(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114761430 A
(43)申请公布日 2022.07.15

(21)申请号 202080082078.6
(22)申请日 2020.09.25
(30)优先权数据
62/906,447 2019.09.26 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.05.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/052764 2020.09.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/062184 EN 2021.04.01
(71)申请人 奥里尼斯生物科学股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 N·克雷 E·德普拉
(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313
专利代理师 吕艳英 贾慧娜
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)

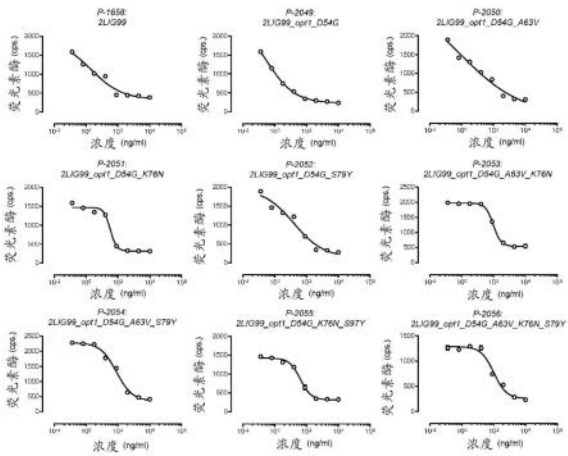
权利要求书15页 说明书124页
序列表98页 附图77页

(54)发明名称

靶向PD-L1的嵌合蛋白及其用途

(57)摘要

本发明部分地涉及结合PD-L1的剂以及所述剂作为诊断剂和治疗剂的用途。本发明还涉及包含PD-L1靶向部分的药物组合物以及所述药物组合物在治疗各种疾病中的用途。在各个方面，本发明涉及具有至少一个特异性地结合至PD-1或PD-L1的靶向部分的结合剂。在各个实施方案中，这些结合剂结合至PD-1或PD-L1并在功能上调节(例如，部分或完全中和)PD-1或PD-L1。



CN 114761430 A

1.一种包含一个或多个识别结构域的PD-L1靶向部分,所述一个或多个识别结构域包含:

(i)三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3),其中:

(a)CDR1包含选自SEQ ID NO:2或5中任一者的氨基酸序列;

(b)CDR2包含选自SEQ ID NO:3或6中任一者的氨基酸序列;并且

(c)CDR3包含选自SEQ ID NO:4或7中任一者的氨基酸序列;或

(ii)与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且

其中(i)或(ii)还在位置D54和G55处包含一个或多个突变,相对于SEQ ID NO:1编号。

2.如权利要求1所述的PD-L1靶向部分,所述PD-L1靶向部分还在位置Q1、Q5、A14、A63、T74、K76、S79、K86和Q110处包含一个或多个突变。

3.如权利要求1或2所述的PD-L1靶向部分,其中所述突变是取代,任选地其中所述取代是选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基;包括组氨酸(H)的芳香族的极性的且带正电荷的亲水性残基;选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基;选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基;或选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸;或选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸。

4.如权利要求1-3中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述突变选自以下一项或多项:

在位置D54处的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是D54G;或选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基,任选地是D54K;或选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是D54T;以及

在位置G55处的选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基,任选地是G55R。

5.如权利要求1-4中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述突变选自以下一项或多项:

在位置Q1处的选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基,任选地是Q1D;

在位置Q5处的选自甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是Q5V;

在位置A14处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是A14P;

在位置A63处的选自甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是A63V;

在位置T74处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是T74S;

在位置K76处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和

半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是K76N;

在位置S79处的选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸,任选地是S79Y;

在位置K86处的精氨酸(R),为K86R;以及在位置Q110处的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是Q110L。

6.如权利要求1-5中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述突变选自以下一项或多项:Q1D、Q5V、A14P、A63V、T74S、K76N、S79Y、K86R和Q110L,任选地是Q1D、Q5V、A14P、D54G、T74S、K76N、S79Y、K86R和Q110L中的全部。

7.如权利要求1-6中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述靶向部分是全长抗体、单结构域抗体、只有重链的重组抗体(VHH)、单链抗体、只有重链的鲨鱼抗体(VNAR)、微量蛋白、darpin、抗运载蛋白、adnectin、适体、Fv、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、肽模拟分子、受体的天然配体、或合成分子,任选地其中所述靶向部分包含可变结构域重链抗体(V_HH)或人源化V_HH。

8.如以上权利要求中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述靶向部分识别并结合PD-L1并基本上在功能上调节所述PD-L1的活性或基本上不在功能上调节所述PD-L1的活性。

9.如以上权利要求中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述靶向部分识别和/或结合至其靶标而基本上不中和所述靶标的活性,或者其中所述靶向部分识别和/或结合至其靶标并基本上中和所述靶标的活性。

10.如以上权利要求中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述靶向部分包含一个或多个另外的识别结构域。

11.如权利要求10所述的PD-L1靶向部分,其中所述一个或多个另外的识别结构域结合至CD8、CD13、CD20、NKp46、Clec9A、Clec4c、PD-1、PD-L1、PD-L2、SIRP1α、FAP、XCR1、肌腱蛋白CA1、Flt3或ECM蛋白。

12.如以上权利要求中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述靶向部分识别并任选地在功能上调节肿瘤抗原。

13.如以上权利要求中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述靶向部分识别并任选地在功能上调节免疫细胞上的抗原。

14.如权利要求13所述的PD-L1靶向部分,其中所述免疫细胞选自T细胞、B细胞、树突状细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、NK细胞和NKT细胞。

15.如以上权利要求中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述靶向部分将细胞毒性T细胞募集至肿瘤细胞或肿瘤环境。

16.如以上权利要求中任一项所述的PD-L1靶向部分,所述PD-L1靶向部分还包含一种或多种(a)野生型信号传导剂或(b)经修饰的信号传导剂,所述经修饰的信号传导剂相对于野生型信号传导剂对所述信号传导剂的受体具有降低的亲和力或活性。

17.如权利要求16所述的PD-L1靶向部分,其中所述靶向部分恢复所述经修饰的信号传导剂对所述信号传导剂的受体的亲和力或活性。

18.如权利要求16所述的PD-L1靶向部分,其中所述经修饰的信号传导剂中的修饰允许活性的减弱。

19.如权利要求16所述的PD-L1靶向部分,其中所述经修饰的信号传导剂的激动或拮抗

活性减弱。

20.如权利要求16-19所述的PD-L1靶向部分,其中所述信号传导剂选自干扰素、白介素和肿瘤坏死因子中的一者或多者,所述干扰素、白介素和肿瘤坏死因子中的任一者任选地被修饰或突变。

21.如权利要求20所述的PD-L1靶向部分,其中所述信号传导剂选自人:IFNα2、IFNα1、IFNβ、IFNγ、共有干扰素、TNF、TNFR、TGF-α、TGF-β、VEGF、EGF、PDGF、FGF、TRAIL、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-33、IGF-1或EPO。

22.如权利要求21所述的PD-L1靶向部分,其中所述人IFNα2包含一个或多个突变,所述一个或多个突变选自R33A、T106X_3、R120E、R144X_1、A145X_2、M148A、R149A和L153A并且是相对于氨基酸序列SEQ ID NO:81或82而言的,其中X_1选自A、S、T、Y、L和I,其中X_2选自G、H、Y、K和D,并且其中X_3选自A和E。

23.如权利要求21所述的PD-L1靶向部分,其中所述人IFNα1包含一个或多个突变,所述一个或多个突变选自A146G、C86X_1和M149X_2并且是相对于氨基酸序列SEQ ID NO:83而言的,其中X_1选自A、Y和S,并且其中X_2选自V和A。

24.如权利要求21所述的PD-L1靶向部分,其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:84,所述人IFNβ包含一个或多个选自W22G、R27G、L32A、L32G、R35A、R35G、V148G、L151G、R152A和R152G的突变。

25.如权利要求21所述的PD-L1靶向部分,其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:100,所述人IL-1β包含一个或多个选自A117G/P118G、R120G、R120A、L122A、T125G/L126G、R127G、Q130A、Q130W、Q131G、K132A、S137G/Q138Y、L145G、H146A、H146G、H146E、H146N、H146R、L145A/L147A、Q148E、Q148G、Q148L、Q148G/Q150G、Q150G/D151A、M152G、F162A、F162A/Q164E、F166A、Q164E/E167K、N169G/D170G、I172A、V174A、K208E、K209A、K209D、K209A/K210A、K219S、K219Q、E221S、E221K、E221S/N224A、N224S/K225S、E244K和N245Q的突变。

26.如权利要求21所述的PD-L1靶向部分,其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:101,所述人IL-2包含一个或多个选自R38A、F42A、Y45A、E62A、N88R、N88I、N88G、D20H、Q126L、Q126F、D109和C125的突变。

27.如权利要求21所述的PD-L1靶向部分,其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:97,所述人TNFα包含一个或多个选自R32G、N34G、Q67G、H73G、L75G、L75A、L75S、T77A、S86G、Y87O、Y87L、Y87A、Y87F、V91G、V91A、I97A、I97Q、I97S、T105G、P106G、A109Y、P113G、Y115G、Y115A、E127G、N137G、D143N、A145G、A145T和Y87Q/I97A的突变。

28.如以上权利要求中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中与SEQ ID NO:1的PD-L1靶向部分相比,所述PD-L1靶向部分以提高的亲和力结合PD-L1。

29.一种基于Fc的嵌合蛋白复合物,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包含:

(A)靶向部分,所述靶向部分包含:

(a)三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3),其中:

(i)CDR1包含选自SEQ ID NO:2或5中任一者的氨基酸序列;

(ii)CDR2包含选自SEQ ID NO:3或6中任一者的氨基酸序列;并且

(iii)CDR3包含选自SEQ ID NO:4或7中任一者的氨基酸序列;或

(b)与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列,并且

其中(a)或(b)还在位置D54和G55处包含一个或多个突变,相对于SEQ ID NO:1编号;和

(B)信号传导剂,其中所述信号传导剂是:

a)野生型信号传导剂;或

b)经修饰的信号传导剂,所述经修饰的信号传导剂相对于所述野生型信号传导剂具有一个或多个赋予提高的安全性的突变;以及

(C)Fc结构域,所述Fc结构域任选地具有一个或多个突变,所述一个或多个突变减少或消除所述Fc结构域的一种或多种效应功能,促进所述Fc结构域中的Fc链配对,和/或使所述Fc结构域中的铰链区稳定化。

30.如权利要求29所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述靶向部分还在位置Q1、Q5、A14、A63、T74、K76、S79、K86和Q110处包含一个或多个突变。

31.如权利要求29或30所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述突变是取代,任选地其中所述取代是选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基;包括组氨酸(H)的芳香族的极性的且带正电荷的亲水性残基;选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基;选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基;或选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸;或选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸。

32.如权利要求29-31中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述突变选自以下一项或多项:

在位置D54处的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是D54G;或选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基,任选地是D54K;或选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是D54T;以及

在位置G55处的选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基,任选地是G55R。

33.如权利要求29-32中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述突变选自以下一项或多项:

在位置Q1处的选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基,任选地是Q1D;

在位置Q5处的选自甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是Q5V;

在位置A14处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是A14P;

在位置A63处的选自甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是A63V;

在位置T74处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是T74S;

在位置K76处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和

半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是K76N;

在位置S79处的选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸,任选地是S79Y;

在位置K86处的精氨酸(R),为K86R;以及

在位置Q110处的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是Q110L。

34.如权利要求29-33中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述突变选自以下一项或多项:Q1D、Q5V、A14P、A63V、T74S、K76N、S79Y、K86R和Q110L,任选地是Q1D、Q5V、A14P、D54G、T74S、K76N、S79Y、K86R和Q110L中的全部。

35.如权利要求29-34中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述靶向部分是全长抗体、单结构域抗体、只有重链的重组抗体(VHH)、单链抗体、只有重链的鲨鱼抗体(VNAR)、微量蛋白、darpin、抗运载蛋白、adnectin、适体、Fv、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、肽模拟分子、受体的天然配体、或合成分子,任选地其中所述靶向部分包含可变结构域重链抗体(V_HH)或人源化V_HH。

36.如权利要求29-35中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述靶向部分识别并结合PD-L1并基本上在功能上调节所述PD-L1的活性或基本上不在功能上调节所述PD-L1的活性。

37.如权利要求29-35中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述靶向部分识别和/或结合至其靶标而基本上不中和所述靶标的活性,或者其中所述靶向部分识别和/或结合至其靶标并基本上中和所述靶标的活性。

38.如权利要求29-37中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物还包含一个或多个另外的靶向部分。

39.如权利要求38所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述一个或多个另外的靶向部分结合至CD8、CD13、CD20、NKp46、Clec9A、Clec4c、PD-1、PD-L1、PD-L2、SIRP1α、FAP、XCR1、肌腱蛋白CA1、Flt3或ECM蛋白。

40.如权利要求29-39中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述靶向部分识别并任选地在功能上调节肿瘤抗原。

41.如权利要求29-40中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述靶向部分识别并任选地在功能上调节免疫细胞上的抗原。

42.如权利要求41所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述免疫细胞选自T细胞、B细胞、树突状细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、NK细胞和NKT细胞。

43.如权利要求29-42中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述靶向部分将细胞毒性T细胞募集至肿瘤细胞或肿瘤环境。

44.如权利要求29所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物还包含一个或多个接头。

45.如权利要求44所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述Fc结构域选自IgG、IgA、IgD、IgM或IgE。

46.如权利要求45所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述IgG选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

47.如权利要求46所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述Fc结构域选自人IgG、IgA、IgD、IgM或IgE。

48.如权利要求47所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述人IgG选自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

49.如权利要求29-48中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述信号传导剂是经修饰的信号传导剂，并且相对于野生型信号传导剂对所述信号传导剂的受体具有降低的亲和力或活性。

50.如权利要求49所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述信号传导剂是经修饰的信号传导剂，并且所述靶向部分恢复所述经修饰的信号传导剂对所述信号传导剂的受体的亲和力或活性。

51.如权利要求29-50中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述Fc链配对通过离子配对和/或旋钮入孔洞配对来促进。

52.如权利要求29-51中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述Fc结构域的所述一个或多个突变导致所述Fc结构域中的Fc链之间的离子配对。

53.如权利要求29-52中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述Fc结构域的所述一个或多个突变导致所述Fc结构域的旋钮入孔洞配对。

54.如权利要求29-53中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述Fc结构域的所述一个或多个突变导致所述Fc结构域的所述效应功能的降低或消除。

55.如权利要求29-54中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述复合物是同源二聚体或异源二聚体。

56.如权利要求29-55中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中基于Fc的嵌合蛋白复合物具有如以下任一者所示的构型和/或取向：图9A-图9F、图10A-图10H、图11A-图11H、图12A-图12D、图13A-图13F、图14A-图14J、图15A-图15D、图16A-图16F、图17A-图17J、图18A-图18F、图19A-图19L、图20A-图20L、图21A-图21F、图22A-图22L、图23A-图23L、图24A-图24J、图25A-图25J、图26A-图26F和图27A-图27F。

57.如权利要求56所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中基于Fc的嵌合蛋白复合物具有如图15B所示的构型和/或取向。

58.如权利要求29-57中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述基于Fc的嵌合蛋白复合物具有如关于任何靶向部分和信号传导剂相对于彼此，和/或任何靶向部分相对于彼此，和/或任何信号传导剂相对于彼此的反式取向/构型。

59.如权利要求29-58中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述基于Fc的嵌合蛋白复合物具有如关于任何靶向部分和信号传导剂相对于彼此，和/或任何靶向部分相对于彼此，和/或任何信号传导剂相对于彼此的顺式取向/构型。

60.如权利要求29-59中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述Fc在人IgG1中包含L234A、L235A和一个另外的选自K322A、K322Q、D265A、P329G和P331S取代的突变，其中编号基于EU公约。

61.如权利要求29-60中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述Fc在人IgG4中包含S228P取代，其中编号基于EU公约。

62.如权利要求29-61中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述经修饰的信

号传导剂相对于野生型信号传导剂对所述信号传导剂的受体具有降低的亲和力或活性。

63.如权利要求29-61中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述靶向部分恢复所述经修饰的信号传导剂对所述信号传导剂的受体的亲和力或活性。

64.如权利要求63所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述经修饰的信号传导剂中的修饰允许活性的减弱。

65.如权利要求63所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述经修饰的信号传导剂的激动或拮抗活性减弱。

66.如权利要求29-65所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述信号传导剂选自干扰素、白介素和肿瘤坏死因子中的一者或多者，所述干扰素、白介素和肿瘤坏死因子中的任一者任选地被修饰或突变。

67.如权利要求66所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述信号传导剂选自人：IFNα2、IFNα1、IFNβ、IFNγ、共有干扰素、TNF、TNFR、TGF-α、TGF-β、VEGF、EGF、PDGF、FGF、TRAIL、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-33、IGF-1或EPO。

68.如权利要求67所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述人IFNα2包含一个或多个突变，所述一个或多个突变选自R33A、T106X_3、R120E、R144X_1 A145X_2、M148A、R149A和L153A并且是相对于氨基酸序列SEQ ID NO:81或82而言的，其中X_1选自A、S、T、Y、L和I，其中X_2选自G、H、Y、K和D，并且其中X_3选自A和E。

69.如权利要求67所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述人IFNα1包含一个或多个突变，所述一个或多个突变选自A146G、C86X_1和M149X_2并且是相对于氨基酸序列SEQ ID NO:83而言的，其中X_1选自A、Y和S，并且其中X_2选自V和A。

70.如权利要求67所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:84，所述人IFNβ包含一个或多个选自W22G、R27G、L32A、L32G、R35A、R35G、V148G、L151G、R152A和R152G的突变。

71.如权利要求67所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:100，所述人IL-1β包含一个或多个选自A117G/P118G、R120G、R120A、L122A、T125G/L126G、R127G、Q130A、Q130W、Q131G、K132A、S137G/Q138Y、L145G、H146A、H146G、H146E、H146N、H146R、L145A/L147A、Q148E、Q148G、Q148L、Q148G/Q150G、Q150G/D151A、M152G、F162A、F162A/Q164E、F166A、Q164E/E167K、N169G/D170G、I172A、V174A、K208E、K209A、K209D、K209A/K210A、K219S、K219Q、E221S、E221K、E221S/N224A、N224S/K225S、E244K和N245Q的突变。

72.如权利要求67所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:101，所述人IL-2包含一个或多个选自R38A、F42A、Y45A、E62A、N88R、N88I、N88G、D20H、Q126L、Q126F、D109和C125的突变。

73.如权利要求67所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:97，所述人TNFα包含一个或多个选自R32G、N34G、Q67G、H73G、L75G、L75A、L75S、T77A、S86G、Y87O、Y87L、Y87A、Y87F、V91G、V91A、I97A、I97Q、I97S、T105G、P106G、A109Y、P113G、Y115G、Y115A、E127G、N137G、D143N、A145G、A145T和Y87Q/I97A的突变。

74.如权利要求67所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述信号传导剂是经修饰的IFNα2，所述经修饰的IFNα2相对于氨基酸序列SEQ ID NO:81或82任选地具有R149A突变。

75.一种包含识别结构域的PD-L1靶向部分,所述识别结构域包含:

(i)三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3),其中:

(a)CDR1包含选自SEQ ID NO:27或30中任一者的氨基酸序列;

(b)CDR2包含选自SEQ ID NO:28或31中任一者的氨基酸序列;并且

(c)CDR3包含选自SEQ ID NO:29或32中任一者的氨基酸序列;或

(ii)与SEQ ID NO:26具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且

其中(i)或(ii)还在位置N32、D33和M97处包含一个或多个突变,相对于SEQ ID NO:26编号。

76.如权利要求75所述的PD-L1靶向部分,其中所述突变是取代。

77.如权利要求75所述的PD-L1靶向部分,其中所述取代是选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基或包括组氨酸(H)的芳香族的极性的且带正电荷的亲水性残基。

78.如权利要求75所述的PD-L1靶向部分,其中所述取代是选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基。

79.如权利要求75所述的PD-L1靶向部分,其中所述取代是选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基。

80.如权利要求75所述的PD-L1靶向部分,其中所述取代是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸或选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸。

81.如权利要求75所述的PD-L1靶向部分,其中在位置N32处的所述取代是选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的正亲水性残基。

82.如权利要求75所述的PD-L1靶向部分,其中在位置N32处的所述取代是选自谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且中性的亲水性残基。

83.如权利要求81或82所述的PD-L1靶向部分,其中在位置N32处的所述取代是N32Q或N32R。

84.如权利要求75所述的PD-L1靶向部分,其中在位置D33处的所述取代是D33H。

85.如权利要求75所述的PD-L1靶向部分,其中在位置M97处的所述取代是选自甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)和缬氨酸(V)的脂肪族疏水性残基。

86.如权利要求85所述的PD-L1靶向部分,其中在位置M97处的所述取代是M97I、M97L或M97V。

87.如权利要求75-86中任一项所述的PD-L1靶向部分,所述PD-L1靶向部分还包含以下突变中的一者或多者:Q1D、Q5V、A14P、A62S、A74S、M77T、M78V、K86R和Q109L,任选地是Q1D、Q5V、A14P、D33H、A62S、A74S、M77T、M78V、K86R、M97V和Q109L中的全部。

88.如权利要求75-87中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述靶向部分是全长抗体、单结构域抗体、只有重链的重组抗体(VHH)、单链抗体、只有重链的鲨鱼抗体(VNAR)、微量蛋白、darpin、抗运载蛋白、adnectin、适体、Fv、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、肽模拟分子、受体的天然配体、或合成分子。

89.如权利要求88所述的PD-L1靶向部分,其中所述靶向部分包含可变结构域重链抗体

(V_HH)或人源化V_HH。

90.如权利要求75-89中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述靶向部分识别并结合PD-L1并基本上在功能上调节所述PD-L1的活性或基本上不在功能上调节所述PD-L1的活性。

91.如权利要求75-90中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述靶向部分识别和/或结合至其靶标而基本上不中和所述靶标的活性,或者其中所述靶向部分识别和/或结合至其靶标并基本上中和所述靶标的活性。

92.如权利要求75-91中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述靶向部分包含一个或多个另外的识别结构域。

93.如权利要求92所述的PD-L1靶向部分,其中所述一个或多个另外的识别结构域结合至CD8、CD13、CD20、NKp46、Clec9A、Clec4c、PD-1、PD-L1、PD-L2、SIRP1α、FAP、XCR1、肌腱蛋白CA1、Flt3或ECM蛋白。

94.如权利要求75-93中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述识别结构域识别并任选地在功能上调节肿瘤抗原。

95.如权利要求75-94中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述靶向部分识别并任选地在功能上调节免疫细胞上的抗原。

96.如权利要求95所述的PD-L1靶向部分,其中所述免疫细胞选自T细胞、B细胞、树突状细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、NK细胞和NKT细胞。

97.如权利要求75-96中任一项所述的PD-L1靶向部分,其中所述靶向部分将细胞毒性T细胞募集至肿瘤细胞或肿瘤环境。

98.如权利要求75-97中任一项所述的PD-L1靶向部分,所述PD-L1靶向部分还包含一种或多种(a)野生型信号传导剂或(b)经修饰的信号传导剂,所述经修饰的信号传导剂相对于野生型信号传导剂对所述信号传导剂的受体具有降低的亲和力或活性。

99.如权利要求98所述的PD-L1靶向部分,其中所述靶向部分恢复所述经修饰的信号传导剂对所述信号传导剂的受体的亲和力或活性。

100.如权利要求98所述的PD-L1靶向部分,其中所述经修饰的信号传导剂中的修饰允许活性的减弱。

101.如权利要求98所述的PD-L1靶向部分,其中所述经修饰的信号传导剂的激动或拮抗活性减弱。

102.如权利要求98-101所述的PD-L1靶向部分,其中所述信号传导剂选自干扰素、白介素和肿瘤坏死因子中的一者或多者,所述干扰素、白介素和肿瘤坏死因子中的任一者任选地被修饰或突变。

103.如权利要求102所述的PD-L1靶向部分,其中所述信号传导剂选自人:IFNα2、IFNα1、IFNβ、IFNγ、共有干扰素、TNF、TNFR、TGF-α、TGF-β、VEGF、EGF、PDGF、FGF、TRAIL、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-33、IGF-1或EPO。

104.如权利要求103所述的PD-L1靶向部分,其中所述人IFNα2包含一个或多个突变,所述一个或多个突变选自R33A、T106X_3、R120E、R144X_1 A145X_2、M148A、R149A和L153A并且是相对于氨基酸序列SEQ ID NO:81或82而言的,其中X_1选自A、S、T、Y、L和I,其中X_2选自G、H、Y、K和D,并且其中X_3选自A和E。

105.如权利要求103所述的PD-L1靶向部分，其中所述人IFNα1包含一个或多个突变，所述一个或多个突变选自A146G、C86X_1和M149X_2并且是相对于氨基酸序列SEQ ID NO:83而言的，其中X_1选自A、Y和S，并且其中X_2选自V和A。

106.如权利要求103所述的PD-L1靶向部分，其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:84，所述人IFNβ包含一个或多个选自W22G、R27G、L32A、L32G、R35A、R35G、V148G、L151G、R152A和R152G的突变。

107.如权利要求103所述的PD-L1靶向部分，其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:100，所述人IL-1β包含一个或多个选自A117G/P118G、R120G、R120A、L122A、T125G/L126G、R127G、Q130A、Q130W、Q131G、K132A、S137G/Q138Y、L145G、H146A、H146G、H146E、H146N、H146R、L145A/L147A、Q148E、Q148G、Q148L、Q148G/Q150G、Q150G/D151A、M152G、F162A、F162A/Q164E、F166A、Q164E/E167K、N169G/D170G、I172A、V174A、K208E、K209A、K209D、K209A/K210A、K219S、K219Q、E221S、E221K、E221S/N224A、N224S/K225S、E244K和N245Q的突变。

108.如权利要求103所述的PD-L1靶向部分，其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:101，所述人IL-2包含一个或多个选自R38A、F42A、Y45A、E62A、N88R、N88I、N88G、D20H、Q126L、Q126F、D109和C125的突变。

109.如权利要求103所述的PD-L1靶向部分，其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:97，所述人TNFα包含一个或多个选自R32G、N34G、Q67G、H73G、L75G、L75A、L75S、T77A、S86G、Y87Q、Y87L、Y87A、Y87F、V91G、V91A、I97A、I97Q、I97S、T105G、P106G、A109Y、P113G、Y115G、Y115A、E127G、N137G、D143N、A145G、A145T和Y87Q/I97A的突变。

110.如权利要求75至109中任一项所述的PD-L1靶向部分，其中与SEQ ID NO:26的PD-L1靶向部分相比，所述PD-L1靶向部分以提高的亲和力结合PD-L1。

111.一种基于Fc的嵌合蛋白复合物，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包含：

(A)靶向部分，所述靶向部分包含：

(a)三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)，其中：

(i)CDR1包含选自SEQ ID NO:27或30中任一者的氨基酸序列；

(ii)CDR2包含选自SEQ ID NO:28或31中任一者的氨基酸序列；并且

(iii)CDR3包含选自SEQ ID NO:29或32中任一者的氨基酸序列；或

(b)与SEQ ID NO:26具有至少90％序列同一性的氨基酸序列，并且

其中(a)或(b)还在位置N32、D33和M97处包含一个或多个突变，相对于SEQ ID NO:26编号；和

(B)信号传导剂，其中所述信号传导剂是：

a)野生型信号传导剂；或

b)经修饰的信号传导剂，所述经修饰的信号传导剂相对于所述野生型信号传导剂具有一个或多个赋予提高的安全性的突变；以及

(C)Fc结构域，所述Fc结构域任选地具有一个或多个突变，所述一个或多个突变减少或消除所述Fc结构域的一种或多种效应功能，促进所述Fc结构域中的Fc链配对，和/或使所述Fc结构域中的铰链区稳定化。

112.如权利要求111所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述突变是取代。

113.如权利要求111所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述取代是亲水性氨基酸

残基,所述亲水性氨基酸残基是选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基或包括组氨酸(H)的芳香族的极性的且带正电荷的亲水性残基。

114.如权利要求111所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述取代是亲水性氨基酸残基,所述亲水性氨基酸残基是选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基。

115.如权利要求111所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述取代是选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基。

116.如权利要求111所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述取代是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸或选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸。

117.如权利要求111所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中在位置N32处的所述取代是选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的正亲水性残基。

118.如权利要求111所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中在位置N32处的所述取代是选自谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且中性的亲水性残基。

119.如权利要求111所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中在位置N32处的所述取代是N32Q或N32R。

120.如权利要求111所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中在位置D33处的所述取代是D33H。

121.如权利要求111所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中在位置M97处的所述取代是选自甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)和缬氨酸(V)的脂肪族疏水性残基。

122.如权利要求111所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中在位置M97处的所述取代是M97I、M97L或M97V。

123.如权利要求111-122中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物还包含以下突变中的一者或多者:Q1D、Q5V、A14P、A62S、A74S、M77T、M78V、K86R和Q109L,任选地是Q1D、Q5V、A14P、D33H、A62S、A74S、M77T、M78V、K86R和M97V中的全部。

124.如权利要求111-123中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述靶向部分是全长抗体、单结构域抗体、只有重链的重组抗体(VHH)、单链抗体、只有重链的鲨鱼抗体(VNAR)、微量蛋白、darpin、抗运载蛋白、adnectin、适体、Fv、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、肽模拟分子、受体的天然配体、或合成分子。

125.如权利要求124所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述靶向部分包含可变结构域重链抗体(V_HH)或人源化V_HH。

126.如权利要求111-125中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述靶向部分识别并结合PD-L1并基本上在功能上调节所述PD-L1的活性或基本上不在功能上调节所述PD-L1的活性。

127.如权利要求111-126中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述靶向部分识别和/或结合至其靶标而基本上不中和所述靶标的活性,或者其中所述靶向部分识别和/或结合至其靶标并基本上中和所述靶标的活性。

128.如权利要求111-127中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,所述基于Fc的嵌

合蛋白复合物还包含一个或多个另外的靶向部分。

129.如权利要求128所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述一个或多个另外的靶向部分结合至CD8、CD13、CD20、NKp46、Clec9A、Clec4c、PD-1、PD-L1、PD-L2、SIRP1α、FAP、XCR1、肌腱蛋白CA1、Flt3或ECM蛋白。

130.如权利要求111-129中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述识别结构域识别并任选地在功能上调节肿瘤抗原。

131.如权利要求111-129中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述靶向部分识别并任选地在功能上调节免疫细胞上的抗原。

132.如权利要求131所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述免疫细胞选自T细胞、B细胞、树突状细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、NK细胞和NKT细胞。

133.如权利要求111-132中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述靶向部分将细胞毒性T细胞募集至肿瘤细胞或肿瘤环境。

134.如权利要求133所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物还包含一个或多个接头。

135.如权利要求111所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述Fc结构域选自IgG、IgA、IgD、IgM或IgE。

136.如权利要求135所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述IgG选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

137.如权利要求111所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述Fc结构域选自人IgG、IgA、IgD、IgM或IgE。

138.如权利要求137所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述人IgG选自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

139.如权利要求108-135中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述信号传导剂是经修饰的信号传导剂,并且相对于野生型信号传导剂对所述信号传导剂的受体具有降低的亲和力或活性。

140.如权利要求139所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述信号传导剂是经修饰的信号传导剂,并且所述靶向部分恢复所述经修饰的信号传导剂对所述信号传导剂的受体的亲和力或活性。

141.如权利要求111-140中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述Fc链配对通过离子配对和/或旋钮入孔洞配对来促进。

142.如权利要求111-141中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述Fc结构域的所述一个或多个突变导致所述Fc结构域中的Fc链之间的离子配对。

143.如权利要求111-142中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述Fc结构域的所述一个或多个突变导致所述Fc结构域的旋钮入孔洞配对。

144.如权利要求111-143中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述Fc结构域的所述一个或多个突变导致所述Fc结构域的所述效应功能的降低或消除。

145.如权利要求111-144中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述复合物是同源二聚体或异源二聚体。

146.如权利要求111-145中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中基于Fc的嵌

合蛋白复合物具有如以下任一者所示的构型和/或取向:图9A-图9F、图10A-图10H、图11A-图11H、图12A-图12D、图13A-图13F、图14A-图14J、图15A-图15D、图16A-图16F、图17A-图17J、图18A-图18F、图19A-图19L、图20A-图20L、图21A-图21F、图22A-图22L、图23A-图23L、图24A-图24J、图25A-图25J、图26A-图26F和图27A-图27F。

147.如权利要求146所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中基于Fc的嵌合蛋白复合物具有如图15B所示的构型和/或取向。

148.如权利要求111-147中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述基于Fc的嵌合蛋白复合物具有如关于任何靶向部分和信号传导剂相对于彼此,和/或任何靶向部分相对于彼此,和/或任何信号传导剂相对于彼此的反式取向/构型。

149.如权利要求111-147中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述基于Fc的嵌合蛋白复合物具有如关于任何靶向部分和信号传导剂相对于彼此,和/或任何靶向部分相对于彼此,和/或任何信号传导剂相对于彼此的顺式取向/构型。

150.如权利要求111-149中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述Fc在人IgG1中包含L234A、L235A和一个另外的选自K322A、K322Q、D265A、P329G和P331S取代的突变,其中编号基于EU公约。

151.如权利要求111-150中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述Fc在人IgG4中包含S228P取代,其中编号基于EU公约。

152.如权利要求111-151中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述信号传导剂相对于野生型信号传导剂对所述信号传导剂的受体具有降低的亲和力或活性。

153.如权利要求111-153中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述靶向部分恢复所述经修饰的信号传导剂对所述信号传导剂的受体的亲和力或活性。

154.如权利要求153所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述经修饰的信号传导剂中的修饰允许活性的减弱。

155.如权利要求153所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述经修饰的信号传导剂的激动或拮抗活性减弱。

156.如权利要求111-155所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述信号传导剂选自干扰素、白介素和肿瘤坏死因子中的一者或多者,所述干扰素、白介素和肿瘤坏死因子中的任一者任选地被修饰或突变。

157.如权利要求156所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述信号传导剂选自人:IFNα2、IFNα1、IFNβ、IFNγ、共有干扰素、TNF、TNFR、TGF-α、TGF-β、VEGF、EGF、PDGF、FGF、TRAIL、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-33、IGF-1或EPO。

158.如权利要求156所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述人IFNα2包含一个或多个突变,所述一个或多个突变选自R33A、T106X_3、R120E、R144X_1 A145X_2、M148A、R149A和L153A并且是相对于氨基酸序列SEQ ID NO:81或82而言的,其中X_1选自A、S、T、Y、L和I,其中X_2选自G、H、Y、K和D,并且其中X_3选自A和E。

159.如权利要求156所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物,其中所述人IFNα1包含一个或多个突变,所述一个或多个突变选自A146G、C86X_1和M149X_2并且是相对于氨基酸序列SEQ ID NO:83而言的,其中X_1选自A、Y和S,并且其中X_2选自V和A。

160.如权利要求156所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:84，所述人IFNβ包含一个或多个选自W22G、R27G、L32A、L32G、R35A、R35G、V148G、L151G、R152A和R152G的突变。

161.如权利要求156所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:100，所述人IL-1β包含一个或多个选自A117G/P118G、R120G、R120A、L122A、T125G/L126G、R127G、Q130A、Q130W、Q131G、K132A、S137G/Q138Y、L145G、H146A、H146G、H146E、H146N、H146R、L145A/L147A、Q148E、Q148G、Q148L、Q148G/Q150G、Q150G/D151A、M152G、F162A、F162A/Q164E、F166A、Q164E/E167K、N169G/D170G、I172A、V174A、K208E、K209A、K209D、K209A/K210A、K219S、K219Q、E221S、E221K、E221S/N224A、N224S/K225S、E244K和N245Q的突变。

162.如权利要求156所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:101，所述人IL-2包含一个或多个选自R38A、F42A、Y45A、E62A、N88R、N88I、N88G、D20H、Q126L、Q126F、D109和C125的突变。

163.如权利要求156所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中相对于氨基酸序列SEQ ID NO:97，所述人TNFα包含一个或多个选自R32G、N34G、Q67G、H73G、L75G、L75A、L75S、T77A、S86G、Y87O、Y87L、Y87A、Y87F、V91G、V91A、I97A、I97Q、I97S、T105G、P106G、A109Y、P113G、Y115G、Y115A、E127G、N137G、D143N、A145G、A145T和Y87Q/I97A的突变。

164.如权利要求156所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物，其中所述信号传导剂是经修饰的IFNα2，所述经修饰的IFNα2相对于氨基酸序列SEQ ID NO:1或2任选地具有R149A突变。

165.一种重组核酸组合物，所述重组核酸组合物编码权利要求1-28和75-110中任一项所述的PD-L1靶向部分。

166.一种宿主细胞，所述宿主细胞包含权利要求165所述的核酸。

167.如权利要求1-28和75-110中任一项所述的PD-L1靶向部分，其中所述靶向部分适用于患有以下一种或多种疾病的患者：癌症、感染、免疫病症和/或自身免疫性疾病。

168.一种用于治疗或预防癌症的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的：

(a)权利要求1-28和75-110中任一项所述的靶向部分；或

(b)权利要求29-74和111-164中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物。

169.如权利要求168所述的方法，其中所述癌症选自以下一项或多项：基底细胞癌；胆道癌；膀胱癌；骨癌；脑和中枢神经系统癌症；乳腺癌；腹膜癌；宫颈癌；绒毛膜癌；结肠和直肠癌；结缔组织癌；消化系统癌症；子宫内膜癌；食道癌；眼癌；头颈癌；胃癌(包括胃肠癌)；成胶质细胞瘤；肝癌；肝细胞瘤；上皮内赘瘤；肾脏癌或肾癌；喉癌；白血病；肝癌；肺癌(例如，小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌)；黑素瘤；骨髓瘤；成神经细胞瘤；口腔癌(唇、舌、口和咽)；卵巢癌；胰腺癌；前列腺癌；成视网膜细胞瘤；横纹肌肉瘤；直肠癌；呼吸系统癌症；唾液腺癌；肉瘤；皮肤癌；鳞状细胞癌；胃癌；睾丸癌；甲状腺癌；子宫或子宫内膜癌；泌尿系统癌症；外阴癌；淋巴瘤，包括霍奇金氏淋巴瘤和非霍奇金氏淋巴瘤，以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)；小淋巴细胞性(SL)NHL；中级/滤泡性NHL；中级弥漫性NHL；高级成免疫细胞性NHL；高级成淋巴细胞性NHL；高级小非核裂细胞NHL；巨大肿块性NHL；套细胞淋巴瘤；AIDS相关淋巴瘤；和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症；慢性淋巴细胞性白血病(CLL)；急性成淋巴细胞性白血病(ALL)；毛细胞性白血病；慢性成髓细胞

性白血病;以及其他癌瘤和肉瘤;和移植后淋巴组织增生性病症(PTLD),以及与斑痣性错构瘤相关的异常血管增生;水肿(例如与脑肿瘤相关的水肿);和梅格斯氏综合征。

170.一种用于治疗或预防自身免疫性疾病和/或神经退行性疾病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的:

(a)权利要求1-28和75-110中任一项所述的靶向部分;或

(b)权利要求29-74和111-164中任一项所述的基于Fc的嵌合蛋白复合物。

171.如权利要求170所述的方法,其中所述自身免疫性疾病和/或神经退行性疾病选自多发性硬化、糖尿病、狼疮、乳糜泻、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、格林-巴利综合征、硬皮病、古德帕斯彻氏综合征、韦格纳氏肉芽肿病、自身免疫性癫痫、拉斯马森氏脑炎、原发性胆汁性硬化、硬化性胆管炎、自身免疫性肝炎、艾迪森氏病、桥本氏甲状腺炎、纤维肌痛症、美尼尔氏综合征;移植排斥(例如,预防同种异体移植排斥)恶性贫血、类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮、皮肌炎、修格连氏综合征、红斑狼疮、重症肌无力、瑞特氏综合征和格雷夫氏病。

172.如权利要求171所述的方法,其中所述自身免疫性疾病和/或神经退行性疾病是多发性硬化。

173.权利要求1-28和75-110中任一项所述的靶向部分用于治疗或预防自身免疫性疾病、神经退行性疾病、代谢性疾病和/或心血管疾病的用途。

174.权利要求1-28和75-110中任一项所述的靶向部分用于制备用于治疗或预防自身免疫性疾病、神经退行性疾病、代谢性疾病和/或心血管疾病的药剂的用途。

175.一种PD-L1靶向部分,所述PD-L1靶向部分包含与选自SEQ ID NO:1、8-26和33-74的氨基酸序列中的任一者具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

176.一种用于治疗或预防癌症的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的权利要求175所述的PD-L1靶向部分。

177.一种用于治疗或预防自身免疫性疾病、神经退行性疾病、代谢性疾病和/或心血管疾病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的权利要求175所述的PD-L1靶向部分。

靶向PD-L1的嵌合蛋白及其用途

技术领域

[0001] 本发明部分地涉及识别并结合PD-L1的靶向部分以及所述部分作为诊断剂和治疗剂的用途。本发明还涉及包含具有PD-L1靶向部分的嵌合蛋白的药物组合物以及所述药物组合物在治疗包括癌症在内的各种疾病中的用途。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2019年9月26日提交的美国临时专利申请号62/906,447的权益,所述申请的全部公开内容特此以引用方式整体并入。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包含已通过EFS-Web以ASCII格式提交的序列表,所述序列表特此以引用方式整体并入。所述ASCII副本创建于2020年9月23日,名称为“ORN-068PC_ST25”且大小为182,668字节。

背景技术

[0006] 已开发出免疫疗法来引导身体的免疫系统对抗癌症。免疫疗法提供细胞特异性的优势,这是诸如化疗法和放射疗法等其他治疗方式所缺乏的。因此,增强基于免疫的疗法的功效的方法在临床上可能是有益的。例如,提供共刺激或共抑制信号的免疫检查点分子在调节针对肿瘤细胞的免疫应答中发挥着核心作用。

[0007] 然而,尽管患者对靶向检查点分子的剂有令人印象深刻的反应,包括例如YERVOY、KEYTRUDA和OPDIVO的成功,但诸如检查点抑制疗法的免疫疗法在绝大多数患者中仍然失败。此外,许多免疫疗法由于副作用而变得复杂,这些副作用极大地缩小了患者的治疗窗口,使患者更容易感染其他疾病。

[0008] 因此,仍然需要可提供针对癌症的靶向治疗同时引起最小副作用的改进的免疫治疗剂。

发明内容

[0009] 在各个方面,本发明涉及具有至少一个特异性地结合至PD-1或PD-L1的靶向部分的结合剂。在各个实施方案中,这些结合剂结合至PD-1或PD-L1并在功能上调节(例如,部分或完全中和)PD-1或PD-L1。在各个实施方案中,这些结合剂结合至PD-1或PD-L1但不在功能上调节(例如,部分或完全中和)PD-1或PD-L1。因此,在各个实施方案中,本发明的结合剂用于例如直接或间接地将表达PD-1的细胞或表达PD-L1的细胞募集至目标位点,同时仍允许细胞经由PD-1或PD-L1进行信号传导(即,所述PD-1或PD-L1结合剂的结合不会降低或消除所述目标位点处的PD-1或PD-L1信号传导)。在一个实施方案中,所述靶向部分是单结构域抗体(VHH)。

[0010] 在多个方面,本发明提供了包含识别结构域的PD-L1靶向部分,所述识别结构域包含:(i)三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3),其中(a)CDR1包含选自SEQ ID NO:2或5中任一者的氨基酸序列;(b)CDR2包含选自SEQ ID NO:3或6中任一者的氨基酸序列;并且(c)CDR3

包含选自SEQ ID NO:4或7中任一者的氨基酸序列;或(ii)与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中(i)或(ii)还在位置D54和G55处包含一个或多个突变,相对于SEQ ID NO:1编号。

[0011] 在多个实施方案中,所述包含识别结构域的PD-L1靶向部分还在位置Q1、Q5、A14、A63、T74、K76、S79、K86和Q110处包含一个或多个突变。

[0012] 在多个实施方案中,所述突变是取代,任选地其中所述取代是选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基;包括组氨酸(H)的芳香族的极性的且带正电荷的亲水性残基;选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基;选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基;或选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸;或选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸。

[0013] 在多个实施方案中,所述突变选自以下一项或多项:在位置D54处的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是D54G;或选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基,任选地是D54K;或选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是D54T;以及在位置G55处的选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基,任选地是G55R。

[0014] 在多个实施方案中,所述突变选自以下一项或多项:在位置Q1处的选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基,任选地是Q1D;在位置Q5处的选自甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是Q5V;在位置A14处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是A14P;在位置A63处的选自甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是A63V;在位置T74处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是T74S;在位置K76处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是K76N;在位置S79处的选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸,任选地是S79Y;在位置K86处的精氨酸(R),为K86R;以及在位置Q110处的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是Q110L。

[0015] 在多个实施方案中,所述突变选自以下一项或多项:Q1D、Q5V、A14P、A63V、T74S、S79Y、K86R和Q110L,任选地是Q1D、Q5V、A14P、D54G、T74S、K76N、S79Y、K86R和Q110L中的全部。

[0016] 在一些方面,本发明涉及包含识别结构域的PD-L1靶向部分,所述识别结构域包含:(i)三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3),其中(a)CDR1包含选自SEQ ID NO:2或5中任一者的氨基酸序列;(b)CDR2包含选自SEQ ID NO:3或6中任一者的氨基酸序列;并且(c)CDR3包含选自SEQ ID NO:4或7中任一者的氨基酸序列;或(ii)与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中(i)或(ii)还在位置D54、G55、K76和S79处包含一个或多

个突变，相对于SEQ ID NO:1编号。在一些实施方案中，所述PD-L1靶向部分在位置T74、K86和Q110处包含一个或多个突变。

[0017] 在一些方面，本发明涉及包含识别结构域的PD-L1靶向部分，所述识别结构域包含：(i)三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)，其中(a)CDR1包含选自SEQ ID NO:27或30中任一者的氨基酸序列；(b)CDR2包含选自SEQ ID NO:28或31中任一者的氨基酸序列；并且(c)CDR3包含选自SEQ ID NO:29或32中任一者的氨基酸序列；或(ii)与SEQ ID NO:26具有至少90％序列同一性的氨基酸序列；并且其中(i)或(ii)还在位置N32、D33和M97处包含一个或多个突变，相对于SEQ ID NO:26编号。

[0018] 在多个实施方案中，所述包含识别结构域的PD-L1靶向部分还包含以下突变中的一者或多者：Q1D、Q5V、A14P、A62S、A74S、M77T、M78V、S79Y、K86R和Q109L，任选地是Q1D、Q5V、A14P、D33H、A62S、A74S、M77T、M78V、K86R、M97V中的全部(相对于SEQ ID NO:26)。

[0019] 在另一方面，本发明涉及具有至少一个特异性地结合至PD-L1的靶向部分的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物。在各个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物还包含信号传导剂，例如但不限于干扰素、白介素和肿瘤坏死因子，所述信号传导剂可以经过修饰以减弱活性。

[0020] 在一些方面，本发明涉及一种基于Fc的嵌合蛋白复合物，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包括(A)靶向部分，所述靶向部分包含：(a)三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)，其中(i)CDR1包含选自SEQ ID NO:2或5中任一者的氨基酸序列；(ii)CDR2包含选自SEQ ID NO:3或6中任一者的氨基酸序列；并且(iii)CDR3包含选自SEQ ID NO:4或7中任一者的氨基酸序列；或(b)与SEQ ID NO:1具有至少90％序列同一性的氨基酸序列；并且其中(a)或(b)还在位置D54和G55处包含一个或多个突变，相对于SEQ ID NO:1编号；和(B)信号传导剂，其中所述信号传导剂是：a)野生型信号传导剂；或b)经修饰的信号传导剂，所述经修饰的信号传导剂相对于所述野生型信号传导剂具有一个或多个赋予提高的安全性的突变；以及(C)Fc结构域，所述Fc结构域任选地具有一个或多个突变，所述一个或多个突变减少或消除所述Fc结构域的一种或多种效应功能，促进所述Fc结构域中的Fc链配对，和/或使所述Fc结构域中的铰链区稳定化。

[0021] 在多个实施方案中，所述包含识别结构域的PD-L1靶向部分还在位置Q1、Q5、A14、A63、T74、K76、S79、K86和Q110处包含一个或多个突变。

[0022] 在多个实施方案中，所述突变是取代，任选地其中所述取代是选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基；包括组氨酸(H)的芳香族的极性的且带正电荷的亲水性残基；选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基；选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基；或选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸；或选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸。

[0023] 在多个实施方案中，所述突变选自以下一项或多项：在位置D54处的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸，任选地是D54G；或选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基，任选地是D54K；或选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨

酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是D54T;以及在位置G55处的选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基,任选地是G55R。

[0024] 在多个实施方案中,所述突变选自以下一项或多项:在位置Q1处的选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基,任选地是Q1D;在位置Q5处的选自甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是Q5V;在位置A14处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是A14P;在位置A63处的选自甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是A63V;在位置T74处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是T74S;在位置K76处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是K76N;在位置S79处的选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸,任选地是S79Y;在位置K86处的精氨酸(R),为K86R;以及在位置Q110处的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是Q110L。在多个实施方案中,所述突变选自以下一项或多项:Q1D、Q5V、A14P、A63V、T74S、S79Y、K86R和Q110L,任选地是Q1D、Q5V、A14P、D54G、T74S、K76N、S79Y、K86R和Q110L中的全部。

[0025] 在一些方面,本发明涉及一种基于Fc的嵌合蛋白复合物,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包括(A)靶向部分,所述靶向部分包含:(a)三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3),其中(i)CDR1包含选自SEQ ID NO:2或5中任一者的氨基酸序列;(ii)CDR2包含选自SEQ ID NO:3或6中任一者的氨基酸序列;并且(iii)CDR3包含选自SEQ ID NO:4或7中任一者的氨基酸序列;或(b)与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中(a)或(b)还在位置D54、G55、K76和S79处包含一个或多个突变,相对于SEQ ID NO:1编号;和(B)信号传导剂,其中所述信号传导剂是:a)野生型信号传导剂;或b)经修饰的信号传导剂,所述经修饰的信号传导剂相对于所述野生型信号传导剂具有一个或多个赋予提高的安全性的突变;以及(C)Fc结构域,所述Fc结构域任选地具有一个或多个突变,所述一个或多个突变减少或消除所述Fc结构域的一种或多种效应功能,促进所述Fc结构域中的Fc链配对,和/或使所述Fc结构域中的铰链区稳定化。

[0026] 在一些方面,本发明还涉及一种基于Fc的嵌合蛋白复合物,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包含(A)靶向部分,所述靶向部分包含:(a)三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3),其中(i)CDR1包含选自SEQ ID NO:27或30中任一者的氨基酸序列;(ii)CDR2包含选自SEQ ID NO:28或31中任一者的氨基酸序列;并且(iii)CDR3包含选自SEQ ID NO:29或32中任一者的氨基酸序列;或(b)与SEQ ID NO:26具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中(a)或(b)还在位置N32、D33和M97处包含一个或多个突变,相对于SEQ ID NO:26编号;和(B)信号传导剂,其中所述信号传导剂是:a)野生型信号传导剂;或b)经修饰的信号传导剂,所述经修饰的信号传导剂相对于所述野生型信号传导剂具有一个或多个赋予提高的安全性的突变;以及(C)Fc结构域,所述Fc结构域任选地具有一个或多个突变,所述一个或多个突变减少或消除所述Fc结构域的一种或多种效应功能,促进所述Fc结构域中的Fc链配对,和/或使所述Fc结构域中的铰链区稳定化。在一些方面,本发明还包括编码本发明的PD-L1靶向

部分或嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的重组核酸。在其他方面，本发明包括包含编码本发明的PD-L1靶向部分或嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的重组核酸的宿主细胞。在多个实施方案中，所述包含识别结构域的PD-L1靶向部分还包含以下突变中的一者或多者：Q1D、Q5V、A14P、A62S、A74S、M77T、M78V、S79Y、K86R和Q109L，任选地是Q1D、Q5V、A14P、D33H、A62S、A74S、M77T、M78V、K86R、M97V中的全部(相对于SEQ ID NO:26)。

[0027] 在各个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含结合至其他目标靶标(例如抗原、受体)的另外的靶向部分。在一个实施方案中，所述其他目标靶标(例如抗原、受体)存在于肿瘤细胞上。在另一个实施方案中，所述其他目标靶标(例如抗原、受体)存在于免疫细胞上。在一些实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以直接或间接地将免疫细胞募集至作用位点(作为非限制性实例，诸如肿瘤微环境)。在一些实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物促进对靶细胞(例如肿瘤细胞)的吞噬作用。

[0028] 在各个实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可用于治疗各种疾病或病症，诸如癌症、感染、免疫病症以及其他疾病和病症，并且本发明涵盖各种治疗方法。

[0029] 在一些实施方案中，本发明涉及嵌合蛋白复合物，其中所述嵌合蛋白复合物包括一个或多个信号传导剂、一个或多个靶向剂和一个或多个片段可结晶结构域(Fc结构域)。本发明的这些基于Fc的嵌合蛋白复合物具有高度靶向选择性，能够条件性和/或调控性调节受体信号传导，并且具有高活性和/或长效活性和/或长效作用，同时引起最小的副作用。

附图说明

[0030] 图1示出了2LIG99 VHH的野生型序列。序列中突出显示的部分示出ABM格式的CDR，序列中加下划线的部分示出Kabat格式的CDR。

[0031] 图2示出了2LIG189 VHH的野生型序列。序列中突出显示的部分示出ABM格式的CDR，序列中加下划线的部分示出Kabat格式的CDR。

[0032] 图3是示出2LIG99人源化和异构化变体的亲和力的表格。对于SEQ ID NO:14，在测定的5分钟时间间隔内未测量到解离。

[0033] 图4是示出第二波2LIG99人源化和异构化变体的亲和力的表格。

[0034] 图5示出了2LIG99变体对HL116细胞上PD-L1/PD-1相互作用对PD-L1/PD-1相互作用的中和。

[0035] 图6是示出2LIG189人源化、脱酰胺化和氧化变体的亲和力的表格。

[0036] 图7是示出第二波2LIG189人源化、脱酰胺化和氧化变体的亲和力的表格。

[0037] 图8示出了2LIG189变体对HL116细胞上PD-L1/PD-1相互作用的中和。

[0038] 图9A-图9F、图10A-图10H、图11A-图11H、图12A-图12D、图13A-图13F、图14A-图14J、图15A-图15D、图16A-图16F、图17A-图17J、图18A-图18F、图19A-图19L、图20A-图20L、图21A-图21F、图22A-图22L、图23A-图23L、图24A-图24J、图25A-图25J、图26A-图26F和图27A-图27F示出了本发明的基于Fc的嵌合蛋白复合物的各个非限制性说明性示意图。在多个实施方案中，每个示意图是本发明的组合物。在图中适用的地方，“TM”是指如本文所描述的“靶向部分”，“SA”是指如本文所描述的“信号传导剂”，“”是如本文所描述的任选的“接头”，两个长平行矩形是如本文所描述的人Fc结构域，例如来自IgG1、来自IgG2或来自IgG4，

且任选地具有同样如本文所描述的效应子敲除和/或稳定化突变，并且所述两个长平行矩形(其中一个具有突出部，另一个具有低凹部)是如本文所描述的人Fc结构域，例如来自IgG1、来自IgG2或来自IgG4，具有如本文所描述的旋钮入孔洞和/或离子对(又名带电对、离子键或带电残基对)突变，并且任选地具有同样如本文所描述的效应子敲除和/或稳定化突变。

[0039] 图9A-图9F示出了说明性同源二聚体2链复合物。这些图示出了同源二聚体2链复合物的说明性构型。

[0040] 图10A-图10H示出了说明性同源二聚体2链复合物，其具有两个靶向部分(TM)(如本文所描述的，在一些实施方案中可以存在更多的靶向部分)。在多个实施方案中，TM1和TM2的位置是可互换的。在多个实施方案中，框中所示的构建体(即图10G和图10H)在TM1与TM2之间或在TM1与Fc之间具有信号传导剂(SA)。

[0041] 图11A-图11H示出了说明性同源二聚体2链复合物，其具有两个信号传导剂(如本文所描述的，在一些实施方案中可以存在更多的信号传导剂)。在多个实施方案中，SA1和SA2的位置是可互换的。

[0042] 在多个实施方案中，框中所示的构建体(即图11G和图11H)在SA1与SA2之间具有TM，或者在N端或C端处具有TM。

[0043] 图12A-图12D示出了说明性异源二聚体2链复合物，其具有分裂TM链和SA链，即TM在Fc的旋钮链上，而SA在Fc的孔洞链上。

[0044] 图13A-图13F示出了说明性异源二聚体2链复合物，其具有分裂TM链和SA链，即两个TM都在Fc的旋钮链上，而SA在Fc的孔洞链上，具有两个靶向部分(如本文所描述的，在一些实施方案中可以存在更多的靶向部分)。在多个实施方案中，TM1和TM2的位置是可互换的。在一些实施方案中，TM1和TM2可以是相同的。

[0045] 图14A-图14J示出了说明性异源二聚体2链复合物，其具有分裂TM链和SA链，即TM在Fc的旋钮链上，而SA在Fc的孔洞链上，具有两个信号传导剂(如本文所描述的，在一些实施方案中可以存在更多的信号传导剂)。在这些取向和/或构型中，一个SA在旋钮链上，一个SA在孔洞链上。在多个实施方案中，SA1和SA2的位置是可互换的。

[0046] 图15A-图15D示出了说明性异源二聚体2链复合物，其具有分裂TM链和SA链，即SA在Fc的旋钮链上，而TM在Fc的孔洞链上。

[0047] 图16A-图16F示出了说明性异源二聚体2链复合物，其具有分裂TM链和SA链，即SA在Fc的旋钮链上，而两个TM都在Fc的孔洞链上，具有两个靶向部分(如本文所描述的，在一些实施方案中可以存在更多的靶向部分)。在多个实施方案中，TM1和TM2的位置是可互换的。在一些实施方案中，TM1和TM2可以是相同的。

[0048] 图17A-图17J示出了说明性异源二聚体2链复合物，其具有分裂TM链和SA链，即SA在Fc的旋钮链上，而TM在Fc的孔洞链上，具有两个信号传导剂(如本文所描述的，在一些实施方案中可以存在更多的信号传导剂)。在这些取向和/或构型中，一个SA在旋钮链上，一个SA在孔洞链上。在多个实施方案中，SA1和SA2的位置是可互换的。

[0049] 图18A-图18F示出了说明性异源二聚体2链复合物，其中TM和SA在同一链上，即SA和TM均在Fc的旋钮链上。

[0050] 图19A-图19L示出了说明性异源二聚体2链复合物，其中TM和SA在同一链上，即SA

和TM均在Fc的旋钮链上,具有两个靶向部分(如本文所描述的,在一些实施方案中可以存在更多的靶向部分)。在多个实施方案中,TM1和TM2的位置是可互换的。在一些实施方案中,TM1和TM2可以是相同的。

[0051] 图20A-图20L示出了说明性异源二聚体2链复合物,其中TM和SA在同一链上,即SA和TM均在Fc的旋钮链上,具有两个信号传导剂(如本文所描述的,在一些实施方案中可以存在更多的信号传导剂)。在多个实施方案中,SA1和SA2的位置是可互换的。

[0052] 图21A-图21F示出了说明性异源二聚体2链复合物,其中TM和SA在同一链上,即SA和TM均在Fc的孔洞链上。

[0053] 图22A-图22L示出了说明性异源二聚体2链复合物,其中TM和SA在同一链上,即SA和TM均在Fc的孔洞链上,具有两个靶向部分(如本文所描述的,在一些实施方案中存在更多的靶向部分)。在多个实施方案中,TM1和TM2的位置是可互换的。在多个实施方案中,TM1和TM2可以是相同的。

[0054] 图23A-图23L示出了说明性异源二聚体2链复合物,其中TM和SA在同一链上,即SA和TM均在Fc的孔洞链上,具有两个信号传导剂(如本文所描述的,在一些实施方案中可以存在更多的信号传导剂)。在多个实施方案中,SA1和SA2的位置是可互换的。

[0055] 图24A-图24J示出了说明性异源二聚体2链复合物,其具有两个靶向部分(如本文所描述的,在一些实施方案中可以存在更多的靶向部分),并且其中SA在旋钮Fc上并且TM在每个链上。在多个实施方案中,TM1和TM2可以是相同的。

[0056] 图25A-图25J示出了说明性异源二聚体2链复合物,其具有两个靶向部分(如本文所描述的,在一些实施方案中可以存在更多的靶向部分),并且其中SA在孔洞Fc上并且TM在每个链上。在多个实施方案中,TM1和TM2可以是相同的。

[0057] 图26A-图26F示出了说明性异源二聚体2链复合物,其具有两个信号传导剂(如本文所描述的,在一些实施方案中可以存在更多的信号传导剂)并且具有分裂SA链和TM链:SA在旋钮上并且TM在孔洞Fc上。

[0058] 图27A-图27F示出了说明性异源二聚体2链复合物,其具有两个信号传导剂(如本文所描述的,在一些实施方案中可以存在更多的信号传导剂)并且具有分裂SA链和TM链:TM在旋钮上并且SA在孔洞Fc上。

[0059] 图28描绘了靶向PD-L1的IFNa2_R149A(上)、IFNa1(中)和IFNa2_A145G(下)AFN的生物活性,以用连续稀释的野生型IFNa2或IFNa1 AFN刺激6小时的HL116细胞中的平均荧光素酶活性(±STDEV)显示。

[0060] 图29示出了AlphaLisa装置中靶向PD-L1的AFN对PD-1/PD-L1相互作用的抑制,其中PD-L1受体珠粒与连续稀释的PD-L1 AFN或阿特鲁单抗一起预孵育,之后添加至供体珠粒中。绘制重复测量的平均AlphaLisa计数±STDEV。

[0061] 图30示出了板结合测定中靶向PD-L1的AFN对CD80/PD-L1相互作用的抑制,其中PD-L1包被的板与连续稀释的PD-L1 AFN一起预孵育,之后添加生物素化的CD80。使用HRP偶联的链霉亲和素和比色过氧化物酶底物测量结合。

[0062] 图31A-图31C描绘了生物层干涉技术(BLI)中PD-L1 VHH AFN对人(图31A)和食蟹猴(图31B)PD-L1的亲和力。在每组图中,在300秒时间点,图上从上到下的点等于从左到右描绘的剂量。图31C是描绘所述亲和力的动力学参数的表格。

[0063] 图32A-图32B示出了生物层干涉技术(BLI)中的2LIG99和2LIG189 VHH表位分类。

[0064] 图33A-图33H描绘了冷冻-解冻循环后PD-L1 AFN变体的稳定性,其中在分析性尺寸确定装置(analytical sizing)(SEC)上分析样品。图33A:2LIG99-IFNa2_R149A;图33B:2LIG189-IFNa2_R149A;图33C:(2LIG99)2-IFNa2_R149A;图33D:(2LIG189)2-IFNa2_R149A;图33E:2LIG99-IFNa1;图33F:2LIG189-IFNa1;图33G:(2LIG99)2-IFNa1;图33H:(2LIG189)2-IFNa1。

[0065] 图34示出了在用PD-L1 VHH AFN治疗后人源化小鼠中的肿瘤生长,其中绘制了每个时间点5-6只动物的中值(以mm3为单位)。

具体实施方式

[0066] 本发明部分地基于识别并结合至PD-L1的结合剂(例如抗体,作为非限制性实例,诸如VHH)的发现。在一些实施方案中,本发明的结合剂是具有一个或多个靶向部分和/或一个或多个信号传导剂的嵌合或融合蛋白的一部分。在各个实施方案中,这些结合剂结合至PD-L1并在功能上调节(例如,部分或完全中和)PD-L1。在一些实施方案中,这些结合剂结合至PD-L1,但不在功能上调节PD-L1。令人惊讶的是,本发明人已发现针对PD-L1的亲本VHH的各种突变可具有如本文所证明的有益特性。

[0067] 本发明还提供了包含所述结合剂的药物组合物以及所述药物组合物在治疗各种疾病,包括癌症、自身免疫性疾病和/或神经退行性疾病中的用途。

[0068] PD-L1结合剂/靶向部分

[0069] 在各个实施方案中,本发明涉及PD-L1结合剂,其是能够特异性地结合至PD-L1的基于蛋白质的剂。在各个实施方案中,PD-L1结合剂是能够特异性地结合至PD-L1而不在功能上调节(例如,部分或完全中和)PD-L1的基于蛋白质的剂。

[0070] 在各个实施方案中,本发明提供了PD-L1结合剂。程序性死亡配体1(PD-L1),也称为分化簇274(CD274)或B7同系物1(B7-H1),是一种据推测在阻抑免疫系统中起主要作用的1型跨膜蛋白。PD-L1响应于LPS和GM-CSF处理在巨噬细胞和树突状细胞(DC)中上调,并且在TCR和B细胞受体进行信号传导时在T细胞和B细胞中上调。

[0071] 在各个实施方案中,本发明的PD-L1结合剂包含具有抗原识别结构域的靶向部分,所述抗原识别结构域识别PD-L1上存在的表位。在一个实施方案中,所述抗原识别结构域识别PD-L1上存在的一个或多个线性表位。如本文所使用,线性表位是指PD-L1上存在的任何连续氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述抗原识别结构域识别PD-L1上存在的一个或多个构象表位。如本文所使用,构象表位是指形成具有能够被抗原识别结构域识别的特征和/或形状和/或三级结构的三维表面的一个或多个氨基酸区段(可能是不连续的)。

[0072] 在各个实施方案中,本发明涉及对包含识别结构域的亲本PD-L1靶向部分的突变,以产生令人惊讶的有益特性。举例来说,在各个实施方案中,本发明的PD-L1靶向部分相对于亲本PD-L1靶向部分具有提高的亲和力。在一些实施方案中,相对于亲本PD-L1靶向部分,所述PD-L1靶向部分具有约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约15倍或约20倍增加的亲和力。在一些实施方案中,相对于亲本PD-L1靶向部分,本发明的PD-L1靶向部分具有约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约15倍或约20倍降低的解离速率。

[0073] 在多个方面，本发明提供了包含识别结构域的PD-L1靶向部分，所述识别结构域包含：(i)三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)，其中(a)CDR1包含选自SEQ ID NO:2或5中任一者的氨基酸序列；(b)CDR2包含选自SEQ ID NO:3或6中任一者的氨基酸序列；并且(c)CDR3包含选自SEQ ID NO:4或7中任一者的氨基酸序列；或(ii)与SEQ ID NO:1具有至少90％序列同一性的氨基酸序列；并且其中(i)或(ii)还在位置D54和G55处包含一个或多个突变，相对于SEQ ID NO:1编号。

[0074] 在多个实施方案中，所述包含识别结构域的PD-L1靶向部分还在位置Q1、Q5、A14、A63、T74、K76、S79、K86和Q110处包含一个或多个突变。

[0075] 在多个实施方案中，突变是取代，任选地其中所述取代是选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基；包括组氨酸(H)的芳香族的极性的且带正电荷的亲水性残基；选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基；选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基；或选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸，或选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸。

[0076] 在多个实施方案中，突变选自以下一项或多项：在位置D54处的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸，任选地是D54G；或选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基，任选地是D54K；或选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基，任选地是D54T；以及在位置G55处的选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基，任选地是G55R。

[0077] 在多个实施方案中，突变选自以下一项或多项：在位置Q1处的选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基，任选地是Q1D；在位置Q5处的选自甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸，任选地是Q5V；在位置A14处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基，任选地是A14P；在位置A63处的选自甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸，任选地是A63V；在位置T74处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基，任选地是T74S；在位置K76处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基，任选地是K76N；在位置S79处的选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸，任选地是S79Y；在位置K86处的精氨酸(R)，为K86R；以及在位置Q110处的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸，任选地是Q110L。

[0078] 在多个实施方案中，突变选自以下一项或多项：Q1D、Q5V、A14P、A63V、T74S、S79Y、K86R和Q110L，任选地是Q1D、Q5V、A14P、D54G、T74S、K76N、S79Y、K86R和Q110L中的全部。

[0079] 在一些方面，本发明涉及包含识别结构域的PD-L1靶向部分，所述识别结构域包含：

[0080] (i)三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)，其中：

[0081] (a)CDR1包含选自SEQ ID NO:2或5中任一者的氨基酸序列;

[0082] (b)CDR2包含选自SEQ ID NO:3或6中任一者的氨基酸序列;并且

[0083] (c)CDR3包含选自SEQ ID NO:4或7中任一者的氨基酸序列;或

[0084] (ii)与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中(i)或(ii)还在位置D54、G55、K76和S79处包含一个或多个突变,相对于SEQ ID NO:1编号。

[0085] 在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:1,所述PD-L1靶向部分还在位置T74、K86和Q110处包含一个或多个突变。在一些实施方案中,所述PD-L1靶向部分具有突变,所述突变是取代,任选地其中所述取代是选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基;包括组氨酸(H)的芳香族的极性的且带正电荷的亲水性残基;选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基;选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基;或选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,或选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸。

[0086] 在一些实施方案中,所述突变选自以下一项或多项:

[0087] ●在位置D54处的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是D54G;或选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基,任选地是D54K;或选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是D54T;

[0088] ●在位置G55处的选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基,任选地是G55R;

[0089] ●在位置T74处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是T74S;

[0090] ●在位置K76处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是K76N;

[0091] ●在位置S79处的选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸,任选地是S79Y;

[0092] ●在位置K86处的精氨酸(R),为K86R;以及

[0093] ●在位置Q110处的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是Q110L。

[0094] 在各个实施方案中,上述突变PD-L1靶向部分(即相对于SEQ ID NO:1公开的那些)相对于亲本PD-L1靶向部分SEQ ID NO:1具有提高的亲和力。

[0095] 在一些方面,本发明的PD-L1靶向部分包括识别结构域,所述识别结构域包含:(i)三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3),其中:

[0096] (a)CDR1包含选自SEQ ID NO:27或30中任一者的氨基酸序列;

[0097] (b)CDR2包含选自SEQ ID NO:28或31中任一者的氨基酸序列;并且

[0098] (c)CDR3包含选自SEQ ID NO:29或32中任一者的氨基酸序列;或

[0099] (ii)与SEQ ID NO:26具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中(i)或(ii)还在位置N32、D33和M97处包含一个或多个突变,相对于SEQ ID NO:26编号。在一些实

施方案中，相对于SEQ ID NO:26，所述PD-L1靶向部分具有突变，所述突变是取代。在一些实施方案中，所述取代是选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基或包括组氨酸(H)的芳香族的极性的且带正电荷的亲水性残基。在一些实施方案中，所述取代是选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基。在一些实施方案中，所述取代是选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基。在一些实施方案中，所述取代是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸或选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸。

[0100] 在一些实施方案中，所述PD-L1靶向部分在位置N32处具有取代，所述取代是选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的正亲水性残基。在一些实施方案中，在位置N32处的取代是选自谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且中性的亲水性残基。在一些实施方案中，相对于SEQ ID NO:26，在位置N32处的取代是N32Q或N32R。

[0101] 在一些实施方案中，相对于SEQ ID NO:26，所述PD-L1靶向部分在位置D33处具有取代，所述取代是D33H。在一些实施方案中，相对SEQ ID NO:26，所述PD-L1靶向部分在位置M97处具有取代，所述取代是选自甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂肪族疏水残基。在一些实施方案中，相对于SEQ ID NO:26，所述PD-L1靶向部分在位置M97处具有取代，所述取代是M97I、M97L或M97V。

[0102] 在多个实施方案中，包含识别结构域的PD-L1靶向部分还包含以下突变中的一者或多者：Q1D、Q5V、A14P、A62S、A74S、M77T、M78V、S79Y、K86R和Q109L，任选地是Q1D、Q5V、A14P、D33H、A62S、A74S、M77T、M78V、K86R、M97V中的全部(相对于SEQ ID NO:26)。

[0103] 在各个实施方案中，上述突变PD-L1靶向部分(即相对于SEQ ID NO:26公开的那些)相对于亲本PD-L1靶向部分SEQ ID NO:26具有提高的亲和力。

[0104] 在一些方面，本发明的PD-L1靶向部分包含与选自SEQ ID NO:1、8-26和33-74的任一氨基酸序列具有至少90％序列同一性的氨基酸序列。

[0105] 在一些实施方案中，本发明的PD-L1靶向部分包括一个或多个另外的识别结构域。在一些实施方案中，这些另外的识别结构域结合至CD8、CD13、CD20、NKp46、Clec9A、Clec4c、PD-1、PD-L1、PD-L2、SIRP1α、FAP、XCR1、肌腱蛋白CA1、Flt3或ECM蛋白。

[0106] 在各个实施方案中，本发明的PD-L1结合剂可以结合至人PD-L1的全长和/或成熟形式和/或同种型和/或剪接变体和/或片段和/或任何其他天然存在的或合成的类似物、变体或突变体。在各个实施方案中，本发明的PD-L1结合剂可以结合至人PD-L1的任何形式。在一个实施方案中，所述PD-L1结合剂结合至PD-L1的磷酰化形式。在一个实施方案中，所述PD-L1结合剂结合至PD-L1的乙酰化形式。

[0107] 在一些实施方案中，所述PD-L1靶向部分识别并任选地在功能上调节肿瘤抗原。在各个实施方案中，所述PD-L1靶向部分识别并任选地在功能上调节免疫细胞上的抗原。所述免疫细胞选自T细胞、B细胞、树突状细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、NK细胞和NKT细胞。在一些实施方案中，本发明的PD-L1靶向部分将细胞毒性T细胞募集至肿瘤细胞或肿瘤环境。

[0108] 在一个实施方案中，本发明的PD-L1结合剂包含具有抗原识别结构域的靶向部分，所述抗原识别结构域识别人PD-L1上存在的一个或多个表位。在一个实施方案中，所述人PD-L1包含以下氨基酸序列(信号肽加下划线)：

[0109] 同种型1：

[0110] MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVV DPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENH TAELVIPELPLAHPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET(SEQ ID NO:75)；

[0111] 同种型2：

[0112] MRIFAVFIFMTYWHLLNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTT NSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFI FRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET(SEQ ID NO:76)；或

[0113] 同种型3：

[0114] MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVV DPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGD(SEQ ID NO:77)。

[0115] 在各个实施方案中，本发明的PD-L1结合剂包含能够特异性结合的靶向部分。在各个实施方案中，所述PD-L1结合剂包含具有抗原识别结构域的靶向部分，诸如抗体或其衍生物。在一个实施方案中，所述PD-L1结合剂包含靶向部分，所述靶向部分是抗体。在各个实施方案中，抗体是包括两条重链和两条轻链的全长多聚体蛋白。每条重链包括一个可变区(例如V_H)和至少三个恒定区(例如CH_1、CH_2和CH_3)，并且每条轻链包括一个可变区(V_L)和一个恒定区(C_L)。可变区决定了抗体的特异性。每个可变区包括由四个相对保守的框架区(FR)侧接的三个高变区，也称为互补性决定区(CDR)。所述三个CDR(称为CDR1、CDR2和CDR3)有助于抗体结合特异性。在一些实施方案中，所述抗体是嵌合抗体。在一些实施方案中，所述抗体是人源化抗体。

[0116] 在一些实施方案中，所述PD-L1结合剂包含靶向部分，所述靶向部分是抗体衍生物或抗体形式。在一些实施方案中，本发明的PD-L1结合剂包含靶向部分，所述靶向部分是单结构域抗体、只有重链的重组抗体(VHH)、单链抗体(scFv)、只有重链的鲨鱼抗体(VNAR)、微量蛋白(半胱氨酸结蛋白、打结素(knottin))、DARPin;四连接素(Tetranectin);Affibody;反式体(Transbody);抗运载蛋白;AdNectin;Affilin;Affimer;微型体(Microbody);适体;奥特瑞斯(alterase);塑性抗体;费洛体(phylomer);斯塔都体(stradobody);巨型体(maxibody);伊维体(evibody);菲诺体(fynomer)、犰狳重复蛋白、库尼茨型结构域(Kunitz domain)、高亲合性多聚体(avimer)、阿特里体(atrimer)、普罗体(probody)、免疫体(immunobody)、曲奥单抗(triomab)、特洛伊体(troybody);佩普体(pepbody);疫苗体(vaccibody)、单特异性体(UniBody);双特异性体(DuoBody)、Fv、Fab、Fab'、F(ab')2、肽模拟分子或合成分子，如以下美国专利号或专利公布号中所描述:US 7,417,130、US 2004/132094、US 5,831,012、US 2004/023334、US 7,250,297、US 6,818,418、US 2004/209243、US 7,838,629、US 7,186,524、US 6,004,746、US 5,475,096、US 2004/146938、US 2004/157209、US 6,994,982、US 6,794,144、US 2010/239633、US 7,803,907、US 2010/119446和/或US 7,166,697，所述专利的内容特此以引用方式整体并入。还参见Storz MAbs.2011年5月-6月;3(3):310-317。

[0117] 在一些实施方案中,所述PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分是单结构域抗体,诸如VHH。所述VHH可以来源于例如产生VHH抗体的生物体,诸如骆驼、鲨鱼,或者所述VHH可以是设计的VHH。VHH是抗体来源的治疗性蛋白质,它们含有天然存在的重链抗体的独特结构和功能性质。VHH技术是基于来自骆驼的缺乏轻链的完全功能抗体。这些重链抗体含有单个可变结构域(V_HH)和两个恒定结构域(CH2和CH3)。

[0118] 在一个实施方案中,所述PD-L1结合剂包含VHH。在一些实施方案中,所述VHH是人源化VHH或骆驼化VHH。

[0119] 在一些实施方案中,所述VHH包含完全人V_H结构域,例如HUMABODY(Crescendo Biologics,Cambridge,UK)。在一些实施方案中,完全人V_H结构域(例如HUMABODY)是单价、二价或三价的。在一些实施方案中,所述完全人V_H结构域(例如HUMABODY)是单特异性或多特异性的,诸如单特异性、双特异性或三特异性的。说明性完全人V_H结构域(例如HUMABODIES)描述于例如WO2016/113555和WO2016/113557中,所述文献的全部内容以引用方式并入。

[0120] 在一些实施方案中,所述PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分是包含具有四个“框架区”或FR和三个“互补决定区”或CDR的单个氨基酸链的VHH。如本文所使用,“框架区”或“FR”是指可变结构域中位于CDR之间的区域。如本文所使用,“互补决定区”或“CDR”是指VHH中含有能够特异性地结合至抗原性靶标的氨基酸序列的可变区。

[0121] 在各个实施方案中,所述PD-L1结合剂包含具有包含至少一个CDR1、CDR2和/或CDR3序列的可变结构域的VHH。在各个实施方案中,所述PD-L1结合剂包含具有包含至少一个FR1、FR2、FR3和FR4序列的可变区的VHH。

[0122] 在一些实施方案中,所述PD-L1结合剂的CDR1序列选自:GTIFSINRMD(SEQ ID NO:2);GTIFS(SEQ ID NO:5);GKIFSGNDMG(SEQ ID NO:27);或GKIFS(SEQ ID NO:30)。

[0123] 在一些实施方案中,所述PD-L1结合剂的CDR2序列选自:LITSDGTPA(SEQ ID NO:3);LITSDGTPAYADSAKG(SEQ ID NO:6);IITSGGITD(SEQ ID NO:28);或IITSGGITDYADAVKG(SEQ ID NO:31)。

[0124] 在一些实施方案中,所述PD-L1结合剂的CDR3序列选自:SSGVYNY(SEQ ID NO:4);SSGVYNY(SEQ ID NO:7);RDRTIW(SEQ ID NO:29);或RDRTIW(SEQ ID NO:32)。

[0125] 在各个示例性实施方案中,所述PD-L1结合剂包含选自以下序列的氨基酸序列:

[0126] ●SEQ ID NO:8-P-1659:2LIG99_OPT1

[0127] (Q1D_Q5V_A14P_T74S_K86R_Q110L)

[0128] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSDGTPAYADSAKGRFTISRDNSKKTVSLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSS

[0129] ●SEQ ID NO:9-P-1660:2LIG99_OPT2

[0130] (Q1D_Q5V_A14P_T23A_T74S_K86R_Q110L)

[0131] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSDGTPAYADSAKGRFTISRDNSKKTVSLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSS

[0132] ●SEQ ID NO:10-P-1661:2LIG99_OPT3

[0133] (Q1D_Q5V_A14P_A63V_T74S_K86R_Q110L)

[0134] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSDGTPAYADSVKGRFTI

SRDNSKKTVSLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSS

[0135] ●SEQ ID NO:11-P-1662:2LIG99_OPT4

[0136] (Q1D_Q5V_A14P_T74S_K76N_K86R_Q110L)

[0137] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSDGTPAYADSAKGRFTI SRDNSKNTVSLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSS

[0138] ●SEQ ID NO:12-P-1663:2LIG99_OPT5

[0139] (Q1D_Q5V_A14P_T74S_S79Y_K86R_Q110L)

[0140] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSDGTPAYADSAKGRFTI SRDNSKKTVYLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSS

[0141] ●SEQ ID NO:13-P-1664:2LIG99_OPT6(Q1D_Q5V_A14P_T23A_A63V_T74S_K76N_ S79Y_K86R_Q110L)

[0142] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSDGTPAYADSAKGRFTI SRDNSKKTVYLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSS

[0143] ●SEQ ID NO:14-P-1665:2LIG99_D54G

[0144] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSGGTPAYADSAKGRFTI SRDNTKKTVSLQMNSLKPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTQVTVSS

[0145] ●SEQ ID NO:15-P-1666:2LIG99_D54K

[0146] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSKGTPAYADSAKGRFTI SRDNTKKTVSLQMNSLKPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTQVTVSS

[0147] ●SEQ ID NO:16-P-1667:2LIG99_D54T

[0148] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSTGTPAYADSAKGRFTI SRDNTKKTVSLQMNSLKPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTQVTVSS

[0149] ●SEQ ID NO:17-P-1668:2LIG99_G55R

[0150] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSDRTPAYADSAKGRFTI SRDNTKKTVSLQMNSLKPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTQVTVSS

[0151] ●SEQ ID NO:18-P-2049:2LIG99_OPT_D54G

[0152] (Q1D_Q5V_A14P_D54G_T74S_K86R_Q110L)

[0153] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSGGTPAYADSAKGRFTI SRDNSKKTVSLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSS

[0154] ●SEQ ID NO:19-P-2050:2LIG99_OPT_D54G_A63V

[0155] (Q1D_Q5V_A14P_D54G_A63V_T74S_K86R_Q110L)

[0156] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSGGTPAYADSVKGRFTI SRDNSKKTVSLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSS

[0157] ●SEQ ID NO:20-P-2051:2LIG99_OPT_D54G_K76N

[0158] (Q1D_Q5V_A14P_D54G_T74S_K76N_K86R_Q110L)

[0159] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSGGTPAYADSAKGRFTI SRDNSKNTVSLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSS

[0160] ●SEQ ID NO:21-P-2052:2LIG99_OPT_D54G_S79Y

[0161] (Q1D_Q5V_A14P_D54G_T74S_S79Y_K86R_Q110L)

[0162] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSGGTPAYADSAKGRFTISRDNSKKTVYLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSS

[0163] ●SEQ ID NO:22-P-2053:2LIG99_OPT_D54G_A63V_K76N

[0164] (Q1D_Q5V_A14P_D54G_A63V_T74S_K76N_K86R_Q110L)

[0165] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSGGTPAYADSVKGRFTISRDNSKNTVSLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSS

[0166] ●SEQ ID NO:23-P-2054:2LIG99_OPT_D54G_A63V_S79Y

[0167] (Q1D_Q5V_A14P_D54G_A63V_T74S_K86R_S97Y_Q110L)

[0168] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSGGTPAYADSVKGRFTISRDNSKKTVYLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSS

[0169] ●SEQ ID NO:24-P-2055:2LIG99_OPT_D54G_K76N_S79Y

[0170] (Q1D_Q5V_A14P_D54G_T74S_K76N_K86R_S79Y_Q110L)

[0171] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSGGTPAYADSAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSS

[0172] ●SEQ ID NO:25-P-2056:2LIG99_OPT_D54G_A63V_K76N_S79Y

[0173] (Q1D_Q5V_A14P_D54G_A63V_T74S_K76N_K86R_S79Y_Q110L)

[0174] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSGGTPAYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSS

[0175] 在各个示例性实施方案中,所述PD-L1结合剂包含的氨基酸序列具有或不具有末端组氨酸标签序列(即,HHHHHH;SEQ ID NO:78)。

[0176] 在一些实施方案中,所述PD-L1结合剂包含的氨基酸序列具有或不具有HA标签(即,YPYDVPDYGS;SEQ ID NO:79)。

[0177] 在一些实施方案中,所述PD-L1结合剂包含的氨基酸序列具有或不具有AAA接头。

[0178] 在一些实施方案中,PD-L1结合剂包含的氨基酸序列具有或不具有AAA接头、HA标签和末端组氨酸标签序列(即,AAAYPYDVPDYGSHHHHHH;SEQ ID NO:80)。

[0179] 在各个实施方案中,本发明设想了如本文所描述的本发明的PD-L1结合剂的任何天然或合成类似物、突变体、变体、等位基因、同系物和直系同源物(本文中统称为“类似物”)的用途。在各个实施方案中,所述PD-L1结合剂的氨基酸序列还包括氨基酸类似物、氨基酸衍生物或其他非经典氨基酸。

[0180] 在各个实施方案中,所述PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分包含与本文所公开的序列中的任一者具有至少60%同一性的序列。举例来说,所述PD-L1结合剂可以包含靶向部分,所述靶向部分包含与本文所公开的序列中的任一者具有至少约60%、至少约61%、至少约62%、至少约63%、至少约64%、至少约65%、至少约66%、至少约67%、至少约68%、至少约69%、至少约70%、至少约71%、至少约72%、至少约73%、至少约74%、至少约75%、至少约76%、至少约77%、至少约78%、至少约79%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、或100%同一性(例如,与本文所公开的序列中的任一者具有约60%、或约61%、或约62%、或约63%、或约64%、或约65%、或约66%、或约

67％、或约68％、或约69％、或约70％、或约71％、或约72％、或约73％、或约74％、或约75％、或约76％、或约77％、或约78％、或约79％、或约80％、或约81％、或约82％、或约83％、或约84％、或约85％、或约86％、或约87％、或约88％、或约89％、或约90％、或约91％、或约92％、或约93％、或约94％、或约95％、或约96％、或约97％、或约98％、约99％或约100％序列同一性)的序列。

[0181] 在各个实施方案中,所述PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分包含相对于本文所公开的序列中的任一者具有一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列。在各个实施方案中,所述PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分包含相对于本文所公开的序列中的任一者具有一个、或两个、或三个、或四个、或五个、或六个、或七个、或八个、或九个、或十个、或十五个、或二十个氨基酸突变的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸突变可以独立地选自取代、插入、缺失和截短。

[0182] 在一些实施方案中,所述氨基酸突变是氨基酸取代,并且可以包括保守和/或非保守取代。

[0183] 可以例如基于在所涉及的氨基酸残基的极性、电荷、大小、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲特性方面的相似性进行“保守取代”。20种天然存在的氨基酸可以分组至以下六个标准氨基酸组中:(1)疏水性:Met、Ala、Val、Leu、Ile;(2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;(3)酸性:Asp、Glu;(4)碱性:His、Lys、Arg;(5)影响链取向的残基:Gly、Pro;以及(6)芳香族:Trp、Tyr、Phe。

[0184] 如本文所使用,“保守取代”定义为以上所示的六个标准氨基酸组中的同一组内所列出的一个氨基酸交换为另一个氨基酸。举例来说,Asp交换为Glu使得经如此修饰的多肽中保留一个负电荷。另外,基于甘氨酸和脯氨酸能够破坏α螺旋,它们可以彼此取代。

[0185] 如本文所使用,“非保守取代”定义为以上所示的六个标准氨基酸组(1)至(6)中的不同组中所列出的一个氨基酸交换为另一个氨基酸。

[0186] 在各个实施方案中,所述取代还可以包括非经典氨基酸。示例性非经典氨基酸总体上包括但不限于硒代半胱氨酸、吡咯赖氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸β-丙氨酸、GABA和δ-氨基乙酰丙酸、4-氨基苯甲酸(PABA)、普通氨基酸的D-异构体、2,4-二氨基丁酸、α-氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、γ-Abu、ε-Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟基脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、磺基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、β-丙氨酸、氟代氨基酸、设计师氨基酸诸如β甲基氨基酸、Cα-甲基氨基酸、Nα-甲基氨基酸和氨基酸类似物。

[0187] 在各个实施方案中,氨基酸突变可以在靶向部分的CDR(例如,CDR1区、CDR2区或CDR3区)中。在另一个实施方案中,氨基酸变化可以在靶向部分的框架区(FR)(例如,FR1区、FR2区、FR3区或FR4区)中。

[0188] 可以使用本领域中的任何已知技术,例如定点诱变或基于PCR的诱变来实现对氨基酸序列的修饰。此类技术描述于例如以下文献中:Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Plainview,N.Y.,1989和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,N.Y.,1989。

[0189] 在各个实施方案中,所述突变基本上不降低本发明的PD-L1结合剂特异性地结合至PD-L1的能力。在各个实施方案中,所述突变基本上不降低本发明的PD-L1结合剂特异性

地结合至PD-L1并且不在功能上调节(例如,部分或完全中和)PD-L1的能力。

[0190] 在各个实施方案中,可以用平衡解离常数(K_D)来描述本发明的PD-L1结合剂对人PD-L1的全长和/或成熟形式和/或同种型和/或剪接变体和/或片段和/或单体和/或二聚体形式和/或任何其他天然存在的或合成的类似物、变体或突变体(包括单体和/或二聚体形式)的结合亲和力。在各个实施方案中,所述PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分结合至人PD-L1的全长和/或成熟形式和/或同种型和/或剪接变体和/或片段和/或任何其他天然存在的或合成的类似物、变体或突变体(包括单体和/或二聚体形式),其中K_D低于约1uM、约900nM、约800nM、约700nM、约600nM、约500nM、约400nM、约300nM、约200nM、约100nM、约90nM、约80nM、约70nM、约60nM、约50nM、约40nM、约30nM、约20nM、约10nM、或约5nM、或约1nM。

[0191] 在各个实施方案中,所述PD-L1结合剂包含靶向部分,所述靶向部分结合目标抗原但不在功能上调节(例如,部分或完全中和)目标抗原,即PD-L1。举例来说,在各个实施方案中,所述PD-L1结合剂的靶向部分仅仅靶向所述抗原但基本上不在功能上调节(例如,部分或完全抑制、降低或中和)所述抗原具有的生物效应。在各个实施方案中,所述PD-L1结合剂的靶向部分结合在物理上与对抗原的生物活性重要的抗原位点(例如,抗原的活性位点)隔开的表位。

[0192] 在各个实施方案中,这些结合剂结合至PD-L1并在功能上调节(例如,部分或完全中和)PD-L1。

[0193] 包含PD-L1靶向部分的治疗剂

[0194] 在各个实施方案中,本发明的PD-L1靶向部分是具有一个或多个靶向剂或信号传导剂的嵌合体或融合物的一部分。因此,本发明提供了包括例如针对PD-L1的靶向部分和一个或多个信号传导剂的嵌合或融合蛋白。在一些实施方案中,本发明提供了一个或多个靶向部分和一个或多个信号传导剂,其中至少一个靶向部分针对PD-L1。

[0195] 在各个实施方案中,所述信号传导剂经过修饰以便对其受体中的一者或多者具有降低的亲和力或活性,从而允许减弱活性(包括激动或拮抗)和/或预防非特异性信号传导或者嵌合或融合蛋白的不理想螯合。在各个实施方案中,所述信号传导剂在其野生型形式下具有拮抗性,并且携带一个或多个减弱其拮抗活性的突变。在各个实施方案中,所述信号传导剂由于一个或多个突变而具有拮抗性,例如激动性信号传导剂被转化成拮抗性信号传导剂,并且任选地,这种经过转化的信号传导剂还携带一个或多个减弱其拮抗活性的突变(例如,如WO2015/007520中所描述,所述文献的全部内容特此以引用方式并入)。

[0196] 因此,在各个实施方案中,所述信号传导剂是具有一个或多个突变的信号传导剂的修饰(例如突变)形式。在各个实施方案中,所述修饰(例如突变)允许经修饰的信号传导剂相对于信号传导剂的未经修饰或未突变,即野生型形式具有一种或多种减弱的活性,诸如降低的结合亲和力、降低的内源活性和降低的特异性生物活性中的一者或多者(例如,比较同一种信号传导剂的野生型形式对比修饰或突变形式)。在一些实施方案中,减弱或降低结合或亲和力的突变包括基本上降低或消除结合或活性的那些突变。在一些实施方案中,减弱或降低结合或亲和力的突变不同于基本上降低或消除结合或活性的那些突变。结果,在各个实施方案中,所述突变允许信号传导剂相对于未突变,即野生型信号传导剂具有提高的安全性,例如,降低的全身毒性、减少的副作用和减少的脱靶效应(例如,比较同一种信号传导剂的野生型形式对比修饰(例如突变)形式)。

[0197] 在一些实施方案中，本发明的靶向部分恢复经修饰的信号传导剂对信号传导剂的受体的亲和力或活性。

[0198] 如本文所描述，该剂由于一个或多个修饰(例如突变)而可以具有提高的安全性。在各个实施方案中，提高的安全性意指本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物提供了较低的毒性(例如全身毒性和/或组织/器官相关毒性)；和/或减轻或基本上消除的副作用；和/或增加的耐受性、减轻或基本上消除的不良事件；和/或减少或基本上消除的脱靶效应；和/或增加的治疗窗。

[0199] 在各个实施方案中，所述信号传导剂经过修饰以具有一个或多个降低其对其受体中的一者或多者的结合亲和力或活性的突变。在一些实施方案中，所述信号传导剂经过修饰以具有一个或多个基本上降低或消除对所述受体的结合亲和力或活性的突变。在一些实施方案中，所述野生型信号传导剂提供的活性是在所述受体处的激动作用(例如，激活治疗部位的细胞效应)。举例来说，所述野生型信号传导剂可以激活其受体。在此类实施方案中，所述突变使得经修饰的信号传导剂在所述受体处的激活活性被降低或消除。举例来说，所述突变可以使得所述经修饰的信号传导剂向靶细胞递送减弱的激活信号，或者可以消除所述激活信号。在一些实施方案中，所述野生型信号传导剂提供的活性是在所述受体处的拮抗作用(例如阻断或阻遏治疗部位的细胞效应)。举例来说，所述野生型信号传导剂可以拮抗或抑制所述受体。在这些实施方案中，所述突变使得所述经修饰的信号传导剂在所述受体处的拮抗活性被降低或消除。举例来说，所述突变可以使得所述经修饰的信号传导剂向靶细胞递送减弱的抑制信号，或者可以消除所述抑制信号。在各个实施方案中，所述信号传导剂由于一个或多个突变而具有拮抗性，例如将激动性信号传导剂转化成拮抗性信号传导剂(例如，如WO 2015/007520中所描述，所述文献的全部内容特此以引用方式并入)，并且任选地，这种经转化的信号传导剂还携带一个或多个降低其对其受体中的一者或多者的结合亲和力或活性，或者基本上降低或消除对其受体中的一者或多者的结合亲和力或活性的突变。

[0200] 在一些实施方案中，所述受体处降低的亲和力或活性可通过与一个或多个如本文所描述的靶向部分(例如，针对PD-L1的靶向部分或本文所描述的任何其他靶向部分)连接而恢复。在其他实施方案中，一个或多个所述靶向部分的活性基本上不能恢复所述受体处被降低的亲和力或活性。

[0201] 在各个实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物减少了脱靶效应，因为它们的信号传导剂具有削弱或消除在受体处的结合亲和力或活性的突变。在各个实施方案中，观察到副作用相对于例如野生型信号传导剂存在这种减少。在各个实施方案中，所述信号传导剂对靶细胞具有活性，因为所述一个或多个靶向部分补偿了实质性激活所需的结合(例如但不限于和/或亲合力)的缺失/不足。在各个实施方案中，所述经修饰的信号传导剂对治疗活性位点的途径基本上无活性，并且其效应基本上针对特异性靶向的细胞类型，从而大大减少了不希望的副作用。

[0202] 在一些实施方案中，所述信号传导剂可以包括一个或多个减弱或减少对一个受体(即，治疗受体)的结合或亲和力的突变以及一个或多个基本上降低或消除第二受体处的结合或活性的突变。在此类实施方案中，这些突变可以处在相同或不同的位置上(即，相同突变或多个突变)。在一些实施方案中，减少一个受体处的结合和/或活性的一个或多个突变

与基本上降低或消除另一个受体处的结合和/或活性的一个或多个突变不同。在一些实施方案中，减少一个受体处的结合和/或活性的一个或多个突变与基本上降低或消除另一个受体处的结合和/或活性的一个或多个突变相同。在一些实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物具有经修饰的信号传导剂，所述经修饰的信号传导剂兼具减弱治疗受体处的结合和/或活性且因此允许更受控制的中靶治疗效果(例如相对于野生型信号传导剂)的突变与基本上降低或消除另一个受体处的结合和/或活性且因此减少副作用(例如相对于野生型信号传导剂)的突变。

[0203] 在一些实施方案中，利用靶向部分(例如，针对PD-L1的靶向部分或本文中所描述的任何其他靶向部分)基本上不能恢复结合或活性的实质性降低或消除。在一些实施方案中，利用靶向部分能恢复结合或活性的实质性降低或消除。在各个实施方案中，基本上降低或消除第二受体处的结合或活性还可以防止另一个受体介导的不利效应。可以选地或另外地，基本上降低或消除另一个受体处的结合或活性改善了治疗效果，因为治疗性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的降低或消除的螯合远离治疗作用位点。举例来说，在一些实施方案中，这就回避了对高剂量的能补偿另一个受体处的损失的本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的需要。这种降低剂量的能力还提供了较低的副作用可能性。

[0204] 在各个实施方案中，所述经修饰的信号传导剂包含一个或多个突变，所述一个或多个突变致使所述信号传导剂对其受体中的一者或多者具有降低、基本上降低或消除的亲和力，例如结合(例如K_D)和/或激活(例如，当所述经修饰的信号传导剂是其受体的激动剂时，可以测量为例如K_A和/或EC_{50})和/或抑制(例如，当所述经修饰的信号传导剂是其受体的拮抗剂时，可以测量为例如K_I和/或IC_{50})。在各个实施方案中，信号传导剂受体处降低的亲和力允许减弱活性(包括激动或拮抗)。在此类实施方案中，相对于野生型信号传导剂，所述经修饰的信号传导剂对受体具有约1％、或约3％、约5％、约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％，或约10％-20％、约20％-40％、约50％、约40％-60％、约60％-80％、约80％-100％的亲和力。在一些实施方案中，相对于所述野生型信号传导剂，所述结合亲和力至少低约2倍、低约3倍、低约4倍、低约5倍、低约6倍、低约7倍、低约8倍、低约9倍、低至少约10倍、低至少约15倍、低至少约20倍、低至少约25倍、低至少约30倍、低至少约35倍、低至少约40倍、低至少约45倍、低至少约50倍、低至少约100倍、低至少约150倍，或低约10-50倍、低约50-100倍、低约100-150倍、低约150-200倍或低超过200倍。

[0205] 在所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含具有降低一个受体处的结合且基本上降低或消除第二受体处的结合的突变的经修饰的信号传导剂的实施方案中，经修饰的信号传导剂对一个受体的结合亲和力的减弱或降低程度低于对另一个受体的亲和力的实质性降低或消除。在一些实施方案中，经修饰的信号传导剂对一个受体的结合亲和力的减弱或降低比对另一个受体的亲和力的实质性降低或消除低约1％、或约3％、约5％、约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％或约95％。在各个实施方案中，实质性降低或消除是指在结合亲和力和/或活性方面存在比减弱或降低更大程度的降低。

[0206] 在各个实施方案中，所述经修饰的信号传导剂包含一个或多个突变，所述一个或多个突变使所述信号传导剂的内源活性例如相对于所述野生型信号传导剂降至约75％、或

约70％、或约60％、或约50％、或约40％、或约30％、或约25％、或约20％、或约10％、或约5％、或约3％、或约1％。

[0207] 在一些实施方案中，所述经修饰的信号传导剂包含一个或多个突变，所述一个或多个突变致使所述信号传导剂对其受体具有降低的亲和力，比所述一个或多个靶向部分对其一个或多个受体的结合亲和力更低。在一些实施方案中，这种结合亲和力差异存在于相同细胞上的信号传导剂/受体与靶向部分/受体之间。在一些实施方案中，这种结合亲和力差异允许所述信号传导剂(例如突变的信号传导剂)具有局部化中靶效应并且使构成在野生型信号传导剂情况下观察到的副作用的基础的脱靶效应最小化。在一些实施方案中，这种结合亲和力低至少约2倍、或至少约5倍、或至少约10倍、或至少约15倍、或低至少约25倍、或至少约50倍、或至少约100倍、或至少约150倍。

[0208] 可以使用本领域中已知的方法来测量受体结合活性。举例来说，可以通过对结合数据进行斯卡查德图分析和计算机拟合(例如Scatchard,1949)或通过如Brecht等人(1993)所描述在流经条件下进行反射干涉光谱法来评定亲和力和/或结合活性，所有文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0209] 在各个实施方案中，所述信号传导剂是免疫调节剂，例如白介素、干扰素和肿瘤坏死因子中的一者或多者，其中任一者任选地被修饰或突变。在一些实施方案中，所述经修饰的信号传导剂选自人：IFNα2、IFNα1、IFNβ、IFNγ、共有干扰素、TNF、TNFR、TGF-α、TGF-β、VEGF、EGF、PDGF、FGF、TRAIL、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-33、IGF-1或EPO。

[0210] 在一些实施方案中，所述信号传导剂是白介素或经修饰的白介素，包括例如IL-1;IL-2;IL-3;IL-4;IL-5;IL-6;IL-7;IL-8;IL-9;IL-10;IL-11;IL-12;IL-13;IL-14;IL-15;IL-16;IL-17;IL-18;IL-19;IL-20;IL-21;IL-22;IL-23;IL-24;IL-25;IL-26;IL-27;IL-28;IL-29;IL-30;IL-31;IL-32;IL-33;IL-35;IL-36或者它们的片段、变体、类似物或家族成员。白介素是由淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞合成的一组多功能细胞因子。已知的功能包括刺激免疫细胞(例如T辅助细胞、B细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞)的增殖、嗜中性粒细胞和T淋巴细胞的趋化性和/或干扰素的抑制。可以使用本领域中已知的测定法来测定白介素活性：Matthews等人,Lymphokines and Interferons:A Practical Approach,Clemens等人编辑,IRL Press,Washington,D.C.1987,第221-225页;以及Orencole和Dinarello(1989)Cytokine 1,14-20。

[0211] 在一些实施方案中，所述信号传导剂是干扰素或干扰素诸如I型干扰素、II型干扰素和III型干扰素的修饰型式。说明性干扰素包括例如干扰素-α-1、干扰素-α-2、干扰素-α-4、干扰素-α-5、干扰素-α-6、干扰素-α-7、干扰素-α-8、干扰素-α-10、干扰素-α-13、干扰素-α-14、干扰素-α-16、干扰素-α-17和干扰素-α-21、干扰素-β以及干扰素-γ、干扰素κ、干扰素ε、干扰素τ和干扰素ω。

[0212] 在一些实施方案中，所述信号传导剂是肿瘤坏死因子(TNF)或者肿瘤坏死因子(TNF)或TNF家族中的蛋白质，包括但不限于TNF-α、TNF-β、LT-β、CD40L、CD27L、CD30L、FASL、4-1BBL、OX40L和TRAIL的修饰型式。

[0213] 本文所描述的野生型信号传导剂的氨基酸序列在本领域中是众所周知的。因此，在各个实施方案中，所述经修饰的信号传导剂包含与本文所描述的信号传导剂的已知野生

型氨基酸序列具有至少约60％、或至少约61％、或至少约62％、或至少约63％、或至少约64％、或至少约65％、或至少约66％、或至少约67％、或至少约68％、或至少约69％、或至少约70％、或至少约71％、或至少约72％、或至少约73％、或至少约74％、或至少约75％、或至少约76％、或至少约77％、或至少约78％、或至少约79％、或至少约80％、或至少约81％、或至少约82％、或至少约83％、或至少约84％、或至少约85％、或至少约86％、或至少约87％、或至少约88％、或至少约89％、或至少约90％、或至少约91％、或至少约92％、或至少约93％、或至少约94％、或至少约95％、或至少约96％、或至少约97％、或至少约98％、或至少约99％序列同一性(例如约60％、或约61％、或约62％、或约63％、或约64％、或约65％、或约66％、或约67％、或约68％、或约69％、或约70％、或约71％、或约72％、或约73％、或约74％、或约75％、或约76％、或约77％、或约78％、或约79％、或约80％、或约81％、或约82％、或约83％、或约84％、或约85％、或约86％、或约87％、或约88％、或约89％、或约90％、或约91％、或约92％、或约93％、或约94％、或约95％、或约96％、或约97％、或约98％、或约99％序列同一性)的氨基酸序列。

[0214] 在各个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含与本文所描述的信号传导剂的任何氨基酸序列具有至少约60％、或至少约61％、或至少约62％、或至少约63％、或至少约64％、或至少约65％、或至少约66％、或至少约67％、或至少约68％、或至少约69％、或至少约70％、或至少约71％、或至少约72％、或至少约73％、或至少约74％、或至少约75％、或至少约76％、或至少约77％、或至少约78％、或至少约79％、或至少约80％、或至少约81％、或至少约82％、或至少约83％、或至少约84％、或至少约85％、或至少约86％、或至少约87％、或至少约88％、或至少约89％、或至少约90％、或至少约91％、或至少约92％、或至少约93％、或至少约94％、或至少约95％、或至少约96％、或至少约97％、或至少约98％、或至少约99％序列同一性(例如约60％、或约61％、或约62％、或约63％、或约64％、或约65％、或约66％、或约67％、或约68％、或约69％、或约70％、或约71％、或约72％、或约73％、或约74％、或约75％、或约76％、或约77％、或约78％、或约79％、或约80％、或约81％、或约82％、或约83％、或约84％、或约85％、或约86％、或约87％、或约88％、或约89％、或约90％、或约91％、或约92％、或约93％、或约94％、或约95％、或约96％、或约97％、或约98％、或约99％序列同一性)的氨基酸序列。

[0215] 在各个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含具有一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸突变可以独立地选自取代、插入、缺失和截短。在一些实施方案中,所述氨基酸突变是氨基酸取代,并且可以包括如本文其他部分所描述的保守和/或非保守取代。

[0216] 在各个实施方案中,所述取代还可以包括如本文其他部分所描述的非经典氨基酸。

[0217] 如本文所描述,所述经修饰的信号传导剂携带影响一个或多个受体处的亲和力和/或活性的突变。在各个实施方案中,存在对治疗受体,例如通过其介导期望的治疗效果(激动或拮抗)的受体的降低的亲和力和/或活性。在各个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂携带基本上降低或消除在受体,例如通过其不介导期望的治疗效果(例如,由于结合的混杂性的结果)的受体处的亲和力和/或活性的突变。如本文所描述的,任何信号传导剂的受体在本领域中是已知的。

[0218] 提供在受体处降低的亲和力和/或活性(例如激动性)的说明性突变见于WO 2013/107791和PCT/EP2017/061544(例如,关于干扰素)、WO 2015/007542(例如,关于白介素)和WO 2015/007903(例如,关于TNF)中,各文献的全部内容特此以引用方式并入。提供在受体处降低的亲和力和/或活性(例如拮抗性)的说明性突变见于WO 2015/007520中,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0219] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含一个或多个突变,所述一个或多个突变致使所述信号传导剂对I型细胞因子受体、II型细胞因子受体、趋化因子受体、肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族中的受体中、TGF-β受体、免疫球蛋白(Ig)超家族中的受体和/或酪氨酸激酶超家族中的受体具有降低的亲和力和/或活性。

[0220] 在各个实施方案中,所述信号传导剂的受体是I型细胞因子受体。I型细胞因子受体在本领域中是已知的,并且包括但不限于IL2(β亚单位)、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL9、IL11、IL12、GM-CSF、G-CSF、LIF、CNTF的受体,以及促血小板生成素(TPO)、催乳素和生长激素的受体。说明性I型细胞因子受体包括但不限于GM-CSF受体、G-CSF受体、LIF受体、CNTF受体、TPO受体和I型IL受体。

[0221] 在各个实施方案中,所述信号传导剂的受体是II型细胞因子受体。II型细胞因子受体是由异源亚单位构成的多聚体受体并且是主要用于干扰素的受体。此受体家族包括但不限于干扰素-α、干扰素-β和干扰素-γ、IL10、IL22和组织因子的受体。说明性II型细胞因子受体包括但不限于IFN-α受体(例如IFNAR1和IFNAR2)、IFN-β受体、IFN-γ受体(例如IFNGR1和IFNGR2)和II型IL受体。

[0222] 在各个实施方案中,所述信号传导剂的受体是G蛋白偶联受体。趋化因子受体是具有七个跨膜结构并与G蛋白偶联以进行信号转导的G蛋白偶联受体。趋化因子受体包括但不限于CC趋化因子受体、CXC趋化因子受体、CX3C趋化因子受体和XC趋化因子受体(XCR1)。示例性趋化因子受体包括但不限于CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR3B、CXCR4、CXCR5、CSCR6、CXCR7、XCR1和CX3CR1。

[0223] 在各个实施方案中,所述信号传导剂的受体是TNFR家族成员。肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族成员共享由围绕CXXCXXC核心基序的三个二硫键形成的富半胱氨酸结构域(CRD),从而形成细长分子。示例性肿瘤坏死因子受体家族成员包括:CD 120a(TNFRSF1A)、CD 120b(TNFRSF1B)、淋巴毒素β受体(LTBR、TNFRSF3)、CD 134(TNFRSF4)、CD40(CD40、TNFRSF5)、FAS(FAS、TNFRSF6)、TNFRSF6B(TNFRSF6B)、CD27(CD27、TNFRSF7)、CD30(TNFRSF8)、CD137(TNFRSF9)、TNFRSF10A(TNFRSF10A)、TNFRSF10B、(TNFRSF10B)、TNFRSF10C(TNFRSF10C)、TNFRSF10D(TNFRSF10D)、RANK(TNFRSFI 1A)、骨保护素(TNFRSF1 IB)、TNFRSF12A(TNFRSF12A)、TNFRSF13B(TNFRSF13B)、TNFRSF13C(TNFRSF13C)、TNFRSF14(TNFRSF14)、神经生长因子受体(NGFR、TNFRSF16)、TNFRSF17(TNFRSF17)、TNFRSF18(TNFRSF18)、TNFRSF19(TNFRSF19)、TNFRSF21(TNFRSF21)和TNFRSF25(TNFRSF25)。在一个实施方案中,所述TNFR家族成员是CD120a(TNFRSF1A)或TNF-R1。在另一个实施方案中,所述TNFR家族成员是CD 120b(TNFRSF1B)或TNF-R2。

[0224] 在各个实施方案中,所述信号传导剂的受体是TGF-β受体。TGF-β受体是单程丝氨酸/苏氨酸激酶受体。TGF-β受体包括但不限于TGFBR1、TGFBR2和TGFBR3。

[0225] 在各个实施方案中,所述信号传导剂的受体是Ig超家族受体。免疫球蛋白(Ig)超

家族中的受体与免疫球蛋白享有结构同源性。Ig超家族中的受体包括但不限于白介素-1受体、CSF-1R、PDGFR(例如PDGFRA和PDGFRB)和SCFR。

[0226] 在各个实施方案中,所述信号传导剂的受体是酪氨酸激酶超家族受体。所述酪氨酸激酶超家族中的受体在本领域中是众所周知的。大约有58种已知的受体酪氨酸激酶(RTK),分为20个亚家族。所述酪氨酸激酶超家族中的受体包括但不限于FGF受体及其各种同种型,诸如FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4和FGFR5。

[0227] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是干扰素α。在此类实施方案中,所述经修饰的IFN-α剂对IFN-α/β受体(IFNAR),即IFNAR1和/或IFNAR2链具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的IFN-α剂对IFN-α/β受体(IFNAR),即IFNAR1和/或IFNAR2链具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0228] 干扰素α的突变形式对本领域技术人员是已知的。在说明性实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是具有氨基酸序列SEQ ID NO:81的等位基因形式IFN-α2a。

[0229] 在说明性实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是具有氨基酸序列SEQ ID NO:82的等位基因形式IFN-α2b(它在氨基酸位置23处与IFN-α2a不同)。

[0230] 在一些实施方案中,所述IFN-α2突变体(IFN-α2a或IFN-α2b)在144-154位的一个或多个氨基酸,诸如氨基酸位置145、148、149和/或153处发生突变。在一些实施方案中,所述IFN-α2突变体包含选自L153A、R149A、M148A和A145G的一个或多个突变。突变体描述于例如WO2013/107791和Piehler等人,(2000)J.Biol.Chem,275:40425-33中,所有文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0231] 在一些实施方案中,所述IFN-α2突变体对IFNAR1具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述IFN-α2突变体包含选自如WO2010/030671中所描述的F64A、N65A、T69A、L80A、Y85A和Y89A的一个或多个突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0232] 在一些实施方案中,所述IFN-α2突变体包含选自如WO2008/124086中所描述的K133A、R144A、R149A和L153A的一个或多个突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0233] 在一些实施方案中,所述IFN-α2突变体包含选自如WO2015/007520和WO2010/030671中所描述的R120E和R120E/K121E的一个或多个突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在此类实施方案中,所述IFN-α2突变体拮抗野生型IFN-α2活性。在此类实施方案中,所述突变IFN-α2对IFNAR1具有降低的亲和力和/或活性,而保留对IFNR2的亲和力和/或活性。

[0234] 在一些实施方案中,所述人IFN-α2突变体包含(1)选自R120E和R120E/K121E的一个或多个突变,不希望受理论束缚,所述突变能产生拮抗效应;和(2)选自K133A、R144A、R149A和L153A的一个或多个突变,不希望受理论束缚,所述突变允许减弱例如IFNAR2处的效应。在一个实施方案中,所述人IFN-α2突变体包含R120E和L153A。

[0235] 在一些实施方案中,所述人IFN-α2突变体包含一个或多个突变,所述一个或多个突变选自如WO 2013/059885中所公开的L15A、A19W、R22A、R23A、L26A、F27A、L30A、L30V、K31A、D32A、R33K、R33A、R33Q、H34A、D35A、Q40A、D114R、L117A、R120A、R125A、K134A、R144A、A145G、A145M、M148A、R149A、S152A、L153A和N156A,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中,所述人IFN-α2突变体包含如WO 2013/059885中所公开的突变

H57Y、E58N、Q61S和/或L30A。在一些实施方案中，所述人IFN-α2突变体包含如WO 2013/059885中所公开的突变H57Y、E58N、Q61S和/或R33A。在一些实施方案中，所述人IFN-α2突变体包含如WO 2013/059885中所公开的突变H57Y、E58N、Q61S和/或M148A。在一些实施方案中，所述人IFN-α2突变体包含如WO 2013/059885中所公开的突变H57Y、E58N、Q61S和/或L153A。在一些实施方案中，所述人IFN-α2突变体包含如WO 2013/059885中所公开的突变N65A、L80A、Y85A和/或Y89A。在一些实施方案中，所述人IFN-α2突变体包含如WO 2013/059885中所公开的突变N65A、L80A、Y85A、Y89A和/或D114A。在一些实施方案中，所述人IFN-α2突变体包含一个或多个选自R144X_1、A145X_2和R33A的突变，其中X_1选自A、S、T、Y、L和I，并且其中X_2选自G、H、Y、K和D。在一些实施方案中，所述信号传导剂是经修饰的IFNα2，所述经修饰的IFNα2相对于氨基酸序列SEQ ID NO:81或82任选地具有R149A突变。

[0236] 在一些实施方案中，所述人IFN-α2突变体在T106处包含突变。在一些实施方案中，T106被A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W或Y取代。

[0237] 在一些实施方案中，所述经修饰的信号传导剂是干扰素α1。在一个实施方案中，所述IFN-α1包含氨基酸序列SEQ ID NO:83或其变体。在一些实施方案中，IFN-α1是经修饰的，即，是变体并且包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述一个或多个突变降低IFN-α1的生物活性。举例来说，所述一个或多个突变可以降低IFN-α1干扰素对治疗受体的亲和力。在一个实施方案中，所述治疗受体是由IFNAR1和IFNAR2亚单位组成的干扰素-α/β受体(IFNAR)。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-α1包含一个或多个降低其对IFNAR1的亲和力的突变。在另一个实施方案中，所述经修饰的IFN-α1包含一个或多个降低其对IFNAR2的亲和力的突变。在一个实施方案中，所述经修饰的IFN-α1包含一个或多个降低其对IFNAR1的亲和力的突变，并且包含一个或多个降低其对IFNAR2的亲和力的突变。在一些实施方案中，所述嵌合蛋白或基于Fc的嵌合蛋白复合物包含一个或多个另外的信号传导剂，例如但不限于可以经过修饰的干扰素、白介素和肿瘤坏死因子。在各个实施方案中，本发明的嵌合蛋白或基于Fc的嵌合蛋白复合物与非靶向IFN-α1或未经修饰的野生型IFN-α(诸如IFN-α1)相比提供提高的安全性和/或治疗活性和/或药代动力学特征(例如，增加的血清半衰期)。

[0238] 在各个实施方案中，所述野生型IFN-α1包含以下氨基酸序列：

[0239] CDLPETHSLDNRRTLMLLAQMSRISPSSCLMDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAPAISVLHELIQQIFNLFTTKDSSAAWDEDLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNADSILAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE(SEQ ID NO:83)。

[0240] 在各个实施方案中，本发明的嵌合蛋白或基于Fc的嵌合蛋白复合物包含IFN-α1的经修饰型式，即IFN-α1变体(包括IFN-α1突变体)作为信号传导剂。在各个实施方案中，所述IFN-α1变体涵盖所述干扰素的突变体、功能性衍生物、类似物、前体、同种型、剪接变体或片段。

[0241] 另外的IFN-α1变体序列在本领域中是已知的。在各个实施方案中，所述经修饰的IFN-α1包含与IFN-α1干扰素变体的任何已知氨基酸序列具有至少约60％、或至少约61％、或至少约62％、或至少约63％、或至少约64％、或至少约65％、或至少约66％、或至少约67％、或至少约68％、或至少约69％、或至少约70％、或至少约71％、或至少约72％、或至少约73％、或至少约74％、或至少约75％、或至少约76％、或至少约77％、或至少约78％、或至少约79％、或至少约80％、或至少约81％、或至少约82％、或至少约83％、或至少约84％、或

至少约85％、或至少约86％、或至少约87％、或至少约88％、或至少约89％、或至少约90％、或至少约91％、或至少约92％、或至少约93％、或至少约94％、或至少约95％、或至少约96％、或至少约97％、或至少约98％、或至少约99％序列同一性(例如约60％、或约61％、或约62％、或约63％、或约64％、或约65％、或约66％、或约67％、或约68％、或约69％、或约70％、或约71％、或约72％、或约73％、或约74％、或约75％、或约76％、或约77％、或约78％、或约79％、或约80％、或约81％、或约82％、或约83％、或约84％、或约85％、或约86％、或约87％、或约88％、或约89％、或约90％、或约91％、或约92％、或约93％、或约94％、或约95％、或约96％、或约97％、或约98％、或约99％序列同一性)的氨基酸序列。

[0242] 在一些实施方案中，相对于SEQ ID NO:83，所述IFN-α1干扰素经过修饰以在位置L15、A19、R23、S25、L30、D32、R33、H34、Q40、C86、D115、L118、K121、R126、E133、K134、K135、R145、A146、M149、R150、S153、L154和N157处的一个或多个氨基酸处具有突变。所述突变可任选地是疏水性突变，并且可以例如选自丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。在一些实施方案中，相对于SEQ ID NO:83，所述IFN-α1干扰素经过修饰以具有一个或多个选自以下的突变：L15A、A19W、R23A、S25A、L30A、L30V、D32A、R33K、R33A、R33Q、H34A、Q40A、C86S、C86A、C86Y、D115R、L118A、K121A、K121E、R126A、R126E、E133A、K134A、K135A、R145A、R145D、R145E、R145G、R145H、R145I、R145K、R145L、R145N、R145Q、R145S、R145T、R145V、R145Y、A146D、A146E、A146G、A146H、A146I、A146K、A146L、A146M、A146N、A146Q、A146R、A146S、A146T、A146V、A146Y、M149A、M149V、R150A、S153A、L154A和N157A。在一些实施方案中，相对于SEQ ID NO:83，所述IFN-α1突变体包含一个或多个选自以下的突变：L30A/H58Y/E59N_Q62S、R33A/H58Y/E59N/Q62S、M149A/H58Y/E59N/Q62S、L154A/H58Y/E59N/Q62S、R145A/H58Y/E59N/Q62S、D115A/R121A、L118A/R121A、L118A/R121A/K122A、R121A/K122A和R121E/K122E。

[0243] 在一个实施方案中，相对于SEQ ID NO:83，所述IFN-α1干扰素经过修饰以在氨基酸位置C86处具有突变。位置C86处的突变可以是例如C86S或C86A。IFN-α1的这些C86突变体被称为基于还原半胱氨酸的聚集突变体。

[0244] 在一些实施方案中，所述经修饰的信号传导剂是干扰素β。在此类实施方案中，所述经修饰的干扰素β剂对IFN-α/β受体(IFNAR)，即IFNAR1和/或IFNAR2链具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中，所述经修饰的干扰素β剂对IFN-α/β受体(IFNAR)，即IFNAR1和/或IFNAR2链具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0245] 在一个实施方案中，所述经修饰的信号传导剂是干扰素β。在此类实施方案中，所述经修饰的干扰素β剂对IFN-α/β受体(IFNAR)，即IFNAR1和/或IFNAR2链具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中，所述经修饰的干扰素β剂对IFN-α/β受体(IFNAR)，即IFNAR1和/或IFNAR2链具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0246] 在说明性实施方案中，所述经修饰的信号传导剂是IFN-β。在各个实施方案中，所述IFN-β涵盖IFN-β的功能性衍生物、类似物、前体、同种型、剪接变体或片段。在各个实施方案中，所述IFN-β涵盖来源于任何物种的IFN-β。在一个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含小鼠IFN-β的经修饰型式。在另一个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含人IFN-β的经修饰型式。人IFN-β是包含166个氨基酸残基的分子量为约22kDa的多肽。人IFN-β的氨基酸序列是SEQ ID NO:84。

[0247] 在一些实施方案中，所述人IFN-β是呈人IFN-β的糖基化形式的IFN-β-1a。在一些

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

[0248] 在各个实施方案中,所述经修饰的IFN-β具有一个或多个突变,所述一个或多个突变降低了所述经修饰的IFN-β对IFNAR的IFNAR1亚单位的结合或亲和力。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β在IFNAR1处具有降低的亲和力和/或活性。在各个实施方案中,所述经修饰的IFN-β是人IFN-β,并且在位置F67、R71、L88、Y92、I95、N96、K123和R124处具有一个或多个突变。在一些实施方案中,所述一个或多个突变是选自F67G、F67S、R71A、L88G、L88S、Y92G、Y92S、I95A、N96G、K123G和R124G的取代。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含F67G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含K123G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含F67G和R71A突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含L88G和Y92G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含Y92G、I95A和N96G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含K123G和R124G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含F67G、L88G和Y92G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含F67S、L88S和Y92S突变。

[0249] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN-β具有一个或多个突变,所述一个或多个突变降低了所述经修饰的IFN-β对IFNAR的IFNAR2亚单位的结合或亲和力。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β在IFNAR2处具有降低的亲和力和/或活性。在各个实施方案中,所述经修饰的IFN-β是人IFN-β,并且在位置W22、R27、L32、R35、V148、L151、R152和Y155处具有一个或多个突变。在一些实施方案中,所述一个或多个突变是选自W22G、R27G、L32A、L32G、R35A、R35G、V148G、L151G、R152A、R152G和Y155G的取代。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含W22G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含L32A突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含L32G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含R35A突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含R35G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含V148G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含R152A突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含R152G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含Y155G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含W22G和R27G突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含L32A和R35A突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含L151G和R152A突变。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-β包含V148G和R152A突变。

[0250] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN-β具有以下突变中的一者或多者:R35A、R35T、E42K、M62I、G78S、A141Y、A142T、E149K和R152H。在一些实施方案中,所述经修饰的IFN-β具有以下突变中的一者或多者:R35A、R35T、E42K、M62I、G78S、A141Y、A142T、E149K和R152H,结合C17S或C17A。

[0251] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN-β具有以下突变中的一者或多者:R35A、R35T、E42K、M62I、G78S、A141Y、A142T、E149K和R152H,结合本文所描述的任何其他IFN-β突变。

[0252] 人IFN-β的晶体结构是已知的,并且描述于Karpusas等人,(1998)PNAS,94(22):11813-11818中。具体而言,已显示人IFN-β的结构包括五个α螺旋(即A、B、C、D和E)和四个连接这些螺旋的环区(即AB、BC、CD和DE环)。在各个实施方案中,所述经修饰的IFN-β在A、B、C、D、E螺旋和/或AB、BC、CD和DE环中具有一个或多个突变,所述一个或多个突变降低了所述经

修饰的IFN-β在治疗受体诸如IFNAR处的结合亲和力或活性。示例性突变描述于WO2000/023114和US20150011732中，所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一个示例性实施方案中，所述经修饰的IFN-β是在氨基酸位置15、16、18、19、22和/或23处包含丙氨酸取代的人IFN-β。在一个示例性实施方案中，所述经修饰的IFN-β是在氨基酸位置28-30、32和33处包含丙氨酸取代的人IFN-β。在一个示例性实施方案中，所述经修饰的IFN-β是在氨基酸位置36、37、39和42处包含丙氨酸取代的人IFN-β。在一个示例性实施方案中，所述经修饰的IFN-β是人IFN-β，所述人IFN-β在氨基酸位置64和67处包含丙氨酸取代并且在位置68处包含丝氨酸取代。在一个示例性实施方案中，所述经修饰的IFN-β是在氨基酸位置71-73处包含丙氨酸取代的人IFN-β。在一个示例性实施方案中，所述经修饰的IFN-β是在氨基酸位置92、96、99和100处包含丙氨酸取代的人IFN-β。在一个示例性实施方案中，所述经修饰的IFN-β是在氨基酸位置128、130、131和134处包含丙氨酸取代的人IFN-β。在一个示例性实施方案中，所述经修饰的IFN-β是在氨基酸位置149、153、156和159处包含丙氨酸取代的人IFN-β。在一些实施方案中，所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在W22处的突变，所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0253] 在一些实施方案中，所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在R27处的突变，所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0254] 在一些实施方案中，所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在W22处的突变，所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基；以及在R27处的突变，所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0255] 在一些实施方案中，所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在L32处的突变，所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0256] 在一些实施方案中，所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在R35处的突变，所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0257] 在一些实施方案中，所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在L32处的突变，所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基；以及在R35处的突变，所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0258] 在一些实施方案中，所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在F67处的突变，所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0259] 在一些实施方案中，所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在R71处的突变，所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0260] 在一些实施方案中，所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在F67处的突变，所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族

疏水性残基;以及在R71处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0261] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在L88处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0262] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在Y92处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0263] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在F67处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在L88处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在Y92处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0264] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在L88处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在Y92处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0265] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在I95处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在Y92处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0266] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在N96处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在Y92处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0267] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在Y92处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在I95处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在N96处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0268] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在K123处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0269] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在R124处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0270] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在K123处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在R124处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0271] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在L151处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0272] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在R152处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0273] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在L151处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在R152处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0274] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在V148处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)和甲硫氨酸(M)的脂族疏水性残基。

[0275] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在V148处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基;以及在R152处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0276] 在一些实施方案中,所述突变IFNβ包含SEQ ID NO:84和在Y155处的突变,所述突变是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的脂族疏水性残基。

[0277] 在一些实施方案中,本发明涉及一种嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含:(a)经修饰的IFN-β,所述经修饰的IFN-β具有氨基酸序列SEQ ID NO:84和在位置W22处的突变,其中所述突变是脂族疏水性残基;和(b)一个或多个靶向部分,所述一个或多个靶向部分包含特异性地结合至目标抗原或受体(例如Clec9A)的识别结构域,所述经修饰的IFN-β和所述一个或多个靶向部分任选地与一个或多个接头连接。在各个实施方案中,在位置W22处的突变是选自G、A、L、I、M和V的脂族疏水性残基。在各个实施方案中,在位置W22处的突变是G。

[0278] 其他示例性IFNβ突变体提供在PCT/EP2017/061544中,所述文献的全部公开内容以引用方式并入本文。

[0279] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是干扰素γ。在此类实施方案中,所述经修饰的干扰素γ剂对干扰素γ受体(IFNGR),即IFNGR1和IFNGR2链具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的干扰素γ剂对干扰素γ受体(IFNGR),即IFNGR1和IFNGR2链具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0280] IFN-γ是II型类干扰素的唯一成员。作为先天免疫应答的一部分,IFN-γ主要由自然杀伤(NK)和自然杀伤T(NKT)细胞产生。CD4 Th1和CD8细胞毒性T淋巴细胞(CTL)效应T细胞、巨噬细胞、树突状细胞和B细胞也产生IFN-γ。激活的IFN-γ形成二聚体,所述二聚体通过由IFN-γ受体1和IFN-γ受体2亚单位构成的异二聚体受体(即,IFN-γ受体或IFN-γR)起作用。IFN-γ受体1是主要的配体结合亚单位,而IFN-γ受体2是信号转导所必需的,并且还增加了IFN-γ受体1对它的配体的亲和力。IFN-γ二聚体与受体的结合激活了JAK-

STAT信号传导途径,从而引发各种生物效应。

[0281] 在各个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含IFN-γ的修饰型式作为信号传导剂。在各个实施方案中,所述IFN-γ涵盖IFN-γ的功能性衍生物、类似物、前体、同种型、剪接变体或片段。在各个实施方案中,所述IFN-γ涵盖来源于任何物种的IFN-γ。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含小鼠IFN-γ的修饰型式。在另一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂包含人IFN-γ的修饰型式。

[0282] 人IFN-γ是包含166个氨基酸残基的多肽。在一个实施方案中,所述人IFN-γ具有氨基酸序列SEQ ID NO:85,其中信号肽包含前23个氨基酸。

[0283] MKYTSYILAFQLCIVLGSLGCYCQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKRSQMLFRGRRASQ(SEQ ID NO:85;N端信号肽加下划线)。

[0284] 如本文所使用,人IFN-γ还可以指没有N端信号肽的成熟人IFN-γ。在该实施方案中,所述成熟的人IFN-γ包含143个氨基酸并具有氨基酸序列:

[0285] QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKRSQMLFRGRRASQ(SEQ ID NO:86)。

[0286] 在一些实施方案中,所述人IFN-γ是人IFN-γ的糖基化形式。在一些实施方案中,所述人IFN-γ是人IFN-γ的非糖基化形式。

[0287] IFN-γ的序列在本领域中是已知的。在各个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ包含与IFN-γ的已知野生型氨基酸序列具有至少约60%、或至少约61%、或至少约62%、或至少约63%、或至少约64%、或至少约65%、或至少约66%、或至少约67%、或至少约68%、或至少约69%、或至少约70%、或至少约71%、或至少约72%、或至少约73%、或至少约74%、或至少约75%、或至少约76%、或至少约77%、或至少约78%、或至少约79%、或至少约80%、或至少约81%、或至少约82%、或至少约83%、或至少约84%、或至少约85%、或至少约86%、或至少约87%、或至少约88%、或至少约89%、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%同一性(例如约60%、或约61%、或约62%、或约63%、或约64%、或约65%、或约66%、或约67%、或约68%、或约69%、或约70%、或约71%、或约72%、或约73%、或约74%、或约75%、或约76%、或约77%、或约78%、或约79%、或约80%、或约81%、或约82%、或约83%、或约84%、或约85%、或约86%、或约87%、或约88%、或约89%、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%序列同一性)的氨基酸序列。

[0288] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN-γ包含与具有氨基酸序列SEQ ID NO:85的人IFN-γ具有至少约60%、或至少约61%、或至少约62%、或至少约63%、或至少约64%、或至少约65%、或至少约66%、或至少约67%、或至少约68%、或至少约69%、或至少约70%、或至少约71%、或至少约72%、或至少约73%、或至少约74%、或至少约75%、或至少约76%、或至少约77%、或至少约78%、或至少约79%、或至少约80%、或至少约81%、或至少约82%、或至少约83%、或至少约84%、或至少约85%、或至少约86%、或至少约87%、或至少约88%、或至少约89%、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或

至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%同一性(例如约60%、或约61%、或约62%、或约63%、或约64%、或约65%、或约66%、或约67%、或约68%、或约69%、或约70%、或约71%、或约72%、或约73%、或约74%、或约75%、或约76%、或约77%、或约78%、或约79%、或约80%、或约81%、或约82%、或约83%、或约84%、或约85%、或约86%、或约87%、或约88%、或约89%、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%序列同一性)的氨基酸序列。

[0289] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN-γ包含与具有氨基酸序列SEQ ID NO:86的人IFN-γ具有至少约60%、或至少约61%、或至少约62%、或至少约63%、或至少约64%、或至少约65%、或至少约66%、或至少约67%、或至少约68%、或至少约69%、或至少约70%、或至少约71%、或至少约72%、或至少约73%、或至少约74%、或至少约75%、或至少约76%、或至少约77%、或至少约78%、或至少约79%、或至少约80%、或至少约81%、或至少约82%、或至少约83%、或至少约84%、或至少约85%、或至少约86%、或至少约87%、或至少约88%、或至少约89%、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%同一性(例如约60%、或约61%、或约62%、或约63%、或约64%、或约65%、或约66%、或约67%、或约68%、或约69%、或约70%、或约71%、或约72%、或约73%、或约74%、或约75%、或约76%、或约77%、或约78%、或约79%、或约80%、或约81%、或约82%、或约83%、或约84%、或约85%、或约86%、或约87%、或约88%、或约89%、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%序列同一性)的氨基酸序列。

[0290] 在各个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ包含具有一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸突变可以独立地选自取代、插入、缺失和截短。

[0291] 在一些实施方案中,所述氨基酸突变是氨基酸取代,并且可以包括保守和/或非保守取代。

[0292] 可以例如基于在所涉及的氨基酸残基的极性、电荷、大小、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲特性方面的相似性进行“保守取代”。20种天然存在的氨基酸可以分组至以下六个标准氨基酸组中:(1)疏水性:Met、Ala、Val、Leu、Ile;(2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;(3)酸性:Asp、Glu;(4)碱性:His、Lys、Arg;(5)影响链取向的残基:Gly、Pro;以及(6)芳香族:Trp、Tyr、Phe。

[0293] 如本文所使用,“保守取代”定义为以上所示的六个标准氨基酸组中的同一组内所列出的一个氨基酸交换为另一个氨基酸。举例来说,Asp交换为Glu使得经如此修饰的多肽中保留一个负电荷。另外,基于甘氨酸和脯氨酸能够破坏α螺旋,它们可以彼此取代。

[0294] 如本文所使用,“非保守取代”定义为以上所示的六个标准氨基酸组(1)至(6)中的不同组中所列出的一个氨基酸交换为另一个氨基酸。

[0295] 在各个实施方案中,所述取代还可以包括非经典氨基酸(总体上例如硒代半胱氨酸、吡咯赖氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸β-丙氨酸、GABA和δ-氨基乙酰丙酸、4-氨基苯甲酸(PABA)、普通氨基酸的D-异构体、2,4-二氨基丁酸、α-氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基

丁酸、γ-Abu、ε-Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟基脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、磺基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、β-丙氨酸、氟代氨基酸、设计师氨基酸诸如β甲基氨基酸、Cα-甲基氨基酸、Nα-甲基氨基酸和氨基酸类似物)。

[0296] 在各个实施方案中,所述IFN-γ经过修饰以具有一个或多个突变。在一些实施方案中,所述突变允许所述经修饰的IFN-γ相对于IFN-γ的未突变(例如野生型)形式具有一种或多种减弱的活性,诸如降低的结合亲和力、降低的内源活性和降低的特异性生物活性中的一者或多者。例如,相对于IFN-γ的未突变(例如野生型)形式,所述一种或多种减弱的活性,诸如降低的结合亲和力、降低的内源活性和降低的特异性生物活性可以处在治疗受体诸如IFN-γ受体处。结果,在各个实施方案中,所述突变允许所述经修饰的可溶性剂相对于IFN-γ的未突变(例如野生型)形式具有降低的全身毒性、减少的副作用和减少的脱靶效应。

[0297] 在各个实施方案中,所述IFN-γ经过修饰以具有降低其在治疗受体诸如包括IFN-γ受体1和IFN-γ受体2亚单位在内的IFN-γ受体处的结合亲和力和/或活性的突变。在一些实施方案中,所述野生型IFN-γ提供的活性是在所述治疗受体处的激动作用(例如,激活治疗部位的细胞效应)。例如,所述野生型IFN-γ可以激活治疗受体。在此类实施方案中,所述突变使得所述经修饰的IFN-γ在所述治疗受体处的激活活性被降低。

[0298] 在一些实施方案中,与靶向部分连接能恢复所述治疗受体(例如,IFN-γ受体)处被降低的亲和力和/或活性。在其他实施方案中,与靶向部分连接基本上不能恢复所述治疗受体处被降低的亲和力和/或活性。在各个实施方案中,本发明的治疗性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物减少了脱靶效应,因为所述IFN-γ具有削弱在治疗受体处的结合亲和力和/或活性的突变。在各个实施方案中,观察到副作用相对于例如野生型IFN-γ存在这种减少。在各个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ对治疗活性位点的途径基本上无活性,并且其效应基本上针对特异性靶向的细胞类型,从而大大减少了不希望的副作用。

[0299] 在各个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ具有一个或多个突变,所述一个或多个突变致使所述IFN-γ对一种或多种治疗受体(例如,IFN-γ受体)具有减弱或降低的亲和力和/或活性,例如,结合(例如KD)和/或激活(可测量为例如KA和/或EC50)。在各个实施方案中,治疗受体处降低的亲和力和/或活性允许减弱来自治疗受体的活性和/或信号传导。

[0300] 在各个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ具有一个或多个突变,所述一个或多个突变降低了所述经修饰的IFN-γ对IFN-γ受体1亚单位的结合或亲和力和/或生物活性。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ在IFN-γ受体1亚单位处具有降低的亲和力和/或活性。在各个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ是人IFN-γ,所述人IFN-γ在涉及与IFN-γ受体1亚单位结合的氨基酸残基处具有一个或多个突变。在一些实施方案中,所述经修饰的IFN-γ是人IFN-γ,所述人IFN-γ在位于与IFN-γ受体1亚单位的界面处的氨基酸处具有一个或多个突变。在各个实施方案中,所述一个或多个突变处在选自但不限于以下的氨基酸处:Q1、V5、E9、K12、H19、S20、V22、A23、D24、N25、G26、T27、L30、K108、H111、E112、I114、Q115、A118、E119和K125(各自相对于SEQ ID NO:86,它是野生型人IFN-γ,并且缺少其N端信号序列)。在一些实施方案中,所述一个或多个突变是选自V5E、S20E、V22A、A23G、A23F、D24G、G26Q、H111A、H111D、I114A、Q115A和A118G(各自相对于SEQ ID NO:86)的取代。在实施

方案中,所述一个或多个突变是选自V22A、A23G、D24G、H111A、H111D、I114A、Q115A和A118G的取代。

[0301] 在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ包含突变A23G和D24G。在另一个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ包含突变I114A和A118G。在另一个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ包含突变V5E、S20E、A23F和G26Q。

[0302] 在各个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ具有以下突变中的一者或多者:残基A23的缺失、残基D24的缺失、S20I取代、A23V取代、D21K取代和D24A取代。

[0303] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN-γ具有一个或多个突变,所述一个或多个突变降低了所述经修饰的IFN-γ对IFN-γ受体2亚单位的结合或亲和力和/或生物活性。

[0304] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN-γ具有一个或多个突变,所述一个或多个突变降低了所述经修饰的IFN-γ对IFN-γ受体1和IFN-γ受体2亚单位的结合或亲和力和/或生物活性。

[0305] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN-γ具有一个或多个降低其对IFN-γ受体1的结合或亲和力和/或生物活性的突变和一个或多个基本上降低或消除其对IFN-γ受体2的结合或亲和力和/或生物活性的突变。在一些实施方案中,具有这种经修饰的IFN-γ的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以提供靶标选择性IFN-γ受体1活性(例如,经由通过靶向部分进行的靶向能恢复IFN-γ受体1活性)。

[0306] 在一些实施方案中,所述经修饰的IFN-γ具有一个或多个降低其对IFN-γ受体1的结合或亲和力和/或生物活性的突变和一个或多个降低其对IFN-γ受体1的结合或亲和力和/或生物活性的突变。在一些实施方案中,具有这种经修饰的IFN-γ的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以提供靶标选择性IFN-γ受体1和/或IFN-γ受体1活性(例如,经由通过靶向部分进行的靶向能恢复IFN-γ受体1和IFN-γ受体2活性)。

[0307] 在各个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ在C端被截短。在一些实施方案中,所述经修饰的IFN-γ是成熟IFN-γ,所述成熟IFN-γ包含具有C端缺失的氨基酸序列SEQ ID NO:86。在此类实施方案中,所述成熟IFN-γ可以包含至少约1个、约2个、约3个、约4个、约5个、约6个、约7个、约8个、约9个、约10个、约11个、约12个、约13个、约14个、约15个、约16个、约17个、约18个、约19个、约20个、约21个、约22个、约23个、约24、或约25个氨基酸残基的C端截短。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ是成熟IFN-γ,所述成熟IFN-γ包含具有5个氨基酸的C端缺失的氨基酸序列SEQ ID NO:86。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ是成熟IFN-γ,所述成熟IFN-γ包含具有7个氨基酸的C端缺失的氨基酸序列SEQ ID NO:86。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ是成熟IFN-γ,所述成熟IFN-γ包含具有14个氨基酸的C端缺失的氨基酸序列SEQ ID NO:86。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ是成熟IFN-γ,所述成熟IFN-γ包含具有15个氨基酸的C端缺失的氨基酸序列SEQ ID NO:86。在一个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ是成熟IFN-γ,所述成熟IFN-γ包含具有16个氨基酸的C端缺失的氨基酸序列SEQ ID NO:86。可用于本发明的具有C端截短的另外的经修饰的IFN-γ描述于Haelewyn等人,Biochem.J.(1997),324:591-595和Lundell等人,Protein Eng.(1991)4:335-341,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0308] 在各个实施方案中,所述经修饰的IFN-γ是如例如在Randal等人(2001)Structure 9:155-163和Randal等人(1998)Protein Sci.7:1057-1060中所描述的单链

IFN-γ，所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中，所述单链IFN-γ包含第一IFN-γ链，所述第一IFN-γ链在其C端连接至第二IFN-γ链的N端。在各个实施方案中，所述第一IFN-γ链和第二IFN-γ链通过如本文其他部分所描述的接头连接。

[0309] 在一些实施方案中，所述第一IFN-γ链包含至少约1个、约2个、约3个、约4个、约5个、约6个、约7个、约8个、约9个、约10个、约11个、约12个、约13个、约14个、约15个、约16个、约17个、约18个、约19个、约20个、约21个、约22个、约23个、约24、或约25个氨基酸残基的C端截短。在一个实施方案中，所述第一IFN-γ链包含约24个氨基酸残基的C端截短。在一些实施方案中，所述第二IFN-γ链包含至少约1个、约2个、约3个、约4个或约5个氨基酸残基的N端截短。在一个实施方案中，所述第二IFN-γ链包含约3个氨基酸残基的N端截短。在一些实施方案中，所述第二IFN-γ链包含至少约1个、约2个、约3个、约4个、约5个、约6个、约7个、约8个、约9个、约10个、约11个、约12个、约13个、约14个、约15个、约16个、约17个、约18个、约19个、约20个、约21个、约22个、约23个、约24、或约25个氨基酸残基的C端截短。在各个实施方案中，如本文其他部分所描述，所述第一IFN-γ链和/或所述第二IFN-γ链在Q1、V5、E9、K12、H19、S20、V22、A23、D24、N25、G26、T27、L30、K108、H111、E112、I114、Q115、A118、E119和K125处包含一个或多个氨基酸突变。在各个实施方案中，所述第一IFN-γ链和/或所述第二IFN-γ链包含一个或多个选自以下的取代：V5E、S20E、V22A、A23G、A23F、D24G、G26Q、H111A、H111D、I114A、Q115A和A118G。在各个实施方案中，所述第一IFN-γ链和/或所述第二IFN-γ链包含一个或多个选自以下的取代：V22A、A23G、D24G、H111A、H111D、I114A、Q115A和A118G。在各个实施方案中，所述第一IFN-γ链和/或所述第二IFN-γ链包含A23G和D24G取代。在各个实施方案中，所述第一IFN-γ链和/或所述第二IFN-γ链包含I114A和A118G取代。在另一个实施方案中，所述突变是V5E、S20E、A23F和G26Q。

[0310] 在各个实施方案中，所述第一IFN-γ链和/或所述第二IFN-γ链包含一个或多个如本文所公开的取代，并且所述第一IFN-γ链和/或所述第二IFN-γ链包含如本文所公开的C端截短。

[0311] 在各个实施方案中，所述第一IFN-γ链和/或所述第二IFN-γ链包含如本文所公开的一个或多个取代和如本文所公开的C端截短。

[0312] 人IFN-γ的晶体结构是已知的，并且描述于例如Ealick等人，(1991)Science，252:698-702中。具体而言，已显示人IFN-γ的结构包括六个α螺旋的核心和在C端区域的延伸的未折叠序列。在各个实施方案中，所述经修饰的IFN-γ在所述一个或多个螺旋中具有一个或多个突变，所述一个或多个突变降低了所述经修饰的IFN-γ在治疗受体(例如IFN-γ受体)处的结合亲和力和/或生物活性。

[0313] 在各个实施方案中，所述经修饰的IFN-γ相对于野生型IFN-γ对治疗受体(例如IFN-γ受体或其IFN-γ受体1和IFN-γ受体2亚单位中的任一者)具有约1％、或约3％、约5％、约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％，或约10％-20％、约20％-40％、约50％、约40％-60％、约60％-80％、约80％-100％的亲和力和/或生物活性。在一些实施方案中，相对于所述野生型IFN-γ，所述结合亲和力和/或生物活性至少低约2倍、低约3倍、低约4倍、低约5倍、低约6倍、低约7倍、低约8倍、低约9倍、低至少约10倍、低至少约15倍、低至少约20倍、低至少约25倍、低至少约30倍、低至少约35倍、低至少约40倍、低至少约45倍、低至

少约50倍、低至少约100倍、低至少约150倍，或低约10-50倍、低约50-100倍、低约100-150倍、低约150-200倍或低超过200倍。

[0314] 在各个实施方案中，所述经修饰的IFN-γ包含一个或多个突变，所述一个或多个突变使所述IFN-γ的内源活性例如相对于所述野生型IFN-γ降至约75％、或约70％、或约60％、或约50％、或约40％、或约30％、或约25％、或约20％、或约10％、或约5％、或约3％、或约1％。

[0315] 在一些实施方案中，所述经修饰的IFN-γ包含一个或多个突变，所述一个或多个突变致使所述经修饰的IFN-γ对受体具有降低的亲和力和/或生物活性。在一些实施方案中，所述经修饰的IFN-γ对受体的结合亲和力和/或生物活性低于靶向部分对其受体的结合亲和力和/或生物活性。在一些实施方案中，这种结合亲和力和/或生物活性差异存在于相同细胞上的经修饰的IFN-γ/受体与靶向部分/受体之间。在一些实施方案中，这种结合亲和力和/或生物活性差异允许所述经修饰的IFN-γ具有局部化中靶效应并且使构成在野生型IFN-γ情况下观察到的副作用的基础的脱靶效应最小化。在一些实施方案中，所述结合亲和力和/或生物活性低至少约2倍、或至少约5倍、或至少约10倍、或至少约15倍、或低至少约25倍、或至少约50倍、或至少约100倍、或至少约150倍。

[0316] 可以使用本领域中已知的方法来测量受体结合活性。举例来说，可以通过对结合数据进行斯卡查德图分析和计算机拟合(例如Scatchard,1949)或通过如Brecht等人(1993)所描述在流经条件下进行反射干涉光谱法来评定亲和力和/或结合活性，所有文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0317] 在一些实施方案中，所述经修饰的信号传导剂是共有干扰素。通过扫描几种人非等位基因IFN-α亚型的序列并且在每个相应位置分配最常观察到的氨基酸，可以生成共有干扰素。所述共有干扰素在166个氨基酸中有20个氨基酸与IFN-α2b不同(88％同源性)，并且与IFN-β比较显示在30％以上的氨基酸位置具有同一性。在各个实施方案中，所述共有干扰素包含以下氨基酸序列SEQ ID NO:87。

[0318] 在一些实施方案中，所述共有干扰素包含氨基酸序列SEQ ID NO:88，该氨基酸序列与氨基酸序列SEQ ID NO:87相差一个氨基酸，即，SEQ ID NO:88缺少SEQ ID NO:87的起始甲硫氨酸残基。

[0319] 在各个实施方案中，所述共有干扰素包括所述共有干扰素的经修饰型式，即共有干扰素变体，作为信号传导剂。在各个实施方案中，所述共有干扰素涵盖所述共有干扰素的功能性衍生物、类似物、前体、同种型、剪接变体或片段。

[0320] 在一个实施方案中，所述共有干扰素变体选自美国专利号4,695,623、4,897,471、5,541,293和8,496,921中所公开的共有干扰素变体，所有这些文献的全部内容特此以引用方式并入。例如，所述共有干扰素变体可以包含如美国专利号4,695,623、4,897,471和5,541,293中所公开的IFN-CON_2或IFN-CON_3的氨基酸序列。在一个实施方案中，所述共有干扰素变体包含氨基酸序列IFN-CON_2(SEQ ID NO:89)。

[0321] 在一个实施方案中，所述共有干扰素变体包含氨基酸序列IFN-CON_3(SEQ ID NO:90)。

[0322] 在一个实施方案中，所述共有干扰素变体包含美国专利号8,496,921中所公开的任一变体的氨基酸序列。例如，所述共有变体可以包含氨基酸序列SEQ ID NO:91。

[0323] 在另一个实施方案中,所述共有干扰素变体可以包含氨基酸序列SEQ ID NO:92。

[0324] 在一些实施方案中,所述共有干扰素变体可以是PEG化的,即包含PEG部分。在一个实施方案中,所述共有干扰素变体可以包含连接在SEQ ID NO:92的S156C位置处的PEG部分。

[0325] 在一些实施方案中,工程化干扰素是人IFN-α2a的变体,在序列Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln(SEQ ID NO:93)的约41位插入Asp产生了Glu-Glu-Phe-Asp-Gly-Asn-Gln(SEQ ID NO:94)(这导致相对于IFN-α2a序列,序列的重新编号)和以下突变:Arg23Lys、Leu26Pro、Glu53Gln、Thr54Ala、Pro56Ser、Asp86Glu、Ile104Thr、Gly106Glu、Thr110Glu、Lys117Asn、Arg125Lys和Lys136Thr。本文中描述共有干扰素的所有实施方案均等同地应用于该工程化干扰素。

[0326] 在各个实施方案中,所述共有干扰素变体包含具有一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸突变可以独立地选自取代、插入、缺失和截短。

[0327] 在一些实施方案中,所述氨基酸突变是氨基酸取代,并且可以包括保守和/或非保守取代。

[0328] 在各个实施方案中,所述取代还可以包括非经典氨基酸(总体上例如硒代半胱氨酸、吡咯赖氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸β-丙氨酸、GABA和δ-氨基乙酰丙酸、4-氨基苯甲酸(PABA)、普通氨基酸的D-异构体、2,4-二氨基丁酸、α-氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、γ-Abu、ε-Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟基脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、磺基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、β-丙氨酸、氟代氨基酸、设计师氨基酸诸如β甲基氨基酸、Cα-甲基氨基酸、Nα-甲基氨基酸和氨基酸类似物)。

[0329] 在各个实施方案中,所述共有干扰素经过修饰以具有一个或多个突变。在一些实施方案中,所述突变允许所述共有干扰素变体相对于所述共有干扰素(例如,具有氨基酸序列SEQ ID NO:87或88的共有干扰素)的未突变(例如野生型)形式具有一种或多种减弱的活性,诸如降低的结合亲和力、降低的内源活性和降低的特异性生物活性中的一者或多者。举例来说,相对于所述共有干扰素的未突变(例如野生型)形式,所述一种或多种减弱的活性,诸如降低的结合亲和力、降低的内源活性和降低的特异性生物活性可以处在治疗受体诸如IFNAR处。结果,在各个实施方案中,所述突变允许所述共有干扰素变体相对于所述共有干扰素的未突变(例如野生型)形式具有降低的全身毒性、减少的副作用和减少的脱靶效应。

[0330] 在各个实施方案中,所述共有干扰素经过修饰以具有降低其对治疗受体诸如IFNAR的结合亲和力或活性的突变。在一些实施方案中,所述共有干扰素提供的活性是在所述治疗受体处的激动作用(例如,激活治疗部位的细胞效应)。例如,所述共有干扰素可以激活治疗受体。在此类实施方案中,所述突变使得所述共有干扰素变体在所述治疗受体处的激活活性被降低。

[0331] 在一些实施方案中,与靶向部分连接能恢复所述治疗受体处被降低的亲和力或活性(例如PD-L1)。在其他实施方案中,与靶向部分连接基本上不能恢复所述治疗受体处被降低的亲和力或活性。在各个实施方案中,本发明的治疗性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物减少了脱靶效应,因为所述共有干扰素变体具有削弱在治疗受体处的结合亲和力或活性的突

变。在各个实施方案中，观察到副作用相对于例如野生型共有干扰素存在这种减少。在各个实施方案中，所述共有干扰素变体对治疗活性位点的途径基本上无活性，并且其效应基本上针对特异性靶向的细胞类型，从而大大减少了不希望的副作用。

[0332] 在各个实施方案中，所述共有干扰素变体具有一个或多个突变，所述一个或多个突变致使所述共有干扰素变体对一种或多种治疗受体具有减弱或降低的亲和力，例如，结合(例如K_D)和/或激活(可以测量为例如K_A和/或EC_{50})。在各个实施方案中，治疗受体处降低的亲和力允许减弱来自治疗受体的活性和/或信号传导。

[0333] 在各个实施方案中，所述共有干扰素变体具有一个或多个突变，所述一个或多个突变降低了所述共有干扰素变体对IFNAR的IFNAR1亚单位的结合或亲和力。在一个实施方案中，所述共有干扰素变体在IFNAR1处具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中，所述共有干扰素变体具有一个或多个突变，所述一个或多个突变降低了所述共有干扰素变体对IFNAR的IFNAR2亚单位的结合或亲和力。在一些实施方案中，所述共有干扰素变体具有一个或多个突变，所述一个或多个突变降低了所述共有干扰素变体对IFNAR1和IFNAR2亚单位的结合或亲和力。

[0334] 在一些实施方案中，所述共有干扰素变体具有一个或多个降低其对IFNAR1的结合或亲和力的突变和一个或多个基本上降低或消除其对IFNAR2的结合或亲和力的突变。在一些实施方案中，具有这种共有干扰素变体的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以提供靶标选择性IFNAR1活性(例如，经由通过靶向部分(例如PD-L1)进行的靶向能恢复IFNAR1活性)。

[0335] 在一些实施方案中，所述共有干扰素变体具有一个或多个降低其对IFNAR2的结合或亲和力的突变和一个或多个基本上降低或消除其对IFNAR1的结合或亲和力的突变。在一些实施方案中，具有这种共有干扰素变体的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以提供靶标选择性IFNAR2活性(例如，经由通过靶向部分(例如PD-L1)进行的靶向能恢复IFNAR2活性)。

[0336] 在一些实施方案中，所述共有干扰素变体具有一个或多个降低其对IFNAR1的结合或亲和力的突变和一个或多个基本上降低其对IFNAR2的结合或亲和力的突变。在一些实施方案中，具有这种共有干扰素变体的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以提供靶标选择性IFNAR1和/或IFNAR2活性(例如，经由通过靶向部分(例如PD-L1)进行的靶向能恢复IFNAR1和/或IFNAR2活性)。

[0337] 在一些实施方案中，相对于SEQ ID NO:88，所述共有干扰素经过修饰以在145-155位的一个或多个氨基酸(诸如氨基酸位置149、150和/或154)处具有突变。在一些实施方案中，相对于SEQ ID NO:88，所述共有干扰素经过修饰以在145-155位的一个或多个氨基酸(诸如氨基酸位置149、150和/或154)处具有突变，所述取代任选地是疏水性的并且选自丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。在一些实施方案中，所述共有干扰素突变体包含一个或多个选自M149A、R150A和L154A且相对于SEQ ID NO:88的突变。

[0338] 在一个实施方案中，相对于SEQ ID NO:88，所述共有干扰素经过修饰以在氨基酸位置121(即，K121)处具有突变。在一个实施方案中，相对于SEQ ID NO:88，所述共有干扰素包含K121E突变。

[0339] 在各个实施方案中，所述经修饰的信号传导剂选自细胞因子、生长因子和激素的经修饰型式。此类细胞因子、生长因子和激素的说明性实例包括但不限于淋巴因子、单核因子、传统多肽激素(诸如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素)；甲状旁腺激

素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素诸如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和促黄体生成激素(LH);肝脏生长因子;成纤维细胞生长因子;催乳激素;胎盘催乳激素;肿瘤坏死因子-α和肿瘤坏死因子-β;苗勒氏管抑制物;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活素;血管内皮生长因子;整合素;促血小板生成素(TPO);神经生长因子如NGF-α;血小板生长因子;转化生长因子(TGF)诸如TGF-α和TGF-β;胰岛素样生长因子-I和胰岛素样生长因子-II;骨诱导因子;干扰素诸如例如干扰素-α、干扰素-β和干扰素-γ(以及I型干扰素、II型干扰素和III型干扰素)、集落刺激因子(CSF)诸如巨噬细胞-CSF(M-CSF);粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF);和粒细胞-CSF(G-CSF);白介素(IL),诸如例如IL-1、IL-1α、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13和IL-18;肿瘤坏死因子诸如例如TNF-α或TNF-β;和其他多肽因子,包括例如LIF和kit配体(KL)。如本文所使用,细胞因子、生长因子和激素包括获自天然来源或者由重组的细菌、真核生物或哺乳动物细胞培养系统产生的蛋白质,以及天然序列细胞因子的生物活性等效物。

[0340] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是选自但不限于转化生长因子(TGF)诸如(TGF-α和TGF-β(及其亚型,包括TGF-β的各种亚型,包括TGFβ1、TGFβ2和TGFβ3))、表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子(诸如胰岛素样生长因子-I和胰岛素样生长因子-II)、成纤维细胞生长因子(FGF)、遗传调节蛋白(heregulin)、血小板衍生生长因子(PDGF)、血管内皮生长因子(VEGF)的生长因子的经修饰型式。

[0341] 在一个实施方案中,所述生长因子是成纤维细胞生长因子(FGF)的经修饰型式。说明性FGF包括但不限于FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、鼠FGF15、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF20、FGF21、FGF22和FGF23。

[0342] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是血管内皮生长因子(VEGF)。VEGF是强有力的生长因子,它在生理性和病理性血管生成中起主要作用,调控血管通透性,并且可以充当表达VEGF受体的细胞上的生长因子。除其他功能外,另外的功能还包括刺激巨噬细胞谱系和内皮细胞中的细胞迁移。VEGF生长因子家族中存在若干成员,以及至少三个受体(VEGFR-1、VEGFR-2和VEGFR-3)。VEGF家族的成员可以结合并激活不止一种VEGFR类型。例如,VEGF-A结合VEGFR-1和VEGFR-2,而VEGF-C结合VEGFR-2和VEGFR-3。VEGFR-1和VEGFR-2激活能调控血管生成,而VEGFR-3激活与淋巴管生成相关联。主要的促血管生成信号是由VEGFR-2激活产生的。据报道,VEGFR-1激活可能与血管生成中的负作用相关联。还已经报道,VEGFR-1信号传导对于经由骨髓来源的VEGFR-1阳性细胞(有助于在骨中形成转移前龛)的体内肿瘤进展是重要的。已经开发了若干种基于VEGF-A指导的/中和的治疗性抗体的疗法,这些疗法主要用于依赖血管生成的各种人类肿瘤的治疗。但这些疗法并非没有副作用。考虑到这些疗法作为一般的非细胞/组织特异性VEGF/VEGFR相互作用抑制剂来起作用,这可能不足为奇。因此,将VEGF(例如,VEGF-A)/VEGFR-2抑制限制于特定的靶细胞(例如肿瘤血管内皮细胞)是合乎需要的。

[0343] 在一些实施方案中,所述VEGF是VEGF-A、VEGF-B、VEFG-C、VEGF-D或VEGF-E以及它们的同种型,包括VEGF-A的各种同种型,诸如$VEGF_{121}$、$VEGF_{121}b$、$VEGF_{145}$、$VEGF_{165}$、$VEGF_{165}b$、$VEGF_{189}$和$VEGF_{206}$。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对VEGFR-1(Flt-1)和/或VEGFR-2(KDR/Flk-1)具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对VEGFR-1(Flt-1)和/或VEGFR-2(KDR/Flk-1)具有基本上降低或消除的亲和力和/

或活性。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对VEGFR-2(KDR/Flk-1)具有降低的亲和力和/或活性,并且/或者对VEGFR-1(Flt-1)具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。这样的实施方案可以用于例如伤口愈合方法或与缺血相关的疾病(不希望受理论束缚,这些疾病受VEGFR-2对内皮细胞功能和血管生成的影响介导)的治疗中。在各个实施方案中,避免了结合至与癌症和促炎活性相关的VEGFR-1(Flt-1)。在各个实施方案中,VEGFR-1(Flt-1)充当诱饵受体,因此大幅降低或消除了在该受体处的亲和力,从而避免了治疗剂的螯合。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对VEGFR-1(Flt-1)具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性,并且/或者对VEGFR-2(KDR/Flk-1)具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述VEGF是VEGF-C或VEGF-D。在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对VEGFR-3具有降低的亲和力和/或活性。或者,所述经修饰的信号传导剂对VEGFR-3具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0344] 促血管生成疗法在各种疾病(例如缺血性心脏病、出血等)中也很重要,并且包括基于VEGF的疗法。VEGFR-2的激活具有促血管生成作用(作用于内皮细胞)。VEFGR-1的激活能刺激炎性细胞(包括例如巨噬细胞)迁移并导致炎症相关的高血管通透性。VEFGR-1的激活还可以促进骨髓相关的肿瘤龛形成。因此,在这种情况下,选择用于VEGFR-2激活的基于VEGF的治疗剂将是合乎需要的。另外,期望细胞特异性靶向例如内皮细胞。

[0345] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对VEGFR-2具有降低的亲和力和/或活性(例如拮抗性),并且/或者对VEGFR-1具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。举例来说,当经由与肿瘤内皮细胞标记物(例如PSMA等)结合的靶向部分靶向肿瘤血管内皮细胞时,这种构建体会特异性地抑制此类标记物阳性细胞上的VEGFR-2激活,而不会激活在途中和靶细胞上的VEGFR-1(如果活性被消除),由此消除了对炎症反应的诱导。相较于VEGF-A中和疗法,这将为许多肿瘤类型提供更具选择性且更安全的抗血管生成疗法。

[0346] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对VEGFR-2具有降低的亲和力和/或活性(例如激动性),并且/或者对VEGFR-1具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,通过靶向血管内皮细胞,这样的构建体促进血管生成而不引起VEGFR-1相关的炎症反应诱导。因此,这样的构建体将具有靶向的促血管生成效应,并且基本上降低了由VEGFR-2以及VEGR-1的全身性激活所引起的副作用的风险。

[0347] 在说明性实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是$VEGF_{165}$,所述$VEGF_{165}$具有氨基酸序列SEQ ID NO:95。

[0348] 在另一个说明性实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是$VEGF_{165b}$,所述$VEGF_{165b}$具有氨基酸序列SEQ ID NO:96。

[0349] 在这些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂在氨基酸I83处具有突变(例如,在I83处的取代突变,例如I83K、I83R或I83H)。不希望受理论束缚,据信此类突变可导致降低的受体结合亲和力。参见,例如,美国专利号9,078,860,所述专利的全部内容特此以引用方式并入。

[0350] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是选自但不限于以下的激素的经修饰型式:人绒毛膜促性腺激素、促性腺激素释放激素、雄激素、雌激素、促甲状腺激素、促卵泡激素、促黄体生成激素、催乳激素、生长激素、促肾上腺皮质激素、抗利尿激素、催产素、促甲状腺激素释放激素、生长激素释放激素、促肾上腺皮质激素释放激素、生长激素抑制素、

多巴胺、褪黑激素、甲状腺素、降血钙素、甲状旁腺激素、糖皮质激素、盐皮质激素、肾上腺素、去甲肾上腺素、黄体酮、胰岛素、升糖素、支链淀粉、钙三醇、钙化醇、心房利钠肽、胃泌素、分泌素、胆囊收缩素、神经肽Y、饥饿素、PYY3-36、胰岛素样生长因子(IGF)、瘦素、促血小板生成素、红细胞生成素(EPO)和血管紧张素原。

[0351] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是TNF-α。TNF是一种多效性细胞因子,它有许多种不同的功能,包括调控细胞生长、分化、细胞凋亡、肿瘤发生、病毒复制、自身免疫性、免疫细胞功能和迁移、炎症以及败血性休克。它结合至靶细胞上的两种独特的膜受体:TNFR1(p55)和TNFR2(p75)。TNFR1表现出非常广泛的表达模式,而TNFR2优先表达在淋巴细胞、Treg、内皮细胞、某些神经元、小胶质细胞、心肌细胞和间质干细胞的某些群体上。响应于受体激活而激活非常独特的生物学途径,但也存在一定的重叠。通常,不希望受理论束缚,TNFR1信号传导与细胞凋亡(细胞死亡)的诱导相关,而TNFR2信号传导与细胞存活信号的激活(例如,NFkB途径的激活)相关。TNF的施用具有全身性毒性,并且这主要是由于TNFR1配接。然而,应当注意,TNFR2的激活还与多种活性相关,同TNFR1一样,在开发基于TNF的治疗剂的情形下,对TNF靶向和活性的控制非常重要。

[0352] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对TNFR1和/或TNFR2具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对TNFR1和/或TNFR2具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。TNFR1表达于大部分组织中,并且参与细胞死亡信号传导,而相形之下,TNFR2参与细胞存活信号传导。因此,在针对癌症治疗方法的实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对TNFR1具有降低的亲和力和/或活性并且/或者对TNFR2具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在这些实施方案中,可以使所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物靶向需要细胞凋亡的细胞,例如肿瘤细胞或肿瘤血管内皮细胞。在针对促进细胞存活的方法的实施方案中,举例来说,在用于治疗神经退行性病症的神经发生中,所述经修饰的信号传导剂对TNFR2具有降低的亲和力和/或活性并且/或者对TNFR1具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。换句话说,在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含允许有利于死亡或存活信号的经修饰的TNF-α剂。

[0353] 在一些实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物具有经修饰的TNF,所述经修饰的TNF对TNFR1具有降低的亲和力和/或活性并且/或者对TNFR2具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,与野生型TNF和/或仅携带促使对TNFR1具有降低的亲和力和/或活性的一个或多个突变的嵌合体相比,这种嵌合体是更有效的细胞凋亡诱导剂。在一些实施方案中,这种嵌合体可用于诱导肿瘤细胞死亡或肿瘤血管内皮细胞死亡(例如,用于治疗癌症)。此外,在一些实施方案中,举例来说,这些嵌合体避免或减少经由TNFR2激活T_{reg}细胞,因此进一步支持TNFR1介导的体内抗肿瘤活性。

[0354] 在一些实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物具有经修饰的TNF,所述经修饰的TNF对TNFR2具有降低的亲和力和/或活性并且/或者对TNFR1具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,这种嵌合体在可能是各种疾病设定,包括但不限于刺激神经发生下的特定治疗目标的一些细胞类型中是更有效的细胞存活激活剂。另外,此类偏好TNFR2的嵌合体还可用于治疗自身免疫性疾病(例如克罗恩氏病、糖尿病、MS、结肠炎等和本文所描述的众多其他自身免疫性疾病)。在一些实施方案中,所述嵌合体靶向自身反应性T细胞。在一些实施方案中,所述嵌合体促进了T_{reg}细胞激活和对细胞毒性T细胞的间接

阻抑。

[0355] 在一些实施方案中,所述嵌合体例如通过激活TNFR2和/或避免TNFR1而引起自身反应性T细胞的死亡(例如,对TNFR2具有降低的亲和力和/或活性并且/或者对TNFR1具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性的经修饰的TNF)。不希望受理论束缚,这些自身反应性T细胞让其细胞凋亡/存活信号例如被NFkB途径活性/信号传导变化改变。在一些实施方案中,所述嵌合体引起具有NFκB途径损伤或修饰的自身反应性T细胞的死亡,所述损伤或修饰构成所述自身反应性T细胞的细胞死亡(细胞凋亡)/存活信号性质不平衡的基础,并且任选地改变了对某些诱导死亡的信号(例如,TNFR2激活)的易感性。

[0356] 在一些实施方案中,基于TNFR-2的嵌合体在诸多疾病中具有额外的治疗应用,所述疾病包括自身免疫性疾病、各种心脏病、脱髓鞘和神经退行性病症,以及感染性疾病等等。

[0357] 在一个实施方案中,所述野生型TNF-α具有氨基酸序列SEQ ID NO:97。

[0358] 在此类实施方案中,所述经修饰的TNF-α剂在一个或多个氨基酸位置29、31、32、84、85、86、87、88、89、145、146和147处具有突变,从而产生了具有降低的受体结合亲和力的经修饰的TNF-α。参见,例如,美国专利号7,993,636,所述专利的全部内容特此以引用方式并入。

[0359] 在一些实施方案中,所述经修饰的人TNF-α部分在如例如WO/2015/007903中所描述的一个或多个氨基酸位置R32、N34、Q67、H73、L75、T77、S86、Y87、V91、I97、T105、P106、A109、P113、Y115、E127、N137、D143、A145和E146处具有突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入(编号根据人TNF序列,Genbank登记号BAG70306,版本BAG70306.1,GI:197692685)。在一些实施方案中,所述经修饰的人TNF-α部分具有选自L29S、R32G、R32W、N34G、Q67G、H73G、L75G、L75A、L75S、T77A、S86G、S86T、Y87Q、Y87L、Y87A、Y87F、Y87H、V91G、V91A、I97A、I97Q、I97S、T105G、P106G、A109Y、P113G、Y115G、Y115A、E127G、N137G、D143N、A145G、A145R、A145T、E146D、E146K和S147D的取代突变。在一些实施方案中,所述人TNF-α部分具有选自Y87Q、Y87L、Y87A、Y87F和Y87H的突变。在另一个实施方案中,所述人TNF-α部分具有选自I97A、I97Q和I97S的突变。在另一个实施方案中,所述人TNF-α部分具有选自Y115A和Y115G的突变。在一些实施方案中,所述人TNF-α部分具有E146K突变。在一些实施方案中,所述人TNF-α部分具有Y87H和E146K突变。在一些实施方案中,所述人TNF-α部分具有Y87H和A145R突变。在一些实施方案中,所述人TNF-α部分具有R32W和S86T突变。在一些实施方案中,所述人TNF-α部分具有R32W和E146K突变。在一些实施方案中,所述人TNF-α部分具有L29S和R32W突变。在一些实施方案中,所述人TNF-α部分具有D143N和A145R突变。在一些实施方案中,所述人TNF-α部分具有D143N和A145R突变。在一些实施方案中,所述人TNF-α部分具有A145T、E146D和S147D突变。在一些实施方案中,所述人TNF-α部分具有A145T和S147D突变。

[0360] 在一些实施方案中,所述经修饰的TNF-α剂具有选自如WO2008/124086中所描述的N39Y、S147Y和Y87H的一个或多个突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0361] 在一些实施方案中,所述经修饰的人TNF-α部分具有如PCT/IB2016/001668中所描述的提供受体选择性的突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中,TNF突变是TNF-R1选择性的。在一些实施方案中,TNF-R1选择性的TNF突变处在位置R32、

S86和E146中的一者或多者处。在一些实施方案中,TNF-R1选择性的TNF突变是R32W、S86T和E146K中的一者或多者。在一些实施方案中,TNF-R1选择性的TNF突变是R32W、R32W/S86T、R32W/E146K和E146K中的一者或多者。在一些实施方案中,TNF突变是TNF-R2选择性的。在一些实施方案中,TNF-R2选择性的TNF突变处在位置A145、E146和S147中的一者或多者处。在一些实施方案中,TNF-R2选择性的TNF突变是A145T、A145R、E146D和S147D中的一者或多者。在一些实施方案中,TNF-R2选择性的TNF突变在A145R、A145T/S147D和A145T/E146D/S147D中的一者或多者。

[0362] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是TNF-β。TNF-β可以与LT-β(LT-α1β2)形成同源三聚体或异源三聚体。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对TNFR1和/或TNFR2和/或疱疹病毒进入介体(HEVM)和/或LT-βR具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0363] 在一个实施方案中,所述野生型TNF-β具有氨基酸序列SEQ ID NO:98。

[0364] 在此类实施方案中,所述经修饰的TNF-β剂可以在106-113位的一个或多个氨基酸处包含突变,从而产生对TNFR2具有降低的受体结合亲和力的经修饰的TNF-β。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂在氨基酸位置106-113处具有一个或多个取代突变。在说明性实施方案中,所述取代突变选自Q107E、Q107D、S106E、S106D、Q107R、Q107N、Q107E/S106E、Q107E/S106D、Q107D/S106E和Q107D/S106D。在另一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂在位置106-113处具有约1至约3个氨基酸的插入。

[0365] 在一些实施方案中,所述经修饰的剂是TNF家族成员(例如TNF-α、TNF-β),它可以是如WO 2015/007903和PCT/IB2016/001668中所描述的单链三聚体型式,所述文献的全部内容以引用的方式并入。

[0366] 在一些实施方案中,所述经修饰的剂是TNF家族成员(例如TNF-α、TNF-β),它在TNFR1处具有降低的亲和力和/或活性,即拮抗活性(例如天然拮抗活性或者由于一个或多个突变所致的拮抗活性,参见例如WO 2015/007520,所述文献的全部内容特此以引用方式并入)。在这些实施方案中,所述经修饰的剂是TNF家族成员(例如TNF-α、TNF-β),它还任选地对TNFR2具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的剂是TNF家族成员(例如TNF-α、TNF-β),它在TNFR2处具有降低的亲和力和/或活性,即拮抗活性(例如天然拮抗活性或者由于一个或多个突变所致的拮抗活性,参见例如WO 2015/007520,所述文献的全部内容特此以引用方式并入)。在这些实施方案中,所述经修饰的剂是TNF家族成员(例如TNF-α、TNF-β),它还任选地对TNFR1具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。此类实施方案的构建体可用于例如以细胞特异性方式阻遏TNF应答的方法中。在一些实施方案中,所述拮抗性TNF家族成员(例如TNF-α、TNF-β)是如WO 2015/007903中所描述的单链三聚体型式。

[0367] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是TRAIL。在一些实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂对DR4(TRAIL-RI)和/或DR5(TRAIL-RII)和/或DcR1和/或DcR2具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂对DR4(TRAIL-RI)和/或DR5(TRAIL-RII)和/或DcR1和/或DcR2具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0368] 在一个实施方案中,所述野生型TRAIL具有氨基酸序列SEQ ID NO:99。

[0369] 在此类实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂可以在氨基酸位置T127-R132、E144-

R149、E155-H161、Y189-Y209、T214-1220、K224-A226、W231、E236-L239、E249-K251、T261-H264和H270-E271处包含突变(编号根据人序列,Genbank登记号NP_003801,版本10NP_003801.1,Gl:4507593;参见上文)。

[0370] 在一些实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂可以包含一个或多个突变,所述一个或多个突变基本上降低了所述经修饰的TRAIL剂对TRAIL-R1的亲和力和/或活性。在此类实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂可以特异性地结合TRIL-R2。示例性突变包括在一个或多个氨基酸位置Y189、R191、Q193、H264、I266和D267处的突变。举例来说,所述突变可以是Y189Q、R191K、Q193R、H264R、I266L和D267Q中的一者或多者。在一个实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂包含突变Y189Q、R191K、Q193R、H264R、I266L和D267Q。

[0371] 在一些实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂可以包含一个或多个突变,所述一个或多个突变基本上降低了所述经修饰的TRAIL剂对TRAIL-R2的亲和力和/或活性。在此类实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂可以特异性地结合TRIL-R1。示例性突变包括在一个或多个氨基酸位置G131、R149、S159、N199、K201和S215处的突变。举例来说,所述突变可以是G131R、R149I、S159R、N199R、K201H和S215D中的一者或多者。在一个实施方案中,所述经修饰的TRAIL剂包含突变G131R、R149I、S159R、N199R、K201H和S215D。另外的TRAIL突变描述于例如Trebing等人,(2014)Cell Death and Disease,5:e1035,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。

[0372] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是TGFα。在此类实施方案中,所述经修饰的TGFα剂对表皮生长因子受体(EGFR)具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的TGFα剂对表皮生长因子受体(EGFR)具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0373] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是TGFβ。在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对TGFBR1和/或TGFBR2具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对TGFBR1和/或TGFBR2具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂任选地对TGFBR3具有降低或基本上降低或消除的亲和力和/或活性,不希望受理论束缚,所述TGFBR3可以充当TGF-β受体的配体的储库。在一些实施方案中,相对于TGFBR2,TGFβ可能更倾向于TGFBR1,或者相对于TGFBR1,TGFβ可能更倾向于TGFBR2。相似地,不希望受理论束缚,LAP可以充当TGF-β受体的配体的储库。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对TGFBR1和/或TGFBR2具有降低的亲和力和/或活性,并且/或者对潜在型相关肽(LAP)具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,此类嵌合体可用于卡-恩二氏病(Camurati-Engelmann disease)或与不适当的TGFβ信号传导相关的其他疾病。

[0374] 在一些实施方案中,所述经修饰的剂是TGF家族成员(例如TGFα、TGFβ),它在TGFBR1、TGFBR2、TGFBR3中的一者或多者处具有降低的亲和力和/或活性,即拮抗活性(例如天然拮抗活性或者由一个或多个突变所致的拮抗活性,参见例如WO 2015/007520,所述文献的全部内容特此以引用方式并入本文)。在这些实施方案中,所述经修饰的剂是TGF家族成员(例如TGFα、TGFβ),它还任选地在TGFBR1、TGFBR2、TGFBR3中的一者或多者处具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0375] 在一些实施方案中,所述经修饰的剂是TGF家族成员(例如TGFα、TGFβ),它在

TGFBR1和/或TGFBR2处具有降低的亲和力和/或活性，即拮抗活性(例如天然拮抗活性或者由一个或多个突变所致的拮抗活性，参见例如WO 2015/007520，所述文献的全部内容特此以引用方式并入本文)。在这些实施方案中，所述经修饰的剂是TGF家族成员(例如TGFα、TGFβ)，它还任选地在TGFBR3处具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0376] 在一个实施方案中，所述经修饰的信号传导剂是白介素。在一个实施方案中，所述经修饰的信号传导剂是IL-1。在一个实施方案中，所述经修饰的信号传导剂是IL-1α或IL-1β。在一些实施方案中，所述经修饰的信号传导剂对IL-1R1和/或IL-1RAcP具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中，所述经修饰的信号传导剂对IL-1R1和/或IL-1RAcP具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在一些实施方案中，所述经修饰的信号传导剂对IL-1R2具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中，所述经修饰的信号传导剂对IL-1R2具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。举例来说，在一些实施方案中，本发明的经修饰的IL-1剂避免IL-1R2处的相互作用，并且因此基本上降低其作为治疗剂的引诱剂和/或接收剂的功能。

[0377] 在一个实施方案中，所述野生型IL-1β具有氨基酸序列SEQ ID NO:100。

[0378] IL1是促炎性细胞因子和重要的免疫系统调控剂。它是CD4 T细胞应答的有效激活剂，能增加Th17细胞的比例以及产生IFNγ和IL-4的细胞的扩增。IL-1还是$CD8^+$T细胞的有效调控剂，从而增强抗原特异性$CD8^+$T细胞扩增、分化、移行至外围和记忆。IL-1受体包含IL-1R1和IL-1R2。结合至IL-1R1和经由IL-1R1进行信号传导构成了IL-1借以介导许多种其生物学(和病理学)活性的机制。IL1-R2可以起诱饵受体的作用，从而降低IL-1用于相互作用和经由IL-1R1进行信号传导的可用性。

[0379] 在一些实施方案中，所述经修饰的IL-1对IL-1R1具有降低的亲和力和/或活性(例如激动活性)。在一些实施方案中，所述经修饰的IL-1对IL-1R2具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在此类实施方案中，存在可恢复的IL-1/IL-1R1信号传导，并且防止了IL-R2处治疗性嵌合体的损失，并且因此减少了所需IL-1的剂量(例如，相对于野生型或仅携带针对IL-R1的减毒突变的嵌合体)。此类构建体可用于例如治疗癌症，包括例如刺激免疫系统以建立抗癌应答的方法中。

[0380] 在一些实施方案中，所述经修饰的IL-1对IL-1R1具有降低的亲和力和/或活性(例如拮抗活性，例如天然拮抗活性或者由于一个或多个突变所致的拮抗活性，参见例如WO 2015/007520，所述文献的全部内容特此以引用方式并入)。在一些实施方案中，所述经修饰的IL-1对IL-1R2具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在此类实施方案中，存在不可恢复的IL-1/IL-1R1信号传导，并且防止了IL-R2处治疗性嵌合体的损失，并且因此减少了所需IL-1的剂量(例如，相对于野生型或仅携带针对IL-R1的减毒突变的嵌合体)。此类构建体可用于例如治疗自身免疫性疾病，包括例如阻抑免疫系统的方法中。

[0381] 在此类实施方案中，所述经修饰的信号传导剂具有氨基酸52-54缺失，这就产生了对I型IL-1R具有降低的结合亲和力并且具有降低的生物活性的经修饰的人IL-1β。参见例如WO 1994/000491，所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中，所述经修饰的人IL-1β具有选自A117G/P118G、R120X、L122A、T125G/L126G、R127G、Q130X、Q131G、K132A、S137G/Q138Y、L145G、H146X、L145A/L147A、Q148X、Q148G/Q150G、Q150G/D151A、M152G、F162A、F162A/Q164E、F166A、Q164E/E167K、N169G/D170G、I172A、V174A、K208E、

K209X、K209A/K210A、K219X、E221X、E221 S/N224A、N224S/K225S、E244K、N245Q的一个或多个取代突变(其中X可以是任何氨基酸变化,例如非保守变化),从而表现出降低的与IL-1R的结合,如例如WO2015/007542和WO/2015/007536中所描述,所述文献的全部内容特此以引用方式并入(编号基于人IL-1β序列,Genbank登记号NP_000567,版本NP-000567.1,Gl:10835145)。在一些实施方案中,所述经修饰的人IL-1β可以具有选自R120A、R120G、Q130A、Q130W、H146A、H146G、H146E、H146N、H146R、Q148E、Q148G、Q148L、K209A、K209D、K219S、K219Q、E221S和E221K的一个或多个突变。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1β包含突变Q131G和Q148G。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1β包含突变Q148G和K208E。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1β包含突变R120G和Q131G。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1β包含突变R120G和H146A。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1β包含突变R120G和H146N。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1β包含突变R120G和H146R。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1β包含突变R120G和H146E。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1β包含突变R120G和H146G。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1β包含突变R120G和K208E。在一个实施方案中,所述经修饰的人IL-1β包含突变R120G、F162A和Q164E。

[0382] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IL-2。在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-2Rα和/或IL-2Rβ和/或IL-2Rγ具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-2Rβ和/或IL-2Rγ具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-2Rα具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。此类实施方案可能有关于癌症的治疗,例如当所述经修饰的IL-2在IL-2Rβ和/或IL-2Rγ处具有激动性时。举例来说,本发明的构建体可能有利于减弱具有IL2受体β和γ的$CD8^+$T细胞的激活(这可以提供抗肿瘤效应),而不利于具有IL2受体α、β和γ的T_{reg}(这可以提供免疫阻抑、促肿瘤效应)。此外,在一些实施方案中,偏好IL-2Rβ和/或IL-2Rγ超过IL-2Rα避免了诸多IL-2副作用,诸如肺水肿。而且,基于IL-2的嵌合体可用于治疗疾病(例如自身免疫性疾病),例如当所述经修饰的IL-2在IL-2Rβ和/或IL-2Rγ处具有拮抗性(例如天然拮抗活性或者由于一个或多个突变所致的拮抗活性,参见例如WO 2015/007520,所述文献的全部内容特此以引用方式并入)时。举例来说,本发明的构建体可能有利于减弱对具有IL2受体β和γ的$CD8^+$T细胞的抑制(并且因此阻遏免疫应答),而不利于具有IL2受体α、β和γ的T_{reg}。或者,在一些实施方案中,携带IL-2的嵌合体有利于T_{reg}的激活,并且因此有利于免疫阻抑,而不利于$CD8^+$T细胞的激活。举例来说,这些构建体可用于治疗疾病或将受益于免疫阻抑的疾病,例如自身免疫性疾病。

[0383] 在一些实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物具有如本文所描述的针对$CD8^+$T细胞的靶向部分以及对IL-2Rβ和/或IL-2Rγ具有降低的亲和力和/或活性并且/或者对IL-2Rα具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性的经修饰的IL-2剂。在一些实施方案中,这些构建体提供靶向性$CD8^+$T细胞活性,并且一般对T_{reg}细胞无活性(或具有基本上降低的活性)。在一些实施方案中,此类构建体与野生型IL-2相比具有增强的免疫刺激效应(例如,不希望受理论束缚,通过不刺激Treg),同时消除或降低了与IL-2相关的全身毒性。

[0384] 在一个实施方案中,所述野生型IL-2具有氨基酸序列SEQ ID NO:101。

[0385] 在此类实施方案中,所述经修饰的IL-2剂在氨基酸L72(L72G、L72A、L72S、L72T、

L72Q、L72E、L72N、L72D、L72R或L72K)、F42(F42A、F42G、F42S、F42T、F42Q、F42E、F42N、F42D、F42R或F42K)和Y45(Y45A、Y45G、Y45S、Y45T、Y45Q、Y45E、Y45N、Y45D、Y45R或Y45K)处具有一个或多个突变。不希望受理论束缚,认为与所述野生型IL-2相比,这些经修饰的IL-2剂对高亲和力IL-2受体具有降低的亲和力并且保留对中亲和力IL-2受体的亲和力。参见例如美国专利公布号2012/0244112,所述美国专利公布的全部内容特此以引用方式并入。

[0386] 在一些实施方案中,所述经修饰的IL-2剂在氨基酸R38、F42、Y45和E62处具有一个或多个突变。举例来说,所述经修饰的IL-2剂可以包含R38A、F42A、Y45A和E62A中的一者或多者。在一些实施方案中,所述经修饰的IL-2剂可以在C125处包含突变。举例来说,所述突变可以是C125S。在此类实施方案中,所述经修饰的IL-2剂可以对IL-2Rα具有基本上降低的亲和力和/或活性,如例如在Carmenate等人(2013)The Journal of Immunology,190:6230-6238中所描述,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中,在R38、F42、Y45和/或E62处具有突变的所述经修饰的IL-2剂能够诱导效应细胞的扩增,所述效应细胞包括CD8+T细胞和NK细胞而不是Treg细胞。在一些实施方案中,在R38、F42、Y45和/或E62处具有突变的所述经修饰的IL-2剂相比野生型IL-2剂毒性更低。包含对IL-2Rα具有基本上降低的亲和力和/或活性的所述经修饰的IL-2剂的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以用于例如肿瘤学中。

[0387] 在其他实施方案中,所述经修饰的IL-2剂可以对IL-2Rβ具有基本上降低的亲和力和/或活性,如在例如WO2016/025385中所描述,所述文献的全部公开内容特此以引用方式并入。在此类实施方案中,所述经修饰的IL-2剂可以诱导Treg细胞而不是效应细胞(诸如CD8+T细胞和NK细胞)的扩增。包含对IL-2Rβ具有基本上降低的亲和力和/或活性的所述经修饰的IL-2剂的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以例如用于治疗自身免疫性疾病中。在一些实施方案中,所述经修饰的IL-2剂可以在氨基酸N88、D20和/或A126处包含一个或多个突变。举例来说,所述经修饰的IL-2剂可以包含N88R、N88I、N88G、D20H、Q126L和Q126F中的一者或多者。

[0388] 在各个实施方案中,所述经修饰的IL-2剂可以在D109或C125处包含突变。举例来说,所述突变可以是D109C或C125S。在一些实施方案中,可以将在D109或C125处具有突变的经修饰的IL-2用于连接至PEG部分。

[0389] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IL-3。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-3受体具有降低的亲和力和/或活性,所述IL-3受体是与跟普通β(βc或CD131)亚单位配对的独特α链的异源二聚体。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-3受体具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性,所述IL-3受体是与跟普通β(βc或CD131)亚单位配对的独特α链的异源二聚体。

[0390] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IL-4。在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对1型和/或2型IL-4受体具有降低的亲和力和/或活性。在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对1型和/或2型IL-4受体具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。1型IL-4受体由具有普通γ链的IL-4Rα亚单位构成并且特异性地结合IL-4。2型IL-4受体包括与被称为IL-13Rα1的不同亚单位结合的IL-4Rα亚单位。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对2型IL-4受体具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0391] 在一个实施方案中,所述野生型IL-4具有氨基酸序列SEQ ID NO:102。

[0392] 在此类实施方案中，所述经修饰的IL-4剂在氨基酸R121(R121A、R121D、R121E、R121F、R121H、R121I、R121K、R121N、R121P、R121T、R121W)、E122(E122F)、Y124(Y124A、Y124Q、Y124R、Y124S、Y124T)和S125(S125A)处具有一个或多个突变。不希望受理论束缚，认为这些经修饰的IL-4剂维持I型受体介导的活性，但是显著降低了其他受体介导的生物活性。参见例如美国专利号6,433,157，所述专利的全部内容特此以引用方式并入。

[0393] 在一个实施方案中，所述经修饰的信号传导剂是IL-6。IL-6通过细胞表面I型细胞因子受体复合物进行信号传导，所述复合物包括配体结合IL-6R链(CD126)和信号转导组分gp130。IL-6还可以结合至IL-6R的可溶形式(sIL-6R)，后者是IL-6R的细胞外部分。sIL-6R/IL-6复合物可能参与神经突长出和神经元存活，并且因此可能在通过髓鞘再生进行的神经再生中非常重要。因此，在一些实施方案中，所述经修饰的信号传导剂对IL-6R/gp130和/或sIL-6R具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中，所述经修饰的信号传导剂对IL-6R/gp130和/或sIL-6R具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0394] 在一个实施方案中，所述野生型IL-6具有氨基酸序列SEQ ID NO:103。

[0395] 在此类实施方案中，所述经修饰的信号传导剂在氨基酸58、160、163、171或177处具有一个或多个突变。不希望受理论束缚，认为这些经修饰的IL-6剂表现出降低的对IL-6Rα的结合亲和力和降低的生物活性。参见例如WO 97/10338，所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0396] 在一个实施方案中，所述经修饰的信号传导剂是IL-10。在此类实施方案中，所述经修饰的信号传导剂对IL-10受体1和IL-10受体2具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中，所述经修饰的信号传导剂对IL-10受体1和IL-10受体2具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0397] 在一个实施方案中，所述经修饰的信号传导剂是IL-11。在这种实施方案中，所述经修饰的信号传导剂对IL-11Rα和/或IL-11Rβ和/或gp130具有降低的亲和力和/或活性。在这种实施方案中，所述经修饰的信号传导剂对IL-11Rα和/或IL-11Rβ和/或gp130具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0398] 在一个实施方案中，所述经修饰的信号传导剂是IL-12。在这种实施方案中，所述经修饰的信号传导剂对IL-12Rβ1和/或IL-12Rβ2具有降低的亲和力和/或活性。在这种实施方案中，所述经修饰的信号传导剂对IL-12Rβ1和/或IL-12Rβ2具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0399] 在一个实施方案中，所述经修饰的信号传导剂是IL-13。在这种实施方案中，所述经修饰的信号传导剂对IL-4受体(IL-4Rα)和IL-13Rα1具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中，所述经修饰的信号传导剂对IL-4受体(IL-4Rα)或IL-13Rα1具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0400] 在一个实施方案中，所述野生型IL-13具有氨基酸序列SEQ ID NO:104。

[0401] 在此类实施方案中，所述经修饰的IL-13剂在氨基酸13、16、17、66、69、99、102、104、105、106、107、108、109、112、113和114处具有一个或多个突变。不希望受理论束缚，认为这些经修饰的IL-13剂表现出降低的生物活性。参见例如WO 2002/018422，所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0402] 在一个实施方案中，所述经修饰的信号传导剂是IL-18。在一些实施方案中，所述

经修饰的信号传导剂对IL-18Rα和/或IL-18Rβ具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IL-18Rα和/或IL-18Rβ具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对II型IL-18Rα,即缺乏信号传导所需的TIR结构域的IL-18Rα同种型具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0403] 在一个实施方案中,所述野生型IL-18具有氨基酸序列SEQ ID NO:105。

[0404] 在此类实施方案中,所述经修饰的IL-18剂可以在选自如WO/2015/007542中所描述的Y37-K44、R49-Q54、D59-R63、E67-C74、R80、M87-A97、N 127-K129、Q139-M149、K165-K171、R183和Q190-N191的氨基酸或氨基酸区域处包含一个或多个突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入(编号基于人IL-18序列,Genbank登记号AAV38697,版本AAV38697.1,GI:54696650)。

[0405] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IL-33。在这种实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对ST-2受体和IL-1RAcP具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对ST-2受体和IL-1RAcP具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。

[0406] 在一个实施方案中,所述野生型IL-33具有氨基酸序列SEQ ID NO:106。

[0407] 在此类实施方案中,所述经修饰的IL-33剂可以在选自如WO/2015/007542中所描述的I113-Y122、S127-E139、E144-D157、Y163-M183、E200、Q215、L220-C227和T260-E269的氨基酸或氨基酸区域处包含一个或多个突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入(编号基于人序列,Genbank登记号NP_254274,版本NP_254274.1,GI:15559209)。

[0408] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是表皮生长因子(EGF)。EGF是有效生长因子家族的成员。成员包括EGF、HB-EGF,以及其他成员,诸如TGFα、双调蛋白、神经调节蛋白、上皮调节蛋白、β细胞蛋白。EGF家族受体包括EGFR(ErbB1)、ErbB2、ErbB3和ErbB4。这些受体可以充当同源二聚体和/或异源二聚体受体亚型。不同的EGF家族成员对各种受体亚型表现出不同的选择性。举例来说,EGF与ErbB1/ErbB1、ErbB1/ErbB2、ErbB4/ErbB2和其他一些异源二聚体亚型相关。HB-EGF具有相似的模式,但它也与ErbB4/4相关。积极或消极地调节EGF(EGF样)生长因子信号传导具有相当大的治疗意义。举例来说,在EGFR信号构成主要的促进生长信号的各种癌症的治疗中,抑制EGFR信号是有意义的。或者,在例如促进伤口愈合(急性和慢性)、口腔粘膜炎(各种癌症疗法,包括但不限于放射疗法的主要副作用)中,刺激EGFR信号传导具有治疗意义。

[0409] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对ErbB1、ErbB2、ErbB3和/或ErbB4具有降低的亲和力和/或活性。此类实施方案可用于例如治疗伤口的方法中。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂结合至一个或多个ErbB1、ErbB2、ErbB3和ErbB4并拮抗这些受体的活性。在此类实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对ErbB1、ErbB2、ErbB3和/或ErbB4具有降低的亲和力和/或活性,这允许以减弱的方式拮抗这些受体的活性。此类实施方案可用于例如癌症的治疗中。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对ErbB1具有降低的亲和力和/或活性。ErbB1是激酶抑制剂的治疗靶标-这些激酶抑制剂大多数具有副作用,因为它们的选择性不高(例如,吉非替尼(gefitinib)、厄洛替尼(erlotinib)、阿法替尼(afatinib)、布加替尼(brigatinib)和艾克替尼(icotinib))。在一些实施方案中,与靶向EGF受体的其他药剂相比,减弱的拮抗性ErbB1信号传导更具中靶性并且具有更少的副作

用。

[0410] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对ErbB1具有降低的亲和力和/或活性(例如拮抗性,例如天然拮抗活性或者由于一个或多个突变所致的拮抗活性,参见例如WO 2015/007520,所述文献的全部内容特此以引用方式并入)并且/或者对ErbB4或可能与其相互作用的其他亚型具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。通过经由靶向部分进行特异性靶向,将实现对ErbB1/ErbB1受体激活的细胞选择性阻抑(拮抗作用,例如天然拮抗活性或者由于一个或多个突变所致的拮抗活性,参见例如WO 2015/007520,所述文献的全部内容特此以引用方式并入),而不牵涉可能与抑制相关副作用有关的其他受体亚型。因此,与在体内抑制所有细胞类型中的EGFR活性的EGFR激酶抑制剂相比,这种构建体将提供细胞选择性(例如,由于受体扩增、过度表达等原因而具有激活的EGFR信号传导的肿瘤细胞)抗EGFR(ErbB1)药物作用,且副作用减少。

[0411] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对ErbB4和/或可能与其相互作用的其他亚型具有降低的亲和力和/或活性(例如激动性)。通过经由靶向部分靶向特定靶细胞,实现了ErbB1信号传导的选择性激活(例如上皮细胞)。在一些实施方案中,这种构建体可用于治疗伤口(促进愈合)且副作用减少,尤其可用于治疗慢性疾患和治疗剂局部施用以外的应用(例如全身性伤口愈合)。

[0412] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是胰岛素或胰岛素类似物。在一些实施方案中,所述经修饰的胰岛素或胰岛素类似物对胰岛素受体和/或IGF1或IGF2受体具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的胰岛素或胰岛素类似物对胰岛素受体和/或IGF1或IGF2受体具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。胰岛素受体处减弱的应答允许控制糖尿病、肥胖症、代谢紊乱等,而直接远离IGF1或IGF2受体则避免了前癌的影响。

[0413] 在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是胰岛素样生长因子I或胰岛素样生长因子II(IGF-1或IGF-2)。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是IGF-1。在这种实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对胰岛素受体和/或IGF1受体具有降低的亲和力和/或活性。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂可以结合至IGF1受体并且拮抗该受体的活性。在这种实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IGF1受体具有降低的亲和力和/或活性,这允许以减弱的方式拮抗该受体的活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对胰岛素受体和/或IGF1受体具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对IGF2受体具有降低的亲和力和/或活性,这允许以减弱的方式拮抗该受体的活性。在一个实施方案中,所述经修饰的信号传导剂对胰岛素受体具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性,并且因此不干扰胰岛素信号传导。在各个实施方案中,这适用于癌症治疗。在各个实施方案中,本发明的剂可以防止IR同种型A引起对癌症治疗的抗性。

[0414] 在一些实施方案中,所述经修饰的信号传导剂是EPO。在各个实施方案中,所述经修饰的EPO剂相对于本文所描述的基于野生型EPO或其他EPO的剂对EPO受体(EPOR)受体和/或肝配蛋白受体(EphR)具有降低的亲和力和/或活性。在一些实施方案中,所述经修饰的EPO剂对EPO受体(EPOR)受体和/或Eph受体(EphR)具有基本上降低或消除的亲和力和/或活性。说明性EPO受体包括但不限于EPOR同源二聚体或EPOR/CD131异源二聚体。还包括β-共用

受体(βcR)作为EPO受体。说明性Eph受体包括但不限于EPHA1、EPHA2、EPHA3、EPHA4、EPHA5、EPHA6、EPHA7、EPHA8、EPHA9、EPHA10、EPHB1、EPHB2、EPHB3、EPHB4、EPHB5和EPHB6。在一些实施方案中,所述经修饰的EPO蛋白包含一个或多个突变,所述一个或多个突变致使所述EPO蛋白对包含一种或多种不同的EPO受体或Eph受体的受体(例如异源二聚体、异源三聚体等,包括但不限于:EPOR-EPHB4、EPOR-βcR-EPOR)具有降低的亲和力。还提供了欧洲专利公布号2492355的受体,包括但不限于NEPOR,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0415] 在一些实施方案中,所述人EPO具有氨基酸序列SEQ ID NO:107(前27个氨基酸是信号肽)。

[0416] 在一些实施方案中,所述人EPO蛋白是EPO的成熟形式(其中信号肽被切除),它是166个氨基酸残基的糖蛋白,具有序列SEQ ID NO:108。

[0417] 预计人EPO蛋白的结构包含四螺旋束,包括螺旋A、螺旋B、螺旋C和螺旋D。在各个实施方案中,所述经修饰的EPO蛋白包含位于EPO蛋白的对生物活性重要的四个区域,即氨基酸残基10-20、44-51、96-108和142-156中的一者或多者突变。在一些实施方案中,所述一个或多个突变位于残基11-15、44-51、100-108和147-151处。这些残基局限于螺旋A(Val11、Arg14和Tyr15)、螺旋C(Ser100、Arg103、Ser104和Leu108)、螺旋D(Asn147、Arg150、Gly151和Leu155)以及A/B连接环(残基42-51)。在一些实施方案中,所述经修饰的EPO蛋白在氨基酸41-52之间以及氨基酸147、150、151和155的残基处包含突变。不希望受理论束缚,据信这些残基的突变对受体结合与体外生物活性都具有实质性影响。在一些实施方案中,所述经修饰的EPO蛋白在残基11、14、15、100、103、104和108处包含突变。不希望受理论束缚,据信这些残基的突变对受体结合活性具有中度影响,并且对体外生物活性具有大得多的影响。说明性取代包括但不限于以下中的一者或多者:Val11Ser、Arg14Ala、Arg14Gln、Tyr15Ile、Pro42Asn、Thr44Ile、Lys45Asp、Val46Ala、Tyr51Phe、Ser100Glu、Ser100Thr、Arg103Ala、Ser104Ile、Ser104Ala、Leu108Lys、Asn147Lys、Arg150Ala、Gly151Ala和Leu155Ala。

[0418] 在一些实施方案中,所述经修饰的EPO蛋白包含影响生物活性而不影响结合的突变,例如Eliot等人Mapping of the Active Site of Recombinant Human Erythropoietin 1997年1月15日;Blood:89(2)中列出的那些突变,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0419] 在一些实施方案中,所述经修饰的EPO蛋白包含涉及EPO蛋白中参与受体接触的表面残基的一个或多个突变。不希望受理论束缚,据信这些表面残基的突变不太可能影响蛋白质折叠,从而保留一定的生物活性。可以突变的说明性表面残基包括但不限于残基147和150。在说明性实施方案中,所述突变是取代,包括N147A、N147K、R150A和R150E中的一者或多者。

[0420] 在一些实施方案中,所述经修饰的EPO蛋白包含在残基N59、E62、L67和L70处的一个或多个突变以及影响二硫键形成的一个或多个突变。不希望受理论束缚,据信这些突变影响折叠和/或预计处在被包埋的位置上,并且因此间接地影响生物活性。

[0421] 在一个实施方案中,所述经修饰的EPO蛋白包含K20E取代,所述取代显著减少受体结合。参见例如Elliott等人,(1997)Blood,89:493-502,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0422] 可以并入本发明的嵌合EPO蛋白中的其他EPO突变公开于例如以下文献中:

Elliott等人,(1997)Blood,89:493-502,所述文献的全部内容特此以引用方式并入;和Taylor等人,(2010)PEDS,23(4):251-260,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0423] 在一个实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物具有(i)包括针对PD-L1的识别结构域的靶向部分和(ii)针对肿瘤细胞的靶向部分,以及本文所描述的经修饰或突变的信号传导剂中的任一种。在一个实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物具有针对PD-L1的靶向部分和针对肿瘤细胞上的另一种靶向物质的第二靶向部分。

[0424] 在各个实施方案中,所述信号传导剂是毒素或有毒的酶。在一些实施方案中,所述毒素或有毒的酶来源于植物和细菌。说明性的毒素或有毒的酶包括但不限于白喉毒素、假单胞菌毒素、炭疽毒素、核糖体灭活蛋白(RIP)诸如篦麻毒素和肥皂草素、葫莲根毒素、相思子毒素、白树毒素和美洲商陆抗病毒蛋白。另外的毒素包括Mathew等人,(2009)Cancer Sci 100(8):1359-65中所公开的那些,全部公开内容特此以引用方式并入。在此类实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以用于以细胞类型特异性方式诱导细胞死亡。在此类实施方案中,所述毒素可以经过修饰,例如突变以降低所述毒素的亲和力和/或活性以便减弱效应,如针对本文的其他信号传导剂所描述。

[0425] 接头和官能团

[0426] 在各个实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以包括一个或多个官能团、残基或部分。在各个实施方案中,所述一个或多个官能团、残基或部分连接或基因融合至本文所描述的信号传导剂或靶向部分(例如PD-L1)中的任一者。在一些实施方案中,此类官能团、残基或部分赋予本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物以一种或多种所期望的性质或功能性。此类官能团和用于将它们引入至本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物中的技术的实例在本领域中是已知的,举例来说,参见Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.(1980)。

[0427] 在各个实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以通过与另一种剂缀合和/或融合以延长半衰期或以其他方式改善药效学和药物动力学性质。在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以与PEG、XTEN(例如呈rPEG形式)、聚唾液酸(POLYXEN)、白蛋白(例如人血清白蛋白或HAS)、弹性蛋白样蛋白(ELP)、PAS、HAP、GLK、CTP、转铁蛋白等等中的一者或多者融合或缀合。在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以与抗体或抗体片段诸如Fc片段融合或缀合。举例来说,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以融合至人免疫球蛋白(Ig)G的Fc结构域的N端或C端。在各个实施方案中,个别嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物中的每一者与BioDrugs(2015)29:215-239中所描述的剂中的一者或多者融合,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。

[0428] 在一些实施方案中,所述官能团、残基或部分包含合适的药理学上可接受的聚合物,诸如聚(乙二醇)(PEG)或其衍生物(诸如甲氧基聚(乙二醇)或mPEG)。在一些实施方案中,PEG部分的连接增加半衰期和/或降低PD-L1结合蛋白的免疫原性。一般来说,可以使用聚乙二醇化的任何合适的形式,诸如本领域中用于抗体和抗体片段的聚乙二醇化(包括但不限于单结构域抗体,诸如VHH);参见例如Chapman,Nat.Biotechnol.,54,531-545(2002);Veronese和Harris,Adv.Drug Deliv.Rev.54,453-456(2003);Harris和Chess,Nat.Rev.Drug.Discov.,2,(2003)和WO04060965,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。用于蛋白质的聚乙二醇化的各种试剂还可以得自市面,例如,得自美国的Nektar

Therapeutics。在一些实施方案中，使用定点聚乙二醇化，具体而言，经由半胱氨酸残基(参见例如Yang等人，Protein Engineering，16，10，761-770(2003)，所述文献的全部内容特此以引用方式并入)。举例来说，出于这个目的，PEG可以连接至本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物中天然存在的半胱氨酸残基。在一些实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物经过修饰以便适当地引入一个或多个供连接PEG用的半胱氨酸残基，或者包含一个或多个供连接PEG用的半胱氨酸残基的氨基酸序列可以使用本领域中已知的技术融合至本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的氨基和/或羧基端。

[0429] 在一些实施方案中，所述官能团、残基或部分包含N连接或O连接的糖基化。在一些实施方案中，引入所述N连接或O连接的糖基化作为共翻译和/或翻译后修饰的一部分。

[0430] 在一些实施方案中，所述官能团、残基或部分包含一个或多个可检测标记或其他信号产生基团或部分。合适的标记和适用于连接、使用和检测它们的技术在本领域中是已知的，并且包括但不限于荧光标记(诸如荧光素、异硫氰酸酯、罗丹明、藻红素、藻青素、别藻蓝素、邻苯二甲醛以及荧光胺和荧光金属诸如Eu或其他镧系金属)、磷光标记、化学发光标记或生物发光标记(诸如鲁米那(luminal)、异鲁米诺(isoluminol)、热性吖啶酯(theromatic acridinium ester)、咪唑、吖啶盐、草酸酯、二氧杂环丁烷或GFP以及它们的类似物)、放射性同位素、金属、金属螯合物或金属阳离子或者特别适用于体内、体外或原位诊断和成像的其他金属或金属阳离子，以及发色团和酶(诸如苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、δ-V-类固醇异构酶、酵母乙醇脱氢酶、α-甘油磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、生物素亲和素过氧化物酶、辣根过氧化酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、β-半乳糖苷酶、核糖核酸酶、尿素酶、催化酶、葡萄糖-VI-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰化胆碱脂酶)。其他合适的标记包括可以使用NMR或ESR光谱加以检测的部分。本发明的此类标记的VHH和多肽可以例如用于体外、体内或原位测定(包括本身已知的免疫测定，诸如ELISA，RIA、EIA和其他“夹心测定”等)以及体内诊断和成像目的，取决于对具体标记的选择。

[0431] 在一些实施方案中，所述官能团、残基或部分包含连接或基因融合至所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的标签。在一些实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以包括单个标签或多个标签。举例来说，所述标签是不抑制或防止本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物与PD-L1或任何其他目标抗原诸如肿瘤抗原的结合的肽、糖或DNA分子。在各个实施方案中，所述标签是至少约：三个至五个氨基酸长、五个至八个氨基酸长、八个至十二个氨基酸长、十二个至十五个氨基酸长或十五个至二十个氨基酸长。说明性标签描述于诸如美国专利公布号US2013/0058962。在一些实施方案中，所述标签是亲和力标签，诸如谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和组氨酸(His)标签。在一个实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含His标签。

[0432] 在一些实施方案中，所述官能团、残基或部分包含螯合基团，例如，以螯合金属或金属阳离子之一。合适的螯合基团例如包括但不限于二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0433] 在一些实施方案中，所述官能团、残基或部分包含作为特异性结合对，诸如生物素-(链霉)亲和素结合对的一个部分的官能团。这种官能团可以用来连接本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物与跟所述结合对的另一半结合(即，通过形成结合对)的另一个蛋白质、多肽或化学化合物。举例来说，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以缀合至生物

素，并且连接至与亲和素或链霉亲和素缀合的另一个蛋白质、多肽、化合物或载体。举例来说，这种缀合的本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以用作例如诊断系统中的报告基因，其中可检测信号产生剂缀合至亲和素或链霉亲和素。此类结合对还可以例如用于使本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物结合至载体，包括适用于药物目的的载体。一个非限制性实例是Cao和Suresh,Journal of Drug Targeting,8,4,257(2000)所描述的脂质体制剂。此类结合对还可以用于连接治疗活性剂与本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物。

[0434] 在一些实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物任选地包含一个或多个接头。在一些实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含连接所述靶向部分和所述信号传导剂的接头。在一些实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含处于所述信号传导剂内的接头(例如，在单链TNF的情况下，所述嵌合蛋白可以包含两个接头以产生三聚体)。

[0435] 在一些实施方案中，提供了编码以单一核苷酸序列形式连接至本文所描述的任何接头的本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的载体，并且所述载体可以用于制备此类嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物。

[0436] 在一些实施方案中，所述接头长度允许靶向部分和信号传导剂与其受体的有效结合。举例来说，在一些实施方案中，所述接头长度允许所述靶向部分中的一个和所述信号传导剂与相同细胞上的受体的有效结合以及另一个靶向部分与另一个细胞的有效结合。本文其他部分提供了说明性细胞对。

[0437] 在一些实施方案中，所述接头长度至少等于所述靶向部分中的一个和所述信号传导剂与相同细胞上的受体的结合位点之间的最小距离。在一些实施方案中，所述接头长度是所述靶向部分中的一个和所述信号传导剂与相同细胞上的受体的结合位点之间的最小距离的至少两倍、或三倍、或四倍、或五倍、或十倍、或二十倍、或25倍、或50倍、或一百倍、或更多倍。

[0438] 如本文所描述，所述接头的长度允许所述靶向部分中的一个和所述信号传导剂与相同细胞上的受体的有效结合，结合是依序的，例如靶向部分/受体结合先于信号传导剂/受体结合。

[0439] 在一些实施方案中，在单个嵌合体中有两个接头，每个柔性接头连接信号传导剂与靶向部分。在各个实施方案中，所述接头的长度允许形成具有疾病细胞和效应细胞的位点，而没有会阻止调节任一细胞的位阻。

[0440] 本发明设想多种接头序列的用途。在各个实施方案中，所述接头可以来源于天然存在的多结构域蛋白或者是如例如以下文献中所描述的经验接头:Chichili等人,(2013),Protein Sci.22(2):153-167;Chen等人,(2013),Adv Drug Deliv Rev.65(10):1357-1369，所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中，可以使用接头设计数据库和计算机程序，诸如以下文献中所描述的那些来设计所述接头:Chen等人,(2013),Adv Drug Deliv Rev.65(10):1357-1369和Crasto等人,(2000),Protein Eng.13(5):309-312，所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在各个实施方案中，所述接头可以是功能性的。举例来说但不限于，所述接头可以发挥功能以改善本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的折叠和/或稳定性，改善表达，改善药物动力学，并且/或者改善生物活性。

[0441] 在一些实施方案中，所述接头是多肽。在一些实施方案中，所述接头少于约100个

氨基酸长。举例来说，所述接头可以是少于约100、约95、约90、约85、约80、约75、约70、约65、约60、约55、约50、约45、约40、约35、约30、约25、约20、约19、约18、约17、约16、约15、约14、约13、约12、约11、约10、约9、约8、约7、约6、约5、约4、约3、或约2个氨基酸长。在一些实施方案中，所述接头是多肽。在一些实施方案中，所述接头超过约100个氨基酸长。举例来说，所述接头可以是超过约100、约95、约90、约85、约80、约75、约70、约65、约60、约55、约50、约45、约40、约35、约30、约25、约20、约19、约18、约17、约16、约15、约14、约13、约12、约11、约10、约9、约8、约7、约6、约5、约4、约3、或约2个氨基酸长。在一些实施方案中，所述接头是柔性的。在另一个实施方案中，所述接头是刚性的。

[0442] 在一些实施方案中，一个接头将两个靶向部分彼此连接并且这种接头具有较短长度，而一个接头连接靶向部分和信号传导剂，这种接头比连接两个靶向部分的接头更长。举例来说，连接两个靶向部分的接头与连接靶向部分和信号传导剂的接头之间的氨基酸长度差异可以是约100、约95、约90、约85、约80、约75、约70、约65、约60、约55、约50、约45、约40、约35、约30、约25、约20、约19、约18、约17、约16、约15、约14、约13、约12、约11、约10、约9、约8、约7、约6、约5、约4、约3、或约2个氨基酸。

[0443] 在各个实施方案中，所述接头基本上由甘氨酸和丝氨酸残基构成(例如约30％、或约40％、或约50％、或约60％、或约70％、或约80％、或约90％、或约95％、或约97％甘氨酸和丝氨酸)。举例来说，在一些实施方案中，所述接头是$(Gly_4Ser)_n$，其中n是约1至约8，例如1、2、3、4、5、6、7或8(SEQ ID NO:109-SEQ ID NO:116)。在一个实施方案中，所述接头序列是GGSGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:117)。其他说明性接头包括但不限于具有序列LE、GGGGS(SEQ ID NO:109)、$(GGGGS)_n$(n＝1-4)(SEQ ID NO:109-SEQ ID NO:112)、$(Gly)_8$(SEQ ID NO:118)、$(Gly)_6$(SEQ ID NO:119)、$(EAAAK)_n$(n＝1-3)(SEQ ID NO:120-SEQ ID NO:122)、A$(EAAAK)_nA$(n＝2-5)(SEQ ID NO:123-SEQ ID NO:126)、AEAAAKEAAAKA(SEQ ID NO:123)、A$(EAAAK)_4$ALEA$(EAAAK)_4$A(SEQ ID NO:127)、PAPAP(SEQ ID NO:128)、KESGSVSSEQLAQFRSLD(SEQ ID NO:129)、EGKSSGSGSESKST(SEQ ID NO:130)、GSAGSAAGSGEF(SEQ ID NO:131)和$(XP)_n$的柔性接头，其中X表示任何氨基酸，例如Ala、Lys或Glu。在各个实施方案中，所述接头是$(GGS)_n$(n＝1-20)(SEQ ID NO:132-151)。在一些实施方案中，所述接头是G。在一些实施方案中，所述接头是AAA。在一些实施方案中，所述接头是$(GGGGS)_n$(n＝5-20)(SEQ ID NO:113-116和SEQ ID NO:152-163)。

[0444] 在一些实施方案中，所述接头是GGGSE(SEQ ID NO:164)、GSESG(SEQ ID NO:165)、GSEGS(SEQ ID NO:166)、GEGGSGEGSSGEGSSSEGGGSEGGGSEGGGSEGGS(SEQ ID NO:167)和每4个氨基酸间隔随机放置G、S和E的接头中的一者或多者。

[0445] 在一些实施方案中，所述接头是抗体(例如IgG、IgA、IgD和IgE，包括子类(例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4，以及IgA1和IgA2))的铰链区。在各个实施方案中，所述接头是抗体(例如IgG、IgA、IgD和IgE，包括子类(例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4，以及IgA1和IgA2))的铰链区。IgG、IgA、IgD和IgE类抗体中发现的铰链区充当柔性间隔基，从而允许Fab部分在空间中自由移动。与恒定区相反，所述铰链结构域在结构上具有多样性，在序列和长度方面都因免疫球蛋白类别和子类而各异。举例来说，铰链区的长度和柔性因IgG子类而各异。IgG1的铰链区涵盖氨基酸216-231，而且因为它自由灵活，Fab片段可以关于其对称轴旋转并且在以两个重链间二硫桥中的第一个为中心的球体内移动。IgG2具有比IgG1短的铰链，具有12

个氨基酸残基和四个二硫桥。IgG2的铰链区缺乏甘氨酸残基，相对较短，并且含有通过额外的重链间二硫桥加以稳定的刚性聚脯氨酸双螺旋。这些性质约束了IgG2分子的柔性。IgG3因其独特的延长铰链区(长达IgG1铰链的约四倍)，含有62个氨基酸(包括21个脯氨酸和11个半胱氨酸)，形成非柔性聚脯氨酸双螺旋而不同于其他子类。在IgG3中，Fab片段相对远离Fc片段，从而赋予所述分子以更大的柔性。IgG3中的细长铰链还负责其与其他子类相比具有较高分子量。IgG4的铰链区比IgG1的短，并且其柔性介于IgG1与IgG2的柔性之间。铰链区的柔性按降序报告为IgG3>IgG1>IgG4>IgG2。

[0446] 根据结晶学研究，免疫球蛋白铰链区可以在功能上进一步细分为三个区域：上铰链区、核心区和下铰链区。参见Shin等人，1992Immunological Reviews 130:87。上铰链区包括从C_{H1}的羧基端至铰链中约束运动的第一个残基，一般是形成介于两个重链之间的链间二硫键的第一个半胱氨酸残基的氨基酸。上铰链区的长度与抗体的区段柔性相关。核心铰链区含有重链间二硫桥，而下铰链区接合C_{H2}结构域的氨基端并且包括C_{H2}中的残基。同前。野生型人IgG1的核心铰链区含有序列Cys-Pro-Pro-Cys(SEQ ID NO:168)，所述序列当通过二硫键形成发生二聚时产生环状八肽，认为所述环状八肽充当枢轴，因此赋予柔性。在各个实施方案中，本发明的接头包含任何抗体(例如IgG、IgA、IgD和IgE，包括子类(例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4，以及IgA1和IgA2))的上铰链区、核心区和下铰链区中的一者或两者或三者。铰链区还可以含有一个或多个糖基化位点，所述糖基化位点包括众多类型的结构独特的位点以供碳水化合物连接用。举例来说，IgA1含有铰链区的17个氨基酸区段内的五个糖基化位点，从而赋予铰链区多肽对肠蛋白酶的抗性，这被视为分泌免疫球蛋白的有利性质。在各个实施方案中，本发明的接头包含一个或多个糖基化位点。在各个实施方案中，所述接头是人IgG4抗体的铰链-CH2-CH3结构域。

[0447] 如果需要，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以连接至包含C_H2和C_H3结构域中的一者或两者和任选地铰链区的抗体Fc区。举例来说，编码作为单个核苷酸序列连接至Fc区的本发明嵌合蛋白的载体可用于制备此类多肽。

[0448] 在一些实施方案中，所述接头是合成的接头，诸如PEG。

[0449] 在各个实施方案中，所述接头可以是功能性的。举例来说但不限于，所述接头可以发挥功能以改善本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的折叠和/或稳定性，改善表达，改善药物动力学，并且/或者改善生物活性。在另一个实例中，所述接头可以发挥功能以使所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物靶向特定的细胞类型或位置。

[0450] 具有Fc结构域的嵌合蛋白复合物

[0451] 在一些实施方案中，本发明涉及嵌合蛋白复合物，其中所述复合物包括一个或多个片段可结晶结构域(Fc结构域)。在一些实施方案中，所述Fc结构域具有一个或多个突变，所述一个或多个突变减少或消除Fc结构域的一个或多个效应功能，促进Fc结构域中的Fc链配对，和/或使Fc结构域中的铰链区稳定化。

[0452] 在各个实施方案中，本发明包括嵌合蛋白复合物，所述嵌合蛋白复合物包含一个或多个靶向剂、一个或多个信号传导剂和一个或多个Fc结构域。在一个实施方案中，所述嵌合蛋白复合物包括至少一个特异性地结合至PD-L1的靶向部分和至少一个Fc结构域。在另一个实施方案中，所述嵌合蛋白复合物包括至少一个特异性地结合至PD-L1的靶向部分、至少一个作为肿瘤坏死因子(TNF)的信号传导剂和至少一个Fc结构域。在各个实施方案中，

TNF信号传导剂可以经过修饰以减弱活性。在一些实施方案中，靶向PD-L1的嵌合蛋白复合物可以直接或间接地将免疫细胞募集至作用位点(作为非限制性实例，诸如肿瘤微环境)。

[0453] 在一些方面，本发明涉及一种基于Fc的嵌合蛋白复合物，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包括(A)靶向部分，所述靶向部分包含：(a)三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)，其中(i)CDR1包含选自SEQ ID NO:2或5中任一者的氨基酸序列；(ii)CDR2包含选自SEQ ID NO:3或6中任一者的氨基酸序列；并且(iii)CDR3包含选自SEQ ID NO:4或7中任一者的氨基酸序列；或(b)与SEQ ID NO:1具有至少90％序列同一性的氨基酸序列；并且其中(a)或(b)还在位置D54和G55处包含一个或多个突变，相对于SEQ ID NO:1编号；和(B)信号传导剂，其中所述信号传导剂是：a)野生型信号传导剂；或b)经修饰的信号传导剂，所述经修饰的信号传导剂相对于所述野生型信号传导剂具有一个或多个赋予提高的安全性的突变；以及(C)Fc结构域，所述Fc结构域任选地具有一个或多个突变，所述一个或多个突变减少或消除所述Fc结构域的一种或多种效应功能，促进所述Fc结构域中的Fc链配对，和/或使所述Fc结构域中的铰链区稳定化。

[0454] 在多个实施方案中，所述包含识别结构域的PD-L1靶向部分还在位置Q1、Q5、A14、A63、T74、K76、S79、K86和Q110处包含一个或多个突变。

[0455] 在多个实施方案中，所述突变是取代，任选地其中所述取代是选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基；包括组氨酸(H)的芳香族的极性的且带正电荷的亲水性残基；选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基；选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基；或选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸；或选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸。

[0456] 在多个实施方案中，所述突变选自以下一项或多项：在位置D54处的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸，任选地是D54G；或选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基，任选地是D54K；或选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基，任选地是D54T；以及在位置G55处的选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基，任选地是G55R。

[0457] 在多个实施方案中，所述突变选自以下一项或多项：在位置Q1处的选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基，任选地是Q1D；在位置Q5处的选自甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸，任选地是Q5V；在位置A14处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基，任选地是A14P；在位置A63处的选自甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸，任选地是A63V；在位置T74处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基，任选地是T74S；在位置K76处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基，任选地是K76N；在位置S79处的选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸，任选地是S79Y；在位置K86处的精氨酸(R)，为K86R；以及在位置

Q110处的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸，任选地是Q110L。在多个实施方案中，所述突变选自以下一项或多项：Q1D、Q5V、A14P、A63V、T74S、S79Y、K86R和Q110L，任选地是Q1D、Q5V、A14P、D54G、T74S、K76N、S79Y、K86R和Q110L中的全部。

[0458] 在一些方面，本发明涉及一种基于Fc的嵌合蛋白复合物，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包含：

[0459] (A)靶向部分，所述靶向部分包含：

[0460] (a)三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)，其中：

[0461] (i)CDR1包含选自SEQ ID NO:2或5中任一者的氨基酸序列；

[0462] (ii)CDR2包含选自SEQ ID NO:3或6中任一者的氨基酸序列；并且

[0463] (iii)CDR3包含选自SEQ ID NO:4或7中任一者的氨基酸序列；或

[0464] (b)与SEQ ID NO:1具有至少90％序列同一性的氨基酸序列；并且其中(a)或(b)还在位置D54、G55、K76和S79处包含一个或多个突变，相对于SEQ ID NO:1编号；和

[0465] (B)信号传导剂，其中所述信号传导剂是：

[0466] a)野生型信号传导剂；或

[0467] b)经修饰的信号传导剂，所述经修饰的信号传导剂相对于所述野生型信号传导剂具有一个或多个赋予提高的安全性的突变；以及

[0468] (C)Fc结构域，所述Fc结构域任选地具有一个或多个突变，所述一个或多个突变减少或消除所述Fc结构域的一种或多种效应功能，促进所述Fc结构域中的Fc链配对，和/或使所述Fc结构域中的铰链区稳定化。

[0469] 在一些实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物具有靶向部分，所述靶向部分相对于SEQ ID NO:1在位置T74、K86和Q110处包括一个或多个突变。在一些实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物具有突变，所述突变是取代，任选地其中所述取代是选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基；包括组氨酸(H)的芳香族的极性的且带正电荷的亲水性残基；选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基；选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基；或选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸，或选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸。

[0470] 在一些实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物具有突变，所述突变选自以下一项或多项：

[0471] ●在位置D54处的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸，任选地是D54G；或选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基，任选地是D54K；或选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基，任选地是D54T，

[0472] ●在位置G55处的选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基，任选地是G55R，

[0473] ●在位置T74处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、脯氨酸(P)和半胱

氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是T74S,

[0474] ●在位置K76处的选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基,任选地是K76N,

[0475] ●在位置S79处的选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸,任选地是S79Y,

[0476] ●在位置K86处的精氨酸(R),为K86R,以及

[0477] ●在位置Q110处的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸,任选地是Q110L。

[0478] 在一些方面,本发明的基于Fc的嵌合蛋白复合物包括:

[0479] (A)靶向部分,所述靶向部分包含:

[0480] (a)三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3),其中:

[0481] (i)CDR1包含选自SEQ ID NO:27或30中任一者的氨基酸序列;

[0482] (ii)CDR2包含选自SEQ ID NO:28或31中任一者的氨基酸序列;并且

[0483] (iii)CDR3包含选自SEQ ID NO:29或32中任一者的氨基酸序列;或

[0484] (b)与SEQ ID NO:26具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并且其中(a)或(b)还在位置N32、D33和M97处包含一个或多个突变,相对于SEQ ID NO:26编号;和

[0485] (B)信号传导剂,其中所述信号传导剂是:a)野生型信号传导剂;b)经修饰的信号传导剂,所述经修饰的信号传导剂相对于所述野生型信号传导剂具有一个或多个赋予提高的安全性的突变;以及

[0486] (C)Fc结构域,所述Fc结构域任选地具有一个或多个突变,所述一个或多个突变减少或消除所述Fc结构域的一种或多种效应功能,促进所述Fc结构域中的Fc链配对,和/或使所述Fc结构域中的铰链区稳定化。

[0487] 在一些实施方案中,本发明的基于Fc的嵌合蛋白复合物相对于SEQ ID NO:26具有突变,所述突变是取代。在一些实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物具有亲水性氨基酸残基的取代,所述亲水性氨基酸残基是选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的极性的且带正电荷的亲水性残基或包括组氨酸(H)的芳香族的极性的且带正电荷的亲水性残基。在一些实施方案中,所述取代是亲水性氨基酸残基,所述亲水性氨基酸残基是选自天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且带中性电荷的亲水性残基。在一些实施方案中,所述取代是亲水性氨基酸残基,所述亲水性氨基酸残基是选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)的极性的且带负电荷的亲水性残基。在一些实施方案中,所述取代是选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)和缬氨酸(V)的疏水性脂肪族氨基酸或选自苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)的疏水性芳香族氨基酸。

[0488] 在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:26在位置N32处的取代是选自精氨酸(R)和赖氨酸(K)的正亲水性残基。在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:26在位置N32处的取代是选自谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、脯氨酸(P)和半胱氨酸(C)的极性的且中性的亲水性残基。在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:26在位置N32处的取代是N32Q或N32R。

[0489] 在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:26在位置D33处的取代是D33H。在其他实施方案中,相对于SEQ ID NO:26在位置M97处的取代是选自甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)和缬氨酸(V)的脂肪族疏水性残基。在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:26在位置M97

处的取代是M97I、M97L或M97V。

[0490] 在多个实施方案中，包含识别结构域的PD-L1靶向部分还包含以下突变中的一者或多者：Q1D、Q5V、A14P、A62S、A74S、M77T、M78V、S79Y、K86R和Q109L，任选地是Q1D、Q5V、A14P、D33H、A62S、A74S、M77T、M78V、K86R、M97V中的全部(相对于SEQ ID NO:26)。

[0491] 在一些实施方案中，本发明涉及一种靶向PD-L1的嵌合蛋白复合物，所述嵌合蛋白复合物具有至少一个特异性地结合至PD-L1的靶向部分、至少一个为干扰素(IFN)或其经修饰形式的信号传导剂和至少一个Fc结构域。在各个实施方案中，IFN信号传导剂可以经过修饰以减弱活性。在一个实施方案中，干扰素是IFN-γ或其经修饰形式。

[0492] 片段可结晶结构域(Fc结构域)是抗体中的与位于免疫系统所涉细胞(例如B淋巴细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞)的细胞表面上的Fc受体相互作用的尾部区域。在IgG、IgA和IgD抗体同种型中，Fc结构域由两个相同的蛋白质片段组成，这些蛋白质片段来源于抗体两条重链的第二和第三恒定结构域。在IgM和IgE抗体同种型中，Fc结构域在每条多肽链中包含三个重链恒定结构域(C_H结构域2-4)。

[0493] 在一些实施方案中，本发明技术的基于Fc的嵌合蛋白复合物包含Fc结构域。在一些实施方案中，所述Fc结构域选自IgG、IgA、IgD、IgM或IgE。在一些实施方案中，所述Fc结构域选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0494] 在一些实施方案中，所述Fc结构域选自人IgG、IgA、IgD、IgM或IgE。在一些实施方案中，所述Fc结构域选自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0495] 在一些实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物的Fc结构域包含IgG的CH2和CH3区。在一些实施方案中，所述IgG是人IgG。在一些实施方案中，所述人IgG选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0496] 在一些实施方案中，所述Fc结构域包含一个或多个突变。在一些实施方案中，所述Fc结构域的一个或多个突变减少或消除了Fc结构域的效应功能。在一些实施方案中，所述突变的Fc结构域对靶受体具有降低的亲和力或结合。作为实例，在一些实施方案中，所述Fc结构域的突变减少或消除了Fc结构域与FcγR的结合。在一些实施方案中，FcγR选自FcγRI；FcγRIIa、131R/R；FcγRIIa、131H/H、FcγRIIb；和FcγRIII。在一些实施方案中，所述Fc结构域的突变减少或消除了与补体蛋白(诸如例如C1q)的结合。在一些实施方案中，所述Fc结构域的突变减少或消除了与与FcγR和补体蛋白(诸如例如C1q)两者的结合。

[0497] 在一些实施方案中，所述Fc结构域包含LALA突变以减少或消除Fc结构域的效应功能。作为实例，在一些实施方案中，LALA突变包括人IgG(例如IgG1)中的L234A和L235A取代(其中编号是基于根据EU公约(Edelman等人，PNAS，1969；63(1)78-85)对人IgG1的CH2残基的常用编号)。

[0498] 在一些实施方案中，所述人IgG的Fc结构域在46处包含突变以减少或消除Fc结构域的效应功能。作为实例，在一些实施方案中，所述突变选自L234A、L234F、L235A、L235E、L235Q、K322A、K322Q、D265A、P329G、P329A、P331G和P331S。

[0499] 在一些实施方案中，所述Fc结构域包含FALA突变以减少或消除Fc结构域的效应功能。作为实例，在一些实施方案中，所述FALA突变包括人IgG4中的F234A和L235A取代。

[0500] 在一些实施方案中，人IgG4的Fc结构域在F234、L235、K322、D265和P329中的一者

或多者处包含突变,以减少或消除Fc结构域的效应功能。作为实例,在一些实施方案中,所述突变选自F234A、L235A、L235E、L235Q、K322A、K322Q、D265A、P329G和P329A。

[0501] 在一些实施方案中,所述Fc结构域的一个或多个突变使Fc结构域中的铰链区稳定化。作为实例,在一些实施方案中,所述Fc结构域在人IgG的S228处包含突变以使铰链区稳定化。在一些实施方案中,所述突变是S228P。

[0502] 在一些实施方案中,所述Fc结构域的一个或多个突变促进Fc结构域中的链配对。在一些实施方案中,通过离子配对(亦称带电对、离子键或带电残基对)促进链配对。

[0503] 在一些实施方案中,所述Fc结构域在IgG的以下氨基酸残基中的一者或多者处包含突变以促进离子配对:D356、E357、L368、K370、K392、D399和K409。

[0504] 作为实例,在一些实施方案中,人IgG Fc结构域包含表1中的突变组合之一以促进离子配对。

[0505]

表 1

一条 Fc 链上的一个或多个取代	另一 Fc 链上的一个或多个替代
D356K D399K	K392D K409D
E357R L368R	K370D K409D
E357R L368K	K370D K409D
E357R D399K	K370D K409D
E357R	K370D
L368R D399K	K392D K409D
L368K D399K	K392D K409D
L368R D399K	K409D
L368K D399K	K409D
L368R	K409D
L368K	K409D
K370D K409D	E357R D399K
K370D K409D	E357R L368R
K370D K409D	E357R L368K

[0506]

表 1	
一条 Fc 链上的一个或多个取代	另一 Fc 链上的一个或多个替代
K370D K409D	E357R D399K
K370D K409D	E357R L368R
K370D K409D	E357R L368K
K370D	E357R
K370D	E357R
K392D K409D	D356K D399K
K392D K409D	L368R D399K
K392D K409D	L368K D399K
K392D K409D	D399K
D399K	K392D K409D
D399K	K409D
K409D	L368R
K409D	L368K
K409D	L368R D399K
K409D	L368K D399K
K409D	L368R
K409D	L368K
K409D	L368R D399K
K409D	L368K D399K
K409D	D399K

[0507] 在一些实施方案中,链配对经由旋钮入孔洞突变促成。在一些实施方案中,所述Fc结构域包含一个或多个突变,以实现Fc结构域中的旋钮入孔洞相互作用。在一些实施方案中,将第一Fc链工程化以表达“旋钮”,并且将第二Fc链工程化以表达互补的“孔洞”。作为实例,在一些实施方案中,人IgG Fc结构域包含表2的突变,以实现旋钮入孔洞相互作用。

[0508]

表 2	
一条 Fc 链上的一个或多个取代	另一 Fc 链上的一个或多个替代
T366Y	Y407T
T366Y/F405A	T394W/Y407T
T366W	Y407A
T366W	Y407V
T366Y	Y407A
T366Y	Y407V
T366Y	Y407T

[0509] 在一些实施方案中,本发明技术的基于Fc的嵌合蛋白复合物中的Fc结构域包含以上公开的突变的任何组合。作为实例,在一些实施方案中,所述Fc结构域包含促进离子配对和/或旋钮入孔洞相互作用的突变。作为实例,在一些实施方案中,所述Fc结构域包含具有以下一种或多种特性的突变:促进离子配对,诱导旋钮入孔洞相互作用,减少或消除Fc结构域的效应功能,以及引起Fc稳定化(例如,在铰链处)。

[0510] 作为实例,在一些实施方案中,人IgG Fc结构域包含表3中公开的突变,所述突变

促进Fc结构域中的离子配对和/或促进旋钮入孔洞相互作用。

[0511]

表 3

一条 Fc 链上的一个或多个取代	另一 Fc 链上的一个或多个替代
T366W K370D	E357R Y407A
T366W K370D	E357R Y407V
T366W K409D	L368R Y407A
T366W K409D	L368R Y407V
T366W K409D	L368K Y407A
T366W K409D	L368K Y407V
T366W K409D	L368R D399K Y407A
T366W K409D	L368R D399K Y407V
T366W K409D	L368K D399K Y407A
T366W K409D	L368K D399K Y407V
T366W K409D	D399K Y407A
T366W K409D	D399K Y407V
T366W K392D K409D	D399K Y407A
T366W K392D K409D	D399K Y407V
T366W K392D K409D	D356K D399K Y407A
T366W K392D K409D	D356K D399K Y407V
T366W K370D K409D	E357R D399K Y407A
T366W K370D K409D	E357R D399K Y407V
T366W K370D K409D	E357R L368R Y407A
T366W K370D K409D	E357R L368R Y407V
T366W K370D K409D	E357R L368K Y407A
T366W K370D K409D	E357R L368K Y407V
T366W K392D K409D	L368R D399K Y407A
T366W K392D K409D	L368R D399K Y407V

[0512]

表3	
一条Fc链上的一个或多个取代	另一Fc链上的一个或多个替代
T366W K392D K409D	L368K D399K Y407A
T366W K392D K409D	L368K D399K Y407V
E357R T366W	K370D Y407A
E357R T366W	K370D Y407V
T366W L368R	Y407A K409D
T366W L368R	Y407V K409D
T366W L368K	Y407A K409D
T366W L368K	Y407V K409D
T366W L368R D399K	Y407A K409D
T366W L368R D399K	Y407V K409D
T366W L368K D399K	Y407A K409D
T366W L368K D399K	Y407V K409D
T366W D399K	Y407A K409D
T366W D399K	Y407V K409D
1366W D399K	K392D Y407A K409D
T366W D399K	K392D Y407V K409D
T366W D356K D399K	K392D Y407A K409D
T366W D356K D399K	K392D Y407V K409D
E357R T366W D399K	K370D Y407A K409D
E357R T366W D399K	K370D Y407V K409D
E357R T366W L368R	K370D Y407A K409D
E357R T366W L368R	K370D Y407V K409D
E357R T366W L368K	K370D Y407A K409D
E357R T366W L368K	K370D Y407V K409D
T366W L368R D399K	K392D Y407A K409D
T366W L368R D399K	K392D Y407V K409D
T366W L368K D399K	K392D Y407A K409D

[0513] 作为实例，在一些实施方案中，人IgG Fc结构域包含表4中公开的突变，所述突变促进Fc结构域中的离子配对，促进旋钮入孔洞相互作用或它们的组合。在多个实施方案中，表4的“链1”和“链2”可以互换(例如，链1可以具有Y407T，并且链2可以具有T366Y)。

[0514]

表4			
链1突变	链2突变	参考文献	IgG
T366Y	Y407T	Ridgway 等人, 1996 Protein Engineering, Design and	IgG1

[0515]

		Selection, 第 9 卷, 第 7 期, 1996 年 7 月 1 日, 第 617-62 页	
T366Y/F405A	T394W/Y407T	Ridgway 等人, 1996 Protein Engineering, Design and Selection, 第 9 卷, 第 7 期, 1996 年 7 月 1 日, 第 617-62 页	IgG1
T366W	Y407A	Atwell 等人, 1997 JMB 第 270 卷, 第 1 期, 1997 年 7 月 4 日, 第 26-35 页	IgG1
T366W	T366S/L368V/Y407A	Atwell 等人, 1997 JMB 第 270 卷, 第 1 期, 1997 年 7 月 4 日, 第 26-35 页	IgG1
T366W	L368A/Y407A	Atwell 等人, 1997 JMB 第 270 卷, 第 1 期, 1997 年 7 月 4 日, 第 26-35 页	IgG1
T366W	T366S/L368A/Y407A	Atwell 等人, 1997 JMB 第 270 卷, 第 1 期, 1997 年 7 月 4 日, 第 26-35 页	IgG1
T366W	T366S/L368G/Y407V	Atwell 等人, 1997 JMB 第 270 卷, 第 1 期, 1997 年 7 月 4 日, 第 26-35 页	IgG1
T366W/D399C	T366S/L368A/K392C/Y407V	Merchant 等人, 1998 Nature Biotechnology, 第 16 卷, 第 677-681 页 (1998)	IgG1
T366W/K392C	T366S/L368A/D399C/Y407V	Merchant 等人, 1998 Nature Biotechnology, 第 16 卷, 第 677-681 页 (1998)	IgG1
S354C/T366W	Y349C/T366S/L368A/Y407V	Merchant 等人, 1998 Nature Biotechnology, 第 16 卷, 第 677-681 页 (1998)	IgG1
Y349C/T366W	S354C/T366S/L368A/Y407V	Merchant 等人, 1998 Nature Biotechnology, 第 16 卷, 第 677-681 页 (1998)	IgG1
E356C/T366W	Y349C/T366S/L368A/Y407V	Merchant 等人, 1998 Nature Biotechnology, 第 16 卷, 第 677-681 页 (1998)	IgG1

[0516]

Y349C/T366W	E356C/T366S/L368A/Y407V	Merchant 等人, 1998 Nature Biotechnology, 第 16 卷, 第 677-681 页 (1998)	IgG1
E357C/T366W	Y349C/T366S/L368A/Y407V	Merchant 等人, 1998 Nature Biotechnology, 第 16 卷, 第 677-681 页 (1998)	IgG1
Y349C/T366W	E357C/T366S/L368A/Y407V	Merchant 等人, 1998 Nature Biotechnology, 第 16 卷, 第 677-681 页 (1998)	IgG1
D339R	K409E	Gunasekaran 等人, 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K	K409E	Gunasekaran 等人, 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339R	K409D	Gunasekaran 等人, 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K	K409D	Gunasekaran 等人, 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K	K360D/K409E	Gunasekaran 等人, 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K	K392D/K409E	Gunasekaran 等人, 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K/E356K	K392D/K409E	Gunasekaran 等人, 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K/E357K	K392D/K409E	Gunasekaran 等人, 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K/E356K	K409E/K439D	Gunasekaran 等人, 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K/E357K	K370D/K409E	Gunasekaran 等人, 2010 The Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	IgG1
D339K/E	K370D/K392D/K4	Gunasekaran 等人, 2010 The	IgG

356K/E357K	09E	Journal of Biological Chemistry 285, 19637-19646.	1
S364H/F405A	Y349T/T394F	Moore 等人, 2011 mAbs, 3:6, 546-557	IgG1
S364H/T394F	Y349T/F405A	Moore 等人, 2011 mAbs, 3:6, 546-557	IgG1
D221R/P228R/K409R	D221E/P228E/L368E	Strop 等人, 2012 JMB, 第 420 卷, 第 3 期, 2012 年 7 月 13 日, 第 204-219 页	IgG1
C223R/E225R/P228R/K409R	C223E/P228E/L368E	Strop 等人, 2012 JMB, 第 420 卷, 第 3 期, 2012 年 7 月 13 日, 第 204-219 页	IgG2
F405L	K409R	Labrijn 等人, 2013 PNAS, 2013 年 3 月 26 日.110 (13) 5145-5150	IgG1
F405A/Y407V	T394W	Von Kreudenstein 等人, 2013 mAbs 2013 年第 5 卷-第 5 期, 第 644-654 页	IgG1
[0517] F405A/Y407V	T366I/T394W	Von Kreudenstein 等人, 2013 mAbs 2013 年第 5 卷-第 5 期, 第 644-654 页	IgG1
F405A/Y407V	T366L/T394W	Von Kreudenstein 等人, 2013 mAbs 2013 年第 5 卷-第 5 期, 第 644-654 页	IgG1
F405A/Y407V	T366L/K392M/T394W	Von Kreudenstein 等人, 2013 mAbs 2013 年第 5 卷-第 5 期, 第 644-654 页	IgG1
L351Y/F405A/Y407V	T366L/K392M/T394W	Von Kreudenstein 等人, 2013 mAbs 2013 年第 5 卷-第 5 期, 第 644-654 页	IgG1
T350V/L351Y/F405A/Y407V	T350V/T366L/K392M/T394W	Von Kreudenstein 等人, 2013 mAbs 2013 年第 5 卷-第 5 期, 第 644-654 页	IgG1
T350V/L351Y/F405A/Y407V	T350V/T366L/K392L/T394W	Von Kreudenstein 等人, 2013 mAbs 2013 年第 5 卷-第 5 期, 第 644-654 页	IgG1

[0518]

K409W	D339V/F405T	Choi 等人, 2013 PNAS, 2013 年 1 月 2 日.110 (1) 270-275	IgG 1
K360E	Q347R	Choi 等人, 2013 PNAS, 2013 年 1 月 2 日.110 (1) 270-275	IgG 1
K360E/K 409W	D339V/Q347R/F4 05T	Choi 等人, 2013 PNAS, 2013 年 1 月 2 日.110 (1) 270-275	IgG 1
Y349C/K 360E/K4 09W	D339V/Q347R/S3 54C/F405T	Choi 等人, 2013 PNAS, 2013 年 1 月 2 日.110 (1) 270-275	IgG 1
K392A/K 409D	E356K/D399K	Leaver-Fey 等人, 2016 Structure, 第 24 卷, 第 4 期, 2016 年 4 月 5 日, 第 641-651 页	IgG 1
T366W	T366S/L358A/Y40 7A	Leaver-Fey 等人, 2016 Structure, 第 24 卷, 第 4 期, 2016 年 4 月 5 日, 第 641-651 页	IgG 1
D339M/ Y407A	T336V/K409V	Leaver-Fey 等人, 2016 Structure, 第 24 卷, 第 4 期, 2016 年 4 月 5 日, 第 641-651 页	IgG 1
D339M/ K360D/Y 407A	T336V/E345R/Q3 47R/K409V	Leaver-Fey 等人, 2016 Structure, 第 24 卷, 第 4 期, 2016 年 4 月 5 日, 第 641-651 页	IgG 1
Y349S/T 366V/K3 70Y/K40 9V	E357D/S364Q/Y4 07A	Leaver-Fey 等人, 2016 Structure, 第 24 卷, 第 4 期, 2016 年 4 月 5 日, 第 641-651 页	IgG 1
Y349S/T 366M/K3 70Y/K40 9V	E356G/E357D/S36 4Q/Y407A	Leaver-Fey 等人, 2016 Structure, 第 24 卷, 第 4 期, 2016 年 4 月 5 日, 第 641-651 页	IgG 1
Y349S/T 366M/K3 70Y/K40 9V	E357D/S364R/Y4 07A	Leaver-Fey 等人, 2016 Structure, 第 24 卷, 第 4 期, 2016 年 4 月 5 日, 第 641-651 页	IgG 1
以及 US20150284475A1 的表 1-表 3 中所描述的任何组合			

[0519] 作为实例,在一些实施方案中,人IgG Fc结构域包含表5中公开的突变,所述突变减少或消除了Fc结构域中的Fc γ R和/或补体结合。在多个实施方案中,两条链中都有表5的

突变。

[0520]

表 5		
链 1 突变	参考文献	IgG
L234A/L235A	Alegre 等人, 1994 Transplantation 57:1537-1543	IgG1
F234A/L235A	Alegre 等人, 1994 Transplantation 57:1537-1543	IgG4
L235E	Morgan 等人, 1995 Immunology.1995 年 10 月; 86(2): 319-324.	IgG1
L235E	Morgan 等人, 1995 Immunology.1995 年 10 月; 86(2): 319-324.	IgG4
L235A	Morgan 等人, 1995 Immunology.1995 年 10 月; 86(2): 319-324.	IgG1
G237A	Morgan 等人, 1995 Immunology.1995 年 10 月; 86(2): 319-324.	IgG1
N297H	Tao 和 Morrison, J. Immunol.1989; 143:2595-2601	IgG1
N297Q	Tao 和 Morrison, J. Immunol.1989; 143:2595-2601	IgG1
N297K	Tao 和 Morrison, J. Immunol.1989; 143:2595-2601	IgG3
N297Q	Tao 和 Morrison, J. Immunol.1989;	IgG3

[0521]

	143:2595-2601	
D265A	Idusogie 等人, 2000 J Immunol 2000 年 4 月 15 日, 164 (8) 4178-4184	IgG1
D270A，V，K	Idusogie 等人, 2000 J Immunol 2000 年 4 月 15 日, 164 (8) 4178-4184	IgG1
K322A，L，M，D，E	Idusogie 等人, 2000 J Immunol 2000 年 4 月 15 日, 164 (8) 4178-4184	IgG1
P329A，X	Idusogie 等人, 2000 J Immunol 2000 年 4 月 15 日, 164 (8) 4178-4184	IgG1
P331A，S，G，X	Idusogie 等人, 2000 J Immunol 2000 年 4 月 15 日, 164 (8) 4178-4184	IgG1
D265A	Idusogie 等人, 2000 J Immunol 2000 年 4 月 15 日, 164 (8) 4178-4184	IgG1
L234A	Hezareh 等人, 2001 J. Virol.2001 年 12 月，第 75 卷第 24 期 12161-12168	IgG1
L234A/L235A	Hezareh 等人, 2001 J. Virol.2001 年 12 月，第 75 卷第 24 期 12161-12168	IgG1
L234F/L235E/P331S	Oganesyan 等人, 2008 Acta Cryst.(2008).D64, 700-704	IgG1
H268Q/V309L/A330S/P331S	An 等人, 2009 mAbs 2009 年第 1	IgG1

	卷-第 6 期，第 572-579 页	
G236R/L328R	Moore 等人, 2011 mAbs 2011 年第 3 卷-第 6 期，第 546-557 页	IgG1
N297G	Couch 等人, 2013 Sci.Transl.Med., 5 (2013) 183ra57，1-12	IgG1
N297G/D265A	Couch 等人, 2013 Sci.Transl.Med., 5 (2013) 183ra57，1-12	IgG1
V234A/G237A/P328S/H268A/V309L/A330S/P331S	Vafa 等人, 2014 Methods 第 65 卷，第 1 期, 2014 年 1 月 1 日，第 114-126 页	IgG2
[0522] L234A/L235A/P329G	Lo 等人, 2016 The Journal of Biological Chemistry 292，3900-3908	IgG1
N297D	Schlothauer 等人, 2016 Protein Engineering, Design and Selection，第 29 卷，第 10 期, 2016 年 10 月 1 日，第 457-466 页	IgG1
S228P/L235E	Schlothauer 等人, 2016 Protein Engineering, Design and Selection，第 29 卷，第 10 期, 2016 年 10 月 1 日，第 457-466 页	IgG4
S228P/L235E/P329G	Schlothauer 等人,	IgG4

[0523]

	2016 Protein Engineering, Design and Selection, 第 29 卷, 第 10 期, 2016 年 10 月 1 日, 第 457-466 页	
L234F/L235A/K322Q	Borrok 等人, 2017 J Pharm Sci 2017 年 4 月, 第 106 卷, 第 4 期, 第 1008-1017 页	IgG1
L234F/L235Q/P331G	Borrok 等人, 2017 J Pharm Sci 2017 年 4 月, 第 106 卷, 第 4 期, 第 1008-1017 页	IgG1
L234F/L235Q/K322Q	Borrok 等人, 2017 J Pharm Sci 2017 年 4 月, 第 106 卷, 第 4 期, 第 1008-1017 页	IgG1
L234A/L235A/G237A/P328S/H268A/A330S/P331S	Tam 等人, 2017 Open Access Antibodies 2017, 6(3), 12; doi:10.3390/antib6030012	IgG1
S228P/F234A/L235A	Tam 等人, 2017 Open Access Antibodies 2017, 6(3), 12; doi:10.3390/antib6030012	IgG4
S228P/F234A/L235A/G237A/P238S	Tam 等人, 2017 Open Access Antibodies 2017, 6(3), 12; doi:10.3390/antib6030012	IgG4
S228P/F234A/L235A/G236□/G237A/P2	Tam 等人, 2017	IgG4

[0524]

38S	Open Access Antibodies 2017, 6(3), 12; doi:10.3390/antib6030012	

[0525] 在一些实施方案中,本发明技术的基于Fc的嵌合蛋白复合物中的Fc结构域是同源二聚体,即,所述嵌合蛋白复合物中的Fc区包含两个相同的蛋白质片段。

[0526] 在一些实施方案中,本发明技术的基于Fc的嵌合蛋白复合物中的Fc结构域是异源二聚体,即,所述Fc结构域包含两个不同的蛋白质片段。

[0527] 在一些实施方案中,使用本文所描述的离子配对和/或旋钮入孔洞突变来工程化异源二聚体Fc结构域。在一些实施方案中,异源二聚体的基于Fc的嵌合蛋白复合物具有反式取向/构型。在反式取向/构型中,在多个实施方案中,靶向部分和信号传导剂未见于本发明的基于Fc的嵌合蛋白复合物的同一多肽链上。

[0528] 在一些实施方案中,所述Fc结构域包括野生型人IgG1的核心铰链区或从其开始,所述核心铰链区包含序列Cys-Pro-Pro-Cys。在一些实施方案中,所述Fc结构域还包括上铰链或其部分(例如,DKTHTCPPC;参见WO 2009053368)、EPKSCDKTHTCPPC或EPKSSDKTHTCPPC;参见Lo等人,Protein Engineering第11卷第6期第495-500页,1998))。

[0529] 基于Fc的嵌合蛋白复合物

[0530] 本发明技术的基于Fc的嵌合蛋白复合物包含至少一个本文所公开的Fc结构域、至少一个信号传导剂和至少一个本文所公开的靶向部分(TM)。

[0531] 应当理解,本发明的基于Fc的嵌合蛋白复合物可以涵盖两种融合蛋白的复合物,每一融合蛋白包含Fc结构域。

[0532] 在一些实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物是异源二聚体的。在一些实施方案中,所述异源二聚体的基于Fc的嵌合蛋白复合物具有反式取向/构型。在一些实施方案中,所述异源二聚体的基于Fc的嵌合蛋白复合物具有顺式取向/构型。

[0533] 在一些实施方案中,使用本文所描述的离子配对和/或旋钮入孔洞突变来工程化异源二聚体Fc结构域。在一些实施方案中,异源二聚体的基于Fc的嵌合蛋白复合物具有反式取向。

[0534] 在反式取向中,在多个实施方案中,靶向部分和信号传导剂未见于本发明的基于Fc的嵌合蛋白复合物的同一多肽链上。在顺式取向中,在多个实施方案中,靶向部分和信号传导剂见于所述基于Fc的嵌合蛋白复合物的独立多肽链上。在顺式取向中,在多个实施方案中,靶向部分和信号传导剂见于所述基于Fc的嵌合蛋白复合物的同一多肽链上。

[0535] 在一些实施方案中,在本文所描述的异源二聚体蛋白复合物中存在超过一个靶向部分时,一个靶向部分可以处于反式取向(相对于信号传导剂),而另一靶向部分可以处于顺式取向(相对于信号传导剂)。在一些实施方案中,信号传导剂和靶标部分在Fc结构域的相同末端/侧(N端或C端)上。在一些实施方案中,信号传导剂和靶向部分在Fc结构域的不同侧/末端(N端和C端)上。

[0536] 在一些实施方案中,在本文所描述的异源二聚体蛋白复合物中存在超过一个靶向部分时,所述靶向部分可见于异源二聚体蛋白复合物中的同一Fc链上或两条不同的Fc链上

(在后一种情况下,所述靶向部分由于在不同的Fc链上,所以相对于彼此是反式的)。在一些实施方案中,在同一Fc链上存在超过一个靶向部分时,所述靶向部分可以在Fc链的同一或不同侧/末端(N端或/和C端)上。

[0537] 在一些实施方案中,在本文所描述的异源二聚体蛋白复合物中存在超过一个信号传导剂时,所述信号传导剂可见于异源二聚体蛋白复合物中的同一Fc链上或两条不同的Fc链上(在后一种情况下,所述信号传导剂由于在不同的Fc链上,所以相对于彼此是反式的)。在一些实施方案中,在同一Fc链上存在超过一个信号传导剂时,所述信号传导剂可以在Fc链的同一或不同侧/末端(N端或/和C端)上。

[0538] 在一些实施方案中,在本文所描述的异源二聚体蛋白复合物中存在超过一个信号传导剂时,一个信号传导剂可以处于反式取向(如相对于靶向部分),而另一信号传导剂可以处于顺式取向(如相对于靶向部分)。

[0539] 在一些实施方案中,所述异源二聚体的基于Fc的嵌合蛋白复合物在单个多肽上不包含信号传导剂和靶向部分。

[0540] 在一些实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白相对于缺乏Fc的嵌合蛋白或不是异源二聚体复合物的嵌合蛋白具有改善的体内半衰期。在一些实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白相对于缺乏Fc的嵌合蛋白或不是异源二聚体复合物的嵌合蛋白具有改善的溶解性、稳定性和其他药理特性。

[0541] 异源二聚体的基于Fc的嵌合蛋白复合物由两种不同的多肽组成。在本文所描述的实施方案中,靶向结构域与信号传导剂位于不同的多肽上,因此,蛋白质含有仅一个靶向结构域拷贝以及仅一个信号传导剂。此外,在多个实施方案中,仅一个靶向结构域(例如VHH)可以避免细胞表面上抗原的交联(在一些情况下这可能引发不良作用)。此外,在多个实施方案中,一个信号传导剂可以减轻分子“拥挤”和对依赖于靶向结构域的亲合力介导的效应功能恢复的潜在干扰。此外,在多个实施方案中,异源二聚体的基于Fc的嵌合蛋白复合物可以具有两个靶向部分,并且这些靶向部分可以被置于两个不同的多肽上。举例来说,在多个实施方案中,可以掩盖两个靶向部分(例如VHH)的C端,以避免潜在的自身抗体或预先存在的抗体(例如VHH自身抗体或预先存在的抗体)。此外,在多个实施方案中,例如在不同多肽上具有靶向结构域而非信号传导剂的异源二聚体的基于Fc的嵌合蛋白复合物,可能有利于两种细胞类型(例如肿瘤细胞和免疫细胞)的“交联”。此外,在多个实施方案中,异源二聚体的基于Fc的嵌合蛋白复合物可以具有两个信号传导剂,每个信号传导剂位于不同的多肽上以允许更复杂的效应应答。

[0542] 此外,在多个实施方案中,例如在不同多肽上具有靶向结构域而非信号传导剂的异源二聚体的基于Fc的嵌合蛋白复合物,有靶向部分和信号传导剂的组合多样性。例如,在多个实施方案中,具有本文所描述的任何靶向部分的多肽可以与具有本文所描述的任何信号传导剂的多肽“现成”组合,以允许在单个基于Fc的嵌合蛋白复合物中快速产生靶向部分和信号传导剂的各种组合。

[0543] 在一些实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包含一个或多个接头。在一些实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包含连接Fc结构域、一个或多个信号传导剂和一个或多个靶向部分的接头。在一些实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包含连接各信号传导剂和靶向部分(或者在存在超过一个靶向部分时,连接信号传导剂)的接头。在

一些实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包含将各信号传导剂连接至Fc结构域的接头。在一些实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包含将各靶向部分连接至Fc结构域的接头。在一些实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包含将靶向部分连接至另一靶向部分的接头。在一些实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包含将信号传导剂连接至另一信号传导剂的接头。

[0544] 在一些实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包含两个或更多个靶向部分。在此类实施方案中，所述靶向部分可以是相同的靶向部分或者它们可以是不同的靶向部分。

[0545] 在一些实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包含两个或更多个信号传导剂。在此类实施方案中，所述信号传导剂可以是相同的靶向部分或者它们可以是不同的靶向部分。

[0546] 作为实例，在一些实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包含Fc结构域、至少两个信号传导剂(SA)和至少两个靶向部分(TM)，其中所述Fc结构域、信号传导剂和靶向部分选自本文所公开的Fc结构域、信号传导剂和靶向部分中的任一者。在一些实施方案中，所述Fc结构域是同源二聚体的。

[0547] 在各个实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图9A-图9F、图10A-图10H、图11A-图11H、图12A-图12D、图13A-图13F、图14A-图14J、图15A-图15D、图16A-图16F、图17A-图17J、图18A-图18F、图19A-图19L、图20A-图20L、图21A-图21F、图22A-图22L、图23A-图23L、图24A-图24J、图25A-图25J、图26A-图26F和图27A-图27F的示意图中的任一者的形式。

[0548] 在各个实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图9A-图9F的示意图中的任一者的形式。

[0549] 在各个实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图10A-图10H的示意图中的任一者的形式。

[0550] 在各个实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图11A-图11H的示意图中的任一者的形式。

[0551] 在各个实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图12A-图12D的示意图中的任一者的形式。

[0552] 在各个实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图13A-图13F的示意图中的任一者的形式。

[0553] 在各个实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图14A-图14J的示意图中的任一者的形式。

[0554] 在各个实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图15A-图15D的示意图中的任一者的形式。

[0555] 在各个实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图16A-图16F的示意图中的任一者的形式。

[0556] 在各个实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图17A-图17J的示意图中的任一者的形式。

[0557] 在各个实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图18A-图18F的示意图中

的任一者的形式。

[0558] 在各个实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图19A-图19L的示意图中的任一者的形式。

[0559] 在各个实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图20A-图20L的示意图中的任一者的形式。

[0560] 在各个实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图21A-图21F的示意图中的任一者的形式。

[0561] 在各个实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图22A-图22L的示意图中的任一者的形式。

[0562] 在各个实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图23A-图23L的示意图中的任一者的形式。

[0563] 在各个实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图24A-图24J的示意图中的任一者的形式。

[0564] 在各个实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图25A-图25J的示意图中的任一者的形式。

[0565] 在各个实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图26A-图26F的示意图中的任一者的形式。

[0566] 在各个实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物采取图27A-图27F的示意图中的任一者的形式。

[0567] 在一些实施方案中,所述信号传导剂连接至所述靶向部分并且所述靶向部分连接至Fc结构域的相同末端(参见图9A-图9F)。在一些实施方案中,所述Fc结构域是同源二聚体的。

[0568] 在一些实施方案中,所述信号传导剂和所述靶向部分连接至Fc结构域,其中靶向部分和信号传导剂连接在相同末端上(参见图9A-图9F)。在一些实施方案中,所述Fc结构域是同源二聚体的。

[0569] 在一些实施方案中,所述靶向部分连接至信号传导剂并且所述信号传导剂连接至Fc结构域的相同末端(参见图9A-图9F)。在一些实施方案中,所述Fc结构域是同源二聚体的。

[0570] 在一些实施方案中,同源二聚体的基于Fc的嵌合蛋白复合物具有两个或更多个靶向部分。在一些实施方案中,存在四个靶向部分和两个信号传导剂,所述靶向部分连接至Fc结构域,并且所述信号传导剂连接至靶向部分的相同末端(参见图10A-图10H)。在一些实施方案中,所述Fc结构域是同源二聚体的。在一些实施方案中,在存在四个靶向部分和两个信号传导剂的情况下,两个靶向部分连接至Fc结构域,并且两个靶向部分连接至信号传导剂,所述信号传导剂连接至Fc结构域的相同末端(参见图10A-图10H)。在一些实施方案中,所述Fc结构域是同源二聚体的。在一些实施方案中,在存在四个靶向部分和两个信号传导剂的情况下,两个靶向部分彼此连接,并且每对中的一个靶向部分连接至Fc结构域的相同末端,并且信号传导剂连接至Fc结构域的相同末端(参见图10A-图10H)。在一些实施方案中,所述Fc结构域是同源二聚体的。在一些实施方案中,在存在四个靶向部分和两个信号传导剂的情况下,两个靶向部分彼此连接,其中每对中的一个靶向部分连接至信号传导剂,而该对中

的另一个靶向部分连接至Fc结构域，其中连接至Fc结构域的靶向部分连接在相同末端上(参见图10A-图10H)。在一些实施方案中，所述Fc结构域是同源二聚体的。

[0571] 在一些实施方案中，同源二聚体的基于Fc的嵌合蛋白复合物具有两个或更多个信号传导剂。在一些实施方案中，在存在四个信号传导剂和两个靶向部分的情况下，两个信号传导剂彼此连接，并且该对中的一个信号传导剂连接至Fc结构域的相同末端，并且所述靶向部分连接至Fc结构域的相同末端(参见图11A-图11H)。在一些实施方案中，所述Fc结构域是同源二聚体的。在一些实施方案中，在存在四个信号传导剂和两个靶向部分的情况下，两个信号传导剂连接至Fc结构域的相同末端，并且所述信号传导剂中的两个各自连接至靶向部分，其中所述靶向部分连接至Fc结构域的相同末端(参见图11A-图11H)。在一些实施方案中，所述Fc结构域是同源二聚体的。在一些实施方案中，在存在四个信号传导剂和两个靶向部分的情况下，两个信号传导剂彼此连接，并且该对中的一个信号传导剂连接至靶向部分，并且所述靶向部分连接至Fc结构域的相同末端(参见图11A-图11H)。在一些实施方案中，所述Fc结构域是同源二聚体的。

[0572] 作为实例，在一些实施方案中，所述基于Fc的嵌合蛋白复合物包含Fc结构域，其中所述Fc结构域包含一个或多个离子配对突变和/或一个或多个旋钮入孔洞突变；至少一个信号传导剂；以及至少一个靶向部分，其中所述离子配对基序和/或旋钮入孔洞基序、信号传导剂和靶向基团选自本文所公开的离子配对基团和/或旋钮入孔洞基序、信号传导剂和靶向部分中的任一者。在一些实施方案中，所述Fc结构域是异源二聚体的。在一些实施方案中，所述Fc结构域包含减少或消除其效应功能的突变。

[0573] 在一些实施方案中，所述信号传导剂连接至所述靶向部分，所述靶向部分连接至所述Fc结构域(参见图18A-图18F和图19A-图19F)。在一些实施方案中，所述靶向部分连接至所述信号传导剂，所述信号传导剂连接至所述Fc结构域(参见图18A-图18F和图19A-图19F)。

[0574] 在一些实施方案中，所述Fc结构域是异源二聚体的。在一些实施方案中，所述Fc结构域包含减少或消除其效应功能的突变。

[0575] 在一些实施方案中，所述信号传导剂和所述靶向部分连接至所述Fc结构域(参见图12A-图12D、图13A-图13D、图18A-图18F和图19A-图19F)。在一些实施方案中，所述靶向部分和所述信号传导剂连接至不同Fc链的相同末端(参见图12A-图12D和图15A-图15D)。在一些实施方案中，所述靶向部分和所述信号传导剂连接至不同Fc链的不同末端(参见图12A-图12D和图15A-图15D)。在一些实施方案中，所述靶向部分和所述信号传导剂连接至相同的Fc链(参见图18A-图18F和图19A-图19F)。在一些实施方案中，所述Fc结构域是异源二聚体的。在一些实施方案中，所述Fc结构域包含减少或消除其效应功能的突变。

[0576] 在一些实施方案中，在存在一个信号传导剂和两个靶向部分的情况下，所述信号传导剂连接至Fc结构域，并且两个靶向部分可以：1)彼此连接，其中一个靶向部分连接至Fc结构域；或者2)各自连接至Fc结构域(参见图13A-图13F、图16A-图16F、图19A-图19L、图22A-图22L、图24A-图24J和图25A-图25J)。在一些实施方案中，靶向部分连接在一个Fc链上，而信号传导剂在另一Fc链上(参见图13A-图13F和图16A-图16F)。在一些实施方案中，成对的靶向部分和信号传导剂连接至相同的Fc链(参见图19A-图19L和图22A-图22L)。在一些实施方案中，一个靶向部分连接至Fc结构域，另一个靶向部分连接至信号传导剂，并且成对

的靶向部分连接至Fc结构域(参见图19A-图19L、图22A-图22L、图24A-图24J和图25A-图25J)。在一些实施方案中,不成对的靶向部分和成对的靶向部分连接至相同的Fc链(参见图19A-图19L和图22A-图22L)。在一些实施方案中,不成对的靶向部分和成对的靶向部分连接至不同的Fc链(参见图24A-图24J和图25A-图25J)。在一些实施方案中,不成对的靶向部分和成对的靶向部分连接在相同的末端上(参见图24A-图24J和图25A-图25J)。在一些实施方案中,所述Fc结构域是异源二聚体的。在一些实施方案中,所述Fc结构域包含减少或消除其效应功能的突变。

[0577] 在一些实施方案中,在存在一个信号传导剂和两个靶向部分的情况下,靶向部分连接至信号传导剂,所述信号传导剂连接至Fc结构域,并且不成对的靶向部分连接至Fc结构域(参见图19A-图19L、图22A-图22L、图24A-图24J和图25A-图25J)。在一些实施方案中,成对的信号传导剂和不成对的靶向部分连接至相同的Fc链(参见图19A-图19L和图22A-图22L)。在一些实施方案中,成对的信号传导剂和不成对的靶向部分连接至不同的Fc链(参见图24A-图24J和图25A-图25J)。在一些实施方案中,成对的信号传导剂和不成对的靶向部分连接在相同的末端上(参见图24A-图24J和图25A-图25J)。在一些实施方案中,所述Fc结构域是异源二聚体的。在一些实施方案中,所述Fc结构域包含减少或消除其效应功能的突变。在一些实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物具有如以下任一者所示的构型和/或取向:图9A-图9F、图10A-图10H、图11A-图11H、图12A-图12D、图13A-图13F、图14A-图14J、图15A-图15D、图16A-图16F、图17A-图17J、图18A-图18F、图19A-图19L、图20A-图20L、图21A-图21F、图22A-图22L、图23A-图23L、图24A-图24J、图25A-图25J、图26A-图26F和图27A-图27F。在一些实施方案中,所述基于Fc的嵌合蛋白复合物具有如图15B所示的构型和/或取向。

[0578] 在一些实施方案中,在存在一个信号传导剂和两个靶向部分的情况下,靶向部分连接在一起,并且信号传导剂连接至所述成对的靶向部分中的一个,其中未连接至信号传导剂的靶向部分连接至Fc结构域(参见图19A-图19L和图22A-图22L)。在一些实施方案中,所述Fc结构域是异源二聚体的。在一些实施方案中,所述Fc结构域包含减少或消除其效应功能的突变。

[0579] 在一些实施方案中,在存在一个信号传导剂和两个靶向部分的情况下,靶向部分连接在一起,并且信号传导剂连接至所述成对的靶向部分中的一个,其中信号传导剂连接至Fc结构域(参见图19A-图19L和图22A-图22L)。在一些实施方案中,所述Fc结构域是异源二聚体的。在一些实施方案中,所述Fc结构域包含减少或消除其效应功能的突变。

[0580] 在一些实施方案中,在存在一个信号传导剂和两个靶向部分的情况下,靶向部分均连接至信号传导剂,其中靶向部分中的一个连接至Fc结构域(参见图19A-图19L和图22A-图22L)。在一些实施方案中,所述Fc结构域是异源二聚体的。在一些实施方案中,所述Fc结构域包含减少或消除其效应功能的突变。

[0581] 在一些实施方案中,在存在一个信号传导剂和两个靶向部分的情况下,靶向部分和信号传导剂连接至Fc结构域(参见图24A-图24J和图25A-图25J)。在一些实施方案中,靶向部分连接在末端上(参见图24A-图24J和图25A-图25J)。在一些实施方案中,所述Fc结构域是异源二聚体的。在一些实施方案中,所述Fc结构域包含减少或消除其效应功能的突变。

[0582] 在一些实施方案中,在存在两个信号传导剂和一个靶向部分的情况下,信号传导

剂连接至Fc结构域的相同末端，并且靶向部分连接至Fc结构域(参见图14A-图14J和图17A-图17J)。在一些实施方案中，信号传导剂连接至同一Fc链上的Fc结构域，而靶向部分连接在另一Fc链上(参见图26A-图26F和图27A-图27F)。在一些实施方案中，所述Fc结构域是异源二聚体的。在一些实施方案中，所述Fc结构域包含减少或消除其效应功能的突变。

[0583] 在一些实施方案中，在存在两个信号传导剂和一个靶向部分的情况下，信号传导剂连接至靶向部分，所述靶向部分连接至Fc结构域，另一信号传导剂连接至Fc结构域(参见图14A-图14J、图15A-图15J、图20A-图20L和图23A-图23L)。在一些实施方案中，靶向部分和不成对的信号传导剂连接至不同的Fc链(参见图14A-图14J和图17A-图17J)。在一些实施方案中，靶向部分和不成对的信号传导剂连接至不同Fc链的相同末端(参见图14A-图14J和图17A-图17J)。在一些实施方案中，靶向部分和不成对的信号传导剂连接至不同Fc链的不同末端(参见图14A-图14J和图17A-图17J)。在一些实施方案中，靶向部分和不成对的信号传导剂连接至相同的Fc链(参见图20A-图20L和图23A-图23L)。在一些实施方案中，所述Fc结构域是异源二聚体的。在一些实施方案中，所述Fc结构域包含减少或消除其效应功能的突变。

[0584] 在一些实施方案中，在存在两个信号传导剂和一个靶向部分的情况下，靶向部分连接至信号传导剂，所述信号传导剂连接至Fc结构域，并且另一个信号传导剂连接至Fc结构域(参见图14A-图14J和图17A-图17J)。在一些实施方案中，成对的信号传导剂和不成对的信号传导剂连接至不同的Fc链(参见图14A-图14J和图17A-图17J)。在一些实施方案中，成对的信号传导剂和不成对的信号传导剂连接至不同Fc链的相同末端(参见图14A-图14J和图17A-图17J)。在一些实施方案中，成对的信号传导剂和不成对的信号传导剂连接至不同Fc链的不同末端(参见图14A-图14J和图17A-图17J)。在一些实施方案中，所述Fc结构域是异源二聚体的。在一些实施方案中，所述Fc结构域包含减少或消除其效应功能的突变。

[0585] 在一些实施方案中，在存在两个信号传导剂和一个靶向部分的情况下，信号传导剂连接在一起，并且靶向部分连接至成对的信号传导剂中的一个，其中靶向部分连接至Fc结构域(参见图20A-图20L和图23A-图23L)。在一些实施方案中，所述Fc结构域是异源二聚体的。在一些实施方案中，所述Fc结构域包含减少或消除其效应功能的突变。

[0586] 在一些实施方案中，在存在两个信号传导剂和一个靶向部分的情况下，信号传导剂连接在一起，并且所述信号传导剂中的一个连接至Fc结构域，并且靶向部分连接至Fc结构域(参见图20A-图20L、图23A-图23L、图26A-图26F和图27A-图27F)。在一些实施方案中，成对的信号传导剂和靶向部分连接至相同的Fc链(参见图20A-图20L和图23A-图23L)。在一些实施方案中，成对的信号传导剂和靶向部分连接至不同的Fc链(参见图26A-图26F和图27A-图27F)。在一些实施方案中，成对的信号传导剂和靶向部分连接至不同Fc链的相同末端(参见图26A-图26F和图27A-图27F)。在一些实施方案中，所述Fc结构域是异源二聚体的。在一些实施方案中，所述Fc结构域包含减少或消除其效应功能的突变。

[0587] 在一些实施方案中，在存在两个信号传导剂和一个靶向部分的情况下，信号传导剂均连接至靶向部分，其中所述信号传导剂中的一个连接至Fc结构域(参见图20A-图20L和图23A-图23L)。在一些实施方案中，所述Fc结构域是异源二聚体的。在一些实施方案中，所述Fc结构域包含减少或消除其效应功能的突变。

[0588] 在一些实施方案中，在存在两个信号传导剂和一个靶向部分的情况下，信号传导

剂连接在一起，并且所述信号传导剂中的一个连接至靶向部分，并且另一个信号传导剂连接至Fc结构域(参见图20A-图20L和图23A-图23L)。

[0589] 在一些实施方案中，在存在两个信号传导剂和一个靶向部分的情况下，每个信号传导剂连接至Fc结构域，并且靶向部分连接至所述信号传导剂中的一个(参见图20A-图20L和图23A-图23L)。在一些实施方案中，信号传导剂连接至相同的Fc链(参见图20A-图20L和图23A-图23L)。

[0590] 在一些实施方案中，靶向部分或信号传导剂连接至包含C_H2和C_H3结构域中的一者或两者和任选地铰链区的Fc结构域。举例来说，编码作为单个核苷酸序列连接至Fc结构域的靶向部分、信号传导剂或它们的组合的载体可用于制备此类多肽。

[0591] 多特异性剂

[0592] 在各个实施方案中，本发明的PD-L1靶向部分是嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的一部分，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含一个或多个如本文所描述的信号传导剂和/或一个或多个另外的靶向部分(即，除了针对PD-L1的靶向部分之外)。因此，本发明提供了包含一种或多种信号传导剂、针对PD-L1的靶向部分和/或一个或多个另外的靶向部分的嵌合或融合蛋白。

[0593] 在各个实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物具有靶向两种不同的细胞(例如，以形成突触)或相同的细胞(例如，以得到更浓的信号传导剂效果)的靶向部分。

[0594] 在一些实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物是多特异性的，即所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含两个或更多个靶向部分，所述靶向部分具有识别并结合两个或更多个靶标(例如抗原或受体或表位)的识别结构域(例如抗原识别结构域)。在此类实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以包含两个或更多个靶向部分，所述靶向部分具有识别并结合相同抗原上或不同抗原上或不同受体上的两个或更多个表位的识别结构域。在各个实施方案中，此类多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物表现出诸多有利性质，诸如增加的亲合力和/或提高的选择性。在一个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含两个靶向部分并且是双特异性的，即识别并结合相同抗原上或不同抗原上或不同受体上的两个表位。

[0595] 在各个实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含两个或更多个靶向部分，各靶向部分是如本文所描述的抗体或抗体衍生物。在一个示例性实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含至少一个包含针对PD-L1的抗原识别结构域的抗体或抗体衍生物(例如VHH)和一个包含针对肿瘤抗原的识别结构域的抗体或抗体衍生物。

[0596] 在各个实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物具有靶向不同抗原或受体的两个或更多个靶向部分，并且一个靶向部分可以减弱其抗原或受体，例如所述靶向部分以低亲和力或亲合力结合其抗原或受体(包括例如以比其他靶向部分对其抗原或受体具有的亲和力或亲合力低的亲和力或亲合力，举例来说，结合亲和力之间的差异可以是约10倍、或25倍、或50倍、或100倍、或300倍、或500倍、或1000倍、或5000倍；举例来说，较低亲和力或亲合力靶向部分能以中至高nM或低至中μM范围内的K_D结合其抗原或受体，而较高亲和力或亲合力靶向部分能以中至高pM或低至中nM范围内的K_D结合其抗原或受体)。举例来说，在一些实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含减毒的

靶向部分,所述减毒的靶向部分针对混杂抗原或受体,从而可以改善对目标细胞的靶向(例如经由其他靶向部分)并且防止多个类型的细胞,包括疗法未靶向的那些细胞的效应(例如通过以比这些实施方案中提供的亲和力更高的亲和力结合混杂抗原或受体)。

[0597] 可以使用本领域中已知的方法来构建本发明的多特异性嵌合蛋白,参见例如美国专利号9,067,991、美国专利公布号20110262348和WO 2004/041862,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一个说明性实施方案中,可以通过化学交联,例如通过如Blattler等人,Biochemistry 24,1517-1524和EP294703所描述使氨基酸残基与有机衍生化剂反应来构建本发明的包含两个或更多个靶向部分的多特异性嵌合蛋白,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在另一个说明性实施方案中,通过基因融合,即构建包括个别靶向部分的多肽的单多肽来构建包含两个或更多个靶向部分的多特异性嵌合蛋白。举例来说,可以形成单多肽构建体,所述构建体编码具有针对PD-L1的抗原识别结构域的第一抗体或抗体衍生物(例如VHH)和具有针对肿瘤抗原的识别结构域的第二抗体或抗体衍生物。PCT专利申请WO96/34103中公开了一种用于产生二价或多价VHH多肽构建体的方法,所述专利申请的全部内容特此以引用方式并入。在另一个说明性实施方案中,可以通过使用接头来构建本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物。举例来说,具有针对PD-L1的抗原识别结构域的第一抗体或抗体衍生物(例如,VHH)的羧基端可以连接至具有针对肿瘤抗原的识别结构域的第二抗体或抗体衍生物的氨基端(或反之亦然)。本文描述了可以使用的说明性接头。在一些实施方案中,本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的组分没有使用接头而直接与彼此连接。

[0598] 在各个实施方案中,本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物识别并结合至PD-L1和在一个或多个免疫细胞上发现的一个或多个抗原,所述免疫细胞可以包括但不限于巨核细胞、血小板、红细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞、T淋巴细胞(例如,细胞毒性T淋巴细胞、T辅助细胞、自然杀伤T细胞)、B淋巴细胞、浆细胞、树突状细胞或它们的子集。在一些实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物特异性地结合至目标抗原并且有效地直接或间接地募集一个或多个免疫细胞。

[0599] 在各个实施方案中,本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物识别并结合至PD-L1和在肿瘤细胞上发现的一个或多个抗原。在这些实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以直接或间接地将免疫细胞(例如巨噬细胞)募集至肿瘤细胞或肿瘤微环境。在此类实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物增强巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用。

[0600] 在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物能够或可用于涉及改变有利于肿瘤的免疫攻击的免疫细胞平衡的方法中。举例来说,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以改变临床重要部位处的免疫细胞比率,从而有利于可以杀死和/或阻抑肿瘤的细胞(例如抗肿瘤巨噬细胞(例如M1巨噬细胞)、T细胞、细胞毒性T淋巴细胞、T辅助细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、B细胞和树突状细胞),并且对抗保护肿瘤的细胞(例如骨髓来源的阻抑细胞(MDSC)、调控T细胞(Treg)、肿瘤相关嗜中性粒细胞(TAN)、M2巨噬细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)或它们的子集)。在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物能够增加效应T细胞与调控T细胞的比率。

[0601] 在一些实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含具有特异性地结合至与肿瘤细胞相关的靶标(例如抗原或受体)的识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中，所述靶向部分直接或间接地募集肿瘤细胞。举例来说，在一些实施方案中，将肿瘤细胞募集至可以吞噬、杀死和/或阻抑肿瘤细胞的一个或多个效应细胞(例如巨噬细胞)。

[0602] 肿瘤细胞或癌细胞是指细胞或组织的不受控制的生长和/或细胞存活时间的异常增加和/或对干扰身体器官和系统的正常功能的细胞凋亡的抑制。举例来说，肿瘤细胞包括良性和恶性癌症、息肉、增生以及休眠肿瘤或微转移。说明性肿瘤细胞包括但不限于以下的细胞：基底细胞癌、胆道癌；膀胱癌；骨癌；脑和中枢神经系统癌症；乳腺癌；腹膜癌；宫颈癌；绒毛膜癌；结肠和直肠癌；结缔组织癌；消化系统癌症；子宫内膜癌；食道癌；眼癌；头颈癌；胃癌(包括胃肠癌)；成胶质细胞瘤；肝癌；肝细胞瘤；上皮内赘瘤；肾脏癌或肾癌；喉癌；白血病；肝癌；肺癌(例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌)；黑素瘤；骨髓瘤；成神经细胞瘤；口腔癌(唇、舌、口和咽)；卵巢癌；胰腺癌；前列腺癌；成视网膜细胞瘤；横纹肌肉瘤；直肠癌；呼吸系统癌症；唾液腺癌；肉瘤；皮肤癌；鳞状细胞癌；胃癌；睾丸癌；甲状腺癌；子宫或子宫内膜癌；泌尿系统癌症；外阴癌；淋巴瘤，包括霍奇金氏淋巴瘤和非霍奇金氏淋巴瘤，以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)；小淋巴细胞性(SL)NHL；中级/滤泡性NHL；中级弥漫性NHL；高级成免疫细胞性NHL；高级成淋巴细胞性NHL；高级小非核裂细胞NHL；巨大肿块性NHL(bulky disease NHL)；套细胞淋巴瘤；AIDS相关淋巴瘤；和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia)；慢性淋巴细胞性白血病(CLL)；急性成淋巴细胞性白血病(ALL)；毛细胞性白血病；慢性成髓细胞性白血病；以及其他癌瘤和肉瘤；和移植后淋巴组织增生性病症(PTLD)，以及与斑痣性错构瘤相关的异常血管增生；水肿(例如，与脑肿瘤相关的水肿)；和梅格斯氏综合征(Meigs' syndrome)。

[0603] 肿瘤细胞或癌细胞还包括但不限于癌瘤，例如各种亚型，包括例如腺癌、基底细胞癌、鳞状细胞癌和移行细胞癌)、肉瘤(包括例如骨和软组织)、白血病(包括例如急性骨髓性、急性成淋巴细胞性、慢性骨髓性、慢性淋巴细胞性和毛细胞)、淋巴瘤和骨髓瘤(包括例如霍奇金氏和非霍奇金氏淋巴瘤、轻链、非分泌性、MGUS和浆细胞瘤)和中枢神经系统癌症(包括例如脑(例如神经胶质瘤(例如星形细胞瘤、寡枝神经胶质瘤和室管膜瘤)、脑膜瘤、垂体腺瘤和神经瘤和脊髓肿瘤(例如脑膜瘤和纤维神经瘤)。

[0604] 说明性肿瘤抗原包括但不限于MART-1/Melan-A、gp100、二肽基肽酶IV(DPPIV)、腺苷脱氨酶结合蛋白(ADAbp)、亲环蛋白b、结肠直肠相关抗原(CRC)-0017-1A/GA733、癌胚抗原(CEA)及其免疫原性表位CAP-1和CAP-2、etv6、aml1、前列腺特异性抗原(PSA)及其免疫原性表位PSA-1、PSA-2和PSA-3、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、T细胞受体/CD3-ζ链、MAGE家族肿瘤抗原(例如MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2(MAGE-B2)、MAGE-Xp3(MAGE-B3)、MAGE-Xp4(MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5)、GAGE家族肿瘤抗原(例如GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9)、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、酪氨酸酶、p53、MUC家族、HER2/neu、p21ras、RCAS1、α-胎儿球蛋白、E-钙粘蛋白、α-连锁蛋白、β-连锁蛋白和γ-连锁蛋白、p120ctn、gp100 Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺瘤性结肠息肉病蛋白(APC)、胞衬蛋白、连接蛋白37、Ig独特型、p15、gp75、GM2和GD2神经节苷脂、病毒产物诸如人乳头状瘤病毒蛋白、Smad家族肿瘤抗原、

lmp-1、NA、EBV编码的核抗原(EBNA)-1、脑糖原磷酸化酶、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1CT-7、c-erbB-2、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD56、CD70、CD74、CD138、AGS16、MUC1、GPNMB、Ep-CAM、PD-L1、PD-L2、PMSA和BCMA(TNFRSF17)。在各个实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含结合这些肿瘤抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0605] 在一些实施方案中,本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物识别并结合至PD-L1以及在肿瘤细胞上的抗原。在一些实施方案中,所述多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物直接或间接地将巨噬细胞募集至所述肿瘤细胞或肿瘤微环境。

[0606] 在一些实施方案中,本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含具有特异性地结合至与T细胞相关的靶标(例如抗原或受体)的识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中,所述靶向部分直接或间接地募集T细胞。在一个实施方案中,所述抗原识别结构域特异性地结合至效应T细胞。在一些实施方案中,所述抗原识别结构域直接或间接地募集效应T细胞,例如,在一些实施方案中,募集至治疗部位(例如,具有一个或多个疾病细胞或者为了治疗效果而加以调节的细胞的位置)。说明性效应T细胞包括细胞毒性T细胞(例如αβTCR、$CD3^+$、$CD8^+$、$CD45RO^+$);$CD4^+$效应T细胞(例如αβTCR、$CD3^+$、$CD4^+$、$CCR7^+$、CD62L高、$IL^-7R/CD127^+$);$CD8^+$效应T细胞(例如αβTCR、$CD3^+$、$CD8^+$、$CCR7^+$、CD62L高、$IL^-7R/CD127^+$);效应记忆T细胞(例如CD62L低、$CD44^+$、TCR、$CD3^+$、$IL^-7R/CD127^+$、$IL\text{-}15R^+$、CCR7低);中枢记忆T细胞(例如$CCR7^+$、$CD62L^+$、$CD27^+$;或CCR7高、$CD44^+$、CD62L高、TCR、$CD3^+$、IL-7R/$CD127^+$、$IL\text{-}15R^+$);$CD62L^+$效应T细胞;$CD8^+$效应记忆T细胞(TEM),包括早期效应记忆T细胞($CD27^+CD62L^-$)和晚期效应记忆T细胞($CD27^-CD62L^-$)(分别是TemE和TemL);CD127(+)CD25(低/-)效应T细胞;CD127(-)CD25(-)效应T细胞;$CD8^+$干细胞记忆效应细胞(TSCM)(例如CD44(低)CD62L(高)CD122(高)sca(+));TH1效应T细胞(例如$CXCR3^+$、$CXCR6^+$和$CCR5^+$;或αβTCR、$CD3^+$、$CD4^+$、$IL\text{-}12R^+$、IFNγR^+、$CXCR3^+$)、TH2效应T细胞(例如$CCR3^+$、$CCR4^+$和$CCR8^+$;或αβTCR、$CD3^+$、$CD4^+$、$IL\text{-}4R^+$、$IL\text{-}33R^+$、$CCR4^+$、$IL\text{-}17RB^+$、$CRTH2^+$);TH9效应T细胞(例如αβTCR、$CD3^+$、$CD4^+$);TH17效应T细胞(例如αβTCR、$CD3^+$、$CD4^+$、$IL\text{-}23R^+$、$CCR6^+$、$IL\text{-}1R^+$);$CD4^+CD45RO^+CCR7^+$效应T细胞、$ICOS^+$效应T细胞;$CD4^+CD45RO^+CCR7(^-)$效应T细胞;以及分泌IL-2、IL-4和/或IFN-γ的效应T细胞。

[0607] 说明性目标T细胞抗原包括例如(并且在适当时包括细胞外结构域):CD8、CD3、SLAMF4、IL-2Rα、4-1BB/TNFRSF9、IL-2Rβ、ALCAM、B7-1、IL-4R、B7-H3、BLAME/SLAMFS、CEACAM1、IL-6R、CCR3、IL-7Rα、CCR4、CXCR1/IL-S RA、CCR5、CCR6、IL-10Rα、CCR 7、IL-1 ORβ、CCRS、IL-12Rβ1、CCR9、IL-12Rβ2、CD2、IL-13Rα1、IL-13、CD3、CD4、ILT2/CDS5j、I LT3/CDS5k、ILT4/CDS5d、ILT5/CDS5a、鲁特格林(lutegrin)α4/CD49d、CDS、整合素αE/CD103、CD6、整合素αM/CD 11b、CDS、整合素αX/CD11c、整合素β2/CD1S、KIR/CD15S、CD27/TNFRSF7、KIR2DL1、CD2S、KIR2DL3、CD30/TNFRSFS、KIR2DL4/CD15Sd、CD31/PECAM-1、KIR2DS4、CD40配体/TNFSF5、LAG-3、CD43、LAIR1、CD45、LAIR2、CDS3、白三烯B4-R1、CDS4/SLAMF5、NCAM-L1、CD94、NKG2A、CD97、NKG2C、CD229/SLAMF3、NKG2D、CD2F-10/SLAMF9、NT-4、CD69、NTB-A/SLAMF6、普通γ链/IL-2Rγ、骨调素、CRACC/SLAMF7、PD-1、CRTAM、PSGL-1、CTLA-4、RANK/TNFRSF11A、CX3CR1、CX3CL1、L-选择素、CXCR3、SIRPβ1、CXCR4、SLAM、CXCR6、TCCR/WSX-1、DNAM-1、促胸腺生成素、EMMPRIN/CD147、TIM-1、EphB6、TIM-2、Fas/TNFRSF6、TIM-3、Fas配体/TNFSF6、TIM-4、FcγRIII/CD16、TIM-6、TNFR1/TNFRSF1A、粒溶素、TNF RIII/TNFRSF1B、TRAI

L R1/TNFRSF10A、ICAM-1/CD54、TRAIL R2/TNFRSF10B、ICAM-2/CD102、TRAILR3/TNFRSF10C、IFN-γR1、TRAILR4/TNFRSF10D、IFN-γR2、TSLP、IL-1R1和TSLP R。在各个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含结合这些说明性T细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0608] 作为非限制性实例，在各个实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物具有针对T细胞上表达的检查点标记物，例如PD-1、CD28、CTLA4、ICOS、BTLA、KIR、LAG3、CD137、OX40、CD27、CD40L、TIM3和A2aR中的一者或多者的靶向部分。

[0609] 在一些实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白包含具有特异性地结合至与B细胞相关的靶标(例如抗原或受体)的识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中，所述靶向部分直接或间接地募集B细胞，例如，在一些实施方案中，募集至治疗部位(例如，具有一个或多个疾病细胞或者为了治疗效果而加以调节的细胞的位置)。说明性目标B细胞抗原包括例如CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD38、CD39、CD40、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CD78、CD79a/b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD89、CD98、CD126、CD127、CDw130、CD138和CDw150。在各个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含结合这些说明性B细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0610] 在一些实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含具有特异性地结合至与自然杀伤细胞相关的靶标(例如抗原或受体)的识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中，所述靶向部分直接或间接地募集自然杀伤细胞，例如，在一些实施方案中，募集至治疗部位(例如，具有一个或多个疾病细胞或者为了治疗效果而加以调节的细胞的位置)。说明性目标自然杀伤细胞抗原包括例如TIGIT、2B4/SLAMF4、KIR2DS4、CD155/PVR、KIR3DL1、CD94、LMIR1/CD300A、CD69、LMIR2/CD300c、CRACC/SLAMF7、LMIR3/CD300LF、Kir1α、DNAM-1、LMIR5/CD300LB、Fc-εRII、LMIR6/CD300LE、Fc-γR1/CD64、MICA、Fc-γRIIB/CD32b、MICB、Fc-γRIIC/CD32c、MULT-1、Fc-γRIIA/CD32a、结合素-2/CD112、Fc-γRIII/CD16、NKG2A、FcRH1/IRTA5、NKG2C、FcRH2/IRTA4、NKG2D、FcRH4/IRTA1、NKp30、FcRH5/IRTA2、NKp44、Fc受体样蛋白3/CD16-2、NKp46/NCR1、NKp80/KLRF1、NTB-A/SLAMF6、Rae-1、Rae-1α、Rae-1β、Rae-1δ、H60、Rae-1ε、ILT2/CD85j、Rae-1γ、ILT3/CD85k、TREM-1、ILT4/CD85d、TREM-2、ILT5/CD85a、TREM-3、KIR/CD158、TREML1/TLT-1、KIR2DL1、ULBP-1、KIR2DL3、ULBP-2、KIR2DL4/CD158d和ULBP-3。在各个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含结合这些说明性NK细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0611] 在一些实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含具有特异性地结合至与巨噬细胞/单核细胞相关的靶标(例如抗原或受体)的识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中，所述靶向部分直接或间接地募集巨噬细胞/单核细胞，例如，在一些实施方案中，募集至治疗部位(例如，具有一个或多个疾病细胞或者为了治疗效果而加以调节的细胞的位置)。说明性目标巨噬细胞/单核细胞抗原包括例如SIRP1a、B7-1/CD80、ILT4/CD85d、B7-H1、ILT5/CD85a、普通β链、整合素α4/CD49d、BLAME/SLAMF8、整合素αX/CD11c、CCL6/C10、整合素β2/CD18、CD155/PVR、整合素β3/CD61、CD31/PECAM-1、胶乳素、CD36/SR-B3、白三烯B4 R1、CD40/TNFRSF5、LIMPIIISR-B2、CD43、LMIR1/CD300A、CD45、LMIR2/CD300c、CD68、LMIR3/CD300LF、CD84/SLAMF5、LMIR5/CD300LB、CD97、LMIR6/CD300LE、CD163、LRP-1、CD2F-10/SLAMF9、MARCO、CRACC/SLAMF7、MD-1、ECF-L、MD-2、EMMPRIN/CD147、MGL2、内皮素/CD105、骨激活素/GPNMB、Fc-γRI/CD64、骨调素、Fc-γRIIB/CD32b、PD-L2、Fc-γRIIC/

CD32c、Siglec-3/CD33、Fc-γRIIA/CD32a、SIGNR1/CD209、Fc-γRIII/CD16、SLAM、GM-CSF Rα、TCCR/WSX-1、ICAM-2/CD102、TLR3、IFN-γR1、TLR4、IFN-γR2、TREM-1、IL-1 RII、TREM-2、ILT2/CD85j、TREM-3、ILT3/CD85k、TREML1/TLT-1、2B4/SLAMF 4、IL-10Rα、ALCAM、IL-10Rβ、氨基肽酶N/ANPEP、ILT2/CD85j、普通β链、ILT3/CD85k、Clq R1/CD93、ILT4/CD85d、CCR1、ILT5/CD85a、CCR2、CD206、整合素α4/CD49d、CCR5、整合素αM/CD11 b、CCR8、整合素αX/CD11c、CD155/PVR、整合素β2/CD18、CD14、整合素β3/CD61、CD36/SR-B3、LAIR1、CD43、LAIR2、CD45、白三烯B4-R1、CD68、LIMPIIISR-B2、CD84/SLAMF5、LMIR1/CD300A、CD97、LMIR2/CD300c、CD163、LMIR3/CD300LF、凝血因子III/组织因子、LMIR5/CD300LB、CX3CR1、CX3CL1、LMIR6/CD300LE、CXCR4、LRP-1、CXCR6、M-CSF R、DEP-1/CD148、MD-1、DNAM-1、MD-2、EMMPRIN/CD147、MMR、内皮素/CD105、NCAM-L1、Fc-γRI/CD64、PSGL-1、Fc-γRIIICD16、RP105、G-CSF R、L-选择素、GM-CSF Rα、Siglec-3/CD33、HVEM/TNFRSF14、SLAM、ICAM-1/CD54、TCCR/WSX-1、ICAM-2/CD102、TREM-1、IL-6R、TREM-2、CXCR1/IL-8RA、TREM-3和TREML1/TLT-1。在各个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含结合这些说明性巨噬细胞/单核细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0612] 在一些实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含具有特异性地结合至与树突状细胞相关的靶标(例如抗原或受体)的识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中，所述靶向部分直接或间接地募集树突状细胞，例如，在一些实施方案中，募集至治疗部位(例如，具有一个或多个疾病细胞或者为了治疗效果而加以调节的细胞的位置)。说明性目标树突状细胞抗原包括例如Clec9A、XCR1、RANK、CD36/SRB3、LOX-1/SR-E1、CD68、MARCO、CD163、SR-A1/MSR、CD5L、SREC-1、CL-P1/COLEC12、SREC-II、LIMPIIISRB2、RP105、TLR4、TLR1、TLR5、TLR2、TLR6、TLR3、TLR9、4-IBB配体/TNFSF9、IL-12/IL-23p40、4-氨基-1,8-萘二甲酰胺、ILT2/CD85j、CCL21/6Ckine、ILT3/CD85k、8-氧代-dG、ILT4/CD85d、8D6A、ILT5/CD85a、A2B5、鲁特格林α4/CD49d、Aag、整合素β2/CD18、AMICA、朗格汉斯蛋白(Langerin)、B7-2/CD86、白三烯B4 R1、B7-H3、LMIR1/CD300A、BLAME/SLAMF8、LMIR2/CD300c、Clq R1/CD93、LMIR3/CD300LF、CCR6、LMIR5/CD300LB CCR7、LMIR6/CD300LE、CD40/TNFRSF5、MAG/Siglec-4-a、CD43、MCAM、CD45、MD-1、CD68、MD-2、CD83、MDL-1/CLEC5A、CD84/SLAMF5、MMR、CD97、NCAML1、CD2F-10/SLAMF9、骨激活素GPNMB、Chern 23、PD-L2、CLEC-1、RP105、CLEC-2、CLEC-8、Siglec-2/CD22、CRACC/SLAMF7、Siglec-3/CD33、DC-SIGN、DCE205、Siglec-5、DC-SIGNR/CD299、Siglec-6、DCAR、Siglec-7、DCIR/CLEC4A、Siglec-9、DEC-205、Siglec-10、Dectin-1/CLEC7A、Siglec-F、Dectin-2/CLEC6A、SIGNR1/CD209、DEP-1/CD148、SIGNR4、DLEC、SLAM、EMMPRIN/CD147、TCCR/WSX-1、Fc-γR1/CD64、TLR3、Fc-γRIIB/CD32b、TREM-1、Fc-γRIIC/CD32c、TREM-2、Fc-γRIIA/CD32a、TREM-3、Fc-γRIII/CD16、TREML1/TLT-1、ICAM-2/CD102和辣椒素R1。在各个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含结合这些说明性DC抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0613] 在一些实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含具有特异性地结合至与选自但不限于巨核细胞、血小板、红细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞或它们的子集的免疫细胞相关的靶标(例如抗原或受体)的识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中，所述抗原识别结构域直接或间接地募集巨核细胞、血小板、红细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞或它们的子集，例如，在

一些实施方案中，募集至治疗部位(例如，具有一个或多个疾病细胞或者为了治疗效果而加以调节的细胞的位置)。

[0614] 在一些实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含具有特异性地结合至与巨核细胞和/或血小板相关的靶标(例如抗原或受体)的识别结构域的靶向部分。说明性目标巨核细胞和/或血小板抗原包括例如GP IIb/IIIa、GPIb、vWF、PF4和TSP。在各个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含结合这些说明性巨核细胞和/或血小板抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0615] 在一些实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含具有特异性地结合至与红细胞相关的靶标(例如抗原或受体)的识别结构域的靶向部分。说明性目标红细胞抗原包括例如CD34、CD36、CD38、CD41a(血小板糖蛋白IIb/IIIa)、CD41b(GPIIb)、CD71(转铁蛋白受体)、CD105、血型糖蛋白A、血型糖蛋白C、c-kit、HLA-DR、H2(MHC-II)和恒河猴抗原。在各个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含结合这些说明性红细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0616] 在一些实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含具有特异性地结合至与肥大细胞相关的靶标(例如抗原或受体)的识别结构域的靶向部分。说明性目标肥大细胞抗原包括例如SCFR/CD117、$Fc_{\varepsilon}RI$、CD2、CD25、CD35、CD88、CD203c、C5R1、CMA1、FCER1A、FCER2、TPSAB1。在各个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含结合这些肥大抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0617] 在一些实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含具有特异性地结合至与嗜碱性粒细胞相关的靶标(例如抗原或受体)的识别结构域的靶向部分。说明性目标嗜碱性粒细胞抗原包括例如$Fc_{\varepsilon}RI$、CD203c、CD123、CD13、CD107a、CD107b和CD164。在各个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含结合这些嗜碱性粒细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0618] 在一些实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含具有特异性地结合至与嗜中性粒细胞相关的靶标(例如抗原或受体)的识别结构域的靶向部分。说明性目标嗜中性粒细胞抗原包括例如7D5、CD10/CALLA、CD13、CD16(FcRIII)、CD18蛋白(LFA-1、CR3和p150、95)、CD45、CD67和CD177。在各个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含结合这些嗜中性粒细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0619] 在一些实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含具有特异性地结合至与嗜酸性粒细胞相关的靶标(例如抗原或受体)的识别结构域的靶向部分。说明性目标嗜酸性粒细胞抗原包括例如CD35、CD44和CD69。在各个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含结合这些嗜酸性粒细胞抗原中的一者或多者的靶向部分。

[0620] 在各个实施方案中，本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含具有特异性地结合至本领域技术人员已知的适当抗原或细胞表面标记物的识别结构域的靶向部分。在一些实施方案中，所述抗原或细胞表面标记物是组织特异性标记物。说明性组织特异性标记物包括但不限于内皮细胞表面标记物，诸如ACE、CD14、CD34、CDH5、ENG、ICAM2、MCAM、NOS3、PECAM1、PROCR、SELE、SELP、TEK、THBD、VCAM1、VWF；平滑肌细胞表面标记物，诸如ACTA2、MYH10、MYH1 1、MYH9、MYOCD；成纤维细胞(基质)细胞表面标记物，诸如ALCAM、CD34、COL1A1、COL1A2、COL3A1、FAP、PH-4；上皮细胞表面标记物，诸如CD1D、K6IRS2、KRT10、KRT13、

KRT17、KRT18、KRT19、KRT4、KRT5、KRT8、MUC1、TACSTD1;新生血管标记物,诸如CD13、TFNA、α-vβ-3(αVβ3)、E-选择素;和脂肪细胞表面标记物,诸如ADIPOQ、FABP4和RETN。在各个实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含结合这些抗原中的一者或多者的靶向部分。在各个实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的靶向部分结合具有这些抗原的细胞中的一者或多者。

[0621] 在各个实施方案中,本发明的多特异性嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物具有一个或多个针对检查点标记物的靶向部分,所述检查点标记物是PD-1/PD-L1或PD-L2、CD28/CD80或CD86、CTLA4/CD80或CD86、ICOS/ICOSL或B7RP1、BTLA/HVEM、KIR、LAG3、CD137/CD137L、OX40/OX40L、CD27、CD40L、TIM3/Gal9和A2aR中的一者或多者。

[0622] 作为非限制性实例,在各个实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物具有(i)在T细胞上表达的检查点标记物,例如PD-1、CD28、CTLA4、ICOS、BTLA、KIR、LAG3、CD137、OX40、Cd27、CD40L、TIM3和A2aR中的一者或多者;和(ii)针对肿瘤细胞的靶向部分,连同本文所描述的任何经修饰(例如突变)信号传导剂。

[0623] 在一些实施方案中,本发明的PD-L1靶向部分包括一个或多个另外的识别结构域。在一些实施方案中,这些另外的识别结构域结合至CD8、CD13、CD20、NKp46、Clec9A、Clec4c、PD-1、PD-L1、PD-L2、SIRP1α、FAP、XCR1、肌腱蛋白CA1、Flt3或ECM蛋白。

[0624] 嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的修饰和产生

[0625] 在各个实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含作为VHH的靶向部分(例如PD-L1)。在各个实施方案中,所述VHH不局限于特定的生物学来源或特定的制备方法。举例来说,所述VHH一般可以通过以下方式获得:(1)通过分离天然存在的重链抗体的V_HH结构域;(2)通过表达编码天然存在的V_HH结构域的核苷酸序列;(3)通过天然存在的V_HH结构域的“人源化”或通过编码此类人源化V_HH结构域的核酸的表达;(4)通过来自任何动物物种,诸如来自哺乳动物物种,诸如来自人类的天然存在的VH结构域的“骆驼化”,或通过编码此类骆驼化VH结构域的核酸的表达;(5)通过如本领域中所描述的“结构域抗体”或“Dab”的“骆驼化”,或通过编码此类骆驼化VH结构域的核酸的表达;(6)通过使用合成或半合成技术来制备本领域中已知的蛋白质、多肽或其他氨基酸序列;(7)通过使用本领域中已知的核酸合成技术来制备编码VHH的核酸,随后表达如此获得的核酸;和/或(8)通过上述一项或多项的任何组合。

[0626] 在一个实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含对应于针对人PD-L1的天然存在的重链抗体的V_HH结构域的VHH。在一些实施方案中,一般可以通过以下方式来产生或获得此类V_HH序列:通过用PD-L1分子适当地使一种骆驼免疫(即,以便产生免疫应答和/或针对PD-L1的重链抗体);通过从所述骆驼获得合适的生物样品(诸如血液样品或任何B细胞样品);以及通过以所述样品为起始物,使用任何合适的已知技术来产生针对PD-L1的V_HH序列。在一些实施方案中,针对PD-L1的天然存在的V_HH结构域可以获自骆驼V_HH序列的天然文库,举例来说,通过使用本领域中已知的一种或多种筛选技术,使用PD-L1或其至少一个部分、片段、抗原决定子或表位对此类文库进行筛选。举例来说,此类文库和技术描述于WO9937681,WO0190190、WO03025020和WO03035694中,所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中,可以使用来源于天然V_HH文库的经过改善的合成或半合成文库,诸如通过诸如随机诱变和/或CDR改组的技术而获自天然V_HH文库的V_HH文库,如例如

WO0043507中所描述，所述文献的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中，用于获得针对PD-L1的V_HH序列的另一种技术包括适当地使能够表达重链抗体的转基因哺乳动物免疫(即，以便产生免疫应答和/或针对PD-L1的重链抗体)，从所述转基因哺乳动物获得合适的生物样品(诸如血液样品，或任何B细胞样品)，然后使用任何合适的已知技术，以所述样品为起始物来产生针对PD-L1的V_HH序列。举例来说，出于这个目的，可以使用WO02085945中和WO04049794中所描述的表达重链抗体的小鼠以及其他方法和技术(所述文献的全部内容特此以引用方式并入)。

[0627] 在一个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含已经“人源化”，即通过将天然存在的V_HH序列的氨基酸序列中(且具体来说是框架序列中)的一个或多个氨基酸残基置换为来自人的常规4链抗体的VH结构域中对应位置上存在的一个或多个氨基酸残基的VHH。这可以使用本领域中已知的人源化技术来进行。在一些实施方案中，可能的人源化取代或人源化取代的组合可以通过本领域中已知的方法来确定，例如，通过在VHH的序列与天然存在的人VH结构域的序列之间进行比较。在一些实施方案中，对所述人源化取代进行选择，以使所得人源化VHH仍保留有利的功能性质。一般来说，作为人源化的结果，本发明的VHH相较于对应的天然存在的V_HH结构域可以变得更“像人的”，同时仍保留有利性质，诸如降低的免疫原性。在各个实施方案中，本发明的人源化VHH可以用本领域中已知的任何合适的方式来获得，并且因此不严格限于已经使用包含天然存在的V_HH结构域作为起始物质的多肽获得的多肽。

[0628] 在一个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包含已经“骆驼化”，即通过将来自常规4链抗体的天然存在的VH结构域的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基置换为骆驼重链抗体的V_HH结构域中对应位置上存在的一个或多个氨基酸残基的VHH。在一些实施方案中，此类“骆驼化”取代被插入在形成和/或存在于VH-VL界面上的氨基酸位置上和/或在所谓的骆驼科标志残基上(参见例如WO9404678，所述文献的全部内容特此以引用方式并入)。在一些实施方案中，用作起始物质或起始点以供产生或设计骆驼化VHH用的VH序列是来自哺乳动物的VH序列，例如，人的VH序列，诸如VH3序列。在各个实施方案中，所述骆驼化VHH可以用本领域中已知的任何合适的方式获得(即，如以上第(1)-(8)点所指示)，并且因此不严格限于已经使用包含天然存在的VH结构域作为起始物质的多肽而获得的多肽。

[0629] 在各个实施方案中，“人源化”与“骆驼化”可以通过以下方式来进行：分别提供编码天然存在的V_HH结构域或VH结构域的核苷酸序列，然后用本领域中已知的方式改变所述核苷酸序列中的一个或多个密码子，以这种方式使得新的核苷酸序列分别编码“人源化”或“骆驼化”VHH。然后可以用本领域中已知的方式表达这种核酸，以便提供本发明的所期望的VHH。或者，分别基于天然存在的V_HH结构域或VH结构域的氨基酸序列，分别可以设计本发明的所期望的人源化或骆驼化VHH的氨基酸序列，然后使用本领域中已知的肽合成技术从头合成。而且，分别基于天然存在的V_HH结构域或VH结构域的氨基酸序列或核苷酸序列，分别可以设计编码所期望的人源化或骆驼化VHH的核苷酸序列，然后使用本领域中已知的核酸合成技术从头合成，此后可以用本领域中已知的方式表达如此获得的核酸，以便提供本发明的所期望的VHH。以天然存在的VH序列或V_HH序列为起始物获得本发明的VHH和/或编码所述VHH的核酸的其他合适的方法和技术在本领域中是已知的，并且可以例如包括以合适的方式组合一种或多种天然存在的VH序列的一个或多个部分(诸如一个或多个FR序列和/或

CDR序列)、一种或多种天然存在的V_HH序列的一个或多个部分(诸如一个或多个FR序列或CDR序列)和/或一个或多个合成或半合成序列,以便提供本发明的VHH或者编码所述VHH的核苷酸序列或核酸。

[0630] 本文描述了用于制备本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的方法。举例来说,可以使用本领域中已知的方法以化学方式合成编码本发明的嵌合蛋白的DNA序列(例如,编码经修饰的信号传导剂和靶向部分和接头的DNA序列)和靶向部分和柔性接头的DNA序列。合成DNA序列可以连接至其他适当的核苷酸序列,包括例如表达控制序列,以产生编码所期望的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的基因表达构建体。因此,在各个实施方案中,本发明提供了包含编码本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的核苷酸序列的分离的核酸。

[0631] 编码本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的核酸可以并入(连接)至表达载体中,所述表达载体可以通过转染、转化或转导技术而引入宿主细胞中。举例来说,可以通过反转录病毒转导将编码本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的核酸引入至宿主细胞中。说明性宿主细胞是大肠杆菌细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚肾293(HEK 293)细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如Hep G2)和骨髓瘤细胞。可以使转化的宿主细胞在允许宿主细胞表达编码本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的基因的条件下生长。因此,在各个实施方案中,本发明提供了包含编码本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的核酸的表达载体。在各个实施方案中,本发明额外提供了包含此类表达载体的宿主细胞。

[0632] 具体的表达和纯化条件将取决于所采用的表达系统而变化。举例来说,如果在大肠杆菌中表达基因,那么首先通过将工程化的基因置于合适的细菌启动子例如Trp或Tac和原核信号序列的下游而将它克隆至表达载体中。在另一个实例中,如果将要在真核宿主细胞,例如CHO细胞中表达工程化的基因,那么首先将它插入含有例如合适的真核启动子、分泌信号、增强子和各种内含子的表达载体中。可以使用转染、转化或转导技术将基因构建体引入至宿主细胞中。

[0633] 本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以通过使经编码所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的表达载体转染的宿主细胞在允许表达所述蛋白质的条件下生长来产生。在表达后,可以使用本领域中众所周知的技术,例如亲和力标签诸如谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和组氨酸标签或通过色谱法来收集并且纯化所述蛋白质。

[0634] 因此,在各个实施方案中,本发明提供了一种编码本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的核酸。在各个实施方案中,本发明提供了一种包含编码本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的核酸的宿主细胞。

[0635] 在各个实施方案中,本发明的PD-L1靶向部分或包含其的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以在体内例如在患者中表达。例如,在各个实施方案中,本发明的PD-L1靶向部分或包含其的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以呈编码本发明的PD-L1靶向部分或包含其的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的核酸形式施用。在各个实施方案中,所述核酸是DNA或RNA。在一些实施方案中,本发明的PD-L1靶向部分或包含其的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物是由经修饰的mRNA,即包含一个或多个经修饰的核苷酸的mRNA编码。在一些实施方案中,所述经修饰的mRNA包含一个或多个在美国专利号8,278,036中发现的修饰,所述专利的全部内容特此以引用方式并入。在一些实施方案中,所述经修饰的mRNA包含m5C、m5U、m6A、s2U、Ψ和2'-O-甲

基-U中的一者或多者。在一些实施方案中，本发明涉及施用编码一种或多种本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的经修饰的mRNA。在一些实施方案中，本发明涉及包含所述经修饰的mRNA的基因治疗载体。在一些实施方案中，本发明涉及包括所述基因治疗载体的基因治疗方法。在各个实施方案中，所述核酸呈溶瘤病毒，例如腺病毒、呼肠孤病毒、麻疹、单纯疱疹、新城疫病毒或牛痘的形式。

[0636] 药学上可接受的盐和赋形剂

[0637] 本文所描述的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以具有能与无机或有机酸反应的充分碱性的官能团，或能与无机或有机碱反应的羧基，以形成药学上可接受的盐。如本领域中众所周知，药学上可接受的酸加成盐是由药学上可接受的酸形成。此类盐包括例如以下文献中列出的药学上可接受的盐:Journal of Pharmaceutical Science,66,2-19(1977)和The Handbook of Pharmaceutical Salts;Properties,Selection,and Use.P.H.Stahl和C.G.Wermuth(编辑),Verlag,Zurich(Switzerland)2002,所述文献特此以引用方式整体并入。

[0638] 作为非限制性实例，药学上可接受的盐包括硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、樟脑磺酸盐、双羟萘酸盐、苯基乙酸盐、三氟乙酸盐、丙烯酸盐、氯代苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、邻乙酰氧基苯甲酸盐、萘-2-苯甲酸盐、异丁酸盐、苯基丁酸盐、α-羟基丁酸盐、丁炔-1,4-二甲酸盐、己炔-1,4-二甲酸盐、癸酸盐、辛酸盐、肉桂酸盐、乙醇酸盐、庚酸盐、马尿酸盐、苹果酸盐、羟基马来酸盐、丙二酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、烟酸盐、酞酸盐、对苯二酸盐、丙炔酸盐、丙酸盐、苯基丙酸盐、癸二酸盐、辛二酸盐、对溴代苯磺酸盐、氯代苯磺酸盐、乙基磺酸盐、2-羟乙基磺酸盐、甲基磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、萘-1,5-磺酸盐、二甲苯磺酸盐和酒石酸盐。

[0639] 术语“药学上可接受的盐”还指具有酸性官能团，诸如羧酸官能团的本发明组合物与碱形成的盐。合适的碱包括但不限于碱金属诸如钠、钾和锂的氢氧化物;碱土金属诸如钙和镁的氢氧化物;其他金属诸如铝和锌的氢氧化物;氨和有机胺，诸如未经取代或经羟基取代的单烷基胺、二烷基胺或三烷基胺、二环己基胺;三丁胺;吡啶;N-甲基,N-乙基胺;二乙基胺;三乙基胺;单(2-OH-低级烷基胺)、双(2-OH-低级烷基胺)或三(2-OH-低级烷基胺)(诸如单(2-羟基乙基)胺、双(2-羟基乙基)胺或三(2-羟基乙基)胺)、2-羟基-叔丁胺或三(羟甲基)甲胺、N,N-二-低级烷基-N-(羟基-低级烷基)-胺(诸如N,N-二甲基-N-(2-羟基乙基)胺)或三(2-羟基乙基)胺;N-甲基-D-葡萄糖胺;和氨基酸，诸如精氨酸、赖氨酸等等。

[0640] 在一些实施方案中，本文所描述的组合物呈药学上可接受的盐的形式。

[0641] 药物组合物和制剂

[0642] 在各个实施方案中，本发明有关于包含本文所描述的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物和药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。本文所描述的任何药物组合物都可以作为包含药学上可接受的载体或媒介物的组合物的组分施用至受试者。此类组合物可以任选地包含适量的药学上可接受的赋形剂，以便提供用于适当施用的形式。

[0643] 在各个实施方案中，药物赋形剂可以是液体，诸如水和油，包括石油、动物、植物或合成来源的那些液体，诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等等。所述药物赋形剂可以是例如生理盐水、阿拉伯树胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白、胶体二氧化硅、脲等等。另外，可以使用助剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂。在一个实施方案中，当施用至受试者时，所述药学上可接受的赋形剂是无菌的。当经静脉内施用本文所描述的任何剂时，水是可用的赋形剂。还可以采用生理盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液作为液体赋形剂，具体来说，用于可注射溶液。合适的药物赋形剂还包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等等。本文所描述的任何剂在需要时还可以包含微量润湿剂或乳化剂或pH值缓冲剂。合适的药物赋形剂的其他实例描述于Remington's Pharmaceutical Sciences 1447-1676(Alfonso R.Gennaro编辑，第19版1995)中，所述文献以引用方式并入本文。

[0644] 本发明包括所描述的药物组合物(和/或其他治疗剂)的各种制剂形式。本文所描述的任何发明药物组合物(和/或其他治疗剂)可以呈溶液、悬浮液、乳液、滴剂、片剂、丸剂、丹剂、胶囊剂、含有液体的胶囊剂、明胶胶囊、粉剂、持续释放制剂、栓剂、乳液、气雾剂、喷雾剂、悬浮液、冻干粉剂、冷冻悬浮液、干燥粉剂的形式或任何其他合用的形式。在一个实施方案中，所述组合物呈胶囊剂形式。在另一个实施方案中，所述组合物呈片剂形式。在另一个实施方案中，所述药物组合物被配制为呈软凝胶胶囊形式。在另一个实施方案中，所述药物组合物被配制为呈明胶胶囊形式。在另一个实施方案中，所述药物组合物被配制为液体。

[0645] 在必要时，本发明的药物组合物(和/或其他剂)还可以包括增溶剂。所述剂还可以与如本领域中已知的合适的媒介物或递送装置一起递送。本文概述的组合疗法可以在单个递送媒介物或递送装置中共同递送。

[0646] 本发明的包含本发明药物组合物(和/或其他剂)的制剂可能适宜呈单位剂型的形式存在，并且可以通过制药领域中众所周知的任何方法来制备。此类方法一般包括使所述治疗剂与构成一种或多种辅助成分的载体缔合的步骤。典型地，所述制剂是通过使所述治疗剂均匀地并且密切地与液体载体、细粉状固体载体或二者缔合，然后在必要时将产物成形为所期望的制剂的剂型(例如湿式或干式造粒、粉末掺合物等，随后使用本领域中已知的常规方法进行制片)来制备。

[0647] 在各个实施方案中，本文所描述的任何药物组合物(和/或其他剂)根据常规程序配制为适合于本文所描述的施用模式的组合物。

[0648] 施用途径包括例如：口服、皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、舌下、鼻内、脑内、阴道内、经皮、直肠、通过吸入或局部。施用可以是局部的或全身的。在一些实施方案中，所述施用是通过口服实现。在另一个实施方案中，所述施用是通过肠胃外注射。施用模式可以留给医师判断，并且部分取决于医学病状的部位。在大部分情况下，施用使得本文所描述的任何剂释放至血流中。

[0649] 在一个实施方案中，本文所描述的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物根据常规程序配制为适合于口服施用的组合物。举例来说，用于口服递送的组合物可以呈片剂、糖锭、水性或油性悬浮液、颗粒剂、粉剂、乳液、胶囊剂、糖浆或酏剂形式。口服施用的组合物可以包含一种或多种剂，例如甜味剂，诸如果糖、阿斯巴特(aspartame)或糖精；调味剂，诸如薄荷油、冬青油或樱桃油；着色剂；和防腐剂，以提供药学上可口的制剂。此外，在呈片剂或丸剂形式

时，所述组合物可以经过包衣以延迟胃肠道中的崩解和吸收，从而在较长时间段内提供持续作用。在本文所描述的渗透活性驱动的任何嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物周围的选择性渗透膜还适用于口服施用的组合物。在后面的这些平台中，来自于所述胶囊剂周围的环境的流体被驱动化合物吸入，所述驱动化合物膨胀从而通过孔口置换所述剂或剂组合物。与立即释放制剂的尖峰分布相反，这些递送平台可以提供本质上零阶的递送分布。时间延迟材料诸如单硬脂酸甘油酯或硬脂酸甘油酯也是可用的。口服组合物可以包括标准赋形剂，诸如甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素和碳酸镁。在一个实施方案中，所述赋形剂属于药物等级。悬浮液以及活性化合物可以含有悬浮剂，诸如例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧化乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、皂土、琼脂、黄芪胶等以及它们的混合物。

[0650] 适用于肠胃外施用(例如静脉内、肌肉内、腹膜内、皮下和关节内注射和输注)的剂型包括例如溶液、悬浮液、分散液、乳液等等。它们还可以制造为呈无菌固体组合物(例如冻干组合物)形式，所述形式可以在即将使用前溶解或悬浮在无菌可注射介质中。它们可以含有例如本领域中已知的悬浮剂或分散剂。适用于肠胃外施用的制剂组分包括无菌稀释剂诸如注射用水、生理盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂；抗细菌剂诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂诸如EDTA；缓冲液诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；和张力调节剂诸如氯化钠或葡萄糖。

[0651] 对于静脉内施用而言，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、克列莫佛(Cremophor)ELTM(BASF,Parsippany,NJ)或磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)。所述载体在制造和存储条件下应当是稳定的，并且应当经过防腐以免受微生物影响。所述载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)以及它们的合适的混合物的溶剂或分散介质。

[0652] 本文所提供的组合物可以单独或与其他合适的组分组合而制成气雾剂制剂(即，“喷雾”)以便经由吸入施用。气雾剂制剂可以放入加压可接受的推进剂诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等等中。

[0653] 本文所描述的任何发明药物组合物(和/或其他剂)可以通过控制释放或持续释放手段或通过本领域普通技术人员众所周知的递送装置施用。实例包括但不限于美国专利号3,845,770、3,916,899、3,536,809、3,598,123、4,008,719、5,674,533、5,059,595、5,591,767、5,120,548、5,073,543、5,639,476、5,354,556和5,733,556中所描述的那些，各美国专利以引用的方式整体并入本文。此类剂型可用于使用例如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、其他聚合物基质、凝胶、渗透膜、渗透系统、多层涂层、微粒、脂质体、微球体或它们的组合提供一种或多种活性成分的控制释放或持续释放，从而在变化的比例下提供所期望的释放分布。可以容易地选择本领域技术人员已知的合适的控制释放或持续释放制剂，包括本文所描述的那些，以便与本文所描述的剂的活性成分一起使用。本发明因此提供了适合口服施用的单个单位剂型，诸如但不限于适合于控制释放或持续释放的片剂、胶囊剂、囊形片和胶囊片。

[0654] 可以通过各种条件包括但不限于pH值变化、温度变化来刺激、通过适当的光的波长、酶的浓度或可用性、水的浓度或可用性或者其他生理条件或化合物来刺激活性成分的控制释放或持续释放。

[0655] 在另一个实施方案中，控制释放系统可以放在欲治疗的目标区域的附近，因此仅

需要全身剂量的一部分(参见例如Goodson,Medical Applications of Controlled Release,同上,第2卷,第115-138页(1984))。可以使用Langer,1990,Science 249:1527-1533)的综述中讨论的其他控制释放系统。

[0656] 药物制剂优选地是无菌的。可以例如通过经无菌过滤膜过滤来实现灭菌。在组合物被冻干的情况下,可以在冻干和复水之前或之后进行过滤灭菌。

[0657] 施用和剂量

[0658] 应当了解,根据本发明施用的本文所描述的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的实际剂量将根据具体剂型和施用模式而变化。本领域技术人员可以考虑能调节嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的作用的许多因素(例如体重、性别、饮食、施用时间、施用途径、排泄速率、受试者的状况、药物组合、遗传倾向和反应敏感性)。可以连续地或者以最大耐受剂量内的一个或多个离散剂量进行施用。本领域技术人员可以使用常规剂量施用测试来确定给定条件组的最佳施用速率。

[0659] 在一些实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的合适的剂量在约0.01mg/kg至约10g/kg受试者体重、约0.01mg/kg至约1g/kg受试者体重、约0.01mg/kg至约100mg/kg受试者体重、约0.01mg/kg至约10mg/kg受试者体重的范围内,例如约0.01mg/kg、约0.02mg/kg、约0.03mg/kg、约0.04mg/kg、约0.05mg/kg、约0.06mg/kg、约0.07mg/kg、约0.08mg/kg、约0.09mg/kg、约0.1mg/kg、约0.2mg/kg、约0.3mg/kg、约0.4mg/kg、约0.5mg/kg、约0.6mg/kg、约0.7mg/kg、约0.8mg/kg、约0.9mg/kg、约1mg/kg、约1.1mg/kg、约1.2mg/kg、约1.3mg/kg、约1.4mg/kg、约1.5mg/kg、约1.6mg/kg、约1.7mg/kg、约1.8mg/kg、1.9mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg、约8mg/kg、约9mg/kg、约10mg/kg体重、约100mg/kg体重、约1g/kg体重、约10g/kg体重,包括所有值和介于这些值之间的范围。

[0660] 所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的个别剂量可以呈含有例如每个单位剂型约0.01mg至约100g、约0.01mg至约75g、约0.01mg至约50g、约0.01mg至约25g、约0.01mg至约10g、约0.01mg至约7.5g、约0.01mg至约5g、约0.01mg至约2.5g、约0.01mg至约1g、约0.01mg至约100mg、约0.1mg至约100mg、约0.1mg至约90mg、约0.1mg至约80mg、约0.1mg至约70mg、约0.1mg至约60mg、约0.1mg至约50mg、约0.1mg至约40mg活性成分、约0.1mg至约30mg、约0.1mg至约20mg、约0.1mg至约10mg、约0.1mg至约5mg、约0.1mg至约3mg、约0.1mg至约1mg或每个单位剂型约5mg至约80mg的单位剂型(例如片剂或胶囊)的形式施用。举例来说,单位剂型可以是约0.01mg、约0.02mg、约0.03mg、约0.04mg、约0.05mg、约0.06mg、约0.07mg、约0.08mg、约0.09mg、约0.1mg、约0.2mg、约0.3mg、约0.4mg、约0.5mg、约0.6mg、约0.7mg、约0.8mg、约0.9mg、约1mg、约2mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg、约100mg、约200mg、约500mg、约1g、约2.5g、约5g、约10g、约25g、约50g、约75g、约100g,包括所有值和介于这些值之间的范围。

[0661] 在一个实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物是以每天约0.01mg至约100g、每天约0.01mg至约75g、每天约0.01mg至约50g、每天约0.01mg至约25g、每天约0.01mg至约10g、每天约0.01mg至约7.5g、每天约0.01mg至约5g、每天约0.01mg至约2.5g、每天约0.01mg至约1g、每天约0.01mg至约100mg、每天约0.1mg至约100mg、每天约0.1mg至约95mg、每天约0.1mg至约90mg、每天约0.1mg至约85mg、每天约0.1mg至约80mg、每天约0.1mg至约

75mg、每天约0.1mg至约70mg、每天约0.1mg至约65mg、每天约0.1mg至约60mg、每天约0.1mg至约55mg、每天约0.1mg至约50mg、每天约0.1mg至约45mg、每天约0.1mg至约40mg、每天约0.1mg至约35mg、每天约0.1mg至约30mg、每天约0.1mg至约25mg、每天约0.1mg至约20mg、每天约0.1mg至约15mg、每天约0.1mg至约10mg、每天约0.1mg至约5mg、每天约0.1mg至约3mg、每天约0.1mg至约1mg或每天约5mg至约80mg的量施用。在各个实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物是以约0.01mg、约0.02mg、约0.03mg、约0.04mg、约0.05mg、约0.06mg、约0.07mg、约0.08mg、约0.09mg、约0.1mg、约0.2mg、约0.3mg、约0.4mg、约0.5mg、约0.6mg、约0.7mg、约0.8mg、约0.9mg、约1mg、约2mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg、约100mg、约200mg、约500mg、约1g、约2.5g、约5g、约7.5g、约10g、约25g、约50g、约75g、约100g的每日剂量施用，包括所有值和介于这些值之间的范围。

[0662] 根据本发明的某些实施方案，包含所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的药物组合物可以施用例如每天超过一次(例如每天约两次、约三次、约四次、约五次、约六次、约七次、约八次、约九次或约十次)、约每天一次、约每隔一天一次、约每第三天一次、约一周一次、约每两周一次、约每个月一次、约每两个月一次、约每三个月一次、约每六个月一次或约每年一次。

[0663] 组合疗法和其他治疗剂

[0664] 在各个实施方案中，将本发明的药物组合物与一种或多种另外的治疗剂联合共同施用。共同施用可以同时或依序进行。

[0665] 在一个实施方案中，将所述其他治疗剂和本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物同时施用至受试者。如本文所使用，术语“同时”意指所述其他治疗剂和所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的施用时间间隔不超过约60分钟，诸如不超过约30分钟、不超过约20分钟、不超过约10分钟、不超过约5分钟或不超过约1分钟。所述其他治疗剂和所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的施用可以通过同时施用单一制剂(例如包含所述其他治疗剂和所述嵌合蛋白的制剂)或独立的制剂(例如包括所述其他治疗剂的第一制剂和包括所述嵌合蛋白的第二制剂)来进行。

[0666] 共同施用不需要同时施用各治疗剂，只要其施用时程使得所述其他治疗剂和所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的药理学活性在时间上重叠，由此发挥组合治疗作用即可。举例来说，所述其他治疗剂和所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以依序施用。如本文所使用，术语“依序”意指所述其他治疗剂和所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的施用时间间隔超过约60分钟。举例来说，依序施用所述其他治疗剂与所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物之间的时间可以间隔超过约60分钟、超过约2小时、超过约5小时、超过约10小时、超过约1天、超过约2天、超过约3天、超过约1周、间隔超过约2周或间隔超过约一个月。最佳的施用时间将取决于代谢速率、排泄速率和/或所施用的其他治疗剂和嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物的药物动力学活性。可以先施用所述其他治疗剂或嵌合蛋白细胞。

[0667] 共同施用也不需要通过相同施用途径向受试者施用所述治疗剂。实际上，各治疗剂可以通过任何适当的途径，例如经肠胃外或非肠胃外施用。

[0668] 在一些实施方案中，本文所描述的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物当与另一种治疗剂

共同施用时协同起作用。在此类实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物和其他治疗剂的施用剂量可以低于当各剂用于单一疗法情形时所采用的剂量。

[0669] 在一些实施方案中，本发明有关于化学治疗剂作为其他治疗剂。举例来说但不限于，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物与化学治疗剂的这种组合可用于治疗癌症，如本文中其他部分所描述。化学治疗剂的实例包括但不限于烷化剂，诸如噻替派(thiotepa)和CYTOXAN环磷酰胺;烷基磺酸酯，诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶，诸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa);乙烯亚胺和甲基蜜胺，包括六甲蜜胺(altretamine)、曲他胺(triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰(acetogenin)(例如布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone));喜树碱(camptothecin)(包括合成类似物拓扑替康(topotecan));苔藓抑素(bryostatin);海绵抑素(cally statin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);念珠藻环肽(cryptophycin)(例如，念珠藻环肽1和念珠藻环肽8);海兔抑素(dolastatin);倍癌霉素(duocarmycin)(包括合成类似物，KW-2189和CB 1-TM1);伊斯罗宾(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑素(spongistatin);氮芥，诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、氮芥氧化物盐酸盐(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、乌拉莫司汀(uracil mustard);亚硝基脲，诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫斯汀(ranimnustine);抗生素，诸如烯二炔类抗生素(例如卡利奇霉素(calicheamicin)，尤其是卡利奇霉素γ1和卡利奇霉素ω1(参见例如Agnew，Chem.Intl.Ed.Engl.,33:183-186(1994)));达内霉素(dynemicin)，包括达内霉素A;双膦酸盐，诸如氯屈膦酸盐(clodronate);埃斯波霉素(esperamicin);以及新制癌菌素发色团(neocarzinostatin chromophore)和相关色素蛋白烯二炔类抗生素发色团、阿克拉霉素(aclacinomysin)、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C(cactinomycin)、卡拉比星(carabicin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN多柔比星(doxorubicin)(包括吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素类(mitomycins)诸如丝裂霉素C、霉芬酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泼非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、奎那霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物，诸如甲氨蝶呤

(methotrexate)和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,诸如迪诺特宁(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、曲美沙特(trimetrexate);嘌呤类似物,诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、噻咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,诸如环胞苷(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮杂尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、脱氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine);雄激素,诸如卡芦睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺药,诸如氨鲁米特(minoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,诸如亚叶酸(frolinic acid);醋葡醛内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);恩尿嘧啶(eniluracil);安吖啶(amsacrine);贝斯布西(bestrabucil);比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);秋水仙胺(demecolcine);地吖醌(diaziquone);依洛尼塞(elformithine);依利醋铵(elliptinium acetate);埃博霉素(epothilone);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;蘑菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidainine);类美登素(maytansinoid),诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocins);米托胍腙(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidanmol);二胺硝吖啶(nitraerine);喷司他汀(pentostatin);蛋氨氮芥(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙基酰肼;丙卡巴肼(procarbazine);PSK多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,Oreg.);雷佐生(razoxane);根霉素(rhizoxin);西佐喃(sizofuran);锗螺胺(spirogermanium);替奴佐酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2″-三氯三乙胺;单端孢霉烯(trichothecenes)(例如T-2毒素、粘液霉素A(verracurin A)、杆孢菌素A(roridin A)和蛇形菌素(anguidine));乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露氮芥(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);加西托星(gacytosine);阿糖胞苷(arabinoside)("Ara-C");环磷酰胺;噻替派;类紫杉醇(taxoid),例如TAXOL太平洋紫杉醇(paclitaxel)(Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)、ABRAXANE太平洋紫杉醇的不含聚氧乙烯化蓖麻油(Cremophor)的经白蛋白工程化的纳米粒子制剂(American Pharmaceutical Partners,Schaumberg,111.)以及TAXOTERE多西他赛(doxetaxel)(Rhone-Poulenc Rorer,Antony,France);苯丁酸氮芥;GEMZAR吉西他滨(gemcitabine);6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,诸如顺铂(cisplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)和卡铂(carboplatin);长春碱(vinblastine);铂;依托泊苷(etoposide)(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱(vincristine);NAVELBINE.长春瑞滨(vinorelbine);诺消灵(novantrone);替尼泊苷(teniposide);依达曲沙(edatrexate);柔红霉素(daunomycin);氨基蝶呤(aminopterin);希罗达(xeloda);伊班膦酸盐(ibandronate);伊立替康(irinotecan)(Camptosar、CPT-11)(包括伊立替康与5-FU的治疗方案和亚叶酸(leucovorin));拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类视黄素(retinoid),诸如视黄酸(retinoic acid);卡培他滨(capecitabine);康普瑞汀(combretastatin);亚叶酸(LV);奥沙利铂(oxaliplatin),包括奥沙利铂治疗方案(FOLFOX);拉帕替尼(lapatinib)(Tykerb);减少细胞增殖的PKC-α、Raf、

H-Ras、EGFR的抑制剂(例如埃罗替尼(erlotinib)(Tarceva))和VEGF-A的抑制剂;以及以上任一者的药学上可接受的盐、酸或衍生物。另外,所述治疗方法还可以包括使用辐射。另外,所述治疗方法还可以包括使用光动力疗法。

[0670] 在一个实施方案中,本发明涉及靶向剪接体(包括剪接体的任何组分)的任何剂作为癌症治疗中的其他治疗剂。

[0671] 在一个实施方案中,本发明涉及靶向Myc的任何剂(即抗Myc治疗剂)作为癌症治疗中的其他治疗剂。

[0672] 在一些实施方案中,包括但不限于感染性疾病应用,本发明涉及抗感染剂作为其他治疗剂。在一些实施方案中,所述抗感染剂是抗病毒剂,包括但不限于阿巴卡韦(Abacavir)、阿昔洛韦(Acyclovir)、阿德福韦(Adefovir)、安普那韦(Amprenavir)、阿扎那韦(Atazanavir)、西多福韦(Cidofovir)、达芦那韦(Darunavir)、地拉韦啶(Delavirdine)、去羟肌苷(Didanosine)、多可沙诺(Docosanol)、依非韦仑(Efavirenz)、埃替格韦(Elvitegravir)、恩曲他滨(Emtricitabine)、恩福韦地(Enfuvirtide)、依曲韦林(Etravirine)、泛昔洛韦(Famciclovir)和膦甲酸盐(Foscarnet)。在一些实施方案中,抗感染剂是抗细菌剂,包括但不限于头孢菌素类抗生素(头孢胺苄(cephalexin)、头孢呋辛(cefuroxime)、头孢羟胺苄(cefadroxil)、头孢唑林(cefazolin)、头孢噻吩(cephalothin)、头孢克洛(cefaclor)、头孢孟多(cefamandole)、头孢西丁(cefoxitin)、头孢丙烯(cefprozil)和头孢托罗酯(ceftobiprole));氟喹诺酮类抗生素(fluoroquinolone antibiotics)(环丙沙星(cipro)、左氟沙星(Levaquin)、氧氟沙星(floxin)、加替沙星(tequin)、莫西沙星(avelox)和诺氟沙星(norflox));四环素类抗生素(四环素、米诺环素(minocycline)、羟四环素(oxytetracycline)和去氧环素(doxycycline));青霉素类抗生素(阿莫西林(amoxicillin)、胺苄西林(ampicillin)、青霉素V、双氯西林(dicloxacillin)、羧苄西林(carbenicillin)、万古霉素(vancomycin)和甲氧西林(methicillin));单酰胺环类抗生素(胺曲南(aztreonam));以及碳青霉烯类抗生素(厄他培南(ertapenem)、多尼培南(doripenem)、亚胺培南(imipenem)/西司他丁(cilastatin)和美罗培南(meropenem))。在一些实施方案中,抗感染剂包括抗疟药(例如氯喹(chloroquine)、奎宁(quinine)、甲氟喹(mefloquine)、伯胺喹(primaquine)、去氧环素(doxycycline)、蒿甲醚(artemether)/苯芴醇(lumefantrine)、阿托伐醌(atovaquone)/氯胍(proguanil)和磺胺多辛(sulfadoxine)/乙胺嘧啶(pyrimethamine))、甲硝唑(metronidazole)、替硝唑(tinidazole)、伊维菌素(ivermectin)、双羟萘酸噻嘧啶(pyrantel pamoate)和阿苯达唑(albendazole)。

[0673] 在一些实施方案中,包括但不限于自身免疫应用,所述其他治疗剂是免疫阻抑剂。在一些实施方案中,所述免疫阻抑剂是消炎剂,诸如类固醇类消炎剂或非类固醇类消炎剂(NSAID)。类固醇,特别是肾上腺皮质类固醇及其合成类似物在本领域中是众所周知的。可用于本发明中的皮质类固醇的实例包括但不限于羟基曲安西龙(hydroxyltriamcinolone)、α-甲基地塞米松(alpha-methyldexamethasone)、β-甲基地塞米松、二丙酸倍氯米松(beclomethasone dipropionate)、苯甲酸倍他米松(betamethasone benzoate)、二丙酸倍他米松、戊酸倍他米松、戊酸氯倍他索(clobetasol valerate)、地奈德(desonide)、去羟米松(desoxy methasone)、地塞米松(dexamethasone)、二乙酸二氟拉松(diflorasone

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

[0674] 在一些实施方案中,本发明有关于作为额外治疗剂用于治疗肥胖的各种剂。用于治疗肥胖症的说明性剂包括但不限于奥利司他(orlistat)(例如ALL1、XENICAL)、氯卡色林(loracaserin)(例如BELVIQ)、苯丁胺(phentermine)-托吡酯(topiramate)(例如QSYMIA)、西布曲明(sibutramme)(例如REDUCTIL或MERJDIA)、利莫那班(rimonabant)(ACOMPLLA)、艾塞那肽(exenatide)(例如BYETTA)、普兰林肽(pramlintide)(例如SYMLIN)苯丁胺、苄非他明(benzphetamine)、二乙胺苯丙酮(diethylpropion)、苯甲曲秦(phendimetrazme)、安非他酮(bupropion)和二甲双胍(metformin)。干扰身体吸收食物中的特定营养物质的能力的剂在所述额外的剂中,例如奥利司他(例如ALU、XENICAL)、葡甘露聚糖和瓜尔胶。抑制食欲的剂也在所述额外的剂中,例如儿茶酚胺及其衍生物(诸如芬特明(phenteimine)和其他基于安非他命的药物)、各种抗抑郁剂和情绪稳定剂(例如安非他酮和托吡酯)、减食欲剂(例如dexedrine、地高辛)。增加身体代谢的剂也在所述额外的剂中。

[0675] 在一些实施方案中,额外治疗剂可以选自食欲抑制剂、神经递质再摄取抑制剂、多巴胺能激动剂、血清素能激动剂、GABA能信号传导调节剂、抗惊厥剂、抗抑郁剂、单胺氧化酶抑制剂、P物质(NK1)受体拮抗剂、黑皮质素受体激动剂和拮抗剂、脂肪酶抑制剂、脂肪吸收

抑制剂、能量摄取或代谢调控剂、大麻素受体调节剂、用于治疗成瘾的剂、用于治疗代谢综合征的剂、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)调节剂;二肽基肽酶4(DPP-4)拮抗剂、用于治疗心血管疾病的剂、用于治疗甘油三酯水平升高的剂、用于治疗低HDL的剂、用于治疗高胆固醇血症的剂和用于治疗高血压的剂。一些用于心血管疾病的剂包括他汀类药物(例如洛伐他汀(lovastatin)、阿托伐他汀(atorvastatin)、氟伐他汀(fluvastatin)、瑞舒伐他汀(rosuvastatin)、辛伐他汀(simvastatin)和帕伐他汀(pravastatin))和ω-3剂(例如LOVAZA、EPANQVA、VASCEPA、酯化ω-3,一般有鱼油、磷虾油、海藻油)。在一些实施方案中,额外的剂可以选自安非他命、苯并二氮平、磺酰脲、美格替奈(meglitinide)、噻唑烷二酮、双胍、β-阻滞剂、XCE抑制剂、利尿剂、硝酸盐、钙通道阻滞剂、芬特明、西布曲明、氯卡色林、西替利司他(cetilistat)、利莫那班、泰伦那班(taranabant)、托吡酯、加巴喷丁(gabapentin)、丙戊酸(valproate)、维加巴因(vigabatrin)、安非他酮、噻加宾(tiagabine)、舍曲林(sertraline)、氟西汀(fluoxetine)、曲唑酮(trazodone)、唑尼沙胺(zonisamide)、哌醋甲酯(methylphenidate)、伐伦克林(varenicline)、纳曲酮(naltrexone)、二乙胺苯丙酮、苯甲曲秦、雷帕格奈德(rcpaglini.de)、那格列奈(nateglinide)、格列美脲(glimepiride)、二甲双胍、吡格列酮(pioglitazone)、罗西格列酮(rosiglilazone)和西他列汀(sitagliptin)。

[0676] 在一些实施方案中,本发明有关于作为额外治疗剂用于治疗糖尿病的剂。说明性抗糖尿病剂包括但不限于磺酰脲(例如DYMELOR(醋磺环己脲)、DIABINESE(氯磺丙脲)、ORINASE(甲磺丁脲)和TOLINASE(甲磺氮卓脲)、GLUCOTROL(格列甲嗪)、GLUCOTROL XL(延长释放)、DIABETA(格列本脲)、MICRONASE(格列本脲)、GLYNASE PRESTAB(格列本脲)和AMARYL(格列美脲));双胍(例如二甲双胍(GLUCOPHAGE、GLUCOPHAGE XR、RIOMET、FORTAMET和GLUMETZA));噻唑烷二酮(例如ACTOS(吡格列酮)和AVANDIA(罗格列酮);α-葡糖苷酶抑制剂(例如PRECOSE(阿卡波糖)和GLYSET(米格列酮);美格替奈(例如PRANDIN(瑞格列奈)和STARLIX(那格列奈));二肽基肽酶IV(DPP-IV)抑制剂(例如JANUVIA(西他列汀)、NESINA(阿格列汀)、ONGLYZA(沙格列汀)和TRADJENTA(利格列汀));钠-葡萄糖同转运蛋白2(SGLT2)抑制剂(例如INVOKANA(卡格列净));和组合药丸(例如组合了格列本脲(磺酰脲)和二甲双胍的GLUCOVANCE、组合了格列甲嗪(磺酰脲)和二甲双胍的METAGLIP和在一个药丸中使用二甲双胍和罗格列酮(AVANDIA)的AVANDAMET、KAZANO(阿格列汀和二甲双胍)、OSENI(阿格列汀加吡格列酮)、二甲双胍口服剂、ACTOS口服剂、BYETTA皮下剂、JANUVIA口服剂、WELCHOL口服剂、JANUMET口服剂、格列甲嗪口服剂、格列美脲口服剂、GLUCOPHAGE口服剂、LANTUS皮下剂、格列本脲口服剂、ONGLYZA口服剂、AMARYl口服剂、LANTUS SOLOSTAR皮下剂、BYDUREON皮下剂、LEVEMIR FLEXPEN皮下剂、ACTOPLUS MET口服剂、GLUMETZA口服剂、TRADJENTA口服剂、溴麦角环肽口服剂、KOMBIGLYZE XR口服剂、INVOKANA口服剂、PRANDIN口服剂、LEVEMIR皮下剂、PARLODEL口服剂、吡格列酮口服剂、NOVOLOG皮下剂、NOVOLOG FLEXPEN皮下剂、VICTOZA 2-PAK皮下剂、HUMALOG皮下剂、STARLIX口服剂、FORTAMET口服剂、GLUCOVANCE口服剂、GLUCOPHAGE XR口服剂、NOVOLOG Mix 70-30FLEXPEN皮下剂、GLYBURIDE-METFORMIN口服剂、阿卡波糖口服剂、SYMLINPEN 60皮下剂、GLUCOTROl XL口服剂、NOVOLIN R注射剂、GLUCOTROL口服剂、DUETACT口服剂、西他列汀口服剂、SYMLINPEN 120皮下剂、HUMALOG KWIKPEN皮下剂、JANUMET XR口服剂、GLIPIZIDE-METFORMIN口服剂、CYCLOSET口服剂、

HUMALOG MIX 75-25皮下剂、那格列奈口服剂、HUMALOG Mix75-25KWIKPEN皮下剂、HUMULIN 70/30皮下剂、PRECOSE口服剂、APIDRA皮下剂、Humulin R注射剂、Jentadueto口服剂、Victoza3-Pak皮下剂、Novolin 70/30皮下剂、NOVOLIN N皮下剂、地特胰岛素皮下剂、微粒化格列本脲口服剂、GLYNASE口服剂、HUMULIN N皮下剂、甘精胰岛素皮下剂、RIOMET口服剂、吡格列酮-二甲双胍口服剂、APIDRA SOLOSTAR皮下剂、赖脯胰岛素皮下剂、GLYSET口服剂、HUMULIN 70/30Pen皮下剂、考来维纶口服剂、西他列汀-二甲双胍口服剂、DIABETA口服剂、常规人胰岛素注射剂、HUMULIN N Pen皮下剂、艾塞那肽皮下剂、HUMALOG Mix 50-50KWIKPEN皮下剂、利拉鲁肽皮下剂、KAZANO口服剂、瑞格列奈口服剂、氯磺丙脲口服剂、门冬胰岛素皮下剂、NOVOLOG Mix 70-30皮下剂、HUMALOG Mix 50-50皮下剂、沙格列汀口服剂、ACTOPLUS Met XR口服剂、米格列醇口服剂、NPH重组人胰岛素皮下剂、NPH胰岛素和常规人胰岛素皮下剂、甲磺氮卓脲口服剂、米非司酮口服剂、门冬胰岛素鱼精蛋白-门冬胰岛素皮下剂、瑞格列奈-二甲双胍口服剂、沙格列汀-二甲双胍口服剂、利格列汀-二甲双胍口服剂、NESINA口服剂、OSENI口服剂、甲磺丁脲口服剂、赖脯胰岛素鱼精蛋白和赖脯胰岛素皮下剂、普兰林肽皮下剂、谷赖胰岛素皮下剂、吡格列酮-格列美脲口服剂、PRANDIMET口服剂、NOVOLOG PenFill皮下剂、利格列汀口服剂、艾塞那肽微球体皮下剂、KORLYM口服剂、阿格列汀口服剂、阿格列汀-吡格列酮口服剂、阿格列汀-二甲双胍口服剂、卡格列净口服剂、赖脯胰岛素(Lispro)(HUMALOG);门冬胰岛素(Aspart)(NOVOLOG);谷赖胰岛素(Glulisine)(APIDRA);常规胰岛素(Regular)(NOVOLIN R或HUMULIN R);NPH(NOVOLIN N或HUMULIN N);甘精胰岛素(Glargine)(LANTUS);地特胰岛素(Detemir)(LEVEMIR);HUMULIN或NOVOLIN 70/30;和NOVOLOG Mix70/30HUMALOG Mix 75/25或50/50。

[0677] 在一些实施方案中,本发明涉及利用输血的组合疗法。举例来说,本发明的组合物可以作为输血的补充。在一些实施方案中,本发明涉及利用铁补充剂的组合疗法。

[0678] 在一些实施方案中,本发明涉及利用一种或多种基于EPO的剂的组合疗法。举例来说,本发明的组合物可以用作其他基于EPO的剂的佐剂。在一些实施方案中,本发明的组合物用作其他基于EPO的剂的维持疗法。其他基于EPO的剂包括以下:依泊汀α,包括但不限于DARBEPOETIN(ARANESP)、EPOCEPT(LUPIN PHARMA)、NANOKINE(NANOGEN PHARMACEUTICAL)、EPOFIT(INTAS PHARMA)、EPOGEN(AMGEN)、EPOGIN、EPREX(JANSSEN-CI LAG)、BINOCRIT(SANDOZ)、PROCRIT;依泊汀β,包括但不限于NEORECORMON(HOFFMANN-LA ROCHE)、RECORMON、单甲氧基聚乙二醇-依泊汀β(MIRCERA,ROCHE);依泊汀δ,包括但不限于DYNEPO(红细胞生成刺激蛋白,SHIRE PLC);依泊汀ω,包括但不限于EPOMAX;依泊汀ζ,包括但不限于SILAPO(STAD A)和RETACRIT(HOSPIRA);以及其他EPO,包括但不限于EPOC EPT(LUPIN PHARMACEUTICALS)、EPOTRUST(PANACEA BI OTEC LTD)、ERYPRO SAFE(BIOCON LTD.)、REPOITIN(SERU M INSTITUTE OF INDIA LIMITED)、VINTOR(EMCURE PHAR MACEUTICALS)、EPOFIT(INTAS PHARMA)、ERYKINE(INTAS BIOPHARMACEUTICA)、WEPOX(WOCKHARDT BIOTECH)、E SPOGEN(LG LIFE SCIENCES)、RELIPOIETIN(RELIANCE LIFE SCIENCES)、SHANPOIETIN(SHANTHA BIOTECHNICS LTD)、ZYROP(CADILA HEALTHCARE LTD.)、EPIAO(RHUEPO)(SHE NYANG SUNSHINE PHARMACEUTICAL CO.LTD)、CINNAPOIE TIN(CINNAGEN)。

[0679] 在一些实施方案中,本发明涉及利用一种或多种免疫调节剂,例如但不限于调节免疫检查点的剂的组合疗法。在各个实施方案中,所述免疫调节剂靶向PD-1、PD-L1和PD-L2

中的一者或多者。在各个实施方案中,所述免疫调节剂是PD-1抑制剂。在各个实施方案中,所述免疫调节剂是对PD-1、PD-L1和PD-L2中的一者或多者具有特异性的抗体。举例来说,在一些实施方案中,所述免疫调节剂是抗体,诸如但不限于,纳武单抗(ONO-4538/BMS-936558,MDX1106,OPDIVO,BRISTOL MYERS SQUIBB)、派姆单抗(KEYTRUDA,MERCK)、皮地利珠单抗(CT-011,CURE TECH)、MK-3475(MERCK)、BMS 936559(BRISTOL MYERS SQUIBB)、MPDL3280A(ROCHE)。在一些实施方案中,所述免疫调节剂靶向CD137或CD137L中的一者或多者。在各个实施方案中,所述免疫调节剂是对CD137或CD137L中的一者或多者具有特异性的抗体。举例来说,在一些实施方案中,所述免疫调节剂是抗体,诸如但不限于乌瑞鲁单抗(urelumab)(又称为BMS-663513和抗4-1BB抗体)。在一些实施方案中,将本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物与乌瑞鲁单抗(任选地与纳武单抗、利丽单抗(lirilumab)和乌瑞鲁单抗中的一者或多者)组合以治疗实体肿瘤和/或B细胞非霍奇金氏淋巴瘤和/或头颈癌和/或多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,所述免疫调节剂是靶向以下一者或多者的剂:CTLA-4、AP2M1、CD80、CD86、SHP-2和PPP2R5A。在各个实施方案中,所述免疫调节剂是对以下一者或多者具有特异性的抗体:CTLA-4、AP2M1、CD80、CD86、SHP-2和PPP2R5A。举例来说,在一些实施方案中,所述免疫调节剂是抗体,诸如但不限于伊匹单抗(ipilimumab)(MDX-010、MDX-101,Yervoy,BMS)和/或曲美目单抗(tremelimumab)(Pfizer)。在一些实施方案中,将本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物与伊匹单抗(任选地与巴维昔单抗(bavituximab))组合以治疗黑素瘤、前列腺癌和肺癌中的一者或多者。在各个实施方案中,所述免疫调节剂靶向CD20。在各个实施方案中,所述免疫调节剂是对CD20具有特异性的抗体。举例来说,在一些实施方案中,所述免疫调节剂是抗体,诸如但不限于,奥法木单抗(GENMAB)、奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)(GAZYVA)、AME-133v(APPLIED MOLECULAR EVOLUTION)、奥瑞珠单抗(GENENTECH)、TRU-015(TRUBION/EMERGENT)、维妥珠单抗(veltuzumab)(IMMU-106)。

[0680] 在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物当与嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法组合使用时协同作用。在一个说明性实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物当与CAR T细胞疗法组合用于治疗肿瘤或癌症时协同作用。在一个实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物当与CAR T细胞疗法组合用于治疗基于血液的肿瘤时协同作用。在一个实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物当与CAR T细胞疗法组合用于治疗实体肿瘤时协同作用。举例来说,使用所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物和CAR T细胞可以协同作用以减轻或消除所述肿瘤或癌症,或者减缓所述肿瘤或癌症的生长和/或进展和/或转移。在各个实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物诱导CAR T细胞分裂。在各个实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物诱导CAR T细胞增殖。在各个实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物预防CAR T细胞无应答。

[0681] 在各个实施方案中,所述CAR T细胞疗法包含靶向诸多抗原(例如肿瘤抗原),诸如但不限于碳酸酐酶IX(CAIX)、5T4、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD47、CS1、CD138、Lewis-Y、L1-CAM、MUC16、ROR-1、IL13Rα2、gp100、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、B细胞成熟抗原(BCMA)、第16型人乳头状瘤病毒E6(HPV-16E6)、CD171、叶酸受体α(FR-α)、GD2、人表皮生长因子受体2(HER2)、间皮素、EGFRvIII、成纤维细胞激活蛋白(FAP)、癌胚抗原癌胚抗原(CEA)和血管内皮生长因子受体2(VEGF-R2)以及本领域中众所周知的其他肿瘤抗原的CAR T细胞。其他说明性肿瘤抗原包括但不限于MART-1/Melan-A、

gp100、二肽基肽酶IV(DPPIV)、腺苷脱氨酶结合蛋白(ADAbp)、亲环蛋白b、结肠直肠相关抗原(CRC)-0017-1A/GA733、癌胚抗原(CEA)及其免疫原性表位CAP-1和CAP-2、etv6、aml1、前列腺特异性抗原(PSA)及其免疫原性表位PSA-1、PSA-2和PSA-3、T细胞受体/CD3-ζ链、MAGE家族肿瘤抗原(例如MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2(MAGE-B2)、MAGE-Xp3(MAGE-B3)、MAGE-Xp4(MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5)、GAGE家族肿瘤抗原(例如GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9)、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、酪氨酸酶、p53、MUC家族、HER2/neu、p21ras、RCAS1、α-胎儿球蛋白、E-钙粘蛋白、α-连锁蛋白、β-连锁蛋白和γ-连锁蛋白、p120ctn、gp100 Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺瘤性结肠息肉病蛋白(APC)、胞衬蛋白、连接蛋白37、Ig独特型、p15、gp75、GM2和GD2神经节苷脂、病毒产物诸如人乳头状瘤病毒蛋白、Smad家族肿瘤抗原、lmp-1、NA、EBV编码的核抗原(EBNA)-1、脑糖原磷酸化酶、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1CT-7、c-erbB-2、CD19、CD37、CD56、CD70、CD74、CD138、AGS16、MUC1、GPNMB、Ep-CAM、PD-L1和PD-L2。

[0682] 示例性CAR T细胞疗法包括但不限于JCAR014(Juno Therapeutics)、JCAR015(Juno Therapeutics)、JCAR017(Juno Therapeutics)、JCAR018(Juno Therapeutics)、JCAR020(Juno Therapeutics)、JCAR023(Juno Therapeutics)、JCAR024(Juno Therapeutics)、CTL019(Novartis)、KTE-C19(Kite Pharma)、BPX-401(Bellicum Pharmaceuticals)、BPX-501(Bellicum Pharmaceuticals)、BPX-601(Bellicum Pharmaceuticals)、bb2121(Bluebird Bio)、CD-19睡美人细胞(Ziopharm Oncology)、UCART19(Cellectis)、UCART123(Cellectis)、UCART38(Cellectis)、UCARTCS1(Cellectis)、OXB-302(Oxford BioMedica、MB-101(Mustang Bio)和由Innovative Cellular Therapeutics开发的CAR T细胞。

[0683] 在一些实施方案中,本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物与一种或多种多发性硬化(MS)治疗剂组合用于治疗MS的方法中,所述MS治疗剂包括但不限于3-干扰素、醋酸格拉替雷、T-干扰素、IFN-β-2(美国专利公布号2002/0025304)、螺旋锗(例如N-(3-二甲基氨基丙基)-2-氮杂-8,8-二甲基-8-锗螺[4:5]癸烷、N-(3-二甲基氨基丙基)-2-氮杂-8,8-二乙基-8-锗螺[4:5]癸烷、N-(3-二甲基氨基丙基)-2-氮杂-8,8-二丙基-8-锗螺[4:5]癸烷和N-(3-二甲基氨基丙基)-2-氮杂-8,8-二丁基-8-锗螺[4:5]癸烷)、维生素D类似物(例如1,25(OH)2D3(参见例如美国专利号5,716,946))、前列腺素(例如拉坦前列素(latanoprost)、溴莫尼定(brimonidine)、PGE1、PGE2和PGE3,参见例如美国专利公布号2002/0004525)、四环素和衍生物(例如米诺环素(minocycline)和多西环素(doxycycline),参见例如美国专利公布号20020022608)、VLA-4结合抗体(参见例如美国专利公布号2009/0202527)、促肾上腺皮质激素、皮质类固醇、强的松(prednisone)、甲基强的松(methylprednisone)、2-氯脱氧腺苷、米托蒽醌、柳氮磺胺吡啶(sulphasalazine)、氨甲蝶呤、硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢菌素、富马酸盐、抗CD20抗体(例如利妥昔单抗(rituximab))和盐酸泰札尼啶(tizanidine hydrochloride)。

[0684] 在一些实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物与治疗MS的一种或多种症状或副作用的一种或多种治疗剂组合使用。此类剂包括但不限于金刚胺、巴氯芬(baclofen)、

罂粟碱(papaverine)、美克洛嗪(meclizine)、羟嗪、磺胺甲恶唑(sulfamethoxazole)、环丙沙星(ciprofloxacin)、多库酯(docusate)、匹莫林(pemoline)、丹曲林(dantrolene)、去氨加压素(desmopressin)、地塞米松(dexamethasone)、托特罗定(tolterodine)、苯妥英(phenyloin)、奥昔布宁(oxybutynin)、比沙可啶(bisacodyl)、文拉法辛(venlafaxine)、阿米替林(amitriptyline)、六亚甲基四胺(methenamine)、氯硝西泮(clonazepam)、异烟肼(isoniazid)、伐地那非(vardenafil)、呋喃妥英(nitrofurantoin)、车前子亲水胶浆(psyllium hydrophilic mucilloid)、前列地尔(alprostadil)、加巴喷丁(gabapentin)、去甲替林(nortriptyline)、帕罗西汀(paroxetine)、溴丙胺太林(propantheline bromide)、莫达非尼(modafinil)、氟西汀(fluoxetine)、非那吡啶(phenazopyridine)、甲基强的松龙(methylprednisolone)、卡马西平(carbamazepine)、丙咪嗪(imipramine)、地西泮(diazepam)、西地那非(sildenafil)、安非他酮(bupropion)和舍曲林(sertraline)。

[0685] 在一些实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物与本文所描述的一种或多种疾病修饰疗法(DMT)(例如,表A的剂)组合用于治疗多发性硬化的方法中。在一些实施方案中,本发明提供了与使用本文所描述的一种或多种DMT(例如,下表中列出的剂)而不使用一种或多种所公开的结合剂相比有所改善的治疗效果。在一个实施方案中,所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物与所述一种或多种DMT的组合产生了协同治疗效果。

[0686] 说明性疾病修饰疗法

[0687]

通用名称	商标名称/公司	频率/递送途径/常用剂量
特立氟胺	AUBAGIO (GENZYME)	每天；口服丸剂；7 mg 或 14 mg.
干扰素 β-1a	AVONEX (BIOGEN IDEC)	每周一次；肌肉内(向肌肉中)注射；30 mcg
干扰素 β-1b	BETASERON (BAYER HEALTHCARE PHARMACEUTICALS, INC.)	每隔一天；皮下(皮肤下)注射；250 mcg.
醋酸格拉替雷	COPAXONE (TEVA NEUROSCIENCE)	每天；皮下(皮肤下)注射；20 mg (20,000 mcg)或者每周三次；皮下(皮肤下)注射；40 mg (40,000 mcg)
干扰素 β-1b	EXTAVIA (NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.)	每隔一天；皮下(皮肤下)注射；250 mcg.
芬戈莫德	GILENYA (NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.)	每天；口服胶囊；0.5 mg.
阿仑单抗(抗 CD52 单克隆抗体)	LEMTRADA (GENZYME)	静脉内输液连续五天，然后在一年后静脉内输液连续三天 (12 mg)

[0688]

通用名称	商标名称/公司	频率/递送途径/常用剂量
米托蒽醌	NOVANTRONE (EMD SERONO)	一年四次在医疗机构中静脉内输液。终生累积剂量界限是 2-3 年内大约 8-12 个剂量(140 mg/m2)。
聚乙二醇化干扰素 β-1a	PLEGRIDY (BIOGEN IDEC)	每 14 天；皮下(皮肤下)注射；125 mcg
干扰素 β-1a	REBIF (EMD SERONO, INC.)	每周三次；皮下(皮肤下)注射；44 mcg
富马酸二甲酯 (BG-12)	TECFIDERA (BIOGEN IDEC)	每天两次；口服胶囊；120 mg 持续一周，此后 240 mg
那他珠单抗(人源化单克隆抗体 VLA-4 拮抗剂)	TYSABRI (BIOGEN IDEC)	在注册的输液机构中每四周静脉内输液一次；300 mg
开发中的 DMT		
阿米洛利(靶向酸敏感离子通道 1 上皮钠通道 Na+/H+ 交换剂)	PAR PHARMACEUTICAL，PERRIGO COMPANY，SIGMAPHARM LABORATORIES	口服
ATX-MS-1467 (使 II 类主要组织相容性复合体 T 细胞应答靶向髓鞘碱性蛋白)	APITOPE / MERCK SERONO	皮内皮下
BAF312 (靶向鞘氨醇 1-磷酸盐(S1P)受体亚型 S1P1 和 S1P5 B 细胞分布 T 细胞分布)	NOVARTIS PHARMA	口服
BGC20-0134 (靶向促炎性和抗炎性细胞因子)	BTG PLC	口服
BIIB033 (靶向	BIOGEN	第 I 期和第 II 期试验

[0689]

通用名称	商标名称/公司	频率/递送途径/常用剂量
LINGO-1 (“含有富亮氨酸重复序列和免疫球蛋白样结构域的 Nogo 受体相互作用蛋白”))		使用静脉内输液，第 I 期试验使用皮下注射
克拉屈滨(靶向 CD4+ T 细胞 DNA 合成和修复 E-选择素细胞内粘附分子 1 促炎性细胞因子白介素 2 和白介素 2R促炎性细胞因子白介素 8 和 RANTES 细胞因子分泌单核细胞和淋巴细胞移动)	MERCK SERONO	口服
环磷酰胺(靶向 T 细胞，特别是 CD4+ 辅助 T 细胞 B 细胞)	BAXTER HEALTHCARE CORPORATION	口服，每个月一次静脉内冲击
达克珠单抗(靶向 T 细胞的 CD25 免疫调节剂的人源化单克隆抗体)	BIOGEN IDEC/ABBVIE BIOTHERAPEUTICS	计划每个月一次肌肉内注射
达氟吡啶(靶向电压门控钾通道退化蛋白/含有亚单位 Cavβ3 的上皮钠通道 L 型钙通道)	ACORDA THERAPEUTICS / BIOGEN IDEC	每 12 小时一片(延长释放)，每天两次 10 mg
屈大麻酚(靶向大麻素受体 CB1 大麻素受体 CB2)	ABBVIE INC.	口服
非拉司特(靶向 α4β1 整合素)	GLAXOSMITHKLINE	口服
GNbAC1MSRV-Env (靶向 MS 相关逆转录病毒的包膜蛋	GENEURO SA / SERVIER	静脉内输液

[0690]

通用名称	商标名称/公司	频率/递送途径/常用剂量
白)		
艾地苯醌(靶向反应性氧物质)	SANTHERA PHARMACEUTICALS	PPMS 的临床试验中的口服剂量是每天 2250 mg (750 mg 剂量，每天三次)
Imilecleucel-T (靶向髓磷脂特异性自身反应性 T 细胞)	OPEXA THERAPEUTICS / MERCK SERONO	根据得自制造商的信息，每年皮下给药 5 次
拉喹莫德	TEVA	预计每天服用 0.6 mg 或 1.2 mg 口服片剂
马赛替尼(靶向 KIT (干细胞因子，也称为 c-KIT)受体以及选择其他酪氨酸激酶肥大细胞)	AB SCIENCE	口服
MEDI-551 (靶向 CD19，即 B 细胞特异性抗原，它是 B 细胞受体复合物的一部分并且功能在于决定 B 细胞激活的阈值；B 细胞；浆母细胞；表达 CD19 (但不表达 CD20)并且分泌大量抗体的 B 细胞；浆母细胞的耗竭可用于涉及病原性自身抗体的自身免疫性疾病)	MEDIMMUNE	静脉内皮下
米诺环素(靶向 T 细胞、小胶质细胞、白细胞移动基质金属蛋白酶)	各不相同	可作为微粒填充胶囊和口服悬浮液口服
MIS416 (靶向先天免疫系统，先天免	INNATE IMMUNOTHERAPE	静脉内

[0691]

通用名称	商标名称/公司	频率/递送途径/常用剂量
疫系统的病原体相关分子模式识别受体、先天免疫系统的骨髓细胞，可能能够重建 SPMS 中发生的失调的免疫系统活性)	UTICS	
霉酚酸酯(靶向嘌呤合成)	由 GENENTECH 制造	口服
纳曲酮(靶向阿片受体 Toll 样受体 4)	各不相同	以低剂量(每天 3 至 4.5 mg)呈口服形式“低剂量纳曲酮”(或“LDN”)给药
奥瑞珠单抗和奥法木单抗(靶向 CD20 B 细胞阻抑的人源化单克隆抗体	ROCHE / GSK	计划静脉内输液
ONO-4641 (靶向鞘氨醇 1-磷酸盐受体)	ONO PHARMACEUTICAL CO.	口服
苯妥英(靶向钠通道)	PFIZER	静脉内肌肉内(不太受欢迎的选项)口服
芬奈莫德 (Ponesimod)	ACTELION	有待确定
雷特格韦(靶向逆转录病毒整合酶疱疹病毒 DNA 包封末端酶)	MERCK	根据得自制造商的信息，每天两次口服 400 mg 片剂
RHB-104	REDHILL BIOPHARMA LIMITED	95 mg 克拉霉素，45 mg 利福布丁和 10 mg 氯法齐明
利鲁唑(靶向谷氨酸能神经传递谷氨酸摄取和释放电压门控钠通道蛋白激酶 C)	COVIS PHARMA / SANOFI	口服

[0692] MS疾病进展在疾病进展的初期阶段可能是最密集并且最具破坏性的。因此，与许多报销政策和根据例如成本和副作用减轻观点的医生实践相反，用最密集DMT开始治疗，例

如所谓的第二线疗法可能对患者的长期疾病状态最有益。在一些实施方案中，用所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物与第二线疗法组合的方案来治疗患者。使用这种组合来降低一种或多种第二线疗法的副作用特性。在一些实施方案中，使用所述组合来降低一种或多种第二线疗法的剂量或施用频率。举例来说，在所述组合的情形下，上文提供的表中列出的剂的剂量可以减少约50％、或约40％、或约30％、或约25％，和/或给药频率可以降至往常的一半或往常的三分之一，或者可以从例如每天一次减至每隔一天一次或每周一次、从每隔一天一次减至每周一次或每两周一次、从每周一次减至每两周一次或每个月一次等等。因此，在一些实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物通过允许更方便的治疗方案而增加了患者依从性。此外，一些DMT有建议终生剂量限制，例如，对于米托蒽醌，终生累积剂量应当严格限制在140mg/m^2，或者治疗2至3年。在一些实施方案中，补充所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物通过允许这种DMT的较低或较少频率给药来保证患者有权使用米托蒽醌。

[0693] 在一些实施方案中，所述患者是还没有接受利用一种或多种DMT的治疗的未治疗患者，并且所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物是用于缓冲第二线疗法的副作用。因此，所述未治疗患者在疾病最初时能够受益于第二线疗法的长期益处。在一些实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物用作使用第二线疗法之前的进入疗法。举例来说，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以施用约3个月的初步治疗周期以稳定疾病，然后所述患者可以过渡至第二线剂的维持疗法。

[0694] 总体上认为未治疗患者与已经接受过一种或多种DMT并且可能失败了的患者相比更可能对疗法作出应答。在一些实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可用于已经接受过一种或多种DMT并且可能失败了的患者。举例来说，在一些实施方案中，所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物增加了在已经接受过一种或多种DMT并且可能失败了的患者中的治疗效果，并且可能允许这些患者像未治疗患者那样应答。

[0695] 在一些实施方案中，所述患者已经接受或正在接受利用一种或多种DMT的治疗并且应答不佳。举例来说，所述患者可能对一种或多种DMT无感受或应答不良。在一些实施方案中，所述患者可能对以下一者或多者无感受或应答不良：特立氟胺(AUBAGIO(GENZYME))；干扰素β-1a(AVONEX(BIOGEN IDEC)；干扰素β-1b(BETASERON(BAYER HEALTHCARE PHARMACEUTICALS、INC.)；醋酸格拉替雷(COPAXONE(TEVA NEUROSCIENCE)；干扰素β-1b(EXTAVIA(NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.)；芬戈莫德(GILENYA(NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORP.)；阿仑单抗(LEMTRADA(GENZYME)；米托蒽醌(NOVANTRONE(EMD SERONO)；聚乙二醇化干扰素β-1a(PLEGRIDY(BIOGEN IDEC)；干扰素β-1a(REBIF(EMD SERONO、INC.)；富马酸二甲酯(BG-12)(TECFIDERA(BIOGEN IDEC)；和那他珠单抗(TYSABRI(BIOGEN IDEC)。在一些实施方案中，一种或多种所公开的结合剂在患者中获得了一种或多种DMT的治疗益处，并且因此减轻或消除了对所述DMT的无应答。举例来说，这可以免除利用一种或多种DMT以较高剂量或频率对患者进行治疗。

[0696] 在患有更具侵袭性的疾病的患者中，一种方法是诱导治疗模型，其中首先将给予具有强功效但存在强安全性隐患的疗法，然后给予维持疗法。这种模型的一个实例可以包括利用阿仑单抗进行初步治疗，然后是IFN-β、GA或BG-12。在一些实施方案中，使用一种或多种所公开的结合剂以防止需要变换维持疗法。在一些实施方案中，使用一种或多种所公开的结合剂作为一种或多种DMT，包括第二线疗法的维持疗法。在一些实施方案中，使用一

种或多种所公开的结合剂作为第一疗法用于诱导，然后进行作为维持疗法的另一种DMT，例如第一线疗法。

[0697] 在一些实施方案中，一种或多种所公开的结合剂可以施用约3个月的初步治疗周期以稳定疾病，然后所述患者可以过渡至第一线剂的维持疗法。

[0698] 在各个实施方案中，使用一种或多种所公开的结合剂来减轻DMT，包括但不限于本文所公开的任何剂的一种或多种副作用。举例来说，一种或多种所公开的结合剂可以用于方案中而允许剂量节约一种或多种DMT并且因此使得较少副作用。举例来说，在一些实施方案中，一种或多种所公开的结合剂可以减轻AUBAGIO或相关剂的一种或多种副作用，所述副作用可以包括头发稀疏、腹泻、流感、恶心、肝脏检验异常和手部或足部罕见性麻木或刺痛(感觉异常)、能增加感染风险的白细胞水平；血压增高；和严重肝脏损伤。在一些实施方案中，一种或多种所公开的结合剂可以减轻AVONEX或相关剂的一种或多种副作用，所述副作用包括注射后的流感样症状、抑郁、轻微贫血、肝脏异常、过敏反应和心脏问题。在一些实施方案中，一种或多种所公开的结合剂可以减轻BETASERON或相关剂的一种或多种副作用，所述副作用包括注射后的流感样症状、注射部位反应、过敏反应、抑郁、肝脏异常和低白细胞计数。在一些实施方案中，一种或多种所公开的结合剂可以减轻COPAXONE或相关剂的一种或多种副作用，所述副作用包括注射部位反应、血管舒张(血管膨胀)；胸痛；注射后立即出现的反应，包括焦虑、胸痛、心悸、气短和面部潮红。在一些实施方案中，一种或多种所公开的结合剂可以减轻EXTAVIA或相关剂的一种或多种副作用，所述副作用包括注射后的流感样症状、注射部位反应、过敏反应、抑郁、肝脏异常和低白细胞计数。在一些实施方案中，一种或多种所公开的结合剂可以减轻GILENYA或相关剂的一种或多种副作用，所述副作用包括头痛、流感、腹泻、背痛、肝脏酶升高、咳嗽、第一个剂量后心率减缓、感染和眼部肿胀。在一些实施方案中，一种或多种所公开的结合剂可以减轻LEMTRADA或相关剂的一种或多种副作用，所述副作用包括皮疹、头痛、发烧、鼻充血、恶心、尿路感染、疲劳、失眠、上呼吸道感染、荨麻疹、瘙痒、甲状腺病症、真菌感染、关节、四肢和背部疼痛、腹泻、呕吐、面部潮红和输液反应(包括恶心、荨麻疹、瘙痒、失眠、寒战、面部潮红、疲劳、气短、味觉变化、消化不良、眩晕、疼痛)。在一些实施方案中，一种或多种所公开的结合剂可以减轻NOVANTRONE或相关剂的一种或多种副作用，所述副作用包括施用后24小时尿液呈蓝绿色；感染、骨髓阻抑(疲劳、瘀伤、低血细胞计数)、恶心、头发稀疏、膀胱感染、口腔溃疡以及严重肝脏和心脏损伤。在一些实施方案中，一种或多种所公开的结合剂可以减轻PLEGRIDY或相关剂的一种或多种副作用，所述副作用包括注射后的流感样症状、注射部位反应、抑郁、轻微贫血、肝脏异常、过敏反应和心脏问题。在一些实施方案中，一种或多种所公开的结合剂可以减轻REBIF或相关剂的一种或多种副作用，所述副作用包括注射后的流感样症状、注射部位反应、肝脏异常、抑郁、过敏反应和低红细胞或白细胞计数。在一些实施方案中，一种或多种所公开的结合剂可以减轻TECFIDERA或相关剂的一种或多种副作用，所述副作用包括面部潮红(热觉或瘙痒和皮肤泛红)、胃肠问题(恶心、腹泻、腹痛)、皮疹、尿蛋白、肝酶升高；和血液淋巴细胞(白细胞)计数减少。在一些实施方案中，一种或多种所公开的结合剂可以减轻TYSABRI或相关剂的一种或多种副作用，所述副作用包括头痛、疲劳、尿路感染、抑郁、呼吸道感染、关节疼痛、胃部不适、腹部不适、腹泻、阴道炎、臂痛或腿痛、皮疹、输液两小时内的过敏或超敏反应(眩晕、发烧、皮疹、瘙痒、恶心、面部潮红、低血压、呼吸困难、胸痛)。

[0699] 在一些实施方案中，本发明涉及利用WO 2013/10779、WO 2015/007536、WO 2015/007520、WO 2015/007542和WO 2015/007903中所描述的一种或多种嵌合剂的组合疗法，所述文献的全部内容特此以引用的方式整体并入。

[0700] 在一些实施方案中，本文所描述的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物包括经过修饰的衍生物，即通过将任何类型的分子共价连接至该组合物以使得共价连接不会妨碍该组合物的活性。举例来说但不限于，衍生物包括通过特别是糖基化、脂化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、利用已知的保护基团/阻断基团衍生化、蛋白水解裂解、连接至细胞配体或其他蛋白质等进行修饰的组合物。可以利用已知技术，包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等进行众多化学修饰中的任一种。

[0701] 在其他实施方案中，本文所描述的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物还包含细胞毒性剂，在说明性实施方案中，所述细胞毒性剂包含毒素、化疗剂、放射性同位素以及引起细胞凋亡或细胞死亡的剂。此类剂可以与本文所描述的组合物缀合。

[0702] 因此，本文所描述的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可以经历翻译后修饰以添加效应子部分，诸如化学接头；可检测部分，诸如荧光染料、酶、底物、生物发光材料、放射性材料和化学发光部分；或功能性部分，诸如链霉亲合素、抗生物素蛋白、生物素、细胞毒素、细胞毒性剂和放射性材料。

[0703] 说明性细胞毒性剂包括但不限于甲氨蝶呤、氨基蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪；烷化剂，诸如氮芥、噻替派、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、丝裂霉素C、洛莫司汀(CCNU)、1-甲基亚硝基脲、环磷酰胺、氮芥、白消安、二溴甘露醇、链佐星、丝裂霉素C、顺-二氯二胺铂(II)(DDP)、顺铂和卡铂(伯尔定)；蒽环霉素，包括柔红霉素(先前的道诺霉素)、多柔比星(阿霉素)、地托比星、卡米诺霉素、伊达比星、表柔比星、米托蒽醌和比生群；抗生素，包括放线菌素D(dactinomycin/actinomycin D)、博来霉素、刺孢霉素、光辉霉素和安曲霉素(AMC)；以及抗有丝分裂剂，诸如长春生物碱类(vinca alkaloid)、长春新碱(vincristine)和长春花碱(vinblastine)。其他细胞毒性剂包括太平洋紫杉醇(紫杉醇)、蓖麻毒素、假单胞菌外毒素、吉西他滨、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴乙锭、依米丁(emetine)、依托泊苷、替尼泊苷、秋水仙素、二羟基蒽二酮、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、丙卡巴肼、羟基脲、天冬酰胺酶、皮质类固醇、米托坦(O,P'-(DDD))、干扰素，以及这些细胞毒性剂的混合物。

[0704] 其他细胞毒性剂包括但不限于化疗剂，诸如卡铂、顺铂、太平洋紫杉醇、吉西他滨、刺孢霉素、多柔比星、5-氟尿嘧啶、丝裂霉素C、放线菌素D、环磷酰胺、长春新碱、博来霉素、VEGF拮抗剂、EGFR拮抗剂、铂、紫杉醇、伊立替康、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、亚叶酸、类固醇、环磷酰胺、美法仑、长春生物碱类(例如长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨)、莫司汀类、酪氨酸激酶抑制剂、放射疗法、性激素拮抗剂、选择性雄激素受体调节剂、选择性雌激素受体调节剂、PDGF拮抗剂、TNF拮抗剂、IL-1拮抗剂、白介素(例如IL-12或IL-2)、IL-12R拮抗剂、毒素缀合的单克隆抗体、肿瘤抗原特异性单克隆抗体、爱必妥(Erbitux)、阿瓦斯丁(Avastin)、帕妥珠单抗(Pertuzumab)、抗CD20抗体、美罗华(Rituxan)、奥瑞珠单抗、奥法木单抗、DXL625、HERCEPTIN®或它们的任何组合。来自植物和细菌的有毒酶，诸如蓖麻毒素、白喉毒素和假单胞菌毒素可以与这些治疗剂(例如抗体)缀合以产生细胞类型特异性杀伤试剂(Youle等人，Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 77:5483(1980)；Gilliland等人，

Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 77:4539(1980);Krolick等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 77:5419(1980))。

[0705] 其他细胞毒性剂包括如Goldenberg在美国专利号6,653,104中所描述的细胞毒性核糖核酸酶。本发明的实施方案还涉及放射免疫缀合物,其中在使用或不使用复合物形成剂的情况下,发射α或β粒子的放射性核种稳定偶合至嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物。此类放射性核素包括β-发射体,诸如磷-32、钪-47、铜-67、镓-67、钇-88、钇-90、碘-125、碘-131、钐-153、镥-177、铼-186或铼-188;以及α发射体,诸如砹-211、铅-212、铋-212、铋-213或锕-225。

[0706] 说明性可检测部分还包括但不限于辣根过氧化物酶、乙酰胆碱酯酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶和荧光素酶。其他说明性荧光材料包括但不限于罗丹明、荧光素、异硫氰酸荧光素、伞形酮、二氯三嗪基胺、藻红蛋白和丹磺酰氯。其他说明性化学发光部分包括但不限于鲁米诺。其他说明性生物发光材料包括但不限于荧光素和水母发光蛋白。其他说明性放射性材料包括但不限于碘-125、碳-14、硫-35、氚和磷-32。

[0707] 治疗方法

[0708] 本文所描述的方法和组合物可应用于治疗各种疾病和病症,包括但不限于癌症、感染、免疫病症、贫血、自身免疫性疾病、心血管疾病、创伤愈合、局部缺血相关疾病、神经退行性疾病、代谢性疾病和许多其他疾病和病症。

[0709] 另外,任何本发明的剂都可以用于治疗各种疾病和病症,或制造用于治疗各种疾病和病症的药物,所述疾病和病症包括但不限于癌症、感染、免疫病症、炎症性疾病或疾患,以及自身免疫性疾病。

[0710] 在一些实施方案中,本发明涉及对以下一种或多种疾病或患有以下一种或多种疾病的患者的治疗:慢性肉芽肿病、骨硬化病、特发性肺纤维化、弗里德希共济失调(Friedreich's ataxia)、特应性皮炎、恰加斯病(Chagas disease)、癌症、心力衰竭、自身免疫性疾病、镰状细胞病、地中海贫血、失血、输血反应、糖尿病、维生素B12缺乏症、胶原血管病、舒瓦克曼综合征(Shwachman syndrome)、血小板减少性紫癜、乳糜泻、内分泌缺乏状态诸如甲状腺功能减退或爱迪生氏病(Addison's disease)、自身免疫性疾病如克罗恩氏病(Crohn's Disease)、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎或青少年类风湿性关节炎、溃疡性结肠炎免疫病症诸如嗜酸性筋膜炎、低免疫球蛋白血症或胸腺瘤/胸腺癌、移植物抗宿主病、白血病前期、非血液综合征(例如唐氏综合征(Down's)、杜波维茨综合征(Dubowwitz)、塞克尔综合征(Seckel))、费尔蒂综合征(Felty syndrome)、溶血性尿毒综合征、骨髓增生异常综合征、夜间阵发性血红蛋白尿症、骨髓纤维瘤、全血细胞减少症、纯红细胞再生障碍、舍亨二氏紫癜(Schoenlein-Henoch purpura)、疟疾、蛋白质饥饿、月经过多、系统性硬化、肝硬化、代谢减退状态和充血性心力衰竭。

[0711] 在一些实施方案中,本发明涉及对以下一种或多种疾病或患有以下一种或多种疾病的患者的治疗:慢性肉芽肿病、骨硬化病、特发性肺纤维化、弗里德希共济失调、特应性皮炎、恰加斯病、分枝杆菌感染、癌症、硬皮病、肝炎、丙型肝炎、败血性休克和类风湿性关节炎。

[0712] 在一些实施方案中,本发明涉及治疗癌症或患有癌症的患者。如本文所使用,癌症是指可能干扰身体器官和系统的正常功能的任何不受控制的细胞生长,并且包括原发性和

转移性肿瘤两种。原发性肿瘤或癌症从其原始位置迁移并且种在重要器官可以通过受影响器官的功能减退而最终导致受试者死亡。转移是由于癌细胞从原发性肿瘤播散至身体其他部分而在远离原发性肿瘤位置出现的一个癌细胞或一组癌细胞。转移最终可能导致受试者死亡。举例来说，癌症可以包括良性和恶性癌症、息肉、增生以及休眠肿瘤或微转移。

[0713] 可治疗的说明性癌症包括但不限于癌瘤，例如各种亚型，包括例如腺癌、基底细胞癌、鳞状细胞癌和移行细胞癌)、肉瘤(包括例如骨和软组织)、白血病(包括例如急性骨髓性、急性成淋巴细胞性、慢性骨髓性、慢性淋巴细胞性和毛细胞)、淋巴瘤和骨髓瘤(包括例如霍奇金氏和非霍奇金氏淋巴瘤、轻链、非分泌性、MGUS和浆细胞瘤)和中枢神经系统癌症(包括例如脑(例如神经胶质瘤(例如星形细胞瘤、寡枝神经胶质瘤和室管膜瘤)、脑膜瘤、垂体腺瘤和神经瘤和脊髓肿瘤(例如脑膜瘤和纤维神经瘤)。

[0714] 可以治疗的说明性癌症包括但不限于：基底细胞癌；胆道癌；膀胱癌；骨癌；脑和中枢神经系统癌症；乳腺癌；腹膜癌；宫颈癌；绒毛膜癌；结肠和直肠癌；结缔组织癌；消化系统癌症；子宫内膜癌；食道癌；眼癌；头颈癌；胃癌(包括胃肠癌)；成胶质细胞瘤；肝癌；肝细胞瘤；上皮内赘瘤；肾脏癌或肾癌；喉癌；白血病；肝癌；肺癌(例如，小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌)；黑素瘤；骨髓瘤；成神经细胞瘤；口腔癌(唇、舌、口和咽)；卵巢癌；胰腺癌；前列腺癌；成视网膜细胞瘤；横纹肌肉瘤；直肠癌；呼吸系统癌症；唾液腺癌；肉瘤；皮肤癌；鳞状细胞癌；胃癌；睾丸癌；甲状腺癌；子宫或子宫内膜癌；泌尿系统癌症；外阴癌；淋巴瘤，包括霍奇金氏淋巴瘤和非霍奇金氏淋巴瘤，以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)；小淋巴细胞性(SL)NHL；中级/滤泡性NHL；中级弥漫性NHL；高级成免疫细胞性NHL；高级成淋巴细胞性NHL；高级小非核裂细胞NHL；巨大肿块性NHL；套细胞淋巴瘤；AIDS相关淋巴瘤；和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症；慢性淋巴细胞性白血病(CLL)；急性成淋巴细胞性白血病(ALL)；毛细胞性白血病；慢性成髓细胞性白血病；以及其他癌瘤和肉瘤；和移植后淋巴组织增生性病症(PTLD)，以及与斑痣性错构瘤相关的异常血管增生；水肿(例如与脑肿瘤相关的水肿)；和梅格斯氏综合征。

[0715] 在各个实施方案中，本发明涉及对Myc驱动的癌症，即过表达Myc的癌细胞的治疗。在一些实施方案中，癌细胞过表达c-Myc、N-Myc和/或L-Myc中的任一者。在一些实施方案中，本发明的方法使癌细胞易于用本文所描述的任一种抗癌治疗剂进行治疗。在一些实施方案中，本发明的方法降低癌细胞的转录活性。

[0716] 在一些实施方案中，本发明涉及对微生物感染和/或慢性感染或患有微生物感染和/或慢性感染的患者的治疗。说明性感染包括但不限于恰加斯病、HIV/AIDS、结核病、骨髓炎、乙型肝炎、丙型肝炎、爱波斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)或细小病毒、T细胞白血病病毒、细菌过度生长综合征、真菌或寄生虫感染。

[0717] 在各个实施方案中，使用本发明的组合物来治疗或预防一种或多种炎症性疾病或疾患，诸如炎症、急性炎症、慢性炎症、呼吸道疾病、动脉粥样硬化、再狭窄、哮喘、过敏性鼻炎、特异性皮炎、脓毒性休克、类风湿性关节炎、炎症性肠病、炎症性盆腔病、疼痛、眼部炎症性疾病、乳糜泻、莱氏综合征(Leigh Syndrome)、甘油激酶缺乏症、家族性嗜酸性粒细胞增多症(FE)、常染色体隐性痉挛性共济失调、喉部炎症性疾病；结核病、慢性胆囊炎、支气管扩张、硅肺病和其他尘肺病。

[0718] 在各个实施方案中，使用本发明的组合物来治疗或预防一种或多种自身免疫性疾

病或疾患，诸如多发性硬化、糖尿病、狼疮、乳糜泻、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome)、硬皮病、古德帕斯彻氏综合征(Goodpasture's syndrome)、韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、自身免疫性癫痫、拉斯马森氏脑炎(Rasmussen's encephalitis)、原发性胆汁性硬化、硬化性胆管炎、自身免疫性肝炎、艾迪森氏病(Addison's disease)、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、纤维肌痛症、美尼尔氏综合征(Menier's syndrome)；移植排斥(例如，预防同种异体移植排斥)、恶性贫血、类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮、皮肌炎、修格连氏综合征(Sjogren's syndrome)、红斑狼疮、多发性硬化、重症肌无力、瑞特氏综合征(Reiter's syndrome)、格雷夫氏病(Grave's disease)和其他自身免疫性疾病。

[0719] 在各个实施方案中，使用本发明的组合物来治疗、控制或预防心血管疾病，诸如影响心脏和血管的疾病或疾患，包括但不限于冠心病(CHD)、脑血管疾病(CVD)、主动脉瓣狭窄、周围性血管病、动脉粥样硬化、动脉硬化、心肌梗塞(心脏病发作)、脑血管疾病(中风)、短暂性脑缺血发作(TIA)、心绞痛(稳定的和不稳定的)、心房纤颤、心律不齐、血管疾病和/或充血性心力衰竭。

[0720] 在各个实施方案中，使用本发明的组合物来治疗或预防一种或多种代谢相关病症。在各个实施方案中，本发明可用于治疗、控制或预防糖尿病，包括1型糖尿病和2型糖尿病以及与肥胖相关的糖尿病。本发明的组合物和方法可用于治疗或预防糖尿病相关病症，包括但不限于糖尿病性肾病、高血糖症、糖耐量受损、胰岛素抗性、肥胖、脂质异常、血脂异常、高脂血症、高甘油三酯血症、高胆固醇血症、低HDL水平、高LDL水平、动脉粥样硬化及其后遗症、血管再狭窄、肠易激综合征、炎症性肠病(包括克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、其他炎症性疾患、胰脏炎、腹部肥胖、神经退化性疾病、视网膜病、赘生性疾患、脂肪细胞肿瘤、脂肪细胞癌(诸如脂肪肉瘤)、前列腺癌和其它癌症(包括胃癌、乳腺癌、膀胱癌和结肠癌)、血管生成、阿尔茨海默氏病、牛皮癣、高血压、代谢综合征(例如，人存在以下病症中的三种或更多种：腹部肥胖、高甘油三酯血症、低HDL胆固醇、高血压和高空腹血浆葡萄糖)、卵巢雄激素过多症(多囊卵巢综合征)和胰岛素抗性是一个组成部分的其他病症，诸如睡眠呼吸暂停。本发明的组合物和方法可用于治疗、控制或预防肥胖(包括遗传性或环境性)和肥胖相关的病症。本文的肥胖相关病症与肥胖相关、由肥胖引起或者是肥胖的结果。肥胖相关病症的实例包括肥胖、糖尿病、过量进食、暴饮暴食和贪食症、高血压、血浆胰岛素浓度升高和胰岛素抗性、血脂异常、高脂血症、子宫内膜癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌和结肠癌、骨关节炎、阻塞性睡眠呼吸暂停、胆结石、心脏病、心律异常和心律不齐、心肌梗塞、充血性心力衰竭、冠心病、猝死、中风、多囊卵巢病、颅咽管瘤、普拉德-威利综合征(Prader-Willi Syndrome)、弗勒利希氏综合征(Frohlich's syndrome)、GH缺乏型受试者、正常变异性身材矮小、特纳氏综合征(Turner's syndrome)和表现出代谢活性降低或静息时能量消耗量(占总不含脂肪物质的百分比)降低的其他病理学疾患，例如患有急性成淋巴细胞性白血病的儿童。肥胖相关病症的其他实例有代谢综合征、胰岛素抗性综合征、生殖激素异常、性功能障碍和生殖功能障碍(诸如生育能力受损、不育症、男性性腺功能减退和女性多毛症)、与母体肥胖相关的胎儿缺陷、胃肠动力障碍(诸如肥胖相关的胃食管回流)、呼吸障碍诸如肥胖性肺换气不足综合征(匹克威克综合征(Pickwickian syndrome))、呼吸急促、心血管病症、炎症(诸如全身性血管炎症)、动脉硬化、高胆固醇血症、下背部疼痛、胆囊疾病、高尿酸血

症、痛风和肾癌，以及麻木风险增高。本发明的组合物和方法还可用于治疗阿尔茨海默氏病。

[0721] 在各个实施方案中，使用本发明的组合物来治疗或预防一种或多种呼吸道疾病，诸如特发性肺纤维化(IPF)、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、支气管扩张、过敏性鼻炎、窦炎、肺血管收缩、炎症、过敏、呼吸受阻、呼吸窘迫综合征、囊性纤维化、肺高压、肺血管收缩、肺气肿、汉坦病毒肺综合征(Hantavirus pulmonary syndrome，HPS)、吕弗勒氏综合征(Loeffler's syndrome)、古德帕斯彻氏综合征(Goodpasture's syndrome)、胸膜炎、肺炎、肺水肿、肺纤维化、肉样瘤病、与呼吸道合胞病毒感染相关的并发症和其他呼吸道疾病。

[0722] 在一些实施方案中，本发明用于治疗或预防一种或多种神经退行性疾病。说明性神经变性疾病包括但不限于弗里德希共济失调、多发性硬化(包括但不限于良性多发性硬化；复发-缓解型多发性硬化(RRMS)；继发性进行性多发性硬化(SPMS)；进行性复发性多发性硬化症(PRMS)；和原发性进行性多发性硬化(PPMS))、阿尔茨海默氏病(包括但不限于早期发作阿尔茨海默氏病、晚期发作阿尔茨海默氏病和家族性阿尔茨海默氏病(FAD)、帕金森氏病和帕金森症(包括但不限于特发性帕金森氏病、血管帕金森症、药物诱发的帕金森症、路易体痴呆、遗传性帕金森氏病、青少年帕金森氏病)、亨廷顿氏病、肌萎缩性侧索硬化(ALS，包括但不限于偶发性ALS、家族性ALS、西太平洋ALS、青少年ALS、西拉玛雅病(Hiramaya Disease))。

[0723] 在各个实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可用于治疗创伤，例如非愈合性创伤、溃疡、灼伤或冻伤、慢性或急性创伤、开放性或闭合性创伤、内伤或外伤(说明性外伤是穿透性和非穿透性创伤)。在各个实施方案中，本发明的嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物可用于治疗局部缺血，作为非限制性实例，与急性冠状动脉综合征相关的局部缺血、急性肺损伤(ALI)、急性心肌梗塞(AMI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、动脉阻塞性疾病、动脉硬化、关节软骨缺陷、无菌性全身性炎症、动脉粥样硬化性心血管疾病、自身免疫性疾病、骨折、骨折、脑水肿、脑灌注不足、伯格氏病(Buerger's disease)、灼伤、癌症、心血管疾病、软骨损伤、脑梗塞、脑缺血、脑中风、脑血管疾病、化学疗法诱导的神经病、慢性感染、慢性肠系膜缺血、跛行、充血性心力衰竭、结缔组织损伤、挫伤、冠状动脉病(CAD)、严重型肢体缺血(CLI)、克罗恩氏病、深静脉血栓形成、深部创伤、溃疡愈合延迟、创伤愈合延迟、糖尿病(I型和II型)、糖尿病性神经病变、糖尿病诱导的局部缺血、弥漫性血管内凝血(DIC)、栓塞性脑缺血、冻伤、移植物对抗宿主病、遗传性出血性毛细管扩张缺血性血管病、高氧性损伤、缺氧、炎症、炎症性肠病、炎症性疾病、肌腱损伤、间歇性跛行、肠缺血、局部缺血、缺血性脑病、缺血性心脏病、缺血性末梢血管病、胎盘缺血、缺血性肾病、缺血性血管病、缺血性再灌注损伤、撕裂伤、左主冠状动脉疾病、肢体缺血、下肢缺血、心肌梗塞、心肌缺血、器官缺血、骨关节炎、骨质疏松症、骨肉瘤、帕金森氏病、周围动脉病(PAD)、周围动脉病、周围缺血、周围神经病变、周围性血管病、癌前、肺水肿、肺栓塞、重塑障碍、肾缺血、视网膜缺血、视网膜病、败血症、皮肤溃疡、实体器官移植、脊髓损伤、中风、软骨下骨囊肿、血栓形成、血栓形成性脑缺血、组织缺血、短暂性缺血性发作(TIA)、外伤性脑损伤、溃疡性结肠炎、肾血管病、血管炎症性疾患、希佩尔-林道综合征(von Hippel-Lindau syndrome)或者组织或器官创伤。

[0724] 在各个实施方案中，本发明涉及治疗一种或多种贫血，包括由慢性肾病(例如由透析)和/或抗癌剂(例如化学疗法和/或HIV治疗(例如齐多夫定(Zidovudine)(INN)或叠氮胸

苷(AZT))、炎症性肠病(例如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)引起的贫血、与炎症性疾患(例如关节炎、狼疮、IBD)相关的贫血、与糖尿病、精神分裂症、脑型疟相关的贫血、再生障碍性贫血和由癌症治疗(例如化学疗法和/或放射)导致的脊髓发育不良和各种骨髓发育不良综合征病(例如镰状细胞性贫血、血红蛋白SC病、血红蛋白C病、α地中海贫血和β地中海贫血、早产后新生儿贫血和相应疾患)。

[0725] 在一些实施方案中,本发明涉及治疗贫血或患有贫血的患者,贫血即红细胞中发现的红细胞数目和/或血红蛋白量低于正常值的疾患。在各个实施方案中,贫血可以是急性的或慢性的。举例来说,本发明的贫血包括但不限于缺铁性贫血、肾贫血、慢性疾病/炎症贫血、恶性贫血(诸如大红细胞性胃液缺乏性贫血、青少年恶性贫血和先天性恶性贫血)、癌症相关性贫血、抗癌相关性贫血(例如化学疗法相关性贫血、放射疗法相关性贫血)、单纯性红血球发育不良、伴随过量胚细胞的难治性贫血、再生障碍性贫血、X连锁铁粒幼细胞性贫血、溶血性贫血、镰状细胞性贫血、由ESA产生受损引起的贫血、脊髓发育不良综合征、低色性贫血、小红细胞性贫血、铁粒幼细胞性贫血、自身免疫性溶血性贫血、库利氏贫血(Cooley's anemia)、地中海贫血、戴-布二氏贫血(Diamond Blackfan anemia)、范科尼氏贫血(Fanconi's anemia)和药物诱导的免疫性溶血性贫血。贫血可以导致严重的症状,包括缺氧、慢性疲劳、注意力不集中、皮肤苍白、低血压、眩晕和心力衰竭。

[0726] 在一些实施方案中,本发明涉及治疗由慢性肾衰竭引起的贫血。在一些实施方案中,本发明涉及治疗由使用一种或多种肾替代疗法,包括透析、血液透析、腹膜透析、血液过滤、血液透析过滤和肾移植引起的贫血。

[0727] 在一些实施方案中,本发明涉及治疗没有进行透析的慢性肾病患者的贫血。举例来说,本发明涉及处在第1阶段CKD、或第2阶段CKD、或第3阶段CKD、或第4阶段CKD、或第5阶段CKD的患者。在一些实施方案中,本发明的患者是第4阶段CKD或第5阶段CKD。在一些实施方案中,本发明的患者已经进行了肾脏移植。在一些实施方案中,本发明涉及治疗患有急性肾损伤(AKI)的患者的贫血。

[0728] 在一些实施方案中,贫血是由化学疗法诱导的。举例来说,化学疗法可以是任何骨髓抑制性化学疗法。在一些实施方案中,化学疗法是Revlimid、Thalomid、地塞米松、阿霉素(Adriamycin)和Doxil中的一种或多种。在一些实施方案中,化学疗法是一种或多种基于铂的药物,包括顺铂(例如PLATINOL)和卡铂(例如PARAPLATIN)。在一些实施方案中,化学疗法是本文所描述的化学治疗剂中的任一种。在一些实施方案中,化学疗法是Groopman等人J Natl Cancer Inst(1999)91(19):1616-1634中描述的任何剂,所述文献的内容以引用方式整体并入本文。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法用于治疗晚期阶段癌症患者(例如第IV阶段或第III阶段或第II阶段癌症)的化学疗法相关性贫血。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法用于治疗接受剂量密集性化学疗法或其他侵袭性化学疗法方案的癌症患者的化学疗法相关性贫血。

[0729] 在一些实施方案中,本发明涉及治疗患有一种或多种基于血液的癌症,诸如白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤的患者的贫血。此类癌症可以直接影响骨髓。此外,本发明涉及已经扩散至骨或骨髓的转移性癌症。在一些实施方案中,本发明涉及治疗进行放射疗法的患者的贫血。这种放射疗法可能损伤骨髓,从而降低其制造红细胞的能力。在其他实施方案中,本发明涉及治疗铁、维生素B12和叶酸中有一种或多种减少或缺乏的患者的贫血。在其

他实施方案中，本发明涉及治疗失血过多(包括但不限于手术后或者由造成内部出血的肿瘤导致)的患者的贫血。在其他实施方案中，本发明涉及治疗慢性病贫血患者的贫血。

[0730] 在一些实施方案中，本发明的方法和组合物刺激红细胞产生。在一些实施方案中，本发明的方法和组合物刺激骨髓中的定向红细胞祖细胞的分裂和分化。

[0731] 本发明的某些实施方案尤其可用于治疗癌症患者的化学疗法诱导的贫血。在一些实施方案中，本发明的方法和组合物允许在癌症患者结束化学疗法后继续施用所述嵌合蛋白或嵌合蛋白复合物。在一些实施方案中，本发明的方法和组合物允许以相对于非癌症患者没有减少的剂量治疗癌症患者。在一些实施方案中，本发明的方法和组合物允许治疗正在接受化学疗法并且被认为可治愈的癌症患者。在各个实施方案中，所述癌症患者存在血栓史、近期手术、长期卧床休养或活动受限和用化学治疗剂进行治疗中的一项或多项。

[0732] 药盒

[0733] 本发明还提供了用于施用本文所描述的任何剂(例如具有或没有各种其他治疗剂的嵌合蛋白)的药盒。所述药盒是包括至少一种本文所描述的本发明药物组合物在内的材料或组分的组合体。因此，在一些实施方案中，所述药盒含有至少一种本文所描述的药物组合物。

[0734] 配置在药盒中的组分的确切特性取决于其预定目的。在一个实施方案中，所述药盒被配置用于治疗人受试者的目的。

[0735] 在所述药盒中可以包括使用说明书。使用说明书典型地包括有形表示，其描述了使用所述药盒的组分实现所期望的结果，诸如治疗癌症时将要采用的技术。任选地，所述药盒还含有本领域技术人员容易了解的其他有用组分，诸如稀释剂、缓冲剂、药学上可接受的载体、注射器、导管、敷涂器、吸移工具或测量工具、包扎材料或其他有用的附件。

[0736] 装配在药盒中的材料和组分可以提供给从业人员，以保持其可操作性和效用的任何便利且适合的方式储存。举例来说，这些组分可以在室温、冷藏温度或冷冻温度下提供。这些组分典型地包含在合适的包装材料中。在各个实施方案中，包装材料是由众所周知的方法构造，优选地以提供无菌、无污染的环境。包装材料可以具有指示所述药盒和/或其组分的内含物和/或目的的外部标签。

[0737] 定义

[0738] 如本文所使用，“一个/一种(a/an)”或“所述(the)”可以意指一个或多于一个。

[0739] 除非特别说明或从上下文显而易见，否则如本文所使用，术语“或”被理解为包含性的并且涵盖“或”与“和”两者。

[0740] 此外，术语“约”当与引用的数值指示结合使用时意指所引用的数值指示加或减所述引用的数值指示的至多10％，例如在(加或减)所述值的10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％、1％、0.5％、0.1％、0.05％或0.01％之内。举例来说，语言“约50”覆盖45至55的范围。

[0741] “有效量”当与医学用途结合使用时是有效提供目标疾病的发病率的可测量治疗、预防或降低的量。

[0742] 如本文所使用，如果活性和/或效应的读出在剂或刺激物存在下相对于不存在此类调节降低了显著量，诸如降低了至少约10％、至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约97％、至少

约98％或更多、多达并且包括至少约100％，那么某性质“降低”。如本领域普通技术人员所理解，在一些实施方案中，活性降低并且一些下游读出将降低但其他下游读出可以增加。

[0743] 相反地，如果活性和/或效应的读出在剂或刺激物存在下相对于不存在此类剂或刺激物增加了显著量，例如增加了至少约10％、至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约97％、至少约98％或更多、多达并且包括至少约100％或更多、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约50倍、至少约100倍，那么活性“增加”。

[0744] 如本文所提及，除非另外规定，否则全部组成百分比都以总组合物的重量计。如本文所使用，词语“包括”及其变化形式旨在是非限制性的，使得在列表中对项目的列举不应排除也可以用于这项技术的组合物和方法中的其他类似项目。类似地，术语“可以(can/may)”及其变化形式旨在是非限制性的，使得一个实施方案可以包含某些要素或特征的列举不排除本发明技术的不含有那些要素或特征的其他实施方案。

[0745] 尽管开放性的术语“包含”作为术语诸如包括、含有或具有的同义词在本文中用以描述和要求本发明，但本发明或其实施方案可以可选地使用替代性术语如“由……组成”或“基本上由……组成”加以描述。

[0746] 如本文所使用，词语“优选的”和“优选地”是指所述技术的在某些情况下提供某些益处的实施方案。然而，其他实施方案在相同或其他情况下也可以是优选的。此外，列举一个或多个优选实施方案不意指其他实施方案是无用的，并且不打算将其他实施方案从所述技术的范围中排除。

[0747] 用于实现治疗效果所需要的本文所描述的组合物的量可以出于特定目的根据常规程序凭经验确定。一般来说，对于出于治疗目的而施用治疗剂而言，治疗剂是以药理学有效剂量给予。“药理学有效量”、“药理学有效剂量”、“治疗有效量”或“有效量”是指足以产生所期望的生理效应的量或能够实现所期望的结果、特别是用于治疗病症或疾病的量。如本文所使用，有效量将包括足以例如延迟病症或疾病的症状的发展、改变病症或疾病的症状的过程(例如，减缓疾病的症状的进展)、减少或消除病症或疾病的一种或多种症状或表现形式，以及逆转病症或疾病的症状的量。治疗益处还包括中断或减缓潜在疾病或病症的进展，无关于是否实现了改善。

[0748] 有效量、毒性和治疗功效可以通过标准药物程序在细胞培养物或实验动物中测定，例如测定LD50(约50％群体的致死剂量)和ED50(在约50％群体中具有治疗有效性的剂量)。剂量可以取决于所用剂型和所用施用途径而变化。毒性与治疗效果之间的剂量比率是治疗指数并且可以表示为LD50/ED50比。在一些实施方案中，展现较大治疗指数的组合物和方法是优选的。治疗有效剂量最初可以由体外测定(包括例如细胞培养物测定)加以估算。此外，剂量可以在动物模型中配制以实现包括如在细胞培养物中或在适当动物模型中测定的IC50的循环血浆浓度范围。所描述的组合物在血浆中的含量可以例如通过高效液相色谱法加以测量。任何特定剂量的效应都可以通过合适的生物测定来监测。剂量可以由医师确定并且根据需要调整以适应观察到的治疗效果。

[0749] 在某些实施方案中，效应将引起至少约10％、至少约20％、至少约30％、至少约50％、至少约70％或至少约90％的可定量变化。在一些实施方案中，效应将引起约10％、约

20％、约30％、约50％、约70％或甚至约90％或更大的可定量变化。治疗益处还包括中断或减缓潜在疾病或病症的进展，无关于是否实现了改善。

[0750] 如本文所使用，“治疗方法”同样适用于组合物用于治疗本文所描述的疾病或病症的用途和/或组合物用于制造用以治疗本文所描述的疾病或病症的药物的一种和/或多种用途。

[0751] 实施例

[0752] 术语“AFN”、“A-Kine”、“AcTa”、“AcTakine”、“AcTaferon”本文中间或用于指代本文所述的嵌合体。

[0753] 在这些实施例中，我们表明PD-L1 VHH诱变产生了具有增加的亲和力和PD-1/PD-L1相互作用中和效力的变体。这种诱变包括人源化和通过定点诱变消除序列倾向(异构化、脱酰胺化和氧化的风险动机)。在第一步中分别进行这些操作，在第二步中结合感兴趣的突变。此处使用的PD-L1 VHH被命名为2LIG99(SEQ ID NO:1)和2LIG189(SEQ ID NO:26)。

[0754] 实施例1:对2LIG99 VHH的第一轮诱变

[0755] VHH 2LIG99(SEQ ID NO:1)在CDR2中含有序列基序DG，这具有高异构化风险。为了避免这个问题，将残基D54和G55分别随机诱变。对于各D54和G55，随机挑选48个克隆、测序，并根据制造商的指南基于C端His标签并使用HisPur钴旋转板(HisPur Cobalt Spin Plates)(ThermoFisher)从TES提取物中纯化VHH。

[0756] 使用生物层干涉技术在Octet Red 96仪器(ForteBio)上筛选纯化的VHH变体的亲和力。简单来说，将与小鼠IgG1 Fc结构域(SinoBiologicals)融合的重组PD-L1细胞外结构域固定在抗鼠IgG定量(AMQ)生物传感器(ForteBio)上。将加载的传感器与单一浓度的PD-L1 VHH变体一起孵育，监测缔合和解离，并使用Octet数据分析软件v10(ForteBio)计算动力学参数。基于对解离动力学的分析，选择突变D54G、D54K、D54T和G55R用于对2LIG99 VHH进行进一步诱变。

[0757] 对于2LIG99的人源化，将该序列与人VH3-23_JH5序列和经设计在框架区中具有一系列突变的构建体(Q1D_Q5V_A14P_T74S_K86R_Q110;2LIG99_OPT1;SEQ ID NO:8)进行比对。将在位置1处包括天冬氨酸以避免形成焦谷氨酸的风险。通过结合个别突变T23A、A63V、K76N、S97Y或这些后者的组合设计了另一系列的变体(SEQ ID NO:9-13)。此外，针对CDR2中的DG异构化位点，再次评估突变D54G、D54K、D54T或G55R(SEQ ID NO:14-17)。将这些变体(具有C端His标签)克隆到pHEN6C载体中，用于在大肠杆菌WK6细胞中进行周质表达。在IPTG诱导后过夜表达后，使细胞沉淀，并根据制造商的指南使用HisPur钴旋转板(ThermoFisher)从周质提取物中纯化。

[0758] 使用生物层干涉技术在Octet Red 96仪器(ForteBio)上测量所得变体的亲和力。简单来说，将与小鼠IgG1 Fc结构域(SinoBiologicals)融合的重组PD-L1细胞外结构域固定在抗鼠IgG定量(AMQ)生物传感器(ForteBio)上。将加载的传感器与连续稀释的PD-L1 VHH变体一起孵育，监测缔合和解离，并使用Octet数据分析软件v10(ForteBio)计算动力学参数。图3中汇总的结果说明人源化突变可导致亲和力丧失，含有突变T23A的SEQ ID NO:9和13尤为如此。

[0759] 实施例2:2LIG99 VHH的突变组合

[0760] 基于Octet中第一系列2LIG99变体的亲和力，我们选择了OPT1人源化变体(具有突

变Q1D_Q5V_A14P_T74S_K86R_Q110)并将这些变体与变异A63V、K76N和S79Y组合，产生了SEQ ID No:18-25。所有这些变体中的异构化基序都经过D54G突变除去。如上所述产生变体并使用重组PD-L1-小鼠Fc蛋白在Octet仪器上测量亲和力。图4中的数据说明，就SEQ ID No:20、21和24而言，有可能对2LIG99序列人源化并除去该序列中的异构化基序而不丧失亲和力，或甚至能提高亲和力，这表明在框架中存在突变K76N和/或S79Y有着令人惊讶的有益效果。

[0761] 我们接下来评估了序列变异对干扰PD-L1/PD-1相互作用能力的影响。为了测试，我们基于PD-L1的细胞外部分生成了二价AFN(参见SEQ ID No:169和170)。当施加于HL116细胞时，将HT1080衍生的克隆用由IFN诱导型6-16启动子控制的萤火虫荧光素酶基因稳定转染，与亲本细胞相比，该AFN在表达PD-1的细胞上更具活性。使用该生物测定来测试2LIG99变体的中和能力。简单来说，将次优的PD-L1 AFN浓度(即1μg/ml)与连续稀释的2LIG99变体一起预孵育。半小时后，将AFN和VHH的组合添加至96孔中的20.000个HL116-PD-1细胞中，并将细胞进一步孵育6小时。测量荧光素酶并绘制与VHH浓度的关系图。由于所需的PD-L1 AFN浓度以及2LIG99VHH的相对高亲和力和中和能力，该测定的灵敏度不允许区分具有提高的中和能力的变体。然而，数据证实含有突变K76N和/或S79Y(也与D54G和/或A63V组合)的变体有效地中和PD-L1/PD-1相互作用，如图5所示。

[0762] 实施例3:对2LIG189的诱变

[0763] 对于2LIG189(SEQ ID NO:26)的人源化，将该序列与人VH3-23_JH5序列和经设计在框架区中具有一系列突变的构建体(Q1D_Q5V_A14P_A74S_K86R_Q109L;2LIG189_OPT1;SEQ ID NO:33)进行比对。将在位置1处包括天冬氨酸以避免形成焦谷氨酸的风险。通过结合突变M77T和/或M78V设计了另一系列的变体(SEQ ID NO:34-36)。分别将CDR1中的脱酰胺化基序中的N32和D33残基突变，产生了22个变体(SEQ ID NO:37-58)。将CDR3边界处的可能对氧化敏感的M97突变为E、F、H、I、L、Q、R、V或Y(SEQ ID NO:59-67)。如实施例1所描述纯化所得突变体并测量亲和力。结果汇总在图6中。使亲和力增加两倍或更多倍的突变包括N32Q、N32R、D33H、M97I、M97L和M97V。

[0764] 实施例4:2LIG189的突变组合

[0765] 基于Octet中第一系列的2LIG189变体的亲和力，我们将人源化变体(Q1D_Q5V_A14P_A74S_M77T_M78V_K86R_Q109L)与脱酰胺化变体N32R或D33H和氧化变体M97V或M97I组合(SEQ ID NO:68-73)。如上所述测量亲和力(汇总在图7中)和中和效力(图8)。两个数据集都表明，脱酰胺化和氧化风险位点都被除去的一些变体(尤其是SEQ ID NO:72和73)的亲和力(分别为40倍和10倍)和PD-L1/PD-1相互作用中和都得到增加。

[0766] 实施例5:对变体2LIG99和2LIG189VHH的选择

[0767] 为了生成靶向PD-L1的Actakine，选择了以下变体。

[0768] 2LIG189;SEQ ID NO:74:

[0769] Q1D_Q5V_A14P_D33H_A62S_A74S_M77T_M78V_S79Y_K86R_M97V_Q109L

[0770] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKIFSGNHMGWYRQAPGKQRELVGIITSGGITDYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNVRDRTIWWGQGTLVTVSS

[0771] 2LIG99;SEQ ID NO:24:

[0772] Q1D_Q5V_A14P_D54G_T74S_K76N_S79Y_K86R_Q110L

[0773] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSGGTPAYADSAKGRFTI

SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSS

[0774] 实施例6:基于选定的2LIG99和2LIG189 VHH变体的靶向PD-L1的AFN

[0775] 在该实施例中,生成并评估了12个靶向PD-L1的AFN。对于靶向,将两个经序列优化和人源化的PD-L1 VHH(2LIG99和2LIG189;见上文)以单价或双价形式使用。弹头包括人IFNa2或野生型人IFNa1的R149(IFNa2_R149A)和A145G(IFNa2_A145G)变体。出于稳定性原因,将IFNa1中的残基C86突变为S。将VHH和弹头克隆成基于Merchant的旋钮入孔洞Fc形式。

[0776] 构建体

[0777] 通过基因合成(GeneArt)制成以下构建体。Fc区含有人IgG1的结构域CH2和CH3。Fc序列中的突变包括:LALA:L234A_L235A;KQ:223Q;孔洞_Merchant:Y349C_T366S_L368A_Y407V;旋钮_Merchant:S354C_T366W。

[0778] 1.2LIG99-Fc3(pcDNA3.4 2LIG99_opt-5*GGS-hIgG1-LALA-KQ-孔洞_Merchant;P-2204)(SEQ ID NO:171)

[0779] MEFGLSWLFLVAILKGVQCDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSGGTPAYADSAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSSGGSGGSGGSGGSGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCQVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0780] 2.2LIG189-Fc3(pcDNA3.4 2LIG189_opt-5*GGS-hIgG1-LALA-KQ-孔洞_Merchant;P-2206)(SEQ ID NO:172)

[0781] MEFGLSWLFLVAILKGVQCDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKIFSGNHMGWYRQAPGKQRELVGIITSGGITDYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNVRDRTIWWGQGTLVTVSSGGSGGSGGSGGSGGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCQVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0782] 3.(2LIG99)2-Fc3(pcDNA3.4 2LIG99_opt-20*GGS2LIG99_opt-5*GGS-hIgG1-LALA-KQ-孔洞_Merchant;P-2399)(SEQ ID NO:173)

[0783] MGWSCIIFFLVATATGVHSDVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGTIFSINRMDWFRQAPGKQRELVALITSGGTPAYADSAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTLVTVSSGGSGGSGGSGGSGG

GNHMGWYRQAPGKQRELVGIITSGGITDYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNVRDRTIWWGQG
TLVTVSSGGSGGSGGSGGSGGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCQVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP
PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

[0786] 5.Fc3(pcDNA3.4 hIgG1-LALA-KQ-孔洞_Merchant;P-1542)(SEQ ID NO:175)

[0787] MKLPVRLLVLMFWIPASSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCQVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0788] 6.Fc4-IFNa2_R149A(pcDNA3.4 huIgG1-LALA-KQ-旋钮_Merc hant-10*GGS-
hIFNa2_R149A;P-1483)(SEQ ID NO:176)

[0789] MKLPVRLLVLMFWIPASSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCQVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRR
ISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVI
QGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMASFSLSTNLQESLRSKE

[0790] 7.Fc4-IFNa2_A145G(pcDNA3.4 huIgG1-LALA-KQ-旋钮_Merc hant-10*GGS-
hIFNa2_A145G;P-2157)(SEQ ID NO:177)

[0791] MKLPVRLLVLMFWIPASSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCQVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRR
ISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVI
QGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRGEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

[0792] 8.Fc4-IFNa1(pcDNA3.4 huIgG1-LALA-KQ-旋钮_Merchant-10*GGS-hIFNa1_C86S;
P-2213)(SEQ ID NO:178)

[0793] MKLPVRLLVLMFWIPASSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCQVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGCDLPETHSLDNRRTLMLLAQMSRI
SPSSCLMDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAPAISVLHELIQQIFNLFTTKDSSAAWDEDLLDKFSTELYQQLNDLEACVM
QEERVGETPLMNADSILAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE

[0794] 产生和纯化

[0795] 根据制造商的指南,将以下质粒组合在ExpiCHO细胞(ThermoFisher Scientific)
中瞬时转染:

[0796] 1.P-2204+P-1483:2LIG99-Fc3+Fc4-IFNa2_R149A

[0797] 2.P-2206+P-1483:2LIG189-Fc3+Fc4-IFNa2_R149A

[0798] 3.P-2399+P-1483:(2LIG99)2-Fc3+Fc4-IFNa2_R149A

[0799] 4.P-2400+P-1483:(2LIG189)2-Fc3+Fc4-IFNa2_R149A

[0800] 5.P-1542+P-1483:Fc3+Fc4-IFNa2_R149A

[0801] 6.P-2204+P-2157:2LIG99-Fc3+Fc4-IFNa2_A145G

[0802] 7.P-2206+P-2157:2LIG189-Fc3+Fc4-IFNa2_A145G

[0803] 8.P-2399+P-2157:(2LIG99)2-Fc3+Fc4-IFNa2_A145G

[0804] 9.P-2400+P-2157:(2LIG189)2-Fc3+Fc4-IFNa2_A145G

[0805] 10.P-1542+P-2157:Fc3+Fc4-IFNa2_A145G

[0806] 11.P-2204+P-2213:2LIG99-Fc3+Fc4-IFNa1

[0807] 12.P-2206+P-2213:2LIG189-Fc3+Fc4-IFNa1

[0808] 13.P-2399+P-2213:(2LIG99)2-Fc3+Fc4-IFNa1

[0809] 14.P-2400+P-2213:(2LIG189)2-Fc3+Fc4-IFNa1

[0810] 15.P-1542+P-2213:Fc3+Fc4-IFNa1

[0811] 转染后一周,收集上清液并通过离心除去细胞。将重组蛋白基于蛋白A结合特性(Hitrap MabSelect SuRe柱,GE Healthcare)并通过随后的尺寸排阻色谱法(Superdex 200increase HiScale 16/40柱,GE Healthcare)纯化,两者均在Äkta纯化器(GE Healthcare)上进行。用分光光度计(NanoDrop仪器,Thermo Scientific)测量浓度,在SDS-PAGE上估算纯度,并在EndoSafe Nexgen仪器(Charles River)上定量内毒素水平。

[0812] HL116报告细胞系中的效力

[0813] 在HL116细胞(用p6-16荧光素酶报告基因稳定转染的IFN应答细胞系)上测试所得PD-L1 VHH AFN的生物活性。将细胞接种过夜,并用连续稀释的不同PD-L1 VHH AFN或非靶向对照刺激6小时。在EnSight多模式酶标仪(Perkin Elmer)上测量荧光素酶活性。图28清楚地表明,所有靶向PD-L1的AFN都比非靶向变体更具活性。

[0814] PD-1/PD-L1相互作用的中和

[0815] 程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)是一种经过充分表征的PD-L1配体。在此处,根据制造商的说明在商业AlphaLisa装置(目录号AL356;PerkinElmer)中比较PD-L1 VHH AFN干扰PD-1/PD-L1相互作用的能力。简单来说,生物素化的PD-1与链霉亲和素包被的Alpha供体珠粒结合,而带有His标签的PD-L1被抗His AlphaLISA受体珠粒捕获。当PD-L1与PD-1结合时,供体珠粒和受体珠粒会非常接近。供体珠粒的激发促使单线态氧分子的释放,从而触发受体珠粒中的能量转移级联,导致在615nm处产生一个尖锐的光发射峰。为了评估相互作用的中和,在添加供体珠粒之前,将受体珠粒与连续稀释的PD-L1VHH AFN一起预孵育。图29中的数据清楚地表明,所有测试的PD-L1AFN对相互作用的抑制程度相同(IC50值在350与400pM之间),并且这种中和作用与抗PD-L1 Ab阿特鲁单抗的中和作用相当。

[0816] CD80/PD-L1相互作用的中和

[0817] PD-L1的第二种已知配体是分化簇80(CD80),也称为B7-1。为了确定PD-L1 AFN是否干扰CD80/PD-L1相互作用,设置了板结合测定。在此处,将MaxiSorp板(Nunc)用人PD-L1-小鼠Fc(SinoBiologicals;10084-H05H;2μg/ml于PBS中)包被过夜。洗涤和封闭(在0.5%酪蛋白的PBS中)后,将板与连续稀释的PD-L1 VHH AFN一起孵育30分钟。添加次优浓度(此处为2μg/ml)生物素化的人CD80-His(SinoBiologicals;10698-H08H-B),并用链霉亲和素-

HRP(Jackson ImmunoResearch)和TMB微孔过氧化物酶底物(KPL)对结合进行定量。与PD-1/PD-L1测定一样,不同的VHH(单价或双价)对CD80/PD-L1相互作用的抑制程度相当(IC50值在650与1100pM之间)(图30)。中和效力与弹头(IFNa2_R149A或IFNa1)无关。

[0818] 亲和力

[0819] 使用生物层干涉(BLI)技术在Octet Red 96仪器(ForteBio)上测量所得PD-L1 VHH AFN变体的亲和力。简单来说,将重组人或食蟹猴PD-L1固定在传感器上。将人PD-L1(SinoBiologicals;10084-H05H)与小鼠IgG Fc融合并加载到抗鼠IgG定量(AMQ)生物传感器(ForteBio)上。使用Pierce™IP用抗体生物素化试剂盒(Pierce™Antibody Biotinylation Kit for IP,ThermoFisher Scientific)对食蟹猴PD-L1(与人IgG Fc基因融合;SinoBiologicals;90251-C02H)进行生物素化,并将其加载到链霉亲和素生物传感器(ForteBio)上。将加载的传感器与连续稀释的PD-L1 VHH AFN变体一起孵育,监测缔合和解离,并使用Octet数据分析软件v10(ForteBio)计算动力学参数。图31A、图31B和图31C中汇总的结果表明,(i)基于2LIG99的AFN对人和食蟹猴PD-L1的亲和力高于其2LIG189对应物,(ii)在AFN中存在两个VHH导致2LIG99 AFN和2LIG189 AFN的亲和力分别增加了3倍和10倍,并且(iii)对人和食蟹猴PD-L1的亲和力相当。

[0820] 表位分类

[0821] 使用生物层干涉(BLI)技术研究PD-L1 VHH与PD-L1上的重叠表位结合的程度。简单来说,使用Pierce™IP用抗体生物素化试剂盒(ThermoFisher Scientific)对2LIG99和2LIG189 AFN进行生物素化,并将它们加载到链霉亲和素生物传感器(ForteBio)上。随后监测人PD-L1(SinoBiologicals;10084-H05H)或与2LIG99 AFN或2LIG189AFN一起预孵育的PD-L1的结合。图32A和图32B中的数据清楚地显示,过量的2LIG189 AFN抑制PD-L1与固定的2LIG99 AFN的结合,反之亦然,表明这两种VHH结合重叠表位。

[0822] 稳定性和可制造性

[0823] 为了深入了解八个PD-L1 VHH AFN的稳定性,将蛋白质浓缩至10mg/ml并进行5次冷冻(-20℃)-解冻循环。在每个循环之后,将样品离心,并在Nanodrop分光光度计上测量蛋白质浓度,未观察到对蛋白质浓度有重大影响。在冷冻-解冻循环之前和之后,在Äkta纯化器上通过尺寸排阻色谱法(Superdex 200increase HiScale 16/40柱,GE Healthcare)分析样品(图33A-图33H)。在分析性SEC中蛋白质浓度的相对稳定且不存在高阶聚集体,说明所有变体在冷冻-解冻中表现出良好的稳定性。

[0824] 人血清的稳定性

[0825] 在平行方法中,测试了血清中PD-L1 VHH AFN的稳定性。将蛋白质以10μg/ml稀释在人血清中,并在37℃下孵育7天、4天、2天或0天。使用HL116报告细胞系测量经孵育蛋白质的生物活性。表6中汇总了这些刺激的EC_{50}值(以ng/ml为单位),显示在血清中于37℃下孵育不会导致生物活性降低,这说明所有PD-L1 VHH AFN在这些条件下同样稳定。

[0826] 表6.在血清中于37℃下孵育后HL116报告基因上AFN的生物活性(以EC50表示).

[0827]

	7天	4天	2天	0天
2LIG99-IFNa2_R149A	0,85	0,76	0,68	0,89
2LIG189-IFNa2_R149A	51,2	43,7	21,55	33,8
(2LIG99)2-IFNa2_R149A	0,058	0,096	0,101	0,047
(2LIG189)2-IFNa2_R149A	0,60	1,48	0,46	0,47
2LIG99-IFNa1	0,15	0,26	0,17	0,13
2LIG189-IFNa1	42,28	40,52	44,1	40,98
(2LIG99)2-IFNa1	0,027	0,030	0,055	0,045
(2LIG189)2-IFNa1	0,14	0,10	0,13	0,16

[0828] 体内功效

[0829] 为了评估PD-L1 VHH AFN的功效,在人源化小鼠的肿瘤模型中测试这些分子。简单来说,对新生NSG小鼠(1-2天大)进行100cGy亚致死照射,然后肝内递送$1x10^5$个$CD34^+$人干细胞(来自HLA-A2阳性脐带血)。在干细胞转移后第13周,给小鼠皮下接种$25x10^5$个人RL滤泡性淋巴瘤细胞(ATCC CRL-2261;对IFN的直接抗增殖效应不敏感)。在肿瘤接种后的第12天和第19天,每周用指定量的AFN静脉内治疗小鼠(参见图34)(每组n=5-6只小鼠)。每2-3天评定肿瘤大小(卡尺测量)和体重。图34中的数据显示直至第二次治疗后一周的肿瘤生长,并证明(i)与等摩尔剂量的非靶向AFN相比,PD-L1 VHH AFN强烈抑制肿瘤生长(与经缓冲液治疗的动物相比,非靶向AFN不减少肿瘤生长);(ii)IFNa1和A145G AFN具有与R149A AFN相似的活性,尽管剂量低约10倍;且(iii)基于2LIG99的AFN具有与基于2LIG89的AFN相似的效力。体重的数据未显示缓冲液治疗与AFN治疗之间有任何重大差异,这确证所有AFN治疗都具有良好的耐受性。

[0830] 等效方案

[0831] 尽管已经结合本发明的具体实施方案描述了本发明,但应当理解,总体来说,按照本发明的原理,能够进行进一步修改并且本申请意在涵盖本发明的任何变化方案、用途或改编,并且包括如在本发明所属领域内的已知或惯用实践范围内和如可以应用于上文所阐述的基本特征和如下所附权利要求书范围内的对本公开的背离。

[0832] 本领域技术人员仅仅使用常规实验就将认识到或者能够确定本文具体描述的具体实施方案的众多等效方案。此类等效方案意图涵盖在以下权利要求书的范围内。

[0833] 以引用的方式并入

[0834] 本文引用的所有专利和出版物特此都以引用方式整体并入。

[0835] 本文讨论的出版物只提供其在本申请提交日期之前的公开内容。在本文中不应被解释为承认本发明由于在先发明而无权先于此类出版物。

[0836] 如本文所使用,所有标题都只用于组织,而非意在以任何方式限制本公开。任何个别部分的内容都可以同样适用于所有部分。

序列表

<110> 奥里尼斯生物科学股份有限公司(Orionis Biosciences LLC)

<120> 靶向PD-L1的嵌合蛋白及其用途

<130> ORN-068PC/114384-5068

<150> US 62/906,447

<151> 2019-09-26

<160> 178

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 1

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

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 2

Gly Thr Ile Phe Ser Ile Asn Arg Met Asp
1 5 10
<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 3
Leu Ile Thr Ser Asp Gly Thr Pro Ala
1 5
<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 4
Ser Ser Gly Val Tyr Asn Tyr
1 5
<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 5
Gly Thr Ile Phe Ser
1 5
<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 6
Leu Ile Thr Ser Asp Gly Thr Pro Ala Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly
1 5 10 15
<210> 7

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 7
Ser Ser Gly Val Tyr Asn Tyr
1 5
<210> 8
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 8
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr Ile Phe Ser Ile Asn
20 25 30
Arg Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Thr Ser Asp Gly Thr Pro Ala Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Val Ser Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His
85 90 95
Val Ser Ser Gly Val Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115
<210> 9
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 9
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

<210> 10
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 10

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

<210> 11

<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 11

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

<210> 12
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 12

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr Ile Phe Ser Ile Asn
20 25 30
Arg Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Thr Ser Asp Gly Thr Pro Ala Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His
85 90 95
Val Ser Ser Gly Val Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 13

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

<210> 14
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr Ile Phe Ser Ile Asn

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

<210> 15
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 15
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr Ile Phe Ser Ile Asn
20 25 30
Arg Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Thr Ser Lys Gly Thr Pro Ala Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Lys Thr Val Ser Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His
85 90 95
Val Ser Ser Gly Val Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 115
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 16

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

<210> 17
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 17

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

Val Ser Ser Gly Val Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 18

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

<210> 19
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 19

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

35 40 45

Ala Leu Ile Thr Ser Gly Gly Thr Pro Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Val Ser Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His
85 90 95

Val Ser Ser Gly Val Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 20

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr Ile Phe Ser Ile Asn
20 25 30

Arg Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Leu Ile Thr Ser Gly Gly Thr Pro Ala Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His
85 90 95

Val Ser Ser Gly Val Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成序列

<400> 21

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

<210> 22

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 22

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

Val Ser Ser
115

<210> 23
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 23

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

<210> 24
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 24

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr Ile Phe Ser Ile Asn
20 25 30
Arg Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Thr Ser Gly Gly Thr Pro Ala Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His
85 90 95
Val Ser Ser Gly Val Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115
<210> 25
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 25
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr Ile Phe Ser Ile Asn
20 25 30
Arg Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Leu Ile Thr Ser Gly Gly Thr Pro Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His
85 90 95
Val Ser Ser Gly Val Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115
<210> 26
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 26

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

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 27
Gly Lys Ile Phe Ser Gly Asn Asp Met Gly
1 5 10

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 28
Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp
1 5

<210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列

<400> 29
Arg Asp Arg Thr Ile Trp
1 5
<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 30
Gly Lys Ile Phe Ser
1 5
<210> 31
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 31
Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly
1 5 10 15
<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 32
Arg Asp Arg Thr Ile Trp
1 5
<210> 33
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 33
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

<210> 34
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 34

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

<210> 35
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成序列
<400> 35
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Asn
20 25 30
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Met Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser
<210> 36
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 36
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Asn
20 25 30
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Met Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 37

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 37

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

<210> 38

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 38

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Glu
20 25 30
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Tyr Leu

65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Met Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser
<210> 39
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 39
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Phe
20 25 30
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Met Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser
<210> 40
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 40
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Gly
20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Met Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 41
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 41

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

<210> 42
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列

<400> 42

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

<210> 43

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 43

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

<210> 44

<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 44

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

<210> 45
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 45

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Arg
20 25 30
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn

85 90 95
Met Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser
<210> 46
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 46
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Ser
20 25 30
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Met Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser
<210> 47
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 47
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Thr
20 25 30
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Met Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 48
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 48

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

<210> 49
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 49

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

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

<210> 50
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 50

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

<210> 51
<211> 114
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 51

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

<210> 52
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 52

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

100 105 110

Ser Ser

<210> 53

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 53

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

Ser Ser

<210> 54

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 54

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Asn
20 25 30
Leu Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Met Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 55
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 55

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

<210> 56
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 56

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Asn

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

<210> 57
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 57
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Asn
20 25 30
Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Met Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 58
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成序列
<400> 58
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Asn
20 25 30
Tyr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Met Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser
<210> 59
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 59
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Asn
20 25 30
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Glu Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 60
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 60

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

<210> 61
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 61

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Asn
20 25 30
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
His Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser
<210> 62
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 62
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Asn
20 25 30
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Ile Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser
<210> 63
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 63
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Asn
20 25 30
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Leu Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 64
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 64
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Asn
20 25 30
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Gln Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 65
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 65

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

<210> 66
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 66

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

<210> 67
<211> 114

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 67

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

<210> 68
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 68

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

Met Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser
<210> 69
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 69
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Asn
20 25 30
His Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Met Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser
<210> 70
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 70
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly Arg
20 25 30
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ala Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Val Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 71
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 71

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

<210> 72
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 72

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

<210> 73
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 73

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

<210> 74
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成序列
<400> 74

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

<210> 75
<211> 290
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 75

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

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125
Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140
Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160
Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175
Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205
Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220
Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225 230 235 240
Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
245 250 255
Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
260 265 270
Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
275 280 285
Glu Thr
290

<210> 76
<211> 176
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 76

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15
Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
20 25 30
Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
35 40 45
Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
50 55 60

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

<210> 77
<211> 178
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 77

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

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160
Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175
Gly Asp
<210> 78
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 78
His His His His His His
1 5
<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 79
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Gly Ser
1 5 10
<210> 80
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 80
Ala Ala Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Gly Ser His His His
1 5 10 15
His His His
<210> 81
<211> 165
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物

<400> 81

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

<210> 82

<211> 165

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工聚合物

<400> 82

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15
Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45
Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60
Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu

65 70 75 80
Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95
Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110
Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125
Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140
Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160
Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 83
<211> 166
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 83
Cys Asp Leu Pro Glu Thr His Ser Leu Asp Asn Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15
Leu Leu Ala Gln Met Ser Arg Ile Ser Pro Ser Ser Cys Leu Met Asp
20 25 30
Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
35 40 45
Gln Lys Ala Pro Ala Ile Ser Val Leu His Glu Leu Ile Gln Gln Ile
50 55 60
Phe Asn Leu Phe Thr Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Asp
65 70 75 80
Leu Leu Asp Lys Phe Cys Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
85 90 95
Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Glu Arg Val Gly Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110
Asn Ala Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Arg Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu

145 150 155 160
Arg Leu Arg Arg Lys Glu
165

<210> 84
<211> 166
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物
<400> 84

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

<210> 85
<211> 166
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 85

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

<210> 86
<211> 143
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 86

Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
1 5 10 15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
20 25 30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
35 40 45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
50 55 60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
65 70 75 80

Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
85 90 95
Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
100 105 110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
115 120 125
Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln
130 135 140

<210> 87
<211> 167
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物
<400> 87

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

<210> 88
<211> 166

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物
<400> 88

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

<210> 89
<211> 166
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物
<400> 89

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

35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
50 55 60

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Ser
65 70 75 80

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
85 90 95

Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110

Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125

Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
145 150 155 160

Arg Leu Arg Arg Lys Glu
165

<210> 90
<211> 166
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物
<400> 90

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
50 55 60

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Ser
65 70 75 80

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
85 90 95

Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110

Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr

115 120 125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
145 150 155 160
Arg Leu Arg Arg Lys Glu
165

<210> 91
<211> 167
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物
<400> 91
Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu
1 5 10 15
Ile Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys
20 25 30
Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln
35 40 45
Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln
50 55 60
Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu
65 70 75 80
Ser Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp
85 90 95
Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu
100 105 110
Met Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile
115 120 125
Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val
130 135 140
Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln
145 150 155 160
Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu
165

<210> 92
<211> 167
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物
<400> 92

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

<210> 93
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 93

```
Glu Glu Phe Gly Asn Gln
1               5
```

<210> 94
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成序列
<400> 94
Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln
1 5
<210> 95
<211> 165
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物
<400> 95
Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15
Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
20 25 30
Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
35 40 45
Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
50 55 60
Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
65 70 75 80
Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
85 90 95
Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
100 105 110
Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe
115 120 125
Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser
130 135 140
Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys
145 150 155 160
Asp Lys Pro Arg Arg
165
<210> 96
<211> 165
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 人工聚合物

<400> 96

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

<210> 97

<211> 157

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工聚合物

<400> 97

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
1 5 10 15
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
20 25 30
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60

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

<210> 98
<211> 171
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物
<400> 98

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

Pro Ser Thr Val Phe Phe Gly Ala Phe Ala Leu
165 170

<210> 99
<211> 281
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物
<400> 99

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

Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
245 250 255
Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
260 265 270
Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
275 280

<210> 100
<211> 153
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物
<400> 100
Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln Gln Lys
1 5 10 15
Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Gln
20 25 30
Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe Val Gln
35 40 45
Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu Lys Glu
50 55 60
Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu
65 70 75 80
Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu
85 90 95
Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu Glu Phe
100 105 110
Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu
115 120 125
Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp Ile Thr
130 135 140
Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser
145 150

<210> 101
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物

<400> 101

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

<210> 102

<211> 129

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工聚合物

<400> 102

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

100 105 110
Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser
115 120 125
Ser
<210> 103
<211> 185
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物
<400> 103
Ala Pro Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His
1 5 10 15
Arg Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr
20 25 30
Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser
35 40 45
Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn
50 55 60
Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn
65 70 75 80
Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu
85 90 95
Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln
100 105 110
Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln
115 120 125
Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr
130 135 140
Asn Ala Ser Leu Thr Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln
145 150 155 160
Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
180 185
<210> 104
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工聚合物
<400> 104
Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu
1 5 10 15
Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
20 25 30
Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala
35 40 45
Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
50 55 60
Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
65 70 75 80
Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
85 90 95
Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg
100 105 110
Phe Asn
<210> 105
<211> 194
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物
<400> 105
Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met
1 5 10 15
Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn
20 25 30
Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile
35 40 45
Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro
50 55 60
Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg
65 70 75 80
Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met
85 90 95
Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys
100 105 110

Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile
115 120 125
Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly
130 135 140
His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe
145 150 155 160
Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys
165 170 175
Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu
180 185 190
Asp Leu

<210> 106
<211> 270
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物
<400> 106
Met Lys Pro Lys Met Lys Tyr Ser Thr Asn Lys Ile Ser Thr Ala Lys
1 5 10 15
Trp Lys Asn Thr Ala Ser Lys Ala Leu Cys Phe Lys Leu Gly Lys Ser
20 25 30
Gln Gln Lys Ala Lys Glu Val Cys Pro Met Tyr Phe Met Lys Leu Arg
35 40 45
Ser Gly Leu Met Ile Lys Lys Glu Ala Cys Tyr Phe Arg Arg Glu Thr
50 55 60
Thr Lys Arg Pro Ser Leu Lys Thr Gly Arg Lys His Lys Arg His Leu
65 70 75 80
Val Leu Ala Ala Cys Gln Gln Gln Ser Thr Val Glu Cys Phe Ala Phe
85 90 95
Gly Ile Ser Gly Val Gln Lys Tyr Thr Arg Ala Leu His Asp Ser Ser
100 105 110
Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Thr
115 120 125
Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr Glu
130 135 140
Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val Leu
145 150 155 160
Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp Gly

165 170 175
Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp Phe
180 185 190
Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys Cys
195 200 205
Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Met His
210 215 220
Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe Ile
225 230 235 240
Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser Glu
245 250 255
Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr
260 265 270

<210> 107
<211> 193
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物
<400> 107
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile

145 150 155 160
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190
Arg

<210> 108
<211> 166
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工聚合物
<400> 108
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1 5 10 15
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
20 25 30
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
35 40 45
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
50 55 60
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
85 90 95
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
100 105 110
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
115 120 125
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
130 135 140
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
145 150 155 160
Cys Arg Thr Gly Asp Arg
165

<210> 109
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成序列
<400> 109
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 110
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10
<210> 111
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 111
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 112
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 112
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser
20
<210> 113
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成序列
<400> 113
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25
<210> 114
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 114
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30
<210> 115
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 115
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser
35
<210> 116
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 116
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40
<210> 117
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 117
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 118
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 118
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5
<210> 119
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 119
Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5
<210> 120
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 120
Glu Ala Ala Ala Lys

1 5

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 121

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1 5 10

<210> 122

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 122

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1 5 10 15

<210> 123

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 123

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

1 5 10

<210> 124

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 124

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1 5 10 15

Ala

<210> 125

<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 125
Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15
Glu Ala Ala Ala Lys Ala
20
<210> 126
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 126
Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15
Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala
20 25
<210> 127
<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 127
Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15
Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala
20 25 30
Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala
35 40 45
<210> 128
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成序列
<400> 128
Pro Ala Pro Ala Pro
1 5
<210> 129
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 129
Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser
1 5 10 15
Leu Asp
<210> 130
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 130
Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr
1 5 10
<210> 131
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 131
Gly Ser Ala Gly Ser Ala Ala Gly Ser Gly Glu Phe
1 5 10
<210> 132
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 132

Gly Gly Ser
1
<210> 133
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 133
Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 134
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 134
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 135
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 135
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5 10
<210> 136
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 136
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 137

<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 137
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser
<210> 138
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 138
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Ser
20
<210> 139
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 139
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
20
<210> 140
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 140
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
20 25
<210> 141
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 141
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
20 25 30
<210> 142
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 142
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Ser
<210> 143
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 143
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Ser Gly Gly Ser
35

<210> 144
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 144
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
35
<210> 145
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 145
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
35 40
<210> 146
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 146
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
35 40 45

<210> 147
<211> 48
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 147
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
35 40 45
<210> 148
<211> 51
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 148
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Gly Gly Ser
50
<210> 149
<211> 54
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 149
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Gly Gly Ser Gly Gly Ser
50

<210> 150
<211> 57
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 150
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
50 55

<210> 151
<211> 60
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 151
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
50 55 60

<210> 152
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成序列
<400> 152
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45
<210> 153
<211> 50
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 153
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Ser
50
<210> 154
<211> 55
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 154
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
50 55
<210> 155

<211> 60
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 155
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
50 55 60
<210> 156
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 156
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Ser
65
<210> 157
<211> 70
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 157
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Ser Gly Gly Gly Gly Ser
65 70

<210> 158
<211> 75
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 158
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
65 70 75

<210> 159
<211> 80
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 159
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
65 70 75 80

<210> 160
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 160

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
65 70 75 80
Gly Gly Gly Gly Ser
85

<210> 161
<211> 90
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 161

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

65 70 75 80
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
85 90

<210> 162
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 162
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
65 70 75 80
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
85 90 95

<210> 163
<211> 100
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 163
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Ser
100
<210> 164
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 164
Gly Gly Gly Ser Glu
1 5
<210> 165
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 165
Gly Ser Glu Ser Gly
1 5
<210> 166
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 166
Gly Ser Glu Gly Ser
1 5
<210> 167
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 167
Gly Glu Gly Gly Ser Gly Glu Gly Ser Ser Gly Glu Gly Ser Ser Ser

1 5 10 15
Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu
20 25 30
Gly Gly Ser
35
<210> 168
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 168
Cys Pro Pro Cys
1
<210> 169
<211> 508
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列
<400> 169
Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15
Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
20 25 30
Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
35 40 45
Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
50 55 60
Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80
Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
85 90 95
Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
100 105 110
Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
115 120 125
Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
130 135 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
145 150 155 160
Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
165 170 175
Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
180 185 190
Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
195 200 205
Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Ser Gly Gly Ser
210 215 220
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
225 230 235 240
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
260 265 270
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
275 280 285
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
290 295 300
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
305 310 315 320
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
325 330 335
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
340 345 350
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
355 360 365
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Gln Val
370 375 380
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
385 390 395 400
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg
405 410 415
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly
420 425 430
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
435 440 445
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

450 455 460

Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
465 470 475 480

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
485 490 495

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505

<210> 170

<211> 733

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 170

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
20 25 30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
50 55 60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
115 120 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
130 135 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
145 150 155 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
165 170 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
180 185 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile

195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Ser Gly Gly Ser

210 215 220

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

225 230 235 240

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly

245 250 255

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

260 265 270

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

275 280 285

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

290 295 300

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

305 310 315 320

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe

325 330 335

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

340 345 350

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

355 360 365

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Gln Val

370 375 380

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

385 390 395 400

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg

405 410 415

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly

420 425 430

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

435 440 445

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

450 455 460

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

465 470 475 480

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

485 490 495

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly

500 505 510

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
515 520 525
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
530 535 540
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
545 550 555 560
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser
565 570 575
Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile
580 585 590
Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln
595 600 605
Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu
610 615 620
His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser
625 630 635 640
Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu
645 650 655
Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly
660 665 670
Val Glu Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg
675 680 685
Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser
690 695 700
Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Ala Ser Phe Ser
705 710 715 720
Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
725 730

<210> 171
<211> 376
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成聚合物.
<400> 171
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr Ile Phe
35 40 45
Ser Ile Asn Arg Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg
50 55 60
Glu Leu Val Ala Leu Ile Thr Ser Gly Gly Thr Pro Ala Tyr Ala Asp
65 70 75 80
Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
85 90 95
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys His Val Ser Ser Gly Val Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
130 135 140
Gly Ser Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
145 150 155 160
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
165 170 175
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
180 185 190
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
195 200 205
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
210 215 220
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
225 230 235 240
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Gln Val Ser Asn Lys Ala
245 250 255
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
260 265 270
Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
275 280 285
Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
290 295 300
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
305 310 315 320
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
325 330 335
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

340 345 350

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

355 360 365

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

370 375

<210> 172

<211> 375

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成聚合物.

<400> 172

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe

35 40 45

Ser Gly Asn His Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg

50 55 60

Glu Leu Val Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp

65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

85 90 95

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr

100 105 110

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

115 120 125

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

145 150 155 160

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

165 170 175

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

180 185 190

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

195 200 205

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

210 215 220
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
225 230 235 240
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Gln Val Ser Asn Lys Ala Leu
245 250 255
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
260 265 270
Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
275 280 285
Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
290 295 300
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
305 310 315 320
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
325 330 335
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
340 345 350
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
355 360 365
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 173
<211> 551
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成聚合物.
<400> 173
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr Ile Phe
35 40 45
Ser Ile Asn Arg Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg
50 55 60
Glu Leu Val Ala Leu Ile Thr Ser Gly Gly Thr Pro Ala Tyr Ala Asp
65 70 75 80
Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

85 90 95

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys His Val Ser Ser Gly Val Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
165 170 175

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
180 185 190

Gly Ser Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
195 200 205

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr Ile Phe Ser
210 215 220

Ile Asn Arg Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu
225 230 235 240

Leu Val Ala Leu Ile Thr Ser Gly Gly Thr Pro Ala Tyr Ala Asp Ser
245 250 255

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
260 265 270

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
275 280 285

Cys His Val Ser Ser Gly Val Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
290 295 300

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
305 310 315 320

Ser Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
325 330 335

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
340 345 350

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
355 360 365

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
370 375 380

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
385 390 395 400

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
405 410 415
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Gln Val Ser Asn Lys Ala Leu
420 425 430
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
435 440 445
Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
450 455 460
Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
465 470 475 480
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
485 490 495
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
500 505 510
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
515 520 525
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
530 535 540
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
545 550

<210> 174
<211> 549
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成聚合物.
<400> 174

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Asn Val Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu
115 120 125
Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
145 150 155 160
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
165 170 175
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
180 185 190
Ser Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
195 200 205
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Ile Phe Ser Gly
210 215 220
Asn His Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu
225 230 235 240
Val Gly Ile Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
245 250 255
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
260 265 270
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
275 280 285
Asn Val Arg Asp Arg Thr Ile Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
290 295 300
Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
305 310 315 320
Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
325 330 335
Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
340 345 350
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
355 360 365
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
370 375 380
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
385 390 395 400
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

405 410 415
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Gln Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
420 425 430
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
435 440 445
Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
450 455 460
Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
465 470 475 480
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
485 490 495
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu
500 505 510
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
515 520 525
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
530 535 540
Leu Ser Pro Gly Lys
545

<210> 175
<211> 246
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成聚合物.
<400> 175
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15
Ser Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25 30
Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
35 40 45
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
50 55 60
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
65 70 75 80
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
85 90 95
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

100 105 110
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Gln Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
115 120 125
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
130 135 140
Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
145 150 155 160
Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
165 170 175
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
180 185 190
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys
195 200 205
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
210 215 220
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
225 230 235 240
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 176
<211> 442
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成聚合物.
<400> 176
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15
Ser Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25 30
Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
35 40 45
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
50 55 60
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
65 70 75 80
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
85 90 95
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

100 105 110
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Gln Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
115 120 125
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
130 135 140
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
145 150 155 160
Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
165 170 175
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
180 185 190
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
195 200 205
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
210 215 220
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
225 230 235 240
Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
245 250 255
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
260 265 270
Ser Gly Gly Ser Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser
275 280 285
Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe
290 295 300
Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe
305 310 315 320
Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met
325 330 335
Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala
340 345 350
Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln
355 360 365
Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu
370 375 380
Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe
385 390 395 400
Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala
405 410 415

Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Ala Ser Phe Ser Leu Ser Thr
420 425 430
Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
435 440

<210> 177
<211> 442
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成聚合物.
<400> 177

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

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
225 230 235 240
Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
245 250 255
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
260 265 270
Ser Gly Gly Ser Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser
275 280 285
Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe
290 295 300
Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe
305 310 315 320
Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met
325 330 335
Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala
340 345 350
Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln
355 360 365
Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu
370 375 380
Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe
385 390 395 400
Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala
405 410 415
Trp Glu Val Val Arg Gly Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr
420 425 430
Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
435 440

<210> 178
<211> 442
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成聚合物.
<400> 178

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

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
35 40 45
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
50 55 60
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
65 70 75 80
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
85 90 95
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
100 105 110
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Gln Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
115 120 125
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
130 135 140
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
145 150 155 160
Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
165 170 175
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
180 185 190
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
195 200 205
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
210 215 220
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
225 230 235 240
Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
245 250 255
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
260 265 270
Ser Gly Gly Ser Cys Asp Leu Pro Glu Thr His Ser Leu Asp Asn Arg
275 280 285
Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Ser Arg Ile Ser Pro Ser Ser
290 295 300
Cys Leu Met Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp
305 310 315 320
Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Pro Ala Ile Ser Val Leu His Glu Leu
325 330 335
Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Thr Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala

340 345 350

Trp Asp Glu Asp Leu Leu Asp Lys Phe Ser Thr Glu Leu Tyr Gln Gln

355 360 365

Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Glu Arg Val Gly Glu

370 375 380

Thr Pro Leu Met Asn Ala Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe

385 390 395 400

Arg Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala

405 410 415

Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Leu Ser Thr

420 425 430

Asn Leu Gln Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu

435 440

2LIG99 VHH 野生型序列(根据 **KABAT** 注释的CDR)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTAS**GTIFS**INRMDWFRQAPGKQRELVALITSDGTPA**YADSAKG**RFTISR
DNTKKTVSLQMNSLKPEDTAVYYCHVSSGVYNYWGQGTQVTVSS

图1

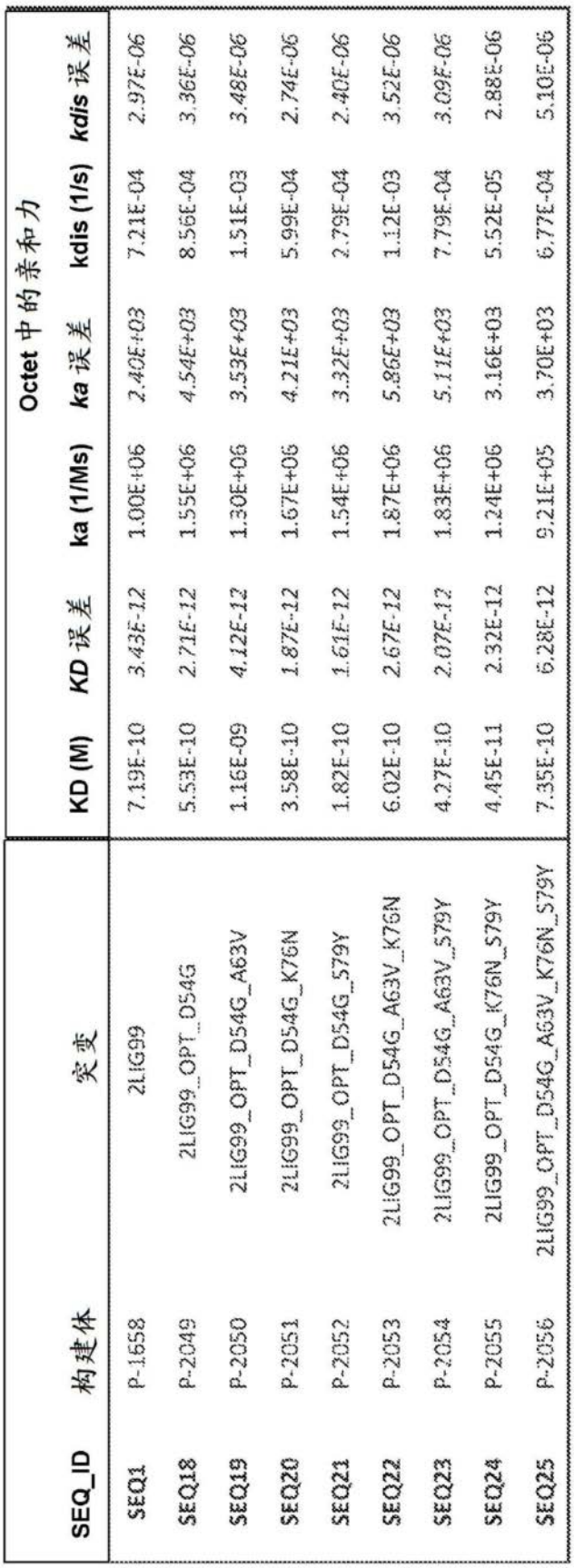
2LIG189 序列(根据 **KABAT** 注释的CDR)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GKIFS**GNDMGWYRQAPGKQRELVGIITSGGITD**YADAVKG**RFTIS
RDNAKNMMYLQMNSLKPEDTAVYYCNMRDRTIWWGQGTQVTVSS

图2

	Octet 中的亲和力					
	SEQ ID	构建体	突变	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	KD 比率
2LIG99 人源化	SEQ ID 1	P-1658	2LIG99	2,82E-10	1,58E+06	4,47E-04	1,00
	SEQ ID 8	P-1659	2LIG99_OPT1	7,94E-10	8,86E+05	7,04E-04	0,35
	SEQ ID 9	P-1660	2LIG99_OPT2	1,48E-09	4,45E+05	6,58E-04	0,19
	SEQ ID 10	P-1661	2LIG99_OPT3	ND	ND	ND	ND
	SEQ ID 11	P-1662	2LIG99_OPT4	4,52E-10	6,71E+05	3,04E-04	0,62
	SEQ ID 12	P-1663	2LIG99_OPT5	1,24E-10	6,07E+05	7,55E-05	2,27
	SEQ ID 13	P-1664	2LIG99_OPT6	1,03E-08	1,21E+05	1,24E-03	0,03
2LIG99 异构化	SEQ ID 14	P-1665	2LIG99_D55G	ND	1,28E+06	ND	ND
	SEQ ID 15	P-1666	2LIG99_D55K	4,59E-10	1,53E+06	7,00E-04	0,61
	SEQ ID 16	P-1667	2LIG99_D55T	1,48E-09	2,95E+05	4,36E-04	0,19
	SEQ ID 17	P-1668	2LIG99_G56R	1,01E-09	7,53E+05	7,61E-04	0,28

图3



SEQ_ID	构建体	突变	Octet 中的亲和力					
			KD (M)	*KD* 误差	ka (1/Ms)	*ka* 误差	kdis (1/s)	*kdis* 误差
SEQ1	P-1658	2LIG99	7.19E-10	*3.43E-12*	1.00E+06	*2.40E+03*	7.21E-04	*2.97E-06*
SEQ18	P-2049	2LIG99_OPT_D54G	5.53E-10	*2.71E-12*	1.55E+06	*4.54E+03*	8.56E-04	*3.36E-06*
SEQ19	P-2050	2LIG99_OPT_D54G_A63V	1.16E-09	*4.12E-12*	1.30E+06	*3.53E+03*	1.51E-03	*3.48E-06*
SEQ20	P-2051	2LIG99_OPT_D54G_K76N	3.58E-10	*1.87E-12*	1.67E+06	*4.21E+03*	5.99E-04	*2.74E-06*
SEQ21	P-2052	2LIG99_OPT_D54G_S79Y	1.82E-10	*1.61E-12*	1.54E+06	*3.32E+03*	2.79E-04	*2.40E-06*
SEQ22	P-2053	2LIG99_OPT_D54G_A63V_K76N	6.02E-10	*2.67E-12*	1.87E+06	*5.86E+03*	1.12E-03	*3.52E-06*
SEQ23	P-2054	2LIG99_OPT_D54G_A63V_S79Y	4.27E-10	*2.07E-12*	1.83E+06	*5.11E+03*	7.79E-04	*3.09E-06*
SEQ24	P-2055	2LIG99_OPT_D54G_K76N_S79Y	4.45E-11	*2.32E-12*	1.24E+06	*3.16E+03*	5.52E-05	*2.88E-06*
SEQ25	P-2056	2LIG99_OPT_D54G_A63V_K76N_S79Y	7.35E-10	*6.28E-12*	9.21E+05	*3.70E+03*	6.77E-04	*5.10E-06*

图4

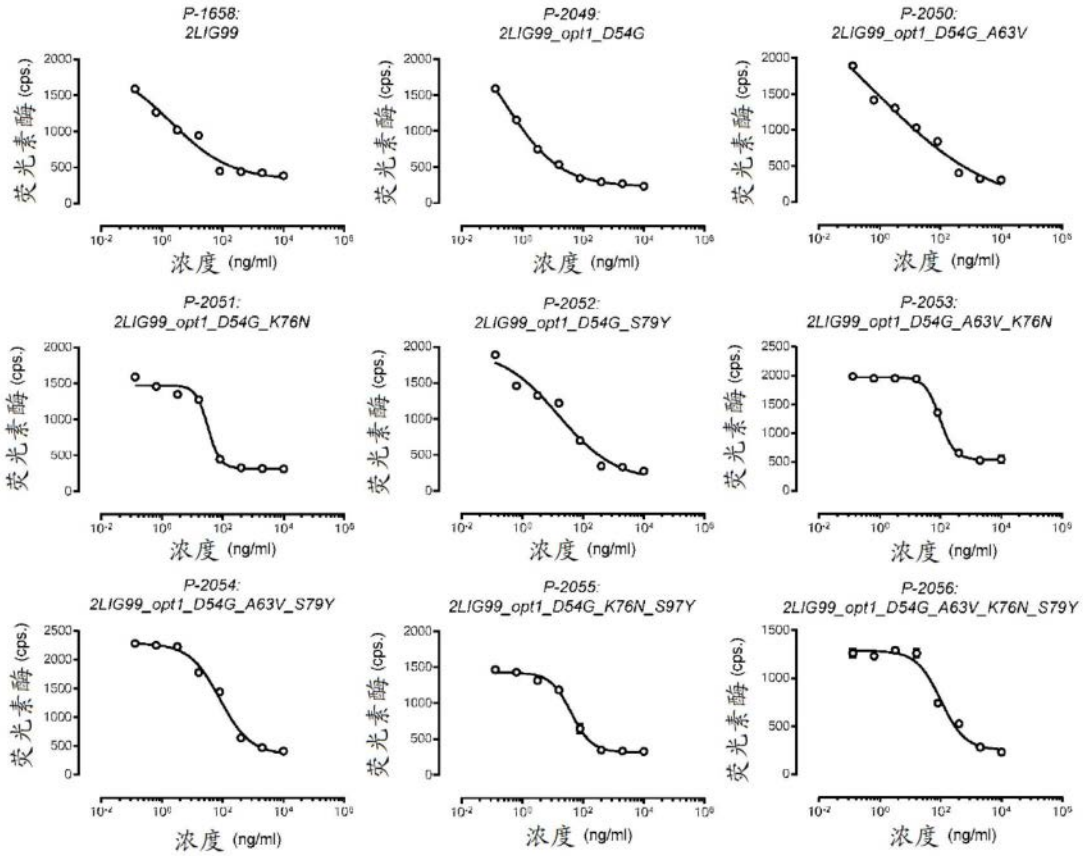

P-1658:
2LIG99
P-2049:
2LIG99_opt1_D54G
P-2050:
2LIG99_opt1_D54G_A63V
P-2051:
2LIG99_opt1_D54G_K76N
P-2052:
2LIG99_opt1_D54G_S79Y
P-2053:
2LIG99_opt1_D54G_A63V_K76N
P-2054:
2LIG99_opt1_D54G_A63V_S79Y
P-2055:
2LIG99_opt1_D54G_K76N_S97Y
P-2056:
2LIG99_opt1_D54G_A63V_K76N_S79Y
荧光素酶 (cps.)
浓度 (ng/ml)

图5

				Octet 中的亲和力			
	SEQ ID	构建体	突变	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	KD 比率
2UG189 人源化	SEQ ID 26	P-1669	2UG189	7,91E-10	1,87E+05	1,48E-04	1,00
	SEQ ID 33	P-1670	2UG189_OPT1	6,92E-09	7,18E+04	4,97E-04	8,75
	SEQ ID 34	P-1671	2UG189_OPT2	1,28E-09	2,34E+05	2,99E-04	1,62
	SEQ ID 35	P-1672	2UG189_OPT3	4,89E-09	1,93E+05	9,42E-04	6,18
	SEQ ID 36	P-1673	2UG189_OPT4	1,74E-09	1,74E+05	3,01E-04	2,19
2UG189 脱酰胺化	SEQ ID 37	P-1674	2UG189_N32A	2,70E-09	2,72E+05	7,33E-04	3,41
	SEQ ID 38	P-1675	2UG189_N32E	5,42E-10	1,82E+05	9,85E-05	0,68
	SEQ ID 39	P-1676	2UG189_N32F	5,50E-10	3,20E+05	1,76E-04	0,70
	SEQ ID 40	P-1677	2UG189_N32G	1,90E-08	1,20E+05	2,28E-03	23,98
	SEQ ID 41	P-1678	2UG189_N32H	1,81E-09	2,47E+05	4,46E-04	2,28
	SEQ ID 42	P-1679	2UG189_N32I	6,51E-09	1,34E+05	8,72E-04	8,23
	SEQ ID 43	P-1680	2UG189_N32L	1,62E-09	1,21E+05	1,95E-04	2,04
	SEQ ID 44	P-1681	2UG189_N32Q	1,25E-10	7,05E+04	8,84E-06	0,16
	SEQ ID 45	P-1682	2UG189_N32R	<1,0E-12	3,51E+05	<1,0E-07	0
	SEQ ID 46	P-1683	2UG189_N32S	1,80E-09	1,63E+05	2,92E-04	2,27
	SEQ ID 47	P-1684	2UG189_N32T	6,31E-09	1,64E+05	1,04E-03	7,97
	SEQ ID 48	P-1685	2UG189_N32V	3,02E-09	2,98E+05	9,00E-04	3,82
	SEQ ID 49	P-1686	2UG189_N32Y	2,04E-09	3,08E+05	6,29E-04	2,58
	SEQ ID 50	P-1687	2UG189_D33E	4,12E-08	2,14E+05	8,83E-03	52,09
	SEQ ID 51	P-1688	2UG189_D33F	9,78E-09	1,09E+06	1,07E-02	12,37
	SEQ ID 52	P-1689	2UG189_D33H	3,72E-10	4,21E+05	1,57E-04	0,47
	SEQ ID 53	P-1690	2UG189_D33I	无结合			
	SEQ ID 54	P-1691	2UG189_D33L	1,64E-08	2,08E+06	3,42E-02	20,72
	SEQ ID 55	P-1692	2UG189_D33Q	2,50E-08	4,74E+05	1,18E-02	31,57
	SEQ ID 56	P-1693	2UG189_D33R	无结合			
	SEQ ID 57	P-1694	2UG189_D33V	无结合			
	SEQ ID 58	P-1695	2UG189_D33Y	2,23E-09	3,75E+06	8,35E-03	2,82
2UG189 氧化	SEQ ID 59	P-1696	2UG189_M97E	无结合			
	SEQ ID 60	P-1697	2UG189_M97F	1,51E-09	1,38E+05	2,08E-04	1,90
	SEQ ID 61	P-1698	2UG189_M97H	无结合			
	SEQ ID 62	P-1699	2UG189_M97I	7,41E-12	4,65E+04	3,45E-07	0,01
	SEQ ID 63	P-1700	2UG189_M97L	1,15E-11	4,25E+04	4,88E-07	0,01
	SEQ ID 64	P-1701	2UG189_M97Q	无结合			
	SEQ ID 65	P-1702	2UG189_M97R	无结合			
	SEQ ID 66	P-1703	2UG189_M97V	5,99E-12	6,37E+04	3,81E-07	0,01
	SEQ ID 67	P-1704	2UG189_M97Y	4,82E-09	3,03E+05	1,46E-03	6,09

图6

SEQ_ID	构建体	突变	Octet 中的亲和力					
			KD (M)	KD 误差	ka (1/Ms)	ka 误差	kdis (1/s)	kdis 误差
SEQ26	P-1669	2LIG189	5,41E-09	3,02E-11	2,43E+05	9,91E+02	1,31E-03	5,00E-06
SEQ68	P-2043	2LIG189_OPT_N32R	1,94E-09	1,14E-11	3,77E+05	1,12E+03	7,31E-04	3,70E-06
SEQ69	P-2044	2LIG189_OPT_D33H	3,24E-10	8,81E-12	4,46E+05	1,44E+03	1,45E-04	3,90E-06
SEQ70	P-2045	2LIG189_OPT_N32R_M97V	3,38E-09	5,88E-11	1,66E+05	1,39E+03	5,60E-04	8,54E-06
SEQ71	P-2046	2LIG189_OPT_N32R_M97I	2,32E-09	2,05E-11	1,97E+05	6,90E+02	4,57E-04	3,71E-06
SEQ72	P-2047	2LIG189_OPT_D33H_M97V	1,44E-10	8,74E-12	5,36E+05	1,95E+03	7,71E-05	4,67E-06
SEQ73	P-2048	2LIG189_OPT_D33H_M97I	5,55E-10	5,41E-12	5,93E+05	1,47E+03	3,29E-04	3,10E-06

图7

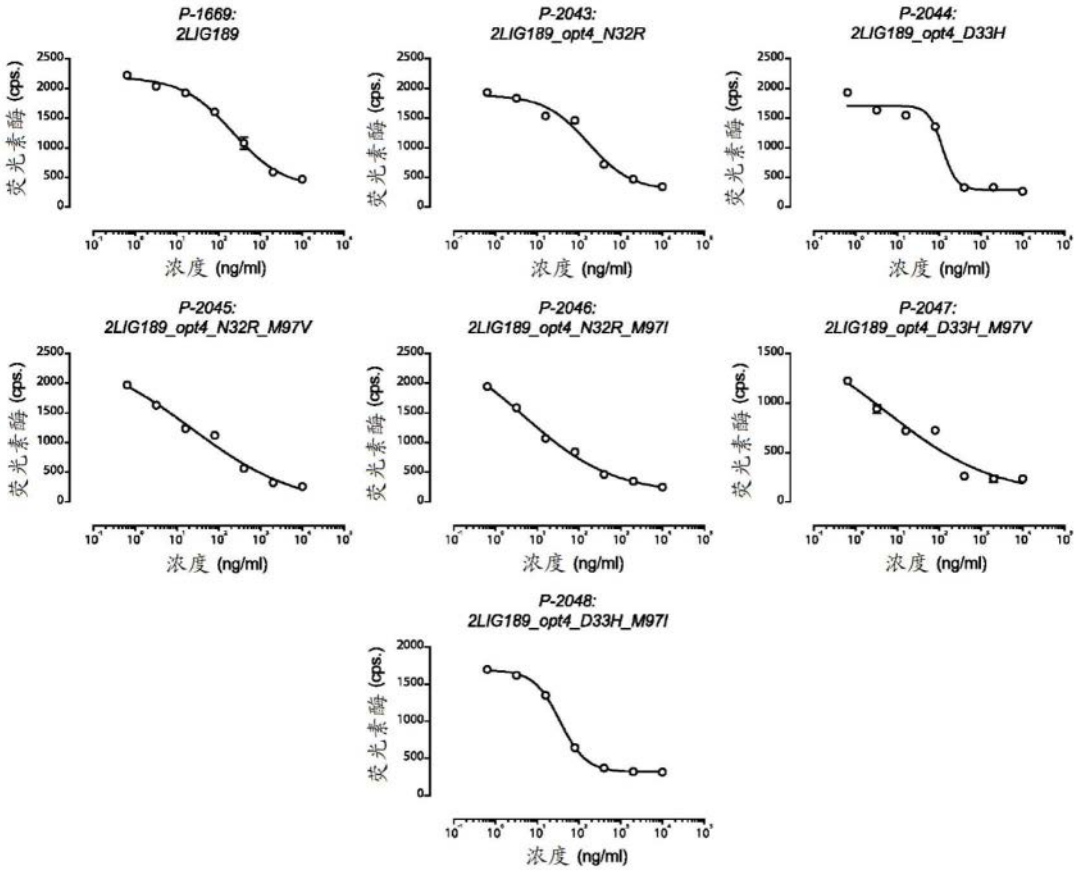

P-1669:
2LIG189
P-2043:
2LIG189_opt4_N32R
P-2044:
2LIG189_opt4_D33H
P-2045:
2LIG189_opt4_N32R_M97V
P-2046:
2LIG189_opt4_N32R_M97I
P-2047:
2LIG189_opt4_D33H_M97V
P-2048:
2LIG189_opt4_D33H_M97I
荧光素酶 (cps.)
浓度 (ng/ml)

图8

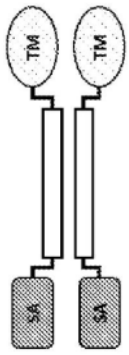

TM
TM
SA
SA

图9A

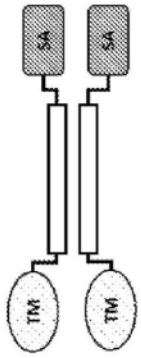


图9B

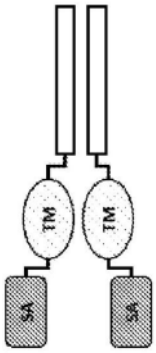


图9C

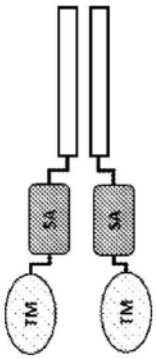


图9D

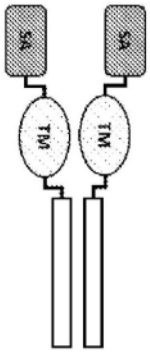


图9E

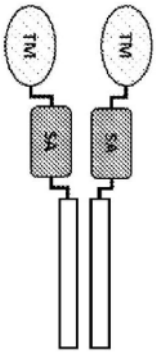


图9F

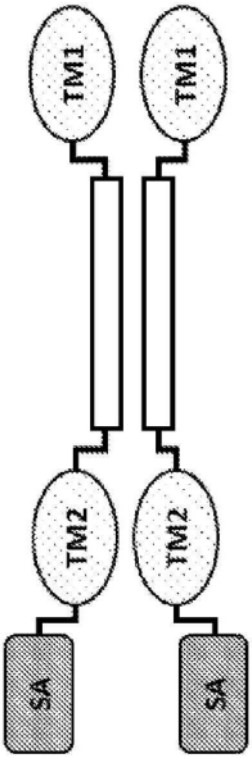


图10A

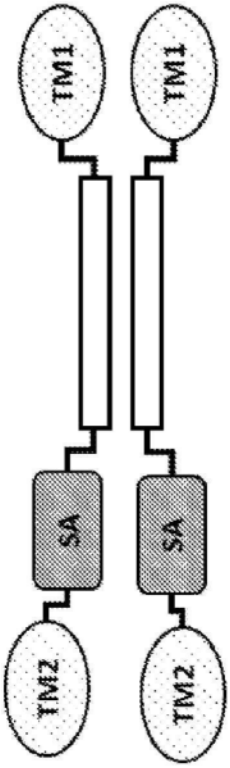


图10B

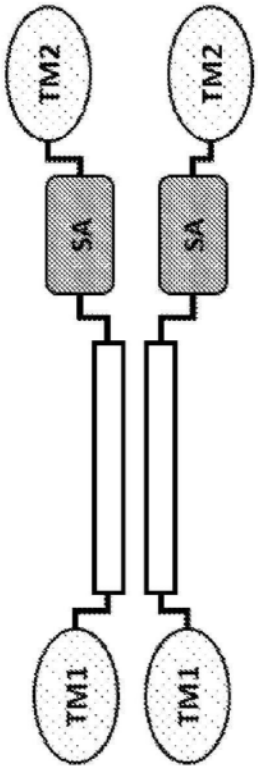


图10C

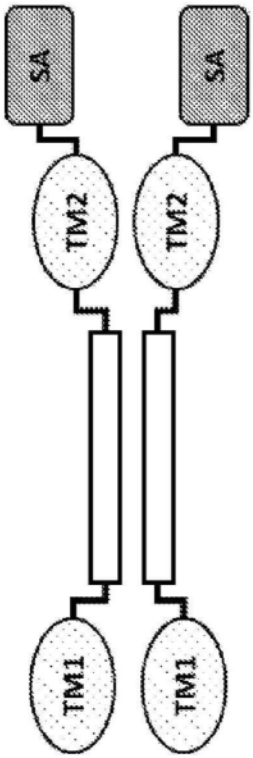


图10D

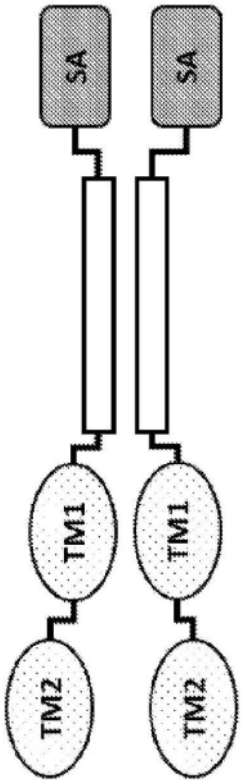


图10E

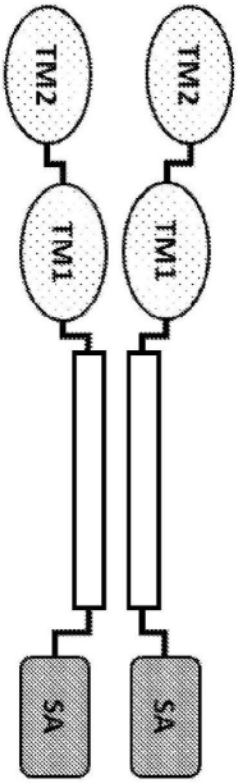


图10F

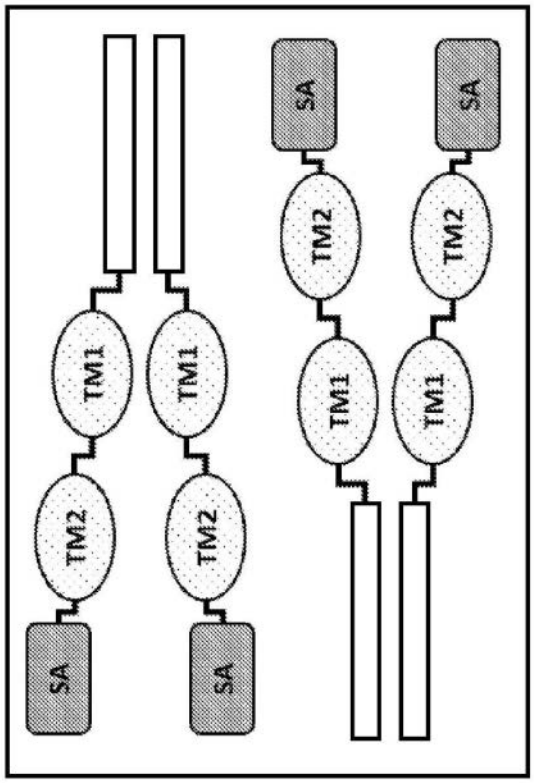


图 10G 图 10H

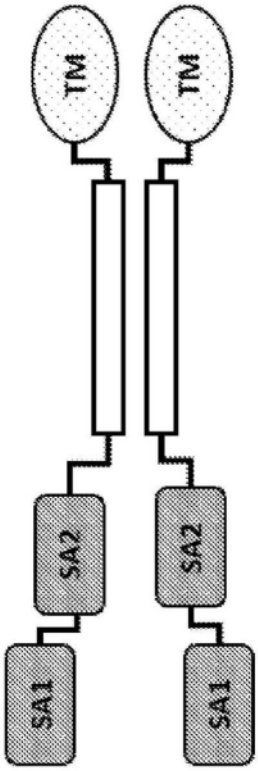


图11A

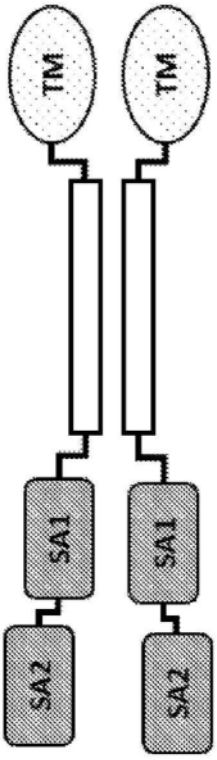


图11B

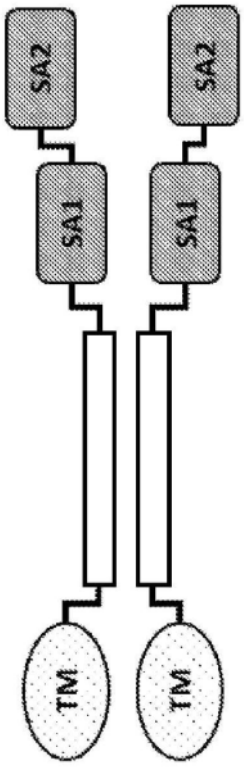


图11C

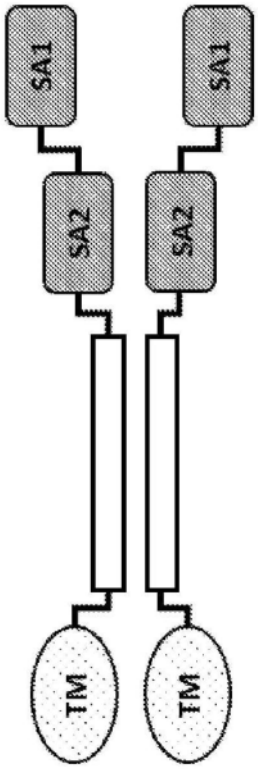


图11D

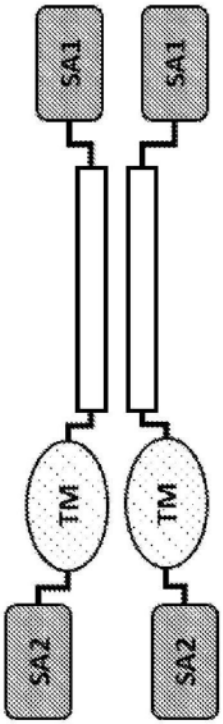


图11E

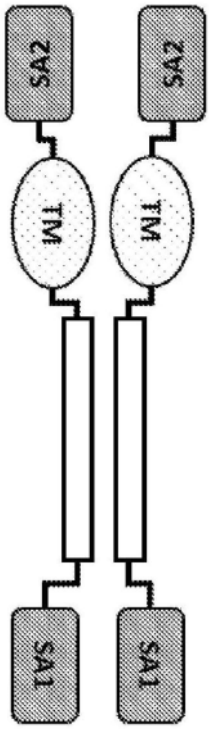


图11F

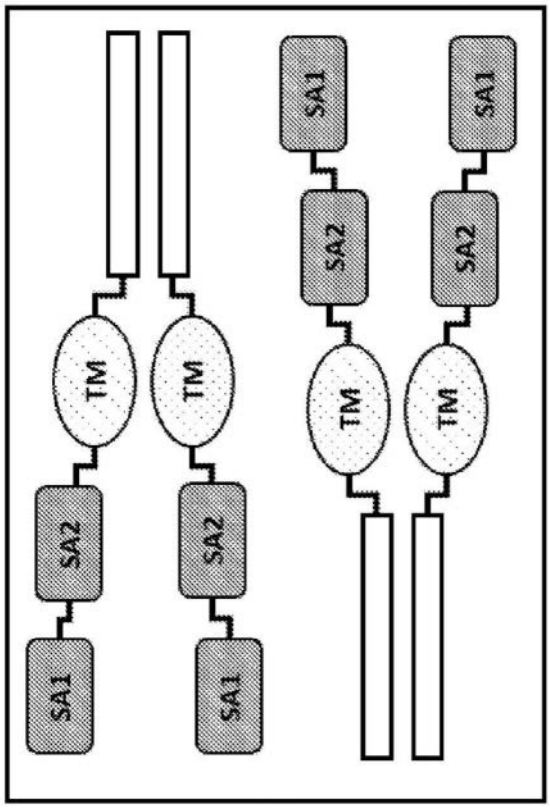


图 11G 图 11H

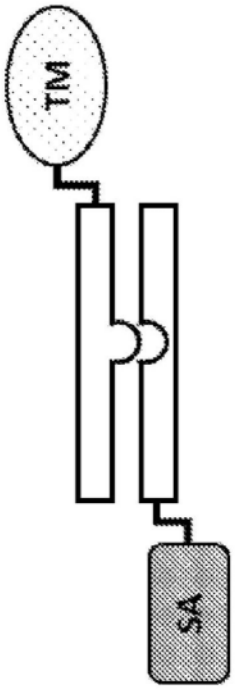


图12A

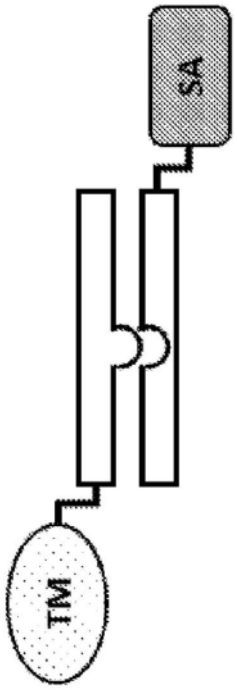


图12B

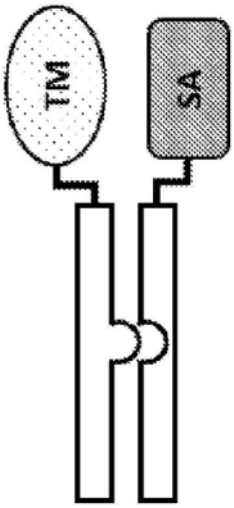


图12C

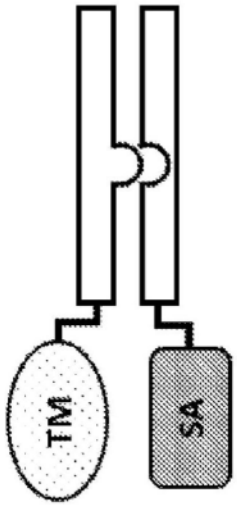


图12D

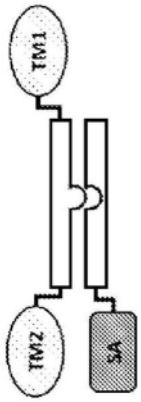


图13A

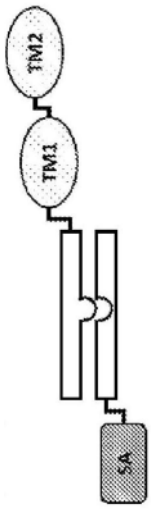


图13B

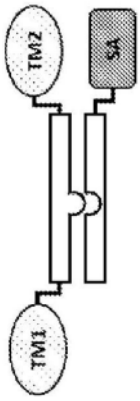


图13C

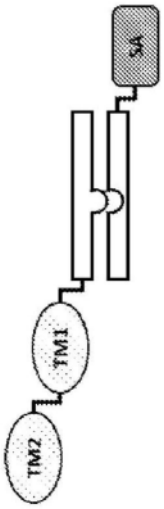


图13D

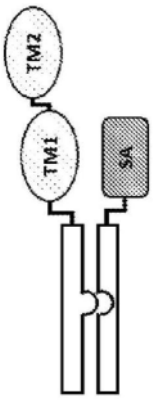


图13E

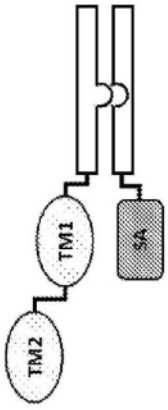


图13F

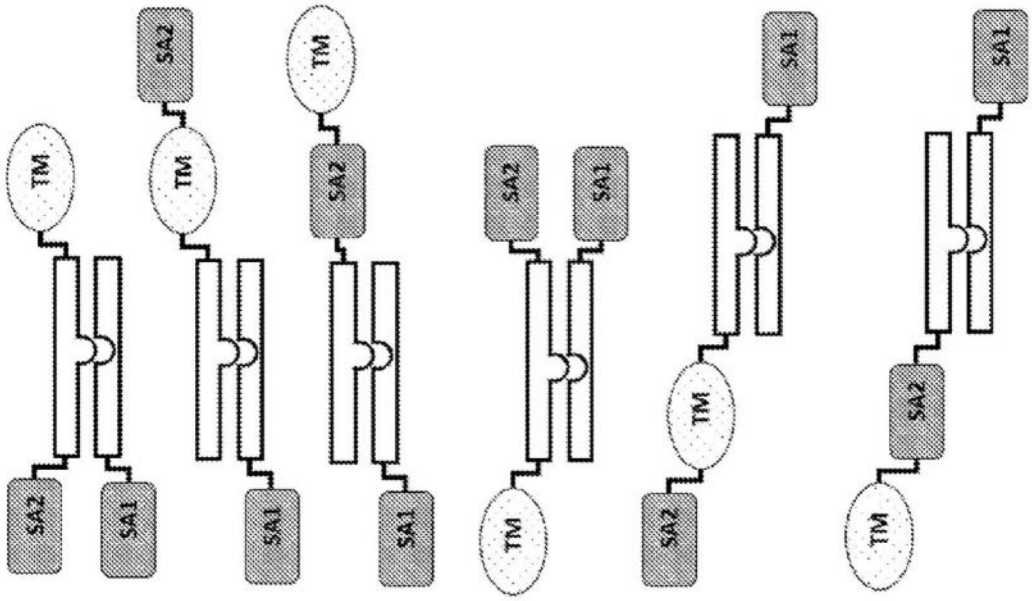


图 14A 图 14B 图 14C 图 14D 图 14E 图 14F

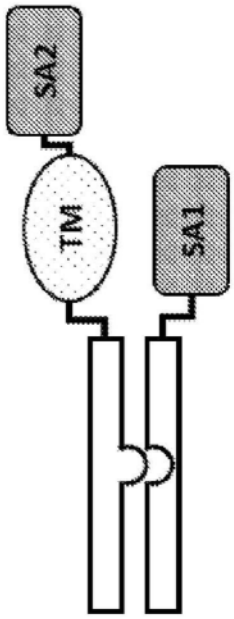


图14G

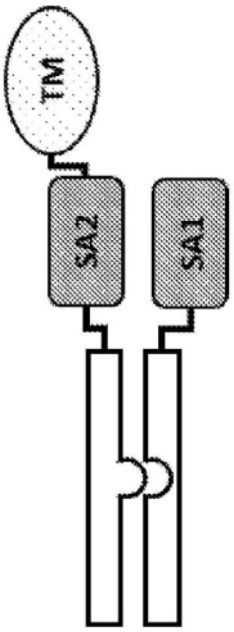


图14H

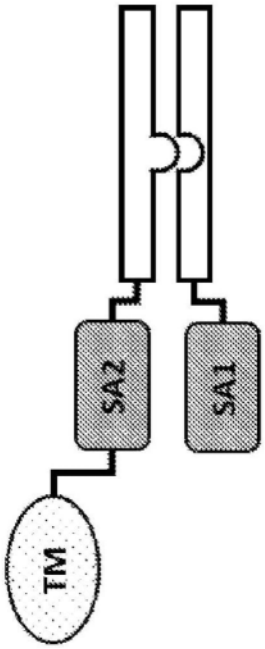


图14I

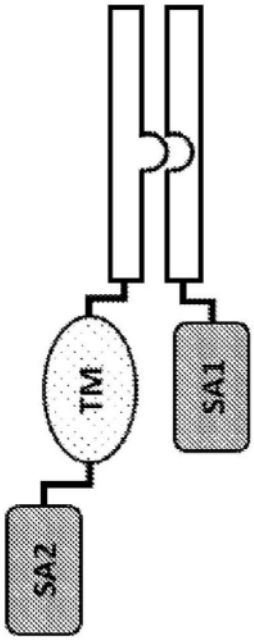


图14J

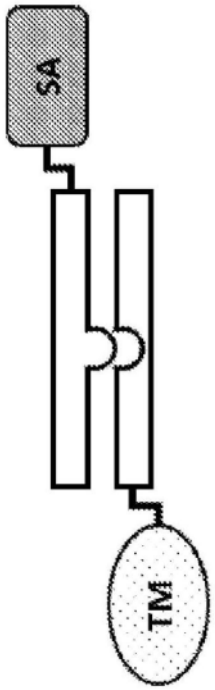


图15A

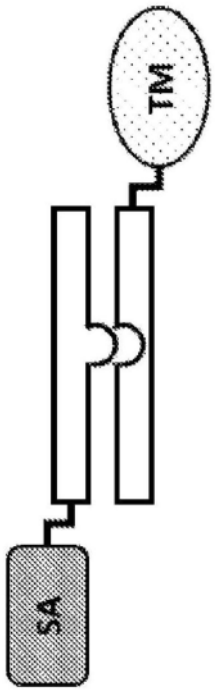


图15B

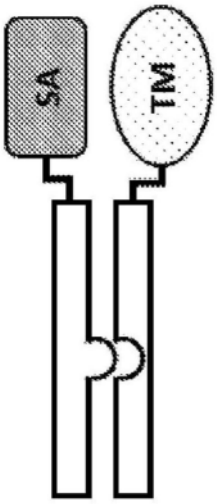


图15C

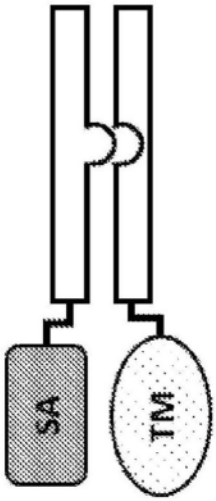


图15D

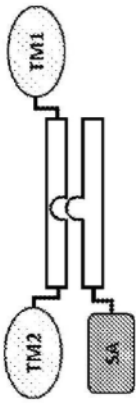


图16A

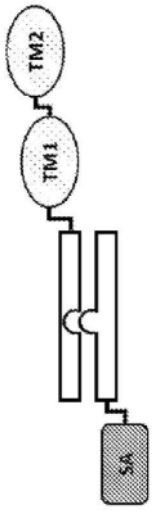


图16B

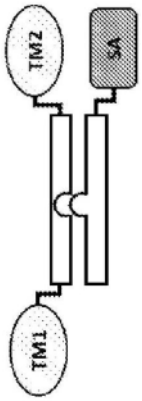


图16C

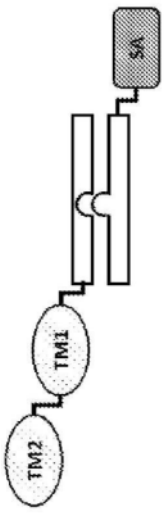


图16D

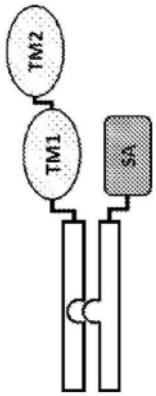


图16E

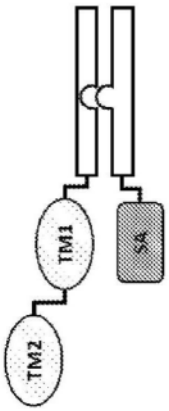


图16F

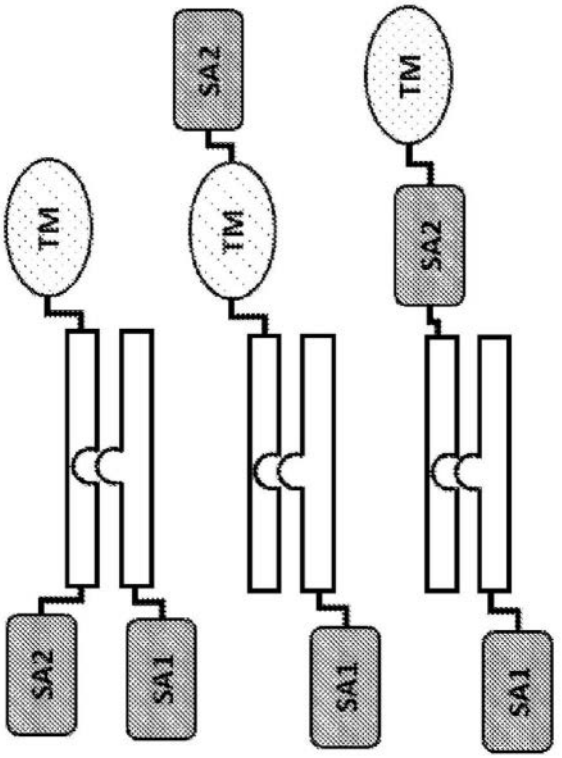


图 17A 图 17B 图 17C

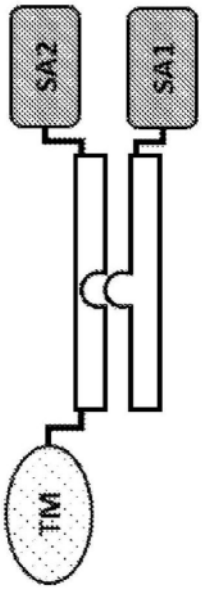


图17D

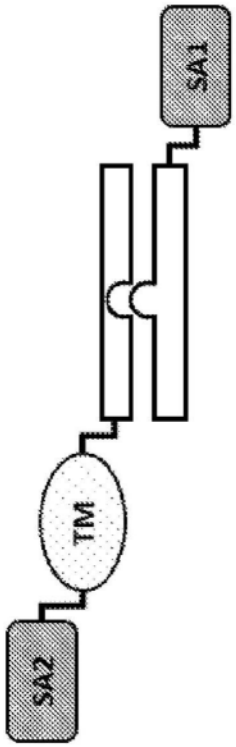


图17E

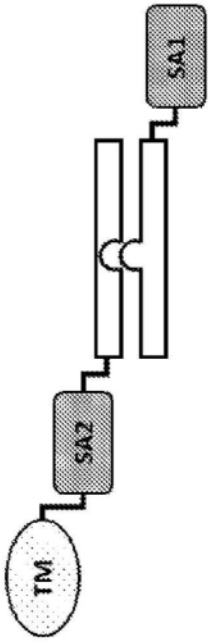


图17F

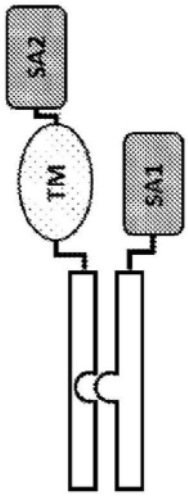


图17G

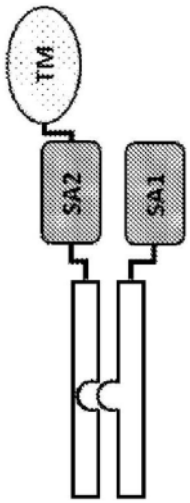


图17H

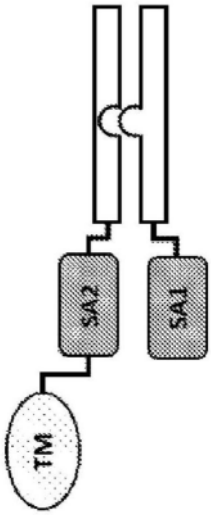


图17I

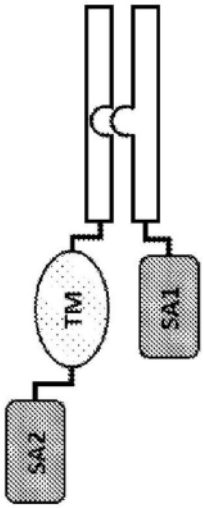


图17J

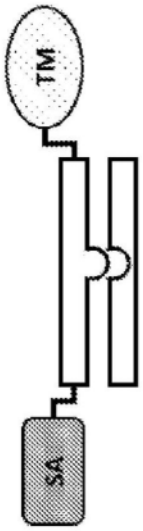


图18A

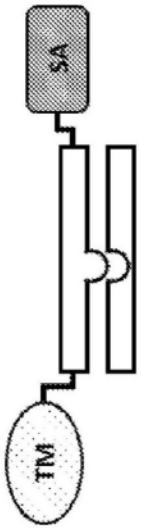


图18B

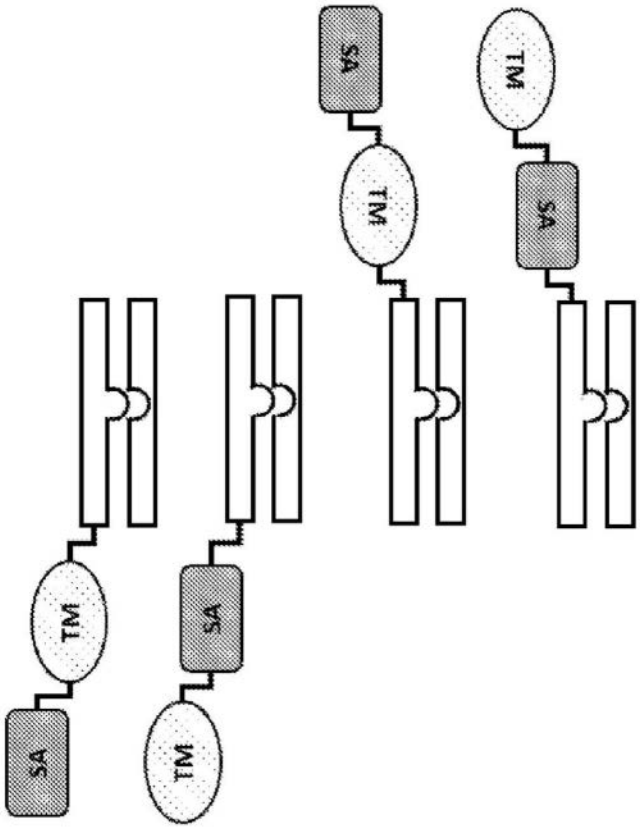


图 18C 图 18D 图 18E 图 18F

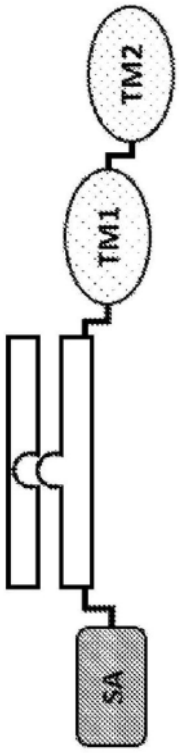


图19A

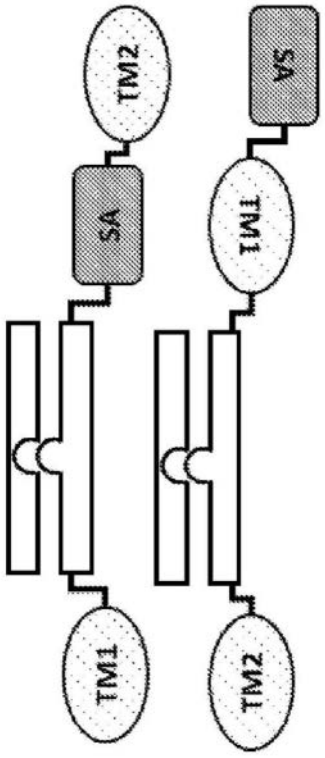


图 19B 图 19C

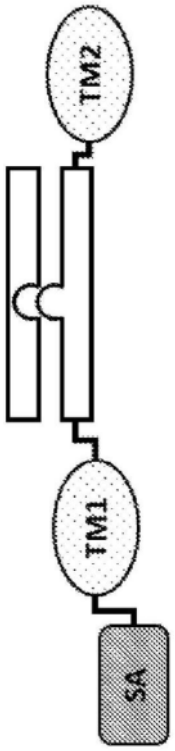


图19D

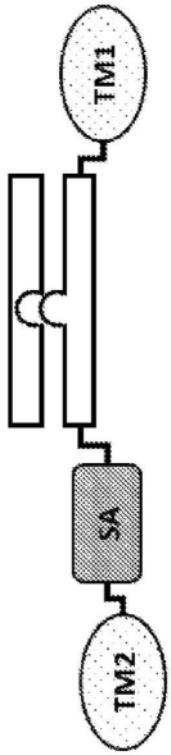


图19E

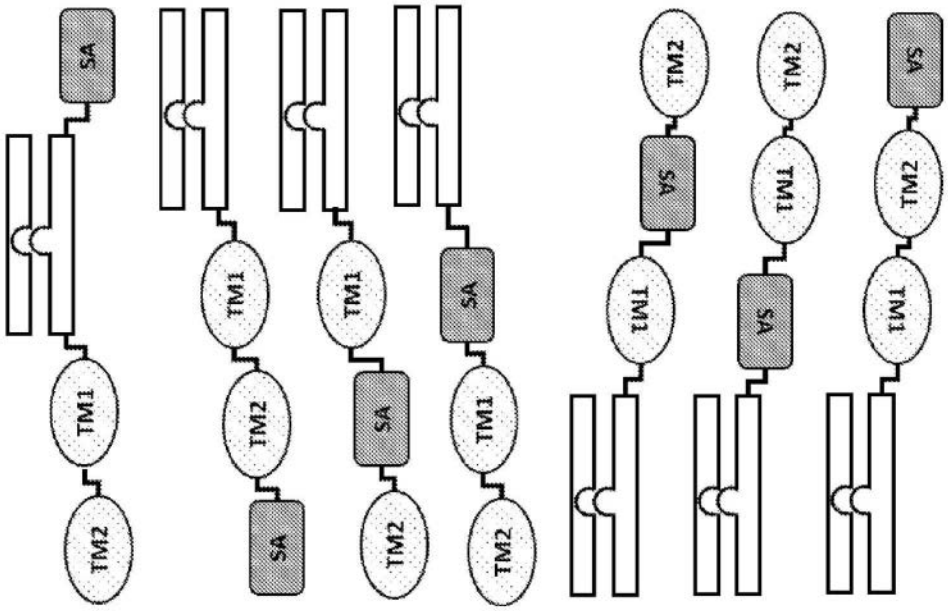


图 19F 图 19G 图 19H 图 19I 图 19J 图 19K 图 19L

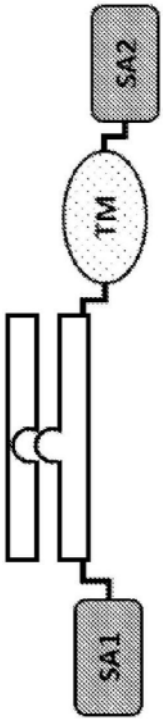


图20A

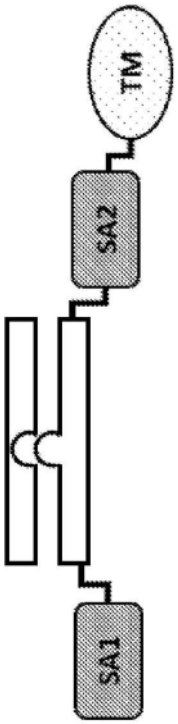


图20B

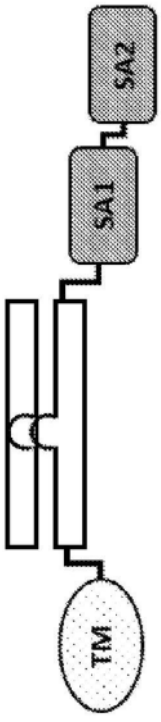


图20C



图20D

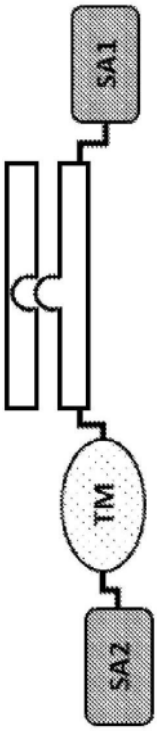


图20E

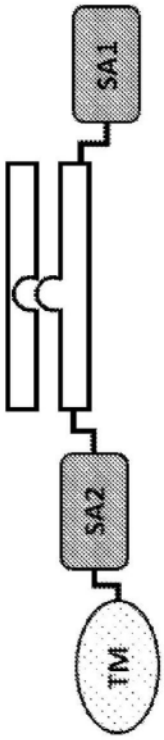


图20F

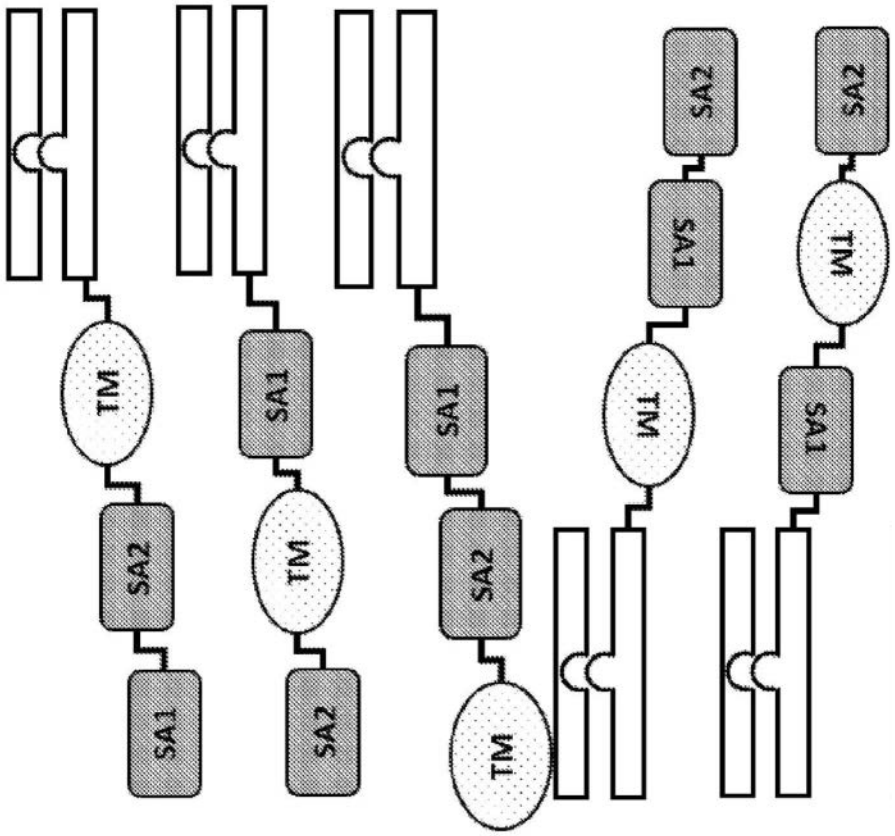


图 20G 图 20H 图 20I 图 20J 图 20K

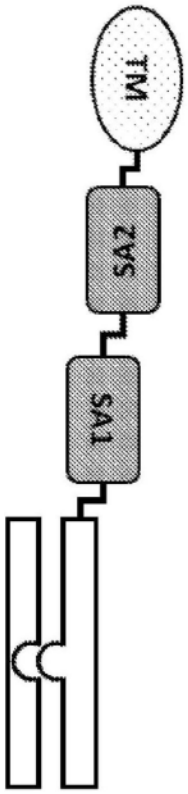


图20L

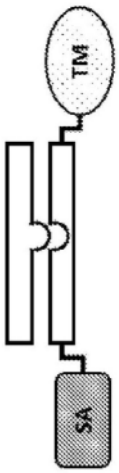


图21A

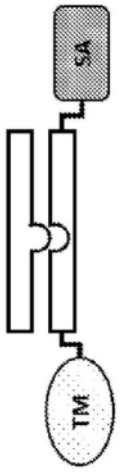


图21B

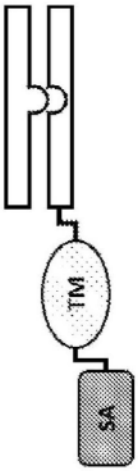


图21C

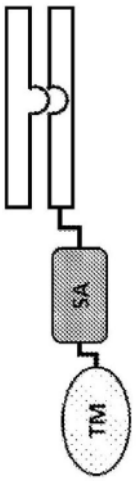


图21D

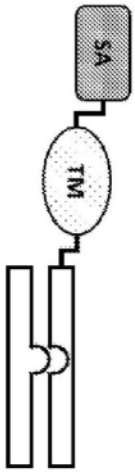


图21E

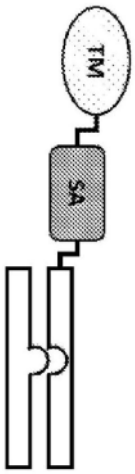


图21F

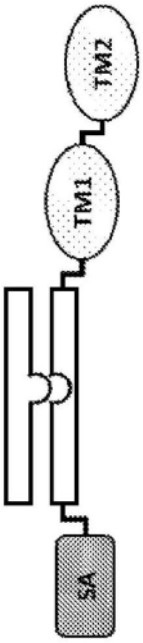


图22A

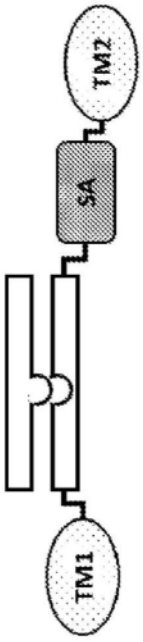


图22B

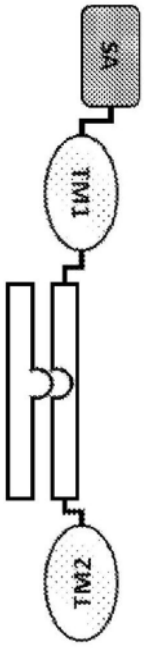


图22C

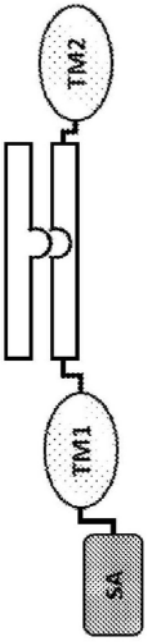


图22D

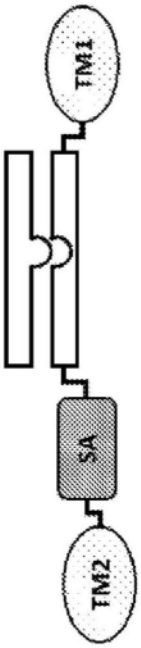


图22E

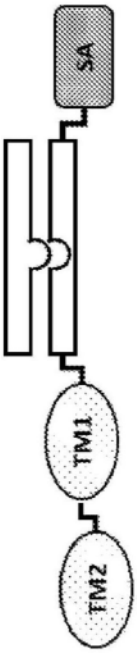


图22F

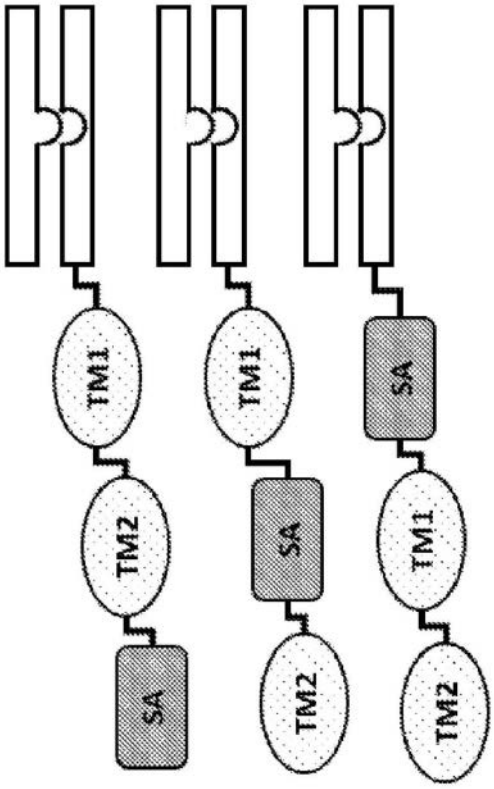


图 22G 图 22H 图 22I

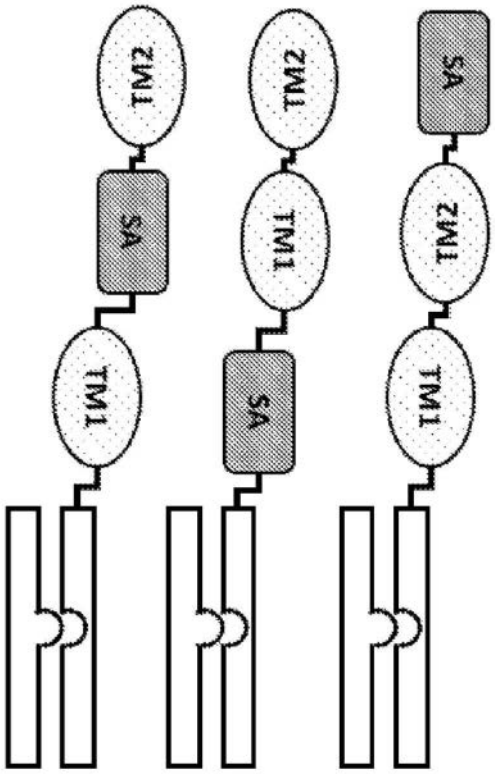


图 22J 图 22K 图 22L

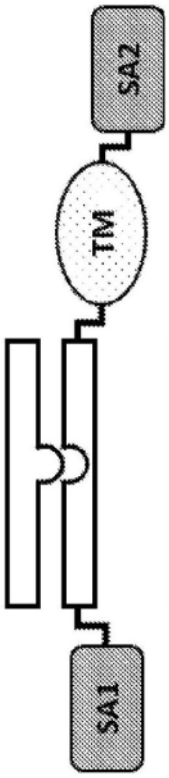


图23A

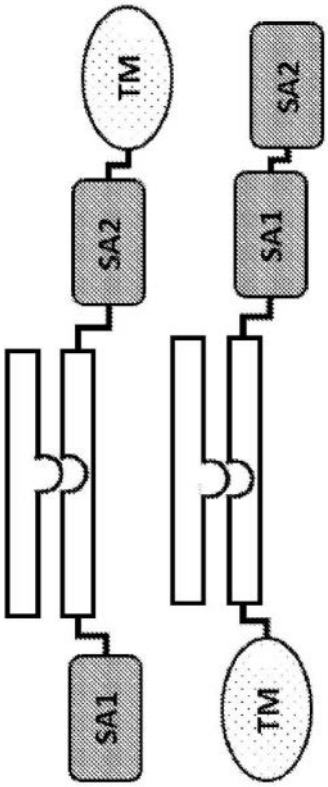


图 23B 图 23C

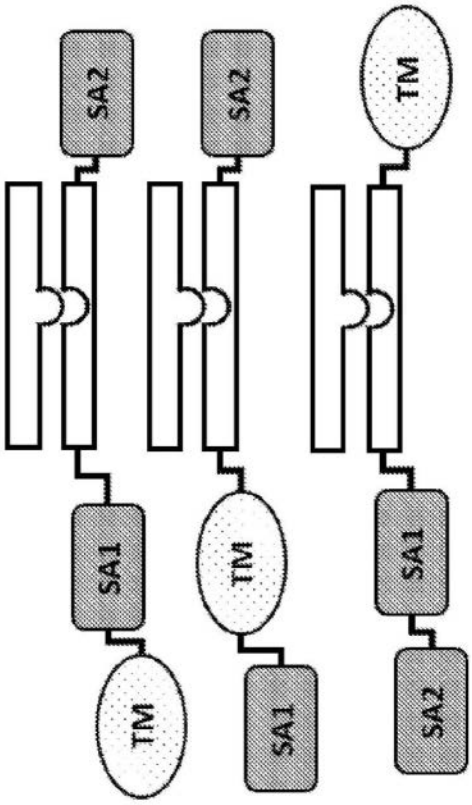


图 23D 图 23E 图 23F

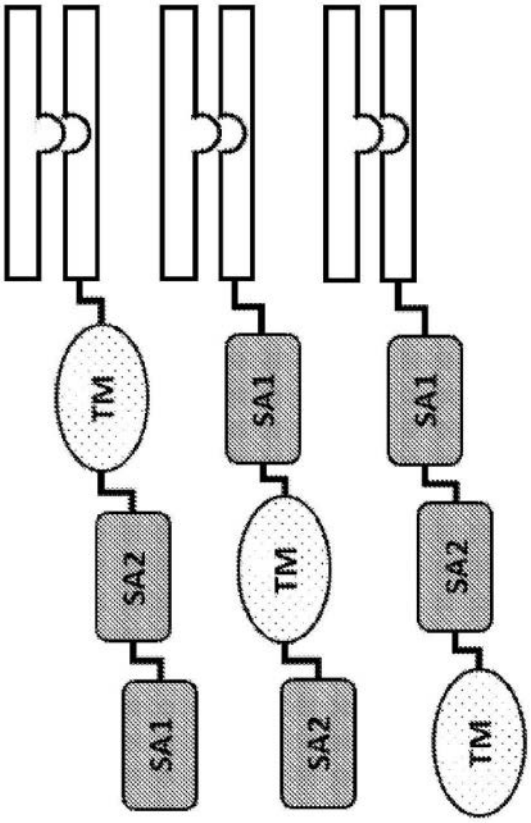


图 23G 图 23H 图 23I

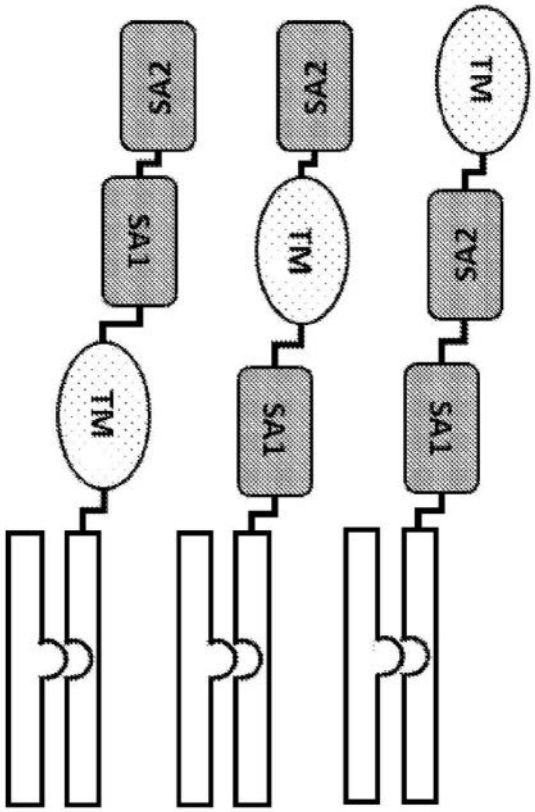


图 23J 图 23K 图 23L

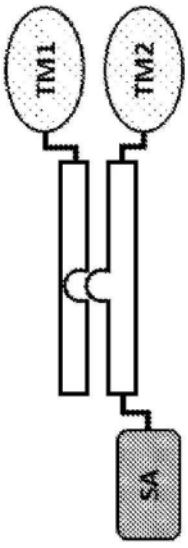


图24A

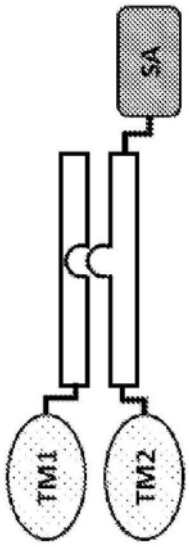


图24B

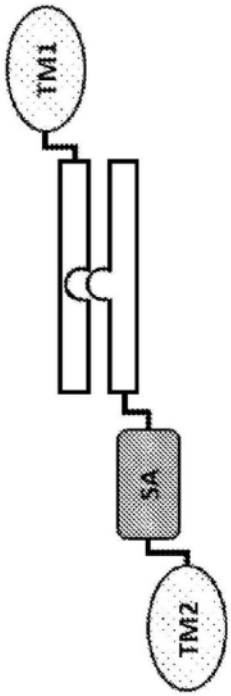


图24C

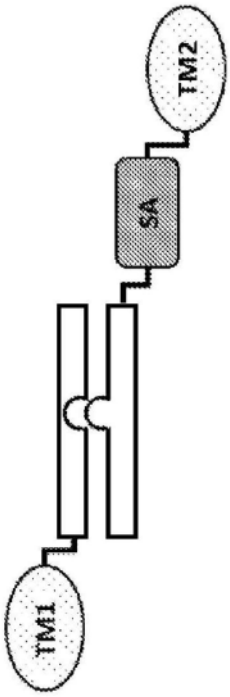


图24D

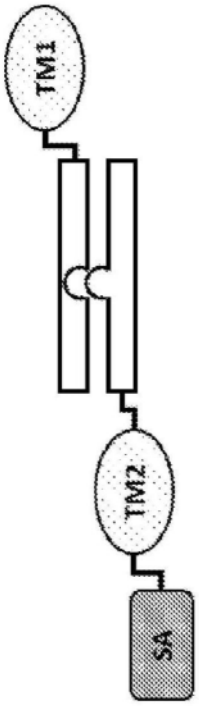


图24E

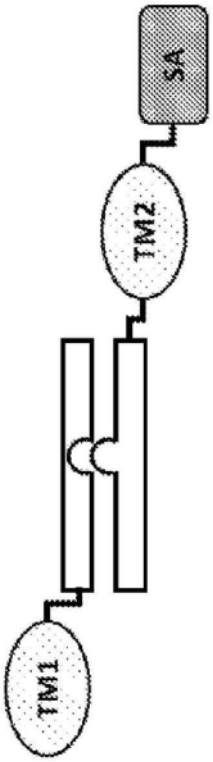


图24F

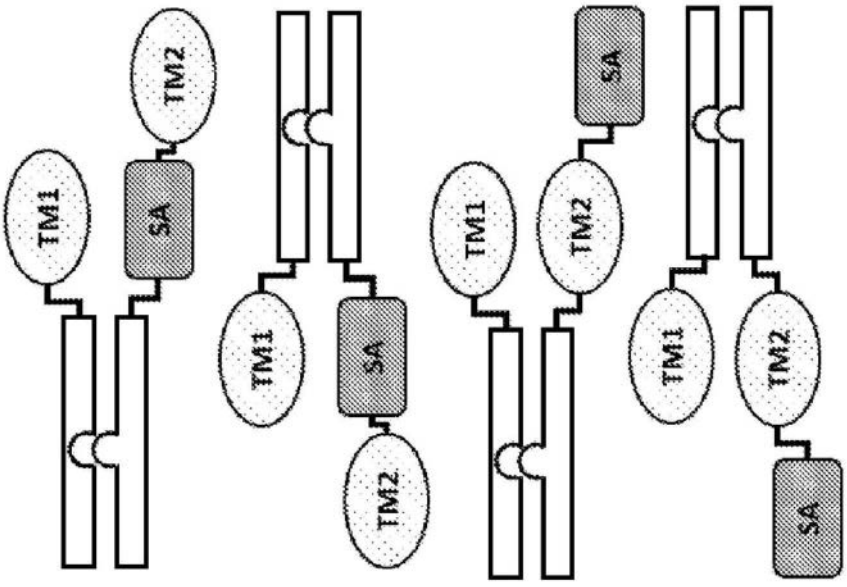


图 24G 图 24H 图 24I 图 24J

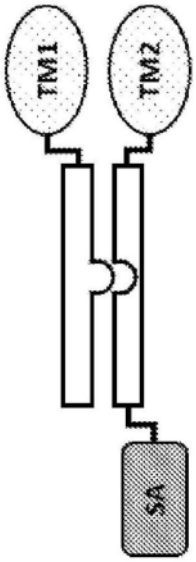


图25A

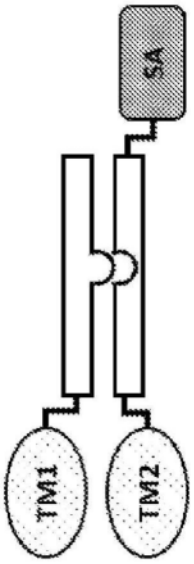


图25B

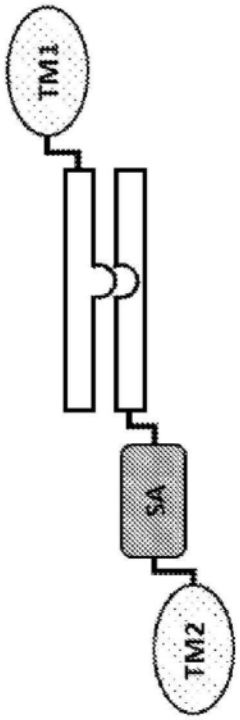


图25C

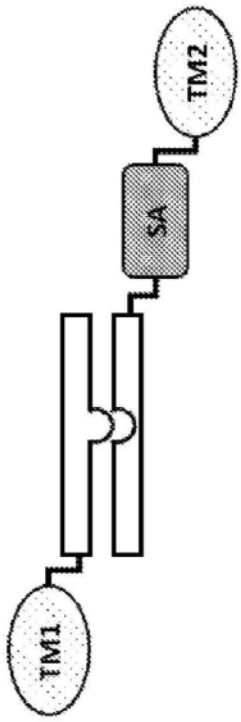


图25D

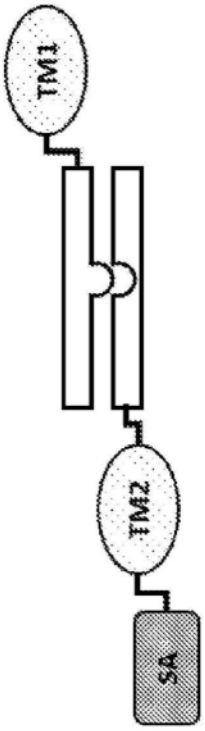


图25E

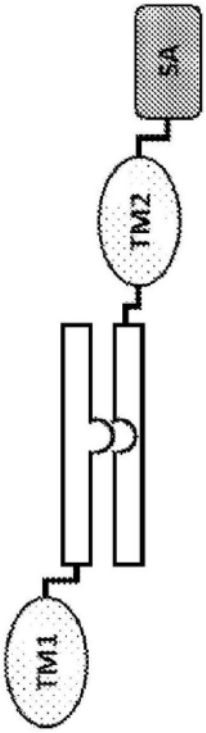


图25F

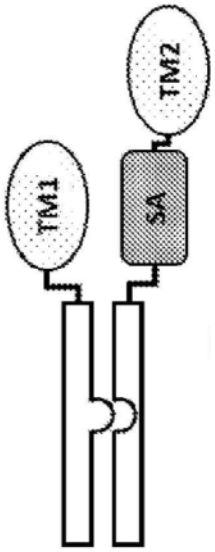


图25G

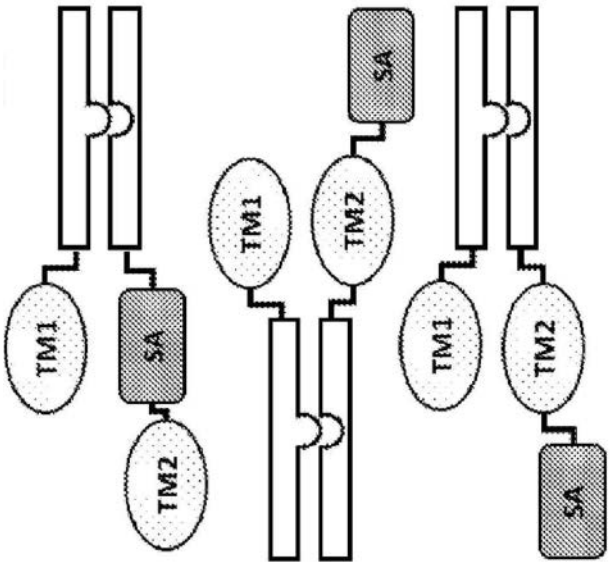


图 25H 图 25I 图 25J

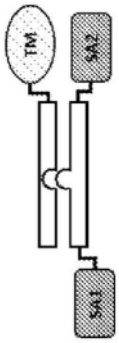


图26A

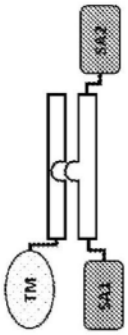


图26B

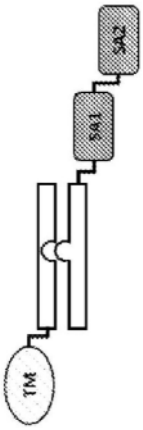


图26C

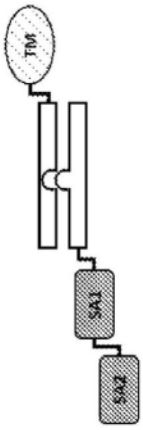


图26D

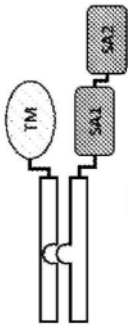


图26E

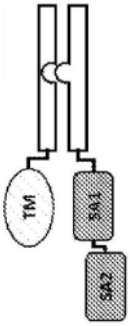


图26F

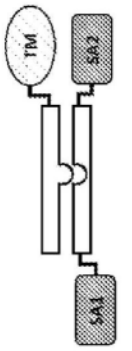


图27A

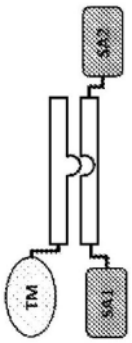


图27B

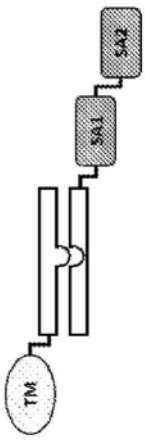


图27C

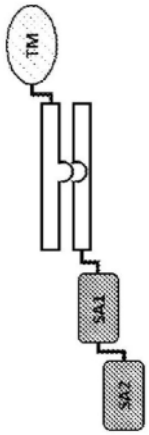


图27D

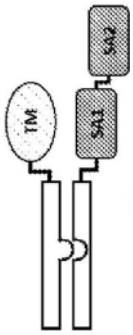


图27E

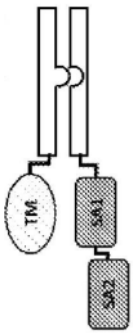


图27F

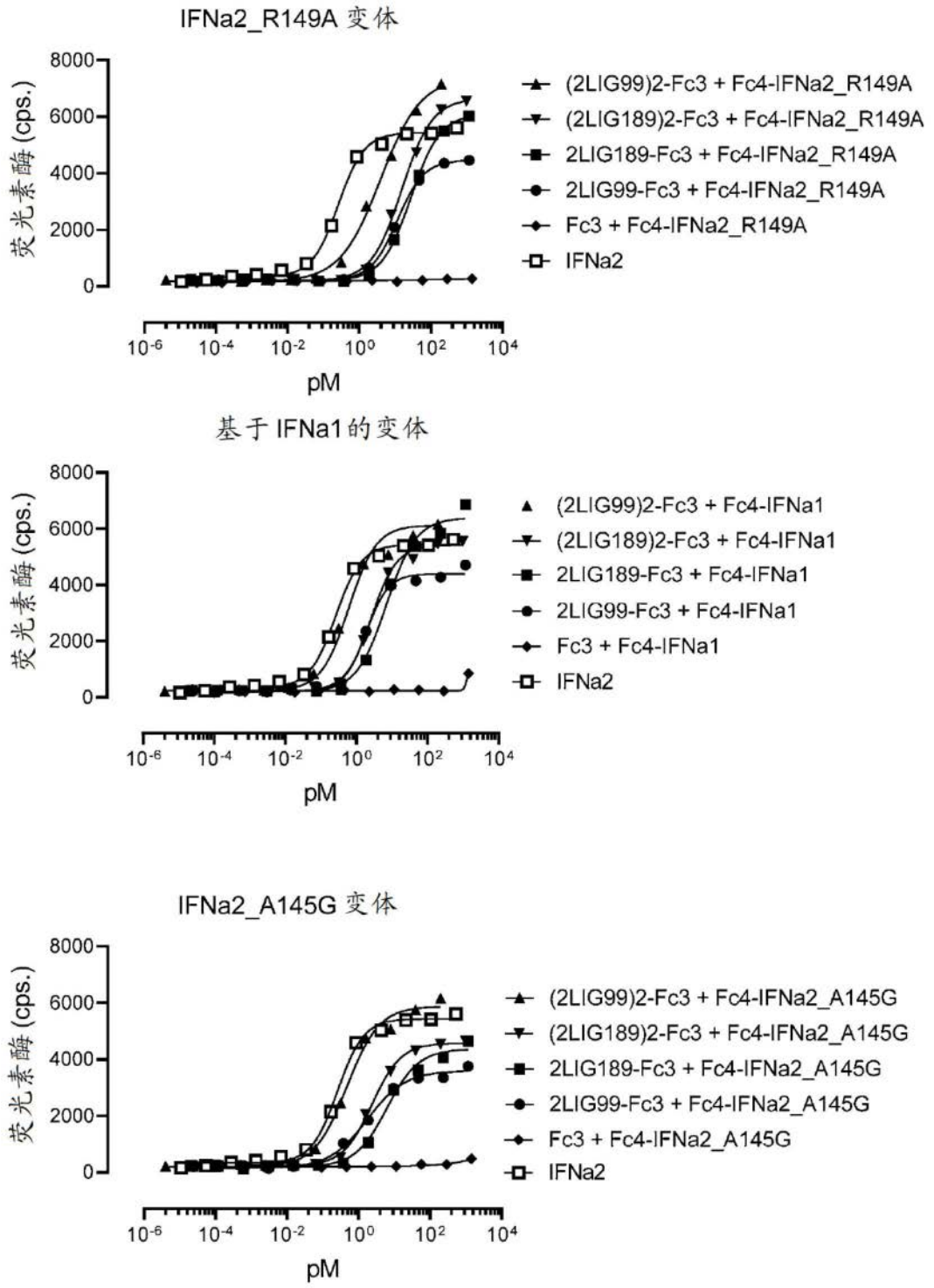

IFNa2_R149A 变体
荧光素酶(cps.)
8000
6000
4000
2000
0
10-6
10-4
10-2
100
102
104
pM
(2LIG99)2-Fc3 + Fc4-IFNa2_R149A
(2LIG189)2-Fc3 + Fc4-IFNa2_R149A
2LIG189-Fc3 + Fc4-IFNa2_R149A
2LIG99-Fc3 + Fc4-IFNa2_R149A
Fc3 + Fc4-IFNa2_R149A
IFNa2
基于IFNa1的变体
荧光素酶(cps.)
pM
(2LIG99)2-Fc3 + Fc4-IFNa1
(2LIG189)2-Fc3 + Fc4-IFNa1
2LIG189-Fc3 + Fc4-IFNa1
2LIG99-Fc3 + Fc4-IFNa1
Fc3 + Fc4-IFNa1
IFNa2
IFNa2_A145G 变体
荧光素酶(cps.)
pM
(2LIG99)2-Fc3 + Fc4-IFNa2_A145G
(2LIG189)2-Fc3 + Fc4-IFNa2_A145G
2LIG189-Fc3 + Fc4-IFNa2_A145G
2LIG99-Fc3 + Fc4-IFNa2_A145G
Fc3 + Fc4-IFNa2_A145G
IFNa2

图28

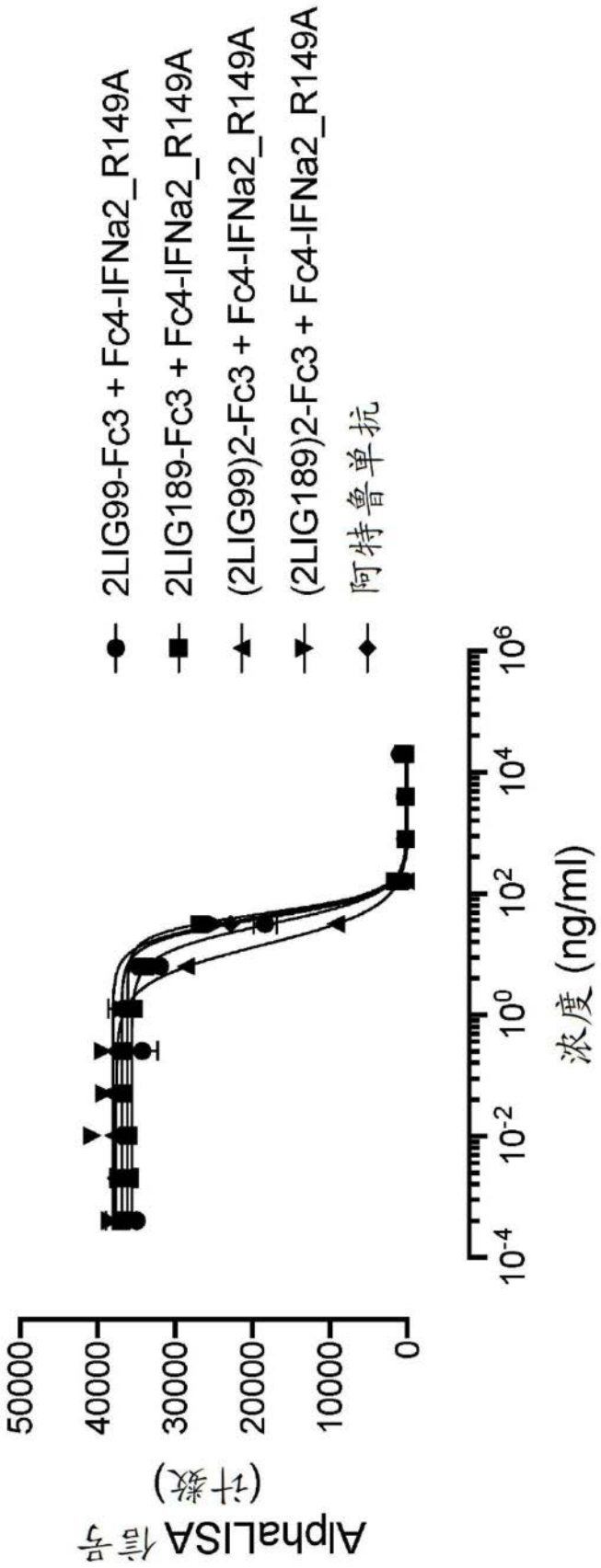

2LIG99-Fc3 + Fc4-IFNa2_R149A
2LIG189-Fc3 + Fc4-IFNa2_R149A
(2LIG99)2-Fc3 + Fc4-IFNa2_R149A
(2LIG189)2-Fc3 + Fc4-IFNa2_R149A
阿特鲁单抗
AlphaLISA 信号 (计数)
50000
40000
30000
20000
10000
0
10^{-4}
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
10^{4}
10^{6}
浓度 (ng/ml)

图29

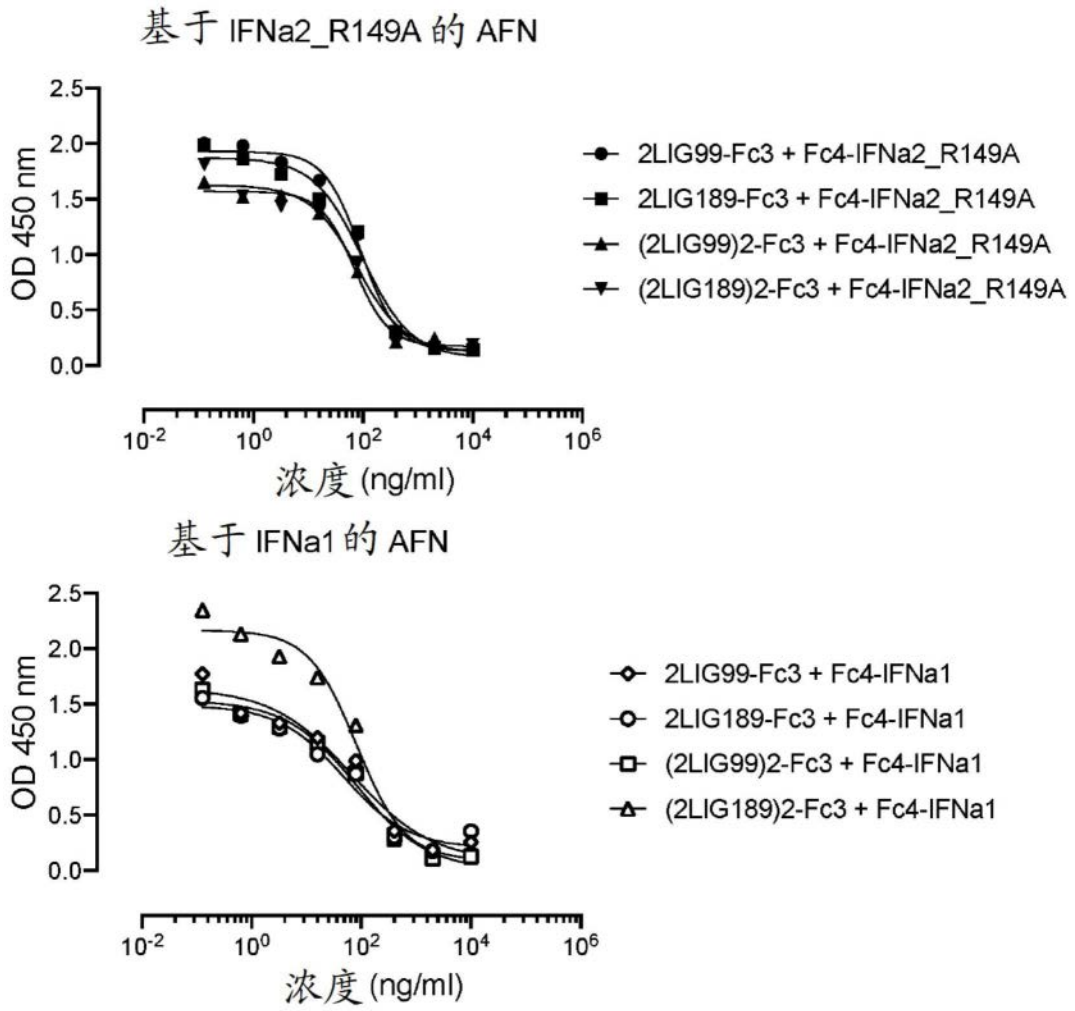

基于 IFNa2_R149A 的 AFN
OD 450 nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10-2
100
102
104
106
浓度 (ng/ml)
2LIG99-Fc3 + Fc4-IFNa2_R149A
2LIG189-Fc3 + Fc4-IFNa2_R149A
(2LIG99)2-Fc3 + Fc4-IFNa2_R149A
(2LIG189)2-Fc3 + Fc4-IFNa2_R149A
基于 IFNa1 的 AFN
OD 450 nm
浓度 (ng/ml)
2LIG99-Fc3 + Fc4-IFNa1
2LIG189-Fc3 + Fc4-IFNa1
(2LIG99)2-Fc3 + Fc4-IFNa1
(2LIG189)2-Fc3 + Fc4-IFNa1

图30

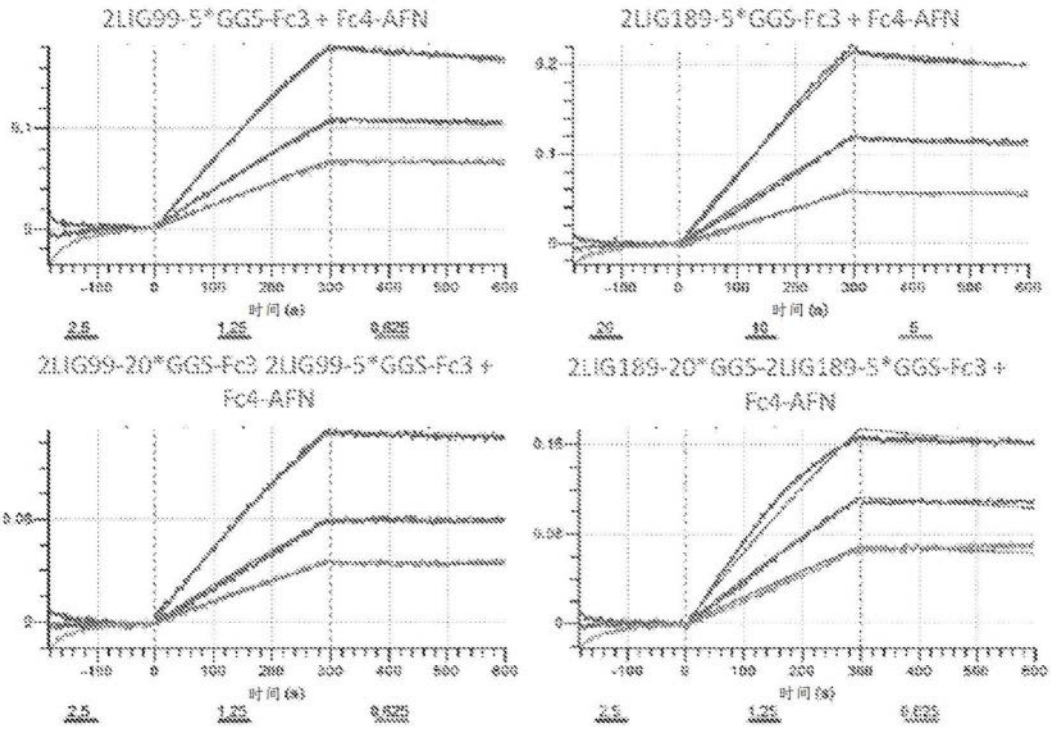

2LIG99-5*GGS-Fc3 + Fc4-AFN
2LIG189-5*GGS-Fc3 + Fc4-AFN
2LIG99-20*GGS-Fc3 2LIG99-5*GGS-Fc3 + Fc4-AFN
2LIG189-20*GGS-2LIG189-5*GGS-Fc3 + Fc4-AFN
时间 (s)
2.5
1.25
0.625
20
10
5

图31A

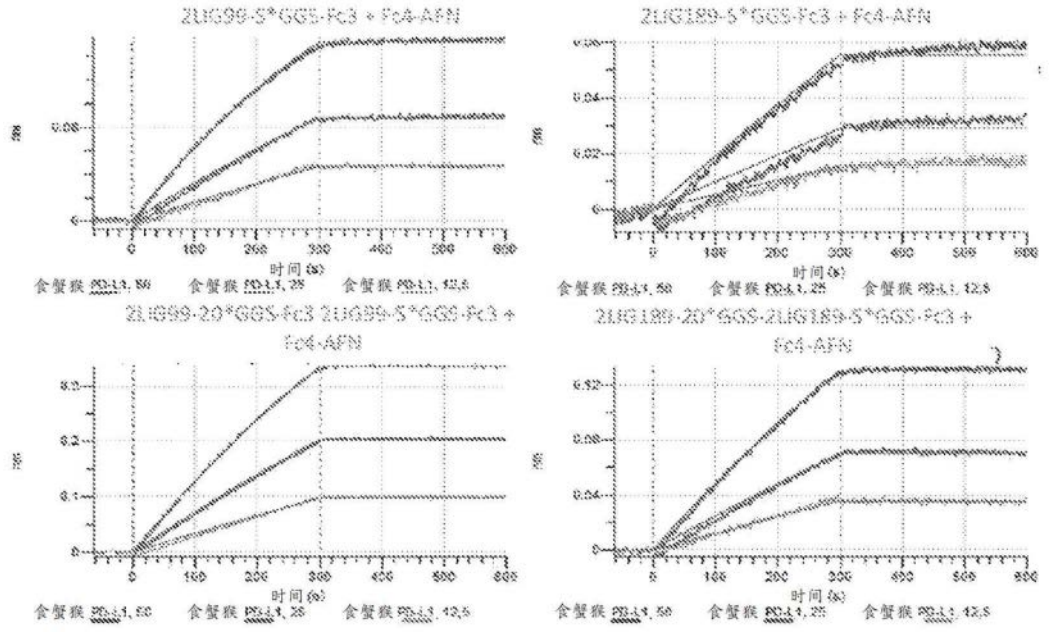

2LIG99-5*GGS-Fc3 + Fc4-AFN
2LIG189-5*GGS-Fc3 + Fc4-AFN
2LIG99-20*GGS-Fc3 2LIG99-5*GGS-Fc3 + Fc4-AFN
2LIG189-20*GGS-2LIG189-5*GGS-Fc3 + Fc4-AFN
时间 (s)

图31B

样品ID	对人 IL6R 的亲和力				对食蟹猴 IL6R 的亲和力			
	KD (M)	ka (1/Ms)	kdis (1/s)		KD (M)	ka (1/Ms)	kdis (1/s)	
2LIG99-Fc3 + Fc4-AFN	3,06E-10	5,75E+05	1,76E-04		1,02E-11	4,57E+04	4,68E-07	
2LIG189-Fc3 + Fc4-AFN	8,34E-09	3,26E+04	2,72E-04		3,68E-11	7,07E+03	2,60E-07	
(2LIG99)2-Fc3 + Fc4-AFN	1,07E-10	6,75E+05	7,20E-05		9,10E-12	2,88E+04	2,62E-07	
(2LIG189)2-Fc3 + Fc4-AFN	9,88E-10	2,91E+05	2,88E-04		4,92E-12	2,51E+04	1,24E-07	

图31C

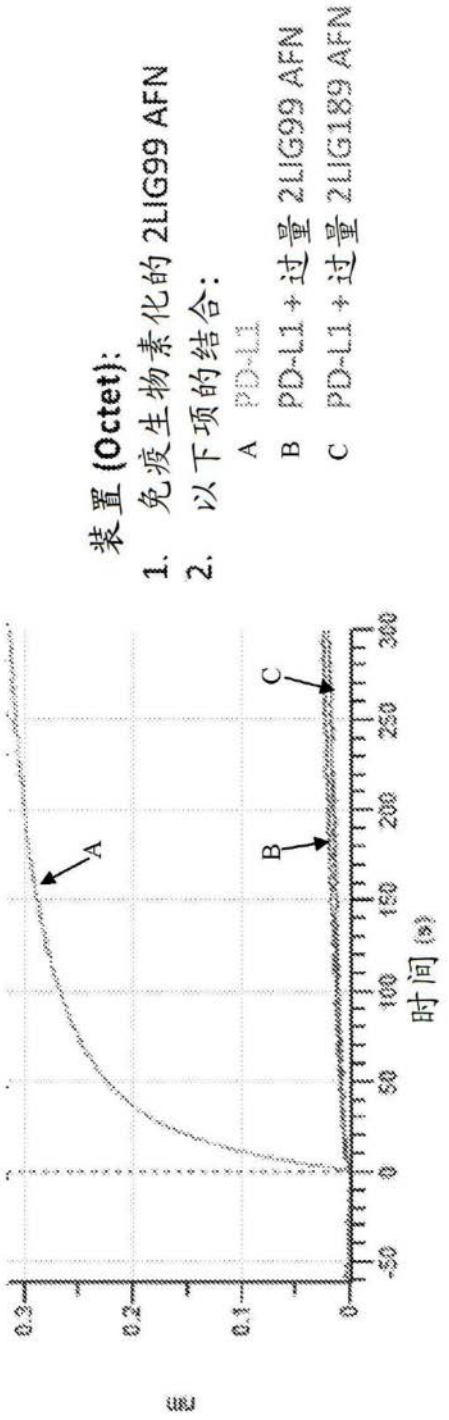

装置 (Octet):
1. 免疫生物素化的 2LIG99 AFN
2. 以下项的结合:
A PD-L1
B PD-L1 + 过量 2LIG99 AFN
C PD-L1 + 过量 2LIG189 AFN
A
B
C
0.3
0.2
0.1
0
-50
0
50
100
150
200
250
300
时间 (s)

图32A

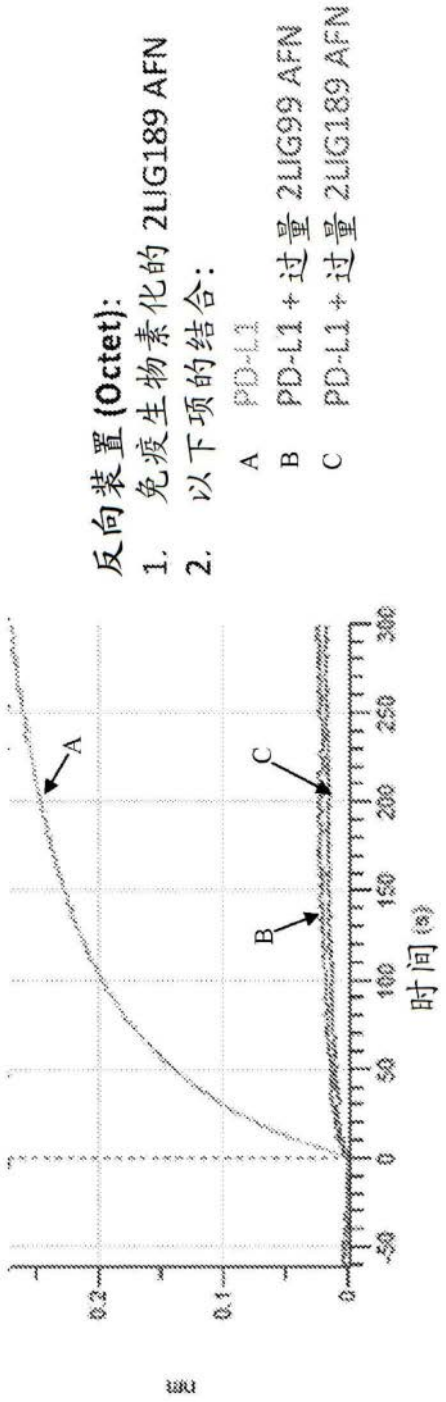

反向装置(Octet):
1. 免疫生物素化的 2LIG189 AFN
2. 以下项的结合:
A PD-L1
B PD-L1 + 过量 2LIG99 AFN
C PD-L1 + 过量 2LIG189 AFN
A
B
C
0.2
0.1
0
-50
0
50
100
150
200
250
300
时间(s)

图32B

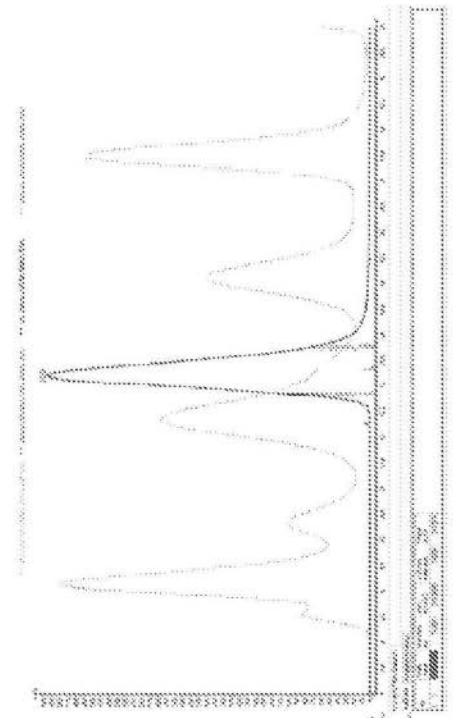


图 33B

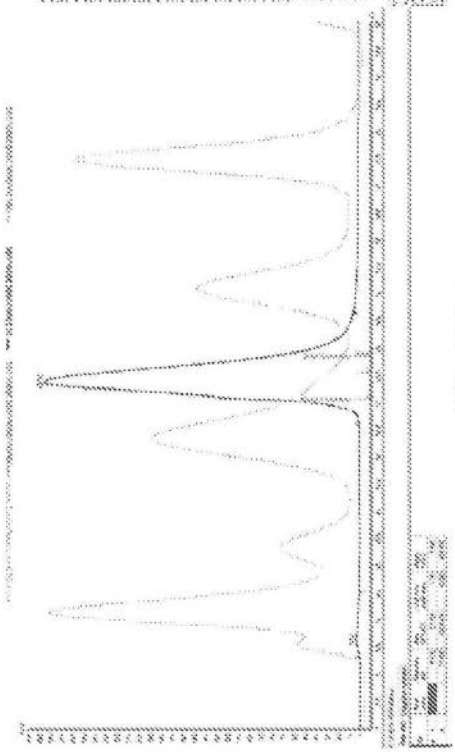


图 33A

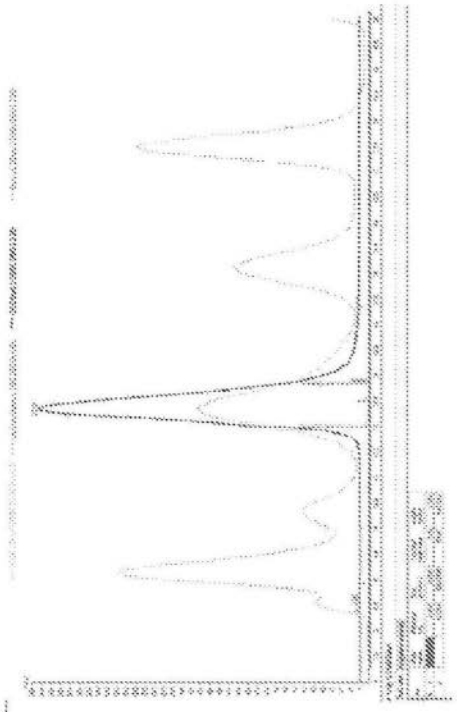


图 33D

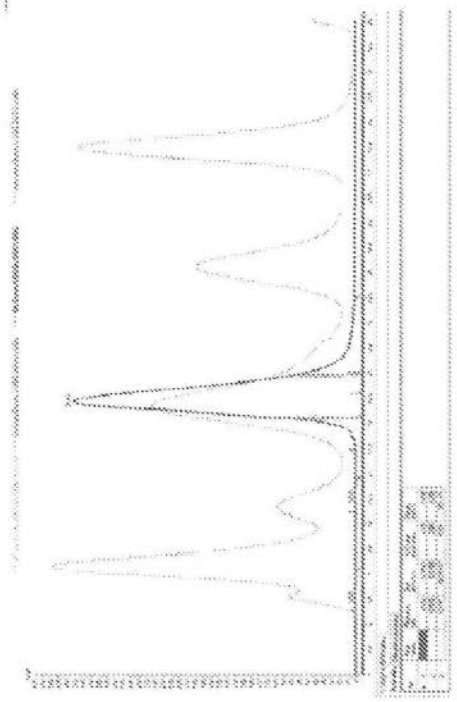


图 33C

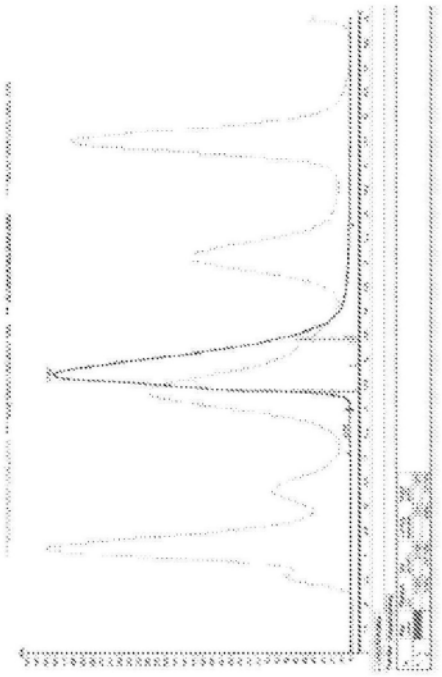


图33E

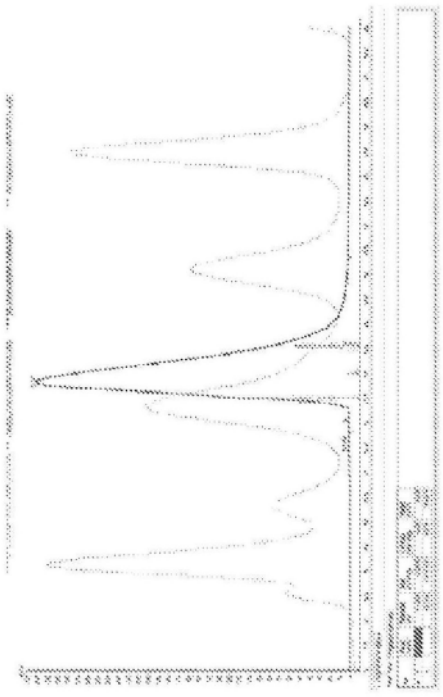


图33F

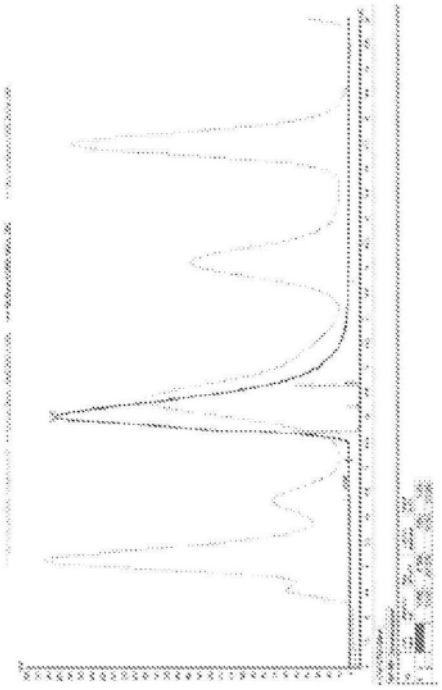


图33G

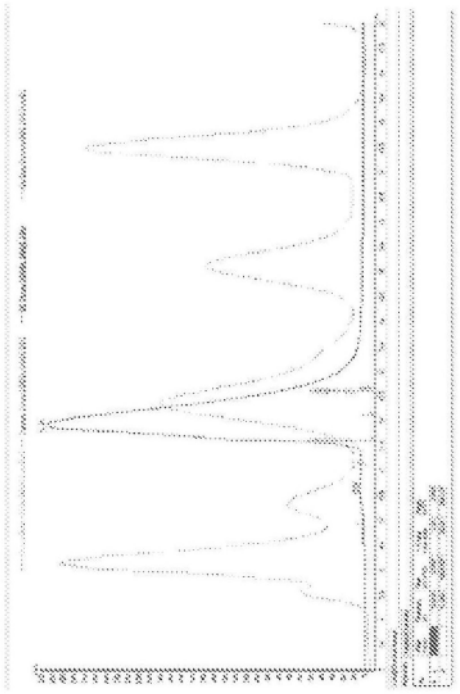


图33H

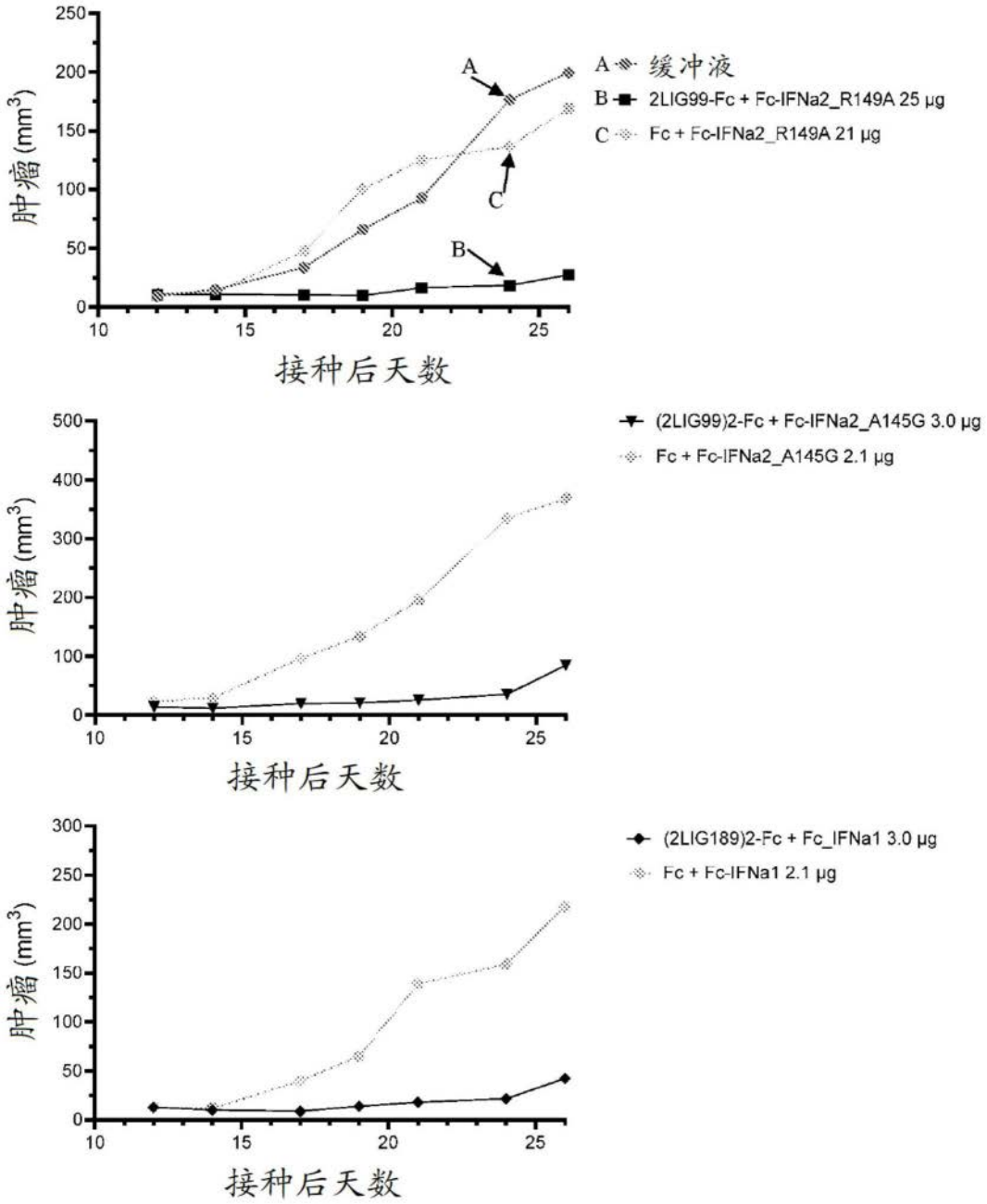

肿瘤 (mm3)
接种后天数
A
B
C
A 缓冲液
B 2LIG99-Fc + Fc-IFNa2_R149A 25 μg
C Fc + Fc-IFNa2_R149A 21 μg
(2LIG99)2-Fc + Fc-IFNa2_A145G 3.0 μg
Fc + Fc-IFNa2_A145G 2.1 μg
(2LIG189)2-Fc + Fc_IFNa1 3.0 μg
Fc + Fc-IFNa1 2.1 μg

图34