



(10) 授权公告号 CN 114173822 B

(45) 授权公告日 2025.01.10

(21) 申请号 202080055104.6

(22) 申请日 2020.06.03

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114173822 A

(43) 申请公布日 2022.03.11

(30) 优先权数据  
62/856,468 2019.06.03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2022.01.28

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2020/070113 2020.06.03

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02020/247974 EN 2020.12.10

(73) 专利权人 芝加哥大学  
地址 美国伊利诺斯州

(72) 发明人 杰弗里·A·哈贝尔 石原纯  
佐佐木光一

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事  
务所(普通合伙) 11413  
专利代理师 回振海 王庆艳

(51) Int.Cl.  
A61K 47/64 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 39/38 (2006.01)  
A61K 39/44 (2006.01)

(56) 对比文件  
W0 2012112690 A2, 2012.08.23

审查员 吕飞

权利要求书2页 说明书55页  
序列表40页 附图17页

(54) 发明名称

用胶原结合药物载体治疗癌症的方法和组合物

(57) 摘要

本公开涉及肿瘤靶向药物载体,其通过有效地将细胞毒剂递送至肿瘤微环境来提高抗肿瘤疗效。本公开的方面涉及包含与胶原结合结构域可操作地连接的白蛋白多肽或IgG Fc结构域多肽的多肽。另外的方面涉及包含本公开的多肽、核酸或细胞的组合物。

1. 包含与胶原结合结构域可操作地连接的白蛋白多肽或IgG Fc结构域多肽的多肽在制备用于降低包含细胞毒剂的癌症治疗的非特异性毒性的药物中的用途,其中所述胶原结合结构域具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:14的氨基酸序列,其中所述多肽通过pH可断裂的连接子连接至细胞毒剂。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中与连接至白蛋白或IgG Fc结构域多肽且未连接至胶原结合结构域的相同细胞毒剂的毒性相比,所述非特异性毒性降低。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中与连接至白蛋白或IgG Fc结构域多肽且未连接至胶原结合结构域的相同细胞毒剂的剂量相比,所述细胞毒剂在肿瘤中的积累增加。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述癌症或肿瘤包括实体瘤。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述癌症包括乳腺癌或结肠癌,或者其中所述肿瘤包括乳房或结肠中的肿瘤。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的用途,其中多肽与一种或多于一种另外的癌症疗法一起施用。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的用途,其中多肽与免疫疗法一起施用。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中所述免疫疗法在所述多肽之前、之后或同时施用。

9. 根据权利要求7或8所述的用途,其中所述免疫疗法包括检查点抑制剂疗法。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中所述检查点抑制剂疗法包括PD-1抗体。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的用途,其中所述多肽被全身施用。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述多肽通过静脉注射施用。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的用途,其中所述细胞毒剂的施用剂量小于未连接至胶原结合结构域的所述细胞毒剂的最小有效剂量。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的用途,其中所述细胞毒剂的施用剂量小于与白蛋白多肽或IgG Fc结构域多肽缀合且未连接至胶原结合结构域的细胞毒剂的最小有效剂量。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的用途,其中所述连接子包括脲连接子。

16. 根据权利要求15所述的用途,其中所述连接子在小于7.4的pH下断裂。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的用途,其中所述多肽通过双官能连接子连接至所述细胞毒剂和/或所述胶原结合多肽。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的用途,其中所述细胞毒剂包括阿霉素。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的用途,其中所述多肽通过肽键共价连接至胶原结合结构域。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的用途,其中所述胶原结合结构域位于所述白蛋白多肽或IgG Fc结构域多肽的氨基末端。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的用途,其中所述多肽包含在所述白蛋白多肽或IgG Fc结构域多肽与所述胶原结合结构域之间的连接子。

22. 根据权利要求21所述的用途,其中所述连接子包含甘氨酸和丝氨酸氨基酸残基。

23. 根据权利要求21或22所述的用途,其中所述连接子包含GGGS、 $(GGGS)_n$ 或 $(GGGS)_2$ 。

24. 根据权利要求1至23中任一项所述的用途,其中所述多肽不与颗粒、纳米囊泡或脂质体可操作地连接。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的用途,其中所述多肽包含至少两个胶原结合结构域。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的用途,其中细胞毒剂与白蛋白的比例为3:1。

## 用胶原结合药物载体治疗癌症的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年6月3日提交的美国临时专利申请第62/856468号的优先权,其全部内容通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表已以ASCII格式以电子方式提交,并在此全文引入作为参考。所述ASCII副本创建于2020年6月12日,名为ARCD-P0688W0-1001126260\_SL.txt,大小为71598字节。

### 背景技术

[0005] II. 发明领域

[0006] 本发明一般涉及医学领域。更具体地,它涉及用于治疗癌症的核苷酸构建体、蛋白质和药物载体的组合物和方法。

[0007] III. 背景技术

[0008] 血清白蛋白(SA)是血液中含有最丰富的蛋白质。包括小分子、肽和细胞因子在内的许多化合物已与SA融合、缀合或共同配制,以改善向疾病病灶的药物递送。SA的超长血浆半衰期和/或亲水性有助于改善药物的药代动力学、安全性和有效性。

[0009] 阿霉素(Dox)是一种小分子抗癌药物,已被美国食品和药物管理局(FDA)批准用于治疗多种癌症。Dox通过被动跨膜扩散在细胞中内化并干扰DNA功能,导致增殖细胞死亡。尽管Dox治疗延长了某些患者群体的生存期,但抗肿瘤疗效并不显著,部分原因是获得性耐药。Dox较差的治疗指数也限制了其治疗用途。事实上,临床上已经报道了Dox的相当大的毒性,包括骨髓抑制、过度炎症和心脏毒性。Dox通常与其他化疗药物联合使用。提高Dox的疗效和最大耐受剂量的其他方法是脂质体制剂(Doxil)和使用带有pH敏感的可断裂的连接子的Dox马来酰亚胺衍生物(亚德阿霉素(aldoxorubicin)),其被开发用于实现与循环SA的(人类序列中的)半胱氨酸-34原位缀合。

[0010] 尽管已经开发出被动靶向肿瘤的细胞毒性药物的策略,本领域需要更多靶向治疗,其可以降低非特异性毒性并提高细胞毒剂的疗效,同时降低达到治疗效果所需的最小有效剂量。

### 发明内容

[0011] 在此,发明人描述了肿瘤靶向药物载体,其通过将细胞毒剂有效地递送至肿瘤微环境来提高抗肿瘤疗效。本公开的方面涉及包含与胶原结合结构域可操作地连接的白蛋白多肽或IgG Fc结构域多肽的多肽。另外的方面涉及包含本公开的多肽、核酸或细胞的组合物。另外的方面还涉及编码本公开的多肽的核酸。更进一步的方面涉及包含本公开的核酸或多肽的细胞。

[0012] 本公开的另一方面涉及制备多肽的方法,其包括在细胞中表达本公开的核酸并分离所表达的多肽。

[0013] 另外的方面涉及用于治疗癌症的方法,其包括施用本公开的多肽、核酸或组合物。另外的方面涉及用于降低对象中包含细胞毒剂的治疗的非特异性毒性的方法,该方法包括向对象施用本公开的多肽或组合物。术语“非特异性毒性”是指非癌细胞的毒性或细胞死亡。

[0014] 另外的方面涉及一种用于增加对象肿瘤中细胞毒剂积累的方法,该方法包括向对象施用本公开的多肽、核酸或组合物。

[0015] 另外的方面涉及将细胞毒剂靶向递送至肿瘤脉管系统的方法,该方法包括向对象施用本公开的多肽或组合物。另外的方面还涉及治疗肿瘤的方法或治疗对象的肿瘤的方法,该方法包括向肿瘤或对象施用本公开的多肽或组合物。在一些方面,该方法用于抑制肿瘤生长或肿瘤进展。抑制可以是至少、至多或约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%(或其中可推导出的任何范围)。

[0016] 在一些实施方案中,多肽与细胞毒剂可操作地连接。术语“可操作地连接”是指共价或非共价连接。在一些实施方案中,连接是共价的。在一些实施方案中,连接是非共价的。在一些实施方案中,多肽与细胞毒剂共价连接。在一些实施方案中,多肽与细胞毒剂非共价连接。在一些实施方案中,多肽通过可断裂的连接子与细胞毒剂连接。在一些实施方案中,可断裂的连接子包括pH-可断裂的连接子。在一些实施方案中,连接子包括脘连接子。在一些实施方案中,在小于7.4的pH值下断裂连接子。在一些实施方案中,在酸性pH下断裂连接子。在一些实施方案中,连接子的最佳断裂是在4.5、5、5.5、6或6.5(或其间的任何范围)的pH值下。最佳断裂是指在溶液中或体外在小于6小时、5小时、4小时、3小时、2小时、1小时、0.5小时或0.25小时(或其中可推导出的任何范围)的时间段内发生至少75%、80%、85%、90%、95%或99%的断裂的pH值。在一些实施方案中,多肽通过双官能连接子连接至细胞毒剂和/或胶原结合多肽。

[0017] 在一些实施方案中,细胞毒剂包括阿霉素。在一些实施方案中,细胞毒剂包含阿霉素的衍生物。在一些实施方案中,细胞毒剂包括亚德阿霉素。在一些实施方案中,细胞毒剂是本文所述的细胞毒剂。在一些实施方案中,细胞毒剂在施用多肽之前与多肽缀合。在一些实施方案中,排除细胞毒剂的原位缀合。

[0018] 在一些实施方案中,多肽通过肽键与胶原结合结构域共价连接。在一些实施方案中,多肽包含来自饰胶蛋白聚糖或血管性血友病因子(vWF)的胶原结合结构域。在一些实施方案中,胶原结合结构域包含与SEQ ID NO:1或其片段具有至少80%同一性的多肽。在一些实施方案中,胶原结合结构域包含与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:11至SEQ ID NO:14或其片段具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的多肽。在一些实施方案中,胶原结合结构域包含与SEQ ID NO:1或其片段具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的多肽。在一些实施方案中,胶原结合结构域包含与SEQ ID NO:2或其片段具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的多肽。在一些实施方案中,胶原结合结构

域包含与SEQ ID NO:3或其片段具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的多肽。在一些实施方案中,胶原结合结构域包含与SEQ ID NO:4或其片段具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的多肽。在一些实施方案中,胶原结合结构域包含与SEQ ID NO:11或其片段具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的多肽。在一些实施方案中,胶原结合结构域包含与SEQ ID NO:12或其片段具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%同一性的多肽。在一些实施方案中,胶原结合结构域包含与SEQ ID NO:13或其片段具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的多肽。在一些实施方案中,胶原结合结构域包含与SEQ ID NO:14或其片段具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的多肽。

[0019] 在一些实施方案中,多肽与白蛋白多肽共价连接。在一些实施方案中,白蛋白多肽包含与SEQ ID NO:7至SEQ ID NO:10之一具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性(或其中可推导出的任何范围)的多肽。

[0020] 在一些实施方案中,多肽与IgG Fc结构域多肽共价连接。在一些实施方案中,IgG Fc结构域包含与SEQ ID NO:15至SEQ ID NO:18之一具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性(或其中可推导出的任何范围)的多肽。

[0021] 在一些实施方案中,胶原结合结构域位于白蛋白多肽的氨基末端。在一些实施方案中,胶原结合结构域位于白蛋白多肽的羧基末端。短语“在氨基末端”或“在羧基末端”是指一种多肽与另一种多肽的相对位置。例如,当一个多肽“在氨基末端”时,它连接到另一个多肽的N-末端氨基。然而,两个多肽或结构域之间可能存在插入序列。类似地,“在羧基末端”的多肽是指与另一个多肽或结构域的羧基末端连接的多肽。在一些实施方案中,细胞毒剂与胶原结合结构域的氨基末端连接。在一些实施方案中,细胞毒剂与胶原结合结构域的羧基末端连接。在一些实施方案中,细胞毒剂与白蛋白多肽的氨基末端连接。在一些实施方案中,细胞毒剂与白蛋白多肽的羧基末端连接。在一些实施方案中,胶原结合结构域位于IgG Fc结构域多肽的氨基末端。

[0022] 在一些实施方案中,胶原结合结构域位于IgG Fc结构域多肽的羧基末端。在一些

实施方案中,细胞毒剂与胶原结合结构域的氨基末端连接。在一些实施方案中,细胞毒剂与胶原结合结构域的羧基末端连接。在一些实施方案中,细胞毒剂与IgG Fc结构域多肽的氨基末端连接。在一些实施方案中,细胞毒剂与IgG Fc结构域多肽的羧基末端连接。

[0023] 在一些实施方案中,多肽包含IgG Fc结构域多肽和胶原结合结构域之间的连接子。在一些实施方案中,连接子包含甘氨酸和丝氨酸氨基酸残基。在一些实施方案中,连接子包含GGGS (SEQ ID NO:19)、 $(GGGS)_n$  (SEQ ID NO:20) 或  $(GGGS)_2$  (SEQ ID NO:5)。

[0024] 在一些实施方案中,多肽包含白蛋白多肽和胶原结合结构域之间的连接子。在一些实施方案中,连接子包含甘氨酸和丝氨酸氨基酸残基。在一些实施方案中,连接子包含GGGS (SEQ ID NO:19)、 $(GGGS)_n$  (SEQ ID NO:20) 或  $(GGGS)_2$  (SEQ ID NO:5)。在一些实施方案中,n为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或大于12(或其中可推导出的任何范围)。

[0025] 在一些实施方案中,多肽未与颗粒、纳米囊泡或脂质体可操作地连接。在一些实施方案中,多肽未与纳米颗粒或固体支持物例如微孔板或珠可操作地连接。在一些实施方案中,组合物不包含脂质体、颗粒或纳米囊泡。

[0026] 在一些实施方案中,组合物不包含纳米颗粒或固体支持物例如微孔板或珠。

[0027] 在一些实施方案中,多肽包含至少两个胶原结合结构域。在一些实施方案中,多肽包含至少2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个胶原结合结构域。胶原结合结构域可以连接在一起或在白蛋白多肽或IgG Fc结构域多肽的氨基末端和羧基末端。

[0028] 在一些实施方案中,细胞毒剂与白蛋白的比例为3:1。在一些实施方案中,细胞毒剂与白蛋白的比例为至少、至多或恰好0.5:1、1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、5.5:1、6:1、7:1、8:1、9:1或10:1(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,白蛋白多肽与胶原结合结构域的比例为1:1、1:2、1:3、1:4、4:1、3:1或2:1(或其中可推导出的任何范围)。

[0029] 在一些实施方案中,细胞毒剂与IgG Fc结构域的比例为3:1。在一些实施方案中,细胞毒剂与IgG Fc结构域的比例为至少、至多或恰好0.5:1、1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、5.5:1、6:1、7:1、8:1、9:1或10:1(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,IgG Fc结构域多肽与胶原结合结构域的比例为1:1、1:2、1:3、1:4、4:1、3:1或2:1(或其中可推导出的任何范围)。

[0030] 在一些实施方案中,对象患有癌症。在一些实施方案中,对象患有乳腺癌或结肠癌,或者肿瘤是乳房肿瘤或结肠肿瘤。在一些实施方案中,对象患有本文所述的癌症或来自本文所述癌症的肿瘤。在一些实施方案中,癌症或肿瘤包括实体瘤。在一些实施方案中,排除血液系统肿瘤或癌症。

[0031] 在一些实施方案中,与连接至白蛋白且未连接至胶原结合结构域的不同细胞毒剂的毒性相比,非特异性毒性降低。例如,与不含胶原结合结构域的不同多肽相比,包含胶原结合结构域的多肽的非特异性毒性可降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。在一些实施方案中,与连接至白蛋白且未连接至胶原结合结构域的不同细胞毒剂的剂量相比,肿瘤中细胞毒剂的积累增加。在一些实施方案中,增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。

[0032] 在一些实施方案中,与连接至IgG Fc结构域和未连接至胶原结合结构域的不同细胞毒剂的毒性相比,非特异性毒性降低。例如,与不含胶原结合结构域的不同多肽相比,包

含胶原结合结构域的多肽的非特异性毒性可降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。在一些实施方案中,与连接至IgG Fc结构域和未连接至胶原结合结构域的相同细胞毒剂的剂量相比,肿瘤中细胞毒剂的积累增加。在一些实施方案中,增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。

[0033] 在一些实施方案中,所述方法还包括施用另外的癌症疗法。在一些实施方案中,对象已经或将接受免疫疗法。在一些实施方案中,已确定对象对免疫疗法无反应。在一些实施方案中,对象患有难治性癌症。在一些实施方案中,对象是经历了与先前疗法或先前免疫疗法相关的毒性的对象。在一些实施方案中,该方法还包括施用免疫疗法。在一些实施方案中,免疫疗法在多肽之前、之后或同时施用。在一些实施方案中,免疫疗法包括检查点抑制剂疗法。在一些实施方案中,检查点抑制剂疗法包括单一检查点抑制剂疗法,这表明仅施用一种检查点抑制剂。在一些实施方案中,检查点抑制剂疗法包括联合检查点抑制剂疗法,这表明施用至少两种检查点抑制剂,例如PD-1抑制剂和CTLA-4抑制剂。在一些实施方案中,检查点抑制剂疗法包含PD-1抗体。在一些实施方案中,检查点抑制剂疗法包含一种或多于一种本文所述的检查点抑制剂。

[0034] 在一些实施方案中,多肽和另外的疗法在相同的组合物中施用。在一些实施方案中,多肽和另外的疗法在分开的组合物中施用。在一些实施方案中,本公开的组合物还包含一种或多于一种免疫检查点抑制剂。在一些实施方案中,本公开的组合物包含PD-1抗体。在一些实施方案中,本公开的组合物包含CTLA-4抗体。在一些实施方案中,本公开的组合物包含PD-1和CTLA-4抗体。

[0035] 在一些实施方案中,全身施用多肽或组合物。在一些实施方案中,通过静脉注射施用多肽或组合物。在一些实施方案中,在肿瘤内或肿瘤周围施用多肽或组合物。在一些实施方案中,多肽或组合物通过本文所述的施用途径施用。

[0036] 在一些实施方案中,细胞毒剂的施用剂量小于未缀合至胶原结合结构域的细胞毒剂的最小有效剂量。在一些实施方案中,细胞毒剂的施用剂量小于未缀合到胶原结合结构域的细胞毒剂的最小有效剂量的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,细胞毒剂的施用剂量小于与白蛋白多肽缀合且未与胶原结合结构域缀合的细胞毒剂的最小有效剂量。在一些实施方案中,细胞毒剂的施用剂量小于与白蛋白多肽缀合且未与胶原结合结构域缀合的细胞毒剂的最小有效剂量的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,细胞毒剂的施用剂量小于与IgG Fc结构域多肽缀合且未与胶原结合结构域缀合的细胞毒剂的最小有效剂量。在一些实施方案中,细胞毒剂的施用剂量小于与IgG Fc结构域多肽缀合且未与胶原结合结构域缀合的细胞毒剂的最小有效剂量的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,对象之前已经用细胞毒剂治疗过。在一些实施方案中,已确定对象对先前治疗无反应或其中对象对先前治疗经历了非特异性毒性。在一些实施方案中,响应于先前的疗法,对象经历超过2次、3次、4次或5次免疫相关的不良事件。

[0037] 在一些实施方案中,本公开的组合物和多肽提供细胞毒剂的靶向递送。与包含相同多肽而无胶原结合结构域的组合物相比,这种靶向递送可以减少心脏损伤,延长存活,降低有效剂量浓度,增加肿瘤浸润淋巴细胞,增加CD8+细胞毒性T细胞,增加自然杀伤细胞,减

少炎症细胞因子例如IFN-g、TNF-a、IL-5和I1-6,或红细胞、白细胞、血细胞比容和/或血红蛋白浓度无不良降低。

[0038] 当提及基因产物时,术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文中可互换使用。

[0039] 术语“对象”、“哺乳动物”和“患者”可互换使用。在一些实施方案中,对象是哺乳动物。在一些实施方案中,对象是人。在一些实施方案中,对象是小鼠、大鼠、兔、狗、驴或实验室测试动物例如果蝇、斑马鱼等。

[0040] 在一些实施方案中,患者之前已经接受过癌症治疗。在一些实施方案中,对象对先前的癌症治疗具有抗药性。在一些实施方案中,对象被确定为对先前的癌症治疗反应差。

[0041] 预期所述方法和组合物包括本文所述的任何实施方案的排除。

[0042] 如本文所用,术语“或”和“和/或”用于描述相互组合或相互排斥的多个组分。例如,“x、y和/或z”可以指单独的“x”、单独的“y”、单独的“z”、“x、y和z”、“(x和y)或z”、“x或(y和z)”或“x或y或z”。特别考虑到可以从实施方案特别地排除x、y或z。

[0043] 在本申请中,术语“约”根据其在细胞生物学领域中的简单和普通含义来使用,以指示包括用于确定该值的装置或方法的误差标准偏差的值。

[0044] 与“包括”、“包含”或“特征在于”同义的术语“包括”是包容性的或开放式的,并且不排除附加的、未列举的要素或方法步骤。短语“由……组成”不包括未指定的任何元素、步骤或成分。短语“基本上由……组成”将所述主题的范围限制为指定的材料或步骤,以及不会对其基本特征和新颖特征产生实质性影响的材料或步骤。预期在术语“包括”的上下文中描述的实施方案也可以在术语“由……组成”或“基本上由……组成”的上下文中实施。

[0045] 特别考虑的是,关于本发明的一个实施方案所讨论的任何限制都可以适用于本发明的任何其他实施方案。此外,本发明的任何组合物可用于本发明的任何方法中,并且本发明的任何方法可用于生产或使用本发明的任何组合物。实施例描述的实施方案的方面也可以是不同实施例或申请中其他地方实施的实施方案,例如发明概述、发明详述、权利要求和附图说明中的实施方案。

## 附图说明

[0046] 下列附图构成本说明书的一部分,并被包括在内以进一步说明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一幅或多于一幅并结合在此呈现的具体实施方案的详细描述,可以更好地理解本发明。

[0047] 图1A-H: Dox-CBD-SA的合成和表征。(A) CBD-SA介导的药物递送示意图。(B) Dox-CBD-SA的合成方案。(C) 通过ELISA检测CBD-SA和SA对I型胶原和III型胶原的亲合力(显示Kd值)。N.D. = 由于信号低而未确定。[浓度]与[信号]的关系图如图7所示。重复两次实验。(D) 显示了每种蛋白质的Dox缀合率。根据BCA蛋白质定量测定(蛋白质)和495nm(Dox)处的吸光度计算值(三次重复实验的均值±SD)。(E) 通过荧光法(495nm激发,590nm发射)评估Dox-CBD-SA在三种不同pH条件下的Dox释放动力学(n=3,均值±SD。重复两次实验)。(F) 接种MMTV-PyMT细胞并孵育过夜。添加Dox、Dox-SA或Dox-CBD-SA(红色)。还用溶酶体追踪器染色细胞(绿色)。比例尺=20μm。展示了代表性图片。重复两次实验。(G,H) Dox变体在体外对MMTV-PyMT细胞或MC38细胞的细胞毒性(n=6,均值±SEM)。两次实验重复。

[0048] 图2A-D: Dox-CBD-SA显示了与相当的Dox-SA的血浆药代动力学和比亚德阿霉素和

Dox-SA更高的肿瘤积累。(A)通过尾静脉注射(i.v.)向无肿瘤的FVB小鼠施用亚德阿霉素、Dox-SA或Dox-CBD-SA(基于Dox为5mg/kg)。在指定的时间点收集血浆。通过荧光法测量Dox的血浆浓度(均值±SEM,对于亚德阿霉素,n=4,对于Dox-SA和Dox-CBD-SA,n=5)。(B)用两相指数衰减计算Dox的血浆半衰期: $MFI(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ 。t<sub>1/2,α</sub>,快速清除半衰期;t<sub>1/2,β</sub>,缓慢清除半衰期。(均值±SEM,对于亚德阿霉素,n=4,对于Dox-SA和Dox-CBD-SA,n=5)。(C)用亚德阿霉素、Dox-SA或Dox-CBD-SA(基于Dox为4.16mg/kg)治疗MMTV-PyMT荷瘤小鼠。在指定时间点采集肿瘤,并定量肿瘤内的Dox量(均值±SEM,n=5每组持续2小时,n=7每组持续24小时)。(D)将100μg DyLight 488标记的SA或等摩尔量DyLight 488标记的CBD-SA静脉注射到MMTV-PyMT荷瘤小鼠体内。注射后1小时,采集肿瘤并通过共聚焦显微镜分析荧光。组织也用DAPI和抗CD31抗体染色。比例尺=100μm。3个肿瘤的代表性图像。重复两次实验。使用带有Tukey检验的方差分析进行统计分析。\*p<0.05;\*\*p<0.01;N.S.=不显著。

[0049] 图3A-L: Dox-CBD-SA在MMTV-PyMT乳腺癌模型中显示出增强的抗肿瘤疗效和淋巴细胞向肿瘤的浸润作用。(A)在第0天将5x10<sup>5</sup> MMTV-PyMT细胞接种到FVB小鼠中。在第7天静脉注射亚德阿霉素、Dox-SA或Dox-CBD-SA(基于Dox为5mg/kg)。图中描绘了第一只小鼠死亡之前的肿瘤体积(均值±SEM)。(B)存活率。(C-F)肿瘤个体生长曲线。CR表示完全响应频率。重复三次实验。(G-L)在第0天接种5x10<sup>5</sup> MMTV-PyMT细胞。在第7天静脉注射亚德阿霉素、Dox-SA或Dox-CBD-SA(以Dox为5mg/kg)。在第14天提取肿瘤内的淋巴细胞,然后进行流式细胞术分析。(G-I)图中显示了每毫克肿瘤重量中(G)CD45<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T细胞、(H)CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T细胞和(I)CD45<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>NK细胞的数量。条形代表均值±SEM。(J-L)图中显示了:(J)[每毫克肿瘤重量中CD45<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T细胞的数量]、(K)[每毫克肿瘤重量中CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T细胞的数量]或(L)[每毫克肿瘤重量中CD45<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>NK细胞的数量]比[肿瘤重量]。重复两次实验。使用(A,H,I)方差分析和Tukey检验或(G)Kruskal-Wallis检验,然后是Dunn检验,或(B)对数秩(Mantel-Cox)检验进行统计分析。\*p<0.05;\*\*p<0.01;N.S.=不显著。

[0050] 图4A-G: Dox-CBD-SA治疗显示毒性降低。在第0天通过尾静脉注射向无肿瘤的FVB小鼠施用20mg/kg的亚德阿霉素或Dox-CBD-SA(基于Dox)。(A-D)第3天的血浆细胞因子浓度。(E)第6天的红细胞计数。(F)第3天的白细胞计数。(G)第16天的脾脏重量。数据表示均值±SEM。重复两次实验。使用带有Tukey检验的方差分析进行统计分析。\*p<0.05;

[0051] \*\*p<0.01;N.S.=不显著。

[0052] 图5A-H: Dox-CBD-SA治疗与抗PD-1检查点抑制剂联合使用可完全根除已建立的MC38肿瘤。在第0天接种5×10<sup>5</sup>个MC38细胞。在第6天、第9天和第12天给小鼠静脉注射5mg/kg(基于Dox)亚德阿霉素或Dox-CBD-SA。在第10天和第13天也腹腔注射αPD-1。(A)实验时间表。(B)图中显示了第一只小鼠死亡前的肿瘤体积(平均值±SEM),CR=完全响应。(C)存活率。(D-G)肿瘤个体生长曲线。CR表示完全响应频率。(H)在第60天,Dox-CBD-SA+αPD-1治疗后的存活者通过皮下注射5×10<sup>5</sup>MC38细胞再次激发。未处理的小鼠也受到与对照组相同数量的细胞的攻击。显示了出现可触及肿瘤的小鼠数量。重复两次实验。使用对数秩(Mantel-Cox)检验对生存曲线进行统计分析。\*p<0.05;\*\*p<0.01;N.S.=不显著。

[0053] 图6:通过MALDI-TOF MS分析确认CBD与SA融合。通过MALDI-TOF MS分析CBD-SA。横坐标是质荷比(m/z),纵坐标是带电离子的强度。重复两次实验。

[0054] 图7A-B: CBD-SA与I型和III型胶原的结合亲和力。通过ELISA确定CBD-SA对(A)I型

胶原和(B) III型胶原的亲合力(n=4, 均值±SD)。图中显示了[浓度]与[信号]的关系。重复两次实验。

[0055] 图8:小鼠SA和与Dox缀合的CBD-SA的SDS-PAGE分析。通过考马斯蓝染色SDS-PAGE分析Dox-SA和Dox-CBD-SA。R减少;NR未减少。显示了代表性图像。重复两次实验。

[0056] 图9A-B:流体动力学大小。(A)通过DLS检测冻干后重组的未缀合的CBD-SA、Dox-CBD-SA和Dox-CBD-SA的大小。(B)还检测了未缀合的SA和Dox-SA的大小。重复两次实验。

[0057] 图10:III型胶原与血管性血友病因子A3结构域之间的结合界面。与III型胶原(PDB 4DMU)复合的血管性血友病因子(CBD)A3结构域的晶体结构。使用UCSF嵌合体处理图像。赖氨酸以蓝色表示。

[0058] 图11:Dox-SA中Dox的体外释放动力学。通过荧光法评估Dox-SA在三种不同pH条件下的Dox释放动力学(495nm激发,590nm发射,n=3,平均值±SD。重复两次实验。

[0059] 图12A-B:DyLight 800标记的SA和CBD-SA的血浆药代动力学。通过尾静脉注射(i.v.)向无肿瘤的FVB小鼠施用200μg DyLight 800标记的SA或CBD-SA。在指定的时间点采集血浆。(A)用注射后1分钟收集的样品的平均信号强度进行归一化每个样品的信号强度(均值±SEM,n=4)。(B)使用两相指数衰减计算标记SA和CBD-SA的血浆半衰期: $MFI(t) = A e^{-t} + B e^{-\beta t}$ 。t1/2,β,缓慢清除半衰期。(平均值±SEM,n=4)。重复一次实验。

[0060] 图13A-B:接受20mg/kg亚德阿霉素或Dox-CBD-SA的小鼠血液学值的变化。注射后第6天的(A)红细胞比容和(B)血红蛋白浓度。重复两次实验。使用带有Tukey检验的方差分析进行统计分析。\*\*\*p<0.01;N.S.=不显著。

[0061] 图14:Dox-CBD-SA治疗后主要器官的组织学分析。无肿瘤FVB小鼠在第0天接受Dox-CBD SA(20mg/kg)。在第16天,取心脏、肝脏、肾脏和肺并加工以获得组织切片(未经处理的n=7,Dox-CBD-SA处理的n=5)。比例尺=200μm。H&E染色的组织学盲法评估,在Dox-CBD-SA治疗后未观察到显著异常。显示了代表性图像。重复两次实验。

[0062] 图15A-15B:在治疗期间MC38肿瘤再攻击以及MC38荷瘤小鼠的体重变化。(A)图中显示了Dox CBD SA+αPD-1治疗的幸存者再次接受MC38细胞激发的肿瘤大小(平均值±胞激发)。未经处理的小鼠也受到与对照组相同数量的细胞的攻击。示出了出现可触及肿瘤的小鼠数量。(B)图5显示了中治疗期间小鼠的体重变化(均值±SEM)。线代表初始体重的85%。实验重复两次。

## 具体实施方式

[0063] 由于小分子抗癌药物广泛分布于组织并引起全身副作用,因此已经尝试对药物进行修饰以改善其药代动力学和生物分布。主动靶向肿瘤特异性或肿瘤相关抗原用于药物递送是一种治疗策略。然而,这在本质上限制了癌症的适用范围,并且还可能由于抗原选择性细胞靶向和杀伤而导致获得性耐药,该抗原可能因突变而丢失。在这里,发明人设计了CBD-SA(胶原结合结构域-血清白蛋白)来克服这些问题。与其他主动靶向策略不同,CBD-SA不需要事先研究肿瘤相关抗原的表达情况,因为胶原在肿瘤中几乎无处不在,并且CBD通过肿瘤微环境中的异常血管结构进入肿瘤基质。随后,CBD-SA与暴露的胶原结合,并将肿瘤基质转化为化疗药物的储存库。

[0064] 心脏毒性是Dox的主要缺点,它限制了Dox的终生累积剂量。出人意料的是,发现即

使20mg/kg的Dox-CBD-SA施用也没有表现出任何心脏损伤的迹象。这表明与CBD-SA预缀合的Dox比游离Dox的心脏毒性更低,后者在小鼠模型中以15mg/kg的累积剂量对心脏组织造成不可逆转的损害。重要的是,15mg/kg的累积剂量几乎相当于人类的最大累积剂量。缀合物的疗效和非特异性毒性有些令人惊讶和出乎意料,因为人们可能假设CBD-SA可能会积聚在身体中不合需要的部位,如肝脏、肾脏和伤口,在这些部位,胶原可能会通过有孔或渗漏的内皮暴露出来。然而,在施用20mg/kg Dox-CBD-SA后发明人没有观察到肝脏和肾脏的病理损伤。因此,本公开描述了一种将细胞毒剂靶向肿瘤环境的新策略。

[0065] I. 靶向多肽

[0066] A. 胶原结合结构域

[0067] 血管性血友病因子(vWF)是一种凝血因子,可与I型和III型胶原以及血小板上的黏附受体GPIb结合。当受伤时,内皮细胞下方的胶原暴露于血浆中,vWF与胶原的结合会引发血栓形成级联反应。在报道的非细菌来源蛋白质/肽中,vWF A结构域对胶原的亲合力最高。

[0068] 在一些实施方案中,多肽包含来自饰胶蛋白聚糖的胶原结合结构域。在一些实施方案中,胶原结合结构域包含饰胶蛋白聚糖肽,例如源自牛的LRELHLNNC (SEQ ID NO:11)或源自人的LRELHLDNNC (SEQ ID NO:12)。

[0069] 在一些实施方案中,胶原结合结构域包含来自人饰胶蛋白聚糖的肽片段,其由以下氨基酸序列表示:

CGPFQQRGLDFDFMLEDEASGIGPEVPDDRDFEPSLGPVCPFRCQCHLRVVQCSDLGL  
DKVPKDLPPDTLLDLQNNKITEIKDGDGFKNLKLNHALILVNNKISKVSPGAFTPLVK  
LERLYLSKNQLKELPEKMPKTLQELRAHENEITKVRKVTFNGLNQMIVIELGTNPLKS  
[0070] SGIENGAFAQGMKKLSYIRIADTNITSIPQGLPPSLTELHLDGNKISRVDAAASLKGLNNL  
AKLGLSFNSISAVDNGSLANTPHLRELHLDNNKLTRVPGGLAEHKYIQVVYLHNNNI  
SVVGSSDFCPPGHNTKKA SYSGVSLFSNPVQYWEIQPSTFRCVYVRS AIQLGNYK  
(SEQ ID NO:13)。

[0071] 在一些实施方案中,胶原结合肽是来自血管性血友病因子(vWF)的肽。人类vWF的序列包含:

MIPARFAGVLLALALILPGTLC AEGTRGRSSTARCSLFGSDFVNTFDGSMYSFAGYCS  
YLLAGGCQKRSFSIIGDFQNGKRVSLSVYLGEFFDIHLFVNGT VTQGDQRV SMPYAS  
KGLYLETEAGYYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQVLLSDRYFNKTCGLCGNFNIFAEDD  
FMTQEGTLTSDPYDFANSWALSSGEQWCERASPPSSSCNISSGEMQKGLWEQCQLL  
KSTSVFARCHPLVDPEPFVALCEKTLCECAGGLECACPALLEYARTCAQEGMVLYG  
WTDHSACSPVCPAGMEYRQCVSPCARTCQSLHINEMCQERCVDGCSCPEGQLLDEG  
LCVESTECPCVHSGKRYPPGTSLSRDCNTCICRNSQWICSNEECPGECLVTGQSHFKS  
FDNRYFTFSGICQYLLARDCQDHSFSIVIETVQCADDRDAVCTRSVTVRLPGLHNSLV  
KLKHGAGVAMDGQDVQLPLLKGD LRIQHTVTASVRLSYGEDLQMDWDGRGRLLV  
KLSPVYAGKTCGLCGNYNGNQGD DFLTPSGLAEP RVEDFGNAWKLHGDCQDLQKQ  
HSDPCALNPRMTRFSEEACA VLTSP TFEACHRAVSPLPYLRNCRYDVCSCSDGRECL  
CGALASYAAACAGRGVRVAWREPGRCELNCPKGQVYLQCGTPCNLTCSRSLSPDE  
ECNEACLEGCFCPPGLYMDERGD CVPKAQCPCYYDGEIFQPEDIFSDHHTMCYCEDG  
[0072] FMHCTMSGVPGSLLPDAVLSSPLSHRSKRSLSCRPPMVKLVCPADNLRAEGLECTKT  
CQNYDLECMMSGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHQKEYAPGETVKIGC  
NTCVCRDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGECQYVLVQDYCGSN  
PGTFRILVGNKGC SHPSVKCKKRV TILVEGGEIELFDGEVNVKRPMKDETHFEVVES  
GRYIILLGKALS VVWDRHLSISVVLKQTYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVE  
EDPVDFGNSWKVSSQCADTRK VPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRILTSDVFQDC  
NKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQH GKVV TWRTATLCPQ  
SCEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKILD  
ELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCEACQEPG  
GLVVPPTDAPVSP TTYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFV  
VDMMERLRISQKWVRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSSELRRIASQVKYAGSQVA  
STSEVLKYTLFQIFSKIDRPEASRITLLLMASQEPQRMSRNFVRYVQGLKKKKVIVIPV  
GIGPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLSSVDELEQQRDEIVSYLCDLAPEAPPPTLPPDM  
AQVTVGPGLLG VSTLGPKRNSMVL DVAFVLEGS DKIGEADFNRSKEFMEEVIQRMD

VGQDSIHVTVLQYSYMTVEYPFSEAQSKGDILQRVREIRYQGGNRTNTGLALRYLS  
 DHSFLVSQGDREQAPNLVYMVTGNPASDEIKRLPGDIQVVPVIGVGNANVQELERIG  
 WPNAPILIQDFETLPREAPDLVLQRCCSGEGLQIPTLSPAPDCSQPLDVILLLDGSSSFP  
 ASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQVSVLQYGSITTIDVPWNVPEKAHLLSLVDV  
 MQREGGPSQIGDALGFAVRYLTSEMHGARGASKAVVILVTDVSVDSVDAADAA  
 RSNRVTVFPIGIGDRYDAAQLRILAGPAGDSNVVKLQRIEDLPTMVTLGNSFLHKLCS  
 GFVVICMDEDGNEKRPDGVWTLPDQCHTVTCQPDGQTLKSHRVNCDRGLRSPCPN  
 SQSPVKVEETCGCRWTCPCVCTGSSTRHIVTFDGQNFKLTGSCSYVLFQNKEDLEV  
 ILHNGACSPGARQGCMSIEVKHSALSVELHSDMEVTVNGRLVSPVYVGGNMEVN  
 VYGAIMHEVRFNHLGHIFTFTPQNEFQLQLSPKTFASKTYGLCGICDENGANDFML  
 RDGTVTTDWKTLVQEWTVQRPGQTCQPILEEQCLVPDSSHQVLLLPLFAECHKVL  
 [0073] APATFYAICQQDSCHQEQQVCEVIASIAHLCRTNGVCVDWRTPDFCAMSPPSLVYN  
 HCEHGCPRHCDGNVSSCGDHPSEGCFPPDKVMLEGSCVPEEACTQCIGEDGVQHQ  
 FLEAWVPDHQPCQICTCLSGRKNCTTQPCPTAKAPTCLCEVARLRQNADQCCPE  
 YECVCDPVSCDLPPVPHCERGLQPTLTNPGECPNFTCACRKEECKRVSPSPCPHRL  
 PTLRKTQCCDEYECACNCVNSTVSCPLGYLASTATNDCGCTTTTCLPDKVCVHRSTI  
 YPVGQFWEEGCDVCTCTDMEDAVMGLRVAQCSQKPCEDSCRSFTYVLHEGECCG  
 RCLPSACEVVTGSPRGDSQSSWKSQVSWASPENPCLINECVRVKEEVFIQQRNVSC  
 PQLEVPVCPSPGFQLSCKTSACCPSCRCERMEACMLNGTVIGPGKTVMIDVCTTCRCM  
 VQVGVISGFKLECRKTTNCPPLGYKEENNTGECCGRCLPTACTIQLRGGQIMTLKR  
 DETLQDGDTHFCKVNERGEYFWEKRVGTGPPFDEHKCLAEGGKIMKIPGTCCDTC  
 EEPECNDITARLQYVKVGSKSEVEVDIHYCQGKASKAMYSIDINDVQDQCSCCSP  
 TRTEPMQVALHCTNGSVVYHEVLNAMECKCSPRKCSK (SEQ ID NO:4)。

[0074] 在一些实施方案中,肽来自vWF A3结构域。VWF A3结构域源自人类序列,残基1670至1874(成熟VWF的907至1111),并具有以下序列:

CSGEGGLQIPTLSPAPDCSQPLDVILLLDGSSSFPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQ  
 VSVLQYGSITTIDVPWNVPEKAHLLSLVDVMQREGGPSQIGDALGFAVRYLTSEM  
 HARGASKAVVILVTDVSVDSVDAADAAARSNRVTVFPIGIGDRYDAAQLRILAGPA  
 GDSNVVKLQRIEDLPTMVTLGNSFLHKLCSG (SEQ ID NO:1)。

[0075] 在一些实施方案中,ECM-肽包含vWF A3的全部或片段,其由以下氨基酸序列表示:

CSQPLDVILLLDGSSSFPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQVSVLQYGSITTIDVP  
 [0076] WNVVPEKAHLLSLVDVMQREGGPSQIGDALGFAVRYLTSEMHGARGASKAVVILV  
 TDVSVDSVDAADAAARSNRVTVFPIGIGDRYDAAQLRILAGPAGDSNVVKLQRIEDL  
 PTMVTLGNSFLHKLCSGFVRICTG (SEQ ID NO:14)。

[0077] 在一些实施方案中,胶原结合结构域包含具有以下序列的多肽:

[0078] CSQPLDVILLDDGSSSPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQVSVLQYGSITTIDVP  
WNVPEKAHLLSLVDVMQREGGPSQIGDALGFAVRYLTSEMHGARGPGASKAVVILV  
TDVSVDSVDAADAARSNRVTVPFIGIDRYDAAQLRILAGPAGDSNVVKLQRIEDL  
PTMVTLGNSFLHKLCSGFVRI (SEQ ID NO:2)

[0079] 在一些实施方案中,多肽包含具有以下序列的胶原结合结构域白蛋白多肽:

[0080] CSQPLDVILLDDGSSSPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQVSVLQYGSITTIDVP  
WNVPEKAHLLSLVDVMQREGGPSQIGDALGFAVRYLTSEMHGARGPGASKAVVILV  
TDVSVDSVDAADAARSNRVTVPFIGIDRYDAAQLRILAGPAGDSNVVKLQRIEDL  
PTMVTLGNSFLHKLCSGFVRI  
GGGSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFGLVLIASF  
QYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENY  
GELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHE  
VARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQR  
MKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLEC  
ADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADF  
VEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEAN  
PPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPT  
LVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSG  
SLVERRPCFSALTVEDETYVPKEFKAETFTFHSICTLPEKEKQIKKQTALAEVKKHP  
KATAEQLKTVMDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAHHHHHH  
(SEQ ID NO:3)

[0081] 典型的肽包括SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:11至SEQ ID NO:14中任一个的全部或部分。胶原结合结构域可以是与本公开的多肽,例如与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:11至SEQ ID NO:14具有75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性(或其中可推导出的任何范围)的多肽。

[0082] B. 连接子

[0083] 多肽中可以包括连接子序列。例如,具有至少、至多或恰好3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个或多于100个氨基酸(或其中的任何可推导范围)的连接子可以将抗体与肽分开。

[0084] 在一些实施方案中,白蛋白多肽、IgG Fc结构域多肽、胶原结合结构域和/或细胞毒剂共价连接。例如,细胞毒剂可以与胶原结合结构域共价连接。在一些实施方案中,细胞毒剂与白蛋白多肽共价连接。在一些实施方案中,细胞毒剂与IgG Fc结构域多肽共价连接。

在一些实施方案中,连接子位于细胞毒剂和胶原结合结构域或白蛋白多肽之间。在一些实施方案中,连接子位于细胞毒剂和胶原结合结构域或IgG Fc结构域多肽之间。在一些实施方案中,白蛋白多肽与胶原结构域共价连接。在一些实施方案中,IgG Fc结构域多肽与胶原结构域共价连接。在一些实施方案中,连接子位于白蛋白多肽和胶原结合结构域之间。在一些实施方案中,连接子位于IgG Fc结构域多肽和胶原结合结构域之间。在一些实施方案中,连接子包括双官能连接子。可以在肽和/或抗体序列之间插入例如氨基酸或肽模拟物序列的连接子。连接子可以具有一个或多个特性,包括灵活的构象、无法形成有序的二级结构或疏水或带电的特性,这些特性可以促进或与任一结构域相互作用。通常在柔性蛋白质区域中发现的氨基酸的实例可以包括Gly、Asn和Ser。例如,合适的肽连接子可以是GGGSGGGS(SEQ ID NO:5)或(GGGS)<sub>n</sub>(SEQ ID NO:6),其中n=1、2、3、4、5、6、7、8、9或10(或其中可推导出的任何范围)。其他接近中性的氨基酸,例如Thr和Ala,也可用于连接子序列中。连接子序列的长度可以在不显著影响融合蛋白的功能或活性的情况下变化(参见,例如,美国专利第6087329号)。在一个特定方面,连接子可以是至少、至多或正好是4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个或100个氨基酸残基(或其中可推导出的任何范围)。连接子的实施例还可以包括化学部分和缀合剂,例如磺基-琥珀酰亚胺衍生物(磺基-SMCC、磺基-SMPB)、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)、戊二酸二琥珀酰亚胺酯(DSG)和酒石酸二琥珀酰亚胺酯(DST)。连接子的实施例还包括线性碳链,例如C<sub>N</sub>(其中N=1个至100个碳原子)。在一些实施方案中,连接子可以是二肽连接子,例如缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)、苯丙氨酸-赖氨酸(phe-lys)连接子或马来酰亚胺己酸-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(vc)连接子。在一些实施方案中,连接子是磺基琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧酸酯(smcc)。磺基-smcc的缀合通过与巯基(硫醇,-SH)反应的马来酰亚胺基团发生,而其磺基-NHS酯与伯胺(如在赖氨酸和蛋白质或肽的N-末端所见)反应。此外,连接子可以是马来酰亚胺己酰基(mc)。在一些实施方案中,共价键可通过使用Traut试剂实现。

#### [0085] C. 白蛋白

[0086] 在一些实施方案中,白蛋白多肽来自小鼠。在一些实施方案中,白蛋白多肽来自人类。

[0087] 在一些实施方案中,白蛋白多肽可包含与具有以下序列的多肽具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性(或其中可推导出的任何范围)的多肽或片段:

MKWVTFISLLFLFSSAYSRRGVFRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQ  
 CPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMAD  
 CCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARR  
 HPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCA  
 SLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDR  
 [0088] ADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDV  
 CKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLRRLAKTYKTTLEKCCAAADPHECY  
 AKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVS  
 RNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVN  
 RRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATK  
 EQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASRAALGL (SEQ ID NO:7)。

[0089] 在一些实施方案中,白蛋白多肽可以包含与具有以下序列的多肽具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性(或其中可推导出的任何范围)的多肽或片段:

EAHKSEIAHRYNDLGEQHFGLVLIQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVAD  
 ESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLP  
 PFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYAEQYNEILTQCCA  
 EADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPN  
 ADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKD  
 [0090] PLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRR  
 HPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDL  
 YEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVED  
 YLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTF  
 HSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFAQFLDTCKAADKD  
 TCFSTEGPNLVTRCKDALA (SEQ ID NO:8)。

[0091] 在一些实施方案中,白蛋白多肽可包含与具有以下序列的多肽具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性(或其中可推导出的任何范围)的多肽或片段:

MKWVTFLLLLFVSGSAFSGVFRREAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQK  
 CSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELAD  
 CCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRH  
 PYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSS  
 MQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLCADDR  
 [0092] AELAKYMCENQATISSKLQTCDDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQ  
 EVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPAC  
 YGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEA  
 ARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVE  
 RRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATA  
 EQLKTVMDDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALA (SEQ ID NO:9)。

[0093] 在一些实施方案中,白蛋白多肽可包含与具有以下序列的多肽具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性(或其中可推导出的任何范围)的多肽或片段:

DAHKSEVAHRFKDLGEEFNKALVLIAFQYLQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD  
 ESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL  
 PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTECC  
 QAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFP  
 KAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLCADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK  
 [0094] PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARR  
 HPDYSVLLLRALAKTYKTTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLE  
 FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAE  
 DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF  
 TFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDDFAAFVEKCKADD  
 KETCFAEEGKKLVAASRAALG (SEQ ID NO:10)。

[0095] D. 来自人IgG的Fc结构域

[0096] 与白蛋白类似,来自人IgG的Fc结构域用于延长药物半衰期,因为Fc结构域也与白蛋白一样具有细胞再循环系统。在一些实施方案中,白蛋白多肽来自人类。

[0097] 在一些实施方案中,hIgG1 Fc多肽可以包含与具有以下序列(IGHG1,99至330)的多肽具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性(或其中可推导出的任何范围)的多肽或片段:

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA  
[0098] LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG  
QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNHYTQKSL  
SLSPGK (SEQ ID NO:15)。

[0099] 在一些实施方案中, hIgG2 Fc多肽可以包含与具有以下序列 (IGHG2, 99至326) 的多肽具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性(或其中可推导出的任何范围)的多肽或片段:

YVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI  
[0100] EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
NYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK (SEQ ID NO:16)。

[0101] 在一些实施方案中, hIgG3 Fc多肽可包含与具有以下序列 (IGHG3, 99至376) 的多肽具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性(或其中可推导出的任何范围)的多肽或片段:

ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPR  
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVH  
[0102] NAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKG  
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPML  
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNRFYQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:  
17)。

[0103] 在一些实施方案中, hIgG4 Fc多肽可以包含与具有以下序列 (IGHG4, 99至327) 的多肽具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性(或其中可推导出的任何范围)的多肽或片段:

ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS  
[0104] IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
NYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVDFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSL  
GK (SEQ ID NO:18)。

[0105] II. 细胞毒剂

[0106] 本公开的实施方案涉及与细胞毒剂连接的白蛋白-胶原结合结构域缀合物。本公开的实施方案涉及与细胞毒剂连接的IgG Fc结构域-胶原结合结构域缀合物。细胞毒剂包括酶抑制剂, 例如二氢叶酸还原酶抑制剂和胸苷酸合酶抑制剂、DNA嵌入剂、DNA切割剂、拓扑异构酶抑制剂、蒽环类药物、长春花药物、丝裂霉素、博来霉素、细胞毒性核苷、蝶啶类药

物、二炔类、鬼臼毒素、海兔毒素、美登木素生物碱、分化诱导剂和紫杉醇。

[0107] 这些类别的成员包括,例如,紫杉醇、氨蝶呤、甲氨蝶呤、二氯甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、阿糖胞苷、美法仑、环氧长春碱、白诺西丁、放线菌素、柔红霉素、阿霉素、丝裂霉素C、丝裂霉素A、洋红霉素、氨基蝶呤、塔利霉素、鬼臼毒素和鬼臼毒素衍生物如依托泊苷或磷酸依托泊苷、长春花碱、长春新碱、长春地辛、紫杉烷类包括紫杉醇、紫杉酚视黄酸、丁酸、N8-乙酰亚精胺、喜树碱、加利车霉素、埃斯培拉霉素、烯二炔、倍癌霉素A、倍癌霉素SA、加利车霉素、喜树碱、哈密特林、美登素类(包括DM1)、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞他汀F(MMAF)和美登木素生物碱(DM4)及其类似物。

[0108] 细胞毒剂还包括细菌毒素例如白喉毒素、植物毒素例如蓖麻毒、小分子毒素例如格尔德霉素、美登木素生物碱和加利车霉素、哈密特林。毒素可通过微管蛋白结合、DNA结合或拓扑异构酶抑制等机制发挥其细胞毒性和细胞抑制作用。

[0109] 也可以使用细胞毒剂,例如美登木素生物碱、海兔毒素、澳瑞他汀、单端孢霉烯、加利车霉素和CC1065,以及具有毒素活性的这些毒素的衍生物。其他细胞毒剂包括BCNU、链脲佐菌素、长春新碱和5-氟尿嘧啶,在美国专利第5053394号、第5770710号中描述的统称为LL-E33288复合物的试剂家族,以及esperamicins(美国专利第5877296号)。可以使用的酶促活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒蛋白A链、相思豆蛋白A链、蒴莲根毒蛋白A链、 $\alpha$ -帚曲毒蛋白、油桐蛋白、香石竹毒蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、姜黄素、巴豆素、皂草抑制剂、多花白树毒蛋白、丝裂蛋白、局限曲菌素、苯霉素、依诺霉素和单端孢霉烯族化合物。参见,例如,1993年10月28日公布的WO 93/21232。在一些实施方案中,细胞毒剂包括本文所述的化疗剂。

[0110] III. 另外的疗法

[0111] A. 免疫疗法

[0112] 在一些实施方案中,该方法包括施用癌症免疫疗法。癌症免疫疗法(有时称为免疫肿瘤学,缩写为IO)是利用免疫系统来治疗癌症。免疫疗法可分为主动、被动或混合(主动和被动)。这些方法利用了这样一个事实,即癌细胞表面通常有可以被免疫系统检测到的分子,称为肿瘤相关抗原(TAA);它们通常是蛋白质或其他大分子(例如碳水化合物)。主动免疫疗法通过靶向TAA来引导免疫系统攻击肿瘤细胞。被动免疫疗法可增强现有的抗肿瘤反应,包括使用单克隆抗体、淋巴细胞和细胞因子。可用于本公开的方法的免疫疗法描述如下。

[0113] 1. 检查点抑制剂和联合治疗

[0114] 本公开的实施方案可以包括免疫检查点抑制剂的施用(也称为检查点抑制剂疗法),其在下文进一步描述。

[0115] a. PD-1、PD-L1和PD-L2抑制剂

[0116] PD-1可以在T细胞遇到感染或肿瘤的肿瘤微环境中起作用。活化的T细胞上调PD-1并继续在外周组织中表达。细胞因子如IFN- $\gamma$ 诱导PD-L1在上皮细胞和肿瘤细胞上的表达。PD-L2在巨噬细胞和树突细胞上表达。PD-1的主要作用是限制外周效应T细胞的活性,防止免疫反应过程中对组织的过度损伤。本公开的抑制剂可以阻断PD-1和/或PD-L1活性的一种或多种功能。

[0117] “PD-1”的替代名称包括CD279和SLEB2。“PD-L1”的替代名称包括B7-H1、B7-4、CD274和B7-H。“PD-L2”的替代名称包括B7-DC、B7-1和CD273。在一些实施方案中,PD-1、PD-L1和PD-L2是人PD-1、PD-L1和PD-L2。

[0118] 在一些实施方案中,PD-1抑制剂是抑制PD-1与其配体结合配偶体结合的分子。在一个特定方面,PD-1配体结合配偶体是PD-L1和/或PD-L2。在另一个实施方案中,PD-L1抑制剂是抑制PD-L1与其结合配偶体结合的分子。在具体方面,PD-L1结合配偶体是PD-1和/或B7-1。在另一个实施方案中,PD-L2抑制剂是抑制PD-L2与其结合配偶体结合的分子。在具体方面,PD-L2结合配偶体是PD-1。抑制剂可以是抗体、其抗原结合片段、免疫黏附素、融合蛋白或寡肽。典型的抗体在美国专利第8735553号、第8354509号和第8008449号中有所描述,均通过引用并入本文。用于本文提供的方法和组合物中的其他PD-1抑制剂是本领域公知的,例如在美国专利申请第US2014/0294898号、第US2014/022021号和第US2011/0008369号中有所描述,均通过引用并入本文。

[0119] 在一些实施方案中,PD-1抑制剂是抗PD-1抗体(例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)。在一些实施方案中,抗PD-1抗体选自纳武单抗、帕博利珠单抗和匹地利珠单抗。在一些实施方案中,PD-1抑制剂是免疫黏附素(例如,包含融合到恒定区(例如免疫球蛋白序列的Fc区)的PD-L1或PD-L2的细胞外或PD-1结合部分的免疫黏附素)。在一些实施方案中,PD-L1抑制剂包含AMP-224。纳武单抗,也称为MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558和**OPDIVO®**,是W02006/121168中描述的抗PD-1抗体。派姆单抗,也称为MK-3475、Merck 3475、兰博利珠单抗、**KEYTRUDA®**和SCH-900475,是W02009/114335中描述的抗PD-1抗体。匹地利珠单抗,也称为CT-011、hBAT或hBAT-1,是W02009/101611中描述的抗PD-1抗体。AMP-224,也称为B7-DCIg,是W02010/027827和W02011/066342中描述的PD-L2-Fc融合可溶性受体。其他PD-1抑制剂包括MEDI0680(也称为AMP-514)和REGN2810。

[0120] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是PD-L1抑制剂,例如德瓦鲁单抗也称为MEDI4736,阿特朱单抗也称为MPDL3280A,阿维鲁单抗也称为MSB00010118C,MDX-1105,BMS-936559,或其组合。在某些方面,免疫检查点抑制剂是PD-L2抑制剂,例如rHIgM12B7。

[0121] 在一些实施方案中,抑制剂包含纳武单抗、帕博利珠单抗或匹地利珠单抗的重链和轻链CDR或VR。因此,在一个实施方案中,抑制剂包含纳武单抗、帕博利珠单抗或匹地利珠单抗的VH区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及纳武单抗、帕博利珠单抗或匹地利珠单抗的VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中,该抗体与上述抗体竞争结合和/或结合PD-1、PD-L1或PD-L2上的相同表位。在另一个实施方案中,该抗体与上述抗体具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或99%(或其中可推导出的任何范围)的可变区氨基酸序列同一性。

[0122] b. CTLA-4、B7-1和B7-2

[0123] 可以在本文提供的方法中靶向的另一个免疫检查点是细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4),也称为CD152。人CTLA-4的完整cDNA序列的基因库登录号为L15006。CTLA-4存在于T细胞表面,当与抗原呈递细胞表面的B7-1(CD80)或B7-2(CD86)结合时充当“关闭”开关。CTLA-4是免疫球蛋白超家族的成员,在辅助T细胞表面表达,并向T细胞传递抑制信号。CTLA-4类似于T细胞共刺激蛋白CD28,两种分子都与抗原呈递细胞上的B7-1和B7-2结合。CTLA-4向T细胞传递抑制信号,而CD28则传递刺激信号。细胞内CTLA-4也存在于调节性T细

胞中,可能对其功能很重要。通过T细胞受体和CD28激活T细胞会导致CTLA-4(一种B7分子的抑制性受体)的表达增加。本公开的抑制剂可以阻断CTLA-4、B7-1和/或B7-2活性的一种或多种功能。在一些实施方案中,抑制剂阻断CTLA-4和B7-1相互作用。在一些实施方案中,抑制剂阻断CTLA-4和B7-2相互作用。

[0124] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗CTLA-4抗体(例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)、其抗原结合片段、免疫黏附素、融合蛋白或寡肽。

[0125] 适用于本方法的抗人CTLA-4抗体(或从其衍生的VH和/或VL结构域)可以使用本领域公知的方法产生。或者,可以使用本领域公知的抗CTLA-4抗体。例如,抗CTLA-4抗体公开于:US 8119129、WO 01/14424、WO 98/42752;WO 00/37504(CP675206,也称为曲美木单抗;以前称为替西木单抗),美国专利第6207156号;Hurwitz等人,1998;可用于本文公开的方法中。上述每个公布专利的教导在此通过引用并入。也可以使用与任何这些本领域公知的抗体竞争结合CTLA-4的抗体。例如,人源化CTLA-4抗体描述于国际专利申请第W02001/014424号、第W02000/037504号和美国专利第8017114号中;所有内容通过引用并入本文。

[0126] 在本公开的方法和组合物中用作检查点抑制剂的另一种抗CTLA-4抗体是易普利姆玛(也称为10D1、MDX-010、MDX-101和Yervoy®)或其抗原结合片段和变体(参见,例如,WO 01/14424)。

[0127] 在一些实施方案中,抑制剂包含替西木单抗或易普利姆玛的重链和轻链CDR或VR。因此,在一个实施方案中,抑制剂包含替西木单抗或易普利姆玛的VH区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及替西木单抗或易普利姆玛的VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中,该抗体与上述抗体竞争结合和/或结合PD-1、B7-1或B7-2上的相同表位。在另一个实施方案中,该抗体与上述抗体具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或99%(或其中可推导出的任何范围)的可变区氨基酸序列同一性。

[0128] 2. 抑制共刺激分子

[0129] 在一些实施方案中,免疫疗法包含共刺激分子的抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂包括B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD28、ICOS、OX40(TNFRSF4)、4-1BB(CD137;TNFRSF9)、CD40L(CD40LG)、GITR(TNFRSF18)的抑制剂及其组合。抑制剂包括抑制性抗体、多肽、化合物和核酸。

[0130] 3. 树突状细胞疗法

[0131] 树突细胞疗法通过使树突细胞将肿瘤抗原呈递给淋巴细胞来激发抗肿瘤反应,淋巴细胞会激活树突状细胞,促使它们杀死其他呈递抗原的细胞。树突状细胞是哺乳动物免疫系统中的抗原呈递细胞(APC)。在癌症治疗中,它们有助于癌症抗原靶向。基于树突细胞的细胞癌症疗法的一个实施例是sipuleucel-T。

[0132] 诱导树突状细胞呈递肿瘤抗原的一种方法是用自体肿瘤裂解物或短肽(与癌细胞上的蛋白质抗原相对应的蛋白质的小部分)接种疫苗。这些肽通常与佐剂(高免疫原性物质)结合使用,以增加免疫和抗肿瘤反应。其他佐剂包括吸引和/或激活树突细胞的蛋白质或其他化学物质,例如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。

[0133] 树突状细胞也可以通过使肿瘤细胞表达GM-CSF来在体内激活。这可以通过基因工程肿瘤细胞产生GM-CSF或用表达GM-CSF的溶瘤病毒感染肿瘤细胞来实现。

[0134] 另一种策略是从患者的血液中除去树突细胞并在体外激活它们。树突细胞在肿瘤

抗原存在时被激活,肿瘤抗原可以是单个肿瘤特异性肽/蛋白质或肿瘤细胞裂解物(分解的肿瘤细胞的溶液)。这些细胞(带有可选的佐剂)被注入并引发免疫反应。

[0135] 树突细胞疗法包括使用与树突细胞表面受体结合的抗体。可以将抗原添加到抗体中,并可以诱导树突细胞成熟并提供对肿瘤的免疫力。

#### [0136] 4. CAR-T细胞疗法

[0137] 嵌合抗原受体(CAR,也称为嵌合免疫受体、嵌合T细胞受体或人工T细胞受体)是一种工程化受体,可将新的特异性与免疫细胞结合以靶向癌细胞。通常,这些受体将单克隆抗体的特异性移植到T细胞上。这些受体被称为嵌合体,因为它们由来自不同来源的部分融合而成。CAR-T细胞疗法是指使用这种转化细胞进行癌症治疗的治疗方法。

[0138] CAR-T细胞设计的基本原理涉及结合抗原结合和T细胞激活功能的重组受体。CAR-T细胞的基本前提是人工生成针对癌细胞标志物的T细胞。科学家可以从一个人身上取出T细胞,对它们进行基因改造,然后将它们放回患者体内,让它们攻击癌细胞。一旦T细胞被设计成CAR-T细胞,它就会充当“活的药物”。CAR-T细胞在细胞外配体识别结构域与细胞内信号分子之间建立联系,细胞内信号分子反过来激活T细胞。细胞外配体识别结构域通常是单链可变片段(scFv)。CAR-T细胞疗法安全性的一个重要方面是如何确保只有癌性肿瘤细胞被靶向,而不是正常细胞。CAR-T细胞的特异性取决于靶向分子的选择。

[0139] 典型的CAR-T疗法包括Tisagenlecleucel (Kymriah) 和Axicabtagene ciloleucel (Yescarta)。在一些实施方案中,CAR-T疗法靶向CD19。

#### [0140] 5. 细胞因子疗法

[0141] 细胞因子是由存在于肿瘤内的多种细胞产生的蛋白质。它们可以调节免疫反应。肿瘤经常利用它们来使其生长并降低免疫反应。这些免疫调节作用使它们可被用作激发免疫反应的药物。两种常用的细胞因子是干扰素和白细胞介素。

[0142] 干扰素是由免疫系统产生的。它们通常参与抗病毒反应,但也可用于治疗癌症。它们分为三种类型:I型(IFN $\alpha$ 和IFN $\beta$ )、II型(IFN $\gamma$ )和III型(IFN $\lambda$ )。

[0143] 白细胞介素对免疫系统有一定的影响。IL-2是典型的白细胞介素细胞因子疗法。

#### [0144] 6. 过继性T细胞疗法

[0145] 过继T细胞疗法是一种通过输注T细胞(过继细胞转移)进行被动免疫的形式。它们存在于血液和组织中,通常在发现外来病原体时激活。具体来说,当T细胞的表面受体遇到在其表面抗原上展示部分外来蛋白质的细胞时,它们就会激活。这些细胞可以是受感染的细胞,也可以是抗原呈递细胞(APC)。它们存在于正常组织和肿瘤组织中,在那里它们被称为肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。它们被APC激活,例如呈递肿瘤抗原的树突细胞。尽管这些细胞可以攻击肿瘤,但肿瘤内的环境具有高度的免疫抑制性,可防止免疫介导的肿瘤死亡。

[0146] 已经开发了多种产生和获取肿瘤靶向T细胞的方法。对肿瘤抗原特异的T细胞可以从肿瘤样本(TIL)中除去或从血液中过滤。随后在体外进行活化和孵育,结果重新输注。激活可以通过基因治疗或通过将T细胞暴露于肿瘤抗原。

[0147] 考虑到癌症治疗可排除本文所述的任何癌症治疗。此外,本公开的实施方案包括先前已经接受过本文所述疗法治疗的患者、当前正在接受本文所述疗法治疗或尚未接受本文所述疗法治疗的患者。在一些实施方案中,患者是已被确定对本文所述的疗法具有抗药

性的患者。在一些实施方案中,患者是已被确定对本文描述的疗法敏感的患者。

#### [0148] B. 溶瘤病毒

[0149] 在一些实施方案中,另外的疗法包括溶瘤病毒。溶瘤病毒是一种优先感染和杀死癌细胞的病毒。当被感染的癌细胞被溶瘤作用破坏时,它们会释放新的传染性病毒颗粒或病毒粒子来帮助破坏剩余的肿瘤。溶瘤病毒被认为不仅会直接破坏肿瘤细胞,还会刺激宿主的抗肿瘤免疫反应以进行长期免疫治疗。

#### [0150] C. 多糖

[0151] 在一些实施方案中,另外的疗法包括多糖。在蘑菇中发现的某些化合物,主要是多糖,可以上调免疫系统并可能具有抗癌特性。例如, $\beta$ -葡聚糖如香菇多糖已在实验室研究中显示可刺激巨噬细胞、NK细胞、T细胞和免疫系统细胞因子,并已在临床试验中作为免疫佐剂进行研究。

#### [0152] D. 新抗原

[0153] 在一些实施方案中,另外的疗法包括新抗原的施用。许多肿瘤表达突变。这些突变可能会产生新的可靶向抗原(新抗原),用于T细胞免疫疗法。使用RNA测序数据确定的癌症病变中CD8<sup>+</sup>T细胞的存在,在具有高突变负荷的肿瘤中更高。在许多人类肿瘤中,与自然杀伤细胞和T细胞的细胞溶解活性相关的转录水平与突变负荷呈正相关。

#### [0154] E. 化疗

[0155] 在一些实施方案中,另外的疗法包括化疗。合适化疗药物种类包括(a)烷基化剂,例如氮芥(例如,氯乙胺、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥)、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺(例如,六甲基三聚氰胺、噻替派)、烷基磺酸盐(例如,白消安)、亚硝基脲(例如,卡莫司汀、洛莫司汀、氯唑菌素、链脲佐菌素)和三嗪(例如达卡巴嗪),(b)抗代谢药,例如叶酸类似物(例如甲氨蝶呤)、嘧啶类似物(例如,5-氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、氮杂尿苷)和嘌呤类似物和相关材料(例如,6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、喷司他丁),(c)天然产物,例如长春花生物碱(例如,长春碱、长春新碱)、表鬼臼毒素(例如,依托泊苷、替尼泊苷)、抗生素(例如、更生霉素、柔红霉素、阿霉素、博来霉素、普卡霉素和米托蒽醌)、酶(例如,L-天冬酰胺酶)和生物反应调节剂(例如,干扰素- $\alpha$ ),和(d)其他药剂,例如铂配位复合物(例如顺铂、卡铂)、取代脲(例如羟基脲)、甲基乙二嗪衍生物(例如丙卡巴肼)和肾上腺皮质抑制剂(例如紫杉醇和米托坦)。在一些实施方案中,顺铂是特别合适的化学治疗剂。

[0156] 顺铂已广泛用于治疗癌症,例如转移性睾丸癌或卵巢癌、晚期膀胱癌、头颈癌、宫颈癌、肺癌或其他肿瘤。顺铂不能口服吸收,因此必须通过其他途径施用,例如静脉内、皮下、肿瘤内或腹腔注射。顺铂可单独使用或与其他药剂组合使用,临床应用中使用的有效剂量包括每三周约15mg/m<sup>2</sup>至约20mg/m<sup>2</sup>持续5天,在某些实施方案中预期总共三个疗程。在一些实施方案中,与包含可操作地连接至编码治疗性多肽的多核苷酸的Egr-1启动子的构建体一起递送至细胞和/或对象的顺铂的量小于单独使用顺铂时递送量。

[0157] 其他合适的化学治疗剂包括抗微管剂,例如紫杉醇和盐酸阿霉素。通过腺病毒载体和阿霉素递送的Egr-1启动子/TNF1构建体的组合被确定可以有效克服对化疗和/或TNF- $\alpha$ 的耐药性,这表明该构建体和阿霉素的联合治疗克服了对阿霉素和TNF- $\alpha$ 的耐药性。

[0158] 阿霉素吸收不良,优选静脉内施用。在某些实施方案中,成人的适当静脉内剂量包括约60mg/m<sup>2</sup>至约75mg/m<sup>2</sup>、间隔约21天,或约25mg/m<sup>2</sup>至约30mg/m<sup>2</sup>,连续2天或3天,以约3周

至约4周的间隔重复,或约20mg/m<sup>2</sup>,每周一次。当先前的化疗或肿瘤性骨髓浸润引起先前的骨髓抑制时,或与其他骨髓生成抑制药物联合使用时,老年患者应使用最低剂量。

[0159] 氮芥是可用于本公开的方法的另一种合适的化学治疗剂。氮芥可以包括但不限于甲氯胺酮(HN<sub>2</sub>)、环磷酰胺和/或异环磷酰胺、美法仑(L-肌溶素)和苯丁酸氮芥。环磷酰胺(CYTOXAN®可从Mead Johnson获得,NEOSTAR®可从Adria获得)是另一种合适的化学治疗剂。成人的合适口服剂量包括例如约1mg/kg/天至约5mg/kg/天,静脉内剂量包括例如在约2天至约5天的时间内分次服用约40mg/kg至约50mg/kg、或约每7天至约每10天约10mg/kg至约15mg/kg、或每周两次约3mg/kg至约5mg/kg、或约1.5mg/kg/天至约3mg/kg/天。由于胃肠道不良反应,优选静脉内途径。该药物有时也经肌内、渗透或进入体腔施用。

[0160] 另外的合适的化学治疗剂包括嘧啶类似物,例如阿糖胞苷(阿糖胞苷)、5-氟尿嘧啶(氟尿嘧啶;5-FU)和氟尿苷(氟脱氧尿苷;FudR)。5-FU可以以约7.5mg/m<sup>2</sup>至约1000mg/m<sup>2</sup>之间的任何剂量施用于对象。此外,5-FU施用方案可以针对多种时间段,例如最多六周,或者由本发明的普通技术人员确定。

[0161] 吉西他滨二磷酸(GEMZAR®,Eli Lilly&Co.,“吉西他滨”)是另一种合适的化学治疗剂,被推荐用于治疗晚期和转移性胰腺癌,因此也将在本发明公开的这些癌症中 useful。

[0162] 递送给患者的化学治疗剂的量可以是可变的。在一个合适的实施方案中,当化疗与构建体一起施用时,化学治疗剂的施用量可以有效引起宿主的癌症停止或消退。在其他实施方案中,化学治疗剂的施用量可以小于所述化疗药物的有效剂量的2倍至10000倍。例如,化疗药物的施用量可能比化疗药物的有效剂量少约20倍,少约500倍,甚至少约5000倍。可以在体内测试本公开的化学治疗剂与构建体组合的所需治疗活性,以及确定有效剂量。例如,此类化合物可以在人体测试之前在合适的动物模型系统中进行测试,包括但不限于大鼠、小鼠、鸡、牛、猴、兔等。体外测试也可用于确定合适的组合和剂量,如实施例所述。

[0163] F. 放疗

[0164] 在一些实施方案中,另外的疗法或先前疗法包括辐射,例如电离辐射。如本文所用,“电离辐射”是指包含具有足够能量或可通过核相互作用产生足够能量以产生电离(电子的获得或损失)的粒子或光子的辐射。典型的和优选的电离辐射是x辐射。向靶组织或细胞递送x辐射的方法是本领域公知的。

[0165] 在一些实施方案中,电离辐射的量大于20Gy并且以一次剂量施用。在一些实施方案中,电离辐射的量为18Gy并且以三次剂量施用。在一些实施方案中,电离辐射的量为至少、至多或恰好2Gy、4Gy、6Gy、8Gy、10Gy、15Gy、16Gy、17Gy、18Gy、19Gy、20Gy、21Gy、22Gy、23Gy、24Gy、25Gy、26Gy、27Gy、18Gy、19Gy、30Gy、31Gy、32Gy、33Gy、34Gy、35Gy、36Gy、37Gy、38Gy、39Gy、40Gy、41Gy、42Gy、43Gy、44Gy、45Gy、46Gy、47Gy、48Gy、49Gy、或40Gy(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,电离辐射施用至少、至多或恰好1剂、2剂、3剂、4剂、5剂、6剂、7剂、8剂、9剂或10剂(或其中可推导出的任何范围)。当施用多于一剂时,该剂量可以间隔约1小时、4小时、8小时、12小时或24小时或1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天或1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、12周、14周或16周,或其中可推导出的任何范围。

[0166] 在一些实施方案中,IR的量可以表示为IR的总剂量,然后以分次剂量施用。例如,

在一些实施方案中,总剂量为50Gy,分10次的分次剂量施用,每次5Gy。在一些实施方案中,总剂量为50Gy至90Gy,分20次至60次的分次剂量施用,各自每次2Gy至3Gy。在一些实施方案中,IR的总剂量为至少、至多或约20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、125、130、135、140或150(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,总剂量以至少、最多或恰好1Gy、2Gy、3Gy、4Gy、5Gy、6Gy、7Gy、8Gy、9Gy、10Gy、12Gy、14Gy、15Gy、20Gy、25Gy、30Gy、35Gy、40Gy、45Gy或50Gy(或其中可推导出的任何范围)的分次剂量施用。在一些实施方案中,施用至少、至多或恰好2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次、12次、13次、14次、15次、16次、17次、18次、19次、20次、21次、22次、23次、24次、25次、26次、27次、28次、29次、30次、31次、32次、33次、34次、35次、36次、37次、38次、39次、40、41次、42次、43次、44次、45次、46次、47次、48次、49次、50次、51次、52次、53次、54次、55次、56次、57次、58次、59次、60次、61次、62次、63次、64次、65次、66次、67次、68次、69次、70次、71次、72次、73次、74次、75次、76次、77次、78次、79次、80次、81次、82次、83次、84次、85次、86次、87次、88次、89次、90次、91次、92次、93次、94次、95次、96次、97次、98次、99次、或100次的分次剂量(或其中可推导出的任何范围)。在一些实施方案中,每天施用至少、至多或恰好1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次或12次(或其中可推导出的任何范围)的分次剂量。在一些实施方案中,每周施用至少、至多或恰好1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次、12次、13次、14次、15次、16次、17次、18次、19次、20次、21次、22次、23次、24次、25次、26次、27次、28次、29次或30次(或其中可推导出的任何范围)的分次剂量。

#### [0167] G. 手术

[0168] 大约60%的癌症患者将接受某种类型的手术,包括预防性、诊断性或分期、治愈性和姑息性手术。治愈性手术包括切除术,其中全部或部分癌组织被物理除去、切除和/或破坏并且可以与其他疗法结合使用,例如本实施方案的治疗、化疗、放疗、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或替代疗法。肿瘤切除是指物理切除肿瘤的至少一部分。除肿瘤切除外,手术治疗还包括激光手术、冷冻手术、电外科和显微控制手术(莫氏手术)。

[0169] 在切除部分或全部癌细胞、组织或肿瘤后,可以在体内形成空腔。治疗可以通过灌注、直接注射或局部应用其他抗癌疗法来完成。此类治疗可以重复进行,例如每1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天,或每1周、2周、3周、4周和5周或每1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或12个月。这些治疗也可以具有不同的剂量。

#### [0170] H. 其他药剂

[0171] 预期其他药剂可与本实施方案的某些方面组合使用以提高治疗的疗效。这些另外的药剂包括影响细胞表面受体和GAP连接的上调的药剂、细胞生长抑制剂和分化药剂、细胞黏附抑制剂、增加过度增殖细胞对凋亡诱导剂的敏感性的药剂或其他生物药剂。通过增加间隙连接的数量来增加细胞间信号传导会增加对邻近过度增殖细胞群的抗过度增殖作用。在其他实施方案中,细胞抑制剂或分化剂可与本实施方案的某些方面组合使用以提高治疗

的抗过度增殖疗效。预期细胞黏附抑制剂以提高本实施方案的疗效。细胞黏附抑制剂的实施例是黏着斑激酶 (FAK) 抑制剂和洛伐他汀。还预期增加过度增殖细胞对细胞凋亡的敏感性的其他药剂,例如抗体c225,可以与本实施方案的某些方面组合使用以提高治疗疗效。

#### [0172] IV. 核酸

[0173] 在某些实施方案中,存在编码本文所述多肽的重组核酸。

[0174] 如在本申请中使用的,术语“多核苷酸”是指重组的或已经分离出不含总基因组核酸的核酸分子。术语“多核苷酸”包括寡核苷酸(长度为100个或少于100个残基的核酸)、包括例如质粒、黏粒、噬菌体、病毒等的重组载体。在某些方面,多核苷酸包括与其天然存在的基因或蛋白质编码序列基本上分离的调节序列。多核苷酸可以是单链(编码或反义)或双链,并且可以是RNA、DNA(基因组、cDNA或合成)、其类似物或其组合。另外的编码或非编码序列可以但不一定存在于多核苷酸中。

[0175] 在这个方面,术语“基因”、“多核苷酸”或“核酸”用于指编码蛋白质、多肽或肽(包括正确转录、翻译后修饰、或定位)。如本领域技术人员将理解的,该术语包括基因组序列、表达盒、cDNA序列和较小的工程化核酸片段,其表达或可以适于表达蛋白质、多肽、结构域、肽、融合蛋白和突变体。编码全部或部分多肽的核酸可以包含编码此类多肽的全部或部分的连续核酸序列。还预期特定的多肽可以由包含具有略微不同的核酸序列编码,但是仍然编码相同或本质上相似的蛋白质(见上文)。

[0176] 在特定的实施方案中,存在分离的核酸片段和包含编码多肽的核酸序列的重组载体(例如,聚合酶、RNA聚合酶、一个或多个截短的聚合酶结构域或作为多肽的相互作用成分)的核酸序列,当相互作用成分相互作用时,驱动基因转录依赖于聚合酶结构域的聚合酶活性。术语“重组”可与多肽或特定多肽的名称结合使用,这通常是指由已在体外操作的核酸分子产生的多肽或该分子的复制产物。

[0177] 不论编码序列本身的长度如何,核酸片段都可以与其他核酸序列组合,例如启动子、聚腺苷酸化信号、另外的限制酶位点、多克隆位点、其他编码片段等,使得它们的总长度可以存在很大差异。因此预期可以使用几乎任何长度的核酸片段,总长度优选地受在预期的重组核酸方案中制备和使用的容易程度的限制。在一些情况下,核酸序列可以编码具有额外异源编码序列的多肽序列,例如以允许多肽的纯化、转运、分泌、翻译后修饰,或用于治疗益处(例如靶向或疗效)。如上所述,可以向修饰的多肽编码序列添加标签或其他异源多肽,其中“异源”是指与修饰的多肽不同的多肽。

[0178] 在某些实施方案中,存在与本文公开的序列具有实质同一性的多核苷酸变体;与使用本文所述方法(例如,使用标准参数的BLAST分析)在本文提供的多核苷酸序列相比,包含至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或更高序列同一性的那些,包括它们之间的所有值和范围。在某些方面,分离的多核苷酸将包含编码多肽的核苷酸序列,该多肽在序列的整个长度上与本文所述的氨基酸序列具有至少90%、优选95%及以上的同源性;或与所述分离的多核苷酸互补的核苷酸序列。

#### [0179] A. 载体

[0180] 多肽可由核酸分子编码。核酸分子可以是核酸载体的形式。术语“载体”用于指载体核酸分子,其中可以插入异源核酸序列以引入到细胞中,在那里它可以被复制和表达。核酸序列可以是“异源的”,这意味着它与引入载体的细胞或并入其中的核酸无关,包括与细

胞或核酸中的序列同源的序列,但位于宿主细胞或核酸中通常未发现的位置。载体包括DNA、RNA、质粒、黏粒、病毒(噬菌体、动物病毒和植物病毒)和人工染色体(例如YAC)。本领域技术人员将具备通过标准重组技术构建载体的能力(例如Sambrook等人,2001;Ausubel等人,1996,均通过引用并入本文)。载体可以用于宿主细胞以产生聚合酶、RNA聚合酶、一种或多种截短的聚合酶结构域或融合、附着或连接至一种或多种截短的RNA聚合酶结构域的相互作用组分。

[0181] 术语“表达载体”是指包含编码至少部分能够转录的基因产物的核酸序列的载体。在某些情况下,RNA分子随后被翻译成蛋白质、多肽或肽。表达载体可以包含多种“控制序列”,其指特定宿主生物中可操作地连接的编码序列的转录和可能翻译所必需的核酸序列。除了控制转录和翻译的控制序列之外,载体和表达载体还可以包含具有其他功能并在本文中描述的核酸序列。

[0182] B. 细胞

[0183] 本公开提供了用于修饰感兴趣的靶标RNA的方法,特别是在原核细胞、真核细胞、组织、器官或生物体中,更特别是在哺乳动物细胞、组织、器官或生物体中。靶RNA可以包含在细胞内的核酸分子中。在一些实施方案中,靶标RNA在真核细胞中,例如哺乳动物细胞或植物细胞。哺乳动物细胞多为人、非人灵长类动物、牛、猪、啮齿动物或小鼠的细胞。细胞可以是非哺乳动物真核细胞,例如家禽、鱼或虾。植物细胞可以是作物植物,例如木薯、玉米、高粱、小麦或水稻。植物细胞也可以是藻类、树木或蔬菜。通过本公开的方法、系统和组合物在细胞中诱导的RNA的调节可以使得细胞和细胞的后代被改变以改善生物产品例如抗体、淀粉、酒精或其他所需细胞产物的生产。在细胞中诱导的RNA的调节可以使得细胞和细胞的后代包括改变所产生的生物产品的改变。

[0184] 哺乳动物细胞可以是人或非人哺乳动物,例如灵长类动物、牛、绵羊、猪、犬、啮齿动物、兔科如猴、牛、羊、猪、狗、兔、大鼠或小鼠的细胞。细胞可以是非哺乳动物真核细胞,例如家禽(例如鸡)、脊椎动物(例如鲑鱼)或贝类(例如牡蛎、蛤、龙虾、虾)的细胞。细胞也可以是植物细胞。植物细胞可以是单子叶植物或双子叶植物或作物或谷物植物,例如木薯、玉米、高粱、大豆、小麦、燕麦或稻。植物细胞也可以是藻类、树木或生产植物、水果或蔬菜(例如柑橘树,例如橙树、葡萄柚或柠檬树;桃树或油桃树;苹果树或梨树;坚果树,例如杏仁或核桃或开心果树;茄属植物;芸苔属植物;莴苣属植物;菠菜属植物;辣椒属植物;棉花、烟草、芦笋、胡萝卜、卷心菜、西兰花、花椰菜、番茄、茄子、胡椒、生菜、菠菜、草莓、蓝莓、覆盆子、黑莓、葡萄、咖啡、可可等)。

[0185] 如本文所用,术语“细胞”、“细胞系”和“细胞孵育物”可互换使用。所有这些术语还包括它们的后代,即任何和所有后代。应当理解,由于有意或无意的突变,所有后代可能不相同。在表达异源核酸序列的上下文中,“宿主细胞”是指原核或真核细胞,包括任何能够复制载体或表达载体编码的异源基因的可转化生物。宿主细胞可以并且已经被用作载体或病毒的受体。宿主细胞可以被“转染”或“转化”,这是指外源核酸,例如重组蛋白编码序列,被转移或引入宿主细胞的过程。转化细胞包括原代对象细胞及其后代。

[0186] 一些载体可以采用允许其在原核和真核细胞中复制和/或表达的控制序列。本领域技术人员将进一步理解孵育所有上述宿主细胞以维持它们并允许载体复制的条件。还理解和已知允许大规模生产载体以及生产由载体编码的核酸及其同源多肽、蛋白质或肽的技

术和条件。

#### [0187] C. 表达系统

[0188] 存在许多至少包含上面讨论的部分或全部上述组合物的表达系统。可以采用基于原核生物和/或基于真核生物的系统与实施方案一起使用以产生核酸序列,或者它们的同源多肽、蛋白质和肽。例如,本公开的载体、融合蛋白、RNA发夹结合蛋白、RNA靶向分子、RNA调节结构域和辅助蛋白可以利用表达系统,例如诱导型或构成的表达系统。许多这样的系统在商业上广泛可用。

[0189] 昆虫细胞/杆状病毒系统可以产生高水平的异源核酸片段的蛋白质表达,例如在美国专利5871986、4879236中所描述的,两者均通过引用并入本文,可以例如以名称MAXBAC® 2.0从INVITROGEN®购买和以名称BACPACKGEN™BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM从CLONTECH®购买。

[0190] 除了公开的表达系统之外,表达系统的其他实施例包括STRATAGENE®的COMPLETE CONTROL诱导型哺乳动物表达系统,它涉及合成的蜕皮激素诱导型受体,或其pET表达系统,一种大肠杆菌表达系统。诱导型表达系统的另一个实施例可从INVITROGEN®获得,它携带T-REX™(四环素调节表达)系统,这是一种使用全长CMV启动子的诱导型哺乳动物表达系统。INVITROGEN®还提供了一种称为甲醇毕赤酵母表达系统的酵母表达系统,该系统专为在甲基营养型酵母毕赤酵母中高水平生产重组蛋白而设计。本领域技术人员会知道如何表达载体,例如表达构建体,以产生核酸序列或其同源多肽、蛋白质或肽。

#### [0191] V. 蛋白质组合物

[0192] 本公开的多肽或多核苷酸,例如包含或编码连接到胶原结合域的白蛋白多肽的多肽或多核苷酸,可以包括1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个或50个或多于50个变异氨基酸或核酸置换或与SEQ ID NO: 1至SEQ ID NO: 18中任一个的至少或至多3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个、101个、102个、103个、104个、105个、106个、107个、108个、109个、110个、111个、112个、113个、114个、115个、116个、117个、118个、119个、120个、121个、122个、123个、124个、125个、126个、127个、128个、129个、130个、131个、132个、133个、134个、135个、136个、137个、138个、139个、140个、141个、142个、143个、144个、145个、146个、147个、148个、149个、150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个、161个、162个、163个、164个、165个、166个、167个、168个、169个、170个、171个、172个、173个、174个、175个、176个、177个、178个、179个、180个、181个、182个、183个、184个、185个、186个、187个、188个、189

个、190个、191个、192个、193个、194个、195个、196个、197个、198个、199个、200个、201个、202个、203个、204个、205个、206个、207个、208个、209个、210个、211个、212个、213个、214个、215个、216个、217个、218个、219个、220个、221个、222个、223个、224个、225个、226个、227个、228个、229个、230个、231个、232个、233个、234个、235个、236个、237个、238个、239个、240个、241个、242个、243个、244个、245个、246个、247个、248个、249个、250个、300个、400个、500个、550个、1000个、1500个或2000个或多于2000个或其中可推导出的任何范围的连续氨基酸或核酸至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相似、相同或同源。

[0193] 本公开的多肽或多核苷酸,例如包含或编码连接到胶原结合域的白蛋白多肽的多肽或多核苷酸,可以包括SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:18中任一个的3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个、101个、102个、103个、104个、105个、106个、107个、108个、109个、110个、111个、112个、113个、114个、115个、116个、117个、118个、119个、120个、121个、122个、123个、124个、125个、126个、127个、128个、129个、130个、131个、132个、133个、134个、135个、136个、137个、138个、139个、140个、141个、142个、143个、144个、145个、146个、147个、148个、149个、150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个、161个、162个、163个、164个、165个、166个、167个、168个、169个、170个、171个、172个、173个、174个、175个、176个、177个、178个、179个、180个、181个、182个、183个、184个、185个、186个、187个、188个、189个、190个、191个、192个、193个、194个、195个、196个、197个、198个、199个、200个、201个、202个、203个、204个、205个、206个、207个、208个、209个、210个、211个、212个、213个、214个、215个、216个、217个、218个、219个、220个、221个、222个、223个、224个、225个、226个、227个、228个、229个、230个、231个、232个、233个、234个、235个、236个、237个、238个、239个、240个、241个、242个、243个、244个、245个、246个、247个、248个、249个、250个、300个、400个、500个、550个、1000个、1500个、2000个或多于2000个或其中可推导出的任何范围的连续氨基酸。

[0194] 在一些实施方案中,多肽包含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:18的氨基酸1至2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、

144、145、146、147、148、149、150、151、152个、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614、615、650、700、750、800、850、900、1000、1500、或2000(或其中可推导出的任何范围)。

[0195] 在一些实施方案中,多肽包含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:18中任一个的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个、101个、102个、103个、104个、105个、106个、107个、108个、109个、110个、111个、112个、113个、114个、115个、116个、117个、118个、119个、120个、121个、122个、123个、124个、125个、126个、127个、128个、129个、130个、131个、132个、133个、134个、135个、136个、137个、138个、139个、140个、141个、142个、143个、144个、145个、146个、147个、148个、149个、150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个、161个、162个、163个、164个、165个、166个、167个、168个、169个、170个、171

个、172个、173个、174个、175个、176个、177个、178个、179个、180个、181个、182个、183个、184个、185个、186个、187个、188个、189个、190个、191个、192个、193个、194个、195个、196个、197个、198个、199个、200个、201个、202个、203个、204个、205个、206个、207个、208个、209个、210个、211个、212个、213个、214个、215个、216个、217个、218个、219个、220个、221个、222个、223个、224个、225个、226个、227个、228个、229个、230个、231个、232个、233个、234个、235个、236个、237个、238个、239个、240个、241个、242个、243个、244个、245个、246个、247个、248个、249个、250个、251个、252个、253个、254个、255个、256个、257个、258个、259个、260个、261个、262个、263个、264个、265个、266个、267个、268个、269个、270个、271个、272个、273个、274个、275个、276个、277个、278个、279个、280个、281个、282个、283个、284个、285个、286个、287个、288个、289个、290个、291个、292个、293个、294个、295个、296个、297个、298个、299个、300个、301个、302个、303个、304个、305个、306个、307个、308个、309个、310个、311个、312个、313个、314个、315个、316个、317个、318个、319个、320个、321个、322个、323个、324个、325个、326个、327个、328个、329个、330个、331个、332个、333个、334个、335个、336个、337个、338个、339个、340个、341个、342个、343个、344个、345个、346个、347个、348个、349个、350个、351个、352个、353个、354个、355个、356个、357个、358个、359个、360个、361个、362个、363个、364个、365个、366个、367个、368个、369个、370个、371个、372个、373个、374个、375个、376个、377个、378个、379个、380个、381个、382个、383个、384个、385个、386个、387个、388个、389个、390个、391个、392个、393个、394个、395个、396个、397个、398个、399个、400个、401个、402个、403个、404个、405个、406个、407个、408个、409个、410个、411个、412个、413个、414个、415个、416个、417个、418个、419个、420个、421个、422个、423个、424个、425个、426个、427个、428个、429个、430个、431个、432个、433个、434个、435个、436个、437个、438个、439个、440个、441个、442个、443个、444个、445个、446个、447个、448个、449个、450个、451个、452个、453个、454个、455个、456个、457个、458个、459个、460个、461个、462个、463个、464个、465个、466个、467个、468个、469个、470个、471个、472个、473个、474个、475个、476个、477个、478个、479个、480个、481个、482个、483个、484个、485个、486个、487个、488个、489个、490个、491个、492个、493个、494个、495个、496个、497个、498个、499个、500个、501个、502个、503个、504个、505个、506个、507个、508个、509个、510个、511个、512个、513个、514个、515个、516个、517个、518个、519个、520个、521个、522个、523个、524个、525个、526个、527个、528个、529个、530个、531个、532个、533个、534个、535个、536个、537个、538个、539个、540个、541个、542个、543个、544个、545个、546个、547个、548个、549个、550个、551个、552个、553个、554个、555个、556个、557个、558个、559个、560个、561个、562个、563个、564个、565个、566个、567个、568个、569个、570个、571个、572个、573个、574个、575个、576个、577个、578个、579个、580个、581个、582个、583个、584个、585个、586个、587个、588个、589个、590个、591个、592个、593个、594个、595个、596个、597个、598个、599个、600个、601个、602个、603个、604个、605个、606个、607个、608个、609个、610个、611个、612个、613个、614个、650个、700个、750个、800个、850个、900个、1000个、1500个、或2000个(或其中可推导出的任何范围)的连续氨基酸。

[0196] 在一些实施方案中,多肽包含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:18中任一个的至少、至多或恰好1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、

17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个、101个、102个、103个、104个、105个、106个、107个、108个、109个、110个、111个、112个、113个、114个、115个、116个、117个、118个、119个、120个、121个、122个、123个、124个、125个、126个、127个、128个、129个、130个、131个、132个、133个、134个、135个、136个、137个、138个、139个、140个、141个、142个、143个、144个、145个、146个、147个、148个、149个、150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个、161个、162个、163个、164个、165个、166个、167个、168个、169个、170个、171个、172个、173个、174个、175个、176个、177个、178个、179个、180个、181个、182个、183个、184个、185个、186个、187个、188个、189个、190个、191个、192个、193个、194个、195个、196个、197个、198个、199个、200个、201个、202个、203个、204个、205个、206个、207个、208个、209个、210个、211个、212个、213个、214个、215个、216个、217个、218个、219个、220个、221个、222个、223个、224个、225个、226个、227个、228个、229个、230个、231个、232个、233个、234个、235个、236个、237个、238个、239个、240个、241个、242个、243个、244个、245个、246个、247个、248个、249个、250个、251个、252个、253个、254个、255个、256个、257个、258个、259个、260个、261个、262个、263个、264个、265个、266个、267个、268个、269个、270个、271个、272个、273个、274个、275个、276个、277个、278个、279个、280个、281个、282个、283个、284个、285个、286个、287个、288个、289个、290个、291个、292个、293个、294个、295个、296个、297个、298个、299个、300个、301个、302个、303个、304个、305个、306个、307个、308个、309个、310个、311个、312个、313个、314个、315个、316个、317个、318个、319个、320个、321个、322个、323个、324个、325个、326个、327个、328个、329个、330个、331个、332个、333个、334个、335个、336个、337个、338个、339个、340个、341个、342个、343个、344个、345个、346个、347个、348个、349个、350个、351个、352个、353个、354个、355个、356个、357个、358个、359个、360个、361个、362个、363个、364个、365个、366个、367个、368个、369个、370个、371个、372个、373个、374个、375个、376个、377个、378个、379个、380个、381个、382个、383个、384个、385个、386个、387个、388个、389个、390个、391个、392个、393个、394个、395个、396个、397个、398个、399个、400个、401个、402个、403个、404个、405个、406个、407个、408个、409个、410个、411个、412个、413个、414个、415个、416个、417个、418个、419个、420个、421个、422个、423个、424个、425个、426个、427个、428个、429个、430个、431个、432个、433个、434个、435个、436个、437个、438个、439个、440个、441个、442个、443个、444个、445个、446个、447个、448个、449个、450个、451个、452个、453个、454个、455个、456个、457个、458个、459个、460个、461个、462个、463个、464个、465个、466个、467个、468个、469个、470个、471个、472个、473个、474个、475个、476个、477个、478个、479个、480个、481个、482个、483个、484个、485个、486个、487个、488个、489个、490个、491个、492个、493个、494个、495个、496个、497个、498个、499个、500个、501个、502个、503个、504个、505个、506个、507个、508个、509个、510个、511个、512个、513个、514个、515个、516个、517个、518个、

519个、520个、521个、522个、523个、524个、525个、526个、527个、528个、529个、530个、531个、532个、533个、534个、535个、536个、537个、538个、539个、540个、541个、542个、543个、544个、545个、546个、547个、548个、549个、550个、551个、552个、553个、554个、555个、556个、557个、558个、559个、560个、561个、562个、563个、564个、565个、566个、567个、568个、569个、570个、571个、572个、573个、574个、575个、576个、577个、578个、579个、580个、581个、582个、583个、584个、585个、586个、587个、588个、589个、590个、591个、592个、593个、594个、595个、596个、597个、598个、599个、600个、601个、602个、603个、604个、605个、606个、607个、608个、609个、610个、611个、612个、613个、614个、650个、700个、750个、800个、850个、900个、1000个、1500个、或2000个(或其中可推导出的任何范围)连续氨基酸,并起始于在SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:18中任一个的位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、577、578、579、580、581、582、583、584、585、

586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614、650、700、750、800、850、900、1000、1500、或2000。

[0197] 在一些实施方案中,多肽包含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:18的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个、101个、102个、103个、104个、105个、106个、107个、108个、109个、110个、111个、112个、113个、114个、115个、116个、117个、118个、119个、120个、121个、122个、123个、124个、125个、126个、127个、128个、129个、130个、131个、132个、133个、134个、135个、136个、137个、138个、139个、140个、141个、142个、143个、144个、145个、146个、147个、148个、149个、150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个、161个、162个、163个、164个、165个、166个、167个、168个、169个、170个、171个、172个、173个、174个、175个、176个、177个、178个、179个、180个、181个、182个、183个、184个、185个、186个、187个、188个、189个、190个、191个、192个、193个、194个、195个、196个、197个、198个、199个、200个、201个、202个、203个、204个、205个、206个、207个、208个、209个、210个、211个、212个、213个、214个、215个、216个、217个、218个、219个、220个、221个、222个、223个、224个、225个、226个、227个、228个、229个、230个、231个、232个、233个、234个、235个、236个、237个、238个、239个、240个、241个、242个、243个、244个、245个、246个、247个、248个、249个、250个、251个、252个、253个、254个、255个、256个、257个、258个、259个、260个、261个、262个、263个、264个、265个、266个、267个、268个、269个、270个、271个、272个、273个、274个、275个、276个、277个、278个、279个、280个、281个、282个、283个、284个、285个、286个、287个、288个、289个、290个、291个、292个、293个、294个、295个、296个、297个、298个、299个、300个、301个、302个、303个、304个、305个、306个、307个、308个、309个、310个、311个、312个、313个、314个、315个、316个、317个、318个、319个、320个、321个、322个、323个、324个、325个、326个、327个、328个、329个、330个、331个、332个、333个、334个、335个、336个、337个、338个、339个、340个、341个、342个、343个、344个、345个、346个、347个、348个、349个、350个、351个、352个、353个、354个、355个、356个、357个、358个、359个、360个、361个、362个、363个、364个、365个、366个、367个、368个、369个、370个、371个、372个、373个、374个、375个、376个、377个、378个、379个、380个、381个、382个、383个、384个、385个、386个、387个、388个、389个、390个、391个、392个、393个、394个、395个、396个、397个、398个、399个、400个、401个、402个、403个、404个、405个、406个、407个、408个、409个、410个、411个、412个、413个、414个、415个、416个、417个、418个、419个、420个、421个、422个、423个、424个、425个、426个、427个、428个、429个、430个、431个、432个、433个、434个、435个、436个、437个、438个、439个、440个、441个、442个、443个、444个、445个、446个、447个、448个、449个、450个、451个、452个、453个、454个、455个、456个、457个、458个、459

个、460个、461个、462个、463个、464个、465个、466个、467个、468个、469个、470个、471个、472个、473个、474个、475个、476个、477个、478个、479个、480个、481个、482个、483个、484个、485个、486个、487个、488个、489个、490个、491个、492个、493个、494个、495个、496个、497个、498个、499个、500个、501个、502个、503个、504个、505个、506个、507个、508个、509个、510个、511个、512个、513个、514个、515个、516个、517个、518个、519个、520个、521个、522个、523个、524个、525个、526个、527个、528个、529个、530个、531个、532个、533个、534个、535个、536个、537个、538个、539个、540个、541个、542个、543个、544个、545个、546个、547个、548个、549个、550个、551个、552个、553个、554个、555个、556个、557个、558个、559个、560个、561个、562个、563个、564个、565个、566个、567个、568个、569个、570个、571个、572个、573个、574个、575个、576个、577个、578个、579个、580个、581个、582个、583个、584个、585个、586个、587个、588个、589个、590个、591个、592个、593个、594个、595个、596个、597个、598个、599个、600个、601个、602个、603个、604个、605个、606个、607个、608个、609个、610个、611个、612个、613个、614个、650个、700个、750个、800个、850个、900个、1000个、1500个、或2000个(或其中可推导出的任何范围)的连续氨基酸,其至少、至多或恰与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:18中任一个60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相似、相同或同源。

[0198] 本公开的多肽可以包括至少、至多或恰好1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个、101个、102个、103个、104个、105个、106个、107个、108个、109个、110个、111个、112个、113个、114个、115个、116个、117个、118个、119个、120个、121个、122个、123个、124个、125个、126个、127个、128个、129个、130个、131个、132个、133个、134个、135个、136个、137个、138个、139个、140个、141个、142个、143个、144个、145个、146个、147个、148个、149个、150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个、161个、162个、163个、164个、165个、166个、167个、168个、169个、170个、171个、172个、173个、174个、175个、176个、177个、178个、179个、180个、181个、182个、183个、184个、185个、186个、187个、188个、189个、190个、191个、192个、193个、194个、195个、196个、197个、198个、199个、200个、201个、202个、203个、204个、205个、206个、207个、208个、209个、210个、211个、212个、213个、214个、215个、216个、217个、218个、219个、220个、221个、222个、223个、224个、225个、226个、227个、228个、229个、230个、231个、232个、233个、234个、235个、236个、237个、238个、239个、240个、241个、242个、243个、244个、245个、246个、247个、248个、249个、250个、251个、252个、253个、254个、255个、256个、257个、258个、259个、260个、261个、262个、263个、264个、265个、266个、267个、268个、269个、270个、271个、272个、273个、274

个、275个、276个、277个、278个、279个、280个、281个、282个、283个、284个、285个、286个、287个、288个、289个、290个、291个、292个、293个、294个、295个、296个、297个、298个、299个、300个、301个、302个、303个、304个、305个、306个、307个、308个、309个、310个、311个、312个、313个、314个、315个、316个、317个、318个、319个、320个、321个、322个、323个、324个、325个、326个、327个、328个、329个、330个、331个、332个、333个、334个、335个、336个、337个、338个、339个、340个、341个、342个、343个、344个、345个、346个、347个、348个、349个、350个、351个、352个、353个、354个、355个、356个、357个、358个、359个、360个、361个、362个、363个、364个、365个、366个、367个、368个、369个、370个、371个、372个、373个、374个、375个、376个、377个、378个、379个、380个、381个、382个、383个、384个、385个、386个、387个、388个、389个、390个、391个、392个、393个、394个、395个、396个、397个、398个、399个、400个、401个、402个、403个、404个、405个、406个、407个、408个、409个、410个、411个、412个、413个、414个、415个、416个、417个、418个、419个、420个、421个、422个、423个、424个、425个、426个、427个、428个、429个、430个、431个、432个、433个、434个、435个、436个、437个、438个、439个、440个、441个、442个、443个、444个、445个、446个、447个、448个、449个、450个、451个、452个、453个、454个、455个、456个、457个、458个、459个、460个、461个、462个、463个、464个、465个、466个、467个、468个、469个、470个、471个、472个、473个、474个、475个、476个、477个、478个、479个、480个、481个、482个、483个、484个、485个、486个、487个、488个、489个、490个、491个、492个、493个、494个、495个、496个、497个、498个、499个、500个、501个、502个、503个、504个、505个、506个、507个、508个、509个、510个、511个、512个、513个、514个、515个、516个、517个、518个、519个、520个、521个、522个、523个、524个、525个、526个、527个、528个、529个、530个、531个、532个、533个、534个、535个、536个、537个、538个、539个、540个、541个、542个、543个、544个、545个、546个、547个、548个、549个、550个、551个、552个、553个、554个、555个、556个、557个、558个、559个、560个、561个、562个、563个、564个、565个、566个、567个、568个、569个、570个、571个、572个、573个、574个、575个、576个、577个、578个、579个、580个、581个、582个、583个、584个、585个、586个、587个、588个、589个、590个、591个、592个、593个、594个、595个、596个、597个、598个、599个、600个、601个、602个、603个、604个、605个、606个、607个、608个、609个、610个、611个、612个、613个、614个或615个(或其中可推导出的任何范围)的置换。

[0199] 置换可以是SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:18任一个的第1位、第2位、第3位、第4位、第5位、第6位、第7位、第8位、第9位、第10位、第11位、第12位、第13位、第14位、第15位、第16位、第17位、第18位、第19位、第20位、第21位、第22位、第23位、第24位、第25位、第26位、第27位、第28位、第29位、第30位、第31位、第32位、第33位、第34位、第35位、第36位、第37位、第38位、第39位、第40位、第41位、第42位、第43位、第44位、第45位、第46位、第47位、第48位、第49位、第50位、第51位、第52位、第53位、第54位、第55位、第56位、第57位、第58位、第59位、第60位、第61位、第62位、第63位、第64位、第65位、第66位、第67位、第68位、第69位、第70位、第71位、第72位、第73位、第74位、第75位、第76位、第77位、第78位、第79位、第80位、第81位、第82位、第83位、第84位、第85位、第86位、第87位、第88位、第89位、第90位、第91位、第92位、第93位、第94位、第95位、第96位、第97位、第98位、第99位、第100位、第101位、第102位、第103位、第104位、第105位、第106位、第107位、第108位、第109位、第110位、第111位、第112位、第113



484位、第485位、第486位、第487位、第488位、第489位、第490位、第491位、第492位、第493位、第494位、第495位、第496位、第497位、第498位、第499位、第500位、第501位、第502位、第503位、第504位、第505位、第506位、第507位、第508位、第509位、第510位、第511位、第512位、第513位、第514位、第515位、第516位、第517位、第518位、第519位、第520位、第521位、第522位、第523位、第524位、第525位、第526位、第527位、第528位、第529位、第530位、第531位、第532位、第533位、第534位、第535位、第536位、第537位、第538位、第539位、第540位、第541位、第542位、第543位、第544位、第545位、第546位、第547位、第548位、第549位、第550位、第551位、第552位、第553位、第554位、第555位、第556位、第557位、第558位、第559位、第560位、第561位、第562位、第563位、第564位、第565位、第566位、第567位、第568位、第569位、第570位、第571位、第572位、第573位、第574位、第575位、第576位、第577位、第578位、第579位、第580位、第581位、第582位、第583位、第584位、第585位、第586位、第587位、第588位、第589位、第590位、第591位、第592位、第593位、第594位、第595位、第596位、第597位、第598位、第599位、第600位、第601位、第602位、第603位、第604位、第605位、第606位、第607位、第608位、第609位、第610位、第611位、第612位、第613位、第614位、第650位、第700位、第750位、第800位、第850位、第900位、第1000位、第1500位或第2000位(或其中可推导出的任何范围)的氨基酸或核酸。

[0200] 本文所述的多肽的固定长度可以是至少、至多、或恰好5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个、101个、102个、103个、104个、105个、106个、107个、108个、109个、110个、111个、112个、113个、114个、115个、116个、117个、118个、119个、120个、121个、122个、123个、124个、125个、126个、127个、128个、129个、130个、131个、132个、133个、134个、135个、136个、137个、138个、139个、140个、141个、142个、143个、144个、145个、146个、147个、148个、149个、150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个、161个、162个、163个、164个、165个、166个、167个、168个、169个、170个、171个、172个、173个、174个、175个、176个、177个、178个、179个、180个、181个、182个、183个、184个、185个、186个、187个、188个、189个、190个、191个、192个、193个、194个、195个、196个、197个、198个、199个、200个、201个、202个、203个、204个、205个、206个、207个、208个、209个、210个、211个、212个、213个、214个、215个、216个、217个、218个、219个、220个、221个、222个、223个、224个、225个、226个、227个、228个、229个、230个、231个、232个、233个、234个、235个、236个、237个、238个、239个、240个、241个、242个、243个、244个、245个、246个、247个、248个、249个、250个、300个、400个、500个、550个、1000个或多于1000个氨基酸(或其中可推导出的任何范围)。

[0201] 置换变体通常包含在蛋白质内的一个或多个位点处一种氨基酸与另一种氨基酸的交换,并且可以被设计成调节多肽的一种或多种特性,其他功能或特性保留或

损失。置换可以是保守的,即一个氨基酸被替换为具有相似形状和电荷的氨基酸。保守置换是本领域公知的,包括例如以下变化:丙氨酸到丝氨酸;精氨酸到赖氨酸;天冬酰胺谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸到谷氨酸;半胱氨酸到丝氨酸;谷氨酰胺到天冬酰胺;谷氨酸到天冬氨酸;甘氨酸到脯氨酸;组氨酸到天冬酰胺或谷氨酰胺;异亮氨酸到亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸到缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸到精氨酸;蛋氨酸到亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸到酪氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸;丝氨酸到苏氨酸;苏氨酸到丝氨酸;色氨酸到酪氨酸;酪氨酸到色氨酸或苯丙氨酸;和缬氨酸到异亮氨酸或亮氨酸。或者,置换可以是非保守的,从而影响多肽的功能或活性。非保守性改变通常涉及用化学上不同的残基置换残基,例如用极性或带电荷氨基酸代替非极性或不带电荷氨基酸,反之亦然。

[0202] 蛋白质可以是重组的,也可以是体外合成的。或者,可以从细菌中分离非重组或重组蛋白质。还预期可以在组合物和方法中实施含有这种变体的细菌。因此,不需要分离蛋白质。

[0203] 术语“功能等效密码子”在本文中用于指对相同氨基酸进行编码的密码子,例如精氨酸或丝氨酸的六个密码子,也指对生物学等效氨基酸进行编码的密码子。

[0204] 还应理解,氨基酸和核酸序列可包括另外的残基,例如另外的N或C末端氨基酸,或分别为5'或3'序列,但基本上如以下之一所列此处公开的序列,只要该序列满足上述标准,包括蛋白质表达所涉及的生物蛋白质活性的维持。末端序列的添加特别适用于核酸序列,其可以例如包括位于编码区的5'端或3'端两侧的各种非编码序列。

[0205] 以下是基于改变蛋白质的氨基酸以创建等效甚至改进的第二代分子的讨论。例如,某些氨基酸可以置换蛋白质结构中的其他氨基酸,而不会显著丧失相互作用的结合能力。诸如酶催化结构域或相互作用组分的结构可以具有氨基酸置换以维持这种功能。由于是蛋白质的相互作用能力和性质决定了该蛋白质的生物功能活性,因此可以在蛋白质序列及其潜在的DNA编码序列中进行某些氨基酸置换,但仍会产生具有类似特性的蛋白质。因此,发明人预期可以在基因的DNA序列中进行各种改变而不会明显损失其生物学效用或活性。

[0206] 在其他实施方案中,通过引入一个或多个置换来改变多肽的功能。例如,某些氨基酸可以置换蛋白质结构中的其他氨基酸,以改变相互作用组分的相互作用结合能力。诸如蛋白质相互作用结构域、核酸相互作用结构域和催化位点的结构可以具有置换的氨基酸以改变这种功能。由于蛋白质的相互作用能力和性质决定了该蛋白质的生物功能活性,因此可以在蛋白质序列及其潜在的DNA编码序列中进行某些氨基酸置换,但仍会产生具有不同特性的蛋白质。因此,发明人预期可以在基因的DNA序列中进行各种改变,并显著改变其生物学效用或活性。

[0207] 在进行此类更改时,可以考虑氨基酸的亲水指数。亲水氨基酸指数在赋予蛋白质相互作用的生物学功能方面的重要性是本领域普遍理解的(Kyte和Doolittle,1982)。公认氨基酸的相对亲水特性有助于生成蛋白质的二级结构,这反过来又定义了蛋白质与其他分子的相互作用,例如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等。

[0208] 本领域还理解,基于亲水性可以有效地进行类似氨基酸的置换。美国专利4554101(通过引用并入本文)指出,蛋白质的最大局部平均亲水性(由其相邻氨基酸的亲水性控制)与蛋白质的生物学特性相关。可以理解的是,一个氨基酸可以被另一个具有相似亲水性值

的氨基酸置换,并且仍然产生生物学等效和免疫学等效的蛋白质。

[0209] 如上所述,氨基酸置换通常基于氨基酸侧链置换基的相对相似性,例如,它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。考虑到各种前述特征的典型的置换是公知的并且包括:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;和缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0210] 在具体的实施方案中,还可以根据常规技术在溶液中或在固体支持物上合成本文所述的全部或部分蛋白质。各种自动合成器是可商购的并且可以根据已知协议使用。例如,参见Stewart和Young (1984); Tam等人, (1983); Merrifield (1986); 和Barany和Merrifield (1979), 每个都通过引用并入本文。或者,可以采用重组DNA技术,其中将编码肽或多肽的核苷酸序列插入表达载体中,转化或转染到合适的宿主细胞中并在适合表达的条件下孵育。

[0211] 一个实施方案包括使用基因转移至细胞,包括微生物,以产生和/或呈递蛋白质。可以将目的蛋白质的基因转移到合适的宿主细胞中,然后在合适的条件下孵育细胞。可以使用编码几乎任何多肽的核酸。本文讨论了重组表达载体的产生以及其中包含的元件。或者,要生产的蛋白质可以是通常由用于蛋白质生产的细胞合成的内源蛋白质。

[0212] VI. 联合疗法

[0213] 本公开的组合物和相关方法,特别是包含与胶原结合结构域连接的白蛋白多肽或IgG Fc结构域多肽的多肽的施用也可以与另外的疗法组合施用,另外的疗法例如本文所述的另外的治疗或者与本领域已知的其他传统治疗组合。

[0214] 本文公开的治疗组合物和治疗可以以数分钟至数周的间隔,在另一治疗或药剂之前、与另一治疗或药剂同时和/或在另一治疗或药剂之后实施。在将药剂分别应用于细胞、组织或生物体的实施方案中,通常会确保在每次递送之间时间未过期,这样治疗剂仍然能够对细胞、组织或生物体发挥有利的组合作用。例如,在这样的情况下,预期可以基本上同时(即,在不到约一分钟内)用两种、三种、四种或多于四种药剂或治疗方法接触细胞、组织或生物体。在其他方面,一种或多于一种治疗剂或治疗可以在施用另一种治疗剂或治疗之前和/或之后的1分钟、5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、45分钟、60分钟、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、25小时、26小时、27小时、28小时、29小时、30小时、31小时、32小时、33小时、34小时、35小时、36小时、37小时、38小时、39小时、40小时、41小时、42小时、43小时、44小时、45小时、46小时、47小时、48小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周或8周或多于8周以及其中可推导出的任何范围的时间内施用或提供。

[0215] 可以采用治疗剂和治疗的各种组合方案。下文显示了此类组合的非限制性示例,其中治疗剂(如本文公开的组合物)为“文”,第二剂(如本文所述或本领域公知的附加剂、化疗剂或检查点抑制剂)为“附加”。

[0216] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0217] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0218] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0219] 在一些实施方案中,可以采用多于一个疗程。预期可以实施多个疗程。

## [0220] VII. 治疗方法

[0221] 当前的方法和组合物涉及治疗癌症的方法。在一些实施方案中,癌症包括实体瘤。在一些实施方案中,癌症是非淋巴瘤。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌或结肠癌。

[0222] 本公开的组合物可用于体内、体外或离体施用。组合物的施用途径可以是例如瘤内、皮内、皮下、静脉内、淋巴管内和腹腔内施用。在一些实施方案中,施用是在瘤内或淋巴管内或瘤周施用。在一些实施方案中,将组合物直接施用到癌组织或淋巴结中。

[0223] 如本文所用,“肿瘤”是指所有肿瘤细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,以及所有癌前和癌变细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”、“细胞增殖性疾病”、“增殖性疾病”和“肿瘤”在本文中并不相互排斥。

[0224] 适合治疗的癌症包括但不限于所有类型、位置、大小和特征的肿瘤。本公开的方法和组合物适用于治疗例如胰腺癌、结肠癌、急性髓性白血病、肾上腺皮质癌、AIDS相关癌症、AIDS相关淋巴瘤、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、儿童小脑或脑基底细胞癌、胆管癌、肝外膀胱癌、骨癌、骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤、脑干胶质瘤、脑肿瘤、小脑星形细胞瘤脑瘤、脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤脑瘤、室管膜瘤脑瘤、成神经管细胞瘤脑瘤、幕上原始肿瘤神经外胚层肿瘤脑肿瘤、视觉通路和下丘脑胶质瘤、乳腺癌、特定的乳腺癌如导管原位癌、浸润性导管癌、乳腺管状癌、乳腺髓样癌、乳腺粘液癌、乳头状癌乳腺,乳腺筛状癌,浸润性小叶癌,炎症原位乳腺癌、小叶原位癌、男性乳腺癌、乳头佩吉特病、乳房叶状肿瘤、复发性/或转移性乳腺癌、癌症、管腔A或B型乳腺癌、三阴性/基底样乳腺癌,和HER2富集的乳腺癌、淋巴瘤、支气管腺瘤/类癌、气管癌、伯基特淋巴瘤、类癌、儿童类癌、不明原发的胃肠癌、中枢神经系统淋巴瘤、原发性小脑星形细胞瘤、儿童脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤,儿童宫颈癌,儿童癌症,慢性淋巴细胞白血病,慢性骨髓性白血病,慢性骨髓增生性疾病,、皮肤T细胞淋巴瘤,、结缔组织增生性小圆细胞瘤,、子宫内膜癌,、室管膜瘤,、食道癌,、尤因氏,、儿童性腺外生殖细胞瘤,、肝外胆汁管癌、眼癌、视网膜母细胞瘤、胆囊癌、胃癌(胃癌)、胃肠癌类肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、生殖细胞肿瘤:颅外、性腺外或卵巢、妊娠滋养细胞肿瘤、脑干胶质瘤、胶质瘤、儿童大脑星形细胞瘤、儿童视觉通路和下丘脑胶质瘤、胃类癌、毛细胞白血病、头颈癌、心脏病、肝细胞(肝)癌、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、下丘脑和视觉通路胶质瘤、儿童眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌(内分泌胰腺)、卡波西肉瘤、肾癌(肾细胞癌)、喉癌、白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞(也称为急性髓细胞白血病)白血病、慢性淋巴细胞(白血病,慢性髓系白血病,多毛细胞唇和口腔癌、脂肪肉瘤、肝癌(原发性)、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(除霍奇金病以外的所有淋巴瘤的旧分类)淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、骨恶性纤维组织细胞瘤/骨肉瘤,儿童髓母细胞瘤、眼内(眼)黑色素瘤、默克尔细胞癌、成人恶性间皮瘤、儿童间皮瘤、转移性鳞状颈癌、口腔癌、多发性内分泌瘤综合征、多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤、蕈样真菌病、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病,慢性髓系白血病,成人急性髓系白血病,儿童急性髓系白血病,多发性骨髓瘤,慢性骨髓增生性疾病,鼻腔和鼻窦癌,鼻咽癌,神经母细胞瘤,口腔癌,口咽癌,骨肉瘤/恶性肿瘤,骨纤维组织细胞瘤,卵巢癌、卵巢上皮癌(表面上皮间质瘤)、卵巢生殖细胞瘤、卵巢低恶性潜能瘤、胰腺癌、胰岛细胞鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、松果体星形细胞瘤、松果体生殖细胞瘤,松果体母细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、儿童垂体腺

瘤、浆细胞瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌(肾癌)、肾盂和输尿管移行细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、儿童唾液腺癌肉瘤,尤因家族肿瘤、卡波西肉瘤、软组织肉瘤、子宫颈综合征肉瘤、皮肤癌(非黑色素瘤)、皮肤癌(黑色素瘤)、皮肤癌、默克尔细胞小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、伴隐匿性原发性颈部鳞状癌、转移性胃癌、幕上原始神经外胚层肿瘤、儿童T细胞淋巴瘤、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤、儿童胸腺瘤、胸腺癌、甲状腺癌、尿道癌、子宫癌、子宫内膜子宫肉瘤、阴道癌、视觉通路和下丘脑胶质瘤、儿童外阴癌和肾母细胞瘤(肾癌)。

#### [0225] VIII. 药物组合物和方法

[0226] 在一些实施方案中,向对象施用药物组合物。不同方面涉及向对象施用有效量的组合物。在一些实施方案中,可以向对象或患者施用包含抑制剂的组合物以治疗癌症或减小肿瘤的大小。此外,此类化合物可与另外的癌症疗法联合施用。

[0227] 组合物可以配制用于肠胃外施用,例如配制用于通过静脉内、经导管注射、动脉内注射、肌内、皮下或甚至腹腔内途径注射。通常,此类组合物可制备为注射剂,例如液体溶液或悬浮液;也可以制备成固态形式,该固态形式用于制备注射前加入液体的溶液或悬浮液;并且,还可以将制剂乳化。根据本公开,此类制剂的制备对于本领域技术人员来说是已知的。其他施用途径包括肿瘤内、肿瘤周围、淋巴管内、注射到癌组织中和注射到淋巴结中。在一些实施方案中,施用是全身性的。

[0228] 还预期了其他施用途径。例如,构建体和药剂可以与载体联合施用。在一些实施方案中,载体是纳米颗粒或微粒。在一些实施方案中,纳米颗粒或微粒是肿瘤导向的纳米颗粒或微粒。例如,载体还可包含将载体引导至肿瘤的靶向部分。靶向部分可以是特异性识别肿瘤细胞的结合剂(例如抗体,包括scFv等或其他抗原结合剂)。在一些实施方案中,构建体被封装在载体内。在一些实施方案中,构建体共价或非共价附接到载体表面。在一些实施方案中,载体是脂质体。在另外的实施方案中,排除了本文所述的载体分子。

[0229] 颗粒可以具有可变尺寸的结构,并且被称为微球、微粒、纳米颗粒、纳米球或脂质体。此类颗粒制剂可通过构建体与颗粒的共价或非共价缀合形成。在一些实施方案中,排除了本文所述的颗粒。

[0230] 适用于注射用途的药物形式包括无菌水溶液或分散液;包括芝麻油、花生油或含水丙二醇的制剂;用于临时制备无菌注射液或分散液的无菌粉剂。在所有情况下,该形式必须是无菌的,并且必须是易于注射的流体。它在制造和储存条件下也应该是稳定的,并且必须防止微生物如细菌和真菌的污染作用。

[0231] 载体也可以是包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、它们的合适混合物和植物油的溶剂或分散介质。可以保持适当的流动性,例如通过使用涂层如卵磷脂、在分散的情况下通过维持所需的粒度以及通过使用表面活性剂来保持。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来防止微生物的作用。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。使用延迟吸收剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可延长注射组合物的吸收。

[0232] 通过将活性化合物与上面列举的各种其他成分以所需数量一起掺入合适的溶剂中,然后经过过滤灭菌,无菌可注射溶液。通常,通过将各种已灭菌的活性成分混合到包含基本分散介质和上述所列的所需其他成分的无菌载体中。关于无菌注射液的无菌粉末的制

备,其优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,该方法会产生活性成分粉末和之前无菌过滤溶液得到的任何另外的所需的成分。

[0233] 如本文所用,术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内,适合与人和动物的组织接触的其在接触时没有过度的毒性、刺激、过敏反应那些化合物、材料、组合物和/或剂型,或其他与合理收益/风险比相称的问题并发症。术语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或载体,例如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料,参与携带或运输化学试剂。

[0234] 如本文所用,“药学上可接受的盐”是指所公开化合物的衍生物,其中母体化合物通过将现有酸或碱部分转化为其盐形式而被修饰。药学上可接受的盐的实施例包括但不限于碱性残基如胺的无机或有机酸盐;酸性残基如羧酸的碱金属盐或有机盐等。药物上可接受的盐包括传统的无毒盐或形成的母体化合物的季铵盐,例如,从无毒的无机或有机酸。可以通过常规化学方法从含有碱性或酸性部分的母体化合物合成药学上可接受的盐。

[0235] 取决于对象的状况,剂量必然会发生一些变化。在任何情况下,负责施用的人将确定个体对象的适当剂量。基于预期目标确定治疗或预防组合物的有效量。术语“单位剂量”或“剂量”是指适用于对象的物理上离散的单位,每个单位包含预定量的组合物,经计算以产生上文讨论的与其施用相关的期望的反应,即适当的途径和方案。根据治疗次数和单位剂量,施用量取决于所需的效果。组合物的精确量还取决于从业者的判断并且因人而异。影响剂量的因素包括对象的身体和临床状态、施用途径、治疗的预期目标(缓解症状与治愈)以及特定组合物的效力、稳定性和毒性。

[0236] 配制后,溶液将以治疗或预防有效的量以及与剂量制剂相容的方式施用。该制剂易于以多种剂型施用,例如上述注射溶液的类型。

[0237] 通常,对于成人(重约70公斤),施用约0.1mg至约3000mg(包括其间的所有值和范围)的化合物,或约5mg至约1000mg(包括其间的所有值和范围)的化合物,或约10mg至约100mg(包括其间的所有值和范围)的化合物。应当理解,这些剂量范围仅作为示例,并且可以根据技术人员已知的因素调整施用。

[0238] 在某些实施方案中,向对象施用约、至少约或至多约0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、15.5、16.0、16.5、17.0、17.5、18.0、18.5、19.0、19.5、20.0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、

320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、410、420、425、430、440、441、450、460、470、475、480、490、500、510、520、525、530、540、550、560、570、575、580、590、600、610、620、625、630、640、650、660、670、675、680、690、700、710、720、725、730、740、750、760、770、775、780、790、800、810、820、825、830、840、850、860、870、875、880、890、900、910、920、925、930、940、950、960、970、975、980、990、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、6000、7000、8000、9000、10000毫克(mg)或微克(mcg)或 $\mu$ g/kg或微克/kg/分钟或mg/kg/min或微克/kg/小时或mg/kg/小时,或其中可推导出的任何范围。

[0239] 可以根据需要或每1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、18小时或24小时(或其中可推导出的任何范围)一次或每天1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次或多于9次(或其中可推导出的任何范围)施用剂量。可以在出现病症之前或之后首次施用剂量。在一些实施方案中,向患者施用1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时(或其中可推导出的任何范围)一次的方案的第一剂量或在患者经历或表现出病症的迹象或症状(或其中可推导出的任何范围)1、2、3、4或5天后向患者施用第一剂量。可以对患者治疗1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或多于10天(或其中可推导出的任何范围)或直到病症的症状消失或减轻,或在感染症状消失或减轻后6小时、12小时、18小时或24小时或1天、2天、3天、4天或5天对患者进行治疗。

[0240] IX. 实施例

[0241] 包括以下实施例以展示本公开的优选实施方案。本领域技术人员应当理解,以下实施例中公开的技术代表了发明人发现的在本公开的实践中发挥良好作用的技术,因此可以被认为构成其实践的优选模式。然而,本领域技术人员根据本公开应当理解,在不脱离本公开的精神和范围的情况下,可以对所公开的具体实施例进行许多改变并且仍然获得相近或相似的结果。

[0242] 实施例1-工程化胶原结合血清白蛋白作为用于癌症治疗的药物缀合载体

[0243] 血清白蛋白(SA)用作载体,通过被动靶向向肿瘤递送细胞毒剂。为了进一步提高SA的肿瘤靶向能力,发明人寻求开发一种方法,通过被动和主动靶向的组合将SA-药物缀合物保留在肿瘤内。由于肿瘤血管通透性,SA与血管性血友病因子的胶原结合结构域(CBD)重组融合,以在外渗后结合在肿瘤基质内。亚德阿霉素(Dox)通过pH敏感连接子与CBD-SA缀合。在乳腺癌小鼠模型中,与Dox-SA和亚德阿霉素治疗相比,Dox-CBD-SA治疗显著抑制了肿瘤生长。Dox-CBD-SA有效刺激宿主抗肿瘤免疫,与抗PD-1检查点抑制剂联合使用时,可彻底根除MC38结肠癌。与亚德阿霉素相比,Dox-CBD-SA减少了不良事件。因此,工程化的CBD-SA可以是一种用途广泛、临床相关的药物缀合载体蛋白,用于治疗实体瘤。

[0244] A. 介绍

[0245] 阿霉素(Dox)是一种小分子抗癌药物,已被美国食品和药物管理局(FDA)批准用于治疗多种癌症。Dox通过被动跨膜扩散在细胞中内化并干扰DNA功能,导致增殖细胞死亡。尽管Dox治疗延长了某些患者群体的生存期,但抗肿瘤疗效并不显著,部分原因是获得性耐药

性。Dox较差的治疗指数也限制了其治疗用途。事实上,临床上已经报道了Dox的相当大的毒性,包括骨髓抑制、过度炎症和心脏毒性(13,14)。为了提高疗效,Dox通常与其他化疗药物联合使用。在此,发明人设计了重组小鼠SA(CBD-SA),其中N-末端与VWF A3结构域的C-末端融合,并且在注射前通过pH依赖性可裂解胺键将亚德阿霉素与CBD-SA缀合(即,Dox-CBD-SA)(21)。发明人评估了工程化CBD-SA作为肿瘤靶向药物载体,通过将Dox有效地递送至肿瘤微环境来提高抗肿瘤疗效。

#### [0246] B. 结果

##### [0247] 1. CBD-SA与胶原结合并可以与Dox缀合

[0248] 发明人合成了Dox-CBD-SA缀合物以靶向肿瘤微环境(图1A,图1B)。发明人首先在体外研究了CBD-SA与重组胶原蛋白的结合能力。SA重组表达,CBD位于小鼠SA的N-末端,使用(GGGS)<sub>2</sub>连接子(SEQ ID NO:5)。通过MALDI-TOF MS进行分析CBD-SA的分子量(图6)。观察到CBD-SA对I型和III型胶原的强结合亲和力(nM范围解离常数(K<sub>d</sub>)值)(图1C,图7)。对于Dox缀合,发明人首先使用2-亚氨基硫杂环戊烷(也称为Traut试剂)将CBD-SA的赖氨酸残基硫醇化。然后,亚德阿霉素与CBD-SA共价缀合。未修饰的SA也以相同的方式与亚德阿霉素缀合(Dox-SA)。非还原条件下的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)显示纯化的Dox-SA和Dox-CBD-SA是单体(图8)。在Dox缀合之前和之后,测量了CBD-SA的流体动力学大小(图9)。结果还表明CBD-SA以单体形式存在并且即使经过冻干/重构循环后,Dox缀合也不会改变这种特性。每个SA分子和每个CBD-SA分子缀合了大约3个Dox分子(图1D)。值得注意的是,发明人的缀合方法不会影响CBD-SA与胶原的结合能力,因为在VWF A3结构域和人胶原III之间的结合界面处没有半胱氨酸或赖氨酸残基(图10,PDB:4DMU(22))。这个界面也远离C-末端融合位点到SA结构域。

##### [0249] 2. Dox在酸性pH条件下释放

[0250] 由于Dox通过pH敏感的可断裂的连接子与SA连接,因此检查了在不同pH条件下Dox从缀合物中的释放动力学(图1E)。孵育48小时后,Dox-CBD-SA在pH 5.0和pH 6.5(报告的肿瘤微环境条件)下的Dox释放达到最大值。相比之下,在pH 7.4下,48小时后仅释放约20%的Dox。Dox-SA显示出相似的释放曲线(图11)。这些数据显示了Dox从缀合物的pH依赖性释放,与先前报道的通过胺键连接的小化学物质的释放动力学一致(21)。

##### [0251] 3. Dox缀合物被癌细胞吸收并保持细胞毒性

[0252] 发明人通过检测Dox的荧光,使用共聚焦激光扫描显微镜比较了Dox缀合物与游离药物的细胞内定位。由于Dox是治疗乳腺癌的主要药物(23),因此发明人选择小鼠乳腺肿瘤病毒-多瘤病毒中间T抗原(MMTV-PyMT)鼠乳腺癌作为实验模型。在存在Dox或Dox缀合物的情况下孵育MMTV-PyMT细胞,然后评估它们的细胞内摄取情况(图1F)。孵育1小时后,在细胞质、细胞内酸性细胞器和优选地在细胞核中检测到游离Dox,表明其传递是通过被动跨膜扩散介导的。相比之下,在加入Dox-SA或Dox-CBD-SA后1小时,与未缀合的Dox相比,细胞质没有显示强荧光。相反,观察到点状荧光,一些点与溶酶体共定位,表明Dox-SA和Dox-CBD-SA都通过内吞作用被内化。添加Dox缀合物后24小时,在细胞核中也观察到了Dox衍生的荧光,这表明细胞内细胞器的酸性pH诱导了药物从缀合物中的释放。发明人接下来检查了不同Dox形式的体外细胞毒性。接种MMTV-PyMT细胞或MC38结肠癌细胞并在Dox形式存在下孵育3天。活力测试表明,所有三种Dox形式在体外都具有类似的细胞毒性(图1G,图1H)。

[0253] 4. Dox-CBD-SA表现出与亚德阿霉素类似的血浆药代动力学,并在肿瘤中积累

[0254] 亚德阿霉素在静脉内(i.v.)施用后与内源性SA迅速反应,因此与Dox相比,它具有更长的血浆半衰期(18)。发明人使用无肿瘤的FVB小鼠测试了有或没有SA和CBD-SA的预先缀合的亚德阿霉素的血浆药代动力学。静脉注射后,观察到类似的亚德阿霉素、Dox-SA和Dox-CBD-SA的血浆半衰期(图2A,图2B)。发明人还检测了带有pH不敏感连接子的荧光标记的SA和CBD-SA的血浆药代动力学(图12)。结果表明,与Dox或染料缀合的每种蛋白质的半衰期相似,表明在血液循环中不会从缀合物中释放Dox。

[0255] 发明人接下来假设CBD与SA的融合将通过主动靶向肿瘤微环境中的胶原来增加肿瘤内Dox的量。为了验证这一假设,发明人测量了施用单次静脉注射后肿瘤组织内Dox的量。在施用后2小时,与亚德阿霉素和Dox-SA相比,Dox-CBD-SA显示出显著更高的Dox肿瘤积累(图2C)。在注射24小时后,与CBD-SA缀合也实现了最高的Dox肿瘤积累,与亚德阿霉素相比显示出显著的增加。组织学分析显示,荧光标记的CBD-SA与肿瘤组织内的CD31染色共定位,表明CBD-SA靶向肿瘤血管系统(图2D)。这些数据表明,CBD与Dox缀合的SA融合使Dox能够靶向肿瘤,导致Dox的肿瘤积累增强。

[0256] 5. Dox-CBD-SA在MMTV-PyMT鼠乳腺癌模型中表现出较好的疗效

[0257] 受血浆药代动力学和肿瘤积累研究的启发,发明人评估了Dox-CBD-SA的体内抗肿瘤作用。MMTV-PyMT原位荷瘤小鼠接受通过尾静脉注射Dox形式的单次静脉注射(5mg/kg,以Dox为基础)。Dox-SA和Dox-CBD-SA显著抑制肿瘤生长,而亚德阿霉素则没有(图3A,图3C至图3F)。这表明,与亚德阿霉素与内源性SA的原位缀合相比,Dox与SA的预缀合将提供更高的治疗效果。值得注意的是,与Dox-SA相比,Dox-CBD-SA显示出更好的治疗效果。与所有其他组相比,Dox-CBD-SA治疗显著延长了存活率(图3B)并诱导了12只小鼠中2只小鼠的肿瘤完全缓解。这些数据表明,在抗肿瘤疗效方面,与未修饰的SA相比,CBD融合的SA可作为优良的Dox载体。

[0258] 6. Dox-CBD-SA增强淋巴细胞的肿瘤浸润

[0259] 据报道,Dox可诱导ICD,从而刺激针对坏死细胞抗原的免疫反应(15)。事实上,ICD增加了肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的数量,这是多种癌症(如结直肠癌和乳腺癌)预后良好的标志(24,25)。发明人分析了Dox-CBD-SA处理后的TIL,特别是T细胞和自然杀伤(NK)细胞。从肿瘤中提取淋巴细胞并在用各种Dox形式处理7天后通过流式细胞术进行分析。Dox-CBD-SA,但不是亚德阿霉素或Dox-SA,显著增加了肿瘤内每单位肿瘤质量的CD8<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞和NK细胞的数量(图3G-3I)。特别是,Dox-CBD-SA治疗使CD8<sup>+</sup>T细胞的数量比其他治疗组增加了大于两倍(图3G)。个体肿瘤大小和TIL细胞数的图显示,Dox-CBD-SA确实诱导了小肿瘤大小与肿瘤浸润的CD8<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞以及NK细胞的数量之间的相关性(图3J-3L)。这些数据表明,淋巴细胞,尤其是CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞的浸润增强,可能有助于Dox-CBD-SA的优良抗肿瘤作用。

[0260] 7. Dox-CBD-SA显示毒性降低

[0261] 因为缀合的亚德阿霉素在生理pH下仅从SA中非常缓慢地释放(图1E),所以发明人假设与亚德阿霉素相比,Dox-CBD-SA表现出降低的毒性。发明人使用无肿瘤的FVB小鼠评估了单次注射亚德阿霉素或Dox-CBD-SA(20mg/kg,基于Dox)后的不良事件。服用亚德阿霉素增加了炎性细胞因子如IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-5和IL-6的血浆浓度,而Dox-CBD-SA则没有(图4A-

D) 亚德阿霉素治疗还引起红细胞 (RBC) 计数、白细胞 (WBC) 计数、血细胞比容和血红蛋白浓度的显著降低 (图4E, 图4F, 图13)。相比之下, Dox-CBD-SA对血液值的不利影响是轻微的。与未治疗组相比, 仅观察到WBC计数显著降低。亚德阿霉素的施用诱导了脾肿大, 而Dox-CBD-SA处理则没有 (图4G)。组织学分析显示, Dox-CBD-SA处理未对心脏、肝脏、肾脏或肺造成可观察到的损害 (图14)。这些数据表明, Dox与CBD-SA的预缀合在各个方面降低了毒性。

[0262] 8. Dox-CBD-SA联合抗PD-1抗体 ( $\alpha$ PD-1) 可根除MC38肿瘤

[0263] 基于对Dox-CBD-SA处理所诱导的TIL增加的观察 (图3G-3L), 发明人假设与亚德阿霉素与CPI的联合治疗相比, Dox-CBD-SA与CPI的联合治疗将显示出更好的治疗效果。为了检验这一假设, 发明人选择了 $\alpha$ PD-1为临床中使用最广泛的CPI (26)。重要的是,  $\alpha$ PD-1在临床试验中与Dox联合使用 (例如NCT02648477)。发明人使用MC38结肠癌模型检验了亚德阿霉素和Dox-CBD-SA与 $\alpha$ PD-1组合的抗肿瘤作用, 该模型具有免疫原性 (27), 但不能通过Dox单一疗法治愈 (28)。C57BL/6小鼠皮下接种 $5 \times 10^5$  MC38细胞。处理方案如图5A所示。在肿瘤接种后6天、9天和12天, 向小鼠施用亚德阿霉素或Dox-CBD-SA。由于Dox-CBD-SA增加了TIL的数量, 发明人在Dox处理一天后注射了两次100 $\mu$ g的 $\alpha$ PD-1 (第10天和第13天)。Dox-CBD-SA加 $\alpha$ PD-1治疗彻底根除了已建立的MC38肿瘤 (第6天的平均肿瘤体积约为100mm<sup>3</sup>, 图5B, 图5G), 并且与所有其他组相比显著延长了小鼠的存活时间 (图5C)。在其他治疗组中, 一小部分小鼠未能表现出完全响应, 并且平均肿瘤大小逐渐增加 (图5B, 图5D-5F)。在Dox-CBD-SA+ $\alpha$ PD-1处理的幸存者中, 在没有另外的治疗的情况下用MC38细胞再次攻击的小鼠没有出现可触及的肿瘤, 这表明它们获得了强大的免疫抗肿瘤记忆 (图5H, 图15A)。在治疗过程中, 没有小鼠表现出大于15%的体重减轻 (图15B)。这些数据表明, Dox-CBD-SA通过诱导ICD与 $\alpha$ PD-1协同作用, 进一步显示了同等剂量的醛固霉素+ $\alpha$ PD-1所不能达到的抗肿瘤作用。

[0264] C. 讨论

[0265] 由于小分子抗癌药物广泛分布于组织并引起全身副作用, 因此已经尝试对药物进行修饰以改善其药代动力学和生物分布。纳米颗粒配方 (17) 或SA反应性 (18, 19) 阿霉素在肿瘤内表现出改善的药代动力学和积累, 部分原因是其病理性异常的血管系统 (5)。然而, 由于人类癌症的异质性, 这种效应可能并不总是对人类癌症有效 (29)。因此, 只依赖被动靶向的药物还可以有改进的余地。用于药物递送的肿瘤特异性或肿瘤相关抗原的主动靶向是另一种治疗策略。然而, 这在本质上限制了癌症的适用范围, 并且还可能由于抗原选择性细胞靶向和杀伤而导致获得性耐药, 该抗原可能因突变而丢失 (30)。在这里, 发明人设计了CBD-SA来克服这些问题。与其他主动靶向策略不同, CBD-SA不需要事先研究肿瘤相关抗原的表达情况, 因为胶原在肿瘤中几乎无处不在, 并且CBD通过肿瘤微环境中的异常血管结构进入肿瘤基质 (6)。随后, CBD-SA与暴露的胶原结合 (图1C, 图7) 并将肿瘤基质转化为化疗药物的储存库。与亚德阿霉素和Dox-SA相比, Dox与CBD-SA的缀合后在肿瘤组织内Dox的积累显著更高 (图2C)。Dox-CBD-SA在肿瘤组织内积累后, 胺键可以在肿瘤微环境中的微酸性条件下裂解 (图1E) (21), 能够从CBD-SA中持续释放Dox。同时, 已知肿瘤细胞摄取SA (1)。值得注意的是, CBD融合并没有改变SA的细胞摄取 (图1F), 表明Dox-CBD-SA也可以像Dox-SA一样有效地在细胞内递送。因此, 部分Dox释放可能发生在肿瘤基质中, 而Dox-CBD-SA仍与基质结合, 部分可能发生在胞吞作用后的内容物室中。CBD-SA相对较低的分子量 (88kDa, 图6) 有利于肿瘤组织的扩散 (32)。

[0266] 在抗肿瘤疗效方面,与亚德阿霉素和Dox-SA相比,Dox-CBD-SA显著抑制了MMTV-PyMT乳腺癌的生长并延长了小鼠的存活期(图3A-3F)。由于Dox-CBD-SA在体内肿瘤组织中的积累量最高,因此Dox-CBD-SA应通过抑制肿瘤细胞增殖来更有效地诱导肿瘤细胞死亡。除了这种效果,单次注射Dox-CBD-SA尽管其血浆清除半衰期更快,但仍能带来持久的治疗效果(图2A,图2B)。这可以通过发明人的观察来解释,即与Dox-SA和亚德阿霉素治疗相比,Dox-CBD-SA治疗诱导了更高数量和更高密度的TIL(图3G-3L)。因此,Dox-CBD-SA的抗肿瘤作用机制可能不仅是直接杀伤细胞,还能刺激宿主抗肿瘤免疫。由于Dox-CBD-SA在肿瘤内有效地积累,它可以比亚德阿霉素和Dox-SA更有效地诱导ICD和肿瘤抗原暴露于免疫系统。因此,Dox-CBD-SA联合 $\alpha$ PD-1协同根除MC38结肠癌(图5B,图5G)。与亚德阿霉素相比,Dox-SA和Dox-CBD-SA的治疗效果的提高(图3A-3F)还表明注射前预缀合Dox将提供更高的抗肿瘤疗效。除了从血液循环中快速清除外,亚德阿霉素与血浆中的其他巯基化合物(如半胱氨酸、谷胱甘肽、纤连蛋白或 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶)的原位缀合(18)也是导致亚德阿霉素治疗效果低下的一个可能原因。

[0267] 心脏毒性是Dox的主要缺点,它限制了Dox的终生累积剂量(13)。组织学分析显示,即使是20mg/kg的Dox-CBD-SA的施用也没有显示出任何心脏损伤的迹象(图14)。这表明与CBD-SA预缀合的Dox比游离Dox的心脏毒性更低,后者在小鼠模型中以15mg/kg的累积剂量对心脏组织造成不可逆转的损害(34)。重要的是,15mg/kg的累积剂量几乎等于人类的最大累积剂量(35)。

[0268] 在制造过程方面,发明人使用Traut试剂缀合Dox,这可以精确控制药物缀合率(36)。由于VWF A3结构域与胶原蛋白的结合界面上没有赖氨酸残基,所以这种方法对CBD与胶原蛋白结合的风险很小(图10)(22)。此外,SA所含的赖氨酸残基数量约为CBD序列的7倍,这也表明由于缀合导致CBD出现不利构象变化的风险较低。Traut试剂还用于靶向CD70的ADC(MDX-1203,Bristol-Myers Squibb)(37),表明其适用性。由于CBD-SA以高产率(约70mg/L至100mg/L HEK293细胞孵育物)生产,发明人提出将Dox与CBD-SA预缀合以简单且可翻译的制备方法产生高抗肿瘤疗效。

[0269] 非特异性毒性的降低是出乎意料的,因为人们可能会认为CBD-SA会积聚在身体中不需要的部位,例如肝脏、肾脏和伤口,在这些部位,胶原可能会通过有孔或渗漏的内皮暴露。然而,在施用20mg/kg Dox-CBD-SA后发明人未观察到肝脏和肾脏的病理损伤(图14)。此外,当前多肽的疗效增加有些出乎意料,因为该领域的先前工作表明化学缀合通常会降低SA的半衰期。据报道,甲氨蝶呤缀合物以药物:蛋白质比例依赖性方式加速了甲氨蝶呤-SA缀合物从循环中的清除(38)。因此,令人惊讶的是,即使Dox-SA和Dox-CBD-SA的半衰期比报道的未经处理的小鼠SA的半衰期短( $t_{1/2}, \beta = 35$  (h))(39),治疗效率仍有所提高。

[0270] 总之,Dox-CBD-SA在肿瘤中积累并激活了宿主抗肿瘤免疫。因此,Dox-CBD-SA的单一疗法抑制了原位MMTV-PyMT乳腺肿瘤的生长并延长了生存期。更重要的是,Dox-CBD-SA联合 $\alpha$ PD-1免疫检查点抑制可以完全根除免疫原性MC38模型中的肿瘤。CBD融合为SA提供了主动靶向能力,SA通常用作被动靶向药物载体,能够有效地将药物从体循环输送到肿瘤中。预计CBD-SA是非免疫原性和生物学上可接受的,因为它由两种天然存在于血液中的蛋白质(VWF A3结构域和SA)组成。此外,CBD-SA不依赖于肿瘤类型特异性抗原,因此作为药物载体为各种类型的实体瘤提供了广泛的适用性。因此,CBD-SA作为抗肿瘤药物载体可能具有临

床转化为癌症治疗的潜力。

#### [0271] D. 材料和方法

##### [0272] 1. 研究设计

[0273] 本研究旨在验证通过工程化胶原结合的SA作为药物缀合载体将抗癌药物递送至肿瘤的策略。具体而言,发明人测试了与未修饰形式相比,Dox-CBD-SA针对乳腺癌和结肠癌小鼠模型的抗肿瘤疗效是否得到改善。还使用无肿瘤小鼠测试了Dox-CBD-SA的副作用。发明人测量了肿瘤生长、抗癌免疫反应和治疗后毒性的多个方面。没有使用统计方法来预先确定所需的样本量,但样本量是根据试点实验的估计和先前公布的结果确定的,这样适当的统计测试就可以产生显著的结果。CBD-SA由多人制备以确保可重复性。除图12外(一次),所有实验均至少重复两次。对于动物研究,在第一次注射Dox-CBD-SA之前,小鼠被随机分配为笼子内的治疗组,并以相同的方式进行治疗。根据动物护理指南,仅当动物因与治疗无关的原因出现健康问题,才将样本排除在分析之外。当MMTV-PyMT模型的肿瘤大小超过 $500\text{mm}^3$ 以及MC38模型的肿瘤大小超过 $600\text{mm}^3$ 时,就达到了生存终点。用于计算统计量的n值在图中或图例中已指明。以盲法方式进行施用和病理分析。统计方法在“统计分析”部分进行了描述。

##### [0274] 2. 细胞孵育

[0275] 如前所述,小鼠乳腺肿瘤病毒-多瘤病毒中间T抗原(MMTV-PyMT)细胞是从FVB-Tg(MMTV-PyMT)转基因小鼠自发发展的乳腺癌中获得的(9)。MC38结肠癌细胞系由R.Weichselbaum实验室(芝加哥大学)友情提供。两种细胞系均使用补充有110mg/L丙酮酸钠、10%热灭活FBS和1%青霉素/链霉素的DMEM(Gibco)。通过IMPACT I病原体测试(IDEXX BioResearch)检查细胞系的支原体污染情况。

##### [0276] 3. 小鼠

[0277] 从Charles River和Jackson实验室获得8周龄至12周龄的雌性FVB小鼠。8周龄至12周龄的雌性C57BL/6小鼠获取自Jackson实验室。在这项工作中进行的所有动物实验都得到了芝加哥大学机构动物护理和使用委员会的批准。

##### [0278] 4. CBD-SA的生产和纯化

[0279] CBD-SA蛋白的设计、生产和纯化与之前报道的CBD蛋白类似(9)。合成编码人VWF A3结构域残基Cys1670-Gly1874(成熟VWF的907-1111)和不含前肽的小鼠SA(整个SA的25个至608个氨基酸)融合的序列,并通过Genscript亚克隆到哺乳动物表达载体pcDNA3.1(+)上。将编码His标签(6His(SEQ ID NO:21))的序列插入C-末端以进一步纯化重组蛋白。悬浮适应的HEK-293F细胞常规维持在无血清FreeStyle 293表达孵育基(Gibco)中。在转染当天,将细胞以 $1 \times 10^6$ 细胞/mL的密度稀释到新鲜孵育基中。添加 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 质粒DNA、 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性25kDa聚乙烯亚胺(Polysciences)和OptiPRO SFM孵育基(4%终浓度,Thermo Fisher Scientific)。在5%CO<sub>2</sub>存在下,在37°C下以135rpm的轨道摇动来搅动孵育瓶。转染7天后,通过通过 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器离心收集细胞孵育基。使用ÄKTApure 25(GE Healthcare)将培养基装入HisTrap HP 5mL柱(GE Healthcare)。用洗涤缓冲液(20mM咪唑、20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5M NaCl、pH 7.4)洗涤柱子后,用500mM咪唑(在20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5M NaCl、pH 7.4中)的梯度洗脱蛋白质。使用HiLoad Superdex 200PG柱(GE Healthcare)通过尺寸排阻色谱法进一步纯化洗脱液。所有纯化步骤均在4°C下进行。通过SDS-PAGE证实蛋白质纯度>90%。

#### [0280] 5. MALDI-TOF MS

[0281] 如前所述,纯化的CBD-SA通过MALDI-TOF质谱仪(Bruker Ultraflex extreme MALDI TOF/TOF)分析(9)。Bruker flexControlr用于数据采集,Bruker flexAnalyse用于数据处理。首先,以50:50乙腈:1% TFA水溶液为溶剂,制备 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(Sigma-Aldrich)的饱和溶液。将PBS中的CBD-SA(5 $\mu$ L,0.1mg/mL)和基质溶液(25 $\mu$ L)混合,然后将1 $\mu$ L的混合物滴在MTP 384研磨钢靶板上。液滴在氮气流中干燥。使用高质量线性正模法对所有样品进行分析,在75%的激光强度下进行2500次激光发射。使用碳酸酐酶、磷酸化酶B和牛SA的混合物在三个点外部校准测量值。

#### [0282] 6. 结合亲和力实验

[0283] 如前所述测试了CBD-SA对胶原的结合亲和力(9)。96孔ELISA板(Greiner Bio-One)在37 $^{\circ}$ C下用胶原I或胶原III(PBS中各10 $\mu$ g/mL)包被过夜,然后用2% BSA的PBS和0.05%的吐温20(PBS-T)在室温下封闭1小时。然后,用PBS-T洗涤孔,并在室温下与浓度不断增加的CBD-SA进一步孵育2小时。用PBS-T洗涤3次后,将SA的生物素缀合抗小鼠体在室温下孵育1小时。洗涤后,通过测量450nm处的吸光度并减去570nm处的吸光度,用四甲基联苯胺底物检测结合的CBD-SA。通过在Prism软件(第7版,GraphPad)中进行非线性回归分析获得表观Kd值,假设为一个位点特异性结合。

#### [0284] 7. Dox缀合物的合成

[0285] 小鼠SA或CBD-SA溶解在含有2mM EDTA的PBS中。加入4摩尔当量的溶解在含有2mM EDTA的PBS中的Traut试剂,并在室温下避光孵育1小时。通过Zeba旋转脱盐柱(Thermo Fisher science)去除多余的Traut试剂。加入溶解在10mM磷酸钠缓冲液(pH 5.9)中的15摩尔当量的亚德阿霉素(MedChemExpress),并在室温下孵育1小时,并在4 $^{\circ}$ C下在黑暗中孵育过夜。为了淬灭反应,加入20摩尔当量的对抗亚德阿霉素的L-半胱氨酸(Sigma-Aldrich(医药级)溶解在含有2mM EDTA的PBS中)。通过离心(10000x g,5分钟)除去未反应的Dox沉淀。上清液通过Zeba旋转脱盐柱进一步纯化,然后使用Amicon-Ultra(Merck,10K MWCO)进行超滤。通过495nm处的吸光度进行定量最终产品中Dox的浓度,使用摩尔消光系数10650(L $\cdot$ mol $^{-1}$  $\cdot$ cm $^{-1}$ )。根据制造商的说明书,通过Pierce BCA蛋白检测试剂盒(Thermo Fisher Scientific)测量蛋白质含量的浓度。

#### [0286] 8. 动态光散射(DLS)

[0287] 使用Zetasizer Nano ZS(Malvern)测量PBS中Dox缀合物的流体动力学大小。合成后立即分析缀合物,或冻干并储存在-20 $^{\circ}$ C下以备用。

#### [0288] 9. 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

[0289] 如发明人之前的工作(9)中所述进行SDS-PAGE。使用4%至20%的梯度凝胶(Bio-Rad),并且在用或不用10mM DTT还原的情况下负载0.5情况的每种Dox缀合物。电泳后,根据制造商的说明书使用SimplyBlue SafeStain(Thermo Fisher Scientific)进行凝胶染色。使用ChemiDoc XRS+系统(Bio-Rad)进行图像采集。

#### [0290] 10. 缀合物中Dox的pH依赖性释放

[0291] 用Slide-A-Lyzer MINI透析装置(Thermo Fisher science,10K MWCO)确定Dox从缀合物中的释放曲线。Dox缀合物在PBS(pH 6.5或7.4)或0.1M醋酸盐缓冲液(pH 5.0)中稀释至100 $\mu$ M(基于Dox)。将150 $\mu$ L的每个样品负载到设备中并用50mL缓冲液透析。使用磁力搅

拌器进行透析。样品台的温度设置为37℃,透析过程中样品避光。在不同的时间点收集透析液并储存在4℃下直到样品收集完成。将透析液分两份(90μL/孔)负载到96孔板上。使用495nm激发和590nm发射检测荧光。在相同缓冲液中制备盐酸阿霉素的系列稀释液以创建标准曲线。

#### [0292] 11. Dox缀合物的细胞摄取

[0293] 为了评估Dox缀合物的细胞摄取,将MMTV-PyMT细胞以5000个细胞/孔的浓度接种在96孔高内涵成像板(Corning)中并孵育过夜。细胞用PBS洗涤,并用溶解在DMEM中的Dox浓度为50μM的游离Dox、Dox-SA或Dox-CBD-SA(110mg/L丙酮酸钠、10%热灭活FBS、1%青霉素/链霉素、酚红(-))处理。孵育后,将细胞洗涤两次,用75nM Lysotracker Deep Red处理,并在37℃下另外孵育30分钟。将细胞洗涤两次并通过IX83显微镜(Olympus)以x 60的放大倍数观察。使用ImageJ软件(NIH)处理图像。比例尺;20μm。

#### [0294] 12. 体外细胞毒性

[0295] 将3000个细胞/孔的MMTV-PyMT细胞或MC38细胞接种在96孔组织培养板(BD Falcon)中并孵育过夜。用丙酮酸钠110mg/L、10%热灭活胎牛血清、1%青霉素/链霉素、苯酚红(-)的DMEM洗涤细胞,加入80μL/孔的DMEM。然后,在PBS中加入的连续稀释的亚德阿霉素、Dox-SA或Dox-CBD-SA(20μL/孔)。细胞在37℃下孵育3天,并根据制造商的说明书使用CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit(Promega)检测细胞活力。用80μL/孔的DMEM+20μL/孔的PBS处理的细胞的存活率为100%,而使用相同混合物的无细胞孔定义为存活率0%。通过Prism软件中的非线性回归分析获得最大半抑制浓度(IC50) ([抑制剂] vs 归一化响应)。

#### [0296] 13. Dox缀合物的血浆药代动力学

[0297] 参考了之前关于多肽-Dox纳米颗粒的报道(40)。为了测量Dox的药代动力学,将5mg/kg Dox等效的亚德阿霉素、Dox-SA或Dox-CBD-SA注射至雌性FVB小鼠体内。在注射后5分钟、30分钟、1小时、4小时、12小时、25小时、50小时和75小时,将血样收集在EDTA涂层管中。血样保存在4℃下直至样品采集结束。将样品离心(2000x g, 5分钟)并收集血浆。将在酸化异丙醇(75mM HCl、10%水、90%异丙醇)中稀释的血浆样品负载到96孔板上(100μL/孔)。如上所述测量荧光。还从未接受注射的小鼠中收集血浆样品,在酸化异丙醇中稀释,并测量以创建背景荧光的标准曲线。指数两相衰减( $Y = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ )拟合用于计算血浆半衰期。快速清除半衰期: $t_{1/2, \alpha}$ , 缓慢清除半衰期: $t_{1/2, \beta}$ 。使用Prism软件(v7, GraphPad)分析数据。

#### [0298] 14. SA和CBD-SA的血浆药代动力学

[0299] 根据制造商的说明书,SA和CBD-SA用DyLight 800NHS酯(Thermo Fisher Scientific)标记。未反应的染料通过如上所述的Zeba旋转脱盐柱除去。标记后,将200μg的每种蛋白质静脉注射到雌性FVB小鼠中。在注射后1分钟、1小时、4小时、24小时、74小时和120小时,将血样收集在EDTA涂层管中。血样保存在4℃下直至样品采集结束。将样品离心(2000x g, 5分钟)并收集血浆。血浆样品在PBS中稀释并负载到96孔板(100μL/孔)。用LI-COR Infrared Odyssey Imager(Li-COR Biosciences)测量血浆中每种蛋白质的浓度。曲线拟合方法和血浆半衰期计算方法如上所述。

#### [0300] 15. MMTV-PyMT肿瘤接种和治疗

[0301] MMTV-PyMT鼠乳腺癌模型的制备如前所述(9)。将悬浮在50μL PBS中的总共5×

$10^5$ MMTV-PyMT细胞皮下注射到每只小鼠右侧的乳腺中。在第7天(5mg/kg)通过尾静脉注射用亚德阿霉素、Dox-SA或Dox-CBD-SA来治疗小鼠。在指定的时间点用数显卡尺测量肿瘤,体积按椭球体计算,其中 $V=4/3 \times 3.14 \times \text{深度}/2 \times \text{宽度}/2 \times \text{高度}/2$ 。当肿瘤体积超过 $500\text{mm}^3$ 或观察到活动性溃疡时处死小鼠。对于治疗实验,使用源自Charles River的FVB小鼠。对于肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)分析,使用了来自Jackson实验室和Charles River的FVB小鼠。来自不同提供者的小鼠比例在所有组中均等。

#### [0302] 16. MC38肿瘤接种和治疗

[0303] MC38鼠结肠癌模型的制备与之前描述的B16F10黑色素瘤模型类似(9)。将悬浮在 $50\mu\text{L}$  PBS中的总共 $5 \times 10^5$ MC38细胞皮内注射到每只C57BL/6小鼠背部的左侧。在第6天、9天、12天,对小鼠静脉注射亚德阿霉素、Dox-SA或Dox-CBD-SA(5mg/kg)。小鼠也接受腹腔内治疗。在第10天和第13天加入 $100\mu\text{g}$ 抗PD-1(Clone 29F.1A12, Bio X Cell)。如上所述监测肿瘤的生长。当肿瘤体积超过 $600\text{mm}^3$ 或观察到活动性溃疡时处死小鼠。在第60天,通过皮内注射 $5 \times 10^5$ MC38细胞来再次攻击未经处理的C57BL/6小鼠或无肿瘤存活者。

#### [0304] 17. 肿瘤积累研究

[0305] 先前关于多肽-Dox纳米颗粒的报告被引用(40)。以 $4.16\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量经尾静脉注射亚德阿霉素、Dox-SA或Dox-CBD-SA到已形成肿瘤的FVB小鼠内。取瘤后称重,于注射后2h或24h冰敷。将肿瘤组织悬浮在 $1\text{mL}$ 酸化的异丙醇中,并使用Lysing Matrix D和FastPrep-24 5G(MP Biomedical)以5000次/分钟的速度匀浆40秒。匀浆后,样品避光,并于 $4^\circ\text{C}$ 下孵育过夜。将样品离心( $5000 \times g$ , 5分钟),并将上清液负载到96孔板上( $100\mu\text{L}/\text{孔}$ , 一式三份)。如上所述,测量荧光以量化组织提取物中Dox的量。对未处理的小鼠肿瘤进行处理,并测量组织提取物的系列稀释液以获得组织衍生的自发荧光的标准曲线。

#### [0306] 18. 肿瘤内注射CBD-SA的组织学分析

[0307] 根据制造商的说明书,将小鼠SA(Sigma-Aldrich)和CBD-SA与NHS-DyLight 488缀合。Zeba离心脱盐柱除去未反应的染料,然后将荧光蛋白溶液于 $4^\circ\text{C}$ 下保存以备用。将 $100\mu\text{g}$ 荧光标记的SA或用等摩尔染料标记的CBD-SA静脉注射给MMTV-PyMT荷瘤小鼠。注射后1小时,收获肿瘤并用OCT化合物冷冻在干冰中。通过冷冻切片获得 $10\mu\text{m}$ 的组织切片。在室温下用含2%多聚甲醛的PBS固定组织15分钟。用PBS-T洗涤后,在室温下用PBS-T中的2%BSA将组织封闭1小时。用生物素标记的抗小鼠CD31抗体(1:100, Biolegend)和Alexa Fluor 647链霉亲和素(1:1000, Biolegend)将组织染色。将组织洗涤3次,然后用带有DAPI(Thermo Fisher Scientific)的ProLong金抗褪色封固剂覆盖。用IX83显微镜(Olympus)以60的放大倍率成像。使用ImageJ软件(NIH)处理图像。

#### [0308] 19. 流式细胞术和抗体

[0309] MMTV-PyMT模型按上述方法制备。在第7天用亚德阿霉素、Dox-SA或Dox-CBD-SA(5mg/kg)治疗小鼠。在第14天处死小鼠。如前所述从每个肿瘤中获得细胞悬液(9)。收获肿瘤并于 $37^\circ\text{C}$ 下在补充有2%FBS、 $2\text{mg}/\text{mL}$ 胶原酶D和 $40\mu\text{g}/\text{mL}$  DNase I(Roche)的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)中消化30分钟。通过 $70\mu\text{m}$ 细胞过滤器轻轻破坏器官,获得单细胞悬浮液。用ACK裂解缓冲液(Quality Biological)裂解红细胞。根据制造商的说明书,使用Fixable Viability Dye eFluor 455(eBioscience)对可固定的活/死细胞进行区分。洗涤步骤后,细胞在固定前在冰上用特异性抗体染色20分钟。以下抗体用于染色细胞:CD3(145-

2C11, BD Biosciences)、CD4 (RM4-5, BD Biosciences)、CD8 $\alpha$  (53-6.7, BD Biosciences)、CD45 (30-F11, BD Biosciences), 和NK1.1 (PK136, BD Biosciences), 所有流式细胞术分析均使用Fortessa流式细胞仪 (BD Biosciences) 进行, 并使用FlowJo软件 (Tree Star) 进行分析。

#### [0310] 20. 毒性概况

[0311] 无肿瘤FVB小鼠通过静脉注射接受20mg/kg的亚德阿霉素或Dox-CBD-SA。在注射后第3天和第6天, 通过下颌下出血从每只小鼠的EDTA涂层管中收集血液样本, 用于血浆细胞因子分析和血液学分析。在指定的时间点测量每只小鼠的体重。在第16天, 处死小鼠并取器官。脾脏称重, 其他器官用于组织学分析。当观察到初始体重减少超过15%时处死小鼠。

#### [0312] 21. 血液学分析

[0313] 根据制造商的说明书, 使用COULTER Ac • T 5diff CP血液分析仪 (Beckman coulter) 分析血样。

#### [0314] 22. 血浆细胞因子的测量

[0315] 如上所述从全血样品中收集血浆并储存在-20°C下以备用。根据制造商的说明书, 使用Ready-SET-Go! ELISA试剂盒 (eBioscience) 和Can Get Signal solution (TOYOBO) 测量血浆中的细胞因子浓度。

#### [0316] 23. 心、肝、肾、肺组织学分析

[0317] 器官用PBS中的2%多聚甲醛固定过夜。石蜡包埋后, 切片5 $\mu$ m, H&E染色。

#### [0318] 24. 统计分析

[0319] 如前所述使用Prism软件 (v7, GraphPad) 确定实验组之间的统计学显著差异 (9)。在使用单向方差分析和Tukey的HSD事后检验的情况下, 通过Brown-Forsythe检验发现组之间的差异相似。对于非参数数据 (图3G), 使用Kruskal-Wallis检验, 然后是Dunn的多重比较检验。通过使用对数秩 (Mantel-Cox) 检验分析生存曲线。符号\*和\*\*分别表示P值小于0.05和0.01; N.S, 无显著差异。

#### [0320] \*\*\*\*\*

[0321] 尽管上文已经以一定程度的特殊性或者参考一个或多个于一个单独的实施方案描述了某些实施方案, 但是本领域技术人员可以在不脱离本发明的范围的情况下对所公开的实施例做出多种改变。此外, 在适当的情况下, 上述任何实施例的方面可以与所描述的任何其他实施例的方面组合以形成具有可比较的或不同的特性并且解决相同或不同的问题的其他实施例。类似地, 应当理解, 上述益处和优点可以与一个实施例有关或可能与若干个实施例有关。对专利公开或其他公开的任何引用在此都是通过引用该公开的公开内容的特定并入。权利要求不应被解释为包括手段加或步骤加功能的限制, 除非在给定的权利要求中分别使用短语“手段”或“步骤”明确叙述了这种限制。

#### [0322] 参考文献

[0323] 在整个说明书中提及的以下参考文献和公开, 在它们提供典型的程序或其他细节补充本文中阐述的那些的范围内, 通过引用具体并入本文。

[0324] 1. F. Kratz, Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. J. Control. Release 132, 171-183 (2008).

[0325] 2. J. Morales, Defining the role of insulin detemir in basal insulin

therapy. *Drugs* 67,2557-2584(2007) .

[0326] 3.R.Flisiak,I.Flisiak,Albinterferon-alfa 2b:a new treatment option for hepatitis C. *Expert.Opin.Biol.Ther.*10,1509-1515(2010) .

[0327] 4.M.Green,G.Manikhas,S.Orlov,B.Afanasyev,A.Makhson,P.Bhar,M.Hawkins, **Abraxane®**,a novel **Cremophor®**-free,albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Ann.Oncol.*17,1263-1268(2006) .

[0328] 5.Y.Matsumura,H.Maeda,A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy:mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.*46,6387-6392(1986) .

[0329] 6.F.Danhier,O.Feron,V.PrPr concept for macromolecular therapeutint: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J.Control.Release* 148,135-146(2010) .

[0330] 7.K.Temming,D.L.Meyer,R.Zabinski,E.C.Dijkers,K.Poelstra,G.Molema,R.J.Kok,Evaluation of RGD-targeted albumin carriers for specific delivery of auristatin E to tumor blood vessels. *Bioconjug.Chem.*17,1385-1394(2006) .

[0331] 8.J.Prakash,L.Beljaars,A.K.Harapanahalli,M.Zeinstra-Smith,A.de Jager-Krikken,M.Hessing,H.Steen,K.Poelstra,Tumor-targeted intracellular delivery of anticancer drugs through the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Int.J.Cancer* 126,1966-1981(2010) .

[0332] 9.J.Ishihara,A.Ishihara,K.Sasaki,S.S.-Y.Lee,M.Yasui,H.Abe,L.Potin,P.Hosseinchik,K.Fukunaga,M.M.Raczy,L.T.Gray,J.-M.Williford,M.Fukayama,S.J.Kron,M.A.Swartz,J.A.Hubbell,Targeted antibody and cytokine cancer immunotherapies through collagen affinity. *Sci.Transl.Med.*in press.

[0333] 10.C.Addi,F.Murschel,G.De Crescenzo,Design and use of chimeric proteins containing a collagen-binding domain for wound healing and bone regeneration. *Tissue Eng.Part B.Rev.*23,163-182(2017) .

[0334] 11.P.P.Provenzano,D.R.Inman,K.W.Eliceiri,J.G.Knittel,L.Yan,C.T.Rueden,J.G.White,P.J.Keely,Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med.*6,11(2008) .

[0335] 12.Z.-H.Zhou,C.-D.Ji,H.-L.Xiao,H.-B.Zhao,Y.-H.Cui,X.-W.Bian, Reorganized Collagen in the Tumor Microenvironment of Gastric Cancer and Its Association with Prognosis. *J.Cancer* 8,1466-1476(2017) .

[0336] 13.R.C.Young,R.F.Ozols,C.E.Myers,The anthracycline antineoplastic drugs. *N.Engl.J.Med.*305,139-153(1981) .

[0337] 14.L.Wang,Q.Chen,H.Qi,C.Wang,C.Wang,J.Zhang,L.Dong,Doxorubicin-induced systemic inflammation is driven by upregulation of toll-like receptor TLR4 and endotoxin leakage. *Cancer Res.*76,6631-6642(2016) .

[0338] 15.G.Kroemer,L.Galluzzi,O.Kepp,L.Zitvogel,Immunogenic cell death in

cancer therapy. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 51-72 (2013).

[0339] 16. J. Rios-Doria, N. Durham, L. Wetzel, R. Rothstein, J. Chesebrough, N. Holoweckyj, W. Zhao, C. C. Leow, R. Hollingsworth, Doxil synergizes with cancer immunotherapies to enhance antitumor responses in syngeneic mouse models. *Neoplasia* 17, 661-670 (2015).

[0340] 17. M. E. O'Brien, N. Wigler, M. Inbar, R. Rosso, E. Grischke, A. Santoro, R. Catane, D. Kieback, P. Tomczak, S. Ackland, Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil®) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* 15, 440-449 (2004).

[0341] 18. F. Kratz, A. Warnecke, K. Scheuermann, C. Stockmar, J. Schwab, P. Lazar, P. Dr D. Kieback, P. Tomczak, S. Ackland, Reduced cardiotoxicity and comparable efous serum albumin with thiol-binding doxorubicin derivatives. Improved efficacy of an acid-sensitive doxorubicin derivative with specific albumin-binding properties compared to that of the parent compound. *J. Med. Chem.* 45, 5523-5533 (2002).

[0342] 19. R. Graeser, N. Esser, H. Unger, I. Fichtner, A. Zhu, C. Unger, F. Kratz, INNO-206, the (6-maleimidocaproyl hydrazone derivative of doxorubicin), shows superior antitumor efficacy compared to doxorubicin in different tumor xenograft models and in an orthotopic pancreas carcinoma model. *Invest. New Drugs* 28, 14-19 (2010).

[0343] 20. S. P. Chawla, Z. Papai, G. Mukhametshina, K. Sankhala, L. Vasylyev, A. Fedenko, K. Khamly, K. Ganjoo, R. Nagarkar, S. Wieland, First-line aldoxorubicin vs doxorubicin in metastatic or locally advanced unresectable soft-tissue sarcoma: a phase 2b randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 1, 1272-1280 (2015).

[0344] 21. M. Prabakaran, J. J. Grailer, S. Pilla, D. A. Steeber, S. Gong, Amphiphilic multi-arm-block copolymer conjugated with doxorubicin via pH-sensitive hydrazone bond for tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials* 30, 5757-5766 (2009).

[0345] 22. T. H. C. Brondijk, D. Bihan, R. W. Farndale, E. G. Huizinga, Implications for collagen I chain registry from the structure of the collagen von Willebrand factor A3 domain complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 5253-5258 (2012).

[0346] 23. H. M. Kuerer, L. A. Newman, T. L. Smith, F. C. Ames, K. K. Hunt, K. Dhingra, R. L. Theriault, G. Singh, S. M. Binkley, N. Sneige, Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 17, 460-469 (1999).

[0347] 24. K. M. Ropponen, M. J. Eskelinen, P. K. Lipponen, E. Alhava, V. M. Kosma, Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal

cancer. *J. Pathol.* 182, 318-324 (1997) .

[0348] 25. S. Loi, N. Sirtaine, F. Piette, R. Salgado, G. Viale, F. Van Eeno, G. Rouas, P. Francis, J. P. Crown, E. Hitre, Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J. Clin. Oncol.* 31, 860-867 (2013) .

[0349] 26. K. M. Hargadon, C. E. Johnson, C. J. Williams, Immune checkpoint blockade therapy for cancer: an overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *Int. Immunopharmacol.* 62, 29-39 (2018) .

[0350] 27. M. Yadav, S. Jhunjhunwala, Q. T. Phung, P. Lupardus, J. Tanguay, S. Bumbaca, C. Franci, T. K. Cheung, J. Fritsche, T. Weinschenk, Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* 515, 572-576 (2014) .

[0351] 28. R. Kuai, W. Yuan, S. Son, J. Nam, Y. Xu, Y. Fan, A. Schwendeman, J. J. Moon, Elimination of established tumors with nanodisc-based combination chemoimmunotherapy. *Sci. Adv.* 4, eaao1736 (2018) .

[0352] 29. U. Prabhakar, H. Maeda, R. K. Jain, E. M. Sevick-Muraca, W. Zamboni, O. C. Farokhzad, S. T. Barry, A. Gabizon, P. Grodzinski, D. C. Blakey, Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res.* 73, 2412-2417 (2013) .

[0353] 30. C. Holohan, S. Van Schaeybroeck, D. B. Longley, P. G. Johnston, Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* 13, 714-726 (2013) .

[0354] 31. M. Yasunaga, S. Manabe, D. Tarin, Y. Matsumura, Cancer-stroma targeting therapy by cytotoxic immunoconjugate bound to the collagen 4 network in the tumor tissue. *Bioconjug. Chem.* 22, 1776-1783 (2011) .

[0355] 32. A. Pluen, Y. Boucher, S. Ramanujan, T. D. McKee, T. Gohongi, E. di Tomaso, E. B. Brown, Y. Izumi, R. B. Campbell, D. A. Berk, Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 4628-4633 (2001) .

[0356] 33. N. Diamantis, U. Banerji, Antibody-drug conjugates—an emerging class of cancer treatment. *Br. J. Cancer* 114, 362-367 (2016) .

[0357] 34. P. W. Fisher, F. Salloum, A. Das, H. Hyder, R. C. Kukreja, Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation* 111, 1601-1610 (2005) .

[0358] 35. G. Takemura, H. Fujiwara, Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 49, 330-352 (2007) .

[0359] 36. M. J. McCall, H. Diril, C. F. Meares, Simplified method for conjugating

macrocyclic bifunctional chelating agents to antibodies via 2-iminothiolane. *Bioconjug. Chem.* 1, 222-226 (1990).

[0360] 37. T.K. Owonikoko, A. Hussain, W.M. Stadler, D.C. Smith, H. Kluger, A.M. Molina, P. Gulati, A. Shah, C.M. Ahlers, P.M. Cardarelli, First-in-human multicenter phase I study of BMS-936561 (MDX-1203), an antibody-drug conjugate targeting CD70. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 77, 155-162 (2016).

[0361] 38. G. Stehle, H. Sinn, A. Wunder, H.H. Schrenk, S. Schütt, W. Maier-Borst, D.L. Heene, The loading rate determines tumor targeting properties of methotrexate-albumin conjugates in rats. *Anticancer. drugs* 8, 677-685 (1997).

[0362] 39. C. Chaudhury, S. Mehnaz, J.M. Robinson, W.L. Hayton, D.K. Pearl, D.C. Roopenian, C.L. Anderson, The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J. Exp. Med.* 197, 315-322 (2003).

[0363] 40. J.A. MacKay, M. Chen, J.R. McDaniel, W. Liu, A.J. Simnick, A. Chilkoti, Self-assembling chimeric polypeptide-doxorubicin conjugate nanoparticles that abolish tumours after a single injection. *Nat. Mater.* 8, 993-999 (2009).

## 序列表

<110> 芝加哥大学

<120> 用胶原结合药物载体治疗癌症的方法和组合物

<130> ARCD-P0688W0-1001126260

<140> PCT/US2020/070113

<141> 2020-06-03

<150> 62/856,468

<151> 2019-06-03

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 205

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp  
1 5 10 15

[0001] Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser  
20 25 30

Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe  
35 40 45

Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu  
50 55 60

Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro  
65 70 75 80

Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly  
85 90 95

Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu  
100 105 110

Thr Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val  
115 120 125

Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp



Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp  
115 120 125

Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp  
130 135 140

Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp  
145 150 155 160

Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val  
165 170 175

Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg  
180 185 190

Ile

<210> 3

<211> 791

<212> PRT

<213> 人工序列

[0003]

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 3

Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser  
1 5 10 15

Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe  
20 25 30

Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu  
35 40 45

Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro  
50 55 60

Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly  
65 70 75 80

Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu  
85 90 95

Thr Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val  
 100 105 110

Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp  
 115 120 125

Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp  
 130 135 140

Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp  
 145 150 155 160

Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val  
 165 170 175

Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg  
 180 185 190

Ile Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ala His Lys Ser Glu Ile  
 195 200 205

[0004]

Ala His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val  
 210 215 220

Leu Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Cys Ser Tyr Asp Glu His  
 225 230 235 240

Ala Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala  
 245 250 255

Asp Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly  
 260 265 270

Asp Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu  
 275 280 285

Ala Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu  
 290 295 300

Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu  
 305 310 315 320

Ala Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met  
325 330 335

Gly His Tyr Leu His Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala  
340 345 350

Pro Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln  
355 360 365

Cys Cys Ala Glu Ala Asp Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp  
370 375 380

Gly Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys  
385 390 395 400

Cys Ser Ser Met Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala  
405 410 415

Val Ala Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile  
420 425 430

[0005] Thr Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His  
435 440 445

Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr  
450 455 460

Met Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys  
465 470 475 480

Asp Lys Pro Leu Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val Glu His  
485 490 495

Asp Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu  
500 505 510

Asp Gln Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu  
515 520 525

Gly Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val  
530 535 540

Ser Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys

	545		550			555		560								
	Cys	Cys	Ala	Glu	Ala	Asn	Pro	Pro	Ala	Cys	Tyr	Gly	Thr	Val	Leu	Ala
					565					570					575	
	Glu	Phe	Gln	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Lys	Asn	Leu	Val	Lys	Thr	Asn
				580					585					590		
	Cys	Asp	Leu	Tyr	Glu	Lys	Leu	Gly	Glu	Tyr	Gly	Phe	Gln	Asn	Ala	Ile
			595					600					605			
	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu
		610					615					620				
	Val	Glu	Ala	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Arg	Val	Gly	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr
	625					630					635					640
	Leu	Pro	Glu	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Cys	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Ala
					645					650					655	
[0006]	Ile	Leu	Asn	Arg	Val	Cys	Leu	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Glu
				660					665					670		
	His	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Ser	Gly	Ser	Leu	Val	Glu	Arg	Arg	Pro	Cys
			675					680					685			
	Phe	Ser	Ala	Leu	Thr	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Lys
		690					695					700				
	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ser	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Pro	Glu	Lys
	705					710					715					720
	Glu	Lys	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	His
					725					730					735	
	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Ala	Glu	Gln	Leu	Lys	Thr	Val	Met	Asp	Asp	Phe
				740					745					750		
	Ala	Gln	Phe	Leu	Asp	Thr	Cys	Cys	Lys	Ala	Ala	Asp	Lys	Asp	Thr	Cys
			755					760					765			
	Phe	Ser	Thr	Glu	Gly	Pro	Asn	Leu	Val	Thr	Arg	Cys	Lys	Asp	Ala	Leu
		770					775					780				

Ala His His His His His His  
785 790

<210> 4  
<211> 2813  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 4

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile  
1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr  
20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly  
35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly  
50 55 60

[0007] Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys  
65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu  
85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro  
100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys  
115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly  
130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly  
145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln  
165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala

	180		185			190														
	Leu	Ser	Ser	Gly	Glu	Gln	Trp	Cys	Glu	Arg	Ala	Ser	Pro	Pro	Ser	Ser				
			195					200					205							
	Ser	Cys	Asn	Ile	Ser	Ser	Gly	Glu	Met	Gln	Lys	Gly	Leu	Trp	Glu	Gln				
		210					215					220								
	Cys	Gln	Leu	Leu	Lys	Ser	Thr	Ser	Val	Phe	Ala	Arg	Cys	His	Pro	Leu				
	225					230					235					240				
	Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Phe	Val	Ala	Leu	Cys	Glu	Lys	Thr	Leu	Cys	Glu				
					245					250					255					
	Cys	Ala	Gly	Gly	Leu	Glu	Cys	Ala	Cys	Pro	Ala	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala				
				260					265					270						
	Arg	Thr	Cys	Ala	Gln	Glu	Gly	Met	Val	Leu	Tyr	Gly	Trp	Thr	Asp	His				
			275					280					285							
[0008]	Ser	Ala	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Pro	Ala	Gly	Met	Glu	Tyr	Arg	Gln	Cys				
		290					295					300								
	Val	Ser	Pro	Cys	Ala	Arg	Thr	Cys	Gln	Ser	Leu	His	Ile	Asn	Glu	Met				
	305					310					315					320				
	Cys	Gln	Glu	Arg	Cys	Val	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Pro	Glu	Gly	Gln	Leu				
					325					330					335					
	Leu	Asp	Glu	Gly	Leu	Cys	Val	Glu	Ser	Thr	Glu	Cys	Pro	Cys	Val	His				
				340					345					350						
	Ser	Gly	Lys	Arg	Tyr	Pro	Pro	Gly	Thr	Ser	Leu	Ser	Arg	Asp	Cys	Asn				
			355					360					365							
	Thr	Cys	Ile	Cys	Arg	Asn	Ser	Gln	Trp	Ile	Cys	Ser	Asn	Glu	Glu	Cys				
		370					375					380								
	Pro	Gly	Glu	Cys	Leu	Val	Thr	Gly	Gln	Ser	His	Phe	Lys	Ser	Phe	Asp				
	385					390					395					400				
	Asn	Arg	Tyr	Phe	Thr	Phe	Ser	Gly	Ile	Cys	Gln	Tyr	Leu	Leu	Ala	Arg				
					405					410					415					

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys  
 420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu  
 435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val  
 450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu  
 465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu  
 485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu  
 500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn  
 515 520 525

[0009]

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro  
 530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln  
 545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met  
 565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe  
 580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys  
 595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly  
 610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val  
 625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln  
645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu  
660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe  
675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys  
690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp  
705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met  
725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val  
740 745 750

[0010]

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg  
755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu  
770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met  
785 790 795 800

Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg  
805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln  
820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr  
835 840 845

Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp  
850 855 860

Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly  
865 870 875 880

Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp  
885 890 895

Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys  
900 905 910

Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu  
915 920 925

Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys  
930 935 940

Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg  
945 950 955 960

Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg  
965 970 975

[0011] His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val  
980 985 990

Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr  
995 1000 1005

Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn  
1010 1015 1020

Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro  
1025 1030 1035

Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln  
1040 1045 1050

Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe  
1055 1060 1065

Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val  
1070 1075 1080

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala

	1085		1090		1095
	Cys Phe 1100	Cys Asp Thr Ile	Ala 1105	Ala Tyr Ala His	Val Cys Ala Gln 1110
	His Gly 1115	Lys Val Val Thr	Trp 1120	Arg Thr Ala Thr	Leu Cys Pro Gln 1125
	Ser Cys 1130	Glu Glu Arg Asn	Leu 1135	Arg Glu Asn Gly	Tyr Glu Cys Glu 1140
	Trp Arg 1145	Tyr Asn Ser Cys	Ala 1150	Pro Ala Cys Gln	Val Thr Cys Gln 1155
	His Pro 1160	Glu Pro Leu Ala	Cys 1165	Pro Val Gln Cys	Val Glu Gly Cys 1170
	His Ala 1175	His Cys Pro Pro	Gly 1180	Lys Ile Leu Asp	Glu Leu Leu Gln 1185
[0012]	Thr Cys 1190	Val Asp Pro Glu	Asp 1195	Cys Pro Val Cys	Glu Val Ala Gly 1200
	Arg Arg 1205	Phe Ala Ser Gly	Lys 1210	Lys Val Thr Leu	Asn Pro Ser Asp 1215
	Pro Glu 1220	His Cys Gln Ile	Cys 1225	His Cys Asp Val	Val Asn Leu Thr 1230
	Cys Glu 1235	Ala Cys Gln Glu	Pro 1240	Gly Gly Leu Val	Val Pro Pro Thr 1245
	Asp Ala 1250	Pro Val Ser Pro	Thr 1255	Thr Leu Tyr Val	Glu Asp Ile Ser 1260
	Glu Pro 1265	Pro Leu His Asp	Phe 1270	Tyr Cys Ser Arg	Leu Leu Asp Leu 1275
	Val Phe 1280	Leu Leu Asp Gly	Ser 1285	Ser Arg Leu Ser	Glu Ala Glu Phe 1290
	Glu Val 1295	Leu Lys Ala Phe	Val 1300	Val Asp Met Met	Glu Arg Leu Arg 1305

Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp  
1310 1315 1320

Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser  
1325 1330 1335

Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln  
1340 1345 1350

Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile  
1355 1360 1365

Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu  
1370 1375 1380

Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val  
1385 1390 1395

Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro  
1400 1405 1410

[0013]

Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile  
1415 1420 1425

Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val  
1430 1435 1440

Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys  
1445 1450 1455

Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro Asp Met  
1460 1465 1470

Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu  
1475 1480 1485

Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu  
1490 1495 1500

Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys  
1505 1510 1515

Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp  
 1520 1525 1530

Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val  
 1535 1540 1545

Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln  
 1550 1555 1560

Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr  
 1565 1570 1575

Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser  
 1580 1585 1590

Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr  
 1595 1600 1605

Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile  
 1610 1615 1620

[0014]

Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu  
 1625 1630 1635

Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp  
 1640 1645 1650

Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg  
 1655 1660 1665

Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala  
 1670 1675 1680

Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly  
 1685 1690 1695

Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe  
 1700 1705 1710

Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr  
 1715 1720 1725

	Gln Val 1730	Ser Val	Leu Gln	Tyr 1735	Gly Ser	Ile Thr	Thr 1740	Ile Asp	Val				
	Pro Trp 1745	Asn Val	Val Pro	Glu 1750	Lys Ala	His Leu	Leu 1755	Ser Leu	Val				
	Asp Val 1760	Met Gln	Arg Glu	Gly 1765	Gly Pro	Ser Gln	Ile 1770	Gly Asp	Ala				
	Leu Gly 1775	Phe Ala	Val Arg	Tyr 1780	Leu Thr	Ser Glu	Met 1785	His Gly	Ala				
	Arg Pro 1790	Gly Ala	Ser Lys	Ala 1795	Val Val	Ile Leu	Val 1800	Thr Asp	Val				
	Ser Val 1805	Asp Ser	Val Asp	Ala 1810	Ala Ala	Asp Ala	Ala 1815	Arg Ser	Asn				
	Arg Val 1820	Thr Val	Phe Pro	Ile 1825	Gly Ile	Gly Asp	Arg 1830	Tyr Asp	Ala				
[0015]	Ala Gln 1835	Leu Arg	Ile Leu	Ala 1840	Gly Pro	Ala Gly	Asp 1845	Ser Asn	Val				
	Val Lys 1850	Leu Gln	Arg Ile	Glu 1855	Asp Leu	Pro Thr	Met 1860	Val Thr	Leu				
	Gly Asn 1865	Ser Phe	Leu His	Lys 1870	Leu Cys	Ser Gly	Phe 1875	Val Arg	Ile				
	Cys Met 1880	Asp Glu	Asp Gly	Asn 1885	Glu Lys	Arg Pro	Gly 1890	Asp Val	Trp				
	Thr Leu 1895	Pro Asp	Gln Cys	His 1900	Thr Val	Thr Cys	Gln 1905	Pro Asp	Gly				
	Gln Thr 1910	Leu Leu	Lys Ser	His 1915	Arg Val	Asn Cys	Asp 1920	Arg Gly	Leu				
	Arg Pro 1925	Ser Cys	Pro Asn	Ser 1930	Gln Ser	Pro Val	Lys 1935	Val Glu	Glu				
	Thr Cys	Gly Cys	Arg Trp	Thr	Cys Pro	Cys Val	Cys	Thr Gly	Ser				

	1940	1945	1950
	Ser Thr Arg His Ile Val 1955	Thr Phe Asp Gly Gln 1960	Asn Phe Lys Leu 1965
	Thr Gly Ser Cys Ser Tyr 1970	Val Leu Phe Gln Asn 1975	Lys Glu Gln Asp 1980
	Leu Glu Val Ile Leu His 1985	Asn Gly Ala Cys Ser 1990	Pro Gly Ala Arg 1995
	Gln Gly Cys Met Lys Ser 2000	Ile Glu Val Lys His 2005	Ser Ala Leu Ser 2010
	Val Glu Leu His Ser Asp 2015	Met Glu Val Thr Val 2020	Asn Gly Arg Leu 2025
	Val Ser Val Pro Tyr Val 2030	Gly Gly Asn Met Glu 2035	Val Asn Val Tyr 2040
[0016]	Gly Ala Ile Met His Glu 2045	Val Arg Phe Asn His 2050	Leu Gly His Ile 2055
	Phe Thr Phe Thr Pro Gln 2060	Asn Asn Glu Phe Gln 2065	Leu Gln Leu Ser 2070
	Pro Lys Thr Phe Ala Ser 2075	Lys Thr Tyr Gly Leu 2080	Cys Gly Ile Cys 2085
	Asp Glu Asn Gly Ala Asn 2090	Asp Phe Met Leu Arg 2095	Asp Gly Thr Val 2100
	Thr Thr Asp Trp Lys Thr 2105	Leu Val Gln Glu Trp 2110	Thr Val Gln Arg 2115
	Pro Gly Gln Thr Cys Gln 2120	Pro Ile Leu Glu Glu 2125	Gln Cys Leu Val 2130
	Pro Asp Ser Ser His Cys 2135	Gln Val Leu Leu Leu 2140	Pro Leu Phe Ala 2145
	Glu Cys His Lys Val Leu 2150	Ala Pro Ala Thr Phe 2155	Tyr Ala Ile Cys 2160

Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val Ile Ala  
2165 2170 2175

Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp Trp  
2180 2185 2190

Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val  
2195 2200 2205

Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp Gly Asn  
2210 2215 2220

Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe Cys Pro  
2225 2230 2235

Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu Glu Ala  
2240 2245 2250

Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu  
2255 2260 2265

[0017]

Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys  
2270 2275 2280

Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr  
2285 2290 2295

Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg  
2300 2305 2310

Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp  
2315 2320 2325

Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly  
2330 2335 2340

Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe  
2345 2350 2355

Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro  
2360 2365 2370

Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys  
 2375 2380 2385

Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val  
 2390 2395 2400

Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys  
 2405 2410 2415

Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His  
 2420 2425 2430

Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys  
 2435 2440 2445

Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu  
 2450 2455 2460

Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg  
 2465 2470 2475

[0018]

Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg  
 2480 2485 2490

Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro Arg Gly  
 2495 2500 2505

Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp Ala Ser  
 2510 2515 2520

Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val Lys Glu  
 2525 2530 2535

Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu  
 2540 2545 2550

Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser  
 2555 2560 2565

Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala Cys Met  
 2570 2575 2580

Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met Ile Asp  
 2585 2590 2595

Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val Ile Ser  
 2600 2605 2610

Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro Cys Pro  
 2615 2620 2625

Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys Gly Arg  
 2630 2635 2640

Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly Gln Ile  
 2645 2650 2655

Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys Asp Thr  
 2660 2665 2670

His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys  
 2675 2680 2685

[0019] Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala  
 2690 2695 2700

Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr  
 2705 2710 2715

Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr  
 2720 2725 2730

Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His  
 2735 2740 2745

Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp  
 2750 2755 2760

Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg  
 2765 2770 2775

Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val  
 2780 2785 2790

Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro

2795

2800

2805

Arg Lys Cys Ser Lys  
2810

<210> 5  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 5  
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
1 5

<210> 6  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> 人工序列

[0020]

<220>  
<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(40)  
<223> 该序列可以包含 1至10 个“Gly Gly Gly Ser”重复单元

<220>  
<223> 有关置换和优选实施方案的详细说明，请参见提交的说明书

<400> 6  
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
35 40

<210> 7  
<211> 609  
<212> PRT  
<213> 未知

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 未知的描述：白蛋白序列

&lt;400&gt; 7

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala  
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu  
35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val  
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp  
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp  
85 90 95

[0021] Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala  
100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln  
115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val  
130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys  
145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro  
165 170 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys  
180 185 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu  
195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys

	210		215			220												
	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val		
	225					230					235					240		
	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser		
					245					250					255			
	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly		
				260					265					270				
	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile		
			275					280					285					
	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu		
		290					295					300						
	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp		
	305					310					315					320		
[0022]	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser		
					325					330					335			
	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly		
				340					345					350				
	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val		
			355					360					365					
	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Lys	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys		
		370					375					380						
	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu		
	385					390					395					400		
	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys		
					405					410					415			
	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu		
				420					425					430				
	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val		
			435					440					445					

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His  
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val  
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg  
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe  
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala  
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu  
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys  
545 550 555 560

[0023]

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala  
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe  
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Arg Ala Ala Leu Gly  
595 600 605

Leu

<210> 8

<211> 584

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述：白蛋白序列

<400> 8

Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu  
1 5 10 15

Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln  
 20 25 30

Lys Cys Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp  
 35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys  
 50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu  
 65 70 75 80

Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro  
 85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu  
 100 105 110

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

[0024]

Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu His Glu Val Ala Arg  
 130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln  
 145 150 155 160

Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala Glu Ala Asp Lys Glu Ser  
 165 170 175

Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ser  
 180 185 190

Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser Met Gln Lys Phe Gly Glu  
 195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro  
 210 215 220

Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys  
 225 230 235 240

Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp  
 245 250 255

Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser  
 260 265 270

Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro Leu Leu Lys Lys Ala His  
 275 280 285

Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala  
 290 295 300

Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala  
 305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg  
 325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Lys  
 340 345 350

[0025]

Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Glu Ala Asn Pro Pro Ala  
 355 360 365

Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln Pro Leu Val Glu Glu Pro  
 370 375 380

Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu Tyr Glu Lys Leu Gly Glu  
 385 390 395 400

Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr Thr Gln Lys Ala Pro  
 405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala Arg Asn Leu Gly Arg  
 420 425 430

Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu Asp Gln Arg Leu Pro Cys  
 435 440 445

Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn Arg Val Cys Leu Leu His  
 450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr Lys Cys Cys Ser Gly Ser  
465 470 475 480

Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr  
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp  
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala  
515 520 525

Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu  
530 535 540

Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys  
545 550 555 560

Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val  
565 570 575

[0026]

Thr Arg Cys Lys Asp Ala Leu Ala  
580

<210> 9

<211> 608

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述：白蛋白序列

<400> 9

Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Val Ser Gly Ser Ala  
1 5 10 15

Phe Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala  
20 25 30

His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu  
35 40 45

Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Cys Ser Tyr Asp Glu His Ala  
50 55 60

Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp  
 65 70 75 80

Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp  
 85 90 95

Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala  
 100 105 110

Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln  
 115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala  
 130 135 140

Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly  
 145 150 155 160

His Tyr Leu His Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro  
 165 170 175

[0027] Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys  
 180 185 190

Cys Ala Glu Ala Asp Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly  
 195 200 205

Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys  
 210 215 220

Ser Ser Met Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val  
 225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr  
 245 250 255

Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly  
 260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met  
 275 280 285

Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp

	290		295		300														
	Lys	Pro	Leu	Leu	Lys	Lys	Ala	His	Cys	Leu	Ser	Glu	Val	Glu	His	Asp			
	305					310					315					320			
	Thr	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ala	Ile	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Asp			
					325					330					335				
	Gln	Glu	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly			
				340					345					350					
	Thr	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Ser			
			355					360					365						
	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Lys	Tyr	Glu	Ala	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys			
			370				375					380							
	Cys	Ala	Glu	Ala	Asn	Pro	Pro	Ala	Cys	Tyr	Gly	Thr	Val	Leu	Ala	Glu			
	385					390					395					400			
[0028]	Phe	Gln	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Lys	Asn	Leu	Val	Lys	Thr	Asn	Cys			
					405					410					415				
	Asp	Leu	Tyr	Glu	Lys	Leu	Gly	Glu	Tyr	Gly	Phe	Gln	Asn	Ala	Ile	Leu			
				420					425					430					
	Val	Arg	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val			
			435					440					445						
	Glu	Ala	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Arg	Val	Gly	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Leu			
			450				455					460							
	Pro	Glu	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Cys	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Ala	Ile			
	465					470					475					480			
	Leu	Asn	Arg	Val	Cys	Leu	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Glu	His			
					485					490					495				
	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Ser	Gly	Ser	Leu	Val	Glu	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe			
				500					505					510					
	Ser	Ala	Leu	Thr	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Lys	Ala			
								520					525						

Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu  
530 535 540

Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys  
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala  
565 570 575

Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe  
580 585 590

Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Cys Lys Asp Ala Leu Ala  
595 600 605

<210> 10

<211> 584

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述：白蛋白序列

[0029]

<400> 10

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu  
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln  
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu  
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys  
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu  
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro  
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu  
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His  
 115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg  
 130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg  
 145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala  
 165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser  
 180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu  
 195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro  
 210 215 220

[0030]

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys  
 225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp  
 245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser  
 260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His  
 275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser  
 290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala  
 305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg  
 325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr  
340 345 350

Tyr Lys Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu  
355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro  
370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu  
385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro  
405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys  
420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys  
435 440 445

[0031]

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His  
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser  
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr  
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp  
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala  
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu  
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys  
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val  
565 570 575

Ala Ala Ser Arg Ala Ala Leu Gly  
580

<210> 11  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Bos sp.

<400> 11  
Leu Arg Glu Leu His Leu Asn Asn Asn Cys  
1 5 10

<210> 12  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 12  
Leu Arg Glu Leu His Leu Asp Asn Asn Cys  
1 5 10

[0032]

<210> 13  
<211> 344  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 13  
Cys Gly Pro Phe Gln Gln Arg Gly Leu Phe Asp Phe Met Leu Glu Asp  
1 5 10 15

Glu Ala Ser Gly Ile Gly Pro Glu Val Pro Asp Asp Arg Asp Phe Glu  
20 25 30

Pro Ser Leu Gly Pro Val Cys Pro Phe Arg Cys Gln Cys His Leu Arg  
35 40 45

Val Val Gln Cys Ser Asp Leu Gly Leu Asp Lys Val Pro Lys Asp Leu  
50 55 60

Pro Pro Asp Thr Thr Leu Leu Asp Leu Gln Asn Asn Lys Ile Thr Glu  
65 70 75 80

Ile Lys Asp Gly Asp Phe Lys Asn Leu Lys Asn Leu His Ala Leu Ile  
85 90 95

Leu Val Asn Asn Lys Ile Ser Lys Val Ser Pro Gly Ala Phe Thr Pro  
100 105 110

Leu Val Lys Leu Glu Arg Leu Tyr Leu Ser Lys Asn Gln Leu Lys Glu  
115 120 125

Leu Pro Glu Lys Met Pro Lys Thr Leu Gln Glu Leu Arg Ala His Glu  
130 135 140

Asn Glu Ile Thr Lys Val Arg Lys Val Thr Phe Asn Gly Leu Asn Gln  
145 150 155 160

Met Ile Val Ile Glu Leu Gly Thr Asn Pro Leu Lys Ser Ser Gly Ile  
165 170 175

Glu Asn Gly Ala Phe Gln Gly Met Lys Lys Leu Ser Tyr Ile Arg Ile  
180 185 190

Ala Asp Thr Asn Ile Thr Ser Ile Pro Gln Gly Leu Pro Pro Ser Leu  
195 200 205

[0033]

Thr Glu Leu His Leu Asp Gly Asn Lys Ile Ser Arg Val Asp Ala Ala  
210 215 220

Ser Leu Lys Gly Leu Asn Asn Leu Ala Lys Leu Gly Leu Ser Phe Asn  
225 230 235 240

Ser Ile Ser Ala Val Asp Asn Gly Ser Leu Ala Asn Thr Pro His Leu  
245 250 255

Arg Glu Leu His Leu Asp Asn Asn Lys Leu Thr Arg Val Pro Gly Gly  
260 265 270

Leu Ala Glu His Lys Tyr Ile Gln Val Val Tyr Leu His Asn Asn Asn  
275 280 285

Ile Ser Val Val Gly Ser Ser Asp Phe Cys Pro Pro Gly His Asn Thr  
290 295 300

Lys Lys Ala Ser Tyr Ser Gly Val Ser Leu Phe Ser Asn Pro Val Gln  
305 310 315 320

Tyr Trp Glu Ile Gln Pro Ser Thr Phe Arg Cys Val Tyr Val Arg Ser  
 325 330 335

Ala Ile Gln Leu Gly Asn Tyr Lys  
 340

<210> 14  
 <211> 196  
 <212> PRT  
 <213> 未知

<220>  
 <223> 未知的描述: ECM序列

<400> 14  
 Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser  
 1 5 10 15

Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe  
 20 25 30

[0034] Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu  
 35 40 45

Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro  
 50 55 60

Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly  
 65 70 75 80

Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu  
 85 90 95

Thr Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val  
 100 105 110

Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp  
 115 120 125

Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp  
 130 135 140

Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp  
 145 150 155 160

Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val  
165 170 175

Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg  
180 185 190

Ile Cys Thr Gly  
195

<210> 15  
<211> 232  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 15  
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
20 25 30

[0035] Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
225 230

<210> 16  
<211> 228  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 16

[0036] Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val  
1 5 10 15

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Met Glu  
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr  
65 70 75 80

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn  
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro  
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

115	120	125																			
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val						
130						135						140									
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val						
145					150					155					160						
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro						
				165					170					175							
Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr						
			180					185					190								
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val						
		195					200					205									
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu						
	210					215					220										
[0037]	Ser	Pro	Gly	Lys																	
	225																				
<210>	17																				
<211>	279																				
<212>	PRT																				
<213>	智人																				
<400>	17																				
Glu	Leu	Lys	Thr	Pro	Leu	Gly	Asp	Thr	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Arg	Cys						
1				5					10					15							
Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro						
			20					25					30								
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu						
		35					40					45									
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Ala	Pro						
	50					55					60										
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys						
65					70					75					80						

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
85 90 95

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp  
100 105 110

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
115 120 125

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
130 135 140

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
145 150 155 160

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg  
165 170 175

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
180 185 190

[0038]

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
195 200 205

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn  
210 215 220

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
225 230 235 240

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser  
245 250 255

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser  
260 265 270

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
275

<210> 18  
<211> 229  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 18  
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 20 25 30  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 35 40 45  
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 50 55 60  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 85 90 95  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
 100 105 110  
 [0039]  
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 115 120 125  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 130 135 140  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 165 170 175  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
 180 185 190  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 195 200 205  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys  
225

<210> 19  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 19  
Gly Gly Gly Ser  
1

<210> 20  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列

[0040]

<220>  
<223>人工序列描述：合成肽

<220>  
<223> 有关置换和优选实施方案的详细说明，请参见提交的说明书

<400> 20  
Gly Gly Gly Ser  
1

<210> 21  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成的6xHis tag

<400> 21  
His His His His His His  
1 5

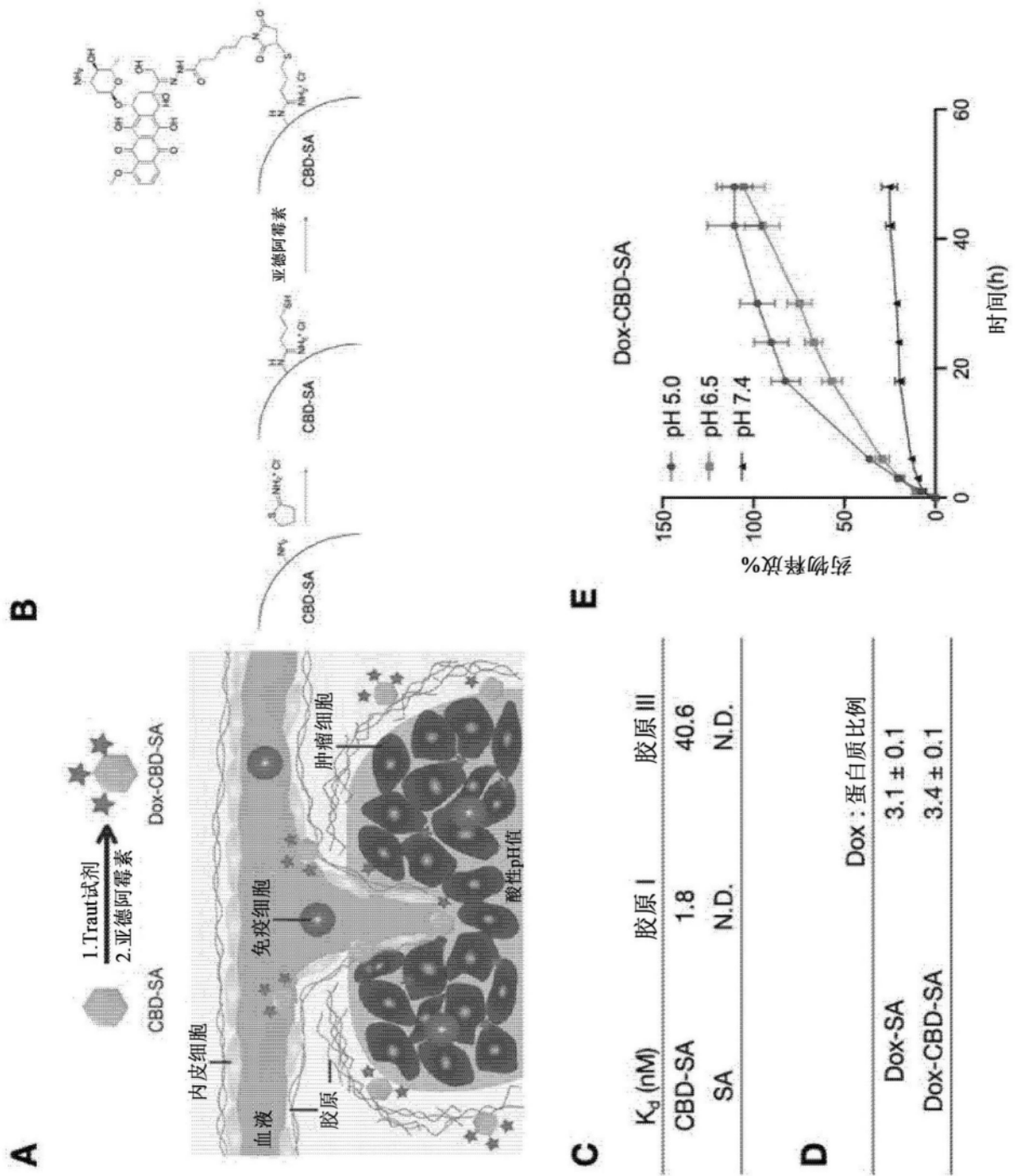


图1A-E

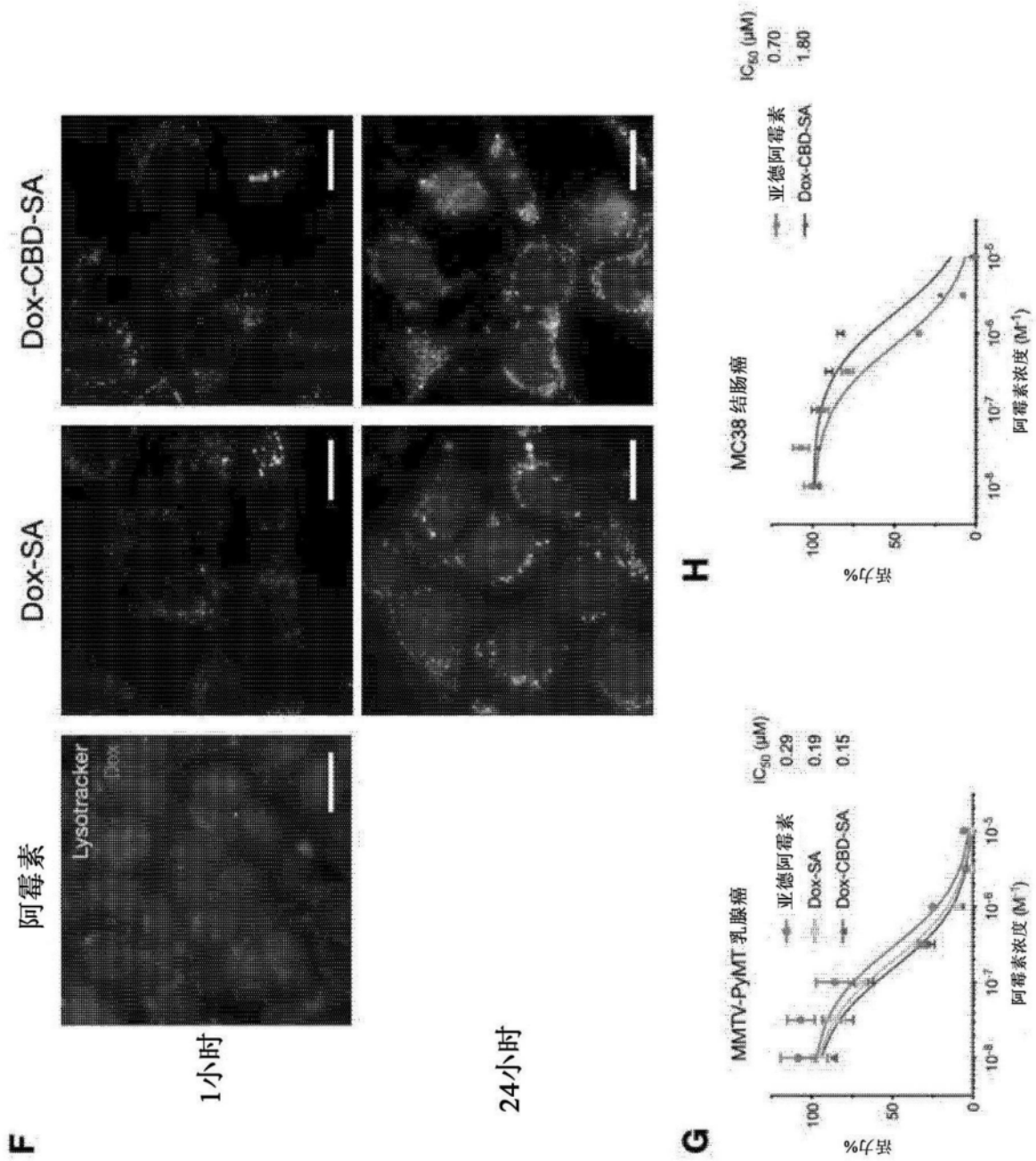


图1F-H

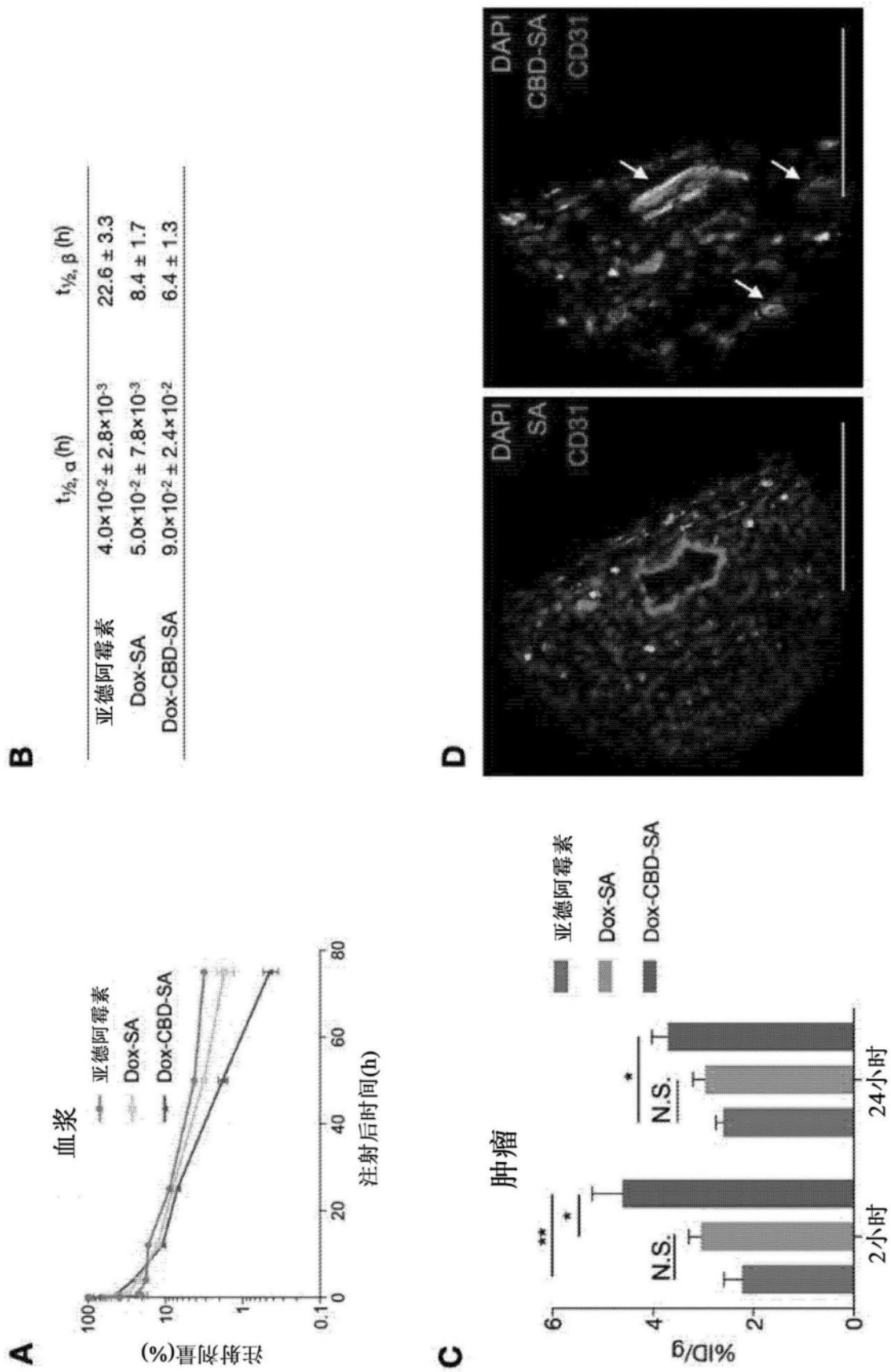


图2A-D

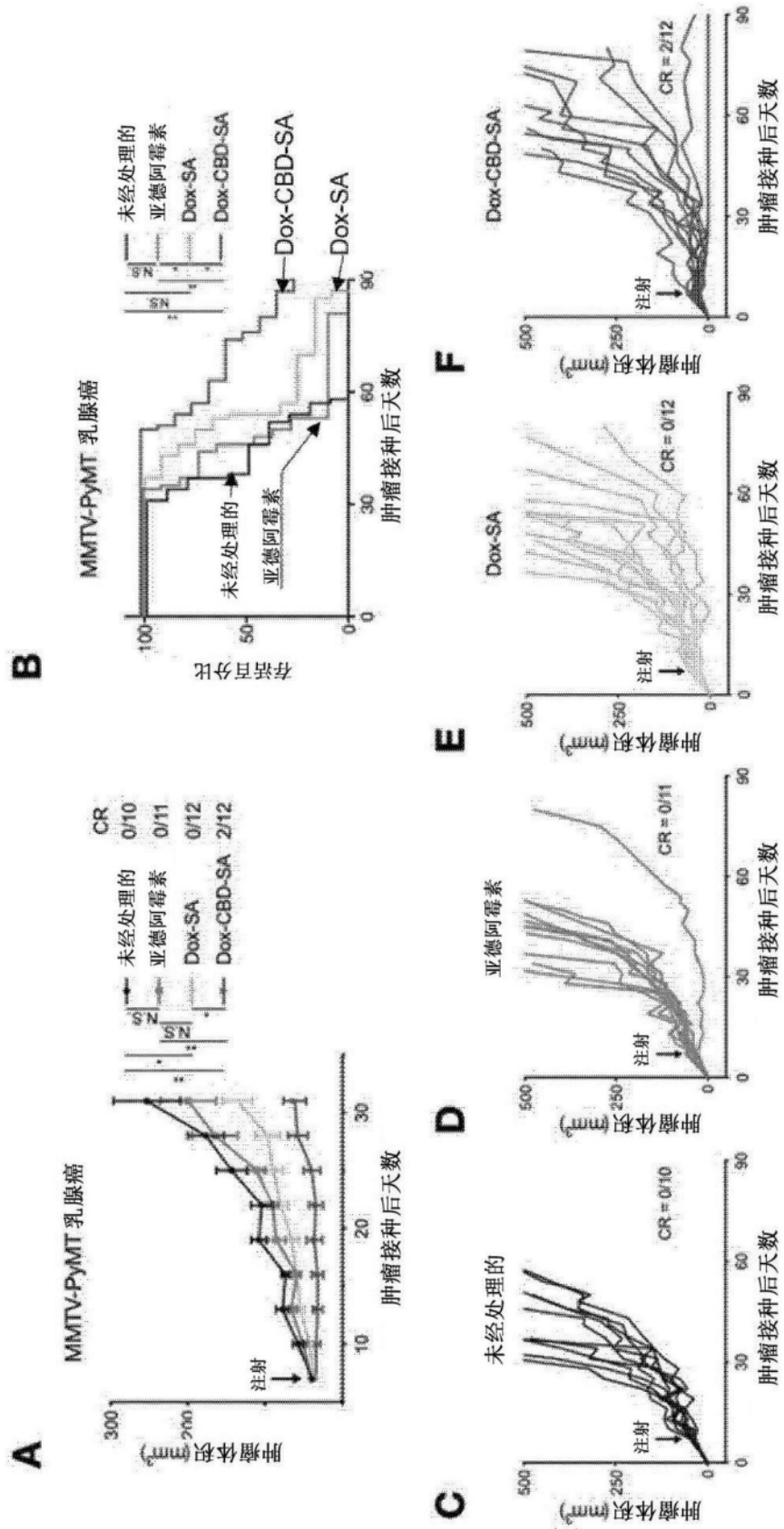


图3A-F

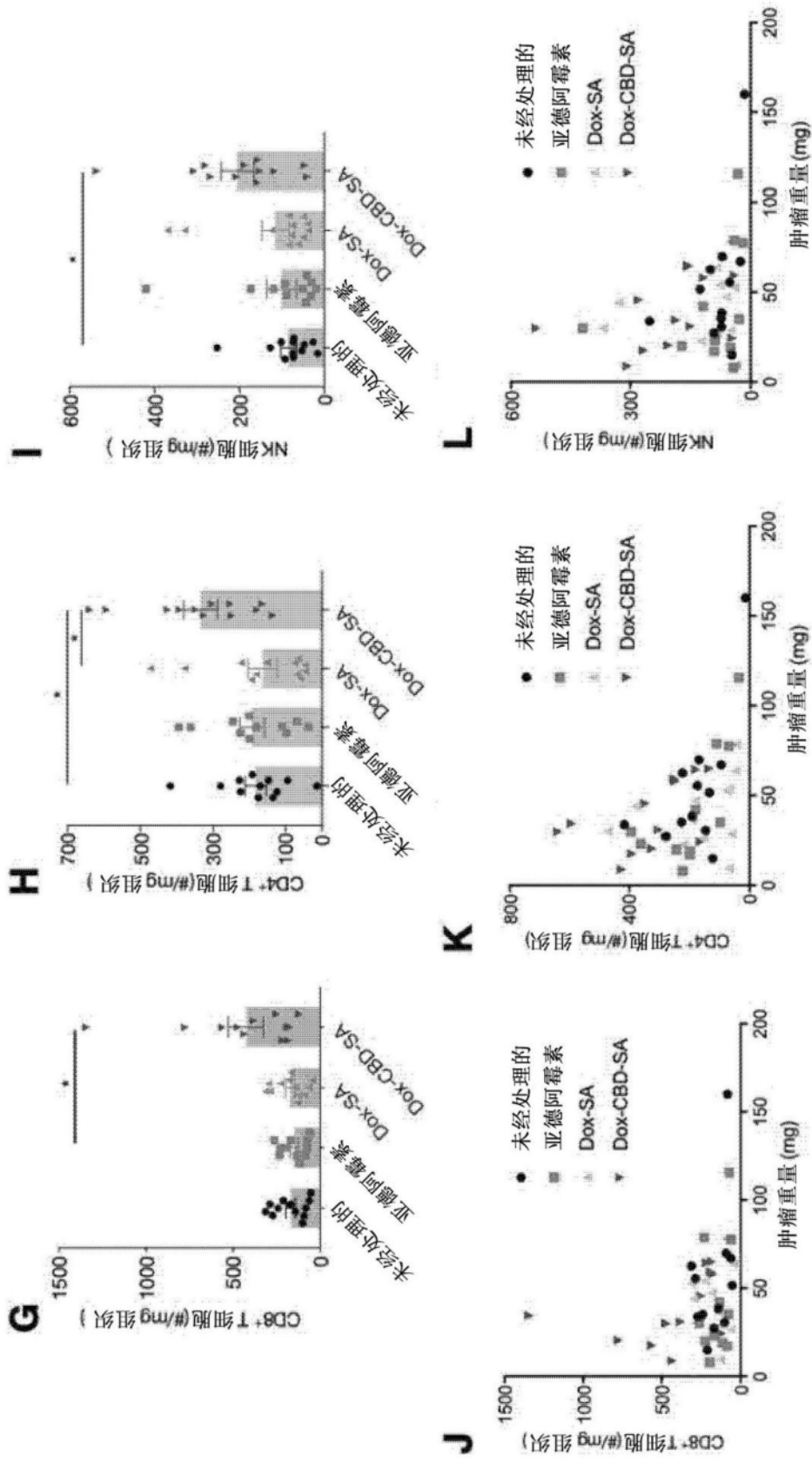


图3G-L

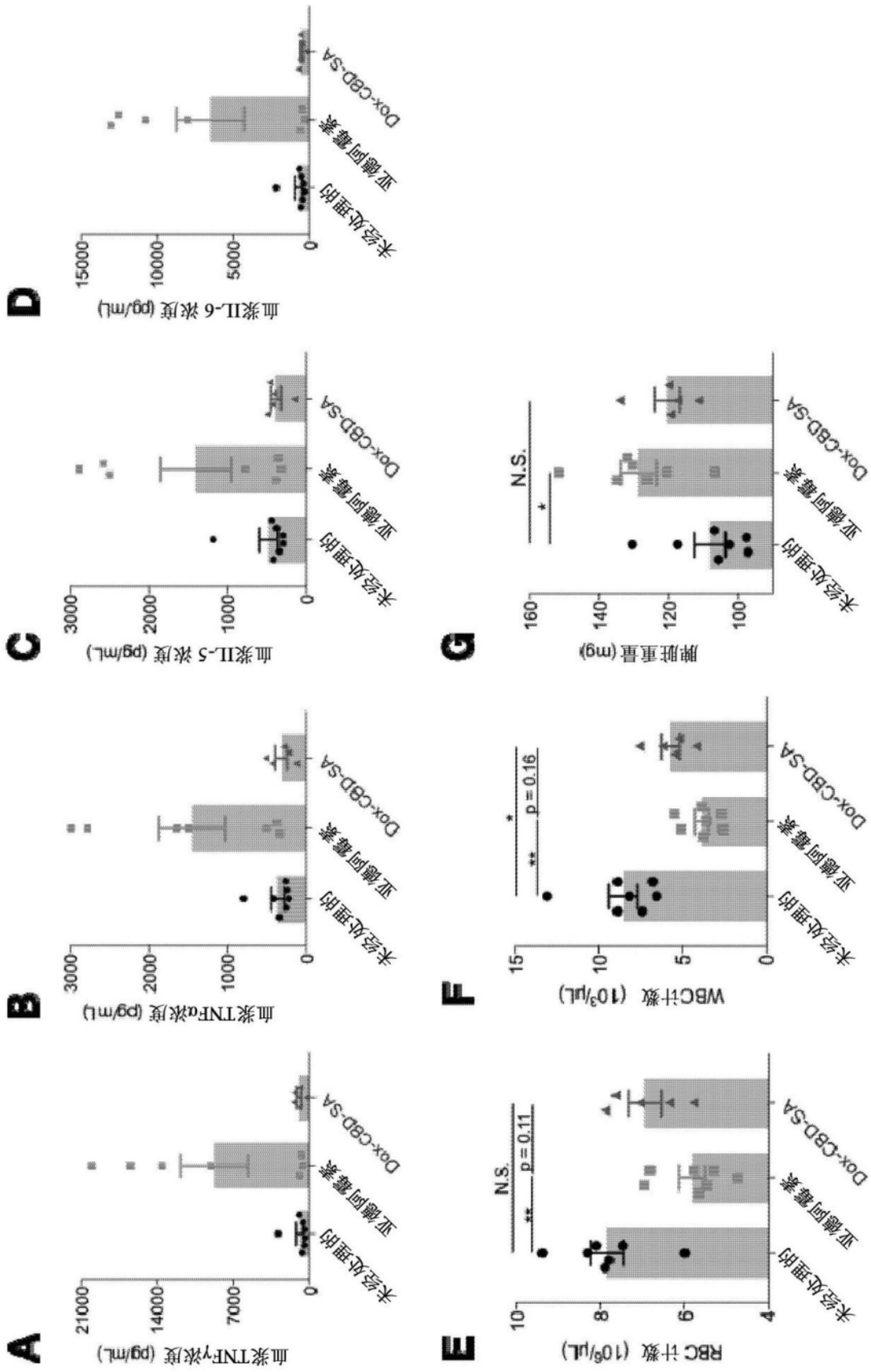


图4A-G

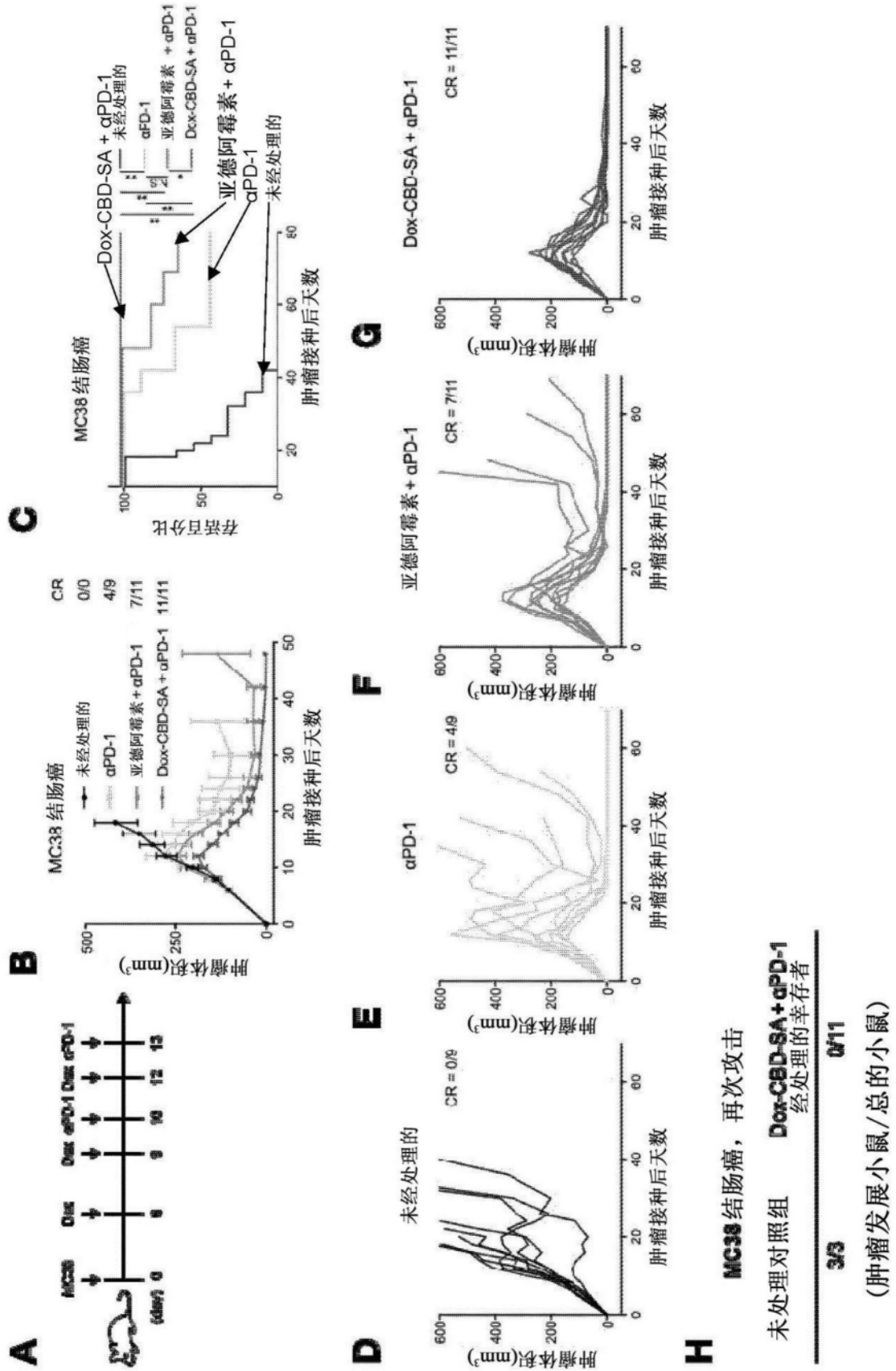


图5A-H

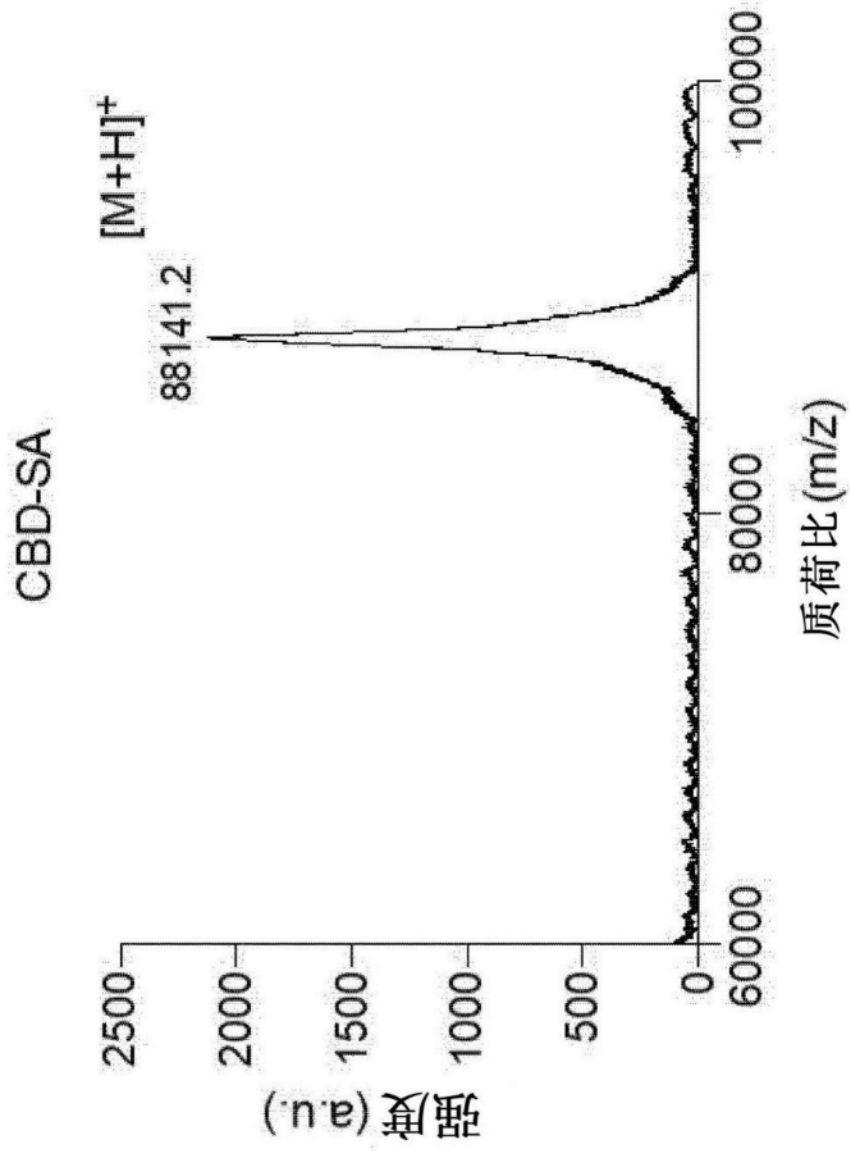


图6

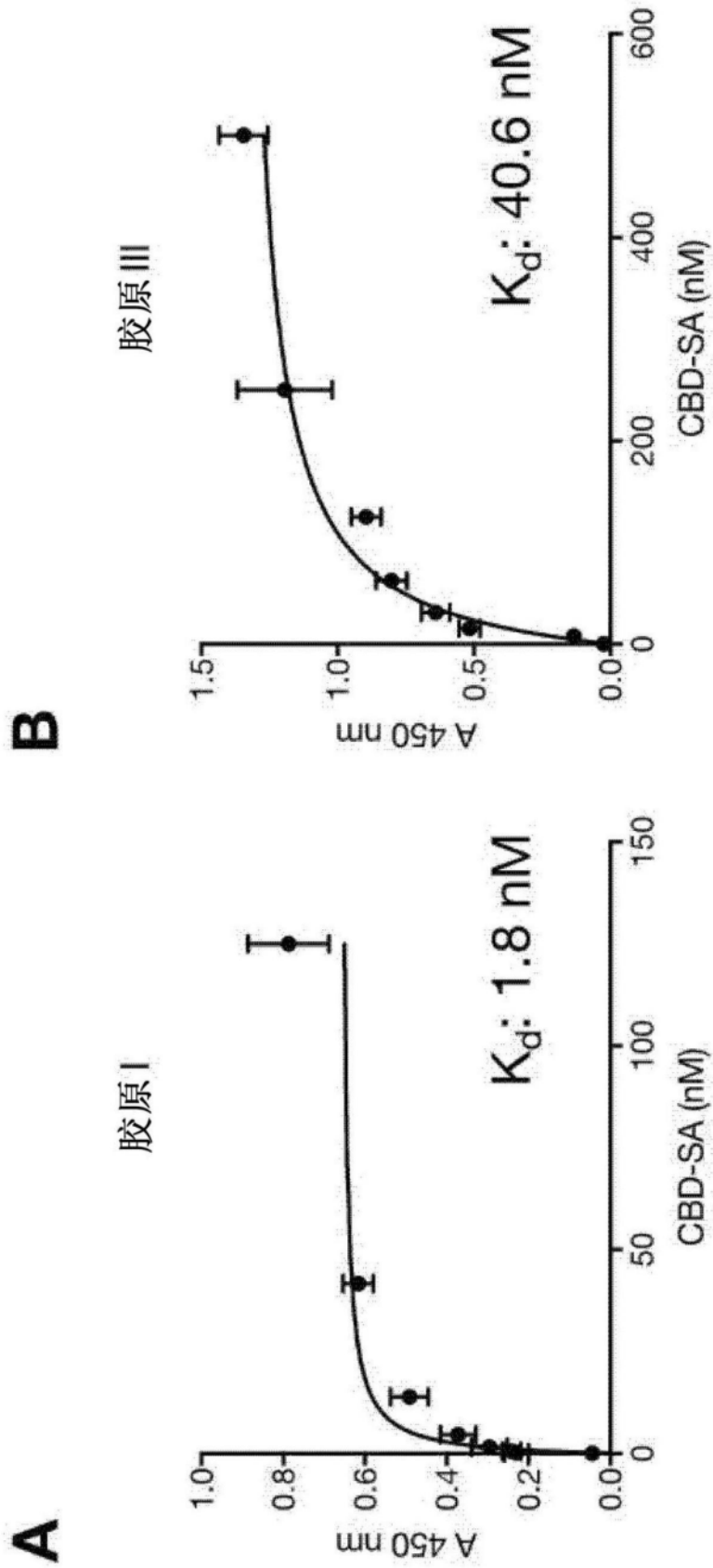


图7A-B

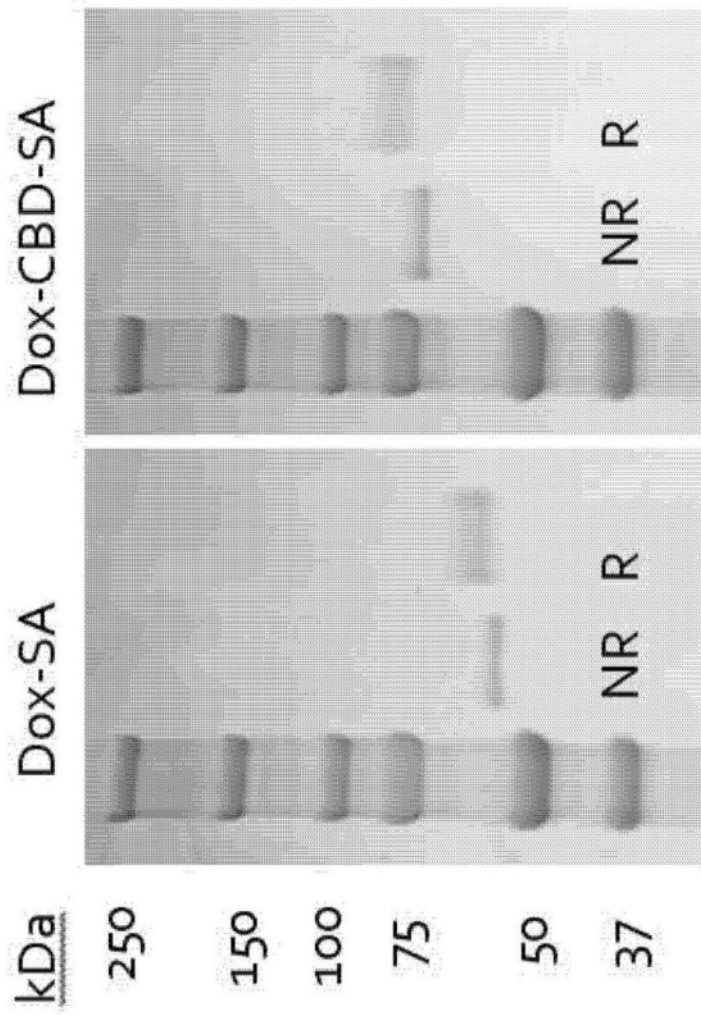


图8

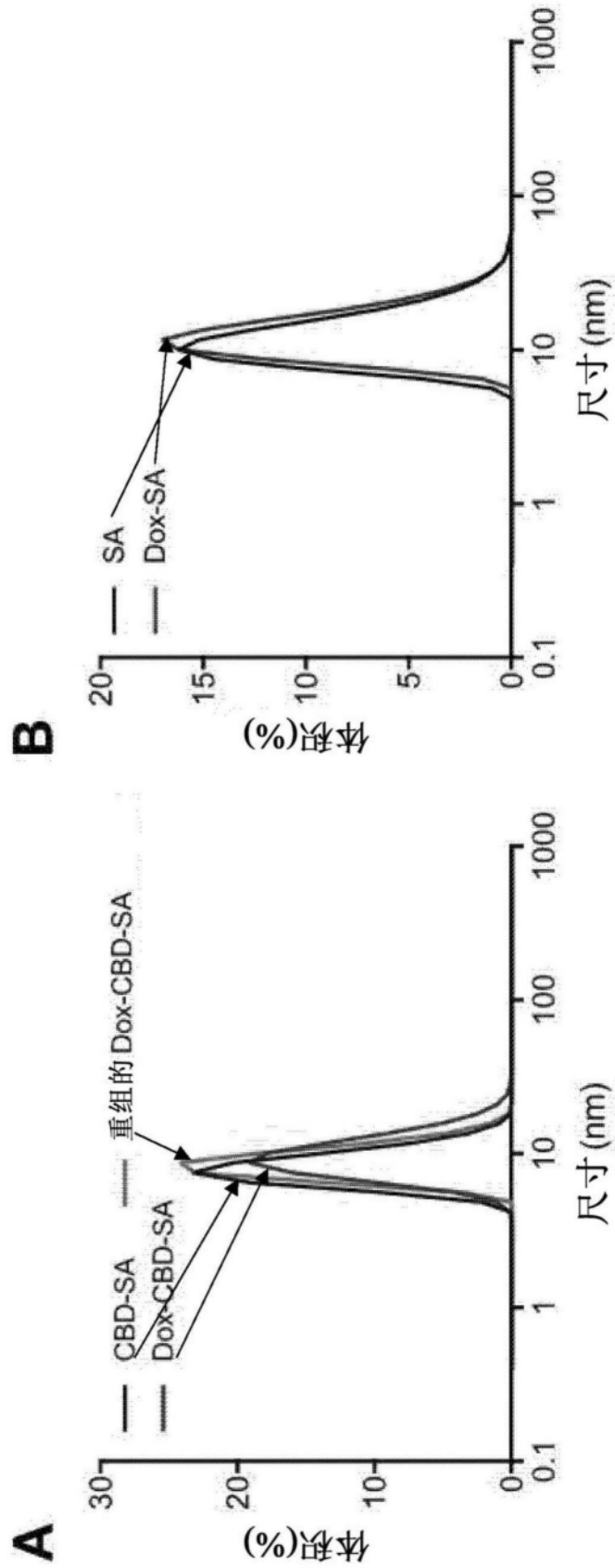


图9A-B

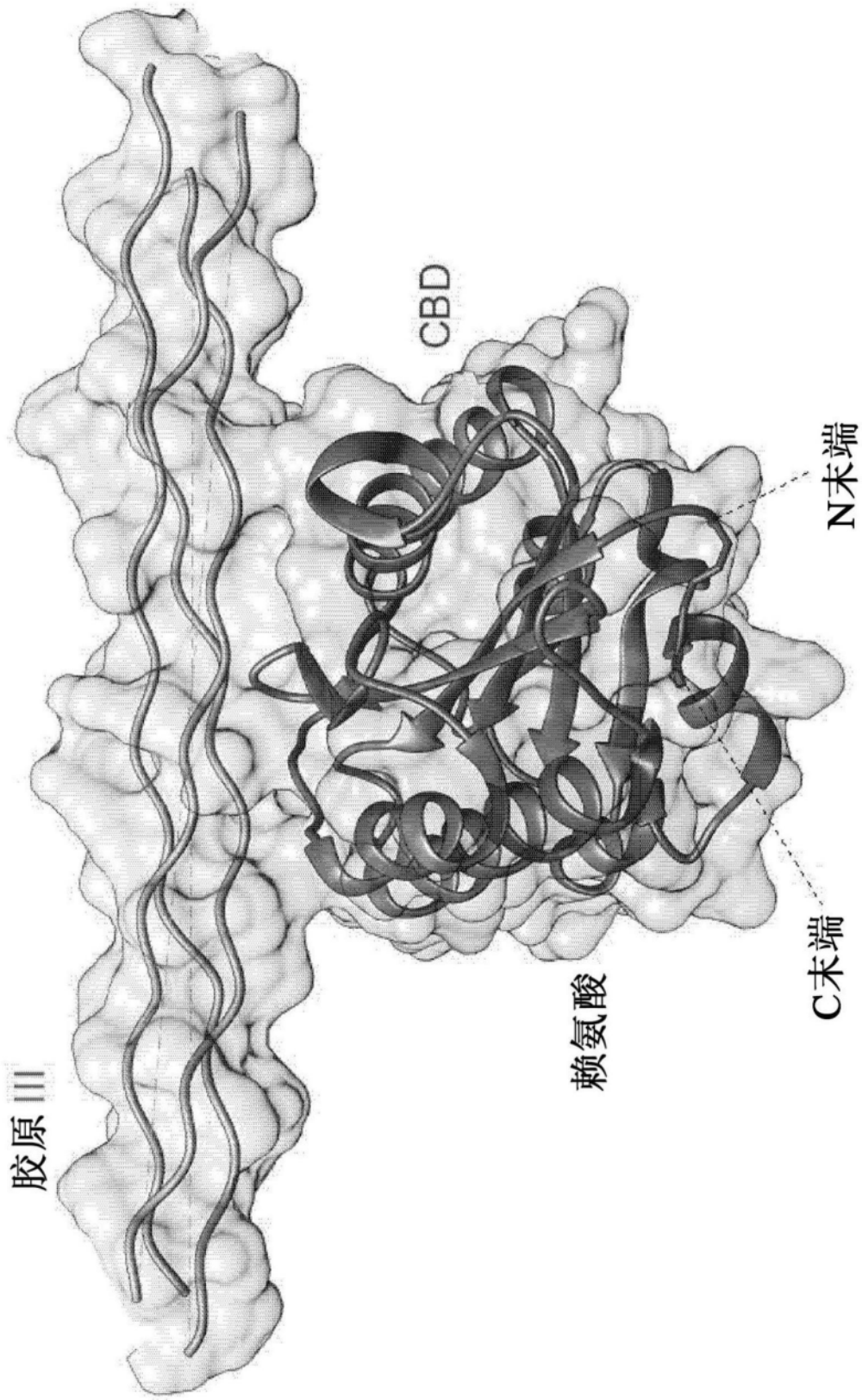


图10

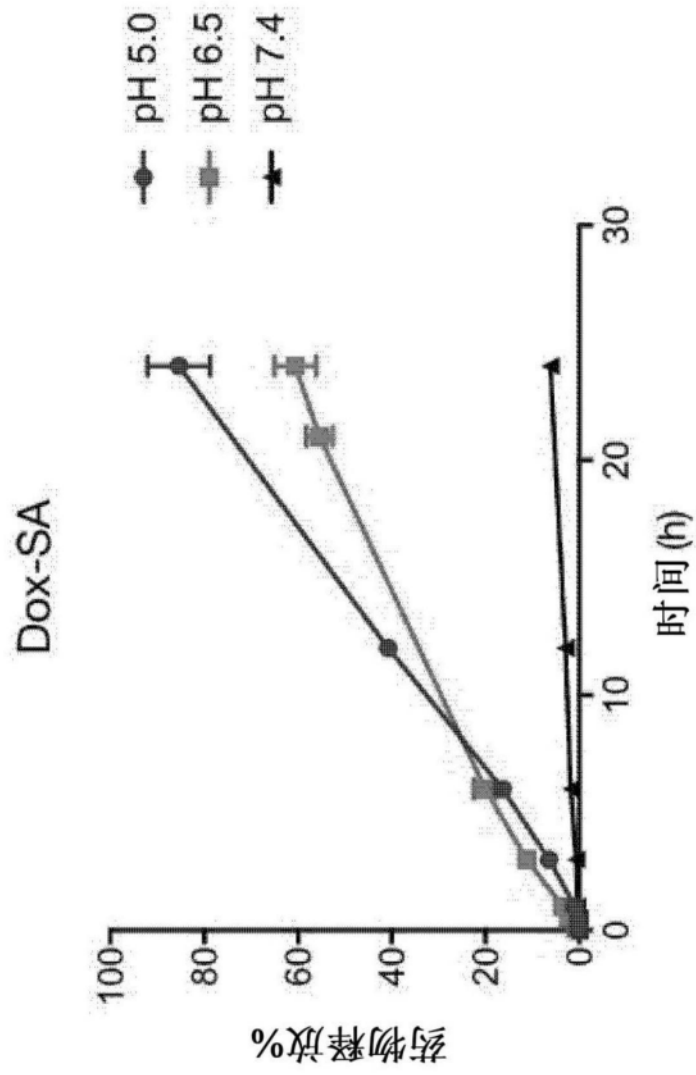


图11

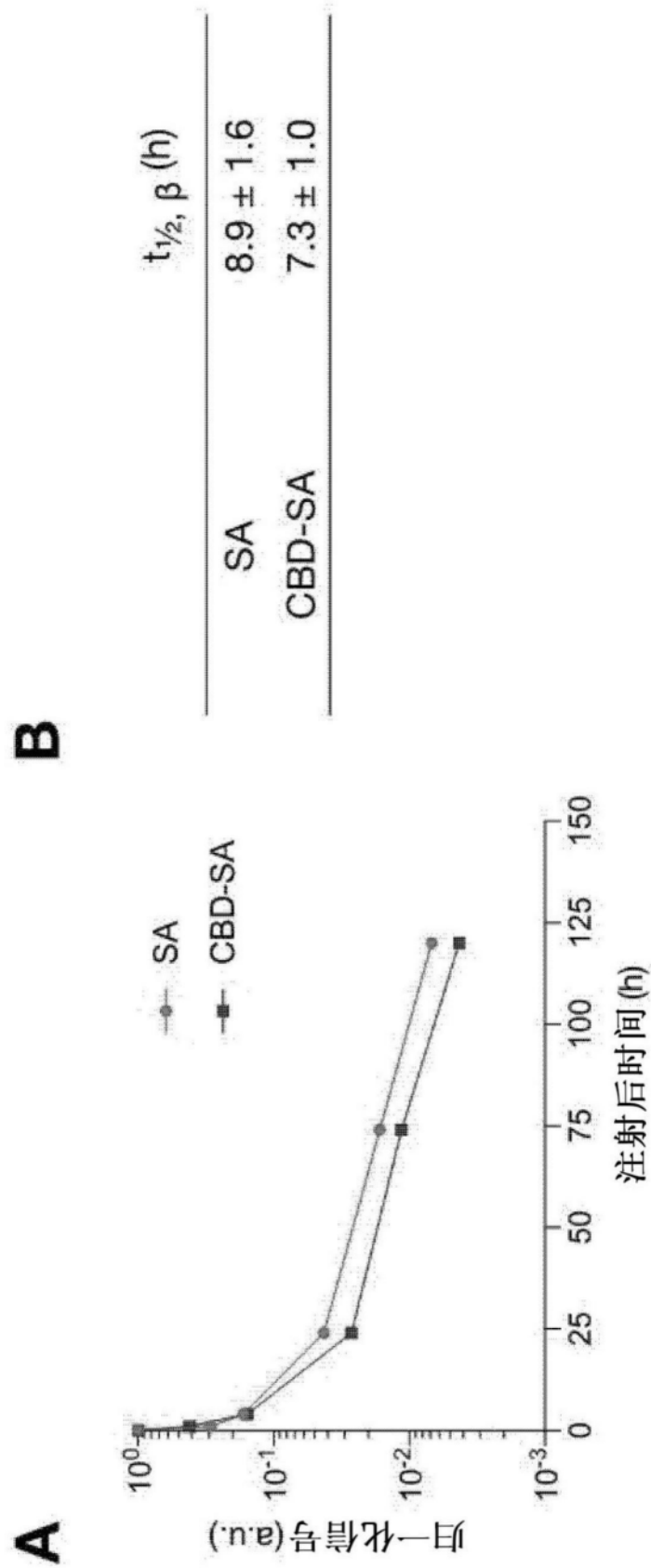


图12A-B

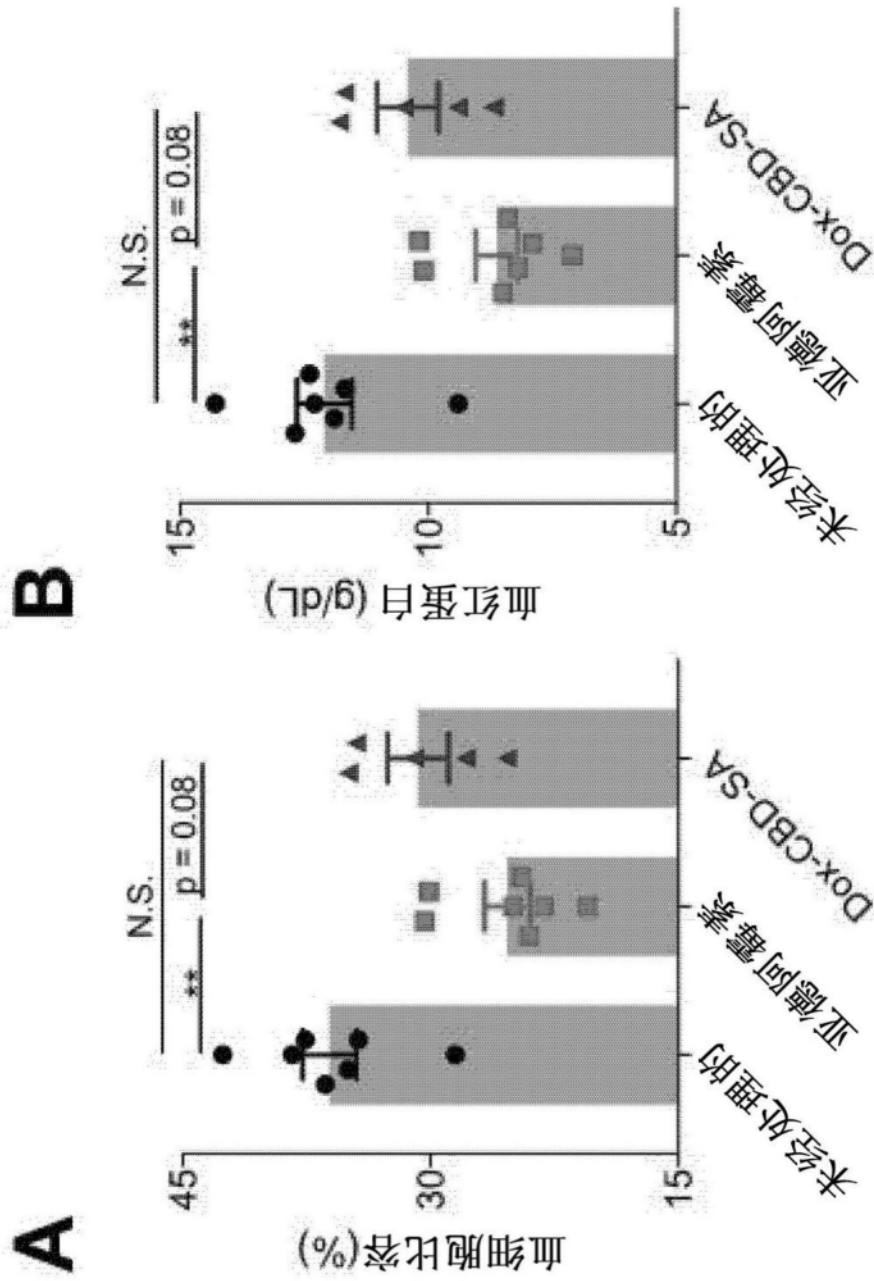


图13A-B

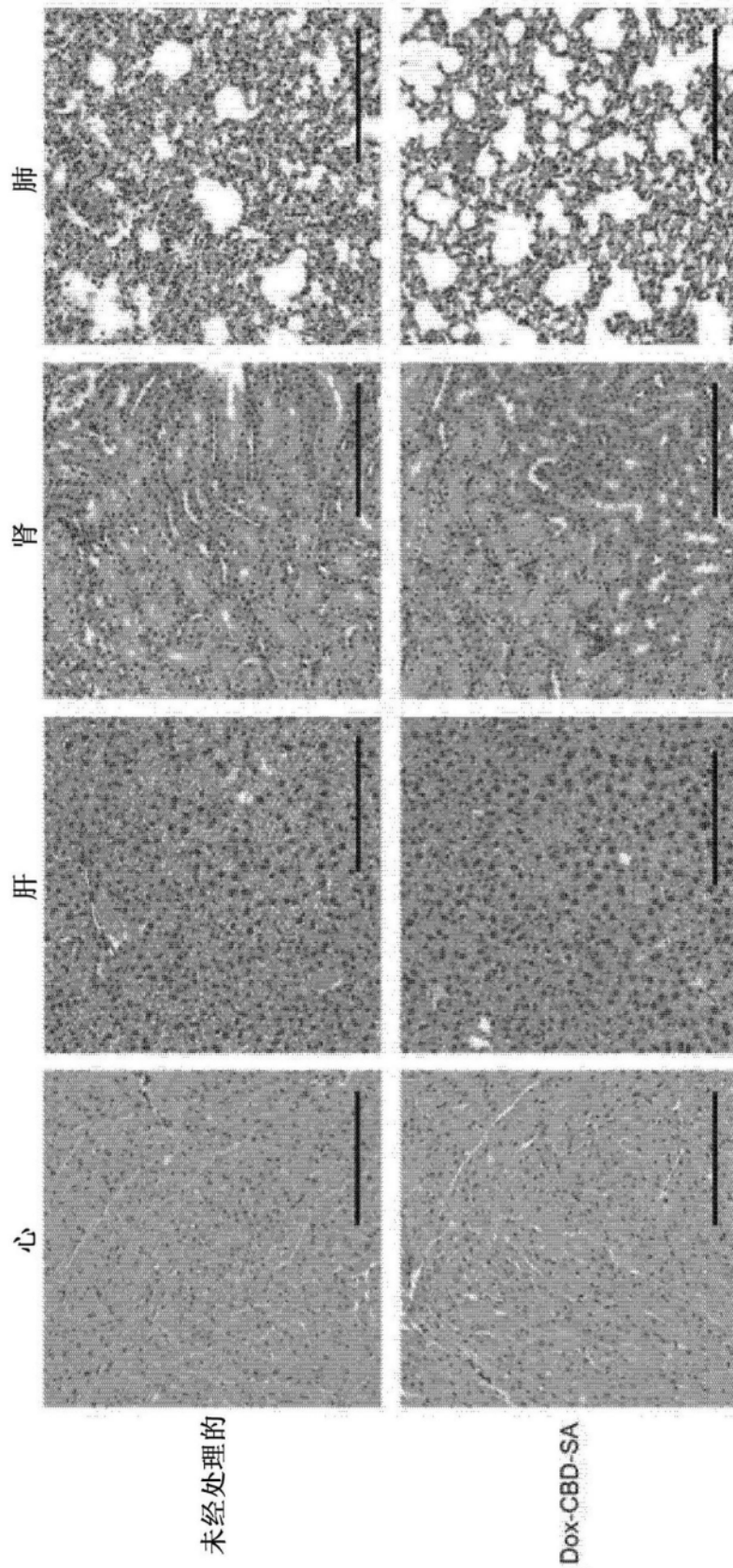


图14

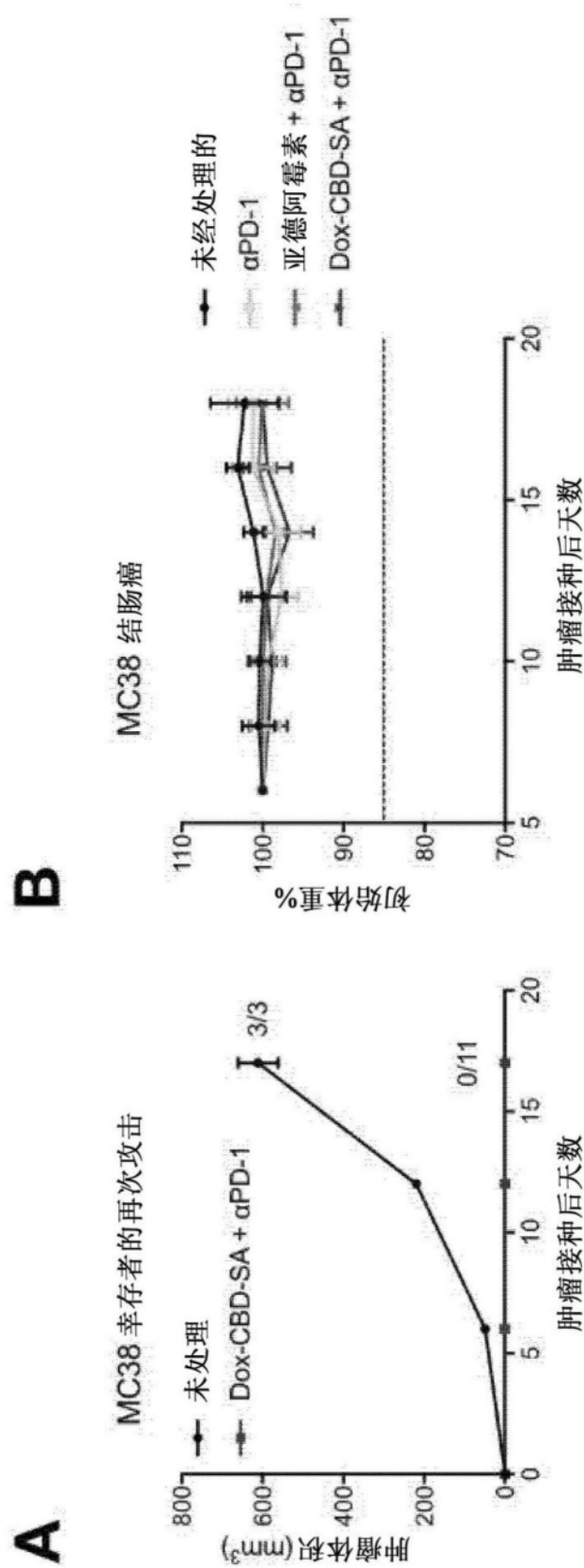


图15A-B