



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114375310 A

(43) 申请公布日 2022.04.19

(21) 申请号 202080063464.0

(22) 申请日 2020.07.08

(30) 优先权数据

62/872,741 2019.07.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.03.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2020/050762 2020.07.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/005599 EN 2021.01.14

(71) 申请人 卡尔医学有限公司

地址 以色列耶路撒冷市

申请人 托马斯杰斐逊大学

(72) 发明人 马克·L·泰科辛斯基

阿米·塔米尔 埃德温·布雷默

(74) 专利代理机构 上海翼胜专利商标事务所

(普通合伙) 31218

代理人 翟羽

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 47/64 (2017.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

权利要求书5页 说明书102页

序列表151页 附图39页

(54) 发明名称

数个异二聚体及其数个使用方法

(57) 摘要

提供了数个异二聚体。因此,本发明提供了一种异二聚体,所述异二聚体包含一二聚化部分,所述二聚化部分连接到至少一I型膜蛋白的至少一氨基酸序列并且连接到至少一II型膜蛋白的至少一氨基酸序列,所述I型膜蛋白能够至少结合所述至少一I型膜蛋白的一天然配体或受体,所述II型膜蛋白能够至少结合所述至少一II型膜蛋白的一天然配体或受体。还提供了编码所述异二聚体的数个核酸构建体及数个系统、表达所述异二聚体的数个宿主细胞及其数个使用方法。

1. 一种异二聚体,其特征在于,所述异二聚体包含一二聚化部分,所述二聚化部分连接到至少一I型膜蛋白的至少一氨基酸序列并且连接到至少一II型膜蛋白的至少一氨基酸序列,所述I型膜蛋白能够至少结合所述至少一I型膜蛋白的一天然配体或受体,所述II型膜蛋白能够至少结合所述至少一II型膜蛋白的一天然配体或受体。

2. 如权利要求1所述的异二聚体,其特征在于,所述二聚化部分是一蛋白质性部分。

3. 如权利要求1至2中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述异二聚体的数个单体并非共价地连接。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述二聚化部分是一抗体的一Fc结构域或其一片段。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述至少一I型膜蛋白选自自由PD1、SIRP α 、LAG3、BTN3A1、CD27、CD80、CD86、ENG、NLGN4X、CD84、TIGIT、CD40、IL-8、IL-10、CD164、LY6G6F、CD28、CTLA4、BTLA、LILRB1、LILRB2、TYROBP、ICOS、VEGFA、CSF1、CSF1R、VEGFB、BMP2、BMP3、GDNF、PDGFC、PDGFD、,RAET1E、CD155、CD166、MICA、NRG1、HVEM、DR3、TEK、TGFB1、LY96、CD96、KIT、CD244、GFER及SIGLEC所组成的群组。

6. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述至少一I型膜蛋白选自自由PD1、SIRP α 、TIGIT、LILRB2及SIGLEC所组成的群组。

7. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述至少一I型膜蛋白选自自由PD1及SIRP α 所组成的群组。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述至少一II型膜蛋白选自自由4-1BBL、FasL、TRAIL、TNF- α 、TNF- β 、OX40L、CD40L、CD40L、CD27L、CD30L、RANKL、TWEAK、APRIL、BAFF、LIGHT、VEGI、GITRL、EDA1/2、淋巴毒素 α 及淋巴毒素 β 所组成的群组。

9. 如权利要求1至7中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述至少一II型膜蛋白选自自由4-1BBL、OX40L、CD40L、LIGHT及GITRL所组成的群组。

10. 如权利要求1至7中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述至少一II型膜蛋白选自自由4-1BBL及CD40L所组成的群组。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述I型膜蛋白及所述II型膜蛋白中的至少一者是一免疫调节剂。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述异二聚体包含一第一单体,所述第一单体包含所述至少一I型膜蛋白的所述至少一氨基酸序列及所述至少一II型膜蛋白的所述至少一氨基酸序列。

13. 如权利要求1至11中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含所述至少一II型膜蛋白的所述至少一氨基酸序列,所述第二单体包含所述至少一I型膜蛋白的所述至少一氨基酸序列。

14. 如权利要求1至11中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述至少一I型膜蛋白的所述至少一氨基酸序列包含所述至少一I型膜蛋白的至少两个氨基酸序列;以及所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述至少一I型膜蛋白的所述至少两个氨基酸序列中的至少一者及所述至少一II型膜蛋白的所述至少一氨基酸序列,所述第二单体包含所述至少一I型膜蛋白的所述至少两个氨基酸序列中的至少一者。

15. 如权利要求14所述的异二聚体,其特征在于,所述第一单体的所述至少一I型膜蛋

白的所述至少两个胺基酸序列中的所述至少一者与所述第二单体的所述I型膜蛋白的所述至少两个胺基酸序列中的所述至少一者是相同的。

16. 如权利要求14所述的异二聚体,其特征在于,所述第一单体的所述至少一I型膜蛋白的所述至少两个胺基酸序列中的所述至少一者与所述第二单体的所述至少一I型膜蛋白的所述至少两个胺基酸序列中的所述至少一者是不同的。

17. 如权利要求1至11中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述至少一I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列;以及所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述至少两个I型膜蛋白的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者及所述至少一II型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列,所述第二单体包含所述至少两个I型膜蛋白的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者。

18. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含所述I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述I型膜蛋白为PD1,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述PD1的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者及所述4-1BBL的所述至少一胺基酸序列,所述第二单体包含所述PD1的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者。

19. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含所述I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述I型膜蛋白为LILRB2,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述LILRB2的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者及所述4-1BBL的所述至少一胺基酸序列,所述第二单体包含所述LILRB2的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者。

20. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含所述I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述I型膜蛋白为LILRB2,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述LILRB2的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者及所述CD40L的所述至少一胺基酸序列,所述第二单体包含所述LILRB2的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者。

21. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含PD1及SIRP α ,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述SIRP α 的所述胺基酸序列及所述4-1BBL的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述PD1的所述胺基酸序列。

22. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含PD1及SIRP α ,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述SIRP α 的所述胺基酸序列及所述CD40L的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述PD1的所述胺基酸序列。

23. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含LILRB2及SIRP α ,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述SIRP α 的所述胺基酸序列及所述4-1BBL的所述胺基酸序列,所

述第二单体包含所述LILRB2的所述胺基酸序列。

24. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含LILRB2及SIRP α ,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述SIRP α 的所述胺基酸序列及所述CD40L的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述LILRB2的所述胺基酸序列。

25. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含LILRB2及PD1,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述PD1的所述胺基酸序列及所述4-1BBL的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述LILRB2的所述胺基酸序列。

26. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含LILRB2及PD1,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述PD1的所述胺基酸序列及所述CD40L的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述LILRB2的所述胺基酸序列。

27. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含SIGLEC及PD1,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述PD1的所述胺基酸序列及所述4-1BBL的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述SIGLEC的所述胺基酸序列。

28. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含SIGLEC及PD1,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述PD1的所述胺基酸序列及所述CD40L的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述SIGLEC的所述胺基酸序列。

29. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含TIGIT及PD1,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述PD1的所述胺基酸序列及所述4-1BBL的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述TIGIT的所述胺基酸序列。

30. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含TIGIT及PD1,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述PD1的所述胺基酸序列及所述CD40L的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述TIGIT的所述胺基酸序列。

31. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含TIGIT及PD1,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单

体,所述第一单体包含所述TIGIT的所述胺基酸序列及所述4-1BBL的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述PD1的所述胺基酸序列。

32. 如权利要求1至4中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含TIGIT及PD1,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述TIGIT的所述胺基酸序列及所述CD40L的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述PD1的所述胺基酸序列。

33. 如权利要求5、6、27及28中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述SIGLEC为SIGLEC10。

34. 如权利要求2至33中任一项所述的异二聚体,其特征在于,所述至少一I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列连接到所述蛋白质性二聚化部分的一N-末端,所述至少一II型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列连接到所述蛋白质性二聚化部分的一C-末端。

35. 一种核酸构建体或系统,其特征在于,所述核酸构建体或系统包含至少一多核苷酸以及一调节元件,所述至少一多核苷酸编码如权利要求2至34中任一项所述的异二聚体,所述调节元件用于指导在一宿主细胞中的所述多核苷酸的表达。

36. 一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞包含如权利要求2至34中任一项所述的异二聚体或如权利要求35所述的核酸构建体或系统。

37. 一种产生一异二聚体的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:在一宿主细胞中表达一核酸构建体或系统,所述核酸构建体或系统编码如权利要求1至34中任一项所述的异二聚体。

38. 如权利要求37所述的方法,其特征在于,所述方法包括将所述二聚化部分添加到所述至少一I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列及所述至少一II型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列中。

39. 如权利要求37至38中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:分离所述异二聚体。

40. 如权利要求1至34中任一项所述的异二聚体、编码所述异二聚体的一核酸构建体或系统或包含所述异二聚体的一细胞的用途,其特征在于,用于治疗可受益于所述异二聚体治疗的一疾病。

41. 如权利要求11至34中任一项所述的异二聚体、编码所述异二聚体的一核酸构建体或系统或包含所述异二聚体的一宿主细胞的用途,其特征在于,用于治疗可受益于调节数个免疫细胞的一疾病。

42. 如权利要求40至41中任一项所述的组合物的用途,其特征在于,所述疾病的数个细胞表达所述I型膜蛋白的一配体或一受体。

43. 如权利要求40至42中任一项所述的组合物的用途,其特征在于,所述疾病的数个细胞表达所述II型膜蛋白的一配体或一受体。

44. 如权利要求40至43中任一项所述的组合物的用途,其特征在于,所述疾病为癌症。

45. 如权利要求44所述的组合物的用途,其特征在于,所述癌症选自由淋巴瘤、白血病及恶性肿瘤所组成的群组。

46. 一种调节数个免疫细胞的活性的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:在存

在如权利要求11至34中任一项所述的异二聚体、编码所述异二聚体的一核酸构建体或系统或包含所述异二聚体的一宿主细胞的情况下体外激活数个免疫细胞。

47. 如权利要求46所述的方法,其特征在于,所述活化步骤是在表达所述I型膜蛋白或所述II型膜蛋白的一配体或一受体的数个细胞存在或在所述I型膜蛋白或所述II型膜蛋白的外源配体或一受体存在下进行的。

48. 如权利要求46至47中任一项所述的方法,其特征在于,所述调节步骤是激活的。

49. 如权利要求46至47中任一项所述的方法,其特征在于,所述调节步骤是抑制的。

50. 如权利要求41至49中任一项所述的方法或组合物,其特征在于,所述免疫细胞包含数个T细胞。

数个异二聚体及其数个使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请主张2019年7月11日提交的美国专利申请案第62/872741号的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表声明

[0004] 所述ASCII文件(名称为82913 SequenceList.txt)创建于2020年7月7日,包含347293字节,与本申请同时提交,通过引用并入本文。

背景技术

[0005] 在本发明的一些实施例中,本发明涉及数个异二聚体及其数个使用方法。

[0006] 双信号蛋白(Dual Signaling Proteins,DSP),也称为信号转换蛋白(Signal-Convertng-Proteins,SCP),是将一I型膜蛋白的一细胞外部分(细胞外氨基末端)连接到一II型膜蛋白的一细胞外部分(细胞外羧基末端)的双功能融合蛋白(functional fusion proteins),形成具有两个活性侧的一融合蛋白(多肽链)(参见例如美国专利第7569663号及第8039437号)。本领域已经公开了几种这样的DSP,包括例如PD1-4-1BBL及SIRP α -4-1BBL(参见例如国际专利申请公开号W02018/127919及W02018/127917)。通过与其天然的相应数个配体或数个受体结合,DSP可具有靶向性及/或功能性,以具体取决于其组成而影响例如数个细胞的一信号级联、生长、存活及活性。因此,例如可以设计一DSP,使得一臂用于选择性靶向一肿瘤部位或肿瘤微环境,而另一臂用作一免疫调节剂。这种独特的DSP成分,如PD1-4-1BBL及SIRP α -4-1BBL,可以促进一肿瘤部位处的适应性免疫的靶向激活。所述平台技术适用于大多数检查点标靶,在保持一良好的风险/收益比的同时,有可能提高疗效。

发明内容

[0007] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种异二聚体,所述异二聚体包含一二聚化部分,所述二聚化部分连接到至少一I型膜蛋白的至少一氨基酸序列并且连接到至少一II型膜蛋白的至少一氨基酸序列,所述I型膜蛋白能够至少结合所述至少一I型膜蛋白的一天然配体或受体,所述II型膜蛋白能够至少结合所述至少一II型膜蛋白的一天然配体或受体。

[0008] 根据本发明的一些实施例,所述二聚化部分是一蛋白质性部分。

[0009] 根据本发明的一些实施例,所述异二聚体的所述数个单体并非共价地连接。

[0010] 根据本发明的一些实施例,所述二聚化部分是一抗体的一Fc结构域或其一片段。

[0011] 根据本发明的一些实施例,至少一I型膜蛋白选自PD1、SIRP α 、LAG3、BTN3A1、CD27、CD80、CD86、ENG、NLGN4X、CD84、TIGIT、CD40、IL-8、IL-10、CD164、LY6G6F、CD28、CTLA4、BTLA、LILRB1、LILRB2、TYROBP、ICOS、VEGFA、CSF1、CSF1R、VEGFB、BMP2、BMP3、GDNF、PDGFC、PDGFD、, RAET1E、CD155、CD166、MICA、NRG1、HVEM、DR3、TEK、TGFB1、LY96、CD96、KIT、CD244、GFER及SIGLEC所组成的群组。

[0012] 根据本发明的一些实施例,所述至少一I型膜蛋白选自PD1、SIRP α 、LAG3、BTN3A1、

CD27、CD80、CD86、ENG、NLGN4X、CD84、TIGIT、CD40、IL-8、IL-10、CD164、LY6G6F、CD28、CTLA4、BTLA、LILRB1、LILRB2、TYROBP、ICOS、VEGFA、CSF1、CSF1R、VEGFB、BMP2、BMP3、GDNF、PDGFC、PDGFD、RAET1E、CD155、CD166、MICA、NRG1、HVEM、DR3、TEK、TGFB1、LY96、CD96、KIT、CD244及GFER所组成的群组。

[0013] 根据本发明的一些实施例,所述至少一I型膜蛋白选自PD1、SIRP α 、LAG3、TIGIT、LILRB1/2、CSF1、CSF1R及TGFB1所组成的群组。

[0014] 根据本发明的一些实施例,所述至少一I型膜蛋白选自PD1、SIRP α 、TIGIT、LILRB2及SIGLEC所组成的群组。

[0015] 根据本发明的一些实施例,所述至少一I型膜蛋白选自PD1及SIRP α 所组成的群组。

[0016] 根据本发明的一些实施例,所述至少一II型膜蛋白选自4-1BBL、FasL、TRAIL、TNF- α 、TNF- β 、OX40L、CD40L、CD27L、CD30L、RANKL、TWEAK、APRIL、BAFF、LIGHT、VEGI、GITRL、EDA1/2、淋巴毒素 α 及淋巴毒素 β 所组成的群组。

[0017] 根据本发明的一些实施例,所述至少一II型膜蛋白选自4-1BBL、OX40L、CD40L、LIGHT及GITRL所组成的群组。

[0018] 根据本发明的一些实施例,所述至少一II型膜蛋白选自4-1BBL及CD40L所组成的群组。

[0019] 根据本发明的一些实施例,所述至少一II型膜蛋白是4-1BBL。

[0020] 根据本发明的一些实施例,所述I型膜蛋白及所述II型膜蛋白中的至少一者是一免疫调节剂。

[0021] 根据本发明的一些实施例,所述异二聚体包含一第一单体,所述第一单体包含至少一I型膜蛋白的至少一胺基酸序列及至少一II型膜蛋白的至少一胺基酸序列。

[0022] 根据本发明的一些实施例,所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含至少一II型膜蛋白的至少一胺基酸序列,所述第二单体包含至少一I型膜蛋白的至少一胺基酸序列。

[0023] 根据本发明的一些实施例,所述至少一I型膜蛋白的至少一胺基酸序列包含所述至少一I型膜蛋白的至少两种胺基酸序列;以及所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含所述至少一I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列及所述至少一II型膜蛋白的至少一胺基酸序列,所述第二单体包含至少一I型膜蛋白的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者。

[0024] 根据本发明的一些实施例,所述第一单体的所述至少一I型膜蛋白的所述至少两个胺基酸序列中的所述至少一者与所述第二单体的所述I型膜蛋白的所述至少两个胺基酸序列中的所述至少一者是相同的。

[0025] 根据本发明的一些实施例,所述第一单体的所述至少一I型膜蛋白的所述至少两个胺基酸序列中的所述至少一者与所述第二单体的所述至少一I型膜蛋白的所述至少两个胺基酸序列中的所述至少一者是不同的。

[0026] 根据本发明的一些实施例,所述至少一I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列;以及所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述至少两个I型膜蛋白的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者及所述至少一II型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列,所述第二单体包含所述至少两个

I型膜蛋白的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者。

[0027] 根据本发明的一些实施例,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含所述I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述I型膜蛋白为PD1,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述PD1的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者及所述4-1BBL的所述至少一胺基酸序列,所述第二单体包含所述PD1的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者。

[0028] 根据本发明的一些实施例,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含所述I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述I型膜蛋白为LILRB2,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述LILRB2的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者及所述4-1BBL的所述至少一胺基酸序列,所述第二单体包含所述LILRB2的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者。

[0029] 根据本发明的一些实施例,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含所述I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述I型膜蛋白为LILRB2,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述LILRB2的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者及所述CD40L的所述至少一胺基酸序列,所述第二单体包含所述LILRB2的所述至少两个胺基酸序列中的至少一者。

[0030] 根据本发明的一些实施例,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含PD1及SIRP α ,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述SIRP α 的所述胺基酸序列及所述4-1BBL的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述PD1的所述胺基酸序列。

[0031] 根据本发明的一些实施例,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含PD1及SIRP α ,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述SIRP α 的所述胺基酸序列及所述CD40L的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述PD1的所述胺基酸序列。

[0032] 根据本发明的一些实施例,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含LILRB2及SIRP α ,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述SIRP α 的所述胺基酸序列及所述4-1BBL的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述LILRB2的所述胺基酸序列。

[0033] 根据本发明的一些实施例,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含LILRB2及SIRP α ,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述SIRP α 的所述胺基酸序列及所述CD40L的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述LILRB2的所述胺基酸序列。

[0034] 根据本发明的一些实施例,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含LILRB2及PD1,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述

PD1的所述胺基酸序列及所述4-1BBL的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述LILRB2的所述胺基酸序列。

[0035] 根据本发明的一些实施例,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含LILRB2及PD1,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述PD1的所述胺基酸序列及所述CD40L的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述LILRB2的所述胺基酸序列。

[0036] 根据本发明的一些实施例,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含SIGLEC及PD1,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述PD1的所述胺基酸序列及所述4-1BBL的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述SIGLEC的所述胺基酸序列。

[0037] 根据本发明的一些实施例,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含SIGLEC及PD1,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述PD1的所述胺基酸序列及所述CD40L的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述SIGLEC的所述胺基酸序列。

[0038] 根据本发明的一些实施例,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含TIGIT及PD1,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述PD1的所述胺基酸序列及所述4-1BBL的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述TIGIT的所述胺基酸序列。

[0039] 根据本发明的一些实施例,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含TIGIT及PD1,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述PD1的所述胺基酸序列及所述CD40L的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述TIGIT的所述胺基酸序列。

[0040] 根据本发明的一些实施例,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含TIGIT及PD1,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述TIGIT的所述胺基酸序列及所述4-1BBL的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述PD1的所述胺基酸序列。

[0041] 根据本发明的一些实施例,所述I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列包含至少两个I型膜蛋白的至少两个胺基酸序列,所述至少两个I型膜蛋白包含TIGIT及PD1,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体以及一第二单体,所述第一单体包含所述TIGIT的所述胺基酸序列及所述CD40L的所述胺基酸序列,所述第二单体包含所述PD1的所述胺基酸序列。

[0042] 根据本发明的一些实施例,所述SIGLEC为SIGLEC10。

[0043] 根据本发明的一些实施例,所述至少一I型膜蛋白的所述至少一胺基酸序列连接

到所述蛋白质性二聚化部分的一N-末端,所述至少一II型膜蛋白的所述至少一氨基酸序列连接到所述蛋白质性二聚化部分的一C-末端。

[0044] 根据本发明一些实施例的一方面,提供了一种核酸构建体或系统,所述核酸构建体或系统包含至少一多核苷酸以及一调节元件,所述至少一多核苷酸编码至少一异二聚体,所述调节元件用于指导在一宿主细胞中的所述多核苷酸的表达。

[0045] 根据本发明一些实施例的一方面,提供了一种宿主细胞,包含所述异二聚体或所述核酸构建体或系统。

[0046] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种产生一异二聚体的方法,所述方法包括以下步骤:在一宿主细胞中表达一核酸构建体或系统,所述核酸构建体或系统编码所述异二聚体。

[0047] 根据本发明的一些实施例,所述方法包括将所述二聚化部分添加到所述至少一I型膜蛋白的所述至少一氨基酸序列及所述至少一II型膜蛋白的所述至少一氨基酸序列中。

[0048] 根据本发明的一些实施例,所述方法包括以下步骤:分离所述异二聚体。

[0049] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种治疗可受益于所述异二聚体治疗的一疾病的方法,所述方法包括以下步骤:向有需要的一受试者施用所述异二聚体、编码所述异二聚体的一核酸构建体或系统或包含所述异二聚体的一宿主细胞,从而治疗所述受试者的所述疾病。

[0050] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种治疗可以受益于调节数个免疫细胞的一疾病的方法,所述方法包括以下步骤:向有需要的一受试者施用所述异二聚体、编码所述异二聚体的一核酸构建体或系统或包含所述异二聚体的一宿主细胞,从而治疗所述受试者的所述疾病。

[0051] 根据本发明的一些实施例,所述方法还包括以下步骤:向所述受试者施用用于治疗所述疾病的一治疗剂。

[0052] 根据本发明一些实施例的一方面,提供了所述异二聚体、编码所述异二聚体的一核酸构建体或系统或包含所述异二聚体的一细胞的用途,用于治疗可受益于所述异二聚体治疗的一疾病。

[0053] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了所述异二聚体、编码所述异二聚体的一核酸构建体或系统或包含所述异二聚体的一细胞的用途,用于治疗可受益于调节数个免疫细胞的一疾病。

[0054] 根据本发明的一些实施例,所述组合物还包含用于治疗所述疾病的一治疗剂。

[0055] 根据本发明的一些实施例,用于治疗所述疾病的所述治疗剂包括一抗体。

[0056] 根据本发明的一些实施例,所述疾病细胞表达所述I型膜蛋白的一配体或一受体。

[0057] 根据本发明的一些实施例,所述疾病细胞表达所述II型膜蛋白的一配体或一受体。

[0058] 根据本发明的一些实施例,所述疾病是癌症。

[0059] 根据本发明的一些实施例,所述癌症选自淋巴瘤、白血病及恶性肿瘤所组成的群组。

[0060] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种调节数个免疫细胞的活性的方法,所述方法包括以下步骤:在存在异二聚体、编码所述异二聚体的一核酸构建体或系统或

包含所述异二聚体的一宿主细胞的情况下体外激活数个免疫细胞。

[0061] 根据本发明的一些实施例,所述活化步骤是在表达所述I型膜蛋白或所述II型膜蛋白的一配体或一受体的数个细胞存在或在所述I型膜蛋白或所述II型膜蛋白的外源配体或一受体存在下进行的。

[0062] 根据本发明的一些实施例,所述调节步骤是激活的。

[0063] 根据本发明的一些实施例,所述调节步骤是抑制的。

[0064] 根据本发明的一些实施例,所述免疫细胞包含数个T细胞。

[0065] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术及/或科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。尽管与本文所述的方法及材料相似或等效的方法及材料可以用于本发明的实施例的实践或测试,但示例性方法及/或材料在下文描述。如有冲突,以专利说明书(包括定义)为准。此外,这些材料、方法及范例仅是说明性的,并不意味着必然是限制性的。

附图说明

[0066] 本文仅以范例的方式,参考附图描述本发明的一些实施例。现在具体参考附图,需要强调的是,所示的细节是作为范例并用于数个本发明实施例的说明性讨论。在这方面,通过所附图式进行的描述使本领域技术人员清楚地知道如何实施本发明的数个实施例。

[0067] 在所述数个图式中:

[0068] 图1是一异二聚体可能排列/构象的数个非限制性范例的一示意图。

[0069] 图2显示出PD1-sc3x4-1BBL (4-1BBL胞外结构域的3个重复) 异二聚体的数个示意图,在本文中称为“DSP305” (SEQ ID NO:79及81) 及“DSP305_V1” (SEQ ID NO:79及83)。

[0070] 图3A至图3H展示出所述PD1-sc3x4-1BBL异二聚体DSP305 (SEQ ID NO:79及81) 及 DSP305_V1 (SEQ ID NO:79及83) 的所述预测3D结构。图3A是一示意性3D模型,图3B是DSP305的一完整原子3D模型 (SEQ ID NO:79及81)。PD1序列(用于“杵(knob)”及“臼(hole)”) 在深灰色色带显示屏(右侧)中显示。“杵”序列的Higg4在图3A的中间以白色带表示。Higg4的“臼”序列在图3A的中间用灰色带表示。4-1BB-L用深灰色缎带表示(左侧)。在PD1、hIgG4及4-1BBL的结构元素之间,用灰色及白色的带状物表示“间隔物(spacer)”/“连接体(linker)”段。hIgG4 Fc结构域(稳定复合物)的所述数个铰链半胱氨酸残基(hinge cysteine residues)用CPK表示。图3C是一示意性3D模型,图3D是DSP305 (SEQ ID NO:79及81) 在其配体(PDL1及4-1BB)存在下的一全原子3D模型。不同的域由不同的色带表示,如图3A所示。此外,绑定到PD1的PDL1以灰色带状(右侧)表示,三个4-1BB域以灰色带状与4-1BBL(左侧)复合表示。图3E是示意图3D模型,图3F是DSP305_V1的完整原子3D模型 (SEQ ID NO:79及83)。不同的域由不同的色带表示,如图3A所示。图3G是示意性3D模型,图3H是DSP305_V1 (SEQ ID NO:79及83) 在配体(PDL1及4-1BB)存在下的一全原子3D模型。不同的域由不同的色带表示,如图3A所示。此外,绑定到PD1的PDL1以灰色带状(右侧)表示,三个4-1BB域以灰色带状与4-1BBL(左侧)复合表示。

[0071] 图4是在还原及/或非还原条件下分离的DSP305及DSP305_V1的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析照片。图中所示的样品为粗(crude)(非纯化)或蛋白质-一种经过五天纯化的上清液。上清液来自转染了编码异二聚体的质粒的Expi293F细胞,如图所示。对照

sup为五天的未转染Expi293F细胞上清液。

[0072] 图5显示出PD1-SIRP α -sc3x4-1BBL异二聚体的数个示意图,在本文中称为“TSP111”(SEQ ID NO:85及81)、“TSP111_V1”(SEQ ID NO:89及91)及“TSP111_V2”(SEQ ID NO:85及83)。

[0073] 图6A至图6D展示出所述预测的PD1-SIRP α -sc3x4-1BBL异二聚体TSP111的3D结构(SEQ ID NO:85及81)。图6A是一示意性3D模型,图6B是TSP111的一完整原子3D模型(SEQ ID NO:85及81)。PD1(在“杵”链中)显示在深灰色带状显示屏(右下侧)中。SIRP α (在“臼(hole)”链中)用深灰色的缎带显示屏(右上侧)表示。“杵”序列的Higg4在图中部显示为白色带。‘臼(hole)’序列的Higg4在图中部显示为灰色带。4-1BBL用深灰色缎带表示(左侧)。在PD1、hIgG4及4-1BBL的结构元素之间,用灰色及白色的带状物表示“间隔物”/“连接体”段。hIgG4 Fc结构域(稳定复合物)的铰链半胱氨酸残基用CPK表示。图6C是一示意性3D模型,图6D是TSP111(SEQ ID NO:85及81)在其数个配体(CD47、PDL1及4-1BB)存在下的一全原子3D模型。不同的域由不同的色带表示,如图6A所示。此外,与PD1结合的PDL1用灰色条带(右下侧)表示,CD47(SIRP α 受体)用灰色条带(右上侧)表示,三个4-1BB受体用灰色条带与4-1BBL(左侧)复合表示。

[0074] 图7是在还原及/或非还原条件下分离的TSP111、TSP111_V1及TSP111_V2的SDS-PAGE分析照片。图中所示的样品为粗(非纯化)或蛋白质-一种经过五天纯化的上清液。上清液来自转染了编码异二聚体的质粒的Expi293F细胞,如图所示。对照sup为五天的未转染Expi293F细胞上清液。

[0075] 图8A至图8D证明PD1-sc3x4-1BBL异二聚体DSP305(SEQ ID NO:79及81)与其在细胞表面表达的配体结合。图8A显示出流式细胞术分析直方图,显示了DLD1-PDL1细胞系上PDL1受体的表达。通过用抗PDL1抗体对DLD1WT及PDL1过度表达细胞系(DLD1-PDL1)进行免疫染色,然后进行流式细胞术分析,以确定PDL1的表面表达水平。GMFI值由FACS检测及FlowJo软件分析确定。图8B显示出流式细胞术分析直方图,显示了4-1BB受体在HT1080-4-1BB细胞系上的表达。4-1BB的表面表达水平通过使用抗4-1BB抗体对HT1080 WT及4-1BB过表达细胞系进行免疫染色,然后进行流式细胞术分析来确定。GMFI值被显示出。图8C显示出流式细胞术分析,显示了DSP305(SEQ ID NO:79及81)与DLD1 WT及PDL1过度表达细胞系的结合。异二聚体与配体表达细胞系的结合通过使用抗-4-1BBL抗体对其4-1BBL结构域进行免疫染色来确定,随后将细胞与所示异二聚体培育,然后进行流式细胞术分析。GMFI值被显示出,并使用一GraphPad Prism软件来创建一结合曲线图(binding curve graph)。图8D显示出流式细胞术分析,表示DSP305与HT1080 WT及4-1BB过表达细胞系结合。异二聚体与细胞系的结合通过使用抗PD1抗体对其PD1结构域进行免疫染色来确定,随后将细胞与所示异二聚体培育,然后进行流式细胞术分析。GMFI值被显示出,并使用GraphPad Prism软件来创建一结合曲线图。

[0076] 图9A至图9D显示出所述PD1-SIRP α -sc3x4-1BBL异二聚体TSP111与其在细胞表面表达的配体的结合。图9A显示出流式细胞术分析,表示TSP111与DLD1 WT及PDL1过度表达细胞系的结合。异二聚体与配体表达细胞系的结合通过使用抗-4-1BBL抗体对其4-1BBL结构域进行免疫染色来确定,随后将细胞与所示异二聚体培育,然后进行流式细胞术分析。GMFI值被显示出,并使用一GraphPad Prism软件来创建一结合曲线图。图9B显示出流式细胞术

分析,表示TSP111与HT1080 WT及4-1BB过表达细胞系的结合。异二聚体蛋白与细胞系的结合通过使用抗PD1抗体对其PD1结构域进行免疫染色来确定,随后将细胞与所示异二聚体培育,然后进行流式细胞术分析。GMFI值被显示出,并使用一GraphPad Prism软件来创建一结合曲线图。图9C显示出流式细胞术分析直方图,显示CHO-K1-CD47过度表达细胞系上CD47受体的表达,而CHO-K1 WT亲代细胞系上不具有表达。CD47的表面表达水平通过使用抗人CD47抗体对CHO-K1 WT及CHO-K1-CD47细胞系进行免疫染色,然后进行流式细胞术分析来确定。GMFI值由FACS检测及FlowJo软件分析确定。图9D显示出流式细胞术分析,表示在不存在或存在抗CD47阻断抗体的情况下,TSP111与CHO-K1 WT及CD47过度表达细胞系结合。异二聚体与配体表达细胞系的结合通过使用抗PD1抗体对其PD1结构域进行免疫染色来确定,随后将细胞与所示异二聚体培育,然后进行流式细胞术分析。GMFI值被显示出,并使用一GraphPad Prism软件来创建一结合曲线图。

[0077] 图10A至图10B显示出PD1-sc3x4-1BBL异二聚体DSP305及PD1-SIRP α -sc3x4-1BBL异二聚体TSP111与至少两个配体的同时结合。将含有异二聚体或对照上清液(来自未转染的Expi293F细胞)的上清液培养在PDL1或CD47预涂覆96孔板中,或以等摩尔量将两种蛋白质混合。培育后,用生物素化的4-1BBL进行检测。图10A显示出DSP305以一浓度依赖方式与PDL1涂层板结合,图10B显示出TSP111独立于CD47、PDL1及混合蛋白涂层板结合。根据标准ELISA协议,使用板读取器(Thermo Scientific,Multiscan FC)在450nm处使用TMB底物进行检测,并在540nm处进行参考。

[0078] 图11A至图11C显示出异二聚体DSP305、TSP111、TSP111_V1及TSP111_V2激活41BB介导的信号转导。图11A至图11C显示出在含有DSP305的上清液或对照上清液(来自未转染细胞)存在下,在PD1涂层板中培养的HT1080 4-1BB细胞的IL-8分泌(图11A);HT1080 4-1BB细胞在含有TSP111的上清液或对照上清液(来自未转染细胞)存在下,在涂有PD1或CD47或这两种蛋白质的混合物的平板中培养(图11B);或HT1080 4-1BB细胞,在含有TSP111、TSP111_V1、TSP111_V2的上清液或对照上清液(来自未转染细胞)的情况下,在涂有CD47的平板中培养(图11C)。使用IL-8ELISA试剂盒及板读取器(Thermo Scientific,Multiscan FC)在450nm处分析上清液中的IL-8浓度,并在540nm处进行参考。

[0079] 图12A是本文中称为“TSP112”的PD1-SIRP α -SC3XD40L异二聚体的示意图(SEQ ID NO:81及146)。

[0080] 图12B至图12C展示出所述预测的PD1-SIRP α -SC3XD40L异二聚体TSP112的3D结构(SEQ ID NO:81及146)。图12B是一示意性3D模型,图12C是TSP112的一全原子3D模型(SEQ ID NO:81及146)。PD1(在“杵”链中)显示在深灰色带状显示屏(右下侧)中。SIRP α (在“臼”链中)在深灰色色带显示屏(右上侧)中显示。“杵”序列的Higg4在图中部显示为白色带。‘臼’序列的Higg4在图中部显示为灰色带。CD40L用深灰色缎带表示(左侧)。在PD1、SIRP α 、hIgG4及CD40L的所述数个结构元件之间,用灰色及白色的带状物表示“间隔物”/“连接体”片段。所述hIgG4 Fc结构域(稳定复合物)的所述数个铰链半胱氨酸残基用CPK表示。

[0081] 图13A是所述LILRB2-SIRP α -sc3x4-1BBL异二聚体的一示意图,在本文中称为“TSP215”(SEQ ID NO:138及85)。

[0082] 图13B至图13C展示出LILRB2-SIRP α -sc3x4-1BBL异二聚体TSP215的所述预测3D结构(SEQ ID NO:138及85)。图13B为示意性3D模型,图13C为TSP115的一全原子3D模型(SEQ

ID NO:138及85)。LILRB2(在“杵”链中)用深灰色缎带显示屏(右下侧)表示。SIRP α (在“臼”链中)在深灰色色带显示屏(右上侧)中显示。“杵”序列的Higg4在图中部显示为白色带。‘臼’序列的Higg4在图中部显示为灰色带。4-1BBL用深灰色缎带表示(左侧)。在LILRB2、SIRP α 、hIgG4及4-1BBL的所述数个结构元件之间,用灰色及白色的带状物表示“间隔物”/“连接体”片段。hIgG4 Fc结构域(稳定复合物)的所述铰链半胱氨酸残基用CPK表示。

[0083] 图14A是LILRB2-SIRP α -SC3XD40L异二聚体的一示意图,本文称为“TSP217”(SEQ ID NO:138及146)。

[0084] 图14B至图14C展示出PD1-SIRP α -SC3XD40L异二聚体TSP217的所述预测3D结构(SEQ ID NO:138及146)。图14B是一示意性3D模型,图14C是TSP217的一全原子3D模型(SEQ ID NO:138及146)。LILRB2(在“杵”链中)用深灰色缎带显示屏(右下侧)表示。SIRP α (在“臼”链中)在深灰色色带显示屏(右上侧)中显示。“杵”序列的Higg4在图中部显示为白色带。‘臼’序列的Higg4在图中部显示为灰色带。CD40L用深灰色缎带表示(左侧)。在LILRB2、SIRP α 、hIgG4及CD40L的结构元素之间,用灰色及白色的带状物表示“间隔物”/“连接体”片段。hIgG4 Fc结构域(稳定复合物)的所述铰链半胱氨酸残基用CPK表示。

[0085] 图15A是SIGLEC10-PD1-sc3x4-1BBL异二聚体的一示意图,在本文中称为“TSP401”(SEQ ID NO:150及79)。

[0086] 图15B至图15C展示出SIGLEC10-PD1-sc3x4-1BBL异二聚体“TSP401”(SEQ ID NO:150及79)的所述预测3D结构。图15B是一示意性3D模型,图15C是TSP401的一全原子3D模型(SEQ ID NO:150及79)。SIGLEC10序列(在“杵”链中)在深灰色带状显示屏(右下方)中显示。PD1(在“臼”链中)以深灰色色带显示(右上侧)。“杵”序列的Higg4在图中部显示为白色带。‘臼’序列的Higg4在图中部显示为灰色带。4-1BBL用深灰色缎带表示(左侧)。在SIGLEC10、PD1、hIgG4及4-1BBL的所述数个结构元件之间,用灰色及白色的带状物表示“间隔物”/“连接体”片段。hIgG4 Fc结构域(稳定复合物)的所述铰链半胱氨酸残基用CPK表示。

[0087] 图16A是TIGIT-PD1-sc3x4-1BBL异二聚体的一示意图,在本文中称为“TSP501”(SEQ ID NO:152及79)。

[0088] 图16B至图16C展示出TIGIT-PD1-sc3x4-1BBL异二聚体“TSP501”(SEQ ID NO:152及79)的所述预测3D结构。图16B是一示意性3D模型,图16C是TSP501的一全原子3D模型(SEQ ID NO:152及79)。TIGIT序列(在“杵”链中)在深灰色带状显示屏(右下侧)中显示。PD1(在“臼”链中)以深灰色色带显示(右上侧)。“杵”序列的Higg4在图中部显示为白色带。‘臼’序列的Higg4在图中部显示为灰色带。4-1BBL用深灰色缎带表示(左侧)。在TIGIT、PD1、hIgG4及4-1BBL的所述数个结构元件之间,用灰色及白色的带状物表示“间隔物”/“连接体”片段。hIgG4 Fc结构域(稳定复合物)的所述铰链半胱氨酸残基用CPK表示。

[0089] 图17是在还原或非还原条件下分离的TSP215、TSP215_V1、TSP214及TSP214_V1的SDS-PAGE分析照片。图中所示样品为粗(非纯化)-五天上清液。上清液来自转染了编码所示异二聚体的质粒的Expi293F细胞。对照sup为五天的未转染Expi293F细胞上清液。

[0090] 图18A至图18B显示出在还原(R)或非还原(NR)条件下分离的TSP112、TSP217、DSP218、TSP221、TSP222、TSP401、TSP403、TSP501及TSP503的SDS-PAGE分析照片。图中所示的样品为粗(非纯化,图18A)或蛋白质-A纯化(图18B)-五天上清液。上清液来自转染了编码所示异二聚体的质粒的Expi293F细胞。对照sup为五天的未转染Expi293F细胞上清液。

[0091] 图19A至图19C是TSP111蛋白印迹分析的照片。图中显示的样品为粗(非纯化)-五天上清液。上清液来自转染了编码异二聚体的质粒的Expi293F细胞,如图所示。对照sup为五天的未转染Expi293F细胞上清液。在非还原(NR)或还原(R)条件下,在SDS-PAGE上分离上清液,然后用抗PD1(图19A)、抗SIRP α (图19B)或抗4-1BBL(图19C)抗体进行免疫印迹。

[0092] 图20A至图20C为TSP112、TSP401、TSP501及TSP221的蛋白质印迹分析照片。图中显示的样品为粗(非纯化)-五天上清液。上清液来自转染了编码所示异二聚体的质粒的Expi293F细胞。在非还原(NR)或还原(R)条件下,在SDS-PAGE上分离含有约50ng异二聚体蛋白质的上清液样品,然后用抗PD1(图20A)、抗SIRP α (图20B)及抗4-1BBL(图20C)抗体进行免疫印迹。

[0093] 图21A至图21C是TSP215、TSP215_V1、TSP214、TSP214_V1、TSP217及DSP218的蛋白质印迹分析照片。图中显示的样品为粗(非纯化)-五天上清液。上清液来自转染了编码所示异二聚体的质粒的Expi293F细胞。对照sup为五天的未转染Expi293F细胞上清液。在非还原(NR)或还原(R)条件下,在SDS-PAGE上分离含有约50ng异二聚体蛋白质的上清液样品,然后用抗4-1BBL(图21A)、抗SIRP α (图21B)及抗LILRB2(图21C)抗体进行免疫印迹。

[0094] 图22A至图22B显示出与DLD1-WT阴性对照细胞系相比,TSP401(图22A)及TSP501(图22B)异二聚体的PD1臂与DLD1-PDL1过度表达细胞系表面表达的配体PDL1的结合。结合通过使用抗4-1BBL抗体对4-1BBL结构域进行免疫染色来确定,随后将细胞与指示的异二聚体培育,然后进行流式细胞术分析。

[0095] 图23显示出TSP401及TSP501与HT1080 WT及4-1BB过表达细胞系的结合。所述数个异二聚体蛋白与所述数个细胞系的结合在所述数个细胞与所述异二聚体培育后通过使用抗PD1抗体对其PD1结构域进行免疫染色,然后进行流式细胞术分析来确定。

[0096] 图24显示出TSP214与HT1080过度表达的4-1BB细胞系的结合。所述数个异二聚体与受体表达细胞系的结合在所述数个细胞与所述异二聚体培育后,通过使用抗LILRB2抗体对其LILRB2结构域进行免疫染色,然后进行流式细胞术分析来确定。用抗4-1BB阻断抗体所述数个细胞的培育,消除了TSP214与所述数个细胞的结合,显示出特异性。

[0097] 图25显示出TSP215与HT1080过度表达的4-1BB细胞系的结合。所述数个异二聚体与4-1BB及CD47表达细胞系的结合在所述数个细胞与所述异二聚体培育后通过使用抗LILRB2抗体对其LILRB2结构域进行免疫染色,然后进行流式细胞术分析来确定。对于特异性测试,在不存在或存在抗CD47阻断抗体、抗4-1BB阻断抗体或两种阻断抗体的组合的情况下确定结合步又。

[0098] 图26A至图26B显示出PD1-SIRP α -SC3XD40异二聚体TSP112与所述数个细胞表面表达的CD40的结合。图26A是一柱状图,显示出HT1080-CD40过度表达细胞系上CD40受体的表达,使用抗CD40抗体测定,然后进行流式细胞术分析。图26B显示出TSP112与HT1080过度表达的CD40细胞的结合。通过使用抗PD1抗体对其PD1结构域进行免疫染色,然后通过流式细胞术分析,在所述数个细胞与所述异二聚体培育后,确定了所述异二聚体与CD40表达细胞系的结合。

[0099] 图27A至图27C显示出PD1-TIGIT-sc3x4-1BBL异二聚体TSP501与所述数个细胞表面表达的CD155(PVR)的结合。图26A至图26B显示出数个直方图,表示了内源性CD155在DLD1-WT细胞上的表达,而在U937细胞上没有表达,这是使用抗CD155抗体确定的,随后进行

流式细胞术分析。图27C显示出TSP501与DLD1-WT表达细胞结合,而与U937细胞无结合。通过使用抗-4-1BBL抗体对其4-1BBL结构域进行免疫染色,然后通过流式细胞术分析,在所述数个细胞与所述异二聚体培育后来确定结合。

[0100] 图28A至图28C显示出DSP214及TSP215异二聚体与各自对应物的同时结合。图28A至图28B显示出DSP214(图28A)及TSP215(图28B)与HLA-G及41BB的结合。图28C显示出DSP215与CD47及41BB的结合。将含有异二聚体TSP214或对照上清液(图28A)或纯化的TSP215异二聚体(图28B至图28C)的上清液培养在HLA-G、CD47或BSA预涂覆的96孔板中。通过与41BB生物素培育检测结合,然后根据标准ELISA协议,使用板读取器在450nm处检测链霉亲和素HRP及TMB底物,参考波长为620nm。

[0101] 图29A至图29B显示出异二聚体TSP401及TSP501激活41BB介导的信号转导。图29A显示出在含有TSP401的上清液存在下,在PDL1及CD24涂层板中培养的HT1080 4-1BB细胞的IL8分泌。图29B显示出在含有TSP501的上清液存在下,在PDL1及CD155(PVR)涂层板中培养的HT1080 4-1BB细胞分泌的IL-8。

[0102] 图30A至图30B显示出异二聚体TSP112、TSP217及DSP218对CD40介导的信号转导的激活。图30A显示出在含有TSP112的上清液存在下,在PDL1及CD47涂层板中培养的HT1080 CD40细胞的IL8分泌。图30B显示出在含有TSP217或DSP218的上清液存在的情况下,在HLA-G及CD47涂层板中培养的HT1080 CD40细胞分泌的IL8。

[0103] 图31显示出异二聚体TSP215激活41BB介导的信号转导。CHO-K1-CD47与HT1080-41BB细胞在含有TSP215的上清液的连续稀释液中共同培养。

[0104] 图32显示出本发明的一些实施例所设想的异二聚体的组成及排列的数个示意图。

具体实施方式

[0105] 在本发明的一些实施例中,本发明涉及数个异二聚体及其数个使用方法。

[0106] 在详细解释本发明的至少一实施例之前,应当理解,本发明的应用不一定局限于以下描述中阐述的细节或由所述数个范例所示例性示出的细节。本发明能够以各种方式实施或实现其他数个实施例。

[0107] 双信号蛋白(Dual Signaling Proteins,DSP),也称为信号转换蛋白(Signal-Convertng-Proteins,SCP),是将一I型膜蛋白的一细胞外部分(细胞外氨基末端)连接到一II型膜蛋白的一细胞外部分(细胞外羧基末端)的双功能融合蛋白,形成具有两个活性侧的一融合蛋白。

[0108] 在将本发明简化为实践的同时,本发明人现在已经生成了数个异二聚体,所述数个异二聚体包含一I型膜蛋白的一细胞外部分及一II型膜蛋白的一细胞外部分。

[0109] 因此,根据本发明的一方面,本发明提供了一种异二聚体,所述异二聚体包含一二聚化部分,所述二聚化部分连接到至少一I型膜蛋白的至少一氨基酸序列并且连接到至少一II型膜蛋白的至少一氨基酸序列,所述I型膜蛋白能够至少结合所述至少一I型膜蛋白的一天然配体或受体,所述II型膜蛋白能够至少结合所述至少一II型膜蛋白的一天然配体或受体。

[0110] 如本文所用,术语“异二聚体”(heterodimer)指由两种不同蛋白质(本文称为单体)人工附着形成的一非天然二聚体蛋白质。

- [0111] 根据数个特定实施例,所述异二聚体的所述数个单体并非共价地连接。
- [0112] 根据数个其他特定实施例,所述异二聚体的所述数个单体共价地连接。
- [0113] 根据数个其他特定实施例,所述异二聚体的所述数个单体通过一二硫键连接。
- [0114] 根据数个其他特定实施例,所述异二聚体的所述数个单体通过一二硫键连接。
- [0115] 如本文所用,术语“二聚化部分”(dimerizing moiety)指一部分(moiety),所述部分能够连接两种不同单体以形成一异二聚体。此类二聚化部分为本领域所知,包括化学部分及蛋白质性部分(chemical and proteinaceous moieties)。
- [0116] 所述二聚化部分连接到至少一I型膜蛋白的至少一氨基酸序列及至少一II型膜蛋白的至少一氨基酸序列。
- [0117] 根据数个其他特定实施例,所述二聚化部分直接连接到所述I型膜蛋白及/或所述II型膜蛋白的氨基酸序列。
- [0118] 根据数个特定实施例,所述二聚化部分并非直接连接到所述I型膜蛋白及/或所述II型膜蛋白的所述氨基酸序列。
- [0119] 根据数个特定实施例,所述二聚化部分共价地连接到所述I型膜蛋白及/或所述II型膜蛋白的所述氨基酸序列。
- [0120] 根据数个特定实施例,所述二聚化部分并非共价地连接到所述I型膜蛋白及/或所述II型膜蛋白的所述氨基酸序列。
- [0121] 根据数个特定实施例,所述二聚化部分与所述I型膜蛋白及/或所述II型膜蛋白异源。
- [0122] 根据数个特定实施例,所述二聚化部分是至少两种不同分子的一组合物。
- [0123] 根据数个特定实施例,所述二聚化部分是一非蛋白质性部分(non-proteinaceous moiety),例如一交联剂、一有机聚合物、一合成聚合物、一小分子等。
- [0124] 本领域已知许多这样的非蛋白质性部分,并且可以从例如Santa Cruz、Sigma-Aldrich、Proteochem等商业上获得。根据数个特定实施例,所述非蛋白质性部分是一异源双功能交联剂。数个异双功能交联剂有两个不同的反应端。一般而言,在第一步骤中,用所述杂双功能试剂的一反应基团来修饰一单体;去除所述剩余的游离试剂。在第二步骤中,将所述修饰的单体与一第二单体混合,然后使其与所述试剂的所述另一端的所述修饰的基团进行反应。最广泛使用的通过胺及巯基(amine and sulfhydryl groups)偶联蛋白质(最不稳定的胺反应性NHS酯首先偶联,去除未偶联试剂后,与巯基进行偶联)。所述数个巯基反应基团通常为马来酰亚胺(maleimides)、吡啶基二硫化物(pyridyl disulfides)及 α -卤代乙酰(alpha-halocetyl)s)。其他交联剂包括数个碳二亚胺(carbodiimides),其连接在羧基(-COOH)及伯胺(-NH₂)之间。另一种方法是将一单体的所述数个赖氨酸残基(lysine residues)修饰为数个硫醇(thiols),并通过添加马来酰亚胺基团(maleimide groups)然后在所述数个单体之间形成数个稳定的硫酯键(thioester bonds)来修饰第二单体。如果其中一单体含有数个天然硫醇,这些基团可以直接与连接到另一单体的马来酰亚胺反应。还存在具有一荧光活性端的数个杂双官能团交联剂(heterobifunctional cross-linkers),例如基于双[2-(4-迭氮水杨酸酰氨基)乙基]二硫化物(Bis[2-(4-azidosalicylamido)ethyl]disulfide, BASED)。当没有特定基团可用于反应时,使用光活性基团(photoreactive groups),这是因为光活性基团在暴露于紫外光时会发生非特异性

反应。此类异双功能交联剂的数个非限制性实例包括但不限于：炔-PEG4-马来酰亚胺 (Alkyne-PEG4-maleimide)、炔-PEG5-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (Alkyne-PEG5-N-hydroxysuccinimidyl ester)、马来酰亚胺-PEG琥珀酰亚胺酯 (Maleimide-PEG-succinimidyl ester)、迭氮-PEG4-苯氧二唑甲基砜 (Azido-PEG4-phenyloxadiazole methylsulfone)、LC-SMCC (琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧基-(6-氨基丙酸)) (LC-SMCC(succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxy-(6-amidocaproate))), MPBH (4-(4-马来酰亚胺苯基)丁酸酰肼盐酸盐+1/2二氧六环) (MPBH(4-(4-N-Maleimidophenyl)butyric acid hydrazide hydrochloride+1/2dioxane)), PDPH (3-(2-吡啶基二硫代)丙酰肼) (PDPH(3-(2-pyridyldithio)propionyl hydrazide)), SIAB (N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯) (SIAB(N-succinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate)), SMPH (琥珀酰亚胺基-6-((b-马来酰亚胺丙酰胺基)己酸) (SMPH(succinimidyl-6-((b-maleimidopropionamido)hexanoate))), 磺基KMUS (N-(κ-马来酰亚胺二甲酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯) (Sulfo-KMUS(N-(κ-maleimidoundecanoyloxy)sulfosuccinimide ester)), 磺基SIAB (磺基琥珀酰亚胺(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯) (Sulfo-SIAB(sulfosuccinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate)), 3-(马来酰亚胺)丙酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (3-(Maleimido)propionic acid N-hydroxysuccinimide ester)、甲氧羰基磺酰氯 (Methoxycarbonylsulfonyl chloride)、炔丙基聚乙二醇酸 (Propargyl-PEG-acid)、氨基聚乙二醇叔丁酯 (Amino-PEG-t-butyl ester)、BocNH-PEG5-酸 (BocNH-PEG5-acid)、BMPH (N-(β-马来酰亚胺丙酸)肼) (BMPH(N-(β-maleimidopropionic acid)hydrazide)、三氟乙酸盐 (trifluoroacetic acid salt)、ANB-NOS、BMPS、EMC、GMB、LC-SPDP、MBS、SBA、SIA、Sulfo-SIA、, SMCC、SMPB、SMPH、SPDP、磺基-LC-SPDP、磺基-MBS、磺基-SANPAH、磺基-SMCC。

[0125] 根据数个其他特定实施例,所述二聚化部分为一蛋白质性部分。

[0126] 根据数个特定实施例,所述二聚化部分包含亲和对多肽的数个成员,其具有针对两个不同亲和互补标记的两个不同亲和部分。此类亲和力对在本领域中是众所周知的,包括但不限于血凝素(HA)、抗HA、AviTagTM、V5、Myc、T7、FLAG、HSV、VSV-G、His、生物素、抗生物素、链霉亲和素、rhizavedin、金属亲和力标记、凝集素亲和力标记。本领域技术人员会知道选择哪个标记。

[0127] 根据数个特定实施例,所述二聚化部分是一抗体(例如IgG、IgA、IgD或IgE)或其一片段的Fc结构域。

[0128] 根据数个特定实施例,所述二聚化部分是人类IgG4的Fc结构域。

[0129] 根据数个特定实施例,所述二聚化部分是人类IgG1的Fc结构域。

[0130] 根据数个特定实施例,所述二聚化部分为Fc结构域单体。

[0131] 根据数个其他特定实施例,所述二聚化部分为Fc结构域二聚体。

[0132] 有许多机制可用于使用一抗体的Fc结构域生成一异二聚体,例如但不限于球形臼(knob-into-hole)或电荷对(charge pairs)(参见Gunasekaran等人,J.Biol.Chem. 285(25):19637(2010),通过引用将其全部内容并入本文件)。

[0133] 因此,根据数个特定实施例,所述Fc结构域可包含数个保守及非保守氨基酸取代(本文也称为突变)。

[0134] 当序列同一性百分比用于蛋白质时,人们认识到不完全相同的残基位置往往因保守的氨基酸取代而不同,氨基酸残基被具有类似化学性质(例如电荷或疏水性)的其他氨基酸残基取代,因此不会改变分子的功能性质。如果数个序列在数个保守取代中不同,则可以向上调整所述序列一致性百分比,以校正所述取代的所述保守性质。通过这种保守取代而不同的数个序列被认为具有“序列相似性”或“相似性”。进行这种调整的方法为本领域技术人员所熟知。通常,这涉及将保守取代作为一部分不匹配而非一完全不匹配(a partial rather than a full mismatch)进行评分,从而增加所述序列一致性的百分比。因此,例如如果一相同氨基酸的一评分为1,一非保守取代的一评分为0,一保守取代的一评分在0到1之间。数个保守取代的所述评分是根据Henikoff S及Henikoff JG的算法计算的。[Amino acid substitution matrices from protein blocks.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.1992, 89(22):10915-9]。

[0135] 下文进一步提供关于保守氨基酸及非保守氨基酸取代的附加说明。

[0136] 本领域已知一Fc域中的这种取代。

[0137] 可与本发明的数个特定实施例一起使用的一代表性范例是“杵-进入-臼”(“knob-into-hole,KIH”)形式。此类杵及臼突变在本领域中是众所周知的,并公开于美国专利号US8216805、Shane Atwell等人J.Mol.Biol.(1997)270,26-35;Cater et等人(Protein Engineering vol.9no.7pp.617-621,1996);and A.Margaret Merchant et.al.Nature Biotechnology(1998年7月16日),其内容通过引用完全并入本文。此外,如Merchant等人Nature Biotech.16:677(1998)所述,这些“杵及臼(knobs and hole)”突变可以与数个二硫键结合,使形成偏向异二聚化(heterodimerization)。

[0138] 因此,根据数个特定实施例,其中一种单体包含一Fc结构域,所述Fc结构域包含一杵突变(knob mutation),而另一单体包含一Fc结构域,所述Fc结构域包含臼突变(hole mutation)。

[0139] 从特定免疫球蛋白类及亚类中选择一特定免疫球蛋白Fc结构域,并选择一第一Fc变体用于杵突变,另一者用于臼突变,落入本领域技术人员的所述范围之内。可与数个特定实施例一起使用的数个取代的数个非限制性范例包括S228P、L235E、T366W、Y349C、T366S、L368A、Y407V及/或E356C(根据欧盟编号)(Kabat,E.A.T.T.Wu,M.Reid Miller,H.M.Perry及K.S.Gottesman.1987.Sequences of proteins of Immunological Interest.US.Dept.of Health and Human Services,Bethesda)对应于SEQ ID NO:109、110或111中的所述人类IgG4氨基酸序列,或L234A、L235A、Y349C、T366W、T354C、D356C、T366S、L368A及/或Y407V(根据欧盟编号(Kabat,E.A.,T.T.Wu,M.Reid-Miller,H.M.Perry and K.S.Gottesman.1987.Sequences of proteins of Immunological Interest.US.Dept.of Health and Human Services,Bethesda)与SEQ ID NO.12、13或14中的所述人类IgG1氨基酸序列相对应。

[0140] 根据数个特定实施例,所述Fc结构域包含选自SEQ ID NO:109-114的一氨基酸序列。

[0141] 根据一数个特定实施例,包含所述I型膜蛋白的所述氨基酸序列的所述单体包含一杵突变(knob mutation)。

[0142] 根据一特定实施例,包含所述I型膜蛋白的所述氨基酸序列的所述单体包含一臼

突变(hole mutation)。

[0143] 根据一特定实施例,包含所述II型膜蛋白的所述氨基酸序列的所述单体包含一杆突变。

[0144] 根据一特定实施例,包含所述II型膜蛋白的所述氨基酸序列的所述单体包含一白突变。

[0145] 根据一特定实施例,包含所述I型膜蛋白的一氨基酸序列及所述II型膜蛋白的一氨基酸序列的一单体包含一杆突变。

[0146] 根据一特定实施例,包含所述I型膜蛋白的一氨基酸序列及所述II型膜蛋白的一氨基酸序列的一单体包含一白突变。

[0147] 根据一特定特定实施例,所述二聚化部分包括一亮氨酸拉链(leucine zipper)或一螺旋(helix-loop-helix)。

[0148] 一些实施例的所述异二聚体包含至少一I型膜蛋白的至少一氨基酸序列及至少一II型膜蛋白的至少一氨基酸序列。这种异二聚体可能排列的数个非限制性范例如图1所示。

[0149] 根据数个特定实施例,从图1的数个图组1至图组13中所示的配置中选择所述异二聚体配置,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0150] 根据数个特定实施例,所述数个异二聚体中包含的每一单体包含一I型膜蛋白的一氨基酸序列及/或一II型膜蛋白的一氨基酸序列。

[0151] 根据数个特定实施例,所述数个异二聚体中包含的每一单体包含一I型膜蛋白的一氨基酸序列及一II型膜蛋白的一氨基酸序列。

[0152] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含一II型膜蛋白的一氨基酸序列,所述第二单体包含一I型膜蛋白的一氨基酸序列。

[0153] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一第一单体,所述第一单体包含一I型膜蛋白的一氨基酸序列及一II型膜蛋白的一氨基酸序列。

[0154] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含一I型膜蛋白的一氨基酸序列及一II型膜蛋白的一氨基酸序列,所述第二单体包含一I型膜蛋白的一氨基酸序列。

[0155] 当两个单体包含一I型膜蛋白的一氨基酸序列时,所述I型膜蛋白氨基酸序列可以相同,可以是相同的I型膜蛋白但一序列不同,或者可以是不同的I型膜蛋白。

[0156] 因此,根据数个特定实施例,所述第一单体的所述I型膜蛋白的所述氨基酸序列与所述第二单体的所述I型膜蛋白的所述氨基酸序列相同。

[0157] 根据数个其他特定实施例,所述第一单体的所述I型膜蛋白的所述氨基酸序列与所述第二单体的所述I型膜蛋白的所述氨基酸序列不同(即不同)。

[0158] 根据数个特定实施例,所述第一单体的所述I型膜蛋白与所述第二单体的所述I型膜蛋白不同(即不同)。

[0159] 当两种单体包含一II型膜蛋白的一氨基酸序列时,所述II型膜蛋白氨基酸序列可以相同,可以是相同的II型膜蛋白但一序列不同,或者可以是不同的II型膜蛋白。

[0160] 因此,根据数个特定实施例,所述第一单体的所述II型膜蛋白的所述氨基酸序列与所述第二单体的所述II型膜蛋白的所述氨基酸序列相同。

[0161] 根据数个其他特定实施例,所述第一单体的所述II型膜蛋白的所述氨基酸序列与

所述第二单体的所述II型膜蛋白的所述氨基酸序列不同(即不同)。

[0162] 根据数个特定实施例,所述第一单体的所述II型膜蛋白与所述第二单体的所述II型膜蛋白不同(即不同)。

[0163] 根据数个特定实施例,当所述二聚化部分是一蛋白质性部分时,所述I型膜蛋白的所述氨基酸序列连接到所述蛋白质二聚化部分的一N端,所述II型膜蛋白的所述氨基酸序列连接到所述蛋白质二聚化部分的一C端。

[0164] 根据数个特定实施例,当所述二聚化部分是一蛋白质性部分时,所述I型膜蛋白的所述氨基酸序列连接到所述蛋白质二聚化部分的一C端,所述II型膜蛋白的所述氨基酸序列连接到所述蛋白质二聚化部分的一N端。

[0165] 根据数个特定实施例,当所述二聚化部分为一蛋白质二聚体部分时,所述I型膜蛋白的所述氨基酸序列及所述II型膜蛋白的所述氨基酸序列均连接至所述蛋白质二聚体二聚化部分的C端或N端。

[0166] 根据数个特定实施例,当所述二聚化部分为一蛋白质二聚体部分时,所述I型膜蛋白的所述氨基酸序列及所述II型膜蛋白的所述氨基酸序列均连接至所述蛋白质二聚体二聚化部分的C-末端。

[0167] 根据数个特定实施例,当所述二聚化部分为一蛋白质二聚体部分时,所述I型膜蛋白的所述氨基酸序列及所述II型膜蛋白的所述氨基酸序列均连接至所述蛋白质二聚体二聚化部分的N-末端。

[0168] 如本文所用,短语“一I型膜蛋白的一氨基酸序列”指I型膜蛋白的一连续氨基酸序列,其至少能够结合所述I型膜蛋白的所述天然配体或受体。

[0169] 根据数个特定实施例,所述氨基酸序列包含I型膜蛋白的一胞外结构域或其一功能片段。

[0170] 如本文所用,短语“I型膜蛋白”指具有一N端胞外结构域的一跨膜蛋白。

[0171] 此类I型膜蛋白的数个非限制性范例包括PD1、SIRP α 、LAG3、BTN3A1、CD27、CD80、CD86、ENG、NLGN4X、CD84、TIGIT、CD40、IL-8、IL-10、CD164、LY6G6F、CD28、CTLA4、BTLA、LILRB1、LILRB2、TYROBP、ICOS、VEGFA、CSF1、CSF1R、VEGFB、BMP2、BMP3、GDNF、PDGFC、PDGFD、RAET1E、CD155、CD166、MICA、NRG1、NRG1、HVEM、DR3、TEK、CDB1、TGF96、CD244 GFER及SIGLEC。

[0172] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白选自PD1、SIRP α 、LAG3、BTN3A1、CD27、CD80、CD86、ENG、NLGN4X、CD84、TIGIT、CD40、IL-8、IL-10、CD164、LY6G6F、CD28、CTLA4、BTLA、LILRB1、LILRB2、TYROBP、ICOS、VEGFA、CSF1、CSF1R、VEGFB、BMP2、BMP3、GDNF、PDGFC、PDGFD、RA1E、CD155、CD166、MICA、NRG1、,HVEM、DR3、TEK、TGFB1、LY96、CD96、KIT、CD244及GFER。

[0173] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白选自由PD1、SIRP α 、LAG3、TIGIT、LILRB1、LILRB2、CSF1、CSF1R及TGFB1所组成的群组。

[0174] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白选自由PD1、SIRP α 、TIGIT、LILRB2及SIGLEC所组成的群组。

[0175] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白是一免疫调节剂。

[0176] 如本文所用,术语“免疫调节剂”指调节一免疫细胞反应(即激活或功能)的一蛋白质。免疫调节剂可以积极调节免疫细胞的激活或功能,也可以消极调节免疫细胞的激活或功能。此类免疫调节剂为本领域所知,包括一免疫检查点蛋白、一细胞因子等。

- [0177] 根据数个特定实施例,所述免疫调节剂是一免疫激活剂。
- [0178] 根据其他数个特定实施例,所述免疫调节剂为一免疫抑制剂。
- [0179] 数个I型膜蛋白免疫调节剂的数个非限制性范例包括但不限于PD1、SIRP α 、CD28、CSF1R、IL-8、IL-10、CTLA4、ICOS、CD27、CD80、CD86、SIGLEC10及TIGIT。根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白包含单一I型膜蛋白。
- [0180] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白包含至少一I型膜蛋白。
- [0181] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白包含至少两个I型膜蛋白。
- [0182] 根据数个特定实施例,从图32中示意性地示出的所述数个异二聚体中选择所述异二聚体组合物及排列,每种可能性代表本发明的一单独实施例。
- [0183] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白选自由PD1及SIRP α 所组成的群组。
- [0184] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白为PD1。
- [0185] 如本文所用,术语“PD1(程序性死亡1(Programmed Death 1),也称为CD279)”指所述PDCD1基因(基因ID 5133)的所述多肽或一功能同源物,例如其功能片段。根据数个特定实施例,术语“PD1”指PD1多肽的一功能同源物。根据数个特定实施例,PD1是人类PD1。根据数个特定实施例,PD1蛋白质指所述人类蛋白质,如以下GenBank编号NP_005009中提供的。
- [0186] 到目前为止,已经确定了PD-1的两个配体,PDL1及PDL2(也称为B7-DC)。根据一特定实施例,所述PDL1蛋白质指所述人类蛋白质,例如在以下GenBank编号NP_001254635及NP_054862中提供。根据一特定实施例,所述PDL2蛋白质指所述人类蛋白质,例如在以下GenBank编号NP_079515中提供。
- [0187] 根据数个特定实施例,PD1胺基酸序列包含SEQ ID NO:1。
- [0188] 根据数个特定实施例,PD1胺基酸序列由SEQ ID NO:1组成。
- [0189] 在本文中,短语“所述PDCD1基因的所述多肽的一功能同源物”或“所述PDCD1基因的所述多肽的一功能片段”是指所述多肽的一部分、一功能同源物(自然产生或合成/重组产生)及/或包含数个保守及非保守胺基酸取代的一PD1多肽,其至少保持结合PD-L1及/或PD-L2的所述全长PD1的所述活性。
- [0190] 测试结合的数个分析在本领域是众所周知的,包括但不限于流式细胞术、BiaCore、生物层干涉仪 **Blitz**[®]分析、HPLC。
- [0191] 根据数个特定实施例,所述PD1将PD-L1与1nm-100 μ M、10-nM-10 μ M、100nM-100 μ M、200nM-10 μ M的一Kd结合,如通过SPR分析确定的,每种可能性代表本发明的一单独实施例。
- [0192] 根据数个特定实施例,所述PD1将PDL1与通过SPR分析确定的约270nM的一Kd结合。
- [0193] 根据数个特定实施例,所述PD1将PDL1与通过SPR分析确定的约8 μ M-9 μ M的一Kd结合。
- [0194] 根据数个特定实施例,所述PD1包含所述PD1的一胞外结构域或其依功能片段。
- [0195] 根据数个特定实施例,所述PD1胺基酸序列包含SEQ ID NO:5、6或7。
- [0196] 根据数个特定实施例,所述PD1胺基酸序列由SEQ ID NO:5、6或7组成。
- [0197] 术语“PD1”还包括具有所需活性(即结合PD-L1及/或PD-L2)的功能同源物(自然产生或合成/重组产生)。例如,此类同源物可以是至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、

至少99%或100%相同或同源于所述多肽SEQ ID NO:1、5、6或7;或至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于编码相同的所述多核苷酸序列(如下文所述)。

[0198] 如本文所用,“同一性”或“序列同一性”指全域同一性,即,本文所公开的整个氨基酸或核酸序列上的一同一性,而不是其数个部分上的同一性。

[0199] 序列同一性或同源性可以使用任何蛋白质或核酸序列比对算法来确定,如Blast、ClustalW及MURCE。

[0200] 所述同源物还可指一直系同源、一缺失、插入或取代变体,包括一氨基酸取代,如下文所述。

[0201] 根据数个特定实施例,所述PD1多肽可包含数个保守及非保守氨基酸取代。此类取代在本领域中已知,并公开于Maute等人PNAS,2015Nov 24;112(47):E6506-14;Ju Yeon等人Nature Communications 2016volume 7,Article number:13354(DOI:10.1038/ncomms13354);及Zack KM等人Structure.2015 23(12):2341-2348(DOI:10.1016/j.str.2015.09.010),其内容通过引用完全并入本文。

[0202] 根据数个特定实施例,一或多个氨基酸突变位于选自V39、L40、N41、Y43、R44、M45、S48、N49、Q50、T51、D52、K53、A56、Q63、G65、Q66、V72、H82、M83、R90、Y96、L97、A100、S102、L103、A104、P105、K106及A107的一氨基酸残基,对应于SEQ ID NO:6中所述的所述PD1氨基酸序列。根据数个特定实施例,一或多个氨基酸突变位于选自以下的氨基酸残基上:V39、L40、N41、Y43、R44、M45、S48、N49、Q50、T51、D52、K53、A56、Q63、G65、Q66、C68、V72、H82、M83、R90、Y96、L97、A100、S102、L103、A104、P105、K106,及A107,对应于SEQ ID NO:6中所述的PD1氨基酸序列。

[0203] 根据数个特定实施例,从以下组中选择一或多种氨基酸变化:(1) V39H或V39R;(2) L40V或L40I;(3) N41I或N41V;(4) Y43F或Y43H;(5) R44Y或R44L;(6) M45Q、M45E、M45L或M45D;(7) S48D、S48L、S48N、S48G或S48V;(8) N49C、N49G、N49Y或N49S;(9) Q50K、Q50E或Q50H;(10) T51V、T51L或T51A;(11) D52F、D52R、D52Y或D52V;(12) K53T或K53L;(13) A56S或A56L;(14) Q63T、Q63I、Q63E、Q63L或Q63P;(15) G65N、G65R、G65I、G65L、G65F或G65V;(16) Q66P;(17) V72I;(18) H82Q;(19) M83L或M83F;(20) R90K;(21) Y96F;(22) L97Y、L97V或L97I;(23) A100I或A100V;(24) S102T或S102A;(25) L103I、L103Y或L103F;(26) A104S、A104H或A104D;(27) P105A;(28) K106G、K106E、K106I、K106V、K106R或K106T;及(29) A107P、A107I或A107V,对应于SEQ ID NO:6中所述的PD1氨基酸序列。

[0204] 根据数个特定实施例,从以下组中选择一或多种氨基酸改变:(1) V39H或V39R;(2) L40V或L40I;(3) N41I或N41V;(4) Y43F或Y43H;(5) R44Y或R44L;(6) M45Q、M45E、M45L或M45D;(7) S48D、S48L、S48N、S48G或S48V;(8) N49C、N49G、N49Y或N49S;(9) Q50K、Q50E或Q50H;(10) T51V、T51L或T51A;(11) D52F、D52R、D52Y或D52V;(12) K53T或K53L;(13) A56S或A56L;(14) Q63T、Q63I、Q63E、Q63L或Q63P;(15) G65N、G65R、G65I、G65L、G65F或G65V;(16) Q66P;(17) C68S(18),V72I;(19) H82Q;(20) M83L或M83F;(21) R90K;(22) Y96F;(23) L97Y、L97V或L97I;(24) A100I或A100V;(25) S102T或S102A;(26) L103I、L103Y或L103F;(27) A104S、A104H或

A104D; (28) P105A; (29) K106G、K106E、K106I、K106V、K106R或K106T; 及(30) A107P、A107I或A107V, 对应于SEQ ID NO:6中所述的PD1胺基酸序列。

[0205] 根据数个特定实施例, 一胺基酸突变位于对应于SEQ ID NO:1中所述PD1胺基酸序列的一胺基酸残基C93处(例如, 相当于对应于SEQ ID NO:6中所述PD1胺基酸序列的一胺基酸残基C68)。

[0206] 根据数个特定实施例, 所述PD1多肽可包含对应于SEQ ID NO:1中所述PD1胺基酸序列的胺基酸残基93(例如, 相当于SEQ ID NO:6中所述PD1胺基酸序列的胺基酸残基68)的一位置的一C到S胺基酸修饰。

[0207] 因此, 根据数个特定实施例, 所述PD1胺基酸序列包含SEQ ID NO:3。

[0208] 根据数个特定实施例, PD1胺基酸序列由SEQ ID NO:3组成。

[0209] 如本文所用, 短语“对应于SEQ ID NO:1中所述的PD1胺基酸序列”、“对应于SEQ ID NO:1”、“对应于SEQ ID NO:6中所述的PD1胺基酸序列”或“对应于SEQ ID NO:6”, 旨在包括相对于任何其他PD1胺基酸序列的所述对应胺基酸残基。

[0210] 关于保守胺基酸及非保守胺基酸取代的附加说明在上文及下文中进一步提供。

[0211] 本发明的一些实施例的所述PD1为至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同或同源于所述多肽SEQ ID NO:3、5、6、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43或45; 或至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于编码相同的所述多核苷酸序列, 每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0212] 根据数个特定实施例, 所述PD1胺基酸序列不包含对应于SEQ ID NO:7的任何胺基酸片段P1-L5及/或F146-V150。

[0213] 根据数个特定实施例, 所述PD1胺基酸序列不包含对应于SEQ ID NO:7的任何胺基酸残基P1-L5及/或F146-V150。

[0214] 根据数个特定实施例, PD1胺基酸序列包含100个至288个胺基酸、100个至200个胺基酸、120个至180个胺基酸、120个至160、130个至170个胺基酸、130个至160、130个至150、140个至160个胺基酸、145个至155个胺基酸、123个至166个胺基酸、138个至145个胺基酸、123个至148个胺基酸、126个至148个胺基酸、123个至140个胺基酸, 126个至140个胺基酸、127个至140个胺基酸、130个至140个胺基酸, 每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0215] 根据数个特定实施例, 所述PD1胺基酸序列包含一胺基酸序列, 所述胺基酸序列选自自由SEQ ID NO:3、5、6、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43及45所组成的群组。

[0216] 根据数个特定实施例, 所述PD1胺基酸序列由一胺基酸序列所组成, 所述胺基酸序列选自自由SEQ ID NO:3、5、6、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43及45所组成的群组。

[0217] 根据数个特定实施例, 所述PD1胺基酸序列包含一胺基酸序列, 所述胺基酸序列选自SEQ ID NO:13及7所组成的群组。

[0218] 根据数个特定实施例,所述PD1胺基酸序列由一胺基酸序列所组成,所述胺基酸序列选自自由SEQ ID NO:13及7所组成的群组。

[0219] 根据数个特定实施例,编码所述PD1胺基酸序列的所述PD1核酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%与SEQ ID NO:2、4、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44或46一致,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0220] 根据数个特定实施例,编码所述PD1胺基酸序列的所述PD1核酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%与SEQ ID NO:14或8一致。

[0221] 根据数个特定实施例,编码所述PD1胺基酸序列的所述PD1核酸序列包含从SEQ ID NO:2、4、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44及46所组成的群组中选择的一核酸序列。

[0222] 根据数个特定实施例,编码所述PD1胺基酸序列的所述PD1核酸序列包括从SEQ ID NO:2、4、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44及46所组成的群组中选择的一核酸序列。

[0223] 根据数个特定实施例,编码所述PD1胺基酸序列的所述PD1核酸序列包含SEQ ID NO:14或8。

[0224] 根据数个特定实施例,编码所述PD1胺基酸序列的所述PD1核酸序列包含SEQ ID NO:14或8。

[0225] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白为SIRP α 。

[0226] 如本文所用,术语“SIRP α (信号调节蛋白 α (Signal Regulatory Protein Alpha),也称为CD172a)”指所述SIRPA基因(基因ID 140885)的所述多肽或一功能同源物,例如其功能片段。根据数个特定实施例,术语“SIRP α ”指SIRP α 多肽的一功能同源物。根据数个特定实施例,SIRP α 是人类SIRP α 。根据数个特定实施例,SIRP α 蛋白质指所述人类蛋白质,如以下GenBank编号NP_001035111、NP_001035112、NP_001317657或NP_542970中提供。

[0227] 根据数个特定实施例,SIRP α 胺基酸序列包含SEQ ID NO:69。

[0228] 根据数个特定实施例,SIRP α 胺基酸序列由SEQ ID NO:69组成。

[0229] 在本文中,短语“所述SIRPA基因的所述多肽的功能同源物”或“所述SIRP1基因的所述多肽的功能片段”是指所述多肽的一部分、一功能同源物(自然产生或合成/重组产生)及/或包含数个保守及非保守胺基酸取代的一SIRP α 多肽,其至少保持结合CD47的所述全长SIRP α 的所述活性。用于测试结合的数个分析在本领域是众所周知的,并在上文及下文中进一步描述。

[0230] 根据一特定实施例,所述CD47蛋白质指人类蛋白质,例如在以下GenBank编号NP_001768或NP_942088中提供。

[0231] 根据数个特定实施例,所述SIRP α 结合CD47与通过SPR确定的0.1 μ M-100 μ M、0.1 μ M-10 μ M、1 μ M-10 μ M、0.1 μ M-5 μ M或1 μ M-2 μ M的一Kd,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0232] 根据数个特定实施例,所述SIRP α 包含所述SIRP α 的一胞外结构域或其一功能片段。

[0233] 根据数个特定实施例,SIRP α 胺基酸序列包含SEQ ID NO:71。

[0234] 根据数个特定实施例,SIRP α 胺基酸序列由SEQ ID NO:71组成。

[0235] 术语“SIRP α ”还包括具有所需活性(即结合CD47)的数个功能同源物(自然产生或合成/重组产生)。例如,此类同源物可以是至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%至少98%、至少99%或100%相同或同源于所述多肽SEQ ID NO:69或71;或至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于编码相同的所述多核苷酸序列(如下文所述)。

[0236] 根据数个特定实施例,所述SIRP α 多肽可包含数个保守及非保守胺基酸取代。此类取代在本领域中已知,并公开于例如Weiskopf K等人Science. (2013);341(6141):88-91,其内容通过引用完全并入本文。

[0237] 根据数个特定实施例,一或多个胺基酸突变位于选自以下胺基酸残基的一胺基酸残基上:L4、V6、A21、A27、I31、E47、K53、E54、H56、V63、L66、K68、V92及F96,对应于SEQ ID NO:71中所述的所述SIRP α 胺基酸序列。

[0238] 根据数个特定实施例,所述SIRP α 胺基酸序列包含选自L4、A27、E47及V92的一胺基酸残基处的一突变,所述胺基酸残基对应于SEQ ID NO:71中所述的SIRP α 胺基酸序列。

[0239] 根据数个特定实施例,从以下组中选择一或多个胺基酸突变:L4V或L4I、V6I或V6L、A21V、A27I或A27L、I31F或I31T、E47V或E47L、K53R、E54Q、H56P或H56R、V63I、L66T或L66G、K68R、V92I及F94L或F94V,对应于SEQ ID NO:71中所述的SIRP α 胺基酸序列。

[0240] 根据数个特定实施例,所述SIRP α 胺基酸序列包含从与SEQ ID NO:71中所述SIRP α 胺基酸序列相对应的L4I、A27I、E47V及V92I所组成的群组中选择的一突变。

[0241] 如本文所用,短语“对应于SEQ ID NO:71中所述的SIRP α 胺基酸序列”或“对应于SEQ ID NO:71”旨在包括相对于任何其他SIRP α 胺基酸序列的所述对应胺基酸残基。

[0242] 根据数个特定实施例,所述SIRP α 胺基酸序列包含SEQ ID NO:75。

[0243] 根据数个特定实施例,所述SIRP α 胺基酸序列由SEQ ID NO:75组成。

[0244] 关于数个保守胺基酸及非保守胺基酸取代的附加说明在上文及下文中进一步提供。

[0245] 本发明一些实施例的所述SIRP α 胺基酸序列为至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%,与多肽SEQ ID NO:71、73、75或77至少98%、至少99%或100%相同或同源;或至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于编码相同的多核苷酸序列,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0246] 根据数个特定实施例,所述SIRP α 胺基酸序列不包含对应于SEQ ID NO:71的胺基

酸片段K117-Y343。

[0247] 根据数个特定实施例,所述SIRP α 胺氨基酸序列不包含对应于序列ID NO:71的任何胺氨基酸残基K117-Y343。

[0248] 根据数个特定实施例,SIRP α 胺氨基酸序列包含100个至504、100个至500个胺氨基酸、150个至450个胺氨基酸、200个至400个胺氨基酸、250个至400个胺氨基酸、300个至400个胺氨基酸、320个至420个胺氨基酸、340个至350个胺氨基酸、300个至400个胺氨基酸、340个至450个胺氨基酸、100个至200个胺氨基酸、100个至150个胺氨基酸、100个至125个胺氨基酸,100个至120个胺氨基酸,100个至119个胺氨基酸,105个至119个胺氨基酸,110个至119个胺氨基酸,115个至119个胺氨基酸,105个至118个胺氨基酸,110个至118个胺氨基酸,115个至118个胺氨基酸,105个至117个胺氨基酸,110个至117个胺氨基酸,115个至117个胺氨基酸,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0249] 根据数个特定实施例,所述SIRP α 胺氨基酸序列包含选自SEQ ID NO:71、73、75及77所组成的群组的一胺氨基酸序列。

[0250] 根据数个特定实施例,所述SIRP α 胺氨基酸序列包含SEQ ID NO:71。

[0251] 根据数个特定实施例,所述SIRP α 胺氨基酸序列由SEQ ID NO:71组成。

[0252] 根据数个特定实施例,编码所述SIRP α 胺氨基酸序列的一核酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:72、74、76或78,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0253] 根据数个特定实施例,编码所述SIRP α 胺氨基酸序列的一核酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:72,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0254] 根据数个特定实施例,编码所述SIRP α 胺氨基酸序列的所述核酸序列包含SEQ ID NO:72。

[0255] 根据数个特定实施例,编码所述SIRP α 胺氨基酸序列的所述核酸序列包含SEQ ID NO:72。

[0256] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白为TIGIT。

[0257] 如本文所用,术语“TIGIT(具有Ig及ITIM结构域的T细胞免疫受体)”指所述TIGIT基因(基因ID 201633)的所述多肽或一功能同源物,例如其功能片段。根据数个特定实施例,术语“TIGIT”指TIGIT多肽的功能同源物。根据数个特定实施例,TIGIT是人类TIGIT。根据一特定实施例,TIGIT蛋白质指所述人类蛋白质,例如在以下GenBank编号NP_776160或XP_024309156中提供。

[0258] 根据数个特定实施例,TIGIT胺氨基酸序列包含SEQ ID NO:160。

[0259] 根据数个特定实施例,TIGIT胺氨基酸序列由SEQ ID NO:160组成。

[0260] 在本文中,短语“所述TIGIT基因的所述多肽的功能同源物”或“所述TIGIT基因的所述多肽的功能片段”是指所述多肽的一部分、一功能同源物(自然产生或合成/重组产生)及/或包含数个保守及非保守胺氨基酸取代的一TIGIT多肽,其至少保持结合CD155(PVR)的所

述全长TIGIT的所述活性。

[0261] 用于测试结合的数个分析在本领域是众所周知的,并在上文及下文中进一步描述。

[0262] 根据一特定实施例,所述CD155蛋白质指所述人类蛋白质,例如在以下GenBank编号NP_001129240、NP_001129241、NP_001129242、NP_006496中提供。

[0263] 根据数个特定实施例,所述TIGIT将CD155与通过SPR确定的0.01 μ M-100 μ M、0.1 μ M-100 μ M、0.1 μ M-10 μ M或0.1 μ M-5 μ M的一Kd结合,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0264] 根据数个特定实施例,所述TIGIT包含所述TIGIT的一胞外结构域或其一功能片段。

[0265] 根据数个特定实施例,TIGIT胺基酸序列包含SEQ ID NO:164。

[0266] 根据数个特定实施例,TIGIT胺基酸序列由SEQ ID NO:164组成。

[0267] 根据数个特定实施例,TIGIT胺基酸序列包含SEQ ID NO:130。

[0268] 根据数个特定实施例,TIGIT胺基酸序列由SEQ ID NO:130组成。

[0269] 术语“TIGIT”还包括具有所需活性(即结合CD155)的数个功能同源物(自然产生或合成/重组产生)。例如,此类同源物可以是至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同或同源于所述多肽SEQ ID NO:160、164或130;或至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于编码相同的所述多核苷酸序列(如下文所述)。

[0270] 根据数个特定实施例,所述TIGIT多肽可包含数个保守及非保守胺基酸取代。

[0271] 根据数个特定实施例,一或多个胺基酸突变位于选自I42及C69的一胺基酸残基处,所述胺基酸残基对应于SEQ ID NO:160中所述的TIGIT胺基酸序列。

[0272] 根据数个特定实施例,从以下组中选择一或多个胺基酸突变:I42A及C69S,其对应于SEQ ID NO:160中所述的TIGIT胺基酸序列。

[0273] 如本文所使用的,短语“对应于SEQ ID NO:160中所述的TIGIT胺基酸序列”或“对应于SEQ ID NO:160”旨在包括相对于任何其他TIGIT胺基酸序列的所述对应胺基酸残基。

[0274] 根据数个特定实施例,所述TIGIT胺基酸序列包含SEQ ID NO:132。

[0275] 根据数个特定实施例,所述TIGIT胺基酸序列由SEQ ID NO:132组成。

[0276] 关于数个保守胺基酸及非保守胺基酸取代的附加说明在上文及下文中进一步提供。

[0277] 根据数个特定实施例,TIGIT胺基酸序列包含100个至244个胺基酸、100个至200个胺基酸、100个至150个胺基酸、120个至140个胺基酸,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0278] 根据数个特定实施例,编码所述TIGIT胺基酸序列的一核酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、

至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:131或133。

[0279] 根据数个特定实施例,编码所述TIGIT胺基酸序列的所述核酸序列包含SEQ ID NO:133。

[0280] 根据数个特定实施例,编码所述TIGIT胺基酸序列的所述核酸序列由SEQ ID NO:133组成。

[0281] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白为LILRB2。

[0282] 如本文所用,术语“LILRB2(白细胞免疫球蛋白样受体B亚家族成员2(Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 2))”指所述LILRB2基因(基因ID 10288)的所述多肽或一功能同源物,例如其功能片段。根据数个特定实施例,术语“LILRB2”指LILRB2多肽的一功能同源物。根据数个特定实施例,所述LILRB2是人类LILRB2。根据数个特定实施例,LILRB2蛋白质是指所述人类蛋白质,例如在以下GenBank编号NP_00107447、NP_001265332、NP_001265333、NP_001265334、NP_001265335中提供。

[0283] 根据数个特定实施例,LILRB2胺基酸序列包含SEQ ID NO:161。

[0284] 根据数个特定实施例,LILRB2胺基酸序列由SEQ ID NO:161组成。

[0285] 在本文中,短语“所述LILRB2基因的所述多肽的功能同源物”或“所述LILRB2基因的所述多肽的功能片段”是指多肽的一部分、一功能同源物(自然产生或合成/重组产生)及/或包含数个保守及非保守胺基酸取代的LILRB2多肽,其至少保持与一主要组织相容性分子(MHC,例如HLA-g)结合的所述全长LILRB2的所述活性。

[0286] 用于测试结合的数个分析在本领域是众所周知的,并在上文及下文中进一步描述。

[0287] 根据数个特定实施例,所述LILRB2将MHC(例如HLA-g)与通过SPR确定的0.1nM-100 μM、0.1nM-10μM、1nM-1μM、1-100nM或1-10nM的一Kd结合,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0288] 根据数个特定实施例,所述LILRB2包含所述LILRB2的一胞外结构域或其一功能片段。

[0289] 根据数个特定实施例,所述LILRB2胺基酸序列包含SEQ ID NO:165。

[0290] 根据数个特定实施例,所述LILRB2胺基酸序列由SEQ ID NO:165组成。

[0291] LILRB2的所述胞外结构域包括4个Ig样结构域,称为D1-D4。

[0292] 因此,根据数个特定实施例,LILRB2的所述胺基酸序列包含至少一Ig样结构域。

[0293] 根据数个特定实施例,LILRB2的所述胺基酸序列包含至少两个Ig样结构域、至少三个Ig样结构域或四个Ig样结构域。

[0294] 根据数个特定实施例,LILRB2的所述胺基酸序列包含LILRB2的数个结构域D1及D2;LILRB2的数个域D1、D2及D3,数个域D1、D2及D4或LILRB2,或LILRB2的数个域D1、D2、D3及D4。

[0295] 根据数个特定实施例,LILRB2胺基酸序列包含SEQ ID NO:115或117。

[0296] 根据数个特定实施例,LILRB2胺基酸序列由SEQ ID NO:115或117组成。

[0297] 术语“LILRB2”还包括数个功能同源物(自然产生或合成/重组产生),其表现出所需的活性(即结合MHC,例如HLA-g)。例如,此类同源物可以是至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、

至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同或同源于所述多肽SEQ ID NO:161、165、115或117；或至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于编码相同的所述多核苷酸序列(如下文所述)。

[0298] 根据数个特定实施例,所述LILRB2多肽可包含数个保守及非保守氨基酸取代。

[0299] 关于数个保守氨基酸及非保守氨基酸取代的附加说明在上文及下文中进一步提供。

[0300] 根据数个特定实施例,LILRB2氨基酸序列包含100个至597个氨基酸、100个至500个氨基酸、100个至400个氨基酸、150个至400个氨基酸、300个至400个氨基酸、350个至400个氨基酸、150个至250个氨基酸,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0301] 根据数个特定实施例,编码所述LILRB2氨基酸序列的一核酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:116或118。

[0302] 根据数个特定实施例,编码所述LILRB2氨基酸序列的所述核酸序列包含SEQ ID NO:116。

[0303] 根据数个特定实施例,编码所述LILRB2氨基酸序列的所述核酸序列包含SEQ ID NO:118。

[0304] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白为SIGLEC。

[0305] 如本文所用,术语“SIGLEC(唾液酸结合免疫球蛋白型凝集素(Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins))”指由一SIGLEC基因或一功能同源物(例如其功能片段)编码的所述多肽。根据数个特定实施例,术语“SIGLEC”是指SIGLEC多肽的一功能同源物。

[0306] 在本文中,短语“一SIGLEC基因的所述多肽的功能同源物”或“一SIGLEC基因的所述多肽的功能片段”是指所述多肽的一部分、一功能同源物(自然产生或合成/重组产生)及/或包含数个保守及非保守氨基酸取代的SIGLEC多肽,其至少保持结合唾液酸的所述全长SIGLEC的所述活性,更具体而言,是含唾液酸的碳水化合物(唾液聚糖)。

[0307] 根据数个特定实施例,所述SIGLEC包含所述SIGLEC的一胞外结构域或其一功能片段。

[0308] SIGLEC的所述胞外结构域包括Ig样结构域。

[0309] 因此,根据数个特定实施例,SIGLEC的所述氨基酸序列包含至少一Ig样结构域。

[0310] 根据数个特定实施例,SIGLEC是人类SIGLEC。

[0311] SIGLEC的数个非限制性范例包括SIGLEC-1、SIGLEC-2、SIGLEC-3、SIGLEC-4、SIGLEC-5、SIGLEC-6、SIGLEC-7、SIGLEC-8、SIGLEC-9、SIGLEC-10、SIGLEC-11、SIGLEC-12、SIGLEC-13、SIGLEC-14、SIGLEC-15、SIGLEC-16、SIGLEC-17。根据数个特定实施例,所述SIGLEC选自SIGLEC-2、SIGLEC-3、SIGLEC-4、SIGLEC-7、SIGLEC-9、SIGLEC-10、SIGLEC-12及SIGLEC-15所组成的群组,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0312] 根据一特定实施例,所述SIGLEC为SIGLEC-10。

[0313] 如本文所用,术语“SIGLEC-10(唾液酸结合Ig样凝集素10(Sialic acid-binding Ig-like lectin 10))”指所述SIGLEC10基因(基因ID 89790)的所述多肽或一功能同源物,例如其功能片段。根据数个特定实施例,SIGLEC10蛋白质是指所述人类蛋白质,如以下GenBank编号NP_001164627、NP_001164628、NP_001164629、NP_001164630、NP_001164632中提供。

[0314] 根据数个特定实施例,SIGLEC10胺基酸序列包含SEQ ID NO:162。

[0315] 根据数个特定实施例,SIGLEC胺基酸序列由SEQ ID NO:162组成。

[0316] 在本文中,短语“所述SIGLEC10基因的所述多肽的功能同源物”或“所述SIGLEC10基因的所述多肽的功能片段”是指所述多肽的一部分、一功能同源物(自然产生或合成/重组产生)及/或包含数个保守及非保守胺基酸取代的SIGLEC-10多肽,其至少保持CD24及/或CD52上表达的结合唾液酸的所述全长SIGLEC-10的所述活性。

[0317] 用于测试结合的数个分析在本领域是众所周知的,并在上文及下文中进一步描述。

[0318] 根据数个特定实施例,所述SIGLEC10将CD24或CD52与通过SPR确定的1nm-100 μ M、0.01-100 μ M、0.01-10 μ M、0.1-10 μ M、0.1-5 μ M或0.1-1 μ M的一Kd结合,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0319] 根据数个特定实施例,SIGLEC-10包含所述SIGLEC-10的一胞外结构域或其一功能片段。

[0320] 根据数个特定实施例,SIGLEC-10的所述胺基酸序列包含至少一Ig样结构域。

[0321] 根据数个特定实施例,SIGLEC-10的所述胺基酸序列包含至少两个Ig样结构域。

[0322] 根据数个特定实施例,SIGLEC-10胺基酸序列包含SEQ ID NO:129。

[0323] 根据数个特定实施例,SIGLEC-10胺基酸序列包含SEQ ID NO:125。

[0324] 根据数个特定实施例,SIGLEC-10胺基酸序列由SEQ ID NO:125组成。

[0325] 术语“SIGLEC-10”还包括数个功能同源物(自然产生或合成/重组产生),其表现出所需的活性(即,结合在CD24及/或CD52上表达的唾液酸)。例如,此类同源物可以是至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同或同源于多肽SEQ ID NO:162、129或125;或至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于编码相同的所述多核苷酸序列(如下文所述)。

[0326] 根据数个特定实施例,所述SIGLEC-10多肽可包含数个保守及非保守胺基酸取代。

[0327] 根据数个特定实施例,一突变位于对应于SEQ ID NO:162中所述SIGLEC-10胺基酸序列的一胺基酸残基C36处。

[0328] 根据数个特定实施例,一胺基酸突变为C36S,对应于SEQ ID NO:162中所述的SIGLEC-10胺基酸序列。

[0329] 如本文所用,短语“对应于SEQ ID NO:162中所述的SIGLEC-10胺基酸序列”或“对

应于SEQ ID NO:162”旨在包括相对于任何其他SIGLEC-10胺基酸序列的所述对应胺基酸残基。

[0330] 根据数个特定实施例,所述SIGLEC-10胺基酸序列包含SEQ ID NO:127。

[0331] 根据数个特定实施例,所述SIGLEC-10胺基酸序列由SEQ ID NO:127组成。

[0332] 关于数个保守胺基酸及非保守胺基酸取代的附加说明在上文及下文中进一步提供。

[0333] 根据数个特定实施例,SIGLEC-10胺基酸序列包含100个至639个胺基酸、100个至600个胺基酸、100个至550个胺基酸、100个至300个胺基酸、100个至200个胺基酸、100个至150个胺基酸,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0334] 根据数个特定实施例,编码SIGLEC-10胺基酸序列的一核酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:126或128。

[0335] 根据数个特定实施例,编码所述SIGLEC-10胺基酸序列的所述核酸序列包含SEQ ID NO:128。

[0336] 根据数个特定实施例,编码所述SIGLEC-10胺基酸序列的所述核酸序列由SEQ ID NO:128组成。

[0337] 如本文所用,短语“一II型膜蛋白的一胺基酸序列”指一II型膜蛋白的一连续胺基酸序列,其至少能够结合所述II型膜蛋白的所述天然配体或受体。

[0338] 根据数个特定实施例,所述胺基酸序列包含所述II型膜蛋白的一胞外结构域或其一功能片段。

[0339] 如本文所用,短语“II型膜蛋白”指具有一C末端胞外结构域的一跨膜蛋白。

[0340] 此类II型膜蛋白的数个非限制性范例包括4-1BBL、FasL、TRAIL、TNF- α 、TNF- β 、OX40L、CD40L、CD40L、CD27L、CD30L、RANKL、TWEAK、APRIL、BAFF、LIGHT、VEGI、GITRL、EDA1/2、淋巴毒素 α 及淋巴毒素 β 。

[0341] 根据数个特定实施例,所述II型膜蛋白选自4-1BBL、OX40L、CD40L、LIGHT及GITRL所组成的群组。

[0342] 根据数个特定实施例,所述II型膜蛋白是一免疫调节剂。

[0343] 此类免疫调节剂包括但不限于4-1BBL、TNF- α 、TNF- β 、OX40L、CD40L、CD27L及CD30L。

[0344] 根据数个特定实施例,所述II型膜蛋白包含一单一II型膜蛋白。

[0345] 根据数个特定实施例,所述II型膜蛋白包含至少一II型膜蛋白。

[0346] 根据数个特定实施例,所述II型膜蛋白包含至少两种II型膜蛋白。

[0347] 根据数个特定实施例,所述II型膜蛋白为4-1BBL。

[0348] 如本文所用,术语“4-1BBL(也称为CD137L及TNFSF9)”指所述TNFSF9基因(基因ID 8744)的所述多肽或一功能同源物,例如其功能片段。根据数个特定实施例,术语“4-1BBL”指4-1BBL多肽的一功能同源物。根据数个特定实施例,4-1BBL为人类4-1BBL。根据数个特定实施例,4-1BBL蛋白质是指所述人类蛋白质,如以下GenBank编号NP_003802中提供。

[0349] 根据数个特定实施例,4-1BBL胺基酸序列包含SEQ ID NO:47。

[0350] 根据数个特定实施例,4-1BBL氨基酸序列由SEQ ID NO:47组成。

[0351] 在本文中,短语“TNFSF9基因的一多肽的功能同源物”或“所述TNFSF9基因的一多肽的功能片段”是指所述多肽的一部分、一功能同源物(自然产生或合成/重组产生)及/或包含数个保守及非保守氨基酸取代的一4-1BBL多肽,其保持所述全长4-1BBL的所述数个活性中的至少一者,例如(i)结合4-1BB、(ii)激活4-1BB信号通路、(iii)激活表达4-1BB的免疫细胞、(iv)形成同源三聚体。

[0352] 根据数个特定实施例,所述功能性4-1BBL同源物或片段能达成至少(i)。

[0353] 根据数个特定实施例,所述功能性4-1BBL同源物或片段能够达成(i)+(ii)、(i)+(iii)、(i)+(iv)、(i)+(ii)+(iii)、(i)+(ii)+(iv)、(i)+(ii)+(iv)、(i)+(iii)+(iv)、(ii)+(iii)+(iv)或(i)+(ii)+(iii)+(iv)。

[0354] 根据一特定实施例,所述4-1BB蛋白质是指所述人类蛋白质,如以下GenBank编号NP_001552中提供。

[0355] 用于测试结合的数个分析在本领域是众所周知的,并在上文及下文中进一步描述。

[0356] 根据数个特定实施例,所述4-1BBL与由SPR确定的约0.1nM-1000nM、0.1nM-100nM、1nM-100nM或55.2nM的一Kd结合,每种可能性代表所请求保护的发明的一单独实施例。

[0357] 确定三聚化(trimerization)的方法在本领域是众所周知的,包括但不限于NATIVE-PAGE、SEC-HPLC 2D凝胶、凝胶过滤、SEC-MALS、分析超速离心(AUC)质谱(MS)、毛细管凝胶电泳(CGE)。

[0358] 如本文所用,术语“激活”指刺激一免疫细胞(例如T细胞、B细胞、NK细胞、吞噬细胞)的所述过程,其导致细胞增殖、成熟、细胞因子产生、吞噬及/或调节或数个效应器功能(effector functions)的诱导。

[0359] 根据数个特定实施例,激活包括共刺激。

[0360] 如本文所用,术语“共刺激”是指传递导致所述免疫细胞激活的一二级抗原非依赖性刺激信号(例如4-1BB信号)。

[0361] 根据数个特定实施例,激活步骤包括抑制导致免疫细胞激活的一抑制信号(例如PDL1信号)。

[0362] 确定一刺激或抑制信号的信号的数个方法在本领域中是众所周知的,也在下面的所述数个范例部分中公开,包括但不限于使用例如BiaCore、HPLC或流式细胞术的结合分析、酶活性分析,例如激酶活性分析,以及使用PCR、西方墨点法、免疫沉淀法及免疫组织化学学等方法表达参与所述信号级联的数个分子。附加地或取代地,可以通过评估免疫细胞的激活或功能来确定信号的传递(共刺激或抑制)。评估免疫细胞活化或功能的数个方法在本领域中是众所周知的,包括但不限于增殖试验(例如CFSE染色、MTS、阿拉玛蓝、BRDU及胸腺嘧啶核苷掺入)、细胞毒性试验(例如CFSE染色、铬释放、钙调素AM)、细胞因子分泌分析(例如细胞内细胞因子染色、ELISPOT及ELISA),使用流式细胞术检测活化标记物如CD25、CD69、CD137、CD107a、PD1及CD62L的表达。

[0363] 根据数个特定实施例,如下文进一步描述,例如在一混合淋巴细胞反应(MLR)中,在体外或离体影响确定信号活性或激活。

[0364] 对于相同的培养条件,所述信号活性或免疫细胞激活或功能通常与同一物种的细

胞中的信号、激活或功能相比表达,但不与异二聚体、编码相同的多核苷酸或编码相同的一宿主细胞接触;或与车辆控制装置(也称为控制装置)接触。

[0365] 根据数个特定实施例,4-1BBL包含所述4-1BBL的一胞外结构域或其一功能片段。

[0366] 根据数个特定实施例,4-1BBL胺基酸序列包含SEQ ID NO:49。

[0367] 根据数个特定实施例,4-1BBL胺基酸序列由SEQ ID NO:49组成。

[0368] 术语“4-1BBL”还包括具有所需活性(如上文所定义)的数个功能同源物(自然产生或合成/重组产生)。例如,此类同源物可以是至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同或同源于所述多肽SEQ ID NO:47或49;或至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于编码相同的所述多核苷酸序列(如下文所述)。

[0369] 根据数个特定实施例,所述4-1BBL多肽可包含数个保守胺基酸取代,如上文及下文进一步描述。

[0370] 根据数个特定实施例,所述4-1BBL胺基酸序列不包含对应于SEQ ID NO:49的所述胺基酸片段A1-V6、A1-G14或A1-E23。

[0371] 根据数个特定实施例,所述4-1BBL胺基酸序列不包含对应于SEQ ID NO:49的任何胺基酸残基A1-V6或A1-G14或A1-E23。

[0372] 根据数个特定实施例,所述4-1BBL胺基酸序列不包含对应于SEQ ID NO:49的所述胺基酸片段G198-E205。

[0373] 根据数个特定实施例,所述4-1BBL胺基酸序列不包含对应于SEQ ID NO:49的任何胺基酸残基G198-E205。

[0374] 如本文所用,短语“对应于SEQ ID NO:49”意欲包括相对于任何其他4-1BBL胺基酸序列的所述对应胺基酸残基。

[0375] 根据数个特定实施例,所述4-1BBL胺基酸序列包含100个至254个胺基酸、150个至250个胺基酸、100个至250个胺基酸、150个至220个胺基酸、180个至220个胺基酸、180个至210个胺基酸、185个至205个胺基酸、185个至200个胺基酸、185个至199个胺基酸、170个至197个胺基酸、170个至182个胺基酸、190个至210个胺基酸,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0376] 本发明的一些实施例的所述4-1BBL为至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同或同源于所述多肽SEQ ID NO:49、51、53、558、57、59、61、63或65;或至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于编码相同的所述多核苷酸序列,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0377] 根据数个特定实施例,所述4-1BBL胺基酸序列包含选自SEQ ID NO:49、51、53、55、

57、59、61、63及65的一氨基酸序列。

[0378] 根据数个特定实施例,所述4-1BBL氨基酸序列由选自SEQ ID NO:49、51、53、55、57、59、61、63及65所组成的群组的一氨基酸序列组成。

[0379] 根据数个特定实施例,编码所述4-1BBL氨基酸序列的所述核酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:50、52、54、56、58、60、62、64及66,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0380] 根据数个特定实施例,编码所述4-1BBL氨基酸序列的所述核酸序列包含从SEQ ID NO:50、52、54、56、58、60、62、64及66所组成的群组中选择的所述核酸序列。

[0381] 根据数个特定实施例,编码所述4-1BBL氨基酸序列的所述核酸序列包括从SEQ ID NO:50、52、54、56、58、60、62、64及66所组成的群组中选择的所述核酸序列。

[0382] 根据数个特定实施例,所述II型膜蛋白为CD40L。

[0383] 如本文所用,术语“CD40L(也称为CD154)”指所述CD40LG基因(基因ID 959)的所述多肽或一功能同源物,例如其功能片段。根据数个特定实施例,术语“CD40L”指CD40L多肽的一功能同源物。根据数个特定实施例,CD40L是人类CD40L。根据数个特定实施例,所述CD40L蛋白质指人类蛋白质,例如在以下GenBank编号NP_000065中提供。

[0384] 根据数个特定实施例,CD40L氨基酸序列包含序列ID NO:163。

[0385] 根据数个特定实施例,CD40L氨基酸序列由序列ID NO:163组成。

[0386] 在本文中,短语“CD40LG基因的一多肽的功能同源物”或“CD40LG基因的多肽的功能片段”是指所述多肽的一部分、一功能同源物(自然产生或合成/重组产生)及/或包含数个保守及非保守氨基酸取代的一CD40L多肽,其保持所述全长CD40L的至少一活性,例如(i)结合CD40、(ii)激活CD40信号通路、(iii)激活表达CD40的免疫细胞、(iv)形成同源三聚体。

[0387] 根据数个特定实施例,所述功能性CD40L同源物或片段能够达成至少(i)。

[0388] 根据数个特定实施例,所述功能性CD40L同源物或片段能够达成(i)+(ii)、(i)+(iii)、(i)+(iv)、(i)+(ii)+(iii)、(i)+(ii)+(iv)、(i)+(ii)+(iv)、(i)+(iii)+(iv)、(ii)+(iii)+(iv)或(i)+(ii)+(iii)+(iv)。

[0389] 根据数个特定实施例,所述CD40蛋白质指所述人类蛋白质,如以下GenBank编号NP_001241、NP_001289682、NP_001309350、NP_001309351、NP_690593中提供。

[0390] 用于测试结合、三聚化、激活、共刺激及信号的数个分析在本领域是众所周知的,并在上文及下文中进一步描述。

[0391] 根据数个特定实施例,所述CD40L将CD40与通过SPR确定的约0.1-1000nM、0.1-100nM、1-100nM或1-5nM的一Kd结合,每种可能性代表所请求保护的发明的一单独实施例。

[0392] 根据数个特定实施例,CD40L包含所述CD40L的一胞外结构域或其一功能片段。

[0393] 根据数个特定实施例,CD40L氨基酸序列包含SEQ ID NO:122。

[0394] 根据数个特定实施例,CD40L氨基酸序列由SEQ ID NO:122组成。

[0395] 根据数个特定实施例,CD40L氨基酸序列包含SEQ ID NO:123。

[0396] 根据数个特定实施例,CD40L氨基酸序列由SEQ ID NO:123组成。

[0397] 术语“CD40L”还包括具有所需活性(如上文所定义)的数个功能同源物(自然产生

或合成/重组产生)。例如,此类同源物可以是至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同或同源于所述多肽SEQ ID NO:163、122或123;或至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于编码相同的所述多核苷酸序列(如下文所述)。

[0398] 根据数个特定实施例,所述CD40L多肽可包含数个保守氨基酸取代,如上文及下文进一步描述。

[0399] 根据数个特定实施例,一突变位于对应于SEQ ID NO:163中所述CD40L氨基酸序列的一氨基酸残基C194处。

[0400] 根据数个特定实施例,一突变为C194S时,对应于SEQ ID NO:163中所述的CD40L氨基酸序列。

[0401] 如本文所用,短语“对应于SEQ ID NO:163中所述的CD40L氨基酸序列”或“对应于SEQ ID NO:163”旨在包括相对于任何其他CD40L氨基酸序列的对应氨基酸残基。

[0402] 根据数个特定实施例,所述CD40L氨基酸序列包含SEQ ID NO:119。

[0403] 根据数个特定实施例,所述CD40L氨基酸序列由SEQ ID NO:119组成。

[0404] 关于保守氨基酸及非保守氨基酸取代的附加说明在上文及下文中进一步提供。

[0405] 根据数个特定实施例,CD40L氨基酸序列包含100个至261个氨基酸、100个至220个氨基酸、100个至200个氨基酸、120个至160个氨基酸,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0406] 根据数个特定实施例,编码所述CD40L氨基酸序列的一核酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:120或124。

[0407] 根据数个特定实施例,编码所述CD40L氨基酸序列的所述核酸序列包含SEQ ID NO:120。

[0408] 根据数个特定实施例,编码所述CD40L氨基酸序列的所述核酸序列包含SEQ ID NO:120。

[0409] 根据数个特定实施例,包含在本文所公开的异二聚体中的一II型膜蛋白的氨基酸序列包含一II型膜蛋白(例如4-1BBL、CD40L)氨基酸序列的三个重复。

[0410] 根据数个特定实施例,所述三个重复中的每一者都能够至少结合II型膜蛋白的一天然配体或受体。

[0411] 根据数个特定实施例,所述三个重复序列具有一相同的II型膜蛋白(例如4-1BBL、CD40L)氨基酸序列。

[0412] 根据其他数个特定实施例,所述三个重复是不同的,即具有数个不同的II型膜蛋白(例如4-1BBL、CD40L)氨基酸序列。

[0413] 根据数个其他特定实施例,三个重复序列中的两个具有相同的II型膜蛋白(例如

4-1BBL、CD40L) 胺基酸序列。

[0414] 根据数个特定实施例,所述II型膜蛋白胺基酸序列不包括所述II型膜蛋白胺基酸序列的所述三个重复序列中的每一者之间的一连接体(linker)。

[0415] 根据数个其他特定实施例,所述II型膜蛋白胺基酸序列包含所述II型膜蛋白胺基酸序列的所述三个重复序列中的每一者之间的一连接体。本领域已知的任何连接体都可以与本发明的数个特定实施例一起使用。下文详细描述了可使用的连接体的数个非限制性范例。

[0416] 根据数个特定实施例,所述连接体是一(GGGGS)_{x2}+GGGG (SEQ ID NO:96) 连接体。

[0417] 根据数个特定实施例,所述连接体是一ggsrgggg (SEQ ID NO:97) 连接体。

[0418] 根据数个特定实施例,所述连接体是一ggsx3 (SEQ ID NO:134) 连接体。

[0419] 因此,例如,根据数个特定实施例,包含在所述异二聚体中的所述4-1BBL胺基酸序列包含所述4-1BBL胺基酸序列的三个重复。

[0420] 根据数个特定实施例,三个重复序列中的每一者都能够达成:(i) 结合4-1BB, (ii) 激活4-1BB信号通路, (iii) 激活表达4-1BB的免疫细胞, (iv) 形成同源三聚体。

[0421] 根据数个特定实施例,所述重复序列可以是本文定义的4-1BBL中的任何一者。

[0422] 根据数个特定实施例,所述重复序列中的至少一者包含本文公开的一4-1BBL胺基酸序列。

[0423] 根据数个特定实施例,所述重复序列中的至少一者由本文公开的一4-1BBL胺基酸序列组成。

[0424] 根据数个特定实施例,一4-1BBL胺基酸序列包含三个重复,所述三个重复包含SEQ ID NO:51的一胺基酸序列。

[0425] 根据数个特定实施例,所述4-1BBL胺基酸序列包含由SEQ ID NO:51组成的胺基酸序列的三个重复。

[0426] 因此,根据数个特定实施例,所述4-1BBL胺基酸序列包含一胺基酸序列,所述胺基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:67。

[0427] 根据数个特定实施例,所述4-1BBL胺基酸序列包含SEQ ID NO:67。

[0428] 根据数个特定实施例,所述4-1BBL胺基酸序列由SEQ ID NO:67组成。

[0429] 根据数个特定实施例,编码所述4-1BBL胺基酸序列的所述核酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:68。

[0430] 根据数个特定实施例,所述4-1BBL核酸序列包含SEQ ID NO:68。

[0431] 根据数个特定实施例,所述4-1BBL核酸序列由SEQ ID NO:68组成。

[0432] 作为另一范例,根据数个特定实施例,包含在所述异二聚体中的所述CD40L胺基酸序列包含一CD40L胺基酸序列的三个重复。

[0433] 根据数个特定实施例,所述三个重复中的每一者都能够达成至少一者:(i) 结合CD40, (ii) 激活CD40信号通路, (iii) 激活表达CD40的免疫细胞, (iv) 形成一同源三聚化体

(homotrimer)。

[0434] 根据数个特定实施例,所述重复序列可以是本文定义的任何CD40L。

[0435] 根据数个特定实施例,至少一重复包含本文公开的一CD40L胺基酸序列。

[0436] 根据数个特定实施例,至少一重复序列由本文公开的一CD40L胺基酸序列组成。

[0437] 根据数个特定实施例,所述CD40L胺基酸序列包含三个重复,所述三个重复包含SEQ ID NO:119的一胺基酸序列。

[0438] 根据数个特定实施例,CD40L胺基酸序列包含由SEQ ID NO:119组成的一胺基酸序列的三个重复。

[0439] 因此,根据数个特定实施例,所述CD40L胺基酸序列包含一胺基酸序列,所述胺基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:121。

[0440] 根据数个特定实施例,所述CD40L胺基酸序列包含SEQ ID NO:121。

[0441] 根据数个特定实施例,所述CD40L胺基酸序列由SEQ ID NO:121组成。

[0442] 根据数个特定实施例,编码所述CD40L胺基酸序列的一核酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:166。

[0443] 根据数个特定实施例,所述CD40L核酸序列包含SEQ ID NO:166。

[0444] 根据数个特定实施例,所述CD40L核酸序列由SEQ ID NO:166组成。

[0445] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白为PD1,所述II型膜蛋白为4-1BBL,且所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含PD1的一胺基酸序列及4-1BBL的一胺基酸序列,所述第二单体包含PD1的一胺基酸序列。

[0446] 根据数个特定实施例,所述第一单体的所述PD1的所述胺基酸及所述第二单体的所述PD1的所述胺基酸相同。

[0447] 根据数个特定实施例,所述第一单体的所述PD1的所述胺基酸及所述第二单体的PD1的所述胺基酸是不同的(即不同的)。

[0448] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一胺基酸序列,所述胺基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:79及8;或SEQ ID NO:79及83。

[0449] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含SEQ ID NO:79及81;或SEQ ID NO:79及83。

[0450] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包括SEQ ID NO:79及81;或SEQ ID NO:79及83。

[0451] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白为LILRB2,所述II型膜蛋白为4-1BBL,且所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含LILRB2胺基酸序列及4-1BBL胺基酸序列,所述第二单体包含LILRB2胺基酸序列。

[0452] 根据数个特定实施例,所述第一单体的所述LILRB2的所述胺基酸及所述第二单体

的所述LILRB2的所述胺基酸相同。

[0453] 根据数个特定实施例,所述第一单体的所述LILRB2的所述胺基酸及所述第二单体的所述LILRB2的所述胺基酸是不同的(即不同的)。

[0454] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一胺基酸序列,所述胺基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:142及138;或SEQ ID NO:144及140。

[0455] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包括SEQ ID NO:142及138;或SEQ ID NO:144及140。

[0456] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包括SEQ ID NO:142及138;或SEQ ID NO:144及140。

[0457] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白为LILRB2,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含LILRB2的一胺基酸序列及CD40L的一胺基酸序列,所述第二单体包含LILRB2的一胺基酸序列。

[0458] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一胺基酸序列,所述胺基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:148及138。

[0459] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含SEQ ID NO:148及138。

[0460] 根据数个特定实施例,所述异二聚体由SEQ ID NO:148及138组成。

[0461] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白选自由PD1及SIRP α 所组成的群组,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含SIRP α 的一胺基酸序列及4-1BBL的一胺基酸序列,所述第二单体包含PD1的一胺基酸序列。

[0462] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一胺基酸序列,所述胺基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:85及81;SEQ ID NO:89及91;或SEQ ID NO:85及83。

[0463] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含SEQ ID NO:85及81;SEQ ID NO:89及91;或SEQ ID NO:85及83。

[0464] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包括SEQ ID NO:85及81;SEQ ID NO:89及91;或SEQ ID NO:85及83。

[0465] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白选自PD1及SIRP α 所组成的群组,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含SIRP α 的一胺基酸序列及CD40L的一胺基酸序列,所述第二单体包含PD1的一胺基酸序列。

[0466] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一胺基酸序列,所述胺基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、

至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:146及81。

[0467] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含SEQ ID NO:146及81。

[0468] 根据数个特定实施例,所述异二聚体由SEQ ID NO:146及81组成。

[0469] 根据数个特定实施例,I型膜蛋白选自LILRB2及SIRP α 所组成的群组,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含SIRP α 的一氨基酸序列及4-1BBL的一氨基酸序列,所述第二单体包含LILRB2的一氨基酸序列。

[0470] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一氨基酸序列,所述氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:85及138;或SEQ ID NO:85及140。

[0471] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包括SEQ ID NO:85及138;或SEQ ID NO:85及140。

[0472] 根据数个特定实施例,所述异二聚体由SEQ ID NO:85及138组成;或由SEQ ID NO:85及140组成。

[0473] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白选自LILRB2及SIRP α 所组成的群组,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含SIRP α 的一氨基酸序列及CD40L的一氨基酸序列,所述第二单体包含LILRB2的一氨基酸序列。

[0474] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一氨基酸序列,所述氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:146及138。

[0475] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含SEQ ID NO:146及138。

[0476] 根据数个特定实施例,所述异二聚体由SEQ ID NO:146及138组成。

[0477] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白选自LILRB2及PD1所组成的群组,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含PD1的一氨基酸序列及4-1BBL的一氨基酸序列,所述第二单体包含LILRB2的一氨基酸序列。

[0478] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一氨基酸序列,所述氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:79及138。

[0479] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含SEQ ID NO:79及138。

[0480] 根据数个特定实施例,所述异二聚体由SEQ ID NO:79及138组成。

[0481] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白选自LILRB2及PD1所组成的群组,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含PD1的一氨基酸序列及CD40L的一氨基酸序列,所述第二单体包含LILRB2的一氨基酸序列。

[0482] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一氨基酸序列,所述氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:154及138。

- [0483] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含SEQ ID NO:154及138。
- [0484] 根据数个特定实施例,所述异二聚体由SEQ ID NO:154及138组成。
- [0485] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白选自SIGLEC及PD1所组成的群组,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含PD1的一胺基酸序列及4-1BBL的一胺基酸序列,所述第二单体包含SIGLEC的一胺基酸序列。
- [0486] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一胺基酸序列,所述胺基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:79及150。
- [0487] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含SEQ ID NO:79及150。
- [0488] 根据数个特定实施例,所述异二聚体由SEQ ID NO:79及150组成。
- [0489] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白选自SIGLEC及PD1所组成的群组,所述II型膜蛋白为CD40L,所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含PD1的一胺基酸序列及CD40L的一胺基酸序列,所述第二单体包含SIGLEC的一胺基酸序列。
- [0490] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一胺基酸序列,所述胺基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:154及150。
- [0491] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含SEQ ID NO:154及150。
- [0492] 根据数个特定实施例,所述异二聚体由SEQ ID NO:154及150组成。
- [0493] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白选自TIGIT及PD1所组成的群组,所述II型膜蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含PD1的一胺基酸序列及4-1BBL的一胺基酸序列,所述第二单体包含TIGIT的一胺基酸序列。
- [0494] 根据数个特定实施例,异二聚体包含一胺基酸序列,所述胺基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:79及152。
- [0495] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含SEQ ID NO:79及152。
- [0496] 根据数个特定实施例,所述异二聚体由SEQ ID NO:79及152组成。
- [0497] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白选自TIGIT及PD1所组成的群组,所述II型膜蛋白为CD40L,且所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含PD1的一胺基酸序列及CD40L的一胺基酸序列,所述第二单体包含TIGIT的一胺基酸序列。
- [0498] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一胺基酸序列,所述胺基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:154及152。
- [0499] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含SEQ ID NO:154及152。
- [0500] 根据数个特定实施例,所述异二聚体由SEQ ID NO:154及152组成。
- [0501] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白选自TIGIT及PD1所组成的群组,所述II型膜

蛋白为4-1BBL,所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含TIGIT的一胺基酸序列及4-1BBL的一胺基酸序列,所述第二单体包含PD1的一胺基酸序列。

[0502] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一胺基酸序列,所述胺基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:156及81。

[0503] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含SEQ ID NO:156及81。

[0504] 根据数个特定实施例,所述异二聚体由SEQ ID NO:156及81组成。

[0505] 根据数个特定实施例,所述I型膜蛋白选自TIGIT及PD1所组成的群组,所述II型膜蛋白为CD40L,且所述异二聚体包含一第一单体及一第二单体,所述第一单体包含TIGIT的一胺基酸序列及CD40L的一胺基酸序列,所述第二单体包含PD1的一胺基酸序列。

[0506] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含一胺基酸序列,所述胺基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同于SEQ ID NO:158及81。

[0507] 根据数个特定实施例,所述异二聚体包含SEQ ID NO:158及81。

[0508] 根据数个特定实施例,所述异二聚体由SEQ ID NO:158及81组成。

[0509] 根据数个特定实施例,本文所公开的异二聚体是可溶的(即,未固定到一合成或天然表面)。

[0510] 根据数个特定实施例,本文所公开的异二聚体被固定到一合成或天然表面。

[0511] 根据数个特定实施例,所述异二聚体中包含的所述数个部分(moieties)的每一者可包含一连接体,所述连接体在所述数个部分之间分离,例如在所述I型膜蛋白的所述胺基酸序列及所述二聚化部分之间分离,在所述I型膜蛋白的所述胺基酸序列及所述二聚化部分之间,在所述II型膜蛋白胺基酸序列的所述三个重复之间分离。

[0512] 根据数个其他特定实施例,所述异二聚体不包含所述I型膜蛋白的所述胺基酸序列及所述二聚化部分之间的一连接体。

[0513] 根据数个其他特定实施例,所述异二聚体不包含所述II型膜蛋白的所述胺基酸序列及所述二聚化部分之间的一连接体。

[0514] 本领域已知的任何连接体都可以与本发明的数个特定实施例一起使用。

[0515] 根据数个特定实施例,所述连接体可衍生自天然存在的数个多结构域蛋白质或一经验连接体(empirical linker),如Chichili等人(2013),Protein Sci.22(2):153-167,Chen等人(2013),Adv Drug Deliv Rev.65(10):1357-1369,其全部内容通过引用并入本文。在一些实施例中,可以使用连接体设计数据库及数个计算机程序来设计所述连接体,如Chen等人(2013),Adv Drug Deliv Rev.65(10):1357-1369及Crasto等人(2000),Protein Eng.13(5):309-312所述,其全部内容通过引用并入本文。

[0516] 根据数个特定实施例,所述连接体是一合成连接体,例如PEG。

[0517] 根据数个特定实施例,所述连接体可以是功能性的。例如,在不受限制的情况下,所述连接体可发挥作用,以改善PD1-4-1BBL融合蛋白的折迭及/或稳定性、改善表达、改善药代动力学及/或改善其生物活性。在另一范例中,所述连接体可以将PD1-4-1BBL融合蛋白

靶向特定细胞类型或位置。

[0518] 根据数个特定实施例,所述连接体为一多肽。

[0519] 数个多肽连接体的数个非限制性实例包括数个连接体,所述数个连接体具有序列 LE,GGGS (SEQ ID NO:99)、(GGGS)_n (n=1-4) (SEQ ID NO:98)、GGGSGGGG (SEQ ID NO:97)、(GGGS)_{x2} (SEQ ID NO:100)、(GGGS)_{x2}+GGGG (SEQ ID NO:96)、(GGGS)_{x3} (SEQ ID NO:134)、(GGGS)_{x4} (SEQ ID NO:135)、(Gly)₈ (SEQ ID NO:136)、(Gly)₆ (SEQ ID NO:137)、(EAAAK)_n (n=1-3) (SEQ ID NO:101)、A(EAAAK)_nA (n=2-5) (SEQ ID NO:102)、AEAAAKEAAKA (SEQ ID NO:103)、A(EAAAK)₄ALEA(EAAAK)₄A (SEQ ID NO:104)、PAPAP (SEQ ID NO:105)、KESGSVSS EQ LAQ FRS LD (SEQ ID NO:106)、EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO:107)、GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO:108) 及 (XP)_n,其中X代表任何氨基酸,例如Ala、Lys或Glu。

[0520] 根据数个特定实施例,所述连接体选自GGGS (SEQ ID NO:99)、(GGGS)_n (n=1-4) (SEQ ID NO:98)、GGGSGGGG (SEQ ID NO:97)、(GGGS)_{x2} (SEQ ID NO:100)、(GGGS)_{x2}+GGGG (SEQ ID NO:96)、(GGGS)_{x2} (SEQ ID NO:100)、(GGGS)_{x3} (SEQ ID NO:134) 及 (GGGS)_{x4} (SEQ ID NO:135) 所组成的群组。

[0521] 根据数个特定实施例,所述连接体选自GGGS (SEQ ID NO:99)、(GGGS)_n (n=1-4) (SEQ ID NO:98)、GGGSGGGG (SEQ ID NO:97)、(GGGS)_{x2} (SEQ ID NO:100)、(GGGS)_{x2}+GGGG (SEQ ID NO:96) 所组成的群组。

[0522] 根据数个特定实施例,所述连接体是 (GGGS)_{x2}+GGGG (SEQ ID NO:96)。

[0523] 根据数个特定实施例,所述连接体是 (ggs)_{x2} (SEQ ID NO:100)。

[0524] 根据数个特定实施例,所述连接体是 (GGGS)_{x3} (SEQ ID NO:134)。

[0525] 根据数个特定实施例,所述连接体是 (GGGS)_{x4} (SEQ ID NO:135)。

[0526] 根据数个特定实施例,所述连接体的一长度为1个至6个氨基酸。

[0527] 根据数个特定实施例,所述连接体基本上由甘氨酸及/或丝氨酸残基组成(例如,约30%、或约40%、或约50%、或约60%、或约70%、或约80%、或约90%、或约95%、或约97%或100%甘氨酸及丝氨酸)。

[0528] 根据数个特定实施例,所述连接体是一单一氨基酸连接体。

[0529] 在本发明的一些实施例中,所述一种氨基酸为甘氨酸。

[0530] 根据数个特定实施例,所述连接体不是一抗体或其一片段的Fc结构域或一铰链区。

[0531] 根据数个特定实施例,相较于包含所述I型膜蛋白及所述II型膜蛋白的相同氨基酸序列的一同型二聚体(homodimer)或包含相同氨基酸序列的数个分离单体的所述产量,所述异二聚体的所述产量高至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少5倍。

[0532] 根据数个特定实施例,相较于包含所述I型膜蛋白及所述II型膜蛋白的相同氨基酸序列的一同型二聚体或包含相同氨基酸序列的数个分离单体的聚集体的所述量,所述异二聚体的所述聚集体的所述量低至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。

[0533] 根据数个特定实施例,相较于包含所述I型膜蛋白及所述II型膜蛋白的相同氨基酸序列的一同型二聚体或包含相同氨基酸序列的数个分离单体的所述稳定性,所述异二聚体的所述稳定性高至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少5倍。

[0534] 根据数个特定实施例,相较于包含所述I型膜蛋白及所述II型膜蛋白的相同氨基酸序列的一同型二聚体或包含相同氨基酸序列的数个分离单体的所述活性,所述异二聚体的所述活性高至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少5倍。

[0535] 根据数个特定实施例,相较于包含所述I型膜蛋白及所述II型膜蛋白的相同氨基酸序列的一同型二聚体或包含相同氨基酸序列的数个分离单体的所述安全性,所述异二聚体的所述安全性高至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少5倍。

[0536] 由于本发明一些实施例的所述异二聚体包含一I型膜蛋白的一氨基酸序列及/或作为一免疫调节剂的一II型膜蛋白的一氨基酸序列,所述异二聚体可用于in-vitro、ex-vivo及/或in-vivo调节数个免疫细胞的方法。

[0537] 因此,根据本发明的一方面,提供了一种调节数个免疫细胞的活性的方法,所述方法包括在存在所述异二聚体、编码所述异二聚体的一核酸构建体或系统或包含所述异二聚体的一宿主细胞的情况下体外激活数个免疫细胞。

[0538] 根据其他数个特定实施例,所述调节步骤是抑制的。

[0539] 根据数个特定实施例,所述调节步骤是激活的。

[0540] 根据数个特定实施例,所述数个免疫细胞表达所述I型膜蛋白或所述II型膜蛋白(例如4-1BB)的一配体或一受体。

[0541] 根据数个特定实施例,所述数个免疫细胞包括数个外周单核血细胞(PBMC)。

[0542] 如本文所用,术语“外周单核血细胞(PBMC)”指具有一单核的一血细胞,包括淋巴细胞、单核细胞及树突状细胞(DC)。

[0543] 根据数个特定实施例,所述PBMC选自由树突状细胞(DC)、T细胞、B细胞、NK细胞及NKT细胞所组成的群组。

[0544] 根据数个特定实施例,所述PBMC包括T细胞、B细胞、NK细胞及NKT细胞。

[0545] 获取PBMC的数个方法在本领域是众所周知的,例如从一受试者中抽取全血并收集在含有一抗凝剂(例如肝素或柠檬酸盐)的一容器中;以及单采术(apheresis)。接下来,根据数个特定实施例,从所述外周血纯化至少一类型的PBMC。本领域技术人员已知用于从全血中纯化PBMC的几种方法及试剂,例如白血球细胞分离(leukapheresis)、沉淀(sedimentation)、密度梯度离心(例如ficoll)、离心淘洗(centrifugal elutriation)、分馏、例如红血球细胞的化学裂解(例如通过ACK)、使用数个细胞表面标记以选择数个特定细胞类型(例如使用FACS分类器或磁性细胞分离技术,如可从Invitrogen、Stemcell Technologies、Cellpro、Advanced Magnetics或Miltenyi Biotec等商业上可获得的技术)、以及通过数个特定抗体以根除(如杀死)或基于阴性选择的亲和纯化(如使用磁性细胞分离技术、FACS分类器及/或捕获ELISA标记)等方法来去除数个特定细胞类型。此等方法描述于例如THE HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY,第1卷至第4卷。(D.N.Weir,编辑者)以及FLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING(A.Radbruch,编辑者,Springer Verlag,2000年)。

[0546] 根据数个特定实施例,所述数个免疫细胞包括数个肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes)。

[0547] 如本文所用,术语“肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)”是指在所述血流中迁移并进入肿瘤的数个单核白血球细胞。

- [0548] 根据数个特定实施例,TIL选自T细胞、B细胞、NK细胞及单核细胞所组成的群组。
- [0549] 获取TIL的数个方法在本领域中是众所周知的,例如通过例如活检(biopsy)或尸检(necropsy)从一受试者获取数个肿瘤样本并制备其一单细胞悬浮液。可以任何合适的方式获得所述单细胞悬浮液,例如机械的方式(使用一GentleMACS™解离剂,Miltenyi Biotec,Auburn,Calif.来解离所述肿瘤)或酶促的方式(如胶原酶或DNA酶)。接下来,可以从细胞悬浮液中纯化所述至少一类型的TIL。本领域技术人员已知用于纯化所需类型TIL的几种方法及试剂,例如,使用细胞表面标记以选择数个特定细胞类型(例如使用FACS分类器或磁性细胞分离技术,例如可从Invitrogen、Stemcell Technologies、Cellpro、Advanced Magnetics或Miltenyi Biotec商业上可获得)以及通过数个特定抗体根除(如杀死)或基于阴性选择的亲和纯化(如使用磁性细胞分离技术、FACS分类器及/或捕获ELISA标记)等方法来去除特定类型细胞。此等方法描述于例如THE HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY,第1卷至第4卷。(D.N.Weir,编辑者)以及FLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING(A.Radbruch,编辑者,Springer Verlag,2000年)。
- [0550] 根据数个特定实施例,所述数个免疫细胞包括数个吞噬细胞。
- [0551] 如本文所用,术语“吞噬细胞”指能够吞噬并包括数个专业及非专业吞噬细胞(professional and non-professional phagocytic cells)的一细胞。分析吞噬作用的数个方法在本领域是众所周知的,例如包括杀灭分析、流式细胞术及/或显微镜评估(活细胞成像、荧光显微镜、共焦显微镜、电子显微镜)。根据数个特定实施例,所述数个吞噬细胞选自单核细胞、树突状细胞(DC)及粒细胞(granulocytes)所组成的群组。
- [0552] 根据数个特定实施例,所述吞噬细胞包括粒细胞。
- [0553] 根据数个特定实施例,所述吞噬细胞包括单核细胞。
- [0554] 根据数个特定实施例,所述免疫细胞包括单核细胞。
- [0555] 根据数个特定实施例,术语“单核细胞”指存在于一组织中的数个循环单核细胞及数个巨噬细胞(也称为单核吞噬细胞)。
- [0556] 根据数个特定实施例,所述单核细胞包括巨噬细胞。通常,数个巨噬细胞的细胞表面表型包括CD14、CD40、CD11b、CD64、F4/80(小鼠)/EMR1(人类)、溶菌酶M、MAC-1/MAC-3及CD68。
- [0557] 根据数个特定实施例,所述单核细胞包括循环单核细胞。通常,数个循环单核细胞的数个细胞表面表型包括CD14及CD16(例如CD14⁺⁺CD16⁻,CD14⁺CD16⁺⁺,CD14⁺⁺CD16⁺)。
- [0558] 根据数个特定实施例,所述免疫细胞包括树突状细胞(DC)。
- [0559] 如本文所用,术语“树突状细胞(DC)”指在淋巴组织或非淋巴组织中发现的数个形态相似的细胞类型的一不同群体中的任何成员。树突状细胞是一类专业的抗原提呈细胞,对HLA限制性T细胞具有较高的致敏能力。树突状细胞包括例如浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells)、髓样树突状细胞(myeloid dendritic cells)(包括未成熟及成熟树突状细胞)、朗格汉斯细胞(Langerhans cells)、叉指细胞(interdigitating cells)、滤泡树突状细胞(follicular dendritic cells)。树突状细胞可以通过功能或表型识别,尤其是通过细胞表面表型识别。这些细胞的特点是其独特的形态,在所述细胞表面有数个面纱状突起,表面HLA II类表达水平介于中到高水平,并能够向T细胞,尤其是幼稚T细胞提供抗原(见Steinman R等人,Ann.Rev.Immunol.1991;9:271-196.)。通常,树突状细

胞的细胞表面表型包括CD1a+、CD4+、CD86+或HLA-DR。树突状细胞一词包括未成熟及成熟的树突状细胞。

[0560] 根据数个特定实施例,所述免疫细胞包括粒细胞。

[0561] 如本文所用,词语“粒细胞”(granulocytes)是指多形核白血球(polymorphonuclear leukocytes),其特征是细胞质中存在颗粒。

[0562] 根据数个特定实施例,所述粒细胞包括中性粒细胞。

[0563] 根据数个特定实施例,所述粒细胞包括肥大细胞。

[0564] 根据数个特定实施例,所述免疫细胞包括T细胞。

[0565] 如本文所用,术语“T细胞”指具有CD3+、具有CD4+或CD8+表型的T细胞受体(TCR)+的分化淋巴细胞。T细胞可以是一效应子或一调节性T细胞。

[0566] 如本文所用,术语“效应子T细胞(effector T cells)”指例如通过产生细胞因子激活或引导其他免疫细胞或具有细胞毒性活性(例如CD4+、Th1/Th2、CD8+细胞毒性T淋巴细胞)的一T细胞。

[0567] 如本文所用,术语“调节性T细胞(regulatory T cell)”或“Treg”指负调节其他T细胞(包括效应性T细胞)以及固有免疫系统细胞的激活的一T细胞。Treg细胞的特点是持续抑制效应子T细胞反应。根据数个特定实施例,所述Treg是一CD4+CD25+Foxp3+T细胞。

[0568] 根据数个特定实施例,所述T细胞为CD4+T细胞。

[0569] 根据其他数个特定实施例,所述T细胞为CD8+T细胞。

[0570] 根据数个特定实施例,所述T细胞是记忆T细胞。数个记忆T细胞的数个非限制性范例包括具有CD3+/CD4+/CD45RA-/CCR7-表型的效应子记忆CD4+T细胞、具有CD3+/CD4+/CD45RA-/CCR7+表型的中央记忆CD4+T细胞、具有CD3+/CD8+CD45RA-/CCR7-表型的效应子记忆CD8+T细胞及具有CD3+/CD8+CD45RA-/CCR7+表型的中央记忆CD8+T细胞。

[0571] 根据数个特定实施例,所述T细胞包括用编码一所需表达产物(expression product of interest)的一核酸序列转导的工程化T细胞。

[0572] 根据数个特定实施例,所需表达产物为一T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

[0573] 如本文所用,短语“使用编码一TCR的一核酸序列转导(transduced with a nucleic acid sequence encoding a TCR或transducing with a nucleic acid sequence encoding a TCR)”是指从T细胞中克隆可变 α 链及 β 链,具有针对MHC上下文中呈现的所需抗原的特异性。本领域已知使用TCR进行转换的数个方法另于例如Nicholson等人Adv Hematol.2012;2012:404081;Wang and Rivière Cancer Gene Ther.2015Mar;22(2):85-94);以及Lamers等人Cancer Gene Therapy(2002)9,613-623。

[0574] 如本文所用,短语“使用编码一CAR的核酸序列转导(transduced with a nucleic acid sequence encoding a CAR或transducing with a nucleic acid sequence encoding a CAR)”是指编码一嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)的一核酸序列的克隆,其中所述CAR包括一抗原识别部分及一T细胞激活部分。一嵌合抗原受体(CAR)是一种人工构建的杂交蛋白质或多肽,包含与T细胞信号或T细胞激活域相连的一抗体的一抗原结合域(例如单链可变片段(scFv))。本领域已知使用一CAR进行转导的数个方法,并公开于Davila等人,Oncoimmunology.,2012年12月1日;1(9):1577-1583;Wang and Rivière Cancer Gene Ther.,2015年3月;22(2):85-94);Maus等人,Blood.,2014年4月24日;123

(17):2625-35;Porter DL The New England journal of medicine.,2011年,365(8):725-733;Jackson HJ,Nat Rev Clin Oncol.,2016年;13(6):370-383;以及Globerson-Levin等人,Mol Ther.,2014年;22(5):1029-1038。

[0575] 根据数个特定实施例,所述免疫细胞包括B细胞。

[0576] 如本文所用,术语“B细胞”指具有一B细胞受体(BCR)+、CD19+及/或B220+表型的一淋巴细胞。B细胞的特点是能够结合特定抗原并引发体液反应。

[0577] 根据数个特定实施例,所述免疫细胞包括NK细胞。

[0578] 如本文所用,术语“NK细胞”指具有CD16+CD56+及/或CD57+TCR-表型的分化淋巴细胞。NK的特点是能够通过激活数个特定的细胞溶解酶来结合并杀死不能表达“自身”MHC/HLA抗原的细胞的能力、杀死肿瘤细胞或其他表达NK激活受体的一配体的病变细胞的能力、以及释放被称为数个细胞因子的蛋白质分子以刺激或抑制免疫反应的能力。

[0579] 根据数个特定实施例,所述免疫细胞包括NKT细胞。

[0580] 如本文所用,术语“NKT细胞”是指一特殊T细胞群,表达一半不变 $\alpha\beta$ T细胞受体(semi-invariant $\alpha\beta$ T-cell receptor)但也表达通常与NK细胞相关的多种分子标记物,例如NK1.1。NKT细胞包括NK1.1+及NK1.1.-,还有CD4+、CD4-、CD8+及CD8-细胞。NKT细胞上的所述TCR是独特的,因为它识别MHC I样分子CD1d呈现的数个糖脂抗原。NKT细胞可以产生促进炎症或免疫耐受的细胞因子,因此具有保护作用或有害作用。

[0581] 根据数个特定实施例,所述免疫细胞从一健康受试者获得。

[0582] 根据数个特定实施例,所述免疫细胞从患有一病理学(例如癌症)的一受试者获得。

[0583] 根据数个特定实施例,调节步骤是在表达所述I型膜蛋白或所述II型膜蛋白的一配体或一受体的数个细胞存在或在所述I型膜蛋白或所述II型膜蛋白的外源配体或受体(例如PD-L1)存在下进行的。

[0584] 根据数个特定实施例,所述外源配体或受体是可溶性的。

[0585] 根据数个其他特定实施例,将所述外源配体或受体固定在一固体载体上。

[0586] 根据数个特定实施例,表达所述配体或受体的所述数个细胞包括数个病理(患病)细胞,例如癌细胞。

[0587] 根据数个特定实施例,所述调制步骤在一刺激剂存在下进行,所述刺激剂能够至少传递一初级激活信号[例如,所述T细胞受体(TCR)与所述抗原呈递细胞(Antigen Presenting Cell,APC)上的所述主要组织相容性复合物(Major Histocompatibility Complex,MHC)/肽复合物的连接(ligation)],导致细胞增殖、成熟,细胞因子产生、吞噬及/或诱导免疫细胞的调节或效应子功能。根据数个特定实施例,所述刺激器试剂还可发射一次级共刺激信号。

[0588] 确定所述刺激剂的所述量以及所述刺激剂与所述数个免疫细胞之间的比率的数个方法完全在本领域技术人员的能力范围内,因此本文未规定。

[0589] 所述刺激剂可以抗原依赖或非抗原依赖(即多克隆)方式激活免疫细胞。

[0590] 根据数个特定实施例,刺激剂包括抗原非特异性刺激剂。

[0591] 本领域技术人员已知非特异性刺激器。因此,作为一非限制性范例,当免疫细胞包含T细胞时,抗原非特异性刺激剂可以是能够结合到一T细胞表面结构并诱导所述T细胞的

所述多克隆刺激的一试剂,例如但不限于抗CD3抗体与一共同刺激蛋白(例如抗CD28抗体)的组合。其他数个非限制性范例包括抗CD2、抗CD137、抗CD134、Notch配体,例如单独或以与抗CD3的各种组合的Delta样1/4、Jagged1/2。其他可诱导T细胞多克隆刺激的数个试剂包括但不限于丝裂原(mitogens)、PHA、PMA离子霉素、CEB及CytoStim(Miltenyi Biotech)。根据数个特定实施例,抗原非特异性刺激物包含抗CD3及抗CD28抗体。根据数个特定实施例,T细胞刺激剂包括抗CD3及抗CD28涂层珠,例如从Miltenyi Biotec获得的CD3CD28 MACSiBeads。

[0592] 根据数个特定实施例,所述刺激剂包括一抗原特异性刺激剂。

[0593] 数个抗原特异性T细胞刺激剂的数个非限制性实例包括载抗原抗原呈递细胞[APC,例如树突状细胞]及载肽重组MHC。因此,例如,T细胞刺激器可以是预先装载有所需抗原(例如肿瘤抗原)或转染有编码一所需抗原的mRNA的树突状细胞。

[0594] 根据数个特定实施例,所述抗原为一癌症抗原。

[0595] 如本文所用,术语“癌症抗原”是指与一非癌症细胞相比,一癌症细胞过度表达或仅表达的一抗原。一癌症抗原可以是一已知的癌抗原或一癌细胞中产生的一新的特异性抗原(即新抗原)。

[0596] 数个已知癌症抗原的数个非限制性实例包括MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-AS、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-AS、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、BAGE-1、RAGE-1、LB33/MUM-1、PRAME、NAG、MAGE-Xp2 (MAGE-B2)、MAGE-Xp3 (MAGE-B3)、MAGE-Xp4 (MAGE-B4)、MAGE-C1/CT7、MAGE-C2、NY-ESO-1、LAGE-1、SSX-1、SSX-2 (HOM-MEL-40)、SSX-3、SSX-4、SSX-5、SCP-1及XAGE、黑素细胞分化抗原(melanocyte differentiation antigens)、p53、ras、CEA、MUC1、PMSA、PSA、酪氨酸酶(tyrosinase)、Melan-A、MART-1、gp100、gp75、alphaactinin-4、Bcr-Abl融合蛋白、Casp-8、 β -catenin、cdc27、cdk4、cdkn2a、coa-1、dek-can融合蛋白、EF2、ETV6-AML1融合蛋白、LDLR-岩藻糖基转移酶AS融合蛋白(LDLR-fucosyltransferaseAS fusion protein)、HLA-A2、HLA-A11、hsp70-2、KIAA0205、Mart2、Mum-2、and 3、neo-PAP、myosin class I、OS-9、pml-RAR α 融合蛋白、PTPRK、K-ras、N-ras、磷酸丙糖异构酶、GnTV、Herv-K-mel、NA-88、SP17及TRP2-Int2、(MART-1)、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、爱泼斯坦巴尔病毒抗原(Epstein Barr virus antigens)、EBNA、人乳头瘤病毒(human papillomavirus,HPV)抗原E6及E7、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、p185erbB2、p150erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72-4、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、甲胎蛋白(alpha.-fetoprotein)、13HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3 (CA 27.29\BCAA)、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68\KP1、C0-029、FGF-5、0250、Ga733 (EpCAM)、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB\170K、NYCO-I、RCASI、SDCCAG16、TA-90 (Mac-2结合蛋白\亲环蛋白C相关蛋白)、TAAL6、TAG72、TLP、TPS、酪氨酸酶相关蛋白、TRP-1或TRP-2。

[0597] 可能表达的其他肿瘤抗原在本领域是众所周知的(例如,参见W000/20581;Cancer Vaccines and Immunotherapy (2000) Eds Stern、Beverley及Carroll,剑桥大学出版社,剑桥)。这些肿瘤抗原的所述数个序列可从公共数据库中随时获得,但也可在WO 1992/020356 AI、WO 1994/005304 AI、WO 1994/023031AI、WO 1995/020974AI、WO 1995/023874AI及WO 1996/026214AI中获得。

[0598] 替代地,或者附加地,可以使用例如通过活检(biopsy)从所述受试者获得的数个

癌细胞来识别一肿瘤抗原。

[0599] 因此,根据数个特定实施例,所述刺激剂包含一癌细胞。

[0600] 根据数个特定实施例,所述调节步骤在一抗癌剂存在下进行。

[0601] 根据数个特定实施例,在所述调节步骤后纯化所述免疫细胞。

[0602] 因此,本发明还考虑了根据本发明的所述数个方法可获得的分离免疫细胞。

[0603] 根据数个特定实施例,根据本发明使用及/或获得的免疫细胞可在任何阶段在液氮温度下新鲜分离、储存(例如冷冻)长时间(例如月、年)以供将来使用;及细胞系。

[0604] 冷冻保存方法为本领域普通技术人员所熟知,并公开于例如在国际专利申请公开号W02007054160及W0 2001039594以及美国专利申请公开号US20149108。

[0605] 根据数个特定实施例,根据本发明获得的细胞可以存储在一细胞库或存储或一存储设施中。

[0606] 因此,本教导进一步建议将所述数个分离的免疫细胞及本发明的方法用作(但不限于)过继免疫细胞治疗疾病的一来源以及与免疫抑制及感染有关的一疾病,所述过继免疫细胞治疗可受益于调节免疫细胞,例如激活免疫细胞(例如一超增殖性疾病)。

[0607] 因此,根据数个特定实施例,本发明的方法包括在所述激活步骤后将免疫细胞过继转移到需要免疫细胞的一受试者。

[0608] 根据数个特定实施例,提供了根据本发明方法可获得的免疫细胞,用于过继细胞治疗。

[0609] 根据本发明的数个特定实施例使用的所述数个细胞可以是自体的或非自体的;它们可以是同基因的或非同基因的;与受试者同种或异种;每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0610] 本教导还考虑本发明(例如,所述异二聚体、编码所述异二聚体的一核酸结构或系统或表达所述异二聚体的一宿主细胞)的组合物在治疗一疾病的方法中的用途,所述疾病可受益于所述异二聚体的治疗。

[0611] 因此,根据本发明的一方面,提供了一种治疗可受益于所述异二聚体治疗的一疾病的方法,所述方法包括向需要所述异二聚体的一受试者施加编码所述异二聚体的一核酸构建体或系统或包含所述异二聚体的一宿主细胞,从而治疗所述受试者的所述疾病。

[0612] 根据本发明的一附加或一替代方面,提供了所述异二聚体、编码所述异二聚体的核酸构建体或系统或包含所述异二聚体的一细胞,用于治疗可受益于所述异二聚体治疗的一疾病。

[0613] 根据本发明的一附加或一替代方面,提供了一种治疗可受益于调节数个免疫细胞的一疾病的方法,所述方法包括向需要所述异二聚体的一受试者施加编码所述异二聚体的一核酸构建体或系统或包含所述异二聚体的一宿主细胞,从而治疗所述受试者的所述疾病。

[0614] 根据本发明的一附加或一替代方面,提供了一种异二聚体、编码所述异二聚体的一核酸构建体或系统或包含所述异二聚体的一宿主细胞,用于治疗可受益于调节数个免疫细胞的一疾病。

[0615] 术语“治疗”指抑制、预防或阻止一病理(疾病、失调或医疗状况)的发展及/或导致病理或病理症状的减轻、缓解或消退。本领域技术人员将理解,可以使用各种方法及分析来

评估一病理学的所述发展,并且类似地,可以使用各种方法及分析来评估一病理学的减轻、缓解或消退。

[0616] 如本文所用,术语“受试者”包括哺乳动物,例如任何年龄及性别的人类。根据数个特定实施例,术语“受试者”是指患有病理学(疾病、失调或医疗状况)的一受试者。根据数个特定实施例,所述术语包括有发生病理学风险的个体。

[0617] 根据数个特定实施例,所述受试者患有与表达所述I型膜蛋白或所述II型膜蛋白的一配体或一受体的数个细胞相关的一疾病。

[0618] 根据数个特定实施例,所述受试者患有与表达所述II型膜蛋白(例如4-1BB、CD40)的一配体或一受体的数个细胞相关的一疾病。

[0619] 根据数个特定实施例,所述受试者的数个染病细胞表达了所述I型膜蛋白或所述II型膜蛋白的一配体或一受体。

[0620] 根据数个特定实施例,所述受试者的数个染病细胞表达了所述I型膜蛋白(例如PDL1、唾液酸、CD155)的一配体或一受体。

[0621] 根据数个特定实施例,所述受试者的数个染病细胞表达了所述II型膜蛋白的一配体或一受体。

[0622] 根据本发明数个特定实施例可治疗的数个疾病的数个非限制性范例包括可受益于血管生成诱导的数个疾病(例如,当所述I型膜蛋白为VEGFA且所述II型膜蛋白为TWEAK或APRIL时)、可受益于抑制血管生成的数个疾病(例如,当所述I型膜蛋白为ENG,所述II型膜蛋白为FasL、TRAIL或VEGI时),以用于诱导骨形成(例如,当所述I型膜蛋白为BMP2,所述II型膜蛋白为TWEAK或APRIL时),以用于抑制骨形成(例如,当所述I型膜蛋白为BMP3,所述II型膜蛋白为RNAKL、FasL、TRAIL、VEGI时),以用于肝再生(例如,当所述I型膜蛋白为GFER,所述II型膜蛋白为TWEAK或APRIL时),以及包括可受益于调节数个免疫细胞的数个疾病(例如,当所述I型膜蛋白及所述II型膜蛋白中至少一是免疫调节剂时)。

[0623] 如本文所用,短语“可受益于调节数个免疫细胞的一疾病”是指所述受试者的免疫反应活性可能足以至少改善所述疾病的数个症状或延迟数个症状出现的数个疾病,然而,无论出于何种原因,所述受试者在这样做时的免疫反应活性都不是优选的。

[0624] 根据数个特定实施例,所述疾病可受益于激活数个免疫细胞。

[0625] 可从激活免疫细胞中获益的数个疾病的数个非限制性范例包括数个过度增殖性疾病、与免疫抑制相关的数个疾病、药物引起的免疫抑制(如mTOR抑制剂、钙调神经磷酸酶抑制剂、类固醇)及数个感染。

[0626] 根据数个特定实施例,所述疾病包括一高增殖性疾病。

[0627] 根据数个特定实施例,所述高增殖性疾病包括硬化(sclerosis)、纤维化(fibrosis)、特发性肺纤维化(Idiopathic pulmonary fibrosis)、银屑病(psoriasis)、系统性硬化/硬皮病(systemic sclerosis/scleroderma)、原发性胆管炎(primary biliary cholangitis)、原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis)、肝纤维化(liver fibrosis)、预防辐射诱导的肺纤维化(prevention of radiation-induced pulmonary fibrosis)、骨髓纤维化(myelofibrosis)或腹膜后纤维化(retroperitoneal fibrosis)。

[0628] 根据数个其他特定实施例,所述高增殖性疾病包括癌症。

[0629] 因此,根据本发明的另一方面,提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向一有其需要的受试者施加本文公开的所述PD1-4-1BBL融合蛋白、包含所述PD1胺基酸序列的所述分离多肽及/或包含所述4-1BBL胺基酸序列的所述分离多肽。

[0630] 如本文所用,癌症一词包括恶性肿瘤 (malignant cancer) 及恶性前癌症 (pre-malignant cancers)。

[0631] 关于癌前 (pre-malignant) 或良性 (benign) 形式的癌症,任选地,其数个组合物及数个方法可用于防止所述恶性前癌症的所述进展朝向一恶性形式 (malignant form)。

[0632] 可通过本发明一些实施例的所述数个方法治疗的数个癌症可以是任何固体或非固体癌症及/或癌症转移。

[0633] 根据数个特定实施例,所述癌症包括恶性癌症 (malignant cancer)。

[0634] 可通过本发明一些实施例的所述数个方法治疗的数个癌症可以是任何固体或非固体癌症及/或癌症转移。癌症的数个范例包括但不限于癌症 (carcinoma)、淋巴瘤 (lymphoma)、母细胞瘤 (blastoma)、肉瘤 (sarcoma) 及白血病 (leukemia)。此类癌症的数个更具体范例包括鳞状细胞癌 (squamous cell cancer)、肺癌 (包括小细胞肺癌 (small-cell lung cancer)、非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer)、肺腺癌 (adenocarcinoma of the lung) 及肺鳞状癌 (squamous carcinoma of the lung))、腹膜癌 (cancer of the peritoneum)、肝细胞癌 (hepatocellular cancer)、肠胃癌或胃癌 (gastric or stomach cancer) (包括胃肠道癌 (gastrointestinal cancer))、胰腺癌 (pancreatic cancer)、胶质母细胞瘤 (glioblastoma)、宫颈癌 (cervical cancer)、卵巢癌 (ovarian cancer)、肝癌 (liver cancer)、膀胱癌 (bladder cancer)、肝癌 (hepatoma)、乳腺癌 (breast cancer)、结肠癌 (colon cancer)、结直肠癌 (colorectal cancer)、子宫内膜癌或子宫癌 (endometrial or uterine carcinoma)、唾液腺癌 (salivary gland carcinoma)、肾癌或肾癌 (kidney or renal cancer)、肝癌 (liver cancer)、前列腺癌、外阴癌 (vulval cancer)、甲状腺癌、肝癌 (hepatic carcinoma) 及各种头颈癌 (head and neck cancer), 以及B细胞淋巴瘤 (B-cell lymphoma) (包括低度/滤泡性非霍奇金淋巴瘤 (low grade/follicular non-Hodgkin's lymphoma) (NHL); 小淋巴细胞 (small lymphocytic, SL) 非霍奇金淋巴瘤 (NHL); 中级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤 (intermediate grade/follicular NHL); 中级弥漫性非霍奇金淋巴瘤 (intermediate grade diffuse NHL); 高级免疫母细胞性非霍奇金淋巴瘤 (high grade immunoblastic NHL); 伯基特淋巴瘤 (Burkitt lymphoma)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (Diffused large B cell lymphoma, DLBCL)、高级别淋巴母细胞性NHL (high grade lymphoblastic NHL); 高级非分裂小细胞非霍奇金淋巴瘤 (high-grade small non-cleaved cell NHL); 大病性非霍奇金淋巴瘤 (bulky disease NHL); 套细胞淋巴瘤 (mantle cell lymphoma); 艾滋病相关淋巴瘤 (AIDS-related lymphoma); 及Waldenstrom巨球蛋白血症; T细胞淋巴瘤 (T cell lymphoma)、霍奇金淋巴瘤 (Hodgkin lymphoma)、慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL); 急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL); 急性髓系白血病 (Acute myeloid leukemia, AML)、急性早幼粒细胞白血病 (Acute promyelocytic leukemia, APL)、毛细胞白血病 (Hairy cell leukemia); 慢性粒细胞白血病 (chronic myeloblastic leukemia, CML); 移植后淋巴增生性疾病 (post-transplant lymphoproliferative disorder, PTLD)、以及与白内障

(phakomatoses)、水肿(edema)(如与脑肿瘤相关的水肿)及梅格斯综合症(Meigs' syndrome)相关的异常血管增生。优选地,所述癌症选自乳腺癌、结直肠癌、直肠癌、非小细胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、肾细胞癌、前列腺癌、肝癌(liver cancer)、胰腺癌、软组织肉瘤(soft-tissue sarcoma)、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、类癌(carcinoid carcinoma)、头颈癌、黑色素瘤、卵巢癌、间皮瘤(mesothelioma)及多发性骨髓瘤。可用于本发明治疗的数个癌症状况包括数个转移性癌症。

[0635] 根据数个特定实施例,所述癌症包括恶性前癌症(pre-malignant cancer)。

[0636] 恶性前癌症(或癌症前期(pre-cancers))在本领域是众所周知的特征(例如,参考Berman JJ.及Henson DE.,2003年Classifying the precancers:a metadata approach.BMC Med Inform Decis Mak.3:8。可通过本发明的所述方法进行治疗的恶性前癌症类别包括获得性小或微小的恶性前癌症(acquired small or microscopic pre-malignant cancers)、具有核异型性的获得性大病变(acquired large lesions with nuclear atypia)、遗传性增生综合症进展为癌症的前体病变、以及获得性弥漫性增生(acquired diffuse hyperplasias)及弥漫性化生(diffuse metaplasias)。数个小或微小的恶性前癌症(small or microscopic pre-malignant cancers)包括子宫颈高级鳞状上皮内病变(High grade squamous intraepithelial lesion of uterine cervix,HGSIL)、肛门上皮内瘤变(anal intraepithelial neoplasia,AIN)、声带发育不良、异常隐窝(aberrant crypts)(结肠性的)、前列腺上皮内瘤变(prostatic intraepithelial neoplasia,PIN)。获得性大的核异型性病灶(acquired large lesions with nuclear atypia)的所述范例包括管状腺瘤(tubular adenoma)、伴蛋白异常血症的血管免疫母细胞性淋巴结病(angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia,AILD)、非典型脑膜瘤(atypical meningioma)、胃息肉(gastric polyp)、大斑块性副银屑病(large plaque parapsoriasis)、骨髓发育不良(myelodysplasia)、原位乳头状移行细胞癌(papillary transitional cell carcinoma in-situ)、难治性贫血伴母细胞过多(refractory anemia with excess blasts)及施奈德乳头状瘤(Schneiderian papilloma)。遗传性增生综合症进展为癌症的前体病变的数个范例包括非典型葡萄胎综合症(atypical mole syndrome)、C细胞腺瘤病(C cell adenomatosis)及MEA。获得性弥漫性增生及弥漫性化生的数个范例包括艾滋病(AIDS)、非典型淋巴增生(atypical lymphoid hyperplasia)、骨佩吉特病(Paget's disease of bone)、移植后淋巴增生性疾病(post-transplant lymphoproliferative disease)及溃疡性结肠炎。

[0637] 根据数个特定实施例,所述癌症为急性髓系白血病(Acute Myeloid Leukemia)、肛门癌(Anal Cancer)、基底细胞癌(Basal Cell Carcinoma)、B细胞非霍奇金淋巴瘤(B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma)、胆管癌(Bile Duct Cancer)、膀胱癌(Bladder Cancer)、乳腺癌(Breast Cancer)、宫颈癌(Cervical Cancer)、慢性淋巴细胞白血病(Chronic Lymphocytic Leukemia,CLL)、慢性髓系白血病(Chronic Myelocytic Leukemia,CML)、结直肠癌(Colorectal Cancer)、皮肤T细胞淋巴瘤(Cutaneous T-Cell Lymphoma)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(Diffuse Large B-Cell Lymphoma)、子宫内膜癌(Endometrial Cancer)、食管癌(Esophageal Cancer)、输卵管癌(Fallopian Tube Cancer)、滤泡性淋巴瘤(Follicular Lymphoma)、胃癌(Gastric Cancer)、胃食管(Gastroesophageal,GE)交界癌

(Junction Carcinomas)、生殖细胞肿瘤(Germ Cell Tumors)、生殖细胞瘤(Germinomatous)(精原细胞瘤(Seminomatous))、生殖细胞肿瘤(Germ Cell Tumors)、多形性胶质母细胞瘤(Glioblastoma Multiforme,GBM)、胶质肉瘤(Gliosarcoma)、头颈癌、肝细胞癌(Hepatocellular Carcinoma)、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin Lymphoma)、下咽癌(Hypopharyngeal Cancer)、喉癌(Laryngeal Cancer)、平滑肌肉瘤(Leiomyosarcoma)、套细胞淋巴瘤(Mantle Cell Lymphoma)、黑色素瘤、默克尔细胞癌(Merkel Cell Carcinoma)、多发性骨髓瘤、神经内分泌肿瘤、非霍奇金淋巴瘤(Non-Hodgkin Lymphoma)、非小细胞肺癌(Non-Small Cell Lung Cancer)、口腔癌(Oral Cavity)、口咽癌(Oropharyngeal Cancer)、骨肉瘤(Osteosarcoma)、卵巢癌、胰腺癌、外周神经鞘瘤(Peripheral Nerve Sheath Tumor)(神经纤维肉瘤(Neurofibrosarcoma))、外周T细胞淋巴瘤(Peripheral T-Cell Lymphomas,PTCL)、腹膜癌(Peritoneal Cancer)、前列腺癌、肾细胞癌(Renal Cell Carcinoma)、唾液腺癌、皮肤癌、小细胞肺癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌(Squamous Cell Carcinoma)、滑膜肉瘤(Synovial Sarcoma)、睾丸癌(Testicular Cancer)、胸腺癌(Thymic Carcinoma)、甲状腺癌、输尿管癌、尿道癌、子宫癌、阴道癌或外阴癌。

[0638] 根据数个特定实施例,所述癌症为急性髓系白血病(Acute myeloid leukemia)、膀胱癌、乳腺癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓系白血病(Chronic myelogenous leukemia)、结直肠癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤(Diffuse large B-cell lymphoma)、上皮性卵巢癌、上皮性肿瘤、输卵管癌、滤泡性淋巴瘤、多形性胶质母细胞瘤、肝细胞癌、头颈癌、白血病、淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤(Non Hodgkin lymphoma)、非小细胞肺癌、卵巢癌、前列腺癌或肾细胞癌。

[0639] 根据数个特定实施例,所述癌症选自淋巴瘤、白血病及癌症所组成的群组。

[0640] 根据数个特定实施例,所述癌症选自淋巴瘤、白血病、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌及鳞状细胞癌所组成的群组。

[0641] 根据数个特定实施例,所述癌症为结肠癌。

[0642] 根据数个特定实施例,所述癌症为卵巢癌。

[0643] 根据数个特定实施例,所述癌症为肺癌。

[0644] 根据数个特定实施例,所述癌症为头颈癌。

[0645] 根据数个特定实施例,所述癌症为白血病。

[0646] 根据数个特定实施例,所述白血病选自急性非淋巴细胞白血病(acute nonlymphocytic leukemia)、慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia)、急性粒细胞白血病(acute granulocytic leukemia)、慢性粒细胞白血病(chronic granulocytic leukemia)、急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia)、成人T细胞白血病(adult T-cell leukemia)、白血病性白血病(aleukemic leukemia)、一白血病性白血病(leukocythemetic leukemia)、碱性粒细胞白血病(basophylic leukemia)、母细胞白血病(blast cell leukemia)、牛白血病(bovine leukemia)、慢性粒细胞白血病(chronic myelocytic leukemia)、皮肤白血病(leukemia cutis)、胚胎白血病(embryonal leukemia)、嗜酸性白血病(eosinophilic leukemia)、罗斯白血病(ross' leukemia)、毛细胞白血病(hairy-cell leukemia)、成血细胞白血病(hemoblastic leukemia)、成血细胞白

血病 (hemocytoblastic leukemia)、成血细胞白血病 (histiocytic leukemia)、组织细胞白血病 (histiocytic leukemia)、干细胞白血病 (stem cell leukemia)、急性单核细胞白血病 (acute monocytic leukemia)、白细胞减少性白血病 (leukopenic leukemia)、淋巴白血病 (lymphatic leukemia)、淋巴细胞白血病 (lymphoblastic leukemia)、淋巴细胞白血病 (lymphocytic leukemia)、淋巴细胞白血病 (lymphogenous leukemia)、淋巴细胞白血病 (lymphoid leukemia)、淋巴肉瘤细胞白血病 (lymphosarcoma cell leukemia)、肥大细胞白血病 (mast cell leukemia)、巨核细胞白血病 (megakaryocytic leukemia)、微髓母细胞白血病 (micromyeloblastic leukemia)、单核细胞白血病 (monocytic leukemia)、粒细胞白血病 (myeloblastic leukemia)、粒细胞白血病 (myelocytic leukemia)、粒细胞白血病 (myeloid granulocytic leukemia)、粒单核细胞白血病 (myelomonocytic leukemia)、奈杰利白血病 (Naegeli leukemia)、浆细胞白血病 (plasma cell leukemia)、浆细胞白血病 (plasmacytic leukemia)、早幼粒细胞白血病 (promyelocytic leukemia)、里德细胞白血病 (Rieder cell leukemia)、席林白血病 (Schilling's leukemia)、干细胞白血病 (stem cell leukemia)、亚白血病 (subleukemic leukemia) 及未分化细胞白血病 (undifferentiated cell leukemia) 所组成的群组。

[0647] 根据数个特定实施例,所述白血病为早幼粒细胞白血病 (promyelocytic leukemia)、急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia) 或慢性髓系白血病 (chronic myelogenous leukemia)。

[0648] 根据数个特定实施例,所述癌症为淋巴瘤。

[0649] 根据数个特定实施例,所述淋巴瘤为B细胞淋巴瘤

[0650] 根据数个特定实施例,所述淋巴瘤为T细胞淋巴瘤。

[0651] 根据数个其他特定实施例,所述淋巴瘤为霍奇金淋巴瘤 (Hodgkins lymphoma)。

[0652] 根据数个特定实施例,所述淋巴瘤为非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkins lymphoma)。

[0653] 根据数个特定实施例,所述非霍奇金淋巴瘤是从以下所组成的一群组中选择的一者:侵袭性NHL、转化性NHL、惰性NHL、复发性NHL、难治性NHL、低度非霍奇金淋巴瘤 (low grade non-Hodgkin's Lymphoma)、滤泡性淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤 (Mantle cell lymphoma)、伯基特淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma)、NK细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、急性淋巴母细胞淋巴瘤及皮肤T细胞癌,包括蕈样肉芽肿/塞兹里综合症 (mycosos fungoides/Sezry syndrome)。

[0654] 根据数个特定实施例,所述癌症为多发性骨髓瘤。

[0655] 根据至少一些实施例,所述多发性骨髓瘤选自以下所组成的群组:产生数个kappa型轻链及/或数个lambda型轻链的数个多发性骨髓瘤癌;侵袭性多发性骨髓瘤 (aggressive multiple myeloma),包括原发性浆细胞白血病 (primary plasma cell leukemia,PCL);可发展为多发性骨髓瘤的良性浆细胞疾病 (benign plasma cell disorders),如MGUS (意义未定的单克隆丙种球蛋白病 (monoclonal gammopathy of undetermined significance))、Waldenstrom巨球蛋白血症 (WM,也称为淋巴浆细胞性淋巴瘤);也可能发展为多发性骨髓瘤的阴燃性多发性骨髓瘤 (smoldering multiple myeloma,SMM)、惰性多发性骨髓瘤 (indolent multiple myeloma)、恶性癌前多发性骨髓瘤;原发性淀粉样变 (primary amyloidosis)。

[0656] 根据数个特定实施例,所述癌症通过肿瘤微环境中存在具有肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes,TIL)的数个肿瘤及/或所述肿瘤微环境中具有一相对较高表达的所述I型或Ii型膜蛋白(例如PDL1或CD47)的配体或受体的数个肿瘤来定义。

[0657] 根据数个特定实施例,所述疾病包括与免疫抑制相关的一疾病或由药物引起的免疫抑制(例如mTOR抑制剂、钙调神经磷酸酶抑制剂、类固醇)。

[0658] 根据数个特定实施例,所述疾病包括HIV、麻疹、流感、LCCM、RSV、人类鼻病毒(Human Rhinoviruses)、EBV、CMV或细小病毒(Parvo viruses)。

[0659] 根据数个特定实施例,所述疾病包括感染。

[0660] 如本文所用,术语“感染”或“传染病”指由一病原体诱发的一疾病。数个病原体的数个具体范例包括病毒病原体、细菌病原体,例如细胞内分枝杆菌病原体(intracellular mycobacterial pathogens)(例如结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*))、细胞内细菌病原体(intracellular bacterial pathogens)(例如单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*))、或细胞内原生动植物病原体(intracellular protozoan pathogens)(例如利什曼原虫(*Leishmania*)及锥虫(*Trypanosoma*))。

[0661] 根据本发明的教导,引起可治疗的数个传染病的数个病毒病原体的数个特定类型包括但不限于反转录病毒(retroviruses)、圆环病毒(circoviruses)、细小病毒(parvoviruses)、帕波病毒(papovaviruses)、腺病毒(adenoviruses)、疱疹病毒(herpesviruses)、虹彩病毒(iridoviruses)、痘病毒(poxviruses)、肝炎病毒(hepadnaviruses)、小核糖核酸病毒(picornaviruses)、杯状病毒(caliciviruses)、托加病毒(togaviruses)、黄病毒(flaviviruses)、呼肠孤病毒(reoviruses)、正粘病毒(orthomyxoviruses)、副粘病毒(paramyxoviruses)、弹状病毒(rhabdoviruses)、布尼亚病毒(bunyaviruses)、冠状病毒(coronaviruses)、沙粒病毒(arenaviruses)及丝状病毒(filoviruses)。

[0662] 可根据本发明的教导治疗的病毒感染的数个具体范例包括但不限于人类免疫缺陷病毒(HIV)诱导的获得性免疫缺陷综合症(AIDS)、流感、鼻病毒感染(rhinoviral infection)、病毒性脑膜炎(viral meningitis)、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus,EBV)感染、甲型肝炎A、B或C病毒感染(hepatitis A,B or C virus infection)、麻疹、乳头状瘤病毒感染/疣(papilloma virus infection/warts)、巨细胞病毒(cytomegalovirus,CMV)感染、单纯疱疹病毒感染(Herpes simplex virus infection)、黄热病(yellow fever)、埃博拉病毒感染(Ebola virus infection)、狂犬病(rabies)等。

[0663] 根据数个特定实施例,所述疾病可受益于抑制数个免疫细胞。

[0664] 根据数个特定实施例,所述疾病为一自身免疫性疾病。此类自身免疫性疾病包括但不限于心血管疾病、类风湿性疾病、腺体疾病、胃肠道疾病、皮肤疾病、肝脏疾病、神经系统疾病、肌肉疾病、肾脏疾病、与生殖有关的疾病、结缔组织疾病及体系疾病(systemic diseases)。

[0665] 自身免疫性心血管疾病的所述范例包括但不限于动脉粥样硬化(atherosclerosis)(Matsuura E.等人,Lupus.1998;7Suppl 2:S135)、心肌梗塞(myocardial infarction)(Vaarala O.Lupus.1998;7Suppl 2:S132)、血栓形成(thrombosis)(Tincani A.等人,Lupus 1998;7Suppl 2:S107-9)、韦格纳肉芽肿(Wegener'

s granulomatosis)、大动脉炎(Takayasu's arteritis)、川崎综合症(Kawasaki syndrome) (Praprotnik S.等人,Wien Klin Wochenschr 2000年8月25日;112(15-16):660)、抗VIII因子自身免疫性疾病(anti-factor VIII autoimmune disease) (Lacroix Desmazes S.等人,Semin Thromb Hemost.2000;26(2):157)、坏死性小血管炎(necrotizing small vessel vasculitis)、显微镜下多血管炎(microscopic polyangiitis)、丘尔格及施特劳斯综合症(Churg and Strauss syndrome)、pauci-免疫局灶性坏死及新月体肾炎(pauci-immune focal necrotizing and crescentic glomerulonephritis) (Noel LH. Ann Med Interne, 巴黎, 2000年5月;151(3):178)、抗磷脂综合症(antiphospholipid syndrome) (Flamholz R.等人,J Clin Apheresis 1999;14(4):171)、抗体诱导的心力衰竭(antibody-induced heart failure) (Wallukat G.等人, Am J Cardiol, 1999年6月17日;83(12A):75H)、血小板减少性紫癜(thrombocytopenic purpura) (Moccia F. Ann Ital Med Int. 1999 Apr-Jun;14(2):114; Semple JW.等人, Blood 1996 May 15;87(10):4245);自身免疫性溶血性贫血(autoimmune hemolytic anemia) (Efremov DG.等人, Leuk Lymphoma, 1998年1月;28(3-4):285; Sallah S.等人, Ann Hematol, 1997年3月;74(3):139)、查加斯病中的心脏自身免疫(cardiac autoimmunity in Chagas' disease) (Cunha Neto E.等人, J Clin Invest, 1996年10月15日;98(8):1709)及抗辅助性T淋巴细胞自身免疫(anti-helper T lymphocyte autoimmunity) (Caporossi AP.等人, Viral Immunol, 1998;11(1):9)。

[0666] 数个自身免疫性类风湿性疾病的数个范例包括但不限于类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis) (Krenn V.等人, Histol Histopathol, 2000年7月;15(3):791; Tisch R, McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci units S A, 1994年1月18日;91(2):437)及强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis) (Jan Voswinkel等人, 2001年;3(3):189)。

[0667] 自身免疫性腺病的数个范例包括但不限于胰腺疾病、I型糖尿病、甲状腺疾病、格雷夫斯病(Graves' disease)、甲状腺炎、自发性自身免疫性甲状腺炎、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、特发性粘液水肿(idiopathic myxedema)、卵巢自身免疫(ovarian autoimmunity)、自身免疫性抗精子不育(autoimmune anti-sperm infertility)、自身免疫性前列腺炎(autoimmune prostatitis)及I型自身免疫性多腺体综合症(Type I autoimmune polyglandular syndrome)。数个疾病包括但不限于胰腺自身免疫性疾病、I型糖尿病(Castano L. and Eisenbarth GS. Ann. Rev. Immunol. 8:647; Zimmet P. diabetes Res Clin Pract 1996年10月;34 Suppl: S125)、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病(Graves' disease) (Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am 2000 Jun;29(2):339; Sakata S.等人, Mol Cell Endocrinol 1993 Mar;92(1):77)、自发性自身免疫性甲状腺炎(Bralely-Mullen H. and Yu S, J Immunol, 2000年12月15日;165(12):7262)、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis) (Toyoda N.等, Nippon Rinsho, 1999年8月;57(8):1810)、特发性粘液水肿(idiopathic myxedema) (Mitsuma T. Nippon Rinsho., 1999年8月;57(8):1759);卵巢自身免疫(Garza KM.等人, J Reprod Immunol., 1998年2月;37(2):87)、自身免疫抗精子不育(Diekman AB.等人, Am Reprod Immunol., 2000年3月);自身免疫性前列腺炎(Alexander RB.等人, Urology, 1997年12月;50(6):893)及I型自身免疫性多腺体综合症(Hara T.等人, Blood., 1991年3月1日;77(5):1127)。

[0668] 自身免疫性胃肠疾病的数个范例包括但不限于慢性炎症性肠道疾病 (chronic inflammatory intestinal diseases) (Garcia Herola A. 等人, *Gastroenterol Hepatol.* 2000 Jan; 23 (1) :16)、乳糜泻 (celiac disease) (Landau YE. 及 Shoenfeld Y. *Harefuah*, 2000年1月16日; 138 (2) :122)、结肠炎、回肠炎及克罗恩病 (Crohn's disease)。

[0669] 自身免疫性皮肤病的实例包括但不限于自身免疫性大疱性皮肤病 (autoimmune bullous skin diseases), 例如但不限于寻常型天疱疮 (pemphigus vulgaris)、大疱性类天疱疮 (bullous pemphigoid) 及落叶型天疱疮 (pemphigus foliaceus)。

[0670] 自身免疫性肝病的数个实例包括但不限于肝炎 (hepatitis)、自身免疫性慢性活动性肝炎 (Franco A. 等人, *Clin Immunol Immunopathol*, 1990年3月; 54 (3) :382)、原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis) (Jones DE. *Clin Sci (Colch)*, 1996年11月; 91 (5) :551; Strassburg CP. 等人, *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, 1999年6月; 11 (6) :595) 及自身免疫性肝炎 (Manns MP. *J Hepatol*, 2000年8月; 33 (2) :326)。

[0671] 自身免疫性神经疾病的数个范例包括但不限于多发性硬化症 (multiple sclerosis) (Cross AH. 等人, *J Neuroimmunol*, 2001年1月1日; 112 (1-2) :1)、阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease) (Oron L. 等人, *J Neural Transm Suppl*, 1997年; 49; 77)、重症肌无力 (myasthenia gravis) (Infante AJ. 及 Kraig E, *Int Rev Immunol*, 1999年; 18 (1-2) :83; Oshima M. 等人, *Eur J Immunol*, 1990年12月; 20 (12) :2563)、神经病变、运动神经病变 (Kornberg AJ. *J Clin Neurosci.*, 2000年5月; 7 (3) :191)、格林-巴利综合症及自身免疫性神经病 (Guillain-Barre syndrome and autoimmune neuropathies) (Kusunoki S. *Am J Med Sci.*, 2000年4月; 319 (4) :234)、肌无力 (myasthenia), 兰伯特-伊顿肌无力综合症 (Lambert-Eaton myasthenic syndrome) (Takamori M. *Am J Med Sci.*, 2000年4月; 319 (4) :204)、副肿瘤性神经疾病 (paraneoplastic neurological diseases)、小脑萎缩 (cerebellar atrophy)、副肿瘤性小脑萎缩 (paraneoplastic cerebellar atrophy) 及僵硬综合症 (stiff-man syndrome) (Hiemstra HS. 等人, *Proc Natl Acad Sci units S A*, 2001年3月27日; 98 (7) :3988)、非副肿瘤性僵硬综合症 (non-paraneoplastic stiff man syndrome)、进行性小脑萎缩 (progressive cerebellar atrophies)、脑炎 (encephalitis)、拉斯穆森脑炎 (Rasmussen's encephalitis)、肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis)、Sydeham舞蹈病 (Sydeham chorea)、抽动秽语综合症 (Gilles de la Tourette syndrome) 及自身免疫性多发性内分泌疾病 (autoimmune polyendocrinopathies) (Antoine JC. 及 Honnorat J. *Rev Neurolo (巴黎)*, 2000年1月; 156 (1) :23)、免疫障碍性神经病 (dysimmune neuropathies) (Nobile Orazio E. 等人, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*, 1999年; 50:419)、获得性神经肌强直 (acquired neuromyotonia)、多发性先天性关节炎 (arthrogryposis multiplex congenita) (Vincent A. 等人, *Ann N Y Acad Sci.*, 1998年5月13日; 神经炎、视神经炎 (Soderstrom M. 等人, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1994年5月; 57 (5) :544) 及神经退行性疾病 (neurodegenerative diseases)。

[0672] 自身免疫性肌肉疾病的数个范例包括但不限于肌炎 (nephritis)、自身免疫性肌炎及原发性干燥综合症 (Feist E. 等人, *Int Arch Allergy Immunol*, 2000年9月; 123 (1) :

92) 及平滑肌自身免疫性疾病 (Zauli D. 等人, Biomed Pharmacother, 1999年6月; 53 (5-6) : 234) .

[0673] 自身免疫性肾病的数个范例包括但不限于肾炎及自身免疫性间质性肾炎 (Kelly CJ. J Am Soc Nephrol, 1990年8月; 1 (2) : 140) .

[0674] 与生殖有关的自身免疫性疾病的数个范例包括但不限于重复的胎儿丢失 (repeated fetal loss) (Tincani A. 等人, Luse, 1998年; 7Suppl 2: S107-9) .

[0675] 自身免疫性结缔组织疾病的数个范例包括但不限于耳部疾病、自身免疫性耳部疾病 (Yoo T.J. 等人, Cell Immunol, 1994年8月; 157 (1) : 249) 及内耳自身免疫性疾病 (Gloddek B. 等人, Ann N Y Acad Sci, 1997年12月29日; 830: 266) .

[0676] 自身免疫系统性疾病的数个范例包括但不限于系统性红斑狼疮 (Erikson J. 等人, Immunol Res, 1998年; 17 (1-2) : 49) 及系统性硬化 (Renaudineau Y. 等人, Clin Diagn Lab Immunol, 1999年3月; 6 (2) : 156) ; Chan OT. 等人, Immunol Rev, 1999年6月; 169: 107) .

[0677] 根据数个特定实施例, 所述疾病为移植物排斥疾病。与移植物移植相关的疾病包括但不限于移植物排斥、慢性移植物排斥、亚急性移植物排斥、超急性移植物排斥、急性移植物排斥及移植物抗宿主病。

[0678] 根据数个特定实施例, 所述疾病是一过敏性疾病, 过敏性疾病的数个范例包括但不限于哮喘、荨麻疹、花粉过敏、尘螨过敏、毒液过敏、化妆品过敏、乳胶过敏、化学过敏、药物过敏、昆虫叮咬过敏、动物皮屑过敏、植物过敏、毒藤过敏及食物过敏。

[0679] 根据数个特定实施例, 本文公开的所述数个组合物 (例如, 异二聚体、编码所述异二聚体的核酸构建体或系统及/或表达所述异二聚体的宿主细胞) 可与其他已建立或实验性治疗方案组合施用于一受试者以治疗所述疾病, 包括但不限于本领域众所周知的止痛剂、化学治疗剂、放射治疗剂、细胞毒性疗法 (调理)、激素疗法、抗体及其他治疗方案 (例如手术) .

[0680] 根据数个特定实施例, 与本发明一些实施例的所述组合物组合施用的所述治疗剂包含一抗体。

[0681] 根据数个特定实施例, 本文所公开的所述数个组合物 (例如, 异二聚体、编码所述异二聚体的核酸构建体或系统及/或表达所述异二聚体的宿主细胞) 可结合过继细胞移植 (adoptive cell transplantation) (例如但不限于骨髓细胞、造血干细胞、PBMC、脐血干细胞及/或诱导多能干细胞) .

[0682] 根据数个特定实施例, 与本发明一些实施例的组合物组合施用的所述治疗剂包含一抗癌剂。

[0683] 可用于本发明数个特定实施例的抗癌剂包括但不限于抗癌药 Acivicin; 阿柔比星 (Aclarubicin); 盐酸阿考达唑 (Acodazole Hydrochloride); 克罗宁 (Acronine); 阿霉素 (Adriamycin); 阿多唑啉 (Adozelesin); 阿德白介素 (Aldesleukin); 阿曲他明 (Altretamine); 安布霉素 (Ambomycin); 醋酸阿米坦酮 (Ametantrone Acetate); 氨基谷氨酰胺 (Aminoglutethimide); 安吡啶 (Amsacrine); 阿那曲唑 (Anastrozole); 蒽霉素 (Anthramycin); 天冬酰胺酶 (Asparaginase); 阿斯珀林 (Asperlin); 阿扎胞苷 (Azacitidine); 阿泽替帕 (Azetepa); 阿唑霉素 (Azotomycin); 巴马司他 (Batimastat); 苯并德巴 (Benzodepa); 比卡鲁胺 (Bicalutamide); 盐酸比生群 (Bisantrene

Hydrochloride);双萘芬二甲磺酸盐(Bisnafide Dimesylate);比泽列辛(Bizelesin);硫酸博来霉素(Bleomycin Sulfate);布雷奎那钠(Brequinar Sodium);溴匹明(Bropirimine);白消安(Busulfan);放线菌素(Cactinomycin);月桂酮(Calusterone);卡拉酰胺(Caracemide);卡贝默(Carbetimer);卡铂(Carboplatin);卡莫司汀(Carmustine);盐酸卡比星(Carubicin Hydrochloride);卡泽莱辛(Carzelesin);头孢呋辛(Cedefingol);苯丁酸氮芥(Chlorambucil);环霉素(Cirolemycin);顺铂(Cisplatin);克拉屈滨(Cladribine);Crisnatol甲磺酸盐;环磷酰胺(Cyclophosphamide);阿糖胞苷(Cytarabine);达卡巴嗪(Dacarbazine);放线菌素(Dactinomycin);盐酸柔红霉素(Daunorubicin Hydrochloride);地西他滨(Decitabine);去甲铂(Dexormaplatin);地扎鸟嘌呤(Dezaguanine);地扎鸟嘌呤甲磺酸盐(Dezaguanine Mesylate);二嗪酮(Diaziquone);多西他赛(Docetaxel);阿霉素(Doxorubicin);盐酸多柔比星(Doxorubicin Hydrochloride);屈洛昔芬(Droloxifene);屈洛昔芬柠檬酸盐(Droloxifene Citrate);丙酸屈莫司他酮(Dromostanolone Propionate);度唑霉素(Duazomycin);依达曲沙(Edatrexate);盐酸依氟鸟氨酸(Eflornithine Hydrochloride);依沙芦星(Elsamitrucin);恩洛铂(Enloplatin);促进(Enpromate);表丙啶(Epipropidine);盐酸表柔比星(Epirubicin Hydrochloride);厄布洛唑(Erbulozole);盐酸埃索比星(Esorubicin Hydrochloride);雌莫司汀(Estramustine);雌莫司汀磷酸钠(Estramustine Phosphate Sodium);依硝唑(Etanidazole);依托泊苷(Etoposide);磷酸依托泊苷(Etoposide Phosphate);依托托林(Etoprine);盐酸法曲唑(Fadrozole Hydrochloride);法扎拉滨(Fazarabine);芬维A胺(Fenretinide);氟尿苷(Floxuridine);磷酸氟达拉滨(Fludarabine Phosphate);氟尿嘧啶(Fluorouracil);氟西他滨(Fluorocitabine);磷喹酮(Fosquidone);磷霉素钠(Fostriecin Sodium);吉西他滨(Gemcitabine);盐酸吉西他滨(Gemcitabine Hydrochloride);羟基脲(Hydroxyurea);盐酸伊达比星(Idarubicin Hydrochloride);异环磷酰胺(Ifosfamide);伊莫磷辛(Ilmofofosine);干扰素Alfa-2a;干扰素Alfa-2b;干扰素 α -n1;干扰素 α -n3;干扰素Beta-I a;干扰素Gamma-I b;异丙铂(Iproplatin);盐酸伊立替康(Irinotecan Hydrochloride);兰瑞肽醋酸盐(Lanreotide Acetate);来曲唑(Letrozole);醋酸亮丙瑞林(Leuprolide Acetate);盐酸利阿唑(Liarozole Hydrochloride);洛美曲索钠(Lometrexol Sodium);洛莫司汀(Lomustine);盐酸氯索蒽醌(Losoxantrone Hydrochloride);马索普罗考(Masoprocol);美登素(Maytansine);盐酸甲氯乙胺(Mechlorethamine Hydrochloride);醋酸甲地孕酮(Megestrol Acetate);醋酸美仑孕酮(Melengestrol Acetate);马法兰(Melphalan);梅诺加里尔(Menogaril);巯基嘌呤(Mercaptopurine);甲氨蝶呤(Methotrexate);甲氨蝶呤钠(Methotrexate Sodium);美托品(Metoprine);梅图德帕(Meturedopa);米替度胺(Mitindomide);线粒体癌(Mitocarcin);丝裂霉素(Mitocromin);丝裂霉素(Mitogillin);丝裂霉素(Mitomalcin);丝裂霉素(Mitomycin);线粒体(Mitosper);米托坦(Mitotane);盐酸米托蒽醌(Mitoxantrone Hydrochloride);霉酚酸(Mycophenolic Acid);诺考达唑(Nocodazole);诺加霉素(Nogalamycin);奥玛铂(Ormaplatin);奥昔兰(Oxisuran);紫杉醇(Paclitaxel);天冬酰胺(Pegaspargase);佩利霉素(Peliomycin);喷他莫司汀(Pentamustine);硫酸呱洛霉素(Peplomycin Sulfate);环磷酰胺(Perfosfamide);匹泊布

罗曼 (Pipobroman); 呱泊硫丹 (Piposulfan); 盐酸吡罗蒽醌 (Piroxantrone Hydrochloride); 普利霉素 (Plicamycin); 普洛美坦 (Plomestane); 聚合物钠 (Porfimer Sodium); 波非霉素 (Porfiromycin); 泼尼莫司汀 (Prednimustine); 盐酸丙卡巴肼 (Procarbazine Hydrochloride); 嘌呤霉素 (Puromycin); 盐酸嘌呤霉素 (Puromycin Hydrochloride); 吡唑啉 (Pyrazofurin; Riboprine); 核糖核酸 (Rogletimide); 罗格莱胺 (Rogletimide); 沙芬醇 (Safingol); 沙芬酚盐酸盐 (Safingol Hydrochloride); 西莫司汀 (Semustine); 辛曲嗪 (Simtrazene); 司帕膦酸钠 (Sparfosate Sodium); 稀疏霉素 (Sparsomycin); 螺锗盐酸盐 (Spirogermanium Hydrochloride); 螺莫司汀 (Spiromustine); 螺铂 (Spiroplatin); 链霉素 (Streptonigrin); 链脲佐菌素 (Streptozocin); 磺胺嘧啶 (Sulofenur); 泰利霉素 (Talisomycin); 紫杉醇 (Taxol); 特可加兰钠 (Tecogalan Sodium); 替加氟 (Tegafur); 盐酸泰洛蒽醌 (Teloxantrone Hydrochloride); 替莫泊芬 (Temoporfin); 替尼泊苷 (Teniposide); 特罗昔隆 (Teroxirone); 睾酮 (Testolactone); 硫胺嘧啶 (Thiamiprine); 硫鸟嘌呤 (Thioguanine); 噻替帕 (Thiotepa); 噻唑呋喃 (Tiazofuirin); 替拉扎明 (Tirapazamine); 盐酸托泊替康 (Topotecan Hydrochloride); 柠檬酸托瑞米芬 (Toremifene Citrate); 醋酸曲霉酮 (Trestolone Acetate); 磷酸三西立宾 (Triciribine Phosphate); 曲美沙 (Trimetrexate); 曲美沙葡糖醛酸 (Trimetrexate Glucuronate); 曲普瑞林 (Triptorelin); 盐酸妥布唑 (Tubulazole Hydrochloride); 尿嘧啶芥末 (Uracil Mustard); 乌瑞德帕 (Uredepa); 维普肽 (Vapreotide); 维替泊芬 (Verteporfin); 长春碱硫酸盐 (Vinblastine Sulfate); 长春新碱硫酸盐 (Vincristine Sulfate); 万地辛 (Vindesine); 硫酸长春碱 (Vindesine Sulfate); 硫酸长春吡啶 (Vinepidine Sulfate); 甘氨酸硫酸盐 (Vinglycinate Sulfate); 硫酸长春新碱 (Vinleurosine Sulfate); 酒石酸长春瑞滨 (Vinorelbine Tartrate); 长春花碱硫酸盐 (Vinrosidine Sulfate); 硫酸文唑烷 (Vinzolidine Sulfate); 伏罗唑 (Vorozole); 泽尼铂 (Zeniplatein); 抑菌素 (Zinostatin); 盐酸佐鲁比星 (Zorubicin Hydrochloride)。其他抗肿瘤剂包括公开于Antineoplastic Agents第52章 (Paul Calabresi及Bruce A. Chabner)、以及Goodman及Gilman的“The Pharmacological Basis of Therapeutics”, 第八版, 1990年, McGraw-Hill, Inc. (卫生专业部 (Health Professions Division))。

[0684] 根据数个特定实施例, 所述抗癌剂包含U抗体。

[0685] 根据数个特定实施例, 所述抗体选自利妥昔单抗 (rituximab)、西妥昔单抗 (cetuximab)、曲妥珠单抗 (trastuzumab)、来曲单抗 (edrecolomab)、阿来单抗 (alemtuzumab)、吉姆图珠单抗 (gemtuzumab)、伊布单抗 (ibritumomab)、帕尼单抗-贝伐单抗 (panitumumab Belimumab)、贝伐单抗 (Bevacizumab)、比伐单抗-美坦辛 (Bivatuzumab mertansine)、布利那单抗 (Blinatumomab)、布隆妥单抗 (Blontuvetmab)、布伦妥昔单抗-韦多汀 (Brentuximab vedotin)、卡妥单抗 (Catumaxomab)、西舒单抗 (Cixutumumab)、达利珠单抗 (Daclizumab)、阿达利单抗 (Adalimumab)、苯妥单抗 (Bezlotoxumab)、Certolizumab pegol、Citatumumab bogatox、Daratumumab、Dinutuximab、Elotuzumab、Ertumaxomb、Etaracizumab、Gemtuzumab ozogamicin、Girentuximab、Necitumumab、Obinutuzumab、Ofatumumab、Pertuzumab、Ramucirumab、Siltuximab、Tositumomab、Nivolumab、彭布罗利珠

单抗 (Pembrolizumab)、杜瓦卢马 (Durvalumab)、阿替唑单抗 (Atezolizumab)、阿维鲁单抗 (Avelumab)、曲妥珠单抗 (Trastuzumab) 及伊普利单抗 (ipilimumab) 所组成的群组。

[0686] 根据数个特定实施例,所述抗体选自利妥昔单抗 (rituximab) 及西妥昔单抗 (cetuximab) 所组成的群组。

[0687] 根据数个特定实施例,所述治疗剂或抗癌剂包含 IMiD (例如沙利度胺 (Thalidomide)、来那度胺 (Lenalidomide)、泊马利度胺 (Pomalidomide))。

[0688] 根据数个特定实施例,所述 IMiD 选自沙利度胺 (Thalidomide)、来那度胺 (Lenalidomide)、泊马利度胺 (Pomalidomide) 所组成的群组。

[0689] 根据数个特定实施例,与本发明一些实施例的组合物组合施用的治疗剂包含一抗感染剂 (例如,抗生素及抗病毒剂)。

[0690] 根据数个特定实施例,与本发明一些实施例的组合物组合施用的治疗剂包含所述免疫抑制剂 (例如 GCSF 及其他骨髓刺激剂、类固醇)。

[0691] 根据数个特定实施例,所述组合疗法具有一相加效应。

[0692] 根据数个特定实施例,所述组合疗法具有一协同效应。

[0693] 根据本发明的另一方面,提供了一种制品,包括包装用于治疗一疾病的一治疗剂的一包装材料;以及所述异二聚体、编码所述异二聚体的一核酸构建体或系统或包含所述异二聚体的一宿主细胞。

[0694] 根据数个特定实施例,所述制品被鉴定用于治疗可受益于用所述异二聚体治疗的一疾病,例如可受益于调节数个免疫细胞的一疾病。

[0695] 根据数个特定实施例,用于治疗所述疾病的所述治疗剂;所述异二聚体、编码所述异二聚体的所述核酸构建体或系统或表达所述异二聚体的所述宿主细胞被包装在数个单独的容器中。

[0696] 根据数个特定实施例,用于治疗所述疾病的治疗剂;所述异二聚体、编码所述异二聚体的所述核酸构建体或系统或表达所述异二聚体的所述宿主细胞被包装在一共调配物中。

[0697] 根据数个特定实施例,所述异二聚体附着于或包含一异源治疗部分。所述治疗部分可以是任何分子,包括小分子化合物及多肽。

[0698] 可与本发明数个特定实施例一起使用的治疗部分的数个非限制性范例包括一细胞毒性部分、一毒性部分、一细胞因子部分、一免疫调节部分、一多肽、一抗体、一药物、一化学品及/或一放射性同位素。

[0699] 根据本发明的一些实施例,通过将编码本发明的一些实施例的所述多肽的所述多核苷酸与编码所述治疗部分的核酸序列翻译融合,使所述治疗部分结合。

[0700] 附加地或替代地,可以使用本领域技术人员已知的任何共轭方法,将治疗部分化学共轭 (偶联) 到本发明一些实施例的所述异二聚体。例如,可以使用 3-(2-吡啶基二硫代)丙酸 N-羟基丁二酰亚胺酯 (3-(2-pyridyldithio) propionic acid N-hydroxysuccinimide ester) (也称为 N-丁二酰亚胺基 3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯 (N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate)) (“SDPD”) (Sigma, Cat. 编号: P-3415; 例如,参见 Cumber 等人,1985年,Methods of Enzymology, 112:207-224)、一戊二醛结

合程序 (glutaraldehyde conjugation procedure) (参见g.T.Hermanson,1996年, Antibody Modification and Conjugation, in Bioconjugate Techniques, 圣地亚哥学术出版社)、或一碳二亚胺结合程序 (carbodiimide conjugation procedure) [参见例如 J.March, Advanced Organic Chemistry: Reaction's, Mechanism, and Structure, 第349-50及372-74 (3版), 1985年; B.Neises等人, 1978年, Angew Chem, Int. Ed. Engl., 17:522; A.Hassner等人, 1978年, Tetrahedron Lett., 4475; E.P.Boden等人, 1986年, J.Org, Chem. 50:2394及L.J.Mathias 1979, Synthesis 561]。

[0701] 例如, 可以使用本领域广泛采用的数个标准化学合成技术将一治疗部分连接到本发明的一些实施例的所述异二聚体上 [参见例如 Hypertext Transferr protocol://worldwideweb(dot)chemistry(dot)org/portal/chemistry], 例如通过一肽键 (当功能部分是一多肽时) 或通过共价键与中间连接元件 (例如连接肽或其他化学部分, 例如有机聚合物) 使用任何合适的直接或间接化学连接。数个嵌合肽可通过在所述数个肽的羧基 (C) 或氨基 (N) 端的键连接, 或通过内部化学基团 (例如直链、支链或环状侧链、内部碳原子或氮原子等) 的键连接。

[0702] 如本文所用, 术语“氨基酸序列”、“蛋白质”、“肽”、“多肽”及“蛋白质性部分”在本文中互换使用, 包括数个天然肽 (降解产物、合成肽或重组肽) 及数个拟肽体 (peptidomimetics) (通常为合成肽)、以及肽类似物的类肽 (peptoids) 及数个半肽 (semipeptoids), 其可能具有例如使肽在一身体内更稳定或更能穿透数个细胞的修饰。此类修饰包括但不限于N端修饰、C端修饰、肽键修饰、主链修饰及残基修饰。制备拟肽化合物的数个方法在本领域是众所周知的, 并且例如在文献 Quantitative Drug Design, C.A.Ramsden Gd., Chapter 17.2, F.Choplin Pergamon Press (1992) 中规定, 通过引用将其并入本文, 如同本文中完全阐述的一样。下文提供了这方面的更多细节。

[0703] 所述肽内的数个肽键 (-CO-NH-) 可例如被N-甲基化酰胺键 (-N(CH₃)-CO-)、酯键 (-C(=O)-O-)、酮亚甲基键 (-CO-CH₂-)、亚砷基甲基键 (-S(=O)-CH₂-)、 α -aza键 (-NH-N(R)-CO-) 取代, 其中R为任何烷基 (例如甲基)、胺键 (-CH₂-NH-)、硫化物键 (-CH₂-S-)、乙烯键 (-CH₂-CH₂-)、羟基乙烯键 (-CH(OH)-CH₂-)、硫酰胺键 (-CS-NH-)、烯炔双键 (-CH=CH-)、氟化烯炔双键 (-CF=CH-)、逆酰胺键 (-NH-CO-)、肽衍生物 (-N(R)-CH₂-CO-), 其中R是自然存在于碳原子上的“正常”侧链。

[0704] 这些修饰可以发生在所述肽链上的任何键上, 甚至可以同时发生在几个 (2-3) 键上。

[0705] 天然芳香族氨基酸 Trp、Tyr 及 Phe 可被非天然芳香族氨基酸取代, 例如 1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸 (1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid) (Tic)、萘丙氨酸 (naphthylalanine)、Phe 的环甲基化衍生物、Phe 或 O-甲基-Tyr 的卤代衍生物。

[0706] 本发明的一些实施例的所述数个肽还可包括一或多种经修饰的氨基酸或一或多种非氨基酸单体 (例如脂肪酸、复合碳水化合物等)。

[0707] 术语“氨基酸”或“数个氨基酸”被理解为包括 20 种天然存在的氨基酸; 这些氨基酸通常在体内进行转译后修饰, 例如, 包括羟脯氨酸 (hydroxyproline)、磷酸丝氨酸 (phosphoserine) 及磷酸苏氨酸 (phosphothreonine); 以及其他不寻常的氨基酸, 包括但不限于 2-氨基己二酸 (2-aminoadipic acid)、羟基赖氨酸 (hydroxylysine)、异桥糖酸

(isodesmosine)、缬氨酸(nor-valine)、亮氨酸(nor-leucine)及鸟氨酸(ornithine)。此外,术语“氨基酸”包括D-及L-氨基酸。

[0708] 下面的表1及表2列出了天然存在的氨基酸(表1)及非常规或修饰的氨基酸(例如,合成的,表2),它们可以与本发明的一些实施例一起使用。

[0709] 表1

[0710]

氨基酸	三字符号缩写	一字符号
氨基丙酸(Alanine)	Ala	A
鱼精胺酸(Arginine)	Arg	R
天门冬酰胺 (Asparagine)	Asn	N
天门冬胺酸(Aspartic acid)	Asp	D
半胱胺酸(Cysteine)	Cys	C
麸胺酸酰胺 (Glutamine)	Gln	Q
麸胺酸 (Glutamic Acid)	Glu	E
甘胺酸(Glycine)	Gly	G
组织胺酸(Histidine)	His	H
异白胺酸 (Isoleucine)	Ile	I
白胺酸(Leucine)	Leu	L
离胺酸(Lysine)	Lys	K
甲硫胺酸 (Methionine)	Met	M
苯丙胺酸 (Phenylalanine)	Phe	F
脯胺酸(Proline)	Pro	P

[0711]	丝氨酸(Serine)	Ser	S
	息宁胺酸 (Threonine)	Thr	T
	色氨酸(Tryptophan)	Trp	W
	酪氨酸(Tyrosine)	Tyr	Y
	缬氨酸(Valine)	Val	V
	以上任何氨基酸	Xaa	X

[0712] 表2

非常规氨基酸	密码(Code)	非常规氨基酸	密码(Code)
鸟氨酸(ornithine)	Orn	羟脯氨酸 (hydroxyproline)	Hyp
α -氨基丁酸(α -aminobutyric acid)	Abu	氨基降冰片基羧酸盐 (aminonorbornyl-carboxylate)	Norb
D-丙氨酸(D-alanine)	Dala	氨基环丙烷羧酸盐 (aminocyclopropane-carboxylate)	Cpro
D-精氨酸 (D-arginine)	Darg	N-(3-胍基丙基)甘氨酸 (N-(3-guanidinopropyl)glycine)	Narg
D-天冬酰胺 (D-asparagine)	Dasn	N-(氨基甲酰基甲基)甘氨酸 (N-(carbamylmethyl	Nasn

[0714]

)glycine)	
D- 天 冬 氨 酸 (D-aspartic acid)	Dasp	N-(羧甲基)甘氨酸 (N-(carboxymethyl) glycine)	Nasp
D- 半 胱 氨 酸 (D-cysteine)	Dcys	N-(硫甲基)甘氨酸 (N-(thiomethyl)glyc ine)	Ncys
D- 谷 氨 酰 胺 (D-glutamine)	Dgln	N-(2-氨甲酰乙基) 甘 氨 酸 (N-(2-carbamylethyl)glycine)	Ngln
D-谷氨酸(D-glutamic acid)	Dglu	N-(2-羧乙基)甘氨 酸 (N-(2-carboxyethyl) glycine)	Nglu
D- 组 氨 酸 (D-histidine)	Dhis	N-(咪唑基乙基)甘 氨 酸 (N-(imidazolylethyl)glycine)	Nhis
D- 异 亮 氨 酸 (D-isoleucine)	Dile	N-(1-甲基丙基)甘 氨 酸 (N-(1-methylpropyl) glycine)	Nile
D-亮氨酸(D-leucine)	Dleu	N-(2-甲基丙基)甘 氨 酸	Nleu

[0715]

		(N-(2-methylpropyl)glycine)	
D-赖氨酸(D-lysine)	Dlys	N-(4-氨基丁基)甘氨酸 (N-(4-aminobutyl)glycine)	Nlys
D-蛋氨酸(D-methionine)	Dmet	N-(2-甲硫基乙基)甘氨酸 (N-(2-methylthioethyl)glycine)	Nmet
D-鸟氨酸(D-ornithine)	Dorn	N-(3-氨基丙基)甘氨酸 (N-(3-aminopropyl)glycine)	Norn
D-苯丙氨酸(D-phenylalanine)	Dphe	N-苄基甘氨酸 (N-benzylglycine)	Nphe
D-脯氨酸(D-proline)	Dpro	N-(羟甲基)甘氨酸 (N-(hydroxymethyl)glycine)	Nser
D-丝氨酸(D-serine)	Dser	N-(1-羟乙基)甘氨酸 (N-(1-hydroxyethyl)glycine)	Nthr
D-苏氨酸(D-threonine)	Dthr	N-(3-吡啶乙基)甘氨酸	Nhtrp

[0716]

		(N-(3-indolyethyl)glycine)	
D-色氨酸 (D-tryptophan)	Dtrp	N-(对羟基苯基)甘氨酸 (N-(<i>p</i> -hydroxyphenyl)glycine)	Ntyr
D-酪氨酸 (D-tyrosine)	Dtyr	N-(1-甲基乙基)甘氨酸 (N-(1-methylethyl)glycine)	Nval
D-缬氨酸(D-valine)	Dval	N-甲基甘氨酸 (N-methylglycine)	Nmgly
D-N-甲基丙氨酸 (D-N-methylalanine)	Dnmala	L-N-甲基丙氨酸 (L-N-methylalanine)	Nmala
D-N-甲基精氨酸 (D-N-methylarginine)	Dnmarg	L-N-甲基精氨酸 (L-N-methylarginine)	Nmarg
D-N-甲基天冬酰胺 (D-N-methylasparagine)	Dnmasn	L-N-甲基天冬酰胺 (L-N-methylasparagine)	Nmasn
D-N-甲基天冬氨酸 (D-N-methylaspartate)	Dnmasp	L-N-甲基天冬氨酸 (L-N-methylaspartic acid)	Nmasp
D-N-甲基半胱氨酸	Dnmcys	L-N-甲基半胱氨酸	Nmcys

[0717]

(D-N-methylcysteine)		(L-N-methylcystein e)	
D-N- 甲基谷氨酰胺 (D-N-methylglutamin e)	Dnmgln	L-N- 甲基谷氨酰胺 (L-N-methylglutami ne)	Nmgln
D-N- 甲基谷氨酸 (D-N-methylglutamat e)	Dnmglu	L-N- 甲基谷氨酸 (L-N-methylglutami c acid)	Nmglu
D-N- 甲基组氨酸 (D-N-methylhistidine)	Dnmhis	L-N- 甲基组氨酸 (L-N-methylhistidin e)	Nmhis
D-N- 甲基异亮氨酸 (D-N-methylisoleucin e)	Dnmile	L-N- 甲基异亮氨酸 (L-N-methylisolleuc ine)	Nmile
D-N- 甲基亮氨酸 (D-N-methylleucine)	Dnmleu	L-N- 甲基亮氨酸 (L-N-methylleucine)	Nmleu
D-N- 甲基赖氨酸 (D-N-methyllysine)	Dnmlys	L-N- 甲基赖氨酸 (L-N-methyllysine)	Nmlys
D-N- 甲基蛋氨酸 (D-N-methylmethioni ne)	Dnmmet	L-N- 甲基蛋氨酸 (L-N-methylmethio nine)	Nmmet
D-N- 甲基鸟氨酸 (D-N-methylornithine)	Dnmorn	L-N- 甲基鸟氨酸 (L-N-methylornithin e)	Nmorn

[0718]

D-N- 甲基苯丙氨酸 (D-N-methylphenylal anine)	Dnmphe	L-N- 甲基苯丙氨酸 (L-N-methylphenyla lanine)	Nmphe
D-N- 甲基脯氨酸 (D-N-methylproline)	Dnmpro	L-N- 甲基脯氨酸 (L-N-methylproline)	Nmpro
D-N- 甲基丝氨酸 (D-N-methylserine)	Dnmser	L-N- 甲基丝氨酸 (L-N-methylserine)	Nmser
D-N- 甲基苏氨酸 (D-N-methylthreonin e)	Dnmthr	L-N- 甲基苏氨酸 (L-N-methylthreoni ne)	Nmthr
D-N- 甲基色氨酸 (D-N-methyltryptoph an)	Dnmtrp	L-N- 甲基色氨酸 (L-N-methyltryptop han)	Nmtrp
D-N- 甲基酪氨酸 (D-N-methyltyrosine)	Dnmtyr	L-N- 甲基酪氨酸 (L-N-methyltyrosin e)	Nmtyr
D-N- 甲基缬氨酸 (D-N-methylvaline)	Dnmval	L-N- 甲基缬氨酸 (L-N-methylvaline)	Nmval
L-正亮氨酸 (L-norleucine)	Nle	L-N- 甲基正亮氨酸 (L-N-methylnorleuc ine)	Nmnle
L- 正 缬 氨 酸 (L-norvaline)	Nva	L-N- 甲基正缬氨酸 (L-N-methylnorvali ne)	Nmnva
L- 乙 基 甘 氨 酸	Etg	L-N- 甲基乙基甘氨	Nmetg

[0719]

(L-ethylglycine)		酸 (L-N-methyl-ethylglycine)	
L-叔丁基甘氨酸 (L-t-butylglycine)	Tbug	L-N-甲基-叔丁基甘氨酸 (L-N-methyl-t-butylglycine)	Nmtbug
L-高苯丙氨酸 (L-homophenylalanine)	Hphe	L-N-甲基高苯丙氨酸 (L-N-methyl-homophenylalanine)	Nmhphe
α -萘丙氨酸 (α -naphthylalanine)	Anap	N-甲基- α -萘丙氨酸 (N-methyl- α -naphthylalanine)	Nmanap
青霉胺 (penicillamine)	Pen	N-甲基青霉胺 (N-methylpenicillamine)	Nmpen
γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid)	Gabu	N-甲基- γ -氨基丁酸 (N-methyl- γ -aminobutyrate)	Nmgabu
环己基丙氨酸 (cyclohexylalanine)	Chexa	N-甲基-环己基丙氨酸 (N-methyl-cyclohexylalanine)	Nmchexa
环戊丙氨酸	Cpen	N-甲基-环戊基丙	Nmcpen

[0720]

(cyclopentylalanine)		氨 酸 (N-methyl-cyclopentylalanine)	
α -氨基- α -甲基丁酸酯(α -amino- α -methylbutyrate)	Aabu	N-甲基- α -氨基- α -甲基丁酸酯(N-methyl- α -amino- α -methylbutyrate))	Nmaabu
α -氨基异丁酸(α -aminoisobutyric acid)	Aib	N-甲基- α -氨基异丁酸酯(N-methyl- α -aminoisobutyrate)	Nmaib
D- α -甲基精氨酸(D- α -methylarginine)	Dmarg	L- α -甲基精氨酸(L- α -methylarginine)	Marg
D- α -甲基天冬酰胺(D- α -methylasparagine)	Dmasn	L- α -甲基天冬酰胺(L- α -methylasparagine)	Masn
D- α -甲基天冬氨酸(D- α -methylaspartate)	Dmasp	L- α -甲基天冬氨酸(L- α -methylaspartate)	Masp
D- α -甲基半胱氨酸(D- α -methylcysteine)	Dmcys	L- α -甲基半胱氨酸(L- α -methylcysteine)	Mcys
D- α -甲基谷氨酰胺(D- α -methylglutamine)	Dmglu	L- α -甲基谷氨酰胺(L- α -methylglutamine)	Mglu
D- α -甲基谷氨酸(D- α -methylglutamate)	Dmglu	L- α -甲基谷氨酸(L- α -methylglutamate)	Mglu

[0721]

-methyl glutamic acid)		α -methylglutamate)	
D- α -甲基组氨酸(D- α -methylhistidine)	Dmhis	L- α -甲基组氨酸(L- α -methylhistidine)	Mhis
D- α -甲基异亮氨酸(D- α -methylisoleucine)	Dmile	L- α -甲基异亮氨酸(L- α -methylisoleucine)	Mile
D- α -甲基亮氨酸(D- α -methyllleucine)	Dmleu	L- α -甲基亮氨酸(L- α -methyllleucine)	Mleu
D- α -甲基赖氨酸(D- α -methyllysine)	Dmlys	L- α -甲基赖氨酸(L- α -methyllysine)	Mlys
D- α -甲基蛋氨酸(D- α -methylmethionine)	Dmmet	L- α -甲基蛋氨酸(L- α -methylmethionine)	Mmet
D- α -甲基鸟氨酸(D- α -methylornithine)	Dmorn	L- α -甲基鸟氨酸(L- α -methylornithine)	Morn
D- α -甲基苯丙氨酸(D- α -methylphenylalanine)	Dmphe	L- α -甲基苯丙氨酸(L- α -methylphenylalanine)	Mphe
D- α -甲基脯氨酸(D- α -methylproline)	Dmpro	L- α -甲基脯氨酸(L- α -methylproline)	Mpro
D- α -甲基丝氨酸(D- α -methylserine)	Dmser	L- α -甲基丝氨酸(L- α -methylserine)	Mser
D- α -甲基苏氨酸(D- α -methylthreonine)	Dmthr	L- α -甲基苏氨酸(L- α -methylthreonine)	Mthr

[0722]

-methylthreonine)		α -methylthreonine)	
D- α -甲基色氨酸(D- α -methyltryptophan)	Dmtrp	L- α -甲基色氨酸(L- α -methyltryptophan)	Mtrp
D- α -甲基酪氨酸(D- α -methyltyrosine)	Dmtyr	L- α -甲基酪氨酸(L- α -methyltyrosine)	Mtyr
D- α -甲基缬氨酸(D- α -methylvaline)	Dmval	L- α -甲基缬氨酸(L- α -methylvaline)	Mval
N-环丁基甘氨酸(N-cyclobutylglycine)	Ncbut	L- α -甲基正缬氨酸(L- α -methylnorvaline)	Mnva
N-环庚基甘氨酸(N-cycloheptylglycine)	Nchep	L- α -甲基乙基甘氨酸(L- α -methylethylglycine)	Metg
N-环己基甘氨酸(N-cyclohexylglycine)	Nchex	L- α -甲基-叔丁基甘氨酸(L- α -methyl- <i>t</i> -butylglycine)	Mtbug
N-环癸基甘氨酸(N-cyclodecylglycine)	Ncdec	L- α -甲基-高苯丙氨酸(L- α -methyl-homophenylalanine)	Mhphe
N-环十二烷基甘氨酸	Ncdod	α -甲基- α -萘丙氨酸(α -methyl- α -naphthylalanine)	Manap

[0723]

(N-cyclododecylglycine)		-naphthylalanine)	
N-环辛基甘氨酸 (N-cyclooctylglycine)	Ncoct	α -甲基青霉胺(α -methylpenicillamine)	Mpen
N-环丙基甘氨酸 (N-cyclopropylglycine)	Ncpro	α -甲基- γ -氨基丁酸 (α -methyl- γ -aminobutyrate)	Mgabu
N-环十一烷基甘氨酸 (N-cycloundecylglycine)	Ncund	α -甲基-环己基丙氨酸 (α -methyl-cyclohexylalanine)	Mchexa
N-(2-氨基乙基)甘氨酸 (N-(2-aminoethyl)glycine)	Naeg	α -甲基-环戊基丙氨酸 (α -methyl-cyclopentylalanine)	Mcpen
N-(2,2-二苯乙基)甘氨酸 (N-(2,2-diphenylethyl)glycine)	Nbhm	N-(N-(2,2-二苯乙基)氨基甲甲基-甘氨酸 (N-(N-(2,2-diphenylethyl)carbonylmethyl-glycine)	Nnbhm
N-(3,3-二苯丙基)甘氨酸 (N-(3,3-diphenylpropyl)glycine)	Nbhe	N-(N-(3,3-二苯丙基)氨基甲甲基-甘氨酸	Nnbhe

		(N-(N-(3,3-diphenylpropyl)carbonyl)met hyl-glycine)	
[0724]	1-羧基-1-(2,2-二苯基 乙基氨基)环丙烷 (1-carboxy-1-(2,2-dip henyl ethylamino)cycloprop ane)	Nmbc	1,2,3,4-四氢异喹啉 -3-羧酸 (1,2,3,4-tetrahydrois oquinoline-3-carbox ylic acid)
	磷酸丝氨酸 (phosphoserine)	pSer	磷酸苏氨酸 (phosphothreonine)
	磷酸酪氨酸 (phosphotyrosine)	pTyr	邻甲基酪氨酸 (O-methyl-tyrosine)
	2-氨基己二酸 (2-aminoadipic acid)		羟赖氨酸 (hydroxylysine)

[0725] 本发明的一些实施例的所述数个肽优选地以一线性形式使用, 尽管将理解, 在环化不会严重干扰肽特性的情况下, 也可以使用所述肽的环形式。

[0726] 由于本发明的异二聚体优选地用于要求异二聚体为可溶性形式的疗法中, 因此本发明的一些实施例的肽包括一或多种非天然或天然极性氨基酸, 包括但不限于丝氨酸及苏氨酸, 由于其含羟基的侧链能够增加肽的溶解性。

[0727] 本发明的肽的氨基酸可以保守地或非保守地被取代。

[0728] 本文使用的术语“保守取代”是指用一天然或非天然存在的氨基酸或具有类似立体特性的拟肽取代肽中天然序列中存在的氨基酸。如果要取代的天然氨基酸的所述侧链是极性或疏水性的, 则保守取代应使用一天然氨基酸、一非天然存在的氨基酸、或具有极性或疏水性的一拟肽部分 (除了具有与被取代氨基酸侧链相同的空间特性)。

[0729] 由于天然氨基酸通常根据其性质进行分组, 考虑到根据本发明, 用空间相似的非带电氨基酸取代带电氨基酸被认为是保守取代, 可以容易地确定由天然存在的氨基酸进行的保守取代。

[0730] 为了通过非天然氨基酸产生保守取代, 也可以使用本领域众所周知的氨基酸类似物 (合成氨基酸)。天然氨基酸的一拟肽体在熟练从业者已知的文献中有很好的记载。

[0731] 当影响保守取代时, 所述取代氨基酸应在所述侧链中具有与所述原始氨基酸相同或相似的官能团。

[0732] 提供功能相似的氨基酸的保守取代表是本领域熟知的。关于哪些氨基酸变化可能是表型沉默的指导也可以在Bowie等人,1990年,Science 247:1306-1310中找到。这种保守修饰的数个变体是除了而不是排除多态性变体、种间同源物及等位基因。典型的保守取代包括但不限于:1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4)精氨酸(R)、赖氨酸(K);5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、缬氨酸(V);6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T);及8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参见,例如,Creighton,Proteins(1984))。氨基酸可以根据与侧链相关的性质进行取代,例如,具有极性侧链的氨基酸可以被取代,例如丝氨酸(S)及苏氨酸(T);基于侧链电荷的氨基酸,例如精氨酸(R)及组氨酸(H);及具有疏水侧链的氨基酸,例如缬氨酸(V)及亮氨酸(L)。正如所指出的,变化通常具有较小的性质,例如不会显著影响蛋白质折叠或活性的保守氨基酸取代。

[0733] 如本文所用的短语“非保守取代”是指将存在于亲本序列中的氨基酸取代为具有不同电化学及/或空间特性的另一天然或非天然存在的氨基酸。因此,取代氨基酸的所述侧链可以显著大于(或小于)被取代的天然氨基酸的侧链及/或可以具有与被取代的氨基酸具有显著不同电子特性的官能团。这种类型的非保守取代的数个范例包括用苯丙氨酸(phenylalanine)或环己基甲基甘氨酸(cyclohexylmethyl glycine)取代丙氨酸(alanine)、用异亮氨酸(isoleucine)取代甘氨酸(glycine)、或用 $\text{NH-CH}[(\text{CH}_2)_5\text{COOH}]$ 取代天冬氨酸(aspartic acid)。落入本发明范围内的那些非保守取代是仍然构成具有抗菌特性的肽的那些。

[0734] 本发明的所述数个肽的所述N及C末端可以被官能团保护。合适的官能团描述于Green及Wuts,“Protecting Groups in Organic Synthesis”,John Wiley and Sons,Chapter 5 and 7,1991,其教导通过引用并入本文。优选的保护基团是促进与其连接的化合物转运到细胞中的那些,例如,通过降低化合物的亲水性及增加化合物的亲油性。

[0735] 根据数个特定实施例,一或多种氨基酸可以通过例如添加一官能团来修饰(概念上视为“化学修饰的”)。例如,天然序列中出现的侧链氨基酸残基可以任选地被修饰,尽管如下文所述,所述蛋白质的其他部分可以任选地被修饰,除了或代替侧链氨基酸残基。如果遵循化学合成过程,例如通过添加一化学修饰的氨基酸,则可以在分子合成期间任选地进行修饰。然而,当氨基酸已经存在于所述分子中时,对氨基酸进行化学修饰(“原位”修饰)也是可能的。举例而言,可以通过基因合成、位点指引(site-directed)(例如,基于PCR)或随机诱变(random mutagenesis)(例如,EMS)通过外切核酸酶缺失、通过化学修饰或通过融合编码异源结构域或结合的多核苷酸序列来引入对所述肽或蛋白质的修饰。

[0736] 如本文所用,术语“化学修饰”在提及一肽时是指通过天然过程如加工或其他转译后修饰或通过本领域熟知的化学修饰技术来修饰至少一氨基酸残基。非限制性示例性修饰类型包括羧甲基化、乙酰化、酰化、磷酸化、糖基化、酰胺化、ADP-核糖基化、脂肪酰化、法呢基、异法呢基、碳水化合物基团、脂肪酸基团的添加(addition of farnesyl group, an isofarnesyl group, a carbohydrate group, a fatty acid group)、用于缀合、功能化、GPI锚形成的一连接体(a linker for conjugation, functionalization, GPI anchor formation)、一脂质或脂质衍生物的共价连接(covalent attachment of a lipid or lipid derivative)、甲基化、十四烷基化、聚乙二醇化、异戊二烯化、磷酸化、泛素化或任何

类似的过程及已知的保护/封闭基团。醚键可以任选地用于将丝氨酸 (serine) 或苏氨酸羟基 (threonine hydroxyl) 连接到一糖的羟基上。酰胺键 (Amide bonds) 可任选用于将谷氨酸或天冬氨酸羧基连接到一糖上的一氨基上 (Garg及Jeanloz, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 第43卷, Academic Press (1985); Kunz, *Ang.Chem.Int.Ed.English* 26:294-308 (1987))。还可以任选地在氨基酸及碳水化合物之间形成缩醛及缩酮键 (Acetal and ketal bonds)。脂肪酸酰基衍生物可以任选地例如通过一游离氨基 (例如赖氨酸) 的酰化来制备 (Toth等人, *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, Rivier and Marshal, eds., ESCOM Publ., Leiden, 1078-1079 (1990))。

[0737] 根据数个特定实施例, 所述数个修饰包括向肽添加一环烷部分, 如PCT申请案W0 2006/050262中所述, 所述申请案通过引用并入本文, 如同在本文中完整阐述一样。这些部分被设计用于与生物分子一起使用并且可以任选地用于赋予蛋白质各种特性。

[0738] 此外, 任选地, 可以修饰所述肽上的任何点。例如, 可以任选地进行蛋白质上糖基化部分的聚乙二醇化, 如PCT申请案W0 2006/050247中所述, 所述申请案通过引用并入本文, 如同在本文中完整阐述一样。一或多个聚乙二醇 (PEG) 基团可任选地添加至O-连接及/或N-连接糖基化。PEG基团可以任选地是支链的或直链的。任选地, 任何类型的水溶性聚合物可以通过一糖基连接体连接到一蛋白质上的一糖基化位点。

[0739] “PEG化蛋白质”是指一蛋白质或具有生物活性的其一片段, 其具有与蛋白质的氨基酸残基共价地结合的聚乙二醇 (PEG) 部分。

[0740] “聚乙二醇”或“PEG”是指一聚亚烷基二醇化合物 (polyalkylene glycol compound) 或其一衍生物, 具有或不具有偶联剂或具有偶联或活化部分 (例如, 具有硫醇、三氟甲磺酸酯、三甲苯磺酸酯 (tresylate)、氮丙啶 (aziridine)、环氧乙烷, 或优选具有一马来酰亚胺部分 (maleimide moiety))。例如马来酰亚胺单甲氧基PEG的化合物是本发明的示例性或活化的PEG化合物。其它聚亚烷基二醇化合物, 例如聚丙二醇, 可用于本发明。其他合适的聚亚烷基二醇化合物包括但不限于以下类型的带电或中性聚合物: 葡聚糖 (dextran)、结肠酸 (colominic acids) 或其他基于碳水化合物的聚合物、氨基酸聚合物及生物素衍生物。

[0741] 根据数个特定实施例, 所述肽被修饰以具有一改变的糖基化模式 (即, 从原始或天然糖基化模式改变)。如本文所用, “改变的”是指缺失一或多个碳水化合物部分及/或具有添加至原始蛋白质的至少一糖基化位点。

[0742] 蛋白质的糖基化通常是N-连接或O-连接的。N-连接是指碳水化合物部分连接到一天冬酰胺残基的所述侧链。所述数个三肽序列、天冬酰胺-X-丝氨酸 (asparagine-X-serine) 及天冬酰胺-X-苏氨酸 (asparagine-X-threonine) (其中X是除脯氨酸之外的任何氨基酸) 是所述碳水化合物部分酶促连接到天冬酰胺侧链的识别序列。因此, 一多肽中这些三肽序列中任一者的存在产生了潜在的糖基化位点。O-连接糖基化是指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一者与羟基胺基酸连接, 最常见的是丝氨酸或苏氨酸, 尽管也可以使用5-羟基脯氨酸 (5-hydroxyproline) 或5-羟基赖氨酸 (5-hydroxylysine)。

[0743] 通过改变所述肽的所述氨基酸序列, 使其包含一或多个上述三肽序列 (用于N-连接糖基化位点), 可以方便地将数个糖基化位点添加至一肽中。也可通过在原始肽序列中添加或取代一或多个丝氨酸或苏氨酸残基 (用于O-连接糖基化位点) 来进行改变。所述肽的氨基酸序列也可以通过在所述DNA水平上引入改变而改变。

[0744] 增加所述肽上碳水化合物部分数量的另一方法是通过糖苷 (glycosides) 的化学或酶偶联 (与所述肽的所述氨基酸残基)。根据所使用的偶联模式,所述数个糖可连接到 (a) 精氨酸及组氨酸, (b) 游离羧基, (c) 游离巯基, 如半胱氨酸, (d) 游离羟基, 如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸, (e) 芳香残基, 如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸, 或 (f) 谷氨酰胺的酰胺基。这些方法如 WO 87/05330、Aplin 及 Wriston、CRC Crit.Rev.Biochem., 22:259-306 (1981) 中所述。

[0745] 一肽上存在的任何碳水化合物部分的去除可以通过化学地、酶促地完成或在 DNA 水平上引入数个变化来完成。化学脱糖需要将所述肽暴露于三氟甲基磺酸 (trifluoromethanesulfonic acid) 或一等效化合物中。这种处理会导致除连接糖 (N-乙酰氨基葡萄糖 (N-acetylglucosamine) 或 N-乙酰半乳糖胺 (N-acetylgalactosamine)) 外的大部分或所有糖被切割, 而使所述氨基酸序列保持完整。

[0746] 化学去糖基化描述于 Hakimuddin 等人, Arch.Biochem.Biophys., 259:52 (1987); 及 Edge 等人, Anal.Biochem., 118:131 (1981)。可以通过使用多种糖苷内切酶及外切糖苷酶来酶切数个肽上的数个碳水化合物部分, 如于 Thotakura 等人, Meth.Enzymol., 138:350 (1987) 中所述。

[0747] 根据数个特定实施例, 所述肽包含一可检测标签。如本文所用, 在一实施例中, 术语“可检测标签”是指技术熟练的从业者使用现有技术可以检测到的任何部分。可检测的标签可以是数个肽序列。可选地, 所述可检测标签可通过化学试剂或酶手段 (例如蛋白质水解) 去除。本发明的一些实施例的数个可检测标签可用于所述肽的纯化。例如, 术语“可检测标签”包括甲壳素结合蛋白 (CBP) - 标签、麦芽糖结合蛋白 (MBP) - 标签、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) - 标签、聚 (His) - 标签、FLAG 标签、表位标签 (Epitope tags), 例如 V5 标签、c-myc 标签及 HA 标签, 以及荧光标签, 例如绿色荧光蛋白 (GFP)、红色荧光蛋白 (RFP), 黄色荧光蛋白 (YFP)、蓝色荧光蛋白 (BFP) 及青色荧光蛋白 (CFP); 以及这些标签的衍生物, 或本领域已知的任何标签。术语“可检测标签” (detectable tag) 还包括术语“可检测标记” (detectable marker)。

[0748] 根据数个特定实施例, 所述肽包含附在其 N-末端的一可检测标签 (例如聚 (His) - 标签)。

[0749] 根据数个特定实施例, 所述肽包含附着到其 C-末端的一可检测标签 (例如聚 (His) - 标签)。

[0750] 根据数个特定实施例, 所述肽的 N-末端不包含一可检测标签 (例如聚 (His) - 标签)。

[0751] 根据数个特定实施例, 所述肽的 C-末端不包含一可检测标签 (例如聚 (His) - 标签)。

[0752] 根据数个特定实施例, 所述肽融合到一可切割部分 (cleavable moiety)。因此, 例如, 为了促进恢复, 所表达的编码序列可以被设计成编码本发明的一些实施例的所述肽及融合的可切割部分。在一实施例中, 所述肽设计成使得其易于通过亲和层析分离; 例如, 通过固定在特定于可切割部分的一管柱上。在一实施例中, 在所述肽及所述可切割部分之间设计一切割位点, 并且可通过使用在所述位点特异性切割所述融合蛋白的一适当酶或试剂处理从色谱管柱释放所述肽 [例如, 参见 Booth 等人, Immunol.Lett. 19:65-70 (1988); 及 Gardella 等人, J.Biol.Chem. 265:15854-15859 (1990)]。根据数个特定实施例, 所述肽为一

分离肽。

[0753] 包含本发明的一些实施例中的相同实施例的所述数个肽及数个异二聚体可以通过肽合成领域的技术人员已知的任何技术来合成及纯化,例如但不限于数个固相及重组技术。

[0754] 对于固相肽合成,可在以下文献J.M.Stewart and J.D.Young,Solid Phase Peptide Synthesis,W.H.Freeman Co.(San Francisco),1963and J.Meienhofer,Hormonal Proteins and Peptides,vol.2,p.46,Academic Press(New York),1973中找到。关于经典溶液合成,参见文献G.Schroder and K.Lupke,The Peptides,vol.1,Academic Press(New York),1965。

[0755] 一般而言,这些方法包括将一或多个氨基酸或适当保护的氨基酸顺序添加到一生长的肽链中。通常,所述第一氨基酸的氨基或羧基受合适的一保护基保护。然后,在适于形成酰胺键的条件下,通过添加序列中具有适当保护的互补(氨基或羧基)基团的下一氨基酸,将所述受保护或衍生的氨基酸连接到惰性固体载体上或在溶液中使用。然后从新添加的氨基酸残基中去除保护基,然后添加下一氨基酸(适当保护),依此类推。在所有所需的氨基酸以正确的顺序连接后,按顺序或同时移除任何剩余的保护基团(及任何固体载体),以提供最终的肽化合物。通过对所述一般程序的简单修改,可以一次向一生长链中添加超过一个的氨基酸,例如,通过(在不使手性中心外消旋的条件(conditions which do not racemize chiral centers)下)将一受保护的三肽与一适当保护的二肽偶联,在脱保护后形成一五肽等。肽合成的进一步描述在美国专利案第6472505号。

[0756] 制备本发明一些实施例的肽化合物的一优选方法涉及固相肽合成。

[0757] Andersson Biopolymers 2000;55(3):227-50描述了大规模肽合成。

[0758] 根据数个特定实施例,使用体外表达系统合成肽。这种体外合成方法(in vitro synthesis methods)在本领域中是众所周知的并且系统的组分是可商购的。

[0759] 根据数个特定实施例,所述肽或包含它们的异二聚体是通过重组DNA技术产生的。“重组”肽或蛋白质是指通过重组DNA技术产生的肽或蛋白质;即,由编码所需肽或蛋白质的外源DNA构建体转化的细胞产生。

[0760] 因此,根据本发明的另一方面,提供了一种核酸构建体或系统,其包含至少一编码异二聚体的多核苷酸,以及用于指导所述多核苷酸在一宿主细胞中表达的调节元件。

[0761] 根据数个特定实施例,所述多核苷酸至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同源如SEQ ID NO:80及82或SEQ ID NO:80及84所示的核酸序列,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0762] 根据数个特定实施例,所述多核苷酸至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同源如SEQ ID NO:86及82、SEQ ID NO:90及92或SEQ ID NO:86及84所示的核酸序列,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0763] 根据数个特定实施例,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:80及82或SEQ ID NO:80及84,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0764] 根据数个特定实施例,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:86及82、SEQ ID NO:90及92或SEQ ID NO:86及84,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0765] 根据数个特定实施例,所述多核苷酸至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、

96%、97%、98%或99%同源于如在SEQ ID NO:147及82、SEQ ID NO:143及139、SEQ ID NO:145及141、SEQ ID NO:86及139、SEQ ID NO:86及141、SEQ ID NO:147及139、SEQ ID NO:149及139、SEQ ID NO:80及139、SEQ ID NO:155及139、SEQ ID NO:80及151、SEQ ID NO:155及151、SEQ ID NO:80及153、SEQ ID NO:157及82、SEQ ID NO:155及153或SEQ ID NO:159及82所示的核酸序列,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0766] 根据数个特定实施例,所述多核苷酸包含在SEQ ID NO:147及82、SEQ ID NO:143及139、SEQ ID NO:145及141、SEQ ID NO:86及139、SEQ ID NO:86及141、SEQ ID NO:86及141、SEQ ID NO:147及139、SEQ ID NO:149及139、SEQ ID NO:80及139、SEQ ID NO:155及139、SEQ ID NO:80及151、SEQ ID NO:155及151、SEQ ID NO:80及153、SEQ ID NO:157及82、SEQ ID NO:155及153或SEQ ID NO:159及82中,每种可能性代表本发明的一单独实施例。

[0767] 如本文所用,术语“多核苷酸”指以一RNA序列、一互补多核苷酸序列(cDNA)、一基因组多核苷酸序列及/或一复合多核苷酸序列(例如,上述组合)的形式分离及提供的一单链或双链核酸序列。

[0768] 根据数个特定实施例,本文公开的任何多核苷酸及核酸序列可包含数个保守的核酸取代。数个保守修饰的多核苷酸是指编码相同或基本相同氨基酸序列的核酸,或在核酸不编码一氨基酸序列的情况下,指基本相同或相关(例如,自然连续)序列。由于遗传密码的退化性,大量功能相同的核酸编码大多数蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG及GCU都编码氨基酸丙氨酸(alanine)。因此,在一丙氨酸由一密码子指定的每个位置,所述密码子可以被改变为所述的另一相应密码子,而不改变编码的多肽。这种核酸变异是“沉默变异”,这是保守修饰的多核苷酸的一种。根据数个特定实施例,本文所述的编码多肽的任何多核苷酸及核酸序列也描述核酸的沉默变体。技术人员会认识到,在某些情况下,核酸中的每个密码子(除了通常为蛋氨酸(methionine)唯一密码子的AUG及通常为色氨酸(tryptophan)唯一密码子的TGG)都可以被修饰以产生功能相同的分子。因此,编码一多肽的一多核苷酸的沉默变体隐含在所述序列中,所述序列与表达产物有关。

[0769] 为了在哺乳动物细胞中表达一外源性多肽,优选将编码所述多肽的一多核苷酸序列连接到适于哺乳动物细胞表达的一核酸构建体中。这种核酸构建体包括一启动子序列,用于以一组成性或可诱导的方式在细胞中指导多核苷酸序列的转录。

[0770] 根据数个特定实施例,所述调节元件是一异源调节元件。

[0771] 本发明的一些实施例的所述核酸构建体(在本文中也称为一“表达载体”)包括使所述载体适于原核生物、真核生物或优选两者(例如穿梭载体)中的复制及整合的数个附加序列。此外,一典型的克隆载体还可以包含一转录及转译起始序列、一转录及转译终止子以及一多聚腺苷酸化信号。举例来说,此类构造通常将包括一5'LTR、一tRNA结合位点、一包装信号、第二链DNA合成的一起源、以及一3'LTR或其一部分。

[0772] 本发明的一些实施例的所述核酸构建物通常包括用于从放置所述肽的一宿主细胞分泌所述肽的一信号序列。优选地,用于此目的的信号序列是哺乳动物信号序列或本发明一些实施例的多肽变体的信号序列。

[0773] 数个真核启动子通常包含两种识别序列、所述TATA盒及上游启动子元件。所述TATA盒位于所述转录起始位点上游25个至30个碱基对,被认为参与引导RNA聚合酶开始RNA

合成。其他上游启动子元件决定转录启动的速率。

[0774] 优选地,本发明一些实施例的所述核酸构建体所使用的启动子在转化的特定细胞群中是活性的。细胞类型特异性及/或组织特异性启动子的数个范例包括数个启动子,例如肝特异性白蛋白[Pinkert等人,(1987) *Genes Dev.* 1:268-277]、淋巴特异性启动子[Calame等人,(1988) (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275];尤其是T细胞受体的启动子[Winoto等人,(1989) *EMBO J.* 8:729-733]及免疫球蛋白;[Banerji等人,(1983) *Cell* 33729-740]、神经元特异性启动子,如神经丝启动子[Byrne等人,(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477]、胰腺特异性启动子[Edlunch等人,(1985) *Science* 230:912-916]或乳腺特异性启动子,如乳清启动子(美国专利案第4873316号及欧洲申请案公开案第264166号)。

[0775] 数个增强子元件可以从连接的同源或异源启动子刺激多达1000倍的转录。当增强子位于转录起始位点的下游或上游时,增强子是激活的。许多来源于病毒的增强子元件具有一广泛的宿主范围,并在多种组织中具有活性。例如,所述SV40早期基因增强子适用于多种细胞类型。适用于本发明一些实施例的其他增强子/启动子组合包括衍生自多瘤病毒、人或鼠巨细胞病毒(CMV)、来自各种逆转录病毒(例如鼠白血病病毒、鼠肉瘤病毒及HIV)的长期重复序列的增强子/启动子组合。参见Enhancers and Eukaryotic Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1983, 通过引用并入本文。

[0776] 在表达载体的构建中,所述启动子优选定位在与异源转录起始点的距离与其在自然环境中与转录起始点的距离大致相同的位置。然而,如本领域所知,可以在不损失启动子功能的情况下调节所述距离中的一些变化。

[0777] 还可以将多聚腺苷酸化序列添加到[表达载体中,以提高mRNA转译的效率。准确有效的多聚腺苷酸化需要两个不同的序列元件:位于多聚腺苷酸化位点下游的富含GU或U的序列及位于上游11个至30个核苷酸的高度保守的六个核苷酸序列AAAA。适用于本发明一些实施例的终止及聚腺苷酸化信号包括衍生自SV40的信号。

[0778] 除了已经描述的元件外,本发明的一些实施例的表达载体通常可包含旨在提高克隆核酸的表达水平或促进携带重组DNA的细胞的鉴定的其他专门元件。例如,许多动物病毒含有DNA序列,可以促进病毒基因组在允许细胞类型中的额外染色体复制。携带这些病毒复制子的质粒,只要由携带在质粒上或所述宿主细胞的所述基因组中的基因提供所述数个适当的因子,就可以在上位体(episomally)复制。

[0779] 所述载体可能包括也可能不包括一真核复制子(eukaryotic replicon)。如果存在真核复制子,则所述载体可在真核细胞中使用适当的选择标记进行扩增。如果所述载体不包含真核复制子,则不可能进行上位体扩增。相反地,重组DNA整合到所述工程细胞的所述基因组中,所述启动子在所述工程细胞的所述基因组中指导所需核酸的表达。

[0780] 本发明的一些实施例的表达载体可进一步包括数个额外的多核苷酸序列,其允许例如从单一mRNA转译多个蛋白质,例如一内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES) 及用于启动子嵌合多肽的基因组整合的序列。

[0781] 因此,根据数个特定实施例,包含在所述异二聚体中的两种单体均由单一结构表达。

[0782] 根据数个其他特定实施例,包含在所述异二聚体中的每一单体由不同的结构表达。

[0783] 应当理解,表达载体中包含的各个元件可以各种配置排列。例如,增强子元件、启动子等、甚至编码以“头尾”构型排列的所述数个单体或所述数个异二聚体的所述(数个)多核苷酸序列,可以作为一反向补体、或一互补构型、作为一反平行链存在。虽然表达载体的非编码元件更有可能发生这种多样性的配置,但也设想了表达载体内编码序列的取代配置。

[0784] 哺乳动物表达载体的数个范例包括但不限于可从Invitrogen获得pcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pGL3、pZeoSV2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、pNMT81;可从Promega获得的pCI;可从Stratagene获得的pMbac、pPbac、pBK RSV及pBK CMV;可从Clontech获得的pTRES及其衍生物。

[0785] 还可以使用包含来自真核病毒(如反转录病毒)的数个调控元件的表达载体。SV40载体包括pSVT7及pMT2。源于牛乳头状瘤病毒的载体包括pBV-1MTHA,源于Epstein Bar病毒的载体包括pHEB0及p205。其他示例性载体包括pMSG、pAV009/A+、pMT010/A+、pMAMneo-5、杆状病毒pDSVE,以及允许在SV-40早期启动子(SV-40 early promoter)、SV-40晚期启动子(SV-40 later promoter)、金属硫蛋白启动子(metallothionein promoter)、小鼠乳腺肿瘤病毒启动子(murine mammary tumor virus promoter)、劳斯肉瘤病毒启动子(Rous sarcoma virus promoter)、多面体启动子(polyhedrin promoter)的指导下表达蛋白质的任何其他载体,或其他在真核细胞中有效表达的启动子。

[0786] 如上所述,病毒是非常特殊的传染源,在许多情况下,它们进化为逃避宿主防御机制。通常,病毒会在特定的细胞类型中感染及传播。病毒载体的靶向特异性利用其天然特异性来特异性地靶向预定的细胞类型,从而将重组基因引入感染细胞。因此,本发明的一些实施例所使用的载体的类型将取决于所转换的细胞类型。根据转化的细胞类型选择合适载体的能力完全在本领域技术人员的能力范围内,因此本文不提供选择考虑的一般描述。例如,骨髓细胞可使用人类T细胞白血病病毒I型(human T cell leukemia virus type I,HTLV-I)靶向,肾细胞可使用杆状病毒自体签名加州核型多角体病毒(baculovirus Autographa californica nucleopolyhedrovirus,AcMNPV)中存在的异源启动子靶向,如Liang CY等人2004年(Arch Virol.149:51-60)中所述。

[0787] 重组病毒载体可用于单体及异二聚体的体内表达,因为它们具有侧向感染及靶向特异性等优点。横向感染是反转录病毒生命周期中固有的,是单一受感染细胞产生许多子代病毒粒子的过程,这些子代病毒粒子发芽并感染相邻细胞。结果是一大片区域迅速感染,其中大部分最初并没有被原始病毒颗粒感染。这与垂直型感染形成对比,在垂直型感染中,传染源仅通过子代传播。也可以产生无法横向传播的病毒载体。如果期望的目的是只将特定基因导入局部数量的靶细胞,则所述特性可能有用。

[0788] 可以使用各种方法将本发明的一些实施例的表达载体引入细胞。此类方法通常描述于Sambrook等人Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Springs Harbor Laboratory,New York(1989,1992);Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley and Sons,Baltimore,Md.(1989);Chang等人,Somatic Gene Therapy,CRC Press,Ann Arbor,Mich.(1995);Vega等人,Gene Targeting,CRC Press,Ann Arbor Mich.(1995),Vectors:A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their

Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) and Gilboa等人[Biotechniques 4(6):504-512, 1986], 并包括例如稳定或瞬时转染、脂质体感染、电穿孔及重组病毒载体感染。此外, 请参见美国专利案第5464764号及第5487992号用于数个正负选择方法。

[0789] 通过病毒感染引入核酸比其他方法(如脂质体感染及电穿孔)具有一些优势, 因为由于病毒的传染性, 可以获得更高的转染效率。

[0790] 目前首选的体内核酸转移技术包括用病毒或非病毒构建物转染, 例如腺病毒、慢病毒、单纯疱疹病毒I型或腺相关病毒(AAV)及脂质系统。用于脂质介导的基因转移的有用脂质为例如DOTMA、DOPE及DC Chol[Tonkinson等人Cancer Investigation, 14(1):54-65(1996)]。用于基因治疗的最优选建构体是病毒, 最优选为腺病毒、AAV、慢病毒或反转录病毒。例如反转录病毒构建体的病毒构建体包括至少一转录启动子/增强子或位点定义元件, 或通过例如交替剪接、核RNA输出或信使的转译后修饰等其他手段控制基因表达的其他元件。这种载体结构还包括包装信号、长末端重复序列(LTR)或其部分, 以及适用于所用病毒的正链及负链引物结合位点, 除非它已经存在于病毒结构中。此外, 这种建构体通常包括用于从放置所述肽的宿主细胞分泌所述肽的信号序列。优选地, 用于此目的的信号序列是哺乳动物信号序列或本发明一些实施例的多肽变体的信号序列。任选地, 所述建构体还可以包括指示多聚腺苷酸化的信号、以及一或多个限制位点及转译终止序列。举例来说, 此类建构体通常将包括一5'LTR、一tRNA结合位点、一包装信号、一第二链DNA合成的一起源、以及3'LTR或其一部分。可以使用其他非病毒载体, 例如阳离子脂质、聚赖氨酸及树状大分子(dendrimers)。

[0791] 如前所述, 除了包含用于插入的编码序列的转录及转译的必要元件外, 本发明的一些实施例的表达构建物还可以包括经设计以增强所表达的单体或异二聚体的稳定性、产生、纯化、产率或毒性的序列。例如, 包含本发明一些实施例的单体或异二聚体及异源蛋白质的融合蛋白或可切割融合蛋白的表达可被工程化。可以设计这样的融合蛋白, 使得可以通过亲和层析容易地分离融合蛋白; 例如, 通过固定在异源蛋白质的特定管柱上。如果在本发明的一些实施例的单体或异二聚体及异源蛋白质之间工程化了切割位点, 则可通过用适当的酶或试剂处理破坏切割位点来从色谱管柱释放所述单体或异二聚体[例如, 参见Booth等人Immunol.Lett.19:65-70; 及Gardella等人, (1990) J.Biol.Chem.265:15854-15859]。

[0792] 本发明还涉及包含本文所述组合物的细胞。

[0793] 因此, 根据本发明的一方面, 提供了一种包含所述异二聚体或核酸构建体或系统的一宿主细胞。

[0794] 如上所述, 多种原核或真核细胞可用作宿主表达系统, 以表达本发明一些实施例的异二聚体。这些包括但不限于微生物, 例如用含有编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌; 用含有编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母; 感染重组病毒表达载体(如花椰菜花叶病毒(cauliflower mosaic virus)、CaMV、烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus)、TMV)或用含有编码序列的重组质粒表达载体(如Ti质粒)转化的植物细胞系统。哺乳动物表达系统也可用于表达本发明一些实施例的所述多肽。

[0795] 细菌构建体的数个范例包括大肠杆菌表达载体的pET系列[Studier等人, (1990) Methods in Enzymol.185:60-89]。

[0796] 可与本发明的教导一起使用的真核细胞的实例包括但不限于哺乳动物细胞、真菌

细胞、酵母细胞、昆虫细胞、藻类细胞或植物细胞。

[0797] 在酵母中,可以使用含有组成型或诱导型启动子的许多载体,如美国专利中所披露。申请编号:5932447。或者,可以使用载体促进外源DNA序列整合到酵母染色体中。

[0798] 在使用植物表达载体的情况下,编码序列的表达可由多个启动子驱动。例如,CaMV的35S RNA及19S RNA启动子等病毒启动子[Brisson等人,(1984) Nature 310:511-514]、或TMV的外壳蛋白启动子[Takamatsu等人,(1987) EMBO J.6:307-311]可以使用。或者,例如RUBISCO的小亚基[Coruzzi等人,(1984) EMBO J.3:1671-1680及Brogli等人,(1984) Science 224:838-843]的植物启动子或例如大豆hsp17.5-E或hsp17.3-B[Gurley等人,(1986), Mol.Cell.Biol.6:559-565]的热休克促进剂可以被使用。这些构建体可以使用Ti质粒、Ri质粒、植物病毒载体、直接DNA转化、微量注射、电穿孔及本领域技术人员熟知的其他技术引入植物细胞。例如,参见Weissbach&Weissbach,1988,Methods for Plant Molecular Biology,Academic Press,NY,Section VIII,pp 421-463。

[0799] 本发明的一些实施例也可以使用本领域公知的其他表达系统,例如昆虫及哺乳动物宿主细胞系统。

[0800] 根据数个特定实施例,所述细胞为一哺乳动物细胞。

[0801] 根据数个特定实施例,所述细胞是一人类细胞。

[0802] 根据数个特定实施例,所述细胞为一细胞系。

[0803] 根据另一数个特定实施例,所述细胞是一主细胞。

[0804] 所述细胞可以来自合适的组织,包括但不限于血液、肌肉、神经、大脑、心脏、肺、肝脏、胰腺、脾脏、胸腺、食道、胃、肠、肾、睾丸、卵巢、头发、皮肤、骨、乳房、子宫、膀胱、脊髓或各种体液。这些细胞可能来自任何发育阶段(包括胚胎、胎儿及成人阶段)以及发育起源(即外胚层、中胚层及内胚层起源)。

[0805] 哺乳动物细胞的数个非限制性范例包括由SV40转化的猴肾CV1系(COS,例如COS-7、ATCC CRL 1651);人类胚胎肾系(HEK293或HEK293细胞亚克隆,用于悬浮培养生长,Graham等人,J.Gen Virol.,36:59 1977);幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);小鼠支持细胞(TM4,Mather,Biol.Reprod.,23:243-251 1980);猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HeLa,ATCC-cc12);NIH3T3,Jurkat,犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);水牛-大鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.,383:44-68 1982);MRC5细胞;FS4细胞;以及一人肝癌细胞系(Hep G2)、PER.C6、K562及中国仓鼠卵巢细胞(CHO)。

[0806] 根据本发明的一些实施例,哺乳动物细胞选自中国仓鼠卵巢(CHO),HEK293,PER.C6、HT1080、NS0、Sp2/0、BHK、Namalwa、COS、HeLa及Vero细胞所组成的群组。

[0807] 根据本发明的一些实施例,所述宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)、PER.C6或一293(例如Expi293F)细胞。

[0808] 根据本发明的另一方面,提供了一种制备一异二聚体的方法,所述方法包括在一宿主细胞中表达所述核酸构建体或系统。

[0809] 根据数个特定实施例,所述产物包括在哺乳动物细胞中表达并在32°C至37°C、5%至10%CO₂下培养5天至13天。

[0810] 可用于本发明数个特定实施例的制备条件的数个非限制性范例在下面的范例部分中公开。

[0811] 因此,例如,编码所述异二聚体的一表达载体在一哺乳动物细胞中表达,例如 Expi293F或ExpiCHO细胞。然后,根据Expi293F或ExpiCHO细胞制造商说明书(Thermo),将转导的细胞在32°C-37°C的5%-10%CO₂的细胞特异性培养基中培养,并在培养至少5天后,从上清液中收集蛋白质并纯化。

[0812] 根据数个特定实施例,所述培养物以分批、分批、补料分批或灌注模式操作。

[0813] 根据数个特定实施例,所述培养物在补料分批条件下操作。

[0814] 根据数个特定实施例,所述培养步骤在36.5°C下进行。

[0815] 根据数个特定实施例,所述培养步骤在36.5°C时生效,温度变化至32°C。这种温度变化可以在到达固定相之前减缓了细胞代谢。

[0816] 根据数个特定实施例,所述方法包括将二聚化部分添加到所表达的氨基酸序列,即添加到所述i型膜蛋白的氨基酸序列及所述II型膜蛋白的氨基酸序列。

[0817] 根据数个特定实施例,所述方法包括分离所述异二聚体。

[0818] 根据数个特定实施例,在培养中的适当时间后影响重组异二聚体的回收。根据数个特定实施例,回收重组异二聚体指收集含有异二聚体的整个培养基,且无需暗示额外的分离或纯化步骤。根据数个特定实施例,本发明的一些实施例的异二聚体可使用多种标准蛋白质纯化技术进行纯化,例如但不限于亲和层析(affinity chromatography)、离子交换层析(ion exchange chromatography)、过滤、电泳、疏水作用层析(hydrophobic interaction chromatography)、凝胶过滤层析(gel filtration chromatography)、反相色谱法(reverse phase chromatography)、刀豆球蛋白A色谱法(concanavalin A chromatography)、混合模式色谱法(mix mode chromatography)、金属亲和色谱法(metal affinity chromatography)、凝集素亲和色谱法(Lectins affinity chromatography)、色谱聚焦法(chromatofocusing)及差异增溶法(differential solubilization)。

[0819] 根据数个特定实施例,在制备步骤及纯化步骤后,可在体内或体外分析异二聚体的治疗效果。此类方法为本领域所知,并包括例如细胞活力、转基因小鼠的存活及激活标记物的表达。

[0820] 本发明的一些实施例的组合物(例如,所述异二聚体、编码所述异二聚体的核酸构建体或系统及/或细胞)可施加于一生物体本身,或施加于与适当载体或赋形剂混合的药物组合物中。

[0821] 因此,在一些实施例中,本发明的特征在于包含治疗有效量的本文所公开的组合物药物组合物。

[0822] 在此,术语“活性成分”指对生物效应负责的组合物(例如,本文所述的异二聚体、核酸结构或系统及/或细胞)。

[0823] 在此,术语“赋形剂”指添加到药物组合物中以进一步促进活性成分施用的惰性物质。赋形剂的数个范例(但不限于)包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖及类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油及聚乙二醇。

[0824] 在下文中,可互换使用的短语“生理上可接受的载体”及“医药上可接受的载体”是指不会对生物体造成显著刺激且不会消除所施用化合物的生物活性及性质的载体或稀释

剂。这些短语中包括一种佐剂。

[0825] 如本文所用,“医药上可接受的载体”包括生理上相容的任何及所有溶剂、分散介质、涂料、抗菌剂及抗真菌剂、等渗剂及吸收延迟剂等。优选地,所述载体适合于静脉、肌肉内、皮下、肠外、脊髓或表皮给药(例如,通过注射或输注)。根据给药途径,活性化合物可包括一或多种医药上可接受的盐。“医药上可接受的盐”是指保留母体化合物所需生物活性且不会产生任何不希望的毒理学效应的盐(参见Berge,S.M.,等人,(1977) J.Pharm).Sci.66:1-19)。此类盐的数个实例包括酸加成盐及碱加成盐。酸加成盐包括衍生自无毒无机酸的盐(例如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、磷等)以及衍生自无毒有机酸的盐(例如脂肪族单羧酸及二羧酸(aliphatic mono-and dicarboxylic acids)、苯基取代烷酸(phenyl-substituted alkanic acids)、羟基烷酸(hydroxy alkanic acids)、芳香酸、脂肪族及芳香族磺酸等)。碱加成盐包括来自碱土金属的盐(例如钠、钾、镁、钙等)以及来自无毒有机胺的盐(例如N,N'-二苄并乙基二胺(N,N'-dibenzylethylenediamine)、N-甲基葡萄糖胺(N-methylglucamine)、氯普鲁卡因(chloroprocaine)、胆碱(choline)、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因(procaine)等)。

[0826] 根据本发明的至少一些实施例的药物组合物还可包括一医药上可接受的抗氧化剂。医药上可接受的抗氧化剂的数个实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸(ascorbic acid)、半胱氨酸盐酸盐(cysteine hydrochloride)、硫酸氢钠(sodium bisulfate)、焦亚硫酸钠(sodium metabisulfite)、亚硫酸钠(sodium sulfite)等;(2)油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯(ascorbyl palmitate)、丁基羟基苯甲醚(butylated hydroxyanisole,BHA)、丁基羟基甲苯(butylated hydroxytoluene,BHT)、卵磷脂(lecithin)、没食子酸丙酯(propyl gallate)、 α -生育酚(alpha-tocopherol)等;及(3)金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid,EDTA)、山梨醇(sorbitol)、酒石酸(tartaric acid)、磷酸等。根据本发明的至少一些实施例的药物组合物还可包括添加剂,例如洗涤剂及增溶剂(例如TWEEN 20(聚山梨酯-20)、TWEEN 80(聚山梨酯-80))及防腐剂(例如硫柳醇、苯甲醇)以及填充剂(例如乳糖、甘露醇)。

[0827] 可用于根据本发明至少一些实施例的药物组合物中的合适水性及非水性载体的所述范例包括水、各种缓冲液含量的缓冲盐水(例如,Tris-HCl、醋酸盐、磷酸盐)、pH值及离子强度、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其适当混合物、植物油(例如橄榄油)及可注射有机酯(例如油酸乙酯)。

[0828] 例如,可以通过使用涂层材料(如卵磷脂)、在分散的情况下保持所需的粒径,以及通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。

[0829] 这些组合物还可包含助剂(adjuvants),例如防腐剂、润湿剂、乳化剂及分散剂。可通过上述灭菌程序以及通过加入各种抗菌剂及抗真菌剂(例如,尼泊金酯(paraben)、氯丁醇(chlorobutanol)、苯酚山梨酸(phenol sorbic acid)等)来确保防止微生物的存在。还可以期望将等渗剂(例如糖、氯化钠等)包含到组合物中。此外,可注射药物形式的延长吸收可通过加入延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝(aluminum monostearate)及明胶)来实现。

[0830] 医药上可接受的载体包括无菌水溶液或分散体及无菌粉末,用于即席制备无菌注射溶液或分散体。本领域已知将此类介质及试剂用于医药活性物质。除任何常规介质或试剂与活性化合物不相容外,预期其在根据本发明至少一些实施例的药物组合物中的用途。

还可将补充活性化合物并入组合物中。

[0831] 治疗性组合物通常必须在制造及储存条件下为无菌且稳定的。所述组合物可以配制成溶液、微乳、脂质体或其他适合高药物浓度的有序结构。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液体聚乙二醇等)及其适当混合物的溶剂或分散介质。例如,可以通过使用例如卵磷脂的涂层、在分散的情况下保持所需的粒径以及通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。在许多情况下,最好在组合物中包括等渗剂(isotonic agents),例如糖、多元醇(例如甘露醇、山梨醇或氯化钠)。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中包括延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸盐及明胶)来实现。无菌可注射溶液的制备方法是,根据需要将所需量的活性化合物与上述一或多种成分的适当溶剂混合,然后进行灭菌微滤。通常,通过将活性化合物加入含有基本分散介质及上述成分所需的其他成分的无菌载体中来制备分散体(dispersions)。对于用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末,优选的制备方法是真空干燥及冷冻干燥(冻干(lyophilization)),其产生活性成分粉末以及来自先前无菌过滤溶液的任何额外所需成分。

[0832] 无菌可注射溶液的制备方法是,根据需要将所需量的活性化合物与上述一或多种成分的适当溶剂混合,然后进行灭菌微滤。通常,通过将活性化合物加入含有基本分散介质及上述成分所需的其他成分的无菌载体中来制备分散体。对于用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末,优选的制备方法是真空干燥及冷冻干燥(冻干(lyophilization)),其产生活性成分粉末以及来自先前无菌过滤溶液的任何额外所需成分。

[0833] 活性成分的数量可以与载体材料组合产生单一剂型,将根据被治疗对象及特定的给药方式而有所不同。可与载体材料结合以产生单一剂型的活性成分的量通常为产生治疗效果的组合物的量。通常,在100%中与医药上可接受的载体组合,所述量将在活性成分的约0.01%到约99%之间,最好在活性成分的约0.1%到约70%之间,最好在活性成分的约1%到约30%之间。

[0834] 调整剂量方案,以提供最佳预期反应(例如一治疗反应)。例如,可给药一次单剂量,可随时间分几次给药,或可根据治疗情况的紧急情况按比例减少或增加剂量。以剂量单位形式配制肠外组合物尤其有利,以便于给药及剂量均匀性。本文所使用的剂量单位形式是指适合作为待治疗受试者的单一剂量的物理离散单位;每个单元包含预定量的活性化合物,其经计算可产生与所需药物载体相关的预期治疗效果。根据本发明的至少一些实施例的剂量单位形式的说明书直接依赖于(a)活性化合物的独特特性及要达到的特定治疗效果,以及(b)合成此类活性化合物以治疗个体敏感性的技术固有的局限性。

[0835] 药物的配方及给药技术可以在文献“Remington's Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition中找到,通过引用并入本文。

[0836] 本发明的一些实施例的药物组合物可以通过本领域众所周知的方法来制造,例如通过常规的混合、溶解、造粒(granulating)、制备凝胶、征税、乳化、封装、包埋或冻干(lyophilizing)方法。

[0837] 本发明的组合物可以使用本领域已知的多种方法中的一或多种通过一或多种给药途径给药。如本领域技术人员将理解的,给药的路线及/或模式将根据期望的结果而变化。根据本发明的至少一些实施例的治疗剂的优选给药途径包括血管内递送(intravascular delivery)(例如注射或输注)、静脉内(intravenous)、肌肉内

(intramuscular)、皮内 (intradermal)、腹腔内 (intraperitoneal)、皮下 (subcutaneous)、脊柱 (spinal)、口腔、肠道、直肠、肺 (例如吸入)、鼻、局部 (topical) (包括经皮 (transdermal)、口腔 (buccal) 及舌下 (sublingual))、膀胱内 (intravesical)、玻璃体腔内 (intravitreal)、腹腔内 (intraperitoneal)、阴道、脑内给药 (例如脑室内 (intra-cerebroventricular)、脑内 (intra-cerebral) 及对流增强扩散 (convection enhanced diffusion))、中枢神经系统传递 (CNS delivery) (例如鞘内 (intrathecal)、脊髓周围 (perispinal) 及脊髓内 (intra-spinal)) 或肠外 (parenteral) (包括皮下 (subcutaneous)、肌肉内 (intramuscular)、腹腔内 (intraperitoneal)、静脉内 (intravenous) 及皮内 (intradermal))、经皮 (transdermal) (被动或使用离子导入或电穿孔)、跨粘膜 (transmucosal) (例如舌下给药、鼻、阴道、直肠或舌下给药)、给药或通过一植入物给药、或其他非肠道给药途径 (例如通过注射或输注)、或本领域已知的其他给药途径及/或给药形式。本文使用的“肠外给药 (parenteral administration)”一词是指除肠内及局部给药以外的给药方式,通常通过注射,包括但不限于静脉注射 (intravenous)、肌肉注射 (intramuscular)、动脉内 (intraarterial)、鞘内 (intrathecal)、囊内 (intracapsular)、眶内 (intraorbital)、心内 (intracardiac)、皮内 (intradermal)、腹腔内 (intraperitoneal)、经气管 (transtracheal)、皮下 (subcutaneous)、皮下注射 (subcuticular)、关节内注射 (intraarticular)、包膜下注射 (subcapsular)、蛛网膜下腔注射 (subarachnoid)、椎管内注射 (intraspinal)、硬膜外注射 (epidural) 及胸骨内 (intrasternal) 注射、或使用可生物降解的插入物,并可配制成适合每种给药途径的剂型。在数个特定实施例中,根据本发明至少一些实施例的蛋白质、治疗剂或药物组合物可经腹腔内或静脉内给药。

[0838] 根据数个特定实施例,本文所公开的组合物通过肠外注射在水溶液中给药。配方也可以是悬浮液或乳液的形式。一般而言,提供用于肠外注射的药物组合物,包括本文所述组合物的有效量,并且任选地包括医药上可接受的稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂及/或载体。此类组合物任选地包括一或多种用于以下用途的物质:稀释剂、无菌水、各种缓冲液含量 (例如 Tris-HCl、醋酸盐、磷酸盐)、pH 值及离子强度的缓冲盐水;以及洗涤剂及增溶剂等添加剂 (如 TWEEN 20 (聚山梨酯-20)、TWEEN 80 (聚山梨酯-80))、抗氧化剂 (例如,水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、焦亚硫酸钠、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠;油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基苯甲醚 (BHA)、丁基羟基甲苯 (BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚;以及金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸 (EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸)、防腐剂 (如硫柳醇、苯甲醇) 及填充剂 (如乳糖、甘露醇)。非水溶剂或载体的数个范例包括乙醇、丙二醇、聚乙二醇、植物油 (如橄榄油及玉米油)、明胶及可注射有机酯 (如油酸乙酯)。制剂可在使用前立即冷冻干燥 (冻干) 或真空干燥并重新溶解/再悬浮。可通过例如通过保持细菌的过滤器过滤、通过将杀菌剂加入组合物、通过辐射组合物或通过加热组合物来对制剂进行灭菌。

[0839] 本文公开的各种组合物 (例如多肽) 可局部应用。局部给药对大多数肽制剂不起作用,尽管它可以有效,尤其是当应用于肺、鼻、口腔 (舌下、口腔)、阴道或直肠粘膜时。

[0840] 本发明的组合物可在吸入的同时输送至肺部,并在以气溶胶或喷雾干燥的颗粒 (空气动力学直径小于约5微米) 输送时穿过肺上皮衬里进入血流。可以使用设计用于治疗

产品肺部输送的各种机械装置,包括但不限于喷雾器、计量吸入器及粉末吸入器,所有这些都是本领域技术人员所熟悉的。商用设备的一些具体范例是Ultravent雾化器(Mallinckrodt Inc.,密苏里州圣路易斯);Acorn II雾化器(Marquest Medical Products,Englewood,Colo.);Ventolin计量吸入器(Glaxo Inc.,Research Triangle Park,N.C.);以及Spinhaler粉末吸入器(Fisons Corp.,Bedford,Mass.)。Nektar、Alkermes及Mannkind都有可吸入的胰岛素粉制剂,这些制剂已获得批准,或正在临床试验中,所述技术可应用于本文所述的制剂。

[0841] 用于粘膜给药的制剂通常为喷雾干燥的药物颗粒,可并入片剂、凝胶、胶囊、悬浮液或乳剂中。标准药用辅料可从任何配方中获得。口服制剂可以是口香糖、凝胶条、片剂或含片。

[0842] 也可以制备透皮制剂。它们通常是药膏、乳液、喷雾剂或贴片,所有这些都可以使用标准技术来制备。透皮制剂需要加入渗透促进剂。本发明的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可以改变,以获得有效的活性成分的量,以实现特定患者、组合物及给药方式的期望治疗反应,而不对患者有毒。所选剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括所用本发明特定组合物的活性、给药途径、给药时间、所用特定化合物的排泄率、治疗持续时间、其他药物、与所使用的特定成分、年龄、性别、体重、状况、一般健康状况及被治疗患者的既往病史以及医学领域众所周知的类似因素结合使用的化合物及/或材料。

[0843] 根据数个特定实施例,以治疗有效量向受试者施用本文公开的组合物。如本文所用,术语“有效量”或“治疗有效量”指足以治疗、抑制或缓解所治疗疾病的一或多个症状或以其他方式提供期望的药理学及/或生理学效果的剂量。治疗有效量的测定完全在本领域技术人员的能力范围内,尤其是根据本文提供的详细公开。

[0844] 对于本发明方法中使用的任何制剂,可通过体外及细胞培养分析初步估计治疗有效量或剂量。例如,可以在动物模型中配制剂量,以达到所需的浓度或滴度。这些信息可用于更准确地确定人体的有效剂量。本文所述活性成分的毒性及治疗效果可通过体外、细胞培养或实验动物中的标准药物程序确定。从这些体外及细胞培养试验以及动物研究中获得的数据可用于制定用于人体的一系列剂量。剂量可能因使用的剂型及使用的给药途径而异。具体的配方、给药途径及剂量可由个别医生根据患者的情况选择。(例如,参见Fingl等人,1975年,发表在“The Pharmacological Basis of Therapeutics”第1章第1页中)。

[0845] 剂量及间隔可单独调整,以提供足以诱导或抑制生物效应的活性成分水平(最低有效浓度,MEC)。每种制剂的MEC会有所不同,但可以根据体外数据进行估计。达到MEC所需的剂量将取决于个体特征及给药途径。检测分析可用于测定血浆浓度。

[0846] 根据待治疗疾病的严重程度及反应性,可以单次或多次给药,疗程从几天持续到几周,或者直到治愈或疾病状态减轻。

[0847] 当然,服用成分的量将取决于治疗对象、痛苦的严重程度、服用方式、处方医生的判断等。

[0848] 在某些实施例中,局部施用所述组合物(例如,异二聚体、核酸构建物或系统或细胞),例如通过直接注射到待处理部位。通常,注射导致组合物的局部浓度增加,其大于通过全身给药可实现的浓度。所述异二聚体组合物可与如上所述的一底物结合,以通过减少多肽从待处理部位的被动扩散来协助产生一增加的多肽组合物的局部浓度。

[0849] 本发明的药物组合物可与本领域已知的医疗设备一起施用。例如,在可选实施例中,根据本发明的至少一些实施例的药物组合物可以使用针头皮下注射装置施用,例如美国专利案第5399163号;第5,383,851号;第5,312,335号;第5,064,413号;第4,941,880号;第4,790,824号;或第4596556号中公开的装置。在本发明中有用的已知植入物及模块的数个范例包括:美国专利案第4487603号,公开了一种可植入式微量输液泵,用于以受控速率分配药物;美国专利案第4486194号,公开了一种通过皮肤给药的治疗装置;美国专利案第4447233号,公开了一种用于以精确输注速率输送药物的药物输注泵;美国专利案第4447224号,公开了一种用于连续给药的可变流量植入式输液器;美国专利案第4439196号,其公开了一种具有多室的腔室的渗透性药物递送系统;还有美国专利案第4475196号,公开了一种渗透性药物递送系统。这些专利通过引用并入本文。本领域技术人员已知许多其他此类植入物、递送系统及模块。

[0850] 活性化合物可以用保护化合物不被快速释放的载体制备,例如一控制释放制剂,包括植入物、透皮贴片及微胶囊递送系统。可使用可生物降解的生物相容性聚合物,如乙烯-醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚正交酯及聚乳酸。制备此类制剂的许多方法已获得专利或为本领域技术人员所熟知。参见例如Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0851] 在植入一聚合物装置(杆(rod)、柱(cylinder)、膜(film)、盘(disk))或注射(微粒)后,可以制备用于系统性长期释放的控制释放聚合物装置。所述底物可以是微球等微粒的形式,其中肽分散在固体聚合物底物或微胶囊中,其中核心由不同于聚合物壳的材料制成,并且肽分散或悬浮在核心中,核心可以是液体或固体。除非本文明确规定,否则微粒、微球及微胶囊可互换使用。或者,所述聚合物可以浇铸(cast)为纳米到四厘米的薄片或薄膜、通过研磨或其他标准技术产生的粉末,甚至是凝胶,例如水凝胶。

[0852] 不可生物降解或可生物降解底物可用于递送本文所公开的活性剂,尽管可生物降解底物是优选的。这些可能是天然或合成聚合物,但由于降解及释放曲线的更好表征,合成聚合物是首选。根据需要释放的时间段选择聚合物。在某些情况下,线性释放可能最有用,但在其他情况下,脉冲释放或“批量释放”可能提供更有效的结果。聚合物可以是水凝胶的形式(通常吸收高达约90重量%的水),并且可以任选地与多价离子或聚合物交联。

[0853] 所述底物可以通过溶剂蒸发、喷雾干燥、溶剂萃取及本领域技术人员已知的其他方法形成。生物可降解微球可以使用为制备药物递送用微球而开发的任何方法制备,例如描述于Mathiowitz and Langer, J. Controlled Release, 5:13-22 (1987); Mathiowitz等人, Reactive Polymers, 6:275-283 (1987); 及Mathiowitz等人, J. Appl Polymer Sci, 35:755-774 (1988)。

[0854] 这些装置可以被配制成为局部释放,用于治疗植入或注射区域——通常会提供远低于全身治疗剂量的剂量——或全身释放。它们可以被植入或注射到皮下、肌肉、脂肪或被吞咽。

[0855] 在某些实施例中,为了确保根据本发明至少一些实施例的治疗性化合物穿过BBB(如果需要),它们可以例如在脂质体中配制。有关脂质体的制造方法,请参见例如美国专利案第4522811号;第5,374,548号;及第5399331号。脂质体可包含一或多个选择性运输到特定细胞或器官中的部分,从而增强靶向药物递送(例如参见V.V. Ranade (1989))

J.Clin.Pharmacol.29:685)。示例性靶向部分包括叶酸或生物素(例如,参见美国专利案第5416016号,Low等人);甘露糖苷(Umezawa等人,Biochem.Biophys.Res.Commun.153:1038);抗体(P.G.Bloeman等人,FEBS Lett.357:140;M.Owais等人,(1995)Antimicrob.Agents Chemother.39:180);表面活性蛋白A受体(Briscoe等人,(1995)Am.J Physiol.1233:134);p120(Schreier等人,(1994)J.Biol.Chem.269:9090);另见K.Keinanen;M.L.Laukkanen(1994)FEBS Lett.346:123;J.J.Killion;I.J.Fidler(1994)Immunomethods 4:273。

[0856] 如果需要,本发明的一些实施例的组合物可以在一包装或一分配器装置中呈现,例如一FDA批准的试剂盒,其可以包含一或多种含有活性成分的单位剂型。例如,所述包装可以包括金属或塑料箔,例如泡罩包装。包装或分配器装置可附有使用说明。包装或分配器也可通过与容器相关的通知进行调节,通知的格式由管制药品制造、使用或销售的政府机构规定,所述通知反映了所述机构对成分或人类或兽医管理形式的批准。例如,此类通知可能是美国食品及药物管理局批准的处方药标签或批准的产品说明书。还可以制备包含在兼容药物载体中配制的本发明制剂的组合物,将其放置在适当的容器中,并对其进行标记,以处理指示的条件,如上文所述。

[0857] 如本文所用,术语“大约”指 $\pm 10\%$ 。

[0858] 术语“包括”、“包含”、“具有”及其共轭词表示“包括但不限于”。

[0859] 术语“由...所组成”是指“包括并限于”。

[0860] 术语“基本上包括”指所述组合物、方法或结构可包括附加成分、步骤及/或部分,但前提是附加成分、步骤及/或部分不会实质性改变所要求的组合物、方法或结构的基本及新颖特征。

[0861] 如本文所用,单数形式“一”及“所述”包括复数引用,除非上下文另有明确规定。例如,术语“化合物”或“至少一化合物”可包括多种化合物,包括其数个混合物。

[0862] 在本申请中,本发明的各种实施例可以范围格式呈现。应当理解,范围格式的描述仅仅是为了方便及简洁,不应被解释为对本发明范围的不灵活限制。因此,范围的描述应被视为已经明确地公开了所述范围内所有可能的子范围以及单一数值。例如,诸如从1到6的范围的描述应被视为具有具体公开的子范围(诸如从1到3、从1到4、从1到5、从2到4、从2到6、从3到6等)以及所述范围内的单一数字(例如,1、2、3、4、5及6)。这适用于任何范围的宽度。

[0863] 每当本文指示数字范围时,其意指包括指示范围内的任何引用数字(分数或整数)。短语“在第一指示数字及第二指示数字之间的范围”及“从第一指示数字”到“第二指示数字之间的范围”在本文中可交换地使用,并且意味着包括第一及第二指示数字以及它们之间的所有小数及整数。

[0864] 如本文所用,术语“方法”是指完成给定任务的方式、方法、技术及程序,包括但不限于化学、药理学、生物学、生物化学及医学领域的从业者已知的或从已知的方式、方法、技术及程序发展而来的那些方式、方法、技术及程序。

[0865] 当参考特定序列时,所述参考还应理解为包括基本上与其互补序列对应的序列,包括由例如测序错误、克隆错误或导致碱基取代的其他改变引起的微小序列变化、碱基缺失或碱基添加,前提是此类变异的频率小于1/50核苷酸,或者小于1/100核苷酸,或者小于1/200核苷酸,或者小于1/500核苷酸,或者小于1/1000核苷酸,小于1/5000核苷酸,或者

小于1/10000核苷酸。

[0866] 数个范例

[0867] 现在参考以下数个范例,其与上述描述一起以非限制性方式示出本发明的一些实施例。

[0868] 通常,本文使用的命名法及本发明中使用的实验室程序包括分子、生物化学、微生物及重组DNA技术。这些技术在文献中有详尽的解释。例如,参见“Molecular Cloning:A laboratory Manual”Sambrook等人,(1989);“Current Protocols in Molecular Biology”Volumes I-III Ausubel,R.M.,ed.(1994);Ausubel等人,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley and Sons,Baltimore,Maryland(1989);Perbal,“A Practical Guide to Molecular Cloning”,John Wiley&Sons,New York(1988);Watson等人,“Recombinant DNA”,Scientific American Books,New York;Birren等人(eds)“Genome Analysis:A Laboratory Manual Series”,Vols.1-4,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York(1998);美国专利案第4,666,828号;第4,683,202号;第4,801,531号;第5,192,659号及第5,272,057号中规定的方法;“Cell Biology:A Laboratory Handbook”,Volumes I-III Cellis,J.E.,ed.(1994);“Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique”by Freshney,Wiley-Liss,N.Y.(1994),Third Edition;“Current Protocols in Immunology”Volumes I-III Coligan J.E.,ed.(1994);Stites等人(eds),“Basic and Clinical Immunology”(8th Edition),Appleton&Lange,Norwalk,CT(1994);Mishell and Shiigi(eds),“Selected Methods in Cellular Immunology”,W.H.Freeman and Co.,New York(1980);可用的免疫测定在专利和科学文献中有广泛的描述,参见例如美国专利案第3,791,932号;第3,839,153号;第3,850,752号;第3,850,578号;第3,853,987号;第3,867,517号;第3,879,262号;第3,901,654号;第3,935,074号;第3,984,533号;第3,996,345号;第4,034,074号;第4,098,876号;第4,879,219号;第5,011,771号及第5,281,521号;“Oligonucleotide Synthesis”Gait,M.J.,ed.(1984);“Nucleic Acid Hybridization”Hames,B.D.,and Higgins S.J.,eds.(1985);“Transcription and Translation”Hames,B.D.,and Higgins S.J.,eds.(1984);“Animal Cell Culture”Freshney,R.I.,ed.(1986);“Immobilized Cells and Enzymes”IRL Press,(1986);“A Practical Guide to Molecular Cloning”Perbal,B.,(1984)and“Methods in Enzymology”Vol.1-317,Academic Press;“PCR Protocols:A Guide To Methods And Applications”,Academic Press,San Diego,CA(1990);Marshak等人,“Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual”CSHL Press(1996);所有这些内容均以引用的方式并入本文件,如同本文件中完全阐述的一样。本文件中还提供了其他一般参考资料。其中的程序被认为是本领域公知的,并且是为了方便读者而提供的。此处包含的所有信息通过引用并入本文。

[0869] 范例1

[0870] 包含两个或三个通过FC连接的蛋白质的异二聚体的数个选择变体-蛋白质(SELECTION VARIANTS OF HETERODIMERS-PROTEINS CONTAINING TWO OR THREE PROTEINS LINKED BY FC)

[0871] 异二聚体-蛋白质的结构分析,包含以下成分:

- [0872] PD1的细胞外结构域(ECD)及由FC链连接的4-1BBL(在本文中称为“sc3x4-1BBL”)的ECD的3个重复组成的一单链(在本文中称为“DSP305”,SEQ ID NO:79及81);
- [0873] 由FC链连接的PD1、SIRPα及sc3x4-1BBL的数个ECD的数个组合(在本文中称为“TSP111”,SEQ ID NO:85及81),包括N端信号肽(SEQ ID NO:95)及含有hIgG4的FC(SEQ ID NO:110及111)的“杵进入臼”(knob into hole);
- [0874] 由FC链连接的PD1、SIRPα及SC3XD40L的数个ECD的数个组合(在本文中称为“TSP112”,SEQ ID NO:81及146),包括N端信号肽(SEQ ID NO:95)及包含hIgG4的FC(SEQ ID NO:110及111)的“杵进入臼”;
- [0875] 通过FC链连接的LILRB2、SIRPα及sc3x4-1BBL的数个ECD的数个组合(在本文中称为“TSP215”,SEQ ID NO:138及85),包括N端信号肽(SEQ ID NO:95)及包含hIgG4的FC(SEQ ID NO:110及111)的“杵进入臼”;
- [0876] 由FC链连接的LILRB2、SIRPα及SC3XD40L的数个ECD的数个组合(本文称为“TSP217”,SEQ ID NO:138及146),包括N端信号肽(SEQ ID NO:95)及含有hIgG4的FC(SEQ ID NO:110及111)的“杵进入臼”;
- [0877] 由FC链连接的SIGLEC10、SIRPα及sc3x4-1BBL的数个ECD的数个组合(本文称为“TSP401”,SEQ ID NO:150及79),包括N端信号肽(SEQ ID NO:95)及含有hIgG4的FC的“杵进入臼”(SEQ ID NO:110及111);
- [0878] 由FC链连接的TIGIT、PD1及sc3x4-1BBL的数个ECD的数个组合(在本文中称为“TSP501”,SEQ ID NO:152及79),包括N端信号肽(SEQ ID NO:95)及包含hIgG4的FC(SEQ ID NO:110及111)的“杵进入臼”;
- [0879] 通过FC链连接的LILRB2、PD1及3XSCD40L的数个ECD的数个组合(在本文中称为“TSP222”,SEQ ID NO:138及154);包含N端信号肽(SEQ ID NO:95)及含有hIgG4的FC(SEQ ID NO:110及111)的“杵进入臼”;
- [0880] 由FC链连接的SIGLEC10、PD1及3XSCD40L的ECD的组合(在本文中称为“TSP403”,SEQ ID NO:150及154),包括N端信号肽(SEQ ID NO:95)及包含hIgG4的FC(SEQ ID NO:110及111)的“杵进入臼”;
- [0881] TIGIT、PD1及3XSCD40L的数个ECD的数个组合,通过FC链连接(在本文中称为“TSP503”,SEQ ID NO:152及154),包括N端信号肽(SEQ ID NO:95)及包含hIgG4的FC(SEQ ID NO:110及111)的“杵进入臼”;
- [0882] 由FC链连接的PD1、TIGIT及3xsc4-1BBL的数个ECD的数个组合(在本文中称为“TSP501V1”,SEQ ID NO:81及156),包括N端信号肽(SEQ ID NO:95)及包含hIgG4的FC(SEQ ID NO:110及111)的“杵进入臼”;或
- [0883] 由FC链连接的PD1、TIGIT及3XSCD40L的ECD的组合(在本文中称为“TSP503V1”,SEQ ID NO:81及158),包括N端信号肽(SEQ ID NO:95)及含有hIgG4的FC(SEQ ID NO:110及111)的“杵进入臼”;
- [0884] 作用以优化以下参数:
- [0885] 折迭-适当折迭,以便与数个靶结合,最大限度地减少潜在的干扰;
- [0886] 完整性-无暴露的蛋白水解位点;
- [0887] 在哺乳动物表达系统中高表达;及

[0888] 低免疫原性。

[0889] 根据一同源X射线结构,对每个零件进行同源建模。对于PD1-PDB ID:3RRQ、5GGR、5GGS、5JXE及4ZQK用作数个模板。对于hIgG4-PDB ID:4C54、4C55、5W5M及5W5N用作数个模板。对于41BB-L-PDB ID:6CPR、6A3V及6CU0用作数个模板。对于SIRP α -PDB-ID的2UV3、2WNG、4CMM、6BIT、2JJS及2JJT用作数个模板。数个连接体段使用CHARMM中的回路建模进行建模,主要是为了避免结构冲突,并对可能的“间隔”长度进行合理的估计。对于CD40L-PDB ID:1ALY、1I8R、3LKJ及3QD6用作数个模板。对于LILRB2-PDB ID:2GW5、4LLA、2DYP及6BCP用作数个模板。对于SIGLEC10-同源物的PDB ID:SIGLEC8 2N7A及2N7B用作数个模板。对于TIGIT-PDB ID:3QOH、3RQ3、3UCR、3UDW及5V52用作数个模板。

[0890] 图3及图6表示为PD1-Fc-sc3x4-1BBL(图3)或SIRP α -PD1-Fc-sc3x4-1BBL(图6)异二聚体识别的所述数个结构域及数个片段生成的数个3D模型,包括或不包括其数个配体(CD47、PDL1及4-1BB)。图12A至图16C表示为PD1-SIRP α -Fc-SC3XD40L(图12A至图12C)、LILRB2-Fc-sc3x4-1BBL(图13A至图13C)、LILRB2-SIRP α -Fc-SC3XD40L(图14A至图14C)、SIGLEC10-PD1-Fc-sc3x4-1BBL(图15A至图15C)或TIGIT-PD1-Fc-sc3x4-1BBL(图16A至图16C)异二聚体所识别的所述数个结构域及数个片段生成的所述数个异二聚体及所述数个3D模型的示意图。所述分析预测可能与所述数个配体结合,不同结构域之间没有干扰。所述结构分析还表示出,sc3x4-1BBL中3个重复的4-1BBL胺基酸序列之间的一内部(GGGGS) $\times 2$ +GGGGG(SEQ ID NO:96)连接子及SC3XD40L中3个重复的CD40L胺基酸序列之间的一内部(GGGGGGS) $\times 3$ (SEQ ID NO:136)连接子将促进这种结合。

[0891] 范例2

[0892] 异二聚体的制备

[0893] 为了比较功能分析及生产评估,使用“杵(knob)”进入“臼(hole)”方法(例如在美国专利案US8216805中描述)生产了几种异二聚体,即:PD1-Fc-3xSc4-1BBL异二聚体,本文称为“DSP305”(SEQ ID NO:79及81)及“DSP305_V1”(SEQ ID NO:79及83);PD1-SIRP α -Fc-3xsc4-1BBL异二聚体在本文中称为“TSP111”(SEQ ID NO:85及81)、“TSP111_V1”(SEQ ID NO:89及91)及“TSP111_V2”(SEQ ID NO:85及83);一PD1-SIRP α -Fc-3xscCD40L异二聚体,本文称为“TSP112”(SEQ ID NO:81及146);LILRB2-PD1-Fc-3xsc4-1BBL异二聚体在本文中称为“DSP214”(SEQ ID NO:138及142)及“DSP 214V1”(SEQ ID NO:140及144);LILRB2-SIRP α -Fc-3xsc4-1BBL异二聚体,本文称为“TSP215”(SEQ ID NO:138及85)及“TSP215 V1”(SEQ ID NO:140及85);LILRB2-SIRP α -Fc-3xscCD40L异二聚体在本文中称为“TSP217”(SEQ ID NO:138及146)、2xLILRB2-Fc-3xscCD40L异二聚体在本文中称为“DSP218”(SEQ ID NO:138及148);LILRB2-PD1-Fc-3x4-1BBL异二聚体,本文称为“TSP221”(SEQ ID NO:138及79);LILRB2-PD1-Fc-3xscCD40L异二聚体在本文中称为“TSP222”(SEQ ID NO:138及154);SIGLEC10-Fc-PD1-3xsc-4-1BBL异二聚体在本文中称为“TSP401”(SEQ ID NO:150及79);SIGLEC10-PD1-Fc-3xscCD40L异二聚体在本文中称为“TSP403”(SEQ ID NO:150及154);TIGIT-Fc-PD1-3xsc-4-1BBL异二聚体在本文中称为“TSP501”(SEQ ID NO:152及79)及TIGIT-PD1-Fc-3xscCD40L异二聚体在本文中称为“TSP503”(SEQ ID NO:152及154)。一些制备的异二聚体的示意图显示在图2、图5、图12A、图13A、图14A、图15A、图16A及图32中。

[0894] 在用DSP305、DSP305_V1、TSP111、TSP111_V1、TSP111_V2、TSP112、DSP214、DSP214_

V1、TSP215、TSP215_V1、TSP217、DSP218、TSP221、TSP222、TSP401、TSP403、TSP501或TSP503的编码序列克隆的pcDNA3.4表达载体转染的Expi293F细胞中进行生产。使用EcoRI及HindIII或XbaI及EcoRV限制酶将序列克隆到所述载体中,并添加Kozak序列及人工信号肽(MESPAQLLFLLLLWLPDGVHA, SEQ ID NO:95)。从细胞培养的上清液中收集所述蛋白质,在某些情况下,使用蛋白质A (PA) Poros MabCapture A树脂或阴离子交换High Trap Q FF树脂通过一步纯化来纯化蛋白质。

[0895] 通过SDS-PAGE来验证所述制备。具体而言,将来自每个样品的35 μ l上清液或3 μ g PA纯化蛋白与含有或不含 β -巯基乙醇(分别为还原和非还原条件)的上样缓冲液混合,在95 $^{\circ}$ C下加热5分钟,然后在8%或4%至20%梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳SDS-PAGE。根据制造商的说明,凝胶上的蛋白质迁移通过e-Stain机器(GenScript)可视化。

[0896] 如图4、图7及图17至图18B所示,在非还原条件下观察到高比例的预期异二聚体分子量形式的蛋白质,并且在还原条件下证实了两个亚基的表达。SDS-PAGE仅检测到少量的异构体(包含两个“杆”或两个“臼”片段的二聚化体)。

[0897] 以同样的方式,几种其他异二聚体(即本文称为“TSP501V1”(SEQ ID NO:81及156)的PD1-TIGIT-3xsc4-1BBL异二聚体及本文称为“TSP503V1”的PD1-TIGIT-3xscCD40L异二聚体”(SEQ ID NOs:81及158))根据上述来制备及分析。

[0898] 根据下文各自的范例3至范例13进一步分析所有制备的异二聚体。

[0899] 范例3

[0900] 所述异二聚体包含所有域

[0901] 材料-如上文范例2所述制备的异二聚体。

[0902] 对于西方墨点法分析(Western blot analysis):Spectra BR蛋白标记(Thermo Fisher Scientific,目录号26634)或3色Extra Range蛋白质标记(GenScript,目录号PM2800)、Laemmli上样缓冲液(BioRad,目录号161-0747)或样品缓冲液(GenScript,目录号M00676)、8%或4%至20%聚丙烯酰胺凝胶(BioRad目录号556-8094或GenScript目录号M00662或M00656)、抗人4-1BBL(BioVision,5369-100)、PD1(Cell Signaling,目录号86163)、抗人PD1(GenScript,目录号A01829-40)、生物素化兔抗人SIRP α (LsBio目录号LS-C370337)、抗人LILRB2(R&D systems目录号MAB2078)、抗人SIRP α (目录号LS-C370337)、链霉亲和素-HRP(Pierce目录号TS21126)、抗人SIGLEC10(R&D systems目录号AF2130)、抗人TIGIT(MyBioSource目录号MBS9217285、抗人CD40L(MyBioSource目录号MBS840387)、二级山羊抗兔IgG(H+L)-HRP偶联物(R&D systems,目录号170-6515)、山羊抗小鼠IgG HRP-偶联物(Bio-rad,目录号170-6516)及ECL Plus Western Blotting底物(Pierce,目录号32132)。

[0903] 对于三明治法ELISA:抗4-1BBL抗体(从匹配对中捕获抗体;Abnova#H00008744-AP41)或抗CD40L、抗PD1生物素化抗体、抗人SIRP(目录号LS-C370337)、抗-human SIGLEC10(R&D systems目录号AF2130),anti-human TIGIT(MyBioSource目录号MBS9217285,anti-human CD40L(MyBioSource目录号MBS840387),Streptavidin Protein,HRP(#21126, Thermo Scientific),TMB底物(1-StepTM Ultra TMB-ELISA底物溶液,Thermo Scientific#34028)。

[0904] 方法

[0905] 西方墨点法分析-所述制备的异二聚体(每泳道50ng至500ng)在还原或非还原条件下(分别在含有或不含 β -巯基乙醇的上样缓冲液中)处理,在95℃下加热5分钟,然后在8%或4-20%梯度SDS-PAGE。随后,将蛋白质转移到PVDF膜上并与初抗一起培育一小时或过夜,抗人4-1BBL、抗PD1、抗SIRP、抗人LILRB2、抗人SIGLEC10、抗人TIGIT或抗人CD40L然后与一HRP偶联的二抗培育一小时。在ECL开发之后检测到信号。

[0906] 三明治法ELISA(Sandwich ELISA)-使用抗4-1BBL或抗CD40L捕获抗体(PBS中2.5 μ g/ml)涂覆数个板并在封闭溶液(PBS,1%BSA,0.005%Tween)中封闭。根据制造商的建议,将所述制备的异二聚体在封闭溶液中连续稀释,然后在涂覆板上培育2小时,然后与一检测抗体(例如抗PD1或抗SIRP 生物素化抗体)一起培育,随后用链霉亲和素-HRP及TMB进行检测基板。使用板读数器(Thermo Scientific,Multiscan FC)在450nm处分析数个板,在620nm处进行参照。

[0907] 结果

[0908] 所述制备的异二聚体包含其所有结构域,即:TSP111包含PD1、SIRP α 及4-1BBL结构域(图19A至图19C);TSP112包含PD1及SIRP α 结构域(图20A至图20B);TSP401包含4-1BBL及PD1结构域(图20A及图20C);TSP501包含4-1BBL及PD1结构域(图20A及图20C);TSP221包含一4-1BBL结构域(图20C);DSP214包含LILRB2及4-1BBL域(图21A及图21C);DSP214 V1包含一4-1BBL域(图21A);TSP215含有LILRB2、SIRP α 及4-1BBL结构域(图21A至图21C);TSP215 V1包含SIRP α 、4-1BBL结构域(图21A至图21B);TSP217包含一LILRB2结构域(图21C);DSP218包含一LILRB2域(图21C)。

[0909] 范例4

[0910] 所述异二聚体结合它们在细胞表面表达的对应配体/受体。

[0911] 所述PD1部分与PDL1的结合分析

[0912] 使用过表达PDL1的DLD1-PDL1细胞系确定包含PD1结构域及4-1BBL结构域的数个异二聚体(例如PD1-4-3xsc1BBL、SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL异二聚体)的所述PD1结构域与人PDL1的结合。DLD1-WT细胞可作为对照,因为它表达低水平的内源性PDL1(图8A)。将细胞与含有异二聚体的不同稀释度的上清液一起培育,然后用偶联的抗4-1BBL抗体进行免疫染色。通过流式细胞术分析结合步骤。

[0913] 材料-包含一PD1结构域及一4-1BBL结构域的数个异二聚体,如上文范例2所述来制备。DLD1-WT及DLD1-PDL1细胞系(Hendriks等人,2016年)、抗人类CD47(InhibRx样,GenScript)、AF647抗人类CD47(InhibRx样,GenScript)、APC抗人类CD274(Biolegend,目录号329708)、APC小鼠IgG、k同种型对照(Biolegend,目录号400122)、APC抗4-1BBL(Biolegend,目录号311506)。

[0914] 方法-将细胞与所制备的含有异二聚体的上清液的系列稀释液在4℃下培育20分钟,然后用针对4-1BBL的偶联抗体进行免疫染色,并通过流式细胞术进行分析。在某些情况下,细胞在与上清液培育之前先与抗CD47阻断剂抗体进行预培育。

[0915] 结果-如图8A所示,与表现出PDL1低内源性表达的DLD1 WT细胞相比,在DLD1-PDL1过表达细胞上观察到一高水平的PDL1膜表达。

[0916] 如图8C所示,DSP305(SEQ ID NO:79及81)以剂量依赖性方式结合过表达DLD1 PDL1的细胞。

[0917] 如图9A至图9B所示,TSP111 (SEQ ID NO:85及81)以一剂量反应方式结合过表达DLD1 WT及过表达PDL1的细胞系。由于两种DLD1细胞系也表达CD47,因此表明TSP111's-SIRP α 臂主要通过细胞上表达的CD47结合DLD1 WT细胞,而TSP111's-PD1及SIRP α 臂均通过PDL1及CD47蛋白结合DLD1 PDL1过表达细胞在细胞表面表达。

[0918] 如图22A所示,TSP401 (SEQ ID NO:150及79)以一剂量依赖性方式结合过表达DLD1 PDL1的细胞。

[0919] 如图22B所示,TSP501 (SEQ ID NO:152及79)以一剂量依赖性方式结合过表达DLD1 PDL1的细胞。

[0920] 所述4-1BBL部分与4-1BB的结合分析

[0921] 使用过表达4-1BB的一HT1080-4-1BB细胞系来测定包含一4-1BBL结构域及一PD1或LILRB2结构域的异二聚体(例如PD1-4-3xsc1BBL及SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL异二聚体)的4-1BBL结构域与人4-1BB的结合。HT1080 WT细胞用作一阴性对照。细胞与含有异二聚体的不同稀释度的上清液一起培育,然后用偶联的抗PD1抗体或抗LILRB2抗体进行免疫染色。通过流式细胞术分析结合。

[0922] 材料-包含一4-1BBL结构域及一PD1或LILRB2结构域的数个异二聚体,如上文范例2来制备。HT1080 WT及HT1080-4-1BB细胞(Wyzgol等人,2009)、抗人CD47阻断剂Ab (InhibRx样,GenScript)、AF647标记的抗人CD47、抗人4-1BB克隆M127阻断剂Ab (BD,目录号552532),AF647标记的抗人4-1BB克隆M127,APC抗人CD85d (ILT4) 抗体克隆41D1 (Biolegend,目录号338708)、APC小鼠IgG1、k同种型对照 (Biolegend,目录号400122)、APC标记的抗PD1 (Biolegend,目录号329908)。

[0923] 方法-将细胞与所制备的异二聚体的系列稀释液(含有上清液)在4°C下培育20分钟至30分钟,然后用针对PD1或LILRB2的一抗体进行免疫染色,并通过流式细胞术进行分析。在某些情况下,细胞在与上清液培育之前先与抗CD47阻断抗体或抗4-1BB阻断抗体进行预培育。

[0924] 结果-如图8B所示,在HT1080 4-1BB细胞的表面上观察到4-1BB的膜表达,而不是在HT1080 WT细胞上。

[0925] 如图8D所示,DSP305 (SEQ ID NO:79及81)与HT1080 4-1BB过表达细胞结合。

[0926] 如图9B所示,TSP111 (SEQ ID NO:89及91)结合了两种HT1080-4-1BB细胞系。由于两种HT1080细胞系也表达CD47,因此表明TSP111的4-1BBL及/或SIRP α 臂都结合了它们的受体(分别为4-1BB、CD47)。

[0927] 如图23所示,TSP401 (SEQ ID NO:150及79)及TSP501 (SEQ ID NO:152及79)与HT1080-4-1BB过表达细胞结合。

[0928] 如图24所示,DSP214 (SEQ ID NO:138及142)与HT1080-4-1BB细胞系结合。用抗4-1BB阻断剂抗体预培育完全阻止了结合。

[0929] 如图25所示,TSP215 (SEQ ID NO:138及85)与HT1080-4-1BB细胞系结合。与抗CD47阻断剂抗体或抗4-1BB阻断剂抗体预培育降低了结合。与抗CD47及抗4-1BB阻断剂抗体预培育完全阻止了结合。

[0930] 所述SIRP α 部分与CD47的结合分析

[0931] 使用过表达人CD47的所述CHO-K1-CD47细胞系测定包含一SIRP α 结构域及一4-

1BBL结构域的异二聚体(例如SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL异二聚体)的一SIRP α 结构域与人CD47的结合。CHO-K1 WT细胞用作一阴性对照。将细胞与含有异二聚体的不同稀释度的上清液一起培育,然后用偶联的抗4-1BBL抗体进行免疫染色。通过流式细胞术分析结合。材料-TSP111 (SEQ ID NO:85及81)、TSP111_V1 (SEQ ID NO:89及91)及TSP111_V2 (SEQ ID NO:85及83),如上文范例2所述制备。CHO-K1及CHO-K1-CD47细胞、抗人CD47阻断剂Ab (InhibRx样 GenScript)、AF647标记的抗人CD47、APC标记的小鼠IgG1、k同种型对照 (Biolegend,目录号 400122)、APC抗4-1BBL (Biolegend,目录号311506)。

[0932] 方法-将细胞与所制备的含有异二聚体的上清液的系列稀释液在4℃下培育20分钟,然后用针对4-1BBL的抗体进行免疫染色并通过流式细胞术进行分析。在某些情况下,细胞在与异二聚体培育之前先与一抗CD47阻断剂抗体进行预培育。

[0933] 结果-如图9C所示,与CHO-K1 WT细胞相比,在CHO-K1 CD47过表达细胞的表面上观察到CD47的膜表达。

[0934] 如图9D所示,TSP111 (SEQ ID NO:85及81)结合CHO-K1-CD47,而不是结合CHO-K1 WT细胞。与抗CD47阻断剂抗体预培育完全消除了TSP111与CHO-K1-CD47细胞的结合。总之,这些结果表明TSP111的SIRP臂与其配体(CD47)结合。

[0935] 所述CD40L部分与CD40的结合分析

[0936] 使用过表达CD40的一HT1080-CD40细胞系测定包含一CD40L结构域及PD1结构域的数个异二聚体(例如SIRP α -PD1-3xscCD40L异二聚体)的所述CD40L结构域与人CD40的结合。HT1080 WT细胞作为一阴性对照,因为它们不表达内源性CD40。将细胞与含有异二聚体的不同稀释度的上清液一起培育,然后用缀合的抗PD-1抗体进行免疫染色。通过流式细胞术分析结合。

[0937] 材料-包含一CD40L结构域及一PD1结构域的数个异二聚体(例如TSP112)如上文范例2中所制备。HT1080 WT及HT1080-CD40细胞系 (Wyzgol等人,2009年)、APC抗人CD40抗体 (Biolegend,目录号313008)、APC小鼠IgG1、k同种型对照 (Biolegend,目录号400120)、APC标记的抗PD1抗体 (Biolegend,目录号329908)。

[0938] 方法-将细胞与所制备的含有异二聚体的上清液的系列稀释液在4℃下培育20分钟,然后用针对PD-1的偶联抗体进行免疫染色,并通过流式细胞术进行分析。

[0939] 结果-如图26A所示,与HT1080 WT细胞相比,在HT1080-CD40过表达细胞上观察到一高水平的CD40膜表达,而HT1080 WT细胞没有表现出CD40的内源性表达。

[0940] 如图26B所示,TSP112 (SEQ ID NO:81及146)以一剂量依赖性方式结合HT1080-CD40过表达细胞。

[0941] 所述TIGIT部分与CD155 (PVR)的结合分析

[0942] 使用内源性表达CD155的一DLD-1WT细胞系测定包含一TIGIT结构域及一4-1BBL结构域的异二聚体(例如TIGIT-Fc-PD1-3xSc-4-1BBL异二聚体)的一TIGIT结构域与人CD155的结合。U937细胞作为一阴性对照,因为它们不表达内源性CD155。将细胞与含有异二聚体的不同稀释度的上清液一起培育,然后用偶联的抗4-1BBL抗体进行免疫染色。通过流式细胞术分析结合。

[0943] 材料-包含一TIGIT结构域及一4-1BBL结构域的异二聚体(例如TSP501)如上文范例2中所述来制备。DLD1-WT细胞系 (ATCC,CCL-221)、U937 (ATCC,CRL-3253)、APC抗人CD155

抗体 (Biolegend, 目录号337618)、APC Mouse IgG1、k同种型对照 (Biolegend, 目录号400120)、APC抗4-1BBL抗体 (Biolegend, 目录号311506)。

[0944] 方法-将细胞与所制备的含有异二聚体的上清液的系列稀释液在4°C下培育20分钟,然后用针对4-1BBL的偶联抗体进行免疫染色,并通过流式细胞术进行分析。

[0945] 结果-如图27A至图27B所示,与同种型对照抗体相比,在DLD-1WT细胞上观察到高水平的CD155膜表达,而U937细胞不表达CD155 (图27B)。

[0946] 如图27C所示,TSP501 (SEQ ID NO:152及79)以一剂量依赖性方式结合DLD-1WT细胞并且不结合U937细胞。

[0947] 异二聚体与其人、小鼠及食蟹猴对应物的结合

[0948] 异二聚体与其相关反配体/受体的结合由表面等离子共振 (SPR) 测定法确定。

[0949] 材料-如上文范例2所述制备的异二聚体。S系列传感器芯片CM5 (GE, 目录号BR100530)、抗体捕获试剂盒、阴性对照蛋白、人PDL1-hFc (R&D, 目录号156-B7-100)、人CD47-hFc (R&D, 目录号4670-CD-050)、小鼠CD47-hFc (R&D, 目录号1866-CD-050)、食蟹猴CD47-hFc (ACROBiosystems, 目录号CD7-C5252)、人4-1BB-hFc (LsBio, 目录号LS-G4041-100)、小鼠4-1BB-hFc (R&D, 目录号937-4B-050)、食蟹猴4-1BB-hFc (R&D, 目录号9324-4B-100)、小鼠PDL1、食蟹猴PDL1。

[0950] 方法-使用Biacore T100生物传感器 (GE Healthcare) 进行SPR分析。使用制造商推荐的标准胺偶联方案,将捕获试剂盒中的抗体与芯片 (Fc1-4) 的所有四个流动通道偶联。作为一非限制性实例,对于SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL异二聚体,PDL1、CD47及4-1BB与芯片的结合在HBS-EP+运行缓冲液 (10mM HEPES pH7.3、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05% Tween20): 将阴性对照蛋白加载到参考通道Fc1上,而Fc2-4加载人、小鼠及食蟹猴PDL1蛋白。所述芯片自动再生后,芯片在Fc1通道上重新加载阴性对照蛋白,在Fc2-4通道上重新加载人、小鼠及食蟹猴4-1BB。芯片自动再生后,芯片在Fc1通道上重新加载阴性对照蛋白,在Fc2-4通道上加载人、小鼠及食蟹猴CD47。在对应物结合之后,SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL-变体分析物通过所有四个通道。以50 μ l/min的流速使用不同浓度的“SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL分析物”反复重复所述过程。在每个循环结束时注入3M MgCl₂溶液 (45秒,20 μ l/分钟),通过去除捕获的分子来再生活性表面。结合参数使用BiaEvaluation软件v.3.0.2 (GE Healthcare) 中的Kinetic 1:1结合模型进行评估。对于PD1-3xsc4-1BBL,应用相同的程序,但没有CD47。以同样的方式,使用来自人食蟹猴及小鼠来源的相关反配体/受体重组蛋白研究每个异二聚体。

[0951] 范例5

[0952] 异二聚体同时结合其对应配体/受体

[0953] 所述数个异二聚体与其对应配体/受体的结合 (例如,在PD1-4-3xsc1BBL及SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL异二聚体的情况下,PD1与PDL1、4-1BBL与4-1BB及SIRP α 与CD47的结合;在LILRB2-SIRP α -3xsc4-1BBL异二聚体的情况下,4-1BBL与4-1BB、LILRB2与HLA-G及SIRP α 与CD47的结合) 通过基于一三明治法ELISA (sandwich ELISA) 的测定法进行测试。所述测定还用于比较异二聚体蛋白的不同变体的所述数个功能特性。

[0954] 材料-如上文范例2所述制备的异二聚体。人重组PDL1 (GenScript)、人重组CD47 (GenScript)、人重组HLA-G (Abcam)、生物素偶联人重组4-1BB蛋白 (biotin-conjugated human recombinant 4-1BB protein) (GenScript)、兔抗人SIRP α 抗体 (抗药物抗体

DSP107)、HRP偶联链霉亲和素蛋白(HRP-conjugated streptavidin Protein)(目录号21126, ThermoScientific)、TMB-ELISA底物溶液(TMB-ELISA Substrate Solution)(Sigma, 目录号T0440)及TMB终止溶液(TMB stop solution)(Southern Biotech, 目录号0412-01)。

[0955] 方法-96孔板通过在4°C下与一重组CD47蛋白、PDL1蛋白、HLA-G蛋白或等摩尔量的两种蛋白的一混合物一起培育过夜来预涂覆(pre-coated)。在封闭及洗涤后,将含有所制备的PD1-4-3xsc1BBL、SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL、2xLILRB2-3xsc4-1BBL或LILRB2-SIRP α -3xsc4-1BBL异二聚体的连续稀释的上清液添加到相关的预涂覆孔中。在额外的洗涤步骤之后,添加生物素化的4-1BB(biotinylated 4-1BB)或兔抗-抗-SIRP α 抗体(rabbit anti-anti-SIRP α antibody)并使其分别与所述异二聚体的4-1BBL臂或SIRP α 臂结合。再次洗涤所述数个板并加入链霉亲和素-HRP(streptavidin-HRP)或山羊抗兔IgG抗体-HRP(goat anti-rabbit IgG antibody-HRP)。根据标准ELISA协议使用一板读数器(Thermo Scientific, Multiscan FC),使用一TMB底物进行检测。

[0956] 结果-如图10A所示,DSP305(SEQ ID NO:79及81)以一浓度依赖性方式与PDL1涂层板结合。

[0957] 如图10B所示,TSP111(SEQ ID NO:85及81)以一浓度依赖性方式结合CD47及PDL1涂覆的板,并且还结合用CD47及PDL1的一混合物涂覆的板。有趣的是,与混合蛋白涂覆板的结合更高,表示出当涉及双臂(SIRP α 及PD1)时结合更强。对照上清液不与任何涂覆板结合。

[0958] 如图28A所示,通过41BB-生物素以一剂量依赖性方式检测到DSP214(SEQ ID NO:138及142)与HLA-G的结合,表示出LILRB2及4-1BBL臂能够结合它们的靶标。阴性对照上清液未观察到结合。

[0959] 如图28B至图28C所示,通过41BB-生物素以一剂量依赖性方式检测到TSP215(SEQ ID NO:138及85)与HLA-G或CD47的结合,表示出LILRB2、SIRP α 及41BBL臂结合他们的目标。没有检测到与仅涂有BSA的对照板的结合。

[0960] 范例6

[0961] 异二聚体激活4-1BB或CD40

[0962] 4-1BB受体的激活

[0963] 通过所制备的包含一4-1BBL结构域的异二聚体(例如PD1-4-3xsc1BBL、SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL、SIGLEC10-Fc-PD1-3xSc-4-1BBL及TIGIT-Fc-PD1-3xSc-4-1BBL异二聚体)激活所述4-1BB受体介导的信号转导,此是使用4-BBL过表达HT1080细胞系(HT1080-4-1BB)测定的。在所述4-1BBL与这些细胞表面的4-1BB受体结合后,一信号通路被激活,导致IL8的分泌(Wygzol等人,2009年,The Journal of Immunology)。为此,将所述数个细胞在含有所述数个异二聚体的连续稀释的上清液中培育过夜。所述培育在所述数个96孔板预涂覆相关蛋白,例如CD47、PDL1、CD24、CD155或等摩尔浓度的两种相关蛋白的一混合物。激活的HT1080-4-1BB细胞向培养基的IL8分泌通过以下方法测定ELISA。

[0964] 材料-包含如上文范例2中所述制备的4-1BBL结构域的异二聚体。人重组PDL1(GenScript)、人重组CD47(GenScript)、人重组PDL1-Fc标记(ACRO Biosystem, 目录号PD1-H5258)、人重组CD24-His标记(ACRO Biosystem, 目录号CD4-H52H3)、人重组CD155 His标记(ACRO Biosystem, 目录号CD5-H5223)、HT1080-4-1BB细胞、IL-8ELISA试剂盒(Biolegend,

目录号431507)、DMEM(Biological Industries,目录号01-055-1A)、RPMI(生物工业,目录号01-100-1A)、FBS(Gibco,目录号10270106)、抗4-1BB抗体(Biolegend,目录号359810)、同型IgG1,k(Biolegend,目录号400122)。

[0965] 方法-所述数个96孔板通过在4°C下与重组CD47或PDL1或DSP305及TSP111等摩尔量的两种蛋白质的混合物在4°C下培育过夜进行预涂覆;带有用于TSP401的PDL1及CD24;或用于TSP501的PDL1及CD155。在洗涤步骤之后,含有产生的PD1-4-3xsc1BBL、SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL、SIGLEC10-Fc-PD1-3xSc-4-1BBL或TIGIT-Fc-PD1-3xSc-4-1BBL异二聚体的连续稀释的上清液被添加到相关的预涂覆孔中,在37°C下培育1小时,然后在37°C下添加HT1080 4-1BB细胞(每孔10000个)24小时。培育后,根据制造商的方案,通过IL8 ELISA试剂盒测定上清液中的IL8浓度。使用一板读数器(Thermo Scientific,Multiscan FC)在450nm处分析上清液的IL-8浓度,在540nm处进行参考。HT1080 4-1BB细胞上4-1BB受体的表达通过用抗4-1BB抗体对细胞进行免疫染色来确定,并通过流式细胞术进行分析。

[0966] 结果-如图8B所示,HT1080-4-1BB细胞确实表达了高水平的相关受体4-1BB。如图11A至图11C及图29A至图29B上清液所示,含有DSP305 SEQ ID NO:79及81)、TSP111(SEQ ID NO:85及81)、TSP111_V1(SEQ ID NO:89及91)或TSP111_V2(SEQ ID NO:85及83)、TSP401(SEQ ID NO:150及79)或TSP501(SEQ ID NO:152及79)能够以一剂量依赖性方式触发信号传导,导致HT1080-41BB细胞分泌IL8。

[0967] 当HT1080-41BB细胞在来自未转染的Expi293F细胞的对照上清液存在下培育时,未观察到IL8分泌。

[0968] 有趣的是,当细胞及测试的SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL异二聚体在涂有CD47及PD1重组蛋白混合物的数个板中培育时,IL8分泌水平更高,这表示出当双臂(SIRP α 及PD1)参与其中。

[0969] CD40受体的激活

[0970] 使用过表达CD40的HT1080细胞确定由制备的包含一CD40L结构域的异二聚体(例如PD1-SIRP α -Fc-3xScCD40L、LILRB2-SIRP α -Fc-3xScCD40L及LILRB2-Fc-3xScCD40L异二聚体)对所述CD40受体介导的信号转导的激活线(HT1080-CD40)。在CD40L与这些细胞表面的所述CD40受体结合后,信号通路被激活,导致IL8的分泌(Wyzgol等人,2009年,The Journal of Immunology)。为此,将所述数个细胞在含有所述数个异二聚体的连续稀释的上清液存在下培育过夜。所述培育在预涂覆相关蛋白质的数个96孔板中进行,例如CD47、PDL1、HLA-G或两种相关蛋白的组合。通过ELISA确定从活化的HT1080-CD40细胞向培养基的IL8分泌。

[0971] 材料-如上文范例2所述制备的异二聚体。人重组CD47(ACRO,目录号CD7-H5227),人重组PDL1-Fc标记(ACRO Biosystem,目录号PD1-H5258),人重组HLA-G(Abcam,目录号ab225660),HT1080-CD40细胞,IL-8ELISA试剂盒(Biolegend,目录号431507),DMEM(Biological Industries,目录号01-055-1A),RPMI(Biological Industries,目录号01-100-1A),FBS(Gibco,目录号10270106),抗CD40抗体(Biolegend,目录号313008),同种型IgG1,k(Biolegend,目录号400120)。

[0972] 方法-数个96孔板通过在4°C下与重组CD47或用于TSP111的PDL1培育过夜来预涂覆;TSP217的HLA-G或CD47;或HLA-G用于DSP218。在洗涤步骤之后,将含有制备的PD1-SIRP α -Fc-3xScCD40L、LILRB2-SIRP α -Fc-3xScCD40L或LILRB2-Fc-3xScCD40L异二聚体的连续稀

释的上清液加入到相关的预涂覆孔中,在37°C培育1小时随后在37°C下添加HT1080 CD40细胞(每孔10000个)24小时。培育后,根据制造商的方案,通过IL8 ELISA试剂盒测定上清液中的IL8浓度。使用一板读数器(Thermo Scientific, Multiscan FC)在450nm处分析上清液的IL8浓度,在540nm处进行参考。HT1080 CD40细胞上CD40受体的表达通过用抗CD40抗体对细胞进行免疫染色来确定,并通过流式细胞术进行分析。

[0973] 结果-如图26A所示,HT1080-CD40细胞确实表达高水平的相关受体CD40。如图30A至图30B所示,含有TSP112 (SEQ ID NO:81及146)、TSP217 (SEQ ID NO:138及146)或DSP218 (SEQ ID NO:138及148)的上清液能够在剂量依赖性方式,导致HT1080-CD40细胞分泌IL8。

[0974] 范例7

[0975] 所述数个异二聚体对阻断配体-受体结合的影响

[0976] 所述数个异二聚体旨在阻断数个靶细胞上表达的内源性配体/受体与天然受体/配体的相互作用。

[0977] 因此,例如,所述相关异二聚体(例如PD1-4-3xsc1BBL或SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL异二聚体)的PD1部分旨在阻断T细胞上表达的内源性PD1与肿瘤细胞上表达的PDL1的相互作用。为此,评估了所制备的异二聚体作为这种相互作用的阻断剂的有效性。用重组人PDL1将数个板(Acro Biosystems, 目录号EP101)涂覆过夜。随后,洗涤数个板并与不同浓度的制备的异二聚体(例如PD1-4-3xsc1BBL或SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL)或阳性对照抗PD1抗体一起培育1小时。添加生物素化的PD1,然后再培育1小时。培育后,洗涤所述板并根据标准ELISA方案用链霉亲和素-HRP及TMB底物(TMB substrate)印迹(blotted)。使用一板读数器(Thermo Scientific, Multiscan FC)在450nm处分析板,在620nm处进行参考。

[0978] 以一类似的方式,研究所述数个相关异二聚体的所述阻断活性以评估它们阻断CD155-TIGIT、SIGLEC10-CD24、LILRB2-HLA-G、CD47-SIRP α -4-1BBL-4-1BB及/或LILRB2-HLA-G结合的有效性。

[0979] 范例8

[0980] 包含4-1BBL或CD40L结构域的数个异二聚体对PBMC或T细胞的激活

[0981] T细胞的激活需要两个信号:T细胞受体(TCR)与所述抗原呈递细胞(Antigen Presenting Cell, APC)上的所述主要组织相容性复合物(Major Histocompatibility Complex, MHC)/肽复合物的连接及在T细胞与所述抗原呈递细胞(APC)上的所述数个相应配体上的数个共刺激受体的交联。4-1BB是一种T细胞共刺激受体,它与4-1BBL连接后可促进CD8⁺及CD4⁺T细胞的扩增、存活、分化及细胞因子表达。CD40及CD40L是在促炎免疫反应中起关键作用的共刺激分子。主要由活化的CD4⁺T细胞表达,CD40L与抗原呈递细胞(APC)上的CD40结合,从而诱导APC活化。反过来,APC会引发细胞毒性T淋巴细胞。

[0982] 本领域已知多种方法来确定T细胞的活化,包括但不限于:

[0983] T细胞表面活化标记物的表达(例如:CD25、CD69、CD62L、CD137、CD107a、PD1等)。通过用特异性抗体染色细胞及流式细胞术分析(FACS)来测试活化标记物的表达。

[0984] 炎性细胞因子的分泌(例如:IL2、IL6、IL8、INF γ 等)。通过ELISA测试炎性细胞因子的分泌。

[0985] 增殖,通过用CFSE(羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein succinimidyl ester))或其他细胞增殖染料预染色T细胞并通过FACS确定的CFSE稀释确定

细胞偏差来测量。还使用一Incucyte机器超时拍照并使用一特定软件分析照片来确定增殖。

[0986] 杀死一靶细胞,例如通过使用Calcein-AM试剂预标记癌细胞并使用发光板读数器测量Calcein释放到培养基中来测量癌细胞。所述杀死步骤也由Incucyte机器使用标记的靶细胞及半胱天冬酶敏感荧光底物(caspase sensitive florescent substrate)确定。

[0987] 范例9

[0988] 异二聚体的体内(in-vivo)抗肿瘤作用

[0989] 三种不同的体内小鼠模型用于测试制备的异二聚体(例如PD1-4-3xsc1BBL及SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL)治疗癌症的功效:

[0990] 1、NSG小鼠接种人干细胞(NSG mice inoculated with human stem cells)或人PBMCs或固定化人PBMCs(immobilized human PBMCs)及人肿瘤细胞。在所述模型中,所述异二聚体与相关的人类反受体/配体(例如PDL1,在肿瘤及免疫细胞上表达)以及与在数个人类免疫细胞上表达的4-1BB或CD40相互作用。

[0991] 2、接种人肿瘤细胞的裸SCID小鼠。在所述模型中,所述相关异二聚体与小鼠及人CD47(在所述数个肿瘤细胞上表达)相互作用,并测试了所述异二聚体对小鼠巨噬细胞活性的影响。

[0992] 3、NSG小鼠接种人干细胞及人肿瘤细胞。在所述模型中,所述异二聚体与肿瘤及/或数个免疫细胞上表达的所述相关反受体/配体相互作用。例如,对于SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL,所述异二聚体与小鼠及人类CD47(在肿瘤及免疫细胞上表达)以及人类T细胞上的4-1BB相互作用。测试了所述异二聚体对所述数个免疫细胞及肿瘤生长的影响。

[0993] 4、C57BL/6-人-4-1BB敲入小鼠(57BL/6-human-4-1BB knock-in mice)接种MC38小鼠结肠癌或其他癌细胞系或过表达人类相关对应物(例如PDL1及/或CD47)的癌细胞系。在所述模型中,所述小鼠4-1BB胞外结构域被人4-1BB的胞外结构域取代,因此所述异二聚体可以与小鼠T细胞上表达的人4-1BB相互作用。所述异二聚体与小鼠及在肿瘤细胞上表达的人PDL1及/或CD47相互作用。

[0994] 5、表达受试异二聚体的所述取代蛋白(surrogate protein)的数个同基因小鼠肿瘤模型(Syngeneic mouse tumor models)。例如,在所述模型中,当测试包含一PD1结构域的一异二聚体时,所述异二聚体与所述数个肿瘤细胞上的小鼠PDL1相互作用。

[0995] 在所有模型中,小鼠都通过静脉内(intravenously,IV)、腹膜内(intraperitoneally,IP)、皮下(subcutaneously,SC)或原位(orthotopically)接种肿瘤细胞。一旦肿瘤可触及($\sim 80\text{mm}^3$),用不同剂量及不同方案制备的异二聚体(例如4-3xsc1BBL及SIRP α -PD1-3xsc4-1BBL异二聚体),小鼠接受IV、IP、SC或原位治疗。

[0996] 跟踪小鼠的体重及临床症状。每周用一卡尺测量几次肿瘤;根据下式计算肿瘤体积: $V = \text{长度} \times \text{宽度}^2 / 2$ 。小鼠体重常规测量。通过整个实验监测肿瘤生长及存活。

[0997] 通过切除肿瘤或引流淋巴结、消化及使用特异性抗体染色及流式细胞术分析的免疫表型来测试肿瘤中免疫细胞的浸润及亚型。附加地或替代地,免疫细胞的浸润或肿瘤的坏死等级通过切除肿瘤、石蜡包埋及切片以用特异性抗体进行免疫组织化学染色来确定。

[0998] 在牺牲时,收获小鼠器官并嵌入石蜡块中用于H&E及IHC染色。

[0999] 根据数个常规程序,在不同时间点从小鼠身上采集血样,用于以下测试:PK分析、

血浆中的细胞因子测量、循环中血细胞亚群的FACS分析、血液学测试、血清化学测试、抗药物-抗体(ADA)分析及中及抗体分析(NAB)。

[1000] 范例10

[1001] LILRB2-SIRP α -3xsc4-1BBL异二聚体在HT1080-41BB及CHO-CD47细胞共培养物中激活4-1BB

[1002] 材料-TSP215如上文范例2所述制备。HT1080-41BB细胞、CHO-K1-CD47细胞、IL-8ELISA试剂盒(Biolegend,目录号431507)、DMEM(Biological Industries,目录号01-055-1A)、FBS(Rhenium,目录号10270106)、APC抗-41BB(Biolegend,目录号309810)、APC抗CD47抗体(Biolegend,目录号343124)、APC同种型IgG1(Biolegend,目录号400120)。

[1003] 方法-将数个CHO-K1-CD47细胞接种在数个96孔板中。将含有所述异二聚体的连续稀释的上清液在37°C下加入细胞中1小时,然后加入HT1080-41BB细胞并在37°C下培育过夜。根据制造商的方案,通过IL8ELISA试剂盒测定上清液中的IL8浓度。使用板读数器(Thermo Scientific,Multiscan FC)在450nm处分析上清液的IL8浓度,在540nm处进行参考。通过用抗CD47及抗41BB抗体进行免疫染色测定CD47表达及4-1BB受体及细胞系上的表达。通过流式细胞术进行分析。

[1004] 结果-使用过表达HT1080细胞系(HT1080-41BB)的4-BBL确定所制备的LILRB2-SIRP α -3xsc4-1BBL异二聚体TSP215对4-1BB受体介导的信号转导的激活。在4-1BBL与这些细胞表面的所述4-1BB受体结合后,依赖于交联的信号通路被激活,导致IL8的分泌(Wyzgol等人,2009年,The Journal of Immunology)。为了通过SIRP α 臂提供交联,将过表达CD47(CHO-K1-CD47)的CHO-K1细胞接种在96孔板中。在顶部添加TSP215的系列稀释液,然后添加HT1080-41BB细胞。在过夜共培育后测定对于所述培养基的从激活的HT1080-4-1BB细胞的IL8分泌。

[1005] 如图31所示,TSP215以一剂量依赖性方式触发IL8释放,表示出它在通过CD47交联后激活41BB/41BBL轴。

[1006] 范例11

[1007] LILRB2臂对相关异二聚体的影响

[1008] M-CSF依赖性巨噬细胞成熟

[1009] 所述数个异二聚体的所述LILRB2臂旨在通过竞争及阻断它们的相互作用来阻断由肿瘤或免疫细胞上表达的HLA-G诱导的对APC(如巨噬细胞及树突状细胞)上表达的内源性LILRB2的免疫抑制信号。M1样巨噬细胞显示出抗肿瘤活性,而M2巨噬细胞据报导可促进肿瘤进展。在M-CSF依赖性巨噬细胞成熟期间用拮抗性抗体阻断LILRB2可导致一更圆且紧密粘附的M1样(抗肿瘤)表型,具有CD14及CD163表达较低的情况。在用LPS刺激制备的巨噬细胞后,检测到促炎细胞因子TNF α 的分泌增加及抗炎IL-10的分泌减少。

[1010] 为此,使用基于流式细胞术的CD14及CD163检测以及通过在LPS预处理巨噬细胞刺激后测量TNF α 及IL-10释放来评估制备的LILRB2异二聚体对M-CSF依赖性巨噬细胞成熟的影响。

[1011] 材料-如上文范例2所述制备的异二聚体、CD14或CD33磁性微珠(Miltenyi Biotec 目录号130-045-501或目录号130-045-501)、RPMI1640(Biological Industries,目录号01-100-1A)、FCS(Gibco,目录号12657-029)、M-CSF(R&D systems,目录号216-MC)、TripLE

(Thermo Fisher Scientific, 目录号12604-013)、LPS (Sigma-Aldrich 目录号L1668-5MG)、IL-4 (R&D systems, 目录号204-IL)、PE抗人CD14抗体 (Biolegend, 目录号367104)、FITC抗人CD163抗体 (Biolegend, 目录号333618)、IL-10ELISA (Invitrogen, 目录号88-7106)、INF α ELISA (Invitrogen, 目录号88-7346)。

[1012] 方法-通过密度梯度离心法从健康志愿者的血液样本中分离PBMC, 然后用氯化铵裂解红血球 (ammonium chloride lysis of erythrocytes)。

[1013] 对于所述测定, 从分离的PBMC中进一步富集单核细胞 (例如, 通过使用CD14或CD33磁性微珠的MACS分选)。每孔20000个单核细胞接种在48孔板中, 并在RPMI 1640培养基+10%FCS中分化为巨噬细胞 (M0), 辅以M-CSF (50ng/ml), 在存在或不存在的异二聚体的情况下5天至7天。部分巨噬细胞用TripLE分离, 并对CD14及CD163表达进行染色。另一部分用LPS (50ng/mL) 及IL-4 (25ng/mL) 刺激过夜, 并通过ELISA测量上清液中IL-10及INF- α 的释放。

[1014] 范例12

[1015] 包含一SIRP α 或LILRB2结构域的所述数个异二聚体对数个巨噬细胞及数个多形核细胞的影响

[1016] 如前所述, 所述数个异二聚体的SIRP α 部分旨在阻断由表达CD47的肿瘤细胞诱导的“不要吃我 (don't eat me)”信号, 通过竞争及阻断APC (如巨噬细胞及粒细胞) 上表达的内源性SIRP α 。具有内源性SIRP α 的肿瘤细胞上的CD47。这种“不要吃我 (don't eat me)”信号的阻塞会诱导肿瘤细胞吞噬作用。

[1017] 所述异二聚体的LILRB2部分旨在通过竞争及阻断HLA-G在肿瘤或免疫细胞上的相互作用, 阻断肿瘤或免疫细胞上表达的HLA-G诱导的对APC (如巨噬细胞及DC) 上表达的内源性LILRB2的免疫抑制信号。具有内源性LILRB2的免疫细胞。HLA-G“不要吃我信号 (don't eat me signal)”的这种阻断诱导肿瘤细胞吞噬作用并阻止免疫细胞之间的抑制性HLA-G-LILRB2信号传导, 进而增强吞噬作用。

[1018] 使用基于流式细胞术的测定法或荧光显微镜评估制备的数个SIRP α 异二聚体对数个人巨噬细胞或数个多形核细胞 (polymorphonuclear cells, PMNs) 吞噬肿瘤细胞的影响以及数个LILRB2异二聚体对数个人巨噬细胞或数个DC吞噬肿瘤细胞的影响。

[1019] 材料-如上文范例2所述制备的异二聚体。CD14磁性微珠 (Miltenyi Biotec 目录号130-045-501), RPMI 1640 (Biological Industries, 目录号01-100-1A), FCS (Gibco, 目录号12657-029), M-CSF (R&D systems, 目录号216-MC), GM-CSF (R&D systems, 目录号7954-GM/CF), LPS (Sigma-Aldrich 目录号L1668-5MG), INF- γ (MBL, 目录号JM-4116-100), IL-4 (R&D systems, 目录号204-IL), CellTraceTM CFSE细胞增殖试剂盒 (Invitrogen, 目录号C34554), PERCP/Cy5.5抗人CD11b抗体 (Biolegend, 目录号301328), PE Cy7抗人HLA-DR抗体 (Biolegend, 目录号361708), APC抗人CD47抗体 (Biolegend, 目录号323124), FITC抗人HLA-G抗体 (Abcam, 目录号ab239334), 利妥昔单抗 (Rituximab), 西妥昔单抗 (Cetuximab), 源自不同的人癌细胞系癌症类型如淋巴瘤 (例如SUDHL6、Ramos) 及来自实体瘤 (例如DLD-1-结肠癌、A549-肺癌及MDAMB231-三阴性乳腺癌)、过表达HLA-G的癌细胞系及不表达的细胞阴性对照。

[1020] 方法-通过密度梯度离心法从健康志愿者的血液样本中分离多形核细胞 (PMN) 及

PBMC,然后用氯化铵裂解红血球。对于PMN测定,癌细胞用细胞膜或细胞质染料标记并与分离的PMN混合。用制备的异二聚体单独或与治疗性抗体(例如利妥昔单抗或西妥昔单抗)组合处理混合培养物。接下来,通过流式细胞术分析PMN对癌细胞的吞噬作用。

[1021] 对于巨噬细胞测定,数个单核细胞从分离的PBMC中进一步富集(例如,使用CD14磁性微珠通过MACS分选)。单核细胞在补充有GM-CSF (50ng/ml) 及M-CSF (50ng/ml) 的RPMI 1640培养基+10%FCS中分化成巨噬细胞(M0) 7天。为了产生1型巨噬细胞(M1),M0细胞由LPS及IFN- γ 引导(primed) 额外24小时。在补充有50ng/mL GM-CSF及20ng/mL IL-4的RPMI 1640培养基+10%FCS中,单核细胞分化为单核细胞衍生的DC 7天。癌细胞用细胞膜或细胞质染料标记,并与分离的及体外分化的I型巨噬细胞(M1) 或DC混合。用制备的异二聚体单独或与治疗性抗体组合处理混合培养物。培育后,未吞噬的肿瘤细胞被洗掉,巨噬细胞用与癌细胞不同颜色的抗CD11b抗体(M1) 或抗HLA-DR抗体(DC) 染色。通过流式细胞术分析巨噬细胞或DC对癌细胞的吞噬作用。在其他实验中,Incucyte对吞噬作用的评估如下:来自各种癌细胞系的肿瘤细胞用细胞质染料预染色,巨噬细胞或DC分别用抗人CD11b抗体或抗HLA-DR抗体染色(不同颜色比细胞质染料)。共培养染色的肿瘤细胞及巨噬细胞,并通过荧光显微镜拍摄图像。吞噬作用被量化为巨噬细胞或对肿瘤细胞吞噬(混合信号) 呈阳性的DC在总巨噬细胞(单一信号) 中的比例。

[1022] 范例13

[1023] 包含一TIGIT结构域的所述异二聚体的数个NK细胞细胞毒活性

[1024] 自然杀伤(NK) 细胞诱导直接的细胞毒性或细胞因子/趋化因子的分泌,而不会将特定抗原识别为B细胞及T细胞。NK细胞毒性在针对感染细胞、恶性肿瘤及应激细胞的免疫反应中起重要作用,并涉及多种疾病的病理过程。

[1025] 本领域已知的许多测定法用于确定所制备的异二聚体对NK活化的影响,包括但不限于:

[1026] 细胞毒性试验-NK细胞(效应细胞) 在共培养试验中杀死靶细胞。通过流式细胞术分析(FACS) 分析杀灭百分比。将靶细胞置于96孔板中,并与预先标记的原代NK细胞以不同的效应-靶(E:T) 比率培育。NK细胞在测定前用1000U/mL IL2培育48小时。4小时及24小时后,收集细胞并通过流式细胞术进行分析。从没有NK细胞的培养物中回收的靶细胞数量用作参考。

[1027] 细胞毒性试验-NK细胞(效应细胞) 在共培养试验中杀死靶细胞。杀伤百分比由Incucyte机器使用标记的靶细胞及半胱天冬酶敏感的荧光底物确定。

[1028] 炎性细胞因子的分泌:原代NK细胞被各种靶细胞以不同比例刺激24小时。无细胞培养上清液中干扰素 γ (IFN- γ) 及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF) 的水平通过ELISA或流式微珠阵列(CBA) 测定。

[1029] 尽管已经结合其数个特定实施例描述了本发明,但显然许多取代、修改及变化对于本领域技术人员来说将是显而易见的。因此,旨在涵盖落入所附权利要求的精神及广泛范围内的所有这些取代、修改及变化。

[1030] 本说明书中提及的所有出版物、专利案及专利申请案在此通过引用整体并入本说明书中,其程度如同每个单独的出版物、专利案或专利申请案被具体且单独地指示通过引用并入本文一样。此外,本申请中任何参考文献的引用或标识不应被解释为承认此类参考

文献可用作本发明的现有技术。就使用章节标题而言，它们不应被解释为必然限制。此外，本申请的任何优先权文件在此通过引用的方式整体并入本文。

序列表

<110> 卡尔医学有限公司 (KAHR Medical Ltd.)

托马斯杰斐逊大学 (Thomas Jefferson University)

马克·L·泰科辛斯基 (TYKOCINSKY, Mark L.)

阿米·塔米尔 (TAMIR, Ami)

埃德温·布雷默 (BREMER, Edwin)

<120> 数个异二聚体及其数个使用方法

<130> 82913

<150> US 62/872,741

<151> 2019-07-11

<160> 166

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 288

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 全长PD1的氨基酸序列

<400> 1

```

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

```

145	150	155	160
Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly			
	165	170	175
Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys			
	180	185	190
Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro			
	195	200	205
Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly			
	210	215	220
Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro			
225	230	235	240
Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly			
	245	250	255
Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg			
	260	265	270
Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu			
	275	280	285

<210> 2

<211> 867

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 全長PD1的核酸序列

<400> 2

```

atgcagatcc cacagcgcc ctggccagtc gtctgggctg tgctacaact gggctggcgg 60
ccaggatggg tcttagactc cccagacagg ccttgaacc ccccccactt ctcccagcc 120
ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc acctcacct gcagcttctc caacacatcg 180
gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240
gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 300
cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360
tacctctgtg gggccatctc cctggcccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 420
gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag ccctcacc 480
aggccagccg gccagttcca aacctggtg gttggtgtcg tgggcggcct gctgggcagc 540
ctgggtgctg tagtctgggt cctggccgtc atctgctccc gggccgcacg agggacaata 600
ggagccaggc gcaccggcca gcccetgaag gaggaccct cagccgtgcc tgtgtttctt 660
gtggactatg gggagctgga tttccagtgg cgagagaaga ccccgagcc ccccggtccc 720
tgtgtccctg agcagacgga gtatgccacc attgtcttct ctagcggaat gggcacctca 780
tccccgccc gcaggggctc agctgacggc cctcggagtg cccagccact gaggcctgag 840
gatggacact gctcttggcc cctctga 867

```

<210> 3

<211> 150

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 全具有CYS93>Ser取代的PD1 ECD的序列

<400> 3

```

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

```

<210> 4

<211> 450

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 3的核酸序列

<400> 4

```

cccggctggt ttctggactc tccagacaga ccttgaacc ctccaacctt ctctcccgt 60
ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc acctteacct gttccttcag caacacctcc 120
gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg tcccctagca accagaccga caagctggcc 180
gcctttcctg aggacagatc tcagccaggc caggactctc ggttcagagt taccagctg 240
cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca 300

```

tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc aagctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc 360
 gagctgagag tgacagaaag acgagctgag gtgccaccg ctcatccctc accttctcca 420
 agacctgctg gccagtttca gacactcgtg 450

<210> 5

<211> 167

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD1 ECM已知片段

<400> 5

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

<210> 6

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD1 ECM已知片段

<400> 6

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

<210> 7

<211> 150

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 150个氨基酸序列原始PD1域

<400> 7

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

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
 130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val
 145 150

<210> 8

<211> 450

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 核酸pf SEQ ID NO 7

<400> 8

ccaggatggt tcttagactc tccagatagg cettggaatc ccctacctt tagccccgcc 60
 ctgctggtgg tgacagaggg cgataacgcc accttccat gctcttttag caacacctcc 120
 gagtctttcg tgctgaattg gtacaggatg agcccttcca accagacaga caagctggca 180
 gcatttcctg aggaccgctc ccagccaggc caggattgcc ggttcagagt gaccagctg 240
 ccaaattggca gggactttca catgagcgtg gtgcgcgccc ggagaaacga ttccggcaca 300
 tacctgtgcg gagcaatctc tctggcacca aaggcacaga tcaaggagtc cctgagggca 360
 gagctgaggg tgaccgagag gagggccgag gtgccaacag cacaccatc tctagccca 420
 aggccagcag gacagttcca aaccctggtg 450

<210> 9

<211> 150

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 150个氨基酸原始PD1域(具有CYS93>Ser取代)

<400> 9

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15
 Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30
 Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60
 Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
 65 70 75 80
 Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95
 Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala

	100		105		110	
Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg	Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg					
	115		120		125	
Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly						
	130		135		140	
Gln Phe Gln Thr Leu Val						
145			150			
<210> 10						
<211> 450						
<212> DNA						
<213> 人工序列						
<220>						
<223> SEQ ID NO 9的核酸						
<400> 10						
ccaggatggt tcttagactc tccagatagg ccttgaatc cccctacctt tagccccgcc 60						
ctgctggtgg tgacagaggg cgataacgcc accttccat gctcttttag caacacctcc 120						
gagtctttcg tgctgaattg gtacaggatg agcccttcca accagacaga caagctggca 180						
gcatttcctg aggaccgctc ccagccaggc caggattctc ggttcagagt gaccagctg 240						
ccaaatggca gggactttca catgagcgtg gtgcgcgccc ggagaaacga ttccggcaca 300						
tacctgtgcg gagcaatctc tctggcacca aaggcacaga tcaaggagtc cctgagggca 360						
gagctgaggg tgaccgagag gagggccgag gtgccaacag cacaccatc tcctagccca 420						
aggccagcag gacagttcca aaccctggtg 450						
<210> 11						
<211> 140						
<212> PRT						
<213> 人工序列						
<220>						
<223> 在PD1域中的140个氨基酸-5-5						
<400> 11						
Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu						
1		5		10		15
Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser						
	20		25		30	
Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser						
	35		40		45	
Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro						
	50		55		60	
Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp						
65		70		75		80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser
 100 105 110
 Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr
 115 120 125
 Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln
 130 135 140

<210> 12

<211> 419

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO 11的核酸

<400> 12

gactctccag ataggccttg gaatccccct acctttagcc cgcacctgct ggtggtgaca 60
 gagggcgata acgccacctt cacatgctct tttagcaaca cctccgagtc tttcgtgctg 120
 aattggtaca ggatgagccc ttccaaccag acagacaagc tggcagcatt tcctgaggac 180
 cgctcccagc caggccagga ttgccggttc agagtgacct agctgcaaaa tggcagggac 240
 tttcacatga gcgtggtgcg cgcccggaga aacgattccg gcacatacct gtgcggagca 300
 atctctctgg caccaaaggc acagatcaag gagtcctga gggcagagct gagggtgacc 360
 gagaggaggg ccgaggtgcc aacagcacac ccattctcta gccaaggcc agcaggaca 419

<210> 13

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 在PD1域(具有CYS93>Ser取代)中的140个氨基酸-5-5

<400> 13

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
 20 25 30
 Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45
 Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
 50 55 60
 Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65 70 75 80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser
 100 105 110
 Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr
 115 120 125
 Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln
 130 135 140

<210> 14

<211> 419

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO 13的核酸

<400> 14

gactctccag ataggccttg gaatccccct acctttagcc cgcacctgct ggtggtgaca 60
 gagggcgata acgccacctt cacatgctct ttagcaaca cctccgagtc tttcgtgctg 120
 aattggtaca ggatgagccc ttccaaccag acagacaagc tggcagcatt tcctgaggac 180
 cgctcccagc caggccagga tctccggttc agagtgacc agctgcaaaa tggcagggac 240
 tttcacatga gcgtggtgcg cgcccggaga aacgattccg gcacatacct gtgcggagca 300
 atctctctgg caccaaaggc acagatcaag gagtcctga gggcagagct gagggtgacc 360
 gagaggaggg ccgaggtgcc aacagcacac ccattctcta gccaaggcc agcaggaca 419

<210> 15

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 140个氨基酸PD1片段

<400> 15

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
 20 25 30
 Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45
 Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
 50 55 60
 Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65 70 75 80

Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu
 100 105 110
 Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro
 115 120 125
 Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln
 130 135

<210> 20

<211> 405

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 19的核酸序列

<400> 20

ccttggaacc ctccaacctt ctctcccget ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60
 accttcacct gttccttcag caacacctcc gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg 120
 tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttctctg aggacagatc tcagccaggc 180
 caggactgcc ggttcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240
 gtgcggggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc 300
 aaggctcaga tcaaagagtc tctgcggggc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360
 gtgcccaccg ctcatccctc accttctcca agacctgccg gccag 405

<210> 21

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 133个氨基酸PD1片段

<400> 21

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
 20 25 30
 Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45
 Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
 50 55 60
 Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65 70 75 80
 Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95

Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser
 100 105 110
 Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr
 115 120 125
 Ala His Pro Ser Pro
 130

<210> 22

<211> 399

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 21的核酸序列

<400> 22

gactcccctg acagaccttg gaaccctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60
 gagggcgaca atgccacett cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc ctctgtgctg 120
 aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tcctgaggac 180
 agatctcagc caggccagga ctgccggttc agagttacc agctgcctaa cggccgggac 240
 ttccacatgt ctgttgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc 300
 atctctctgg ctccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360
 gaaagacgag ctgaggtgcc caccgctcat ccctcacct 399

<210> 23

<211> 135

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD1 -10-5 (具有CYS93>Ser取代)

<400> 23

Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu
 1 5 10 15
 Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser
 20 25 30
 Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys
 35 40 45
 Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg
 50 55 60
 Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val
 65 70 75 80
 Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile
 85 90 95

Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu
 100 105 110
 Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro
 115 120 125
 Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln
 130 135

<210> 24

<211> 405

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 23的核酸序列

<400> 24

ccttggaacc ctccaacctt ctctcccget ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60
 accttcacct gttccttcag caacacctcc gagtccttcg tgctgaactg gtacagaatg 120
 tcccctagca accagaccga caagctggcc gcctttctctg aggacagatc tcagccaggc 180
 caggactctc ggttcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240
 gtgcggggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc 300
 aaggctcaga tcaaagagtc tctgcggggc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360
 gtgcccaccg ctcatccctc accttctcca agacctgctg gccag 405

<210> 25

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD1 -10-12 (具有CYS93>Ser取代)

<400> 25

Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu
 1 5 10 15
 Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser
 20 25 30
 Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys
 35 40 45
 Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg
 50 55 60
 Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val
 65 70 75 80
 Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile
 85 90 95

Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu
 100 105 110

Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro
 115 120 125

<210> 26

<211> 384

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 25的核酸序列

<400> 26

ccttggaacc ctccaacctt ctctcccgt ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc 60
 accttcacct gttccttcag caacacctec gactccttcg tgctgaactg gtacagaatg 120
 tcccctagca accagaccga caagetggcc gcctttctctg aggacagatc tcagccaggc 180
 caggactctc ggttcagagt taccagctg cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt 240
 gtgcggggcca gacggaacga ctctggcaca tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc 300
 aaggctcaga tcaaagagtc tctgcggggc gagctgagag tgacagaaag acgagctgag 360
 gtgcccaccg ctcatccctc acct 384

<210> 27

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD1 -5-12 (新,来自V20) (具有CYS93>Ser取代)

<400> 27

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
 20 25 30

Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45

Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
 50 55 60

Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65 70 75 80

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95

Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser
 100 105 110

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr
 115 120 125

Ala His Pro Ser Pro
 130

<210> 28

<211> 399

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 27的核酸序列

<400> 28

gactctccag acagacctg gaaccteca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60
 gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc ctctgtgctg 120
 aactggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgctt tcttgaggac 180
 agatctcagc caggccagga ctctcggttc agagttacc agctgcctaa cggccgggac 240
 ttccacatgt ctggtgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc 300
 atctctctgg ctcccaaggc tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360
 gaaagacgag ctgaggtgcc caccgctcat cctcacct 399

<210> 29

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD1 -11-12

<400> 29

Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly
 1 5 10 15

Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe
 20 25 30

Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu
 35 40 45

Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe
 50 55 60

Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val
 65 70 75 80

Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser
 85 90 95

Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg
 100 105 110

Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro
 115 120 125

<210> 30

<211> 381

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 29的核酸序列

<400> 30

tggaaccctc caaccttctc tcccgtcttg ctggtgggta ccgagggcga caatgccacc 60
 ttcacctgtt ccttcagcaa cacctccgag tecttcgtgc tgaactggta cagaatgtcc 120
 cctagcaacc agaccgacaa getggccgcc tttcttgagg acagatctca gccaggccag 180
 gactgtcggg tcagagtgc ccagctgcct aacggcagag acttccacat gtccgtcgtg 240
 cgggccagaa gaaacgactc tggcacctat ctgtgcggcg ccattctctt ggctcccaag 300
 gctcagatca aagagtctct gcgggccgag ctgagagtga cagaaagacg agctgaggtg 360
 cccaccgctc atccctcacc t 381

<210> 31

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD1 -11-12 (新,来自V18) (具有CYS93>Ser取代)

<400> 31

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

<210> 32

<211> 381

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 31的核酸序列

<400> 32

```

tggaaccctc caaccttctc tcccgtctctg ctggtggta ccgagggcga caatgccacc 60
ttcacctggt ccttcagcaa cacctccgag tccttcgtgc tgaactggta cagaatgtcc 120
cctagcaacc agaccgacaa gctggccgcc tttcctgagg acagatctca gccaggccag 180
gactctcggg tcagagtgac ccagctgcct aacggcagag acttccacat gtccgtcgtg 240
cgggccagaa gaaacgactc tggcacctat ctgtgcggcg ccattctctt ggctcccaag 300
gctcagatca aagagtctct gcgggcccag ctgagagtga cagaaagacg agctgaggtg 360
cccaccgctc atccctcacc t 381

```

<210> 33

<211> 134

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD1 -11-5

<400> 33

```

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

```

<210> 34
 <211> 402
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 编码SEQ ID NO 33的核酸序列
 <400> 34
 tggaaccctc caaccttctc tcccgtctctg ctggtgggta ccgagggcga caatgccacc 60
 ttcacctgtt ccttcagcaa cacctccgag tccttcgtgc tgaactggta cagaatgtcc 120
 cctagcaacc agaccgacaa gctggccgcc tttcttgagg acagatctca gccaggccag 180
 gactgtcggg tcagagtgc ccagctgcct aacggcagag acttccacat gtccgtcgtg 240
 cgggccagaa gaaacgactc tggcacctat ctgtgcggcg ccattctctct ggctcccagg 300
 gctcagatca aagagtctct gcgggcccag ctgagagtga cagaaagacg agctgaggtg 360
 cccaccgctc atccctcacc ttctccaaga cctgctggcc ag 402
 <210> 35
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> PD1 -11-5 (新,来自V19) (具有CYS93>Ser取代)
 <400> 35
 Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly
 1 5 10 15
 Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe
 20 25 30
 Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu
 35 40 45
 Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe
 50 55 60
 Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val
 65 70 75 80
 Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser
 85 90 95
 Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg
 100 105 110
 Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser
 115 120 125
 Pro Arg Pro Ala Gly Gln
 130

<210> 36
 <211> 402
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 编码SEQ ID NO 35的核酸序列
 <400> 36
 tggaaccctc caaccttctc tcccgtctctg ctggtggta ccgagggcga caatgccacc 60
 ttcacctgtt ccttcagcaa cacctccgag tccttcgtgc tgaactggta cagaatgtcc 120
 cctagcaacc agaccgacaa gctggccgcc tttcttgagg acagatctca gccaggccag 180
 gactctcggg tcagagtgc ccagctgcct aacggcagag acttccacat gtccgtcgtg 240
 cgggccagaa gaaacgactc tggcacctat ctgtgcggcg ccattctctct ggctcccaag 300
 gctcagatca aagagtctct gcgggcccag ctgagagtga cagaaagacg agctgaggtg 360
 cccaccgctc atccctcacc ttctccaaga cctgctggcc ag 402
 <210> 37
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> PD1 -5-7
 <400> 37
 Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
 20 25 30
 Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45
 Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
 50 55 60
 Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65 70 75 80
 Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser
 100 105 110
 Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr
 115 120 125
 Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala
 130 135

<210> 38

<211> 414

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 37的核酸序列

<400> 38

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60
 gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg 120
 aactgggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tcctgaggac 180
 agatctcagc caggccagga ctgtcggttc agagtgacct agctgcctaa cggcagagac 240
 ttccacatgt ccgtcgtgcg ggccagaaga aacgactctg gcacctatct gtgcggcgcc 300
 atctctctgg ctcccaagge tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360
 gaaagacgag ctgaggtgcc caccgctcat cctcacctt ctccaagacc tgct 414

<210> 39

<211> 138

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD1 -5-7 (新,来自V21) (具有CYS93>Ser取代)

<400> 39

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

<210> 40
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 编码SEQ ID NO 39的核酸序列
 <400> 40
 gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60
 gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg 120
 aactgggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tcttgaggac 180
 agatctcagc caggccagga ctctcggttc agagtgacct agctgcctaa cggcagagac 240
 ttccacatgt ccgctcgtgcg ggccagaaga aacgactctg gcacctatct gtgcggcgcc 300
 atctctctggt ctcccaagge tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360
 gaaagacgag ctgaggtgcc caccgctcat cctcacctt ctccaagacc tgct 414
 <210> 41
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> PD1 -5-9 f来自(具有 out CYS93>Ser 取代)136个氨基酸
 <400> 41
 Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
 20 25 30
 Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45
 Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
 50 55 60
 Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65 70 75 80
 Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser
 100 105 110
 Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr
 115 120 125
 Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg
 130 135

<210> 42

<211> 408

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 41的核酸序列

<400> 42

gactctccag acagaccttg gaacctcca accttctctc ccgctctgct ggtggttacc 60
 gagggcgaca atgccacctt cacctgttcc ttcagcaaca cctccgagtc cttcgtgctg 120
 aactgggtaca gaatgtcccc tagcaaccag accgacaagc tggccgcctt tcctgaggac 180
 agatctcagc caggccagga ctgtcggttc agagttacc agctgcctaa cggccgggac 240
 ttccacatgt ctgttgtgcg ggccagacgg aacgactctg gcacatatct gtgcggcgcc 300
 atctctctgg ctcccaagge tcagatcaaa gagtctctgc gggccgagct gagagtgaca 360
 gaaagacgag ctgaggtgcc caccgctcat cctcacctt ctccaaga 408

<210> 43

<211> 145

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD1 -0-5来自(不具有CYS93>Ser取代)145个氨基酸

<400> 43

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

Gln

145

<210> 44

<211> 435

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 43的核酸序列

<400> 44

```

ccccggctggt ttctggactc tccagacaga ctttgaacc ctccaacctt ctctcccgt 60
ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc acctteacct gttccttcag caacacctcc 120
gagtccttcg tgctgaaactg gtacagaatg tcccctagea accagaccga caagctggcc 180
gcctttcctg aggacagatc tcagccaggc caggactgtc ggttcagagt taccagctg 240
cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca 300
tatctgtgcg gcgccatctc tctggetccc aaggetcaga tcaaagagtc tctgcgggcc 360
gagctgagag tgacagaaaag acgagctgag gtgcccaccg ctcatcctc accttctcca 420
agacctgctg gccag 435

```

<210> 45

<211> 143

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD1 -0-7来自(不具有CYS93>Ser取代)143个氨基酸

<400> 45

```

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
1           5           10           15
Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
           20           25           30
Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
           35           40           45
Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
           50           55           60
Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
65           70           75           80
Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
           85           90           95
Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
           100          105          110
Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg

```

115	120	125
Ala Glu Val Pro Thr	Ala His Pro Ser Pro Ser	Pro Arg Pro Ala
130	135	140
<210> 46		
<211> 429		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 编码SEQ ID NO 45的核酸序列		
<400> 46		
cccggctggt ttctggactc tccagacaga ccttgggaacc ctccaacctt ctctcccgct 60		
ctgctggtgg ttaccgaggg cgacaatgcc acctteacct gttccttcag caacacctcc 120		
gagtccttcg tgctgaaactg gtacagaatg tcccctagca accagaccga caagctggcc 180		
gcctttcctg aggacagatc tcagccaggc caggactgtc ggttcagagt taccagctg 240		
cctaacggcc gggacttcca catgtctgtt gtgcgggcca gacggaacga ctctggcaca 300		
tatctgtgcg gcgccatctc tctggctccc aaggctcaga tcaaagagtc tctgcgggcc 360		
gagctgagag tgacagaaaag acgagctgag gtgcccaccg ctcatcctc accttctcca 420		
agacctgct 429		
<210> 47		
<211> 254		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 全长41BBL的氨基酸序列		
<400> 47		
Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro		
1	5	10
Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val		
	20	25
Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe		
	35	40
Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser		
	50	55
Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp		
65	70	75
Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val		
	85	90
Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp		
	100	105
		110

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
 115 120 125
 Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
 130 135 140
 Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
 145 150 155 160
 Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
 165 170 175
 Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
 180 185 190
 Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
 195 200 205
 Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
 210 215 220
 Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
 225 230 235 240
 Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 245 250

<210> 48

<211> 765

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 全长41BBL的核酸序列

<400> 48

atggaatacgc cctctgacgc ttcactggac cccgaagccc cgtggcctcc cgcgccccgc 60
 gctcgcgcct gccgcgtact gccttgggcc ctggtcgcgg ggctgctgct gctgctgctg 120
 ctcgctgccg cctgcgccgt cttcctcgcc tgcccctggg ccgtgtccgg ggctcgcgcc 180
 tcgccccggt ccgcggccag cccgagactc cgcgagggtc ccgagctttc gcccagcgat 240
 cccgccggcc tcttggacct gcggcagggc atgtttgcgc agctggtggc ccaaaatggt 300
 ctgctgatcg atgggccct gagctggtac agtgaccag gcctggcagg cgtgtccctg 360
 acggggggcc tgagctacaa agaggacacg aaggagctgg tgggtggcaa ggctggagtc 420
 tactatgtct tctttcaact agagctgcgg cgcgtggtgg ccggcgaggg ctcaggctcc 480
 gtttcaactg cgctgcacct gcagccactg cgctctgctg ctggggccgc cgccctggct 540
 ttgaccgtgg acctgccacc cgctctctcc gaggtcggga actcggcctt cggtttccag 600
 ggccgcttgc tgcacctgag tgccggccag cgctggggcg tccatcttca cactgagccc 660
 agggcacgcc atgcctggca gttaccag ggcgccacag tcttgggact cttccgggtg 720
 acccccgaaa tcccagccgg actcccttca ccgaggtcgg aataa 765

<210> 49

<211> 205
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 原始41BBL域
 <400> 49
 Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala
 1 5 10 15
 Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro
 20 25 30
 Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala
 35 40 45
 Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro
 50 55 60
 Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp
 65 70 75 80
 Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe
 85 90 95
 Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val
 100 105 110
 Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala
 115 120 125
 Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg
 130 135 140
 Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly
 145 150 155 160
 Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala
 165 170 175
 Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr
 180 185 190
 Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 195 200 205
 <210> 50
 <211> 615
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 编码SEQ ID NO: 49的核酸序列
 <400> 50

gcctgcccct gggccgtgtc cggggctcgc gcctcgccc gctccgcggc cagcccgaga 60
 ctccgcgagg gtcccagct ttgcccagac gatcccgcg gcctcttga cctgcggcag 120
 ggcatgtttg cgcagctggt ggccaaaat gttctgctga tcgatgggcc cctgagctgg 180
 tacagtgacc caggcctggc aggcgtgtcc ctgacgggg gcctgagcta caaagaggac 240
 acgaaggagc tggtggtggc caaggctgga gtctactatg tcttctttca actagagctg 300
 cggcgcgtgg tggccggcga gggctcaggc tccgtttcac ttgcgctgca cctgcagcca 360
 ctgcgctctg ctgctggggc cgccgcctg gctttgaccg tggacctgcc acccgctcc 420
 tccgaggctc ggaactcggc cttcggtttc cagggccgct tgctgcacct gactgcccgc 480
 cagcgcctgg gcgctcatct tcacaactgag gccagggcac gccatgcctg gcagcttacc 540
 cagggcgcca cagtcttggg actcttccgg gtgacccccg aatcccagc cggactcctt 600
 tcaccgaggt cggaa 615

<210> 51

<211> 191

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 在4-1BBL域中的191个氨基酸14-0

<400> 51

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

Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro
 100 105 110
 Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu
 115 120 125
 Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly
 130 135 140
 Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His
 145 150 155 160
 Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr
 165 170 175
 Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro
 180 185 190
 Ser Pro Arg Ser Glu
 195

<210> 54

<211> 591

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 53的核酸序列

<400> 54

gctagagctt ctctggctc tgccgcttct cccagactga gagaaggacc tgagctgagc 60
 cctgatgatc ctgctggact gctggatctg cggcaggca tgtttgctca gttggtggcc 120
 cagaacgtgc tgctgatcga tggccctctg tcttggtact ctgatccagg attggctggc 180
 gtgtccctga ctggcggcct gtcttataaaa gaggacacca aagaactggt gttggccaag 240
 gccggcgtgt actacgtgtt ctttcagctg gaactgcgga gactggtggc tggcgaagga 300
 tctggatctg tgtctctggc cctgcatctg cagcctctga gaagtgctgc aggcgctgct 360
 gcaactggctc tgacagttga tctgctctct gctctctccg aggccagaaa ctccgccttt 420
 ggcttccaag gcagactgct gcacctgtcc gctggacaga gactgggagt ccatctgcac 480
 acagaggcca gagctagaca cgcttgagcag ttgacacagg gcgctacagt gctgggcctg 540
 tttagagtga cccctgagat tccagccggc ctgcatctc ctgatctga g 591

<210> 55

<211> 185

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 185个氨基酸41BBL 片段

<400> 55

Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu

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

<210> 56

<211> 555

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 55的核酸序列

<400> 56

```

ctgagagaag gacctgagct gagcctgat gatcctgctg gactgctgga tctgcggcag 60
ggcatgtttg ctcagttggt ggcccagaac gtgctgctga tcgatggccc tctgtcctgg 120
tactctgata caggattggc tggcgtgtcc ctgactggcg gctgtcttta caaagaggac 180
accaaaagaac tgggtggtggc caaggccggc gtgtactacg tgttctttca gctggaactg 240
cggagagtgg tggctggcga aggatctgga tctgtgtctc tggecctgca tctgcagcct 300
ctgagaagtg ctgcagcgc tgetgcaactg gctctgacag ttgatctgcc tctgcctcc 360
tccgaggcca gaaactccgc ctttggttc caaggcagac tgctgcacct gtccgctgga 420
cagagactgg gactccatct gcacacagag gccagagcta gacacgcttg gcagttgaca 480
cagggcgcta cagtgtggg cctgtttaga gtgaccctg agattccagc cggcctgcca 540

```

tctcctagat ctgag 555

<210> 57

<211> 199

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 199个氨基酸41BBL片段

<400> 57

Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg
1 5 10 15

Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu
 20 25 30

Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile
 35 40 45

Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser
 50 55 60

Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val
65 70 75 80

Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg
 85 90 95

Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu
 100 105 110

Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val
 115 120 125

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

Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His
145 150 155 160

Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly
 165 170 175

Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly
 180 185 190

Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 195

<210> 58

<211> 597

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 57的核酸序列

<400> 58

tctggcgcta gagcttctcc tggctctgcc gcttctccca gactgagaga aggacctgag 60
 ctgagccctg atgatcctgc tggactgctg gatctgcggc agggcatggt tgctcagttg 120
 gtggcccaga acgtgctgct gatcgatggc cctctgtcct ggtactctga tccaggattg 180
 gctggcggtg ccctgactgg cggcctgtct tacaagagg acaccaaaga actggtggtg 240
 gccaaaggccg gcgtgtacta cgtgttcttt cagctggaac tgcggagagt ggtggctggc 300
 gaaggatctg gatctgtgtc tctggcctg catctgcagc ctctgagaag tgctgcaggc 360
 gctgctgcac tggtctgtac agttgatctg cctctgcct cctccgaggc cagaaactcc 420
 gcctttggct tccaaggcag actgctgcac ctgtccgctg gacagagact gggagtccat 480
 ctgcacacag aggccagagc tagacacgct tggcagttga cacagggcgc tacagtgtg 540
 ggctgttta gagtgacccc tgagattcca gccggcctgc catctctag atctgag 597

<210> 59

<211> 184

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4-1BBL -21-0 184个氨基酸

<400> 59

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

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
 165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 180

<210> 60

<211> 552

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 59的核酸序列

<400> 60

agagagggcc ctgagctgtc tctgatgat cctgctggac tgctggacct gagacagggc 60
 atgtttgctc agctgggtggc ccagaacgtg ctgctgattg atggccctct gtctctgtac 120
 tctgatcctg gattggctgg cgtgtccctg actggcggcc tgtcttaca agaggacacc 180
 aaagaactgg tggtcgccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240
 agagtgggtg ctggcgaagg atctggatct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300
 agaagtgctg caggcgtgc tgcaactggct ctgacagttg atctgectcc tgctctctcc 360
 gaggccagaa actccgcctt tggttccaa ggcagactgc tgcatctgtc tgccggacag 420
 agactgggag tgcacctcca tacagaggcc agagctagac acgcttgga gttgacacag 480
 ggcgctacag tgctgggcct gtttagagtg acacctgaga tcccagccgg cctgccatct 540
 ccaagatctg aa 552

<210> 61

<211> 182

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4-1BBL -23-0 182个氨基酸

<400> 61

Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg
 1 5 10 15
 Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp
 20 25 30
 Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu
 35 40 45
 Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala
 50 55 60
 Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val
 65 70 75 80
 Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln

	85	90	95
Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp			
	100	105	110
Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln			
	115	120	125
Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu			
	130	135	140
His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala			
145	150	155	160
Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu			
	165	170	175
Pro Ser Pro Arg Ser Glu			
	180		

<210> 62

<211> 546

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 61的核酸序列

<400> 62

```

ggccctgagc tgtctcctga tgatcctgct ggactgctgg acctgagaca gggcatgttt 60
gctcagctgg tggcccagaa cgtgctgctg attgatggcc ctctgtcctg gtactctgat 120
cctggattgg ctggcgtgtc cctgactggc ggctgtctt acaaagagga caccaaagaa 180
ctgggtggctg ccaaggccgg cgtgtactac gtgttcttcc agctggaact gcggagagtg 240
gtggctggcg aaggatctgg atctgtgtct ctggccctgc atctgcagcc tctgagaagt 300
gctgcaggcg ctgctgcact ggctctgaca gttgatctgc ctctgcctc ctccgaggcc 360
agaaactccg cctttggctt ccaaggcaga ctgctgcatc tgtctgccgg acagagactg 420
ggagtgcacc tccatacaga ggccagagct agacacgctt ggcaattgac acagggcgct 480
acagtgctgg gcctgtttag agtgacacct gagatcccag ccggcctgcc atctccaaga 540
tctgaa 546

```

<210> 63

<211> 183

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4-1BBL -14-8 183个氨基酸

<400> 63

Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp			
1	5	10	15

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

<210> 64

<211> 551

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 63的核酸序列

<400> 64

gatctgccgc ttctcctaga ctgagagagg gcctgagct gtctcctgat gatcctgctg 60
 gactgctgga cctgagacag ggcatgtttg ctcagctggt ggcccagaac gtgctgctga 120
 ttgatggccc tctgtcctgg tactctgate ctggattggc tggcgtgtcc ctgactggcg 180
 gcctgtctta caaagaggac accaaagaac tgggtggtgc caaggccggc gtgtactacg 240
 tgttctttca gctggaactg cggagagtgg tggctggcga aggatctgga tctgtgtctc 300
 tggccctgca tctgcagcct ctgagaagtg ctgcagcgc tgctgcactg gctctgacag 360
 ttgatctgcc tctgcctcc tccgaggcca gaaactccgc ctttggttc caagcgacac 420
 tgctgcatct gtctgccgga cagagactgg gactgcacct ccatacagag gccagagcta 480
 gacacgcttg gcagttgaca caggcgccta cagtgtctgg cctgtttaga gtgacacctg 540
 agatcccagc c 551

<210> 65

<211> 176

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4-1BBL -21-8 176个氨基酸

<400> 65

```

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

```

<210> 66

<211> 528

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 65的核酸序列

<400> 66

```

agagagggcc ctgagctgtc tctgatgat cctgctggac tgctggacct gagacagggc 60
atgtttgctc agctgggtgc ccagaacgtg ctgctgattg atggcctct gtctgtgtac 120
tctgatcctg gattggctgg cgtgtcctg actggcggcc tgtcttaca agaggacacc 180

```

aaagaactgg tggtcgcaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240
 agagtgggtg ctggcgaagg atctggatct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300
 agaagtgctg caggcgtgc tgcaactggct ctgacagttg atctgcctcc tgcctcctcc 360
 gaggccagaa actccgcctt tggcttcaa ggcagactgc tgcactctgtc tgccggacag 420
 agactgggag tgcacctcca tacagaggcc agagctagac acgcttggca gttgacacag 480
 ggcgctacag tgctgggcct gtttagagt acacctgaga tcccagcc 528

<210> 67

<211> 601

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 601个氨基酸_{sc3x4-1BBL} (-14-0)内连接体(GGGGS)x2+GGGG

<400> 67

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

Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala
 210 215 220
 Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln
 225 230 235 240
 Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly
 245 250 255
 Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr
 260 265 270
 Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln
 275 280 285
 Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser
 290 295 300
 Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala
 305 310 315 320
 Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn
 325 330 335
 Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln
 340 345 350
 Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp
 355 360 365
 Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro
 370 375 380
 Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg
 405 410 415
 Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu
 420 425 430
 Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu
 435 440 445
 Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly
 450 455 460
 Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu
 465 470 475 480
 Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu
 485 490 495
 Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu
 500 505 510
 His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu

515	520	525
Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe		
530	535	540
Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly		
545	550	555
Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr		
	565	570
Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro		
	580	590
Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu		
595	600	

<210> 68

<211> 1803

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 67的核酸序列

<400> 68

```

agcgcgcct cccctaggct gcgcgagga ccagagctga gccagacga tccagcagga 60
ctgctggacc tgaggcaggg aatgttcgca cagctggtgg ccagaacgt gctgctgac 120
gacggccctc tgtcttgta cagcatcca ggactggcag gcgtgagcct gacaggcga 180
ctgtcctata aggaggatac caaggagctg gtggtggcaa aggcaggcgt gtactacgtg 240
ttcttccagc tggagctgag gagagtgtg gcaggagagg gatccgatc tgtgagcctg 300
gccctgcacc tgcagccact gcggagcgc gcaggagcag ccgccctggc cctgaccgtg 360
gacctgccac ctgcatctag cgaggcacgg aattctgct tcggcttca gggcagactg 420
ctgcacctga gcgccgaca gaggctggga gtgcacctgc acacagaggc aagggaaga 480
cacgatggc agctgacaca gggagcaacc gtgctgggac tgttccgct gaccctgag 540
atcccagcag gactgccatc cccccgtct gagggcggc gcgggtccg aggaggagga 600
tctggcggcg gcggcagcgc cgctcccc aggtgcgcg agggacctga gctgtccca 660
gacgatcctg ccggcctgct ggacctgaga cagggaatgt ttgccagct ggtcgctcag 720
aacgtgctgc tgattgacgg cccctgtcc tggtatagc atcctggact ggcaggcgtg 780
tctctgacag gcggactgag ttacaaaga gactaaag aactggtcgt cgccaaagcc 840
ggcgtgtact acgtgttctt ccaactggag ctgaggagg tcgtcgccg cgaaggcagc 900
ggctctgtga gcctggcct gcacctgca cactgagga gcgccccg cgccgccgc 960
ctggccctga ctgtggacct gccaccagca tcctctgagg caaggaattc gccttcggc 1020
ttccagggcc ggctgctgca cctgtctgcc ggacagagac tgggcgtcca cctgcatacc 1080
gaagccagag ccaggcatgc ctggcagctg acccaggcg ccaccgtgct gggcctgttc 1140
agagtgacc cagaaattcc agcaggactg cttcccaa ggtctgagg aggaggagga 1200
agtggcggag gaggatccg agggggagg agcgcgcct cccaagact gagagagga 1260

```

ccagagctgt cccctgatga ccctgccggg ctgctggacc tgagacaagg catgttcgcc 1320
 cagctggtcg cacaaaacgt gctgttaatt gacggccac tgtcctggta ttccgacct 1380
 ggctggccg gcgtgtccct gacaggcggc ctgtcttaca aagaagacac aaaagaactg 1440
 gtcgtcgcta aagctggcgt gtactacgtg ttcttcaat tagaactgag aagggtcgtc 1500
 gccggcgagg gcagcgggtc tgtgagcctg gcctgcacc tgcaaccgct gcggagcgcc 1560
 gccggcgctg ccgccctggc cctgacagtg gacctgcctc cagcaagctc cgaggcaagg 1620
 aatagcgctt tcggctttca aggccgctg ctgcacctgt ccgccggaca gcggctgggc 1680
 gtccacctgc acaccgaagc cagagcccgc catgcctggc agctgactca gggcgctacc 1740
 gtgctgggcc tgttccgcgt gaccccagag atccctgccg gcctgcctc ccctcggtct 1800
 gag 1803

<210> 69

<211> 504

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 全长SIRP的氨基酸序列

<400> 69

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

Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Ser
 180 185 190
 Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser Tyr Ser
 195 200 205
 Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val His Ser
 210 215 220
 Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp Pro Leu
 225 230 235 240
 Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro Thr Leu
 245 250 255
 Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn Val Thr
 260 265 270
 Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp Leu
 275 280 285
 Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val Thr Glu
 290 295 300
 Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val Asn Val
 305 310 315 320
 Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu His Asp
 325 330 335
 Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser Ala His
 340 345 350
 Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly Ser Asn
 355 360 365
 Glu Arg Asn Ile Tyr Ile Val Val Gly Val Val Cys Thr Leu Leu Val
 370 375 380
 Ala Leu Leu Met Ala Ala Leu Tyr Leu Val Arg Ile Arg Gln Lys Lys
 385 390 395 400
 Ala Gln Gly Ser Thr Ser Ser Thr Arg Leu His Glu Pro Glu Lys Asn
 405 410 415
 Ala Arg Glu Ile Thr Gln Asp Thr Asn Asp Ile Thr Tyr Ala Asp Leu
 420 425 430
 Asn Leu Pro Lys Gly Lys Lys Pro Ala Pro Gln Ala Ala Glu Pro Asn
 435 440 445
 Asn His Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Gln Thr Ser Pro Gln Pro Ala Ser
 450 455 460
 Glu Asp Thr Leu Thr Tyr Ala Asp Leu Asp Met Val His Leu Asn Arg
 465 470 475 480
 Thr Pro Lys Gln Pro Ala Pro Lys Pro Glu Pro Ser Phe Ser Glu Tyr

	485	490	495
Ala Ser Val Gln Val Pro Arg Lys			
	500		
<210> 70			
<211> 1512			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 全长SIRP的核酸序列			
<400> 70			
atggagcccg ccggcccggc ccccgggcgc ctcgggcgcg tgctctgect gctgctcgcc 60			
gcgtcctgcg cctggtcagg agtggcgggt gaggaggagc tgcaggtgat tcagcctgac 120			
aagtccgtat cagttgcagc tggagagtcg gccattctgc actgcactgt gacctccctg 180			
atccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga ggagctggac cagccccgga attaattctac 240			
aatcaaaaag aaggccactt cccccgggta acaactgttt cagagtccac aaagagagaa 300			
aacatggact tttccatcag catcagtaac atcacccag cagatgccgg cacctactac 360			
tgtgtgaagt tccgaaaagg gagccctgac acggagttta agtctggagc aggcaactgag 420			
ctgtctgtgc gtgcaaaacc ctctgcccc gtggtatcgg gcctgcggc gagggccaca 480			
cctcagcaca cagtgcgctt cacctgcgag tcccacggct tctcaccag agacatcacc 540			
ctgaaatggg tcaaaaatgg gaatgagctc tcagacttcc agaccaactg ggaccccgta 600			
ggagagagcg tgtcctacag catccacagc acagccaagg tgggtctgac ccgcgaggac 660			
gttcaactctc aagtcatctg cgaggtggcc cacgtcacct tgcaggggga ccctcttcgt 720			
gggactgcca acttgtctga gaccatccga gttccacca ccttggaggt tactcaacag 780			
cccgtgaggg cagagaacca ggtgaatgtc acctgccagg tgaggaagtt ctacccccag 840			
agactacagc tgacctggtt ggagaatgga aacgtgtccc ggacagaaac ggcctcaacc 900			
gttacagaga acaaggatgg tacctacaac tggatgagct ggctcctggt gaatgtatct 960			
gcccacaggg atgatgtgaa gctcacctgc caggtggagc atgacgggca gccagcggtc 1020			
agcaaaaagcc atgacctgaa ggtctcagcc cacccgaagg agcagggctc aaataccgcc 1080			
gctgagaaca ctggatctaa tgaacggaac atctatattg tgggtgggtgt ggtgtgcacc 1140			
ttgctggtgg ccctactgat ggcggcctc tacctcgtcc gaatcagaca gaagaaagcc 1200			
cagggctcca cttcttctac aaggttgcac gagccccaga agaatgccag agaaataaca 1260			
caggacacaa atgatatcac atatgcagac ctgaacctgc ccaaggggaa gaagcctgct 1320			
ccccaggctg cggagcccaa caaccacacg gagtatgcca gcattcagac cagccccgag 1380			
cccgcgtcgg aggacaccct cacctatget gacctggaca tgggtccacct caaccggacc 1440			
cccaagcagc cgcccccaa gcctgagccg tctttctcag agtacgccag cgtccaggtc 1500			
ccgaggaagt ga 1512			
<210> 71			
<211> 343			
<212> PRT			

<213> 人工序列

<220>

<223> 原始SIRPa域(343AA)

<400> 71

Glu	Glu	Glu	Leu	Gln	Val	Ile	Gln	Pro	Asp	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Ala
1				5					10					15	
Ala	Gly	Glu	Thr	Ala	Thr	Leu	Arg	Cys	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Ile	Pro
				20				25					30		
Val	Gly	Pro	Ile	Gln	Trp	Phe	Arg	Gly	Ala	Gly	Pro	Gly	Arg	Glu	Leu
				35			40					45			
Ile	Tyr	Asn	Gln	Lys	Glu	Gly	His	Phe	Pro	Arg	Val	Thr	Thr	Val	Ser
				50			55				60				
Asp	Leu	Thr	Lys	Arg	Asn	Asn	Met	Asp	Phe	Ser	Ile	Arg	Ile	Gly	Asn
65				70						75				80	
Ile	Thr	Pro	Ala	Asp	Ala	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Val	Lys	Phe	Arg	Lys
				85				90						95	
Gly	Ser	Pro	Asp	Asp	Val	Glu	Phe	Lys	Ser	Gly	Ala	Gly	Thr	Glu	Leu
				100				105						110	
Ser	Val	Arg	Ala	Lys	Pro	Ser	Ala	Pro	Val	Val	Ser	Gly	Pro	Ala	Ala
				115				120						125	
Arg	Ala	Thr	Pro	Gln	His	Thr	Val	Ser	Phe	Thr	Cys	Glu	Ser	His	Gly
				130			135					140			
Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Ile	Thr	Leu	Lys	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu
145				150						155				160	
Leu	Ser	Asp	Phe	Gln	Thr	Asn	Val	Asp	Pro	Val	Gly	Glu	Ser	Val	Ser
				165				170						175	
Tyr	Ser	Ile	His	Ser	Thr	Ala	Lys	Val	Val	Leu	Thr	Arg	Glu	Asp	Val
				180				185						190	
His	Ser	Gln	Val	Ile	Cys	Glu	Val	Ala	His	Val	Thr	Leu	Gln	Gly	Asp
				195				200						205	
Pro	Leu	Arg	Gly	Thr	Ala	Asn	Leu	Ser	Glu	Thr	Ile	Arg	Val	Pro	Pro
				210				215						220	
Thr	Leu	Glu	Val	Thr	Gln	Gln	Pro	Val	Arg	Ala	Glu	Asn	Gln	Val	Asn
225				230						235				240	
Val	Thr	Cys	Gln	Val	Arg	Lys	Phe	Tyr	Pro	Gln	Arg	Leu	Gln	Leu	Thr
				245				250						255	
Trp	Leu	Glu	Asn	Gly	Asn	Val	Ser	Arg	Thr	Glu	Thr	Ala	Ser	Thr	Val
				260				265						270	
Thr	Glu	Asn	Lys	Asp	Gly	Thr	Tyr	Asn	Trp	Met	Ser	Trp	Leu	Leu	Val

275	280	285
Asn Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu		
290	295	300
His Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser		
305	310	315
Ala His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly		
325	330	335
Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr		
340		

<210> 72

<211> 1029

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 71的核酸序列

<400> 72

```

gaggaggagc tgcaggatgat tcagcctgac aagtccgtat cagttgcagc tggagagtcg 60
gccattctgc actgcactgt gacctcctg atccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga 120
ggagctggac cagcccggga attaattctac aatcaaaaag aaggccactt cccccgggta 180
acaactgttt cagagtccac aaagagagaa aacatggact tttccatcag catcagtaac 240
atcacccag cagatgccgg cacctactac tgtgtgaagt tccgaaagg gagccctgac 300
acggagttta agtctggagc aggcactgag ctgtctgtgc gtgccaaacc ctctgcccc 360
gtggtatcgg gccctgcggc gagggccaca cctcagcaca cagtgcgctt cacctgcgag 420
tcccacggct tctcacccag agacatcacc ctgaaatggt tcaaaaatgg gaatgagctc 480
tcagacttcc agaccaacgt ggaccccgtg ggagagagcg tgtcctacag catccacagc 540
acagccaagg tgggtgctgac ccgcgaggac gttcactctc aagtcatctg cgaggtggcc 600
cacgtcacct tgcaggggga ccctcttctg gggactgcc aattgtctga gaccatccga 660
gttccacca ccttggaggt tactcaacag cccgtgaggg cagagaacca ggtgaatgtc 720
acctgccagg tgaggaagtt ctacccccag agactacagc tgacctggtt ggagaatgga 780
aacgtgtccc ggacagaaac ggctcaacc gttacagaga acaaggatgg tacctacaac 840
tggatgagct ggctcctggt gaatgtatct gccacaggg atgatgtgaa gctcacctgc 900
caggtggagc atgacgggca gccagcggtc agcaaaagcc atgacctgaa ggtctcagcc 960
cacccgaagg agcagggctc aaataccgcc gctgagaaca ctggatctaa tgaacggaac 1020
atctatatt 1029

```

<210> 73

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 116个氨基酸SIRPa片段

<400> 73

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

<210> 74

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 73的核酸序列

<400> 74

gaagaggaac tgcaagtgat ccagcctgac aagtccgtgc tgggtggctgc tggcgaaacc 60
 gccacactga gatgtaccgc cacctctctg atccctgtgg gccctatcca gtggtttaga 120
 ggcgctggac ctggcagaga gctgatctac aaccagaaag agggccactt tcctagagtg 180
 accaccgtgt ccgacctgac caagcggaac aacatggact tctccatccg gatcggcaac 240
 atcacccttg ctgatgccgg cacctactac tgcgtgaagt tccggaaggg ctcccctgac 300
 gacgtcgagt ttaaataccgg cgctggcacc gaactgtccg tgcgagct 348

<210> 75

<211> 343

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有 4 个点突变SIRPa的343个氨基酸序列

<400> 75

Glu Glu Glu Ile Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala

1	5	10	15
Ala Gly Glu Thr	Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr Ser Leu Ile Pro		
	20	25	30
Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Val Leu			
	35	40	45
Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser			
	50	55	60
Asp Leu Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn			
65	70	75	80
Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys			
	85	90	95
Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu			
	100	105	110
Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala			
	115	120	125
Arg Ala Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly			
	130	135	140
Phe Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu			
145	150	155	160
Leu Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser			
	165	170	175
Tyr Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val			
	180	185	190
His Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp			
	195	200	205
Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro			
	210	215	220
Thr Leu Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn			
225	230	235	240
Val Thr Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr			
	245	250	255
Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val			
	260	265	270
Thr Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val			
	275	280	285
Asn Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu			
	290	295	300
His Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser			
305	310	315	320

Ala His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly
 325 330 335

Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr
 340

<210> 76

<211> 1029

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 75的核酸序列

<400> 76

gaagaggaaa tccaagtgat ccagcctgac aagtccgtgc tgggtggctgc tggcgaaacc 60
 gccacactga gatgtaccat cacctctctg atccctgtgg gccctatcca gtggtttaga 120
 ggcgctggac ctggcagagt gctgatctac aaccagaaag agggccactt tcttagagtg 180
 accaccgtgt ccgacctgac caagcggaac aacatggact tctccatccg gatcggaac 240
 atcaccctctg ctgatgccgg cacctactac tgcatacaagt tccggaagg ctcccctgac 300
 gacgtcgagt ttaaataccgg cgtggcacc gaactgtccg tgcgagctaa accttctgct 360
 cccgtgggtgt ctggccctgc cgctagagct acacctcagc acaccgtgtc ttttacctgc 420
 gaggcccacg gcttcagccc tagagacatc acctgaagt ggttcaagaa cggcaacgag 480
 ctgtccgact tccagaccaa cgtggaccct gtgggagagt ccgtgtccta ctccatccac 540
 tctaccgcca aggtggtgct gacccgagag gacgtgcaca gccaagtgat ctgtgaagtg 600
 gcccacgtga ccctccaggg cgatccttg agaggaccg ccaacctgtc cgagacaatc 660
 agagtgcctc ctacactgga agtgaccag cagcctgtgc gggccgagaa tcaagtgaac 720
 gtgacctgcc aagtgcgaa gttctaccct cagagactgc agctgacctg gctggaaaac 780
 ggcaatgtgt ccagaaccga gacagcctcc acctgaccg agaacaagga tggcacctac 840
 aattggatgt cctggctgct cgtgaacgtg tccgctcaca gagatgacgt gaagctgaca 900
 tgccagggtgg aacacgatgg ccagcctgcc gtgtctaagt cccacgacct gaaagtgtct 960
 gctcacccca aagagcaggg ctccaatacc gccgctgaga acaccggctc caacgagaga 1020
 aacatctac 1029

<210> 77

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有 4 个点突变的SIRPa的116个氨基酸序列

<400> 77

Glu Glu Glu Ile Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala
 1 5 10 15

Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr Ser Leu Ile Pro

	20		25		30
Val Gly Pro	Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Val Leu				
	35		40		45
Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser					
	50		55		60
Asp Leu Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn					
65		70		75	80
Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys					
	85		90		95
Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu					
	100		105		110
Ser Val Arg Ala					
	115				

<210> 78

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 77的核酸序列

<400> 78

```

gaagaggaaa tccaagtgat ccagcctgac aagtccgtgc tgggtggctgc tggcgaaacc 60
gccacactga gatgtacat cacctctctg atccctgtgg gccctatcca gtggtttaga 120
ggcgctggac ctggcagagt gctgatctac aaccagaaag agggccactt tcctagagtg 180
accaccgtgt cggacctgac caagcggaac aacatggact tctccatccg gatcggcaac 240
atcacccttg ctgatgccgg cacctactac tgcatcaagt tccggaaggg ctcccctgac 300
gacgtcgagt ttaaattccgg cgctggcacc gaactgtccg tgcgagct 348

```

<210> 79

<211> 989

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DSP305 及 DSP105_V1的989个氨基酸白链

<400> 79

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu					
1		5		10	15
Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser					
	20		25		30
Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser					
	35		40		45

Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
 50 55 60
 Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65 70 75 80
 Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser
 100 105 110
 Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr
 115 120 125
 Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 145 150 155 160
 Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 165 170 175
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 180 185 190
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 195 200 205
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 210 215 220
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 245 250 255
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 260 265 270
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Cys
 275 280 285
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
 290 295 300
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 305 310 315 320
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 325 330 335
 Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 340 345 350
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

355	360	365
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser		
370	375	380
Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu		
385	390	395
Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met		
405	410	415
Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu		
420	425	430
Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly		
435	440	445
Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly		
450	455	460
Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly		
465	470	475
Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg		
485	490	495
Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro		
500	505	510
Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu		
515	520	525
Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu		
530	535	540
Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu		
545	550	555
Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro		
565	570	575
Arg Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
580	585	590
Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro		
595	600	605
Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln		
610	615	620
Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr		
625	630	635
Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr		
645	650	655
Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr		
660	665	670

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
 675 680 685
 Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
 690 695 700
 Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
 705 710 715 720
 Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
 725 730 735
 Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
 740 745 750
 Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
 755 760 765
 Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 770 775 780
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
 785 790 795 800
 Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro
 805 810 815
 Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala
 820 825 830
 Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro
 835 840 845
 Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp
 850 855 860
 Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe
 865 870 875 880
 Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val
 885 890 895
 Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala
 900 905 910
 Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg
 915 920 925
 Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly
 930 935 940
 Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala
 945 950 955 960
 Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr
 965 970 975
 Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu

980	985
<210> 80	
<211> 2967	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 编码SEQ ID NO 79的核酸序列	
<400> 80	
gactctccag ataggccttg gaatccccct acctttagcc cgcacctgct ggtggtgaca 60	
gagggcgata acgccacctt cacatgctct tttagcaaca cctccgagtc tttcgtgctg 120	
aattggtaca ggatgagccc ttccaaccag acagacaagc tggcagcatt tcttgaggac 180	
cgctcccagc caggccagga ttctcggttc agagtgacc agctgcaaaa tggcagggac 240	
tttccatga gcgtggtgcg cgccccgaga aacgattccg gcacatacct gtgcggagca 300	
atctctctgg caccaaaaggc acagatcaag gagtccctga gggcagagct gagggtgacc 360	
gagaggaggg ccgaggtgcc aacagcacac ccattctcta gcccaggcc agcaggacag 420	
ggaggaggag gatccggagg aggaggatcc gagtctaagt atggaccacc atgccctcca 480	
tgtccagcac ctgagtttga gggaggacct tccgtgttcc tgtttcccc taagccaaag 540	
gacacactga tgatctccag gacaccagag gtgacctgcg tgggtggtgga cgtgtctcag 600	
gaggatcccc aggtgcagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca caatgccaaag 660	
accaagccta gggaggagca gtttaactcc acataccgcg tgggtgtctgt gctgaccgtg 720	
ctgcaccagg attggctgaa cggcaaggag tataagtgtg aggtgagcaa taagggcctg 780	
ccaagctcca tcgagaagac catctccaag gcaaaggac agccaaggga gcctcaggtg 840	
tatacactgc caccagcca gtgcgagatg accaagaacc aggtgagcct gtctctgtgcc 900	
gtgaagggct tctaccatc tgacatgcc gtggagtggg agagcaatgg ccagcccag 960	
aacaattata agaccacacc tccagtgtg gactccgatg gctctttctt tctggtgtcc 1020	
aggctgacag tggataagtc tcgctggcag gagggcaacg tgttttcttg tagcgtgatg 1080	
cacgaggccc tgcacaatca ctacaccag aagtccctgt ctctgagcct gggcaagggc 1140	
ggcggcggct ccgaggagg aggaagcgcc gcctccccta ggctgcgca gggaccagag 1200	
ctgagcccag acgatccagc aggactgctg gacctgagc agggaatggt cgcacagctg 1260	
gtggcccaga acgtgctgct gatcgacggc cctctgtctt ggtacagcga tccaggactg 1320	
gcaggcgtga gcctgacagc cggactgtcc tataaggagg ataccaagga gctggtggtg 1380	
gcaaaggcag gcgtgtacta cgtgttcttc cagctggagc tgaggagagt ggtggcagga 1440	
gagggatccg gatctgtgag cctggccctg cacctgcagc cactgcggag cgccgcagga 1500	
gcagccgccc tggccctgac cgtggacctg ccacctgcat cttagcaggc acggaattct 1560	
gccttcggct ttcagggcag actgctgcac ctgagcgccg gacagaggct gggagtgcac 1620	
ctgcacacag aggcaagggc aagacacgca tggcagctga cacagggagc aaccgtgctg 1680	
ggactgttcc gcgtgacccc tgagatcca gcaggactgc catcccccg gtctgagggc 1740	
ggcggcgggt ccgaggagg aggatctggc ggcggcggca gcgccgctc ccccaggctg 1800	
cgcgagggac ctgagctgtc cccagacgat cctgccggcc tgctggacct gagacaggga 1860	

atgtttgccc agctggctgc tcagaacgtg ctgctgattg acggccccct gtcctggtat 1920
 agcgatcctg gactggcagg cgtgtctctg acaggcggac tgagttacaa agaagacact 1980
 aaagaactgg tcgtcgccaa agccggcgtg tactacgtgt tcttccaact ggagctgagg 2040
 agggctcgtc cgggcgaagg cagcggctct gtgagcctgg ccctgcacct gcaaccactg 2100
 aggagcggcg ccggcgccgc cgccctggcc ctgactgtgg acctgccacc agcatcctct 2160
 gaggcaagga attccgcctt cggttccag ggccggctgc tgcacctgtc tgccggacag 2220
 agactgggcg tccacctgca taccgaagcc agagccaggc atgcctggca gctgaccag 2280
 ggcgccaccg tgctgggctt gttcagagt accccagaaa ttccagcagg actgccttcc 2340
 ccaaggtctg agggaggagg aggaagtggc ggaggaggat ccggaggggg agggagcgc 2400
 gcctcccaaa gactgagaga gggaccagag ctgtcccctg atgacctgc cgggctgctg 2460
 gacctgagac aaggcatggt cgcccagctg gtgcacaaa acgtgctgtt aattgacggc 2520
 ccaactgtct ggtattccga cctggcctg gccggcgtgt cctgacagg cggcctgtct 2580
 tacaagaag acacaaaaga actggtcgtc gctaaagctg gcgtgtacta cgtgttcttc 2640
 caattagaac tgagaagggt cgtcgccggc gagggcagcg ggtctgtgag cctggccctg 2700
 cacctgcaac cgctgcggag cgccgccggc gctgccgcc tggccctgac agtggacctg 2760
 cctccagcaa gctccgaggc aaggaatagc gccttcggct ttcaaggccg cctgctgcac 2820
 ctgtccgccg gacagcggct gggcgtccac ctgcacaccg aagccagagc ccgcatgcc 2880
 tggcagctga ctcagggcgc taccgtgctg ggctgttcc gcgtgacccc agagatcctt 2940
 gccggcctgc cctcccctcg gtctgag 2967

<210> 81

<211> 379

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DSP305的379个氨基酸序列

<400> 81

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser
 20 25 30
 Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser
 35 40 45
 Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
 50 55 60
 Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65 70 75 80
 Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser

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

<210> 82

<211> 1137

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 81的核酸序列

<400> 82

```

gactctccag ataggccttg gaatccccct acctttagcc cgcacctgct ggtggtgaca 60
gagggcgata acgccacctt cacatgctct ttagcaaca cctccgagtc tttcgtgctg 120
aattggtaca ggatgagccc ttccaaccag acagacaagc tggcagcatt tcctgaggac 180
cgctcccagc caggccagga ttctcggttc agagtgacct agctgccaaa tggcagggac 240
tttcacatga gcgtggtgcg cgccccgaga aacgattccg gcacatacct gtgcggagca 300
atctctctgg caccaaaggc acagatcaag gagtcctga gggcagagct gagggtgacc 360
gagaggaggg ccgagggtgc aacagcacac ccattctcta gcccaggcc agcaggacag 420
ggcggaggag gcagcggagg aggaggatcc gagtctaagt acggaccacc atgccctcca 480
tgtcctgcac cagagttcga gggaggacca tccgtgttcc tgtttccacc taagcctaag 540
gacacctga tgatctccag aacccccgag gtgacatgcg tgggtggtgga cgtgtctcag 600
gaggatcctg aggtgcagtt caattggtac gtggatggcg tggaggtgca caacgccaag 660
acaaagcccc gggaggagca gtttaatagc acctacagag tgggtgtccgt gctgacagtg 720
ctgcaccagg attggctgaa tggcaaggag tataagtgta aggtgagcaa caaggcctg 780
cctagctcca tcgagaagac catctccaag gccaaaggcc agccaagaga gccacaggtg 840
tgcacctgc caccaagcca ggaggagatg acaaagaatc aggtgtccct gtggtgtctg 900
gtgaagggtc tctacccttc cgacatgcc gtggagtggg agtctaacgg ccagccagag 960
aacaattaca agaccacacc tccagtgtg gactctgatg gcagcttctt tctgtattct 1020
cggctgaccg tggataagag cagatggcag gagggaacg tgttcagctg ctccgtgatg 1080
cacgaggccc tgcacaacca ctatacacag aagtctctga gcctgtccct gggcaag 1137

```

<210> 83

<211> 389

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DSP305_V1的389个氨基酸序列

<400> 83

```

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
1           5           10           15
Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
           20           25           30
Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
           35           40           45
Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
           50           55           60
Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
65           70           75           80

```

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

385

<210> 84

<211> 1167

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码SEQ ID NO 83的核酸序列

<400> 84

```

ccaggatggt tcctggacag ccccgatagg cettggaatc ccctacctt ttcccctgcc 60
ctgctggtgg tgacagaggg cgacaacgcc accttccat gctcttttag caacacctcc 120
gagtctttcg tgctgaattg gtacaggatg agcccttcca accagacaga taagctggca 180
gcatttccag aggaccgcag ccagcctgga caggattgcc ggttcagagt gaccagctg 240
ccaaatggca gggactttca catgtccgtg gtgcgcgccc ggagaaacga ttctggcaca 300
tacctgtgcg gagcaatcag cctggcacca aaggcacaga tcaaggagtc cctgagggca 360
gagctgaggg tgaccgagag gagggccgag gtgccaacag cacaccatc tcctagccca 420
cggcccgcg gccagttcca gaccctggtg ggaggaggag gaagcggagg aggaggatcc 480
gagtctaagt acggaccacc atgccctcca tgtcctgcac cagagtttga gggcggccca 540
tccgtgttcc tgtttcccc taagcccaag gacaccctga tgatcagccg gaccccagag 600
gtgacatgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaggatcctg aggtgcagtt caattggtac 660
gtggatggcg tggaggtgca caacgccaag acaaagcccc gggaggagca gtttaattcc 720
acctacagag tgggtgtctgt gctgacagtg ctgcaccagg attggctgaa tggcaaggag 780
tataagtgta aggtgtccaa caagggcctg cccagctcca tcgagaagac catctctaag 840
gccaaaggcc agccaagaga gccacaggtg tgcaccctgc caccatcca ggaggagatg 900
acaaagaatc aggtgtctct gtggtgtctg gtgaagggt tctacccttc tgacatcgca 960
gtggagtggg agagcaacgg acagccagag acaattaca agaccacacc tccagtgctg 1020
gactctgatg gcagcttctt tctgtatagc cggctgaccg tggataagtc cagatggcag 1080
gagggcaacg tgttcagctg ttccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctatacacag 1140
aagtctctga gcctgtccct gggcaag 1167

```

<210> 85

<211> 1192

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1192个氨基酸TSP111 及 TSP111_V2 "白"链

<400> 85

```

Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala
1           5           10          15
Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro
                20           25           30

```

Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
 50 55 60
 Asp Leu Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn
 65 70 75 80
 Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
 85 90 95
 Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
 100 105 110
 Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala
 115 120 125
 Arg Ala Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly
 130 135 140
 Phe Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu
 145 150 155 160
 Leu Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser
 165 170 175
 Tyr Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val
 180 185 190
 His Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp
 195 200 205
 Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro
 210 215 220
 Thr Leu Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn
 225 230 235 240
 Val Thr Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr
 245 250 255
 Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val
 260 265 270
 Thr Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val
 275 280 285
 Asn Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu
 290 295 300
 His Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser
 305 310 315 320
 Ala His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly
 325 330 335
 Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

	340		345		350										
Ser	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
	355		360		365										
Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
	370		375		380										
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
385			390		395		400								
Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
	405		410		415										
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
	420		425		430										
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
	435		440		445										
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
	450		455		460										
Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
465			470		475		480								
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Cys	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
	485		490		495										
Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
	500		505		510										
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
	515		520		525										
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Arg
	530		535		540										
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
545			550		555		560								
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
	565		570		575										
Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
	580		585		590										
Ala	Ala	Ser	Pro	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Pro	Glu	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp
	595		600		605										
Pro	Ala	Gly	Leu	Leu	Asp	Leu	Arg	Gln	Gly	Met	Phe	Ala	Gln	Leu	Val
	610		615		620										
Ala	Gln	Asn	Val	Leu	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro	Leu	Ser	Trp	Tyr	Ser	Asp
625			630		635		640								
Pro	Gly	Leu	Ala	Gly	Val	Ser	Leu	Thr	Gly	Gly	Leu	Ser	Tyr	Lys	Glu
	645		650		655										

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe		
660	665	670
Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser		
675	680	685
Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala		
690	695	700
Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala		
705	710	715
Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala		
725	730	735
Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His		
740	745	750
Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val		
755	760	765
Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly		
770	775	780
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser		
785	790	795
Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly		
805	810	815
Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn		
820	825	830
Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu		
835	840	845
Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys		
850	855	860
Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu		
865	870	875
Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu		
885	890	895
Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu		
900	905	910
Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser		
915	920	925
Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg		
930	935	940
Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln		
945	950	955
Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu		

	965	970	975
Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser			
	980	985	990
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu			
	995	1000	1005
Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu			
	1010	1015	1020
Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val			
	1025	1030	1035
Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu			
	1040	1045	1050
Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr			
	1055	1060	1065
Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe			
	1070	1075	1080
Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser			
	1085	1090	1095
Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly			
	1100	1105	1110
Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser			
	1115	1120	1125
Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His			
	1130	1135	1140
Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala			
	1145	1150	1155
Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu			
	1160	1165	1170
Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser			
	1175	1180	1185

Pro Arg Ser Glu
1190

<210> 86

<211> 3577

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO 85的核酸

<400> 86

gaggaggagc tgcaggtcat ccagcccgat aagtctgtgc tgggtggcagc aggagagacc 60

gccacactga gatgcaccgc cacaagcctg atcccagtgg gaccaatcca gtggttttagg 120
ggagcaggac ctggaaggga gctgatctac aaccagaagg agggccactt cccaagggtg 180
accacagtgt ccgacctgac caagcggaac aatatggatt tttctatcag aatcggcaat 240
atcacacctg ccgacgccgg cacctactat tgcgtgaagt tcagaaaggg cagcccagac 300
gatgtggagt ttaagagcgg agcaggaacc gagctgtccg tgagagccaa gccttctgcc 360
ccagtggatga gcgaccagc agcaaggga accccacagc acacagtgtc cttcacctgt 420
gagagccacg gcttttcccc acgcgatatc aactgaagt ggttcaagaa cggcaatgag 480
ctgagcgact ttcagaccaa cgtggatccc gtgggcgagt ctgtgagcta ctccatccac 540
tctacagcca aggtgggtgt gacccgggag gacgtgcaca gccaggtcat ctgagagtg 600
gcacacgtga ccctgcaggg cgatcctctg agaggcacag ccaatctgag cgagaccatc 660
agggtgcccc ctacactgga ggtgaccag cagcccgtga gggcagagaa ccaagtgaat 720
gtgacatgtc aggtgcggaa gttctaccct cagagactgc agctgacctg gctggagaac 780
ggcaactgta gccggaccga gacagccagc accgtgacag agaacaagga cggcacatat 840
aattggatgt cttggctgct ggtgaactg agcgcaccaca gggacgatgt gaagctgacc 900
tgccaggtgg agcacgacgg acagccagcc gtgtctaaga gccacgatct gaaggtgagc 960
gcccacccta aggagcaggg ctccaacaca gccgccgaga ataccggcag caacgagaga 1020
aatatctacg gaggaggagg atccggagga ggaggatccg agtctaagta tggaccacca 1080
tgccctccat gtccagcacc tgagtttgag ggaggacctt ccgtgttctt gtttccccct 1140
aagccaaagg acacactgat gatctccagg acaccagagg tgacctgctt ggtggtggac 1200
gtgtctcagg aggatcccga ggtgcagttc aactggtac tggatggcgt ggaggtgcac 1260
aatgccaaga ccaagcctag ggaggagcag ttaactcca cataccgctt ggtgtctgtg 1320
ctgaccgtgc tgcaccagga ttggctgaac ggcaaggagt ataagtgtaa ggtgagcaat 1380
aagggcctgc caagctccat cgagaagacc atctccaagg caaagggaca gccaaaggag 1440
cctcaggtgt atacactgcc acccagccag tgcgagatga ccaagaacca ggtgagcctg 1500
tctgtgccg tgaagggtt ctacctctt gacatcgccg tggagtggga gagcaatggc 1560
cagcccgaga acaattataa gaccacacct ccagtgtgg actccgatgg ctctttcttt 1620
ctggtgtcca ggctgacagt ggataagtct cgctggcagg agggcaactt gttttcttgt 1680
agcgtgatgc acgaggccct gcacaatcac tacaccaga agtccctgtc tctgagcctg 1740
ggcaagggcg gcggcggctc cggaggagga ggaagcggc cctcccctag gctgcgcgag 1800
ggaccagagc tgagcccaga cgatccagca ggactgtctg acctgaggca gggaatgttc 1860
gcacagctgg tggcccagaa cgtgctgctg atcgacggcc ctctgtcttg gtacagcgat 1920
ccaggactgg caggcgtgag cctgacaggc ggactgtctt ataaggagga taccaaggag 1980
ctggtgggtg caaaggcagg cgtgtactac gtgttcttcc agctggagct gaggagagtg 2040
gtggcaggag agggatccgg atctgtgagc ctggccctgc acctgcagcc actgcggagc 2100
gccgcaggag cagccgccct ggccctgacc gtggacctgc cacctgcac tagcgaggca 2160
cggaattctg ccttcggctt tcagggcaga ctgctgcacc tgagcggcg acagaggctg 2220
ggagtgcacc tgcaacacaga ggcaaggga agacacgcat ggcagctgac acaggagca 2280
accgtgtgg gactgttccg cgtgaccct gagatccag caggactgcc atcccccg 2340
tctgagggcg gcggcgggtc cggaggagga ggatctggcg gcggcggcag cgccgcctcc 2400

cccaggctgc gcgagggacc tgagctgtcc ccagacgac ctgccggcct gctggacctg 2460
 agacagggaa tgtttgccca gctggctgct cagaacgtgc tgctgattga cggccccctg 2520
 tcctgggtata gcgatcctgg actggcaggc gtgtctctga caggcggact gagttacaaa 2580
 gaagacacta aagaactggt cgtcgccaaa gccggcgtgt actacgtgtt cttccaactg 2640
 gagctgagga gggctcgtcg cggcgaaggc agcggctctg tgagcctggc cctgcacctg 2700
 caaccactga ggagcgccgc cggcgccgcc gccctggccc tgactgtgga cctgccacca 2760
 gcatcctctg aggcaaggaa ttccgccttc ggcttccagg gccggctgct gcacctgtct 2820
 gccggacaga gactgggcgt ccacctgcat accgaagcca gagccaggca tgcctggcag 2880
 ctgaccaggc gcgccaccgt gctgggctg ttcagagtga cccagaaat tccagcagga 2940
 ctgccttccc caaggtctga gggaggagga ggaagtggcg gaggaggatc cggaggggga 3000
 gggagcgccg cctccccaaag actgagagag ggaccagagc tgtcccctga tgacctgcc 3060
 gggctgctgg acctgagaca aggcatgttc gccagctgg tcgcacaaaa cgtgctgtta 3120
 attgacggcc cactgtcctg gtattccgac cctggcctgg ccggcgtgtc cctgacaggc 3180
 ggctgtctt acaaagaaga cacaaaagaa ctggctctcg ctaaagctgg cgtgtactac 3240
 gtgttcttcc aattagaact gagaagggtc gtcgccggcg agggcagcgg gtctgtgagc 3300
 ctggccctgc acctgcaacc gctgcggagc gccgccggcg ctgccgccct ggccctgaca 3360
 gtggacctgc ctccagcaag ctccgaggca aggaatagcg ccttcggctt tcaaggccgc 3420
 ctgctgcacc tgtccgccgg acagcggctg ggcgtccacc tgcacaccga agccagagcc 3480
 cgccatgcct ggcagctgac tcaggcgct accgtgctgg gctgttccg cgtgacccca 3540
 gagatccctg ccggcctgcc ctcccctcgg tctgagt 3577

<210> 87

<400> 87

000

<210> 88

<400> 88

000

<210> 89

<211> 379

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 379个氨基酸TSP111_V1 "白"链

<400> 89

Asp	Ser	Pro	Asp	Arg	Pro	Trp	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Leu
1				5				10						15	
Leu	Val	Val	Thr	Glu	Gly	Asp	Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser
				20				25						30	
Asn	Thr	Ser	Glu	Ser	Phe	Val	Leu	Asn	Trp	Tyr	Arg	Met	Ser	Pro	Ser
				35				40						45	

Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro
 50 55 60
 Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp
 65 70 75 80
 Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser
 100 105 110
 Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr
 115 120 125
 Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 145 150 155 160
 Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 165 170 175
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 180 185 190
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 195 200 205
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 210 215 220
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 245 250 255
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 260 265 270
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Cys
 275 280 285
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
 290 295 300
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 305 310 315 320
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 325 330 335
 Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 340 345 350
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

355	360	365
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
370	375	
<210> 90		
<211> 1137		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> SEQ ID NO 89的核酸		
<400> 90		
gactctccag ataggccttg gaatccccct acctttagcc cgcacctgct ggtggtgaca 60		
gagggcgata acgccacett cacatgctct tttagcaaca cctccgagtc tttcgtgctg 120		
aattggtaca ggatgagccc ttccaaccag acagacaagc tggcagcatt tcttgaggac 180		
cgcagccagc caggacagga ttccccggtc agagtgacct agctgccaaa tggcagggac 240		
tttccatgt ctgtggtgcg cgccccgaga aacgatagcg gcacatacct gtgcggagca 300		
atctccctgg caccaaaggc acagatcaag gagtccctga gggcagagct gagggtgacc 360		
gagaggaggg ccgaggtgcc aacagcacac ccatctccta gcccaaggcc agcaggacag 420		
ggaggaggag gctctggagg aggaggatcc gagtctaagt acggaccacc atgccctcca 480		
tgtcctgcac cagagttcga gggaggacca tccgtgttc tgtttccacc taagcctaag 540		
gacaccctga tgatctccag aacccccgag gtgacatgcg tgggtggtgga cgtgtctcag 600		
gaggatcctg aggtgcagtt caattggtac gtggatggcg tggaggtgca caacgccaaag 660		
acaaagcccc gggaggagca gttaattct acctacagag tggtagcgt gctgacagtg 720		
ctgcaccagg attggctgaa tggcaaggag tataagtgta aggtgagcaa caagggcctg 780		
cctagctcca tcgagaagac catctccaag gccaaaggcc agccaagaga gccccaggtg 840		
tacaccctgc caccagcca gtgcgagatg acaaagaatc aggtgagcct gtcctgtgcc 900		
gtgaagggtc tctaccctag cgacatcgca gtggagtggg agtccaacgg acagccagag 960		
aacaattata agaccacacc tccagtgtg gactccgatg gctctttctt tctggtgtcc 1020		
cggctgaccg tggataagag ccggtggcag gagggcaacg tgttcagctg cagcgtgatg 1080		
cacgaggccc tgcacaacca ctatacacag aagtcctgt ctctgagcct gggcaag 1137		
<210> 91		
<211> 1192		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 1192个氨基酸TSP111_V1 "杵"链		
<400> 91		
Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala		
1 5 10 15		
Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro		

Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 340 345 350
 Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 355 360 365
 Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 370 375 380
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 385 390 395 400
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 405 410 415
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 420 425 430
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 435 440 445
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 450 455 460
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 465 470 475 480
 Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 485 490 495
 Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 500 505 510
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 515 520 525
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 530 535 540
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 545 550 555 560
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 565 570 575
 Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 580 585 590
 Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
 595 600 605
 Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
 610 615 620
 Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
 625 630 635 640
 Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu

	645	650	655
Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe			
	660	665	670
Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser			
	675	680	685
Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala			
	690	695	700
Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala			
705	710	715	720
Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala			
	725	730	735
Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His			
	740	745	750
Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val			
	755	760	765
Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly			
	770	775	780
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser			
785	790	795	800
Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly			
	805	810	815
Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn			
	820	825	830
Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu			
	835	840	845
Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys			
	850	855	860
Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu			
865	870	875	880
Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu			
	885	890	895
Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu			
	900	905	910
Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser			
	915	920	925
Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg			
	930	935	940
Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln			
945	950	955	960

Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu
 965 970 975
 Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Ser
 980 985 990
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu
 995 1000 1005
 Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu
 1010 1015 1020
 Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
 1025 1030 1035
 Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
 1040 1045 1050
 Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr
 1055 1060 1065
 Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe
 1070 1075 1080
 Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
 1085 1090 1095
 Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
 1100 1105 1110
 Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
 1115 1120 1125
 Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His
 1130 1135 1140
 Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala
 1145 1150 1155
 Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu
 1160 1165 1170
 Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
 1175 1180 1185
 Pro Arg Ser Glu
 1190
 <210> 92
 <211> 3576
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> SEQ ID NO 91的核酸
 <400> 92

gaggaggagc tgcaggatcat ccagcccgat aagtctgtgc tgggtggcagc aggagagacc 60
 gccacactga gatgcaccgc cacaagcctg atcccagtg gaccaatcca gtggttttagg 120
 ggagcaggac ctggaaggga gctgatctac aaccagaagg agggccactt cccaagggtg 180
 accacagtgt ccgacctgac caagcggaac aatatggatt tttctatcag aatcggaat 240
 atcacacctg ccgacgccgg cacctactat tgcgtgaagt tcagaaaggg cagcccagac 300
 gatgtggagt ttaagtccgg agcaggaacc gagctgtctg tgagagcaaa gcctagcgcc 360
 ccagtgggtg ccgaccagc agcaaggga accccacagc acacagtgtc cttcacctgt 420
 gagtcccacg gcttttctcc acgcgatatc aactgaagt ggttcaagaa cggcaatgag 480
 ctgagcgact ttacagacaa cgtggatccc gtgggcgagt ctgtgagcta ctccatccac 540
 tctacagcca aggtgggtgct gacccgggag gacgtgcaca gccaggatcat ctgagaggtg 600
 gcacacgtga ccctgcaggg cgatcctctg agaggcagc ccaatctgtc cgagaccatc 660
 aggggtgccc ctacactgga ggtgaccag cagcccgtga gggcagagaa ccaagtgaat 720
 gtgacatgtc aggtgcggaa gttctaccct cagagactgc agctgacctg gctggagaac 780
 ggcaatgtga gccgcaccga gacagcctcc accgtgacag agaacaagga cggcacatat 840
 aattggatga gctggctgct ggtgaacgtg tccgccaca gggacgatgt gaagctgacc 900
 tgccagggtg agcacgacgg acagccagcc gtgtctaaga gccacgatct gaaggtgtcc 960
 gccacccta aggagcaggg ctctaacaca gccgccgaga ataccggcag caacgagaga 1020
 aatatctacg gaggaggagg atccggagga ggaggatccg agtctaagta tggaccacca 1080
 tgccctccat gtccagcacc tgagtttgag ggaggaccta gcgtgttctt gtttcccct 1140
 aagccaaagg acacactgat gatctccagg acaccagagg tgacctgcgt ggtggtggac 1200
 gtgtctcagg aggatcccga ggtgcagttc aactggtac tggtatggcgt ggaggtgcac 1260
 aatgccaaga ccaagcctag ggaggagcag ttaactcta cataccgctg ggtgagcgtg 1320
 ctgaccgtgc tgcaccagga ttggctgaac ggcaaggagt ataagtgtaa ggtgagcaat 1380
 aagggcctgc caagctccat cgagaagacc atctccaagg caaagggaca gccaaaggag 1440
 cctcaggtgt gcacactgcc accctctcag gaggagatga ccaagaacca ggtgagcctg 1500
 tgggtgtctg tgaagggtt ctaccaagc gacatcgccg tggagtggga gtccaatggc 1560
 cagcccagaga acaattacaa gaccacacct ccagtgtgag actctgatgg cagcttcttt 1620
 ctgtatttcta ggctgacagt ggataagagc cgctggcagg agggcaactg gtttagctgt 1680
 tccgtgatgc acgaggcct gcacaatcac tataccaga agtctctgag cctgtccctg 1740
 ggcaagggcg gcggcggcag cggcggagga ggatccgccg cctctcctag gctgagggag 1800
 ggaccagagc tgagcccaga cgatccagca ggactgctgg acctgaggca gggaatgttc 1860
 gcacagctgg tggcccagaa cgtgctgctg atcgacggcc ctctgagctg gtactccgat 1920
 ccaggactgg caggcgtgtc cctgacaggc ggactgtctt ataaggagga taccaaggag 1980
 ctggtggtgg caaaggcagg cgtgtactac gtgtttcttc agctggagct gaggagagtg 2040
 gtggcaggag agggctctgg aagcgtgtcc ctggccctgc acctgcagcc actgcggagc 2100
 gccgcaggag cagccgccct ggccctgacc gtggacctgc cacctgcac tagcgaggca 2160
 cggaattctg ccttcggett tcagggcaga ctgctgcacc tgagcggcg acagaggctg 2220
 ggagtgcacc tgacacagaa ggcaaggga agacacgcat ggcagctgac acaggagca 2280
 accgtgctgg gactgttccg cgtgaccct gagatcccag caggactgcc atctccacgg 2340

agcgagggcg gcggcggctc tggaggagga ggaagcggag gcggcggctc cgccgcttct 2400
 cccaggctgc gcgagggacc tgagctgtcc ccagacgatc ctgccggcct gctggacctg 2460
 agacagggaa tgtttgcca gctggctgct cagaacgtgc tgctgattga cggccccctg 2520
 tcctggattt ccgatcctgg actggcaggc gtgagcctga caggcggcct gagctacaaa 2580
 gaagacacta aagaactggt cgtcgccaaa gccggcgtgt actacgtgtt cttccaactg 2640
 gagctgagga gggctcgtcg cggcgaagga tccggcagcg tgtccctggc cctgcacctg 2700
 caaccactga ggagcgccgc cggcgccgcc gccctggccc tgactgtgga cctgccacca 2760
 gcatcctctg aggcaaggaa ttccgccttc ggcttccagg gccggctgct gcacctgtct 2820
 gccggacaga gactgggctg ccacctgcat accgaagcca gagccaggca tgcctggcag 2880
 ctgaccacag gcgccaccgt gctgggctg ttcagagtga cccagaaat tccagcagga 2940
 ctgccttctc caaggagcga gggcggcggg ggctccggcg gaggaggctc tggcggcggc 3000
 ggctccgccg cctctccaag gctgcgcgag ggaccagagc tgtccctga tgacctgcc 3060
 gggctgctgg acctgagaca aggcatgttc gccagctgg tcgcacaaa cgtgctgtta 3120
 attgacggcc cactgtcctg gtatagcgac cctggcctgg ccggcgtgtc tctgacaggc 3180
 ggactgagct acaaagaaga tactaaagaa ctggctgtgg ccaaagctgg cgtgtactac 3240
 gtgttcttcc aattagaact gagaagggtc gtcgccggcg aggatccgg gagcgtgtcc 3300
 ctggccctgc acctgcaacc gctgcggagc gccgccggcg ctgccgccct ggccctgaca 3360
 gtggacctgc ctccagcaag ctccgaggca aggaatagcg ccttcggctt tcaaggccgc 3420
 ctgctgcacc tgtccgccg acagcggctg ggcgtccacc tgcacaccga agccagagcc 3480
 cgccatgcct ggcagctgac tcaggcgct accgtgctgg gcctgttccg cgtgacccca 3540
 gagatccctg caggactgcc ctctcctcgg agcgag 3576

<210> 93

<400> 93

000

<210> 94

<400> 94

000

<210> 95

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工讯号胜肽

<400> 95

Met Glu Ser Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1

5

10

15

Asp Gly Val His Ala

20

<210> 96

<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接体胜肽序列
<400> 100
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10
<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接体胜肽序列
<220>
<221> REPEAT
<222> (1) .. (5)
<223> 可能重复 1-3 倍
<400> 101
Glu Ala Ala Ala Lys
1 5
<210> 102
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接体胜肽序列
<220>
<221> REPEAT
<222> (2) .. (6)
<223> 重复2-5 倍
<400> 102
Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala
1 5
<210> 103
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 连接体胜肽序列

<400> 103

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala
1 5 10

<210> 104

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 连接体胜肽序列

<400> 104

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15
Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala
 20 25 30
Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala
 35 40 45

<210> 105

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 连接体胜肽序列

<400> 105

Pro Ala Pro Ala Pro
1 5

<210> 106

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 连接体胜肽序列

<400> 106

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

Leu Asp

<210> 107

<211> 14

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 连接体胜肽序列
 <400> 107
 Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr
 1 5 10
 <210> 108
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 连接体胜肽序列
 <400> 108
 Gly Ser Ala Gly Ser Ala Ala Gly Ser Gly Glu Phe
 1 5 10
 <210> 109
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 连接体胜肽序列
 <400> 109
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Glu 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
 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> 110
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 连接体胜肽序列
 <400> 110
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Glu 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
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140

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 Val 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> 112
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 连接体胜肽序列
 <400> 112
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 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 Asp Glu Leu 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> 113
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 连接体胜肽序列
 <400> 113
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 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 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp 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> 114
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 连接体胜肽序列
 <400> 114
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 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 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val
 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> 115
 <211> 398
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LILRB2 D1-4, AA 22-419 (Q8N423-1 UniParc) 胺基酸序列
 <400> 115
 Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp Ala Glu Pro Asp Ser
 1 5 10 15
 Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Ser Cys Gln Gly Ser Leu
 20 25 30
 Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys Lys Ser Ala Ser Trp
 35 40 45
 Ile Thr Arg Ile Arg Pro Glu Leu Val Lys Asn Gly Gln Phe His Ile
 50 55 60
 Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Thr Gly Arg Tyr Gly Cys Gln Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Ser Arg Ala Arg Trp Ser Glu Leu Ser Asp Pro Leu Val Leu Val Met
 85 90 95
 Thr Gly Ala Tyr Pro Lys Pro Thr Leu Ser Ala Gln Pro Ser Pro Val
 100 105 110
 Val Thr Ser Gly Gly Arg Val Thr Leu Gln Cys Glu Ser Gln Val Ala
 115 120 125
 Phe Gly Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Glu His Pro Gln
 130 135 140
 Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser Ser Arg Ala Ile Phe
 145 150 155 160
 Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg Trp Ser His Arg Cys Tyr
 165 170 175
 Gly Tyr Asp Leu Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Ser Pro Ser Asp Leu
 180 185 190
 Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro Ser Leu Ser Val
 195 200 205
 Gln Pro Gly Pro Val Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu Thr Leu Gln Cys
 210 215 220

agcaagaagc catctctgag cgtgcagcca ggccctgtgg tggcacctgg cgagtctctg 660
 accctgcagt gcgtgagcga cgtgggctac gatcggttcg tgctgtataa ggaggagag 720
 agggatctga ggcagctgcc aggagacag cctcaggcag gactgtccca ggcaaacttt 780
 aactggggcc ccgtgagccg gagctacggc ggacagtacc gctgctatgg agcacacaat 840
 ctgtcctctg agtgttctgc ccccagcgac ccctggaca tcctgatcac cggccagatc 900
 aggggcacac cattcatcag cgtgcagcca ggaccaaccg tggcctccgg cgagaacgtg 960
 aactgctgt gccagagctg gcgccagttc cacaccttc tgctgacaaa ggcaggagca 1020
 gcagacgcac ctctgaggct gcgctccatc cacgagtacc caaagtatca ggccgagttt 1080
 ccaatgagcc ccgtgacctc cgcccacgca ggcacataca gatgctatgg cagcctgaac 1140
 agcgaccct acctgctgag ccacccttc gagccactgg agctggtggt gtcc 1194

<210> 117

<211> 198

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LILRB2 D1-2, AA 22-219 (Q8N423-1 UniParc) 胺基酸序列

<400> 117

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

Gly Tyr Asp Leu Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Ser Pro Ser Asp Leu
 180 185 190

Leu Glu Leu Leu Val Pro
 195

<210> 118

<211> 594

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> LILRB2 D1-2, AA 22-219 (Q8N423-1 UniParc) 核酸序列

<400> 118

cagaccggca caatcccca gctaccctg tgggccgagc cagatagcgt gatcaccag 60
 ggctcccccg tgacactgtc ttgccagggc agcctggagg cacaggagta ccggctgtat 120
 agagagaaga agagcgcctc ctggatcacc cggatcagac ccgagctggt gaagaacggc 180
 cagtttcaca tcccttccat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat 240
 tctcgggcca gatggagcga gctgtccgac ccctggtgc tggatcatgac cggcgcctat 300
 ccaaagccca cactgtccgc ccagccttct ccagtggatga cctctggcgg cagagtgaca 360
 ctgcagtgtg agagccagggt ggcccttcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag 420
 gagcaccccc agtgtctgaa tagccagcct cacgcccggg gcagctccag agccatcttc 480
 tctgtgggcc ctgtgagccc aaaccggaga tggcccaca ggtgctacgg ctatgacctg 540
 aacagcccat acgtgtggtc tagcccctct gatctgctgg agctgctggt gcct 594

<210> 119

<211> 148

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD40L, AA 114-261 C194S (P29965 联合的蛋白) 氨基酸序列

<400> 119

Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu
 1 5 10 15
 Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu
 35 40 45
 Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe
 50 55 60
 Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala

	85		90		95
Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu					
	100		105		110
Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val					
	115		120		125
Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly					
	130		135		140
Leu Leu Lys Leu					

145

<210> 120

<211> 444

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD40L, AA 114-261 C194S (P29965 联合的蛋白) 核酸序列

<400> 120

```

cagaagggcg atcagaatcc tcagattgcc gcccacgtga tctctgaggc ctctagcaag 60
accacaagcg tgctgcagtg ggcaaaaaa ggtactata caatgtctaa caatctggtg 120
accctggaga acggcaagca actgaccgtc aaaagacagg gctgtacta catctacgt 180
caggtgacct tctgcagcaa tagggaggcc tctctcagg caccttttat cgctctctg 240
agcctgaagt ccccaggccg gttcgagaga atctgttaa gggcagcaaa cactcacagc 300
tccgccaaac catgtggaca gcagagcata cacctgggcg gcgtgttcga gctgcaaccg 360
ggagcctccg tgtttgtcaa tgtgaccgac ccatcccagg tgtctcacgg caccggcttc 420
accagcttcg gcctgctgaa gctg 444

```

<210> 121

<211> 474

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> sc3xCD40L, AA 114-261 C194S (P29965 联合的蛋白) 内连接体
3x(GGGGS) 胺基酸序列

<400> 121

Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu					
1	5	10	15		
Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr					
	20	25	30		
Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu					
	35	40	45		
Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe					

50	55	60
Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu		
65	70	75
Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala		
	85	90
Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu		
	100	105
Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val		
	115	120
Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly		
130	135	140
Leu Leu Lys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
145	150	155
Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val		
	165	170
Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu		
	180	185
Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly		
195	200	205
Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln		
210	215	220
Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile		
225	230	235
Ala Ser Leu Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu		
	245	250
Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser		
	260	265
Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe		
	275	280
Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr		
290	295	300
Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
305	310	315
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala		
	325	330
Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln		
	340	345
Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu		
355	360	365

Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile
 370 375 380
 Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala
 385 390 395 400
 Pro Phe Ile Ala Ser Leu Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg
 405 410 415
 Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly
 420 425 430
 Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala
 435 440 445
 Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr
 450 455 460
 Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu
 465 470
 <210> 122
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CD40L full ECD, AA 47-261 (P29965 联合的蛋白) 胺基酸序列
 <400> 122
 His Arg Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser
 20 25 30
 Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe
 35 40 45
 Val Lys Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser
 50 55 60
 Phe Glu Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val
 65 70 75 80
 Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu
 85 90 95
 Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly
 100 105 110
 Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln
 115 120 125
 Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile
 130 135 140

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD40L, AA 114-261不具有突变的(P29965 联合的蛋白)核酸序列

<400> 124

cagaagggcg atcagaatcc tcagattgcc gccacgtga tctctgaggc ctctagcaag 60
 accacaagcg tgctgcagtg ggcagaaaaa ggtactata caatgtctaa caatctggtg 120
 accctggaga acggcaagca actgaccgtc aaaagacagg gcctgtacta catctacgt 180
 caggtgacct tctgcagcaa tagggaggcc tctctcagg caccttttat cgcctctctg 240
 tgcctgaagt ccccaggcgg gttcagaga atctgttaa gggcagcaaa cactcacagc 300
 tccgccaac catgtggaca gcagagcata cacctggcgg gcgtgttcga gctgcaaccg 360
 ggagcctccg tgtttgtaa tgtgaccgac ccateccagg tgtctcagg caccggcttc 420
 accagcttcg gcctgctgaa gctg 444

<210> 125

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Siglec 10, AA 18-145不具有突变的(Q96LC7-1 联合的蛋白)氨基酸序列

<400> 125

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

<210> 126

<211> 186

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Siglec 10, AA 18-145不具有突变的(Q96LC7-1 联合的蛋白) 胺基酸序列

<400> 126

gatggccggt tttggatcag agtgcaggag tccgtgatgg tgcctgaggg cctgtgcatc 60
 agcgtgccat gtccttctc ttacccaga caggactgga ccggctctac accgcctac 120
 ggctattggg ttaaggccgt gaccgagaca acaaaggcg ccctgtggc cacaaaccac 180
 cagagc 186

<210> 127

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Siglec 10, AA 18-145加上C36S(Q96LC7-1 联合的蛋白) 胺基酸序列

<400> 127

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

<210> 128

<211> 384

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Siglec 10, AA 18-145加上C36S(Q96LC7-1 联合的蛋白) 核酸序列

<400> 128

gatggccggt tttggatcag agtgcaggag tccgtgatgg tgcctgaggg cctgtctatc 60

agcgtgccat gtccttctc ttaccccaga caggactgga ccggtcttac acccgcctac 120
 ggctattggg ttaaggccgt gaccgagaca acaaaggcg ccctgtggc cacaaccac 180
 cagagcagag aggtggagat gtccaccgg ggcagattcc agctgacagg cgaccccgcc 240
 aagggcaatt gtagcctggt catcaggac gccagatgc aggatgagtc tcaagtacttc 300
 tttaggggtg agcgcggcag ctacgtgccc tataacttta tgaatgatgg cttctttctg 360
 aaggtgaccg ccctgacaca gaag 384

<210> 129

<211> 534

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Siglec 10全ECD, AA 17-550 (Q96LC7-1 联合的蛋白) 氨基酸序列

<400> 129

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

Ser Ala Gln Arg Thr Val Arg Leu Arg Val Ala Tyr Ala Pro Arg Asp
 210 215 220
 Leu Val Ile Ser Ile Ser Arg Asp Asn Thr Pro Ala Leu Glu Pro Gln
 225 230 235 240
 Pro Gln Gly Asn Val Pro Tyr Leu Glu Ala Gln Lys Gly Gln Phe Leu
 245 250 255
 Arg Leu Leu Cys Ala Ala Asp Ser Gln Pro Pro Ala Thr Leu Ser Trp
 260 265 270
 Val Leu Gln Asn Arg Val Leu Ser Ser Ser His Pro Trp Gly Pro Arg
 275 280 285
 Pro Leu Gly Leu Glu Leu Pro Gly Val Lys Ala Gly Asp Ser Gly Arg
 290 295 300
 Tyr Thr Cys Arg Ala Glu Asn Arg Leu Gly Ser Gln Gln Arg Ala Leu
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Val Gln Tyr Pro Pro Glu Asn Leu Arg Val Met Val Ser
 325 330 335
 Gln Ala Asn Arg Thr Val Leu Glu Asn Leu Gly Asn Gly Thr Ser Leu
 340 345 350
 Pro Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Cys Leu Val Cys Val Thr His Ser
 355 360 365
 Ser Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Gln Arg Gly Gln Val Leu Ser
 370 375 380
 Pro Ser Gln Pro Ser Asp Pro Gly Val Leu Glu Leu Pro Arg Val Gln
 385 390 395 400
 Val Glu His Glu Gly Glu Phe Thr Cys His Ala Arg His Pro Leu Gly
 405 410 415
 Ser Gln His Val Ser Leu Ser Leu Ser Val His Tyr Ser Pro Lys Leu
 420 425 430
 Leu Gly Pro Ser Cys Ser Trp Glu Ala Glu Gly Leu His Cys Ser Cys
 435 440 445
 Ser Ser Gln Ala Ser Pro Ala Pro Ser Leu Arg Trp Trp Leu Gly Glu
 450 455 460
 Glu Leu Leu Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asp Ser Phe Glu Val Thr Pro
 465 470 475 480
 Ser Ser Ala Gly Pro Trp Ala Asn Ser Ser Leu Ser Leu His Gly Gly
 485 490 495
 Leu Ser Ser Gly Leu Arg Leu Arg Cys Glu Ala Trp Asn Val His Gly
 500 505 510
 Ala Gln Ser Gly Ser Ile Leu Gln Leu Pro Asp Lys Lys Gly Leu Ile

<400> 134

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 135

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 连接体氨基酸序列

<400> 135

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 136

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 连接体氨基酸序列

<400> 136

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 137

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 连接体氨基酸序列

<400> 137

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 138

<211> 642

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LILRB2 D1-4 Fc IgG4 杵: in TSP 214 及 215 217 218 221 及
222个氨基酸序列

<400> 138

Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp Ala Glu Pro Asp Ser
 1 5 10 15
 Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Ser Cys Gln Gly Ser Leu
 20 25 30
 Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys Lys Ser Ala Ser Trp
 35 40 45
 Ile Thr Arg Ile Arg Pro Glu Leu Val Lys Asn Gly Gln Phe His Ile
 50 55 60
 Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Thr Gly Arg Tyr Gly Cys Gln Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Ser Arg Ala Arg Trp Ser Glu Leu Ser Asp Pro Leu Val Leu Val Met
 85 90 95
 Thr Gly Ala Tyr Pro Lys Pro Thr Leu Ser Ala Gln Pro Ser Pro Val
 100 105 110
 Val Thr Ser Gly Gly Arg Val Thr Leu Gln Cys Glu Ser Gln Val Ala
 115 120 125
 Phe Gly Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Glu Glu His Pro Gln
 130 135 140
 Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser Ser Arg Ala Ile Phe
 145 150 155 160
 Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg Trp Ser His Arg Cys Tyr
 165 170 175
 Gly Tyr Asp Leu Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Ser Pro Ser Asp Leu
 180 185 190
 Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro Ser Leu Ser Val
 195 200 205
 Gln Pro Gly Pro Val Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu Thr Leu Gln Cys
 210 215 220
 Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr Lys Glu Gly Glu
 225 230 235 240
 Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln Pro Gln Ala Gly Leu Ser
 245 250 255
 Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg Ser Tyr Gly Gly Gln
 260 265 270
 Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Cys Ser Ala Pro
 275 280 285
 Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Ile Arg Gly Thr Pro
 290 295 300

Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala Ser Gly Glu Asn Val
 305 310 315 320
 Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His Thr Phe Leu Leu Thr
 325 330 335
 Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu Arg Ser Ile His Glu
 340 345 350
 Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Ala
 355 360 365
 His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu Asn Ser Asp Pro Tyr
 370 375 380
 Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu Val Val Ser Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys
 405 410 415
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly
 420 425 430
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 435 440 445
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 450 455 460
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 465 470 475 480
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 485 490 495
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 500 505 510
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 515 520 525
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 530 535 540
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 545 550 555 560
 Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 565 570 575
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 580 585 590
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 595 600 605
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

610	615	620	
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	Leu Ser Leu Ser Leu		
625	630	635	640
Gly Lys			
<210> 139			
<211> 1926			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> LILRB2 D1-4 Fc IgG4 杵: in TSP 214 及 215 217 218 221 及			
222个核酸序列			
<400> 139			
cagaccggca caatcccca gctaccctg tgggccgagc cagatagcgt gatcaccag 60			
ggctcccccg tgacactgtc ttgccagggc agcctggagg cacaggagta cggctgtat 120			
agagagaaga agagcgctc ctggatcacc cggatcagac ccgagctggt gaagaacggc 180			
cagtttcaca tcccttccat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat 240			
tctcgggcca gatggagcga gctgtccgac ccctggtgc tggatcatgac cggcgcctat 300			
ccaaagccca cactgtccgc ccagccttct ccagtggatga cctctggcgg cagagtgaca 360			
ctgcagtgtg agagccaggc ggccttcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag 420			
gagcaccccc agtgtctgaa tagccagcct cacgcccggg gcagctccag agccatcttc 480			
tctgtgggcc ctgtgagccc aaaccggaga tggcccaca ggtgctacgg ctatgacctg 540			
aacagcccat acgtgtggc tagcccctct gatctgctgg agctgctggt gcctggcgtg 600			
agcaagaagc catctctgag cgtgcagcca ggccctgtgg tggcacctgg cgagtctctg 660			
accctgcagt gcgtgagcga cgtgggctac gatcggttcg tgctgtataa ggaggagag 720			
agggatctga ggcagctgcc aggagacag cctcaggcag gactgtccca ggcaaacttt 780			
acactgggcc ccgtgagccg gagctacggc ggacagtacc gctgctatgg agcacacaat 840			
ctgtcctctg agtgttctgc cccagcgac ccctggaca tcctgatcac cggccagatc 900			
aggggcacac cattcatcag cgtgcagcca ggaccaaccg tggcctccgg cgagaacgtg 960			
acactgctgt gccagagctg gcgccagttc cacaccttc tgctgacaaa ggcaggagca 1020			
gcagacgcac ctctgaggct gcgctccatc cacgagtacc caaagtatca ggccgagttt 1080			
ccaatgagcc ccgtgacctc cgcccagca ggcacataca gatgctatgg cagcctgaac 1140			
agcgaccct acctgctgag ccacccttc gagccactgg agctggtggt gtccggcggc 1200			
ggcggctctg gcggaggagg cagcggagga ggaggatccg agtctaagta cggaccacca 1260			
tgccctccat gtctgcacc agagtccgag ggaggacct ccgtgttct gtttccacct 1320			
aagcctaagg acaccctgat gatctccaga acccccagg tgacatgcgt ggtggtggac 1380			
gtgtctcagg aggatcctga ggtgcagttc aattggtacg tggatggcgt ggaggtgcac 1440			
aacgccaaga caaagcccc ggaggagcag tttaatagca cctacagagt ggtgtccgtg 1500			
ctgacagtgc tgcaccagga ttggctgaat ggcaaggagt ataagttaa ggtgagcaac 1560			
aagggcctgc ctagctccat cgagaagacc atctccaagg ccaaggcca gccaaagag 1620			

ccacaggtgt gcaccctgcc accaagccag gaggagatga caaagaatca ggtgtccctg 1680
 tgggtgtctgg tgaagggctt ctacccttcc gacatcgccg tggagtggga gtctaacggc 1740
 cagccagaga acaattacaa gaccacacct ccagtgtctgg actctgatgg cagcttcttt 1800
 ctgtattctc ggctgaccgt ggataagagc agatggcagg agggcaactg gttcagctgc 1860
 tccgtgatgc acgaggccct gcacaaccac tatacacaga agtctctgag cctgtccctg 1920
 ggcaag 1926

<210> 140

<211> 442

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LILRB2 D1-2 Fc IgG4 杵: in TSP 214 V1 及 215 V1 胺基酸序列

<400> 140

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

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

<210> 141

<211> 1326

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> LILRB2 D1-2 Fc IgG4 杆: in TSP 214 V1 及 215 V1 核酸序列

<400> 141

cagaccggca caatcccaa gcctaccctg tgggccgagc cagatagcgt gatcaccag 60
 ggctccccg tgacactgtc ttgccaggc agcctggagg cacaggagta ccgctgtat 120

agagagaaga agagcgcctc ctggatcacc cggatcagac ccgagctggt gaagaacggc 180
 cagtttcaca tcccttccat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat 240
 tctcgggcca gatggagcga gctgtccgac cccttggtgc tggatcatgac cggcgcctat 300
 ccaaagccca cactgtccgc ccagccttct ccagtgggtga cctctggcgg cagagtgaca 360
 ctgcagtgtg agagccagggt ggccttcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag 420
 gagcaccccc agtgtctgaa tagccagcct cacgcccggg gcagctccag agccatcttc 480
 tctgtgggcc ctgtgagccc aaaccggaga tggcccaca ggtgctacgg ctatgacctg 540
 aacagcccat acgtgtggtc tagcccctct gatctgctgg agctgctggt gcctggcggc 600
 ggcggctctg gcgaggagg cagcggagga ggaggatccg agtctaagta cggaccacca 660
 tgcctccat gtcctgcacc agagtccgag ggaggacat ccgtgttct gtttccacct 720
 aagcctaagg acacctgat gatctccaga acccccgagg tgacatgctg ggtggtggac 780
 gtgtctcagg aggatcctga ggtgcagttc aattggtacg tggatggcgt ggaggtgcac 840
 aacgccaaga caaagccccg ggaggagcag tttaatagca cctacagagt ggtgtccgtg 900
 ctgacagtgc tgcaccagga ttggctgaat ggcaaggagt ataagtgtaa ggtgagcaac 960
 aagggcctgc ctagctccat cgagaagacc atctccaagg ccaaggcca gccaaagagag 1020
 ccacaggtgt gcaccctgcc accaagccag gaggagatga caaagaatca ggtgtccctg 1080
 tgggtgtctgg tgaagggett ctacccttcc gacatcgccg tggagtggga gtctaacggc 1140
 cagccagaga acaattacaa gaccacacct ccagtctgg actctgatgg cagcttcttt 1200
 ctgtattctc ggctgaccgt ggataagagc agatggcagg agggcaactg gttcagctgc 1260
 tccgtgatgc acgaggcct gcacaaccac tatacacaga agtctctgag cctgtccctg 1320
 ggcaag 1326

<210> 142

<211> 1252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LILRB2 D1-4 -Fc IgG4 白-sc3x41BBL: 在DSP 214 氨基酸序列中

<400> 142

Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp Ala Glu Pro Asp Ser
 1 5 10 15
 Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Ser Cys Gln Gly Ser Leu
 20 25 30
 Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys Lys Ser Ala Ser Trp
 35 40 45
 Ile Thr Arg Ile Arg Pro Glu Leu Val Lys Asn Gly Gln Phe His Ile
 50 55 60
 Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Thr Gly Arg Tyr Gly Cys Gln Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Ser Arg Ala Arg Trp Ser Glu Leu Ser Asp Pro Leu Val Leu Val Met

				85					90					95				
Thr	Gly	Ala	Tyr	Pro	Lys	Pro	Thr	Leu	Ser	Ala	Gln	Pro	Ser	Pro	Val			
				100					105					110				
Val	Thr	Ser	Gly	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Gln	Cys	Glu	Ser	Gln	Val	Ala			
				115					120					125				
Phe	Gly	Gly	Phe	Ile	Leu	Cys	Lys	Glu	Gly	Glu	Glu	Glu	His	Pro	Gln			
				130					135					140				
Cys	Leu	Asn	Ser	Gln	Pro	His	Ala	Arg	Gly	Ser	Ser	Arg	Ala	Ile	Phe			
				145					150					155				
Ser	Val	Gly	Pro	Val	Ser	Pro	Asn	Arg	Arg	Trp	Ser	His	Arg	Cys	Tyr			
				165					170					175				
Gly	Tyr	Asp	Leu	Asn	Ser	Pro	Tyr	Val	Trp	Ser	Ser	Pro	Ser	Asp	Leu			
				180					185					190				
Leu	Glu	Leu	Leu	Val	Pro	Gly	Val	Ser	Lys	Lys	Pro	Ser	Leu	Ser	Val			
				195					200					205				
Gln	Pro	Gly	Pro	Val	Val	Ala	Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Cys			
				210					215					220				
Val	Ser	Asp	Val	Gly	Tyr	Asp	Arg	Phe	Val	Leu	Tyr	Lys	Glu	Gly	Glu			
				225					230					235				
Arg	Asp	Leu	Arg	Gln	Leu	Pro	Gly	Arg	Gln	Pro	Gln	Ala	Gly	Leu	Ser			
				245					250					255				
Gln	Ala	Asn	Phe	Thr	Leu	Gly	Pro	Val	Ser	Arg	Ser	Tyr	Gly	Gly	Gln			
				260					265					270				
Tyr	Arg	Cys	Tyr	Gly	Ala	His	Asn	Leu	Ser	Ser	Glu	Cys	Ser	Ala	Pro			
				275					280					285				
Ser	Asp	Pro	Leu	Asp	Ile	Leu	Ile	Thr	Gly	Gln	Ile	Arg	Gly	Thr	Pro			
				290					295					300				
Phe	Ile	Ser	Val	Gln	Pro	Gly	Pro	Thr	Val	Ala	Ser	Gly	Glu	Asn	Val			
				305					310					315				
Thr	Leu	Leu	Cys	Gln	Ser	Trp	Arg	Gln	Phe	His	Thr	Phe	Leu	Leu	Thr			
				325					330					335				
Lys	Ala	Gly	Ala	Ala	Asp	Ala	Pro	Leu	Arg	Leu	Arg	Ser	Ile	His	Glu			
				340					345					350				
Tyr	Pro	Lys	Tyr	Gln	Ala	Glu	Phe	Pro	Met	Ser	Pro	Val	Thr	Ser	Ala			
				355					360					365				
His	Ala	Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Tyr	Gly	Ser	Leu	Asn	Ser	Asp	Pro	Tyr			
				370					375					380				
Leu	Leu	Ser	His	Pro	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Leu	Val	Val	Ser	Gly	Gly			
				385					390					395				

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys
 405 410 415
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly
 420 425 430
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 435 440 445
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 450 455 460
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 465 470 475 480
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 485 490 495
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 500 505 510
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 515 520 525
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 530 535 540
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Cys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 545 550 555 560
 Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 565 570 575
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 580 585 590
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp
 595 600 605
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 610 615 620
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 625 630 635 640
 Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro
 645 650 655
 Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
 660 665 670
 Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
 675 680 685
 Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
 690 695 700
 Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu

705	710	715	720
Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu			
	725	730	735
Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala			
	740	745	750
Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala			
	755	760	765
Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala			
	770	775	780
Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu			
785	790	795	800
Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu			
	805	810	815
Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile			
	820	825	830
Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly			
	835	840	845
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg			
	850	855	860
Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu			
865	870	875	880
Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile			
	885	890	895
Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser			
	900	905	910
Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val			
	915	920	925
Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg			
	930	935	940
Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu			
945	950	955	960
Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val			
	965	970	975
Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe			
	980	985	990
Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His			
	995	1000	1005
Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln			
	1010	1015	1020

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro
 1025 1030 1035
 Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly
 1040 1045 1050
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu
 1055 1060 1065
 Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu
 1070 1075 1080
 Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
 1085 1090 1095
 Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
 1100 1105 1110
 Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr
 1115 1120 1125
 Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe
 1130 1135 1140
 Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
 1145 1150 1155
 Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
 1160 1165 1170
 Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
 1175 1180 1185
 Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His
 1190 1195 1200
 Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala
 1205 1210 1215
 Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu
 1220 1225 1230
 Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
 1235 1240 1245
 Pro Arg Ser Glu
 1250
 <210> 143
 <211> 3756
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LILRB2 D1-4 -Fc IgG4 白-sc3x41BBL: 在DSP 214 胺基酸序列核酸
 序列中

<400> 143

cagaccggca caatcccaa gcctaccctg tgggccgagc cagatagcgt gatcaccag 60
ggctcccccg tgacactgtc ttgccagggc agcctggagg cacaggagta ccggctgtat 120
agagagaaga agagcgcctc ctggatcacc cggatcagac ccgagctggt gaagaacggc 180
cagtttcaca tcccttccat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat 240
tctcgggcca gatggagcga gctgtccgac ccctgggtgc tggatcatgac cggcgcctat 300
ccaaagccca cactgtccgc ccagccttct ccagtgggta cctctggcgg cagagtgaca 360
ctgcagtgtg agagccaggt ggccctcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcaggag 420
gagcaccccc agtgtctgaa tagccagcct cacgcccggg gcagctccag agccatcttc 480
tctgtgggcc ctgtgagccc aaaccggaga tggteccaca ggtgctacgg ctatgacctg 540
aacagcccat acgtgtggte tagccctctt gatctgctgg agctgctggt gcctggcgtg 600
agcaagaagc catctctgag cgtgcagcca ggccctgtgg tggcacctgg cgagtctctg 660
accctgcagt gcgtgagcga cgtgggctac gatcggttcg tgctgtataa ggaggagag 720
agggatctga ggcagctgcc aggcagacag cctcaggcag gactgtccca ggcaaacttt 780
aactggggcc ccgtgagccg gagctacggc ggacagtacc gctgctatgg agcacacaat 840
ctgtcctctg agtgttctgc ccccagcgac ccctggaca tcttgatcac cggccagatc 900
aggggcacac catcctcag cgtgcagcca ggaccaaccg tggcctccgg cgagaacgtg 960
aactgctgt gccagagctg gcgccagttc cacaccttc tgctgacaaa ggcaggagca 1020
gcagacgcac ctctgaggct gcgctccatc cacagtacc caaagtatca ggccgagttt 1080
ccaatgagcc ccgtgacctc cgcccagca ggcacataca gatgctatgg cagcctgaac 1140
agcgaccctt acctgctgag ccacccttcc gagccactgg agctggtggt gtccggcggc 1200
ggcggctctg gaggaggagg atccggagga ggaggatccg agtctaagta tggaccacca 1260
tgccctccat gtccagcacc tgagtttgag ggaggactt ccgtgttctt gtttccccct 1320
aagccaaagg acacactgat gatctccagg acaccagagg tgacctgcgt ggtggtggac 1380
gtgtctcagg aggatcccga ggtgcagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcac 1440
aatgccaaga ccaagcctag ggaggagcag tttactcca cataccgctt ggtgtctgtg 1500
ctgaccgtgc tgcaccagga ttggctgaac ggcaaggagt ataagtgtaa ggtgagcaat 1560
aagggcctgc caagctccat cgagaagacc atctccaagg caaagggaca gccaaaggag 1620
cctcagggtg atacactgcc acccagccag tgcgagatga ccaagaacca ggtgagcctg 1680
tctgtgccg tgaagggtt ctaccatctt gacatcgccg tggagtggga gagcaatggc 1740
cagcccgaga acaattataa gaccacacct ccagtgtggt actccgatgg ctctttcttt 1800
ctggtgtcca ggctgacagt ggataagtct cgctggcagg agggcaacgt gttttcttgt 1860
agcgtgatgc acgaggccct gcacaatcac tacaccaga agtccctgtc tctgagcctg 1920
ggcaagggcg gcggcggtc cggaggagga ggaagcgccg cctcccctag gctgcgcgag 1980
ggaccagagc tgagcccaga cgatccagca ggactgctgg acctgaggca gggaatgttc 2040
gcacagctgg tgccccagaa cgtgctgctg atcgacggcc ctctgtcttg gtacagcgat 2100
ccaggactgg caggcgtgag cctgacaggc ggactgtcct ataaggagga taccaaggag 2160
ctgggtggtg caaaggcagg cgtgtactac gtgttcttc agctggagct gaggagagtg 2220
gtggcaggag agggatccgg atctgtgagc ctggccctgc acctgcagcc actgcggagc 2280

gccgcaggag cagccgccct ggccctgacc gtggacctgc cacctgcadc tagcgaggca 2340
 cggaattctg ccttcggctt tcagggcaga ctgctgcacc tgagcgccgg acagaggctg 2400
 ggagtgcacc tgcacacaga ggcaagggca agacacgcat ggcagctgac acagggagca 2460
 accgtgctgg gactgttccg cgtgaccctt gagatcccag caggactgcc atccccccgg 2520
 tctgagggcg gcggcgggtc cggaggagga ggatctggcg gcggcggcag cgccgcctcc 2580
 cccaggctgc gcgagggacc tgagctgtcc ccagacgac ctgccggcct gctggacctg 2640
 agacagggaa tgtttgccc gctggctgct cagaacgtgc tgctgattga cgccccctg 2700
 tcctggtata gcgaccttg actggcaggc gtgtctctga caggcggact gagttacaaa 2760
 gaagacacta aagaactggt cgtcgccaaa gccggcgtgt actacgtgtt cttccaactg 2820
 gagctgagga gggctcgtgc cggcgaaggc agcggctctg tgagcctggc cctgcacctg 2880
 caaccactga ggagcgccg cggcgccgcc gccctggccc tgactgtgga cctgccacca 2940
 gcatcctctg aggcaaggaa ttccgcttc ggcttcagg gccggctgct gcacctgtct 3000
 gccggacaga gactgggctt ccacctgcat accgaagcca gagccaggca tgctggcag 3060
 ctgaccagg gcgccaccgt gctgggctt ttcagagtga ccccagaaat tccagcagga 3120
 ctgccttccc caaggtctga gggaggagga ggaagtggcg gaggaggatc cggaggggga 3180
 gggagcgccg cctccccaaag actgagagag ggaccagagc tgtcccctga tgaccctgcc 3240
 gggctgctgg acctgagaca aggcatgtt gccagctgg tcgcacaaaa cgtgctgtta 3300
 attgacggcc cactgtcctg gtattccgac cctggcctgg ccggcgtgtc cctgacaggc 3360
 ggctgtctt acaaagaaga cacaaaagaa ctggtcgtc ctaaagctgg cgtgtactac 3420
 gtgttcttcc aattagaact gagaagggtc gtcgccggcg agggcagcgg gtctgtgagc 3480
 ctggccctgc acctgcaacc gctgcggagc gccgccggcg ctgccgcctt ggccctgaca 3540
 gtggacctgc ctccagcaag ctccaggca aggaatagcg ccttcggctt tcaaggccgc 3600
 ctgctgcacc tgtccgccg acagcggctg ggcgtccacc tgacaccga agccagagcc 3660
 cgccatgcct ggcagctgac tcagggcgct accgtgctgg gcctgttccg cgtgacccca 3720
 gagatccctg ccggcctgcc ctcccctcg tctgag 3756

<210> 144

<211> 1052

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LILRB2 D1-2- Fc IgG4 白- sc3x41BBL: 在DSP 214 V1 氨基酸序列中

<400> 144

Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp Ala Glu Pro Asp Ser
 1 5 10 15
 Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Ser Cys Gln Gly Ser Leu
 20 25 30
 Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys Lys Ser Ala Ser Trp
 35 40 45
 Ile Thr Arg Ile Arg Pro Glu Leu Val Lys Asn Gly Gln Phe His Ile

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400
 Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 405 410 415
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly
 435 440 445
 Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu
 450 455 460
 Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe
 465 470 475 480
 Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser
 485 490 495
 Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu
 500 505 510
 Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val
 515 520 525
 Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu
 530 535 540
 Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser
 545 550 555 560
 Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala
 565 570 575
 Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu
 580 585 590
 His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala
 595 600 605
 Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly
 610 615 620
 Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg
 625 630 635 640
 Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 645 650 655
 Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp
 660 665 670
 Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu

675	680	685
Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser		
690	695	700
Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys		
705	710	715
Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val		
725	730	735
Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly		
740	745	750
Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly		
755	760	765
Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu		
770	775	780
Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser		
785	790	795
Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg		
805	810	815
His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg		
820	825	830
Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly		
835	840	845
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala		
850	855	860
Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala		
865	870	875
Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln		
885	890	895
Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly		
900	905	910
Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr		
915	920	925
Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln		
930	935	940
Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser		
945	950	955
Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala		
965	970	975
Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn		
980	985	990

Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln
 995 1000 1005
 Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala
 1010 1015 1020
 Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
 1025 1030 1035
 Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 1040 1045 1050

<210> 145

<211> 3156

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> LILRB2 D1-2- Fc IgG4 白- sc3x41BBL: 在DSP 214 V1 核酸序列中

<400> 145

cagaccggca caatcccaaa gcctaccctg tgggccgagc cagatagcgt gatcaccag 60
 ggctcccccg tgacactgtc ttgccagggc agcctggagg cacaggagta ccggctgtat 120
 agagagaaga agagcgcctc ctggatcacc cggatcagac ccgagctggt gaagaacggc 180
 cagtttcaca tcccttccat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat 240
 tctcgggcca gatggagcga gctgtccgac ccctgggtgc tggatcatgac cggcgcctat 300
 ccaaagccca cactgtccgc ccagccttct ccagtggatga cctctggcgg cagagtgaca 360
 ctgcagtgtg agagccaggc ggccctcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag 420
 gagcaccccc agtgtctgaa tagccagcct cacgcccggg gcagctccag agccatcttc 480
 tctgtgggcc ctgtgagccc aaaccggaga tggcccaca ggtgctacgg ctatgacctg 540
 aacagcccat acgtgtggtc tagcccctct gatctgctgg agctgctggt gcctggcggc 600
 ggccggctctg gaggaggagg atccggagga ggaggatccg agtctaagta tggaccacca 660
 tgccctccat gtccagcacc tgagtttgag ggaggacctt ccgtgttctt gtttccccct 720
 aagccaaagg acacactgat gatctccagg acaccagagg tgacctgcgt ggtggtggac 780
 gtgtctcagg aggatcccga ggtgcagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcac 840
 aatgccaaaga ccaagcctag ggaggagcag tttactcca cataccgctg ggtgtctgtg 900
 ctgaccgtgc tgcaccagga ttggctgaac ggcaaggagt ataagtgtaa ggtgagcaat 960
 aagggcctgc caagctccat cgagaagacc atctccaagg caaagggaca gccaaaggag 1020
 cctcagggtg atacactgcc acccagccag tgcgagatga ccaagaacca ggtgagcctg 1080
 tctgtgcccg tgaagggett ctaccatctt gacatcgccg tggagtggga gagcaatggc 1140
 cagcccgaga acaattataa gaccacacct ccagtctggt actccgatgg ctctttcttt 1200
 ctgggtgtcca ggctgacagt ggataagtct cgctggcagg agggcaacgt gttttcttgt 1260
 agcgtgatgc acgaggecct gcacaatcac tacaccaga agtcctgtc tctgagcctg 1320
 ggcaagggcg gcggcggctc cggaggagga ggaagcggc cctcccctag gctgcgcgag 1380
 ggaccagagc tgagcccaga cgatccagca ggactgctgg acctgaggca gggaatgttc 1440

gcacagctgg tggcccagaa cgtgctgctg atcgacggcc ctctgtcttg gtacagcgat 1500
ccaggactgg caggcgtgag cctgacaggc ggactgtcct ataaggagga taccaaggag 1560
ctgggtggggg caaaggcagg cgtgtactac gtgttcttcc agctggagct gaggagagtg 1620
gtggcaggag agggatccgg atctgtgagc ctggccctgc acctgcagcc actgcgagc 1680
gccgcaggag cagccgccct ggccctgacc gtggacctgc cacctgcatc tagcgaggca 1740
cggaattctg ccttcggcct tcagggcaga ctgctgcacc tgagcgccgg acagaggctg 1800
ggagtgcacc tgcacacaga ggcaagggca agacacgcat ggcagctgac acaggagca 1860
accgtgctgg gactgttccg cgtgaccct gagatcccag caggactgcc atcccccg 1920
tctgagggcg gcggcgggtc cggaggagga ggatctggcg gcggcggcag cgccgctcc 1980
cccaggctgc gcgagggacc tgagctgtcc ccagacgac ctgccggcct gctggacctg 2040
agacagggaa tgtttgccca gctggctgct cagaacgtgc tgctgattga cggccccctg 2100
tcctggtata gcgatcctgg actggcaggc gtgtctctga caggcggact gagttacaaa 2160
gaagacacta aagaactggt cgtcgccaaa gccggcgtgt actacgtgtt cttccaactg 2220
gagctgagga gggctcgtgc cggcgaaggc agcggctctg tgagcctggc cctgcacctg 2280
caaccactga ggagcgccg cggcgccgcc gccctggccc tgactgtgga cctgccacca 2340
gcatcctctg aggcaaggaa ttccgccttc ggcttccagg gccggctgct gcacctgtct 2400
gccggacaga gactgggctt ccacctgcat accgaagcca gagccaggca tgctggcag 2460
ctgaccagg gcgccaccgt gctgggcctg ttcagagtga cccagaaat tccagcagga 2520
ctgccttccc caaggtctga gggaggagga ggaagtggcg gaggaggatc cggaggggga 2580
gggagcgccg cctccccaaag actgagagag ggaccagagc tgtcccctga tgacctgcc 2640
gggctgctgg acctgagaca aggcatgttc gccagctgg tcgcacaaa cgtgctgtta 2700
attgacggcc cactgtcctg gtattccgac cctggcctgg ccggcgtgtc cctgacaggc 2760
ggcctgtctt acaaagaaga cacaaaagaa ctggctgctg ctaaagctgg cgtgtactac 2820
gtgttcttcc aattagaact gagaagggtc gtcgccggcg agggcagcgg gtctgtgagc 2880
ctggccctgc acctgcaacc gctgcggagc gccgccggcg ctgccgccct ggccctgaca 2940
gtggacctgc ctccagcaag ctccaggca aggaatagcg cttcggcctt tcaaggccgc 3000
ctgctgcacc tgtccgccgg acagcggctg gggtccacc tgcacaccga agccagagcc 3060
cgccatgcct ggcagctgac tcagggcgt accgtgctgg gcctgttccg cgtgacccca 3120
gagatccctg ccggcctgcc ctcccctcgg tctgag 3156

<210> 146

<211> 1076

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SIRPa -Fc 白 IgG4- sc3xCD40L: 在TSP 112 及 217 氨基酸序列中

<400> 146

Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala

1 5 10 15

Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro

Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 340 345 350
 Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 355 360 365
 Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 370 375 380
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 385 390 395 400
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 405 410 415
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 420 425 430
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 435 440 445
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 450 455 460
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 465 470 475 480
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Cys Glu Met Thr Lys Asn
 485 490 495
 Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 500 505 510
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 515 520 525
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg
 530 535 540
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 545 550 555 560
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 565 570 575
 Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 580 585 590
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn
 595 600 605
 Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr
 610 615 620
 Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn
 625 630 635 640
 Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly

	645		650		655
Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala					
	660		665		670
Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Ser Leu Lys Ser Pro Gly					
	675		680		685
Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala					
	690		695		700
Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu					
705		710		715	720
Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val					
	725		730		735
Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu Gly Gly					
	740		745		750
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Gly					
	755		760		765
Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser					
	770		775		780
Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met					
785		790		795	800
Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys					
	805		810		815
Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn					
	820		825		830
Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Ser Leu Lys					
	835		840		845
Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His					
	850		855		860
Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val					
865		870		875	880
Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro					
	885		890		895
Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys					
	900		905		910
Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser					
	915		920		925
Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu					
	930		935		940
Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr					
945		950		955	960

Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu
 965 970 975
 Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe
 980 985 990
 Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu
 995 1000 1005
 Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
 1010 1015 1020
 Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile
 1025 1030 1035
 His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe
 1040 1045 1050
 Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe
 1055 1060 1065
 Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu
 1070 1075

<210> 147

<211> 3228

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SIRPa -Fc 白 IgG4- sc3xCD40L: 在TSP 112 及 217 核酸序列中

<400> 147

gaggaggagc tgcaggatcat ccagcctgat aagtctgtgc tgggtggcagc aggagagaca 60
 gccacactgc ggtgcaccgc cacaagcctg atcccagtgg gcccacatcca gtggttcagg 120
 ggagcaggac ctggaaggga gctgatctac aaccagaagg agggccactt tccaagagtg 180
 accacagtgt ccgacctgac caagcggaac aatatggatt tctctatcag aatcggaat 240
 atcacacctg ccgacgccgg cacctactat tgcgtgaagt tcaggaagg ctccccagac 300
 gatgtggagt ttaagagcgg agcaggcacc gagctgtccg tgagggccaa gccttctgcc 360
 ccagtgggta gcgaccagc agccagagcc accccacagc acacagtgag cttcacctgt 420
 gagagccacg gcttttcccc ccgggacatc accctgaagt ggttcaagaa cggcaatgag 480
 ctgtccgact ttcagaccaa cgtggacccc gtgggagcagt ctgtgagcta ttccatccac 540
 tctacagcca aggtggtgct gaccgcgag gacgtgcaca gccaggatcat ctgagaggtg 600
 gcacacgtga ccctgcaggg cgatccctg aggggcacag ccaatctgag cgagacaatc 660
 agagtgcccc ctacactgga ggtgaccag cagcccgtgc gcgagagaa ccaagtgaat 720
 gtgacatgtc aggtgcgga gttctaccct cagagactgc agctgacctg gctggagaac 780
 ggcaacgtga gccggaccga gacagccagc accgtgacag agaacaagga cggcacatat 840
 aattggatgt cttggctgct ggtgaacgtg agcgcaccaca gggacgatgt gaagctgacc 900
 tgccagggtg agcacgacgg acagccagcc gtgtctaaga gccacgatct gaaggtgagc 960

gccacccta aggagcagg ctccaacaca gccgccgaga ataccggcag caacgagcgg 1020
 aatatctacg gaggaggagg ctccggagga ggaggctccg agtctaagta tggaccacca 1080
 tgccctccat gtccagcacc tgagtctgag ggaggaccta gcgtgttctt gtttccccct 1140
 aagccaaagg acacctgat gatctccaga acaccagagg tgacctgcgt ggtggtggac 1200
 gtgtctcagg aggacccca ggtgcagttt aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcac 1260
 aatgccaaga ccaagccccg ggaggagcag ttcaattcca cataccgcgt ggtgtctgtg 1320
 ctgacctgac tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt ataagtgtaa ggtgagcaat 1380
 aagggcctgc caagctccat cgagaaaacc atcagcaagg caaagggaca gccccgggag 1440
 cctcaggtgt atacactgcc accctcccag tgcgagatga ccaagaacca ggtgagcctg 1500
 tcctgtgccg tgaagggtt ttaccatctt gacatcgccg tggagtggga gagcaatggc 1560
 cagcccagga acaattataa gaccacacct ccagtgtctg actccgatgg ctctttcttt 1620
 ctggtgtcca ggctgacagt ggataagtct cgctggcagg agggcaactg gttctcttgt 1680
 agcgtgatgc acgaggcct gcacaatcac tacacccaa agtcctgtc tctgagcctg 1740
 ggcaagggcg gcggcggtc cggcggagga ggctctggcg gcggcggcag cggaggcggc 1800
 ggctcccaga agggcgatca gaacccccag atcgccgcc acgtgatctc cgaggcctct 1860
 agcaagacca catctgtgct gcagtgggcc gagaagggt actatacaat gagcaacaat 1920
 ctggtgacct tggagaacgg caagcagctg acagtgaagc ggcaggcctt gtactatctc 1980
 tatgcccagg tgaccttctg ctccaataga gagcctctt ctcaggcccc ctttatcgcc 2040
 tcctgtctc tgaagtctc tggccggtc gagagaatcc tgctgagggc agcaaacaca 2100
 cacagctccg ccaagccctg tggccagcag tctatccacc tggcggcgt gttcgagctg 2160
 cagccaggag ccagcgtgtt tgtaatgtg accgacctg gccaggtgtc ccacggcacc 2220
 ggcttcacca gcttcggcct gctgaagctg ggcgcgggcg gctctggcgg aggaggcagc 2280
 ggaggaggag gctcccagaa aggcgatcag aacctcaga ttgctgcca cgtgatcagc 2340
 gaggcctcta gcaagaccac atccgtgctg cagtgggctg aaaaaggata ctatacaatg 2400
 tctaataatc tggtgaccct ggagaatggc aagcagctga ccgtcaagag acaggcctg 2460
 tattatatct acgcccaggt gaccttttgc agcaatcgcg aggcctctc tcaggctcca 2520
 ttcatcgcca gcctgtccct gaagtcccc ggcaggttg agcgatcct gctgagagcc 2580
 gccaatacc acagctccgc caagccatgt ggacagcagt ccattcacct gggcggcgtg 2640
 ttcgagctgc aaccaggagc cagcgtgtc gtgaatgtga ccgaccctc tcaggtgagc 2700
 cacggcaccg gcttcaccag cttcggcctg ctgaagctgg gtggaggagg ctctggcggg 2760
 ggcggcagcg gcggaggagg ctcccagaag ggcgatcaga atcctcagat tgccgcccac 2820
 gtgatctctg aggcctctag caagaccaca agcgtgctgc agtgggcaga aaaagggtac 2880
 tatacaatgt ctaacaatct ggtgacctg gagaacggca agcaactgac cgtcaaaaga 2940
 cagggcctgt actacatcta cgtcaggtg accttctgca gcaataggga ggcctctctt 3000
 caggcacctt ttatcgctc tctgagcctg aagtccccag gccggttca gagaatcctg 3060
 ttaagggcag caaacactca cagctccgcc aaacctgtg gacagcagag catacactg 3120
 ggcggcgtgt tcgagctgca accgggagcc tccgtgttg tcaatgtgac cgacctatcc 3180
 caggtgtctc acggcaccg cttcaccagc ttcggcctgc tgaagctg 3228

<210> 148

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 580 585 590
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp
 595 600 605
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 610 615 620
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 625 630 635 640
 Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 645 650 655
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala
 660 665 670
 Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln
 675 680 685
 Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu
 690 695 700
 Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile
 705 710 715 720
 Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala
 725 730 735
 Pro Phe Ile Ala Ser Leu Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg
 740 745 750
 Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly
 755 760 765
 Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala
 770 775 780
 Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr
 785 790 795 800
 Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 805 810 815
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro
 820 825 830
 Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser
 835 840 845
 Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu
 850 855 860
 Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu
 865 870 875 880
 Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser

	885	890	895
Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg			
	900	905	910
Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys			
	915	920	925
Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln			
	930	935	940
Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser			
945	950	955	960
His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu Gly Gly Gly			
	965	970	975
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp			
	980	985	990
Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys			
	995	1000	1005
Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met			
	1010	1015	1020
Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val			
	1025	1030	1035
Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys			
	1040	1045	1050
Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu			
	1055	1060	1065
Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala			
	1070	1075	1080
Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile			
	1085	1090	1095
His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe			
	1100	1105	1110
Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe			
	1115	1120	1125
Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu			
	1130	1135	
<210> 149			
<211> 3408			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> LILRB2-Fc -Fc 白 IgG4- sc3xCD40L: 在TSP 218 核酸序列中			

<400> 149

cagaccggca caatccctaa gccaacctg tggccgagc ctgatagcgt gatcaccag 60
ggctccccag tgacactgag ctgccagggc tccctggagg cacaggagta ccgctgtat 120
agagagaaga agtctgccag ctggatcacc cggatcagac ctgagctggt gaagaacggc 180
cagttccaca tcccatctat cacctgggag cacacaggcc ggtacggatg ccagtactat 240
agccgggcca gatggtctga gctgagcgac ccctgggtgc tggatcatgac cggagcctat 300
cccaagccta cactgtctgc ccagccaagc ccagtgggta cctctggcgg cagagtgaca 360
ctgcagtgtg agagccaggt ggcttcggc ggctttatcc tgtgcaagga gggcgaggag 420
gagcaccac agtgtctgaa tagccagcca cacgccagg gcagctccc cgccatcttc 480
agcgtgggac ccgtgagccc aaaccggaga tggteccacc gctgctacgg ctatgacctg 540
aacagccctt acgtgtggtc tagcccaagc gatctgctgg agctgctggt gcccggcgtg 600
agcaagaagc cttccctgtc tgtgcagcct ggaccagtgg tggcacctgg agagtccctg 660
accctgcagt gcgtgagcga cgtgggctac gatcggtttg tgctgtataa ggaggagag 720
agggatctga ggcagctgcc aggcagacag ccacaggccg gctgtccca ggccaacttc 780
accctgggccc cagtgagccc gtcctatggc ggccagtaca gatgctatgg cgcccacaat 840
ctgtcctctg agtgttccgc cccaagcgac ccctggaca tctgatcac cggccagatc 900
aggggcacac ctttatcag cgtgcagcca ggacctacc tggcctccgg cgagaacgtg 960
aactgctgt gccagagctg gcgccagttc cacaccttc tgctgacaaa ggcaggagca 1020
gcagacgcac cactgaggct gcgctccatc cacgagtacc ccaagtatca ggccgagttc 1080
ccaatgtccc cagtgacctc tgcccacgca ggcacataca ggtgttatgg cagcctgaac 1140
agcgaccct acctgctgtc tcaccctagc gagccactgg agctggtggt gtctggagga 1200
ggaggcagcg gcggaggagg ctccggaggc ggcggtctg agagcaagta tggaccacct 1260
tgcccacat gtccagcacc agagtctgag ggaggacaa gcgtgttcct gtttctcca 1320
aagcctaagg acaccctgat gatctccgc accctgagg tgacatgcgt ggtggtggac 1380
gtgtctcagg aggaccccga ggtgcagttt aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcac 1440
aatgccaaga ccaagccccg ggaggagcag ttcaactcta cctacagagt ggtgagcgtg 1500
ctgacagtgc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt ataagtgtaa ggtgagcaat 1560
aaggcctgc ctagctccat cgagaaaacc atcagcaagg caaagggaca gccaggag 1620
cctcaggtgt ataccctgcc ccctcccag tgcgagatga caaagaacca ggtgtccctg 1680
tcttgtgccc tgaagggtt ttaccatec gacatcgcc tggagtggga gtctaattggc 1740
cagcccgaga acaattataa gaccacacca cccgtgctgg actccgatgg ctctttcttt 1800
ctggtgagca ggctgaccgt ggataagtec cgctggcagg agggcaacgt gttcagctgc 1860
tccgtgatgc acgaggccct gcacaatcac tacacacaga agtctctgag cctgtccctg 1920
ggcaagggcg gcggcggtc tggcgcggc ggcagcggcg gcggcggtc cggaggaggc 1980
ggctctcaga agggcgatca gaacccccag atcgccgcc acgtgatcag cgaggcctct 2040
agcaagacca catccgtgct gcagtgggccc gagaagggt actataccat gagcaacaat 2100
ctggtgacac tggagaacgg caagcagctg accgtgaaga ggcaggcct gtactatctc 2160
tacgccagg tgacattctg ctccaatcgc gagcctctc ctcaggcccc ttttatcgcc 2220
tctctgagcc tgaagtctcc aggccggtc gagagaatcc tgctgagggc agcaaacacc 2280

cacagctccg ccaagccttg tggccagcag tctatccacc tgggcggcgt gttcgagctg 2340
cagccaggag ccagcgtggt tgtgaatgtg acagacccta gccaggtgtc ccacggcacc 2400
ggcttcacca gcttcggcct gctgaagctg ggcgcgggcg gcagcggggg cggcggctcc 2460
ggagggggag gctctcagaa aggcgatcag aatccacaga ttgctgcca cgtgatctct 2520
gaggcctcta gcaagaccac aagcgtgctg cagtgggctg aaaaaggata ctataccatg 2580
tctaataatc tggtagacct ggagaatggc aagcagctga ctgtcaagag acagggcctg 2640
tattacatct acgctcaggt gacattttgc agcaatagag aggctcctc tcaggctccc 2700
ttcatcgcct ccctgtctct gaagtcacct ggcaggtttg agcgcatcct gctgagagcc 2760
gccaatactc acagctccgc caagccatgt ggacagcagt ccattcacct gggcggcgtg 2820
ttcgagctgc aaccaggagc cagcgtgttc gtgaatgtga cagaccctc tcaggtgagc 2880
cacggcaccg gcttcaccag cttcggcctg ctgaagctgg gtggcggcgg cagcggcggg 2940
ggcggctccg gaggcggagg ctctcagaag ggcgatcaga atcctcagat tgcagccac 3000
gtgatctccg aggcctctag caagaccaca tctgtgctgc agtgggctga gaaaggctac 3060
tataccatgt ctaacaatct ggtgacctg gagaacggca agcaactgac tgtcaaaaga 3120
cagggcctgt attatatcta cgetcaagtg acattctgca gcaatcggga ggctcctct 3180
caggcacctc tcacgccag cctgtccctg aagtcacctg gccggttca gagaatcctg 3240
ttaagagccg ccaatacaca cagctccgcc aaacctgtg gacagcagag catacactg 3300
ggcggcgtgt tcgagctgca accgggagcc tccgtgtttg tcaatgtgac agaccatcc 3360
caggtgtctc acggcaccg cttcaccagc ttcggcctgc tgaagctg 3408

<210> 150

<211> 367

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Siglec-Fc 杆 IgG4: 在TSP 401 及 403 胺基酸序列中

<400> 150

Asp	Gly	Arg	Phe	Trp	Ile	Arg	Val	Gln	Glu	Ser	Val	Met	Val	Pro	Glu
1				5					10					15	
Gly	Leu	Ser	Ile	Ser	Val	Pro	Cys	Ser	Phe	Ser	Tyr	Pro	Arg	Gln	Asp
				20					25					30	
Trp	Thr	Gly	Ser	Thr	Pro	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Trp	Phe	Lys	Ala	Val	Thr
				35					40					45	
Glu	Thr	Thr	Lys	Gly	Ala	Pro	Val	Ala	Thr	Asn	His	Gln	Ser	Arg	Glu
				50					55					60	
Val	Glu	Met	Ser	Thr	Arg	Gly	Arg	Phe	Gln	Leu	Thr	Gly	Asp	Pro	Ala
65									70					75	
Lys	Gly	Asn	Cys	Ser	Leu	Val	Ile	Arg	Asp	Ala	Gln	Met	Gln	Asp	Glu
				85					90					95	
Ser	Gln	Tyr	Phe	Phe	Arg	Val	Glu	Arg	Gly	Ser	Tyr	Val	Arg	Tyr	Asn

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

<210> 151

<211> 1101

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Siglec-Fc 杆 IgG4: 在TSP 401 及 403 核酸序列中

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

<210> 153

<211> 1053

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> TIGIT-Fc 杵 IgG4: 在TSP 501 及 503 核酸序列

<400> 153

atgaccggca caatcgagac aacaggcaac atctctgccg agaagggagg cagcatcgcc 60
 ctgcagtgcc acctgagcag caccacagcc caggtgacct aggtgaactg ggagcagcag 120
 gaccagctgc tggccatctc caatgccgat ctgggctggc acatcagccc ctcctttaag 180
 gataggggtg cacctggacc aggctgggc ctgaccctgc agagcctgac cgtgaatgac 240
 acaggcgagt acttctgtat ctaccacaca tatcctgatg gcacctatac aggcagaatc 300
 tttctggagg tgctggagtc tagcgtggcc gagcacggag gaggaggctc cggaggagga 360
 ggctctgaga gcaagtacgg accaccttgc ccaccatgct cagcacctga gttcgaggga 420
 ggacctagcg tgttctgtt tctccaaag ccaaaggaca ccctgatgat cagcaggacc 480
 cctgagggtga catgcgtggt ggtggacgtg tcccaggagg accccgaggt gcagttcaac 540
 tggtatgtgg atggcgtgga ggtgcacaat gccaagacaa agcccaggga ggagcagttt 600
 aactccacct accgcgtggt gtctgtgctg acagtgtctg accaggactg gctgaacggc 660
 aaggagtata agtgaaggt gtctaataag ggctgcect cctctatcga gaaaaccatc 720
 agcaaggcca agggccagcc aagagagcca caggtgtgca cctgccacc ttcccaggag 780
 gagatgacaa agaaccaggt gtctctgtgg tgtctggtga agggcttcta cccatctgac 840
 atgcccgtag agtgggagag caatggccag cccgagaaca attacaagac cacaccacc 900
 gtgctggaca gcgatggctc cttctttctg tatagccggc tgaccgtgga taagtccaga 960
 tggcaggagg gcaacgtgtt ttctgtctct gtgatgcacg aggcctgca caatcactat 1020
 acacagaaga gcctgtccct gtctctgggc aag 1053

<210> 154

<211> 873

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PD1- Fc 白 IgG4-sc3xCD40L: 在TSP222 及 403 及 503氨基酸
序列中

<400> 154

Asp	Ser	Pro	Asp	Arg	Pro	Trp	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Leu
1				5					10					15	
Leu	Val	Val	Thr	Glu	Gly	Asp	Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser
				20				25						30	
Asn	Thr	Ser	Glu	Ser	Phe	Val	Leu	Asn	Trp	Tyr	Arg	Met	Ser	Pro	Ser
				35				40						45	
Asn	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Arg	Ser	Gln	Pro
				50			55							60	
Gly	Gln	Asp	Ser	Arg	Phe	Arg	Val	Thr	Gln	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp
65				70						75				80	
Phe	His	Met	Ser	Val	Val	Arg	Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr
				85						90				95	
Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu	Ala	Pro	Lys	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser

Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr
 420 425 430
 Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr
 435 440 445
 Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys
 450 455 460
 Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Ser
 465 470 475 480
 Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn
 485 490 495
 Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly
 500 505 510
 Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr
 515 520 525
 Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu
 530 535 540
 Leu Lys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 545 550 555 560
 Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile
 565 570 575
 Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys
 580 585 590
 Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys
 595 600 605
 Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val
 610 615 620
 Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala
 625 630 635 640
 Ser Leu Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg
 645 650 655
 Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile
 660 665 670
 His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val
 675 680 685
 Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser
 690 695 700
 Phe Gly Leu Leu Lys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 705 710 715 720
 Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala

	725		730		735
His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp					
	740		745		750
Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu					
	755		760		765
Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr					
	770		775		780
Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro					
785		790		795	800
Phe Ile Ala Ser Leu Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile					
	805		810		815
Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln					
	820		825		830
Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser					
	835		840		845
Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly					
	850		855		860
Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu					
865		870			

<210> 155

<211> 2619

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PD1- Fc 白 IgG4-sc3xCD40L: 在TSP222 及 403 及 503氨基酸
序列中

<400> 155

gacagcccag atagaccttg gaatccacct accttctccc cgcacctgct ggtggtgaca 60
gagggcgata acgccacctt cacatgctct ttagcaaca cctccgagtc tttgtgctg 120
aattggtaca ggatgagccc ttccaaccag acagacaagc tggccgcatt ccctgaggac 180
cgctcccagc caggacagga ttctcggttc agagtgacct agctgcaaaa tggccgggac 240
tttccatga gcgtggtgag agcccggaga aacgatccg gcacatacct gtgcggagcc 300
atctctcttg ccccaaaggc acagatcaag gagtccctgc gggcagagct gagagtgacc 360
gagaggaggg cagagggtcc cacagcacac ccatctecta gcccacggcc cgcaggacag 420
ggaggaggag gcagcggggg aggaggtcc gagtctaagt acggaccacc atgccctcca 480
tgtctgcac cagagttcga gggaggacca tccgtgttc tgtttccacc taagcctaag 540
gacaccctga tgatcagccg gaccccagag gtgacatgcg tgggtgtgga cgtgagccag 600
gaggaccccg aggtgcagtt taattggtat gtggatggcg tggaggtgca caacgccaag 660
accaagccca gggaggagca gttcaacagc acctaccgcg tgggtgtccgt gctgacagtg 720

ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tataagtgta aggtgtccaa caagggcctg 780
cctagctcca tcgagaaaac catcagcaag gcaaaggac agccacggga gccacaggtg 840
tacaccctgc caccaagcca gtgcgagatg acaaagaatc aggtgagcct gtcctgtgcc 900
gtgaagggtt tttacccttc cgacatcgcc gtggagtggg agtctaacgg ccagccagag 960
aacaattata agaccacacc tccagtgtg gactccgatg gctctttctt tctggtgtct 1020
aggctgaccg tggataagag ccgctggcag gagggaacg tgttcagctg cagcgtgatg 1080
cacgaggccc tgcacaacca ctatacaca aagtccctgt ctctgagcct gggcaagggc 1140
ggcggcggca gcggcggagg aggctccgga ggcggcggct ctggcggcgg cggcagccag 1200
aagggcgatc agaatcctca gatcgcgcc cacgtgatca gcgaggctc tagcaagacc 1260
acatccgtgc tgcagtgggc cgagaagggc tactatacca tgagcaaca tctggtgaca 1320
ctggagaatg gcaagcagct gaccgtgaag cggcagggcc tgtactatat ctacgccag 1380
gtgacattct gcagcaacag agaggctcc tctcagggc cttttatcgc ctctctgagc 1440
ctgaagtctc caggccggtt cgagagaatc ctgctgaggg cagcaaacac ccacagctcc 1500
gccaagcctt gtggccagca gtctatccac ctgggcggcg tgttcgagct gcagccagga 1560
gccagcgtgt ttgtgaatgt gacagaccct agccaggtgt cccacggcac cggcttcacc 1620
agcttcggcc tgctgaagct gggcggcggc ggcagcgggg gcggcggctc cggaggggga 1680
ggctctcaga aaggcgatca gaatccacag attgctgcc acgtgatctc tgaggcctct 1740
agcaagacca caagcgtgct gcagtgggct gaaaaaggat actataccat gtctaataat 1800
ctggtgacac tggagaatgg caagcagctg actgtcaaga gacagggcct gtattacatc 1860
tacgctcagg tgacattttg cagcaataga gaggctcct ctcaggctcc cttcatcgcc 1920
tcctgtctc tgaagtccc tggcaggtt gagcgcaccc tgctgagagc cgccaatact 1980
cacagctccg ccaagccatg tggacagcag tccattcacc tgggcggcgt gttcgagctg 2040
caaccaggag ccagcgtggt cgtgaatgtg acagaccct ctcaggtgag ccacggcacc 2100
ggcttcacca gcttcggcct gctgaagctg ggtggcggcg gcagcggcgg gggcggctcc 2160
ggaggcggag gctctcagaa gggcgatcag aatcctcaga ttgcagcca cgtgatctcc 2220
gaggcctcta gcaagaccac atctgtgctg cagtgggctg agaaaggcta ctataccatg 2280
tctaacaatc tggtgacact ggagaacggc aagcaactga ctgtcaaaag acagggcctg 2340
tattatatct acgctcaagt gacattctgc agcaatcggg aggcctctc tcaggcacc 2400
ttcatcgcca gcctgtccct gaagtccct ggccggttc agagaatcct gtttaagacc 2460
gccaatacac acagctccgc caaacatgt ggacagcaga gcatacact gggcggcgtg 2520
ttcgagctgc aaccgggagc ctccgtgtt gtcaatgtga cagaccatc ccaggtgtct 2580
cacggcaccg gcttcaccag cttcggcctg ctgaagctg 2619

<210> 156

<211> 961

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TIGIT-Fc 白 IgG4-sc3x4-1BBL: 在TSP 501V1 胺基酸序列中

<400> 156

Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Ile Ala Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val
 20 25 30
 Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Ser Asn
 35 40 45
 Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala
 50 55 60
 Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp
 65 70 75 80
 Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 115 120 125
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 145 150 155 160
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 165 170 175
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 180 185 190
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 195 200 205
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 210 215 220
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 225 230 235 240
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 245 250 255
 Pro Ser Gln Cys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
 260 265 270
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 275 280 285
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 290 295 300
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

305	310	315	320
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu			
	325	330	335
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly			
	340	345	350
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg			
	355	360	365
Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu			
	370	375	380
Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile			
385	390	395	400
Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser			
	405	410	415
Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val			
	420	425	430
Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg			
	435	440	445
Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu			
	450	455	460
Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val			
465	470	475	480
Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe			
	485	490	495
Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His			
	500	505	510
Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly			
	515	520	525
Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly			
	530	535	540
Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
545	550	555	560
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro			
	565	570	575
Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly			
	580	585	590
Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro			
	595	600	605
Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly			
610	615	620	

930	935	940	
Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser			
945	950	955	960
Glu			
<210> 157			
<211> 2883			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> TIGIT-Fc 白 IgG4-sc3x4-1BBL: 在TSP 501V1 核酸序列中			
<400> 157			
atgaccggca caatcgagac aacaggcaac atctctgccg agaagggagg cagcatcgcc 60			
ctgcagtgcc acctgagcag caccacagcc caggtgacct aggtgaactg ggagcagcag 120			
gaccagctgc tggccatctc caatgccgat ctgggctggc acatcagccc ctctttaaag 180			
gataggggtg cacctggacc aggctgggc ctgacctgc agagcctgac cgtgaatgac 240			
acaggcgagt acttctgtat ctaccacaca tatcctgatg gcacctatac aggcagaatc 300			
tttctggagg tgctggagtc tagcgtggcc gagcacggag gaggaggatc cggaggagga 360			
ggatccgagt ctaagtatgg accaccatgc cctccatgtc cagcacctga gtttgaggga 420			
ggaccttccg tgttctgtt tccccctaag ccaaaggaca cactgatgat ctccaggaca 480			
ccagaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg tctcaggagg atcccagggt gcagttcaac 540			
tggtacgtgg atggcgtgga ggtgcacaat gccaaagaca agcctaggga ggagcagttt 600			
aactccacat accgcgtggt gtctgtgctg accgtgctgc accaggattg gctgaacggc 660			
aaggagtata agtftaaggt gagcaataag ggctgcca gctccatcga gaagaccatc 720			
tccaaggcaa agggacagcc aaggagcct caggtgtata cactgccacc cagccagtgc 780			
gagatgacca agaaccagggt gagcctgtcc tgtgccgtga agggcttcta cccatctgac 840			
atcgccgtgg agtgggagag caatggccag cccgagaaca attataagac cacacctcca 900			
gtgctggact ccgatggctc tttctttctg gtgtccaggc tgacagtgga taagtctcgc 960			
tggcaggagg gcaacgtgtt ttctttagc gtgatgcacg aggccctgca caatcactac 1020			
accagaagt ccctgtctct gagcctgggc aaggcgggcg gcggctccgg aggaggagga 1080			
agcggccct cccctaggct gcgcgaggga ccagagctga gccagacga tccagcagga 1140			
ctgctggacc tgaggcagg aatgttcgca cagctggtgg ccagaacgt gctgctgac 1200			
gacggccctc tgtcttggt aagcagatcca ggactggcag gcgtgagcct gacaggcgga 1260			
ctgtcctata aggaggatac caaggagctg gtggtggcaa aggcaggcgt gtactacgtg 1320			
ttcttccagc tggagctgag gagagtgtg gcaggagagg gatccggatc tgtgagcctg 1380			
gccctgcacc tgcagccact gcggagcgc gcaggagcag ccgccctggc cctgaccgtg 1440			
gacctgccac ctgcatctag cgaggcacgg aattctgect tcggcttca gggcagactg 1500			
ctgcacctga gcgccggaca gaggtggga gtgcacctgc acacagaggc aagggaaga 1560			
cacgatggc agctgacaca gggagcaacc gtgctgggac tgttccgcgt gaccctgag 1620			
atcccagcag gactgccatc cccccgtct gagggcggc gcgggtccgg aggaggagga 1680			

tctggcggcg gcggcagcgc cgcctcccc aggctgcgcg agggacctga gctgtcccca 1740
gacgatcctg ccggcctgct ggacctgaga cagggaatgt ttgccagct ggctgctcag 1800
aacgtgctgc tgattgacgg ccccctgtcc tggtatagcg atcctggact ggcaggcgtg 1860
tctctgacag gcggactgag ttacaaagaa gacactaaag aactggtcgt cgccaaagcc 1920
ggcgtgtact acgtgttctt ccaactggag ctgaggaggg tcgtcgccgg cgaaggcagc 1980
ggctctgtga gcctggccct gcacctgcaa ccaactgagga gcgccgccgg cgccgccgcc 2040
ctggccctga ctgtggacct gccaccagca tcctctgagg caaggaattc cgccttcggc 2100
ttccagggcc ggctgctgca cctgtctgcc ggacagagac tgggcgtcca cctgcatacc 2160
gaagccagag ccaggcatgc ctggcagctg acccaggcgg ccaccgtgct gggcctgttc 2220
agagtgacc cagaaattcc agcaggactg cttccccaa ggtctgaggg aggaggagga 2280
agtggcggag gaggatccgg agggggaggg agcgcgcct ccccaagact gagagagga 2340
ccagagctgt cccctgatga cctgcccgg ctgctggacc tgagacaagg catgttcgcc 2400
cagctggtcg cacaaaacgt gctgttaatt gacggcccac tgtcttgta ttccgacct 2460
ggcctggccg gcgtgtccct gacaggcggc ctgtcttaca aagaagacac aaaagaactg 2520
gtcgtcgcta aagctggcgt gtactacgtg ttcttccaat tagaactgag aagggtcgtc 2580
gccggcgagg gcagcgggtc tgtgagcctg gccctgcacc tgcaaccgct gcggagcgc 2640
gccggcgctg ccgccctggc cctgacagtg gacctgcctc cagcaagctc cgaggcaagg 2700
aatagcgcct tcggctttca aggccgcctg ctgcacctgt ccgccgaca gcggctgggc 2760
gtccacctgc acaccgaagc cagagcccgc catgcctggc agctgactca gggcgtacc 2820
gtgctgggcc tgttccgcgt gaccccagag atccctgccg gctgcctc cctcgtct 2880
gag 2883

<210> 158

<211> 845

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TIGIT-Fc 白 IgG4-sc3xCD40L: 在TSP 503V1 胺基酸序列中

<400> 158

Met	Thr	Gly	Thr	Ile	Glu	Thr	Thr	Gly	Asn	Ile	Ser	Ala	Glu	Lys	Gly
1			5					10					15		
Gly	Ser	Ile	Ala	Leu	Gln	Cys	His	Leu	Ser	Ser	Thr	Thr	Ala	Gln	Val
			20					25					30		
Thr	Gln	Val	Asn	Trp	Glu	Gln	Gln	Asp	Gln	Leu	Leu	Ala	Ile	Ser	Asn
			35					40					45		
Ala	Asp	Leu	Gly	Trp	His	Ile	Ser	Pro	Ser	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Ala
			50				55					60			
Pro	Gly	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Thr	Leu	Gln	Ser	Leu	Thr	Val	Asn	Asp
65						70				75				80	
Thr	Gly	Glu	Tyr	Phe	Cys	Ile	Tyr	His	Thr	Tyr	Pro	Asp	Gly	Thr	Tyr

				85					90					95			
Thr	Gly	Arg	Ile	Phe	Leu	Glu	Val	Leu	Glu	Ser	Ser	Val	Ala	Glu	His		
				100					105					110			
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro		
				115					120					125			
Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val		
				130					135					140			
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr		
				145					150					155			160
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu		
				165					170					175			
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys		
				180					185					190			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser		
				195					200					205			
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys		
				210					215					220			
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile		
				225					230					235			240
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro		
				245					250					255			
Pro	Ser	Gln	Cys	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala		
				260					265					270			
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn		
				275					280					285			
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser		
				290					295					300			
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg		
				305					310					315			320
Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu		
				325					330					335			
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Gly		
				340					345					350			
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly		
				355					360					365			
Gly	Gly	Ser	Gln	Lys	Gly	Asp	Gln	Asn	Pro	Gln	Ile	Ala	Ala	His	Val		
				370					375					380			
Ile	Ser	Glu	Ala	Ser	Ser	Lys	Thr	Thr	Ser	Val	Leu	Gln	Trp	Ala	Glu		
				385					390					395			400

Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly
 405 410 415
 Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln
 420 425 430
 Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile
 435 440 445
 Ala Ser Leu Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu
 450 455 460
 Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser
 465 470 475 480
 Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe
 485 490 495
 Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr
 500 505 510
 Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 515 520 525
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala
 530 535 540
 Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln
 545 550 555 560
 Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu
 565 570 575
 Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile
 580 585 590
 Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala
 595 600 605
 Pro Phe Ile Ala Ser Leu Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg
 610 615 620
 Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly
 625 630 635 640
 Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala
 645 650 655
 Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr
 660 665 670
 Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 675 680 685
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro
 690 695 700
 Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser

705	710	715	720
Val Leu Gln Trp	Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr	Met Ser Asn Asn	Leu
	725	730	735
Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu			
	740	745	750
Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser			
	755	760	765
Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Ser Leu Lys Ser Pro Gly Arg			
	770	775	780
Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys			
785	790	795	800
Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln			
	805	810	815
Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser			
	820	825	830
His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu			
	835	840	845

<210> 159

<211> 2535

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> TIGIT-Fc 白 IgG4-sc3xCD40L: 在TSP 503V1 胺基酸序列中

<400> 159

```

atgaccggca caatcgagac aacaggcaac atctctgccg agaaggagg cagcatcgcc 60
ctgcagtgcc acctgagcag caccacagcc caggtgacct aggtgaactg ggagcagcag 120
gaccagctgc tggccatctc caatgccgat ctgggctggc acatcagccc ctcctttaag 180
gataggggtg cacctggacc aggctgggc ctgacctgc agacctgac cgtgaatgac 240
acaggcgagt acttctgtat ctaccacaca tatcctgatg gcacctatac aggcagaatc 300
tttctggagg tgctggagtc tagcgtggcc gagcacggag gaggaggcag cgggggagga 360
ggctccgagt ctaagtacgg accaccatgc cctccatgct ctgcaccaga gttcgaggga 420
ggaccatccg tgttctgtt tccacctaag cctaaggaca cctgatgat cagccggacc 480
ccagaggtga catgcgtggt ggtggacgtg agccaggagg accccgaggt gcagtttaat 540
tggtatgtgg atggcgtgga ggtgcacaac gccaaagca agcccaggga ggagcagttc 600
aacagcacct accgcgtggt gtccgtgctg acagtgctgc accaggactg gctgaatggc 660
aaggagtata agtgaaggt gtccaacaag ggectgecta gctccatcga gaaaaccatc 720
agcaaggcaa agggacagcc acgggagcca caggtgtaca cctgccacc aagccagtgc 780
gagatgacaa agaatcaggt gagcctgtcc tgtgccgtga agggctttta cccttccgac 840
atcgccgtgg agtgggagtc taacggccag ccagagaaca attataagac cacacctcca 900

```

gtgctggact ccgatggctc tttctttctg gtgtctaggc tgaccgtgga taagagccgc 960
 tggcaggagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactat 1020
 acacaaaagt ccctgtctct gagcctgggc aagggcggcg gcggcagcgg cggaggaggc 1080
 tccggaggcg gcggctctgg cggcggcggc agccagaagg gcgatcagaa tcctcagatc 1140
 gccgcccacg tgatcagcga ggccctctagc aagaccacat ccgtgctgca gtgggcccag 1200
 aagggctact ataccatgag caacaatctg gtgacactgg agaatggcaa gcagctgacc 1260
 gtgaagcggc agggcctgta ctatatctac gcccagggtga cattctgcag caacagagag 1320
 gcctcctctc agggcccctt tatcgctctc ctgagcctga agtctccagg ccggttcgag 1380
 agaatcctgc tgagggcagc aaacacccac agctccgcca agccttgtgg ccagcagtct 1440
 atccacctgg gcggcgtgtt cgagctgcag ccaggagcca gcgtgtttgt gaatgtgaca 1500
 gaccctagcc aggtgtccca cggcaccggc ttcaccagct tcggcctgct gaagctgggc 1560
 ggccggcggca gcggggggcgg cggtccgga gggggaggct ctcaaaaagg cgatcagaat 1620
 ccacagattg ctgcccacgt gatctctgag gcctctagca agaccacaag cgtgctgcag 1680
 tgggctgaaa aaggatacta taccatgtct aataatctgg tgacactgga gaatggcaag 1740
 cagctgactg tcaagagaca gggcctgtat tacatctacg ctcaggtgac attttgcagc 1800
 aatagagagg cctcctctca ggtcccttc atcgctccc tgtctctgaa gtcccctggc 1860
 aggtttgagc gcacctctgt gagagccgcc aatactcaca gctccgcaa gccatgtgga 1920
 cagcagtcca ttcacctggg cggcgtgttc gagctgcaac caggagccag cgtgttcgtg 1980
 aatgtgacag acccctctca ggtgagccac ggcaccggct tcaccagctt cggcctgctg 2040
 aagctgggtg gcggcggcag cggcgggggc ggctccggag gcggaggctc tcagaagggc 2100
 gatcagaatc ctcagattgc agcccacgtg atctccgagg cctctagcaa gaccacatct 2160
 gtgctgcagt gggctgagaa aggctactat accatgtcta acaatctggt gacactggag 2220
 aacggcaagc aactgactgt caaaagacag ggctgtatt atatctacgc tcaagtgaca 2280
 ttctgcagca atcgggaggc ctctctcag gcaccctca tcgccagcct gtcccctgaag 2340
 tcccctggcc ggttcgagag aatcctgtta agagccgcca atacacacag ctccgccaaa 2400
 ccatgtggac agcagagcat acacctgggc ggctgttctg agctgcaacc gggagcctcc 2460
 gtgtttgtca atgtgacaga cccatcccag gtgtctcagc gcaccggctt caccagcttc 2520
 ggctctgctga agctg 2535

<210> 160

<211> 244

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TIGIT 全长 (Q495A1 联合的蛋白 ID) 氨基酸序列

<400> 160

Met	Arg	Trp	Cys	Leu	Leu	Leu	Ile	Trp	Ala	Gln	Gly	Leu	Arg	Gln	Ala
1			5				10				15				
Pro	Leu	Ala	Ser	Gly	Met	Met	Thr	Gly	Thr	Ile	Glu	Thr	Thr	Gly	Asn
			20				25				30				

Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser
 35 40 45
 Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln
 50 55 60
 Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser
 65 70 75 80
 Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln
 85 90 95
 Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr
 100 105 110
 Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu
 115 120 125
 Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Leu Leu Gly
 130 135 140
 Ala Met Ala Ala Thr Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val Ile Val Val
 145 150 155 160
 Val Ala Leu Thr Arg Lys Lys Lys Ala Leu Arg Ile His Ser Val Glu
 165 170 175
 Gly Asp Leu Arg Arg Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp Ser Pro Ser
 180 185 190
 Ala Pro Ser Pro Pro Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala Ala Pro Ala
 195 200 205
 Gly Leu Cys Gly Glu Gln Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu Leu His Asp
 210 215 220
 Tyr Phe Asn Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Cys Ser Phe Phe
 225 230 235 240
 Thr Glu Thr Gly
 <210> 161
 <211> 598
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> LILRB2 D1-4, 全长 (Q8N423-1 UniParc) 氨基酸序列
 <400> 161
 Met Thr Pro Ile Val Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Pro Arg Thr His Val Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp
 20 25 30
 Ala Glu Pro Asp Ser Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Ser

35	40	45
Cys Gln Gly Ser Leu Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys		
50	55	60
Lys Ser Ala Ser Trp Ile Thr Arg Ile Arg Pro Glu Leu Val Lys Asn		
65	70	75
Gly Gln Phe His Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Thr Gly Arg Tyr		
85	90	95
Gly Cys Gln Tyr Tyr Ser Arg Ala Arg Trp Ser Glu Leu Ser Asp Pro		
100	105	110
Leu Val Leu Val Met Thr Gly Ala Tyr Pro Lys Pro Thr Leu Ser Ala		
115	120	125
Gln Pro Ser Pro Val Val Thr Ser Gly Gly Arg Val Thr Leu Gln Cys		
130	135	140
Glu Ser Gln Val Ala Phe Gly Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu		
145	150	155
Glu Glu His Pro Gln Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser		
165	170	175
Ser Arg Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg Trp		
180	185	190
Ser His Arg Cys Tyr Gly Tyr Asp Leu Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser		
195	200	205
Ser Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys		
210	215	220
Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Val Val Ala Pro Gly Glu Ser		
225	230	235
Leu Thr Leu Gln Cys Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu		
245	250	255
Tyr Lys Glu Gly Glu Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln Pro		
260	265	270
Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg		
275	280	285
Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser		
290	295	300
Glu Cys Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln		
305	310	315
Ile Arg Gly Thr Pro Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala		
325	330	335
Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His		
340	345	350

Thr Phe Leu Leu Thr Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu
 355 360 365
 Arg Ser Ile His Glu Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser
 370 375 380
 Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu
 385 390 395 400
 Asn Ser Asp Pro Tyr Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu
 405 410 415
 Val Val Ser Gly Pro Ser Met Gly Ser Ser Pro Pro Pro Thr Gly Pro
 420 425 430
 Ile Ser Thr Pro Ala Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly
 435 440 445
 Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile Gly
 450 455 460
 Ile Leu Val Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe
 465 470 475 480
 Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln
 485 490 495
 Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro
 500 505 510
 Thr Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala Gln
 515 520 525
 Glu Glu Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys Asp Thr Gln Pro Glu Asp Gly
 530 535 540
 Val Glu Met Asp Thr Arg Ala Ala Ala Ser Glu Ala Pro Gln Asp Val
 545 550 555 560
 Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg Lys Ala Thr Glu
 565 570 575
 Pro Pro Pro Ser Gln Glu Arg Glu Pro Pro Ala Glu Pro Ser Ile Tyr
 580 585 590
 Ala Thr Leu Ala Ile His
 595
 <210> 162
 <211> 697
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Siglec 10 全长 (Q96LC7-1 联合的蛋白) 氨基酸序列
 <400> 162

Met Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gly Ser Gln Ala
 1 5 10 15
 Met Asp Gly Arg Phe Trp Ile Arg Val Gln Glu Ser Val Met Val Pro
 20 25 30
 Glu Gly Leu Cys Ile Ser Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Arg Gln
 35 40 45
 Asp Trp Thr Gly Ser Thr Pro Ala Tyr Gly Tyr Trp Phe Lys Ala Val
 50 55 60
 Thr Glu Thr Thr Lys Gly Ala Pro Val Ala Thr Asn His Gln Ser Arg
 65 70 75 80
 Glu Val Glu Met Ser Thr Arg Gly Arg Phe Gln Leu Thr Gly Asp Pro
 85 90 95
 Ala Lys Gly Asn Cys Ser Leu Val Ile Arg Asp Ala Gln Met Gln Asp
 100 105 110
 Glu Ser Gln Tyr Phe Phe Arg Val Glu Arg Gly Ser Tyr Val Arg Tyr
 115 120 125
 Asn Phe Met Asn Asp Gly Phe Phe Leu Lys Val Thr Ala Leu Thr Gln
 130 135 140
 Lys Pro Asp Val Tyr Ile Pro Glu Thr Leu Glu Pro Gly Gln Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ile Cys Val Phe Asn Trp Ala Phe Glu Glu Cys Pro Pro Pro
 165 170 175
 Ser Phe Ser Trp Thr Gly Ala Ala Leu Ser Ser Gln Gly Thr Lys Pro
 180 185 190
 Thr Thr Ser His Phe Ser Val Leu Ser Phe Thr Pro Arg Pro Gln Asp
 195 200 205
 His Asn Thr Asp Leu Thr Cys His Val Asp Phe Ser Arg Lys Gly Val
 210 215 220
 Ser Ala Gln Arg Thr Val Arg Leu Arg Val Ala Tyr Ala Pro Arg Asp
 225 230 235 240
 Leu Val Ile Ser Ile Ser Arg Asp Asn Thr Pro Ala Leu Glu Pro Gln
 245 250 255
 Pro Gln Gly Asn Val Pro Tyr Leu Glu Ala Gln Lys Gly Gln Phe Leu
 260 265 270
 Arg Leu Leu Cys Ala Ala Asp Ser Gln Pro Pro Ala Thr Leu Ser Trp
 275 280 285
 Val Leu Gln Asn Arg Val Leu Ser Ser Ser His Pro Trp Gly Pro Arg
 290 295 300
 Pro Leu Gly Leu Glu Leu Pro Gly Val Lys Ala Gly Asp Ser Gly Arg

305		310		315		320
Tyr Thr Cys Arg	Ala Glu Asn Arg	Leu Gly Ser Gln	Gln Arg	Ala Leu		
	325		330		335	
Asp Leu Ser Val	Gln Tyr Pro Pro	Glu Asn Leu Arg	Val Met	Val Ser		
	340		345		350	
Gln Ala Asn Arg	Thr Val Leu Glu	Asn Leu Gly Asn	Gly Thr	Ser Leu		
	355		360		365	
Pro Val Leu Glu	Gly Gln Ser Leu	Cys Leu Val Cys	Val Thr	His Ser		
	370		375		380	
Ser Pro Pro Ala	Arg Leu Ser Trp	Thr Gln Arg Gly	Gln Val	Leu Ser		
385		390		395		400
Pro Ser Gln Pro	Ser Asp Pro Gly	Val Leu Glu Leu	Pro Arg	Val Gln		
	405		410		415	
Val Glu His Glu	Gly Glu Phe Thr	Cys His Ala Arg	His Pro	Leu Gly		
	420		425		430	
Ser Gln His Val	Ser Leu Ser Leu	Ser Val His Tyr	Ser Pro	Lys Leu		
	435		440		445	
Leu Gly Pro Ser	Cys Ser Trp Glu	Ala Glu Gly Leu	His Cys	Ser Cys		
	450		455		460	
Ser Ser Gln Ala	Ser Pro Ala Pro	Ser Leu Arg Trp	Trp Leu	Gly Glu		
465		470		475		480
Glu Leu Leu Glu	Gly Asn Ser Ser	Gln Asp Ser Phe	Glu Val	Thr Pro		
	485		490		495	
Ser Ser Ala Gly	Pro Trp Ala Asn	Ser Ser Leu Ser	Leu His	Gly Gly		
	500		505		510	
Leu Ser Ser Gly	Leu Arg Leu Arg	Cys Glu Ala Trp	Asn Val	His Gly		
	515		520		525	
Ala Gln Ser Gly	Ser Ile Leu Gln	Leu Pro Asp Lys	Lys Gly	Leu Ile		
	530		535		540	
Ser Thr Ala Phe	Ser Asn Gly Ala	Phe Leu Gly Ile	Gly Ile	Thr Ala		
545		550		555		560
Leu Leu Phe Leu	Cys Leu Ala Leu	Ile Ile Met Lys	Ile Leu	Pro Lys		
	565		570		575	
Arg Arg Thr Gln	Thr Glu Thr Pro	Arg Pro Arg Phe	Ser Arg	His Ser		
	580		585		590	
Thr Ile Leu Asp	Tyr Ile Asn Val	Val Pro Thr Ala	Gly Pro	Leu Ala		
	595		600		605	
Gln Lys Arg Asn	Gln Lys Ala Thr	Pro Asn Ser Pro	Arg Thr	Pro Leu		
610		615		620		

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
 180 185 190
 Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
 195 200 205
 Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
 210 215 220
 Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
 225 230 235 240
 Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
 245 250 255
 Gly Leu Leu Lys Leu
 260

<210> 164

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TIGIT 全 ECD 氨基酸序列

<400> 164

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

<210> 165

<211> 440

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LILRB2 全 ECD 氨基酸序列

<400> 165

Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp Ala Glu Pro Asp Ser																			
1				5						10									15
Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Ser Cys Gln Gly Ser Leu																			
				20						25									30
Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys Lys Ser Ala Ser Trp																			
				35						40									45
Ile Thr Arg Ile Arg Pro Glu Leu Val Lys Asn Gly Gln Phe His Ile																			
				50						55									60
Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Thr Gly Arg Tyr Gly Cys Gln Tyr Tyr																			
65										70									80
Ser Arg Ala Arg Trp Ser Glu Leu Ser Asp Pro Leu Val Leu Val Met																			
				85						90									95
Thr Gly Ala Tyr Pro Lys Pro Thr Leu Ser Ala Gln Pro Ser Pro Val																			
				100						105									110
Val Thr Ser Gly Gly Arg Val Thr Leu Gln Cys Glu Ser Gln Val Ala																			
				115						120									125
Phe Gly Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Glu Glu His Pro Gln																			
				130						135									140
Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser Ser Arg Ala Ile Phe																			
145										150									160
Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg Trp Ser His Arg Cys Tyr																			
				165						170									175
Gly Tyr Asp Leu Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Ser Pro Ser Asp Leu																			
				180						185									190
Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro Ser Leu Ser Val																			
				195						200									205
Gln Pro Gly Pro Val Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu Thr Leu Gln Cys																			
				210						215									220
Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr Lys Glu Gly Glu																			
225										230									240
Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln Pro Gln Ala Gly Leu Ser																			
				245						250									255
Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg Ser Tyr Gly Gly Gln																			
				260						265									270
Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Cys Ser Ala Pro																			
				275						280									285

Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Ile Arg Gly Thr Pro
 290 295 300
 Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala Ser Gly Glu Asn Val
 305 310 315 320
 Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His Thr Phe Leu Leu Thr
 325 330 335
 Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu Arg Ser Ile His Glu
 340 345 350
 Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Ala
 355 360 365
 His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu Asn Ser Asp Pro Tyr
 370 375 380
 Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu Val Val Ser Gly Pro
 385 390 395 400
 Ser Met Gly Ser Ser Pro Pro Pro Thr Gly Pro Ile Ser Thr Pro Ala
 405 410 415
 Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly Ser Asp Pro Gln Ser
 420 425 430
 Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val
 435 440

<210> 166

<211> 1422

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> sc3xCD40L, AA 114-261 C194S (P29965 联合的蛋白) 内连接体
 3x (GGGGS) 核酸序列

<400> 166

cagaagggcg atcagaaccc ccagatcgcc gccacgtga tctccgaggc ctctagcaag 60
 accacatctg tgctgcagtg ggccgagaag ggctactata caatgagcaa caatctgggtg 120
 accctggaga acggcaagca gctgacagtg aagcggcagg gcctgtacta tatctatgcc 180
 caggtgacct tctgctccaa tagagaggcc tectctcagg cccctttat cgcctccctg 240
 tctctgaagt ctctggccg gttcgagaga atctgctga gggcagcaaa cacacacagc 300
 tccgccaagc cctgtggcca gcagtctatc cacctgggcg gctgtttega gctgcagcca 360
 ggagccagcg tgtttgtgaa tgtgaccgac cctagccagg tgtcccacgg caccggttc 420
 accagcttcg gcctgctgaa gctgggcggc ggcggctctg gcggaggagg cagcggagga 480
 ggaggctccc agaaaggcga tcagaacct cagattgctg cccacgtgat cagcagggcc 540
 tctagcaaga ccacatccgt gctgcagtgg gctgaaaaag gatactatac aatgtctaata 600
 aatctgggtga ccctggagaa tggcaagcag ctgaccgtca agagacaggg cctgtattat 660

atctacgcc aggtgacct ttgcagcaat cgcgaggcct cctctcaggc tccattcatc 720
gccagcctgt cctgaagtc cccaggcagg tttgagcgca tcttgctgag agccgccaat 780
acccacagct ccgccaagcc atgtggacag cagtccattc acctgggcgg cgtgttcgag 840
ctgcaaccag gagccagcgt gttcgtgaat gtgaccgacc cctctcaggt gagccacggc 900
accggcttca ccagcttcgg cctgctgaag ctgggtggag gaggctctgg cgggggcggc 960
agcggcggag gaggctccca gaagggcgat cagaatcctc agattgccgc ccacgtgatc 1020
tctgaggcct ctagcaagac cacaagcgtg ctgcagtggg cagaaaaagg gtactataca 1080
atgtctaaca atctggtgac cctggagaac ggcaagcaac tgaccgtcaa aagacagggc 1140
ctgtactaca tctacgctca ggtgacctc tgcagcaata gggaggcctc ctctcaggca 1200
ccttttatcg cctctctgag cctgaagtec ccaggccggt tcgagagaat cctgttaagg 1260
gcagcaaaaca ctcacagetc cgccaaacca tgtggacagc agagcataca cctgggcggc 1320
gtgttcgagc tgcaaccggg agcctccgtg tttgtcaatg tgaccgacc atcccaggtg 1380
tctcacggca ccgcttcac cagcttcggc ctgctgaagc tg 1422

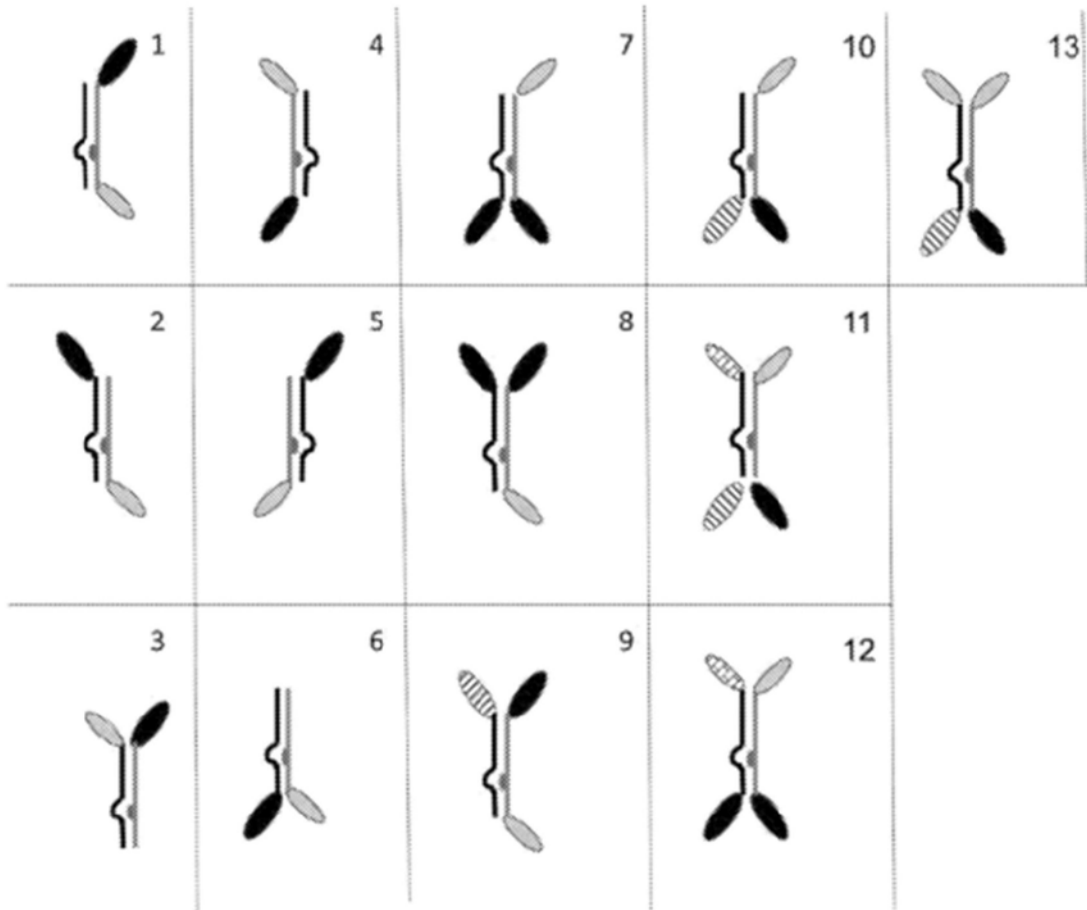


图1

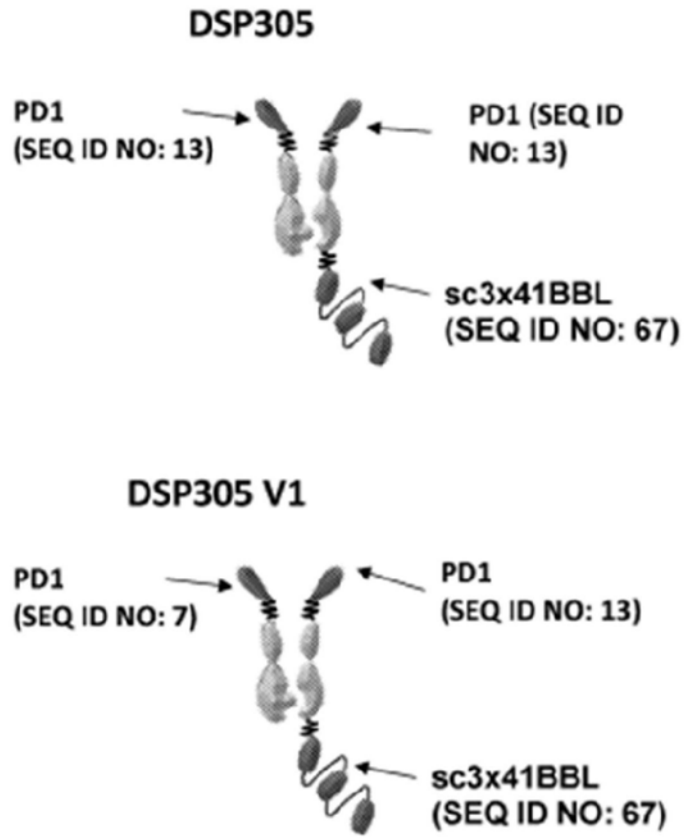


图2

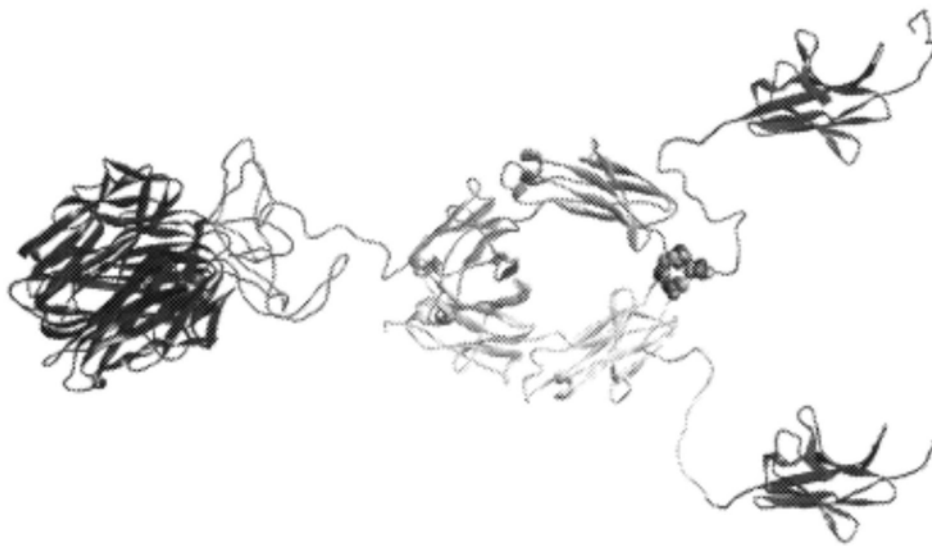


图3A

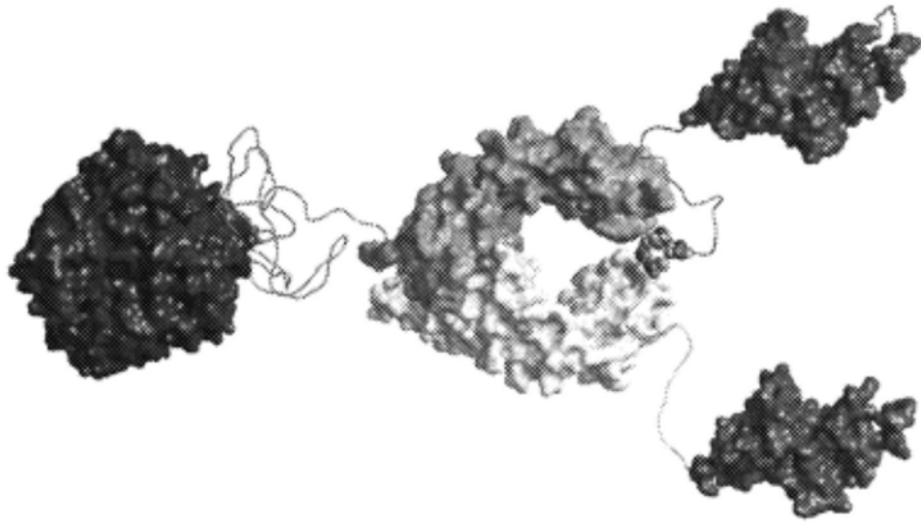


图3B

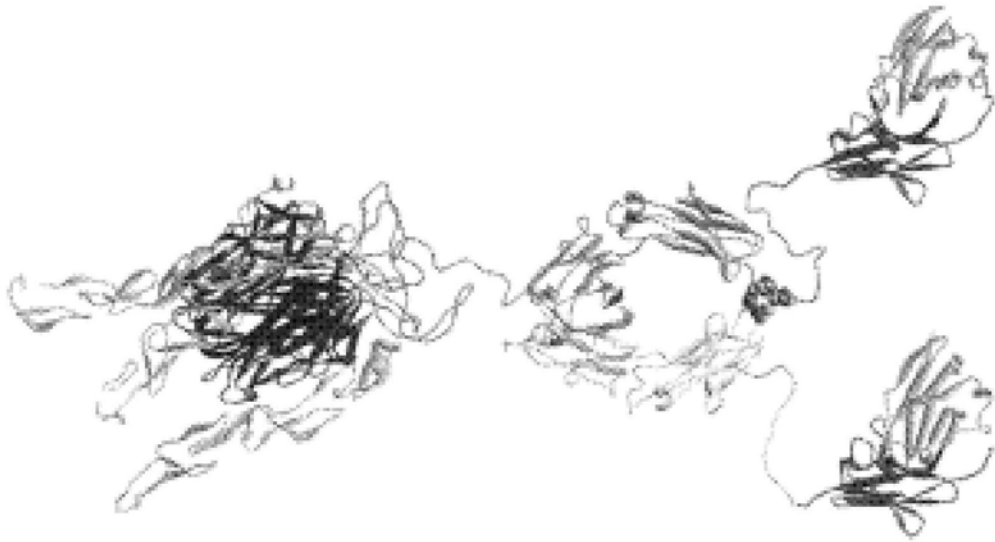


图3C

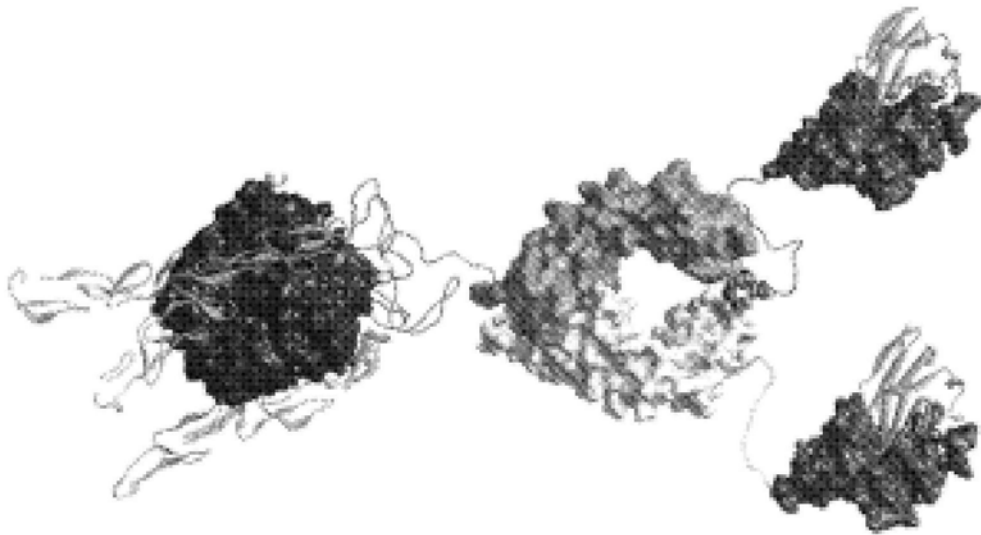


图3D



图3E

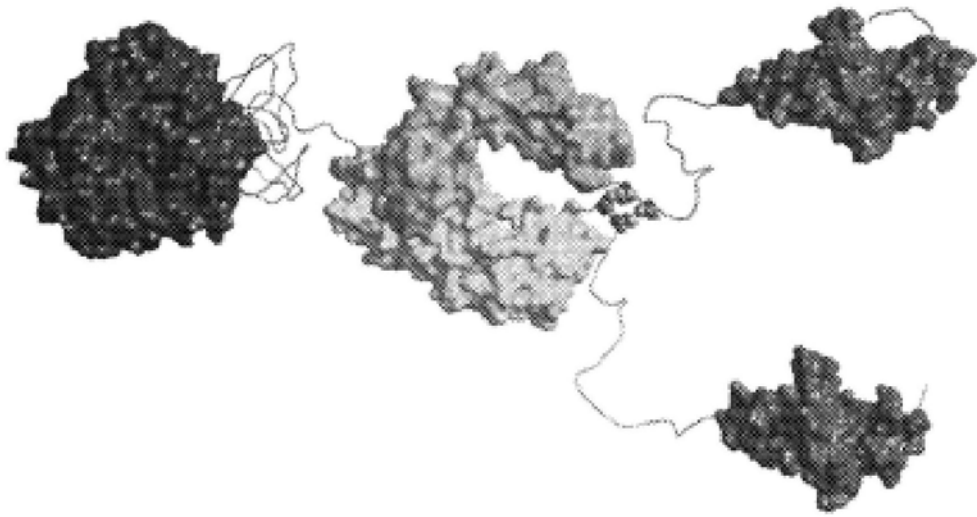


图3F

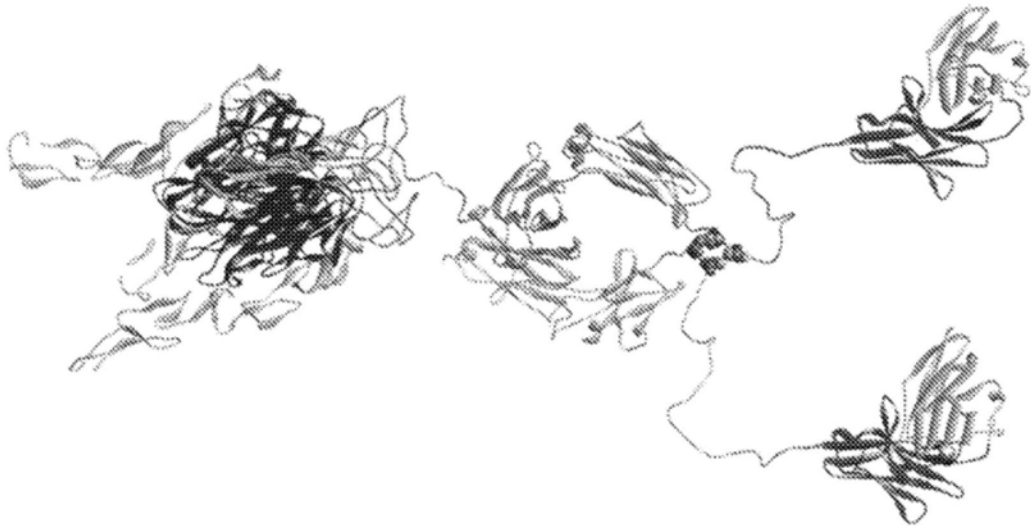


图3G

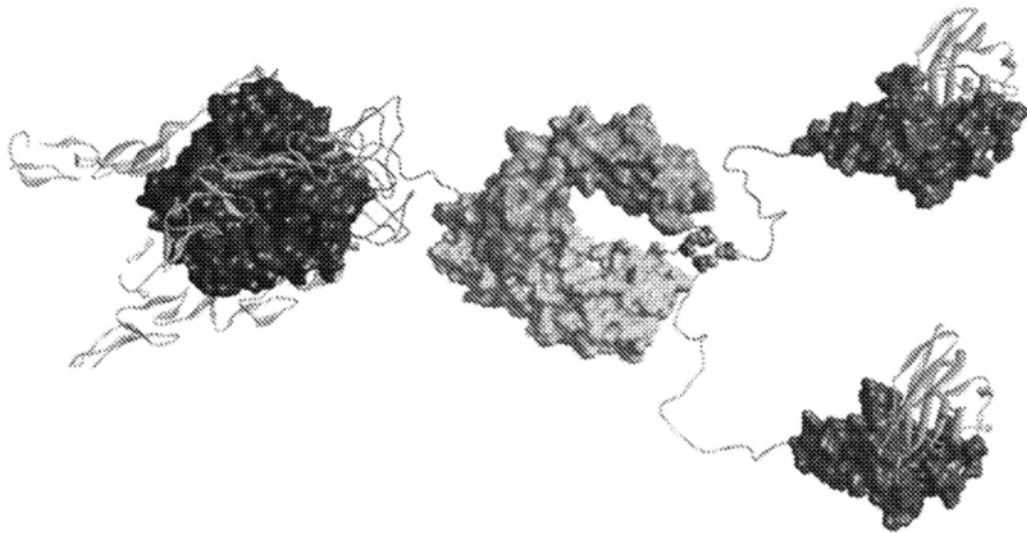


图3H

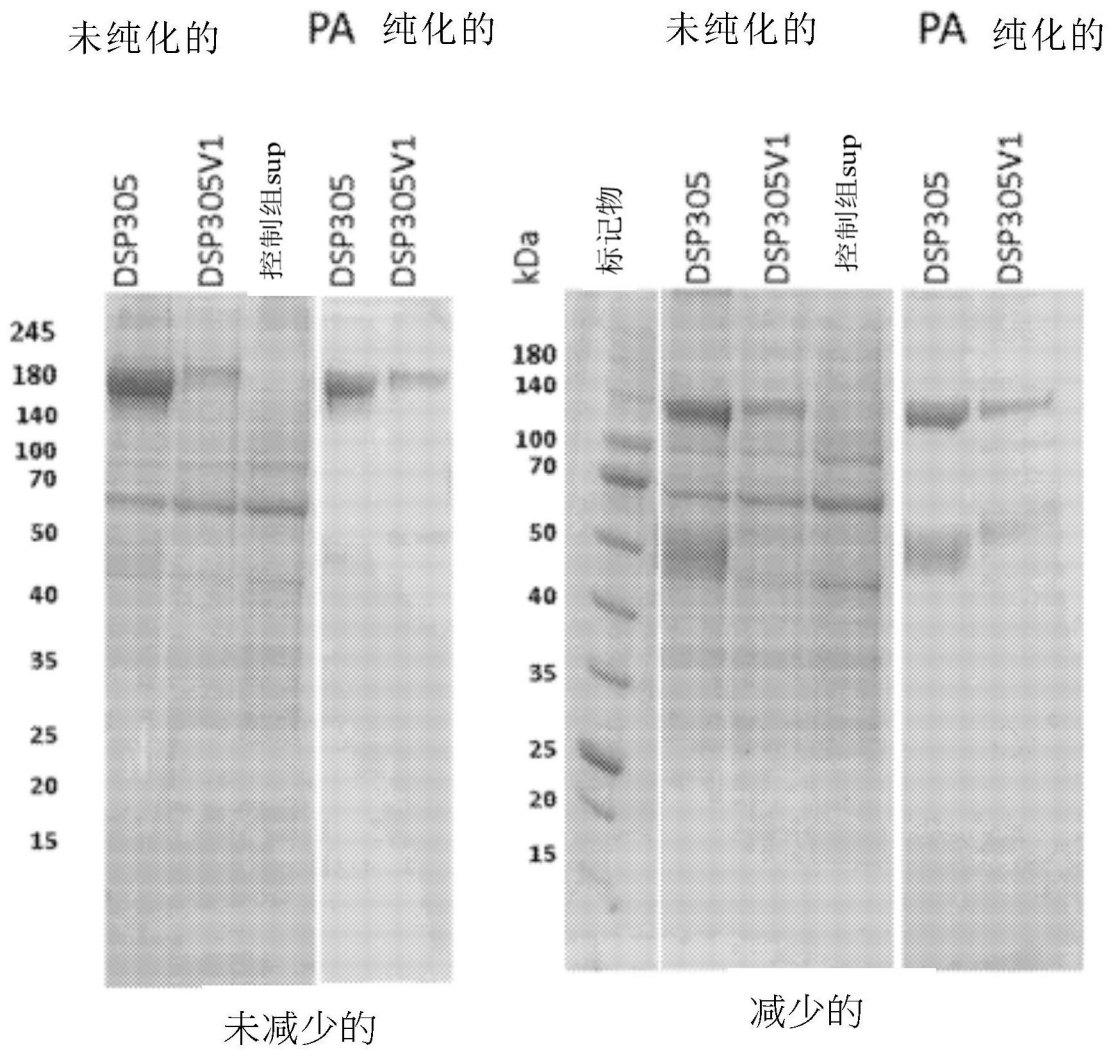


图4

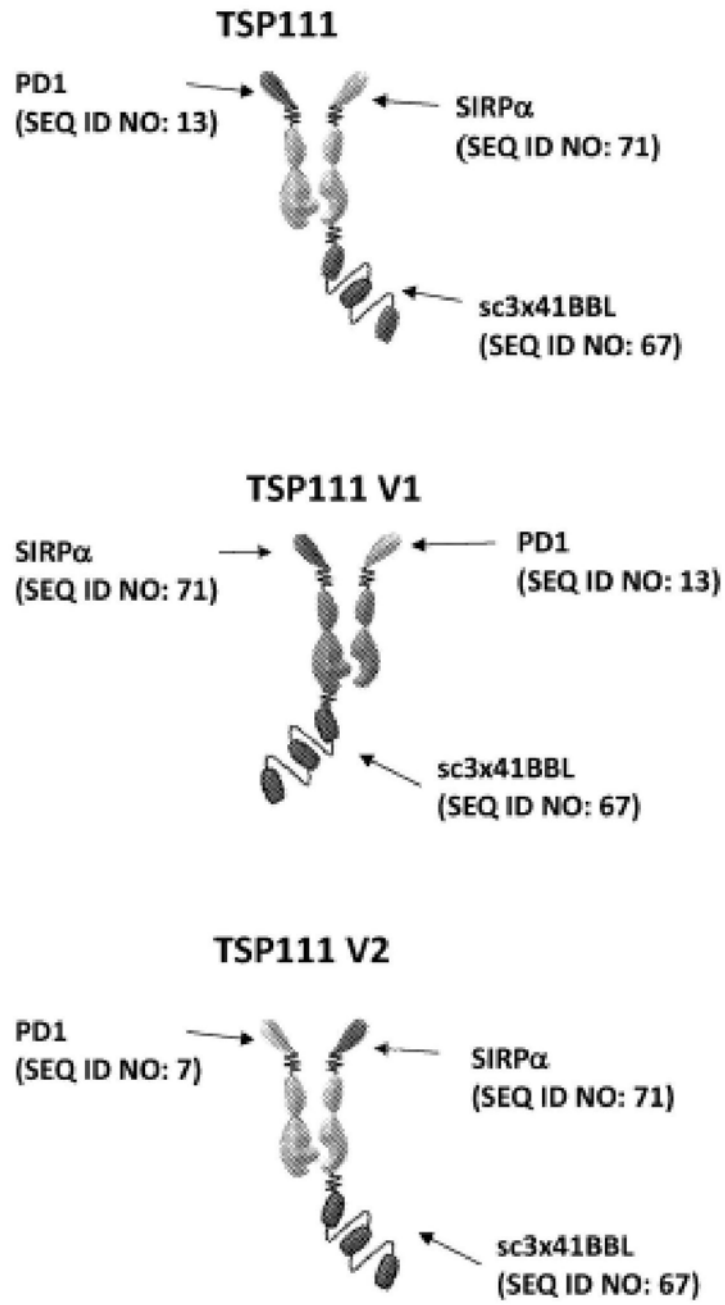


图5



图6A

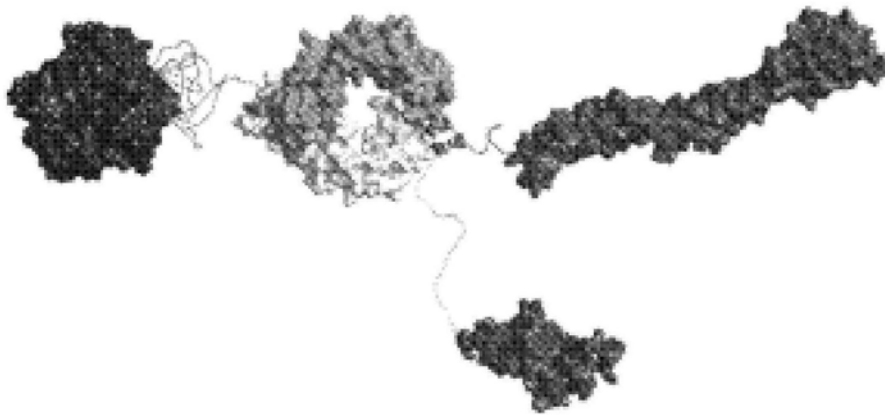


图6B

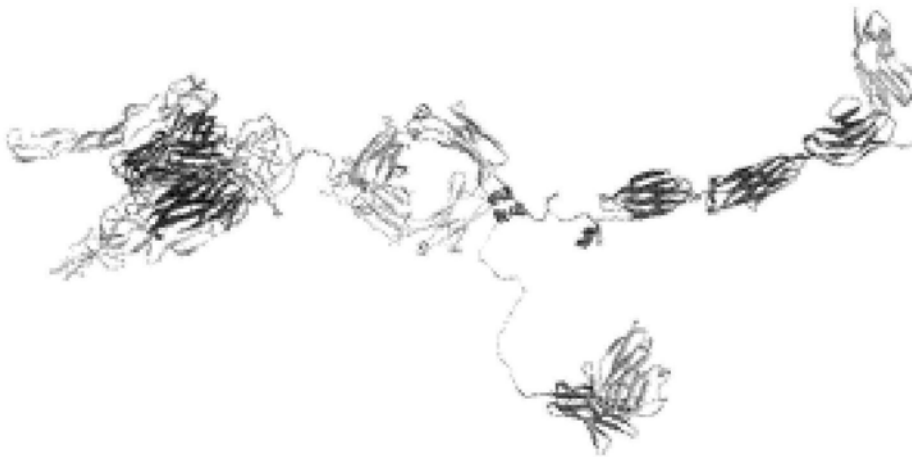


图6C

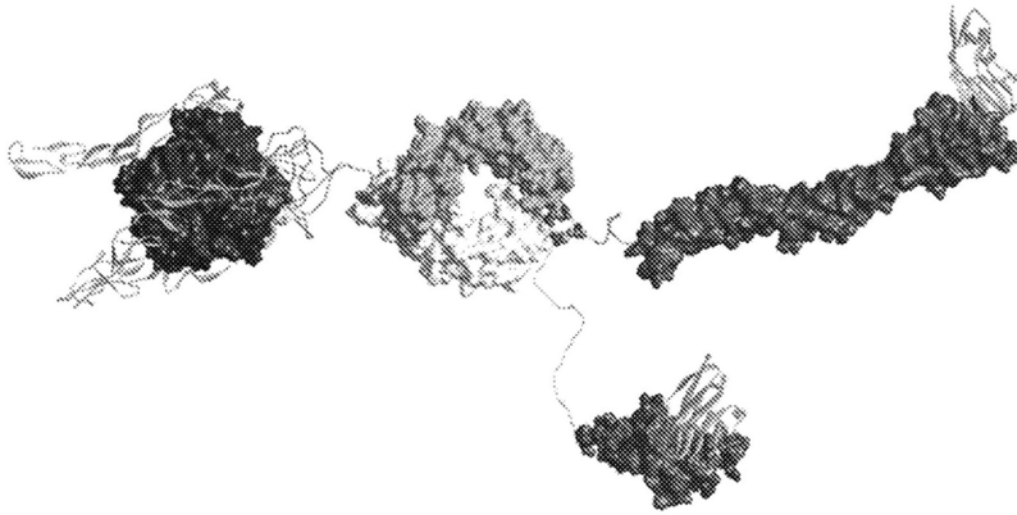


图6D

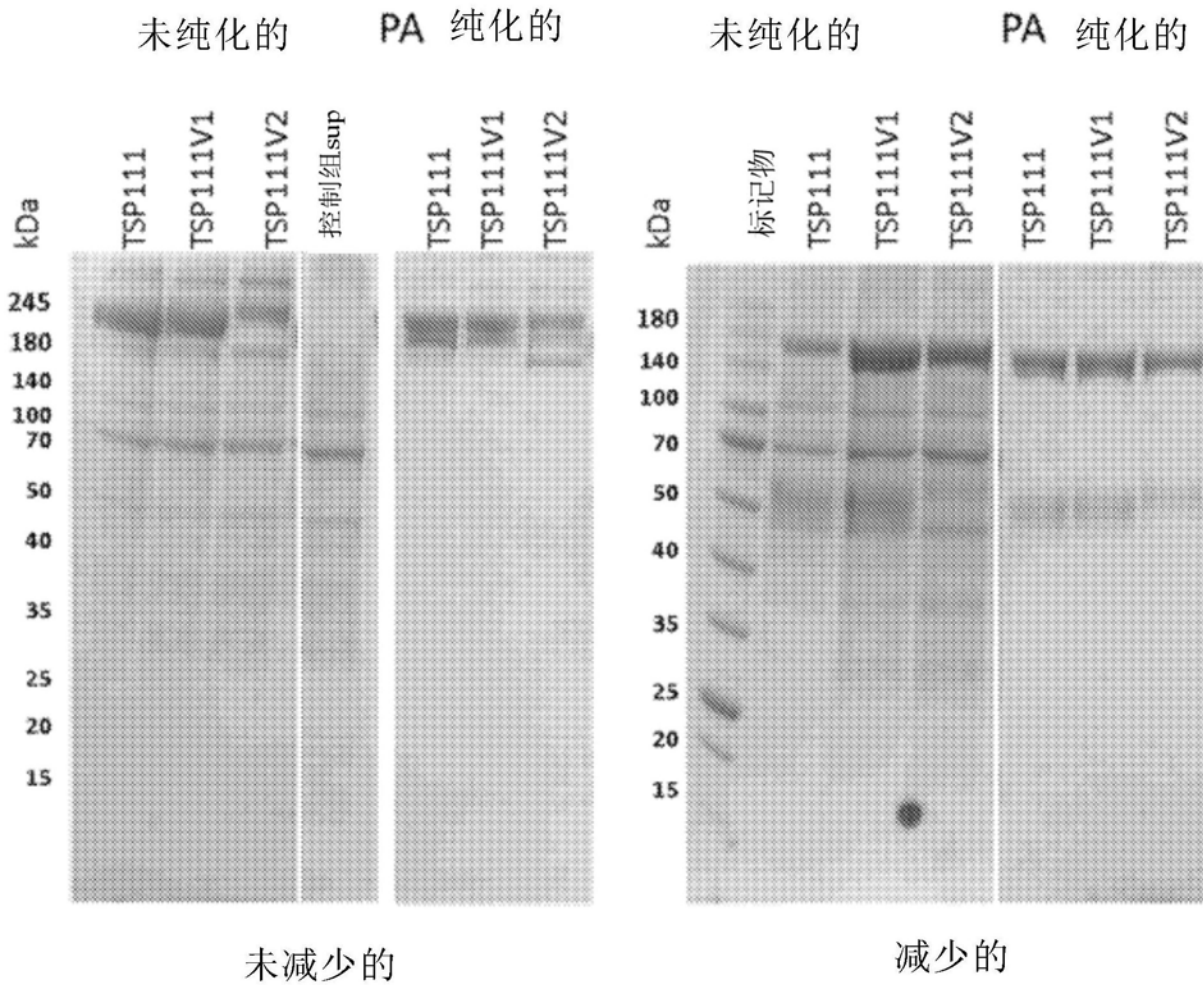


图7

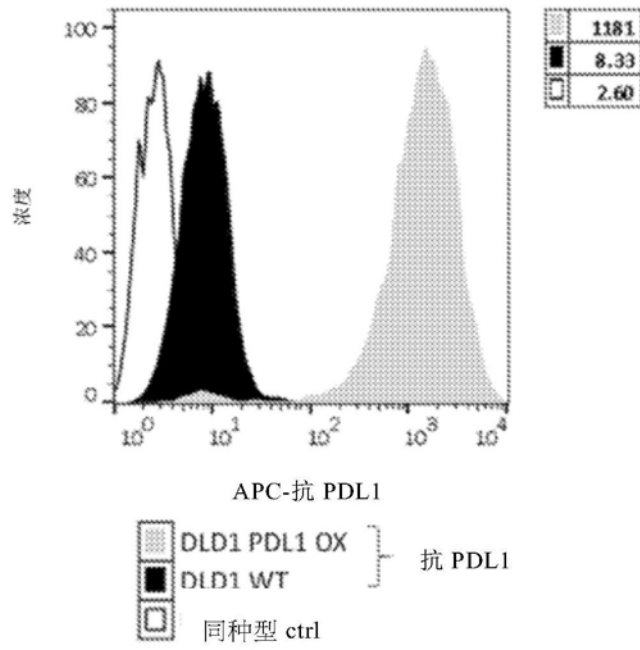


图8A

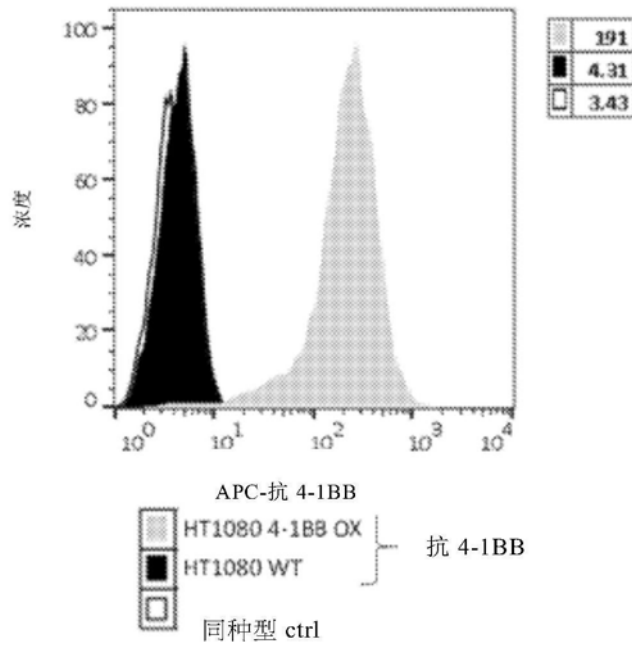


图8B

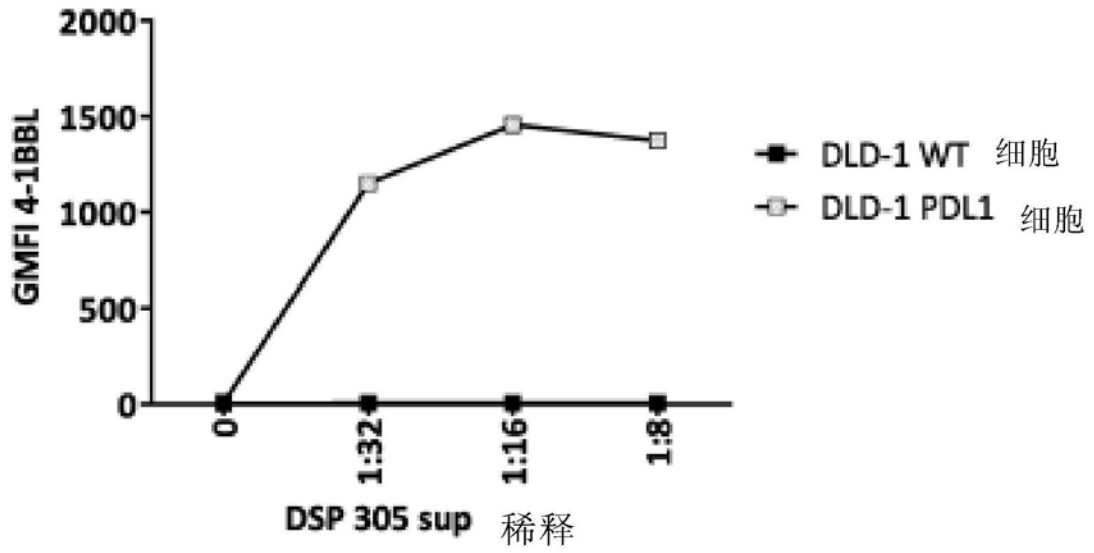


图8C

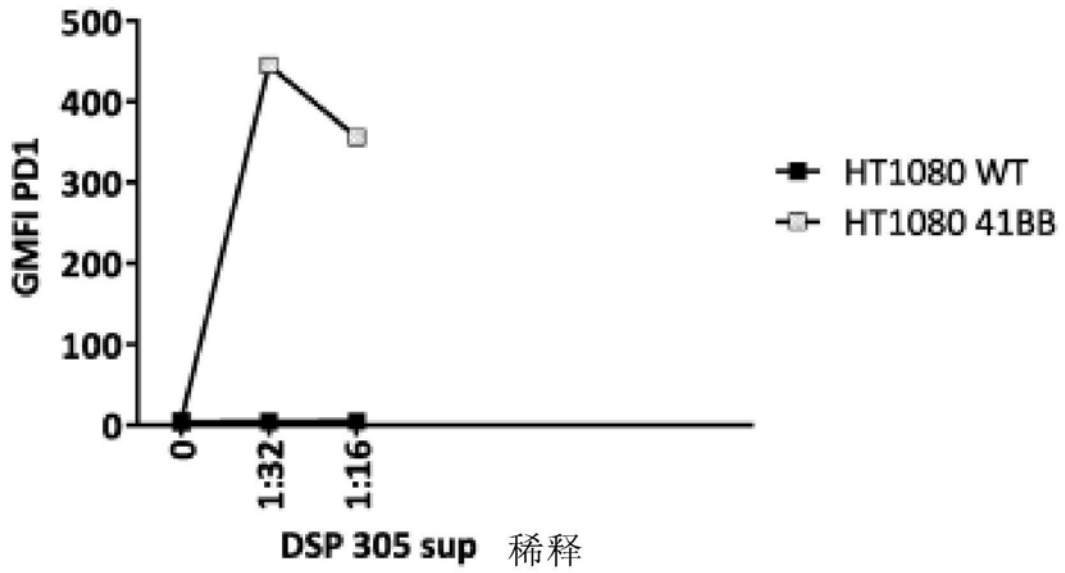


图8D

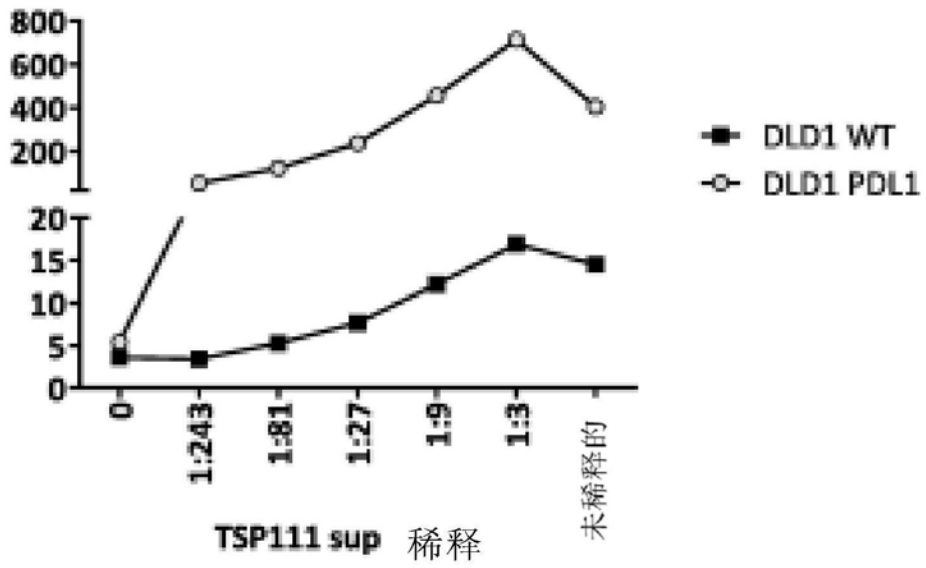


图9A

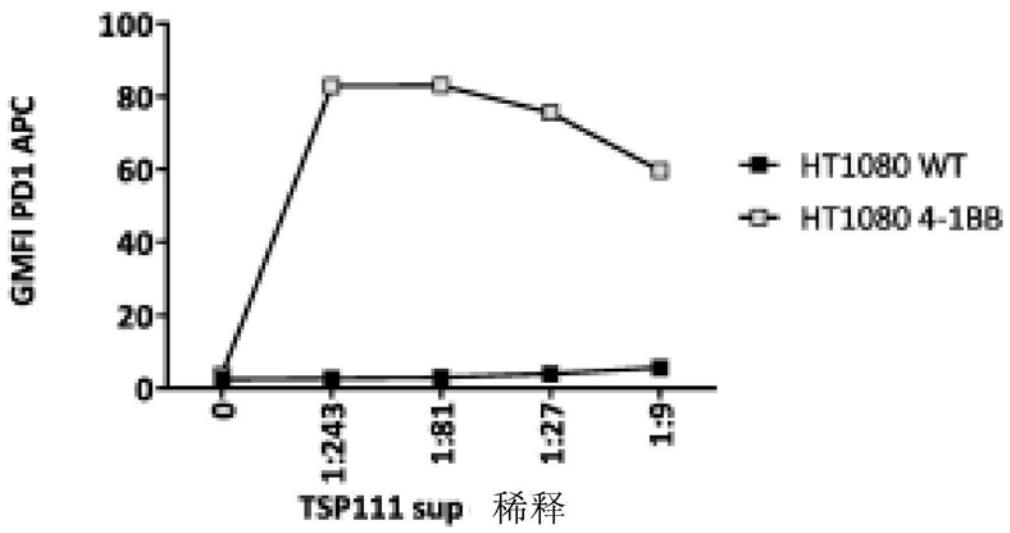


图9B

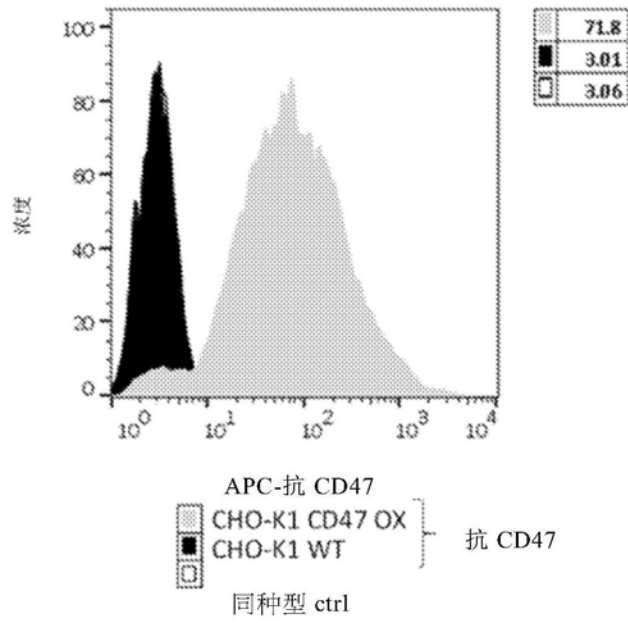


图9C

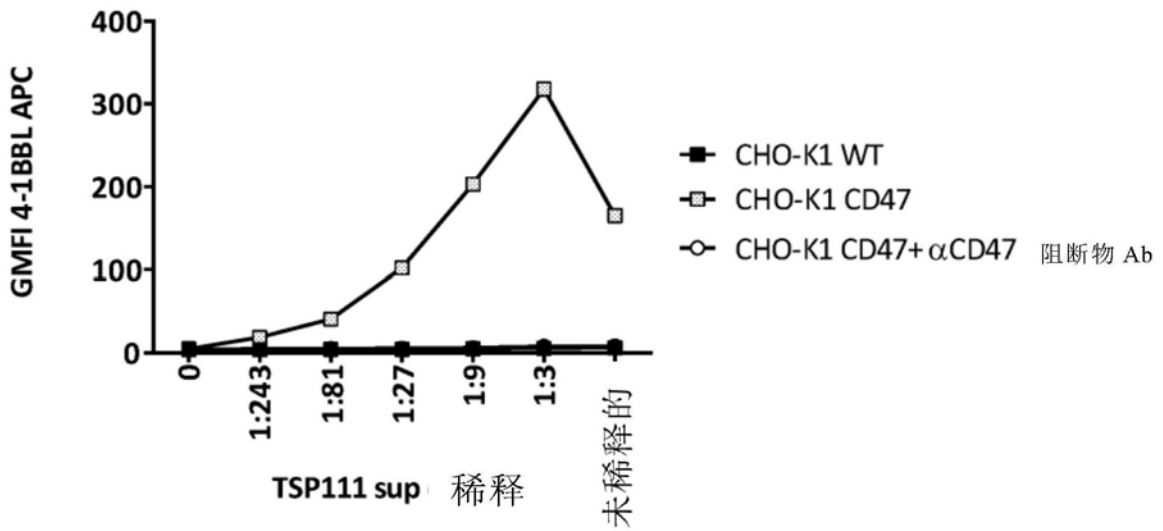


图9D

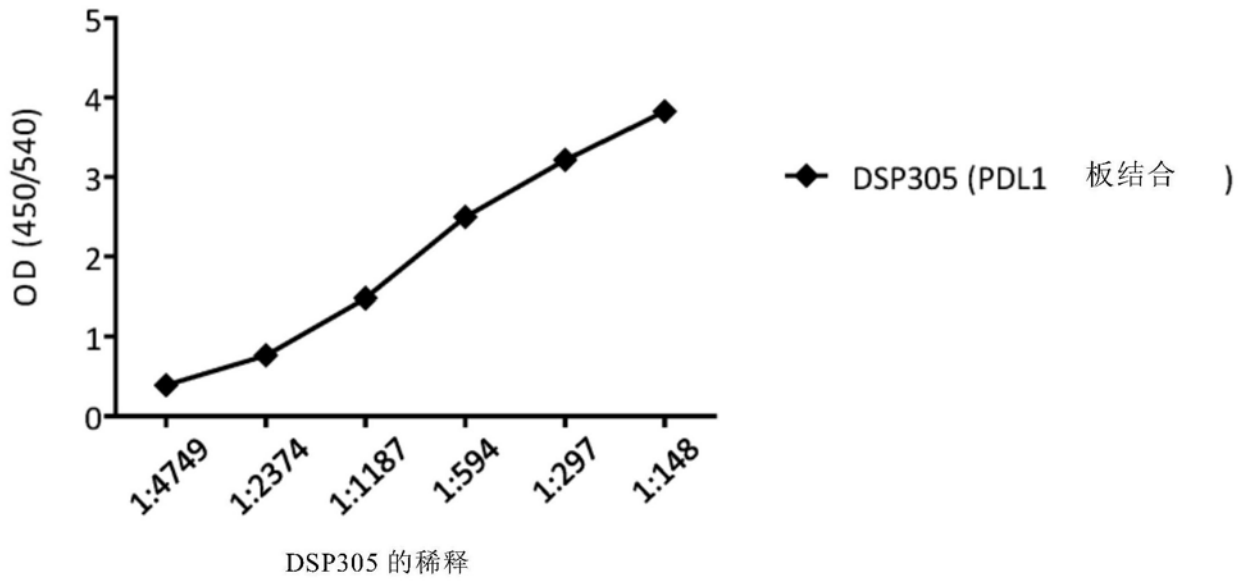


图10A

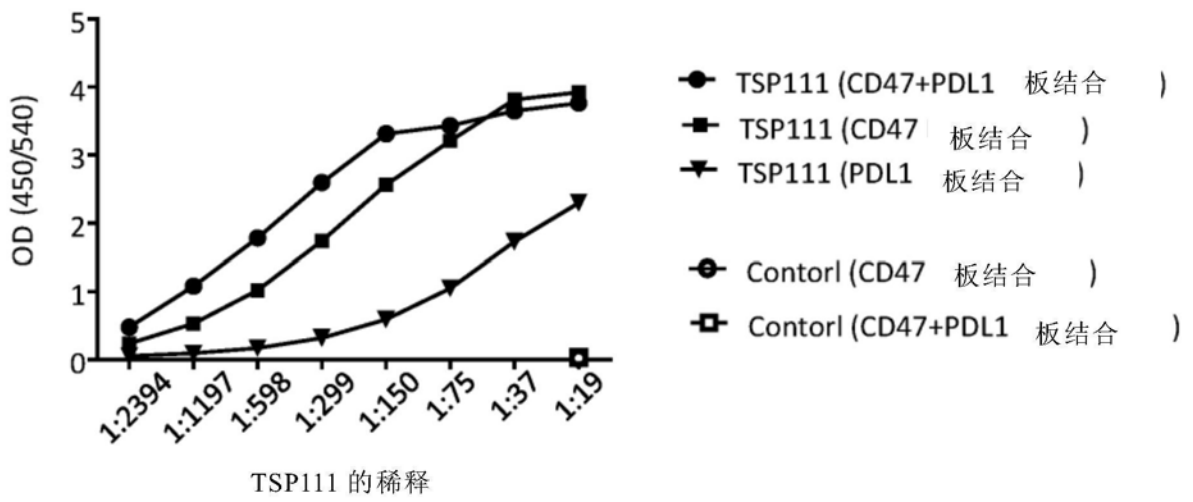


图10B

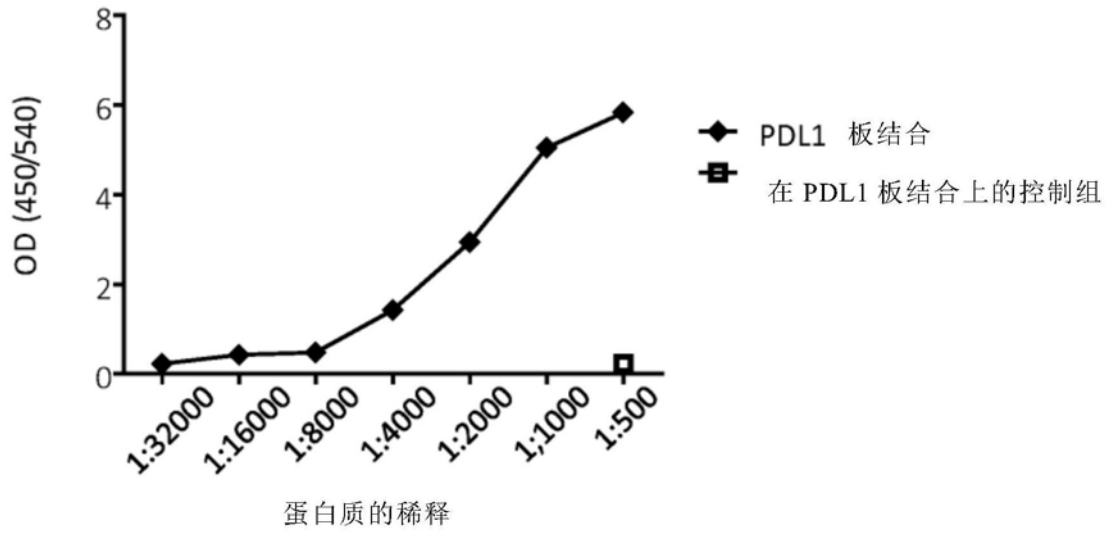


图11A

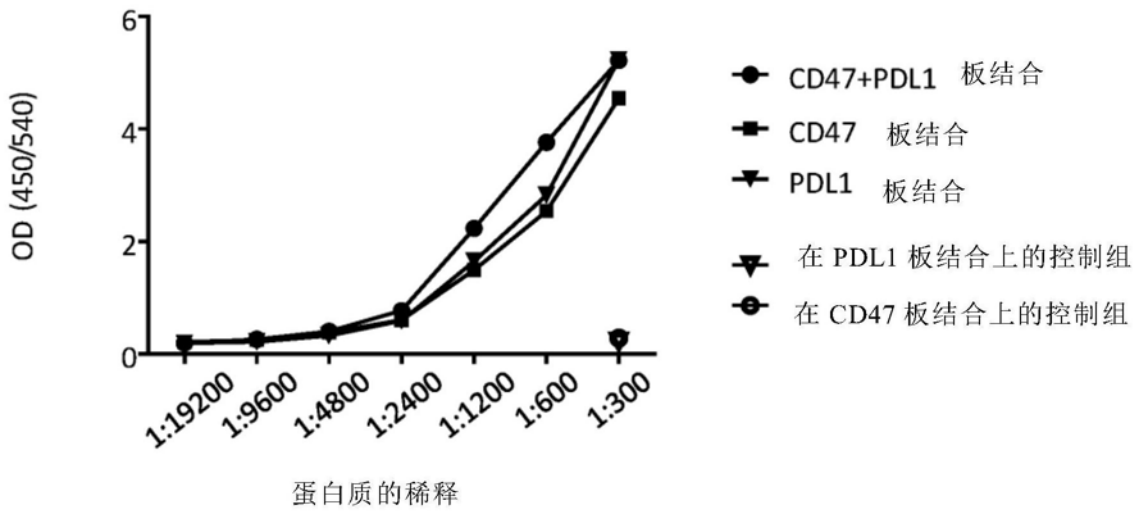


图11B

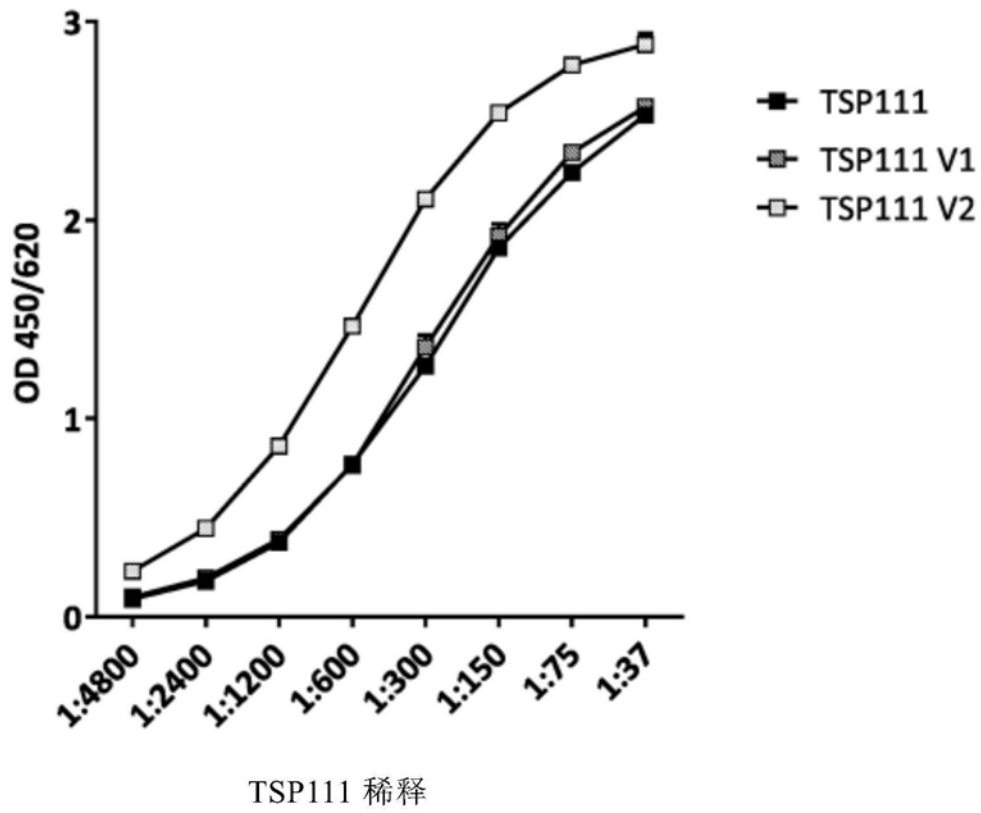


图11C

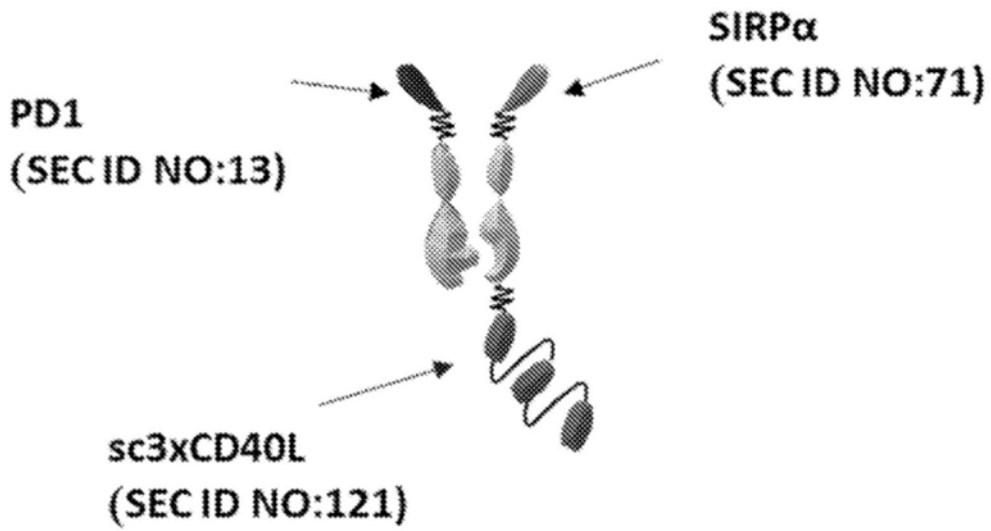


图12A



图12B

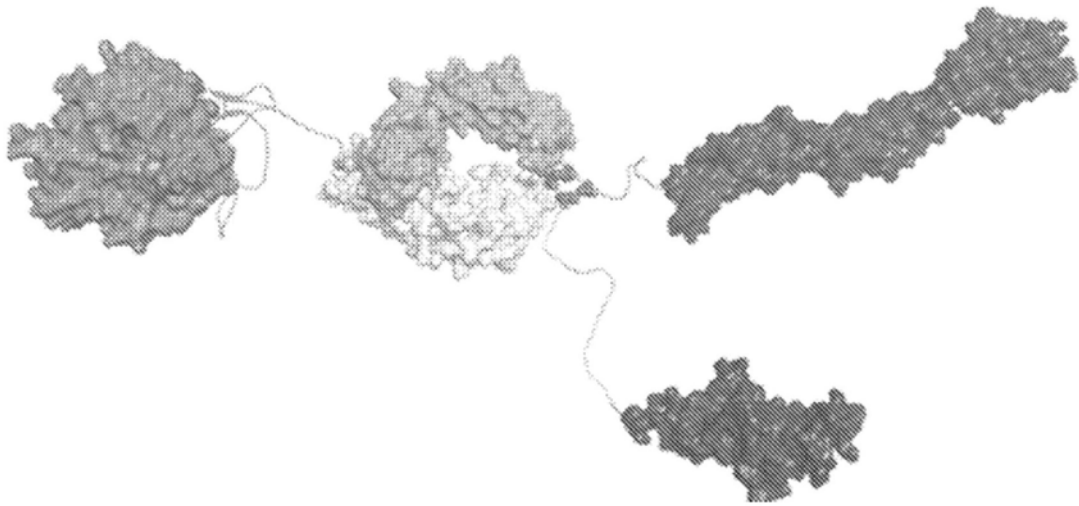


图12C

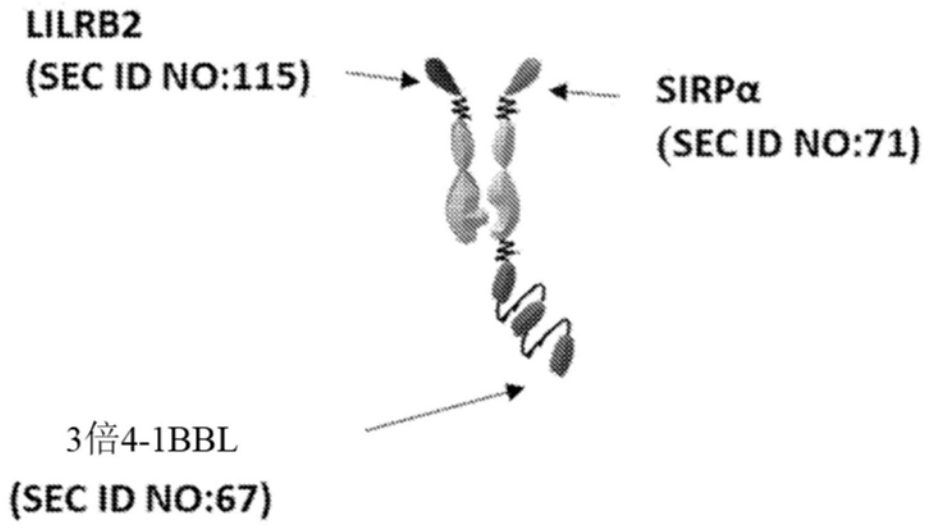


图13A

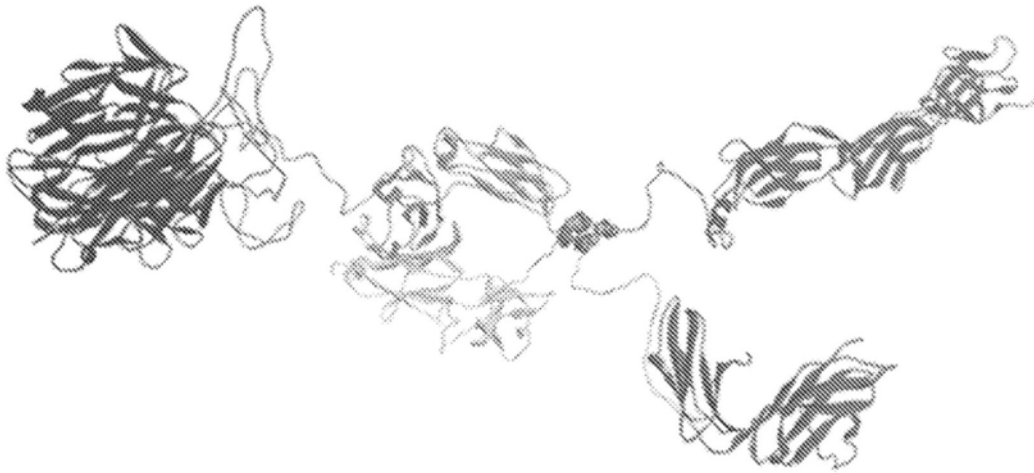


图13B

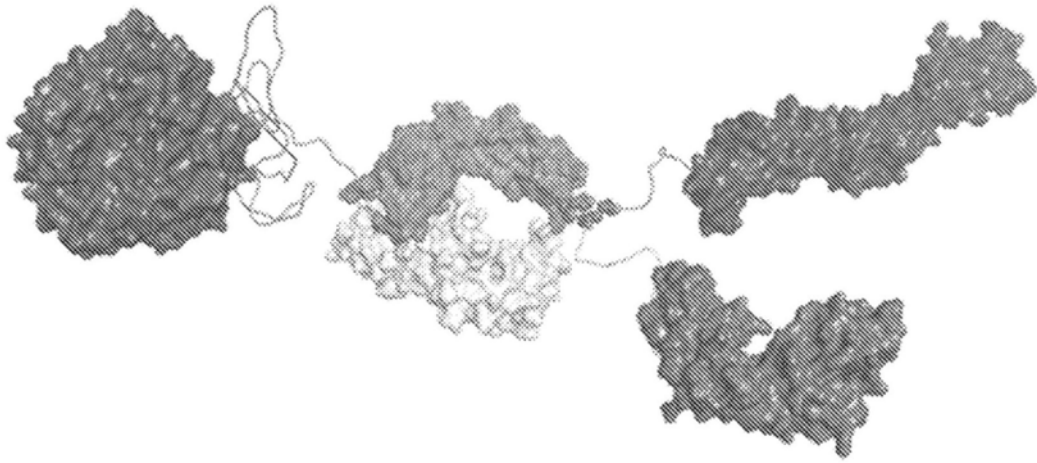


图13C

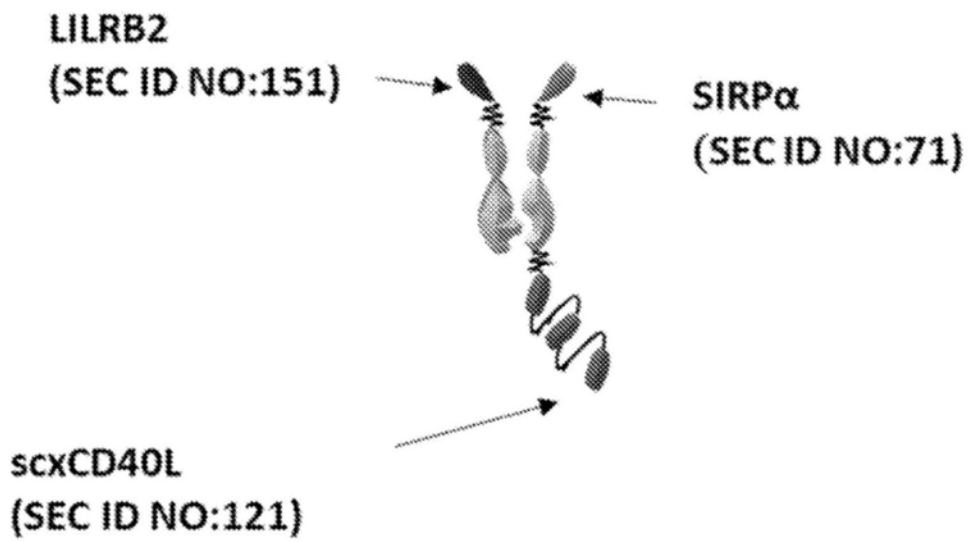


图14A



图14B

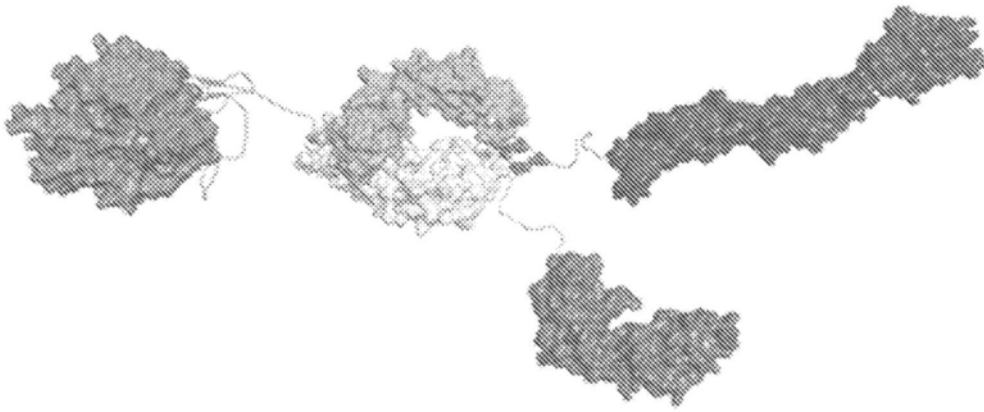


图14C

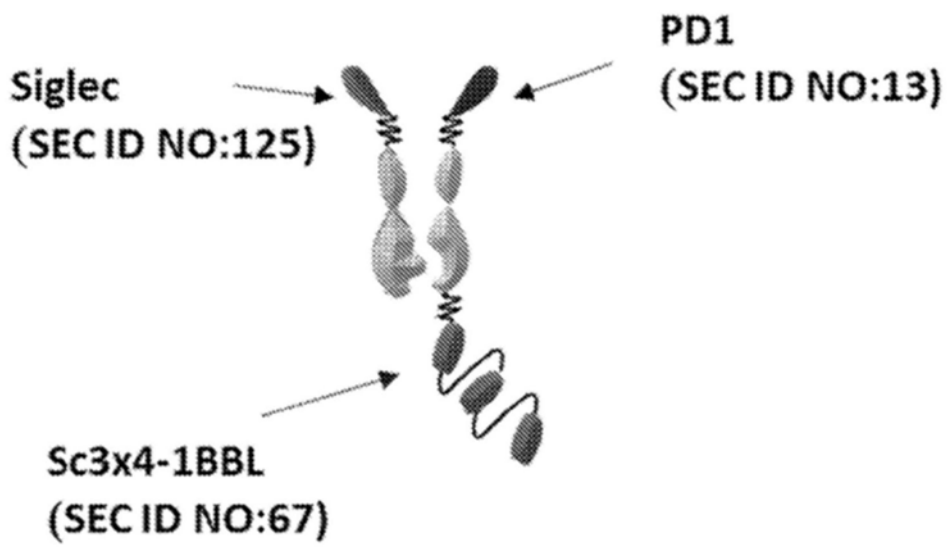


图15A



图15B

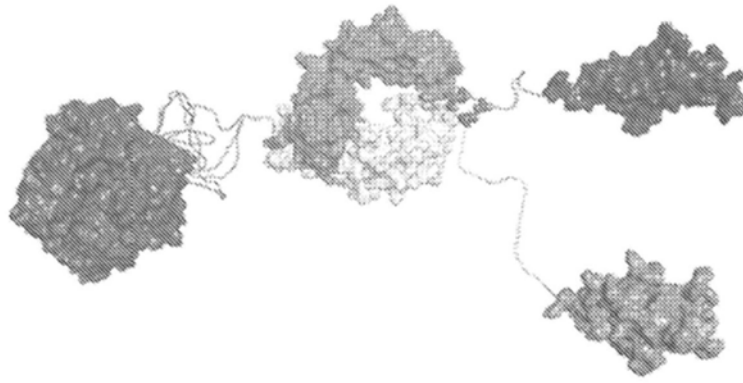


图15C

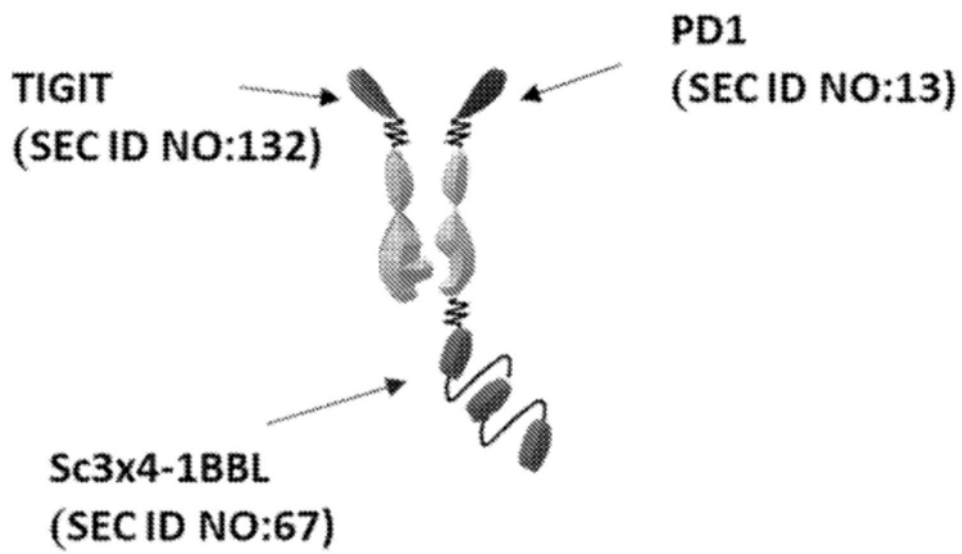


图16A



图16B

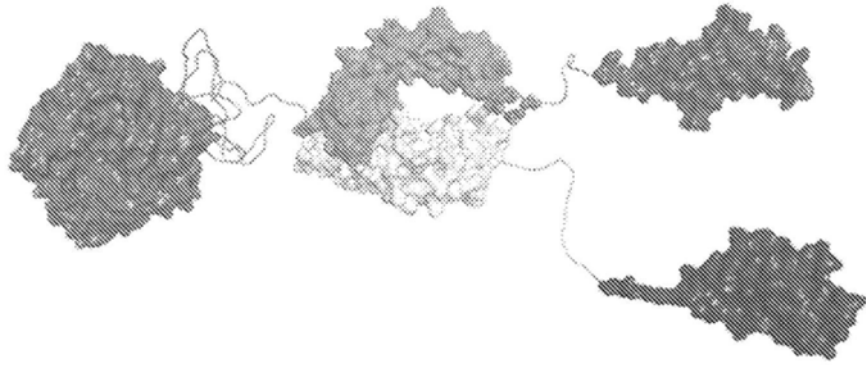
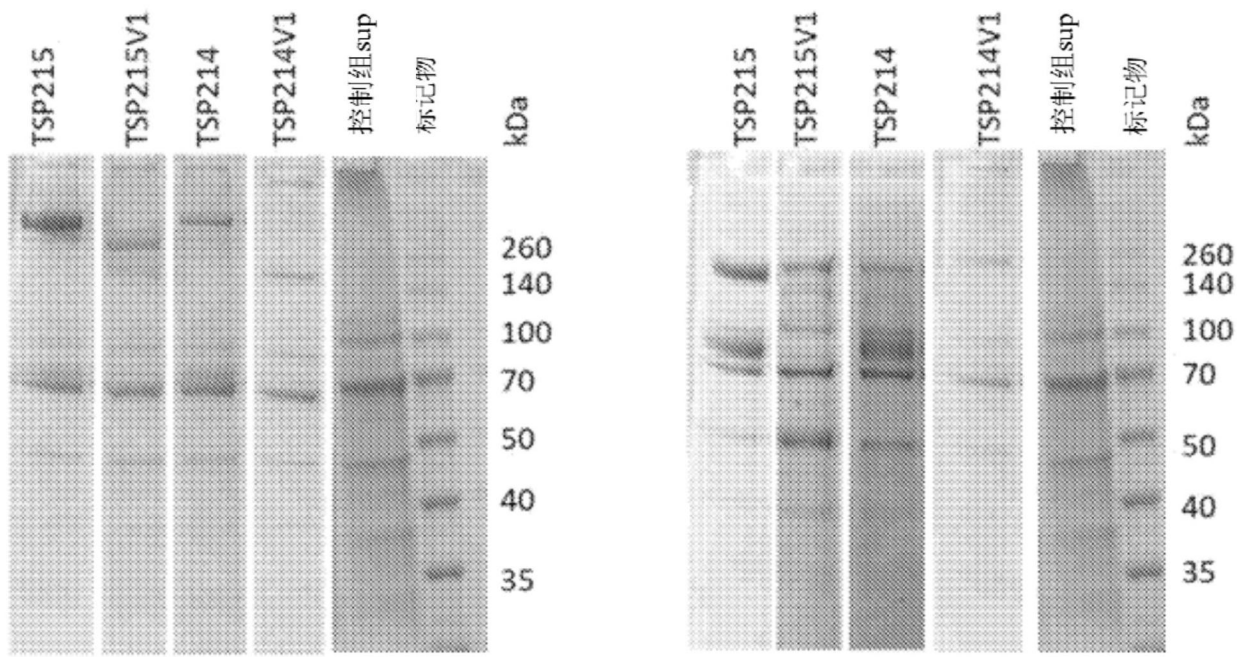


图16C



未减少的

减少的

图17

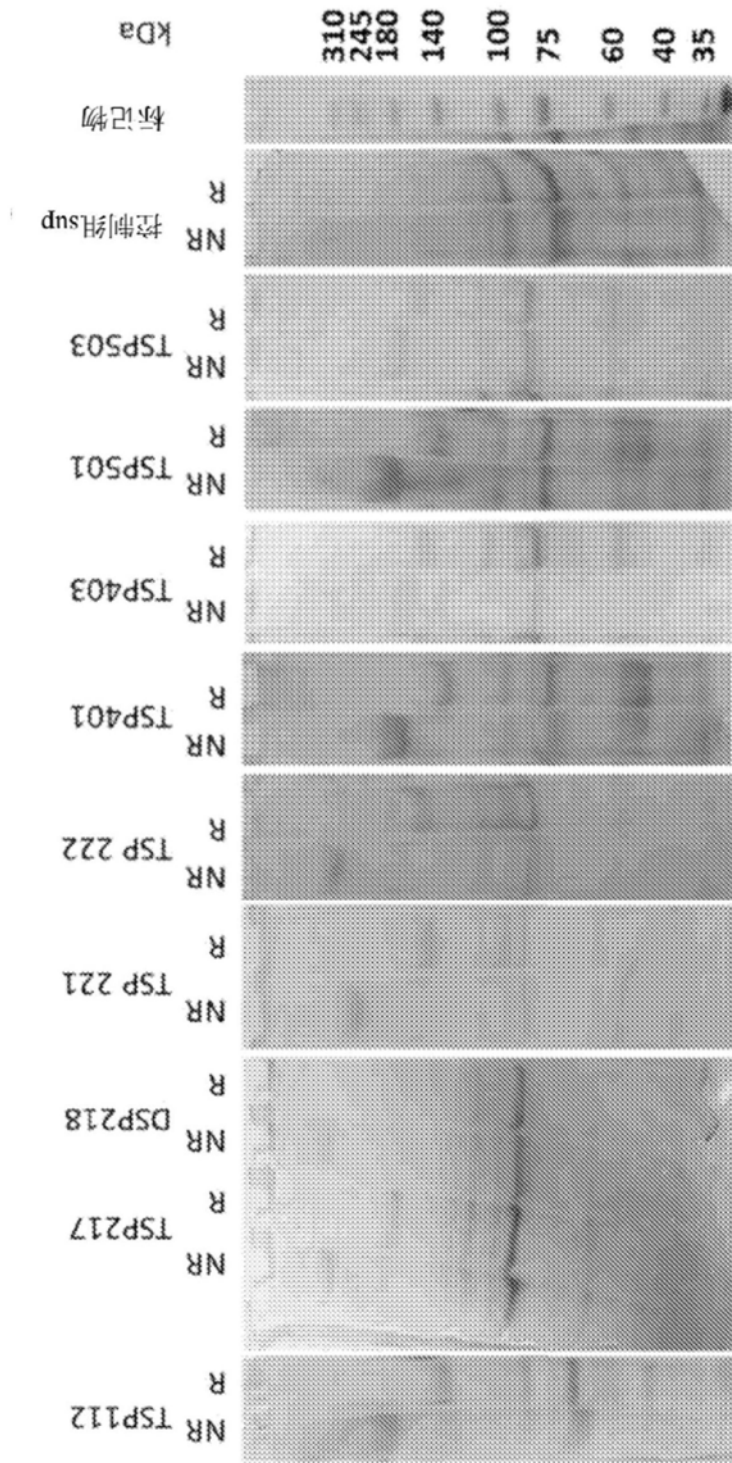


图18A

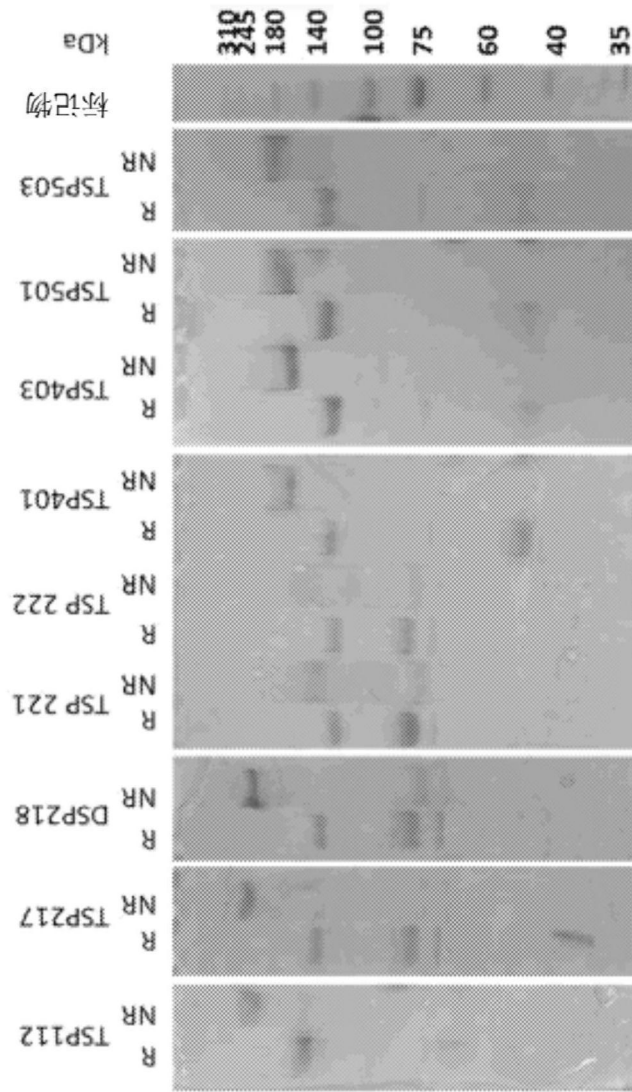


图18B

R NR



抗 PD1

图19A

R NR



抗 SIRPα

图19B

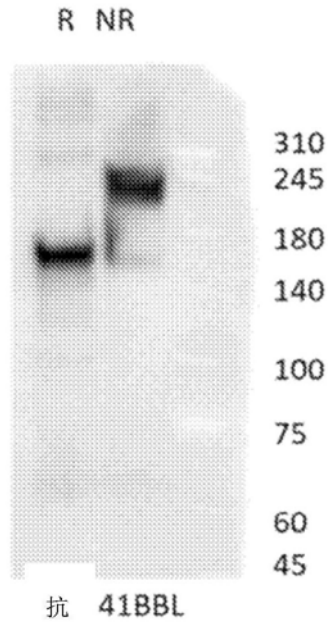


图19C

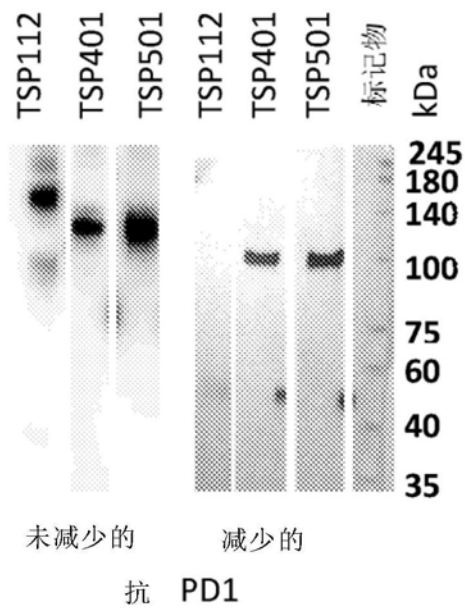


图20A

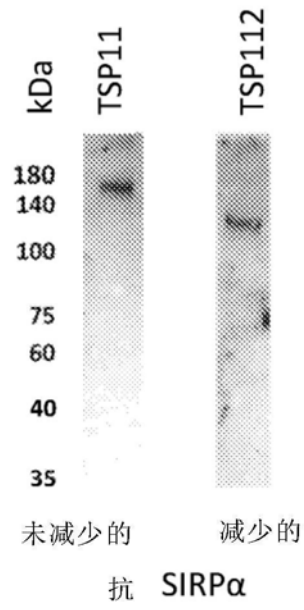


图20B

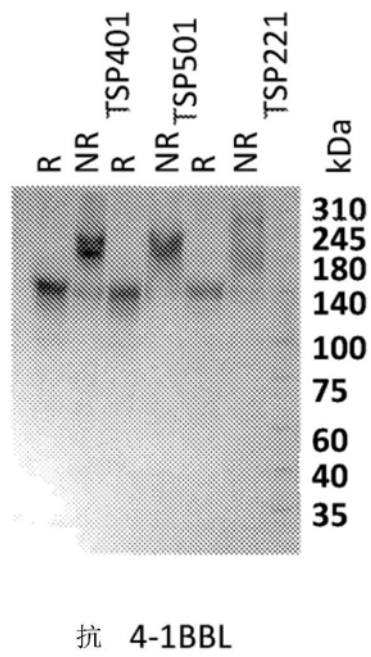
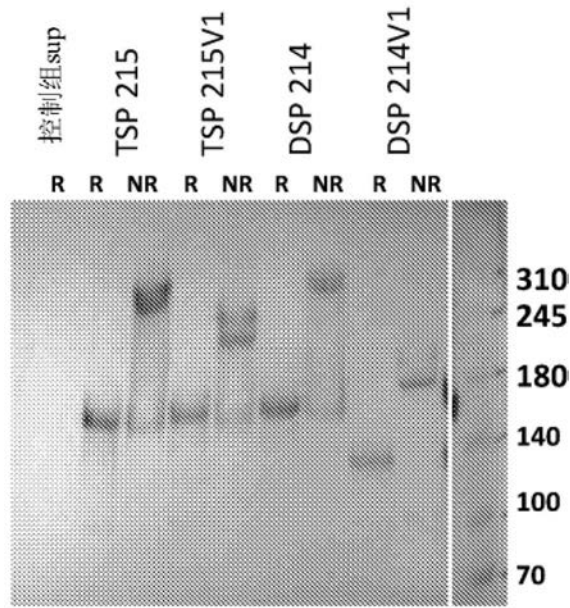
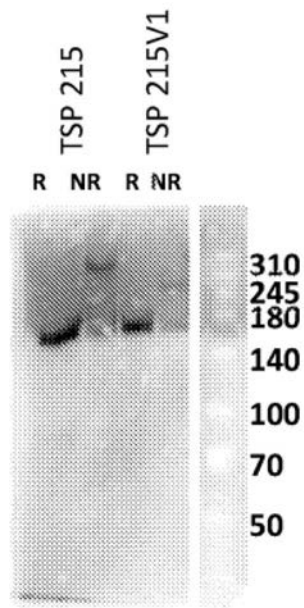


图20C



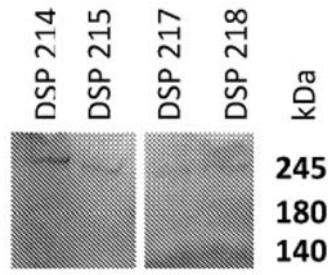
抗 4-1BBL

图21A



抗 SIRPα

图21B



未减少的

抗 LILRB2

图21C

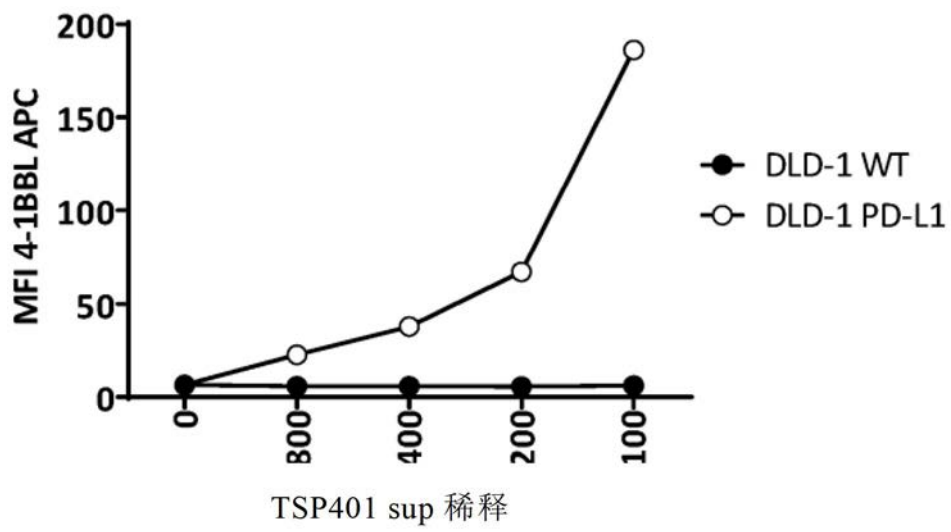


图22A

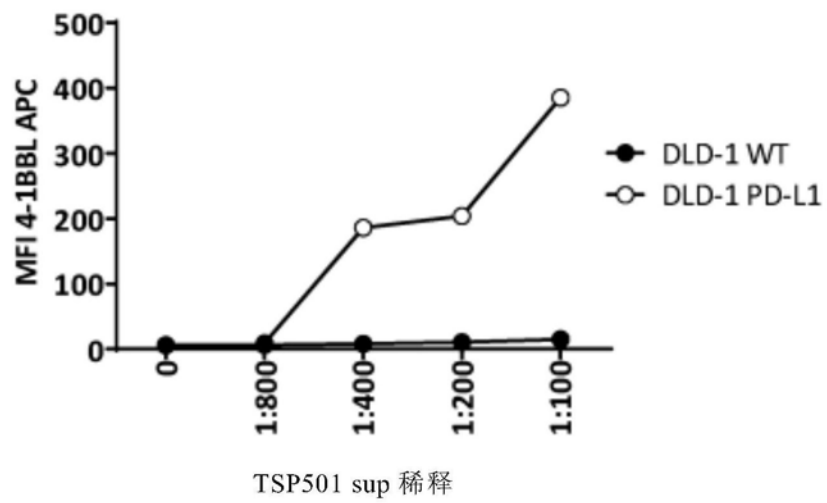


图22B

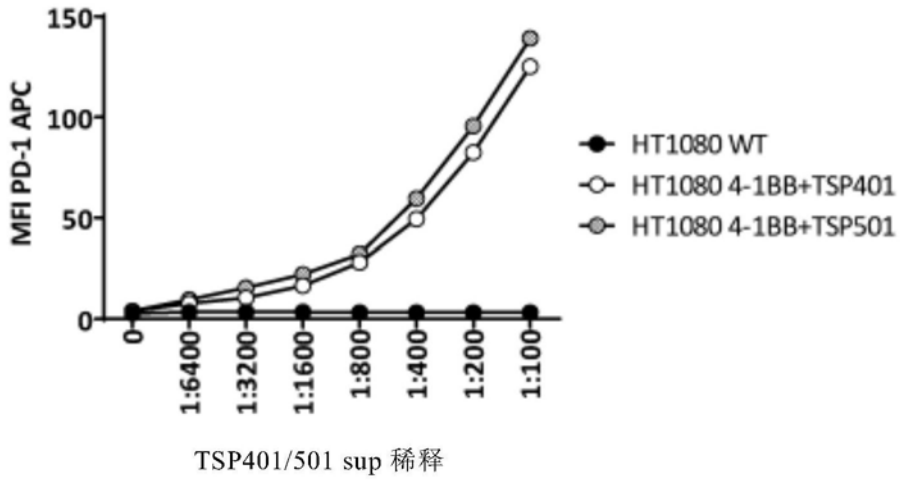


图23

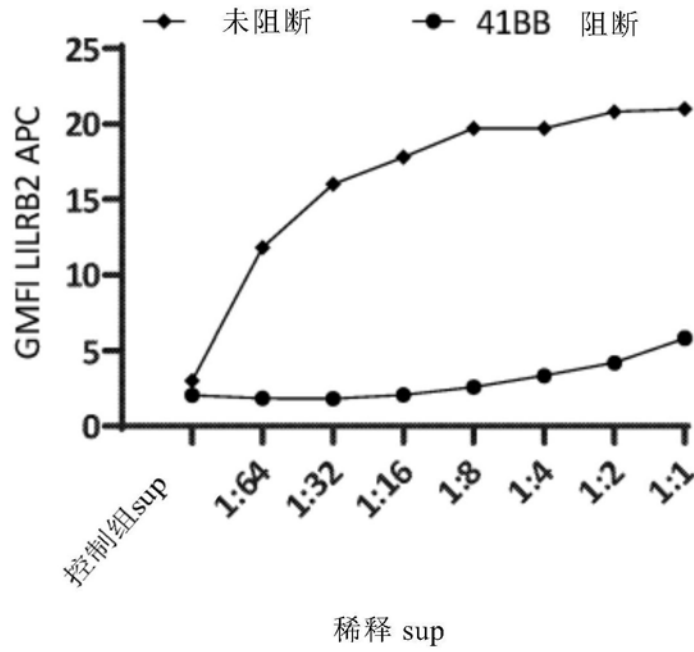


图24

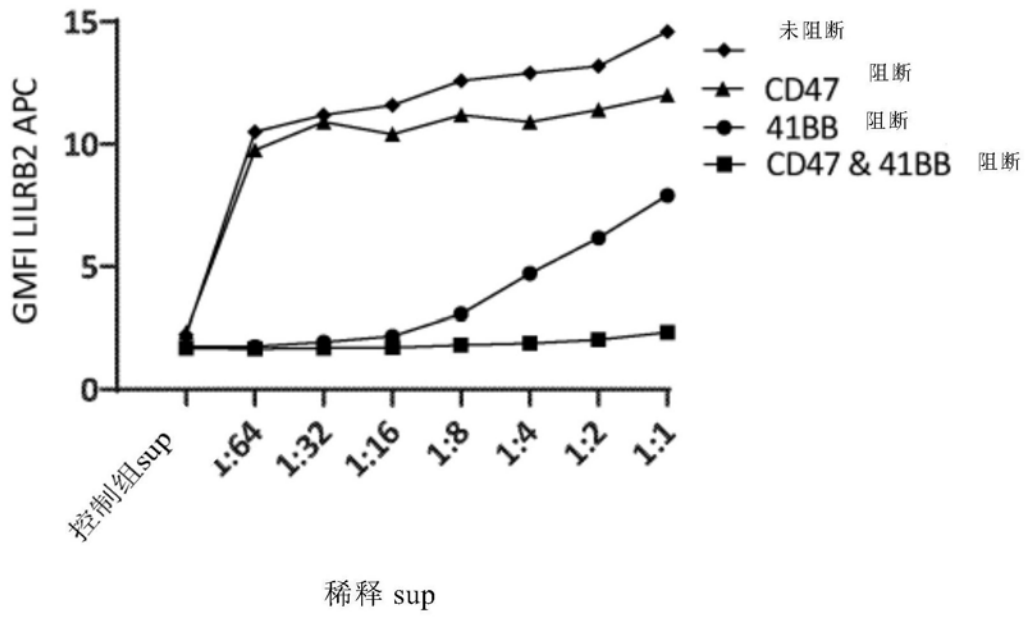


图25

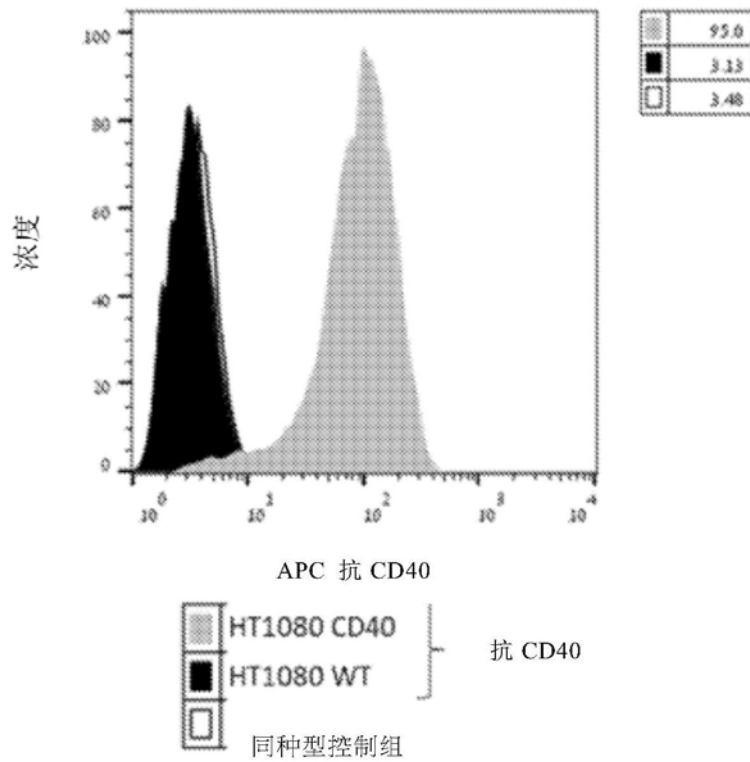


图26A

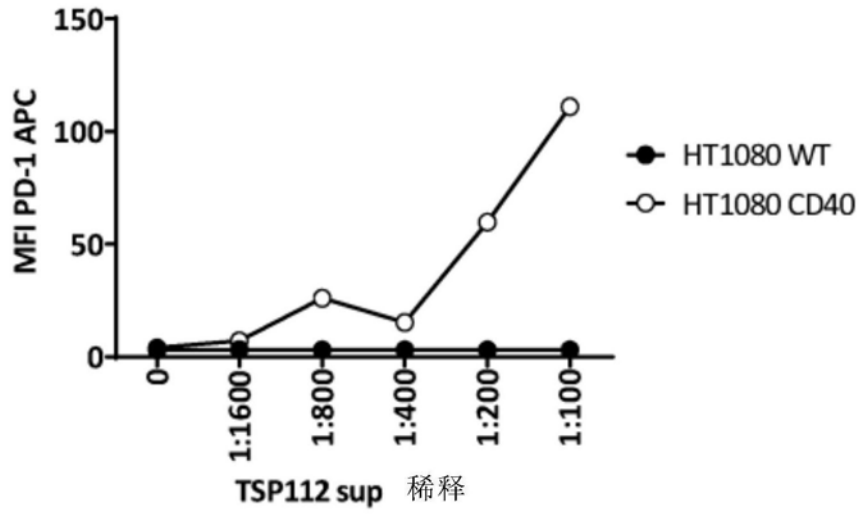


图26B

图 27A

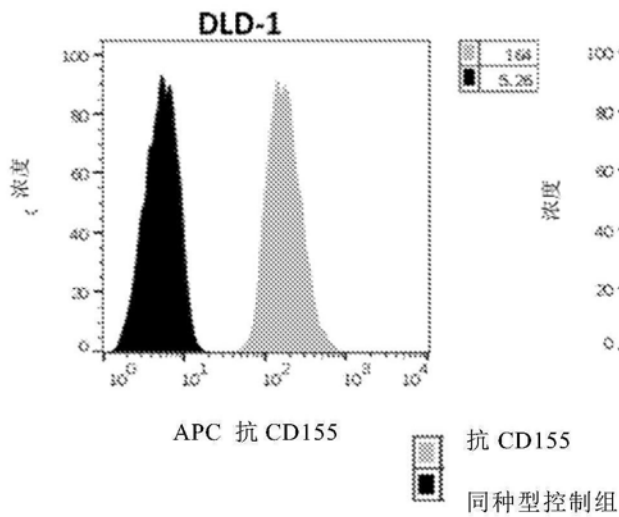
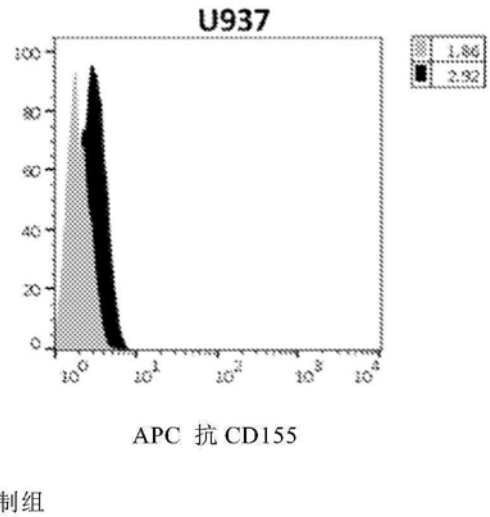


图 27B



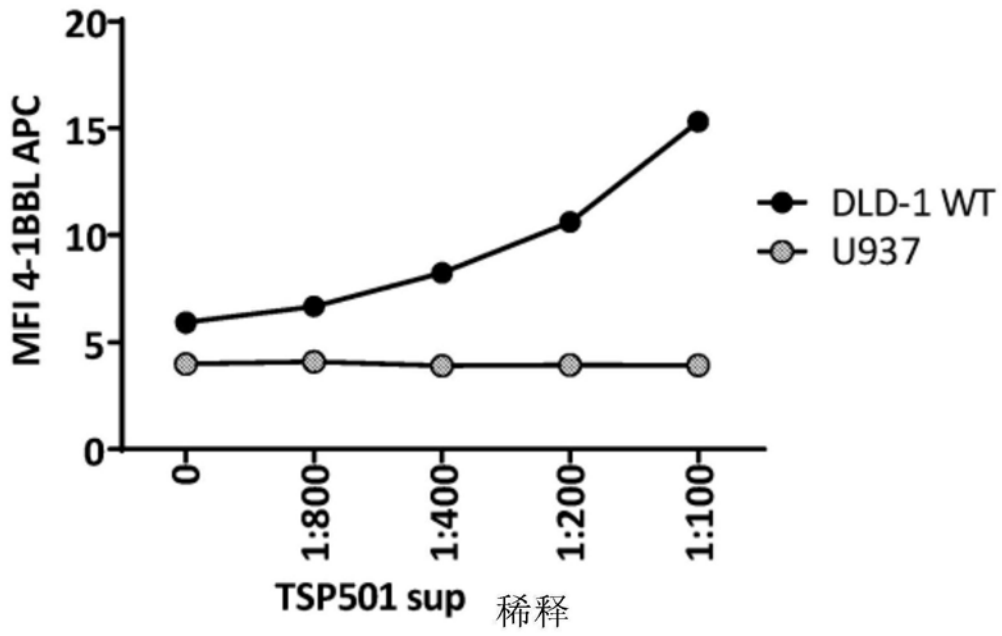


图27C

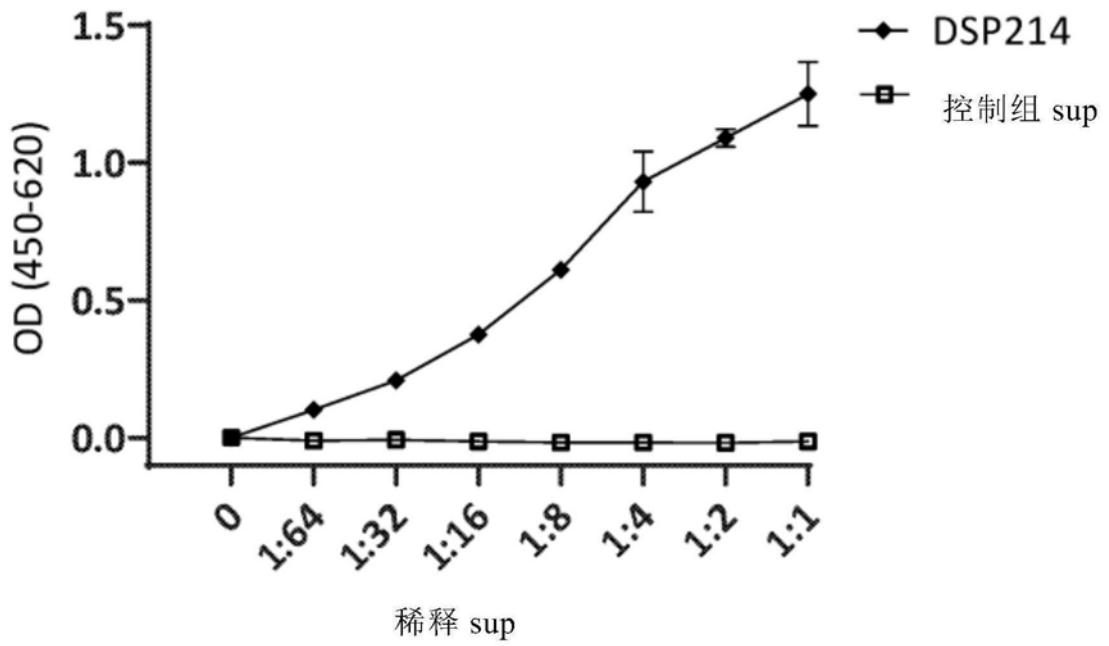


图28A

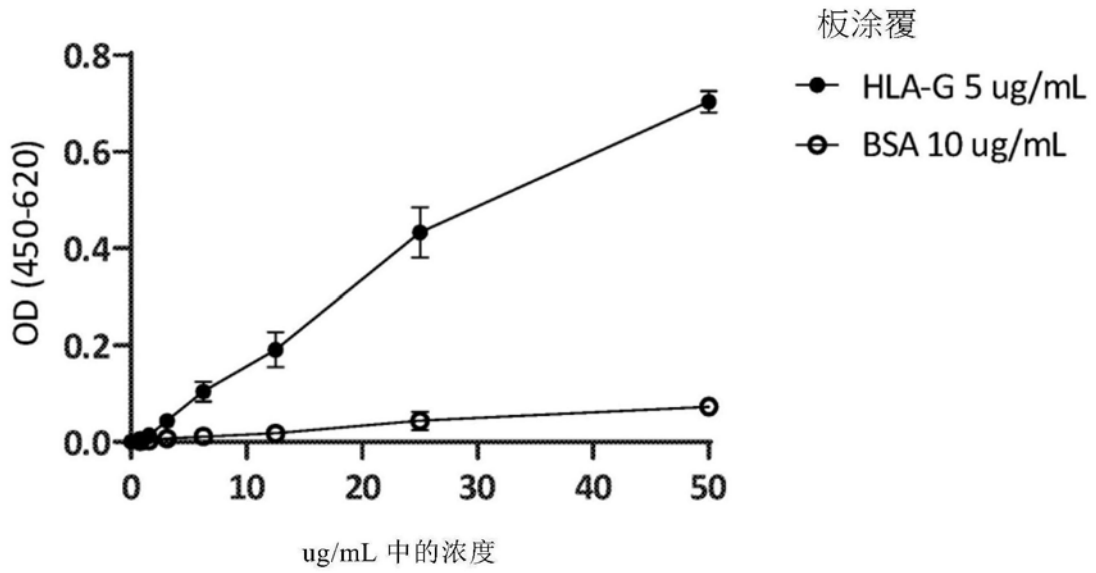


图28B

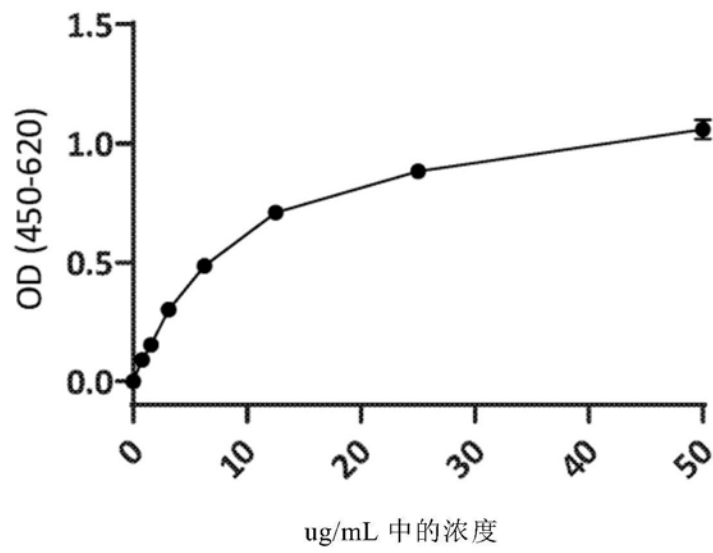


图28C

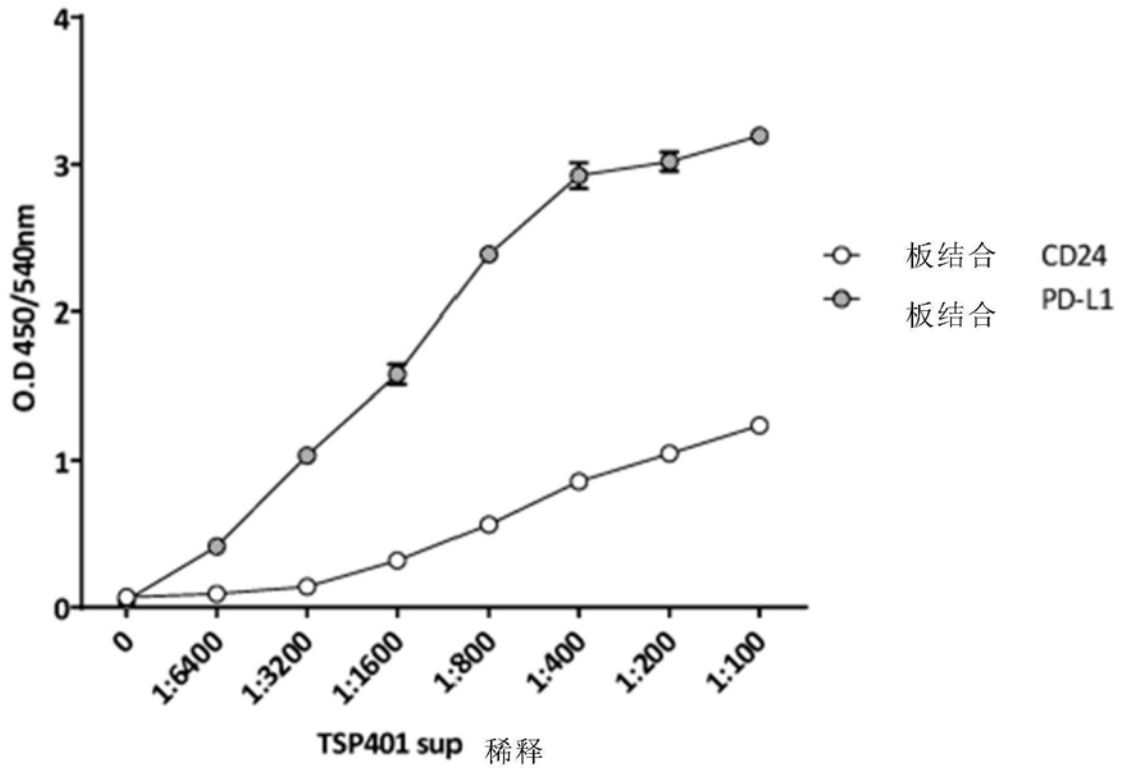


图29A

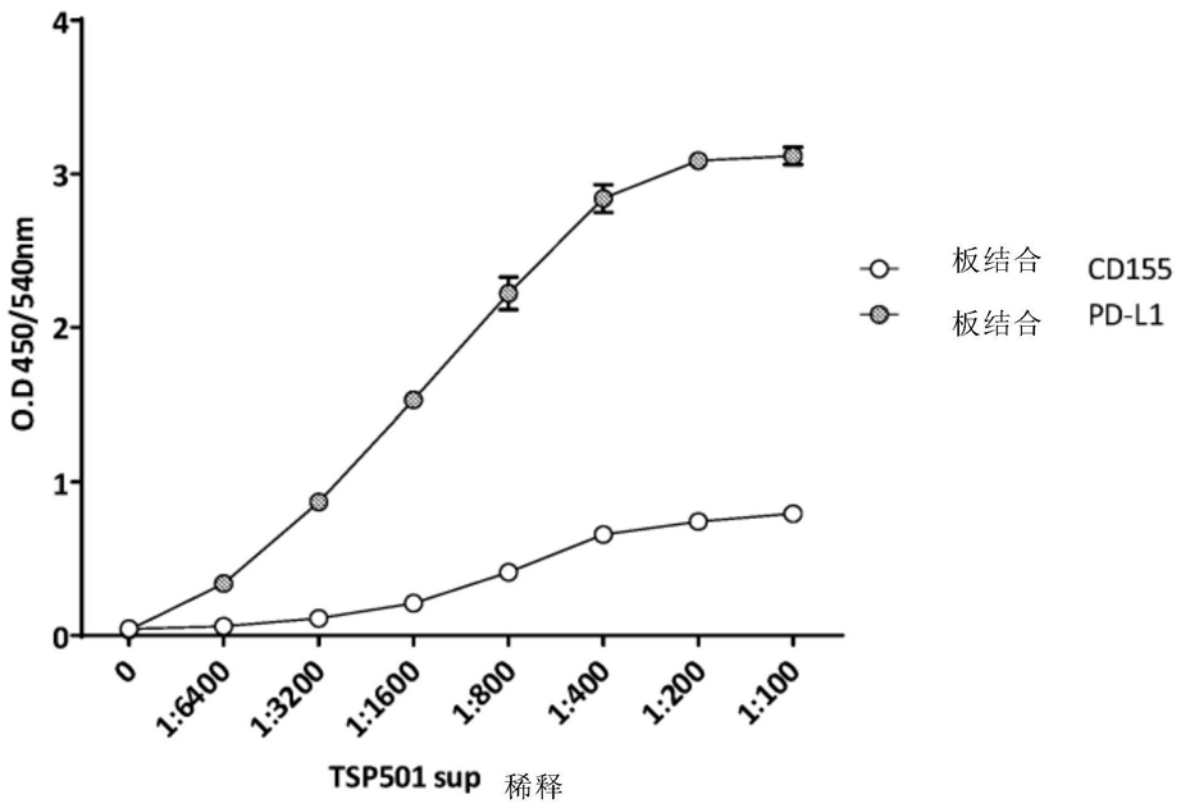


图29B

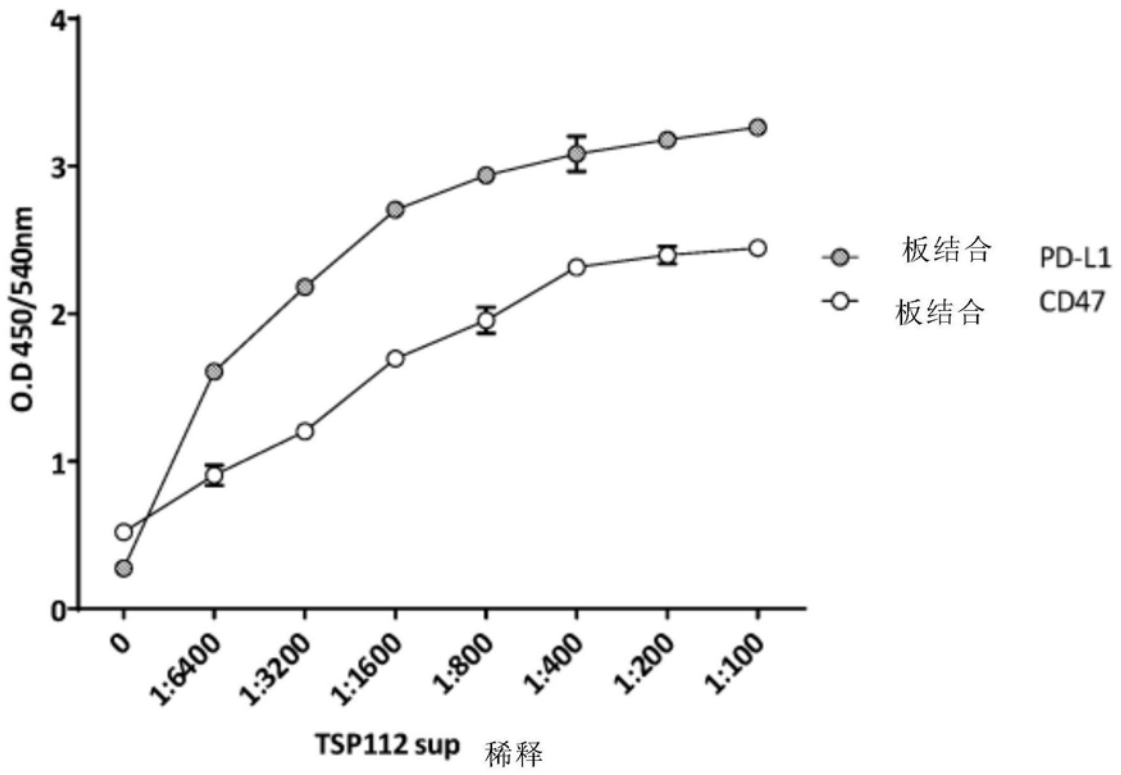


图30A

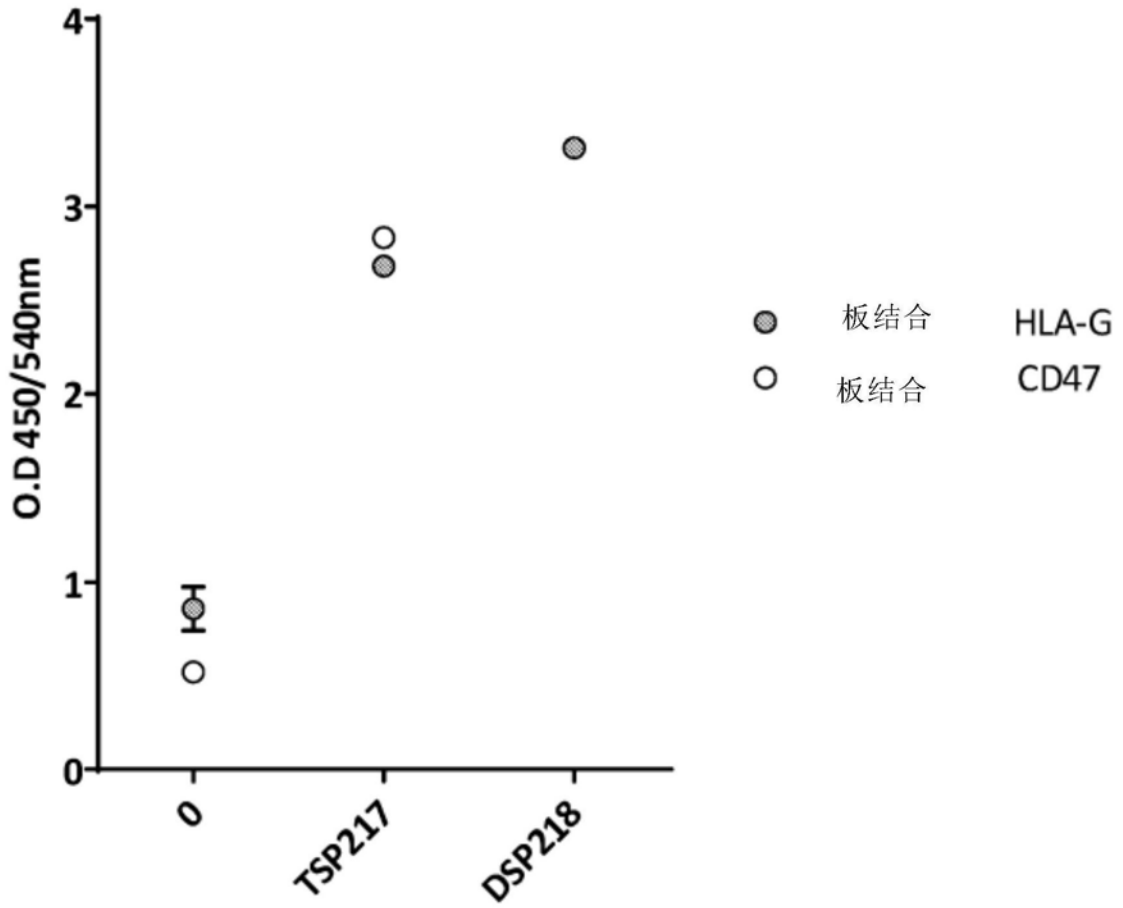


图30B

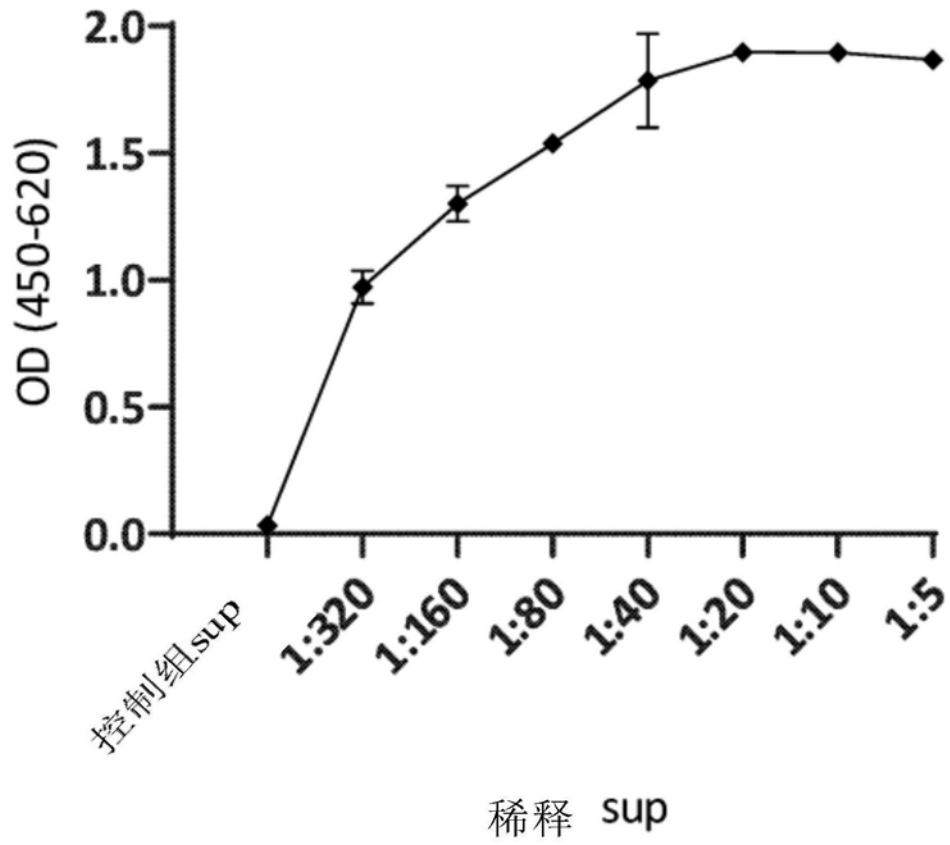


图31

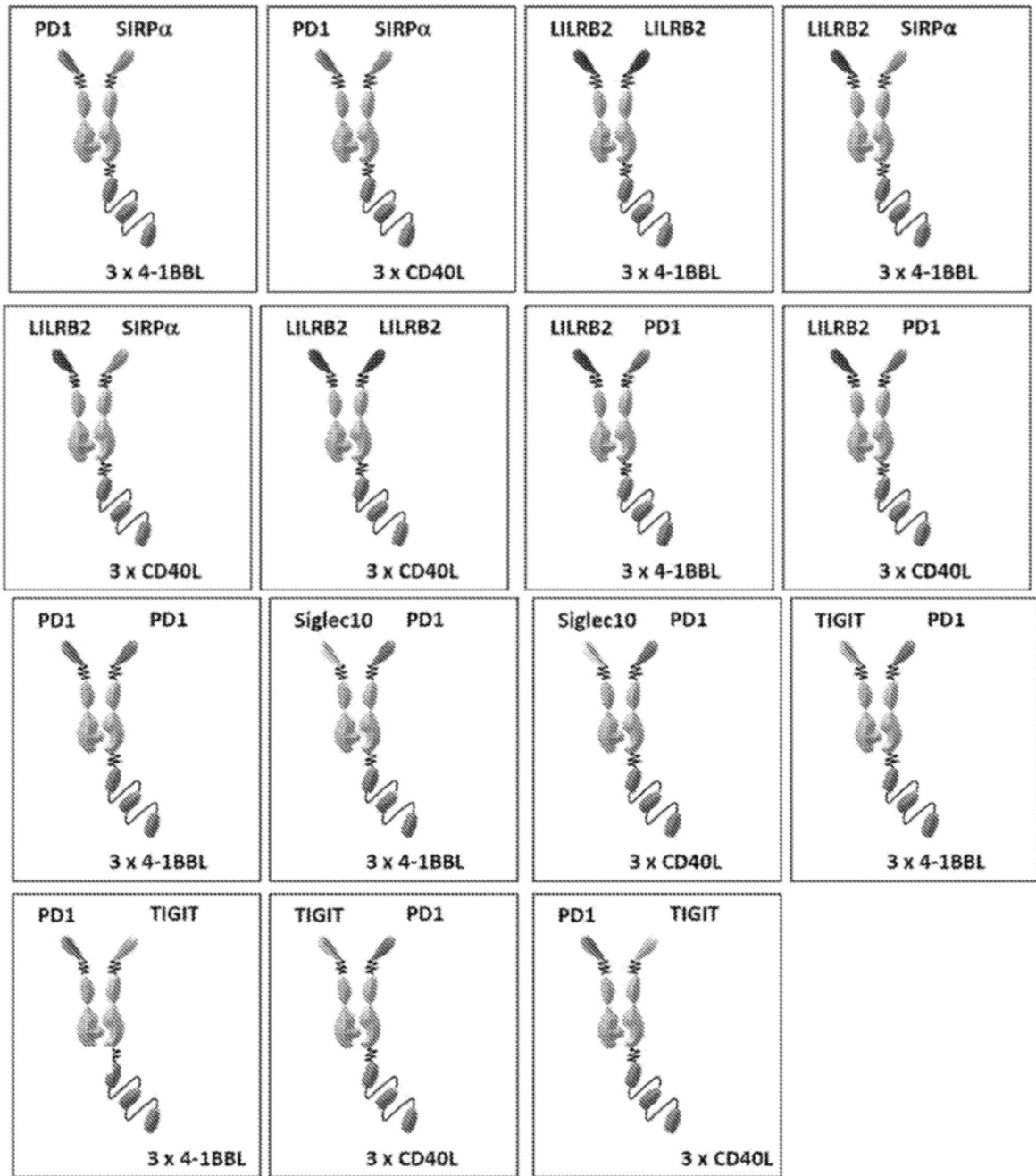


图32