

1. 一种抗原呈递复合物,其包含通过二硫键连接的两个人源化或人的免疫球蛋白重链氨基酸序列,每个重链在铰链区上方融合至HLA氨基酸序列,其中每个重链的恒定区包含直接与纳米颗粒偶联的未配对的半胱氨酸,

其中所述抗原呈递复合物不含有免疫球蛋白轻链序列或免疫球蛋白重链可变区,

其中所述抗原呈递复合物包含与HLA结合的抗原肽以呈递给T细胞和 β 2微球蛋白肽,和

其中所述纳米颗粒包含PLGA-PEG聚合物,并且具有50至250 nm的尺寸,所述纳米颗粒还包含与所述纳米颗粒表面缀合的抗CD28共刺激配体,所述抗CD28共刺激配体为抗CD28抗体

其中,所述抗CD28抗体的重链的可变区域的序列为

EVKLQQSGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSDYGVHWVRQAPGKGLEWLGVWAGGGTNYNSALMSRKTISKD
NSKSQVSLKMSVTAADTAVYYCARDKGYSSYYYSMDYWGQGLVTVSS,和

其中,所述抗CD28抗体的轻链的可变区域的序列为

DIELTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYYVTSLMQWYQQKPGQPPKLLIFAASNVESGVPDRFSGSGSG
TDFTLTISSLQAEDVAMYFCQQSRKVPYTFGGGTKVEIK。

2. 根据权利要求1所述的抗原呈递复合物,其中所述免疫球蛋白重链氨基酸序列包括IGHV4序列。

3. 根据权利要求1或2所述的抗原呈递复合物,其中所述HLA氨基酸序列是HLA-A*02:01。

4. 根据权利要求2的抗原呈递复合物,其中IGHV4序列是IGHV4-59。

5. 根据权利要求1的抗原呈递复合物,其中抗原肽是肿瘤抗原。

6. 根据权利要求4的抗原呈递复合物,其中所述抗原呈递复合物通过基于Kabat编号的残基473处的未配对半胱氨酸固定。

7. 根据权利要求1的抗原呈递复合物,其中所述纳米颗粒是可生物降解的。

8. 根据权利要求6的抗原呈递复合物,其中所述抗原呈递复合物通过硫氢基-马来酰亚胺化学与纳米颗粒缀合。

9. 根据权利要求1的抗原呈递复合物,其中所述纳米颗粒的尺寸小于200 nm。

10. 根据权利要求9的抗原呈递复合物,其中纳米颗粒的尺寸小于100 nm。

11. 根据权利要求1的抗原呈递复合物,其中所述抗原呈递复合物和共刺激配体以5:1至1:5的比例缀合。

12. 根据权利要求1的抗原呈递复合物,其中所述纳米颗粒每个颗粒具有100至1500个配体。

13. 根据权利要求12的抗原呈递复合物,其中所述纳米颗粒每个颗粒具有200至1200个配体。

14. 根据权利要求2的抗原呈递复合物,其中恒定区包含一个以上铰链稳定突变。

15. 根据权利要求14的抗原呈递复合物,其中所述铰链稳定突变包含在CH链中引入的一个以上突变。

16. 根据权利要求1的抗原呈递复合物,其中所述抗CD28共刺激配体通过免疫球蛋白重链的基于Kabat编号的残基473处的半胱氨酸与纳米颗粒缀合。

用于免疫疗法的组合物和方法

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求2013年6月24日提交的美国临时申请No.61/838,547和2014年3月6日提交的美国临时申请No.61/948,916的权益和优先权,其在此通过引用整体并入。

发明领域

[0003] 本发明涉及用于免疫疗法的组合物(包括药物组合物)及方法。

背景技术

[0004] 抗原呈递细胞(APC)是一种加工和呈现在其表面上与主要组织相容性复合物(MHC)蛋白复合的抗原肽的细胞。效应细胞,诸如T细胞,可使用受体诸如T细胞受体(TCR)识别这些肽-MHC(pMHC)复合物。

[0005] 树突细胞(DC)是一种抗原呈递细胞的实例,其可被刺激以有效呈递抗原并支持免疫效应细胞扩增,从而激活对抗原的细胞毒反应。在一些免疫疗法中,DC是从患者收集到的并用抗原脉冲或用病毒载体转染。在输回所述患者后,这些激活的细胞呈递肿瘤抗原至效应淋巴细胞(如CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和B细胞)。如果适当进行,该疗法可起始针对表达抗原(包括肿瘤抗原)细胞的细胞毒反应。

[0006] 然而,DC免疫疗法,如许多免疫疗法面临显著的限制。例如,接种的癌症患者中离体可检测的强且抗原特异性T细胞反应与仅较弱的临床反应存在差异。Janikashvili N等, Personalized dendritic cell-based tumor immunotherapy. Immunotherapy 2010年1月1日;2(1):57。

[0007] 仍然需要有效用于包括抗原特异性免疫疗法的免疫疗法的组合物(包括货架稳定的药物组合物)和方法。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供用于免疫疗法的组合物和方法,其包括用于在患者中诱导抗原特异性T细胞的货架稳定的药物组合物。此类组合物用于治疗例如,癌症和传染病。在一些方面,所述组合物是人工抗原呈递细胞(aAPC),其包括在其表面上具有抗原呈递复合物和任选的T细胞共刺激信号的药学上可接受的珠粒或颗粒,以向患者提供在适当的情况下呈递一种或多种抗原(如,一种或多种肿瘤抗原)的分子复合物以激活抗原特异性T细胞。所述珠粒或颗粒经设计提供药效动力学优势,包括循环特性、生物分布和降解动力学,以及活性。此类参数包括尺寸、表面电荷、聚合物组成、配体缀合化学、配体密度等。

[0010] 在一些实施方案中,T细胞共刺激信号是抗-CD28抗体或其部分,其可包含人重链氨基酸序列,包括选自IgG、IgD、IgA或IgM同种型的序列。在一些实施方案中,免疫球蛋白序列包括人IgG恒定和可变序列。框架(FW)序列可经修饰含有重要或所需的鼠科框架残基以维持一个或多个抗原结合位点的完整性。互补决定区(CDR)可基于鼠科抗体氨基酸序列(如,9.3mAb),或其它CD28结合序列,其中许多是已知的。在一些实施方案中,所述抗体重链是人IGHV4(如,IGHV4-59)种系FW的变体。在一些实施方案中,所述抗体包含轻链且所述轻

链是人IGKV4-01FW的变体。所述抗体可包含恒定区,且所述恒定区可为人IgG4或其变体。

[0011] 所述共刺激分子可缀合至具有抗原呈递分子复合物的固体支撑物,以诱导抗原特异性T细胞。抗原呈递分子复合物可包括I类MHC和/或II类复合物,或其包含抗原结合槽的部分。在一些实施方案中,所述分子复合物包含一个或多个HLA氨基酸序列(如,包含HLA的胞外结构域或其抗原呈递部分),其可包含另外的序列,诸如免疫球蛋白序列,或其它二聚化序列或稳定序列。在一些实施方案中,HLA-Ig二聚化融合物提供稳定性和/或结合亲和力方面的优势。

[0012] 因此,在一些实施方案中,本发明提供用于呈递抗原至T细胞的珠粒-或颗粒-缀合的分子复合物,其中所述复合物包含形成I类或II类抗原结合槽的氨基酸序列或其部分。所述抗原呈递复合物的氨基酸序列可包括与异源序列的融合物,以提供例如稳定性、亲和力和空间优势。在一些实施方案中,所述异源序列包括免疫球蛋白序列。在一些实施方案中,所述分子复合物包括融合至异源序列诸如免疫球蛋白序列的HLA(如,HLA-A2)氨基酸序列。在一些实施方案中,所述免疫球蛋白包含人重链免疫球蛋白序列(如,IGVH4),其可包括免疫球蛋白恒定序列以提供二聚体HLA,和可任选地包含可变区序列。所述可变序列如果存在可被任选地修饰以减少或消除潜在的抗原结合并且任选地无鼠科FW残基。所述HLA氨基酸序列可为HLA-A*02:01 (IMGT登记号HLA00005)或其衍生物。

[0013] T细胞共刺激配体和/或抗原呈递复合物(以及本文所述的其它配体,包括靶向配体)可缀合至固体支撑物用于离体或体内抗原呈递和抗原特异性T细胞激活。在一些实施方案中,所述固体支撑物是具有用于偶联配体的表面官能团的珠粒或颗粒(如,PLGA或PLGA-PEG颗粒)。所述颗粒经设计提供药效动力学优势,包括循环特性、生物分布和降解动力学以及活性。此类参数包括尺寸、表面电荷、聚合物组成、配体缀合化学、配体密度等。

[0014] 在各个实施方案中,所述药物组合物可另外包含用于呈递至T细胞且可与配体缀合的珠粒或颗粒共同配制的抗原肽。在各个实施方案中,所述药物组合物是货架稳定的,并且可以在施用前复溶的冻干形式提供,或替代地以另一种施用给患者的便利形式(如,通过肠胃外施用)提供。

[0015] 本文所述的药物组合物通过向有需要的患者施用有效量的组合物用于免疫疗法,例如,用于诱导抗原特异性细胞毒性T细胞形成的方法。具体而言,抗原呈递平台可用于治疗传染病、癌症或自身免疫性疾病患者,或者向免疫抑制患者提供预防性保护。

[0016] 本发明还提供编码本文所述的氨基酸序列的多核苷酸,以及表达本文所述的氨基酸序列的宿主细胞。

[0017] 本发明通过以下非限制性实例进一步说明。

[0018] 本发明的细节示于以下随附的说明书和权利要求书中。尽管与本文所述那些方法和材料类似的方法和材料可用于本发明的实践或测试中,但现在描述说明性方法和材料。本发明的其它特征、目标和优势将通过说明书和权利要求书变得显而易见。除非上下文另外明确说明,否则在说明书和随附权利要求书中,单数形式还包括复数形式。除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属的领域普通技术人员通常所理解相同的含义。

[0019] 附图简述

[0020] 图1-3显示了抗-CD28的三条人源化可变重序列。

- [0021] 图4-6显示了抗-CD28的三条人源化可变轻序列。
- [0022] 图7显示了经修饰的恒定重序列。
- [0023] 图8显示了恒定κ轻序列。
- [0024] 图9显示了用于构建HLA融合物的人源化非CD28-结合可变区。
- [0025] 图10显示了人源化HLA-IgG4HC的氨基酸序列。
- [0026] 图11显示了轻链3 (LC3或Vκ3) 的氨基酸序列。
- [0027] 图12显示了重链1 (HC1) 的氨基酸序列。
- [0028] 图13显示了重链2 (HC2) 的氨基酸序列。
- [0029] 图14-16显示了用于在STABLEFAST-NS0细胞系中表达的表达构建体。
- [0030] 图17显示了人源化抗-CD28mAb不是超激动剂。
- [0031] 图18显示了人源化抗-CD28克隆特异性染色人T-细胞系上的CD28。图18 (A) :用鼠科抗-人CD8mAb (克隆9.3, 同种型IgG2a) 染色;图18 (B) :用人源化抗-CD28 (同种型IgG4) 染色。
- [0032] 发明详述
- [0033] 以下缩写可在全文中使用:BLAST-基本局部比对搜索工具,CDR-互补决定区,Cκ-κ轻链恒定区,Fc-抗体片段可结晶区,Fw-(可变区的)框架区,HLA-人白细胞抗原,MHC-主要组织相容性复合物,VH-可变重链,Vκ-可变κ轻链及V区-抗体可变区,VH或Vκ。
- [0034] 本发明提供用于免疫疗法的组合物和方法,其包括用于在患者中诱导抗原特异性T细胞的货架稳定的药物组合物。在一些实施方案中,所述组合物包含二聚体HLA抗原呈递复合物。在一些实施方案中,所述组合物包含人源化免疫球蛋白序列或其部分,其可用作人工抗原呈递细胞(aAPC)上配体的组分,以向患者提供二聚体分子复合物用于呈递一种或多种抗原(如,一种或多种肿瘤抗原)和任选的一种或多种共刺激信号。如下更详述的抗原呈递平台可基于人工固体支撑物,诸如药学上可接受的支撑物(包括胶乳或聚合物珠粒或颗粒)。
- [0035] 在一些实施方案中,所述T细胞共刺激信号是抗-CD28抗体或其部分。在一些实施方案中,所述抗-CD28抗体包含选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA或IgM的至少一种人免疫球蛋白同种型的序列。例如,所述抗-CD28抗体可为IgG同种型,并且可含有一种或多种IgG种系框架序列的序列。例如,所述抗-CD28可含有人IGHV4重链氨基酸序列,其可被修饰以具有一至十五个氨基酸修饰。所述修饰可包括鼠科框架残基以支持一个或多个抗原结合位点的完整性。
- [0036] 在一些实施方案中,互补决定区(CDR)基于鼠科抗体氨基酸序列,其可任意地包含一至十个、诸如一至五个氨基酸修饰。在一些实施方案中,一个、两个、三个或多个CDR基于小鼠9.3mAb (Tan等.J.Exp.Med.1993177:165),其可公开获得。示例性CDR示于图1-6中。在一些实施方案中,所述抗体具有全套的重链和/或全套的轻链CDR(9.3mAb)。例如,在一些实施方案中,所述重链可变区含有一个、两个或三个以下CDR,其可各自任选地被一个、两个或三个氨基酸取代、缺失或添加修饰:CDR1(DYGVH)、CDR2(VIWAGGGTNYNSALMS)和CDR3(DKGYSYYYSM DY)。在一些实施方案中,所述轻链可变区含有一个、两个或三个以下CDR,其各自可被一个、两个或三个氨基酸取代、缺失或添加修饰:CDR1(RASESVEYYVTSLMQ)、CDR2(AASNVES)和CDR3(QQSRKVPYT)。

[0037] 可替代的CDR序列、可变区或CD28-结合配体可用于各种实施方案中。可替代的配体和抗体描述于美国专利7,612,170、美国专利6,987,171和美国专利6,887,466中,例如,并且这些公开内容在此通过引用整体并入。

[0038] 在一些实施方案中,所述抗体重链包含人IGHV4-59种系框架(FW)的变体,其经修饰包括5至15个鼠科FW残基。在一些实施方案中,所述抗体包含轻链氨基酸序列,并且所述轻链序列可为人IGKV4-01FW序列的变体,并且其可经修饰包括3至15个鼠科FW残基。

[0039] 所述抗-CD28人重链序列可经修饰,例如,以在位置1、3、6、37、48、67、71、73、76、78、82、82a和82c(基于Kabat编号)处包含一个或多个(如,2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个或所有)鼠科Fw残基。在这些位置处的鼠科Fw残基可如9.3mAb中一样。所述轻链可经修饰以在位置3、4、49、70、85、87和80包含一个或多个(如,2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个或所有)鼠科Fw残基。所选的鼠科Fw残基可支持抗原-结合位点的完整性。人源化抗-CD28抗体维持对CD28的亲合力和9.3mAb的T细胞共刺激活性,并且为至少40%、50%、75%、80%、90%,并且在一些实施方案中,与9.3mAb相比,对于CD28结合100%或更有效。在各个实施方案中,所述抗-CD28mAb不是超激动剂。

[0040] 所述抗体可包含恒定区并且所述恒定区可为任何同种型。在一些实施方案中,所述抗体恒定区是人IgG4或其变体。在一些实施方案中,所述恒定区包含一个或多个铰链稳定突变,其可被引入至CH链中(如,S241,其可被P取代)。在一些实施方案中,所述抗体包含恒定区,并且所述恒定区包含一个或多个适于化学偶联所述抗体至固体支撑物的突变。所述一个或多个适于偶联的突变可产生氨基酸侧链官能团(如,硫醇、胺或羟基),诸如未配对的半胱氨酸(如,在S473处)。对恒定区的其它变化包括那些减少Fc γ 受体结合的修饰。例如,所述CH链可在L248处修饰,如,L248E。

[0041] 在一些实施方案中,所述抗体是抗体片段,诸如F(ab')₂或Fab,或者为单链抗体或其它抗原-结合抗体片段。例如,所述抗体片段可为本文所述的人源化mAb或其它抗-CD28的单链可变片段。

[0042] 在一些实施方案中,所述共刺激分子是单链可变片段(scFv),其包含由抗CD28mAb诸如本文所述的抗体的VH和VL链形成的抗原结合环,或基本上由由抗CD28mAb诸如本文所述的抗体的VH和VL链形成的抗原结合环组成。scFv抗体构建体可包含通过短肽连接子以头-头或头-尾构象连接在一起的一条或若干条(2、3、4或5)VH和VL高可变区链(每条链一起形成3-D抗原表位结合袋的部分)。此类构建体可由于其较小的尺寸经由完全合成路径方便地产生。此外,scFv可展现出较低的免疫原性潜力。

[0043] 在其它实施方案中,所述共刺激配体是包含连接至共刺激分子配体或抑制配体的scFv的一个或多个HLA分子的双特异性构建体。所述抗原呈递复合物和共刺激或抑制配体可通过肽系链缀合,所述肽系链使得双特异性构建体可共价连接至纳米颗粒表面。在一些实施方案中,此类构建体产生与含有HLA的较大构建体和各自独立连接至NP表面的共刺激或抑制配体的纳米颗粒相同的活性,从而提供生产优势。

[0044] 所述共刺激分子可缀合至具有抗原呈递分子复合物的固体支撑物,以诱导抗原特异性T细胞。所述抗原呈递分子复合物可包括I类和/或II类MHC复合物,或其包含抗原-结合槽的部分。在一些实施方案中,所述分子复合物包含一个或两个HLA氨基酸序列,其可含有另外的异源序列,诸如免疫球蛋白序列。可替代的异源序列包括二聚化氨基酸序列诸如c-

fos和c-jun。在一些实施方案中,HLA-融合物提供在稳定性和/或结合亲和力方面另外的优势。

[0045] 在各个实施方案中,所述抗原呈递复合物是MHC I类分子复合物或MHC II类分子复合物,或可替代地CD1d。所述MHC I类分子复合物可包含至少两种融合蛋白。第一融合蛋白包含第一MHC I类 α 链和第一免疫球蛋白重链,并且第二融合蛋白包含第二MHC I类 α 链和第二免疫球蛋白重链。第一和第二免疫球蛋白重链缔合以形成MHC I类分子复合物。所述MHC I类分子复合物包含第一MHC I类肽结合槽和第二MHC I类肽结合槽。所述MHC II类分子复合物可包含至少四种融合蛋白。两种第一融合蛋白包含(i)免疫球蛋白重链和(ii)MHC II类 β 链的胞外结构域。两种第二融合蛋白包含(i)免疫球蛋白轻链和(ii)MHC II类 α 链的胞外结构域。所述两种第一和两种第二融合蛋白缔合以形成MHC II类分子复合物。每个第一融合蛋白的MHC II类 β 链的胞外结构域和每个第二融合蛋白的MHC II类 α 链的胞外结构域形成MHC II类肽结合槽。抗原肽结合至肽结合槽。在各个实施方案中,所述免疫球蛋白序列是包含铰链区的部分重链序列以支持二聚化。

[0046] 在一些实施方案中,所述抗原呈递复合物是经工程化含有未配对的半胱氨酸或使用天然存在的未配对半胱氨酸的合成或重组HLA单体,以用于缀合至纳米颗粒。此外,共刺激信号(或其它基于抗体的配体)可为Fab或scFv。在此类实施方案中,所述两种信号可重组在单个多功能构建体中,所述构建体包含拴系至结合所需受体的抗原结合抗体片段(如,scFv)的HLA分子。

[0047] 在其它方面和实施方案中,本发明提供用于呈递抗原至T细胞的珠粒-或颗粒-缀合的分子复合物,其中所述复合物包含人源化免疫球蛋白序列或其融合至抗原呈递序列的部分,如HLA氨基酸序列。在一些实施方案中,所述免疫球蛋白序列是人重链序列(如,IGHV4框架)。所述可变区不包含针对CD28或其它人蛋白的抗原结合活性。所述HLA氨基酸序列可为HLA-A*02:01(IMGT登记号HLA00005)或其衍生物或片段,诸如具有1至10个或1至5个氨基酸取代、缺失或插入的衍生物。所述人源化免疫球蛋白序列可另外包含HLA和免疫球蛋白序列之间的连接子氨基酸序列。优选地,所述连接至缺乏免疫原性。所述分子复合物可另外包含 β 2微球蛋白肽。

[0048] 在各个实施方案中,所述免疫球蛋白融合序列属于IgG、IgD、IgA或IgM同种型,并且可源自任何人种系框架。所述种系框架包括IGHV4(如,IGHV4-59),其可含有或可不含有相对于抗-CD28描述的一个或多个鼠科框架残基。在一些实施方案中,根据该方面,上文所述的抗-CD28抗体的重链(有或无鼠科框架残基)融合至HLA,并且在此类实施方案中,所述可变区经修饰以减少或消除CD28结合。

[0049] 在一些实施方案中,所述HLA融合构建体不含可变链序列。例如,所述HLA或抗原呈递复合物可融合至铰链区上方的Ig恒定区序列以提供二聚体HLA。例如,HLA或其抗原呈递部分可缀合至每条IgG重链的CH1部分。所有IgG分子通过铰链区(上和下)中的二硫键连接在一起的两种相同的重链(恒定区和可变区)组成。例如,在一些实施方案中,HLA分子或抗原呈递复合物融合至CH1(铰链区上方的IgH链的N-末端),从而产生由于缺乏任何VH和VL轻链序列而较小的二聚体融合蛋白。此类构建体可提供生产优势,以及展现出的免疫原性潜力较小。

[0050] 在另一些实施方案中,所述抗原呈递复合物(如,HLA序列)不含有Ig融合伴侣,并

且是单体。例如,在一些实施方案中,抗原呈递复合物或HLA分子(如HLA-A2等)的C-端末端含有适于定点结合至固体/半固体基质诸如合成纳米颗粒(如PLGA-PEG-马来酰亚胺嵌段共聚物,或本文所述的其它颗粒)上的官能团(如马来酰亚胺部分)的肽系链序列。所述系链序列可含有任何适当的序列,其可主要由亲水残基诸如Gly、Ser、Ala和Thr构成,诸如两个、三个、四个或五个重复的GGGSG或AAAGG,其中半胱氨酸残基掺入约5至约15个(或约5至约10个氨基酸)系链内的某处。所述半胱氨酸残基应掺入预测不形成分子内二硫键的位点处。

[0051] 在一些实施方案中,所述HLA-Ig融合物或其他HLA构建体还包含用于呈递至T细胞的结合至HLA的抗原肽。所述抗原肽可包含用于酪氨酸酶、hTERT、MAGE-1、MAGE-3、gp-100、NY-ES0-1、Melan A/Mart-1、HPV 16-E7、gp75/褐色、BAGE和S-100中的一个或多个的抗原部分和/或如WO 2004/006951(其内容在此通过引用整体并入)中所述的由I类或II类复合物呈递的任一种抗原肽。所述HLA复合物可连接至固体支撑物,诸如如所述的珠粒或颗粒,用于任选地与共刺激信号一起呈递抗原至T细胞。

[0052] 可与抗原呈递复合物一起提供的其它信号包括:CD80(B7-1)、CD86(B7-2)、B7-H3、4-1BBL、CD27、CD30、CD134(OX-40L)、B7h(B7RP-1)、CD40、LIGHT、(或此类分子或其活性部分的如本文所述的任选人源化的Ig融合物)、特异性结合至HVEM的抗体、特异性结合至CD40L的抗体、特异性结合至OX40的抗体、特异性结合Fas的抗体、特异性结合PD1的抗体、特异性结合至GITR的抗体及特异性结合至4-1BB的抗体。

[0053] 本发明的用于抗原呈递平台的粘附分子可介导平台粘附至T细胞或至T细胞前体。用于本发明的粘附分子包括例如,ICAM-1和LFA-3。

[0054] T细胞生长因子影响T细胞的增殖和/或分化。T细胞生长因子的实例包括细胞因子(如,白介素、干扰素)和超抗原。特别有用的细胞因子包括IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15和 γ 干扰素。T细胞生长因子可封装在珠粒或颗粒中或化学缀合或吸附至所述表面。因此,在一些实施方案中,所述纳米颗粒另外包含包埋在所述颗粒的疏水性核心中的治疗化合物或蛋白/肽(如化疗剂、细胞因子或白介素诸如IL-2,趋化因子如吸引T细胞的CCL9,和/或检查点抑制分子如抗-PD1抗体或抗-PD1肽)。在一些实施方案中,此类aAPC经构建靶向特定细胞以用于刺激或抑制以及重编程。在一些实施方案中,经包埋的化合物通过降解颗粒基质释放。此类aAPC可通过限制由于脱靶相互作用导致的非所需活性,使得组合疗法更加可耐受和有效。

[0055] 根据本发明的各方面表示的抗原包括肿瘤相关的抗原。肿瘤相关的抗原包括仅由所述抗原来源的肿瘤表达的独特肿瘤抗原,在许多中表达而不在正常成人组织中表达的共有肿瘤抗原(癌胚抗原、癌症/睾丸抗原),以及还由肿瘤来源于的正常组织表达的组织特异性抗原。肿瘤相关的抗原可为例如,胚胎抗原、具有异常翻译后修饰的抗原、分化抗原、突变致癌基因或肿瘤抑制子的产物、融合蛋白或致癌病毒蛋白。多种肿瘤相关的抗原是本领域已知的,并且这些中的许多是可商购获得的。癌胚和胚胎抗原包括癌性胚胎抗原和 α -胎蛋白(通常仅在发育胚胎中高度表达,但通常分别由肝肿瘤和结肠肿瘤高度表达),胎盘碱性磷酸酶唾液酸化-LewisX(在腺癌中表达),CA-125和CA-19(在肠胃肿瘤、肝肿瘤和妇科肿瘤中表达),TAG-72(在结直肠肿瘤中表达),上皮糖蛋白2(在许多癌中表达),胰腺癌胚抗原、5T4(在胃癌中表达)、 α 胎蛋白受体(在多种肿瘤类型中表达,特别是哺乳动物肿瘤)和M2A(在生殖细胞瘤形成中表达)。

[0056] 在一些实施方案中,至少一种抗原是癌症/睾丸(CT)抗原,其可包括NY-ESO-1, MAGE-A、B和C,CTAG-1,CTAG-45,GAGE和SSX,其在睾丸的生殖细胞中正常表达和不在正常成人人体组织中表达。然而,多种类型的癌症细胞已显示表达CT抗原,包括黑素瘤、乳腺癌、肝癌、肺癌、卵巢癌和霍奇金氏淋巴瘤。

[0057] 肿瘤相关的分化抗原包括酪氨酸酶(在黑素瘤中表达)和特定表面免疫球蛋白(在淋巴瘤中表达)。

[0058] 突变致癌基因或肿瘤抑制子基因产物包括Ras和p53,这两者在许多肿瘤类型中表达,Her-2/neu(在乳腺癌和妇科癌中表达)、EGF-R、雌激素受体、黄体酮受体、视网膜母细胞瘤基因产物、myc(与肺癌相关)、ras、与乳腺癌相关的p53非突变体、MAGE-1和MAGE-3(与黑素瘤、肺癌或其它癌症相关)。

[0059] 其它肿瘤抗原包括在慢性髓样白血病中表达的融合蛋白诸如BCR-ABL,和在颈癌中存在的致癌病毒蛋白诸如HPV 16、E6和E7型。组织特异性肿瘤抗原包括黑素转铁蛋白和MUC1(在胰腺癌和乳腺癌中表达);CD 10(之前已知为常见急性淋巴母细胞性白血病抗原或CALLA)或表面免疫球蛋白(在B细胞白血病和淋巴瘤中表达);IL-2受体、T细胞受体、CD45R、CD4+/CD8+的 α 链(在T细胞白血病和淋巴瘤中表达);前列腺特异性抗原和前列腺酸磷酸酶(在前列腺癌中表达);gp100、MelanA/Mart-1、酪氨酸酶、gp75/褐色、BAGE和S-100(在黑素瘤中表达);细胞角蛋白(在各种癌中表达);及CD19、CD20和CD37(在淋巴瘤中表达)。

[0060] 在一些实施方案中,所述抗原肽包括MART-1、gp100、NY-ESO-1,及由本文所述的HLA抗原呈递复合物(诸如本文所述的HLA-Ig融合复合物)呈递的MAGE-A3。

[0061] 在另一些实施方案中,所述组合物包含所述肿瘤类型的多个抗原的混合物,诸如至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个抗原(如,2至10或3-8个抗原)。

[0062] 在一些实施方案中,所述抗原是自身抗原,其是生物体对其产生免疫反应的生物体自己的“自体抗原”。自身抗原参与自身免疫性疾病诸如古德帕斯彻氏综合症(Goodpasture's syndrome)、多发性硬化、格雷夫斯氏病(Graves'disease)、重症肌无力、全身性红斑狼疮、胰岛素依赖型糖尿病、风湿性关节炎、寻常性天疱疮、爱迪生氏病(Addison's disease)、疱疹样皮炎、乳糜泻和桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)。例如,糖尿病相关的自身抗原包括胰岛素、谷氨酸脱羧酶(GAD)和其它胰岛细胞自身抗原,如ICA 512/IA-2蛋白酪氨酸磷酸酶、ICA12、ICA69、前胰岛素原或其免疫活性片段(如,胰岛素B-链、A链、C肽或其免疫活性片段)、IGRP、HSP60、羧肽酶H、外周蛋白、神经节苷脂(如,GM1-2、GM3)或其免疫活性片段。

[0063] 在一些实施方案中,所述一种或多种抗原属于传染因子,诸如原生动物、细菌、真菌(单细胞和多细胞)、病毒、朊病毒、胞内寄生物、蠕虫的组分及其它可诱导免疫反应的传染因子。细菌抗原包括革兰氏阳性球菌、革兰氏阴性杆菌、革兰氏阴性细菌、厌氧细菌的抗原,诸如以下各科的有机体:放线菌科、芽胞杆菌科、巴尔通氏体科、博德特氏菌、Captophagaceae、棒状杆菌科、肠杆菌科、军团菌科、微球菌科、分支杆菌科、诺卡氏菌科、巴斯德氏菌科、假单胞菌科、螺旋体科、弧菌科以及以下各属的有机体:不动杆菌属、布鲁氏菌、弯曲菌属、丹毒丝菌属、爱文菌属、弗朗西斯氏菌属、加德纳氏菌属(**Gardnerella**)、螺杆菌属、列文菌属、李斯特菌属、链杆菌属和吸收不良菌属。原生动物传染因子的抗原包括患疟疾的疟原虫、利什曼原虫物种、锥体虫属物种和血吸虫属物种的抗原。真菌抗原包括曲霉

属、芽生菌属、假丝酵母属、球孢子菌属、隐球菌属、组织胞浆菌属、巴西副球孢子菌(Paracoccidioides)、孢子丝菌属、毛霉目的有机体、诱导着色真菌病和足分支菌病的有机体及毛癣菌属、小孢子菌属、表皮癣菌属和马拉色菌属各属的有机体的抗原。朊病毒的抗原包括引起瘙痒病、牛海绵状脑病(BSE)、猫科动物海绵状脑病、库鲁病、克鲁兹佛得-雅克病(Creutzfeldt-Jakob Disease,CJD)、格-斯二氏综合症(Gerstmann-Strassler-Scheinker Disease,GSS)和致命性家族性失眠症(FFI)的朊病毒的唾液酸糖蛋白PrP 27-30。可从其获得抗原肽的胞内寄生物包括但不限于衣原体科、支原体科、无胆甾原体科、立克次体,及柯克斯体属和埃立克体属两属的有机体。病毒肽抗原包括但不限于腺病毒、单纯疱疹病毒、乳头瘤病毒、呼吸道合胞病毒、痘病毒、HIV、流感病毒和CMV的那些病毒肽抗原。特别有用的病毒肽抗原包括HIV蛋白诸如HIV gag蛋白(包括但不限于膜锚定(MA)蛋白、核衣壳(CA)蛋白和核壳体(NC)蛋白)、HJV聚合酶、流感病毒基质(M)蛋白和流感病毒核壳体(NP)蛋白、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎核心蛋白(HBcAg)、戊型肝炎蛋白(HBeAg)、乙型肝炎DNA聚合酶、丙型肝炎抗原等。

[0064] 抗原,包括抗原肽,可主动或被动结合至抗原呈递复合物的抗原结合槽,如美国专利6,268,411(其在此通过引用整体并入)所述。任选地,抗原肽可共价结合至肽结合槽。

[0065] 如果需要,肽系链可用于连接抗原肽至肽结合槽。例如,对多种I类MHC分子的晶体学分析表明 β 2M的氨基端与停留于MHC肽结合槽中的抗原肽的羧基端非常靠近,相距约20.5埃。因此,使用相对短的连接子序列,长约13个氨基酸,人们可将肽栓系至 β 2M的氨基端。如果所述序列适当,则该肽将结合至MHC结合沟(参见美国专利6,268,411)。

[0066] 所述抗体或片段和/或抗原呈递复合物可缀合至固体支撑物以用于离体或体内抗原呈递。各种固体支撑物描述于WO 2004/006951中,其内容在此通过引用整体并入。在一些实施方案中,所述固体支撑物是具有用于偶联配体的官能团的珠粒或颗粒。所述材料可为可生物降解有机材料,诸如纤维素或葡聚糖。在一些实施方案中,选择嵌段共聚物运输(traffic)至特定结构位点,并且以特定间隔生物降解,即具有较长或较短的血浆半寿期,或较长或较短的组织停留时间。

[0067] 在一些实施方案中,所述珠粒或颗粒包含聚合物,诸如以下的一者或多者:含环糊精聚合物、含阳离子环糊精聚合物,聚(D,L-乳酸-共-羟基乙酸)(PLGA),聚(己内酯)(PCL),乙烯-乙酸乙烯酯聚合物(EVA),聚(乳酸)(PLA),聚(L-乳酸)(PLLA),聚(羟基乙酸)(PGA),聚(L-乳酸-共-羟基乙酸)(PLLGA),聚(D,L-丙交酯)(PDLA),聚(L-丙交酯)(PLLA),PLGA-b-聚(乙二醇)-PLGA(PLGA-bPEG-PLGA),PLLA-bPEG-PLLA,PLGA-PEG-马来酰亚胺(PLGA-PEG-mal),聚(D,L-丙交酯-共-己内酯),聚(D,L-丙交酯-共-己内酯-共-乙交酯),聚(D,L-丙交酯-共-PEO-共-D,L-丙交酯),聚(D,L-丙交酯-共-PP0-共-D,L-丙交酯),聚烷基氰基丙烯酸酯、聚氨酯、聚-L-赖氨酸(PLL),甲基丙烯酸羟丙基酯(HPMA),聚乙二醇,聚-L-谷氨酸,聚(羟氨酸),聚酸酐,聚原酸酯,聚(酯酰胺),聚酰胺,聚(酯醚),聚碳酸酯,聚烯烃诸如聚乙烯和聚丙烯,聚亚烷基二醇诸如聚(乙二醇)(PEG),聚环氧烷(PEO),聚对苯二酸亚烷基酯诸如聚(对苯二甲酸乙二酯),聚乙烯醇(PVA),聚乙烯醚,聚乙烯酯诸如聚(乙酸乙烯酯),聚卤代乙烯诸如聚(氯乙烯)(PVC),聚乙烯吡咯烷酮,聚硅氧烷,聚苯乙烯(PS),聚氨酯,衍生的纤维素诸如烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素,丙烯酸的聚合物诸如聚((甲基)丙烯酸甲酯)(PMMA)、聚((甲基)丙烯酸乙酯)、

聚((甲基)丙烯酸丁酯)、聚((甲基)丙烯酸异丁酯)、聚((甲基)丙烯酸己酯)、聚((甲基)丙烯酸异癸酯)、聚((甲基)丙烯酸月桂酯)、聚((甲基)丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)、聚(丙烯酸十八烷基酯)(聚丙烯酸)及其共聚物和混合物,聚二噁烷酮及其共聚物,聚羟基脂肪酸酯,聚富马酸丙二酯(polypropylene fumarate),聚氧化亚甲基,泊洛沙姆,聚(原酸酯),聚(丁酸),聚(戊酸),聚(丙交酯-共-己内酯),三亚甲基碳酸酯,聚乙烯吡咯烷酮,聚原酸酯,聚磷腈和聚磷酸酯,以及两种或多种此类聚合物的掺混物和/或嵌段共聚物。其它药学上可接受的材料,诸如胶乳,也可用作固体颗粒支撑物。

[0068] 在一些实施方案中,所述抗原呈递复合物和共刺激信号缀合至在聚合物的端末端(如,背向朝向所述颗粒表面的末端)上具有表面官能团的PLGA或PLGA-PEG颗粒,诸如PLGA-PEG-马来酰亚胺颗粒(其在亲水外表面提供用于化学偶联的官能团)。在一些实施方案中,aAPC持续存于外周血液循环足够长的时间以使其经由血液/淋巴交换分布至靶组织,包括运输至淋巴结。所述壳的组成还可影响生物分布。因此,在各个实施方案中,所述颗粒具有亲水壳,其可通过PLGA-PEG共聚物的PEG实现。在各个实施方案中,所述颗粒的电荷稍微带负电,例如由于PLGA上的COOH基团的组合以及通过靶向连接至所述颗粒表面的配体导致的电荷。在一些实施方案中,所述颗粒(具有或不具有缀合的配体)具有约0至约-20mV,或在一些实施方案中,-5至-15mV或约-10mV的表面电荷。

[0069] 包含PLGA-PEG共聚物的纳米颗粒描述于例如美国专利8,420,123中,其在此通过引用并入。

[0070] 所述颗粒可在形状不规则与球形和/或具有不匀整或不规则表面与具有光滑表面方面不同。球形颗粒相对于不规则尺寸的颗粒具有较小的表面积。如果使用球形颗粒,则较少的试剂由于减少的表面积是必需的。换句话说,不规则成形的颗粒具有比球形颗粒显著较大的表面积,其为细胞提供每表面积缀合的蛋白含量和表面积接触。例如,不对称纳米颗粒可具有至少一个表面沿着至少一个轴的曲率半径在以下范围之一:(a)约1nm至约10nm;(b)约11nm至约100nm;(c)约101nm至约400nm;(d)约401nm至约1 μ m;(e)约10 μ m至约20 μ m;(f)约20 μ m至约100 μ m;和(g)约101 μ m至约1mm。在一些实施方案中,所述不对称纳米颗粒可具有由以下限定的不对称形状:沿着x轴的尺度(a)、沿着y轴的尺度(b),和沿着z轴的尺度(c),其中(a)、(b)或(c)的至少一个不等于至少一个其它尺度(a)、(b)或(c)。在一些实施方案中,所述不对称形状是椭球体,其可通过以下等式之一描述: $a>b=c$ (长椭球体); $a>b>c$ (三轴椭球体);和 $a=b>c$ (扁椭球体)。可根据本发明使用的不对称纳米颗粒描述于W0 2013/086500中,其在此通过引用整体并入。

[0071] 颗粒的尺寸可不同。在各个实施方案中,所述颗粒尺寸(公称直径)在0.05-50 μ m的范围内,或在一些实施方案中,0.05-35 μ m,或在一些实施方案中,0.05至10 μ m,及在一些实施方案中,为约0.05至约3.0、约4.0或约5.0 μ m。例如,在一些实施方案中,所述颗粒直径或平均直径为50至500nm。在一些实施方案中,所述颗粒的平均尺寸小于约400nm、约300nm、约200nm或约100nm,以允许更好的外周血液循环。在一些实施方案中,所述纳米颗粒的平均尺寸(如,直径或最大轴)为约100nm、约150nm或约200nm。术语“约”,当与以数字特征相关联时,意为 $\pm 10\%$ 。在一些实施方案中,至少90%的颗粒在约50至约250nm、诸如约100至约150nm的范围内。所述颗粒可在尺寸方面一致或可在尺寸方面不同,其中平均颗粒尺寸优选

如上文所述。在一些实施方案中,所述颗粒足够小以利用“EPR效应”(增强的渗透和滞留效应)。

[0072] 本文所述的配体和分子复合物可使用任何可用的工艺化学缀合至所述珠粒。用于配体结合的官能团包括PEG-COOH、PEG-NH₂、PEG-SH或连接至不同聚合物诸如聚氰基丙烯酸酯或聚己内酯的其它官能团。

[0073] 例如,固体支撑物可在蛋白结合至其表面之前涂覆。一旦已经选择涂料化学,固体支撑物的表明可被激活以使特异性连接特定蛋白质分子。因此,可鉴于与各种细胞类群的最佳反应性和生物相容性来选择涂料。优选地,无论使用的涂料化学是什么,其提供适用于进一步激活化学的基质。多种此类涂料是本领域所熟知的。例如,固体支撑物可用人血清白蛋白、三(3-巯丙基)-N-甘氨酸基氨基)甲烷(美国专利6,074,884)、明胶-氨基葡聚糖(美国专利5,466,609)或氨基酸均聚物或无规共聚物涂覆。在一个实施方案中,使用包含聚(谷氨酸、赖氨酸、酪氨酸)[6:3:1]的无规氨基酸共聚物;该共聚物可从Sigma Chemical Co.以产品编号P8854获得。其为氨基酸谷氨酸、赖氨酸和酪氨酸比率为6份谷氨酸、3份赖氨酸和1份酪氨酸的线性无规聚合物。在另一个实施方案中,使用氨基酸共聚物,其包括比率为4份赖氨酸与1份酪氨酸的赖氨酸和酪氨酸。在又一个实施方案中,使用氨基酸共聚物,其包括比率为1份赖氨酸与1份丙氨酸的赖氨酸和丙氨酸。在另一个实施方案中,用合成聚合物涂覆固体支撑物,然后在合成聚合物连接至蛋白质分子之前,激活所述合成聚合物。

[0074] 在一些实施方案中,分子通过吸附或通过直接化学键合(包括共价键合)直接连接至固体支撑物。参见,如,Hermanson, BLOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, New York, 1996。分子本身可直接激活为具有多个化学官能团,包括亲核基团、离去基团或亲电子基团。激活官能团包括烷基卤和酰基卤、胺、巯基、醛、不饱和键、酰肼、异氰酸根、异硫氰酸根、酮及其它已知激活用于化学键合的基团。可选地,分子可通过使用小分子-偶联试剂结合至固体支撑物。偶联试剂的非限制性实例包括碳二亚胺、马来酰亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺酯、双氯乙基胺、双功能醛诸如戊二醛、酸酐等。在其它实施方案中,分子可通过亲和力结合诸如生物素-链霉亲和素键合或偶联,如本领域熟知那样偶联至固体支撑物。例如,链霉亲和素可通过共价或非共价连接结合至固体支撑物,并且生物素化分子可使用本领域熟知的方法合成。

[0075] 在一些实施方案中,所述颗粒或珠粒是聚合物,诸如PLGA-PEG、PLGA-PEG-马来酰亚胺或酯-包埋的PLGA,其中在聚合期间产生用于表面配体缀合的官能团。所述马来酰亚胺基团为形成的颗粒提供在所述颗粒外表面上的亲水“隐形”涂料(PEG),以及连接至该壳的可用于共价连接配体的官能团,所述配体具有至少一个可用的游离氢硫基(-SH)基团。例如,HLA-Ig配体和/或抗-CD28可构建在于Fc中含有S473C取代的人IgG4框架(如本文所述)上。HLA-Ig或抗-CD28的473处的该未配对半胱氨酸残基可在温和还原条件下缀合至与PEG连接的马来酰亚胺基团。温和还原条件不可能不可逆地使所述蛋白(特别是HLA-Ig分子的HLA-β-2-微球蛋白部分)变性。

[0076] 在一个示范性实施方案中,所述纳米颗粒在约50nm至大到约5μm(如,平均直径或最大轴)的范围内,具有可能倾向于特定体内生物降解率的核心(PLGA)(通过调整PLGA聚合物的LA:GA比率和/或mw)、使其免受血清蛋白调理和从循环移除的亲水外壳(如“PEG刷”起作用)、用一致控制配体密度(1分子/马来酰亚胺基团的随机关系)官能化的表面,及配体朝

向远离所述核心。在一些实施方案中,LA:GA比率为60%/40%至40%/60%,并且在一些实施方案中,为约50%/50%。在一些实施方案中,所述PLGA的分子量为约25K至约35K(如,约30K),并且所述PEG的分子量为约3K至约10K,诸如约5K。在一些实施方案中,所述核心颗粒的直径为约150nm或约200nm。

[0077] 在一个可替代的实施方案中,所述支撑物可用含有一个或多个可用于通常通过连接子共价连接至适合的反应物的化学部分或官能团的聚合物涂覆。

[0078] 激活化学允许特异性、稳定连接分子至固体支撑物表面。存在可用于连接蛋白质官能团的多种方法。例如,常见的交联剂戊二醛可用于以两步工艺连接蛋白胺基团至胺化固体支撑物编码。所得的键对水解是稳定的。其它方法包括使用含有与在蛋白上的胺反应的n-羟基-琥珀酰亚胺基(NHS)酯的交联剂、含有与含胺-、含巯基-或含组氨酸的蛋白反应的活性卤素的交联剂、含有与胺或巯基反应的环氧化物的交联剂,在马来酰亚胺基团与巯基之间缀合,以及通过高碘酸盐氧化侧接糖部分、然后通过还原性胺化形成蛋白醛基。

[0079] 特定蛋白连接至固体支撑物表面可通过直接偶联蛋白或通过使用间接方法实现。当偶联至连接子或间隔子蛋白诸如抗-小鼠IgG或链霉亲和素时,某些蛋白将使其直接连接或缀合而其它蛋白或抗体保留更佳的功能活性。如果需要,则可使用连接子或连接蛋白。配体,诸如所述抗原呈递复合物和共刺激分子可经氨基酸取代修饰以允许化学缀合。

[0080] 相同固体支撑物上具体蛋白的比率可变化以提高固体支撑物在抗原或抗体呈递中的有效性。例如,抗原呈递复合物与抗-CD28的比率可为至少约30:1、或至少约10:1、约3:1、约1:1、约0.3:1;约0.1:1,和至少约0.03:1。在一些实施方案中,所述比率为约5:1、约4:1、约3:1、约2:1、或约1:1、约1:2、约1:3、约1:4或约1:5。偶联至所述支撑物的蛋白的总量可为至少10mg/ml、至少25mg/ml、至少50mg/ml、至少100mg/ml、至少150mg/ml或大于200mg/ml。在一些实施方案中,诸如那些采用具有表面官能团(如,马来酰亚胺或酯)的PLGA或PLGA-PEG颗粒,偶联至所述颗粒的蛋白总量可为1至10 μ g/mg的PLGA,或在一些实施方案中,2至6 μ g/mg PLGA。在一些实施方案中,所述颗粒的配体密度为约10³至约10⁵个配体/ μ m²,或在一些实施方案中约10⁴个配体/ μ m²。例如,对于尺寸在100至200nm范围内的纳米颗粒,所述纳米颗粒平均具有约100至约1500个配体,诸如约200至约1200个配体,或约400至约1000个配体,或约500至约800个配体。

[0081] 在各个实施方案中,本发明提供包含聚合物珠粒或颗粒、如本文所述的抗-CD28抗体,和/或抗原呈递复合物诸如如本文所述的人源化Ig HLA融合复合物的药物组合物。所述药物组合物可另外包含用于呈递至如所述的T细胞且可与缀合珠粒或颗粒共配制的抗原肽。在各个实施方案中,所述药物组合物是货架稳定的,并且在一些实施方案中,以用于在施用前复溶的冻干形式提供,或以另一种“现成”药物制剂提供。

[0082] 在一些实施方案中,本发明提供包含直径或平均直径为50至500nm的基于PLGA或PLGA-PEG的纳米颗粒和包含表面-缀合的抗-CD28抗体和抗原呈递复合物的药物组合物。所述抗-CD28抗体可为人源化抗体,如如本文所述的人源化抗体,并且可为抗体片段诸如单链可变片段。在一些实施方案中,所述抗原呈递复合物包含至少一个HLA抗原-结合槽。所述抗-CD28和HLA复合物可在相同反应中分别或一起偶联至所述颗粒。所述药物组合物可包含至少一种肽抗原,诸如肿瘤抗原(如,MART-1),并且其可与所述颗粒在无任何活性装载工艺

的情况下共配制。

[0083] 本文所述的药物组合物可通过向有需要的患者施用有效量的组合物用于免疫疗法,例如用于诱导抗原特异性细胞毒性T细胞形成的方法中。在一些实施方案中,所述患者是癌症患者。

[0084] 本文所述的基于颗粒的抗原呈递平台可通过任何适当途径施用给患者,包括静脉内施用、动脉内施用、皮下施用、皮内施用、淋巴管内施用和肿瘤内施用。患者包括人和兽医学患者。

[0085] 本发明的一些示例性实施方案描述如下。

[0086] 在一些实施方案中,本发明提供包含聚合物PLGA-PEG颗粒的药物组合物,所述聚合物PLGA-PEG颗粒的尺寸在约100至200nm范围内、表面电荷为约-0至-20mV(和在一些实施方案中-5至-15mV),和每个颗粒有约100至1500个蛋白质配体。在一些实施方案中,所述蛋白质配体各自通过硫氢基-马来酰亚胺化学偶联至所述颗粒。所述配体包括抗-CD28抗体配体群体和HLA配体群体及一种或多种用于呈递至T细胞的抗原肽。所述组合物包含用于静脉内、动脉内、皮下、真皮内、淋巴管内或肿瘤内施用的药学上可接受的载体。

[0087] 在一些实施方案中,所述颗粒基本上是球形或近似球形的。

[0088] 在一些实施方案中,所述PLGA是约50%乳酸(LA)和50%羟基乙酸(GA)的聚合物。

[0089] 在一些实施方案中,所述PLGA聚合物的分子量为约30K,并且所述PEG的分子量为约3K至约10K,诸如约5K。

[0090] 在一些实施方案中,所述组合物具有每个颗粒400至1000个配体。

[0091] 在一些实施方案中,所述抗-CD28抗体配体包含任选具有5至15个鼠科框架残基的人IGHV4-59种系框架,和任选具有3至15个鼠科框架残基的IGKV4-01种系框架。

[0092] 在一些实施方案中,所述抗-CD28是ScFv。

[0093] 在一些实施方案中,所述HLA是HLA-A*02:01,其可包含与铰链区上方的免疫球蛋白序列的融合物,足以提供二聚体HLA构建体。

[0094] 在一些实施方案中,所述组合物是经冻干的。

[0095] 具体而言,抗原呈递平台可用于治疗传染病、癌症或自身免疫性疾病患者,或向免疫抑制患者提供预防性保护。

[0096] 可治疗的传染病包括那些由细菌、病毒、朊病毒、真菌、寄生虫、蠕虫等引起的传染病。此类疾病包括AIDS、肝炎、CMV感染和移植后淋巴增生性疾病(PTLD)。CMV,例如,是器官移植患者中存在的最常见的病毒病原体,并且是经历骨髓或外周血液干细胞移植的患者中发病率和死亡率的主要起因(Zaia, Hematol. Oncol. Clin. North Am. 4, 603-23, 1990)。这是由于这些患者免疫受损的状况,这使得血清反应阳性患者中的潜伏性病毒重新激活或血清反应阴性个体机会性感染。当前治疗集中于使用抗病毒化合物诸如更昔洛韦,其具有缺点,其中最显著的是出现耐药性CMV。这些治疗的一种有用的替代者是预防性免疫治疗方案,其包括在启动移植程序之前产生来源于患者或适当供体的病毒特异性CTL。

[0097] PTLD发生在大比例的移植患者中,并由Epstein-Barr病毒(EBV)感染导致。EBV感染据信存在于约90%的美国成人人群中(Anagnostopoulos&Hummel, Histopathology 29, 291-2) 15, 1996)。活跃的病毒复制和感染被免疫系统阻止,但是如在CMV的情况下,由于移植疗法而免疫受损的个体丧失控制T细胞类群,这使得病毒重新激活。这代表了对移植方案

的严重妨碍。EBV还可参与多种血液学癌症和非血液学癌症中的肿瘤促进。在EBV与鼻咽癌之间还存在强相关性。因此,使用EBV-特异性T细胞预防性治疗为当前疗法提供了优良的替代方法。

[0098] 可根据本发明肿瘤的癌症包括黑素瘤,癌如结肠癌、头颈癌、十二指肠癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、导管癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌、肾癌、子宫内膜癌、胃癌、发育异常的口腔粘膜癌、息肉癌、侵入性口腔癌、非小细胞性肺癌、过渡和鳞状细胞泌尿癌等;神经恶性肿瘤,如神经母细胞瘤、神经胶质瘤等;血液学恶性肿瘤,如慢性骨髓性白血病、儿童急性白血病、非霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、恶性皮肤T细胞、蕈样霉菌病、非MF皮肤T-细胞淋巴瘤、淋巴瘤样丘疹病、富T细胞皮肤淋巴性增生、大疱性类天疱疮、盘状红斑狼疮、扁平苔癣等;等。参见,如,Mackensen等,Int.J.Cancer 86,385-92,2000;Jonuleit等,Int.J.Cancer 93,243-51,2001;Lan等,J.Immunotherapy 24,66-78,2001;Meidenbauer等,J.Immunol.170(4),2161-69,2003。

[0099] 在一些实施方案中,本发明提供通过施用本文所述的药物组合物以激活具有抗肿瘤活性的T细胞来治疗癌症(包括以上鉴定的那些癌症)的方法。在一些实施方案中,所述疗法与一种或多种免疫检查点抑制剂诸如纳武单抗(Nivolumab)、Pembrolizumab和伊匹单抗(Ipilimumab)一起提供。在一些实施方案中,另外的疗法是抗-CTLA4或抗-PD1或抗-PD-L1。另外的疗法或检查点抑制可通过其常规方案分别施用,或可作为本文所述的纳米颗粒或连接至单独类群的纳米颗粒的另外配体施用。在一些实施方案中,一种或多种免疫检查点抑制剂提供为起始疗法,和使用随后开始的本文所述的纳米颗粒的疗法,例如在约1至约8周的检查点抑制疗法后或在约2至约4周的检查点抑制疗法后。在一些实施方案中,一种或多种检查点抑制剂与纳米颗粒疗法同时提供,例如在疗法开始时和约每两周,或在疗法开始时和约每两周进行一种或多种检查点抑制剂及约每四周进行纳米颗粒疗法。在一些实施方案中,所述患者对检查点抑制疗法耐受,或者仅显示了对检查点抑制疗法的部分或短暂响应,并且本文所述的aAPC增强这些患者中的肿瘤消退。在另一些实施方案中,对于通常对检查点抑制疗法耐受的癌症,本文所述的组合物扩大了成功使用针对此类癌症的检查点抑制剂。

[0100] 在一些实施方案中,所述肽抗原是基于患者的个性化基础、基于对患者肿瘤的分析选择的。例如,可使用Ionov Y.,A high throughput method for identifying personalized tumor-associated antigens,Oncotarget 1(2):148-155(2010)(其在此通过引用并入)所述的方法,或其它方法。在这些实施方案中,可提供所述纳米颗粒(基于“现成”),并且基于个性化基础选择和装载肿瘤抗原。

[0101] 可治疗的自身免疫性疾病包括哮喘、全身性红斑狼疮、风湿性关节炎、I型糖尿病、多发性硬化、克罗恩氏病(Crohn's disease)、溃疡性结肠炎、银屑病、重症肌无力、古德帕斯彻氏综合症、格雷夫斯氏病、寻常性天疱疮、爱迪生氏病、疱疹样皮炎、乳糜泻和桥本氏甲状腺炎。

[0102] 抗原特异性辅助T细胞可用于激活巨噬细胞或激活B细胞以产生可用于例如治疗传染病和癌症的特异性抗体。产生抗体的B细胞本身还可用于该目的。

[0103] 本发明还提供编码本文所述的氨基酸序列的多核苷酸以及表达本文所述的氨基酸序列的宿主细胞。

[0104] 本发明通过以下非限制性实例进一步说明。

实施例

[0105] 实施例1:种系人源化可变区和人恒定区序列的设计

[0106] 该实施例尤其表明来自小鼠抗-CD28抗体模板的种系人源化(接枝的CDR)抗体的序列设计;人恒定区序列(包括含有S241P(Kabat编号)较链稳定突变、L248E(Kabat编号)突变以去除残余Fc γ 受体结合、及适于偶联抗体的Cys残基(S473C,Kabat编号)的人IgG4)的设计;潜在不结合至CD28的变体种系人源化抗体V结构域的设计;融合HLA-A*02:01至种系人源化抗体的不含有潜在T细胞表位的N-端的连接子序列的设计。

[0107] 起始抗-CD28抗体是鼠科9.3单克隆抗体(Tan等.J.Exp.Med.1993177:165)。9.3抗体V区的结构模型使用Swiss PDB产生,并分析以鉴别V区中可能对抗体结合性质必需的氨基酸。CDR内含有的所有残基(使用Kabat和Chothia定义)连同多个框架残基被认为对于结合具有潜在的重要性。抗-CD28的VH和Vk序列含有典型的框架(Fw)残基,并且CDR 1、2和3基序与许多鼠科抗体相当。

[0108] 对于人源化,人IGHV4-59种系Fw被选为重链的模板(参考由Tan等J.Immunol 2002169:1119-1125选择的IGHV3/OR16-10)。IGKV4-01种系Fw被选为轻链的模板。这些Fw都与其对应的鼠科VH和Vk序列具有62%同源性。将所述鼠科CDR接枝至这些Fw中,并且还纳入不同数量的鼠科Fw残基以产生三种人源化VH变体和三种人源化Vk变体(图1-6)。

[0109] 对于重链Fw,Fw1残基1和3被认为对于抗原结合较重要,因为它们与结合袋相邻,而残基6被认为影响 β 链支持残基1和3的构象及CDR3的构象。因此这些鼠科Fw残基保留在所有变体中。

[0110] 在Fw2中,残基37被认为对于维持VH与Vk之间的界面是重要的,而残基48被认为支持CDR2的构象;因此这两个残基都保留在所有变体中。

[0111] 在Fw3中,残基73、76和78直接接触CDR1,而残基71接触CDR1和CDR2两者;因此,这些残基可能为抗原结合所需(取决于CDR1和CDR2的贡献),并因此保留在所有变体中。残基71可有时通过影响残基71至78的构象而间接影响CDR1的构象,而残基82a和82c还可间接影响CDR2的构象。这些残基因此仅保留在VH1中。残基67和82在三维结构中相邻,并且相互作用以填充可影响CDR2的构象并潜在影响支持CDR 1和3的 β 链的空间。因此这些残基保留在变体VH1和VH2中。

[0112] 对于轻链Fw,Fw1残基3与结合袋相邻,并可直接参与抗原结合,而残基4直接支持CDR3的构象。因此,这些鼠科Fw残基保留在所有变体中。

[0113] 在Fw2中,残基49支持CDR2的构象,并且对于重链与轻链之间界面也是重要的,其中其直接支持重链CDR3的构象,因此保留在所有变体中。

[0114] 在Fw3中,残基85和87被认为对重链和轻链的界面是重要的,并且也支持CDR3构象并因此保留在所有变体中。残基80被认为潜在具有对CDR 2和3的构象存在间接影响,并且仅保留在Vk1中。残基70通过与轻链残基R24形成盐桥,并因此对Vk结构域具有重要构象影响。在抗-CD28中,该盐桥不存在(因为残基70是N而非D),并引入该相互作用可以是不利的;然而在鼠科中抗体N70被糖基化(NFS),并且在人源化期间移除这个将是有益的;因此所述鼠科N保留在Vk1和Vk2中,但在Vk3中改变为D。

[0115] 基于人IgG4/ κ 的恒定区序列经设计包含铰链稳定突变(S241P)和移除残余Fc γ 受体结合(L248E)的较低铰链中的突变。半胱氨酸残基还包含在Fc的C-端附近以用于化学偶联目的(S473C)。经修饰的IgG4重链恒定区序列示于图7中,连同 κ 轻链恒定区序列(图8)。

[0116] 另外的VH结构域设计为潜在不结合至CD28,并且该序列显示于图9中。对鼠科V区序列的分析表明(从小鼠种系V区的体突变的程度说)所述VH可能是CD28结合的主要贡献者。因此仅潜在非结合人源化VH变体经设计。该变体不含有任何小鼠Fw残基以重构正确的CDR构象,并且在CDRH3中在可能对结合是重要的残基处还含有三个突变(Y100A、Y100aA、Y100bA)。

[0117] 实施例2:用于融合HLA-A*02:01至人源化抗体的连接子的设计

[0118] 将用于融合HLA-A*02:01(IMGT登记号HLA00005)至人源化抗-CD28抗体N-端的连接子通过iTopeTM和TCEDTM构建并并入分析以去除潜在免疫原性。

[0119] iTopeTM软件预测了34个人MHC II类等位基因的开放式结合沟内肽的氨基酸侧链与特异性结合袋之间的有利相互作用(特别是袋位置;p1、p4、p6、p7和p9)。这些等位基因代表全球存在的最常见的HLA-DR等位基因,而没有权重由于任何特定种族人群中最主要存在的那些等位基因。二十个等位基因含有‘开放’p1构型,并且十四个含有‘闭合’构型,其中位置83处的甘氨酸被缬氨酸替代。关键结合残基的位置经由电脑模拟产生重叠横跨测试蛋白质序列的一个氨基酸的9聚体肽获得。与物理MHC II类结合实验的比较已显示iTopeTM可用于以高精度成功区别结合与不结合MHC II类分子的肽。经由电脑模拟产生的MHC II类结合分析的任何限制使用TCEDTM减少,所述TCEDTM含有来源于之前在EpiScreenTM离体T细胞表位作图测定中筛选的序列的大数据库肽(>10,000条肽)序列。因此TCEDTM可用于针对不相关的抗体和蛋白序列搜索任何测试序列,以寻找与实际离体免疫原性的相关性。

[0120] 使用iTopeTM对连接子序列分析是用横跨连接子序列的重叠9聚体进行的,针对34个MHC II类等位基因的每一个测试所述重叠9聚体。基于潜在‘命中’和与MHC II类分子的相互作用对每个9聚体评分。通过所述软件计算的所述肽得分在0至1之间。将产生高平均结合得分(在iTopeTM评分函数中>0.55)的非种系肽突出显示,并且如果 $\geq 50\%$ 的MHC II类结合肽(即34个等位基因中的17个)具有高结合亲和力(得分>0.6),则此类肽被定义为“混杂高亲和力”MHC II类结合肽(其被认为对于含有CD4+T细胞表位是高风险的)。其中 $\geq 50\%$ 的MHC II类结合肽(得分>0.55(但而非大部分>0.6))的肽被定义为“混杂中等亲和力”MHC II类结合肽。对所述序列的进一步分析使用TCEDTM进行。所述序列用于通过BLAST搜索询问TCEDTM以鉴定在之前EpiScreenTM研究中刺激T细胞响应的不相关蛋白的肽(T细胞表位)之间的任何高序列同一性。

[0121] 由Schneck等使用的序列包含两个连接子,一个在HLA-A*02:01的N-端处以与N-端信号序列连接,和一个在C-端用于融合至抗-CD28VH结构域(参见例如图9)。对于N-端连接子,从信号序列切割位点至连接子分析序列,并且所述序列包括HLA-A*02:01成熟蛋白的前8个氨基酸。对于C-端连接子,从HLA-A*02:01 $\alpha 3$ 结构域的末端8个氨基酸至连接子序列和抗-CD28VH结构域的多达前8个氨基酸分析序列。

[0122] 结合得分>0.6(高亲和力)的肽结合至大部分的(≥ 17)MHC II类等位基因(定义为混杂高亲和力粘合剂)。结合得分在0.55与0.6之间的中等亲和力粘合剂结合 ≥ 17 MHC II类等位基因。发现N-端连接子含有两条混杂MHC II类结合序列,一条高亲和力(在位置2处有

[0141] 通过ELISA筛选来自HC1::LC3转染的总共1,127个孔的人IgG表达。筛选来自HC2::LC3转染的总共612个孔。基于IgG浓度,对于HC1::LC3和HC2::LC3,分别将总共290个和101个细胞系放大到24-孔板。24小时产率测定用于选择最佳表达者以用于进一步分析。简而言之,将24-孔板以 5×10^5 个细胞接种在500 μ L新鲜培养基中。24小时后,上清液通过ELISA筛选。基于IgG浓度,对于HC1::LC3和HC2::LC3,分别将总共60和24个细胞系放大到6孔板。

[0142] 3-天特异性产率测定用于选择最佳表达者以用于进一步分析。简而言之,将6-孔板以 4×10^5 个细胞接种在1.5mL新鲜培养基中。在3天后,对细胞计数,并且通过ELISA筛选上清液。基于IgG浓度和生长,可计算以pg/细胞/天计的平均特定产率或SPR。基于相对SPR,对于HC1::LC3和HC2::LC3,分别总共20和10个细胞系放大到T-75烧瓶。以T-75规模重复3天SPR测定以选择最终细胞系用于悬浮液适应,并放大用于mAb生产。

[0143] 将针对每个mAb的五个细胞系放大至30-mL振动培养基并重新评估SPR和生长。保存(banked)所有悬浮物系。对于每个mAb表现最佳的细胞系经放大至转瓶培养基用于小规模生产。

[0144] 对于HLA-IgG4融合蛋白,构建pBFksr::HLA-IgG4::LC3双顺反子表达载体以用于STABLEFAST-NS0细胞系产生。载体图示于图15中。还为三顺反子表达载体创建了含有人 β 2微球蛋白基因的表达盒和载体,所述三顺反子表达载体编码所有三种融合蛋白亚基(人HLA-IgG4重链融合物、 α -CD28轻链[LC3]和人 β 2微球蛋白)。三顺反子构建体示于图16中。所有三个基因的表达在短暂HEK293培养物中通过上清液的ELISA和蛋白质印迹分析确认。

[0145] 实施例5:功能表征

[0146] 测试针对CD28的人源化单克隆抗体诱导刚分离的PBMC在mAb涂覆板上扩增的能力。如图17所示,人源化抗-CD28不是超激动剂。

[0147] 测试人源化单克隆抗体在人T-细胞系上染色CD28的能力。结果示于图18中。图18(A)显示了用鼠科抗-人CD8mAb(克隆9.3,同种型IgG2a)染色。黑色=未染色的细胞,红色=抗-IgG2a FITC,蓝色=抗-CD28+抗-IgG2a FITC。图18(B)显示了用人源化抗-CD28(同种型IgG4)染色。黑色=未染色的细胞,红色=抗-IgG4PE、蓝色=抗-CD28(35ng)+抗-IgG4PE、紫色=抗CD28(1 μ g)+抗-IgG4PE。用人源化抗-CD28染色可用克隆9.3mAb(未显示)阻断。

[0148] 在纯化HLA-Ig之后,抗原肽装载效率通过使用构象依赖性抗-HLA mAb的ELISA检查,以捕获肽装载的蛋白(如Immunology 17.2章中当前方案所述)。与非特异性肽(即MHC错误匹配)的0%相比,预期特异性肽的可再生装载效率(即正确的MHC限制)为~90%。

[0149] 通过引用并入

[0150] 本文参考的所有专利和公开物在此通过引用整体并入。

序列表

<110> 耐克西缪恩公司
 <120> 用于免疫疗法的组合物和方法
 <130> FCT150900-99
 <140> CN 201480046380.0
 <141> 2014-06-23
 <150> US 61/838,547
 <151> 2013-06-24
 <150> US 61/948,916
 <151> 2014-03-06
 <160> 34
 <170> PatentIn version 3.5
 [0001] <210> 1
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列(抗-CD28的人源化可变重序列)
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(360)
 <400> 1
 gag gtg aag ctg cag cag tca gga cct ggc ctg gtg aag ccc tca gag 48
 Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 acc ctg tcc ctc act tgt act gtc tct ggg ttt tca tta agc gac tat 96
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
 20 25 30
 ggt gtt cat tgg gtt cgc cag get cca gga aag gga ctg gag tgg ctg 144

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu	
35 40 45	
gga gta ata tgg gct ggt gga ggc acg aat tat aat tgg gct etc atg	192
Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met	
50 55 60	
tcc aga aag acc atc agc aaa gac aac tcc aag agc caa gtt ttc tta	240
Ser Arg Lys Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu	
65 70 75 80	
aaa atg aac agt ctg aca gct gct gac aca gcc gtg tat tac tgt gcc	288
Lys Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	
85 90 95	
aga gat aag gga tac tcc tat tac tat tct atg gac tac tgg ggc caa	336
Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
100 105 110	
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca	360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

[0002]

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 2

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
 50 55 60

Ser Arg Lys Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0003]

<210> 3

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 (抗-CD28 VH2)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 3

gag gtg aag ctg cag cag tca gga cct ggc ctg gtg aag ccc tca gag 48
 Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

acc ctg tcc ctc act tgt act gtc tct ggg ttt tca tta agc gac tat 96
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
 20 25 30

	ggt gtt cat tgg gtt cgc cag gct cca gga aag gga ctg gag tgg ctg	144
	Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu	
	35 40 45	
	gga gta ata tgg gct ggt gga ggc acg aat tat aat tcg gct ctc atg	192
	Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met	
	50 55 60	
	tcc aga aag acc atc agc aaa gac aac tcc aag agc caa gtt tcc tta	240
	Ser Arg Lys Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu	
	65 70 75 80	
	aaa atg agc agt gtg aca gct gct gac aca gcc gtg tat tac tgt gcc	288
	Lys Met Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	
	85 90 95	
	aga gat aag gga tac tcc tat tac tat tct atg gac tac tgg ggc caa	336
	Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
	100 105 110	
	ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca	360
[0004]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115 120	
	<210> 4	
	<211> 120	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 4	
	Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
	1 5 10 15	
	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr	
	20 25 30	
	Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu	

35	40	45
Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met		
50	55	60
Ser Arg Lys Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu		
65	70	75
Lys Met Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
85	90	95
Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	

[0005]

<210> 5
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列 (抗-CD28 VH3)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(360)

<400> 5

gag	gtg	aag	ctg	cag	cag	tca	gga	cct	ggc	ctg	gtg	aag	ccc	tca	gag	48
Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
1			5				10						15			

acc	ctg	tcc	ctc	act	tgt	act	gtc	tct	ggg	ttt	tca	tta	agc	gac	tat	96
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Asp	Tyr	
			20				25						30			

	ggt gtt cat tgg gtt cgc cag gct cca gga aag gga ctg gag tgg ctg	144
	Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu	
	35 40 45	
	gga gta ata tgg gct ggt gga ggc acg aat tat aat tcg gct ctc atg	192
	Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met	
	50 55 60	
	tcc aga gtg acc atc agc aaa gac aac tcc aag agc caa gtt tcc tta	240
	Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu	
	65 70 75 80	
	aaa ctg agc agt gtg aca gct gct gac aca gcc gtg tat tac tgt gcc	288
	Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	
	85 90 95	
	aga gat aag gga tac tcc tat tac tat tct atg gac tac tgg ggc caa	336
	Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
	100 105 110	
[0006]	ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca	360
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115 120	
	<210> 6	
	<211> 120	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 6	
	Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
	1 5 10 15	
	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr	
	20 25 30	

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0007]

<210> 7

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 (抗-CD28 VK1)

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (333)

<400> 7

gac atc gag ctc act cag tct cca gat tct ttg gct gtg tct cta ggg 48
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

gag aga gcc acc atc aac tgc aga gcc agt gag agt gtt gaa tat tat 96
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr

20	25	30	
gtc aca agt tta atg cag tgg tac cag cag aag cca gga cag cca ccc			144
Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
35	40	45	
aaa ctc ctc atc ttt gct gca tcc aac gta gaa tct ggg gtc cct gac			192
Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Asp			
50	55	60	
agg ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca aac ttc acc ctc acc atc tct			240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
65	70	75	80
tct ctg cag gag gag gat gtt gca atg tat ttc tgt cag caa agt agg			288
Ser Leu Gln Glu Glu Asp Val Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg			
85	90	95	
aag gtt cct tac acg ttc gga ggg ggg acc aag gtg gaa ata aaa			333
Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105	110	

[0008]

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr			
20	25	30	

Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
35	40	45	

Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Glu Glu Asp Val Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95

Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 9
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0009] <220>
 <223> 合成序列 (抗-CD28 VK2)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (333)

<400> 9
 gac atc gag ctc act cag tct cca gat tct ttg gct gtg tct cta ggg 48
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

gag aga gcc acc atc aac tgc aga gcc agt gag agt gtt gaa tat tat 96
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
 20 25 30

gtc aca agt tta atg cag tgg tac cag cag aag cca gga cag cca ccc 144
 Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

aaa ctc ctc atc ttt gct gca tcc aac gta gaa tct ggg gtc cct gac 192

Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

agg ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca aac ttc acc ctc acc atc tct 240
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

tct ctg cag gcc gag gat gtt gca atg tat ttc tgt cag caa agt agg 288
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95

aag gtt cct tac acg ttc gga ggg ggg acc aag gtg gaa ata aaa 333
 Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 10
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0010]

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
 20 25 30

Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95

Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

- <210> 11
- <211> 333
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成序列 (抗-CD28 VK3)

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1).. (333)

[0011]

<400> 11
 gac atc gag ctc act cag tct cca gat tct ttg gct gtg tct cta ggg 48
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 gag aga gcc acc atc aac tgc aga gcc agt gag agt gtt gaa tat tat 96
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
 20 25 30
 gtc aca agt tta atg cag tgg tac cag cag aag cca gga cag cca ccc 144
 Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 aaa ctc ctc atc ttt gct gca tcc aac gta gaa tct ggg gtc cct gac 192
 Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 agg ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc acc atc tct 240
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

	100	105	110	
	<210>	13		
	<211>	984		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	合成序列 (经修饰的恒定重序列)		
	<220>			
	<221>	CDS		
	<222>	(1).. (984)		
	<400>	13		
		gct tcc acc aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg		48
		Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg		
		1 5 10 15		
[0013]		agc acc tcc gag agc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac		96
		Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
		20 25 30		
		ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc		144
		Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
		35 40 45		
		ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc		192
		Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
		50 55 60		
		ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acg aag acc		240
		Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr		
		65 70 75 80		
		tac acc tgc aat gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag		288
		Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
		85 90 95		
		aga gtt gag tcc aaa tat ggt ccc cca tgc cca cca tgc cca gca cct		336
		Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
		100 105 110		

	gag ttc gag ggg gga cca tca gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag	384
	Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
	115 120 125	
	gac act ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg	432
	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
	130 135 140	
	gac gtg agc cag gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat	480
	Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
	145 150 155 160	
	ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc	528
	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe	
	165 170 175	
	aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac	576
	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	
	180 185 190	
[0014]	tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc	624
	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu	
	195 200 205	
	ccg tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga	672
	Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
	210 215 220	
	gag cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag	720
	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys	
	225 230 235 240	
	aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac	768
	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
	245 250 255	
	atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag	816
	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	
	260 265 270	
	acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc	864
	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser	
	275 280 285	

agg cta acc gtg gac aag agc agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca 912
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac aca cag aag agc 960
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

ctc tgc ctg tct ctg ggt aaa tga 984
 Leu Cys Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 14
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

[0015]

<400> 14

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
					85					90					95	
	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
					100					105					110	
	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
					115					120					125	
	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
										130					135	140
	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
										145					150	155
[0016]	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe
															165	170
	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
															180	185
	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu
															195	200
	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
															210	215
	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
															225	230
	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
															245	250

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Cys Leu Ser Leu Gly Lys
 325

[0017]

- <210> 15
- <211> 324
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成序列 (恒定 k 轻序列)

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(324)

<400> 15
 cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag 48
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc 96
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa 144
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35	40	45	
tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc			192
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
50	55	60	
acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag			240
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu			
65	70	75	80
aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg			288
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser			
85	90	95	
ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag			324
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
100	105		
<210> 16			
<211> 107			
[0018] <212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 16			
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu			
1	5	10	15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe			
20	25	30	
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln			
35	40	45	
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
50	55	60	

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Ala Ala Ala Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 19

<211> 733

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 (人源化 HLA-IgG4HC)

[0021]

<400> 19

Gln Val Gln Leu Thr Arg Glu Gly Ser Gly Ser His Ser Met Arg Tyr
 1 5 10 15

Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile
 20 25 30

Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp
 35 40 45

Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu
 50 55 60

Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser
 65 70 75 80

	Gln	Thr	His	Arg	Val	Asp	Leu	Gly	Thr	Leu	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Gln	
					85					90					95		
	Ser	Glu	Ala	Gly	Ser	His	Thr	Val	Gln	Arg	Met	Tyr	Gly	Cys	Asp	Val	
				100					105					110			
	Gly	Ser	Asp	Trp	Arg	Phe	Leu	Arg	Gly	Tyr	His	Gln	Tyr	Ala	Tyr	Asp	
			115					120					125				
	Gly	Lys	Asp	Tyr	Ile	Ala	Leu	Lys	Glu	Asp	Leu	Arg	Ser	Trp	Thr	Ala	
		130					135					140					
	Ala	Asp	Met	Ala	Ala	Gln	Thr	Thr	Lys	His	Lys	Trp	Glu	Ala	Ala	His	
	145					150					155					160	
[0022]	Val	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	Ala	Tyr	Leu	Glu	Gly	Thr	Cys	Val	Glu	Trp	
					165					170					175		
	Leu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Glu	Thr	Leu	Gln	Arg	Thr	Asp	
				180					185					190			
	Ala	Pro	Lys	Thr	His	Met	Thr	His	His	Ala	Val	Ser	Asp	His	Glu	Ala	
			195					200					205				
	Thr	Leu	Arg	Cys	Trp	Ala	Leu	Ser	Phe	Tyr	Pro	Ala	Glu	Ile	Thr	Leu	
		210					215					220					
	Thr	Trp	Gln	Arg	Asp	Gly	Glu	Asp	Gln	Thr	Gln	Asp	Thr	Glu	Leu	Val	
	225					230					235					240	
	Glu	Thr	Arg	Pro	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr	Phe	Gln	Lys	Trp	Ala	Ala	Val	
					245					250						255	

Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His
 260 265 270

Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Trp Ala Arg Glu Val Ser Glu Val
 275 280 285

Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu
 290 295 300

Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Val
 305 310 315 320

His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val
 325 330 335

[0023]

Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg
 340 345 350

Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu
 355 360 365

Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp
 370 375 380

Lys Gly Tyr Ser Ala Ala Ala Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 385 390 395 400

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 405 410 415

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 420 425 430

	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
				435				440					445			
	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
		450					455					460				
	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
	465					470					475				480	
	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser
				485						490					495	
	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys
			500						505					510		
[0024]	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
			515				520						525			
	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
	530						535					540				
	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
	545				550						555					560
	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
					565					570					575	
	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
			580						585					590		
	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
		595						600					605			

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
610 615 620

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
625 630 635 640

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
645 650 655

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
660 665 670

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
675 680 685

[0025]

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
690 695 700

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
705 710 715 720

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys Leu Ser Leu Gly Lys
725 730

<210> 20

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 (轻链 3(LC3 或 Vk3))

<400> 20

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
 20 25 30

Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95

[0026] Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 21

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 (重链 1(HC1))

<400> 21

[0027] Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
 50 55 60

Ser Arg Lys Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

[0028]

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

[0029] Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 22

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 (重链 2(HC2))

<400> 22

Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5					10					15	

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Asp	Tyr
			20					25						30	

Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu
		35					40					45			

[0030]

Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Met
	50					55					60				

Ser	Arg	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Ser	Leu
65					70					75					80

Lys	Met	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	

Arg	Asp	Lys	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105						110	

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
		115						120				125			

Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala
		130					135				140				

	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
	145	150	155	160
	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
		165	170	175
	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
		180	185	190
	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys			
		195	200	205
	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro			
		210	215	220
[0031]	Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val			
	225	230	235	240
	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
		245	250	255
	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu			
		260	265	270
	Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
		275	280	285
	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
		290	295	300
	Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
	305	310	315	320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

[0032] Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 23

Asp Tyr Gly Val His
1 5

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 24

Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
1 5 10 15

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

[0033]

<220>

<223> 合成序列

<400> 25

Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 26

Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln
1 5 10 15

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 27

Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0034] <220>
<223> 合成序列

<400> 28

Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 29

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 30

Ala Ala Ala Gly Gly
 1 5

<210> 31
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列 (N 端连接子)

[0035]

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(51)

<400> 31
 cag gtc caa ctg acg cgt gag ggg tcc ggc tct cac tcc atg agg tat 48
 Gln Val Gln Leu Thr Arg Glu Gly Ser Gly Ser His Ser Met Arg Tyr
 1 5 10 15

ttc 51
 Phe

<210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 32

Gln Val Gln Leu Thr Arg Glu Gly Ser Gly Ser His Ser Met Arg Tyr
 1 5 10 15

Phe

<210> 33

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 (C 端连接子)

[0036]

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(57)

<400> 33

gag ggt ttg ccc aag ccc ctc acc tgg gct cga gag gtg agc gag gtc 48
 Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Trp Ala Arg Glu Val Ser Glu Val
 1 5 10 15

aag ctg cag 57
 Lys Leu Gln

<210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 34

Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Trp Ala Arg Glu Val Ser Glu Val
1 5 10 15

[0037]

Lys Leu Gln

抗-CO28 VHH 序列

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GAGGTGAGCTGCACGACCTGGCCCTGGTGAACCTCCAGACCCCTCCCTCAGTCTGACCTGTCTGGCTTTCATYAGCCGACCTATGTTG
E Y K L Q Q S S P S L Y N P S E T L S L T C T V S Q F S L S D Y Q
15

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TTCATGGGTTCCGACGACTCCAGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC
Y N W V E Q A P Q Q N Q L E W L Q V I W A Q Q Q Q Y N Y N S K L S S L S S K A R A R
40

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GACCTCAGCCAAAGCAGCTCCAGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC
T I S N Q N S K S Q V F L K W S S L T Y A Q Q Y A Q Y Y C A S S C A R A G A R A S S A
70

310     320     330     340     350
TACTCTATATGCTATGAGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC
Y S Y Y Y S S S Q Y W S Q Q T L Y T V S
100 M S C S
110

```

根据 Kabat 的 CD88 定义和蛋白质序列编号。CD88 核苷酸和蛋白质序列以红色突出显示。

图1

抗-CD28 VK2 序列

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GACATCGAGCTCACTCAGTCTCAGATTTCTTGGCTGTGTCTCTAGGGGAGGAGGAGCCACCCATCAGATGCGAGAGTCCAGTCCAGTGTGTGATGATTTATTTTCA
15      25      35      45      55      65      75      85      95
D Y E L Y Q S P Q S L A V S L Q S R A T I N C R A S S Y S Y S Y Y Y Y
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
CAGCTTAAATGCNUTSSTACCAAGACAGGACGACCCACCAACTCTCTCTTGGTGCATGACCTGGACCTGGATCTGGGATCTGGGATCCCTGAGAGGATTTAG
15      25      35      45      55      65      75      85      95
T S L S Q W Y Q Q K P Q Q P R K L L I P A A S S V E S Q V F Q S F S
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TGGCAATGGGCTYGGGCAACTTCACCGCTCAGCATCTCTCTGTGGAGGACGAGGATGTTGCAATGTTATTTCTCGAGCAAGTGGGAGGATTCCTTAC
25      35      45      55      65      75      85      95
G S G S Q T N F T L T I S S L Q A E Q V A M Y F C Q Q S R K N Y R Y
310     320     330
AAGTTCCGAGGAGGAGCAGAGGATGAAATATAA
35      45      55
T F S S Q T K V E I K
110     118

```

根据 ¹GenBank 的 CDR 定义和蛋白质序列编号。CDR 核苷酸和蛋白质序列以红色突出显示。

图5

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

图10

Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val
 225 230 235 240

Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val
 245 250 255

Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His
 260 265 270

Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Trp Ala Arg Glu Val Ser Glu Val
 275 280 285

Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu
 290 295 300

Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Val
 305 310 315 320

His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val
 325 330 335

Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg
 340 345 350

Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu
 355 360 365

Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp
 370 375 380

Lys Gly Tyr Ser Ala Ala Ala Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 385 390 395 400

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 405 410 415

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 420 425 430

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

图10,续

Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val
 225 230 235 240

Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val
 245 250 255

Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His
 260 265 270

Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Trp Ala Arg Glu Val Ser Glu Val
 275 280 285

Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu
 290 295 300

Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Val
 305 310 315 320

His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val
 325 330 335

Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg
 340 345 350

Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu
 355 360 365

Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp
 370 375 380

Lys Gly Tyr Ser Ala Ala Ala Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 385 390 395 400

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 405 410 415

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 420 425 430

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

图10,续

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
660 665 670

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
675 680 685

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
690 695 700

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
705 710 715 720

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys Leu Ser Leu Gly Lys
725 730

图10,续

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

图11

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

图12

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

图12,续

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

图13

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

图13,续

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

图13,续

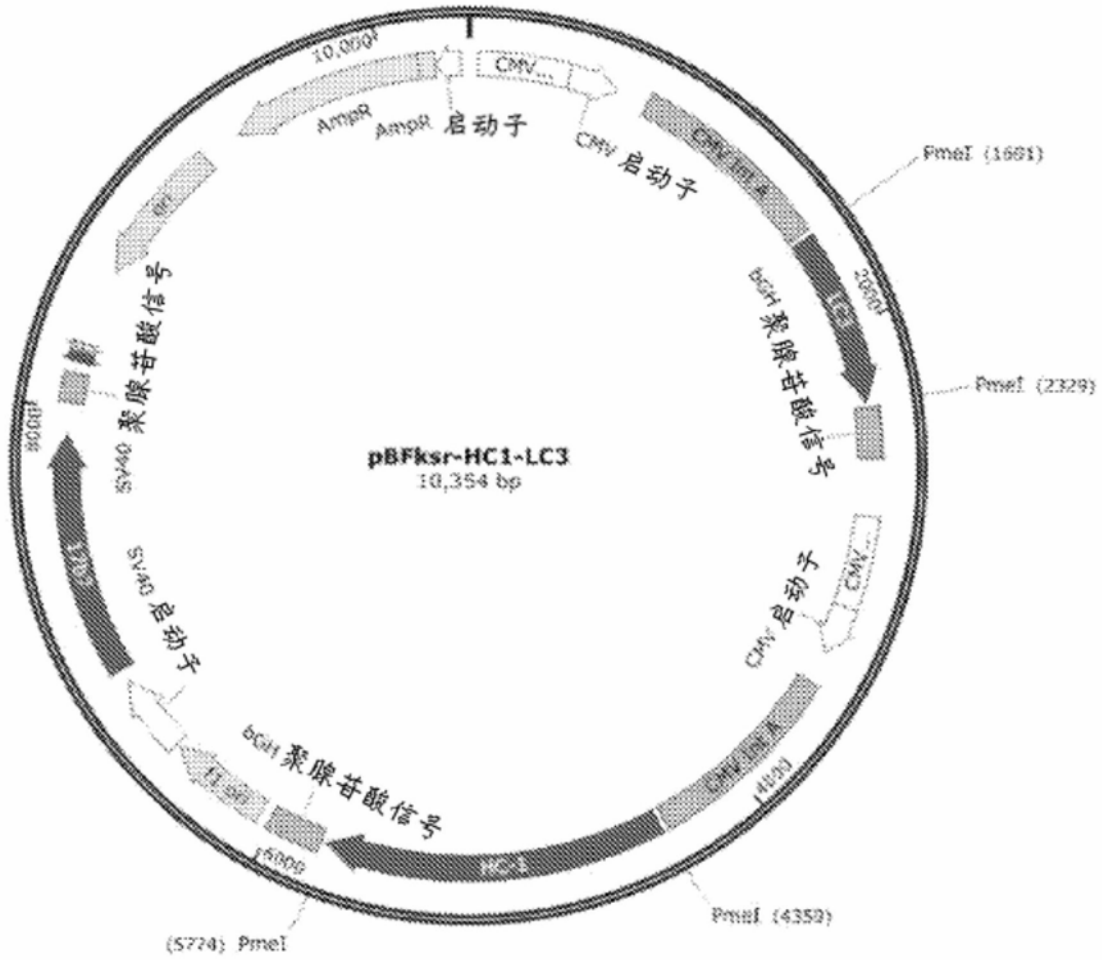


图14

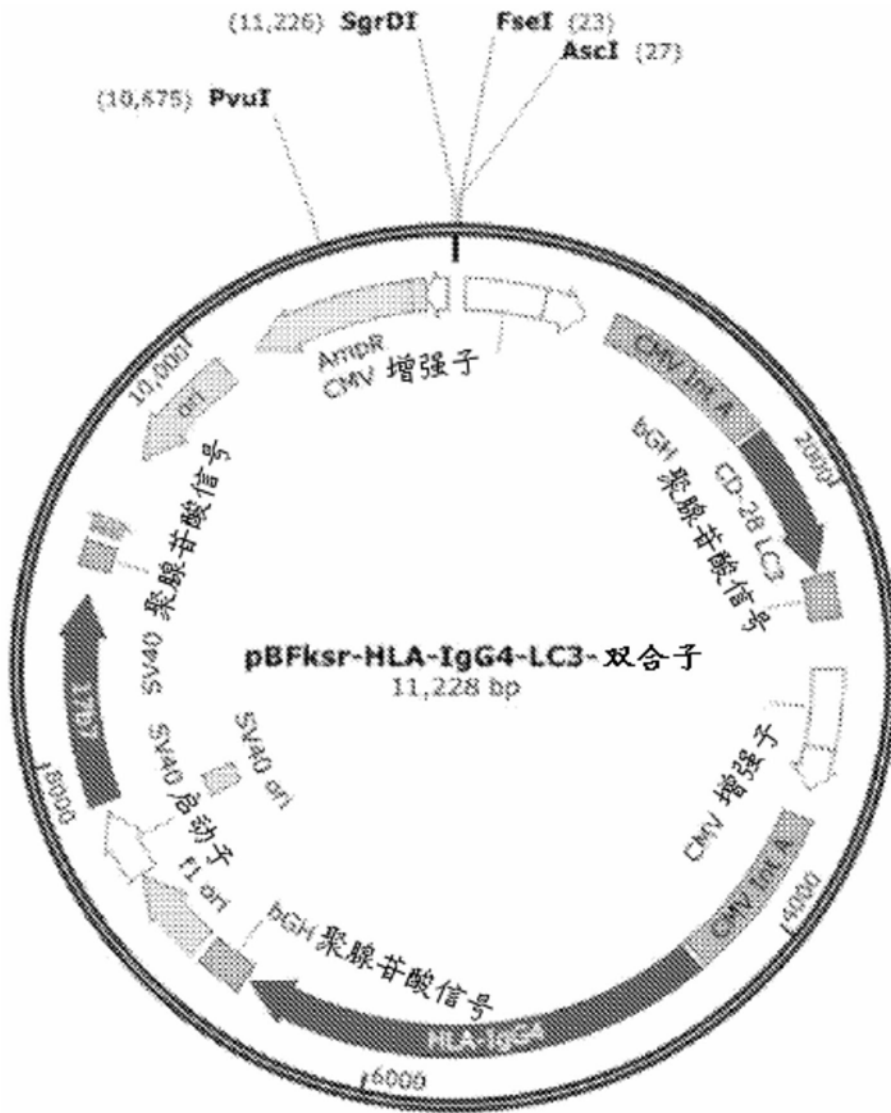


图15

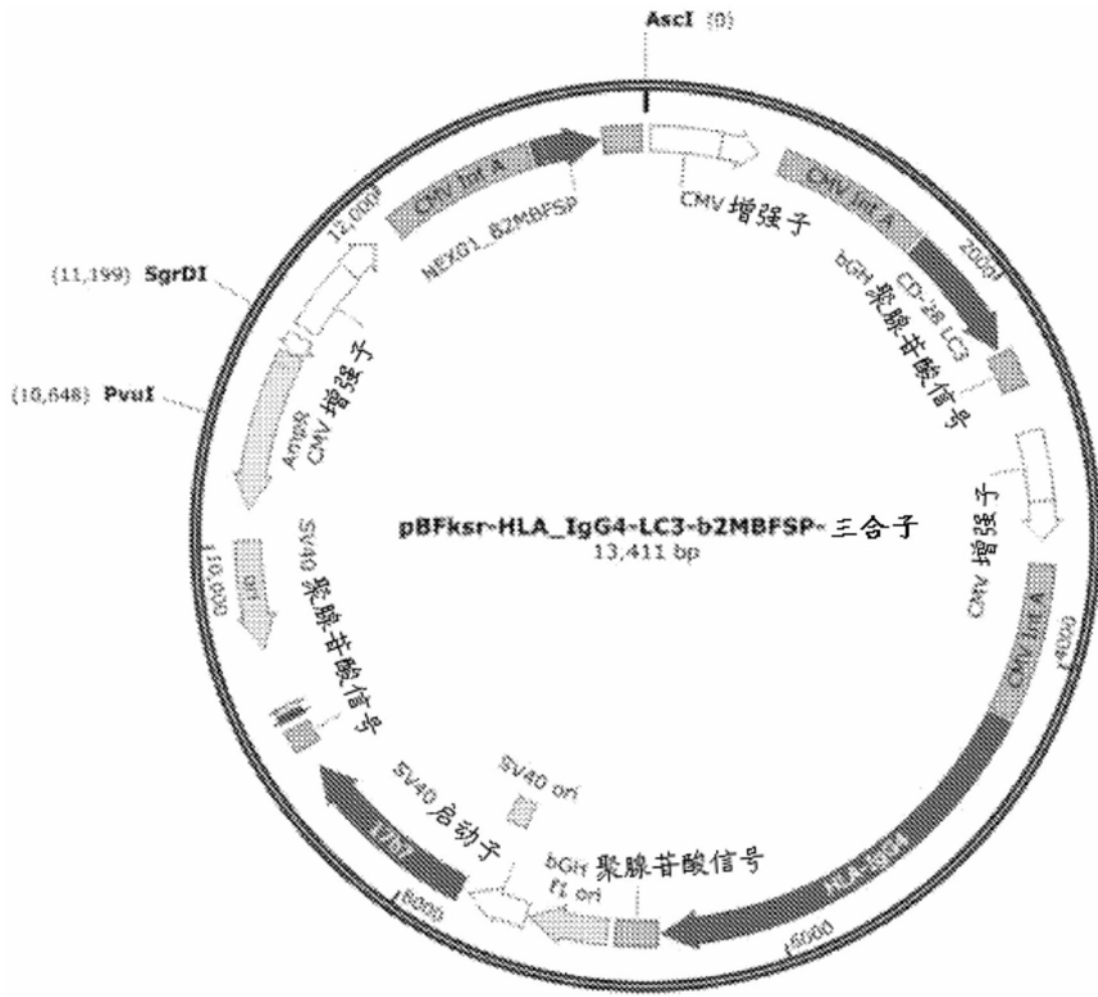


图16

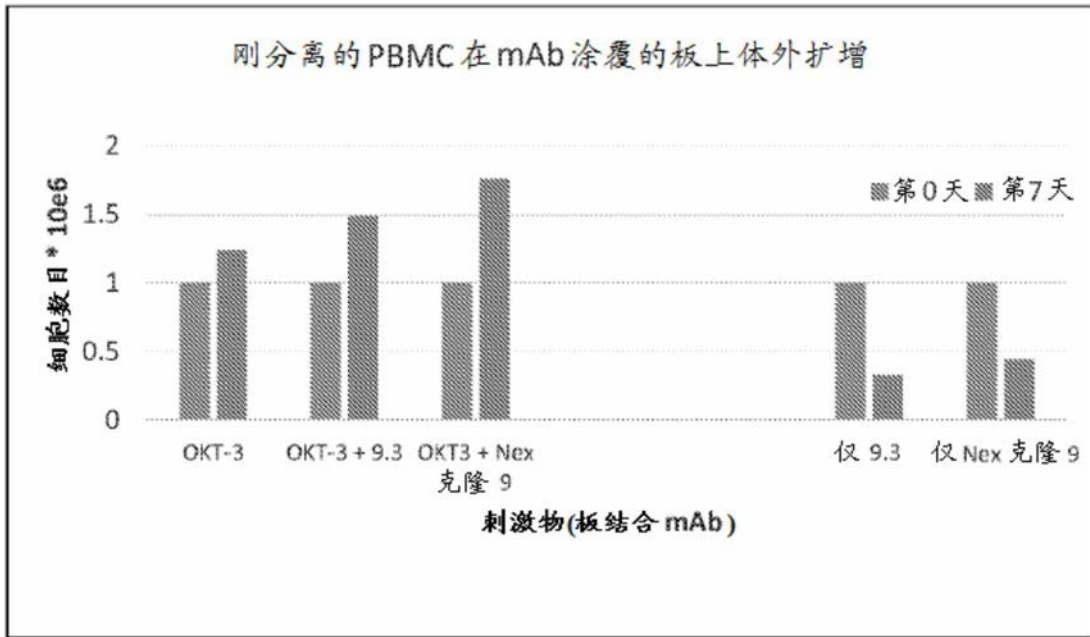


图17

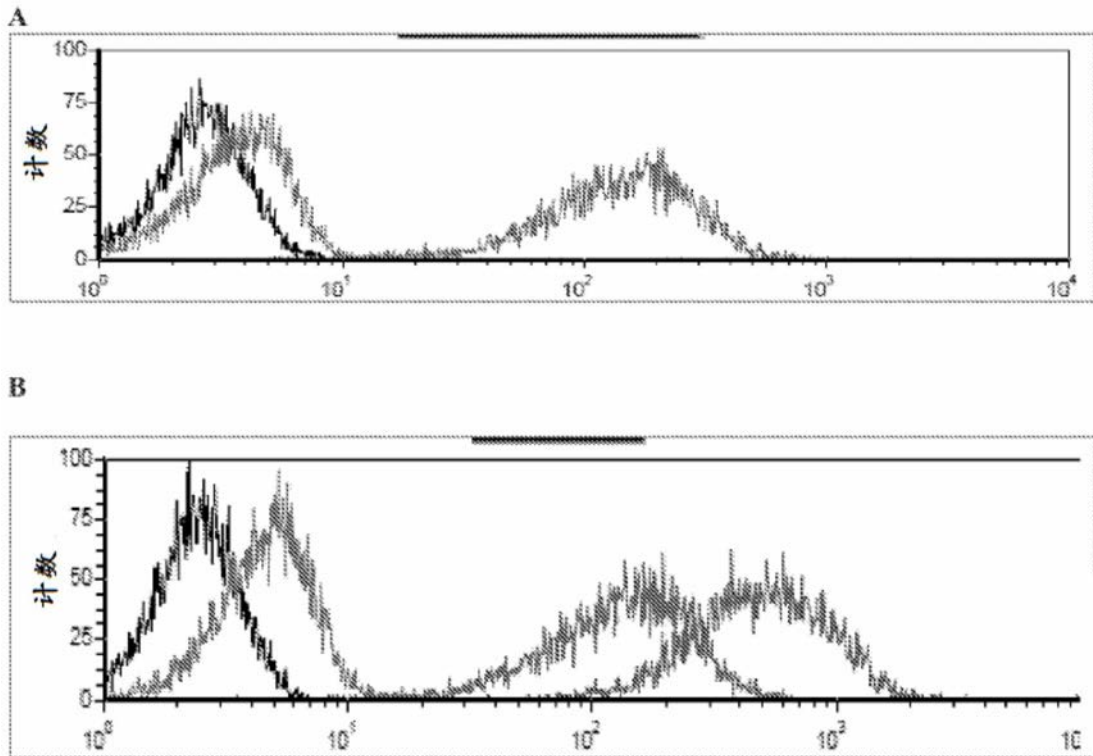


图18