

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

专利代理师 陶家蓉 杨昀

(51) Int.Cl.

C07K 14/745 (2006.01)

PCT/US2021/017714 2021.02.11

W02021/163369 EN 2021.08.19

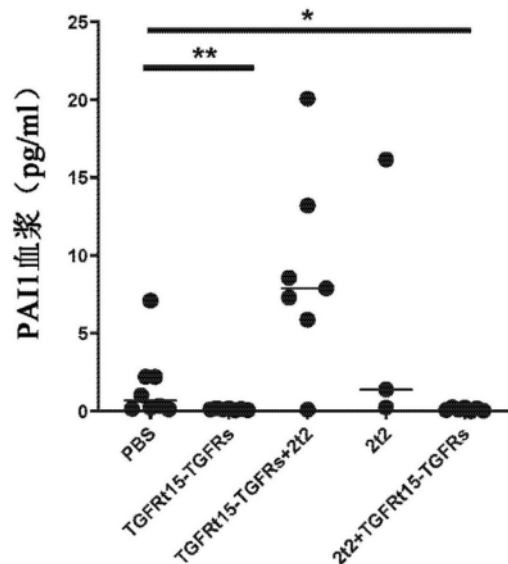
地址 美国佛罗里达州

(72)发明人 H·C·翁

权利要求书3页 说明书138页
序列表111页 附图95页

治疗年龄相关疾病和炎性疾病的方法

本文提供了治疗受试者中的衰老相关疾病或炎性疾病的方法,其包括(i)治疗有效量的NK细胞活化剂和/或NK细胞和/或单克隆抗体;以及(ii)治疗有效量的Treg细胞活化剂和/或Treg细胞和/或单克隆抗体和/或AGE抑制剂。



1. 一种治疗受试者中的衰老相关疾病或炎性疾病的方法,所述方法包含向所述受试者施用:

(i) 治疗有效量的NK细胞活化剂和/或NK细胞和/或单克隆抗体;以及

(ii) 治疗有效量的Treg细胞活化剂和/或Treg细胞和/或单克隆抗体和/或晚期糖基化终产物(AGE)抑制剂。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述衰老相关疾病是炎性衰老相关的。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中(i)在与(ii)基本上相同的时间施用于所述受试者。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在向所述受试者施用(ii)之前向所述受试者施用(i)。

5. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在向所述受试者施用(i)之前向所述受试者施用(ii)。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述方法包含向所述受试者施用治疗有效量的NK细胞。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述NK细胞是从外周血、脐带血分离的,或从iPSC分离和分化的自体、单倍体相合的或同种异体NK细胞。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述方法进一步包含:

从所述受试者中分离所述NK细胞;

在足以诱导或增加所述NK细胞增殖的条件下,在液体培养基中培养所述分离的NK细胞,

其中在所述分离和培养步骤之后,将所述NK细胞施用于所述受试者。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述液体培养基包含多链嵌合多肽。

10. 根据权利要求6至9中任一项所述的方法,其中所述NK细胞包含嵌合抗原受体。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述嵌合抗原受体包含与组织因子或CD26特异性结合的细胞外结构域。

12. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述方法包含向所述受试者施用治疗有效量的NK细胞活化剂和/或单克隆抗体。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述NK细胞活化剂是一种或多种多链嵌合多肽。

14. 根据权利要求12所述的方法,其中所述单克隆抗体是一种或多种抗组织因子抗体和/或抗CD26抗体。

15. 根据权利要求12所述的方法,其中所述NK细胞活化剂包含一种或多种多链嵌合多肽,并且所述单克隆抗体包含一种或多种抗组织因子抗体和/或抗CD26抗体。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述方法包含向所述受试者施用治疗有效量的Treg细胞。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述Treg细胞是从外周血或脐带血中分离的自体Treg细胞、单倍体相合的Treg细胞或同种异体Treg细胞。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述方法进一步包含:

从所述受试者中分离所述Treg细胞;

在足以诱导或增加所述Treg细胞增殖的条件下,在液体培养基中培养所述分离的Treg

细胞,

其中在所述分离和培养步骤之后,将所述Treg细胞施用于所述受试者。

19.根据权利要求18所述的方法,其中从所述受试者中分离所述Treg细胞的所述步骤包含从所述受试者获得包含Treg细胞的样品,以及使用能够结合CD39的抗体或配体从所述样品中分离所述Treg细胞。

20.根据权利要求19所述的方法,其中从所述样品中分离所述Treg细胞的所述步骤包含:

在允许所述抗体或配体与表达CD39的Treg细胞结合的条件下,将所述样品与能够结合CD39的所述抗体或配体混合;以及

将与所述抗体或配体结合的所述Treg细胞与所述样品中的其它组分离,从而分离所述Treg细胞。

21.根据权利要求19或20所述的方法,其中:

所述抗体是小鼠抗体、人源化抗体或人抗体或其抗原结合片段;和/或

所述抗体或所述配体用生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或荧光染料中的至少一种标记,或与颗粒、珠、树脂或固体支持物结合。

22.根据权利要求20所述的方法,其中所述分离包含使用流式细胞术、荧光活化细胞分选(FACS)、离心或基于柱、板、颗粒或珠的方法。

23.根据权利要求18至22中任一项所述的方法,其中所述 T_{reg} 细胞是从包含新鲜或冷冻的外周血、脐带血、外周血单核细胞、淋巴细胞、 $CD4^+$ T细胞或 T_{reg} 细胞的样品分离的自体 T_{reg} 细胞、单倍体相合的 T_{reg} 细胞或同种异体 T_{reg} 细胞。

24.根据权利要求18至23中任一项所述的方法,其中所述 T_{reg} 细胞是 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 细胞。

25.根据权利要求18至23中任一项所述的方法,其中所述 T_{reg} 细胞是 $CD4^+CD25^+CD127^{dim-}$ 细胞。

26.根据权利要求18至25中任一项所述的方法,其中所述 T_{reg} 细胞在体外和体内是免疫抑制性的。

27.根据权利要求18至26中任一项所述的方法,其中所述液体培养基包含一种或多种单链嵌合多肽。

28.根据权利要求16至27中任一项所述的方法,其中所述Treg细胞包含嵌合抗原受体。

29.根据权利要求28所述的方法,其中所述嵌合抗原受体包含与组织因子或CD36特异性结合的细胞外结构域。

30.根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述方法包含向所述受试者施用治疗有效量的Treg细胞活化剂和/或单克隆抗体和/或AGE抑制剂。

31.根据权利要求30所述的方法,其中所述Treg细胞活化剂是一种或多种单链嵌合多肽。

32.根据权利要求30所述的方法,其中所述单克隆抗体是抗组织因子抗体和/或抗CD36抗体中的一种或两种。

33.根据权利要求30所述的方法,其中所述AGE抑制剂是可溶性RAGE捕获剂。

34.根据权利要求30所述的方法,其中所述Treg细胞活化剂包含一种或多种单链嵌合

多肽,所述单克隆抗体包含一种或多种抗组织因子抗体和/或抗CD36抗体,并且所述AGE抑制剂包含一种或多种可溶性RAGE捕获剂。

35. 根据权利要求9、13或15所述的方法,其中所述多链嵌合多肽包含:

(a) 第一嵌合多肽,其包含:

(i) 第一靶标结合结构域;

(ii) 可溶性组织因子结构域;和

(iii) 一对亲和结构域中的第一结构域;

(b) 第二嵌合多肽,其包含:

(i) 一对亲和结构域中的第二结构域;和

(ii) 第二靶标结合结构域,

其中第一嵌合多肽和第二嵌合多肽通过一对亲和结构域中的第一结构域和第二结构域的结合而缔合。

36. 根据权利要求27、31或34所述的方法,其中所述单链嵌合多肽包含:

(i) 第一靶标结合结构域;

(ii) 可溶性组织因子结构域;和

(iii) 第二靶标结合结构域。

37. 根据权利要求1至37中任一项所述的方法,其中所述衰老相关病症选自以下组成的组:阿尔茨海默氏病、动脉瘤、囊性纤维化、胰腺炎中的纤维化、青光眼、高血压、特发性肺纤维化、炎症肠病、椎间盘退行性变、黄斑变性、骨关节炎、2型糖尿病、脂肪萎缩、脂肪营养不良、动脉粥样硬化、白内障、COPD、特发性肺纤维化、肾移植失败、肝纤维化、骨质量损失、心肌梗塞、少肌症、伤口愈合、脱发、心肌细胞肥大、骨关节炎、帕金森病、年龄相关的肺组织弹性损失、黄斑变性、恶病质、肾小球硬化症、肝硬化、NAFLD、骨质疏松症、肌萎缩性侧索硬化、亨廷顿氏病、脊髓小脑共济失调、多发性硬化、神经退行性变、中风、癌症、痴呆、血管疾病、感染易感性、慢性炎症,和肾功能障碍。

38. 根据权利要求1至37中任一项所述的方法,其中所述炎性疾病选自以下组成的组:类风湿性关节炎、炎症肠病、红斑狼疮、狼疮肾炎、糖尿病性肾病、CNS损伤、阿尔茨海默氏病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、克罗恩氏病、多发性硬化、格林-巴利综合征、银屑病、格雷夫斯病、溃疡性结肠炎和非酒精性脂肪性肝炎。

治疗年龄相关疾病和炎性疾病的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年2月11日提交的美国临时申请第62/975,141号的优先权,其通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及生物技术领域,并且更具体地,涉及治疗炎性疾病和年龄相关疾病的方法。

背景技术

[0004] 人类衰老与全身性炎症升高相关(Ferrucci等人,《血液(Blood)》105(6):2294-2299,2005;Dinarello,《美国临床营养学杂志(Am J Clin Nutr)》83(2):447S-455S,2006)。将炎症与衰老联系起来的过程称为炎性衰老(Franceschi等人,《美国纽约科学会年鉴(Ann N Y Acad Sci)》908:244-254,2000)。炎性衰老的特征在于慢性、低度、无菌炎症状态,并且其引起衰老细胞的积聚和炎症小体的持续活化。衰老过程与影响免疫系统的主要变化有关,并导致各种与衰老相关的病理。

[0005] 衰老细胞已经在许多不同疾病的发病机理中起着作用,这些疾病包括例如青光眼(Liton等人,2005)、特发性肺纤维化(IPF)(Yanai等人,2015;Schafer等人,2017)、动脉粥样硬化(Uryga和Bennett,2016;Childs等人,2016)、肝硬化/NAFLD(Krizhanovsky等人,2008;Kim等人,2013;Ogrodnik等人,2017;Wiemann等人,2002)、肾小球硬化症(Melk等人,2003;Melk等人,2004;Maker等人,2016)、2型糖尿病(Chen等人,2009;Helman等人,2016)、恶病质(Berry等人,2017;Xu等人,2015;Baker等人,2016)、少肌症(Sousa-Victor等人,2014;Cosgrove等人,2014;Chang等人,2016)、骨关节炎(Price等人,2002;Kuyinu等人,2016;Jeon等人,2017)、癌症(Latz等人,《免疫学研讨会(Sem.Immunol.)》40:61-73,2018)、关节炎(Latz等人,《免疫学研讨会(Sem.Immunol.)》40:61-73,2018)和神经退行性疾病(Latz等人,《免疫学研讨会(Sem.Immunol.)》40:61-73,2018)。

[0006] 免疫系统的功能是检测和应答组织损伤或致病微生物的入侵。先天免疫细胞是抵御感染的第一道防线,表达不同的种系编码的模式识别受体(PRR),其识别微生物特有的保守的病原体相关分子模式(PAMP)(Janeway,《冷泉港定量生物学研讨会(Cold Spring Harb Symp Quant Biol)》54Pt 1:1-13,1989;Gong等人,《自然免疫学评论(Nat Rev Immunol)》20(2):95-112,2020)。由破损或受损细胞释放的危险信号也被损伤相关分子模式(DAMP)的受体识别(Gong等人,《自然免疫学评论》20(2):95-112,2020)。PAMP和DAMP均可通过活化如Toll样受体(TLR)等经典PRR和多种种系编码的受体(如NOD样受体(NLR)、视黄酸诱导型基因I(RIG-I)样受体(RLR)、C型凝集素受体(CLR)和细胞内DNA传感器)来启动先天性免疫应答(Cao,《自然免疫学评论》16(1):35-50,2016)。DAMP也可被几种其它受体感知。这些包括晚期糖基化终产物受体(RAGE)(Hudson等人,《医学年度评论(Annu Rev Med)》69:349-364,2018;Teissier等人,《生物老年学(Biogerontology)》20(3):279-301,2019)、髓系细胞上

表达的触发受体 (TREM) (Ford等人,《免疫学目前视点 (Curr Opin Immunol)》21(1):38-46, 2009)、几种G蛋白偶联受体 (GPCR) (Heng等人,《药理学与毒理学年度回顾 (Annu Rev Pharmacol Toxicol)》54:227-249, 2014; Weiss等人,《免疫学趋势 (Trends Immunol)》39(10):815-829, 2018) 和离子通道 (Eisenhut等人,《弗吕格档案 (Pflugers Arch)》461(4): 401-421, 2011)。

[0007] DAMP引发的炎性应答被称为无菌炎症,因为它们不依赖于病原体感染 (Chen等人,《自然免疫学评论》10(12):826-837, 2010)。DAMP可以活化非免疫细胞和先天免疫细胞 (Chen等人,《自然免疫学评论》10(12):826-837, 2010)。这些细胞的活化导致细胞因子和趋化因子的产生,其继而募集炎性细胞并活化适应性免疫应答 (Chen等人,《自然免疫学评论》10(12):826-837, 2010)。还已知一些DAMP直接活化适应性免疫细胞 (Lau等人,《实验医学杂志 (J Exp Med)》202(9):1171-1177, 2005; Qin等人,《免疫学杂志 (J Immunol)》199(1):72-81, 2017)。虽然无菌炎症在组织修复和再生中发挥重要作用以在伤害性损伤后重建组织止血,但由于重复的组织损伤或响应于组织中存在的过量先天免疫触发而未解决的慢性炎症对宿主是有害的并且可能导致无菌炎性疾病,包括癌症、代谢障碍 (例如,糖尿病)、神经退行性疾病 (例如,阿尔茨海默氏病、帕金森病) 和自身免疫性疾病 (例如,多发性硬化) (Roh等人,《免疫网络 (Immune Netw)》18(4):e27, 2018)。

[0008] 炎症小体是大的多聚体蛋白质复合物,其包含胞质模式识别受体、含有半胱天冬酶募集结构域 (ASC) 的衔接蛋白细胞凋亡相关斑点样蛋白和半胱天冬酶-1 (Lamkanfi等人,《细胞 (Cell)》157(5):1013-1022, 2014)。它们在先天免疫细胞和其它细胞中的组装由多种刺激物触发并最终活化半胱天冬酶-1,然后半胱天冬酶-1将前IL-1 β 裂解成IL-1 β (Latz等人,《自然免疫学评论》13(6):397-411, 2013; Walsh等人,《神经系统科学自然评论 (Nat Rev Neurosci)》15(2):84-97, 2014)。迄今为止,已经发现了多种炎症小体。在所鉴定的各种炎症小体中,核苷酸结合寡聚化结构域,富含亮氨酸重复序列的受体 (NLR) 家族含热蛋白结构域3 (NLRP3) 炎症小体的特征最明显 (Swanson等人,《自然免疫学评论》19(8):477-489, 2019)。NLR被认为是病原体和危险信号的关键传感器。NLRP3炎症小体具有两步活化机制:“引发”,其需要诱导前IL-1 β 和NLRP3,以及“活化”,其中功能性炎症小体复合物在摄取PAMP或DAMP后组装。包括阿尔茨海默氏病 (Heneka等人,《自然 (Nature)》493(7434):674-678, 2013)、帕金森病 (Heneka等人,《神经系统科学自然评论》19(10):610-621, 2018), 和动脉粥样硬化 (Jin等人,《美国心脏学会杂志 (J Am Heart Assoc)》8(12):e012219, 2019) 等各种疾病的病理学与NLRP3炎症小体的过度活化有关。

[0009] 无菌炎症也可以由衰老细胞的积聚引起。细胞衰老被定义为不可逆的细胞周期停滞,其响应于细胞应激而发生并防止缺陷传递至下一代 (Collado等人,《自然综述癌症 (Nat. Rev. Cancer)》10(1):51-57, 2010; McHugh等人,《细胞生物学杂志 (J Cell Biol)》217(1):65-77, 2018)。细胞衰老在发育、组织止血和伤口愈合过程中起主要保护作用 (Munoz-Espin等人,《细胞 (Cell)》155(5):1104-1118, 2013; Storer等人,《细胞》155(5):1119-1130, 2013; Demaria等人,《发育细胞 (Dev Cell)》31(6):722-733, 2014; Yun等人,《E生命 (Elife)》4, 2015)。细胞衰老伴随有促炎表型。表型是指衰老相关分泌表型 (SASP) (McHugh等人,《细胞生物学杂志》217(1):65-77, 2018)。SASP的特征在于炎性细胞因子、趋化因子、生长因子和蛋白酶的释放。这通过自分泌和旁分泌信号传导增强细胞衰老,并募集和指导

免疫细胞清除衰老细胞。因此,细胞衰老和SASP是在细胞水平、组织水平和器官水平维持体内平衡的重要生理反应。然而,在持续损伤或衰老期间,衰老细胞的清除受到损害,并且功能失调的细胞积聚。来自这些未清除和积聚的衰老细胞的SASP是炎症因子的长期和慢性来源,这些炎症因子产生炎症微环境,导致多种病理表现(Munoz-Espin等人,《自然评论-分子细胞生物学(Nat Rev Mol Cell Biol)》15(7):482-496,2014;van Deursen,《自然》509(7501):439-446,2014;McHugh等人,《细胞生物学杂志》217(1):65-77,2018)。此外,一些SASP因子引发含有炎症小体的细胞,这增加了刺激慢性炎症小体活化以诱导无菌炎症的风险。

[0010] 动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病,由脂质代谢失衡和适应性不良的免疫应答引起,这种免疫应答是由载胆固醇的巨噬细胞在动脉壁中的积聚引起的。高脂血症在涉及趋化因子一趋化因子受体对和内皮粘附分子(包括选择素和粘附分子)的多步过程中增加了募集到小鼠动脉粥样硬化斑块的循环单核细胞的数量。募集的单核细胞在内膜中分化成巨噬细胞或树突细胞,在那里它们通过巨胞饮作用或清道夫受体介导的途径摄取致动脉粥样硬化脂蛋白。由此产生的泡沫细胞分泌促炎细胞因子和趋化因子,以及放大炎症应答并促进巨噬细胞趋化的滞留因子。这些积聚的巨噬细胞经历内质网应激,其如果延长则导致细胞凋亡。这种细胞死亡与有缺陷的胞葬作用结合,导致形成坏死核心,这是晚期斑块的特征(Moore等人,《自然免疫学评论》13:709-721,2013)。

[0011] 在人类中,低水平的循环Treg与增加的急性冠状动脉综合征的风险相关,并且在稳定斑块与不稳定斑块中发现较高数量的Treg(Dietel等人,《动脉粥样硬化(Atherosclerosis)》230:92-99,2013)。这些发现得到了对高胆固醇血症小鼠模型的研究的支持,这些研究表明在动脉粥样硬化进展期间,循环和斑块中的Treg数量下降和抑制功能降低(Maganto-Garcia等人,《循环(Circulation)》124:185-195,2011)。值得注意的是,使用抗CD25抗体或白喉毒素靶向消耗FoxP3⁺细胞在动脉粥样硬化进展的小鼠模型中消耗Treg会加剧疾病(Klingenberg等人,《临床研究杂志》123:1323-1334,2013),而Treg的过继转移会阻止疾病进展(Ait-Oufella等人,《自然医学》12:178-180,2006)。最近的研究表明,Treg通过抑制正在进行的巨噬细胞和T细胞促炎应答,以及将巨噬细胞再教育至促进组织修复和斑块收缩的促消退状态,从而使动脉粥样硬化消退。Treg对于M2-样巨噬细胞在消退斑块中的富集和许可关键的促消退巨噬细胞功能是必需的,包括清除凋亡细胞、产生专门的促消退脂质介质和上调感知这些消退介质的受体。Treg衍生的细胞因子,如IL-10和TGF- β ,可以抑制巨噬细胞的炎症应答,促进替代活化,并增加胞葬作用。M2巨噬细胞也可以分泌IL-10和TGF- β ,其反过来又可以维持iTreg,并且这种相互的相互作用可能协同促进斑块中的组织修复。与纤维帽中平滑肌细胞的增加相对应的消退斑块中的胞葬作用的Treg依赖性增加和坏死核心面积的减少表明Treg是实现促进斑块稳定性的组织修复功能的关键参与者(Sharma等人,《循环研究(Circ Res)》127:335-353,2020)。

[0012] 调节性T(Treg)细胞是对自身和非自身抗原的外周耐受性的重要介质(Sakaguchi等人,《细胞(Cell)》133(5):775-787,2008;Sakaguchi等人,《免疫学年度评论(Annu Rev Immunol)》38:541-566,2020)。Treg细胞通过抑制先天免疫细胞、抗原呈递细胞(APC)功能以及适应性B、CD4⁺或CD8⁺效应T(Teff)细胞应答的多种抑制机制实现这种免疫调节控制(Sakaguchi等人,《国际免疫学杂志(Int Immunol)》21(10):1105-1111,2009)。Treg细胞在

宿主中的整体免疫调节潜能中起着核心作用。Treg细胞发育、体内平衡或功能的改变可能使这些细胞易患多种疾病,包括过敏、自身免疫、移植排斥、癌症和对免疫疗法的应答(Sakaguchi等人,《免疫学年度评论》38:541-566,2020)。目前的研究集中在开发新的疗法以通过使用细胞因子和小分子量药物增强体内Treg细胞功能,以支持内源性Treg细胞增殖或活化,在自体过继性细胞疗法(ACT)中离体操作Treg细胞以促进自身免疫环境中的免疫调节,或抗原特异性Treg细胞,包括嵌合抗原受体Treg(CAR-Treg)细胞,以增强过敏性炎症中的耐受性(Ferreira等人,《自然——新药开发综述(Nat Rev Drug Discov)》18(10):749-769,2019)。在接受Treg细胞的患者中已经显示出优异的安全性(Esensten等人,《变态反应与临床免疫学杂志(JAllergy Clin Immunol)》142(6):1710-1718,2018)。早期临床研究显示了使用Treg细胞预防和治疗急性和慢性移植物抗宿主疾病的令人鼓舞的结果(Brunstein等人,《血液(Blood)》117(3):1061-1070,2011;Di Ianni等人,《血液》117(14):3921-3928,2011;Martelli等人,《血液》124(4):638-644,2014;Theil等人,《细胞疗法(Cytotherapy)》17(4):473-486,2015;Brunstein等人,《血液》127(8):1044-1051,2016)、自身免疫性和神经退行性疾病(Thonhoff等人,《神经病学、神经免疫学与神经炎症》5(4):e465,2018;Dall'Era等人,《关节炎风湿病(Arthritis Rheumatol)》71(3):431-440,2019)。

发明内容

[0013] 调节性T(Treg)细胞是宿主中对自身和非自身抗原的外周耐受性和整体免疫调节潜力的重要介质(Sakaguchi等人,《细胞》133(5):775-787,2008;Sakaguchi等人,《免疫学年度评论》38:541-566,2020)。Treg细胞通过多种抑制机制实现这种免疫调节控制。这些包括IL-2剥夺、抑制性细胞因子(即,IL-10和TGF- β)的分泌和通过与CTLA-4的高亲和力结合从抗原呈递细胞获得共刺激分子(Oberle等人,《免疫学杂志》179(6):3578-3587,2007;Tang等人,《自然免疫学(Nat Immunol)》9(3):239-244,2008;Zheng等人,《免疫学杂志》181(3):1683-1691,2008)。调节性Treg也利用三磷酸腺苷(ATP)一腺苷途径作为先天性和适应性免疫的关键调节剂。

[0014] CD39是广泛表达于免疫细胞(例如,Treg)、内皮细胞和肿瘤细胞上的显性外核苷酸酶,其将ATP和二磷酸腺苷(ADP)水解成一磷酸腺苷(AMP)(Moesta等人,《自然免疫学评论》20(12):739-755,2020)。然后AMP被CD73水解成腺苷。腺苷与其在免疫细胞上展示的受体A1、A2A、A2B和A3结合。A2A和A2B受体(A2AR和A2BR)是增加细胞内cAMP和PKA水平的Gs—偶联受体,以cAMP—依赖性方式在腺苷诱导的免疫抑制中起主导作用。A1和A3受体(A1R和A3R)是Gi/o—偶联受体,其降低有利于细胞活化的细胞内cAMP,因此通常被视为免疫促进腺苷受体。在人类中,A1R、A2AR和A3R显示出对腺苷的高亲和力,而A2BR具有显著较低的亲和力。A2A和A2BR在免疫细胞上表达(Feng等人,《国际癌症细胞(Cancer Cell Int)》20:110,2020)。最近,研究表明人CD39^{hi}调节性T细胞在炎性条件下表现出更强的稳定性、更高的Foxp3表达和抑制能力(Gu等人,《细胞与分子免疫学杂志(Cell Mol Immunol)》14(6):521-528,2017)。Treg细胞发育、体内平衡或功能的改变可能使这些细胞易患多种疾病,包括过敏、自身免疫、移植排斥、癌症和对免疫疗法的应答(Sakaguchi等人,《免疫学年度评论》38:541-566,2020)。目前的研究集中在开发新的疗法以通过使用细胞因子和小分子量

药物增强体内Treg细胞功能,以支持内源性Treg细胞增殖或活化,在自体过继性细胞疗法(ACT)中离体操作Treg细胞以促进自身免疫环境中的免疫调节,或抗原特异性Treg细胞,包括嵌合抗原受体Treg (CAR-Treg)细胞,以增强过敏性炎症中的耐受性(Ferreira等人,《自然——新药开发综述》18(10):749-769,2019)。本发明是一种方法,其使用Treg细胞来使炎症小体失活,然后随后使用由一种或多种免疫治疗剂活化的免疫细胞来减少个体中积聚的衰老细胞,以治疗炎性衰老和/或任何衰老相关病理。提供了一种抑制炎症小体相关疾病和抑制衰老相关疾病的方法。Treg细胞可以是在ACT环境中使用的体内增强的内源性Treg细胞或离体操作的Treg细胞。用于衰老细胞清除的免疫细胞可以通过体内免疫治疗剂活化或通过离体刺激和扩增方法生成以支持ACT给药。

[0015] 本发明是一种方法,其利用通过抑制炎症小体的活性(例如,使用2t2、抗组织因子抗体、RAGE(晚期糖基化终产物捕获剂)、抗CD36抗体,或过继性细胞疗法(例如,用2t2和3t28处理的免疫细胞、抗组织因子CAR-Treg细胞,或抗CD36 CAR Treg细胞)和减少衰老细胞的积聚(例如,使用抗组织因子抗体、抗CD26抗体,或抗CD36抗体,任选地进一步使用TGFRt15-TGFRs;TGFRt15-TGFRs;过继性细胞疗法(例如,用18t15-12s处理的免疫细胞、用18t15-12s和7t15-21s处理的免疫细胞、抗组织因子CAR NK细胞或抗CD26 CAR NK细胞))来减轻炎症的方法。该方法包括免疫疗法、针对炎症和衰老的mAb以及活化的和/或工程化的NK和T细胞的各种组合,以通过多个通道攻击炎性衰老以消除炎症的直接原因以及这些原因的潜在发展和维持。在一个实例中,炎症小体的抗炎方法由调节性T细胞驱动。另外,衰老细胞方法可以是NK细胞介导的。该方法解决了炎性衰老中的关键因素、慢性炎性活性和积聚衰老细胞的潜在贡献,衰老细胞产生维持炎症小体活性的衰老相关分泌表型(SASP)因子。

[0016] 提供了一种治疗炎症小体相关疾病和衰老细胞相关疾病的方法。Treg细胞可以是在ACT环境中使用的体内增强的内源性Treg细胞或离体操作的Treg细胞。用于衰老细胞清除的免疫细胞可以通过体内免疫治疗剂活化或通过离体刺激和扩增方法生成以支持ACT给药。

[0017] 本文提供了治疗受试者中的衰老相关疾病或炎性疾病的方法,其包括向所述受试者施用:(i)治疗有效量的NK细胞活化剂和/或NK细胞和/或单克隆抗体;以及(ii)治疗有效量的Treg细胞活化剂和/或Treg细胞和/或单克隆抗体和/或晚期糖基化终产物(AGE)抑制剂。

[0018] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,衰老相关疾病是炎性衰老相关的。在本文所述的任何方法的一些实施例中,(i)在与(ii)基本上相同的时间施用于受试者。在本文所述的任何方法的一些实施例中,在向受试者施用(ii)之前向受试者施用(i)。在本文所述的任何方法的一些实施例中,在向受试者施用(i)之前向受试者施用(ii)。

[0019] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,该方法包括向受试者施用治疗有效量的NK细胞。在本文所述的任何方法的一些实施例中,NK细胞是从外周血、脐带血分离的,或从iPSC分离和分化的自体、单倍体相合或同种异体NK细胞。本文所述的任何方法的一些实施例进一步包括:从受试者中分离NK细胞;以及在足以诱导或增加NK细胞增殖的条件下在液体培养基中培养分离的NK细胞,其中在分离和培养步骤之后,将NK细胞施用于受试者。在本文所述的任何方法的一些实施例中,液体培养基包括多链嵌合多肽。在本文所述的任何方

法的一些实施例中,NK细胞包含嵌合抗原受体。在本文所述的任何方法的一些实施例中,嵌合抗原受体包含与组织因子或CD26特异性结合的细胞外结构域。

[0020] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,该方法包含向受试者施用治疗有效量的NK细胞活化剂和/或单克隆抗体。在本文所述的任何方法的一些实施例中,NK细胞活化剂是一种或多种多链嵌合多肽。在本文所述的任何方法的一些实施例中,单克隆抗体是一种或多种抗组织因子抗体和/或抗CD26抗体。在本文所述的任何方法的一些实施例中,NK细胞活化剂包含一种或多种多链嵌合多肽,并且单克隆抗体包含一种或多种抗组织因子抗体和/或抗CD26抗体。

[0021] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,该方法包括向受试者施用治疗有效量的Treg细胞。在本文所述的任何方法的一些实施例中,Treg细胞是从外周血或脐带血中分离的自体Treg细胞、单倍体相合的Treg细胞或同种异体Treg细胞。在本文所述的任何方法的一些实施例中,该方法进一步包括:从受试者中分离Treg细胞;在足以诱导或增加Treg细胞增殖的条件下在液体培养基中培养分离的Treg细胞,其中在分离和培养步骤之后,将Treg细胞施用于受试者。

[0022] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,从受试者中分离Treg细胞的步骤包含从受试者获得包含Treg细胞的样品,以及使用能够结合CD39的抗体或配体从样品中分离Treg细胞。在本文所述的任何方法的一些实施例中,从样品中分离Treg细胞的步骤包含:在允许抗体或配体与表达CD39的Treg细胞结合的条件下,将样品与能够结合CD39的抗体或配体混合;以及将与抗体或配体结合的Treg细胞与样品中的其它组分离,从而分离Treg细胞。在本文所述的任何方法的一些实施例中,该抗体是小鼠抗体、人源化抗体或人抗体或其抗原结合片段;和/或抗体或配体用生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或荧光染料中的至少一种标记,或与颗粒、珠、树脂或固体支持物结合。在本文所述的任何方法的一些实施例中,分离包含使用流式细胞术、荧光活化细胞分选(FACS)、离心或基于柱、板、颗粒或珠的方法。

[0023] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,Treg细胞是从包含新鲜或冷冻的外周血、脐带血、外周血单核细胞、淋巴细胞、CD4⁺T细胞或Treg细胞的样品中分离的自体Treg细胞、单倍体相合的Treg细胞或同种异体Treg细胞。在本文所述的任何方法的一些实施例中,Treg细胞是CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺细胞。在本文所述的任何方法的一些实施例中,Treg细胞是CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}细胞。在本文所述的任何方法的一些实施例中,Treg细胞在体外和体内是免疫抑制性的。

[0024] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,液体培养基包含一种或多种单链嵌合多肽。在本文所述的任何方法的一些实施例中,Treg细胞包含嵌合抗原受体。在本文所述的任何方法的一些实施例中,嵌合抗原受体包含与组织因子或CD36特异性结合的细胞外结构域。

[0025] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,该方法包含向受试者施用治疗有效量的Treg细胞活化剂和/或单克隆抗体和/或AGE抑制剂。在本文所述的任何方法的一些实施例中,Treg细胞活化剂是一种或多种单链嵌合多肽。在本文所述的任何方法的一些实施例中,单克隆抗体是抗组织因子抗体和/或抗CD36抗体中的一种或两种。在本文所述的任何方法的一些实施例中,AGE抑制剂是可溶性RAGE捕获剂。在本文所述的任何方法的一些实施例中,

中,Treg细胞活化剂包含一种或多种单链嵌合多肽,单克隆抗体包含一种或多种抗组织因子抗体和/或抗CD36抗体,并且AGE抑制剂包含一种或多种可溶性RAGE捕获剂。

[0026] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,多链嵌合多肽包含:(a)第一嵌合多肽,其包含:(i)第一靶标结合结构域;(ii)可溶性组织因子结构域;以及(iii)一对亲和结构域的第一结构域;以及(b)第二嵌合多肽,其包含:(i)一对亲和结构域的第二结构域;以及(ii)第二靶标结合结构域,其中第一嵌合多肽和第二嵌合多肽通过该对亲和结构域的第一结构域和第二结构域的结合而缔合。

[0027] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,单链嵌合多肽包含:(i)第一靶标结合结构域;(ii)可溶性组织因子结构域;以及(iii)第二靶标结合结构域。

[0028] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,衰老相关病症选自以下组成的组:阿尔茨海默氏病、动脉瘤、囊性纤维化、胰腺炎中的纤维化、青光眼、高血压、特发性肺纤维化、炎性肠病、椎间盘退行性变、黄斑变性、骨关节炎、2型糖尿病、脂肪萎缩、脂肪营养不良、动脉粥样硬化、白内障、COPD、特发性肺纤维化、肾移植失败、肝纤维化、骨质量损失、心肌梗塞、少肌症、伤口愈合、脱发、心肌细胞肥大、骨关节炎、帕金森病、年龄相关的肺组织弹性损失、黄斑变性、恶病质、肾小球硬化症、肝硬化、NAFLD、骨质疏松症、肌萎缩性侧索硬化、亨廷顿氏病、脊髓小脑共济失调、多发性硬化、神经退行性变、中风、癌症、痴呆、血管疾病、感染易感性、慢性炎症,和肾功能障碍。

[0029] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,炎性疾病选自以下组成的组:类风湿性关节炎、炎性肠病、红斑狼疮、狼疮肾炎、糖尿病性肾病、CNS损伤、阿尔茨海默氏病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、克罗恩氏病、多发性硬化、格林-巴利综合征、银屑病、格雷夫斯病、溃疡性结肠炎和非酒精性脂肪性肝炎。

[0030] 如本文所用,术语“嵌合”是指多肽包括最初来源于两个不同来源(例如两种天然存在的不同蛋白质,例如来自相同或不同物种)的氨基酸序列(例如,结构域)。例如,嵌合多肽可包括来自至少两种不同的天然存在的人蛋白质的结构域。在一些实例中,嵌合多肽可包括作为合成序列的结构域(例如,scFv)和衍生自天然存在的蛋白质(例如,天然存在的人蛋白质)的结构域。在一些实施例中,嵌合多肽可包括至少两个不同的结构域,其为合成序列(例如,两个不同的scFv)。

[0031] “抗原结合结构域”是能够特异性结合到一种或多种不同抗原的一个或多个蛋白质结构域(例如,由来自单个多肽的氨基酸形成或由来自两个或两个多肽(例如,相同或不同的多肽)的氨基酸形成)。在一些实例中,抗原结合结构域可能以与天然存在的抗体相似的特异性和亲和力结合到抗原或表位。在一些实施例中,抗原结合结构域可以是抗体或其片段。在一些实施例中,抗原结合结构域可以包括替代支架。本文描述抗原结合结构域的非限制性实例。抗原结合结构域的另外的实例是本领域已知的。

[0032] “可溶性组织因子结构域”是指与缺少跨膜结构域和细胞内结构域的野生型哺乳动物组织因子蛋白(例如,野生型人组织因子蛋白)的段具有至少70%同一性(例如,至少75%同一性、至少80%同一性、至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性、至少99%同一性或100%相同)的多肽。本文描述可溶性组织因子结构域的非限制性实例。

[0033] 术语“可溶性白介素蛋白”在本文中用于指成熟并且分泌的白介素蛋白或其生物活性片段。在一些实例中,可溶性白介素蛋白可以包括与野生型成熟并且分泌的哺乳动物

白介素蛋白(例如,野生型人白介素蛋白)至少70%相同、至少75%相同、至少80%相同、至少85%相同、至少90%相同、至少95%相同、至少99%相同或100%相同的序列,并且保留其生物活性。本文描述可溶性白介素蛋白的非限制性实例。

[0034] 术语“可溶性细胞因子蛋白”在本文中用于指成熟并且分泌的细胞因子蛋白或其生物活性片段。在一些实例中,可溶性细胞因子蛋白可以包括与野生型成熟并且分泌的哺乳动物白介素蛋白(例如,野生型人白介素蛋白)至少70%相同、至少75%相同、至少80%相同、至少85%相同、至少90%相同、至少95%相同、至少99%相同或100%相同的序列,并且保留其生物活性。本文描述可溶性细胞因子蛋白的非限制性实例。

[0035] 术语“可溶性白介素受体”在本文中以最广泛的意义用于指一种多肽,其缺少能够结合一个或多个其天然配体(例如,在生理条件下,例如在室温下、在磷酸盐缓冲盐水中)的跨膜结构域(和任选的细胞内结构域)。例如,可溶性白介素受体可以包括与野生型白介素受体的细胞外结构域至少70%相同(例如,至少75%相同、至少80%相同、至少85%相同、至少90%相同、至少95%相同、至少99%相同或100%相同)的序列,并且保留其特异性结合到一个或多个其天然配体的能力,但缺少其跨膜结构域(并且任选地,还缺少其细胞内结构域)。本文描述可溶性白介素受体的非限制性实例。

[0036] 术语“可溶性细胞因子受体”在本文中以最广泛的意义用于指一种多肽,其缺少能够结合一个或多个其天然配体(例如,在生理条件下,例如在室温下、在磷酸盐缓冲盐水中)的跨膜结构域(和任选的细胞内结构域)。例如,可溶性细胞因子受体可以包括与野生型细胞因子受体的细胞外结构域至少70%相同(例如,至少75%相同、至少80%相同、至少85%相同、至少90%相同、至少95%相同、至少99%相同或100%相同)的序列,并且保留其特异性结合到一个或多个其天然配体的能力,但缺少其跨膜结构域(并且任选地,还缺少其细胞内结构域)。本文描述了可溶性细胞因子受体的非限制性实例。

[0037] 术语“抗体”在本文中以其最广泛的意义使用,并且包括某些类型的免疫球蛋白分子,其包括一个或多个特异性结合到抗原或表位的抗原结合域。抗体具体包括例如完整抗体(例如,完整免疫球蛋白)、抗体片段和多特异性抗体。抗原结合结构域的一个实例是由VH-VL二聚体形成的抗原结合结构域。本文描述抗体的另外的实例。抗体的另外的实例是本领域已知的。

[0038] “亲和力”是指抗原结合位点与其结合配偶体(例如,抗原或表位)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外说明,否则如本文所用,“亲和力”是指固有结合亲和力,其反映抗原结合结构域与抗原或表位的成员之间的1:1相互作用。分子X与其配偶体Y的亲和力可以通过解离平衡常数(K_D)表示。在下文中更详细地描述贡献于解离平衡常数的动力学组分。亲和力可以通过本领域已知的常见方法来测量,包括本文描述的方法。亲和力可以例如使用表面等离子体共振(SPR)技术(例如,BIACORE®)或生物层干涉测量术(例如,FORTEBIO®)来确定。确定对抗原结合结构域和其对应抗原或表位的亲和力的另外的方法是本领域已知的。

[0039] 如本文所用,“单链多肽”是指单条蛋白质链。

[0040] 如本文所用,“多链多肽”是指包含两个或更多个(例如三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)蛋白链(例如至少第一嵌合多肽和第二多肽)的多肽,其中两个或更多个蛋白链通过非共价键缔合形成四级结构。

[0041] 术语“一对亲和结构域”是以小于小于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (例如,小于 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、小于 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 、小于 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 或小于 $1 \times 10^{-11} \text{M}$)的 K_D 彼此特异性结合的两个不同的蛋白质结构域。在一些实例中,一对亲和结构域可以是一对天然存在的蛋白质。在一些实施例中,一对亲和结构域可以是一对合成蛋白质。本文描述亲和结构域对的非限制性实例。

[0042] 术语“表位”是指特异性结合到抗原结合结构域的抗原的一部分。表位可以例如由表面可接近的氨基酸残基和/或糖侧链组成,并且可以具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于,在存在变性溶剂的情况下,与前者的结合而非与后者的结合可能会丢失。表位可以包含直接参与结合的氨基酸残基和不直接参与结合的其他氨基酸残基。鉴定与抗原结合域结合的表位的方法是本领域已知的。

[0043] 术语“治疗”是指改善病症的至少一种症状。在一些实例中,所治疗的病症是癌症,并且改善癌症的至少一种症状包括减少异常增殖、基因表达、信号传导、翻译和/或因子的分泌。一般来说,治疗方法包括将治疗有效量的组合物给予需要或已确定为需要这种治疗的受试者,所述组合物减少病症的至少一种症状。

[0044] 除非另外定义,否则本文中使用的所有技术术语和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。本文描述了用于本发明的方法和材料;还可以使用其他在本领域已知的合适的方法和材料。材料、方法和实例仅是说明性的并且不旨在是限制性的。本文所提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其他参考文献通过全文引用的方式并入。在发生冲突的情况下,应以本说明书(包含定义)为准。

[0045] 本发明的其它特征和优点将通过以下详细描述和附图以及通过权利要求书变得显而易见。

附图说明

[0046] 图1显示多链嵌合多肽的示例图:(i) 第一嵌合多肽,其包括第一靶标结合结构域(A)、可溶性组织因子结构域、结构域亲和对中的第一结构域(可溶性白介素IL-15),和另外的靶标结合结构域(B);和(ii) 第二嵌合多肽,其包括结构域亲和对中的第二结构域(IL-15受体 α 寿司结构域)、第二靶标结合结构域(C)和另外的抗原结合结构域(D)。顶部草图描绘第一和第二嵌合多肽通过一对亲和结构域的缔合。底部示意图显示第一和第二嵌合多肽中结构域的顺序。

[0047] 图2显示多链嵌合多肽的示例图:(i) 第一嵌合多肽,其包括第一靶标结合结构域(A)、包括五个氨基酸取代以便去除可溶性组织因子与FVIIa的结合的可溶性组织因子结构域、结构域亲和对中的第一结构域(包括D8N或D8A氨基酸取代的可溶性白介素IL-15)和另外的靶标结合结构域(B);和(ii) 第二嵌合多肽,其包括结构域亲和对中的第二结构域(IL-15受体 α 寿司结构域)、第二靶标结合结构域(C)和另外的抗原结合结构域(D)。顶部草图描绘第一和第二嵌合多肽通过一对亲和结构域的缔合。底部示意图显示第一和第二嵌合多肽中结构域的顺序。在本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种的其它实施例中,可溶性组织因子结构域可包含可溶性野生型人组织因子结构域或由可溶性野生型人组织因子结构域组成(包含野生型人组织因子内的连续序列或由野生型人组织因子内的连续序列组成)。

[0048] 图3显示示例性IL-12/IL-15 α Su DNA构建体的示意图。

[0049] 图4显示示例性IL-18/TF/IL-15DNA构建体的示意图。

[0050] 图5显示示例性IL-12/IL-15 α Su与IL-18/TF/IL-15DNA构建体之间的相互作用的示意图。

[0051] 图6显示产生IL-18/TF/IL-15:IL-12/IL-15 α Su复合物(18t15-12s)的示例性IL-12/IL-15 α Su与IL-18/TF/IL-15融合蛋白之间的相互作用的示意图。

[0052] 图7显示来自抗TF抗体亲和柱的18t15-12s纯化洗脱的色谱图。

[0053] 图8显示在分析尺寸排阻柱上洗脱后,抗TF Ab/SEC纯化的18t15-12s蛋白的示例性色谱图,证明单体多蛋白18t15-12s复合物与蛋白质聚集体分离。

[0054] 图9显示二硫键还原后18t15-12s复合物的4-12%SDS-PAGE的实例。泳道1:SeeBlue Plus2标记;泳道2:抗组织因子抗体亲和柱纯化的18t15-12s(0.5 μ g);泳道3:抗组织因子抗体亲和柱纯化的18t15-12s(1 μ g)。

[0055] 图10显示去糖基化和未去糖基化18t15-12s的SDS PAGE分析。泳道1:抗组织因子抗体亲和柱纯化的18t15-12s(0.5 μ g),未去糖基化;泳道2:抗TF Ab纯化的18t15-12s(1 μ g),未去糖基化;泳道3:18t15-12s(1 μ g),去糖基化,泳道4:Mark12未染色的制造商。

[0056] 图11显示用于18t15-12s复合物的夹心ELISA,其包含抗人组织因子捕获抗体和生物素化抗人IL-12检测抗体(BAF 219)。

[0057] 图12显示用于18t15-12s复合物的夹心ELISA,其包含抗人组织因子捕获抗体和生物素化抗人IL-15检测抗体(BAM 247)。

[0058] 图13显示用于18t15-12s复合物的夹心ELISA,其包含抗人组织因子捕获抗体和生物素化抗人IL-18检测抗体(D045-6)。

[0059] 图14显示用于18t15-12s复合物的夹心ELISA,其包含抗人组织因子(I43)捕获抗体和抗人组织因子检测抗体。

[0060] 图15显示由18t15-12s复合物(空心方块)和重组IL-15(黑色方块)介导的IL-15依赖性32D β 细胞的增殖。

[0061] 图16显示18t15-12s复合物(空心正方形)内IL-18的生物活性,其中重组IL-18(黑色正方形)和重组IL-12(黑色圆)分别用作阳性和阴性对照。

[0062] 图17显示18t15-12s复合物(空心正方形)内IL-12的生物活性,其中重组IL-12(黑色圆)和重组IL-18(空心正方形)分别用作阳性和阴性对照。

[0063] 图18A和18B显示由18t15-12s复合物诱导的NK细胞上CD25的细胞表面表达和由18t15-12s复合物诱导的NK细胞的细胞表面CD69表达。

[0064] 图19显示由18t15-12s复合物诱导的NK细胞的细胞内干扰素 γ 表达的流式细胞术图。

[0065] 图20显示18t15-12s诱导的人NK细胞对K562细胞的细胞毒性。

[0066] 图21示出了示例性IL-7/IL-15 α Su DNA构建体的示意图。

[0067] 图22示出了示例性IL-21/TF/IL-15DNA构建体的示意图。

[0068] 图23示出了示例性IL-7/IL-15 α Su和IL-21/TF/IL-15DNA构建体之间相互作用的示意图。

[0069] 图24示出了产生IL-21/TF/IL-15:IL-7/IL-15 α Su复合物(21t15-7s)的示例性IL-7/IL-15 α Su和IL-21/TF/IL-15融合蛋白之间的相互作用的示意图。

[0070] 图25示出了扩增的NK细胞对K562人肿瘤细胞的细胞毒活性,其中用21t15-7s+抗

TF IgG1抗体刺激的NK细胞显示出比未用21t15-7s+抗TF IgG1抗体刺激的NK细胞更强的K562细胞特异性裂解。

[0071] 图26示出了示例性IL-21/IL-15R α Su DNA构建体的示意图。

[0072] 图27示出了示例性IL-7/TF/IL-15DNA构建体的示意图。

[0073] 图28示出了示例性IL-21/IL-15R α Su和IL-7/TF/IL-15DNA构建体之间相互作用的示意图。

[0074] 图29示出了产生IL-7/TF/IL-15:IL-21/IL-15R α SU复合物(7t15-21s)的示例性IL-21/IL-15R α Su和IL-7/TF/IL-15融合蛋白之间的相互作用的示意图。

[0075] 图30示出了抗TF IgG1抗体、7t15-21s和含有等量抗TF IgG1抗体和7t15-21s的复合物的尺寸排阻色谱(SEC)图谱。

[0076] 图31示出了从两个不同供体的血液(2×10^6 个细胞/mL)中分离的人NK细胞的耗氧率(OCR),单位为皮摩尔/分钟。

[0077] 图32示出了从两个不同供体的血液(2×10^6 个细胞/mL)中分离的人NK细胞的细胞外酸化率(ECAR),单位为mpH/分钟。

[0078] 图33示出了TGFRt15-TGFRs构建体的示意图。

[0079] 图34示出了TGFRt15-TGFRs构建体的另一个示意图。

[0080] 图35示出了TGFRt15-TGFRs和TGFR-F对TGFB β 1的抑制结果。

[0081] 图36A和36B示出了使用ELISA用相应的抗体检测TGFRt15-TGFRs中的IL-15和TGFB β RII的结果。

[0082] 图37是示出了在抗TF抗体树脂上结合和洗脱后,含有TGFRt15-TGFRs蛋白的细胞培养物上清液的色谱图的线图。

[0083] 图38示出了TGFRt15-TGFRs的分析SEC曲线图。

[0084] 图39示出了通过还原SDS-PAGE分析的去糖基化之前和之后的TGFRt15-TGFRs。

[0085] 图40A和40B示出了TGFRt15-TGFRs处理的和对照处理的小鼠的脾脏重量和免疫细胞类型的百分比。图40A示出了与PBS对照相比,用TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏重量。图40B示出了与PBS对照相比,用TGFRt15-TGFRs处理的小鼠中CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和NK细胞的百分比。

[0086] 图41A和41B示出了用TGFRt15-TGFRs处理的小鼠在92小时内的脾脏重量和免疫刺激。图41A示出了在处理16、24、48、72和92小时用TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏重量。图41B示出了在处理16、24、48、72和92小时用TGFRt15-TGFRs处理的小鼠中免疫细胞的百分比。

[0087] 图42A和42B示出了用TGFRt15-TGFRs处理的小鼠中Ki67和粒酶B随时间的表达。

[0088] 图43示出了在C57BL/6小鼠中通过TGFRt15-TGFRs增强脾细胞的细胞毒性。

[0089] 图44示出了胰腺癌小鼠模型中响应于PBS治疗、单独化疗、单独TGFRt15-TGFRs或化疗和TGFRt15-TGFRs组合的肿瘤尺寸变化。

[0090] 图45示出了从用TGFRt15-TGFRs处理的小鼠中分离的NK细胞的细胞毒性。

[0091] 图46示出了用18t15-12s、18t15-12s16和7t15-21s刺激后淋巴细胞群表面表型的变化。

[0092] 图47示出了用18t15-12s刺激后NK细胞中磷酸-STAT4和磷酸-STAT5水平的增加。

- [0093] 图48A至48C示出了用西方饮食喂养并用TGF α 15-TGF β s处理的ApoE $^{-/-}$ 小鼠中Treg、NK细胞和CD8 $^{+}$ T细胞的体内刺激。
- [0094] 图49A至49C示出了用TGF α 15-TGF β s处理后C57BL/6小鼠中的免疫刺激作用。
- [0095] 图50A和50B示出了用西方饮食喂养并用TGF α 15-TGF β s处理的ApoE $^{-/-}$ 小鼠中NK细胞和CD8 $^{+}$ T细胞增殖的体内诱导。
- [0096] 图51A和51B示出了用TGF α 15-TGF β s处理NK细胞后,NK细胞的细胞毒性增强。
- [0097] 图52A和52B示出了用TGF α 15-TGF β s处理NK细胞后,NK细胞的ADCC活性增强。
- [0098] 图53A至53H示出了TGF α 15-TGF β s加抗TRP1抗体(TA99)与化疗组合在黑素瘤小鼠模型中的抗肿瘤活性。
- [0099] 图54A至54C示出了通过TGF α 15-TGF β s对ApoE $^{-/-}$ 小鼠中西方饮食诱导的高血糖症的改善。
- [0100] 图55示出了细胞表面染色,总结了用18t15-12s刺激并在rhIL15中培养后NK细胞分化为细胞因子诱导的记忆样NK细胞(CIML-NK细胞)。
- [0101] 图56示出了用TGF α 15-TGF β s处理后CD44 ^{hi} 记忆T细胞的上调。
- [0102] 图57是示例性 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽的示意图。
- [0103] 图58是示出了示例性 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽从抗组织因子抗体亲和柱洗脱的色谱图。
- [0104] 图59是色谱,其显示了负载有示例性 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽的Superdex200 Increase 10/300GL凝胶过滤柱的洗脱。
- [0105] 图60是使用抗组织因子抗体亲和柱纯化的示例性 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(4至12% ν NuPage Bis-Tris凝胶)。
- [0106] 图61是示出了使用实例38中描述的方法进行的示例性 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽的ELISA定量的曲线图。纯化的组织因子用作对照。
- [0107] 图62是显示了示例性 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽刺激从两位供者的血液分离出的CD4 $^{+}$ T细胞表达CD25的能力的曲线图。如实例39所述进行实验。
- [0108] 图63是显示了示例性 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽刺激从两位供者的血液分离出的CD8 $^{+}$ T细胞表达CD25的能力的曲线图。如实例39所述进行实验。
- [0109] 图64是显示了示例性 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽刺激从两位供者的血液分离出的CD4 $^{+}$ T细胞表达CD69的能力的曲线图。如实例39所述进行实验。
- [0110] 图65是示例性IL-2/TF/IL-2单链嵌合多肽的示意图。
- [0111] 图66示出了使用32D β 细胞增殖测定,与重组IL-2相比,IL-2/TF/IL-2中的IL-2活性。
- [0112] 图67示出了使用CTLL-2细胞增殖测定,与重组IL-2相比,IL-2/TF/IL-2中的IL-2活性。
- [0113] 图68示出了用标准食物或高脂肪饮食喂养并用PBS对照(未处理)或用IL-2/TF/IL-2处理的ApoE $^{-/-}$ 小鼠的空腹血糖水平。
- [0114] 图69示出了用标准食物或高脂肪饮食喂养并用PBS对照(未处理)或用IL-2/TF/IL-2处理的ApoE $^{-/-}$ 小鼠的血液淋巴细胞中CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ T调节细胞的比率。
- [0115] 图70是示出了在抗TF抗体树脂上结合和洗脱后,含有IL-2/TF/IL-2蛋白的细胞培

养物上清液的色谱图的线图。

[0116] 图71示出了IL-2/TF/IL-2的分析SEC图。

[0117] 图72A和72B示出了IL-2/TF/IL-2在去糖基化前后的还原型SDS-PAGE分析。图16A显示了IL-2/TF/IL-2在脱糖基化之前的还原型SDS-PAGE分析。图16B显示了IL-2/TF/IL-2在脱糖基化之后的还原型SDS-PAGE分析。

[0118] 图73A和73B示出了使用IL-2/TF/IL-2对C57BL/6小鼠进行免疫刺激的结果。图73A示出了用IL-2/TF/IL-2处理后的脾脏重量。图73B示出了IL-2/TF/IL-2处理后免疫细胞类型的百分比。

[0119] 图74示出了用IL-2/TF/IL-2处理的小鼠中CD4⁺T细胞的CD25表达上调。

[0120] 图75示出了IL-2/TF/IL-2在C57BL/6小鼠中的药代动力学。

[0121] 图76A和76B示出了IL-2/TF/IL-2在减弱ApoE^{-/-}小鼠中高脂肪诱导的动脉粥样硬化斑块形成中的作用。图20A显示了喂食标准食物或高脂肪饮食且经PBS对照物或IL-2/TF/IL-2处理的ApoE^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化斑的代表性视图。图76B示出了每组动脉粥样硬化斑块的定量分析结果。

[0122] 图77示出了与对照处理的小鼠相比,IL-2/TF/IL-2处理的小鼠的空腹血糖水平。

[0123] 图78示出了用IL-2/TF/IL-2处理的小鼠和对照处理的小鼠的血液淋巴细胞中CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg的百分比。

[0124] 图79A至79C是示出了用2t2处理后C57BL/6小鼠中免疫刺激的一组曲线图。

[0125] 图80A至80C是示出了用西方饮食喂养并用2t2处理的ApoE^{-/-}小鼠中Treg、NK细胞和CD8⁺T细胞的体内刺激的一组曲线图。

[0126] 图81A和81B是示出了在C57BL/6小鼠中通过2t2诱导脾细胞增殖的一组曲线图。

[0127] 图82A和82B是示出了用西方饮食喂养并用2t2处理的ApoE^{-/-}小鼠中NK细胞和CD8⁺T细胞增殖的体内诱导的一组曲线图。

[0128] 图83A至83C是示出了通过2t2对ApoE^{-/-}小鼠中西方饮食诱导的高血糖症的改善的一组曲线图。

[0129] 图84示出了用2t2处理后CD44记忆T细胞的上调。

[0130] 图85A至85C示出了在CD4⁺CD25^{hi}T_{reg}细胞,CD4⁺CD25⁻T_{con}细胞或CD8⁺T_{con}细胞中响应于2t2或IL2处理的人血液淋巴细胞pStat5a应答。图85A示出了CD4⁺CD25^{hi}T_{reg}细胞中的pSTAT5应答。图85B显示了CD4⁺CD25⁻T_{con}细胞中的pSTAT5应答。图85C示出了CD8⁺T_{con}细胞中的pSTAT5应答。

[0131] 图86是示出了用PBS或TGFRt15-TGFRs和/或2t2处理后老龄小鼠的血浆血红蛋白A1C水平的曲线图。

[0132] 图87A至87C是示出了用PBS;TGFRt15-TGFRs;2t2;第0天第一剂TGFRt15-TGFRs,第60天第二剂2t2;或第0天第一剂2t2,第60天第二剂TGFRt15-TGFRs处理后老龄小鼠组织中衰老标志物(分别为IL-1α、IL-6和PAI-1)的基因表达水平的一组图。

[0133] 图88A示出了用于喂养ApoE^{-/-}小鼠以诱导NASH的实验设计的示意图。

[0134] 图88B是示出了对与ApoE^{-/-}小鼠肝脏中胶原积聚和纤维化相关的羟基脯氨酸含量的治疗效果曲线图。

[0135] 图89A是高脂肪饮食诱导的动脉粥样硬化动物模型的实验设计的示意图。

[0136] 图89B是示出了2t2处理对ApoE^{-/-}小鼠中IL-1 β 和MCP-1血浆细胞因子水平的影响的表格,其中在第二次注射后三天收集血浆样品。

[0137] 图90是示出了2t2处理对高脂肪饮食诱导的ApoE^{-/-}小鼠中甘油三酯血浆水平的影响的曲线图。

[0138] 图91是示出了2t2处理对高脂肪饮食诱导的ApoE^{-/-}小鼠中LDL血浆水平的影响的曲线图。

[0139] 图92是示出了施用2t2对高脂肪饮食诱导的ApoE^{-/-}小鼠体重的影响的曲线图。

[0140] 图93A至93E示出了用对照或高脂肪饮食喂养且未处理或用TGFRt15-TGFRs、2t2或21t15-TGFR处理的小鼠的示例性身体外观。

[0141] 图94A至94E是示出了用基于IL-2的分子(2t2)处理可诱导小鼠模型中脱毛后毛囊形成的一组图像。图94A是仅在剃毛后进行脱毛的对照小鼠的图像,图94B是其中脱毛后施用低剂量IL-2(1mg/kg)的小鼠的图像,图94C至94E示出了其中脱毛后施用0.3mg/kg(图94C)、1mg/kg(图94D)和3mg/kg(图94E)的2t2的小鼠的图像。黑色箭头表示生长期的毛囊,这些毛囊随后将延伸到真皮中并促进头发生长。

[0142] 图95示出了每个处理组每10个区域计数的毛发生长期毛囊的总数。

[0143] 图96是使用黑素瘤小鼠模型的实验设计的示例性示意图。

[0144] 图97A至97H是示出了施用TGFRt15-TGFRs对黑素瘤小鼠模型血液中NK/T细胞增殖、扩增和活化的影响的曲线图。

[0145] 图98A至98C是示出了TGFRt15-TGFRs处理对黑素瘤小鼠模型血浆中TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3水平的影响的曲线图。

[0146] 图99A至99E是示出了用地塞米松或TGFRt15-TGFRs和地塞米松的联合处理对黑素瘤小鼠模型中IL-2、IL-1 β 、IL-6和GM-CSF的血浆水平的影响的曲线图。

[0147] 图100A至100B是示出了用地塞米松或TGFRt15-TGFRs和地塞米松的联合处理对黑素瘤小鼠模型脾脏中NK细胞和CD8⁺T细胞水平的影响的曲线图。

[0148] 图101A至101C是示出了用盐水(黑线)、地塞米松(深灰线)或地塞米松、TGFRt15-TGFRs和TA99的联合处理(浅灰线)对脾细胞糖酵解活性的影响的一组曲线图。

[0149] 图102A至102L是用盐水、地塞米松或地塞米松、TGFRt15-TGFRs和TA99的联合处理对来自黑素瘤小鼠模型的脾细胞的糖酵解活性(糖酵解、糖酵解能力、糖酵解储备和非糖酵解酸化)的影响的一组曲线图。

[0150] 图103A至103C是示出了用PBS、地塞米松或地塞米松、TGFRt15-TGFRs和TA99的联合处理对来自黑素瘤小鼠模型的脾细胞的线粒体呼吸的影响的一组曲线图。

[0151] 图104A至104L是示出了用PBS、地塞米松或地塞米松、TGFRt15-TGFRs和TA99的联合处理对来自小鼠黑素瘤模型的脾细胞的线粒体呼吸(基础呼吸、最大呼吸、备用呼吸能力和ATP产生)的影响的一组曲线图。

[0152] 图105A至105H是示出了在黑素瘤小鼠模型中,用PBS、地塞米松或地塞米松、TGFRt15-TGFRs和TA99的联合处理对NK/Ki67细胞、CD8/Ki67细胞、NK细胞、CD8细胞、NK/CD25细胞、NK/粒酶B细胞、CD8/CD25细胞和CD8/粒酶B细胞浸润入黑素瘤肿瘤的影响的一组曲线图。

[0153] 图106A是黑素瘤小鼠模型中B16F10肿瘤中治疗诱导的衰老的实验设计的示意图。

[0154] 图106B至106E是示出了DTX处理对小鼠B16F10肿瘤细胞中衰老相关基因表达(分别为DPP4、IL-6、p16和p21)的影响的一组曲线图。

[0155] 图107A是黑素瘤小鼠模型中B16F10肿瘤中治疗诱导的衰老的实验设计的示意图。

[0156] 图107B至107C是示出了在黑素瘤肿瘤模型中,用盐水、地塞米松或地塞米松、TGF α 15-TGF α s和TA99的联合处理分别对B16F10肿瘤中p21和IL-6表达的影响的曲线图。

[0157] 图108A是示出了2t2或IL-2对含IL2 α 0K或含IL-2R0K的细胞增殖的影响的曲线图。

[0158] 图108B是示出了IL-2的2t2对人CD4⁺CD25⁺Treg pSTAT5和人CD8⁺T_{con} pSTAT5活化的影响的曲线图。

[0159] 图108C是示出了2t2或IL-2对人CD4⁺CD25⁺T_{con} pSTAT5或人CD56^{bright} NK pSTAT5活化的影响的曲线图。

[0160] 图108D是示出了2t2或IL-2对CD56^{dim} NK pSTAT5活化的影响的曲线图。

[0161] 图109A是研究在喂食西方饮食的ApoE^{-/-}小鼠中用2t2处理的效果的实验示意图。

[0162] 图109B是示出了施用2t2对喂食西方饮食的ApoE^{-/-}小鼠中CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞、CTLA4⁺Foxp3⁺Treg细胞和CD39⁺Foxp3⁺Treg细胞水平的影响的一组曲线图。

[0163] 图109C是示出了施用2t2对喂食西方饮食的ApoE^{-/-}小鼠中CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和CD3⁺NK1.1⁺NK细胞水平的影响的一组曲线图。

[0164] 图109D是示出了施用2t2对喂食西方饮食的ApoE^{-/-}小鼠中IL-10、MCP-1和TNF- α 的血浆水平的影响的一组曲线图。

[0165] 图109E是示出了施用2t2对喂食西方饮食的ApoE^{-/-}小鼠中血浆LDL胆固醇水平、空腹血糖水平和HOMA-IR指数的影响的一组曲线图。

[0166] 图110A至110D是示出了用PBS;TGF α t15-TGF α s;2t2;第0天第一剂TGF α t15-TGF α s,第60天第二剂2t2;或第0天第一剂2t2,第60天第二剂TGF α t15-TGF α s处理后老龄小鼠血浆中衰老标志物(分别为PAI1、IL-1 α 、CXCL1和IL-2)的蛋白表达水平的一组曲线图。

具体实施方式

[0167] 本文提供了治疗受试者中的衰老相关疾病或炎性疾病的方法,其包括:(i)治疗有效量的NK细胞活化剂和/或NK细胞和/或单克隆抗体;以及(ii)治疗有效量的Treg细胞活化剂和/或Treg细胞和/或单克隆抗体和/或晚期糖基化终产物(AGE)抑制剂。在一些实施例中,衰老相关疾病是炎性衰老相关的。

[0168] 治疗受试者中衰老相关疾病和炎性疾病的方法

[0169] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,(i)在与(ii)基本上相同的时间施用于受试者。在本文所述的任何方法的一些实施例中,在向受试者施用(ii)之前向受试者施用(i)。在本文所述的任何方法的一些实施例中,在向受试者施用(i)之前向受试者施用(ii)。

[0170] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,该方法包括向受试者施用治疗有效量的NK细胞。在一些实施例中,NK细胞是自体NK细胞。在一些实施例中,该方法可以进一步包括:从受试者中分离NK细胞;以及在足以诱导或增加NK细胞增殖的条件下在液体培养基中培养分离的NK细胞,其中在分离和培养步骤之后,将NK细胞施用于受试者。在一些实施例中,液体培养基包括一种或多种多链嵌合多肽(例如,本文所述的任何示例性多链嵌合多肽)。

[0171] 在一些实施例中,NK细胞包括嵌合抗原受体(例如,嵌合抗原受体包含与组织因子或CD26特异性结合的细胞外结构域)。

[0172] 在一些实施例中,该方法可以包括向受试者施用治疗有效量的NK细胞活化剂。在一些实施例中,NK细胞活化剂是一种或多种多链嵌合多肽(例如,一种或多种本文所述的任何多链嵌合多肽)。在一些实施例中,NK细胞活化剂是抗组织因子抗体、抗CD26抗体和/或抗CD36抗体中的一种或多种。在一些实施例中,NK细胞活化剂包括一种或多种多链嵌合多肽和抗组织因子抗体、抗CD26抗体和/或抗CD36抗体中的一种或多种。

[0173] 在一些实施例中,该方法包括向受试者施用治疗有效量的Treg细胞。在一些实施例中,Treg细胞是自体Treg细胞。在一些实施例中,该方法进一步包括:从受试者中分离Treg细胞;在足以诱导或增加Treg细胞增殖的条件下在液体培养基中培养分离的Treg细胞,其中在分离和培养步骤之后,将Treg细胞施用于受试者。在一些实施例中,液体培养基包括一种或多种单链嵌合多肽。

[0174] 在一些实施例中,Treg细胞包括嵌合抗原受体(例如,包括与组织因子或CD36特异性结合的细胞外结构域的嵌合抗原受体)。

[0175] 在一些实施例中,该方法包括向受试者施用治疗有效量的Treg细胞活化剂。在一些实施例中,Treg细胞活化剂是一种或多种单链嵌合多肽(例如,一种或多种本文所述的任何单链嵌合多肽)。在一些实施例中,Treg细胞活化剂是抗组织因子抗体和抗CD36抗体中的一种或两种。在一些实施例中,Treg细胞活化剂是可溶性RAGE捕获剂。

[0176] 在一些实施例中,Treg细胞活化剂包括一种或多种单链嵌合多肽和抗组织因子抗体、抗CD36抗体和可溶性RAGE捕获剂中的一种或多种。

[0177] 在一些实施例中,该方法包括向受试者施用治疗有效量的单克隆抗体。在一些实施例中,单克隆抗体包含可以直接或间接降低炎症小体或衰老细胞活性的抗组织因子抗体、抗CD36抗体和/或抗CD36抗体中的一种或多种。

[0178] 在一些实施例中,该方法包括向受试者施用治疗有效量的晚期糖基化终产物(AGE)抑制剂。在一些实施例中,晚期糖基化终产物(AGE)抑制剂包含一种或多种可以直接或间接降低炎症小体或衰老细胞活性的可溶性RAGE捕获剂。

[0179] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,衰老相关疾病是炎性衰老相关的。衰老相关疾病的非限制性实例选自以下组成的组:阿尔茨海默氏病、动脉瘤、囊性纤维化、胰腺炎中的纤维化、青光眼、高血压、特发性肺纤维化、炎性肠病、椎间盘退行性变、黄斑变性、骨关节炎、2型糖尿病、脂肪萎缩、脂肪营养不良、动脉粥样硬化、白内障、COPD、特发性肺纤维化、肾移植失败、肝纤维化、骨质量损失、心肌梗塞、少肌症、伤口愈合、脱发、心肌细胞肥大、骨关节炎、帕金森病、年龄相关的肺组织弹性损失、黄斑变性、恶病质、肾小球硬化症、肝硬化、NAFLD、骨质疏松症、肌萎缩性侧索硬化、亨廷顿氏病、脊髓小脑共济失调、多发性硬化、神经退行性变、中风、癌症、痴呆、血管疾病、感染易感性、慢性炎症,和肾功能障碍。

[0180] 炎性疾病的非限制性实例包括:类风湿性关节炎、炎性肠病、红斑狼疮、狼疮肾炎、肌萎缩性侧索硬化、糖尿病性肾病、CNS损伤、阿尔茨海默氏病、帕金森病、克罗恩氏病、多发性硬化、格林-巴利综合征、银屑病、格雷夫斯病、溃疡性结肠炎和非酒精性脂肪性肝炎。

[0181] 在一些实施例中,受试者可以是被鉴定或诊断为患有年龄相关疾病或患有慢性炎症的受试者。

[0182] 在一些实施例中,这些方法可导致受试者中衰老相关疾病的一种或多种症状的数量、严重性或频率的降低(例如,与治疗前受试者中癌症的一种或多种症状的数量、严重性或频率相比)。

[0183] 在一些实例中,该方法可导致受试者中衰老细胞的数量减少(例如,受试者中衰老相关疾病或病症所涉及和/或牵连的一种或多种特定组织中衰老细胞数量的减少)(例如,约1%减少至约99%减少、约1%减少至约95%减少、约1%减少至约90%减少、约1%减少至约85%减少、约1%减少至约80%减少、约1%减少至约75%减少、约1%减少至约70%减少、约1%减少至约65%减少、约1%减少至约60%减少、约1%减少至约55%减少、约1%减少至约50%减少、约1%减少至约45%减少、约1%减少至约40%减少、约1%减少至约35%减少、约1%减少至约30%减少、约1%减少至约25%减少、约1%减少至约20%减少、约1%减少至约15%减少、约1%减少至约10%减少、约1%减少至约5%减少、约5%减少至约99%减少、约5%减少至约95%减少、约5%减少至约90%减少、约5%减少至约85%减少、约5%减少至约80%减少、约5%减少至约75%减少、约5%减少至约70%减少、约5%减少至约65%减少、约5%减少至约60%减少、约5%减少至约55%减少、约5%减少至约50%减少、约5%减少至约45%减少、约5%减少至约40%减少、约5%减少至约35%减少、约5%减少至约30%减少、约5%减少至约25%减少、约5%减少至约20%减少、约5%减少至约15%减少、约5%减少至约10%减少、约10%减少至约99%减少、约10%减少至约95%减少、约10%减少至约90%减少、约10%减少至约85%减少、约10%减少至约80%减少、约10%减少至约75%减少、约10%减少至约70%减少、约10%减少至约65%减少、约10%减少至约60%减少、约10%减少至约55%减少、约10%减少至约50%减少、约10%减少至约45%减少、约10%减少至约40%减少、约10%减少至约35%减少、约10%减少至约30%减少、约10%减少至约25%减少、约10%减少至约20%减少、约10%减少至约15%减少、约15%减少至约99%减少、约15%减少至约95%减少、约15%减少至约90%减少、约15%减少至约85%减少、约15%减少至约80%减少、约15%减少至约75%减少、约15%减少至约70%减少、约15%减少至约65%减少、约15%减少至约60%减少、约15%减少至约55%减少、约15%减少至约50%减少、约15%减少至约45%减少、约15%减少至约40%减少、约15%减少至约35%减少、约15%减少至约30%减少、约15%减少至约25%减少、约15%减少至约20%减少、约20%减少至约99%减少、约20%减少至约95%减少、约20%减少至约90%减少、约20%减少至约85%减少、约20%减少至约80%减少、约20%减少至约75%减少、约20%减少至约70%减少、约20%减少至约65%减少、约20%减少至约60%减少、约20%减少至约55%减少、约20%减少至约50%减少、约20%减少至约45%减少、约20%减少至约40%减少、约20%减少至约35%减少、约20%减少至约30%减少、约20%减少至约25%减少、约25%减少至约99%减少、约25%减少至约95%减少、约25%减少至约90%减少、约25%减少至约85%减少、约25%减少至约80%减少、约25%减少至约75%减少、约25%至约70%减少、约25%减少至约65%减少、约25%减少至约60%减少、约25%减少至约55%减少、约25%减少至约50%减少、约25%减少至约45%减少、约25%减少至约40%减少、约25%减少至约35%减少、约25%减少至约30%减少、约30%减少至约99%减少、约30%减少至约95%减少、约30%减少至约90%减少、约30%减少至约85%减少、约30%减少至约80%减少、约30%减少至约75%减少、约30%减少至约70%减少、约30%减少至约65%减少、约30%减少至约60%减少、约30%减少至约55%减少、约

30%减少至约50%减少、约30%减少至约45%减少、约30%减少至约40%减少、约30%减少至约35%减少、约35%减少至约99%减少、约35%减少至约95%减少、约35%减少至约90%减少、约35%减少至约85%减少、约35%减少至约80%减少、约35%减少至约75%减少、约35%减少至约70%减少、约35%减少至约65%减少、约35%减少至约60%减少、约35%减少至约55%减少、约35%减少至约50%减少、约35%减少至约45%减少、约35%减少至约40%减少、约40%减少至约99%减少、约40%减少至约95%减少、约40%减少至约90%减少、约40%减少至约85%减少、约40%减少至约80%减少、约40%减少至约75%减少、约40%减少至约70%减少、约40%减少至约65%减少、约40%减少至约60%减少、约40%减少至约55%减少、约40%减少至约50%减少、约40%减少至约45%减少、约45%减少至约99%减少、约45%减少至约95%减少、约45%减少至约90%减少、约45%减少至约85%减少、约45%减少至约80%减少、约45%减少至约75%减少、约45%减少至约70%减少、约45%减少至约65%减少、约45%减少至约60%减少、约45%减少至约55%减少、约45%减少至约50%减少、约50%减少至约99%减少、约50%减少至约95%减少、约50%减少至约90%减少、约50%减少至约85%减少、约50%减少至约80%减少、约50%减少至约75%减少、约50%减少至约70%减少、约50%减少至约65%减少、约50%减少至约60%减少、约50%减少至约55%减少、约55%减少至约99%减少、约55%减少至约95%减少、约55%减少至约90%减少、约55%减少至约85%减少、约55%减少至约80%减少、约55%减少至约75%减少、约55%减少至约70%减少、约55%减少至约65%减少、约55%减少至约60%减少、约60%减少至约99%减少、约60%减少至约95%减少、约60%减少至约90%减少、约60%减少至约85%减少、约60%减少至约80%减少、约60%减少至约75%减少、约60%减少至约70%减少、约60%减少至约65%减少、约65%减少至约99%减少、约65%减少至约95%减少、约65%减少至约90%减少、约65%减少至约85%减少、约65%减少至约80%减少、约65%减少至约75%减少、约65%减少至约70%减少、约70%减少至约99%减少、约70%减少至约95%减少、约70%减少至约90%减少、约70%减少至约85%减少、约70%减少至约80%减少、约70%减少至约75%减少、约75%减少至约99%减少、约75%减少至约95%减少、约75%减少至约90%减少、约75%减少至约85%减少、约75%减少至约80%减少、约80%减少至约99%减少、约80%减少至约95%减少、约80%减少至约90%减少、约80%减少至约85%减少、约85%减少至约99%减少、约85%减少至约95%减少、约85%减少至约90%减少、约90%减少至约99%减少、约90%减少至约95%减少或约95%减少至约99%减少),例如,与治疗前受试者中衰老细胞的数量相比。

[0184] 术语“受试者”是指任何哺乳动物。在一些实施例中,受试者或“需要治疗的受试者”可以是犬科动物(例如,狗)、猫科动物(例如,猫)、马科动物(例如,马)、绵羊、牛、猪、山羊、灵长类动物,例如猿猴(例如,猴(例如狨猴、狒狒)或猿(例如,大猩猩、黑猩猩、猩猩或长臂猿)或人;或啮齿动物(例如,小鼠、豚鼠、仓鼠或大鼠)。在一些实施例中,受试者或“需要治疗的受试者”可以是非人哺乳动物,尤其可以采用常规用作证明在人中的治疗功效的模型的哺乳动物(例如,鼠、兔、猪、犬或灵长类动物)。

[0185] Treg细胞

[0186] 在一些实施例中,可以向受试者施用Treg细胞。在一些实施例中,施用于受试者的Treg细胞可以是从小周血或脐带血中分离的自体Treg细胞、单倍体相合的Treg细胞或同种

异体Treg细胞。在一些实施例中,本文所述的方法可以进一步包括从受试者中分离Treg细胞、在液体培养基中培养分离的Treg细胞,以及将Treg细胞施用回受试者。在一些实施例中,从受试者中分离Treg细胞包含从受试者获得包含Treg细胞的样品,以及使用能够结合CD39的抗体或配体从样品中分离Treg细胞。在一些实施例中,从样品中分离Treg细胞的步骤包含:在允许抗体或配体与表达CD39的Treg细胞结合的条件下,将样品与能够结合CD39的抗体或配体混合;以及将与抗体或配体结合的Treg细胞与样品中的其它组分分离,从而分离Treg细胞。在一些实施例中,该抗体是小鼠抗体、人源化抗体或人抗体或其抗原结合片段;和/或抗体或配体用生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或荧光染料中的至少一种标记,或与颗粒、珠、树脂或固体支持物结合。在一些实施例中,分离包含使用流式细胞术、荧光活化细胞分选(FACS)、离心或基于柱、板、颗粒或珠的方法。在一些实施例中,Treg细胞是从包含新鲜或冷冻的外周血、脐带血、外周血单核细胞、淋巴细胞、CD4⁺T细胞或Treg细胞的样品中分离的自体Treg细胞、单倍体相合的Treg细胞或同种异体Treg细胞。在一些实施例中,Treg细胞是CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺细胞。在一些实施例中,Treg细胞是CD4⁺CD25⁺CD127dim⁻细胞。在一些实施例中,Treg细胞在体外和体内是免疫抑制性的。

[0187] 在一些实施例中,可以使用商业上可获得的试剂盒(参见,例如,EasySep™人CD4⁺CD127^低CD25⁺调节性T细胞分离试剂盒或Dynabeads调节性CD4⁺CD25⁺T细胞试剂盒)分离Treg细胞。在一些实施例中,液体培养基可以包括一种或多种单链嵌合多肽(例如,本文所述的任何示例性单链嵌合多肽,例如,2t2或3t28)。在一些实施例中,液体培养基可以包括使用在其表面上具有CD3和CD28以及重组IL-2或2t2的珠。

[0188] 在一些实施例中,Treg细胞可以包含嵌合抗原受体(例如,包括与组织因子或CD36特异性结合的细胞外结构域的嵌合抗原受体)。可以与组织因子或CD36结合的细胞外结构域的非限制性实例是scFv。抗CD36抗体的非限制性实例可以商购自英杰公司(Invitrogen)、艾博抗公司(Abcam)、基因泰克公司(GeneTex)、诺伟司生物制品公司(Novus Biologicals)、Proteintech公司和默克密理博(EMD Millipore)。抗组织因子重链可变结构域和轻链可变结构域的非限制性实例描述于美国专利号7,968,094和美国专利号8,007,795中。嵌合抗原受体包括跨膜结构域、共刺激结构域(例如,细胞内CD28结构域)和CD3zeta信号传导结构域。例如,跨膜结构域可以包括与以下至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的序列:SEQ ID NO:1(FWVLVVGGVLACYSLVTVAFIIFWV)。例如,共刺激结构域可以包括与以下至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的序列:SEQ ID NO:2(RSKRSRLHSDYMNTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS)。例如,CD3zeta信号传导结构域可以包括与以下至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的序列:SEQ ID NO:3(RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR)。

[0189] Treg细胞活化剂

[0190] 在一些实施例中,可以向受试者施用一种或多种Treg细胞活化剂。在一些实施例中,Treg细胞活化剂可以是单链嵌合多肽(例如,本文所述的任何示例性单链嵌合多肽)、抗组织因子抗体(例如,美国专利号7,968,094和美国专利号8,007,795中所述的抗组织因子抗体)、可溶性RAGE蛋白或抗CD36抗体。

[0191] 可溶性RAGE蛋白可以具有与以下至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少

99%或100%相同的序列:SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5。

[0192] 可溶性人RAGE变体1(SEQ ID NO:4)

maagtavgaw vlvlslwgav vgaqnitari geplvlkckg apkkppqrle wklntgrtea

[0193] wkvlsppggg pwdsvarvlp ngslflpavg iqdegifrcq amnrngketk snyrvrvyrk
nsrvfskasl lpkkkpstpa lahegl

[0194] 可溶性人RAGE变体2(SEQ ID NO:5)

[0195] maagtavgaw vlvlslwgav vgaqnitari geplvlkckg apkkppqrle wklntgrtea

wkvlsppggg pwdsvarvlp ngslflpavg iqdegifrcq amnrngketk snyrvrvyqi

[0196] pgkpeivdsa seltagvpnk vgtcvsegsy pagtlshwld gkplvpnekg es

[0197] 在一些实例中,可溶性RAGE蛋白由具有与以下至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的序列的核酸编码:SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7。

[0198] 可溶性人RAGE变体1cDNA(SEQ ID NO:6)

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta

gtaggtgctc aaaacatcac agcccggtt ggcgagccac tgggtgctgaa gtgtaagggg

gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct

tggaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc

[0199] aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag

gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccgtaag

aattccaggg tcttctccaa ggcctccctc ttacctaaga aaaagccttc aaccccagcc

ttggcccatg agggcctctg a

[0200] 小鼠RAGE cDNA(SEQ ID NO:7)

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta

gtaggtgctc aaaacatcac agcccggtt ggcgagccac tgggtgctgaa gtgtaagggg

gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct

tggaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgtccttccc

[0201] aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag

gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt

cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctggtgt tccaataag

gtggggacat gtgtgtcaga gggaagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttgat

gggaagcccc tgggtgcctaa tgagaagggt gagtcctaa

[0202] 本领域技术人员可以理解,在不同物种之间不保守的位置处进行的取代/突变不太可能对蛋白质/核酸的活性产生负面影响,而在物种之间保守的位置处进行的取代/突变更可能对蛋白质/核酸的活性产生负面影响。

[0203] NK细胞

[0204] 在一些实施例中,可以向受试者施用NK细胞。在一些实施例中,施用于受试者的NK细胞可以是从小周血、脐带血分离的或从iPSC分离和分化的自体NK细胞、单倍体相合的NK细胞或同种异体NK细胞。在一些实施例中,本文所述的方法可以进一步包括从受试者中分离NK细胞、在液体培养基中培养分离的NK细胞,以及将NK细胞施用回受试者。在一些实施例中,可以使用商业上可获得的试剂盒(参见,例如,EasySep™人NK细胞分离试剂盒、MojoSort

人NK细胞分离试剂盒和诺伟司生物制品人NK细胞分离试剂盒)分离NK细胞。在一些实施例中,液体培养基可以包括一种或多种多链嵌合多肽(例如,本文所述的任何示例性多链嵌合多肽,例如,18t15-12s和/或7t15-21s)。

[0205] 在一些实施例中,NK细胞可以包含嵌合抗原受体(例如,包括与组织因子或CD26特异性结合的细胞外结构域的嵌合抗原受体)。可以与组织因子或CD26结合的细胞外结构域的非限制性实例是scFv。抗CD26抗体的非限制性实例可以商购自艾博抗公司、英杰公司和基因泰克公司。抗组织因子重链可变结构域和轻链可变结构域的非限制性实例描述于美国专利号7,968,094和美国专利号8,007,795中。嵌合抗原受体包括跨膜结构域、共刺激结构域(例如,细胞内CD28结构域)和CD3zeta信号传导结构域。例如,跨膜结构域可以包括与以下至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的序列:SEQ ID NO:1。例如,共刺激结构域可以包括与以下至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的序列:SEQ ID NO:2。例如,CD3zeta信号传导结构域可以包括与以下至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的序列:SEQ ID NO:3。

[0206] NK细胞活化剂

[0207] 在一些实施例中,可以向受试者施用一种或多种NK细胞活化剂。在一些实施例中,NK细胞活化剂可以是一种或多种多链嵌合多肽(例如,本文所述的任何示例性多链嵌合多肽)、抗组织因子抗体(例如,美国专利号7,968,094和美国专利号8,007,795中所述的抗组织因子抗体)、抗CD36抗体(例如,可以商购自英杰公司、艾博抗公司、基因泰克公司、诺伟司生物制品公司、Proteintech公司和默克密理博公司的抗CD36抗体)和抗CD26抗体(例如,可以商购自艾博抗公司、英杰公司和基因泰克公司的抗CD26抗体)。NK细胞活化剂,如基于细胞因子的试剂,可以通过指导活化NK细胞起作用或可以增强NK细胞活性,如介导NK细胞的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的抗体。

[0208] 多链嵌合多肽

[0209] 在本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种的一些实施例中,第一靶标结合结构域(例如,本文所描述的第一靶标结合结构域中的任一种)和可溶性组织因子结构域(例如,本文所描述的示例性可溶性组织因子结构域中的任一种)在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包含在第一嵌合多肽中的第一靶标结合结构域(例如,本文所描述的示例性第一靶标结合结构域中的任一种)与可溶性组织因子结构域(例如,本文所描述的示例性可溶性组织因子结构域中的任一种)之间的接头序列(例如,本文所描述或本领域已知的示例性接头序列中的任一种)。

[0210] 在本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种的一些实施例中,可溶性组织因子结构域(例如,本文所描述的示例性可溶性组织因子结构域中的任一种)与一对亲和结构域中的第一结构域(例如,本文所描述的示例性亲和结构域对中的任一种的示例性第一结构域中的任一种)在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包含在第一嵌合多肽中的可溶性组织因子结构域(例如,本文所描述的示例性可溶性组织因子结构域中的任一种)与一对亲和结构域中的第一结构域(例如,本文所描述的示例性亲和结构域对中的任一种的示例性第一结构域中的任一种)之间的接头序列(例如,本文所描述或本领域已知的示例性接头序列中的任一种)。

[0211] 在本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种的一些实施例中,一对亲和结构域中的第二结构域(例如,本文所描述的示例性亲和结构域对中的任一种的示例性第二结构域中的任一种)与第二靶标结合结构域(例如,本文所描述的示例性第二靶标结合结构域中的任一种)在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在本文描述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽还包含在一对亲和结构域中的第二结构域(例如,本文描述的任一对示例性亲和结构域中的任一个示例性第二结构域)与第二嵌合多肽的第二靶标结合结构域(例如,本文描述的任一个示例性第二靶标结合结构域)之间的接头序列(例如,本文描述或本领域已知的任一个示例性接头序列)。

[0212] 组织因子

[0213] 人组织因子是263个氨基酸的跨膜蛋白,其含有三个结构域:(1)219个氨基酸的N端胞外域(残基1-219);(2)22个氨基酸的跨膜域(残基220-242);和(3)21个氨基酸的胞质C端尾(残基242-263)((UniProtKB标识符编号:P13726)。胞质尾在Ser253和Ser258处含有两个磷酸化位点,在Cys245处含有一个S-棕榈酰化位点。没有发现胞质域的缺失或突变影响组织因子凝血活性。组织因子在蛋白质胞内域中Cys245处具有一个S-棕榈酰化位点。Cys245位于胞内域的氨基酸端,并且靠近膜表面。组织因子跨膜域由单跨度的 α -螺旋构成。

[0214] 由两个纤连蛋白III型结构域构成的组织因子的细胞外结构域通过六氨基酸接头与跨膜结构域连接。这一接头提供构象灵活性,以使组织因子细胞外结构域与其跨膜结构域和胞质结构域解偶联。每个组织因子纤连蛋白III型模块均由两个重叠的 β 折叠构成,其中顶层折叠结构域含有三个反平行的 β 链,而底层折叠含有四个 β 链。 β 链通过 β 环在链BA和BB、BC和BD以及BE和BF之间连接,其在两个模块中均构象保守。有三个短的 α 螺旋段连接 β 链。组织因子的独特特征是链 β 10与链 β 11之间的17个氨基酸的 β -发夹,这不是纤连蛋白超家族的常见成分。N端结构域还在 β 6F与 β 7G之间包含一个12个氨基酸的环,所述环不存在于C端结构域,并且是组织因子特有的。这种纤连蛋白III型结构域结构是免疫球蛋白样家族蛋白质折叠的特征,并且在广泛多种细胞外蛋白中是保守的。

[0215] 一旦酶原FVII与组织结合形成活性组织因子-FVIIa复合物,就可通过有限的蛋白水解将其迅速转化成FVIIa。FVIIa以大约0.1nM(血浆FVII的1%)的浓度作为酶循环,也可以直接结合到组织因子。组织因子与FVIIa在组织因子-FVIIa复合物上的变构相互作用极大地提高了FVIIa的酶促活性:小的发色肽基底物的水解速率提高约20到100倍,并且天然大分子底物FIX和FX的激活速率提高接近一百万倍。与结合到组织因子时FVIIa活性位点的变构激活相一致,磷脂双层上组织因子-FVIIa复合物的形成(即,当磷脂酰基-L-丝氨酸暴露在膜表面时)以 Ca^{2+} 依赖性方式将FIX或FX激活速率再提高1,000倍。相对于游离FVIIa,组织因子-FVIIa-磷脂复合物对FX激活的大约百万倍总体增加是凝血级联反应的关键调节点。

[0216] FVII是约50kDa的单链多肽,由406个氨基酸残基组成,具有N端富含 γ -羧基谷氨酸(GLA)的结构域、两个表皮生长因子样结构域(EGF1和EGF2)和C端丝氨酸蛋白酶结构域。FVII通过在EGF2与蛋白酶结构域之间的短接头区中Ile¹⁵⁴-Arg¹⁵²键的特异性蛋白水解裂解而被激活为FVIIa。这种裂解引起轻链和重链通过Cys¹³⁵和Cys²⁶²的单个二硫键固定在一起。FVIIa通过其N端GLA结构域以 Ca^{2+} 依赖性方式结合磷脂膜。GLA结构域的C端紧邻芳香族堆叠和两个EGF结构域。芳香族堆叠将GLA连接到结合单个 Ca^{2+} 离子的EGF1结构域。占用这一

Ca^{2+} 结合位点会增加FVIIa酰胺分解活性和组织因子缔合。催化三联体由His¹⁹³、Asp²⁴²和Ser³⁴⁴组成,并且FVIIa蛋白酶域内单个 Ca^{2+} 离子的结合对其催化活性至关重要。FVII对FVIIa的蛋白水解激活释放了Ile¹⁵³处新形成的氨基端,使其向后折叠并且插入激活袋中,与Asp³⁴³的羧酸盐形成盐桥,以生成氧阴离子孔。这一盐桥的形成对于FVIIa活性至关重要。但是,在蛋白水解激活后,游离的FVIIa中不会发生氧阴离子孔的形成。结果,FVIIa以酶原样状态循环,血浆蛋白酶抑制剂不能很好识别所述状态,使其以大约90分钟的半衰期循环。

[0217] FVIIa活性位点在膜表面上方的组织因子介导的定位对于FVIIa朝向同源底物很重要。游离FVIIa在结合到膜上时采用稳定扩展结构,其活性位点定位在膜表面上方约80Å。FVIIa与组织因子结合后,FVa活性位点将重新定位为更靠近膜约6 Å。这种调节可帮助FVIIa催化三联体与靶标底物裂解位点适当对齐。使用无GLA结构域的FVIIa,已显示活性位点仍位于膜上方相似的距离,证明即使在没有FVIIa-膜相互作用的情况下,组织因子也能够完全支持FVIIa活性位点定位。另外的数据显示,只要组织因子细胞外结构域以某种方式系栓到膜表面,组织因子就支持完全FVIIa蛋白水解活性。但是,将FVIIa的活性位点提高到膜表面上方大于80 Å会大大降低组织因子-FVIIa复合物激活FX的能力,但不会降低组织因子-FVIIa的酰胺分解活性。

[0218] 丙氨酸扫描诱变已用于评定组织因子细胞外结构域中特定氨基酸侧链对与FVIIa相互作用的作用(Gibbs等人,《生物化学(Biochemistry)》33(47):14003-14010,1994;Schullek等人,《生物化学杂志(J Biol Chem)》269(30):19399-19403,1994)。丙氨酸取代鉴别出有限数量的残基位置,在这些位置处,丙氨酸置换引起对FVIIa结合的亲和力降低5到10倍。发现这些残基侧链中的大多数在晶体结构中充分暴露于溶剂,与大分子配体相互作用一致。FVIIa配体结合位点位于两个模块之间边界处的宽广区上。在C模块中,位于突出的B-C环上的残基Arg¹³⁵和Phe¹⁴⁰提供与FVIIa的独立接触。Leu¹³³位于手指状结构的基底部,并且挤入两个模块之间的裂缝中。这提供由Lys²⁰、Thr⁶⁰、Asp⁵⁸和Ile²²组成的重要结合残基的主要簇的连续性。Thr⁶⁰仅部分暴露于溶剂,并且可能起局部结构作用,而不是与配体显著接触。结合位点延伸到模块间角的凹面,其涉及Glu²⁴和Gln¹¹⁰,并且可能涉及更远的残基Val²⁰⁷。结合区从Asp58延伸到由Lys⁴⁸、Lys⁴⁶、Gln³⁷、Asp⁴⁴和Trp⁴⁵形成的凸表面区。Trp⁴⁵和Asp⁴⁴不会独立地与FVIIa相互作用,表明Trp⁴⁵位置处的突变效应可能反映这一侧链对邻近Asp⁴⁴和Gln³⁷侧链的局部堆积的结构重要性。相互作用区还包括两个表面暴露的芳香族残基Phe⁷⁶和Tyr⁷⁸,其在N模块中形成疏水簇的一部分。

[0219] 组织因子-FVIIa的已知生理底物是FVII、FIX和FX以及某些蛋白酶激活受体。突变分析已鉴别出许多残基,当突变时,所述残基支持对小肽底物的完全FVIIa酰胺分解活性,但缺少支持大分子底物(即,FVII、FIX和FX)激活的能力(Ruf等人,《生物化学杂志》267(31):22206-22210,1992;Ruf等人,《生物化学杂志》267(9):6375-6381,1992;Huang等人,《生物化学杂志》271(36):21752-21757,1996;Kirchhofer等人,《生物化学》39(25):7380-7387,2000)。已显示在残基159-165处的组织因子环区和在这一柔性环中或附近的残基对于组织因子-FVIIa复合物的蛋白水解活性至关重要。这定义了提出的组织因子的底物结合位点外区,所述区与FVIIa活性位点相距甚远。甘氨酸残基被稍大的残基丙氨酸取代会大大损害组织因子-FVIIa的蛋白水解活性。这表明甘氨酸提供的柔性对于用于组织因子大分子底物识别的残基159-165的环至关重要。

[0220] 还证明了残基Lys¹⁶⁵和Lys¹⁶⁶对于底物识别和结合很重要。这些残基中的任何一个突变为丙氨酸均会引起组织因子辅助因子功能的显著降低。在大多数组织因子-FVIIa结构中,Lys¹⁶⁵和Lys¹⁶⁶彼此背对,Lys¹⁶⁵指向FVIIa,而Lys¹⁶⁶指向晶体结构中的底物结合位点外区。FVIIa的Lys¹⁶⁵和Gla³⁵之间的推定盐桥形成将支持组织因子与FVIIa的GLA结构域相互作用调节底物识别的观点。这些结果表明,组织因子胞外域的C端部分直接与FIX和FX的GLA结构域、可能的邻近EGF1结构域相互作用,并且FVIIa GLA结构域的存在可直接或间接调节这些相互作用。

[0221] 可溶性组织因子结构域

[0222] 在本文所述的任何多肽的一些实施例中,可溶性组织因子结构域可以是缺乏信号序列、跨膜结构域和细胞内结构域的野生型组织因子多肽。在一些实例中,可溶性组织因子结构域可以是组织因子突变体,其中野生型组织因子多肽缺少信号序列、跨膜结构域和细胞内结构域,并且已在所选氨基酸处经过进一步修饰。在一些实例中,可溶性组织因子结构域可以是可溶性人组织因子结构域。在一些实例中,可溶性组织因子结构域可以是可溶性小鼠组织因子结构域。在一些实例中,可溶性组织因子域可为大鼠可溶性组织因子域。下文显示可溶性人组织因子结构域、小鼠可溶性组织因子结构域、大鼠可溶性组织因子结构域和突变可溶性组织因子结构域的非限制性实例。

[0223] 示例性可溶性人组织因子结构域(SEQ ID NO:8)

[0224] SGTNTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[0225] 示例性核酸编码可溶性人组织因子结构域(SEQ ID NO:9)

[0226] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTC
GAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGCGCAGTGAAGTCCAAATG
TTTCTATACACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGG
TGTTTAGCTACCCCGCCGGAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTT
ACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAGGTGAATGTGAC
AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCCGCAAAGATTTAA
TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCCTCCGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[0227] 示例性突变体可溶性人组织因子结构域(SEQ ID NO:10)

[0228] SGTNTNTVAAYNLTWKSTNFATALEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECALTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVARNNTALSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[0229] 示例性突变体可溶性人组织因子结构域(SEQ ID NO:11)

[0230] SGTNTNTVAAYNLTWKSTNFATALEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDAKSKCFYTTDTECALTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLAENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVARNNTALSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[0231] 示例性可溶性小鼠组织因子结构域(SEQ ID NO:12)

[0232] agipekafnlwtwistdfktilwqpkptnytytvqisdrsrnwknkcfsttdtecdltdeivkdvtwa
yeakvlsvprnrsvhgdgdqlvihgeppftnapkflpyrdtnlgqpviqqfeqgrklrvvkdsltlvrkngtf
ltlrqvfkgdlgyiityrkgsstgkktntntnefsidveegvsycffvqamifsrktnqnspsgstvcteqwksf
lge

[0233] 示例性可溶性大鼠组织因子结构域(SEQ ID NO:13)

[0234] agtppgkafnlwtwistdfktilwqpkptnytytvqisdrsrnwkykctgttdtecdltdeivkdvnw
tyearvlsvpwrnsthgketlfgthgeppftnarkflpyrdtkigqpviqkyeqggtklkvtkdsftlvrkngt
fltlrqvfngdlgyiltyrkdsstgrktnththneflidvekgvsycffaqaavifsrktnhkspsitkcteqwks
vlge

[0235] 在一些实施例中,可溶性组织因子结构域可以包括与以下至少70%相同、至少72%相同、至少74%相同、至少76%相同、至少78%相同、至少80%相同、至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同的序列:SEQ ID NO:8、10、11、12或13。在一些实施例中,可溶性组织因子结构域可以包括SEQ ID NO:8、10、11、12或13的序列,其中其N-末端去除1至20个氨基酸(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸)和/或从其C-末端去除1至20个氨基酸(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸)。

[0236] 如本领域中可了解,本领域技术人员将理解,在不同哺乳动物物种之间保守的氨基酸的突变更可能降低蛋白质的活性和/或结构稳定性,而在不同哺乳动物物种之间不具保守性的氨基酸的突变不太可能降低蛋白质的活性和/或结构稳定性。

[0237] 在本文所述的任何单链或多链嵌合多肽的一些实例中,可溶性组织因子结构域不能结合因子VIIa。在本文所述的任何单链或多链嵌合多肽的一些实例中,可溶性组织因子结构域不将无活性的因子X转化为因子Xa。在本文所述的任何单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,单链或多链嵌合多肽不刺激哺乳动物中的凝血。

[0238] 在一些实例中,可溶性组织因子结构域可以是可溶性人组织因子结构域。在一些实施例中,可溶性组织因子结构域可以是可溶性小鼠组织因子结构域。在一些实施例中,可溶性组织因子结构域可为可溶性大鼠组织因子结构域。

[0239] 在一些实例中,可溶性组织因子结构域不包括以下中的一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个或七个):在对应于成熟野生型人组织因子蛋白的氨基酸位置20的氨基酸位置处的赖氨酸;在对应于成熟野生型人组织因子蛋白的氨基酸位置22的氨基酸位置处的异亮氨酸;在对应于成熟野生型人组织因子蛋白的氨基酸位置45的氨基酸位置处的色氨酸;在对应于成熟野生型人组织因子蛋白的氨基酸位置58的氨基酸位置处的天冬氨酸;在对应于成熟野生型人组织因子蛋白的氨基酸位置94的氨基酸位置处的酪氨酸;在对应于成熟野生型人组织因子蛋白的氨基酸位置135的氨基酸位置处的精氨酸;和在对应于成熟野生型人组织因子蛋白的氨基酸位置140的氨基酸位置处的苯丙氨酸。在一些实施例中,突变体可溶性组织因子具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0240] 在一些实例中,可溶性组织因子结构域可以由包括与以下至少70%相同、至少72%相同、至少74%相同、至少76%相同、至少78%相同、至少80%相同、至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、

至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同的序列的核酸编码:SEQ ID NO: 9。

[0241] 接头序列

[0242] 在一些实施例中,接头序列可为柔性接头序列。可使用的接头序列的非限制性实例描述于Klein等人,《蛋白质工程、设计和选择 (Protein Engineering, Design & Selection)》27 (10):325-330,2014;Priyanka等人,《蛋白质科学 (Protein Sci.)》22 (2):153-167,2013中。在一些实例中,接头序列是合成接头序列。

[0243] 在本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种的一些实施例中,第一嵌合多肽可包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个接头序列(例如,相同或不同的接头序列,例如本文所描述或本领域已知的示例性接头序列中的任一种)。在本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种的一些实施例中,第二嵌合多肽可包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个接头序列(例如,相同或不同的接头序列,例如本文所描述或本领域已知的示例性接头序列中的任一种)。

[0244] 在一些实施例中,接头序列可以具有1个氨基酸至约100个氨基酸、1个氨基酸至约90个氨基酸、1个氨基酸至约80个氨基酸、1个氨基酸至约70个氨基酸、1个氨基酸至约60个氨基酸、1个氨基酸至约50个氨基酸、1个氨基酸至约45个氨基酸、1个氨基酸至约40个氨基酸、1个氨基酸至约35个氨基酸、1个氨基酸至约30个氨基酸、1个氨基酸至约25个氨基酸、1个氨基酸至约24个氨基酸、1个氨基酸至约22个氨基酸、1个氨基酸至约20个氨基酸、1个氨基酸至约18个氨基酸、1个氨基酸至约16个氨基酸、1个氨基酸至约14个氨基酸、1个氨基酸至约12个氨基酸、1个氨基酸至约10个氨基酸、1个氨基酸至约8个氨基酸、1个氨基酸至约6个氨基酸、1个氨基酸至约4个氨基酸、约2个氨基酸至约100个氨基酸、约2个氨基酸至约90个氨基酸、约2个氨基酸至约80个氨基酸、约2个氨基酸至约70个氨基酸、约2个氨基酸至约60个氨基酸、约2个氨基酸至约50个氨基酸、约2个氨基酸至约45个氨基酸、约2个氨基酸至约40个氨基酸、约2个氨基酸至约35个氨基酸、约2个氨基酸至约30个氨基酸、约2个氨基酸至约25个氨基酸、约2个氨基酸至约24个氨基酸、约2个氨基酸至约22个氨基酸、约2个氨基酸至约20个氨基酸、约2个氨基酸至约18个氨基酸、约2个氨基酸至约16个氨基酸、约2个氨基酸至约14个氨基酸、约2个氨基酸至约12个氨基酸、约2个氨基酸至约10个氨基酸、约2个氨基酸至约8个氨基酸、约2个氨基酸至约6个氨基酸、约2个氨基酸至约4个氨基酸、约4个氨基酸至约100个氨基酸、约4个氨基酸至约90个氨基酸、约4个氨基酸至约80个氨基酸、约4个氨基酸至约70个氨基酸、约4个氨基酸至约60个氨基酸、约4个氨基酸至约50个氨基酸、约4个氨基酸至约45个氨基酸、约4个氨基酸至约40个氨基酸、约4个氨基酸至约35个氨基酸、约4个氨基酸至约30个氨基酸、约4个氨基酸至约25个氨基酸、约4个氨基酸至约24个氨基酸、约4个氨基酸至约22个氨基酸、约4个氨基酸至约20个氨基酸、约4个氨基酸至约18个氨基酸、约4个氨基酸至约16个氨基酸、约4个氨基酸至约14个氨基酸、约4个氨基酸至约12个氨基酸、约4个氨基酸至约10个氨基酸、约4个氨基酸至约8个氨基酸、约4个氨基酸至约6个氨基酸、约6个氨基酸至约100个氨基酸、约6个氨基酸至约90个氨基酸、约6个氨基酸至约80个氨基酸、约6个氨基酸至约70个氨基酸、约6个氨基酸至约60个氨基酸、约6个氨基酸至约50个氨基酸、约6个氨基酸至约45个氨基酸、约6个氨基酸至约40个氨基酸、约6个氨基酸至约35个氨基酸、约6个氨基酸至约30个氨基酸、约6个氨基酸至约25个氨基酸、约6个氨基酸至

[illegible]

20个氨基酸至约60个氨基酸、约20个氨基酸至约50个氨基酸、约20个氨基酸至约45个氨基酸、约20个氨基酸至约40个氨基酸、约20个氨基酸至约35个氨基酸、约20个氨基酸至约30个氨基酸、约20个氨基酸至约25个氨基酸、约20个氨基酸至约24个氨基酸、约20个氨基酸至约22个氨基酸、约22个氨基酸至约100个氨基酸、约22个氨基酸至约90个氨基酸、约22个氨基酸至约80个氨基酸、约22个氨基酸至约70个氨基酸、约22个氨基酸至约60个氨基酸、约22个氨基酸至约50个氨基酸、约22个氨基酸至约45个氨基酸、约22个氨基酸至约40个氨基酸、约22个氨基酸至约35个氨基酸、约22个氨基酸至约30个氨基酸、约22个氨基酸至约25个氨基酸、约22个氨基酸至约24个氨基酸、约25个氨基酸至约100个氨基酸、约25个氨基酸至约90个氨基酸、约25个氨基酸至约80个氨基酸、约25个氨基酸至约70个氨基酸、约25个氨基酸至约60个氨基酸、约25个氨基酸至约50个氨基酸、约25个氨基酸至约45个氨基酸、约25个氨基酸至约40个氨基酸、约25个氨基酸至约35个氨基酸、约25个氨基酸至约30个氨基酸、约30个氨基酸至约100个氨基酸、约30个氨基酸至约90个氨基酸、约30个氨基酸至约80个氨基酸、约30个氨基酸至约70个氨基酸、约30个氨基酸至约60个氨基酸、约30个氨基酸至约50个氨基酸、约30个氨基酸至约45个氨基酸、约30个氨基酸至约40个氨基酸、约30个氨基酸至约35个氨基酸、约35个氨基酸至约100个氨基酸、约35个氨基酸至约90个氨基酸、约35个氨基酸至约80个氨基酸、约35个氨基酸至约70个氨基酸、约35个氨基酸至约60个氨基酸、约35个氨基酸至约50个氨基酸、约35个氨基酸至约45个氨基酸、约35个氨基酸至约40个氨基酸、约40个氨基酸至约100个氨基酸、约40个氨基酸至约90个氨基酸、约40个氨基酸至约80个氨基酸、约40个氨基酸至约70个氨基酸、约40个氨基酸至约60个氨基酸、约40个氨基酸至约50个氨基酸、约40个氨基酸至约45个氨基酸、约45个氨基酸至约100个氨基酸、约45个氨基酸至约90个氨基酸、约45个氨基酸至约80个氨基酸、约45个氨基酸至约70个氨基酸、约45个氨基酸至约60个氨基酸、约45个氨基酸至约50个氨基酸、约50个氨基酸至约100个氨基酸、约50个氨基酸至约90个氨基酸、约50个氨基酸至约80个氨基酸、约50个氨基酸至约70个氨基酸、约50个氨基酸至约60个氨基酸、约60个氨基酸至约100个氨基酸、约60个氨基酸至约90个氨基酸、约60个氨基酸至约80个氨基酸、约60个氨基酸至约70个氨基酸、约70个氨基酸至约100个氨基酸、约70个氨基酸至约90个氨基酸、约70个氨基酸至约80个氨基酸、约80个氨基酸至约100个氨基酸、约80个氨基酸至约90个氨基酸、或约90个氨基酸至约100个氨基酸的总长度。

[0245] 在一些实施例中,接头富含甘氨酸(Gly或G)残基。在一些实施例中,接头富含丝氨酸(Ser或S)残基。在一些实施例中,接头富含甘氨酸和丝氨酸残基。在一些实施例中,接头具有一个或多个甘氨酸-丝氨酸残基对(GS),例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个GS对。在一些实施例中,接头具有一个或多个Gly-Gly-Gly-Ser(GGGS)序列,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个GGGS序列。在一些实施例中,接头具有一个或多个Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(GGGGS)序列,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个GGGGS序列。在一些实施例中,接头具有一个或多个Gly-Gly-Ser-Gly(GGSG)序列,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个GGSG序列。

[0246] 在一些实施例中,接头序列可以包含GGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:14)或由其组成。在一些实施例中,接头序列可以由包含以下或由以下组成的核酸编码:GGCGGTGGAGGATCCGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCT(SEQ ID NO:15)。在一些实施例中,接头序列可以包

含以下或由以下组成:GGSGGGG(S EQ ID NO:16)。

[0247] 靶标结合结构域

[0248] 在本文所述的任何单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域、第二靶标结合结构域和/或另外的一个或多个靶标结合结构域可以是抗原结合结构域(例如,本文所述的或本领域已知的任何示例性抗原结合结构域)、可溶性白介素或细胞因子蛋白(例如,本文所述的任何示例性可溶性白介素蛋白或可溶性细胞因子蛋白)和可溶性白介素或细胞因子受体(例如,本文所述的任何示例性可溶性白介素受体或可溶性细胞因子受体)。

[0249] 在本文所述的任何单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,一个或多个第一靶标结合结构域(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性第一靶标结合结构域)、第二靶标结合结构域(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性第二靶标结合结构域)和一个或多个另外的靶标结合结构域可以各自独立地特异性结合选自以下的组的靶标:特异性结合至选自由以下组成的组的靶标:CD16a、CD28、CD3(例如,CD3 α 、CD3 β 、CD3 δ 、CD3M和CD3K中的一种或多种)、CD33、CD20、CD19、CD22、CD123、IL-1R、IL-1、VEGF、IL-6R、IL-4、IL-10、PDL-1、TIGIT、PD-1、TIM3、CTLA4、MICA、MICB、IL-6、IL-8、TNF α 、CD26a、CD36、ULBP2、CD30、CD200、IGF-1R、MUC4AC、MUC5AC、Trop-2、CMET、EGFR、HER1、HER2、HER3、PSMA、CEA、B7H3、EPCAM、BCMA、P-钙粘蛋白、CEACAM5、UL16结合蛋白(例如,ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5和ULBP6)、HLA-DR、DLL4、TYRO3、AXL、MER、CD122、CD155、PDGF-DD、TGF- β 受体II(TGF- β RII)的配体、TGF- β RIII的配体、DNAM-1的配体、Nkp46的配体、Nkp44的配体、NKG2D的配体、Nkp30的配体、scMHC I的配体、scMHC II的配体、scTCR的配体、IL-1的受体、IL-2的受体、IL-3的受体、IL-7的受体、IL-8的受体、IL-10的受体、IL-12的受体、IL-15的受体、IL-17的受体、IL-18的受体、IL-21的受体、PDGF-DD的受体、干细胞因子(SCF)的受体、干细胞样酪氨酸激酶3配体(FLT3L)的受体、MICA的受体、MICB的受体、ULP16结合蛋白的受体、CD155的受体、CD122的受体和CD28的受体。

[0250] 在本文所述的任何单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域、第二靶标结合结构域和/或一个或多个另外的靶标结合结构域可以各自独立地具有约5个氨基酸至约1000个氨基酸、约5个氨基酸至约950个氨基酸、约5个氨基酸至约900个氨基酸、约5个氨基酸至约850个氨基酸、约5个氨基酸至约800个氨基酸、约5个氨基酸至约750个氨基酸、约5个氨基酸至约700个氨基酸、约5个氨基酸至约650个氨基酸、约5个氨基酸至约600个氨基酸、约5个氨基酸至约550个氨基酸、约5个氨基酸至约500个氨基酸、约5个氨基酸至约450个氨基酸、约5个氨基酸至约400个氨基酸、约5个氨基酸至约350个氨基酸、约5个氨基酸至约300个氨基酸、约5个氨基酸至约280个氨基酸、约5个氨基酸至约260个氨基酸、约5个氨基酸至约240个氨基酸、约5个氨基酸至约220个氨基酸、约5个氨基酸至约200个氨基酸、约5个氨基酸至约195个氨基酸、约5个氨基酸至约190个氨基酸、约5个氨基酸至约185个氨基酸、约5个氨基酸至约180个氨基酸、约5个氨基酸至约175个氨基酸、约5个氨基酸至约170个氨基酸、约5个氨基酸至约165个氨基酸、约5个氨基酸至约160个氨基酸、约5个氨基酸至约155个氨基酸、约5个氨基酸至约150个氨基酸、约5个氨基酸至约145个氨基酸、约5个氨基酸至约140个氨基酸、约5个氨基酸至约135个氨基酸、约5个氨基酸至约130个氨基酸、约5个氨基酸至约125个氨基酸、约5个氨基酸至约120个氨基酸、约5个氨基酸至约115个氨基酸、

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

总数。

[0251] 本文所述的任何靶标结合结构域可以以小于 1×10^{-7} M、小于 1×10^{-8} M、小于 1×10^{-9} M、小于 1×10^{-10} M、小于 1×10^{-11} M、小于 1×10^{-12} M或小于 1×10^{-13} M的解离平衡常数(K_D)与其靶标结合。在一些实施例中,本文提供的抗原结合蛋白构建体可以以约 1×10^{-3} M至约 1×10^{-5} M、约 1×10^{-4} M至约 1×10^{-6} M、约 1×10^{-5} M至约 1×10^{-7} M、约 1×10^{-6} M至约 1×10^{-8} M、约 1×10^{-7} M至约 1×10^{-9} M、约 1×10^{-8} M至约 1×10^{-10} M或约 1×10^{-9} M至约 1×10^{-11} M(包括端值)的 K_D 与鉴定抗原结合。

[0252] 本文所述的任何靶标结合结构域可以以约1pM至约30nM之间(例如,约1pM至约25nM、约1pM至约20nM、约1pM至约15nM、约1pM至约10nM、约1pM至约5nM、约1pM至约2nM、约1pM至约1nM、约1pM至约950pM、约1pM至约900pM、约1pM至约850pM、约1pM至约800pM、约1pM至约750pM、约1pM至约700pM、约1pM至约650pM、约1pM至约600pM、约1pM至约550pM、约1pM至约500pM、约1pM至约450pM、约1pM至约400pM、约1pM至约350pM、约1pM至约300pM、约1pM至约250pM、约1pM至约200pM、约1pM至约150pM、约1pM至约100pM、约1pM至约90pM、约1pM至约80pM、约1pM至约70pM、约1pM至约60pM、约1pM至约50pM、约1pM至约40pM、约1pM至约30pM、约1pM至约20pM、约1pM至约10pM、约1pM至约5pM、约1pM至约4pM、约1pM至约3pM、约1pM至约2pM、约2pM至约30nM、约2pM至约25nM、约2pM至约20nM、约2pM至约15nM、约2pM至约10nM、约2pM至约5nM、约2pM至约2nM、约2pM至约1nM、约2pM至约950pM、约2pM至约900pM、约2pM至约850pM、约2pM至约800pM、约2pM至约750pM、约2pM至约700pM、约2pM至约650pM、约2pM至约600pM、约2pM至约550pM、约2pM至约500pM、约2pM至约450pM、约2pM至约400pM、约2pM至约350pM、约2pM至约300pM、约2pM至约250pM、约2pM至约200pM、约2pM至约150pM、约2pM至约100pM、约2pM至约90pM、约2pM至约80pM、约2pM至约70pM、约2pM至约60pM、约2pM至约50pM、约2pM至约40pM、约2pM至约30pM、约2pM至约20pM、约2pM至约10pM、约2pM至约5pM、约2pM至约4pM、约2pM至约3pM、约5pM至约30nM、约5pM至约25nM、约5pM至约20nM、约5pM至约15nM、约5pM至约10nM、约5pM至约5nM、约5pM至约2nM、约5pM至约1nM、约5pM至约950pM、约5pM至约900pM、约5pM至约850pM、约5pM至约800pM、约5pM至约750pM、约5pM至约700pM、约5pM至约650pM、约5pM至约600pM、约5pM至约550pM、约5pM至约500pM、约5pM至约450pM、约5pM至约400pM、约5pM至约350pM、约5pM至约300pM、约5pM至约250pM、约5pM至约200pM、约5pM至约150pM、约5pM至约100pM、约5pM至约90pM、约5pM至约80pM、约5pM至约70pM、约5pM至约60pM、约5pM至约50pM、约5pM至约40pM、约5pM至约30pM、约5pM至约20pM、约5pM至约10pM、约10pM至约30nM、约10pM至约25nM、约10pM至约20nM、约10pM至约15nM、约10pM至约10nM、约10pM至约5nM、约10pM至约2nM、约10pM至约1nM、约10pM至约950pM、约10pM至约900pM、约10pM至约850pM、约10pM至约800pM、约10pM至约750pM、约10pM至约700pM、约10pM至约650pM、约10pM至约600pM、约10pM至约550pM、约10pM至约500pM、约10pM至约450pM、约10pM至约400pM、约10pM至约350pM、约10pM至约300pM、约10pM至约250pM、约10pM至约200pM、约10pM至约150pM、约10pM至约100pM、约10pM至约90pM、约10pM至约80pM、约10pM至约70pM、约10pM至约60pM、约10pM至约50pM、约10pM至约40pM、约10pM至约30pM、约10pM至约20pM、约15pM至约30nM、约15pM至约25nM、约15pM至约20nM、约15pM至约15nM、约15pM至约10nM、约15pM至约5nM、约15pM至约2nM、约15pM至约1nM、约15pM至约950pM、约15pM至约900pM、约15pM至约850pM、约15pM至约800pM、约15pM至约750pM、约15pM至约700pM、约15pM至约650pM、约15pM至约600pM、约15pM至约550pM、约15pM至约500pM、约15pM至约450pM、约15pM至约400pM、约

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

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

约500pM至约850pM、约500pM至约800pM、约500pM至约750pM、约500pM至约700pM、约500pM至约650pM、约500pM至约600pM、约500pM至约550pM、约600pM至约30nM、约600pM至约25nM、约600pM至约30nM、约600pM至约15nM、约600pM至约10nM、约600pM到约5nM、约600pM到约2nM、约600pM到约1nM、约600pM到约950pM、约600pM到约900pM、约600pM到约850pM、约600pM至约800pM、约600pM至约750pM、约600pM至约700pM、约600pM至约650pM、约700pM至约30nM、约700pM至约25nM、约700pM至约30nM、约700pM至约15nM、约700pM至约10nM、约700pM至约5nM、约700pM至约2nM、约700pM至约1nM、约700pM至约950pM、约700pM至约900pM、约700pM至约850pM、约700pM至约800pM、约700pM至约750pM、约800pM至约30nM、约800pM至约25nM、约800pM至约30nM、约800pM至约15nM、约800pM至约10nM、约800pM至约5nM、约800pM至约2nM、约800pM至约1nM、约800pM至约950pM、约800pM至约900pM、约800pM至约850pM、约900pM至约30nM、约900pM至约25nM、约900pM至约30nM、约900pM至约15nM、约900pM至约10nM、约900pM至约5nM、约900pM至约2nM、约900pM至约1nM、约900pM至约950pM、约1nM至约30nM、约1nM至约25nM、约1nM至约20nM、约1nM至约15nM、约1nM至约10nM、约1nM至约5nM、约2nM至约30nM、约2nM至约25nM、约2nM至约20nM、约2nM至约15nM、约2nM至约10nM、约2nM至约5nM、约4nM至约30nM、约4nM至约25nM、约4nM至约20nM、约4nM至约15nM、约4nM至约10nM、约4nM至约5nM、约5nM至约30nM、约5nM至约25nM、约5nM至约20nM、约5nM至约15nM、约5nM至约10nM、约10nM至约30nM、约10nM至约25nM、约10nM至约20nM、约10nM至约15nM、约15nM至约30nM、约15nM至约25nM、约15nM至约20nM、约20nM至约30nM和约20nM至约25nM)的 K_D 与其靶标结合。

[0253] 本文所述的任何靶标结合结构域可以以约1nM至约10nM之间(例如,约1nM至约9nM、约1nM至约8nM、约1nM至约7nM、约1nM至约6nM、约1nM至约5nM、约1nM至约4nM、约1nM至约3nM、约1nM至约2nM、约2nM至约10nM、约2nM至约9nM、约2nM至约8nM、约2nM至约7nM、约2nM至约6nM、约2nM至约5nM、约2nM至约4nM、约2nM至约3nM、约3nM至约10nM、约3nM至约9nM、约3nM至约8nM、约3nM至约7nM、约3nM至约6nM、约3nM至约5nM、约3nM至约4nM、约4nM至约10nM、约4nM至约9nM、约4nM至约8nM、约4nM至约7nM、约4nM至约6nM、约4nM至约5nM、约5nM至约10nM、约5nM至约9nM、约5nM至约8nM、约5nM至约7nM、约5nM至约6nM、约6nM至约10nM、约6nM至约9nM、约6nM至约8nM、约6nM至约7nM、约7nM至约10nM、约7nM至约9nM、约7nM至约8nM、约8nM至约10nM、约8nM至约9nM和约9nM至约10nM)的 K_D 与其靶标结合。

[0254] 本领域已知的多种不同方法可用于测定本文所述的任何多肽的 K_D 值(例如,电泳迁移率变动测定法、滤膜结合测定法、表面等离子体共振和生物分子结合动力学测定法等)。

[0255] 抗原结合结构域

[0256] 在本文所述的任何单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域特异性地结合相同的抗原。在这些单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域特异性结合相同的表位。在这些单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域包括相同的氨基酸序列。

[0257] 在本文所述的任何单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域特异性结合不同的抗原。

[0258] 在本文所述的任何单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和

第二靶标结合结构域中的一个或两个是抗原结合结构域。在本文所述的任何单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域各自是抗原结合结构域。

[0259] 在本文所述的任何单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,抗原结合结构域包括或为scFv或单结构域抗体(例如,VHH或VNAR结构域)。

[0260] 在一些实例中,抗原结合结构域(例如,本文描述的任一个抗原结合结构域)可以特异性结合到以下中的任一个:CD16a(参见例如第9,035,026号美国专利中描述的那些)、CD28(参见例如第7,723,482号美国专利中描述的那些)、CD3(参见例如第9,226,962号美国专利中描述的那些)、CD33(参见例如第8,759,494号美国专利中描述的那些)、CD20(参见例如W0 2014/026054中描述的那些)、CD19(参见例如第9,701,758号美国专利中描述的那些)、CD22(参见例如W0 2003/104425中描述的那些)、CD123(参见例如W0 2014/130635中描述的那些)、IL-1R(参见例如第8,741,604号美国专利中描述的那些)、IL-1(参见例如W02014/095808中描述的那些)、VEGF(参见例如第9,090,684号美国专利中描述的那些)、IL-6R(参见例如第7,482,436号美国专利中描述的那些)、IL-4(参见例如第2012/0171197号美国专利申请公开中描述的那些)、IL-10(参见例如第2016/0340413号美国专利申请公开中描述的那些)、PDL-1(参见例如Drees等人,《蛋白质表达和纯化(Protein Express.Purif.)》94:60-66,2014中所描述的那些)、TIGIT(参见例如第2017/0198042号美国专利申请公开中所描述的那些)、PD-1(参见例如第7,488,802号美国专利中所描述的那些)、TIM3(参见例如第8,552,156号美国专利中所描述的那些)、CTLA4(参见例如W0 2012/120125中所描述的那些)、MICA(参见例如W0 2016/154585中所描述的那些)、MICB(参见例如第8,753,640号美国专利中所描述的那些)、IL-6(参见例如Gejima等人,《人抗体(Human Antibodies)》11(4):121-129,2002中所描述的那些)、IL-8(参见例如第6,117,980号美国专利中所描述的那些)、TNF α (参见例如Geng等人,《免疫学研究(Immunol.Res.)》62(3):377-385,2015中所描述的那些)、CD26a(参见例如W0 2017/189526中所描述的那些)、CD36(参见例如第2015/0259429号美国专利申请公开中所描述的那些)、ULBP2(参见例如第9,273,136号美国专利中所描述的那些)、CD30(参见例如Homach等人,《斯堪的纳维亚免疫学杂志(Scand.J.Immunol.)》48(5):497-501,1998中所描述的那些)、CD200(参见例如第9,085,623号美国专利中所描述的那些)、IGF-1R(参见例如第2017/0051063号美国专利申请公开中所描述的那些)、MUC4AC(参见例如W0 2012/170470中所描述的那些)、MUC5AC(参见例如第9,238,084号美国专利中所描述的那些)、Trop-2(参见例如W0 2013/068946中所描述的那些)、CMET(参见例如Edwardraja等人,《生物技术与生物工程(Biotechnol.Bioeng.)》106(3):367-375,2010中所描述的那些)、EGFR(参见例如Akbari等人,《蛋白质表达和纯化》127:8-15,2016中所描述的那些)、HER1(参见例如第2013/0274446号美国专利申请公开中所描述的那些)、HER2(参见例如Cao等人,《生物技术快报(Biotechnol.Lett.)》37(7):1347-1354,2015中所描述的那些)、HER3(参见例如第9,505,843号美国专利中所描述的那些)、PSMA(参见例如Parker等人,《蛋白质表达和纯化》89(2):136-145,2013中所描述的那些)、CEA(参见例如W0 1995/015341中所描述的那些)、B7H3(参见例如第9,371,395号美国专利中所描述的那些)、EPCAM(参见例如W0 2014/159531中描述的那些)、BCMA(参见例如Smith等人,《分子疗法(Mol.Ther.)》26(6):1447-1456,2018中所

描述的那些)、P-钙粘着蛋白(参见例如第7,452,537号美国专利中所描述的那些)、CEACAM5(参见例如第9,617,345号美国专利中所描述的那些)、UL16结合蛋白(参见例如W0 2017/083612中所描述的那些)、HLA-DR(参见例如Pistillo等人,《实验和临床免疫遗传学(Exp.Clin.Immunogenet.)》14(2):123-130,1997中所描述的那些)、DLL4(参见例如W0 2014/007513中所描述的那些)、TYRO3(参见例如W02016/166348中所描述的那些)、AXL(参见例如W0 2012/175692中所描述的那些)、MER(参见例如W0 2016/106221中所描述的那些)、CD122(参见例如美国专利申请公开第2016/0367664号中所描述的那些)、CD155(参见例如W0 2017/149538中所描述的那些)或PDGF-DD(参见例如美国专利第9,441,034号中所描述的那些)。

[0261] 本文所述的任何单链或多链嵌合多肽中存在的抗原结合结构域各自独立地选自由以下组成的组:VHH结构域、VNAR结构域和scFv。在一些实施例中,本文描述的任一个抗原结合结构域是BiTe、(scFv)₂、纳米抗体(nanobody)、纳米抗体-HSA、DART、TandAb、单链双功能抗体(scDiabody)、单链双功能抗体-CH3、scFv-CH-CL-scFv、HSAbody、单链双功能抗体-HAS或串联scFv。可用于任何单链或多链嵌合多肽的抗原结合结构域的其它实例是本领域已知的。

[0262] VHH结构域是可在骆驼科动物中发现的单个单体可变抗体结构域。VNAR结构域是可在软骨鱼中发现的单个单体可变抗体结构域。VHH结构域和V_{NAR}结构域的非限制性方面描述于以下中:例如Cromie等人,《医药化学当前论题(Curr.Top.Med.Chem.)》15:2543-2557,2016;De Genst等人,《发育与比较免疫学(Dev.Comp.Immunol.)》30:187-198,2006;De Meyer等人,《生物技术趋势(Trends Biotechnol.)》32:263-270,2014;Kijanka等人,《纳米医学(Nanomedicine)》10:161-174,2015;Kovaleva等人,《生物疗法专家观点(Expert.Opin.Biol.Ther.)》14:1527-1539,2014;Krah等人,《免疫药理学和免疫毒理学(Immunopharmacol.Immunotoxicol.)》38:21-28,2016;Mujic-Delic等人,《药理科学趋势(Trends Pharmacol.Sci.)》35:247-255,2014;Muyldermans,《生物技术杂志(J.Biotechnol.)》74:277-302,2001;Muyldermans等人,《生物化学科学趋势(Trends Biochem.Sci.)》26:230-235,2001;Muyldermans,《生物化学年鉴(Ann.Rev.Biochem.)》82:775-797,2013;Rahbarizadeh等人,《免疫学研究(Immunol.Invest.)》40:299-338,2011;Van Audenhove等人,《E生物医学(EBioMedicine)》8:40-48,2016;Van Bockstaele等人,《研究药物当前观点(Curr.Opin.Investig.Drugs)》10:1212-1224,2009;Vincke等人,《分子生物学方法(Methods Mol.Biol.)》911:15-26,2012;和Wesolowski等人,《医学微生物学和免疫学(Med.Microbiol.Immunol.)》198:157-174,2009。

[0263] 在一些实施例中,本文所述的单链或多链嵌合多肽中的每个抗原结合结构域都是VHH结构域,或至少一个抗原结合结构域是VHH结构域。在一些实施例中,本文所述的单链或多链嵌合多肽中的每个抗原结合结构域都是VNAR结构域,或至少一个抗原结合结构域是VNAR结构域。在一些实施例中,本文所述的单链或多链嵌合多肽中的每个抗原结合结构域都是scFv结构域,或至少一个抗原结合结构域是scFv结构域。

[0264] 在一些实施例中,存在于单链或多链嵌合多肽中的两种或更多种多肽可以组装(例如,非共价组装)以形成本文所述的抗原结合结构域中的任一种,例如,抗体的抗原结合片段(例如,本文所述的抗体的抗原结合片段中的任一种)、VHH-scAb、VHH-Fab、双重scFab、

F(ab')₂、双抗体、crossMab、DAF(二合一)、DAF(四合一)、DutaMab、DT-IgG、孔中旋钮共同轻链、孔中旋钮组装、电荷对、Fab臂交换、SEEDbody、LUZ-Y、Fcab、κλ-体、正交Fab、DVD-IgG、IgG(H)-scFv、scFv-(H) IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L) IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、Zybody、DVI-IgG、双抗体-CH₃、三体、微型抗体、微型体、TriBi微型体、scFv-CH₃ KIH、Fab-scFv、F(ab')₂-scFv₂、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、scDiabody-Fc、Diabody-Fc、串联scFv-Fc、细胞内抗体、对接和锁定(dock and lock)、lmmTAC、IgG-IgG缀合物、Cov-X-Body和scFv1-PEG-scFv₂。参见例如Spiess等人,《分子免疫学(Mol. Immunol.)》67:95-106,2015,其在此全文并入,以便描述这些元件。抗体的抗原结合片段的非限制性实例包括Fv片段、Fab片段、F(ab')₂片段和Fab'片段。抗体的抗原结合片段的另外实例是IgG的抗原结合片段(例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的抗原结合片段)(例如,人或人源化IgG,例如人或人源化IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的抗原结合片段);IgA的抗原结合片段(例如,IgA1或IgA2的抗原结合片段)(例如,人或人源化IgA,例如人或人源化IgA1或IgA2的抗原结合片段);IgD的抗原结合片段(例如,人或人源化IgD的抗原结合片段);IgE的抗原结合片段(例如,人或人源化IgE的抗原结合片段);或IgM的抗原结合片段(例如,人或人源化IgM的抗原结合片段)。

[0265] “Fv”片段包括一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的非共价连接的二聚体。

[0266] “Fab”片段包括除Fv片段的重链和轻链可变结构域外,轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(C_{H1})。

[0267] “F(ab')₂”片段包括在铰链区附近通过二硫键接合的两个Fab片段。

[0268] “双可变结构域免疫球蛋白”或“DVD-Ig”是指多价且多特异性结合蛋白,如例如DiGiammarino等人,《分子生物学方法(Methods Mol. Biol.)》899:145-156,2012;Jakob等人,《单抗(MABs)》5:358-363,2013;和美国专利第7,612,181号;第8,258,268号;第8,586,714号;第8,716,450号;第8,722,855号;第8,735,546号;和第8,822,645号中所描述,其中的每一个均通过引用整体并入。

[0269] DART描述于例如Garber,《自然综述:药物发现(Nature Reviews Drug Discovery)》13:799-801,2014中。

[0270] 在本文所述的任何抗原结合结构域的一些实施例中,其可以结合选自由蛋白质、碳水化合物、脂质及其组合组成的组的抗原。

[0271] 抗原结合结构域的另外实例和方面是本领域已知的。

[0272] 可溶性白介素或细胞因子蛋白

[0273] 在本文所述的任何单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域中的一个或两个可以是可溶性白介素蛋白或可溶性细胞因子蛋白。在一些实施例中,可溶性白介素或可溶性细胞因子蛋白选自以下组成的组:IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD、SCF和FLT3L。可溶性IL-2、IL-3、IL-7、IL-8、IL-10、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、PDGF-DD、SCF和FLT3L的非限制性实例在以下提供。

[0274] 人可溶性IL-2(SEQ ID NO:17)

- aptssstkk t qlqlehlld lqmilnginn yknpkltrml tfkfymppka
- [0275] telkhlqcle eelkpleevl nlaqsknfhl rprdlisnin vivlelkgse
ttfmceyade tativeflnr witfcqsiis tlt
- [0276] 人可溶性IL-3 (SEQ ID NO:18)
apmtqttpklt swvnscnmid eiithlkqpp lppldfnnln gedqdilmen
- [0277] nlrrpnleaf nravkslqna saiesilkn lpcplataa ptrhpihikd
gdwnefrrkl tfylktlena qaqqtllsla if
- [0278] 人可溶性IL-7 (SEQ ID NO:19)
dcdiegkdgkqyesv lmvsidqlld smkeigsncl nnefnffkrh icdankegmf
- [0279] lfraarklrq flkmnstgdf dlhllkvseg ttillnctgq vkgrkpaalg
eaqptkslee nkslkeqkkl ndlcflkrll qeiktcwnki lmgtkch
- [0280] 人可溶性IL-8 (SEQ ID NO:20)
egavlprsak elrcqciqty skpfhpkfik elrviesgph canteiivkl
- [0281] sdgrelcldp kenwvqrvve kflkraens
- [0282] 人可溶性IL-10 (SEQ ID NO:21)
spgqgtqsensc thfpgnlpnm lrdlrdafrs vktffqmkdq ldnlllkesl
- [0283] ledfkgyllgc qalsemiqfy leevmpqaen qdpdikahvn slgenlktlr
lrlrrchrfl pcenkskave qvknafnklq ekgiykamse fdifinyiea
ymtmkirn
- [0284] 人可溶性IL-15 (SEQ ID NO:22)
Nwvnvisdlkki edliqsmhid atlytesdvh psckvtamkc fllelqvisl
- [0285] esgdasihdt venliilann slssngnvte sgckeceele eknikeflqs
fvhivqmfin ts
- [0286] 人可溶性IL-17 (SEQ ID NO:23)
gitiprn pgcpnsedkn fprrtvmvnl inhrntntnp krssdyynrs
- [0287] tspwnlhrne dperypsviw eakcrhlgi nadgnvdyhm nsvpiqqeil
vrrrepphpc nsfrlekilv svgtctvtpi vhhva
- [0288] 人可溶性IL-18 (SEQ ID NO:24)
yfgklesklsvirn lndqvlfidq gnrplfedmt dsdcrdnapr tifiismykd
- [0289] sqprgmavti svkcekistl scenkiisfk emnppdnikd tksdiiffqr
- [0290] svpghdnkmq fesssyegyf lacekerdlf klilkkedel gdrsimftvq ned
- [0291] 人可溶性PDGF-DD (SEQ ID NO:25)

- rdtsatpqsasi kalrnanlrr desnhltdly rrdeitqvkg ngyvqsprfp
nsyprnlllt wrlhsqentr iqlvfdnqfg leeaendicr ydfvevedis
etstiirgrw cghkevppri ksrtmqikit fksddyfvak pgfkiiysll
[0292] edfqpaaase tnwesvtssi sgvsynspsv tdptliadal dkkiaefdtv
edllkyfnpe swqedlenmy ldtpyrgrs yhdrkskvd1 drlnddakry
sctprnysvn ireelklanv vffprcllvq rcggnccgct vnwrscctns
gktvkkkyhev lqfepghikr rgraktmalv diqldhherc dcicssrppr
[0293] 人可溶性SCF(SEQ ID N0:26)
egicrnrvtnnvkdv tkivanlpkd ymitlkyvpg mdvlpshcwi semvvqlsds
ltdlldkfsn iseglsnysi idklvnivdd lvecvkenss kdlkksfksp
[0294] eprlftpeef frifnrside fkdffvaset sdcvvsstls pekdsrvsvt
kpfmlppvaa sslrndssss nrkaknppgd sslhwaamal palfsliigf
afgalywkk r qpsltraven iqineednei smlqekeref gev
[0295] 人可溶性FLT3L(SEQ ID N0:27)
tqdcsfqhspissd favkirelsd yllqdyptv asnlqdealc gglwrlvlaq
rwmrlktva gskmqgller vnteihfvtk cafqpppscl rfvtqtnisrl
[0296] lqetseqlva lkpwitrqnf srclelqcqp dsstlpppws prpleatapt
apqpplllll llpvgl1111a aawclhwqrt rrrtprpgeq vppvpspql
llveh
[0297] 以下提供可溶性MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5和ULBP6的非限制
性实例。
[0298] 人可溶性MICA(SEQ ID N0:28)
ephsrlry nltvlswdgs vqsgfltevh ldgqpflrcd rpkcrakpqq
qwaedvlgk twdretrdlt gngkdlrmtl ahikdqkegl hslqeirvce
ihednstrss qhfyydgelf lsqnletkew tmpqssraqt lamnvrnflk
edamktkthy hamhadclqe lrrylksgvv lrrtvppmvn vtrseasegn
[0299] itvtcrasgf ypwnitlswr qdgvslshdt qqwgdvlpdg ngtyqtwvat
ricqgeeqrft tcymehsgnh sthpvpsgkv lvlqshwqtf hvsavaaaai
fviiiifyvrc ckkktsaaeg pelvslqvld qhpvgtsdhr datqlgfqpl
msdlgstgst ega
[0300] 人可溶性MICB(SEQ ID N0:29)

- aephslry nlmvlsqdes vqsgflaegh ldgqpflryd rqkrrakpqq
qwaedvlgak twdtetedlt engqdlrrtl thikdqkggl hslqeirvce
ihedsstrgs rhfyydgelf lsqnletqes tvpqssraqt lamnvtntfwk
[0301] edamktkthy ramqadclqk lqrylksgva irrtpvpmvn vtcsevsegn
itvtcrassf yprnitltwr qdgvslshnt qqwgdvlpdg ngtyqtwvat
rirqgeeqrf tcymehsgnh gthpvpsgkv lvlqsqrtdf pyvsaampcf
viiiilcvpc ckkktsaaeg pelvslqvld qhpvgtgdhr
daaqlgfqpl msatgstgst ega
- [0302] 人可溶性ULBP1 (SEQ ID NO:30)
wvdthclcydfiit pksrpepqcw evqglvderp flhydcvnhk akafaslgkk
vntktweeq tetlrdvddf lkgqllldiqv enlipieplt lqarmscehe
- [0303] ahghgrgswq flfngqkflf fdsnnrkwt lhpqakkmte kweknrdvtm
ffqkislgdc kmwleeflmy weqmdptkp pslapq
- [0304] 人可溶性ULBP2 (SEQ ID NO:31)
gradphslcyditvi pkfrpgprwc avqqqvdekt flhydcgntk vtpvsplgkk
lnvttawkaq npvlrevvdi lteqlrdiql enytpkeplt lqarmsceqk
- [0305] aeghssgswq fsfdgqifll fdsekrmwt vhpqarkmke kwendkvvam
sfhyfsmgdc igwledflmg mdstlepszag aplams
- [0306] 人可溶性ULBP3 (SEQ ID NO:32)
dahslwynfti ihlprhgqgw cevqsqvdk nflsydcgsd kvlsmghele
qlyatdawgk qlemlrevgq rlrleladte ledftpsgpl tlqvrmsece
- [0307] eadgyirgsw qfsfdgrkfl lfdsnrkwt vvhagarmk ekwekdsglt
tffkmvsmrd ckswlrdflm hrkkrlpta pptmapq
- [0308] 人可溶性ULBP4 (SEQ ID NO:33)
hslcfnftik slsrpgqpw eaqvflnkn flqynsdnm vkplgllgkk
vyatstwgel tqtlgevgrd lrmlldikp qiktsdpstl qvemfcqrea
- [0309] erctgaswqf atngeksllf dammntwtvi nheaskiket wkkdrgleky
frklsgdcd hwlreflghw eampeptvsp vnasdihwss sslpdrwiil
gafillvlmg ivlicvwwqn gewqaglwpl rts
- [0310] 人可溶性ULBP5 (SEQ ID NO:34)
gladp hslcyditvi pkfrpgprwc avqqqvdekt flhydcgskt vtpvsplgkk
lnvttawkaq npvlrevvdi lteqlldiql enyipkeplt lqarmsceqk
- [0311] aeghsgswq lsfdgqifll fdsenrmwt vhpqarkmke kwendkdmtn
sfhyismgdc tgwledflmg mdstlepszag apptmssg
- [0312] 人可溶性ULBP6 (SEQ ID NO:35)

rrddp hslcyditvi pkfrpgprwc avqqqvdekt flhydcgnkt vtpvsplgkk
lnvtmawkaq npvlrevvdi lteqlldiql enytpkeplt lqarmsceqk
[0314] aeghssgswq fsidgqtfl1 fdsekrmwtt vhpqarkmke kwendkdvam
sfhyismgdc igwledflmg mdstlepszag aplanmssg

[0315] 可溶性白介素蛋白和可溶性细胞因子蛋白的另外实例是本领域已知的。

[0316] 可溶性受体

[0317] 在本文所述的任何单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域中的一个或两个是可溶性白介素受体、可溶性细胞因子受体或配体受体。在一些实施例中,可溶性受体是可溶性TGF- β 受体II (TGF- β RII) (参见例如Yung等人,《美国呼吸与重症医学杂志 (Am. J. Resp. Crit. Care Med.)》194(9):1140-1151,2016中所描述的那些)、可溶性TGF- β RIII (参见例如Heng等人,《胎盘 (Placenta)》57:320,2017中所描述的那些)、可溶性NKG2D (参见例如Cosman等人,《免疫 (Immunity)》14(2):123-133,2001; Costa等人,《免疫学前沿 (Front. Immunol.)》,第9卷,第1150章,2018年5月29日;doi: 10.3389/fimmu.2018.01150)、可溶性Nkp30 (参见例如Costa等人,《免疫学前沿》,第9卷,第1150章,2018年5月29日;数字对象标识符:10.3389/fimmu.2018.01150)、可溶性Nkp44 (参见例如Costa等人,《免疫学前沿》,第9卷,第1150章,2018年5月29日;数字对象标识符:10.3389/fimmu.2018.01150中所描述的那些)、可溶性Nkp46 (参见例如Mandelboim等人,《自然 (Nature)》409:1055-1060,2001;Costa等人,《免疫学前沿》,第9卷,第1150章,2018年5月29日;数字对象标识符:10.3389/fimmu.2018.01150)、可溶性DNAM-1 (参见例如Costa等人,《免疫学前沿》,第9卷,第1150章,2018年5月29日;数字对象标识符:10.3389/fimmu.2018.01150中所描述的那些)、scMHC I (参见例如Washburn等人,《科学公共图书馆综合卷 (PLoS One)》6(3):e18439,2011中所描述的那些)、scMHC II (参见例如Bishwajit等人,《细胞免疫学 (Cellular Immunol.)》170(1):25-33,1996中所描述的那些)、scTCR (参见例如Weber等人,《自然》356(6372):793-796,1992中所描述的那些)、可溶性CD155 (参见例如Tahara-Hanaoka等人,《国际免疫学 (Int. Immunol.)》16(4):533-538,2004中所描述的那些)或可溶性CD28 (参见例如Hebbar等人,《临床与实验免疫学 (Clin. Exp. Immunol.)》136:388-392,2004)。

[0318] 可溶性白介素受体和可溶性细胞因子受体的另外实例是本领域已知的。

[0319] 另外的抗原结合结构域

[0320] 在任何单链或多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)另外的靶标结合结构域(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性靶标结合结构域)。在任何多链嵌合多肽的一些实施例中,一个或多个另外的抗原结合结构域中的至少一个可位于可溶性组织因子结构域(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性可溶性组织因子结构域)和亲和结构域对的第一结构域(例如,本文所述的任何示例性亲和结构域对的任何示例性第一结构域)之间。在一些实施例中,第一嵌合多肽可进一步包括在可溶性组织因子结构域(例如,本文所描述的示例性可溶性组织因子结构域中的任一种)与一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)之间的接头序列(例如,本文所描述或本领域已知的示例性接头序列中的任一种),和/或一个或多个另外

的靶标结合结构域中的至少一个(例如,本文描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)与一对亲和结构域中的第一结构域(例如,本文所描述的示例性亲和结构域对中的任一种的本文所描述的示例性第一结构域中的任一种)之间的本文所接头序列(例如,本文所描述或本领域已知的示例性接头序列中的任一种)。

[0321] 在本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种的一些实施例中,第一嵌合多肽在第一嵌合多肽的N端和/或C端进一步包括一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)另外的靶标结合结构域。在一些实施例中,在第一嵌合多肽中,一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)直接邻接亲和结构域对中的第一结构域(例如,本文所描述的示例性亲和结构域对中的任一种的本文所描述的示例性第一结构域中的任一种)。在一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括在一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)与一对亲和结构域中的第一结构域(例如,本文所描述的示例性亲和结构域对中的任一种的本文所描述的示例性第一结构域中的任一种)之间的接头序列(例如,本文所描述或本领域已知的示例性接头序列中的任一种)。在一些实施例中,在第一嵌合多肽中,一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个(例如,本文描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)直接邻接第一靶标结合结构域(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)。在一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包含在一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)与第一靶标结合结构域(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)之间的接头序列(例如,本文所描述或本领域已知的示例性接头序列中的任一种)。

[0322] 在本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种的一些实施例中,在第一嵌合多肽中,一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)安置于第一嵌合多肽的N和/或C端,并且一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)定位在可溶性组织因子结构域(例如,本文所描述或本领域已知的任何示例性可溶性组织因子结构域中的任一种)与一对亲和结构域中的第一结构域(例如,本文所描述的示例性亲和结构域对中的任一种的示例性第一结构域中的任一种)之间。在一些实施例中,在第一嵌合多肽中,安置于N端的一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个另外的靶标结合结构域(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)直接邻接第一靶标结合结构域(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)或一对亲和结构域中的第一结构域(例如,本文所描述的示例性亲和结构域对中的任一种的示例性第一结构域中的任一种)。在一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包含第一嵌合多肽中安置于至少一个另外的靶标结合结构域(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)与第一靶标结合结构域(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)或一对亲和结构域中的第一结构域(例如,本文所描述的示例性亲和结构域对中的任一种的示例性第一结构域中的任一种)之间的接头序列(例如,本文所描述或本领域已知的接头序列中的任一种)。在一些实施例中,在第一嵌合多肽中,安置于C端的一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个另外的靶标结合结

构域(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)直接邻接第一靶标结合结构域(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)或一对亲和结构域中的第一结构域(例如,本文所描述的示例性亲和结构域对中的任一种的示例性第一结构域中的任一种)。在一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包括第一嵌合多肽中安置于至少一个另外的靶标结合结构域(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)与第一靶标结合结构域(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)或一对亲和结构域中的第一结构域(例如,本文所描述的示例性亲和结构域对中的任一种的示例性第一结构域中的任一种)之间的接头序列(例如,本文所描述或本领域已知的接头序列中的任一种)。在一些实施例中,位于可溶性组织因子结构域(例如,本文所描述的示例性可溶性组织因子结构域中的任一种)与一对亲和结构域中的第一结构域(例如,本文所描述的第一结构域中的任一种或本文所描述的示例性亲和结构域对中的任一种)之间的一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)直接邻接可溶性组织因子结构域和/或一对亲和结构域中的第一结构域。在一些实施例中,第一嵌合多肽进一步包含接头序列(例如,本文所描述或本领域已知的示例性接头序列中的任一种),所述接头序列安置于(i)可溶性组织因子结构域(例如,本文所描述的示例性可溶性组织因子中的任一种)与一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)之间,所述一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个位于可溶性组织因子结构域(例如,本文所描述的示例性可溶性组织因子中的任一种)与一对亲和结构域中的第一结构域(例如,本文所描述的示例性亲和结构域对中的任一种的示例性第一结构域中的任一种)之间,和/或(ii)一对亲和结构域中的第一结构域与一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个之间,所述一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个位于可溶性组织因子结构域与一对亲和结构域中的第一结构域之间。

[0323] 在本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种的一些实施例中,第二嵌合多肽在第二嵌合多肽的N端和/或C端进一步包括一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)另外的靶标结合结构域(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)。在一些实施例中,在第二嵌合多肽中,一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)直接邻接所述一对亲和结构域中的第二结构域(例如,本文所描述的示例性亲和结构域对中的任一种的示例性第二结构域中的任一种)。在一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括第二嵌合多肽中在一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)与一对亲和结构域中的第二结构域(例如,本文所描述的示例性亲和结构域对中的任一种的示例性第二结构域中的任一种)之间的接头序列(例如,本文所描述或本领域已知的示例性接头序列中的任一种)。在一些实施例中,在第二嵌合多肽中,一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)直接邻接第二靶标结合结构域(例如,本文所描述或本领域已知的靶标结合结构域中的任一种)。在一些实施例中,第二嵌合多肽进一步包括第二嵌合多肽中在一个或多个另外的靶标结合结构域中的至少一个(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)与第二靶标结合结构

域(例如,本文所描述或本领域已知的示例性靶标结合结构域中的任一种)之间的接头序列(例如,本文所描述或本领域已知的示例性接头序列中的任一种)。

[0324] 在本文描述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域、第二靶标结合结构域和一个或多个另外的靶标结合结构域中的两个或更多个(例如,三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个或十个或更多个)特异性结合到相同的抗原。在一些实施例中,第一靶标结合结构域、第二靶标结合结构域和一个或多个另外的靶标结合结构域中的两个或更多个(例如,三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个或十个或更多个)特异性结合到相同的表位。在一些实施例中,第一靶标结合结构域、第二靶标结合结构域和一个或多个另外的靶标结合结构域中的两个或更多个(例如,三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个或十个或更多个)包括相同的氨基酸序列。在一些实施例中,第一靶标结合结构域、第二靶标结合结构域和一个或多个另外的靶标结合结构域各自特异性结合到相同的抗原。在一些实施例中,第一靶标结合结构域、第二靶标结合结构域和一个或多个另外的靶标结合结构域各自特异性结合到相同的表位。在一些实施例中,第一靶标结合结构域、第二靶标结合结构域和一个或多个另外的靶标结合结构域各自包括相同的氨基酸序列。

[0325] 在本文描述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域、第二靶标结合结构域和一个或多个另外的靶标结合结构域特异性结合到不同的抗原。在本文描述的任一种多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域、第二靶标结合结构域和一个或多个靶标结合结构域中的一个或多个(例如,两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个或十个或更多个)是抗原结合结构域。在一些实施例中,第一靶标结合结构域、第二靶标结合结构域和一个或多个另外的靶标结合结构域各自是抗原结合结构域(例如,scFv或单结构域抗体)。

[0326] 亲和结构域对

[0327] 在一些实施例中,多链嵌合多肽包括:1) 包括一对亲和结构域中的第一结构域的第一嵌合多肽,和2) 包括一对亲和结构域中的第二结构域的第二嵌合多肽,使得第一嵌合多肽和第二嵌合多肽通过一对亲和结构域中的第一结构域和第二结构域的结合而缔合。在一些实施例中,所述一对亲和结构域是来自人IL-15受体的 α 链(IL15R α)的寿司结构域和可溶性IL-15。寿司结构域,也称为短共有重复序列或I型糖蛋白基序,是蛋白质-蛋白质相互作用中的常见基序。已在许多蛋白质结合分子,包括补体组分C1r、C1s、因子H和C2m以及非免疫分子因子XIII和 β 2-糖蛋白上鉴别了寿司结构域。典型的寿司结构域具有大约60个氨基酸残基,并且包含四个半胱氨酸(Ranganathan,《太平洋生物计算专题讨论会(Pac.Symp Biocomput.)》2000:155-67)。第一半胱氨酸可与第三半胱氨酸形成二硫键,并且第二半胱氨酸可与第四半胱氨酸形成二硫桥键。在其中一对亲和结构域中的一个成员是可溶性IL-15的一些实施例中,可溶性IL15具有D8N或D8A氨基酸取代。在其中一对亲和结构域中的一个成员是人IL-15受体的 α 链(IL15R α)的一些实施例中,人IL15R α 是成熟全长IL15R α 。在一些实施例中,所述一对亲和结构域是芽胞杆菌RNA酶和芽胞杆菌RNA酶抑制子。在一些实施

例中,所述一对亲和结构域是PKA和AKAP。在一些实施例中,所述一对亲和结构域是基于突变核糖核酸酶I片段的衔接子/对接标签模块(Rossi,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA.)》103:6841-6846,2006;Sharkey等人,《癌症研究(Cancer Res.)》68:5282-5290,2008;Rossi等人,《药物科学趋势(Trends Pharmacol Sci.)》33:474-481,2012)或基于蛋白质突触蛋白、突触结合蛋白、突触泡蛋白和SNAP25相互作用的SNARE模块(Deyev等人,《自然·生物技术(Nat Biotechnol.)》1486-1492,2003)。

[0328] 在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽包括一对亲和结构域的第一结构域,并且多链嵌合多肽的第二嵌合多肽包括一对亲和结构域的第二结构域,其中该对亲和结构域的第一结构域和该对亲和结构域的第二结构域以小于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、小于 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、小于 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 、小于 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 、小于 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 、小于 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 、或小于 $1 \times 10^{-13} \text{M}$ 的解离平衡常数(K_D)彼此结合。在一些实施例中,该对亲和结构域的第一结构域和该对亲和结构域的第二结构域以约 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、约 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、约 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、约 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 、约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 、约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 、约 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 、约 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-13} \text{M}$ 、约 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 、约 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、约 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、约 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 、约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 、约 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 、约 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 、或约 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-13} \text{M}$ (包括端值)的 K_D 彼此结合。本领域已知的多种不同方法中的任一种均可以用于确定一对亲和结构域中的第一结构域与一对亲和结构域中的第二结构域的结合的 K_D 值(例如,电泳迁移变动分析、滤膜结合分析、表面等离子体共振和生物分子结合动力学分析等)。

[0329] 在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽包括一对亲和结构域的第一结构域,多链嵌合多肽的第二嵌合多肽包括一对亲和结构域的第二结构域,其中该对亲和结构域的第一结构域、该对亲和结构域的第二结构域或两者的长度可以为约10至100个氨基酸。例如,一对亲和结构域的第一结构域、一对亲和结构域的第二结构域,或两者的长度可以为约10至100个氨基酸、长度为约15至100个氨基酸、长度为约20至100个氨基酸、长度为约25至100个氨基酸、长度为约30至100个氨基酸、长度为约35至100个氨基酸、长度为约40至100个氨基酸、长度为约45至100个氨基酸、长度为约50至100个氨基酸、长度为约55至100个氨基酸、长度为约60至100个氨基酸、长度为约65至100个氨基酸、长度为约70至100个氨基酸、长度为约75至100个氨基酸、长度为约80至100个氨基酸、长度为约85至100个氨基酸、长度为约90至100个氨基酸、长度为约95至100个氨基酸、长度为约10至95个氨基酸、长度为约10至90个氨基酸、长度为约10至85个氨基酸、长度为约10至80个氨基酸、长度为约10至75个氨基酸、长度为约10至70个氨基酸、长度为约10至65个氨基酸、长度为约10至60个氨基酸、长度为约10至55个氨基酸、长度为约10至50个氨基酸、长度为约10至45个氨基酸、长度为约10至40个氨基酸、长度为约10至35个氨基酸、长度为约10至30个氨基酸、长度为约10至25个氨基酸、长度为约10至20个氨基酸、长度为约10至15个氨基酸、长度为约20至30个氨基酸、长度为约30至40个氨基酸、长度为约40至50个氨基酸、长度为约50至60个氨基酸、长度为约60至70个氨基酸、长度为约70至80个氨基酸、长度为约80至90个氨基酸、长度为约90至100个氨基酸、长度为约20至90个氨基酸、长度为约30至80个氨基酸、长度为约40至70个氨基酸、长度为约50至60个氨基酸,或其间的任何范围。在一些实施例中,一对亲和结构域的第一结构域、一对亲和结构域的第二结构域或两者的长度为约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、

60、65、70、75、80、85、90、95或100个氨基酸。

[0330] 在一些实施例中,本文公开的一对亲和结构域中的第一和/或第二结构域中的任一个可以在其N端和/或C端包括一个或多个另外的氨基酸(例如1、2、3、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸),只要一对亲和结构域中第一和/或第二结构域的功能保留完整即可。例如,来自人IL-15受体的 α 链(IL15R α)的寿司结构域可以在N端和/或C端包括一个或多个另外的氨基酸,同时仍保留与可溶性IL-15结合的能力。另外地或可替代地,可溶性IL-15可以在N端和/或C端包括一个或多个另外的氨基酸,同时仍保留与来自人IL-15受体的 α 链(IL15R α)的寿司结构域结合的能力。

[0331] 来自IL-15受体 α (IL15R α) 的 α 链的sushi结构域的非限制性实例可以包括与以下至少70%相同、至少75%相同、至少80%相同、至少85%相同、至少90%相同、至少95%相同、至少99%相同或100%相同的序列:ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLT ECVLNKATNVAHWTPSLKCIR (SEQ ID NO:36)。在一些实施例中,来自IL15R α 的 α 链的sushi结构域可以由包括ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCT CTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCAGGTGCGTG CTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG (SEQ ID NO:37)的核酸编码。

[0332] 在一些实施例中,可溶性IL-15可以包括与以下至少70%相同、至少75%相同、至少80%相同、至少85%相同、至少90%相同、至少95%相同、至少99%相同或100%相同的序列:NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLI ILANNS LSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:22)。在一些实施例中,可溶性IL-15可以由包括AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATA TCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGA GCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAAT AACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCA AGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC (SEQ ID NO:38)的序列的核酸编码。

[0333] 信号序列

[0334] 在一些实施例中,多链嵌合多肽包括第一嵌合多肽,所述第一嵌合多肽在其N端包括信号序列。在一些实施例中,多链嵌合多肽包括第二嵌合多肽,所述第二嵌合多肽在其N端包括信号序列。在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽和多链嵌合多肽的第二嵌合多肽都包括信号序列。如本领域普通技术人员将理解,信号序列是存在于许多内源产生的蛋白质的N端的氨基酸序列,其将蛋白质引导到分泌路径(例如,蛋白质被引导以存在于某些细胞内细胞器中、存在于细胞膜中或从细胞中分泌)。信号序列是异质的,并且其一级氨基酸序列差异很大。但是,信号序列的长度典型地为16至30个氨基酸,并且包括亲水、通常带正电荷的N端区、中央疏水结合结构域和含有信号肽酶的裂解位点的C端区。

[0335] 在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或两者包括具有氨基酸序列MKWVTFISLLFLFSSAYS (SEQ ID NO:39)的信号序列。在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或两者包括由以下核酸序列编码的信号序列:

[0336] ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTTCCTCTTTAGCAGCGCCTACTCC (SEQ ID NO:40), ATGAAGTGGGTACATTTATCTCTTTACTGTTTCCTCTTCTCCAGCGCCTACAGC (SEQ ID NO:41), 或ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTTCCTCTTTAGCAGCGCCTACTCC (SEQ ID NO:42)。

[0337] 在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或两者包括具有氨基酸序列MKCLLYLAFLFLGVNC (SEQ ID NO:43)的信号序列。在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或两者包括具有氨基酸序列MGQIVTMFEALPHIIDEVINIVIIIVLIIITSIKAVYNFATCGILALVSFLFLAGRSCG (SEQ ID NO:44)的信号序列。在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或两者包括具有氨基酸序列MPNHQSGSPTGSSDLLLSGKKQRPHLALRRKRRRMRKINRKVRRMNLAPIKEKTAWQHLQALISEAEVLKTSQTPQNSLTFLALLSVLGPPVTG (SEQ ID NO:45)的信号序列。在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或两者包括具有氨基酸序列MDSKGSSQKGSRLLLLLLVSNLLLCQGVVS (SEQ ID NO:46)的信号序列。本领域普通技术人员将知道用于本文所描述的多链嵌合多肽的第一嵌合多肽和/或第二嵌合多肽的其它适当的信号序列。

[0338] 在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或两者包括长度为约10至100个氨基酸的信号序列。例如,信号序列可以是长度为约10至100个氨基酸、长度为约15至100个氨基酸、长度为约20至100个氨基酸、长度为约25至100个氨基酸、长度为约30至100个氨基酸、长度为约35至100个氨基酸、长度为约40至100个氨基酸、长度为约45至100个氨基酸、长度为约50至100个氨基酸、长度为约55至100个氨基酸、长度为约60至100个氨基酸、长度为约65至100个氨基酸、长度为约70至100个氨基酸、长度为约75至100个氨基酸、长度为约80至100个氨基酸、长度为约85至100个氨基酸、长度为约90至100个氨基酸、长度为约95至100个氨基酸、长度约10至95个氨基酸、长度为约10至90个氨基酸、长度为约10至85个氨基酸、长度为约10至80个氨基酸、长度为约10至75个氨基酸、长度为约10至70个氨基酸、长度为约10至65个氨基酸、长度为约10至60个氨基酸、长度为约10至55个氨基酸、长度为约10至50个氨基酸、长度为约10至45个氨基酸、长度为约10至40个氨基酸、长度为约10至35个氨基酸、长度为约10至30个氨基酸、长度为约10至25个氨基酸、长度为约10至20个氨基酸、长度为约10至15个氨基酸、长度为约20至30个氨基酸、长度为约30至40个氨基酸、长度为约40至50个氨基酸、长度为约50至60个氨基酸、长度为约60至70个氨基酸、长度为约70至80个氨基酸、长度为约80至90个氨基酸、长度为约90至100个氨基酸、长度为约20至90个氨基酸、长度为约30至80个氨基酸、长度为约40至70个氨基酸、长度为约50至60个氨基酸,或其间的任何范围。在一些实施例中,信号序列的长度为约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100个氨基酸。

[0339] 在一些实施例中,本文公开的任一个信号序列可以在其N端和/或C端包括一个或多个另外的氨基酸(例如,1、2、3、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸),只要信号序列的功能保留完整即可。例如,具有氨基酸序列MKCLLYLAFLFLGVNC (SEQ ID NO:43)的信号序列可以在N-末端或C-末端包括一个或多个另外的氨基酸,同时仍然保留将多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或两者导向分泌途径的能力。

[0340] 在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或两者包括将多链嵌合多肽引导到细胞外空间中的信号序列。这类实施例可以用于产生相

对容易分离和/或纯化的多链嵌合多肽。

[0341] 肽标签

[0342] 在一些实施例中,多链嵌合多肽包括第一嵌合多肽,其包括肽标签(例如,在第一嵌合多肽的N端或C端)。在一些实施例中,多链嵌合多肽包括第二嵌合多肽,其包括肽标签(例如,在第二嵌合多肽的N端或C端)。在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽和多链嵌合多肽的第二嵌合多肽都包括肽标签。在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或两者包括两个或更多个肽标签。

[0343] 可以包括在多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或两者中的示例性肽标签包括但不限于AviTag (GLNDIFEAQKIEWHE;SEQ ID NO:47)、钙调蛋白标签 (KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL;SEQ ID NO:48)、聚谷氨酸标签 (EEEEEE;SEQ ID NO:49)、E-标签 (GAPVPYPDPLEPR;SEQ ID NO:50)、FLAG-标签 (DYKDDDDK;SEQ ID NO:51)、来自血凝素的肽HA-tag (YPYDVPDYA;SEQ ID NO:52)、his-标签 (HHHHH(SEQ ID NO:53);HHHHHH(SEQ ID NO:54);HHHHHHH(SEQ ID NO:55);HHHHHHHH(SEQ ID NO:56);HHHHHHHHH(SEQ ID NO:57);或HHHHHHHHHH(SEQ ID NO:58)、myc-标签 (EQKLISEEDL;SEQ ID NO:59)、NE-标签 (TKENPRSNQEESYDDNES;SEQ ID NO:60)、S-标签 (KETAAAKFERQHMDS;SEQ ID NO:61)、SBP-标签 (MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP;SEQ ID NO:62)、Softag 1 (SLAELLNAGLGGS;SEQ ID NO:63)、Softag 3 (TQDPSRVG;SEQ ID NO:64)、Spot-标签 (PDRVRAVSHWSS;SEQ ID NO:65)、Strep-标签 (WSHPQFEK;SEQ ID NO:66)、TC标签 (CCPGCC;SEQ ID NO:67)、Ty标签 (EVHTNQDPLD;SEQ ID NO:68)、V5标签 (GKPIPNPLLGLDST;SEQ ID NO:69)、VSV-标签 (YTDIEMNRLGK;SEQ ID NO:70)和Xpress标签 (DLYDDDDK;SEQ ID NO:71)。在一些实施例中,组织因子蛋白是肽标签。

[0344] 可包括在多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或两者中的肽标签可用于与多链嵌合多肽相关的多种应用中的任一种。例如,肽标签可以用于纯化多链嵌合多肽。作为一个非限制性实例,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽(例如,重组表达的第一嵌合多肽)、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽(例如,重组表达的第二嵌合多肽)或两者可以包括myc标签;可以使用识别myc标签的抗体纯化包括加myc标签的第一嵌合多肽、加myc标签的第二嵌合多肽或两者的多链嵌合多肽。识别myc标签的抗体的一个非限制性实例是9E10,其可以从非商业发展研究杂交瘤库(Developmental Studies Hybridoma Bank)获得。作为另一非限制性实例,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽(例如,重组表达的第一嵌合多肽)、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽(例如,重组表达的第二嵌合多肽)或两者可以包括组氨酸标签;可使用镍或钴螯合物纯化包括加组氨酸标签的第一嵌合多肽、加组氨酸标签的第二嵌合多肽或两者的多链嵌合多肽。本领域普通技术人员将知道其它合适的标签和结合这些标签的试剂以用于纯化多链嵌合多肽。在一些实施例中,纯化后从多链嵌合多肽的第一嵌合多肽和/或第二嵌合多肽去除肽标签。在一些实施例中,纯化后未从多链嵌合多肽的第一嵌合多肽和/或第二嵌合多肽去除肽标签。

[0345] 可以包括在多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或两者中的肽标签可以用于例如多链嵌合多肽的免疫沉淀、多链嵌合多肽的成像(例如,通过蛋白质印迹法、ELISA、流式细胞术和/或免疫细胞化学)和/或多链嵌合多肽的增溶。

[0346] 在一些实施例中,多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽

或两者包括长度为约10至100个氨基酸的肽标签。例如,肽标签可以是长度为约10至100个氨基酸、长度为约15至100个氨基酸、长度为约20至100个氨基酸、长度为约25至100个氨基酸、长度为约30至100个氨基酸、长度为约35至100个氨基酸、长度为约40至100个氨基酸、长度为约45至100个氨基酸、长度为约50至100个氨基酸、长度为约55至100个氨基酸、长度为约60至100个氨基酸、长度为约65至100个氨基酸、长度为约70至100个氨基酸、长度为约75至100个氨基酸、长度为约80至100个氨基酸、长度为约85至100个氨基酸、长度为约90至100个氨基酸、长度为约95至100个氨基酸、长度为约10至95个氨基酸、长度为约10至90个氨基酸、长度为约10至85个氨基酸、长度为约10至80个氨基酸、长度为约10至75个氨基酸、长度为约10至70个氨基酸、长度为约10至65个氨基酸、长度为约10至60个氨基酸、长度为约10至55个氨基酸、长度为约10至50个氨基酸、长度为约10至45个氨基酸、长度为约10至40个氨基酸、长度为约10至35个氨基酸、长度为约10至30个氨基酸、长度为约10至25个氨基酸、长度为约10至20个氨基酸、长度为约10至15个氨基酸、长度为约20至30个氨基酸、长度为约30至40个氨基酸、长度为约40至50个氨基酸、长度为约50至60个氨基酸、长度为约60至70个氨基酸、长度为约70至80个氨基酸、长度为约80至90个氨基酸、长度为约90至100个氨基酸、长度为约20至90个氨基酸、长度为约30至80个氨基酸、长度为约40至70个氨基酸、长度为约50至60个氨基酸,或其间的任何范围。在一些实施例中,肽标签的长度为约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100个氨基酸。

[0347] 多链嵌合多肽的第一嵌合多肽、多链嵌合多肽的第二嵌合多肽或两者中包括的肽标签可以具有任何合适的长度。例如,肽标签的长度可以是5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个氨基酸。在多链嵌合多肽包括两个或更多个肽标签的实施例中,两个或更多个肽标签可以具有相同或不同的长度。在一些实施例中,本文公开的任一个肽标签可以在N端和/或C端包括一个或多个另外的氨基酸(例如,1、2、3、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸),只要肽标签的功能保留完整即可。例如,具有氨基酸序列EQKLISEEDL (SEQ ID NO:59)的myc标签可以包括一个或多个另外的氨基酸(例如,在肽标签的N-末端和/或C-末端),同时仍然保留被抗体(例如,9E10)结合的能力。

[0348] 示例性多链嵌合多肽-A型

[0349] 在本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域各自独立地特异性结合到IL-18的受体或IL-12的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合结构域和可溶性组织因子结构域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽还包含在第一嵌合多肽中第一靶标结合结构域与可溶性组织因子结构域之间的接头序列(例如,本文描述的任一个示例性接头)。

[0350] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,一对亲和结构域中的第二结构域和第二靶标结合结构域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽还包括在第二嵌合多肽中一对亲和结构域中的第二结构域与第二靶标结合结构域之间的接头序列(例如,本文描述的任一个示例性接头)。

[0351] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子结构域可以是本文描述的任一种示例性可溶性组织因子结构域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,所述一对亲和结构域可以是本文描述的任一对示例性亲和结构域。

[0352] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域中的一个或两个是激动性抗原结合结构域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域各自是激动性抗原结合结构域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,抗原结合结构域包括scFv或单结构域抗体。

[0353] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域中的一个或两个是可溶性IL-15或可溶性IL-18。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域各自独立地是可溶性IL-15或可溶性IL-18。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域都特异性结合到IL-18的受体或IL-12的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域特异性结合到相同的表位。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域包括相同的氨基酸序列。

[0354] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域特异性结合到IL-12的受体,而第二靶标结合结构域特异性结合到IL-18的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域特异性结合到IL-18的受体,而第二靶标结合结构域特异性结合到IL-12的受体。

[0355] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域包括可溶性IL-18(例如,可溶性人IL-18)。

[0356] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-18包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0357] YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDI IFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (SEQ ID NO:72)。

[0358] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-18由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0359] TACTTCGGCAAACCTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGATCAAGGTAACCGGCCTCTGTTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGACAATGCCCCCGGACCATCTTCATTATCTCCATGTACAAGGACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAAGTGTGAGAAAATCAGCACTTATCTTGTGAGAACAAGATCATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCGATAACATCAAGGACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTGCCCGGTCACGATAACAAGATGCAGTTCGAATCCTCCTCCTACGAGGGCTACTTTTtagcttGTGAAAAGGAGAGGGATTTATTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATCGTTCCATCATGTTACCGTCCAAAACGAGGAT (SEQ ID NO:73)。

[0360] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合结构域包括可溶性IL-12(例如,可溶性人IL-12)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-15包括可溶性人IL-12 β (p40)的序列和可溶性人IL-12 α (p35)的序列。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性IL-15人IL-15进一步包括可溶性IL-12 β (p40)的序列与可溶性人IL-12 α (p35)的

序列之间的接头序列(例如,本文所描述的示例性接头序列中的任一种)。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,接头序列包含GGGSGGGSGGGG(S_{EQ} ID NO:14)。

[0361] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-12 β (p40)的序列包含与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0362] IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTC HKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ GVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS WSEWASVPCS(S_{EQ} ID NO:74)。

[0363] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-12 β (p40)由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0364] ATTTGGGAAGTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTCGAAGTGGACTGGTATCCCGATGCTCCCGGCGAAAT GGTGGTGCTCACTTGTGACACCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCTCGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGC TCCGGAAGACCTCACAATCCAAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACACATGCCACAAGGGAGGCGAGG TGCTCAGCCATTCTTATTATTATTACACAAGAAGGAAGACGGAATCTGGTCCACCGACATTTTAAAAGATCAGAA GGAGCCCAAGAATAAGACCTTTTAAAGGTGTGAGGCCAAAACTACAGCGGTCGTTTCACTTGTGGTGGCTGACC ACCATTTCCACCGATTAACTTCTCCGTGAAAAGCAGCCGGGAAGCTCCGACCTCAAGGTGTGACATGTGGAG CCGCTACCTCAGCGCTGAGAGGGTTCGTGGCGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAGATAG CGTTGTCCCGCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAACTCAAGTACGAGAAC TACACCTCCTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCCGATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAA ATAGCCGGCAAGTTGAGGTCTCTTGGGAATATCCCGACACTTGGAGCACACCCACAGCTACTTCTTTAACCTT TTGTGTGCAAGTTCAAGGTAAAAGCAAGCGGGAGAAGAAAGACCGGGTGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTC ATCTGTGCGGAAGAACGCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACTCCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCA GCGTGCCTTGTTCC(S_{EQ} ID NO:75)。

[0365] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-12 α (p35)包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0366] RNLPVATPDPMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLEL TKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDEL MQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS(S_{EQ} ID NO:76)。

[0367] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-12 α (p35)由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0368] CGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGTTCCCTTGTTTACACCACAGCCAGAATTTACTGAGGGCCGTGAGCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAATTTTACCCCTGCACCAGCGAGGAGATCGACCATGAAGATATCACCAAGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTTTACCTCTGGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTCTCAACTCTCGTGAAACCAGCTTCATCACAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGAAGACCTCCTTTATGATGGCTTTATGCCTCAGCTCCATCTACGAGGATTTAAAGATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTCATGGACCCTAAACGGCAGATCTTTTTAGACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCAAGCTTTAAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCCTCCCTCGAGGAGCCCCGATTTTTACAAGACAAAGATCAAAGTGTGCATTTTACTCCACGCCTTTAGGATCCGGGCCGTGACCATTGACCGGGTCATGAGCTATTTAAACGCCAGC (SEQ ID NO:77)。

[0369] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0370] YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQKEGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNLSLSSNGNVTESGKCEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:78)。

[0371] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0372] TACTTCGGCAAACCTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTCTGTTTATCGATCAAGGTAACCGGCTCTGTTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGACAATGCCCCCGGACCATCTTCATTATCTCCATGTACAAGGACAGCCAGCCCCGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAAGTGTGAGAAAATCAGCACTTATCTTGTGAGAACAAAGATCATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCGATAACATCAAGGACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTGCCCCGTACGATAACAAGATGCAGTTCGAATCCTCCTCCTACGAGGGCTACTTTTAGCTTGTGAAAAGGAGAGGGATTTATTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATCGTTCCATCATGTTTACCGTCCAAAACGAGGATAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGAATGTGGAGAGCACTGGTTCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTAAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTGTAAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTA

GAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACG
GCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTT
TGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC (SEQ ID NO:79)。

[0373] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0374] MKWVTFISLLFLFSSAYSFYGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTSDSCRDNAPRTIFIIS
MYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDKMQFESSSYEGYFLA
CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEGSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDW
KSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGT
KVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRT
VNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLELQVISLES
GDASIHTVENLIILANSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:80)。

[0375] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0376] ATGAAGTGGGTCACATTTATCTCTTTACTGTTCTCTTCTCCAGCGCTACAGCTACTTCGGCAAACCT
GGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGATCAAGGTAACCGGCCTCTGTTC
GAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGACAATGCCCCCGGACCATCTTCATTATCTCCATGTACAAGGACAGCC
AGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAAGTGTGAGAAAATCAGCACTTTATCTTGTGAGAACAAGATCAT
CTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCGATAACATCAAGGACACCAAGTCCGATATCATCTTCTTCCAGCGGTCCGTG
CCCGGTCACGATAACAAGATGCAGTTCGAATCCTCCTCCTACGAGGGCTACTTTTTAGCTTGTGAAAAGGAGAGGG
ATTTATTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATCGTTCCATCATGTTACCGTCCAAAACGAGGA
TAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAACCATCCTCGAATGG
GAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCT
ATACCACCGACACCGAGTGCGATCTACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGT
TAGCTACCCCGCCGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACC
CCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAG
TGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCCGGCAAAGATTTAAT
CTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCA
CCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTT
AAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCT
TGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCC
ACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTG
CAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTT
ATCAATACCTCC (SEQ ID NO:81)。

[0377] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%

相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0378] IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTC
HKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ
GVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ
LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSS
WSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLRLRAVSNMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDHED
ITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDP
KRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASITCPPP
MSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR (SEQ ID NO:82)。

[0379] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0380] ATTTGGGAAGTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTCAAGTGGACTGGTATCCCGATGCTCCCGCGCAAAT
GGTGGTGCTCACTTGTGACACCCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCTCGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGC
TCCGGAAGACCTCACAATCCAAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACACATGCCACAAGGGAGGCGAGG
TGCTCAGCCATTCCTTATTATTATTACACAAGAAGGAAGACGGAATCTGGTCCACCGACATTTTAAAAGATCAGAA
GGAGCCCAAGAATAAGACCTTTTAAAGGTGTGAGGCCAAAACTACAGCGGTCGTTTCACTTGTGTTGGTGGCTGACC
ACCATTTCCACCGATTAACTTCTCCGTGAAAAGCAGCCGGGAAGCTCCGACCTCAAGGTGTGACATGTGGAG
CCGCTACCTCAGCGCTGAGAGGGTTCGTGGCGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAGATAG
CGCTTGTCCCGCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAACTCAAGTACGAGAAC
TACACCTCCTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCCGATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAA
ATAGCCGGCAAGTTGAGGTCTCTTGGAATATCCCGACACTTGGAGCACACCCACAGCTACTTCTCTTTAACCTT
TTGTGTGCAAGTTCAAGGTAAAAGCAAGCGGAGAAGAAAGACCGGGTGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTC
ATCTGTGCGGAAGAACGCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACTCCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCA
GCGTGCTTGTTCGGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGGGAGGATCTCGTAACCTCCCCGTGGC
TACCCCGATCCCGGAATGTTCCCTTGTTTACCCACAGCCAGAATTTACTGAGGGCCGTGAGCAACATGCTGCAG
AAAGCTAGGCAGACTTTAGAATTTTACCCTTGACCCAGCGAGGAGATCGACCATGAAGATATACCAAGGACAAGA
CATCCACCGTGAGGCTTGTTTACCTCTGGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTCTCAACTCTCGTGAAACCAGCTT
CATCACAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGAAGACCTCCTTTATGATGGCTTTATGCCTCAGCTCCATCTACGAG
GATTTAAAGATGTACCAAGTGAGTTCAGACCATGAACGCCAAGCTGCTCATGGACCCTAAACGGCAGATCTTTT
TAGACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCAAGCTTTAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAA
GTCCTCCCTCGAGGAGCCCGATTTTACAAGACAAAGATCAAAGTGTGCATTTTACTCCACGCCTTTAGGATCCGG
GCCGTGACCATTGACCGGGTCATGAGCTATTTAAACGCCAGCATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACG
CCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGC
CGGCACCAGCAGCCTACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAG
TGCATCCGG (SEQ ID NO:83)。

[0381] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0382] MKWVTFISLLFLFSSAYSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG
KTLLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTI
STDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYT
SSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC
RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFCLHHSQNLLRAVSNNMLQKA
RQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIIYEDL
KMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAV
TIDRVMSYLNASITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLK CIR
(SEQ ID NO:84)。

[0383] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0384] ATGAAATGGGTGACCTTTATTCTTTACTGTTCTCTTTAGCAGCGCTACTCCATTTGGGAAGTGA
GAAGGACGTCTACGTGGTCGAACTGGACTGGTATCCCGATGCTCCCGGCGAAATGGTGGTGCTCACTTGTGACACC
CCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCCTCGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTCCGGAAGACCCTCACAATCC
AAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACACATGCCACAAGGGAGGCGAGGTGCTCAGCCATTCCTTATTATT
ATTACACAAGAAGGAAGACGGAATCTGGTCCACCGACATTTTAAAGATCAGAAGGAGCCCAAGAATAAGACCTTT
TTAAGGTGTGAGGCCAAAACTACAGCGTCGTTTCACTTGTGGTGGCTGACCACCATTTCACCGATTAACT
TCTCCGTGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCTCAAGGTGTGACATGTGGAGCCGCTACCCTCAGCGCTGAGAG
GGTTCGTGGCGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAGATAGCGCTGTCCCGCTGCCGAAGAA
TCTTTACCCATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAACTCAAGTACGAGAACTACACCTCCTCCTTCTTTATCC
GGGACATCATTAAAGCCCGATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAAATAGCCGGCAAGTTGAGGTCTC
TTGGGAATATCCCGACACTTGGAGCACACCCACAGCTACTTCTCTTAACTTTTGTGTGCAAGTTCAAGGTAAA
AGCAAGCGGGAGAAGAAAGACCGGGTGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTCATCTGTGGAAGAACGCCTCCA
TCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACTCCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCAGCGTGCCTTGTTCGGCGGTGG
AGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCTCGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGTT
CCTTGTTTACACCACAGCCAGAATTTACTGAGGGCCGTGAGCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAAT
TTTACCCTTGACACGAGGAGATCGACCATGAAGATATACCAAGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTTT
ACCTCTGGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGCTCAACTCTCGTGAAACCAGCTTCATCACAAATGGCTCTTGTTTA
GCTTCCCGGAAGACCTCCTTTATGATGGCTTTATGCCTCAGCTCCATCTACGAGGATTTAAAGATGTACCAAGTGG
AGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTCATGGACCCTAAACGGCAGATCTTTTACGAGGAGAACATGCTGGCTGT
GATTGATGAGCTGATGCAAGCTTTAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAAGTCCCTCGAGGAGCCCGAT
TTTTACAAGACAAAGATCAAACTGTGCATTTTACTCCACGCCTTTAGGATCCGGGCCGTGACCATTGACCGGGTCA
TGAGCTATTTAAACGCCAGCATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTA
TAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAG
TGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCTCTTTAAAGTGCATCCGG (SEQ ID NO:
85)。

[0385] 示例性多链嵌合多肽-B型

[0386] 在本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种的一些实施例中,第一靶标结合结构域

和第二靶标结合结构域各自独立地特异性结合到IL-7的受体或IL-21的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合结构域和可溶性组织因子结构域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽还包含在第一嵌合多肽中第一靶标结合结构域与可溶性组织因子结构域之间的接头序列(例如,本文描述的任一个示例性接头)。

[0387] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子结构域和一对亲和结构域中的第一结构域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽还包括在第一嵌合多肽中可溶性组织因子结构域与一对亲和结构域中的第一结构域之间的接头序列(例如,本文描述的任一个示例性接头)。

[0388] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,一对亲和结构域中的第二结构域和第二靶标结合结构域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽还包括在第二嵌合多肽中一对亲和结构域中的第二结构域与第二靶标结合结构域之间的接头序列(例如,本文描述的任一个示例性接头)。

[0389] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子结构域可以是本文描述的任一种示例性可溶性组织因子结构域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,所述一对亲和结构域可以是本文描述的任一对示例性亲和结构域。

[0390] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域中的一个或两个是可溶性IL-21(例如,可溶性人IL-21多肽)或可溶性IL-7(例如,可溶性人IL-7多肽)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域各自独立地为可溶性IL-21或可溶性IL-7。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域都特异性结合到IL-21的受体或IL-7的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域特异性结合到相同的表位。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域包括相同的氨基酸序列。

[0391] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域特异性结合到IL-21的受体,而第二靶标结合结构域特异性结合到IL-7的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域特异性结合到IL-7的受体,而第二靶标结合结构域特异性结合到IL-21的受体。

[0392] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域包括可溶性IL-21(例如,可溶性人IL-21)。

[0393] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-21包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0394] QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIIN VSIKKLKRKPPSTNAGRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO: 86)。

[0395] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-21由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%

相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0396] CAAGGTCAAGATCGCCACATGATTAGAATGCGTCAACTTATAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTA TGTGAATGACTTGGTCCCTGAATTTCTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGACAACTGTGAGTGGTCAGCTTTTTCC TGTTTTTCAGAAGGCCCACTAAAGTCAGCAAATACAGGAAACAATGAAAGGATAATCAATGTATCAATTAATAAGC TGAAGAGGAAACCACCTTCCACAAATGCAGGGAGAAGACAGAAACACAGACTAACATGCCCTTCATGTGATTCTTA TGAGAAAAAACCAACCAAGAATTCCTAGAAAGATTCAAATCACTTCTCCAAAAGATGATTCATCAGCATCTGTCC TCTAGAACACACGGAAGTGAAGATTCC (SEQ ID NO:87)。

[0397] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-21由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0398] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTA CGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCC TGCTTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGC TGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTA CGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCC TCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC (SEQ ID NO:88)。

[0399] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-7的序列包含与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0400] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLK MNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNK ILMGTKEH (SEQ ID NO:19)。

[0401] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-7由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0402] GATTGTGATATTGAAGGTAAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATT ATTGGACAGCATGAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCTGAATAATGAATTTAACTTTTTTAAAAGACATATCTGTGAT GCTAATAAGGAAGGTATGTTTTATTCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCTTAAATGAATAGCACTGGTG ATTTTGATCTCCACTTATTAAGTTTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACTGGCCAGGTTAAAGGAAG AAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGCCCAACCAACAAAGAGTTTGGAAGAAAAATAAATCTTTAAAGGAACAGAAAAA CTGAATGACTTGTGTTTCCTAAAGAGACTATTACAAGAGATAAAAACTTGTTGGAATAAAATTTTGATGGGCACTA AAGAACAC (SEQ ID NO:89)。

[0403] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0404] QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIIN
VSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSRTHGSEDSSGTTNTVAAYN
LTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTG
SAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSS
GKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVSQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMH
IDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHD TVENLI ILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNI
KEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:90)。

[0405] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0406] CAAGGTCAAGATCGCCACATGATTAGAATGCGTCAACTTATAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTA
TGTGAATGACTTGGTCCCTGAATTTCTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGACAAACTGTGAGTGGTCAGCTTTTTCC
TGTTTTT CAGAAGGCCCACTAAAGTCAGCAAATACAGGAAACAATGAAAGGATAATCAATGTATCAATTA AAAAGC
TGAAGAGGAAACACCTTCCACAAATGCAGGGAGAAGACAGAAACACAGACTAACATGCCCTTCATGTGATTCTTA
TGAGAAAAAACCAACCAAGAATTCCTAGAAAGATTCAAATCACTTCTCCAAAAGATGATTCATCAGCATCTGTCC
TCTAGAACACACGGAAGTGAAGATTCCTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAATCAA
CTAATTTCAAGACAATTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCGTCATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTC
AGGAGATTGAAAAAGCAAATGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAGGATGTG
AAGCAGACGTACTTGGCACGGGTCTTCTCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGTTCTGCTGGGGAGCCTC
TGTATGAGAACTCCCCAGAGTTCACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGACAGCCAACAATTCAGAGTTTTGAACA
GGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACGGACTTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCCTAAGCCTC
CGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTATACACTTTATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCA
AAACAAACACTAATGAGTTTTT GATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACTACTGTTTCAGTGTTCAAGCAGTGATTCC
CTCCCGAACAGTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAGAA
AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTAT
ACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTC
TTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGC
AACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAAT
CCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC (SEQ ID NO:91)。

[0407] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0408] MGVKVLFALICIAVAEAQGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQ
KAQLKSANTGNNERIINVS IKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSRTH
GSEDSSGTTNTVAAYNLTKWSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQT
YLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVSQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWV
NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHD TVENLI ILANNSLSSNGN
VTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:92)。

[0409] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0410] ATGGGAGTGAAAGTTCTTTTTGCCCTTATTTGTATTGCTGTGGCCGAGGCCCAAGGTCAAGATCGCCA
CATGATTAGAATGCGTCAACTTATAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTATGTGAATGACTTGGTCCCTGAATTT
CTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGACAACTGTGAGTGGTCAGCTTTTTCTGTTCAGAAAGGCCCACTAAAGT
CAGCAAATACAGGAAACAATGAAAGGATAATCAATGTATCAATTAAGCTGAAGAGGAAACCACCTTCCACAAA
TGCAGGGAGAAGACAGAAACACAGACTAACATGCCCTTCATGTGATTCTTATGAGAAAAACCACCCAAAGAATTC
CTAGAAAGATTCAAATCACTTCTCCAAAAGATGATTCATCAGCATCTGTCTCTAGAACACACGGAAGTGAAGATT
CCTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAATTTTGGAGTG
GGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAGATTGAAAAAGCAAATGCTTT
TACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAGGATGTGAAGCAGACGTACTTGGCACGGGTCT
TCTCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGTTCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGAACTCCCCAGAGTTCAC
ACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGACAGCCAACAATTCAGAGTTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACC
GTAGAAGATGAACGGACTTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCTTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAA
TTTATACACTTTATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTTTTGAT
TGATGTGGATAAAGGAGAAAACTACTGTTTCAGTGTTCAAGCAGTGATTCCCTCCCGAACAGTTAACCGGAAGAGT
ACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAGAAAAGTGGGTGAACGTCATCAGCGATT
TAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTC
TTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATC
CACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTCTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCT
GCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTT
CATCAATACCTCC (SEQ ID NO:93)

[0411] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0412] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLK
MNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNK
ILMGTKEHITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR (SEQ
ID NO:94)。

[0413] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0414] GATTGTGATATTGAAGGTAAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATT
ATTGGACAGCATGAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCTGAATAATGAATTTAACTTTTTTAAAAGACATATCTGTGAT
GCTAATAAGGAAGGTATGTTTTTATCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCTTAAATGAATAGCACTGGTG
ATTTTGATCTCCACTTATTAAGTTTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACTGGCCAGGTTAAAGGAAG
AAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGCCCAACCAACAAAGAGTTTGAAGAAAAATAAATCTTTAAAGGAACAGAAAAA
CTGAATGACTTGTGTTTCCTAAAGAGACTATTACAAGAGATAAAAACTTGTTGGAATAAAATTTTGATGGGCACTA

AAGAACACATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTC
CAGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAAC
AAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA (SEQ ID NO:95)。

[0415] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0416] MGVKVLFALICIAVAEADCDIEGKDGKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANK
EGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLND
LCFLKRLLEIKTCWNKILMGTEKHITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKAT
NVAHWTTPSLKCIR (SEQ ID NO:96)。

[0417] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0418] ATGGGAGTGAAAGTTCTTTTGGCCTTATTTGTATTGCTGTGGCCGAGGCCGATTGTGATATTGAAGG
TAAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATTATTGGACAGCATGAAAGAAATTGGT
AGCAATTGCCTGAATAATGAATTTAACTTTTTTAAAAGACATATCTGTGATGCTAATAAGGAAGGTATGTTTTAT
TCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCTTAAATGAATAGCACTGGTGATTTTGATCTCCACTTATTAAGT
TTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACTGGCCAGGTTAAAGGAAGAAAACCAGCTGCCCTGGGTGAAGCC
CAACCAACAAAGAGTTTGGAAAGAAAATAAATCTTTAAAGGAACAGAAAAAACTGAATGACTTGTGTTTCCTAAAGA
GACTATTACAAGAGATAAAAACTTGTGGAATAAAATTTTGATGGGCACTAAAGAACACATCACGTGCCCTCCCC
CATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACCTC
GGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGA
CAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA (SEQ ID NO:97)。

[0419] 示例性多链嵌合多肽-C型

[0420] 在本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域各自独立地特异性结合到IL-7的受体或IL-21的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合结构域和可溶性组织因子结构域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽还包含在第一嵌合多肽中第一靶标结合结构域与可溶性组织因子结构域之间的接头序列(例如,本文描述的任一个示例性接头)。

[0421] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子结构域和一对亲和结构域中的第一结构域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽还包括在第一嵌合多肽中可溶性组织因子结构域与一对亲和结构域中的第一结构域之间的接头序列(例如,本文描述的任一个示例性接头)。

[0422] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,一对亲和结构域中的第二结构域和第二靶标结合结构域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽还包括在第二嵌合多肽中一对亲和结构域中的第二结构域与第二靶标结合结构域之间的接头序列(例如,本文描述的任一个示例性接头)。

[0423] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子结构域可以是本文描述的

任一种示例性可溶性组织因子结构域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,所述一对亲和结构域可以是本文描述的任一对示例性亲和结构域。

[0424] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域中的一个或两个是可溶性IL-21(例如,可溶性人IL-21多肽)或可溶性IL-7(例如,可溶性人IL-7多肽)。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域各自独立地为可溶性IL-21或可溶性IL-7。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域都特异性结合到IL-21的受体或IL-7的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域特异性结合到相同的表位。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域包括相同的氨基酸序列。

[0425] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域特异性结合到IL-21的受体,而第二靶标结合结构域特异性结合到IL-7的受体。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域特异性结合到IL-7的受体,而第二靶标结合结构域特异性结合到IL-21的受体。

[0426] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-21包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0427] QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIIN
VSIKKLKRKPPSTNAGRQKHLTCPSCDSEYKPPKEFLERFKSLQKMIHQHLSRTHGSEDS (SEQ ID NO:
86)。

[0428] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-21由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0429] CAAGGTCAAGATCGCCACATGATTAGAATGCGTCAACTTATAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTA
TGTGAATGACTTGGTCCCTGAATTTCTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGACAACTGTGAGTGGTCAGCTTTTTCC
TGTTTTTCAAGGCCCACTAAAGTCAGCAAATACAGGAAACAATGAAAGGATAATCAATGTATCAATTAATAAGC
TGAAGAGGAAACACCTTCCACAAATGCAGGGAGAAGACAGAAACACAGACTAACATGCCCTTCATGTGATTCTTA
TGAGAAAAAACCAACCAAGAATTCCTAGAAAGATTCAAATCACTTCTCCAAAAGATGATTCATCAGCATCTGTCC
TCTAGAACACACGGAAGTGAAGATTCC (SEQ ID NO:87)。

[0430] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-21由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0431] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTA
CGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCC
TGCTTTTCAAGGCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGC
TGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTA

CGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCC
TCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC (SEQ ID NO:88)。

[0432] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-7的序列包含与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0433] DCDIEGKDQKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLK
MNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNK
ILMGTKEH (SEQ ID NO:19)。

[0434] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人IL-7由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:GATTGTGATATTGAAGGTAAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTCTAATGGTCAGCATCGATCAATTATTGG
ACAGCATGAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCTGAATAATGAATTTAACTTTTTTAAAAAGACATATCTGTGATGCTAA
TAAGGAAGGTATGTTTTTATCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCTTAAAAATGAATAGCACTGGTGATTTT
GATCTCCACTTATTAAGTTTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACTGGCCAGGTAAAGGAAGAAAAC
CAGCTGCCCTGGGTGAAGCCCAACCAACAAAGAGTTTGGAAGAAAATAAATCTTTAAAGGAACAGAAAAAACTGAA
TGACTTGTGTTTCCTAAAGAGACTATTACAAGAGATAAAAACTTGTGGAATAAAATTTGATGGGCACTAAAGAA
CAC (SEQ ID NO:89)。

[0435] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0436] DCDIEGKDQKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLK
MNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNK
ILMGTKEHSGTTNTVAAYNLTKWSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVK
QTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLR
DVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVSQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREN
WVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSN
GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINITS (SEQ ID NO:98)。

[0437] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0438] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCT
GCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAAGTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGAC
GCCAACAAGGAGGGCATGTTCTGTTCAAGGCCGCCAGGAACTGCGGCAGTTCCTGAAGATGAACTCCACCGGCG
ACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCG
GAAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAG
CTGAACGACCTGTGCTTCCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCA
AGGAGCATAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCT

CGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAA
TGTTTTCTATACACCGACACCGAGTGCATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCC
GGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGA
ATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAAT
GTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAG
ATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTT
TTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAATAGG
AAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCA
GCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCA
CCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCT
AGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGT
CCGGCTGCAAGGAGTGCAGAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCA
GATGTTTCATCAATACCTCC (SEQ ID NO:99)。

[0439] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0440] MKWVTFISLLFLFSSAYSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQDLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDAN
KEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLN
DLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKESGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCF
YTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNV
VEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLTYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRTVNRKS
TDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASI
HDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHVIVQMFINTS (SEQ ID NO:100)。

[0441] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0442] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCTACTCCGATTGCGACATCGA
GGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATC
GGCTCCAAGTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAGGAGGGCATGTTCC
TGTTTCAGGGCCGCCAGGAAACTGCGGCAGTTCTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAA
GGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAACCTGCTGCTCTGGGAGAG
GCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCTCTGA
AGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCATAGCGGCACAACCAA
CACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTT
AACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACACCGACACCG
AGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGTGTTTAGCTACCCCGCCGG
CAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACC
AATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGA
CTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTA

CTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAAGGC
GAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTG
AGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGA
TTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCC
ATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGA
ATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGA
GCTGGAGGAGAAGACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC (SEQ
ID NO:101)。

[0443] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0444] QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIIN
VSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDSITCPPPMSVEH
ADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR (SEQ ID NO:102)。

[0445] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0446] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTA
CGTGAACGACCTGGTGCCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCC
TGCTTTCAGAAGGCCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGC
TGAAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGCAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTA
CGAGAAGAAGCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCC
TCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCCATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGA
AGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCT
CACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG (SEQ ID
NO:103)。

[0447] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0448] MKWVTFISLLFLFSSAYSQGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCF
QKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSR
THGSEDSITCPPPMSVEHADIWKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR (SEQ
ID NO:104)。

[0449] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0450] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCCCAGGGCCAGGACAG
GCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAG
TTTCTGCCTGCCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCAGCTGA

AGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCCTCCAC
AAACGCCGGCAGGAGGCAGAAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGAAGCCCCCAAGGAG
TTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGG
ACTCCATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCG
GGAGAGGTATATCTGTAAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAG
GCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG (SEQ ID NO:105)。

[0451] 示例性多链嵌合多肽-D型

[0452] 在本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域各自独立地特异性结合到TGF- β 。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一靶标结合结构域和可溶性组织因子结构域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,第一嵌合多肽还包含在第一嵌合多肽中第一靶标结合结构域与可溶性组织因子结构域之间的接头序列(例如,本文描述的任一个示例性接头)。

[0453] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子结构域和一对亲和结构域中的第一结构域在第一嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一嵌合多肽还包括在第一嵌合多肽中可溶性组织因子结构域与一对亲和结构域中的第一结构域之间的接头序列(例如,本文描述的任一个示例性接头)。

[0454] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,一对亲和结构域中的第二结构域和第二靶标结合结构域在第二嵌合多肽中彼此直接邻接。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第二嵌合多肽还包括在第二嵌合多肽中一对亲和结构域中的第二结构域与第二靶标结合结构域之间的接头序列(例如,本文描述的任一个示例性接头)。

[0455] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子结构域可以是本文描述的任一种示例性可溶性组织因子结构域。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,所述一对亲和结构域可以是本文描述的任一对示例性亲和结构域。

[0456] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域各自独立地特异性结合到TGF- β 。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域特异性结合到相同的表位。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域包括相同的氨基酸序列。

[0457] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域是可溶性TGF- β 受体(例如,可溶性TGF β R_{II}受体,例如可溶性人TGF β R_{II})。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人TGF β R_{II}包括可溶性人TGF β R_{II}的第一序列和可溶性人TGF β R_{II}的第二序列。在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人TGF β R_{II}包括安置于可溶性人TGF β R_{II}的第一序列与可溶性人TGF β R_{II}的第二序列之间的接头。在这些多链嵌合多肽的一些实例中,接头包括序列GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:14)。

[0458] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人TGF β R_{II}受体的第一序列包含与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0459] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID

NO:106)。

[0460] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人TGFRBRII受体的第二序列包含与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:SEQ ID NO:106。

[0461] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人TGFRBRII受体的第一序列由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0462] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAA
GTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACATGC
AGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCC
TGGAGACCGTGTGTACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCAT
CATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTGTAAACGACAACATC
ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGAT(SEQ ID NO:107)。

[0463] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性人TGFRBRII受体的第二序列由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0464] ATTCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAA
ATTTCCCCAGCTGTGCAAAATCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGC
TCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCC
TGGAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCAT
CATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATC
ATCTTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC(SEQ ID NO:108)。

[0465] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性TGF- β 受体包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0466] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFVFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVVRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGG
GSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFVFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVVRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD(SEQ ID
NO:109)。

[0467] 在这些多链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性TGF- β 受体由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0468] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAA

GTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAAGTGC
AGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCC
TGGAGACCGTGTGTACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCAT
CATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTGTAAACGACAACATC
ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTG
GGAGTATTCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATT
TCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCTGG
AAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCAT
GAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATC
TTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGAC (SEQ ID NO:110)。

[0469] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0470] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGSGGG
GSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSGTTNTVAA
YNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVES
TGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSS
SSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVSQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRENWVNVISDLKKIEDLIQS
MHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEK
NIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:111)。

[0471] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0472] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAA
GTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAAGTGC
AGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCC
TGGAGACCGTGTGTACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCAT
CATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTGTAAACGACAACATC
ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTG
GGAGTATTCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATT
TCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCTGG
AAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCAT
GAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATC
TTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGA
AGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCAC

CAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAA
GATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGTGTTTAGCTACCCCGCCGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCGGCTGGCG
AGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTT
TGAGCAAGTTGGCACAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTC
AGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCTCCGGCAAGAAGA
CAGCTAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGT
GATCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCGATAGCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTC
CGGGAGAACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCA
CTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTA
TCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTC
TGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC (SEQ ID NO: 112)。

[0473] 在一些实施例中,第一嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0474] MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI
TSICEKPQEVCAVVRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIF
SEEYNTSNPDGGGSGGGSGGGGSIIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQEVCAVVRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFS
EEYNTSNPDSGTTNTVAAYNLWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDV
KQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSL
RDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE
NWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSS
NGNVTESGKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO: 113)。

[0475] 在一些实施例中,第一嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0476] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCTACTCCATCCCCCCCCATGT
GCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTC
TGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAATGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGA
AGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCTGGAGACCGTGTGTACGACCC
CAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCC
GGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTGTAAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACA
CCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCA
GAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGC
GATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGC
CTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAA
GCTGCCCTACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGC
GAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCA

GCAACCCCGACAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCAT
CCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCC
AAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCAGTGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCG
CCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCC
CGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAGGTG
AATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCCGGCA
AAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGA
GTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAAT
AGGAAAAGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGAACTGGGTGAACGTCA
TCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGT
GCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGAC
GCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAG
AGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGT
CCAGATGTTTCATCAATACCTCC (SEQ ID NO:114)。

[0477] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0478] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGG
GSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDITCPPPMSV
EHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR (SEQ ID NO:115)。

[0479] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0480] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAA
GTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACCTGC
AGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCC
TGGAGACCGTGTGTACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCAT
CATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTGTAAACGACAACATC
ATCTTCAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTG
GGAGTATTCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATT
TCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCC
ATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCTGG
AAACCGTCTGCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCAT
GAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATC
TTTAGCGAGGAATACAATACCAGCAACCCCGACATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCT
GGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAG
CAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

(SEQ ID NO:116)。

[0481] 在一些实施例中,第二嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0482] MKWVTFISLLFLFSSAYSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI
TSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIF
SEEYNTSNPDGGGGSGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFS
EEYNTSNPDITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR
(SEQ ID NO:117)。

[0483] 在一些实施例中,第二嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0484] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCCATCCCCCCCCATGT
GCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTCTGCAAGTTC
TGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACCTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGA
AGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCTGGAGACCGTGTGTACAGACCC
CAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCC
GGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTGTAACGACAACATCATCTTCAGCGAAGAGTACAACA
CCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTATTCCTCCCCACGTGCA
GAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGC
GATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTCCATCTGTGAGAAGC
CTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCTGGAAACCGTCTGCCACGATCCCAA
GCTGCCCTACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAAAAGAAGCCTGGC
GAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGAATACAATACCA
GCAACCCCGACATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTA
CAGCCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTACCGAGTGCGTGCTG
AATAAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG (SEQ ID NO:118)。

[0485] 单链嵌合多肽

[0486] 本文提供了单链嵌合多肽,其包括:(i)第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一个靶标结合域)、(ii)可溶性组织因子域(例如本文所述或所属领域中已知的任一个示例性可溶性组织因子域),以及(iii)第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一个靶标结合域)。

[0487] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)与可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)彼此直接邻接。在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包含介于第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性第一靶标结合域)与可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)之间的接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例

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

[0488] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)与第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)彼此直接邻接。在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽还包含在第一靶标结合结构域(例如,本文描述或本领域已知的任一个示例性靶标结合结构域)与第二靶标结合结构域(例如,本文描述或本领域已知的任一个示例性靶标结合结构域)之间的接头序列(例如,本文描述或本领域已知的任一个示例性接头序列)。在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)与可溶性组织因子域(例如本文所述的任一种示例性可溶性组织因子域)彼此直接邻接。在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽进一步包含介于第二靶标结合域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性靶标结合域)与可溶性组织因子域(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性可溶性组织因子域)之间的接头序列(例如本文所述或所属领域中已知的任一种示例性接头序列)。

[0489] A型单链嵌合多肽的示例性实施例

[0490] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和/或第二靶标结合域可以独立地特异性结合到CD3(例如人CD3)或CD28(例如人CD28)。在一些实施例中,第一靶标结合域特异性结合到CD3(例如人CD3),而第二靶标结合域特异性结合到CD28(例如人CD28)。在一些实施例中,第一靶标结合结构域特异性结合到CD28(例如,人CD28),而第二靶标结合结构域特异性结合到CD3(例如,人CD3)。

[0491] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和可溶性组织因子结构域彼此直接邻接。在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽还包括在第一靶标结合结构域与可溶性组织因子结构域之间的接头序列(例如,本文描述的任一个示例性接头)。

[0492] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子结构域与第二靶标结合结构域彼此直接邻接。在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽还包括在可溶性组织因子结构域与第二靶标结合结构域之间的接头序列(例如,本文描述的任一个示例性接头)。

[0493] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域中的一个或两个是抗原结合结构域。在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域各自是抗原结合结构域(例如,本文描述的任一个示例性抗原结合结构域)。在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,抗原结合结构域包括scFv或单结构域抗体。

[0494] 特异性结合到CD3的scFv的非限制性实例可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0495] QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGT
SYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELARPGASVKMSC
KASGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR
YYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:119)。

[0496] 在一些实施例中,特异性结合到CD3的scFv可以由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0497] CAGATCGTGCTGACCCAAAGCCCCGCCATCATGAGCGCTAGCCCCGGTGAGAAGGTGACCATGACATG
CTCCGCTTCCAGCTCCGTGTCCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACCAGCCCCAAAAGGTGGATCTAC
GACACCAGCAAGCTGGCCTCCGAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGGCACCAGCTACTCTTTAACCA
TTTCCGGCATGGAAGCTGAAGACGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACCCCTTCACATTCCGATC
TGGCACCAAGCTCGAAATCAATCGTGGAGGAGGTGGCAGCGGCGGCGGTGGATCCGGCGGAGGAGGAAGCCAAGTT
CAACTCCAGCAGAGCGGCGCTGAACTGGCCCCGGCCGCGCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTCCGGCTATA
CATTTACTCGTTACACAATGCATTGGGTCAAGCAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATCGGATATATCAACCC
TTCCCGGGGCTACACCAACTATAACCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCCTGACAAGAGCTCCTCCACC
GCCTACATGCAGCTGTCTCTTTAACCAGCGAGGACTCCGCTGTTTACTACTGCGCTAGGTATTACGACGACCACT
ACTGTTTAGACTATTGGGGACAAGGTACCACTTTAACCGTCAGCAGC (SEQ ID NO:120)。

[0498] 特异性结合到CD28的scFv的非限制性实例可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0499] VQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKAT
LTSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIEMTQSPAIMSASL
GERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGSTSYSLTISSMEAEDAATYFCHQY
HRSPTFGGGTKLETKR (SEQ ID NO:121)。

[0500] 在一些实施例中,特异性结合到CD28的scFv可以由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0501] GTCCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAACCTCGTGAAACCCGGTGCTTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGC
CAGCGGATACACCTTCACCTCCTATGTGATCCAGTGGGTCAAACAGAAGCCCGGACAAGGTCTCGAGTGGATCGGC
AGCATCAACCTTACAACGACTATACCAAATACAACGAGAAGTTTAAGGGAAGGCTACTTTAACCTCCGACAAAA
GCTCCATCACAGCCTACATGGAGTTCAGCTCTTTAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTACTATTGCGCCCGGTGGGG
CGACGGCAATTACTGGGGACGGGGCACAACACTGACCGTGAGCAGCGGAGGCGGAGGCTCCGGCGGAGGCGGATCT
GGCGGTGGCGGCTCCGACATCGAGATGACCCAGTCCCCGCTATCATGTCCGCCTCTTTAGGCGAGCGGGTCACAA
TGACTTGTACAGCCTCCTCCAGCGTCTCCTCCTACTTCCATTGGTACCAACAGAAACCCGGAAGCTCCCCTAA
ACTGTGCATCTACAGCACCAGCAATCTCGCCAGCGGCGTGCCCCCTAGGTTTTCCGGAAGCGGAAGCACCAGCTAC
TCTTTAACCATCTCCTCCATGGAGGCTGAGGATGCCGCCACCTACTTTTGTACCAGTACCACCGGTCCCCACCT

TCGGAGGCGGCACCAAACTGGAGACAAAGAGG (SEQ ID NO:122)。

[0502] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和/或第二靶标结合结构域是可溶性受体(例如,可溶性CD28受体或可溶性CD3受体)。在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子结构域可以是本文描述的任一个示例性可溶性组织因子结构域。

[0503] 在一些实施例中,单链嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0504] QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGT
SYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELARPGASVKMSC
KASGYTFTRYTMHWVKRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR
YYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDT
ECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNTVEDER
TLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPV
ECMGQEKGEFREVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFK
GKATLTSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIEMTQSPAIM
SASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGSTSYSLTISSMEAEDAATYF
CHQYHRSPTFGGGTKLETKR (SEQ ID NO:123)。

[0505] 在一些实施例中,单链嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0506] CAGATCGTGCTGACCCAAAGCCCCGCCATCATGAGCGCTAGCCCCGGTGAGAAGGTGACCATGACATG
CTCCGCTTCCAGCTCCGTGTCCTACATGAAGTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACCCAGCCCCAAAGGTGGATCTAC
GACACCAGCAAGCTGGCCTCCGGAGTGCCCGCTCATTTCGGGGCTCTGGATCCGGCACCAGCTACTCTTTAACCA
TTTCCGGCATGGAAGCTGAAGACGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACCCCTTACATTCCGATC
TGGCACCAAGCTCGAAATCAATCGTGGAGGAGGTGGCAGCGGCGCGGTGGATCCGGCGGAGGAGGAAGCCAAGTT
CAACTCCAGCAGAGCGGCGCTGAACTGGCCCGGCCGCGCCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTCCGGCTATA
CATTTACTCGTTACACAATGCATTGGGTCAAGCAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATCGGATATATCAACCC
TTCCCGGGGCTACACCAACTATAACCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCCTGACAAGAGCTCCTCCACC
GCCTACATGCAGCTGTCTCTTTAACCAGCGAGGACTCCGCTGTTTACTACTGCGTAGGTATTACGACGACCACT
ACTGTTTAGACTATTGGGGACAAGGTACCACTTTAACCCTCAGCAGCTCCGGCACCACCAATACCGTGGCCGCTTA
TAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGAACCCAGCCGTCATCAAGTTTACACC
GTGCAGATCTCCACCAAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTGCTTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCG
ACGAAATCGTCAAGGACGTCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCAC
CGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAATTCCCCGAATTCACCCCTATTATTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCT
ACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGGCACCAAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGTGCGGCGGA
ATAACACATTTTTATCCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTC
CTCCGGCAAAAAGACCGCTAAGACCAACACCAACGAGTTTTTAATTGACGTGGACAAAGCGGAGAACTACTGCTTC
AGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCGAAGAGCACAGATTCCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAG

AAAAGGGCGAGTTCCGGGAGGTCCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAACCTCGTGAAACCCGGTGCTTCCGTGAAAAT
GTCTTGTAAGGCCAGCGGATACACCTTACCTCCTATGTGATCCAGTGGGTCAAACAGAAGCCCGGACAAGGTCTC
GAGTGGATCGGCAGCATCAACCCTTACAACGACTATACCAAATACAACGAGAAGTTTAAGGGAAAGGCTACTTTAA
CCTCCGACAAAAGCTCCATCACAGCCTACATGGAGTTCAGTCTTTAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTACTATTG
CGCCCGGTGGGGCGACGGCAATTACTGGGGACGGGGACAACACTGACCGTGAGCAGCGGAGGCGGAGGCTCCGGC
GGAGGCGGATCTGGCGGTGGCGGCTCCGACATCGAGATGACCCAGTCCCCCGCTATCATGTCCGCCTCTTTAGGCG
AGCGGGTCACAATGACTTGTACAGCCTCCTCCAGCGTCTCCTCCTACTTCCATTGGTACCAACAGAAACCCGG
AAGCTCCCCTAAACTGTGCATCTACAGCACCAGCAATCTCGCCAGCGGCGTGCCCCCTAGGTTTTCCGGAAGCGGA
AGCACCAGCTACTCTTTAACCATCTCCTCCATGGAGGCTGAGGATGCCGCCACCTACTTTTGTACCAGTACCACC
GGTCCCCACCTTCGGAGGCGGCACCAAACCTGGAGACAAAGAGG (SEQ ID NO: 124)。

[0507] 在一些实施例中,单链嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0508] MKWVTFISLLFLFSSAYSQIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDT
SKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGGSGGGGSGGGGSQVQL
QQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAY
MQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQ
ISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTI
QSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVS
QAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEW
IGSINPYNDYTKYNEKFKGKATLTSKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTLTVSSGGGSGGG
GSGGGGSDIEMTQSPAIMASASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGST
SYSLTISSMEAEDAATYFCHQYHRSPTFGGGTKLETKR (SEQ ID NO: 125)。

[0509] 在一些实施例中,单链嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0510] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCTTATTATTTTTATTTCAGCTCCGCCTATTCCCAGATCGTGCTGAC
CCAAAGCCCCGCCATCATGAGCGCTAGCCCCGGTGAGAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCCAGCTCCGTGTCC
TACATGAACTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACCAGCCCCAAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCTCCG
GAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGGCACCAGCTACTCTTTAACCATTTCGGGCATGGAAGCTGAAGA
CGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACCCCTTCACATTCGGATCTGGCACCAAGCTCGAAATCAAT
CGTGAGGAGGTGGCAGCGGCGGCGGTGGATCCGGCGGAGGAGGAAGCCAAGTTCAACTCCAGCAGAGCGGCGCTG
AACTGGCCCCGGCCGGCGCCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTCCGGCTATACATTTACTCGTTACACAATGCA
TTGGGTCAAGCAGAGGCCCGGTCAAGTTTATAGAGTGGATCGGATATATCAACCCCTCCCGGGGCTACACCAACTAT
AACCAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCCTGACAAGAGCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCTCTT
TAACCAGCGAGGACTCCGCTGTTTACTACTGCGCTAGGTATTACGACGACCACTACTGTTTACTACTATTGGGGACA
AGGTACCACTTTAACCGTCAGCAGCTCCGGCACCACCAATACCGTGCCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACC
AACTTCAAGACAATTCTGGAATGGGAACCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGAGATCTCCACCAAATCCG
GAGACTGGAAGAGCAAGTGCTTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCGACGAAATCGTCAAGGACGTCAA

GCAAACCTATCTGGCTCGGGTCTTTTCCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTC
TACGAGAATTCCCCGAATTCACCCCTTATTTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAG
TTGGCACCAAGGTGAACGTCACCGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGTGCGGCGGAATAACACATTTTTATCCCTCCG
GGATGTGTTCGGCAAAGACCTCATCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACCGCTAAG
ACCAACACCAACGAGTTTTTAATTGACGTGGACAAAGGCGAGAATACTACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTT
CTCGTACCGTCAACCGGAAGAGCACAGATTCCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGGT
CCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAACCTCGTGAAACCCGGTGCTTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCCAGCGGATAC
ACCTTCACCTCCTATGTGATCCAGTGGGTCAAACAGAAGCCCGGACAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAGCATCAACC
CTTACAACGACTATACCAAATACAACGAGAAGTTTAAGGGAAAGGCTACTTTAACCTCCGACAAAAGCTCCATCAC
AGCCTACATGGAGTTCAGCTCTTTAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTACTATTGCGCCCGGTGGGGCGACGGCAAT
TACTGGGGACGGGGCACAACACTGACCGTGAGCAGCGGAGGCGGAGGCTCCGGCGGAGGCGGATCTGGCGGTGGCG
GCTCCGACATCGAGATGACCCAGTCCCCCGCTATCATGTCCGCCTCTTTAGGCGAGCGGGTCACAATGACTTGTAC
AGCCTCCTCCAGCGTCTCCTCCTACTTCCATTGGTACCAACAGAAACCCGGAAGCTCCCCTAACTGTGCATC
TACAGCACCAGCAATCTCGCCAGCGGCGTGCCCCCTAGGTTTTCCGGAAGCGGAAGCACCAGCTACTCTTTAACCA
TCTCCTCCATGGAGGCTGAGGATGCCGCCACCTACTTTTGTACACAGTACCACCGGTCCCCCACCTTCGGAGGCGG
CACCAAACCTGGAGACAAAGAGG (SEQ ID NO:126)。

[0511] B型单链嵌合多肽的示例性实施例

[0512] 在本文所述的任一种单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合域和/或第二靶标结合域可以独立地特异性结合到IL-2受体(例如人IL-2受体)。

[0513] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和可溶性组织因子结构域彼此直接邻接。在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽还包括在第一靶标结合结构域与可溶性组织因子结构域之间的接头序列(例如,本文描述的任一个示例性接头)。

[0514] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子结构域与第二靶标结合结构域彼此直接邻接。在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,单链嵌合多肽还包括在可溶性组织因子结构域与第二靶标结合结构域之间的接头序列(例如,本文描述的任一个示例性接头)。

[0515] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,第一靶标结合结构域和第二靶标结合结构域是可溶性人IL-2蛋白。特异性结合到IL-2受体的IL-2蛋白的非限制性实例可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0516] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE
VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:
17)。

[0517] 在一些实施例中,特异性结合到IL-2受体的IL-2蛋白可以由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0518] GCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCCAAACCTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAAGTGAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAAGTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTTCACCTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACATAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTAACT (SEQ ID NO:127)。

[0519] 在一些实施例中,特异性结合到IL-2受体的IL-2蛋白可以由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0520] GCCCCACCTCCTCCTCCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGCTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTAAACGGCATCAACAACCTACAAGAACCCCAAGCTGACTCGTATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAGCATTTACAGTGTTTAGAGGAGGAGCTGAAGCCCCCTCGAGGAGGTGCTGAATTTAGCCAGTCCAAGAATTTCCATTTAAGGCCCCGGGATTTAATCAGCAACATCAACGTGATCGTTTTAGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACCGCCACCATCGTGGAGTTTTTAAATCGTTGGATCACCTTC TGCCAGTCCATCATCTCCACTTTAACC (SEQ ID NO:128)。

[0521] 在这些单链嵌合多肽的一些实施例中,可溶性组织因子结构域可以是本文描述的任一个示例性可溶性组织因子结构域。

[0522] 在一些实施例中,单链嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0523] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFQVGTQVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:129)。

[0524] 在一些实施例中,单链嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0525] GCCCCACCTCCTCCTCCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGCTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTAAACGGCATCAACAACCTACAAGAACCCCAAGCTGACTCGTATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAGCATTTACAGTGTTTAGAGGAGGAGCTGAAGCCCCCTCGAGGAGGTGCTGAATTTAGCCAGTCCAAGAATTTCCATTTAAGGCCCCGGGATTTAATCAGCAACATCAACGTGATCGTTTTAGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACCGCCACCATCGTGGAGTTTTTAAATCGTTGGATCACCTTC TGCCAGTCCATCATCTCCACTTTAACCAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCA CCAACTTCAAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTC CGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTACCGATGAGATCGTGAAAGATGTG

AAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTCTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCGCTGGCGAGCCTT
TATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCA
AGTTGGCACAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTC
CGGGATGTGTTCGGCAAAGATTTAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTA
AAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCC
CTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACCAGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCGGGGAG
GCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGA
ATGGAATTAATAATTACAAGAATCCCAAACTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCAC
AGAAGTGAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAA
AACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACTAAAGGGATCTGAAACAA
CATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAG
CATCATCTCAACACTAACT (SEQ ID NO:130)。

[0526] 在一些实施例中,单链嵌合多肽可以包括与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列:

[0527] MKWVTFISLLFLFSSAYSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA
TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQ
SIIISTLTSGTTNTVAAYNLWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKNVNTVEDERTLVRRNNTFLSLRD
VFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREAP
TSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF
HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIISTLT (SEQ ID NO:131)。

[0528] 在一些实施例中,单链嵌合多肽由与以下至少80%相同(例如,至少82%相同、至少84%相同、至少86%相同、至少88%相同、至少90%相同、至少92%相同、至少94%相同、至少96%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同)的序列编码:

[0529] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCTACTCCGCCCCACCTCCTC
CTCCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGCTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTAAACGGCATCAACAAC
TACAAGAACCCCAAGCTGACTCGTATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAGCATT
TACAGTGTCTTAGAGGAGGAGCTGAAGCCCCTCGAGGAGGTGCTGAATTTAGCCCAGTCCAAGAATTTCCATTTAAG
GCCCCGGGATTTAATCAGCAACATCAACGTGATCGTTTTAGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACCTTCATGTGCGAG
TACGCCGACGAGACCGCCACCATCGTGGAGTTTTTAAATCGTTGGATCACCTTCTGCCAGTCCATCATCTCCACTT
TAACCAGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTCGA
ATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGT
TTCTATACCACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGG
TGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATT
TACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAGGTGAATGTG
ACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCGGCAAAGATT
TAATCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTT
AATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAA

AGCACCGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAGGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTACTGCTGGATTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAA TCCCAAACCTACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGT CTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACTTTCACTTAAGACCCAGGG ACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAATAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATATGCTGA TGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTAACT (SEQ ID NO:132)。

[0530] 其它治疗剂

[0531] 本文所描述的方法中的任一种的一些实施例可进一步包括向受试者(例如,本文所描述的受试者中的任一种)施用治疗有效量的一种或多种另外的治疗剂。可与多链嵌合多肽(例如,本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种)或免疫细胞(例如,以单一配制物或两种或更多种配制物的形式向受试者施用)大体同时向受试者施用一种或多种另外的治疗剂。在一些实施例中,可在施用多链嵌合多肽(例如,本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种)或免疫细胞之前向受试者施用一种或多种另外的治疗剂。在一些实施例中,可在向受试者施用多链嵌合多肽(例如,本文所描述的多链嵌合多肽中的任一种)或免疫细胞后向受试者施用一种或多种另外的治疗剂。

[0532] 其它治疗剂的非限制性实例包括:抗癌药物、活化受体激动剂、免疫检查点抑制剂、用于阻断HLA特异性抑制性受体的药剂、糖原合成酶激酶(GSK)3抑制剂和抗体。

[0533] 抗癌药物的非限制性实例包括抗代谢药物(例如,5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-巯基嘌呤(6-MP)、卡培他滨(capecitabine)、阿糖胞苷(cytarabine)、氟尿苷(floxuridine)、氟达拉滨(fludarabine)、吉西他滨(gemcitabine)、羟基尿素、甲胺喋呤、6-硫鸟嘌呤、克拉屈滨(cladribine)、奈拉滨(nelarabine)、喷司他汀(pentostatin)或培美曲塞(pemetrexed))、植物碱(例如,长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、长春地辛(vindesine)、喜树碱(camptothecin)、9-甲氧基喜树碱、冠狗牙花定碱(coronaridine)、紫杉醇、乌檀根碱(naucleoral)、二异戊二烯基化吲哚生物碱(diprenylated indole alkaloid)、山矢车菊碱(montamine)、希什金矢车菊碱(schischkiniin)、原小蘗碱(protoberberine)、小蘗碱(berberine)、血根碱(sanguinarine)、白屈菜红碱(chelerythrine)、白屈菜碱(chelidonine)、鹅掌楸碱(liriodenine)、山岗蠹吾碱(clivorine)、 β -咔啉、脱甲氧基娃儿藤碱(antofine)、娃儿藤碱(tylophorine)、白叶藤碱(cryptolepine)、新白叶藤碱(neocryptolepine)、紫堇诺灵碱(corynoline)、依兰碱(sampangine)、咔唑、文殊兰碱(crinamine)、高山网球花碱(montanine)、玫瑰树碱(ellipticine)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、多西他赛(docetaxel)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenisopide)、伊立替康(irinotecan)、拓扑替康(topotecan)或吡啶酮生物碱)、蛋白酶体抑制剂(例如,乳酸素(lactacystin)、双硫仑(disulfiram)、表没食子儿茶素-3-没食子酸酯、马里佐米(marizomib)(盐孢菌素(salinosporamide)A)、奥普佐米(oprozomib)(ONX-0912)、地兰佐米(delanzomib)(CEP-18770)、环氧霉素(epoxomicin)、MG132、 β -羟基 β -甲基丁酸盐、硼替佐米(bortezomib)、卡非佐米(carfilzomib)或埃沙佐米(ixazomib))、抗肿瘤抗生素(例如,阿霉素(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、表柔比星(epirubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、伊达比星(idarubicin)、放线菌素(actinomycin)、普卡霉素

(plicamycin)、丝裂霉素(mitomycin)或博来霉素(bleomycin))、组蛋白脱乙酰基酶抑制剂(例如,伏立诺他(vorinostat)、帕比诺他(panobinostat)、贝林司他(belinostat)、吉韦诺他(givinostat)、阿贝辛他(abexinostat)、缩肽(depsipeptide)、恩替诺特(entinostat)、苯基丁酸盐、丙戊酸、曲古抑菌素(trichostatin)A、达西司他(dacinostat)、莫西司他(mocetinostat)、普瑞司他(pracinostat)、烟酰胺(nicotinamide)、坎比诺尔(cambinol)、替诺文(tenovin)1、替诺文6、斯汀诺(sirtinol)、利可司他(ricolinostat)、替非司他(tefinostat)、凯维林(kevetrin)、奎西司他(quisinostat)、雷米诺他(resminostat)、泰克地那林(tacedinaline)、西达本胺(chidamide)或赛利司他(selisistat))、酪氨酸激酶抑制剂(例如,阿昔替尼(axitinib)、达沙替尼(dasatinib)、恩可非尼(encorafenib)、厄洛替尼(erlotinib)、伊马替尼(imatinib)、尼洛替尼(nilotinib)、帕唑帕尼(pazopanib)和舒尼替尼(sunitinib))和化疗剂(例如,全反式维甲酸、阿扎胞苷(azacitidine)、硫唑嘌呤(azathioprine)、去氧氟尿苷、埃博霉素(epothilone)、羟脲、伊马替尼、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星(valrubicin)、维罗非尼(vemurafenib)和来那度胺(lenalidomide))。化疗剂的其它实例包括烷化剂,例如二氯甲二乙胺、环磷酰胺(cyclophosphamide)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、美法仑(melphalan)、异环磷酰胺(ifosfamide)、噻替派(thiotepa)、六甲三聚氰胺(hexamethylmelamine)、白消安(busulfan)、六甲蜜胺(altretamine)、丙卡巴肼(procarbazine)、达卡巴嗪(dacarbazine)、替莫唑胺(temozolomide)、卡莫司汀(carmustine)、罗莫司汀(lumustine)、链脲霉素(streptozocin)、卡铂(carboplatin)、顺铂(cisplatin)和奥沙利铂(oxaliplatin)。

[0534] 激活受体激动剂的非限制性实例包括激活和增强NK细胞的细胞毒性的激活受体的任何激动剂,包括抗CD16抗体(例如,抗CD16/CD30双特异性单克隆抗体(BiMAb))和基于Fc的融合蛋白。检查点抑制剂的非限制性实例包括抗PD-1抗体(例如,MEDI0680)、抗PD-L1抗体(例如,BCD-135、BGB-A333、CBT-502、CK-301、CS1001、FAZ053、KN035、MDX-1105、MSB2311、SHR-1316、抗PD-L1/CTLA-4双特异性抗体KN046、抗PD-L1/TGFβRII融合蛋白M7824、抗PD-L1/TIM-3双特异性抗体LY3415244、阿特珠单抗(atezolizumab)或阿维鲁单抗(avelumab))、抗TIM3抗体(例如,TSR-022、Sym023或MBG453)和抗CTLA-4抗体(例如,AGEN1884、MK-1308或抗CTLA-4/OX40双特异性抗体ATOR-1015)。用于阻断HLA特异性抑制受体的试剂的非限制性实例包括莫那力单抗(monalizumab)(例如,抗HLA-ENKG2A抑制受体单克隆抗体)。GSK3抑制剂的非限制性实例包括替格鲁西布(tideglusib)或CHIR99021。可以用作其它治疗剂的抗体的非限制性实例包括抗CD26抗体(例如,YS110)、抗CD36抗体和可结合到NK细胞上的Fc受体(例如,CD16)并激活所述受体的任何其它抗体或抗体构建体。在一些实施例中,其它治疗剂可以是胰岛素或二甲双胍(metformin)。

[0535] 实例

[0536] 在以下实例中进一步描述本发明,所述实例不限制权利要求书中所描述的本发明的范围。

[0537] 实例1. 示例性多链嵌合多肽的构建和其特性评估

[0538] 产生两种多链嵌合多肽并且评估其特性。两个多链嵌合多肽中的每一个均包括第一嵌合多肽,其包括与第一靶标结合结构域和结构域亲和对中的第一结构域共价连接的可溶性组织因子结构域。两个多链嵌合多肽中的每一个中的第二嵌合多肽包括结构域亲和对

中的第二结构域和第二靶标结合结构域。

[0539] 多链嵌合多肽的逻辑基础构建的描述

[0540] 组织因子(TF)是一种稳定的跨膜蛋白,含有236个氨基酸残基。组织因子的截短的重组219个氨基酸的细胞外结构域是可溶的,并且已知在细菌或哺乳动物细胞中以高水平表达。在不希望受特定理论束缚的情况下,申请人推测219-aa组织因子可用作产生独特多链嵌合多肽的连接接头。

[0541] 由在发酵液中生长的CHO细胞以高水平产生包括可溶性组织因子结构域的第一嵌合多肽。通过在固体基质上偶联的抗组织因子单克隆抗体(mAb)纯化这些第一嵌合多肽。值得注意的是,组织因子含有FVIIa和FX的结合位点。当组织因子未锚定到磷脂双层时,组织因子-FVIIa复合物对FX的催化活性低约100万倍。因此,在不希望受特定理论束缚的情况下,申请人推测在第一嵌合多肽的构建中使用不跨膜的组织因子的219-aa细胞外结构域可以消除第一嵌合多肽中组织因子的促凝活性。为了进一步降低或消除219-aa组织因子的促凝活性,可以在组织因子中进行选择突变,具体来说在已知有助于FVIIa结合位点结合能的七个氨基酸残基上进行。

[0542] 所描述的嵌合多肽的结合相互作用的表征

[0543] 为了确定第一和第二嵌合多肽是否彼此结合以形成多链嵌合多肽,进行体外结合分析。为了确定包含可溶性组织因子结构域的第一嵌合多肽是否由抗TF mAb识别并结合,进行体外结合分析。值得注意的是,数据表明突变组织因子蛋白仍由已知与组织因子上的FX结合位点结合的抗TF mAb识别并选择性结合。为了确定包含与scFv或细胞因子共价连接的可溶性组织因子结构域的第一嵌合多肽(参见图1和图2)是否具有功能性scFvs或细胞因子,进行体外结合分析。来自前述分析的数据与具有预期生物活性的纯化的第一嵌合多肽一致(例如,scFv选择性结合预期靶抗原或细胞因子选择性结合预期受体或结合蛋白)。

[0544] 另外,使用包括彼此结合的第一和第二嵌合多肽的两个多链嵌合多肽进行的实验展现预期靶标结合活性(例如,多链嵌合多肽特异性结合到由第一靶标结合结构域特异性识别的靶标和由第二靶标结合结构域特异性识别的靶标)。

[0545] 基于前述结果,申请人得出结论,可溶性组织因子连接接头提供或实现了编码scFv、白介素、细胞因子、白介素受体或细胞因子受体的多肽在三维空间中相对于可溶性组织因子结构域并且相对于彼此的适当呈现,使得各自保留预期生物特性和活性。

[0546] 当第一和第二嵌合多肽两者被共表达时,异二聚复合物以高水平分泌到发酵液中。捕获复合物并且使用亲和色谱通过结合到固体基质的抗TF mAb容易地纯化。如通过体外结合分析所分析,这些多链嵌合多肽的第一和第二靶标结合结构域保留其预期生物活性。因此,多链嵌合多肽的组装提供适用于生物活性的结构域的空间呈现和折叠。重要的是,多链嵌合多肽的空间布置不干扰组织因子上的FX结合位点,这使得能够使用抗TF mAb进行亲和纯化。

[0547] 所描述的嵌合多肽的稳定性的表征

[0548] 两种纯化的多链嵌合多肽均为稳定的。这些多链嵌合多肽在人血清中在37℃下培养72小时具有完整结构和完全生物活性。

[0549] 所描述的嵌合多肽聚集倾向的表征

[0550] 在4℃下在PBS中存储时,两种纯化的多链嵌合多肽均不形成聚集体。

[0551] 所描述的嵌合多肽的粘度表征

[0552] 当将多链嵌合多肽以高达50mg/mL的浓度在PBS中配制时,不存在粘度问题。

[0553] 多链嵌合多肽平台的其它应用

[0554] 来自这些研究的数据显示,本文所描述的平台技术可用于产生可以本文所描述的格式中的任一种与衍生自抗体的靶标结合结构域融合分子,包括但不限于粘附分子、受体、细胞因子、配体和趋化因子。利用适当的靶标结合结构域,所得多链嵌合多肽可促进各种免疫效应细胞的缀合并介导靶细胞,包括癌细胞、受病毒感染的细胞或衰老细胞的破坏。多链嵌合多肽中的其它结构域刺激、激活并吸引免疫系统,以增强效应细胞对靶细胞的细胞毒性。

[0555] 实例2:IL-12/IL-15 α Su DNA构建体的产生

[0556] 在非限制性实例中,产生IL-12/IL-15 α Su DNA构建体(图3)。人IL-12亚基序列、人IL-15 α Su序列、人IL-15序列、人组织因子219序列和人IL-18序列从UniProt网站获得,并且这些序列的DNA由金唯智(Genewiz)合成。制造DNA构建体,用GS(3)接头将IL-12亚基 β (p40)连接到IL-12亚基 α (p35)以生成IL-12的单链形式,并且然后直接将IL-12序列连接到IL-15 α Su序列。最终的IL-12/IL-15 α Su DNA构建体序列由金唯智合成。

[0557] IL12/IL-15 α Su构建体的核酸序列(包括信号肽序列)如下所示(SEQ ID NO:85):

[0558] (信号肽)

[0559] ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTCTCTTTAGCAGCGCCTACTCC

[0560] (人IL-12亚基 β (p40))

[0561] ATTTGGGAAGTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTCTGAACTGGACTGGTATCCCGATGCTCCCGGCGAAATG
GTGGTGCTCACTTGTGACACCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCCTCGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTC
CGGAAAGACCCTCACAATCCAAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACACATGCCACAAGGGAGGCGAGGTGC
TCAGCCATTCTTATTATTATTACACAAGAAGGAAGACGGAATCTGGTCCACCGACATTTTAAAAGATCAGAAGGAG
CCCAAGAATAAGACCTTTTTAAGGTGTGAGGCCAAAACTACAGCGGTCGTTTCACTTGTGGTGGCTGACCACCAT
TTCCACCGATTTAACCTTCTCCGTGAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCTCAAGGTGTGACATGTGGAGCCGCTA
CCCTCAGCGCTGAGAGGGTTCGTGGCGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAGATAGCGCTTGT
CCCGCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAACTCAAGTACGAGAACTACACCTC
CTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCCGATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAAATAGCCGGC
AAGTTGAGGTCTCTTGGGAATATCCCGACACTTGGAGCACACCCACAGCTACTTCTTTAACCTTTTGTGTGCAA
GTTCAAGGTAAGCAAGCGGGAGAAGAAAGACCGGGTGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTCATCTGTGCGAA
GAACGCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACTCCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCAGCGTGCCTTGTT
CC

[0562] (接头)

[0563] GGCGGTGGAGGATCCGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGAGGATCT

[0564] (人IL-12亚基 α (p35))

[0565] CGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGTTCCCTTGTTTACACCACAGCCAGAATTTACTG
AGGGCCGTGAGCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAATTTTACCCTTGACACAGCGAGGAGATCGACCA
TGAAGATATACCAAGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTTTACCTCTGGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTC
TCAACTCTCGTGAAACCAGCTTCATCACAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGAAGACCTCCTTTATGATGGCTTTA

TGCCTCAGCTCCATCTACGAGGATTTAAAGATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTCATGGA
CCCTAAACGGCAGATCTTTTTAGACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCAAGCTTTAAACTTCAACT
CCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCTCCCTCGAGGAGCCCGATTTTTACAAGACAAAGATCAAAGTGTGCATTTTACTC
CACGCCTTTAGGATCCGGGCCGTGACCATTGACCGGGTCATGAGCTATTTAAACGCCAGC

[0566] (人IL-15R α 寿司结构域)

[0567] ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGC
CGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCAGGTGCGTGCTGAATAA
GGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[0568] 实例3: IL-18/TF/IL-15DNA构建体的产生

[0569] 在非限制性实例中,制造IL-18/TF/IL-15构建体(图4),将IL-18序列连接到组织
因子219的N端编码区,并且进一步将IL-18/TF构建体与IL-15的N端编码区连接。由金唯智
合成的IL-18/TF/IL-15构建体的核酸序列(包括前导序列)如下所示(SEQ ID NO:81):

[0570] (信号肽)

[0571] ATGAAGTGGGTCACATTTATCTCTTTACTGTTCTCTTCTCCAGCGCCTACAGC

[0572] (人IL-18)

[0573] TACTTCGGCAAACCTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGAT
CAAGGTAACCGGCTCTGTTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGACAATGCCCCCGGACCATCTTCATTAT
CTCCATGTACAAGGACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAAGTGTGAGAAAATCAGCACTTTAT
CTTGTGAGAACAAGATCATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCGATAACATCAAGGACACCAAGTCCGATATCATC
TTCTTCCAGCGGTCCGTGCCCGGTCACGATAACAAGATGCAGTTCGAATCCTCCTCCTACGAGGGCTACTTTTTAGC
TTGTGAAAAGGAGAGGGATTTATTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATCGTTCCATCATGTTCA
CCGTCCAAAACGAGGAT

[0574] (人组织因子219)

[0575] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTC
GAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATG
TTTCTATACACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCCGG
TGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTT
ACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGAC
AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCCGCAAAGATTTAA
TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCTCCGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[0576] (人IL-15)

[0577] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC
ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG
CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

[0578] 实例4: IL-12/IL-15R α Su和IL-18/TF/IL-15融合蛋白的分泌

[0579] 将IL-12/IL-15 α Su和IL-18/TF/IL-15DNA构建体克隆到pMSGV-1修饰的逆转录病毒表达载体(如以引用方式并入本文的Hughes,《人基因疗法》16:457-72,2005所描述)中,并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达使得可形成和分泌可溶性IL-18/TF/IL-15:IL-12/IL-15 α Su蛋白复合物(称为18t15-12s;图5和图6)。使用抗TF抗体亲和色谱和尺寸排阻色谱从CHO-K1细胞培养上清液中纯化18t15-12s蛋白,得到由IL-12/IL-15 α Su和IL-18/TF/IL-15融合蛋白组成的可溶性(非聚集)蛋白复合物。

[0580] IL12/IL-15 α Su融合蛋白的氨基酸序列(包括信号肽序列)如下所示(SEQ ID NO: 84):

[0581] (信号肽)

[0582] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0583] (人IL-12亚基 β (p40))

[0584] IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

[0585] (接头)

[0586] GGGGSGGGGSGGGGS

[0587] (人IL-12亚基 α (p35))

[0588] RNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTCTSEEDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSTFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSYEDLQMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

[0589] (人IL-15 α 寿司结构域)

[0590] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0591] IL-18/TF/IL-15融合蛋白的氨基酸序列(包括信号肽序列)如下所示(SEQ ID NO: 80):

[0592] (信号肽)

[0593] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0594] (人IL-18)

[0595] YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIIISFKEMNPPDNIKDTSKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED

[0596] (人组织因子219)

[0597] SGTNTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[0598] (人IL-15)

[0599] NWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0600] 在一些情况下,将前导(信号序列)肽从完整的多肽上裂解下来以产生可能可溶或分泌的成熟形式。

[0601] 实例5:通过免疫亲和色谱纯化18t15-12s

[0602] 将抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团™AKTA Avant蛋白纯化系统。除洗脱步骤外,所有步骤的流速均为4mL/min,洗脱步骤的流速为2mL/min。

[0603] 18t15-12s的细胞培养收获物用1M Tris碱调节到pH 7.4,并且加载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。加载样本后,用5个柱体积的PBS洗涤柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸(pH 2.9)洗脱。收集280nm处的吸光度,并且然后通过添加1M Tris碱将样本中和到pH 7.5-8.0。然后使用具有30KDa分子量截断值的Amicon®离心过滤器将中和的样品缓冲液交换到PBS中。图7显示18t15-12s复合物结合抗TF抗体亲和柱,其中TF是18t15-12s结合伴侣。将缓冲液交换的蛋白质样品存储在2-8℃下,以用于进一步生化分析和生物活性测试。

[0604] 每次洗脱后,接着使用6个柱体积的0.1M甘氨酸(pH 2.5)剥离抗TF抗体亲和柱。然后使用10个柱体积的PBS、0.05%叠氮化钠中和所述柱,并且存储在2-8℃下。

[0605] 实例6:18t15-12s的尺寸排阻色谱

[0606] 将通用电气医疗集团Superdex®200 Increase 10/300GL凝胶过滤柱连接到通用电气医疗集团AKTA™Avant蛋白纯化系统。用2个柱体积的PBS平衡所述柱。流速为0.8mL/min。使用毛细管环将200μL 1mg/mL的18t15-12s复合物注入到柱上。用1.25个柱体积的PBS追赶注射液。SEC色谱图如图8所示。有一个主要的18t15-12s蛋白峰以及一个较小的高分子量峰,可能是由于18t15-12s二聚体或聚集体的糖基化程度不同所致。

[0607] 实例7:18t15-12s的SDS-PAGE

[0608] 为了测定纯度和蛋白质分子量,使用4-12%NuPage Bis-Tris蛋白质凝胶SDS-PAGE分析纯化的18t15-12s蛋白质样本。将凝胶用InstantBlue™染色约30分钟,然后在纯净水中脱色过夜。图9显示抗TF抗体亲和纯化的18t15-12s的示例SDS凝胶,其中条带在预期分子量(kDa和56kDa)处。

[0609] 实例8:CHO-K1细胞中18t15-12s的糖基化

[0610] 根据制造商的说明书,使用蛋白质去糖基化混合物II试剂盒(新英格兰生物实验室)证实CHO-K1细胞中18t15-12s的糖基化。图10显示去糖基化和未去糖基化的18t15-12s的示例SDS PAGE。去糖基化降低18t15-12s的分子量,如图10泳道4所示。

[0611] 实例9:18t15-12s复合物的重组蛋白定量

[0612] 使用标准夹心ELISA方法检测并定量了18t15-12s复合物(图11-14)。抗人组织因子抗体充当捕获抗体,并且生物素化抗人IL-12、IL-15或IL-18抗体(BAF 219、BAM 247、D045-6,所有为安迪生物公司产品)充当检测抗体。还使用抗人组织因子捕获抗体(I43)和抗人组织因子抗体检测抗体检测纯化的18t15-12s蛋白复合物中的组织因子。将I43/抗TF抗体ELISA与相似浓度下的纯化组织因子进行比较。

[0613] 实例10:18t15-12s复合物的免疫刺激能力

[0614] 为了评定18t15-12s复合物的IL-15免疫刺激活性,向200μL IMDM:10%FBS培养基中的32Dβ细胞(104个细胞/孔)中添加浓度逐渐提高的18t15-12s。将32Dβ细胞在37℃下培育3天。在第四天,添加WST-1增殖试剂(10μL/孔),并且在4小时后,在450nm处测量吸光度,

以基于WST-1裂解为可溶性甲臢染料来确定细胞增殖。评定人重组IL-15的生物活性作为阳性对照。如图15所示,18t15-12s展现32D β 细胞的IL-15依赖性细胞增殖。与人重组IL-15相比,18t15-12s复合物展现降低的活性,可能是由于IL-18和组织因子与IL-15结构域的连接所致。

[0615] 为了评定18t15-12s复合物中IL-12和IL-18的个别活性,将18t15-12s添加到200 μ L IMDM:10%热灭活的FBS培养基中的HEK-Blue IL-12和HEK-Blue IL-18报告细胞(5×10^4 个细胞/孔;hkb-il12和hkb-hm118, InvivoGen)中。将细胞在37℃下培育过夜。将20 μ L诱导的HEK-Blue IL-12和HEK-Blue IL-18报告细胞上清液添加到180 μ L QUANTI-Blue (InvivoGen)中,并且在37℃下培育1-3小时。通过测量620nm处的吸光度来评定IL-12或IL-18活性。将人重组IL-12或IL-18评定为阳性或阴性对照。如图16和图17所示,18t15-12s复合物的每个细胞因子结构域均保留特定生物活性。与人重组IL-18或IL-12相比,18t15-12s的活性降低,可能是由于IL-15和组织因子与IL-18结构域的连接以及IL-12与IL-15R α 寿司结构域的连接所致。

[0616] 实例11:通过18t15-12s复合物诱导细胞因子诱导的记忆样NK细胞

[0617] 在用饱和量的IL-12(10ng/mL)、IL-15(50ng/mL)和IL-18(50ng/mL)过夜刺激纯化的NK细胞后,可以离体诱导细胞因子诱导的记忆样NK细胞。这些记忆样特性已通过IL-2受体 α (IL-2R α 、CD25)、CD69(和其它激活标记)的表达和增加的IFN- γ 产生进行测量。为了评估18t15-12s复合物促进细胞因子诱导的记忆样NK细胞生成的能力,用0.01nM至10000nM的18t15-12s复合物或个别细胞因子(重组IL-12(10ng/mL)、IL-18(50ng/mL)和IL-15(50ng/mL))的组合刺激纯化的人NK细胞(>95%CD56+)14-18小时。通过抗体染色和流式细胞术评定细胞表面CD25和CD 69表达以及细胞内IFN- γ 水平。

[0618] 从血库获得新鲜的人白细胞,并且用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司(StemCell Technologies))分离CD56+ NK细胞。NK细胞的纯度>70%,并且通过用对CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750具有特异性的抗体(BioLegend)染色得到证实。对细胞进行计数,并且以 0.2×10^6 个/mL再悬浮于96孔平底板中的0.2mL完全培养基(RPMI 1640(Gibco),补充有2mM L-谷氨酰胺(Thermo Life Technologies)、青霉素(Thermo Life Technologies)、链霉素(Thermo Life Technologies)和10%FBS(Hyclone))中。在37℃、5%CO₂下用细胞因子hIL-12(10ng/mL)(Biolegend)、hIL-18(50ng/mL)(安迪生物(R&D Systems))和hIL-15(50ng/mL)(NCI)的混合物或用0.01nM至10000nM的18t15-12s刺激细胞14至18小时。然后收获细胞并用对CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750(BioLegend)具有特异性的抗体表面染色30分钟。染色后,将细胞在FACS缓冲液(含0.5%BSA(EMD密理博(EMD Millipore)) and 0.001%叠氮化钠(西格玛(Sigma)))的1X PBS(Hyclone))中洗涤(室温下1500RPM 5分钟)。洗涤两次后,使用BD FACSCelesta™流式细胞仪分析细胞(绘制的数据-平均荧光强度;图18A和图18B)。

[0619] 从血库获得新鲜的人白细胞,并且用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司(StemCell Technologies))分离CD56+ NK细胞。NK细胞的纯度>70%,并且通过用CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750特异性抗体(BioLegend)染色得到证实。对细胞进行计数,并且以 0.2×10^6 个/mL再悬浮于96孔平底板中的0.2mL完全培养基(RPMI 1640(Gibco),补充有2mM L-谷氨酰胺(Thermo Life Technologies)、青霉素(Thermo Life

Technologies))、链霉素(Thermo Life Technologies)和10%FBS(Hyclone))中。在37℃, 5%CO₂下用hIL-12(10ng/mL)(Biolegend)、hIL-18(50ng/mL)(安迪(R&D))和hIL-15(50ng/mL)(NCI)的细胞因子混合物或0.01nM至10000nM 18t15-12s复合物刺激细胞14-18小时。然后将细胞用10μg/mL布雷菲德菌素(Brefeldin)A(西格玛)和1X莫能菌素(Monensin)(eBioscience)处理4小时,然后收集并用对CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750具有特异性的抗体染色30分钟。染色后,将细胞在FACS缓冲液(1X PBS(Hyclone),含0.5%BSA(EMD密理博)和0.001%叠氮化钠(西格玛))中洗涤(室温下1500RPM 5分钟),并且在室温下固定10分钟。固定后,将细胞在1x渗透化缓冲液(eBioscience)中洗涤(室温下1500RPM 5分钟),并且在室温下用IFN-γ-PE Ab(Biolegend)染色30分钟。用1x渗透化缓冲液再次洗涤细胞,然后用FACS缓冲液洗涤。将细胞沉淀重悬于300μl的FACS缓冲液中并使用BD FACSCelesta™流式细胞仪进行分析(绘制IFN-γ阳性细胞的%;图19)。

[0620] 实例12:NK细胞对人肿瘤细胞的体外细胞毒性

[0621] 在存在浓度逐渐提高的18t15-12s复合物或作为对照的细胞因子混合物的情况下,将人骨髓性白血病细胞K562(用CellTrace紫罗兰标记)与纯化的人NK细胞一起培育。20小时后,收获培养物,用碘化丙啶(PI)染色,并且通过流式细胞术评定。如图20所示,18t15-12s复合物以与细胞因子混合物相似或更大的水平诱导人NK对K562的细胞毒性,其中18t15-12s复合物和细胞因子混合物均诱导比培养基对照更大的细胞毒性。

[0622] 实例13:IL-18/IL-15RαSu和IL-12/TF/IL-15DNA构建体的产生

[0623] 在非限制性实例中,产生IL-18/IL-15RαSu和IL-12/TF/IL-15DNA构建体。人IL-18亚基序列、人IL-15RαSu序列、人IL-12序列、人组织因子219序列和人IL-15序列由金唯智合成。制造DNA构建体,将IL-18直接连接到IL-15RαSu。还制备其它构建体,将IL-12序列连接到人组织因子219形式的N端编码区,并且进一步将IL-12/TF构建体连接到IL-15的N端编码区。如上所描述,使用IL-12的单链形式(p40-接头-p35)。

[0624] IL-18/IL-15RαSu构建体的核酸序列(包括信号肽序列)如下所示(SEQ ID NO: 133):

[0625] (信号肽)

[0626] ATGAAGTGGGTCACATTTATCTCTTTACTGTTCTCTCTCCAGCGCCTACAGC

[0627] (人IL-18)

[0628] TACTTCGGCAAACCTGGAATCCAAGCTGAGCGTGATCCGGAATTTAAACGACCAAGTTCTGTTTATCGAT
CAAGGTAACCGGCTCTGTTTCGAGGACATGACCGACTCCGATTGCCGGGACAATGCCCCCGGACCATCTTCATTAT
CTCCATGTACAAGGACAGCCAGCCCCGGGGCATGGCTGTGACAATTAGCGTGAAGTGTGAGAAAATCAGCACTTTAT
CTTGTGAGAACAAGATCATCTCCTTTAAGGAAATGAACCCCCCGGATAACATCAAGGACACCAAGTCCGATATCATC
TTCTTCCAGCGGTCCGTGCCCGGTCACGATAACAAGATGCAGTTCGAATCCTCCTCCTACGAGGGCTACTTTTTAGC
TTGTGAAAAGGAGAGGGATTTATTCAAGCTGATCCTCAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGATCGTTCCATCATGTTCA
CCGTCCAAAACGAGGAT

[0629] (人IL-15Rα寿司结构域)

[0630] ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGC
CGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCGTGCTGAATAA
GGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[0631] IL-12/TF/IL-15构建体的核酸序列(包括前导序列)如下所示(SEQ ID NO:134):

[0632] (信号肽)

[0633] ATGAAATGGGTGACCTTTATTTCTTTACTGTTCTCTTTAGCAGCGCCTACTCC

[0634] (人IL-12亚基 β (p40))

[0635] ATTTGGGAAGTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTTCGAACTGGACTGGTATCCCGATGCTCCCGGCGAAATG
GTGGTGCTCACTTGTGACACCCCCGAAGAAGACGGCATCACTTGGACCCTCGATCAGAGCAGCGAGGTGCTGGGCTC
CGGAAAGACCCTCACAATCCAAGTTAAGGAGTTCGGAGACGCTGGCCAATACACATGCCACAAGGGAGGCGAGGTGC
TCAGCCATTCTTATTATTATTACACAAGAAGGAAGACGGAATCTGGTCCACCGACATTTTAAAAGATCAGAAGGAG
CCCAAGAATAAGACCTTTTTAAGGTGTGAGGCCAAAACTACAGCGTTCGTTTCACTTGTTGGTGGCTGACCACCAT
TTCCACCGATTTAACCTTCTCCGTGAAAAAGCAGCCGGGGAAGCTCCGACCCCTCAAGGTGTGACATGTGGAGCCGCTA
CCCTCAGCGCTGAGAGGGTTCGTGGCGATAACAAGGAATACGAGTACAGCGTGGAGTGCCAAGAAGATAGCGCTTGT
CCCCTGCCGAAGAATCTTTACCCATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACAACTCAAGTACGAGAACTACACCTC
CTCCTTCTTTATCCGGGACATCATTAAGCCCGATCCTCCTAAGAATTTACAGCTGAAGCCTCTCAAAAATAGCCGGC
AAGTTGAGGTCTCTTGGGAATATCCCGACACTTGGAGCACACCCACAGCTACTTCTCTTTAACCTTTTGTGTGCAA
GTTCAAGGTAAAAGCAAGCGGGAGAAGAAAGACCGGGTGTTTACCGACAAAACCAGCGCCACCGTCATCTGTGCGAA
GAACGCCTCCATCAGCGTGAGGGCTCAAGATCGTTATTACTCCAGCAGCTGGTCCGAGTGGGCCAGCGTGCCTTGTT
CC

[0636] (接头)

[0637] GGCGGTGGAGGATCCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGGCGGAGGATCT

[0638] (人IL-12亚基 α (p35))

[0639] CGTAACCTCCCCGTGGCTACCCCCGATCCCGGAATGTTCCCTTGTTTACACCACAGCCAGAATTTACTG
AGGGCCGTGAGCAACATGCTGCAGAAAGCTAGGCAGACTTTAGAATTTTACCCTTGACCAGCGAGGAGATCGACCA
TGAAGATATCACCAAGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTTTACCTCTGGAGCTGACAAAGAACGAGTCTTGTC
TCAACTCTCGTGAAACCAGCTTCATCACAAATGGCTCTTGTTTAGCTTCCCGGAAGACCTCCTTTATGATGGCTTTA
TGCCTCAGCTCCATCTACGAGGATTTAAAGATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTCATGGA
CCCTAAACGGCAGATCTTTTTAGACCAGAACATGCTGGCTGTGATTGATGAGCTGATGCAAGCTTTAACTTCAACT
CCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCTCCCTCGAGGAGCCCGATTTTTACAAGACAAAGATCAAAGTGTGCATTTTACTC
CACGCCTTTAGGATCCGGGCCGTGACCATTGACCGGGTCATGAGCTATTTAAACGCCAGC

[0640] (人组织因子219)

[0641] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTC
GAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATG
TTTCTATACACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCCGG
TGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTT
ACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAGGTGAATGTGAC
AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCCGCAAAGATTTAA
TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCTCCGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[0642] (人IL-15)

[0643] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC
ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG
CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

[0644] 实例14: IL-18/IL-15R α Su和IL-12/TF/IL-15融合蛋白的分泌

[0645] 将IL-18/IL-15R α Su和IL-12/TF/IL-15构建体克隆到pMSGV-1修饰的逆转录病毒
表达载体(Hughes,《人基因疗法》16:457-72,2005,以引用的方式并入本文)中,并且将表达
载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达导致了可溶性IL-12/TF/
IL-15:IL-18/IL-15R α Su蛋白复合物(称为12t15/18s)的分泌,其可以通过抗TF Ab亲和力和
和其它色谱方法纯化。

[0646] IL-18/IL-15R α Su融合蛋白的氨基酸序列(包括信号肽序列)如下所示(SEQ ID
NO:135):

[0647] (信号肽)

[0648] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0649] (人IL-18)

[0650] YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCE
KISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQQRVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGD
RSIMFTVQNED

[0651] (人IL-15R α 寿司结构域)

[0652] ITCPPMSVEHADIWKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[0653] IL-12/TF/IL-15融合蛋白的氨基酸序列(包括前导序列)如下所示(SEQ ID NO:
136):

[0654] (信号肽)

[0655] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0656] (人IL-12亚基 β (p40))

[0657] IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCH
KGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV
TCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPPPKNLQLKP
LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCS

[0658] (接头)

[0659] GGGSGGGSGGGGS

[0660] (人IL-12亚基 α (p35))

[0661] RNLPVATPDGPMFPLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELT
KNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQ
ALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

[0662] (人组织因子219)

[0663] SGTNTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ

TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQKEKGEFRE

[0664] (人IL-15)

[0665] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0666] 在一些情况下,将前导肽从完整多肽上裂解下来以产生可能可溶或分泌的成熟形式。

[0667] 实例15:IL-7/IL-15R α Su DNA构建体的产生

[0668] 在非限制性实例中,产生IL-7/IL-15R α Su DNA构建体(参见图21)。人IL-7序列、人IL-15R α Su序列、人IL-15序列和人组织因子219序列是从UniProt网站获得的,并且这些序列的DNA由金唯智合成。制造DNA构建体,将IL-7序列连接到IL-15R α Su序列。最终的IL-7/IL-15R α Su DNA构建体序列由金唯智合成。

[0669] 编码IL-7/IL-15R α Su构建体的第二嵌合多肽的核酸序列(包括信号肽序列)如下所示(SEQ ID NO:97):

[0670] (信号肽)

[0671] ATGGGAGTGAAAGTTCTTTTTGCCCTTATTTGTATTGCTGTGGCCGAGGCC

[0672] (人IL-7)

[0673] GATTGTGATATTGAAGGTAAAGATGGCAAACAATATGAGAGTGTTCTAATGGTCAGCATCGATCAATTA
TTGGACAGCATGAAAGAAATTGGTAGCAATTGCCTGAATAATGAATTAACTTTTTTAAAAGACATATCTGTGATGC
TAATAAGGAAGGTATGTTTTTATTCCGTGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATTTCTTAAAATGAATAGCACTGGTGATT
TTGATCTCCACTTATTAAGTTTCAGAAGGCACAACAATACTGTTGAACTGCACTGGCCAGGTTAAAGGAAGAAAA
CCAGCTGCCCTGGGTGAAGCCCAACCAACAAAGAGTTTGGAAGAAAATAAATCTTTAAAGGAACAGAAAAAACTGAA
TGACTTGTGTTTCTAAAGAGACTATTACAAGAGATAAAAACTTGTTGGAATAAAATTTTGATGGGCACTAAAGAAC
AC

[0674] (人IL-15R α 寿司结构域)

[0675] ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCC
AGGGAGCGGTACATTTGTAATCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAA
GGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0676] IL-7/IL-15R α Su构建体的第二嵌合多肽(包括信号肽序列)如下所示(SEQ ID NO:100):

[0677] (信号肽)

[0678] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0679] (人IL-7)

[0680] DCDIEGKDQKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKM
NSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKIL
MGTKEH

[0681] (人组织因子219)

[0682] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVQK
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV

FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRVTNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[0683] (人IL-15)

[0684] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0685] 实例16:IL-21/TF/IL-15DNA构建体的产生

[0686] 在非限制性实例中,通过将IL-21序列与组织因子219的N-末端编码区连接,并进一步将IL-21/TF构建体与IL-15的N-末端编码区连接,制备IL-21/TF/IL-15构建体(图22)。

[0687] 由金唯智合成的编码IL-21/TF/IL-15构建体的第一嵌合多肽的核酸序列(包括前导序列)如下所示(SEQ ID NO:93):

[0688] (信号肽)

[0689] ATGGGAGTGAAAGTTCTTTTTGCCCTTATTTGTATTGCTGTGGCCGAGGCC

[0690] (人IL-21片段)

[0691] CAAGGTCAAGATCGCCACATGATTAGAATGCGTCAACTTATAGATATTGTTGATCAGCTGAAAAATTAT
GTGAATGACTTGGTCCCTGAATTTCTGCCAGCTCCAGAAGATGTAGAGACAACTGTGAGTGGTCAGCTTTTTCTG
TTTTCAGAAGGCCCAACTAAAGTCAGCAAATACAGGAAACAATGAAAGGATAATCAATGTATCAATTAAGCTGA
AGAGGAAACCACCTTCCACAAATGCAGGGAGAAGACAGAAACACAGACTAACATGCCCTTCATGTGATTCTTATGAG
AAAAAACCCCAAGAATTCCTAGAAAGATTCAAATCACTTCTCCAAAAGATGATTCATCAGCATCTGTCCTCTAG
AACACACGGAAGTGAAGATTCC

[0692] (人组织因子219)

[0693] TCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGAAATCAACTAATTTCAAGACAATTTG
GAGTGGGAACCCAAACCCGTCATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAGATTGGAAGCAATG
CTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTACCGACGAGATTGTGAAGGATGTGAAGCAGACGTAATGGCACGGG
TCTTCTCCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGACCGGTTCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGAACTCCCCAGAGTTC
ACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGACAGCCAACAATTCAGAGTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGAC
CGTAGAAGATGAACGGAATTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAA
TTTATACACTTTATTATTGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACAACTAATGAGTTTTTGATT
GATGTGGATAAAGGAGAAAATACTGTTTCAGTGTTCAGCAGTGATCCCTCCCGAACAGTTAACCGGAAGAGTAC
AGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAGAA

[0694] (人IL-15)

[0695] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCC
ACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTGTAAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGT
TATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTAGCCAATAACTCTTTAT
CCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTG
CAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

[0696] 包括前导序列的IL-21/TF/IL-15构建体的第一嵌合多肽是SEQ ID NO:92:

[0697] (信号肽)

[0698] MGVKVLFALICIAVAEA (SEQ ID NO:140)

[0699] (人IL-21)

[0700] QQQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINV

SIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLQKMIHQHLSRTHGSEDS

[0701] (人组织因子219)

[0702] SGTNTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVQK
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[0703] (人IL-15)

[0704] NWNVNISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0705] 实例17: IL-7/IL-15R α Su和IL-21/TF/IL-15融合蛋白的分泌

[0706] 将IL-7/IL-15R α Su和IL-21/TF/IL-15DNA构建体克隆到pMSGV-1修饰的逆转录病毒表达载体(如以引用方式并入本文的Hughes,《人基因疗法》16:457-72,2005所描述)中,并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达使得可形成和分泌可溶性IL-21/TF/IL-15:IL-7/IL-15R α Su蛋白质复合物(称为21t15-7s;图23和图24)。使用抗TF抗体亲和色谱和尺寸排阻色谱从CHO-K1细胞培养上清液中纯化21t15-7s蛋白,得到由IL-7/IL-15R α Su和IL-21/TF/IL-15融合蛋白组成的可溶性(非聚集)蛋白复合物。

[0707] 在一些情况下,将前导(信号序列)肽从完整的多肽上裂解下来以产生可能可溶或分泌的成熟形式。

[0708] 实例18:通过免疫亲和色谱纯化21t15-7s

[0709] 将抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团TMAKTA Avant蛋白纯化系统。除洗脱步骤外,所有步骤的流速均为4mL/min,洗脱步骤的流速为2mL/min。

[0710] 21t15-7s的细胞培养收获物用1M Tris碱调节到pH 7.4,并且加载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。加载样本后,用5个柱体积的PBS洗涤柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸(pH 2.9)洗脱。收集280nm处的吸光度,并且然后通过添加1M Tris碱将样本中和到pH 7.5-8.0。然后使用具有30KDa分子量截断值的Amicon[®]离心过滤器将中和的样品缓冲液交换到PBS中。将缓冲液交换的蛋白质样本存储在2-8℃下以用于进一步生化分析和生物活性测试。

[0711] 每次洗脱后,接着使用6个柱体积的0.1M甘氨酸(pH 2.5)剥离抗TF抗体亲和柱。然后使用10个柱体积的PBS、0.05%叠氮化钠中和所述柱,并且存储在2-8℃下。

[0712] 实例19:尺寸排阻色谱

[0713] 将通用电气医疗集团Superdex[®]200 Increase 10/300GL凝胶过滤柱连接到通用电气医疗集团AKTATMAvant蛋白纯化系统。用2个柱体积的PBS平衡所述柱。流速为0.7mL/min。使用毛细管环将200 μ L 1mg/mL的7t15-21s复合物注入到柱上。用1.25个柱体积的PBS追赶注射液。

[0714] 实例20:NK细胞对人肿瘤细胞的细胞毒性

[0715] 从血库获得新鲜的人血白细胞层。使用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)通过阴性选择分离NK细胞。在37℃和5%CO₂下,将NK细胞在含21t15-7s 100nM和50nM抗TF IgG1抗体的完全RPMI-1640培养基中培养长达11天。将激活的NK细胞与Celltrace紫罗兰标记的K562细胞以等于2:1的E:T比混合,并且在37℃下培育4小时。收获混合物,并且通过碘化丙啶染色和流式细胞术测定死亡的K562细胞的百分比。图25示出了

当与扩增的NK细胞孵育时,K562细胞的特异性裂解增加。

[0716] 实例21:IL-21/IL-15 α Su DNA构建体的产生

[0717] 在非限制性实例中,产生IL-21/IL-15 α Su DNA构建体。人IL-21序列和人IL-15 α Su序列是从UniProt网站获得的,并且这些序列的DNA由金唯智合成。制造DNA构建体,将IL-21序列连接到IL-15 α Su序列。最终的IL-21/IL-15 α Su DNA构建体序列由金唯智合成。参见图26。

[0718] 实例22:IL-7/TF/IL-15DNA构建体的产生

[0719] 在非限制性实例中,通过将IL-7序列连接到组织因子219的N端编码区,并且进一步将IL-7/TF构建体与IL-15的N端编码区连接来制备IL-7/TF/IL-15构建体。参见图27。

[0720] 实例23:IL-21/IL-15 α Sushi DNA构建体的产生

[0721] 在非限制性实例中,产生IL-21/IL-15 α Su的第二嵌合多肽。人IL-21和人IL-15 α 寿司序列是从UniProt网站获得的,并且这些序列的DNA由金唯智合成。制造DNA构建体,将IL-21序列连接到IL-15 α 寿司序列。最终的IL-21/IL-15 α Su DNA构建体序列由金唯智合成。

[0722] 由金唯智合成的编码IL-21/IL-15 α Su结构域的第二嵌合多肽的核酸序列(包括前导序列)如下所示(SEQ ID NO:105):

[0723] (信号肽)

[0724] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0725] (人IL-21)

[0726] CAGGGCCAGGACAGGCACATGATCCGGATGAGGCAGCTCATCGACATCGTCGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCCGAGTTTCTGCCTGCCCCGAGGACGTGGAGACCAACTGCGAGTGGTCCGCCTTCTCCTGCTTTCAGAAGGCCAGCTGAAGTCCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGAGCATCAAGAAGCTGAGCGGAAGCCTCCCTCCACAAACGCCGGCAGGAGGAGAAGCACAGGCTGACCTGCCCCAGCTGTGACTCCTACGAGAAGCCCCCAAGGAGTTCCTGGAGAGGTTCAAGTCCCTGCTGCAGAAGATGATCCATCAGCACCTGTCCTCCAGGACCCACGGCTCCGAGGACTCC

[0727] (人IL-15 α 寿司结构域)

[0728] ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAGCCGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCAGTGCGTGCTGAATAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG

[0729] IL-21/IL-15 α sushi结构域的第二嵌合多肽(包括前导序列)如下所示(SEQ ID NO:104):

[0730] (信号序列)

[0731] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0732] (人IL-21)

[0733] QQQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERI INVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLQKMIHQHLSSRTHGSEDS

[0734] (人IL-15 α sushi结构域)

[0735] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[0736] 实例24:IL-7/TF/IL-15DNA构建体的产生

[0737] 在非限制性实例中,通过将IL-7序列连接到组织因子219的N端编码区,并且进一步将IL-7/TF构建体与IL-15的N端编码区连接来制备IL-7/TF/IL-15的示例性第一嵌合多肽。由金唯智合成的编码IL-7/TF/IL-15的第一嵌合多肽的核酸序列(包括前导序列)如下所示(SEQ ID NO:137):

[0738] (信号肽)

[0739] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0740] (人IL-7片段)

[0741] GATTGCGACATCGAGGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGCGTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGGAGATCGGCTCCAAGTGCCTCAACAACGAGTTCAACTTCTTCAAGCGGCACATCTGCGACGCAACAAGGAGGGCATGTTCTCTGTTTCAAGGCGCCAGGAACTGCGGCAGTTCTTGAAGATGAACTCCACCGGCGACTTCGACCTGCACCTGCTGAAGGTGTCCGAGGGCACCACCATCCTGCTGAACTGCACCGGACAGGTGAAGGGCCGGAACCTGCTGCTCTGGGAGAGGCCCAACCCACCAAGAGCCTGGAGGAGAACAAGTCCCTGAAGGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTGTGCTTCTGAAGAGGCTGCTGCAGGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAGGAGCAT

[0742] (人组织因子219)

[0743] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGGAAGAGCACCAACTTCAAACCATCCTCGAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATGTTTCTATACACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGGTGTTTAGCTACCCCGCCGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTTACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGACAGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGATTTAACTCTACACACTGTATTACTGGAAGTCTTCTCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATCGACGTGGATAAAGGCGAAAACCTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCACGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[0744] (人IL-15)

[0745] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGCCACTTTATACACAGAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAAGTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTTAGCCAATAACTCTTTATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC

[0746] IL-7/TF/IL-15的第一嵌合多肽(包含前导序列)如下所示(SEQ ID NO:100):

[0747] (信号肽)

[0748] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0749] (人IL-7)

[0750] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH

[0751] (人组织因子219)

[0752] SGTNTNTVAAYNLTKWSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ

TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGNYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQGEKGEFRE

[0753] (人IL-15)

[0754] NWNVNISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0755] 实例25: IL-21/IL-15R α Su和IL-7/TF/IL-15融合蛋白的分泌

[0756] 将IL-21/IL-15R α Su和IL-7/TF/IL-15DNA构建体克隆到pMSGV-1修饰的逆转录病毒表达载体(如以引用方式并入本文的Hughes,《人基因疗法》16:457-72,2005所描述)中,并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达使得形成和分泌可溶性IL-7/TF/IL-15:IL-21/IL-15R α Su蛋白复合物(称为7t15-21s)。使用抗TF抗体(IgG1)亲和色谱和尺寸排阻色谱从CHO-K1细胞培养上清液中纯化7t15-21s蛋白,得到由IL-21/IL-15R α Su和IL-7/TF/IL-15融合蛋白组成的可溶性(非聚集)蛋白复合物。参见图28和图29。

[0757] 实例26: IL-21/IL-15R α Su和IL-7/TF/IL-15融合蛋白的分析性尺寸排阻色谱(SEC)分析

[0758] 为了确定抗组织因子单克隆抗体和7t15-21s是否可以形成抗体-融合-分子复合物,进行分析型尺寸排阻色谱(SEC)。将Superdex 200 Increase 10/300GL凝胶过滤柱(来自通用电气医疗集团)连接到AKTA Avant系统(来自通用电气医疗集团)。用2个柱体积的PBS平衡所述柱。流速为0.7mL/min。抗TF mAb(1mg/mL)、7t15-21s(1mg/mL)和以1:1比混合的混合物的样品,因此每种蛋白质的最终浓度为0.5mg/mL处于PBS中。使用毛细管环将每个样本注入Superdex 200柱,并且通过SEC进行分析。每个样品的SEC色谱图如图30所示。SEC结果表明,7t15-21s有两个蛋白峰,可能代表7t15-21s的二聚体(表观分子量为199.2kDa)和更高的寡聚体,并且抗TF mAb有一个峰(表观分子量为206.8kDa)。但是,如所预期,在含有抗TF mAb和7t15-21s的混合物样本中形成了更高分子量的新蛋白质峰(表观分子量为576.9kDa),表明抗TF mAb和7t15-21s通过抗TF mAb与融合蛋白复合物中的TF结合形成抗体-抗原复合物。

[0759] 实例27: 7t15-21s复合物+抗TF IgG1抗体对原代自然杀伤(NK)细胞的扩增能力

[0760] 为了评定7t15-21s复合物扩增原代自然杀手(NK)细胞的能力,将7t15-21s复合物和7t15-21s复合物+抗TF IgG1抗体添加到从新鲜人白细胞样本获得的NK细胞中。在37°C和5%CO₂下,用50nM的7t15-21s复合物伴随或不伴随25nM的抗TF IgG1或抗TF IgG4抗体刺激细胞。通过每48-72小时计数,将细胞维持在0.5x10⁶个/mL,不超过2.0x10⁶个/mL的浓度下,并且用新鲜刺激剂补充培养基。将用7t15-21s复合物或抗TF IgG1抗体或抗TF IgG4抗体或抗TF IgG4+7t15-21s复合物刺激的细胞维持到第5天。观察到原代NK细胞在与21t15-7s复合物+抗TF IgG1抗体一起培育后的扩增。

[0761] 实例28: 通过7t15-21s复合物+抗TF IgG1抗体活化扩增的NK细胞

[0762] 用7t15-21s复合物+抗TF IgG1抗体过夜刺激纯化的NK细胞后,离体诱导原代NK细胞。从血库获得新鲜的人白细胞,并且用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)分离CD56⁺NK细胞。NK细胞的纯度>80%,并且通过用CD56-BV421和CD16-BV510特异性抗体(BioLegend)染色得到证实。对细胞进行计数,并且以1x10⁶个/mL再悬浮于24孔平底板中的

1mL完全培养基(RPMI 1640(Gibco),补充有4mM L-谷氨酰胺(Thermo Life Technologies)、青霉素(Thermo Life Technologies)、链霉素(Thermo Life Technologies)、非必需氨基酸(Thermo Life Technologies)、丙酮酸钠(Thermo Life Technologies)和10%FBS(Hyclone))中。在37℃和5%CO₂下,用50nM的7t15-21s伴随或不伴随25nM的抗TF IgG1抗体刺激细胞。每48-72小时对细胞计数一次,并且将其维持在0.5x10⁶个/mL至2.0x10⁶个/mL的浓度下直到第14天为止。培养基定期补充新鲜刺激剂。收获细胞并在第3天用对CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE、CD69-APCFire750具有特异性的抗体(Biolegend)进行表面染色,并通过流式细胞仪(Celeste-BD Bioscience)进行分析。观察到激活标记CD25MFI随7t15-21s复合物+抗TF IgG1抗体刺激而增加,但不随7t15-21s复合物刺激而增加。观察到激活标记CD69 MFI随7t15-21s复合物+抗TF IgG1抗体和单独的7t15-21s复合物两者增加。

[0763] 实例29:使用18t15-12s增加NK细胞中的葡萄糖代谢

[0764] 进行了一组实验以确定18t15-12s的构建体(图6)对从人血中纯化的NK细胞的耗氧率和细胞外酸化率(ECAR)的影响。

[0765] 在这些实验中,从血库中两个不同的人供体获得新鲜的人白细胞,并且使用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)通过阴性选择分离NK细胞。NK细胞的纯度>80%,并且通过用CD56-BV421和CD16-BV510特异性Ab(BioLegend)染色得到证实。对细胞进行计数,并且将其以2x10⁶个/mL重悬于24孔平底板中的1mL完全培养基(RPMI 1640(吉毕科公司),补充有4mM L-谷氨酰胺(Thermo Life Technologies)、青霉素(Thermo Life Technologies)、链霉素(Thermo Life Technologies)、非必需氨基酸(Thermo Life Technologies)、丙酮酸钠(Thermo Life Technologies)和10%FBS(Hyclone))中。在37℃和5%CO₂下,用(1)单独的培养基,(2)100nM 18t15-12s或(3)单细胞因子重组人IL-12(0.25μg)、重组人IL-15(1.25μg)和重组人IL-18(1.25μg)的混合物刺激细胞过夜。第二天,收获细胞,并且使用XFp分析仪(Seahorse Bioscience)对扩增的NK细胞进行细胞外通量分析。将收获的细胞洗涤并以2.0x10⁵个细胞/孔至少一式两份地铺板,以用于OCR(耗氧率)和ECAR(细胞外酸化率)的细胞外通量分析。在含有2mM谷氨酰胺的Seahorse培养基中进行糖酵解应激测试。在分析过程中使用以下物质:10mM葡萄糖;100nM寡霉素;和100mM 2-脱氧-D-葡萄糖(2DG)。

[0766] 数据显示,与用重组人IL-12、重组人IL-15和重组人IL-18的组合活化的相同细胞(图32)相比,18t15-12s导致耗氧率(图31)和细胞外酸化速率(ECAR)显著增加。

[0767] 实例30:TGFRt15-TGFRs融合蛋白的生成和表征

[0768] 生成了包含TGFβ受体II/IL-15RaSu(TGFR)和TGFβ受体II/TF/IL-15(TGFRt15)融合蛋白的融合蛋白复合物(图33和图34)。人TGFβ受体II(Ile24-Asp159)、组织因子219和IL-15序列是从UniProt网站获得的,并且这些序列的DNA由金唯智合成。具体地,通过用G4S(3)接头连接两个TGFβ受体II序列以生成单链形式的TGFβ受体II,然后直接连接到组织因子219的N-末端编码区,随后连接到IL-15的N-末端编码区来制备构建体。

[0769] 包含连接到组织因子219的N-末端接着连接到IL-15的N-末端的两个TGFβ受体II的构建体的核酸和蛋白质序列如下所示。

[0770] 这两个TGFβ受体II/TF/IL-15构建体的核酸序列(包括信号肽序列)如下所示:

[0771] (信号肽)

[0772] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0773] (两个人TGFB受体II片段)

[0774] ATCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAG
TTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTACGACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACGCGAG
CATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCTGG
AGACCGTGTGTACGACCCCAAGCTCCCTTATCAGCACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATG
AAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTGTAAACGACAACATCATCTT
CAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTA
TTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAG
CTGTGCAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTC
CATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCTGGAAACCGTCT
GCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTATCCTGGAAGACGCCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAA
AAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGA
ATACAATACCAGCAACCCCGAC

[0775] (人组织因子219)

[0776] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGAAGAGCACCAACTTCAAACCATCCTC
GAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATG
TTTCTATACACCGACACCGAGTGCATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGG
TGTTTAGCTACCCCGCCGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTT
ACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGAC
AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGATTTAA
TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCCCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACACTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC
CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[0777] (人IL-15)

[0778] AACTGGGTGAACGTCATCAGCGATTTAAAGAAGATCGAAGATTTAATTCAGTCCATGCATATCGACGC
CACTTTATACAGAAATCCGACGTGCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTTTTACTGGAGCTGCAA
GTTATCTCTTTAGAGAGCGGAGACGCTAGCATCCACGACACCGTGGAGAATTTAATCATTTTTAGCCAATAACTCTT
TATCCAGCAACGGCAACGTGACAGAGTCCGGCTGCAAGGAGTGCGAAGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTT
TCTGCAATCCTTTGTGCACATTGTCCAGATGTTTCATCAATACCTCC (SEQ ID NO:114)

[0779] TGFβ受体II/TF/IL-15融合蛋白的氨基酸序列(包括前导序列)如下所示:

[0780] (信号肽)

[0781] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0782] (人TGFβ受体II)

[0783] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVVRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGS
GGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVVRKNDENI
TLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[0784] (人组织因子219)

[0785] SGTNTNTVAAYNLTKWSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[0786] (人IL-15)

[0787] NWNVNISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLII
LANNLSSSNGNVTESGKCECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:113)

[0788] 还通过将两个TGFβ受体II直接附接到由金唯智合成的IL-15RαSu链来制备构建体。包含与IL-15RαSu的N-末端连接的TGFβ受体II的构建体的核酸和蛋白质序列如下所示。

[0789] TGFβ受体II/IL-15RαSu构建体核酸序列(包括信号肽序列)的如下所示:

[0790] (信号肽)

[0791] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0792] (两个人TGFβ受体II片段)

[0793] ATCCCCCCCCATGTGCAAAAGAGCGTGAACAACGATATGATCGTGACCGACAACAACGGCGCCGTGAAG
TTTCCCCAGCTCTGCAAGTTCTGCGATGTCAGGTTTCAGCACCTGCGATAATCAGAAGTCCTGCATGTCCAACCTGCAG
CATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAAAATGACGAGAACATCACCTGG
AGACCGTGTGTACGACCCCAAGCTCCCTTATCACGACTTCATTCTGGAGGACGCTGCCTCCCCCAAATGCATCATG
AAGGAGAAGAAGAAGCCCGGAGAGACCTTCTTTATGTGTTCTGTAGCAGCGACGAGTGTAAACGACAACATCATCTT
CAGCGAAGAGTACAACACCAGCAACCCTGATGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTA
TTCCTCCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAATAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAATTTCCCCAG
CTGTGCAAAATTCTGCGATGTGAGGTTTTCCACCTGCGACAACCAGAAGTCCTGTATGAGCAACTGCTCCATCACCTC
CATCTGTGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCTGTCTGGCGGAAGAATGACGAGAATATCACCTGGAAACCGTCT
GCCACGATCCCAAGCTGCCCTACCACGATTTTCATCCTGGAAGACGCCCGCCAGCCCTAAGTGCATCATGAAAGAGAAA
AAGAAGCCTGGCGAGACCTTTTTTCATGTGCTCCTGCAGCAGCGACGAATGCAACGACAATATCATCTTTAGCGAGGA
ATACAATACCAGCAACCCCGAC

[0794] (人IL-15Rα寿司结构域)

[0795] ATTACATGCCCCCTCCCATGAGCGTGGAGCACGCCGACATCTGGGTGAAGAGCTATAGCCTCTACAG
CCGGGAGAGGTATATCTGTAACAGCGGCTTCAAGAGGAAGGCCGGCACCAGCAGCCTCACCGAGTGCCTGCTGAAT
AAGGCTACCAACGTGGCTCACTGGACAACACCCTCTTTAAAGTGCATCCGG (SEQ ID NO:118)

[0796] 这两个TGFβ受体II/IL-15RαSu构建体的氨基酸序列(包括信号肽序列)如下所示:

[0797] (信号肽)

[0798] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0799] (两个人TGFβ受体II细胞外结构域)

[0800] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVVRKND
ENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGS
GGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVVRKNDENI
TLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[0801] (人IL-15Rα寿司结构域)

[0802] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR (SEQ

ID NO:117)

[0803] 在一些情况下,将前导肽从完整多肽上裂解下来以产生可能可溶或分泌的成熟形式。

[0804] 将TGF β R/IL-15 α Su和TGF β R/TF/IL-15构建体克隆到修饰的逆转录病毒表达载体中,如先前所描述(Hughes MS、Yu YY、Dudley ME、Zheng Z、Robbins PF、Li Y等人,《来源于具有明显抗肿瘤反应的患者的TCR基因的转移传送高度活性T细胞效应功能(Transfer of aTCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions)》《人基因疗法(Hum Gene Ther)》2005;16:457-72),并且将表达载体转染到CHO-K1细胞中。两种构建体在CHO-K1细胞中的共表达使得可形成和分泌可溶性TGF β R/TF/IL-15:TGF β R/IL-15 α Su蛋白复合物(称为TGFRt15-TGFRs),其可通过抗-TF IgG1亲和力和其它色谱方法纯化。

[0805] TGFRt15-TGFRs对HEK-Blue TGF β 细胞中TGF β 1活性的影响

[0806] 为了评估TGFRt15-TGFRs中TGF β RII的活性,分析TGFRt15-TGFRs对HEK-Blue TGF β 细胞中TGF β 1活性的影响。将HEK-Blue TGF β 细胞(Invivogen)用预温热的PBS洗涤两次,并且以 5×10^5 个细胞/mL再悬浮于测试培养基(DMEM、10%热灭活的FCS、1x谷氨酰胺、1x抗生素-抗真菌剂和2x谷氨酰胺)中。在平底96孔板中,向每个孔中添加50 μ L细胞(2.5×10^4 个细胞/孔),并且接着添加50 μ L 0.1nM TGF β 1(安迪生物公司)。然后将以1:3连续稀释制备的TGFRt15-TGFRs或TGFR-Fc(安迪生物公司)添加到板中,以达到200 μ L的总体积。在37 $^{\circ}$ C下培育24小时后,将40 μ L诱导的HEK-Blue TGF β 细胞上清液添加到平底96孔板中的160 μ L预温热的QUANTI-Blue(Invivogen)中,并且在37 $^{\circ}$ C下培育1-3小时。然后使用酶标仪(Multiscan Sky)在620-655nm下测定OD值。用GraphPad Prism 7.04计算每个蛋白质样本的IC₅₀。TGFRt15-TGFRs和TGFR-Fc的IC₅₀分别为216.9pM和460.6pM。这些结果显示TGFRt15-TGFRs中的TGF β RII结构域能够阻断HEK-Blue TGF β 细胞中TGF β 1的活性。

[0807] TGFRt15-TGFRs中的IL-15促进含IL-2R β 和共同 γ 链的32D β 细胞增殖

[0808] 为了评估TGFRt15-TGFRs中IL-15的活性,使用表达IL2R β 和共同 γ 链的32D β 细胞将TGFRt15-TGFRs的IL-15活性与重组IL-15进行比较,并且评估其对促进细胞增殖的作用。将IL-15依赖性32D β 细胞用IMDM-10%FBS洗涤5次,并且以 2×10^4 个细胞/孔接种在孔中。将连续稀释的TGFRt15-TGFRs或IL-15添加到细胞中(图35)。将细胞在CO₂培育箱中在37 $^{\circ}$ C下培育3天。通过在第3天向每个孔中添加10 μ L WST1并在CO₂培育箱中在37 $^{\circ}$ C下再培养3小时来检测细胞增殖。通过分析产生的甲臞染料的数量来测量450nm处的吸光度。如图35所示, TGFRt15-TGFRs和IL-15促进32D β 细胞增殖,其中TGFRt15-TGFRs和IL-15的EC₅₀分别为1901pM和10.63pM。

[0809] 使用ELISA用对应抗体检测TGFRt15-TGFRs中的IL-15和TGF β RII结构域

[0810] 将96孔板用R5(包被缓冲液)中的100 μ L(8 μ g/mL)抗TF IgG1包被,并且在室温(RT)下培育2小时。将板洗涤3次,并且用100 μ L 1%BSA的PBS溶液阻断。TGFRt15-TGFRs以1:3连续稀释添加,并且在RT下培育60min。洗涤3次后,将50ng/mL的生物素化抗IL-15抗体(BAM247,安迪生物公司)或200ng/mL的生物素化抗TGF β RII抗体(BAF241,安迪生物公司)添加到孔中并且在RT下培育60min。接着将板洗涤3次,并且以每孔100 μ L添加0.25 μ g/mL的HRP-SA(Jackson ImmunoResearch),并且在RT下培育30min,接着洗涤4次并与100 μ L的ABTS

在RT下培育2min。读取405nm处的吸光度。如图36A和36B所示,通过单独的抗体检测TGF α t15-TGFRs中的IL-15和TGF β R11结构域。

[0811] 来自抗TF抗体亲和柱的TGF α t15-TGFRs的纯化洗脱色谱

[0812] 将从细胞培养物中收获的TGF α t15-TGFRs加载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。加载样本后,用5个柱体积的PBS洗涤柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸(pH2.9)洗脱。收集A280洗脱峰,并且然后用1M Tris碱中和到pH 7.5-8.0。然后使用具有30KDa分子量截断值的Amicon离心过滤器将中和的样本缓冲液交换到PBS中。如图37所示,抗TF抗体亲和柱与含有TF作为融合配偶体的TGF α t15-TGFRs结合。将缓冲液交换的蛋白质样本存储在2-8℃下,以用于进一步生化分析和生物活性测试。每次洗脱后,使用6个柱体积的0.1M甘氨酸(pH 2.5)剥离抗TF抗体亲和柱。然后使用5个柱体积的PBS和7个柱体积的20%乙醇中和所述柱,以进行存储。抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团AKTA Avant系统。除洗脱步骤外,所有步骤的流速均为4mL/min,洗脱步骤的流速为2mL/min。

[0813] TGF α t15-TGFRs的分析型尺寸排阻色谱(SEC)分析

[0814] 将Superdex 200 Increase 10/300GL凝胶过滤柱(来自通用电气医疗集团)连接到AKTA Avant系统(来自通用电气医疗集团)。用2个柱体积的PBS平衡所述柱。流速为0.7mL/min。使用毛细管环将含有TGF α t15-TGFRs于PBS中的样本注入Superdex 200柱,并且通过SEC分析。样品的SEC色谱图如图38所示。SEC结果显示TGF α t15-TGFRs的四个蛋白质峰。

[0815] TGF α t15-TGFRs的还原SDS-PAGE分析

[0816] 为了测定TGF α t15-TGFRs蛋白的纯度和分子量,在还原条件下通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(4-12%NuPage Bis-Tris凝胶)电泳(SDS-PAGE)方法分析用抗TF抗体亲和柱纯化的蛋白质样本。电泳后,将凝胶用即时蓝染色约30分钟,然后在纯净水中脱色过夜。

[0817] 为了验证TGF α t15-TGFRs蛋白在CHO细胞中翻译后经历糖基化,使用来自新英格兰生物实验室的蛋白质去糖基化混合物II试剂盒和制造商的说明书进行去糖基化实验。图39示出了非去糖基化(泳道1为红色轮廓)和去糖基化(泳道2为黄色轮廓)状态下样品的还原SDS-PAGE分析。结果显示,当在CHO细胞中表达时,TGF α t15-TGFRs蛋白被糖基化。去糖基化后,纯化的样本在还原SDS凝胶中显示预期的分子量(69kDa和39kDa)。泳道M加载有10u1 SeeBlue Plus2预染标准液。

[0818] TGF α t15-TGFRs在C57BL/6小鼠中的免疫刺激活性

[0819] TGF α t15-TGFRs是多链多肽(本文描述的A型多链多肽),包括第一多肽和第二多肽,所述第一多肽是两个TGF β R11结构域人组织因子219片段和人IL-15的可溶性融合体,所述第二多肽是两个TGF β R11结构域和人类IL-15受体 α 链的寿司结构域的可溶性融合体。

[0820] 将野生型C57BL/6小鼠用对照溶液或0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg TGF α t15-TGFRs皮下处理。处理后四天,评估脾脏重量和脾脏中存在的各种免疫细胞类型的百分比。如图40A所示,用TGF α t15-TGFRs处理的小鼠的脾脏重量随着TGF α t15-TGFRs剂量的增加而增加。此外,分别用1mg/kg、3mg/kg和10mg/kg TGF α t15-TGFRs处理的小鼠的脾脏重量比用对照溶液处理的小鼠高。另外,评估在对照处理和TGF α t15-TGFRs处理的小鼠的脾脏中存在的CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞和CD19⁺B细胞的百分比。如图40B所示,在用TGF α t15-TGFRs处理的小鼠脾脏中,CD8⁺T细胞和NK细胞的百分比都随着TGF α t15-TGFRs剂

量的增加而增加。具体来说,与对照处理的小鼠相比,用0.3mg/kg、3mg/kg和10mg/kg TGFRT15-TGFRs处理的小鼠中CD8⁺T细胞的百分比更高,并且与对照处理的小鼠相比,用0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg和10mg/kg TGFRT15-TGFRs处理的小鼠中NK细胞的百分比更高。这些结果证明TGFRT15-TGFRs能够刺激脾脏中的免疫细胞,尤其CD8⁺T细胞和NK细胞。

[0821] 在野生型C57BL/6小鼠中评估TGFRT15-TGFRs分子的药代动力学。用3mg/kg剂量的TGFRT15-TGFRs皮下处理小鼠。在各个时间点从尾静脉排出小鼠血液,并且制备血清。用ELISA测定小鼠血清中的TGFRT15-TGFRs浓度(捕获:抗人组织因子抗体;检测:生物素化抗人TGFβ受体抗体,之后使用过氧化物酶结合的链霉亲和素和ABTS底物)。结果显示,TGFRT15-TGFRs在C57BL/6小鼠中的半衰期为12.66小时。

[0822] 制备小鼠脾细胞以便评估随时间推移TGFRT15-TGFRs在小鼠中的免疫刺激活性。如图41A所示,用TGFRT15-TGFRs处理的小鼠的脾脏重量在处理48小时后增加并随时间持续增加。另外,评估在对照处理和TGFRT15-TGFRs处理的小鼠的脾脏中存在的CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞和CD19⁺B细胞的百分比。如图41B所示,在用TGFRT15-TGFRs处理的小鼠脾脏中,CD8⁺T细胞和NK细胞的百分比在处理48小时后都增加,并且在单剂量处理后随时间越来越高。这些结果进一步证明TGFRT15-TGFRs能够刺激脾脏中的免疫细胞,尤其CD8⁺T细胞和NK细胞。

[0823] 此外,在单剂量(3mg/kg)的TGFRT15-TGFRs后从小鼠分离的脾细胞中,评估基于脾细胞Ki67表达的免疫细胞的动态增殖和基于颗粒酶B表达的细胞毒性潜力。如图42A和42B所示,在用TGFRT15-TGFRs处理的小鼠脾脏中,NK细胞对Ki67和粒酶B的表达在处理24小时后增加,其对CD8⁺T细胞和NK细胞的表达在单剂量处理后48小时和随后的时间点都增加。这些结果证明TGFRT15-TGFRs不仅增加CD8⁺T细胞和NK细胞的数目,而且增强这些细胞的细胞毒性。TGFRT15-TGFRs的单剂量处理引起CD8⁺T细胞和NK细胞增殖至少4天。

[0824] 还评估来自用TGFRT15-TGFRs处理的小鼠的脾细胞对肿瘤细胞的细胞毒性。用CellTrace紫罗兰标记小莫洛尼(Moloney)白血病细胞(Yac-1),并且将其用作肿瘤靶细胞。在处理后的各个时间点,由TGFRT15-TGFRs(3mg/kg)处理的小鼠脾脏制备脾细胞,并且将其用作效应细胞。将靶细胞与效应细胞以E:T比=10:1混合,并且在37℃下培育20小时。通过使用流式细胞术分析碘化丙啶阳性、紫罗兰标记的Yac-1细胞来评定靶细胞活力。使用以下公式计算Yac-1肿瘤抑制的百分比:(1-[实验样本中的Yac-1活细胞数]/[不含脾细胞的样本中的Yac-1活细胞数])×100。如图43所示,来自TGFRT15-TGFRs处理的小鼠的脾细胞比对照小鼠脾细胞对Yac-1细胞具有更强的细胞毒性。

[0825] 响应于化疗和/或TGFRT15-TGFRs的肿瘤尺寸分析

[0826] 将胰腺癌细胞(SW1990, ATCC®CRL-2172)皮下(s.c.)注射到C57BL/6scid小鼠(杰克逊实验室,001913,2×10⁶个细胞/小鼠,在100μL HBSS中)中以建立胰腺癌小鼠模型。注射肿瘤细胞两周后,开始用阿布拉生(Abraxane)(新基医药(Celgene),68817-134,5mg/kg,i.p.)和吉西他滨(西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich),G6423,40mg/kg,i.p.)的组合腹膜内化疗,接着在2天内用TGFRT15-TGFRs(3mg/kg,s.c.)进行免疫治疗。以上程序视为一个治疗周期,并且重复另外3个周期(1个周期/周)。对照组被设置为注射SW1990的小鼠,其单独接受PBS、化疗(吉西他滨和阿布拉生)或TGFRT15-TGFRs。伴随治疗周期,每隔一天测量并记录每只动物的肿瘤尺寸,直到注射SW1990细胞后2个月实验终止。对肿瘤体积的测量结果

进行分组分析,结果表明,接受化疗和TGFRt15-TGFRs组合的动物与PBS组相比具有显著更小的肿瘤,而单独的化疗和TGFRt15-TGFRs治疗都不如组合有效(图44)。

[0827] 体外衰老B16F10黑色素瘤模型

[0828] 接着,评估激活的小鼠NK细胞在体外杀死衰老B16F10黑色素瘤细胞。用CellTrace紫罗兰标记B16F10衰老细胞(B16F10-SNC)细胞,并且与不同E:T比的体外2t2激活的小鼠NK细胞(从用TGFRt15-TGFRs10 mg/kg注射4天的C57BL/6的小鼠脾脏中分离)一起培育16小时。将细胞用胰蛋白酶处理,洗涤并再悬浮于含有碘化丙啶(PI)溶液的完全培养基中。通过流式细胞仪评估细胞毒性(图45)。

[0829] 实例31:通过多链嵌合多肽构建体体外刺激NK细胞

[0830] 进行一组实验,以评定用18t15-12s、18t15-12s16和7t15-21s刺激后淋巴细胞群体的表面表型的变化。在这些实验中,从血库获得新鲜的人白细胞。用Ficoll-PAQUE Plus(通用电气医疗集团)密度梯度培养基分离外周血淋巴细胞。对细胞进行计数,并且以 0.2×10^6 个/mL的浓度再悬浮于96孔平底板中的0.2mL完全培养基(RPMI 1640(Gibco),补充有2mM L-谷氨酰胺(Thermo Life Technologies)、青霉素(Thermo Life Technologies)、链霉素(Thermo Life Technologies)和10%FBS(Hyclone))中。在37℃和5%CO₂下用以下物质刺激细胞16小时:18t15-12s(100nM)、18t15-12s16(100nM)、单细胞因子rhIL15(50ng/mL)(美天旎(Miltenyi))、rhIL18(50ng/mL)(英伟杰)和rhIL-12(10ng/mL)(派普泰克(Peprotech))的混合物;7t15-21s(100nM)+抗TF抗体(50nM);7t15-21s(100nM);或抗TF抗体(50nM)。第二天,收获细胞并用对CD4或CD8、CD62L和CD69具有特异性的抗体表面染色30分钟。表面染色后,将细胞在FACS缓冲液(含0.5%BSA(EMD密理博)和0.001%叠氮化钠(西格玛)的1X PBS(Hyclone)中洗涤(室温下1500RPM 5分钟)。两次洗涤后,通过流式细胞术(Celesta-BD Bioscience)分析细胞。图46示出了纯化的淋巴细胞群(CD4和CD8 T细胞)与18t15-12s、18t15-12s16或7t15-21s+抗TF抗体孵育过夜导致表达CD69的CD8和CD4 T细胞的百分比增加。另外,用7t15-21s+抗TF抗体孵育导致表达CD62L的CD8和CD4 T细胞的百分比增加(图46)。

[0831] 进行一组实验以确定在用18t15-12s刺激后NK细胞中磷酸化STAT4和磷酸化STAT5水平的提高。在这些实验中,从血库获得新鲜的人白细胞,并且用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)分离CD56⁺N细胞。NK细胞的纯度>70%,并且通过用CD56-BV421、CD16-BV510、CD25-PE和CD69-APCFire750特异性抗体(BioLegend)染色得到证实。对细胞进行计数并将其以 0.05×10^6 个/mL的浓度重悬于96孔平底板中0.1mL完全培养基(RPMI1640(吉毕科公司),补充有2mM L-谷氨酰胺(Thermo Life Technologies)、青霉素(Thermo Life Technologies)、链霉素(Thermo Life Technologies)和10%FBS(Hyclone))中。在37℃和5%CO₂下,用hIL-12(10ng/mL)(Biolegend)或hIL-15(50ng/mL)(NCI)(单细胞因子)或18t15-12s(100nM)刺激细胞90分钟。未刺激的NK细胞(US)用作对照。收获细胞并将其固定于多聚甲醛(西格玛)中到达1.6%的最终浓度。将板在黑暗中在室温下培育10分钟。添加FACS缓冲液(1X PBS(Hyclone),含0.5%BSA(EMD密理博)和0.001%叠氮化钠(西格玛))(100μL),并且将细胞转移到96孔“V”底板。将细胞在室温下以1500RPM洗涤5分钟。通过轻轻上下移吸,将细胞沉淀与100μL冷却甲醇混合,并且在4℃下培育细胞30分钟。将细胞与100mL FACS缓冲液混合,并且在室温下以1500RPM洗涤5分钟。将细胞沉淀与50mL含4mL

pSTAT4(BD Bioscience)和pSTAT5抗体(BD Bioscience)的FACS缓冲液混合,接着在黑暗中在室温下培育30分钟。将细胞与100mL FACS缓冲液混合,并且在室温下以1500RPM洗涤5分钟。将细胞沉淀与50mL FACS缓冲液混合,并且通过流式细胞术(Celesta-BD Bioscience)分析细胞。图47示出了用18t15-12s繁育NK细胞诱导pSTAT4和pSTAT5的增加(作图数据,归一化变化倍数)。

[0832] 实例32: TGFRt15-TGFRs在体内刺激NK细胞

[0833] 进行一组实验来确定TGFRt15-TGFRs构建体对以西方饮食喂养的ApoE^{-/-}小鼠的免疫刺激的影响。在这些实验中,给6周龄雌性B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J小鼠(杰克逊实验室)喂食含有21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖,19.5%酪蛋白和15%淀粉的西方饮食(TD88137,Envigo Laboratories)。西方饮食8周后,将小鼠用3mg/kg的TGFRt15-TGFRs皮下注射。处理后三天,将小鼠禁食16小时,并且然后通过眼眶后静脉丛穿刺收集血样。将血液与10μL 0.5MEDTA混合,并且抽取20μL血液用于淋巴细胞亚群分析。将红血细胞用ACK(0.15M NH₄Cl,1.0mM KHCO₃,0.1mM Na₂EDTA,pH 7.4)溶解,并且将淋巴细胞在4℃下在FACS染色缓冲液(PBS中1%BSA)中用抗小鼠CD8a和抗小鼠NK1.1抗体染色30分钟。将细胞洗涤一次并用BD FACS Celesta分析。对于Treg染色,在4℃下在FACS染色缓冲液中,用抗小鼠CD4和抗小鼠CD25抗体将ACK处理的血液淋巴细胞染色30分钟。将细胞洗涤一次并再悬浮于固定/通透性工作溶液中,并且在室温下培育60分钟。将细胞洗涤一次并再悬浮于通透缓冲液中。将样品在室温下以300-400×g离心5分钟,并且然后弃去上清液。将细胞沉淀重悬于剩余体积中并用1x透化缓冲液将体积调节至约100μL。将抗Foxp3抗体添加到细胞中,并且将细胞在室温下培育30分钟。将通透缓冲液(200μL)添加到细胞中,并且将细胞在室温下以300-400×g离心5分钟。将细胞再悬浮于流式细胞术染色缓冲液中,并且在流式细胞仪上进行分析。图48A至48C示出了用TGFRt15-TGFRs处理增加了用西方饮食喂养的ApoE^{-/-}小鼠中NK细胞和CD8⁺T细胞的百分比。

[0834] 实例33: 体内诱导免疫细胞增殖

[0835] 进行一组实验以确定TGFRt15-TGFRs构建体对C57BL/6小鼠免疫刺激的作用。在这些实验中,用0.1、0.3、1、3和10mg/kg对照溶液(PBS)或TGFRt15-TGFRs皮下处理C57BL/6小鼠。在处理4天使经过处理的小鼠安乐死。测量脾脏重量并制备脾细胞悬浮液。将脾细胞悬浮液用缀合的抗CD4、抗CD8和抗NK1.1(NK)抗体染色。另外针对增殖标记Ki67对细胞进行染色。图49A示出了用TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏重量随着TGFRt15-TGFRs剂量的增加而增加。另外,与仅用对照溶液处理的小鼠相比,用1mg/kg、3mg/kg和10mg/kg TGFRt15-TGFRs处理的小鼠的脾脏重量更高。CD8⁺T细胞和NK细胞的百分比都随着TGFRt15-TGFRs剂量的增加而增加(图49B)。最后,在测试的TGFRt15-TGFRs的所有剂量下,TGFRt15-TGFRs显著上调CD8⁺T细胞和NK细胞中细胞增殖标志物Ki67的表达(图49C)。这些结果证明,TGFRt15-TGFRs处理诱导C57BL/6小鼠中CD8⁺T细胞和NK细胞两者的增殖。

[0836] 进行一组实验来确定TGFRt15-TGFRs构建体对以西方饮食喂养的ApoE^{-/-}小鼠的免疫刺激的影响。在这些实验中,给6周龄雌性B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J小鼠(杰克逊实验室)喂食含有21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖,19.5%酪蛋白和15%淀粉的西方饮食(TD88137,Envigo Laboratories)。西方饮食8周后,将小鼠用3mg/kg的TGFRt15-TGFRs皮下注射。处理后三天,将小鼠禁食16小时,并且然后通过眼眶后静脉丛穿刺收集血样。将血液

与10 μ L 0.5MEDTA混合,并且抽取20 μ L血液用于淋巴细胞亚群分析。将红血细胞用ACK (0.15M NH₄Cl,1.0mM KHCO₃,0.1mM Na₂EDTA,pH 7.4)溶解,并且将淋巴细胞在4℃下在FACS染色缓冲液(PBS中1%BSA)中用抗小鼠CD8a和抗小鼠NK1.1抗体染色30分钟。将细胞洗涤一次并在室温下再悬浮于固定缓冲液(BioLegend目录号420801)中20分钟。将细胞以350 $\times$ g离心5分钟,将固定的细胞再悬浮于细胞内染色通透洗涤缓冲液(BioLegend目录号421002)中,并且然后以350 $\times$ g离心5分钟。然后在室温下将细胞用抗Ki67抗体染色20分钟。将细胞用细胞内染色通透洗涤缓冲液洗涤两次,并且以350 $\times$ g离心5分钟。然后将细胞再悬浮于FACS染色缓冲液中。用BD FACS Celesta分析淋巴细胞亚群。如图50A和50B所述,用TGFRt15-TGFRs处理ApoE^{-/-}小鼠诱导NK和CD8⁺T细胞增殖(Ki67—阳性染色)。

[0837] 实例34:用多链构建体处理后NK介导的细胞毒性

[0838] 进行一组实验以确定用TGFRt15-TGFRs处理NK细胞是否增强NK细胞的细胞毒性。在这些实验中,将人道迪(Daudi)B淋巴瘤细胞用CellTrace紫罗兰(CTV)标记,并且用作肿瘤靶细胞。3mg/kg的TGFRt15-TGFRs皮下处理后4天,对C57BL/6雌性小鼠脾脏使用磁性细胞分选方法(美天旎生物技术(Miltenyi Biotec)),用NK1.1阳性选择分离小鼠NK效应细胞。用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)从衍生自人血白细胞层的外周血单核细胞中分离人NK效应细胞。将靶细胞(人道迪B淋巴瘤细胞)与效应细胞(小鼠NK效应细胞或人NK效应细胞)在存在50nM TGFRt15-TGFRs或不存在TGFRt15-TGFRs(对照)的情况下混合,并且在37℃下对于小鼠NK细胞培育44小时,且对于人NK细胞培育20小时。通过使用流式细胞术分析碘化丙啶阳性、CTV标记的细胞来评定靶细胞(道迪)活力。使用公式(1-实验样品中活肿瘤细胞数/不含NK细胞的样品中的活肿瘤细胞数) $\times$ 100计算道迪抑制的百分比。图51示出了与在没有TGFRt15-TGFRs活化的情况相比,在用TGFRt15-TGFRs活化NK细胞后,小鼠(图51A)和人(图51B)NK细胞对Daudi B细胞具有显著更强的细胞毒性。

[0839] 进行一组实验以确定用TGFRt15-TGFRs处理后的小鼠和人NK细胞的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。在这些实验中,将人道迪B淋巴瘤细胞用CellTrace紫罗兰(CTV)标记,并且用作肿瘤靶细胞。3mg/kg的TGFRt15-TGFRs皮下处理后4天,对C57BL/6雌性小鼠脾脏使用磁性细胞分选方法(美天旎生物技术),用NK1.1阳性选择分离小鼠NK效应细胞。用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)从衍生自人血白细胞层的外周血单核细胞中分离人NK效应细胞。将靶细胞(道迪B细胞)与效应细胞(小鼠NK效应细胞或人NK效应细胞)在存在抗CD20抗体(10nM利妥昔单抗(Rituximab),基因泰克(Genentech))并且存在50nM TGFRt15-TGFRs或不存在TGFRt15-TGFRs(对照)的情况下混合,并且在37℃下对于小鼠NK细胞培育44小时,且对于人NK细胞培育20小时。道迪B细胞表达抗CD20抗体的CD20靶标。培育后通过使用流式细胞术分析碘化丙啶阳性、CTV标记的靶细胞来评定靶细胞活力。使用公式(1-实验样品中活肿瘤细胞数/不含NK细胞的样品中的活肿瘤细胞数) $\times$ 100计算道迪抑制的百分比。图52示出了比在没有TGFRt15-TGFRs活化的情况相比,在用TGFRt15-TGFRs活化NK细胞后,小鼠NK细胞(图52A)和人NK细胞(图52B)对Daudi B细胞具有更强的ADCC活性。

[0840] 实例35:癌症的治疗

[0841] 进行一组实验,以评定在黑色素瘤小鼠模型中TGFRt15-TGFRs加抗TRP1抗体(TA99)与化疗组合的抗肿瘤活性。在这些实验中,将C57BL/6小鼠用0.5 $\times$ 10⁶个B16F10黑色

素瘤细胞皮下注射。在第1天、第4天和第7天用三个剂量的多西他赛(10mg/kg) (DTX) 处理小鼠,接着在第9天用单剂量足组合免疫疗法TGFRT15-TGFRs(3mg/kg)+抗-TRP1抗体TA99(200 μg)处理小鼠。图53A示出了处理方案的示意图。通过卡尺测量监测肿瘤生长,并且使用公式 $V = (L \times W^2) / 2$ 来计算肿瘤体积,其中L是最大肿瘤直径,并且W是垂直肿瘤直径。图53B示出了与盐水对照和DTX处理组相比,用DTX+TGFRT15-TGFRs+TA99处理显著降低了肿瘤生长($N = 10, ****p < 0.001$, 多重t检验分析)。

[0842] 为了评定B16F10肿瘤模型中的免疫细胞亚群,进行外周血分析。在这些实验中,将C57BL/6小鼠用B16F10细胞注射,并且用DTX、DTX+TGFRT15-TGFRs+TA99或盐水处理。对于DTX+TGFRT15-TGFRs+TA99组免疫疗法后第2、5、8天,并且对于DTX和盐水组肿瘤注射后第11天,从荷B16F10瘤小鼠的下颌下静脉采血。在ACK溶解缓冲液中溶解RBC,并且将淋巴细胞洗涤并用抗NK1.1、抗CD8和抗CD4抗体染色。通过流式细胞术(Celesta-BD Bioscience)分析细胞。图53C至53E示出了与盐水和DTX处理组相比,DTX+TGFRT15-TGFRs+TA99处理诱导肿瘤中NK细胞和CD8⁺T细胞百分比的增加。

[0843] 在第17天,使用Trizol从用盐水、DTX或DTX+TGFRT15-TGFRs+TA99处理的小鼠的肿瘤中提取总RNA。使用QuantiTect逆转录试剂盒(凯杰(Qiagen))将总RNA(1μg)用于cDNA合成。使用FAM标记的衰老细胞标记(F) p21 (G) DPP4和(H) IL6预先设计的引物,用CFX96检测系统(伯乐(Bio-Rad))进行实时PCR。将管家基因18S核糖体RNA用作内部对照,以将表达水平的变异性归一化。相对于18S rRNA,每个靶标mRNA的表达基于Ct计算为 $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$,其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{靶标}} - Ct_{18S}$ 。数据呈现为相比于盐水对照的变化倍数。图53F至53H示出了DTX处理诱导衰老肿瘤细胞的增加,其随后在用TGFRT15-TGFRs+TA99免疫疗法处理后减少。

[0844] 进行一组实验以研究通过TGFRT15-TGFRs改善ApoE^{-/-}小鼠中西方饮食诱导的高血糖症。在这些实验中,给6周龄雌性B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J小鼠(杰克逊实验室)喂食含有21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖,19.5%酪蛋白和15%淀粉的西方饮食(TD88137, Envigo Laboratories)。西方饮食8周后,将小鼠用3mg/kg的TGFRT15-TGFRs皮下注射。处理后三天,将小鼠禁食16小时,并且然后通过眼眶后静脉丛穿刺收集血样。用血糖仪(OneTouch UltraMini)和GenUltimated测试条,使用一滴新鲜血液检测血糖。如图54A所示,TGFRT15-TGFRs处理降低了西方饮食诱导的高血糖症。用Eve Technologies的小鼠大鼠代谢阵列(Mouse Rat Metabolic Array)分析血浆胰岛素和抵抗素水平。HOMA-IR使用以下公式计算:稳态模型评估-胰岛素抵抗=葡萄糖(mg/dL)*胰岛素(mU/mL)/405。如图54B所示,与未处理组相比,TGFRT15-TGFRs治疗降低了胰岛素抵抗。如图54C所示,与未处理组相比,TGFRT15-TGFRs($p < 0.05$)显著降低了抵抗素水平,这可能与TGFRT15-TGFRs诱导的胰岛素抵抗降低有关(图54B)。

[0845] 实例36:诱导NK细胞分化成细胞因子诱导的记忆样NK细胞

[0846] 进行一组实验以评估在用18t15-12s刺激后NK细胞分化成细胞因子诱导的记忆样NK细胞(CIMK-NK细胞)。在这些实验中,从血库获得新鲜的人白细胞,并且用RosetteSep/人NK细胞试剂(干细胞技术有限公司)分离CD56⁺NK细胞。NK细胞的纯度>90%,并且通过用CD56-BV421、CD16-BV510,CD25-PE和CD69-APCFire750抗体(BioLegend)染色来证实。对细胞进行计数并且将其以 2×10^6 个/mL重悬于24孔平底板中的2mL完全培养基(RPMI1640(吉毕科公司),补充有2mM L-谷氨酰胺(Thermo Life Technologies)、青霉素(Thermo Life

Technologies)、链霉素(Thermo Life Technologies)和10%FBS(Hyclone))中。细胞未刺激(“无添加”)或用18t15-12s(100nM)或包括rhIL15(50ng/mL)(美天旌)、rhIL18(50ng/mL)(英伟杰)和rhIL-12(10ng/mL)(派普泰克)的单一细胞因子的混合物(“单一细胞因子”)在37℃和5%CO₂下刺激16小时。第二天,收获细胞,并且在室温下用温热完全培养基以1000RPM洗涤两次持续10分钟。将细胞以2x10⁶个/mL重悬于24孔平底板中的2mL含rhIL15(1ng/mL)的完全培养基中。每2天后,将一半培养基替换为含有rhIL15的新鲜完全培养基。

[0847] 为了评定第7天NK细胞记忆表型的变化,将细胞用针对细胞表面CD56、CD16、CD27、CD62L、NKp30和NKp44的抗体染色(BioLegend)。表面染色后,将细胞在含0.5%BSA(EMD密理博)和0.001%叠氮化钠(西格玛)的FACS缓冲液(1X PBS(Hyclone))中洗涤(室温下1500RPM 5分钟)。两次洗涤后,通过流式细胞术(Celesta-BD Bioscience)分析细胞。图55示出了用18t15-12s孵育NK细胞导致表达CD27、CD62L和NKp44的CD16⁺CD56⁺NK细胞的百分比增加,以及CD16⁺CD56⁺NK细胞中NKp30的水平(MFI)增加。

[0848] 实例37:CD44记忆T细胞上调

[0849] 进行一组实验以评定用TGFRt15-TGFRs处理后CD44记忆T细胞的上调。在这些实验中,将C57BL/6小鼠用TGFRt15-TGFR皮下处理。使经过处理的小鼠安乐死并在处理后4天(TGFRt15-TGFRs)制备单一脾细胞悬浮液。将制备的脾细胞用荧光染料偶联的抗CD4、抗CD8和抗CD44抗体染色,并且通过流式细胞术分析CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞中CD44^高T细胞的百分比。结果显示,TGFRt15-TGFRs上调了记忆标记CD44在CD4⁺和CD8⁺T细胞上的表达(图56)。这些发现表明TGFRt15-TGFRs能够诱导小鼠T细胞分化成记忆T细胞。

[0850] 实例38.示例性单链嵌合多肽的产生

[0851] 生成了示例性单链嵌合多肽(α CD3scFv/TF/ α CD28scFv),其包括为抗CD3 scFv的第一靶标结合结构域、可溶性人组织因子结构域和为抗CD28 scFv的第二靶标结合结构域(图57)。这种单链嵌合多肽的核酸和氨基酸序列如下文所示。

[0852] 编码示例性单链嵌合多肽(α CD3scFv/TF/ α CD28scFv)的核酸(SEQ ID NO:126)

[0853] (信号肽)

[0854] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCTTATTATTTTATTTCAGCTCCGCCTATTCC

[0855] (α CD3轻链可变区)

[0856] CAGATCGTGCTGACCCAAAGCCCCGCCATCATGAGCGCTAGCCCCGGTGAGAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCCAGCTCCGTGTCCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAAAGCGGAACCAGCCCCAAAAGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCTCCGGAGTGCCCGCTCATTTCCGGGGCTCTGGATCCGGCACCAGCTACTCTTTAACCATTTCCGGCATGGAAGCTGAAGACGCTGCCACCTACTATTGCCAGCAATGGAGCAGCAACCCCTTCACATTCGGATCTGGCACCAAGCTCGAAATCAATCGT

[0857] (接头)

[0858] GGAGGAGGTGGCAGCGGCGGCGGTGGATCCGGCGGAGGAGGAAGC

[0859] (α CD3重链可变区)

[0860] CAAGTTCAACTCCAGCAGAGCGGCGCTGAACTGGCCCCGGCCGCGCTCCGTCAAGATGAGCTGCAAGGCTTCCGGCTATACATTTACTCGTTACACAATGCATTGGGTCAAGCAGAGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATCGGATATATCAACCCCTTCCCGGGGCTACACCAACTATAACCAAAAAGTTCAAGGATAAAGCCACTTTAACCACTGACAAGAGCTCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCTCTTTAACCAGCGAGGACTCCGCTGTTTACTACTGCGCTAGGTATTAC

GACGACCACTACTGTTTAGACTATTGGGGACAAGGTACCACTTTAACCGTCAGCAGC

[0861] (人组织因子219形式)

[0862] TCCGGCACCACCAATACCGTGCCGCTTATAACCTCACATGGAAGAGCACCAACTTCAAGACAATTCTG
GAATGGGAACCCAAGCCCGTCAATCAAGTTTACACCGTGCAGATCTCCACCAAATCCGGAGACTGGAAGAGCAAGTG
CTTCTACACAACAGACACCGAGTGTGATTTAACCGACGAAATCGTCAAGGACGTCAAGCAAACCTATCTGGCTCGGG
TCTTTTCCTACCCCGCTGGCAATGTCGAGTCCACCGGCTCCGCTGGCGAGCCTCTCTACGAGAATTCCTCCGAATTC
ACCCCTTATTTAGAGACCAATTTAGGCCAGCCTACCATCCAGAGCTTCGAGCAAGTTGGCACCAAGGTGAACGTCAC
CGTCGAGGATGAAAGGACTTTAGTGCGGCGGAATAACACATTTTTATCCCTCCGGGATGTGTTTCGGCAAAGACCTCA
TCTACACACTGTACTATTGGAAGTCCAGCTCCTCCGGCAAAAAGACCGCTAAGACCAACACCAACGAGTTTTTAATT
GACGTGGACAAAGGCGAGAACTACTGCTTCAGCGTGCAAGCCGTGATCCCTTCTCGTACCGTCAACCGGAAGAGCAC
AGATTCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[0863] (α CD28轻链可变区)

[0864] GTCCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAACCTCGTGAAACCCGGTCTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCC
AGCGGATACACCTTACCTCCTATGTGATCCAGTGGGTCAAACAGAAGCCCGACAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAG
CATCAACCTTACAACGACTATACCAAATACAACGAGAAGTTAAGGGAAAGGCTACTTTAACCTCCGACAAAAGCT
CCATCACAGCCTACATGGAGTTCAGCTCTTTAACATCCGAGGACAGCGCTCTGTACTATTGCGCCCGGTGGGGCGAC
GGCAATTACTGGGGACGGGGCACAACACTGACCGTGAGCAGC

[0865] (接头)

[0866] GGAGGCGGAGGCTCCGGCGGAGGCGGATCTGGCGGTGGCGGCTCC

[0867] (α CD28轻链可变区)

[0868] GACATCGAGATGACCCAGTCCCCGCTATCATGTCCGCCTCTTTAGGCGAGCGGGTCACAATGACTTGT
ACAGCCTCCTCCAGCGTCTCCTCCTCTACTTCCATTGGTACCAACAGAAACCCGGAAGCTCCCCTAACTGTGCAT
CTACAGCACCAGCAATCTCGCCAGCGGCGTGCCCCCTAGGTTTTCCGGAAGCGGAAGCACCAGCTACTCTTTAACCA
TCTCCTCCATGGAGGCTGAGGATGCCGCCACCTACTTTTGTACCAGTACCACCGGTCCCCACCTTCGGAGGCGGC
ACCAAACCTGGAGACAAAGAGG

[0869] 示例性单链嵌合多肽(α CD3_{scFv}/TF/ α CD28_{scFv}) (SEQ ID NO:125)

[0870] (信号肽)

[0871] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0872] (α CD3轻链可变区)

[0873] QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVP AHFRGSGSGTS
YSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR

[0874] (接头)

[0875] GGGGSGGGGSGGGGS

[0876] (α CD3重链可变区)

[0877] QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQG LEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKAT
LTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS

[0878] (人组织因子219)

[0879] SGTTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV

FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVSVQAVIPSRVTNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[0880] (α CD28轻链可变区)

[0881] VQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQVWKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKATL
TSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTTLTVSS

[0882] (接头)

[0883] GGGGSGGGGSGGGGS

[0884] (α CD28重链可变区)

[0885] DIEMTQSPAIMASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGSGST
SYSLTISSMEAEDAATYFCHQYHRSPTFGGGTKLETKR

[0886] 生成了第二示例性单链嵌合多肽(α CD28scFv/TF/ α CD3scFv),其包括为抗CD28
scFv的第一靶标结合结构域、可溶性人组织因子结构域和为抗CD3 scFv的第二靶标结合结
构域(图58)。这种单链嵌合多肽的核酸和氨基酸序列如下文所示。

[0887] 编码示例性单链嵌合多肽(α CD28scFv/TF/ α CD3scFv)的核酸(SEQ ID NO:138)

[0888] (信号肽)

[0889] ATGAAATGGGTCACCTTCATCTCTTTACTGTTTTTATTTAGCAGCGCCTACAGC

[0890] (α CD28轻链可变区)

[0891] GTGCAGCTGCAGCAGTCCGGACCCGAAGTGGTCAAGCCCGTGCCTCCGTGAAAATGTCTTGTAAGGCT
TCTGGCTACACCTTTACCTCCTACGTCATCCAATGGGTGAAGCAGAAGCCCGTCAAGGTCTCGAGTGGATCGGCAG
CATCAATCCCTACAACGATTACACCAAGTATAACGAAAAGTTAAGGGCAAGGCCACTCTGACAAGCGACAAGAGCT
CCATTACCGCTACATGGAGTTTTCTCTTTAACTTCTGAGGACTCCGCTTTATACTATTGCGCTCGTTGGGGCGAT
GGCAATTATTGGGGCCGGGGAAGTACTTTAACAGTGAGCTCC

[0892] (接头)

[0893] GGCGGCGGCGGAAGCGGAGGTGGAGGATCTGGCGGTGGAGGCAGC

[0894] (α CD28重链可变区)

[0895] GACATCGAGATGACACAGTCCCCGCTATCATGAGCGCCTCTTTAGGAGAACGTGTGACCATGACTTGT
ACAGCTTCCTCCAGCGTGAGCAGCTCCTATTTCCACTGGTACCAGCAGAAACCCGGCTCCTCCCCTAACTGTGTAT
CTACTCCACAAGCAATTTAGCTAGCGGCGTGCTCCTCGTTTTAGCGGCTCCGGCAGCACCTCTTACTCTTTAACCA
TTAGCTCTATGGAGGCCGAAGATGCCGCCACATACTTTTGCCATCAGTACCACCGGTCCCCTACCTTTGGCGGAGGC
ACAAAGCTGGAGACCAAGCGG

[0896] (人组织因子219形式)

[0897] AGCGGCACCACCAACACAGTGGCCGCTACAATCTGACTTGGAATCCACCAACTTCAAGACCATCCTC
GAGTGGGAGCCCAAGCCCGTTAATCAAGTTTATACCGTGCAGATTTCCACCAAGAGCGGCGACTGGAATCCAAGTG
CTTCTATACCACAGACACCGAGTGCGATCTCACCGACGAGATCGTCAAAGACGTGAAGCAGACATATTTAGCTAGGG
TGTTCTCCTACCCGCTGGAACGTGGAGAGCACCGGATCCGCTGGAGAGCCTTTATACGAGAACTCCCCGAATTC
ACCCCTATCTGGAACCAATTTAGGCCAGCCCACCATCCAGAGCTTCGAACAAGTTGGCACAAAGGTGAACGTCAC
CGTCGAAGATGAGAGGACTTTAGTGCGGAGGAACAATACATTTTATCCTTACGTGACGTCTTCGGCAAGGATTTAA
TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCTAGCTCCTCCGGCAAGAAGACCGCCAAGACCAATACCAACGAATTTTAAATT
GACGTGGACAAGGGCGAGAAGTACTGCTTCTCCGTGCAAGCTGTGATCCCCTCCCGACAGTGAACCGGAAGTCCAC
CGACTCCCCCGTGGAGTGCATGGGCCAAGAGAAGGGAGAGTTTCGTGAG

[0898] (α CD3轻链可变区)

[0899] CAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCGCTATTATGAGCGCTAGCCCCGGTGAAAAGGTGACTATGACATGC
AGGCCAGCTCTTCCGTGAGCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCAGCCCTAAAAGGTGGATCTACGA
CACCAGCAAGCTGGCCAGCGGCGTCCCCGCTCACTTTCGGGGCTCCGGCTCCGGAACAAGCTACTCTCTGACCATCA
GCGGCATGGAAGCCGAGGATGCCGTACCTATTACTGTCAGCAGTGGAGCTCCAACCCCTTACCTTTGGATCCGGC
ACCAAGCTCGAGATTAATCGT

[0900] (接头)

[0901] GGAGGCGGAGGTAGCGGAGGAGGCGGATCCGGCGGTGGAGGTAGC

[0902] (α CD3重链可变区)

[0903] CAAGTTCAGCTCCAGCAAAGCGGCGCCGAACTCGCTCGGCCCGGCGCTTCCGTGAAGATGTCTTGTAAG
GCCTCCGGCTATACCTTACCCGGTACACAATGCACTGGGTCAAGCAACGGCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATTGG
CTATATCAACCCCTCCCGGGGCTATACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAAGCCACCCTCACCACCGACAAGT
CCAGCAGCACCGCTTACATGCAGCTGAGCTCTTTAACATCCGAGGATTCGCCCGTGTACTACTGCGCTCGGTACTAC
GACGATCATTACTGCCTCGATTACTGGGGCCAAGGTACCACCTTAACAGTCTCCTCC

[0904] 示例性单链嵌合多肽(α CD28scFv/TF/ α CD3scFv) (SEQ ID NO:139)

[0905] (信号肽)

[0906] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0907] (α CD28轻链可变区)

[0908] VQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKFKGKATL
TSDKSSITAYMEFSSLTSEDSALYYCARWGDGNYWGRGTTTLTVSS

[0909] (接头)

[0910] GGGSGGGSGGGGS

[0911] (α CD28重链可变区)

[0912] DIEMTQSPAIMASASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFGSGSGT
SYSLTISSMEAEDAATYFCHQYHRSPTFGGGTKLETKR

[0913] (人组织因子219)

[0914] SGTNTNTVAAYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQ
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[0915] (α CD3轻链可变区)

[0916] QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTS
YSLTISGMEAEDAATYYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR

[0917] (接头)

[0918] GGGSGGGSGGGGS

[0919] (α CD3重链可变区)

[0920] QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKAT
LTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS

[0921] 将编码 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv的核酸克隆到经过修饰的逆转录病毒表达载体中,如先前所描述(Hughes等人,《人类基因治疗》16:457-72,2005)。将编码 α CD3scFv/TF/ α

CD28scFv的表达载体转染到CHO-K1细胞中。表达载体在CHO-K1细胞中的表达允许分泌可溶性 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽(称为3t28),其可以通过抗TF抗体亲和与其它色谱方法来纯化。

[0922] 抗组织因子抗体亲和柱用于纯化 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽。抗组织因子抗体亲和柱连接到GE Healthcare AKTA Avant系统。除洗脱步骤外,所有步骤都使用4mL/min的流速,洗脱步骤的流速为2mL/min。

[0923] 使用1M Tris碱将包括 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽的细胞培养收集物调节到pH 7.4并且负载到经5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱(上文所述)上。加载样本后,用5个柱体积的PBS洗涤柱,接着用6个柱体积的0.1M乙酸(pH 2.9)洗脱。收集A280洗脱峰,然后通过添加1M Tris碱中和到pH 7.5-8.0。然后使用具有30kDa分子量截断值的Amicon离心过滤器将中和的样本缓冲液交换到PBS中。图2中的数据表明抗组织因子抗体亲和柱能够结合包含人类可溶性组织因子域的 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽。将缓冲交换的蛋白质样本存储在2-8℃下以用于进一步的生化分析和生物活性测试。

[0924] 每次洗脱之后,使用6个柱体积的0.1M甘氨酸(pH 2.5)剥离抗组织因子抗体亲和柱。然后使用10个柱体积的PBS、0.05%Na₃N₃中和所述柱,并且存储在2-8℃下。

[0925] 使用连接到AKTA Avant系统(来自通用电气医疗集团)的Superdex 200 Increase 10/300GL凝胶过滤柱(来自通用电气医疗集团),对 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽进行分析型尺寸排阻色谱(SEC)。用2个柱体积的PBS平衡所述柱。使用0.8mL/min的流速。使用毛细管环将两百微升的 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽(1mg/mL)注射到柱上。注射单链嵌合多肽后,将1.25个柱体积的PBS流入柱中。SEC色谱图如图59所示。数据显示存在3个蛋白质峰,可能代表 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽的单体和二聚体或其它不同形式。

[0926] 为了测定 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽的纯度和蛋白质分子量,利用标准的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(4-12%NuPage Bis-Tris凝胶)电泳(SDS-PAGE)方法、在还原型条件下分析从抗组织因子抗体亲和柱纯化的 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv蛋白质样品。将凝胶用InstantBlue染色约30分钟并用纯净水脱色过夜。图60示出了使用抗组织因子 α 抗体亲和柱纯化的 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽的SDS凝胶。结果显示,纯化的 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽在还原的SDS凝胶中具有预期分子量(72kDa)。

[0927] 实例39. α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽的功能表征

[0928] 基于ELISA的方法证实了 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽形成。使用ELISA检测 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽,其中一种抗TF单克隆抗体用于捕获并且另一种不同的抗TF单克隆抗体用于检测(图61)。将相似浓度的纯化的组织因子蛋白用作对照。

[0929] 进行进一步的体外实验,以确定 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽是否能够激活人周边血液单核细胞(PBMC)。从血库获得新鲜的人白细胞,并使用密度梯度Histopaque(Sigma)分离出外周血单核细胞(PBMC)。对细胞进行计数且以 0.2×10^6 个/mL的浓度再悬浮于平底96孔板中的0.2mL完全培养基(RPMI 1640(Gibco),其补充有2mM L-谷氨酰胺(赛默生命技术公司(Thermo Life Technologies))、青霉素(赛默生命技术公司)、链霉素(赛默生命技术公司)和10%FBS(Hyclone))中。细胞在37℃、5%CO₂下用0.01nM到1000nM的 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽刺激3天。72小时之后,收集细胞且表面用

CD4-488、CD8-PerCP Cy5.5、CD25-BV421、CD69-APCFire750、CD62L-PE Cy7和CD44-PE (Biolegend) 染色30分钟。表面染色后,将细胞在含0.5%BSA (EMD密理博) 和0.001%叠氮化钠(西格玛)的FACS缓冲液(1X PBS (Hyclone)) 中洗涤(室温下1500RPM 5分钟)。洗涤两次后,将细胞重悬于300 μ L的FACS缓冲液中并通过流式细胞术(Celesta-BD Bioscience) 进行分析。图62和63中的数据表明 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽能够刺激CD8⁺和CD4⁺T细胞。

[0930] 进一步进行实验,其中对使用Histopaque (西格玛) 分离出的PBMC进行计数且以0.2x10⁶/mL再悬浮于平底96孔板中的0.2mL完全培养基(RPMI 1640 (Gibco), 其补充有2mM L-谷氨酰胺(赛默生命技术公司)、青霉素(赛默生命技术公司)、链霉素(赛默生命技术公司) 和10%FBS (Hyclone)) 中。然后在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下用0.01nM到1000nM的 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽刺激细胞3天。72小时之后,收集细胞且表面用CD4-488、CD8-PerCP Cy5.5、CD25-BV421、CD69-APCFire750、CD62L-PE Cy7和CD44-PE (Biolegend) 染色30分钟。表面染色后,将细胞在含0.5%BSA (EMD密理博) 和0.001%叠氮化钠(西格玛)的FACS缓冲液(1X PBS (Hyclone)) 中洗涤(室温下1500RPM 5分钟)。洗涤两次后,将细胞重悬于300 μ L的FACS缓冲液中并通过流式细胞术(Celesta-BD Bioscience) 进行分析。数据再次表明 α CD3scFv/TF/ α CD28scFv单链嵌合多肽能够刺激CD4⁺T细胞的活化(图64)。

[0931] 实例40. 示例性单链嵌合多肽IL-2/TF/IL-2的产生和表征

[0932] 生成了包括结合IL-2受体的第一靶标结合结构域、可溶性人组织因子结构域和结合IL-2受体的第二靶标结合结构域的示例性单链嵌合多肽(IL-2/TF/IL-2) (图65)。这种单链嵌合多肽的核酸和氨基酸序列如下文所示。

[0933] 编码示例性单链嵌合多肽(IL-2/TF/IL-2)的核酸(SEQ ID NO:132)

[0934] (信号肽)

[0935] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0936] (第一IL-2片段)

[0937] GCCCCACCTCCTCCTCCACCAAGAAGACCCAGCTGCAGCTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATG
ATTTTAAACGGCATCAACAACCTACAAGAACCCCAAGCTGACTCGTATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCCAAGAA
GGCCACCGAGCTGAAGCATTTACAGTGTTTAGAGGAGGAGCTGAAGCCCTCGAGGAGGTGCTGAATTTAGCCCAGT
CCAAGAATTTCCATTTAAGGCCCCGGGATTTAATCAGCAACATCAACGTGATCGTTTTAGAGCTGAAGGGCTCCGAG
ACCACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACCGCCACCATCGTGGAGTTTTTAAATCGTTGGATCACCTTCTGCCA
GTCCATCATCTCCACTTTAACC

[0938] (人组织因子219形式)

[0939] AGCGGCACAACCAACACAGTCGCTGCCTATAACCTCACTTGAAGAGCACCAACTTCAAAACCATCCTC
GAATGGGAACCCAAACCCGTTAACCAAGTTTACACCGTGCAGATCAGCACCAAGTCCGGCGACTGGAAGTCCAAATG
TTTCTATACACCGACACCGAGTGCGATCTCACCGATGAGATCGTGAAAGATGTGAAACAGACCTACCTCGCCCGGG
TGTTTAGCTACCCCGCCGGCAATGTGGAGAGCACTGGTTCCGCTGGCGAGCCTTTATACGAGAACAGCCCCGAATTT
ACCCCTTACCTCGAGACCAATTTAGGACAGCCCACCATCCAAAGCTTTGAGCAAGTTGGCACAAAGGTGAATGTGAC
AGTGGAGGACGAGCGGACTTTAGTGCGGCGGAACAACACCTTCTCAGCCTCCGGGATGTGTTCCGCAAAGATTTAA
TCTACACACTGTATTACTGGAAGTCCTCTTCTCCGGCAAGAAGACAGCTAAAACCAACACAAACGAGTTTTTAATC
GACGTGGATAAAGGCGAAAACCTACTGTTTCAGCGTGCAAGCTGTGATCCCCCTCCCGGACCGTGAATAGGAAAAGCAC

CGATAGCCCCGTTGAGTGCATGGGCCAAGAAAAGGGCGAGTTCCGGGAG

[0940] (第二IL-2片段)

[0941] GCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGCATTACTGCTGGATTTACAGATG
ATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCCAAACTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAA
GGCCACAGAAGTGAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAA
GCAAAAACCTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAATAAAGGGATCTGAA
ACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCA
AAGCATCATCTCAACACTAACT

[0942] 示例性单链嵌合多肽(IL-2/TF/IL-2)(SEQ ID NO:131)

[0943] (信号肽)

[0944] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0945] (人IL-2)

[0946] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV
LNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

[0947] (人组织因子219)

[0948] SGTNTNTVAAYNLTKWSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVQK
TYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSLRDV
FGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFSVQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRE

[0949] (人IL-2)

[0950] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV
LNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

[0951] 将编码IL-2/TF/IL-2的核酸克隆到经过修饰的逆转录病毒表达载体中,如先前所描述(Hughes等人,《人类基因治疗》16:457-72,2005)。将编码IL-2/TF/IL-2的表达载体转染到CHO-K1细胞中。表达载体在CHO-K1细胞中的表达允许分泌出可溶性IL-2/TF/IL-2单链嵌合多肽(称为2t2),所述多肽能够通过抗TF抗体亲和和其它色谱方法来纯化。

[0952] IL-2和IL-2/TF/IL-2以类似方式促进含有IL-2R β 和共用 γ 链的32D β 细胞增殖

[0953] 为了评估IL-2/TF/IL-2中的IL-2活性,对IL-2/TF/IL-2与重组IL-2促进表达IL-2R β 和共用 γ 链的32D β 细胞增殖进行比较。IL-2依赖性32D β 细胞用IMDM-10%FBS洗涤5次,并且以 2×10^4 个细胞/孔接种到孔中。将连续稀释的IL-2/TF/IL-2或IL-2添加到细胞中(图66)。将细胞在CO₂培育箱中在37℃下培育3天。通过在第3天向每个孔中添加10 μ l WST1并在CO₂培育箱中在37℃下再培养3小时来检测细胞增殖。通过测量450nm吸光度来分析产生的甲臞染料的量。如图66所示,IL-2/TF/IL-2和IL-2以类似方式活化32D β 细胞。IL-2/TF/IL-2和IL-2的EC₅₀分别是158.1pM和140pM。

[0954] 相较于IL-2,IL-2/TF/IL-2促进含有IL-2R $\alpha\beta$ γ 的CTLL-2细胞增殖的能力改善

[0955] 为了评估IL-2/TF/IL-2中的IL-2活性,对IL-2/TF/IL-2与重组IL-2促进表达IL-2R α 、IL-2R β 和共用 γ 链的CTLL-2细胞增殖进行比较。IL-2依赖性CTLL-2细胞用IMDM-10%FBS洗涤5次,并且以 2×10^4 个细胞/孔接种到孔中。将连续稀释的IL-2/TF/IL-2或IL-2添加到细胞中(图67)。将细胞在CO₂培育箱中在37℃下培育3天。通过在第3天向每个孔中添加10 μ l WST1并在CO₂培育箱中在37℃下再培养3小时来检测细胞增殖。通过测量450nm吸光度来

分析产生的甲臞染料。如图59所示, IL-2/TF/IL-2促进的CTLL-2细胞增殖比IL-2强4至5倍。IL-2/TF/IL-2的 EC_{50} 是123.2pM, IL-2是548.2pM。

[0956] IL-2/TF/IL-2抑制了ApoE^{-/-}鼠的高脂诱导高血糖症恶化

[0957] 用标准食物饮食或含有21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖、19.5%酪蛋白和15%淀粉的高饮食脂肪(TD88137, 哈兰实验室(Harlan Laboratories))喂养六周龄雌性ApoE^{-/-}小鼠(杰克逊实验室(Jackson Lab))并维持在标准条件下。在第7周, 将高脂肪饮食喂养的小鼠随机分为对照组和处理组。然后, 小鼠通过皮下注射3mg/kg剂量接受IL-2/TF/IL-2(处理组)或PBS(饮食组和对照组)。给药后三天, 将小鼠禁食过夜, 并且通过眼眶后静脉丛穿刺收集血液样本。使用OneTouch血糖仪测量整夜空腹血糖水平。如图68所示, 结果显示IL-2/TF/IL-2注射有效抑制ApoE^{-/-}小鼠中血糖水平的增加。

[0958] IL-2/TF/IL-2使血液淋巴细胞中的CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T调节性(Treg)细胞比率显著上调

[0959] 向六周龄雌性ApoE^{-/-}小鼠(杰克逊实验室)喂食标准饮食或含有21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖、19.5%酪蛋白和15%淀粉的高脂肪饮食(TD88137, 哈兰实验室)并且在标准条件下维持。第7周, 将高脂饮食喂养的小鼠随机分为对照组和处理组。然后, 小鼠通过皮下注射3mg/kg剂量接受IL-2/TF/IL-2(处理组)或PBS(饮食组和对照组)。给药后的第三天, 通过眼眶后静脉丛穿刺来收集整夜空腹的血液样品且与ACK溶解缓冲液(赛默飞世尔科技)一起在37℃下培育5分钟。然后将样本再悬浮于FACS缓冲液(含0.5%BSA(EMD密理博)和0.001%叠氮化钠(西格玛)的1×PBS(Hyclone))中, 并且用FITC-抗CD4和APC-抗CD25抗体(BioLegend)进行表面染色30分钟。将表面染色的样本进一步固定, 并且用Fix/Perm缓冲液(Biolegend)预金属化并用PE-抗Foxp3抗体(Biolegend)细胞内染色。染色后, 将细胞用FAC缓冲液洗涤两次, 然后在室温下以1500RPM离心5分钟。通过流式细胞术(Celesta-BD Bioscience)分析细胞。如图69所示, 与未处理组(食物饮食组为0.4%±0.16, 高脂肪饮食组为0.46%±0.09)相比, IL-2/TF/IL-2处理显著增加了血液淋巴细胞中的Treg数量(3.5%±0.32)。

[0960] 抗TF抗体亲和柱纯化IL-2/TF/IL-2的洗脱色谱

[0961] 将从细胞培养物中收获的IL-2/TF/IL-2负载到用5个柱体积的PBS平衡的抗TF抗体亲和柱上。上样后, 用5个柱体积的PBS洗柱, 然后用6个柱体积的0.1M乙酸(pH 2.9)洗脱。收集A280洗脱峰, 并且然后用1M Tris碱中和到pH 7.5-8.0。然后使用具有30kDa分子量截断值的Amicon离心过滤器将中和的样本缓冲液交换到PBS中。如图70所示, 抗TF抗体亲和柱与含有TF作为融合结构域的IL-2/TF/IL-2结合。将缓冲液交换的蛋白质样本存储在2-8℃下, 以用于进一步生化分析和生物活性测试。每次洗脱后, 使用6个柱体积的0.1M甘氨酸(pH 2.5)剥离抗TF抗体亲和柱。然后使用5个柱体积的PBS和7个柱体积的20%乙醇中和所述柱, 以进行存储。抗TF抗体亲和柱连接到通用电气医疗集团AKTA Avant系统。除洗脱步骤外, 所有步骤的流速均为4mL/min, 洗脱步骤的流速为2mL/min。

[0962] IL-2/TF/IL-2的分析型尺寸排阻色谱(SEC)分析

[0963] 为了使用分析型尺寸排阻色谱(SEC)分析IL-2/TF/IL-2, 将Superdex 200 Increase 10/300GL凝胶过滤柱(得自通用电气医疗集团)连接到AKTA Avant系统(得自通用电气医疗集团)。用2个柱体积的PBS平衡所述柱。流速为0.7mL/min。使用毛细管回路将含

有IL-2/TF/IL-2于PBS中的样品注入Superdex 200柱中并且通过SEC进行分析。样品的SEC色谱图如图71所示。SEC结果表明IL-2/TF/IL-2有两个蛋白质峰。

[0964] IL-2/TF/IL-2的还原型SDS-PAGE

[0965] 为了测定蛋白质的纯度和分子量,在还原条件下通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(4-12%NuPage Bis-Tris凝胶)电泳(SDS-PAGE)方法分析用抗TF抗体亲和柱纯化的IL-2/TF/IL-2蛋白样品。电泳后,将凝胶用即时蓝染色约30分钟,然后在纯净水中脱色过夜。

[0966] 为了验证IL-2/TF/IL-2蛋白在CHO细胞中翻译后经历糖基化,使用来自新英格兰生物实验室(New England Biolabs)的蛋白质脱糖基化混合物II试剂盒,根据制造商说明书进行脱糖基化实验。图72A和72B示出了非去糖基化(泳道1为红色轮廓)和去糖基化(泳道2为黄色轮廓)状态下样品的还原SDS-PAGE分析。结果显示,当在CHO细胞中表达时,IL-2/TF/IL-2蛋白被糖基化。去糖基化后,纯化的样本在还原SDS凝胶中以预期分子量(56kDa)运行。泳道M加载有10 μ L SeeBlue Plus2预染标准液。

[0967] IL-2/TF/IL-2的体内表征

[0968] 将IL-2/TF/IL-2以不同剂量皮下注射到C57BL/6小鼠中,以测定体内IL-2/TF/IL-2的免疫刺激活性。小鼠用0.1、0.4、2和10mg/kg的对照溶液(PBS)或IL-2/TF/IL-2皮下处理。在处理后的第3天使经过处理的小鼠安乐死。在处理后的第3天收集小鼠脾脏并称重。制备单一脾细胞悬浮液,并且制备的脾细胞针对CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和NK细胞染色(用荧光染料结合的抗CD4、抗CD8和抗NK1.1抗体),并通过流式细胞术分析。结果显示,IL-2/TF/IL-2在基于脾脏重量扩增脾细胞方面是有效的(图73A),尤其是在0.1至10mg/kg时。在2和10mg/kg下,与对照处理的小鼠相比,CD8⁺T细胞的百分比更高(图73B)。在所有测试剂量下,NK细胞的百分比均高于对照处理的小鼠(图73B)。

[0969] 已知IL-2上调免疫细胞的CD25表达。我们因此获知了经IL-2/TF/IL-2处理的小鼠中的CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和NK细胞的CD25表达。C57BL/6小鼠用IL-2/TF/IL-2皮下处理,如上述段落中所述。脾细胞用荧光染料偶联的抗CD4、抗CD8、CD25和NK1.1单克隆抗体染色。通过流式细胞术分析脾细胞亚群的CD25表达(MFI)。如图74所示,在测试的剂量和时间点(第3天),IL-2/TF/IL-2显著上调了CD4⁺T细胞而非CD8⁺T细胞或NK细胞的CD25表达。

[0970] 还研究了IL-2/TF/IL-2在C57BL/6小鼠中的药代动力学。将IL-2/TF/IL-2以1mg/kg皮下注射到C57BL/6小鼠中。如图75所示,在不同时间点从尾静脉抽取小鼠血液,并制备血清。用ELISA测定IL-2/TF/IL-2浓度(捕获:抗组织因子抗体;检测:生物素化的抗人IL-2抗体,然后是SA-HRP和ABTS底物)。用PK Solutions 2.0(Summit Research Services)计算,IL-2/TF/IL-2的半衰期为1.83小时。

[0971] IL-2/TF/IL-2减弱了ApoE^{-/-}小鼠中的高脂肪诱导动脉粥样硬化斑形成

[0972] 向六周龄雌性ApoE^{-/-}小鼠(杰克逊实验室)喂食标准饮食或高脂肪饮食(21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖、19.5%酪蛋白和15%淀粉)(TD88137,哈兰实验室)并且在标准条件下维持。第7周,将高脂饮食(HFD)喂养的小鼠随机分为对照组和处理组。然后以每周3mg/kg的剂量皮下施用于小鼠IL-2/TF/IL-2(处理组)或PBS(饮食组和对照组),持续4周。在第12周,通过异氟烷使所有小鼠安乐死。收集主动脉,纵向打开,使用正面方法用苏丹IV溶液(0.5%)染色。然后用Image J软件定量斑块面积(红色,如图76A所示)相对于总主动

脉面积的百分比。图76A示出了来自各组的动脉粥样硬化斑块的代表性视图。图76B示出了每组动脉粥样硬化斑块的定量分析结果。对照组(HF饮食)的斑面积百分比远高于处理组(HFD+IL-2/TF/IL-2):10.28%对4.68%。

[0973] IL-2/TF/IL-2抑制2型糖尿病恶化

[0974] 向雄性BKS.Cg-Dock7^m/+Lepr^{db}/J(db/db(杰克逊实验室))小鼠喂食标准饮食,并让其随意饮水。在六周龄时,将小鼠随机分为对照组和处理组。处理组每两周一次以皮下注射方式接受3mg/kg的IL-2/TF/IL-2,而对照组仅接受媒剂(PBS)。使用OneTouch血糖仪每周测量整夜空腹血糖水平。结果显示,IL-2/TF/IL-2有效抑制BKS.Cg-Dock7^m/+Lepr^{db}/J小鼠中血糖水平的增加(图77)。

[0975] 首次注射后,IL-2/TF/IL-2显著上调了血液淋巴细胞中的CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T调节细胞的比率

[0976] 向雄性BKS.Cg-Dock7^m/+Lepr^{db}/J(db/db)(杰克逊实验室)小鼠喂食标准饮食并让其随意饮水。在六周龄时,将小鼠随机分为对照组和处理组。处理组每两周一次以皮下注射方式接受3mg/kg的IL-2/TF/IL-2,而对照组仅接受媒剂(PBS)。首次注射药物后的第四天,收集整夜空腹血样,并与ACK溶解缓冲液(赛默飞世尔科技)在37℃下培育5分钟。然后将样本再悬浮于FACS缓冲液(含0.5%BSA(EMD密理博)和0.001%叠氮化钠(西格玛)的1X PBS(Hyclone))中,并且用FITC-抗CD4和APC-抗CD25抗体(BioLegend)进行表面染色30分钟。将表面染色的样本进一步固定,并且用Fix/Perm缓冲液(Biolegend)预金属化并用PE-抗Foxp3抗体(Biolegend)细胞内染色。染色后,将细胞用FACS缓冲液洗涤两次并通过流式细胞术(Celesta-BD Bioscience)进行分析。测量血液淋巴细胞中CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg的百分比。如图78所示,结果显示IL-2/TF/IL-2显著上调了血液淋巴细胞中Treg的比例。*p<0.05

[0977] 实例41:通过IL-2/TF/IL-2(2t2)体内刺激NK细胞

[0978] 进行了一组实验以确定2t2构建体对C57BL/6小鼠免疫刺激的影响。在这些实验中,对照溶液(PBS)或2t2以0.1、0.4、2和10mg/kg皮下处理C57BL/6小鼠。处理后第3天将经处理的小鼠安乐死。测量脾脏重量并制备单一脾细胞悬浮液。脾细胞悬浮液用偶联的抗CD4、抗CD8和抗NK1.1(NK)抗体染色。通过流式细胞术分析CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和NK细胞的百分比,以及淋巴细胞亚群上的CD25表达。图79A示出了2t2在基于脾脏重量扩增脾细胞方面是有效的,尤其是在0.1至10mg/kg的剂量水平下。处理后,在2和10mg/kg下,与对照处理的小鼠相比,2t2处理的小鼠中CD8⁺T细胞的百分比更高(图79B)。在测试的2t2的所有剂量下,与对照处理的小鼠相比,2t2处理的小鼠中NK细胞的百分比也较高(图79B)。另外,处理后,在0.4和10mg/kg下,2t2显著上调了CD4⁺T细胞而非CD8⁺T细胞和NK细胞的CD25表达(图79C)。

[0979] 进行了一组实验以测定2t2构建体对西方饮食喂养的ApoE^{-/-}小鼠的免疫刺激的影响。在这些实验中,给6周龄雌性B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J小鼠(杰克逊实验室)喂食含有21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖,19.5%酪蛋白和15%淀粉的西方饮食(TD88137,Envigo Laboratories)。西方饮食8周后,向小鼠皮下注射3mg/kg的2t2。处理后三天,将小鼠禁食16小时,并且然后通过眼眶后静脉丛穿刺收集血样。将血液与10μL 0.5M EDTA混合,并且抽取20μL血液用于淋巴细胞亚群分析。将红血细胞用ACK(0.15M NH₄Cl,1.0mM KHCO₃,0.1mM

Na₂EDTA, pH 7.4) 溶解, 并且将淋巴细胞在4℃下在FACS染色缓冲液(PBS中1%BSA)中用抗小鼠CD8a和抗小鼠NK1.1抗体染色30分钟。将细胞洗涤一次并用BD FACS Celesta分析。对于Treg染色, 在4℃下在FACS染色缓冲液中, 用抗小鼠CD4和抗小鼠CD25抗体将ACK处理的血液淋巴细胞染色30分钟。将细胞洗涤一次并再悬浮于固定/通透性工作溶液中, 并且在室温下培育60分钟。将细胞洗涤一次并再悬浮于通透缓冲液中。将样品在室温下以300-400×g离心5分钟, 并且然后弃去上清液。将细胞沉淀重悬于剩余体积中并用1x透化缓冲液将体积调节至约100μL。将抗Foxp3抗体添加到细胞中, 并且将细胞在室温下培育30分钟。将通透缓冲液(200μL)添加到细胞中, 并且将细胞在室温下以300-400×g离心5分钟。将细胞再悬浮于流式细胞术染色缓冲液中, 并且在流式细胞仪上进行分析。图80B至80C示出了用2t2处理增加了用西方饮食喂养的ApoE^{-/-}小鼠中NK细胞和CD8⁺T细胞的百分比。图80A示出了用2t2处理也增加了Treg细胞的百分比。

[0980] 实例42: 体内诱导免疫细胞增殖

[0981] 进行了一组实验以测定2t2构建体对C57BL/6小鼠免疫细胞刺激的影响。在这些实验中, 对照溶液(PBS)或2t2以0.1、0.4、2和10mg/kg皮下处理C57BL/6小鼠。处理后第3天将经处理的小鼠安乐死。测量脾脏重量并制备单一脾细胞悬浮液。将脾细胞悬浮液用缀合的抗CD4、抗CD8和抗NK1.1(NK)抗体染色。通过流式细胞术分析CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和NK细胞的百分比。图81A示出了2t2处理在基于脾脏重量扩增脾细胞方面是有效的, 尤其是在0.1至10mg/kg时。在2和10mg/kg下, 与对照处理的小鼠相比, CD8⁺T细胞的百分比更高(图81B)。在测试的2t2的所有剂量下, 与对照处理的小鼠相比, NK细胞的百分比较高(图81B)。这些结果表明, 2t2处理能够诱导C57BL/6小鼠的CD8⁺T细胞和NK细胞增殖。

[0982] 进行了一组实验以测定2t2构建体对西方饮食喂养的ApoE^{-/-}小鼠的免疫刺激的影响。在这些实验中, 给6周龄雌性B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J小鼠(杰克逊实验室)喂食含有21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖, 19.5%酪蛋白和15%淀粉的西方饮食(TD88137, Envigo Laboratories)。西方饮食8周后, 向小鼠皮下注射3mg/kg的2t2。处理后三天, 将小鼠禁食16小时, 并且然后通过眼眶后静脉丛穿刺收集血样。将血液与10μL 0.5M EDTA混合, 并且抽取20μL血液用于淋巴细胞亚群分析。将红血细胞用ACK(0.15M NH₄Cl, 1.0mM KHCO₃, 0.1mM Na₂EDTA, pH 7.4)溶解, 并且将淋巴细胞在4℃下在FACS染色缓冲液(PBS中1%BSA)中用抗小鼠CD8a和抗小鼠NK1.1抗体染色30分钟。将细胞洗涤一次并在室温下再悬浮于固定缓冲液(BioLegend目录号420801)中20分钟。将细胞以350×g离心5分钟, 将固定的细胞再悬浮于细胞内染色通透洗涤缓冲液(BioLegend目录号421002)中, 并且然后以350×g离心5分钟。然后在室温下将细胞用抗Ki67抗体染色20分钟。将细胞用细胞内染色通透洗涤缓冲液洗涤两次, 并且以350×g离心5分钟。然后将细胞再悬浮于FACS染色缓冲液中。用BD FACS Celesta分析淋巴细胞亚群。图82A和82B示出了用2t2处理ApoE^{-/-}小鼠也诱导了NK和CD8⁺T细胞的增殖(Ki67-阳性染色)。

[0983] 实例43: 糖尿病的治疗

[0984] 进行了一组实验, 以研究2t2对西方饮食诱发的ApoE^{-/-}小鼠高血糖症的改善作用。在这些实验中, 给6周龄雌性B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J小鼠(杰克逊实验室)喂食含有21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖, 19.5%酪蛋白和15%淀粉的西方饮食(TD88137, Envigo Laboratories)。西方饮食8周后, 向小鼠皮下注射3mg/kg的2t2。处理后三天, 将小鼠禁食16

小时,并且然后通过眼眶后静脉丛穿刺收集血样。用血糖仪(OneTouch UltraMini)和GenUltimated测试条,使用一滴新鲜血液检测血糖。如图83A所示,2t2处理显著降低了西方饮食诱导的高血糖症($p < 0.04$)。用Eve Technologies的小鼠大鼠代谢阵列(Mouse Rat Metabolic Array)分析血浆胰岛素和抵抗素水平。HOMA-IR使用以下公式计算:稳态模型评估-胰岛素抵抗=葡萄糖(mg/dL)*胰岛素(mU/mL)/405。如图83B所示,与未处理组相比,2t2处理降低了胰岛素抵抗。如图31C所示,与未处理组相比,2t2($p < 0.02$)显著降低了抵抗素水平,这可能与2t2诱导的胰岛素抵抗降低有关(图83B)。

[0985] 实例44.CD44记忆T细胞上调

[0986] C57BL/6小鼠以皮下途径用2t2处理。对经处理的小鼠实施安乐死,并在处理后第4天(TGFRt15-TGFRs)或第3天(2t2)制备单一脾细胞悬浮液。将制备的脾细胞用荧光染料偶联的抗CD4、抗CD8和抗CD44抗体染色,并且通过流式细胞术分析CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞中CD44^高T细胞的百分比。结果显示,2t2上调了记忆标记CD44在CD4⁺和CD8⁺T细胞上的表达(图84)。这些发现表明2t2能够诱导小鼠T细胞分化为记忆T细胞。

[0987] 实例45:通过2t2诱导Treg细胞

[0988] 通过Ficoll Paque Plus(GE17144003)从5mL全血血沉棕黄层分离健康供体(供体163)的周边血液单核细胞(PBMC)。然后用ACK溶解PBMC以去除红血球。用IMDM-10%FBS洗涤细胞并进行计数。将 1.8×10^6 个细胞(100 μ L/管)接种到流管中,并与50 μ L的下行2t2或IL2(15000、1500、150、15、1.5、0.15或0pM)和50 μ L的预染色抗体(抗CD8-BV605和抗CD127-AF647)一起培育。在水浴中在37 $^{\circ}$ C下培育细胞30分钟。在37 $^{\circ}$ C水浴中添加200 μ L预热的BD Phosflow固定缓冲液I(目录号557870,BD生物科学公司(Becton Dickinson Biosciences))10分钟以停止刺激。将细胞(4.5×10^5 个细胞/100 μ L)转移到V形96孔板中并旋转沉降,随后用100 μ L的-20 $^{\circ}$ C预冷却的BD Phosflow Perm缓冲液III(目录号BD Biosciences)在冰上透化30分钟。然后将细胞用200 μ L的FACS缓冲液充分洗涤2次,并用一组荧光抗体(抗CD25-PE、CD4-PerCP-Cy5.5、CD56-BV421、CD45RA-PE-Cy7和pSTAT5a-AF488)染色以区分不同的淋巴细胞亚群并评估pSTAT5a状态。将细胞离心并重悬于200 μ L的FACS缓冲液中进行FACS Celesta分析。如图85A所示,6pM的2t2足以诱导CD4⁺CD25^{hi}T_{reg}细胞中Stat5a的磷酸化,而需要43.11pM的IL-2诱导相同淋巴细胞群体中Stat5a的磷酸化。相反,与IL2相比,2t2在诱导CD4⁺CD25⁻T_{con}和CD8⁺T_{con}细胞中Stat5a的磷酸化方面活性较低(图85B)或活性相同(图85C)。这些结果表明,在激活人PBMC中的T_{reg}方面,2t2优于IL2,且在人血液淋巴细胞pStat5a应答方面,2t2展现的T_{reg}选择性相较于IL-2增大。

[0989] 实例46.TGFRt15-TGFRs和2t2处理对老龄小鼠血浆中小鼠血红蛋白A1C的影响

[0990] C57BL/6,72周龄小鼠购自杰克逊实验室。将小鼠圈养在受控温度和受控光环境中。将小鼠分成五组,接受以下处理:盐水对照($n=8$),第0天一剂TGFRt15-TGFRs($n=8$),第0天一剂TGFRt15-TGFRs,然后第60天一剂2t2($n=7$),第0天一剂2t2($n=3$),以及第0天一剂2t2,然后第60天一剂TGFRt15-TGFRs($n=7$)。用PBS、TGFRt15-TGFRs(3mg/kg)、2t2(3mg/kg)或TGFRt15-TGFRs(3mg/kg)加2t2(3mg/kg)对小鼠进行皮下处理。

[0991] 在第120天,将小鼠血液从颌下静脉收集到含有EDTA的管中。使用小鼠血红蛋白A1C测定试剂盒(Crystal Chem)评估血液中血红蛋白A1C的水平。将全血与裂解缓冲液混合而不产生泡沫,并在室温下孵育10分钟以裂解红细胞。在微量培养板中,添加CC1a和CC1b试

剂并与来自先前步骤的裂解物混合,并在37℃培养箱中进一步孵育5分钟。孵育后,在酶标仪中在 A_{700} nm波长下测量吸光度。吸光度测量后,添加CC2试剂,并进一步在37℃培养箱中培育3分钟。在酶标仪中在 A_{700} nm波长下测量最终吸光度。根据制造商的说明(Crystal Chem)基于吸光度的变化计算血红蛋白A1C。

[0992] 结果表明,与对照处理的小鼠相比,用2t2然后用TGFRt15-TGFRs处理老龄小鼠降低了血红蛋白A1C的血浆水平(图86)。

[0993] 实例47. 老龄小鼠模型中衰老标志物的减少

[0994] C57BL/6, 72周龄小鼠购自杰克逊实验室。将小鼠圈养在受控温度和受控光环境中。将小鼠分成五组,接受以下处理:盐水对照($n=8$),第0天一剂TGFRt15-TGFRs($n=8$),第0天一剂TGFRt15-TGFRs,然后第60天一剂2t2($n=7$),第0天一剂2t2($n=3$),以及第0天一剂2t2,然后第60天一剂TGFRt15-TGFRs($n=7$)。用PBS、TGFRt15-TGFRs(3mg/kg)、2t2(3mg/kg)或TGFRt15-TGFRs(3mg/kg)加2t2(3mg/kg)对小鼠进行皮下处理。在处理第120天,对小鼠实施安乐死,并收获肝脏以通过定量PCR评估衰老标志物IL-1 α 、IL6和PAI-1的表达水平。将收获的肾脏储存在1.7mL Eppendorf管中的液氮中。通过使用均化器在1mL Trizol(赛默飞世尔公司(Thermo Fischer))中均化样品。将均化的组织转移到新鲜的Eppendorf管中。使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen#74106)根据制造商的说明书提取总RNA。使用QuantiTect逆转录试剂盒(凯杰公司(Qiagen))将1 μ g总RNA用于cDNA合成。使用购自赛默科技(Thermo Scientific)的FAM标记的预先设计的引物,用CFX96检测系统(伯乐公司(Bio-Rad))进行实时PCR。对于所有检测的基因一式三份进行反应。将管家基因18S核糖体RNA用作内部对照,以将表达水平的变异性归一化。相对于18S rRNA,每个靶标mRNA的表达基于Ct计算为 $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$,其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{靶标}} - Ct_{18S}$ 。未处理的6周龄小鼠(幼鼠)用作对照,与老龄小鼠的基因表达水平进行比较。

[0995] 如图87A至87C所示,肝脏中的IL-1 α 、IL6和PAI-1的基因表达随着小鼠的年龄而增加,正如随着细胞衰老的年龄依赖性增加所预期的。用单剂量的TGFRt15-TGFRs处理72个月大的小鼠在降低肝脏中衰老标志物的基因表达方面产生了显著且持久的效果,表明处理与老龄小鼠肝脏中天然存在的衰老细胞的减少相关。然而,在其它处理中,尽管IL-1 α 、IL6和PAI-1的基因表达降低,但不是静态显著的。

[0996] 实例48. 通过2t2和TGFRt15-TGFRs的组合减少ApoE^{-/-}小鼠中西方饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎(NASH)

[0997] 用含有21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖、19.5%酪蛋白和15%淀粉的西方饮食(TD88137, Envigo实验室)喂养6周龄雌性B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J小鼠(杰克逊实验室)(表1)。在西方饮食6周后,对第2组小鼠皮下注射第1剂3mg/kg的TGFRt15-TGFRs,或对第3组和第4组小鼠皮下注射3mg/kg的2t2。在西方饮食12周后,对第2组的小鼠皮下注射第2剂3mg/kg的TGFRt15-TGFRs,对第3组皮下注射3mg/kg的2t2,或对第4组皮下注射3mg/kg的TGFRt15-TGFRs(图88A)。第1组的小鼠作为对照。在西方饮食14周后,对小鼠实施安乐死,并且收集肝脏以分析作为纤维化标志物的肝羟脯氨酸含量。用光度测定法测定肝水解产物中的肝羟脯氨酸。首先将速冻肝脏的类似片段(200mg)在HCl(6N)中在110℃下水解16小时,然后过滤并等分。将等分试样(50 μ L)与氯胺T(2.5mM)一起孵育5分钟,随后与埃利希试剂(Ehrlich's reagent)(410mM)一起在60℃下孵育30分钟。在558nm处测定吸附三次,并与羟

脯氨酸的标准曲线进行比较。结果表示为 $\mu\text{g/g}$ 湿肝组织。如图88B所示,与对照组相比,2t2和TGFRt15-TGFRs处理的组合(第4组)显著降低了由西方饮食诱导的肝羟脯氨酸含量($p < 0.00312$,基于普通单向ANOVA和图基多重比较检验),而单独的TGFRt15-TGFRs或2t2处理没有导致肝羟脯氨酸含量的显著变化。数据表明,2t2和TGFRt15-TGFRs的组合可能具有治疗NASH的潜力。

[0998] 表1

[0999]	组	动物	处理	小鼠/组
	1	ApoE ^{-/-}	对照	7
	2	ApoE ^{-/-}	TGFRt15-TGFRs	11
	3	ApoE ^{-/-}	2t2	10
	4	ApoE ^{-/-}	2t2+TGFRt15-TGFRs	10

[1000] 实例49. ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠模型中的细胞因子、甘油三酯和LDL水平

[1001] 进行一组实验以确定用2t2处理的ApoE^{-/-}小鼠中的细胞因子、甘油三酯和LDL水平。在这些实验中,给6周龄雌性B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J小鼠(杰克逊实验室)喂食含有21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖,19.5%酪蛋白和15%淀粉的西方饮食(TD88137,Envigo Laboratories)。在西方饮食的6周、9周和12周后,向小鼠皮下注射3mg/kg的2t2。

[1002] 在9周第二次注射后3天,从小鼠获得从2t2处理的小鼠和未处理的小鼠(用相同饮食但未用2t2处理的小鼠)获得的血浆样品。如图89A所示,第二次给药后3天,通过颌下静脉穿刺收集过夜禁食血液样品并分离血浆。通过Eve技术(卡尔加里,AB Canada T2N 0M4)分析IL-1 β 、MCP-1和TNF- α 与小鼠细胞因子阵列促炎聚焦10-plex(MDF10)。如图89B所示,2t2处理组的IL-1 β 水平与对照组相比显著降低($p = 0.0312$),2t2处理组的MCP-1水平与对照组相比显著降低($p = 0.0235$),2t2处理组的TNF- α 水平与对照组相比显著降低($p = 0.0172$)。

[1003] 测定在9周第二次注射后3天从2t2处理的小鼠和未处理的小鼠(用相同饮食但未用2t2处理的小鼠)获得的血浆样品中甘油三酯和LDL的浓度。通过颌下静脉穿刺收集过夜禁食血液样品并分离血浆。使用艾博抗公司(Abcam)的甘油三酯定量测定试剂盒(目录号ab65336,艾博抗公司)根据制造商的方案测定甘油三酯的血浆浓度,其中在标准96孔板中制备血浆并与甘油三酯测定缓冲液混合。向孔中添加脂肪酶,并在室温下进一步孵育20分钟。孵育后,向各孔中添加甘油三酯反应混合物,在室温下避光进一步孵育60分钟,在570nm波长下测量吸光度。根据制造商的说明计算试验样品中甘油三酯的浓度,单位为nmol/L(mM)。

[1004] 根据制造商的方案,用小鼠LDL-胆固醇测定试剂盒(目录号79980,Crystal Chem)分析血浆LDL。将血浆样品与CC1试剂混合并在37°C下孵育5分钟。孵育后,在酶标仪中在600nm波长下测量吸光度。在吸光度测量后,添加CC2试剂并在37°C下进一步孵育5分钟。在酶标仪中在600nm下测量最终吸光度。根据制造商的说明(Crystal Chem)基于吸光度的变化计算小鼠LDL-胆固醇浓度。

[1005] 数据表明,2t2处理显著降低了血浆甘油三酯水平和血浆LDL水平(分别为图90和91)。施用2t2没有显著影响小鼠的体重(与未处理的对照相比)(图92)。

[1006] 实例50:施用TGFRt15-TGFRs对基于高脂肪饮食的2型糖尿病小鼠模型的影响

[1007] 材料和方法

[1008] TGFRt15-TGFRs是包括两个TGF β 结合结构域的多链嵌合多肽(本文所述的多链嵌

合多肽), TGF β 结合结构域是可溶性人TGF β R_{II}二聚体(aa24-159)。2t15-TGFRs是包括IL-21和TGF β 结合结构域的多链嵌合多肽。2t2单链嵌合多肽与上述实例中描述的单链嵌合多肽相同。

[1009] 结果

[1010] 为了评估TGF β Rt15-TGFRs、2t2和2t15-TGFRs在基于高脂肪饮食的2型糖尿病小鼠模型(来自杰克逊实验室的B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J)中的影响。给小鼠饲喂对照饮食或高脂肪饮食11周。用高脂肪饮食喂养的小鼠亚群也用TGF β Rt15-TGFRs、2t15-TGFR或2t2处理。喂食对照饮食、高脂肪饮食的小鼠,以及喂食高脂肪饮食并用TGF β Rt15-TGFRs、2t15-TGFRs或2t2处理的小鼠在处理4天后进行评估。

[1011] 为了检测TGF β Rt15-TGFRs、2t15-TGFRs和2t2对动物皮肤和毛发的外观和质地的影响,给小鼠喂食对照或高脂肪饮食7周,也用TGF β Rt15-TGFRs、2t15-TGFRs或2t2处理喂食高脂肪饮食的小鼠亚群。处理一周后,评估小鼠的外观。与喂食对照饮食的小鼠相比,喂食高脂肪饮食且未处理的小鼠,或喂食高脂肪饮食且用2t15-TGFRs处理的小鼠显得不整洁且毛发蓬松,并且白发/脱发增加(图93A、93B和93E)。令人惊讶的是,与未接受TGF β Rt15-TGFRs或2t2处理的高脂肪饮食喂养的小鼠(图93B)相比,接受TGF β Rt15-TGFRs或2t2处理的高脂肪饮食喂养的小鼠(图93C和93D)看起来更整洁且更健康(白发/脱发更少)。具体而言,与对照小鼠相比,TGF β Rt15-TGFRs或2t2处理的小鼠显示出优良的皮肤和毛发外观和质地。这些结果表明,用TGF β Rt15-TGFRs或2t2处理可改善哺乳动物皮肤和毛发的外观和质地。

[1012] 实例51. 使用单链嵌合多肽改善毛发生长

[1013] 将7周龄C57BL/6J小鼠的背毛剃毛并使用商业脱毛膏脱毛。在同一天向小鼠皮下注射单次剂量2t2或低剂量的市售重组IL-2,然后每天给药历时另外四天。未经处理的小鼠用作对照。在第10天,处死小鼠并制备剃毛区域的皮肤切片。图94A至94E示出了脱毛后第10天C57BL/6J小鼠皮肤切片的代表性H&E染色。图94A示出了仅在剃毛后进行脱毛的对照小鼠,图94B示出了脱毛后施用低剂量IL-2(1mg/kg)的小鼠,图94C至94E示出了脱毛后施用0.3mg/kg(图94C)、1mg/kg(图94D)和3mg/kg(图94E)的2t2的小鼠。黑色箭头表示生长期的毛囊,这些毛囊随后将延伸到真皮中并促进头发生长。图95示出了每个处理组每10个区域计数的毛发生长期毛囊的总数。总而言之,数据显示与仅脱毛相比,2t2分子使得生长期毛囊数量增加。这种作用也是剂量依赖性的。

[1014] 实例52:癌症的治疗

[1015] 进行一组实验以评估TGF β Rt15-TGFRs加抗TRP1抗体(TA99)与化疗组合在黑素瘤小鼠模型中的抗肿瘤活性。在这些实验中,将C57BL/6小鼠用 0.5×10^6 个B16F10黑色素瘤细胞皮下注射。在第1天、第4天和第7天用三个剂量的化疗多西他赛(docetaxel)(10mg/kg)(DTX)处理小鼠,接着在第8天用单剂量的组合免疫疗法TGF β Rt15-TGFRs(3mg/kg)+抗TRP1抗体TA99(200 μ g)处理。图96示出了处理方案的示意图。

[1016] 为了评定B16F10肿瘤模型中的免疫细胞亚群,进行外周血分析。在这些实验中,将C57BL/6小鼠用B16F10细胞注射,并且用DTX、DTX+TGF β Rt15-TGFRs+TA99或盐水处理。对于DTX+TGF β Rt15-TGFRs+TA99组,在免疫疗法后第3、5和10天从B16F10荷瘤小鼠的颌下静脉抽取血液。将RBC在ACK裂解缓冲液中裂解,洗涤淋巴细胞并用抗NK1.1、抗CD8、抗Ki67、抗CD25、抗粒酶B和抗CD4抗体染色。通过流式细胞术(Celesta-BD Bioscience)分析细胞。图

97A至97H示出了与盐水和DTX处理组相比,DTX+TGFRt15-TGFRs+TA99处理诱导血液中NK细胞和CD8⁺T细胞百分比的增加。

[1017] 还在DTX-TGFRt15-TGFRs+TA99组的免疫疗法后16小时、3天、5天和10天获得的样品中测定TGF- θ 1、TGF- θ 2和TGF- θ 3的血浆水平。数据显示,与仅用DTX处理的小鼠中的水平相比,用TGFRt15-TGFRs和TA99处理降低了DTX处理的小鼠中TGF- θ 1和TGF- θ 2的血浆水平(图98A至98C)。

[1018] 还在DTX-TGFRt15-TGFRs+TA99组的免疫疗法后16小时、3天、5天和10天获得的样品中测定了IL-2、IL-1 θ 、IL-6、MCP-1和GM-CSF的血浆水平。数据显示,与仅用DTX处理的小鼠中的水平相比,用TGFRt15-TGFRs和TA99处理降低了DTX处理的小鼠中IL-2、IL-1 θ 、IL-6和GM-CSF的血浆水平(图99A至99E)。

[1019] 在小鼠中移植B16F10细胞后第18天,处死小鼠并测定小鼠脾脏中NK细胞和CD8⁺T细胞的相对水平。数据显示,与单独用DTX处理的小鼠脾脏中的水平相比,用TGFRt15-TGFRs和TA99处理增加了DTX处理小鼠脾脏中的NK细胞和CD8⁺T细胞水平(图100A至100B)。

[1020] 为了评估糖酵解活性,在免疫疗法后3天、5天和10天从小鼠获得的样品中进行糖酵解应激测试。通过测量糖酵解、糖酵解能力、糖酵解储备和非糖酵解酸化来测定来自B16F10荷瘤小鼠的脾细胞的糖酵解活性。数据显示,与仅用DTX处理的小鼠中的水平相比,用TGFRt15-TGFRs和TA99处理增加了DTX处理的小鼠中脾细胞的糖酵解活性(图101A至101C和图102A至102L)。

[1021] 在免疫疗法后3天、5天和10天从小鼠获得的样品上进行Mito应激测试以进一步评估来自B16F10荷瘤小鼠的脾细胞的代谢。还通过测量基础呼吸、最大呼吸、备用呼吸能力和ATP产生来测定来自B16F10荷瘤小鼠的脾细胞的线粒体呼吸。数据显示,与仅用DTX处理的小鼠中的水平相比,用TGFRt15-TGFRs和TA99处理增加了DTX处理的小鼠中脾细胞的线粒体呼吸(图103A至103C和图104A至104L)。

[1022] 还在用DTX、DTX+TGFRt15-TGFRs+TA99或盐水处理的小鼠的B16F10肿瘤中评估NK和T细胞肿瘤浸润。图105A至105H示出了与盐水和DTX处理组相比,DTX+TGFRt15-TGFRs+TA99处理导致B16F10肿瘤中NK细胞和CD8⁺T细胞的浸润水平增加。

[1023] 在第1天、第4天和第7天用三个剂量的化疗多西他赛(10mg/kg) (DTX) 处理的黑素瘤小鼠模型中测定B16F10肿瘤中的衰老相关基因表达。图106A示出了处理方案的示意图。评估B16F10肿瘤中DPP4、IL6、p16和p21的表达水平。图106B至106E示出了DTX处理诱导小鼠中B16F10肿瘤细胞中衰老相关基因表达的增加。

[1024] 为了评估TGFRt15-TGFRs处理后B16F10肿瘤细胞中化疗诱导的衰老水平,在第1天、第4天和第7天用三个剂量的化疗多西他赛(10mg/kg) (DTX) 处理小鼠,接着在第8天用单剂量的组合免疫疗法TGFRt15-TGFRs(3mg/kg)+抗TRP1抗体TA99(200 μ g) 处理小鼠。在第17天,使用Trizol从用盐水、DTX+TGFRt15-TGFRs+TA99处理的小鼠的B16H10肿瘤中提取总RNA。图107A示出了处理方案的示意图。使用QuantiTect逆转录试剂盒(凯杰(Qiagen))将总RNA(1 μ g)用于cDNA合成。使用用于衰老细胞标志物p21和IL-6的FAM标记的预先设计的引物,用CFX96检测系统(伯乐公司)进行实时PCR,数据显示TGFRt15-TGFRs和抗TRP1处理降低了用地塞米松处理的小鼠中B16F10肿瘤中的p21基因表达(图107B至107C)。

[1025] 实例52:2t2的IL-2活性

[1026] 在细胞系和PBMC细胞中将2t2的IL2活性与重组IL2(阿地白介素(Proleukin))进行比较。用IMDM-10%FBS洗涤IL2依赖性32D β 或CTLL-2细胞5次,并以 2×10^4 个细胞/孔接种到孔中。将如图108A所示的连续稀释的2t2或IL2添加到细胞中。将细胞在CO₂培养箱中在37℃下孵育3天。通过在第3天向各孔中添加10 μ l的WST1并在CO₂培养箱中在37℃下再孵育3小时来检测细胞增殖。通过测量450nm处的吸光度来分析产生的甲臞染料。如图108A所示,2t2和IL2以类似方式活化32D β (含有IL-2R β γ)细胞。2t2和IL2的EC₅₀分别为70.59pM和65.51pM。然而,2t2促进CTLL-2细胞(含有IL-2R $\alpha\beta$ γ)增殖比IL-2强2倍以上。2t2的EC₅₀是90.72pM,IL2是252.8pM。

[1027] 通过PBMC pSTAT5测定确定下降的2t2的活性并与IL2(以15000pM开始)进行比较。通过Ficoll Paque Plus(目录号GE17144003,GE医疗生命科学部(GE Healthcare Life Sciences))从5ml全血血沉棕黄层分离PBMC并用ACK裂解。用I10洗涤细胞并计数。将 1.8×10^6 个细胞(100 μ L/管)接种到流管中,并与50 μ l下行的2t2或IL2和50 μ L预染色抗体(BV605-抗CD8,BioLegend)一起孵育。在水浴中在37℃下培育细胞30分钟。在37℃水浴中添加200 μ L预热的BD Phosflow固定缓冲液I(目录号557870,BD生物科学公司)10分钟。将细胞(4.5×10^5 个细胞/100 μ L)转移到V形96孔板中并旋转沉降,随后用100 μ L的-20℃预冷却的BD Phosflow Perm缓冲液III(目录号558050,BD生物科学公司)在冰中透化30分钟。然后将细胞用200 μ L的FACS洗涤缓冲液充分洗涤2次,并用荧光抗体组(PE-抗CD25、PerCP-Cy5.5-抗CD4、AF488-抗pSTAT5a、BD生物科学公司和BV421-抗CD56,BioLegend)染色以区分不同的淋巴细胞亚群和pSTAT5a状态。将细胞快速离心并且再悬浮于200 μ L FACS缓冲液中以用于FACSCelesta分析。如图108B所示,2t2活化CD4⁺CD25⁺T_{reg}细胞优于IL2超过7倍。2t2的EC₅₀是6.118pM,IL2是43.11pM。2t2和IL2以类似方式活化CD8⁺T_{con}细胞。2t2和IL2的EC₅₀分别为853.6pM和932.3pM。如图108C所示,2t2活化CD4⁺CD25⁻T_{con}细胞优于IL2超过2倍。2t2的EC₅₀是100.9pM,IL2是223pM。2t2和IL2以类似方式活化CD56^{bright} NK细胞。2t2和IL2的EC₅₀分别为26.62pM和24.16pM。如图108D所示,2t2活化CD56^{dim} NK细胞优于IL2超过4倍。2t2的EC₅₀是165.4pM,IL2是660.3pM。

[1028] 实例53:2t2活化的Treg细胞使炎性衰老失活

[1029] 研究设计如图109A所示,用含有21%脂肪、0.15%胆固醇、34.1%蔗糖、19.5%酪蛋白和15%淀粉的西方饮食脂肪(TD88137,哈兰实验室)喂养六周龄雌性ApoE^{-/-}小鼠(杰克逊实验室)并在标准条件下维持。第6周,将喂食西方饮食的小鼠随机分为对照组和处理组。然后以3mg/kg的剂量皮下注射小鼠2t2(处理组)或PBS(对照组)。小鼠在三周时间间隔内连续接受两次皮下注射,之后在研究期间接受第一次注射,同时继续西方饮食。在20周龄(西方饮食后14周)对小鼠实施安乐死。

[1030] 如图109B所示,第一次给药后三天,通过颌下静脉穿刺收集过夜禁食血液样品,并与ACK裂解缓冲液(赛默飞世尔科技)在37℃下孵育5分钟。然后将样品重悬于含0.5%BSA(默克密理博)和0.001%叠氮化钠(西格玛公司(Sigma))的FACS缓冲液(1X PBS(Hyclone))中,并用BV605-抗CD45、PE-Cy7-抗CD3、BV510-抗CD4、APC-Cy7-抗CD25、APC-抗CD39和BV421-抗CTLA4(Biolegend)表面染色30分钟。将表面染色的样品进一步固定,并且用Fix/Perm缓冲液(Biolegend)预金属化并用PE-抗Foxp3(Biolegend)细胞内染色。染色后,将细胞用FACS缓冲液以1500RPM在室温下洗涤两次,持续5分钟,并通过流式细胞术(Celesta-BD

Bioscience) 进行分析。通过FlowJo收集和分析流动数据。使用由高CD45荧光染色和低侧散射(SSC)门控(CD45^高SSC^低)组成的异质淋巴细胞门控策略在流式细胞仪上描绘淋巴细胞群。从每个管中采集至少50,000个门控淋巴细胞用于每次分析。淋巴细胞亚群从总CD45^高SSC^低淋巴细胞群体中描述为调节性T细胞(CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺)、调节性T细胞(CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD39⁺Foxp3⁺)和调节性T细胞(CD3⁺CD4⁺CD8⁻CTLA4⁺Foxp3⁺)。

[1031] 如图109B所示,与对照组相比,2t2处理显著增加了血液淋巴细胞中的CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺Treg群体($p=0.0041$),与对照组相比,显著增加了血液淋巴细胞中的CD3⁺CD4⁺CD8⁻CTLA4⁺Foxp3⁺Treg群体($p=0.022$),与对照组相比,显著增加了血液淋巴细胞中的CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD39⁺Foxp3⁺Treg群体($p<0.0001$)。

[1032] 如图109C所示,第一次给药后三天,通过颌下静脉穿刺收集过夜禁食血液样品,并与ACK裂解缓冲液(赛默飞世尔科技)在37℃下孵育5分钟。然后将样品重悬于含0.5%BSA(默克密理博)和0.001%叠氮化钠(西格玛公司)的FACS缓冲液(1X PBS(Hyclone))中,并用BV605-抗CD45、PE-Cy7-抗CD3、BV510-抗CD4、PerCP5.5-抗CD8和APC-抗NK1.1(Biolegend)表面染色30分钟。染色后,将细胞用FACS缓冲液以1500RPM在室温下洗涤两次,持续5分钟,并通过流式细胞术(Celesta-BD Bioscience)进行分析。通过FlowJo收集和分析流动数据。使用由高CD45荧光染色和低侧散射(SSC)门控(CD45^高SSC^低)组成的异质淋巴细胞门控策略在流式细胞仪上描绘淋巴细胞群。从每个管中采集至少50,000个门控淋巴细胞用于每次分析。从总CD45^高SSC^低淋巴细胞群体中描绘淋巴细胞亚群作为辅助性T细胞(CD3⁺CD4⁺CD8⁻)。将来自总CD45^高SSC^低淋巴细胞群体的淋巴细胞亚群描绘为细胞毒性T细胞(CD3⁺CD4⁻CD8⁺)。将来自总CD45^高SSC^低淋巴细胞群体的淋巴细胞亚群描绘为自然杀伤(NK)细胞(CD3⁻NK1.1⁺)。如图109C所示,与对照组相比,2t2处理显著减少了血液淋巴细胞中的辅助性T细胞(CD3⁺CD4⁺CD8⁻)群体($p=0.0279$),与对照组相比对血液淋巴细胞中的细胞毒性T细胞(CD3⁺CD4⁻CD8⁺)群体没有影响(NS),与对照组相比显著增加了血液淋巴细胞中的自然杀伤(NK)细胞(CD3⁻NK1.1⁺)群体($p<0.0001$)。

[1033] 如图109D所示,第2次给药后3天,通过颌下静脉穿刺收集过夜禁食血液样品并分离血浆。通过Eve技术(卡尔加里,AB Canada T2N 0M4)分析IL-1 β 、MCP-1和TNF- α 与小鼠细胞因子阵列促炎聚焦10-plex(MDF10)。如图109D所示,2t2处理组的IL-1 β 水平与对照组相比显著降低($p=0.0312$),2t2处理组的MCP-1水平与对照组相比显著降低($p=0.0235$),2t2处理组的TNF- α 水平与对照组相比显著降低($p=0.0172$)。

[1034] 如图109E所示,第3次给药后2周,通过颌下静脉穿刺收集过夜禁食血样,并立即使用OneTouch葡萄糖计测量空腹血糖水平。分离血浆,用小鼠LDL-胆固醇测定试剂盒(目录号79980,Crystal Chem)和超敏小鼠胰岛素ELISA试剂盒(目录号90080,Crystal Chem)根据制造商的方案分析LDL和胰岛素。如图109E所示,与对照组相比,2t2处理组的LDL水平显著降低($p=0.0025$)。与对照组相比,2t2处理组的空腹血糖水平显著降低($p=0.0089$)。与对照组相比,2t2处理组中基于葡萄糖和胰岛素水平的HOMA-IR指数和反映的胰岛素抵抗显著降低($p=0.0102$)。

[1035] 实例54: TGF α 15-TGF α s和2t2处理对老龄小鼠中小鼠血浆标志物的影响

[1036] C57BL/6,72周龄小鼠购自杰克逊实验室。将小鼠圈养在受控温度和受控光环境中。将小鼠分成五组,接受以下处理:盐水对照($n=8$),第0天一剂TGF α 15-TGF α s($n=8$),第

0天一剂TGFRt15-TGFRs,然后第60天一剂2t2(n=7),第0天一剂2t2(n=3),以及第0天一剂2t2,然后第60天一剂TGFRt15-TGFRs(n=7)。用PBS、TGFRt15-TGFRs(3mg/kg)、2t2(3mg/kg)或TGFRt15-TGFRs(3mg/kg)加2t2(3mg/kg)对小鼠进行皮下处理。在第120天,将小鼠血液从颌下静脉收集到含有EDTA的管中。将全血以3000RPM离心10分钟以将血浆与血液分离。通过多重细胞因子阵列(Eve技术)对血浆标志物PAI-1、IL-1 α 和CXCL1进行分析。结果表明,与对照处理的小鼠相比,用2t2随后用TGFRt15-TGFRs处理老龄小鼠降低了PAI-1、IL-1 α 和CXCL1的血浆水平(图110A至D)。还测量了IL-2的血浆水平。血浆IL-2水平通过用2t2随后用TGFRt15-TGFRs处理而降低,但由于动物之间的变异性,这些变化并不显著。与对照组相比,用单独的TGFRt15-TGFRs处理老龄小鼠也导致血浆中PAI-1和CXCL1蛋白水平的显著降低(图110A至D)。

[1037] 其它实施例

[1038] 应理解,虽然已经结合其具体描述对本发明进行了描述,但前面的描述旨在说明而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围限定。其它方面、优点以及修改都处于以下权利要求书的范围内。

序列表

<110> HCW生物制剂公司(HCW BIOLOGICS, INC.)

<120> 治疗年龄相关疾病和炎性疾病的方法

<130> 47039-0020W01

<140>

<141>

<150> 62/975,141

<151> 2020-02-11

<160> 140

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 1

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 2

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 2

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 3

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 3

```

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1           5           10           15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
          20           25           30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
          35           40           45
Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
          50           55           60
Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
65           70           75           80
Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
          85           90           95
Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
          100          105          110

```

Arg

<210> 4

<211> 146

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 4

```

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
1           5           10           15
Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
          20           25           30
Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
          35           40           45
Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
          50           55           60
Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65           70           75           80

```

Asn	Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	Pro	Ala	Val	Gly	Ile	Gln	Asp	Glu	Gly	Ile
			85						90					95	
Phe	Arg	Cys	Gln	Ala	Met	Asn	Arg	Asn	Gly	Lys	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn
			100					105					110		
Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Tyr	Arg	Lys	Asn	Ser	Arg	Val	Phe	Ser	Lys	Ala
			115				120					125			
Ser	Leu	Leu	Pro	Lys	Lys	Lys	Pro	Ser	Thr	Pro	Ala	Leu	Ala	His	Glu
			130				135				140				
Gly	Leu														
145															
<210>	5														
<211>	172														
<212>	PRT														
<213>	智人(Homo sapiens)														
<400>	5														
Met	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala	Val	Gly	Ala	Trp	Val	Leu	Val	Leu	Ser	Leu
1			5						10					15	
Trp	Gly	Ala	Val	Val	Gly	Ala	Gln	Asn	Ile	Thr	Ala	Arg	Ile	Gly	Glu
			20					25					30		
Pro	Leu	Val	Leu	Lys	Cys	Lys	Gly	Ala	Pro	Lys	Lys	Pro	Pro	Gln	Arg
			35				40					45			
Leu	Glu	Trp	Lys	Leu	Asn	Thr	Gly	Arg	Thr	Glu	Ala	Trp	Lys	Val	Leu
			50			55					60				
Ser	Pro	Gln	Gly	Gly	Gly	Pro	Trp	Asp	Ser	Val	Ala	Arg	Val	Leu	Pro
65				70					75					80	
Asn	Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	Pro	Ala	Val	Gly	Ile	Gln	Asp	Glu	Gly	Ile
			85						90					95	
Phe	Arg	Cys	Gln	Ala	Met	Asn	Arg	Asn	Gly	Lys	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn
			100					105					110		
Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Tyr	Gln	Ile	Pro	Gly	Lys	Pro	Glu	Ile	Val	Asp
			115				120					125			
Ser	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Ala	Gly	Val	Pro	Asn	Lys	Val	Gly	Thr	Cys
			130				135					140			
Val	Ser	Glu	Gly	Ser	Tyr	Pro	Ala	Gly	Thr	Leu	Ser	Trp	His	Leu	Asp
145				150					155					160	
Gly	Lys	Pro	Leu	Val	Pro	Asn	Glu	Lys	Gly	Glu	Ser				
			165						170						
<210>	6														
<211>	441														

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta	60
gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tggtgctgaa gtgtaagggg	120
gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct	180
tggaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgccttccc	240
aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag	300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccgtaag	360
aattccaggg tcttctccaa ggcctcctc ttacctaaga aaaagccttc aaccccagcc	420
ttggcccatg agggcctctg a	441

<210> 7

<211> 519

<212> DNA

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 7

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta	60
gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tggtgctgaa gtgtaagggg	120
gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct	180
tggaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgccttccc	240
aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag	300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt	360
cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctggtgt tccaataag	420
gtggggacat gtgtgtcaga gggaagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttgat	480
gggaagcccc tggcgcctaa tgagaagggt gagtcctaa	519

<210> 8

<211> 219

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 8

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser	
1 5 10 15	
Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln	
20 25 30	
Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys	
35 40 45	
Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val	
50 55 60	
Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala	

65	70	75	80
Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn			
	85	90	95
Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr			
	100	105	110
Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu			
	115	120	125
Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg			
	130	135	140
Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser			
145	150	155	160
Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu			
	165	170	175
Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val			
	180	185	190
Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu			
	195	200	205
Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu			
	210	215	

<210> 9

<211> 657

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 9

agcggcaca ccaacacagt cgctgcctat aacctcactt ggaagagcac caacttcaaa	60
accatcctcg aatgggaacc caaacccgtt aaccaagttt acaccgtgca gatcagcacc	120
aagtccggcg actggaagtc caaatgtttc tataccaccg acaccgagtg cgatctcacc	180
gatgagatcg tgaaagatgt gaaacagacc tacctcgccc ggggtgtttag ctaccccgcc	240
ggcaatgtgg agagcactgg ttccgctggc gagcctttat acgagaacag ccccgattt	300
accccttacc tcgagaccaa tttaggacag cccaccatcc aaagctttga gcaagttggc	360
acaaaggtga atgtgacagt ggaggacgag cggacttttag tgcggcggaa caacaccttt	420
ctcagcctcc gggatgtgtt cggcaaagat ttaatctaca cactgtatta ctggaagtcc	480
tcttcctccg gcaagaagac agctaaaacc aacacaaacg agtttttaat cgacgtggat	540
aaaggcgaaa actactgttt cagcgtgcaa gctgtgatcc cctcccgagc cgtgaatagg	600
aaaagcaccg atagccccgt tgagtgcatt ggccaagaaa agggcgagtt ccgggag	657

<210> 10

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 10

```

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

```

<210> 11

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 11

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

<210> 12

<211> 223

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 12

Ala	Gly	Ile	Pro	Glu	Lys	Ala	Phe	Asn	Leu	Thr	Trp	Ile	Ser	Thr	Asp
1				5					10				15		
Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Glu	Trp	Gln	Pro	Lys	Pro	Thr	Asn	Tyr	Thr	Tyr

Asp Val Asn Trp Thr Tyr Glu Ala Arg Val Leu Ser Val Pro Trp Arg

65	70	75	80
Asn Ser Thr His Gly Lys Glu Thr Leu Phe Gly Thr His Gly Glu Glu			
	85	90	95
Pro Pro Phe Thr Asn Ala Arg Lys Phe Leu Pro Tyr Arg Asp Thr Lys			
	100	105	110
Ile Gly Gln Pro Val Ile Gln Lys Tyr Glu Gln Gly Gly Thr Lys Leu			
	115	120	125
Lys Val Thr Val Lys Asp Ser Phe Thr Leu Val Arg Lys Asn Gly Thr			
	130	135	140
Phe Leu Thr Leu Arg Gln Val Phe Gly Asn Asp Leu Gly Tyr Ile Leu			
145	150	155	160
Thr Tyr Arg Lys Asp Ser Ser Thr Gly Arg Lys Thr Asn Thr Thr His			
	165	170	175
Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp Val Glu Lys Gly Val Ser Tyr Cys Phe			
	180	185	190
Phe Ala Gln Ala Val Ile Phe Ser Arg Lys Thr Asn His Lys Ser Pro			
	195	200	205
Glu Ser Ile Thr Lys Cys Thr Glu Gln Trp Lys Ser Val Leu Gly Glu			
	210	215	220

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 14

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 15

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 15

Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Thr Cys Cys Gly
 1 5 10 15
 Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Cys Thr Cys Cys Gly Gly
 20 25 30
 Cys Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Ala Thr Cys Thr
 35 40 45
 <210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 16
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 17
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 17
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr

130
 <210> 18
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 18
 Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Pro Leu Lys Thr Ser Trp Val Asn Cys
 1 5 10 15
 Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu Lys Gln Pro Pro Leu
 20 25 30
 Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu Asp Gln Asp Ile Leu
 35 40 45
 Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu Ala Phe Asn Arg Ala
 50 55 60
 Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile Leu Lys Asn
 65 70 75 80
 Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala Pro Thr Arg His Pro
 85 90 95
 Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe Arg Arg Lys Leu Thr
 100 105 110
 Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln Thr Thr Leu
 115 120 125
 Ser Leu Ala Ile Phe

130
 <210> 19
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 19
 Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
 1 5 10 15
 Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
 20 25 30
 Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
 35 40 45
 Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
 50 55 60
 Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
 65 70 75 80

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
 85 90 95
 Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
 100 105 110
 Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
 115 120 125
 Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
 130 135 140
 Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 145 150

<210> 20

<211> 79

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 20

Glu Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys
 1 5 10 15
 Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu
 20 25 30
 Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val
 35 40 45
 Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp
 50 55 60
 Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser
 65 70 75

<210> 21

<211> 160

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 21

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
 1 5 10 15
 Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
 20 25 30
 Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
 35 40 45
 Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
 50 55 60
 Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala

65	70	75	80
Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu			
	85	90	95
Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu			
	100	105	110
Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe			
	115	120	125
Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp			
	130	135	140
Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn			
145	150	155	160
<210> 22			
<211> 114			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 22			
Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile			
1	5	10	15
Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His			
	20	25	30
Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln			
	35	40	45
Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu			
	50	55	60
Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val			
65	70	75	80
Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile			
	85	90	95
Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn			
	100	105	110
Thr Ser			
<210> 23			
<211> 132			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 23			
Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys			
1	5	10	15
Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn			

				20					25					30		
Thr	Asn	Thr	Asn	Pro	Lys	Arg	Ser	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Asn	Arg	Ser	Thr	
		35					40					45				
Ser	Pro	Trp	Asn	Leu	His	Arg	Asn	Glu	Asp	Pro	Glu	Arg	Tyr	Pro	Ser	
	50					55					60					
Val	Ile	Trp	Glu	Ala	Lys	Cys	Arg	His	Leu	Gly	Cys	Ile	Asn	Ala	Asp	
65					70					75					80	
Gly	Asn	Val	Asp	Tyr	His	Met	Asn	Ser	Val	Pro	Ile	Gln	Gln	Glu	Ile	
				85					90					95		
Leu	Val	Leu	Arg	Arg	Glu	Pro	Pro	His	Cys	Pro	Asn	Ser	Phe	Arg	Leu	
			100					105				110				
Glu	Lys	Ile	Leu	Val	Ser	Val	Gly	Cys	Thr	Cys	Val	Thr	Pro	Ile	Val	
		115					120					125				
His	His	Val	Ala													
	130															
<210>	24															
<211>	157															
<212>	PRT															
<213>	智人(Homo sapiens)															
<400>	24															
Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn	
1			5					10					15			
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	
			20					25				30				
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile	
		35					40					45				
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile	
	50					55					60					
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile	
65					70					75					80	
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	
			85						90					95		
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys	
			100					105				110				
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu	
		115					120					125				
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	
	130					135					140					
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp				

145	150	155
<210> 25		
<211> 352		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 25		
Arg Asp Thr Ser Ala Thr Pro Gln Ser Ala Ser Ile Lys Ala Leu Arg		
1 5 10 15		
Asn Ala Asn Leu Arg Arg Asp Glu Ser Asn His Leu Thr Asp Leu Tyr		
20 25 30		
Arg Arg Asp Glu Thr Ile Gln Val Lys Gly Asn Gly Tyr Val Gln Ser		
35 40 45		
Pro Arg Phe Pro Asn Ser Tyr Pro Arg Asn Leu Leu Leu Thr Trp Arg		
50 55 60		
Leu His Ser Gln Glu Asn Thr Arg Ile Gln Leu Val Phe Asp Asn Gln		
65 70 75 80		
Phe Gly Leu Glu Glu Ala Glu Asn Asp Ile Cys Arg Tyr Asp Phe Val		
85 90 95		
Glu Val Glu Asp Ile Ser Glu Thr Ser Thr Ile Ile Arg Gly Arg Trp		
100 105 110		
Cys Gly His Lys Glu Val Pro Pro Arg Ile Lys Ser Arg Thr Asn Gln		
115 120 125		
Ile Lys Ile Thr Phe Lys Ser Asp Asp Tyr Phe Val Ala Lys Pro Gly		
130 135 140		
Phe Lys Ile Tyr Tyr Ser Leu Leu Glu Asp Phe Gln Pro Ala Ala Ala		
145 150 155 160		
Ser Glu Thr Asn Trp Glu Ser Val Thr Ser Ser Ile Ser Gly Val Ser		
165 170 175		
Tyr Asn Ser Pro Ser Val Thr Asp Pro Thr Leu Ile Ala Asp Ala Leu		
180 185 190		
Asp Lys Lys Ile Ala Glu Phe Asp Thr Val Glu Asp Leu Leu Lys Tyr		
195 200 205		
Phe Asn Pro Glu Ser Trp Gln Glu Asp Leu Glu Asn Met Tyr Leu Asp		
210 215 220		
Thr Pro Arg Tyr Arg Gly Arg Ser Tyr His Asp Arg Lys Ser Lys Val		
225 230 235 240		
Asp Leu Asp Arg Leu Asn Asp Asp Ala Lys Arg Tyr Ser Cys Thr Pro		
245 250 255		
Arg Asn Tyr Ser Val Asn Ile Arg Glu Glu Leu Lys Leu Ala Asn Val		

260	265	270
Val Phe Phe Pro Arg Cys Leu Leu	Val Gln Arg Cys Gly Gly Asn Cys	
275	280	285
Gly Cys Gly Thr Val Asn Trp Arg Ser Cys Thr Cys Asn Ser Gly Lys		
290	295	300
Thr Val Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Gln Phe Glu Pro Gly His Ile		
305	310	315
Lys Arg Arg Gly Arg Ala Lys Thr Met Ala Leu Val Asp Ile Gln Leu		
325	330	335
Asp His His Glu Arg Cys Asp Cys Ile Cys Ser Ser Arg Pro Pro Arg		
340	345	350
<210> 26		
<211> 248		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 26		
Glu Gly Ile Cys Arg Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val Thr		
1	5	10
Lys Leu Val Ala Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu Lys Tyr		
20	25	30
Val Pro Gly Met Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu Met		
35	40	45
Val Val Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe Ser		
50	55	60
Asn Ile Ser Glu Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu Val		
65	70	75
Asn Ile Val Asp Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser Ser Lys		
85	90	95
Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe Thr Pro		
100	105	110
Glu Glu Phe Phe Arg Ile Phe Asn Arg Ser Ile Asp Ala Phe Lys Asp		
115	120	125
Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val Ser Ser Thr Leu		
130	135	140
Ser Pro Glu Lys Asp Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe Met Leu		
145	150	155
Pro Pro Val Ala Ala Ser Ser Leu Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Asn		
165	170	175
Arg Lys Ala Lys Asn Pro Pro Gly Asp Ser Ser Leu His Trp Ala Ala		

	180						185						190					
Met	Ala	Leu	Pro	Ala	Leu	Phe	Ser	Leu	Ile	Ile	Gly	Phe	Ala	Phe	Gly			
	195						200						205					
Ala	Leu	Tyr	Trp	Lys	Lys	Arg	Gln	Pro	Ser	Leu	Thr	Arg	Ala	Val	Glu			
	210						215						220					
Asn	Ile	Gln	Ile	Asn	Glu	Glu	Asp	Asn	Glu	Ile	Ser	Met	Leu	Gln	Glu			
225	230						235						240					
Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Gln	Glu	Val											
	245																	
<210>	27																	
<211>	209																	
<212>	PRT																	
<213>	智人(Homo sapiens)																	
<400>	27																	
Thr	Gln	Asp	Cys	Ser	Phe	Gln	His	Ser	Pro	Ile	Ser	Ser	Asp	Phe	Ala			
1	5						10						15					
Val	Lys	Ile	Arg	Glu	Leu	Ser	Asp	Tyr	Leu	Leu	Gln	Asp	Tyr	Pro	Val			
	20						25						30					
Thr	Val	Ala	Ser	Asn	Leu	Gln	Asp	Glu	Glu	Leu	Cys	Gly	Gly	Leu	Trp			
	35						40						45					
Arg	Leu	Val	Leu	Ala	Gln	Arg	Trp	Met	Glu	Arg	Leu	Lys	Thr	Val	Ala			
	50						55						60					
Gly	Ser	Lys	Met	Gln	Gly	Leu	Leu	Glu	Arg	Val	Asn	Thr	Glu	Ile	His			
65	70						75						80					
Phe	Val	Thr	Lys	Cys	Ala	Phe	Gln	Pro	Pro	Pro	Ser	Cys	Leu	Arg	Phe			
	85						90						95					
Val	Gln	Thr	Asn	Ile	Ser	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Thr	Ser	Glu	Gln	Leu			
	100						105						110					
Val	Ala	Leu	Lys	Pro	Trp	Ile	Thr	Arg	Gln	Asn	Phe	Ser	Arg	Cys	Leu			
	115						120						125					
Glu	Leu	Gln	Cys	Gln	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Leu	Pro	Pro	Pro	Trp	Ser			
	130						135						140					
Pro	Arg	Pro	Leu	Glu	Ala	Thr	Ala	Pro	Thr	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Leu			
145	150						155						160					
Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Val	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala			
	165						170						175					
Trp	Cys	Leu	His	Trp	Gln	Arg	Thr	Arg	Arg	Arg	Thr	Pro	Arg	Pro	Gly			
	180						185						190					
Glu	Gln	Val	Pro	Pro	Val	Pro	Ser	Pro	Gln	Asp	Leu	Leu	Leu	Val	Glu			

195	200	205
His		
<210> 28		
<211> 360		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 28		
Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly		
1 5 10 15		
Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Thr Glu Val His Leu Asp Gly Gln Pro		
20 25 30		
Phe Leu Arg Cys Asp Arg Gln Lys Cys Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln		
35 40 45		
Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Asn Lys Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg		
50 55 60		
Asp Leu Thr Gly Asn Gly Lys Asp Leu Arg Met Thr Leu Ala His Ile		
65 70 75 80		
Lys Asp Gln Lys Glu Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys		
85 90 95		
Glu Ile His Glu Asp Asn Ser Thr Arg Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr		
100 105 110		
Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Lys Glu Trp Thr		
115 120 125		
Met Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Arg Asn		
130 135 140		
Phe Leu Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr His Ala Met		
145 150 155 160		
His Ala Asp Cys Leu Gln Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val		
165 170 175		
Val Leu Arg Arg Thr Val Pro Pro Met Val Asn Val Thr Arg Ser Glu		
180 185 190		
Ala Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr		
195 200 205		
Pro Trp Asn Ile Thr Leu Ser Trp Arg Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser		
210 215 220		
His Asp Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr		
225 230 235 240		
Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Cys Gln Gly Glu Glu Gln Arg		
245 250 255		

Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Ser Thr His Pro Val			
260	265	270	
Pro Ser Gly Lys Val Leu Val Leu Gln Ser His Trp Gln Thr Phe His			
275	280	285	
Val Ser Ala Val Ala Ala Ala Ala Ile Phe Val Ile Ile Ile Phe Tyr			
290	295	300	
Val Arg Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser Ala Ala Glu Gly Pro Glu Leu			
305	310	315	320
Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Gln His Pro Val Gly Thr Ser Asp His			
	325	330	335
Arg Asp Ala Thr Gln Leu Gly Phe Gln Pro Leu Met Ser Asp Leu Gly			
	340	345	350
Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Ala			
355	360		
<210> 29			
<211> 361			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 29			
Ala Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Met Val Leu Ser Gln Asp			
1	5	10	15
Glu Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Ala Glu Gly His Leu Asp Gly Gln			
20	25	30	
Pro Phe Leu Arg Tyr Asp Arg Gln Lys Arg Arg Ala Lys Pro Gln Gly			
35	40	45	
Gln Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Ala Lys Thr Trp Asp Thr Glu Thr			
50	55	60	
Glu Asp Leu Thr Glu Asn Gly Gln Asp Leu Arg Arg Thr Leu Thr His			
65	70	75	80
Ile Lys Asp Gln Lys Gly Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val			
	85	90	95
Cys Glu Ile His Glu Asp Ser Ser Thr Arg Gly Ser Arg His Phe Tyr			
100	105	110	
Tyr Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Gln Glu Ser			
115	120	125	
Thr Val Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Thr			
130	135	140	
Asn Phe Trp Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr Arg Ala			
145	150	155	160

Met	Gln	Ala	Asp	Cys	Leu	Gln	Lys	Leu	Gln	Arg	Tyr	Leu	Lys	Ser	Gly	
					165				170						175	
Val	Ala	Ile	Arg	Arg	Thr	Val	Pro	Pro	Met	Val	Asn	Val	Thr	Cys	Ser	
					180				185						190	
Glu	Val	Ser	Glu	Gly	Asn	Ile	Thr	Val	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Phe	
					195				200						205	
Tyr	Pro	Arg	Asn	Ile	Thr	Leu	Thr	Trp	Arg	Gln	Asp	Gly	Val	Ser	Leu	
					210				215						220	
Ser	His	Asn	Thr	Gln	Gln	Trp	Gly	Asp	Val	Leu	Pro	Asp	Gly	Asn	Gly	
225					230					235					240	
Thr	Tyr	Gln	Thr	Trp	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Arg	Gln	Gly	Glu	Glu	Gln	
					245				250						255	
Arg	Phe	Thr	Cys	Tyr	Met	Glu	His	Ser	Gly	Asn	His	Gly	Thr	His	Pro	
					260				265						270	
Val	Pro	Ser	Gly	Lys	Val	Leu	Val	Leu	Gln	Ser	Gln	Arg	Thr	Asp	Phe	
					275				280						285	
Pro	Tyr	Val	Ser	Ala	Ala	Met	Pro	Cys	Phe	Val	Ile	Ile	Ile	Ile	Leu	
					290				295						300	
Cys	Val	Pro	Cys	Cys	Lys	Lys	Lys	Thr	Ser	Ala	Ala	Glu	Gly	Pro	Glu	
305					310					315					320	
Leu	Val	Ser	Leu	Gln	Val	Leu	Asp	Gln	His	Pro	Val	Gly	Thr	Gly	Asp	
					325				330						335	
His	Arg	Asp	Ala	Ala	Gln	Leu	Gly	Phe	Gln	Pro	Leu	Met	Ser	Ala	Thr	
					340				345						350	
Gly	Ser	Thr	Gly	Ser	Thr	Glu	Gly	Ala								
					355				360							
<210> 30																
<211> 190																
<212> PRT																
<213> 智人(Homo sapiens)																
<400> 30																
Trp	Val	Asp	Thr	His	Cys	Leu	Cys	Tyr	Asp	Phe	Ile	Ile	Thr	Pro	Lys	
1					5				10					15		
Ser	Arg	Pro	Glu	Pro	Gln	Trp	Cys	Glu	Val	Gln	Gly	Leu	Val	Asp	Glu	
					20				25					30		
Arg	Pro	Phe	Leu	His	Tyr	Asp	Cys	Val	Asn	His	Lys	Ala	Lys	Ala	Phe	
					35				40					45		
Ala	Ser	Leu	Gly	Lys	Lys	Val	Asn	Val	Thr	Lys	Thr	Trp	Glu	Glu	Gln	
					50				55					60		

Thr	Glu	Thr	Leu	Arg	Asp	Val	Val	Asp	Phe	Leu	Lys	Gly	Gln	Leu	Leu
65					70					75					80
Asp	Ile	Gln	Val	Glu	Asn	Leu	Ile	Pro	Ile	Glu	Pro	Leu	Thr	Leu	Gln
			85						90						95
Ala	Arg	Met	Ser	Cys	Glu	His	Glu	Ala	His	Gly	His	Gly	Arg	Gly	Ser
			100					105					110		
Trp	Gln	Phe	Leu	Phe	Asn	Gly	Gln	Lys	Phe	Leu	Leu	Phe	Asp	Ser	Asn
			115				120						125		
Asn	Arg	Lys	Trp	Thr	Ala	Leu	His	Pro	Gly	Ala	Lys	Lys	Met	Thr	Glu
			130				135						140		
Lys	Trp	Glu	Lys	Asn	Arg	Asp	Val	Thr	Met	Phe	Phe	Gln	Lys	Ile	Ser
145					150					155					160
Leu	Gly	Asp	Cys	Lys	Met	Trp	Leu	Glu	Glu	Phe	Leu	Met	Tyr	Trp	Glu
				165					170						175
Gln	Met	Leu	Asp	Pro	Thr	Lys	Pro	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Gly		
			180						185				190		

<210> 31

<211> 191

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 31

Gly	Arg	Ala	Asp	Pro	His	Ser	Leu	Cys	Tyr	Asp	Ile	Thr	Val	Ile	Pro
1				5					10					15	
Lys	Phe	Arg	Pro	Gly	Pro	Arg	Trp	Cys	Ala	Val	Gln	Gly	Gln	Val	Asp
			20					25					30		
Glu	Lys	Thr	Phe	Leu	His	Tyr	Asp	Cys	Gly	Asn	Lys	Thr	Val	Thr	Pro
			35				40						45		
Val	Ser	Pro	Leu	Gly	Lys	Lys	Leu	Asn	Val	Thr	Thr	Ala	Trp	Lys	Ala
			50				55					60			
Gln	Asn	Pro	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Val	Asp	Ile	Leu	Thr	Glu	Gln	Leu
65					70					75					80
Arg	Asp	Ile	Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Leu	Thr	Leu
				85					90						95
Gln	Ala	Arg	Met	Ser	Cys	Glu	Gln	Lys	Ala	Glu	Gly	His	Ser	Ser	Gly
			100					105					110		
Ser	Trp	Gln	Phe	Ser	Phe	Asp	Gly	Gln	Ile	Phe	Leu	Leu	Phe	Asp	Ser
			115					120					125		
Glu	Lys	Arg	Met	Trp	Thr	Thr	Val	His	Pro	Gly	Ala	Arg	Lys	Met	Lys
			130					135					140		

Glu Lys Trp Glu Asn Asp Lys Val Val Ala Met Ser Phe His Tyr Phe
 145 150 155 160
 Ser Met Gly Asp Cys Ile Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met
 165 170 175
 Asp Ser Thr Leu Glu Pro Ser Ala Gly Ala Pro Leu Ala Met Ser
 180 185 190

<210> 32

<211> 188

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 32

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

<210> 33

<211> 233

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 33

His Ser Leu Cys Phe Asn Phe Thr Ile Lys Ser Leu Ser Arg Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Trp Cys Glu Ala Gln Val Phe Leu Asn Lys Asn Leu Phe Leu
 20 25 30
 Gln Tyr Asn Ser Asp Asn Asn Met Val Lys Pro Leu Gly Leu Leu Gly
 35 40 45
 Lys Lys Val Tyr Ala Thr Ser Thr Trp Gly Glu Leu Thr Gln Thr Leu
 50 55 60
 Gly Glu Val Gly Arg Asp Leu Arg Met Leu Leu Cys Asp Ile Lys Pro
 65 70 75 80
 Gln Ile Lys Thr Ser Asp Pro Ser Thr Leu Gln Val Glu Met Phe Cys
 85 90 95
 Gln Arg Glu Ala Glu Arg Cys Thr Gly Ala Ser Trp Gln Phe Ala Thr
 100 105 110
 Asn Gly Glu Lys Ser Leu Leu Phe Asp Ala Met Asn Met Thr Trp Thr
 115 120 125
 Val Ile Asn His Glu Ala Ser Lys Ile Lys Glu Thr Trp Lys Lys Asp
 130 135 140
 Arg Gly Leu Glu Lys Tyr Phe Arg Lys Leu Ser Lys Gly Asp Cys Asp
 145 150 155 160
 His Trp Leu Arg Glu Phe Leu Gly His Trp Glu Ala Met Pro Glu Pro
 165 170 175
 Thr Val Ser Pro Val Asn Ala Ser Asp Ile His Trp Ser Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Pro Asp Arg Trp Ile Ile Leu Gly Ala Phe Ile Leu Leu Val Leu
 195 200 205
 Met Gly Ile Val Leu Ile Cys Val Trp Trp Gln Asn Gly Glu Trp Gln
 210 215 220
 Ala Gly Leu Trp Pro Leu Arg Thr Ser
 225 230

<210> 34

<211> 193

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 34

Gly Leu Ala Asp Pro His Ser Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro
 1 5 10 15
 Lys Phe Arg Pro Gly Pro Arg Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp

	20		25		30														
Glu	Lys	Thr	Phe	Leu	His	Tyr	Asp	Cys	Gly	Ser	Lys	Thr	Val	Thr	Pro				
	35						40					45							
Val	Ser	Pro	Leu	Gly	Lys	Lys	Leu	Asn	Val	Thr	Thr	Ala	Trp	Lys	Ala				
	50						55					60							
Gln	Asn	Pro	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Val	Asp	Ile	Leu	Thr	Glu	Gln	Leu				
65						70				75					80				
Leu	Asp	Ile	Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Ile	Pro	Lys	Glu	Pro	Leu	Thr	Leu				
						85				90				95					
Gln	Ala	Arg	Met	Ser	Cys	Glu	Gln	Lys	Ala	Glu	Gly	His	Gly	Ser	Gly				
	100							105				110							
Ser	Trp	Gln	Leu	Ser	Phe	Asp	Gly	Gln	Ile	Phe	Leu	Leu	Phe	Asp	Ser				
	115						120					125							
Glu	Asn	Arg	Met	Trp	Thr	Thr	Val	His	Pro	Gly	Ala	Arg	Lys	Met	Lys				
	130						135					140							
Glu	Lys	Trp	Glu	Asn	Asp	Lys	Asp	Met	Thr	Met	Ser	Phe	His	Tyr	Ile				
145						150				155					160				
Ser	Met	Gly	Asp	Cys	Thr	Gly	Trp	Leu	Glu	Asp	Phe	Leu	Met	Gly	Met				
						165				170				175					
Asp	Ser	Thr	Leu	Glu	Pro	Ser	Ala	Gly	Ala	Pro	Pro	Thr	Met	Ser	Ser				
						180				185				190					
Gly																			
<210>	35																		
<211>	193																		
<212>	PRT																		
<213>	智人(Homo sapiens)																		
<400>	35																		
Arg	Arg	Asp	Asp	Pro	His	Ser	Leu	Cys	Tyr	Asp	Ile	Thr	Val	Ile	Pro				
1				5					10					15					
Lys	Phe	Arg	Pro	Gly	Pro	Arg	Trp	Cys	Ala	Val	Gln	Gly	Gln	Val	Asp				
				20					25				30						
Glu	Lys	Thr	Phe	Leu	His	Tyr	Asp	Cys	Gly	Asn	Lys	Thr	Val	Thr	Pro				
	35						40					45							
Val	Ser	Pro	Leu	Gly	Lys	Lys	Leu	Asn	Val	Thr	Met	Ala	Trp	Lys	Ala				
	50						55					60							
Gln	Asn	Pro	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Val	Asp	Ile	Leu	Thr	Glu	Gln	Leu				
65						70				75					80				
Leu	Asp	Ile	Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Leu	Thr	Leu				
						85				90				95					

Gln	Ala	Arg	Met	Ser	Cys	Glu	Gln	Lys	Ala	Glu	Gly	His	Ser	Ser	Gly
100				105				110							
Ser	Trp	Gln	Phe	Ser	Ile	Asp	Gly	Gln	Thr	Phe	Leu	Leu	Phe	Asp	Ser
115				120				125							
Glu	Lys	Arg	Met	Trp	Thr	Thr	Val	His	Pro	Gly	Ala	Arg	Lys	Met	Lys
130				135				140							
Glu	Lys	Trp	Glu	Asn	Asp	Lys	Asp	Val	Ala	Met	Ser	Phe	His	Tyr	Ile
145				150				155				160			
Ser	Met	Gly	Asp	Cys	Ile	Gly	Trp	Leu	Glu	Asp	Phe	Leu	Met	Gly	Met
				165				170				175			
Asp	Ser	Thr	Leu	Glu	Pro	Ser	Ala	Gly	Ala	Pro	Leu	Ala	Met	Ser	Ser
180				185				190							

Gly

<210> 36

<211> 65

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 36

Ile	Thr	Cys	Pro	Pro	Pro	Met	Ser	Val	Glu	His	Ala	Asp	Ile	Trp	Val
1			5					10					15		
Lys	Ser	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Ser	Arg	Glu	Arg	Tyr	Ile	Cys	Asn	Ser	Gly
20				25				30							
Phe	Lys	Arg	Lys	Ala	Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Cys	Val	Leu	Asn
35				40				45							
Lys	Ala	Thr	Asn	Val	Ala	His	Trp	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys	Cys	Ile
50				55				60							

Arg

65

<210> 37

<211> 195

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

<210> 41
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 41
atgaagtggg tcacatttat ctctttactg ttctcttctt ccagcgccta cagc 54
<210> 42
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 42
atgaaatggg tgacctttat ttctttactg ttctcttcta gcagcgccta ctcc 54
<210> 43
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 43
Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Leu Gly Val Asn Cys
1 5 10 15
<210> 44
<211> 58
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 44

Met Gly Gln Ile Val Thr Met Phe Glu Ala Leu Pro His Ile Ile Asp
1 5 10 15
Glu Val Ile Asn Ile Val Ile Ile Val Leu Ile Ile Ile Thr Ser Ile
 20 25 30
Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Cys Gly Ile Leu Ala Leu Val Ser
 35 40 45
Phe Leu Phe Leu Ala Gly Arg Ser Cys Gly
 50 55

<210> 45

<211> 97

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 45

Met Pro Asn His Gln Ser Gly Ser Pro Thr Gly Ser Ser Asp Leu Leu
1 5 10 15
Leu Ser Gly Lys Lys Gln Arg Pro His Leu Ala Leu Arg Arg Lys Arg
 20 25 30
Arg Arg Glu Met Arg Lys Ile Asn Arg Lys Val Arg Arg Met Asn Leu
 35 40 45
Ala Pro Ile Lys Glu Lys Thr Ala Trp Gln His Leu Gln Ala Leu Ile
 50 55 60
Ser Glu Ala Glu Glu Val Leu Lys Thr Ser Gln Thr Pro Gln Asn Ser
65 70 75 80
Leu Thr Leu Phe Leu Ala Leu Leu Ser Val Leu Gly Pro Pro Val Thr
 85 90 95
Gly

<210> 46

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 46

Met Asp Ser Lys Gly Ser Ser Gln Lys Gly Ser Arg Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Leu Val Val Ser Asn Leu Leu Leu Cys Gln Gly Val Val Ser
 20 25 30

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 47

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
1 5 10 15

<210> 48

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 48

Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg
1 5 10 15
Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala Leu
 20 25

<210> 49

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 49

Glu Glu Glu Glu Glu Glu

1 5
<210> 50
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 50
Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg
1 5 10
<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 51
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5
<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 52
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5
<210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 53
His His His His His
1 5
<210> 54
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 54
His His His His His His
1 5
<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 55
His His His His His His His
1 5
<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 56
His His His His His His His
1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 57

His His His His His His His His

1 5

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 58

His His His His His His His His His

1 5 10

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 59

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 60
Thr Lys Glu Asn Pro Arg Ser Asn Gln Glu Glu Ser Tyr Asp Asp Asn
1 5 10 15
Glu Ser
<210> 61
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 61
Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser
1 5 10 15
<210> 62
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 62
Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
1 5 10 15
Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro
20 25 30
Gln Gly Gln Arg Glu Pro
35
<210> 63
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide”
<400> 63
Ser Leu Ala Glu Leu Leu Asn Ala Gly Leu Gly Gly Ser
1 5 10
<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note=“Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide”
<400> 64
Thr Gln Asp Pro Ser Arg Val Gly
1 5
<210> 65
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note=“Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide”
<400> 65
Pro Asp Arg Val Arg Ala Val Ser His Trp Ser Ser
1 5 10
<210> 66
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note=“Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide”
<400> 66
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5
<210> 67
<211> 6

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 67
Cys Cys Pro Gly Cys Cys
1 5
<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 68
Glu Val His Thr Asn Gln Asp Pro Leu Asp
1 5 10
<210> 69
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 69
Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
1 5 10
<210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 70

Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys

1 5 10

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 71

Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 72

<211> 157

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 72

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn

1 5 10 15

Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp

20 25 30

Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile

35 40 45

Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile

50 55 60

Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile

65 70 75 80

Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys

85 90 95

Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys

100 105 110

Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu

115 120 125

Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu

130 135 140

Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp

145 150 155

<210> 73
 <211> 471
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 73
 tacttcggca aactggaatc caagctgagc gtgatccgga atttaaacga ccaagttctg 60
 tttatcgatc aaggtaaccg gcctctgttc gaggacatga ccgactccga ttgccgggac 120
 aatgcccccc ggaccatctt cattatctcc atgtacaagg acagccagcc ccggggcatg 180
 gctgtgacaa ttagcgtgaa gtgtgagaaa atcagcactt tatcttgtga gaacaagatc 240
 atctccttta aggaaatgaa ccccccgat aacatcaagg acaccaagtc cgatatcatc 300
 ttcttccagc ggtccgtgcc cggtcacgat aacaagatgc agttcgaatc ctctctctac 360
 gagggctact ttttagcttg tgaaaaggag agggatttat tcaagctgat cctcaagaag 420
 gaggacgagc tgggcgatcg ttccatcatg ttcaccgtcc aaaacgagga t 471
 <210> 74
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 74
 Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr
 1 5 10 15
 Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu
 20 25 30
 Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly
 35 40 45
 Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly
 50 55 60
 Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu
 65 70 75 80
 Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys
 85 90 95
 Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys
 100 105 110
 Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr
 115 120 125
 Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln
 130 135 140
 Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly
 145 150 155 160
 Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala

	165		170		175	
Cys	Pro	Ala	Ala	Glu	Glu	Ser
			Leu	Pro	Ile	Glu
					Val	Met
					Val	Asp
					Ala	
	180		185		190	
Val	His	Lys	Leu	Lys	Tyr	Glu
			Asn	Tyr	Thr	Ser
				Ser	Phe	Phe
					Ile	Arg
	195		200		205	
Asp	Ile	Ile	Lys	Pro	Asp	Pro
			Pro	Pro	Lys	Asn
				Leu	Gln	Leu
				Lys	Pro	Leu
	210		215		220	
Lys	Asn	Ser	Arg	Gln	Val	Glu
			Val	Ser	Trp	Glu
				Tyr	Pro	Asp
				Thr	Trp	
	225		230		235	
Ser	Thr	Pro	His	Ser	Tyr	Phe
			Ser	Leu	Thr	Phe
				Cys	Val	Gln
				Val	Gln	
	245		250		255	
Gly	Lys	Ser	Lys	Arg	Glu	Lys
			Lys	Asp	Arg	Val
				Phe	Thr	Asp
				Lys	Thr	
	260		265		270	
Ser	Ala	Thr	Val	Ile	Cys	Arg
			Lys	Asn	Ala	Ser
				Ile	Ser	Val
				Arg	Ala	
	275		280		285	
Gln	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser
			Ser	Ser	Trp	Ser
				Glu	Trp	Ala
				Ser	Val	Pro
	290		295		300	
Cys	Ser					
305						
<210>	75					
<211>	918					
<212>	DNA					
<213>	智人(Homo sapiens)					
<400>	75					
atttggaac	tgaagaagga	cgtctacgtg	gtcgaactgg	actggtatcc	cgatgctccc	60
ggcgaaatgg	tgggtgctcac	ttgtgacacc	cccgaagaag	acggcatcac	ttggaccctc	120
gatcagagca	gcgaggtgct	gggctccgga	aagaccctca	caatccaagt	taaggagttc	180
ggagacgctg	gccaatacac	atgccacaag	ggaggcgagg	tgctcagcca	ttccttatta	240
ttattacaca	agaaggaaga	cggaatctgg	tccaccgaca	ttttaaaaga	tcagaaggag	300
cccaagaata	agaccttttt	aaggtgtgag	gccaaaaact	acagcggtcg	tttcacttgt	360
tggtggctga	ccaccatttc	caccgattta	accttctccg	tgaaaagcag	ccggggaagc	420
tccgaccctc	aaggtgtgac	atgtggagcc	gctaccctca	gcgctgagag	ggttcgtggc	480
gataacaagg	aatacgagta	cagcgtggag	tgccaagaag	atagcgcttg	tcccgtgcc	540
gaagaatctt	taccattga	ggtgatggtg	gacgccgtgc	acaaactcaa	gtacgagaac	600
tacacctcct	ccttctttat	ccgggacatc	attaagcccg	atcctcctaa	gaatttacag	660
ctgaagcctc	tcaaaaatag	ccggcaagtt	gaggtctctt	gggaatatcc	cgacacttgg	720
agcacacccc	acagctactt	ctctttaacc	ttttgtgtgc	aagttcaagg	taaaagcaag	780
cgggagaaga	aagaccgggt	gtttaccgac	aaaaccagcg	ccaccgtcat	ctgtcggag	840
aacgcctcca	tcagcgtgag	ggctcaagat	cgttattact	ccagcagctg	gtccgagtgg	900

gccagcgtgc cttgttcc	918
<210> 76	
<211> 197	
<212> PRT	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 76	
Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu	
1 5 10 15	
His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys	
20 25 30	
Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp	
35 40 45	
His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu	
50 55 60	
Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr	
65 70 75 80	
Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe	
85 90 95	
Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr	
100 105 110	
Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys	
115 120 125	
Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu	
130 135 140	
Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser	
145 150 155 160	
Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu	
165 170 175	
Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser	
180 185 190	
Tyr Leu Asn Ala Ser	
195	
<210> 77	
<211> 591	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 77	
cgtaacctcc ccgtggctac ccccgatccc ggaatgttcc cttgtttaca ccacagccag	60
aatttactga gggccgtgag caacatgctg cagaaagcta ggcagacttt agaattttac	120

```

ccttgcacca gcgaggagat cgaccatgaa gatataacca aggacaagac atccaccgtg      180
gaggcttggtt tacctctgga gctgacaaaag aacgagtcctt gtctcaactc tcgtgaaacc      240
agcttcatca caaatggctc ttgttttagct tcccggaaga cctcctttat gatggcttta      300
tgcctcagct ccatctacga ggatttaaag atgtaccaag tggagttcaa gaccatgaac      360
gccaaagctgc tcatggaccc taaacggcag atcttttttag accagaacat gctggctgtg      420
attgatgagc tgatgcaagc tttaaacttc aactccgaga ccgtccctca gaagtcctcc      480
ctcgaggagc ccgattttta caagacaaaag atcaaactgt gcattttact ccacgccttt      540
aggatccggg ccgtgaccat tgaccgggtc atgagctatt taaacgccag c                    591

```

<210> 78

<211> 490

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 78

```

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

```

Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln Val Tyr Thr		
180	185	190
Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys Cys Phe Tyr		
195	200	205
Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val Lys Asp Val		
210	215	220
Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala Gly Asn Val		
225	230	235
Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn Ser Pro Glu		
245	250	255
Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr Ile Gln Ser		
260	265	270
Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu Asp Glu Arg		
275	280	285
Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg Asp Val Phe		
290	295	300
Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser Ser Ser Ser		
305	310	315
Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp Val		
325	330	335
Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val Ile Pro Ser		
340	345	350
Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu Cys Met Gly		
355	360	365
Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp		
370	375	380
Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr		
385	390	395
Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met		
405	410	415
Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp		
420	425	430
Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn		
435	440	445
Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys		
450	455	460
Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val		
465	470	475
His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser		

485	490
<210> 79	
<211> 1470	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"	
<400> 79	
tacttcggca aactggaatc caagctgagc gtgatccgga atttaaacga ccaagttctg	60
tttatcgatc aaggtaacccg gcctctgttc gaggacatga ccgactccga ttgccgggac	120
aatgcccccc ggaccatctt cattatctcc atgtacaagg acagccagcc ccggggcatg	180
gctgtgacaa ttagcgtgaa gtgtgagaaa atcagcactt tatcttgtga gaacaagatc	240
atctccttta aggaaatgaa cccccccgat aacatcaagg acaccaagtc cgatatcatc	300
ttcttccagc ggtccgtgcc cggtcacgat aacaagatgc agttcgaatc ctctcctac	360
gagggctact ttttagcttg tgaaaaggag agggatttat tcaagctgat cctcaagaag	420
gaggacgagc tgggcgatcg ttccatcatg ttcaccgtcc aaaacgagga tagcggcaca	480
accaacacag tcgctgccta taacctcact tggaagagca ccaacttcaa aaccatcctc	540
gaatgggaac ccaaaccgt taaccaagtt tacaccgtgc agatcagcac caagtccggc	600
gactggaagt ccaaagtgtt ctataccacc gacaccgagt gcgatctcac cgatgagatc	660
gtgaaagatg tgaaacagac ctacctgcc cgggtgttta gctacccgc cggaatgtg	720
gagagcactg gttccgctgg cgagccttta tacgagaaca gccccgaatt tacccttac	780
ctcgagacca atttaggaca gccaccatc caaagcttg agcaagttgg cacaaggtg	840
aatgtgacag tggaggacga gcggacttta gtgcggcgga acaacacctt tctcagcctc	900
cgggatgtgt tcggcaaaga tttaatctac acactgtatt actggaagtc ctcttcctcc	960
ggcaagaaga cagctaaaac caacacaaac gagtttttaa tcgacgtgga taaaggcgaa	1020
aactactgtt tcagcgtgca agctgtgatc ccctcccga ccgtgaatag gaaaagcacc	1080
gatagccccg ttgagtgcac gggccaagaa aaggcgagc tccgggagaa ctgggtgaac	1140
gtcatcagcg atttaaagaa gatcgaagat ttaattcagt ccatgcatat cgacgccact	1200
ttatacacag aatccgacgt gcacccctct tgtaaggtga ccgcatgaa atgtttttta	1260
ctggagctgc aagtatctc tttagagagc ggagacgcta gcatccacga caccgtggag	1320
aatttaataca ttttagccaa taactcttta tccagcaacg gcaacgtgac agagtccggc	1380
tgcaaggagt gcgaagagct ggaggagaag aacatcaagg agtttctgca atcctttgtg	1440
cacattgtcc agatgttcat caatacctcc	1470
<210> 80	
<211> 508	
<212> PRT	
<213> 人工序列	

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 80

Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala
1				5					10					15	
Tyr	Ser	Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn
			20					25					30		
Leu	Asn	Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe
		35					40					45			
Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile
	50					55					60				
Phe	Ile	Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val
65					70				75					80	
Thr	Ile	Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn
				85				90					95		
Lys	Ile	Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp
			100					105					110		
Thr	Lys	Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp
			115					120					125		
Asn	Lys	Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala
		130					135					140			
Cys	Glu	Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp
145					150					155				160	
Glu	Leu	Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp	Ser
				165					170					175	
Gly	Thr	Thr	Asn	Thr	Val	Ala	Ala	Tyr	Asn	Leu	Thr	Trp	Lys	Ser	Thr
			180					185					190		
Asn	Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Glu	Trp	Glu	Pro	Lys	Pro	Val	Asn	Gln	Val
		195					200						205		
Tyr	Thr	Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Lys	Ser	Gly	Asp	Trp	Lys	Ser	Lys	Cys
		210					215				220				
Phe	Tyr	Thr	Thr	Asp	Thr	Glu	Cys	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	Lys
225					230					235				240	
Asp	Val	Lys	Gln	Thr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ala	Gly
				245					250					255	
Asn	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Leu	Tyr	Glu	Asn	Ser
			260					265						270	

Pro	Glu	Phe	Thr	Pro	Tyr	Leu	Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Gln	Pro	Thr	Ile
275				280				285							
Gln	Ser	Phe	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Lys	Val	Asn	Val	Thr	Val	Glu	Asp
290				295				300							
Glu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Leu	Arg	Asp
305				310				315				320			
Val	Phe	Gly	Lys	Asp	Leu	Ile	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Lys	Ser	Ser
				325				330				335			
Ser	Ser	Gly	Lys	Lys	Thr	Ala	Lys	Thr	Asn	Thr	Asn	Glu	Phe	Leu	Ile
				340				345				350			
Asp	Val	Asp	Lys	Gly	Glu	Asn	Tyr	Cys	Phe	Ser	Val	Gln	Ala	Val	Ile
				355				360				365			
Pro	Ser	Arg	Thr	Val	Asn	Arg	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Pro	Val	Glu	Cys
370				375				380							
Met	Gly	Gln	Glu	Lys	Gly	Glu	Phe	Arg	Glu	Asn	Trp	Val	Asn	Val	Ile
385				390				395				400			
Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Ile	Glu	Asp	Leu	Ile	Gln	Ser	Met	His	Ile	Asp
				405				410				415			
Ala	Thr	Leu	Tyr	Thr	Glu	Ser	Asp	Val	His	Pro	Ser	Cys	Lys	Val	Thr
				420				425				430			
Ala	Met	Lys	Cys	Phe	Leu	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Ile	Ser	Leu	Glu	Ser
435				440				445							
Gly	Asp	Ala	Ser	Ile	His	Asp	Thr	Val	Glu	Asn	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala
450				455				460							
Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Val	Thr	Glu	Ser	Gly	Cys	Lys
465				470				475				480			
Glu	Cys	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Ile	Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Ser
				485				490				495			
Phe	Val	His	Ile	Val	Gln	Met	Phe	Ile	Asn	Thr	Ser				
500				505											

<210> 81

<211> 1524

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 81

```

atgaagtggg tcacatttat ctctttactg ttctctttct ccagcgccta cagctacttc      60
ggcaaactgg aatccaagct gagcgtgatc cggaatttaa acgaccaagt tctgtttatc      120
gatcaaggta accggcctct gttcgaggac atgaccgact ccgattgccg ggacaatgcc      180
ccccggacca tcttcattat ctccatgtac aaggacagcc agccccgggg catggctgtg      240
acaattagcg tgaagtgtga gaaaatcagc actttatctt gtgagaacaa gatcatctcc      300
tttaaggaaa tgaaccccc cgateaacatc aaggacacca agtccgatat catcttcttc      360
cagcgggtccg tgccccgtca cgataacaag atgcagttcg aatcctcctc ctacgagggc      420
tacttttttag cttgtgaaaa ggagagggat ttattcaagc tgatcctcaa gaaggaggac      480
gagctggggcg atcgttccat catgttcacc gtccaaaacg aggatagcgg cacaaccaac      540
acagtcgctg cctataacct cacttggaag agcaccaact tcaaaacct cctcgaatgg      600
gaacccaaac ccgttaacca agtttacacc gtgcagatca gcaccaagtc cggcgactgg      660
aagtccaaat gtttctatac caccgacacc gagtgcgac tcaccgatga gatcgtgaaa      720
gatgtgaaac agacctacct cgccccgggtg ttagctacc ccgccggcaa tgtggagagc      780
actggttccg ctggcgagcc ttatcacgag aacagccccg aatttaccct ttacctcgag      840
accaatttag gacagcccac catccaaagc tttagcaag ttggcacaaa ggtgaatgtg      900
acagtggagg acgagcggac tttagtgcgg cggaacaaca cttttctcag cctccgggat      960
gtgttcggca aagatttaat ctacacactg tattactgga agtcctcttc ctccggcaag     1020
aagacagcta aaaccaacac aaacgagttt ttaatcgacg tggataaagg cgaaaactac     1080
tgtttcagcg tgcaagctgt gatcccctcc cggaccgtga ataggaaaag caccgatagc     1140
cccgttgagt gcatgggcca agaaaagggc gagttccggg agaactgggt gaacgtcatc     1200
agcgatttaa agaagatcga agatttaatt cagtccatgc atatcgacgc cactttatac     1260
acagaatccg acgtgcaccc ctcttgtaag gtgaccgcca tgaaatgttt ttactggag      1320
ctgcaagtta tctctttaga gagcggagac gctagcatcc acgacaccgt ggagaattta      1380
atcatttttag ccaataactc ttatccagc aacggcaacg tgacagagtc cggctgcaag      1440
gagtgcgaag agctggagga gaagaacatc aaggagtttc tgcaatcctt tgtgcacatt      1500
gtccagatgt tcatcaatac ctcc                                     1524

```

<210> 82

<211> 583

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 82

Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr

1

5

10

15

Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu

20

25

30

Glu	Asp	Gly	Ile	Thr	Trp	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser	Ser	Glu	Val	Leu	Gly
35				40				45							
Ser	Gly	Lys	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Val	Lys	Glu	Phe	Gly	Asp	Ala	Gly
50				55				60							
Gln	Tyr	Thr	Cys	His	Lys	Gly	Gly	Glu	Val	Leu	Ser	His	Ser	Leu	Leu
65				70				75				80			
Leu	Leu	His	Lys	Lys	Glu	Asp	Gly	Ile	Trp	Ser	Thr	Asp	Ile	Leu	Lys
85				90				95							
Asp	Gln	Lys	Glu	Pro	Lys	Asn	Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Cys	Glu	Ala	Lys
100				105				110							
Asn	Tyr	Ser	Gly	Arg	Phe	Thr	Cys	Trp	Trp	Leu	Thr	Thr	Ile	Ser	Thr
115				120				125							
Asp	Leu	Thr	Phe	Ser	Val	Lys	Ser	Ser	Arg	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Gln
130				135				140							
Gly	Val	Thr	Cys	Gly	Ala	Ala	Thr	Leu	Ser	Ala	Glu	Arg	Val	Arg	Gly
145				150				155				160			
Asp	Asn	Lys	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Val	Glu	Cys	Gln	Glu	Asp	Ser	Ala
165				170				175							
Cys	Pro	Ala	Ala	Glu	Glu	Ser	Leu	Pro	Ile	Glu	Val	Met	Val	Asp	Ala
180				185				190							
Val	His	Lys	Leu	Lys	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Thr	Ser	Ser	Phe	Phe	Ile	Arg
195				200				205							
Asp	Ile	Ile	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro	Lys	Asn	Leu	Gln	Leu	Lys	Pro	Leu
210				215				220							
Lys	Asn	Ser	Arg	Gln	Val	Glu	Val	Ser	Trp	Glu	Tyr	Pro	Asp	Thr	Trp
225				230				235				240			
Ser	Thr	Pro	His	Ser	Tyr	Phe	Ser	Leu	Thr	Phe	Cys	Val	Gln	Val	Gln
245				250				255							
Gly	Lys	Ser	Lys	Arg	Glu	Lys	Lys	Asp	Arg	Val	Phe	Thr	Asp	Lys	Thr
260				265				270							
Ser	Ala	Thr	Val	Ile	Cys	Arg	Lys	Asn	Ala	Ser	Ile	Ser	Val	Arg	Ala
275				280				285							
Gln	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Ser	Trp	Ser	Glu	Trp	Ala	Ser	Val	Pro
290				295				300							
Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
305				310				315				320			
Ser	Arg	Asn	Leu	Pro	Val	Ala	Thr	Pro	Asp	Pro	Gly	Met	Phe	Pro	Cys
325				330				335							
Leu	His	His	Ser	Gln	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Val	Ser	Asn	Met	Leu	Gln

340	345	350
Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile		
355	360	365
Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys		
370	375	380
Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu		
385	390	395
Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser		
405	410	415
Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met		
420	425	430
Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro		
435	440	445
Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu		
450	455	460
Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser		
465	470	475
Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile		
485	490	495
Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met		
500	505	510
Ser Tyr Leu Asn Ala Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu		
515	520	525
His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg		
530	535	540
Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu		
545	550	555
Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr		
565	570	575
Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg		
580		

<210> 83

<211> 1749

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 83

```

atttgggaac tgaagaagga cgtctacgtg gtcgaactgg actggtatcc cgatgctccc      60
ggcgaaatgg tgggtgctcac ttgtgacacc cccgaagaag acggcatcac ttggaccctc      120
gatcagagca gcgaggtgct gggctccgga aagaccctca caatccaagt taaggagttc      180
ggagacgctg gccaatacac atgccacaag ggaggcgagg tgctcagcca ttccttatta      240
ttattacaca agaaggaaga cggaatctgg tccaccgaca ttttaaaaga tcagaaggag      300
cccaagaata agaccttttt aaggtgtgag gccaaaaact acagcggtcg tttcacttgt      360
tgggtggctga ccaccatttc caccgattta accttctccg tgaaaagcag ccggggaagc      420
tccgaccctc aaggtgtgac atgtggagcc gctaccctca gcgctgagag ggttcgtggc      480
gataacaagg aatacgagta cagcgtggag tgccaagaag atagcgcttg tcccgtgccc      540
gaagaatctt taccattga ggtgatggtg gacgccgtgc aaaaactcaa gtacgagaac      600
tacacctcct cttcttttat ccgggacatc attaagcccg atcctcctaa gaatttacag      660
ctgaagcctc tcaaaaatag ccggcaagtt gaggtctctt gggaatatcc cgacacttgg      720
agcacacccc acagctactt ctctttaacc ttttgtgtgc aagttcaagg taaaagcaag      780
cgggagaaga aagaccgggt gtttaccgac aaaaccagcg ccaccgtcat ctgtcggaa      840
aacgcctcca tcagcgtgag ggctcaagat cgttattact ccagcagctg gtccgagtgg      900
gccagcgtgc cttgttccgg cgggtggagga tccggaggag gtggctccgg cggcggagga      960
tctcgtaacc tccccgtggc tcccccgat cccggaatgt tcccttgttt acaccacagc     1020
cagaatttac tgagggccgt gagcaacatg ctgcagaaag ctaggcagac tttagaattt     1080
tacccttgca ccagcgagga gatcgaccat gaagatatca ccaaggacaa gacatccacc     1140
gtggaggctt gtttacctct ggagctgaca aagaacgagt cttgtctcaa ctctcgtgaa     1200
accagcttca tcacaaatgg ctcttgttta gcttcccga agacctcctt tatgatggct     1260
ttatgcctca gctccatcta cgaggattta aagatgtacc aagtggagtt caagaccatg     1320
aacgccaagc tgctcatgga ccctaaacgg cagatctttt tagaccagaa catgctggct     1380
gtgattgatg agctgatgca agctttaaac ttcaactccg agaccgtccc tcagaagtcc     1440
tccctcgagg agcccgattt ttacaagaca aagatcaaac tgtgcatttt actccacgcc     1500
tttaggatcc gggccgtgac cattgaccgg gtcatgagct atttaaagc cagcattaca     1560
tgccccccctc ccatgagcgt ggagcacgcc gacatctggg tgaagagcta tagcctctac     1620
agccgggaga ggtatatctg taacagcggc ttcaagagga aggccggcac cagcagcctc     1680
accgagtgcg tgctgaataa ggctaccaac gtggctcact ggacaacacc ctctttaaag     1740
tgcacccgg                                     1749

```

<210> 84

<211> 601

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 84

Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala
1				5				10					15		
Tyr	Ser	Ile	Trp	Glu	Leu	Lys	Lys	Asp	Val	Tyr	Val	Val	Glu	Leu	Asp
			20					25					30		
Trp	Tyr	Pro	Asp	Ala	Pro	Gly	Glu	Met	Val	Val	Leu	Thr	Cys	Asp	Thr
		35					40					45			
Pro	Glu	Glu	Asp	Gly	Ile	Thr	Trp	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser	Ser	Glu	Val
	50					55				60					
Leu	Gly	Ser	Gly	Lys	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Val	Lys	Glu	Phe	Gly	Asp
65				70				75						80	
Ala	Gly	Gln	Tyr	Thr	Cys	His	Lys	Gly	Gly	Glu	Val	Leu	Ser	His	Ser
				85				90					95		
Leu	Leu	Leu	Leu	His	Lys	Lys	Glu	Asp	Gly	Ile	Trp	Ser	Thr	Asp	Ile
			100					105					110		
Leu	Lys	Asp	Gln	Lys	Glu	Pro	Lys	Asn	Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Cys	Glu
		115					120					125			
Ala	Lys	Asn	Tyr	Ser	Gly	Arg	Phe	Thr	Cys	Trp	Trp	Leu	Thr	Thr	Ile
		130				135				140					
Ser	Thr	Asp	Leu	Thr	Phe	Ser	Val	Lys	Ser	Ser	Arg	Gly	Ser	Ser	Asp
145				150				155					160		
Pro	Gln	Gly	Val	Thr	Cys	Gly	Ala	Ala	Thr	Leu	Ser	Ala	Glu	Arg	Val
			165					170					175		
Arg	Gly	Asp	Asn	Lys	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Val	Glu	Cys	Gln	Glu	Asp
		180					185					190			
Ser	Ala	Cys	Pro	Ala	Ala	Glu	Glu	Ser	Leu	Pro	Ile	Glu	Val	Met	Val
		195				200				205					
Asp	Ala	Val	His	Lys	Leu	Lys	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Thr	Ser	Ser	Phe	Phe
	210					215				220					
Ile	Arg	Asp	Ile	Ile	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro	Lys	Asn	Leu	Gln	Leu	Lys
225				230				235						240	
Pro	Leu	Lys	Asn	Ser	Arg	Gln	Val	Glu	Val	Ser	Trp	Glu	Tyr	Pro	Asp
			245					250					255		
Thr	Trp	Ser	Thr	Pro	His	Ser	Tyr	Phe	Ser	Leu	Thr	Phe	Cys	Val	Gln
		260					265					270			
Val	Gln	Gly	Lys	Ser	Lys	Arg	Glu	Lys	Lys	Asp	Arg	Val	Phe	Thr	Asp
		275				280				285					
Lys	Thr	Ser	Ala	Thr	Val	Ile	Cys	Arg	Lys	Asn	Ala	Ser	Ile	Ser	Val
	290					295				300					

Arg	Ala	Gln	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Ser	Trp	Ser	Glu	Trp	Ala	Ser				
305							310				315				320				
Val	Pro	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly				
				325					330					335					
Gly	Gly	Ser	Arg	Asn	Leu	Pro	Val	Ala	Thr	Pro	Asp	Pro	Gly	Met	Phe				
			340				345						350						
Pro	Cys	Leu	His	His	Ser	Gln	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Val	Ser	Asn	Met				
		355				360						365							
Leu	Gln	Lys	Ala	Arg	Gln	Thr	Leu	Glu	Phe	Tyr	Pro	Cys	Thr	Ser	Glu				
370					375					380									
Glu	Ile	Asp	His	Glu	Asp	Ile	Thr	Lys	Asp	Lys	Thr	Ser	Thr	Val	Glu				
385				390					395					400					
Ala	Cys	Leu	Pro	Leu	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Glu	Ser	Cys	Leu	Asn	Ser				
			405					410					415						
Arg	Glu	Thr	Ser	Phe	Ile	Thr	Asn	Gly	Ser	Cys	Leu	Ala	Ser	Arg	Lys				
		420					425					430							
Thr	Ser	Phe	Met	Met	Ala	Leu	Cys	Leu	Ser	Ser	Ile	Tyr	Glu	Asp	Leu				
	435					440					445								
Lys	Met	Tyr	Gln	Val	Glu	Phe	Lys	Thr	Met	Asn	Ala	Lys	Leu	Leu	Met				
450				455					460										
Asp	Pro	Lys	Arg	Gln	Ile	Phe	Leu	Asp	Gln	Asn	Met	Leu	Ala	Val	Ile				
465			470						475					480					
Asp	Glu	Leu	Met	Gln	Ala	Leu	Asn	Phe	Asn	Ser	Glu	Thr	Val	Pro	Gln				
			485					490					495						
Lys	Ser	Ser	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Phe	Tyr	Lys	Thr	Lys	Ile	Lys	Leu				
		500				505						510							
Cys	Ile	Leu	Leu	His	Ala	Phe	Arg	Ile	Arg	Ala	Val	Thr	Ile	Asp	Arg				
	515				520						525								
Val	Met	Ser	Tyr	Leu	Asn	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Pro	Pro	Pro	Met	Ser				
530				535					540										
Val	Glu	His	Ala	Asp	Ile	Trp	Val	Lys	Ser	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Ser	Arg				
545			550						555					560					
Glu	Arg	Tyr	Ile	Cys	Asn	Ser	Gly	Phe	Lys	Arg	Lys	Ala	Gly	Thr	Ser				
			565					570					575						
Ser	Leu	Thr	Glu	Cys	Val	Leu	Asn	Lys	Ala	Thr	Asn	Val	Ala	His	Trp				
		580				585						590							
Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys	Cys	Ile	Arg											
	595				600														

<210> 85

<211> 1803

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 85

atgaaatggg	tgacctttat	ttctttactg	ttctctctta	gcagcgccta	ctccatttgg	60
gaactgaaga	aggacgtcta	cgtggtcgaa	ctggactggt	atcccgatgc	tcccggcgaa	120
atgggtggtgc	tcacttgtga	cacccccgaa	gaagacggca	tcacttggac	cctcgatcag	180
agcagcgagg	tgctgggctc	cggaaagacc	ctcacaatcc	aagttaagga	gttcggagac	240
gctggccaat	acacatgcc	caagggaggc	gaggtgctca	gccattcctt	attattatta	300
cacaagaagg	aagacggaat	ctggtccacc	gacattttta	aagatcagaa	ggagcccaag	360
aataagacct	ttttaaggtg	tgaggccaaa	aactacagcg	gtcgtttcac	ttgttggtgg	420
ctgaccacca	tttccaccga	tttaaccttc	tccgtgaaaa	gcagccgggg	aagctccgac	480
cctcaaggtg	tgacatgtgg	agccgctacc	ctcagcgctg	agagggttcg	tggcgataac	540
aaggaatacg	agtacagcgt	ggagtgccaa	gaagatagcg	cttgtcccgc	tgccgaagaa	600
tctttaccca	ttgaggtgat	ggtggacgcc	gtgcacaaac	tcaagtacga	gaactacacc	660
tcctccttct	ttatccggga	catcattaag	cccgatcctc	ctaagaattt	acagctgaag	720
cctctcaaaa	atagccggca	agttgaggtc	tcttggaat	atcccgacac	ttggagcaca	780
ccccacagct	acttctcttt	aaccttttgt	gtgcaagttc	aaggtaaaag	caagcgggag	840
aagaaagacc	gggtgtttac	cgacaaaacc	agcgccaccg	tcattctgtc	gaagaacgcc	900
tccatcagcg	tgagggtc	agatcgttat	tactccagca	gctggtccga	gtgggccagc	960
gtgccttggt	ccggcggtgg	aggatccgga	ggaggtggct	ccggcgggcg	aggatctcgt	1020
aacctccccg	tggctacccc	cgatcccgga	atgttccctt	gtttacacca	cagccagaat	1080
ttactgaggg	ccgtgagcaa	catgctgcag	aaagctaggc	agactttaga	atttttaccct	1140
tgcaccagcg	aggagatcga	ccatgaagat	atcaccaagg	acaagacatc	caccgtggag	1200
gcttggtttac	ctctggagct	gacaaagaac	gagtcttgct	tcaactctcg	tgaaccagc	1260
ttcatcacia	atggctcttg	tttagcttcc	cggaagacct	cctttatgat	ggctttatgc	1320
ctcagctcca	tctacgagga	tttaaagatg	taccaagtgg	agttcaagac	catgaacgcc	1380
aagctgctca	tggaccctaa	acggcagatc	tttttagacc	agaacatgct	ggctgtgatt	1440
gatgagctga	tgcaagcttt	aaacttcaac	tccgagaccg	tcctcagaa	gtcctccctc	1500
gaggagcccc	atttttacaa	gacaaagatc	aaactgtgca	ttttactcca	cgccttttagg	1560
atccggggccg	tgaccattga	ccgggtcatg	agctatttta	acgccagcat	tacatgcccc	1620
cctcccatga	gcgtggagca	cgccgacatc	tgggtgaaga	gctatagcct	ctacagccgg	1680
gagaggtata	tctgtaacag	cggttcaag	aggaaggccg	gcaccagcag	cctcaccgag	1740
tgcgtgctga	ataaggctac	caacgtggct	cactggacaa	caccctcttt	aaagtgcac	1800
cgg						1803

<400> 86

115 120 125

130

<400> 87

cagcatctgt cctctagaac acacggaagt gaagattcc 399

〈213〉 智人(Homo sapiens)

Gln	Gly	Gln	Asp	Arg	His	Met	Ile	Arg	Met	Arg	Gln	Leu	Ile	Asp	Ile
1				5					10					15	
Val	Asp	Gln	Leu	Lys	Asn	Tyr	Val	Asn	Asp	Leu	Val	Pro	Glu	Phe	Leu
			20					25					30		
Pro	Ala	Pro	Glu	Asp	Val	Glu	Thr	Asn	Cys	Glu	Trp	Ser	Ala	Phe	Ser
		35					40					45			
Cys	Phe	Gln	Lys	Ala	Gln	Leu	Lys	Ser	Ala	Asn	Thr	Gly	Asn	Asn	Glu
	50					55				60					
Arg	Ile	Ile	Asn	Val	Ser	Ile	Lys	Lys	Leu	Lys	Arg	Lys	Pro	Pro	Ser

65	70	75	80
Thr Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys			
	85	90	95
Asp Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys			
	100	105	110
Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His			
	115	120	125
Gly Ser Glu Asp Ser Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn			
	130	135	140
Leu Thr Trp Lys Ser Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro			
145	150	155	160
Lys Pro Val Asn Gln Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly			
	165	170	175
Asp Trp Lys Ser Lys Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu			
	180	185	190
Thr Asp Glu Ile Val Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val			
	195	200	205
Phe Ser Tyr Pro Ala Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu			
	210	215	220
Pro Leu Tyr Glu Asn Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn			
225	230	235	240
Leu Gly Gln Pro Thr Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val			
	245	250	255
Asn Val Thr Val Glu Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr			
	260	265	270
Phe Leu Ser Leu Arg Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu			
	275	280	285
Tyr Tyr Trp Lys Ser Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn			
	290	295	300
Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe			
305	310	315	320
Ser Val Gln Ala Val Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr			
	325	330	335
Asp Ser Pro Val Glu Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu			
	340	345	350
Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile			
	355	360	365
Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His			
	370	375	380

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 385 390 395 400
 Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
 405 410 415
 Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
 420 425 430
 Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
 435 440 445
 Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 450 455 460

Thr Ser
 465

<210> 91

<211> 1398

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"

<400> 91

caaggtcaag atcgccacat gattagaatg cgtcaactta tagatattgt tgatcagctg	60
aaaaattatg tgaatgactt ggtccctgaa tttctgccag ctccagaaga tgtagagaca	120
aactgtgagt ggtcagcttt ttcctgtttt cagaaggccc aactaaagtc agcaaataca	180
ggaaacaatg aaaggataat caatgtatca attaaaaagc tgaagaggaa accaccttcc	240
acaaatgcag ggagaagaca gaaacacaga ctaacatgcc cttcatgtga ttcttatgag	300
aaaaaaccac ccaaagaatt cctagaaaga ttcaaatac ttctccaaa gatgattcat	360
cagcatctgt cctctagaac acacggaagt gaagattcct caggcactac aaatactgtg	420
gcagcatata atttaacttg gaaatcaact aatttcaaga caattttgga gtgggaaccc	480
aaaccgtca atcaagtcta cactgttcaa ataagcacta agtcaggaga ttggaaaagc	540
aaatgctttt acacaacaga cacagagtgt gacctaccg acgagattgt gaaggatgtg	600
aagcagacgt acttggcacg ggtcttctcc taccggcgag ggaatgtgga gagcaccggt	660
tctgctgggg agcctctgta tgagaactcc ccagagttca caccttacct ggagacaaac	720
ctcggacagc caacaattca gagttttgaa caggtgggaa caaaagtga tgtgaccgta	780
gaagatgaac ggactttagt cagaaggaa aacactttcc taagcctccg ggatgttttt	840
ggcaaggact taattttatac actttattat tggaatctt caagttcagg aaagaaaaca	900
gccaaaacaa acactaatga gtttttgatt gatgtggata aaggagaaaa ctactgtttc	960
agtgttcaag cagtgttcc ctcccgaaca gttaaccgga agagtacaga cagcccggta	1020
gagtgtatgg gccaggagaa aggggaattc agagaaaact gggatgaacgt catcagcgat	1080

ttaaagaaga tcgaagattt aattcagtcc atgcatatcg acgccacttt atacacagaa 1140
 tccgacgtgc acccctcttg taaggtgacc gccatgaaat gttttttact ggagctgcaa 1200
 gttatctctt tagagagcgg agacgctagc atccacgaca ccgtggagaa tttaatcatt 1260
 ttagccaata actctttatc cagcaacggc aacgtgacag agtccggctg caaggagtgc 1320
 gaagagctgg aggagaagaa catcaaggag tttctgcaat cctttgtgca cattgtccag 1380
 atgttcatca atacctcc 1398

<210> 92

<211> 483

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 92

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu

1 5 10 15

Ala Gln Gly Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp

20 25 30

Ile Val Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe

35 40 45

Leu Pro Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe

50 55 60

Ser Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn

65 70 75 80

Glu Arg Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro

85 90 95

Ser Thr Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser

100 105 110

Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe

115 120 125

Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr

130 135 140

His Gly Ser Glu Asp Ser Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr

145 150 155 160

Asn Leu Thr Trp Lys Ser Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu

165 170 175

Pro Lys Pro Val Asn Gln Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser

180 185 190

Gly Asp Trp Lys Ser Lys Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp		
195	200	205
Leu Thr Asp Glu Ile Val Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg		
210	215	220
Val Phe Ser Tyr Pro Ala Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly		
225	230	235
Glu Pro Leu Tyr Glu Asn Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr		
245	250	255
Asn Leu Gly Gln Pro Thr Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys		
260	265	270
Val Asn Val Thr Val Glu Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn		
275	280	285
Thr Phe Leu Ser Leu Arg Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr		
290	295	300
Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr		
305	310	315
Asn Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys		
325	330	335
Phe Ser Val Gln Ala Val Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser		
340	345	350
Thr Asp Ser Pro Val Glu Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg		
355	360	365
Glu Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu		
370	375	380
Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val		
385	390	395
His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu		
405	410	415
Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val		
420	425	430
Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn		
435	440	445
Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn		
450	455	460
Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile		
465	470	475
Asn Thr Ser		
<210> 93		
<211> 1449		

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 93

atgggagtga aagttctttt tgcccttatt tgtattgctg tggccgaggc ccaaggtcaa	60
gatcgccaca tgattagaat gcgtcaactt atagatattg ttgatcagct gaaaaattat	120
gtgaatgact tgggtccctga atttctgcca gctccagaag atgtagagac aaactgtgag	180
tggtcagctt tttcctgttt tcagaaggcc caactaaagt cagcaaatac aggaaacaat	240
gaaaggataa tcaatgtatc aattaaaaag ctgaagagga aaccaccttc cacaaatgca	300
gggagaagac agaaacacag actaacatgc ctttcattgt attcttatga gaaaaacca	360
cccaaagaat tcctagaaag attcaaatca cttctccaaa agatgattca tcagcatctg	420
tcctctagaa cacacggaag tgaagattcc tcaggcacta caaatactgt ggcagcatat	480
aatttaactt ggaaatcaac taatttcaag acaattttgg agtgggaacc caaacccgtc	540
aatcaagtct acactgttca aataagcact aagtcaggag atttgaaaag caaatgcttt	600
tacacaacag acacagagtg tgacctcacc gacgagattg tgaaggatgt gaagcagacg	660
tacttggcac gggctcttctc ctacccggca gggaatgtgg agagcaccgg ttctgctggg	720
gagcctctgt atgagaactc cccagagttc acaccttacc tggagacaaa cctcggacag	780
ccaacaattc agagttttga acaggtggga acaaaaagta atgtgaccgt agaagatgaa	840
cggacttttag tcagaaggaa caacactttc ctaagcctcc gggatgtttt tggcaaggac	900
ttaattttata cactttatta ttggaaatct tcaagttcag gaaagaaaac agccaaaaca	960
aacactaatg agttttttgat tgatgtggat aaaggagaaa actactgttt cagtgttcaa	1020
gcagtgattc cctcccgaac agttaaccgg aagagtacag acagcccggg agagtgtatg	1080
ggccaggaga aaggggaatt cagagaaaac tgggtgaacg tcatcagcga tttaaagaag	1140
atcgaagatt taattcagtc catgcatatc gacgccactt tatacacaga atccgacgtg	1200
cacccctctt gtaaggtgac cgccatgaaa tgttttttac tggagctgca agttatctct	1260
ttagagagcg gagacgctag catccacgac accgtggaga atttaatcat ttagccaat	1320
aactctttat ccagcaacgg caacgtgaca gagtccggct gcaaggagtg cgaagagctg	1380
gaggagaaga acatcaagga gtttctgcaa tcctttgtgc acattgtcca gatgttcac	1440
aatacctcc	1449

<210> 94

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide”

<400> 94

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

<210> 95

<211> 651

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 95

```

gatttgtgata ttgaaggtaa agatggcaaa caatatgaga gtgttctaata ggtcagcatc      60
gatcaattat tggacagcat gaaagaaatt ggtagcaatt gcctgaataa tgaatttaac      120
tttttttaaaa gacatatctg tgatgctaata aaggaaggta tgtttttatt ccgtgctgct      180
cgcaagttga ggcaatttct taaaatgaat agcactgggtg attttgatct ccacttatta      240
aaagtttcag aaggcacaac aatactgttg aactgcactg gccagggtta aggaagaaaa      300
ccagctgccc tgggtgaagc ccaaccaaca aagagtttgg aagaaaataa atcttttaag      360
gaacagaaaa aactgaatga cttgtgtttc ctaaagagac tattacaaga gataaaaact      420
tgtttggaata aaattttgat gggcactaaa gaacacatca cgtgccctcc ccccatgtcc      480
gtggaacacg cagacatctg ggtcaagagc tacagcttgt actccaggga gcggtacatt      540
tgtaactctg gtttcaagcg taaagccggc acgtccagcc tgacggagtg cgtgttgaac      600
aaggccacga atgtcgccca ctggacaacc cccagtctca aatgcattag a                651

```

<210> 96

<211> 234

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 96

```

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu
1           5           10          15
Ala Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val
          20          25          30
Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly
          35          40          45
Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys
          50          55          60
Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu
65          70          75          80
Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu
          85          90          95
Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln
          100         105         110
Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys
          115         120         125
Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp
          130         135         140
Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn

```

145	150	155	160
Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met			
	165	170	175
Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser			
	180	185	190
Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr			
	195	200	205
Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His			
	210	215	220
Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg			
225	230		

<210> 97

<211> 702

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 97

atgggagtggaagttctttttgccccttatttgtattgctgtggccgaggccgattgtgat	60
attgaaggtaagatggcaacaaatattgagagtggttctaatgggtcagcatcgatcaatta	120
ttggacacgcatgaaagaaattggttagcaattgcctgaataatgaatttaacgttttttaaa	180
agacatatctgtgatgctaaataggaaggatgttttttatccgtgctgctcgcaagttg	240
aggcaatttcttaaaatgaatagcactgggtgattttgatctccacttattaaaagtttca	300
gaaggcacacaataactgttgaactgcactggccagggttaaggaagaaaaccagctgcc	360
ctgggtgaagccaaccaacaaagagtttgaagaaaataaatcttttaaggaacagaaa	420
aaactgaatgacttgtgtttcctaaagagactattacaagagataaaaaactgtttggaat	480
aaaatttttgatgggcactaaagaacacatcacgtgccctccccatgtcgtgtgaacac	540
gcagacatctgggtcaagagctacagcttgactccaggagcggtacattgttaactct	600
ggtttcaagcgtaaaagccggcacgtccagctgacggagtgctgttgaaacaggccacg	660
aatgtcgcccactggacaacccccagtctcaatgcattaga	702

<210> 98

<211> 485

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide”

<400> 98

Asp	Cys	Asp	Ile	Glu	Gly	Lys	Asp	Gly	Lys	Gln	Tyr	Glu	Ser	Val	Leu
1				5					10					15	
Met	Val	Ser	Ile	Asp	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Met	Lys	Glu	Ile	Gly	Ser
			20					25					30		
Asn	Cys	Leu	Asn	Asn	Glu	Phe	Asn	Phe	Phe	Lys	Arg	His	Ile	Cys	Asp
		35					40					45			
Ala	Asn	Lys	Glu	Gly	Met	Phe	Leu	Phe	Arg	Ala	Ala	Arg	Lys	Leu	Arg
	50					55				60					
Gln	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Thr	Gly	Asp	Phe	Asp	Leu	His	Leu	Leu
65				70					75					80	
Lys	Val	Ser	Glu	Gly	Thr	Thr	Ile	Leu	Leu	Asn	Cys	Thr	Gly	Gln	Val
			85					90					95		
Lys	Gly	Arg	Lys	Pro	Ala	Ala	Leu	Gly	Glu	Ala	Gln	Pro	Thr	Lys	Ser
			100					105					110		
Leu	Glu	Glu	Asn	Lys	Ser	Leu	Lys	Glu	Gln	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Leu
			115					120					125		
Cys	Phe	Leu	Lys	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Ile	Lys	Thr	Cys	Trp	Asn	Lys
			130				135					140			
Ile	Leu	Met	Gly	Thr	Lys	Glu	His	Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Thr	Val	Ala
145					150				155					160	
Ala	Tyr	Asn	Leu	Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	Asn	Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Glu
			165					170					175		
Trp	Glu	Pro	Lys	Pro	Val	Asn	Gln	Val	Tyr	Thr	Val	Gln	Ile	Ser	Thr
			180					185					190		
Lys	Ser	Gly	Asp	Trp	Lys	Ser	Lys	Cys	Phe	Tyr	Thr	Thr	Asp	Thr	Glu
		195					200						205		
Cys	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Asp	Val	Lys	Gln	Thr	Tyr	Leu
	210					215				220					
Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ala	Gly	Asn	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Ser
225					230				235					240	
Ala	Gly	Glu	Pro	Leu	Tyr	Glu	Asn	Ser	Pro	Glu	Phe	Thr	Pro	Tyr	Leu
			245					250					255		
Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Gln	Pro	Thr	Ile	Gln	Ser	Phe	Glu	Gln	Val	Gly
			260					265					270		
Thr	Lys	Val	Asn	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Glu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Arg
			275				280					285			
Asn	Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Leu	Arg	Asp	Val	Phe	Gly	Lys	Asp	Leu	Ile

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

<210> 99

<211> 1455

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 99

gattgcgaca tcgagggcaa ggacggcaag cagtacgaga gcgtgctgat ggtgtccatc	60
gaccagctgc tggacagcat gaaggagatc ggctccaact gcctcaacaa cgagttcaac	120
ttcttcaagc ggcacatctg cgacgccaac aaggagggca tgttctgtt cagggccgcc	180
aggaaactgc ggcagttcct gaagatgaac tccaccggcg acttcgacct gcacctgctg	240
aaggtgtccg agggcaccac catcctgctg aactgcaccg gacaggtgaa gggccgga	300

```

cctgctgctc tgggagaggc ccaacccacc aagagcctgg aggagaacaa gtccctgaag      360
gagcagaaga agctgaacga cctgtgcttc ctgaagaggc tgctgcagga gatcaagacc      420
tgctggaaca agatcctgat gggcaccaag gagcatagcg gcacaaccaa cacagtcgct      480
gcctataacc tcacttgga gaggaccaac ttcaaaacca tcctcgaatg ggaacccaaa      540
cccgttaacc aagtttacac cgtgcagatc agcaccaagt ccggcgactg gaagtccaaa      600
tgttttctata ccaccgacac cgagtgcgat ctcaccgatg agatcgtgaa agatgtgaaa      660
cagacctacc tcgcccgggt gtttagctac cccgccggca atgtggagag cactggttcc      720
gctggcgagc ctttatacga gaacagcccc gaatttacc cttacctga gaccaattta      780
ggacagccca ccatccaaag ctttgagcaa gttggcacia aggtgaatgt gacagtggag      840
gacgagcgga ctttagtgcg gcggaacaac acctttctca gcctccggga tgtgttcggc      900
aaagatttaa tctacacact gtattactgg aagtctcttt cctccggcaa gaagacagct      960
aaaaccaaca caaacgagtt ttaaatcgac gtggataaag gcgaaaacta ctgtttcagc     1020
gtgcaagctg tgatcccctc ccggaccgtg aataggaaaa gcaccgatag ccccgttgag     1080
tgcattgggcc aagaaaaggg cgagttccgg gagaactggg tgaacgtcat cagcgattta     1140
aagaagatcg aagatttaat tcagtccatg catatcgacg ccactttata cacagaatcc     1200
gacgtgcacc cctcttgtaa ggtgaccgcc atgaaatgtt ttttactgga gctgcaagtt     1260
atctcttttag agagcggaga cgctagcatc cagcacaccg tggagaatth aatcatttta     1320
gccaataact ctttatccag caacggcaac gtgacagagt ccggctgcaa ggagtgcgaa     1380
gagctggagg agaagaacat caaggagttt ctgcaatcct ttgtgcacat tgtccagatg     1440
ttcatcaata cctcc

```

<210> 100

<211> 503

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 100

```

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1           5           10           15
Tyr Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser
          20          25          30
Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile
          35          40          45
Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile
          50          55          60
Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys
65          70          75          80

```

Leu	Arg	Gln	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Thr	Gly	Asp	Phe	Asp	Leu	His
				85					90					95	
Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Glu	Gly	Thr	Thr	Ile	Leu	Leu	Asn	Cys	Thr	Gly
			100					105					110		
Gln	Val	Lys	Gly	Arg	Lys	Pro	Ala	Ala	Leu	Gly	Glu	Ala	Gln	Pro	Thr
			115				120						125		
Lys	Ser	Leu	Glu	Glu	Asn	Lys	Ser	Leu	Lys	Glu	Gln	Lys	Lys	Leu	Asn
			130				135						140		
Asp	Leu	Cys	Phe	Leu	Lys	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Ile	Lys	Thr	Cys	Trp
145						150					155				160
Asn	Lys	Ile	Leu	Met	Gly	Thr	Lys	Glu	His	Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Thr
				165					170						175
Val	Ala	Ala	Tyr	Asn	Leu	Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	Asn	Phe	Lys	Thr	Ile
			180						185					190	
Leu	Glu	Trp	Glu	Pro	Lys	Pro	Val	Asn	Gln	Val	Tyr	Thr	Val	Gln	Ile
			195					200						205	
Ser	Thr	Lys	Ser	Gly	Asp	Trp	Lys	Ser	Lys	Cys	Phe	Tyr	Thr	Thr	Asp
						215						220			
Thr	Glu	Cys	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Asp	Val	Lys	Gln	Thr
225						230					235				240
Tyr	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ala	Gly	Asn	Val	Glu	Ser	Thr
				245						250					255
Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Leu	Tyr	Glu	Asn	Ser	Pro	Glu	Phe	Thr	Pro
			260						265					270	
Tyr	Leu	Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Gln	Pro	Thr	Ile	Gln	Ser	Phe	Glu	Gln
			275					280						285	
Val	Gly	Thr	Lys	Val	Asn	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Glu	Arg	Thr	Leu	Val
			290					295						300	
Arg	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Leu	Arg	Asp	Val	Phe	Gly	Lys	Asp
305						310					315				320
Leu	Ile	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Lys	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Lys	Lys
				325						330					335
Thr	Ala	Lys	Thr	Asn	Thr	Asn	Glu	Phe	Leu	Ile	Asp	Val	Asp	Lys	Gly
			340						345					350	
Glu	Asn	Tyr	Cys	Phe	Ser	Val	Gln	Ala	Val	Ile	Pro	Ser	Arg	Thr	Val
			355					360						365	
Asn	Arg	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Pro	Val	Glu	Cys	Met	Gly	Gln	Glu	Lys
			370					375						380	
Gly	Glu	Phe	Arg	Glu	Asn	Trp	Val	Asn	Val	Ile	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys

385	390	395	400
Ile Glu Asp Leu	Ile Gln Ser Met His	Ile Asp Ala Thr	Leu Tyr Thr
	405	410	415
Glu Ser Asp Val	His Pro Ser Cys Lys	Val Thr Ala Met	Lys Cys Phe
	420	425	430
Leu Leu Glu Leu	Gln Val Ile Ser Leu	Glu Ser Gly Asp	Ala Ser Ile
	435	440	445
His Asp Thr Val	Glu Asn Leu Ile	Ile Leu Ala Asn	Asn Ser Leu Ser
	450	455	460
Ser Asn Gly Asn	Val Thr Glu Ser Gly	Cys Lys Glu Cys	Glu Glu Leu
465	470	475	480
Glu Glu Lys Asn	Ile Lys Glu Phe Leu	Gln Ser Phe Val	His Ile Val
	485	490	495
Gln Met Phe Ile	Asn Thr Ser		
	500		

<210> 101

<211> 1509

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 101

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttcctgttct ccagegccta ctccgattgc	60
gacatcgagg gcaaggacgg caagcagtac gagagcgtgc tgatggtgtc catcgaccag	120
ctgctggaca gcatgaagga gatcggtctc aactgcctca acaacgagtt caacttcttc	180
aagcggcaca tctgcgacgc caacaaggag ggcatgttcc tgttcagggc cgccaggaaa	240
ctgcggcagt tcctgaagat gaactccacc ggcgacttcg acctgcacct gctgaagggtg	300
tccgagggca ccaccatcct gctgaactgc accggacagg tgaagggccg gaaacctgct	360
gctctgggag aggcccaacc caccaagagc ctggaggaga acaagtcctt gaaggagcag	420
aagaagctga acgacctgtg cttcctgaag aggtctgtgc aggagatcaa gacctgctgg	480
aacaagatcc tgatgggcac caaggagcat agcggcacia ccaacacagt cgctgcctat	540
aacctcactt ggaagagcac caacttcaaa accatcctcg aatgggaacc caaacccgtt	600
aaccaagttt acaccgtgca gatcagcacc aagtccggcg actggaagtc caaatgtttc	660
tataaccacc acaccgagtg cgatctcacc gatgagatcg tgaaagatgt gaaacagacc	720
tacctgccc ggggtgtttag ctaccccgcc ggcaatgtgg agagcactgg ttccgctggc	780
gagcctttat acgagaacag ccccggaattt accccttacc tcgagaccaa tttagacag	840
cccaccatcc aaagctttga gcaagttggc acaaagtgat atgtgacagt ggaggacgag	900

```

cggacttttag tgcggcggaa caacaccttt ctcagcctcc gggatgtgtt cggcaaagat      960
ttaatctaca cactgtatta ctggaagtcc tcttcctccg gcaagaagac agctaaaacc      1020
aacacaaacg agtttttaat cgacgtggat aaaggcgaaa actactgttt cagcgtgcaa      1080
gctgtgatcc cctcccgac cgtgaatagg aaaagcacgc atagccccgt tgagtgcag      1140
ggccaagaaa agggcgagtt ccgggagAAC tgggtgaacg tcatcagcga tttaaagaag      1200
atcgaagatt taattcagtc catgcatatc gacgccactt tatacacaga atccgacgtg      1260
caccctcttt gtaaggtgac cgccatgaaa tgttttttac tggagctgca agttatctct      1320
ttagagagcg gagacgctag catccacgac accgtggaga atttaatcat tttagccaat      1380
aactctttat ccagcaacgg caacgtgaca gagtccggct gcaaggagtg cgaagagctg      1440
gaggagaaga acatcaagga gtttctgcaa tcctttgtgc acattgtcca gatgttcac      1500
aatacctcc                                          1509
<210> 102
<211> 198
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide"
<400> 102
Gln Gly Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile
1           5           10           15
Val Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu
      20           25           30
Pro Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser
      35           40           45
Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu
      50           55           60
Arg Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser
65           70           75           80
Thr Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys
      85           90           95
Asp Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys
      100          105          110
Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His
      115          120          125
Gly Ser Glu Asp Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His
      130          135          140
Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr

```

145	150	155	160
Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr			
	165	170	175
Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro			
	180	185	190
Ser Leu Lys Cys Ile Arg			
195			
<210> 103			
<211> 594			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> source			
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"			
<400> 103			
cagggccagg acaggcacat gatccggatg aggcagctca tcgacatcgt cgaccagctg			60
aagaactacg tgaacgacct ggtgcccagag tttctgcctg ccccccagga cgtggagacc			120
aactgcgagt ggtccgcctt ctctgtcttt cagaaggccc agctgaagtc cgccaacacc			180
ggcaacaacg agcggatcat caacgtgagc atcaagaagc tgaagcggaa gcctccctcc			240
acaaacgccg gcaggaggca gaagcacagg ctgacctgcc ccagctgtga ctctacgag			300
aagaagcccc ccaaggagtt cctggagagg ttcaagtccc tgctgcagaa gatgatccat			360
cagcacctgt cctccaggac ccacggctcc gaggactcca ttacatgccc ccctcccatg			420
agcgtggagc acgccgacat ctgggtgaag agctatagcc tctacagccg ggagaggtat			480
atctgtaaca gcggcttcaa gaggaaggcc ggcaccagca gcctcaccga gtgcgtgctg			540
aataaggcta ccaacgtggc tcaactggaca acaccctctt taaagtgcac ccgg			594
<210> 104			
<211> 216			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> source			
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"			
<400> 104			
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala			
1 5 10 15			
Tyr Ser Gln Gly Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile			
20 25 30			

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

<210> 105

<211> 648

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"

<400> 105

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgtttct ccagcgccta ctcccagggc 60
 caggacaggc acatgatccg gatgaggcag ctcatcgaca tcgtcgacca gctgaagaac 120
 tacgtgaacg acctggtgcc cgagtttctg cctgcccccg aggacgtgga gaccaactgc 180
 gagtgggtccg ctttctcctg ctttcagaag gcccagctga agtccgcca caccggcaac 240
 aacgagcgga tcatcaacgt gagcatcaag aagctgaagc ggaagcctcc ctccacaaac 300
 gccggcagga ggcagaagca caggctgacc tgccccagct gtgactccta cgagaagaag 360

```

ccccccaagg agttcctgga gaggttcaag tccctgctgc agaagatgat ccatcagcac      420
ctgtcctcca ggaccacagg ctccgaggac tccattacat gccccctcc catgagcgtg      480
gagcacgccg acatctgggt gaagagctat agcctctaca gccgggagag gtatatctgt      540
aacagcggct tcaagaggaa ggccggcacc agcagcctca ccgagtgcgt gctgaataag      600
gctaccaacg tggtcactg gacaacaccc tctttaaagt gcatccgg      648

```

<210> 106

<211> 136

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 106

```

Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr
1           5           10           15
Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp
           20           25           30
Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys
           35           40           45
Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val
           50           55           60
Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp
65           70           75           80
Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro
           85           90           95
Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met
           100          105          110
Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu
           115          120          125
Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
           130          135

```

<210> 107

<211> 408

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 107

```

atcccccccc atgtgcaaaa gagcgtgaac aacgatatga tcgtgaccga caacaacggc      60
gccgtgaagt ttccccagct ctgcaagttc tgcgatgtca ggttcagcac ctgcgataat      120
cagaagtcc tcatgtccaa ctgcagcatc acctccatct gcgagaagcc ccaagaagtg      180
tgcgtggccg tgtggcgga aaatgacgag aacatcaccc tggagaccgt gtgtcacgac      240
cccaagctcc cttatcacga cttcattctg gaggacgctg cctcccccaa atgcatcatg      300
aaggagaaga agaagcccg agagaccttc tttatgtgtt cctgtagcag cgacgagtgt      360

```



```

aacgacaaca tcattcttcag cgaagagtac aacaccagca accctgat      408
<210> 108
<211> 408
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 108
attcctcccc acgtgcagaa gagcgtgaat aatgacatga tcgtgaccga taacaatggc      60
gccgtgaaat ttccccagct gtgcaaattc tgcgatgtga ggttttccac ctgcgacaac      120
cagaagtcct gtatgagcaa ctgctccatc acctccatct gtgagaagcc tcaggaggtg      180
tgcgtggctg tctggcggaa gaatgacgag aatatcacc ccagaaaccgt ctgccacgat      240
cccaagctgc cctaccacga tttcatcctg gaagacgccg ccagccctaa gtgcatcatg      300
aaagagaaaa agaagcctgg cgagaccttt ttcattgtgt cctgcagcag cgacgaatgc      360
aacgacaata tcattcttag cgaggaatac aataccagca accccgac      408
<210> 109
<211> 287
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide"
<400> 109
Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr
1           5           10           15
Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp
      20           25           30
Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys
      35           40           45
Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val
      50           55           60
Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp
65           70           75           80
Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro
      85           90           95
Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met
      100          105          110
Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu
      115          120          125
Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

```

130	135	140	
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val			
145	150	155	160
Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro			
	165	170	175
Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln			
	180	185	190
Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro			
	195	200	205
Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr			
	210	215	220
Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile			
225	230	235	240
Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys			
	245	250	255
Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn			
	260	265	270
Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp			
	275	280	285
<210> 110			
<211> 861			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> source			
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"			
<400> 110			
atcccccccc atgtgcaaaa gagcgtgaac aacgatatga tcgtgaccga caacaacggc			60
gccgtgaagt ttccccagct ctgcaagttc tgcgatgtca ggttcagcac ctgcgataat			120
cagaagtcct gcatgtccaa ctgcagcatc acctccatct gcgagaagcc ccaagaagtg			180
tgcgtggccg tgtggcgga aaatgacgag aacatcaccc tggagaccgt gtgtcacgac			240
cccaagctcc cttatcacga cttcattctg gaggacgtg cctcccccaa atgcatcatg			300
aaggagaaga agaagcccgg agagaccttc tttatgtgtt cctgtagcag cgacgagtgt			360
aacgacaaca tcattctcag cgaagagtac aacaccagca accctgatgg aggtggcgga			420
tccggaggtg gaggttctgg tggaggtggg agtattcttc ccacgtgca gaagagcgtg			480
aataatgaca tgatcgtgac cgataacaat ggcgccgtga aatttcccca gctgtgcaaa			540
ttctgcgatg tgaggttttc cacctgcgac aaccagaagt cctgtatgag caactgctcc			600
atcacctcca tctgtgagaa gcctcaggag gtgtgcgtgg ctgtctggcg gaagaatgac			660

gagaatatca ccctggaaac cgtctgccac gatcccaagc tgcctacca cgatttcac 720
 ctggaagacg ccgccagccc taagtgcac atgaaagaga aaaagaagcc tggcgagacc 780
 tttttcatgt gctcctgcag cagcgacgaa tgcaacgaca atatcatctt tagcgaggaa 840
 tacaatacca gcaacccccga c 861

<210> 111

<211> 620

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 111

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

Gln	Glu	Val	Cys	Val	Ala	Val	Trp	Arg	Lys	Asn	Asp	Glu	Asn	Ile	Thr	
210							215					220				
Leu	Glu	Thr	Val	Cys	His	Asp	Pro	Lys	Leu	Pro	Tyr	His	Asp	Phe	Ile	
225						230					235				240	
Leu	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Pro	Lys	Cys	Ile	Met	Lys	Glu	Lys	Lys	Lys	
					245					250					255	
Pro	Gly	Glu	Thr	Phe	Phe	Met	Cys	Ser	Cys	Ser	Ser	Asp	Glu	Cys	Asn	
					260				265					270		
Asp	Asn	Ile	Ile	Phe	Ser	Glu	Glu	Tyr	Asn	Thr	Ser	Asn	Pro	Asp	Ser	
		275						280						285		
Gly	Thr	Thr	Asn	Thr	Val	Ala	Ala	Tyr	Asn	Leu	Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	
	290						295					300				
Asn	Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Glu	Trp	Glu	Pro	Lys	Pro	Val	Asn	Gln	Val	
305					310						315				320	
Tyr	Thr	Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Lys	Ser	Gly	Asp	Trp	Lys	Ser	Lys	Cys	
					325					330					335	
Phe	Tyr	Thr	Thr	Asp	Thr	Glu	Cys	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	
					340				345					350		
Asp	Val	Lys	Gln	Thr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ala	Gly	
		355						360						365		
Asn	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Leu	Tyr	Glu	Asn	Ser	
	370						375							380		
Pro	Glu	Phe	Thr	Pro	Tyr	Leu	Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Gln	Pro	Thr	Ile	
385					390						395				400	
Gln	Ser	Phe	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Lys	Val	Asn	Val	Thr	Val	Glu	Asp	
					405					410					415	
Glu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Leu	Arg	Asp	
					420				425					430		
Val	Phe	Gly	Lys	Asp	Leu	Ile	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Lys	Ser	Ser	
		435						440						445		
Ser	Ser	Gly	Lys	Lys	Thr	Ala	Lys	Thr	Asn	Thr	Asn	Glu	Phe	Leu	Ile	
		450					455							460		
Asp	Val	Asp	Lys	Gly	Glu	Asn	Tyr	Cys	Phe	Ser	Val	Gln	Ala	Val	Ile	
465						470					475				480	
Pro	Ser	Arg	Thr	Val	Asn	Arg	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Pro	Val	Glu	Cys	
					485					490					495	
Met	Gly	Gln	Glu	Lys	Gly	Glu	Phe	Arg	Glu	Asn	Trp	Val	Asn	Val	Ile	
					500					505					510	
Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Ile	Glu	Asp	Leu	Ile	Gln	Ser	Met	His	Ile	Asp	

515	520	525
Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr		
530	535	540
Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser		
545	550	555
Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala		
565	570	575
Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys		
580	585	590
Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser		
595	600	605
Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser		
610	615	620

<210> 112

<211> 1860

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 112

atcccccccc atgtgcaaaa gagcgtgaac aacgatatga tcgtgaccga caacaacggc	60
gccgtgaagt ttccccagct ctgcaagttc tgcatgtca ggttcagcac ctgcgataat	120
cagaagtcct gcatgtccaa ctgcagcatc acctccatct gcgagaagcc ccaagaagtg	180
tgcgtggccg tgtggcggaa aatgacgag aacatcaccc tggagaccgt gtgtcacgac	240
cccaagctcc cttatcacga cttcattctg gaggacgtg cctccccaa atgcatcatg	300
aaggagaaga agaagcccgg agagacctt tttatgtgtt cctgtagcag cgacgagtgt	360
aacgacaaca tcattctcag cgaagagtac aacaccagca accctgatgg aggtggcgga	420
tccggagggtg gaggttctgg tggagggtggg agtattcctc cccacgtgca gaagagcgtg	480
aataatgaca tgatcgtgac cgataacaat ggcgccgtga aatttcccca gctgtgcaaa	540
ttctgcgatg tgaggttttc cacctgcgac aaccagaagt cctgtatgag caactgctcc	600
atcacctcca tctgtgagaa gcctcaggag gtgtgcgtgg ctgtctggcg gaagaatgac	660
gagaatatca ccctggaaac cgtctgccac gatcccaagc tgccctacca cgatttcac	720
ctggaagacg ccgccagccc taagtgcac atgaaagaga aaaagaagcc tggcgagacc	780
tttttcatgt gtcctgcag cagcgacgaa tgcaacgaca atatcatctt tagcgaggaa	840
tacaatacca gcaaccccgga cagcggcaca accaacacag tcgctgccta taacctact	900
tggaagagca ccaactcaa aaccatcctc gaatgggaac ccaaaccgt taaccaagtt	960
tacaccgtgc agatcagcac caagtccggc gactggaagt ccaaagtgtt ctataccacc	1020

gacaccgagt gcgatctcac cgatgagatc gtgaaagatg tgaaacagac ctacctcgcc 1080
 cgggtgttta gctaccccg cggcaatgtg gagagcactg gttccgctgg cgagccttta 1140
 tacgagaaca gccccgaatt tacccttac ctcgagacca atttaggaca gccaccatc 1200
 caaagctttg agcaagttgg cacaaggtg aatgtgacag tggaggacga gcggacttta 1260
 gtgcggcgga acaacacctt tctcagctc cgggatgtgt tcggcaaaga tttaatctac 1320
 acactgtatt actggaagtc ctcttctcc ggcaagaaga cagctaaaac caacacaaac 1380
 gagtttttaa tcgacgtgga taaaggcgaa aactactgtt tcagcgtgca agctgtgac 1440
 ccctcccga cgtgaatag gaaaagcacc gatagccccg ttgagtgcac gggccaagaa 1500
 aagggcgagt tccgggagaa ctgggtgaac gtcacagcg atttaaagaa gatcgaagat 1560
 ttaattcagt ccatgcata cgacgccact ttatacacag aatccgacgt gcacctctt 1620
 tgtaagtgga ccgcatgaa atgttttta ctggagctgc aagttatctc tttagagagc 1680
 ggagacgcta gcatccacga caccgtggag aatttaatca ttttagccaa taactcttta 1740
 tccagcaacg gcaacgtgac agagtccggc tgcaaggagt gcgaagagct ggaggagaag 1800
 aacatcaagg agtttctgca atcctttgtg cacattgtcc agatgttcat caatacctcc 1860

<210> 113

<211> 638

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 113

Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala
1			5					10					15		
Tyr	Ser	Ile	Pro	Pro	His	Val	Gln	Lys	Ser	Val	Asn	Asn	Asp	Met	Ile
			20					25					30		
Val	Thr	Asp	Asn	Asn	Gly	Ala	Val	Lys	Phe	Pro	Gln	Leu	Cys	Lys	Phe
			35				40					45			
Cys	Asp	Val	Arg	Phe	Ser	Thr	Cys	Asp	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Met	Ser
			50				55				60				
Asn	Cys	Ser	Ile	Thr	Ser	Ile	Cys	Glu	Lys	Pro	Gln	Glu	Val	Cys	Val
65				70					75					80	
Ala	Val	Trp	Arg	Lys	Asn	Asp	Glu	Asn	Ile	Thr	Leu	Glu	Thr	Val	Cys
				85					90					95	
His	Asp	Pro	Lys	Leu	Pro	Tyr	His	Asp	Phe	Ile	Leu	Glu	Asp	Ala	Ala
			100					105					110		
Ser	Pro	Lys	Cys	Ile	Met	Lys	Glu	Lys	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Phe
			115					120					125		

Phe	Met	Cys	Ser	Cys	Ser	Ser	Asp	Glu	Cys	Asn	Asp	Asn	Ile	Ile	Phe
130							135					140			
Ser	Glu	Glu	Tyr	Asn	Thr	Ser	Asn	Pro	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
145					150					155					160
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ile	Pro	Pro	His	Val	Gln	Lys
				165					170					175	
Ser	Val	Asn	Asn	Asp	Met	Ile	Val	Thr	Asp	Asn	Asn	Gly	Ala	Val	Lys
				180					185					190	
Phe	Pro	Gln	Leu	Cys	Lys	Phe	Cys	Asp	Val	Arg	Phe	Ser	Thr	Cys	Asp
		195						200					205		
Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Met	Ser	Asn	Cys	Ser	Ile	Thr	Ser	Ile	Cys	Glu
		210					215						220		
Lys	Pro	Gln	Glu	Val	Cys	Val	Ala	Val	Trp	Arg	Lys	Asn	Asp	Glu	Asn
225					230					235					240
Ile	Thr	Leu	Glu	Thr	Val	Cys	His	Asp	Pro	Lys	Leu	Pro	Tyr	His	Asp
				245						250					255
Phe	Ile	Leu	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Pro	Lys	Cys	Ile	Met	Lys	Glu	Lys
				260					265					270	
Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Phe	Phe	Met	Cys	Ser	Cys	Ser	Ser	Asp	Glu
		275						280						285	
Cys	Asn	Asp	Asn	Ile	Ile	Phe	Ser	Glu	Glu	Tyr	Asn	Thr	Ser	Asn	Pro
		290					295							300	
Asp	Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Thr	Val	Ala	Ala	Tyr	Asn	Leu	Thr	Trp	Lys
305					310					315					320
Ser	Thr	Asn	Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Glu	Trp	Glu	Pro	Lys	Pro	Val	Asn
				325						330					335
Gln	Val	Tyr	Thr	Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Lys	Ser	Gly	Asp	Trp	Lys	Ser
				340					345					350	
Lys	Cys	Phe	Tyr	Thr	Thr	Asp	Thr	Glu	Cys	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	Ile
		355						360					365		
Val	Lys	Asp	Val	Lys	Gln	Thr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Tyr	Pro
		370						375						380	
Ala	Gly	Asn	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Leu	Tyr	Glu
385					390					395					400
Asn	Ser	Pro	Glu	Phe	Thr	Pro	Tyr	Leu	Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Gln	Pro
				405						410				415	
Thr	Ile	Gln	Ser	Phe	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Lys	Val	Asn	Val	Thr	Val
				420					425					430	
Glu	Asp	Glu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Leu

435	440	445
Arg Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys		
450	455	460
Ser Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe		
465	470	475
Leu Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala		
485	490	495
Val Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val		
500	505	510
Glu Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asn Trp Val Asn		
515	520	525
Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His		
530	535	540
Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys		
545	550	555
Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu		
565	570	575
Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile		
580	585	590
Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly		
595	600	605
Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu		
610	615	620
Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser		
625	630	635
<210> 114		
<211> 1914		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> source		
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"		
<400> 114		
atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgtttct ccagcgccta ctccatcccc		60
ccccatgtgc aaaagagcgt gaacaacgat atgacgtga cgcacaaca cggcgccgtg		120
aagtttcccc agctctgcaa gttctgcgat gtcaggttca gcacctgcga taatcagaag		180
tcctgcatgt ccaactgcag catcacctcc atctgcgaga agccccaaga agtgtgcgtg		240
gccgtgtggc ggaaaaatga cgagaacatc accctggaga ccgtgtgtca cgacccaag		300


```

ctcccttatac acgacttcat tctggaggac gctgcctccc ccaaatgcat catgaaggag 360
aagaagaagc ccggagagac cttctttatg tgttcctgta gcagcgacga gtgtaacgac 420
aacatcatct tcagcgaaga gtacaacacc agcaaccctg atggaggtgg cggatccgga 480
ggtggagggtt ctggaggagg tgggagtatt cctccccacg tgcagaagag cgtgaataat 540
gacatgatcg tgaccgataa caatggcgcc gtgaaatttc cccagctgtg caaattctgc 600
gatgtgaggt tttccacctg cgacaaccag aagtccctgta tgagcaactg ctccatcacc 660
tccatctgtg agaagcctca ggagggtgtg gtggctgtct ggcggaagaa tgacgagaat 720
atcacccctgg aaaccgtctg ccacgatccc aagctgcctt accacgattt catcctggaa 780
gacgccgcca gccctaagt catcatgaaa gagaaaaaga agcctggcga gacctttttc 840
atgtgctcct gcagcagcga cgaatgcaac gacaatatca tcttttagcga ggaatacaat 900
accagcaacc ccgacagcgg cacaaccaac acagtcgctg cctataacct cacttggag 960
agcaccaact tcaaaacccat cctcgaatgg gaacccaaac ccgttaacca agtttacacc 1020
gtgcagatca gcaccaagtc cggcgactgg aagtccaaat gtttctatac caccgacacc 1080
gagtgcgata tcaccgatga gatcgtgaaa gatgtgaaac agacctacct cgcccgggtg 1140
tttagctacc ccgccggcaa tgtggagagc actggttccg ctggcgagcc tttatacgag 1200
aacagccccg aattttacccc ttacctcgag accaatttag gacagcccac catccaaagc 1260
tttgagcaag ttggcacaaa ggtgaatgtg acagtggagg acgagcggac tttagtgcgg 1320
cggaacaaca cttttctcag cctccgggat gtgttcggca aagatttaat ctacacactg 1380
tattactgga agtcctcttc ctccggcaag aagacagcta aaaccaacac aaacgagttt 1440
ttaatcgacg tggataaagg cgaaaactac tgtttcagcg tgcaagctgt gatccctcc 1500
cggaccgtga ataggaaaag caccgatagc cccgttgagt gcatgggcca agaaaagggc 1560
gagttccggg agaactgggt gaacgtcatc agcgatttaa agaagatcga agatttaatt 1620
cagtccatgc atatcgacgc cactttatac acagaatccg acgtgcaccc ctcttgtaag 1680
gtgaccgcca tgaaatgttt tttactggag ctgcaagtta tctctttaga gagcggagac 1740
gctagcatcc acgacaccgt ggagaattta atcattttag ccaataactc tttatccagc 1800
aacggcaacg tgacagagtc cggctgcaag gagtgcgaag agctggagga gaagaacatc 1860
aaggagtttc tgcaatcctt tgtgcacatt gtccagatgt tcatcaatac ctcc 1914

```

<210> 115

<211> 352

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 115

Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr

1

5

10

15

Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp

	20						25						30				
Val	Arg	Phe	Ser	Thr	Cys	Asp	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Met	Ser	Asn	Cys		
	35						40						45				
Ser	Ile	Thr	Ser	Ile	Cys	Glu	Lys	Pro	Gln	Glu	Val	Cys	Val	Ala	Val		
	50						55						60				
Trp	Arg	Lys	Asn	Asp	Glu	Asn	Ile	Thr	Leu	Glu	Thr	Val	Cys	His	Asp		
65						70				75					80		
Pro	Lys	Leu	Pro	Tyr	His	Asp	Phe	Ile	Leu	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Pro		
				85				90						95			
Lys	Cys	Ile	Met	Lys	Glu	Lys	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Phe	Phe	Met		
	100						105						110				
Cys	Ser	Cys	Ser	Ser	Asp	Glu	Cys	Asn	Asp	Asn	Ile	Ile	Phe	Ser	Glu		
	115						120						125				
Glu	Tyr	Asn	Thr	Ser	Asn	Pro	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly		
	130						135						140				
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ile	Pro	Pro	His	Val	Gln	Lys	Ser	Val		
145						150				155					160		
Asn	Asn	Asp	Met	Ile	Val	Thr	Asp	Asn	Asn	Gly	Ala	Val	Lys	Phe	Pro		
				165				170						175			
Gln	Leu	Cys	Lys	Phe	Cys	Asp	Val	Arg	Phe	Ser	Thr	Cys	Asp	Asn	Gln		
	180						185						190				
Lys	Ser	Cys	Met	Ser	Asn	Cys	Ser	Ile	Thr	Ser	Ile	Cys	Glu	Lys	Pro		
	195						200						205				
Gln	Glu	Val	Cys	Val	Ala	Val	Trp	Arg	Lys	Asn	Asp	Glu	Asn	Ile	Thr		
	210						215						220				
Leu	Glu	Thr	Val	Cys	His	Asp	Pro	Lys	Leu	Pro	Tyr	His	Asp	Phe	Ile		
225						230				235					240		
Leu	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Pro	Lys	Cys	Ile	Met	Lys	Glu	Lys	Lys	Lys		
				245				250						255			
Pro	Gly	Glu	Thr	Phe	Phe	Met	Cys	Ser	Cys	Ser	Ser	Asp	Glu	Cys	Asn		
	260						265						270				
Asp	Asn	Ile	Ile	Phe	Ser	Glu	Glu	Tyr	Asn	Thr	Ser	Asn	Pro	Asp	Ile		
	275						280						285				
Thr	Cys	Pro	Pro	Pro	Met	Ser	Val	Glu	His	Ala	Asp	Ile	Trp	Val	Lys		
	290						295						300				
Ser	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Ser	Arg	Glu	Arg	Tyr	Ile	Cys	Asn	Ser	Gly	Phe		
305						310				315					320		
Lys	Arg	Lys	Ala	Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Cys	Val	Leu	Asn	Lys		
				325				330						335			

Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg

340

345

350

<210> 116

<211> 1056

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 116

atcccccccc	atgtgcaaaa	gagcgtgaac	aacgatatga	tcgtgaccga	caacaacggc	60
gccgtgaagt	ttccccagct	ctgcaagtgc	tgcatgtgca	ggttcagcac	ctgcgataat	120
cagaagtcct	gcatgtccaa	ctgcagcatc	acctccatct	gcgagaagcc	ccaagaagtg	180
tgcgtggccg	tgtggcggaa	aaatgacgag	aacatcaccc	tgagagaccg	gtgtcacgac	240
cccaagctcc	cttatcacga	cttcattctg	gaggacgctg	cctcccccaa	atgcatcatg	300
aaggagaaga	agaagcccgg	agagaccttc	tttatgtgtt	cctgtagcag	cgacgagtgt	360
aacgacaaca	tcattcttcag	cgaagagtac	aacaccagca	accctgatgg	aggtggcggg	420
tccggaggtg	gaggttctgg	tgagagtggt	agtattcctc	cccacgtgca	gaagagcgtg	480
aataatgaca	tgatcgtgac	cgataacaat	ggcgccgtga	aatttcccca	gctgtgcaaa	540
ttctgcgatg	tgaggttttc	cacctgcgac	aaccagaagt	cctgtatgag	caactgctcc	600
atcacctcca	tctgtgagaa	gcctcaggag	gtgtgcgtgg	ctgtctggcg	gaagaatgac	660
gagaatatca	ccctggaaac	cgtctgccac	gatcccaagc	tgccctacca	cgatttcac	720
ctggaagacg	ccgccagccc	taagtgcac	atgaaagaga	aaaagaagcc	tggcgagacc	780
tttttcatgt	gctcctgcag	cagcgacgaa	tgcaacgaca	atatcatctt	tagcgaggaa	840
tacaatacca	gcaaccccga	cattacatgc	ccccctccca	tgagcgtgga	gcacgccgac	900
atctgggtga	agagctatag	cctctacagc	cgggagaggt	atatctgtaa	cagcggcttc	960
aagaggaagg	ccggcaccag	cagcctcacc	gagtgcgtgc	tgaataaggc	taccaacgtg	1020
gctcactgga	caacaccctc	tttaaagtgc	atccgg			1056

<210> 117

<211> 370

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 117

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1	5	10	15
Tyr Ser Ile Pro	Pro His Val Gln Lys	Ser Val Asn Asn	Asp Met Ile
20	25	30	
Val Thr Asp Asn	Asn Gly Ala Val Lys Phe	Pro Gln Leu Cys	Lys Phe
35	40	45	
Cys Asp Val Arg	Phe Ser Thr Cys Asp	Asn Gln Lys Ser	Cys Met Ser
50	55	60	
Asn Cys Ser Ile	Thr Ser Ile Cys Glu Lys	Pro Gln Glu Val	Cys Val
65	70	75	80
Ala Val Trp Arg	Lys Asn Asp Glu Asn	Ile Thr Leu Glu	Thr Val Cys
85	90	95	
His Asp Pro Lys	Leu Pro Tyr His Asp	Phe Ile Leu Glu	Asp Ala Ala
100	105	110	
Ser Pro Lys Cys	Ile Met Lys Glu Lys	Lys Lys Pro Gly	Glu Thr Phe
115	120	125	
Phe Met Cys Ser	Cys Ser Ser Asp Glu	Cys Asn Asp Asn	Ile Ile Phe
130	135	140	
Ser Glu Glu Tyr	Asn Thr Ser Asn Pro	Asp Gly Gly Gly	Gly Ser Gly
145	150	155	160
Gly Gly Gly Ser	Gly Gly Gly Ser	Ile Pro Pro His	Val Gln Lys
165	170	175	
Ser Val Asn Asn	Asp Met Ile Val Thr	Asp Asn Asn Gly	Ala Val Lys
180	185	190	
Phe Pro Gln Leu	Cys Lys Phe Cys Asp	Val Arg Phe Ser	Thr Cys Asp
195	200	205	
Asn Gln Lys Ser	Cys Met Ser Asn Cys	Ser Ile Thr Ser	Ile Cys Glu
210	215	220	
Lys Pro Gln Glu	Val Cys Val Ala Val	Trp Arg Lys Asn	Asp Glu Asn
225	230	235	240
Ile Thr Leu Glu	Thr Val Cys His Asp	Pro Lys Leu Pro	Tyr His Asp
245	250	255	
Phe Ile Leu Glu	Asp Ala Ala Ser	Pro Lys Cys Ile	Met Lys Glu Lys
260	265	270	
Lys Lys Pro Gly	Glu Thr Phe Phe	Met Cys Ser Cys	Ser Ser Asp Glu
275	280	285	
Cys Asn Asp Asn	Ile Ile Phe Ser	Glu Glu Tyr Asn	Thr Ser Asn Pro
290	295	300	
Asp Ile Thr Cys	Pro Pro Pro Met	Ser Val Glu His	Ala Asp Ile Trp
305	310	315	320

Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser
 325 330 335
 Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu
 340 345 350
 Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
 355 360 365
 Ile Arg
 370

<210> 118

<211> 1110

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"

<400> 118

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttcctgttct ccagcgccta ctccatcccc	60
ccccatgtgc aaaagagcgt gaacaacgat atgatcgtga cgcacaacaa cggcgccgtg	120
aagtttcccc agctctgcaa gttctgcgat gtcaggttca gcacctgcga taatcagaag	180
tcttgcattgt ccaactgcag catcacctcc atctgcgaga agccccaaga agtgtgcgtg	240
gccgtgtggc ggaaaaatga cgagaacatc accctggaga cctgtgtgtca cgaccccaag	300
ctcccttatac acgacttcat tctggaggac gctgcctccc ccaaattgat catgaaggag	360
aagaagaagc ccggagagac cttctttatg tgttctgtga gcagcgacga gtgtaacgac	420
aacatcatctt tcagcgaaga gtacaacacc agcaaccctg atggaggtgg cggatccgga	480
ggtggaggtt ctggtggagg tgggagtatt cctccccacg tgcagaagag cgtgaataat	540
gacatgatcg tgaccgataa caatggcgcc gtgaaatttc ccagctgtg caaattctgc	600
gatgtgaggt tttccacctg cgacaaccag aagtctgtga tgagcaactg ctccatcacc	660
tccatctgtg agaagcctca ggaggtgtgc gtggctgtct ggcggaagaa tgacgagaat	720
atcaccctgg aaaccgtctg ccacgatccc aagctgcctt accacgattt catcctggaa	780
gacgccgcca gccctaagtg catcatgaaa gagaaaaaga agcctggcga gacctttttc	840
atgtgctcct gcagcagcga cgaatgcaac gacaatatca tcttttagcga ggaatacaat	900
accagcaacc ccgacattac atgccccctt cccatgagcg tggagcacgc cgacatctgg	960
gtgaagagct atagcctcta cagccgggag aggtatatct gtaacagcgg cttcaagagg	1020
aaggccggca ccagcagcct caccgagtgc gtgctgaata aggctaccaa cgtggctcac	1080
tggacaacac cctctttaa gtgcatccgg	1110

<210> 119

<211> 241

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 119

Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met
			20					25					30		
Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr
		35					40					45			
Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	His	Phe	Arg	Gly	Ser
		50				55					60				
Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Met	Glu	Ala	Glu
65					70				75					80	
Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr
				85					90					95	
Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Asn	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
			100					105						110	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln
			115					120					125		
Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys
			130				135					140			
Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys
145					150				155					160	
Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser
				165					170					175	
Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu
			180					185					190		
Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu
			195					200					205		
Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp
			210					215					220		
His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser
225					230					235				240	
Ser															

<210> 120

<211> 723

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 120

```

cagatcgtgc tgacccaaag ccccgccatc atgagcgcta gccccggtga gaaggtgacc      60
atgacatgct ccgcttccag ctccgtgtcc tacatgaact ggtatcagca gaaaagcgga      120
accagcccca aaaggtggat ctacgacacc agcaagctgg cctccggagt gcccgtcat      180
ttccgggggt ctggatccgg caccagctac tctttaacca tttccggcat ggaagctgaa      240
gacgctgcca cctactattg ccagcaatgg agcagcaacc cttcacatt cggatctggc      300
accaagctcg aaatcaatcg tggaggaggt ggcagcggcg gcggtggatc cggcggagga      360
ggaagccaag ttcaactcca gcagagcggc gctgaactgg cccggccccg cgcctccgtc      420
aagatgagct gcaaggcttc cggctataca tttactcggt acacaatgca ttgggtcaag      480
cagaggcccc gtcaaggttt agagtggatc ggatatatca acccttcccg gggctacacc      540
aactataacc aaaagttaa ggataaagcc actttaacca ctgacaagag ctctccacc      600
gcctacatgc agctgtcctc tttaccagc gaggactccg ctgtttacta ctgcgctagg      660
tattacgacg accactactg tttagactat tggggacaag gtaccacttt aaccgtcagc      720
agc                                          723

```

<210> 121

<211> 236

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 121

```

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
1           5           10           15
Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val
          20          25          30
Ile Gln Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
          35          40          45
Ser Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Tyr Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
          50          55          60
Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala Tyr Met
65           70           75           80

```

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

<210> 122

<211> 708

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 122

gtccagctgc agcagagcgg acccgaactc gtgaaaccg gtgcttcctg gaaaatgtct	60
tgtaggcca gcggatacac cttcacctcc tatgtgatcc agtgggtcaa acagaagccc	120
ggacaaggtc tcgagtggat cggcagcatc aacccttaca acgactatac caaatacaac	180
gagaagtitta agggaaaggc tactttaacc tccgacaaaa gctccatcac agcctacatg	240
gagttcagct ctttaacatc cgaggacagc gctctgtact attgcgcccc gtggggcgac	300
ggcaattact ggggacgggg cacaacactg accgtgagca gcggaggcgg aggctccggc	360
ggaggcggat ctggcggtgg cggtccgac atcgagatga cccagtcgcc cgctatcatg	420
tccgcctctt taggcgagcg ggtcacaatg acttgtagc cctcctccag cgtctcctcc	480
tcctacttcc attggtacca acagaaacc ggaagctccc ctaaactgtg catctacagc	540
accagcaatc tcgccagcgg cgtgccccct aggttttccg gaagcggaag caccagctac	600

tctttaacca tctcctccat ggaggctgag gatgccgcca cctacttttg tcaccagtac 660
caccgggtccc ccaccttcgg aggcggcacc aaactggaga caaagagg 708
<210> 123
<211> 696
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 123
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln
115 120 125
Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys
130 135 140
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys
145 150 155 160
Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser
165 170 175
Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu
180 185 190
Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu
195 200 205
Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp
210 215 220

His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser
225					230					235					240
Ser	Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Thr	Val	Ala	Ala	Tyr	Asn	Leu	Thr	Trp	Lys
				245					250						255
Ser	Thr	Asn	Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Glu	Trp	Glu	Pro	Lys	Pro	Val	Asn
				260					265						270
Gln	Val	Tyr	Thr	Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Lys	Ser	Gly	Asp	Trp	Lys	Ser
				275					280						285
Lys	Cys	Phe	Tyr	Thr	Thr	Asp	Thr	Glu	Cys	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	Ile
				290					295						300
Val	Lys	Asp	Val	Lys	Gln	Thr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Tyr	Pro
305						310				315					320
Ala	Gly	Asn	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Leu	Tyr	Glu
						325				330					335
Asn	Ser	Pro	Glu	Phe	Thr	Pro	Tyr	Leu	Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Gln	Pro
				340					345						350
Thr	Ile	Gln	Ser	Phe	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Lys	Val	Asn	Val	Thr	Val
				355					360						365
Glu	Asp	Glu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Leu
				370					375						380
Arg	Asp	Val	Phe	Gly	Lys	Asp	Leu	Ile	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Lys
385						390				395					400
Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Lys	Lys	Thr	Ala	Lys	Thr	Asn	Thr	Asn	Glu	Phe
				405					410						415
Leu	Ile	Asp	Val	Asp	Lys	Gly	Glu	Asn	Tyr	Cys	Phe	Ser	Val	Gln	Ala
				420					425						430
Val	Ile	Pro	Ser	Arg	Thr	Val	Asn	Arg	Lys	Ser	Thr	Asp	Ser	Pro	Val
				435					440						445
Glu	Cys	Met	Gly	Gln	Glu	Lys	Gly	Glu	Phe	Arg	Glu	Val	Gln	Leu	Gln
				450					455						460
Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser
465						470				475					480
Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Val	Ile	Gln	Trp	Val
				485					490						495
Lys	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Ser	Ile	Asn	Pro
				500					505						510
Tyr	Asn	Asp	Tyr	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr
				515					520						525
Leu	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Ile	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Phe	Ser	Ser

530	535	540
Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Asp		
545	550	555
Gly Asn Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly		560
	565	570
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu		575
	580	585
Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val		590
	595	600
Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Phe His		605
	610	620
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Cys Ile Tyr Ser		
625	630	635
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly		640
	645	650
Ser Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala		655
	660	670
Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro Thr Phe Gly Gly		
	675	680
Gly Thr Lys Leu Glu Thr Lys Arg		685
	690	695

<210> 124

<211> 2088

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 124

cagatcgtgc tgacccaaag ccccgccatc atgagcgcta gccccggtga gaaggtgacc	60
atgacatgct ccgcttccag ctccgtgtcc tacatgaact ggtatcagca gaaaagcgga	120
accagcccca aaaggtggat ctacgacacc agcaagctgg cctccggagt gcccgtcat	180
ttccggggct ctggatccgg caccagctac tctttaacca tttccggcat ggaagctgaa	240
gacgctgcca cctactattg ccagcaatgg agcagcaacc ccttcacatt cggatctggc	300
accaagctcg aaatcaatcg tggaggaggt ggcagcggcg gcggtggatc cggcggagga	360
ggaagccaag ttcaactcca gcagagcggc gctgaactgg cccggccccg cgcctccgtc	420
aagatgagct gcaaggcttc cggctataca ttactcgtt acacaatgca ttgggtcaag	480
cagaggcccc gtcaaggttt agagtggatc ggatatatca acccttcccc gggctacacc	540

```

aactataacc aaaagttcaa ggataaagcc actttaacca ctgacaagag ctcctccacc      600
gcctacatgc agctgtcctc ttttaaccagc gaggactccg ctgtttacta ctgcgctagg      660
tattacgacg accactactg ttttagactat tggggacaag gtaccacttt aaccgtcagc      720
agctccggca ccaccaatac cgtggccgct tataacctca catggaagag caccaacttc      780
aagacaattc tggaatggga acccaagccc gtcaatcaag tttacaccgt gcagatctcc      840
accaaatccg gagactggaa gagcaagtgc ttctacacaa cagacaccga gtgtgattta      900
accgacgaaa tcgtcaagga cgtcaagcaa acctatctgg ctcggtcttt ttcctacccc      960
gctggcaatg tcgagtccac cggctccgct ggcgagcctc tctacgagaa ttccccgaa     1020
ttcacccctt atttagagac caatttaggc cagcctacca tccagagctt cgagcaagtt     1080
ggcaccaagg tgaacgtcac cgtcaggatg gaaaggactt tagtgcggcg gaataacaca     1140
tttttatccc tccgggatgt gttcggcaaa gacctcatct acacactgta ctattggaag     1200
tccagctcct ccggcaaaaa gaccgctaag accaacacca acgagttttt aattgacgtg     1260
gacaaaggcg agaactactg cttcagcgtg caagccgtga tcccttctcg taccgtcaac     1320
cggaagagca cagattcccc cgttgagtgc atgggccaaag aaaagggcga gttccgggag     1380
gtccagctgc agcagagcgg acccgaactc gtgaaaccgg gtgcttccgt gaaaatgtct     1440
tgtaaggcca gcggatacac cttcacctcc tatgtgatcc agtgggtcaa acagaagccc     1500
ggacaaggtc tcgagtggat cggcagcatc aacccttaca acgactatac caataacaac     1560
gagaagttta agggaaaggc tactttaacc tccgacaaaa gctccatcac agcctacatg     1620
gagttcagct ctttaacatc cgaggacagc gctctgtact attgcgcccg gtggggcgac     1680
ggcaattact ggggacgggg cacaacactg accgtgagca gcggaggcgg aggctccggc     1740
ggaggcggat ctggcgggtg cggctccgac atcgagatga cccagtcccc cgctatcatg     1800
tccgcctctt taggcgagcg ggtcacaatg acttgtacag cctcctccag cgtctcctcc     1860
tcctacttcc attggtacca acagaaaccc ggaagctccc ctaaactgtg catctacagc     1920
accagcaatc tcgccagcgg cgtgccccct aggttttccg gaagcggag caccagctac     1980
tctttaacca tctcctccat ggaggctgag gatgccgcca cctacttttg tcaccagtac     2040
caccggtccc ccaccttcgg aggcggcacc aaactggaga caaagagg                        2088

```

<210> 125

<211> 714

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 125

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser

20 25 30

Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser		
35					40					45							
Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp		
50					55					60							
Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	His	Phe	Arg		
65					70					75					80		
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Met	Glu		
85					90					95							
Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro		
100					105					110							
Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Asn	Arg	Gly	Gly	Gly		
115					120					125							
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu		
130					135					140							
Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met		
145					150					155						160	
Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp		
165					170					175							
Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn		
180					185					190							
Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala		
195					200					205							
Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser		
210					215					220							
Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr		
225					230					235						240	
Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr		
245					250					255							
Val	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Thr	Val	Ala	Ala	Tyr	Asn	Leu	Thr		
260					265					270							
Trp	Lys	Ser	Thr	Asn	Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Glu	Trp	Glu	Pro	Lys	Pro		
275					280					285							
Val	Asn	Gln	Val	Tyr	Thr	Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Lys	Ser	Gly	Asp	Trp		
290					295					300							
Lys	Ser	Lys	Cys	Phe	Tyr	Thr	Thr	Asp	Thr	Glu	Cys	Asp	Leu	Thr	Asp		
305					310					315						320	
Glu	Ile	Val	Lys	Asp	Val	Lys	Gln	Thr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Ser		
325					330					335							
Tyr	Pro	Ala	Gly	Asn	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Leu		

340	345	350
Tyr Glu Asn Ser Pro Glu Phe Thr	Pro Tyr Leu Glu Thr	Asn Leu Gly
355	360	365
Gln Pro Thr Ile Gln Ser Phe Glu	Gln Val Gly Thr	Lys Val Asn Val
370	375	380
Thr Val Glu Asp Glu Arg Thr Leu	Val Arg Arg Asn Asn Thr	Phe Leu
385	390	395
Ser Leu Arg Asp Val Phe Gly Lys	Asp Leu Ile Tyr Thr	Leu Tyr Tyr
405	410	415
Trp Lys Ser Ser Ser Ser Gly Lys	Lys Thr Ala Lys Thr	Asn Thr Asn
420	425	430
Glu Phe Leu Ile Asp Val Asp Lys	Gly Glu Asn Tyr Cys	Phe Ser Val
435	440	445
Gln Ala Val Ile Pro Ser Arg Thr	Val Asn Arg Lys Ser	Thr Asp Ser
450	455	460
Pro Val Glu Cys Met Gly Gln Glu	Lys Gly Glu Phe Arg	Glu Val Gln
465	470	475
Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu	Val Lys Pro Gly Ala	Ser Val Lys
485	490	495
Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr	Thr Phe Thr Ser Tyr	Val Ile Gln
500	505	510
Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln	Gly Leu Glu Trp Ile	Gly Ser Ile
515	520	525
Asn Pro Tyr Asn Asp Tyr Thr Lys	Tyr Asn Glu Lys Phe	Lys Gly Lys
530	535	540
Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser	Ser Ile Thr Ala Tyr	Met Glu Phe
545	550	555
Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser	Ala Leu Tyr Tyr Cys	Ala Arg Trp
565	570	575
Gly Asp Gly Asn Tyr Trp Gly Arg	Gly Thr Thr Leu Thr	Val Ser Ser
580	585	590
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	Gly Ser Gly Gly Gly	Ser Asp
595	600	605
Ile Glu Met Thr Gln Ser Pro Ala	Ile Met Ser Ala Ser	Leu Gly Glu
610	615	620
Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala	Ser Ser Ser Val Ser	Ser Ser Tyr
625	630	635
Phe His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	Gly Ser Ser Pro Lys	Leu Cys Ile
645	650	655

Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 660 665 670
 Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 675 680 685
 Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro Thr Phe
 690 695 700
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Thr Lys Arg
 705 710

<210> 126

<211> 2142

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"

<400> 126

atgaagtggg tgaccttcat cagcttatta tttttattca gctccgccta ttcccagatc	60
gtgctgaccc aaagccccgc catcatgagc gctagccccg gtgagaaggt gaccatgaca	120
tgctccgctt ccagctccgt gtcctacatg aactggatc agcagaaaag cggaaccagc	180
cccaaaaggt ggatctacga caccagcaag ctggcctccg gagtgccgcg tcatttccgg	240
ggctctggat ccggcaccag ctactcttta accatttccg gcatggaagc tgaagacgt	300
gccacctact attgccagca atggagcagc aacccttca cattcggatc tggcaccaag	360
ctcgaaatca atcgtggagg aggtggcagc ggcggcggtg gatccggcgg aggaggaagc	420
caagttcaac tccagcagag cggcgctgaa ctggccccgc cggcgccctc cgtcaagatg	480
agctgcaagg cttccggcta tacatttact cgttacacaa tgcatgggt caagcagagg	540
cccggtaag gtttagagt gatcggatat atcaaccctt cccggggcta caccaactat	600
aaccaaaagt tcaaggataa agccacttta accactgaca agagctcctc caccgcctac	660
atgcagctgt cctctttaac cagcgaggac tccgctgttt actactgcgc taggtattac	720
gacgaccact actgtttaga ctattgggga caaggtacca ctttaaccgt cagcagctcc	780
ggcaccacca ataccgtggc cgcttataac ctcacatgga agagcaccaa cttcaagaca	840
attctggaat gggaacccaa gcccgtcaat caagtttaca ccgtgcagat ctccaccaa	900
tccggagact ggaagagcaa gtgcttctac acaacagaca ccgagtgtga tttaaccgac	960
gaaatcgtca aggacgtcaa gcaaacctat ctggctcggg tcttttctta cccgctggc	1020
aatgtcgagt ccaccggctc cgctggcgag cctctctacg agaattcccc cgaattcacc	1080
ccttatattag agaccaattht agccagcct accatccaga gcttcgagca agttggcacc	1140
aaggtgaacg tcaccgtcga ggatgaaagg acttttagtgc ggcggaataa cacattttta	1200
tcctccggg atgtgttcgg caaagacctc atctacacac tgtactattg gaagtccagc	1260
tcctccggca aaaagaccgc taagaccaac accaacgagt ttttaattga cgtggacaaa	1320

```

ggcgagaact actgcttcag cgtgcaagcc gtgatccctt ctcgtaccgt caaccggaag 1380
agcacagatt cccccgttga gtgcatgggc caagaaaagg gcgagttccg ggaggtccag 1440
ctgcagcaga gcggacccga actcgtgaaa cccggtgctt cctgaaaaat gtcttgtaag 1500
gccagcggat acaccttcac ctcctatgtg atccagtggg tcaaacagaa gcccggacaa 1560
ggtctcagat ggatcggcag catcaaccct tacaacgact ataccaaata caacgagaag 1620
tttaagggaaggctacttt aacctccgac aaaagctcca tcacagccta catggagttc 1680
agctcttttaa catccgagga cagcgtcttg tactattgcg cccggtgggg cgacggcaat 1740
tactggggac ggggcacaac actgaccgtg agcagcggag gcggaggctc cggcggaggc 1800
ggatctggcg gtggcggctc cgacatcgag atgaccagat ccccgctat catgtccgcc 1860
tcttttaggcg agcgggtcac aatgacttgt acagctcct ccagcgtctc ctctcctac 1920
ttccatttgt accaacagaa acccggaagc tcccctaaac tgtgcatcta cagcaccagc 1980
aatctcgcca gcggcgtgcc ccctaggttt tccggaagcg gaagcaccag ctactcttta 2040
accatctcct ccatggaggc tgaggatgcc gccacctact tttgtcacca gtaccaccgg 2100
tccccacct tcggaggcgg caccaaactg gagacaaaga gg 2142

```

<210> 127

<211> 399

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 127

```

gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
acatttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttacttta 240
agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
acaacattca tgttgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
tggattacct tttgtcaaag catcatctca acactaact 399

```

<210> 128

<211> 399

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 128

```

gccccacct cctcctccac caagaagacc cagctgcage tggagcattt actgctggat 60
ttacagatga ttttaaaccg catcaacaac tacaagaacc ccaagctgac tcgtatgctg 120
accttcaagt tctacatgcc caagaaggcc accgagctga agcatttaca gtgttttagag 180
gaggagctga agccccctga ggaggtgctg aatttagccc agtccaagaa tttccattta 240
aggccccggg atttaatcag caacatcaac gtgatcgttt tagagctgaa gggctccgag 300
accaccttca tgtgcgagta cgccgacgag accgccacca tcgtggagtt tttaaatcgt 360
tggatcacct tctgccagtc catcatctcc actttaacc 399

```

<210> 129

<211> 485

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 129

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
			20					25					30		
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys
		35					40					45			
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys
		50				55					60				
Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu
65				70					75					80	
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu
			85					90					95		
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
			100					105					110		
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile
		115					120					125			
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Thr	Val	Ala	Ala	Tyr	Asn
		130				135					140				
Leu	Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	Asn	Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Glu	Trp	Glu	Pro
145				150					155					160	
Lys	Pro	Val	Asn	Gln	Val	Tyr	Thr	Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Lys	Ser	Gly
			165					170					175		
Asp	Trp	Lys	Ser	Lys	Cys	Phe	Tyr	Thr	Thr	Asp	Thr	Glu	Cys	Asp	Leu
		180						185				190			
Thr	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Asp	Val	Lys	Gln	Thr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Val
		195				200						205			
Phe	Ser	Tyr	Pro	Ala	Gly	Asn	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu
		210				215					220				
Pro	Leu	Tyr	Glu	Asn	Ser	Pro	Glu	Phe	Thr	Pro	Tyr	Leu	Glu	Thr	Asn
225				230					235					240	
Leu	Gly	Gln	Pro	Thr	Ile	Gln	Ser	Phe	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Lys	Val

245	250	255
Asn Val Thr Val Glu Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr		
260	265	270
Phe Leu Ser Leu Arg Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu		
275	280	285
Tyr Tyr Trp Lys Ser Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn		
290	295	300
Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe		
305	310	315
Ser Val Gln Ala Val Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr		
325	330	335
Asp Ser Pro Val Glu Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu		
340	345	350
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
355	360	365
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys		
370	375	380
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys		
385	390	395
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys		
405	410	415
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu		
420	425	430
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
435	440	445
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala		
450	455	460
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile		
465	470	475
Ile Ser Thr Leu Thr		480
485		

<210> 130

<211> 1455

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 130

```

gccccacact cctcctccac caagaagacc cagctgcagc tggagcattt actgctggat      60
ttacagatga ttttaaacgg catcaacaac tacaagaacc ccaagctgac tcgtatgctg      120
accttcaagt tctacatgcc caagaaggcc accgagctga agcatttaca gtgttttagag      180
gaggagctga agccccctga ggaggtgctg aatttagccc agtccaagaa tttccattta      240
aggccccggg atttaatcag caacatcaac gtgatcgttt tagagctgaa gggctccgag      300
accaccttca tgtgcgagta cgccgacgag accgccacca tcgtggagtt tttaaatcgt      360
tggatcacct tctgccagtc catcatctcc actttaacca gcggcacaac caacacagtc      420
gctgcctata acctcacttg gaagagcacc aacttcaaaa ccacctcga atgggaaccc      480
aaacccgtta accaagtta caccgtgcag atcagacca agtccggcga ctggaagtcc      540
aaatgtttct ataccaccga caccgagtgc gatctcaccg atgagatcgt gaaagatgtg      600
aaacagacct acctcgcccc ggtgttttagc taccgcccg gcaatgtgga gagcactggt      660
tccgtggcg agcctttata cgagaacagc cccgaattta ccccttacct cgagaccaat      720
ttaggacagc ccaccatcca aagctttgag caagttggca caaagtgaa tgtgacagtg      780
gaggacgagc ggactttagt gcggcggaac aacaccttct tcagcctccg ggatgtgttc      840
ggcaaagatt taatctacac actgtattac tggaagtcct cttcctccgg caagaagaca      900
gctaaaacca acacaaacga gtttttaatc gacgtggata aaggcgaaaa ctactgtttc      960
agcgtgcaag ctgtgatccc ctcccggacc gtgaatagga aaagcaccga tagccccgtt     1020
gagtgcattg gccaaagaaa gggcgagttc cgggaggcac ctacttcaag ttctacaaag     1080
aaaacacagc tacaactgga gcatttactg ctggatttac agatgatttt gaatggaatt     1140
aataattaca agaatcccaa actcaccagg atgctcatat ttaagtttta catgcccaag     1200
aaggccacag aactgaaaca tcttcagtgt ctagaagaag aactcaaacc tctggaggaa     1260
gtgctaaatt tagctcaaag caaaaacttt cacttaagac ccagggactt aatcagcaat     1320
atcaacgtaa tagttctgga actaaaggga tctgaaacaa cattcatgtg tgaatatgct     1380
gatgagacag caaccattgt agaatttctg aacagatgga ttaccttttg tcaaagcatc     1440
atctcaacac taact                                     1455

```

<210> 131

<211> 503

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 131

```

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1           5           10           15
Tyr Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu
                20           25           30

```

Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn		
35	40	45
Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met		
50	55	60
Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu		
65	70	75
Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe		
85	90	95
His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu		
100	105	110
Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu		
115	120	125
Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln		
130	135	140
Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala		
145	150	155
Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp		
165	170	175
Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys		
180	185	190
Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys		
195	200	205
Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala		
210	215	220
Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala		
225	230	235
Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu		
245	250	255
Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr		
260	265	270
Lys Val Asn Val Thr Val Glu Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn		
275	280	285
Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr		
290	295	300
Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys		
305	310	315
Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr		
325	330	335
Cys Phe Ser Val Gln Ala Val Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys		

340	345	350
Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe		
355	360	365
Arg Glu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu		
370	375	380
Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn		
385	390	395
Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met		
405	410	415
Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu		
420	425	430
Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe		
435	440	445
His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu		
450	455	460
Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu		
465	470	475
Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln		
485	490	495
Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr		
500		
<210> 132		
<211> 1509		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> source		
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"		
<400> 132		
atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgtttct ccagcgccta ctccgcccc	60	
acctcctcct ccaccaagaa gaccagctg cagctggagc atttactgct ggatttacag	120	
atgatttttaa acggcatcaa caactacaag aacccaagc tgactcgtat gctgaccttc	180	
aagttctaca tgccaagaa ggccaccgag ctgaagcatt tacagtgttt agaggaggag	240	
ctgaagcccc tcgaggaggt gctgaattta gccagtgcca agaatttcca tttaaggccc	300	
cgggatttaa tcagcaacat caacgtgatc gttttagagc tgaagggtc cgagaccacc	360	
ttcatgtgcg agtacgccga cgagaccgcc accatcgtgg agttttttaa tcgttgatc	420	
accttctgcc agtccatcat ctccacttta accagcgga caaccaacac agtcgctgcc	480	
tataacctca cttggaagag caccaacttc aaaaccatcc tcgaatggga acccaaacc	540	

```

gttaaccaag tttacaccgt gcagatcagc accaagtccg gcgactggaa gtccaaatgt      600
ttctatacca ccgacaccga gtgcgatctc accgatgaga tcgtgaaaga tgtgaaacag      660
acctacctcg cccgggtgtt tagctacccc gccggcaatg tggagagcac tggttccgct      720
ggcgagcctt tatacgagaa cagccccgaa tttaccctt acctcgagac caatttagga      780
cagcccacca tccaaagctt tgagcaagtt ggcacaaagg tgaatgtgac agtggaggac      840
gagcggactt tagtgcggcg gaacaacacc tttctcagcc tccgggatgt gttcggcaaa      900
gatttaatat acacactgta ttactggaag tcctcttctt ccggcaagaa gacagctaaa      960
accaacacaa acgagttttt aatcgacgtg gataaaggcg aaaactactg tttcagcgtg     1020
caagctgtga tccccctccg gaccgtgaat agggaaaagca ccgatagccc cgttgagtgc     1080
atgggccaaag aaaaggggcg gttccgggag gcacctactt caagttctac aaagaaaaca     1140
cagctacaac tggagcattt actgctggat ttacagatga ttttgaatgg aattaataat     1200
tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc     1260
acagaactga aacatcttca gtgtctagaa gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta     1320
aatntagctc aaagcaaaaa ctttacttta agaccaggg acttaatcag caatatcaac     1380
gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag     1440
acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga tggattacct tttgtcaaag catcatctca     1500
acactaact                                     1509

```

<210> 133

<211> 720

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 133

```

atgaagtggg tcacatttat ctctttactg ttctcttctt ccagcgccta cagctacttc      60
ggcaaactgg aatccaagct gagcgtgatc cggaatttaa acgaccaagt tctgtttatc     120
gatcaaggta accggcctct gttcgaggac atgaccgact ccgattgccg ggacaatgcc     180
ccccggacca tcttcattat ctccatgtac aaggacagcc agccccgggg catggctgtg     240
acaattagcg tgaagtgtga gaaaatcagc actttatctt gtgagaacaa gatcatctcc     300
tttaaggaaa tgaaccccc cgateacatc aaggacacca agtccgatat catcttcttc     360
cagcgggccg tgccccgtca cgataacaag atgcagttcg aatcctcttc ctacgagggc     420
tacttttttag cttgtgaaaa ggagagggat ttattcaagc tgatcctcaa gaaggaggac     480
gagctggggcg atcgttccat catgttcacc gtccaaaacg aggatattac atgccccctt     540
cccatgagcg tggagcacgc cgacatctgg gtgaagagct atagcctcta cagccgggag     600
aggtatatct gtaacagcgg cttcaagagg aaggccggca ccagcagcct caccgagtgc     660
gtgctgaata aggctaccaa cgtggctcac tggacaacac cctcttttaa gtgcatccgg     720

```

<210> 134

<211> 2607

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 134

atgaaatggg	tgacctttat	ttctttactg	ttcctcttta	gcagcgccta	ctccatttgg	60
gaactgaaga	aggacgtcta	cgtggtcgaa	ctggactggt	atcccgatgc	tcccggcgaa	120
atgggtggtgc	tcacttgtga	cacccccgaa	gaagacggca	tcacttggac	cctcgatcag	180
agcagcgagg	tgctgggctc	cggaaagacc	ctcacaatcc	aagttaagga	gttcggagac	240
gctggccaat	acacatgcca	caagggaggc	gaggtgctca	gccattcctt	attattatta	300
cacaagaagg	aagacggaat	ctggtccacc	gacattttta	aagatcagaa	ggagcccaag	360
aataagacct	ttttaaggtg	tgaggccaaa	aactacagcg	gtcgtttcac	ttgttggtgg	420
ctgaccacca	tttccaccga	tttaaccttc	tccgtgaaaa	gcagccgggg	aagctccgac	480
cctcaaggtg	tgacatgtgg	agccgctacc	ctcagcgctg	agagggttcg	tggcgataac	540
aaggaatacg	agtacagcgt	ggagtgccaa	gaagatagcg	cttgtcccgc	tgccgaagaa	600
tctttaccca	ttgaggtgat	ggtggacgcc	gtgcacaaac	tcaagtacga	gaactacacc	660
tcctccttct	ttatccggga	catcattaag	cccgatcctc	ctaagaattt	acagctgaag	720
cctctcaaaa	atagccggca	agttgaggtc	tcttggaat	atcccgacac	ttggagcaca	780
ccccacagct	acttctcttt	aaccttttgt	gtgcaagttc	aaggtaaaag	caagcgggag	840
aagaaagacc	gggtgtttac	cgacaaaacc	agcgccaccg	tcattctgtc	gaagaacgcc	900
tccatcagcg	tgagggtctc	agatcgttat	tactccagca	gctggtccga	gtgggccagc	960
gtgccttggt	ccggcggtgg	aggatccgga	ggaggtggct	ccggcgggcg	aggatctcgt	1020
aacctccccg	tggctacccc	cgatcccgga	atgttccctt	gtttacacca	cagccagaat	1080
ttactgaggg	ccgtgagcaa	catgctgcag	aaagctaggc	agactttaga	attttacctt	1140
tgcaccagcg	aggagatcga	ccatgaagat	atcaccaagg	acaagacatc	caccgtggag	1200
gcttgtttac	ctctggagct	gacaaagaac	gagtcttgct	tcaactctcg	tgaaccagc	1260
ttcatcacia	atggctcttg	tttagcttcc	cggaagacct	cctttatgat	ggctttatgc	1320
ctcagctcca	tctacgagga	tttaaagatg	taccaagtgg	agttcaagac	catgaacgcc	1380
aagctgctca	tggaccctaa	acggcagatc	tttttagacc	agaacatgct	ggctgtgatt	1440
gatgagctga	tgcaagcttt	aaacttcaac	tccgagaccg	tccttcagaa	gtcctccctc	1500
gaggagcccc	atttttacaa	gacaaagatc	aaactgtgca	ttttactcca	cgccttttag	1560
atccgggccc	tgaccattga	ccgggtcatg	agctatttta	acgccagcag	cggcacaacc	1620
aacacagtcg	ctgcctataa	cctcacttgg	aagagcacca	acttcaaaa	catcctcgaa	1680
tgggaaccca	aacccgttaa	ccaagtttac	accgtgcaga	tcagcaccaa	gtccggcgac	1740
tggaagtcca	aatgtttcta	taccaccgac	accgagtgcg	atctcaccga	tgagatcgtg	1800
aaagatgtga	aacagacct	cctcgccccg	gtgttttagct	accccgccgg	caatgtggag	1860

```

agcactgggtt ccgctggcga gcctttatac gagaacagcc ccgaatttac cccttacctc 1920
gagaccaatt taggacagcc caccatccaa agctttgagc aagttggcac aaaggtgaat 1980
gtgacagtgg aggacgagcg gacttttagtg cggcgggaaca acacctttct cagcctccgg 2040
gatgtgttcg gcaaagattt aatctacaca ctgtattact ggaagtcctc ttcctccggc 2100
aagaagacag ctaaaaccaa cacaacgag tttttaatcg acgtggataa aggcgaaaac 2160
tactgtttca gcgtgcaagc tgtgatcccc tcccggaccg tgaataggaa aagcaccgat 2220
agccccgttg agtgcattggg ccaagaaaag ggcgagtcc gggagaactg ggtgaacgtc 2280
atcagcgatt taaagaagat cgaagattta attcagtcca tgcatatcga cgccacttta 2340
tacacagaat ccgacgtgca cccctcttgt aaggtgaccg ccatgaaatg ttttttactg 2400
gagctgcaag ttatctcttt agagagcgga gacgctagca tccacgacac cgtggagaat 2460
ttaatcattt tagccaataa ctctttatcc agcaacggca acgtgacaga gtccggctgc 2520
aaggagtgcg aagagctgga ggagaagaac atcaaggagt ttctgcaatc ctttgtgcac 2580
attgtccaga tgttcatcaa tacctcc 2607

```

<210> 135

<211> 240

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 135

```

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1           5           10           15
Tyr Ser Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn
20          25          30
Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe
35          40          45
Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile
50          55          60
Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val
65          70          75          80
Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn
85          90          95
Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp
100         105         110
Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp
115         120         125
Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala

```


130	135	140
Cys Glu Lys Glu Arg Asp	Leu Phe Lys Leu Ile	Leu Lys Lys Glu Asp
145	150	155
Glu Leu Gly Asp Arg Ser	Ile Met Phe Thr Val	Gln Asn Glu Asp Ile
165	170	175
Thr Cys Pro Pro Pro Met	Ser Val Glu His Ala Asp	Ile Trp Val Lys
180	185	190
Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser	Arg Glu Arg Tyr Ile	Cys Asn Ser Gly Phe
195	200	205
Lys Arg Lys Ala Gly Thr	Ser Ser Leu Thr Glu	Cys Val Leu Asn Lys
210	215	220
Ala Thr Asn Val Ala His	Trp Thr Thr Pro Ser	Leu Lys Cys Ile Arg
225	230	235
240		
<210> 136		
<211> 869		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> source		
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"		
<400> 136		
Met Lys Trp Val Thr Phe	Ile Ser Leu Leu Phe	Leu Phe Ser Ser Ala
1	5	10
Tyr Ser Ile Trp Glu Leu	Lys Lys Asp Val Tyr	Val Val Glu Leu Asp
20	25	30
Trp Tyr Pro Asp Ala Pro	Gly Glu Met Val Val	Leu Thr Cys Asp Thr
35	40	45
Pro Glu Glu Asp Gly Ile	Thr Trp Thr Leu Asp	Gln Ser Ser Glu Val
50	55	60
Leu Gly Ser Gly Lys Thr	Leu Thr Ile Gln Val	Lys Glu Phe Gly Asp
65	70	75
Ala Gly Gln Tyr Thr Cys	His Lys Gly Gly Glu	Val Leu Ser His Ser
85	90	95
Leu Leu Leu Leu His Lys	Lys Glu Asp Gly Ile	Trp Ser Thr Asp Ile
100	105	110
Leu Lys Asp Gln Lys Glu	Pro Lys Asn Lys Thr	Phe Leu Arg Cys Glu
115	120	125
Ala Lys Asn Tyr Ser Gly	Arg Phe Thr Cys Trp	Trp Leu Thr Thr Ile

130	135	140
Ser Thr Asp Leu Thr Phe	Ser Val Lys Ser Ser	Arg Gly Ser Ser Asp
145	150	155
Pro Gln Gly Val Thr Cys	Gly Ala Ala Thr Leu	Ser Ala Glu Arg Val
165	170	175
Arg Gly Asp Asn Lys Glu	Tyr Glu Tyr Ser Val	Glu Cys Gln Glu Asp
180	185	190
Ser Ala Cys Pro Ala Ala	Glu Glu Ser Leu Pro	Ile Glu Val Met Val
195	200	205
Asp Ala Val His Lys Leu	Lys Tyr Glu Asn Tyr	Thr Ser Ser Phe Phe
210	215	220
Ile Arg Asp Ile Ile Lys	Pro Asp Pro Pro Lys	Asn Leu Gln Leu Lys
225	230	235
Pro Leu Lys Asn Ser Arg	Gln Val Glu Val Ser	Trp Glu Tyr Pro Asp
245	250	255
Thr Trp Ser Thr Pro His	Ser Tyr Phe Ser Leu	Thr Phe Cys Val Gln
260	265	270
Val Gln Gly Lys Ser Lys	Arg Glu Lys Lys Asp	Arg Val Phe Thr Asp
275	280	285
Lys Thr Ser Ala Thr Val	Ile Cys Arg Lys Asn	Ala Ser Ile Ser Val
290	295	300
Arg Ala Gln Asp Arg Tyr	Tyr Ser Ser Ser Trp	Ser Glu Trp Ala Ser
305	310	315
Val Pro Cys Ser Gly Gly	Gly Gly Ser Gly Gly	Gly Gly Ser Gly Gly
325	330	335
Gly Gly Ser Arg Asn Leu	Pro Val Ala Thr Pro	Asp Pro Gly Met Phe
340	345	350
Pro Cys Leu His His Ser	Gln Asn Leu Leu Arg	Ala Val Ser Asn Met
355	360	365
Leu Gln Lys Ala Arg Gln	Thr Leu Glu Phe Tyr	Pro Cys Thr Ser Glu
370	375	380
Glu Ile Asp His Glu Asp	Ile Thr Lys Asp Lys	Thr Ser Thr Val Glu
385	390	395
Ala Cys Leu Pro Leu Glu	Leu Thr Lys Asn Glu	Ser Cys Leu Asn Ser
405	410	415
Arg Glu Thr Ser Phe Ile	Thr Asn Gly Ser Cys	Leu Ala Ser Arg Lys
420	425	430
Thr Ser Phe Met Met Ala	Leu Cys Leu Ser Ser	Ile Tyr Glu Asp Leu
435	440	445

Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met			
450	455	460	
Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile			
465	470	475	480
Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln			
	485	490	495
Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu			
	500	505	510
Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg			
	515	520	525
Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala			
	530	535	540
Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu			
545	550	555	560
Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr			
	565	570	575
Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu			
	580	585	590
Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu			
	595	600	605
Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser			
	610	615	620
Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu			
625	630	635	640
Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly			
	645	650	655
Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg			
	660	665	670
Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile			
	675	680	685
Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala			
	690	695	700
Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn			
705	710	715	720
Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg			
	725	730	735
Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu			
	740	745	750
Phe Arg Glu Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu			

755	760	765
Asp Leu Ile Gln Ser Met His	Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser	
770	775	780
Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu		
785	790	795
Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp		
805	810	815
Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn		
820	825	830
Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu		
835	840	845
Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met		
850	855	860
Phe Ile Asn Thr Ser		

865

<210> 137

<211> 1509

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 137

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttcctgttct ccagcgccta ctccgattgc	60
gacatcgagg gcaaggacgg caagcagtac gagagcgtgc tgatggtgtc catcgaccag	120
ctgctggaca gcatgaagga gatcggtccc aactgcctca acaacgagtt caacttcttc	180
aagcggcaca tctgcgacgc caacaaggag ggcatgttcc tgttcagggc cgccaggaaa	240
ctgcggcagt tcctgaagat gaactccacc ggcgacttcg acctgcacct gctgaagggtg	300
tccgagggca ccaccatcct gctgaactgc accggacagg tgaagggccg gaaacctgct	360
gctctgggag aggcccaacc caccaagagc ctggaggaga acaagtcctt gaaggagcag	420
aagaagctga acgacctgtg cttcctgaag aggtctgtgc aggagatcaa gacctgctgg	480
aacaagatcc tgatgggcac caaggagcat agcggcacia ccaacacagt cgctgcctat	540
aacctcactt ggaagagcac caacttcaaa accatcctcg aatgggaacc caaacccgtt	600
aaccaagttt acaccgtgca gatcagcacc aagtccggcg actggaagtc caaatgtttc	660
tataaccacc acaccgagtg cgatctcacc gatgagatcg tgaaagatgt gaaacagacc	720
tacctgccc ggggtgttag ctaccccgcc ggcaatgtgg agagcactgg ttccgctggc	780
gagcctttat acgagaacag ccccggaattt accccttacc tcgagaccaa tttagacag	840
cccaccatcc aaagctttga gcaagttggc acaaagtgta atgtgacagt ggaggacgag	900

cggactttag	tgcggcggaa	caacaccttt	ctcagcctcc	gggatgtgtt	cggcaaagat	960
ttaatctaca	cactgtatta	ctggaagtcc	tcttcctccg	gcaagaagac	agctaaaacc	1020
aacacaaacg	agtttttaat	cgacgtggat	aaaggcgaaa	actactgttt	cagcgtgcaa	1080
gctgtgatcc	cctcccggac	cgtgaatagg	aaaagcaccg	atagccccgt	tgagtgcatt	1140
ggccaagaaa	agggcgagtt	ccgggagAAC	tgggtgaacg	tcatcagcga	tttaaagaag	1200
atcgaagatt	taattcagtc	catgcatatc	gacgccactt	tatacacaga	atccgacgtg	1260
cacccctctt	gtaaggtgac	cgccatgaaa	tgttttttac	tggagctgca	agttatctct	1320
ttagagagcg	gagacgctag	catccacgac	accgtggaga	atttaatcat	tttagccaat	1380
aactctttat	ccagcaacgg	caacgtgaca	gagtccggct	gcaaggagtg	cgaagagctg	1440
gaggagaaga	acatcaagga	gtttctgcaa	tcctttgtgc	acattgtcca	gatgttcatt	1500
aatacctcc						1509
<210>	138					
<211>	2142					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<221>	source					
<223>	/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"					
<400>	138					
atgaaatggg	tcaccttcat	ctctttactg	tttttattta	gcagcgccta	cagcgtgcag	60
ctgcagcagt	ccggacccga	actggtcaag	cccgggtgcct	ccgtgaaaat	gtcttgtaag	120
gcttctggct	acacctttac	ctcctacgtc	atccaatggg	tgaagcagaa	gcccgggtcaa	180
ggctctcgagt	ggatcggcag	catcaatccc	tacaacgatt	acaccaagta	taacgaaaag	240
tttaagggca	aggccactct	gacaagcgac	aagagctcca	ttaccgccta	catggagttt	300
tcctctttta	cttctgagga	ctccgcttta	tactattgcg	ctcgttgggg	cgatggcaat	360
tattggggcc	ggggaactac	tttaacagtg	agctccggcg	gcggcggaag	cggaggtgga	420
ggatctggcg	gtggaggcag	cgacatcgag	atgacacagt	cccccgctat	catgagcgcc	480
tctttaggag	aacgtgtgac	catgacttgt	acagcttcc	ccagcgtgag	cagctcctat	540
ttccactgg	accagcagaa	acccggctcc	tcccctaaac	tgtgtatcta	ctccacaagc	600
aatttagcta	gcggcgtgcc	tcctcgtttt	agcggctccg	gcagcacctc	ttactcttta	660
accattagct	ctatggaggc	cgaagatgcc	gccacatact	tttgccatca	gtaccaccgg	720
tcccctacct	ttggcggagg	cacaaagctg	gagaccaagc	ggagcggcac	caccaacaca	780
gtggccgcct	acaatctgac	ttggaaatcc	accaacttca	agaccatcct	cgagtgggag	840
cccaagcccc	ttaatcaagt	ttataccgtg	cagatttcca	ccaagagcgg	cgactggaaa	900
tccaagtgt	tctataccac	agacaccgag	tgcgatctca	ccgacgagat	cgtaaaagac	960
gtgaagcaga	catatttagc	taggggtgtt	tcctaccccg	ctggaaacgt	ggagagcacc	1020
ggatccgctg	gagagccttt	atacgagaac	tccccgaat	tcaccccta	tctggaaacc	1080
aatttaggcc	agcccacat	ccagagcttc	gaacaagttg	gcacaaaggt	gaacgtcacc	1140

```

gtcgaagatg agaggacttt agtgcggagg aacaatacat ttttatcctt acgtgacgtc 1200
ttcggcaagg atttaatcta cacactgtat tactggaagt ctagctcctc cggcaagaag 1260
accgccaaga ccaataccaa cgaattttta attgacgtgg acaagggcga gaactactgc 1320
ttctccgtgc aagctgtgat cccctcccgg acagtgaacc ggaagtccac cgactcccc 1380
gtggagtgca tgggccaaga gaagggagag tttcgtgagc agatcgtgct gaccagttcc 1440
cccgtatta tgagcgctag ccccggtgaa aaggtgacta tgacatgcag cgccagctct 1500
tccgtgagct acatgaactg gtatcagcag aagtccggca ccagccctaa aaggtggatc 1560
tacgacacca gcaagctggc cagcggcgtc cccgtcact ttcggggctc cggctccgga 1620
acaagctact ctctgaccat cagcggcatg gaagccgagg atgccgctac ctattactgt 1680
cagcagtgga gctccaaccc cttcaccttt ggatccggca ccaagctcga gattaatcgt 1740
ggaggcggag gtagcggagg aggcggatcc ggcggtggag gtagccaagt tcagctccag 1800
caaagcggcg ccgaactcgc tcggccccggc gcttccgtga agatgtcttg taaggcctcc 1860
ggctatacct tcacccggtg cacaatgcac tgggtcaagc aacggccccg tcaaggttta 1920
gagtggattg gctatatcaa cccctcccgg ggctatacca actacaacca gaagttcaag 1980
gacaaagcca ccctcaccac cgacaagtcc agcagaccg cttacatgca gctgagctct 2040
ttaacatccg aggattccgc cgtgtactac tgcgtcgggt actacgacga tcattactgc 2100
ctcgattact ggggccaagg taccacctta acagtctcct cc 2142

```

<210> 139

<211> 714

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 139

```

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1           5           10           15
Tyr Ser Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
20           25           30
Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
35           40           45
Tyr Val Ile Gln Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
50           55           60
Ile Gly Ser Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Tyr Thr Lys Tyr Asn Glu Lys
65           70           75           80
Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala
85           90           95
Tyr Met Glu Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr

```

			100				105				110					
Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Asp	Gly	Asn	Tyr	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Thr	Leu	
			115				120				125					
Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
			130				135				140					
Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	
145							150				155				160	
Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	
			165				170				175					
Ser	Ser	Ser	Tyr	Phe	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	
			180				185				190					
Lys	Leu	Cys	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Pro	
			195				200				205					
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	
210							215				220					
Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	His	Gln	Tyr	His	Arg	
225							230				235				240	
Ser	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Thr	Lys	Arg	Ser	Gly	
			245				250				255					
Thr	Thr	Asn	Thr	Val	Ala	Ala	Tyr	Asn	Leu	Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	Asn	
			260				265				270					
Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Glu	Trp	Glu	Pro	Lys	Pro	Val	Asn	Gln	Val	Tyr	
			275				280				285					
Thr	Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Lys	Ser	Gly	Asp	Trp	Lys	Ser	Lys	Cys	Phe	
290							295				300					
Tyr	Thr	Thr	Asp	Thr	Glu	Cys	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Asp	
305							310				315				320	
Val	Lys	Gln	Thr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ala	Gly	Asn	
			325				330				335					
Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Leu	Tyr	Glu	Asn	Ser	Pro	
			340				345				350					
Glu	Phe	Thr	Pro	Tyr	Leu	Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Gln	Pro	Thr	Ile	Gln	
			355				360				365					
Ser	Phe	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Lys	Val	Asn	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Glu	
370							375				380					
Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Leu	Arg	Asp	Val	
385							390				395				400	
Phe	Gly	Lys	Asp	Leu	Ile	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Lys	Ser	Ser	Ser	
			405				410				415					

Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp		
420	425	430
Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val Ile Pro		
435	440	445
Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu Cys Met		
450	455	460
Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser		
465	470	475
Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys		
	485	490
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser		
	500	505
Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser		
	515	520
Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser		
	530	535
Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys		
545	550	555
Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu		
	565	570
Glu Ile Asn Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
	580	585
Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg		
	595	600
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe		
	610	615
Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu		
625	630	635
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn		
	645	650
Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser		
	660	665
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val		
	675	680
Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp		
	690	695
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser		
705	710	
<210> 140		

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 140

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu

1

5

10

15

Ala

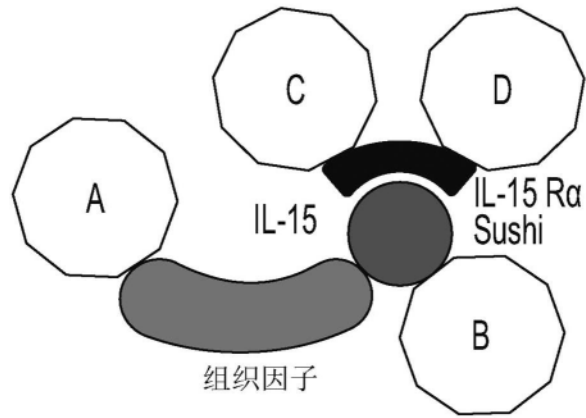


图1

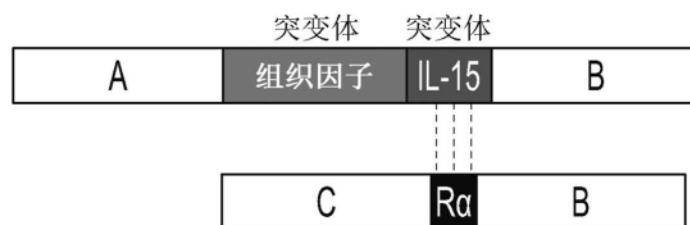
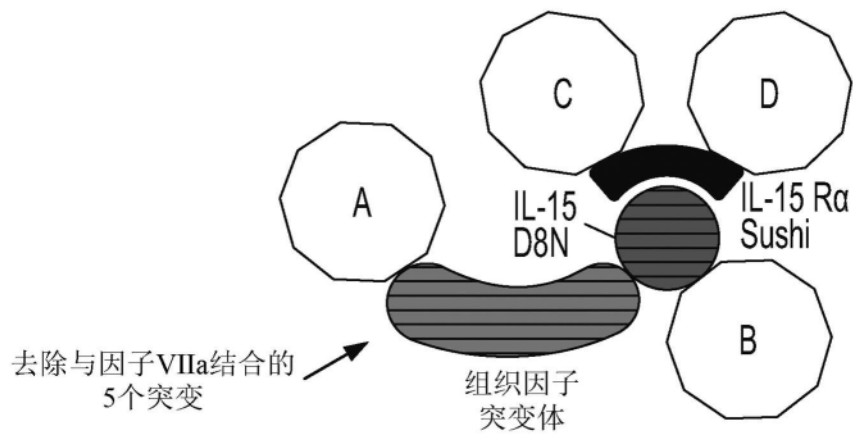


图2



图3



图4



图5

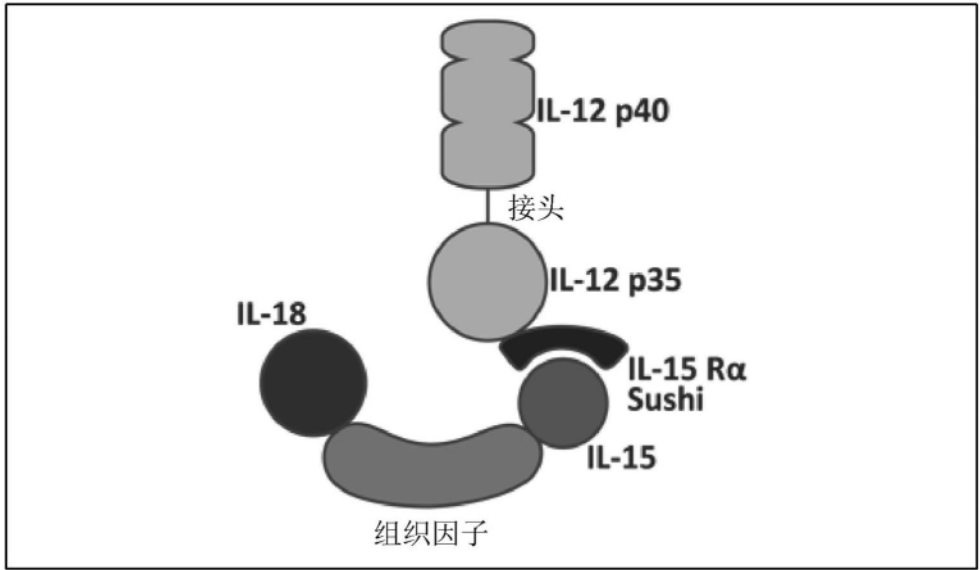


图6

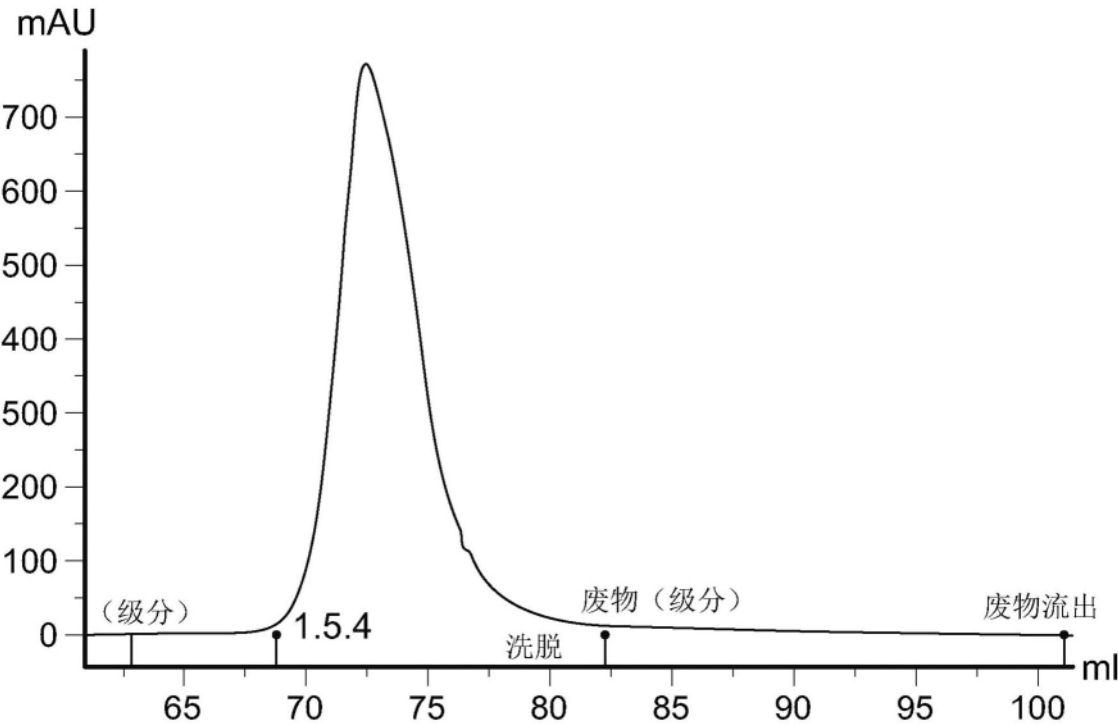


图7

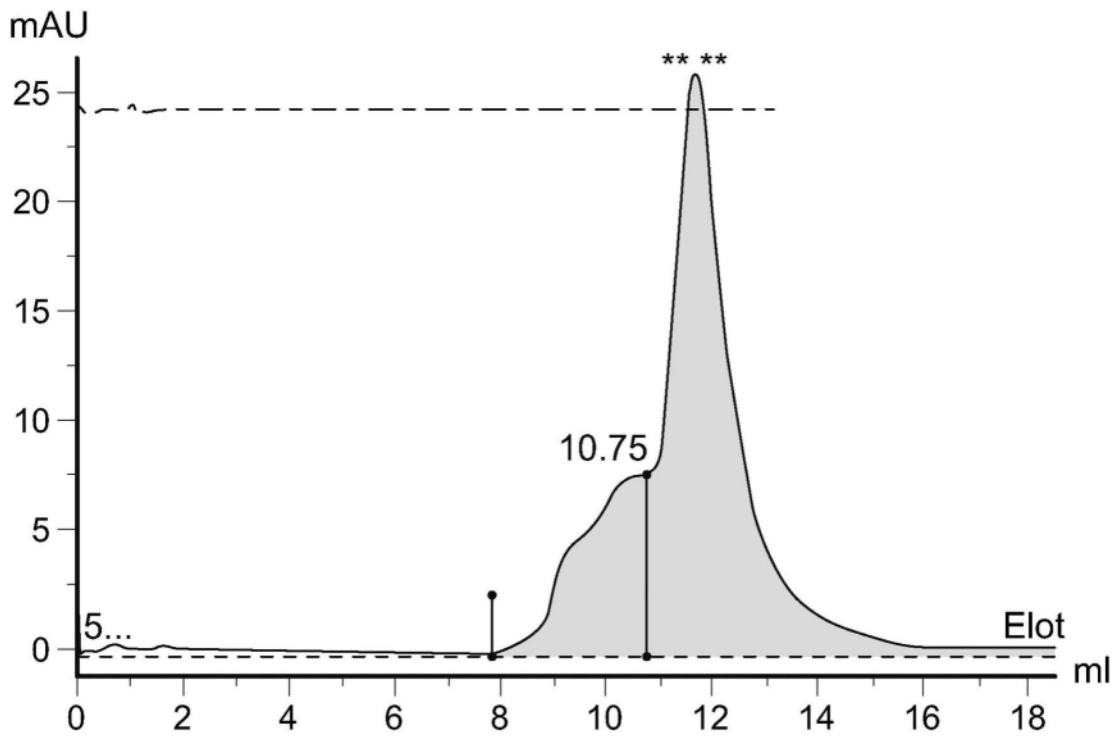


图8

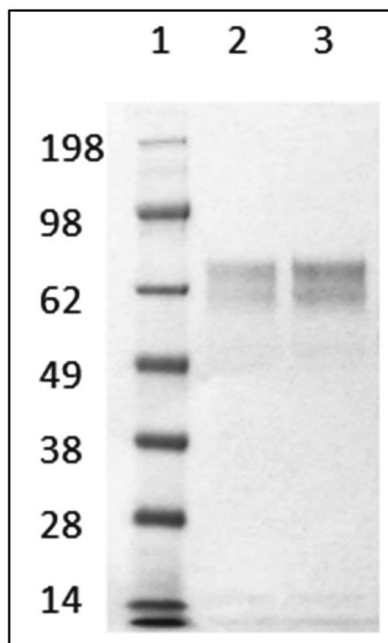


图9

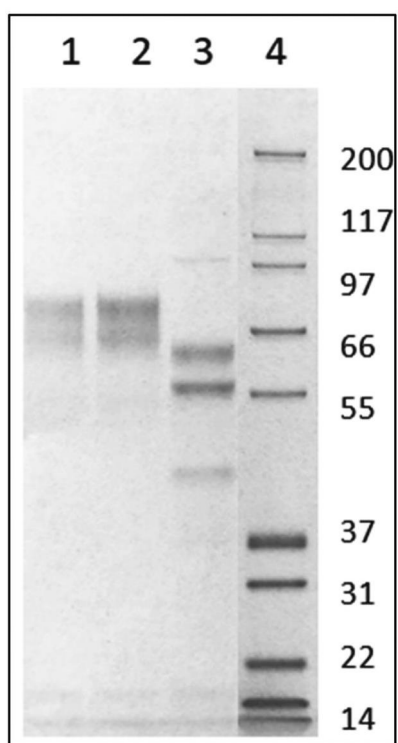


图10

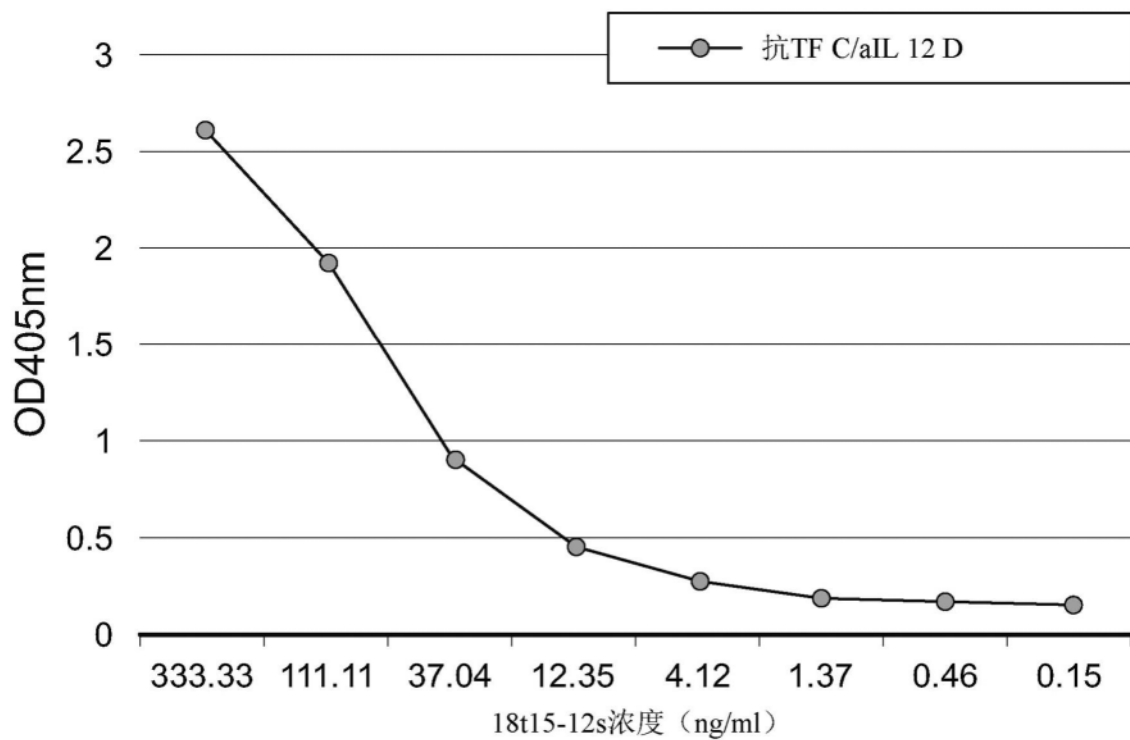


图11

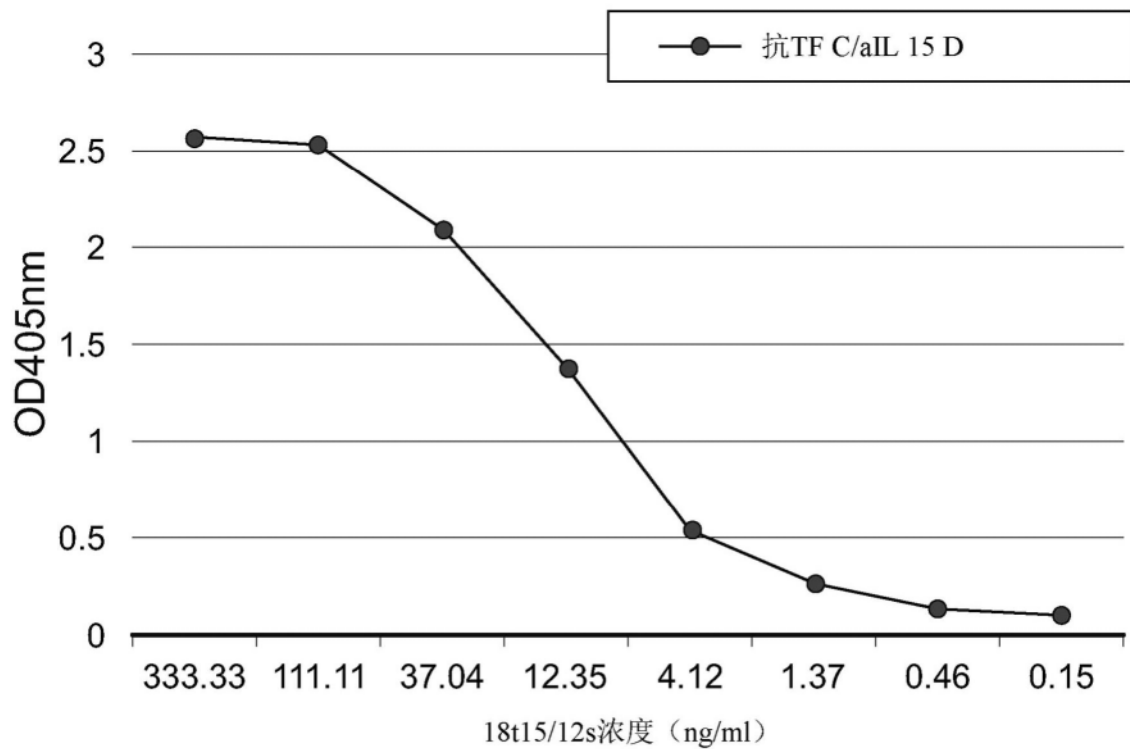


图12

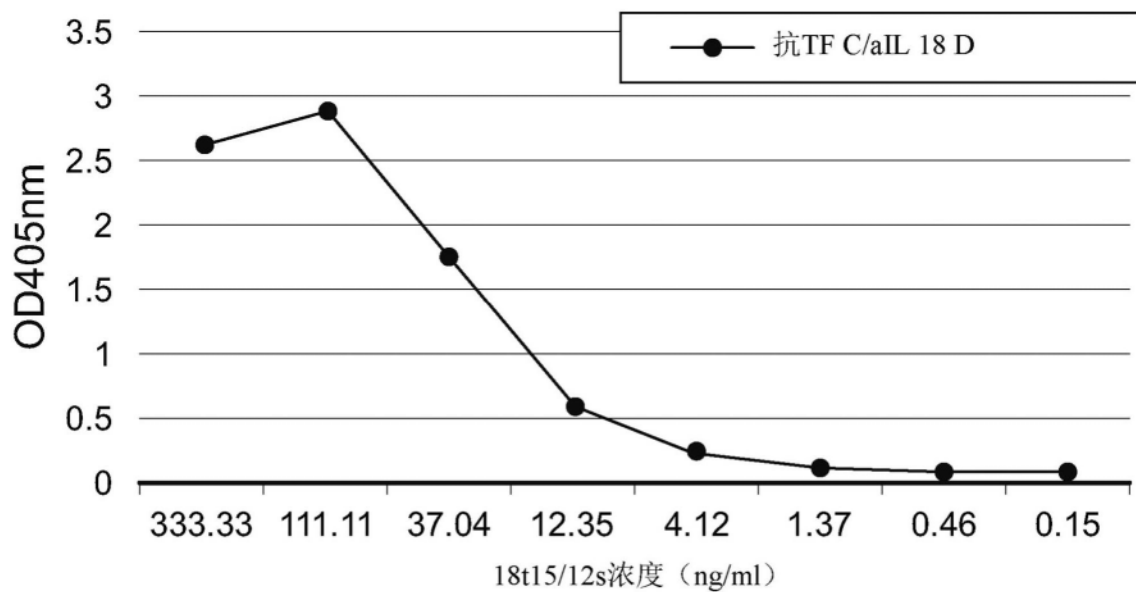


图13

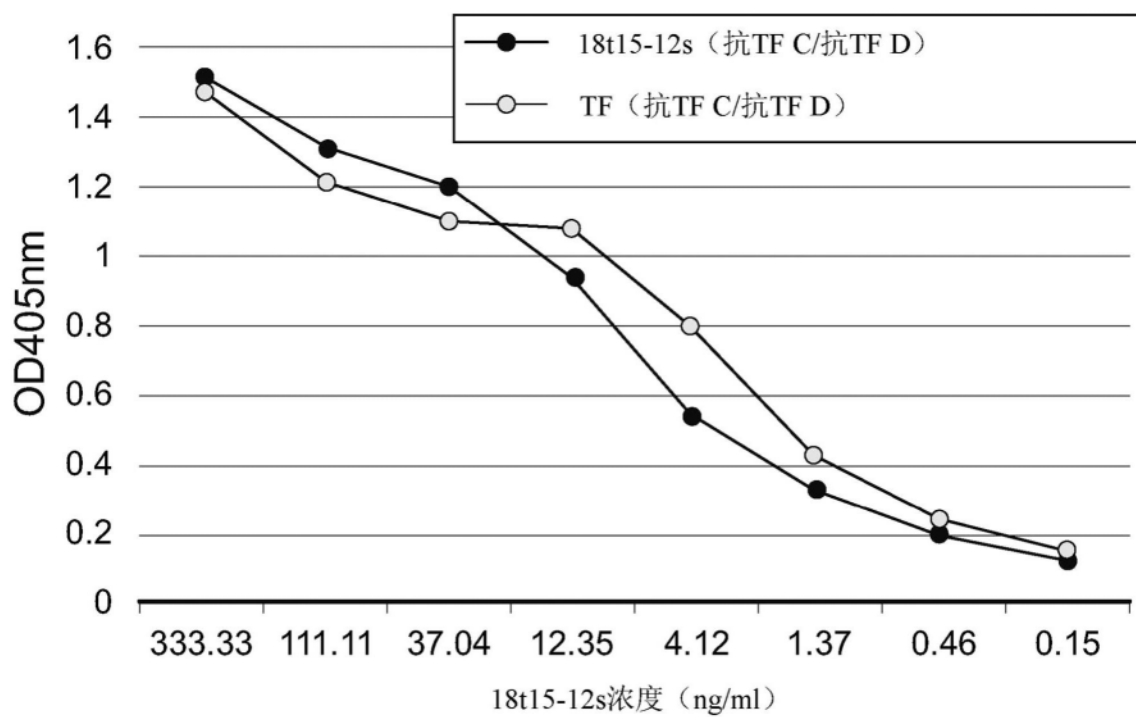


图14

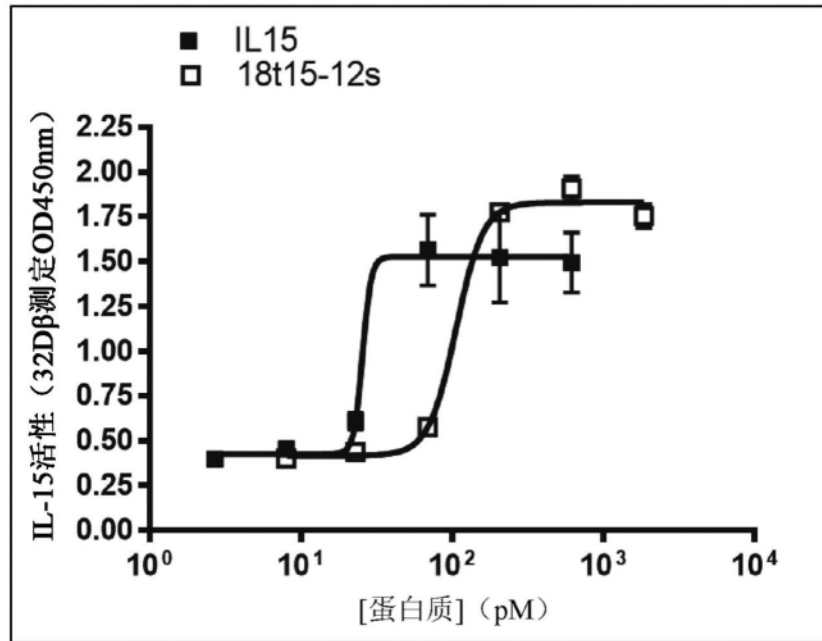


图15

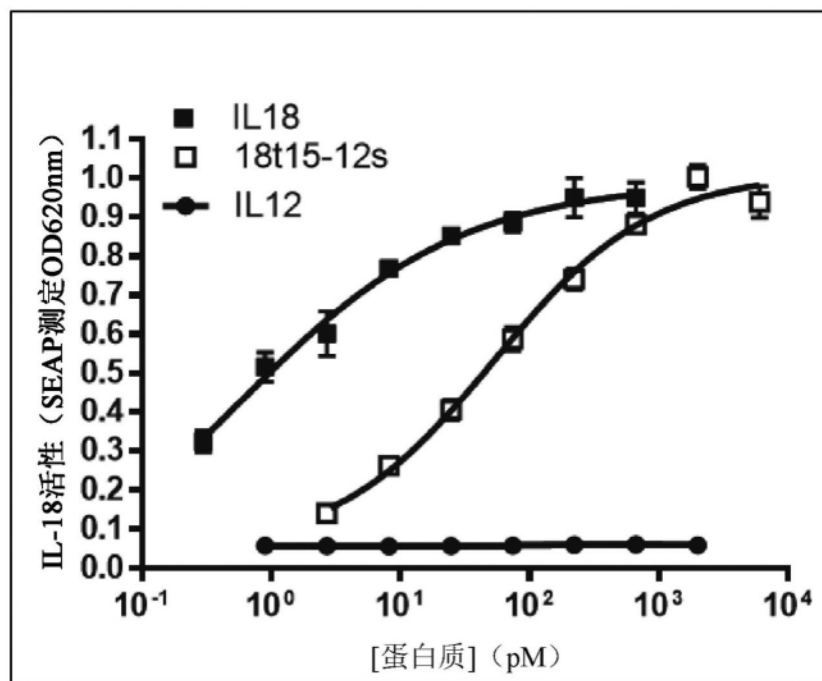


图16

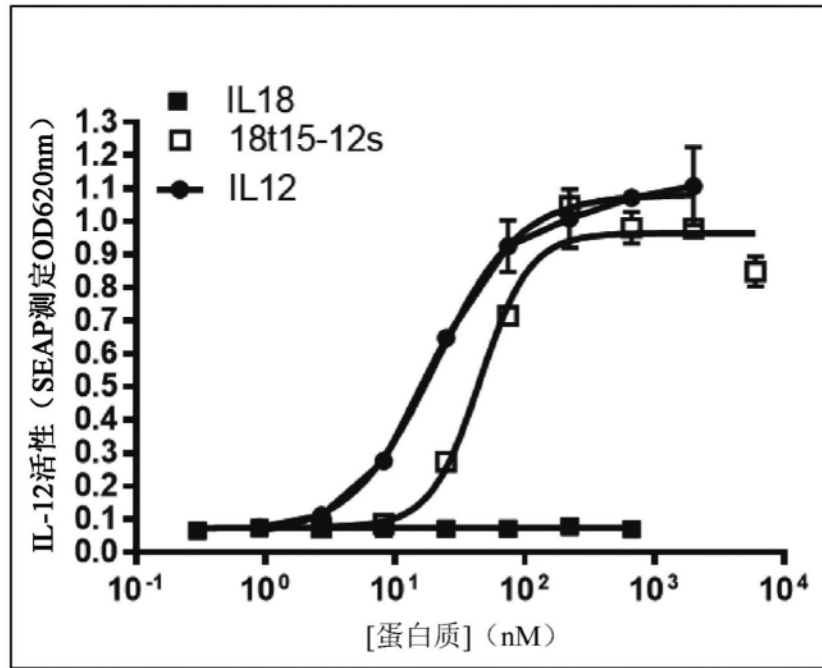


图17

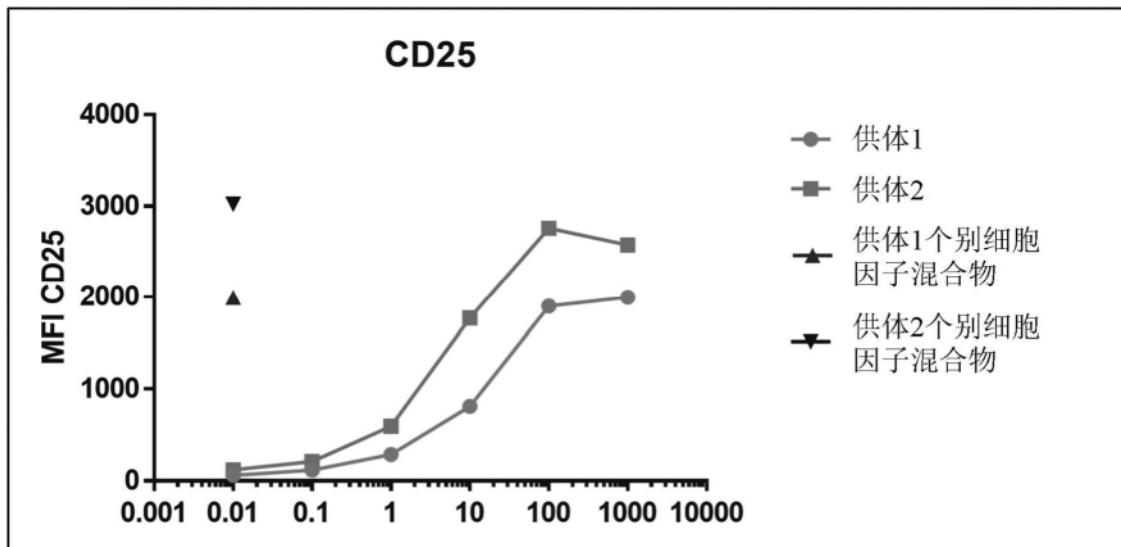


图18A

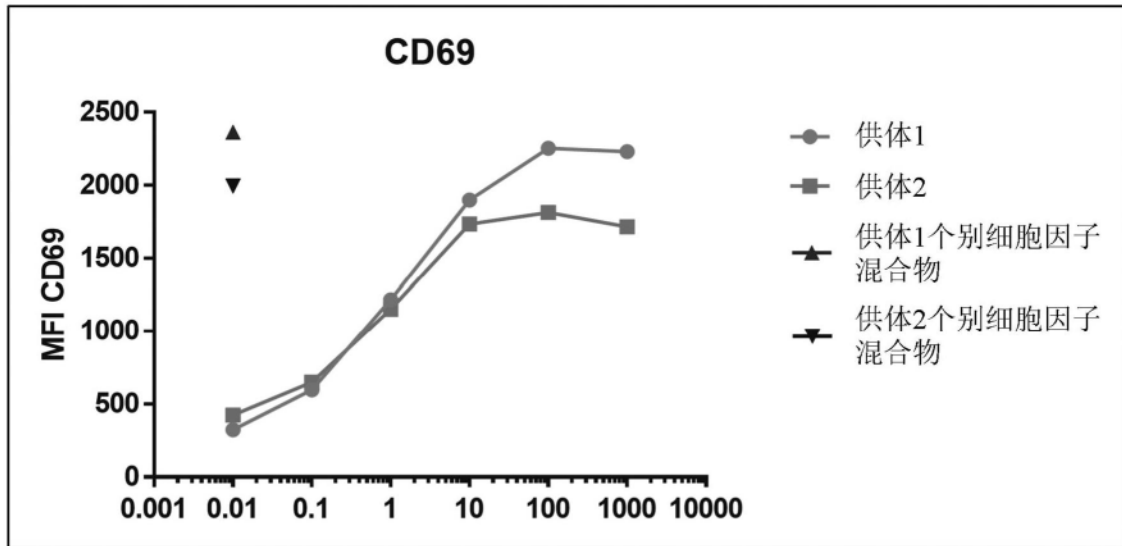


图18B

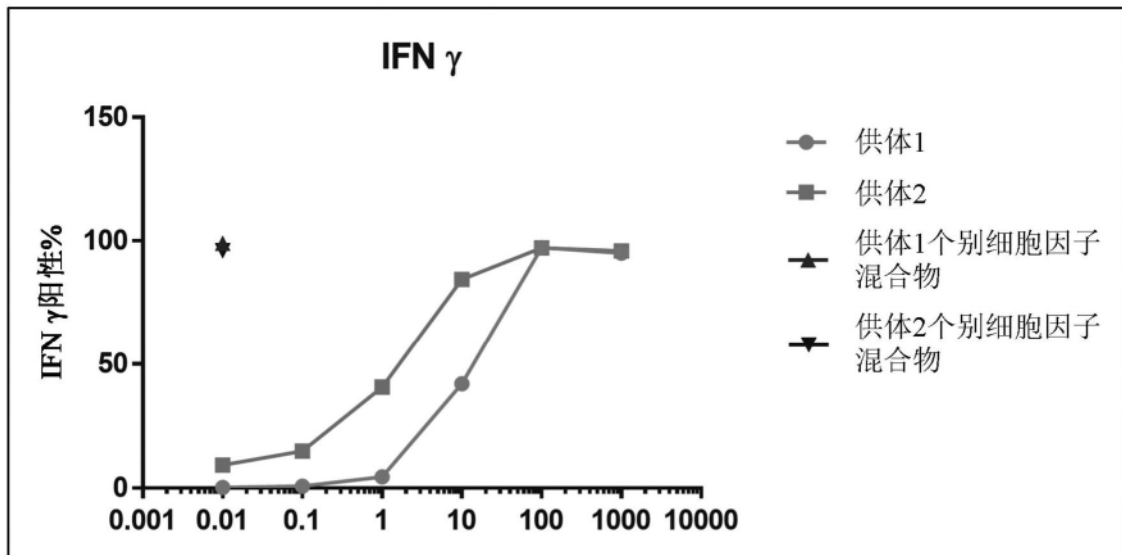


图19

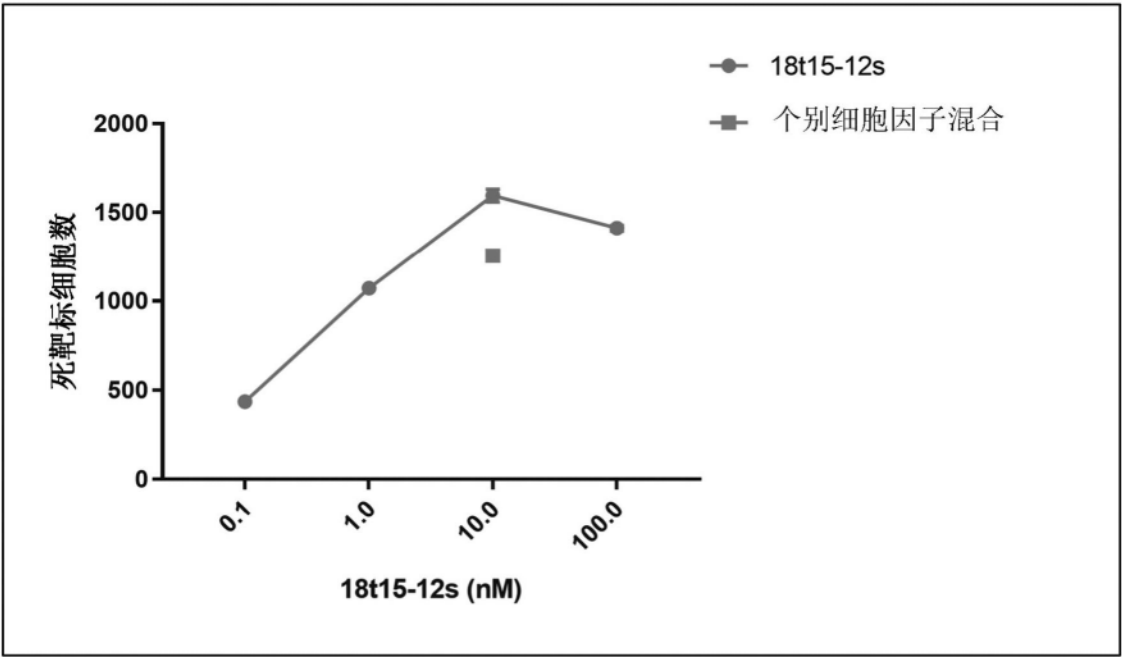


图20



图21



图22



图23

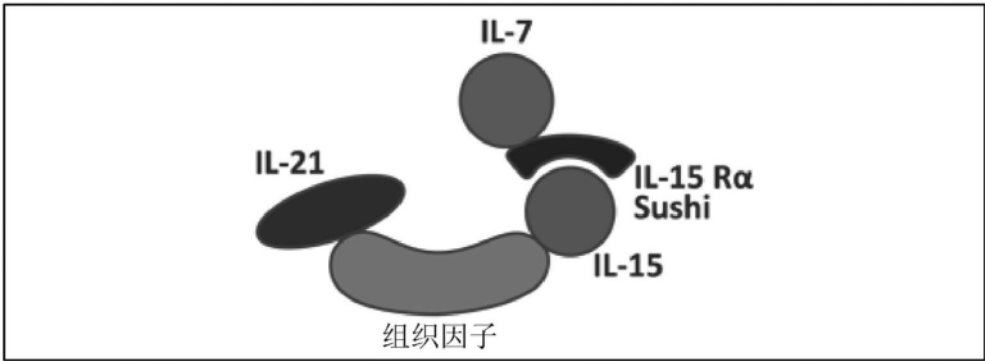


图24

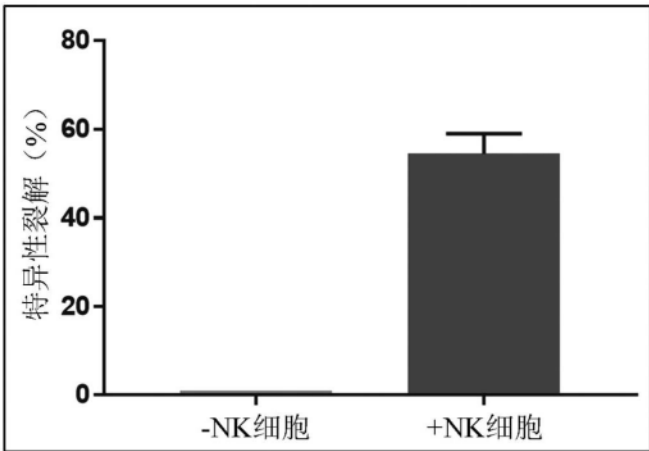


图25



图26



图27



图28

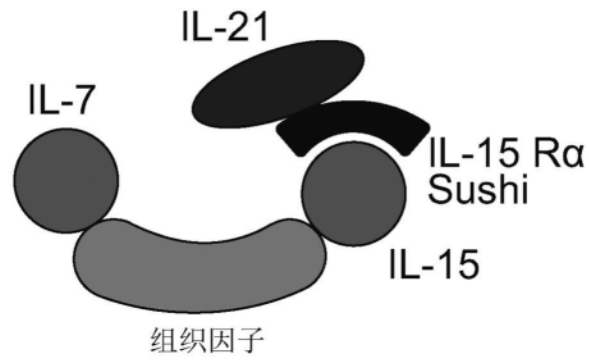


图29

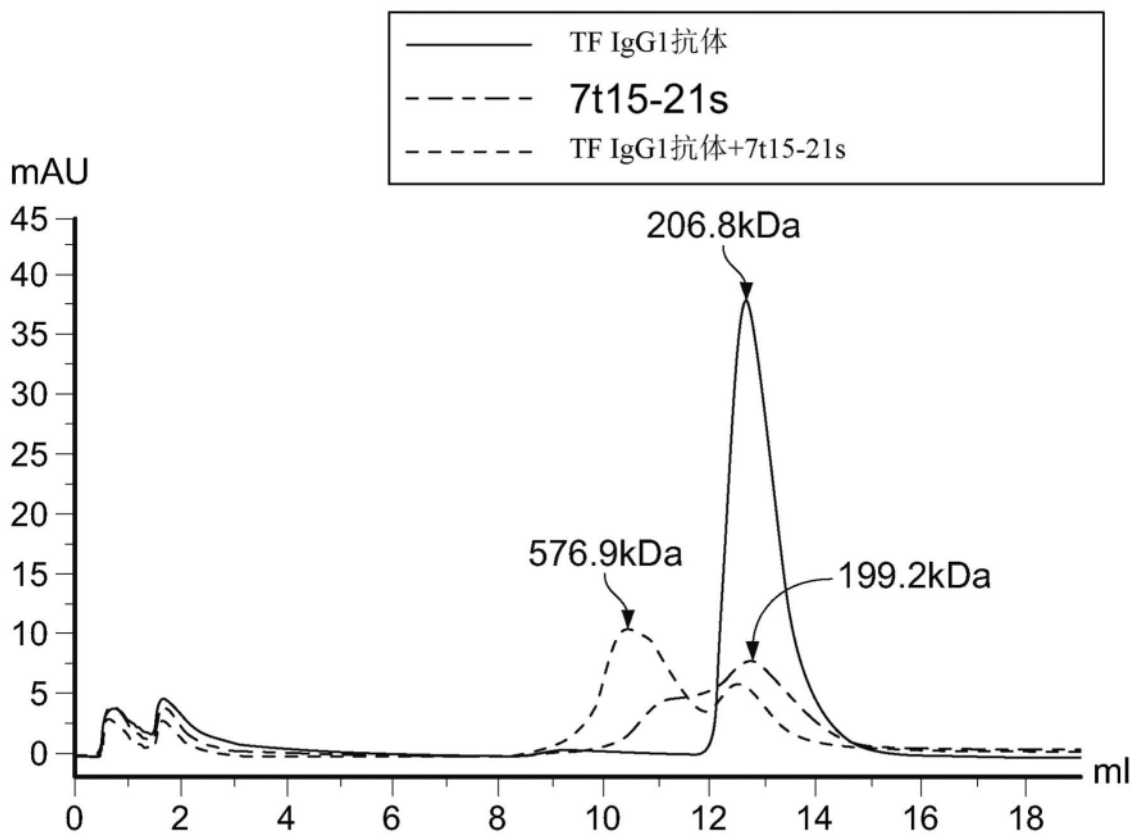


图30

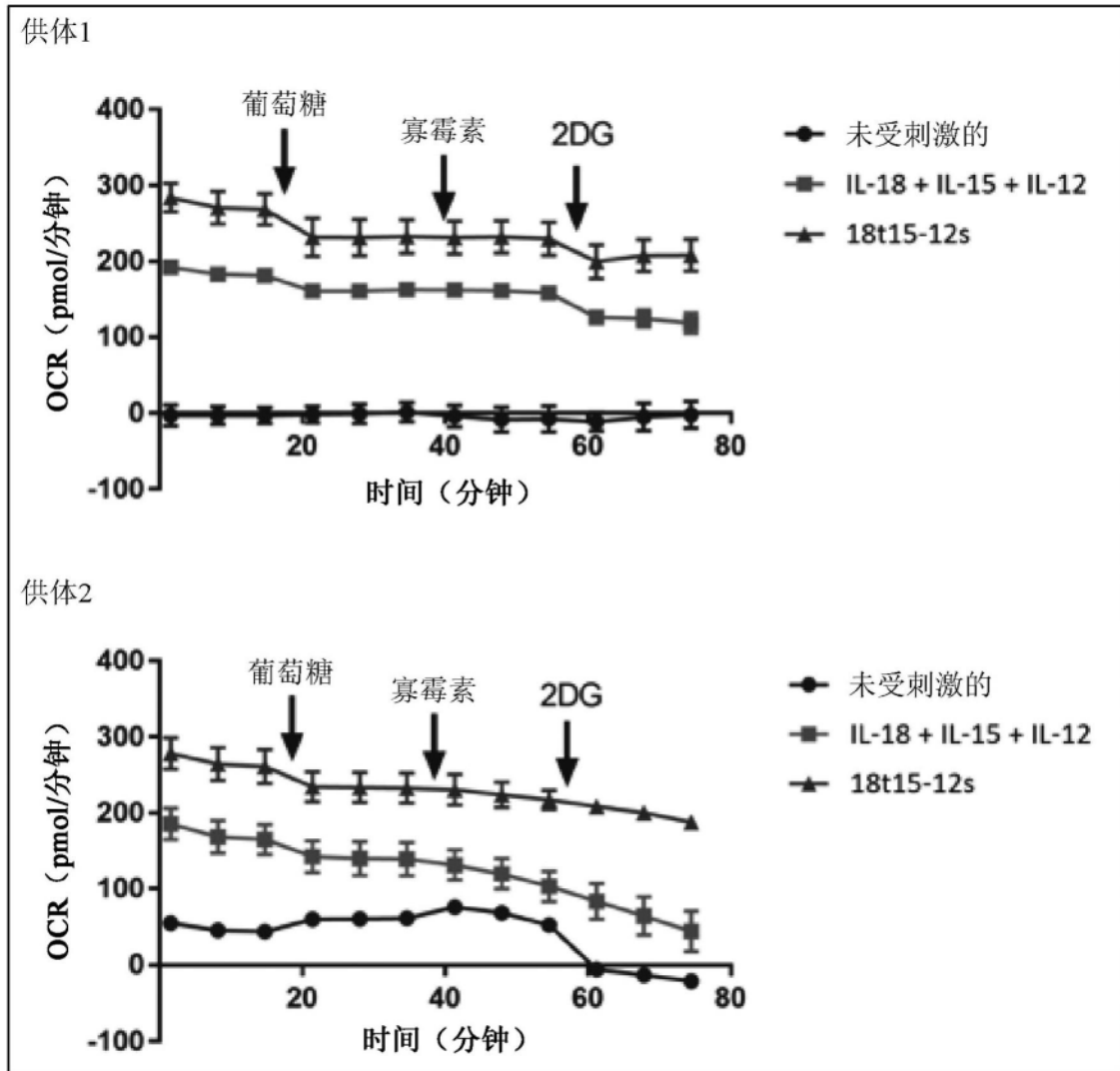


图31

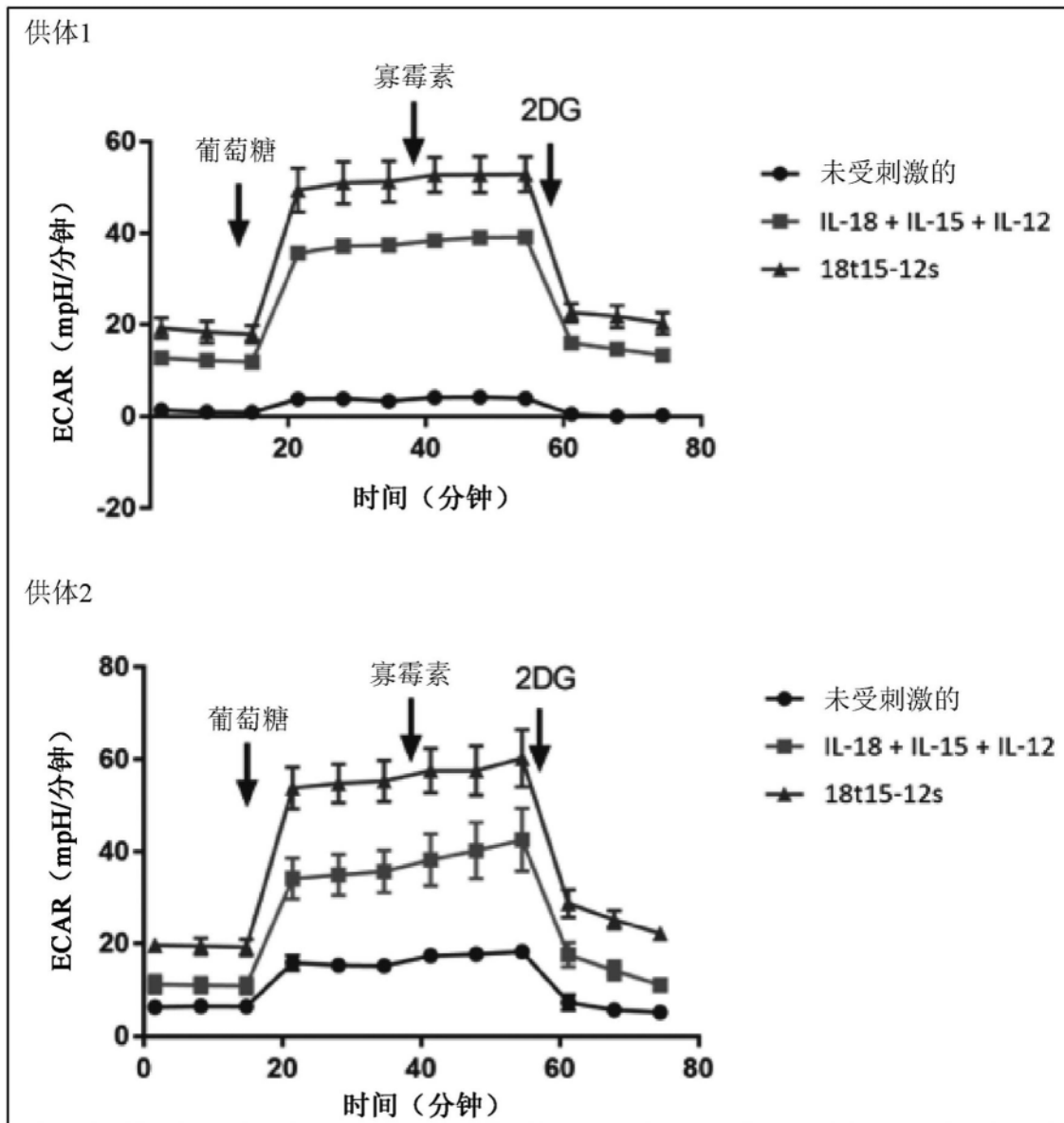


图32

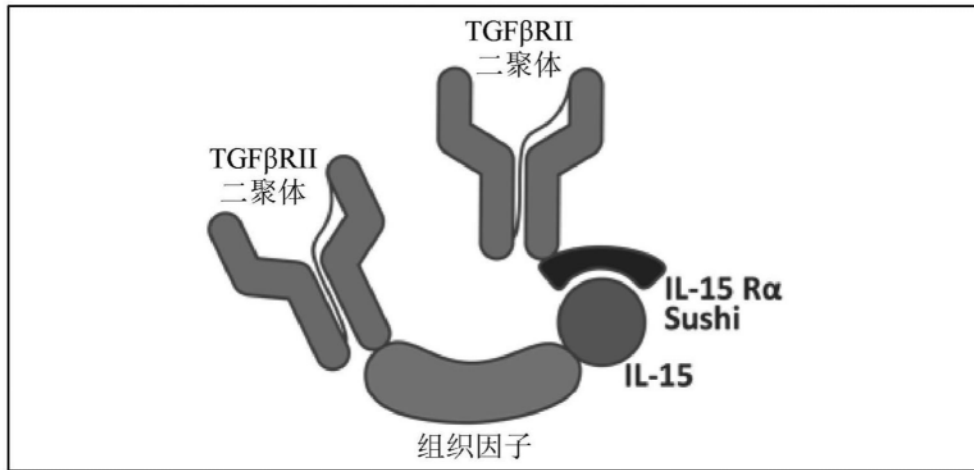


图33



图34

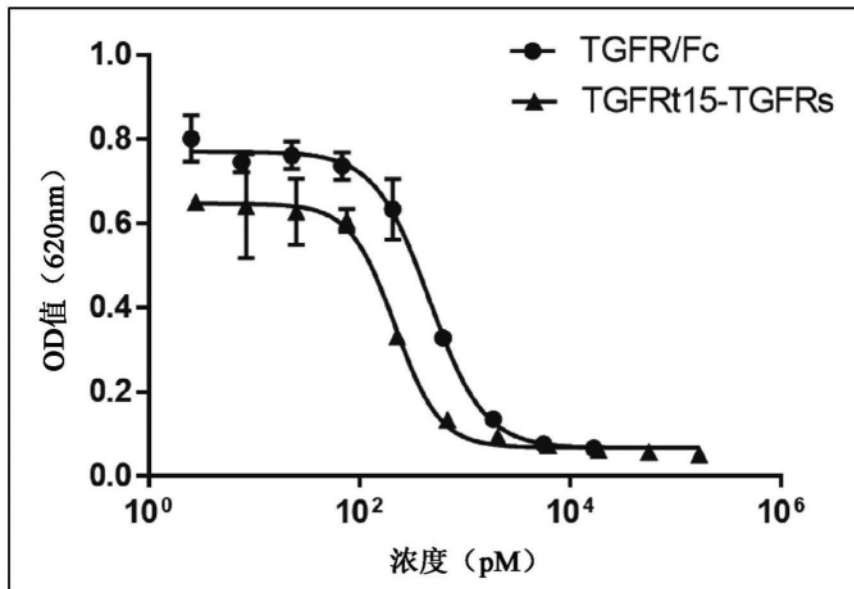


图35

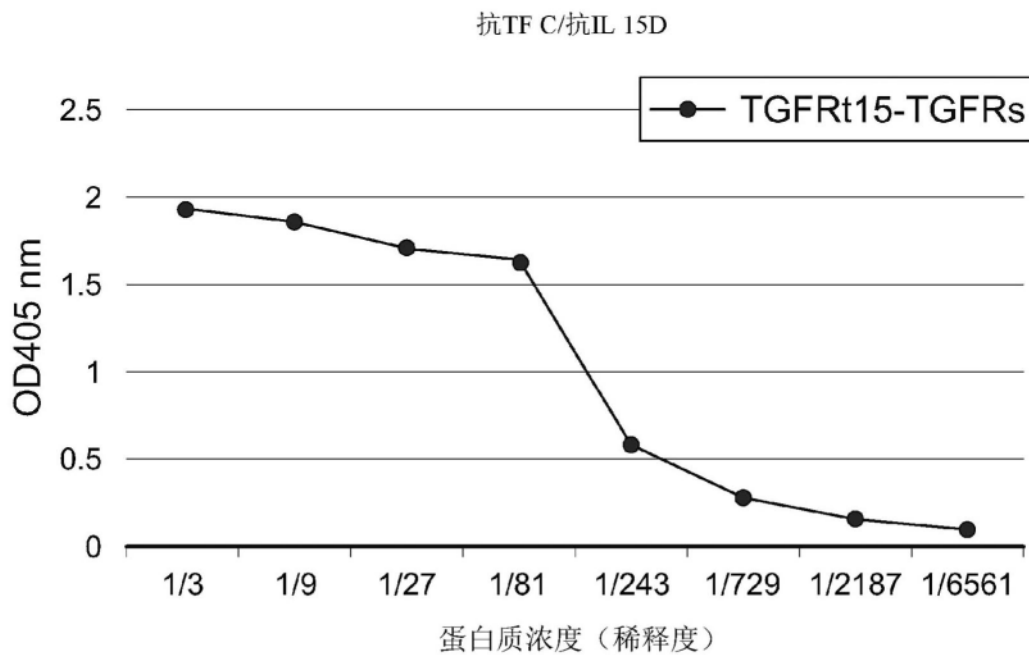


图36A

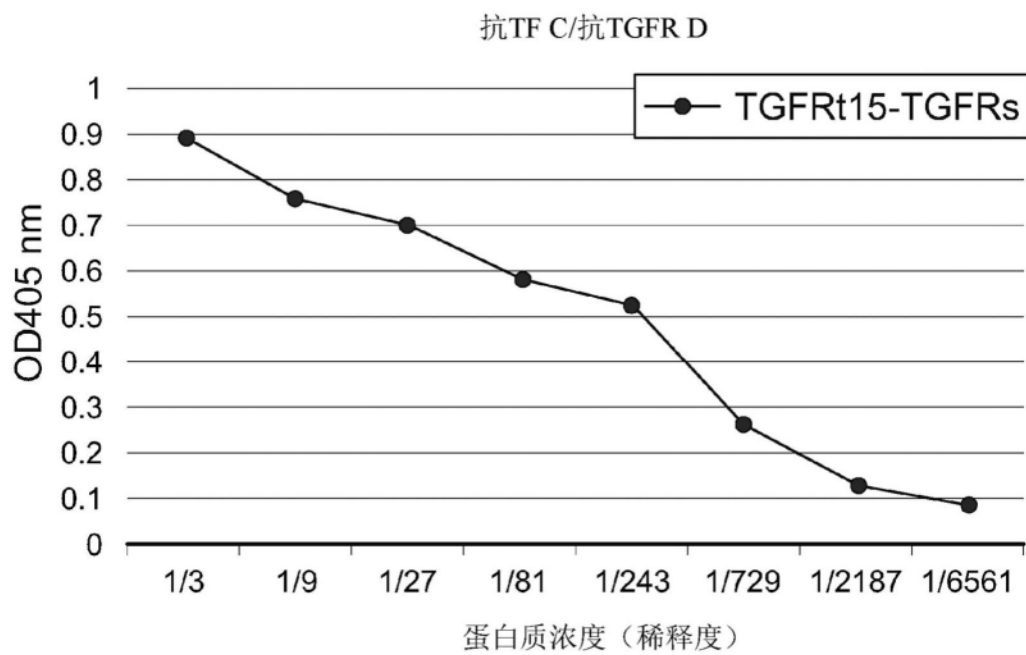


图36B

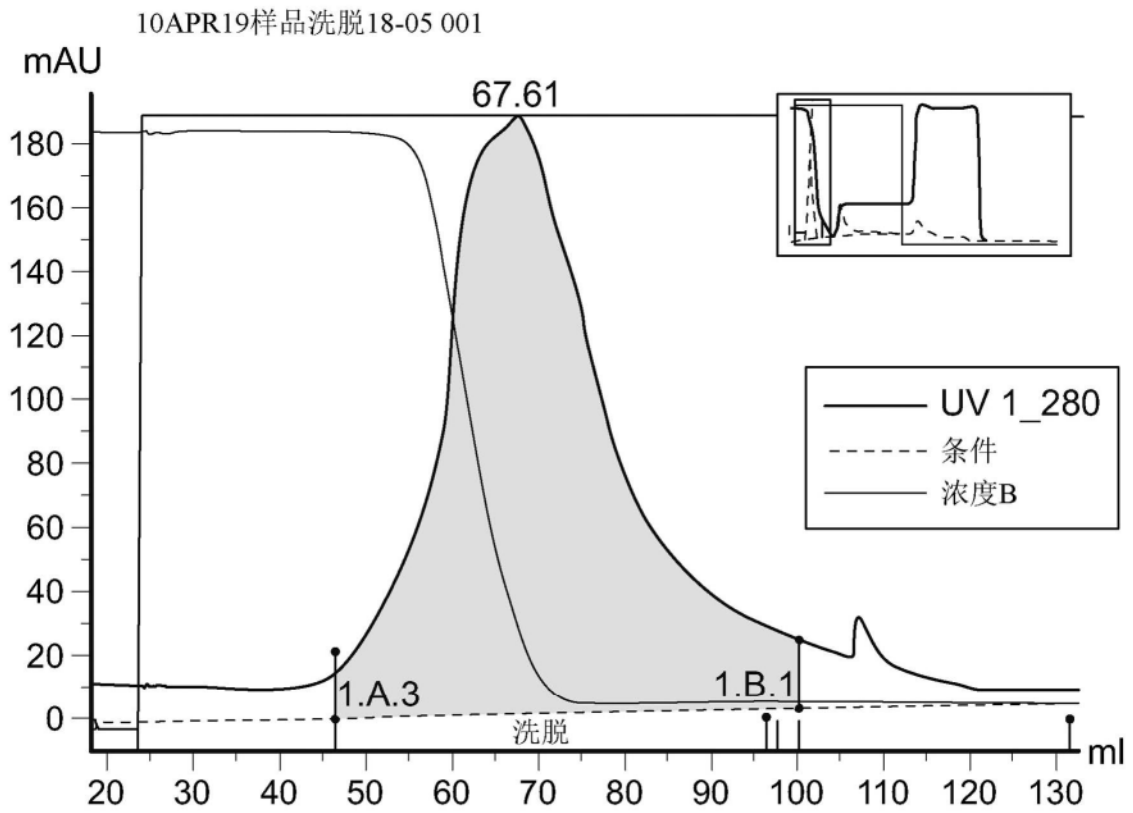


图37

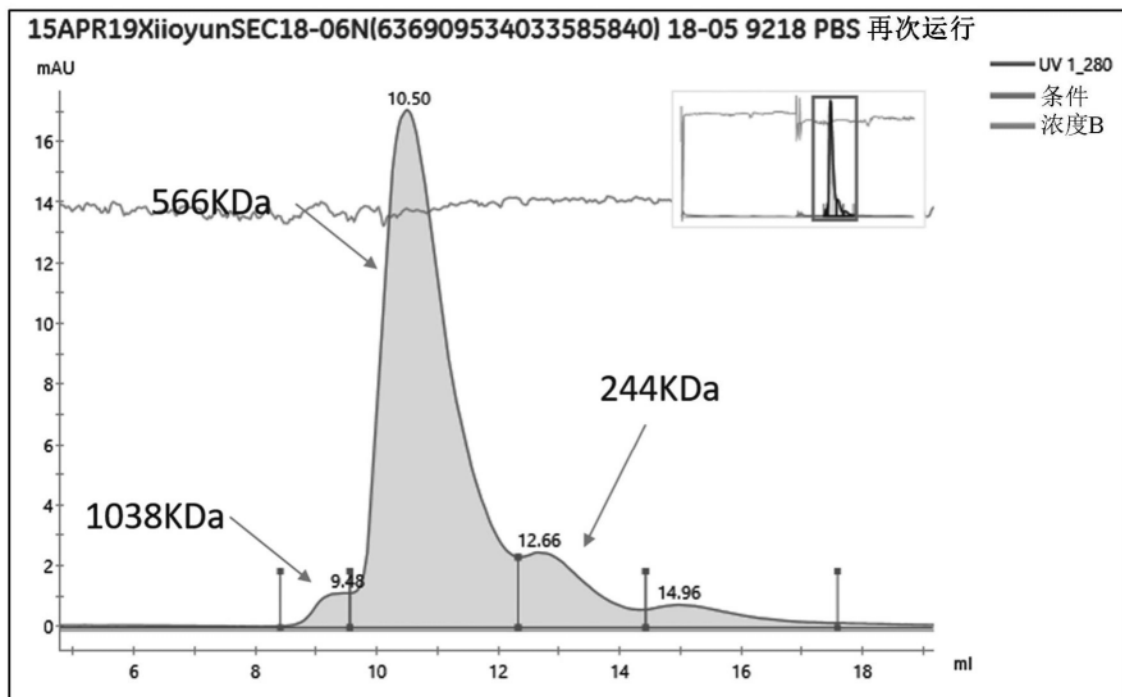


图38

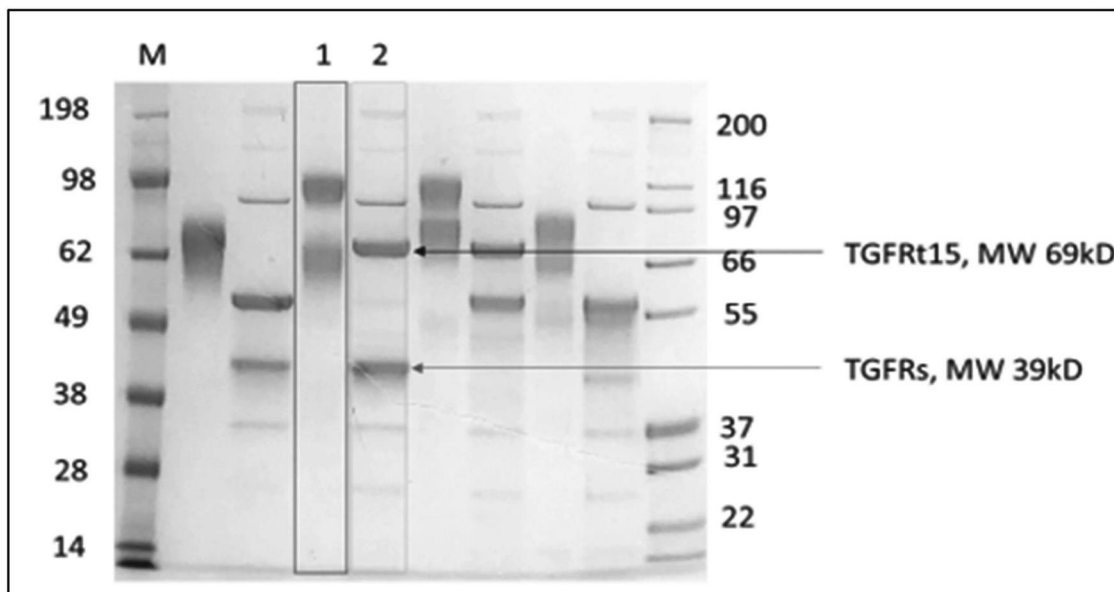


图39

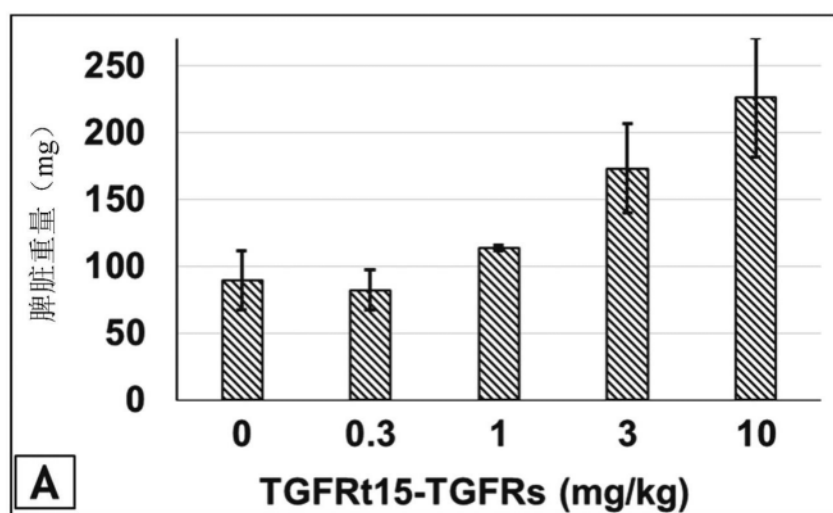


图40A

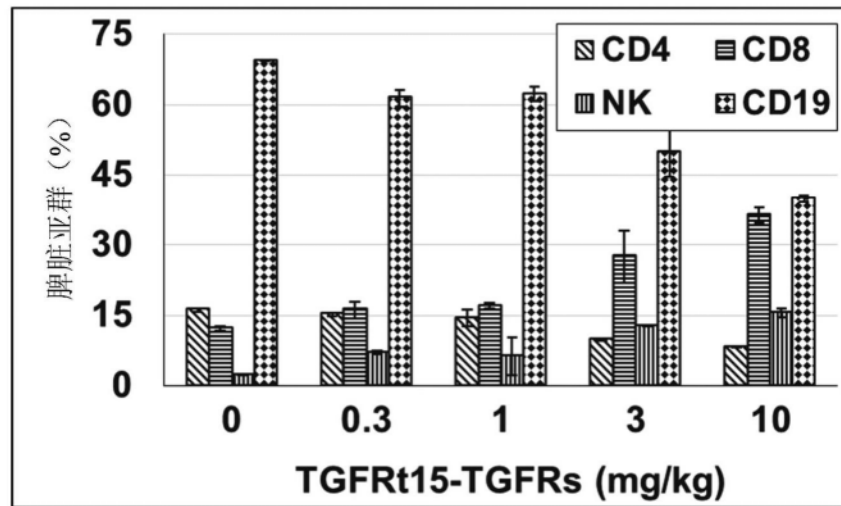


图40B

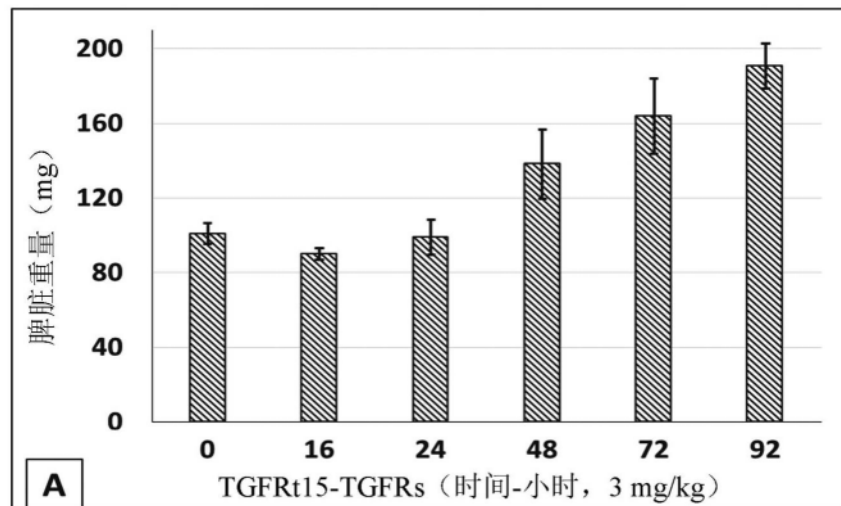


图41A

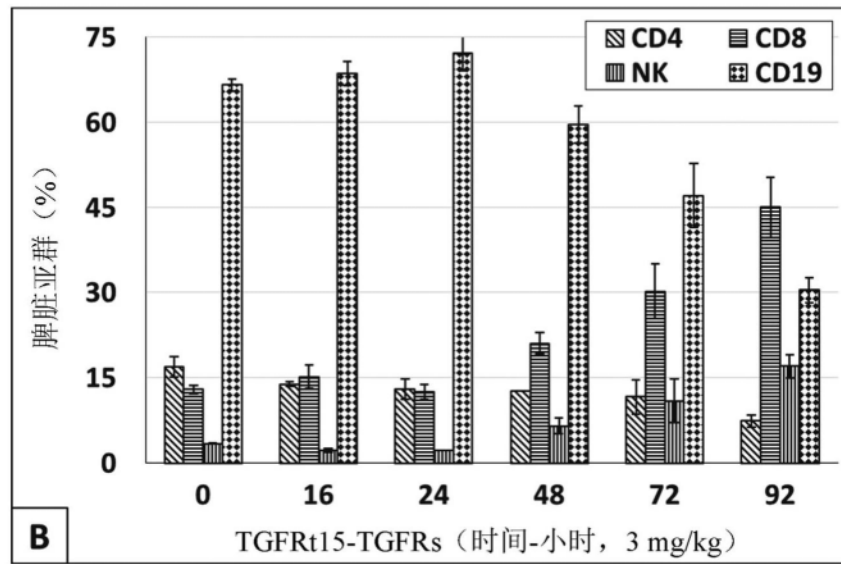


图41B

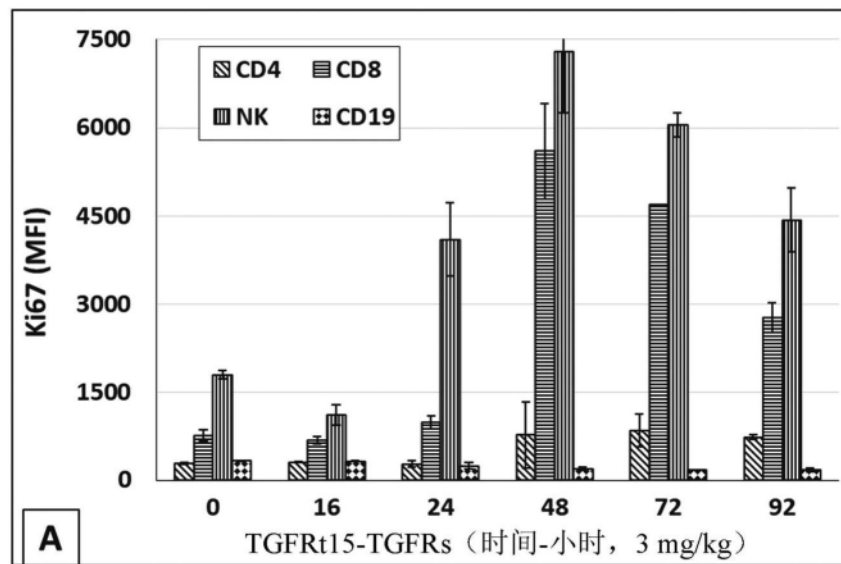


图42A

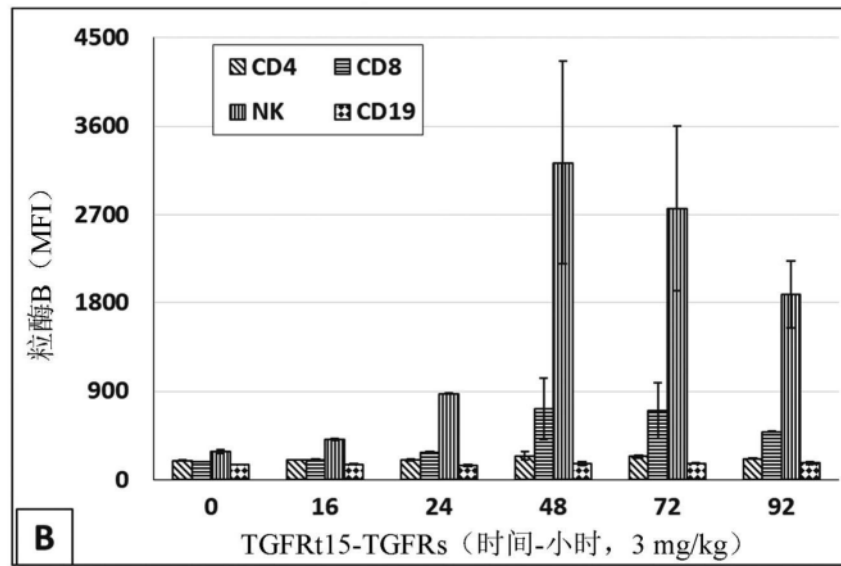


图42B

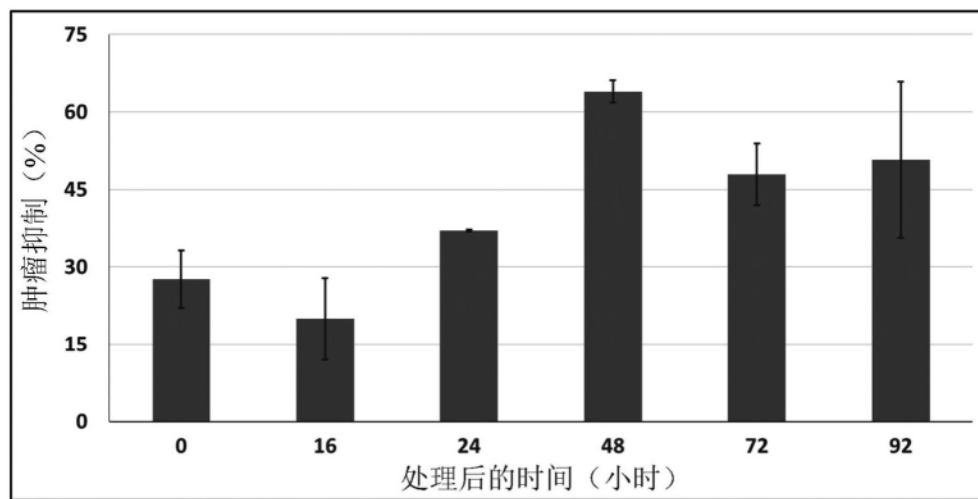


图43

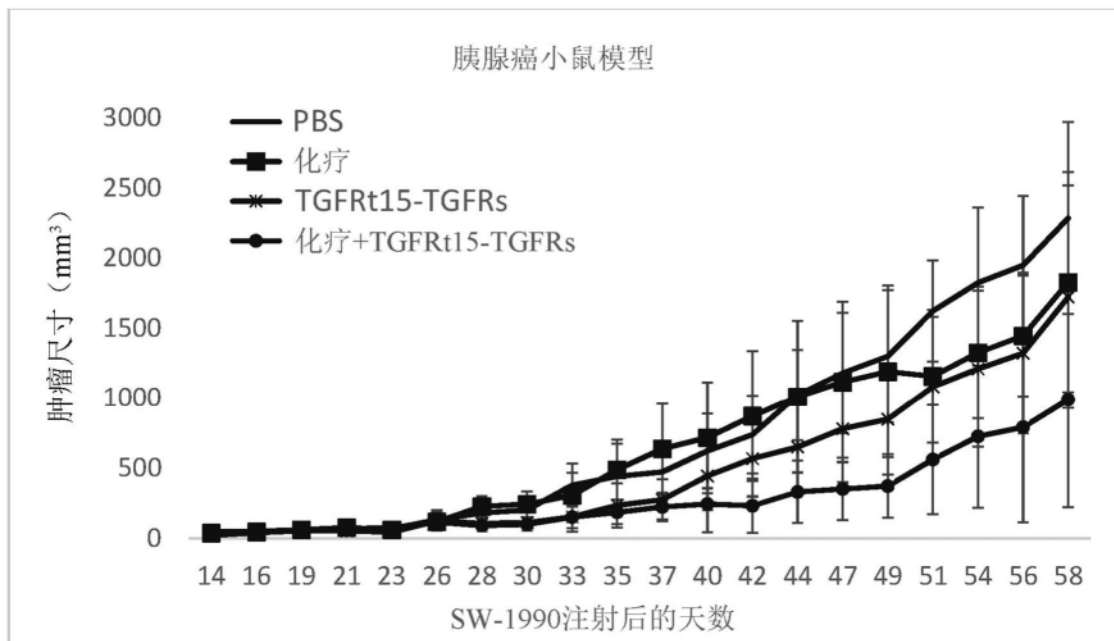


图44

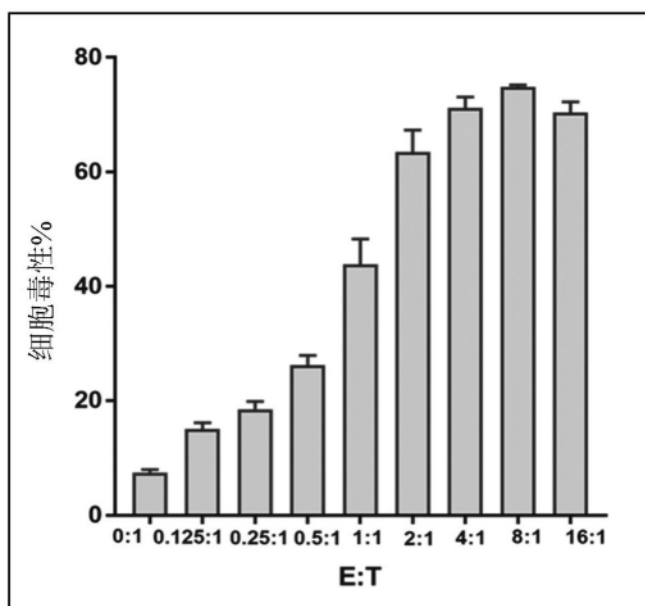


图45

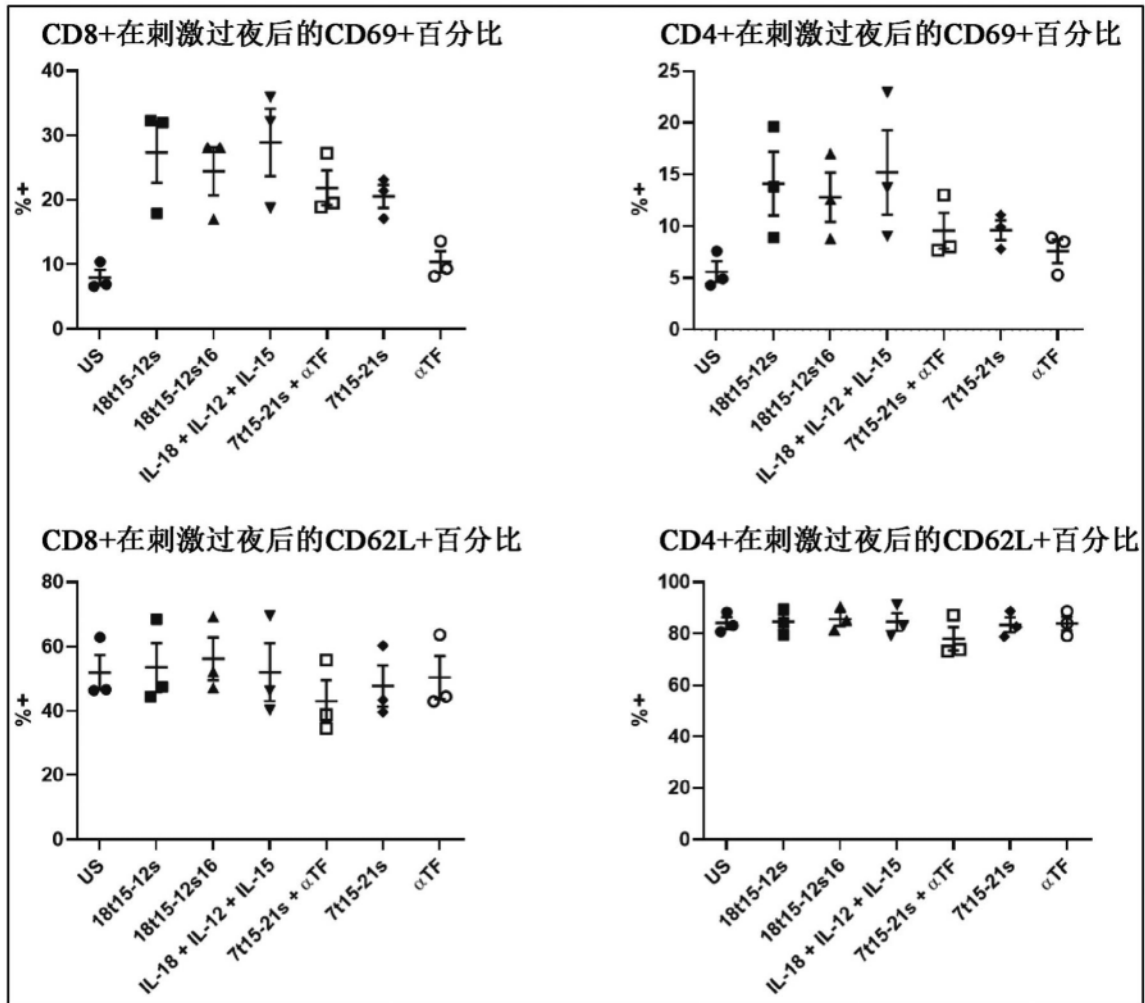


图46

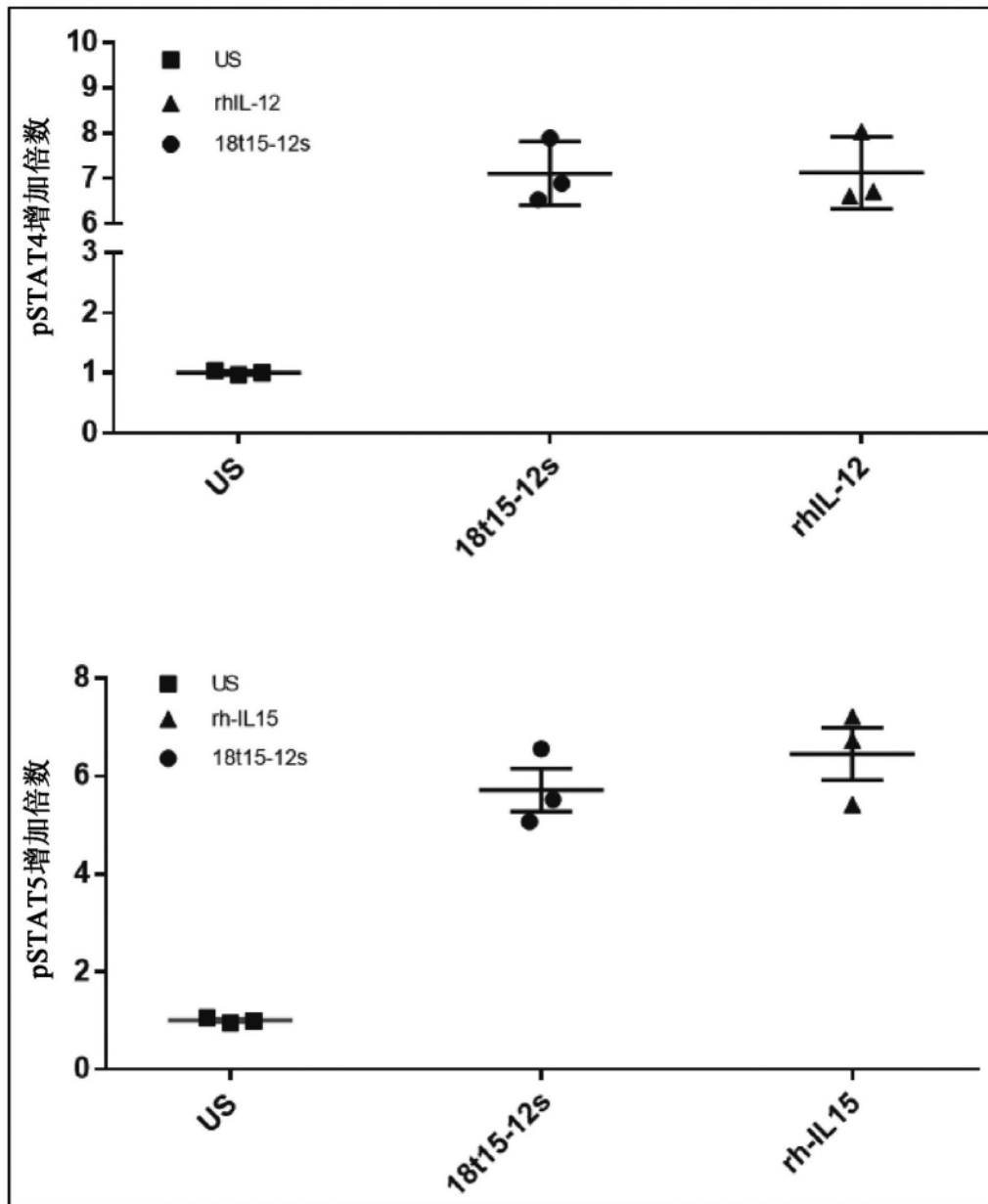


图47

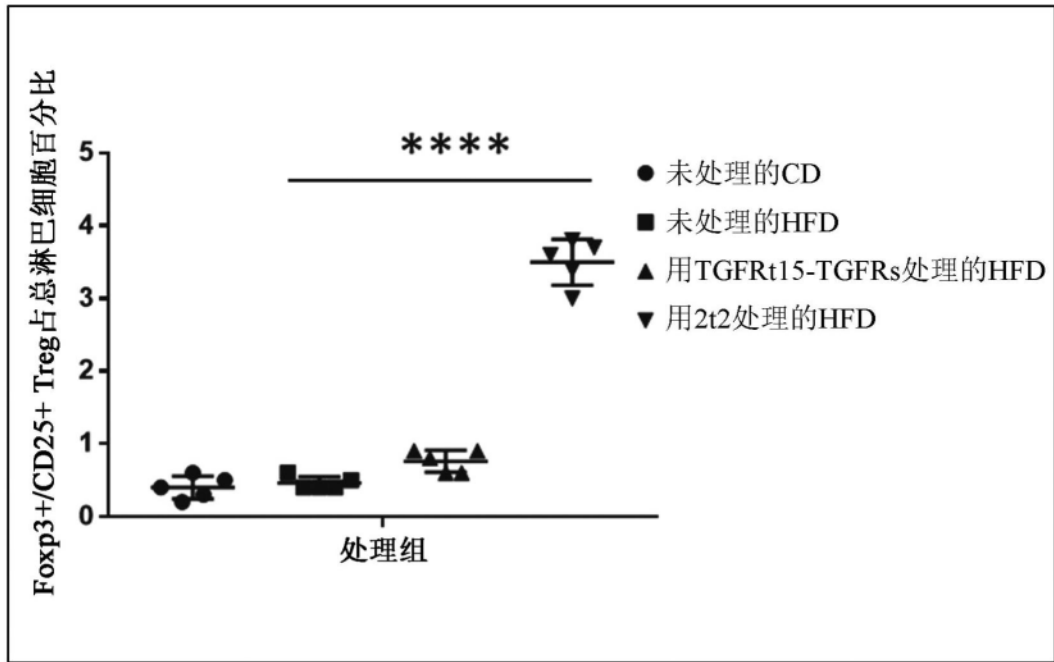


图48A

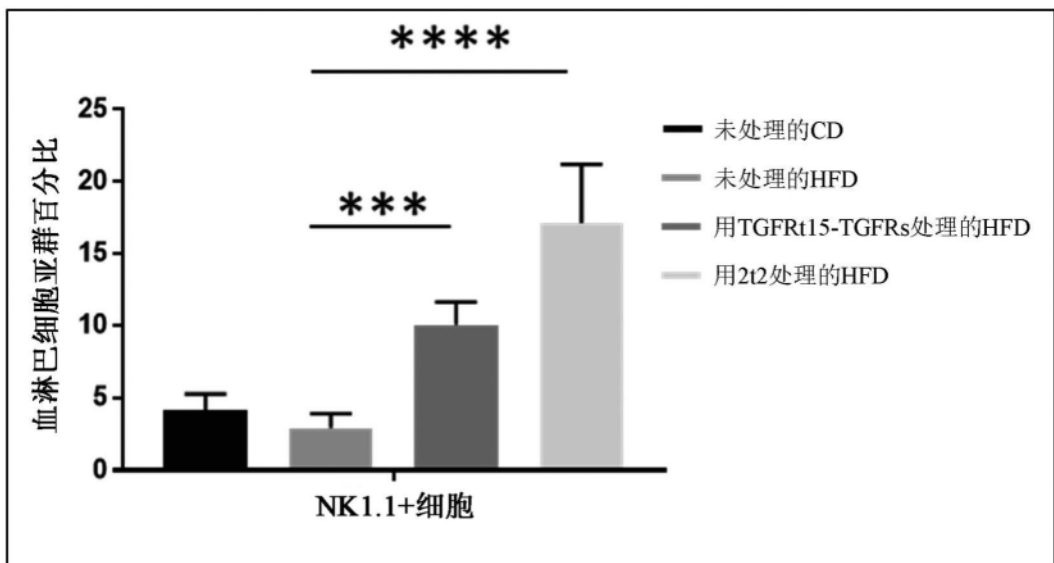


图48B

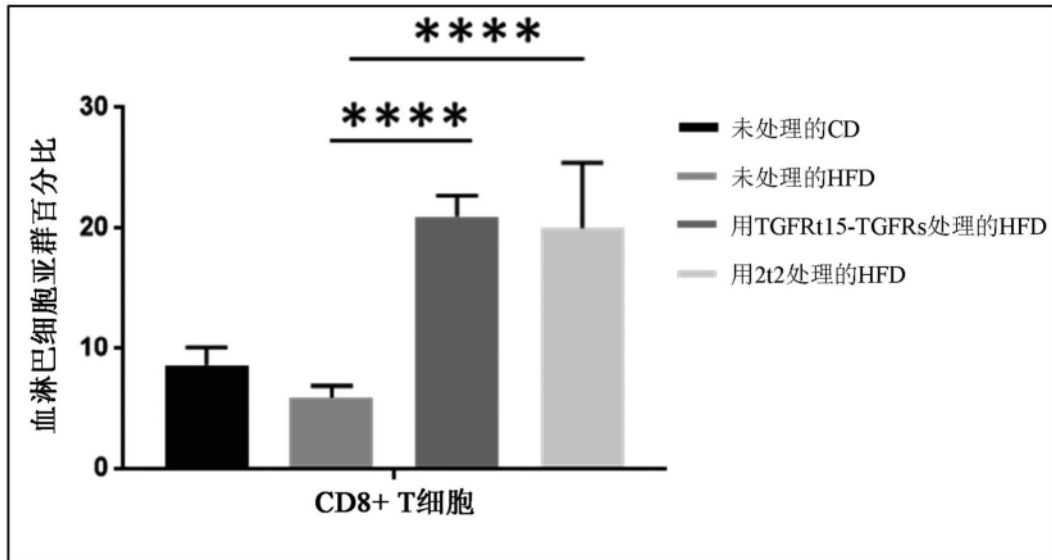


图48C

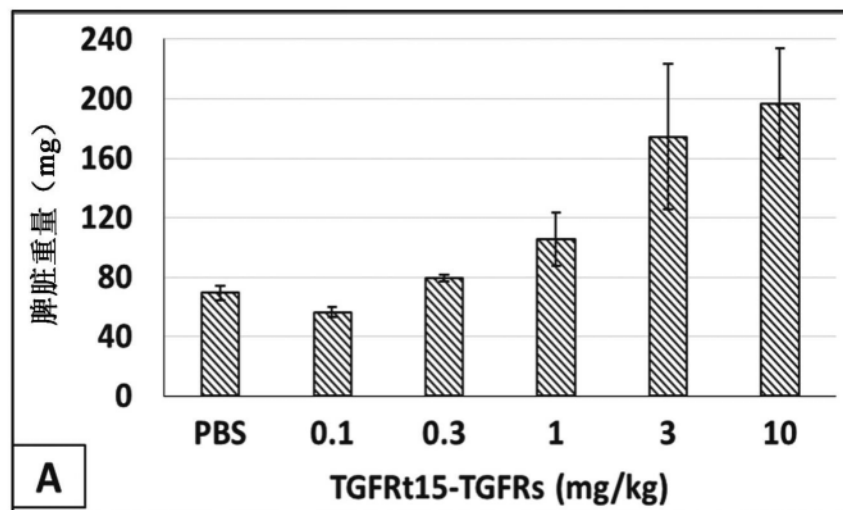


图49A

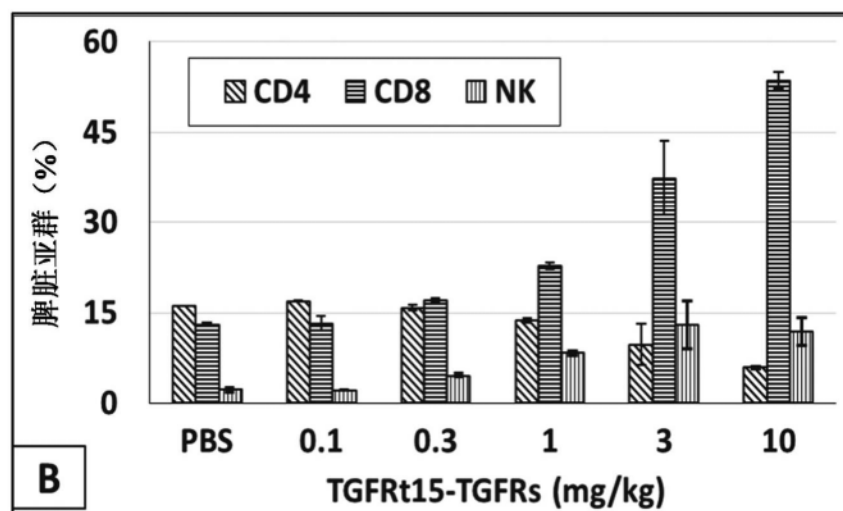


图49B

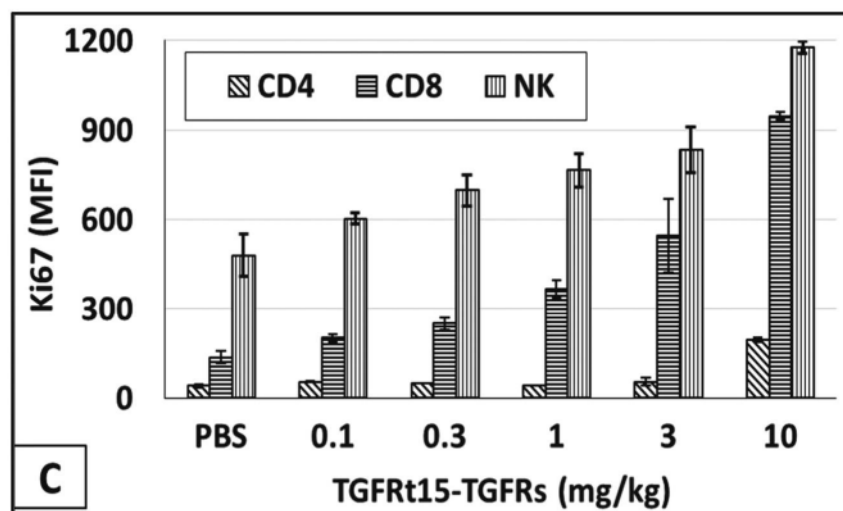


图49C

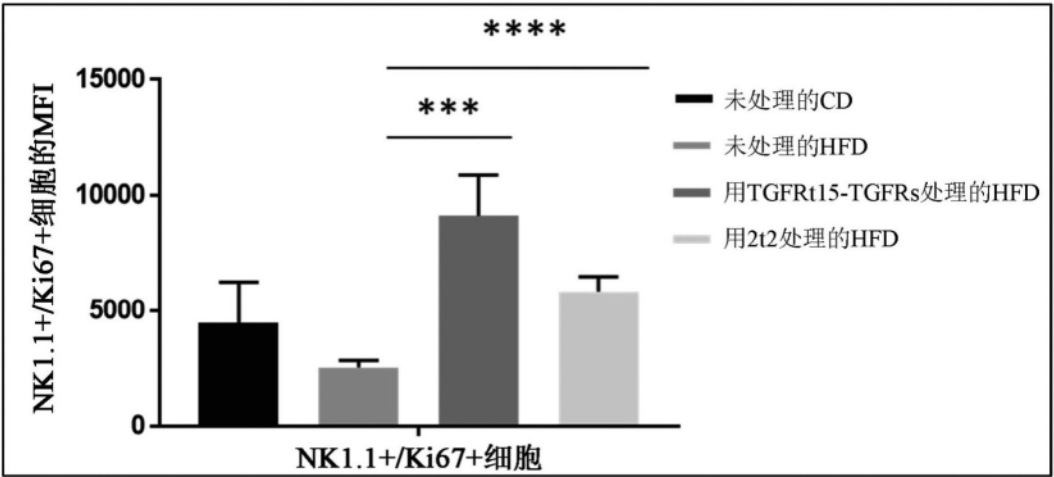


图50A

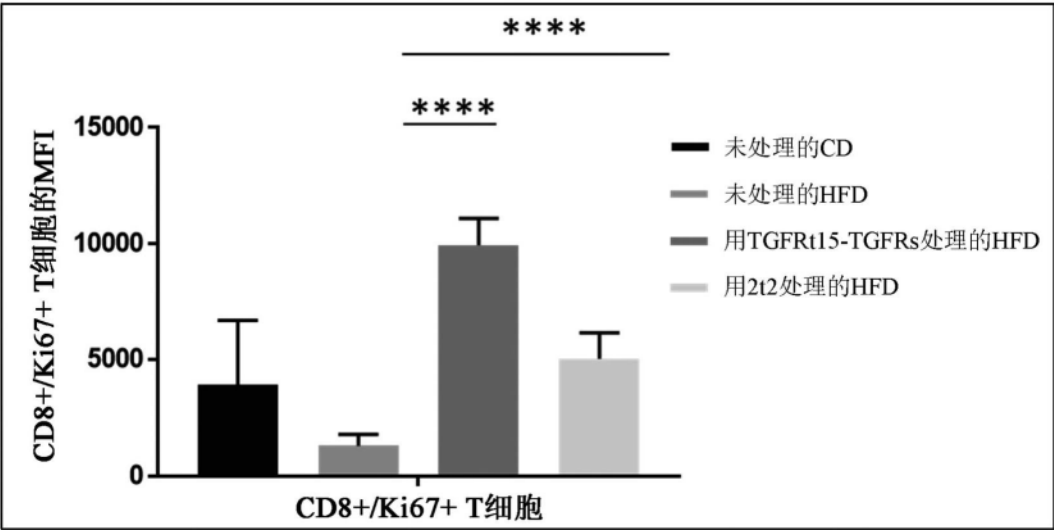


图50B

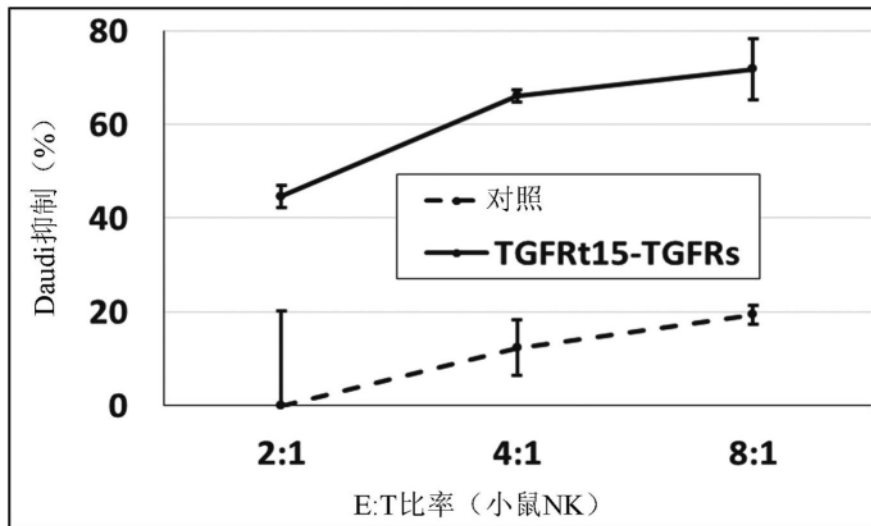


图51A

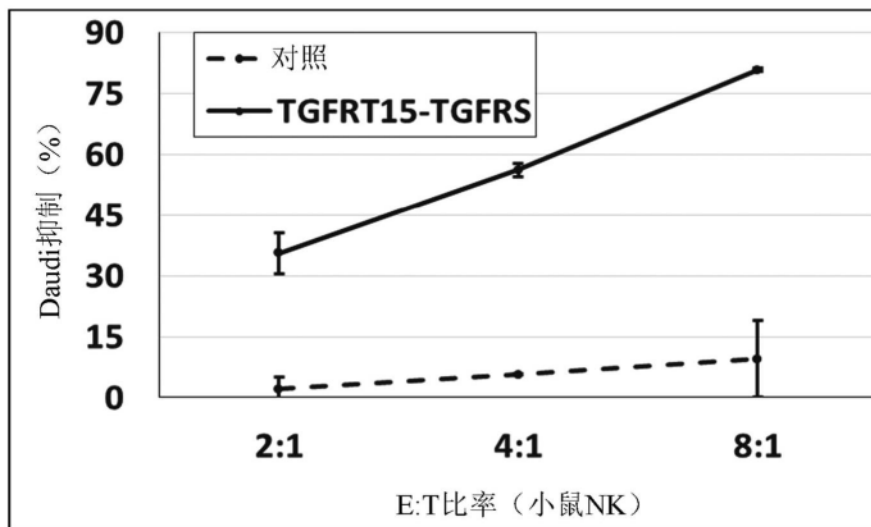


图51B

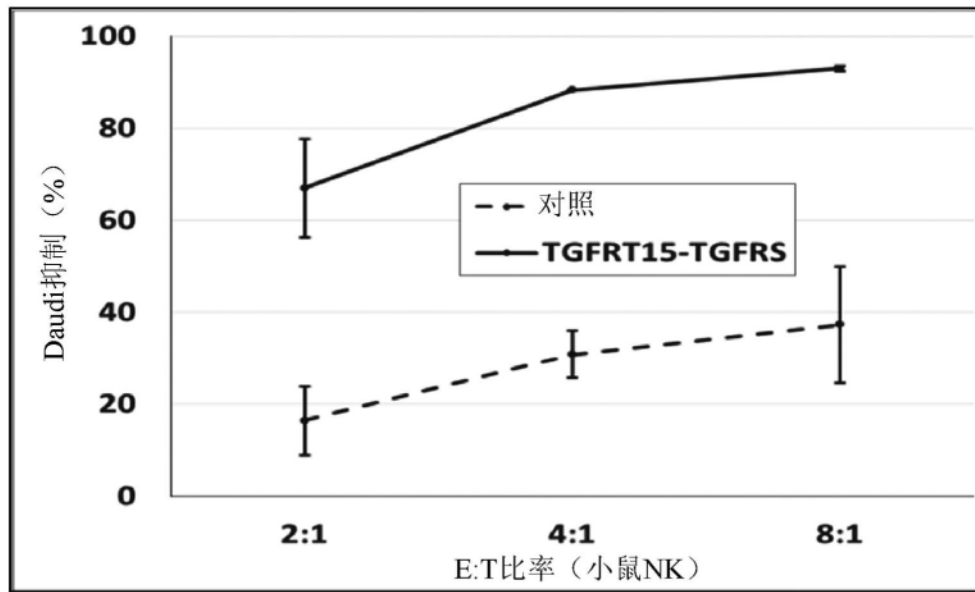


图52A

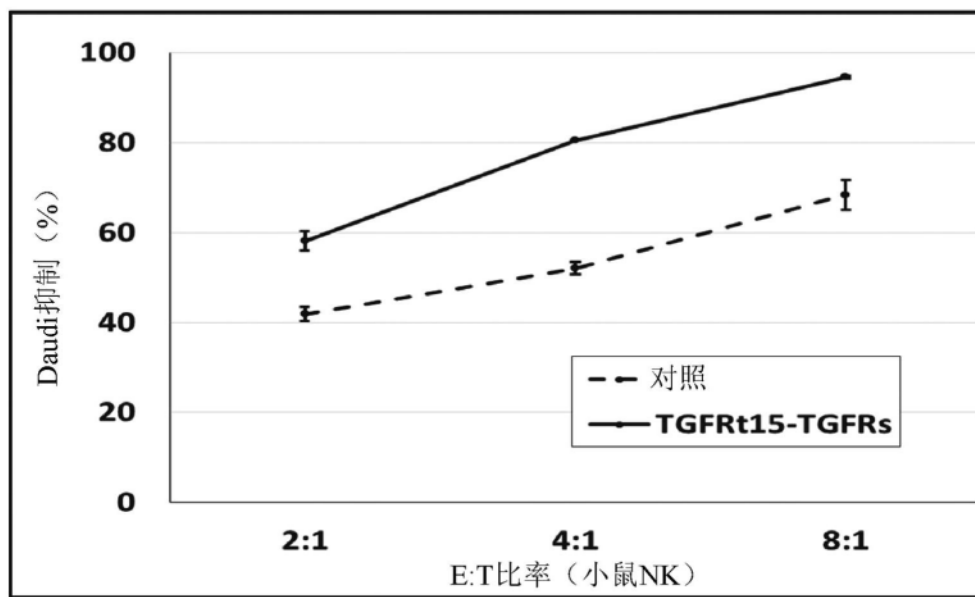


图52B

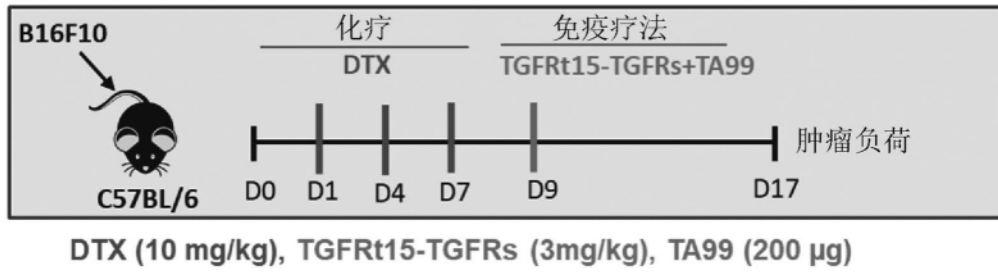


图53A

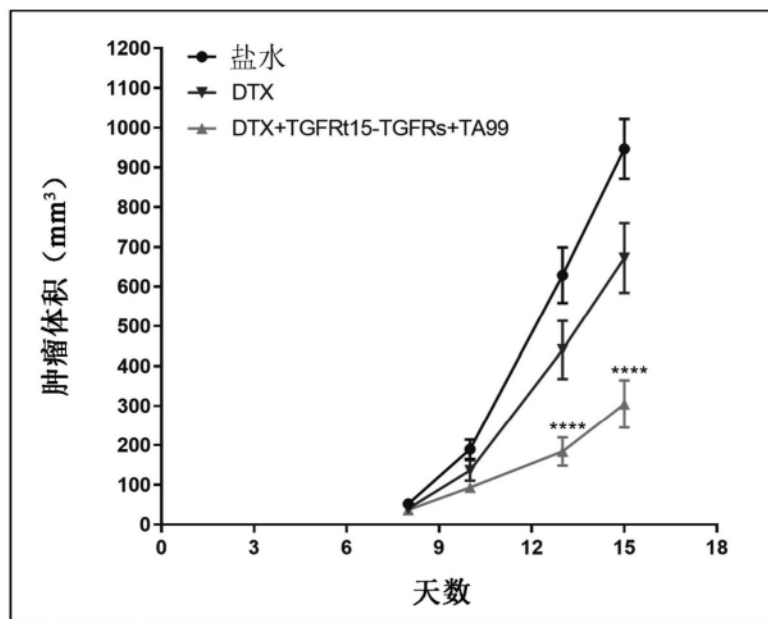


图53B

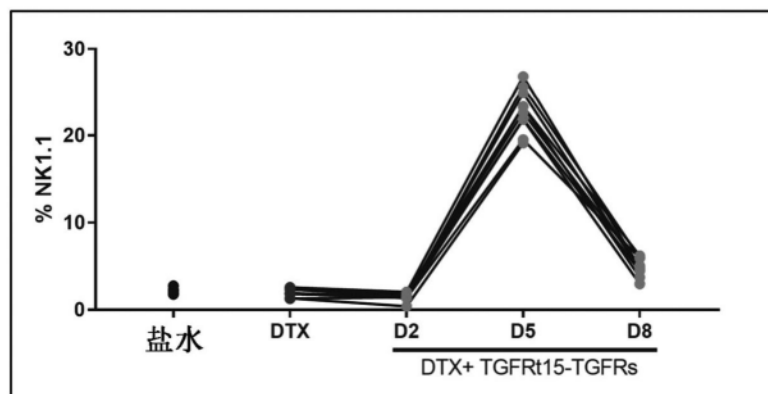


图53C

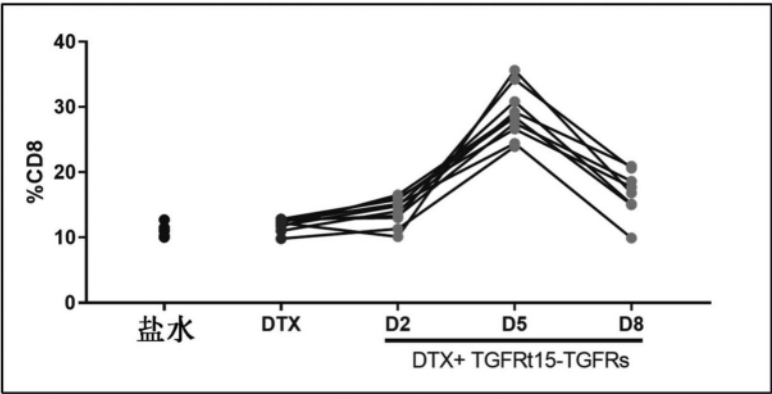


图53D

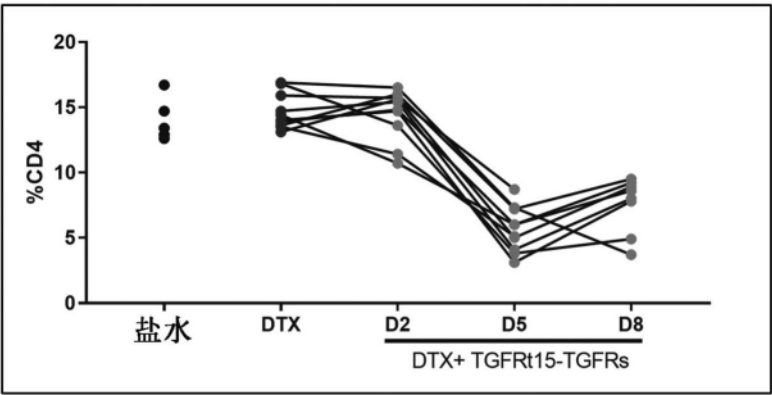


图53E

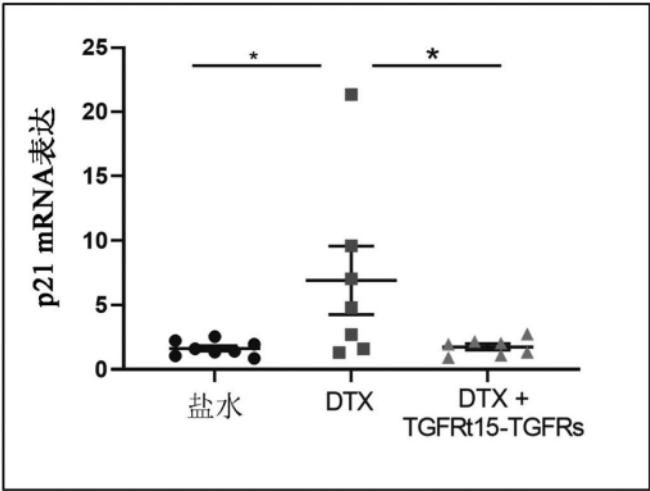


图53F

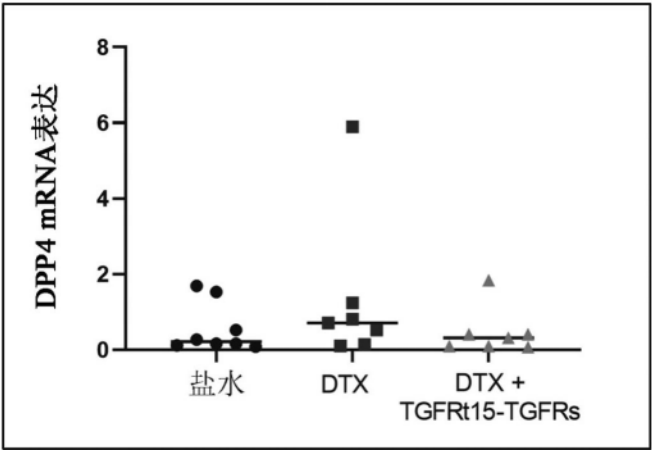


图53G

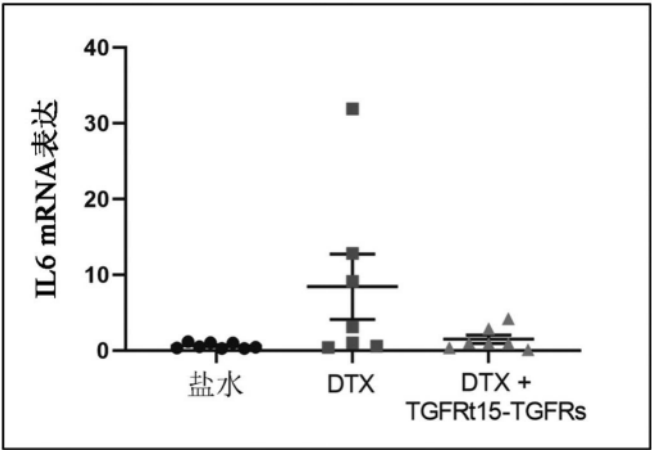


图53H

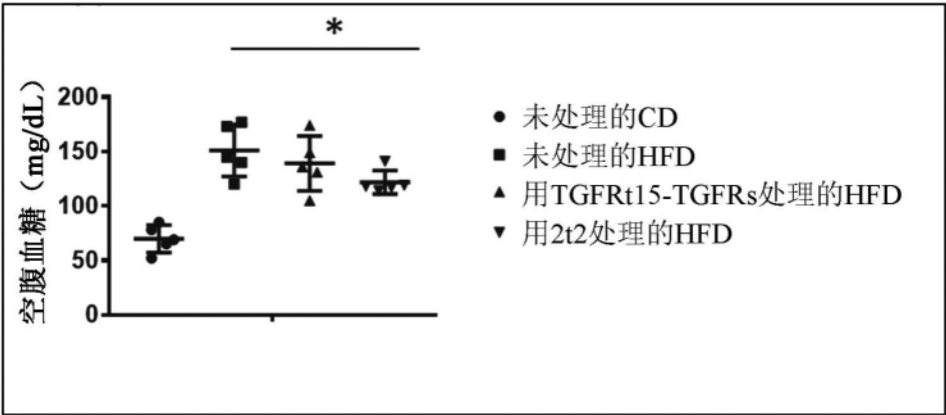


图54A

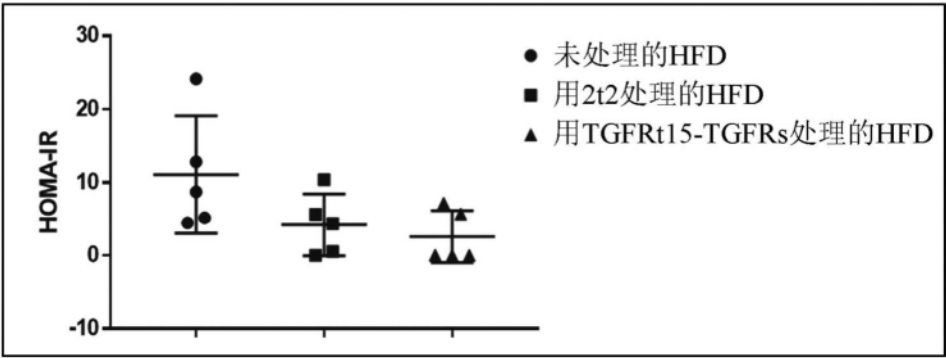


图54B

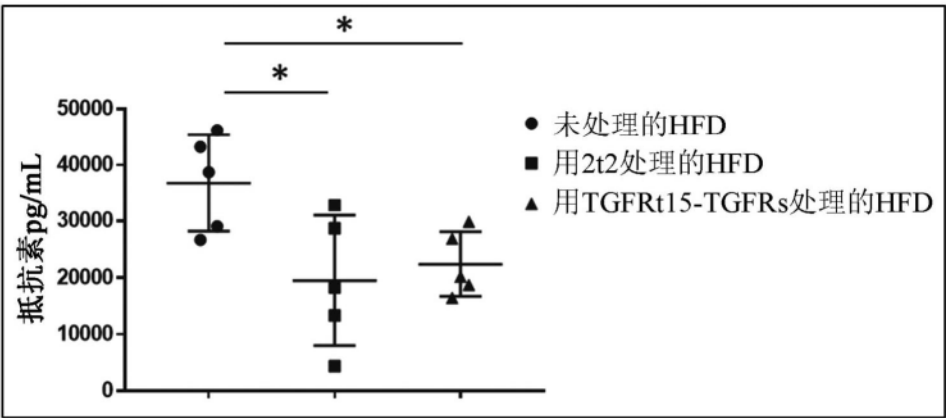


图54C

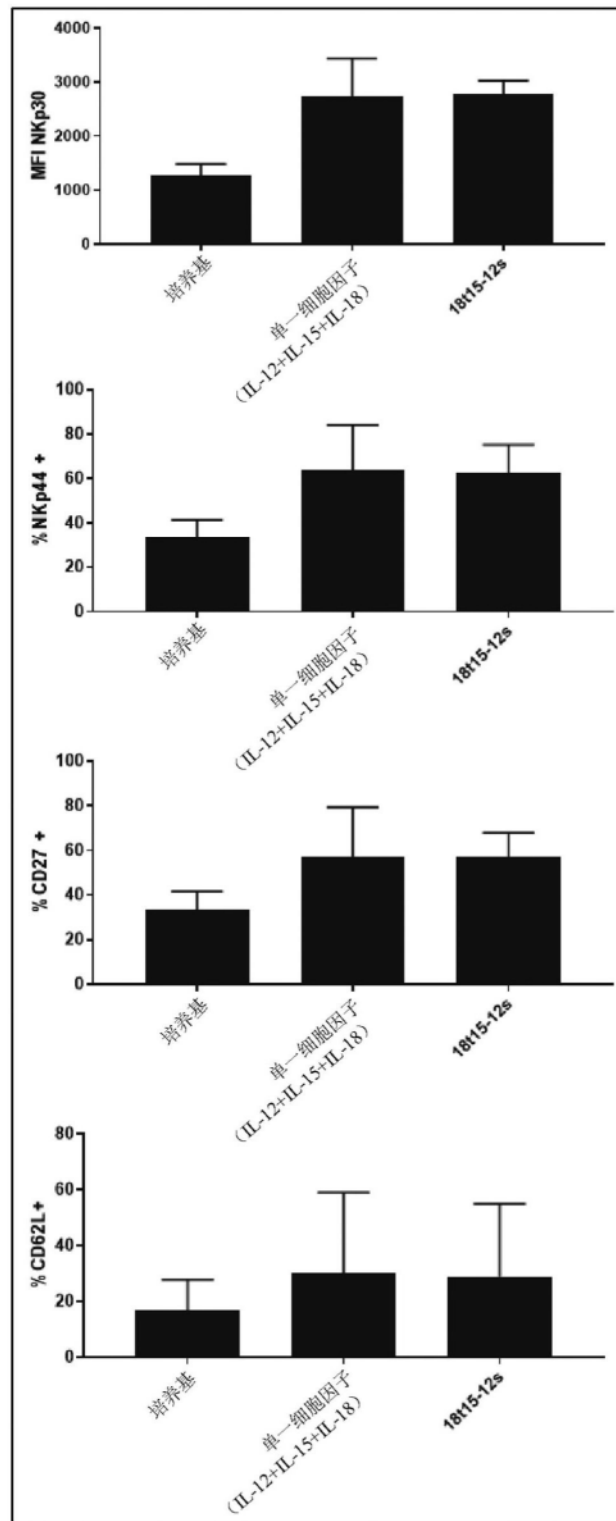


图55

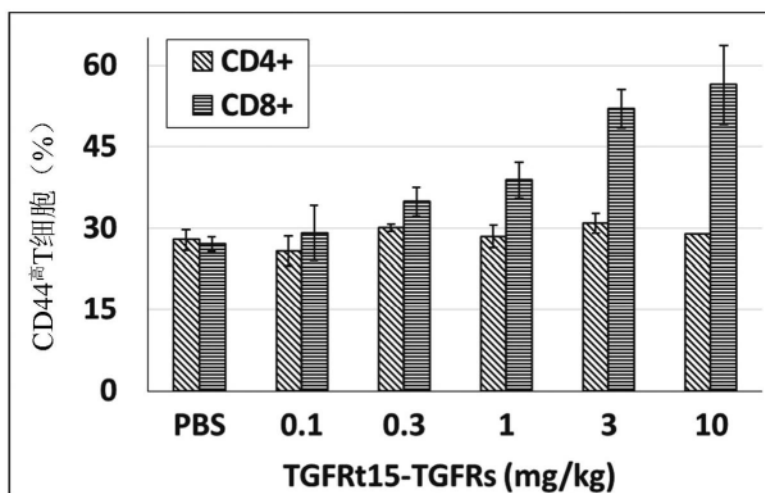


图56

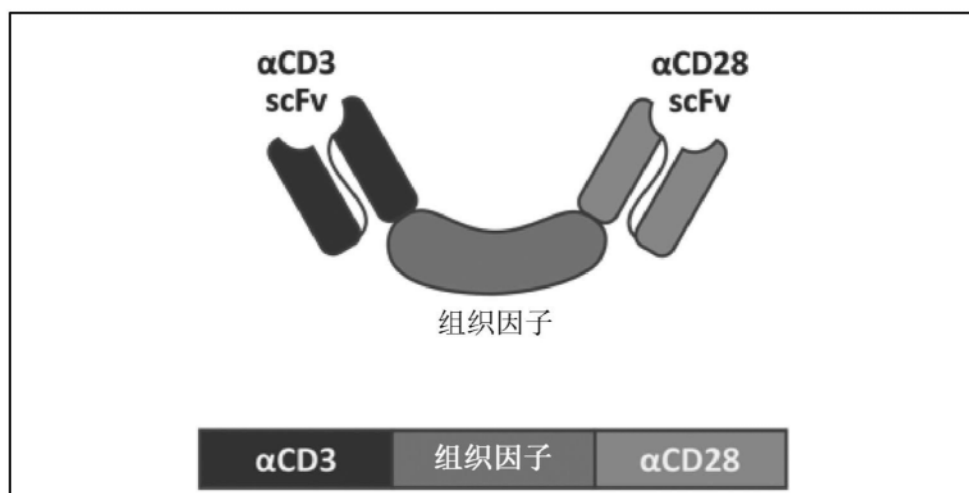


图57

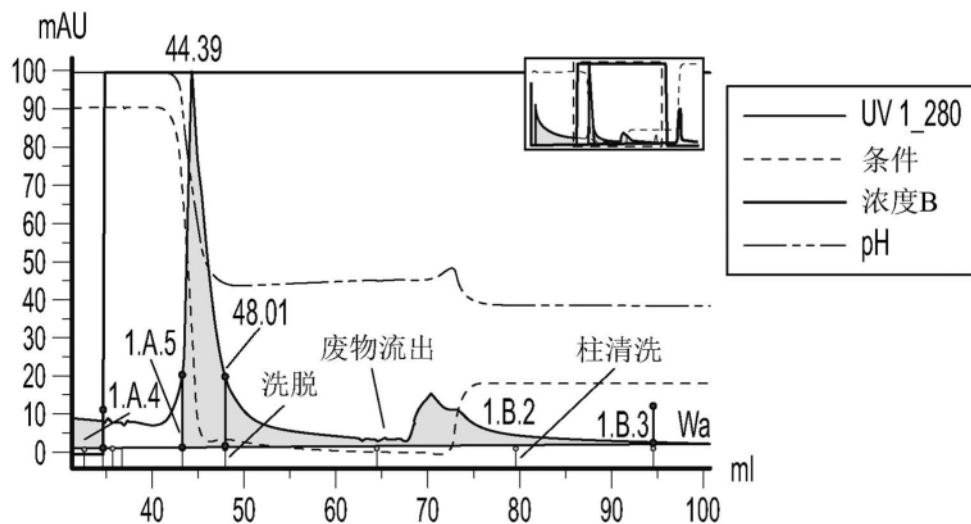


图58

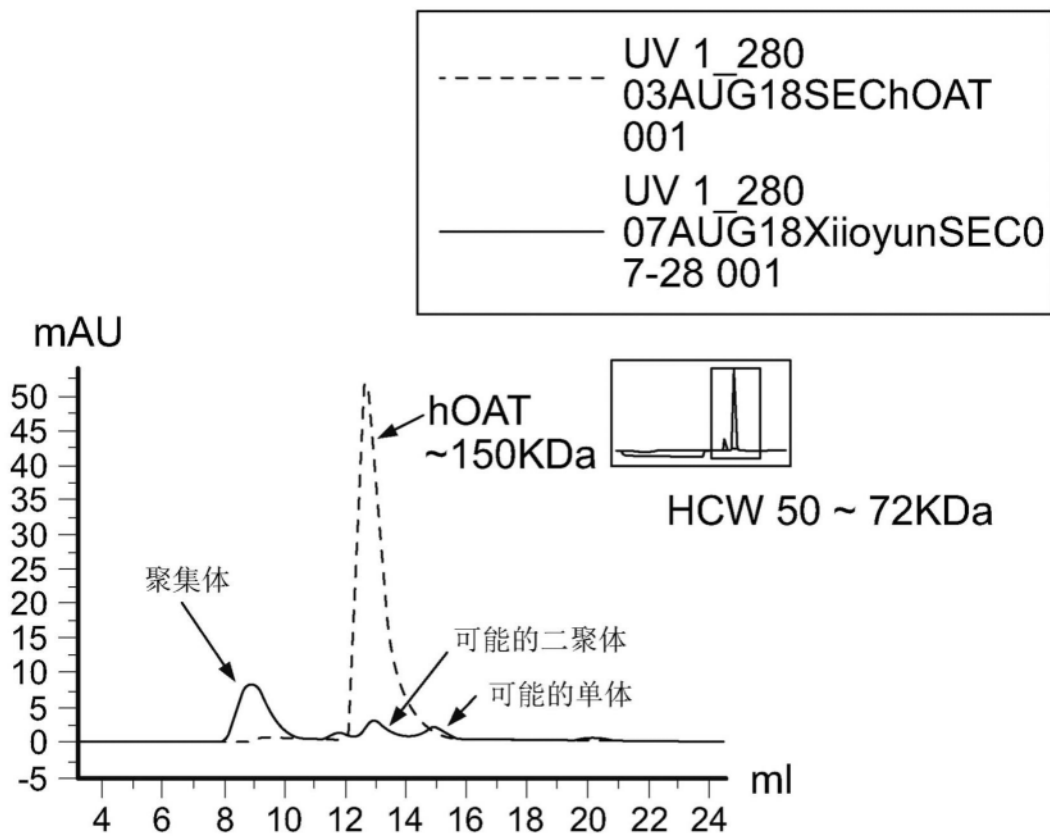


图59

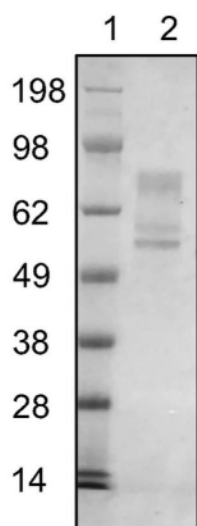


图60

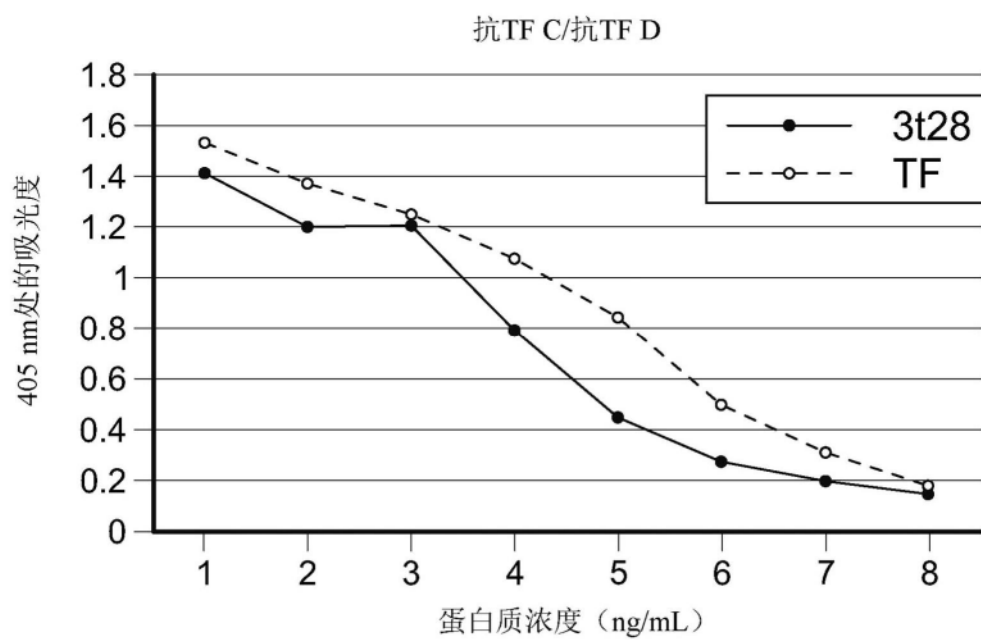


图61

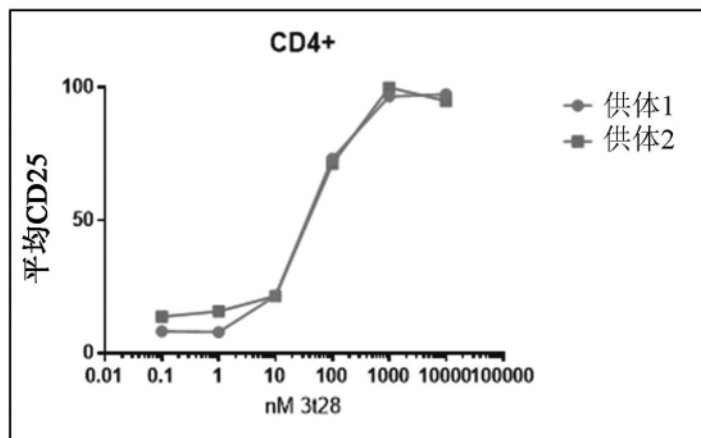


图62

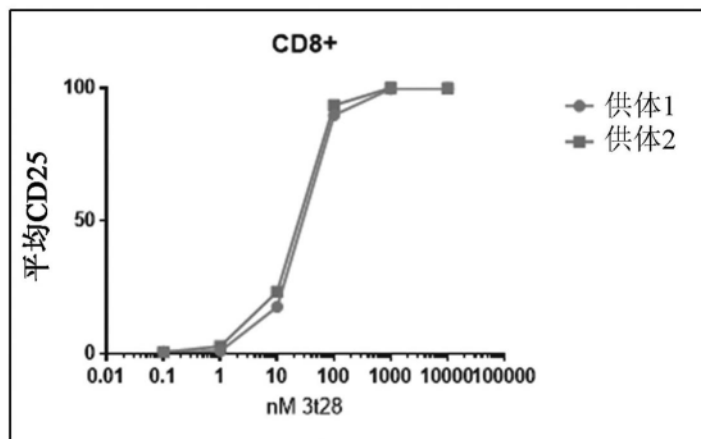


图63

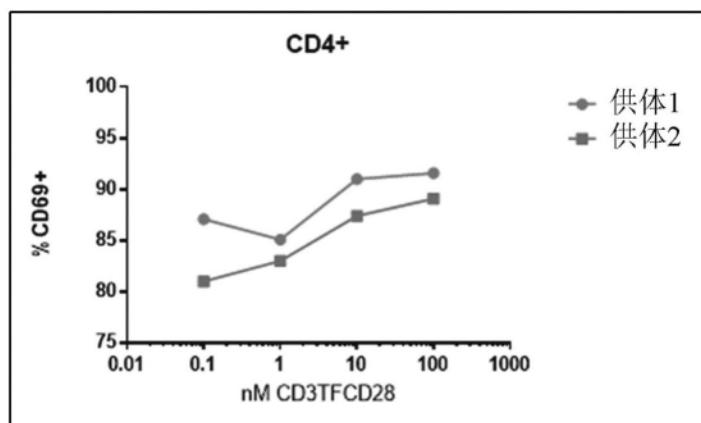


图64

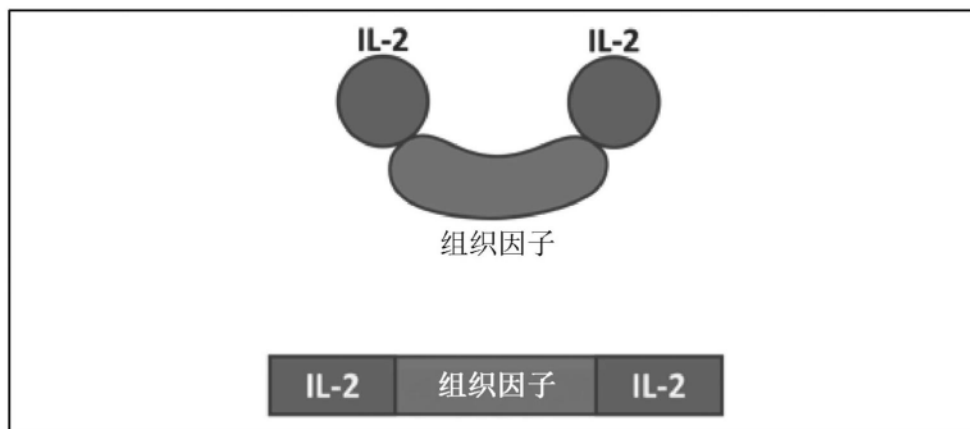


图65

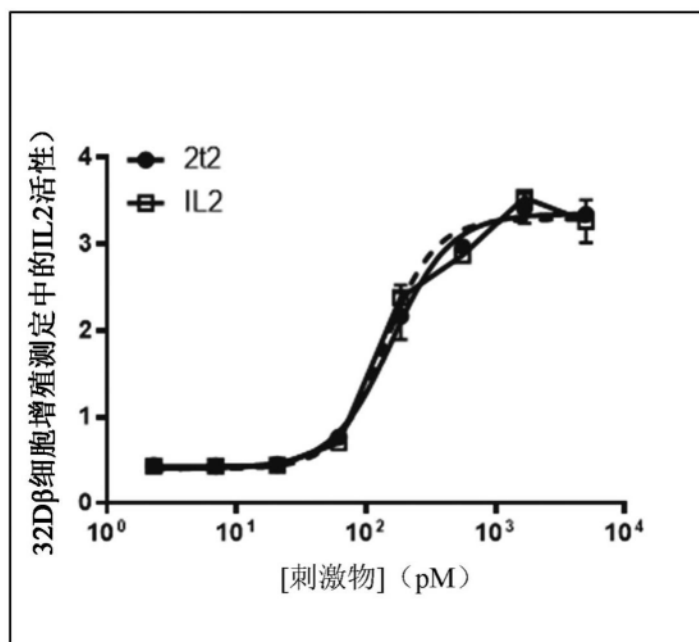


图66

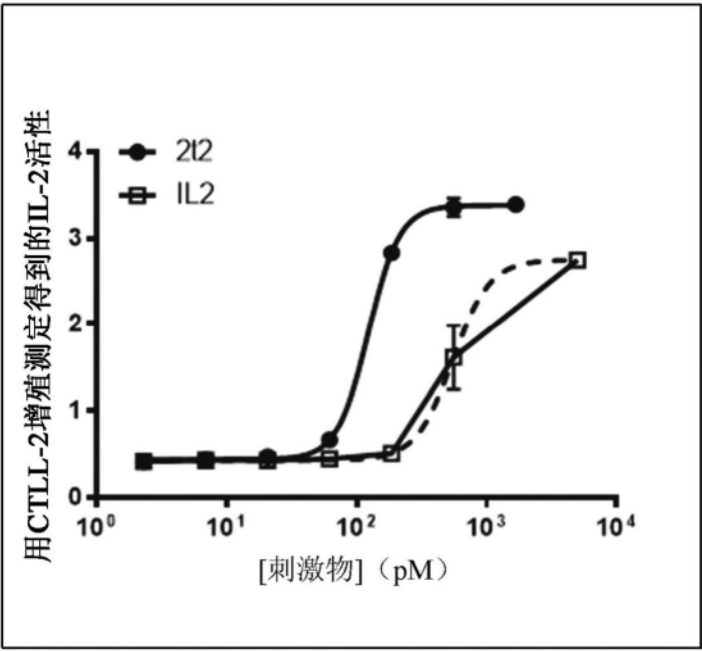


图67

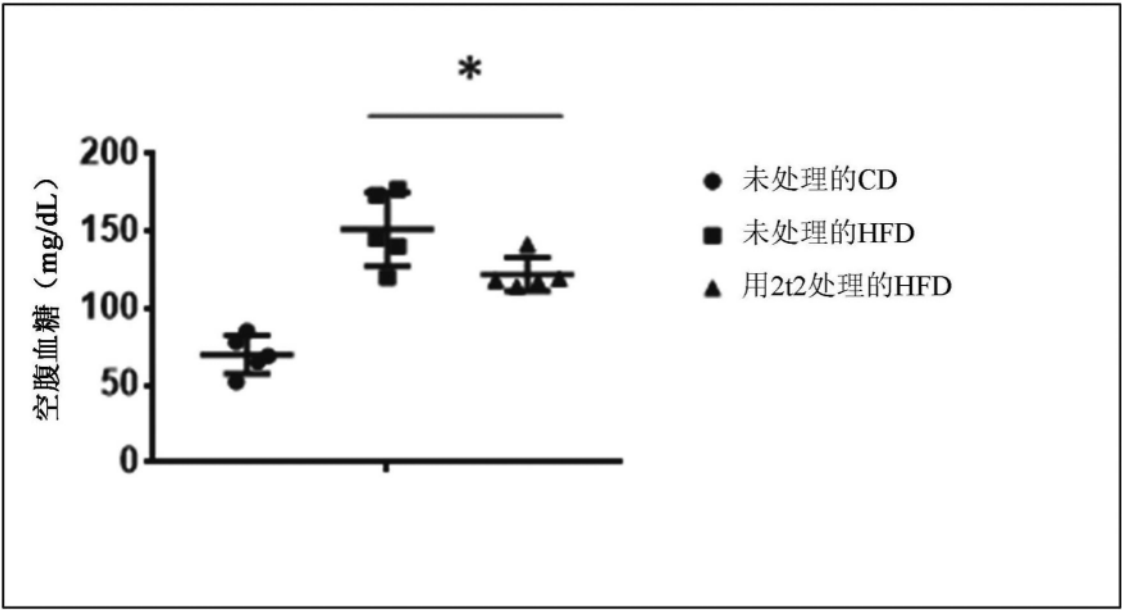


图68

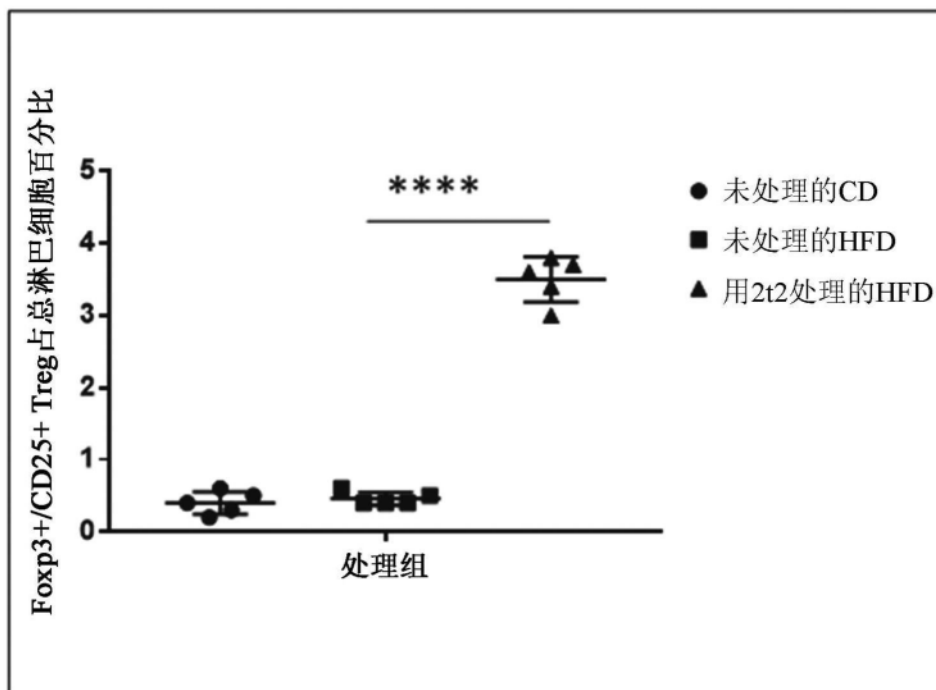


图69

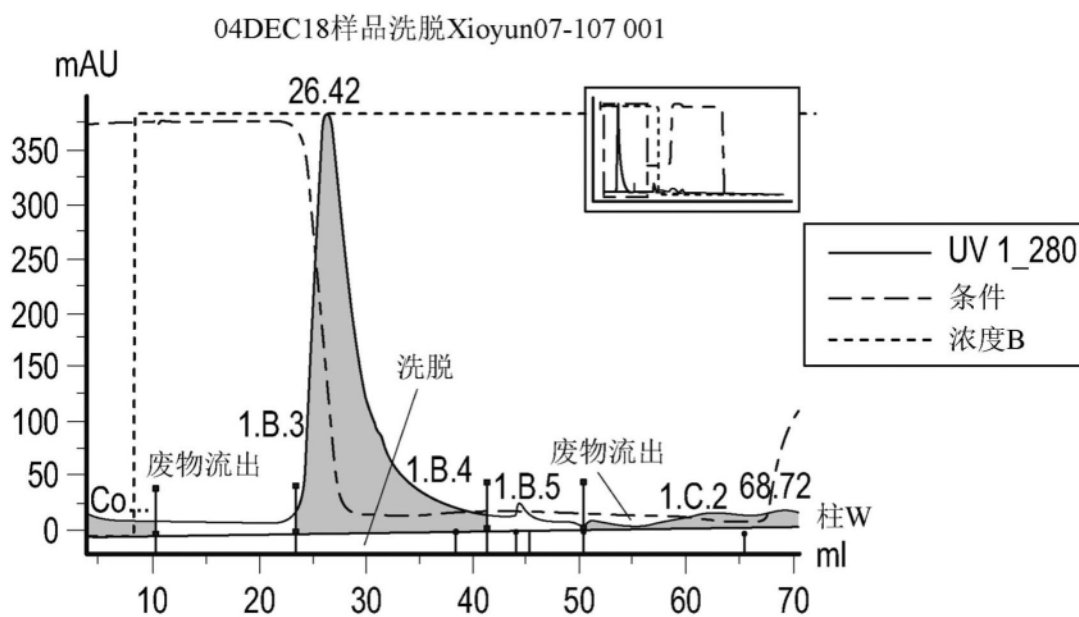


图70

15APR19XiioyunSEC18-06(636909247995606081) 07-107 2702t2 PBS

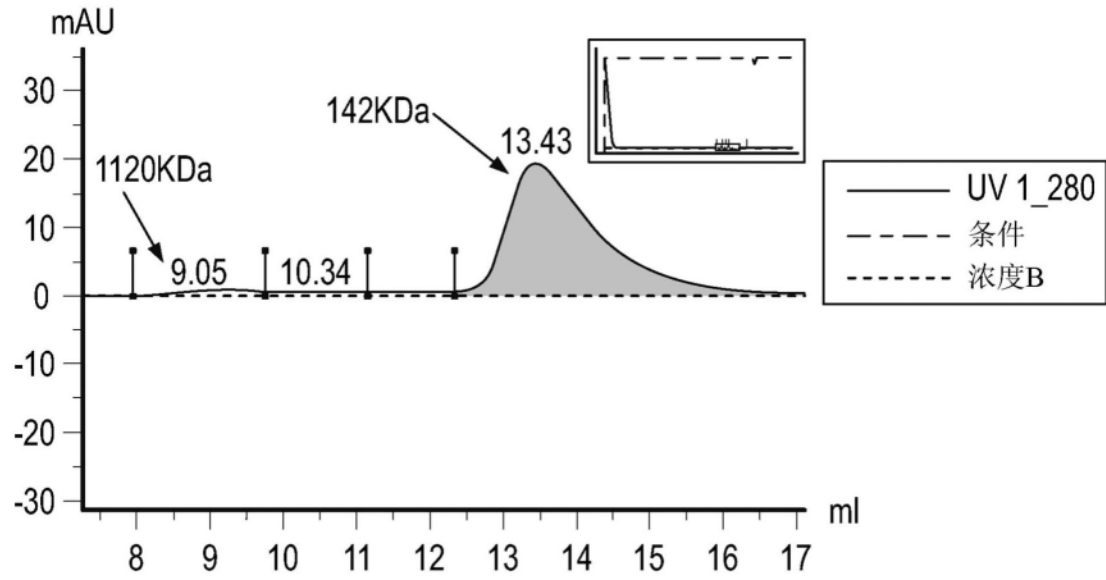


图71

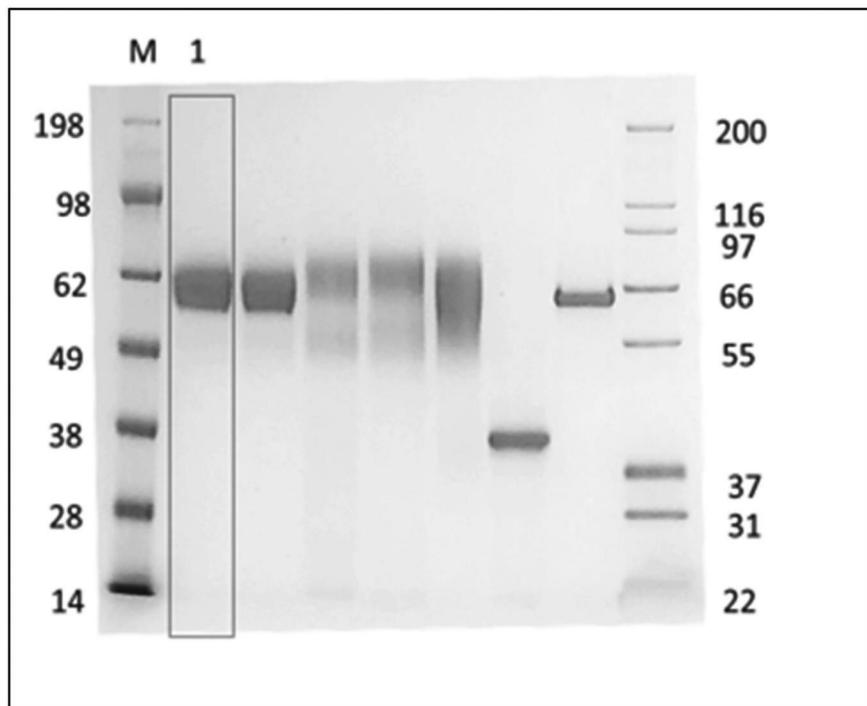


图72A

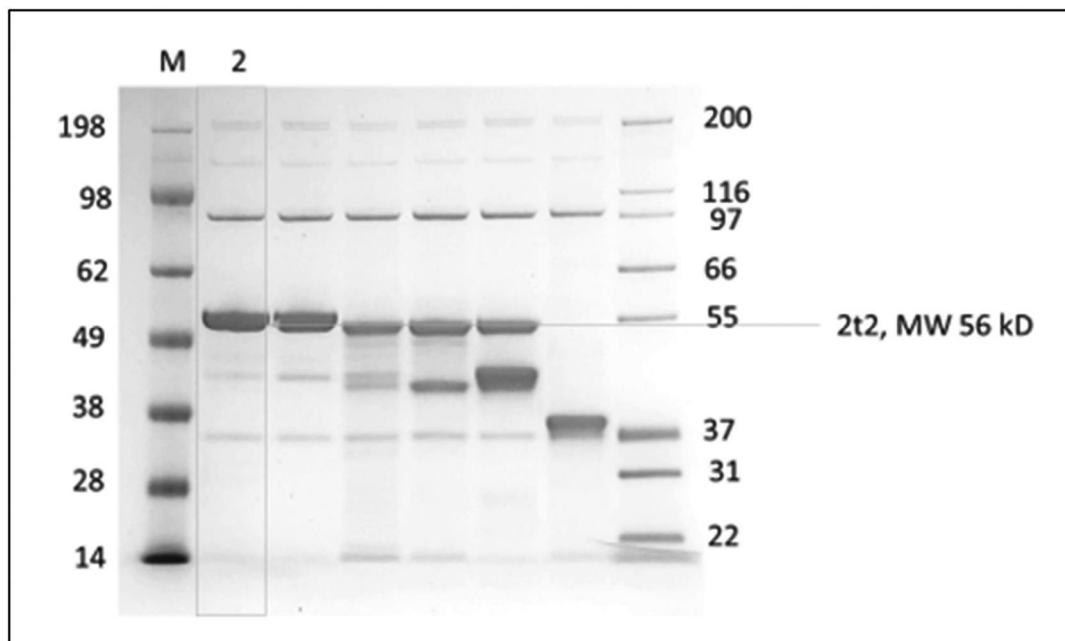


图72B

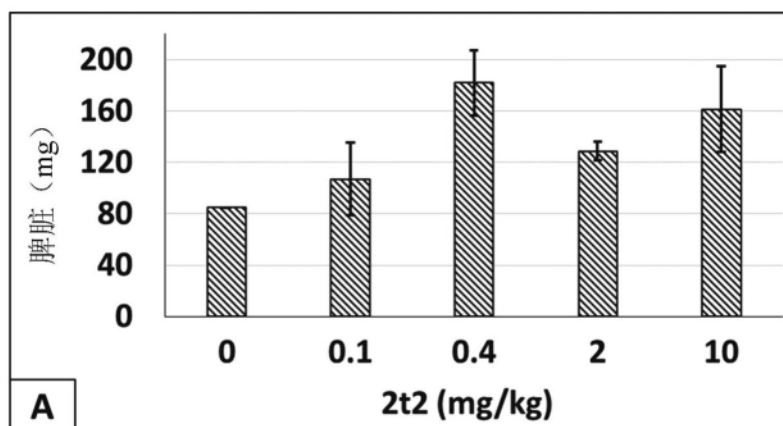


图73A

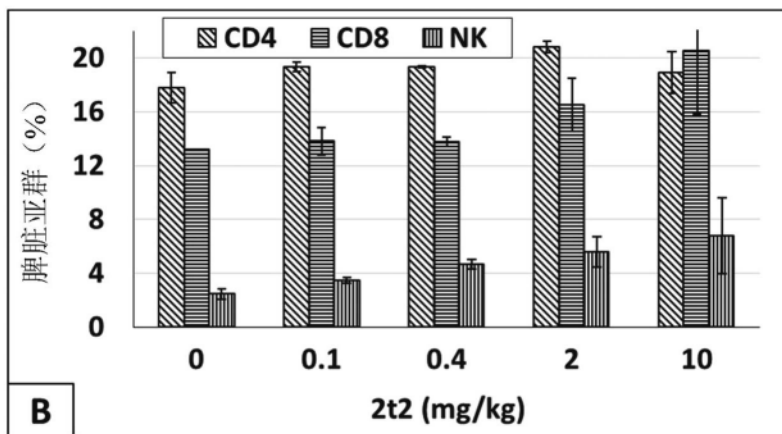


图73B

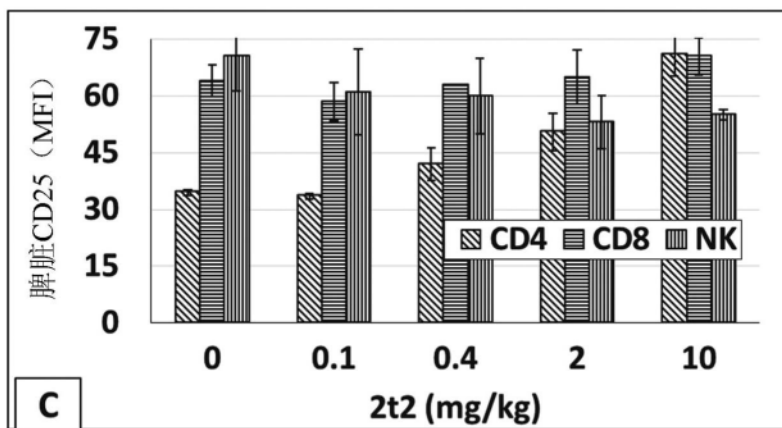


图74

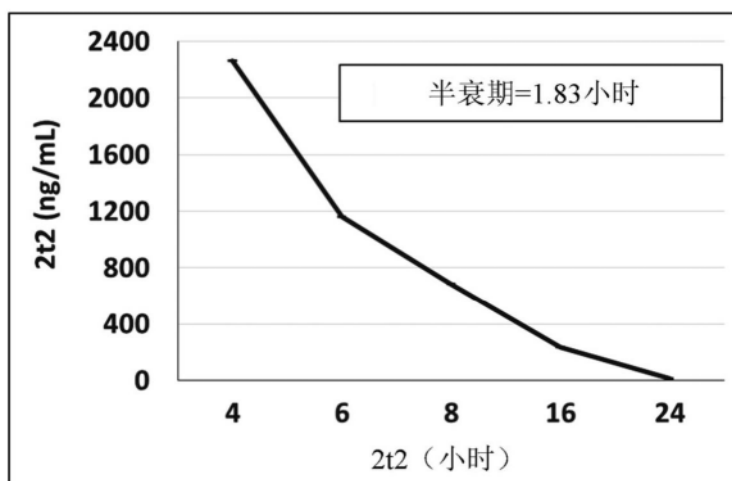


图75

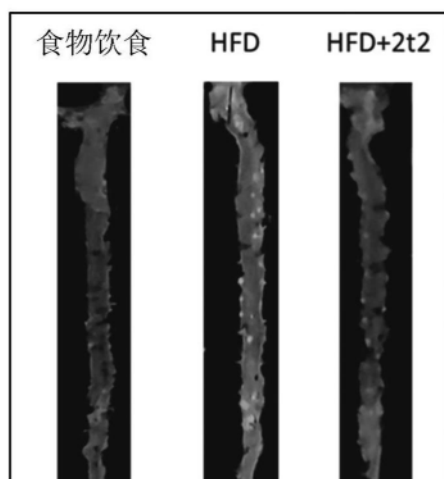


图76A

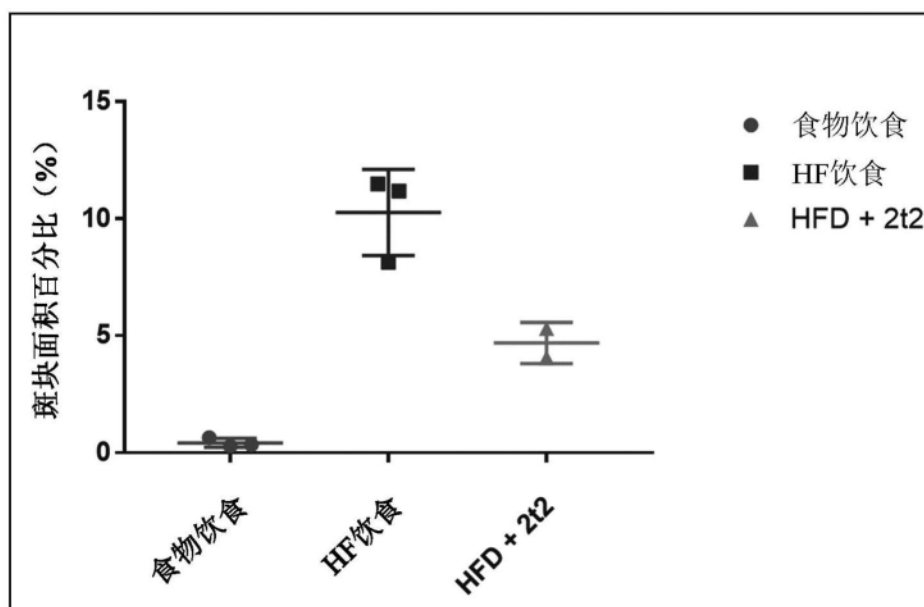


图76B

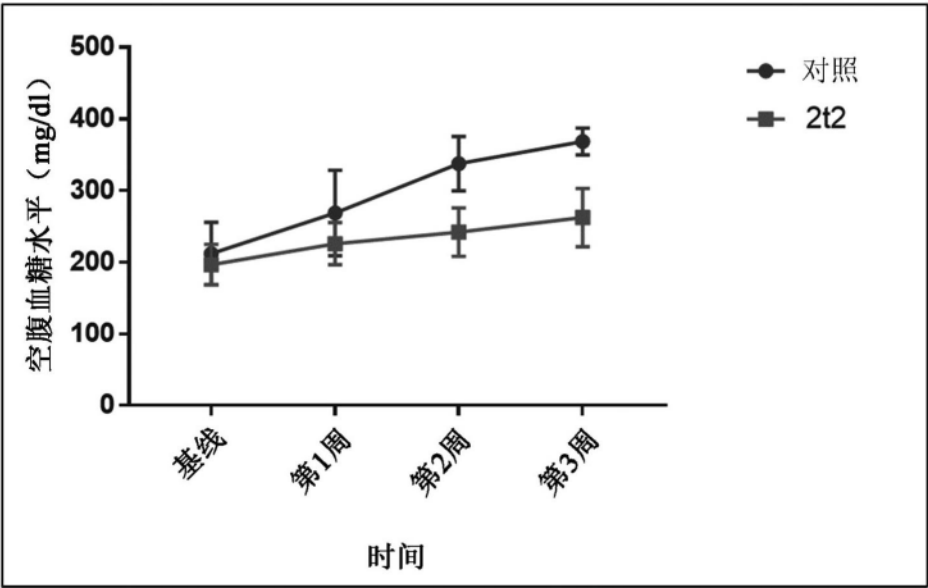


图77

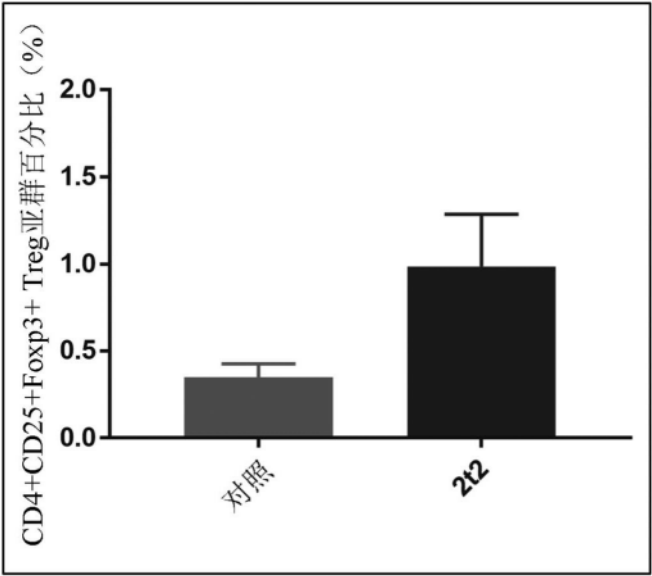


图78

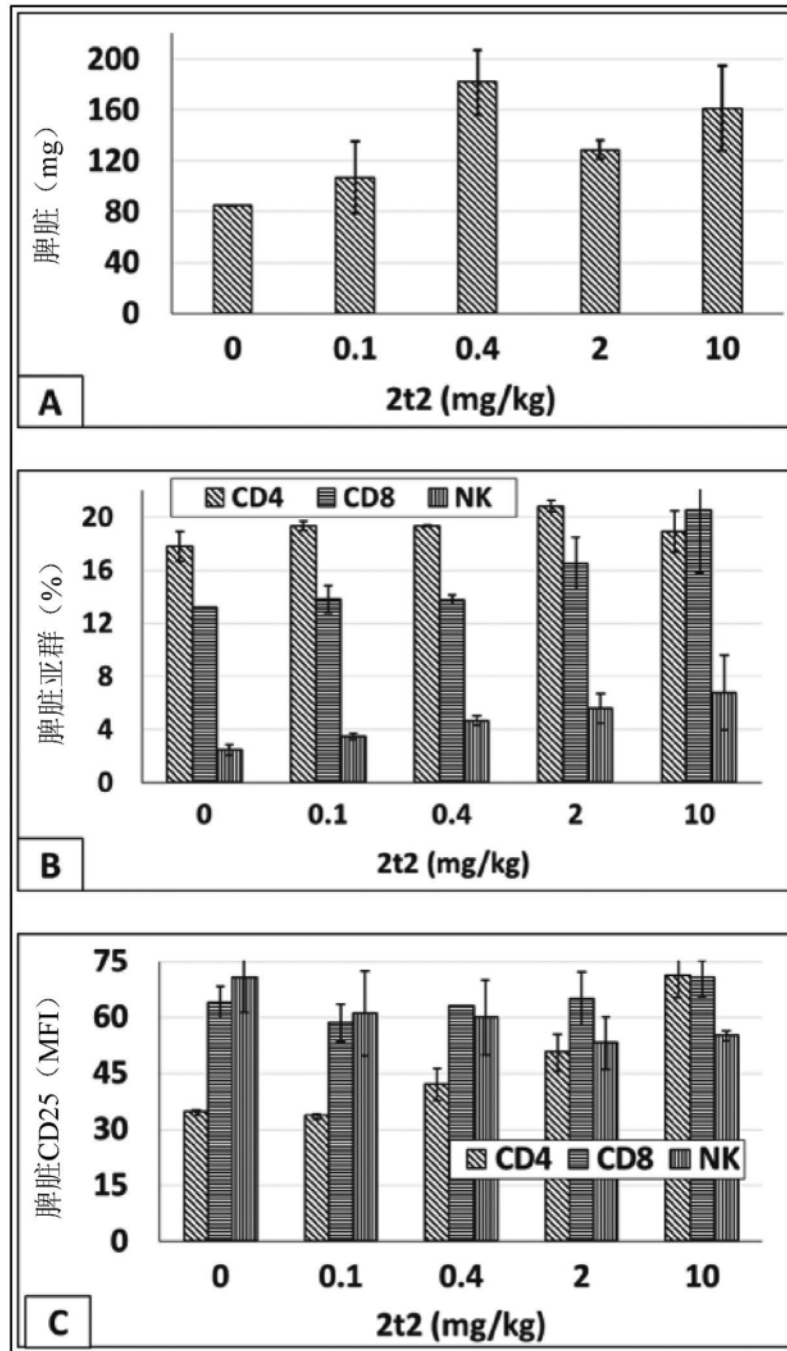


图79

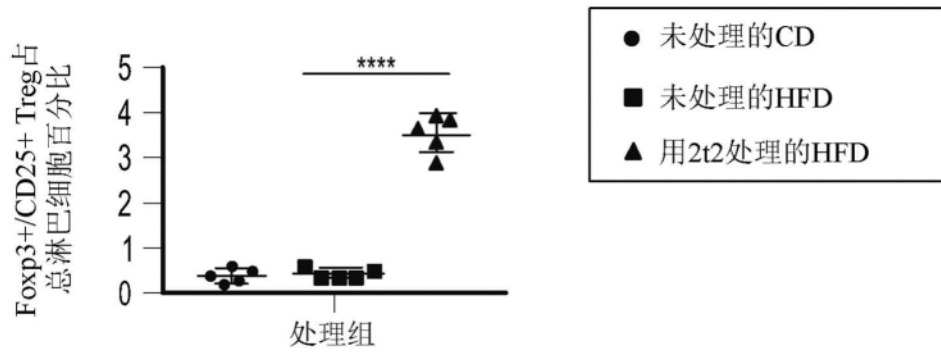


图80A

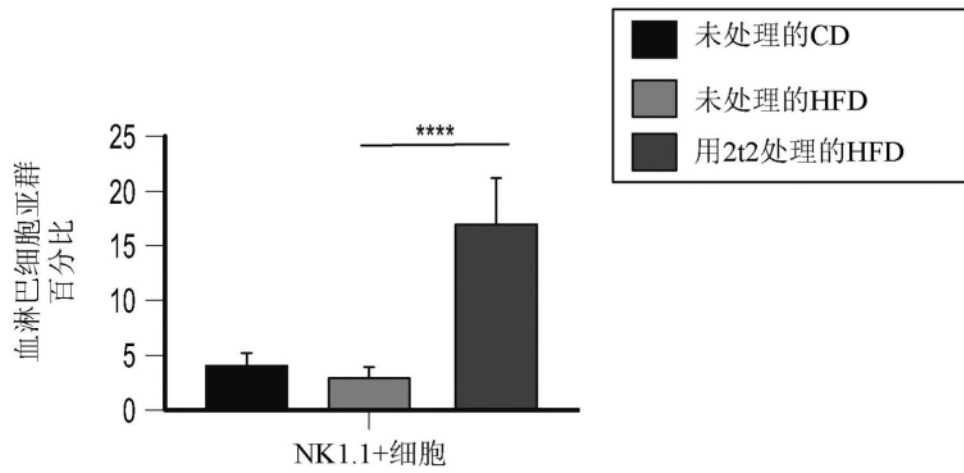


图80B

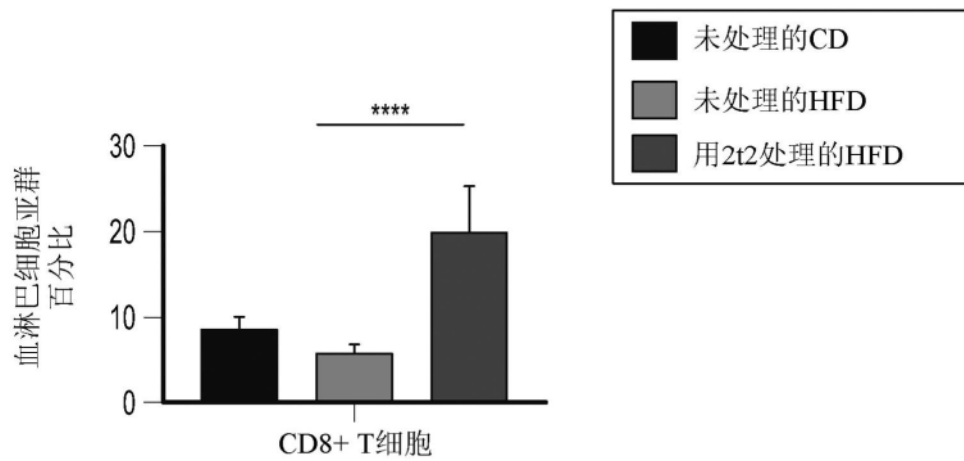


图80C

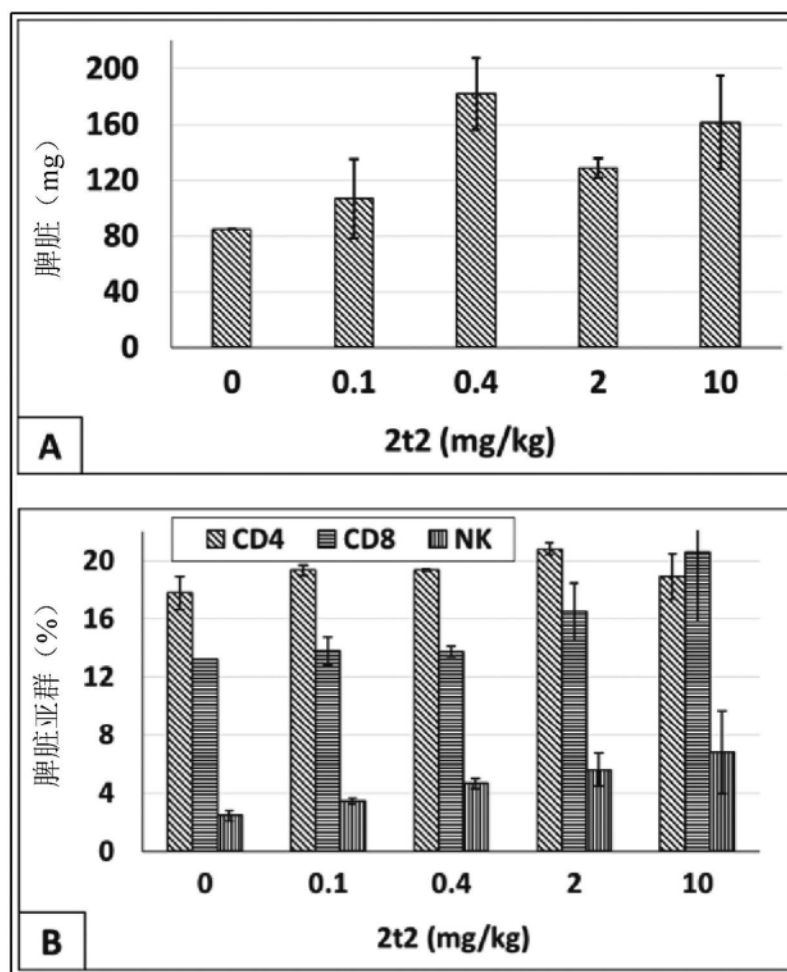


图81

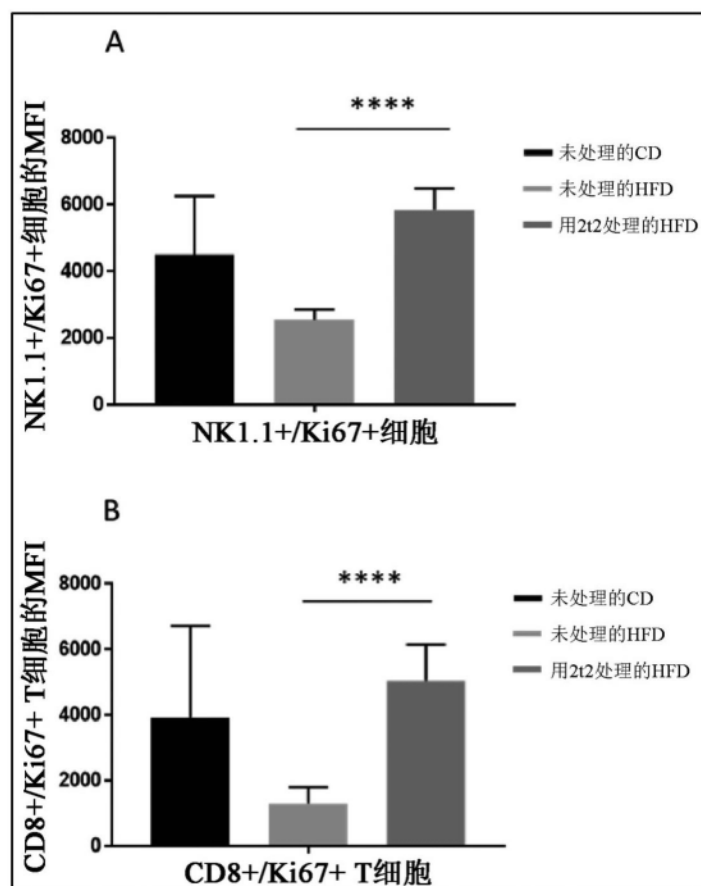


图82

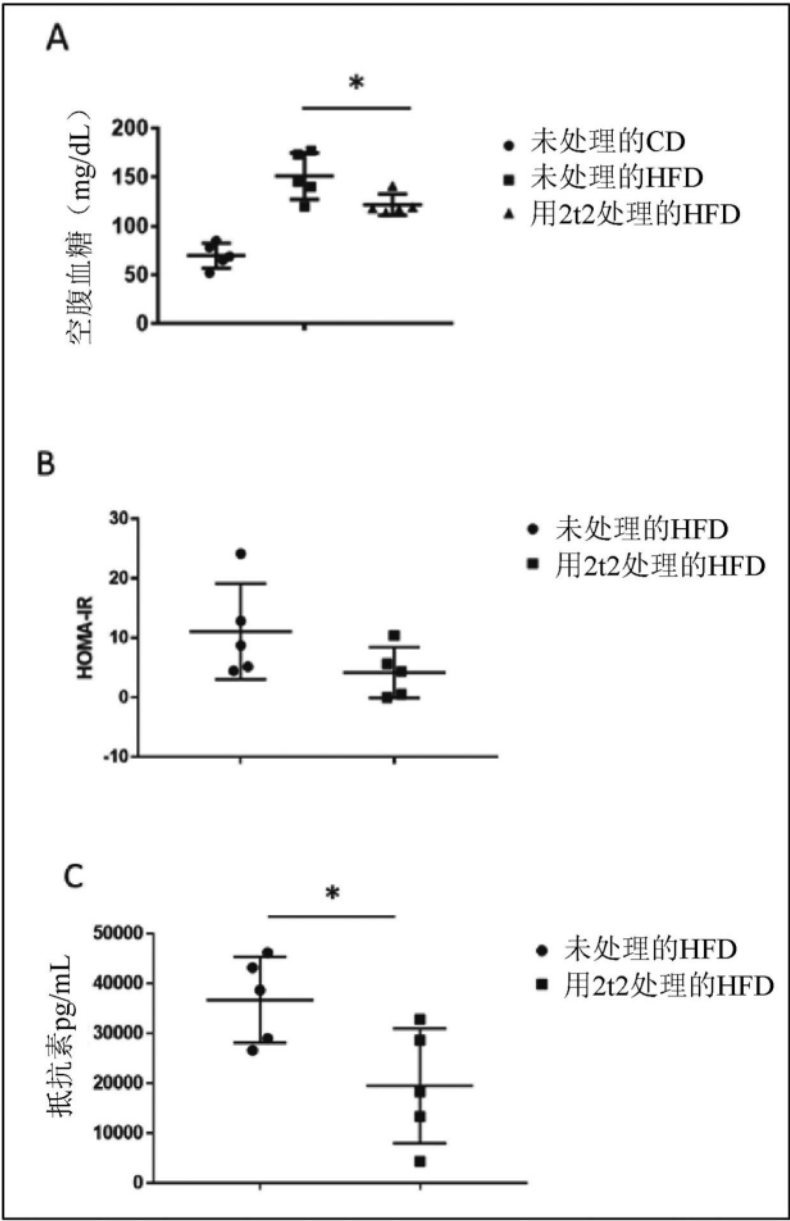


图83

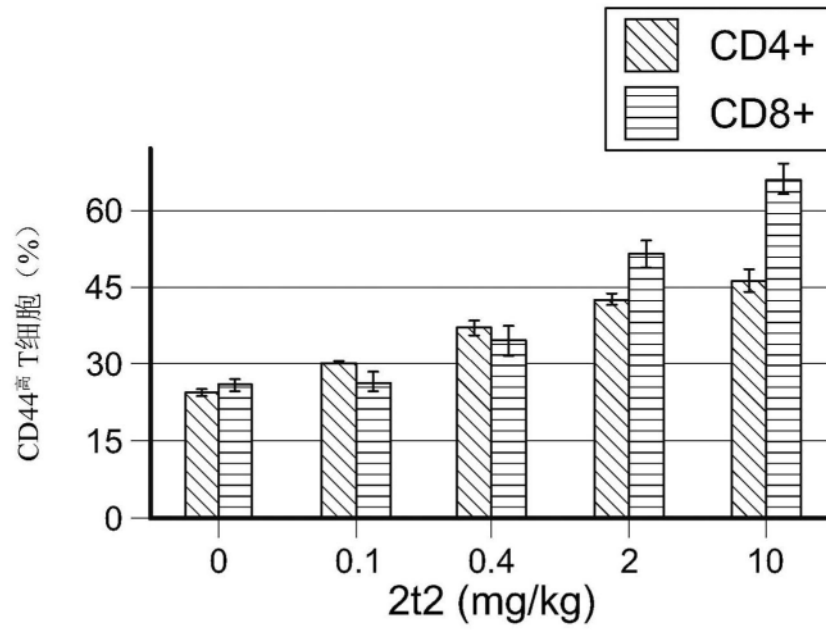


图84

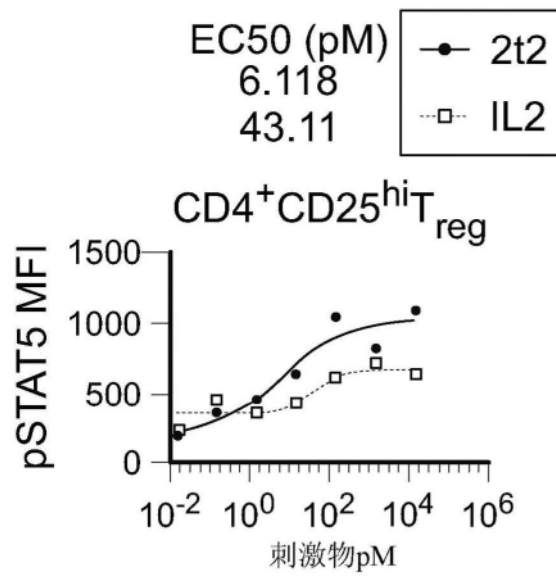


图85A

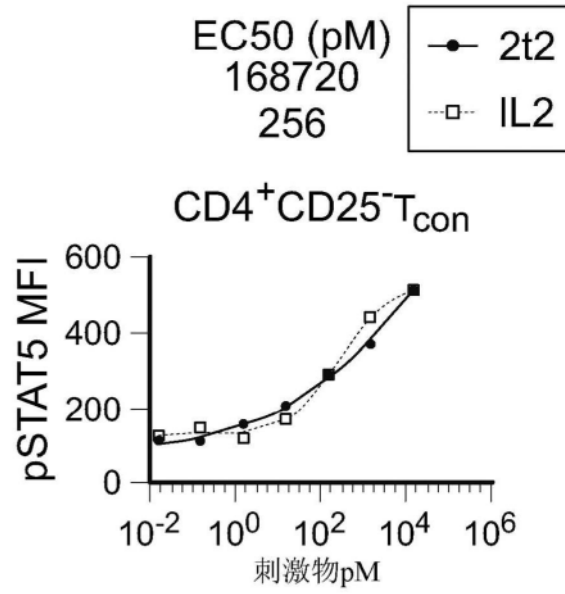


图85B

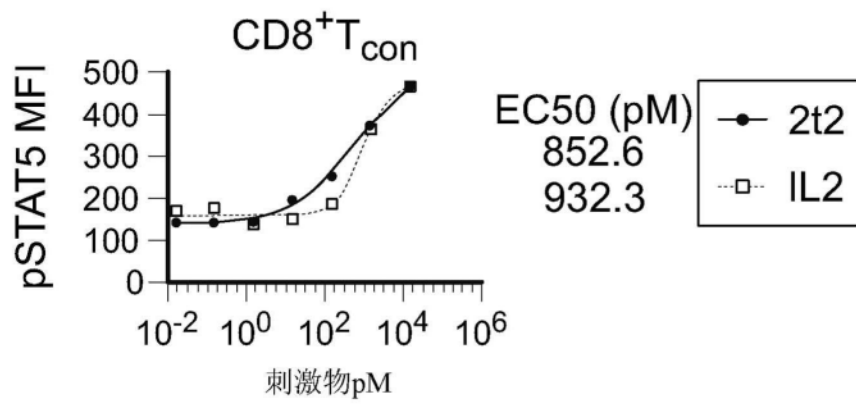


图85C

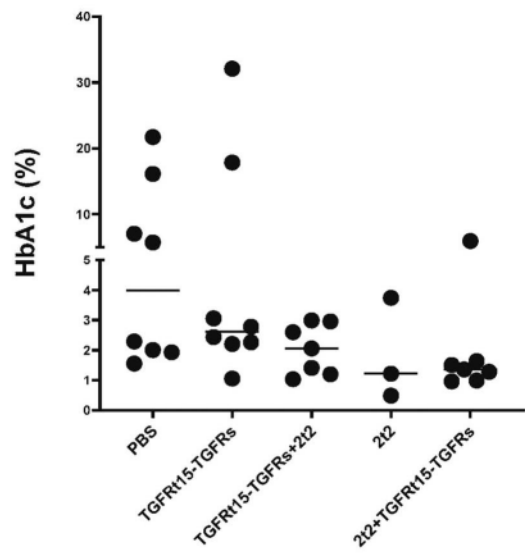


图86

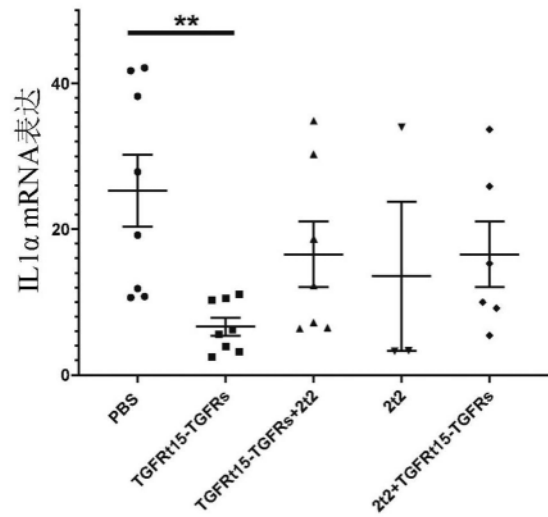


图87A

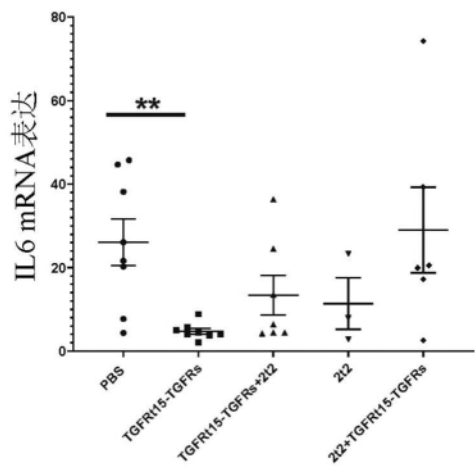


图87B

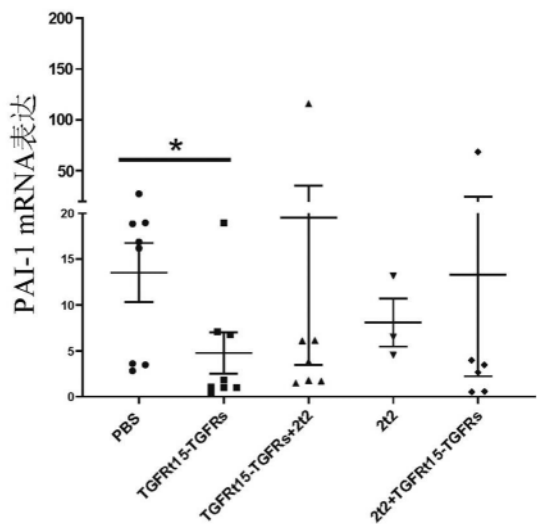


图87C

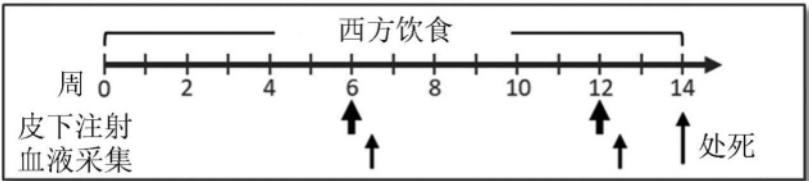


图88A

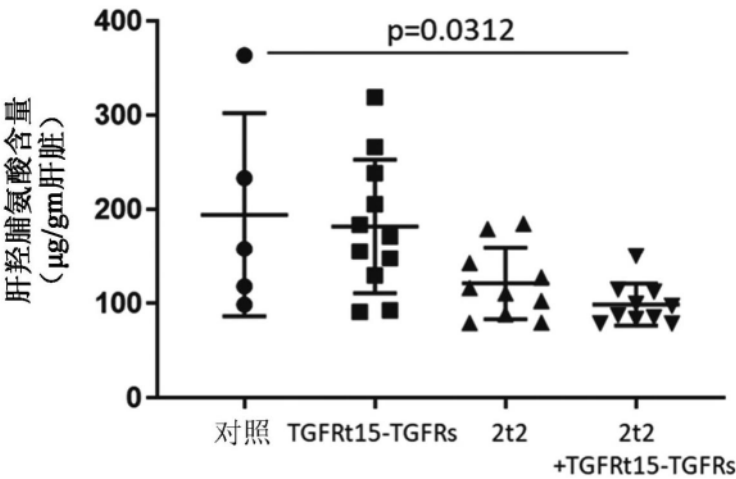


图88B

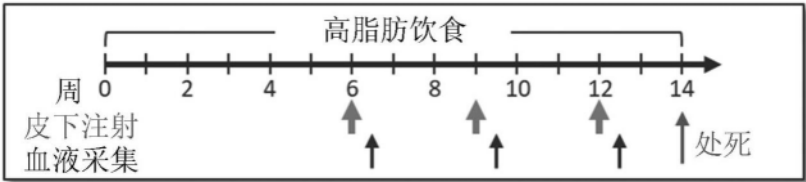


图89A

血浆细胞因子	未处理	2t2处理	P值
	血浆水平 (pg/ml) (M $\pm$ SEM)	血浆水平 (pg/ml) (M $\pm$ SEM)	
IL-1 β	21.75 $\pm$ 5.73	4.94 $\pm$ 2.02	0.03
GM-CSF	16.62 $\pm$ 3.5	29.88 $\pm$ 5.86	0.07
IL-6	26.33 $\pm$ 8.52	14.15 $\pm$ 2.60	0.25
IL-10	57.55 $\pm$ 28.29	19.68 $\pm$ 9.10	0.24
MCP-1	210.8 $\pm$ 33.42	109.2 $\pm$ 24.46	0.03
TNF- α	31.25 $\pm$ 12.65	13.56 $\pm$ 1.735	0.24

图89B

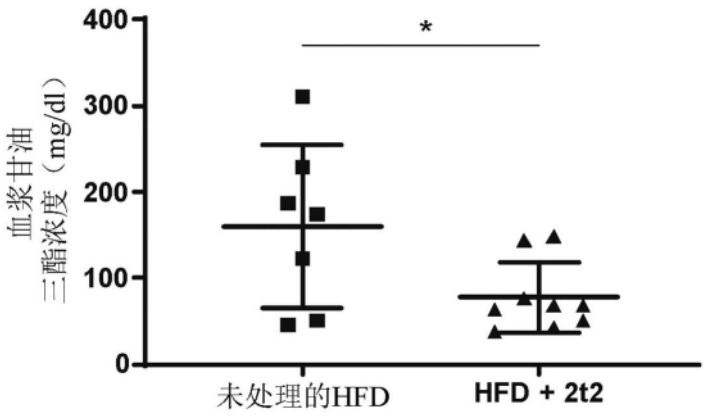


图90

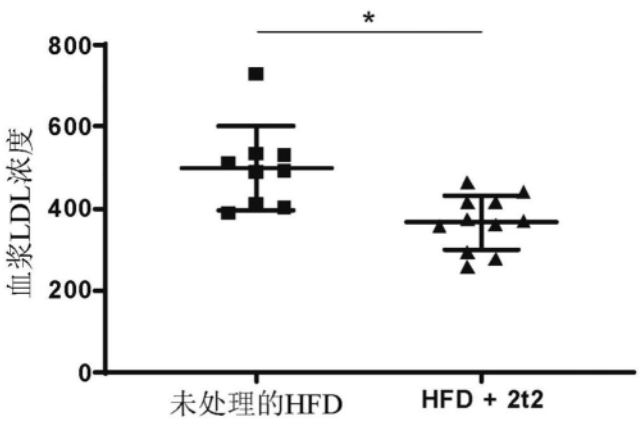


图91

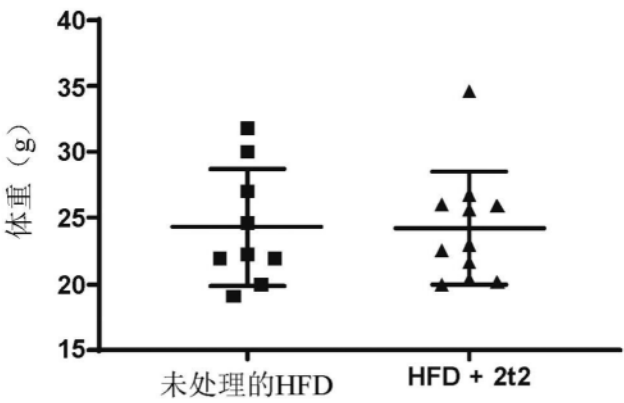


图92

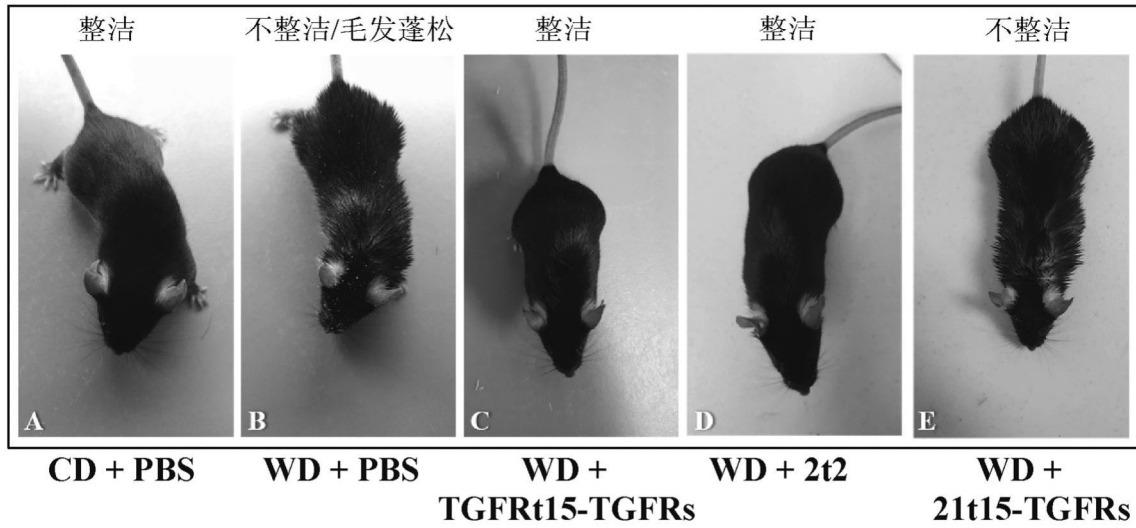


图93A-93E

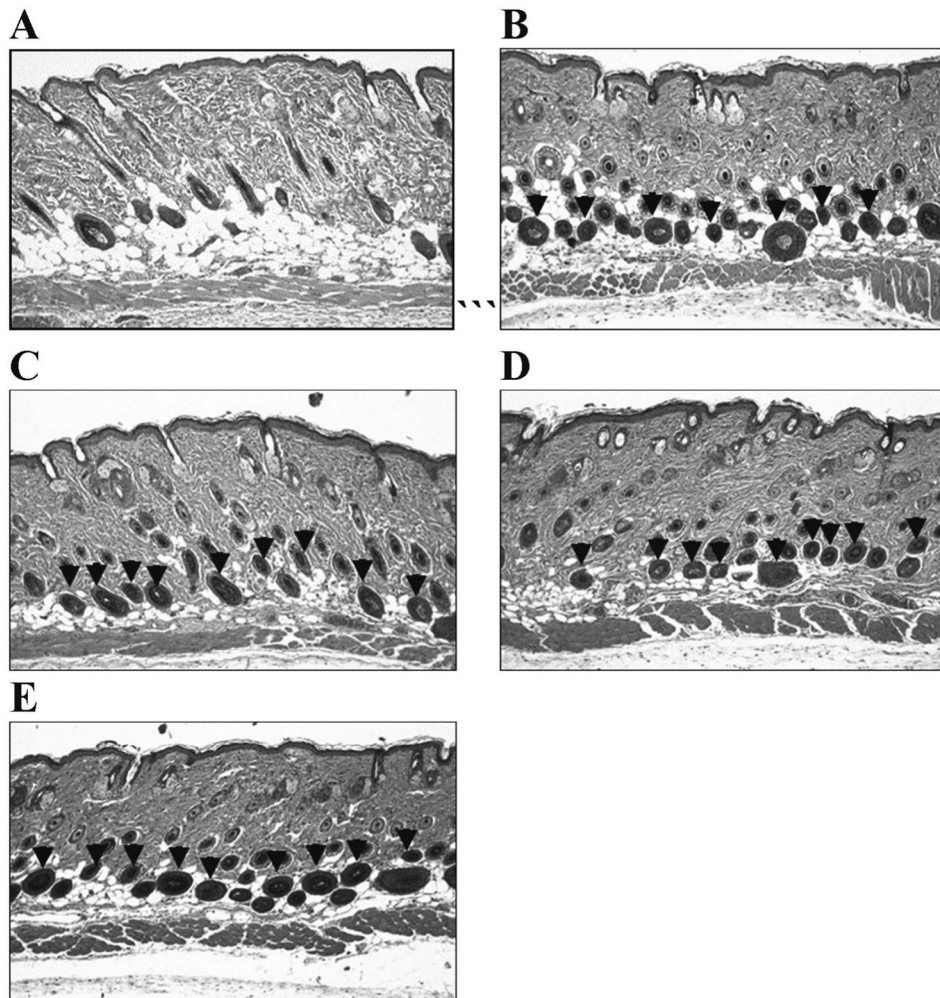


图94A-94E

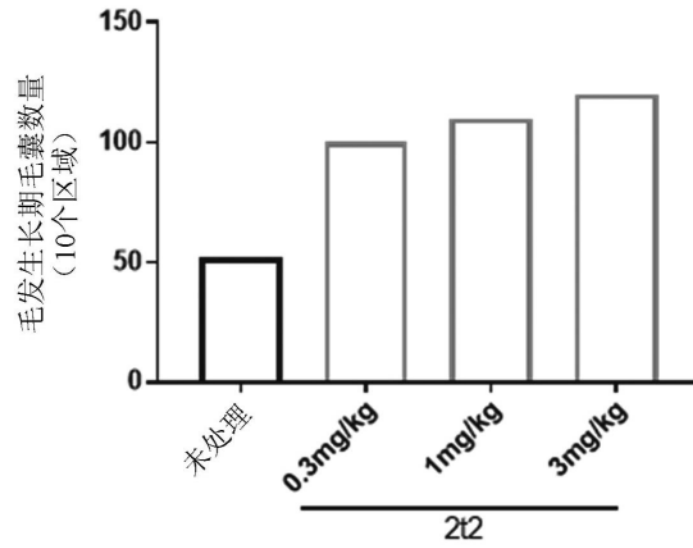


图95

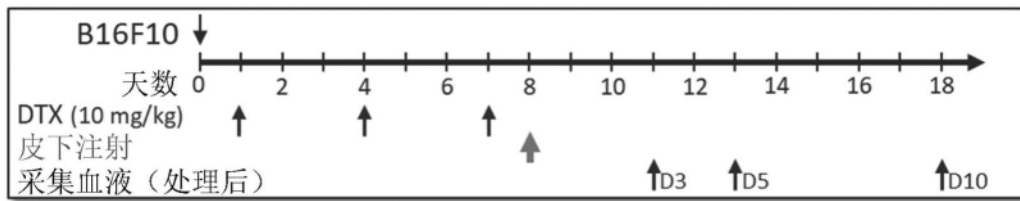


图96

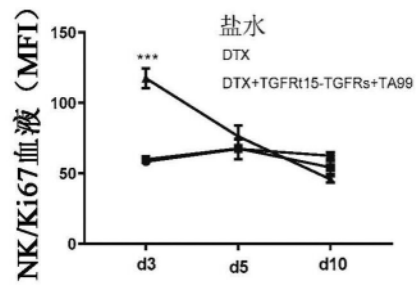


图97A

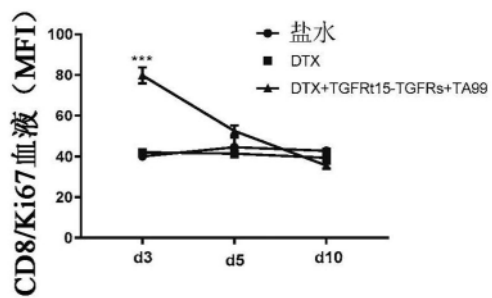


图97B

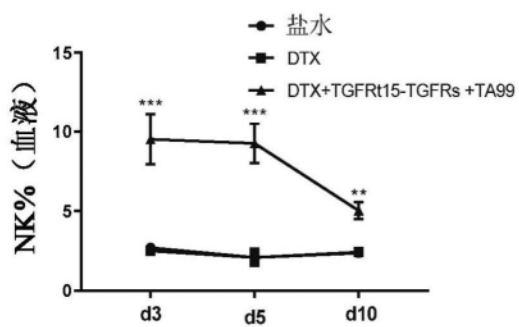


图97C

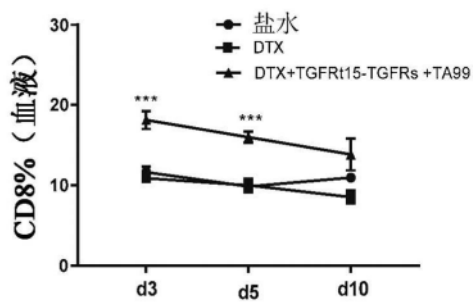


图97D

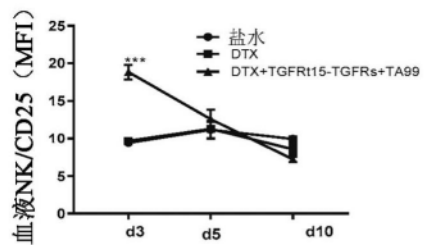


图97E

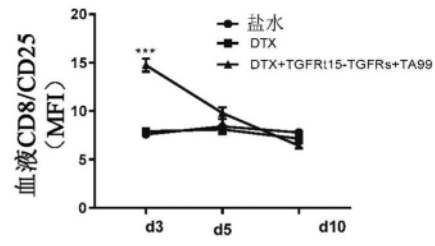


图97F

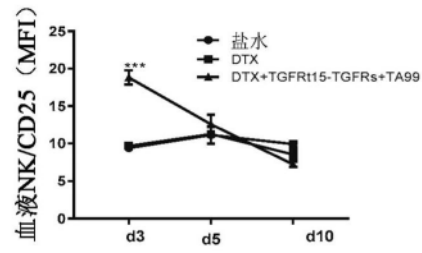


图97G

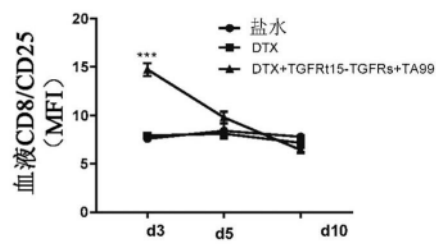


图97H

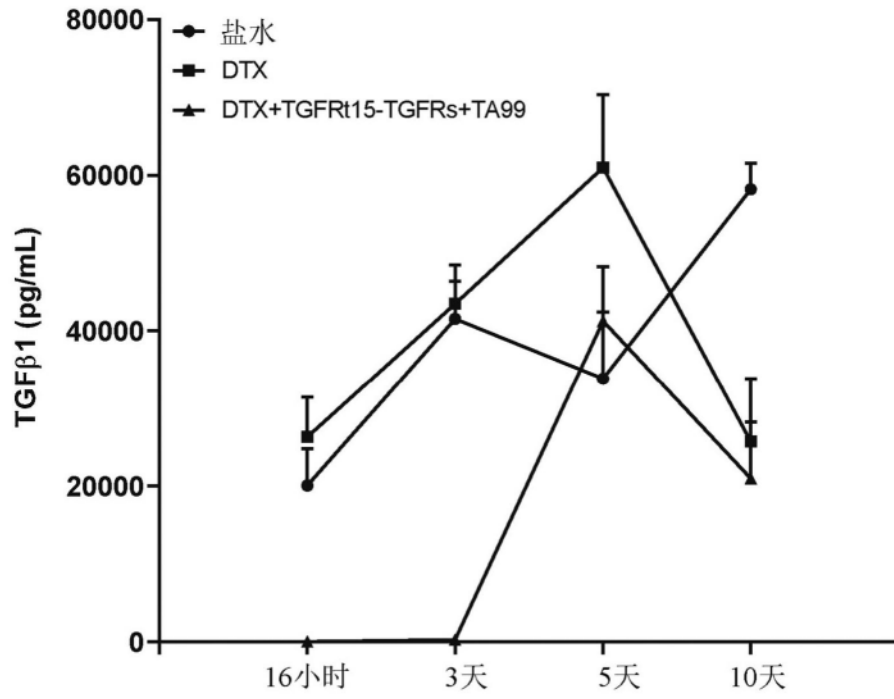


图98A

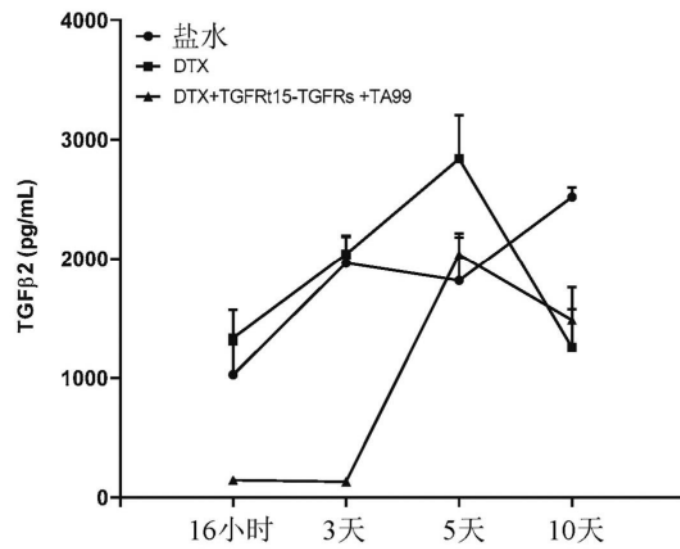


图98B

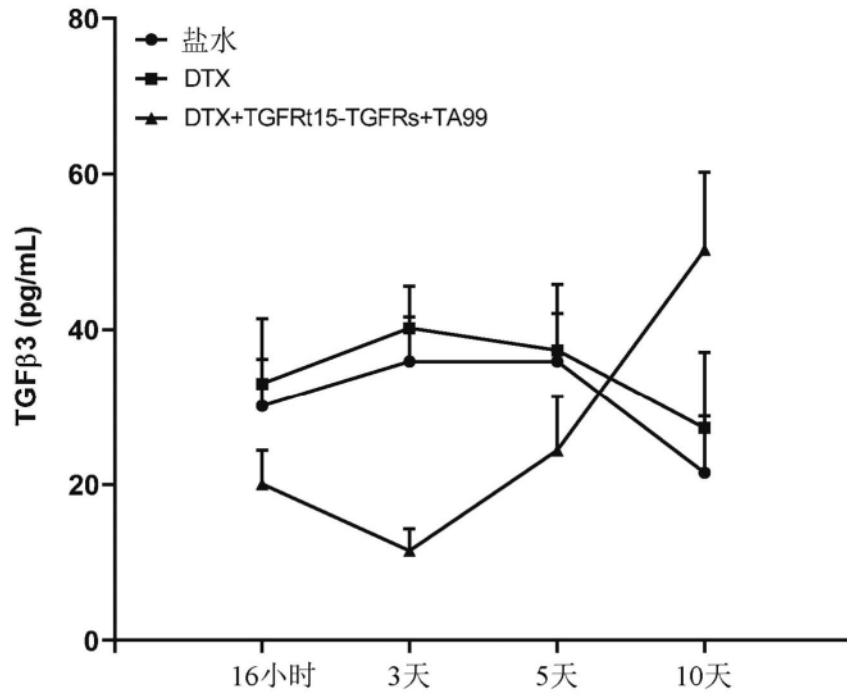


图98C

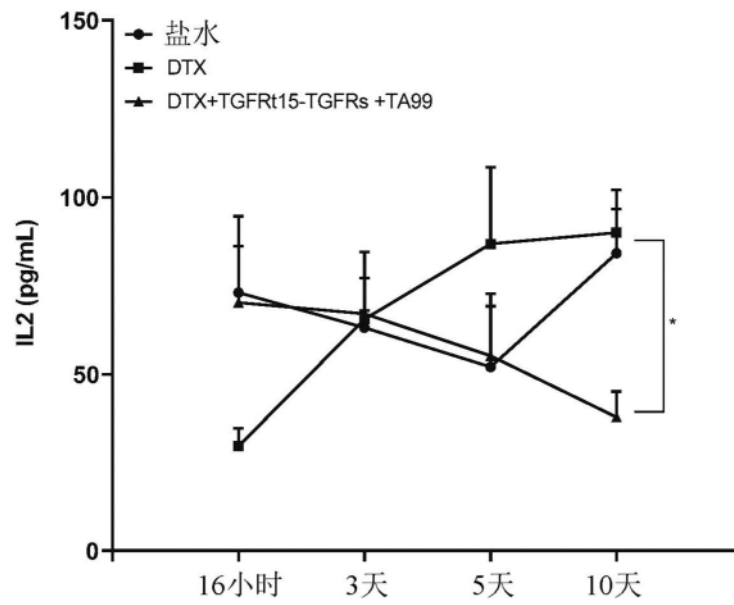


图99A

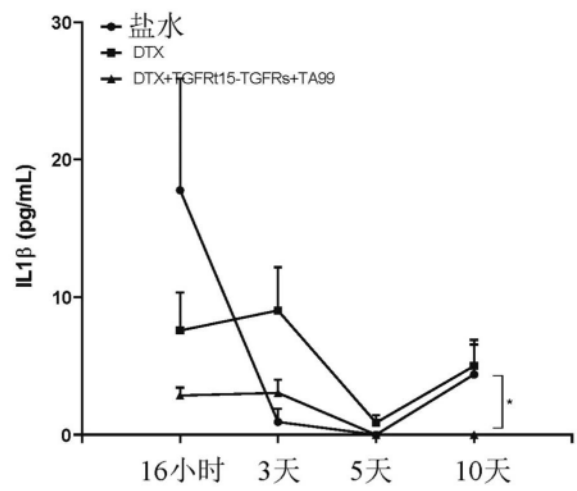


图99B

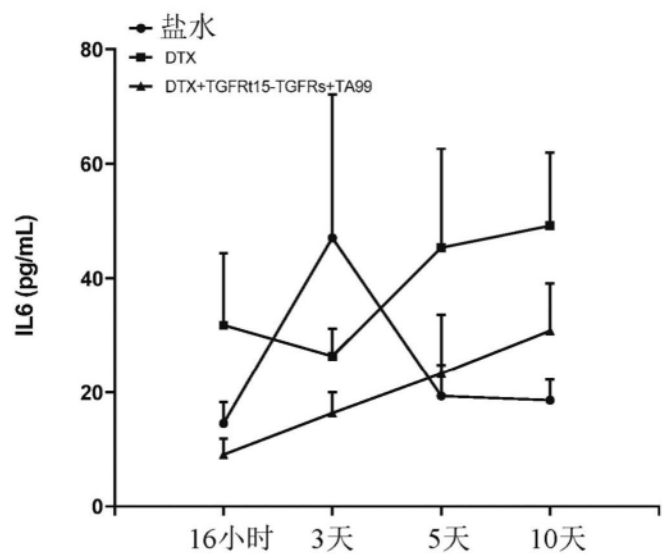


图99C

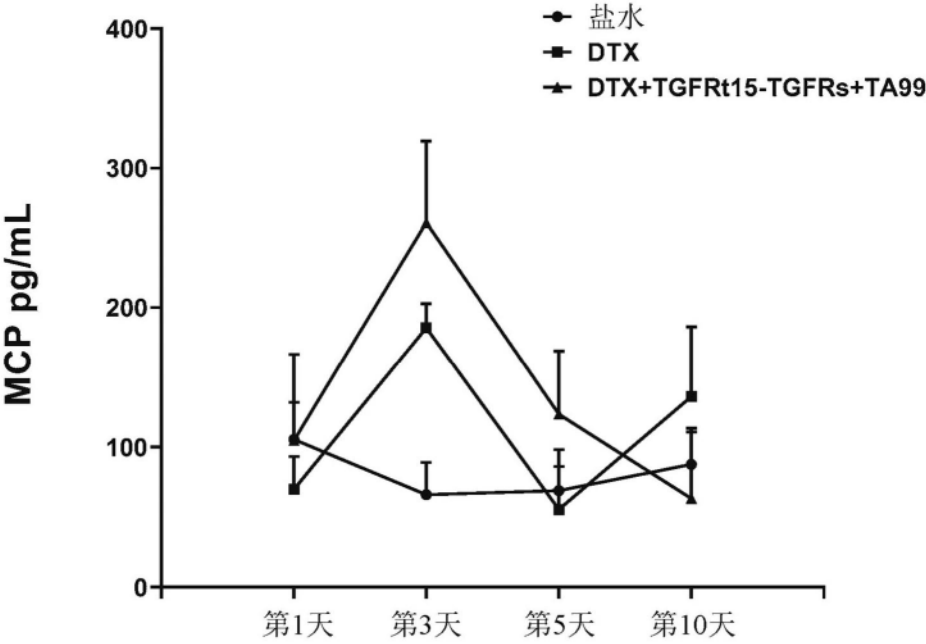


图99D

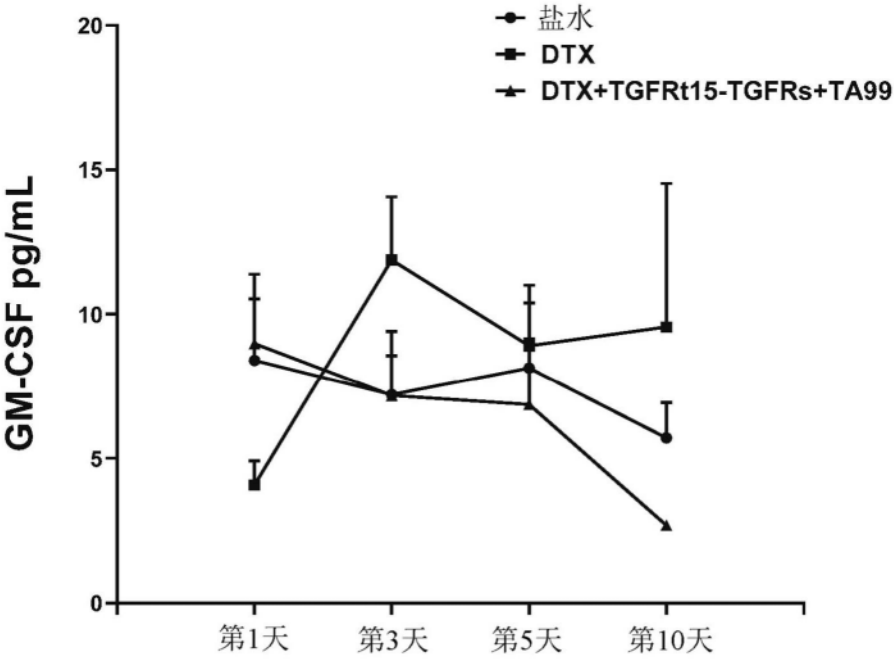


图99E

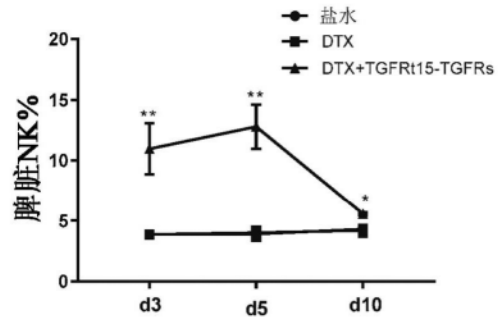


图100A

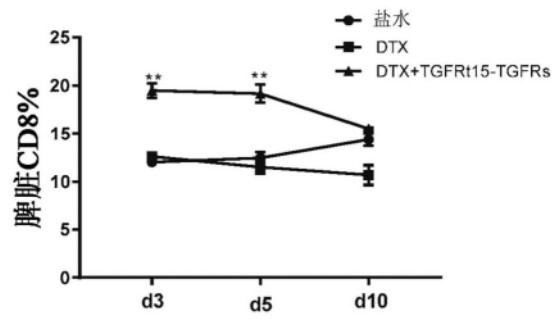


图100B

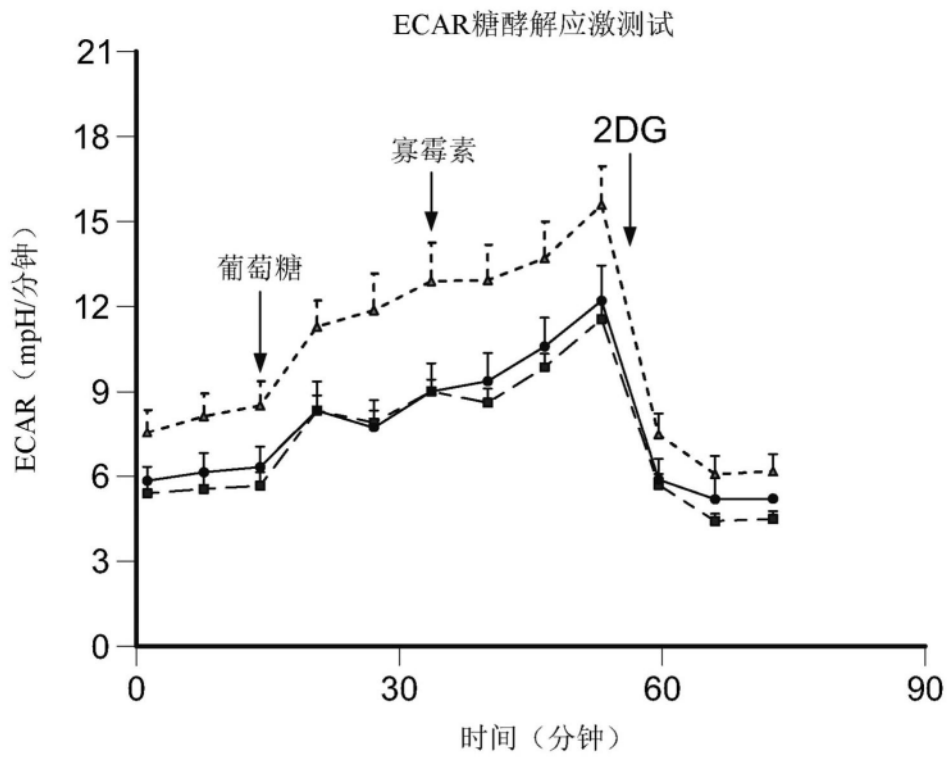


图101A

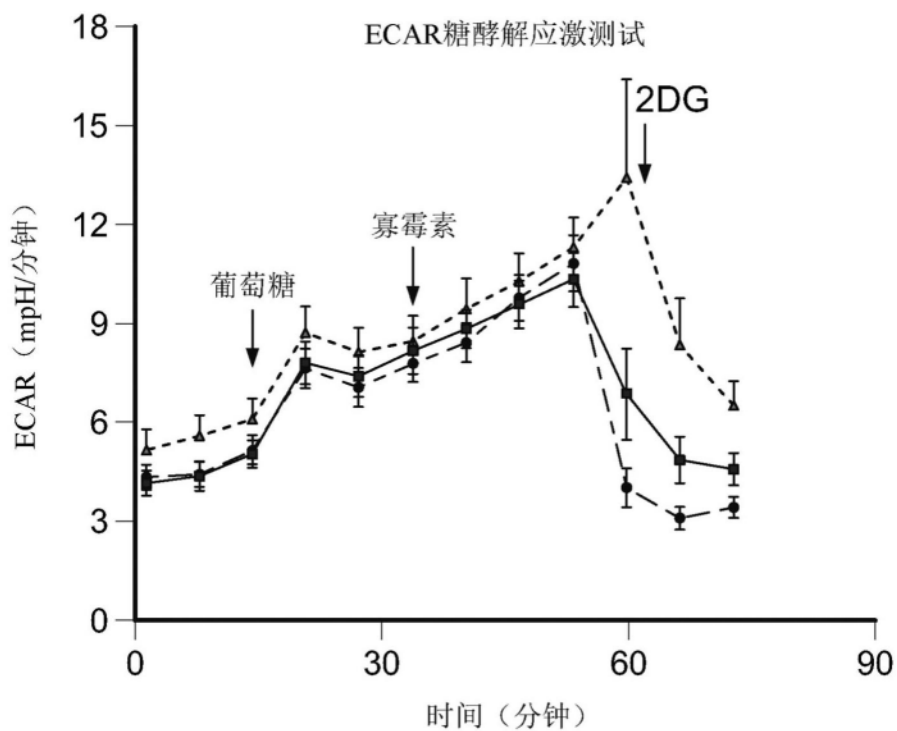


图101B

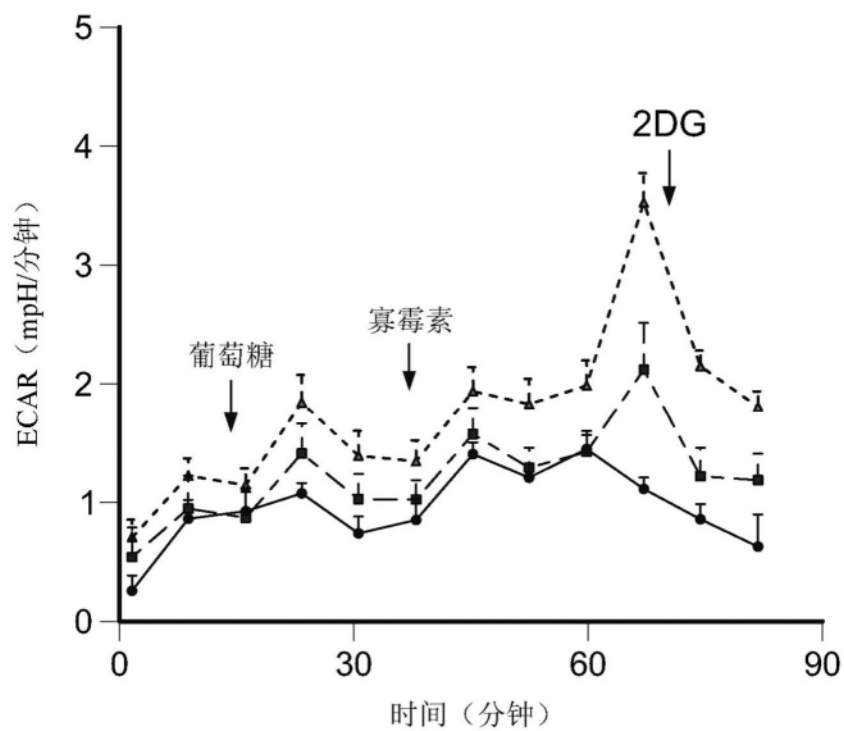


图101C

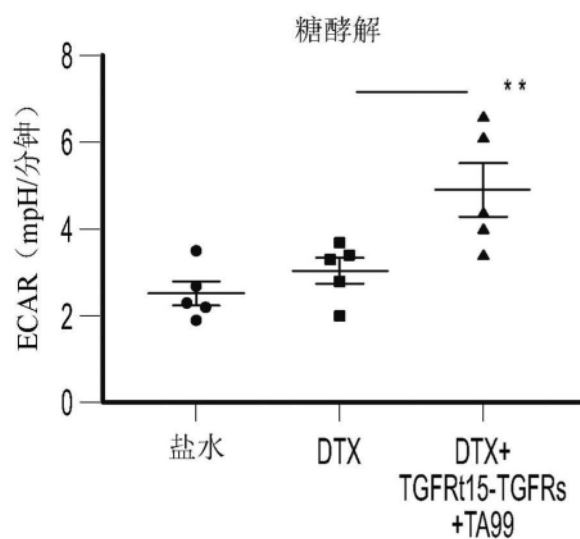


图102A

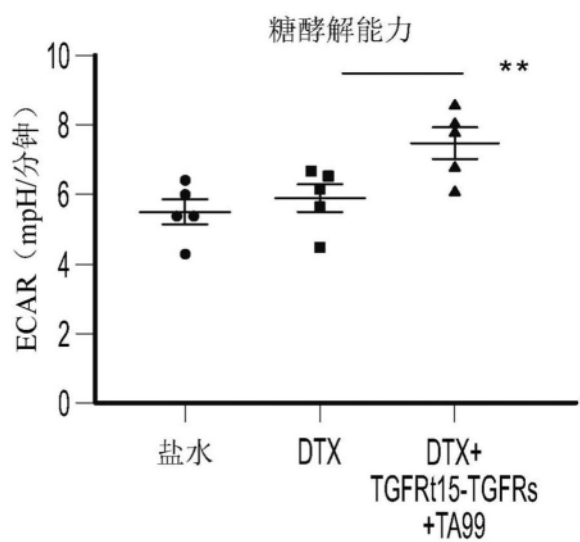


图102B

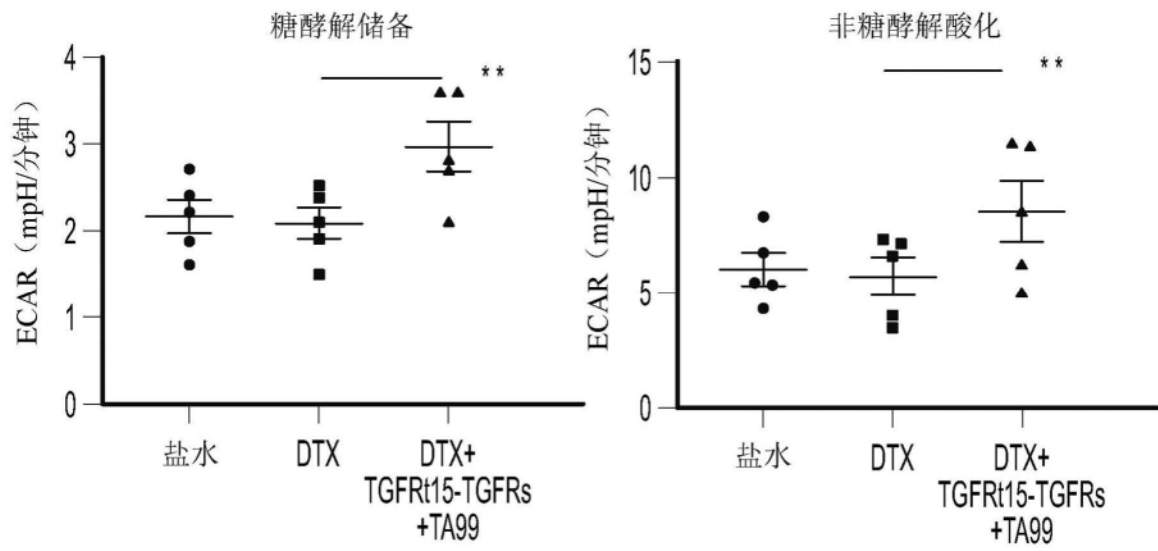


图102C

图102D

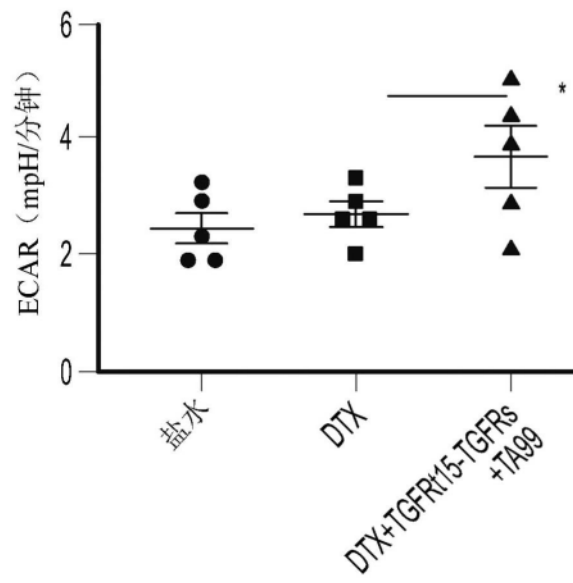


图102E

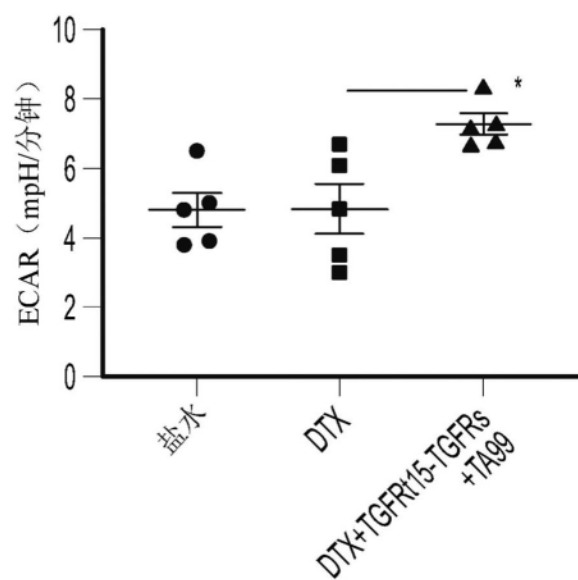


图102F

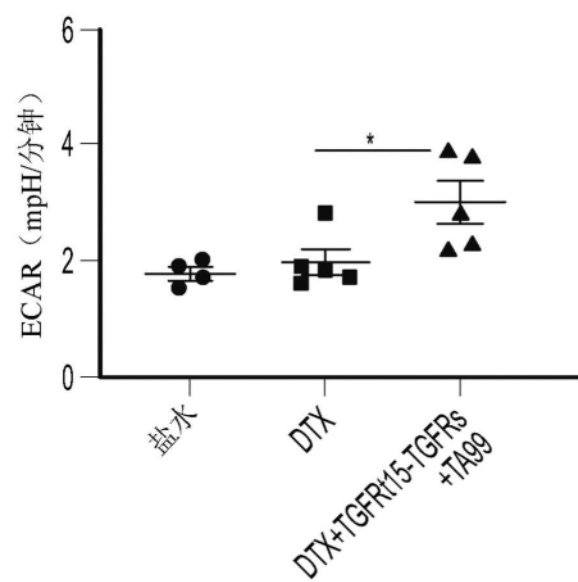


图102G

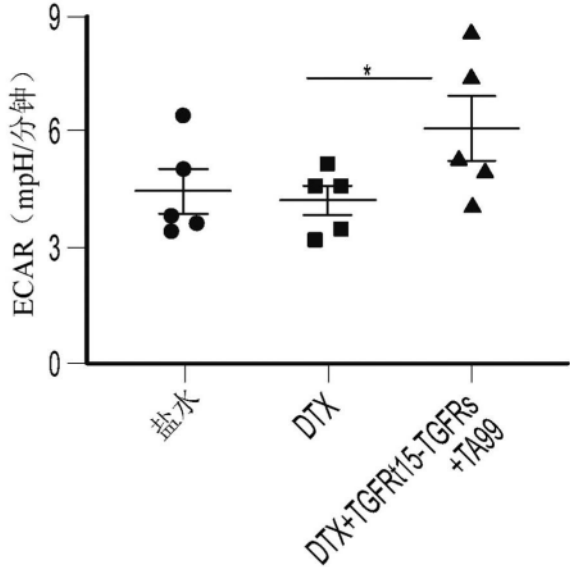


图102H

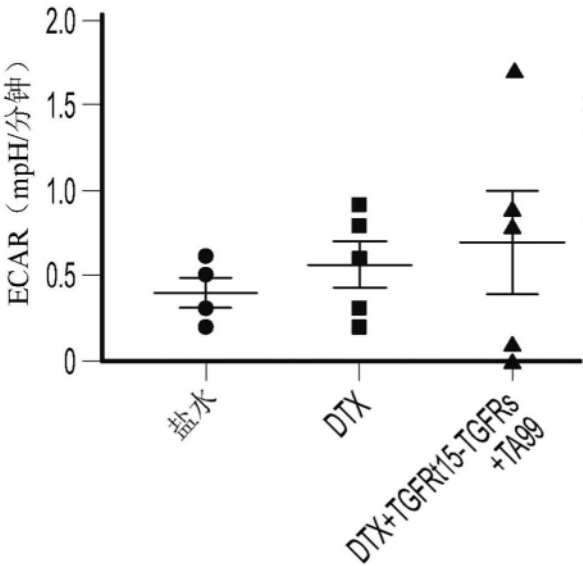


图102I

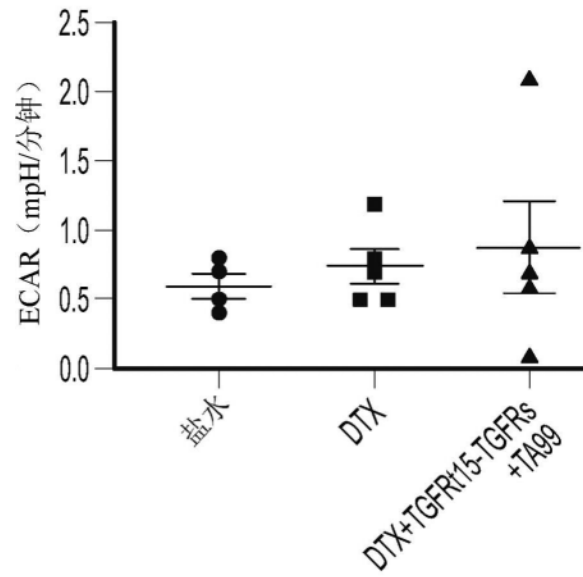


图102J

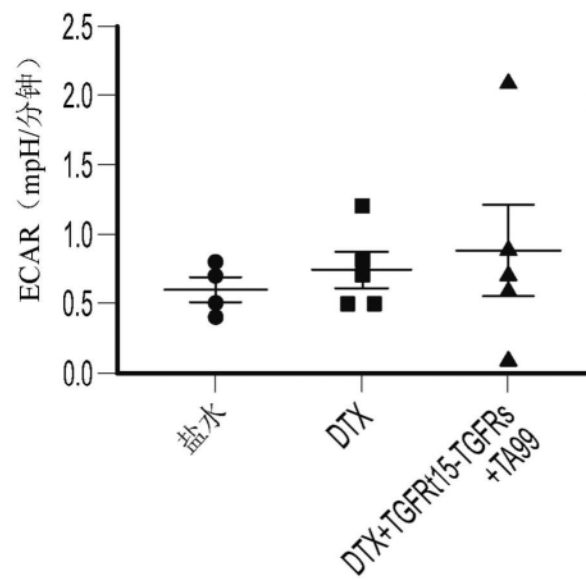


图102K

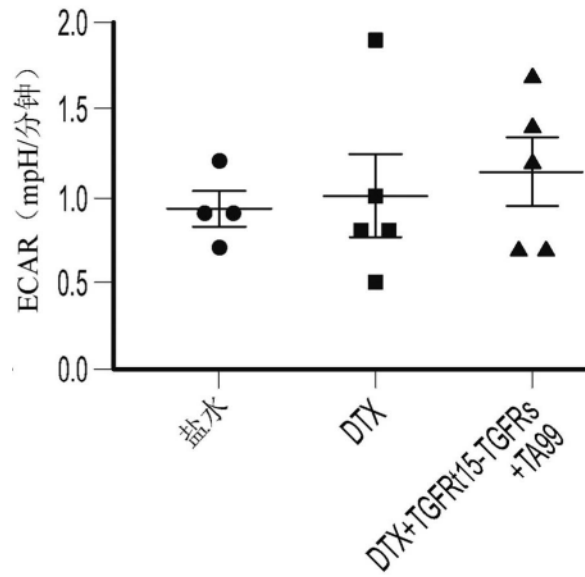


图102L

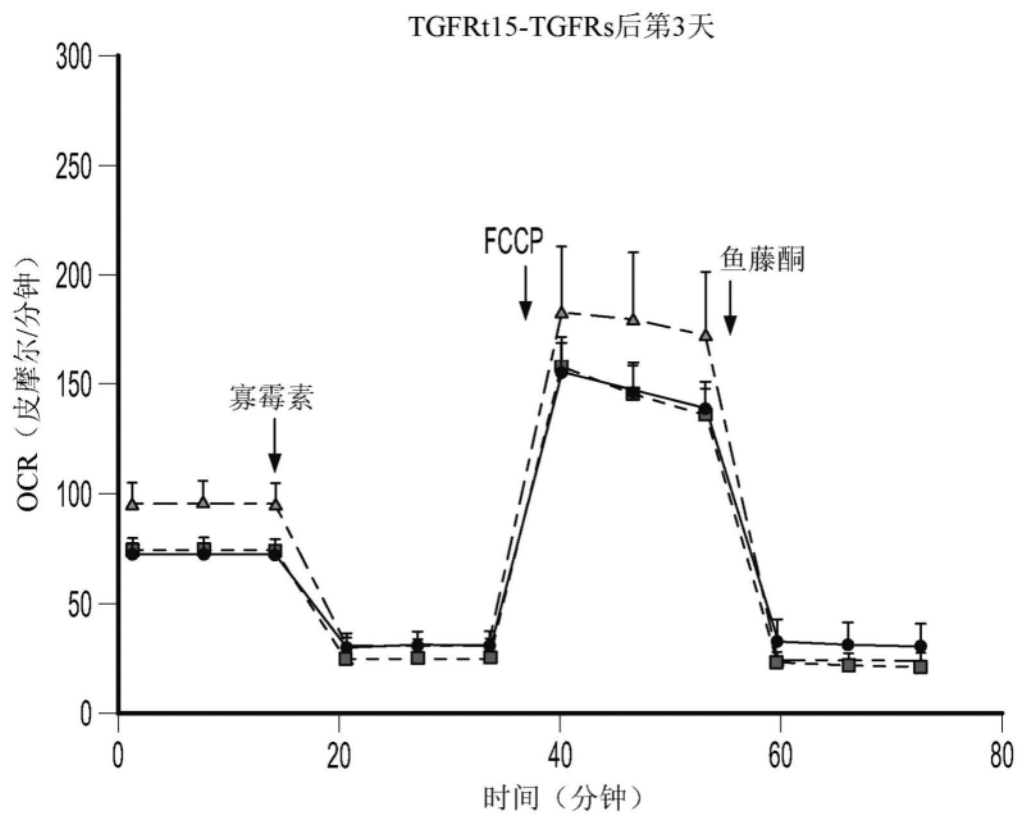


图103A

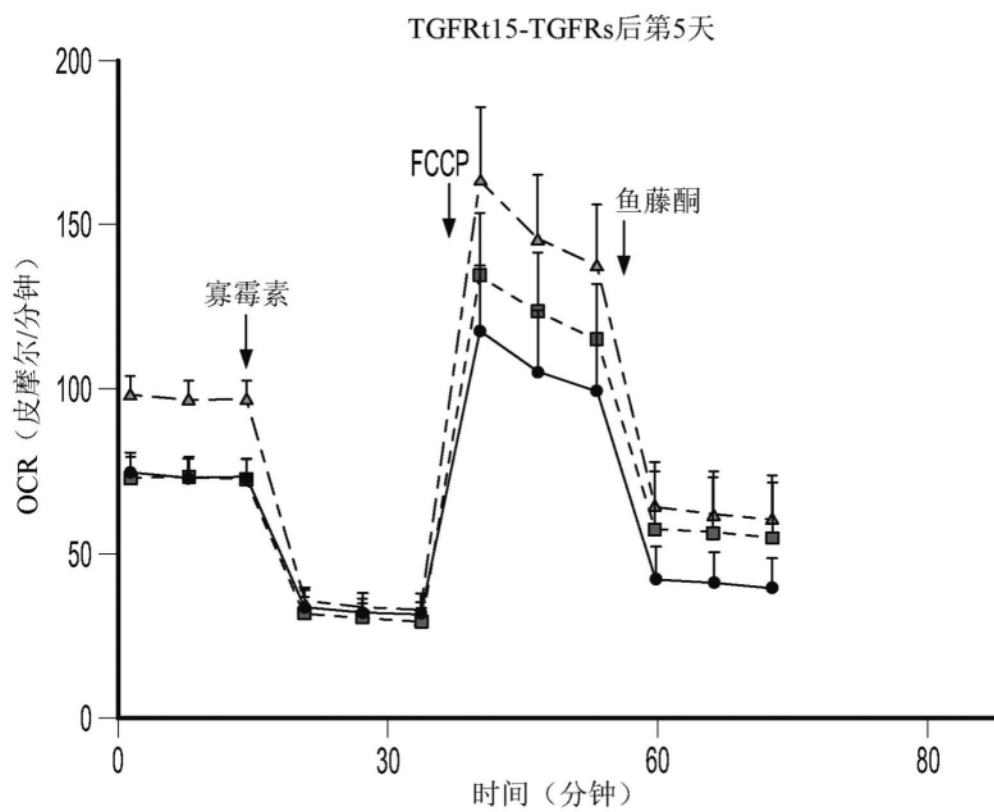


图103B

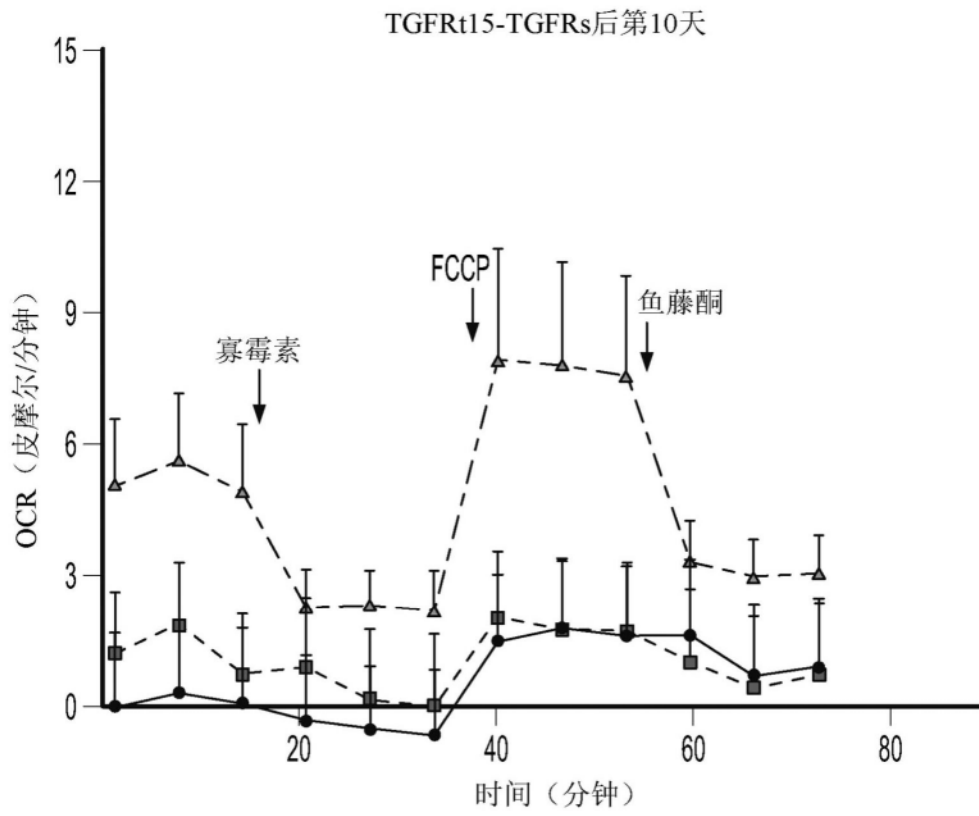


图103C

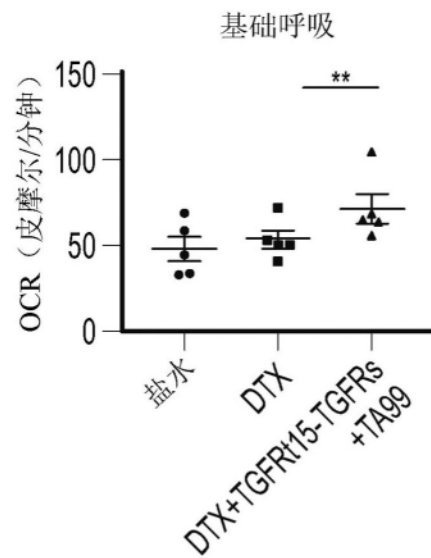


图104A

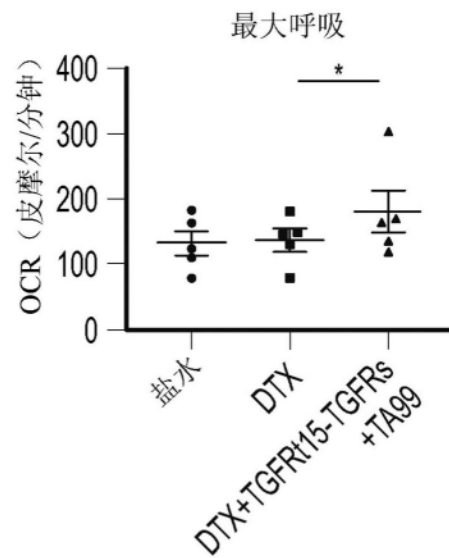


图104B

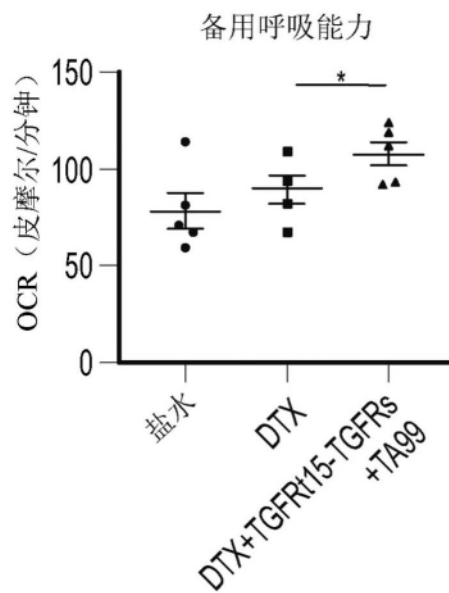


图104C

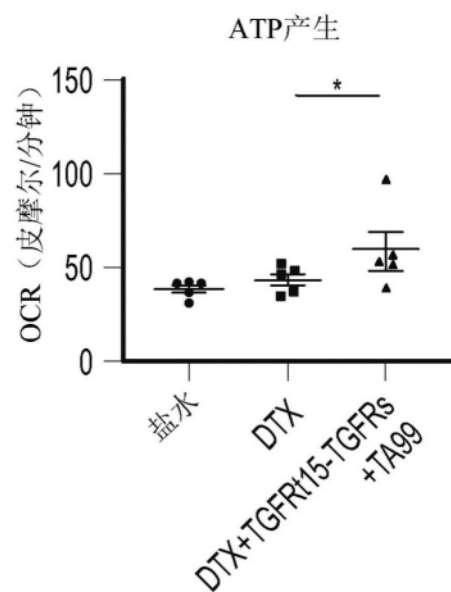


图104D

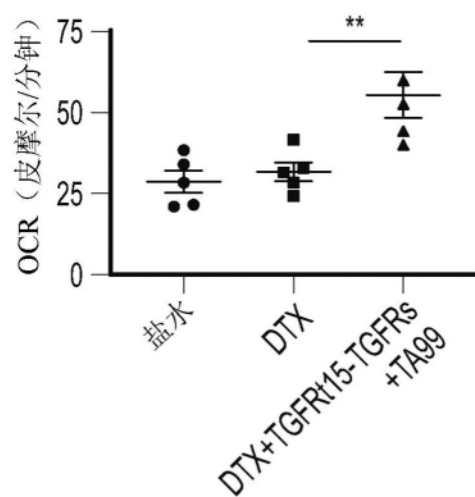


图104E

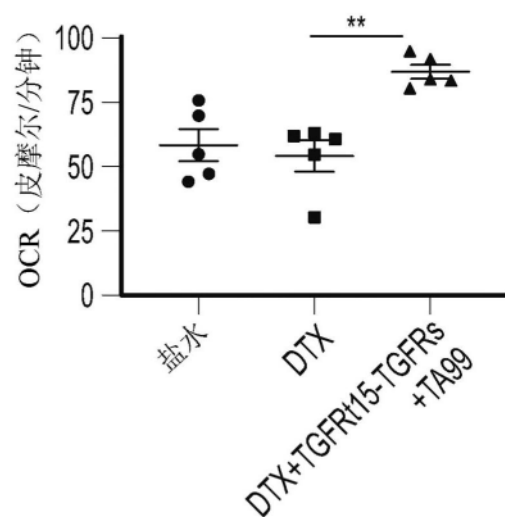


图104F

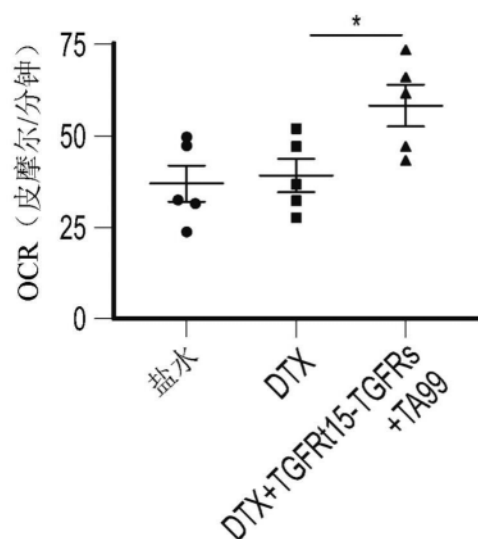


图104G

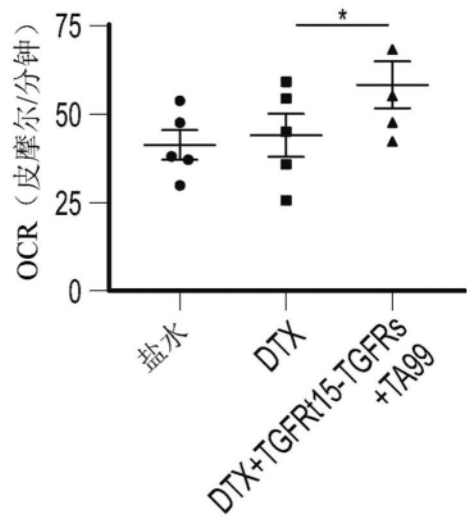


图104H

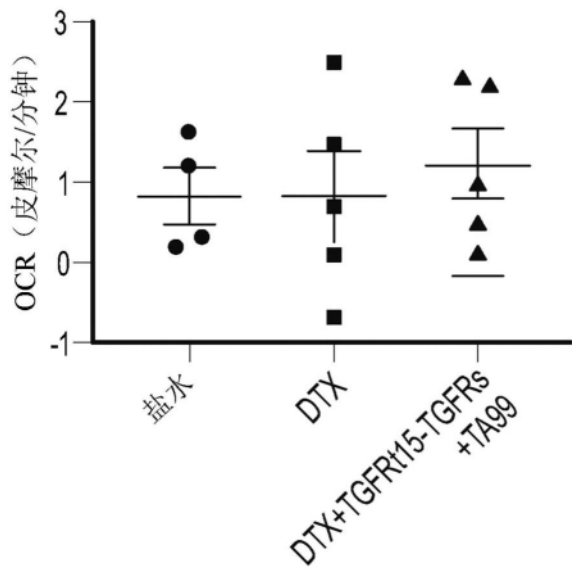


图104I

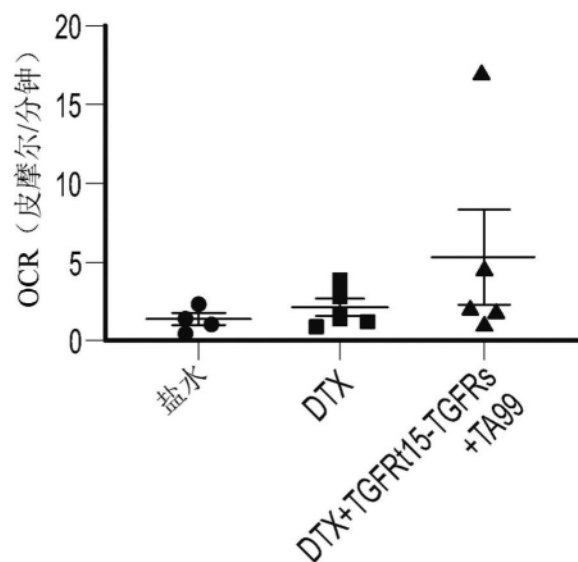


图104J

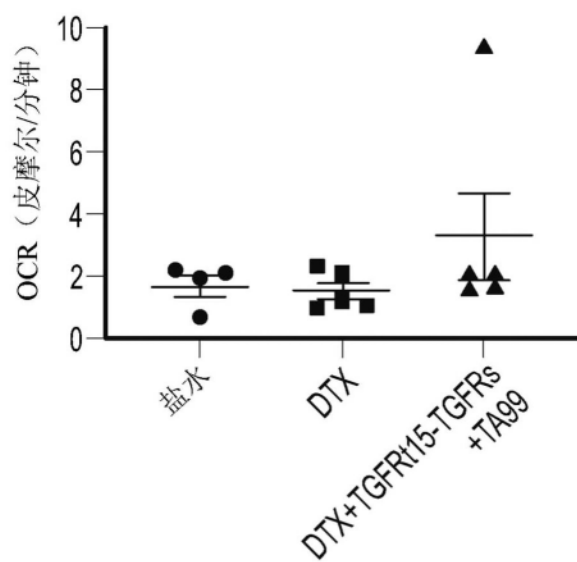


图104K

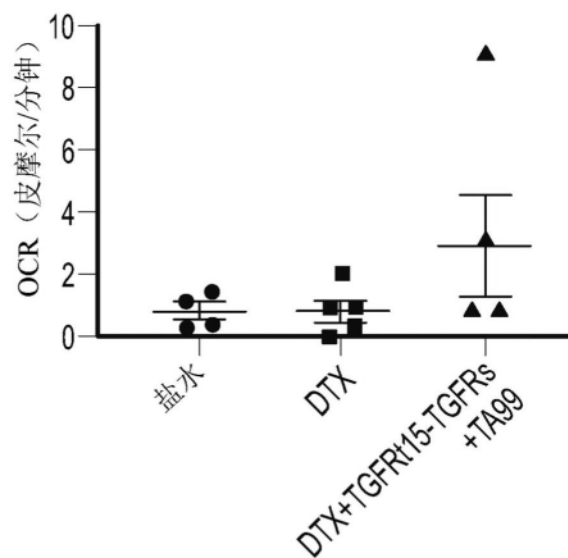


图104L

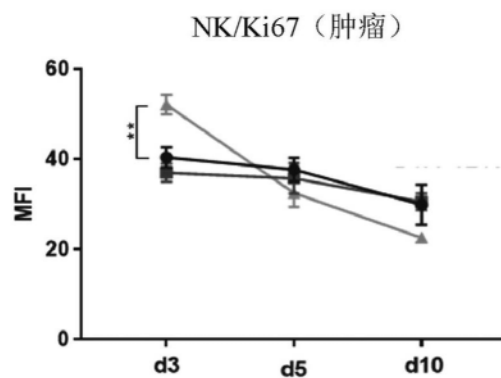


图105A

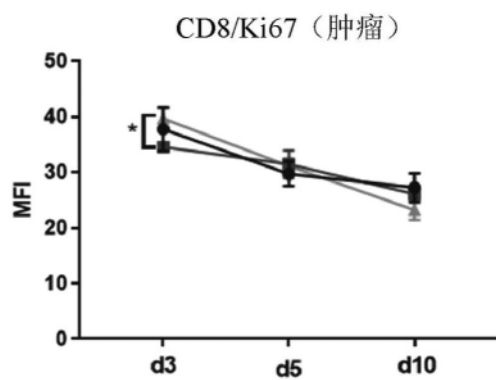


图105B

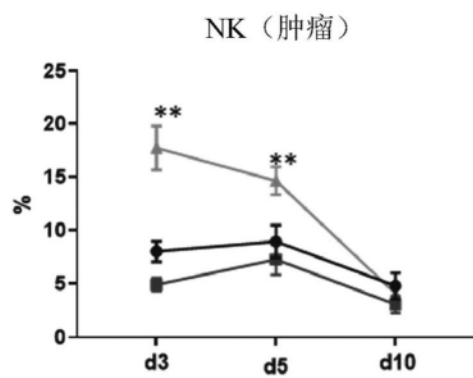


图105C

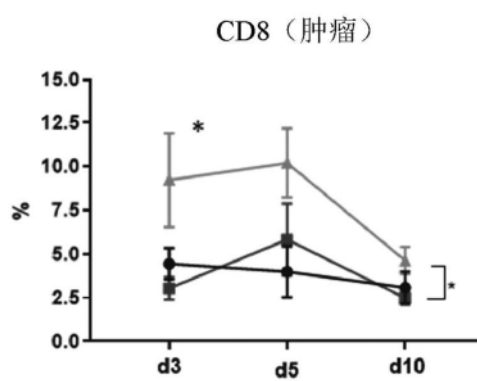


图105D

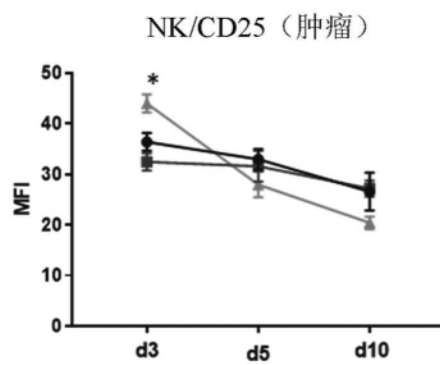


图105E

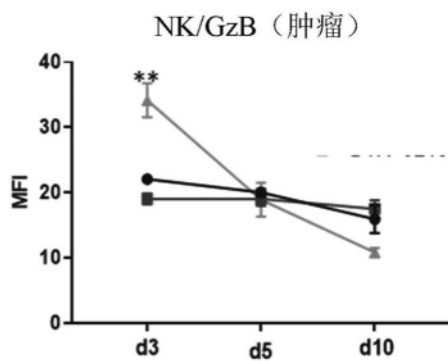


图105F

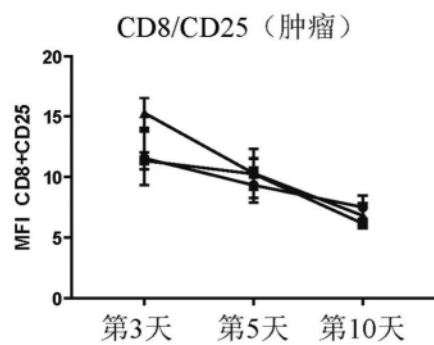


图105G

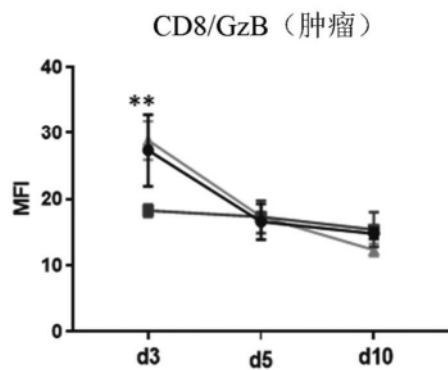


图105H

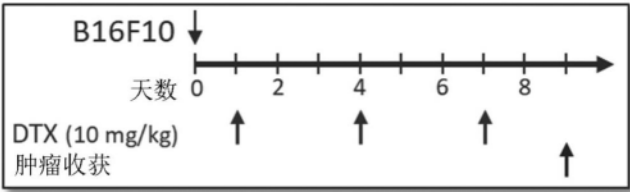


图106A

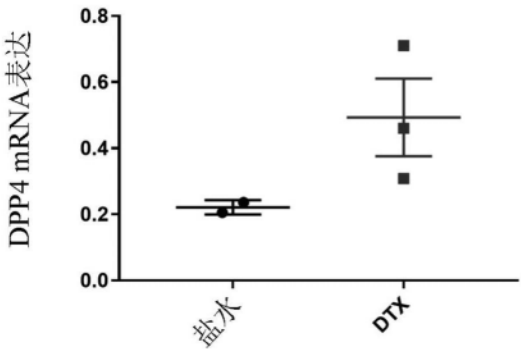


图106B

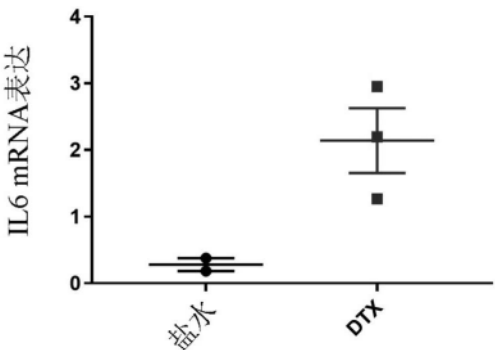


图106C

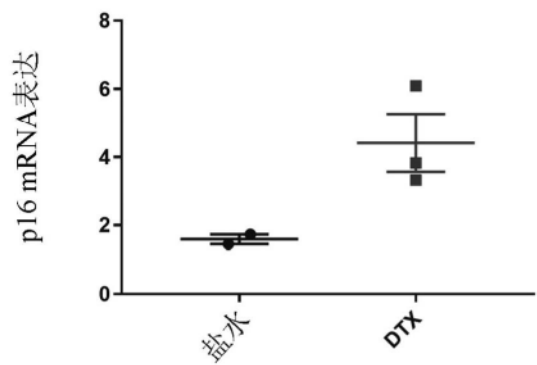


图106D

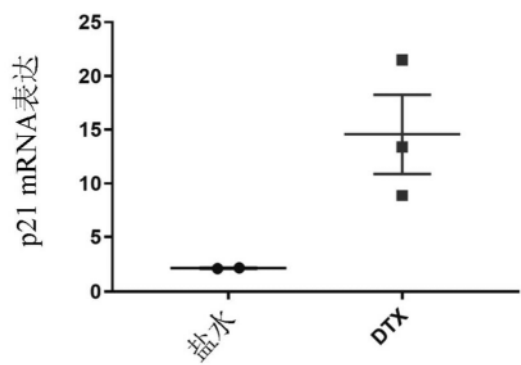


图106E

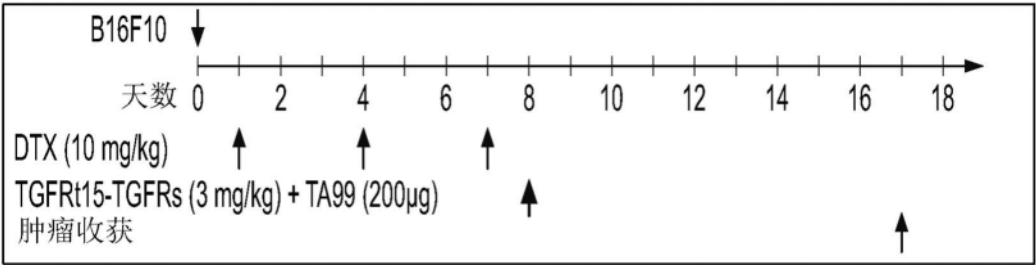


图107A

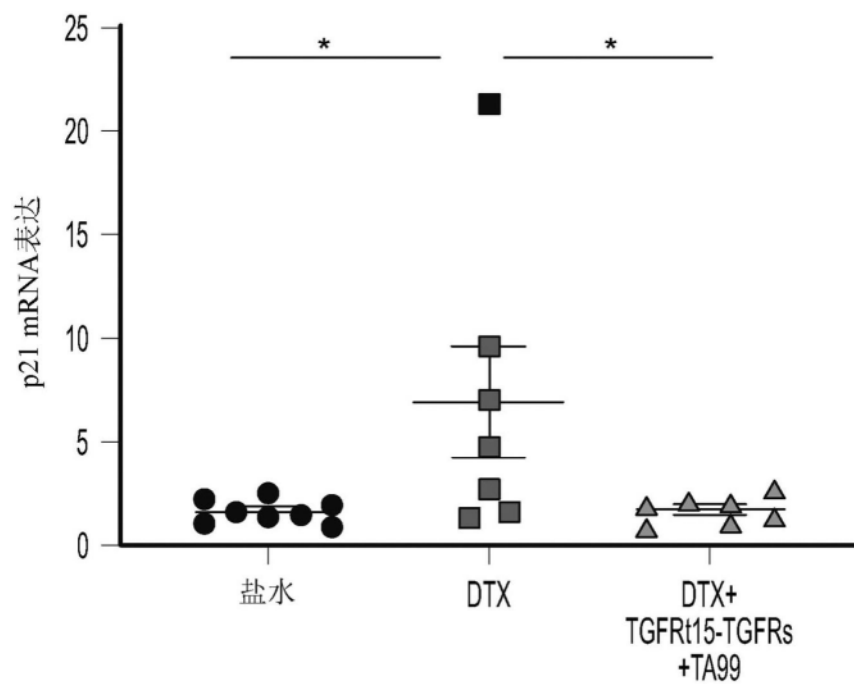


图107B

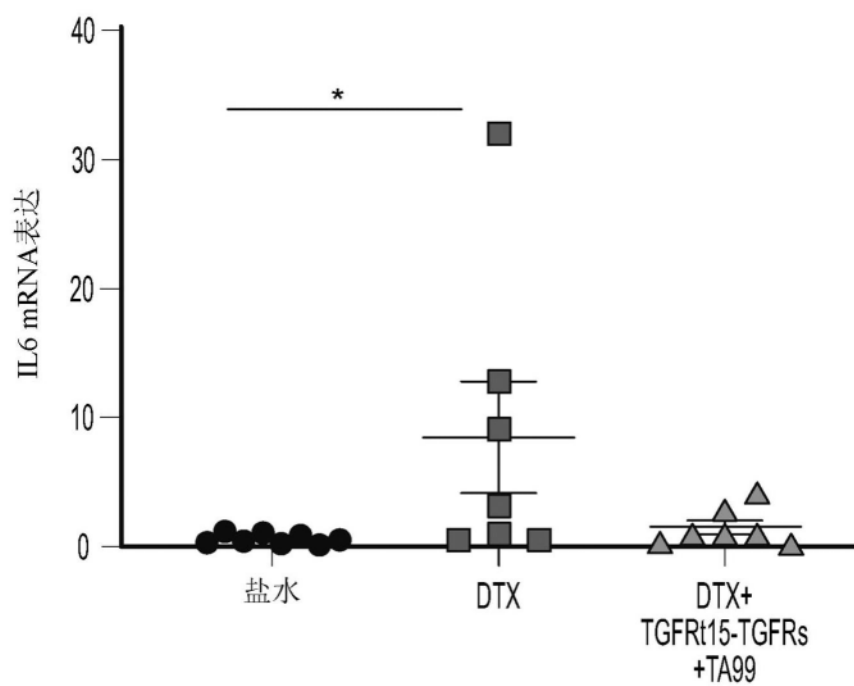


图107C

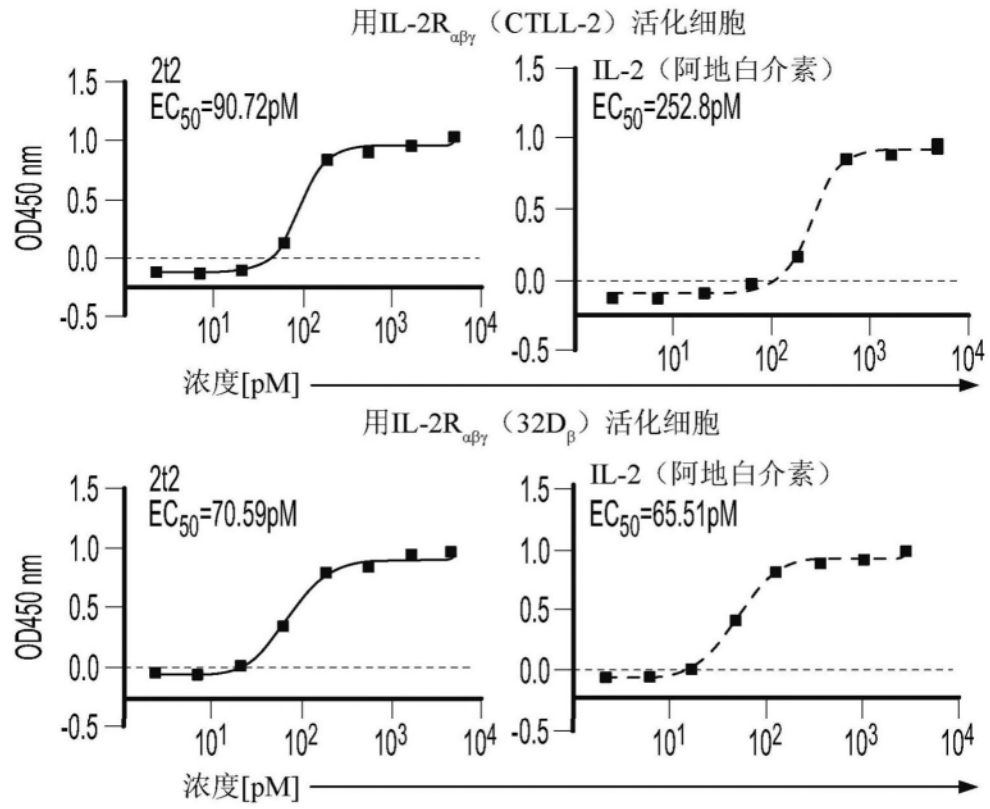


图108A

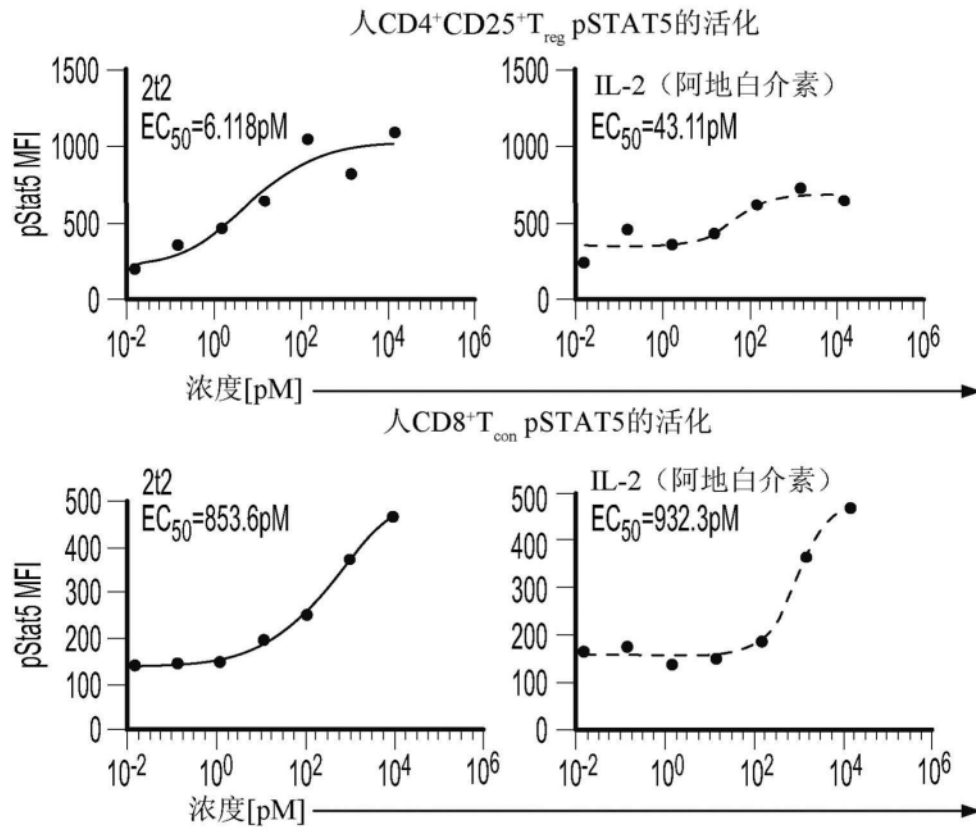


图108B

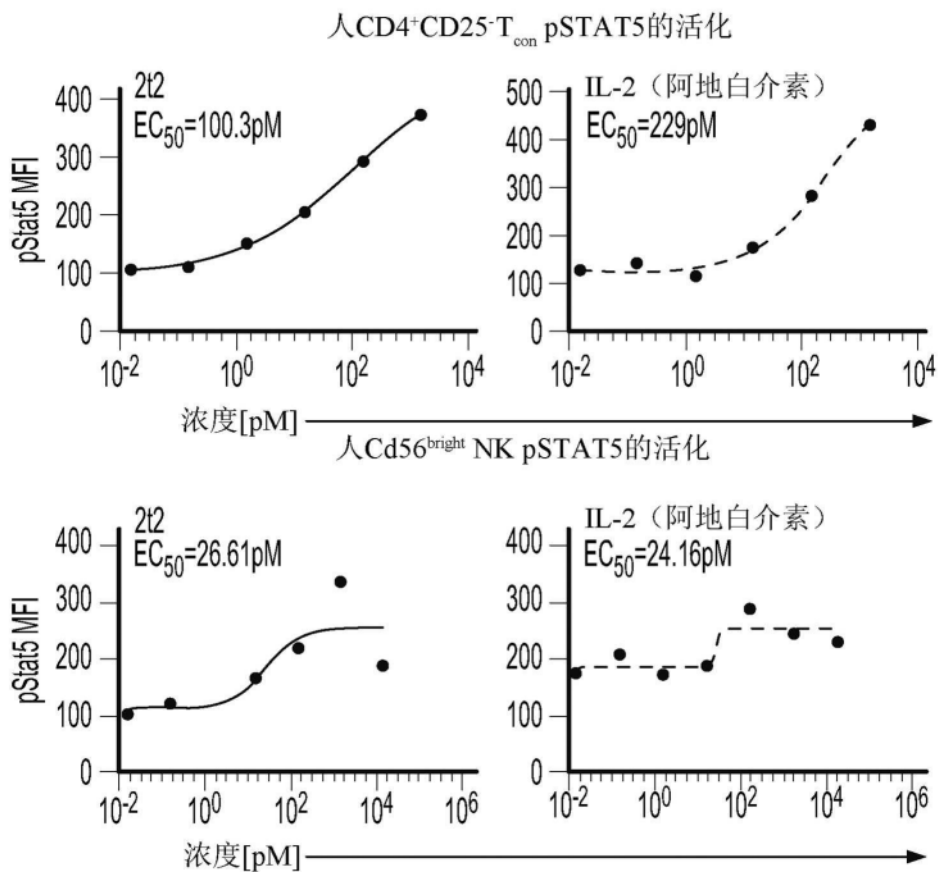


图108C

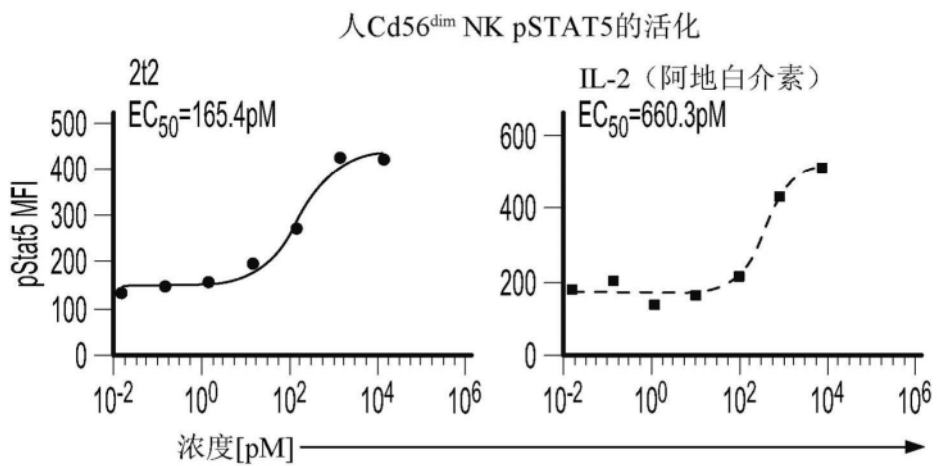


图108D

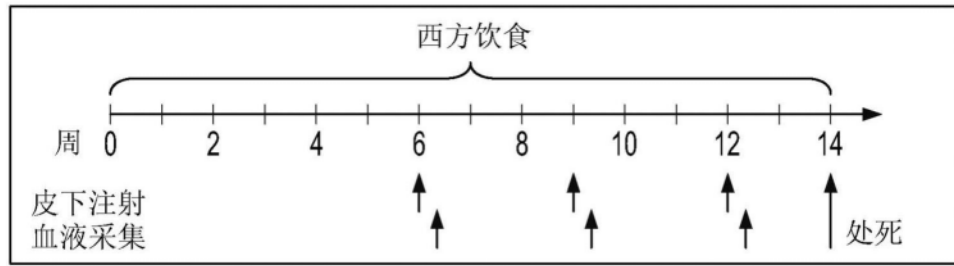


图109A

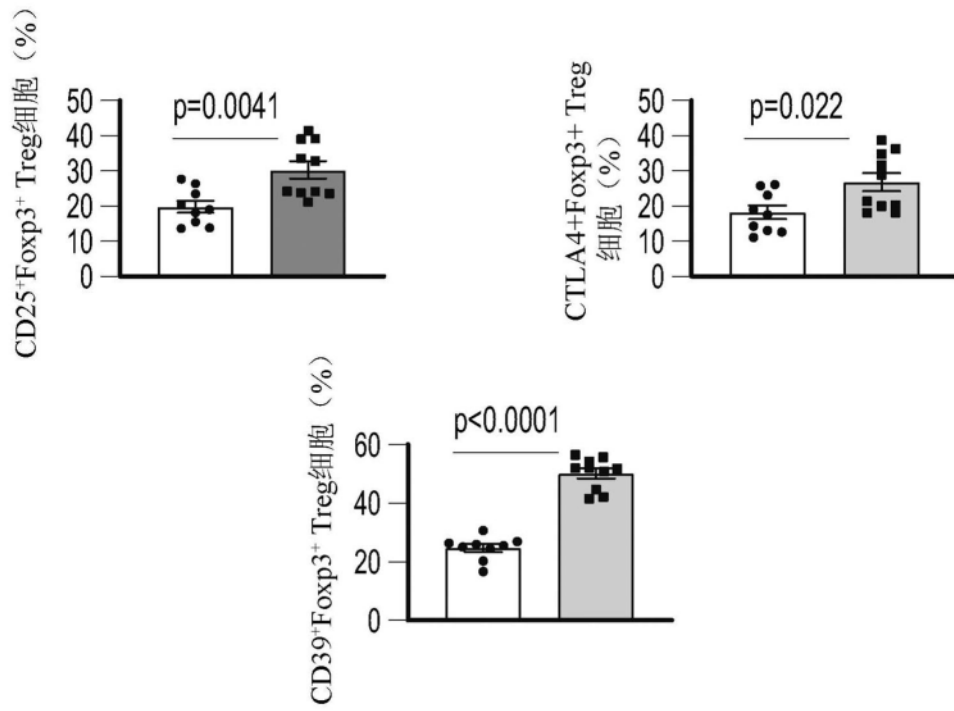


图109B

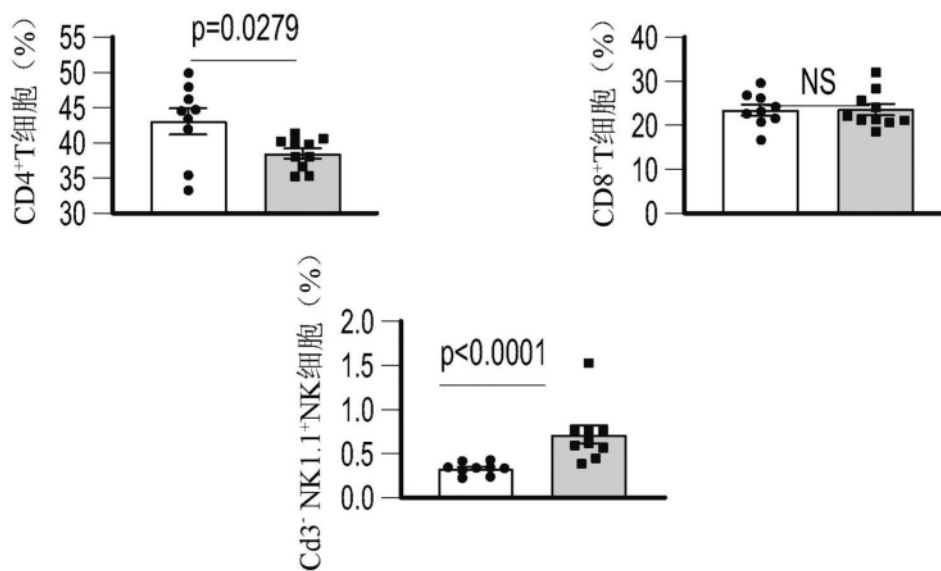


图109C

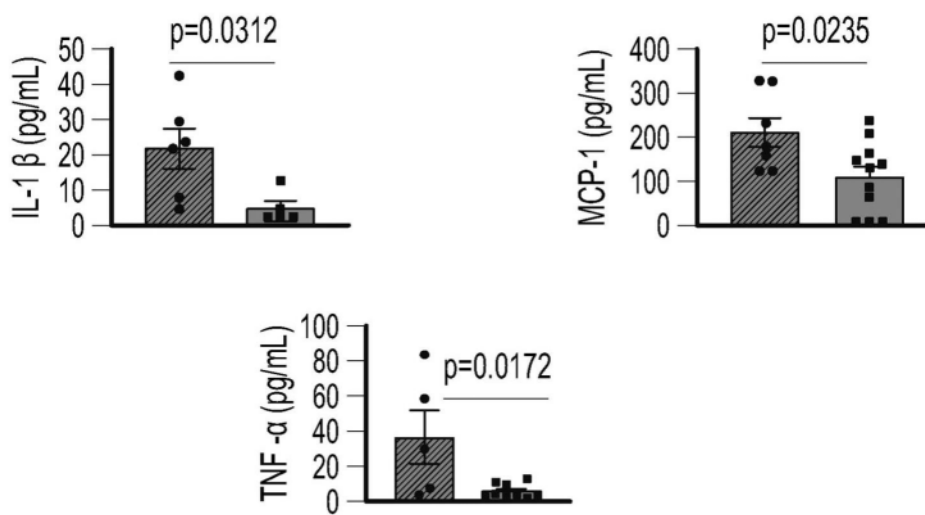


图109D

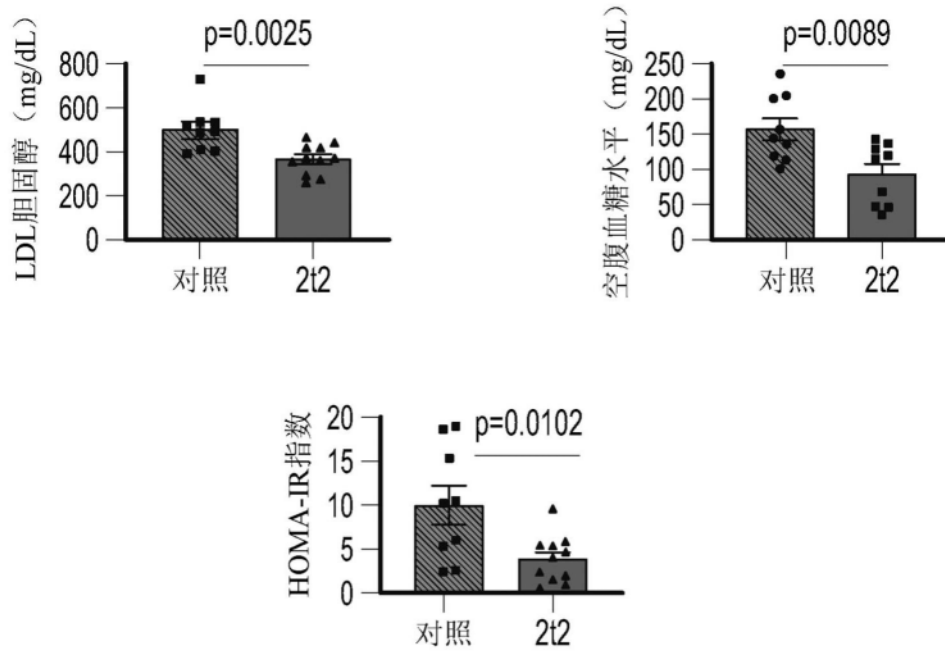


图109E

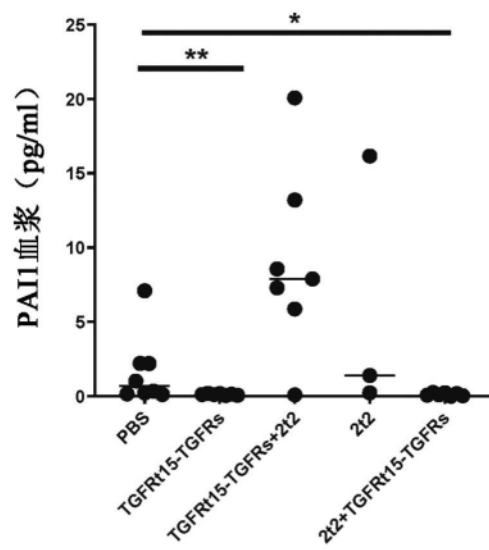


图110A

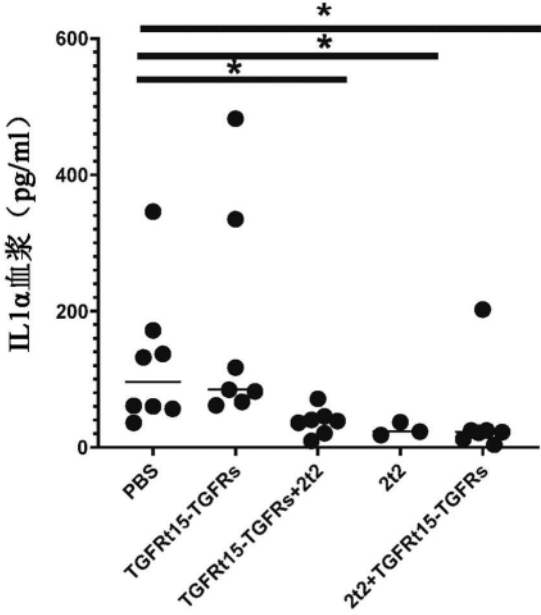


图110B

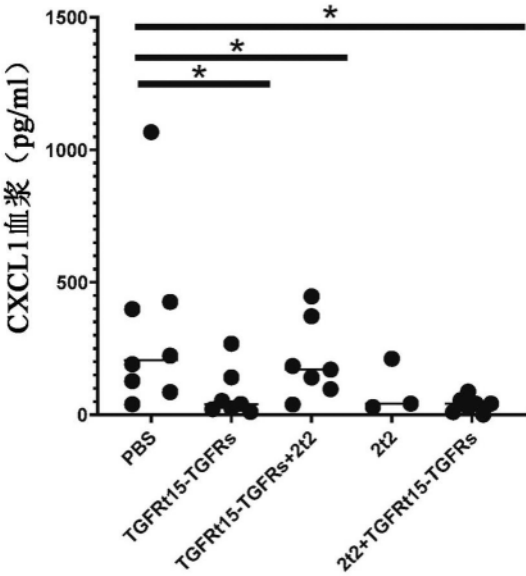


图110C

