溶性IL-18(例如人可溶性IL-18)。

[2132] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-18包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2133] YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO:109)。

[2134] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-18由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2135] TACTTCGGCAAACTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGATCAAGGTAACCGGCCTCTGTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGACAATGCCCCCCGGACCATCTTCATTATCTCCATGTACAAGGACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAAGTGTGAGAAAATCAGCACTTTATCTTGTGAGAACAAGATCATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCCGATAACATCAAGGACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTGCCCGGTCACGATAACAAGATGCAGTTCGAATCCTCCTCCTACGAGGGCTACTTTTTAGCTTGTGAAAAGGAGAGGGATTTATTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATCGTTCCATCATGTTCACCGTCCAAAACGAGGAT(SEQ ID NO:171)。

[2136] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域包括可溶性IL-12(例如人可溶性IL-12)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-15包括人可溶性IL-12β(p40)的序列和人可溶性IL-12α(p35)的序列。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性IL-15(例如人可溶性IL-15)进一步包括介于可溶性IL-12β(p40)的序列与人可溶性IL-12α(p35)的序列之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头序列)。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,接头序列包含GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:102)。

[2137] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-12β(p40)的序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2138] IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTC HKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ GVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCS(SEQ ID NO:81)。

[2139] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-12β(p40)由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2140] ATTTGGGAACTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTCGAACTGGACTGGTATCCCGATGCTCCCGGCGAAAT GGTGGTGCTCACTTGTGACACCCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCCTCGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGC TCCGGAAAGACCCTCACAATCCAAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACACATGCCACAAGGGAGGCGAGG TGCTCAGCCATTCCTTATTATTATTACACAAGAAGGAAGACGGAATCTGGTCCACCGACATTTTAAAAGATCAGAA GGAGCCCAAGAATAAGACCTTTTTAAGGTGTGAGGCCAAAAACTACAGCGGTCGTTTCACTTGTTGGTGGCTGACC ACCATTTCCACCGATTTAACCTTCTCCGTGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCTCAAGGTGTGACATGTGGAG CCGCTACCCTCAGCGCTGAGAGGGTTCGTGGCGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAGATAG CGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAACTCAAGTACGAGAAC TACACCTCCTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCCGATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAA ATAGCCGGCAAGTTGAGGTCTCTTGGGAATATCCCGACACTTGGAGCACACCCCACAGCTACTTCTCTTTAACCTT TTGTGTGCAAGTTCAAGGTAAAAGCAAGCGGGAGAAGAAAGACCGGGTGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTC ATCTGTCGGAAGAACGCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACTCCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCA GCGTGCCTTGTTCC(SEQ ID NO:172)。

[2141] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-12α(p35)包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2142] RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLEL TKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDEL MQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS(SEQ ID NO:80)。

[2143] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-12α(p35)由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2144] CGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGTTCCCTTGTTTACACCACAGCCAGAATTTACT GAGGGCCGTGAGCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAATTTTACCCTTGCACCAGCGAGGAGATCGAC

CATGAAGATATCACCAAGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTTTACCTCTGGAGCTGACAAAGAACGAGTCTT GTCTCAACTCTCGTGAAACCAGCTTCATCACAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGAAGACCTCCTTTATGATGGC TTTATGCCTCAGCTCCATCTACGAGGATTTAAAGATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTC ATGGACCCTAAACGGCAGATCTTTTTAGACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCAAGCTTTAAACT TCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCCTCCCTCGAGGAGCCCGATTTTTACAAGACAAAGATCAAACTGTGCAT TTTACTCCACGCCTTTAGGATCCGGGCCGTGACCATTGACCGGGTCATGAGCTATTTAAACGCCAGC(SEQ ID NO:173)。

[2145] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域包括特异性结合到CD16的scFv(例如抗CD16 scFv)。

[2146] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,特异性结合到CD16的scFv包括轻链可变域,所述轻链可变域包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2147] SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNT ASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVGH(SEQ ID NO:215)。

[2148] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,特异性结合到CD16的scFv由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的轻链可变域序列编码:

[2149] TCCGAGCTGACCCAGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGG CGACTCCCTGAGGTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGC AAGAACAACAGGCCCTCCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCA CAGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCGG CGGCGGCACCAAGCTGACCGTGGGCCAT(SEQ ID NO:216)。

[2150] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,特异性结合到CD16的scFv包括重链可变域,所述重链可变域包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2151] EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLLFDYWGQGTLVTVSR(SEQ ID NO:217)。

[2152] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,特异性结合到CD16的scFv由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的重链可变域序列编码:

[2153] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGC TGCCTCCGGCTTCACCTTCGACGACTACGGCATGTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTG TCCGGCATCAACTGGAACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACA ACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGG CAGGTCCCTGCTGTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGG(SEQ ID NO:218)。

[2154] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2155] YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:174)。

[2156] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2157] TACTTCGGCAAACTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGATCAAGGTAACCGGCCTCTGTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGACAATGCCCCCCGGACCATCTTCATTATCTCCATGTACAAGGACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAAGTGTGAGAAAATCAGCACTTTATCTTGTGAGAACAAGATCATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCCGATAACATCAAGGACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTGCCCGGTCACGATAACAAGATGCAGTTCGAATCCTCCTCCTACGAGGGCTACTTTTTAGCTTGTGAAAAGGAGAGGGATTTATTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATCGTTCCATCATGTTCACCGTCCAAAACGAGGATAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:175)。

[2158] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2159] MKWVTFISLLFLFSSAYSYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDW

KSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGT
KVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRT
VNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLES
GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:176)。

[2160] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2161] ATGAAGTGGGTCACATTTATCTCTTTACTGTTCCTCTTCTCCAGCGCCTACAGCTACTTCGGCAAACT
GGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGATCAAGGTAACCGGCCTCTGTTC
GAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGACAATGCCCCCCGGACCATCTTCATTATCTCCATGTACAAGGACAGCC
AGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAAGTGTGAGAAAATCAGCACTTTATCTTGTGAGAACAAGATCAT
CTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCCGATAACATCAAGGACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTG
CCCGGTCACGATAACAAGATGCAGTTCGAATCCTCCTCCTACGAGGGCTACTTTTTAGCTTGTGAAAAGGAGAGGG
ATTTATTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATCGTTCCATCATGTTCACCGTCCAAAACGAGGA
TAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGG
GAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCT
ATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTT
TAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACC
CCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAG
TGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAAT
CTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCA
CCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTT
AAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCT
TGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCC
ACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTG
CAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTC
ATCAATACCTCC(SEQ ID NO:177)。

[2162] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2163] IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTC
HKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ
GVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ
LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS
WSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHED
ITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDP
KRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASITCPPP
MSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRSELTQDPAVSVALGQTV

RITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSG
NHVVFGGGTKLTVGHGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLE
WVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLLFDYWGQGTLVTVSR(SEQ
ID NO:223)。

[2164] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2165] ATTTGGGAACTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTCGAACTGGACTGGTATCCCGATGCTCCCGGCGAAAT
GGTGGTGCTCACTTGTGACACCCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCCTCGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGC
TCCGGAAAGACCCTCACAATCCAAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACACATGCCACAAGGGAGGCGAGG
TGCTCAGCCATTCCTTATTATTATTACACAAGAAGGAAGACGGAATCTGGTCCACCGACATTTTAAAAGATCAGAA
GGAGCCCAAGAATAAGACCTTTTTAAGGTGTGAGGCCAAAAACTACAGCGGTCGTTTCACTTGTTGGTGGCTGACC
ACCATTTCCACCGATTTAACCTTCTCCGTGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCTCAAGGTGTGACATGTGGAG
CCGCTACCCTCAGCGCTGAGAGGGTTCGTGGCGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAGATAG
CGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAACTCAAGTACGAGAAC
TACACCTCCTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCCGATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAA
ATAGCCGGCAAGTTGAGGTCTCTTGGGAATATCCCGACACTTGGAGCACACCCCACAGCTACTTCTCTTTAACCTT
TTGTGTGCAAGTTCAAGGTAAAAGCAAGCGGGAGAAGAAAGACCGGGTGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTC
ATCTGTCGGAAGAACGCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACTCCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCA
GCGTGCCTTGTTCCGGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCTCGTAACCTCCCCGTGGC
TACCCCCGATCCCGGAATGTTCCCTTGTTTACACCACAGCCAGAATTTACTGAGGGCCGTGAGCAACATGCTGCAG
AAAGCTAGGCAGACTTTAGAATTTTACCCTTGCACCAGCGAGGAGATCGACCATGAAGATATCACCAAGGACAAGA
CATCCACCGTGGAGGCTTGTTTACCTCTGGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTCTCAACTCTCGTGAAACCAGCTT
CATCACAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGAAGACCTCCTTTATGATGGCTTTATGCCTCAGCTCCATCTACGAG
GATTTAAAGATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTCATGGACCCTAAACGGCAGATCTTTT
TAGACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCAAGCTTTAAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAA
GTCCTCCCTCGAGGAGCCCGATTTTTACAAGACAAAGATCAAACTGTGCATTTTACTCCACGCCTTTAGGATCCGG
GCCGTGACCATTGACCGGGTCATGAGCTATTTAAACGCCAGCATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACG
CCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGC
CGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAG
TGCATCCGGTCCGAGCTGACCCAGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGG
GCGACTCCCTGAGGTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGG
CAAGAACAACAGGCCCTCCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATC
ACAGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCG
GCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGGGCCATGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGAGGATCCGA
GGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGC
TTCACCTTCGACGACTACGGCATGTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCA
ACTGGAACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAA
CTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTG

CTGTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGG(SEQ ID NO:224)。

[2166] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2167] MKWVTFISLLFLFSSAYSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTI
STDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYT
SSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC
RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKA
RQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDL
KMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAV
TIDRVMSYLNASITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI
RSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITG
AQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVGHGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFT
FDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLLF
DYWGQGTLVTVSR(SEQ ID NO:225)。

[2168] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2169] ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTCCTCTTTAGCAGCGCCTACTCCATTTGGGAACTGAA
GAAGGACGTCTACGTGGTCGAACTGGACTGGTATCCCGATGCTCCCGGCGAAATGGTGGTGCTCACTTGTGACACC
CCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCCTCGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTCCGGAAAGACCCTCACAATCC
AAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACACATGCCACAAGGGAGGCGAGGTGCTCAGCCATTCCTTATTATT
ATTACACAAGAAGGAAGACGGAATCTGGTCCACCGACATTTTAAAAGATCAGAAGGAGCCCAAGAATAAGACCTTT
TTAAGGTGTGAGGCCAAAAACTACAGCGGTCGTTTCACTTGTTGGTGGCTGACCACCATTTCCACCGATTTAACCT
TCTCCGTGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCTCAAGGTGTGACATGTGGAGCCGCTACCCTCAGCGCTGAGAG
GGTTCGTGGCGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAGATAGCGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAA
TCTTTACCCATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAACTCAAGTACGAGAACTACACCTCCTCCTTCTTTATCC
GGGACATCATTAAGCCCGATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAAATAGCCGGCAAGTTGAGGTCTC
TTGGGAATATCCCGACACTTGGAGCACACCCCACAGCTACTTCTCTTTAACCTTTTGTGTGCAAGTTCAAGGTAAA
AGCAAGCGGGAGAAGAAAGACCGGGTGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTCATCTGTCGGAAGAACGCCTCCA
TCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACTCCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCAGCGTGCCTTGTTCCGGCGGTGG
AGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCTCGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGTTC
CCTTGTTTACACCACAGCCAGAATTTACTGAGGGCCGTGAGCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAAT
TTTACCCTTGCACCAGCGAGGAGATCGACCATGAAGATATCACCAAGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTTT
ACCTCTGGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTCTCAACTCTCGTGAAACCAGCTTCATCACAAATGGCTCTTGTTTA
GCTTCCCGGAAGACCTCCTTTATGATGGCTTTATGCCTCAGCTCCATCTACGAGGATTTAAAGATGTACCAAGTGG
AGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTCATGGACCCTAAACGGCAGATCTTTTTAGACCAGAACATGCTGGCTGT
GATTGATGAGCTGATGCAAGCTTTAAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCCTCCCTCGAGGAGCCCGAT

TTTTACAAGACAAAGATCAAACTGTGCATTTTACTCCACGCCTTTAGGATCCGGGCCGTGACCATTGACCGGGTCA
TGAGCTATTTAAACGCCAGCATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTA
TAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAG
TGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGTCCGAGCTGACCC
AGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAGGTCCTACTA
CGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACAACAGGCCCTCCGGC
ATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGACG
AGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGT
GGGCCATGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGA
GGAGGAGTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCGACGACTACGGCA
TGTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGAACGGCGGATCCACCGG
CTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAAC
TCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGTTCGACTACTGGGGACAGG
GCACCCTGGTGACCGTGTCCAGG(SEQ ID NO:226)。

[2170] 示例性的F型多链嵌合多肽

[2171] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到IL-7(例如人可溶性IL-7)的受体、CD16(例如抗CD16 scFv)或IL-21(例如人可溶性IL-21)的受体。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括其它靶标结合域。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括其它靶标结合域。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域特异性结合到CD16或IL-21的受体。

[2172] 在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2173] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域和亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2174] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对中的第二域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2175] 在一些实施例中,第二嵌合多肽在第二嵌合多肽的N端或C端进一步包含一个或多个其它靶标结合域。

[2176] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域和亲和域对中的第二域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与其它靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2177] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中直接彼此邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的第二靶标结合域与其它靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2178] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对可以是本文所述的任一种示例性亲和域对。

[2179] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和其它抗原结合域中的一个或多个是激动性抗原结合域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和其它抗原结合域各自是激动性抗原结合域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,抗原结合域包括scFv或单域抗体。

[2180] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到受体IL-7,而第二靶标结合域特异性结合到CD16或IL-21的受体。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域包括可溶性IL-7蛋白。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性IL-7蛋白是人可溶性IL-7。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二抗原结合域包括特异性结合到CD16的靶标结合域。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域包括特异性结合到CD16的scFv。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域特异性结合到IL-21的受体。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域包括可溶性IL-21。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性IL-21是人可溶性IL-21。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括特异性结合到IL-21的受体的其它靶标结合域。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域包括可溶性IL-21。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性IL-21是人可溶性IL-21。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括特异性结合到CD16的其它靶标结合域。

[2181] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的抗原。在一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的表位。在一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个包含相同的氨基酸序列。

[2182] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域包括可溶性IL-7(例如人可溶性IL-7)。

[2183] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-7包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2184] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEH(SEQ ID NO:79)。

[2185] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-7由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2186] GATTGTGATATTGAAGGTAAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATTATTGGACAGCATGAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCTGAATAATGAATTTAACTTTTTTAAAAGACATATCTGTGATGCTAATAAGGAAGGTATGTTTTTATTCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCTTAAAATGAATAGCACTGGTGATTTTGATCTCCACTTATTAAAAGTTTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACTGGCCAGGTTAAAGGAAGAAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGCCCAACCAACAAAGAGTTTGGAAGAAAATAAATCTTTAAAGGAACAGAAAAAACTGAATGACTTGTGTTTCCTAAAGAGACTATTACAAGAGATAAAAACTTGTTGGAATAAAATTTTGATGGGCACTAAAGAACAC(SEQ ID NO:198)。

[2187] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-7由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2188] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCAT(SEQ ID NO:227)。

[2189] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21的序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2190] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS(SEQ ID NO:83)。

[2191] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2192] CAAGGTCAAGATCGCCACATGATTAGAATGCGTCAACTTATAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTATGTGAATGACTTGGTCCCTGAATTTCTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGACAAACTGTGAGTGGTCAGCTTTTTCCTGTTTTCAGAAGGCCCAACTAAAGTCAGCAAATACAGGAAACAATGAAAGGATAATCAATGTATCAATTAAAAAGCTGAAGAGGAAACCACCTTCCACAAATGCAGGGAGAAGACAGAAACACAGACTAACATGCCCTTCATGTGATTCTTATGAGAAAAAACCACCCAAAGAATTCCTAGAAAGATTCAAATCACTTCTCCAAAAGATGATTCATCAGCATCTGTCCTCTAGAACACACGGAAGTGAAGATTCC(SEQ ID NO:197)。

[2193] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2194] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC(SEQ ID NO:182)。

[2195] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域包括特异性结合到CD16的scFv(例如抗CD16 scFv)。

[2196] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,特异性结合到CD16的scFv包括轻链可变域,所述轻链可变域包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2197] SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVGH(SEQ ID NO:215)。

[2198] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,特异性结合到CD16的scFv由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的轻链可变域序列编码:

[2199] TCCGAGCTGACCCAGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAGGTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACAACAGGCCCTCCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGGGCCAT(SEQ ID NO:216)。

[2200] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,特异性结合到CD16的scFv包括重链可变域,所述重链可变域包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2201] EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLLFDYWGQGTLVTVSR(SEQ ID NO:217)。

[2202] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,特异性结合到CD16的scFv由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的重链可变域序列编码:

[2203] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCGACGACTACGGCATGTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGAACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGG(SEQ ID NO:218)。

[2204] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、

至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2205] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLK MNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNK ILMGTKEHSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVK QTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLR DVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREN WVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSN GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:207)。

[2206] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2207] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCT GCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGAC GCCAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCG ACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCG GAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAG CTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCA AGGAGCATAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCT CGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAA TGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCC GGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGA ATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAAT GTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAG ATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTT TTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGG AAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCA GCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCA CCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCT AGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGT CCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCA GATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:208)。

[2208] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2209] MKWVTFISLLFLFSSAYSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDAN KEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLN DLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEHSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCF YTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVT

VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKS TDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASI HDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:209)。

[2210] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2211] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCGATTGCGACATCGA GGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATC GGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCC TGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAA GGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAG GCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGA AGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCATAGCGGCACAACCAA CACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTT AACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCG AGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGG CAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACC AATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGA CTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTA CTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGC GAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTG AGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGA TTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCC ATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGA ATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGA GCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:210)。

[2212] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2213] SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNT ASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVGHGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLS CAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGRSLLFDYWGQGTLVTVSRITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERII NVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS(SEQ ID NO: 232)。

[2214] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至

少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2215] TCCGAGCTGACCCAGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGG
CGACTCCCTGAGGTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGC
AAGAACAACAGGCCCTCCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCA
CAGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCGG
CGGCGGCACCAAGCTGACCGTGGGCCATGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGAGGATCCGAG
GTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCT
TCACCTTCGACGACTACGGCATGTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAA
CTGGAACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAAC
TCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGC
TGTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGGATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCA
CGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAG
GCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAA
AGTGCATCCGGCAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAA
CTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTC
TCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGA
AGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTC
CTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTG
TCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC(SEQ ID NO:233)。

[2216] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2217] MKWVTFISLLFLFSSAYSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKN
NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVGHGGGGSGGGGSGGGGSEVQ
LVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSL
YLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLLFDYWGQGTLVTVSRITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAG
TSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSC
FQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSS
RTHGSEDS(SEQ ID NO:234)。

[2218] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2219] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCTCCGAGCTGACCCA
GGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAGGTCCTACTAC
GCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACAACAGGCCCTCCGGCA
TCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGACGA
GGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTG
GGCCATGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAG
GAGGAGTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCGACGACTACGGCAT

GTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGAACGGCGGATCCACCGGC
TACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACT
CCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGTTCGACTACTGGGGACAGGG
CACCCTGGTGACCGTGTCCAGGATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGC
TATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCG
AGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGCAGGGCCAGGA
CAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCC
GAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGC
TGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTC
CACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAG
GAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCG
AGGACTCC(SEQ ID NO:235)。

[2220] 示例性的G型多链嵌合多肽

[2221] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到TGFβ(例如人TGFβRII受体)、CD16(例如抗CD16 scFv)或IL-21(例如人可溶性IL-21)的受体。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括其它靶标结合域。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括其它靶标结合域。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域特异性结合到CD16或IL-21的受体。

[2222] 在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2223] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域和亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2224] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对中的第二域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2225] 在一些实施例中,第二嵌合多肽在第二嵌合多肽的N端或C端进一步包含一个或多个其它靶标结合域。

[2226] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域和亲和域对中的第二域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与其它靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2227] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中直接彼此邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包

括介于第二嵌合多肽中的第二靶标结合域与其它靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2228] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对可以是本文所述的任一种示例性亲和域对。

[2229] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和其它抗原结合域中的一个或多个是激动性抗原结合域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和其它抗原结合域各自是激动性抗原结合域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,抗原结合域包括scFv或单域抗体。

[2230] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到TGF-β、CD16或IL-21的受体。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到TGF-β,而第二靶标结合域特异性结合到CD16或IL-21的受体。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域是可溶性TGF-β受体。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性TGF-β受体是可溶性TGFβRII受体。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域特异性结合到CD16。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二抗原结合域包括特异性结合到CD16的抗原结合域。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二抗原结合域包括特异性结合到CD16的scFv。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域特异性结合到IL-21的受体。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域包括可溶性IL-21。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域包括人可溶性IL-21。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括特异性结合到IL-21的受体的其它靶标结合域。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域包括可溶性IL-21。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性IL-21是人可溶性IL-21。在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括特异性结合到CD16的其它靶标结合域。

[2231] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的抗原。在一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的表位。在一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个包含相同的氨基酸序列。

[2232] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域包括TGFβRII受体(例如人可溶性TGFβRII受体)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII包括人可溶性TGFRβRII的第一序列和人可溶性TGFRβRII的第二序列。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII包括安置于人可溶性TGFRβRII的第一序列与人可溶性TGFRβRII的第二序列之间的接头。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,接头包括序列GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:102)。

[2233] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第一序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少

90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2234] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID NO:183)。

[2235] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第二序列包含与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2236] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID NO:184)。

[2237] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第一序列由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2238] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGAT(SEQ ID NO:185)。

[2239] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第二序列由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2240] ATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:186)。

[2241] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性TGF-β受体包括与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2242] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND

ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQID NO:188)。

[2243] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFβRII受体由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2244] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:187)。

[2245] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21的序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2246] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS(SEQ ID NO:83)。

[2247] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2248] CAAGGTCAAGATCGCCACATGATTAGAATGCGTCAACTTATAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTATGTGAATGACTTGGTCCCTGAATTTCTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGACAAACTGTGAGTGGTCAGCTTTTTCCTGTTTTCAGAAGGCCCAACTAAAGTCAGCAAATACAGGAAACAATGAAAGGATAATCAATGTATCAATTAAAAAGCTGAAGAGGAAACCACCTTCCACAAATGCAGGGAGAAGACAGAAACACAGACTAACATGCCCTTCATGTGATTCTTATGAGAAAAAACCACCCAAAGAATTCCTAGAAAGATTCAAATCACTTCTCCAAAAGATGATTCATCAGCATCTGTCCTCTAGAACACACGGAAGTGAAGATTCC(SEQ ID NO:197)。

[2249] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2250] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCC

TGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGC
TGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTA
CGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCC
TCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC(SEQ ID NO:182)。

[2251] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,特异性结合到CD16的scFv包括轻链可变域,所述轻链可变域包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2252] SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNT
ASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVGH(SEQ ID NO:215)。

[2253] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,特异性结合到CD16的scFv由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的轻链可变域序列编码:

[2254] TCCGAGCTGACCCAGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGG
CGACTCCCTGAGGTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGC
AAGAACAACAGGCCCTCCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCA
CAGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCGG
CGGCGGCACCAAGCTGACCGTGGGCCAT(SEQ ID NO:216)。

[2255] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,特异性结合到CD16的scFv包括重链可变域,所述重链可变域包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2256] EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLLFDYWGQGTLVTVSR(SEQ ID NO:217)。

[2257] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,特异性结合到CD16的scFv由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的重链可变域序列编码:

[2258] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGC
TGCCTCCGGCTTCACCTTCGACGACTACGGCATGTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTG
TCCGGCATCAACTGGAACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACA
ACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGG
CAGGTCCCTGCTGTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGG(SEQ ID NO:218)。

[2259] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2260] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGG

GSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSGTTNTVAA
YNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVES
TGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSS
SSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQS
MHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEK
NIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:236)。

[2261] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2262] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAA
GTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGC
AGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCC
TGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCAT
CATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATC
ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTG
GGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATT
TCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGG
AAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCAT
GAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATC
TTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGA
AGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCAC
CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAA
GATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCG
AGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTT
TGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTC
AGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGA
CAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGT
GATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTC
CGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCA
CTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTA
TCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTC
TGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:237)。

[2263] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2264] MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI

TSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF
SEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS
EEYNTSNPDSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDV
KQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSL
RDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSS
NGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQID NO:238)。

[2265] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2266] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCATGT
GCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTC
TGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGA
AGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCC
CAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCC
GGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACA
CCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCA
GAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGC
GATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGC
CTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAA
GCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGC
GAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCA
GCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCAT
CCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCC
AAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCG
CCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCC
CGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTG
AATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCA
AAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGA
GTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAAT
AGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCA
TCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGT
GCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGAC
GCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAG
AGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGT
CCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:239)。

[2267] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一

致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2268] SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVGHGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLLFDYWGQGTLVTVSRITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS(SEQ ID NO:232)。

[2269] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2270] TCCGAGCTGACCCAGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAGGTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACAACAGGCCCTCCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGGGCCATGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCGACGACTACGGCATGTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGAACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGGATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGCAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC(SEQ ID NO:233)。

[2271] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:MKWVTFISLLFLFSSAYSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVGHGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLLFDYWGQGTLVTVSRITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS(SEQ ID NO:234)。

[2272] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少

84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2273] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCTCCGAGCTGACCCAGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAGGTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACAACAGGCCCTCCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGGGCCATGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCGACGACTACGGCATGTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGAACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGGATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGCAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC(SEQ ID NO:235)。

[2274] 示例性的H型多链嵌合多肽

[2275] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到IL-7的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2276] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域和亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2277] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对中的第二域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2278] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对可以是本文所述的任一种示例性亲和域对。

[2279] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独

立地特异性结合到IL-7的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域包括相同的氨基酸序列。

[2280] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域包括可溶性IL-7(例如人可溶性IL-7)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-7包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2281] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEH(SEQ ID NO:79)。

[2282] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-7由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2283] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCAT(SEQ ID NO:227)。

[2284] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2285] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEHSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:207)。

[2286] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2287] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAG

CTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCA
AGGAGCATAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCT
CGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAA
TGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCC
GGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGA
ATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAAT
GTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAG
ATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTT
TTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGG
AAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCA
GCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCA
CCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCT
AGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGT
CCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCA
GATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:208)。

[2288] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2289] MKWVTFISLLFLFSSAYSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDAN
KEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLN
DLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEHSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCF
YTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVT
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKS
TDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASI
HDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:209)。

[2290] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2291] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCGATTGCGACATCGA
GGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATC
GGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCC
TGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAA
GGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAG
GCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGA
AGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCATAGCGGCACAACCAA
CACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTT
AACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCG
AGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGG
CAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACC

AATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGA
CTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTA
CTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGC
GAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTG
AGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGA
TTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCC
ATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGA
ATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGA
GCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ
ID NO:210)。

[2292] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2293] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLK
MNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNK
ILMGTKEHITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR(SEQ
ID NO:203)。

[2294] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2295] GATTGTGATATTGAAGGTAAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATT
ATTGGACAGCATGAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCTGAATAATGAATTTAACTTTTTTAAAAGACATATCTGTGAT
GCTAATAAGGAAGGTATGTTTTTATTCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCTTAAAATGAATAGCACTGGTG
ATTTTGATCTCCACTTATTAAAAGTTTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACTGGCCAGGTTAAAGGAAG
AAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGCCCAACCAACAAAGAGTTTGGAAGAAAATAAATCTTTAAAGGAACAGAAAAAA
CTGAATGACTTGTGTTTCCTAAAGAGACTATTACAAGAGATAAAAACTTGTTGGAATAAAATTTTGATGGGCACTA
AAGAACACATCACGTGCCCTCCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTC
CAGGGAGCGGTACATTTGTAACTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAAC
AAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA(SEQ ID NO:204)。

[2296] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2297] MKWVTFISLLFLFSSAYSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDAN
KEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLN
DLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEHITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKA
TNVAHWTTPSLKCIR(SEQ ID NO:250)。

[2298] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2299] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCGATTGCGACATCGA GGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATC GGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCC TGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAA GGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAG GCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGA AGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCATATTACATGCCCCCC TCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAAC AGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACT GGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG(SEQ ID NO:251)。

[2300] 示例性的I型多链嵌合多肽

[2301] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到TGF-β。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2302] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域和亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2303] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对中的第二域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2304] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对可以是本文所述的任一种示例性亲和域对。

[2305] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到TGF-β。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域包括相同的氨基酸序列。

[2306] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域是可溶性TGF-β受体(例如可溶性TGFβRII受体,例如人可溶性TGFβRII)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII包括人可溶性TGFRβRII的第一序列和人可溶性TGFRβRII的第二序列。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII包括安置于人可溶性TGFRβRII的第一序列与人可溶性TGFRβRII的第二序列之间的接头。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,接头包括序列GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:102)。

[2307] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第一序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少

90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2308] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID NO:183)。

[2309] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第二序列包含与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2310] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID NO:184)。

[2311] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第一序列由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2312] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGAT(SEQ ID NO:185)。

[2313] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第二序列由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2314] ATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:186)。

[2315] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性TGF-β受体包括与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2316] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND

ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQID NO:188)。

[2317] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性TGF-β受体由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:187)。

[2318] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2319] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:236)。

[2320] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2321] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATT

TCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGG
AAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCAT
GAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATC
TTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGA
AGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCAC
CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAA
GATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCG
AGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTT
TGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTC
AGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGA
CAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGT
GATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTC
CGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCA
CTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTA
TCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTC
TGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:237)。

[2322] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2323] MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI
TSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF
SEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS
EEYNTSNPDSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDV
KQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSL
RDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSS
NGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQID NO:238)。

[2324] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2325] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCATGT
GCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTC
TGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGA
AGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCC
CAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCC
GGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACA

CCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCA
GAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGC
GATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGC
CTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAA
GCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGC
GAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCA
GCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCAT
CCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCC
AAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCG
CCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCC
CGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTG
AATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCA
AAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGA
GTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAAT
AGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCA
TCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGT
GCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGAC
GCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAG
AGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGT
CCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:239)。

[2326] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2327] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGG
GSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDITCPPPMSV
EHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR(SEQ ID NO:193)。

[2328] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2329] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAA
GTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGC
AGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCC
TGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCAT
CATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATC
ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTG
GGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATT
TCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCC

ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGG
AAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCAT
GAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATC
TTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCT
GGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAG
CAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG
(SEQ ID NO:257)。

[2330] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2331] MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI
TSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF
SEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS
EEYNTSNPDITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR
(SEQ ID NO:195)。

[2332] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2333] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCATGT
GCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTC
TGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGA
AGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCC
CAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCC
GGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACA
CCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCA
GAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGC
GATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGC
CTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAA
GCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGC
GAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCA
GCAACCCCGACATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTA
CAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTG
AATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG(SEQ ID NO:259)。

[2334] 示例性的J型多链嵌合多肽

[2335] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到IL-7的受体、IL-21的受体或CD137L的受体。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括其它靶标结合域。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域特异性结合到IL-21(例如可溶性

IL-21,例如人可溶性IL-21)的受体或CD137L(例如可溶性CD137L,例如人可溶性CD137L)的受体。

[2336] 在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2337] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域和亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2338] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对中的第二域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2339] 在一些实施例中,第二嵌合多肽在第二嵌合多肽的N端或C端进一步包含一个或多个其它靶标结合域。

[2340] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域和亲和域对中的第二域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与其它靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2341] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中直接彼此邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的第二靶标结合域与其它靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2342] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对可以是本文所述的任一种示例性亲和域对。

[2343] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括其它靶标结合域。在一些实施例中,其它靶标结合域和

[2344] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和其它靶标结合域中的一个或多个是激动性抗原结合域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和其它靶标结合域各自是激动性抗原结合域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,抗原结合域包括scFv或单域抗体。

[2345] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到IL-7的受体,而第二靶标结合域特异性结合到IL-21的受体或CD137L的受体。在一些实施例中,其它靶标结合域特异性结合到IL-21的受体或CD137L的受体。

[2346] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域是可溶性IL-7(例如人可溶性IL-7)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-7包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少

92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2347] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLF

[2348] RAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEH(SEQ ID NO:79)。

[2349] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-7由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2350] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCAT(SEQ ID NO:227)。

[2351] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域或其它靶标结合域特异性结合到IL-21的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域或其它靶标结合域是可溶性IL-21(例如人可溶性IL-21)。

[2352] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21包括与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2353] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS(SEQ ID NO:83)。

[2354] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2355] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC(SEQ ID NO:182)。

[2356] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域特异性结合到CD137L的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包含特异性结合到CD137L的受体的其它靶标结合域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域和/或其它靶标结合域是可溶性CD137L(例如人可溶性CD137L)。

[2357] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性CD137L包括与以下至少80％一致

(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2358] REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE(SEQ ID NO:260)。

[2359] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性CD137L由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2360] CGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATCCCAGCCGGACTCCCTTCACCGAGGTCGGAA(SEQ ID NO:261)。

[2361] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性CD137L包括与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2362] DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI(SEQ ID NO:262)。

[2363] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性CD137L由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2364] GATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATC(SEQ ID NO:263)。

[2365] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2366] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLK MNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNK ILMGTKEHSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVK QTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLR DVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREN WVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSN GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:207)。

[2367] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2368] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCT GCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGAC GCCAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCG ACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCG GAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAG CTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCA AGGAGCATAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCT CGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAA TGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCC GGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGA ATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAAT GTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAG ATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTT TTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGG AAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCA GCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCA CCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCT AGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGT CCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCA GATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:208)。

[2369] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2370] MKWVTFISLLFLFSSAYSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDAN KEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLN DLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEHSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCF YTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVT VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKS TDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASI

HDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:209)。

[2371] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2372] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCGATTGCGACATCGA
GGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATC
GGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCC
TGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAA
GGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAG
GCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGA
AGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCATAGCGGCACAACCAA
CACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTT
AACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCG
AGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGG
CAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACC
AATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGA
CTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTA
CTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGC
GAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTG
AGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGA
TTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCC
ATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGA
ATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGA
GCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ
ID NO:210)。

[2373] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:QGQDRHMIRMRQLIDI
VDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLT
CPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDSITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKR
KAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRGGGGSGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVL
LIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA
ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
(SEQ ID NO:268)。

[2374] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2375] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTA
CGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCC

TGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGC
TGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTA
CGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCC
TCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCCATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGA
AGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCT
CACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGGGCGGT
GGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCTCGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCG
GCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAG
CTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTG
GTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAG
GCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGA
CCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGC
CAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCT
TGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATCCCAGCCGGACTCCCTTCACCGAGGTCGGAA(SEQ ID NO:269)。

[2376] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2377] MKWVTFISLLFLFSSAYSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCF
QKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSR
THGSEDSITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRGGGG
SGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV
AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR
LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE(SEQ ID NO:270)。

[2378] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2379] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCCAGGGCCAGGACAG
GCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAG
TTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGA
AGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCAC
AAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAG
TTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGG
ACTCCATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCG
GGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAG
GCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGGGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCT
CCGGCGGCGGAGGATCTCGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGG
CATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTG
GCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCT
ACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCA

CCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAG
GCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTC
ACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCC
CGAAATCCCAGCCGGACTCCCTTCACCGAGGTCGGAA(SEQ ID NO:271)。

[2380] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2381] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIIN
VSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDSITCPPPMSVEH
ADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRGGGGSGGGGSGGGGSDPAGLLD
LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS
LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF
RVTPEI(SEQ ID NO:272)。

[2382] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2383] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTA
CGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCC
TGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGC
TGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTA
CGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCC
TCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCCATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGA
AGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCT
CACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGGGCGGT
GGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCTGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGT
TTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGG
CGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTAT
GTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGC
AGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCG
GAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACT
GAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAA
TC(SEQ ID NO:273)。

[2384] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2385] MKWVTFISLLFLFSSAYSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCF
QKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSR
THGSEDSITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRGGGG
SGGGGSGGGGSDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF

FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI(SEQ ID NO:274)。

[2386] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2387] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCCAGGGCCAGGACAG GCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAG TTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGA AGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCAC AAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAG TTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGG ACTCCATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCG GGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAG GCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGGGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCT CCGGCGGCGGAGGATCTGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAA TGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTG AGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGC GGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGG GGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAG GGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCT GGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATC(SEQ ID NO:275)。

[2388] 示例性的K型多链嵌合多肽

[2389] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到IL-7的受体或TGF-β。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2390] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域和亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2391] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对中的第二域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2392] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对可以是本文所述的任一种示例性亲和域对。

[2393] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到IL-7的受

体,而第二靶标结合域特异性结合到TGF-β。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到TGF-β,而第二靶标结合域特异性结合到IL-7的受体。

[2394] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域包括可溶性IL-7蛋白(例如人可溶性IL-7蛋白)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-7蛋白包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2395] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLF

[2396] RAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEH(SEQ ID NO:79)。

[2397] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-7由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2398] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCAT(SEQ ID NO:227)。

[2399] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域包含特异性结合到TGF-β的靶标结合域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域是可溶性TGF-β受体(例如可溶性TGFβRII受体,例如人可溶性TGFβRII受体)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII包括人可溶性TGFRβRII的第一序列和人可溶性TGFRβRII的第二序列。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII包括安置于人可溶性TGFRβRII的第一序列与人可溶性TGFRβRII的第二序列之间的接头。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,接头包括序列GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:102)。

[2400] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第一序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2401] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID NO:183)。

[2402] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第二序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2403] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKN

DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID NO:184)。

[2404] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第一序列由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2405] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGAT(SEQ ID NO:185)。

[2406] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第二序列由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2407] ATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:186)。

[2408] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性TGF-β受体包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2409] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQID NO:188)。

[2410] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性TGF-β受体由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2411] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCAT

CATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATC
ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTG
GGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATT
TCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGG
AAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCAT
GAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATC
TTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:187)。

[2412] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2413] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLK
MNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNK
ILMGTKEHSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVK
QTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLR
DVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREN
WVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSN
GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:207)。

[2414] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2415] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCT
GCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGAC
GCCAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCG
ACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCG
GAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAG
CTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCA
AGGAGCATAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCT
CGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAA
TGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCC
GGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGA
ATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAAT
GTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAG
ATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTT
TTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGG
AAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCA
GCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCA
CCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCT
AGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGT

CCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCA
GATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:208)。

[2416] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2417] MKWVTFISLLFLFSSAYSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDAN
KEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLN
DLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEHSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCF
YTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVT
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKS
TDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASI
HDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:209)。

[2418] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2419] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCGATTGCGACATCGA
GGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATC
GGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCC
TGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAA
GGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAG
GCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGA
AGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCATAGCGGCACAACCAA
CACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTT
AACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCG
AGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGG
CAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACC
AATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGA
CTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTA
CTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGC
GAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTG
AGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGA
TTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCC
ATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGA
ATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGA
GCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ
ID NO:210)。

[2420] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2421] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR(SEQ ID NO:193)。

[2422] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2423] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG(SEQ ID NO:257)。

[2424] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2425] MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR(SEQ ID NO:195)。

[2426] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2427] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCC

CAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCC
GGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACA
CCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCA
GAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGC
GATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGC
CTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAA
GCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGC
GAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCA
GCAACCCCGACATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTA
CAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTG
AATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG(SEQ ID NO:259)。

[2428] 示例性的L型多链嵌合多肽

[2429] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到TGF-β、IL-21的受体或CD137L的受体。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括其它靶标结合域。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域特异性结合到IL-21(例如可溶性IL-21,例如人可溶性IL-21)的受体或CD137L(例如可溶性CD137L,例如人可溶性CD137L)的受体。

[2430] 在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2431] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域和亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2432] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对中的第二域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2433] 在一些实施例中,第二嵌合多肽在第二嵌合多肽的N端或C端进一步包含一个或多个其它靶标结合域。

[2434] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域和亲和域对中的第二域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与其它靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2435] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中直接彼此邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的第二靶标结合域与其它靶标结合域之间的接头序列(例如本文所

述的任一种示例性接头)。

[2436] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对可以是本文所述的任一种示例性亲和域对。

[2437] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和其它靶标结合域中的一个或多个是激动性抗原结合域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域、第二靶标结合域和其它靶标结合域各自是激动性抗原结合域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,抗原结合域包括scFv或单域抗体。

[2438] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到TGF-β,而第二靶标结合域特异性结合到IL-21的受体或CD137L的受体。

[2439] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域是可溶性TGF-β受体(例如可溶性TGFβRII受体,例如人可溶性TGFβRII受体)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII包括人可溶性TGFRβRII的第一序列和人可溶性TGFRβRII的第二序列。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII包括安置于人可溶性TGFRβRII的第一序列与人可溶性TGFRβRII的第二序列之间的接头。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,接头包括序列GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:102)。

[2440] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第一序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2441] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID NO:183)。

[2442] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第二序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2443] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID NO:184)。

[2444] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第一序列由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2445] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATC

ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGAT(SEQ ID NO:185)。

[2446] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第二序列由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2447] ATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:186)。

[2448] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性TGF-β受体包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2449] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQID NO:188)。

[2450] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性TGF-β受体由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2451] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:187)。

[2452] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域或其它靶标结合域特异性结合到IL-21的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域或其它靶标结合域包括可溶性IL-21(例如人可溶性IL-21)。

[2453] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2454] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS(SEQ ID NO:83)。

[2455] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性IL-21由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2456] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC(SEQ ID NO:182)。

[2457] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域或其它靶标结合域特异性结合到CD137L的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域和/或其它靶标结合域包括可溶性CD137L(例如人可溶性CD137L)。

[2458] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性CD137L包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2459] REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE(SEQ ID NO:260)。

[2460] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性CD137L由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2461] CGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATCCCAGCCGGACTCCCTTCACCGAGGTCGGAA(SEQ ID NO:261)。

[2462] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性CD137L包括与以下至少80%一致(例如至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少96%一致、至少97%一致、至少

98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2463] DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQL ELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEI(SEQ ID NO:262)。

[2464] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性CD137L由与以下至少80％一致(例如至少85％一致、至少90％一致、至少95％一致、至少96％一致、至少97％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2465] GATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCT GATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAA GAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGG TGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGC CCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTG CTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTA CCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATC(SEQ ID NO:263)。

[2466] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2467] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKN DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGG GSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSGTTNTVAA YNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVES TGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSS SSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQS MHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEK NIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:236)。

[2468] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2469] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAA GTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGC AGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCC TGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCAT CATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATC ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTG GGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATT TCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCC ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGG AAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCAT

GAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATC
TTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGA
AGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCAC
CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAA
GATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCG
AGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTT
TGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTC
AGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGA
CAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGT
GATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTC
CGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCA
CTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTA
TCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTC
TGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:237)。

[2470] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2471] MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI
TSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF
SEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS
EEYNTSNPDSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDV
KQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSL
RDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSS
NGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQID NO:238)。

[2472] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2473] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCATGT
GCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTC
TGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGA
AGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCC
CAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCC
GGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACA
CCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCA
GAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGC
GATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGC

CTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAA
GCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGC
GAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCA
GCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCAT
CCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCC
AAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCG
CCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCC
CGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTG
AATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCA
AAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGA
GTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAAT
AGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCA
TCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGT
GCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGAC
GCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAG
AGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGT
CCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:239)。

[2474] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2475] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIIN
VSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDSITCPPPMSVEH
ADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRGGGGSGGGGSGGGGSREGPELS
PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVV
AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT
QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE(SEQ ID NO:268)。

[2476] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2477] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTA
CGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCC
TGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGC
TGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTA
CGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCC
TCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCCATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGA
AGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCT
CACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGGGCGGT
GGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCTCGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCG
GCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAG

CTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTG
GTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAG
GCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGA
CCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGC
CAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCT
TGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATCCCAGCCGGACTCCCTTCACCGAGGTCGGAA(SEQ ID NO:269)

[2478] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2479] MKWVTFISLLFLFSSAYSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCF
QKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSR
THGSEDSITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRGGGG
SGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV
AKAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR
LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE(SEQ ID NO:270)。

[2480] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2481] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCCAGGGCCAGGACAG
GCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAG
TTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGA
AGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCAC
AAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAG
TTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGG
ACTCCATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCG
GGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAG
GCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGGGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCT
CCGGCGGCGGAGGATCTCGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGG
CATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTG
GCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCT
ACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCA
CCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAG
GCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTC
ACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCC
CGAAATCCCAGCCGGACTCCCTTCACCGAGGTCGGAA(SEQ ID NO:271)

[2482] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2483] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIIN

VSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDSITCPPPMSVEH
ADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRGGGGSGGGGSGGGGSDPAGLLD
LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS
LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF
RVTPEI(SEQ ID NO:272)。

[2484] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2485] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTA
CGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCC
TGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGC
TGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTA
CGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCC
TCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCCATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGA
AGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCT
CACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGGGCGGT
GGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCTGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGT
TTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGG
CGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTAT
GTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGC
AGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCG
GAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACT
GAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAA
TC(SEQ ID NO:273)。

[2486] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2487] MKWVTFISLLFLFSSAYSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCF
QKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSR
THGSEDSITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRGGGG
SGGGGSGGGGSDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYYVF
FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA
RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI(SEQ ID NO:274)。

[2488] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2489] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCCAGGGCCAGGACAG
GCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAG
TTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGA

AGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCAC
AAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAG
TTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGG
ACTCCATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCG
GGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAG
GCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGGGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCT
CCGGCGGCGGAGGATCTGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAA
TGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTG
AGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGC
GGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGG
GGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAG
GGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCT
GGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATC(SEQ ID NO:275)。

[2490] 示例性的M型多链嵌合多肽

[2491] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到TGF-β或IL-21的受体。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括其它靶标结合域。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域特异性结合到IL-21(例如可溶性IL-21,例如人可溶性IL-21)的受体或TGF-β(例如可溶性TGF-β受体,例如可溶性TGFβRII受体)。

[2492] 在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2493] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域和亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2494] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对中的第二域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2495] 在一些实施例中,第二嵌合多肽在第二嵌合多肽的N端或C端进一步包含一个或多个其它靶标结合域。

[2496] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域和亲和域对中的第二域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与其它靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2497] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中直接彼此邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包

括介于第二嵌合多肽中的第二靶标结合域与其它靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2498] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对可以是本文所述的任一种示例性亲和域对。

[2499] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到TGF-β,而第二靶标结合域特异性结合到TGF-β或IL-21的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域是可溶性TGF-β受体(例如可溶性TGFβRII受体,例如人可溶性TGFβRII受体)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII包括人可溶性TGFRβRII的第一序列和人可溶性TGFRβRII的第二序列。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII包括安置于人可溶性TGFRβRII的第一序列与人可溶性TGFRβRII的第二序列之间的接头。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,接头包括序列GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:102)。

[2500] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第一序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2501] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID NO:183)。

[2502] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第二序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2503] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID NO:184)。

[2504] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第一序列由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2505] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGAT(SEQ ID NO:185)。

[2506] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第二序列由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少

90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2507] ATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:186)。

[2508] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性TGF-β受体包括与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2509] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQID NO:188)。

[2510] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性TGF-β受体由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2511] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:187)。

[2512] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域特异性结合到IL-21的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域包括可溶性IL-21(例如人可溶性IL-21)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性IL-21包括与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2513] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS(SEQ ID NO:83)。

[2514] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性IL-21由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC(SEQ ID NO:182)。

[2515] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2516] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:236)。

[2517] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2518] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGA

AGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCAC
CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAA
GATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCG
AGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTT
TGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTC
AGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGA
CAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGT
GATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTC
CGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCA
CTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTA
TCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTC
TGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:237)。

[2519] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2520] MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI
TSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF
SEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS
EEYNTSNPDSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDV
KQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSL
RDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSS
NGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQID NO:238)。

[2521] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2522] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCATGT
GCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTC
TGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGA
AGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCC
CAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCC
GGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACA
CCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCA
GAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGC
GATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGC
CTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAA
GCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGC

GAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCA
GCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCAT
CCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCC
AAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCG
CCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCC
CGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTG
AATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCA
AAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGA
GTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAAT
AGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCA
TCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGT
GCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGAC
GCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAG
AGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGT
CCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:239)。

[2523] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2524] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGG
GSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDITCPPPMSV
EHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRQGQDRHMIRMRQLIDIVDQL
KNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSC
DSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS(SEQ ID NO:300)。

[2525] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2526] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAA
GTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGC
AGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCC
TGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCAT
CATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATC
ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTG
GGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATT
TCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGG
AAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCAT
GAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATC

TTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCT
GGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAG
CAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG
CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACG
ACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCA
GAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGG
AAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGA
AGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGAC
CCACGGCTCCGAGGACTCC(SEQ ID NO:301)。

[2527] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2528] MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI
TSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF
SEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS
EEYNTSNPDITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRQG
QDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKP
PSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS(SEQ ID NO:302)。

[2529] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2530] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCATGT
GCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTC
TGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGA
AGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCC
CAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCC
GGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACA
CCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCA
GAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGC
GATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGC
CTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAA
GCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGC
GAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCA
GCAACCCCGACATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTA
CAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTG
AATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGCAGGGCCAGGACAGGCACATGA
TCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCC
TGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCC

AACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCG GCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGA GAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC(SEQ ID NO:303)。

[2531] 示例性的N型多链嵌合多肽

[2532] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到TGF-β或CD16。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括其它靶标结合域。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,所述其它靶标结合域特异性结合到CD16(例如抗CD16 scFv)或TGF-β(例如可溶性TGF-β受体,例如可溶性TGFβRII受体)。

[2533] 在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2534] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域和亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2535] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对中的第二域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2536] 在一些实施例中,第二嵌合多肽在第二嵌合多肽的N端或C端进一步包含一个或多个其它靶标结合域。

[2537] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域和亲和域对中的第二域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与其它靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2538] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中直接彼此邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的第二靶标结合域与其它靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2539] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对可以是本文所述的任一种示例性亲和域对。

[2540] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到TGF-β,而第二靶标结合域特异性结合到TGF-β或CD16。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域是可溶性TGF-β受体(例如可溶性TGFβRII受体,例如人可溶性TGFβRII受体)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII包括人可溶性TGFRβRII的第一序列和人

可溶性TGFRβRII的第二序列。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII包括安置于人可溶性TGFRβRII的第一序列与人可溶性TGFRβRII的第二序列之间的接头。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,接头包括序列GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:102)。

[2541] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第一序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2542] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID NO:183)。

[2543] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第二序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2544] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID NO:184)。

[2545] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第一序列由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2546] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGAT(SEQ ID NO:185)。

[2547] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第二序列由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2548] ATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:186)。

[2549] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性TGF-β受体包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少

92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2550] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQID NO:188)。

[2551] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性TGF-β受体由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2552] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:187)。

[2553] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域特异性结合到CD16。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域包括抗CD16 scFv。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,特异性结合到CD16的scFv包括轻链可变域,所述轻链可变域包括与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2554] SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVGH(SEQ ID NO:215)。

[2555] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,特异性结合到CD16的scFv由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的轻链可变域序列编码：

[2556] TCCGAGCTGACCCAGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAGGTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACAACAGGCCCTCCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCGG

CGGCGGCACCAAGCTGACCGTGGGCCAT(SEQ ID NO:216)。

[2557] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,特异性结合到CD16的scFv包括重链可变域,所述重链可变域包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2558] EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLLFDYWGQGTLVTVSR(SEQ ID NO:217)。

[2559] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,特异性结合到CD16的scFv由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的重链可变域序列编码:

[2560] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCGACGACTACGGCATGTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGAACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGG(SEQ ID NO:218)。

[2561] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2562] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:236)。

[2563] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2564] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCC

ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGG
AAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCAT
GAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATC
TTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGA
AGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCAC
CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAA
GATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCG
AGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTT
TGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTC
AGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGA
CAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGT
GATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTC
CGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCA
CTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTA
TCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTC
TGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:237)。

[2565] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2566] MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI
TSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF
SEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS
EEYNTSNPDSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDV
KQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSL
RDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSS
NGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQID NO:238)。

[2567] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2568] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCATGT
GCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTC
TGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGA
AGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCC
CAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCC
GGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACA
CCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCA

GAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGC
GATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGC
CTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAA
GCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGC
GAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCA
GCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCAT
CCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCC
AAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCG
CCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCC
CGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTG
AATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCA
AAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGA
GTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAAT
AGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCA
TCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGT
GCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGAC
GCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAG
AGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGT
CCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:239)。

[2569] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2570] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGG
GSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDITCPPPMSV
EHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRSELTQDPAVSVALGQTVRIT
CQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHV
VFGGGTKLTVGHGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVS
GINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLLFDYWGQGTLVTVSR(SEQ ID
NO:308)。

[2571] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2572] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAA
GTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGC
AGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCC
TGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCAT
CATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATC

ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTG
GGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATT
TCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGG
AAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCAT
GAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATC
TTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCT
GGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAG
CAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG
TCCGAGCTGACCCAGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCC
TGAGGTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACAA
CAGGCCCTCCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCT
CAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCGGCGGCGGCA
CCAAGCTGACCGTGGGCCATGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGAGGATCCGAGGTGCAGCT
GGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTTCACCTTC
GACGACTACGGCATGTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGAACG
GCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTA
CCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGTTCGAC
TACTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGG(SEQ ID NO:309)。

[2573] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2574] MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI
TSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF
SEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS
EEYNTSNPDITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRSE
LTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQA
EDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVGHGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDD
YGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLLFDYW
GQGTLVTVSR(SEQ ID NO:310)。

[2575] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2576] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCATGT
GCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTC
TGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGA
AGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCC
CAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCC

GGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACA
CCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCA
GAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGC
GATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGC
CTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAA
GCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGC
GAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCA
GCAACCCCGACATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTA
CAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTG
AATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGTCCGAGCTGACCCAGGACCCTG
CTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAGGTCCTACTACGCCTCCTG
GTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACAACAGGCCCTCCGGCATCCCTGAC
AGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACT
ACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGGGCCATGG
CGGCGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTG
GTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCGACGACTACGGCATGTCCTGGG
TGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGAACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGA
TTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGG
GCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCTGG
TGACCGTGTCCAGG(SEQ ID NO:311)。

[2577] 示例性的O型多链嵌合多肽

[2578] 在本文所述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到TGF-β或CD137L的受体。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括其它靶标结合域。在本文所述的这些多链嵌合多肽的一些实施例中,所述其它靶标结合域特异性结合到TGF-β的受体(例如可溶性TGF-β受体,例如可溶性TGFβRII受体)或CD137L。

[2579] 在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2580] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域和亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2581] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对中的第二域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2582] 在一些实施例中,第二嵌合多肽在第二嵌合多肽的N端或C端进一步包含一个或多

个其它靶标结合域。

[2583] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域和亲和域对中的第二域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与其它靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2584] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,其它靶标结合域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中直接彼此邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括介于第二嵌合多肽中的第二靶标结合域与其它靶标结合域之间的接头序列(例如本文所述的任一种示例性接头)。

[2585] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子域可以是本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,亲和域对可以是本文所述的任一种示例性亲和域对。

[2586] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到TGF-β,而第二靶标结合域特异性结合到CD137L。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域或其它靶标结合域是可溶性TGF-β受体(例如可溶性TGFβRII受体,例如人可溶性TGFβRII受体)。

[2587] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII包括人可溶性TGFRβRII的第一序列和人可溶性TGFRβRII的第二序列。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII包括安置于人可溶性TGFRβRII的第一序列与人可溶性TGFRβRII的第二序列之间的接头。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,接头包括序列GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:102)。

[2588] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第一序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2589] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID NO:183)。

[2590] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第二序列包含与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2591] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID NO:184)。

[2592] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第一序列由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2593] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAA GTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGC AGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCC TGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCAT CATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATC ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGAT(SEQ ID NO:185)。

[2594] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性TGFRβRII受体的第二序列由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2595] ATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAA ATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGC TCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCC TGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCAT CATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATC ATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:186)。

[2596] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性TGF-β受体包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2597] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKN DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGG GSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQID NO: 188)。

[2598] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性TGF-β受体由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2599] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAA GTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGC AGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCC TGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCAT CATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATC ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTG GGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATT TCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCC ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGG AAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCAT

GAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATC TTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:187)。

[2600] 在一些实施例中这些多链嵌合多肽,第二靶标结合域包括可溶性CD137L蛋白(例如人可溶性CD137L蛋白)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性CD137L包括与以下至少80%一致(例如至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少96%一致、至少97%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2601] REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE(SEQ ID NO:260)。

[2602] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性CD137L由与以下至少80%一致(例如至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少96%一致、至少97%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2603] CGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGC GCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTG TCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCT TCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCC ACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAAC TCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGG CCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATCCC AGCCGGACTCCCTTCACCGAGGTCGGAA(SEQ ID NO:261)。

[2604] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性CD137L包括与以下至少80%一致(例如至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少96%一致、至少97%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2605] DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQL ELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEI(SEQ ID NO:262)。

[2606] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,人可溶性CD137L由与以下至少80%一致(例如至少85%一致、至少90%一致、至少95%一致、至少96%一致、至少97%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2607] GATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCT GATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAA GAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGG TGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGC CCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTG CTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTA CCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATC(SEQ ID NO:263)。

[2608] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2609] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKN DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGG GSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSGTTNTVAA YNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVES TGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSS SSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQS MHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEK NIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:236)。

[2610] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2611] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAA GTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGC AGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCC TGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCAT CATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATC ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTG GGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATT TCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCC ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGG AAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCAT GAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATC TTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGA AGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCAC CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAA GATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCG AGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTT TGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTC AGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGA CAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGT GATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTC CGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCA CTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTA TCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTC TGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:237)。

[2612] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一

致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2613] MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQID NO:238)。

[2614] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2615] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC(SEQ ID NO:239)。

[2616] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列:

[2617] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRGGGGSGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE(SEQ ID NO:316)。

[2618] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一致、至少96%一致、至少98%一致、至少99%一致或100%一致)的序列编码:

[2619] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGGGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCTCGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATCCCAGCCGGACTCCCTTCACCGAGGTCGGAA(SEQ ID NO:317)。

[2620] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可包括与以下至少80%一致(例如至少82%一致、至少84%一致、至少86%一致、至少88%一致、至少90%一致、至少92%一致、至少94%一

致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列：

[2621] MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRGGGGSGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE(SEQ ID NO:318)。

[2622] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80％一致(例如至少82％一致、至少84％一致、至少86％一致、至少88％一致、至少90％一致、至少92％一致、至少94％一致、至少96％一致、至少98％一致、至少99％一致或100％一致)的序列编码：

[2623] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGGGGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCTCGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATCCCAGCCGGACTCCCTTCACCGAGGTCGGAA(SEQ ID NO:319)。

[2624] 治疗老年化相关疾病或病状的方法

[2625] 本文提供了治疗有需要的受试者的老年化相关疾病或病状(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性类型的老年化相关疾病或病状)的方法,包括将治疗有效量的一种或多种自然杀手(NK)细胞活化剂(例如本文所述或所属领域中已知的任一种自然杀手

(NK)细胞活化剂)施用于经鉴定患有老年化相关疾病或病状(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性类型的老年化相关疾病或病状)的受试者。

[2626] 本文提供了治疗有需要的受试者的老年化相关疾病或病状(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性类型的老年化相关疾病或病状)的方法,包括将治疗有效量的活化NK细胞(例如本文所述或所属领域中已知的任一种活化NK细胞)施用于经鉴定患有老年化相关疾病或病状(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性类型的老年化相关疾病或病状)的受试者。

[2627] 这些方法的一些实施例进一步包括:获得休眠NK细胞;以及使休眠NK细胞在试管内、在包括一种或多种NK细胞活化剂的液体培养基中接触,其中所述接触引起活化NK细胞产生,随后将所述NK细胞施用于受试者。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是获自受试者的自体NK细胞。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是获自受试者的单倍体NK细胞。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是同种异体休眠NK细胞。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是人造NK细胞。在任何这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是携带嵌合抗原受体或重组T细胞受体的基因工程化NK细胞。

[2628] 在这些方法的一些实例中,液体培养基是无血清液体培养基。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,液体培养基是化学成分确定的液体培养基。这些方法的一些实例进一步包括分离出活化NK细胞(和任选地进一步将治疗有效量的活化NK细胞施用于受试者,例如本文所述的任一种受试者)。在这些方法的一些实施例中,接触步骤进行约2小时至约20天的时段(或本文所述的此范围的任一子范围)。

[2629] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,老年化相关疾病或病状选自以下群组:癌症、自体免疫疾病、代谢疾病、神经退化性疾病、心血管疾病、皮肤病、早衰疾病和脆性疾病。

[2630] 癌症的非限制性实例包括:实体肿瘤、血液肿瘤、肉瘤、骨肉瘤、神经胶母细胞瘤、神经母细胞瘤、黑色素瘤、横纹肌肉瘤、尤文氏肉瘤、骨肉瘤、B细胞赘瘤、多发性骨髓瘤、B细胞淋巴瘤、B细胞非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、骨髓增生异常综合症(MDS)、皮肤T细胞淋巴瘤、视网膜母细胞瘤、胃癌、尿道上皮癌、肺癌、肾细胞癌、胃癌和食道癌、胰脏癌、前列腺癌、乳癌、结肠直肠癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、头颈部鳞状细胞癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、肝癌和肝细胞癌。

[2631] 自体免疫疾病的非限制性实例是1型糖尿病。

[2632] 代谢疾病的非限制性实例包括:肥胖、脂质营养不良和2型糖尿病。

[2633] 神经退化性疾病的非限制性实例包括:阿尔茨海默氏病、帕金森氏病和痴呆。

[2634] 心血管疾病的非限制性实例包括:冠状动脉疾病、动脉粥样硬化和肺动脉高压。

[2635] 皮肤病的非限制性实例包括:伤口愈合、秃发、皱纹、老年性雀斑痣、皮肤变薄、着色性干皮病和先天性角化不良。

[2636] 早衰疾病的非限制性实例包括:早衰和呼奇逊-吉尔福早衰综合症。

[2637] 脆性疾病的非限制性实例包括:脆性、疫苗接种有反应、骨质疏松症和肌肉减少症。

[2638] 在本文所述的任一种老年化相关疾病或病状的一些实施例中,老年化相关疾病或

病状选自以下群组:年龄相关黄斑变性、骨关节炎、脂肪萎缩、特发性肺纤维化、肾脏移植失败、肝纤维化、骨量损失、肌肉减少症、年龄相关的肺组织弹性丧失、骨质疏松症、年龄相关的肾功能障碍,和化学诱发的肾功能障碍。

[2639] 在本文所述的任一种老年化相关疾病或病状的一些实施例中,老年化相关疾病或病状是2型糖尿病或动脉粥样硬化。

[2640] 在本文所述的任一种方法的一些实施例中,受试者已经诊断或鉴定患有老年化相关疾病或病状(例如本文所述的任一种示例性老年化相关疾病或病状)。本文所述的任一种方法的一些实施例可以包括选择经鉴定或诊断患有老年化相关疾病或病状(例如本文所述的任一种示例性老年化相关疾病或病状)的受试者的步骤。

[2641] 在这些方法的一些实施例中,施药使得受试者的靶组织中的衰老细胞数量减少(例如减少至少5%,减少至少10%,减少至少15%,减少至少20%,减少至少25%,减少至少30%,减少至少35%,减少至少40%,减少至少45%,减少至少50%,减少至少55%,减少至少60%,减少至少65%,减少至少70%,减少至少75%,减少至少80%,减少至少85%,减少至少90%,或减少至少95%,或减少约10%至减少约99%,减少约10%至减少约95%,减少约10%至减少约90%,减少约10%到减少约85%,减少约10%至减少约80%,减少约10%到减少约75%,减少约10%至减少约70%,减少约10%到减少约65%,减少约10%至减少约60%,减少约10%到减少约55%,减少约10%至减少约50%,减少约10%到减少约45%,减少约10%至减少约40%,减少约10%到减少约35%,减少约10%至减少约30%,减少约10%至减少约25%,减少约10%至减少约20%,减少约10%至减少约15%,减少约15%至减少约99%,减少约15%至减少约95%,减少约15%至减少约90%,减少约15%至减少约85%,减少约15%至减少约80%,减少约15%至减少约75%,减少约15%至减少约70%,减少约15%至减少约65%,减少约15%至减少约60%,减少约15%至减少约55%,减少约15%至减少约50%,减少约15%至减少约45%,减少约15%至减少约40%,减少约15%至减少约35%,减少约15%至减少约30%,减少约15%至减少约25%,减少约15%至减少约20%,减少约20%至减少约99%,减少约20%至减少约95%,减少约20%至减少约90%,减少约20%到减少约85%,减少约20%至减少约80%,减少约20%到减少约75%,减少约20%至减少约70%,减少约20%到减少约65%,减少约20%至减少约60%,减少约20%至减少约55%,减少约20%到减少约50%,减少约20%至减少约45%,减少约20%到减少约40%,减少约20%到减少约35%,减少约20%到减少约30%,减少约20%至减少约25%,减少约25%至减少约99%,减少约25%至减少约95%,减少约25%至约90%,减少约25%至减少约85%,减少约25%至减少约80%,减少约25%至减少约75%,减少约25%至减少约70%,减少约25%至减少约65%,减少约25%至减少约60%,减少约25%至减少约55%,减少约25%至减少约50%,减少约25%至减少约45%,减少约25%至减少约40%,减少约25%至减少约35%,减少约25%至减少约30%,减少约30%至减少约99%,减少约30%至减少约95%,减少约30%至减少约90%,减少约30%到减少约85%,减少约30%至减少约80%,减少约30%到减少约75%,减少约30%至减少约70%,减少约30%到减少约65%,减少约30%至减少约60%,减少约30%至减少约55%,减少约30%至减少约50%,减少约30%至减少约45%,减少约30%至减少约40%,减少约30%至减少约35%,减少约35%至减少约99%,减少约35%至减少约95%,减少约35%至减少约90%,减少约35%至减少约85%,减少约35%至减少约80%,减少约35%

至减少约75％,减少约35％至减少约70％,减少约35％至减少约65％,减少约35％至减少约60％,减少约35％至减少约55％,减少约35％至减少约50％,减少约35％至减少约45％,减少约35％至减少约40％,减少约40％至减少约99％,减少约40％至减少约95％,减少约40％至减少约90％,减少约40％至减少约85％,减少约40％至减少约80％,减少约40％到减少约75％,减少约40％至减少约70％,减少约40％到减少约65％,减少约40％至减少约60％,减少约40％至减少约55％,减少约40％至减少约50％,减少约40％至减少约45％,减少约45％至减少约99％,减少约45％至减少约95％,减少约45％至减少约90％,减少约45％至减少约85％,减少约45％至减少约80％,减少约45％至减少约75％,减少约45％至减少约70％,减少约45％至减少约65％,减少约45％至减少约60％,减少约45％至减少约55％,减少约45％至减少约50％,减少约50％至减少约99％,减少约50％至减少约95％,减少约50％至减少约90％,减少约50％至减少约85％,减少约50％至减少约80％,减少约50％至减少约75％,减少约50％至减少约70％,减少约50％到减少约65％,减少约50％至减少约60％,减少约50％至减少约55％,减少约55％至减少约99％,减少约55％至减少约95％,减少约55％至减少约90％,减少约55％至减少约85％,减少约55％至减少约80％,减少约55％至减少约75％,减少约55％至减少约70％,减少约55％至减少约65％,减少约55％至减少约60％,减少约60％至减少约99％,减少约60％至减少约95％,减少约60％至减少约90％,减少约60％至减少约85％,减少约60％至减少约80％,减少约60％到减少约75％,减少约60％至减少约70％,减少约60％到减少约65％,减少约65％至减少约99％,减少约65％至减少约95％,减少约65％至减少约90％,减少约65％至减少约85％,减少约65％至减少约80％,减少约65％至减少约75％,减少约65％至减少约70％,减少约70％至减少约99％,减少约70％至减少约95％,减少约70％至减少约90％,减少约70％到减少约85％,减少约70％至减少约80％,减少约70％到减少约75％,减少约75％至减少约99％,减少约75％至减少约95％,减少约75％至减少约90％,减少约75％至减少约85％,减少约75％至减少约80％,减少约80％至减少约99％,减少约80％至减少约95％,减少约80％至减少约90％,减少约80％至减少约85％,减少约85％至减少约99％,减少约85％至减少约95％,减少约85％至减少约90％,减少约90％至减少约99％,减少约90％至减少约95％,或减少约95％至减少约99％),例如相较于受试者在治疗之前的靶组织中的衰老细胞数量。

[2642] 在这些方法的一些实施例中,施药使得受试者的IFN-γ、细胞毒性颗粒颗粒酶和/或穿孔素水平相较于治疗之前的受试者或尚未接受治疗的类似对照受试者的水平增加(例如,至少增加5％,至少增加10％,至少增加15％,至少增加20％,至少增加25％,至少增加30％,至少增加35％,至少增加40％,至少增加45％,至少增加50％,至少增加55％,至少增加60％,至少增加65％,至少增加70％,至少增加75％,至少增加80％,至少增加85％,至少增加90％,至少增加95％,或至少增加99％,或增加约10％至增加约500％(或本文所述的此范围的任一子范围)。

[2643] 在一些实施例中,这些方法能够使受试者的癌症的一种或多种症状的数目、严重程度或频率降低(例如相较于治疗前的受试者的癌症的一种或多种症状的数目、严重程度或频率)。在一些实施例中,这些方法能使得受试者的一种或多种实体肿瘤的体积减少(例如,减少约1％至减少约99％,减少约1％至减少约95％,减少约1％至减少约90％,减少约1％至减少约85％,减少约1％至减少约80％,减少约1％至减少约75％,减少约1％至减少约

70%,减少约1%至减少约65%,减少约1%至减少约60%,减少约1%至减少约55%,减少约1%至减少约50%,减少约1%至减少约45%,减少约1%至减少约40%,减少约1%至减少约35%,减少约1%至减少约30%,减少约1%至减少约25%,减少约1%至减少约20%,减少约1%至减少约15%,减少约1%至减少约10%,减少约1%至减少约5%,减少约5%至减少约99%,减少约5%至减少约95%,减少约5%至减少约90%,减少约5%至减少约85%,减少约5%至减少约80%,减少约5%至减少约75%,减少约5%至减少约70%,减少约5%至减少约65%,减少约5%至减少约60%,减少约5%至减少约55%,减少约5%至减少约50%,减少约5%至减少约45%,减少约5%至减少约40%,减少约5%至减少约35%,减少约5%至减少约30%,减少约5%至减少约25%,减少约5%至减少约20%,减少约5%至减少约15%,减少约5%至减少约10%,减少约10%至减少约99%,减少约10%至减少约95%,减少约10%至减少约90%,减少约10%至减少约85%,减少约10%至减少约80%,减少约10%至减少约75%,减少约10%至减少约70%,减少约10%至减少约65%,减少约10%至减少约60%,减少约10%至减少约55%,减少约10%至减少约50%,减少约10%至减少约45%,减少约10%至减少约40%,减少约10%至减少约35%,减少约10%至减少约30%,减少约10%至减少约25%,减少约10%至减少约20%,减少约10%至减少约15%,减少约15%至减少约99%,减少约15%至减少约95%,减少约15%至减少约90%,减少约15%至减少约85%,减少约15%至减少约80%,减少约15%至减少约75%,减少约15%至减少约70%,减少约15%至减少约65%,减少约15%至减少约60%,减少约15%至减少约55%,减少约15%至减少约50%,减少约15%至减少约45%,减少约15%至减少约40%,减少约15%至减少约35%,减少约15%至减少约30%,减少约15%至减少约25%,减少约15%至减少约20%,减少约20%至减少约99%,减少约20%至减少约95%,减少约20%至减少约90%,减少约20%至减少约85%,减少约20%至减少约80%,减少约20%至减少约75%,减少约20%至减少约70%,减少约20%至减少约65%,减少约20%至减少约60%,减少约20%至减少约55%,减少约20%至减少约50%,减少约20%至减少约45%,减少约20%至减少约40%,减少约20%至减少约35%,减少约20%至减少约30%,减少约20%至减少约25%,减少约25%至减少约99%,减少约25%至减少约95%,减少约25%至减少约90%,减少约25%至减少约85%,减少约25%至减少约80%,减少约25%至减少约75%,减少约25%至减少约70%,减少约25%至减少约65%,减少约25%至减少约60%,减少约25%至减少约55%,减少约25%至减少约50%,减少约25%至减少约45%,减少约25%至减少约40%,减少约25%至减少约35%,减少约25%至减少约30%,减少约30%至减少约99%,减少约30%至减少约95%,减少约30%至减少约90%,减少约30%至减少约85%,减少约30%至减少约80%,减少约30%至减少约75%,减少约30%至减少约70%,减少约30%至减少约65%,减少约30%至减少约60%,减少约30%至减少约55%,减少约30%至减少约50%,减少约30%至减少约45%,减少约30%至减少约40%,减少约30%至减少约35%,减少约35%至减少约99%,减少约35%至减少约95%,减少约35%至减少约90%,减少约35%至减少约85%,减少约35%至减少约80%,减少约35%至减少约75%,减少约35%至减少约70%,减少约35%至减少约65%,减少约35%至减少约60%,减少约35%至减少约55%,减少约35%至减少约50%,减少约35%至减少约45%,减少约35%至减少约40%,减少约40%至减少约99%,减少约40%至减少约95%,减少约40%至减少约90%,减少约40%至减少约85%,减少约40%至减少约80%,减少约40%至减少约75%,减

少约40％至减少约70％,减少约40％至减少约65％,减少约40％至减少约60％,减少约40％至减少约55％,减少约40％至减少约50％,减少约40％至减少约45％,减少约45％至减少约99％,减少约45％至减少约95％,减少约45％至减少约90％,减少约45％至减少约85％,减少约45％至减少约80％,减少约45％至减少约75％,减少约45％至减少约70％,减少约45％至减少约65％,减少约45％至减少约60％,减少约45％至减少约55％,减少约45％至减少约50％,减少约50％至减少约99％,减少约50％至减少约95％,减少约50％至减少约90％,减少约50％至减少约85％,减少约50％至减少约80％,减少约50％至减少约75％,减少约50％至减少约70％,减少约50％至减少约65％,减少约50％至减少约60％,减少约50％至减少约55％,减少约55％至减少约99％,减少约55％至减少约95％,减少约55％至减少约90％,减少约55％至减少约85％,减少约55％至减少约80％,减少约55％至减少约75％,减少约55％至减少约70％,减少约55％至减少约65％,减少约55％至减少约60％,减少约60％至减少约99％,减少约60％至减少约95％,减少约60％至减少约90％,减少约60％至减少约85％,减少约60％至减少约80％,减少约60％至减少约75％,减少约60％至减少约70％,减少约60％至减少约65％,减少约65％至减少约99％,减少约65％至减少约95％,减少约65％至减少约90％,减少约65％至减少约85％,减少约65％至减少约80％,减少约65％至减少约75％,减少约65％至减少约70％,减少约70％至减少约99％,减少约70％至减少约95％,减少约70％至减少约90％,减少约70％至减少约85％,减少约70％至减少约80％,减少约70％至减少约75％,减少约75％至减少约99％,减少约75％至减少约95％,减少约75％至减少约90％,减少约75％至减少约85％,减少约75％至减少约80％,减少约80％至减少约99％,减少约80％至减少约95％,减少约80％至减少约90％,减少约80％至减少约85％,减少约85％至减少约99％,减少约85％至减少约95％,减少约85％至减少约90％,减少约90％至减少约99％,减少约90％至减少约95％,或减少约95％至减少约99％)(例如相较于治疗之前或治疗开始时的一种或多种实体肿瘤的体积)。在一些实施例中,这些方法可减少(例如,减少约1％至减少约99％或本文所述的这一范围的任何子范围)在受试者中发生转移或发生一种或多种其它转移的风险(例如相较于治疗之前的受试者或施用不同治疗的相似受试者或受试者群体中发生转移或发生一种或多种其它转移的风险)。

[2644] 在一些实施例中,这些方法可以使得受试者的代谢疾病得到治疗。在一些实施例中,代谢疾病的治疗能够引起例如以下中的一种或多种(例如二、三、四、五或六种):葡萄糖耐受性改善、葡萄糖利用率改善、糖尿病性骨关节炎的严重程度或恶化减少、皮肤病变的严重程度或恶化减少、酮症的严重程度或恶化减少、针对胰岛细胞的自体抗体的产生减少、胰岛素敏感性增加、质量减少,以及身体质量指数降低。可以根据标准技术测定空腹葡萄糖或葡萄糖耐受性来监测受试者对治疗的反应。典型地,根据所述方法降低血糖,以便达成一定的血糖水平,其特征为空腹血糖小于100mg/dL或两小时75g口服葡萄糖耐受性测试值小于140mg/dL。在一些实施例中,对治疗的反应可以包括确定与前期糖尿病、新发糖尿病或活动性糖尿病有关的其它因素,包括血压、身体质量指数、PPARγ功能、脂质代谢、糖化血红蛋白(H1c)和肾功能。

[2645] 在一些实施例中,这些方法可以消除神经退化性疾病或降低其风险,减轻其严重程度或延迟其发作,包括疾病的生物化学、组织学和/或行为症状、其并发症以及在疾病恶化过程中出现的中间病理学表型。

[2646] 在一些实施例中,皮肤病的有效治疗可以通过本文所述或所属领域中已知的任何方法评估,包括检查皮肤状况,包括皮肤颜色、湿度、温度、质地、移动性和肿胀,以及皮肤病变(相较于治疗之前的皮肤状况)。

[2647] 在一些实施例中,可以通过本文所述的或本领域已知的任何方法来评估对自身免疫疾病的有效治疗,包括监测对新鲜分离的PBMC的全血细胞计数分析、总Ig水平以及血清自身抗体滴度的分析。

[2648] 在一些实施例中,可以通过本文所述的或本领域已知的任何方法来评估脆性疾病的有效治疗,包括监测骨矿物质密度、骨结构和几何形状、骨转换的生物医学标标志物、维生素D测量、卡诺夫斯基行为状态(Karnofskyperformance status)和ECOG分数,以及对疫苗的反应能力。

[2649] 杀死或减少受试者的衰老细胞数量的方法

[2650] 本文提供了杀死或减少有需要的受试者的衰老细胞(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性类型的衰老细胞)的方法,包括将治疗有效量的一种或多种NK细胞活化剂(例如本文所述或所属领域中已知的任一种NK细胞活化剂)施用于受试者。

[2651] 本文还提供了杀死或减少有需要的受试者的衰老细胞(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性类型的衰老细胞)的数量的方法,包括将治疗有效量的活化NK细胞(例如本文所述或所属领域中已知的任一种活化NK细胞)施用于受试者。

[2652] 这些方法的一些实施例进一步包括:获得休眠NK细胞;以及使休眠NK细胞在试管内、在包括一种或多种NK细胞活化剂的液体培养基中接触,其中所述接触引起活化NK细胞产生,随后将所述NK细胞施用于受试者。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是获自受试者的自体NK细胞。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是获自受试者的单倍体NK细胞。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是同种异体休眠NK细胞。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是人造NK细胞。在任何这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是携带嵌合抗原受体或重组T细胞受体的基因工程化NK细胞。

[2653] 在这些方法的一些实例中,液体培养基是无血清液体培养基。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,液体培养基是化学成分确定的液体培养基。这些方法的一些实例进一步包括分离出活化NK细胞(和进一步将治疗有效量的活化NK细胞施用于受试者,例如本文所述的任何受试者)。在这些方法的一些实施例中,接触步骤进行约2小时至约20天的时段(或本文所述的此范围的任一子范围)。

[2654] 在这些方法的一些实施例中,衰老细胞是衰老的癌细胞、衰老的单核细胞、衰老的淋巴细胞、衰老的星形胶质细胞、衰老的微神经胶质细胞、衰老的神经元、衰老的组织纤维母细胞、衰老的真皮纤维母细胞、衰老的角质细胞,或其它分化组织特异性分裂功能细胞。在这些方法的一些实施例中,衰老癌细胞是化学疗法诱导的衰老细胞或放射线诱导的衰老细胞。

[2655] 在这些方法的一些实施例中,受试者已鉴定或诊断患有老年化相关的疾病或病状(例如本文所述或本领域已知的任何老年化相关疾病或病症)。在本文所述的任一种老年化相关疾病或病状的一些实施例中,老年化相关疾病或病状选自:癌症、自体免疫疾病、代谢疾病、神经退化性疾病、心血管疾病、皮肤病、早衰症和脆性疾病。

[2656] 癌症的非限制性实例包括:实体肿瘤、血液肿瘤、肉瘤、骨肉瘤、神经胶母细胞瘤、

神经母细胞瘤、黑色素瘤、横纹肌肉瘤、尤文氏肉瘤、骨肉瘤、B细胞赘瘤、多发性骨髓瘤、B细胞淋巴瘤、B细胞非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、骨髓增生异常综合症(MDS)、皮肤T细胞淋巴瘤、视网膜母细胞瘤、胃癌、尿道上皮癌、肺癌、肾细胞癌、胃癌和食道癌、胰脏癌、前列腺癌、乳癌、结肠直肠癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、头颈部鳞状细胞癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、肝癌和肝细胞癌。

[2657] 自体免疫疾病的非限制性实例是1型糖尿病。

[2658] 代谢疾病的非限制性实例包括:肥胖、脂质营养不良和2型糖尿病。

[2659] 神经退化性疾病的非限制性实例包括:阿尔茨海默氏病、帕金森氏病和痴呆。

[2660] 心血管疾病的非限制性实例包括:冠状动脉疾病、动脉粥样硬化和肺动脉高压。

[2661] 皮肤病的非限制性实例包括:伤口愈合、秃发、皱纹、老年性雀斑痣、皮肤变薄、着色性干皮病和先天性角化不良。

[2662] 早衰疾病的非限制性实例包括:早衰和呼奇逊-吉尔福早衰综合症。

[2663] 脆性疾病的非限制性实例包括:脆性、疫苗接种有反应、骨质疏松症和肌肉减少症。

[2664] 在本文所述的任一种老年化相关疾病或病状的一些实施例中,老年化相关疾病或病状选自以下群组:年龄相关黄斑变性、骨关节炎、脂肪萎缩、特发性肺纤维化、肾脏移植失败、肝纤维化、骨量损失、肌肉减少症、年龄相关的肺组织弹性丧失、骨质疏松症、年龄相关的肾功能障碍,和化学诱发的肾功能障碍。

[2665] 在本文所述的任一种老年化相关疾病或病状的一些实施例中,老年化相关疾病或病状是2型糖尿病或动脉粥样硬化。

[2666] 在这些方法的一些实施例中,施药使得受试者的靶组织中的衰老细胞数量减少(例如至少减少5%,至少减少10%,至少减少15%,至少减少20%,至少减少25%,至少减少30%,至少减少35%,至少减少40%,至少减少45%,至少减少50%,至少减少55%,至少减少60%,至少减少65%,至少减少70%,至少减少75%,至少减少80%,至少减少85%,减少至少90%,或至少减少约95%,或减少约10%至减少约99%)(或本文所述的此范围的任一子范围)),例如相较于受试者在治疗之前的靶组织中的衰老细胞数量。在这些方法的一些实施例中,受试者中的靶组织可以以下中的一个或多个:脂肪组织、胰脏组织、肝脏组织、肺组织、血管、骨组织、中枢神经系统(CNS)组织、眼组织、皮肤组织、肌肉组织和二级淋巴器官组织。

[2667] 在这些方法的一些实施例中,施药使得受试者中的IFN-γ、细胞毒性颗粒的颗粒酶和/或穿孔素水平相较于治疗之前的受试者或尚未接受治疗的类似对照受试者增加(例如至少增加5%,至少增加10%,至少增加15%,至少增加20%,至少增加25%,至少增加30%,至少增加35%,至少增加40%,至少增加45%,至少增加50%,至少增加55%,至少增加60%,至少增加65%,至少增加70%,至少增加75%,至少增加80%,至少增加85%,至少增加90%,至少增加95%,或至少增加99%,或增加约10%至增加约500%(或本文所述的此范围的任一子范围))。

[2668] 在这些方法的一些实施例中,可以通过对活检样品进行免疫染色来测定靶组织(例如本文所述的任一种靶组织)中的衰老细胞数量。在这些方法的一些实施例中,靶组织

(例如本文所述的任一种靶组织)中的衰老细胞数量可以间接地通过受试者的老年化相关疾病或病状的一种或多种症状(例如本文所述的老年化相关疾病或病状的任一种症状)的改善来观察到。

[2669] 衰老细胞

[2670] 衰老细胞显示重要且独特的特性,包括形态、染色质组织、基因表达和代谢的变化。存在与细胞衰老相关的几种生化和功能特性,例如(i)细胞周期蛋白依赖性激酶的抑制子p16和p21的表达增加,(ii)存在衰老相关的β-半乳糖苷酶,即溶酶体活性的标记,(iii)出现衰老相关的异染色质灶和核纤层蛋白B1水平下调,(iv)对由抗凋亡BCL家族蛋白表达增加引起的凋亡的抗性,和(v)CD26(DPP4)、CD36(清道夫(Scavenger)受体)、叉头盒4(FOXO4)和分泌性载体膜蛋白4(SCAMP4)上调。衰老细胞还表达炎症特征,即所谓的衰老相关分泌表型(SASP)。通过SASP,衰老细胞产生广泛范围的炎性细胞因子(IL-6、IL-8)、生长因子(TGF-β)、趋化因子(CCL-2)和基质金属蛋白酶(MMP-3、MMP-9),其以细胞自主方式运作以增强衰老(自分泌作用),并且与微环境通信并改变微环境(旁分泌作用)。SASP因子可通过触发衰老监视,即免疫介导的衰老细胞清除来促进肿瘤抑制。然而,慢性炎症也是肿瘤发生的已知驱动因素,并且越来越多的证据表明,慢性SASP也能增强癌症转移和老年化相关疾病。

[2671] 衰老细胞的分泌概况取决于环境。例如,人纤维母细胞中不同的线粒体功能障碍诱导的线粒体功能障碍相关衰老(MiDAS)引起缺乏IL-1依赖性炎症因子的SASP出现。NAD+/NADH比率的降低活化AMPK信号传导,其通过活化p53诱导MiDAS。结果,p53抑制NF-κB信号传导,其为促炎性SASP的关键诱导因素。相反,由人细胞中持续性DNA损伤引起的细胞衰老诱导炎性SASP,其依赖于共济失调毛细血管扩张突变(ATM)激酶的活化,而不依赖于p53的活化。特别地,IL-6和IL-8的表达和分泌水平提高。还展现了由异位表达p16INK4a和p21CIP1引起的细胞衰老诱导人纤维母细胞的衰老表型,且不存在炎性SASP,表明生长停滞本身并不刺激SASP。

[2672] 衰老的最主要特征之一是稳定生长停滞。这是通过两个重要路径,即p16/Rb和p53/p21实现的,这两个路径均为肿瘤抑制的关键。DNA损伤引起:(1)染色质中γH2Ax(组蛋白编码基因)和53BP1(DNA损伤反应中涉及)的高沉积:这引起激酶级联反应的活化,最终引起p53活化,和(2)p16INK4a和ARF(均由CDKN2A编码)和P15INK4b(由CDKN2B编码)的活化:p53诱导细胞周期蛋白依赖性激酶抑制子(p21)的转录,并且与p16INK4a和p15INK4b两者一起阻断细胞周期进展的基因(CDK4和CDK6)。这最终引起成视网膜细胞瘤蛋白(Rb)磷酸化不足,并且使细胞周期停滞在G1期。

[2673] 在正常老年化的情况下,选择性杀死衰老细胞已显示可显著改善小鼠的健康寿命,并且改善与年龄相关的疾病或癌症疗法的结果(Ovadya,《临床研究杂志(J Clin Invest.)》128(4):1247-1254,2018)。在自然界中,衰老细胞通常被先天免疫细胞去除。衰老的诱导不仅阻止了受损/改变的细胞的潜在增殖和转化,而且还通过产生SASP因子(主要起自然杀伤(NK)细胞的化学引诱物(如IL-15和CCL2)和巨噬细胞的化学引诱物(如CFS-1和CCL2)的作用)促进组织修复。这些先天免疫细胞介导消除应激细胞的免疫监视机制。衰老细胞通常上调NK细胞活化受体NKG2D和DNAM1配体,其属于应激诱导性配体家族:防御感染性疾病和恶性肿瘤的一线免疫的重要组分。受体活化后,NK细胞可接着通过其溶细胞机构

特异性诱导衰老细胞的死亡。已经指出NK细胞在免疫监视肝纤维化(Sagiv,《致癌基因(Oncogene)》32(15):1971-1977,2013)、肝细胞癌(Iannello,《实验医学杂志(JExpMed)》210(10):2057-2069,2013)、多发性骨髓瘤(Soriani,《血液(Blood)》113(15):3503-3511,2009)以及甲羟戊酸路径功能障碍所应激的神经胶质瘤细胞(Ciaglia,《国际癌症杂志(Int JCancer)》142(1):176-190,2018)的衰老细胞方面的作用。子宫内膜细胞经历急性细胞衰老,并且不会分化成蜕膜细胞。分化的蜕膜细胞分泌IL-15,并且从而募集子宫NK细胞以靶向并消除未分化的衰老细胞,因此有助于重塑和年轻化子宫内膜(Brighton,《E生命(Elife)》6:e31274,2017)。以类似的机制,在肝纤维化过程中,表达p53的衰老肝卫星细胞使驻留库普弗(Kupfer)巨噬细胞和新浸润的巨噬细胞的极化偏向促炎性M1表型,其显示衰老活性。已显示F4/80+巨噬细胞在清除小鼠子宫衰老细胞以维持产后子宫功能中起关键作用。

[2674] 衰老细胞主要通过上调NKG2D(在NK细胞上表达)的配体、趋化因子和其它SASP因子来募集NK细胞。肝纤维化的体内模型已显示活化NK细胞有效清除衰老细胞(Krizhanovsky,《细胞(Cell)》134(4):657-667,2008)。研究已描述多种模型来研究衰老,包括肝纤维化(Krizhanovsky,《细胞》134(4):657-667,2008)、骨关节炎(Xu,《老年学杂志:A系列,生物科学与医学(J GerontolABiol SciMed Sci)》72(6):780-785,2017)和帕金森氏病(Chinta,《细胞报告(CellRep)》22(4):930-940,2018)。用于研究衰老细胞的动物模型描述于:Krizhanovsky,《细胞》134(4):657-667,2008;Baker,《自然》479(7372):232-236,2011;Farr,《自然·医学(NatMed)》23(9):1072-1079,2017;Bourgeois,《欧洲生物化学学会联合会快报(FEBS Lett)》592(12):2083-2097,2018;Xu,《自然·医学》24(8):1246-1256,2018)。

[2675] 改善皮肤和/或头发的质地和/或外观的方法

[2676] 本文还提供了使有需要的受试者的皮肤和/或毛发的质地和/或外观在一段时间(例如本文所述的任一时间段)内改善的方法,包括将治疗有效量的一种或多种自然杀手(NK)细胞活化剂(例如本文所述或所属领域中已知的任一种NK细胞活化剂)施用于受试者。

[2677] 本文还提供了使有需要的受试者的皮肤和/或毛发的质地和/或外观在一段时间(例如本文所述的任一时间段)内改善的方法,包括将治疗有效数量的活化NK细胞(例如本文所述或所属领域中已知的任一种活化NK细胞)施用于受试者。

[2678] 这些方法的一些实施例进一步包括:获得休眠NK细胞;以及使休眠NK细胞在试管内、在包括一种或多种NK细胞活化剂的液体培养基中接触,其中所述接触引起活化NK细胞产生,随后将所述NK细胞施用于受试者。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是获自受试者的自体NK细胞。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是获自受试者的单倍体NK细胞。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是同种异体休眠NK细胞。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是人造NK细胞。在任何这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是携带嵌合抗原受体或重组T细胞受体的基因工程化NK细胞。

[2679] 在这些方法的一些实例中,液体培养基是无血清液体培养基。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,液体培养基是化学成分确定的液体培养基。这些方法的一些实例进一步包括分离出活化NK细胞(和进一步将治疗有效量的活化NK细胞施用于受试者,例如本文所述的任何受试者)。在这些方法的一些实施例中,接触步骤进行约2小时至约20天的

时段(或本文所述的此范围的任一子范围)。

[2680] 在这些方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的皮肤的质地和/或外观在一段时间(例如本文所述的任一时间段)内改善。

[2681] 在这些方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的皮肤在一段时间(例如本文所述的任一时间段)内的皱纹形成速率减少(例如至少减少5%,至少减少10%,至少减少15%,至少减少20%,至少减少25%,至少减少30%,至少减少35%,至少减少40%,至少减少45%,至少减少50%,至少减少55%,至少减少60%,至少减少65%,至少减少70%,至少减少75%,至少减少80%,至少减少85%,至少减少90%,或至少减少95%,或减少约5%至减少约99%(或本文所述的此范围的任一子范围)),例如相较于治疗之前的受试者的皱纹形成速率或未接受治疗的类似受试者的皱纹形成速率。

[2682] 在这些方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的皮肤着色在一段时间(例如本文所述的任一时间段)内改善。

[2683] 在这些方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的皮肤质地在一段时间(例如本文所述的任一时间段)内改善。

[2684] 在这些方法的一些实施例中,所述方法使得受试者毛发的质地和/或外观在一段时间(例如本文所述的任一时间段)内改善。

[2685] 在这些方法的一些实施例中,所述方法使得受试者在一段时间(例如本文所述的任一时间段范围)内的白发形成速率减少(例如至少减少5%,至少减少10%,至少减少15%,至少减少20%,至少减少25%,至少减少30%,至少减少35%,至少减少40%,至少减少45%,至少减少50%,至少减少55%,至少减少60%,至少减少65%,至少减少70%,至少减少75%,至少减少80%,至少减少85%,减少至少90%,或至少减少95%,或减少约5%至减少约99%(或本文所述的此范围的任一子范围)),例如相较于治疗之前的受试者的白发形成速率或未接受治疗的类似受试者的白发形成速率。

[2686] 在这些方法的一些实施例中,所述方法使得受试者在一段时间(例如本文所述的任一时间段)内的白发数量减少(例如至少减少5%,至少减少10%,至少减少15%,至少减少20%,至少减少25%,至少减少30%,至少减少35%,至少减少40%,至少减少45%,至少减少50%,至少减少55%,至少减少60%,至少减少65%,至少减少70%,至少减少75%,至少减少80%,至少减少85%,至少减少90%,或至少减少95%,或减少约5%至减少约99%(或本文所述的此范围的任一子范围)),例如相较于治疗之前的受试者的白发数量或未接受治疗的类似受试者的白发形成速率。

[2687] 在这些方法的一些实施例中,所述方法使得受试者在一段时间(例如本文所述的任一时间段)内的脱发速率减少(例如至少减少5%,至少减少10%,至少减少15%,至少减少20%,至少减少25%,至少减少30%,至少减少35%,至少减少40%,至少减少45%,至少减少50%,至少减少55%,至少减少60%,至少减少65%,至少减少70%,至少减少75%,至少减少80%,至少减少85%,至少减少90%,或至少减少95%,或减少约5%至减少约99%(或本文所述的此范围的任一子范围)),例如相较于治疗之前的受试者的脱发速率或未接受治疗的类似受试者的脱发速率。

[2688] 在这些方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的毛发质地在一段时间(例如本文所述的任一时间段)内改善。

[2689] 在这些方法的一些实施例中,所述方法使得受试者皮肤中的衰老真皮纤维母细胞数量在一段时间(例如本文所述的任一时间段)内减少(例如至少减少5%,至少减少10%,至少减少15%,至少减少20%,至少减少25%,至少减少30%,至少减少35%,至少减少40%,至少减少45%,至少减少50%,至少减少55%,至少减少60%,至少减少65%,至少减少70%,至少减少75%,至少减少80%,至少减少85%,减少至少90%,或至少减少95%,或减少约5%至减少约99%(或本文所述的此范围的任一子范围)),例如相较于治疗之前的受试者的衰老真皮细胞数量或未接受治疗的类似受试者的衰老真皮细胞数量。

[2690] 在这些方法的一些实施例中,受试者皮肤的质地和/或外观在一段时间(例如本文所述的任一时间段)内的改善可以利用本文所述或所属领域中已知的任何方法评估,包括检查皮肤病变、肤色和色素沉着、皮肤水分、温度、弹性和血管的存在、尺寸和形状。

[2691] 在这些方法的一些实施例中,受试者毛发的质地和/或外观在一段时间(例如本文所述的任一时间段)内的改善可以利用本文所述或所属领域中已知的任何方法评估。

[2692] 在这些方法的一些实施例中,所述时间段是例如一个月到十年,一个月到九年,一个月到八年,一个月到七年,一个月到六年,一个月到五年,一个月到四年,一个月到三年,一个月到两年,一个月到十八个月,一个月到十二个月,一个月到十个月,一个月到八个月,一个月到六个月,一个月到四个月,一个月到两个月一个月到六周,六周到十年,六周到九年六周到八年六周到七年,六周到六年,六周到五年,六周到四年,六周到三年,六周到两年,六周到十八个月,六周到十二个月,六周到十个月,六周到八个月,六周到六个月,六周到四个月,六周到两个月,两个月到十年,两个月到九年两个月到八年两个月到七年两个月到六年,两个月到五年两个月到四年,两个月到三年,两个月到两年,两个月到十八个月,两个月到十二个月,两个月到十个月,两个月到八个月两个月到六个月,两个月到四个月,四个月到十年,四个月到九年,四个月到八年,四个月到七年,四个月到六年,四个月到五年,四个月到四年,四个月到三年,四个月到两年,四个月到十八个月,四个月到十二个月,四个月到十个月,四个月到八个月,四个月到六个月,六个月到十年,六个月到九年,六个月到八年,六个月到七年,六个月到六年,六个月到五年,六个月到四年,六个月到三年,六个月到两年,六个月到十八个月,六个月到十二个月,六个月到十个月,六个月到八个月,八个月到十年,八个月到九年,八个月到八年,八个月到七年,八个月到六年,八个月到五年,八个月到四年,八个月到三年,八个月到两年,几个月到十八个月,八个月到十二个月,八个月到十个月,十个月到十年,十个月到九年,十个月到八年,十个月到七年,十个月到六年,十个月到五年,十个月到四年,十个月到三年,十个月到两年,十个月到十八个月,十个月到十二个月,十二个月到十年,十二个月到九年,十二个月到八年,十二个月到七年,十二个月到六年,十二个月到五年,十二个月到四年,十二个月到三年,十二个月到两年,十二个月到十八个月,十八个月到十年,十八个月到九年,十八个月到八年,十八个月到七年,十八个月到六年,十八个月到五年,十八个月到四年,十八个月到三年,十八个月到两年,两年到十年,两年到九年,两年到八年,两年到七年,两年到六年,两年到五年,两年到四年,两年到三年三年到十年,三年到九年,三年到八年,三年到七年,三年到六年,三年到五年,三年到四年,四年到十年,四年到九年,四年至八年,四年至七年,四年到六年,四年到五年,五年到十年,五年到九年,五年到八年,五年到七年,五年到六年,六年到十年,六年到九年,六年到八年,六年到七年,七年到十年,七年到九年,七年到八年,八年到十年,八年至九年,或九年到十年。

[2693] 在这些方法的一些实施例中,受试者的年龄是约30至约35、约35至约40、约40至约45、约45至约50、约50至约55、约55至约60、约60至约65、约65至约70、约70至约75、约75至约80、约80至约85、约85至约90、约90至约95、约95至约100、约100至约105、约105至约110、约110至约115,或约115至约120。

[2694] 有助于治疗受试者的肥胖症的方法

[2695] 本文提供了有助于使有需要的受试者的肥胖症在一段时间(例如本文所述的任一时间段范围)内得到治疗的方法,包括将治疗有效量的一种或多种自然杀手(NK)细胞活化剂(例如本文所述或所属领域中已知的任一种NK细胞活化剂)施用于受试者。

[2696] 本文还提供了有助于使有需要的受试者的肥胖症在一段时间(例如本文所述的任一时间段范围)内得到治疗的方法,包括将治疗有效数量的活化NK细胞(例如本文所述或所属领域中已知的任一种活化NK细胞)施用于受试者。

[2697] 这些方法的一些实施例进一步包括:获得休眠NK细胞;以及使休眠NK细胞在试管内、在包括一种或多种NK细胞活化剂的液体培养基中接触,其中所述接触引起活化NK细胞产生,随后将所述NK细胞施用于受试者。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是获自受试者的自体NK细胞。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是获自受试者的单倍体NK细胞。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是同种异体休眠NK细胞。在这些方法的一些实例中,休眠NK细胞是人造NK细胞。在这些方法中的任一种方法的一些实例中,休眠NK细胞是携带嵌合抗原受体或重组T细胞受体的基因工程化NK细胞。

[2698] 在这些方法的一些实例中,液体培养基是无血清液体培养基。在本文所述的任一种方法的一些实施例中,液体培养基是化学成分确定的液体培养基。这些方法的一些实例进一步包括分离出活化NK细胞(和进一步将治疗有效量的活化NK细胞施用于受试者,例如本文所述的任何受试者)。在这些方法的一些实施例中,接触步骤进行约2小时至约20天的时段(或本文所述的此范围的任一子范围)。

[2699] 在这些方法的一些实施例中,所述方法使得受试者在一段时间(例如本文所述的任一时间段)内的质量减少(例如,至少减少5%,至少减少10%,至少减少15%,至少减少20%,至少减少25%,至少减少30%,至少减少35%,至少减少40%,至少减少45%,至少减少50%,至少减少55%,至少减少60%,至少减少65%,至少减少70%,至少减少75%,至少减少80%,至少减少85%,至少减少90%,或至少减少95%,或减少约5%至减少约99%(或本文所述的此范围的任一子范围)),例如相较于治疗之前的受试者的质量。

[2700] 在这些方法的一些实施例中,所述方法使得受试者在一段时间(例如本文所述的任一时间段)内的身体质量指数(BMI)减少(例如,至少减少5%,至少减少10%,至少减少15%,至少减少20%,至少减少25%,至少减少30%,至少减少35%,至少减少40%,至少减少45%,至少减少50%,至少减少55%,至少减少60%,至少减少65%,至少减少70%,至少减少75%,至少减少80%,至少减少85%,至少减少90%,或至少减少95%,或减少约5%至减少约99%(或本文所述的此范围的任一子范围)),例如相较于治疗之前的受试者的BMI。

[2701] 在这些方法的一些实施例中,所述方法使得受试者从前期糖尿病恶化到2型糖尿病的速率减少(例如,至少减少5%,至少减少10%,至少减少15%,至少减少20%,至少减少25%,至少减少30%,至少减少35%,至少减少40%,至少减少45%,至少减少50%,至少减少55%,至少减少60%,至少减少65%,至少减少70%,至少减少75%,至少减少80%,至少

减少85％,至少减少90％,或减少至少95％,或减少约5％至减少约99％(或本文所述的此范围的任一子范围)),例如相较于治疗之前的受试者从前期糖尿病恶化到2型糖尿病的速率或未接受治疗的类似受试者从前期糖尿病恶化到2型糖尿病的速率。

[2702] 在这些方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的空腹血清葡萄糖水平减少(例如,至少减少5％,至少减少10％,至少减少15％,至少减少20％,至少减少25％,至少减少30％,至少减少35％,至少减少40％,至少减少45％,至少减少50％,至少减少55％,至少减少60％,至少减少65％,至少减少70％,至少减少75％,至少减少80％,至少减少85％,至少减少90％,或至少减少95％,或减少约5％至减少约99％(本文所述的此范围的任一子范围)),例如相较于治疗之前的受试者的空腹血清葡萄糖水平。

[2703] 在这些方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的胰岛素敏感性增加(例如,至少增加5％,至少增加10％,至少增加15％,至少增加20％,至少增加25％,至少增加30％,至少增加35％,至少增加40％,至少增加45％,至少增加50％,至少增加55％,至少增加60％,至少增加65％,至少增加70％,至少增加75％,至少增加80％,至少增加85％,至少增加90％,至少增加95％,或至少增加99％,或增加约10％至增加约500％(本文所述的此范围的任一子范围),例如相较于治疗之前的受试者的胰岛素敏感性。

[2704] 在这些方法的一些实施例中,所述方法使得受试者的动脉粥样硬化严重程度减少(例如,至少减少5％,至少减少10％,至少减少15％,至少减少20％,至少减少25％,至少减少30％,至少减少35％,至少减少40％,至少减少45％,至少减少50％,至少减少55％,至少减少60％,至少减少65％,至少减少70％,至少减少75％,至少减少80％,至少减少85％,至少减少90％,或至少减少95％,或减少约5％至减少约99％(本文所述的此范围的任一子范围)),例如相较于治疗之前的受试者的动脉粥样硬化严重程度。

[2705] 在这些方法的一些实施例中,受试者的肥胖症在一段时间(例如本文所述的任一时间段)内的治疗可以通过本文所述或所属领域中已知的任何方法评估,包括例如测量体重和/或身体尺寸、全身脂肪、全身或局部肥胖,和身体质量指数(BMI)。

[2706] 在这些方法的一些实施例中,可以通过根据标准技术测定空腹血清葡萄糖水平或葡萄糖耐量来监测受试者对治疗的反应。在这些方法的一些实施例中,可以使用本文所述或本领域已知的任何方法来测量胰岛素敏感性,包括高胰岛素性正常血糖钳夹和静脉内葡萄糖耐量测试、体内稳态模型评估(HOMA)和定量胰岛素敏感性检查指数(QUICKI)。

[2707] 在这些方法的一些实施例中,可使用本文所述或本领域已知的任何方法测量受试者的动脉粥样硬化严重程度,包括心脏导管插入术、多普勒超声检查、血压比较、MUGA/放射性核素血管造影、铊/心肌灌注扫描,和计算机断层扫描。

[2708] 在这些方法的一些实施例中,时间段是一个月至十年(或本文所述的此范围的任一子范围)。

[2709] 在这些方法的一些实施例中,受试者的年龄范围是约1至约5、约5至约10、约10至约15、约15至约20、约20至约25、约25至约30、约30至约35、约35至约40、约40至约45、约45至约50、约50至约55、约55至约60、约60至约65、约65至约70、约70至约75、约75至约80、约80至约85、约85至约90、约90至约95、约95至约100、约100至约105、约105至约110、约110至约115,或约115至约120。

[2710] 其它治疗剂

[2711] 本文所述的任一种方法中的一些实施例可进一步包括向受试者(例如本文所述的任一受试者)施用治疗有效量的一种或多种其它治疗剂。一种或多种其它治疗剂能够与NK细胞活化剂或活化NK细胞基本上同时施用于受试者(例如作为单一配制物或两种或更多种配制物施用于受试者)。在一些实施例中,可以在施用NK细胞活化剂或活化NK细胞之前向受试者施用一种或多种其它治疗剂。在一些实施例中,可以在向受试者施用一种或多种NK细胞活化剂或活化NK细胞之后向受试者施用一种或多种其它治疗剂。

[2712] 其它治疗剂的非限制性实例包括:抗癌药物、活化受体激动剂、免疫检查点抑制剂、用于阻断HLA特异性抑制受体的试剂、糖原合成酶激酶(GSK)3抑制剂和抗体。

[2713] 抗癌药的非限制性实例包括抗代谢药物(例如5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-巯基嘌呤(6-MP)、卡培他滨(capecitabine)、阿糖胞苷(cytarabine)、氟尿苷(floxuridine)、氟达拉滨(fludarabine)、吉西他滨(gemcitabine)、羟基脲、甲氨蝶呤(methotrexate)、6-硫鸟嘌呤、克拉屈滨(cladribine)、奈拉滨(nelarabine)、喷司他汀(pentostatin)或培美曲塞(pemetrexed))、植物碱(例如,长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、长春地辛(vindesine)、喜树碱(camptothecin)、9-甲氧基喜树碱、狗牙花定碱(coronaridine)、紫杉醇(taxol)、乌檀根碱(naucleaoral)、二异戊二烯基化吲哚生物碱(diprenylatedindolealkaloid)、山矢车菊碱(montamine)、希什金矢车菊碱(schischkiniin)、原小檗碱(protoberberine)、小檗碱(berberine)、血根碱(sanguinarine)、白屈菜红碱(chelerythrine)、白屈菜碱(chelidonine)、鹅掌楸碱(liriodenine)、山岗蠹吾碱(clivorine)、β-咔啉、脱甲氧基娃儿藤碱(antofine)、娃儿藤碱(tylophorine)、白叶藤碱(cryptolepine)、新白叶藤碱(neocryptolepine)、紫堇诺灵碱(corynoline)、依兰碱(sampangine)、咔唑、文珠兰碱(crinamine)、高山网球花碱(montanine)、玫瑰树碱(ellipticine)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、多西他赛(docetaxel)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenisopide)、伊立替康(irinotecan)、拓扑替康(topotecan)或吖啶酮生物碱)、蛋白酶体抑制剂(例如,乳胞素(lactacystin)、双硫仑(disulfiram)、表没食子儿茶素-3-没食子酸酯、马里佐米(marizomib)(盐孢菌素(salinosporamide)A)、奥普佐米(oprozomib)(ONX-0912)、地兰佐米(delanzomib)(CEP-18770)、环氧霉素(epoxomicin)、MG132、β-羟基β-甲基丁酸盐、硼替佐米(bortezomib)、卡非佐米(carfilzomib)或埃沙佐米(ixazomib))、抗肿瘤抗生素(例如,阿霉素(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、表柔比星(epirubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、伊达比星(idarubicin)、放线菌素(actinomycin)、普卡霉素(plicamycin)、丝裂霉素(mitomycin)或博来霉素(bleomycin))、组蛋白脱乙酰基酶抑制剂(例如,伏立诺他(vorinostat)、帕比诺他(panobinostat)、贝林司他(belinostat)、吉韦诺他(givinostat)、阿贝辛他(abexinostat)、缩肽(depsipeptide)、恩替诺特(entinostat)、苯基丁酸盐、丙戊酸、曲古抑菌素(trichostatin)A、达西司他(dacinostat)、莫西司他(mocetinostat)、普瑞司他(pracinostat)、烟酰胺(nicotinamide)、坎比诺尔(cambinol)、替诺文(tenovin)1、替诺文6、斯汀诺(sirtinol)、利可司他(ricolinostat)、替非司他(tefinostat)、凯维林(kevetrin)、奎西司他(quisinostat)、雷米诺他(resminostat)、泰克地那林(tacedinaline)、西达本胺(chidamide)或赛利司他(selisistat))、酪氨酸激酶抑制剂(例如,阿昔替尼(axitinib)、达沙替尼(dasatinib)、恩可非尼(encorafinib)、厄洛

替尼(erlotinib)、伊马替尼(imatinib)、尼洛替尼(nilotinib)、帕唑帕尼(pazopanib)和舒尼替尼(sunitinib))和化疗剂(例如,全反式维甲酸、阿扎胞苷(azacitidine)、硫唑嘌呤(azathioprine)、去氧氟尿苷、埃博霉素(epothilone)、羟脲、伊马替尼、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星(valrubicin)、维罗非尼(vemurafenib)和来那度胺(lenalidomide))。化学治疗剂的其它实例包括烷化剂,例如二氯甲二乙胺、环磷酰胺(cyclophosphamide)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、美法仑(melphalan)、异环磷酰胺(ifosfamide)、噻替派(thiotepa)、六甲三聚氰胺(hexamethylmelamine)、白消安(busulfan)、六甲蜜胺(altretamine)、丙卡巴肼(procarbazine)、达卡巴嗪(dacarbazine)、替莫唑胺(temozolomide)、卡莫司汀(carmustine)、罗莫司汀(lumustine)、链脲霉素(streptozocin)、卡铂(carboplatin)、顺铂(cisplatin)和奥沙利铂(oxaliplatin)。

[2714] 活化受体激动剂的非限制性实例包括活化和增强NK细胞的细胞毒性的活化受体的任何激动剂,包括抗CD16抗体(例如抗CD16/CD30双特异性单克隆抗体(BiMAb))和基于Fc的融合蛋白。检查点抑制剂的非限制性实例包括抗PD-1抗体(例如MEDI0680)、抗PD-L1抗体(例如BCD-135、BGB-A333、CBT-502、CK-301、CS1001、FAZ053、KN035、MDX-1105、MSB2311、SHR-1316、抗PD-L1/CTLA-4双特异性抗体KN046、抗PD-L1/TGFβRII融合蛋白M7824、抗PD-L1/TIM-3双特异性抗体LY3415244、阿特珠单抗(atezolizumab)或阿维鲁单抗(avelumab))、抗TIM3抗体(例如TSR-022、Sym023或MBG453)和抗CTLA-4抗体(例如,AGEN1884、MK-1308或抗CTLA-4/OX40双特异性抗体ATOR-1015)。用于阻断HLA特异性抑制受体的试剂的非限制性实例包括莫那力单抗(monalizumab)(例如抗HLA-ENKG2A抑制受体单克隆抗体)。GSK3抑制剂的非限制性实例包括替格鲁西布(tideglusib)或CHIR99021。可用作另外的治疗剂的抗体的非限制性实例包括抗CD26抗体(例如YS110)、抗CD36抗体和可结合到NK细胞上的Fc受体(例如CD16)并活化所述受体的任何其它抗体或抗体构建体。在一些实施例中,其它治疗剂可以是胰岛素或二甲双胍(metformin)。

[2715] 实例

[2716] 本发明在以下实例中进行了进一步描述,所述实例不限制权利要求中所述的本发明范围。

[2717] 实例1:使用多链多肽对C57BL/6小鼠进行免疫刺激

[2718] 材料和方法

[2719] 产生包括第一多肽和第二多肽的示例性多链多肽(本文所述的A型多链多肽),其中第一多肽是两个TGFβRII域、人组织因子219片段和人IL-15的可溶性融合体,并且第二多肽是两个TGFβRII域和人IL-15Rα链寿司域的可溶性融合体。

[2720] 结果

[2721] C57BL/6小鼠的免疫刺激

[2722] 用对照PBS溶液或用剂量分别为0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg的多链多肽皮下处理野生型C57BL/6小鼠。处理后第四天,评估脾脏重量和脾脏中存在的各种免疫细胞类型的百分比。具体地说,产生单一脾细胞悬浮液且用荧光染料偶联的抗体(包括抗CD4、抗CD8、抗NK1.1和抗CD19)染色。利用流式细胞术评估经对照溶液或多链多肽处理的小鼠的脾脏中所存在的$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、自然杀手(NK)细胞和$CD19^+$B细胞的百分比。如图1A所示,经多链多肽处理的小鼠的脾脏重量随着多链多肽的剂量增加而增加。此外,经1mg/kg、

3mg/kg和10mg/kg多链多肽处理的小鼠的脾脏重量分别显著高于对照溶液处理的小鼠。如图1B所示,在多链多肽处理的小鼠的脾脏中,CD8+T细胞和NK细胞的百分比均随着多链多肽的剂量增加而增加。具体地说,经0.3mg/kg、3mg/kg和10mg/kg多链多肽处理的小鼠中的$CD8^+$T细胞百分比高于对照物处理的小鼠,并且经0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg和10mg/kg多链多肽处理的小鼠中的NK细胞百分比高于对照物处理的小鼠。这些结果证明示例性多链多肽能够刺激脾脏中的免疫细胞,尤其$CD8^+$T细胞和NK细胞。

[2723] 药物动力学

[2724] 评估示例性多链多肽在野生型C57BL/6小鼠中的药物动力学。用3mg/kg剂量的多链多肽皮下处理小鼠。在不同时间点经由尾静脉收集血液,并且制备血清。用ELISA测定血清中的多链多肽浓度。简单来说,多链多肽是使用抗人组织因子抗体捕捉并且使用生物素化抗人TGFβ受体、过氧化酶偶联的抗生蛋白链菌素和ABTS底物加以检测。结果表明,示例性多链多肽的半衰期为12.66小时。

[2725] C57BL/6小鼠随时间的免疫刺激

[2726] 为了评估多链多肽随时间的免疫刺激效应,用3mg/kg单次剂量的多链多肽处理小鼠,并且紧接在处理之后以及在处理之后的第16、24、48、72和92小时使用上述技术评估脾脏重量和脾脏中存在的免疫细胞类型百分比。如图2A所示,多链多肽处理的小鼠的脾脏重量在处理后的第48小时增加,并在接下来的44小时内继续增加。另外,如图2B所示,在多链多肽处理的小鼠的脾脏中,$CD8^+$T细胞和NK细胞的百分比在处理后的第48小时均增加,并在接下来的44小时内继续增加。这些结果进一步证明,示例性多链多肽能够随时间刺激脾脏中的免疫细胞,尤其$CD8^+$T细胞和NK细胞。

[2727] $CD8^+$T细胞和NK细胞的增殖增强和对颗粒酶B的表达增强

[2728] 为了评估多链多肽诱导的免疫细胞增殖和细胞毒性潜力,用3mg/kg单次剂量的多链多肽处理小鼠,并且紧接在处理之后以及在处理之后的第16、24、48、72和92小时评估这些小鼠的脾脏。简单来说,产生单一脾细胞悬浮液并且用针对不同细胞类型的与荧光染料偶联的抗体染色,包括抗CD4、抗CD8、抗NK1.1和抗CD19,以及抗Ki67抗体(即,细胞增殖标志物)和抗颗粒酶B抗体(即,细胞毒性标志物)。通过流式细胞术分析每种免疫细胞类型的Ki67和颗粒酶B的平均荧光强度(MFI)。如图3A和3B所示,与紧接在处理(0小时)之后相比,NK细胞对Ki67和颗粒酶B的表达在第24小时以及随后评估的每个时间点增加。此外,与紧接在处理(0小时)之后相比,$CD8^+$T细胞对Ki67和颗粒酶B的表达在第48小时以及随后评估的每个时间点增加。因此,单次剂量的多链多肽使得$CD8^+$T细胞和NK细胞的增殖在处理后维持长达至少4天。

[2729] 这些结果证明,多链多肽不仅使脾脏中的$CD8^+$T细胞和NK细胞数量增加,而且使这些细胞的增殖和细胞毒性增强。

[2730] 针对肿瘤细胞的细胞毒性

[2731] 接下来,评估多链多肽在C57BL/6小鼠中活化的脾细胞针对肿瘤细胞的细胞毒性。小鼠莫洛尼(Moloney)白血病细胞(Yac-1)用CellTrace紫色标记并且用作肿瘤靶细胞。C57BL/6小鼠用3mg/kg单次剂量的多链多肽处理,并且在随后的多个时间点制备脾细胞且用作效应细胞。将靶标肿瘤细胞与效应细胞以10:1的效应子:靶标(E:T)比率混合并且在37℃下培育20小时。通过使用流式细胞术分析经紫色标记的碘化丙啶(PI)阳性Yac-1细胞来

评估靶细胞存活率。使用下式计算Yac-1肿瘤抑制百分比：

[2732] Yac-1肿瘤抑制百分比＝(1-实验样品中的Yac-1活细胞数/不含脾细胞的样品中的Yac-1活细胞数)×100

[2733] 如图4所示,多链多肽处理24小时或更长时间之后的小鼠的脾细胞显示针对Yac-1细胞的细胞毒性相较于未处理小鼠的脾细胞增强。

[2734] 实例2:使用基于高脂肪饮食的2型糖尿病小鼠模型,对C57BL/6小鼠的免疫刺激

[2735] 材料和方法

[2736] TGFRt15-TGFRs是多链嵌合多肽(本文所述的A型多链嵌合多肽),其包括两个TGFβ结合域,其是人可溶性TGFβRII二聚体(aa24-159)。21t15-TGFRs是包括IL-21和TGFβ结合域的多链嵌合多肽(本文所述的A型多链嵌合多肽)。3t28是包括两个IL-2多肽的嵌合多肽(本文所述的B型嵌合多肽)。

[2737] 结果

[2738] 为了评估TGFRt15-TGFRs、2t2和21t15-TGFRs治疗2型糖尿病的作用,使用基于高脂肪饮食的2型糖尿病小鼠模型(得自杰克逊实验室的B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J)。给小鼠饲喂对照饮食或高脂肪饮食11周。饲喂高脂肪饮食的小鼠亚群还用TGFRt15-TGFRs、2t2或21t15-TGFRs处理。饲喂对照饮食、高脂肪饮食的小鼠以及饲喂高脂肪饮食且经TGFRt15-TGFRs、2t2或21t15-TGFRs处理的小鼠在处理后的第4天进行评估。简单来说,产生单一脾细胞悬浮液且用荧光染料偶联的抗体(包括抗CD4、抗CD8、抗NK1.1和抗CD19)染色。使用流式细胞术评估每组小鼠的脾脏中存在的CD4$^+$T细胞、CD8$^+$T细胞、自然杀手(NK)细胞和CD19$^+$B细胞的百分比。

[2739] 如图5A所示,相较于未处理的小鼠,饲喂高脂肪饮食的小鼠在用TGFRt15-TGFRs处理之后,PBMC中的NK细胞百分比显著增加,但在21t15 TGFRs处理之后则不然。另外,相较于未处理的小鼠,在TGFRt15-TGFRs、2t2或21t15-TGFRs处理之后,PBMC中的CD8$^+$T细胞百分比显著增加。此外,还使用抗Ki67抗体评估PBMC中的CD4$^+$T细胞、CD8$^+$T细胞、自然杀手(NK)细胞和CD19$^+$B细胞的增殖。如图5B所示,用TGFRt15-TGFRs处理之后,增殖的NK细胞、CD4$^+$T细胞和CD8$^+$T细胞的数量显著增加,但是用2t2或21t15-TGFRs处理之后则不然。

[2740] 为了检查TGFRt15-TGFRs、2t2和21t15-TGFRs对动物皮肤和毛发外观和质地的影响,向小鼠饲喂对照饮食或高脂肪饮食7周,并且饲喂高脂肪饮食的小鼠亚群还用TGFRt15-TGFRs、2t2或21t15-TGFRs处理。处理后一周,评估小鼠的外观。饲喂高脂肪饮食且未处理的小鼠,或饲喂高脂肪饮食且经21t15-TGFRs处理的小鼠表现为毛发不整洁且打皱,且白发/脱发相较于饲喂对照饮食的小鼠增加(图6A、6B和6E)。惊人的是,相较于饲喂高脂肪饮食且不接受TGFRt15-TGFRs或2t2处理的小鼠(图6B),饲喂高脂肪饮食且接受TGFRt15-TGFRs或2t2处理的小鼠表现为毛发整洁且更健康(白发/脱发更少)(图6C和6D)。具体而言,与对照小鼠相比,TGFRt15-TGFRs或2t2处理的小鼠显示出优良的皮肤和毛发外观和质地。这些结果表明,用TGFRt15-TGFRs或2t2处理可改善哺乳动物皮肤和毛发的外观和质地。

[2741] 接下来,给小鼠饲喂对照饮食或高脂肪饮食9周,并且饲喂高脂肪饮食的小鼠亚群用TGFRt15-TGFRs、2t2或21t15-TGFRs处理。处理后四天,测量每组小鼠的空腹体重。相较于饲喂对照饮食的小鼠,饲喂高脂肪饮食且未处理的小鼠以及饲喂高脂肪饮食且经21t15-TGFRs处理的小鼠的空腹体重显著增加。然而,饲喂高脂肪饮食且经TGFRt15-TGFRs或2t2处

理的小鼠的空腹体重相较于上述其它两个高脂肪饮食组减少。研究结束时(第9周)的小鼠空腹体重显示于图7中。

[2742] 为了评估每组小鼠的空腹葡萄糖水平,给小鼠饲喂对照饮食或高脂肪饮食并且未处理或在第44、59和73天用TGFRt15-TGFRs、2t2或21t15-TGFRs处理。处理后4天测量每组小鼠的空腹血糖。如图8所示,第二和第三次剂量(分别在第59天和第73天)之后,饲喂高脂肪饮食且用2t2处理的小鼠(红线)的空腹血糖水平相较于饲喂高脂肪饮食、但未处理的小鼠(黄线)显著降低。饲喂高脂肪饮食且经TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的空腹血糖水平保持恒定(绿线),而饲喂高脂肪饮食且经21t15-TGFRs处理的小鼠的空腹血糖水平增加(蓝线)。

[2743] 实例3:化学疗法诱导的衰老B16F10黑色素瘤细胞表达NK配体

[2744] 材料与方法

[2745] 通过用多烯紫杉醇(7.5μM,西格玛(Sigma))处理细胞3天、随后在完全培养基中恢复4天来诱导B16F10黑色素瘤细胞的细胞衰老。通过用衰老相关β-半乳糖苷酶(SAβ-gal)将细胞染色来获知细胞衰老。简单来说,B16F10对照细胞和衰老细胞(B16F10-SNC)用PBS洗涤一次,用0.5%戊二醛(PBS(pH7.2))固定30分钟。细胞在37℃下用X-gal溶液(1mg/mL X-gal、0.12mM $K_3Fe[CN]_6$、0.12mM $K_4Fe[CN]_6$,和1mM $MgCl_2$/PBS,pH 6.0)染色整夜,并且使用尼康(Nikon)光学显微镜成像。

[2746] 结果

[2747] 使用如上文所述的化学疗法诱导B16F10黑色素瘤细胞发生细胞衰老。如图9A所示,化学疗法诱导衰老的B16F10细胞(B16F10-SNC)就SAβ-gal染色而言呈阳性,而对照B16F10细胞则未染色。接下来,使用RT-qPCR分析衰老基因的表达,其中在第0天或分别在第4、8、12和16天诱导衰老之后分离出RNA。将表达水平相对于对照B16F10细胞归一化。如图9B-9D所示,在实验过程中,从衰老细胞分离出的RNA中p21、IL6和DPP4的表达上调。另外,如图9E和9F所示,在衰老细胞中也诱导了RATE1E和ULBP1(NK活化受体NKG2D配体)的表达,最高表达水平出现在第16天。这些结果表明,化学疗法诱导衰老的B16F10细胞经受活化NK细胞的细胞毒性比对照B16F10细胞强。

[2748] 化疗诱导衰老的B16F10黑色素瘤细胞的干细胞特性的获取

[2749] 为了检查化学疗法诱导衰老的B16F10黑色素瘤细胞是否具有干细胞特性,进行了集落形成分析。简单来说,在六孔板上每孔接种1000个细胞,并且每隔两天更换培养基。如图10A所示(以100倍放大率拍摄影像),培养5周之后,衰老细胞能够形成集落。为了评估集落对干细胞标志物的表达,从集落中分离出RNA并且通过RT-qPCR测定Oct4和Notch4 mRNA的表达。相较于对照B16F10细胞,化学疗法诱导衰老的B16F10黑色素瘤细胞显示癌症干细胞标志物Oct4和Notch 4上调(图10B和10C)。此外,通过用针对CD44、CD24和CD133的抗体染色、随后进行流式细胞术来评估干细胞标志物CD44、CD24和CD133在细胞表面上的表达。如图10D-10F所示,化学疗法诱导衰老的干细胞(B16F10-SNC-CSC)中的双阳性群体($CD44^+CD24^+$、$CD44^+CD133^+$和$CD24^+CD133^+$)相较于对照B16F10增加。

[2750] 化学疗法诱导衰老(CIS)的具有干细胞特性的黑色素瘤细胞比对照B16F10细胞更具“迁移性”和“侵袭性”

[2751] 使用迁移分析法分析了化学诱导衰老(CIS)的具有干细胞特性的黑色素瘤细胞(B16F10-SNC-CSC)的迁移特性。简单来说,将对照B16F10细胞和B16F10-SNC-CSC细胞接种

于六孔培养板上且用p20移液管尖端损伤。在0、12和24小时后对细胞的运动进行成像。如图11A所示,在试管内迁移分析中,化学疗法诱导衰老(CIS)的具有干细胞特性的黑色素瘤细胞(B16F10-SNC-CSC)的迁移性大于对照B16F10细胞。

[2752] 接下来,使用侵袭分析法分析化学疗法诱导衰老的具有干细胞特性的细胞(B16F10-SNC-CSC)的侵袭特性。在涂有基质胶的24孔插入式共培养池上进行侵袭分析。简单来说,将$0.5x10^6$个对照B16F10细胞和B16F10-SNC-CSC细胞接种于上部腔室的无血清培养基中,而下部腔室用补充有10%FBS的培养基填充。培育16小时之后,去除过滤器上表面的细胞,而将过滤器下方的细胞固定且用0.02%结晶紫溶液染色。以100倍放大率对三个视野中的细胞数计数。如图11B和11C所示,化学疗法诱导衰老的具有干细胞特性的细胞在侵入基质胶涂膜时的侵袭性大于对照B16F10细胞。这些结果表明,化学疗法诱导衰老的B16F10肿瘤细胞能够重新获得其增殖能力、获得干细胞特征并且具有增强的迁移能力和侵袭力用于转移。

[2753] 小鼠NK细胞对化学疗法诱导衰老的具有干细胞特性的细胞发挥的细胞毒性活性

[2754] 为了在体内扩增NK细胞,将TGFRt15-TGFRs(10mg/kg)皮下注入C57BL/6小鼠维持4天。从这些小鼠获得脾脏且使用MACS Miltenyi柱纯化NK细胞。纯化的NK细胞然后在试管内利用2t2扩增(图12A)。

[2755] 为了评估所扩增的NK细胞的细胞毒性,用CellTrace紫标记化学疗法诱导衰老的干细胞(B16F10-SNC-CSC)或对照B16F10细胞并且与活化的2t2小鼠NK细胞(从注射10mg/kg TGFRt15-TGFRs维持4天的C57BL/6小鼠的脾脏分离而得)一起以多种E:T比率在试管内培育16小时。B16F10-SNC-CSC和对照B16F10细胞以胰蛋白酶处理,洗涤且再悬浮于含有碘化丙啶(PI)溶液的完全培养基中,并且通过流式细胞术获知细胞毒性。如图12B所示,NK细胞杀死化学疗法诱导衰老的具有干细胞特性的细胞(B16F10-SNC-CSC)的有效性大于对照B16F10细胞。

[2756] 黑色素瘤小鼠模型的组合疗法

[2757] 评估TGFRt15-TGFRs治疗小鼠黑色素瘤模型的黑色素瘤的作用。简单地说,将$5x10^5$个B16F10细胞皮下注射到C57BL/6小鼠中。当肿瘤体积达到约$100mm^3$时,每隔两天用多烯紫杉醇(化学疗法)(5mg/kg)或TA99(200μg)作为单一药剂或以组合形式治疗小鼠,并且一周给予TGFRt15-TGFRs(3mg/kg)一次(图13A)。接受生理盐水、单独的多烯紫杉醇(化学疗法)/TA99或单独的TGFRt15-TGFRs的小鼠用作对照。每个实验组和对照组测试五只小鼠。每隔两天测量肿瘤体积。如图13B和13C所示,在同基因黑色素瘤小鼠模型中,相较于经生理盐水处理的小鼠或经单独的化学疗法或TA99治疗的小鼠,TGFRt15-TGFRs与化学疗法或TA99的组合减缓了肿瘤恶化。

[2758] 实例4:化学治疗剂诱导人胰脏细胞系SW1990的衰老

[2759] 材料和方法

[2760] β-半乳糖苷酶染色:使用市购的试剂盒(Cell SignalingTechnology),根据制造商说明书,通过标准β-半乳糖苷酶染色(pH6.0)证实化学疗法诱导的衰老。次日,去除染色溶液,且用磷酸盐缓冲盐水洗涤细胞,且向孔中添加70%甘油。β-半乳糖苷酶阳性细胞将被染成蓝色,而未处理的对照细胞则不会被染色。

[2761] 流式细胞术:获得一百万个对照细胞和衰老细胞且使用针对干细胞表面标志物的

市购抗体(例如抗CD44和抗CD24抗体(Biolegend))、根据制造商说明书进行染色。然后洗涤细胞,并使用BD Celesta流式细胞仪进行分析。表现出干细胞样特性的细胞对CD44和CD24呈双重阳性。

[2762] 基因表达分析:获得一百万个对照细胞和衰老细胞且使用Trizol(赛默飞世尔(Thermofisher))溶解,随后使用RNA分离试剂盒(凯杰(Qiagen))进行RNA纯化。使用凯杰的cDNA Quantitect试剂盒对RNA进行定量且转变为cDNA。cDNA然后作为标准的Taqman基因表达分析(赛默飞世尔)的模板用于定量衰老、干细胞标志物以及NK配体的相对丰度。

[2763] NK细胞细胞毒性分析:使用市购的NK分离试剂盒(StemCell)从健康的人供体(n=2)中分离出NK细胞,并且使用细胞因子融合分子18t15-12s(100nM)活化整夜。次日,洗涤NK细胞以去除细胞因子分子,并且与CellTrace紫标记的未处理对照肿瘤细胞或化学疗法诱导衰老的肿瘤细胞以4:1的E:T比率混合20小时。次日,用胰蛋白酶消化细胞,并使用流式细胞仪分析每个孔的全部内含物,并分析细胞的抑制百分比。

[2764] 结果

[2765] 通过分别用2.5μM和6.25μM的化学治疗药物凯素(Abraxane)(塞尔基因公司(Celgene))和吉西他滨(Gemcitabine)(西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich))处理3天来诱导人胰脏肿瘤细胞系SW1990衰老。未处理的SW1990细胞用作对照。3天后更换培养基,且使细胞在培养基中静置4天。如图14所示,经化学治疗药物处理的衰老细胞的β-半乳糖苷酶染色呈阳性(蓝色),而对照细胞未染色。处理后第4天、第11天和第22天,评估衰老细胞和对照细胞对衰老和干细胞标志物的表达。如图14所示,与对照细胞相比,衰老细胞对CD44和CD24的双重阳性染色随时间增加。此外,在第0天以及在处理后的第2、4和24天,还利用上述基因表达分析法分析化学疗法诱导衰老的SW1990细胞对其衰老标志物(包括DPP4、IL6和p21)、干细胞标志物(包括Oct3/4、CD24和CD44)和NK配体(包括连接素和MICA)的表达。如图15所示,所提到的所有标志物的表达随时间增加。

[2766] 试管内活化的人NK细胞的细胞毒性

[2767] 为了评估试管内活化的人NK细胞(经18t15-12s处理)的细胞毒性,通过分别用2.5μM和6.25μM的化学治疗药物凯素(塞尔基因公司)和吉西他滨(西格玛奥德里奇公司)处理3天来诱导人胰脏肿瘤细胞系SW1990的衰老。未处理的SW1990细胞用作对照。3天后更换培养基,且使细胞在培养基中静置30天。每4天更换一次培养基。获得活化NK细胞且利用上述NK细胞的细胞毒性分析法评估其对化学疗法诱导衰老的肿瘤细胞和未处理的对照肿瘤细胞的细胞毒性。如图16所示,活化NK细胞对对照SW1990细胞(SW1990)和衰老SW1990细胞(SW1990s)均显示出增加的细胞毒性。

[2768] 实例5:IL-12/IL-15RαSu DNA构建体的产生

[2769] 在一个非限制性实例中,产生IL-12/IL-15RαSuDNA构建体(图17)。人IL-12亚单元序列、人IL-15RαSu序列、人IL-15序列、人组织因子219序列和人IL-18序列从UniProt网站获得,并且这些序列的DNA由金唯智(Genewiz)合成。如下制造DNA构建体:用GS(3)接头将IL-12亚单元β(p40)连接到IL-12亚单元α(p35)以产生IL-12的单链形式,并且然后直接将IL-12序列连接到IL-15RαSu序列。最终的IL-12/IL-15RαSu DNA构建体序列由金唯智合成。

[2770] IL12/IL-15RαSu构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:181):

[2771] (信号肽)

[2772] ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTCCTCTTTAGCAGCGCCTACTCC

[2773] (人IL-12亚单元β(p40))

[2774] ATTTGGGAACTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTCGAACTGGACTGGTATCCCGATGCTCCCGGCGAAATG
GTGGTGCTCACTTGTGACACCCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCCTCGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTC
CGGAAAGACCCTCACAATCCAAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACACATGCCACAAGGGAGGCGAGGTGC
TCAGCCATTCCTTATTATTATTACACAAGAAGGAAGACGGAATCTGGTCCACCGACATTTTAAAAGATCAGAAGGAG
CCCAAGAATAAGACCTTTTTAAGGTGTGAGGCCAAAAACTACAGCGGTCGTTTCACTTGTTGGTGGCTGACCACCAT
TTCCACCGATTTAACCTTCTCCGTGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCTCAAGGTGTGACATGTGGAGCCGCTA
CCCTCAGCGCTGAGAGGGTTCGTGGCGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAGATAGCGCTTGT
CCCGCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAACTCAAGTACGAGAACTACACCTC
CTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCCGATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAAATAGCCGGC
AAGTTGAGGTCTCTTGGGAATATCCCGACACTTGGAGCACACCCCACAGCTACTTCTCTTTAACCTTTTGTGTGCAA
GTTCAAGGTAAAAGCAAGCGGGAGAAGAAAGACCGGGTGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTCATCTGTCGGAA
GAACGCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACTCCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCAGCGTGCCTTGTT
CC

[2775] (接头)

[2776] GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCT

[2777] (人IL-12亚单元α(p35))

[2778] CGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGTTCCCTTGTTTACACCACAGCCAGAATTTACTG
AGGGCCGTGAGCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAATTTTACCCTTGCACCAGCGAGGAGATCGACCA
TGAAGATATCACCAAGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTTTACCTCTGGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTC
TCAACTCTCGTGAAACCAGCTTCATCACAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGAAGACCTCCTTTATGATGGCTTTA
TGCCTCAGCTCCATCTACGAGGATTTAAAGATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTCATGGA
CCCTAAACGGCAGATCTTTTTAGACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCAAGCTTTAAACTTCAACT
CCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCCTCCCTCGAGGAGCCCGATTTTTACAAGACAAAGATCAAACTGTGCATTTTACTC
CACGCCTTTAGGATCCGGGCCGTGACCATTGACCGGGTCATGAGCTATTTAAACGCCAGC

[2779] (人IL-15Rα寿司域)

[2780] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGC
CGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAA
GGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[2781] 实例6:IL-18/TF/IL-15DNA构建体的产生

[2782] 在一个非限制性实例中,如下制造IL-18/TF/IL-15构建体(图18):将IL-18序列连接到组织因子219的N端编码区,并且进一步将IL-18/TF构建体与IL-15的N端编码区连接。由金唯智合成的IL-18/TF/IL-15构建体(包括前导序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:177):

[2783] (信号肽)

[2784] ATGAAGTGGGTCACATTTATCTCTTTACTGTTCCTCTTCTCCAGCGCCTACAGC

[2785] (人IL-18)

[2786] TACTTCGGCAAACTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGAT

CAAGGTAACCGGCCTCTGTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGACAATGCCCCCCGGACCATCTTCATTAT
CTCCATGTACAAGGACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAAGTGTGAGAAAATCAGCACTTTAT
CTTGTGAGAACAAGATCATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCCGATAACATCAAGGACACCAAGTCCGATATCATC
TTCTTCCAGCGGTCCGTGCCCGGTCACGATAACAAGATGCAGTTCGAATCCTCCTCCTACGAGGGCTACTTTTTAGC
TTGTGAAAAGGAGAGGGATTTATTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATCGTTCCATCATGTTCA
CCGTCCAAAACGAGGAT

[2787] (人组织因子219)

[2788] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTC
GAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATG
TTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGG
TGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTT
ACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGAC
AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAA
TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[2789] (人IL-15)

[2790] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC
ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG
CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[2791] 实例7:IL-12/IL-15RαSu和IL-18/TF/IL-15融合蛋白的分泌

[2792] 将IL-12/IL-15RαSu和IL-18/TF/IL-15DNA构建体克隆到pMSGV-1修饰的逆转录病毒表达载体(如Hughes,《人基因疗法(Hum Gene Ther)》16:457-72,2005中所述,所述文献以引用的方式并入本文)中,并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达允许形成和分泌可溶性IL-18/TF/IL-15:IL-12/IL-15RαSu蛋白复合物(称为18t15-12s;图19和图20)。使用抗TF抗体亲和色谱法和尺寸排阻色谱法从CHO-K1细胞培养上清液中纯化18t15-12s蛋白,得到由IL-12/IL-15RαSu和IL-18/TF/IL-15融合蛋白组成的可溶性(非聚集)蛋白复合物。

[2793] IL12/IL-15RαSu融合蛋白(包括信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:180):

[2794] (信号肽)

[2795] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[2796] (人IL-12亚单元β(p40))

[2797] IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCH
KGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV
TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKP
LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW

ASVPCS

[2798] (接头)

[2799] GGGGSGGGGSGGGGS

[2800] (人IL-12亚单元α(p35))

[2801] RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELT KNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQ ALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

[2802] (人IL-15Rα寿司域)

[2803] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[2804] IL-18/TF/IL-15融合蛋白(包括信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO: 176):

[2805] (信号肽)

[2806] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[2807] (人IL-18)

[2808] YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCE KISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGD RSIMFTVQNED

[2809] (人组织因子219)

[2810] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[2811] (人IL-15)

[2812] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[2813] 在一些情况下,使前导(信号序列)肽从完整的多肽中裂解以产生可溶或可以分泌的成熟形式。

[2814] 实例8:通过免疫亲和色谱法纯化18t15-12s

[2815] 将抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团™ AKTAAvant蛋白纯化系统。除洗脱步骤外,所有步骤的流速均为4mL/min,洗脱步骤的流速为2mL/min。

[2816] 18t15-12s的细胞培养物收获物用1M Tris碱调节到pH 7.4,并且加载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。加载样品后,用5个柱体积的PBS洗涤柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸pH2.9洗脱。收集280nm吸光度,并且然后通过添加1MTris碱将样品中和到pH7.5-8.0。然后使用具有30KDa分子量截断值的Amicon®离心过滤器,使中和的样品在PBS中缓冲交换。图21显示18t15-12s复合物结合抗TF抗体亲和柱,其中TF是18t15-12s结合伴侣。缓冲交换的蛋白质样品在2-8℃下存储以用于进一步的生化分析和生物活性测试。

[2817] 每次洗脱后,接着使用6个柱体积的0.1M甘氨酸pH 2.5剥离抗TF抗体亲和柱。然后使用10个柱体积的PBS、0.05%叠氮化钠中和所述柱,并且在2-8℃下存储。

[2818] 实例9:18t15-12s的尺寸排阻色谱法

[2819] 将通用电气医疗集团Superdex®200Increase 10/300GL凝胶过滤柱连接到通用电

气医疗集团AKTA™ Avant蛋白纯化系统。用2个柱体积的PBS平衡所述柱。流速为0.8mL/min。使用毛细管回路将200μL 1mg/mL的18t15-12s复合物注入色谱柱上。用1.25个柱体积的PBS追踪注射液。SEC色谱如图22所示。有一个主要的18t15-12s蛋白峰以及一个较小的高分子量峰,可能是由于18t15-12s二聚体或聚集体的糖基化程度不同所致。

[2820] 实例10:18t15-12s的SDS-PAGE

[2821] 为了测定纯度和蛋白质分子量,使用4-12%NuPage Bis-Tris蛋白质凝胶SDS-PAGE分析纯化的18t15-12s蛋白质样品。凝胶用InstantBlue™染色约30分钟,接着在纯化水中脱色整夜。图23显示抗TF抗体亲和纯化的18t15-12s的示例SDS凝胶,其色带出现在预期分子量(66kDa和56kDa)处。

[2822] 实例11:CHO-K1细胞中的18t15-12s糖基化

[2823] 使用蛋白质脱糖基化混合物II试剂盒(新英格兰生物实验室(New England Biolabs)),根据制造商说明书,证实CHO-K1细胞中的18t15-12s糖基化。图24显示脱糖基化和未脱糖基化的18t15-12s的示例SDS PAGE。脱糖基化降低18t15-12s的分子量,如图24泳道4所示。

[2824] 实例12:18t15-12s复合物的重组蛋白定量

[2825] 使用标准夹层ELISA方法检测并定量了18t15-12s复合物(图25-28)。抗人组织因子抗体充当捕获抗体,并且生物素化的抗人IL-12、IL-15或IL-18抗体(BAF 219、BAM 247、D045-6,皆出自安迪生物公司)充当检测抗体。还使用抗人组织因子捕获抗体(I43)和抗人组织因子抗体检测抗体检测纯化的18t15-12s蛋白复合物中的组织因子。将I43/抗TF抗体ELISA与相似浓度的纯化组织因子进行比较。

[2826] 实例13:18t15-12s复合物的免疫刺激能力

[2827] 为了评估18t15-12s复合物的IL-15免疫刺激活性,向200μL IMDM:10%FBS培养基中的32Dβ细胞(104个细胞/孔)中添加浓度递增的18t15-12s。将32Dβ细胞在37℃下培育3天。在第四天,添加WST-1增殖试剂(10μL/孔),并且在4小时后,测量450nm吸光度,以基于WST-1裂解为可溶性甲臜染料来测定细胞增殖。评估人重组IL-15作为阳性对照的生物活性。如图29所示,18t15-12s展现32Dβ细胞的IL-15依赖性细胞增殖。与人重组IL-15相比,18t15-12s复合物展现降低的活性,可能是由于IL-18和组织因子与IL-15域的连接所致。

[2828] 为了评估18t15-12s复合物中IL-12和IL-18的个别活性,将18t15-12s添加到200μLIMDM:10%热灭活的FBS培养基中HEK-Blue IL-12和HEK-Blue IL-18报告细胞(5×10^4个细胞/孔;hkb-il12和hkb-hmil18,英伟杰(InvivoGen))中。将细胞在37℃下培育整夜。将20μl诱导的HEK-Blue IL-12和HEK-Blue IL-18报告细胞上清液添加到180μl QUANTI-Blue(英伟杰)中,并且在37℃下培育1-3小时。通过测量620nm吸光度来评估IL-12或IL-18活性。人重组IL-12或IL-18作为阳性或阴性对照加以评估。如图30和图31所示,18t15-12s复合物中的每个细胞因子域均保持特定生物活性。与人重组IL-18或IL-12相比,18t15-12s的活性降低,可能是由于IL-15和组织因子与IL-18域的连接以及IL-12与IL-15Rα寿司域的连接所致。

[2829] 实例14:18t15-12s复合物诱导细胞因子诱导的记忆样NK细胞产生

[2830] 用饱和量的IL-12(10ng/mL)、IL-15(50ng/mL)和IL-18(50ng/mL)整夜刺激纯化的NK细胞后,可离体诱导细胞因子诱导的记忆样NK细胞产生。这些记忆样特性已通过IL-2受

体α(IL-2Rα、CD25)、CD69(和其它活化标志物)的表达和增加的IFN-γ产生进行测量。为了评估18t15-12s复合物促进细胞因子诱导的记忆样NK细胞产生的能力,用0.01nM至10000nM的18t15-12s复合物或个别细胞因子的组合(重组IL-12(10ng/mL)、IL-18(50ng/mL)和IL-15(50ng/mL))刺激纯化的人NK细胞(>95%CD56+)14-18小时。通过抗体染色和流式细胞术评估细胞表面CD25和CD 69表达以及细胞内IFN-γ水平。

[2831] 从血库获得新鲜的人白细胞,并且用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司(StemCellTechnologies))分离出CD56+NK细胞。NK细胞的纯度>70%,并且通过用CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特异性抗体(BioLegend)染色得到证实。对细胞进行计数,并且以0.2×10^6个/mL再悬浮于平底96孔板中的0.2mL完全培养基(RPMI 1640(吉毕科公司(Gibco),所述完全培养基补充有2mM L-谷氨酰胺(赛默生命技术公司(Thermo LifeTechnologies))、青霉素(赛默生命技术公司)、链霉素(赛默生命技术公司)和10%FBS(Hyclone))。°在37℃、5%CO_2下用细胞因子hIL-12(10ng/mL)(Biolegend)、hIL-18(50ng/mL)(安迪生物公司)和hIL-15(50ng/mL)(NCI)的混合物或用0.01nM至10000nM 18t15-12s刺激细胞14-18小时。然后收获细胞,并且用CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特异性抗体(BioLegend)进行表面染色30分钟。染色后,将细胞在FACS缓冲液(1×PBS(Hyclone),含0.5%BSA(EMD密理博(EMDMillipore))和0.001%叠氮化钠(西格玛(Sigma)))中洗涤(室温下1500RPM 5分钟)。洗涤两次后,使用BD FACSCelesta™流式细胞仪分析细胞(绘制的数据-平均荧光强度;图32A和图32B)。

[2832] 从血库获得新鲜的人白细胞,并且用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)分离CD56+NK细胞。NK细胞的纯度>70%,并且通过用CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特异性抗体(BioLegend)染色得到证实。对细胞进行计数,并且以0.2×10^6个/mL再悬浮于平底96孔板中的0.2mL完全培养基(RPMI 1640(吉毕科公司),所述完全培养基补充有2mM L-谷氨酰胺(赛默生命技术公司)、青霉素(赛默生命技术公司))、链霉素(赛默生命技术公司)和10%FBS(Hyclone))。在37℃,5%CO2下用hIL-12(10ng/mL)(Biolegend)、hIL-18(50ng/mL)(安迪)和hIL-15(50ng/mL)(NCI)的细胞因子混合物或0.01nM至10000nM 18t15-12s复合物刺激细胞14-18小时。然后将细胞用10μg/mL布雷菲德菌素(Brefeldin)A(西格玛)和1×莫能菌素(Monensin)(eBioscience)处理4小时,然后收集并用CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特异性抗体染色30分钟。染色后,将细胞在FACS缓冲液(1×PBS(Hyclone),含0.5%BSA(EMD密理博)和0.001%叠氮化钠(西格玛))中洗涤(室温下1500RPM 5分钟),并且在室温下固定10分钟。固定后,将细胞在1×通透缓冲液(eBioscience)中洗涤(室温下1500RPM 5分钟),并且在室温下用IFN-γ-PE Ab(Biolegend)染色30分钟。用1×通透缓冲液再次洗涤细胞,然后用FACS缓冲液洗涤。将细胞集结粒再悬浮于300μl FACS缓冲液中,并且使用BD FACSCelesta™流式细胞仪进行分析(绘制的IFN-γ阳性细胞百分比;图33)。

[2833] 实例15:NK细胞在试管内对人肿瘤细胞的细胞毒性

[2834] 在存在浓度递增的18t15-12s复合物或作为对照的细胞因子混合物的情况下,将人骨髓性白血病细胞K562(CellTrace紫标记)与纯化的人NK细胞一起培育。20小时后,收获培养物,用碘化丙啶(PI)染色,并且通过流式细胞术评估。如图34所示,18t15-12s复合物以与细胞因子混合物相似或更大的水平诱导人NK对K562的细胞毒性,其中18t15-12s复合物

和细胞因子混合物均诱导比培养基对照更大的细胞毒性。

[2835] 实例16:IL-12/IL-15RαSu/αCD16scFv和IL-18/TF/IL-15DNA构建体的产生

[2836] 在一个非限制性实例中,产生IL-12/IL-15RαSu/αCD16scFv和IL-18/TF/IL-15DNA构建体(图35和图36)。人IL-12亚单元序列、人IL-15RαSu序列、人IL-15序列、人组织因子219序列和人IL-18序列由金唯智合成。如下制造DNA构建体:用GS(3)接头将IL-12亚单元β(p40)连接到IL-12亚单元α(p35)以产生IL-12的单链形式,直接将IL-12序列连接到IL-15RαSu序列,并且直接将IL-12/IL-15RαSu构建体连接到αCD16scFv的N端编码区。

[2837] IL-12/IL-15RαSu/αCD16scFv构建体的核酸序列如下(SEQ ID NO:226):

[2838] (信号肽)

[2839] ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTCCTCTTTAGCAGCGCCTACTCC

[2840] (人IL-12亚单元β(p40))

[2841] ATTTGGGAACTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTCGAACTGGACTGGTATCCCGATGCTCCCGGCGAAATGGTGGTGCTCACTTGTGACACCCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCCTCGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTCCGGAAAGACCCTCACAATCCAAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACACATGCCACAAGGGAGGCGAGGTGCTCAGCCATTCCTTATTATTATTACACAAGAAGGAAGACGGAATCTGGTCCACCGACATTTTAAAAGATCAGAAGGAGCCCAAGAATAAGACCTTTTTAAGGTGTGAGGCCAAAAACTACAGCGGTCGTTTCACTTGTTGGTGGCTGACCACCATTTCCACCGATTTAACCTTCTCCGTGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCTCAAGGTGTGACATGTGGAGCCGCTACCCTCAGCGCTGAGAGGGTTCGTGGCGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAGATAGCGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAACTCAAGTACGAGAACTACACCTCCTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCCGATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAAATAGCCGGCAAGTTGAGGTCTCTTGGGAATATCCCGACACTTGGAGCACACCCCACAGCTACTTCTCTTTAACCTTTTGTGTGCAAGTTCAAGGTAAAAGCAAGCGGGAGAAGAAAGACCGGGTGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTCATCTGTCGGAAGAACGCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACTCCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCAGCGTGCCTTGTTCC

[2842] (接头)

[2843] GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCT

[2844] (人IL-12亚单元α(p35))

[2845] CGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGTTCCCTTGTTTACACCACAGCCAGAATTTACTGAGGGCCGTGAGCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAATTTTACCCTTGCACCAGCGAGGAGATCGACCATGAAGATATCACCAAGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTTTACCTCTGGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTCTCAACTCTCGTGAAACCAGCTTCATCACAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGAAGACCTCCTTTATGATGGCTTTATGCCTCAGCTCCATCTACGAGGATTTAAAGATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTCATGGACCCTAAACGGCAGATCTTTTTAGACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCAAGCTTTAAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCCTCCCTCGAGGAGCCCGATTTTTACAAGACAAAGATCAAACTGTGCATTTTACTCCACGCCTTTAGGATCCGGGCCGTGACCATTGACCGGGTCATGAGCTATTTAAACGCCAGC

[2846] (人IL-15Rα寿司域)

[2847] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[2848] (抗人CD16轻链可变域)

[2849] TCCGAGCTGACCCAGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAGGTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACAACAGGCCCTCCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGGGCCAT

[2850] (接头)

[2851] GGCGGCGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGAGGATCC

[2852] (抗人CD16重链可变域)

[2853] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCGACGACTACGGCATGTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGAACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGG

[2854] 还如下制造构建体:将IL-18序列连接到组织因子219的N端编码区,并且将IL-18/TF构建体与IL-15的N端编码区连接(图36)。IL-18/TF/IL-15构建体(包括前导序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:177):

[2855] (信号肽)

[2856] ATGAAGTGGGTCACATTTATCTCTTTACTGTTCCTCTTCTCCAGCGCCTACAGC

[2857] (人IL-18)

[2858] TACTTCGGCAAACTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGATCAAGGTAACCGGCCTCTGTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGACAATGCCCCCCGGACCATCTTCATTATCTCCATGTACAAGGACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAAGTGTGAGAAAATCAGCACTTTATCTTGTGAGAACAAGATCATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCCGATAACATCAAGGACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTGCCCGGTCACGATAACAAGATGCAGTTCGAATCCTCCTCCTACGAGGGCTACTTTTTAGCTTGTGAAAAGGAGAGGGATTTATTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATCGTTCCATCATGTTCACCGTCCAAAACGAGGAT

[2859] (人组织因子219)

[2860] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[2861] (人IL-15)

[2862] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC

ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG
CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[2863] 实例17:IL-12/IL-15RαSu/αCD16scFv和IL-18/TF/IL-15融合蛋白的分泌

[2864] 将IL-12/IL-15RαSu/αCD16scFv和IL-18/TF/IL-15构建体克隆到pMSGV-1修饰的逆转录病毒表达载体(Hughes,《人基因疗法》16:457-72,2005,通过引用并入本文)中,然后将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达引起可溶性IL-18/TF/IL-15:IL-12/IL-15RαSu/αCD16scFv蛋白复合物(称为18t15-12s/αCD16;图37和图38)的分泌。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达引起可溶性IL-18/TF/IL-15:IL-12/IL-15RαSu/αCD16scFv蛋白复合物(称为18t15-12s/αCD16;图37和图38)的分泌,所述复合物可通过抗TF Ab亲和法和其它色谱方法纯化。在一些情况下,使信号肽从完整多肽中裂解以产生成熟形式。

[2865] IL-12/IL-15RαSu/αCD16scFv融合蛋白(包括信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ IDNO:225):

[2866] (信号肽)

[2867] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[2868] (人IL-12亚单元β(p40))

[2869] IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCH
KGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV
TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKP
LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCS

[2870] (接头)

[2871] GGGGSGGGGSGGGGS

[2872] (人IL-12亚单元α(p35))

[2873] RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELT
KNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQ
ALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

[2874] (人IL-15Rα寿司结构域)

[2875] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[2876] (抗人CD16轻链可变域)

[2877] SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTA
SLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVGH

[2878] (接头)

[2879] GGGGSGGGGSGGGGS

[2880] (抗人CD16重链可变域)

[2881] EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFT
ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLLFDYWGQGTLVTVSR

[2882] IL-18/TF/IL-15融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:221):

[2883] (信号肽)

[2884] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[2885] (人IL-18)

[2886] YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED

[2887] (人组织因子219)

[2888] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[2889] (人IL-15)

[2890] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[2891] 实例18:IL-18/IL-15RαSu和IL-12/TF/IL-15DNA构建体的产生

[2892] 在一个非限制性实例中,产生IL-18/IL-15RαSu和IL-12/TF/IL-15DNA构建体。人IL-18亚单元序列、人IL-15RαSu序列、人IL-12序列、人组织因子219序列和人IL-15序列由金唯智合成。如下制造DNA构建体:将IL-18直接连接到IL-15RαSu。还如下制造另一种构建体:将IL-12序列连接到人组织因子219形式的N端编码区,并且进一步将IL-12/TF构建体连接到IL-15的N端编码区。如上所述,使用IL-12的单链形式(p40-接头-p35)。

[2893] IL-18/IL-15RαSu构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:320):

[2894] (信号肽)

[2895] ATGAAGTGGGTCACATTTATCTCTTTACTGTTCCTCTTCTCCAGCGCCTACAGC

[2896] (人IL-18)

[2897] TACTTCGGCAAACTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGATCAAGGTAACCGGCCTCTGTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGACAATGCCCCCCGGACCATCTTCATTATCTCCATGTACAAGGACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAAGTGTGAGAAAATCAGCACTTTATCTTGTGAGAACAAGATCATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCCGATAACATCAAGGACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTGCCCGGTCACGATAACAAGATGCAGTTCGAATCCTCCTCCTACGAGGGCTACTTTTTAGCTTGTGAAAAGGAGAGGGATTTATTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATCGTTCCATCATGTTCACCGTCCAAAACGAGGAT

[2898] (人IL-15Rα寿司域)

[2899] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[2900] IL-12/TF/IL-15构建体(包括前导序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:321):

[2901] (信号肽)

[2902] ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTCCTCTTTAGCAGCGCCTACTCC

[2903] (人IL-12亚单元β(p40))

[2904] ATTTGGGAACTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTCGAACTGGACTGGTATCCCGATGCTCCCGGCGAAATG
GTGGTGCTCACTTGTGACACCCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCCTCGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTC
CGGAAAGACCCTCACAATCCAAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACACATGCCACAAGGGAGGCGAGGTGC
TCAGCCATTCCTTATTATTATTACACAAGAAGGAAGACGGAATCTGGTCCACCGACATTTTAAAAGATCAGAAGGAG
CCCAAGAATAAGACCTTTTTAAGGTGTGAGGCCAAAAACTACAGCGGTCGTTTCACTTGTTGGTGGCTGACCACCAT
TTCCACCGATTTAACCTTCTCCGTGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCTCAAGGTGTGACATGTGGAGCCGCTA
CCCTCAGCGCTGAGAGGGTTCGTGGCGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAGATAGCGCTTGT
CCCGCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAAACTCAAGTACGAGAACTACACCTC
CTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCCGATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAAATAGCCGGC
AAGTTGAGGTCTCTTGGGAATATCCCGACACTTGGAGCACACCCCACAGCTACTTCTCTTTAACCTTTTGTGTGCAA
GTTCAAGGTAAAAGCAAGCGGGAGAAGAAAGACCGGGTGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTCATCTGTCGGAA
GAACGCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACTCCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCAGCGTGCCTTGTT
CC

[2905] (接头)

[2906] GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCT

[2907] (人IL-12亚单元α(p35))

[2908] CGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGTTCCCTTGTTTACACCACAGCCAGAATTTACTG
AGGGCCGTGAGCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAATTTTACCCTTGCACCAGCGAGGAGATCGACCA
TGAAGATATCACCAAGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTTTACCTCTGGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTC
TCAACTCTCGTGAAACCAGCTTCATCACAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGAAGACCTCCTTTATGATGGCTTTA
TGCCTCAGCTCCATCTACGAGGATTTAAAGATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTCATGGA
CCCTAAACGGCAGATCTTTTTAGACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCAAGCTTTAAACTTCAACT
CCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCCTCCCTCGAGGAGCCCGATTTTTACAAGACAAAGATCAAACTGTGCATTTTACTC
CACGCCTTTAGGATCCGGGCCGTGACCATTGACCGGGTCATGAGCTATTTAAACGCCAGC

[2909] (人组织因子219)

[2910] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTC
GAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATG
TTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGG
TGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTT
ACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGAC
AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAA
TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[2911] (人IL-15)

[2912] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC
ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG

CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[2913] 实例19:IL-18/IL-15RαSu和IL-12/TF/IL-15融合蛋白的分泌

[2914] 将IL-18/IL-15RαSu和IL-12/TF/IL-15构建体克隆到pMSGV-1修饰的逆转录病毒表达载体(Hughes,《人基因疗法》16:457-72,2005,通过引用并入本文)中,并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达引起可溶性IL-12/TF/IL-15:IL-18/IL-15RαSu蛋白复合物(称为12t15/s18)的分泌,所述复合物可通过抗TFAb亲和法和其它色谱方法纯化。

[2915] IL-18/IL-15RαSu融合蛋白(包括信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:322):

[2916] (信号肽)

[2917] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[2918] (人IL-18)

[2919] YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED

[2920] (人IL-15Rα寿司域)

[2921] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[2922] IL-12/TF/IL-15融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:323):

[2923] (信号肽)

[2924] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[2925] (人IL-12亚单元β(p40))

[2926] IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

[2927] (接头)

[2928] GGGGSGGGGSGGGGS

[2929] (人IL-12亚单元α(p35))

[2930] RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

[2931] (人组织因子219)

[2932] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[2933] (人IL-15)

[2934] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[2935] 在一些情况下,使前导肽从完整多肽中裂解以产生可溶或可以分泌的成熟形式。

[2936] 实例20:18t15-12s16复合物的重组蛋白定量

[2937] 使用标准夹层ELISA方法检测并定量18t15-12s16复合物(包含IL-12/IL-15RαSu/αCD16scFv;IL-18/TF/IL-15)(图39)。抗人组织因子抗体/IL-2或抗TF Ab/IL-18充当捕获抗体,并且生物素化抗人IL-12或IL-18抗体(BAF 219、D045-6,均出自安迪生物公司)充当检测抗体。还使用抗人组织因子抗体(I43)和抗人组织因子抗体检测抗体来检测组织因子。

[2938] 实例21:TGFβRII/IL-15RαSu和IL-21/TF/IL-15DNA构建体的产生

[2939] 在一个非限制性实例中,产生TGFβRII/IL-15RαSuDNA构建体(图40)。人TGFβRII二聚体和人IL-21序列从UniProt网站获得,并且这些序列的DNA由金唯智合成。如下制造DNA构建体:用接头将TGFβRII连接到另一TGFβRII以产生TGFβRII的单链形式,并且然后直接将TGFβRII单链二聚体序列连接到IL-15RαSu的N端编码区。

[2940] TGFβRII/IL-15RαSu构建体(包括信号序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:196):

[2941] (信号肽)

[2942] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[2943] (人TGFβRII-第1片段)

[2944] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCACGATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGAT

[2945] (接头)

[2946] GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[2947] (人TGFβRII-第2片段)

[2948] ATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCACAATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC

[2949] (人IL-15Rα寿司域)

[2950] ATCACGTGTCCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGTATTAGA

[2951] 另外,如下制造IL-21/TF/IL-15构建体:将IL-21序列连接到组织因子219的N端编码区,并且进一步将IL-21/TF构建体连接到IL-15的N端编码区(图41)。IL-21/TF/IL-15构建体(包括前导序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:192):

[2952] (信号肽)

[2953] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[2954] (人IL-21)

[2955] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTAC GTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTG CTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGA AGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAG AAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAG GACCCACGGCTCCGAGGACTCC

[2956] (人组织因子219)

[2957] TCCGGCACCACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTG GAATGGGAACCCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGCAGATCTCCACCAAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTG CTTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCGACGAAATCGTCAAGGACGTCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGG TCTTTTCCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAATTCCCCCGAATTC ACCCCTTATTTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGGCACCAAGGTGAACGTCAC CGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGTGCGGCGGAATAACACATTTTTATCCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGACCTCA TCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACCGCTAAGACCAACACCAACGAGTTTTTAATT GACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCGGAAGAGCAC AGATTCCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[2958] (人IL-15)

[2959] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[2960] 实例22:TGFβRII/IL-15RαSu和IL-21/TF/IL-15融合蛋白的分泌

[2961] 将TGFβRII/IL-15RαSu和IL-21/TF/IL-15DNA构建体克隆到pMSGV-1修饰的逆转录病毒表达载体(如Hughes,《人基因疗法》16:457-72,2005中所描述,其通过引用并入本文)中,并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达引起可溶性IL-21/TF/IL-15:TGFβRII/IL-15RαSu蛋白复合物(称为21t15-TGFRs;图42和图43)的分泌。使用抗TF抗体亲和色谱法和其它色谱方法从CHO-K1细胞培养上清液中纯化21t15-TGFRs复合物。

[2962] TGFβRII/IL-15RαSu构建体(包括信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:195):

[2963] (信号肽)

[2964] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[2965] (人TGFβRII-第1片段)

[2966] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[2967] (接头)

[2968] GGGGSGGGGSGGGGS

[2969] (人TGFβRII-第2片段)

[2970] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[2971] (人IL-15Rα寿司域)

[2972] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[2973] 成熟的IL-21/TF/IL-15融合蛋白(包括信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:191):

[2974] (信号肽)

[2975] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[2976] (人IL-21)

[2977] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINV SIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS

[2978] (人组织因子219)

[2979] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[2980] (人IL-15)

[2981] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[2982] 在一些情况下,使前导肽从完整多肽中裂解以产生可溶或可以分泌的成熟形式。

[2983] 实例23:通过免疫亲和色谱法纯化21t15-TGFRs

[2984] 将抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团AKTA™ Avant蛋白纯化系统。除洗脱步骤外,所有步骤的流速均为4mL/min,洗脱步骤的流速为2mL/min。

[2985] 21t15-TGFRs的细胞培养收获物用1M Tris碱调节到pH 7.4,并且加载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。加载样品后,用5个柱体积的PBS洗涤柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸pH2.9洗脱。收集280nm吸光度,并且然后接着通过添加1MTris碱将样品中和到pH7.5-8.0。然后使用具有30KDa分子量截断值的Amicon®离心过滤器,使中和的样品在PBS中缓冲交换。图44显示21t15-TGFRs复合物结合抗TF抗体亲和柱,其中TF是21t15-TGFRs结合伴侣。将缓冲交换的蛋白质样品在2-8℃下存储,以用于进一步的生化分析和生物活性测试。

[2986] 每次洗脱后,接着使用6个柱体积的0.1M甘氨酸pH 2.5剥离抗TF抗体亲和柱。然后使用10个柱体积的PBS、0.05%叠氮化钠中和所述柱,并且在2-8℃下存储。

[2987] 实例24:21t15-TGFRs的尺寸排阻色谱

[2988] 将通用电气医疗集团Superdex®200Increase 10/300GL凝胶过滤柱连接到通用电气医疗集团AKTA™ Avant蛋白纯化系统。用2个柱体积的PBS平衡所述柱。流速为0.8mL/min。使用毛细管回路将200μL 1mg/mL的21t15-TGFRs复合物注入色谱柱上。然后用1.25个柱体积的PBS追踪注射液。SEC色谱如图45所示。有两个蛋白质峰,可能代表21t15-TGFRs的单体和二聚体形式。

[2989] 实例25:21t15-TGFRs的SDS-PAGE

[2990] 为了测定纯度和蛋白质分子量,使用4-12%NuPage Bis-Tris蛋白质凝胶SDS-PAGE在还原条件下分析纯化的21t15-TGFRs复合蛋白质样品。凝胶用InstantBlue™染色约30分钟,接着在纯化水中脱色整夜。图46显示抗TF抗体亲和纯化的21t15-TGFRs的示例SDS凝胶,其色带出现在39.08kDa和53kDa处。

[2991] 使用蛋白质脱糖基化混合物II试剂盒(新英格兰生物实验室)和制造商说明书,证实CHO细胞中的21t15-TGFRs糖基化。脱糖基化降低21t15-TGFRs的分子量,如图46泳道4所示。

[2992] 实例26:21t15-TGFRs复合物的重组蛋白定量

[2993] 使用标准夹层ELISA方法检测且定量21t15-TGFRs复合物(图47-50)。抗人组织因子抗体充当捕获抗体并且生物素化抗人IL-21、IL-15或TGFβRII充当检测抗体。还使用抗人组织因子捕获抗体(I43)和抗人组织因子抗体检测抗体来检测组织因子。将I43/抗TF抗体ELISA与相似浓度下的纯化组织因子进行比较。

[2994] 实例27:21t15-TGFRs复合物的免疫刺激能力

[2995] 为了评估21t15-TGFRs复合物的IL-15免疫刺激活性,向200μLIMDM:10%FBS培养基中的32Dβ细胞(10^4个细胞/孔)中添加浓度递增的21t15-TGFRs,并且将细胞在37℃下培育3天。在第四天,然后添加WST-1增殖试剂(10μL/孔),并且在4小时后,测量450nm吸光度,以基于WST-1裂解为可溶性甲臜染料来测定细胞增殖。评估人重组IL-15作为阳性对照的生物活性。如图51所示,21t15-TGFRs展现IL-15依赖性32Dβ细胞增殖。与人重组IL-15相比,21t15-TGFRs复合物减少了,这可能是由于IL-21和组织因子与IL-15域的连接所致。

[2996] 另外,HEK-BlueTGFβ报告细胞(hkb-tgfb,英伟杰)用于测量21t15-TGFRs阻断TGFβ1活性的能力(图52)。将浓度递增的21t15-TGFRs与0.1nM TGFβ1混合并添加到200μLIMDM:10%热灭活FBS培养基中的HEK-Blue TGFβ报告细胞(2.5×10^4个细胞/孔)中。将细胞在37℃下培育整夜。次日,将20μl诱导的HEK-Blue TGFβ报告细胞上清液添加到180μlQUANTI-Blue(英伟杰)中,并且在37℃下培育1-3小时。通过测量620nm吸光度来评估21t15-TGFRs活性。评估人重组TGFβRII/Fc活性作为阳性对照。

[2997] 这些结果展现21t15-TGFRs复合物的TGFβRII域保持其捕获TGFβ1的能力。与人重组TGFβRII/Fc相比,21t15-TGFRs阻断TGFβ1活性的能力降低,可能是由于TGFβRII连接到IL-15Rα寿司域所致。

[2998] 实例28:21t15-TGFRs复合物诱导细胞因子诱导的记忆样NK细胞产生

[2999] 在用饱和量的细胞因子整夜刺激纯化的NK细胞后,可离体诱导细胞因子诱导的记忆样NK细胞产生。这些记忆样特性可通过IL-2受体α(IL-2Rα、CD25)、CD69(和其它活化标记)的表达,和增加的IFN-γ产生来测量。为了评估21t15-TGFRs复合物促进细胞因子诱导的记忆样NK细胞产生的能力,用1nM至100nM的21t15-TGFRs复合物刺激纯化的人NK细胞(>95%CD56+)14-18小时。通过抗体染色和流式细胞术评估细胞表面CD25和CD 69表达以及细胞内IFN-γ水平。

[3000] 从血库获得新鲜的人白细胞,并且用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)分离出CD56+NK细胞。NK细胞的纯度>70%,并且通过用CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特异性抗体(BioLegend)染色得到证实。对细胞进行计数,并且以0.2×10^6个/mL再悬浮于平底96孔板中的0.2mL完全培养基(RPMI 1640(吉毕科公司),所

述完全培养基补充有2mM L-谷氨酰胺(赛默生命技术公司)、青霉素(赛默生命技术公司))、链霉素(赛默生命技术公司)和10％FBS(Hyclone))。在37℃、5％CO2下用hIL-21(50ng/ml)(Biolegend)和hIL-15(50ng/ml)(NCI)的混合细胞因子或用1nM、10nM或100nM21t15-TGFRs复合物整夜刺激细胞14-18小时。然后收获细胞,并且用CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特异性抗体进行表面染色30分钟。染色后,将细胞在FACS缓冲液(含0.5％BSA(EMD密理博)和0.001％叠氮化钠(西格玛)的1×PBS(Hyclone))中洗涤(室温下1500RPM 5分钟)。洗涤两次后,使用BDFACSCelesta™流式细胞仪分析细胞。(绘制的数据-平均荧光强度;图53和图54)。

[3001] 从血库获得新鲜的人白细胞,并且用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)分离出CD56+NK细胞。NK细胞的纯度>70％,并且通过用CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特异性抗体(BioLegend)染色得到证实。对细胞进行计数,并且以0.2×106个/mL再悬浮于平底96孔板中的0.2mL完全培养基(RPMI 1640(吉毕科公司),所述完全培养基补充有M L-谷氨酰胺(赛默生命技术公司)、青霉素(赛默生命技术公司))、链霉素(赛默生命技术公司)和10％FBS(Hyclone))。在37℃、5％CO2下用hIL-21(50ng/ml)(Biolegend)和hIL-15(50ng/ml)(NCI)的混合细胞因子或1nM、10nM或100nM 21t15-TGFRs复合物整夜刺激细胞14-18小时。然后用10μg/ml布雷菲德菌素A(西格玛)和1×莫能菌素(eBioscience)处理细胞4小时。收获细胞,并且用CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特异性抗体进行表面染色30分钟。染色后,将细胞在FACS缓冲液(含0.5％BSA(EMD密理博)和0.001％叠氮化钠(西格玛)的1×PBS(Hyclone)中洗涤(室温下1500RPM 5分钟),并且在室温下固定10分钟。固定后,将细胞用1×通透缓冲液(eBioscience)洗涤(室温下1500RPM,持续5分钟),并且在室温下用细胞内IFN-γ-PE(Biolegend)染色30分钟。细胞用1×通透缓冲液再次洗涤,然后用FACS缓冲液洗涤。将细胞集结粒再悬浮于300μl FACS缓冲液中,并且使用BD FACSCelesta™流式细胞仪进行分析。(绘制的IFN-γ阳性细胞百分比;图55)。

[3002] 实例29:NK细胞在试管内对肿瘤细胞的细胞毒性

[3003] 在存在递增浓度的21t15-TGFRs复合物的情况下,将人骨髓性白血病细胞K562(CellTrace紫标记)与纯化的人NK细胞一起培育(使用StemCell人NK细胞纯化试剂盒(E:T比;2:1))。20小时后,收获培养物,用碘化丙啶(PI)染色,并且通过流式细胞术评估。如图56所示,与对照相比,21t15-TGFRs复合物诱导人NK对K562的细胞毒性。

[3004] 实例30:IL-21/TF突变体/IL-15DNA构建体的产生和与TGFβRII/IL-15RαSuTGF得到的融合蛋白复合物

[3005] 在一个非限制性实例中,通过将IL-21直接连接到组织因子219突变体的N端编码区,并且进一步将IL-21/TF突变体连接到IL-15的N端编码区来制造IL-21/TF突变体/IL-15DNA构建体。

[3006] IL-21/TF突变体/IL-15构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:324,加阴影的核苷酸是突变体,并且突变密码子带有下划线):

[3007] (信号序列)

[3008] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3009] (人IL-21)

[3010] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTAC GTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTG CTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGA AGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAG AAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAG GACCCACGGCTCCGAGGACTCC

[3011] (人组织因子219突变体)

[3012] TCCGGCACCACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTT CGCGACAGCTCTGGAATGGGAACCCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGCAGATC TCCACCAAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTGCTTCTACACAACAGACACCGAGTGTG CTTTAACCGACGAAATCGTCAAGGACGTCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCC TACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAATTC CCCCGAATTCACCCCTTATTTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGA GCAAGTTGGCACCAAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGTGGCGCGG AATAACACAGCTTTATCCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGACCTCATCTACACACTGTAC TATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACCGCTAAGACCAACACCAACGAGTTTTT AATTGACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTC GTACCGTCAACCGGAAGAGCACAGATTCCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGG CGAGTTCCGGGAG

[3013] (人IL-15)

[3014] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3015] IL-21/TF突变体/IL-15构建体(包括信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO: 325,取代的残基加阴影):

[3016] (信号肽)

[3017] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3018] (人IL-21)

[3019] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINV SIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS

[3020] (人组织因子219)

[3021] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFATALEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTEC ALTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVG TKVNVTVEDERTLVARNNTALSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDK GENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3022] (人IL-15)

[3023] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIH DTVENLI ILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3024] 在一些情况下,使前导肽从完整多肽中裂解以产生可溶或可以分泌的成熟形式。

[3025] 在一些实施例中,IL-21/TF突变体/IL-15DNA构建体可与TGFβRII/IL-15RαSu DNA构建体组合,使用如上所述的逆转录病毒载体转染到细胞中,并且以IL-21/TF突变体/IL-15和TGFβRII/IL-15RαSu融合蛋白形式表达。TGFβRII/IL-15RαSu融合蛋白的IL-15RαSu域结合到IL-21/TF突变体/IL-15融合蛋白的IL-15域,产生IL-21/TF突变体/IL-15:TGFβRII/IL-15RαSu复合物。

[3026] 实例31:IL-21/IL-15RαSu和TGFβRII/TF/IL-15DNA构建体的产生和所得融合蛋白复合物

[3027] 在一个非限制性实例中,通过将IL-21直接连接到IL-15RαSu亚单元序列来制造IL-21/IL-15RαSuDNA构建体。IL-21/IL-15RαSu构建体(包括信号序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:214):

[3028] (信号序列)

[3029] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3030] (人IL-21)

[3031] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC

[3032] (人IL-15Rα寿司域)

[3033] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[3034] IL-21/IL-15RαSu构建体(包括信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:213):

[3035] (信号肽)

[3036] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3037] (人IL-21)

[3038] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS

[3039] (人IL-15Rα寿司域)

[3040] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[3041] 在一些情况下,使前导肽从完整多肽中裂解以产生可溶或可以分泌的成熟形式。

[3042] 在一些实施例中,IL-21/IL-15RαSu DNA构建体可与TGFβRII/TF/IL-15DNA构建体组合,转染到如上所述的逆转录病毒载体中,并且以IL-21/IL-15RαSu和TGFβRII/TF/IL-15融合蛋白形式表达。IL-21/IL-15RαSu融合蛋白的IL-15RαSu域结合到TGFβRII/TF/IL-15融合蛋白的IL-15域,产生TGFβRII/TF/IL-15:IL-21/IL-15RαSu复合物。

[3043] 通过将TGFβRII序列连接到人组织因子219形式的N端编码区,并且然后将TGFβRII/TF构建体连接到IL-15的N端编码区,产生TGFβRII/TF/IL-15RαSu DNA构建体。如上所

述,使用TGFβRII的单链形式(TGFβRII-接头-TGFβRII)。TGFβRII/TF/IL-15构建体(包括前导序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:239):

[3044] (信号肽)

[3045] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3046] (人TGFβRII-第1片段)

[3047] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAG TTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAC GATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGG AGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATG AAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTT CAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGAT

[3048] (接头)

[3049] GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[3050] (人TGFβRII-第2片段)

[3051] ATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAA TTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCAC AATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGG AAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATG AAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTT TAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC

[3052] (人组织因子219)

[3053] TCCGGCACCACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTG GAATGGGAACCCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGCAGATCTCCACCAAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTG CTTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCGACGAAATCGTCAAGGACGTCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGG TCTTTTCCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAATTCCCCCGAATTC ACCCCTTATTTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGGCACCAAGGTGAACGTCAC CGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGTGCGGCGGAATAACACATTTTTATCCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGACCTCA TCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACCGCTAAGACCAACACCAACGAGTTTTTAATT GACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCGGAAGAGCAC AGATTCCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3054] (人IL-15)

[3055] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3056] TGFβRII/TF/IL-15融合蛋白(包括信号肽)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:238):

[3057] (信号肽)

[3058] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3059] (人TGFβRII-第1片段)

[3060] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[3061] (接头)

[3062] GGGGSGGGGSGGGGS

[3063] (人TGFβRII-第2片段)

[3064] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[3065] (人组织因子219)

[3066] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3067] (人IL-15)

[3068] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIH DTVENLI ILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3069] 实例32.示例性单链嵌合多肽的产生产生了示例性的单链嵌合多肽,其包括作为抗CD3 scFv的第一靶标结合域、人可溶性组织因子域和作为抗CD28 scFv的第二靶标结合域(αCD3scFv/TF/αCD28scFv)(图57)。这种单链嵌合多肽的核酸和氨基酸序列如下所示。

[3070] 编码示例性单链嵌合多肽(αCD3scFv/TF/αCD28scFv)的核酸(SEQ ID NO:158)

[3071] (信号肽)

[3072] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCTTATTATTTTTATTCAGCTCCGCCTATTCC

[3073] (αCD3轻链可变区)

[3074] CAGATCGTGCTGACCCAAAGCCCCGCCATCATGAGCGCTAGCCCCGGTGAGAAGGTGACCATGACATGC TCCGCTTCCAGCTCCGTGTCCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACCAGCCCCAAAAGGTGGATCTACGA CACCAGCAAGCTGGCCTCCGGAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGGCACCAGCTACTCTTTAACCATTT CCGGCATGGAAGCTGAAGACGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACCCCTTCACATTCGGATCTGGC ACCAAGCTCGAAATCAATCGT

[3075] (接头)

[3076] GGAGGAGGTGGCAGCGGCGGCGGTGGATCCGGCGGAGGAGGAAGC

[3077] (αCD3重链可变区)

[3078] CAAGTTCAACTCCAGCAGAGCGGCGCTGAACTGGCCCGGCCCGGCGCCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAG GCTTCCGGCTATACATTTACTCGTTACACAATGCATTGGGTCAAGCAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATCGG ATATATCAACCCTTCCCGGGGCTACACCAACTATAACCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCACTGACAAGA GCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCTCTTTAACCAGCGAGGACTCCGCTGTTTACTACTGCGCTAGGTATTAC GACGACCACTACTGTTTAGACTATTGGGGACAAGGTACCACTTTAACCGTCAGCAGC

[3079] (人组织因子219形式)

[3080] TCCGGCACCACCAATACCGTGGCCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTG GAATGGGAACCCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGCAGATCTCCACCAAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTG CTTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCGACGAAATCGTCAAGGACGTCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGG

TCTTTTCCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAATTCCCCCGAATTC
ACCCCTTATTTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGGCACCAAGGTGAACGTCAC
CGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGTGCGGCGGAATAACACATTTTTATCCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGACCTCA
TCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACCGCTAAGACCAACACCAACGAGTTTTTAATT
GACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCGGAAGAGCAC
AGATTCCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3081] (αCD28轻链可变区)

[3082] GTCCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAACTCGTGAAACCCGGTGCTTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCC
AGCGGATACACCTTCACCTCCTATGTGATCCAGTGGGTCAAACAGAAGCCCGGACAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAG
CATCAACCCTTACAACGACTATACCAAATACAACGAGAAGTTTAAGGGAAAGGCTACTTTAACCTCCGACAAAAGCT
CCATCACAGCCTACATGGAGTTCAGCTCTTTAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTACTATTGCGCCCGGTGGGGCGAC
GGCAATTACTGGGGACGGGGCACAACACTGACCGTGAGCAGC

[3083] (接头)

[3084] GGAGGCGGAGGCTCCGGCGGAGGCGGATCTGGCGGTGGCGGCTCC

[3085] (αCD28轻链可变区)

[3086] GACATCGAGATGACCCAGTCCCCCGCTATCATGTCCGCCTCTTTAGGCGAGCGGGTCACAATGACTTGT
ACAGCCTCCTCCAGCGTCTCCTCCTCCTACTTCCATTGGTACCAACAGAAACCCGGAAGCTCCCCTAAACTGTGCAT
CTACAGCACCAGCAATCTCGCCAGCGGCGTGCCCCCTAGGTTTTCCGGAAGCGGAAGCACCAGCTACTCTTTAACCA
TCTCCTCCATGGAGGCTGAGGATGCCGCCACCTACTTTTGTCACCAGTACCACCGGTCCCCCACCTTCGGAGGCGGC
ACCAAACTGGAGACAAAGAGG

[3087] 示例性单链嵌合多肽(αCD3scFv/TF/αCD28scFv)(SEQ ID NO:157)

[3088] (信号肽)

[3089] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3090] (αCD3轻链可变区)

[3091] QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTS
YSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR

[3092] (接头)

[3093] GGGGSGGGGSGGGGS

[3094] (αCD3重链可变区)

[3095] QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKAT
LTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS

[3096] (人组织因子219)

[3097] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3098] (αCD28轻链可变区)

[3099] VQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKATL
TSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTLTVSS

[3100] (接头)

[3101] GGGGSGGGGSGGGGS

[3102] (αCD28重链可变区)

[3103] DIEMTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGST SYSLTISSMEAEDAATYFCHQYHRSPTFGGGTKLETKR

[3104] 产生了第二示例性单链嵌合多肽,其包括作为抗-CD28 scFv的第一靶标结合域,人可溶性组织因子域和作为抗-CD3 scFv的第二靶标结合域(αCD28scFv/TF/αCD3scFv)(图57)。该单链嵌合多肽的核酸和氨基酸序列如下所示。

[3105] 编码示例性单链嵌合多肽(αCD28scFv/TF/αCD3scFv)的核酸(SEQ ID NO:326)

[3106] (信号肽)

[3107] ATGAAATGGGTCACCTTCATCTCTTTACTGTTTTTATTTAGCAGCGCCTACAGC

[3108] (αCD28轻链可变区)

[3109] GTGCAGCTGCAGCAGTCCGGACCCGAACTGGTCAAGCCCGGTGCCTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCT TCTGGCTACACCTTTACCTCCTACGTCATCCAATGGGTGAAGCAGAAGCCCGGTCAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAG CATCAATCCCTACAACGATTACACCAAGTATAACGAAAAGTTTAAGGGCAAGGCCACTCTGACAAGCGACAAGAGCT CCATTACCGCCTACATGGAGTTTTCCTCTTTAACTTCTGAGGACTCCGCTTTATACTATTGCGCTCGTTGGGGCGAT GGCAATTATTGGGGCCGGGGAACTACTTTAACAGTGAGCTCC

[3110] (接头)

[3111] GGCGGCGGCGGAAGCGGAGGTGGAGGATCTGGCGGTGGAGGCAGC

[3112] (αCD28重链可变区)

[3113] GACATCGAGATGACACAGTCCCCCGCTATCATGAGCGCCTCTTTAGGAGAACGTGTGACCATGACTTGT ACAGCTTCCTCCAGCGTGAGCAGCTCCTATTTCCACTGGTACCAGCAGAAACCCGGCTCCTCCCCTAAACTGTGTAT CTACTCCACAAGCAATTTAGCTAGCGGCGTGCCTCCTCGTTTTAGCGGCTCCGGCAGCACCTCTTACTCTTTAACCA TTAGCTCTATGGAGGCCGAAGATGCCGCCACATACTTTTGCCATCAGTACCACCGGTCCCCTACCTTTGGCGGAGGC ACAAAGCTGGAGACCAAGCGG

[3114] (人组织因子219)

[3115] AGCGGCACCACCAACACAGTGGCCGCCTACAATCTGACTTGGAAATCCACCAACTTCAAGACCATCCTC GAGTGGGAGCCCAAGCCCGTTAATCAAGTTTATACCGTGCAGATTTCCACCAAGAGCGGCGACTGGAAATCCAAGTG CTTCTATACCACAGACACCGAGTGCGATCTCACCGACGAGATCGTCAAAGACGTGAAGCAGACATATTTAGCTAGGG TGTTCTCCTACCCCGCTGGAAACGTGGAGAGCACCGGATCCGCTGGAGAGCCTTTATACGAGAACTCCCCCGAATTC ACCCCCTATCTGGAAACCAATTTAGGCCAGCCCACCATCCAGAGCTTCGAACAAGTTGGCACAAAGGTGAACGTCAC CGTCGAAGATGAGAGGACTTTAGTGCGGAGGAACAATACATTTTTATCCTTACGTGACGTCTTCGGCAAGGATTTAA TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCTAGCTCCTCCGGCAAGAAGACCGCCAAGACCAATACCAACGAATTTTTAATT GACGTGGACAAGGGCGAGAACTACTGCTTCTCCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACAGTGAACCGGAAGTCCAC CGACTCCCCCGTGGAGTGCATGGGCCAAGAGAAGGGAGAGTTTCGTGAG

[3116] (αCD3轻链可变区)

[3117] CAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGCTATTATGAGCGCTAGCCCCGGTGAAAAGGTGACTATGACATGC AGCGCCAGCTCTTCCGTGAGCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCAGCCCTAAAAGGTGGATCTACGA CACCAGCAAGCTGGCCAGCGGCGTCCCCGCTCACTTTCGGGGCTCCGGCTCCGGAACAAGCTACTCTCTGACCATCA GCGGCATGGAAGCCGAGGATGCCGCTACCTATTACTGTCAGCAGTGGAGCTCCAACCCCTTCACCTTTGGATCCGGC

ACCAAGCTCGAGATTAATCGT

[3118] (接头)

[3119] GGAGGCGGAGGTAGCGGAGGAGGCGGATCCGGCGGTGGAGGTAGC

[3120] (αCD3重链可变区)

[3121] CAAGTTCAGCTCCAGCAAAGCGGCGCCGAACTCGCTCGGCCCGGCGCTTCCGTGAAGATGTCTTGTAAGGCCTCCGGCTATACCTTCACCCGGTACACAATGCACTGGGTCAAGCAACGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATTGGCTATATCAACCCCTCCCGGGGCTATACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAAGCCACCCTCACCACCGACAAGTCCAGCAGCACCGCTTACATGCAGCTGAGCTCTTTAACATCCGAGGATTCCGCCGTGTACTACTGCGCTCGGTACTACGACGATCATTACTGCCTCGATTACTGGGGCCAAGGTACCACCTTAACAGTCTCCTCC

[3122] 示例性单链嵌合多肽(αCD28scFv/TF/αCD3scFv)(SEQ ID NO:327)

[3123] (信号肽)

[3124] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3125] (αCD28轻链可变区)

[3126] VQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKATLTSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTLTVSS

[3127] (接头)

[3128] GGGGSGGGGSGGGGS

[3129] (αCD28重链可变区)

[3130] DIEMTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGSTSYSLTISSMEAEDAATYFCHQYHRSPTFGGGTKLETKR

[3131] (人组织因子219)

[3132] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3133] (αCD3轻链可变区)

[3134] QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR

[3135] (接头)

[3136] GGGGSGGGGSGGGGS

[3137] (αCD3重链可变区)

[3138] QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS

[3139] 将编码αCD3scFv/TF/αCD28scFv的核酸克隆到经修饰的逆转录病毒表达载体中,如此前所述(Hughes等人,《人基因疗法》16:457-72,2005)。将编码αCD3scFv/TF/αCD28scFv的表达载体转染到CHO-K1细胞中。表达载体在CHO-K1细胞中的表达允许分泌出可溶性αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽(称为3t28),所述多肽能够通过抗TF Ab亲和法和其它色谱方法来纯化。

[3140] 抗组织因子亲和柱用于纯化αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽。抗组织因子亲和柱连接到通用电气医疗集团AKTAAvant系统。所有步骤都使用4mL/min的流速,但洗脱

步骤除外,洗脱步骤是2mL/min。

[3141] 使用1MTris碱将包括αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽的细胞培养收集物调节到pH 7.4并且加载到经5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱(上文所述)。加载样品后,用5个柱体积的PBS洗涤柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸pH 2.9洗脱。收集A280洗脱峰,然后通过添加1MTris碱中和到pH7.5-8.0。然后使用具有30KDa分子量截断值的Amicon离心过滤器,使中和的样品在PBS中缓冲交换。图58中的数据表明抗组织因子亲和柱能够结合包含人可溶性组织因子域的αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽。将缓冲交换的蛋白质样品在2-8℃下存储以用于进一步的生化分析和生物活性测试。

[3142] 每次洗脱后,使用6个柱体积的0.1M甘氨酸(pH2.5)剥离抗组织因子亲和柱。然后使用10个柱体积的PBS、0.05%NaN_3中和所述柱,并且在2-8℃下存储。

[3143] 使用与AKTAAvant系统(得自通用电气医疗集团)连接的Superdex 200Increase 10/300GL凝胶过滤柱(得自通用电气医疗集团),对αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽进行分析型尺寸排阻色谱(SEC)。用2个柱体积的PBS平衡所述柱。使用0.8mL/min的流速。使用毛细管回路,将两百微升的αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽(1mg/mL)注射到柱上。注射单链嵌合多肽后,将1.25个柱体积的PBS流入柱中。SEC色谱如图59所示。数据显示存在3个蛋白质峰,可能代表αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽的单体和二聚体或其它不同形式。

[3144] 为了测定αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽的纯度和蛋白质分子量,利用标准的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(4-12%NuPageBis-Tris凝胶)电泳(SDS-PAGE)方法、在还原条件下分析从抗组织因子亲和柱纯化的αCD3scFv/TF/αCD28scFv蛋白质样品。凝胶用InstantBlue染色约30分钟,并用纯化水脱色整夜。图60显示了使用抗组织因子亲和柱纯化的αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽的SDS凝胶。结果表明,纯化的αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽在还原型SDS凝胶中具有预期的分子量(72kDa)。

[3145] 实例33.αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽的功能表征

[3146] 基于ELISA的方法证实了αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽的形成。使用捕捉抗体、抗人组织因子抗体(I43)和检测抗体抗TF抗体,使用抗TF抗体(I43)/抗TF抗体特异性ELISA检测αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽(图61)。具有相似浓度的纯化组织因子蛋白用作对照。

[3147] 执行进一步的试管内实验,以确定αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽是否能够活化人周边血液单核细胞(PBMC)。从血库获得新鲜的人白细胞,并使用密度梯度Histopaque(Sigma)分离周边血液单核细胞(PBMC)。对细胞进行计数,并且以0.2×10^6个/mL再悬浮于平底96孔板中的0.2mL完全培养基(RPMI 1640(吉毕科公司),其补充有0.2mM L-谷氨酰胺(赛默生命技术公司)、青霉素(赛默生命技术公司))、链霉素(赛默生命技术公司)和10%FBS(Hyclone))。在37℃、5%CO_2下用0.01nM到1000nM的αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽刺激细胞3天。72小时之后,收集细胞且用CD4-488、CD8-PerCPCy5.5、CD25-BV421、CD69-APCFire750、CD62L-PECy7和CD44-PE特异性抗体(Biolegend)进行表面染色30分钟。表面染色之后,用含0.5%BSA(EMD密理博)和0.001%叠氮化钠(西格玛)的FACS缓冲液(1×PBS(Hyclone))洗涤细胞(室温下,1500RPM,5分钟)。两次洗涤后,将细胞再悬浮于300ΤL的FACS缓冲液中并通过流式细胞术(Celesta-BD Bioscience)进行分析。图62和63

中的数据表明αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽能够刺激$CD8^+$和$CD4^+$T细胞。

[3148] 进一步进行实验,其中对使用Histopaque(西格玛)分离出的PBMC进行计数且以0.2×10^6/mL再悬浮于平底96孔板中的0.2mL完全培养基(RPMI 1640(Gibco),其补充有2mM L-谷氨酰胺(赛默生命技术公司)、青霉素(赛默生命技术公司)、链霉素(赛默生命技术公司)和10%FBS(Hyclone))中。在37℃、5%CO_2下用0.01nM到1000nM的αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽刺激细胞3天。72小时之后,收集细胞且用CD4-488、CD8-PerCPCy5.5、CD25-BV421、CD69-APCFire750、CD62L-PECy7和CD44-PE(Biolegend)进行表面染色30分钟。表面染色后,将细胞在含0.5%BSA(EMD密理博)和0.001%叠氮化钠(西格玛)的FACS缓冲液(1×PBS(Hyclone))中洗涤(室温下1500RPM 5分钟)。两次洗涤后,将细胞再悬浮于300ΤL的FACS缓冲液中并通过流式细胞术(Celesta-BD Bioscience)进行分析。数据再次表明αCD3scFv/TF/αCD28scFv单链嵌合多肽能够刺激$CD4^+$T细胞的活化(图64)。

[3149] 实例34:IL-7/IL-15RαSu DNA构建体的产生

[3150] 在一个非限制性实例中,产生IL-7/IL-15RαSu DNA构建体(参见图65)。人IL-7序列、人IL-15RαSu序列、人IL-15序列和人组织因子219序列从UniProt网站获得,并且这些序列的DNA由金唯智合成。如下制造DNA构建体:将IL-7序列连接到IL-15RαSu序列。最终的IL-7/IL-15RαSu DNA构建体序列由金唯智合成。

[3151] 编码IL-7/IL-15RαSu构建体的第二嵌合多肽(包括信号肽序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:206):

[3152] (信号肽)

[3153] ATGGGAGTGAAAGTTCTTTTTGCCCTTATTTGTATTGCTGTGGCCGAGGCC

[3154] (人IL-7)

[3155] GATTGTGATATTGAAGGTAAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATTATTGGACAGCATGAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCTGAATAATGAATTTAACTTTTTTAAAAGACATATCTGTGATGCTAATAAGGAAGGTATGTTTTTATTCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCTTAAAATGAATAGCACTGGTGATTTTGATCTCCACTTATTAAAAGTTTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACTGGCCAGGTTAAAGGAAGAAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGCCCAACCAACAAAGAGTTTGGAAGAAAATAAATCTTTAAAGGAACAGAAAAAACTGAATGACTTGTGTTTCCTAAAGAGACTATTACAAGAGATAAAAACTTGTTGGAATAAAATTTTGATGGGCACTAAAGAACAC

[3156] (人IL-15Rα寿司域)

[3157] ATCACGTGCCCTCCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[3158] IL-7/IL-15RαSu构建体的第二嵌合多肽(包括信号肽序列)如下(SEQ ID NO:205):

[3159] (信号肽)

[3160] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3161] (人IL-7)

[3162] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKIL

MGTKEH

[3163] (人组织因子219)

[3164] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3165] (人IL-15)

[3166] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3167] 实例35:IL-21/TF/IL-15DNA构建体的产生

[3168] 在一个非限制性实例中,通过将IL-21序列连接到组织因子219的N端编码区,并且进一步将IL-21/TF构建体与IL-15的N端编码区连接,制造IL-21/TF/IL-15构建体(图66)。

[3169] 由金唯智合成的编码IL-21/TF/IL-15构建体的第一嵌合多肽(包括前导序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:202):

[3170] (信号肽)

[3171] ATGGGAGTGAAAGTTCTTTTTGCCCTTATTTGTATTGCTGTGGCCGAGGCC

[3172] (人IL-21片段)

[3173] CAAGGTCAAGATCGCCACATGATTAGAATGCGTCAACTTATAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTATGTGAATGACTTGGTCCCTGAATTTCTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGACAAACTGTGAGTGGTCAGCTTTTTCCTGTTTTCAGAAGGCCCAACTAAAGTCAGCAAATACAGGAAACAATGAAAGGATAATCAATGTATCAATTAAAAAGCTGAAGAGGAAACCACCTTCCACAAATGCAGGGAGAAGACAGAAACACAGACTAACATGCCCTTCATGTGATTCTTATGAGAAAAAACCACCCAAAGAATTCCTAGAAAGATTCAAATCACTTCTCCAAAAGATGATTCATCAGCATCTGTCCTCTAGAACACACGGAAGTGAAGATTCC

[3174] (人组织因子219)

[3175] TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAATTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAGATTGGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAGGATGTGAAGCAGACGTACTTGGCACGGGTCTTCTCCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGTTCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGAACTCCCCAGAGTTCACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGACAGCCAACAATTCAGAGTTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACGGACTTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTTATACACTTTATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTTTTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACTACTGTTTCAGTGTTCAAGCAGTGATTCCCTCCCGAACAGTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAGAA

[3176] (人IL-15)

[3177] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3178] 包括前导序列的IL-21/TF/IL-15构建体的第一嵌合多肽是SEQ ID NO:201:

[3179] (信号肽)

[3180] MGVKVLFALICIAVAEA(SEQ ID NO:328)

[3181] (人IL-21)

[3182] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS

[3183] (人组织因子219)

[3184] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3185] (人IL-15)

[3186] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3187] 实例36:IL-7/IL-15RαSu和IL-21/TF/IL-15融合蛋白的分泌

[3188] 将IL-7/IL-15RαSu和IL-21/TF/IL-15DNA构建体克隆到pMSGV-1修饰的逆转录病毒表达载体(Hughes,《人基因疗法》16:457-72,2005,通过引用并入本文)中,并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达允许形成和分泌可溶性IL-21/TF/IL-15:IL-7/IL-15RαSu蛋白复合物(称为21t15-7s;图67和图68)。使用抗TF抗体亲和色谱法和尺寸排阻色谱法从CHO-K1细胞培养上清液中纯化21t15-7s蛋白,得到由IL-7/IL-15RαSu和IL-21/TF/IL-15融合蛋白组成的可溶性(非聚集)蛋白复合物。

[3189] 在一些情况下,使前导(信号序列)肽从完整多肽中裂解以产生可溶或可以分泌的成熟形式。

[3190] 实例37:通过免疫亲和色谱法纯化21t15-7s

[3191] 将抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团™ AKTAAvant蛋白纯化系统。所有步骤都是4mL/min的流速,但洗脱步骤除外,洗脱步骤是2mL/min。

[3192] 21t15-7s的细胞培养收获物用1MTris碱调节到pH7.4,并且加载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。加载样品后,用5个柱体积的PBS洗涤柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸pH2.9洗脱。收集280nm吸光度,并且然后通过添加1MTris碱将样品中和到pH7.5-8.0。然后使用具有30KDa分子量截断值的Amicon®离心过滤器,使中和的样品在PBS中缓冲交换。缓冲交换的蛋白质样品在2-8℃下储存以用于进一步的生化分析和生物活性测试。

[3193] 每次洗脱后,接着使用6个柱体积的0.1M甘氨酸pH 2.5剥离抗TF抗体亲和柱。然后使用10个柱体积的PBS、0.05%叠氮化钠中和所述柱,并且在2-8℃下存储。

[3194] 实例38:尺寸排阻色谱

[3195] 将通用电气医疗集团Superdex®200Increase 10/300GL凝胶过滤柱连接到通用电气医疗集团AKTA™ Avant蛋白纯化系统。用2个柱体积的PBS平衡所述柱。流速为0.7mL/min。使用毛细管回路将200μL 1mg/mL的7t15-21s复合物注入色谱柱上。用1.25个柱体积的PBS追踪注射液。

[3196] 实例39:21t15-7s和21t15-TGFRs的SDS-PAGE

[3197] 为了测定纯度和蛋白质分子量,使用4-12%NuPage Bis-Tris蛋白质凝胶SDS-PAGE分析纯化的21t15-7s或21t15-TGFRs蛋白质样品。凝胶将用InstantBlue™染色约30分

钟,接着在纯化水中脱色整夜。

[3198] 实例40:CHO-K1细胞中的21t15-7s和21t15-TGFRs糖基化

[3199] 使用蛋白质脱糖基化混合物II试剂盒(新英格兰生物实验室),根据制造商说明书,证实CHO-K1细胞中的21t15-7s糖基化或CHO-K1细胞中的21t15-TGFRs糖基化。

[3200] 实例41:21t15-7s和21t15-TGFRs复合物的重组蛋白定量

[3201] 使用标准夹层ELISA方法检测并定量21t15-7s复合物或21t15-TGFRs复合物。抗人组织因子抗体(IgG1)充当捕获抗体,并且生物素化抗人IL-21、IL-15或IL-7抗体(21t15-7s)或生物素化抗人IL-21、IL-15或TGF-βRII抗体(21t15-TGFRs)充当检测抗体。使用抗人组织因子捕获抗体和抗人组织因子抗体(IgG1)检测抗体检测纯化的21t15-7s或21t15-TGFRs蛋白复合物中的组织因子。将抗TF抗体ELISA与相似浓度下的纯化的组织因子进行比较。

[3202] 实例42:IL-21/IL-15RαSu DNA构建体的产生

[3203] 在一个非限制性实例中,产生IL-21/IL-15RαSuDNA构建体。人IL-21序列和人IL-15RαSu序列从UniProt网站获得,并且这些序列的DNA由金唯智合成。通过将IL-21序列连接到IL-15RαSu序列来制造DNA构建体。最终的IL-21/IL-15RαSu DNA构建体序列由金唯智合成。参见图69。

[3204] 实例43:IL-7/TF/IL-15DNA构建体的产生

[3205] 在一个非限制性实例中,通过将IL-7序列连接到组织因子219的N端编码区,并且进一步将IL-7/TF构建体与IL-15的N端编码区连接来制造IL-7/TF/IL-15构建体。参见图70。

[3206] 实例44:IL-21/IL-15Rα寿司域DNA构建体的产生

[3207] 在一个非限制性实例中,产生IL-21/IL-15RαSu的第二嵌合多肽。人IL-21和人IL-15Rα寿司域序列从UniProt网站获得,并且这些序列的DNA由金唯智合成。通过将IL-21序列连接到IL-15Rα寿司域序列来制造DNA构建体。最终的IL-21/IL-15RαSu DNA构建体序列由金唯智合成。

[3208] 由金唯智合成的编码IL-21/IL-15RαSu域的第二嵌合多肽(包括前导序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:214):

[3209] (信号肽)

[3210] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3211] (人IL-21)

[3212] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC

[3213] (人IL-15Rα寿司域)

[3214] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAA

GGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[3215] IL-21/IL-15Rα寿司域的第二嵌合多肽(包括前导序列)如下(SEQ ID NO:213):

[3216] (信号序列)

[3217] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3218] (人IL-21)

[3219] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINV SIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS

[3220] (人IL-15Rα寿司域)

[3221] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[3222] 实例45:IL-7/TF/IL-15DNA构建体的产生

[3223] 在一个非限制性实例中,通过将IL-7序列连接到组织因子219的N端编码区,并且进一步将IL-7/TF构建体与IL-15的N端编码区连接来制造IL-7/TF/IL-15的示例性第一嵌合多肽。由金唯智合成的编码IL-7/TF/IL-15的第一嵌合多肽(包括前导序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:210):

[3224] (信号肽)

[3225] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3226] (人IL-7片段)

[3227] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTG CTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGC CAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACT TCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAA CCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAA CGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGC AT

[3228] (人组织因子219)

[3229] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTC GAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATG TTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGG TGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTT ACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGAC AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAA TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3230] (人IL-15)

[3231] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG

CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3232] IL-7/TF/IL-15的第一嵌合多肽(包括前导序列)如下(SEQ ID NO:209):

[3233] (信号肽)

[3234] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3235] (人IL-7)

[3236] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKM NSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKIL MGTKEH

[3237] (人组织因子219)

[3238] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3239] (人IL-15)

[3240] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3241] 实例46:IL-21/IL-15RαSu和IL-7/TF/IL-15融合蛋白的分泌

[3242] 将IL-21/IL-15RαSu和IL-7/TF/IL-15DNA构建体克隆到pMSGV-1修饰的逆转录病毒表达载体(如Hughes,《人基因疗法》16:457-72,2005中所述,通过引用并入本文)中,并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达允许形成和分泌可溶性IL-7/TF/IL-15:IL-21/IL-15RαSu蛋白复合物(称为7t15-21s)。使用抗TF抗体(IgG1)亲和色谱法和尺寸排阻色谱法从CHO-K1细胞培养上清液中纯化7t15-21s蛋白,得到由IL-21/IL-15RαSu和IL-7/TF/IL-15融合蛋白组成的可溶性(非聚集)蛋白复合物。参见图71和图72。

[3243] 实例47:7t15-21s复合物+抗TFIgG1抗体扩增原代自然杀伤(NK)细胞的能力

[3244] 为了评估7t15-21s复合物扩增原代自然杀伤(NK)细胞的能力,将7t15-21s复合物和7t15-21s复合物+抗TF IgG1抗体添加到从新鲜人白细胞样品获得的NK细胞中。在37°和5%CO_2下,在25nM的抗TF IgG1或抗TF IgG4抗体存在或不存在下,用50nM的7t15-21s复合物刺激细胞。通过每48-72小时计数,将细胞维持在0.5×10^6/mL,不超过2.0×10^6/mL的浓度,并且用新鲜刺激剂补充培养基。经7t15-21s复合物或抗TF IgG1抗体或抗TF IgG4抗体或抗TF IgG4+7t15-21s复合物刺激的细胞维持直到第5天。观察到原代NK细胞在与21t15-7s复合物+抗TF IgG1抗体一起培育后扩增。

[3245] 实例48:7t15-21s复合物+抗TFIgG1抗体使扩增的NK细胞活化

[3246] 用7t15-21s复合物+抗TF IgG1抗体整夜刺激纯化的NK细胞后,离体诱导原代NK细胞。从血库获得新鲜的人白细胞,并且用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)分离出CD56+NK细胞。NK细胞的纯度>80%,并且通过用CD56-BV421和CD16-BV510特异性抗体(BioLegend)染色得到证实。对细胞进行计数,并且以1×10^6个/mL再悬浮于平底24孔板中的1mL完全培养基(RPMI 1640(吉毕科公司),补充有4mM L-谷氨酰胺(赛默生命技术公司)、青霉素(赛默生命技术公司)、链霉素(赛默生命技术公司)、非必需氨基酸(赛默生命技术公司)、丙酮酸钠(赛默生命技术公司)和10%FBS(Hyclone))中。在37°和5%CO_2下,在

25nM的抗TF IgG1抗体存在或不存在下,用50nM的7t15-21s刺激细胞。每48-72小时对细胞计数,并且将其维持在0.5×10^6/mL至2.0×10^6/mL的浓度直到第14天。培养基定期补充新鲜刺激剂。收集细胞且在第3天用CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特异性抗体进行表面染色(Biolegend,且通过流式细胞术-Celeste-BD Bioscience进行分析)。观察到活化标志物CD25 MFI随7t15-21s复合物+抗TF IgG1抗体刺激而增加,但不随7t15-21s复合物刺激而增加。观察到活化标志物CD69 MFI随7t15-21s复合物+抗TF IgG1抗体和单独的7t15-21s复合物增加。

[3247] 实例49:使用18t15-12s增加NK细胞中的葡萄糖代谢

[3248] 进行了一组实验以测定18t15-12s的构建体对从人血中纯化的NK细胞的耗氧速率和细胞外酸化速率(ECAR)的影响。

[3249] 在这些实验中,从血库中两个不同的人供体获得新鲜的人白细胞,并且使用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)通过负向选择分离NK细胞。NK细胞的纯度>80%,并且通过用CD56-BV421和CD16-BV510特异性抗体(BioLegend)染色得到证实。对细胞进行计数,并且以2×10^6个/mL再悬浮于平底24孔板中的1mL完全培养基(RPMI 1640(吉毕科公司),补充有4mM L-谷氨酰胺(赛默生命技术公司)、青霉素(赛默生命技术公司)、链霉素(赛默生命技术公司)、非必需氨基酸(赛默生命技术公司)、丙酮酸钠(赛默生命技术公司)和10%FBS(Hyclone))中。在37℃和5%CO_2下,用(1)单独的培养基,(2)100nM 18t15-12s或(3)单一细胞因子重组人IL-12(0.25μg)、重组人IL-15(1.25μg)和重组人IL-18(1.25μg)的混合物刺激细胞整夜。次日,收获细胞,并且使用XFp分析仪(Seahorse Bioscience)对扩增的NK细胞进行细胞外通量分析。将收获的细胞洗涤且以每孔2.0×10^5个细胞至少双重复接种,以用于OCR(耗氧速率)和ECAR(细胞外酸化速率)的细胞外通量分析。在含有2mM谷氨酰胺的Seahorse培养基中进行糖酵解应激测试。在分析过程中使用以下物质:10mM葡萄糖;100nM寡霉素;和100mM 2-脱氧-D-葡萄糖(2DG)。

[3250] 数据显示,与用重组人IL-12、重组人IL-15和重组人IL-18的组合活化的相同细胞相比,18t15-12s引起耗氧速率(图73)和细胞外酸化速率(ECAR)显著提高(图74)。

[3251] 实例50:7t15-16s21融合蛋白产生和表征

[3252] 产生融合蛋白复合物,其包含抗CD16scFv/IL-15RαSu/IL-21和IL-7/TF/IL-15融合蛋白。人IL-7和IL-21序列从UniProt网站获得,并且这些序列的DNA由金唯智合成。具体来说,通过将IL-7序列连接到组织因子219的N端编码区,接着连接到IL-15的N端编码区来制造构建体。

[3253] 以下显示包含IL-7的构建体的核酸和蛋白质序列,所述IL-7连接到组织因子219的N端,继之与IL-15的N端连接。

[3254] IL-7/TF/IL-15构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3255] (信号肽)

[3256] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3257] (人IL-7)

[3258] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACT

TCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAA
CCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAA
CGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGC
AT

[3259] (人组织因子219)

[3260] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTC
GAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATG
TTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGG
TGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTT
ACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGAC
AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAA
TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3261] (人IL-15)

[3262] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC
ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG
CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3263] IL-7/TF/IL-15融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下:

[3264] (信号肽)

[3265] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3266] (人IL-7)

[3267] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKM
NSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKIL
MGTKEH

[3268] (人组织因子219)

[3269] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3270] (人IL-15)

[3271] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3272] 还通过将人CD16scFv序列连接到IL-15RαSu链的N端编码区,接着连接到由金唯智合成的IL-21的N端编码区来制造构建体。以下显示包含抗CD16scFv的构建体的核酸和蛋白质序列,所述抗CD16scFv连接到IL-15RαSu链的N端,继之与IL-21的N端编码区连接。

[3273] 抗CD16SscFv/IL-15RαSu/IL-21构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3274] (信号肽)

[3275] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3276] ((抗人CD16scFv)

[3277] TCCGAGCTGACCCAGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGC GACTCCCTGAGGTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAA GAACAACAGGCCCTCCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCACAG GCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCGGCGGC GGCACCAAGCTGACCGTGGGCCATGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGAGGATCCGAGGTGCA GCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTTCACCT TCGACGACTACGGCATGTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGAAC GGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTA CCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGTTCGACT ACTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGG

[3278] (人IL-15Rα寿司域)

[3279] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGC CGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAA GGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[3280] (人IL-21)

[3281] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTAC GTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTG CTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGA AGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAG AAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAG GACCCACGGCTCCGAGGACTCC

[3282] 抗CD16scFv/IL-15RαSu/IL-21构建体(包括信号肽序列)的氨基酸序列如下:

[3283] (信号肽)

[3284] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3285] (抗人CD16scFv)

[3286] SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTA SLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVGHGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCA ASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGR SLLFDYWGQGTLVTVSR

[3287] (人IL-15Rα寿司域)

[3288] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[3289] (人IL-21)

[3290] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINV SIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS

[3291] 在一些情况下,使前导肽从完整多肽中裂解以产生可溶或可能分泌的成熟形式。

[3292] 将抗CD16scFv/IL-15RαSu/IL-21和IL-7/TF/IL-15构建体克隆到修饰的逆转录病毒表达载体中,如此前所述(Hughes MS,YuYY,DudleyME,Zheng Z,Robbins PF,LiY等人.来

源于具有明显抗肿瘤反应的患者的TCR基因的转移传送高度活性T细胞效应功能(TransferofaTCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions).《人基因疗法》2005;16:457-72),并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达允许形成和分泌可溶性IL-7/TF/IL-15:抗CD16scFv/IL-15RαSu/IL-21蛋白复合物(称为7t15-16s21;图75和图76),其可通过基于抗TF IgG1抗体的亲和力和其它色谱方法纯化。

[3293] 7t15-16s21对表达人CD16b的CHO细胞的结合

[3294] 用含有人CD16b的pMC质粒转染CHO细胞,并且用10μg/mL杀稻瘟菌素(blasticidin)选择10天。稳定表达CD16b的CHO细胞用1.2μg/mL的含有抗人CD16 scFv的7t15-16s21或不含抗人CD16 scFv的18t15-12s染色作为阴性对照,并且然后用生物素化抗人组织因子和PE偶联的抗生蛋白链菌素染色。如图77A所示,只有含有7t15-16s21的抗人CD16scFv使细胞染色。如图77B所示,18t15-12s没有将表达人CD16b的CHO细胞染色。

[3295] 使用ELISA检测7t15-16s21中的IL-15、IL-21和IL-7

[3296] 96孔板用100μL含有(8μg/mL)抗TF IgG1的R5(涂布缓冲液)涂布并且在室温(RT)下培育2小时。洗板3次,并且用100μL含有1%BSA的PBS阻断。将7t15-16s21的连续稀释液(1:3比率)添加到孔中,并且在室温下培育60分钟。洗涤3次后,将50ng/mL的生物素化抗IL-15抗体(BAM247,安迪生物公司)、500ng/mL的生物素化抗IL-21抗体(13-7218-81,安迪生物公司)或500ng/mL的生物素化抗IL-7抗体(506602,安迪生物公司)添加到孔中并且在室温下培育60分钟。洗板3次,并且与0.25μg/mL的HRP-SA(杰克逊免疫研究实验室)一起在室温下以每孔100μL培育30分钟,随后洗涤4次并与100μl的ABTS在室温下培育2分钟。读取405nm吸光度。如图78A-78C所示,通过个别抗体检测7t15-16s21中的IL-15、IL-21和IL-7域。

[3297] 7t15-16s21中的IL-15促进含IL-2Rβ和共同γ链的32Dβ细胞增殖

[3298] 为了分析7t15-16s21中IL-15的活性,使用表达IL2Rβ和共同γ链的32Dβ细胞,将7t15-16s21的IL-15活性与重组IL-15进行比较,并且评估其对促进细胞增殖的作用。将IL-15依赖性32Dβ细胞用IMDM-10%FBS洗涤5次,并且以2×10^4个细胞/孔接种在孔中。将连续稀释的7t15-16s21或IL-15添加到细胞中(图79)。在CO_2培养箱中在37℃下培育细胞3天。通过在第3天向每个孔中添加10μl WST1并在CO_2培养箱中在37℃下再培养3小时来检测细胞增殖。通过分析产生的甲臜染料的量来测量450nm吸光度。如图79所示,7t15-16s21和IL-15促进32Dβ细胞增殖,7t15-16s21和IL-15的EC_{50}分别为172.2pM和16.63pM。

[3299] 抗TF抗体亲和柱纯化洗脱7t15-16s21的色谱

[3300] 将从细胞培养物中收获的7t15-16s21加载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。然后用5个柱体积的PBS洗柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸(pH 2.9)洗脱。收集A280洗脱峰,并且用1M Tris碱中和到pH 7.5-8.0。使用具有30KDa分子量截断值的Amicon离心过滤器,使中和的样品在PBS中缓冲交换。图80是曲线图,其显示了含有7t15-16s21蛋白的细胞培养上清液在抗TF抗体树脂上结合和洗脱后的色谱特征曲线。如图80所示,抗TF抗体亲和柱结合含有TF的7t15-16s21。缓冲交换的蛋白质样品在2-8℃下存储,以用于进一步的生化分析和生物活性测试。每次洗脱后,使用6个柱体积的0.1M甘氨酸(pH2.5)剥离抗TF抗体亲和柱。然后使用5个柱体积的PBS和7个柱体积的20%乙醇中和所述柱,以便存储。抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团AKTAAvant系统。所有步骤都是4mL/min的流速,

但洗脱步骤除外,洗脱步骤是2mL/min。

[3301] 7t15-16s21的分析型尺寸排阻色谱(SEC)分析

[3302] 为了对7t15-16s21进行尺寸排阻色谱(SEC)分析,使用与AKTAAvant系统(通用电气医疗集团)连接的Superdex200 Increase 10/300GL凝胶过滤柱(通用电气医疗集团)。用2个柱体积的PBS平衡所述柱。流速为0.7mL/min。使用毛细管回路将含有7t15-16s21于PBS中的样品注入Superdex 200柱,并且通过SEC进行分析。如图81所示,SEC结果显示7t15-16s21有两个蛋白质峰。

[3303] 实例51:TGFRt15-16s21融合蛋白的产生和表征

[3304] 产生包含抗人CD16scFv/IL-15RαSu/IL21和TGFβ受体II/TF/IL-15融合蛋白的融合蛋白复合物(图82和83)。人TGFβ受体II(Ile24-Asp159)、组织因子219和IL-15序列从UniProt网站获得,并且这些序列的DNA由金唯智合成。具体来说,如下制造构建体:利用G4S(3)接头将两个TGFβ受体II序列连接以产生TGFβ受体II的单链形式,并且然后直接连接到组织因子219的N端编码区,接着连接到IL-15的N端编码区。

[3305] 以下显示包含两个TGFβ受体II的构建体的核酸和蛋白质序列,所述TGFβ受体II连接到组织因子219的N端,继之与IL-15的N端连接。

[3306] 两个TGFβ受体II/TF/IL-15构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3307] (信号肽)

[3308] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3309] (两个人TGFβ受体II片段)

[3310] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC

[3311] (人组织因子219)

[3312] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC

GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3313] (人IL-15)

[3314] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC
ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG
CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3315] TGFβ受体II/TF/IL-15融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下:

[3316] (信号肽)

[3317] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3318] (人TGFβ受体II)

[3319] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGS
GGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENI
TLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[3320] (人组织因子219)

[3321] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3322] (人IL-15)

[3323] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3324] 还通过将抗人CD16scFv序列直接连接到IL-15RαSu链的N端编码区,接着连接到由金唯智合成的IL-21的N端编码区来制造构建体。以下显示包含抗人CD16scFv的构建体的核酸和蛋白质序列,所述抗人CD16scFv连接到IL-15RαSu的N端,继之与IL-21的N端编码区连接。

[3325] 抗CD16scFv/IL-15RαSu/IL-21构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3326] (信号肽)

[3327] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3328] (抗人CD16scFv)

[3329] TCCGAGCTGACCCAGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGC
GACTCCCTGAGGTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAA
GAACAACAGGCCCTCCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCACAG
GCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCGGCGGC
GGCACCAAGCTGACCGTGGGCCATGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGAGGATCCGAGGTGCA
GCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTTCACCT
TCGACGACTACGGCATGTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGAAC
GGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTA

CCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGTTCGACT ACTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGG

[3330] (人IL-15Rα寿司域)

[3331] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGC CGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAA GGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[3332] (人IL-21)

[3333] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTAC GTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTG CTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGA AGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAG AAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAG GACCCACGGCTCCGAGGACTCC

[3334] 抗CD16scFv/IL-15RαSu/IL-21构建体(包括信号肽序列)的氨基酸序列如下:

[3335] (信号肽)

[3336] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3337] (抗人CD16scFv)

[3338] SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTA SLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVGHGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCA ASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGR SLLFDYWGQGTLVTVSR

[3339] (人IL-15Rα寿司域)

[3340] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[3341] (人IL-21)

[3342] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINV SIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS

[3343] 在一些情况下,使前导肽从完整多肽中裂解以产生可溶或可以分泌的成熟形式。

[3344] 将抗CD16scFv/IL-15RαSu/IL-21和TGFR/TF/IL-15构建体克隆到修饰的逆转录病毒表达载体中,如此前所述(Hughes MS,YuYY,DudleyME,Zheng Z,Robbins PF,LiY等人.来源于具有明显抗肿瘤反应的患者的TCR基因的转移传送高度活性T细胞效应功能.《人基因疗法》2005;16:457-72),并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达允许形成和分泌可溶性TGFR/TF/IL-15:CD16scFv/IL-15RαSu/IL-21蛋白复合物(称为TGFRt15-16s21),其可通过基于抗TF IgG1的亲和力和其它色谱方法纯化。

[3345] TGFRt15-16s21与表达人CD16b的CHO细胞之间的相互作用

[3346] 用含有人CD16b的pMC质粒转染CHO细胞,并且用10μg/mL杀稻瘟菌素选择10天。稳定表达CD16b的细胞用1.2μg/mL含有抗人CD16 scFv的TGFRt15-16s21或不含抗人CD16scFv的7t15-21s染色作为阴性对照,并且用生物素化抗人组织因子抗体和PE偶联的抗生蛋白链菌素染色。如图84A和84B所示,含有抗人CD16scFv的TGFRt15-16s21显示阳性结合,而7t15-21s不显示结合。

[3347] TGFRt15-16s21对HEK-Blue TGFβ细胞中TGFβ1活性的影响

[3348] 为了评估TGFRt15-16s21中TGFβRII的活性,分析TGFRt15-16s21对HEK-Blue TGFβ细胞中TGFβ1活性的影响。将HEK-Blue TGFβ细胞(英伟杰)用预温热的PBS洗涤两次,并且以5×10^5个细胞/mL再悬浮于测试培养基(DMEM,10%热灭活的FCS,1×谷氨酰胺,1×抗生素-抗真菌剂和2×谷氨酰胺)中。在平底96孔板中,向每个孔中添加50μl细胞(2.5×10^4个细胞/孔),并且接着添加50μL 0.1nM TGFβ1(安迪生物公司)。然后将以1:3连续稀释制备的TGFRt15-16s21或TGFR-Fc(安迪生物公司)添加到板中,以达到200μL的总体积。在37℃下培育24小时后,将40μL诱导的HEK-BlueTGFβ细胞上清液添加到平底96孔板中的160μL预温热的QUANTI-Blue(英伟杰)中,并且在37℃下培育1-3小时。然后使用酶标仪(Multiscan Sky)在620-655nM下测定OD值。用GraphPad Prism 7.04计算每个蛋白质样品的IC_{50}。TGFRt15-16s21和TGFR-Fc的IC_{50}分别为9127pM和460.6pM。这些结果显示TGFRt15-16s21中的TGFβRII域能够阻断HEK-Blue TGFβ细胞中TGFβ-1的活性。

[3349] TGFRt15-16s21中的IL-15促进含IL-2Rβ和共同γ链的32Dβ细胞增殖

[3350] 为了分析TGFRt15-16s21中IL-15的活性,使用表达IL2Rβ和共同γ链的32Dβ细胞将TGFRt15-16s21的IL-15活性与重组IL-15进行比较,并且评估其对促进细胞增殖的作用。将IL-15依赖性32Dβ细胞用IMDM-10%FBS洗涤5次,并且以2×10^4个细胞/孔接种在孔中。将连续稀释的TGFRt15-16s21或IL-15添加到细胞中(图86)。在CO_2培养箱中在37℃下细胞培育3天。通过在第3天向每个孔中添加10μLWST1并在CO_2培养箱中在37℃下再培养3小时来检测细胞增殖。通过分析产生的甲臜染料的量来测量450nm吸光度。数据如图85所示。如图86所示,TGFRt15-16s21和IL-15促进32Dβ细胞增殖,TGFRt15-16s21和IL-15的EC_{50}分别为51298pM和10.63pM。

[3351] 使用ELISA检测TGFRt15-16s21中的IL-15、IL-21和TGFβRII

[3352] 96孔板用100μL含有(8μg/mL)抗TF IgG1的R5(涂布缓冲液)涂布并且在室温(RT)下培育2小时。洗板3次,并且用100μL含有1%BSA的PBS阻断。添加以1:3的比连续稀释的TGFRt15-16s21,并且在室温下培育60分钟。洗涤三次后,每孔施加50ng/mL的生物素化抗IL-15抗体(BAM247,安迪生物公司)、500ng/mL的生物素化抗IL-21抗体(13-7218-81,安迪生物公司)或200ng/mL的生物素化抗TGFβRII抗体(BAF241,安迪生物公司),并且在室温下培育60分钟。洗涤三次后,与0.25μg/mL的HRP-SA(杰克逊免疫研究实验室)一起在室温下以每孔100μL培育30分钟,接着进行4次洗涤,并且与100μL的ABTS一起在室温下培育2分钟。读取405nm吸光度。如图87A-87C所示,TGFRt15-16s21中的IL-15、IL-21和TGFβRII域通过相应抗体检测。

[3353] 使用抗TF抗体亲和柱纯化洗脱TGFRt15-16s21的色谱

[3354] 将从细胞培养物中收获的TGFRt15-16s21加载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。加载样品后,用5个柱体积的PBS洗柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸(pH2.9)洗脱。收集A280洗脱峰,并且然后用1M Tris碱中和到pH 7.5-8.0。然后使用具有30KDa分子量截断值的Amicon离心过滤器,使中和的样品在PBS中缓冲交换。如图88所示,抗TF抗体亲和柱与TGFRt15-16s21结合,其含有组织因子作为融合伴侣。缓冲交换的蛋白质样品在2-8℃下存储,以用于进一步的生化分析和生物活性测试。每次洗脱后,使用6个柱体积的0.1M甘氨酸(pH2.5)剥离抗TF抗体亲和柱。然后使用5个柱体积的PBS和7个柱体积的20%乙醇中和

所述柱,以便存储。抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团AKTA Avant系统。所有步骤都是4mL/min的流速,但洗脱步骤除外,洗脱步骤是2mL/min。

[3355] 对TGFRt15-16s21进行的还原型SDS-PAGE

[3356] 为了测定TGFRt15-16s21蛋白的纯度和分子量,在还原条件下通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(4-12%NuPage Bis-Tris凝胶)电泳(SDS-PAGE)分析用抗TF抗体亲和柱纯化的蛋白质样品。电泳后,将凝胶用InstantBlue染色约30分钟,接着在纯化水中脱色整夜。

[3357] 为了验证TGFRt15-16s21蛋白在CHO细胞中翻译后经历糖基化,使用来自新英格兰生物实验室的蛋白质脱糖基化混合物II试剂盒,根据制造商说明书进行脱糖基化实验。图89显示样品在未脱糖基化(红色轮廓的泳道1)和脱糖基化(黄色轮廓的泳道2)状态下的还原型SDS-PAGE分析的结果。结果显示,当在CHO细胞中表达时,TGFRt15-16s21蛋白被糖基化。脱糖基化后,纯化的样品在还原SDS凝胶中显示预期的分子量(69kDa和48kDa)。泳道M载有10μL SeeBlue Plus2预染标准液。

[3358] 实例52:7t15-7s融合蛋白的产生和表征

[3359] 产生包含IL-7/TF/IL-15和IL-7/IL-15RαSu融合蛋白的融合蛋白复合物(图90和图91)。人IL-7、组织因子219和IL-15序列从UniProt网站获得,并且这些序列的DNA由金唯智合成。具体来说,通过将IL-7序列连接到组织因子219的N端编码区,接着连接到IL-15的N端编码区来制造构建体。

[3360] 以下显示包含IL-7的构建体的核酸和蛋白质序列,所述IL-7连接到组织因子219的N端,继之与IL-15的N端连接。

[3361] 7t15构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3362] (信号肽)

[3363] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3364] (人IL7)

[3365] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCAT

[3366] (人组织因子219)

[3367] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC

GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3368] (人IL-15)

[3369] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC
ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG
CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3370] 7t15融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下:

[3371] (信号肽)

[3372] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3373] (人IL7)

[3374] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKM
NSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKIL
MGTKEH

[3375] (人组织因子219)

[3376] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3377] (人IL-15)

[3378] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3379] 还通过将IL-7序列连接到由金唯智合成的IL-15RαSu链的N端编码区来制造构建体。以下显示包含IL-7的构建体的核酸和蛋白质序列,所述IL-7连接到IL-15RαSu链的N端。

[3380] 7s构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3381] (信号肽)

[3382] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3383] (人IL7)

[3384] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTG
CTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGC
CAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACT
TCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAA
CCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAA
CGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGC
AT

[3385] (人IL-15Rα寿司域)

[3386] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGC
CGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAA
GGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[3387] 7s融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下:

[3388] (信号肽)

[3389] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3390] (人IL7)

[3391] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEH

[3392] (人IL-15Rα寿司域)

[3393] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[3394] 将抗IL-7/TF/IL-15和IL-7/IL-15RαSu构建体克隆到修饰的逆转录病毒表达载体中,如此前所述(Hughes MS,YuYY,DudleyME,ZhengZ,Robbins PF,LiY等人.来源于具有明显抗肿瘤反应的患者的TCR基因的转移传送高度活性T细胞效应功能.《人基因疗法》2005;16:457-72),并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达允许形成和分泌称为7t15-7s的可溶性IL-7/TF/IL-15:IL-7/IL-15RαSu蛋白复合物,其可通过抗TF抗体IgG1亲和力和其它色谱方法纯化。

[3395] 使用抗TF抗体亲和柱纯化洗脱7t15-7s的色谱

[3396] 将从细胞培养物中收获的7t15-7s加载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。加载样品后,用5个柱体积的PBS洗柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸(pH 2.9)洗脱。收集A280洗脱峰,并且然后用1M Tris碱中和到pH 7.5-8.0。然后使用具有30KDa分子量截断值的Amicon离心过滤器,使中和的样品在PBS中缓冲交换。如图92所示,抗TF抗体亲和柱与含有组织因子(TF)作为融合伴侣的7t15-7s结合。缓冲交换的蛋白质样品在2-8℃下存储,以用于进一步的生化分析和生物活性测试。每次洗脱后,使用6个柱体积的0.1M甘氨酸(pH2.5)剥离抗TF抗体亲和柱。然后使用5个柱体积的PBS和7个柱体积的20%乙醇中和所述柱,以进行存储。抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团AKTA Avant系统。所有步骤都是4mL/min的流速,但洗脱步骤除外,洗脱步骤是2mL/min。

[3397] 7t15-7s在C57BL/6小鼠中的免疫刺激

[3398] 7t15-7s是多链多肽(本文所述的A型多链多肽),其包括作为人IL-7、人组织因子219片段和人IL-15的可溶性融合物的第一多肽(7t15),和作为人IL-7和人IL-15受体α链的寿司域的可溶性融合物的第二多肽(7s)。

[3399] CHO细胞用IL7-TF-IL-15(7t15)和IL7-IL-15Ra寿司域(7s)载体共转染。从转染的CHO细胞培养上清液中纯化7t15-7s复合物。通过ELISA证明复合物中的IL-7、IL-15和组织因子(TF)组分,如图93所示。人源化抗TF单克隆抗体(抗TF IgG1)作为捕获抗体用于测定7t15-7s中的TF,并且生物素化抗人IL-15抗体(安迪生物公司)和生物素化抗人IL-7抗体(安迪生物公司)作为检测抗体用于分别检测7t15-7s中的IL-15和IL-7,随后使用过氧化酶偶联的抗生蛋白链菌素(杰克逊免疫研究实验室(Jackson ImmunoResearch Lab))和ABTS底物(Surmodics IVD,Inc.)。

[3400] 将7t15-7s以10mg/kg皮下注射到C57BL/6小鼠中,以测定7t15-7s在体内的免疫刺激活性。用PBS皮下处理的C57BL/6小鼠用作对照。处理后第4天收集小鼠脾脏并称重。制备单一脾细胞悬浮液,并且用荧光染料偶联的抗CD4、抗CD8和抗NK1.1抗体染色,通过流式细

胞术分析CD4$^+$T细胞、CD8$^+$T细胞和NK细胞的百分比。结果表明,基于脾脏重量,7t15-7s有效扩增脾细胞(图94A),并且具体地说,CD8$^+$T细胞和NK细胞的百分比高于对照物处理的小鼠(图94B)。

[3401] 实例53:TGFRt15-TGFRs融合蛋白产生和表征

[3402] 产生融合蛋白复合物,其包含TGFβ受体II/IL-15RαSu和TGFβ受体II/TF/IL-15融合蛋白(图95和图96)。人TGFβ受体II(Ile24-Asp159)、组织因子219和IL-15序列从UniProt网站获得,并且这些序列的DNA由金唯智合成。具体来说,如下制造构建体:利用G4S(3)接头将两个TGFβ受体II序列连接以产生TGFβ受体II的单链形式,并且然后直接连接到组织因子219的N端编码区,接着连接到IL-15的N端编码区。

[3403] 以下显示包含两个TGFβ受体II的构建体的核酸和蛋白质序列,所述受体II连接到组织因子219的N端,后接IL-15的N端。

[3404] 两个TGFβ受体II/TF/IL-15构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3405] (信号肽)

[3406] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3407] (两个人TGFβ受体II片段)

[3408] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC

[3409] (人组织因子219)

[3410] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3411] (人IL-15)

[3412] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC

ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG
CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3413] TGFβ受体II/TF/IL-15融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下:

[3414] (信号肽)

[3415] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3416] (人TGFβ受体II)

[3417] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGS
GGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENI
TLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[3418] (人组织因子219)

[3419] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3420] (人IL-15)

[3421] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3422] 还通过将两个TGFβ受体II直接连接到由金唯智合成的IL-15RαSu链来构建构建体。以下显示包含TGFβ受体II的构建体的核酸和蛋白质序列,所述受体II连接到IL-15RαSu的N端。

[3423] TGFβ受体II/IL-15RαSu构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3424] (信号肽)

[3425] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3426] (两个人TGFβ受体II片段)

[3427] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAG
TTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAG
CATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGG
AGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATG
AAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTT
CAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTA
TTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAG
CTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTC
CATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCT
GCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAA
AAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGA
ATACAATACCAGCAACCCCGAC

[3428] (人IL-15Rα寿司域)

[3429] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[3430] 两个TGFβ受体II/IL-15RαSu构建体(包括信号肽序列)的氨基酸序列如下:

[3431] (信号肽)

[3432] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3433] (两个人TGFβ受体II胞外域)

[3434] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[3435] (人IL-15Rα寿司域)

[3436] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[3437] 在一些情况下,将前导肽从完整多肽中裂解以产生可溶或可以分泌的成熟形式。

[3438] 将TGFβR/IL-15RαSu和TGFβR/TF/IL-15构建体克隆到修饰的逆转录病毒表达载体中,如此前所述(Hughes MS,YuYY,DudleyME,ZhengZ,Robbins PF,LiY等人.来源于具有明显抗肿瘤反应的患者的TCR基因的转移传送高度活性T细胞效应功能.《人基因疗法》2005;16:457-72),并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达允许形成和分泌可溶性TGFβR/TF/IL-15:TGFβR/IL-15RαSu蛋白复合物(称为TGFRt15-TGFRs),其可通过抗-TF IgG1亲和力和其它色谱方法纯化。

[3439] TGFRt15-TGFRs对HEK-Blue TGFβ细胞中TGFβ1活性的影响

[3440] 为了评估TGFRt15-TGFRs中TGFβRII的活性,分析TGFRt15-16s21对HEK-Blue TGFβ细胞中TGFβ1活性的影响。将HEK-Blue TGFβ细胞(英伟杰)用预温热的PBS洗涤两次,并且以5×10^5个细胞/mL再悬浮于测试培养基(DMEM,10%热灭活的FCS,1×谷氨酰胺,1×抗生素-抗真菌剂和2×谷氨酰胺)中。在平底96孔板中,向每个孔中添加50μL细胞(2.5×10^4个细胞/孔),并且接着添加50μL 0.1nM TGFβ1(安迪生物公司)。然后将以1:3连续稀释制备的TGFRt15-16s21或TGFR-Fc(安迪生物公司)添加到板中,以达到200μL的总体积。在37℃下培育24小时后,将40μL诱导的HEK-BlueTGFβ细胞上清液添加到平底96孔板中的160μL预温热的QUANTI-Blue(英伟杰)中,并且在37℃下培育1-3小时。然后使用酶标仪(Multiscan Sky)在620-655nM下测定OD值(图97)。用GraphPadPrism7.04计算每个蛋白质样品的IC_{50}。TGFRt15-TGFRs和TGFR-Fc的IC_{50}分别为216.9pM和460.6pM。这些结果显示TGFRt15-TGFRs中的TGFβRII域能够阻断HEK-Blue TGFβ细胞中TGFβ1的活性。

[3441] TGFRt15-TGFRs中的IL-15促进含IL-2Rβ和共同γ链的32Dβ细胞增殖

[3442] 为了评估TGFRt15-TGFRs中IL-15的活性,使用表达IL2Rβ和共同γ链的32Dβ细胞将TGFRt15-TGFRs的IL-15活性与重组IL-15进行比较,并且评估其对促进细胞增殖的作用。将IL-15依赖性32Dβ细胞用IMDM-10%FBS洗涤5次,并且以2×10^4个细胞/孔接种在孔中。将连续稀释的TGFRt15-TGFRs或IL-15添加到细胞中(图98)。在CO_2培养箱中在37℃下培育细胞3天。通过在第3天向每个孔中添加10μLWST1并在CO_2培养箱中在37℃下再培养3小时来检测细胞增殖。通过分析产生的甲臜染料的量来测量450nm吸光度。如图98所示,TGFRt15-

TGFRs和IL-15促进了32Dβ细胞增殖,TGFRt15-16s21和IL-15的EC_{50}分别为1901pM和10.63pM。

[3443] 使用ELISA用对应抗体检测TGFRt15-TGFRs中的IL-15和TGFβRII域

[3444] 96孔板用100μL含有(8μg/mL)抗TF IgG1的R5(涂布缓冲液)涂布并且在室温(RT)下培育2小时。洗板3次,并且用100μL含有1%BSA的PBS阻断。TGFRt15-TGFRs以1:3连续稀释液添加,并且在室温下培育60分钟。洗涤3次后,将50ng/mL的生物素化抗IL-15抗体(BAM247,安迪生物公司)或200ng/mL的生物素化抗TGFbRII抗体(BAF241,安迪生物公司)添加到孔中并且在室温下培育60分钟。接着洗板3次,并且以每孔100μL添加0.25μg/mL的HRP-SA(杰克逊免疫研究实验室),并且在室温下培育30分钟,接着洗涤4次并与100μL的ABTS在室温下培育2分钟。读取405nm吸光度。如图99A和99B所示,通过个别抗体检测TGFRt15-TGFRs中的IL-15和TGFβRII域。

[3445] 抗TF抗体亲和柱纯化洗脱TGFRt15-TGFRs的色谱

[3446] 将从细胞培养物中收获的TGFRt15-TGFRs加载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。加载样品后,用5个柱体积的PBS洗柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸(pH2.9)洗脱。收集A280洗脱峰,并且然后用1M Tris碱中和到pH 7.5-8.0。然后使用具有30KDa分子量截断值的Amicon离心过滤器,使中和的样品在PBS中缓冲交换。如图100所示,抗TF抗体亲和柱与含有TF作为融合伴侣的TGFRt15-TGFRs结合。缓冲交换的蛋白质样品在2-8℃下存储,以用于进一步的生化分析和生物活性测试。每次洗脱后,使用6个柱体积的0.1M甘氨酸(pH2.5)剥离抗TF抗体亲和柱。然后使用5个柱体积的PBS和7个柱体积的20%乙醇中和所述柱,以便存储。抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团AKTAAvant系统。所有步骤都是4mL/min的流速,但洗脱步骤除外,洗脱步骤是2mL/min。

[3447] TGFRt15-TGFRs的分析型尺寸排阻色谱(SEC)分析

[3448] 将Superdex 200Increase 10/300GL凝胶过滤柱(来自通用电气医疗集团)连接到AKTA Avant系统(来自通用电气医疗集团)。用2个柱体积的PBS平衡所述柱。流速为0.7mL/min。使用毛细管回路将含有TGFRt15-TGFRs于PBS中的样品注入Superdex200柱,并且通过SEC分析。样品的SEC色谱如图101所示。SEC结果显示TGFRt15-TGFRs存在四个蛋白质峰。

[3449] TGFRt15-TGFRs的还原型SDS-PAGE分析

[3450] 为了测定TGFRt15-TGFRs蛋白的纯度和分子量,在还原条件下通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(4-12%NuPage Bis-Tris凝胶)电泳(SDS-PAGE)方法分析用抗TF抗体亲和柱纯化的蛋白质样品。电泳后,将凝胶用InstantBlue染色约30分钟,接着在纯化水中脱色整夜。

[3451] 为了验证TGFRt15-TGFRs蛋白在CHO细胞中翻译后经历糖基化,使用来自新英格兰生物实验室的蛋白质脱糖基化混合物II试剂盒和制造商说明书进行脱糖基化实验。图102显示样品在未脱糖基化(红色轮廓的泳道1)和脱糖基化(黄色轮廓的泳道2)状态下的还原型SDS-PAGE分析。结果显示,当在CHO细胞中表达时,TGFRt15-TGFRs蛋白被糖基化。脱糖基化后,纯化的样品在还原SDS凝胶中显示预期的分子量(69kDa和39kDa)。泳道M载有10ul SeeBlue Plus2预染标准液。

[3452] TGFRt15-TGFRs在C57BL/6小鼠中的免疫刺激活性

[3453] TGFRt15-TGFRs是多链多肽(本文所述的A型多链多肽),其包括作为两个TGFβRII

域、人组织因子219片段和人IL-15的可溶性融合物的第一多肽,以及作为两个TGFβRII域和人IL-15受体α链的寿司域的可溶性融合物的第二多肽。

[3454] 野生型C57BL/6小鼠用对照溶液或0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg TGFRt15-TGFRs皮下处理。处理后四天,评估脾脏重量和脾脏中存在的各种免疫细胞类型的百分比。如图103A所示,用TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏重量随TGFRt15-TGFRs剂量的增加而增加。此外,分别用1mg/kg、3mg/kg和10mg/kg TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏重量高于对照溶液处理的小鼠。另外,评估对照物处理和TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏中存在的$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、NK细胞和$CD19^+$B细胞的百分比。如图103B所示,在用TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏中,$CD8^+$T细胞和NK细胞的百分比均随TGFRt15-TGFRs剂量的增加而增加。具体来说,与对照处理的小鼠相比,用0.3mg/kg、3mg/kg和10mg/kg TGFRt15-TGFRs处理的小鼠中$CD8^+$T细胞的百分比更高,并且与对照处理的小鼠相比,用0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg和10mg/kg TGFRt15-TGFRs处理的小鼠中NK细胞的百分比更高。这些结果证明TGFRt15-TGFRs能够刺激脾脏中的免疫细胞,尤其$CD8^+$T细胞和NK细胞。

[3455] 评估TGFRt15-TGFRs分子在野生型C57BL/6小鼠中的药代动力学。用3mg/kg剂量的TGFRt15-TGFRs皮下处理小鼠。在多个时间点从尾静脉排出小鼠血液,并且制备血清。用ELISA测定小鼠血清中的TGFRt15-TGFRs浓度(捕获:抗人组织因子抗体;检测:生物素化抗人TGFβ受体抗体,随后使用过氧化酶偶联的抗生蛋白链菌素和ABTS底物)。结果显示,TGFRt15-TGFRs在C57BL/6小鼠中的半衰期为12.66小时。

[3456] 制备小鼠脾细胞以便评估TGFRt15-TGFRs在小鼠中随时间推移的免疫刺激活性。如图104A所示,用TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏重量在处理后48小时增加,并且随时间持续增加。另外,评估对照物处理和TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏中存在的$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、NK细胞和$CD19^+$B细胞的百分比。如图104B所示,在用TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏中,在处理后48小时,$CD8^+$T细胞和NK细胞的百分比均增加,并且在单次剂量处理后随时间推移越来越高。这些结果进一步证明TGFRt15-TGFRs能够刺激脾脏中的免疫细胞,尤其$CD8^+$T细胞和NK细胞。

[3457] 此外,在单次剂量(3mg/kg)TGFRt15-TGFRs后从小鼠分离的脾细胞中,评估基于脾细胞Ki67表达的免疫细胞的动态增殖和基于颗粒酶B表达的细胞毒性潜力。如图105A和105B所示,在用TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏中,在处理后24小时,NK细胞对Ki67和颗粒酶B的表达增加,并且$CD8^+$T细胞和NK细胞对其的表达在单次剂量处理后48小时和后续时间点均增加。这些结果证明TGFRt15-TGFRs不仅增加$CD8^+$T细胞和NK细胞的数目,而且增强这些细胞的细胞毒性。TGFRt15-TGFRs的单次剂量处理引起$CD8^+$T细胞和NK细胞增殖至少4天。

[3458] 还评估来自用TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾细胞对肿瘤细胞的细胞毒性。用CellTrace紫标记小鼠莫洛尼(Moloney)白血病细胞(Yac-1),并且将其用作肿瘤靶细胞。在处理后的多个时间点,由TGFRt15-TGFRs(3mg/kg)处理的小鼠脾脏制备脾细胞,并且将其用作效应细胞。将靶细胞与效应细胞以E:T比率=10:1混合,并且在37℃下培育20小时。通过使用流式细胞术分析碘化丙啶阳性、紫色标记的Yac-1细胞来评估靶细胞存活率。使用以式计算Yac-1肿瘤抑制的百分比:(1-[实验样品中的Yac-1活细胞数]/[不含脾细胞的样品中的Yac-1活细胞数])×100。如图106所示,来自TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾细胞对Yac-1

细胞的细胞毒性比对照小鼠脾细胞强。

[3459] 响应于化疗和/或TGFRt15-TGFRs的肿瘤尺寸分析

[3460] 将胰脏癌细胞(SW1990,ATCC®CRL-2172)皮下(sc)注射到C57BL/6scid小鼠(杰克逊实验室(The Jackson Laboratory),001913,2×10^6个细胞/小鼠,在100μLHBSS中)中以建立胰脏癌小鼠模型。注射肿瘤细胞之后的第二周,开始使用凯素(塞尔基因公司,68817-134,5mg/kg,i.p.)和吉西他滨(西格玛奥德里奇公司,G6423,40mg/kg,i.p.)的组合对这些小鼠以腹膜内途径进行化学疗法,接着在2天内用TGFRt15-TGFRs(3mg/kg,s.c.)进行免疫疗法。以上程序视为一个治疗周期,并且重复另外3个周期(1个周期/周)。对照组被设置为注射SW1990的小鼠,其接受PBS、化学疗法(吉西他滨和阿布拉生)或单独的TGFRt15-TGFRs。在整个治疗周期,每隔一天测量并记录每只动物的肿瘤尺寸,直到注射SW1990细胞后2个月实验终止。按组分析肿瘤体积的测量,并且结果表明,与PBS组相比,接受化学疗法和TGFRt15-TGFRs组合的动物的肿瘤明显更小,而化学疗法和单独TGFRt15-TGFRs疗法均不能如组合那样充分发挥作用(图107)。

[3461] 试管内衰老B16F10黑色素瘤模型

[3462] 接下来,评估活化的小鼠NK细胞在试管内杀死衰老的B16F10黑色素瘤细胞。用CellTrace紫标记B16F10衰老细胞(B16F10-SNC)细胞,并且与2t2活化的小鼠NK细胞(从注射TGFRt15-TGFRs10 mg/kg 4天的C57BL/6小鼠的脾脏中分离)一起在试管内以不同E:T比率培育16小时。将细胞用胰蛋白酶消化,洗涤并再悬浮在含有碘化丙啶(PI)溶液的完全培养基中。通过流式细胞术评估细胞毒性(图108)。

[3463] 实例54:7t15-21s137L(长版)融合蛋白产生和表征

[3464] 产生包含IL-21/IL-15RαSu/CD137L和IL-7/TF/IL-15融合蛋白的融合蛋白复合物(图109和图110)。具体来说,如下制造构建体:将IL-7序列连接到组织因子219的N端编码区,接着连接到IL-15的N端编码区。以下显示包含IL-7的构建体的核酸和蛋白质序列,所述IL-7连接到组织因子219的N端,后接IL-15的N端。

[3465] 7t15构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3466] (信号肽)

[3467] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3468] (人IL7)

[3469] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCAT

[3470] (人组织因子219)

[3471] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGG

TGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTT
ACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGAC
AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAA
TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3472] (人IL-15)

[3473] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC
ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG
CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3474] 7t15融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下：

[3475] (信号肽)

[3476] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3477] (人IL7)

[3478] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKM
NSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKIL
MGTKEH

[3479] (人组织因子219)

[3480] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3481] (人IL-15)

[3482] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3483] 以下显示21s137L的核酸和蛋白质序列。21s137L构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下：

[3484] (信号肽)

[3485] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3486] (人IL-21)

[3487] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTAC
GTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTG
CTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGA
AGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAG
AAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAG
GACCCACGGCTCCGAGGACTCC

[3488] (人IL-15Rα寿司域)

[3489] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGC

CGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAA
GGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[3490] ((G4S)3接头)

[3491] GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCT

[3492] (人CD137L)

[3493] CGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCG
CAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTC
CCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCT
TTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTG
CGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGC
CTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGG
CACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATCCCAGCCGGA
CTCCCTTCACCGAGGTCGGAA

[3494] 21s137L融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下:

[3495] (信号肽)

[3496] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3497] (人IL-21)

[3498] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINV
SIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS

[3499] (人IL-15Rα寿司域)

[3500] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[3501] ((G4S)3接头)

[3502] GGGGSGGGGSGGGGS

[3503] (人CD137L)

[3504] REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG
VYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL
HTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

[3505] 在一些情况下,将前导肽从完整多肽中裂解以产生可溶或可以分泌的成熟形式。

[3506] 将IL-21/IL-15RαSu/CD137L和IL-7/TF/IL-15构建体克隆到修饰的逆转录病毒表达载体中,如此前所述(Hughes MS,YuYY,DudleyME,ZhengZ,RobbinsPF,LiY等人,来源于具有明显抗肿瘤反应的患者的TCR基因的转移传送高度活性T细胞效应功能.《人基因疗法》2005;16:457-72),并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达允许形成和分泌可溶性IL-7/TF/IL-15:IL-21/IL-15RαSu/CD137L蛋白复合物(称为7t15-21s137L),其可通过抗TF抗体IgG1亲和力和其它色谱方法纯化。

[3507] 使用抗TF抗体亲和柱纯化洗脱7t15-21s137L的色谱

[3508] 将从细胞培养物中收获的7t15-21s137L加载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。加载样品后,用5个柱体积的PBS洗柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸(pH2.9)洗脱。收集A280洗脱峰,并且然后用1M Tris碱中和到pH 7.5-8.0。然后使用具有30KDa分子量截断值的Amicon离心过滤器,使中和的样品在PBS中缓冲交换。如图111所示,抗TF抗体亲和

柱与含有TF作为融合伴侣的7t15-21s137L结合。缓冲交换的蛋白质样品在2-8℃下存储,以用于进一步的生化分析和生物活性测试。每次洗脱后,使用6个柱体积的0.1M甘氨酸(pH2.5)剥离抗TF抗体亲和柱。然后使用5个柱体积的PBS和7个柱体积的20%乙醇中和所述柱,以便存储。抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团AKTAAvant系统。所有步骤都是4mL/min的流速,但洗脱步骤除外,洗脱步骤是2mL/min。图112显示7t15-21s137L的分析型SEC特征曲线。

[3509] 实例55:7t15-21s137L(短版)融合蛋白产生和表征

[3510] 产生包含IL-21/IL-15RαSu/CD137L和IL-7/TF/IL-15融合蛋白的融合蛋白复合物。具体来说,如下制造构建体:将IL-7序列连接到组织因子219的N端编码区,接着连接到IL-15的N端编码区。以下显示包含IL-7的构建体的核酸和蛋白质序列,所述IL-7连接到组织因子219的N端,后接IL-15的N端。

[3511] 7t15构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3512] (信号肽)

[3513] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3514] (人IL7)

[3515] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCAT

[3516] (人组织因子219)

[3517] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3518] (人IL-15)

[3519] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3520] 7t15融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下:

[3521] (信号肽)

[3522] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3523] (人IL7)

[3524] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKM NSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKIL MGTKEH

[3525] (人组织因子219)

[3526] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3527] (人IL-15)

[3528] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3529] 以下显示21s137L(短版)的核酸和蛋白质序列。21s137L(短版)构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3530] (信号肽)

[3531] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3532] (人IL-21)

[3533] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTAC GTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTG CTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGA AGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAG AAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAG GACCCACGGCTCCGAGGACTCC

[3534] (人IL-15Rα寿司域)

[3535] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGC CGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAA GGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[3536] ((G4S)3接头)

[3537] GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCT

[3538] (人CD137配体短版)

[3539] GATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTG ATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGA GGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGG CCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTG GCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCA CCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGG GCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATC

[3540] 21s137L(短版)构建体(包括信号肽序列)的氨基酸序列如下:

[3541] (信号肽)

[3542] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3543] (人IL-21)

[3544] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINV SIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS

[3545] (人IL-15Rα寿司域)

[3546] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[3547] ((G4S)3接头)

[3548] GGGGSGGGGSGGGGS

[3549] (人CD137配体短版)

[3550] DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLE LRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEI

[3551] 将IL-21/IL-15RαSu/CD137L(短版)和IL-7/TF/IL-15构建体克隆到修饰的逆转录病毒表达载体中,如此前所述(Hughes MS,YuYY,DudleyME,ZhengZ,Robbins PF,LiY等人,来源于具有明显抗肿瘤反应的患者的TCR基因的转移传送高度活性T细胞效应功能.《人基因疗法》2005;16:457-72),并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达允许形成和分泌可溶性IL-7/TF/IL-15:IL-21/IL-15RαSu/CD137L蛋白复合物(称为7t15-21s137L(短版)),其可通过抗TF抗体IgG1亲和力和其它色谱方法纯化。

[3552] 7t15-21s137L(短版)对CD137(4.1BB)的结合

[3553] 第1天,用100μL含有(2.5μg/mL)GAHIgGFc(G-102-C,安迪生物科技公司)的R5(涂布缓冲液)或仅R5涂布96孔板且在4℃下培育整夜。第2天,洗板三次,并且在37℃下用300μL含有1%BSA的PBS阻断2小时。以100μL/孔添加10ng/mL的4.1BB/Fc(838-4B,安迪生物公司),并且将其在室温下培育2小时。洗涤三次后,将7t15-21s137L或7t15-21s以1/3比率连续稀释(从10nM开始),并且在4℃下培育整夜。在第3天,在3次洗涤后,将300ng/mL的生物素化抗hTF抗体(BAF2339,安迪生物公司)以每孔100μL添加,并且在室温下培育2小时。然后洗板三次,并且与0.25μg/mL的HRP-SA(杰克逊免疫研究实验室)一起以每孔100μL培育30分钟,接着洗涤3次并与100μL的ABTS在室温下培育2分钟。读取405nm吸光度。如图113所示,与7t15-21s相比,7t15-21s137L(短版)显示与4.1BB/Fc(蓝线)的显著相互作用。

[3554] 用ELISA检测7t15-21s137L(短版)中的IL-15、IL-21和IL-7

[3555] 96孔板用100μL含有(8μg/mL)抗TF抗体IgG1的R5(涂布缓冲液)涂布并且在室温(RT)下培育2小时。洗板3次,并且用100μL含有1%BSA的PBS阻断。添加以1:3比率连续稀释的7t15-21s137L(短版),并且在室温下培育60分钟。洗涤三次后,将50ng/mL的生物素化抗IL-15抗体(BAM247,安迪生物公司)、500ng/mL的生物素化抗IL21抗体(13-7218-81,安迪生物公司)或500ng/mL的生物素化抗IL7抗体(506602,安迪生物公司)添加到孔中,并且在室温下培育60分钟。洗涤三次并且与0.25μg/mL的HRP-SA(杰克逊免疫研究实验室)以每孔100μL在室温下培育30分钟后,接着进行四次洗涤,并且与100μL的ABTS在室温下培育2分钟。读取405nm吸光度。如图114A-114C所示,通过对应的抗体检测7t15-21s137L(短版)中的IL-15、IL-21和IL-7域。

[3556] 7t15-1s137L(短版)中的IL-15促进含IL2Rαβγ的CTLL2细胞增殖

[3557] 为了评估7t15-21s137L(短版)中IL-15的活性,将7t15-21s137L(短版)与重组IL-15在促进表达IL2Rαβγ的CTLL2细胞增殖的方面进行比较。将IL-15依赖性CTLL2细胞用IMDM-10%FBS洗涤5次,并且以2×10^4个细胞/孔接种到孔中。将连续稀释的7t15-21s137L(短版)或IL-15添加到细胞中(图115)。在CO_2培养箱中在37℃下培育细胞3天。通过在第3天向每个孔中添加10μL WST1,并且在CO_2培养箱中在37℃下再培养3小时来检测细胞增殖。通过测量450nm吸光度来分析产生的甲臜染料的量。如图115所示,7t15-21s137L(短版)和IL-15促进CTLL2细胞增殖。7t15-21s137L(短版)和IL-15的EC_{50}分别为55.91pM和6.22pM。

[3558] 7t15-1s137L(短版)中的IL-21促进含IL21R的B9细胞增殖

[3559] 为了评估7t15-21s137L(短版)的IL-21活性,将7t15-21s137L(短版)与重组IL-21在促进表达IL-21R的B9细胞增殖的方面进行比较。将含有IL-21R的B9细胞用RPMI-10%FBS洗涤5次,并且以1×10^4个细胞/孔接种到孔中。将连续稀释的7t15-21s137L(短版)或IL-21添加到细胞中(图116)。在CO_2培养箱中在37℃下培育细胞5天。通过在第5天向每个孔中添加10μL WST1,并且在CO_2培养箱中在37℃下再培养4小时来检测细胞增殖。通过测量450nm吸光度来分析产生的甲臜染料的量。如图116所示,7t15-21s137L(短版)和IL-21促进B9细胞增殖。7t15-21s137L(短版)和IL-21的EC_{50}分别为104.1nM和72.55nM。

[3560] 实例56:7t15-TGFRs融合蛋白产生和表征

[3561] 产生包含TGFβ受体II/IL-15RαSu和IL-7/TF/IL-15融合蛋白的融合蛋白复合物(图117和图118)。人TGFβ受体II(Ile24-Asp159)、组织因子219、IL-15和IL-7序列从UniProt网站获得,并且这些序列的DNA由金唯智合成。具体来说,如下制造构建体:将IL-7序列连接到组织因子219的N端编码区,接着连接到IL-15的N端编码区。以下显示包含IL-7的构建体的核酸和蛋白质序列,所述IL-7连接到组织因子219的N端,后接IL-15的N端。

[3562] 7t15构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3563] (信号肽)

[3564] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3565] (人IL7)

[3566] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCAT

[3567] (人组织因子219)

[3568] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGAC

AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAA
TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3569] (人IL-15)

[3570] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC
ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG
CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3571] 7t15融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下:

[3572] (信号肽)

[3573] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3574] (人IL7)

[3575] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKM
NSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKIL
MGTKEH

[3576] (人组织因子219)

[3577] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3578] (人IL-15)

[3579] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3580] 还通过将两个TGFβ受体II直接连接到由金唯智合成的IL-15RαSu链来制造构建体。以下显示包含TGFβ受体II的构建体的核酸和蛋白质序列,所述受体II连接到IL-15RαSu的N端。

[3581] TGFRs构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3582] (信号肽)

[3583] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3584] (人TGFβ受体II片段)

[3585] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAG
TTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAG
CATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGG
AGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATG
AAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTT
CAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTA
TTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAG
CTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTC

CATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCT
GCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAA
AAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGA
ATACAATACCAGCAACCCCGAC

[3586] (人IL-15Rα寿司域)

[3587] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGC
CGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAA
GGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[3588] TGFRs融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下:

[3589] (信号肽)

[3590] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3591] (人TGFβ受体II)

[3592] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGS
GGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENI
TLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[3593] (人IL-15Rα寿司域)

[3594] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[3595] 7t15-TGFRs对HEK-Blue TGFβ细胞中TGFβ1活性的影响

[3596] 为了评估7t15-TGFRs中TGFβR的活性,分析7t15-TGFRs对HEK-Blue TGFβ细胞中TGFβ1活性的影响。将HEK-Blue TGFβ细胞(英伟杰)用预温热的PBS洗涤两次,并且以5×10^5个细胞/mL再悬浮于测试培养基(DMEM,10%热灭活的FCS,1×谷氨酰胺,1×抗生素-抗真菌剂和2×谷氨酰胺)中。在平底96孔板中,向每个孔中添加50μL细胞(2.5×10^4个细胞/孔),并且接着添加50μL 0.1nM TGFβ1(安迪生物公司)。然后将以1:3连续稀释制备的7t15-TGFRs或TGFR-Fc(安迪生物公司)添加到板中,以达到200μL的总体积。在37℃下培育24小时后,将40μL诱导的HEK-BlueTGFβ细胞上清液添加到平底96孔板中的160μL预温热的QUANTI-Blue(英伟杰)中,并且在37℃下培育1-3小时。然后使用酶标仪(Multiscan Sky)在620-655nM下测定OD值。数据如图119所示。用GraphPad Prism 7.04计算每个蛋白质样品的IC_{50}。7t15-TGFRs和TGFR-Fc的IC_{50}分别为1142pM和558.6pM。这些结果显示7t15-TGFRs中的TGFβR能够阻断HEK-Blue TGFβ细胞中TGFβ1的活性。

[3597] 用ELISA检测7t15-TGFRs中的IL-15、TGFβRII和IL-7

[3598] 96孔板用100μL含有(8μg/mL)抗TF抗体IgG1的R5(涂布缓冲液)涂布并且在室温(RT)下培育2小时。洗板3次,并且用100μL含有1%BSA的PBS阻断。添加7t15-TGFRs的连续稀释液(1:3比率),并且在室温下培育60分钟。洗涤3次后,添加50ng/mL的生物素化抗IL-15抗体(BAM247,安迪生物公司)、200ng/mL的生物素化抗TGFbRII抗体(BAF241,安迪生物公司)或500ng/mL的生物素化抗IL-7抗体(506602,安迪生物公司)并在室温下培育60分钟。洗涤三次后,与0.25μg/mL的HRP-SA(杰克逊免疫研究实验室)一起在室温下以每孔100μL培育30分钟,接着进行4次洗涤,并且与100μLABTS在室温下培育2分钟。读取405nm吸光度。如图120A-120C所示,通过对应的抗体检测7t15-TGFRs中的IL-15、TGFR和IL-7。

[3599] 7t15-TGFRs中的IL-15促进含IL-2Rβ和共同γ链的32Dβ细胞增殖

[3600] 为了评估7t15-TGFRs中IL-15的活性,使用表达IL2Rβ和共同γ链的32Dβ细胞,将7t15-TGFRs与重组IL-15进行比较,并且评估其对促进细胞增殖的作用。将IL-15依赖性32Dβ细胞用IMDM-10%FBS洗涤5次,并且以2×10^4个细胞/孔接种在孔中。将连续稀释的7t15-TGFRs或IL-15添加到细胞中(图121)。在CO_2培养箱中在37℃下培育细胞3天。通过在第3天向每个孔中添加10μLWST1并在CO_2培养箱中在37℃下再培养3小时来检测细胞增殖。通过测量450nm吸光度来分析产生的甲臜染料的量。如图121所示,7t15-TGFRs和IL-15促进32Dβ细胞增殖,7t15-TGFRs和IL-15的EC_{50}分别为126nM和16.63pM。

[3601] 使用抗TF抗体亲和柱纯化洗脱7t15-TGFRs的色谱

[3602] 将从细胞培养物中收获的7t15-TGFRs加载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。加载样品后,用5个柱体积的PBS洗柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸(pH2.9)洗脱。收集A280洗脱峰,并且然后用1M Tris碱中和到pH 7.5-8.0。然后使用具有30KDa分子量截断值的Amicon离心过滤器,使中和的样品在PBS中缓冲交换。如图122所示,抗TF抗体亲和柱可结合含有TF作为7t15-TGFRs的融合伴侣的7t15-TGFRs。缓冲交换的蛋白质样品在2-8℃下存储,以用于进一步的生化分析和生物活性测试。每次洗脱后,使用6个柱体积的0.1M甘氨酸(pH2.5)剥离抗TF抗体亲和柱。然后使用5个柱体积的PBS和7个柱体积的20%乙醇中和所述柱,以便存储。抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团AKTA Avant系统。所有步骤都是4mL/min的流速,但洗脱步骤除外,洗脱步骤是2mL/min。

[3603] 7t15-TGFRs的还原型SDS-PAGE分析

[3604] 为了测定蛋白质的纯度和分子量,在还原条件下通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(4-12%NuPageBis-Tris凝胶)电泳(SDS-PAGE)方法分析用抗TF抗体亲和柱纯化的7t15-TGFRs蛋白样品。电泳后,将凝胶用InstantBlue染色约30分钟,接着在纯化水中脱色整夜。

[3605] 为了验证7t15-TGFRs蛋白在CHO细胞中翻译后经历糖基化,使用来自新英格兰生物实验室的蛋白质脱糖基化混合物II试剂盒和制造商说明书进行脱糖基化实验。图123显示样品在未脱糖基化(红色轮廓的泳道1)和脱糖基化(黄色轮廓的泳道2)状态下的还原型SDS-PAGE分析。这些结果显示所述蛋白质在CHO细胞中表达时被糖基化。脱糖基化后,纯化的样品在还原型SDS凝胶中显示预期的分子量(55kDa和39kDa)。泳道M上载有10ul SeeBlue Plus2预染标准液。

[3606] 7t15-TGFRs的表征

[3607] 7t15-TGFRs是多链多肽(本文所述的A型多链多肽),其包括作为人IL-7、人组织因子219片段和人IL-15的可溶性融合物的第一多肽(7t15),以及作为单链的两个TGFβRII域和人IL-15受体α链寿司域的可溶性融合物的第二多肽(TGFRs)。

[3608] CHO细胞用7t15和TGFRs载体共转染。从转染的CHO细胞培养上清液中纯化7t15-TGFRs复合物。如图124所示,通过ELISA证明复合物中的IL-7、IL-15、TGFβ受体和组织因子(TF)组分。使用人源化抗TF抗体单克隆抗体(抗TF抗体IgG1)作为捕获抗体来确定7t15-TGFRs中的TF,并且使用针对人IL-15抗体(安迪生物公司)、人IL-7(Biolegend)、抗TGFβ受体(安迪生物公司)的生物素化抗体作为检测抗体来分别确定7t15-TGFRs中的IL-7、IL-15和TGFβ受体。然后使用过氧化酶偶联的抗生蛋白链菌素(杰克逊免疫研究实验室)和ABTS底

物(Surmodics IVD,Inc.)检测所结合的生物素化抗体。通过ELISA分析结果(图124)。

[3609] C57BL/6小鼠中7t15-TGFRs的体内表征

[3610] 为了测定体内7t15-TGFRs的免疫刺激活性,将C57BL/6小鼠用对照溶液(PBS)或7t15-TGFRs以0.3、1、3和10mg/kg进行皮下处理。使经过处理的小鼠安乐死。在处理后第4天收集小鼠脾脏并称重。制备单一脾细胞悬浮液,并且用荧光染料偶联的抗CD4、抗CD8和抗NK1.1抗体染色,并且通过流式细胞术分析$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞和NK细胞的百分比。结果表明,基于脾脏重量,7t15-TGFRs尤其在1-10mg/kg下有效扩增脾细胞(图125A)。在所有测试剂量下,与对照物处理的小鼠相比,$CD8^+$T细胞和NK细胞的百分比更高(图125B)。

[3611] CD4+和CD8+T细胞的CD44表达

[3612] 已知IL-15诱导T细胞上的CD44表达和记忆T细胞的发育。评估经7t15-TGFRs处理的小鼠中的$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的CD44表达。用7t15-TGFRs皮下处理C57BL/6小鼠。用荧光染料偶联的抗CD4、抗CD8和抗CD44单克隆抗体,针对免疫细胞亚群对脾细胞进行染色。通过流式细胞术分析总CD4+T细胞中的$CD4^+CD44^{高}$T细胞百分比和总$CD8^+$T细胞中的$CD8^+CD44^{高}$T细胞百分比。如图126A和126B所示,7t15-TGFRs显著活化$CD4^+$和$CD8^+$T细胞分化成记忆T细胞。

[3613] 此外,还评估在小鼠单剂量处理后,7t15-TGFRs诱导的脾细胞基于Ki67表达的免疫细胞的动态增殖,和脾细胞基于颗粒酶B表达的细胞毒性潜力。用3mg/kg的7t15-TGFRs皮下处理C57BL/6小鼠。使经过处理的小鼠安乐死并制备脾细胞。制备的脾细胞用荧光染料偶联的抗CD4、抗CD8和抗NK1.1(NK)抗体针对免疫细胞亚群进行染色,并且然后用抗Ki67抗体针对细胞增殖进行细胞内染色,并且用抗颗粒酶B抗体针对细胞毒性标记进行细胞内染色。通过流式细胞术分析对应免疫细胞亚群的Ki67和颗粒酶B的平均荧光强度(MFI)。如图127A和127B所示,在用7t15-TGFRs处理的小鼠的脾脏中,与PBS对照处理相比,$CD8^+$T细胞和NK细胞对Ki67和颗粒酶B的表达增加。这些结果证明7t15-TGFRs不仅增加$CD8^+$T细胞和NK细胞的数目,而且增强这些细胞的潜在细胞毒性。

[3614] 另外,还评估小鼠脾细胞对肿瘤细胞的细胞毒性。将小鼠Yac-1细胞用CellTrace紫标记,并且用作肿瘤靶细胞。从7t15-TGFRs处理的小鼠制备脾细胞,并且将其用作效应细胞。将靶细胞与效应细胞以E:T比率=10:1在RPMI-10培养基中、在具有或不具有100nM的7t15-TGFRs的情况下混合,并且在37℃下培育20小时。通过使用流式细胞术分析紫色标记的活Yac-1细胞来评估Yac-1靶细胞抑制。使用下式计算Yac-1抑制的百分比:(1-实验样品中的Yac-1活细胞数/不含脾细胞的样品中的Yac-1活细胞数)×100。如图128所示,7t15-TGFRs处理的小鼠脾细胞对Yac-1细胞的细胞毒性强于对照小鼠脾细胞,并且在细胞毒性分析过程中添加7t15-TGFRs进一步增强脾细胞对Yac-1靶细胞的细胞毒性。

[3615] 实例57:TGFRt15-21s137L融合蛋白产生和表征

[3616] 产生包含IL-21/IL-15RαSu/CD137L和TGFβ受体II/TF/IL-15融合蛋白的融合蛋白复合物(图129和图130)。人TGFβ受体II(Ile24-Asp159)、组织因子219和IL-15序列从UniProt网站获得,并且这些序列的DNA由金唯智合成。具体来说,如下制造构建体:利用G4S(3)接头将两个TGFβ受体II序列连接以产生TGFβ受体II的单链形式,并且然后直接连接到组织因子219的N端编码区,接着连接到IL-15的N端编码区。

[3617] TGFRt15构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3618] (信号肽)

[3619] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3620] (人TGFβ受体II片段)

[3621] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAG
TTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAG
CATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGG
AGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATG
AAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTT
CAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTA
TTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAG
CTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTC
CATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCT
GCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAA
AAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGA
ATACAATACCAGCAACCCCGAC

[3622] (人组织因子219)

[3623] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTC
GAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATG
TTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGG
TGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTT
ACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGAC
AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAA
TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3624] (人IL-15)

[3625] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC
ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG
CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3626] TGFRt15融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下:

[3627] (信号肽)

[3628] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3629] (人TGFβ受体II)

[3630] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGS
GGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENI
TLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[3631] (人组织因子219)

[3632] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3633] (人IL-15)

[3634] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3635] 以下显示21s137L的核酸和蛋白质序列。21s137L构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下：

[3636] (信号肽)

[3637] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3638] (人IL-21)

[3639] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC

[3640] (人IL-15Rα寿司域)

[3641] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[3642] ((G4S)3接头)

[3643] GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCT

[3644] (人CD137L)

[3645] CGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATCCCAGCCGGACTCCCTTCACCGAGGTCGGAA

[3646] 21s137L融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下：

[3647] (信号肽)

[3648] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3649] (人IL-21)

[3650] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS

[3651] (人IL-15Rα寿司域)

[3652] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[3653] ((G4S)3接头)

[3654] GGGGSGGGGSGGGGS

[3655] (人CD137L)

[3656] REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG VYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL HTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

[3657] 在一些情况下,将前导肽从完整多肽中裂解以产生可溶或可以分泌的成熟形式。

[3658] 将IL-21/IL-15RαSu/CD137L和TGFR/TF/IL-15构建体克隆到修饰的逆转录病毒表达载体中,如此前所述(Hughes MS,YuYY,DudleyME,ZhengZ,RobbinsPF,LiY等人,来源于具有明显抗肿瘤反应的患者的TCR基因的转移传送高度活性T细胞效应功能.《人基因疗法》2005;16:457-72),并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达允许形成和分泌可溶性TGFR/TF/IL-15:IL-21/IL-15RαSu/CD137L蛋白复合物(称为TGFRt15-21s137L),其可通过抗TF抗体IgG1亲和力和其它色谱方法纯化。

[3659] 使用抗TF抗体亲和柱纯化洗脱TGFRt15-21s137L的色谱

[3660] 将从细胞培养物中收获的TGFRt15-21s137L加载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。加载样品后,用5个柱体积的PBS洗柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸(pH2.9)洗脱。收集A280洗脱峰,并且然后用1M Tris碱中和到pH 7.5-8.0。然后使用具有30KDa分子量截断值的Amicon离心过滤器,使中和的样品在PBS中缓冲交换。如图131所示,抗TF抗体亲和柱与含有TF作为TGFRt15-21s137L的融合伴侣的TGFRt15-21s137L结合。缓冲交换的蛋白质样品在2-8℃下存储,以用于进一步的生化分析和生物活性测试。每次洗脱后,使用6个柱体积的0.1M甘氨酸(pH2.5)剥离抗TF抗体亲和柱。然后使用5个柱体积的PBS和7个柱体积的20%乙醇中和所述柱,以便存储。抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团AKTAAvant系统。所有步骤都是4mL/min的流速,但洗脱步骤除外,洗脱步骤是2mL/min。

[3661] 实例58:TGFRt15-TGFRs21融合蛋白产生和表征

[3662] 产生包含TGFβ受体II/IL-15RαSu/IL-21和TGFβ受体II/TF/IL-15融合蛋白的融合蛋白复合物(图132和图133)。人TGFβ受体II(Ile24-Asp159)、组织因子219、IL-21和IL-15序列从UniProt网站获得,并且这些序列的DNA由金唯智合成。具体来说,如下制造构建体:利用G4S(3)接头将两个TGFβ受体II序列连接以产生TGFβ受体II的单链形式,并且然后直接连接到组织因子219的N端编码区,接着连接到IL-15的N端编码区。

[3663] 以下显示包含两个TGFβ受体II的构建体的核酸和蛋白质序列,所述受体II连接到组织因子219的N端,后接IL-15的N端。

[3664] TGFRt15构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3665] (信号肽)

[3666] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3667] (人TGFβ受体II片段)

[3668] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAG TTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAG CATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGG

AGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATG
AAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTT
CAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTA
TTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAG
CTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTC
CATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCT
GCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAA
AAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGA
ATACAATACCAGCAACCCCGAC

[3669] (人组织因子219)

[3670] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTC
GAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATG
TTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGG
TGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTT
ACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGAC
AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAA
TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3671] (人IL-15)

[3672] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC
ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG
CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3673] TGFRt15融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下:

[3674] (信号肽)

[3675] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3676] (人TGFβ受体II)

[3677] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGS
GGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENI
TLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[3678] (人组织因子219)

[3679] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3680] (人IL-15)

[3681] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL

ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3682] 还通过将两个TGFβ受体II直接连接到IL-15RαSu链,接着连接到由金唯智合成的IL-21的N端编码区来制造构建体。以下显示包含TGFβ受体II的构建体的核酸和蛋白质序列,所述受体II连接到IL-15RαSu的N端,后接IL-21的N端。

[3683] TGFRs21构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3684] (信号肽)

[3685] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3686] (人TGFβ受体II片段)

[3687] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAG
TTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAG
CATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGG
AGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATG
AAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTT
CAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTA
TTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAG
CTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTC
CATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCT
GCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAA
AAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGA
ATACAATACCAGCAACCCCGAC

[3688] (人IL-15Rα寿司域)

[3689] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGC
CGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAA
GGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[3690] (人IL-21)

[3691] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTAC
GTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTG
CTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGA
AGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAG
AAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAG
GACCCACGGCTCCGAGGACTCC

[3692] TGFRs21融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下:

[3693] (信号肽)

[3694] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3695] (人TGFβ受体II)

[3696] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGS
GGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENI
TLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[3697] (人IL-15Rα寿司域)

[3698] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[3699] (人IL-21)

[3700] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINV SIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS

[3701] 在一些情况下,将前导肽从完整多肽中裂解以产生可能可溶或分泌的成熟形式。

[3702] 将TGFR/IL-15RαSu/IL-21和TGFR/TF/IL-15构建体克隆到修饰的逆转录病毒表达载体中,如此前所述(Hughes MS,YuYY,DudleyME,ZhengZ,RobbinsPF,LiY等人,来源于具有明显抗肿瘤反应的患者的TCR基因的转移传送高度活性T细胞效应功能.《人基因疗法》2005;16:457-72),并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达允许形成和分泌可溶性TGFR/TF/IL-15:TGFR/IL-15RαSu/IL-21蛋白复合物(称为TGFRt15-TGFRs21),其可通过抗TF抗体IgG1亲和力和其它色谱方法纯化。

[3703] 使用抗TF抗体亲和柱纯化洗脱TGFRt15-TGFRs21的色谱

[3704] 从细胞培养物中收获的TGFRt15-TGFRs21被加载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。加载样品后,用5个柱体积的PBS洗柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸(pH2.9)洗脱。收集A280洗脱峰,并且然后用1M Tris碱中和到pH 7.5-8.0。然后使用具有30KDa分子量截断值的Amicon离心过滤器,使中和的样品在PBS中缓冲交换。如图134所示,抗TF抗体亲和柱与含有TF作为融合伴侣的TGFRt15-TGFRs21结合。缓冲交换的蛋白质样品在2-8℃下存储,以用于进一步的生化分析和生物活性测试。每次洗脱后,使用6个柱体积的0.1M甘氨酸(pH2.5)剥离抗TF抗体亲和柱。然后使用5个柱体积的PBS和7个柱体积的20%乙醇中和所述柱,以进行存储。抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团AKTAAvant系统。所有步骤都是4mL/min的流速,但洗脱步骤除外,洗脱步骤是2mL/min。

[3705] TGFRt15-TGFRs21的还原型SDS-PAGE分析

[3706] 为了测定蛋白质的纯度和分子量,在还原条件下通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(4-12%NuPageBis-Tris凝胶)电泳(SDS-PAGE)方法分析用抗TF抗体亲和柱纯化的TGFRt15-TGFRs21蛋白样品。电泳后,将凝胶用InstantBlue染色约30分钟,接着在纯化水中脱色整夜。

[3707] 为了验证TGFRt15-TGFRs21蛋白质在CHO细胞中翻译后经历糖基化,使用来自新英格兰生物实验室的蛋白质脱糖基化混合物II试剂盒和制造商说明书进行脱糖基化实验。图135显示未脱糖基化(红色轮廓的泳道1)和脱糖基化(黄色轮廓的泳道2)状态的样品的还原SDS-PAGE分析。显然,当蛋白质在CHO细胞中表达时,所述蛋白质被糖基化。脱糖基化后,纯化的样品在还原SDS凝胶中显示预期的分子量(69kDa和55kDa)。泳道M载有10ul SeeBlue Plus2预染标准液。

[3708] TGFRt15-TGFRs21在C57BL/6小鼠中的免疫刺激

[3709] TGFRt15-TGFRs21是多链多肽(本文所述的A型多链多肽),其包括作为单链的两个TGFβRII域、人组织因子219片段和人IL-15的可溶性融合物的第一多肽(TGFRt15),以及作为单链的两个TGFβRII域、人IL-15受体α链的寿司域和人IL-21的可溶性融合物的第二多肽(TGFRs21)。

[3710] CHO细胞用TGFRt15和TGFRs21载体共转染。从转染的CHO细胞培养上清液中纯化

TGFRt15-TGFRs21复合物。如图136所示,通过ELISA证明复合物中的TGFβ受体、IL-15、IL-21和组织因子(TF)组分。使用人源化抗TF单克隆抗体(抗TF IgG1)作为捕获抗体来确定TGFRt15-TGFRs21中的TF,使用生物素化抗人IL-15抗体(安迪生物公司)、生物素化抗人TGFβ受体抗体(安迪生物公司)和生物素化抗人IL-21抗体(安迪生物公司)作为检测抗体来分别确定TGFRt15-TGFRs21中的IL-15、TGFβ受体和IL-21。为了检测,使用过氧化酶偶联的抗生蛋白链菌素(杰克逊免疫研究实验室)和ABTS。

[3711] 用对照溶液(PBS)或TGFRt15-TGFRs21以3mg/kg皮下处理野生型C57BL/6小鼠。处理后四天,评估脾脏重量和脾脏中存在的各种免疫细胞类型的百分比。如图137A所示,评估对照物处理和TGFRt15-TGFRs21处理的小鼠的脾脏中存在的$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞和NK细胞的百分比。还评估在TGFRt15-TGFRs21处理后基于Ki67表达的免疫细胞的动态增殖。将脾细胞用荧光染料偶联的抗CD4、抗CD8和抗-NK1.1(NK)抗体染色,并且然后用抗Ki67抗体细胞内染色。通过流式细胞术分析$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞和NK细胞的百分比以及对应免疫细胞亚群的Ki67的平均荧光强度(MFI)(图137A和137B)。此外,还评估小鼠单次剂量处理后由TGFRt15-TGFRs21诱导的脾细胞基于颗粒酶B表达的细胞毒性潜力。如图138所示,在用TGFRt15-TGFRs21处理的小鼠的脾脏中,NK细胞对颗粒酶B表达在处理后增加。将来自TGFRt15-TGFRs21处理的小鼠的脾细胞用荧光染料偶联的抗CD4、抗CD8和抗NK1.1(NK)抗体染色,并且然后用抗颗粒酶B抗体细胞内染色。通过流式细胞术分析对应免疫细胞亚群的颗粒酶B的平均荧光强度(MFI)(图138)。

[3712] 如图137A所示,在用TGFRt15-TGFRs21处理的小鼠的脾脏中,在单次TGFRt15-TGFRs21处理后的第4天,$CD8^+$T细胞和NK细胞的百分比均增加。这些结果证明TGFRt15-TGFRs21能够诱导免疫细胞在小鼠脾脏中增殖,尤其$CD8^+$T细胞和NK细胞。

[3713] 另外,还评估小鼠脾细胞对肿瘤细胞的细胞毒性。将小鼠Yac-1细胞用CellTrace紫标记,并且用作肿瘤靶细胞。从TGFRt15-TGFRs21处理的小鼠制备脾细胞,并且将其用作效应细胞。将靶细胞与效应细胞以E:T比率=10:1在RPMI-10培养基中、在具有或不具有100nM的TGFRt15-TGFRs21的情况下混合,并且在37℃下培育24小时。通过使用流式细胞术分析紫色标记的活Yac-1细胞来评估Yac-1靶细胞抑制。使用下式计算Yac-1抑制的百分比:(1-[实验样品中Yac-1活细胞数]/[不含脾细胞的样品中Yac-1活细胞数])×100。如图139所示,在细胞毒性分析期间,在存在TGFRt15-TGFRs21的情况下,TGFRt15-TGFRs21处理的小鼠脾细胞对Yac-1细胞的细胞毒性强于对照小鼠细胞(图139)。

[3714] 实例59:TGFRt15-TGFRs16融合蛋白产生

[3715] 产生包含TGFβ受体II/IL-15RαSu/抗CD16scFv和TGFβ受体II/TF/IL-15融合蛋白的融合蛋白复合物(图140和图141)。人TGFβ受体II(Ile24-Asp159)、组织因子219和IL-15序列从UniProt网站获得,并且这些序列的DNA由金唯智合成。具体来说,如下制造构建体:利用G4S(3)接头将两个TGFβ受体II序列连接以产生TGFβ受体II的单链形式,并且然后直接连接到组织因子219的N端编码区,接着连接到IL-15的N端编码区。

[3716] 以下显示包含两个TGFβ受体II的构建体的核酸和蛋白质序列,所述受体II连接到组织因子219的N端,后接IL-15的N端。

[3717] TGFRt15构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3718] (信号肽)

[3719] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3720] (人TGFβ受体II片段)

[3721] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAG
TTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAG
CATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGG
AGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATG
AAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTT
CAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTA
TTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAG
CTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTC
CATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCT
GCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAA
AAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGA
ATACAATACCAGCAACCCCGAC

[3722] (人组织因子219)

[3723] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTC
GAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATG
TTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGG
TGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTT
ACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGAC
AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAA
TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3724] (人IL-15)

[3725] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC
ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG
CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3726] TGFRt15融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下:

[3727] (信号肽)

[3728] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3729] (人TGFβ受体II)

[3730] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGS
GGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENI
TLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[3731] (人组织因子219)

[3732] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3733] (人IL-15)

[3734] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3735] 还通过将两个TGFβ受体II直接连接到IL-15RαSu链,接着连接到由金唯智合成的抗CD16scFv序列来制造构建体。以下显示包含TGFβ受体II连接到IL-15RαSu的N端,后接抗CD16scFv序列的构建体的核酸和蛋白质序列。

[3736] TGFRs16构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3737] (信号肽)

[3738] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3739] (人TGFβ受体II片段)

[3740] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC

[3741] (人IL-15Rα寿司域)

[3742] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[3743] (抗人CD16scFv)

[3744] TCCGAGCTGACCCAGGACCCTGCTGTGTCCGTGGCTCTGGGCCAGACCGTGAGGATCACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAGGTCCTACTACGCCTCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTGATCTACGGCAAGAACAACAGGCCCTCCGGCATCCCTGACAGGTTCTCCGGATCCTCCTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACCATCACAGGCGCTCAGGCCGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCAACTCCAGGGACTCCTCCGGCAACCATGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGGGCCATGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGAGGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGAGCTGTGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCGACGACTACGGCATGTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAACTGGAACGGCGGATCCACCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCAGGTCCCTGCTGTTCGACT

ACTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGG

[3745] TGFRs16融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下:

[3746] (信号肽)

[3747] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3748] (人TGFβ受体II)

[3749] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGS GGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENI TLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[3750] (人IL-15Rα寿司域)

[3751] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[3752] (抗人CD16scFv)

[3753] SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTA SLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTKLTVGHGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCA ASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGR SLLFDYWGQGTLVTVSR

[3754] 在一些情况下,将前导肽从完整多肽中裂解以产生可能可溶或分泌的成熟形式。

[3755] 将TGFR/IL-15RαSu/抗CD16scFv和TGFR/TF/IL-15构建体克隆到修饰的逆转录病毒表达载体中,如此前所述(Hughes MS,YuYY,DudleyME,ZhengZ,Robbins PF,LiY等人,来源于具有明显抗肿瘤反应的患者的TCR基因的转移传送高度活性T细胞效应功能.《人基因疗法》2005;16:457-72),并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达允许形成和分泌可溶性TGFR/TF/IL-15:TGFR/IL-15RαSu/抗CD16scFv蛋白复合物(称为TGFRt15-TGFRs16),其通过抗TF IgG1亲和力和其它色谱方法纯化。

[3756] 实例60:TGFRt15-TGFRs137L融合蛋白产生

[3757] 产生包含TGFβ受体II/IL-15RαSu/CD137L和TGFβ受体II/TF/IL-15融合蛋白的融合蛋白复合物(图142和图143)。人TGFβ受体II(Ile24-Asp159)、组织因子219、CD137L和IL-15序列从UniProt网站获得,并且这些序列的DNA由金唯智合成。具体来说,如下制造构建体:利用G4S(3)接头将两个TGFβ受体II序列连接以产生TGFβ受体II的单链形式,并且然后直接连接到组织因子219的N端编码区,接着连接到IL-15的N端编码区。

[3758] 以下显示包含两个TGFβ受体II的构建体的核酸和蛋白质序列,所述受体II连接到组织因子219的N端,后接IL-15的N端。

[3759] TGFRt15构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3760] (信号肽)

[3761] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3762] (人TGFβ受体II片段)

[3763] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAG TTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAG CATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGG AGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATG

AAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTT
CAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTA
TTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAG
CTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTC
CATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCT
GCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAA
AAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGA
ATACAATACCAGCAACCCCGAC

[3764] (人组织因子219)

[3765] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTC
GAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATG
TTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGG
TGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTT
ACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGAC
AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAA
TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3766] (人IL-15)

[3767] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC
ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG
CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3768] TGFRt15融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下:

[3769] (信号肽)

[3770] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3771] (人TGFβ受体II)

[3772] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGS
GGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENI
TLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[3773] (人组织因子219)

[3774] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3775] (人IL-15)

[3776] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3777] 还通过将两个TGFβ受体II直接连接到IL-15RαSu链,接着连接到(G4S)3接头和由金唯智合成的CD137L序列来制造构建体。以下显示包含TGFβ受体II的构建体的核酸和蛋白质序列,所述受体II连接到IL-15RαSu的N端,后接(G4S)3接头和CD137L序列。

[3778] TGFRs137L构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下:

[3779] (信号肽)

[3780] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3781] (人TGFβ受体II片段)

[3782] ATCCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCCTGGAGACCGTGTGTCACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC

[3783] (人IL-15Rα寿司域)

[3784] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[3785] ((G4S)3接头)

[3786] GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCT

[3787] (人CD137L)

[3788] CGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATCCCAGCCGGACTCCCTTCACCGAGGTCGGAA

[3789] TGFRs137L融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下:

[3790] (信号肽)

[3791] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3792] (人TGFβ受体II)

[3793] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKND

ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGS
GGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENI
TLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[3794] (人IL-15Rα寿司域)

[3795] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[3796] ((G4S)3接头)

[3797] GGGGSGGGGSGGGGS

[3798] (人CD137L)

[3799] REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG
VYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL
HTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

[3800] 在一些情况下,将前导肽从完整多肽中裂解以产生可能可溶或分泌的成熟形式。

[3801] 将TGFR/IL-15RαSu/CD137L和TGFR/TF/IL-15构建体克隆到修饰的逆转录病毒表达载体中,如此前所述(Hughes MS,YuYY,DudleyME,ZhengZ,Robbins PF,LiY等人,来源于具有明显抗肿瘤反应的患者的TCR基因的转移传送高度活性T细胞效应功能.《人基因疗法》2005;16:457-72),并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达允许形成和分泌可溶性TGFR/TF/IL-15:TGFR/IL-15RαSu/CD137L蛋白复合物(称为TGFRt15-TGFRs137L),其可通过抗TF IgG1亲和力和其它色谱方法纯化。

[3802] 实例61.示例性单链嵌合多肽2t2的产生与表征

[3803] 产生了示例性的单链嵌合多肽,其包括结合至IL-2受体的第一靶标结合域、人可溶性组织因子域和结合至IL-2受体的第二靶标结合域(IL-2/TF/IL-2;称为2t2)(图144)。这种单链嵌合多肽的核酸和氨基酸序列如下所示。

[3804] 编码示例性单链嵌合多肽(IL-2/TF/IL-2)的核酸(SEQ ID NO:164)

[3805] (信号肽)

[3806] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3807] (第一IL-2片段)

[3808] GCCCCCACCTCCTCCTCCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGCTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATG
ATTTTAAACGGCATCAACAACTACAAGAACCCCAAGCTGACTCGTATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAA
GGCCACCGAGCTGAAGCATTTACAGTGTTTAGAGGAGGAGCTGAAGCCCCTCGAGGAGGTGCTGAATTTAGCCCAGT
CCAAGAATTTCCATTTAAGGCCCCGGGATTTAATCAGCAACATCAACGTGATCGTTTTAGAGCTGAAGGGCTCCGAG
ACCACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACCGCCACCATCGTGGAGTTTTTAAATCGTTGGATCACCTTCTGCCA
GTCCATCATCTCCACTTTAACC

[3809] (人组织因子219)

[3810] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTC
GAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATG
TTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGG
TGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTT
ACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGAC
AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAA

TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3811] (第二IL-2片段)

[3812] GCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATG
ATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCCAAACTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAA
GGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAA
GCAAAAACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACTAAAGGGATCTGAA
ACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCA
AAGCATCATCTCAACACTAACT

[3813] 示例性单链嵌合多肽(IL-2/TF/IL-2)(SEQ ID NO:163)

[3814] (信号肽)

[3815] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3816] (人IL-2)

[3817] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV
LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

[3818] (人组织因子219)

[3819] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3820] (人IL-2)

[3821] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV
LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

[3822] 将编码IL-2/TF/IL-2的核酸克隆到经修饰的逆转录病毒表达载体中,如此前所述(Hughes等人,《人基因疗法》16:457-72,2005)。将编码IL-2/TF/IL-2的表达载体转染到CHO-K1细胞中。表达载体在CHO-K1细胞中的表达允许分泌可溶性IL-2/TF/IL-2单链嵌合多肽(称为2t2),其可通过抗TF抗体亲和力和其他色谱方法纯化。

[3823] IL-2和2t2以类似方式促进含有IL-2Rβ和共用γ链的32Dβ细胞增殖

[3824] 为了评估2t2对IL-2的活性,对2t2与重组IL-2在促进表达IL-2Rβ和共用γ链的32Dβ细胞增殖方面进行比较。IL-2依赖性32Dβ细胞用IMDM-10%FBS洗涤5次且以每孔2×10^4个细胞接种于孔中。将2t2或IL-2的连续稀释液添加到细胞中(图145)。在CO_2培养箱中在37℃下培育细胞3天。通过在第3天向每个孔中添加10μl WST1并在CO_2培养箱中在37℃下再培养3小时来检测细胞增殖。通过测量450nm吸光度来分析产生的甲臜染料的量。如图145所示,2t2和IL-2以类似方式活化32Dβ细胞。2t2和IL-2的EC_{50}分别是158.1pM和140pM。

[3825] 相较于IL-2,2t2促进含有IL-2Rαβγ的CTLL-2细胞增殖的能力改善

[3826] 为了评估2t2对IL-2的活性,将2t2与重组IL-2在促进表达IL-2Rα、IL-2Rβ和共用γ链的CTLL-2细胞增殖方面进行比较。IL-2依赖性CTLL-2细胞用IMDM-10%FBS洗涤5次且以每孔2×10^4个细胞接种于孔中。将2t2或IL-2的连续稀释液添加到细胞中(图146)。在CO_2培养箱中在37℃下培育细胞3天。通过在第3天向每个孔中添加10μl WST1且在CO_2培育箱中

在37℃下再培育3小时来检测细胞增殖。通过测量450nm吸光度来分析产生的甲臜染料的量。如图146所示,2t2促进CTLL-2细胞增殖比IL-2强4-5倍。2t2的EC_{50}为123.2pM,而IL-2为548.2pM。

[3827] 2t2抑制$ApoE^{-/-}$小鼠的高脂肪诱导高血糖症恶化

[3828] 向六周龄雌性$ApoE^{-/-}$小鼠(杰克逊实验室(Jackson Lab))饲喂标准饮食或含有21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖、19.5%酪蛋白和15%淀粉的高脂肪饮食(TD88137,哈兰实验室(HarlanLaboratories))并且在标准条件下维持。在第7周,将饲喂高脂肪饮食的小鼠随机分为对照组和处理组。小鼠然后通过皮下注射接受3mg/kg剂量的2t2(处理组)或PBS(饮食组和对照组)。给药后三天,将小鼠禁食整夜,并通过眼眶后静脉神经丛穿刺收集血样。使用OneTouch血糖仪测量整夜空腹血糖水平。如图147所示,结果表明2t2注射有效地抑制了$ApoE^{-/-}$小鼠的葡萄糖水平增加。

[3829] 2t2使血液淋巴细胞中的$CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$T调控(Treg)细胞比率显著上调

[3830] 向六周龄雌性$ApoE^{-/-}$小鼠(杰克逊实验室)饲喂标准饮食或含有21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖、19.5%酪蛋白和15%淀粉的高脂肪饮食(TD88137,哈兰实验室)并且在标准条件下维持。第7周,将饲喂高脂肪饮食的小鼠随机分为对照组和处理组。小鼠然后通过皮下注射接受3mg/kg剂量的2t2(处理组)或PBS(饮食组和对照组)。给药后的第三天,通过眼眶后静脉从穿刺来收集整夜空腹的血液样品且与ACK溶解缓冲液(赛默飞世尔科技)一起在37℃下培育5分钟。然后将样品再悬浮于FACS缓冲液(1×PBS(Hyclone),其含有0.5%BSA(EMD密理博)和0.001%叠氮化钠(西格玛))中且用FITC-抗CD4和APC-抗CD25抗体(BioLegend)进行表面染色30分钟。将表面染色的样品进一步固定,并用Fix/Perm缓冲液(BioLegend)进行预金属化,并用PE-抗Foxp3抗体(BioLegend)进行细胞内染色。染色后,将细胞用FACs缓冲液洗涤两次,然后在室温下以1500RPM离心5分钟。通过流式细胞术(Celesta-BDBioscience)分析细胞。如图148所示,与未处理组(饮食组为0.4%±0.16,高脂肪饮食组为0.46%±0.09)相比,2t2处理显着增加了血液淋巴细胞中的Treg群体(3.5%±0.32)。

[3831] 抗TF抗体亲和柱纯化洗脱2t2的色谱

[3832] 从细胞培养物中收获的2t2被加载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。加载样品后,用5个柱体积的PBS洗柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸(pH 2.9)洗脱。收集A280洗脱峰,并且然后用1M Tris碱中和到pH 7.5-8.0。然后使用具有30KDa分子量截断值的Amicon离心过滤器,使中和的样品在PBS中缓冲交换。如图149所示,抗TF抗体亲和柱与含有TF作为融合伴侣的2t2结合。缓冲交换的蛋白质样品在2-8℃下存储,以用于进一步的生化分析和生物活性测试。每次洗脱后,使用6个柱体积的0.1M甘氨酸(pH 2.5)剥离抗TF抗体亲和柱。然后使用5个柱体积的PBS和7个柱体积的20%乙醇中和所述柱,以便存储。抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团AKTA Avant系统。所有步骤都是4mL/min的流速,但洗脱步骤除外,洗脱步骤是2mL/min。

[3833] 2t2的分析型尺寸排阻色谱(SEC)分析

[3834] 为了使用分析型尺寸排阻色谱(SEC)分析2t2,将Superdex200 Increase 10/300GL凝胶过滤柱(得自通用电气医疗集团)连接到AKTA Avant系统(得自通用电气医疗集团)。用2个柱体积的PBS平衡所述柱。流速为0.7mL/min。使用毛细管回路将含有2t2于PBS中

的样品注入Superdex 200柱,并且通过SEC分析。样品的SEC色谱如图150所示。SEC结果表明2t2有两个蛋白质峰。

[3835] 2t2的还原型SDS-PAGE

[3836] 为了测定蛋白质的纯度和分子量,在还原条件下通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(4-12%NuPage Bis-Tris凝胶)电泳(SDS-PAGE)方法分析用抗TF抗体亲和柱纯化的2t2蛋白样品。电泳后,将凝胶用InstantBlue染色约30分钟,接着在纯化水中脱色整夜。

[3837] 为了验证2t2蛋白在CHO细胞中翻译后经历糖基化,使用来自新英格兰生物实验室的蛋白质脱糖基化混合物II试剂盒,根据制造商说明书进行脱糖基化实验。图151A和151B显示了样品在未脱糖基化(红色轮廓的泳道1)和脱糖基化(黄色轮廓的泳道2)状态下的还原型SDS-PAGE分析。结果表明,2t2蛋白在CHO细胞中表达时被糖基化。脱糖基化后,纯化的样品在还原SDS凝胶中以预期的分子量(56kDa)跑电泳。泳道M载有10μLSeeBluePlus2预染标准液。

[3838] 2t2的体内表征

[3839] 以不同剂量将2t2皮下注射到C57BL/6小鼠中,以测定2t2在体内的免疫刺激活性。用0.1、0.4、2和10mg/kg的对照溶液(PBS)或2t2皮下处理小鼠。经处理的小鼠在处理后第3天安乐死。在处理后第3天收集小鼠脾脏并称重。制备单一脾细胞悬浮液,且所制备的脾细胞针对$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞和NK细胞染色(用荧光染料偶联的抗CD4、抗CD8和抗NK1.1抗体染色),且通过流式细胞术分析。结果表明,基于脾脏重量,2t2尤其在0.1-10mg/kg时有效扩增脾细胞(图152A)。在2和10mg/kg时,$CD8^+$T细胞百分比高于对照物处理的小鼠(图152B)。在所有测试剂量下,NK细胞百分比高于对照物处理的小鼠(图152B)。

[3840] 已知IL-2上调免疫细胞对CD25的表达。我们因此获知了经2t2处理的小鼠中的$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞和NK细胞的CD25表达。如上述段落中所述,用2t2皮下处理C57BL/6小鼠。脾细胞用荧光染料偶联的抗CD4、抗CD8、CD25和NK1.1单克隆抗体染色。通过流式细胞术分析脾细胞亚群的CD25表达(MFI)。如图153所示,在测试的剂量和时间点(第3天),2t2显著上调$CD4^+$T细胞对CD25的表达,但CD8+T细胞或NK细胞则不然。

[3841] 还研究了2t2在C57BL/6小鼠中的药代动力学。将2t2以1mg/kg皮下注射到C57BL/6小鼠中。在如图154所示的多个时间点从小鼠尾静脉抽血,并且制备血清。用ELISA测定2t2浓度(捕获:抗组织因子抗体;检测:生物素化抗人IL-2抗体,然后是SA-HRP和ABTS底物)。使用PKSolutions2.0(SummitResearch Services)计算得出的2t2的半衰期为1.83小时。

[3842] 2t2使$ApoE^{-/-}$小鼠的高脂肪诱导动脉粥样硬化斑的形成减少

[3843] 向六周龄雌性$ApoE^{-/-}$小鼠(杰克逊实验室)饲喂标准饮食或高脂肪饮食(21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖、19.5%酪蛋白和15%淀粉)(TD88137,哈兰实验室)并且在标准条件下维持。在第7周,将饲喂高脂肪饮食(HFD)的小鼠随机分为对照组和处理组。然后以3mg/kg的剂量将2t2(处理组)或PBS(饮食组和对照组)皮下施用于小鼠,每周一次,历时4周。在第12周,通过异氟烷对所有小鼠实施安乐死。收集主动脉,纵向打开且使用正面方法,用苏丹IV溶液(0.5%)染色。然后使用Image J软件对斑块面积(红色,如图155A所示)相对于总主动脉面积的百分比进行定量。图155A显示了每组的动脉粥样硬化斑的代表性视图。图155B显示了每组的动脉粥样硬化斑的定量分析结果。对照组(HF饮食)的斑块面积百分比比处理组(HFD+2t2)高得多:10.28%相对于4.68%。

[3844] 2t2抑制2型糖尿病恶化.

[3845] 雄性BKS.Cg-Dock7^{m}+/+Lepr^{db}/J(db/db(杰克逊实验室))小鼠饲喂标准饮食且随意接受饮用水。在六周龄时,将小鼠随机分为对照组和处理组。处理组每两周一次以皮下注射接受3mg/kg的2t2,而对照组仅接受媒剂(PBS)。使用OneTouch血糖仪每周测量整夜空腹血糖水平。结果显示2t2有效抑制BKS.Cg-Dock7^{m}+/+Lepr^{db}/J小鼠的葡萄糖水平增加(图156)。

[3846] 2t2在第一次注射之后显著上调血液淋巴细胞中的CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}T调控细胞比率

[3847] 雄性BKS.Cg-Dock7^{m}+/+Lepr^{db}/J(db/db)(杰克逊实验室)小鼠饲喂标准饮食且随意接受饮用水。在六周龄时,将小鼠随机分为对照组和处理组。处理组每两周一次以皮下注射接受3mg/kg的2t2,而对照组仅接受媒剂(PBS)。第一次药物注射之后的第四天,收集整夜空腹血液样品且与ACK溶解缓冲液(赛默飞世尔科技)一起在37℃下培育5分钟。然后将样品再悬浮于FACS缓冲液(1×PBS(Hyclone),其含有0.5%BSA(EMD密理博)和0.001%叠氮化钠(西格玛))中且用FITC-抗CD4和APC-抗CD25抗体(BioLegend)进行表面染色30分钟。将表面染色的样品进一步固定,并用Fix/Perm缓冲液(BioLegend)进行预金属化,并用PE-抗Foxp3抗体(BioLegend)进行细胞内染色。染色后,将细胞用FACs缓冲液洗涤两次,并通过流式细胞仪(Celesta-BD Bioscience)进行分析。测量血液淋巴细胞中的CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}Tregs百分比。如图157所示,结果表明2t2显著上调血液淋巴细胞中的Tregs比率(*p<0.05)。

[3848] 实例62.示例性单链嵌合多肽15t15的产生和表征

[3849] 产生了第二示例性单链嵌合多肽,其包括结合至IL-15受体的第一靶标结合域,人可溶性组织因子域和结合至IL-15受体的第二靶标结合域(IL-15/TF/IL-15;称为15t15)(图158)。这种单链嵌合多肽的核酸和氨基酸序列如下所示。

[3850] 编码示例性单链嵌合多肽(IL-15/TF/IL-15)的核酸(SEQ ID NO:170)

[3851] (信号肽)

[3852] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3853] (第一IL-15片段)

[3854] AACTGGGTGAACGTGATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAGGATTTAATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACTCTGTACACTGAGAGCGACGTGCACCCTAGCTGCAAGGTGACTGCCATGAAGTGCTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGCGATGCCAGCATCCACGACACTGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAACAACTCTTTAAGCAGCAACGGCAACGTGACAGAGAGCGGCTGCAAGGAGTGCGAGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTTTACAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTCATCAACACTAGC

[3855] (人组织因子219形式)

[3856] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC

GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3857] (第二IL-15片段)

[3858] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC
ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG
CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3859] 示例性单链嵌合多肽(IL-15/TF/IL-15)(SEQ ID NO:169)

[3860] (信号肽)

[3861] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3862] (人IL-15)

[3863] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3864] (人组织因子219)

[3865] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3866] (人IL-15)

[3867] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3868] 将编码IL-15/TF/IL-15的核酸克隆到经修饰的逆转录病毒表达载体中,如此前所述(Hughes等人,《人类基因疗法》16:457-72,2005)。将编码IL-15/TF/IL-15的表达载体转染到CHO-K1细胞中。表达载体在CHO-K1细胞中的表达允许分泌可溶性IL-15/TF/IL-15单链嵌合多肽(称为15t15),其可通过抗TF抗体亲和力和其它色谱方法纯化。

[3869] 15t15促进含有IL-2Rβ和共用γ链的32Dβ细胞增殖

[3870] 将15t15对IL-15的活性与重组IL-15在表达IL2Rβ和共用γ链的32Dβ细胞中进行比较。IL15依赖性32Dβ细胞用IMDM-10％FBS洗涤五次,并且以2×10^4个细胞/孔接种到孔中。将15t15或IL-15的连续稀释液添加到细胞中(图159)。在CO_2培养箱中在37℃下培育细胞3天。通过在第3天向每个孔中添加10μLWST1并在CO_2培养箱中在37℃下再培养3小时来检测细胞增殖。通过测量450nm吸光度来分析产生的甲臜染料的量。如图159所示,15t15促进32Dβ细胞增殖不如IL-15有效。15t15和IL-15的EC_{50}分别是161.4pM和1.6pM。

[3871] 抗TF抗体亲和柱纯化洗脱15t15的色谱

[3872] 从细胞培养物中收获的15t15被加载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。加载样品后,用5个柱体积的PBS洗柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸(pH 2.9)洗脱。收集A280洗脱峰,并且然后用1M Tris碱中和到pH 7.5-8.0。然后使用具有30KDa分子量截断值的Amicon离心过滤器,使中和的样品在PBS中缓冲交换。如图160所示,抗TF抗体亲和柱与含有TF作为融合伴侣的15t15结合。缓冲交换的蛋白质样品在2-8℃下存储,以用于进一步的生化分析和生物活性测试。每次洗脱后,使用6个柱体积的0.1M甘氨酸(pH2.5)剥离抗TF抗

体亲和柱。然后使用5个柱体积的PBS和7个柱体积的20％乙醇中和所述柱,以便存储。抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团AKTA Avant系统。所有步骤都是4mL/min的流速,但洗脱步骤除外,洗脱步骤是2mL/min。

[3873] 15t15的还原型SDS-PAGE

[3874] 为了测定蛋白质的纯度和分子量,在还原条件下通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(4-12％NuPage Bis-Tris凝胶)电泳(SDS-PAGE)方法分析用抗TF抗体亲和柱纯化的15t15蛋白样品。电泳后,将凝胶用InstantBlue染色约30分钟,接着在纯化水中脱色整夜。

[3875] 为了验证15t15蛋白在CHO细胞中翻译后经历糖基化,使用来自新英格兰生物实验室的蛋白质脱糖基化混合物II试剂盒和制造商说明书进行脱糖基化实验。图161A和161B显示样品在未脱糖基化(红色轮廓的泳道1)和脱糖基化(黄色轮廓的泳道2)状态下的还原型SDS-PAGE分析。结果显示,当在CHO细胞中表达时,15t15蛋白被糖基化。脱糖基化后,纯化的样品在还原SDS凝胶中以预期的分子量(50kDa)跑电泳。泳道M载有10μLSeeBlue Plus2预染标准液。

[3876] 实例63:NK细胞在试管内的刺激

[3877] 进行了一组实验,以评估NK细胞在经18t15-12s、18t15-12s16和7t15-21s+抗TF抗体刺激后的表面表型的变化。在这些实验中,从血库获得新鲜的人白细胞,并且用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)分离$CD56^+$NK细胞。NK细胞的纯度>90％,并且通过用CD56-BV421、CD16-BV510,CD25-PE和CD69-APCFire750抗体(BioLegend)染色来确认。对细胞进行计数并以0.2×10^6个/mL的浓度再悬浮于96孔平底板中的0.2mL完全培养基(RPMI 1640(吉毕科公司),补充有2mML-谷氨酰胺(赛默生命技术公司)、青霉素(赛默生命技术公司)、链霉素(赛默生命技术公司)和10％FBS(Hyclone))中。°在37℃和5％CO_2下,用以下物质刺激细胞16小时:18t15-12s(100nM);18t15-12s16(100nM);单一细胞因子rhIL15(50ng/mL)(美天旎(Miltenyi))、rhIL18(50ng/mL)(英伟杰)和rhIL-12(10ng/mL)(派普泰克(Peprotech))的混合物;7t15-21s+抗TF抗体(100nM-50nM);7t15-21s(100nM);或抗TF抗体(50nM)。次日,收获细胞,并用CD56、CD16、CD25、CD69、CD27、CD62L、NKp30和NKp44特异性抗体进行表面染色30分钟。表面染色后,在含0.5％BSA(EMD密理博)和0.001％叠氮化钠(西格玛)的FACS缓冲液(1×PBS(Hyclone))中洗涤细胞(室温下1500RPM 5分钟)。两次洗涤后,通过流式细胞术(Celesta-BDBioscience)分析细胞。图162A和162B表明,纯化NK细胞与18t15-12s、18t15-12s16和7t15-21s+抗TF抗体一起培育整夜使得表达CD25、CD69、NKp44和NKp30活化标志物的细胞的百分比增加且使表达CD62L的细胞的百分比降低。所有活化标志物数据来自以$CD56^+$设门的淋巴细胞。

[3878] 进行了一组实验,以评估淋巴细胞群体在经18t15-12s、18t15-12s16和7t15-21s刺激后的表面表型的变化。在这些实验中,从血库获得新鲜的人白细胞。用Ficoll-PAQUE Plus(通用电气医疗集团)密度梯度培养基分离外周血淋巴细胞。对细胞进行计数并以0.2×10^6个/mL的浓度再悬浮于平底96孔板中的0.2mL完全培养基(RPMI 1640(吉毕科公司),补充有2mM L-谷氨酰胺(赛默生命技术公司)、青霉素(赛默生命技术公司)、链霉素(赛默生命技术公司)和10％FBS(Hyclone))中。°在37℃和5％CO_2下,用以下物质刺激细胞16小时:18t15-12s(100nM);18t15-12s16(100nM);单一细胞因子rhIL15(50ng/mL)(美天旎)、rhIL18(50ng/mL)(英伟杰)和rhIL-12(10ng/mL)(派普泰克)的混合物;7t15-21s(100nM)+

抗TF抗体(50nM);7t15-21s(100nM);或抗TF抗体(50nM)。次日,收获细胞并用CD4或CD8、CD62L和CD69特异性抗体进行表面染色30分钟。表面染色后,在FACS缓冲液(含0.5%BSA(EMD密理博)和0.001%叠氮化钠(西格玛)的1×PBS(Hyclone)中洗涤细胞(室温下1500RPM5分钟)。两次洗涤后,通过流式细胞术(Celesta-BDBioscience)分析细胞。图163显示纯化的淋巴细胞群体(CD4和CD8 T细胞)与18t15-12s、18t15-12s16或7t15-21s+抗TF抗体一起整夜培育使得表达CD69的CD8和CD4 T细胞的百分比增加。另外,与7t15-21s+抗TF抗体一起培育使得表达CD62L的CD8和CD4 T细胞的百分比增加(图163)。

[3879] 进行了一组实验,以确定18t15-12s对从人血中纯化的NK细胞的细胞外酸化速率(ECAR)的影响。ECAR可用于测量糖酵解。糖酵解是一个分子的葡萄糖在细胞内生物化学转化为两个分子的丙酮酸酯,同时产生两个分子的ATP。通过Seahorse XF96分析仪测得的ECAR增加表示糖酵解增加。在这些实验中,从血库获得新鲜的人白细胞,并且用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)分离出$CD56^{+}$NK细胞。NK细胞的纯度>70%,并且通过用CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE和CD69-APCFire750抗体(BioLegend)染色得到证实。对细胞进行计数并以0.2×10^{6}个/mL的浓度再悬浮于平底96孔板中的0.2mL完全培养基(RPMI 1640(吉毕科公司),补充有2mM L-谷氨酰胺(赛默生命技术公司)、青霉素(赛默生命技术公司)、链霉素(赛默生命技术公司)和10%FBS(Hyclone))中。°细胞在37℃和5%CO_2下用单一细胞因子hIL-12(10ng/mL)(Biolegend)、hIL-18(50ng/mL)(R&D)和hIL-15(50ng/mL)(NCI)或18t15-12s(100nM)的混合物刺激14-18小时。次日,收获细胞并在Seahorse培养基中洗涤两次。将细胞(2×10^{5}个细胞/孔)接种于涂有10μL聚-L-赖氨酸(西格玛)的96孔通量板中。分析之前,使NK细胞粘附于板30分钟。在缓冲的Seahorse培养基中以10倍浓度制备葡萄糖、寡霉素和2DG溶液且注入校准板的端口A、B和C。ECAR读数每6.5-7分钟获取一次,且ECAR结果代表80分钟内的平均读数或每个时间点的平均读数。图164显示了18t15-12s整夜刺激NK细胞引起基础ECAR水平升高。葡萄糖和寡霉素的添加进一步分别显示了用18t15-12s刺激整夜的NK细胞的糖酵解和糖分解能力增强(图164)。单独培养基或IL12、IL18和IL-15混合物整夜处理的NK细胞用于比较(图164)。

[3880] 进行了一组实验以确定NK细胞在经18t15-12s刺激后的磷酸化STAT4和磷酸化STAT5水平升高。在这些实验中,从血库获得新鲜的人白细胞,并且用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)分离出$CD56^{+}$NK细胞。NK细胞的纯度>70%,并且通过用CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE和CD69-APCFire750特异性抗体(BioLegend)染色得到证实。对细胞进行计数并以0.05×10^{6}个/mL的浓度再悬浮于96孔平底板中0.1mL完全培养基(RPMI 1640(吉毕科公司),补充有2mM L-谷氨酰胺(赛默生命技术公司)、青霉素(赛默生命技术公司)、链霉素(赛默生命技术公司)和10%FBS(Hyclone))中。°在37℃和5%CO_2下,用hIL-12(10ng/mL)(Biolegend)或hIL-15(50ng/mL)(NCI)(单一细胞因子)或18t15-12s(100nM)刺激细胞90分钟。未刺激的NK细胞(US)用作对照。收获细胞并在多聚甲醛(西格玛)中固定到1.6%的最终浓度。将板在黑暗中在室温下培育10分钟。添加FACS缓冲液(1×PBS(Hyclone),含0.5%BSA(EMD密理博)和0.001%叠氮化钠(西格玛))(100μL),并且将细胞转移到"V"底96孔板。在室温下以1500RPM洗涤细胞5分钟。通过轻轻上下移吸,将细胞集结粒与100μL冷却甲醇混合,并且在4℃下培育细胞30分钟。将细胞与100mLFACS缓冲液混合,并且在室温下以1500RPM洗涤5分钟。将细胞集结粒与50mL含4mLpSTAT4(BDBioscience)和

pSTAT5抗体(BDBioscience)的FACS缓冲液混合,接着在黑暗中在室温下培育30分钟。将细胞与100mL FACS缓冲液混合,并且在室温下以1500RPM洗涤5分钟。将细胞集结粒与50mL FACS缓冲液混合,并且通过流式细胞术(Celesta-BD Bioscience)分析细胞。图165显示NK细胞与18t15-12s一起培育诱导pSTAT4和pSTAT5增加(绘制数据,归一化的倍数变化)。

[3881] 进行了一组实验,以确定18t15-12s或细胞因子混合物(例如IL12、IL18和IL-15)对从人血中纯化的NK细胞的耗氧速率(OCR)和细胞外酸化速率(ECAR)的影响。通过Seahorse XF96分析仪测量OCR和ECAR。在这些实验中,使用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司),经由负向选择从人白细胞中分离出新鲜的人NK细胞。刚纯化的NK细胞用18t15-12s(100nM)或rhIL12(10ng/mL)、rhIL18(50ng/mL)和rhIL-15(50ng/mL)细胞因子的混合物刺激整夜(16小时)作为对照。次日,洗涤细胞,计数,并将相等数量的细胞接种于缓冲的Seahorse培养基中。在缓冲的Seahorse培养基中以10倍浓度制备葡萄糖、寡霉素和2DG溶液,并注入校准板的端口A、B和C中。图166显示了来自两位个别供体的OCR(左)和ECAR(右)数据。18t15-12s整夜刺激NK细胞使得基础ECAR和OCR水平升高。葡萄糖和寡霉素的添加进一步显示用18t15-12s刺激整夜的NK细胞的糖酵解和糖分解能力分别增强。用单独培养基或IL12、IL18和IL-15的混合物处理整夜的NK细胞用于比较。

[3882] 实例64:2t2和/或TGFRt15-TGFRs在体内刺激NK细胞

[3883] 进行了一组实验,以确定2t2构建体在C57BL/6小鼠中进行免疫刺激的作用。在这些实验中,用0.1、0.4、2和10mg/kg的对照溶液(PBS)或2t2皮下处理C57BL/6小鼠。使经过处理的小鼠在处理后第3天安乐死。测量脾脏重量并制备单一脾细胞悬浮液。脾细胞悬浮液用偶联的抗CD4、抗CD8和抗NK1.1(NK)抗体染色。通过流式细胞术分析$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞和NK细胞的百分比以及淋巴细胞亚群对CD25的表达。图167A表明,基于脾脏重量,2t2尤其在0.1-10mg/kg的剂量水平下有效扩增脾细胞。处理之后,在2和10mg/kg下,2t2处理的小鼠中的$CD8^+$T细胞百分比高于对照物处理的小鼠(图167B)。在2t2的所有测试剂量下,经2t2处理的小鼠中的NK细胞百分比也高于对照物处理的小鼠(图167B)。另外,以0.4到10mg/kg处理之后,2t2使$CD4^+$T细胞对CD25的表达显著上调,但$CD8^+$T细胞和NK细胞则不然(图167C)。

[3884] 进行了一组实验,以确定TGFRt15-TGFRs构建体在C57BL/6小鼠中进行免疫刺激的作用。在这些实验中,用0.3、1、3和10mg/kg对照溶液(PBS)或TGFRt15-TGFRs皮下处理C57BL/6小鼠。经过处理的小鼠在处理后第4天安乐死。测量脾脏重量并制备单一脾细胞悬浮液。将脾细胞悬浮液用偶联的抗CD4、抗CD8和抗NK1.1(NK)抗体染色。通过流式细胞术分析$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞和NK细胞百分比。图168A显示用TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏重量随TGFRt15-TGFRs剂量的增加而增加。此外,用1mg/kg、3mg/kg和10mg/kg TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏重量高于对照溶液处理的小鼠。图168B表明$CD8^+$T细胞和NK细胞的百分比均随TGFRt15-TGFRs剂量的增加而增加。具体来说,与对照物处理的小鼠相比,用0.3mg/kg、3mg/kg和10mg/kgTGFRt15-TGFRs处理的小鼠中$CD8^+$T细胞的百分比更高,并且与对照物处理的小鼠相比,用0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg和10mg/kgTGFRt15-TGFRs处理的小鼠中NK细胞的百分比更高。

[3885] 进行一组实验,以确定TGFRt15-TGFRs构建体或2t2构建体在饲喂西方饮食的$ApoE^{-/-}$小鼠中进行免疫刺激的作用。在这些实验中,给6周龄雌性B6.129P2-$ApoE^{tm1Unc}$/J小鼠(杰克逊实验室)饲喂含有21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖,19.5%酪蛋白和15%淀

粉的西方饮食(TD88137,Envigo Laboratories)。西方饮食8周后,将3mg/kg的TGFRt15-TGFRs或2t2皮下注入小鼠。处理后三天,将小鼠禁食16小时,并且然后通过眼眶后静脉丛穿刺收集血样。将血液与10μL0.5 M EDTA混合,并且抽取20μL血液用于淋巴细胞亚群分析。用ACK(0.15M NH_4Cl,1.0mM $KHCO_3$,0.1mM Na_2EDTA,pH 7.4)溶解红血细胞,并且在4℃下在FACS染色缓冲液(PBS中1%BSA)中用抗小鼠CD8a和抗小鼠NK1.1抗体将淋巴细胞染色30分钟。洗涤细胞一次并用BD FACS Celesta分析。对于Treg染色,在4℃下在FACS染色缓冲液中,用抗小鼠CD4和抗小鼠CD25抗体将ACK处理的血液淋巴细胞染色30分钟。洗涤细胞一次并再悬浮于固定/通透性工作溶液中,并且在室温下培育60分钟。洗涤细胞一次并再悬浮于通透缓冲液中。在室温下以300-400×g将样品离心5分钟,并且然后弃去上清液。将细胞集结粒再悬浮于残余体积中,并且用1×通透缓冲液将体积调节到约100μL。将抗Foxp3抗体添加到细胞中,并且在室温下培育细胞30分钟。将通透缓冲液(200μL)添加到细胞中,并且将细胞在室温下以300-400×g离心5分钟。将细胞再悬浮于流式细胞术染色缓冲液中,并且在流式细胞仪上进行分析。图169B-169C表明,TGFRt15-TGFRs处理使得饲喂西方饮食的$ApoE^{-/-}$小鼠中的NK细胞和$CD8^+$T细胞百分比增加。图169A表明2t2处理也增加了Treg细胞的百分比。

[3886] 实例65:体内诱导免疫细胞增殖

[3887] 进行一组实验以确定2t2构建体在C57BL/6小鼠中刺激免疫细胞的作用。在这些实验中,用0.1、0.4、2和10mg/kg的对照溶液(PBS)或2t2皮下处理C57BL/6小鼠。使经过处理的小鼠在处理后3天安乐死。测量脾脏重量并制备单一脾细胞悬浮液。脾细胞悬浮液用偶联的抗CD4、抗CD8和抗NK1.1(NK)抗体染色。通过流式细胞术分析$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞和NK细胞的百分比。图170A表明,基于脾脏重量,2t2处理尤其在0.1-10mg/kg时有效扩增脾细胞。在2和10mg/kg时,$CD8^+$T细胞百分比高于对照物处理的小鼠(图170B)。另外,在2t2的所有测试剂量下,NK细胞的百分比高于对照物处理的小鼠(图170B)。这些结果表明,2t2处理能够诱导C57BL/6小鼠中的$CD8^+$T细胞和NK细胞增殖。

[3888] 进行了一组实验,以确定TGFRt15-TGFRs构建体在C57BL/6小鼠中进行免疫刺激的作用。在这些实验中,用0.1、0.3、1、3和10mg/kg的对照溶液(PBS)或TGFRt15-TGFRs皮下处理C57BL/6小鼠。使经过处理的小鼠在处理后第4天安乐死。测量脾脏重量并制备脾细胞悬浮液。将脾细胞悬浮液用偶联的抗CD4、抗CD8和抗NK1.1(NK)抗体染色。另外针对增殖标志物Ki67对细胞进行染色。图171A显示用TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏重量随TGFRt15-TGFRs剂量的增加而增加。另外,与仅用对照溶液处理的小鼠相比,用1mg/kg、3mg/kg和10mg/kgTGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏重量更高。$CD8^+$T细胞和NK细胞的百分比均随TGFRt15-TGFRs剂量的增加而增加(图171B)。最后,在TGFRt15-TGFRs的所有测试剂量下,TGFRt15-TGFRs使得$CD8^+$T细胞和NK细胞中的细胞增殖标志物Ki67的表达显著上调。这些结果证明,TGFRt15-TGFRs处理诱导C57BL/6小鼠中的$CD8^+$T细胞和NK细胞增殖。

[3889] 进行一组实验,以确定TGFRt15-TGFRs构建体或2t2构建体在饲喂西方饮食的$ApoE^{-/-}$小鼠中进行免疫刺激的作用。在这些实验中,给6周龄雌性B6.129P2-$ApoE^{tm1Unc}$/J小鼠(杰克逊实验室)饲喂含有21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖,19.5%酪蛋白和15%淀粉的西方饮食(TD88137,Envigo Laboratories)。西方饮食8周后,将3mg/kg的TGFRt15-TGFRs皮下注射到小鼠中。处理后三天,将小鼠禁食16小时,并且然后通过眼眶后静脉丛穿

刺收集血样。将血液与10μL 0.5M EDTA混合,并且抽取20μL血液用于淋巴细胞亚群分析。用ACK(0.15M NH_4Cl,1.0mM $KHCO_3$,0.1mM Na_2EDTA,pH 7.4)溶解红血细胞,并且在4℃下在FACS染色缓冲液(PBS中1%BSA)中用抗小鼠CD8a和抗小鼠NK1.1抗体将淋巴细胞染色30分钟。洗涤细胞一次并在室温下再悬浮于固定缓冲液(BioLegend目录号420801)中20分钟。将细胞以350×g离心5分钟,将固定的细胞再悬浮于细胞内染色通透洗涤缓冲液(BioLegend目录号421002)中,并且然后以350×g离心5分钟。然后在室温下将细胞用抗Ki67抗体染色20分钟。用细胞内染色通透洗涤缓冲液洗涤细胞两次,并且以350×g离心5分钟。然后将细胞再悬浮于FACS染色缓冲液中。用BDFACSCelesta分析淋巴细胞亚群。如图172A中所述,用TGFRt15-TGFRs处理$ApoE^{-/-}$小鼠诱导NK和$CD8^+$T细胞增殖(Ki67阳性染色)。另外,图172B表明,2t2处理$ApoE^{-/-}$小鼠还诱导了NK和$CD8^+$T细胞增殖(Ki67阳性染色)。

[3890] 进行一组实验,以便在7t15-21s、TGFRt15-TGFRs和2t2处理之后,确定7t15-21s+抗TF抗体使NSG小鼠中的NK细胞扩增的作用。在这些实验中,从血库获得新鲜的人白细胞,并且用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)分离出$CD56^+$NK细胞。NK细胞的纯度>90%,并且通过用CD56-BV421、CD16-BV510,CD25-PE和CD69-APCFire750抗体(BioLegend)染色来确认。对细胞进行计数并且以2×10^6个/mL再悬浮于平底24孔板中的2mL完全培养基(RPMI 1640(吉毕科公司),补充有2mML-谷氨酰胺(赛默生命技术公司)、青霉素(赛默生命技术公司)、链霉素(赛默生命技术公司)和10%FBS(Hyclone))中。用7t15-21s(100nM)和抗TF抗体(50nM)刺激细胞15天。每两天后,以2x 10^6/mL的浓度将细胞再悬浮于含有100nM 7t15-21s和50nM抗TF抗体的新鲜培养基中。随着培养物体积的增加,将细胞转移至更高体积的烧瓶中。使用锥虫蓝对细胞进行计数以获知扩增倍数。7t15-21s+抗TF抗体扩增的NK细胞在温热的HBSS缓冲液(Hyclone)中、在室温下以1000RPM洗涤三次,历时10分钟。将7t15-21s+抗TF抗体扩增的NK细胞再悬浮于10×10^6/0.2mL HBSS缓冲液中且静脉内注射到NSG小鼠(NOD锡特(NOD scid)γ小鼠)的尾静脉中(杰克逊实验室)。转移的NK细胞每48小时用7t15-21s(10ng/剂量,i.p.)、TGFRt15-TGFRs(10ng/剂量,i.p.)或2t2(10ng/剂量,i.p.)支持,长达21天。每周通过流式细胞术(Celesta-BD Bioscience)测量血液中的经人7t15-21s+抗TF抗体扩增的NK细胞的移植和持久性,所述NK细胞针对hCD45、mCD45、hCD56、hCD3和hCD16抗体染色(数据代表每组3只小鼠)。图173表明,相较于对照物处理的小鼠,用7t15-21s、TGFRt15-TGFRs或2t2处理带有授受性转移7t15-21s+抗TF抗体扩增的NK细胞的小鼠诱导了授受性转移的NK细胞扩增和持久存在。

[3891] 实例66:用单链构建体或多链构建体处理之后,NK介导了细胞毒性

[3892] 进行一组实验以确定用TGFRt15-TGFRs处理NK细胞是否增强NK细胞的细胞毒性。在这些实验中,将人道迪(Daudi)B淋巴瘤细胞用CellTrace紫(CTV)标记,并且用作肿瘤靶细胞。3mg/kg的TGFRt15-TGFRs皮下处理后第4天,对C57BL/6雌性小鼠脾脏使用磁性细胞分选方法(美天旎生物技术(MiltenyiBiotec)),通过NK1.1正向选择分离出小鼠NK效应细胞。用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)从衍生自人血白细胞层的外周血单核细胞中分离出人NK效应细胞。将靶细胞(人道迪B淋巴瘤细胞)与效应细胞(小鼠NK效应细胞或人NK效应细胞)在存在50nM TGFRt15-TGFRs或不存在TGFRt15-TGFRs(对照)的情况下混合,并且在37℃下对于小鼠NK细胞培育44小时,且对于人NK细胞培育20小时。通过使用流式细胞术分析碘化丙啶阳性、CTV标记的细胞来评估靶细胞(道迪)存活率。使用公式(1-实验

样品中活肿瘤细胞数/不含NK细胞的样品中的活肿瘤细胞数)×100计算道迪细胞抑制百分比。图174表明,相比于不存在TGFRt15-TGFRs活化的情况,用TGFRt15-TGFRs活化NK细胞后,小鼠(图174A)和人(图174B)NK细胞对道迪B细胞具有显著更强的细胞毒性。

[3893] 进行一组实验以确定用TGFRt15-TGFRs处理后的小鼠和人NK细胞的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。在这些实验中,将人道迪B淋巴瘤细胞用CellTrace紫色(CTV)标记,并且用作肿瘤靶细胞。3mg/kg的TGFRt15-TGFRs皮下处理后4天,对C57BL/6雌性小鼠脾脏使用磁性细胞分选方法(美天旎生物技术),用NK1.1阳性选择分离小鼠NK效应细胞。用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)从衍生自人血白细胞层的外周血单核细胞中分离人NK效应细胞。将靶细胞(道迪B细胞)与效应细胞(小鼠NK效应细胞或人NK效应细胞)在存在抗CD20抗体(10nM利妥昔单抗(Rituximab),基因泰克(Genentech))并且存在50nM TGFRt15-TGFRs或不存在TGFRt15-TGFRs(对照)的情况下混合,并且在37℃下对于小鼠NK细胞培育44小时,且对于人NK细胞培育20小时。道迪B细胞表达抗CD20抗体的CD20靶标。培育后通过使用流式细胞术分析碘化丙啶阳性、CTV标记的靶细胞来评估靶细胞活力。使用公式(1-实验样品中活肿瘤细胞数/不含NK细胞的样品中的活肿瘤细胞数)×100计算道迪抑制的百分比。图175表明,相比于不存在TGFRt15-TGFRs活化的情况,用TGFRt15-TGFRs活化NK细胞后,小鼠NK细胞(图175A)和人NK细胞(图175B)对道迪B细胞具有更强的ADCC活性。

[3894] 进行了一组实验,以确定TGFRt15-TGFRs活化的小鼠NK细胞对衰老的B16F10黑色素瘤细胞的细胞毒性。在这些实验中,通过将10mg/kg的TGFRt15-TGFRs注射到C57BL/6小鼠维持4天来体内活化小鼠NK细胞,随后分离出脾脏NK细胞。然后在100nM2t2存在下、在试管内扩增NK细胞7天。衰老的B16F10靶细胞(B16F10-SNC)用CellTrace紫(CTV)标记且与活化的小鼠NK效应细胞以不同的效应子:靶标(E:T)比率培育16小时。细胞用胰蛋白酶消化,洗涤并再悬浮于含有碘化丙啶(PI)溶液的完全培养基中。通过流式细胞术,基于经CTV标记的细胞的PI染色来获知TGFRt15-TGFRs/2t2活化NK细胞针对衰老细胞的细胞毒性。这些发现表明,体内用TGFRt15-TGFRs活化NK细胞,然后在试管内扩增并用2t2活化,使得NK细胞对衰老的黑色素瘤肿瘤细胞的杀伤作用增加(图176)。

[3895] 实例67:癌症、糖尿病和动脉粥样硬化的治疗

[3896] 进行一组实验,以评估TGFRt15-TGFRs加抗TRP1抗体(TA99)与化学疗法组合在黑色素瘤小鼠模型中的抗肿瘤活性。在这些实验中,将0.5×10^6个B16F10黑色素瘤细胞皮下注射到C57BL/6小鼠中。在第1天、第4天和第7天用三次剂量的多烯紫杉醇(10mg/kg)(DTX)处理小鼠,接着在第9天用单次剂量的组合免疫疗法TGFRt15-TGFRs(3mg/kg)+抗-TRP1抗体TA99(200μg)处理小鼠。图177A显示处理方案的示意图。通过卡尺测量监测肿瘤生长,并且使用公式$V=(L\times W^2)/2$来计算肿瘤体积,其中L是最大肿瘤直径,并且W是垂直肿瘤直径。图177B显示与盐水对照和DTX处理组相比,DTX+TGFRt15-TGFRs+TA99显著减少肿瘤生长(N=10,****$p<0.001$,多重t检验分析)。

[3897] 为了评估B16F10肿瘤模型中的免疫细胞亚群,进行外周血分析。在这些实验中,将C57BL/6小鼠用B16F10细胞注射,并且用DTX、DTX+TGFRt15-TGFRs+TA99或盐水处理。对于DTX+TGFRt15-TGFRs+TA99组免疫疗法后第2、5、8天,并且对于DTX和盐水组肿瘤注射后第11天,从荷B16F10瘤小鼠的下颌下静脉采血。在ACK溶解缓冲液中溶解RBC,并且将淋巴细胞洗涤并用抗NK1.1、抗CD8和抗CD4抗体染色。通过流式细胞术(Celesta-BDBioscience)分析细

胞。图177C-177E显示与生理盐水和DTX处理组相比,DTX+TGFRt15-TGFRs+TA99处理诱导肿瘤中的NK细胞和$CD8^+$T细胞百分比增加。

[3898] 在第17天,使用Trizol从生理盐水、DTX或DTX+TGFRt15-TGFRs+TA99处理的小鼠的肿瘤中提取总RNA。使用QuantiTect逆转录试剂盒(凯杰(Qiagen))将总RNA(1μg)用于cDNA合成。使用FAM标记的衰老细胞标记(F)p21(G)DPP4和(H)IL6预先设计的引物,用CFX96检测系统(伯乐(Bio-Rad))进行实时PCR。管家基因18S核糖体RNA用作内部对照,以将表达水平的变异性归一化。相对于18S rRNA,每个靶标mRNA的表达基于Ct、按照$2^{-\Delta(\Delta Ct)}$计算,其中$\Delta Ct = Ct_{靶标} - Ct_{18S}$。数据呈现为相比于盐水对照的变化倍数。图177F-177H显示DTX处理诱导衰老肿瘤细胞增加,所述细胞随后在用TGFRt15-TGFRs+TA99免疫疗法处理后减少。

[3899] 进行一组实验以研究通过TGFRt15-TGFRs改善$ApoE^{-/-}$小鼠中西方饮食诱导的高血糖症。在这些实验中,给6周龄雌性B6.129P2-$ApoE^{tm1Unc}$/J小鼠(杰克逊实验室)饲喂含有21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖,19.5%酪蛋白和15%淀粉的西方饮食(TD88137,Envigo Laboratories)。西方饮食8周后,将3mg/kg的TGFRt15-TGFRs或2t2皮下注射到小鼠中。处理后三天,将小鼠禁食16小时,并且然后通过眼眶后静脉丛穿刺收集血样。用血糖仪(OneTouch UltraMini)和GenUltimated测试条,使用一滴新鲜血液检测血糖。如图178A所示,TGFRt15-TGFRs处理显著减轻西方饮食诱导的高血糖症($p<0.04$)。用EveTechnologies的小鼠大鼠代谢阵列(Mouse Rat MetabolicArray)分析血浆胰岛素和抵抗素水平。使用以下公式计算HOMA-IR:稳态模型评估-胰岛素抵抗=血糖(mg/dL)*胰岛素(mU/mL)/405。如图178B所示,与未处理组相比,2t2与TGFRt15-TGFRs处理均降低胰岛素抵抗。如图178C所示,与未处理组相比,2t2($p<0.02$)与TGFRt15-TGFRs($p<0.05$)均显著降低抵抗素水平,这可能与2t2和TGFRt15-TGFRs诱导的胰岛素抵抗降低相关(图3B)。

[3900] 实例68:诱导NK细胞分化成细胞因子诱导的记忆样NK细胞

[3901] 进行一组实验,以评估用18t15-12s刺激后NK细胞分化成细胞因子诱导的记忆样NK细胞(CIMK-NK细胞)。在这些实验中,从血库获得新鲜的人白细胞,并且用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)分离出$CD56^+$NK细胞。NK细胞的纯度>90%,并且通过用CD56-BV421、CD16-BV510,CD25-PE和CD69-APCFire750抗体(BioLegend)染色来确认。对细胞进行计数并且以2×10^6个/mL再悬浮于平底24孔板中的2mL完全培养基(RPMI 1640(吉毕科公司),补充有2mML-谷氨酰胺(赛默生命技术公司)、青霉素(赛默生命技术公司)、链霉素(赛默生命技术公司)和10%FBS(Hyclone))中。对细胞不刺激("无添加")或用18t15-12s(100nM)或包括rhIL15(50ng/mL)(美天旎)、rhIL18(50ng/mL)(英伟杰)和rhIL-12(10ng/mL)(派普泰克)的单一细胞因子混合物("单一细胞因子")在37℃和5%CO_2下刺激16小时。次日,收获细胞,并且在室温下用温热完全培养基以1000RPM洗涤两次持续10分钟。将细胞以2×10^6个/mL再悬浮于平底24孔板中的2mL含rhIL-15(1ng/mL)的完全培养基中。每2天后,将一半培养基替换为含有rhIL-15的新鲜完全培养基。

[3902] 为了评估第7天NK细胞记忆表型的变化,将细胞用针对细胞表面CD56、CD16、CD27、CD62L、NKp30和NKp44的抗体染色(BioLegend)。表面染色后,将细胞在含0.5%BSA(EMD密理博)和0.001%叠氮化钠(西格玛)的FACS缓冲液(1×PBS(Hyclone))中洗涤(室温下1500RPM 5分钟)。两次洗涤后,通过流式细胞术(Celesta-BDBioscience)分析细胞。图179显示将NK细胞与18t15-12s一起培育使得表达CD27、CD62L和NKp44的$CD16^+CD56^+$NK细胞百分比增加,

以及$CD16^{+}CD56^{+}$NK细胞中的NKp30水平(MFI)提高。

[3903] 实例69.CD44记忆T细胞的上调

[3904] 用7t15-TGFRs或2t2皮下处理C57BL/6小鼠。处理之后的第4天(TGFRt15-TGFRs)或第3天(2t2),使经过处理的小鼠安乐死并且制备单一脾细胞悬浮液。将制备的脾细胞用荧光染料偶联的抗CD4、抗CD8和抗CD44抗体染色,并且通过流式细胞术分析$CD4^{+}$T细胞或$CD8^{+}$T细胞中$CD44^{高}$T细胞的百分比。结果显示,TGFRt15-TGFRs和2t2上调记忆标志物CD44在CD4+和CD8+T细胞上的表达(图180)。这些发现表明TGFRt15-TGFRs和2t2能够诱导小鼠T细胞分化成记忆T细胞。

[3905] 实例70:改善质地和/或外观和/或头发

[3906] 为了检查2t2对毛发再生的影响,首先用剪刀将C57BL6/J小鼠(杰克逊实验室)的背部毛发剪短,然后将脱毛膏(Nair)涂在剃毛区域维持30秒钟,然后擦净。4小时后,皮下施用2t2(3mg/kg,单次剂量),低剂量重组IL-2(25000IU,连续5天,1次剂量/天)或PBS。监测小鼠与毛发再生有关的皮肤色素沉着,并且拍摄照片且使用Image J软件分析。图181A显示了在用PBS、2t2或IL-2处理的小鼠脱毛后10天的皮肤色素沉着。图181B显示每组小鼠在处理后第10天的色素沉着百分比,如使用Image J软件所分析。结果表明,与PBS处理的小鼠相比,用2t2或IL-2处理小鼠在脱毛后可促进毛发再生。

[3907] 首先用剪刀将C57BL6/J小鼠(杰克逊实验室)的背部毛发剪短,然后再将脱毛膏(Nair)涂到刮毛区域刚好约30秒,然后擦净。4小时后,皮下施用2t2(3mg/kg,单次剂量)、低剂量重组IL-2(25000IU,连续5天,1次剂量/天)或PBS。监测小鼠的与毛发再生有关的皮肤色素沉着,并拍照且使用Image J软件分析。图182显示了在用PBS、2t2或IL-2处理的小鼠脱毛后第14天的皮肤色素沉着。结果表明,与PBS处理的小鼠相比,用2t2或IL-2处理小鼠在脱毛后促进毛发再生。

[3908] 实例71:用单链或多链嵌合多肽处理后的组织因子凝血分析

[3909] 进行一组实验,以便在单链或多链嵌合多肽处理后,评估血液凝结。为了引发凝血级联路径,组织因子(TF)与因子VIIa(FVIIa)结合以形成TF/FVIIa复合物。然后,TF/FVIIa复合物结合因子X(FX),并且将FX转化为FXa。

[3910] 因子VIIa(FVIIa)活性分析

[3911] 一种测量凝血的分析涉及测量因子VIIa(FVIIa)活性。这类分析需要组织因子和钙的存在。TF/FVIIa复合物活性可通过小的底物或天然蛋白质底物,例如因子X(FX)进行测量。当FX用作底物时,磷脂也是TF/FVIIa活性所需的。在这一分析中,用FVIIa特异性发色底物S-2288(Diapharma,俄亥俄州西切斯特(WestChester,OH))确定FVIIa活性。S-2288底物的颜色变化可通过分光光度法测量,并且与FVIIa(例如,TF/FVIIa复合物)的蛋白水解活性成比例。

[3912] 在这些实验中,比较以下组的FVIIa活性:组织因子域的219个氨基酸的胞外域(TF_{219})、具有野生型组织因子域的多链嵌合多肽和具有突变组织因子域的多链嵌合多肽。含有突变组织因子分子的嵌合多肽用以下氨基酸位点处对TF结构域的突变构建:Lys20、Ile22、Asp58、Arg135和Phe140。

[3913] 为了评估FVIIa的活性,将FVIIa和TF_{219}或含TF_{219}的多链嵌合多肽以等摩尔浓度(10nM)以70μL总体积在96孔ELISA板的所有孔中混合。在37℃下培育10分钟后,添加10μL

8mM S-2288底物以开始反应。然后在37℃下保持培育20分钟。最后,通过读取405nm吸光度来监测颜色变化。表1和表2中显示不同TF/VIIa复合物的OD值。表1显示TF_{219}、21t15-21s野生型(WT)和21t15-21s突变体(Mut)的比较。表2显示TF_{219}、21t15-TGFRs野生型(WT)和21t15-TGFRs突变体(Mut)的比较。这些数据显示,在发色S-2288用作底物时,含TF_{219}的多链嵌合多肽(例如21t15-21s-WT、21t15-21s-Mut、21t15-TGFRS-WT和21t15-TGFRS-Mut)的FVIIa活性比TF_{219}低。值得注意的是,与含有野生型TF_{219}的多链嵌合多肽相比,含有TF_{219}突变的多链嵌合多肽显示低得多的FVIIa活性。

[3914] 表1.FVIIa活性

[3915]

分子	405nmOD值
TF_{219}	0.307
21t15/21S-WT	0.136
21t15/21S-Mut	0.095

[3916] WT:野生型TF_{219},Mut:含有突变的TF_{219}。

[3917] 表2.FVIIa活性

[3918]

分子	405nmOD值
TF_{219}	0.345
21t15/TGFRS-WT	0.227
21t15/TGFRS-Mut	0.100

[3919] WT:野生型TF_{219},Mut:含有突变的TF_{219}。

[3920] 因子X(FX)活化分析

[3921] 测量凝血的另一分析涉及测量因子X(FX)的活化。简单来说,在钙和磷脂的存在下,TF/VIIa将凝血因子X(FX)活化为因子Xa(FXa)。与不含跨膜域的TF_{219}相比,含有TF的跨膜域的TF_{243}将FX活化为FXa的活性更高。通过使用FXa特异性发色底物S-2765(Diapharma,俄亥俄州西切斯特)测量FXa活性来确定TF/VIIa依赖性的FX活化。S-2765的颜色变化可通过分光光度法进行监测,并且与FXa的蛋白水解活性成比例。

[3922] 在这些实验中,将多链嵌合多肽(18t15-12s、小鼠(m)21t15、21t15-TGFRs和21t15-7s)的FX活化与阳性对照(因诺维)或TF_{219}进行比较。将TF_{219}(或含TF_{219}的多链嵌合多肽)/FVIIa复合物以等摩尔浓度(每个0.1nM)在96孔ELISA板的圆底孔中以50μL的体积混合,之后添加10μL 180nM FX。在37℃下培育15分钟(在此期间FX转化为Fxa)后,向每个孔中添加8μL0.5 M EDTA(其螯合钙,并且从而终止由TF/VIIa进行FX活化)以停止FX活化。接下来,将10μL3.2mM S-2765底物添加反应混合物中。紧接着,测量405nm板吸光度,并且记录为0时的吸光度。然后将板在37℃下培育10-20分钟。通过培育后读取405nm吸光度来监测颜色变化。使用发色底物S-2765通过FXa活性测量的FX活化结果如图183所示。在这一实验中,使用含有脂化重组人TF_{243}的商业凝血酶原试剂因诺维作为FX活化的阳性对照。用纯化水将因诺维重构到约10nM TF_{243}。接下来,通过将等体积的0.2nM FVIIa与0.2nM因诺维混合来制造0.1nM TF/VIIa复合物。因诺维展现非常强效的FX活化活性,而TF_{219}和含TF_{219}的多链嵌合多肽具有非常低的FX活化活性,从而证实TF_{219}在TF/FVIIa复合物中对于体内活化天然底物FX不具有活性。

[3923] 凝血酶原时间测试

[3924] 测量凝血的第三种分析是凝血酶原时间(PT)测试,其测量凝血活性。此处,PT测试使用市售正常人血浆(Ci-Trol凝血对照,I级)进行。对于标准PT测试,在钙的存在下,通过添加脂化重组人TF_{243}因诺维来引发凝血反应。由STart PT分析仪(Diagnostics Stago,新泽西州帕西帕尼(Parsippany,NJ))监测并报告凝血时间。通过将0.2mL在PT分析缓冲液(50mM Tris-HCl,pH 7.5,14.6mM $CaCl_2$,0.1%BSA)中稀释的因诺维的各种稀释液注入含有0.1mL在37℃下预温热的正常人血浆的比色皿中,开始PT分析。在PT分析中,较短的PT时间(凝血时间)指示较高的TF依赖性凝血活性,而较长的PT(凝血时间)指示较低的TF依赖性凝血活性。

[3925] 如图184所示,将不同量的因诺维(例如,用纯化水重构,等效于10nM脂化重组人TF_{243}的因诺维视为100%因诺维)添加到PT分析中展现剂量反应关系,其中较低浓度的TF_{243}引起较长的PT时间(较低的凝血活性)。例如,0.001%的因诺维的PT时间大于110秒,这几乎与单独的缓冲液相同。

[3926] 在另一实验中,对TF_{219}和多链嵌合多肽进行PT测试,所述多肽包括:18t15-12s、7t15-21s、21t15-TGFRs-WT和21t15-TGFRs-Mut。图185显示TF_{219}和含TF_{219}的多链嵌合多肽(浓度为100nM)具有延长的PT时间,表明凝血活性极低或无凝血活性。

[3927] 还进行研究以评估在存在携带多链嵌合多肽(32Dβ或人PBMC)的细胞因子组分的受体的其它细胞存在下,培育多链嵌合多肽是否会影响PT分析中的凝血时间。为了检查表达IL-15受体的细胞(32Dβ细胞)或表达IL-15和IL-21受体的细胞(PBMC)是否会结合含IL-15的多链嵌合多肽以模拟天然TF作为细胞FVIIa受体,将含TF_{219}的多链嵌合多肽(对于每个分子,在100nM浓度下)在PT分析缓冲液中稀释并与32Dβ细胞(在2×10^5个细胞/mL下)或PBMC(在1×10^5个细胞/mL下)在室温下一起预培育20-30分钟。然后如上所述进行PT分析。图186和187显示以100nM最终浓度与32Dβ细胞(图186)或PBMC(图187)混合的TF_{219}和含TF_{219}的多链嵌合多肽的PT时间延长,与0.001-0.01%因诺维相似(等效于0.1pM至1.0pM TF_{243})。以相对的TF_{243}活性百分比表示,含TF_{219}的多链嵌合多肽与因诺维相比,TF依赖性凝血活性低100,000至1,000,000倍。这证明即使在分子结合到完整的细胞膜表面,如32Dβ或PBMC时,含TF_{219}的多链嵌合多肽也具有极低或不具有TF依赖性凝血活性。

[3928] 实例72:7t15-21s137L(长版)的表征

[3929] 7t15构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:210):

[3930] (信号肽)

[3931] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3932] (人IL7)

[3933] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCCTGTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCAT

[3934] (人组织因子219)

[3935] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTC GAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATG TTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGG TGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTT ACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGAC AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAA TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[3936] (人IL-15)

[3937] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTCATCAATACCTCC

[3938] 7t15融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:209):

[3939] (信号肽)

[3940] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3941] (人IL7)

[3942] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKM NSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKIL MGTKEH

[3943] (人组织因子219)

[3944] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[3945] (人IL-15)

[3946] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[3947] 21s137L构建体(包括信号肽序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:331):

[3948] (信号肽)

[3949] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

[3950] (人IL-21)

[3951] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTAC GTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTG CTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGA AGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAG AAGAAGCCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAG GACCCACGGCTCCGAGGACTCC

[3952] (人IL-15Rα寿司域)

[3953] ATTACATGCCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGC CGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAA GGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[3954] ((G4S)3接头)

[3955] GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCT

[3956] (人CD137L)

[3957] CGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCG CAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTC CCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCT TTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTG CGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGC CTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGG CACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATCCCAGCCGGA CTCCCTTCACCGAGGTCGGAA

[3958] 21s137L融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:332):

[3959] (信号肽)

[3960] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[3961] (人IL-21)

[3962] QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINV SIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS

[3963] (人IL-15Rα寿司域)

[3964] ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[3965] ((G4S)3接头)

[3966] GGGGSGGGGSGGGGS

[3967] (人CD137L)

[3968] REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG VYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL HTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

[3969] 进行以下实验以评估7t15-21s137L中的CD137L部分是否完整以结合到CD137(4.1BB)。第1天,用100μL含有(2.5μg/mL)GAH IgG Fc(G-102-C,安迪生物公司)的R5(涂布缓冲液)涂布96孔板整夜。在第2天,将板洗涤三次并在37℃下用300μL含有1%BSA的PBS阻断2小时。在室温下以每孔100μL添加10ng/ml的4.1BB/Fc(838-4B,安迪生物公司)维持2小时。洗涤三次后,以10nM开始添加7t15-21s137L(长版)或7t15-21s137Ls(短版),或以1/3稀释度从180ng/mL开始添加重组人4.1BBL,接着在4℃下培育整夜。在第3天,将板洗涤三次,并且以每孔100μL施加500ng/mL的生物素化山羊抗人4.1BBL(BAF2295,安迪生物公司),接着在室温下培育2小时。将板洗涤三次,并且与0.25μg/mLHRP-SA(杰克逊免疫研究)以每孔100μL培育30min。然后将板洗涤三次,并且与100μLABTS在室温下培育2min。在405nm处读取结果。如图188所示,与人重组4.1BB配体(rhCD137L,浅灰色星)相比,7t15-21s137L(长版)

和7t15-21s137L(短版)均可与4.1BB/Fc(深色菱形和灰色方块)相互作用。与7t15-21s137L(短版)(灰色方块)相比,7t15-21s137L(长版)(深色菱形)与4.1BB/Fc更好地相互作用。

[3970] 进行以下实验以评估7t15-21s137L(长版)中的组分IL7、IL21、IL15和4.1BBL是否完整,以使用ELISA通过个别抗体检测。96孔板用100μL含有(4μg/mL)抗TF(人IgG1)的R5(涂布缓冲液)涂布且在室温下培育2小时。将板洗涤三次,并且用100μL含有1%BSA的PBS阻断。以10nM起始并且以1/3稀释度添加纯化的7t15-21s137L(长版),接着在室温下培育60分钟。将板洗涤三次,并且每孔添加500ng/mL生物素化抗IL7(506602,安迪生物公司)、500ng/mL生物化抗IL21(13-7218-81,安迪生物公司)、50ng/mL生物素化抗IL15(BAM247,安迪生物公司)或500ng/ml生物素化山羊抗人4.1BBL(BAF2295,安迪生物公司)并在室温下培育60分钟。将板洗涤三次并在室温下与0.25μg/mL的HRP-SA(杰克逊免疫研究)以每孔100μL培育30分钟。将板洗涤四次,并且与100μLABTS在室温下培育2分钟。读取405nm吸光度结果。如图189A-189D所示,通过个别抗体检测到7t15-21s137L(长版)中的组分,包括IL7、IL21、IL15和4.1BBL。

[3971] 进行以下实验以评估7t15-21s137L(长版)和7t15-21s137L(短版)中的IL15的活性。将7t15-21s137L(长版)和7t15-21s137L(短版)促进表达IL2Rαβγ的CTLL2细胞增殖的能力与重组IL15进行比较。将IL15依赖性CTLL2细胞用IMDM-10%FBS洗涤五次,并且以2×10^4个细胞/孔接种到孔中。将连续稀释的7t15-21s137L(长版)、7t15-21s137L(短版)或IL15添加到细胞中。在CO_2培养箱中在37℃下培育细胞3天。通过在第3天向每个孔中添加20μLPrestoBlue(A13261,赛默飞世尔),并且在CO_2培养箱中在37℃下再培养4小时来检测细胞增殖。在微量滴定板读取器中读取570-610nm原始吸光度。如图190所示,7t15-21s137L(长版)、7t15-21s137L(短版)和IL15都促进CTLL2细胞增殖。7t15-21s137L(长版)、7t15-21s137L(短版)和IL15的EC_{50}分别是51.19pM、55.75pM和4.947pM。

[3972] 实例73:2t2诱导Treg细胞

[3973] 通过Ficoll Paque Plus(GE17144003)从5mL全血白细胞层中分离出健康供体(供体163)的外周血单核细胞(PBMC)。然后用ACK裂解PBMC以去除红细胞。细胞用IMDM-10%FBS洗涤并计数。将1.8×10^6个细胞(100TL/管)接种于流量管中且与50TL的浓度递减的2t2或IL2(15000、1500、150、15、1.5、0.15或0pM)和50TL的预染色抗体(抗CD8-BV605和抗CD127-AF647)一起培育。在水浴中、在37℃下培育细胞30分钟。在水浴中,在37℃下,历时10分钟添加200TL预温热的BD Phosflow固定缓冲液I(目录号557870,BectonDickinsonBiosciences)以中止刺激。将细胞(4.5×10^5个细胞/100TL)转移到V形96孔板中且离心,随后在冰上用100TL的-20℃预冷却BD Phosflow Perm缓冲液III(Cat# BD Biosciences)渗透30分钟。细胞然后充分地用200TL的FACS缓冲液洗涤2次且用一组荧光抗体(抗CD25-PE、CD4-PerCP-Cy5.5、CD56-BV421、CD45RA-PE-Cy7和pSTAT5a-AF488)染色以区分不同的淋巴细胞亚群且评估pSTAT5a状态。将细胞离心并且再悬浮于200TLFACS缓冲液中以用于FACSCelesta分析。如图191A中所示,6pM的2t2足以诱导$CD4^+CD25^{hi}T_{reg}$细胞中的Stat5a发生磷酸化,而诱导相同的淋巴细胞群中的Stat5a发生磷酸化需要43.11pM的IL-2。相比之下,2t2诱导$CD4^+CD25^-T_{con}$和$CD8^+T_{con}$细胞中的Stat5a发生磷酸化的活性小于IL2(图191B)或活性等同于IL2(图191C)。这些结果表明,在活化人PBMC中的T_{reg}方面,2t2优于IL2,且在人血液淋巴细胞pStat5a应答方面,2t2展现的T_{reg}选择性相较于IL-2增大。

[3974] 实例74.使用单链嵌合多肽改善毛发生长

[3975] 将7周龄C57BL6/J小鼠的背毛剃毛并使用商业脱毛膏脱毛。在同一天向小鼠皮下注射单次剂量2t2或低剂量的市售重组IL-2,然后每天给药历时另外四天。未经处理的小鼠用作对照。在第10天,处死小鼠并制备剃毛区域的皮肤切片。图192A-192E显示了脱毛后第10天C57BL6J小鼠皮肤切片的代表性H&E染色。图192A显示了对照小鼠-仅在剃毛后进行了脱毛,图192B显示了在脱毛后再施用低剂量IL-2(1mg/kg)的小鼠,并且图192C-192E显示了在脱毛后再施用0.3mg/kg(图192C)、1mg/kg(图192D)和3mg/kg(图192E)2t2的小鼠。黑色箭头表示生长期的毛囊,这些毛囊随后将延伸到真皮中并促进头发生长。图194显示了每个处理组每10个视野计数的生长期毛囊总数。总而言之,数据显示与仅脱毛相比,2t2分子使得生长期毛囊数量增加。这种作用也是剂量依赖性的。

[3976] 实例75:使免疫细胞分化成记忆样免疫细胞

[3977] 从血库获得新鲜的人白细胞,并且用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)分离出$CD56^{+}$NK细胞。NK细胞的纯度>70%,并且通过用CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750(BioLegend)染色得到证实。对细胞进行计数并以2x 10^{6}细胞/mL的密度再悬浮于补充有2mML-谷氨酰胺(赛默生命技术公司)、抗生素(青霉素,10,000个单位/mL;链霉素,10,000μg/mL;赛默生命技术公司)和10%FBS(Hyclone)的RPMI 1640培养基(吉毕科)中。。将细胞(1mL)转移至平底24孔板中,且通过培养基进行:不处理,或用7t15-21s+抗组织因子(TF)-抗体(IgG1)(50nM)扩增14天。用新鲜的7t15-21s+抗TF抗体(IgG1)(50nM)加强细胞,以使细胞密度保持在大约1x 10^{6}细胞/mL。

[3978] 处理组的未扩增NK细胞用作全DNA甲基化水平的阳性对照(数据未显示)。使NK细胞集结(1x 10^{6}),并使用QIAampUCPDNA微型试剂盒(凯杰)分离出基因组DNA(nDNA)。使用EZ DNAMethylation-Direct试剂盒(Zymo Research),根据制造商的方案,对500ng纯化的nDNA进行亚硫酸氢钠处理。亚硫酸氢盐处理在DNA中引入了甲基化依赖的变化,其中去甲基化的胞嘧啶被转化为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶则保持不变。亚硫酸氢盐处理的nDNA(10-50ng)用作模板,以便使用含有正向引物IFNG127F(5'-ATGGTATAGGTGGGTATAATGG-3')和生物素化反向引物IFNG355R-bio(生物素-5'-CAATATACTACACCTCCTCTAACTAC-3')(GENEWIZ)的PyromarkPCR试剂盒(凯杰)对含有两个CpG位点(CpG-186和CpG-54,相对于转录起始位点TSS的位置)的IFNγ启动子的228bp区域进行PCR扩增。PCR条件是在95℃下15分钟,在95℃下30秒、在56℃下30秒、在72℃下60秒、然后在72℃下10分钟的48个循环。目测1.2%TAE琼脂糖凝胶上的PCR扩增产物的完整性和品质。通过焦磷酸测序测定这两个CpG位点的DNA甲基化状态,这是在单个CpG位点定量测量DNA甲基化的金标准技术。在约翰霍普金斯大学遗传资源核心机构(Johns Hopkins UniversityGenetic Resources Core Facility),使用对CpG位点-186和CpG位点-54分别具有特异性的DNA测序引物C186-IFNG135F(5'-GGTGGGTATAATGGG-3')(SEQ ID NO:333)和C54-IFNG261F(5'-ATTATTTTATTTTAAAAAATTTGTG-3')(SEQ ID NO:334)进行焦磷酸测序反应。使用市售的未甲基化和甲基化DNA(ZymoResearch)作为DNA甲基化的对照。对于每种处理,合并两个CpG位点(-186和-54)的甲基化百分比。相对于在未暴露的NK细胞中观察到的两个CpG位点的DNA甲基化水平,计算DNA甲基化的百分比差异。

[3979] 对这两个IFNγCpG位点的DNA甲基化状态的分析揭露,由7t15-21s+抗TF抗体支持

的NK细胞中的DNA脱甲基水平高于未暴露的NK细胞(图194)。7t15-21s+抗TF抗体支持的这些NK细胞与未暴露的NK细胞相比,在DNA甲基化方面表现出47.70%±11.76的差异(即,脱甲基化)。在用7t15-21s+抗TF抗体处理后,这两个IFNγCpG位点的DNA甲基化水平与IFNγ的表达增加相关。这些数据表明,NK细胞的长期暴露(培养扩增14天)联合7t15-21s+抗TF抗体的组合方案能够诱导两个低甲基化IFNγCpG位点(-186和-54)的DNA脱甲基化,并且7t15-21s+抗TF抗体(IgG1)能够通过CpG位点的DNA脱甲基化,以表观遗传方式对IFNγ的基因表达进行再编程,从而使得NK细胞相互转化为先天性免疫记忆NK细胞。

[3980] 其它实施例

[3981] 应理解,虽然已经结合其具体说明对本发明进行了描述,但前述说明旨在说明而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围限定。其它方面、优点以及修改均处于以下权利要求书的范围内。

[3982] 示例性实施例

[3983] 实施例A1.单链嵌合多肽,其包含:

[3984] (i)第一靶标结合域;

[3985] (ii)可溶性组织因子域;和

[3986] (iii)第二靶标结合域,

[3987] 实施例A2.实施例A1的单链嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域与所述可溶性组织因子域彼此直接邻接。

[3988] 实施例A3.实施例A1的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列。

[3989] 实施例A4.实施例A1至A3中任一项的单链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域和所述第二靶标结合域彼此直接邻接。

[3990] 实施例A5.实施例A1至A3中任一项的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于可溶性组织因子域与第二靶标结合域之间的接头序列。

[3991] 实施例A6.实施例A1的单链嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域与所述第二靶标结合域彼此直接邻接。

[3992] 实施例A7.实施例A1的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于第一靶标结合域与第二靶标结合域之间的接头序列。

[3993] 实施例A8.实施例A6或A7的单链嵌合多肽,其中第二靶标结合域和可溶性组织因子域彼此直接邻接。

[3994] 实施例A9.实施例A6或A7的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于第二靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列。

[3995] 实施例A10.实施例A1至A9中任一项的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的抗原。

[3996] 实施例A11.实施例A10的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。

[3997] 实施例A12.实施例A11的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域包含相同的氨基酸序列。

[3998] 实施例A13.实施例A1至A9中任一项的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二

靶标结合域特异性结合到不同的抗原。

[3999] 实施例A14.实施例A1至A13中任一项的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是抗原结合域。

[4000] 实施例A15.实施例A14的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域各自是抗原结合域。

[4001] 实施例A16.根据实施例A12或A13所述的多链嵌合多肽,其中抗原结合域包含scFv或单域抗体。

[4002] 实施例A17.实施例A1至A16中任一项的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个结合到选自由以下组成的群组的靶标:CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、IL-1的受体、IL-2的受体、IL-3的受体、IL-7的受体、IL-8的受体、IL-10的受体、IL-12的受体、IL-15的受体、IL-17的受体、IL-18的受体、IL-21的受体、PDGF-D的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体、CD122的受体和CD28的受体。

[4003] 实施例A18.实施例A1至A16中任一项的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。

[4004] 实施例A19.实施例A18的单链嵌合多肽,其中可溶性白介素、细胞因子或配体蛋白选自由以下组成的群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-D和SCF、FLT3L、MICA、MICB,和ULP16结合蛋白。

[4005] 实施例A20.实施例A1至A16中任一项的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子受体。

[4006] 实施例A21.实施例A20的单链嵌合多肽,其中可溶性白介素或细胞因子受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、可溶性NKG2D、可溶性NKp30、可溶性NKp44、可溶性NKp46、可溶性DNAM1、scMHCI、scMHCII、scTCR、可溶性CD155或可溶性CD28。

[4007] 实施例A22.实施例A1至A21中任一项的单链嵌合多肽,其中可溶性组织因子域是可溶性人组织因子域。

[4008] 实施例A23.实施例A22的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少80%一致的序列。

[4009] 实施例A24.实施例A23的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少90%一致的序列。

[4010] 实施例A25.实施例A24的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少95%一致的序列。

[4011] 实施例A26.实施例A22至A25中任一项的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域不包含以下中的一种或多种:

[4012] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸；

[4013] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸；

[4014] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸；

[4015] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸；

[4016] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸；

[4017] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[4018] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[4019] 实施例A27.实施例A26的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域不包含以下中的任一种：

[4020] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸；

[4021] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸；

[4022] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸；

[4023] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸；

[4024] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸；

[4025] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[4026] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[4027] 实施例A28.实施例A1至A27中任一项的单链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域不能结合因子VIIa。

[4028] 实施例A29.实施例A1至A28中任一项的单链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域不将非活性因子X转化为因子Xa。

[4029] 实施例A30.实施例A1至A29中任一项的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽不刺激哺乳动物的血液凝结。

[4030] 实施例A31.实施例A1至A30中任一项的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含一个或多个位于其N端和/或C端的其它靶标结合域。

[4031] 实施例A32.实施例A31的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽包含一个或多个位于其N端的其它靶标结合域。

[4032] 实施例A33.实施例A32的单链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域直接邻接第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域。

[4033] 实施例A34.实施例A33的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于至少一个其它抗原结合域之一与第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域之间的接头序列。

[4034] 实施例A35.实施例A31的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽包含一个或多个位于其C端的其它靶标结合域。

[4035] 实施例A36.实施例A35的单链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域之一直接邻接第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域。

[4036] 实施例A37.实施例A35的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于至少一个其它靶标结合域之一与第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域之间的接头序列。

[4037] 实施例A38.实施例A31的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽包含一个或多个位于其N端和C端的其它靶标结合域。

[4038] 实施例A39.实施例A38的单链嵌合多肽,其中位于N端的一个或多个其它抗原结合域之一直接邻接第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域。

[4039] 实施例A40.实施例A38的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于N端的一个或多个其它抗原结合域之一与第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域之间的接头序列。

[4040] 实施例A41.实施例A38的单链嵌合多肽,其中位于C端的一个或多个其它抗原结合域之一直接邻接第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域。

[4041] 实施例A42.实施例A38的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于C端的一个或多个其它抗原结合域之一与第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域之间的接头序列。

[4042] 实施例A43.实施例A31至A42中任一项的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的抗原。

[4043] 实施例A44.实施例A43的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的表位。

[4044] 实施例A45.实施例A44的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个包含相同的氨基酸序列。

[4045] 实施例A46.实施例A43的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自特异性结合到相同的抗原。

[4046] 实施例A47.实施例A46的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域特异性各自结合到相同的表位。

[4047] 实施例A48.实施例A47的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自包含相同的氨基酸序列。

[4048] 实施例A49.实施例A31至A42中任一项的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域特异性结合到相同的抗原。

[4049] 实施例A50.实施例A31至A49中任一项的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个靶标结合域中的一个或多个是抗原结合域。

[4050] 实施例A51.实施例A50的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自是抗原结合域。

[4051] 实施例A52.实施例A51的单链嵌合多肽,其中抗原结合域包含scFv或单域抗体。

[4052] 实施例A53.实施例A31至A52中任一项的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第

二靶标结合域和一个或多个靶标结合域中的一个或多个特异性地结合到选自由以下组成的群组的靶标:CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、IL-1的受体、IL-2的受体、IL-3的受体、IL-7的受体、IL-8的受体、IL-10的受体、IL-12的受体、IL-15的受体、IL-17的受体、IL-18的受体、IL-21的受体、PDGF-D的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体、CD122的受体和CD28的受体。

[4053] 实施例A54.实施例A31至A52中任一项的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。

[4054] 实施例A55.实施例A54的单链嵌合多肽,其中可溶性白介素、细胞因子或配体蛋白选自由以下组成的群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-D和SCF、FLT3L、MICA、MICB,和ULP16结合蛋白。

[4055] 实施例A56.实施例A31至A52中任一项的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子受体。

[4056] 实施例A57.实施例A56的单链嵌合多肽,其中所述可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、可溶性NKG2D、可溶性NKp30、可溶性NKp44、可溶性NKp46、可溶性DNAM1、scMHCI、scMHCII、scTCR、可溶性CD155、可溶性CD122、可溶性CD3或可溶性CD28。

[4057] 实施例A58.实施例A1至A57中任一项的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含位于其N端的信号序列。

[4058] 实施例A59.实施例A1至A58中任一项的单链嵌合多肽,其中单链嵌合多肽进一步包含定位于单链嵌合多肽N端或C端的肽标签。

[4059] 实施例A60.一种组合物,其包含实施例A1至A59的任一种单链嵌合多肽。

[4060] 实施例A61.实施例A60的组合物,其中所述组合物是医药组合物。

[4061] 实施例A62.一种试剂盒,其包含至少一次剂量的实施例A60或A61的组合物。

[4062] 实施例A63.一种核酸,其编码实施例A1至A59中任一项的任一种单链嵌合多肽。

[4063] 实施例A64.一种载体,其包含实施例A63的核酸。

[4064] 实施例A65.实施例A64的载体,其中所述载体是表达载体。

[4065] 实施例A66.一种细胞,其包含实施例A63的核酸或实施例A64或A65的载体。

[4066] 实施例A67.一种产生单链嵌合多肽的方法,所述方法包含:

[4067] 在足以引起所述单链嵌合多肽产生的条件下、在培养基中培养实施例A66的细胞;和

[4068] 从所述细胞和/或所述培养基中回收所述单链嵌合多肽。

[4069] 实施例A68.一种单链嵌合多肽,其通过实施例A67的方法产生。

[4070] 实施例A69.实施例A26的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少80%一致的序列。

[4071] 实施例A70.实施例A69的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少90%一致的序列。

[4072] 实施例A71.实施例A70的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少95%一致的序列。

[4073] 实施例A72.实施例A71的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少100%一致的序列。

[4074] 实施例A73.实施例A26的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少80%一致的序列。

[4075] 实施例A74.实施例A73的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少90%一致的序列。

[4076] 实施例A75.实施例A74的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少95%一致的序列。

[4077] 实施例A76.实施例A75的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98100%一致的序列。

[4078] 实施例B1.一种单链嵌合多肽,其包含:

[4079] (i)第一靶标结合域;

[4080] (ii)可溶性组织因子域;和

[4081] (iii)第二靶标结合域,

[4082] 其中:

[4083] 第一靶标结合域和第二靶标结合域各自特异性结合到IL-2受体;或

[4084] 第一靶标结合域和第二靶标结合域各自特异性结合到IL-15受体。

[4085] 实施例B2.实施例B1的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域与可溶性组织因子域彼此直接邻接。

[4086] 实施例B3.实施例B1的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列。

[4087] 实施例B4.实施例B1至B3中任一项的单链嵌合多肽,其中可溶性组织因子域与第二靶标结合域彼此直接邻接。

[4088] 实施例B5.实施例B1至B3中任一项的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于可溶性组织因子域与第二靶标结合域之间的接头序列。

[4089] 实施例B6.实施例B1的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域与第二靶标结合域彼此直接邻接。

[4090] 实施例B7.实施例B1的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于第一靶标结合域与第二靶标结合域之间的接头序列。

[4091] 实施例B8.实施例B6或B7的单链嵌合多肽,其中第二靶标结合域与可溶性组织因子域彼此直接邻接。

[4092] 实施例B9.实施例B6或B7的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介

于第二靶标结合域和可溶性组织因子域之间的接头序列。

[4093] 实施例B10.实施例B1至B9中任一项的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域均为可溶性白介素蛋白。

[4094] 实施例B11.实施例B10的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域是可溶性IL-2蛋白。

[4095] 实施例B12.实施例B11的单链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-2蛋白是人可溶性IL-2蛋白。

[4096] 实施例B13.实施例B12的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-2蛋白包含SEQ ID NO:78。

[4097] 实施例B14.实施例B10的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域是可溶性IL-15蛋白。

[4098] 实施例B15.实施例B14的单链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15蛋白是人可溶性IL-15蛋白。

[4099] 实施例B16.实施例B15的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-15蛋白包含SEQ ID NO:82。

[4100] 实施例B17.实施例B1至B16中任一项的单链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域是人可溶性组织因子域。

[4101] 实施例B18.实施例B17的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少80%一致的序列。

[4102] 实施例B19.实施例B18的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少90%一致的序列。

[4103] 实施例B20.实施例B19的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少95%一致的序列。

[4104] 实施例B21.实施例B17至B20中任一项的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域不包含以下中的一种或多种:

[4105] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;

[4106] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;

[4107] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;

[4108] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;

[4109] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;

[4110] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[4111] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[4112] 实施例B22.实施例B21的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域不包含以下中的任一种:

[4113] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;

[4114] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;

[4115] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;

[4116] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;

[4117] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;

[4118] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[4119] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[4120] 实施例B23.实施例B1至B22中任一项的单链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域不能结合因子VIIa。

[4121] 实施例B24.实施例B1至B23中任一项的单链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域不将非活性因子X转化为因子Xa。

[4122] 实施例B25.实施例B1至B24中任一项的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽不刺激哺乳动物的血液凝结。

[4123] 实施例B26.实施例B1到B25中任一项的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含一个或多个位于其N端和/或C端的其它靶标结合域。

[4124] 实施例B27.实施例B26的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽包含一个或多个位于其N端的其它靶标结合域。

[4125] 实施例B28.实施例B27的单链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域直接邻接第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域。

[4126] 实施例B29.实施例B28的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于至少一个其它靶标结合域之一与第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域之间的接头序列。

[4127] 实施例B30.实施例B26的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽包含一个或多个位于其C端的其它靶标结合域。

[4128] 实施例B31.实施例B30的单链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域之一直接邻接第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域。

[4129] 实施例B32.实施例B30的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于至少一个其它靶标结合域之一与第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域之间的接头序列。

[4130] 实施例B33.实施例B26的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽包含一个或多个位于其N端和C端的其它靶标结合域。

[4131] 实施例B34.实施例B33的单链嵌合多肽,其中位于N端的一个或多个其它抗原结合域之一直接邻接第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域。

[4132] 实施例B35.实施例B33的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于N端的一个或多个其它抗原结合域之一与第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域之间的接头序列。

[4133] 实施例B36.实施例B33的单链嵌合多肽,其中位于C端的一个或多个其它抗原结合域之一直接邻接第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域。

[4134] 实施例B37.实施例B33的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于C端的一个或多个其它抗原结合域之一与第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域之间的接头序列。

[4135] 实施例B38.实施例B26至B37中任一项的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自特异性结合到IL-2受体或IL-15受体。

[4136] 实施例B39.实施例B38的单链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自包含相同的氨基酸序列。

[4137] 实施例B40.实施例B26至B37中任一项的单链嵌合多肽,其中所述一个或多个其它靶标结合域是抗原结合域。

[4138] 实施例B41.实施例B40的单链嵌合多肽,其中抗原结合域包含scFv或单域抗体。

[4139] 实施例B42.实施例B26至B37、B40和B41中任一项的单链嵌合多肽,其中所述一个或多个其它靶标结合域特异性地结合到选自由以下组成的群组的靶标:CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM-1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、IL-1的受体、IL-2的受体、IL-3的受体、IL-7的受体、IL-8的受体、IL-10的受体、IL-12的受体、IL-15的受体、IL-17的受体、IL-18的受体、IL-21的受体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体、CD122的受体和CD28的受体。

[4140] 实施例B43.实施例B6至B37、B40和B41中任一项的单链嵌合多肽,其中所述一个或多个其它靶标结合域是可溶性白介素或细胞因子蛋白。

[4141] 实施例B44.实施例B43的单链嵌合多肽,其中所述可溶性白介素或细胞因子蛋白选自由以下组成的群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。

[4142] 实施例B45.实施例B6至B37、B40和B41中任一项的单链嵌合多肽,其中所述一个或多个其它靶标结合域是可溶性白介素或细胞因子受体。

[4143] 实施例B46.实施例B45的单链嵌合多肽,其中所述可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)和可溶性TGF-βRIII。

[4144] 实施例B47.实施例B1至B46中任一项的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含位于其N端的信号序列。

[4145] 实施例B48.实施例B1至B47中任一项的单链嵌合多肽,其中单链嵌合多肽进一步包含定位于单链嵌合多肽N端或C端的肽标签。

[4146] 实施例B49.一种组合物,其包含实施例B1至B48的任一种单链嵌合多肽。

[4147] 实施例B50.实施例B49的组合物,其中所述组合物是医药组合物。

[4148] 实施例B51.一种试剂盒,其包含至少一次剂量的实施例B49或B50的组合物。

[4149] 实施例B52.一种核酸,其编码实施例B1到B48中任一项的任一种单链嵌合多肽。

[4150] 实施例B53.一种载体,其包含实施例B52的核酸。

[4151] 实施例B54.实施例B53的载体,其中所述载体是表达载体。

[4152] 实施例B55.一种细胞,其包含实施例B52的核酸或实施例B53或B54的载体。

[4153] 实施例B56.一种产生单链嵌合多肽的方法,所述方法包含:

[4154] 在足以引起所述单链嵌合多肽产生的条件下、在培养基中培养实施例B55的细胞;和

[4155] 从所述细胞和/或所述培养基中回收所述单链嵌合多肽。

[4156] 实施例B57.一种单链嵌合多肽,其通过实施例B56的方法产生。

[4157] 实施例B58.实施例B21的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少80%一致的序列。

[4158] 实施例B59.实施例B58的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少90%一致的序列。

[4159] 实施例B60.实施例B59的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少95%一致的序列。

[4160] 实施例B61.实施例B60的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97100%一致的序列。

[4161] 实施例B62.实施例B21的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少80%一致的序列。

[4162] 实施例B63.实施例B62的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少90%一致的序列。

[4163] 实施例B64.实施例B63的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少95%一致的序列。

[4164] 实施例B65.实施例B64的单链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98100%一致的序列。

[4165] 实施例C1.一种多链嵌合多肽,其包含:

[4166] (a)第一嵌合多肽,其包含:

[4167] (i)第一靶标结合域;

[4168] (ii)可溶性组织因子域;和

[4169] (iii)亲和域对中的第一域;

[4170] (b)第二嵌合多肽,其包含:

[4171] (i)亲和域对中的第二域;和

[4172] (ii)第二靶标结合域,

[4173] 其中所述第一嵌合多肽和所述第二嵌合多肽通过所述亲和域对中的所述第一域和所述第二域的结合而缔合。

[4174] 实施例C2.实施例C1的多链嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域和所述可溶性组织因子域在所述第一嵌合多肽中彼此直接邻接。

[4175] 实施例C3.实施例C1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于第

一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列。

[4176] 实施例C4.实施例C1至C3中任一项的多链嵌合多肽,其中可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。

[4177] 实施例C5.实施例C1至C3中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4178] 实施例C6.实施例C1至C5中任一项的多链嵌合多肽,其中亲和域对中的第二域与第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。

[4179] 实施例C7.实施例C1至C5中任一项的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列。

[4180] 实施例C8.实施例C1至C7中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的抗原。

[4181] 实施例C9.实施例C8的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。

[4182] 实施例C10.实施例C9的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域包含相同的氨基酸序列。

[4183] 实施例C11.实施例C1至C7中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到不同的抗原。

[4184] 实施例C12.实施例C1至C11中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是抗原结合域。

[4185] 实施例C13.实施例C12的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域各自是抗原结合域。

[4186] 实施例C14.实施例C12或C13的多链嵌合多肽,其中抗原结合域包含scFv或单域抗体。

[4187] 实施例C15.实施例C1至C14中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个特异性地结合到选自由以下组成的群组的靶标:CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM-1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、IL-1的受体、IL-2的受体、IL-3的受体、IL-7的受体、IL-8的受体、IL-10的受体、IL-12的受体、IL-15的受体、IL-17的受体、IL-18的受体、IL-21的受体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体、CD122的受体和CD28的受体。

[4188] 实施例C16.实施例C1至C14中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。

[4189] 实施例C17.实施例C16的多链嵌合多肽,其中可溶性白介素或细胞因子蛋白选自由以下组成的群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-

21、PDGF-DD、SCF、FLT3L、MICA、MICB,和ULP16结合蛋白。

[4190] 实施例C18.实施例C1至C14中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子受体。

[4191] 实施例C19.实施例C18的多链嵌合多肽,其中可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、可溶性NKG2D、可溶性NKp30、可溶性NKp44、可溶性NKp46、可溶性DNAM1、scMHCI、scMHCII、scTCR、可溶性CD155或可溶性CD28。

[4192] 实施例C20.实施例C1至C19中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包含一个或多个其它靶标结合域,其中所述一个或多个其它抗原结合域中的至少一个定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[4193] 实施例C21.实施例C20的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包括介于可溶性组织因子域与一个或多个其它抗原结合域中的至少一个之间的接头序列,和/或介于一个或多个其它抗原结合域中的至少一个与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4194] 实施例C22.实施例C1至C19中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含一个或多个位于第一嵌合多肽N端和/或C端的其它靶标结合域。

[4195] 实施例C23.实施例C22的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第一嵌合多肽中直接邻接亲和域对中的第一域。

[4196] 实施例C24.实施例C22的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4197] 实施例C25.实施例C22的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域。

[4198] 实施例C26.实施例C22的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与第一靶标结合域之间的接头序列。

[4199] 实施例C27.实施例C22的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个安置于第一嵌合多肽的N端和/或C端,并且一个或多个其它靶标结合域中的至少一个定位于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[4200] 实施例C28.实施例C27的多链嵌合多肽,其中安置于N端的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个其它靶标结合域在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域或亲和域对中的第一域。

[4201] 实施例C29.实施例C27的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含安置于第一嵌合多肽中的至少一个其它靶标结合域与第一靶标结合域或亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4202] 实施例C30.实施例C27的多链嵌合多肽,其中安置于C端的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个其它靶标结合域在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域或亲和域对中的第一域。

[4203] 实施例C31.实施例C27的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含安置于第一嵌合多肽中的至少一个其它靶标结合域与第一靶标结合域或亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4204] 实施例C32.实施例C27的多链嵌合多肽,其中定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个直接邻接可溶性组织因子

域和/或亲和域对中的第一域。

[4205] 实施例C33.实施例C27的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含接头序列,所述接头序列安置于(i)可溶性组织因子域与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个之间,所述靶标结合域定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间;和/或(ii)亲和域对中的第一域与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个之间,所述靶标结合域定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[4206] 实施例C34.实施例C1至C33中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含一个或多个位于第二嵌合多肽N端和/或C端的其它靶标结合域。

[4207] 实施例C35.实施例C34的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第二嵌合多肽中直接邻接亲和域对中的第二域。

[4208] 实施例C36.实施例C34的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与亲和域对中的第二域之间的接头序列。

[4209] 实施例C37.实施例C34的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第二嵌合多肽中直接邻接第二靶标结合域。

[4210] 实施例C38.实施例C34的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与第二靶标结合域之间的接头序列。

[4211] 实施例C39.实施例C20至C38中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的抗原。

[4212] 实施例C40.实施例C39的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的表位。

[4213] 实施例C41.实施例C40的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个包含相同的氨基酸序列。

[4214] 实施例C42.实施例C39的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自特异性结合到相同的抗原。

[4215] 实施例C43.实施例C42的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自特异性结合到相同的表位。

[4216] 实施例C44.实施例C43的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自包含相同的氨基酸序列。

[4217] 实施例C45.实施例C20至C38中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域特异性结合到不同的抗原。

[4218] 实施例C46.实施例C20至C45中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个靶标结合域中的一个或多个是抗原结合域。

[4219] 实施例C47.实施例C46的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自是抗原结合域。

[4220] 实施例C48.实施例C47的多链嵌合多肽,其中抗原结合域包含scFv。

[4221] 实施例C49.实施例C20至C48中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个靶标结合域中的一个或多个特异性地结合到选自由以下组成

的群组的靶标:CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM-1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKP30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、IL-1的受体、IL-2的受体、IL-3的受体、IL-7的受体、IL-8的受体、IL-10的受体、IL-12的受体、IL-15的受体、IL-17的受体、IL-18的受体、IL-21的受体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体、CD122的受体和CD3的受体以及CD28的受体。

[4222] 实施例C50.实施例C20至C48中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。

[4223] 实施例C51.实施例C50的多链嵌合多肽,其中可溶性白介素、细胞因子或配体蛋白选自由以下组成的群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF、FLT3L、MICA、MICB,和ULP16结合蛋白。

[4224] 实施例C52.实施例C20至C48中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子受体。

[4225] 实施例C53.实施例C52的多链嵌合多肽,其中所述可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、可溶性NKG2D、可溶性NKp30、可溶性NKp44、可溶性NKp46、可溶性DNAM1、scMHCI、scMHCII、scTCR、可溶性CD155、可溶性CD122、可溶性CD3或可溶性CD28。

[4226] 实施例C54.实施例C1至C53中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包含位于第一嵌合多肽N端或C端的肽标签。

[4227] 实施例C55.实施例C1至C53中任一项的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽进一步包含定位于第二嵌合多肽N端或C端的肽标签。

[4228] 实施例C56.实施例C1至C55中任一项的多链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域是人可溶性组织因子域。

[4229] 实施例C57.实施例C56的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少80%一致的序列。

[4230] 实施例C58.实施例C57的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ IDNO:93至少90%一致的序列。

[4231] 实施例C59.实施例C58的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少95%一致的序列。

[4232] 实施例C60.实施例C56至C59中任一项的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域不包含以下中的一种或多种:

[4233] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;

[4234] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨

酸;

[4235] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;

[4236] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;

[4237] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;

[4238] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[4239] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[4240] 实施例C61.实施例C60的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域不包含以下中的任一种:

[4241] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;

[4242] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;

[4243] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;

[4244] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;

[4245] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;

[4246] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[4247] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[4248] 实施例C62.实施例C1至C61中任一项的多链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域不能结合到因子VIIa。

[4249] 实施例C63.实施例C1至C62中任一项的多链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域不将非活性因子X转化为因子Xa。

[4250] 实施例C64.实施例C1至C63中任一项的多链嵌合多肽,其中所述多链嵌合多肽不刺激哺乳动物的血液凝结。

[4251] 实施例C65.实施例C1至C64中任一项的多链嵌合多肽,其中所述亲和域对是来自人IL-15受体α链(IL15Rα)的寿司域和可溶性IL-15。

[4252] 实施例C66.实施例C65的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15具有D8N或D8A氨基酸取代。

[4253] 实施例C67.实施例C65或C66的多链嵌合多肽,其中所述人IL-15Rα是成熟全长IL-15Rα。

[4254] 实施例C68.实施例C1至C64中任一项的多链嵌合多肽,其中所述亲和域对选自由以下组成的群组:芽胞杆菌核糖核酸酶(barnase)和芽胞杆菌核糖核酸酶抑制子(barnstar)、PKA和AKAP、基于突变核糖核酸酶I片段的衔接子/对接标签模块,以及基于蛋白质突触蛋白、突触结合蛋白、突触泡蛋白和SNAP25的相互作用的SNARE模块。

[4255] 实施例C69.实施例C1至C68中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽和/或第

二嵌合多肽进一步包含位于其N端的信号序列。

[4256] 实施例C70.一种组合物,其包含实施例C1至C69的任一种多链嵌合多肽。

[4257] 实施例C71.实施例C70的组合物,其中所述组合物是医药组合物。

[4258] 实施例C72.一种试剂盒,其包含至少一次剂量的实施例C70或C71的组合物。

[4259] 实施例C73.一种核酸,其编码实施例C1至C69中任一项的任一种多链嵌合多肽。

[4260] 实施例C74.一种载体,其包含实施例C73的核酸。

[4261] 实施例C75.实施例C74的载体,其中所述载体是表达载体。

[4262] 实施例C76.一种细胞,其包含实施例C73的核酸或实施例C74或C75的载体。

[4263] 实施例C77.一种产生多链嵌合多肽的方法,所述方法包含:

[4264] 在足以引起所述多链嵌合多肽产生的条件下、在培养基中培养实施例C76的细胞;和

[4265] 从所述细胞和/或所述培养基中回收所述多链嵌合多肽。

[4266] 实施例C78.一种多链嵌合多肽,其通过实施例C77的方法产生。

[4267] 实施例C79.实施例A56的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少80%一致的序列。

[4268] 实施例C80.实施例C79的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少90%一致的序列。

[4269] 实施例C81.实施例C80的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少95%一致的序列。

[4270] 实施例C82.实施例C81的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97100%一致的序列。

[4271] 实施例C83.实施例C56的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少80%一致的序列。

[4272] 实施例C84.实施例C83的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少90%一致的序列。

[4273] 实施例C85.实施例C84的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少95%一致的序列。

[4274] 实施例C86.实施例C85的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少100%一致的序列。

[4275] 实施例D1.一种多链嵌合多肽,其包含:

[4276] (a)第一嵌合多肽,其包含:

[4277] (i)第一靶标结合域;

[4278] (ii)可溶性组织因子域;和

[4279] (iii)亲和域对中的第一域;

[4280] (b)第二嵌合多肽,其包含:

[4281] (i)亲和域对中的第二域;和

[4282] (ii)第二靶标结合域,

[4283] 其中:

[4284] 所述第一嵌合多肽和所述第二嵌合多肽通过所述亲和域对中的所述第一域和所

述第二域的结合而缔合；

[4285] 所述第一靶标结合域和所述第二靶标结合域各自独立地特异性结合到IL-18的受体或IL-12的受体。

[4286] 实施例D2.实施例D1的多链嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域和所述可溶性组织因子域在所述第一嵌合多肽中彼此直接邻接。

[4287] 实施例D3.实施例D1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于所述第一嵌合多肽中的所述第一靶标结合域与所述可溶性组织因子域之间的接头序列。

[4288] 实施例D4.实施例D1至D3中任一项的多链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域和所述亲和域对中的所述第一域在所述第一嵌合多肽中彼此直接邻接。

[4289] 实施例D5.实施例D1至D3中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于所述第一嵌合多肽中的所述可溶性组织因子域与所述亲和域对中的所述第一域之间的接头序列。

[4290] 实施例D6.实施例D1至D5中任一项的多链嵌合多肽,其中所述亲和域对中的所述第二域和所述第二靶标结合域在所述第二嵌合多肽中彼此直接邻接。

[4291] 实施例D7.实施例D1至D5中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含介于所述第二嵌合多肽中的所述亲和域对中的所述第二域与所述第二靶标结合域之间的接头序列。

[4292] 实施例D8.实施例D1至D7中任一项的多链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域是人可溶性组织因子域。

[4293] 实施例D9.实施例D8的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少80％一致的序列。

[4294] 实施例D10.实施例D9的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少90％一致的序列。

[4295] 实施例D11.实施例D10的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少95％一致的序列。

[4296] 实施例D12.实施例D8至D11中任一项的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域不包含以下中的一种或多种：

[4297] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸；

[4298] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸；

[4299] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸；

[4300] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸；

[4301] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸；

[4302] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[4303] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[4304] 实施例D13.实施例D12的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域不包含以

下中的任一种：

[4305] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸；

[4306] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸；

[4307] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸；

[4308] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸；

[4309] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸；

[4310] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[4311] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[4312] 实施例D14.实施例D1至D13中任一项的多链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域不能结合到因子VIIa。

[4313] 实施例D15.实施例D1至D14中任一项的多链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域不将非活性因子X转化为因子Xa。

[4314] 实施例D16.实施例D1至D15中任一项的多链嵌合多肽,其中所述多链嵌合多肽不刺激哺乳动物的血液凝结。

[4315] 实施例D17.实施例D1至D16中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包含位于第一嵌合多肽N端或C端的肽标签。

[4316] 实施例D18.实施例D1至D17中任一项的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽进一步包含位于第二嵌合多肽N端或C端的肽标签。

[4317] 实施例D19.根据实施例F1至F70中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽和/或所述第二嵌合多肽在其N端进一步包含信号序列。

[4318] 实施例D20.实施例D19的多链嵌合多肽,其中所述信号序列包含SEQ ID NO:117。

[4319] 实施例D21.实施例D20的多链嵌合多肽,其中所述信号序列是SEQ ID NO:117。

[4320] 实施例D22.实施例D1至D21中任一项的多链嵌合多肽,其中所述亲和域对是来自人IL-15受体α链(IL-15Rα)的寿司域和可溶性IL-15。

[4321] 实施例D23.实施例D22的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15具有D8N或D8A氨基酸取代。

[4322] 实施例D24.实施例D22的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15包含与SEQ ID NO:8280％一致的序列。

[4323] 实施例D25.实施例D24的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15包含与SEQ ID NO:8290％一致的序列。

[4324] 实施例D26.实施例D25的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15包含与SEQ ID NO:8295％一致的序列。

[4325] 实施例D27.实施例D26的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15包含SEQ ID NO:82。

[4326] 实施例D28.实施例D22至D27中任一项的多链嵌合多肽,其中IL-15Rα的寿司域包

含来自人IL-15Rα的寿司域。

[4327] 实施例D29.实施例D28的多链嵌合多肽,其中人IL-15Rα的寿司域包含与SEQ ID NO:11380％一致的序列。

[4328] 实施例D30.实施例D29的多链嵌合多肽,其中人IL-15Rα的寿司域包含与SEQ ID NO:11390％一致的序列。

[4329] 实施例D31.实施例D30的多链嵌合多肽,其中人IL-15Rα的寿司域包含与SEQ ID NO:11395％一致的序列。

[4330] 实施例D32.实施例D31的多链嵌合多肽,其中人IL15Rα的寿司域包含SEQ ID NO:113。

[4331] 实施例D33.实施例D28的多链嵌合多肽,其中人IL-15Rα的寿司域是成熟全长IL-15Rα。

[4332] 实施例D34.实施例D1至D21中任一项的多链嵌合多肽,其中所述亲和域对选自由以下组成的群组:芽胞杆菌核糖核酸酶和芽胞杆菌核糖核酸酶抑制子、PKA和AKAP、基于突变核糖核酸酶I片段的衔接子/对接标签模块,以及基于蛋白质突触蛋白、突触结合蛋白、突触泡蛋白和SNAP25的相互作用的SNARE模块。

[4333] 实施例D35.实施例D1至D34中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是激动性抗原结合域。

[4334] 实施例D36.实施例D35的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域各自是激动性抗原结合域。

[4335] 实施例D37.实施例D35或D36的多链嵌合多肽,其中抗原结合域包含scFv或单域抗体。

[4336] 实施例D38.实施例D1至D34中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性IL-15或可溶性IL-18。

[4337] 实施例D39.实施例D38的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地是可溶性IL-15或可溶性IL-18。

[4338] 实施例D40.实施例D1至D39中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域均特异性结合到IL-18的受体或IL-12的受体。

[4339] 实施例D41.实施例B40的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。

[4340] 实施例D42.实施例D41的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域包含相同的氨基酸序列。

[4341] 实施例D43.实施例D1至D39中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域特异性结合到IL-12的受体,而第二靶标结合域特异性结合到IL-18的受体。

[4342] 实施例D44.实施例D1至D39中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域特异性结合到IL-18的受体,而第二靶标结合域特异性结合到IL-12的受体。

[4343] 实施例D45.实施例D44的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域包含可溶性IL-18。

[4344] 实施例D46.实施例D45的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-18是人可溶性IL-18。

[4345] 实施例D47.实施例D46的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-18包含与SEQ ID NO:109至少80％一致的序列。

[4346] 实施例D48.实施例D47的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-18包含与SEQ ID NO:109至少90%一致的序列。

[4347] 实施例D49.实施例D48的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-18包含与SEQ ID NO:109至少95%一致的序列。

[4348] 实施例D50.实施例D49的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-18包含与SEQ ID NO:109的序列。

[4349] 实施例D51.实施例D44至D50中任一项的多链嵌合多肽,其中第二靶标结合域包含可溶性IL-12。

[4350] 实施例D52.实施例D51的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-18是人可溶性IL-12。

[4351] 实施例D53.实施例D52的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-15包含人可溶性IL-12β(p40)的序列和人可溶性IL-12α(p35)的序列。

[4352] 实施例D54.实施例D53的多链嵌合多肽,其中人可溶性IL-15进一步包含介于可溶性IL-12β(p40)的序列与人可溶性IL-12α(p35)的序列之间的接头序列。

[4353] 实施例D55.实施例D54的多链嵌合多肽,其中所述接头序列包含SEQ ID NO:102。

[4354] 实施例D56.实施例D53至D55中任一项的多链嵌合多肽,其中人可溶性IL-12β(p40)的序列包含与SEQ ID NO:81至少80%一致的序列。

[4355] 实施例D57.实施例D56的多链嵌合多肽,其中人可溶性IL-12β(p40)的序列包含与SEQ ID NO:81至少90%一致的序列。

[4356] 实施例D58.实施例D57的多链嵌合多肽,其中人可溶性IL-12β(p40)的序列包含与SEQ ID NO:81至少95%一致的序列。

[4357] 实施例D59.实施例D58的多链嵌合多肽,其中人可溶性IL-12β(p40)的序列包含与SEQ ID NO:81。

[4358] 实施例D60.实施例D53至D59中任一项的多链嵌合多肽,其中人可溶性IL-12α(p35)的序列包含与SEQ ID NO:80至少80%一致的序列。

[4359] 实施例D61.实施例D60的多链嵌合多肽,其中人可溶性IL-12α(p35)的序列包含与SEQ ID NO:80至少90%一致的序列。

[4360] 实施例D62.实施例D61的多链嵌合多肽,其中人可溶性IL-12α(p35)的序列包含与SEQ ID NO:80至少95%一致的序列。

[4361] 实施例D63.实施例D62的多链嵌合多肽,其中人可溶性IL-12α(p35)的序列包含与SEQ ID NO:80。

[4362] 实施例D64.实施例D1的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:174至少80%一致的序列。

[4363] 实施例D65.实施例D64的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:174至少90%一致的序列。

[4364] 实施例D66.实施例D65的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:174至少95%一致的序列。

[4365] 实施例D67.实施例D66的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:174。

[4366] 实施例D68.实施例D67的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:176。

[4367] 实施例D69.实施例D1和D64至D68中任一项的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽包

含与SEQ ID NO:178至少80％一致的序列。

[4368] 实施例D70.实施例D69的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:178至少90％一致的序列。

[4369] 实施例D71.实施例D70的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:178至少95％一致的序列。

[4370] 实施例D72.实施例D71的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:178。

[4371] 实施例D73.实施例D72的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:180。

[4372] 实施例D74.实施例D1至D63中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包含一个或多个其它靶标结合域,其中所述一个或多个其它抗原结合域中的至少一个定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[4373] 实施例D75.实施例D74的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包括介于可溶性组织因子域与一个或多个其它抗原结合域中的至少一个之间的接头序列,和/或介于一个或多个其它抗原结合域中的至少一个与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4374] 实施例D76.实施例D1至D63中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含一个或多个位于第一嵌合多肽N端和/或C端的其它靶标结合域。

[4375] 实施例D77.实施例D76的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第一嵌合多肽中直接邻接亲和域对中的第一域。

[4376] 实施例D78.根据实施例F22所述的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含在所述一个或多个其它靶标结合域中的所述至少一个与所述亲和域对中的所述第一域之间的接头序列。

[4377] 实施例D79.实施例D76的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域。

[4378] 实施例D80.实施例D76的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与第一靶标结合域之间的接头序列。

[4379] 实施例D81.实施例D76的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个安置于第一嵌合多肽的N端和/或C端,并且一个或多个其它靶标结合域中的至少一个定位于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[4380] 实施例D82.实施例D81的多链嵌合多肽,其中安置于N端的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个其它靶标结合域在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域或亲和域对中的第一域。

[4381] 实施例D83.实施例D81的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含安置于第一嵌合多肽中的至少一个其它靶标结合域与第一靶标结合域或亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4382] 实施例D84.实施例D81的多链嵌合多肽,其中安置于C端的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个其它靶标结合域在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域或亲和域对中的第一域。

[4383] 实施例D85.实施例D81的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含安置于第一嵌合多肽中的至少一个其它靶标结合域与第一靶标结合域或亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4384] 实施例D86.实施例D81的多链嵌合多肽,其中定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个直接邻接可溶性组织因子域和/或亲和域对中的第一域。

[4385] 实施例D87.实施例D81的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含接头序列,所述接头序列安置于(i)可溶性组织因子域与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个之间,所述靶标结合域定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间;和/或(ii)亲和域对中的第一域与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个之间,所述靶标结合域定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[4386] 实施例D88.实施例D1至D63和D74至D87中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含一个或多个位于第二嵌合多肽N端和/或C端的其它靶标结合域。

[4387] 实施例D89.实施例D88的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第二嵌合多肽中直接邻接亲和域对中的第二域。

[4388] 实施例D90.实施例D88的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与亲和域对中的第二域之间的接头序列。

[4389] 实施例D91.实施例D88的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第二嵌合多肽中直接邻接第二靶标结合域。

[4390] 实施例D92.实施例B88的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与第二靶标结合域之间的接头序列。

[4391] 实施例D93.实施例D74至D92中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的抗原。

[4392] 实施例D94.实施例B93的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的表位。

[4393] 实施例D95.实施例B94的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个包含相同的氨基酸序列。

[4394] 实施例D96.实施例D74至D92中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域特异性结合到不同的抗原。

[4395] 实施例D97.实施例D74至D96中任一项的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它抗原结合域特异性地结合到选自由以下组成的群组的靶标:CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM-1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、IL-1的受体、IL-2的受体、IL-3的受体、IL-7的受体、IL-8的受体、IL-10的受体、IL-12的受体、IL-15的受体、IL-17的受体、IL-18的受体、IL-21的受体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体和CD28的受

体。

[4396] 实施例D98.实施例D74至D96中任一项的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域是可溶性白介素或细胞因子蛋白。

[4397] 实施例D99.实施例B98的多链嵌合多肽,其中可溶性白介素、细胞因子或配体蛋白选自由以下组成的群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD、SCF、FLT3L、MICA、MICB,和ULP16结合蛋白。

[4398] 实施例D100.实施例D74至D96中任一项的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域是可溶性白介素或细胞因子受体。

[4399] 实施例D101.实施例B100的多链嵌合多肽,其中可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、可溶性NKG2D、可溶性NKp30、可溶性NKp44、可溶性NKp46、可溶性DNAM1、scMHCI、scMHCII、scTCR、可溶性CD155、可溶性CD122,或可溶性CD28。

[4400] 实施例D102.一种组合物,其包含实施例D1至D101的任一种多链嵌合多肽。

[4401] 实施例D103.实施例D102的组合物,其中所述组合物是医药组合物。

[4402] 实施例D104.一种试剂盒,其包含至少一次剂量的实施例D102或D103的组合物。

[4403] 实施例D105.一种核酸,其编码实施例D1至D101中任一项的任一种多链嵌合多肽。

[4404] 实施例D106.一种载体,其包含实施例D105的核酸。

[4405] 实施例D107.实施例D106的载体,其中所述载体是表达载体。

[4406] 实施例D108.一种细胞,其包含实施例D105的核酸或实施例D106或D107的载体。

[4407] 实施例D109.一种产生多链嵌合多肽的方法,所述方法包含:

[4408] 在足以引起所述多链嵌合多肽产生的条件下、在培养基中培养实施例D108的细胞;和

[4409] 从所述细胞和/或所述培养基中回收所述多链嵌合多肽。

[4410] 实施例D110.一种多链嵌合多肽,其通过实施例D109的方法产生。

[4411] 实施例D111.实施例D8的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少80%一致的序列。

[4412] 实施例D112.实施例D111的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少90%一致的序列。

[4413] 实施例D113.实施例D112的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少95%一致的序列。

[4414] 实施例D114.实施例D113的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97100%一致的序列。

[4415] 实施例D115.实施例D8的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少80%一致的序列。

[4416] 实施例D116.实施例D115的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少90%一致的序列。

[4417] 实施例D117.实施例D116的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少95%一致的序列。

[4418] 实施例D118.实施例D117的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98100%一致的序列。

[4419] 实施例E1.一种多链嵌合多肽,其包含:

[4420] (a)第一嵌合多肽,其包含:

[4421] (i)第一靶标结合域;

[4422] (ii)可溶性组织因子域;和

[4423] (iii)亲和域对中的第一域;

[4424] (b)第二嵌合多肽,其包含:

[4425] (i)亲和域对中的第二域;和

[4426] (ii)第二靶标结合域,

[4427] 其中:

[4428] 所述第一嵌合多肽和所述第二嵌合多肽通过所述亲和域对中的所述第一域和所述第二域的结合而缔合;和

[4429] 所述第一靶标结合域和所述第二靶标结合域各自独立地特异性结合到IL-21的受体或肿瘤生长因子受体βII(TGFβRII)的配体。

[4430] 实施例E2.实施例E1的多链嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域和所述可溶性组织因子域在所述第一嵌合多肽中彼此直接邻接。

[4431] 实施例E3.实施例E1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列。

[4432] 实施例E4.实施例E1至E3中任一项的多链嵌合多肽,其中可溶性组织因子域和亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。

[4433] 实施例E5.实施例E1至E3中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4434] 实施例E6.实施例E1至E5中任一项的多链嵌合多肽,其中亲和域对中的第二域和第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。

[4435] 实施例E7.实施例E1至E5中任一项的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列。

[4436] 实施例E8.实施例E1至E7中任一项的多链嵌合多肽,其中可溶性组织因子域是人可溶性组织因子域。

[4437] 实施例E9.实施例E8的多链嵌合多肽,其中人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少80%一致的序列。

[4438] 实施例E10.实施例E9的多链嵌合多肽,其中人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少90%一致的序列。

[4439] 实施例E11.实施例E10的多链嵌合多肽,其中人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少95%一致的序列。

[4440] 实施例E12.实施例E8至E11中任一项的多链嵌合多肽,其中人可溶性组织因子域不包含以下中的一种或多种:

[4441] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;

[4442] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;

[4443] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;

[4444] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;

[4445] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;

[4446] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[4447] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[4448] 实施例E13.实施例E12的多链嵌合多肽,其中人可溶性组织因子域不包含以下中的任一种:

[4449] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;

[4450] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;

[4451] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;

[4452] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;

[4453] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;

[4454] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[4455] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[4456] 实施例E14.实施例E1至E13中任一项的多链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域不能结合到因子VIIa。

[4457] 实施例E15.实施例E1至E14中任一项的多链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域不将非活性因子X转化为因子Xa。

[4458] 实施例E16.实施例E1至E15中任一项的多链嵌合多肽,其中所述多链嵌合多肽不刺激哺乳动物的血液凝结。

[4459] 实施例E17.实施例E1至E16中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包含位于第一嵌合多肽N端或C端的肽标签。

[4460] 实施例E18.实施例E1至E17中任一项的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽进一步包含位于第二嵌合多肽N端或C端的肽标签。

[4461] 实施例E19.实施例E1至E18中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽和/或第二嵌合多肽进一步包含位于其N端的信号序列。

[4462] 实施例E20.实施例E19的多链嵌合多肽,其中所述信号序列包含SEQ ID NO:117。

[4463] 实施例E21.实施例E20的多链嵌合多肽,其中所述信号序列是SEQ ID NO:117。

[4464] 实施例E22.实施例E1至E21中任一项的多链嵌合多肽,其中所述亲和域对是来自人IL-15受体α链(IL-15Rα)的寿司域和可溶性IL-15。

[4465] 实施例E23.实施例E22的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15具有D8N或D8A氨基酸取代。

[4466] 实施例E24.实施例E22的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15包含与SEQ ID NO:

8280％一致的序列。

[4467] 实施例E25.实施例E24的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15包含与SEQ ID NO:8290％一致的序列。

[4468] 实施例E26.实施例E25的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15包含与SEQ ID NO:8295％一致的序列。

[4469] 实施例E27.实施例E26的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15包含SEQ ID NO:82。

[4470] 实施例E28.实施例E22至E27中任一项的多链嵌合多肽,其中IL-15Rα的寿司域包含来自人IL-15Rα的寿司域。

[4471] 实施例E29.实施例E28的多链嵌合多肽,其中人IL-15Rα的寿司域包含与SEQ ID NO:11380％一致的序列。

[4472] 实施例E30.实施例E29的多链嵌合多肽,其中人IL-15Rα的寿司域包含与SEQ ID NO:11390％一致的序列。

[4473] 实施例E31.实施例E30的多链嵌合多肽,其中人IL-15Rα的寿司域包含与SEQ ID NO:11395％一致的序列。

[4474] 实施例E32.实施例E31的多链嵌合多肽,其中人IL15Rα的寿司域包含SEQ ID NO:113。

[4475] 实施例E33.实施例E28的多链嵌合多肽,其中人IL-15Rα的寿司域是成熟全长IL-15Rα。

[4476] 实施例E34.实施例E1至E21中任一项的多链嵌合多肽,其中所述亲和域对选自由以下组成的群组:芽胞杆菌核糖核酸酶和芽胞杆菌核糖核酸酶抑制子、PKA和AKAP、基于突变核糖核酸酶I片段的衔接子/对接标签模块,以及基于蛋白质突触蛋白、突触结合蛋白、突触泡蛋白和SNAP25的相互作用的SNARE模块。

[4477] 实施例E35.实施例E1至E34中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是抗原结合域。

[4478] 实施例E36.实施例E35的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域是抗原结合域。

[4479] 实施例E37.实施例E35或E36的多链嵌合多肽,其中抗原结合域包含scFv或单域抗体。

[4480] 实施例E38.实施例E1至E34中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性IL-21或可溶性TGFβRII。

[4481] 实施例E39.实施例E1至E38中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域均特异性结合到IL-21的受体或TGFβRII的配体。

[4482] 实施例E40.实施例E39的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。

[4483] 实施例E41.实施例E40的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域包含相同的氨基酸序列。

[4484] 实施例E42.实施例E1至E38中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域特异性结合到TGFβRII的配体,而第二靶标结合域特异性结合到IL-21的受体。

[4485] 实施例E43.实施例E1至E38中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域特异性结合到IL-21的受体,而第二靶标结合域特异性结合到TGFβRII的配体。

[4486] 实施例E44.实施例E43的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域包含可溶性IL-21。

[4487] 实施例E45.实施例E44的多链嵌合多肽,其中可溶性IL-21是人可溶性IL-21。

[4488] 实施例E46.实施例E45的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-21包含与SEQ ID NO:83至少80%一致的序列。

[4489] 实施例E47.实施例E46的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-21包含与SEQ ID NO:83至少90%一致的序列。

[4490] 实施例E48.实施例E47的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-21包含与SEQ ID NO:83至少95%一致的序列。

[4491] 实施例E49.实施例E48的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-21包含与SEQ ID NO:83的序列。

[4492] 实施例E50.实施例E43至E49中任一项的多链嵌合多肽,其中第二靶标结合域包含可溶性TGFβRII。

[4493] 实施例E51.实施例E50的多链嵌合多肽,其中可溶性TGFβRII是人可溶性TGFβRII。

[4494] 实施例E52.实施例E51的多链嵌合多肽,其中人可溶性TGFβRII包含人可溶性TGFβRII的第一序列和人可溶性TGFβRII的第二序列。

[4495] 实施例E53.实施例E52的多链嵌合多肽,其中人可溶性TGFβRII进一步包含介于人可溶性TGFβRII的第一序列与人可溶性TGFβRII的第二序列之间的接头序列。

[4496] 实施例E54.实施例E53的多链嵌合多肽,其中所述接头序列包含SEQ ID NO:102。

[4497] 实施例E55.实施例E52至E54中任一项的多链嵌合多肽,其中人可溶性TGFβRII的第一序列包含与SEQ ID NO:183至少80%一致的序列。

[4498] 实施例E56.实施例E55的多链嵌合多肽,其中人可溶性TGFβRII的第一序列包含与SEQ ID NO:183至少90%一致的序列。

[4499] 实施例E57.实施例E56的多链嵌合多肽,其中人可溶性TGFβRII的第一序列包含与SEQ ID NO:183至少95%一致的序列。

[4500] 实施例E58.实施例E57的多链嵌合多肽,其中人可溶性TGFβRII的第一序列包含SEQ ID NO:183。

[4501] 实施例E59.实施例E52至E58中任一项的多链嵌合多肽,其中人可溶性TGFβRII的所述第二序列包含与SEQ ID NO:184至少80%一致的序列。

[4502] 实施例E60.根据实施例C59所述的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性TGFβRII的第二序列包含与SEQ ID NO:184至少90%一致的序列。

[4503] 实施例E61.实施例E60的多链嵌合多肽,其中人可溶性TGFβRII的所述第二序列包含与SEQ ID NO:184至少95%一致的序列。

[4504] 实施例E62.实施例E61的多链嵌合多肽,其中人可溶性TGFβRII的第二序列包含SEQ ID NO:184。

[4505] 实施例E63.实施例E1的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:189至少80%一致的序列。

[4506] 实施例E64.实施例E63的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:189

至少80％一致的序列。

[4507] 实施例E65.实施例E64的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:189至少95％一致的序列。

[4508] 实施例E66.实施例E65的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:189。

[4509] 实施例E67.实施例E66的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:191。

[4510] 实施例E68.实施例E1和E63至E67中任一项的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:193至少80％一致的序列。

[4511] 实施例E69.实施例E68的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:193至少90％一致的序列。

[4512] 实施例E70.实施例E69的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:193至少95％一致的序列。

[4513] 实施例E71.实施例E70的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:193。

[4514] 实施例E72.实施例E71的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:195。

[4515] 实施例E73.实施例E1至E62中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包含一个或多个其它靶标结合域,其中所述一个或多个其它抗原结合域中的至少一个定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[4516] 实施例E74.实施例E73的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包括介于可溶性组织因子域与一个或多个其它抗原结合域中的至少一个之间的接头序列,和/或介于一个或多个其它抗原结合域中的至少一个与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4517] 实施例E75.实施例E1至E62中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含一个或多个位于第一嵌合多肽N端和/或C端的其它靶标结合域。

[4518] 实施例E76.实施例E75的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第一嵌合多肽中直接邻接亲和域对中的第一域。

[4519] 实施例E77.实施例E75的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4520] 实施例E78.实施例E75的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域。

[4521] 实施例E79.实施例E75的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与第一靶标结合域之间的接头序列。

[4522] 实施例E80.实施例E75的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个安置于第一嵌合多肽的N端和/或C端,并且一个或多个其它靶标结合域中的至少一个定位于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[4523] 实施例E81.实施例E80的多链嵌合多肽,其中安置于N端的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个其它靶标结合域在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域或亲和域对中的第一域。

[4524] 实施例E82.实施例E80的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含安置于第一嵌合多肽中的至少一个其它靶标结合域与第一靶标结合域或亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4525] 实施例E83.实施例E80的多链嵌合多肽,其中安置于C端的一个或多个其它靶标结

合域中的至少一个其它靶标结合域在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域或亲和域对中的第一域。

[4526] 实施例E84.实施例E80的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含安置于第一嵌合多肽中的至少一个其它靶标结合域与第一靶标结合域或亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4527] 实施例E85.实施例E80的多链嵌合多肽,其中定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个直接邻接可溶性组织因子域和/或亲和域对中的第一域。

[4528] 实施例E86.实施例E80的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含接头序列,所述接头序列安置于(i)可溶性组织因子域与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个之间,所述靶标结合域定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间;和/或(ii)亲和域对中的第一域与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个之间,所述靶标结合域定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[4529] 实施例E87.实施例E1至E62和E73至E86中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含一个或多个位于第二嵌合多肽N端和/或C端的其它靶标结合域。

[4530] 实施例E88.实施例E87的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第二嵌合多肽中直接邻接亲和域对中的第二域。

[4531] 实施例E89.实施例E87的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与亲和域对中的第二域之间的接头序列。

[4532] 实施例E90.实施例E87的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第二嵌合多肽中直接邻接第二靶标结合域。

[4533] 实施例E91.实施例E87的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与第二靶标结合域之间的接头序列。

[4534] 实施例E92.实施例E73至E91中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的抗原。

[4535] 实施例E93.实施例E92的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的表位。

[4536] 实施例E94.实施例E93的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个包含相同的氨基酸序列。

[4537] 实施例E95.实施例E73至E91中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域特异性结合到不同的抗原。

[4538] 实施例E96.实施例E73至E95中任一项的多链嵌合多肽,其中所述一个或多个其它抗原结合域特异性地结合到选自由以下组成的群组的靶标:CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-D、TGF-β受体II(TGF-β

RII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM-1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、IL-1的受体、IL-2的受体、IL-3的受体、IL-7的受体、IL-8的受体、IL-10的受体、IL-12的受体、IL-15的受体、IL-17的受体、IL-18的受体、IL-21的受体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体和CD28的受体。

[4539] 实施例E97.实施例E73至E95中任一项的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域是可溶性白介素或细胞因子蛋白。

[4540] 实施例E98.实施例E97的多链嵌合多肽,其中可溶性白介素、细胞因子或配体蛋白选自由以下组成的群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD、SCF、FLT3L、MICA、MICB,和ULP16结合蛋白。

[4541] 实施例E99.实施例E73至E95中任一项的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域是可溶性白介素或细胞因子受体。

[4542] 实施例E100.实施例E99的多链嵌合多肽,其中可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、可溶性NKG2D、可溶性NKp30、可溶性NKp44、可溶性NKp46、可溶性DNAM1、scMHCI、scMHCII、scTCR、可溶性CD155或可溶性CD28。

[4543] 实施例E101.一种组合物,其包含实施例E1至E100的任一种多链嵌合多肽。

[4544] 实施例E102.实施例E101的组合物,其中所述组合物是医药组合物。

[4545] 实施例E103.一种试剂盒,其包含至少一次剂量的实施例E101或E102的组合物。

[4546] 实施例E104.一种核酸,其编码实施例E1至E100中任一项的任一种多链嵌合多肽。

[4547] 实施例E105.一种载体,其包含实施例E104的核酸。

[4548] 实施例E106.实施例E105的载体,其中所述载体是表达载体。

[4549] 实施例E107.一种细胞,其包含实施例C104的核酸或实施例E105或E106的载体。

[4550] 实施例E108.一种产生多链嵌合多肽的方法,所述方法包含:

[4551] 在足以引起所述多链嵌合多肽产生的条件下、在培养基中培养实施例E107的细胞;和

[4552] 从所述细胞和/或所述培养基中回收所述多链嵌合多肽。

[4553] 实施例E109.一种多链嵌合多肽,其通过实施例E108的方法产生。

[4554] 实施例E110.实施例E12的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少80%一致的序列。

[4555] 实施例E111.实施例E110的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少90%一致的序列。

[4556] 实施例E112.实施例E111的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少95%一致的序列。

[4557] 实施例E113.实施例E112的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97100%一致的序列。

[4558] 实施例E114.实施例E12的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少80%一致的序列。

[4559] 实施例E115.实施例E114的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与

SEQ ID NO:98至少90%一致的序列。

[4560] 实施例E116.实施例E115的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少95%一致的序列。

[4561] 实施例E117.实施例E116的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98100%一致的序列。

[4562] 实施例F1.一种多链嵌合多肽,其包含:

[4563] (c)第一嵌合多肽,其包含:

[4564] (i)第一靶标结合域;

[4565] (ii)可溶性组织因子域;和

[4566] (iii)亲和域对中的第一域;

[4567] (d)第二嵌合多肽,其包含:

[4568] (i)亲和域对中的第二域;和

[4569] (ii)第二靶标结合域,

[4570] 其中:

[4571] 所述第一嵌合多肽和所述第二嵌合多肽通过所述亲和域对中的所述第一域和所述第二域的结合而缔合;

[4572] 所述第一靶标结合域和所述第二靶标结合域各自独立地特异性结合到IL-21的受体或IL-7的受体。

[4573] 实施例F2.实施例F1的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。

[4574] 实施例F3.实施例F1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列。

[4575] 实施例F4.实施例F1至F3中任一项的多链嵌合多肽,其中可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。

[4576] 实施例F5.实施例F1至F3中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4577] 实施例F6.实施例F1至F5中任一项的多链嵌合多肽,其中亲和域对中的第二域与第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。

[4578] 实施例F7.实施例F1至F5中任一项的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列。

[4579] 实施例F8.实施例F1至F7中任一项的多链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域是人可溶性组织因子域。

[4580] 实施例F9.实施例F8的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少80%一致的序列。

[4581] 实施例F10.实施例F9的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少90%一致的序列。

[4582] 实施例F11.实施例F10的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少95%一致的序列。

[4583] 实施例F12.实施例F11的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含SEQ

ID NO:93。

[4584] 实施例F13.实施例F8的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少80%一致的序列。

[4585] 实施例F14.实施例F13的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少90%一致的序列。

[4586] 实施例F15.实施例F14的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ IDNO:97至少95%一致的序列。

[4587] 实施例F16.实施例F15的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含SEQ ID NO:97。

[4588] 实施例F17.实施例F8的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少80%一致的序列。

[4589] 实施例F18.实施例F17的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少90%一致的序列。

[4590] 实施例F19.实施例F18的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少95%一致的序列。

[4591] 实施例F20.实施例F19的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含SEQ ID NO:98。

[4592] 实施例F21.实施例F8至F11、F13至F15和F17至F19中任一项的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域不包含以下中的一种或多种:

[4593] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;

[4594] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;

[4595] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;

[4596] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;

[4597] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;

[4598] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[4599] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[4600] 实施例F22.实施例F21的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域不包含以下中的任一种:

[4601] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;

[4602] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;

[4603] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;

[4604] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;

[4605] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;

[4606] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[4607] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[4608] 实施例F23.实施例F1至F22中任一项的多链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域不能结合到因子VIIa。

[4609] 实施例F24.实施例F1至F23中任一项的多链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域不将非活性因子X转化为因子Xa。

[4610] 实施例F25.实施例F1至F24中任一项的多链嵌合多肽,其中所述多链嵌合多肽不刺激哺乳动物的血液凝结。

[4611] 实施例F26.实施例F1至F25中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包含位于第一嵌合多肽N端或C端的肽标签。

[4612] 实施例F27.实施例F1至F26中任一项的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽进一步包含位于第二嵌合多肽N端或C端的肽标签。

[4613] 实施例F28.实施例F1至F27中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽和/或第二嵌合多肽进一步包含位于其N端的信号序列。

[4614] 实施例F29.实施例F28的多链嵌合多肽,其中所述信号序列包含SEQ ID NO:117。

[4615] 实施例F30.实施例F28的多链嵌合多肽,其中所述信号序列是SEQ ID NO:328。

[4616] 实施例F31.实施例F1至F30中任一项的多链嵌合多肽,其中所述亲和域对是来自人IL-15受体α链(IL-15Rα)的寿司域和可溶性IL-15。

[4617] 实施例F32.实施例F31的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15具有D8N或D8A氨基酸取代。

[4618] 实施例F33.实施例F31的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15包含与SEQ ID NO:82至少80%一致的序列。

[4619] 实施例F34.实施例F33的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15包含与SEQ ID NO:82至少90%一致的序列。

[4620] 实施例F35.实施例F34的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15包含与SEQ ID NO:82至少95%一致的序列。

[4621] 实施例F36.实施例F35的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15包含SEQ ID NO:82。

[4622] 实施例F37.实施例F31至F36中任一项的多链嵌合多肽,其中IL-15Rα的寿司域包含来自人IL-15Rα的寿司域。

[4623] 实施例F38.实施例F37的多链嵌合多肽,其中人IL-15Rα的寿司域包含与SEQ ID NO:113至少80%一致的序列。

[4624] 实施例F39.实施例F38的多链嵌合多肽,其中人IL-15Rα的寿司域包含与SEQ ID NO:113至少90%一致的序列。

[4625] 实施例F40.实施例F39的多链嵌合多肽,其中人IL-15Rα的寿司域包含与SEQ ID NO:113至少95%一致的序列。

[4626] 实施例F41.实施例F40的多链嵌合多肽,其中人IL15Rα的寿司域包含SEQ ID NO:

113。

[4627] 实施例F42.实施例F37的多链嵌合多肽,其中人IL-15Rα的寿司域是成熟全长IL-15Rα。

[4628] 实施例F43.实施例F1至F30中任一项的多链嵌合多肽,其中所述亲和域对选自由以下组成的群组:芽胞杆菌核糖核酸酶和芽胞杆菌核糖核酸酶抑制子、PKA和AKAP、基于突变核糖核酸酶I片段的衔接子/对接标签模块,以及基于蛋白质突触蛋白、突触结合蛋白、突触泡蛋白和SNAP25的相互作用的SNARE模块。

[4629] 实施例F44.实施例F1至F43中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是激动性抗原结合域。

[4630] 实施例F45.实施例F44的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域各自是激动性抗原结合域。

[4631] 实施例F46.实施例F44或F45的多链嵌合多肽,其中抗原结合域包含scFv或单域抗体。

[4632] 实施例F47.实施例F1至F43中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性IL-21或可溶性IL-7。

[4633] 实施例F48.实施例F47的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地是可溶性IL-21或可溶性IL-7。

[4634] 实施例F49.实施例F1至F48中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域均特异性结合到IL-21的受体或IL-7的受体。

[4635] 实施例F50.实施例F49的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。

[4636] 实施例F51.实施例F50的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域包含相同的氨基酸序列。

[4637] 实施例F52.实施例F1至F48中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域特异性结合到IL-12的受体,而第二靶标结合域特异性结合到IL-7的受体。

[4638] 实施例F53.实施例F1至F48中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域特异性结合到IL-7的受体,而第二靶标结合域特异性结合到IL-21的受体。

[4639] 实施例F54.实施例F53的多链嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域包含可溶性IL-21。

[4640] 实施例F55.实施例F54的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-21是人可溶性IL-21。

[4641] 实施例F56.实施例F55的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-21包含与SEQ ID NO:83至少80%一致的序列。

[4642] 实施例F57.实施例F56的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-21包含与SEQ ID NO:83至少90%一致的序列。

[4643] 实施例F58.实施例F57的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-21包含与SEQ ID NO:83至少95%一致的序列。

[4644] 实施例F59.实施例F58的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-21包含SEQ ID NO:83的序列。

[4645] 实施例F60.实施例F53至F59中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域

包含可溶性IL-7。

[4646] 实施例F61.实施例D60的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-7是人可溶性IL-7。

[4647] 实施例F62.实施例F61的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-7包含与SEQ ID NO:79至少80%一致的序列。

[4648] 实施例F63.实施例F62的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-7包含与SEQ ID NO:79至少90%一致的序列。

[4649] 实施例F64.实施例F63的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-7包含与SEQ ID NO:79至少95%一致的序列。

[4650] 实施例F65.实施例F64的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性IL-7包含SEQ ID NO:79的序列。

[4651] 实施例F66.实施例F1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少80%一致的序列。

[4652] 实施例F67.实施例F66的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少90%一致的序列。

[4653] 实施例F68.实施例F67的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少95%一致的序列。

[4654] 实施例F69.实施例F68的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:207。

[4655] 实施例F70.实施例F69的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:209。

[4656] 实施例F71.实施例F1和F66至F70中任一项的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:211至少80%一致的序列。

[4657] 实施例F72.实施例F71的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:211至少90%一致的序列。

[4658] 实施例F73.实施例F72的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:211至少95%一致的序列。

[4659] 实施例F74.实施例F73的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:211。

[4660] 实施例F75.实施例F74的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:213。

[4661] 实施例F76.实施例F1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:199至少80%一致的序列。

[4662] 实施例F77.实施例F76的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:199至少90%一致的序列。

[4663] 实施例F78.实施例F77的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:199至少95%一致的序列。

[4664] 实施例F79.实施例F68的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:199。

[4665] 实施例F80.实施例F69的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:

201。

[4666] 实施例F81.实施例F1和F76至F80中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:203至少80%一致的序列。

[4667] 实施例F82.实施例F81的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:203至少90%一致的序列。

[4668] 实施例F83.实施例F82的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:203至少95%一致的序列。

[4669] 实施例F84.实施例F83的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:203。

[4670] 实施例F85.实施例F84的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:209。

[4671] 实施例F86.实施例F1至F65中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包含一个或多个其它靶标结合域,其中所述一个或多个其它抗原结合域中的至少一个定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[4672] 实施例F87.实施例F86的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包括介于可溶性组织因子域与一个或多个其它抗原结合域中的至少一个之间的接头序列,和/或介于一个或多个其它抗原结合域中的至少一个与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4673] 实施例F88.实施例F1至F65中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含一个或多个位于第一嵌合多肽N端和/或C端的其它靶标结合域。

[4674] 实施例F89.实施例F88的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第一嵌合多肽中直接邻接亲和域对中的第一域。

[4675] 实施例F90.实施例F88的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4676] 实施例F91.实施例F88的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域。

[4677] 实施例F92.实施例F88的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与第一靶标结合域之间的接头序列。

[4678] 实施例F93.实施例F88的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个安置于第一嵌合多肽的N端和/或C端,并且一个或多个其它靶标结合域中的至少一个定位于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[4679] 实施例F94.实施例F93的多链嵌合多肽,其中安置于N端的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个其它靶标结合域在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域或亲和域对中的第一域。

[4680] 实施例F95.实施例F93的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含安置于第一嵌合多肽中的至少一个其它靶标结合域与第一靶标结合域或亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4681] 实施例F96.实施例F93的多链嵌合多肽,其中安置于C端的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个其它靶标结合域在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域或亲和域对中的第一域。

[4682] 实施例F97.实施例F93的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含安置于第一嵌合多肽中的至少一个其它靶标结合域与第一靶标结合域或亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4683] 实施例F98.实施例F93的多链嵌合多肽,其中定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个直接邻接可溶性组织因子域和/或亲和域对中的第一域。

[4684] 实施例F99.实施例F93的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含接头序列,所述接头序列安置于(i)可溶性组织因子域与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个之间,所述靶标结合域定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间;和/或(ii)亲和域对中的第一域与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个之间,所述靶标结合域定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[4685] 实施例F100.实施例F1至F65和F86至F99中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含一个或多个位于第二嵌合多肽N端和/或C端的其它靶标结合域。

[4686] 实施例F101.实施例F100的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第二嵌合多肽中直接邻接亲和域对中的第二域。

[4687] 实施例F102.实施例F100的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与亲和域对中的第二域之间的接头序列。

[4688] 实施例F103.实施例F100的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第二嵌合多肽中直接邻接第二靶标结合域。

[4689] 实施例F104.实施例F100的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与第二靶标结合域之间的接头序列。

[4690] 实施例F105.实施例F86至F104中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的抗原。

[4691] 实施例F106.实施例F105的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的表位。

[4692] 实施例F107.实施例F106的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个包含相同的氨基酸序列。

[4693] 实施例F108.实施例F86至F104中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域特异性结合到不同的抗原。

[4694] 实施例F109.实施例F86至F108中任一项的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它抗原结合域特异性地结合到选自由以下组成的群组的靶标:CD16a、CD28、CD3、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM-1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、

NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、IL-1的受体、IL-2的受体、IL-3的受体、IL-7的受体、IL-8的受体、IL-10的受体、IL-12的受体、IL-15的受体、IL-17的受体、IL-18的受体、IL-21的受体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体和CD28的受体。

[4695] 实施例F110.实施例F86至F108中任一项的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域是可溶性白介素或细胞因子蛋白。

[4696] 实施例F111.实施例F110的多链嵌合多肽,其中可溶性白介素、细胞因子或配体蛋白选自由以下组成的群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD、SCF、FLT3L、MICA、MICB,和ULP16结合蛋白。

[4697] 实施例F112.实施例F86至F108中任一项的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域是可溶性白介素或细胞因子受体。

[4698] 实施例F113.实施例F112的多链嵌合多肽,其中可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、可溶性NKG2D、可溶性NKp30、可溶性NKp44、可溶性NKp46、可溶性DNAM1、scMHCI、scMHCII、scTCR、可溶性CD155、可溶性CD122,或可溶性CD28。

[4699] 实施例F114.一种组合物,其包含实施例F1至F113的任一种多链嵌合多肽。

[4700] 实施例F115.实施例F114的组合物,其中所述组合物是医药组合物。

[4701] 实施例F116.一种试剂盒,其包含至少一次剂量的实施例F114或F115的组合物。

[4702] 实施例F117.一种核酸,其编码实施例F1至F113中任一项的任一种多链嵌合多肽。

[4703] 实施例F118.一种载体,其包含实施例F117的核酸。

[4704] 实施例F119.实施例F118的载体,其中所述载体是表达载体。

[4705] 实施例F120.一种细胞,其包含实施例F117的核酸或实施例F118或F119的载体。

[4706] 实施例F121.一种产生多链嵌合多肽的方法,所述方法包含:

[4707] 在足以引起所述多链嵌合多肽产生的条件下、在培养基中培养实施例F120的细胞;和

[4708] 从所述细胞和/或所述培养基中回收所述多链嵌合多肽。

[4709] 实施例F122.一种多链嵌合多肽,其通过实施例F121的方法产生。

[4710] 实施例G1.一种多链嵌合多肽,其包含:

[4711] (a)第一嵌合多肽,其包含:

[4712] (i)第一靶标结合域;

[4713] (ii)可溶性组织因子域;和

[4714] (iii)亲和域对中的第一域;

[4715] (b)第二嵌合多肽,其包含:

[4716] (i)亲和域对中的第二域;和

[4717] (ii)第二靶标结合域,

[4718] 其中:

[4719] 所述第一嵌合多肽和所述第二嵌合多肽通过所述亲和域对中的所述第一域和所述第二域的结合而缔合;和

[4720] 所述第一靶标结合域和所述第二靶标结合域各自独立地特异性结合到:IL-7的受

体、CD16、IL-21的受体、TGF-β或CD137L的受体。

[4721] 实施例G2.实施例G1的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。

[4722] 实施例G3.实施例G1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列。

[4723] 实施例G4.实施例G1至G3中任一项的多链嵌合多肽,其中可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。

[4724] 实施例G5.实施例G1至G3中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4725] 实施例G6.实施例G1至G5中任一项的多链嵌合多肽,其中亲和域对中的第二域与第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。

[4726] 实施例G7.实施例G1至G5中任一项的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列。

[4727] 实施例G8.实施例G1至G7中任一项的多链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域是人可溶性组织因子域。

[4728] 实施例G9.实施例G8的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少80%一致的序列。

[4729] 实施例G10.实施例G9的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少90%一致的序列。

[4730] 实施例G11.实施例G10的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少95%一致的序列。

[4731] 实施例G12.实施例G8至G11中任一项的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域不包含以下中的一种或多种:

[4732] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;

[4733] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;

[4734] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;

[4735] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;

[4736] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;

[4737] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[4738] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[4739] 实施例G13.实施例G12的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域不包含以下中的任一种:

[4740] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;

[4741] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;

[4742] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸；

[4743] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸；

[4744] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸；

[4745] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[4746] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[4747] 实施例G14.实施例G1至G13中任一项的多链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域不能结合到因子VIIa。

[4748] 实施例G15.实施例G1至G14中任一项的多链嵌合多肽,其中所述可溶性组织因子域不将非活性因子X转化为因子Xa。

[4749] 实施例G16.实施例G1至G15中任一项的多链嵌合多肽,其中所述多链嵌合多肽不刺激哺乳动物的血液凝结。

[4750] 实施例G17.实施例G1至G16中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包含位于第一嵌合多肽N端或C端的肽标签。

[4751] 实施例G18.实施例G1至G17中任一项的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽进一步包含位于第二嵌合多肽N端或C端的肽标签。

[4752] 实施例G19.实施例G1至G18中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽和/或第二嵌合多肽进一步包含位于其N端的信号序列。

[4753] 实施例G20.实施例G19的多链嵌合多肽,其中所述信号序列包含SEQ ID NO:117。

[4754] 实施例G21.实施例G20的多链嵌合多肽,其中所述信号序列是SEQ ID NO:117。

[4755] 实施例G22.实施例G1至G21中任一项的多链嵌合多肽,其中所述亲和域对是来自人IL-15受体α链(IL-15Rα)的寿司域和可溶性IL-15。

[4756] 实施例G23.实施例G22的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15具有D8N或D8A氨基酸取代。

[4757] 实施例G24.实施例G22的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15包含与SEQ ID NO:8280％一致的序列。

[4758] 实施例G25.实施例G24的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15包含与SEQ ID NO:8290％一致的序列。

[4759] 实施例G26.实施例G25的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15包含与SEQ ID NO:82至少95％一致的序列。

[4760] 实施例G27.实施例G26的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-15包含SEQ ID NO:82。

[4761] 实施例G28.实施例G22至G27中任一项的多链嵌合多肽,其中IL-15Rα的寿司域包含来自人IL-15Rα的寿司域。

[4762] 实施例G29.实施例G28的多链嵌合多肽,其中来自人IL15Rα的寿司域包含与SEQ ID NO:11380％一致的序列。

[4763] 实施例G30.实施例G29的多链嵌合多肽,其中人IL-15Rα的寿司域包含与SEQ ID

NO:11390％一致的序列。

[4764] 实施例G31.实施例G30的多链嵌合多肽,其中人IL-15Rα的寿司域包含与SEQ ID NO:11395％一致的序列。

[4765] 实施例G32.实施例G31的多链嵌合多肽,其中人IL-15Rα的寿司域包含SEQ ID NO:113。

[4766] 实施例G33.实施例G28的多链嵌合多肽,其中人IL-15Rα的寿司域是成熟全长IL-15Rα。

[4767] 实施例G34.实施例G1至G21中任一项的多链嵌合多肽,其中所述亲和域对选自由以下组成的群组:芽胞杆菌核糖核酸酶和芽胞杆菌核糖核酸酶抑制子、PKA和AKAP、基于突变核糖核酸酶I片段的衔接子/对接标签模块,以及基于蛋白质突触蛋白、突触结合蛋白、突触泡蛋白和SNAP25的相互作用的SNARE模块。

[4768] 实施例G35.实施例G1至G34中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到IL-7的受体、CD16或IL-21的受体。

[4769] 实施例G36.实施例G35的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域特异性结合到IL-7受体,而第二靶标结合域特异性结合到CD16或IL-21受体。

[4770] 实施例G37.实施例G36的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域包含可溶性IL-7蛋白。

[4771] 实施例G38.实施例G37的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-7蛋白是人可溶性IL-7。

[4772] 实施例G39.实施例G36至G38中任一项的多链嵌合多肽,其中第二抗原结合域包含特异性结合到CD16的抗原结合域。

[4773] 实施例G40.实施例G39的多链嵌合多肽,其中第二抗原结合域包含特异性结合到CD16的scFv。

[4774] 实施例G41.实施例G36至G38中任一项的多链嵌合多肽,其中第二抗原结合域特异性结合到IL-21的受体。

[4775] 实施例G42.实施例G41的多链嵌合多肽,其中第二抗原结合域包含可溶性IL-21。

[4776] 实施例G43.实施例G42的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-21是人可溶性IL-21。

[4777] 实施例G44.实施例G36至G40中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含特异性结合到IL-21的受体的其它靶标结合域。

[4778] 实施例G45.实施例G44的多链嵌合多肽,其中其它靶标结合域包含可溶性IL-21。

[4779] 实施例G46.实施例G45的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-21是人可溶性IL-12。

[4780] 实施例G47.实施例G1至G34中任一项的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域各自独立地特异性结合到TGF-β、CD16,或IL-21的受体。

[4781] 实施例G48.实施例G47的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域特异性结合到TGF-β,而第二靶标结合域特异性结合到CD16或IL-21受体。

[4782] 实施例G49.实施例G48的多特异性嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域是可溶性TGF-β受体。

[4783] 实施例G50.实施例G49的多特异性嵌合多肽,其中可溶性TGF-β受体是可溶性TGFβRII受体。

[4784] 实施例G51.实施例G48至G50中任一项的多特异性嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域特异性结合到CD16。

[4785] 实施例G52.实施例G51的多特异性嵌合多肽,其中所述第二抗原结合域包含特异性结合到CD16的抗原结合域。

[4786] 实施例G53.实施例G52的多链嵌合多肽,其中所述第二抗原结合域包含特异性结合到CD16的scFv。

[4787] 实施例G54.实施例G48至G50中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域特异性结合到IL-21的受体。

[4788] 实施例G55.实施例G54的多链嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域包含可溶性IL-21。

[4789] 实施例G56.实施例G55的多链嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域包含人可溶性IL-21。

[4790] 实施例G57.实施例G48至G53中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含特异性结合到IL-21的受体的其它靶标结合域。

[4791] 实施例G58.实施例G57的多链嵌合多肽,其中所述其它靶标结合域包含可溶性IL-21。

[4792] 实施例G59.实施例G58的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-21是人可溶性IL-21。

[4793] 实施例G60.实施例G1至G34中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域和所述第二靶标结合域各自独立地特异性结合到IL-7的受体。

[4794] 实施例G61.实施例G60的多链嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域和所述第二靶标结合域包括可溶性IL-7。

[4795] 实施例G62.实施例G61的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-7是人可溶性IL-7。

[4796] 实施例G63.实施例G1至G34中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域和所述第二靶标结合域各自独立地特异性结合到TGF-β。

[4797] 实施例G64.实施例G63的多特异性嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域和所述第二靶标结合域是可溶性TGF-β受体。

[4798] 实施例G65.实施例G64的多特异性嵌合多肽,其中所述可溶性TGF-β受体是可溶性TGFβRII受体。

[4799] 实施例G66.实施例G1至G34中任一项的多特异性嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域和所述第二靶标结合域各自独立地特异性结合到IL-7的受体、IL-21的受体或CD137L的受体。

[4800] 实施例G67.实施例G66的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域特异性结合到IL-7的受体,而第二靶标结合域特异性结合到IL-21的受体或CD137L的受体。

[4801] 实施例G68.实施例G67的多特异性嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域是可溶性IL-7。

[4802] 实施例G69.实施例G68的多特异性嵌合多肽,其中所述可溶性IL-7是人可溶性IL-7。

[4803] 实施例G70.实施例G67至G69中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域特异性结合到IL-21的受体。

[4804] 实施例G71.实施例G70的多链嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域是可溶性IL-21。

[4805] 实施例G72.实施例E71所述的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-21是人可溶性IL-21。

[4806] 实施例G73.实施例G67至G69中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二抗原结合域特异性结合到CD137L的受体。

[4807] 实施例G74.实施例G73的多链嵌合多肽,其中所述第二抗原结合域是可溶性CD137L。

[4808] 实施例G75.实施例G74的多链嵌合多肽,其中所述可溶性CD137L是人可溶性CD137L。

[4809] 实施例G76.实施例G67至G72中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含特异性结合到CD137L的受体的其它靶标结合域。

[4810] 实施例G77.实施例G76的多链嵌合多肽,其中所述其它靶标结合域包含可溶性CD137L。

[4811] 实施例G78.实施例G77的多链嵌合多肽,其中所述可溶性CD137L是人可溶性CD137L。

[4812] 实施例G79.实施例G1至G34中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域和所述第二靶标结合域各自独立地特异性结合到IL-7的受体或TGF-β。

[4813] 实施例G80.实施例G79的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域特异性结合到受体IL-7,而第二靶标结合域特异性结合到TGF-β。

[4814] 实施例G81.实施例G80的多链嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域包含可溶性IL-7蛋白。

[4815] 实施例G82.实施例G81的多链嵌合多肽,其中所述可溶性IL-7蛋白是人可溶性IL-7。

[4816] 实施例G83.实施例G80至G82中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二抗原结合域包含特异性结合到TGF-β的抗原结合域。

[4817] 实施例G84.实施例G83的多特异性嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域是可溶性TGF-β受体。

[4818] 实施例G85.实施例G84的多特异性嵌合多肽,其中所述可溶性TGF-β受体是可溶性TGFβRII受体。

[4819] 实施例G86.实施例G1至G34中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域和所述第二靶向结合域各自独立地特异性结合到TGF-β、IL-21的受体或CD137L的受体。

[4820] 实施例G87.实施例G86的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域特异性结合到TGF-β,而第二靶标结合域特异性结合到IL-21的受体或CD137L的受体。

[4821] 实施例G88.实施例G87的多特异性嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域是可溶性TGF-β受体。

[4822] 实施例G89.实施例G88的多特异性嵌合多肽,其中所述可溶性TGF-β受体是可溶性TGFβRII受体。

[4823] 实施例G90.实施例G87至G89中任一项的多特异性嵌合多肽,其中所述第二靶标结

合域特异性结合到IL-21的受体。

[4824] 实施例G91.实施例G90的多链嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域包含可溶性IL-21。

[4825] 实施例G92.实施例G91•的多链嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域包含人可溶性IL-21。

[4826] 实施例G93.实施例G87至G89中任一项的多特异性嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域特异性结合到CD137L的受体。

[4827] 实施例G94.实施例G93•的多链嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域包含可溶性CD137L。

[4828] 实施例G95.实施例G94•的多链嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域包含人可溶性CD137L。

[4829] 实施例G96.实施例G87至G92中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含特异性结合到CD137L的受体的其它靶标结合域。

[4830] 实施例G97.实施例G96•的多链嵌合多肽,其中所述其它靶标结合域包含可溶性CD137L。

[4831] 实施例G98.实施例G97•的多链嵌合多肽,其中所述可溶性CD137L是人可溶性CD137L。

[4832] 实施例G99.实施例G1至G34中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域和所述第二靶标结合域各自独立地特异性结合到TGF-β或IL-21的受体。

[4833] 实施例G100.实施例G99的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域特异性结合到TGF-β,而第二靶标结合域特异性结合到TGF-β或IL-21的受体。

[4834] 实施例G101.实施例G100•的多特异性嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域是可溶性TGF-β受体。

[4835] 实施例G102.实施例G101•的多特异性嵌合多肽,其中所述可溶性TGF-β受体是可溶性TGFβRII受体。

[4836] 实施例G103.实施例G100至G102中任一项的多特异性嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域特异性结合到IL-21的受体。

[4837] 实施例G104.实施例G103的多链嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域包含可溶性IL-21。

[4838] 实施例G105.实施例G104•的多链嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域包含人可溶性IL-21。

[4839] 实施例G106.实施例G100至G102中任一项的多特异性嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域特异性结合到TGF-β。

[4840] 实施例G107.实施例G106的多特异性嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域是可溶性TGF-β受体。

[4841] 实施例G108.实施例G107的多特异性嵌合多肽,其中所述可溶性TGF-β受体是可溶性TGFβRII受体。

[4842] 实施例G109.实施例G100至G105中任一项的多特异性嵌合多肽,其中第二多肽进一步包含特异性结合到TGF-β的其它靶标结合域。

[4843] 实施例G110.实施例G109的多特异性嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域是可溶性TGF-β受体。

[4844] 实施例G111.实施例G110的多特异性嵌合多肽,其中所述可溶性TGF-β受体是可溶性TGFβRII受体。

[4845] 实施例G112.实施例G1至G34中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域和所述第二靶向结合域各自独立地特异性结合到TGF-β或IL-16。

[4846] 实施例G113.实施例G112的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域特异性结合到TGF-β,而第二靶标结合域特异性结合到TGF-β或IL-16。

[4847] 实施例E322.实施例E122所述的多特异性嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域是可溶性TGF-β受体。

[4848] 实施例E322.实施例G114的多特异性嵌合多肽,其中所述可溶性TGF-β受体是可溶性TGFβRII受体。

[4849] 实施例G116.实施例G113至G115中任一项的多特异性嵌合多肽,其中第二靶标结合域特异性结合到IL-16。

[4850] 实施例G117.实施例G116的多特异性嵌合多肽,其中第二抗原结合域包含特异性结合到CD16的抗原结合域。

[4851] 实施例G118.实施例G117的多链嵌合多肽,其中第二抗原结合域包含特异性结合到CD16的scFv。

[4852] 实施例G119.实施例G113至G115中任一项的多特异性嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域特异性结合到TGF-β。

[4853] 实施例G120.实施例G119的多特异性嵌合多肽,其中第一靶标结合域是可溶性TGF-β受体。

[4854] 实施例G121.实施例G120的多特异性嵌合多肽,其中所述可溶性TGF-β受体是可溶性TGFβRII受体。

[4855] 实施例G122.实施例G113至G118中任一项的多特异性嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含特异性结合到TGF-β的其它靶标结合域。

[4856] 实施例G123.实施例G122的多特异性嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域是可溶性TGF-β受体。

[4857] 实施例G124.实施例G123的多特异性嵌合多肽,其中所述可溶性TGF-β受体是可溶性TGFβRII受体。

[4858] 实施例G125.实施例G1至G34中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域和所述第二靶标结合域各自独立地特异性结合到TGF-β或CD137L的受体。

[4859] 实施例G126.实施例G125的多链嵌合多肽,其中第一靶标结合域特异性结合到TGF-β,而第二靶标结合域特异性结合到CD137L的受体。

[4860] 实施例G127.实施例G126的多特异性嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域是可溶性TGF-β受体。

[4861] 实施例G128.实施例G127的多特异性嵌合多肽,其中所述可溶性TGF-β受体是可溶性TGFβRII受体。

[4862] 实施例G129.实施例G128的多链嵌合多肽,其中所述第二靶标结合域包含可溶性

CD137L蛋白。

[4863] 实施例G130.实施例G129的多链嵌合多肽,其中所述可溶性CD137L蛋白是人可溶性CD137L。

[4864] 实施例G131.实施例G126至G130中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含特异性结合到TGF-β的其它靶标结合域。

[4865] 实施例G132.实施例G131的多特异性嵌合多肽,其中所述其它靶标结合域是可溶性TGF-β受体。

[4866] 实施例G133.实施例G132的多特异性嵌合多肽,其中所述可溶性TGF-β受体是可溶性TGFβRII受体。

[4867] 实施例G134.实施例G1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少80%一致的序列。

[4868] 实施例G135.实施例G134的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少90%一致的序列。

[4869] 实施例G136.实施例G135的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少95%一致的序列。

[4870] 实施例G137.实施例G136的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:207。

[4871] 实施例G138.实施例G137的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:209。

[4872] 实施例G139.实施例G1和G134至G138中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:232至少80%一致的序列。

[4873] 实施例G140.实施例G139的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:232至少90%一致的序列。

[4874] 实施例G141.实施例G140的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:232至少95%一致的序列。

[4875] 实施例G142.实施例G141的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:232。

[4876] 实施例G143.实施例G142的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:234。

[4877] 实施例G144.实施例G1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少80%一致的序列。

[4878] 实施例G145.实施例G144的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少90%一致的序列。

[4879] 实施例G146.实施例G145的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少95%一致的序列。

[4880] 实施例G147.实施例G146的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:236。

[4881] 实施例G148.实施例G147的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:238。

[4882] 实施例G149.实施例G1和G144至G148中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:232至少80%一致的序列。

[4883] 实施例G150.实施例G149的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:232至少90%一致的序列。

[4884] 实施例G151.实施例G150的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:232至少95%一致的序列。

[4885] 实施例G152.实施例G151的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:232。

[4886] 实施例G153.实施例G152的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:234。

[4887] 实施例G154.实施例G1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少80%一致的序列。

[4888] 实施例G155.实施例G154的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少90%一致的序列。

[4889] 实施例G156.实施例G155的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少95%一致的序列。

[4890] 实施例G157.实施例G156的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:207。

[4891] 实施例G158.实施例G157的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:209。

[4892] 实施例G159.实施例G1和G154至G158中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:203至少80%一致的序列。

[4893] 实施例G160.实施例G159的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:203至少90%一致的序列。

[4894] 实施例G161.实施例G160的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:203至少95%一致的序列。

[4895] 实施例G162.实施例G161的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:203。

[4896] 实施例G163.实施例G162的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:250。

[4897] 实施例G164.实施例G1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少80%一致的序列。

[4898] 实施例G165.实施例G164的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少90%一致的序列。

[4899] 实施例G166.实施例G165的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少95%一致的序列。

[4900] 实施例G167.实施例G166的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:236。

[4901] 实施例G168.实施例G167的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID

NO:238。

[4902] 实施例G169.实施例G1和G164至G168中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:193至少80%一致的序列。

[4903] 实施例G170.实施例G169的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:193至少90%一致的序列。

[4904] 实施例G171.实施例G170的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:193至少95%一致的序列。

[4905] 实施例G172.实施例G171的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:193。

[4906] 实施例G173.实施例G172的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:195。

[4907] 实施例G174.实施例G1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少80%一致的序列。

[4908] 实施例G175.实施例G174的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少90%一致的序列。

[4909] 实施例G176.实施例G175的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少95%一致的序列。

[4910] 实施例G177.实施例G176的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:207。

[4911] 实施例G178.实施例G177的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:209。

[4912] 实施例G179.实施例G1和G174至G178中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:268至少80%一致的序列。

[4913] 实施例G180.实施例G179的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:268至少90%一致的序列。

[4914] 实施例G181.实施例G180的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:268至少95%一致的序列。

[4915] 实施例G182.实施例G181的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:268。

[4916] 实施例G183.实施例G182的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:270。

[4917] 实施例G184.实施例G1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少80%一致的序列。

[4918] 实施例G185.实施例G184的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少90%一致的序列。

[4919] 实施例G186.实施例G185的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少95%一致的序列。

[4920] 实施例G187.实施例G186的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:207。

[4921] 实施例G188.实施例G187的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:209。

[4922] 实施例G189.实施例G1和G184至G188中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:272至少80%一致的序列。

[4923] 实施例G190.实施例G189的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:272至少90%一致的序列。

[4924] 实施例G191.实施例G190的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:272至少95%一致的序列。

[4925] 实施例G192.实施例G191的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:272。

[4926] 实施例G193.实施例G192的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:272。

[4927] 实施例G194.实施例G1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少80%一致的序列。

[4928] 实施例G195.实施例G194的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少90%一致的序列。

[4929] 实施例G196.实施例G195的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:207至少95%一致的序列。

[4930] 实施例G197.实施例G196的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:207。

[4931] 实施例G198.实施例G197的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:209。

[4932] 实施例G199.实施例G1和G194至G198中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:193至少80%一致的序列。

[4933] 实施例G200.实施例G199的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:193至少90%一致的序列。

[4934] 实施例G201.实施例G200的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:193至少95%一致的序列。

[4935] 实施例G202.实施例G201的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:193。

[4936] 实施例G203.实施例G202的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:195。

[4937] 实施例G204.实施例G1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少80%一致的序列。

[4938] 实施例G205.实施例G204的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少90%一致的序列。

[4939] 实施例G206.实施例G205的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少95%一致的序列。

[4940] 实施例G207.实施例G206的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID

NO:236。

[4941] 实施例G208.实施例G207的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:238。

[4942] 实施例G209.实施例G1和G204至G208中任一项的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:268至少80%一致的序列。

[4943] 实施例G210.实施例G209的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:268至少90%一致的序列。

[4944] 实施例G211.实施例G210的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:268至少95%一致的序列。

[4945] 实施例G212.实施例G211的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:268。

[4946] 实施例G213.实施例G212的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:270。

[4947] 实施例G214.实施例G1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少80%一致的序列。

[4948] 实施例G215.实施例G214的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少90%一致的序列。

[4949] 实施例G216.实施例G215的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少95%一致的序列。

[4950] 实施例G217.实施例G216的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:236。

[4951] 实施例G218.实施例G217的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:238。

[4952] 实施例G219.实施例G1和G214至G218中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:300至少80%一致的序列。

[4953] 实施例G220.实施例G219的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:300至少90%一致的序列。

[4954] 实施例G221.实施例G220的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:300至少95%一致的序列。

[4955] 实施例G222.实施例G221的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:300。

[4956] 实施例G223.实施例G222的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:302。

[4957] 实施例G224.实施例G1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少80%一致的序列。

[4958] 实施例G225.实施例G224的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少90%一致的序列。

[4959] 实施例G226.实施例G225的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少95%一致的序列。

[4960] 实施例G227.实施例G226的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:236。

[4961] 实施例G228.实施例G227的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:238。

[4962] 实施例G229.实施例G1和G224至G228中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:308至少80%一致的序列。

[4963] 实施例G230.实施例G229的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:308至少90%一致的序列。

[4964] 实施例G231.实施例G230的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:308至少95%一致的序列。

[4965] 实施例G232.实施例G231的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:308。

[4966] 实施例G233.实施例G232的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:310。

[4967] 实施例G234.实施例G1的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少80%一致的序列。

[4968] 实施例G235.实施例G234的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少90%一致的序列。

[4969] 实施例G236.实施例G235的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含与SEQ ID NO:236至少95%一致的序列。

[4970] 实施例G237.实施例G236的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:236。

[4971] 实施例G238.实施例G237的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含SEQ ID NO:238。

[4972] 实施例G239.实施例G1和G234至G238中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:316至少80%一致的序列。

[4973] 实施例G240.实施例G239的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:316至少90%一致的序列。

[4974] 实施例G241.实施例G240的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含与SEQ ID NO:316至少95%一致的序列。

[4975] 实施例G242.实施例G241的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:316。

[4976] 实施例G243.实施例G242的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽包含SEQ ID NO:318。

[4977] 实施例G244.实施例G1至G133中任一项的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包含一个或多个其它靶标结合域,其中一个或多个其它抗原结合域中的至少一个定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[4978] 实施例G245.实施例G244的多链嵌合多肽,其中第一嵌合多肽进一步包括介于可溶性组织因子域与一个或多个其它抗原结合域中的至少一个之间的接头序列,和/或介于

一个或多个其它抗原结合域中的至少一个与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4979] 实施例G246.实施例G1至G133中任一项的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含一个或多个位于第一嵌合多肽N端和/或C端的其它靶标结合域。

[4980] 实施例G247.实施例G246的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第一嵌合多肽中直接邻接亲和域对中的第一域。

[4981] 实施例G248.实施例G246的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4982] 实施例G249.实施例G246的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域。

[4983] 实施例G250.实施例G246的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与第一靶标结合域之间的接头序列。

[4984] 实施例G251.实施例G246的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个安置于第一嵌合多肽的N端和/或C端,并且一个或多个其它靶标结合域中的至少一个定位于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[4985] 实施例G252.实施例G251的多链嵌合多肽,其中安置于N端的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个其它靶标结合域在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域或亲和域对中的第一域。

[4986] 实施例G253.实施例G251的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含安置于第一嵌合多肽中的至少一个其它靶标结合域与第一靶标结合域或亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4987] 实施例G254.实施例G251的多链嵌合多肽,其中安置于C端的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个其它靶标结合域在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域或亲和域对中的第一域。

[4988] 实施例G255.实施例G251的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含安置于第一嵌合多肽中的至少一个其它靶标结合域与第一靶标结合域或亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[4989] 实施例G256.实施例G251的多链嵌合多肽,其中定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个直接邻接可溶性组织因子域和/或亲和域对中的第一域。

[4990] 实施例G257.实施例G251的多链嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽进一步包含接头序列,所述接头序列安置于(i)可溶性组织因子域与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个之间,所述靶标结合域定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间;和/或(ii)亲和域对中的第一域与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个之间,所述靶标结合域定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[4991] 实施例G258.实施例G44至G46、G57至G59、G76至G78、G96至G98、G109至G111、G122至G124和G131至G133中任一项的多链嵌合多肽,其中第二嵌合多肽进一步包含位于第二嵌合多肽N端和/或C端的其它靶标结合域。

[4992] 实施例G259.实施例G258的多链嵌合多肽,其中其它靶标结合域在第二嵌合多肽中直接邻接亲和域对中的第二域。

[4993] 实施例G260.实施例G258的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的其它靶标结合域与亲和域对中的第二域之间的接头序列。

[4994] 实施例G261.实施例G258的多链嵌合多肽,其中其它靶标结合域在第二嵌合多肽中直接邻接第二靶标结合域。

[4995] 实施例G262.实施例G258的多链嵌合多肽,其中所述第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的其它靶标结合域与第二靶标结合域之间的接头序列。

[4996] 实施例G263.一种组合物,其包含实施例G1至G262的任一种多链嵌合多肽。

[4997] 实施例G264.实施例G263的组合物,其中所述组合物是医药组合物。

[4998] 实施例G265.一种试剂盒,其包含至少一次剂量的实施例G263或G264的组合物。

[4999] 实施例G266.一种核酸,其编码实施例G1至G262中任一项的任一种多链嵌合多肽。

[5000] 实施例G267.一种载体,其包含实施例G266的核酸。

[5001] 实施例G268.实施例G267的载体,其中所述载体是表达载体。

[5002] 实施例G269.一种细胞,其包含实施例G323的核酸或实施例G267或G268的载体。

[5003] 实施例G270.一种产生多链嵌合多肽的方法,所述方法包含:

[5004] 在足以引起所述多链嵌合多肽产生的条件下、在培养基中培养实施例G269的细胞;和

[5005] 从所述细胞和/或所述培养基中回收所述多链嵌合多肽。

[5006] 实施例G271.一种多链嵌合多肽,其通过实施例G270的方法产生。

[5007] 实施例G272.实施例G8的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少80%一致的序列。

[5008] 实施例G273.实施例G272的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少90%一致的序列。

[5009] 实施例G274.实施例G273的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少95%一致的序列。

[5010] 实施例G275.实施例G274的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:97至少100%一致的序列。

[5011] 实施例G276.实施例G8的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少80%一致的序列。

[5012] 实施例G277.实施例G276的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少90%一致的序列。

[5013] 实施例G278.实施例G277的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少95%一致的序列。

[5014] 实施例G279.实施例G278的多链嵌合多肽,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:98至少100%一致的序列。

[5015] 实施例H1.一种治疗有需要的受试者的老年化相关疾病或病状的方法,所述方法包含将治疗有效量的一种或多种自然杀手(NK)细胞活化剂施用于经鉴定患有老年化相关疾病或病状的受试者。

[5016] 实施例H2.一种杀死或减少有需要的受试者的衰老细胞数量的方法,所述方法包含将治疗有效量的一种或多种NK细胞活化剂施用于受试者。

[5017] 实施例H3.实施例H2的方法,其中所述衰老细胞是衰老的癌细胞、衰老的单核细胞、衰老的淋巴细胞、衰老的星形胶质细胞、衰老的微神经胶质细胞、衰老的神经元、衰老的组织纤维母细胞、衰老的真皮纤维母细胞、衰老的角质细胞,或其它分化组织特异性分裂功能细胞。

[5018] 实施例H4.实施例H3的方法,其中所述衰老癌细胞是化学疗法诱导的衰老细胞或辐射诱导的衰老细胞。

[5019] 实施例H5.实施例H2的方法,其中所述受试者已被鉴定或诊断患有老年化相关疾病或病状。

[5020] 实施例H6.实施例H1或H5的方法,其中所述老年化相关疾病或病状选自由以下组成的群组:癌症、自体免疫疾病、代谢疾病、神经退化性疾病、心血管疾病、皮肤病、早衰疾病和脆性疾病。

[5021] 实施例H7.实施例H6的方法,其中所述癌症选自由以下组成的群组:实体肿瘤、血液肿瘤、肉瘤、骨肉瘤、神经胶母细胞瘤、神经母细胞瘤、黑色素瘤、横纹肌肉瘤、尤文氏肉瘤、骨肉瘤、B细胞赘瘤、多发性骨髓瘤、B细胞淋巴瘤、B细胞非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、骨髓增生异常综合症(MDS)、皮肤T细胞淋巴瘤、视网膜母细胞瘤、胃癌、尿道上皮癌、肺癌、肾细胞癌、胃癌和食道癌、胰脏癌、前列腺癌、乳癌、结肠直肠癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、头颈部鳞状细胞癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、肝癌和肝细胞癌。

[5022] 实施例H8.实施例H6的方法,其中所述自体免疫疾病是1型糖尿病。

[5023] 实施例H9.实施例H6的方法,其中所述代谢疾病选自由肥胖症、脂质营养不良和2型糖尿病组成的群组。

[5024] 实施例H10.实施例H6的方法,其中所述神经退化性疾病选自由阿尔茨海默氏病、帕金森氏病和痴呆症组成的群组。

[5025] 实施例H11.实施例H6的方法,其中所述心血管疾病选自由冠状动脉疾病、动脉粥样硬化和肺动脉高血压组成的群组。

[5026] 实施例H12.实施例H6的方法,其中所述皮肤病选自由以下组成的群组:伤口愈合、秃发、皱纹、老年性雀斑痣、皮肤变薄、着色性干皮病和先天性角化不良。

[5027] 实施例H13.实施例H6的方法,其中所述早衰疾病选自由早衰和呼奇逊-吉尔福早衰综合症组成的群组。

[5028] 实施例H14.实施例H6的方法,其中所述脆性疾病选自由脆性、疫苗接种反应、骨质疏松症和肌肉减少症组成的群组。

[5029] 实施例H15.实施例H1或H5的方法,其中所述老年化相关疾病或病状选自以下群组:年龄相关黄斑变性、骨关节炎、脂肪萎缩、特发性肺纤维化、肾脏移植失败、肝纤维化、骨量损失、肌肉减少症、年龄相关的肺组织弹性丧失、骨质疏松症、年龄相关的肾功能障碍,和化学诱发的肾功能障碍。

[5030] 实施例H16.实施例H1或H5的方法,其中所述老年化相关疾病或病状是2型糖尿病或动脉粥样硬化。

[5031] 实施例H17.实施例H1至H16中任一项的方法,其中施药引起受试者的靶组织中的衰老细胞数量减少。

[5032] 实施例H18.实施例H17的方法,其中所述靶组织选自由以下组成的群组:脂肪组织、胰脏组织、肝脏组织、肺组织、血管、骨组织、中枢神经系统(CNS)组织、眼组织、皮肤组织、肌肉组织和次级淋巴器官组织。

[5033] 实施例H19.实施例H1至H18中任一项的方法,其中所述施药引起活化NK细胞中的CD25、CD69、MTOR-C1、SREBP1、IFN-γ和颗粒酶B的表达水平升高。

[5034] 实施例H20.一种治疗有需要的受试者的老年化相关疾病或病状的方法,所述方法包含将治疗有效数量的活化NK细胞施用于经鉴定患有老年化相关疾病或病状的受试者。

[5035] 实施例H21.一种杀死或减少有需要的受试者的衰老细胞数量的方法,所述方法包含将治疗有效数量的活化NK细胞施用于受试者。

[5036] 实施例H22.实施例H21的方法,其中所述衰老细胞是衰老的癌细胞、衰老的单核细胞、衰老的淋巴细胞、衰老的星形胶质细胞、衰老的微神经胶质细胞、衰老的神经元、衰老的组织纤维母细胞、衰老的真皮纤维母细胞、衰老的角质细胞,或其它分化组织特异性分裂功能细胞。

[5037] 实施例H23.实施例H22的方法,其中所述衰老癌细胞是化学疗法诱导的衰老细胞或辐射诱导的衰老细胞。

[5038] 实施例H24.实施例H21的方法,其中所述受试者已被鉴定或诊断患有老年化相关疾病或病状。

[5039] 实施例H25.实施例H20或H24的方法,其中所述老年化相关疾病或病状选自由以下组成的群组:癌症、自体免疫疾病、代谢疾病、神经退化性疾病、心血管疾病、皮肤病、早衰疾病和脆性疾病。

[5040] 实施例H26.实施例H25的方法,其中所述癌症选自由以下组成的群组:实体肿瘤、血液肿瘤、肉瘤、骨肉瘤、神经胶母细胞瘤、神经母细胞瘤、黑色素瘤、横纹肌肉瘤、尤文氏肉瘤、骨肉瘤、B细胞赘瘤、多发性骨髓瘤、B细胞淋巴瘤、B细胞非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、骨髓增生异常综合症(MDS)、皮肤T细胞淋巴瘤、视网膜母细胞瘤、胃癌、尿道上皮癌、肺癌、肾细胞癌、胃癌和食道癌、胰脏癌、前列腺癌、乳癌、结肠直肠癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、头颈部鳞状细胞癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、肝癌和肝细胞癌。

[5041] 实施例H27.实施例H25的方法,其中所述自体免疫疾病是1型糖尿病。

[5042] 实施例H28.实施例H25的方法,其中所述代谢疾病选自由肥胖症、脂质营养不良和2型糖尿病组成的群组。

[5043] 实施例H29.实施例H25的方法,其中所述神经退化性疾病选自由阿尔茨海默氏病、帕金森氏病和痴呆症组成的群组。

[5044] 实施例H30.实施例H25的方法,其中所述心血管疾病选自由冠状动脉疾病、动脉粥样硬化和肺动脉高血压组成的群组。

[5045] 实施例H31.实施例H25的方法,其中所述皮肤病选自由以下组成的群组:伤口愈合、秃发、皱纹、老年性雀斑痣、皮肤变薄、着色性干皮病和先天性角化不良。

[5046] 实施例H32.实施例H25的方法,其中所述早衰疾病选自由早衰和呼奇逊-吉尔福早衰综合症组成的群组。

[5047] 实施例H33.实施例H25的方法,其中所述脆性疾病选自由脆性、疫苗接种反应、骨

质疏松症和肌肉减少症组成的群组。

[5048] 实施例H34.实施例H20或H24的方法,其中所述老年化相关疾病或病状选自由以下组成的群组:年龄相关黄斑变性、骨关节炎、脂肪萎缩、特发性肺纤维化、肾脏移植失败、肝纤维化、骨量损失、肌肉减少症、年龄相关的肺组织弹性丧失、骨质疏松症、年龄相关的肾功能障碍,和化学诱发的肾功能障碍。

[5049] 实施例H35.实施例H20至H34中任一项的方法,其中所述方法进一步包括:

[5050] 获得休眠NK细胞;和

[5051] 使所述休眠NK细胞在试管内、在包含一种或多种NK细胞活化剂的液体培养基中接触,其中所述接触引起活化NK细胞产生,随后施用于所述受试者。

[5052] 实施例H36.实施例H35的方法,其中所述休眠NK细胞是获自所述受试者的自体NK细胞。

[5053] 实施例H37.实施例H35的方法,其中所述休眠NK细胞是同种异体休眠NK细胞。

[5054] 实施例H38.实施例H35的方法,其中所述休眠NK细胞是人工NK细胞。

[5055] 实施例H39.实施例H35的方法,其中所述休眠NK细胞是单倍型休眠NK细胞。

[5056] 实施例H40.实施例H35至H39中任一项的方法,其中所述休眠NK细胞是携带嵌合抗原受体或重组T细胞受体的基因工程化NK细胞。

[5057] 实施例H41.实施例H35至H40中任一项的方法,其中所述方法进一步包含分离出活化NK细胞,随后将所述活化NK细胞施用于受试者。

[5058] 实施例H42.一种使有需要的受试者的皮肤和/或毛发的质地和/或外观在一段时间内改善的方法,所述方法包含将治疗有效量的一种或多种自然杀手(NK)细胞活化剂施用于所述受试者。

[5059] 实施例H43.一种使有需要的受试者的皮肤和/或毛发的质地和/或外观在一段时间内改善的方法,所述方法包含将治疗有效数量的活化NK细胞施用于所述受试者。

[5060] 实施例H44.实施例H43的方法,其中所述方法进一步包括:

[5061] 获得休眠NK细胞;和

[5062] 使所述休眠NK细胞在试管内、在包含一种或多种NK细胞活化剂的液体培养基中接触,其中所述接触引起活化NK细胞产生,随后施用于所述受试者。

[5063] 实施例H45.实施例H44的方法,其中所述休眠NK细胞是获自所述受试者的自体NK细胞。

[5064] 实施例H46.实施例H44的方法,其中所述休眠NK细胞是同种异体休眠NK细胞。

[5065] 实施例H47.实施例H44的方法,其中所述休眠NK细胞是人工NK细胞。

[5066] 实施例H48.实施例H44的方法,其中所述休眠NK细胞是单倍型休眠NK细胞。

[5067] 实施例H49.实施例H44至H48中任一项的方法,其中所述休眠NK细胞是携带嵌合抗原受体或重组T细胞受体的基因工程化NK细胞。

[5068] 实施例H50.实施例H44至H49中任一项的方法,其中所述方法进一步包含分离出活化NK细胞,随后将所述活化NK细胞施用于受试者。

[5069] 实施例H51.实施例H42至H50中任一项的方法,其中所述方法使得所述受试者的皮肤质地和/或外观在一段时间内改善。

[5070] 实施例E322.实施例H51的方法,其中所述方法使得所述受试者在一段时间内的皮

肤皱纹形成速率减小。

[5071] 实施例E322.实施例H51或H52的方法,其中所述方法使得受试者的皮肤着色在一段时间内改善。

[5072] 实施例H54.实施例H51至H53中任一项的方法,其中所述方法使得所述受试者的皮肤质地在一段时间内改善。

[5073] 实施例H55.实施例H42至H50中任一项的方法,其中所述方法使得所述受试者的毛发质地和/或外观在一段时间内改善。

[5074] 实施例H56.实施例H55的方法,其中所述方法使得所述受试者在一段时间内的白发形成速率减小。

[5075] 实施例H57.实施例H55或H56的方法,其中所述方法使得所述受试者在一段时间内的白发数量减少。

[5076] 实施例H58.实施例H55至H57中任一项的方法,其中所述方法使得受试者的脱发率随时间降低。

[5077] 实施例H59.实施例H55至H58中任一项的方法,其中所述方法使得所述受试者的毛发质地在一段时间内改善。

[5078] 实施例H60.实施例H42至H59中任一项的方法,其中所述时间段在约一个月与约10年之间。

[5079] 实施例H61.实施例H42至H60中任一项的方法,其中所述方法使得受试者皮肤中的衰老真皮纤维母细胞数量在一段时间内减少。

[5080] 实施例H62.一种有助于使有需要的受试者的肥胖症在一段时间内得到治疗的方法,所述方法包含将治疗有效量的一种或多种自然杀手(NK)细胞活化剂施用于所述受试者。

[5081] 实施例H63.一种有助于使有需要的受试者的肥胖症在一段时间内得到治疗的方法,所述方法包含将治疗有效数量的活化NK细胞施用于所述受试者。

[5082] 实施例H64.实施例H63的方法,其中所述方法进一步包含:

[5083] 获得休眠NK细胞;和

[5084] 使所述休眠NK细胞在试管内、在包含一种或多种NK细胞活化剂的液体培养基中接触,其中所述接触引起活化NK细胞产生,随后施用于所述受试者。

[5085] 实施例H65.实施例H64的方法,其中所述休眠NK细胞是获自所述受试者的自体NK细胞。

[5086] 实施例H66.实施例H64的方法,其中所述休眠NK细胞是同种异体休眠NK细胞。

[5087] 实施例H67.实施例H64的方法,其中所述休眠NK细胞是人工NK细胞。

[5088] 实施例H68.实施例H64的方法,其中所述休眠NK细胞是单倍型休眠NK细胞。

[5089] 实施例H69.实施例H64至H68中任一项的方法,其中所述休眠NK细胞是携带嵌合抗原受体或重组T细胞受体的基因工程化NK细胞。

[5090] 实施例H70.实施例H64至H69中任一项的方法,其中所述方法进一步包含分离出活化NK细胞,随后将所述活化NK细胞施用于受试者。

[5091] 实施例H71.实施例H62至H70中任一项的方法,其中所述方法使得受试者的质量在一段时间内降低。

[5092] 实施例H72.实施例H62至H71中任一项的方法,其中所述方法使得受试者的身体质量指数(BMI)在一段时间内降低。

[5093] 实施例H73.实施例H62至H70中任一项的方法,其中所述方法使得所述受试者从前期糖尿病向2型糖尿病恶化的速率降低。

[5094] 实施例H74.实施例H62至H70中任一项的方法,其中所述方法使得受试者的空腹血清葡萄糖水平降低。

[5095] 实施例H75.实施例H62至H70中任一项的方法,其中所述方法使得受试者的胰岛素敏感性增加。

[5096] 实施例H76.实施例H62至H70中任一项的方法,其中所述方法使得受试者的动脉粥样硬化症严重程度降低。

[5097] 实施例H77.实施例H62-H76中任一项的方法,其中所述时间段在约两周至约30周之间。10年。

[5098] 实施例H78.实施例H1至H19、H35至H42、H44至H62和H64至H77中任一项的方法,其中一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种引起以下中的一者或多者活化:IL-2的受体、IL-7的受体、IL-12的受体、IL-15的受体、IL-18的受体、IL-21的受体、IL-33的受体;CD16、CD69、CD25、CD59、CD352、NKp80、DNAM-1、2B4、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D、KIR2DS1、KIR2Ds2/3、KIR2DL4、KIR2DS4、KIR2DS5和KIR3DS1的受体。

[5099] 实施例H79.实施例H78的方法,其中引起IL-2受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-2受体的可溶性IL-2或激动性抗体。

[5100] 实施例H80.实施例H78的方法,其中引起IL-7受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-7受体的可溶性IL-7或激动性抗体。

[5101] 实施例H81.实施例H78的方法,其中引起IL-12受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-2受体的可溶性IL-12或激动性抗体。

[5102] 实施例H82.实施例H78的方法,其中引起IL-15受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-15受体的可溶性IL-15或激动性抗体。

[5103] 实施例H83.实施例H78的方法,其中引起IL-21受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-21受体的可溶性IL-21或激动性抗体。

[5104] 实施例H84.实施例H78的方法,其中引起IL-33受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL-33受体的可溶性IL-33或激动性抗体。

[5105] 实施例H85.实施例H78的方法,其中引起CD16受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到CD16的激动性抗体。

[5106] 实施例H86.实施例H78的方法,其中引起CD69受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到CD69的激动性抗体。

[5107] 实施例H87.实施例H78的方法,其中引起CD25、CD36、CD59的受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到CD25、CD6、CD59的激动性抗体。

[5108] 实施例H88.实施例H78的方法,其中引起CD352受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到CD352的激动性抗体。

[5109] 实施例H89.实施例H78的方法,其中引起NKp80受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKp80的激动性抗体。

[5110] 实施例H90.实施例H78的方法,其中引起DNAM-1受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到DNAM-1的激动性抗体。

[5111] 实施例H91.实施例H78的方法,其中引起2B4受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到2B4的激动性抗体。

[5112] 实施例H92.实施例H78的方法,其中引起NKp30受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKp30的激动性抗体。

[5113] 实施例H93.实施例H78的方法,其中引起NKp44受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKp44的激动性抗体。

[5114] 实施例H94.实施例H78的方法,其中引起NKp46受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKp46的激动性抗体。

[5115] 实施例H95.实施例H78的方法,其中引起NKG2D受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKG2D的激动性抗体。

[5116] 实施例H96.实施例H78的方法,其中引起KIR2DS1受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DS1的激动性抗体。

[5117] 实施例H97.实施例H78的方法,其中引起KIR2DS2/3受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DS2/3的激动性抗体。

[5118] 实施例H98.实施例H78的方法,其中引起KIR2DL4受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DL4的激动性抗体。

[5119] 实施例H99.实施例H78的方法,其中引起KIR2DS4受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DS4的激动性抗体。

[5120] 实施例H100.实施例H78的方法,其中引起KIR2DS5受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DS5的激动性抗体。

[5121] 实施例H101.实施例H78的方法,其中引起KIR3DS1受体活化的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR3DS1的激动性抗体。

[5122] 实施例H102.实施例H1至H19、H35至H42、H44至H62和H64至H101中任一项的方法,其中一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种引起以下中的一种或多种的活化减少:PD-1、TGF-β受体、TIGIT、CD1、TIM-3、Siglec-7、IRP60、Tactile、IL1R8、NKG2A/KLRD1、KIR2DL1、KIR2DL2/3、KIR2DL5、KIR3DL1、KIR3DL2、ILT2/LIR-1和LAG-2。

[5123] 实施例H103.实施例H102的方法,其中引起PD-1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到PD-1的拮抗性抗体、可溶性PD-1、可溶性PD-L1,或特异性结合到PD-L1的抗体。

[5124] 实施例H104.实施例H102的方法,其中引起TGF-β受体活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是可溶性TGF-β受体、特异性结合到TGF-β的抗体,或特异性结合到TGF-β受体的拮抗性抗体。

[5125] 实施例H105.实施例H102的方法,其中引起TIGIT活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到TIGIT的拮抗性抗体、可溶性TIGIT,或特异性结合到TIGIT配体的抗体。

[5126] 实施例H106.实施例H102的方法,其中引起CD1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到CD1的拮抗性抗体、可溶性CD1,或特异性结合到CD1配体的

抗体。

[5127] 实施例H107.实施例H102的方法,其中引起TIM-3活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到TIM-3的拮抗性抗体、可溶性TIM-3,或特异性结合到TIM-3配体的抗体。

[5128] 实施例H108.实施例H102的方法,其中引起Siglec-7活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到Siglec-7的拮抗性抗体,或特异性结合到Siglec-7配体的抗体。

[5129] 实施例H109.实施例H102的方法,其中引起IRP60活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IRP60的拮抗性抗体,或特异性结合到IRP60配体的抗体。

[5130] 实施例H110.实施例H102的方法,其中引起Tactile活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到Tactile的拮抗性抗体,或特异性结合到Tactile配体的抗体。

[5131] 实施例H111.实施例H102的方法,其中引起IL1R8活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到IL1R8的拮抗性抗体,或特异性结合到IL1R8配体的抗体。

[5132] 实施例H112.实施例H102的方法,其中引起NKG2A/KLRD1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到NKG2A/KLRD1的拮抗性抗体,或特异性结合到NKG2A/KLRD1配体的抗体。

[5133] 实施例H113.实施例H102的方法,其中引起KIR2DL1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DL1的拮抗性抗体,或特异性结合到KIR2DL1配体的抗体。

[5134] 实施例H114.实施例H102的方法,其中引起KIR2DL2/3活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DL2/3的拮抗性抗体,或特异性结合到KIR2DL2/3配体的抗体。

[5135] 实施例H115.实施例H102的方法,其中引起KIR2DL5活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR2DL5的拮抗性抗体,或特异性结合到KIR2DL5配体的抗体。

[5136] 实施例H116.实施例H102的方法,其中引起KIR3DL1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR3DL1的拮抗性抗体,或特异性结合到KIR3DL1配体的抗体。

[5137] 实施例H117.实施例H102的方法,其中引起KIR3DL2活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到KIR3DL2的拮抗性抗体,或特异性结合到KIR3DL2配体的抗体。

[5138] 实施例H118.实施例H102的方法,其中引起ILT2/LIR-1活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到ILT2/LIR-1的拮抗性抗体,或特异性结合到ILT2/LIR-1配体的抗体。

[5139] 实施例H119.实施例H102的方法,其中引起LAG-2活化减少的一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是特异性结合到LAG-2的拮抗性抗体,或特异性结合到LAG-2配体的抗

体。

[5140] 实施例H120.实施例H1至H19、H35至H42、H44至H62和H64至H77中任一项的方法,其中一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是单链嵌合多肽,其包含:

[5141] (i)第一靶标结合域;

[5142] (ii)可溶性组织因子域;和

[5143] (iii)第二靶标结合域,

[5144] 实施例H121.实施例H120的多链嵌合多肽,其中所述第一靶标结合域和所述可溶性组织因子域彼此直接邻接。

[5145] 实施例H122.实施例H120的方法,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列。

[5146] 实施例H123.实施例H120至H122中任一项的方法,其中所述可溶性组织因子域和所述第二靶标结合域彼此直接邻接。

[5147] 实施例H124.实施例H120至H122中任一项的方法,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于可溶性组织因子域和第二靶标结合域之间的接头序列。

[5148] 实施例H125.实施例H120的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域彼此直接邻接。

[5149] 实施例H126.实施例H120的方法,其中单链嵌合多肽进一步包含介于第一靶标结合域和第二靶标结合域之间的接头序列。

[5150] 实施例H127.实施例H125或H126的方法,其中第二靶标结合域和可溶性组织因子域彼此直接邻接。

[5151] 实施例H128.实施例H125或H126的方法,其中单链嵌合多肽进一步包含介于第二靶标结合域和可溶性组织因子域之间的接头序列。

[5152] 实施例H129.实施例H120至H128中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的抗原。

[5153] 实施例H130.实施例H129的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。

[5154] 实施例H131.实施例H130的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域包含相同的氨基酸序列。

[5155] 实施例H132.实施例H120至H128中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到不同的抗原。

[5156] 实施例H133.实施例H120至H132中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是抗原结合域。

[5157] 实施例H134.实施例H133的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域各自是抗原结合域。

[5158] 实施例H135.实施例H134的方法,其中抗原结合域包含scFv或单域抗体。

[5159] 实施例H136.实施例H120至H135中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个结合到选自由以下组成的群组的靶标:CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、

CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKP30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体,和CD122的受体。

[5160] 实施例H137.实施例H120至H128中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。

[5161] 实施例H138.实施例H137的方法,其中所述可溶性白介素或细胞因子蛋白选自由以下组成的群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。

[5162] 实施例H139.实施例H120至H128中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子受体。

[5163] 实施例H140.实施例H139的方法,其中所述可溶性白介素或细胞因子受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、TNFα的可溶性受体、IL-4的可溶性受体,或IL-10的可溶性受体。

[5164] 实施例H141.实施例H120至H140中任一项的方法,其中所述可溶性组织因子域是人可溶性组织因子域。

[5165] 实施例H142.实施例H141的方法,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少80%一致的序列。

[5166] 实施例H143.实施例H142的方法,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少90%一致的序列。

[5167] 实施例H144.实施例H143的方法,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少95%一致的序列。

[5168] 实施例H145.实施例H141至H144中任一项的方法,其中所述人可溶性组织因子域不包含以下中的一种或多种:

[5169] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;

[5170] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;

[5171] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;

[5172] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;

[5173] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;

[5174] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[5175] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[5176] 实施例H146.实施例H145的方法,其中所述人可溶性组织因子域不包含以下中的任一种:

[5177] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;

[5178] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;

[5179] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;

[5180] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;

[5181] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;

[5182] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[5183] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[5184] 实施例H147.实施例H120至H146中任一项的方法,其中所述可溶性组织因子域不能结合因子VIIa。

[5185] 实施例H148.实施例H120至H147中任一项的方法,其中所述可溶性组织因子域不将非活性因子X转化为因子Xa。

[5186] 实施例H149.实施例H120至H148中任一项的方法,其中所述单链嵌合多肽不刺激哺乳动物中的血液凝结。

[5187] 实施例H150.实施例H120至H149中任一项的方法,其中所述单链嵌合多肽进一步包含一个或多个位于其N端和/或C端的其它靶标结合域。

[5188] 实施例H151.实施例H150的方法,其中所述单链嵌合多肽包含一个或多个位于其N端的其它靶标结合域。

[5189] 实施例H152.实施例H151的方法,其中一个或多个其它靶标结合域直接邻接第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域。

[5190] 实施例H153.实施例H152的方法,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于至少一个其它靶标结合域之一与第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域之间的接头序列。

[5191] 实施例H154.实施例H150的方法,其中所述单链嵌合多肽包含一个或多个位于其C端的其它靶标结合域。

[5192] 实施例H155.实施例H154的方法,其中一个或多个其它靶标结合域之一直接邻接第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域。

[5193] 实施例H156.实施例H154的单链嵌合多肽,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于至少一个其它靶标结合域之一与第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域之间的接头序列。

[5194] 实施例H157.实施例H150的方法,其中所述单链嵌合多肽包含一个或多个位于其N端和C端的其它靶标结合域。

[5195] 实施例H158.实施例H157的方法,其中位于N端的一个或多个其它抗原结合域之一直接邻接第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域。

[5196] 实施例H159.实施例H157的方法,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于N端的一个或多个其它抗原结合域之一与第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域之

间的接头序列。

[5197] 实施例H160.实施例H157的方法,其中位于C端的一个或多个其它抗原结合域之一直接邻接第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域。

[5198] 实施例H161.实施例H157的方法,其中所述单链嵌合多肽进一步包含介于C端的一个或多个其它抗原结合域之一与第一靶标结合域、第二靶标结合域或可溶性组织因子域之间的接头序列。

[5199] 实施例H162.实施例H150至H161中任一项的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的抗原。

[5200] 实施例H163.实施例H162的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的表位。

[5201] 实施例H164.实施例H163的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个包含相同的氨基酸序列。

[5202] 实施例H165.实施例H162的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自特异性结合到相同的抗原。

[5203] 实施例H166.实施例H165的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自特异性结合到相同的表位。

[5204] 实施例H167.实施例H166的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自包含相同的氨基酸序列。

[5205] 实施例H168.实施例H150至H161中任一项的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域特异性结合到不同的抗原。

[5206] 实施例H169.实施例H150至H168中任一项的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个靶标结合域中的一个或多个是抗原结合域。

[5207] 实施例H170.实施例H169的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自是抗原结合域。

[5208] 实施例H171.实施例H170的方法,其中抗原结合域包含scFv或单域抗体。

[5209] 实施例H172.实施例H150至H171中任一项的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个靶标结合域中的一个或多个特异性地结合到选自选自由以下组成的群组的靶标:CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体,和CD122的受体。

[5210] 实施例H173.实施例H150至H161中任一项的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。

[5211] 实施例H174.实施例H173的方法,其中所述可溶性白介素或细胞因子蛋白选自由以下组成的群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、

PDGF-DD和SCF。

[5212] 实施例H175.实施例H150至H161中任一项的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子受体。

[5213] 实施例H176.实施例H175的方法,其中所述可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、TNFα的可溶性受体、IL-4的可溶性受体,或IL-10的可溶性受体。

[5214] 实施例H177.实施例H1至H19、H35至H42、H44至H62和H64至H77中任一项的方法,其中一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是多链嵌合多肽,其包含:

[5215] (c)第一嵌合多肽,其包含:

[5216] (i)第一靶标结合域;

[5217] (ii)可溶性组织因子域;和

[5218] (iii)亲和域对中的第一域;

[5219] (d)第二嵌合多肽,其包含:

[5220] (i)亲和域对中的第二域;和

[5221] (ii)第二靶标结合域,

[5222] 其中所述第一嵌合多肽和所述第二嵌合多肽通过所述亲和域对中的所述第一域和所述第二域的结合而缔合。

[5223] 实施例H178.实施例H177的方法,其中第一靶标结合域和可溶性组织因子域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。

[5224] 实施例H179.实施例H177的方法,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的第一靶标结合域与可溶性组织因子域之间的接头序列。

[5225] 实施例H180.实施例H177至H179中任一项的方法,其中可溶性组织因子域和亲和域对中的第一域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。

[5226] 实施例H181.实施例H177至H179中任一项的方法,其中第一嵌合多肽进一步包含介于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[5227] 实施例H182.实施例H177至H181中任一项的方法,其中亲和域对中的第二域与第二靶标结合域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。

[5228] 实施例H183.实施例H177至H181中任一项的方法,其中第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列。

[5229] 实施例H184.实施例H177至H183中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的抗原。

[5230] 实施例H185.实施例H184的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。

[5231] 实施例H186.实施例H185的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域包含相同的氨基酸序列。

[5232] 实施例H187.实施例H177至H183中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到不同的抗原。

[5233] 实施例H188.实施例H177至H187中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是抗原结合域。

[5234] 实施例H189.实施例H188的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域各自是抗原结合域。

[5235] 实施例H190.实施例H188或H189的方法,其中抗原结合域包含scFv或单域抗体。

[5236] 实施例H191.实施例H177至H190中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个特异性地结合到选自由以下组成的群组的靶标:CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKP30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体,和CD122的受体。

[5237] 实施例H192.实施例H177至H183中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。

[5238] 实施例H193.实施例H192的方法,其中所述可溶性白介素或细胞因子蛋白选自由以下组成的群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。

[5239] 实施例H194.实施例H177至H183中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。

[5240] 实施例H195.实施例H194的方法,其中所述可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、TNFα的可溶性受体、IL-4的可溶性受体,或IL-10的可溶性受体。

[5241] 实施例H196.实施例H177至H195中任一项的方法,其中第一嵌合多肽进一步包含一个或多个其它靶标结合域,其中所述一个或多个其它抗原结合域中的至少一个定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[5242] 实施例H197.实施例H196的方法,其中第一嵌合多肽进一步包括介于可溶性组织因子域与一个或多个其它抗原结合域中的至少一个之间的接头序列,和/或介于一个或多个其它抗原结合域中的至少一个与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[5243] 实施例H198.实施例H177至H195中任一项的方法,其中所述第一嵌合多肽进一步包含一个或多个位于第一嵌合多肽N端和/或C端的其它靶标结合域。

[5244] 实施例H199.实施例H198的多链嵌合多肽,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第一嵌合多肽中直接邻接亲和域对中的第一域。

[5245] 实施例H200.实施例H198的方法,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[5246] 实施例H201.实施例H198的方法,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域。

[5247] 实施例H202.实施例H198的方法,其中所述第一嵌合多肽进一步包含介于一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与第一靶标结合域之间的接头序列。

[5248] 实施例H203.实施例H198的方法,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个安置于第一嵌合多肽的N端和/或C端,并且一个或多个其它靶标结合域中的至少一个定位于第一嵌合多肽中的可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[5249] 实施例H204.实施例H203的方法,其中安置于N端的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个其它靶标结合域在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域或亲和域对中的第一域。

[5250] 实施例H205.实施例H203的方法,其中所述第一嵌合多肽进一步包含安置于第一嵌合多肽中的至少一个其它靶标结合域与第一靶标结合域或亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[5251] 实施例H206.实施例H203的方法,其中安置于C端的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个其它靶标结合域在第一嵌合多肽中直接邻接第一靶标结合域或亲和域对中的第一域。

[5252] 实施例H207.实施例H203的方法,其中所述第一嵌合多肽进一步包含安置于第一嵌合多肽中的至少一个其它靶标结合域与第一靶标结合域或亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[5253] 实施例H208.实施例H203的方法,其中定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个直接邻接可溶性组织因子域和/或亲和域对中的第一域。

[5254] 实施例H209.实施例H203的方法,其中所述第一嵌合多肽进一步包含接头序列,所述接头序列安置于(i)可溶性组织因子域与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个之间,所述靶标结合域定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间;和/或(ii)亲和域对中的第一域与一个或多个其它靶标结合域中的至少一个之间,所述靶标结合域定位于可溶性组织因子域与亲和域对中的第一域之间。

[5255] 实施例H210.实施例H177至H209中任一项的方法,其中所述第二嵌合多肽进一步包含一个或多个位于第二嵌合多肽N端和/或C端的其它靶标结合域。

[5256] 实施例H211.实施例H210的方法,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第二嵌合多肽中直接邻接亲和域对中的第二域。

[5257] 实施例H212.实施例H210的方法,其中所述第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与亲和域对中的第二域之间的接头序列。

[5258] 实施例H213.实施例H210的方法,其中一个或多个其它靶标结合域中的至少一个在第二嵌合多肽中直接邻接第二靶标结合域。

[5259] 实施例H214.实施例H210的方法,其中所述第二嵌合多肽进一步包含介于第二嵌合多肽中的一个或多个其它靶标结合域中的至少一个与第二靶标结合域之间的接头序列。

[5260] 实施例H215.实施例H196至H214中任一项的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的抗原。

[5261] 实施例H216.实施例H215的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的两个或更多个特异性结合到相同的表位。

[5262] 实施例H217.实施例H216的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或

多个其它靶标结合域中的两个或更多个包含相同的氨基酸序列。

[5263] 实施例H218.实施例H215的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自特异性结合到相同的抗原。

[5264] 实施例H219.实施例H218的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自特异性结合到相同的表位。

[5265] 实施例H220.实施例H219的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自包含相同的氨基酸序列。

[5266] 实施例H221.实施例H196至H214中任一项的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域特异性结合到不同的抗原。

[5267] 实施例H222.实施例H196至H221中任一项的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个靶标结合域中的一个或多个是抗原结合域。

[5268] 实施例H223.实施例H222的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域各自是抗原结合域。

[5269] 实施例H224.实施例H223的方法,其中抗原结合域包含scFv。

[5270] 实施例H225.实施例H196至H224中任一项的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个靶标结合域中的一个或多个特异性地结合到选自选自由以下组成的群组的靶标:CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKp30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体,和CD122的受体。

[5271] 实施例H226.实施例H196至H214中任一项的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。

[5272] 实施例H227.实施例H226的方法,其中所述可溶性白介素或细胞因子蛋白选自由以下组成的群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。

[5273] 实施例H228.实施例H196至H214中任一项的方法,其中第一靶标结合域、第二靶标结合域和一个或多个其它靶标结合域中的一个或多个是可溶性白介素或细胞因子受体。

[5274] 实施例H229.实施例H228的方法,其中所述可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、TNFα的可溶性受体、IL-4的可溶性受体,或IL-10的可溶性受体。

[5275] 实施例H230.实施例H196至H229中任一项的方法,其中所述可溶性组织因子域是人可溶性组织因子域。

[5276] 实施例H231.实施例H230的方法,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少80%一致的序列。

[5277] 实施例H232.实施例H231的方法,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID

NO:93至少90%一致的序列。

[5278] 实施例H233.实施例H232的方法,其中所述人可溶性组织因子域包含与SEQ ID NO:93至少95%一致的序列。

[5279] 实施例H234.实施例H230至H233中任一项的方法,其中所述人可溶性组织因子域不包含以下中的一种或多种:

[5280] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;

[5281] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;

[5282] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;

[5283] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;

[5284] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;

[5285] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[5286] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[5287] 实施例H235.实施例H234的方法,其中所述人可溶性组织因子域不包含以下中的任一种:

[5288] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置20对应的氨基酸位置的赖氨酸;

[5289] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置22对应的氨基酸位置的异亮氨酸;

[5290] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置45对应的氨基酸位置的色氨酸;

[5291] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置58对应的氨基酸位置的天冬氨酸;

[5292] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置94对应的氨基酸位置的酪氨酸;

[5293] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置135对应的氨基酸位置的精氨酸;以及

[5294] 位于与人成熟野生型组织因子蛋白的氨基酸位置140对应的氨基酸位置的苯丙氨酸。

[5295] 实施例H236.实施例H196至H235中任一项的方法,其中所述可溶性组织因子域不能结合到因子VIIa。

[5296] 实施例H237.实施例H196至H236中任一项的方法,其中所述可溶性组织因子域不将非活性因子X转化为因子Xa。

[5297] 实施例H238.实施例H196至H237中任一项的方法,其中所述多链嵌合多肽不刺激哺乳动物的血液凝结。

[5298] 实施例H239.实施例H196至H238中任一项的方法,其中所述亲和域对是来自人IL-15受体α链(IL-15Rα)的寿司域和可溶性IL-15。

[5299] 实施例H240.实施例H239的方法,其中可溶性IL15具有D8N或D8A氨基酸取代。

[5300] 实施例H241.实施例H239或H240的方法,其中人IL-15Rα是成熟全长IL-15Rα。

[5301] 实施例H242.实施例H196至H238中任一项的方法,其中所述亲和域对选自由以下组成的群组:芽胞杆菌核糖核酸酶和芽胞杆菌核糖核酸酶抑制子、PKA和AKAP、基于突变核糖核酸酶I片段的衔接子/对接标签模块,以及基于蛋白质突触蛋白、突触结合蛋白、突触泡蛋白和SNAP25的相互作用的SNARE模块。

[5302] 实施例H243.实施例H1至H19、H35至H42、H44至H62和H64至H77中任一项的方法,其中一种或多种NK细胞活化剂中的至少一种是多链嵌合多肽,其包含:

[5303] (a)第一和第二嵌合多肽,其中各包含:

[5304] (i)第一靶标结合域;

[5305] (ii)Fc域;和

[5306] (iii)亲和域对中的第一域;

[5307] (b)第三和第四嵌合多肽,其中各包含:

[5308] (i)亲和域对中的第二域;和

[5309] (ii)第二靶标结合域,

[5310] 其中所述第一和第二嵌合多肽与所述第三和第四嵌合多肽通过亲和域对中的第一域与第二域的结合而缔合,并且所述第一和第二嵌合多肽通过其Fc域缔合。

[5311] 实施例H244.实施例H243的方法,其中第一靶标结合域和Fc域在第一和第二嵌合多肽中彼此直接邻接。

[5312] 实施例H245.实施例H243的方法,其中所述第一和第二嵌合多肽进一步包含介于第一和第二嵌合多肽中的第一靶标结合域与Fc域之间的接头序列。

[5313] 实施例H246.实施例H243至H245中任一项的方法,其中Fc域与亲和域对中的第一域在第一和第二嵌合多肽中彼此直接邻接。

[5314] 实施例H247.实施例H243至H245中任一项的方法,其中第一嵌合多肽进一步包含介于第一和第二嵌合多肽中的Fc域与亲和域对中的第一域之间的接头序列。

[5315] 实施例H248.实施例H243至H247中任一项的方法,其中亲和域对中的第二域与第二靶标结合域在第三和第四嵌合多肽中彼此直接邻接。

[5316] 实施例H249.实施例H243至H247中任一项的方法,其中第三和第四嵌合多肽进一步包括介于第三和第四嵌合多肽中的亲和域对中的第二域与第二靶标结合域之间的接头序列。

[5317] 实施例H250.实施例H243至H249中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的抗原。

[5318] 实施例H251.实施例H250的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到相同的表位。

[5319] 实施例H252.实施例H251的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域包含相同的氨基酸序列。

[5320] 实施例H253.实施例H243至H249中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域特异性结合到不同的抗原。

[5321] 实施例H254.实施例H243至H253中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是抗原结合域。

[5322] 实施例H255.实施例H254的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域各自是

抗原结合域。

[5323] 实施例H256.实施例H254或H255的方法,其中抗原结合域包含scFv或单域抗体。

[5324] 实施例H257.实施例H243至H256中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个特异性地结合到选自由以下组成的群组的靶标:CD16a、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNFα、CD26、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘素、CEACAM5、UL16结合蛋白、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF-β受体II(TGF-βRII)的配体、TGF-βRIII的配体、DNAM1的配体、NKp46的配体、NKp44的配体、NKG2D的配体、NKP30的配体、scMHCI的配体、scMHCII的配体、scTCR的配体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体,和CD122的受体。

[5325] 实施例H258.实施例H243至H256中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子蛋白。

[5326] 实施例H259.实施例H258的方法,其中所述可溶性白介素或细胞因子蛋白选自由以下组成的群组:IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD和SCF。

[5327] 实施例H260.实施例H243至H256中任一项的方法,其中第一靶标结合域和第二靶标结合域中的一个或两个是可溶性白介素或细胞因子受体。

[5328] 实施例H261.实施例H260的方法,其中所述可溶性受体是可溶性TGF-β受体II(TGF-βRII)、可溶性TGF-βRIII、TNFα的可溶性受体、IL-4的可溶性受体,或IL-10的可溶性受体。

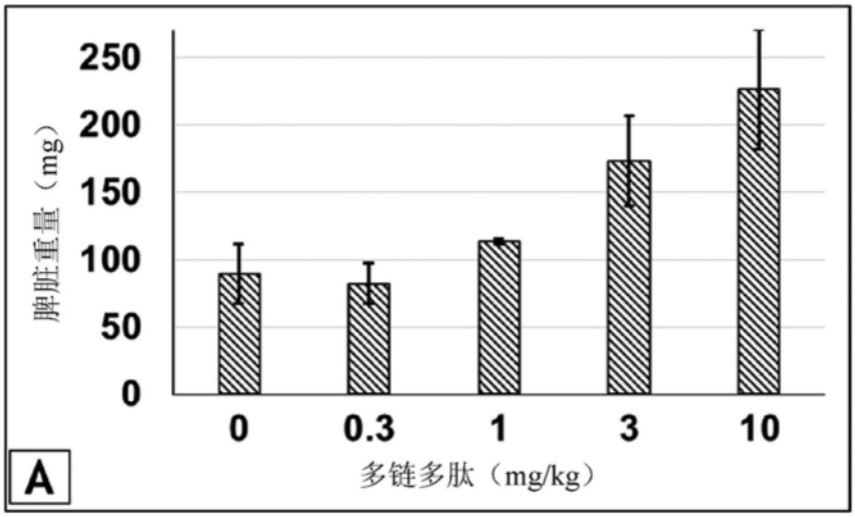

250
200
150
100
50
0
脾脏重量（mg）
0
0.3
1
3
10
多链多肽（mg/kg）
A

图1A

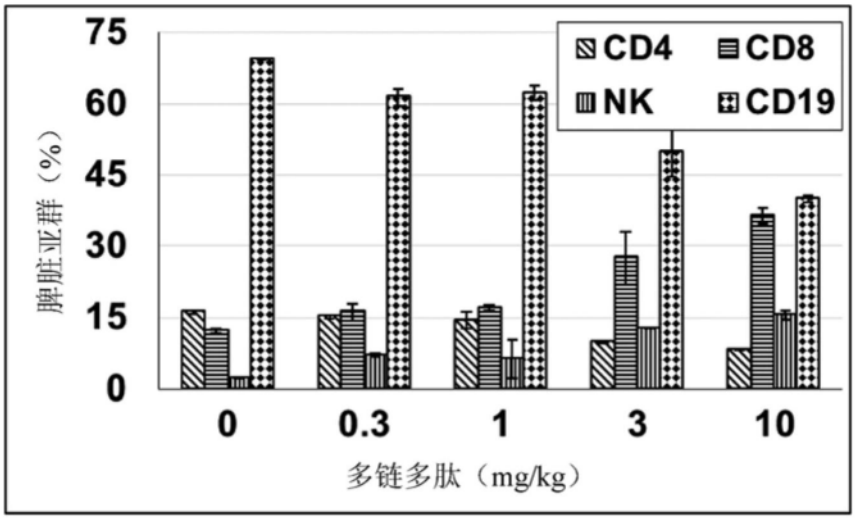

75
60
45
30
15
0
脾脏亚群（%）
CD4
CD8
NK
CD19
0
0.3
1
3
10
多链多肽（mg/kg）

图1B

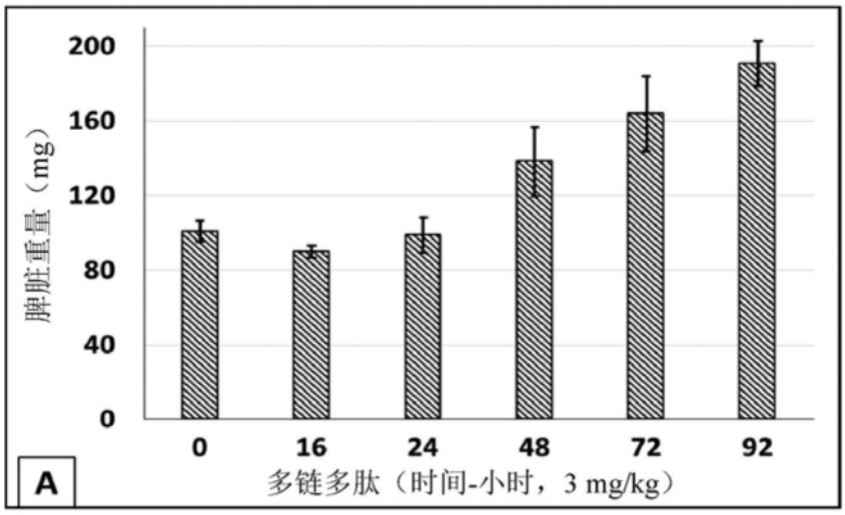

200
160
120
80
40
0
脾脏重量（mg）
0
16
24
48
72
92
多链多肽（时间-小时，3 mg/kg）
A

图2A

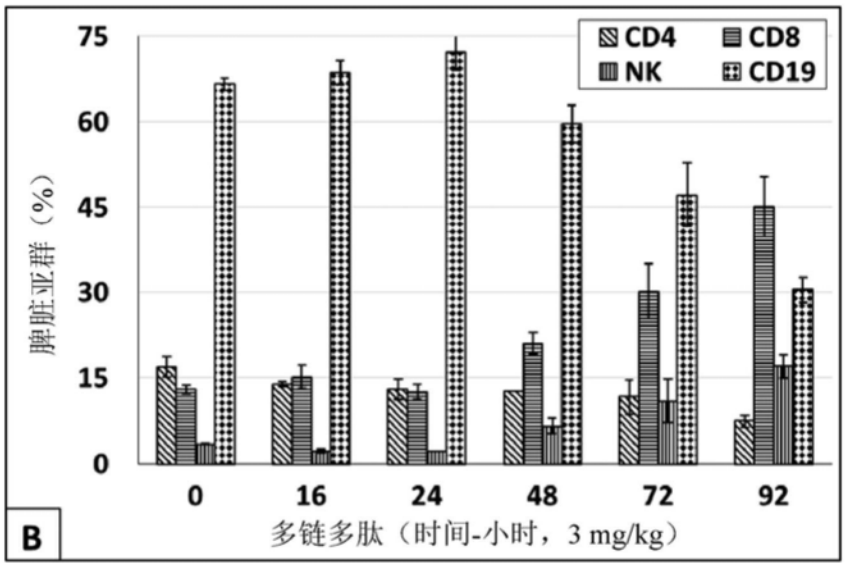

75
60
45
30
15
0
脾脏亚群（%）
CD4
CD8
NK
CD19
0
16
24
48
72
92
多链多肽（时间-小时，3 mg/kg）
B

图2B

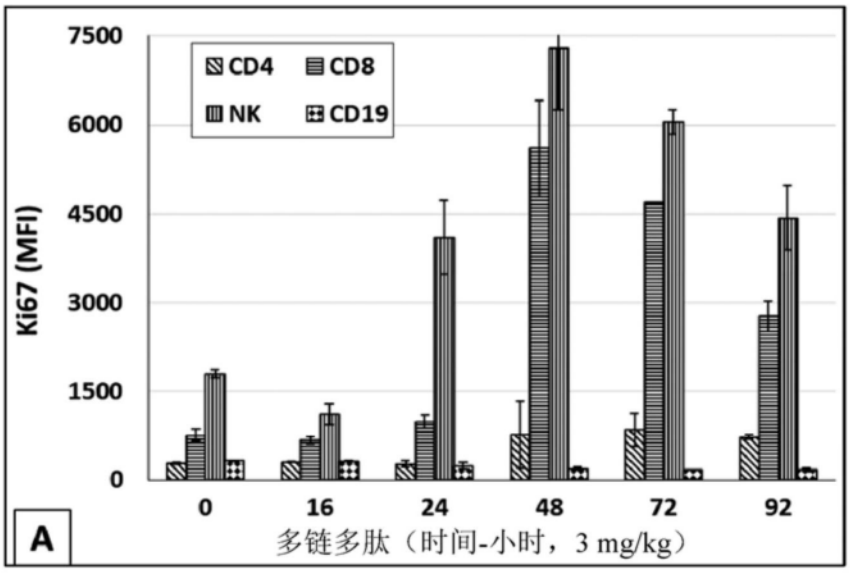

7500
6000
4500
3000
1500
0
Ki67 (MFI)
CD4
CD8
NK
CD19
0
16
24
48
72
92
多链多肽（时间-小时，3 mg/kg）
A

图3A

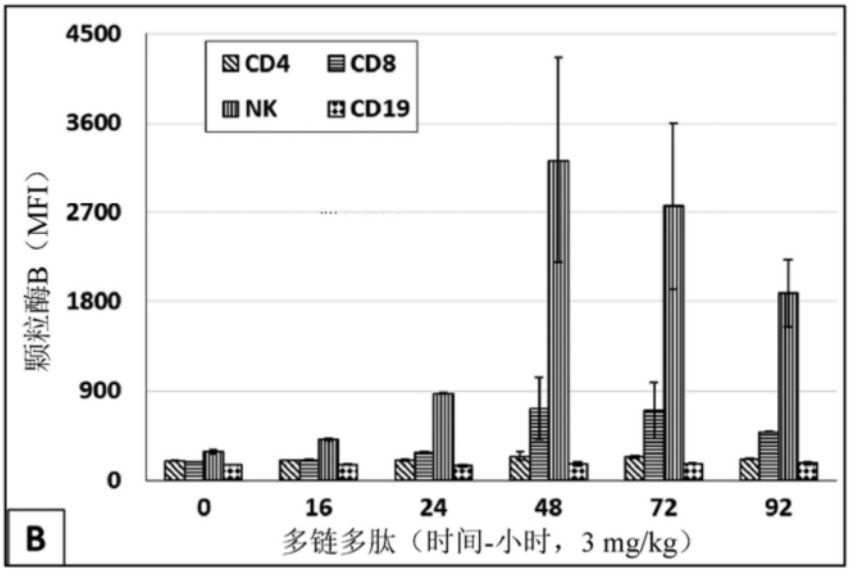

4500
3600
2700
1800
900
0
颗粒酶B（MFI）
CD4
CD8
NK
CD19
0
16
24
48
72
92
多链多肽（时间-小时，3 mg/kg）
B

图3B

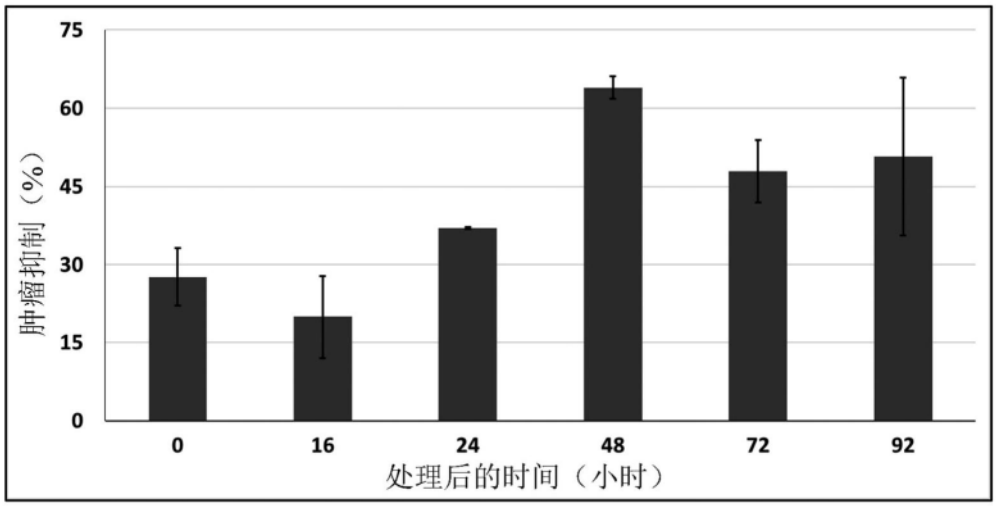

75
60
45
30
15
0
肿瘤抑制（%）
0
16
24
48
72
92
处理后的时间（小时）

图4

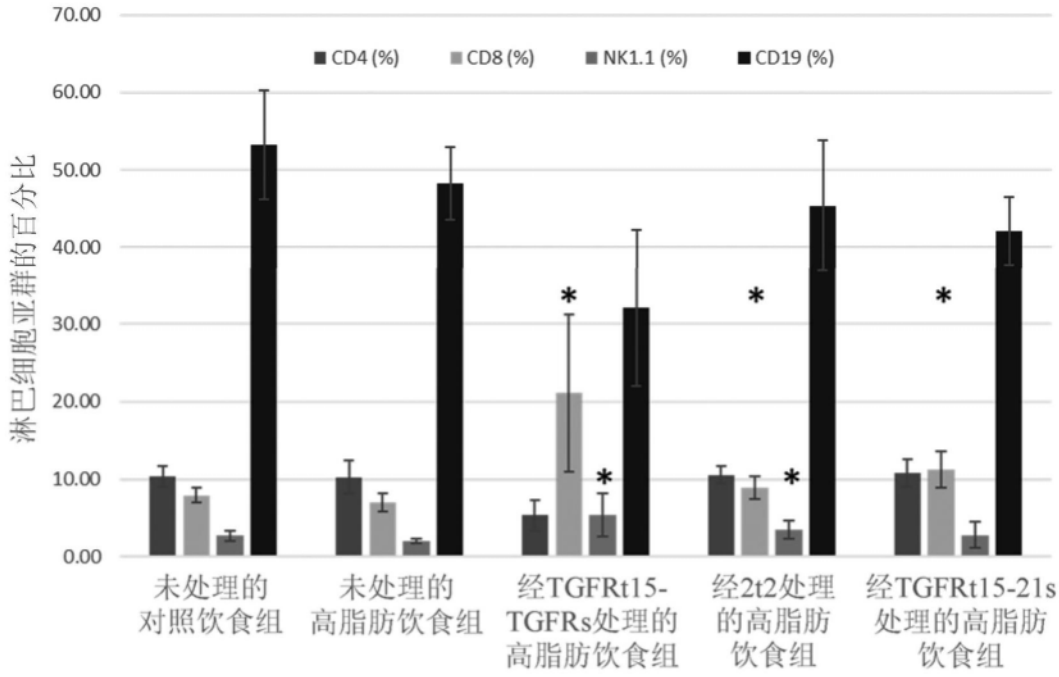

70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
CD4 (%)
CD8 (%)
NK1.1 (%)
CD19 (%)
淋巴细胞亚群的百分比
*
未处理的对照饮食组
未处理的高脂肪饮食组
经TGFRt15-TGFRs处理的高脂肪饮食组
经2t2处理的高脂肪饮食组
经TGFRt15-21s处理的高脂肪饮食组
*相对于未处理的高脂肪饮食组，具有统计显著性

图5A

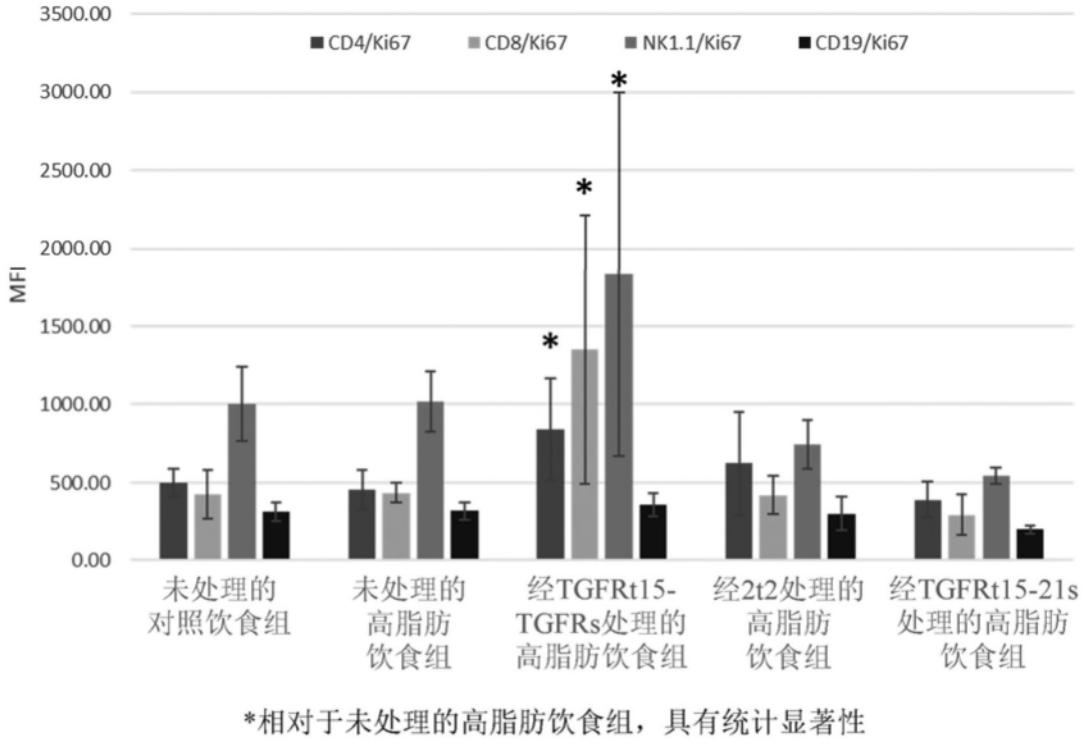

3500.00
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
MFI
CD4/Ki67
CD8/Ki67
NK1.1/Ki67
CD19/Ki67
*
*
*
未处理的对照饮食组
未处理的高脂肪饮食组
经TGFRt15-TGFRs处理的高脂肪饮食组
经2t2处理的高脂肪饮食组
经TGFRt15-21s处理的高脂肪饮食组
*相对于未处理的高脂肪饮食组，具有统计显著性

图5B

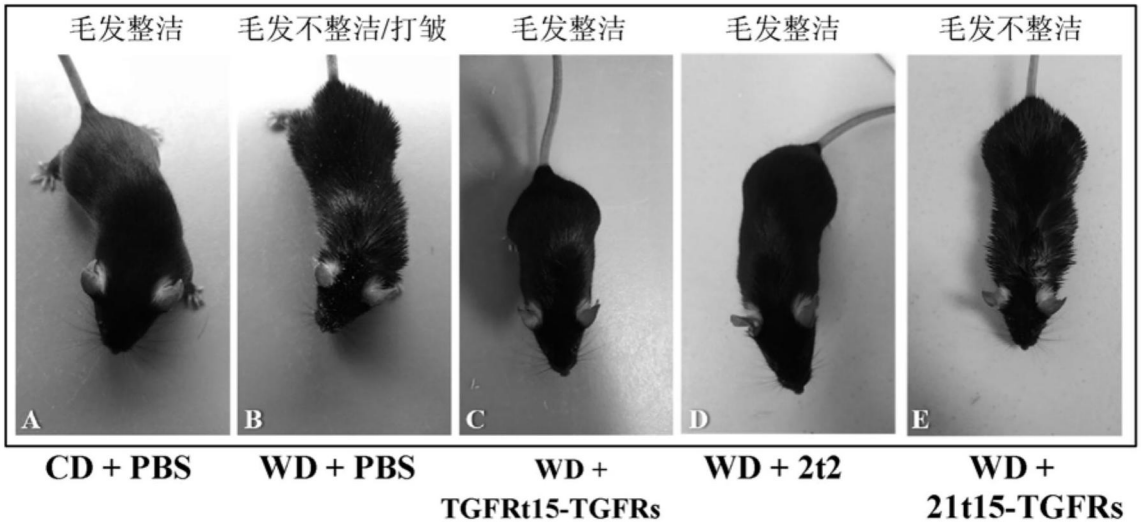

毛发整洁
毛发不整洁/打皱
毛发整洁
毛发整洁
毛发不整洁
A
B
C
D
E
CD + PBS
WD + PBS
WD + TGFRt15-TGFRs
WD + 2t2
WD + 21t15-TGFRs

图6A-6E

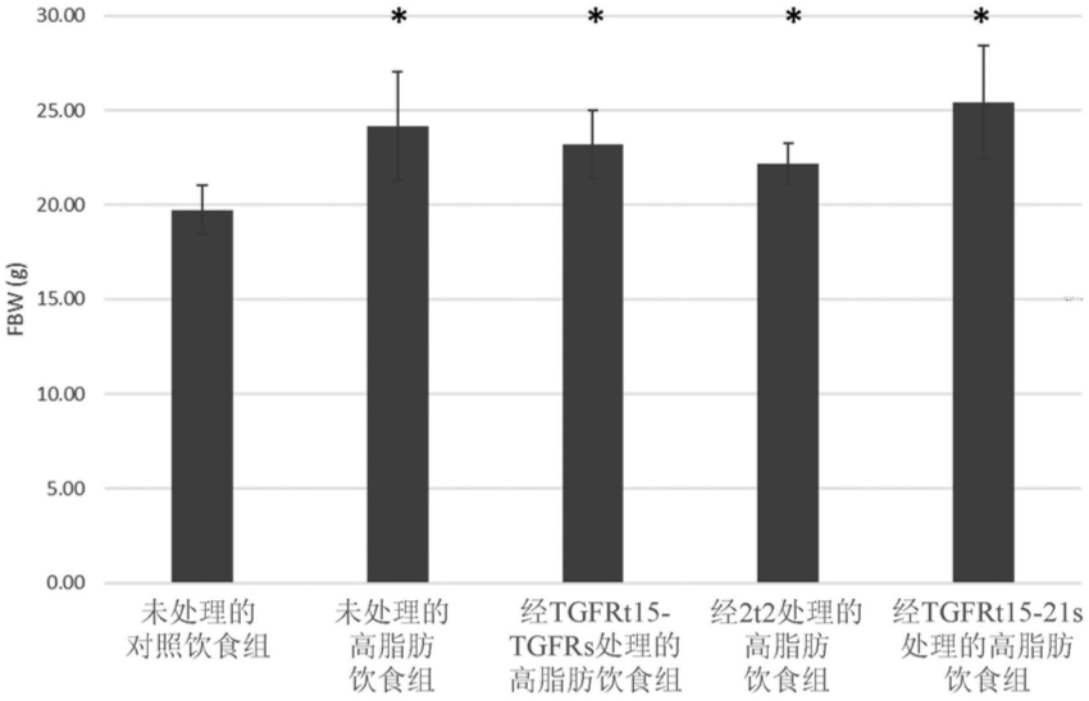

30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
FBW (g)
*
*
*
*
未处理的对照饮食组
未处理的高脂肪饮食组
经TGFRt15-TGFRs处理的高脂肪饮食组
经2t2处理的高脂肪饮食组
经TGFRt15-21s处理的高脂肪饮食组
*相对于正常饮食对照组，具有统计显著性

图7

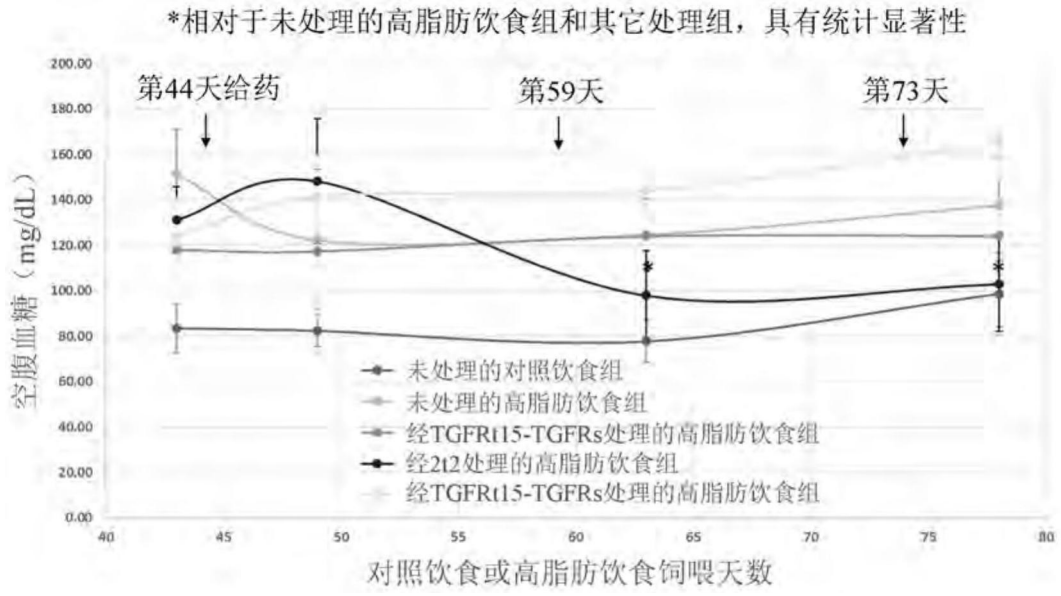

*相对于未处理的高脂肪饮食组和其它处理组，具有统计显著性
第44天给药
第59天
第73天
空腹血糖（mg/dL）
200.00
180.00
160.00
140.00
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
40
45
50
55
60
65
70
75
80
未处理的对照饮食组
未处理的高脂肪饮食组
经TGFRt15-TGFRs处理的高脂肪饮食组
经2t2处理的高脂肪饮食组
经TGFRt15-TGFRs处理的高脂肪饮食组
对照饮食或高脂肪饮食饲喂天数

图8

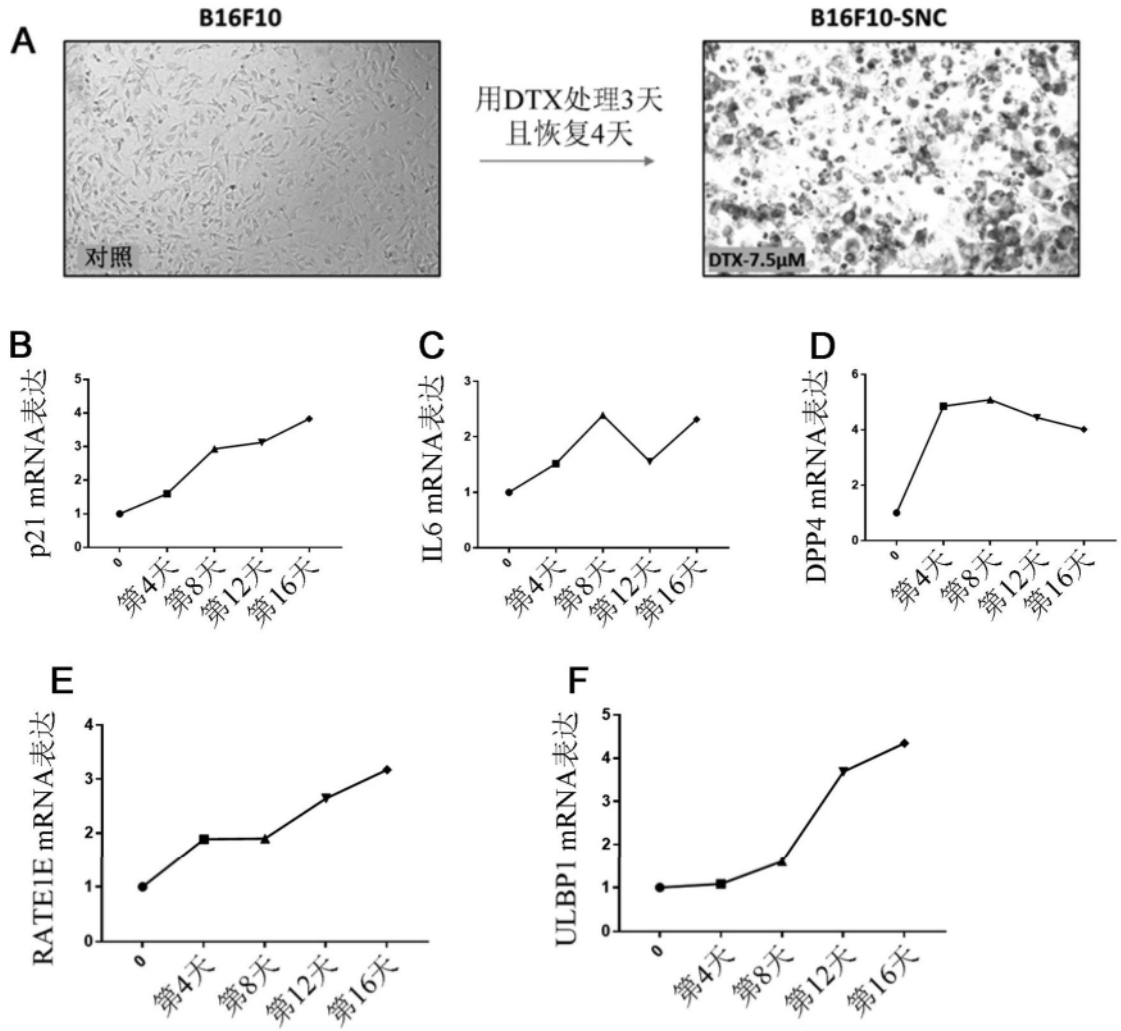

A
B16F10
对照
用DTX处理3天
且恢复4天
B16F10-SNC
DTX-7.5μM
B
p21 mRNA表达
C
IL6 mRNA表达
D
DPP4 mRNA表达
0
第4天
第8天
第12天
第16天
E
RATE1E mRNA表达
F
ULBP1 mRNA表达

图9A-9F

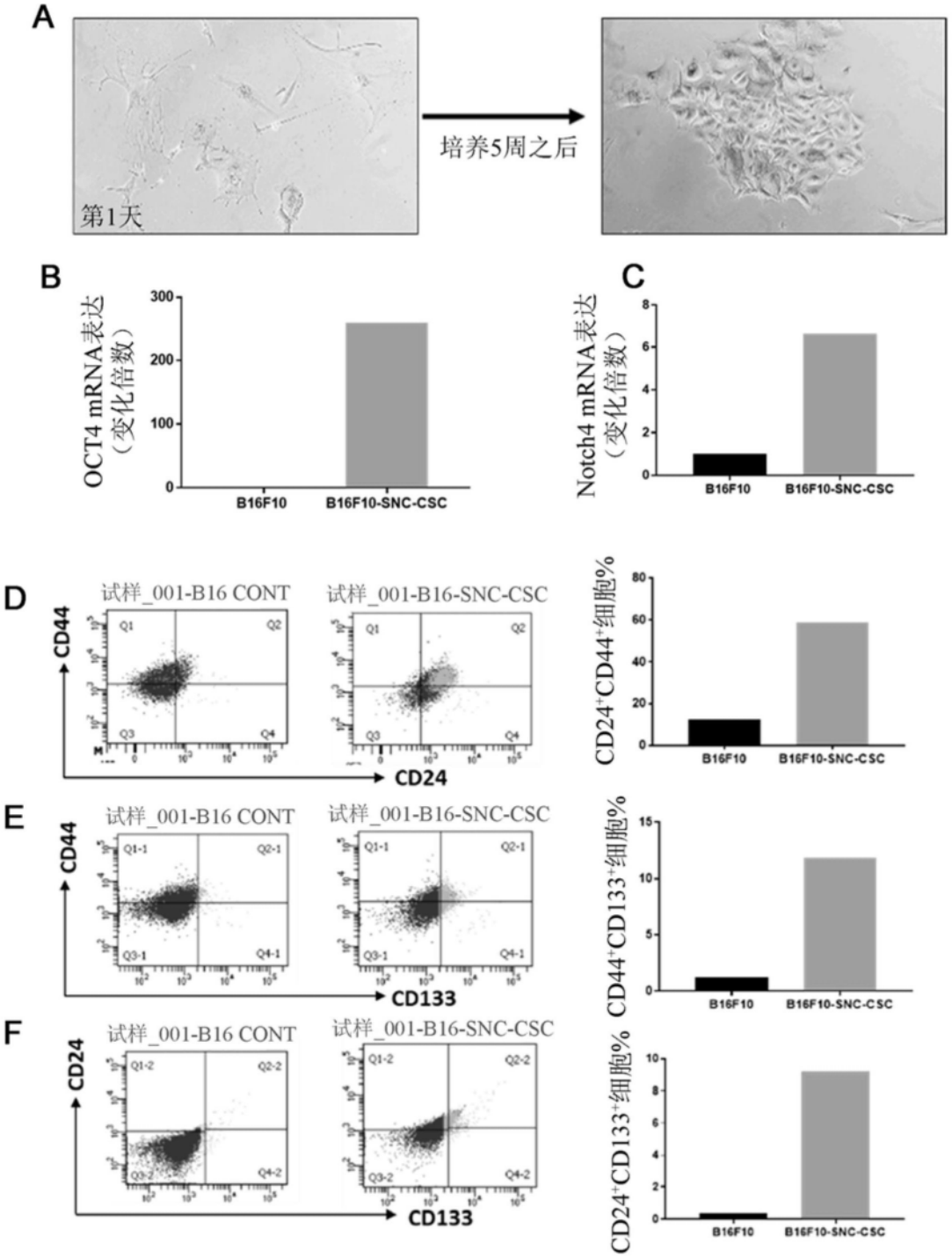

A
第1天
培养5周之后
B
OCT4 mRNA表达（变化倍数）
300
200
100
0
B16F10
B16F10-SNC-CSC
C
Notch4 mRNA表达（变化倍数）
8
6
4
2
0
B16F10
B16F10-SNC-CSC
D
试样_001-B16 CONT
试样_001-B16-SNC-CSC
CD44
CD24
Q1
Q2
Q3
Q4
CD24+CD44+细胞%
80
60
40
20
0
B16F10
B16F10-SNC-CSC
E
试样_001-B16 CONT
试样_001-B16-SNC-CSC
CD44
CD133
Q1-1
Q2-1
Q3-1
Q4-1
CD44+CD133+细胞%
15
10
5
0
B16F10
B16F10-SNC-CSC
F
试样_001-B16 CONT
试样_001-B16-SNC-CSC
CD24
CD133
Q1-2
Q2-2
Q3-2
Q4-2
CD24+CD133+细胞%
10
8
6
4
2
0
B16F10
B16F10-SNC-CSC

图10A-10F

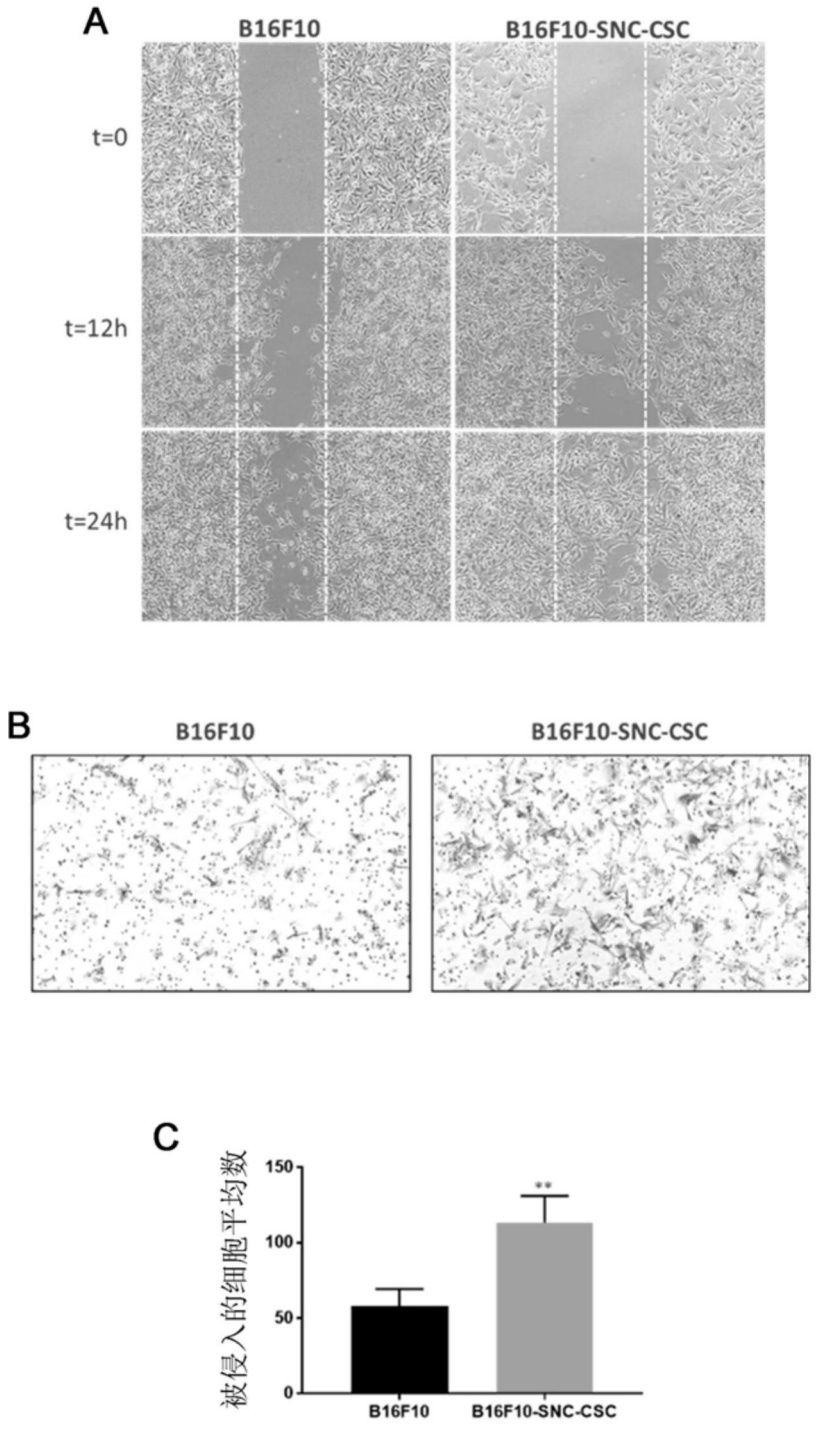

A
B16F10
B16F10-SNC-CSC
t=0
t=12h
t=24h
B
B16F10
B16F10-SNC-CSC
C
被侵入的细胞平均数
150
100
50
0
**
B16F10
B16F10-SNC-CSC

图11A-11C

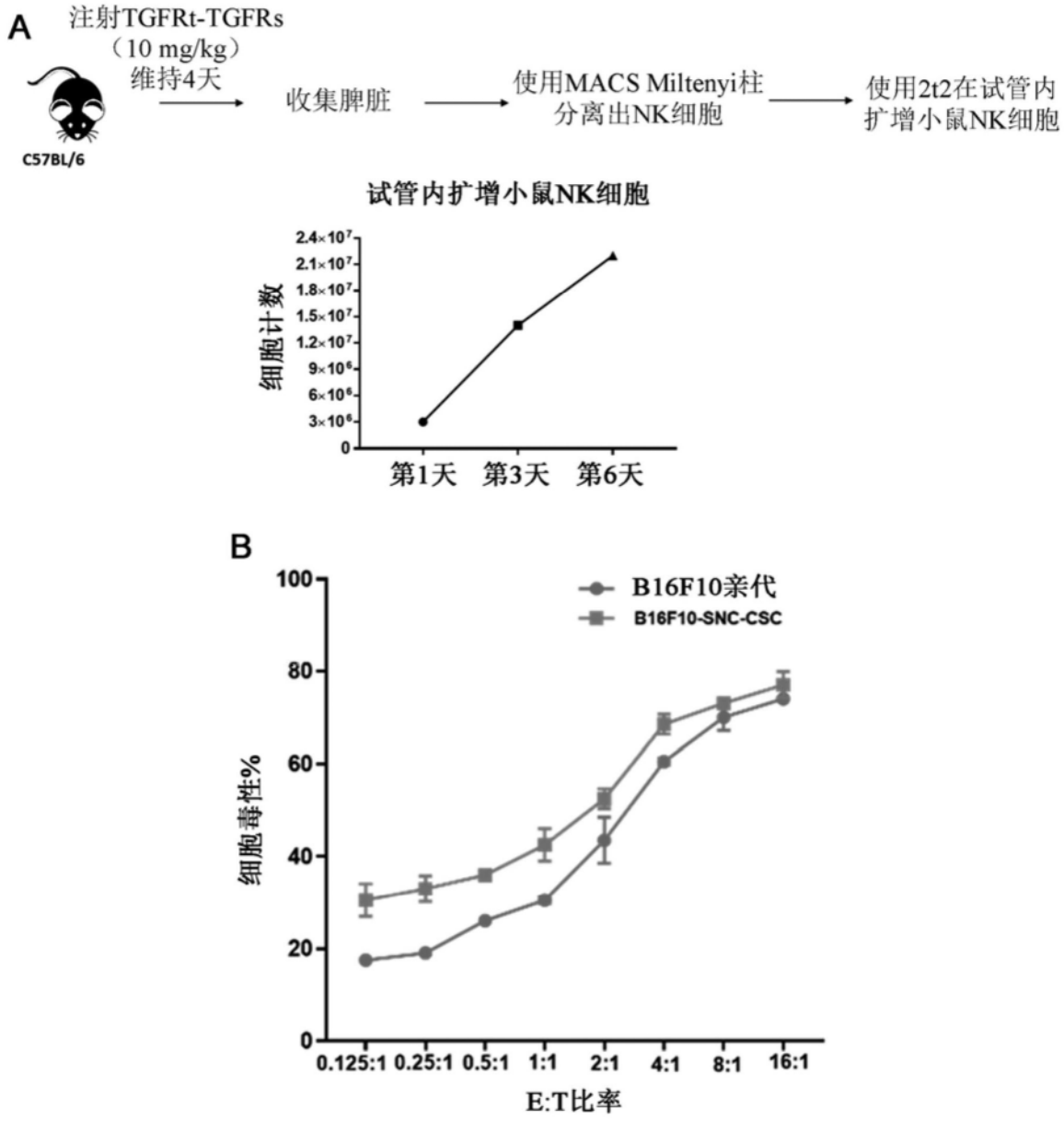

A
注射TGFRt-TGFRs
（10 mg/kg）
维持4天
C57BL/6
收集脾脏
使用MACS Miltenyi柱
分离出NK细胞
使用2t2在试管内
扩增小鼠NK细胞
试管内扩增小鼠NK细胞
细胞计数
2.4×10⁷
2.1×10⁷
1.8×10⁷
1.5×10⁷
1.2×10⁷
9×10⁶
6×10⁶
3×10⁶
0
第1天 第3天 第6天
B
细胞毒性%
100
80
60
40
20
0
B16F10亲代
B16F10-SNC-CSC
0.125:1 0.25:1 0.5:1 1:1 2:1 4:1 8:1 16:1
E:T比率

图12A-12B

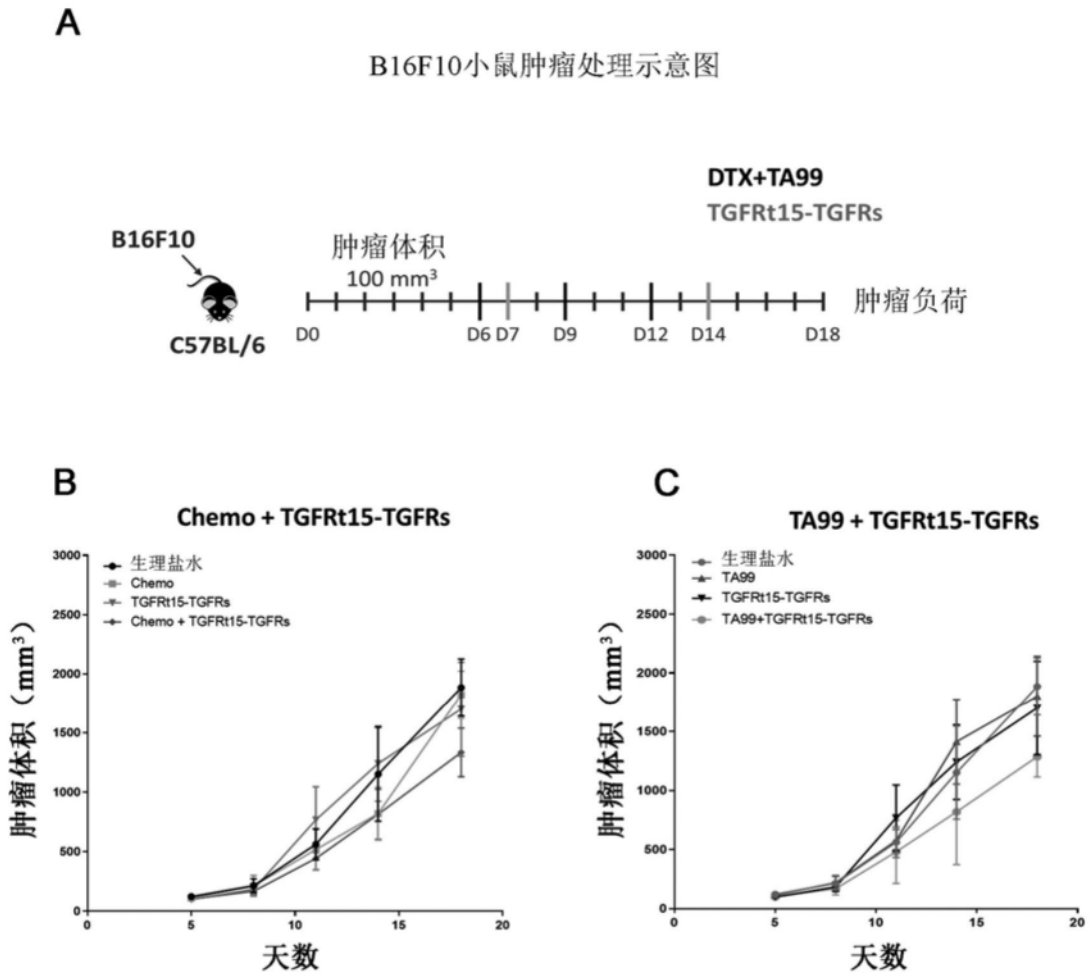

A
B16F10小鼠肿瘤处理示意图
DTX+TA99
TGFRt15-TGFRs
B16F10
C57BL/6
肿瘤体积
100 mm³
肿瘤负荷
D0
D6 D7
D9
D12
D14
D18
B
Chemo + TGFRt15-TGFRs
生理盐水
Chemo
TGFRt15-TGFRs
Chemo + TGFRt15-TGFRs
肿瘤体积（mm³）
天数
C
TA99 + TGFRt15-TGFRs
生理盐水
TA99
TGFRt15-TGFRs
TA99+TGFRt15-TGFRs
肿瘤体积（mm³）
天数

图13A-13C

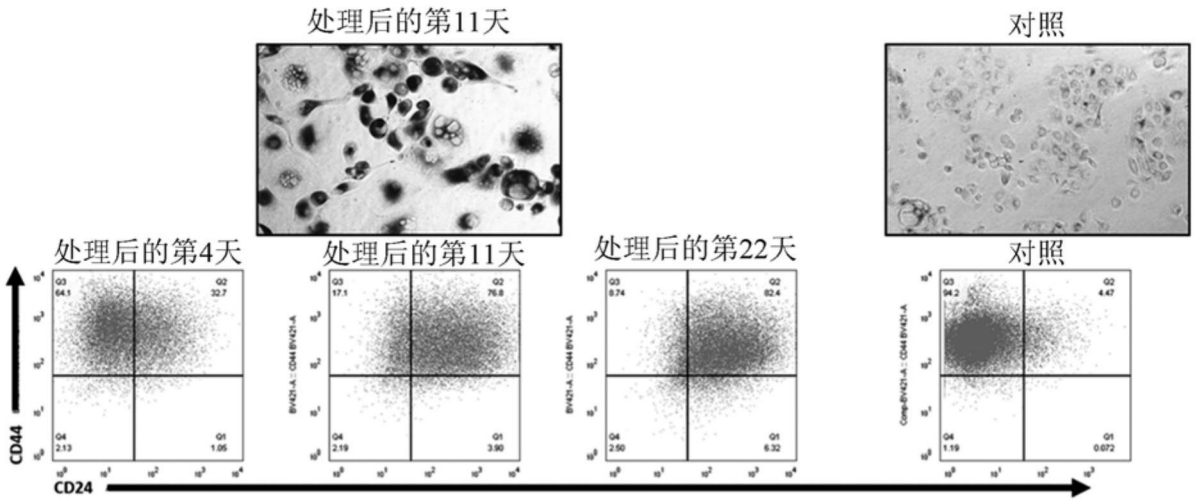

处理后的第11天
对照
处理后的第4天
处理后的第11天
处理后的第22天
对照
CD44
CD24

图14

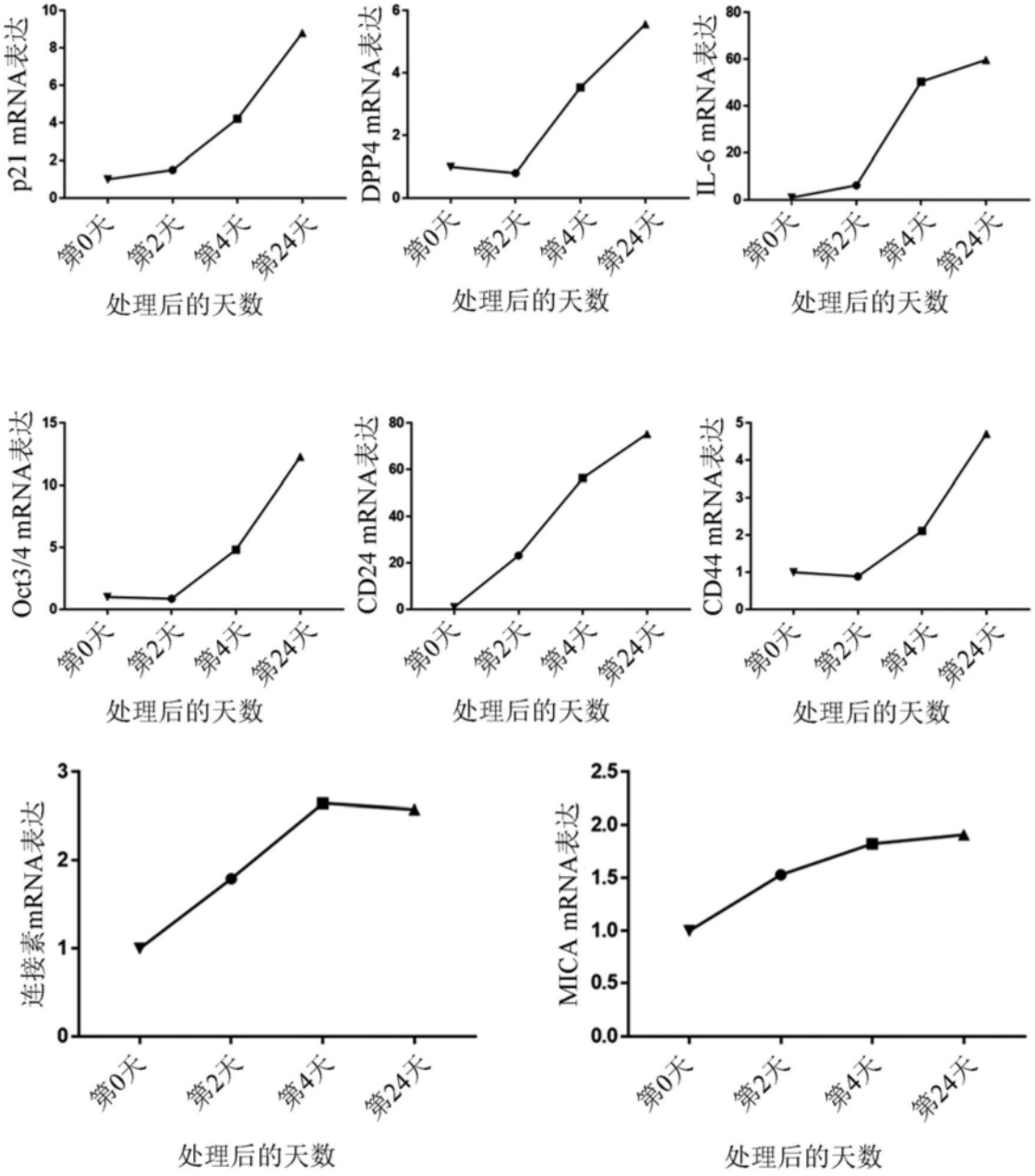

p21 mRNA表达
DPP4 mRNA表达
IL-6 mRNA表达
Oct3/4 mRNA表达
CD24 mRNA表达
CD44 mRNA表达
连接素mRNA表达
MICA mRNA表达
第0天
第2天
第4天
第24天
处理后的天数

图15

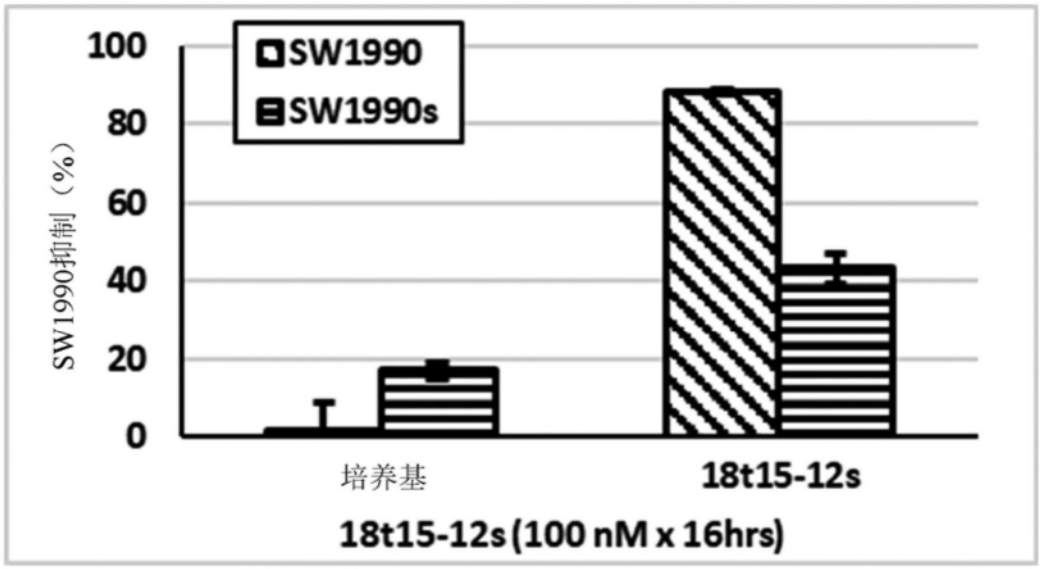


图16

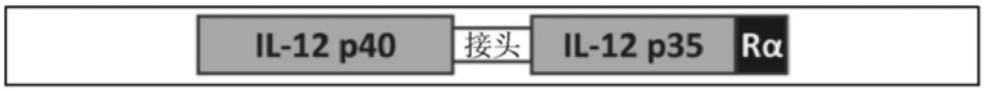


图17



图18

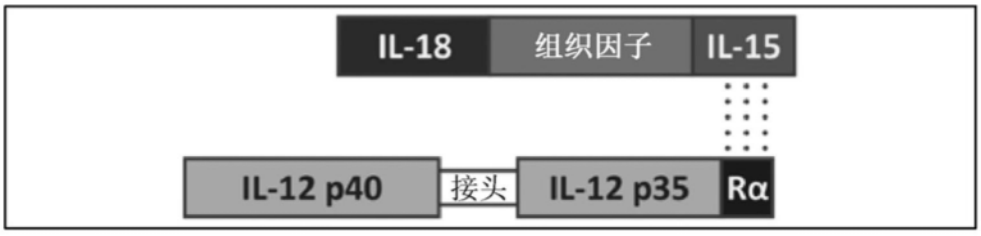


图19

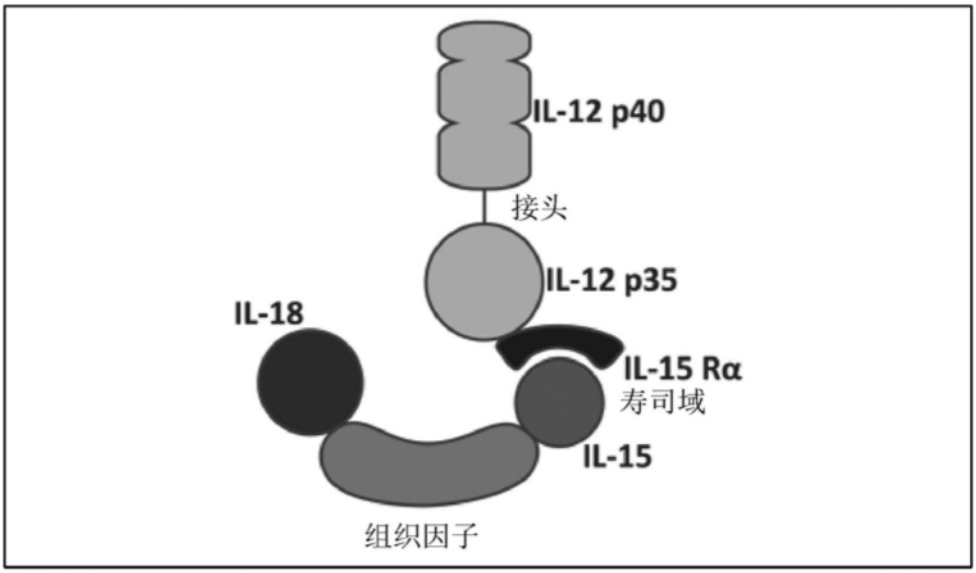

IL-12 p40
接头
IL-12 p35
IL-18
IL-15 Rα
寿司域
IL-15
组织因子

图20

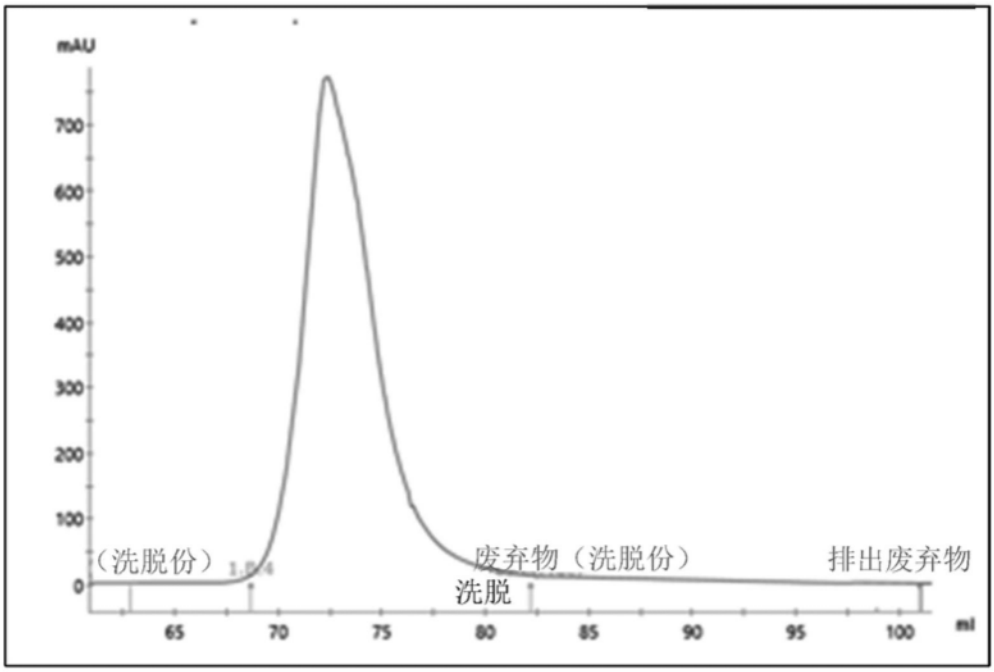

mAU
700
600
500
400
300
200
100
0
（洗脱份）
废弃物（洗脱份）
排出废弃物
洗脱
65
70
75
80
85
90
95
100
ml

图21

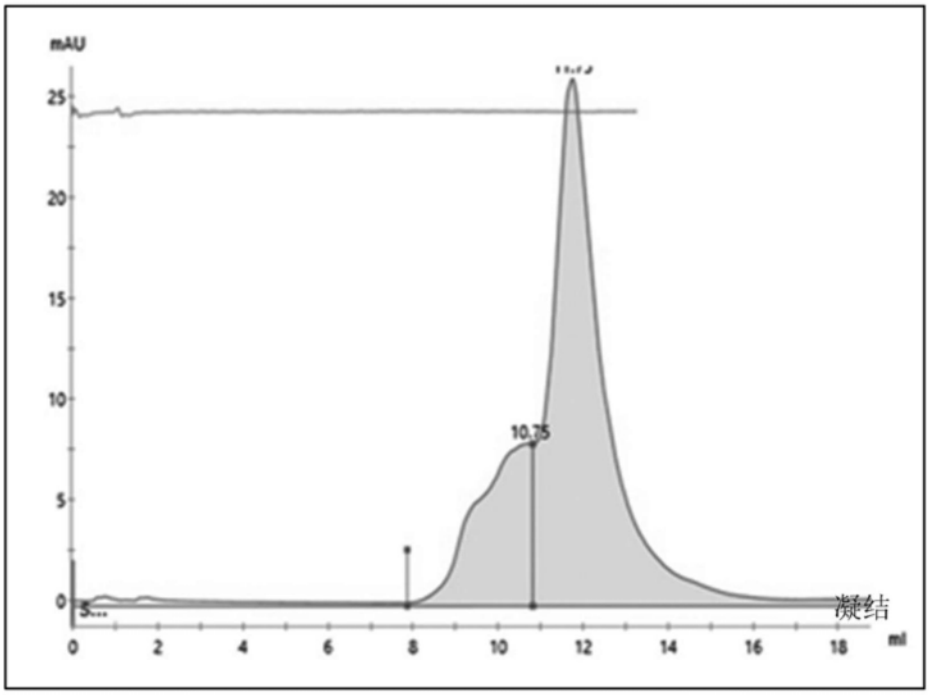

mAU
25
20
15
10
5
0
10.75
凝结
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
ml

图22

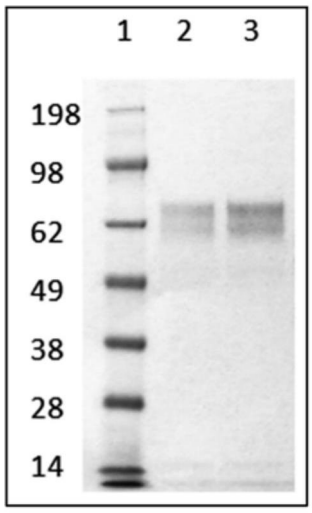

1
2
3
198
98
62
49
38
28
14

图23

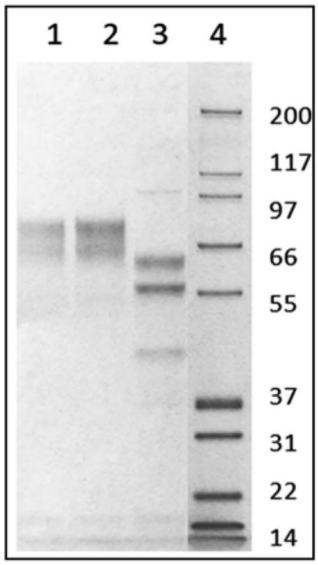

1
2
3
4
200
117
97
66
55
37
31
22
14

图24

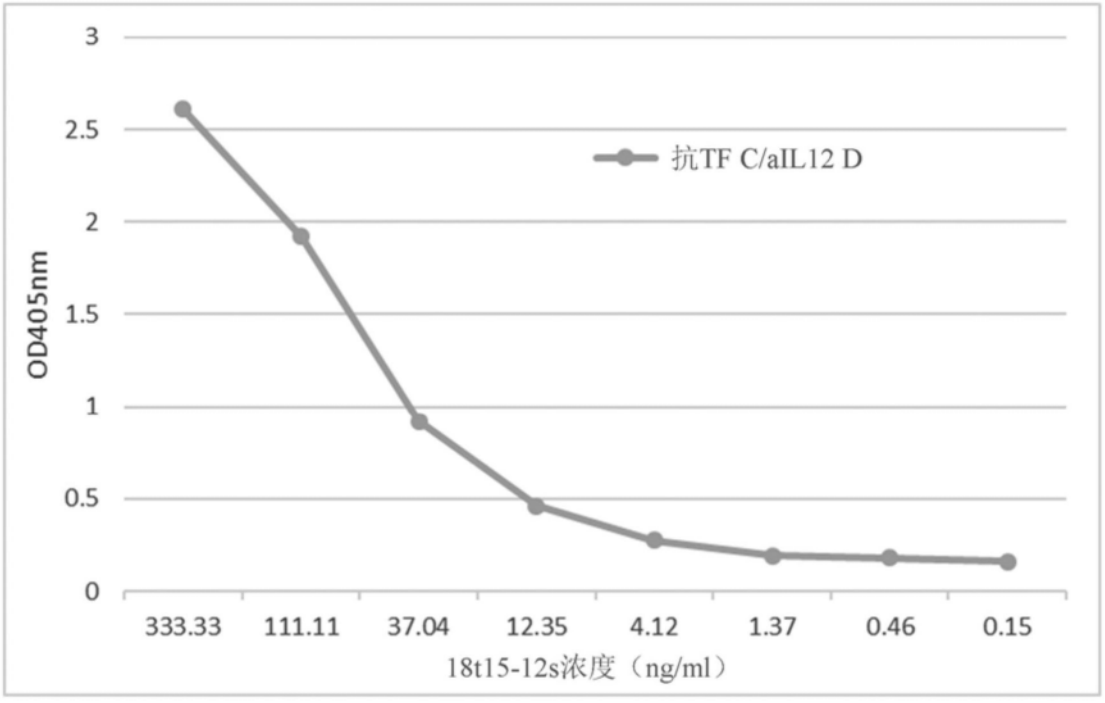

3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OD405nm
抗TF C/aIL12 D
333.33
111.11
37.04
12.35
4.12
1.37
0.46
0.15
18t15-12s浓度（ng/ml）

图25

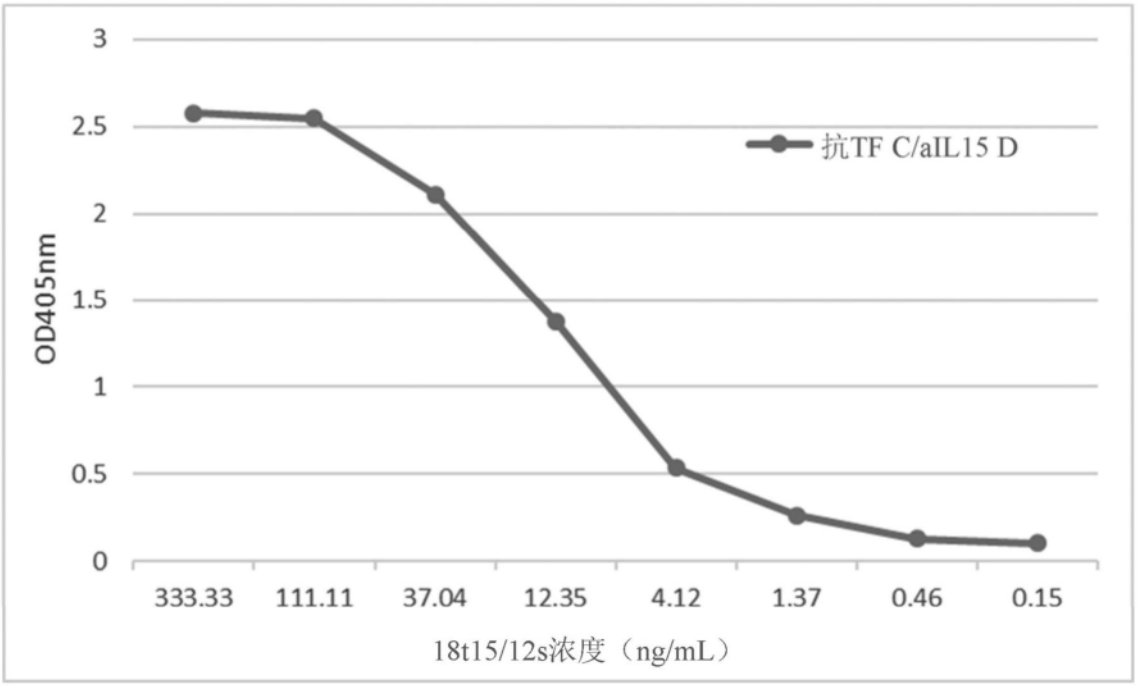

3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OD405nm
抗TF C/aIL15 D
333.33
111.11
37.04
12.35
4.12
1.37
0.46
0.15
18t15/12s浓度（ng/mL）

图26

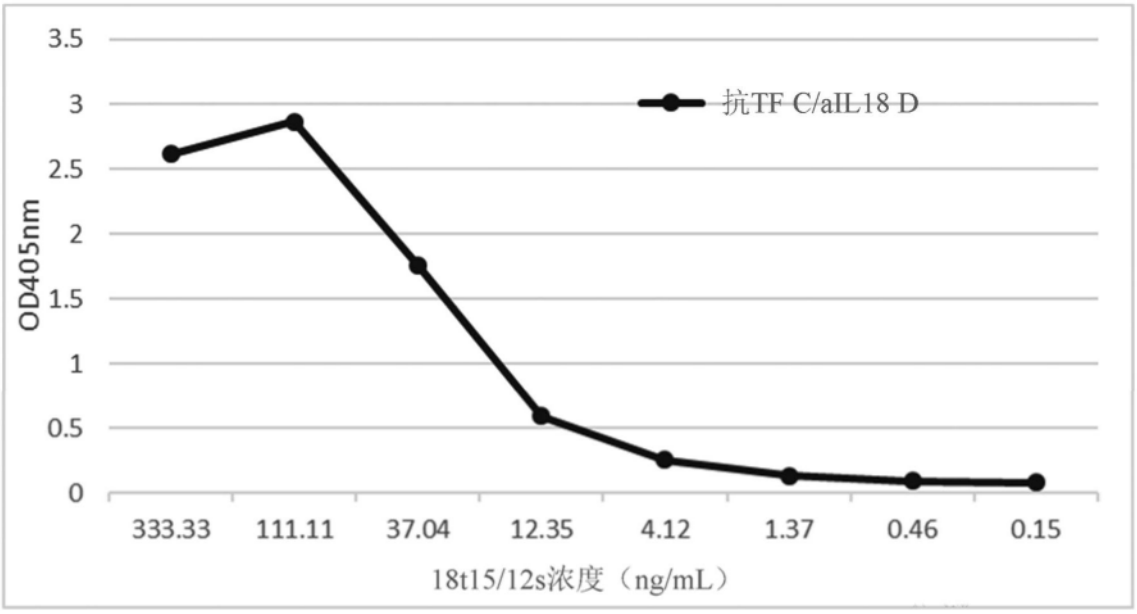

3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OD405nm
抗TF C/aIL18 D
333.33
111.11
37.04
12.35
4.12
1.37
0.46
0.15
18t15/12s浓度（ng/mL）

图27

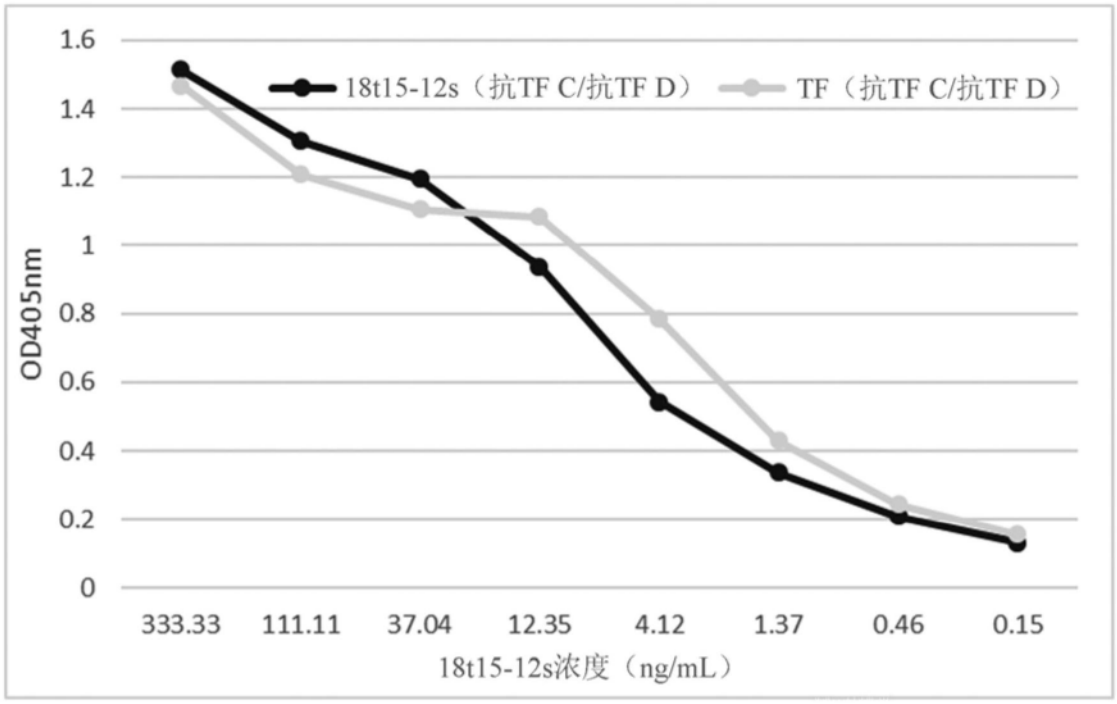

18t15-12s（抗TF C/抗TF D）
TF（抗TF C/抗TF D）
OD405nm
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
333.33
111.11
37.04
12.35
4.12
1.37
0.46
0.15
18t15-12s浓度（ng/mL）

图28

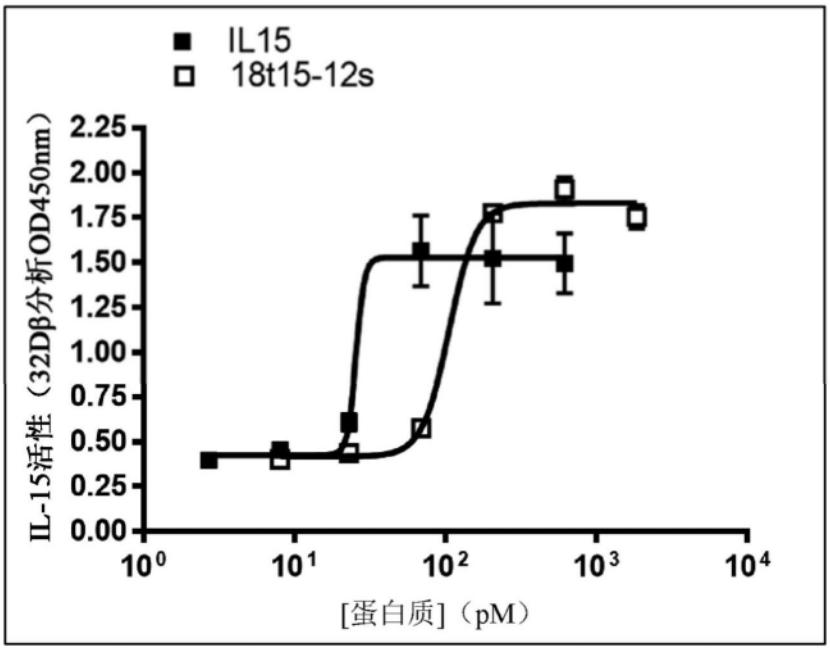

IL15
18t15-12s
IL-15活性（32Dβ分析OD450nm）
2.25
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
[蛋白质]（pM）

图29

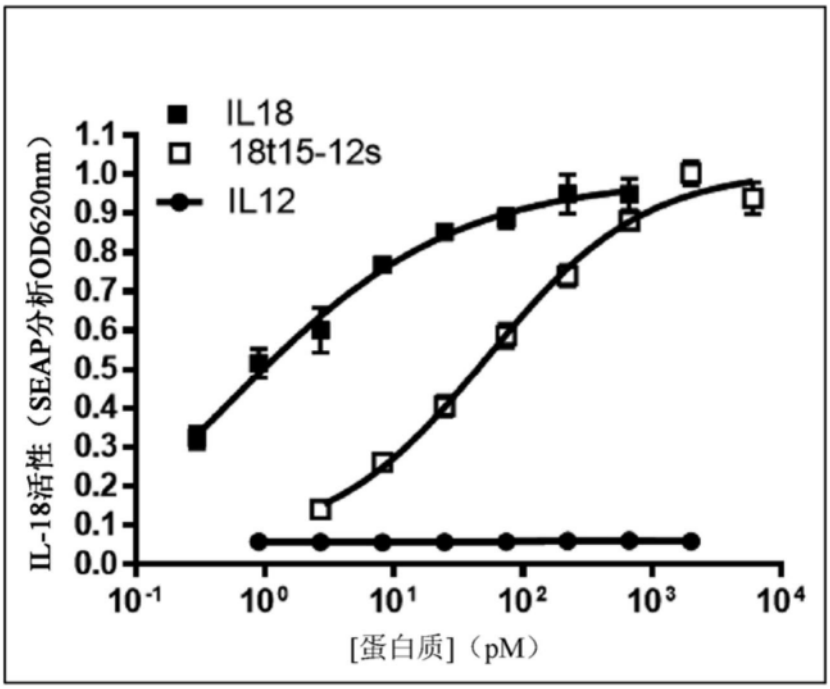

IL18
18t15-12s
IL12
IL-18活性（SEAP分析OD620nm）
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
10-1
100
101
102
103
104
[蛋白质]（pM）

图30

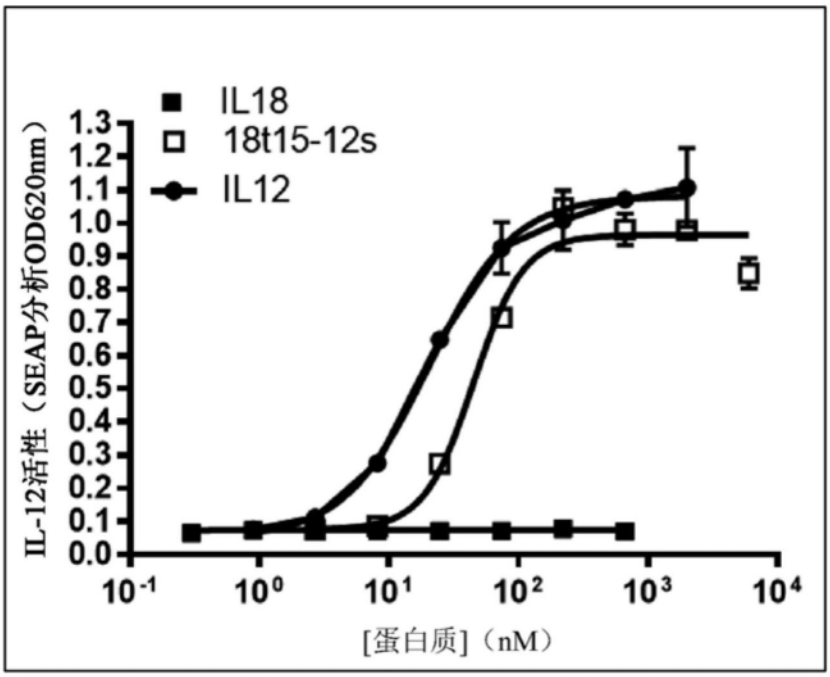

IL18
18t15-12s
IL12
IL-12活性（SEAP分析OD620nm）
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
10-1
100
101
102
103
104
[蛋白质]（nM）

图31

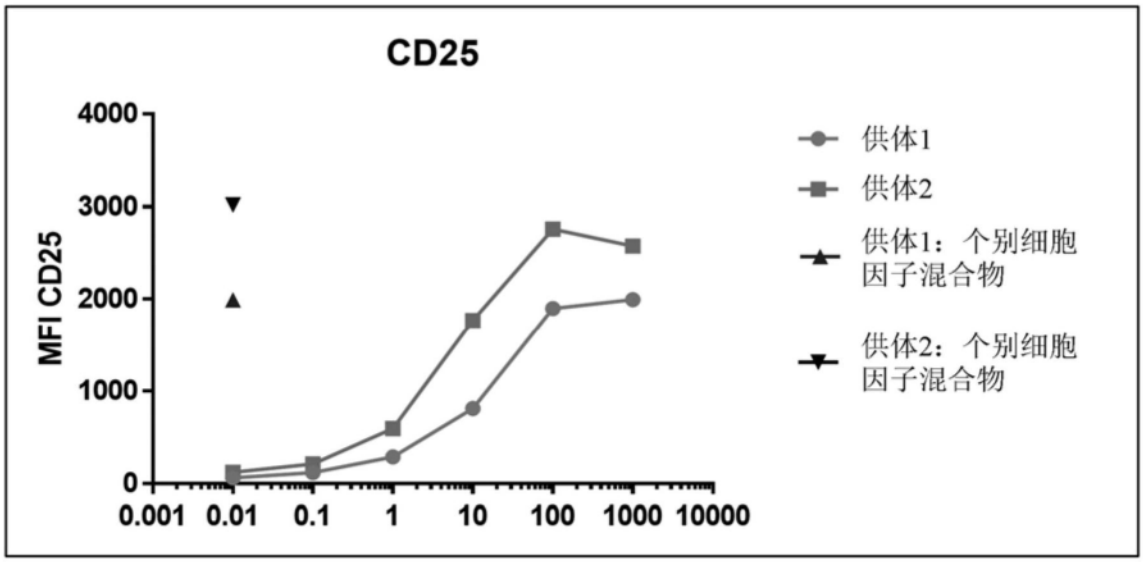

CD25
MFI CD25
4000
3000
2000
1000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
供体1
供体2
供体1：个别细胞因子混合物
供体2：个别细胞因子混合物

图32A

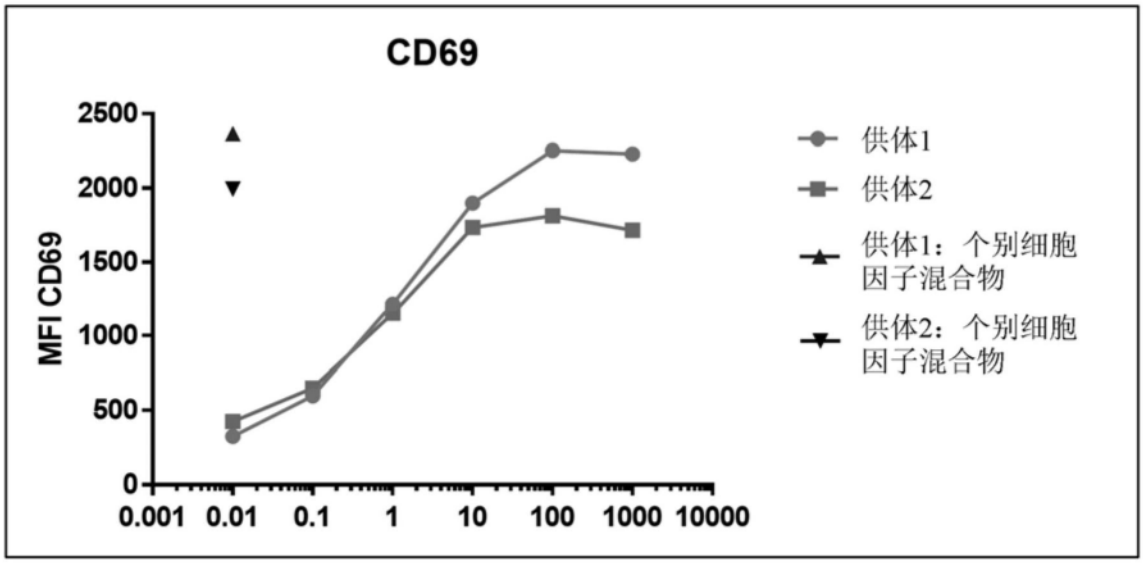

CD69
MFI CD69
2500
2000
1500
1000
500
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
供体1
供体2
供体1：个别细胞因子混合物
供体2：个别细胞因子混合物

图32B

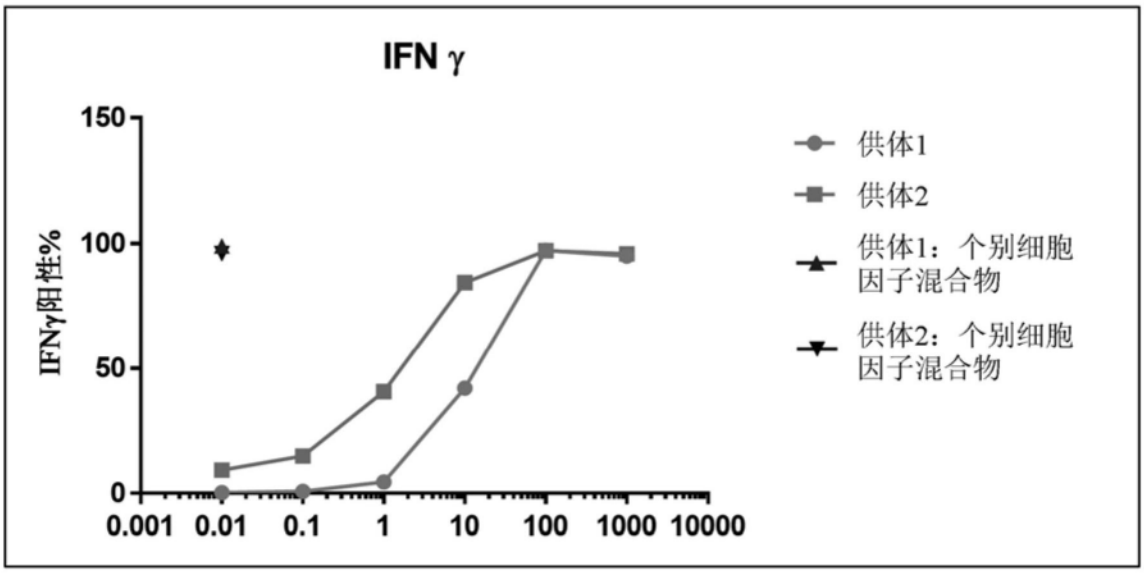

IFN γ
IFNγ阳性%
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
供体1
供体2
供体1：个别细胞因子混合物
供体2：个别细胞因子混合物

图33

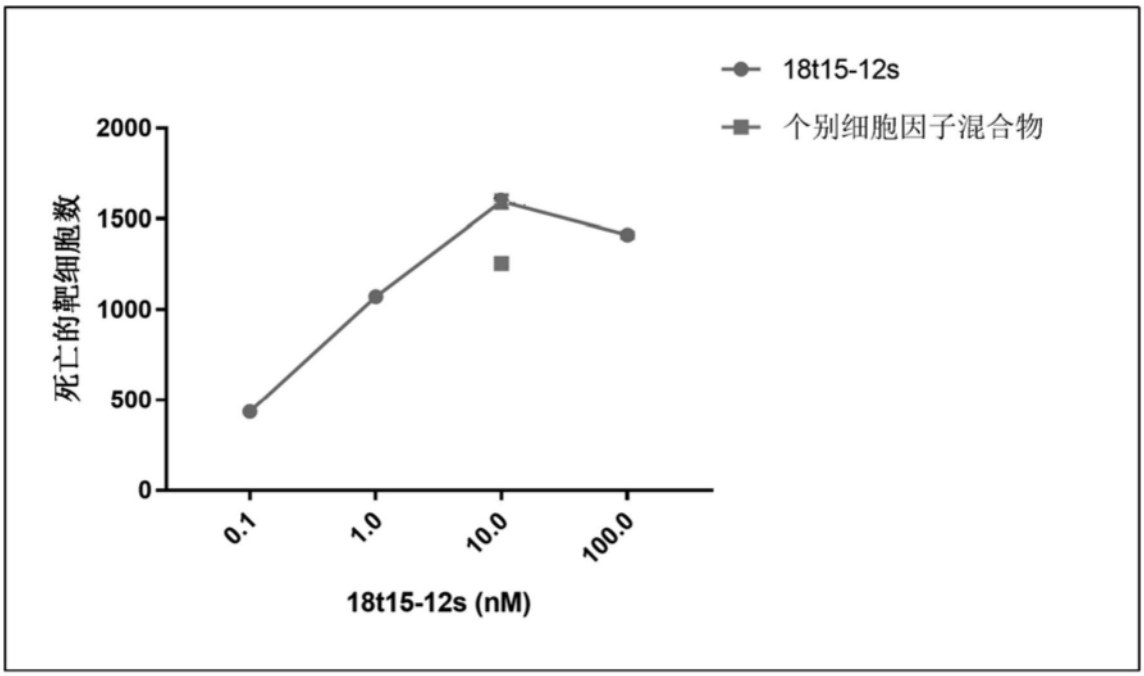

18t15-12s
个别细胞因子混合物
死亡的靶细胞数
2000
1500
1000
500
0
0.1
1.0
10.0
100.0
18t15-12s (nM)

图34

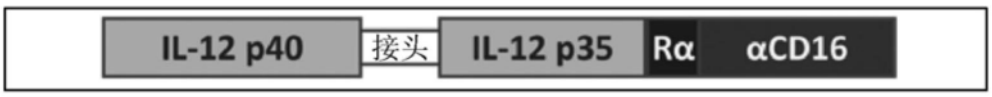

IL-12 p40
接头
IL-12 p35
Rα
αCD16

图35


IL-18
组织因子
IL-15

图36


IL-18
组织因子
IL-15
IL-12 p40
接头
IL-12 p35
Rα
αCD16

图37

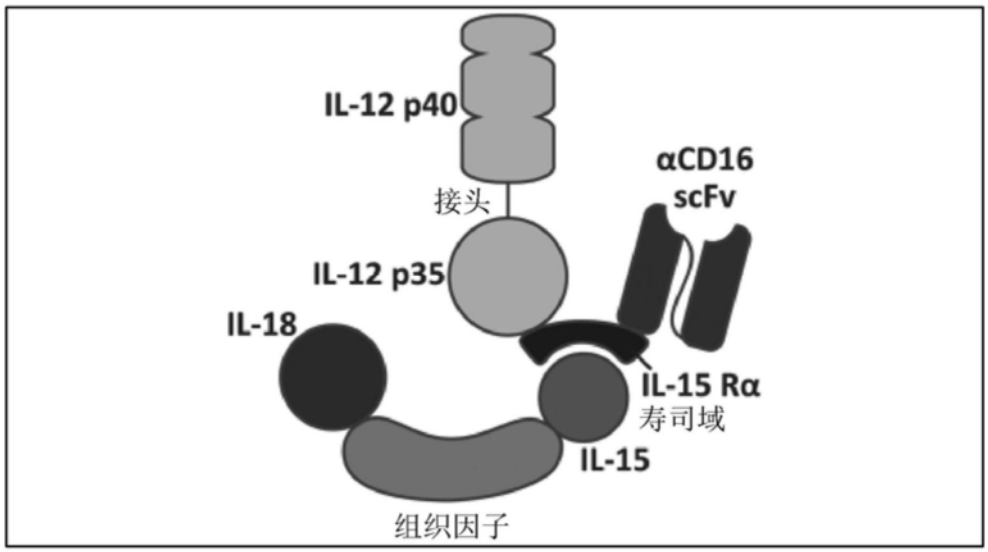

IL-12 p40
αCD16
scFv
接头
IL-12 p35
IL-18
IL-15 Rα
寿司域
IL-15
组织因子

图38

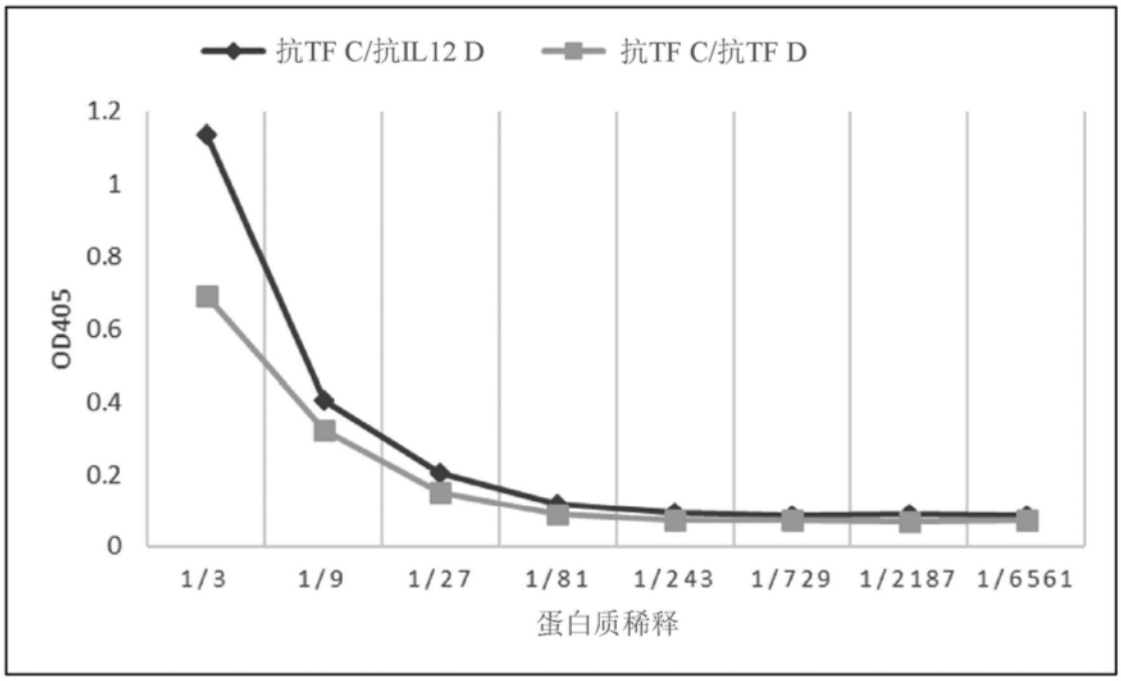


图39



图40



图41



图42

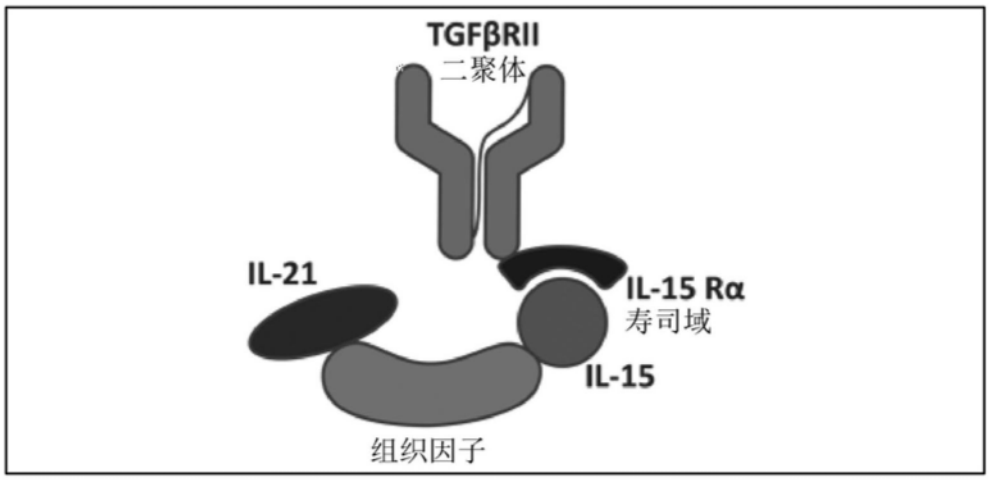

TGFβRII
二聚体
IL-21
IL-15 Rα
寿司域
IL-15
组织因子

图43

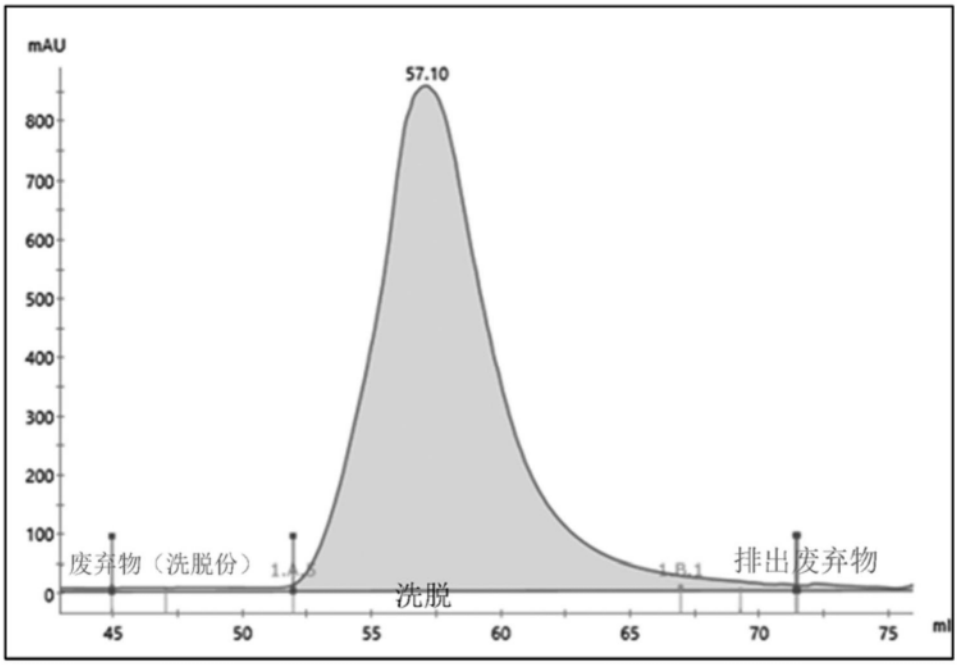

mAU
57.10
800
700
600
500
400
300
200
100
0
废弃物（洗脱份）
洗脱
排出废弃物
45
50
55
60
65
70
75
ml

图44

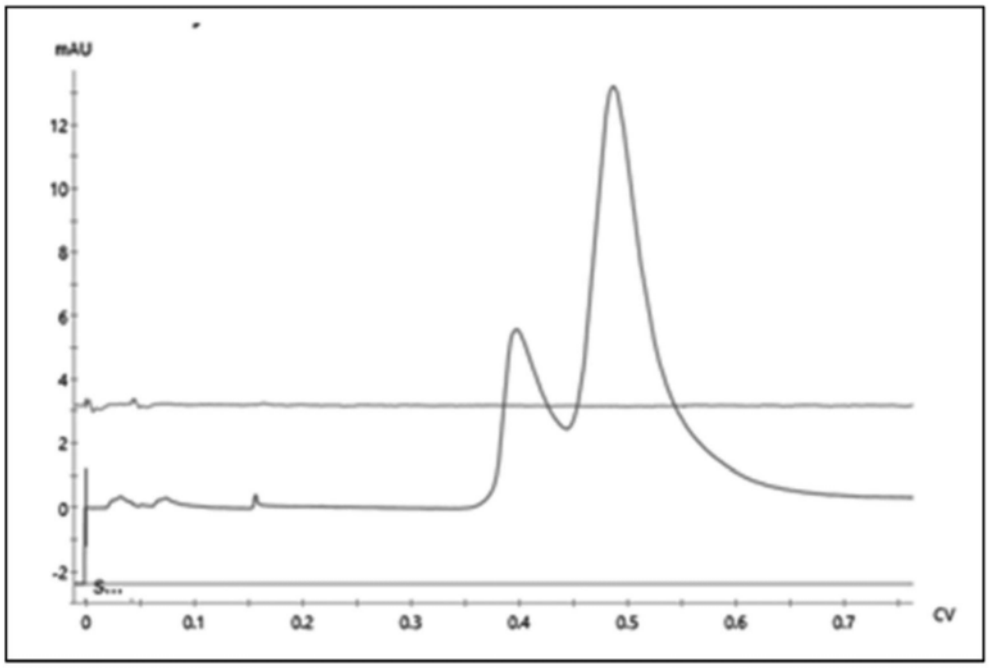

mAU
12
10
8
6
4
2
0
-2
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
CV

图45

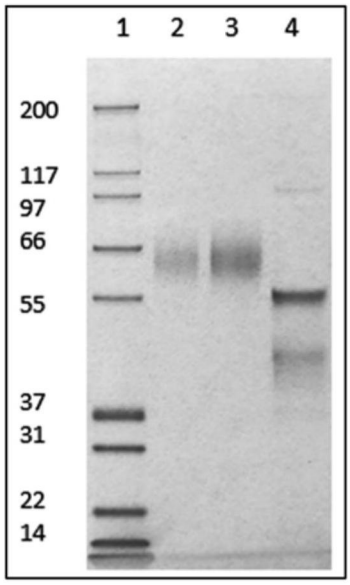

1
2
3
4
200
117
97
66
55
37
31
22
14

图46

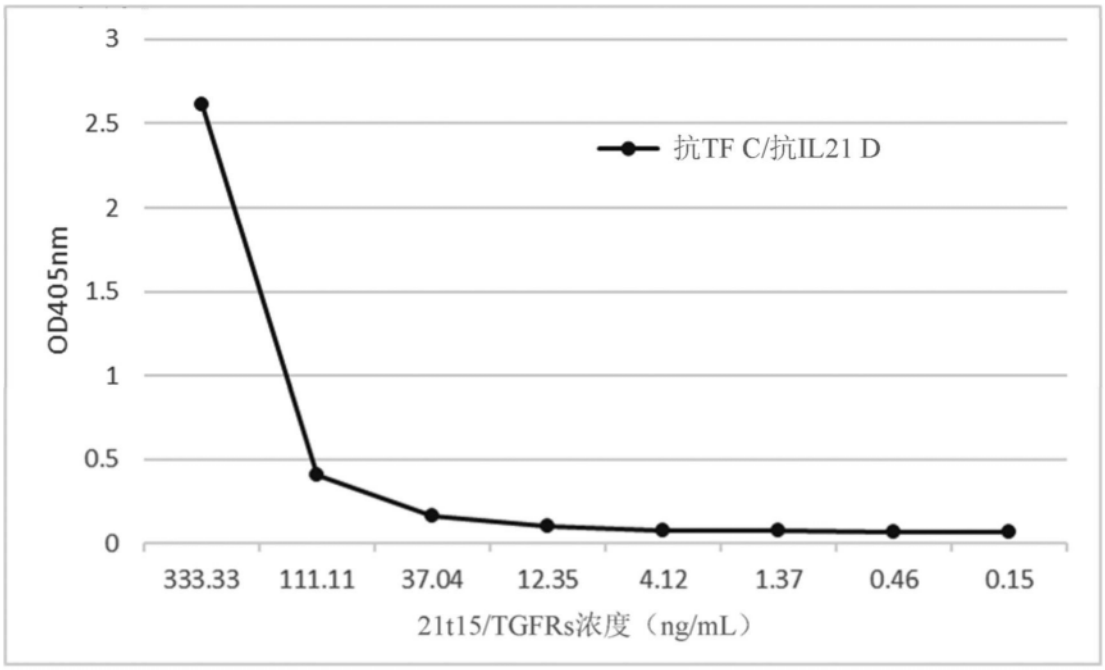

3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OD405nm
抗TF C/抗IL21 D
333.33
111.11
37.04
12.35
4.12
1.37
0.46
0.15
21t15/TGFRs浓度（ng/mL）

图47

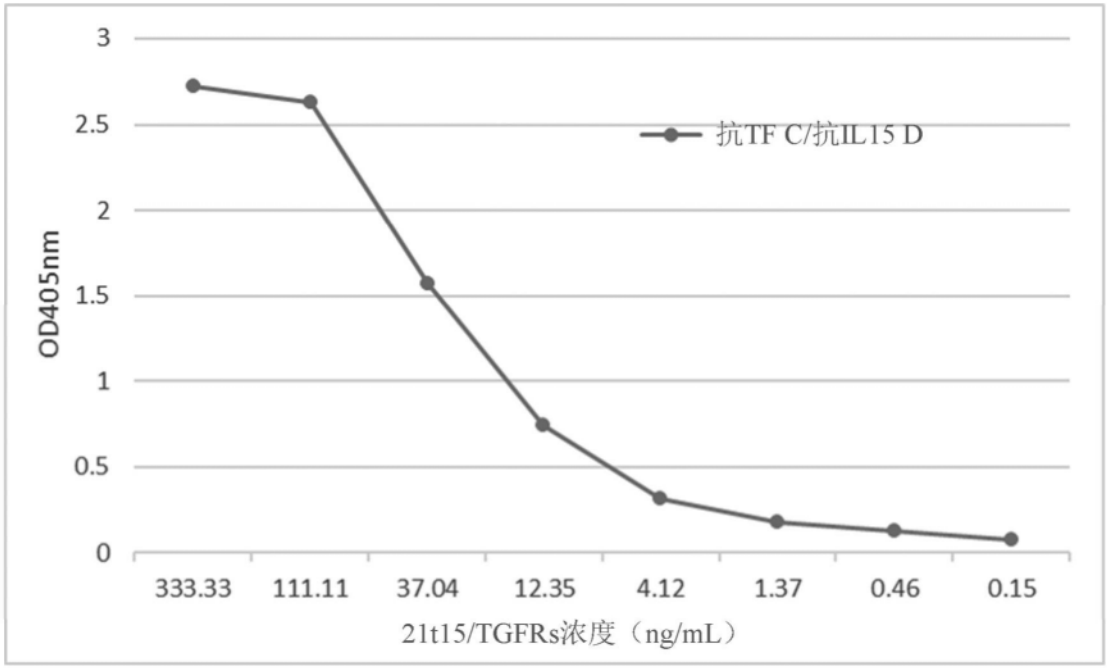

3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OD405nm
抗TF C/抗IL15 D
333.33
111.11
37.04
12.35
4.12
1.37
0.46
0.15
21t15/TGFRs浓度（ng/mL）

图48

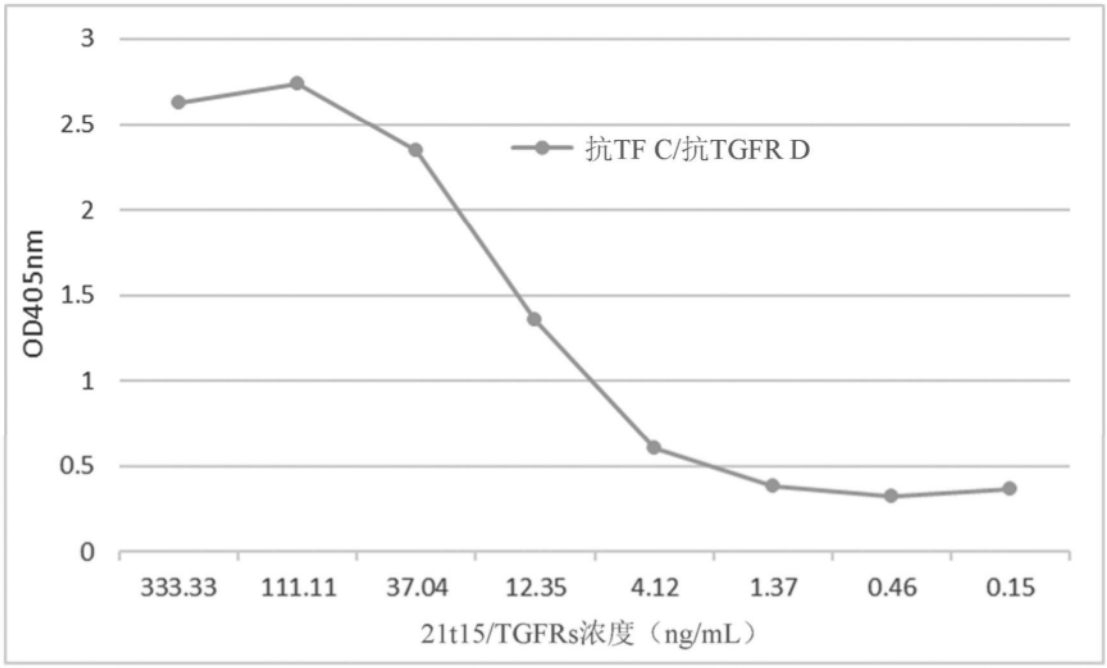

3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OD405nm
抗TF C/抗TGFR D
333.33
111.11
37.04
12.35
4.12
1.37
0.46
0.15
21t15/TGFRs浓度（ng/mL）

图49

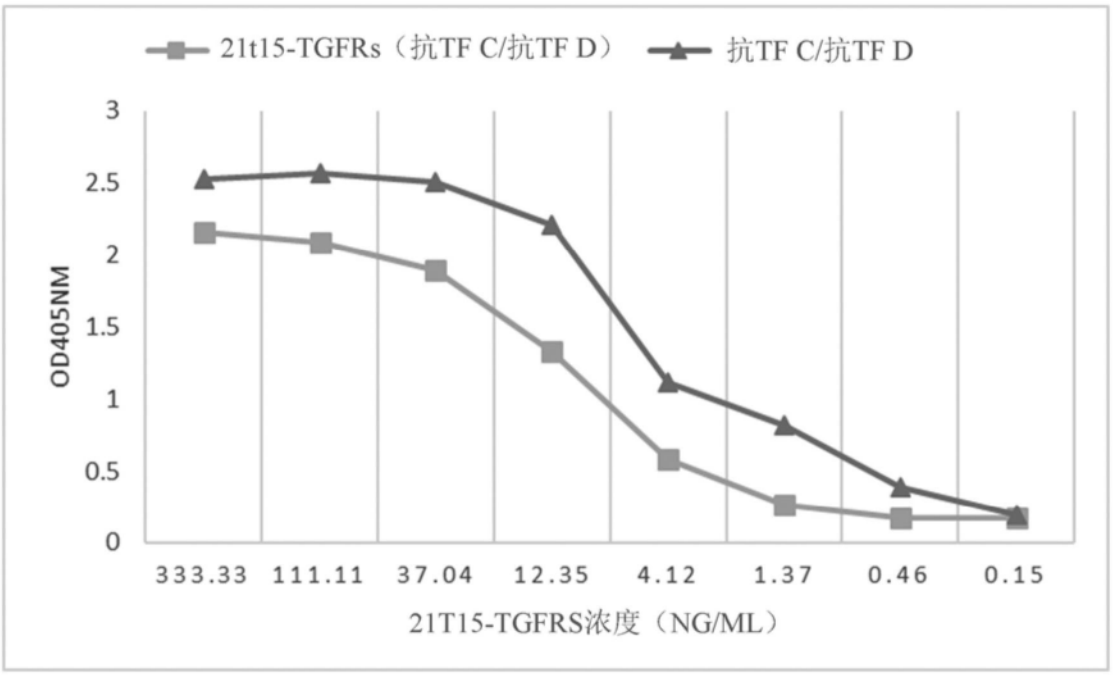

21t15-TGFRs（抗TF C/抗TF D）
抗TF C/抗TF D
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OD405NM
333.33
111.11
37.04
12.35
4.12
1.37
0.46
0.15
21T15-TGFRS浓度（NG/ML）

图50

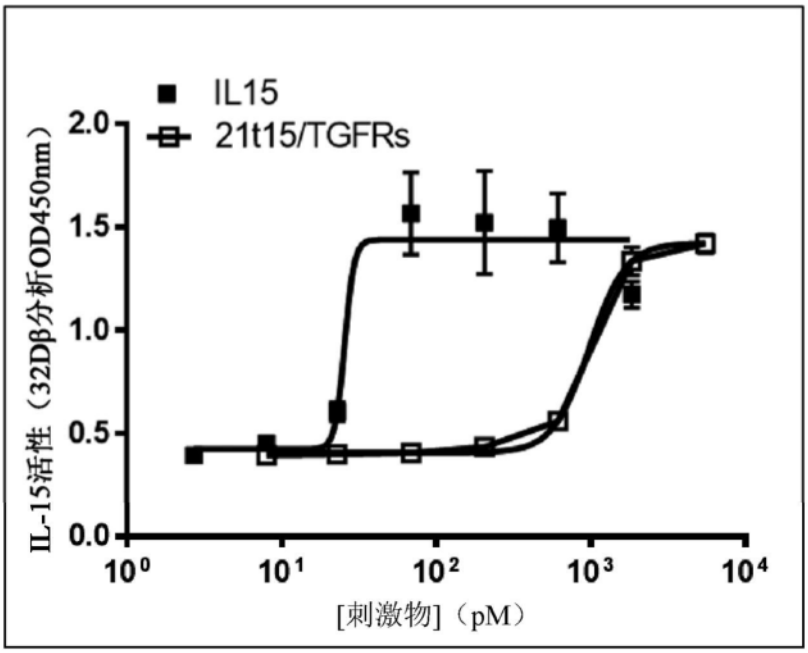

IL15
21t15/TGFRs
IL-15活性（32Dβ分析OD450nm）
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
[刺激物]（pM）

图51

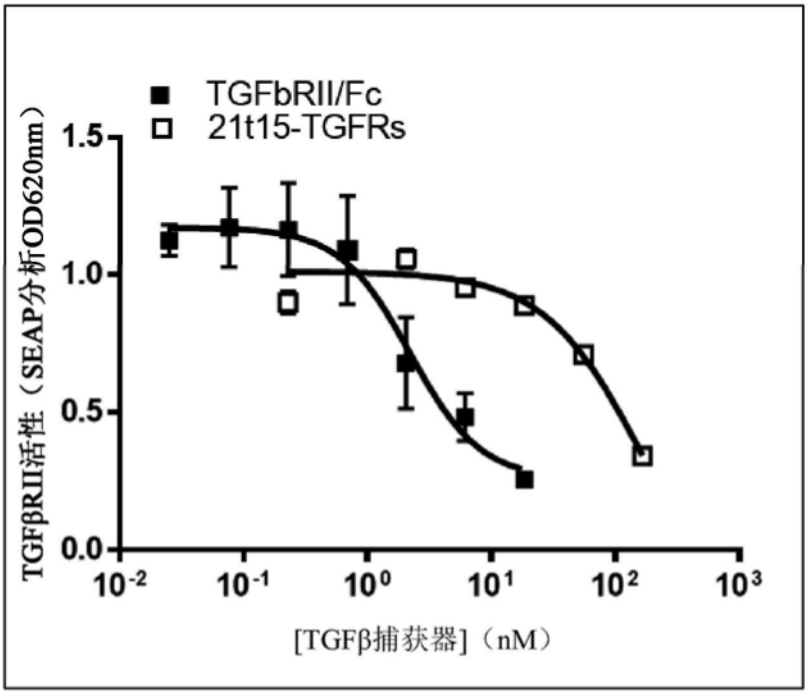

TGFbRII/Fc
21t15-TGFRs
TGFβRII活性（SEAP分析OD620nm）
1.5
1.0
0.5
0.0
10⁻²
10⁻¹
10⁰
10¹
10²
10³
[TGFβ捕获器]（nM）

图52

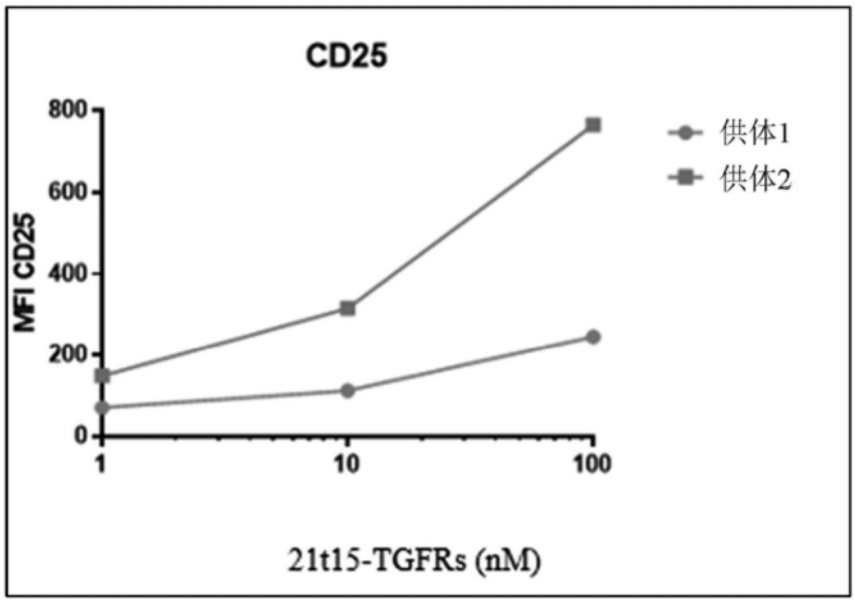

CD25
800
600
400
200
0
MFI CD25
1
10
100
21t15-TGFRs (nM)
供体1
供体2

图53

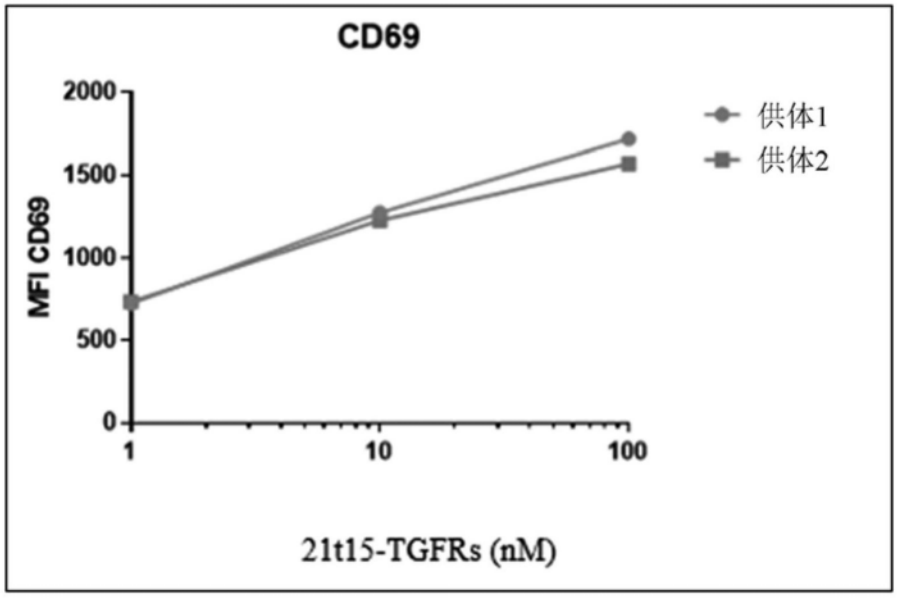

CD69
2000
1500
1000
500
0
MFI CD69
1
10
100
21t15-TGFRs (nM)
供体1
供体2

图54

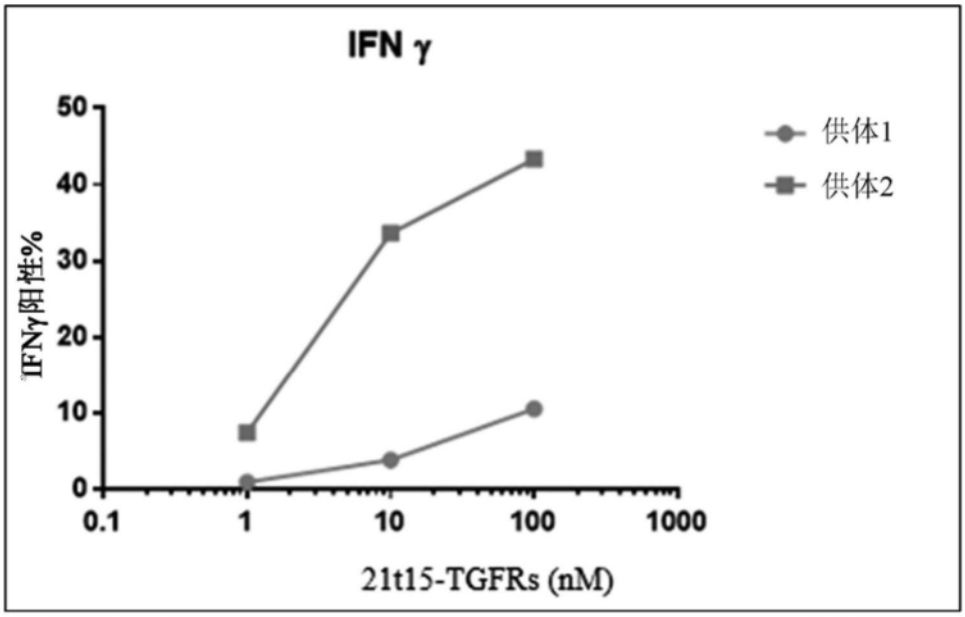

IFN γ
IFNγ阳性%
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
100
1000
21t15-TGFRs (nM)
供体1
供体2

图55

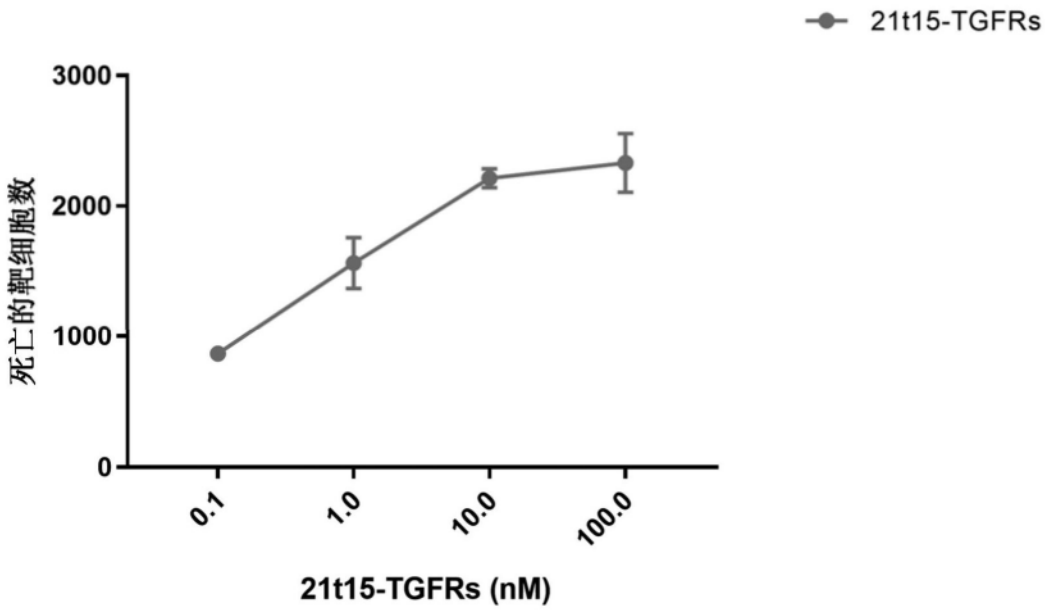

21t15-TGFRs
死亡的靶细胞数
3000
2000
1000
0
0.1
1.0
10.0
100.0
21t15-TGFRs (nM)

图56

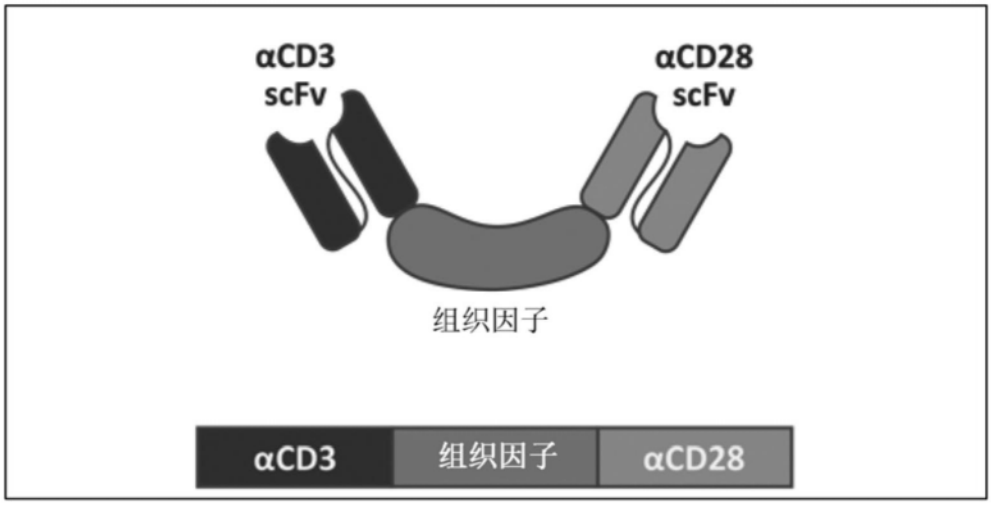

αCD3
scFv
αCD28
scFv
组织因子
αCD3
组织因子
αCD28

图57

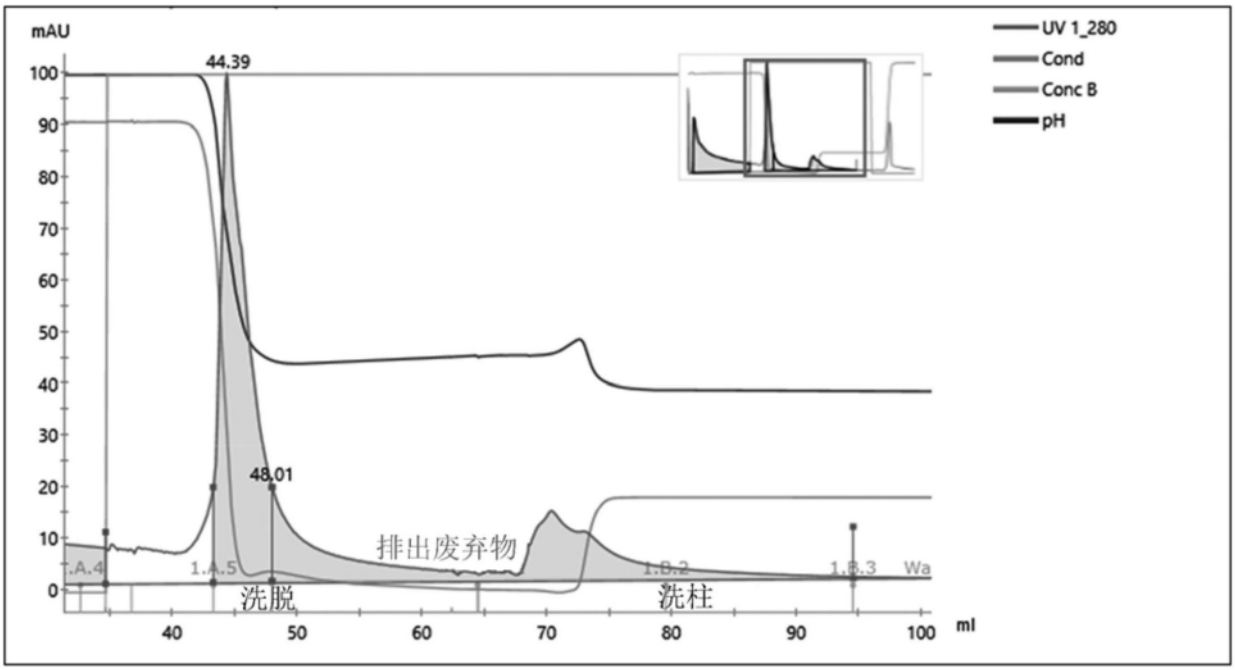

mAU
UV 1_280
Cond
Conc B
pH
44.39
48.01
排出废弃物
洗脱
洗柱
ml

图58

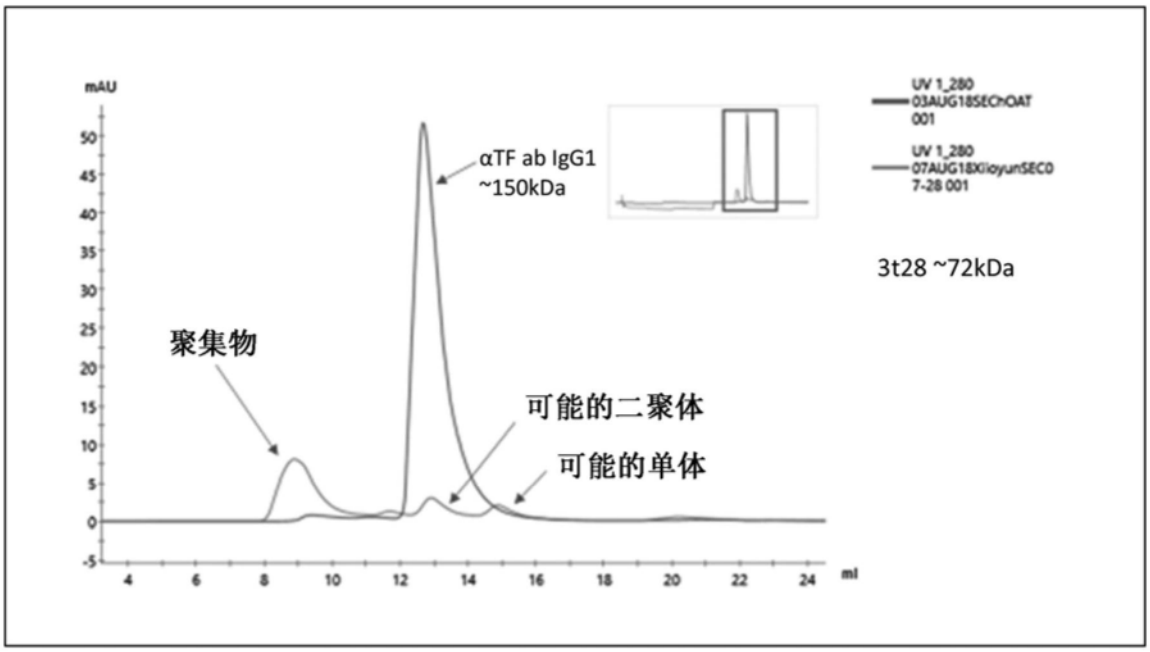

mAU
αTF ab IgG1
~150kDa
聚集物
可能的二聚体
可能的单体
3t28 ~72kDa
ml

图59

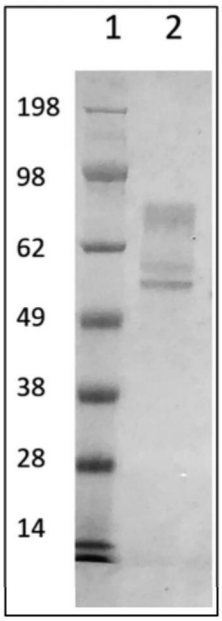

1
2
198
98
62
49
38
28
14

图60

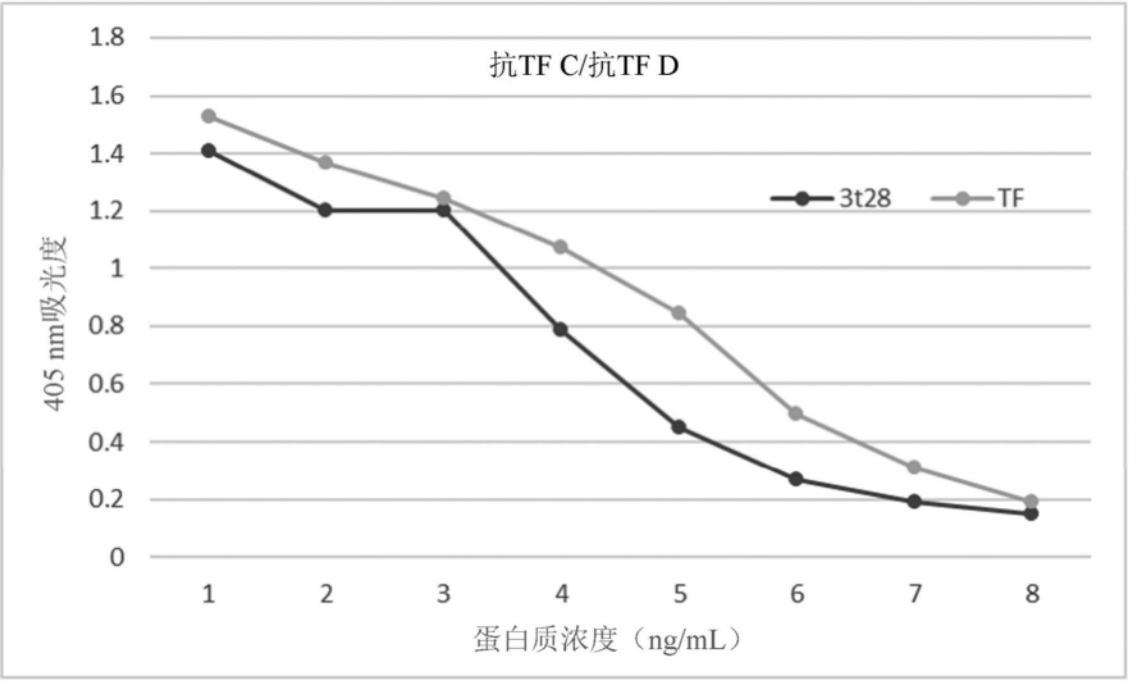

抗TF C/抗TF D
405 nm吸光度
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
3t28
TF
1
2
3
4
5
6
7
8
蛋白质浓度（ng/mL）

图61

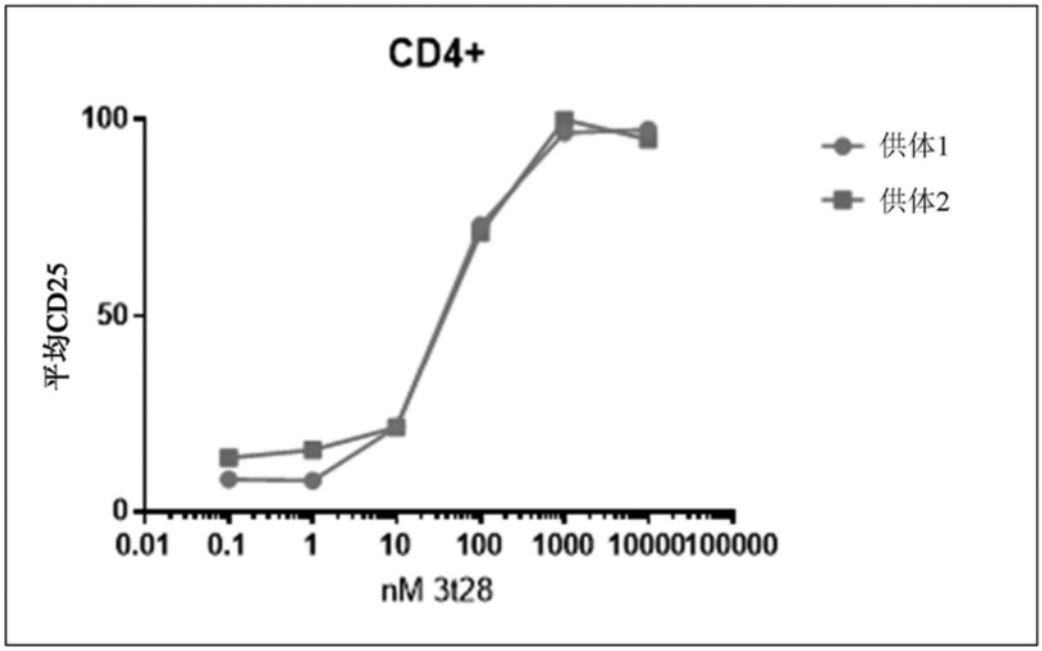

CD4+
平均CD25
100
50
0
供体1
供体2
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000100000
nM 3t28

图62

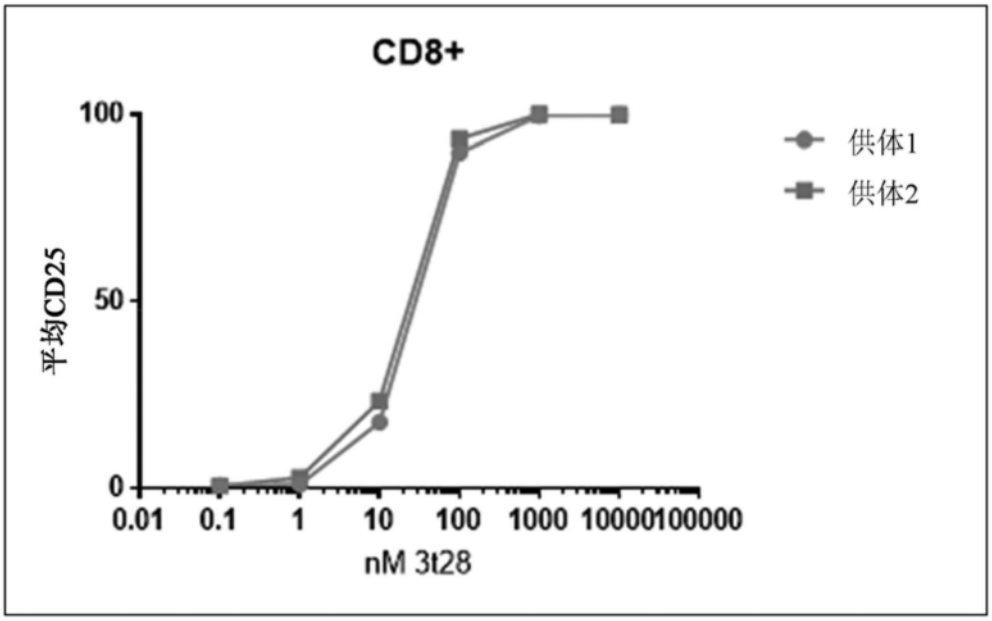

CD8+
100
50
0
平均CD25
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000100000
nM 3t28
供体1
供体2

图63

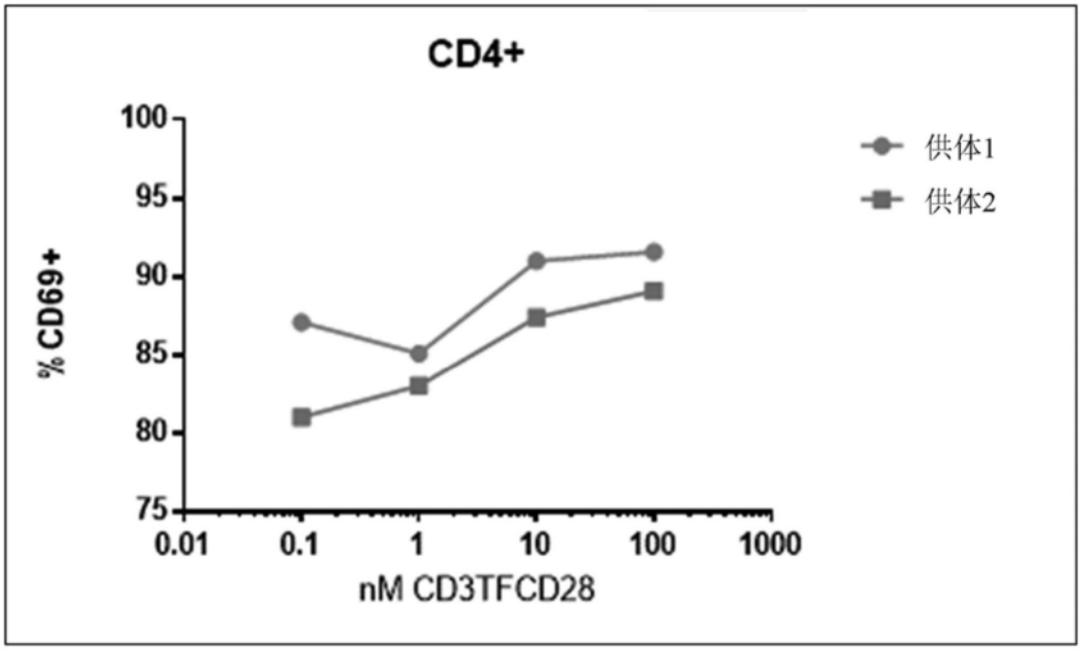

CD4+
100
95
90
85
80
75
% CD69+
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM CD3TFCD28
供体1
供体2

图64


IL-7
Rα

图65



图66



图67

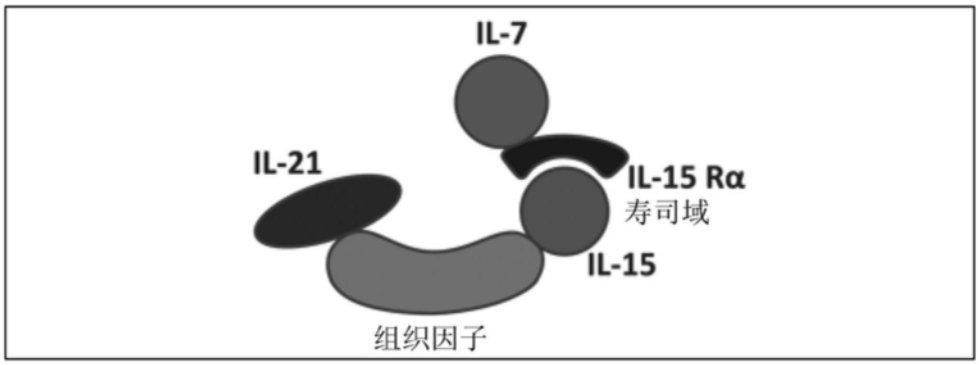


图68



图69



图70



图71

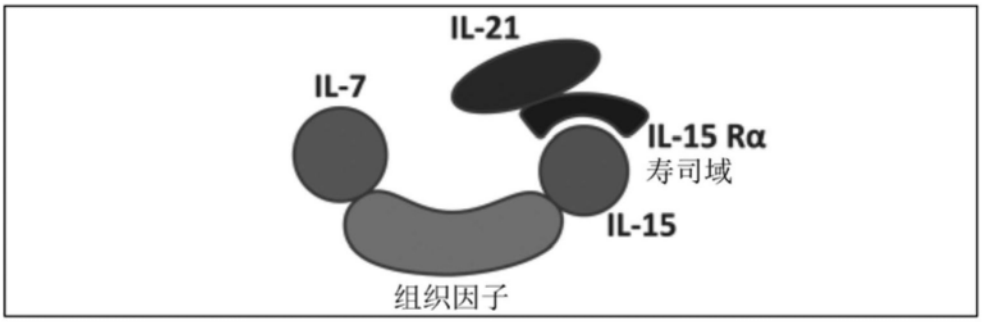


图72

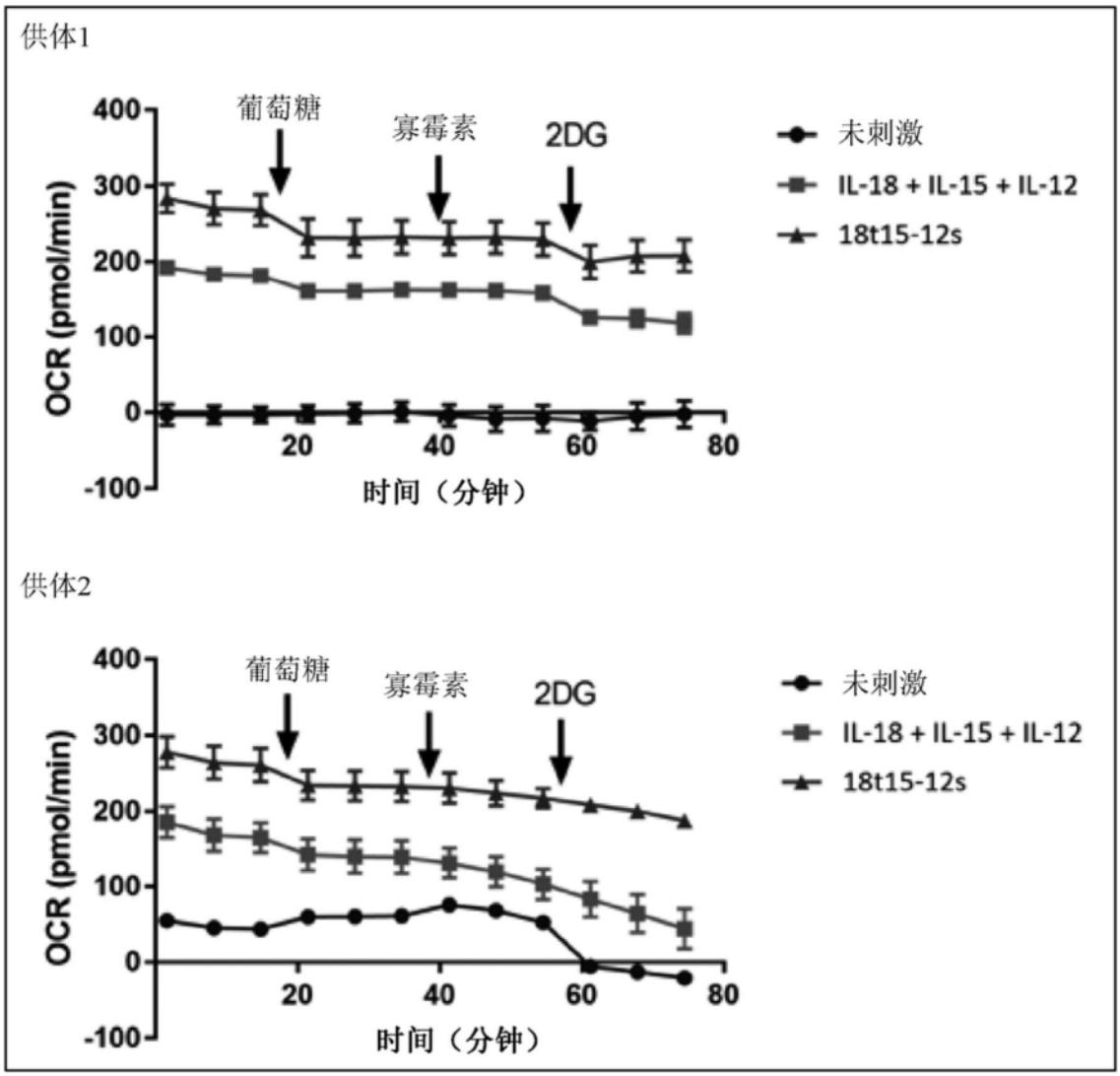

供体1
葡萄糖
寡霉素
2DG
未刺激
IL-18 + IL-15 + IL-12
18t15-12s
OCR (pmol/min)
400
300
200
100
0
-100
20
40
60
80
时间（分钟）
供体2
葡萄糖
寡霉素
2DG
未刺激
IL-18 + IL-15 + IL-12
18t15-12s
OCR (pmol/min)
400
300
200
100
0
-100
20
40
60
80
时间（分钟）

图73

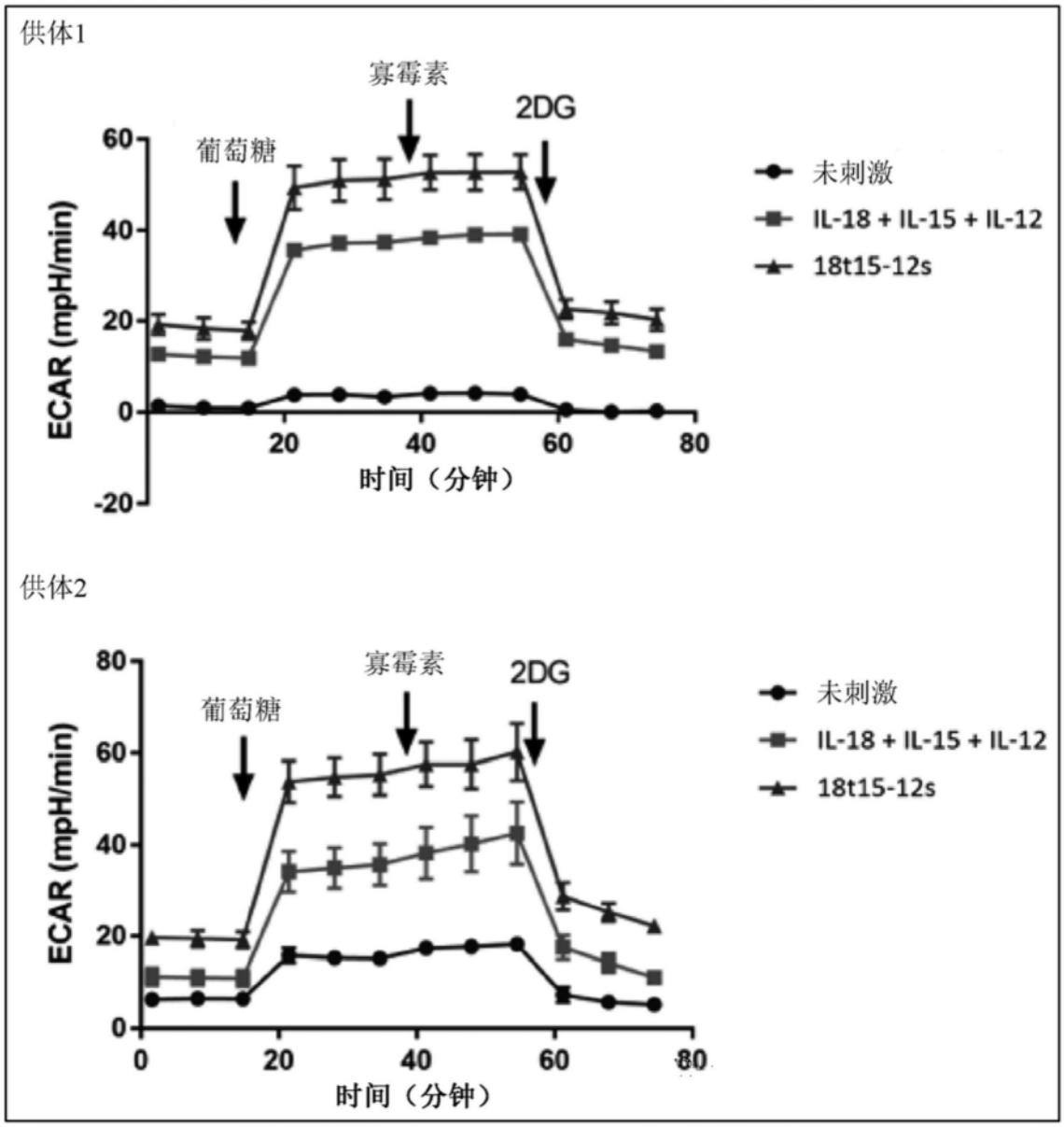

供体1
寡霉素
2DG
葡萄糖
60
40
20
0
-20
ECAR (mpH/min)
20
40
60
80
时间（分钟）
未刺激
IL-18 + IL-15 + IL-12
18t15-12s
供体2
寡霉素
2DG
葡萄糖
80
60
40
20
0
ECAR (mpH/min)
0
20
40
60
80
时间（分钟）
未刺激
IL-18 + IL-15 + IL-12
18t15-12s

图74

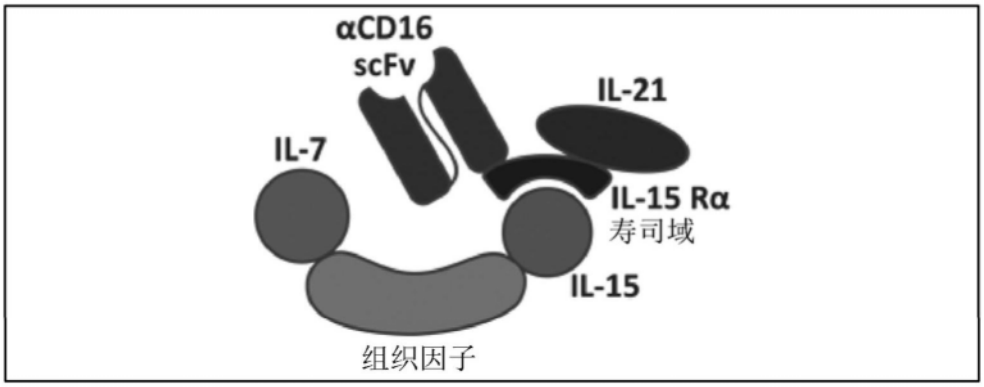

αCD16
scFv
IL-21
IL-7
IL-15 Rα
寿司域
IL-15
组织因子

图75

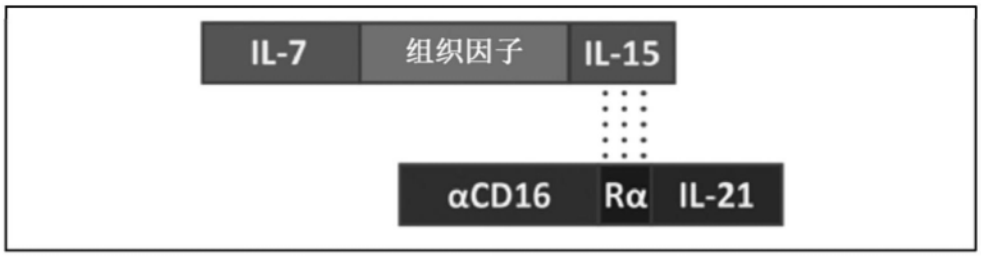

IL-7
组织因子
IL-15
αCD16
Rα
IL-21

图76

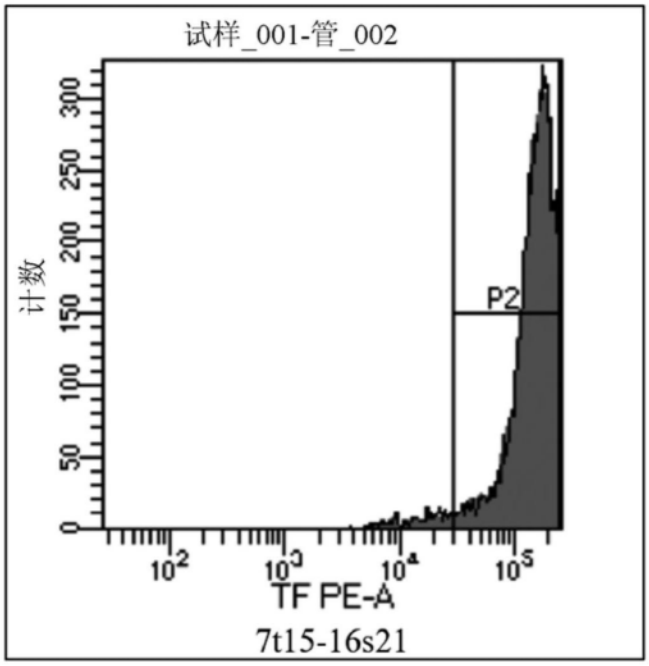

试样_001-管_002
计数
0
50
100
150
200
250
300
P2
10^2
10^3
10^4
10^5
TF PE-A
7t15-16s21

图77A

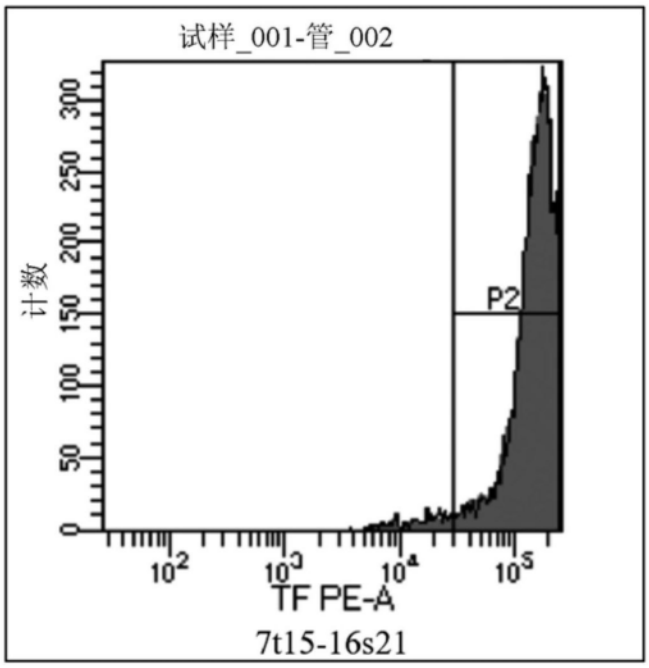

试样_001-管_002
计数
0
50
100
150
200
250
300
P2
10^2
10^3
10^4
10^5
TF PE-A
7t15-16s21

图77B

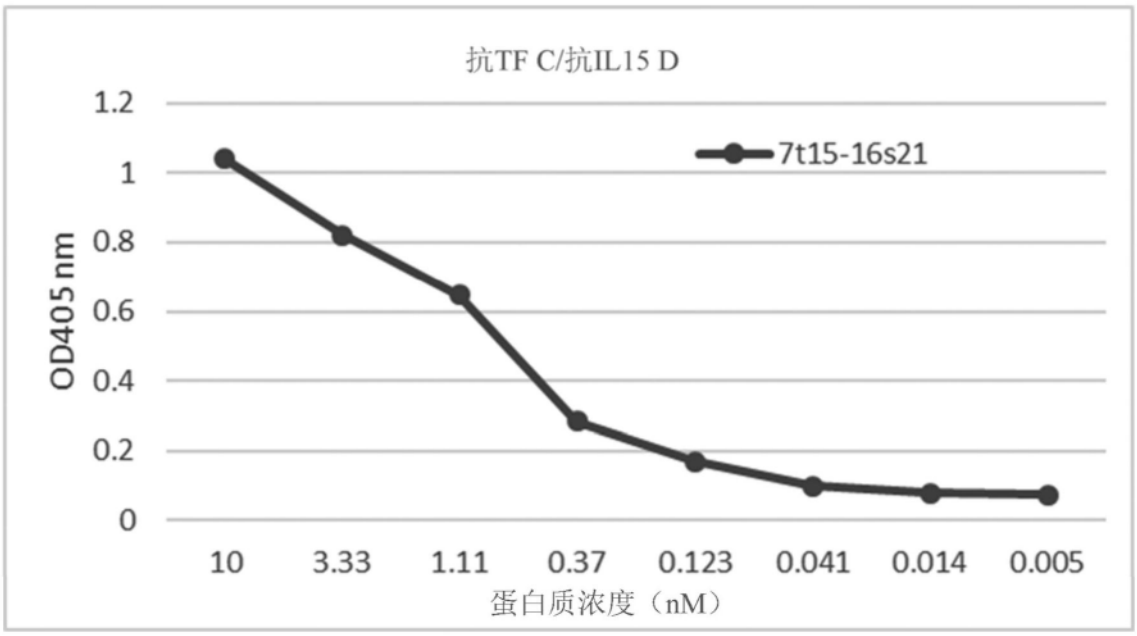

抗TF C/抗IL15 D
OD405 nm
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
7t15-16s21
10
3.33
1.11
0.37
0.123
0.041
0.014
0.005
蛋白质浓度（nM）

图78A

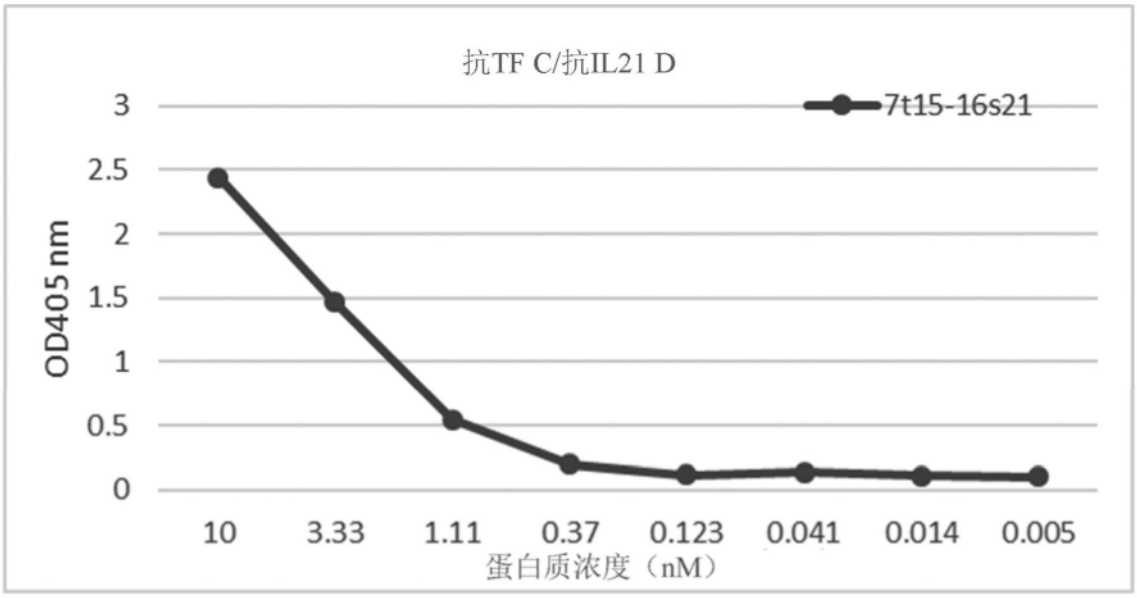

抗TF C/抗IL21 D
7t15-16s21
OD405 nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
10
3.33
1.11
0.37
0.123
0.041
0.014
0.005
蛋白质浓度（nM）

图78B

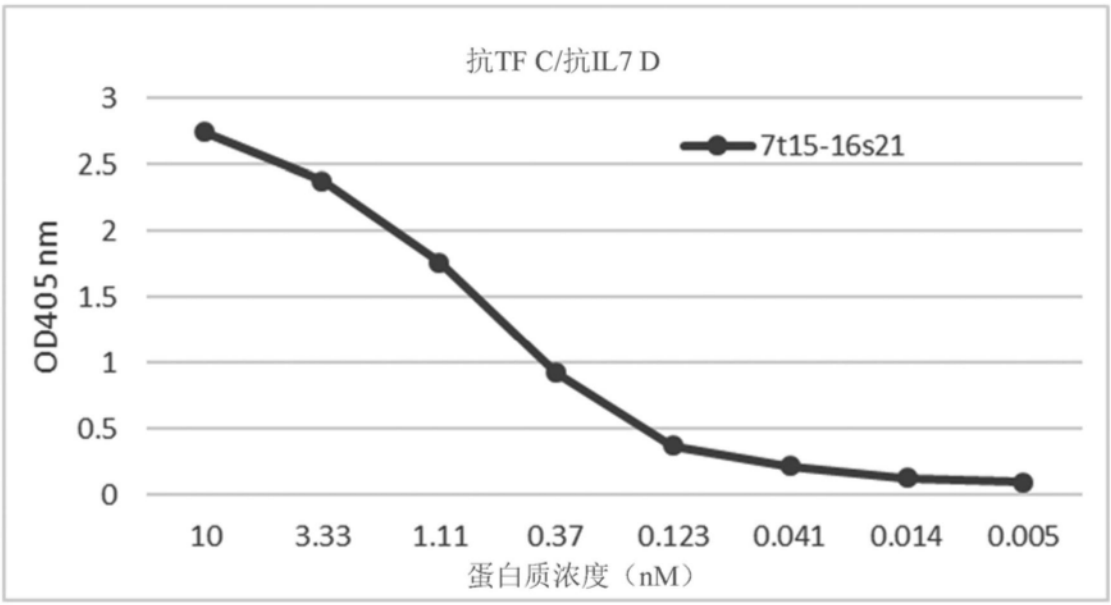

抗TF C/抗IL7 D
7t15-16s21
OD405 nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
10
3.33
1.11
0.37
0.123
0.041
0.014
0.005
蛋白质浓度（nM）

图78C

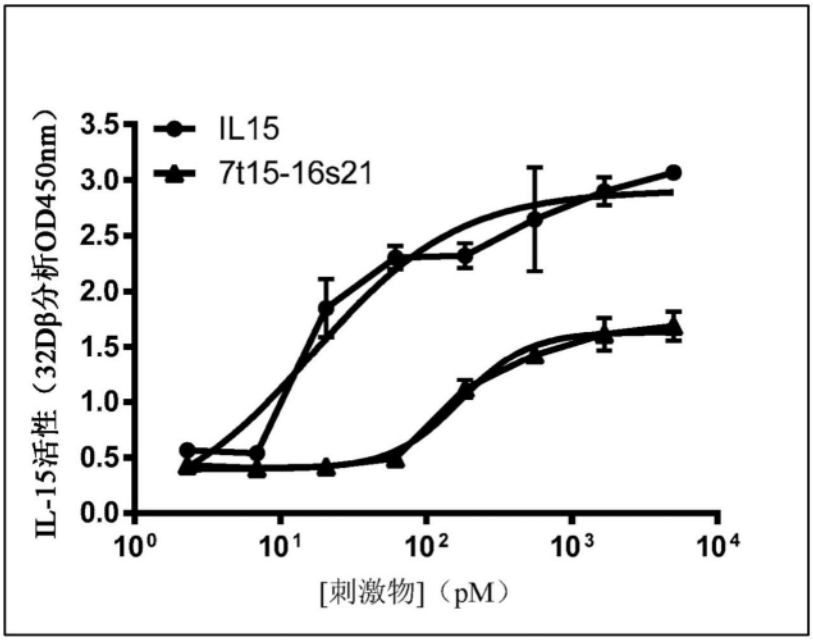

IL15
7t15-16s21
IL-15活性（32Dβ分析OD450nm）
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
[刺激物]（pM）

图79

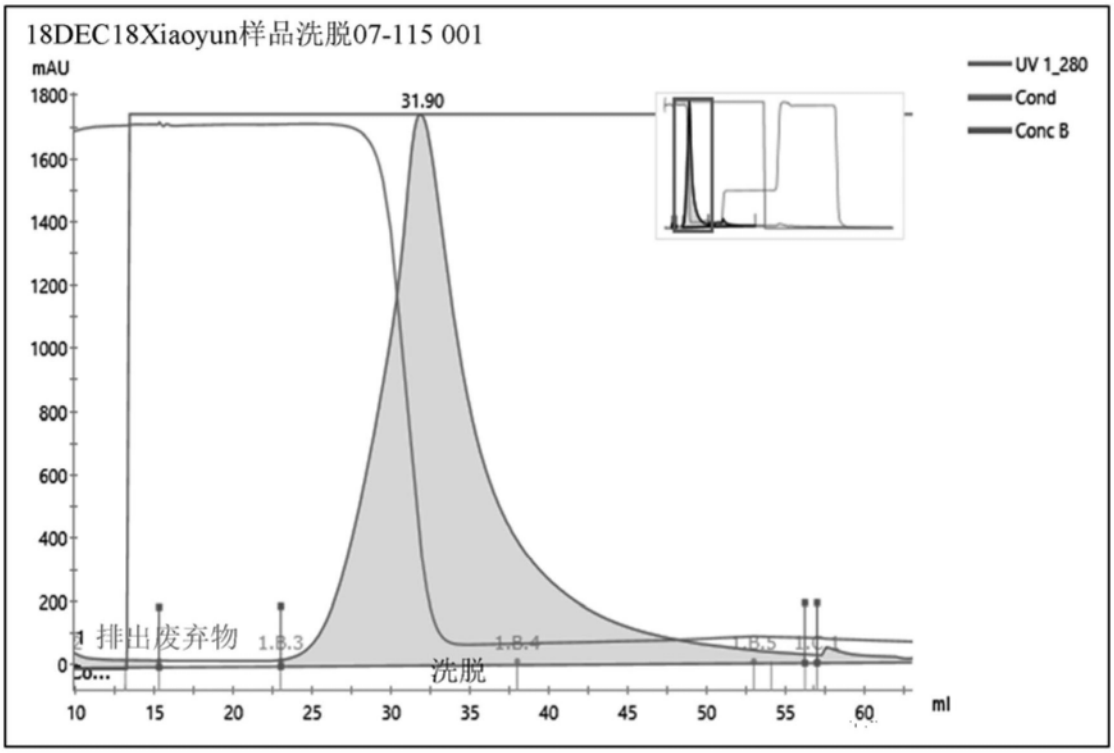

18DEC18Xiaoyun样品洗脱07-115 001
mAU
UV 1_280
Cond
Conc B
31.90
1 排出废弃物
洗脱
ml

图80

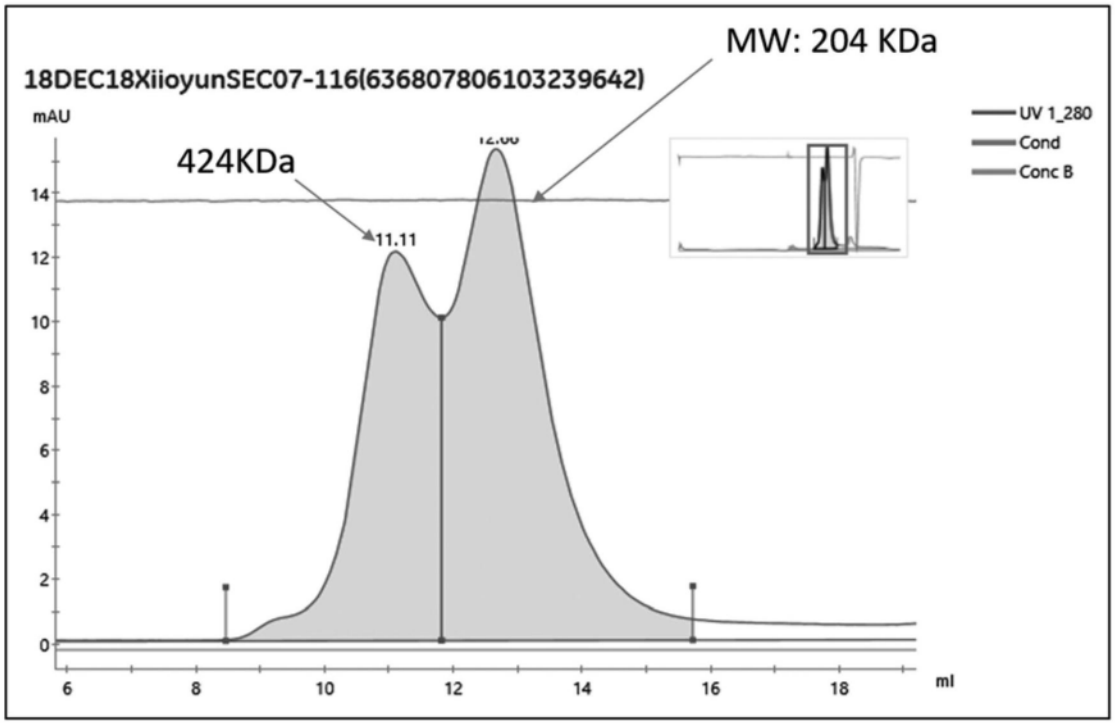

MW: 204 KDa
18DEC18XiioyunSEC07-116(636807806103239642)
mAU
424KDa
11.11
UV 1_280
Cond
Conc B
14
12
10
8
6
4
2
0
6
8
10
12
14
16
18
ml

图81

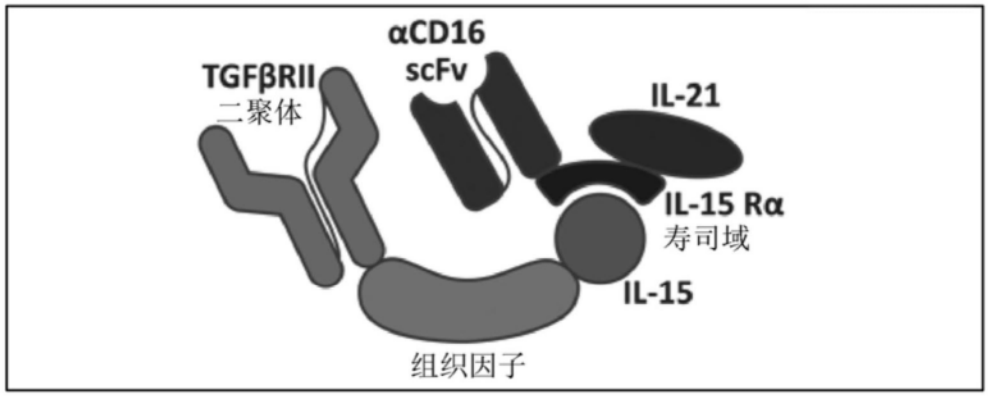

αCD16
scFv
TGFβRII
二聚体
IL-21
IL-15 Rα
寿司域
IL-15
组织因子

图82


TGFβRII
接头
TGFβRII
组织因子
IL-15
αCD16
Rα
IL-21

图83

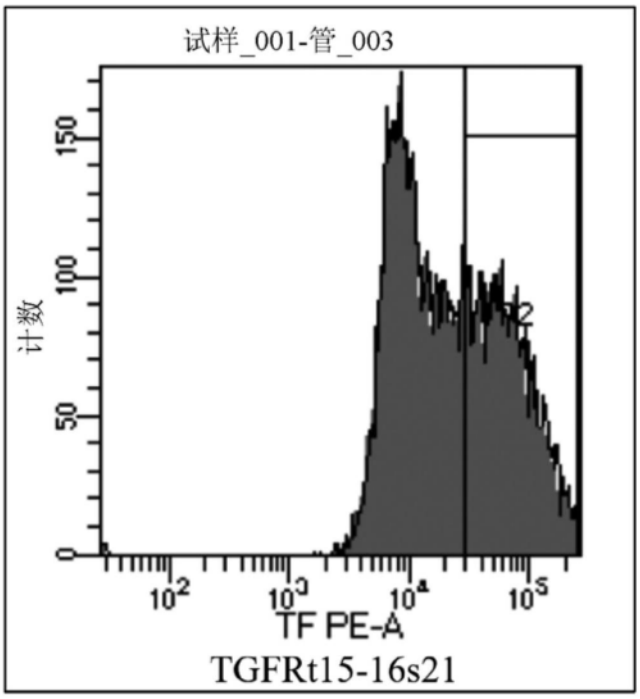

试样_001-管_003
计数
0
50
100
150
10^2
10^3
10^4
10^5
TF PE-A
TGFRt15-16s21

图84A

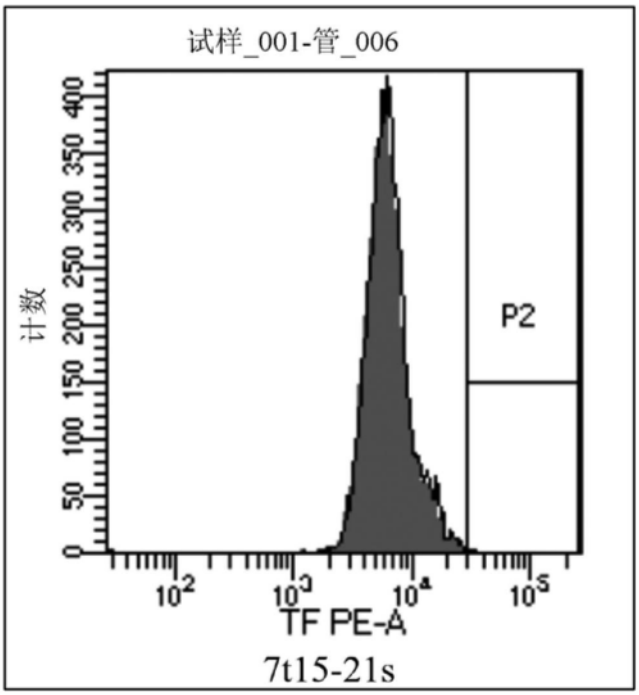

试样_001-管_006
计数
0
50
100
150
200
250
300
350
400
P2
10^2
10^3
10^4
10^5
TF PE-A
7t15-21s

图84B

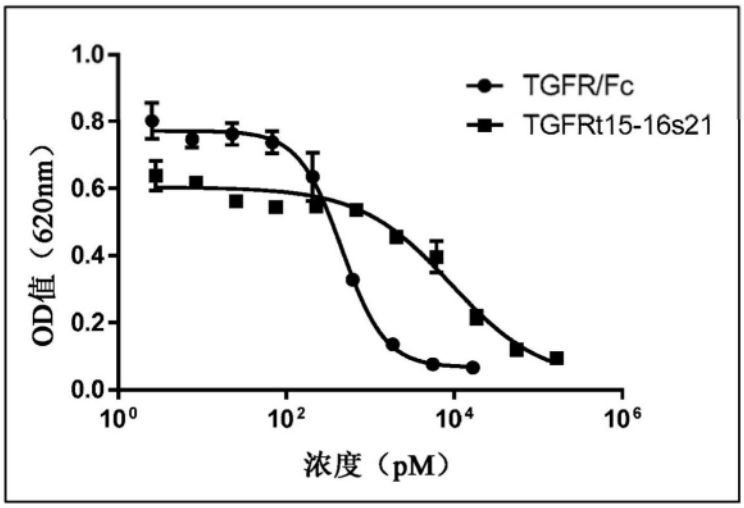

TGFR/Fc
TGFRt15-16s21
OD值（620nm）
浓度（pM）

图85

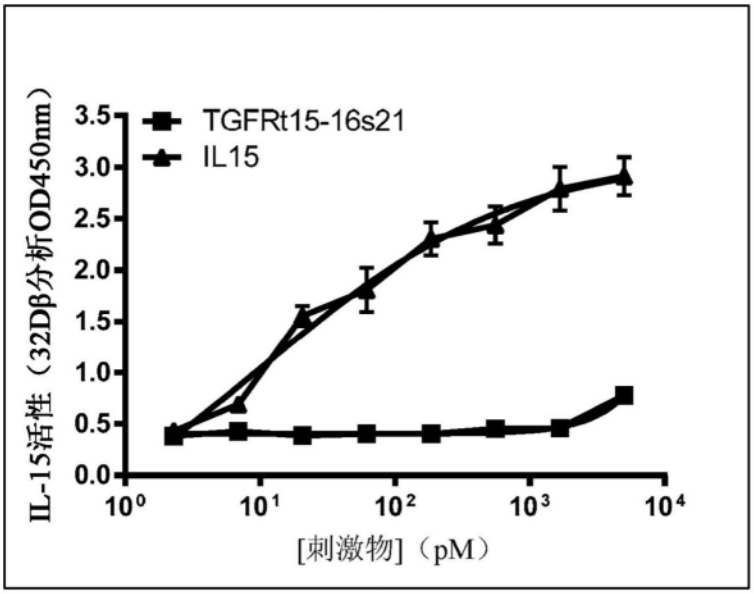

TGFRt15-16s21
IL15
IL-15活性（32Dβ分析OD450nm）
[刺激物]（pM）

图86

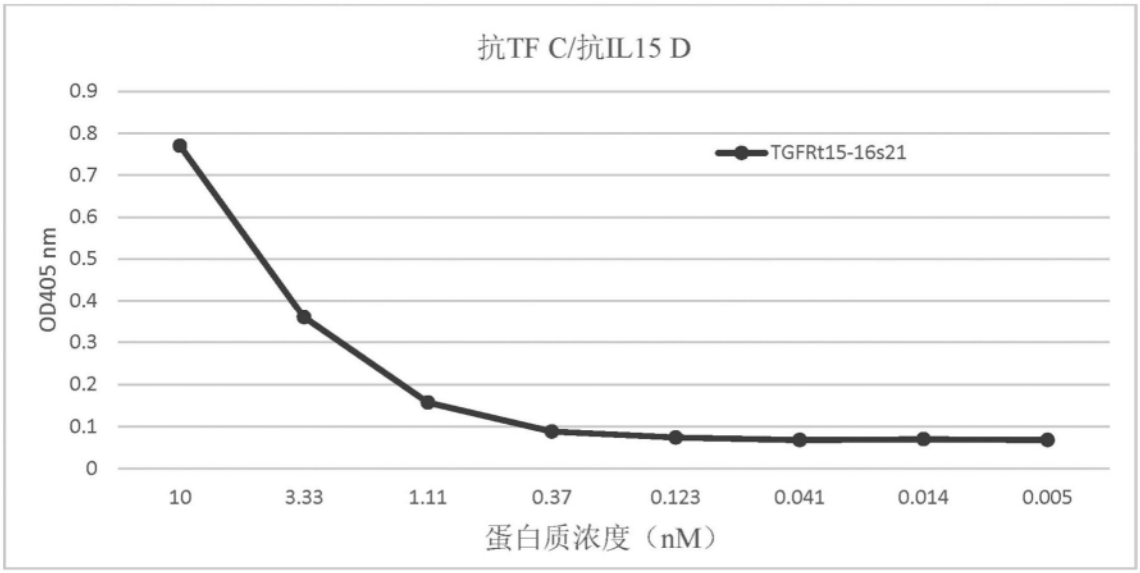

抗TF C/抗IL15 D
TGFRt15-16s21
OD405 nm
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
10
3.33
1.11
0.37
0.123
0.041
0.014
0.005
蛋白质浓度（nM）

图87A

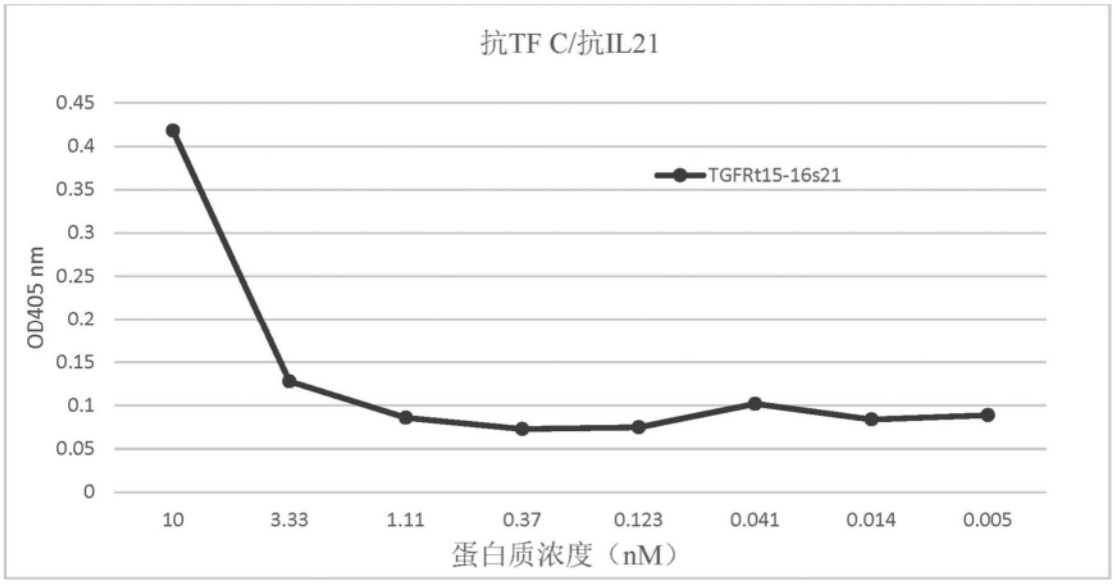

抗TF C/抗IL21
TGFRt15-16s21
OD405 nm
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
10
3.33
1.11
0.37
0.123
0.041
0.014
0.005
蛋白质浓度（nM）

图87B

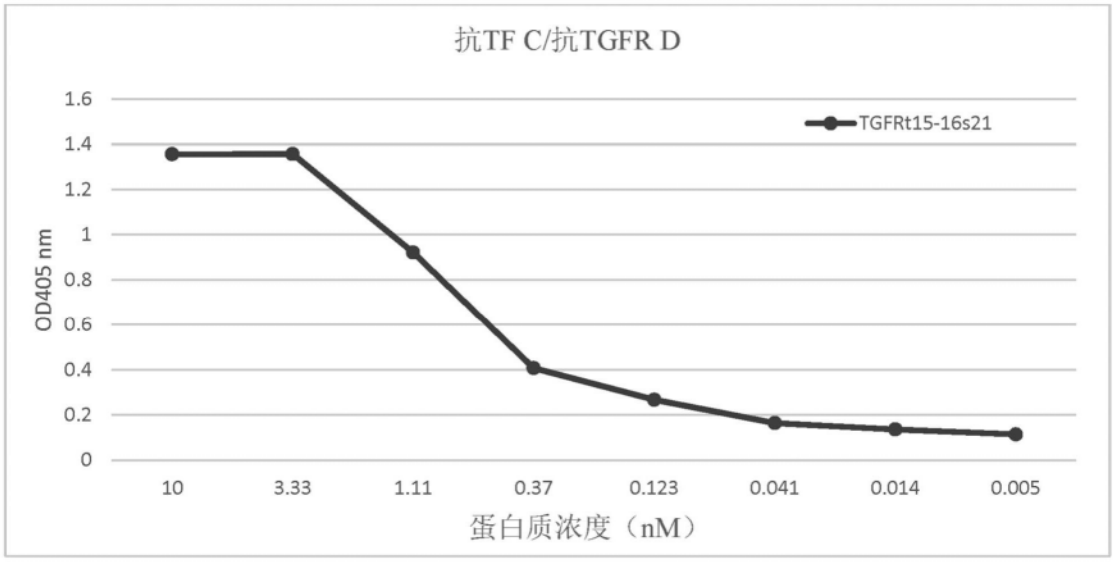

抗TF C/抗TGFR D
TGFRt15-16s21
OD405 nm
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
10
3.33
1.11
0.37
0.123
0.041
0.014
0.005
蛋白质浓度（nM）

图87C

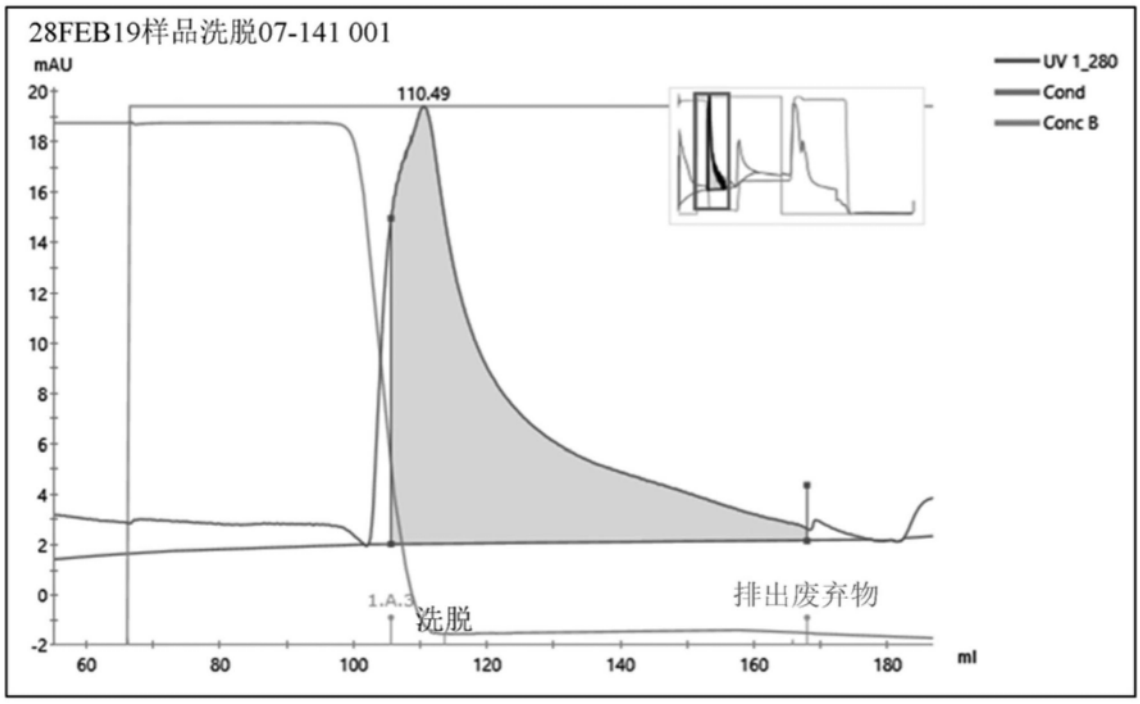

28FEB19样品洗脱07-141 001
mAU
UV 1_280
Cond
Conc B
110.49
1.A.3
洗脱
排出废弃物
ml
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
60
80
100
120
140
160
180

图88

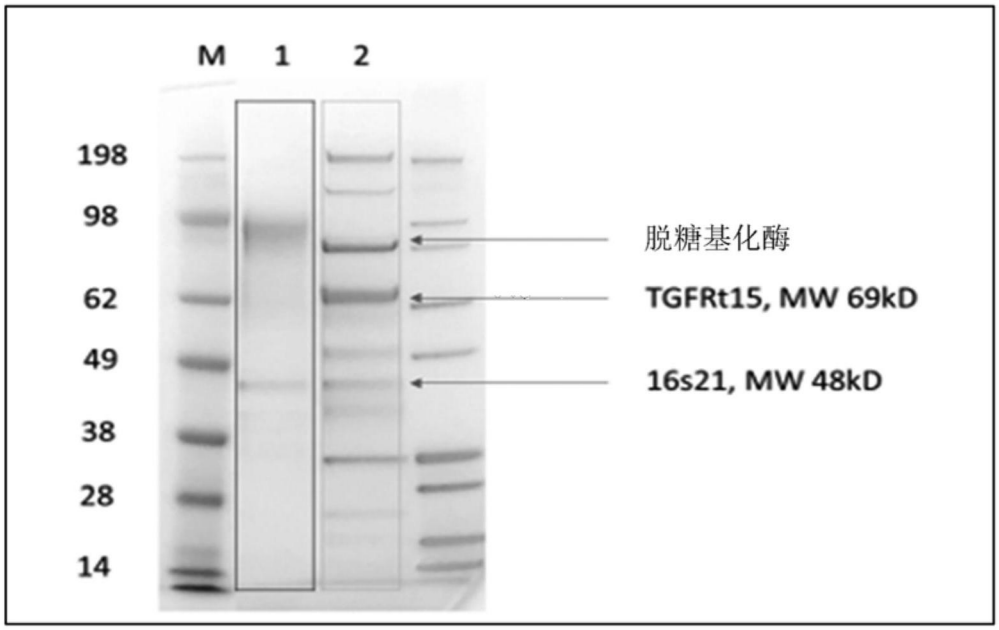

M
1
2
198
98
62
49
38
28
14
脱糖基化酶
TGFRt15, MW 69kD
16s21, MW 48kD

图89

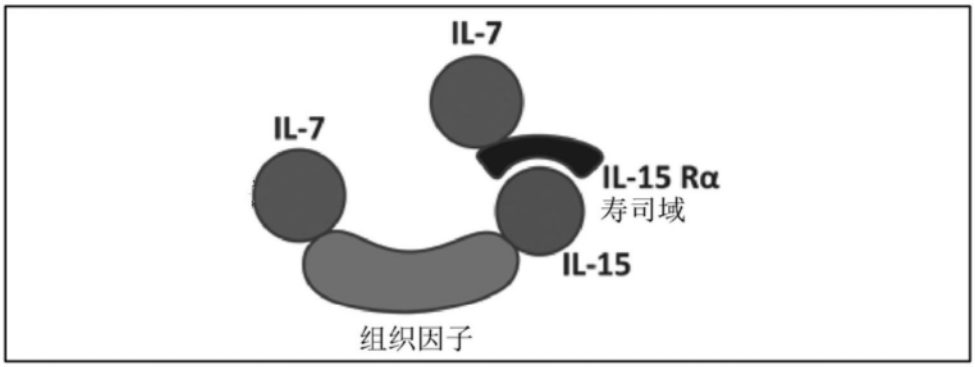

IL-7
IL-7
IL-15 Rα
寿司域
IL-15
组织因子

图90


IL-7
组织因子
IL-15
IL-7
Rα

图91

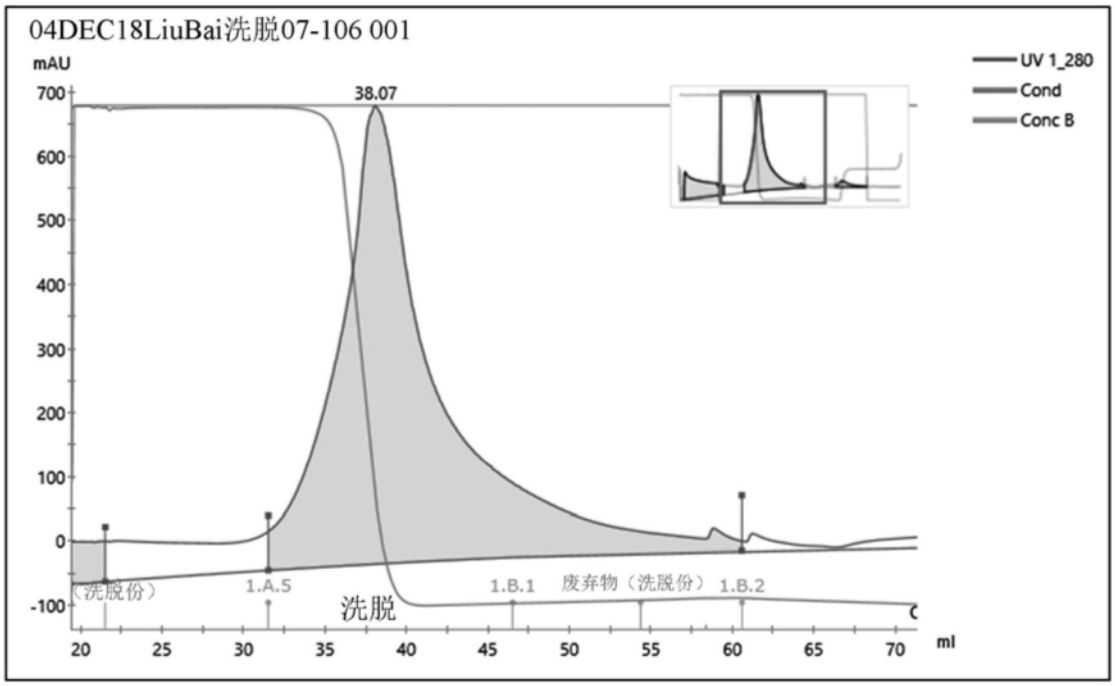

04DEC18LiuBai洗脱07-106 001
mAU
UV 1_280
Cond
Conc B
38.07
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
（洗脱份）
1.A.5
洗脱
1.B.1
废弃物（洗脱份）
1.B.2
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
ml

图92

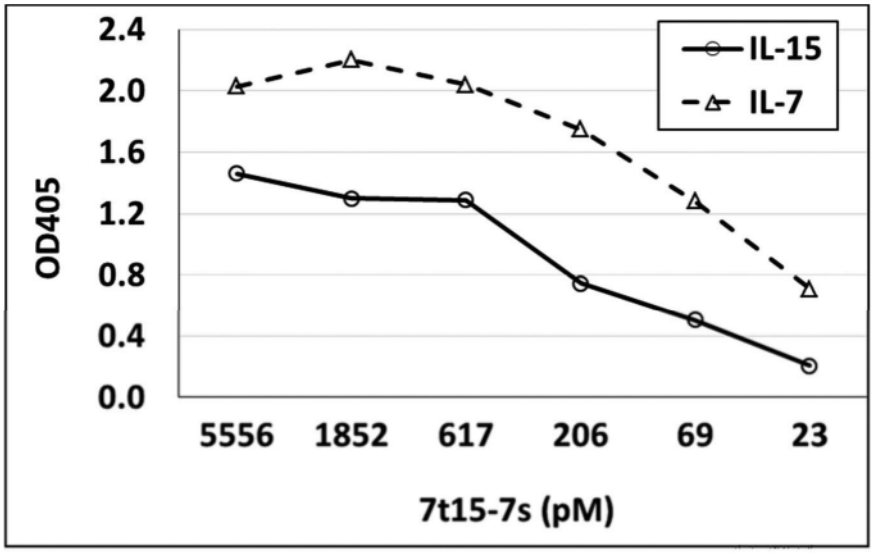

IL-15
IL-7
OD405
2.4
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
5556
1852
617
206
69
23
7t15-7s (pM)

图93

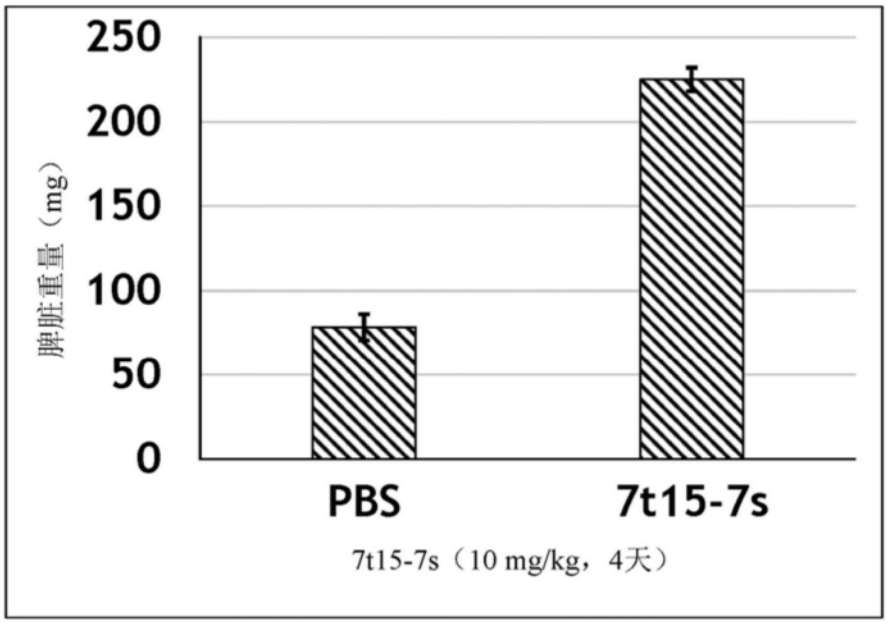

250
200
150
100
50
0
脾脏重量（mg）
PBS
7t15-7s
7t15-7s（10 mg/kg，4天）

图94A

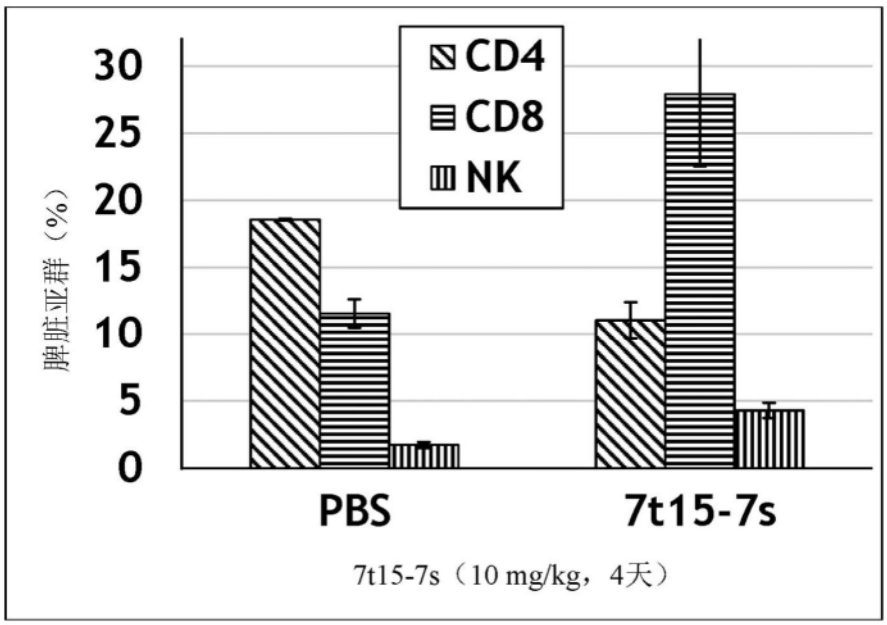

30
25
20
15
10
5
0
脾脏亚群（%）
CD4
CD8
NK
PBS
7t15-7s
7t15-7s（10 mg/kg，4天）

图94B

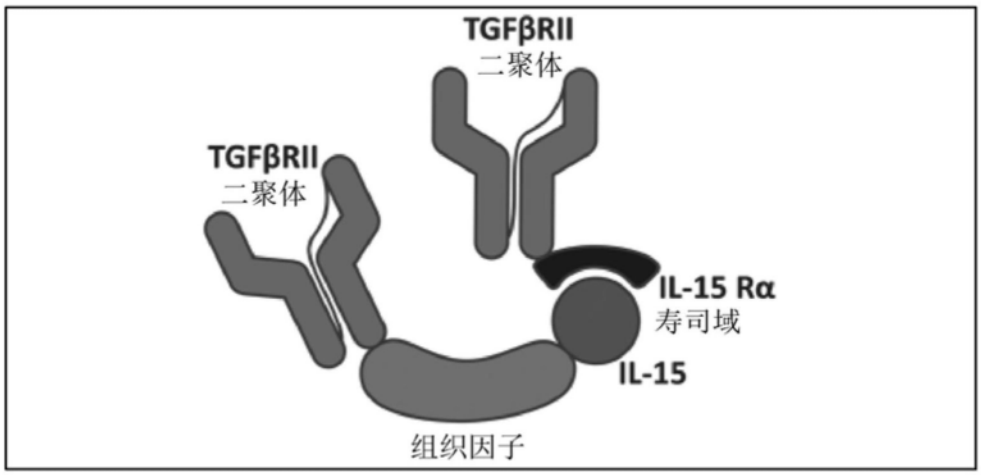

TGFβRII
二聚体
TGFβRII
二聚体
IL-15 Rα
寿司域
IL-15
组织因子

图95

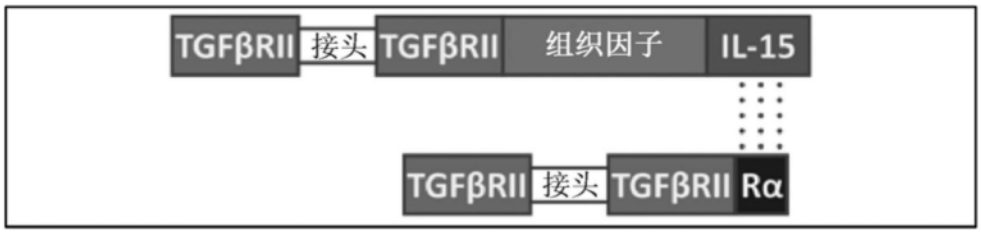

TGFβRII
接头
TGFβRII
组织因子
IL-15
TGFβRII
接头
TGFβRII
Rα

图96

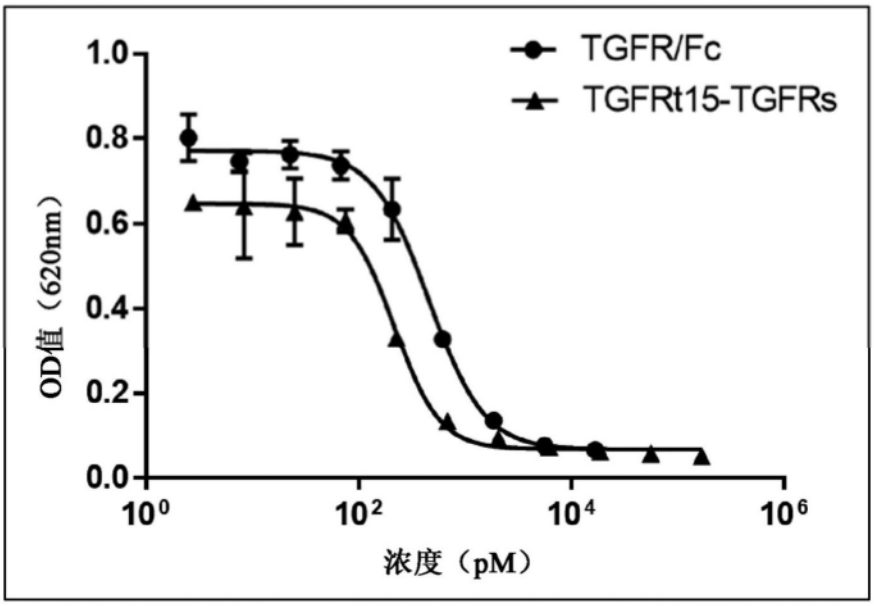

TGFR/Fc
TGFRt15-TGFRs
OD值（620nm）
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
10⁰
10²
10⁴
10⁶
浓度（pM）

图97

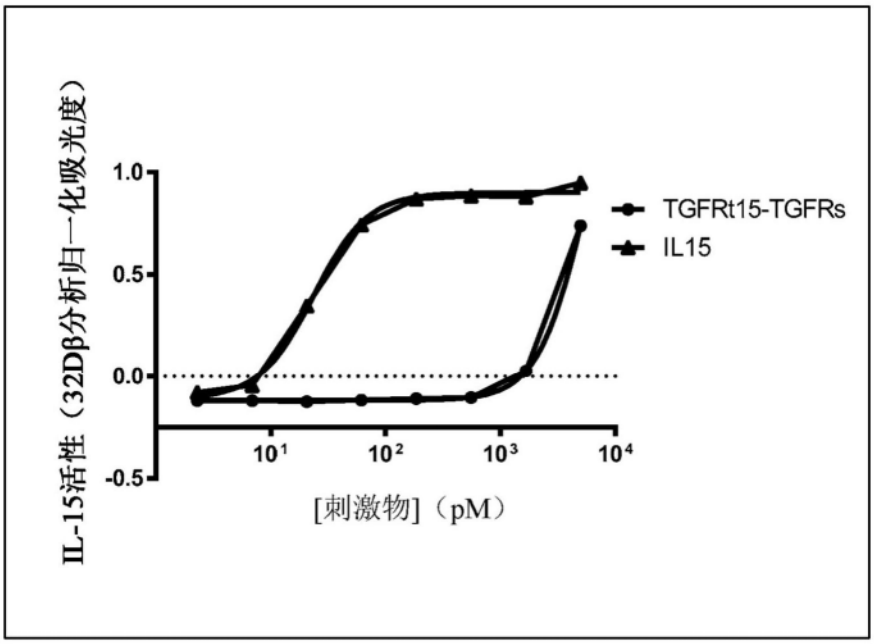

IL-15活性（32Dβ分析归一化吸光度）
1.0
0.5
0.0
-0.5
10^1
10^2
10^3
10^4
[刺激物]（pM）
TGFRt15-TGFRs
IL15

图98

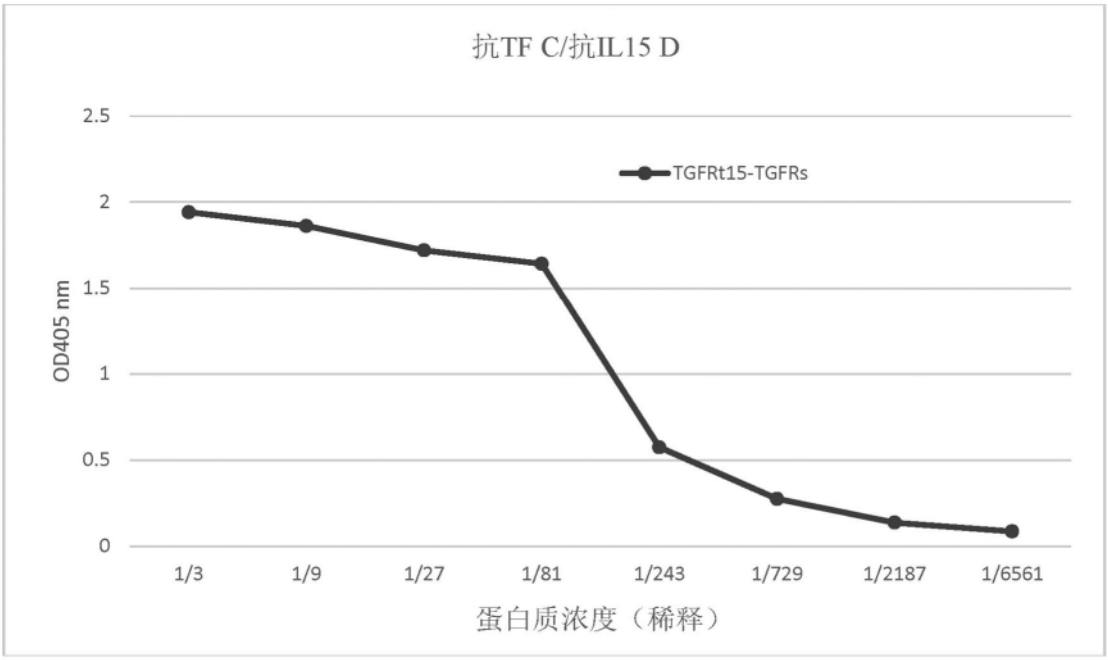

抗TF C/抗IL15 D
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OD405 nm
TGFRt15-TGFRs
1/3
1/9
1/27
1/81
1/243
1/729
1/2187
1/6561
蛋白质浓度（稀释）

图99A

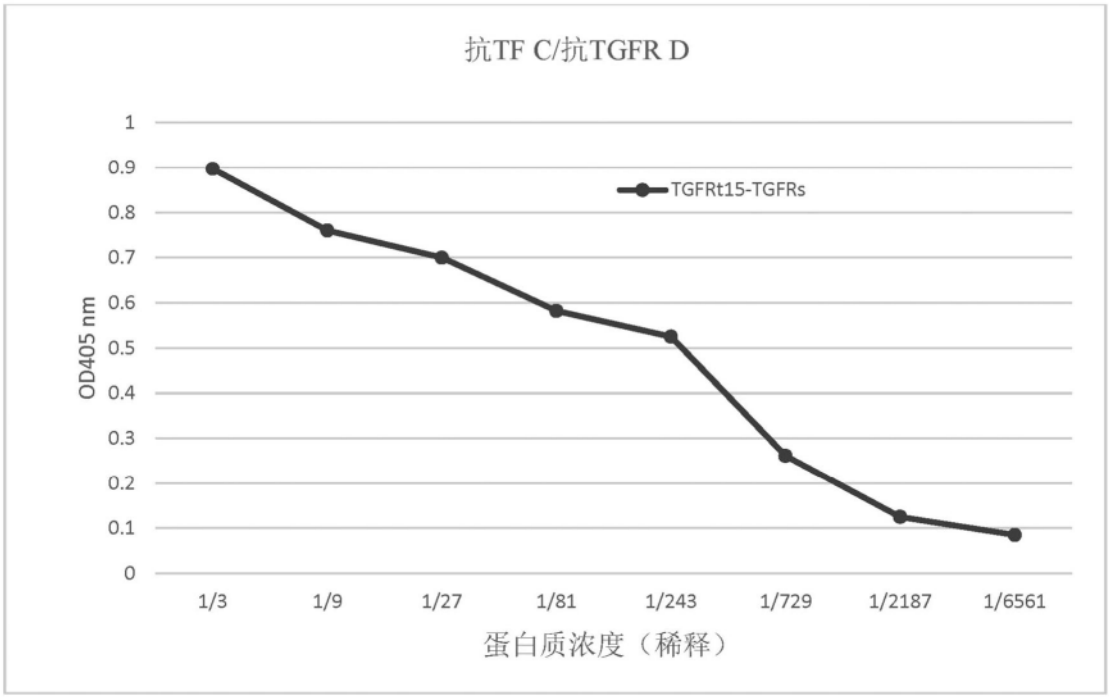

抗TF C/抗TGFR D
TGFRt15-TGFRs
OD405 nm
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1/3
1/9
1/27
1/81
1/243
1/729
1/2187
1/6561
蛋白质浓度（稀释）

图99B

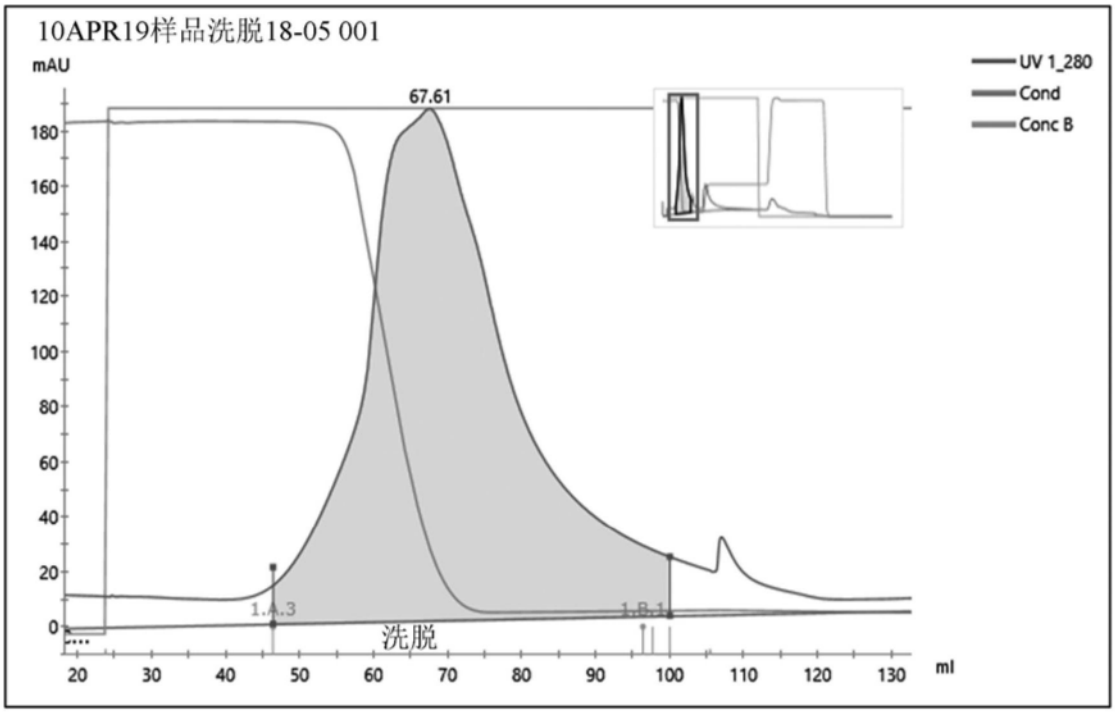

10APR19样品洗脱18-05 001
mAU
UV 1_280
Cond
Conc B
67.61
1.A.3
1.B.1
洗脱
ml

图100

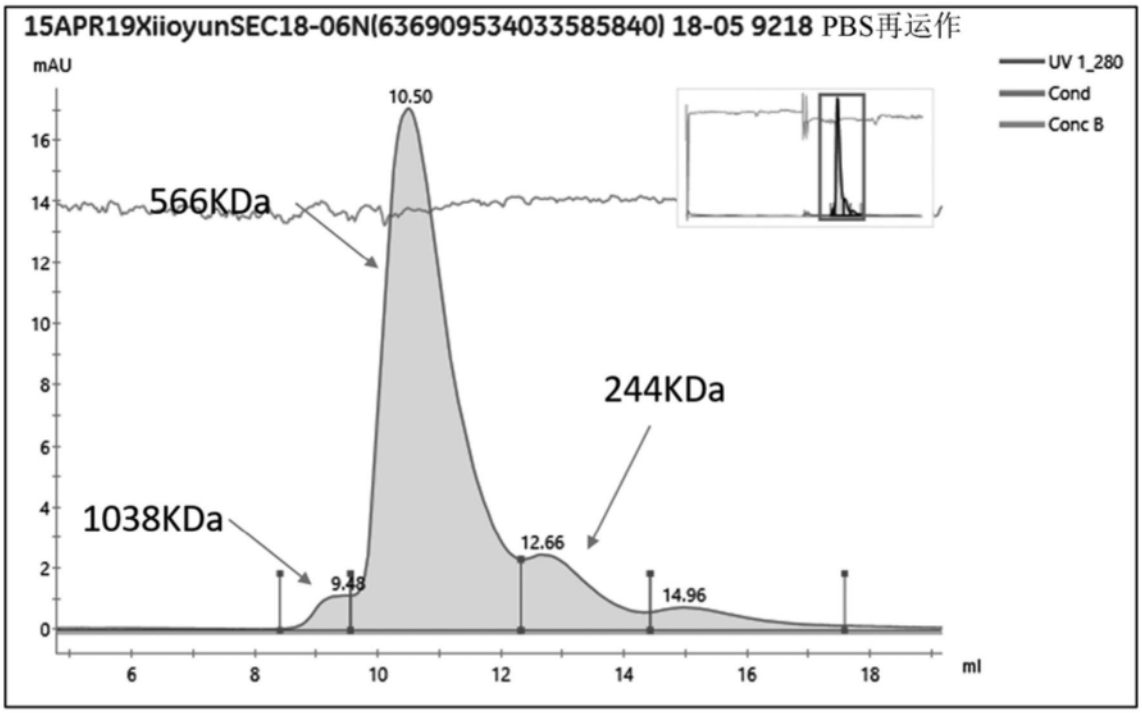

15APR19XiioyunSEC18-06N(636909534033585840) 18-05 9218 PBS再运作
mAU
UV 1_280
Cond
Conc B
566KDa
244KDa
1038KDa
10.50
12.66
9.48
14.96
ml

图101

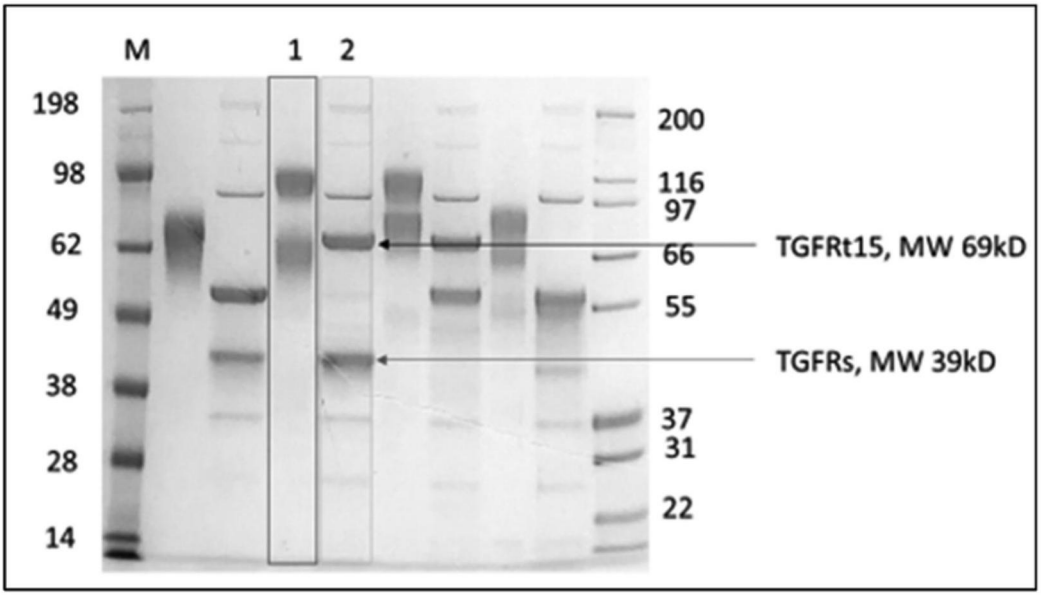

M
1
2
198
98
62
49
38
28
14
200
116
97
66
55
37
31
22
TGFRt15, MW 69kD
TGFRs, MW 39kD

图102

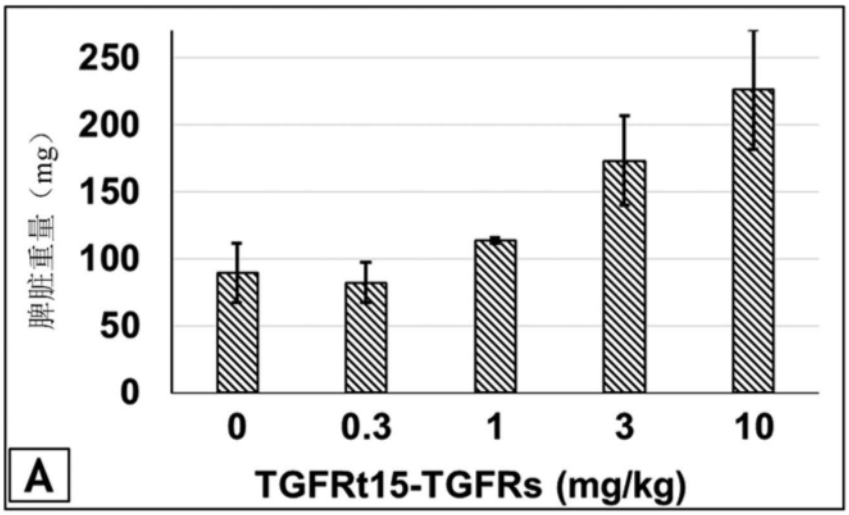

250
200
150
100
50
0
脾脏重量（mg）
0
0.3
1
3
10
A
TGFRt15-TGFRs (mg/kg)

图103A

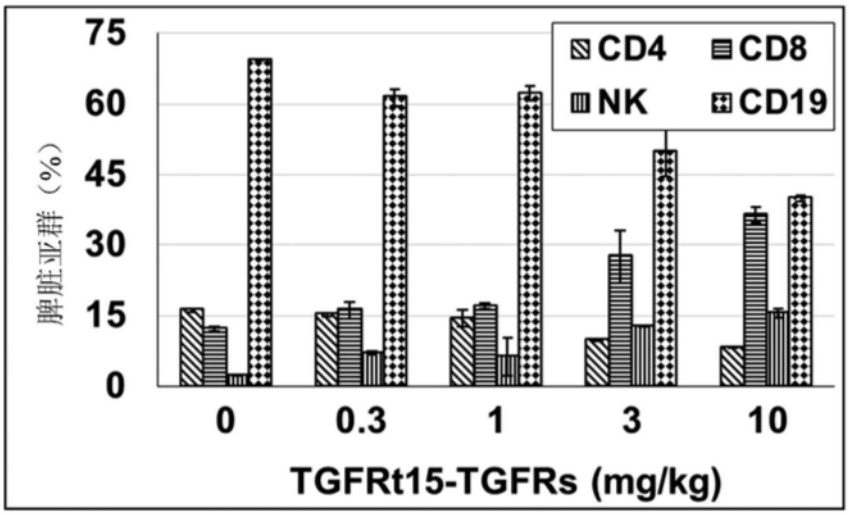

75
60
45
30
15
0
脾脏亚群（%）
CD4
CD8
NK
CD19
0
0.3
1
3
10
TGFRt15-TGFRs (mg/kg)

图103B

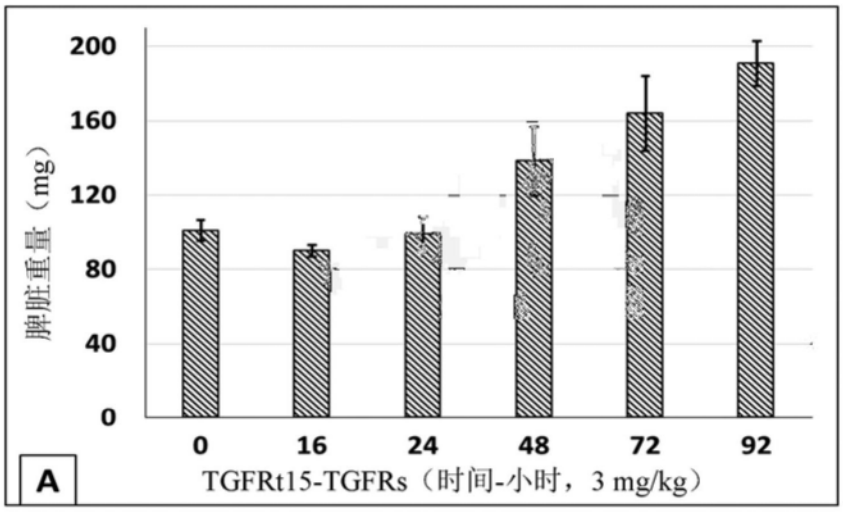

脾脏重量（mg）
200
160
120
80
40
0
0
16
24
48
72
92
A
TGFRt15-TGFRs（时间-小时，3 mg/kg）

图104A

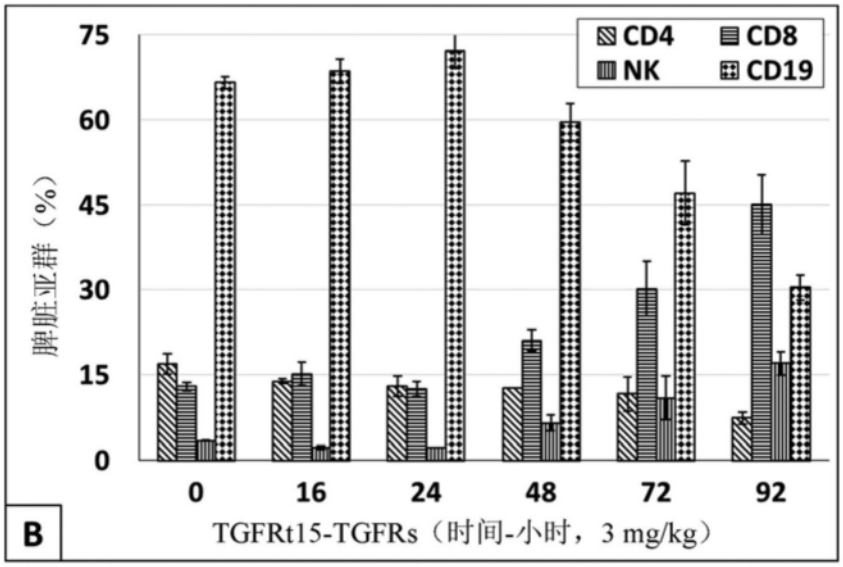

CD4
CD8
NK
CD19
脾脏亚群（%）
75
60
45
30
15
0
0
16
24
48
72
92
B
TGFRt15-TGFRs（时间-小时，3 mg/kg）

图104B

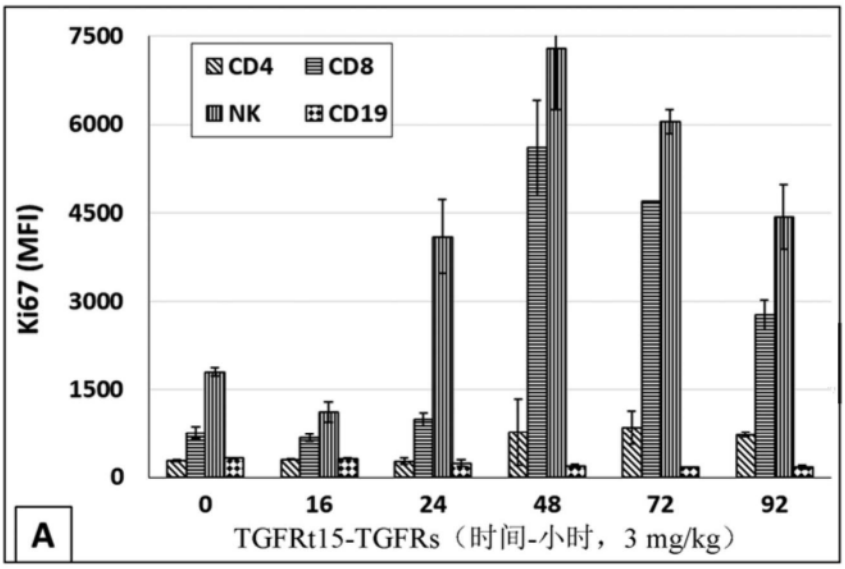

7500
6000
4500
3000
1500
0
Ki67 (MFI)
CD4
CD8
NK
CD19
0
16
24
48
72
92
A
TGFRt15-TGFRs（时间-小时，3 mg/kg）

图105A

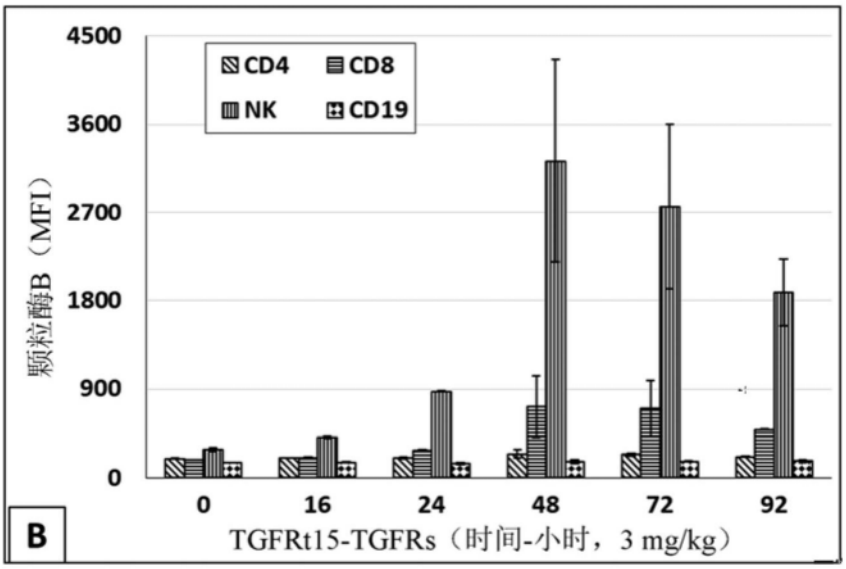

4500
3600
2700
1800
900
0
颗粒酶B（MFI）
CD4
CD8
NK
CD19
0
16
24
48
72
92
B
TGFRt15-TGFRs（时间-小时，3 mg/kg）

图105B

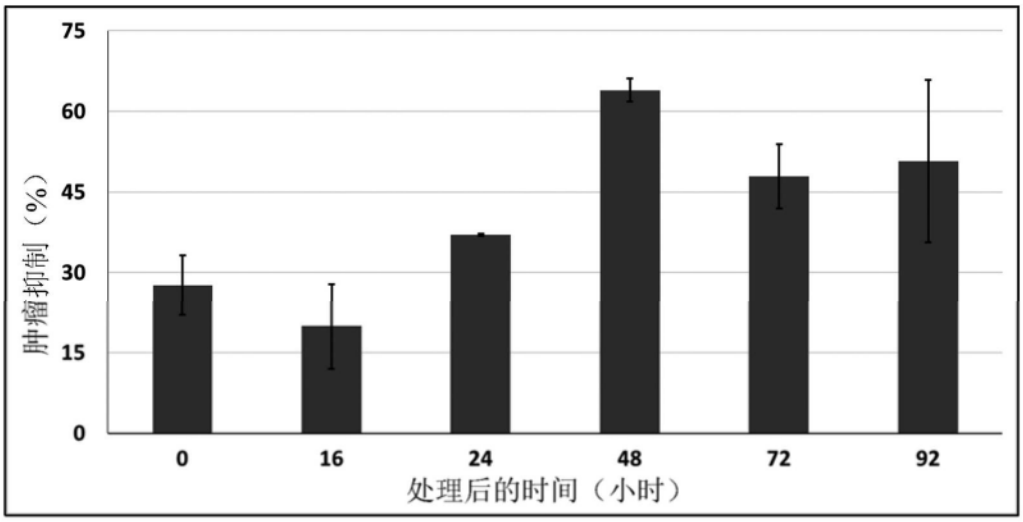

75
60
45
30
15
0
肿瘤抑制（%）
0
16
24
48
72
92
处理后的时间（小时）

图106

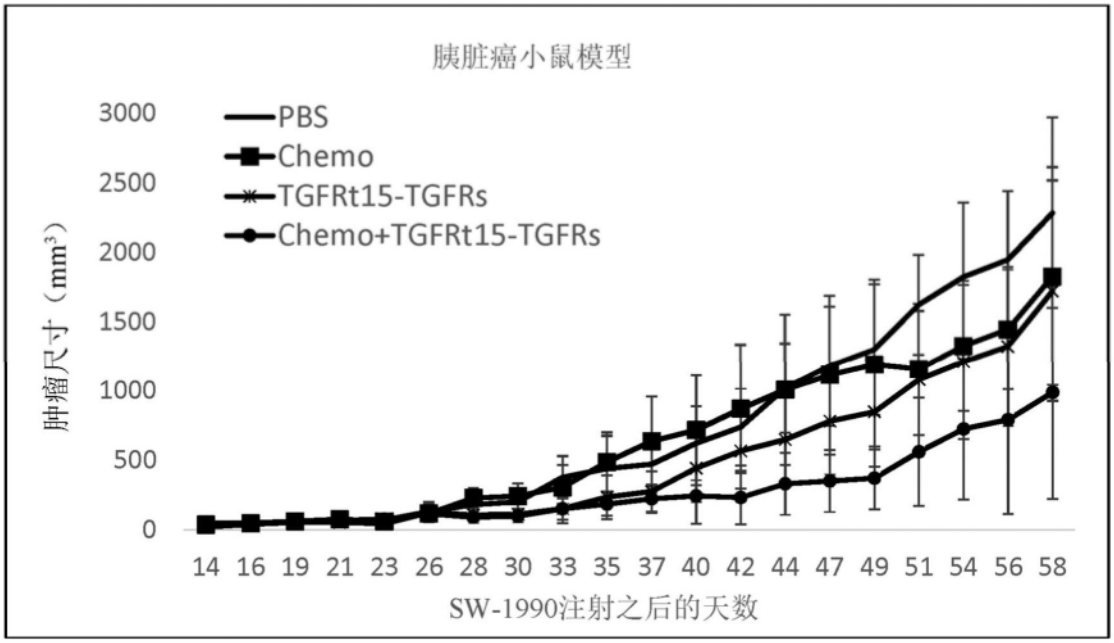

胰脏癌小鼠模型
PBS
Chemo
TGFRt15-TGFRs
Chemo+TGFRt15-TGFRs
肿瘤尺寸（mm³）
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
14 16 19 21 23 26 28 30 33 35 37 40 42 44 47 49 51 54 56 58
SW-1990注射之后的天数

图107

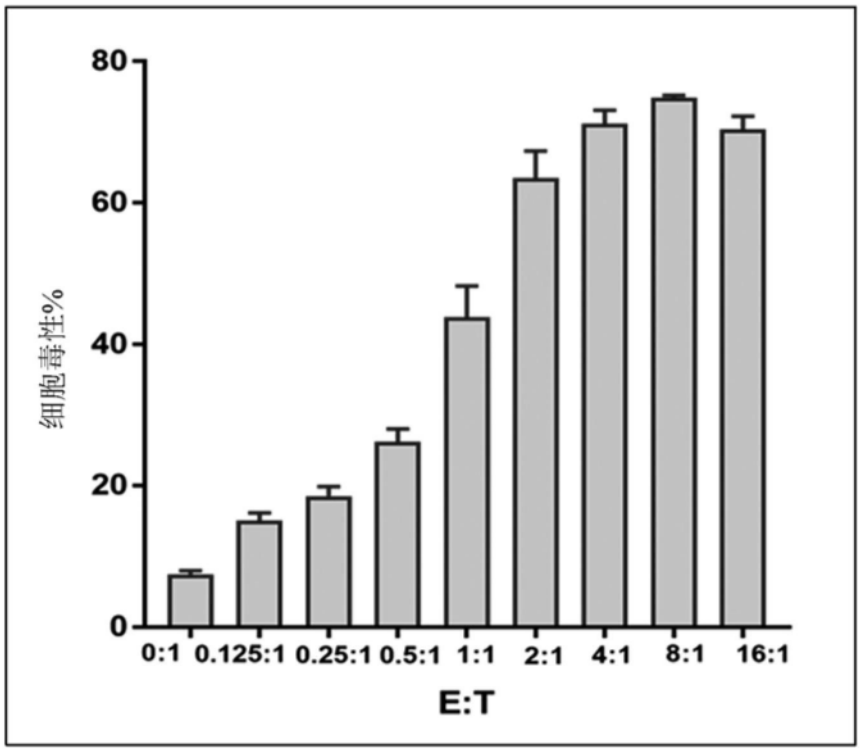


图108

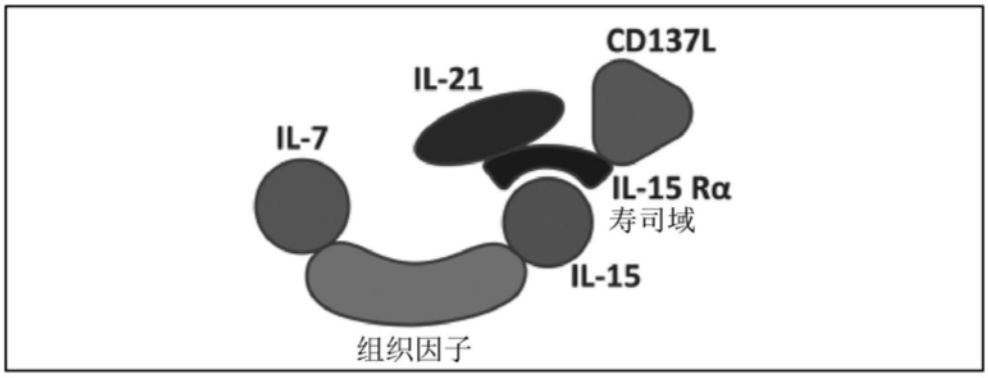


图109



图110

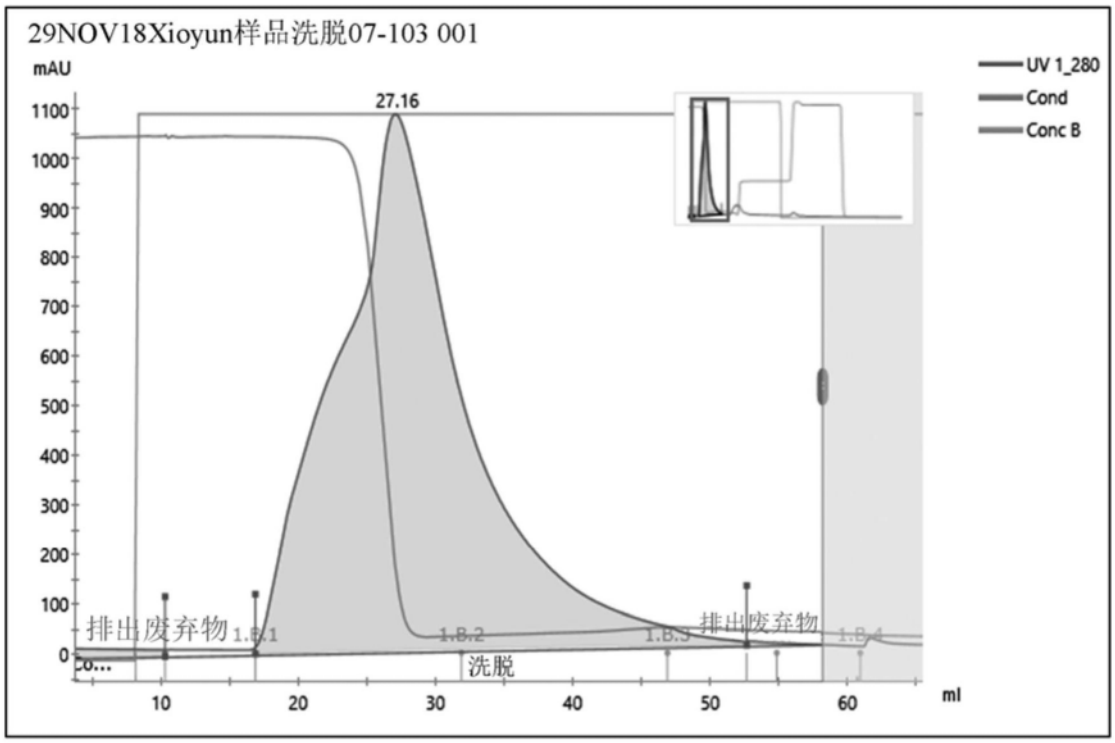

29NOV18Xioyun样品洗脱07-103 001
mAU
UV 1_280
Cond
Conc B
27.16
排出废弃物
1.B.1
1.B.2
洗脱
1.B.3
排出废弃物
1.B.4
ml

图111

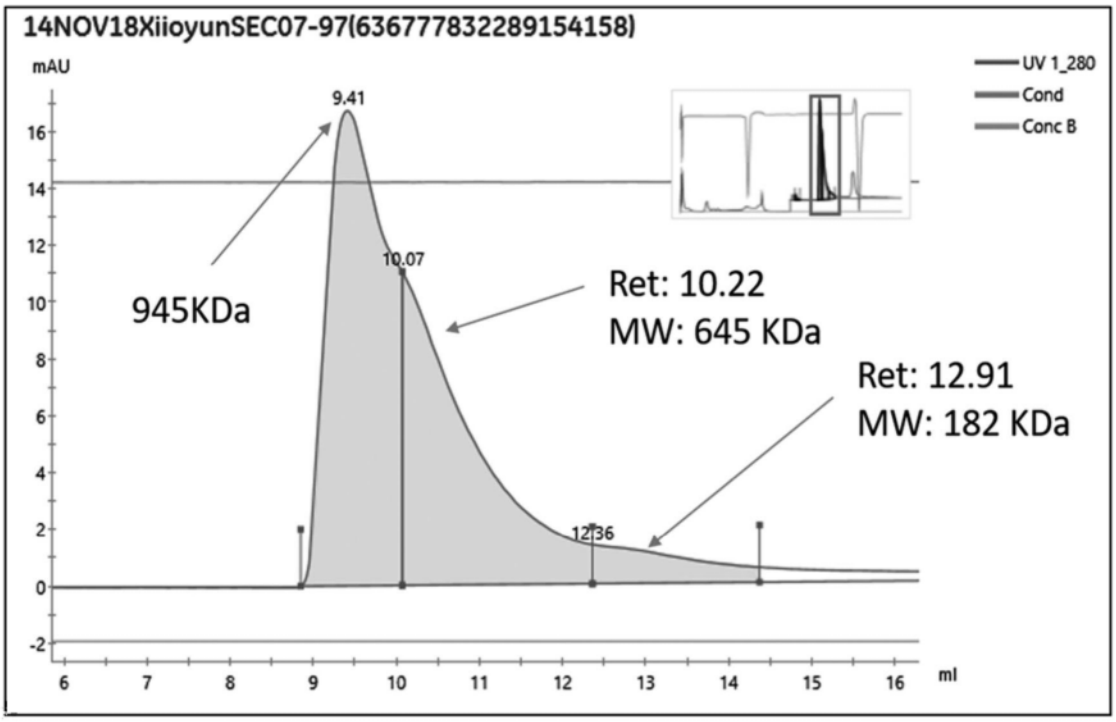

14NOV18XiioyunSEC07-97(636777832289154158)
mAU
UV 1_280
Cond
Conc B
9.41
10.07
12.36
945KDa
Ret: 10.22
MW: 645 KDa
Ret: 12.91
MW: 182 KDa
ml

图112

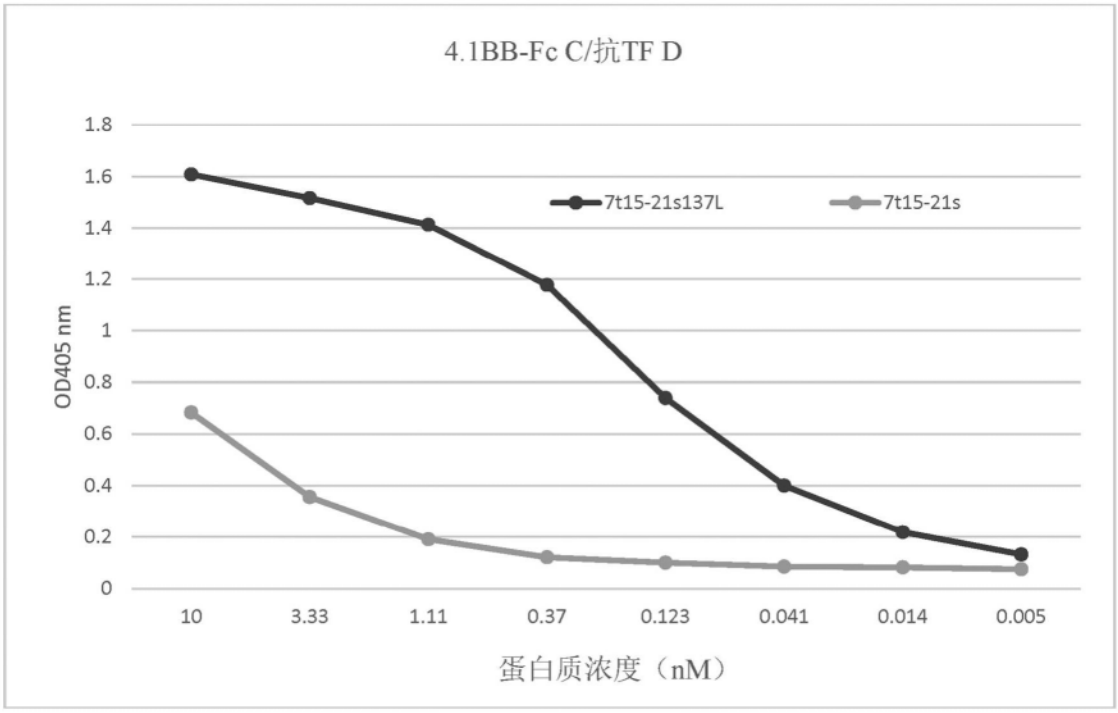

4.1BB-Fc C/抗TF D
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD405 nm
7t15-21s137L
7t15-21s
10
3.33
1.11
0.37
0.123
0.041
0.014
0.005
蛋白质浓度（nM）

图113

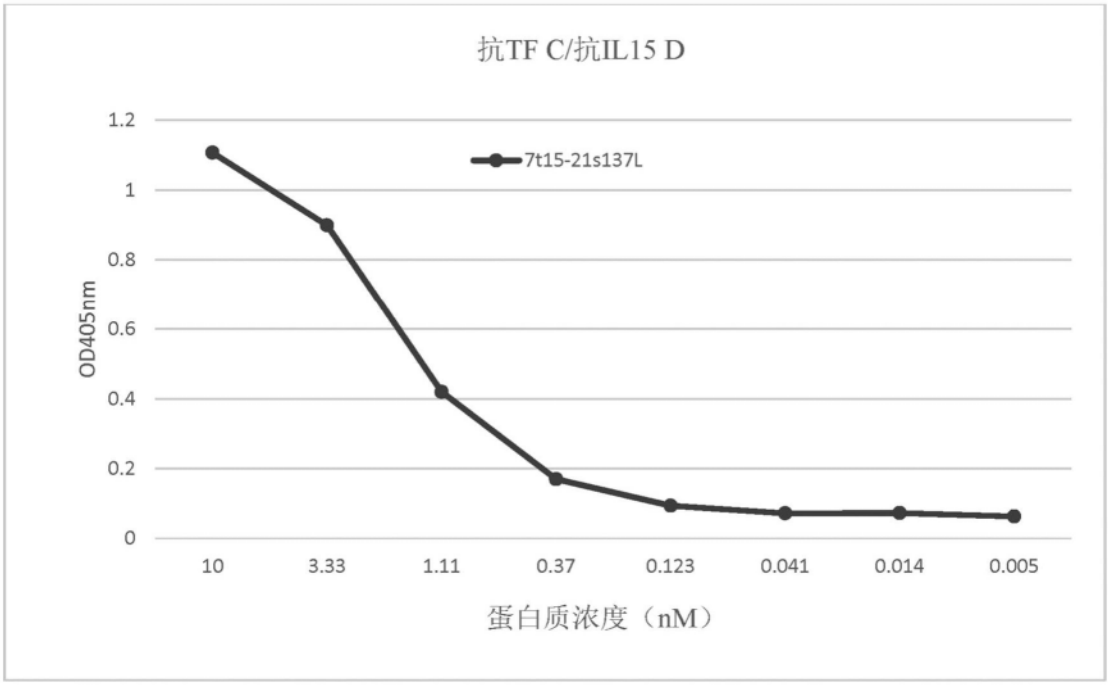

抗TF C/抗IL15 D
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD405nm
7t15-21s137L
10
3.33
1.11
0.37
0.123
0.041
0.014
0.005
蛋白质浓度（nM）

图114A

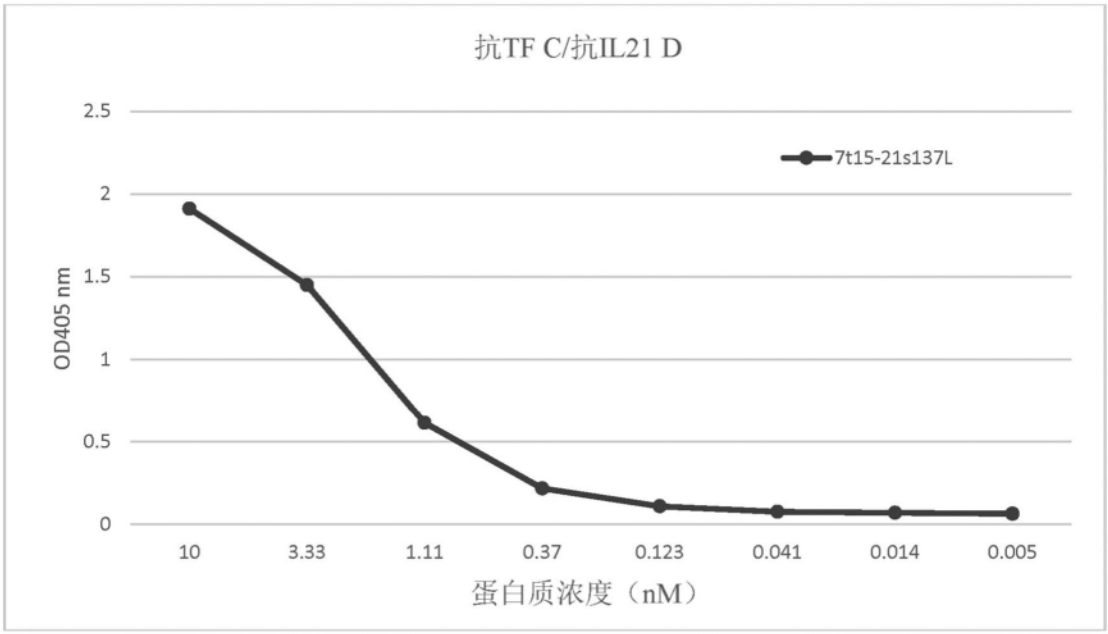

抗TF C/抗IL21 D
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OD405 nm
7t15-21s137L
10
3.33
1.11
0.37
0.123
0.041
0.014
0.005
蛋白质浓度（nM）

图114B

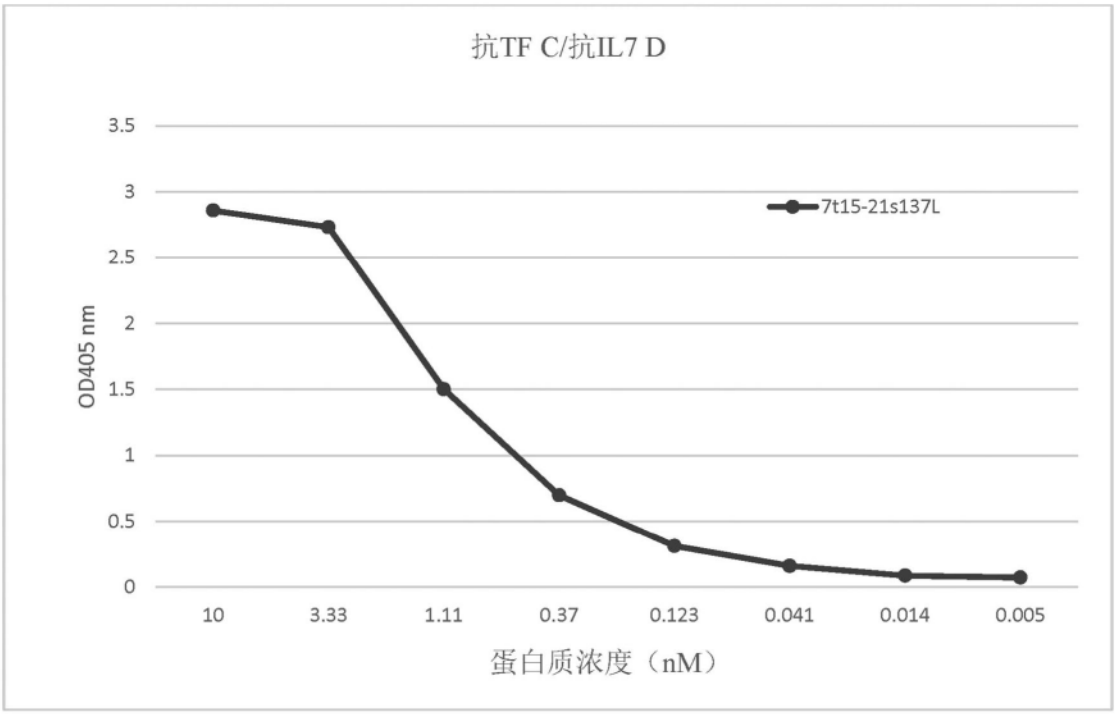

抗TF C/抗IL7 D
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OD405 nm
7t15-21s137L
10
3.33
1.11
0.37
0.123
0.041
0.014
0.005
蛋白质浓度（nM）

图114C

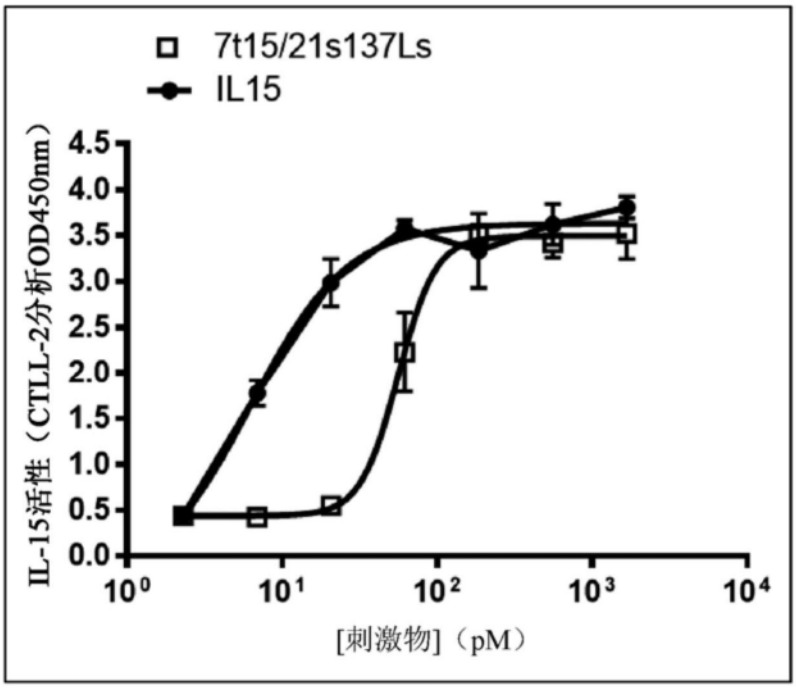

7t15/21s137Ls
IL15
IL-15活性（CTLL-2分析OD450nm）
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
[刺激物]（pM）

图115

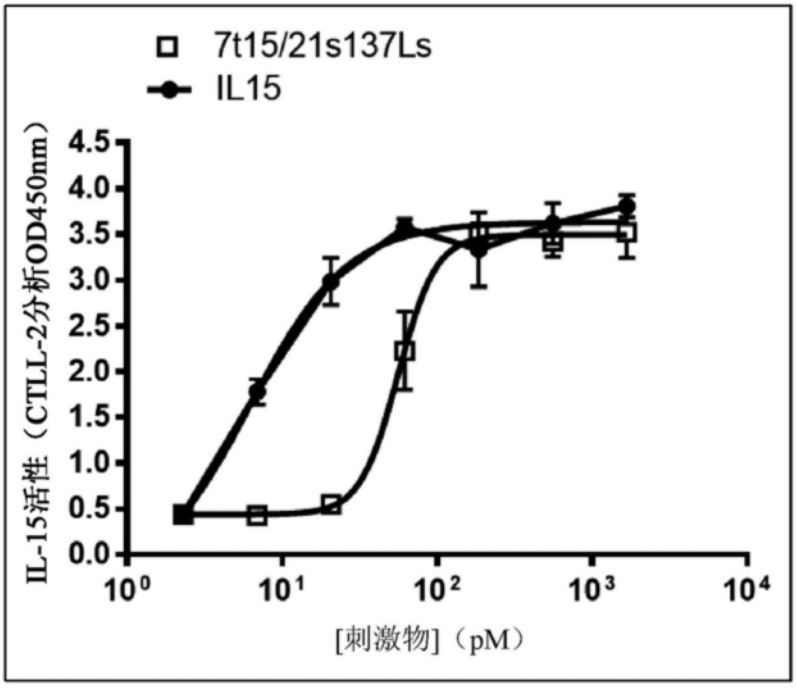

7t15/21s137Ls
IL15
IL-15活性（CTLL-2分析OD450nm）
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
[刺激物]（pM）

图116

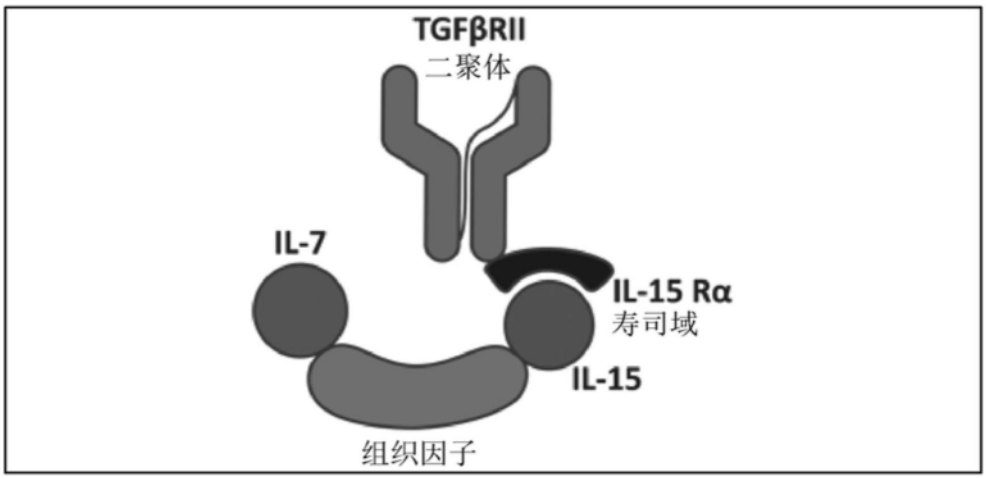


图117

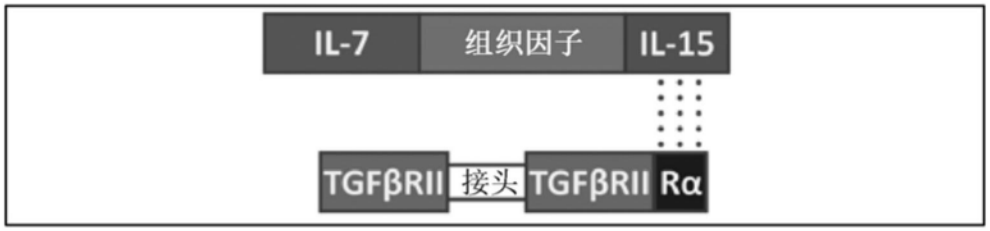


图118

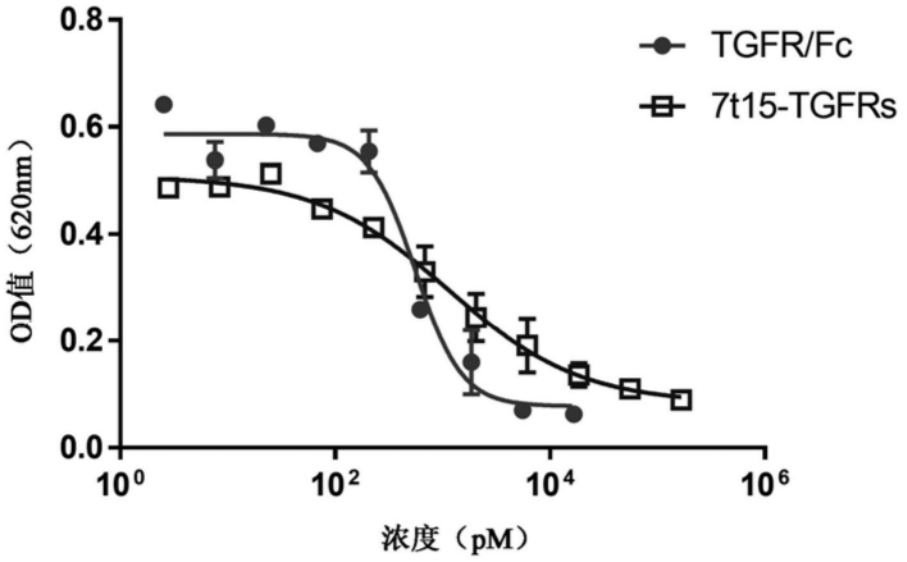


图119

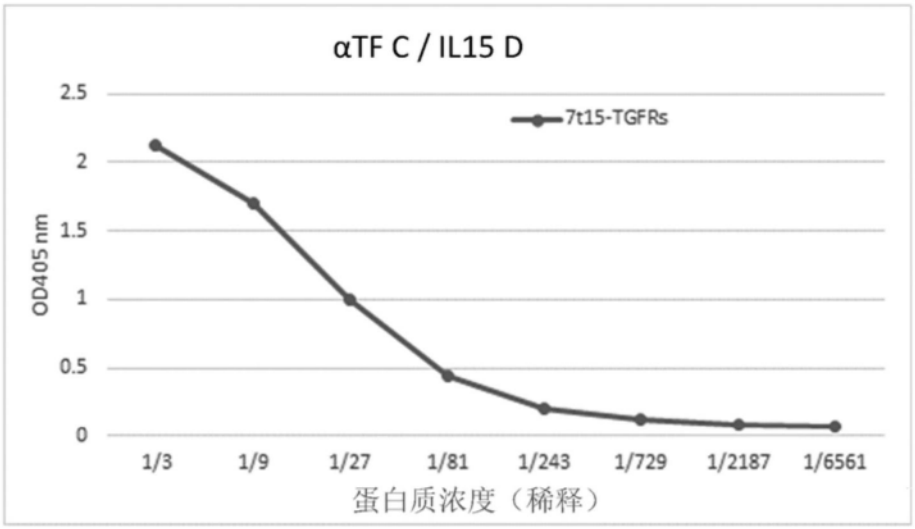

αTF C / IL15 D
7t15-TGFRs
OD405 nm
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1/3
1/9
1/27
1/81
1/243
1/729
1/2187
1/6561
蛋白质浓度（稀释）

图120A

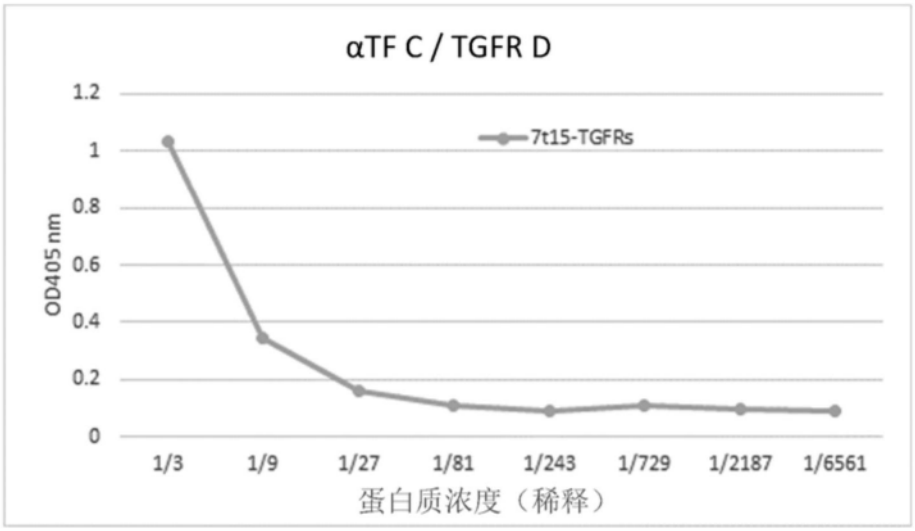

αTF C / TGFR D
7t15-TGFRs
OD405 nm
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1/3
1/9
1/27
1/81
1/243
1/729
1/2187
1/6561
蛋白质浓度（稀释）

图120B

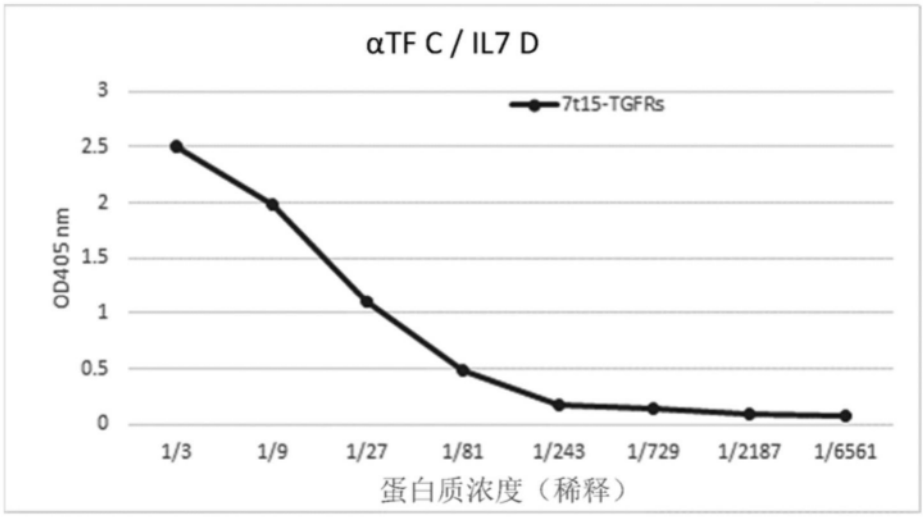

αTF C / IL7 D
7t15-TGFRs
OD405 nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1/3
1/9
1/27
1/81
1/243
1/729
1/2187
1/6561
蛋白质浓度（稀释）

图120C

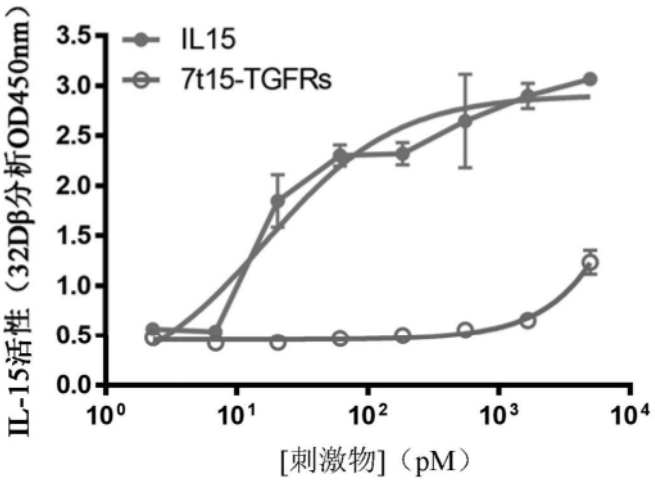

IL15
7t15-TGFRs
IL-15活性（32Dβ分析OD450nm）
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
[刺激物]（pM）

图121

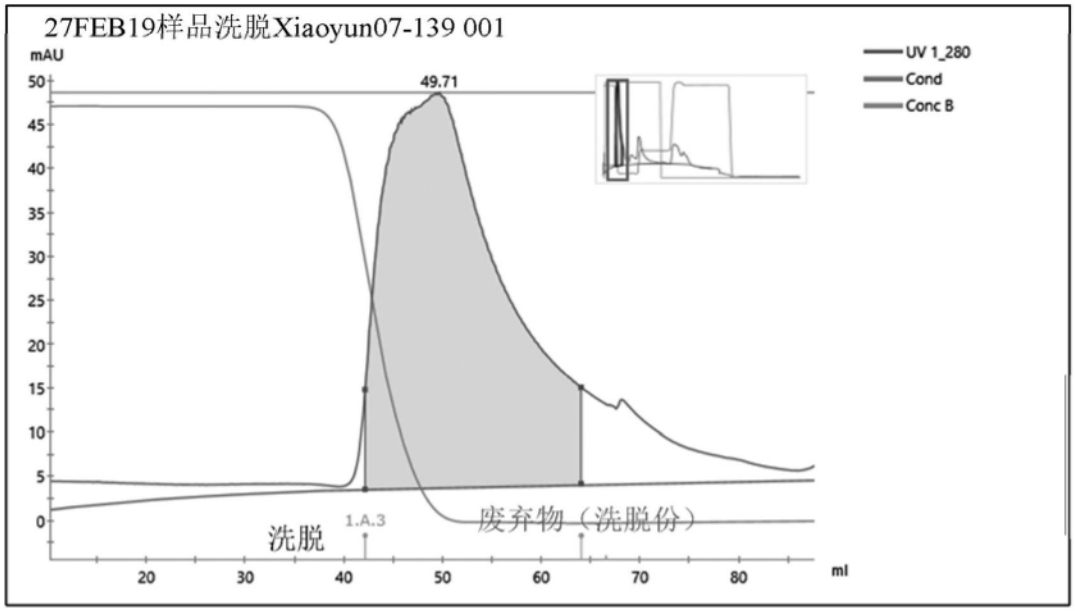

27FEB19样品洗脱Xiaoyun07-139 001
mAU
UV 1_280
Cond
Conc B
49.71
洗脱
1.A.3
废弃物（洗脱份）
ml

图122

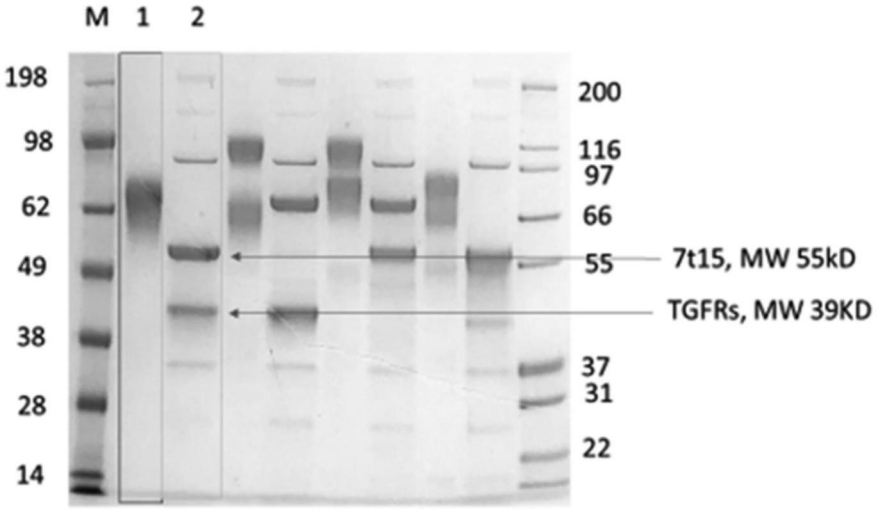

M
1
2
198
98
62
49
38
28
14
200
116
97
66
55
37
31
22
7t15, MW 55kD
TGFRs, MW 39KD

图123

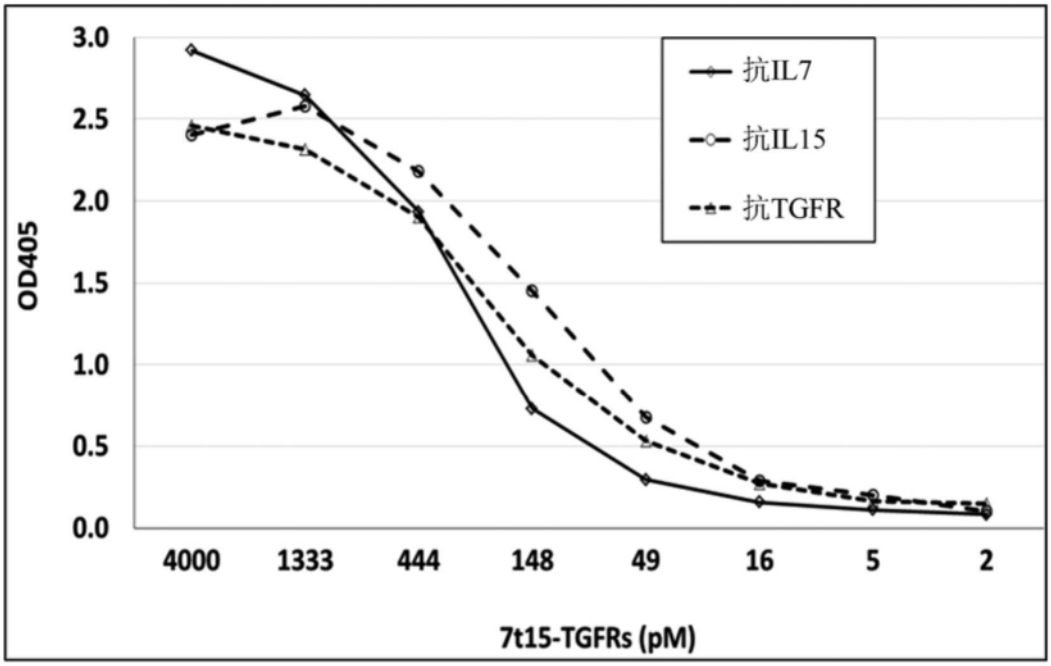

3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OD405
抗IL7
抗IL15
抗TGFR
4000
1333
444
148
49
16
5
2
7t15-TGFRs (pM)

图124

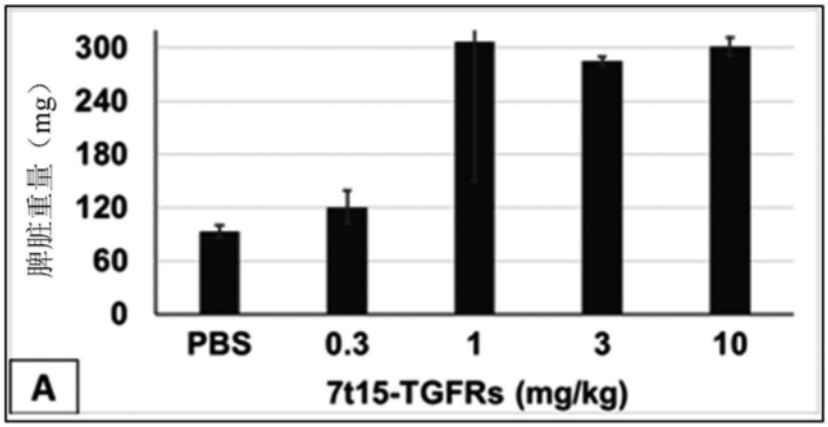

300
240
180
120
60
0
脾脏重量（mg）
PBS
0.3
1
3
10
A
7t15-TGFRs (mg/kg)

图125A

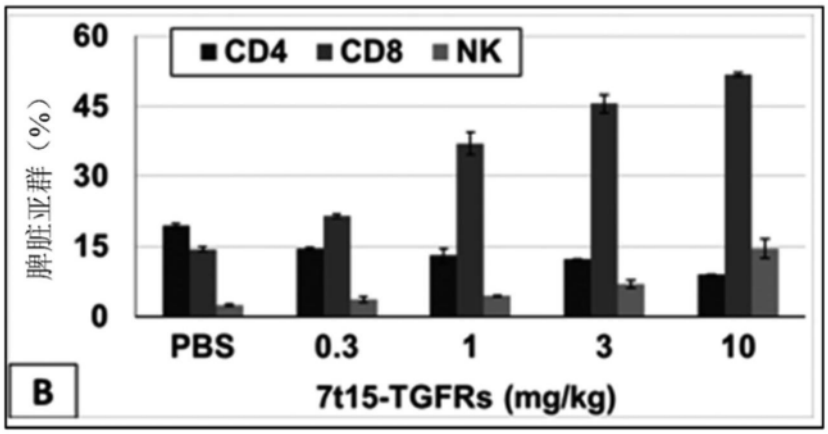


图125B

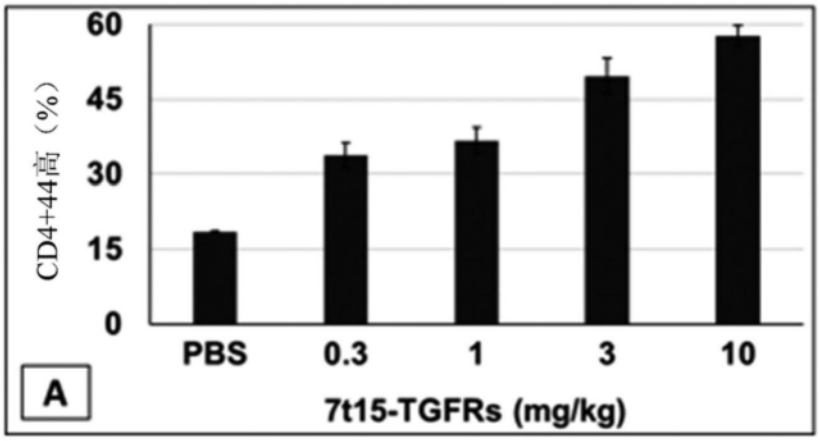


图126A

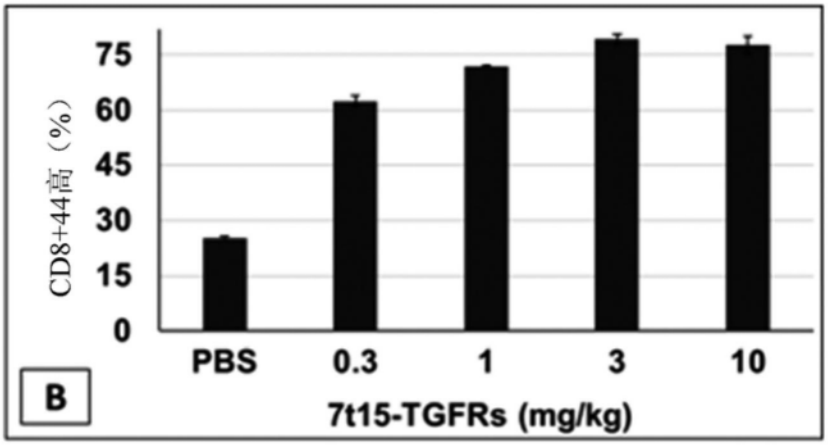


图126B

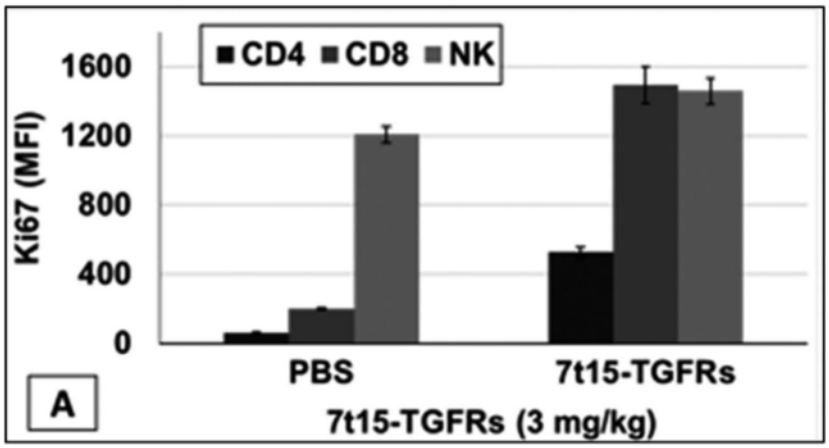

CD4 CD8 NK
1600
1200
800
400
0
Ki67 (MFI)
PBS
7t15-TGFRs
A
7t15-TGFRs (3 mg/kg)

图127A

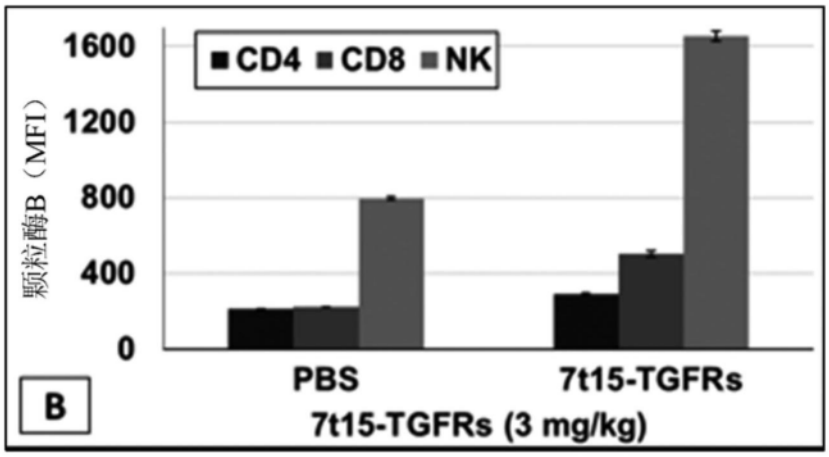

CD4 CD8 NK
1600
1200
800
400
0
颗粒酶B（MFI）
PBS
7t15-TGFRs
B
7t15-TGFRs (3 mg/kg)

图127B

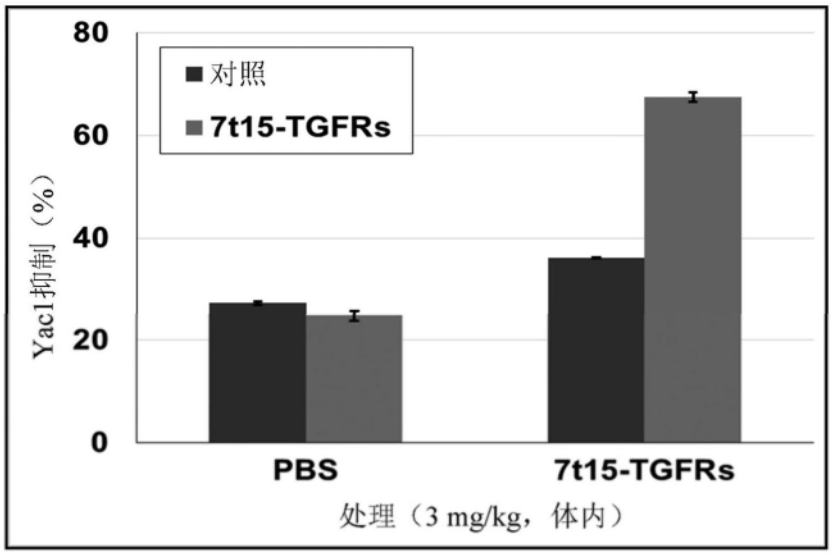


图128

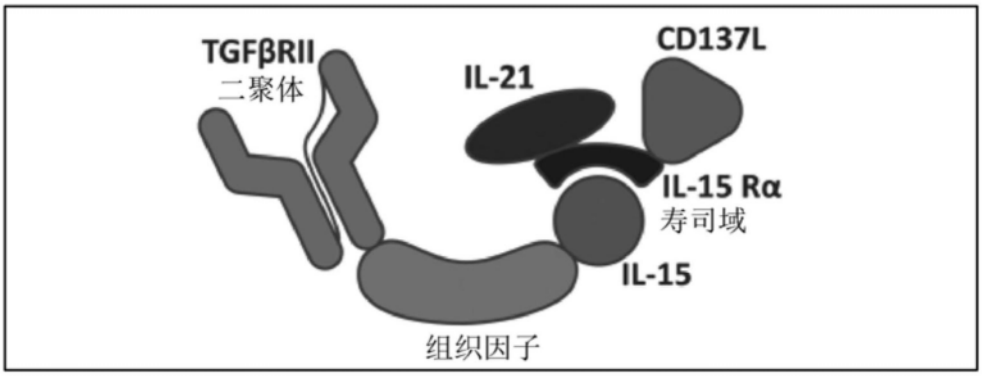


图129



图130

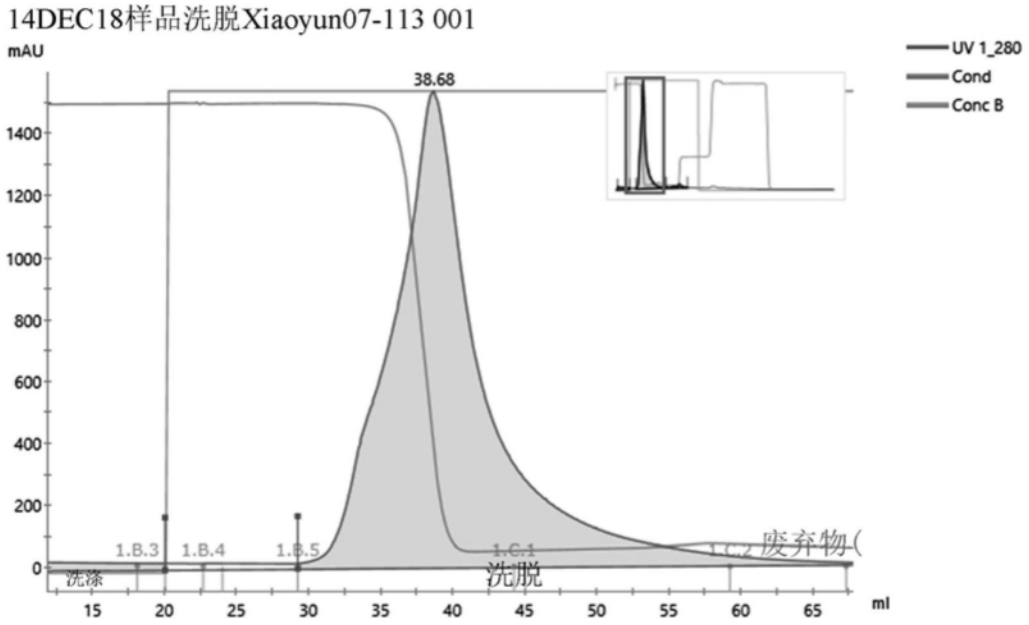


图131

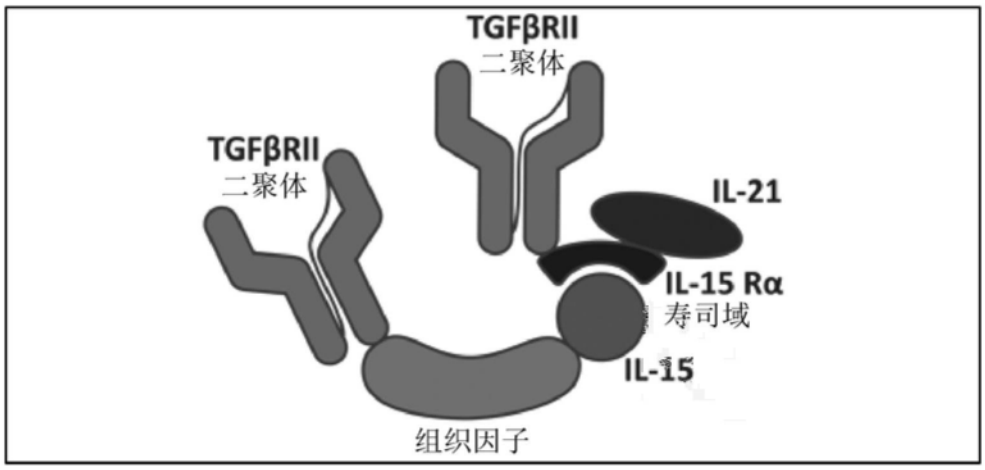


图132

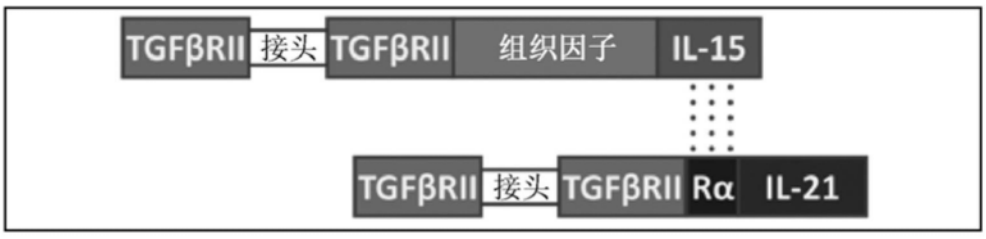


图133

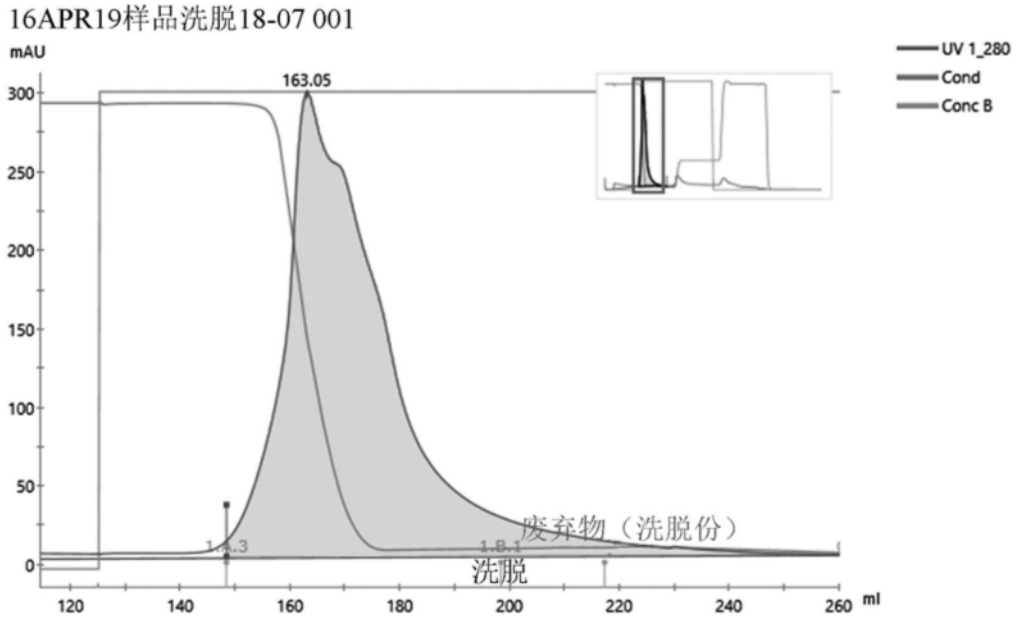

16APR19样品洗脱18-07 001
mAU
UV 1_280
Cond
Conc B
163.05
300
250
200
150
100
50
0
120
140
160
180
200
220
240
260
ml
废弃物（洗脱份）
洗脱

图134

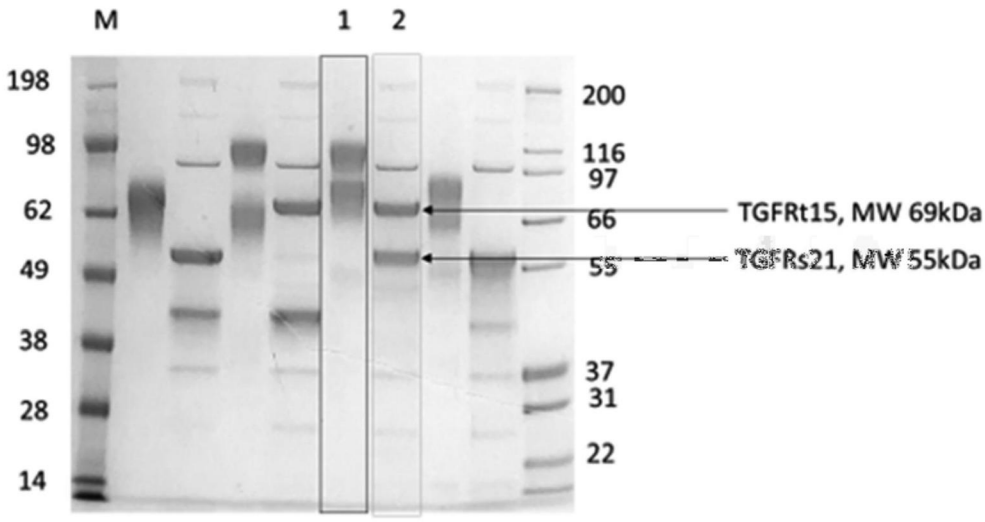

M
1
2
198
98
62
49
38
28
14
200
116
97
66
55
37
31
22
TGFRt15, MW 69kDa
TGFRs21, MW 55kDa

图135

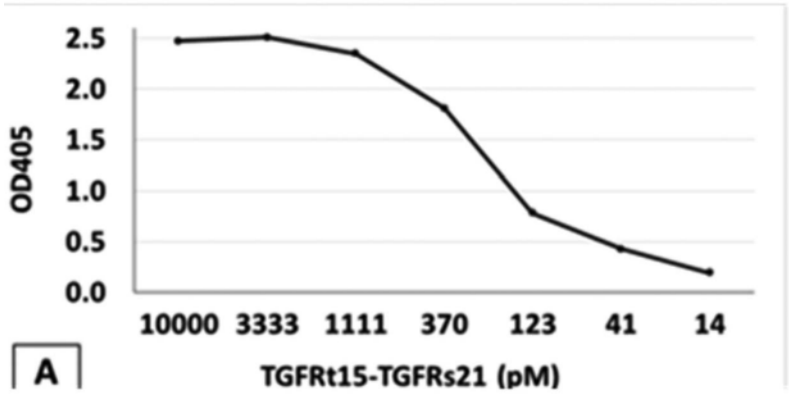


图136A

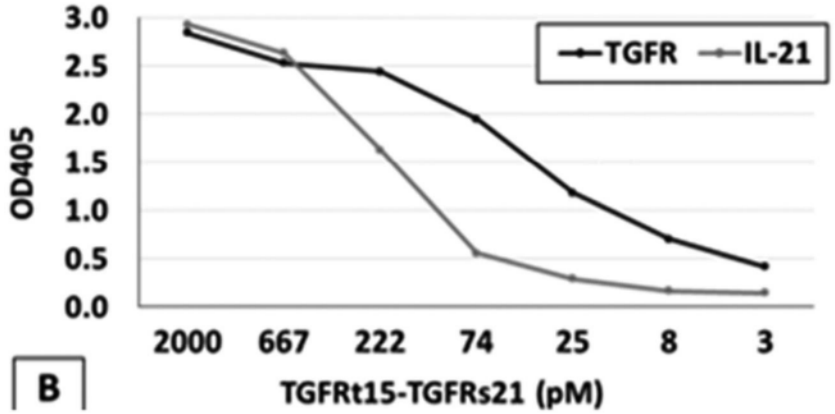


图136B

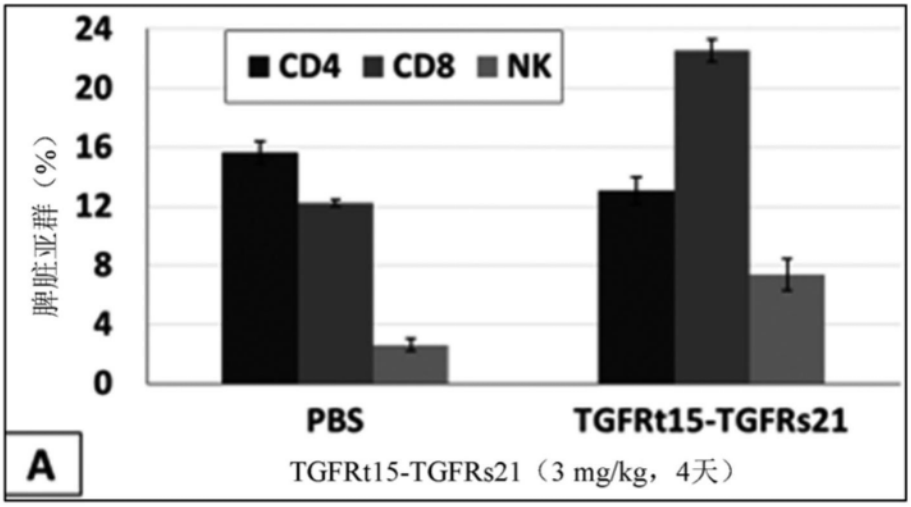


图137A

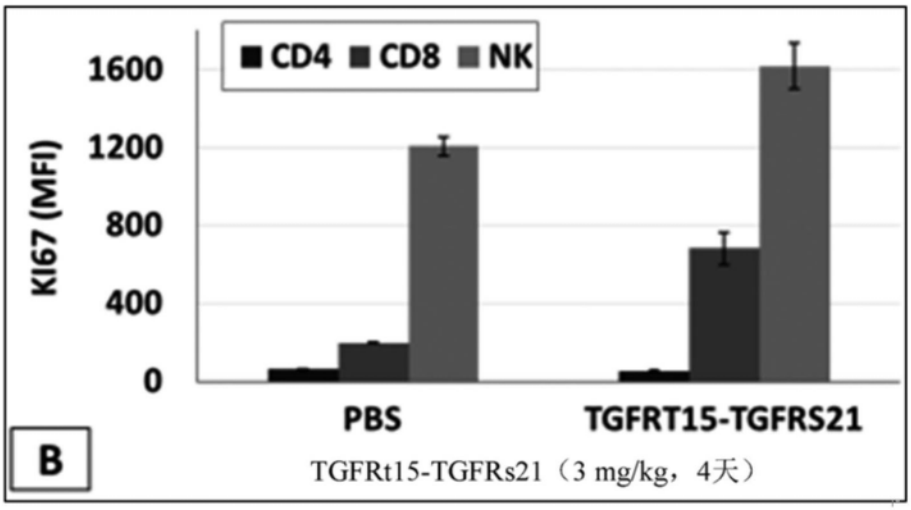

CD4
CD8
NK
KI67 (MFI)
1600
1200
800
400
0
PBS
TGFRT15-TGFRS21
B
TGFRt15-TGFRs21（3 mg/kg，4天）

图137B

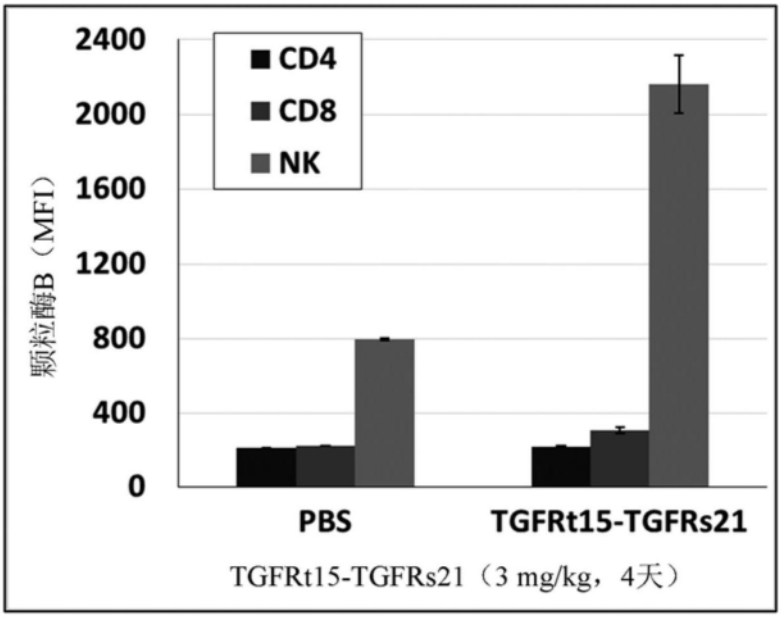

CD4
CD8
NK
颗粒酶B（MFI）
2400
2000
1600
1200
800
400
0
PBS
TGFRt15-TGFRs21
TGFRt15-TGFRs21（3 mg/kg，4天）

图138

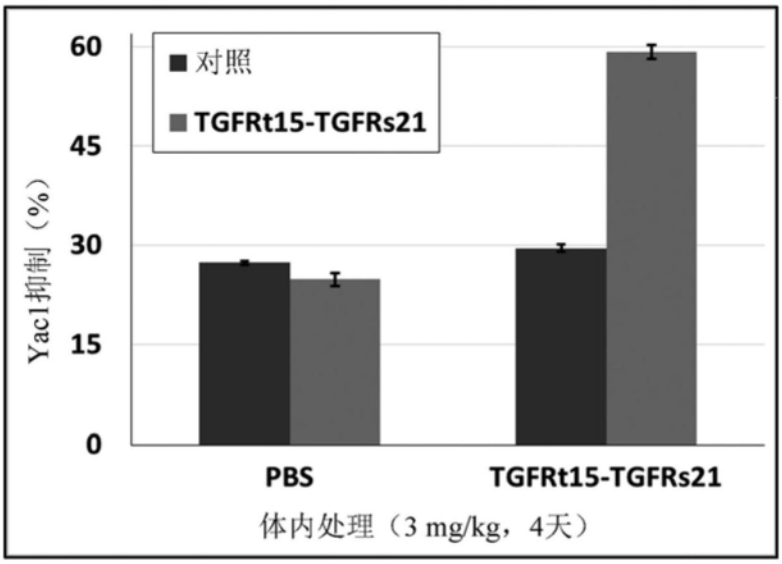


图139

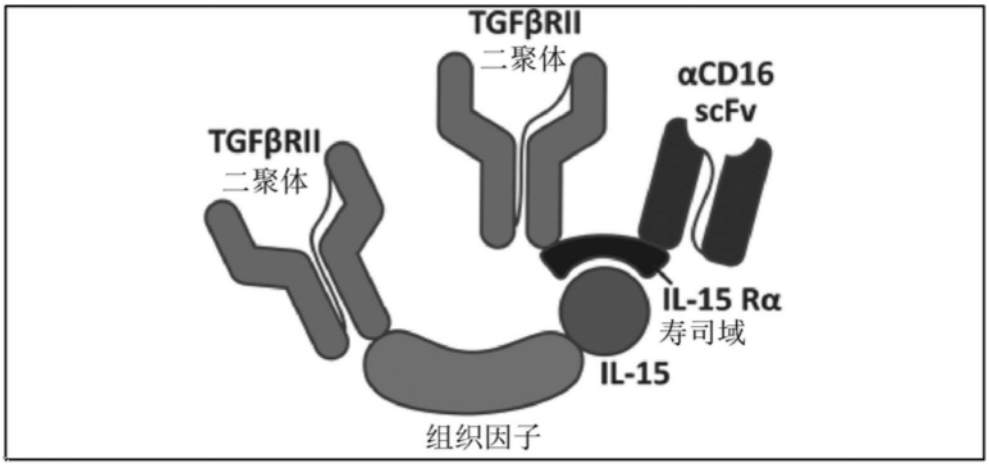


图140

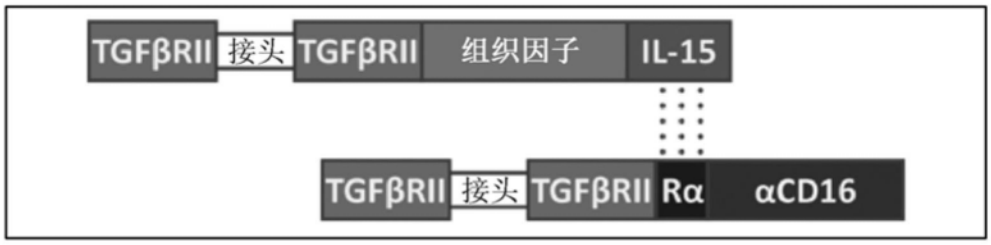


图141

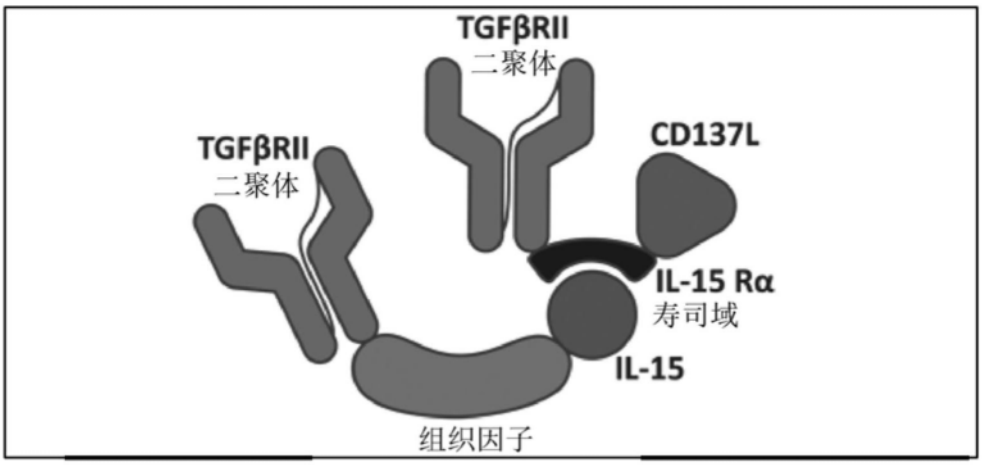


图142



图143

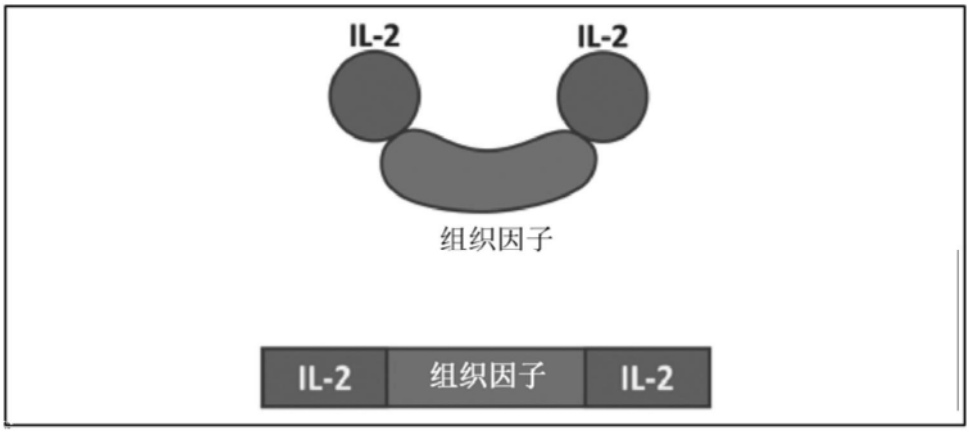


图144

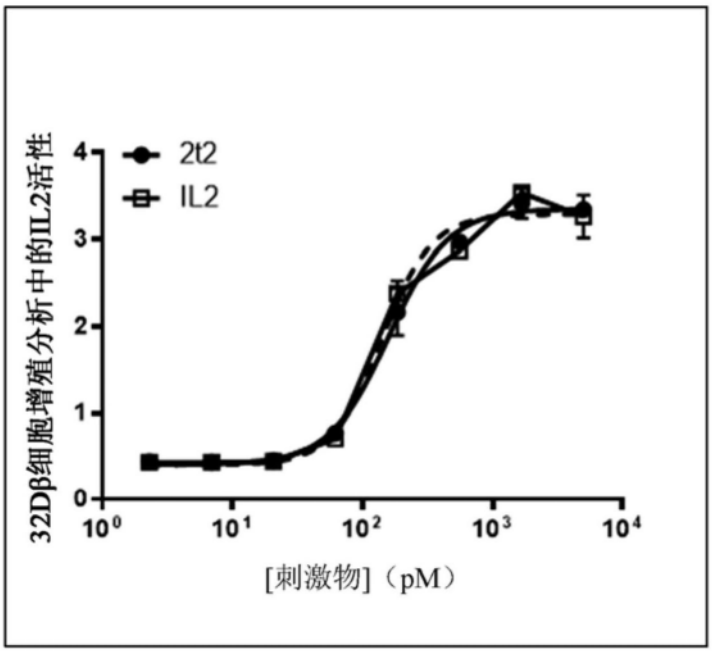

32Dβ细胞增殖分析中的IL2活性
2t2
IL2
4
3
2
1
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
[刺激物]（pM）

图145

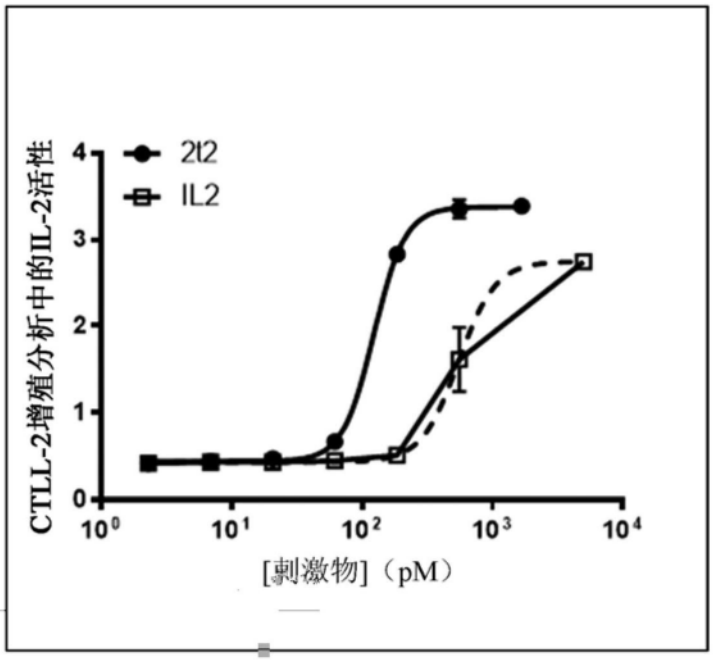

CTLL-2增殖分析中的IL-2活性
2t2
IL2
4
3
2
1
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
[刺激物]（pM）

图146

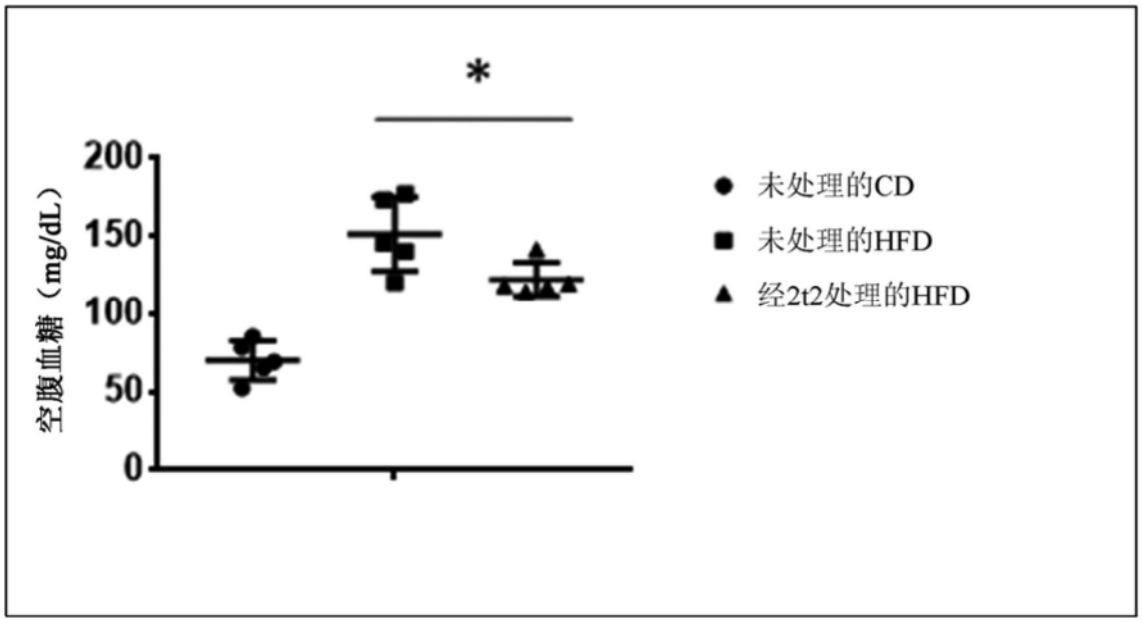

*
200
150
100
50
0
空腹血糖（mg/dL）
未处理的CD
未处理的HFD
经2t2处理的HFD

图147

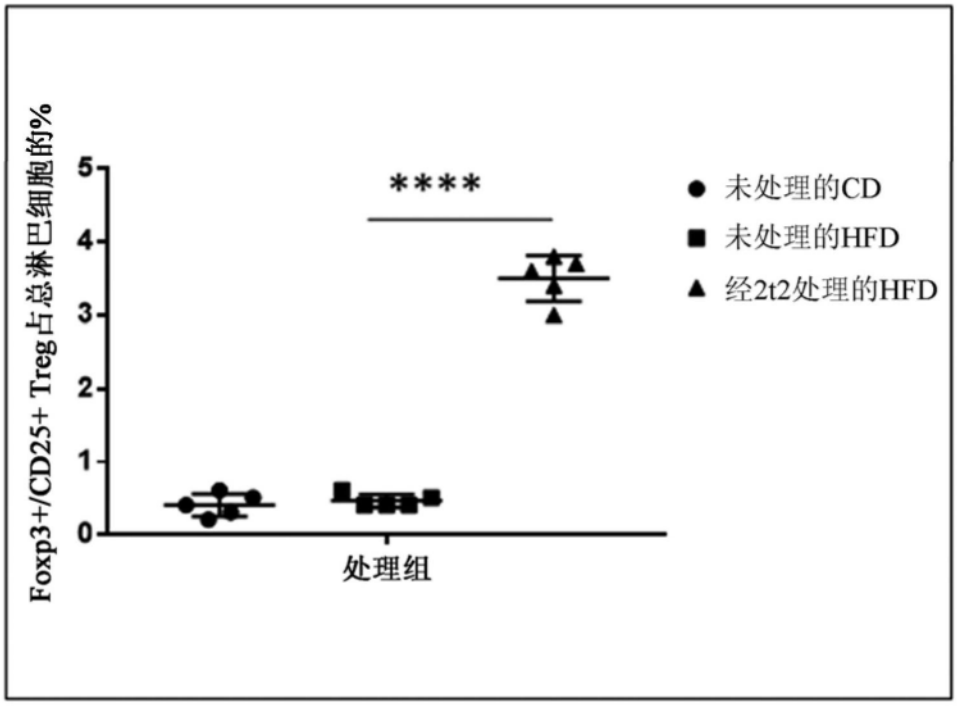

****
5
4
3
2
1
0
Foxp3+/CD25+ Treg占总淋巴细胞的%
处理组
未处理的CD
未处理的HFD
经2t2处理的HFD

图148

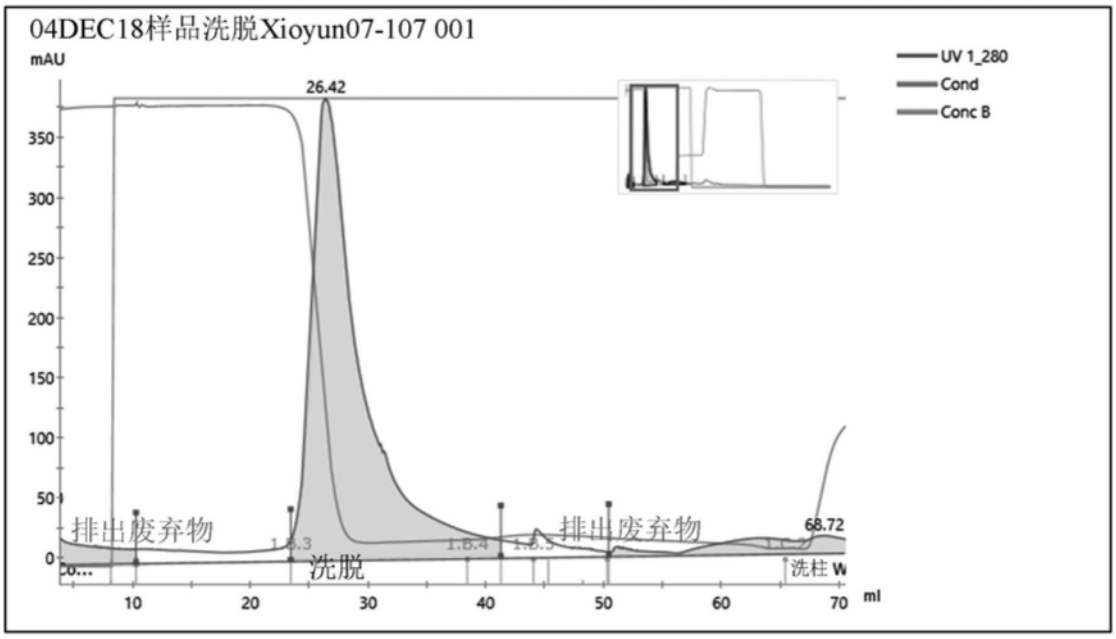

04DEC18样品洗脱Xioyun07-107 001
mAU
UV 1_280
Cond
Conc B
26.42
68.72
排出废弃物
洗脱
排出废弃物
洗柱
ml

图149

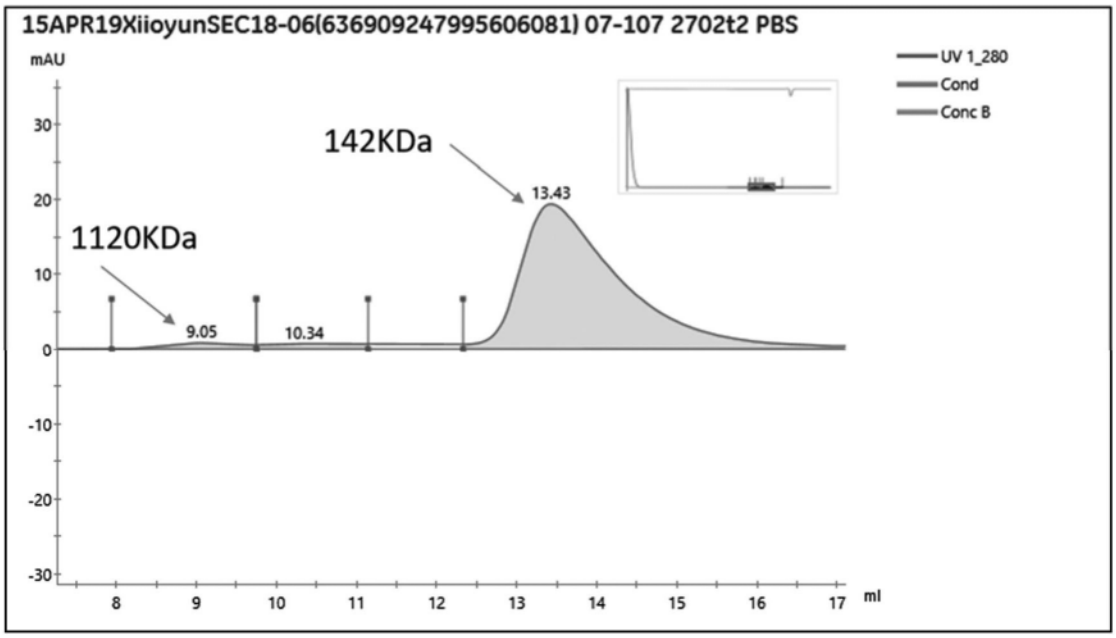

15APR19XiioyunSEC18-06(636909247995606081) 07-107 2702t2 PBS
mAU
UV 1_280
Cond
Conc B
142KDa
13.43
1120KDa
9.05
10.34
ml

图150

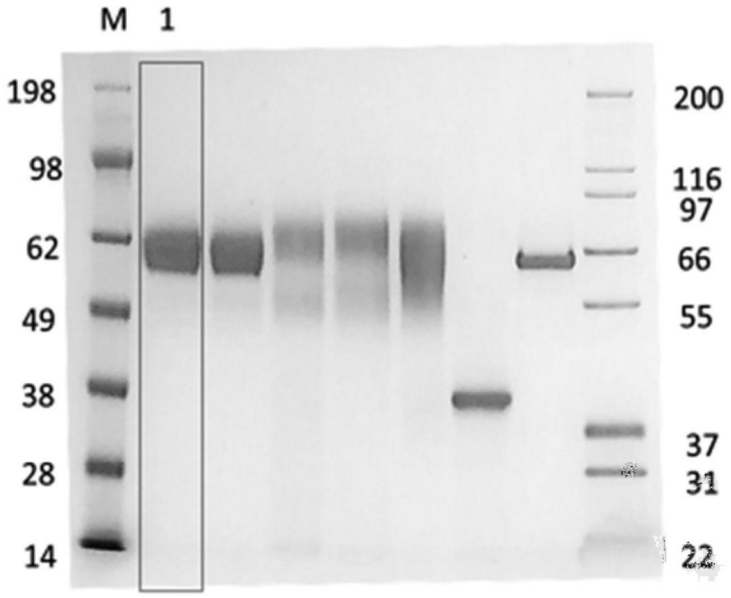

M 1
198
98
62
49
38
28
14
200
116
97
66
55
37
31
22

图151A

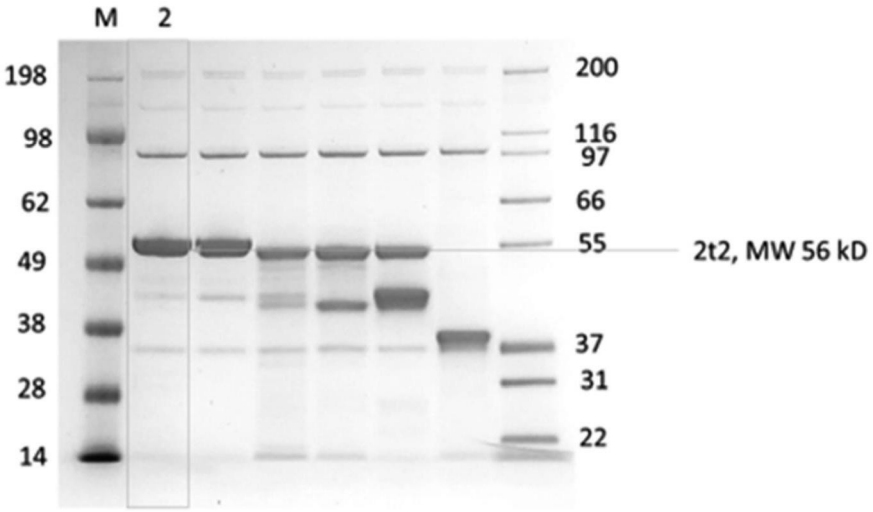

M 2
198
98
62
49
38
28
14
200
116
97
66
55
37
31
22
2t2, MW 56 kD

图151B

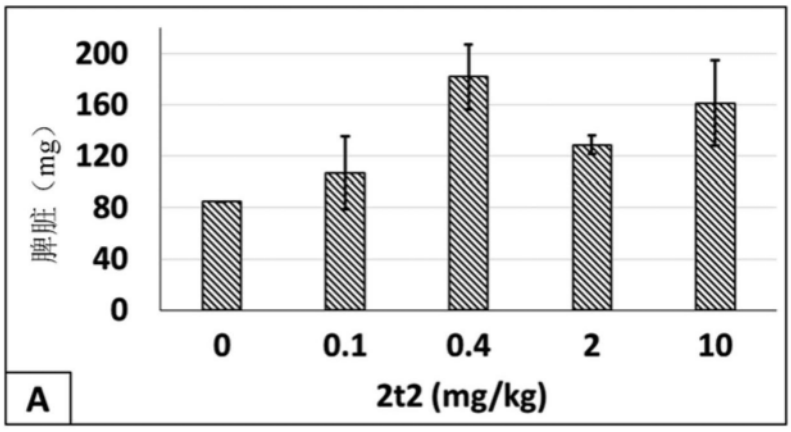


图152A

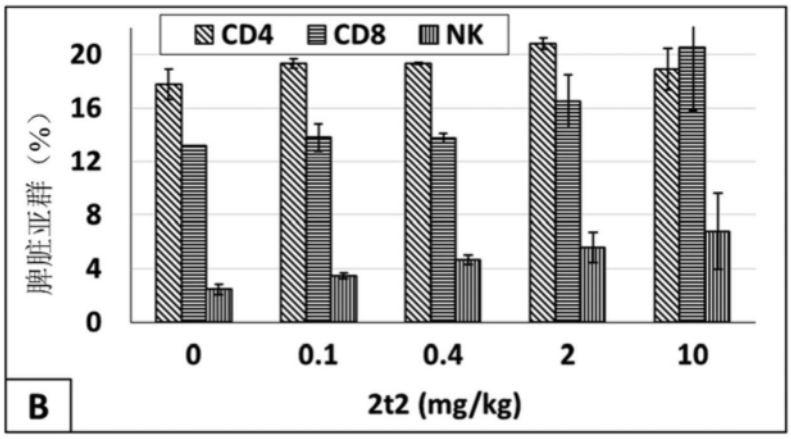


图152B

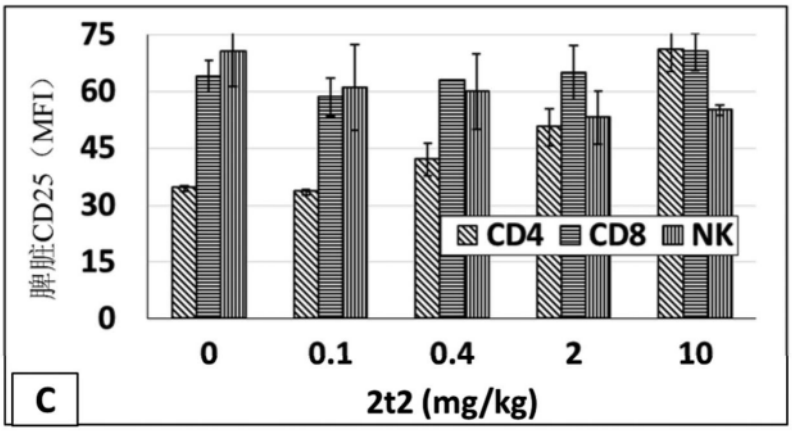


图153

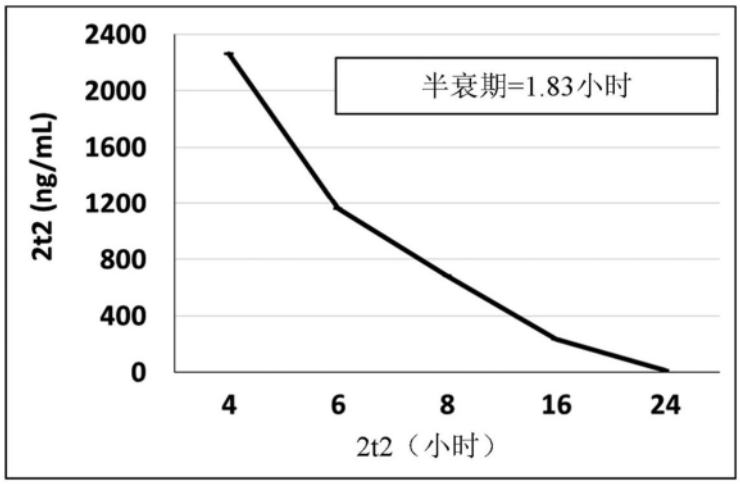

2400
2000
1600
1200
800
400
0
2t2 (ng/mL)
半衰期=1.83小时
4
6
8
16
24
2t2（小时）

图154

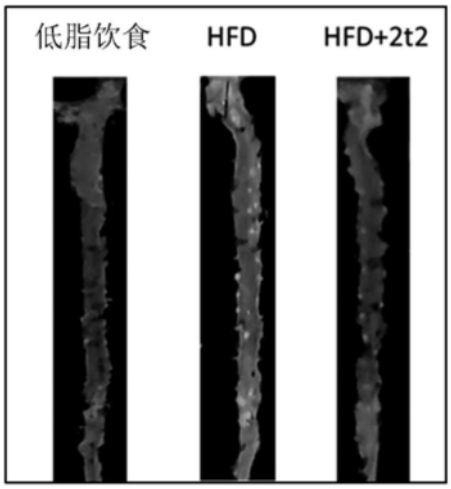

低脂饮食
HFD
HFD+2t2

图155A

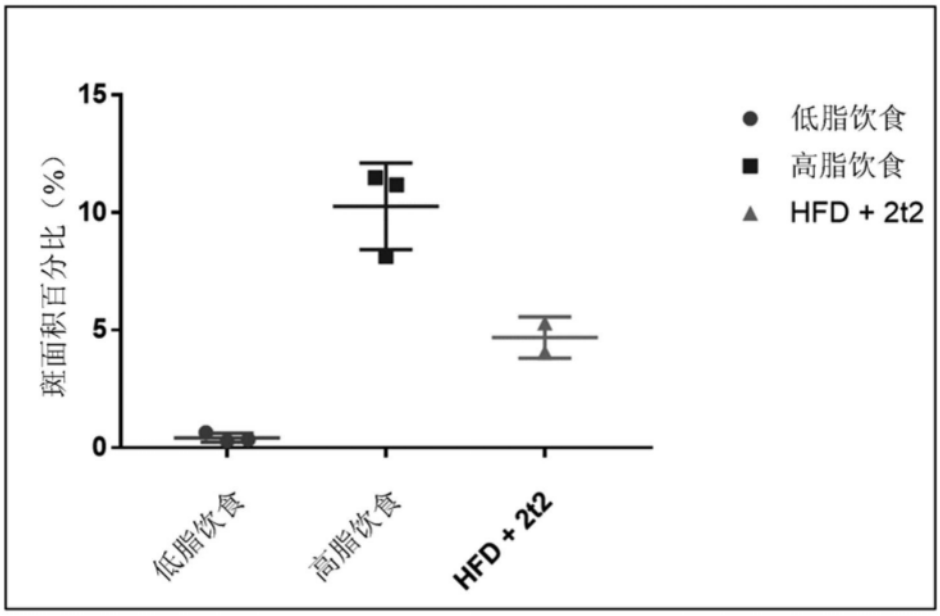

15
10
5
0
斑面积百分比（%）
低脂饮食
高脂饮食
HFD + 2t2
低脂饮食
高脂饮食
HFD + 2t2

图155B

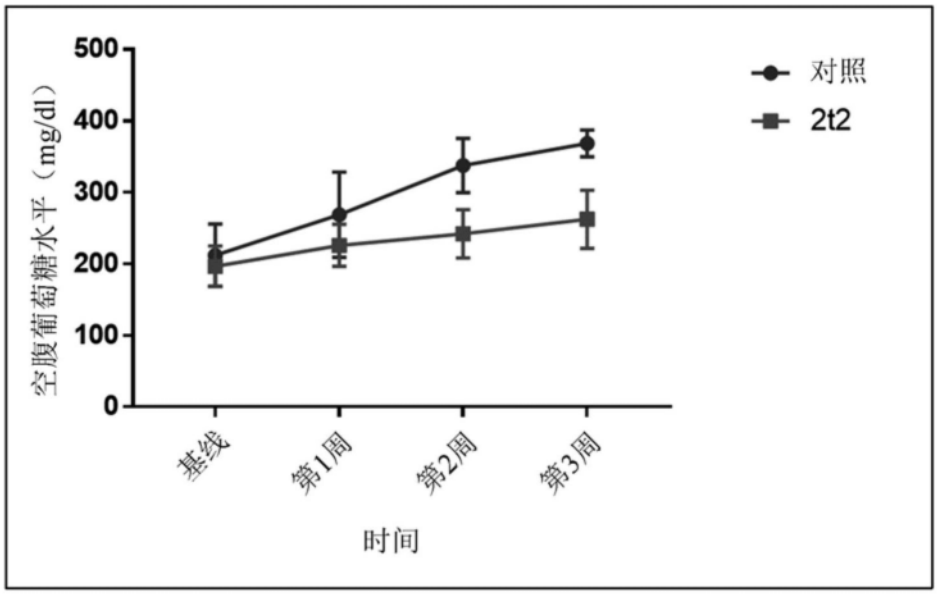

500
400
300
200
100
0
空腹葡萄糖水平（mg/dl）
对照
2t2
基线
第1周
第2周
第3周
时间

图156

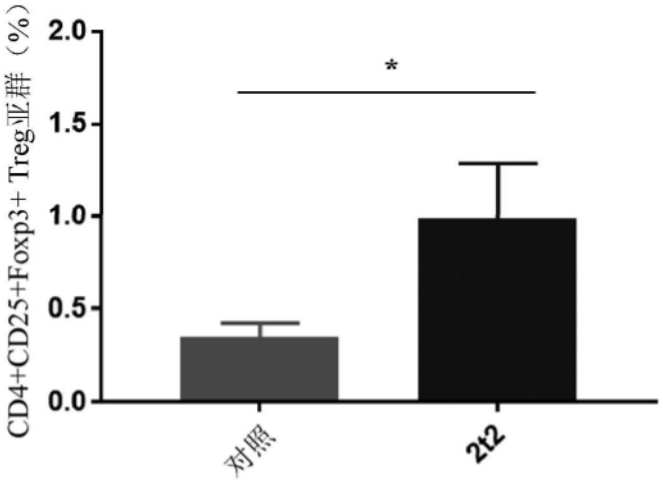

CD4+CD25+Foxp3+ Treg亚群（%）
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
对照
2t2

图157

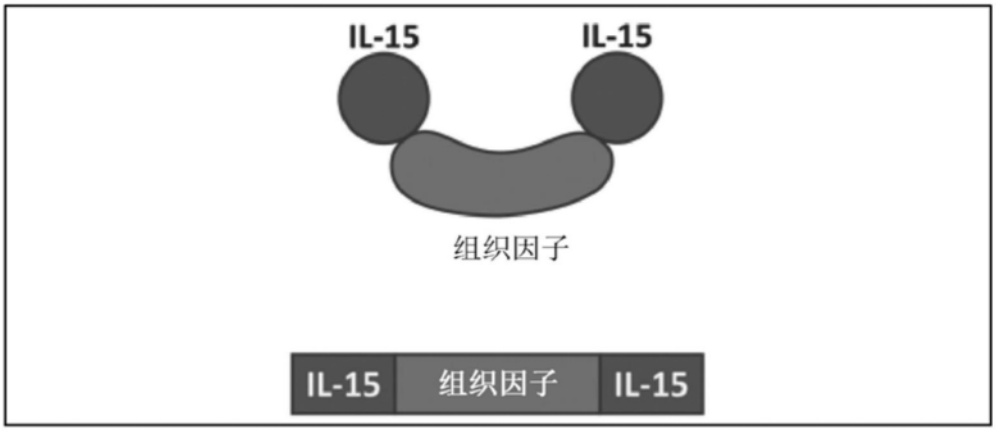

IL-15
IL-15
组织因子
IL-15
组织因子
IL-15

图158

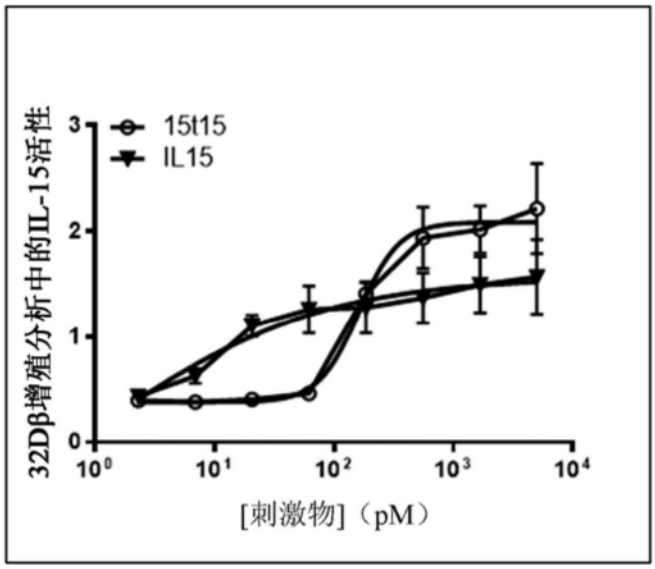

32Dβ增殖分析中的IL-15活性
15t15
IL15
3
2
1
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
[刺激物]（pM）

图159

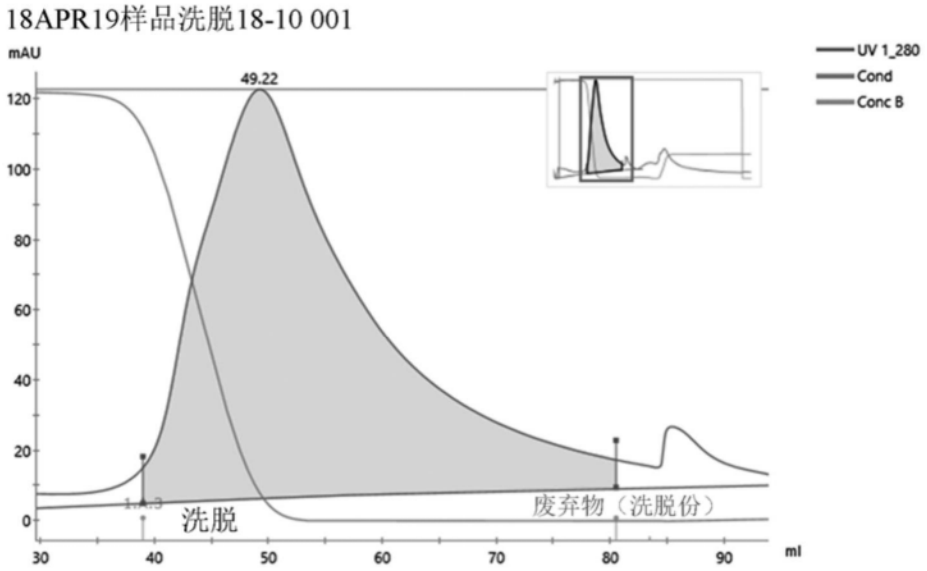

18APR19样品洗脱18-10 001
mAU
UV 1_280
Cond
Conc B
49.22
120
100
80
60
40
20
0
洗脱
废弃物（洗脱份）
30
40
50
60
70
80
90
ml

图160

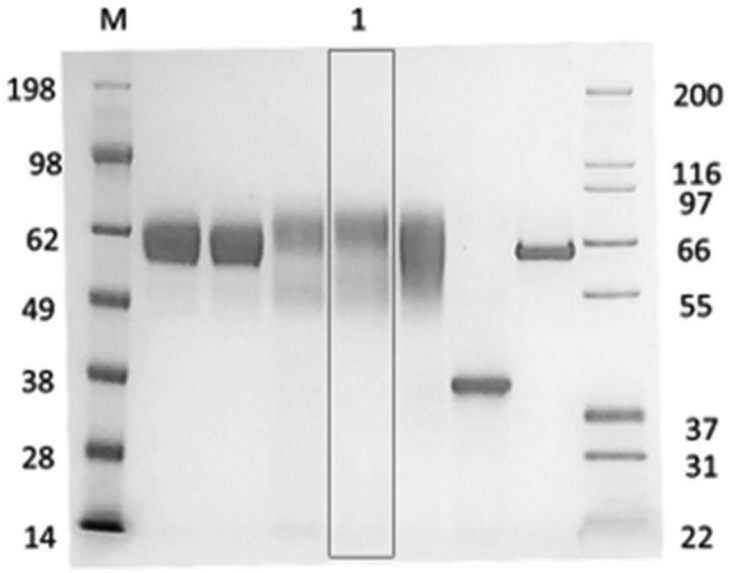

M
1
198
98
62
49
38
28
14
200
116
97
66
55
37
31
22

图161A

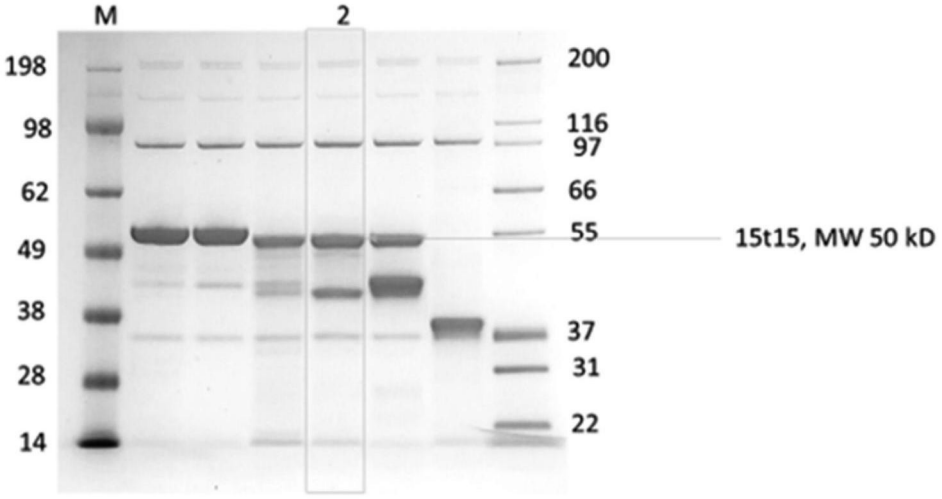

M
2
198
98
62
49
38
28
14
200
116
97
66
55
37
31
22
15t15, MW 50 kD

图161B

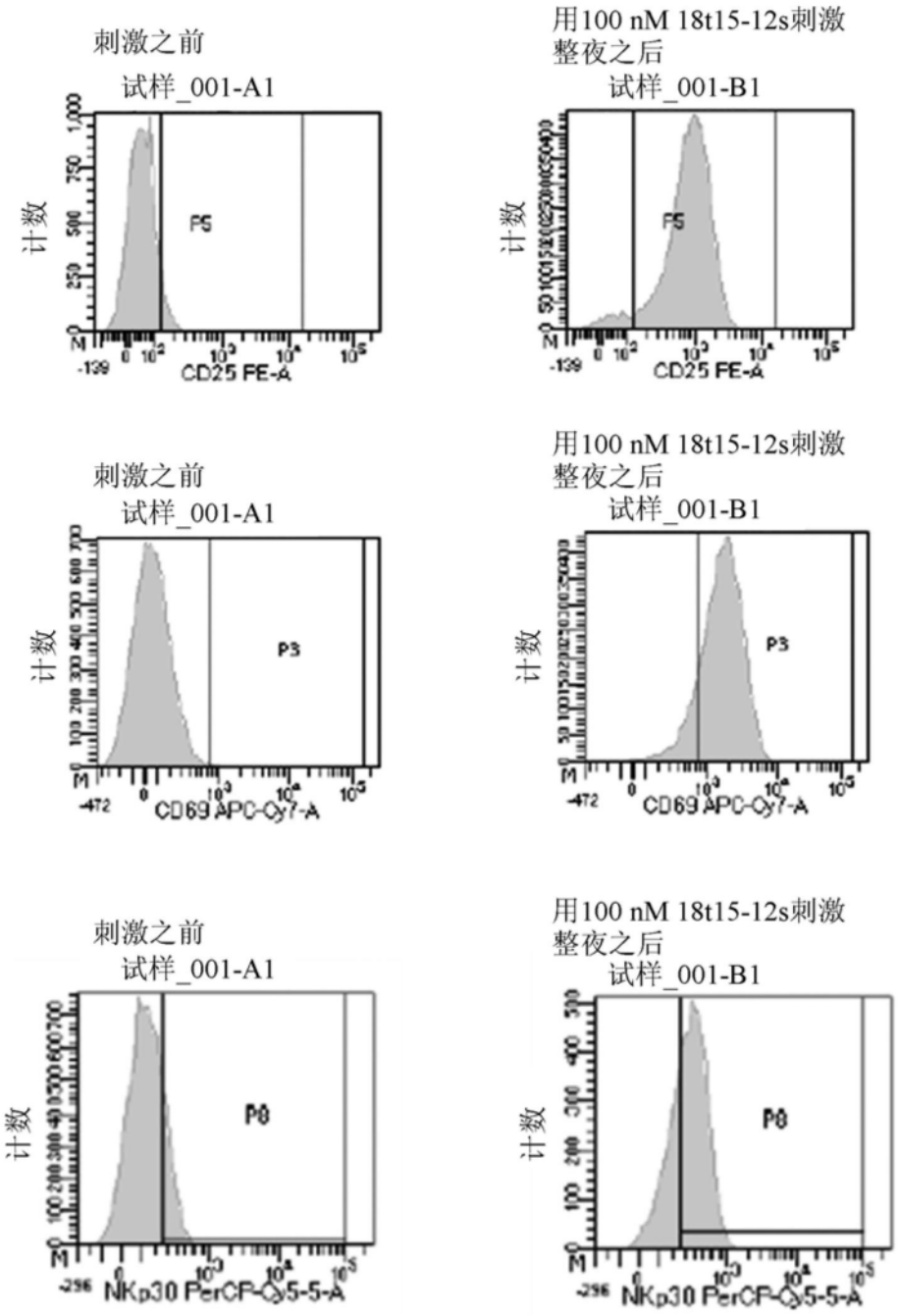

刺激之前
试样_001-A1
计数
P5
CD25 FE-A
用100 nM 18t15-12s刺激
整夜之后
试样_001-B1
计数
P5
CD25 FE-A
刺激之前
试样_001-A1
计数
P3
CD69 APC-Cy7-A
用100 nM 18t15-12s刺激
整夜之后
试样_001-B1
计数
P3
CD69 APC-Cy7-A
刺激之前
试样_001-A1
计数
P8
NKp30 PerCP-Cy5-5-A
用100 nM 18t15-12s刺激
整夜之后
试样_001-B1
计数
P8
NKp30 PerCP-Cy5-5-A

图162A

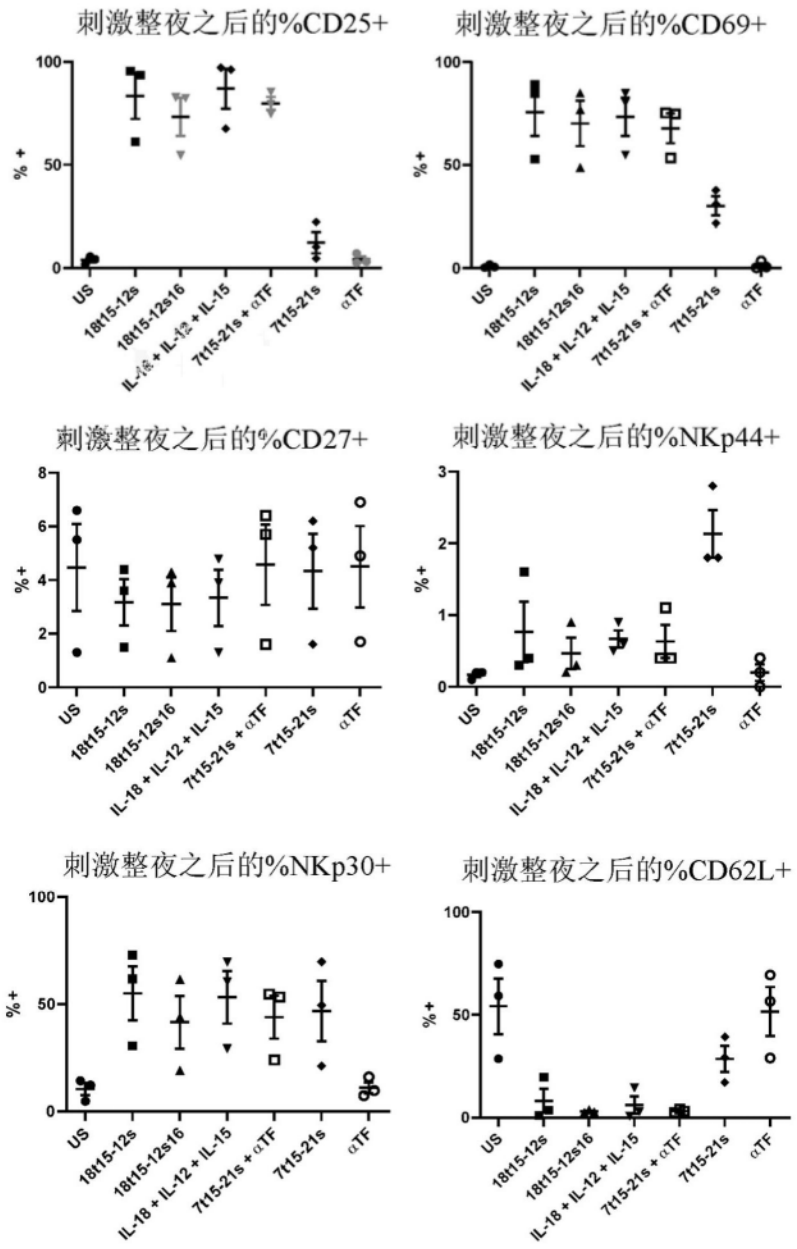

刺激整夜之后的%CD25+
刺激整夜之后的%CD69+
刺激整夜之后的%CD27+
刺激整夜之后的%NKp44+
刺激整夜之后的%NKp30+
刺激整夜之后的%CD62L+
% +
US
18t15-12s
18t15-12s16
IL-18 + IL-12 + IL-15
7t15-21s + αTF
7t15-21s
αTF

图162B

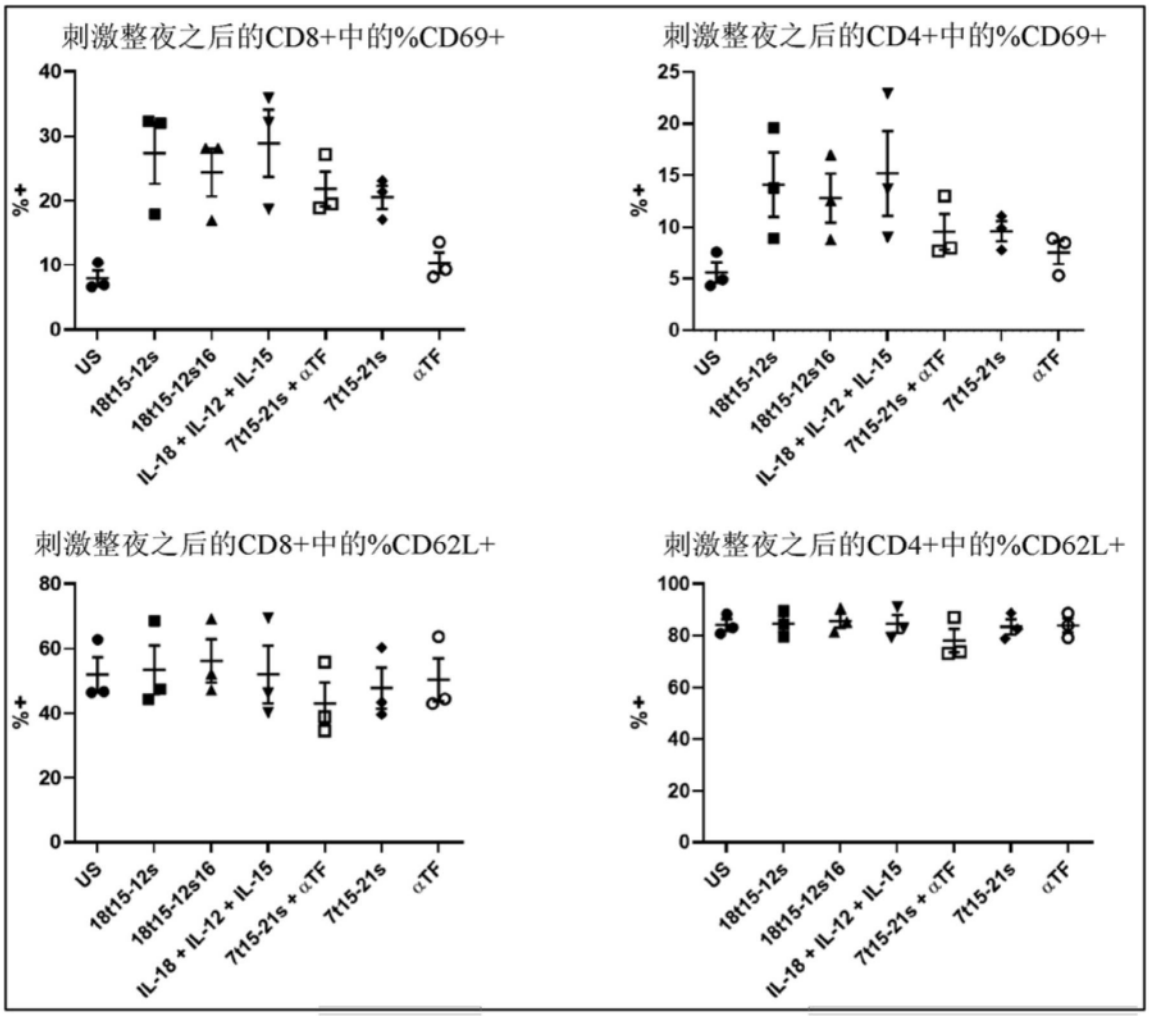

刺激整夜之后的CD8+中的%CD69+
刺激整夜之后的CD4+中的%CD69+
刺激整夜之后的CD8+中的%CD62L+
刺激整夜之后的CD4+中的%CD62L+
%+
US
18t15-12s
18t15-12s16
IL-18 + IL-12 + IL-15
7t15-21s + αTF
7t15-21s
αTF

图163

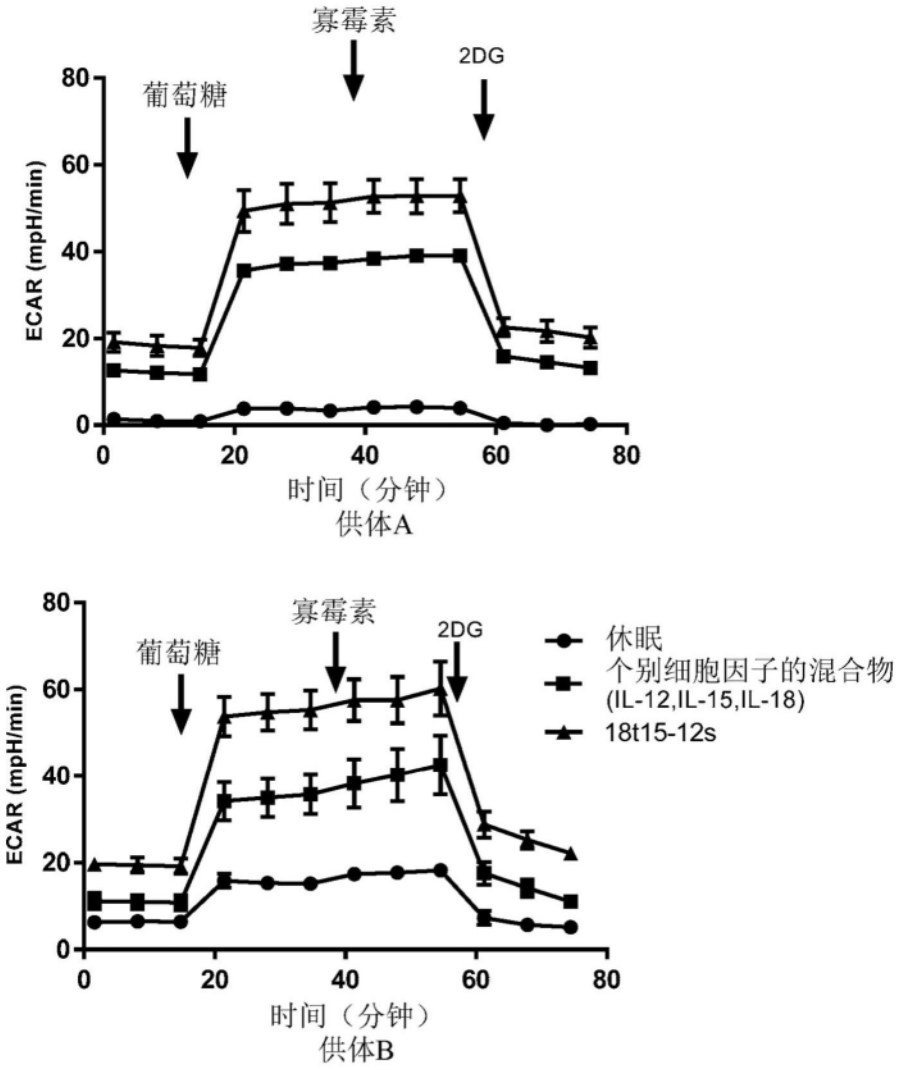

寡霉素
2DG
葡萄糖
ECAR (mpH/min)
0
20
40
60
80
时间（分钟）
供体A
寡霉素
2DG
葡萄糖
休眠
个别细胞因子的混合物
(IL-12,IL-15,IL-18)
18t15-12s
ECAR (mpH/min)
时间（分钟）
供体B

图164

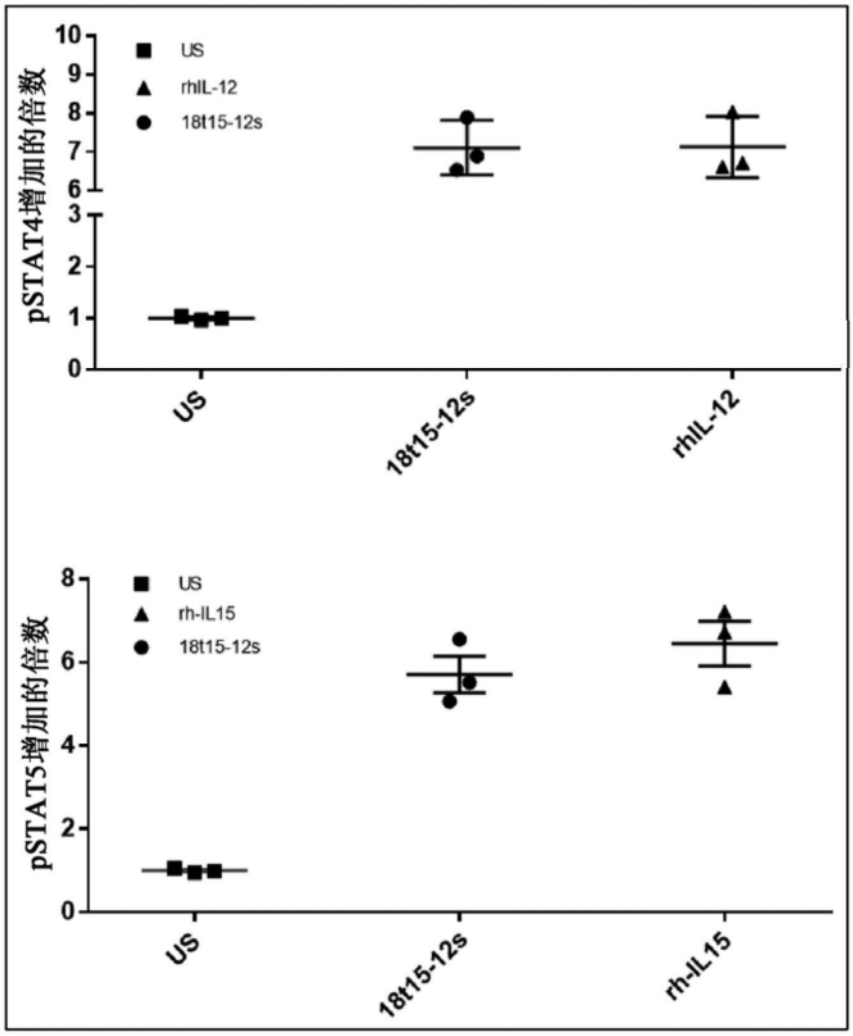

pSTAT4增加的倍数
US
rhIL-12
18t15-12s
10
9
8
7
6
3
2
1
0
US
18t15-12s
rhIL-12
pSTAT5增加的倍数
US
rh-IL15
18t15-12s
8
6
4
2
0
US
18t15-12s
rh-IL15

图165

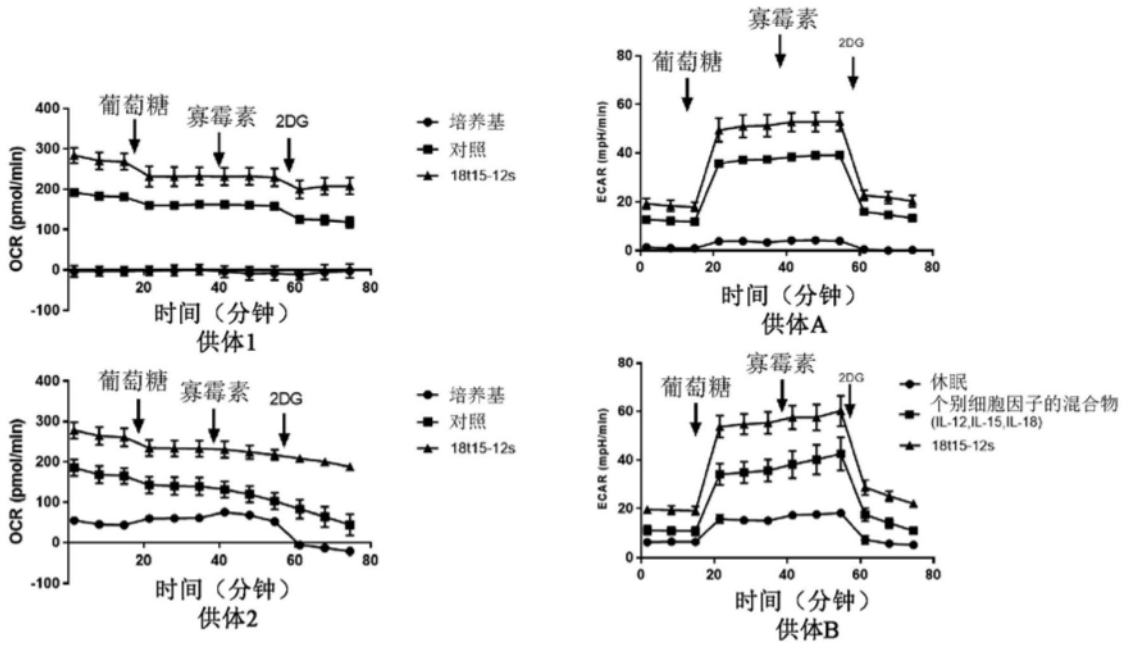


图166

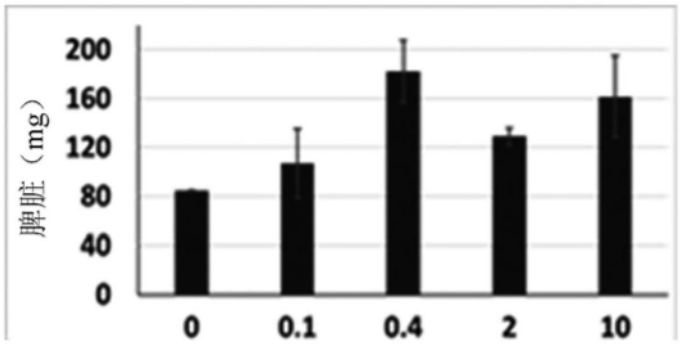


图167A

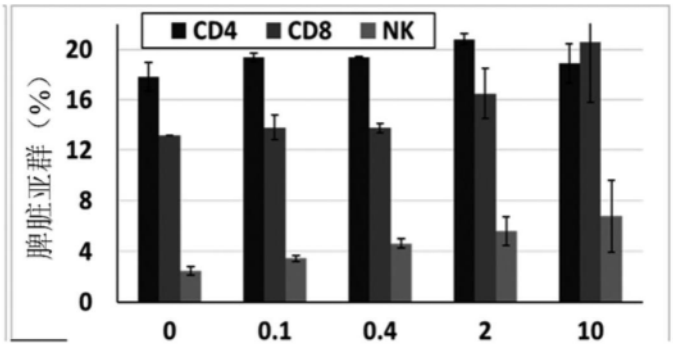


图167B

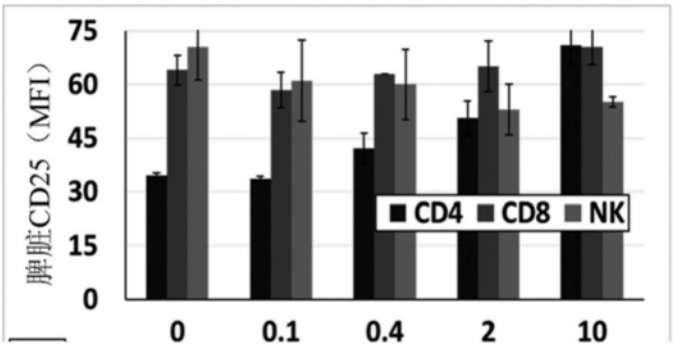


图167C

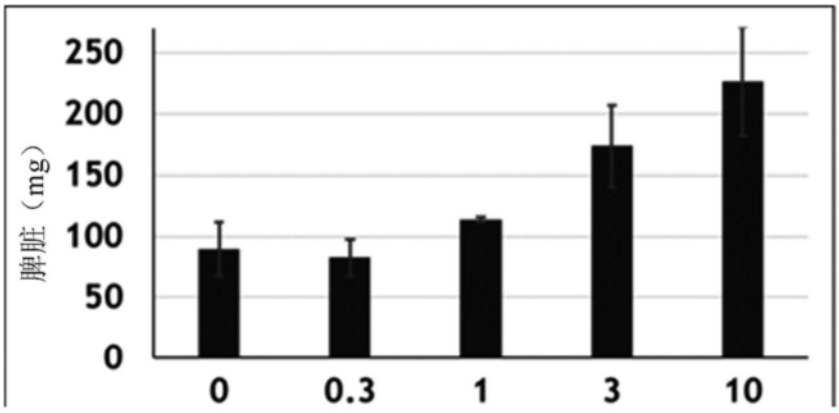


图168A

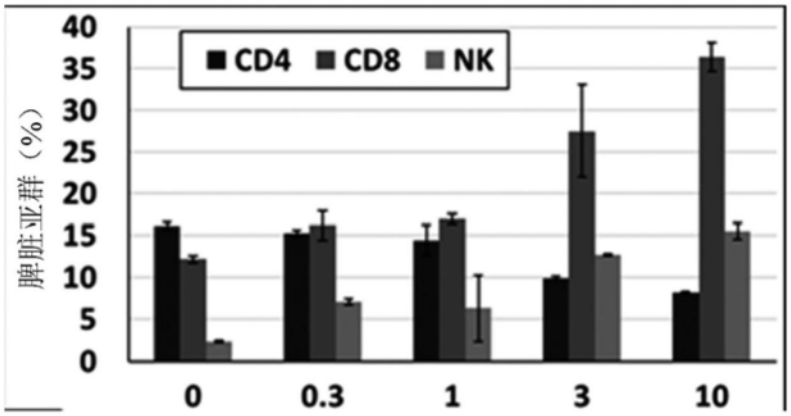


图168B

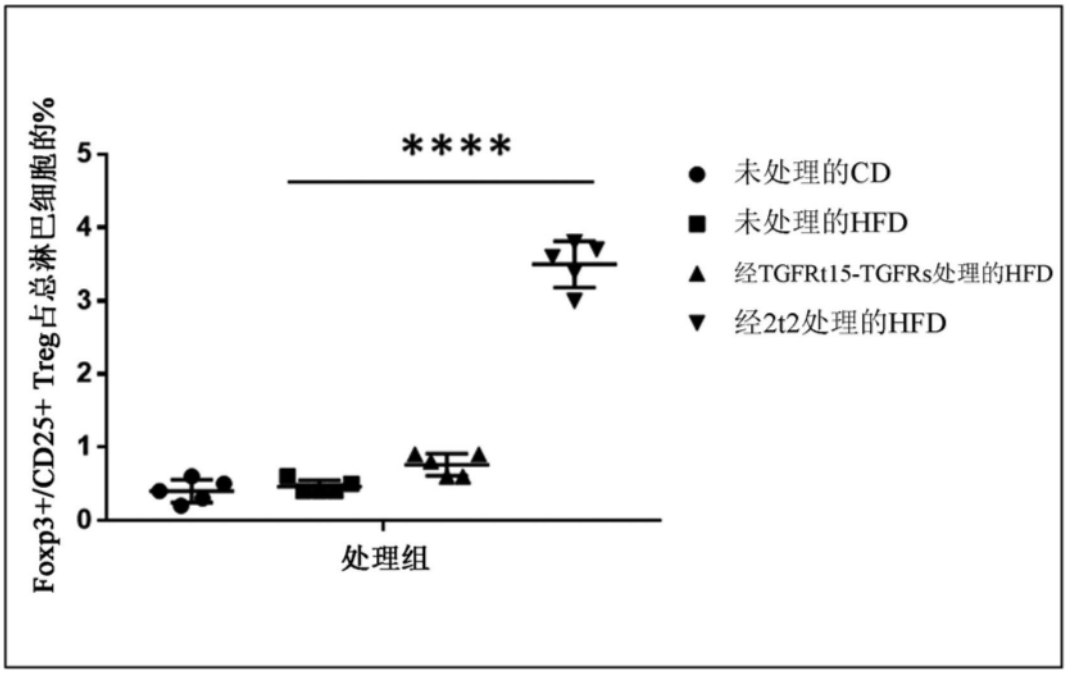

Foxp3+/CD25+ Treg占总淋巴细胞的%
5
4
3
2
1
0
****
处理组
未处理的CD
未处理的HFD
经TGFRt15-TGFRs处理的HFD
经2t2处理的HFD

图169A

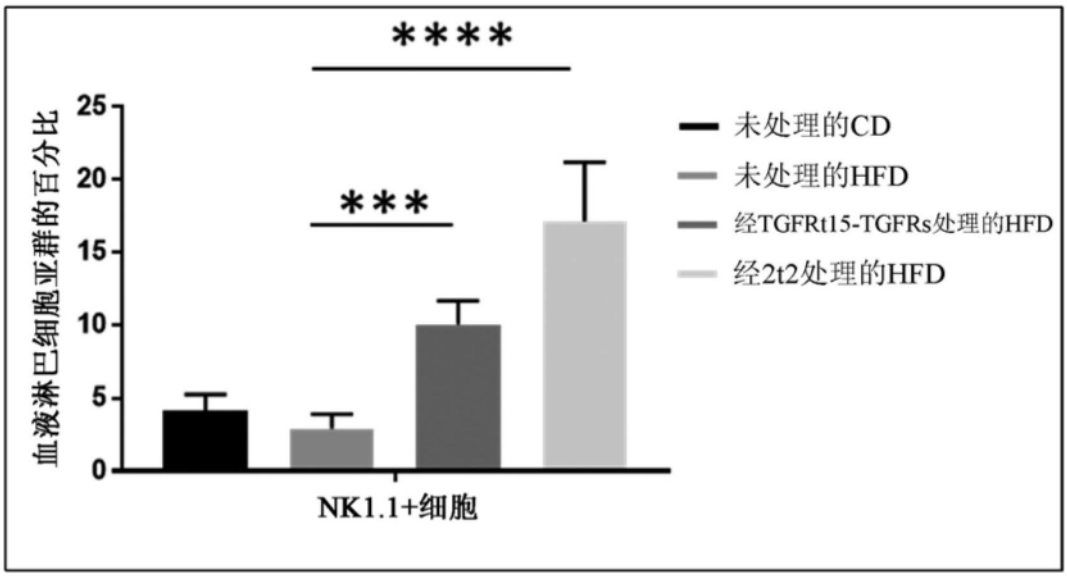

血液淋巴细胞亚群的百分比
25
20
15
10
5
0
****
***
NK1.1+细胞
未处理的CD
未处理的HFD
经TGFRt15-TGFRs处理的HFD
经2t2处理的HFD

图169B

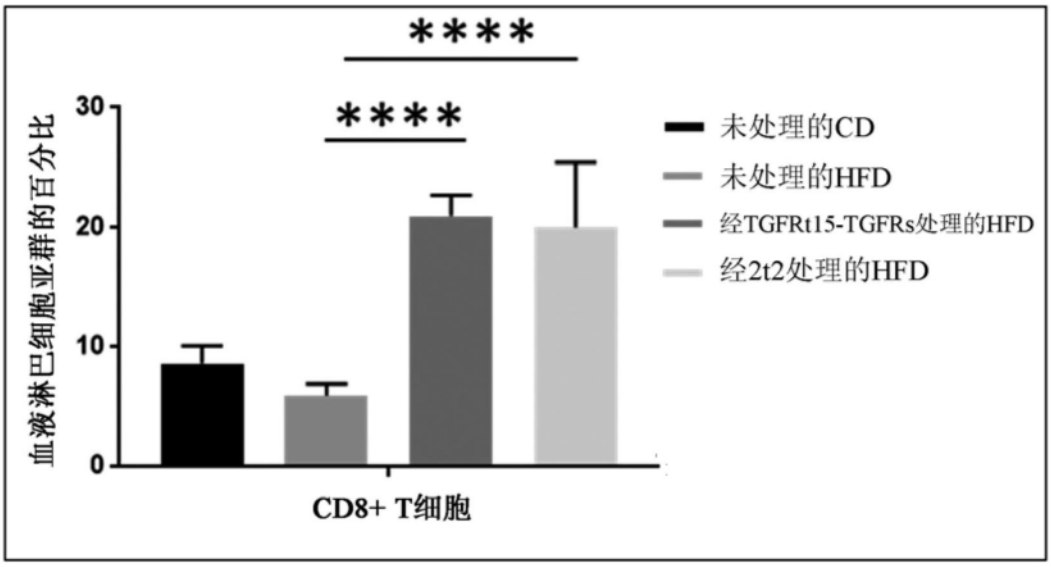


图169C

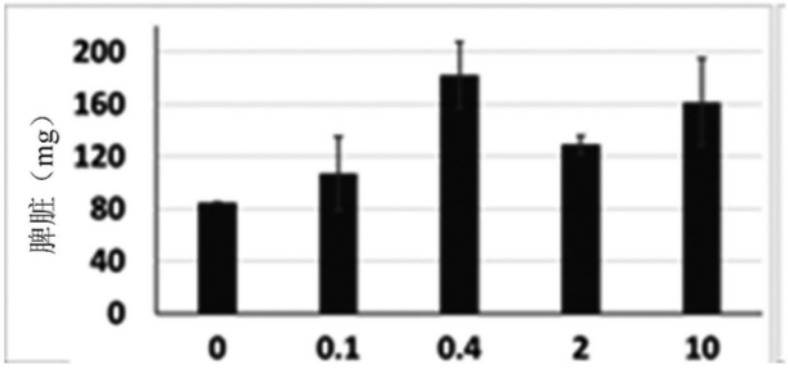


图170A

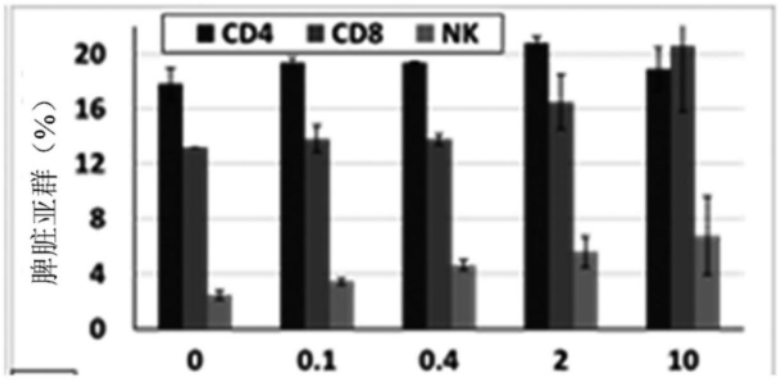


图170B

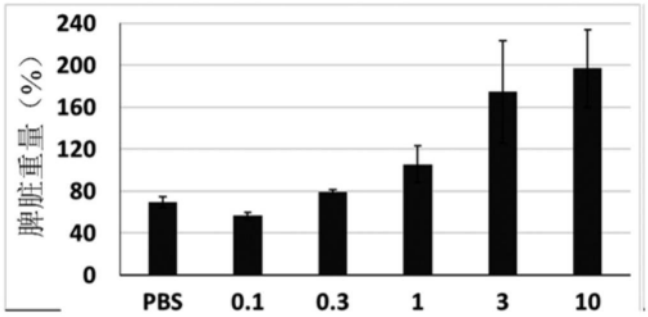


图171A

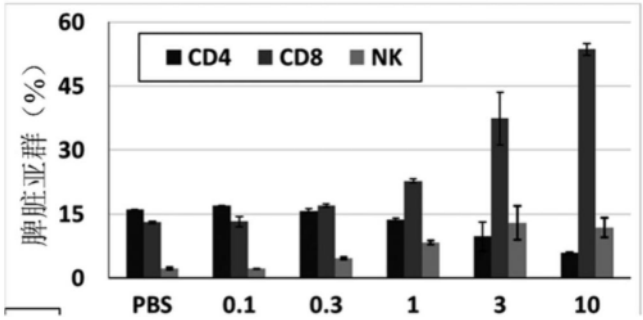


图171B

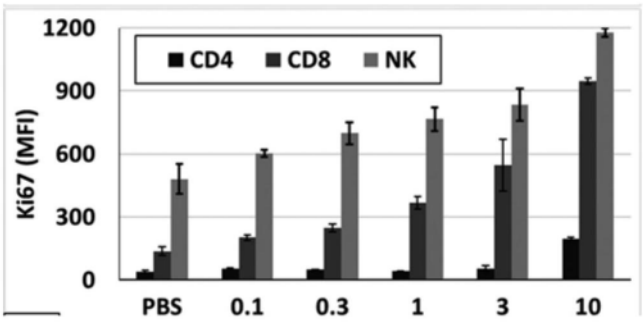


图171C

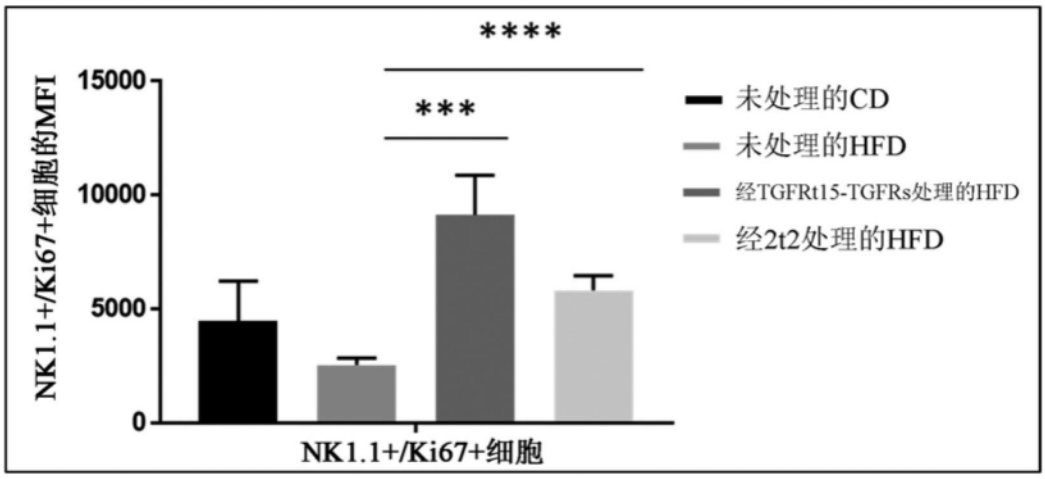

****
***
15000
10000
5000
0
NK1.1+/Ki67+细胞的MFI
NK1.1+/Ki67+细胞
未处理的CD
未处理的HFD
经TGFRt15-TGFRs处理的HFD
经2t2处理的HFD

图172A

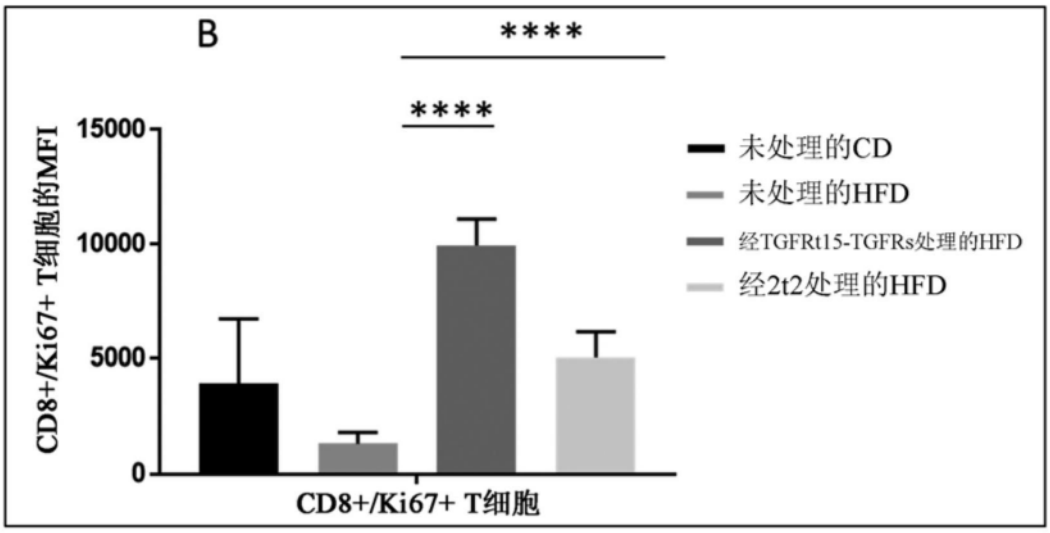
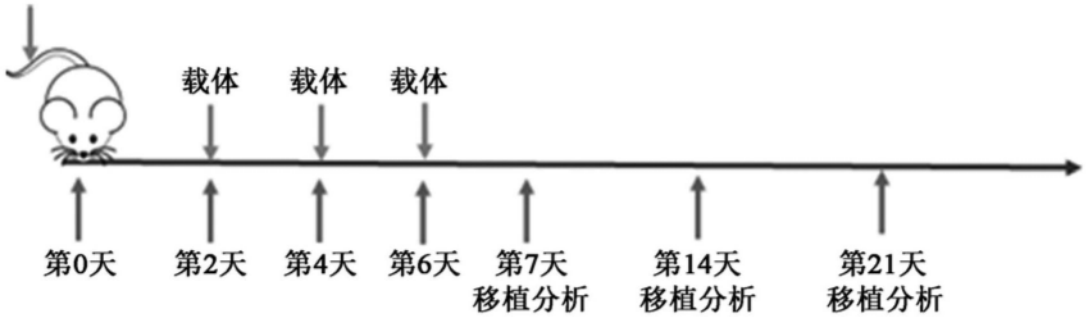

B
****
****
15000
10000
5000
0
CD8+/Ki67+ T细胞的MFI
CD8+/Ki67+ T细胞
未处理的CD
未处理的HFD
经TGFRt15-TGFRs处理的HFD
经2t2处理的HFD

图172B


载体
载体
载体
第0天
第2天
第4天
第6天
第7天
移植分析
第14天
移植分析
第21天
移植分析

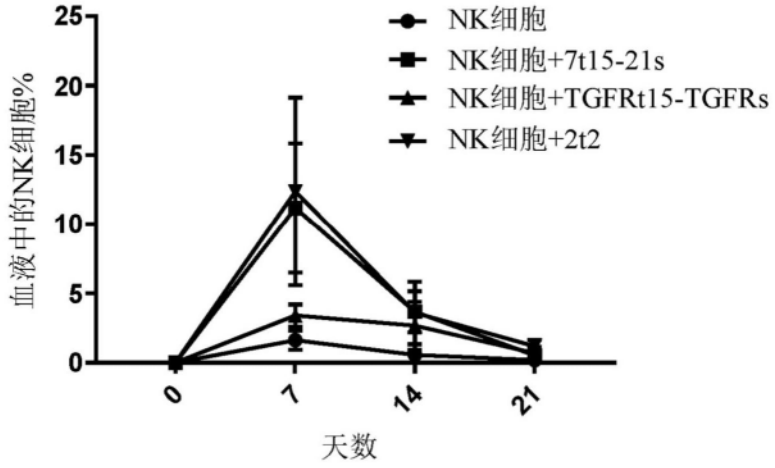

NK细胞
NK细胞+7t15-21s
NK细胞+TGFRt15-TGFRs
NK细胞+2t2
血液中的NK细胞%
25
20
15
10
5
0
0
7
14
21
天数

图173

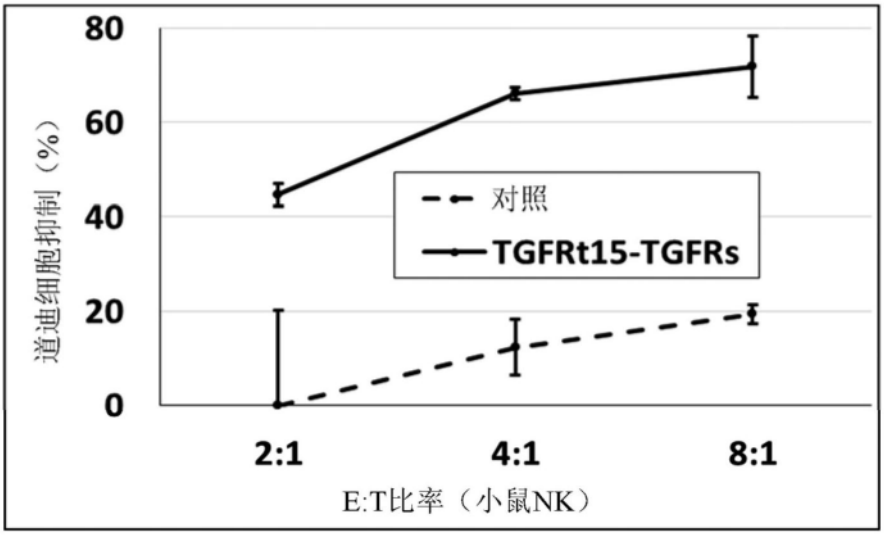

80
60
40
20
0
道迪细胞抑制（%）
对照
TGFRt15-TGFRs
2:1
4:1
8:1
E:T比率（小鼠NK）

图174A

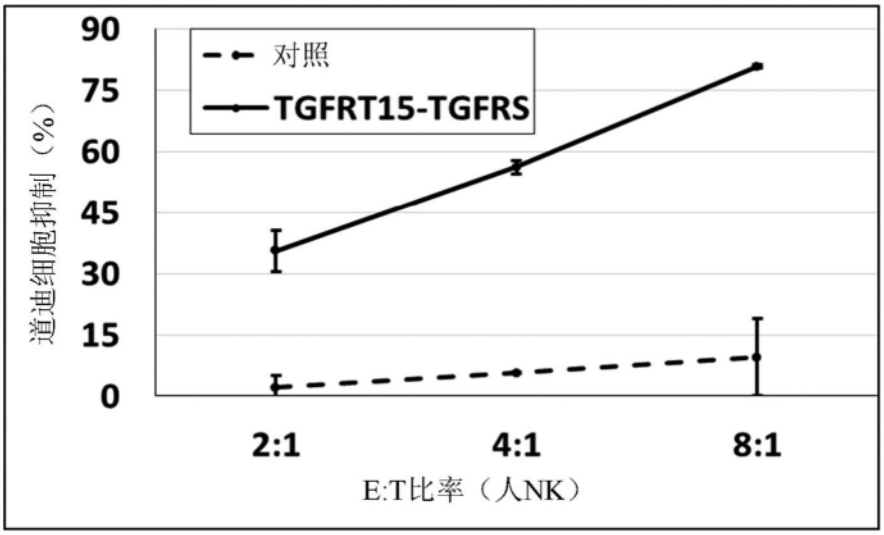

90
75
60
45
30
15
0
道迪细胞抑制（%）
对照
TGFRT15-TGFRS
2:1
4:1
8:1
E:T比率（人NK）

图174B

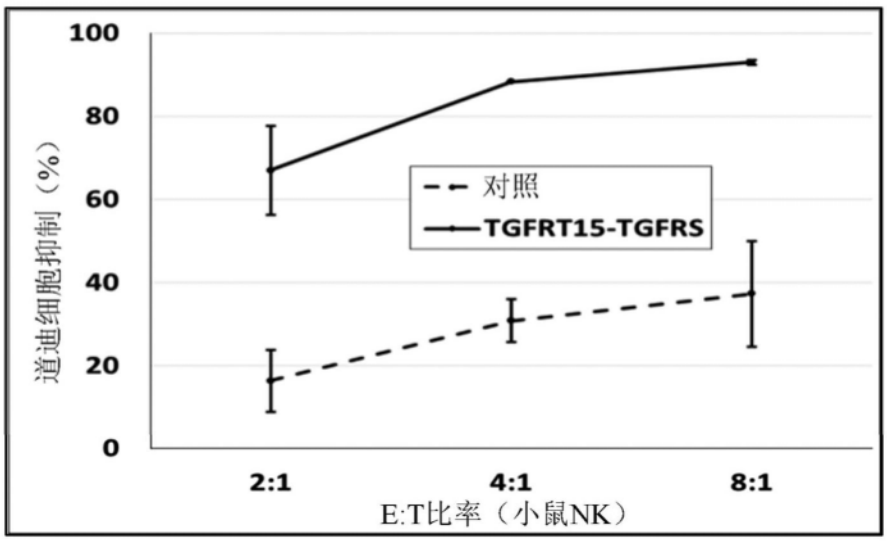

100
80
60
40
20
0
道迪细胞抑制（%）
对照
TGFRT15-TGFRS
2:1
4:1
8:1
E:T比率（小鼠NK）

图175A

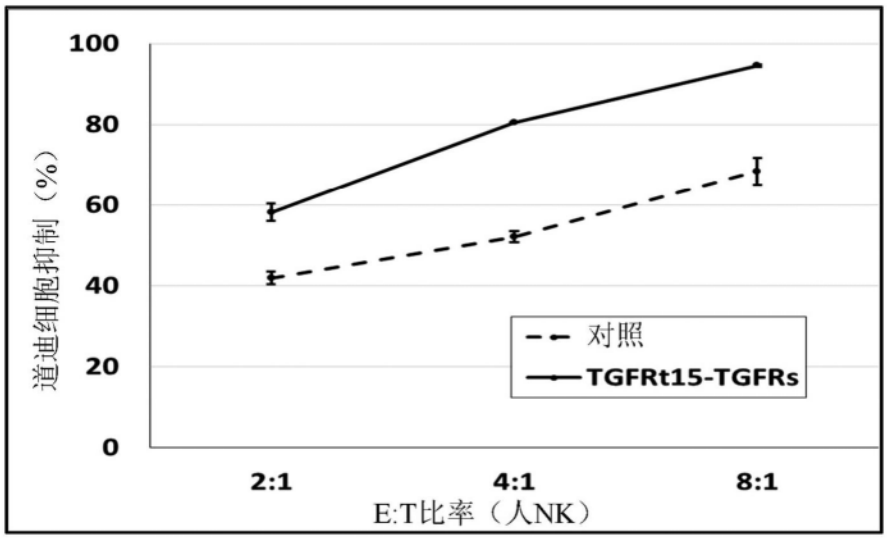


图175B

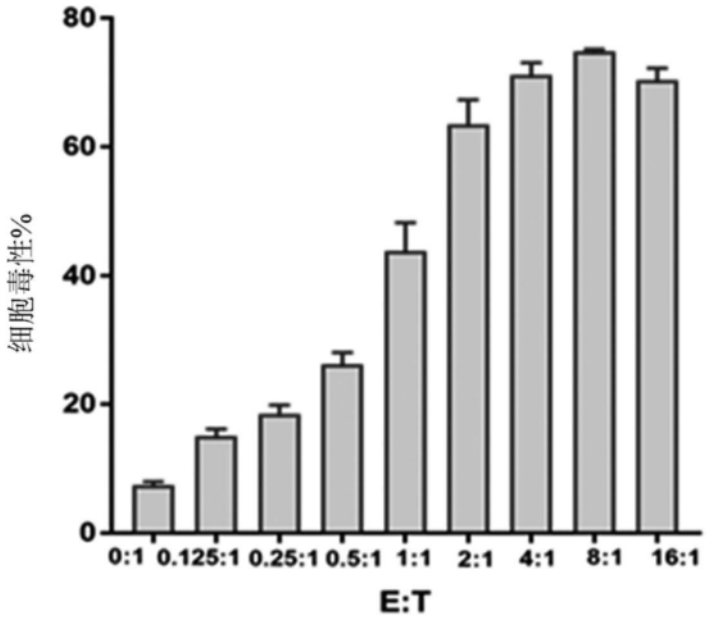


图176

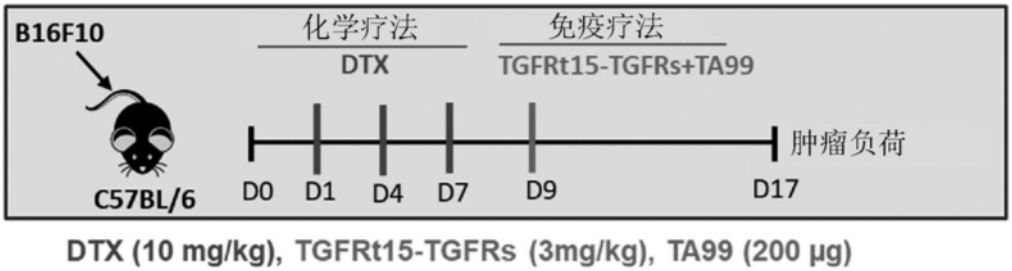


图177A

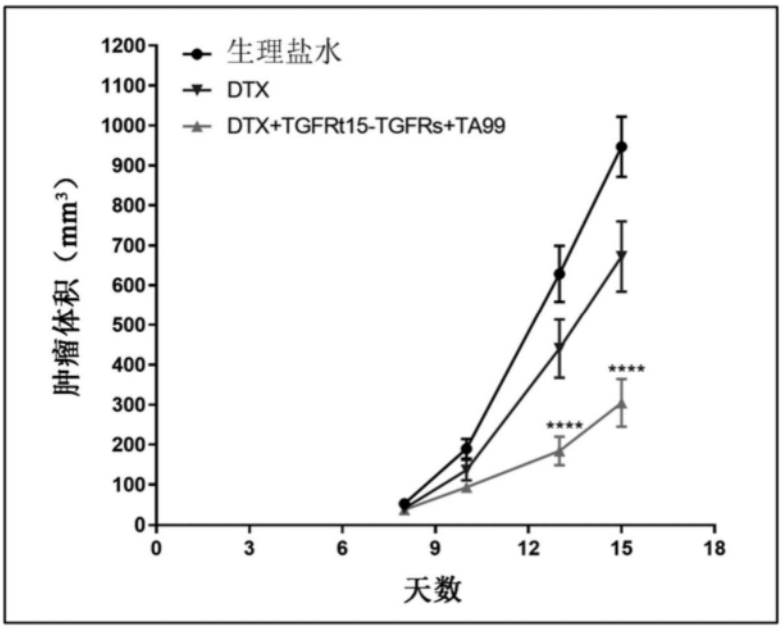


图177B

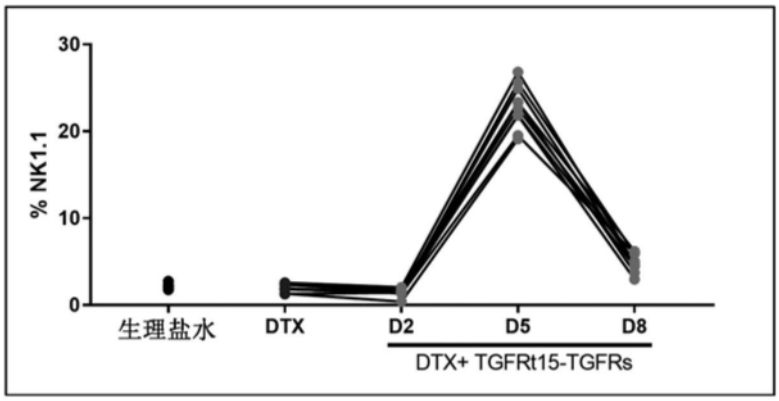


图177C

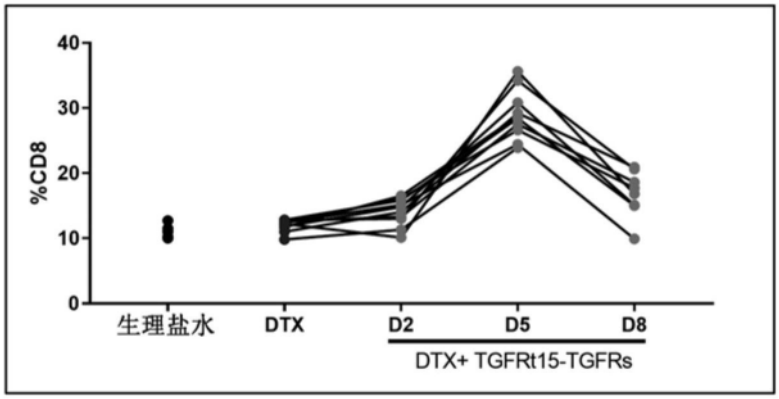


图177D

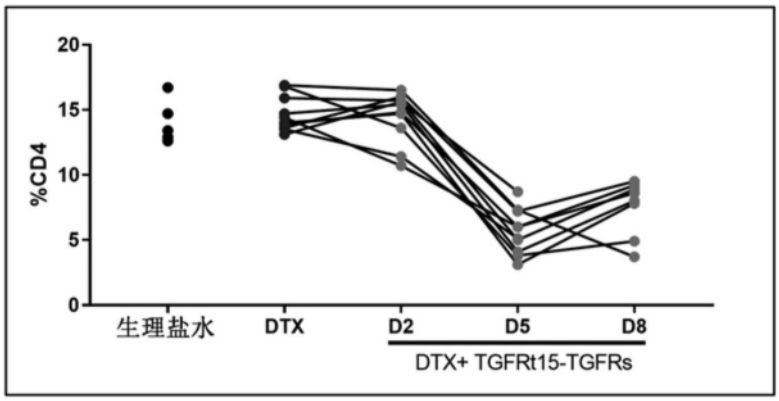


图177E

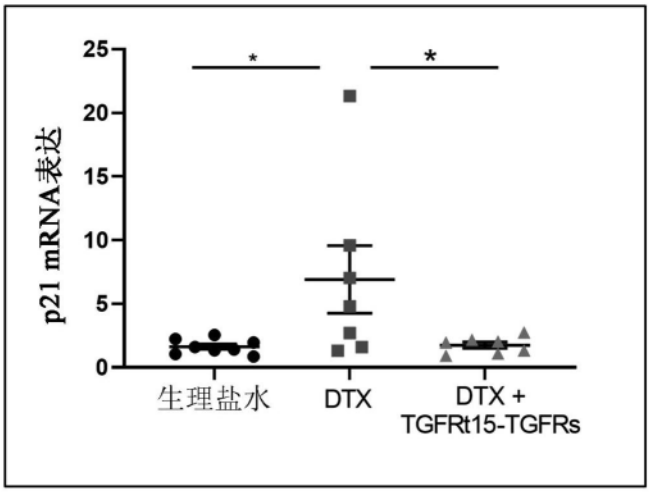


图177F

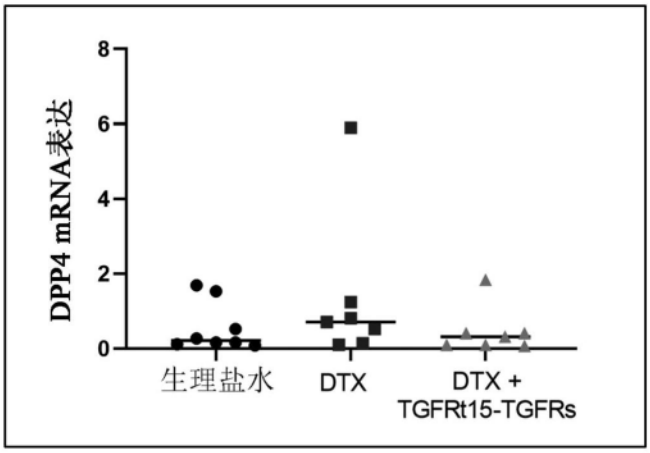


图177G

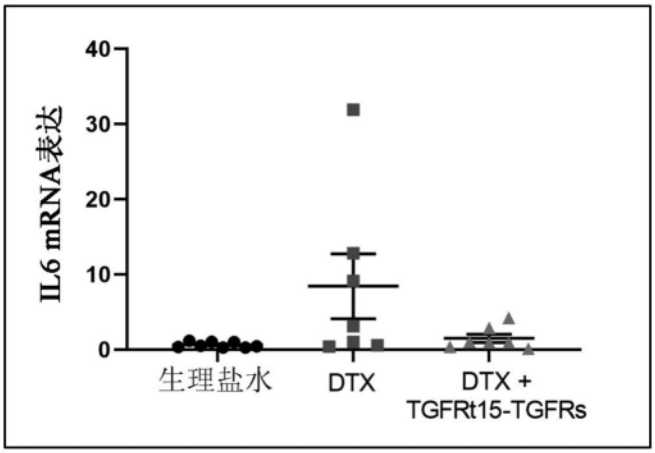


图177H

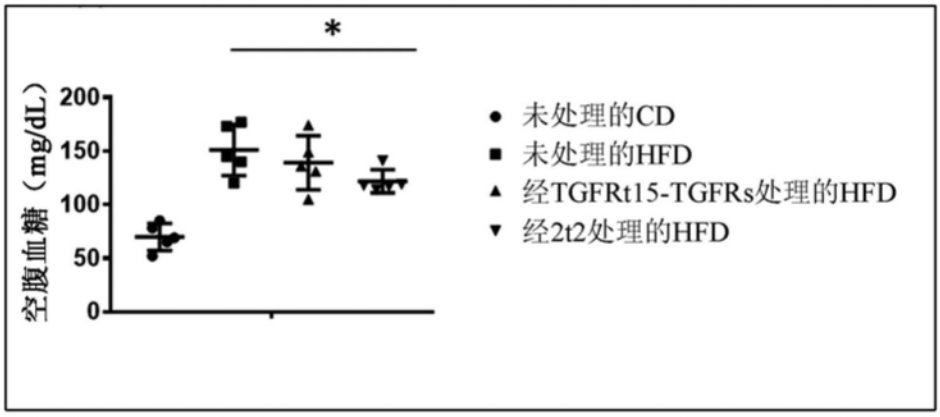


图178A

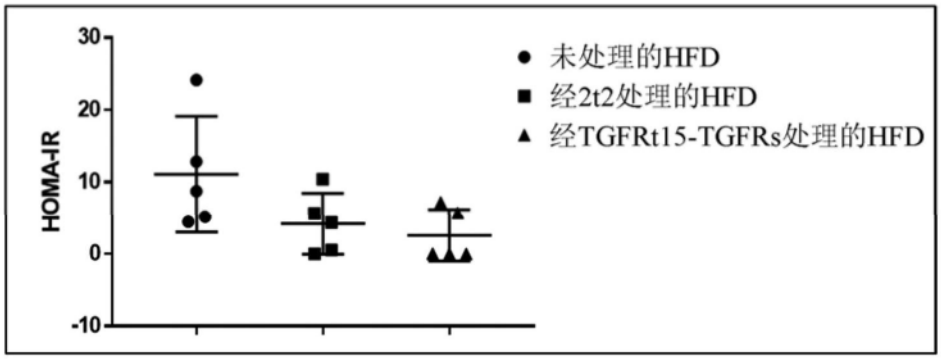


图178B

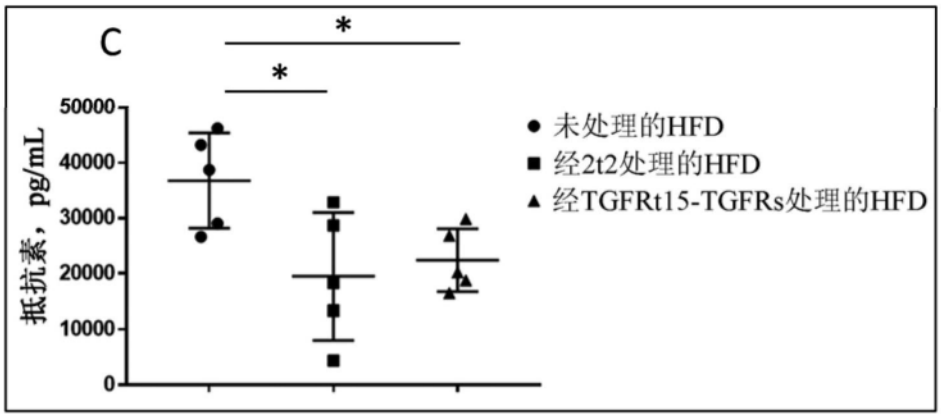

C
*
*
50000
40000
30000
20000
10000
0
抵抗素，pg/mL
未处理的HFD
经2t2处理的HFD
经TGFRt15-TGFRs处理的HFD

图178C

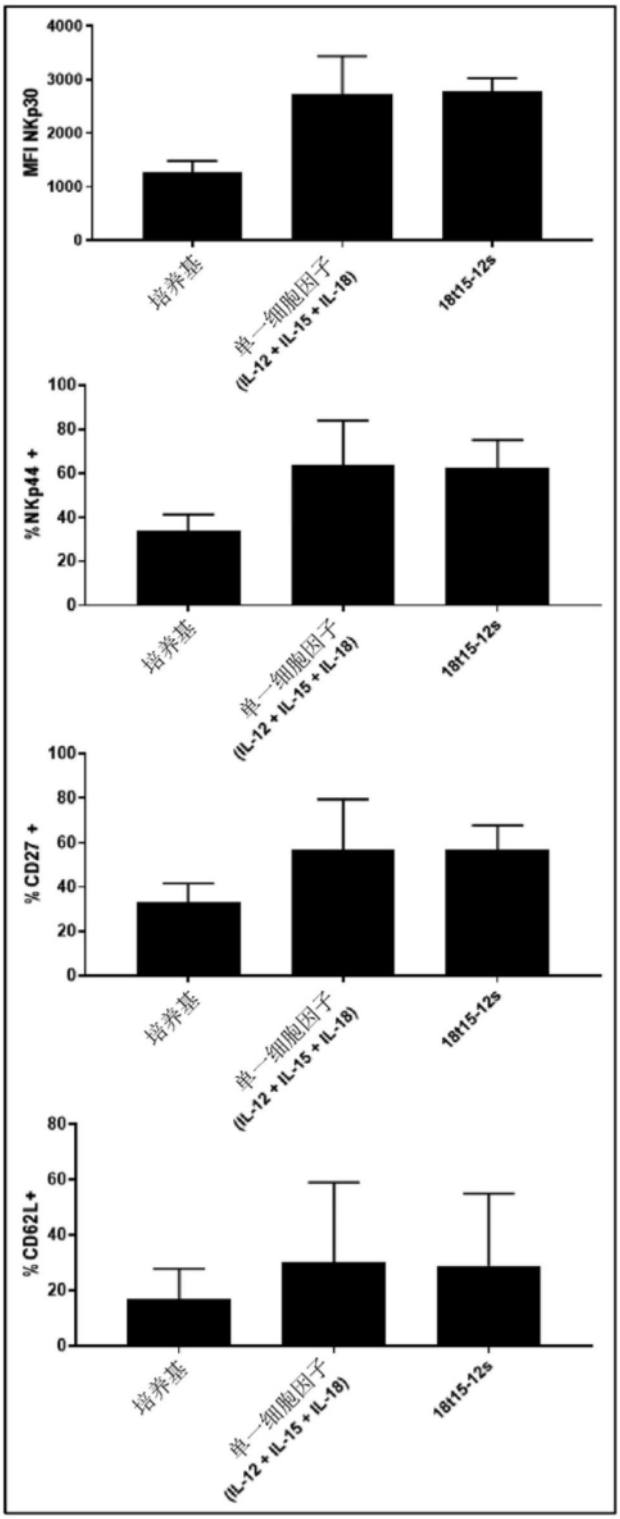

MFI NKp30
4000
3000
2000
1000
0
培养基
单一细胞因子
(IL-12 + IL-15 + IL-18)
18t15-12s
%NKp44 +
100
80
60
40
20
0
培养基
单一细胞因子
(IL-12 + IL-15 + IL-18)
18t15-12s
% CD27 +
100
80
60
40
20
0
培养基
单一细胞因子
(IL-12 + IL-15 + IL-18)
18t15-12s
% CD62L+
80
60
40
20
0
培养基
单一细胞因子
(IL-12 + IL-15 + IL-18)
18t15-12s

图179

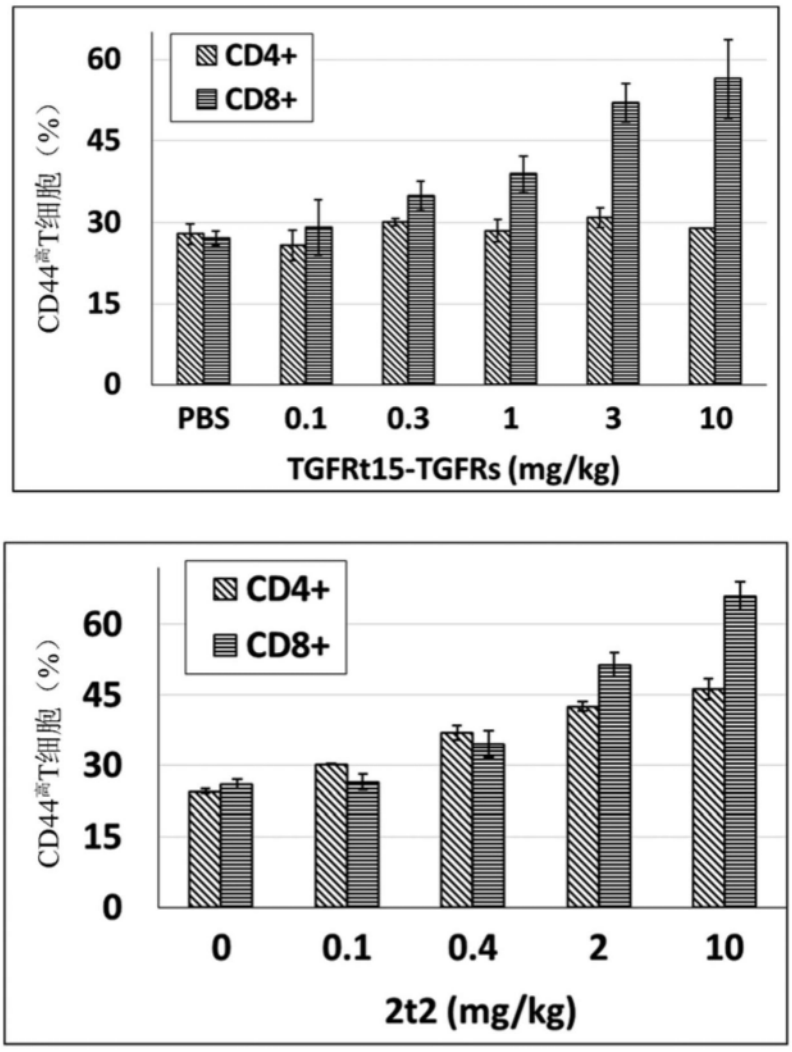

CD4+
CD8+
CD44高T细胞（%）
60
45
30
15
0
PBS
0.1
0.3
1
3
10
TGFRt15-TGFRs (mg/kg)
CD4+
CD8+
CD44高T细胞（%）
60
45
30
15
0
0
0.1
0.4
2
10
2t2 (mg/kg)

图180

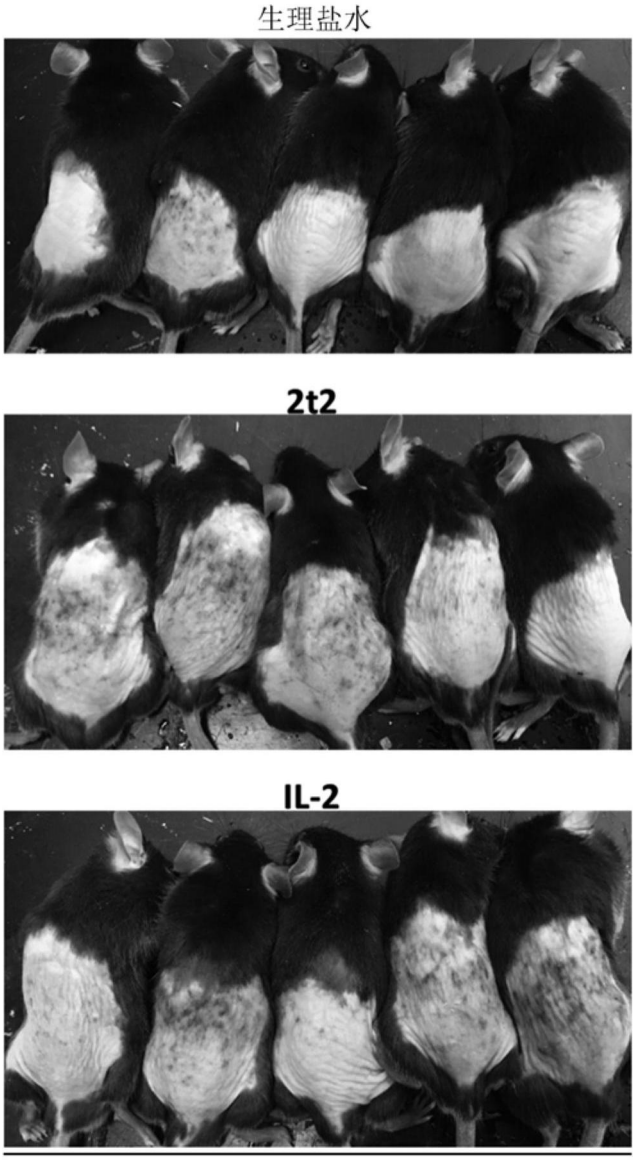


图181A

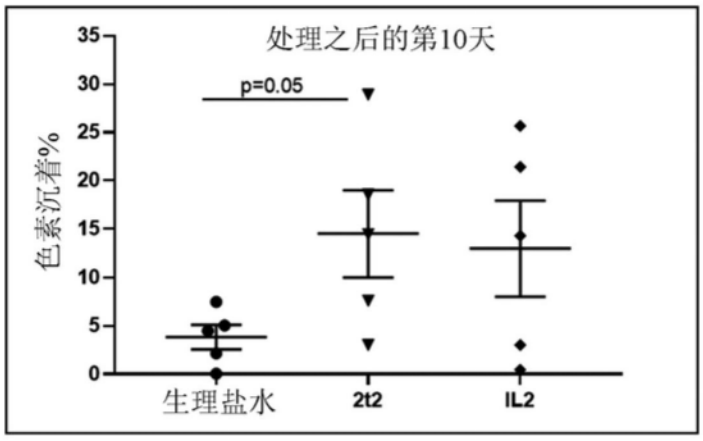

处理之后的第10天
p=0.05
色素沉着%
35
30
25
20
15
10
5
0
生理盐水
2t2
IL2

图181B

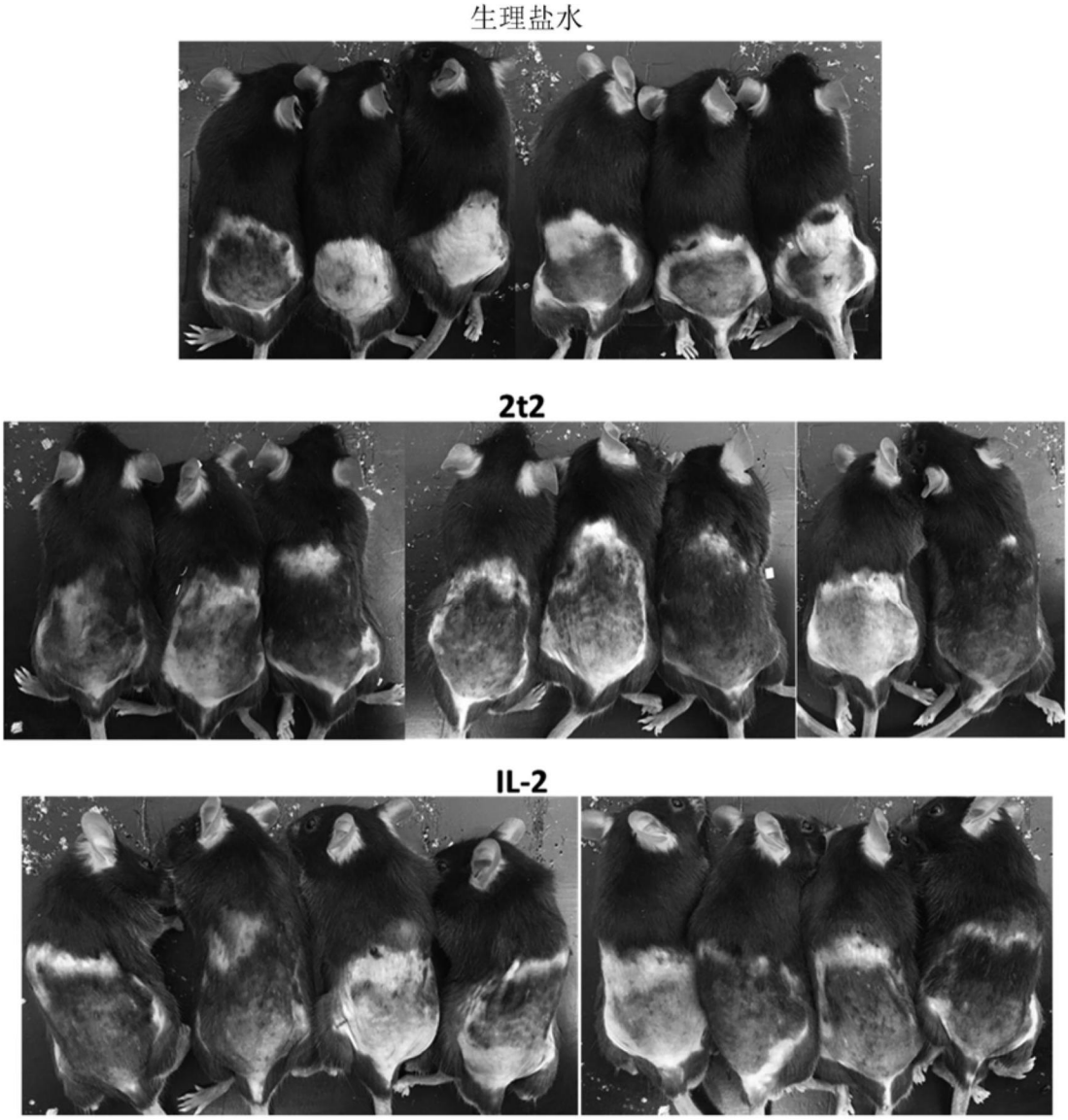

生理盐水
2t2
IL-2

图182

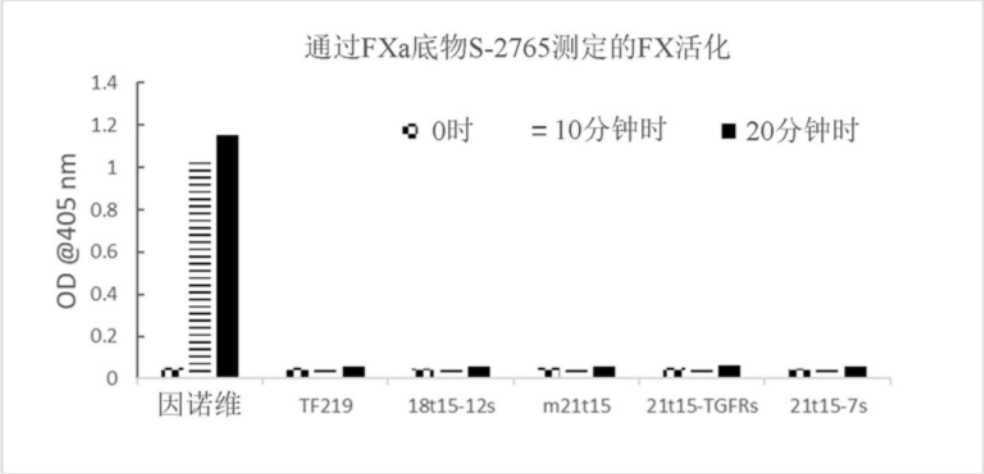

通过FXa底物S-2765测定的FX活化
OD @405 nm
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0时
= 10分钟时
20分钟时
因诺维
TF219
18t15-12s
m21t15
21t15-TGFRs
21t15-7s

图183

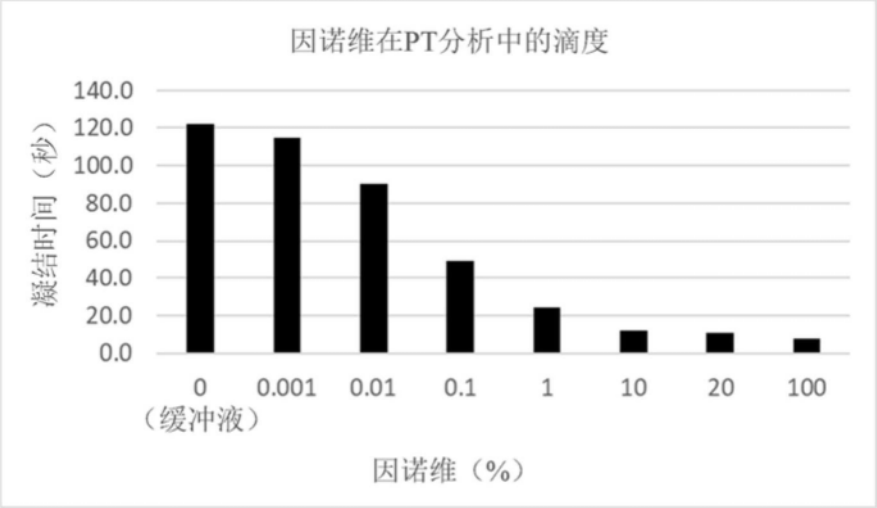

因诺维在PT分析中的滴度
凝结时间（秒）
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
0
（缓冲液）
0.001
0.01
0.1
1
10
20
100
因诺维（%）

图184

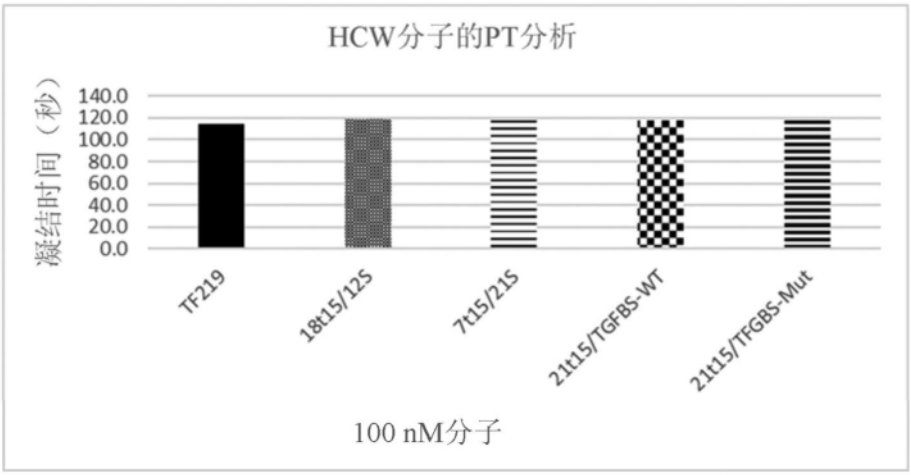

HCW分子的PT分析
凝结时间（秒）
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
TF219
18t15/12S
7t15/21S
21t15/TGFBS-WT
21t15/TFGBS-Mut
100 nM分子

图185

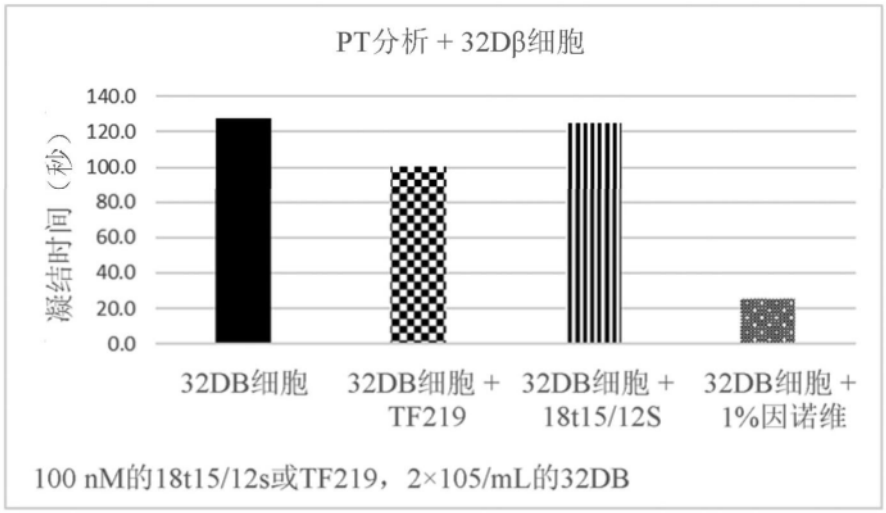

PT分析 + 32Dβ细胞
凝结时间（秒）
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
32DB细胞
32DB细胞 + TF219
32DB细胞 + 18t15/12S
32DB细胞 + 1%因诺维
100 nM的18t15/12s或TF219，2×105/mL的32DB

图186

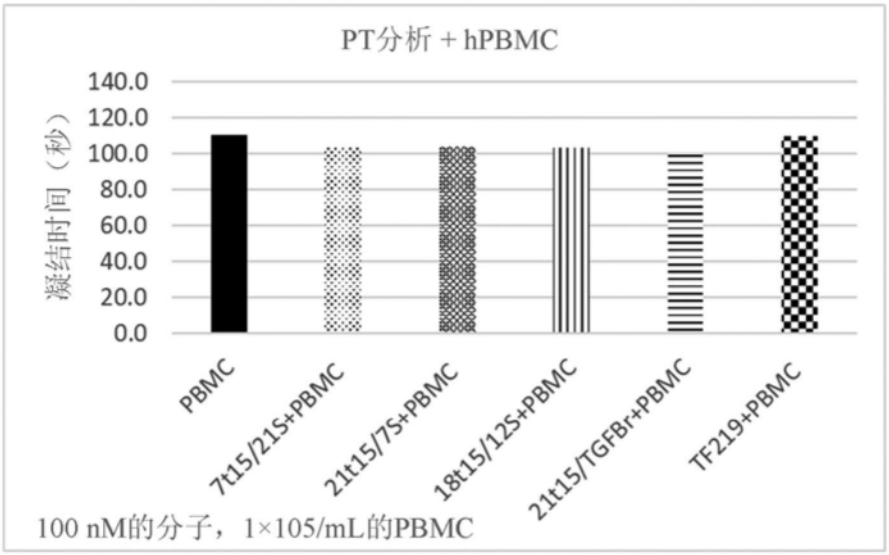

PT分析＋hPBMC
凝结时间（秒）
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
PBMC
7t15/21S+PBMC
21t15/7S+PBMC
18t15/12S+PBMC
21t15/TGFBr+PBMC
TF219+PBMC
100 nM的分子，1×105/mL的PBMC

图187

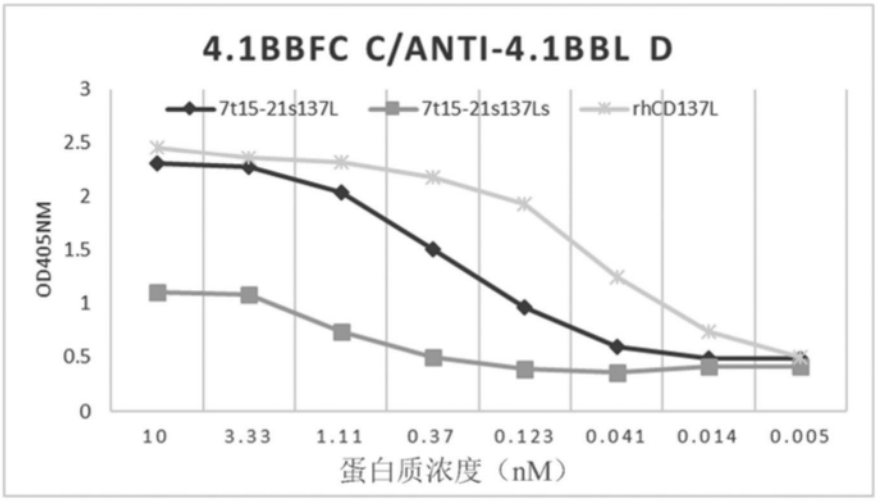

4.1BBFC C/ANTI-4.1BBL D
7t15-21s137L
7t15-21s137Ls
rhCD137L
OD405NM
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
10
3.33
1.11
0.37
0.123
0.041
0.014
0.005
蛋白质浓度（nM）

图188

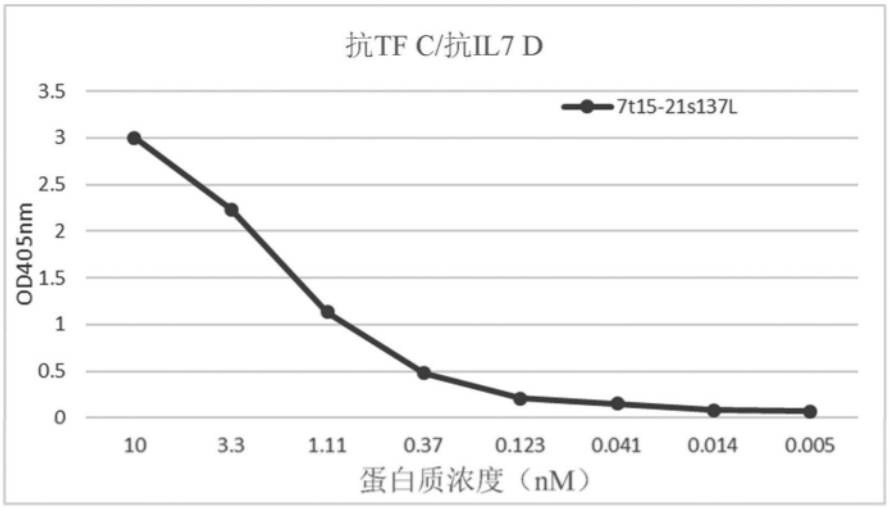

抗TF C/抗IL7 D
7t15-21s137L
OD405nm
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
10
3.3
1.11
0.37
0.123
0.041
0.014
0.005
蛋白质浓度（nM）

图189A

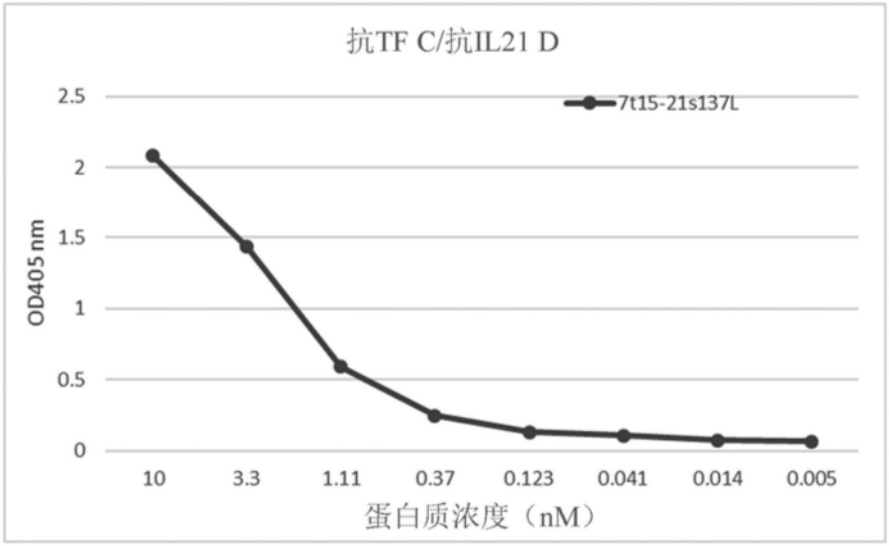

抗TF C/抗IL21 D
7t15-21s137L
OD405 nm
2.5
2
1.5
1
0.5
0
10
3.3
1.11
0.37
0.123
0.041
0.014
0.005
蛋白质浓度（nM）

图189B

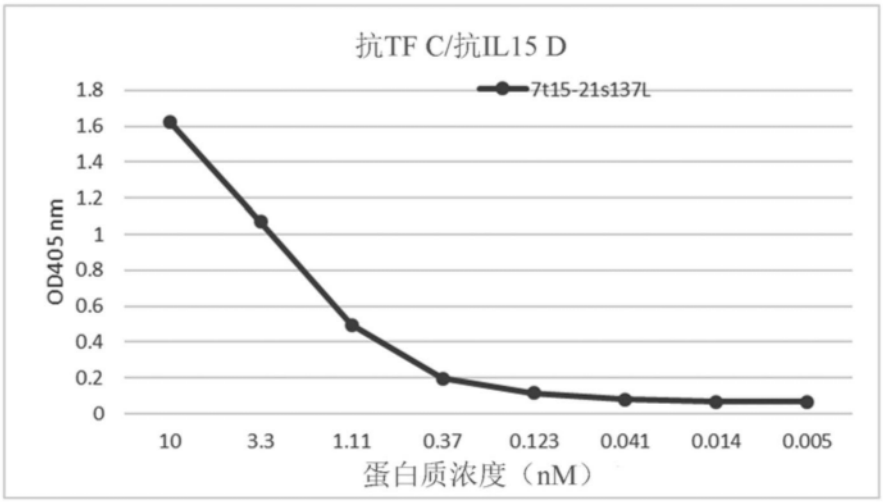

抗TF C/抗IL15 D
7t15-21s137L
OD405 nm
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
10
3.3
1.11
0.37
0.123
0.041
0.014
0.005
蛋白质浓度（nM）

图189C

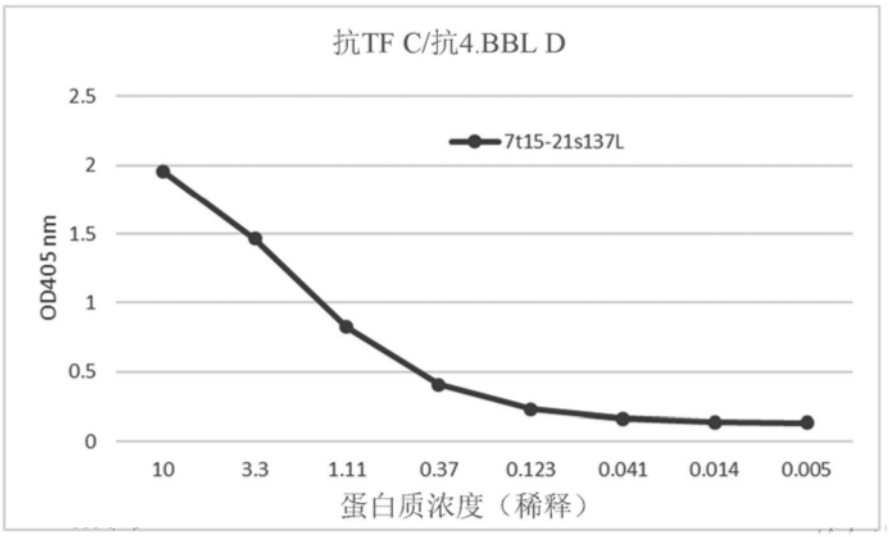

抗TF C/抗4.BBL D
7t15-21s137L
OD405 nm
2.5
2
1.5
1
0.5
0
10
3.3
1.11
0.37
0.123
0.041
0.014
0.005
蛋白质浓度（稀释）

图189D

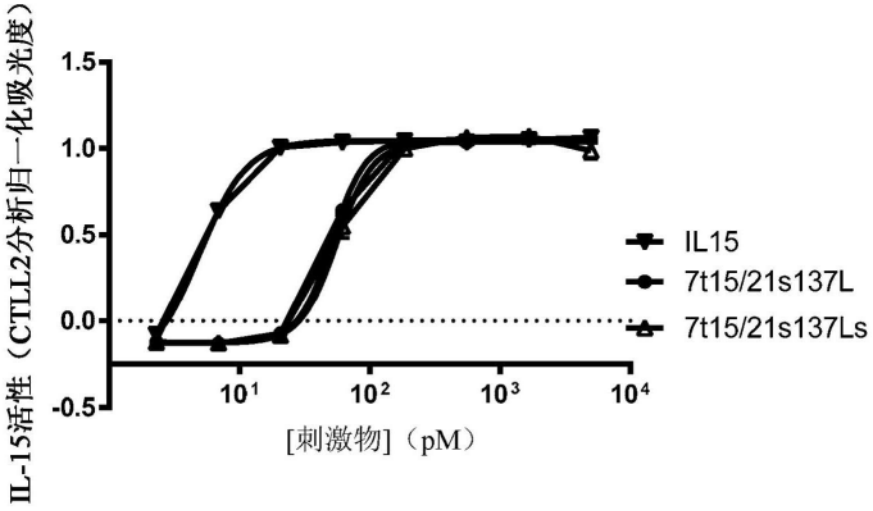

IL-15活性（CTLL2分析归一化吸光度）
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
10^1
10^2
10^3
10^4
[刺激物]（pM）
IL15
7t15/21s137L
7t15/21s137Ls

图190

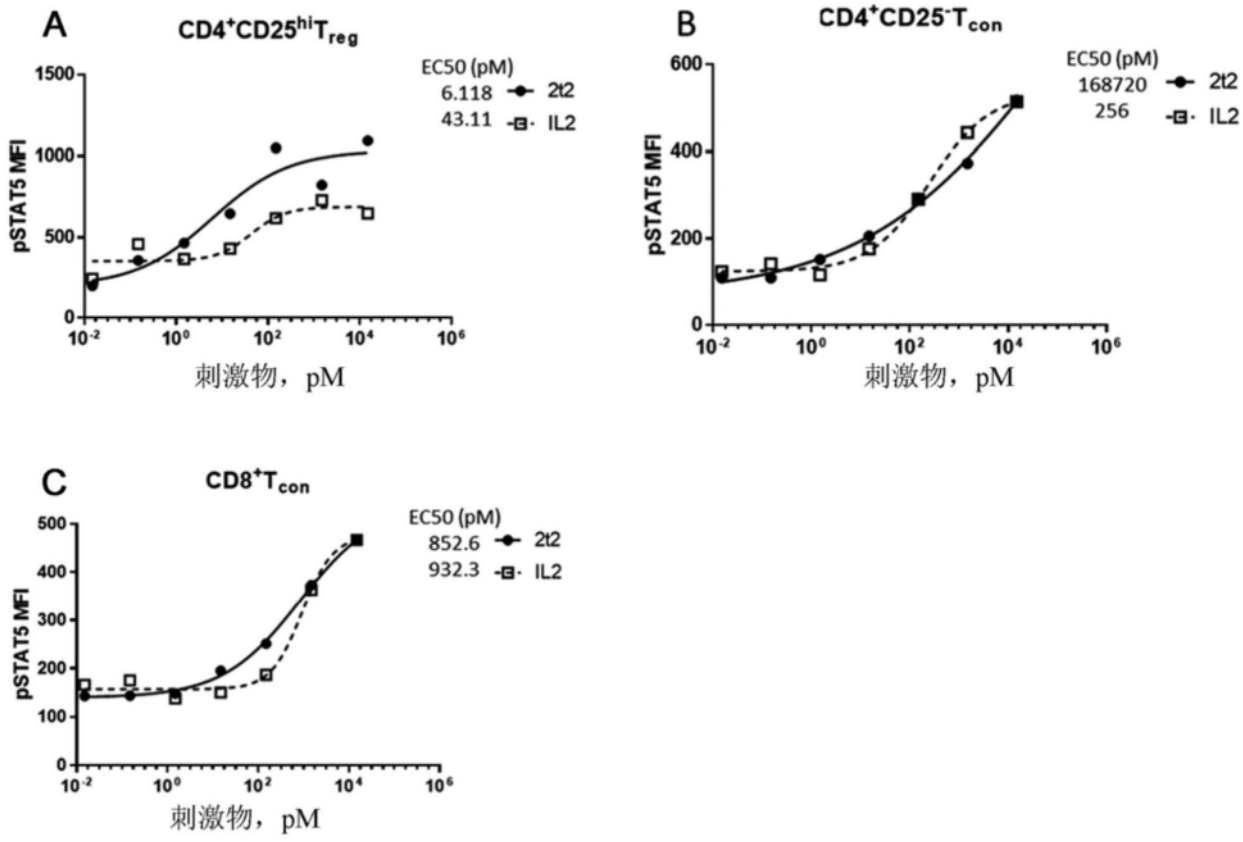

A
$CD4^+CD25^{hi}T_{reg}$
EC50 (pM)
6.118 2t2
43.11 IL2
pSTAT5 MFI
刺激物，pM
B
$CD4^+CD25^-T_{con}$
EC50 (pM)
168720 2t2
256 IL2
pSTAT5 MFI
刺激物，pM
C
$CD8^+T_{con}$
EC50 (pM)
852.6 2t2
932.3 IL2
pSTAT5 MFI
刺激物，pM

图191

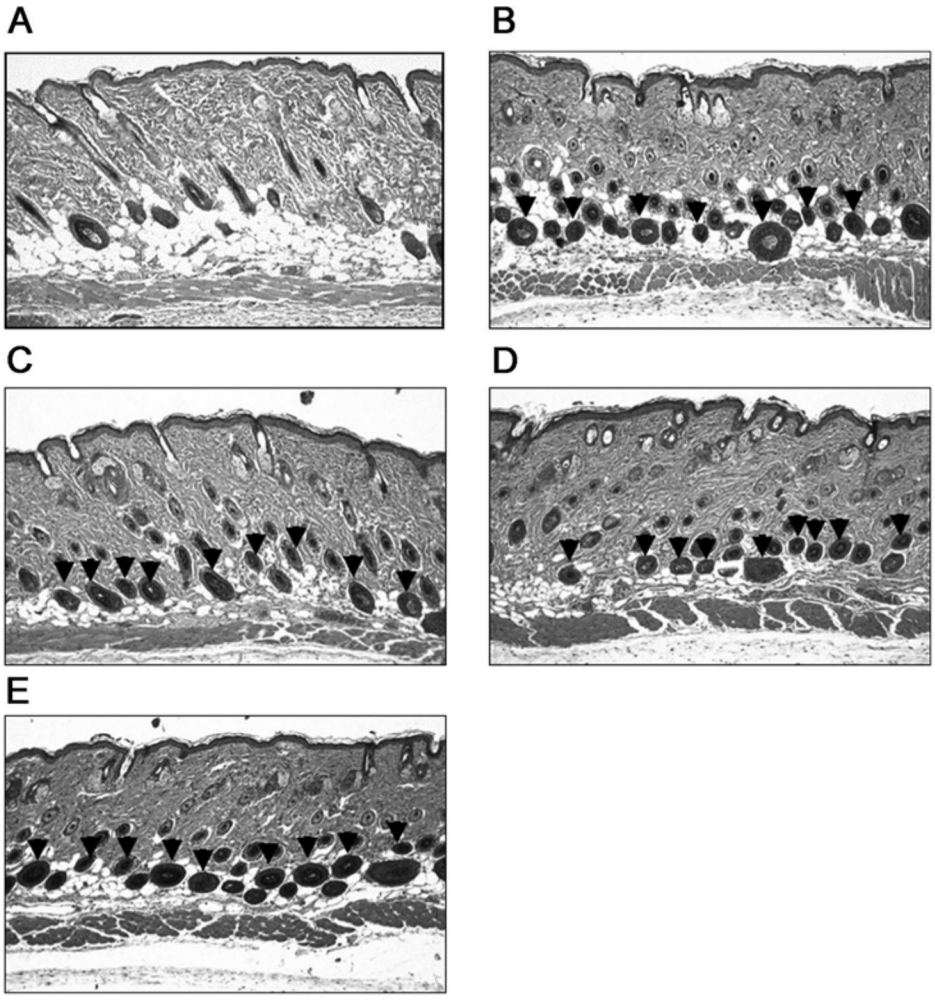


图192

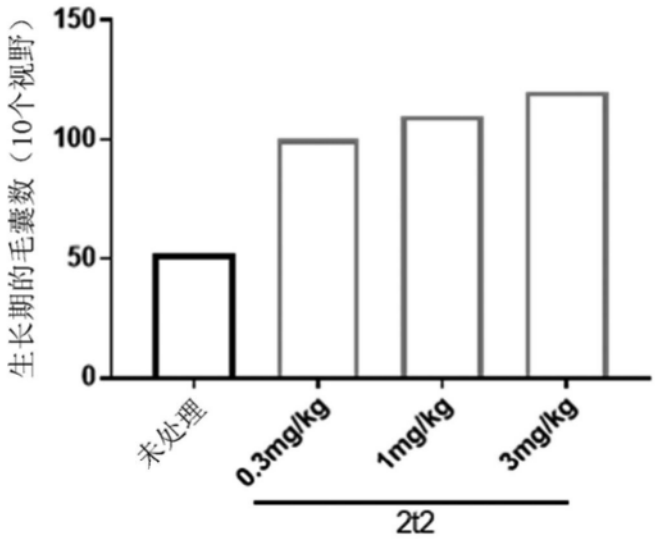


图193

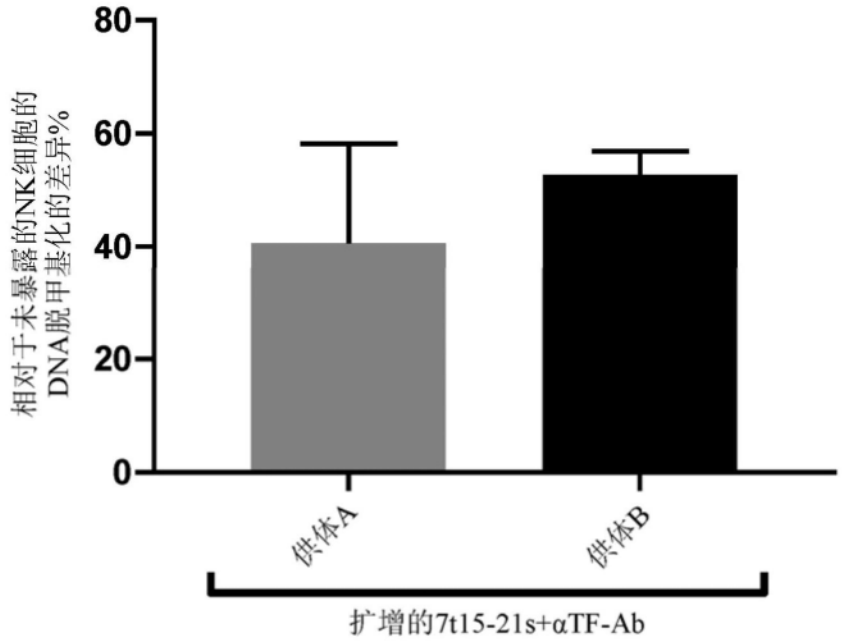

80
60
40
20
0
相对于未暴露的NK细胞的DNA脱甲基化的差异%
供体A
供体B
扩增的7t15-21s+αTF-Ab

图194