



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114867847 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 05

(21) 申请号 202080087831.0

(22) 申请日 2020.11.19

(30) 优先权数据

10-2019-0149779 2019.11.20 KR

10-2020-0015802 2020.02.10 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.06.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2020/016376 2020.11.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/101270 KO 2021.05.27

(71) 申请人 吉爱希公司

地址 韩国京畿道

(72) 发明人 张明浩 洪天钧 高东佑 李俊燮

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 陈桢

(51) Int.Cl.

C12N 5/0783 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 14/55 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

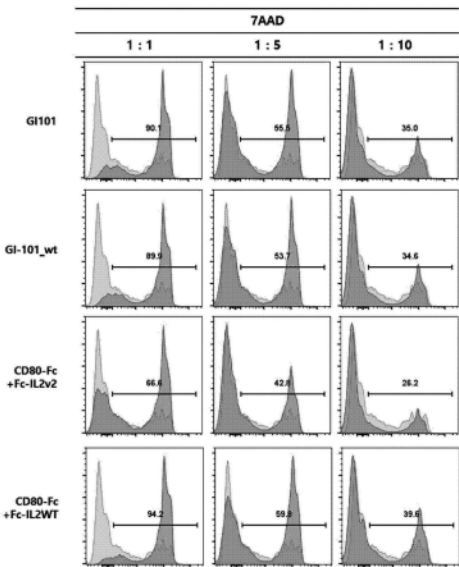
权利要求书2页 说明书27页
序列表52页 附图36页

(54) 发明名称

用于培养自然杀手细胞的组合物及使用其来生产自然杀手细胞的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于培养自然杀手细胞的组合物,其包含作为活性成分的含有IL-2蛋白与CD80蛋白的融合蛋白,及使用其来生产自然杀手细胞的方法。具体地,本发明的用于培养自然杀手细胞的组合物,其包含作为活性成分的含有IL-2蛋白或其变体与CD80或其片段的融合蛋白,会促进自然杀手细胞的增殖、诱导CD16及NKp46的表达及增加颗粒酶B与穿透细胞膜蛋白质的表达与分泌,因此可用于生产具有优异抗癌免疫功能的自然杀手细胞。



1. 一种用于培养自然杀手细胞的组合物,其包含作为活性成分的含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白二聚体。

2. 如权利要求1的组合物,其中所述IL-2变体是通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中的第38个及第42个氨基酸而获得的。

3. 如权利要求1的组合物,其中所述IL-2变体由SEQ ID NO:6的氨基酸序列构成。

4. 如权利要求1的组合物,其中该CD80片段由SEQ ID NO:11的氨基酸序列中的第35个至第242个氨基酸构成。

5. 如权利要求1的组合物,其中该融合蛋白由SEQ ID NO:9的氨基酸序列构成。

6. 一种用于培养自然杀手细胞的方法,其包含:

i) 从外周血单核细胞(PBMCs)中分离出不表达CD3的细胞;
ii) 从以上步骤中所分离出的不表达CD3的细胞中分离出表达CD56的细胞;及
iii) 在含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白二聚体的存在下,培养该经分离的细胞。

7. 如权利要求6的方法,其中所述融合蛋白二聚体以1nM至500nM的浓度予以处理。

8. 如权利要求6的方法,其中在该培养步骤中的培养期为5天至25天。

9. 一种自然杀手细胞,其是通过如权利要求6的方法所制得的。

10. 如权利要求9的自然杀手细胞,其中在该自然杀手细胞中CD16及NKp46的表达是增加的。

11. 如权利要求9的自然杀手细胞,其中在该自然杀手细胞中颗粒酶B及穿透细胞膜蛋白质的表达是增加的。

12. 一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含如权利要求9的自然杀手细胞作为活性成分。

13. 如权利要求9的药物组合物,其中该癌症是选自于由下列所构成的群组的任一个:胃癌、肝癌、肺癌、结直肠癌、乳癌、前列腺癌、卵巢癌、胰脏癌、子宫颈癌、甲状腺癌、喉癌、急性淋巴母细胞白血病、脑瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、唾液腺癌及淋巴瘤。

14. 一种用于培养自然杀手细胞的方法,其包含:

i) 从PBMCs中分离出不表达CD3的细胞;及
ii) 在含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白二聚体的存在下,培养该经分离的细胞。

15. 一种自然杀手细胞,其是通过如权利要求14的方法所制得的。

16. 一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含如权利要求15的自然杀手细胞作为一活性成分。

17. 如权利要求16的药物组合物,其中该癌症是选自于由下列所构成的群组的任一个:胃癌、肝癌、肺癌、结直肠癌、乳癌、前列腺癌、卵巢癌、胰脏癌、子宫颈癌、甲状腺癌、喉癌、急性淋巴母细胞白血病、脑瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、唾液腺癌及淋巴瘤。

18. 一种用于培养自然杀手细胞的方法,其包含:

i) 从PBMCs中分离出表达CD56的细胞;及
iii) 在含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白二聚体的存在下,培养该经分离的细胞。

19. 一种自然杀手细胞,其是通过如权利要求18的方法所制得。

20. 一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含如权利要求19的自然杀手细胞作为活性成分。

21. 如权利要求20的药物组合物,其中该癌症是选自于由下列所构成的群组的任一个:胃癌、肝癌、肺癌、结直肠癌、乳癌、前列腺癌、卵巢癌、胰脏癌、子宫颈癌、甲状腺癌、喉癌、急性淋巴母细胞白血病、脑瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、唾液腺癌及淋巴瘤。

22. 一种用于增进PBMCs中一自然杀手细胞的活性的方法,其包含在含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白二聚体的存在下,培养PBMCs。

23. 一种外周血单核细胞,其是由如权利要求22的方法所制得。

24. 一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含如权利要求23的自然杀手细胞作为活性成分。

25. 如权利要求24的药物组合物,其中该癌症是选自于由下列所构成的群组的任一个:胃癌、肝癌、肺癌、结直肠癌、乳癌、前列腺癌、卵巢癌、胰脏癌、子宫颈癌、甲状腺癌、喉癌、急性淋巴母细胞白血病、脑瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、唾液腺癌及淋巴瘤。

用于培养自然杀手细胞的组合物及使用其来生产自然杀手细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于培养自然杀手细胞的组合物及使用其来生产自然杀手细胞的方法。

背景技术

[0002] 发明背景

[0003] 对于癌症的治疗,已经发展出各种的治疗法,如手术、放疗及化疗,但有许多的副作用报告,近年来已发展出使用患者的免疫功能的免疫疗法。特别是,研究使用可进行大规模生产及冷冻的自然杀手细胞的免疫疗法。

[0004] 具体地,自然杀手细胞是一种分布在身体的骨髓、脾、周边淋巴结及外周血的淋巴细胞。其等约占外周血淋巴细胞的10%,且在先天性免疫反应中占重要角色(Ann Rev Immunol., 24:257-286, 2006)。此外,自然杀手细胞是CD56及CD16阳性,但CD3阴性。自然杀手细胞通过释放含有穿透细胞膜蛋白质及颗粒酶的细胞质颗粒来杀伤细胞。自然杀手细胞会分泌各种的细胞因子,如IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF及IL-10。

[0005] 此外,自然杀手细胞的细胞表面上会表达数种受体,且此等受体牵涉细胞黏着、杀伤细胞能力的活化或杀伤细胞能力的抑制。然而,正常受试者体内大部分的自然杀手细胞处于非活化状态。因此需有活化的自然杀手细胞来消除癌症。此外,在癌症患者体内存在的自然杀手细胞方面,自然杀手细胞由于癌细胞的免疫回避机制而有功能缺陷。因此,活化自然杀手细胞,以便使用自然杀手细胞作为治疗剂非常重要。再者,因为体内存在的自然杀手细胞数量有限,因此必要开发出可大量增殖及冷冻从正常受试者或患者而来的血液中的自然杀手细胞的技术。

[0006] IL-2,亦称作T细胞生长因子(TCGF),是一种球状糖蛋白,其在淋巴细胞的生成、存活及动态平衡中发挥核心的作用。IL-2具有15.5kDa至16kDa的蛋白大小且由133个氨基酸构成。IL-2通过与具有三个不同次单元的IL-2受体结合,介导各种免疫作用。

[0007] 此外,CD80亦称作B7-1,是膜连型蛋白B7家族的成员,其通过与配体结合涉及免疫调节,因此传递共刺激反应及共抑制反应。CD80是一种表达在T细胞、B细胞、树状细胞及单核球表面上的透膜蛋白。CD80已知会与CD28、CTLA4(CD152)及PD-L1结合。

[0008] 因此,自然杀手细胞对于抗癌治疗的重要性众所周知,但能放大自然杀手细胞以便有效地使用其等的具体方法仍不足。

发明内容

[0009] 据此,研究大量制备活化的自然杀手细胞的结果,本发明人通过使用含有IL-2蛋白与CD80蛋白的融合蛋白二聚体制备自然杀手细胞。此外,本发明人确定因此制得的自然杀手细胞活性增强且表现出优异的抗癌作用,因此完成本发明。

[0010] 为达到上述目的,根据一个示例性的实施方案,提供一种用于培养自然杀手细胞

的组合物,其包含作为活性成分的含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白二聚体。

[0011] 根据另一个示例性的实施方案,提供一种用于培养自然杀手细胞的方法,其包含:i) 从外周血单核细胞(PBMC)中分离出不会表达CD3的细胞;ii) 从以上步骤中分离的不会表达CD3的细胞中,分离出会表达CD56的细胞;及iii) 在含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白二聚体的存在下,培养该分离的细胞。

[0012] 根据又一个示例性的实施方案,提供一种通过该用于培养自然杀手细胞的方法制得的自然杀手细胞。

[0013] 根据再一个示例性的实施方案,提供一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含该自然杀手细胞作为活性成分。

[0014] 根据又再另一个示例性的实施方案,提供一种用于培养自然杀手细胞的方法,其包含:i) 从PBMCs中分离出不会表达CD3的细胞;及ii) 在含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白二聚体的存在下,培养该分离的细胞。

[0015] 根据另一个示例性的实施方案,提供一种通过该用于培养自然杀手细胞的方法制得的自然杀手细胞。

[0016] 根据又一个示例性的实施方案,提供一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含该自然杀手细胞作为活性成分。

[0017] 根据再另一个示例性的实施方案,提供一种用于培养自然杀手细胞的方法,其包含:i) 从PBMCs中分离出会表达CD56的细胞;及iii) 在含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白二聚体的存在下,培养该分离的细胞。

[0018] 根据又再另一个示例性的实施方案,提供一种通过该用于培养自然杀手细胞的方法制得的自然杀手细胞。

[0019] 根据另一个示例性的实施方案,提供一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含该自然杀手细胞作为活性成分。

[0020] 根据又一个示例性的实施方案,提供一种用于促进PBMCs中自然杀手细胞的活化的方法,其包含在含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白二聚体的存在下培养PBMCs。

[0021] 根据又一个示例性的实施方案,提供一种通过该用于促进PBMCs中自然杀手细胞的活化的方法制得的PBMCs。

[0022] 根据再另一个示例性的实施方案,提供一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含该PBMCs作为活性成分。

[0023] 本发明的用于培养自然杀手细胞的组合物,其包含作为活性成分的含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白,可促进自然杀手细胞的增殖、诱导CD16及NKp46的表达及增加颗粒酶B及穿透细胞膜蛋白质的表达与分泌,因此可用于生产具有优异抗癌免疫功能的自然杀手细胞。

附图说明

[0024] 结合下列说明与附图可更详细地了解例示实施例,其中:

[0025] 图1A是本发明中使用的融合蛋白二聚体的示意图;

[0026] 图1B显示确定所获得的融合蛋白二聚体(GI-101)的SDS-PAGE影像;

- [0027] 图1C显示根据吸亮度的融合蛋白二聚体(GI-101)的含量;
- [0028] 图1D显示所获得的融合蛋白二聚体(GI-101)的尺寸排除色谱法(SEC)的分析结果;
- [0029] 图2A显示确定所获得的hCD80-Fc融合蛋白二聚体的SDS-PAGE影像;
- [0030] 图2B显示所获得的hCD80-Fc融合蛋白二聚体的尺寸排除色谱法(SEC)的分析结果;
- [0031] 图3A显示确定所获得的Fc-IL2v2融合蛋白二聚体的SDS-PAGE影像;
- [0032] 图3B显示所获得的Fc-IL2v2融合蛋白二聚体的尺寸排除色谱法(SEC)的分析结果;
- [0033] 图3C显示确定所获得的Fc-IL2wt融合蛋白二聚体的SDS-PAGE影像;
- [0034] 图3D显示所获得的Fc-IL2wt融合蛋白二聚体的尺寸排除色谱法(SEC)的分析结果;
- [0035] 图4A显示确定所获得的hCD80-Fc-IL2wt融合蛋白二聚体的SDS-PAGE影像;
- [0036] 图4B显示所获得的hCD80-Fc-IL2wt融合蛋白二聚体的尺寸排除色谱法(SEC)的分析结果;
- [0037] 图5A及5B显示在AIM-V (5%SR) 条件下培养时NK细胞的数量;
- [0038] 图6A及6B显示在AIM-V (5%SR) 条件下培养时NK细胞的存活力;
- [0039] 图7A及7B显示在AIM-V (5%hABS) 条件下培养时NK细胞的数量;
- [0040] 图8A及8B显示在AIM-V (5%hABS) 条件下培养时NK细胞的存活力;
- [0041] 图9A及9B显示在X-VIVO (5%hABS) 条件下培养时NK细胞的数量;
- [0042] 图10A及10B显示在X-VIVO (5%hABS) 条件下培养时NK细胞的存活力;
- [0043] 图11A及11B显示在NK MACS (5%hABS) 条件下培养时NK细胞的数量;
- [0044] 图12A及12B显示在NK MACS (5%hABS) 条件下培养时NK细胞的存活力;
- [0045] 图13显示FACS分析的结果,其确定培养在含有AIM-V (5%SR) 培养基的组合物中的自然杀手细胞的纯度;
- [0046] 图14显示FACS分析的结果,其确定培养在含有AIM-V (5%hABS) 培养基的组合物中的自然杀手细胞的纯度;
- [0047] 图15显示FACS分析的结果,其确定培养在含有X-VIVO15 (5%hABS) 培养基的组合物中的自然杀手细胞的纯度;
- [0048] 图16显示FACS分析的结果,其确定培在含有NK MACS (5%hABS) 培养基的组合物中的自然杀手细胞的纯度;
- [0049] 图17显示培养在含有AIM-V (5%SR) 培养基的组合物中的自然杀手细胞的活化性标记的分析结果;
- [0050] 图18显示培养在含有AIM-V (5%SR) 培养基的组合物中的自然杀手细胞的抑制性标记的分析结果;
- [0051] 图19显示培养在含有AIM-V (5%hABS) 培养基的组合物中的自然杀手细胞的活化性标记的分析结果;
- [0052] 图20显示培养在含有AIM-V (5%hABS) 培养基的组合物中的自然杀手细胞的抑制性标记的分析结果;

[0053] 图21显示培养在含有X-VIVO (5%hABS) 培养基的组合物中的自然杀手细胞的活化性标记的分析结果;

[0054] 图22显示培养在含有X-VIVO (5%hABS) 培养基的组合物中的自然杀手细胞的抑制性标记的分析结果;

[0055] 图23显示培养在含有NK MACS (5%hABS) 培养基的组合物中的自然杀手细胞的活化性标记的分析结果;

[0056] 图24显示培养在含有NK MACS (5%hABS) 培养基的组合物中的自然杀手细胞的抑制性标记的分析结果;

[0057] 图25显示培养在含有AIM-V (5%SR) 培养基的组合物中的自然杀手细胞的细胞毒性标记的分析结果;

[0058] 图26显示培养在含有AIM-V (5%hABS) 培养基的组合物中的自然杀手细胞的细胞毒性标记的分析结果;

[0059] 图27显示培养在含有X-VIVO15 (5%hABS) 培养基的组合物中的自然杀手细胞的细胞毒性标记的分析结果;

[0060] 图28显示培养在含有NK MACS (5%hABS) 培养基的组合物中的自然杀手细胞的细胞毒性标记的分析结果;

[0061] 图29显示在AIM-V (5%hABS) 培养基中含GI-101 (50nM)、GI-101_wt (50nM)、CD80-Fc (50nM)+Fc-IL2v2 (50nM) 或CD80-Fc (50nM)+Fc-IL2wt (50nM) 的组合物中培养21天的自然杀手细胞的去颗粒能力的分析结果;

[0062] 图30显示在AIM-V (5%hABS) 培养基中含GI-101 (50nM)、GI-101_wt (50nM)、CD80-Fc (50nM)+Fc-IL2v2 (50nM) 或CD80-Fc (50nM)+Fc-IL2wt (50nM) 的组合物中培养21天的自然杀手细胞的癌细胞杀伤作用的分析结果;

[0063] 图31显示在X-VIVO15 (5%hABS) 培养基中含GI-101 (50nM)、GI-101_wt (50nM)、CD80-Fc (50nM)+Fc-IL2v2 (50nM) 或CD80-Fc (50nM)+Fc-IL2wt (50nM) 的组合物中培养21天的自然杀手细胞的去颗粒能力的分析结果;

[0064] 图32显示在X-VIVO15 (5%hABS) 培养基中含GI-101 (50nM)、GI-101_wt (50nM)、CD80-Fc (50nM)+Fc-IL2v2 (50nM) 或CD80-Fc (50nM)+Fc-IL2wt (50nM) 的组合物中培养21天的自然杀手细胞的癌细胞杀伤作用的分析结果;

[0065] 图33显示在NK MACS (5%hABS) 培养基中含GI-101 (50nM)、GI-101_wt (50nM)、CD80-Fc (50nM)+Fc-IL2v2 (50nM) 或CD80-Fc (50nM)+Fc-IL2wt (50nM) 的组合物中培养21天的自然杀手细胞的去颗粒能力的分析结果;及

[0066] 图34显示在NK MACS (5%hABS) 培养基中含GI-101 (50nM)、GI-101_wt (50nM)、CD80-Fc (50nM)+Fc-IL2v2 (50nM) 或CD80-Fc (50nM)+Fc-IL2wt (50nM) 的组合物中培养21天的自然杀手细胞的癌细胞杀伤作用的分析结果。

具体实施方式

[0067] 用于NK细胞增殖的组合物及培养基

[0068] 本发明的一个方面提供一种用于培养自然杀手(NK)细胞的组合物,其包含作为活性成分的含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白二聚体。此外,提供一种自然杀手

细胞培养基,其包含所述融合蛋白二聚体作为活性成分。

[0069] 该用于培养自然杀手细胞的组合物可进一步包含任一种选自于由培养基、血清、补充剂及其等的组合所构成的群组。

[0070] 该NK细胞培养基可为于细胞培养基中添加含有IL-2蛋白与CD80蛋白的融合蛋白二聚体的培养基。在此情况下,所述细胞培养基可包括任一种选自于由氨基酸、糖、无机盐及维生素所构成的群组。优选地,所述细胞培养基可包括氨基酸、糖、无机盐及维生素中的全部。作为一个具体实施方案,该NK细胞培养基可包括至少一种以下表1至表4中的组分。

[0071] 本文中使用的术语“细胞培养基”意指用于培养细胞,具体地NK细胞,更具体地CD3-CD56+细胞的培养基。此包括细胞于试管中的细胞生长及存活所需的组分,或包括帮助细胞生长及存活的组分。具体地,所述组分可为维生素、必需或非必需氨基酸及微量元素。该培养基可为用于培养细胞,优选地真核细胞,更佳地NK细胞的培养基。

[0072] 根据本发明的细胞培养基可包括氨基酸组分、维生素组分、无机盐组分、其它组分及纯水,其中:

[0073] a) 该氨基酸组分是选自于由下列所构成的群组中的至少一种氨基酸:甘氨酸、L-丙氨酸、L-缬氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸、L-苏氨酸、L-丝氨酸、L-半胱氨酸、L-甲硫氨酸、L-天冬氨酸、L-天冬酰胺、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、L-离氨酸、L-精氨酸、L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-酪氨酸、L-色氨酸、L-脯氨酸、 β -丙氨酸、 γ -氨基丁酸、鸟氨酸、瓜氨酸、高丝氨酸、三碘甲状腺素、甲状腺素和二氧苯丙氨酸或其等的组合,优选地选自于由下列所构成的群组中的至少一种氨基酸:甘氨酸、L-丙氨酸、L-精氨酸、L-半胱氨酸、L-谷氨酰胺、L-组氨酸、L-离氨酸、L-甲硫氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸及L-缬氨酸或其等的组合;

[0074] b) 该维生素是选自于由下列所构成的群组中的至少一种维生素:生物素、D-泛酸钙、叶酸、烟碱酰胺、盐酸吡多辛、核黄素、盐酸硫胺素、维生素B12、氯化胆碱、i-肌醇及抗坏血酸或其等的组合,优选地选自于由下列所构成的群组中的至少一种维生素:i-肌醇、盐酸硫胺素、烟碱酰胺及盐酸吡多辛或其等的组合;

[0075] c) 该无机盐组分是选自于由下列所构成的群组中的至少一种无机盐:氯化钙(CaCl_2) (无水)、硫酸铜五水合物($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、硫酸铁(III)七水合物($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、氯化镁(无水)、硫酸镁(MgSO_4) (无水)、氯化钾(KCl)、氯化钠(NaCl)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、磷酸二氢钠一水合物($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、硫酸锌七水合物($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、硝酸铁(III)九水合物($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)及碳酸氢钠(NaHCO_3)或其等的组合,优选地选自于由下列所构成的群组中的至少一种无机盐:氯化钠(NaCl)、碳酸氢钠(NaHCO_3)、氯化钾(KCl)、氯化钙(CaCl_2) (无水)及磷酸二氢钠一水合物($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)或其等的组合;

[0076] d) 该其它组分是选自于由下列所构成的群组中的至少一种其它组分:D-葡萄糖(右旋糖)、丙酮酸钠、次黄嘌呤Na、胸苷、亚麻油酸、类脂酸、腺苷酸、胞苷、鸟苷、尿苷、2'-脱氧腺苷、2'-脱氧胞苷HCl及2'-脱氧鸟苷或其等的组合,优选地可为丙酮酸钠;及

[0077] e) 纯水是用于溶解该氨基酸、维生素、无机盐及其它组分,且可通过一或多个蒸馏过程获得,或透过滤器纯化。

[0078] 此外,根据本发明的细胞培养基可进一步包含生长因子或细胞因子。该生长因子可为IGF、bFGF、TGF、HGF、EGF、VEGF、PDGF等等单独或其中至少二种,但不限于此。该细胞因子可为IL-1、IL-4、IL-6、IFN- γ 、IL-10、IL-15、IL-17、IL-21等等单独或其中至少二种,但

不限于此。

[0079] 此外,根据本发明的细胞培养基可进一步包含用于活化自然杀手细胞的抗体。该用于活化自然杀手细胞的抗体可为抗CD3抗体、抗CD2抗体、抗CD335抗体等等单独或其中至少二种,但不限于此。此外,可包括与该用于活化自然杀手细胞的抗体结合的珠。此外,可使用含有二或多种用于活化自然杀手细胞的抗体或其可变区片段的融合蛋白。

[0080] 特别是,所述NK培养基可进一步包括选自于由下列所构成的群组中的任一个:IL-15、IL-21及其等的组合。

[0081] 该IL-15及IL-21可为一种介白素(IL),意指由免疫活性细胞如淋巴细胞或单核球及巨噬细胞生成的蛋白质生物活性物质。当使用单核细胞作为来源细胞培养自然杀手细胞时,可使用IL-15及IL-21促进自然杀手细胞的增殖,但当仅单独或组合使用其等之时,有低增殖率及纯度的问题(Biossel L. et al., Biology of Blood and Marrow Transplantation, 14, 1031-1038, 2008)。

[0082] 具体地,所述培养基可为用于培养动物细胞的惯用培养基,如DMEM (Dulbecco氏改良Eagle氏培养基)、EDM (内皮分化培养基)、MEM (最小限度必需培养基)、BME (基本培养基)、RPMI 1640、F-10、F-12、 α -MEM (α -最小限度必需培养基)、G-MEM (Glasgow氏最小限度必需培养基)、Iscove氏改良Dulbecco氏培养基、AIM-V培养基、X-VIVO™ 15培养基、NK MACS培养基。在本发明的实施方案中,使用AIM-V培养基、X-VIVO™ 15培养基及NK MACS作为培养基。

[0083] 本发明中使用的术语“血清”意指在血液完全凝集后从血液中分离出的清澈上清液。此外,用于培养动物细胞的合成培养基中需要添加血清,通常是使用牛、马或人的血清。在牛源血清方面,可使用胎牛血清(FBS)、新生牛血清、小牛血清、牛血清等等,取决于采血时机。在人源血清方面,可使用AB血型供血者的人血清,人AB血清没有对A与B血型抗原的抗体,所以可最小化免疫反应。此外,可使用CTS Immune Cell SR等等作为“血清”的替代物。在本发明的实施方案中,使用人AB血清或CTS Immune Cell SR。

[0084] 可使用GLUTAMAX (GIBCO®)、L-谷氨酸替代品作为补充剂,用以改善细胞培养期间的安全性及细胞活性。此外,所述补充剂可为NK MACS补充剂(Miltenyi Biotec, 130-113-102)。

[0085] 含有IL-2蛋白与CD80蛋白的融合蛋白二聚体

[0086] 本文中使用的术语“IL-2”或“白介素-2”,除非有另外说明,否则意指从任何脊椎动物来源,包括哺乳动物,例如灵长类动物(如人)及啮齿动物(如小鼠及大鼠)获得的任何野生型IL-2。IL-2可从动物细胞获得,还包括从能够生成IL-2的重组细胞获得的IL-2。此外,IL-2可为野生型IL-2或其变体。

[0087] 在本说明书中,IL-2或其变体可集体以术语“IL-2蛋白”或“IL-2多肽”表示。IL-2、IL-2蛋白、IL-2多肽及IL-2变体会特异性地结合至例如IL-2受体。此特异性结合可用熟悉本领域普通技术人员已知的方法鉴定。

[0088] IL-2之一实施方案可具有SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36的氨基酸序列。在此,IL-2亦可为成熟形式。具体地,成熟IL-2可不含信号序列,且可具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在此,IL-2可在包含野生型IL-2的片段的概念下使用,其中野生型IL-2的N端或C端部分被截短。

[0089] 此外,IL-2的片段可为从具有SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36的氨基酸序列的蛋白

的N端截短1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续的氨基酸的形式。此外,所述IL-2的片段可为从具有SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36的氨基酸序列的蛋白的C端截短1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续的氨基酸的形式。

[0090] 本文中所使用的术语“IL-2变体”意指全长IL-2或上述IL-2的片段中一部分的氨基酸被取代的形式。即,IL-2变体可具有与野生型IL-2或其片段不同的氨基酸序列。然而,IL-2变体可具有与野生型IL-2相当或相似的活性。在此,“IL-2活性”可意指例如与IL-2受体特异性结合,所述特异性结合可用熟悉本领域普通技术人员已知的方法测量。

[0091] 具体地,IL-2变体可通过取代野生型IL-2中一部分的氨基酸而获得。通过氨基酸取代而获得的IL-2变体的实施方案,可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中的第38个、第42个、第45个、第61个及第72个氨基酸中的至少一个而获得。

[0092] 具体地,所述IL-2变体可通过以另一氨基酸取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中的第38个、第42个、第45个、第61个及第72个氨基酸中的至少一个而获得。此外,当IL-2为SEQ ID NO:35的氨基酸序列中N端的一部分被截短的形式时,可以另一氨基酸取代与SEQ ID NO:10的氨基酸序列中互补对应位置处的氨基酸。例如,当IL-2具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列时,其IL-2变体可通过以另一氨基酸取代SEQ ID NO:35氨基酸序列中第58个、第62个、第65个、第81个或第92个氨基酸中的至少一个而获得。此等氨基酸残基分别对应应在SEQ ID NO:10的氨基酸序列中的第38个、第42个、第45个、第61个及第72个氨基酸残基。根据一个实施方案,可取代一、二、三、四、五、六、七、八、九或十个氨基酸,只要此IL-2变体能保持IL-2活性。根据另一个实施方案,可取代一至五个氨基酸。

[0093] 在一个实施方案中,IL-2变体可为二个氨基酸被取代的形式。具体地,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第38个及第42个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第38个及第45个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第38个及第61个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第38个及第72个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第42个及第45个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第42个及第61个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第42个及第72个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第45个及第61个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第45个及第72个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第61个及第72个氨基酸而获得。

[0094] 再者,IL-2变体可为三个氨基酸被取代的形式。具体地,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第38个、第42个及第45个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第38个、第42个及第61个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第38个、第42个及第72个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第38个、第45个及第61个氨基酸而获得。此外,在一实施方案

中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第38个、第45个及第72个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第38个、第61个及第72个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第42个、第45个及第61个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第42个、第45个及第72个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第45个、第61个及第72个氨基酸而获得。

[0095] 此外,IL-2变体可为四个氨基酸被取代的形式。具体地,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第38个、第42个、第45个及第61个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第38个、第42个、第45个及第72个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第38个、第45个、第61个及第72个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第38个、第42个、第61个及第72个氨基酸而获得。此外,在一实施方案中,所述IL-2变体可通过取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第42个、第45个、第61个及第72个氨基酸而获得。

[0096] 再者,IL-2变体可为五个氨基酸被取代的形式。具体地,所述IL-2变体可通过以另一氨基酸取代SEQ ID NO:10的氨基酸序列中第38个、第42个、第45个、第61个及第72个氨基酸中的每一个而获得。

[0097] 在此,通过取代而导入的“另一氨基酸”可为任一个选自于由下列所构成的群组:丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、离氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸及缬氨酸。然而,在所述IL-2变体的氨基酸取代方面,在SEQ ID NO:10的氨基酸序列中,第38个氨基酸不能以精氨酸取代、第42个氨基酸不能以苯丙氨酸取代、第45个氨基酸不能以酪氨酸取代、第61个氨基酸不能以谷氨酸取代及第72个氨基酸不能以亮氨酸取代。

[0098] 在IL-2变体的氨基酸取代方面,在SEQ ID NO:10的氨基酸序列中,第38个氨基酸,精氨酸,可以非精氨酸的氨基酸取代。优选地,在IL-2变体的氨基酸取代方面,在SEQ ID NO:10的氨基酸序列中,第38个氨基酸,精氨酸,可以丙氨酸取代(R38A)。

[0099] 在IL-2变体的氨基酸取代方面,在SEQ ID NO:10的氨基酸序列中,第42个氨基酸,苯丙氨酸,可以非苯丙氨酸的氨基酸取代。优选地,在IL-2变体的氨基酸取代方面,在SEQ ID NO:10的氨基酸序列中,第42个氨基酸,苯丙氨酸,可以丙氨酸取代(F42A)。

[0100] 在IL-2变体的氨基酸取代方面,在SEQ ID NO:10的氨基酸序列中,第45个氨基酸,酪氨酸,可以非酪氨酸的氨基酸取代。优选地,在IL-2变体的氨基酸取代方面,在SEQ ID NO:10的氨基酸序列中,第45个氨基酸,酪氨酸,可以丙氨酸取代(Y45A)。

[0101] 在IL-2变体的氨基酸取代方面,在SEQ ID NO:10的氨基酸序列中,第61个氨基酸,谷氨酸,可以非谷氨酸的氨基酸取代。优选地,在IL-2变体的氨基酸取代方面,在SEQ ID NO:10的氨基酸序列中,第61个氨基酸,谷氨酸,可以精氨酸取代(E61R)。

[0102] 在IL-2变体的氨基酸取代方面,在SEQ ID NO:10的氨基酸序列中,第72个氨基酸,亮氨酸,可以非亮氨酸的氨基酸取代。优选地,在IL-2变体的氨基酸取代方面,在SEQ ID NO:10的氨基酸序列中,第72个氨基酸,亮氨酸,可以甘氨酸取代(L72G)。

[0103] 具体地, IL-2变体可通过至少一个选自于由下列所构成的群组的取代而获得: SEQ ID NO:10的氨基酸序列中之R38A、F42A、Y45A、E61R及L72G。

[0104] 具体地, IL-2变体可通过在选自于由R38A、F42A、Y45A、E61R及L72G所构成的群组的位置中的二个、三个、四个或五个位置处的氨基酸取代而获得。

[0105] 此外, IL-2变体可为二个氨基酸被取代的形式。具体地, IL-2变体可通过R38A及F42A的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过R38A及Y45A的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过R38A及E61R的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过R38A及L72G的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过F42A及Y45A的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过F42A及E61R的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过F42A及L72G的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过E61R及L72G的取代而获得。

[0106] 此外, IL-2变体可为三个氨基酸被取代的形式。具体地, IL-2变体可通过R38A、F42A及Y45A的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过R38A、F42A及E61R的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过R38A、F42A及L72G的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过R38A、Y45A及E61R的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过R38A、Y45A及L72G的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过F42A、Y45A及E61R的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过F42A、Y45A及L72G的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过F42A、E61R及L72G的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过Y45A、E61R及L72G的取代而获得。

[0107] 此外, IL-2变体可为四个氨基酸被取代的形式。具体地, IL-2变体可通过R38A、F42A、Y45A及E61R的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过R38A、F42A、Y45A及L72G的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过R38A、F42A、E61R及L72G的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过R38A、Y45A、E61R及L72G的取代而获得。此外, 在一实施方案中, IL-2变体可通过F42A、Y45A、E61R及L72G的取代而获得。

[0108] 此外, IL-2变体可通过R38A、F42A、Y45A、E61R及L72G的取代而获得。

[0109] 优选地, 所述IL-2变体的实施方案可包含任一个选自于下列SEQ ID NO:10的氨基酸序列中的取代组合(a)至(d):

[0110] (a) R38A/F42A

[0111] (b) R38A/F42A/Y45A

[0112] (c) R38A/F42A/E61R

[0113] (d) R38A/F42A/L72G

[0114] 在此, 当IL-2具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列时, 氨基酸取代可出现在与SEQ ID NO:10的氨基酸序列中互补对应位置处。此外, 即使IL-2是SEQ ID NO:35的氨基酸序列的片段, 氨基酸取代亦可出现在与SEQ ID NO:10的氨基酸序列中互补对应位置处。

[0115] 具体地, IL-2变体可具有SEQ ID NO:6、22、23或24的氨基酸序列。

[0116] 此外, IL-2变体可具有低活体内毒性的特征。在此, 所述低活体内毒性可能为IL-2与IL-2受体 α 链(IL-2R α)结合引起的副作用。已开发出各种可减少因IL-2与IL-2受体 α 结合所引起的副作用的IL-2变体, 且此IL-2变体可为美国专利案第5,229,109号及韩国专利案第1667096号中所揭示的。特别是, 本申请案中所述的IL-2变体对IL-2受体 α 链(IL-2R α)具

有低结合能力,因此具有比野生型IL-2低的活体内毒性。

[0117] 本文中所使用的术语“CD80”亦称作“B7-1”,是一种存在树状细胞、活化B细胞及单核球中的膜蛋白。CD80提供T细胞的活化及存活必需的共刺激讯息。CD80已知为存在T细胞表面上二种不同的蛋白(即CD28及CTLA-4)的配体。CD80可由288个氨基酸构成,具体地可具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列。此外,本文中所使用的术语“CD80蛋白”意指CD80全长或CD80片段。

[0118] 本文中所使用的术语“CD80片段”意指CD80的截短形式。此外,所述CD80片段可为CD80的胞外结构域。CD80片段的实施方案可通过删除CD80的N端第1个至第34个氨基酸(其是信号序列)而获得。具体地,CD80片段的实施方案可为由SEQ ID NO:11中第35个至第288个氨基酸构成的蛋白。此外,CD80片段的实施方案可为由SEQ ID NO:11中第35个至第242个氨基酸构成的蛋白。此外,CD80片段的实施方案可为由SEQ ID NO:11中第35个至第232个氨基酸构成的蛋白。此外,CD80片段的实施方案可为由SEQ ID NO:11中第35个至第139个氨基酸构成的蛋白。此外,CD80片段的实施方案可为由SEQ ID NO:11中第142个至第242个氨基酸构成的蛋白。在一实施方案中,CD80片段可具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0119] 此外,所述IL-2蛋白与该CD80蛋白可透过接头或载体(carrier)彼此连接。具体地,所述IL-2或其变体与该CD80(B7-1)或其片段可透过接头或载体彼此连接。在本说明中,所述接头及该载体可交换使用。

[0120] 该接头可连接二个蛋白。该接头的实施方案可包括1至50个氨基酸、白蛋白或其片段、免疫球蛋白的Fc结构域等等。在此,免疫球蛋白的Fc结构域意指含有免疫球蛋白的重链恒定区2(CH2)及重链恒定区3(CH3),而不含免疫球蛋白的重及轻链可变区及轻链恒定区1(CH1)的蛋白。该免疫球蛋白可为IgG、IgA、IgE、IgD或IgM,优选地可为IgG4。在此,野生型免疫球蛋白G4的Fc结构域可具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0121] 此外,免疫球蛋白的Fc结构域可为Fc结构域变体及野生型Fc结构域。此外,在本文中所使用的术语“Fc结构域变体”可意指在糖基化模式方面与野生型Fc结构域不同的形式,与野生型Fc结构域相比具高糖基化,或与野生型Fc结构域相比具低糖基化,或去糖基化的形式。此外,无糖基化Fc结构域包含于其中。通过宿主的培养条件或基因操作,可使该Fc结构域或其变体适应而具有调整数量的唾液酸、岩藻糖基化或糖基化。

[0122] 此外,免疫球蛋白的Fc结构域的糖基化可通过常规的方法修饰,如化学方法、酵素方法及使用微生物的遗传工程方法。此外,所述Fc结构域变体可为免疫球蛋白、IgG、IgA、IgE、IgD及IgM各别的Fc区的混合形式。此外,所述Fc结构域变体可为该Fc结构域中的一些氨基酸经其它氨基酸取代的形式。该Fc结构域变体的实施方案可具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0123] 该融合蛋白可具有使用Fc结构域作为接头(或载体)的结构,其中CD80蛋白与IL-2蛋白,或IL-2蛋白与CD80蛋白,分别连接至该接头或载体的N端及C端(图1A)。该Fc结构域的N端或C端与CD80或IL-2间的连接,可任择地通过一连接肽达成。

[0124] 具体地,融合蛋白可由下列结构式(I)或(II)构成:

[0125] $N'-X-[接头(1)]_n-Fc结构域-[接头(2)]_m-Y-C'$ (I)

[0126] $N'-Y-[接头(1)]_n-Fc结构域-[接头(2)]_m-X-C'$ (II)

[0127] 在此,在结构式(I)及(II)中,

[0128] N'是该融合蛋白的N端，

[0129] C'是该融合蛋白的C端，

[0130] X是CD80蛋白，

[0131] Y是IL-2蛋白，

[0132] 该接头(1)及(2)是肽接头，及

[0133] n及m各独立地为0或1。

[0134] 优选地，所述融合蛋白可由结构式(I)构成。所述IL-2蛋白如上所述。此外，所述CD80蛋白如上所述。根据一个实施方案，所述IL-2蛋白可为与野生型IL-2相比具有一至五个氨基酸取代的IL-2变体。该CD80蛋白可为从野生型CD80的N端或C端截短高达约34个连续的氨基酸残基所获得的片段。或者，所述CD80蛋白可为具有与T细胞表面受体CTLA-4及CD28结合的活性的胞外免疫球蛋白样结构域。

[0135] 具体地，所述融合蛋白可具有SEQ ID NO:9、26、28或30的氨基酸序列。根据另一个实施方案，所述融合蛋白包括与SEQ ID NO:9、26、28或30的氨基酸序列具有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在此，所述同一性是例如同源百分比，且可透过同源性比对软件如National Center of Biotechnology Information (NCBI) 的BlastN软件测定。

[0136] 该肽接头(1)可包含在该CD80蛋白与该Fc结构域之间。该肽接头(1)可由5至80个连续的氨基酸、20至60个连续的氨基酸、25至50个连续的氨基酸或30至40个连续的氨基酸构成。在一实施方案中，所述肽接头(1)可由30个氨基酸构成。此外，所述肽接头(1)可包含至少一个半胱氨酸。具体地，所述肽接头(1)可含有一个、二个或三个半胱氨酸。此外，所述肽接头(1)可源自免疫球蛋白的铰链。在一实施方案中，所述肽接头(1)可为由SEQ ID NO:3的氨基酸序列构成的肽接头。

[0137] 该肽接头(2)可由1至50个连续的氨基酸、3至30个连续的氨基酸或5至15个连续的氨基酸构成。在一实施方案中，所述肽接头(2)可为(G4S)_n (其中n是1至10的整数)。在此，于(G4S)_n中，n可为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一实施方案中，所述肽接头(2)可为由SEQ ID NO:5的氨基酸序列构成的肽接头。

[0138] 在本发明的另一方面中，提供一种通过结合二个融合蛋白而获得的二聚体，其各含有IL-2蛋白与CD80蛋白。含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白如上所述。

[0139] 在此，构成该二聚体的融合蛋白间的结合，可通过，但不限于，存在该接头中的半胱氨酸形成的双硫键达成。构成该二聚体的融合蛋白可为彼此相同或不同的融合蛋白。优选地，所述二聚体可为同型二聚体。构成该二聚体的融合蛋白的实施方案可为具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的蛋白。

[0140] NK细胞培养方法1

[0141] 本发明的另一方面提供一种用于培养自然杀手细胞的方法：i) 从外周血单核细胞(PBMC)中分离出不会表达CD3的细胞；ii) 从以上步骤中分离的不会表达CD3的细胞中，分离出会表达CD56的细胞；及iii) 在含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白二聚体的存在下，培养该分离的细胞。

[0142] 本发明中使用的术语“PBMC”意指外周血单核细胞。PBMC由淋巴细胞(T细胞、B细胞、自然杀手细胞)及单核球构成，可利用Ficoll及离心从全血中分离出来。PBMC可从个体

获得的全血中分离出来。

[0143] 所述融合蛋白二聚体如对于用于培养自然杀手细胞的组合物的详细说明。所述融合蛋白二聚体可以1nM至500nM的浓度处理。具体地,所述融合蛋白二聚体可以1nM至500nM、5nM至300nM或10nM至150nM的浓度处理。在本发明的实施方案中,所述融合蛋白二聚体以1.6nM或50nM的浓度处理。

[0144] 用于培养该分离的细胞的方法可使用此技术领域广为人知的方法进行。具体地,培养该分离的细胞的步骤中的培养温度可为27℃至40℃或30℃至37℃。在本发明的实施例中,培养在37℃之温度下进行。此外,在培养该分离的细胞的步骤中,培养期间的CO₂浓度可为1%至10%,优选地,其可在5%CO₂条件下培养。

[0145] 在培养该分离的细胞的步骤中,培养期可为5天至25天、6天至23天或7天至21天。在本发明的实施方案中,培养期为20天,从第5天开始出现显著的增殖差异。

[0146] 所获得的NK细胞及其用途

[0147] 本发明之另一方面提供由该用于培养自然杀手细胞的方法制得的自然杀手细胞。

[0148] 该自然杀手细胞可具有增加表达的CD16及NKp46。该自然杀手细胞可具有增加表达的颗粒酶B及穿透细胞膜蛋白质。根据该用于培养自然杀手细胞的方法培养的自然杀手细胞可冷冻,且即使再次解冻亦不会损害功能。

[0149] 由于活化受体如CD16及NKp46的高度表达,所述自然杀手细胞对癌细胞株表现出增强的杀伤能力及增加的颗粒酶B与穿透细胞膜蛋白质分泌,因此预期会有优异的抗癌作用。因此,可使用大量临床上适用的活化的自然杀手细胞,制备能有效治疗癌症的治疗剂。此外,所述自然杀手细胞可具有高度表达的NKp30或DNAM1。

[0150] 本发明之另一方面提供一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含该自然杀手细胞作为活性成分。

[0151] 此外,以所述药物组合物的总重量为基础,由该用于培养自然杀手细胞的方法制得的自然杀手细胞的数量可占10至95重量%。再者,除了该活性成分外,所述药物组合物可进一步包含至少一种表现出相同或相似功能的活性成分。

[0152] 所述药物组合物的剂量可根据各种因素调整,包括疾病类型、疾病严重程度、该组合物中所含的活性成分及其它成分的种类及含量、配方的种类及患者的年龄、体重、整体健康状况、性别及饮食、投药时间、投药途径及组合物的分泌率、治疗期间及同时使用的药物。

[0153] 然而,在取得理想的效果方面,以活性成分自然杀手细胞为基础,所述药物组合物的剂量可为 1×10^2 细胞/kg至 1.0×10^{13} 细胞/kg以及 1×10^7 细胞/kg至 1.5×10^{11} 细胞/kg。在此情况下,所述剂量可一天给药一次,或可分成数次给药。

[0154] 此外,所述药物组合物可通过此技术领域已知的各种方法给药。给药途径可由熟悉本领域普通技术人员,考虑给药方法、体液体积、黏度等等适当地选择。

[0155] 该癌症可选自于由下列所构成的群组中的任一个:胃癌、肝癌、肺癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰脏癌、子宫颈癌、甲状腺癌、喉癌、急性淋巴母细胞白血病、脑瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、唾液腺癌及淋巴瘤。

[0156] 使用所获得的NK细胞的治疗方法

[0157] 本发明的另一方面提供一种用于治疗癌症的方法,其包括对患有癌症的个体给药该NK细胞。在此情况下,所述NK细胞及癌症如上所述。本发明的又另一方面提供该NK细胞用

于治疗癌症的用途。

[0158] NK细胞培养方法2

[0159] 本发明的另一方面提供一种用于培养自然杀手细胞的方法,其包含:i)从PBMCs中分离出不会表达CD3的细胞;及ii)在含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白二聚体的存在下,培养该分离的细胞。

[0160] 本发明的另一方面提供由该用于培养自然杀手细胞的方法制得的自然杀手细胞。本发明的又另一方面提供一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含该自然杀手细胞作为活性成分。本发明的又另一方面提供一种用于治疗癌症的方法,其包含对患有癌症的个体给药该NK细胞。在此情况下,所述NK细胞及癌症如上所述。本发明的又再另一方面提供该NK细胞用于治疗癌症的用途。

[0161] 由于活化受体如CD16及NKp46的高度表达,所述自然杀手细胞对癌细胞株表现出增强的杀伤能力及增加的颗粒酶B与穿透细胞膜蛋白质分泌,因此预期会有优异的抗癌作用。因此,可使用大量临床上适用的活化的自然杀手细胞制备能有效治疗癌症的治疗剂。此外,所述自然杀手细胞可具有高度表达的NKp30或DNAM1。

[0162] 该癌症可选自于由下列所构成的群组中的任一个:胃癌、肝癌、肺癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰脏癌、子宫颈癌、甲状腺癌、喉癌、急性淋巴母细胞白血病、脑瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、唾液腺癌及淋巴瘤。

[0163] NK细胞培养方法3

[0164] 本发明的另一方面提供一种用于培养自然杀手细胞的方法,其包含:i)从PBMCs中分离出会表达CD56的细胞;及ii)在含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白二聚体的存在下,培养该分离的细胞。

[0165] 本发明的又另一方面提供一种由该用于培养自然杀手细胞的方法制得的自然杀手细胞。由于活化受体如CD16及NKp46的高度表达,所述自然杀手细胞对癌细胞株表现出增强的杀伤能力及增加的颗粒酶B与穿透细胞膜蛋白质分泌,因此预期会有优异的抗癌作用。因此,可使用大量临床上适用的活化的自然杀手细胞制备能有效治疗癌症的治疗剂。此外,所述自然杀手细胞可具有高度表达的NKp30或DNAM1。

[0166] 本发明的又另一方面提供一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含该自然杀手细胞作为活性成分。本发明的又另一方面提供一种用于治疗癌症的方法,其包含对患有癌症的个体给药该NK细胞。在此情况下,所述NK细胞及癌症如上所述。本发明的又再另一方面提供该NK细胞用于治疗癌症的用途。

[0167] 该癌症可选自于由下列所构成的群组中的任一个:胃癌、肝癌、肺癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰脏癌、子宫颈癌、甲状腺癌、喉癌、急性淋巴母细胞白血病、脑瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、唾液腺癌及淋巴瘤。

[0168] NK细胞培养方法4

[0169] 本发明的另一方面提供一种用于增进PBMCs中自然杀手细胞的活性的方法,其包含在含有IL-2或其变体与CD80或其片段的融合蛋白二聚体的存在下,培养PBMCs。

[0170] 本发明的又另一方面提供由该用于增进PBMCs中自然杀手细胞的活性的方法制得的PBMCs。该PBMC中的自然杀手细胞具有高度表达的活化受体如CD16及NKp46,从而增加抗癌细胞株的细胞杀伤能力及颗粒酶B与穿透细胞膜蛋白质的分泌,因此预期会有优异的抗

癌作用。因此,可使用含有大量临床上适用的活化的自然杀手细胞的PBMCs制备能有效治疗癌症的治疗剂。此外,所述PBMCs中的自然杀手细胞可具有高度表达的NKp30或DNAM1。

[0171] 本发明的又另一方面提供一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含该PBMCs作为活性成分。本发明的又再另一方面提供一种用于治疗癌症的方法,其包含对患有癌症的个体给药该NK细胞。在此情况下,NK细胞及癌症如上所述。本发明的又再另一方面提供该NK细胞用于治疗癌症的用途。

[0172] 该癌症可选自于由下列所构成的群组中的任一个:胃癌、肝癌、肺癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰脏癌、子宫颈癌、甲状腺癌、喉癌、急性淋巴母细胞白血病、脑瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、唾液腺癌及淋巴瘤。

[0173] 在下文中,将通过下列实施例更详细的说明本发明。然而,下列实施例仅供例示说明本发明,而本发明的范畴不受其限制。

[0174] I.GI-101、自然杀手细胞及自然杀手细胞培养组合物的制备

[0175] 制备实施例1,hCD80-Fc-IL-2变体(2M):GI101的制备

[0176] 为了生成含有人CD80片段、Fc结构域与IL-2变体的融合蛋白,通过ThermoFisher Scientific的Invitrogen GeneArt Gene Synthesis服务合成一个包含核苷酸序列(SEQ ID NO:8)的多核苷酸,其从N端依序编码含有信号肽(SEQ ID NO:1)、CD80片段(SEQ ID NO:2)、接头结合的Ig铰链(SEQ ID NO:3)、Fc结构域(SEQ ID NO:4)、接头(SEQ ID NO:5)及具有二个氨基酸取代(R38A,F42A)的IL-2变体(2M)(SEQ ID NO:6)的融合蛋白,并克隆进入pcDNA3_4载体中。此外,将该载体导入CHO细胞(Expi-CHO™)中,用以表达具有SEQ ID NO:9的融合蛋白。导入该载体后,在37℃、125RPM及8%CO₂的环境中培养该细胞7天,然后收集以纯化融合蛋白。将纯化的融合蛋白二聚体命名为“GI101”。

[0177] 使用含MabSelect SuRe蛋白A树脂的色谱法进行纯化。该融合蛋白在25mM Tris、25mM NaCl及pH 7.4的条件下会结合于其上。然后,用100mM NaCl及100mM乙酸于pH 3下进行洗提。在将20%1M Tris-HCl,pH 9置于收集管中后,收集该融合蛋白。将收集的融合蛋白于PBS缓冲液中透析16个小时进行交换。

[0178] 然后,使用具TSKgel G3000SWXL管柱(TOSOH Bioscience)的尺寸排除色谱法,测量在280nm波长下随着时间变化的吸亮度,获得高浓度的融合蛋白。此时,对分离纯化的融合蛋白进行在还原(R)或非还原(NR)条件下的SDS-PAGE处理,且用考马斯蓝(Coomassie Blue)染色,确定其纯度(图1B)。用NanoDrop检测,确定包含2.78mg/ml浓度的融合蛋白(图1C)。此外,使用尺寸排除色谱法分析的结果示于图1D中。

[0179] 制备实施例2,Fc-IL-2变体(2M)二聚体:Fc-IL-2v2的制备

[0180] 为了生成含有Fc结构域与IL-2变体的融合蛋白,通过ThermoFisher Scientific的Invitrogen GeneArt Gene Synthesis服务合成一个包含核苷酸序列(SEQ ID NO:45)的多核苷酸,其从N端依序编码含有信号肽(SEQ ID NO:1)、Ig铰链(SEQ ID NO:38)、Fc结构域(SEQ ID NO:4)、接头(SEQ ID NO:5)及具有二个氨基酸取代(R38A,F42A)的IL-2变体(2M)(SEQ ID NO:6)的融合蛋白,并克隆进入pcDNA3_4载体中。此外,将该载体导入CHO细胞(Expi-CHO™)中,用以表达SEQ ID NO:44的融合蛋白。导入该载体后,在37℃、125RPM及8%CO₂的环境中培养该细胞7天,然后收集以纯化融合蛋白二聚体。将纯化的融合蛋白二聚体命名为“Fc-IL2v2”。

[0181] 使用与制备实施例1中相同的方法进行该融合蛋白的纯化及收集。对分离纯化的融合蛋白进行在还原(R)或非还原(NR)条件下的SDS-PAGE处理,且用考马斯蓝染色,确定其纯度(图3A)。结果确定该融合蛋白形成二聚体。此外,使用尺寸排除色谱法分析的结果示于图3B中。

[0182] 制备实施例3,Fc-IL-2二聚体:Fc-IL-2wt的制备

[0183] 为了生成含有Fc结构域与野生型IL-2的融合蛋白,通过ThermoFisher Scientific的Invitrogen GeneArt Gene Synthesis服务合成一个包含核苷酸序列(SEQ ID NO:43)的多核苷酸,其从N端依序编码含有信号肽(SEQ ID NO:1)、Ig铰链(SEQ ID NO:38)、Fc结构域(SEQ ID NO:4)、接头(SEQ ID NO:5)及野生型IL-2(SEQ ID NO:10)的融合蛋白,并克隆进入pcDNA3_4载体中。此外,将该载体导入CHO细胞(Expi-CHO™)中,用以表达具有SEQ ID NO:42的融合蛋白。导入该载体后,在37℃、125RPM及8%CO₂的环境中培养该细胞7天,然后收集以纯化融合蛋白二聚体。将纯化的融合蛋白二聚体命名为“Fc-IL2wt”。

[0184] 使用与制备实施例1中相同的方法进行该融合蛋白的纯化及收集。对分离纯化的融合蛋白进行在还原(R)或非还原(NR)条件下的SDS-PAGE处理,且用考马斯蓝染色,确定其纯度(图3C)。结果确定该融合蛋白形成二聚体。此外,使用尺寸排除色谱法分析的结果示于图3D中。

[0185] 制备实施例4,hCD80-Fc-IL-2野生型二聚体:hCD80-Fc-IL-2wt的制备

[0186] 为了生成含有人CD80片段、Fc结构域与IL-2野生型蛋白的融合蛋白,通过ThermoFisher Scientific的Invitrogen GeneArt Gene Synthesis服务合成一个包含核苷酸序列(SEQ ID NO:41)的多核苷酸,其从N端依序编码含有信号肽(SEQ ID NO:1)、CD80片段(SEQ ID NO:2)、接头结合的Ig铰链(SEQ ID NO:3)、Fc结构域(SEQ ID NO:4)、接头(SEQ ID NO:5)及IL-2野生型(SEQ ID NO:10)的融合蛋白,并克隆进入pcDNA3_4载体中。此外,将该载体导入CHO细胞(Expi-CHO™)中,用以表达具有SEQ ID NO:46的融合蛋白。导入该载体后,在37℃、125RPM及8%CO₂浓度的环境中培养该细胞7天,然后收集以纯化融合蛋白二聚体。将纯化的融合蛋白二聚体命名为“hCD80-Fc-IL2wt”。

[0187] 使用含MabSelect SuRe蛋白A树脂的色谱法进行纯化。该融合蛋白在25mM Tris、25mM NaCl及pH 7.4的条件下会结合于其上。然后,用100mM NaCl及100mM乙酸于pH 3下进行洗提。在将20%1M Tris-HCl,pH 9置于收集管中后,收集该融合蛋白。将收集的融合蛋白于PBS缓冲液中透析16个小时进行交换。

[0188] 然后,使用具TSKgel G3000SWXL管柱(TOSOH Bioscience)的尺寸排除色谱法,测量在280nm波长下随着时间变化的吸亮度,获得高浓度的融合蛋白。此时,对分离纯化的融合蛋白进行在还原(R)或非还原(NR)条件下的SDS-PAGE处理,且用考马斯蓝染色,确定其纯度(图4A)。结果确定该融合蛋白形成二聚体。此外,使用尺寸排除色谱法分析的结果示于图4B中。

[0189] 制备实施例5,hCD80-Fc二聚体:hCD80-Fc的制备

[0190] 为了生成含有人CD80片段与Fc结构域的融合蛋白,通过ThermoFisher Scientific的Invitrogen GeneArt Gene Synthesis服务合成一个包含核苷酸序列的多核苷酸(SEQ ID NO:39),其从N端依序编码含有信号肽(SEQ ID NO:1)、CD80片段(SEQ ID NO:2)、接头结合的Ig铰链(SEQ ID NO:3)及Fc结构域(SEQ ID NO:4)的融合蛋白,并克隆进入

pcDNA3_4载体。此外,将该载体导入CHO细胞 (Expi-CHO™) 中,用以表达具有SEQ ID NO:40的融合蛋白。导入该载体后,在37℃、125RPM及8%CO₂的环境中培养该细胞7天,然后收集以纯化融合蛋白二聚体。将纯化的融合蛋白二聚体命名为“hCD80-Fc”。

[0191] 使用含MabSelect SuRe蛋白A树脂的色谱法进行纯化。该融合蛋白在25mM Tris、25mM NaCl及pH 7.4的条件下会结合于其上。然后,用100mM NaCl及100mM乙酸在pH 3下进行洗提。在将20%1M Tris-HCl,pH 9置于收集管中后,收集该融合蛋白。将收集的融合蛋白于PBS缓冲液中透析16个小时进行交换。

[0192] 然后,使用具TSKgel G3000SWXL管柱 (TOSOH Bioscience) 的尺寸排除色谱法,测量在280nm波长下随着时间变化的吸亮度,获得高浓度的融合蛋白。此时,对分离纯化的融合蛋白进行在还原(R)或非还原(NR)条件下的SDS-PAGE处理,且用考马斯蓝染色,确定其纯度(图2A)。结果确定该融合蛋白形成二聚体。此外,使用尺寸排除色谱法分析的结果示于图2B中。

[0193] 制备实施例1,自然杀手细胞培养基的制备

[0194] 在具有以下表1至表4的组成的各基本培养基中,分别添加对应于表5的添加条件1至4的物质,制备自然杀手细胞培养基组合物。

[0195] [表1]

	基本培养基 1				
	组分	制造商	Cat.#	剂量	最后浓度
[0196]	CTS™ 免疫细胞 SR (血清代用品)	Thermo	A2596102	0.5ml	5%
	GLUTAMAX 100X	GIBCO	A12860-01	0.5ml	1X
	rhIL-15	R&D systems	247-ILB/CF	使用前才添加	66.7IU
	rhIL-21	R&D systems	8879-IL/CF	使用前才添加	0.341IU
[0197]	抗 CD2/CD335 珠	Miltenyi Biotec	130-094-483		
	OKT3	Biolegend	317326		10ng/mL
	AIM-V 培养基	GIBCO	0870112-DK	至 50ml	

[0198] [表2]

[0199]

基本培养基 2				
组分	制造商	Cat.#	剂量	最后浓度
人 AB 血清	Sigma	H4522	2.5ml	5%
GLUTAMAX 100X	GIBCO	A12860-01	0.5ml	1X
rhIL-15	R&D systems	247-ILB/CF	使用前才添加	66.7IU
rhIL-21	R&D systems	8879-IL/CF	使用前才添加	0.341IU
抗 CD2/CD335 珠	Miltenyi Biotec	130-094-483		
OKT3	Biolegend	317326		10ng/mL
AIM-V 培养基	GIBCO	0870112-DK	至 50ml	

[0200]

[表3]

[0201]

基本培养基 3				
组分	制造商	Cat.#	剂量	最后浓度
人 AB 血清	Sigma	H4522	2.5ml	5%
GLUTAMAX 100X	GIBCO	A12860-01	0.5ml	1X
rhIL-15	R&D systems	247-ILB/CF	使用前才添加	66.7IU
rhIL-21	R&D systems	8879-IL/CF	使用前才添加	0.341IU
抗 CD2/CD335 珠	Miltenyi Biotec	130-094-483		
OKT3	Biolegend	317326		10ng/mL
X-VIVO™ 15 培养基	Lonza	04-418Q	至 50ml	

[0202]

[表4]

[0203]

基本培养基 4				
组分	制造商	Cat.#	剂量	最后浓度

[0204]

人 AB 血清	Sigma	H4522	2.5ml	5%
NK MACS 补充剂	Miltenyi Biotec	130-113-102	500 μ l	1%
抗 CD2/CD335 珠	Miltenyi Biotec	130-094-483		
OKT3	Biolegend	317326		10ng/mL
NK MACS 培养基		130-112-968	至 50ml	

[0205] [表5]

[0206]	添加材料				
	类型	组分	制造商	剂量	最后浓度
	添加条件 1	GI-101	GI-Innovation	使用前才添加	1.6nM / 50nM
	添加条件 2	GI-101WT	GI-Cell	使用前才添加	1.6nM / 50nM
	添加条件 3	CD80-Fc+Fc-IL2WT	GI-Cell	使用前才添加	CD80-Fc(1.6nM)+ Fc-IL2WT(1.6nM) / CD80-Fc(50nM)+ Fc-IL2WT(50nM)
	添加条件 4	CD80-Fc+Fc-IL2v2	GI-Cell	使用前才添加	CD80-Fc(1.6nM)+ Fc-IL2v2(1.6nM) / CD80-Fc(50nM)+ Fc-IL2v2(50nM)

[0207] 实施例1,源自外周血液单核细胞(PBMC)的CD3(-)CD 56(+)自然杀手细胞的制备

[0208] 为了获得CD3(-)细胞,使用ADAM-MC2自动细胞计数器(NanoEnTek, purchased from Cosmo Genetech Co.,Ltd.)计算PBMCs(外周血单核细胞,Zen-Bio.Inc,NC 27709, USA,Cat#:SER-PBMC-200-F)的数量。将PBMCs转移至新管中,然后在300×g、温度4℃下离心5分钟。将0.5%(v/v)牛血清白蛋白(BSA)及EDTA以2mM的浓度包含于PBS中,制备MACs缓冲液(pH 7.2)。离心完成后,以每 1×10^7 细胞80μl的MACs缓冲液及20μl的CD3磁珠(Miltenyi biotech,130-050-101)处理细胞沉淀物至悬浮,然后在温度4℃下培育15分钟。加入10ml MACs进行清洗,且在300×g、温度4℃下离心10分钟,然后将细胞沉淀物再悬浮于0.5ml MACs缓冲液中。

[0209] 先让2ml MACs缓冲液流进LD管柱(Miltenyi Biotec,Bergisch Gladbach, Germany,Cat#:130-042-901)中,然后接着细胞悬浮液。如此获得通过LD管柱的CD3(-)细胞。这时使2ml MACs缓冲液流过三次,获得CD3(-)细胞,如此能够充分地分开残留在LD管柱中的细胞。使用细胞计数器计数所获得的CD3(-)细胞,然后将其置于新管中,在300×g、温度4℃下离心5分钟。然后去除上清液,然后每 1×10^7 细胞添加80μl的MACs缓冲液及20μl的CD56磁珠(Miltenyi biotech,Cat#:130-050-401),接着在温度4℃下培育15分钟。加入10ml MACs缓冲液进行清洗,且在300×g、温度4℃下离心10分钟,然后将细胞沉淀物重新悬浮于0.5ml MACs缓冲液中。

[0210] 先让3ml MACs缓冲液流进LS管柱(Miltenyi Biotec,Bergisch Gladbach, Germany,Cat#:130-042-901)中,接着细胞悬浮液。这时使2ml MACs缓冲液流过三次,如此能够充分地分开残留在LD管柱中的细胞。将LS管柱与磁力架分开后,加入5mL MACs缓冲液,用活塞加压以获得CD3(-)CD56(+)自然杀手细胞。将获得的CD3(-)CD56(+)自然杀手细胞置于新的管中并在300×g、温度4℃下离心5分钟。移除上清液后,考虑培养条件将细胞悬浮于表1至表4中所示的基本培养基中。使用细胞计数器计数悬浮细胞的数量。

[0211] 实施例2,源自外周血单核细胞(PBMC)的CD3(-)CD56(+)自然杀手细胞的培养

[0212] 将包含在NK细胞活化/扩张试剂盒(Cat#:130-112-968)(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)中的100 μ l的CD335(NKp46)-生物素及100 μ l的CD2-生物素置于1.5mL微管中并混合,然后加入500 μ l抗生物素MACSiBead粒子并混合。然后,加入300 μ l MACs缓冲液,及使用微管旋转器在2℃至8℃下混合2小时。考虑细胞数目,将每 1×10^6 细胞5 μ l的NK活化珠转移至新管中。加入1mL PBS并在300 $\times$ g下离心5分钟。移除上清液后,按照每 10^6 NK细胞5 μ l添加待使用的NK MACs培养基(Cat#:130-094-483)(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany),使珠松开,接着接种至在实施例1中分离的CD(3)-CD56(+)自然杀手细胞中。

[0213] 接着,将制得的CD3(-)CD56(+)自然杀手细胞悬浮在制备实施例1中所制得的含添加剂的培养基组合物中,使细胞总数为 2.5×10^5 ,并将其种在48孔盘中,接着于37℃、5%CO₂的条件下培养。然后,每2天测定细胞数,当细胞汇合占培养容器的80%以上(汇合度)时,依照48孔盘、24孔盘、12孔盘、6孔盘及25T培养瓶的顺序继代培养,最后在第21天收成所有的细胞。

[0214] 实施例3,细胞数的计数及细胞存活力的比较

[0215] 使用细胞计数器(ADAM-MC2)计数第5、9、11、13、15、17及21天的培养的自然杀手细胞的总细胞数及存活力。此时,当细胞达到80%汇合(其是继代培养的标准)时,计数以上这些天的细胞数,因为细胞的增殖速率随着处理的材料及培养基的种类而变。

[0216] 在制备实施例1中制得的培养基组合物的条件下培养的CD3-CD56+细胞的总细胞数及存活力的比较结果,示于表6至13中及图5A至12B中。

[0217] 结果确定,所有其中添加制备实施例1中制得的GI-101的培养基,具有自然杀手细胞的总数大于对照组(添加CD80-Fc+Fc-IL2v2或CD80-Fc+Fc-IL2WT),无论在四个基本培养基条件下的处理浓度如何(表1至4)(图5A、5B、7A、7B、9A、9B、11A及11B)。

[0218] 此外,即使是细胞存活力,当添加GI-101时,不管基本培养基及浓度如何,所有的培养基组合物表现出高存活力(图6A、6B、8A、8B、10A、10B、12A及12B)。

[0219] 根据结果确定,与对照组(添加CD80-Fc+Fc-IL2v2或CD80-Fc+Fc-IL2WT)相比,不管基本培养基及浓度如何,GI-101在改善自然杀手细胞的增殖能力及存活力上扮演重要角色。

[0220] [表6]

[0221]

总细胞数(X10 ⁵)										
培养 条件	浓度	处理材料	CD3-CD56+细胞							
			第 0 天 (接种)	第 5 天	第 9 天	第 11 天	第 13 天	第 15 天	第 17 天	第 21 天
表 1	50nM	GI-101	2.50	3.17	8.56	-	23.84	-	27.38	23.76
		GI-101WT	2.50	2.36	6.40	-	-	-	15.45	13.33
		CD80-Fc+Fc- IL2v2	2.50	2.62	6.61	-	16.16	-	21.93	13.19
		CD80-Fc+Fc- IL2WT	2.50	1.87	-	11.04	13.92	-	17.86	13.33
	1.6nM	GI-101	2.50	2.27	6.79	-	13.98	-	15.62	11.19
		GI-101WT	2.50	1.92	4.65	-	-	-	-	3.58
		CD80-Fc+Fc-	2.50	0.23	-	-	-	-	-	-
		IL2WT								

[0222]

		IL2v2								
		CD80-Fc+Fc- IL2WT	2.50	1.76	-	-	6.96	-	6.64	4.46

[0223] [表7]

[0224]

细胞存活力(%)										
培养 条件	浓度	处理材料	CD3-CD56+细胞							
			第 0 天 (接种)	第 5 天	第 9 天	第 11 天	第 13 天	第 15 天	第 17 天	第 21 天
表 1	50nM	GI-101	-	76.58	82.41	-	90.94	-	86.68	84.19
		GI-101WT	-	75.98	83.42	-	-	-	89.27	89.53
		CD80-Fc+Fc- IL2v2	-	78.18	81.73	-	90.57	-	88.76	89.64
		CD80-Fc+Fc- IL2WT	-	83.64	-	86.50	92.19	-	89.62	82.36
	1.6nM	GI-101	-	75.08	82.94	-	87.85	-	90.34	88.22
		GI-101WT	-	77.55	82.32	-	-	-	-	87.01
		CD80-Fc+Fc- IL2v2	-	49.77	-	-	-	-	-	-
		CD80-Fc+Fc- IL2WT	-	74.51	-	-	86.47	-	88.90	93.29

[0225] [表8]

总细胞数(X10 ⁵)										
培养条件	浓度	处理材料	CD3-CD56+细胞							
			第 0 天 (接种)	第 5 天	第 9 天	第 11 天	第 13 天	第 15 天	第 17 天	第 21 天
[0226] 表 2	50nM	GI-101	2.5	11.71	38.81	-	214.88	415.25	-	694.59
		GI-101WT	2.5	8.57	30.58	62.31	96.42	-	-	152.16
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2.5	8.12	-	-	90.54	122.27	-	153.14
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2.5	7.80	29.97	-	92.32	118.56	-	152.23
	1.6nM	GI-101	2.5	5.60	28.69	-	55.39	-	-	94.22
[0227]		GI-101WT	2.5	6.58	14.92	-	35.18	-	-	37.81
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2.5	6.02	19.85	-	56.26	-	-	75.83
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2.5	6.04	18.39	-	46.50	-	-	55.51

[0228] [表9]

[0229]

细胞存活力(%)										
培养条件	浓度	处理材料	CD3-CD56+细胞							
			第 0 天 (接种)	第 5 天	第 9 天	第 11 天	第 13 天	第 15 天	第 17 天	第 21 天
表 2	50nM	GI-101	-	93.31	95.64	-	96.47	96.58	-	93.21
		GI-101WT	-	94.38	95.45	96.06	94.96	-	-	92.14
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	-	93.32	-	-	97.01	95.96	-	91.73
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	91.51	96.49	-	96.19	95.23	-	91.81
	1.6nM	GI-101	-	91.81	93.75	-	95.14	-	-	85.22
		GI-101WT	-	93.56	93.56	-	94.81	-	-	88.63
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	-	93.57	94.00	-	94.36	-	-	89.53
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	90.87	94.04	-	95.01	-	-	87.36

[0230] [表10]

[0231]

总细胞数(X10 ⁵)										
培养条件	浓度	处理材料	CD3-CD56+细胞							
			第 0 天 (接种)	第 5 天	第 9 天	第 11 天	第 13 天	第 15 天	第 17 天	第 21 天
表 3	50nM	GI-101	2.50	6.07	24.64	-	46.13	61.25	-	99.60
		GI-101WT	2.50	6.98	24.90	-	49.75	64.15	-	67.71
		CD80-Fc+Fc-	2.50	4.11	-	21.60	-	-	-	56.02

[0232]

		IL2v2								
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2.50	5.73	23.52	-	51.17	66.32	-	76.19
	1.6nM	GI-101	2.50	6.47	25.14	-	54.13	69.59	-	86.68
		GI-101WT	2.50	3.34	-	-	-	-	-	10.91
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2.50	1.07	-	-	-	-	-	-
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2.50	4.61	13.16	-	16.27	-	-	13.16

[0233] [表11]

[0234]

细胞存活力(%)										
培养条件	浓度	处理材料	CD3-CD56+细胞							
			第 0 天 (接种)	第 5 天	第 9 天	第 11 天	第 13 天	第 15 天	第 17 天	第 21 天
表 3	50nM	GI-101	-	89.72	90.65	-	90.59	88.11	-	82.08
		GI-101WT	-	90.74	92.95	-	93.20	90.52	-	87.38
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	-	87.57	-	88.80	-	-	-	87.63
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	88.60	93.44	-	95.13	94.99	-	91.38
	1.6nM	GI-101	-	90.07	92.11	-	92.64	90.80	-	85.62
		GI-101WT	-	85.76	-	-	-	-	-	75.98
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	-	66.33	-	-	-	-	-	-
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	88.05	90.17	-	89.08	-	-	79.81

[0235] [表12]

[0236]

总细胞数(X10 ⁵)										
培养条件	浓度	处理材料	CD3-CD56+细胞							
			第 0 天 (接种)	第 5 天	第 9 天	第 11 天	第 13 天	第 15 天	第 17 天	第 21 天
表 4	50nM	GI-101	2.50	6.31	37.36	58.21	-	146.76	-	467.75

[0237]		GI-101WT	2.50	5.74	30.24	52.00	-	126.99	-	347.59
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2.50	6.96	31.20	51.52	-	130.65	-	285.63
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2.50	6.30	35.52	50.08	-	147.54	-	350.28
	1.6nM	GI-101	2.50	6.75	37.28	63.68	-	166.42	-	419.02
		GI-101WT	2.50	2.46	-	8.08	9.84	-	-	8.93
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2.50	0.73	-	-	-	-	-	-
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2.50	3.86	18.85	-	48.90	67.86	-	134.21

[0238] [表13]

细胞存活力(%)										
培养条件	浓度	处理材料	CD3-CD56+细胞							
			第 0 天	第 5 天	第 9 天	第 11 天	第 13 天	第 15 天	第 17 天	第 21 天
			(接种)							
[0239] 表 4	50nM	GI-101	-	94.72	96.93	97.24	-	96.20	-	96.04
		GI-101WT	-	94.90	96.79	96.11	-	63.11	-	64.73
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	-	95.33	97.83	96.70	-	95.73	-	96.43
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	95.99	97.86	97.52	-	97.09	-	96.39
	1.6nM	GI-101	-	94.75	97.72	96.89	-	94.67	-	95.00
		GI-101WT	-	89.00	-	88.06	-	-	-	88.22
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	-	75.94	-	-	-	-	-	-
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	91.40	96.61	-	-	96.49	-	95.99

[0240] II. 使用自然杀手细胞培养组合物的自然杀手细胞的特征

[0241] 实施例4, 自然杀手细胞的纯度的测量

[0242] 使从实施例2获得的CD3-CD56+自然杀手细胞分别于300×g下离心5分钟, 除去上清液, 加入1ml FACS缓冲液使沉淀物松开。然后, 于PBS中添加3% (v/v) FBS、10mM EDTA、20mM HEPES、10μg/ml多黏菌素B、100U/ml盘尼西林、100μg/ml链霉素及1mM丙酮酸钠, 配制FACS缓冲液, 然后添加1ml配制的FACS缓冲液以重新悬浮该细胞沉淀物。接着, 用FACS缓冲

液稀释至用细胞计数器计数得 2×10^6 细胞/ml。

[0243] 将100 μ l稀释的细胞溶液加至各个5ml的FACS管中,进一步于其中加入100 μ l FACS缓冲液,接着用PerCP标志的抗人CD3抗体(PerCP人抗CD3(克隆UCHT1))及PE/cy7标志的抗人CD56抗体(PE/cy7人抗CD56(克隆B159))处理。然后,在4℃下培育20分钟后,加入200 μ l FACS缓冲液及在1,500rpm下离心3分钟。去除上清液,加入200 μ l FACS使悬浮,然后使用流式细胞仪(CYTEK®Aurora,Cytex,Fremont,CA,USA)判定细胞表型。

[0244] 实验中使用的抗体的信息示于表14中。此外,测量在制备实施例1中制得的培养基组合物的条件下培养21天的CD3-CD56+自然杀手细胞的纯度,并示于图13至16中。

[0245] [表14]

	标靶	颜色	克隆	制造商	Cat#
[0246] NK 标记	CD3	PerCP	UCHT1	BioLegend	300428
	CD56	APC/cy7	5.1H11	BioLegend	362512

[0247] 实施例5,自然杀手细胞的活化性及抑制性标记的鉴定

[0248] 使从实施例2获得的CD3-CD56+自然杀手细胞分别于 $300 \times g$ 条件下离心5分钟,去除上清液,加入1ml FACS缓冲液使沉淀物松开。

[0249] 于PBS中添加3% (v/v) FBS、10mM EDTA、20mM HEPES、10 μ g/ml多黏菌素B、100U/ml盘尼西林、100 μ g/ml链霉素及1mM丙酮酸钠,制备FACS缓冲液,然后加入1ml制得的FACS缓冲液使细胞沉淀物再悬浮。然后,用FACS缓冲液稀释至使用细胞计数器计数得 2×10^6 细胞/ml。将100 μ l稀释的细胞溶液加至各个5ml的FACS管中,使用流式细胞仪,使用Pe-CF594标志的抗人CD16抗体(PE-CF594人抗CD16(克隆3G8))、APC标志的抗人DNAM1抗体(APC人抗DNAM1(克隆11A8))、BV605标志的抗人NKG2C抗体(BV605人抗NKG2C(克隆134591))、BV650标志的抗人NKG2D抗体(BV650人抗NKG2D(克隆1D11))、BB515标志的抗人NKp46抗体(BB515人抗NKp46(克隆9E2))、BV480标志的抗人NKp30抗体(BV480人抗NKp30(克隆p30-15))、PE标志的抗人PD-1抗体(PE人抗PD-1(克隆EH12.2H7))及APC标志的抗人NKG2A抗体(APC抗人NKG2A(克隆131411))确定。然后,在4℃下培育20分钟后,加入100 μ l FACS缓冲液并于1,500rpm下离心3分钟。

[0250] 去除上清液,加入200 μ l FACS缓冲液使悬浮,然后使用流式细胞仪(CYTEK®Aurora,Cytex,Fremont,CA,USA)判定细胞表型。实验中使用的抗体的信息示于表15中。鉴定在制备实施例1中制得的培养基组合物的条件下培养21天的CD3-CD56+自然杀手细胞的活化性及抑制性标记,并示于图17至24中。

[0251] [表15]

[0252]

	标靶	颜色	克隆	制造商	Cat#
活化性标记	CD16	PE-CF594	3G8	BD	562293
	DNAM1	APC	11A8	BioLegend	338312
	NKp46	BB515	9E2	BD	564536
	NKp30	BV480	p30-15	BD	746491
抑制性标记	PD-1	PE	EH12.2H7	BioLegend	329906
	NKG2A	APC	131411	R&D systems	FAB1059A-100

[0253] 实施例6,自然杀手细胞的颗粒酶B、穿透细胞膜蛋白质、干扰素 γ 分泌能力的测定

[0254] 为了测定从实施例2获得的CD3-CD56+自然杀手细胞的颗粒酶及穿透细胞膜蛋白质分泌能力,利用胞内染色测量自然杀手细胞内颗粒酶B、穿透细胞膜蛋白质及干扰素 γ 的表达。使培养的自然杀手细胞在300×g条件下离心5分钟,去除上清液。然后,用各个培养组合物将其稀释至使用细胞计数器计数得 2×10^6 细胞/ml。

[0255] 于96孔盘的各孔中分配200 μ l的制得的细胞,然后加入1% (v/v) 刺激性鸡尾酒溶液(1X) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 并于37℃、CO₂条件下培育4小时。然后,使该盘在300×g条件下离心5分钟,去除上清液。接着,于PBS中添加3% (v/v) FBS、10mM EDTA、20mM HEPES、10 μ g/ml多黏菌素B、100U/ml盘尼西林、100 μ g/ml链霉素及1mM丙酮酸钠,制备FACS缓冲液,然后加入100 μ l制得的FACS缓冲液使细胞沉淀物悬浮。去除上清液,加入100 μ l BD CYTOFIX/CYTOPERM™缓冲液(通透/固定缓冲液,BD science)进行固定及通透,然后悬浮,接着在4℃下培育30分钟。进一步添加100 μ l FACS缓冲液,然后在1,500rpm下离心3分钟。

[0256] 用PE/cy7标志的抗人颗粒酶B抗体(PE/cy7抗人颗粒酶B(克隆NGZB))、APC标志的抗人穿透细胞膜蛋白质抗体(APC抗人穿透细胞膜蛋白质(克隆B-D48))及BV421标志的抗人干扰素 γ 抗体(BV421抗人IFN- γ (克隆B27))处理。然后,在4℃下培育20分钟后,加入100 μ l FACS缓冲液并于1,500rpm下离心3分钟。去除上清液后,加入200 μ l FACS缓冲液(固定缓冲液)使悬浮,使用流式细胞仪测定细胞的表达。

[0257] 实验中使用的抗体的信息示于表16中。鉴定在制备实施例1制得的培养基组合物的条件下培养21天的CD3-CD56+自然杀手细胞的标记,并示于图25至28中。

[0258] [表16]

[0259]

	标靶	颜色	克隆	制造商	Cat#
细胞毒性	穿透细胞膜蛋白质	APC	B-D48	BioLegend	353312
	IFN- γ	BV421	B27	BioLegend	506538
	颗粒酶(GB11)	PE/cy7	NGZB	ebioscience	25-8898-82

[0260] III. 根据培养组合物的自然杀手细胞的癌细胞杀伤能力的分析

[0261] 实施例8,自然杀手细胞抗癌细胞的去颗粒能力及杀伤作用的确定

[0262] 具体地,将K562癌细胞株(American Type Culture Collection,ATCC)于PBS中稀释至以下表17所示的细胞数,并分配于各孔中。

[0263] [表17]

[0264]	E:T	1:1	1:5	1:10
	(E) NK细胞	2.5×10^5 细胞	1×10^5 细胞	1×10^5 细胞
	(T) K562	2.5×10^5 细胞	5×10^5 细胞	1×10^6 细胞

[0265] 具体地,用各培养组合物将K562癌细胞株稀释至 1×10^7 细胞/ml,然后针对各孔根据上表具体指出的细胞数分配。然后,亦用各培养组合物将自然杀手细胞稀释至 5×10^6 细胞/ml,然后针对各孔根据上表具体指出的细胞数分配,在 $30 \times g$ 条件下离心3分钟。接着,在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养4小时后,用BV421标志的抗人CD3抗体(BV421人抗CD3(克隆UCHT1))、PE标志的抗人CD16抗体(PE人抗CD16(克隆3G8))、PE/cy7标志的抗人CD56抗体(PE/cy7人抗CD56(克隆B159))及FITC标志的抗人CD107a抗体(FITC抗人CD107a抗体(克隆H4A3))处理,并在冰上培育20分钟。

[0266] 然后,添加100 μL FACS缓冲液,于1,300rpm、 4°C 条件下离心5分钟。去除上清液后,用7-AAD存活力染色溶液处理,避光室温下反应15分钟。然后,加入100 μL FACS缓冲液,在1,300rpm、 4°C 条件下离心5分钟。再次加入200 μL FACS缓冲液,在1,300rpm、 4°C 条件下离心5分钟。再重复一次以上方法后,去除上清液,加入400 μL FACS缓冲液,接着使用流式细胞仪(CYTEL®Aurora,Cytek,Fremont,CA,USA)分析。

[0267] 在表1至4的基本培养基中分别添加50nM表5的添加剂的组合物中培养21天的自然杀手细胞的去颗粒能力及杀伤作用,示于图29至34中。

序列表

<110> 吉爱希公司

<120> 用于培养自然杀手细胞的组合物及使用其来生产自然杀手细胞的方法

<130> PF-B2646

<140> PCT/KR2020/016376

<141> 2020-11-19

<150> 10-2019-0149779

<151> 2019-11-20

<150> 10-2020-0015802

<151> 2020-02-10

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 信号肽 (TPA)

<400> 1

Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala

20 25

<210> 2

<211> 208

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hB7-1:35-242

<400> 2

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp

20 25 30

Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn

35 40 45

Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn

50 55 60

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

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 带有接头的铰链

<400> 3

Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Ala	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro		
			20					25					30		

<210> 4

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫球蛋白fc

<400> 4

Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
1				5					10					15	
Pro	Lys	Asp	Gln	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val

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

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> linker

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 6

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hIL-2M

<400> 6

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	Ala	Met	Leu	Thr	Ala	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> 7

<211> 617

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含IL-2变体和CD80片段的融合蛋白

<400> 7

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

Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr		
100	105	110
Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser		
115	120	125
Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro		
130	135	140
Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro		
145	150	155
Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile		
165	170	175
Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser		
180	185	190
Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu		
195	200	205
Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr		
210	215	220
Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
225	230	235
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly		
245	250	255
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser		
260	265	270
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg		
275	280	285
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro		
290	295	300
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
305	310	315
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
325	330	335
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
340	345	350
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
355	360	365
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
370	375	380
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
385	390	395
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		

405	410	415
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
420	425	430
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
435	440	445
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala		
450	455	460
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly		
465	470	475
Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu		
485	490	495
Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile		
500	505	510
Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe		
515	520	525
Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu		
530	535	540
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys		
545	550	555
Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile		
565	570	575
Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala		
580	585	590
Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe		
595	600	605
Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr		
610	615	

<210> 8

<211> 1857

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码融合蛋白 (GI101) 的核苷酸

<400> 8

```

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60
tctccttctc acgtgtgat ccacgtgacc aaagaagta aagaggtcgc cacactgtcc 120
tgcggccaca acgtttcagt ggaagaactg gcccagacca ggatctactg gcagaaagaa 180
aagaaaatgg tgctgaccat gatgtccggc gacatgaaca tctggcctga gtacaagaac 240
cggaccatct tcgacatcac caacaacctg tccatcgtga ttctggccct gaggccttct 300

```

gatgagggca cctatgagtg cgtgggtgctg aagtacgaga aggacgcctt caagcgcgag 360
 cacctggctg aagtgacact gtccgtgaag gccgactttc ccacaccttc catctccgac 420
 ttcgagatcc ctacctcaa catccggcgg atcatctgtt ctacctctgg cggctttcct 480
 gagcctcacc tgtcttggct ggaaaacggc gaggaactga acgccatcaa caccaccgtg 540
 tctcaggacc ccgaaaccga gctgtacgct gtgtcctcca agctggactt caacatgacc 600
 accaaccaca gcttcatgtg cctgattaag tacggccacc tgagagtga ccagaccttc 660
 aactggaaca ccaccaagca agagcacttc cctgacaatg gatctggcgg cggaggttct 720
 ggcggaggtg gaagcggagg cggaggatct gctgagtcta agtatggccc tccttgtcct 780
 ccatgtcctg ctccagaagc tgctggcggc ccctctgtgt tcctgtttcc tccaaagcct 840
 aaggaccagc tcatgatctc tcggacacc gaagtacct gcgtgggtgg ggatgtgtct 900
 caagaggacc ctgaggtgca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 960
 aagaccaagc ctagagagga acagttcaac tccacctaca gagtgggtgc cgtgctgacc 1020
 gtgctgcacc aggattggct gaacggcaaa gagtacaagt gcaaggtgtc caacaagggc 1080
 ctgccttcca gcatcgaaaa gaccatctcc aaggctaagg gccagcctag ggaacccag 1140
 gtttacacc tgctccaag ccaagaggaa atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc 1200
 ctgggtcaagg gcttctaccc ttccgacatt gccgtggaat gggagtccaa tggccagcct 1260
 gagaacaact acaagaccac acctcctgtg ctggactccg acggctcctt ctttctgtac 1320
 tctcgctga ccgtggacaa gtctagatgg caagagggca acgtgttctc ctgctctgtg 1380
 ctgcacgagg ccctgcacaa tcactacacc cagaagtccc tgtctctgtc tcttgaggt 1440
 ggtggcgggt ctgcccctac cagctcctct accaagaaaa cccagctcca gttggagcat 1500
 ctgctgctgg acctccagat gattctgaac gggatcaaca actataagaa cccaagctg 1560
 accgccatgc tgaccgctaa gttctacatg cccaagaagg ccaccgagct gaagcacctc 1620
 cagtgcctgg aagaagaact gaagcccctg gaagaggtgc tgaatctggc ccagtccaag 1680
 aacttccacc tgaggccacg ggacctgatc agcaacatca acgtgatcgt gctggaactg 1740
 aagggctccg agacaacctt tatgtgcgag tacgccgacg agacagccac catcgtggaa 1800
 tttctgaacc ggtggatcac cttctgccag agcatcatct ccacactgac ctgatga 1857

<210> 9

<211> 592

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白 (GI101)

<400> 9

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp

20 25 30

Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn

35 40 45

Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn		
50	55	60
Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr		
65	70	75 80
Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His		
85	90	95
Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser		
100	105	110
Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys		
115	120	125
Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn		
130	135	140
Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu		
145	150	155 160
Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr		
165	170	175
Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn		
180	185	190
Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn		
195	200	205
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
210	215	220
Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
225	230	235 240
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
245	250	255
Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
260	265	270
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
275	280	285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe		
290	295	300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
305	310	315 320
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu		
325	330	335
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
340	345	350
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys		

355	360	365
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
370	375	380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
385	390	395
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
405	410	415
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser		
420	425	430
Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
435	440	445
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser		
450	455	460
Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu		
465	470	475
Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr		
485	490	495
Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu		
500	505	510
Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val		
515	520	525
Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu		
530	535	540
Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr		
545	550	555
Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe		
565	570	575
Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr		
580	585	590
<210> 10		
<211> 133		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> hIL-2		
<400> 10		
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
1	5	10
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> 11																			
<211> 288																			
<212> PRT																			
<213> 人工序列																			
<220>																			
<223> CD80																			
<400> 11																			
Met	Gly	His	Thr	Arg	Arg	Gln	Gly	Thr	Ser	Pro	Ser	Lys	Cys	Pro	Tyr				
1			5			10			15										
Leu	Asn	Phe	Phe	Gln	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Gly	Leu	Ser	His	Phe	Cys				
20								25				30							
Ser	Gly	Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu				
35						40						45							
Ser	Cys	Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile				
50						55						60							
Tyr	Trp	Gln	Lys	Glu	Lys	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp				
65					70					75					80				
Met	Asn	Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr				
85								90				95							
Asn	Asn	Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly				
100						105						110							
Thr	Tyr	Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg				
115						120						125							
Glu	His	Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr				

130	135	140
Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile		
145	150	155
Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu		
165	170	175
Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp		
180	185	190
Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met		
195	200	205
Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg		
210	215	220
Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro		
225	230	235
Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly		
245	250	255
Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg		
260	265	270
Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val		
275	280	285
<210> 12		
<211> 215		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 改性的Fc		
<400> 12		
Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
1	5	10
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
20	25	30
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
35	40	45
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe		
50	55	60
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
65	70	75
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu		
85	90	95
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		

100	105	110
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys	
115	120	125
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
130	135	140
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	
145	150	155
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser	
165	170	175
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser	
180	185	190
Cys Ser Val Met His Glu Ala	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	
195	200	205
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
210	215	
<210> 13		
<211> 306		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> mCD80		
<400> 13		
Met Ala Cys Asn Cys Gln Leu	Met Gln Asp Thr Pro Leu Leu Lys Phe	
1	5	10
Pro Cys Pro Arg Leu Ile Leu	Leu Phe Val Leu Leu Ile Arg Leu Ser	
20	25	30
Gln Val Ser Ser Asp Val Asp	Glu Gln Leu Ser Lys Ser Val Lys Asp	
35	40	45
Lys Val Leu Leu Pro Cys Arg	Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser	
50	55	60
Glu Asp Arg Ile Tyr Trp Gln	Lys His Asp Lys Val Val Leu Ser Val	
65	70	75
Ile Ala Gly Lys Leu Lys Val	Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu	
85	90	95
Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser	Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser	
100	105	110
Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys	Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr	
115	120	125
Tyr Glu Val Lys His Leu Ala	Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp	

130	135	140
Phe Ser Thr Pro Asn Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr		
145	150	155
Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe		
165	170	175
Ser Trp Leu Glu Asn Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile		
180	185	190
Ser Gln Asp Pro Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp		
195	200	205
Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly		
210	215	220
Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp		
225	230	235
Pro Pro Asp Ser Lys Asn Thr Leu Val Leu Phe Gly Ala Gly Phe Gly		
245	250	255
Ala Val Ile Thr Val Val Val Ile Val Val Ile Ile Lys Cys Phe Cys		
260	265	270
Lys His Arg Ser Cys Phe Arg Arg Asn Glu Ala Ser Arg Glu Thr Asn		
275	280	285
Asn Ser Leu Thr Phe Gly Pro Glu Glu Ala Leu Ala Glu Gln Thr Val		
290	295	300

Phe Leu

305

<210> 14

<211> 1848

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码融合蛋白 (mGI101) 的核苷酸

<400> 14

```

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60
tctccttctc acgctgtgga cgagcagctc tccaagtccg tgaaggataa ggtcctgctg 120
ccttgccggt acaactctcc tcacgaggac gagtctgagg accgatcta ctggcagaaa 180
cacgacaagg tgggtgctgc cgtgatcgcc ggaaagctga aagtgtggcc tgagtacaag 240
aacaggaccc tgtacgacaa caccacctac agcctgatca tcctgggcct cgtgctgagc 300
gatagaggca cctattcttg cgtgggtgcag aagaaagagc ggggcaccta cgaagtgaag 360
cacctggctc tgggtcaagct gtccatcaag gccgacttca gcaccctaa catcaccgag 420
tctggcaacc cttccgccga caccaagaga atcacctgtt tcgcctctgg cggcttcctt 480
aagcctcggg tctcttggct ggaaaacggc agagagctgc ccgcatcaa taccaccatt 540

```

tctcaggacc cagagtccga gctgtacacc atctccagcc agctcgactt taacaccacc 600
 agaaaccaca ccatcaagtg cctgattaag tacggcgacg cccacgtgtc cgaggacttt 660
 acttgggaga aacctcctga ggaccctcct gactctggat ctggcggcgg aggttctggc 720
 ggaggtggaa gcgaggcgagg aggatctgct gagtctaagt atggccctcc ttgtcctcca 780
 tgtcctgctc cagaagctgc tggcggaccc tctgtgttcc tgtttcctcc aaagcctaag 840
 gaccagctca tgatctctcg gacccttgaa gtgacctgcg tgggtggtgga tgtgtctcaa 900
 gaggaccctg aggtgcagtt caattggtac gtggacggcg tggaaagtga caacgccaag 960
 accaagccta gagaggaaca gttcaactcc acctatagag tgggtgtccgt gctgaccgtg 1020
 ctgcaccagg attggctgaa cggcaaagag tacaagtga aggtgtccaa caagggcctg 1080
 ccttccagca tcgaaaagac catcagcaag gctaagggcc agcctaggga accccaggtt 1140
 tacaccctgc ctccaagcca agaggaaatg accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg 1200
 gtcaagggtt tctacccttc cgacattgcc gtggaatggg agtccaatgg ccagcctgag 1260
 aacaactaca agaccacacc tcctgtgctg gactccgacg gctccttctt tctgtactct 1320
 cgctgaccg tggacaagtc taggtggcaa gagggcaacg tgttctctctg ctctgtgctg 1380
 cagagggctc tgcacaacca ctacaccag aagtcctgt ctctgtctct tggaggtggt 1440
 ggcggttctg cccctacctc cagctctacc aagaaaacc agctccagtt ggagcatctg 1500
 ctgctggacc tccagatgat cctgaatggc atcaacaatt acaagaacc caagctgacc 1560
 gccatgctga ccgctaagtt ctacatgccc aagaaggcca ccgagctgaa gcatttgcag 1620
 tgcttggaa aggaactgaa gcccctggaa gaagtgtga atctggcca gtccaagaac 1680
 ttccacctga ggcctaggga cctgatctcc aacatcaacg tgatcgtgct ggaactgaaa 1740
 ggctccgaga caaccttcat gtgcgagtac gccgacgaga cagccaccat cgtggaattt 1800
 ctgaaccggt ggatcacctt ctgccagagc atcatctcca cactgacc 1848

<210> 15

<211> 616

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白 (mGI101)

<400> 15

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

Asn Arg Thr Leu Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly		
85	90	95
Leu Val Leu Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys		
100	105	110
Glu Arg Gly Thr Tyr Glu Val Lys His Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser		
115	120	125
Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro		
130	135	140
Ser Ala Asp Thr Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro		
145	150	155
Lys Pro Arg Phe Ser Trp Leu Glu Asn Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile		
165	170	175
Asn Thr Thr Ile Ser Gln Asp Pro Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser		
180	185	190
Ser Gln Leu Asp Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu		
195	200	205
Ile Lys Tyr Gly Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys		
210	215	220
Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
225	230	235
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro		
245	250	255
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val		
260	265	270
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr		
275	280	285
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu		
290	295	300
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
305	310	315
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
325	330	335
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
340	345	350
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
355	360	365
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
370	375	380
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		

385	390	395	400
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			
	405	410	415
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser			
	420	425	430
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
	435	440	445
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu			
	450	455	460
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly			
465	470	475	480
Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln			
	485	490	495
Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn			
	500	505	510
Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr			
	515	520	525
Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu			
	530	535	540
Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn			
545	550	555	560
Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val			
	565	570	575
Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp			
	580	585	590
Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys			
	595	600	605
Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr			
610	615		

<210> 16

<211> 1437

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码融合蛋白 (GI101C1) 的核苷酸

<400> 16

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60
tctccttctc acgctgtgat ccacgtgacc aaagaagtga aagaggtcgc cacactgtcc 120
tgcggccaca acgtttcagt ggaagaactg gccagacca ggatctactg gcagaaagaa 180

aagaaaatgg tgctgacat gatgtccggc gacatgaaca tctggcctga gtacaagaac 240
cggaccatct tcgacatcac caacaacctg tccatcgatga ttctggccct gaggccttct 300
gatgagggca cctatgagtg cgtgggtgctg aagtacgaga aggacgcctt caagcgcgag 360
cacctggctg aagtgcact gtccgtgaag gccgactttc ccacaccttc catctccgac 420
ttcgagatcc ctacctcaa catccggcgg atcatctgtt ctacctctgg cggcttttct 480
gagcctcacc tgtcttggct ggaaaacggc gaggaactga acgcatcaa caccaccgtg 540
tctcaggacc ccgaaaccga gctgtacgct gtgtcctcca agctggactt caacatgacc 600
accaaccaca gcttcatgtg cctgattaag tacggccacc tgagagtga ccagaccttc 660
aactggaaca ccaccaagca agagcacttc cctgacaatg gatctggcgg cggaggttct 720
ggcggaggtg gaagcggagg cggaggatct gctgagtcta agtatggccc tccttgtcct 780
ccatgtcctg ctccagaagc tgttggcgga ccctctgtgt tcctgtttcc tccaaagcct 840
aaggaccagc tcatgatctc tcggacaccc gaagtgcct gcgtgggtgt ggatgtgtct 900
caagaggacc ctgaggtgca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 960
aagaccaagc ctagagagga acagttcaac tccacctaca gagtgggtgt cgtgctgacc 1020
gtgctgcacc aggattggct gaacggcaaa gactacaagt gcaaggtgtc caacaagggc 1080
ctgccttcca gcatcgaaaa gaccatctcc aaggctaagg gccagcctag ggaacccag 1140
gtttacaccc tgctccaag ccaagaggaa atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc 1200
ctgggtcaagg gcttctaccc ttccgacatt gccgtggaat gggagtccaa tggccagcct 1260
gagaacaact acaagaccac acctcctgtg ctggactccg acggtcctt ctttctgtac 1320
tctcgctga ccgtggacaa gtctaggtgg caagagggca acgtgttctc ctgctctgtg 1380
ctgcacgagg ccctgcacaa tcactacacc cagaagtccc tgtctctgtc cctgggc 1437

<210> 17

<211> 454

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白 (GI101C1)

<400> 17

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

				85					90					95			
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser		
				100					105					110			
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys		
				115					120					125			
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn		
				130					135					140			
Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu		
145					150					155					160		
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr		
				165					170					175			
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn		
				180					185					190			
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn		
				195					200					205			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
				210					215					220			
Ser	Ala	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro		
225					230					235					240		
Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys		
				245					250					255			
Asp	Gln	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val		
				260					265					270			
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp		
				275					280					285			
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe		
				290					295					300			
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
305					310					315					320		
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu		
				325					330					335			
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg		
				340					345					350			
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys		
				355					360					365			
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp		
				370					375					380			
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys		
385					390					395					400		

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 450

<210> 18

<211> 1176

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码融合蛋白 (GI101C2) 的核苷酸

<400> 18

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60
 tctccatctc acgccgctga gtctaagtac ggccctcctt gtccctccatg tcctgctcca 120
 gaagctgctg gcggaccctc tgtgttcctg tttcctccaa agcctaagga ccagctcatg 180
 atctctcgga cccctgaagt gacctgcgtg gtggtggatg tgtctcaaga ggaccctgag 240
 gtgcagttca attggtacgt ggacggcgtg gaagtgcaca acgccaagac caagcctaga 300
 gaggaacagt tcaactccac ctacagagtg gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggat 360
 tggctgaacg gcaaagagta caagtgcaag gtgtccaaca agggcctgcc ttccagcatc 420
 gaaaagacca tctccaaggc taagggccag ctagggaac cccaggttta caccctgcct 480
 ccaagccaag aggaaatgac caagaaccag gtgtccctga cctgcctggg caagggttc 540
 tacccttccg acattgccgt ggaatgggag tccaatggcc agcctgagaa caactacaag 600
 accacacctc ctgtgctgga ctccgacggc tccttctttc tgtactctcg cctgaccgtg 660
 gacaagtcta ggtggcaaga gggcaacgtg ttctcctgct ctgtgctgca cgaggccctg 720
 cacaatcact acaccagaa gtccctgtct ctgtctcttg gcggaggcgg aggatctgct 780
 cctacctcca gctccacca gaaaaccag ctccagttgg agcatctgct gctggacctc 840
 cagatgatcc tgaatggcat caacaattac aagaaccca agctgaccgc catgctgacc 900
 gctaagttct acatgccccaa gaaggccacc gagctgaagc acctccagt cctggaagag 960
 gaactgaagc ccctggaaga agtgcctgaat ctggcccagt ccaagaactt ccacctgagg 1020
 cctagggacc tgatctccaa catcaacgtg atcgtgctgg aactgaaagg ctccgagaca 1080
 accttcatgt gcgagtacgc cgacgagaca gccaccatcg tggaatttct gaaccggtgg 1140
 atcaccttct gccagtccat catctccaca ctgacc 1176

<210> 19

<211> 367

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白 (GI101C2)

<400> 19

Ala	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
1				5				10					15		
Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
			20					25					30		
Gln	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
		35					40					45			
Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
	50					55					60				
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
65				70						75				80	
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
			85					90						95	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
		100						105					110		
Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	115						120					125			
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
	130					135					140				
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
145				150						155				160	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
			165					170					175		
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg
		180						185					190		
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
	195					200						205			
Ser	Val	Leu	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
	210					215					220				
Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser
225				230						235				240	
Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln
			245					250					255		
Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Ala
		260						265					270		
Met	Leu	Thr	Ala	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys
	275						280						285		

His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu		
290	295	300
Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile		
305	310	315 320
Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr		
	325	330 335
Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu		
	340	345 350
Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr		
	355	360 365

<210> 20

<211> 1434

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码融合蛋白 (mGI101C1) 的核苷酸

<400> 20

```

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60
tctccttctc acgctgtgga cgagcagctc tccaagtccg tgaaggataa ggtcctgctg 120
ccttgccggt acaactctcc tcacgaggac gagtctgagg accgatcta ctggcagaaa 180
cacgacaagg tgggtgctgtc cgtgatcgcc ggaaagctga aagtgtggcc tgagtacaag 240
aacaggaccc tgtacgacaa caccacctac agcctgatca tcctgggcct cgtgctgagc 300
gatagaggca cctattcttg cgtggtgcag aagaaagagc ggggcaccta cgaagtgaag 360
cacctggctc tgggtcaagct gtccatcaag gccgacttca gcaccctaa catcaccgag 420
tctggcaacc ctccgccga caccaagaga atcacctgtt tcgcctctgg cggcttcctt 480
aagcctcggg tctcttggct ggaaaacggc agagagctgc ccggcatcaa taccaccatt 540
tctcaggacc cagagtccga gctgtacacc atctccagcc agctcgactt taacaccacc 600
agaaaccaca ccatcaagtg cctgattaag tacggcgacg cccacgtgtc cgaggacttt 660
acttgggaga aacctcctga ggacctcct gactctggat ctggcggcgg aggttctggc 720
ggaggtggaa gcggaggcgg aggatctgct gagtctaagt atggccctcc ttgtcctcca 780
tgtcctgctc cagaagctgc tggcggaccc tctgtgttcc tgtttcctcc aaagcctaag 840
gaccagctca tgatctctcg gaccctgaa gtgacctgcg tgggtggtgga tgtgtctcaa 900
gaggaccctg aggtgcagtt caattggtac gtggacggcg tggaagtgca caacgccaag 960
accaagccta gagaggaaca gttcaactcc acctatagag tgggtgtccg gctgaccgtg 1020
ctgcaccagg attggctgaa cggcaaagag tacaagtgca aggtgtccaa caagggcctg 1080
ccttcagca tcgaaaagac catcagcaag gctaagggcc agcctaggga accccaggtt 1140
tacaccctgc ctccaagcca agaggaaatg accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg 1200
gtcaagggct tctacccttc cgacattgcc gtggaatggg agtccaatgg ccagcctgag 1260
aacaactaca agaccacacc tcctgtgctg gactccgacg gctccttctt tctgtactct 1320

```

cgcctgaccg tggacaagtc taggtggcaa gagggcaacg tgttctcctg ctctgtgctg 1380
 cacgaggctc tgcacaacca ctacaccag aagtcctgt ctctgtccct gggc 1434
 <210> 21
 <211> 478
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 融合蛋白 (mGI101C1)
 <400> 21
 Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys
 20 25 30
 Ser Val Lys Asp Lys Val Leu Leu Pro Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His
 35 40 45
 Glu Asp Glu Ser Glu Asp Arg Ile Tyr Trp Gln Lys His Asp Lys Val
 50 55 60
 Val Leu Ser Val Ile Ala Gly Lys Leu Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys
 65 70 75 80
 Asn Arg Thr Leu Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly
 85 90 95
 Leu Val Leu Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys
 100 105 110
 Glu Arg Gly Thr Tyr Glu Val Lys His Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser
 115 120 125
 Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro
 130 135 140
 Ser Ala Asp Thr Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro
 145 150 155 160
 Lys Pro Arg Phe Ser Trp Leu Glu Asn Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile
 165 170 175
 Asn Thr Thr Ile Ser Gln Asp Pro Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser
 180 185 190
 Ser Gln Leu Asp Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu
 195 200 205
 Ile Lys Tyr Gly Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys
 210 215 220
 Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro			
	245	250	255
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val			
	260	265	270
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr			
	275	280	285
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu			
	290	295	300
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
305	310	315	320
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
	325	330	335
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
	340	345	350
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile			
	355	360	365
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro			
	370	375	380
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu			
385	390	395	400
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			
	405	410	415
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser			
	420	425	430
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
	435	440	445
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu			
	450	455	460
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly			
465	470	475	
<210> 22			
<211> 133			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> IL-2的变体 (3M, M45)			
<400> 22			
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 Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala 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> 23

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IL-2的变体 (3M, M61)

<400> 23

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 Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Arg 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> 24

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IL-2的变体 (3M, M72)

<400> 24

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 Ala Met Leu Thr Ala 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 Gly 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> 25

<211> 1851

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码融合蛋白 (GI102-M45) 的核苷酸

<400> 25

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60

tctccttctc acgtgtgat ccacgtgacc aaagaagtga aagaggtcgc cacactgtcc 120

tgcggccaca acgtttcagt ggaagaactg gcccagacca ggatctactg gcagaaagaa 180

aagaaaatgg tgctgaccat gatgtccggc gacatgaaca tctggcctga gtacaagaac 240

cggaccatct tcgacatcac caacaacctg tccatcgtga ttctggccct gaggccttct 300

gatgagggca cctatgagtg cgtggtgctg aagtacgaga aggacgcctt caagcgcgag 360
 cacctggctg aagtgacact gtccgtgaag gccgactttc ccacaccttc catctccgac 420
 ttcgagatcc ctacctcaa catccggcgg atcatctgtt ctacctctgg cggctttcct 480
 gagcctcacc tgtcttggct ggaaaacggc gaggaactga acgccatcaa caccaccgtg 540
 tctcaggacc ccgaaaccga gctgtacgct gtgtcctcca agctggactt caacatgacc 600
 accaaccaca gcttcatgtg cctgattaag tacggccacc tgagagtga ccagaccttc 660
 aactggaaca ccaccaagca agagcacttc cctgacaatg gatctggcgg cggaggttct 720
 ggcggaggtg gaagcggagg cggaggatct gctgagtcta agtatggccc tccttgtcct 780
 ccatgtcctg ctccagaagc tgctggcggc ccctctgtgt tcctgtttcc tccaaagcct 840
 aaggaccagc tcatgatctc tcggacacc gaagtacct gcgtgggtgt ggatgtgtct 900
 caagaggacc ctgaggtgca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 960
 aagaccaagc ctagagagga acagttcaac tccacctaca gagtgggtgc cgtgctgacc 1020
 gtgctgcacc aggattggct gaacggcaaa gactacaagt gcaaggtgtc caacaagggc 1080
 ctgccttcca gcatcgaaaa gaccatctcc aaggctaagg gccagcctag ggaacccag 1140
 gtttacacc tgctccaag ccaagaggaa atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc 1200
 ctgggtcaagg gcttctaccc ttccgacatt gccgtggaat gggagtccaa tggccagcct 1260
 gagaacaact acaagaccac acctcctgtg ctggactccg acggctcctt ctttctgtac 1320
 tctcgctga ccgtggacaa gtctagatgg caagagggca acgtgttctc ctgctctgtg 1380
 ctgcacgagg ccctgcacaa tcactacacc cagaagtccc tgtctctgtc tcttgaggt 1440
 ggtggcgggt ctgcccctac cagctcctct accaagaaaa cccagctcca gttggagcat 1500
 ctgctgctgg acctccagat gattctgaac gggatcaaca actataagaa cccaagctg 1560
 accgccatgc tgaccgctaa gttcgccatg cccaagaagg ccaccgagct gaagcacctc 1620
 cagtgcctgg aagaagaact gaagcccctg gaagaggtgc tgaatctggc ccagtccaag 1680
 aacttccacc tgaggccacg ggacctgatc agcaacatca acgtgatcgt gctggaactg 1740
 aagggctccg agacaacctt tatgtgcgag tacgccgacg agacagccac catcgtggaa 1800
 tttctgaacc ggtggatcac cttctgccag agcatcatct ccacactgac c 1851

<210> 26

<211> 592

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白 (GI102-M45)

<400> 26

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp

20 25 30

Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn

35 40 45

Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn		
50	55	60
Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr		
65	70	75 80
Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His		
	85	90 95
Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser		
	100	105 110
Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys		
	115	120 125
Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn		
	130	135 140
Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu		
145	150	155 160
Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr		
	165	170 175
Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn		
	180	185 190
Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn		
	195	200 205
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
210	215	220
Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
225	230	235 240
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
	245	250 255
Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
	260	265 270
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
	275	280 285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe		
290	295	300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
305	310	315 320
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu		
	325	330 335
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
	340	345 350
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys		

355	360	365
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
370	375	380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
385	390	395
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
405	410	415
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser		
420	425	430
Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
435	440	445
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser		
450	455	460
Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu		
465	470	475
Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr		
485	490	495
Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu		
500	505	510
Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val		
515	520	525
Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu		
530	535	540
Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr		
545	550	555
Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe		
565	570	575
Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr		
580	585	590

<210> 27

<211> 1851

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码融合蛋白 (GI102-M61) 的核苷酸

<400> 27

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60
tctccttctc acgctgtgat ccacgtgacc aaagaagtga aagaggtcgc cacactgtcc 120
tgcggccaca acgtttcagt ggaagaactg gccagacca ggatctactg gcagaaagaa 180

aagaaaatgg tgctgacat gatgtccggc gacatgaaca tctggcctga gtacaagaac 240
cggacatct tgcacatcac caacaacctg tccatcgtga ttctggccct gaggccttct 300
gatgagggca cctatgagtg cgtggtgctg aagtacgaga aggacgcctt caagcgcgag 360
cacctggctg aagtgacact gtccgtgaag gccgactttc ccacaccttc catctccgac 420
ttcgagatcc ctacctcaa catccggcgg atcatctgtt ctacctctgg cggctttcct 480
gagcctcacc tgtcttggct ggaaaacggc gaggaactga acgcatcaa caccaccgtg 540
tctcaggacc ccgaaaccga gctgtacgct gtgtcctcca agctggactt caacatgacc 600
accaaccaca gcttcatgtg cctgattaag tacggccacc tgagagtga ccagaccttc 660
aactggaaca ccaccaagca agagcacttc cctgacaatg gatctggcgg cggaggttct 720
ggcggaggtg gaagcggagg cggaggatct gctgagtcta agtatggccc tccttgtcct 780
ccatgtcctg ctccagaagc tgctggcgga ccctctgtgt tcctgtttcc tccaaagcct 840
aaggaccagc tcatgatctc tcggacaccc gaagtgaact gcgtggtggt ggatgtgtct 900
caagaggacc ctgaggtgca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 960
aagaccaagc ctagagagga acagttcaac tccacctaca gagtgggtgc cgtgctgacc 1020
gtgctgcacc aggattggct gaacggcaaa gagtacaagt gcaaggtgtc caacaagggc 1080
ctgccttcca gcatcgaaaa gaccatctcc aaggctaagg gccagcctag ggaacccag 1140
gtttacaccc tgctccaag ccaagaggaa atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc 1200
ctgggtcaagg gcttctaccc ttccgacatt gccgtggaat gggagtccaa tggccagcct 1260
gagaacaact acaagaccac acctcctgtg ctggactccg acggctcctt ctttctgtac 1320
tctcgctga ccgtggacaa gtctagatgg caagagggca acgtgttctc ctgctctgtg 1380
ctgcacgagg ccctgcacaa tctactacac cagaagtccc tgtctctgtc tcttgaggt 1440
ggtggcggtt ctgcccctac cagctcctct accaagaaaa ccagctcca gttggagcat 1500
ctgctgctgg acctccagat gattctgaac gggatcaaca actataagaa cccaagctg 1560
accgccatgc tgaccgctaa gttctacatg cccaagaagg ccaccgagct gaagcacctc 1620
cagtgcctgg aaagggaact gaagcccctg gaagaggtgc tgaatctggc ccagtccaag 1680
aacttccacc tgaggccacg ggacctgac agcaacatca acgtgatcgt gctggaactg 1740
aagggctccg agacaacctt tatgtgcgag tacgccgac agacagccac catcgtggaa 1800
tttctgaacc ggtggatcac cttctgccag agcatcatct ccacactgac c 1851

<210> 28

<211> 592

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白 (GI102-M61)

<400> 28

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp

20 25 30

Gln	Lys	Glu	Lys	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp	Met	Asn	
35					40					45						
Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn	
50					55					60						
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr	
65					70					75					80	
Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg	Glu	His	
85					90					95						
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser	
100					105					110						
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys	
115					120					125						
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn	
130					135					140						
Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu	
145					150					155					160	
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr	
165					170					175						
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn	
180					185					190						
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn	
195					200					205						
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
210					215					220						
Ser	Ala	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
225					230					235					240	
Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
245					250					255						
Asp	Gln	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
260					265					270						
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
275					280					285						
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	
290					295					300						
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
305					310					315					320	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	
325					330					335						
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	

340	345	350
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	Pro Pro Ser Gln Glu Glu	Met Thr Lys
355	360	365
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	Leu Val Lys Gly Phe Tyr	Pro Ser Asp
370	375	380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	Asn Gly Gln Pro Glu Asn	Asn Tyr Lys
385	390	395
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	Ser Asp Gly Ser Phe Phe	Leu Tyr Ser
405	410	415
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser	Arg Trp Gln Glu Gly Asn	Val Phe Ser
420	425	430
Cys Ser Val Leu His Glu Ala	Leu His Asn His Tyr Thr	Gln Lys Ser
435	440	445
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly	Gly Gly Gly Ser Ala Pro	Thr Ser Ser
450	455	460
Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu	Gln Leu Glu His Leu Leu	Leu Asp Leu
465	470	475
Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile	Asn Asn Tyr Lys Asn Pro	Lys Leu Thr
485	490	495
Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe	Tyr Met Pro Lys Lys Ala	Thr Glu Leu
500	505	510
Lys His Leu Gln Cys Leu Glu	Arg Glu Leu Lys Pro Leu	Glu Glu Val
515	520	525
Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys	Asn Phe His Leu Arg Pro	Arg Asp Leu
530	535	540
Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile	Val Leu Glu Leu Lys Gly	Ser Glu Thr
545	550	555
Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala	Asp Glu Thr Ala Thr Ile	Val Glu Phe
565	570	575
Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe	Cys Gln Ser Ile Ile Ser	Thr Leu Thr
580	585	590

<210> 29

<211> 1857

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码融合蛋白 (GI102-M72) 的核苷酸

<400> 29

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60

```

tctccttctc acgctgtgat ccacgtgacc aaagaagtga aagaggtcgc cacactgtcc 120
tgcggccaca acgtttcagt ggaagaactg gcccagacca ggatctactg gcagaaagaa 180
aagaaaatgg tgctgaccat gatgtccggc gacatgaaca tctggcctga gtacaagaac 240
cggaccatct tcgacatcac caacaacctg tccatcgtga ttctggccct gaggccttct 300
gatgagggca cctatgagtg cgtggtgctg aagtacgaga aggacgcctt caagcgcgag 360
cacctggctg aagtgcacct gtccgtgaag gccgactttc ccacaccttc catctccgac 420
ttcgagatcc ctacctcaa catccggcgg atcatctgtt ctacctctgg cggcttttct 480
gagcctcacc tgtcttggtt ggaaaacggc gaggaactga acgcatcaa caccaccgtg 540
tctcaggacc ccgaaaccga gctgtacgct gtgtcctcca agctggactt caacatgacc 600
accaaccaca gcttcatgtg cctgattaag tacggccacc tgagagtga ccagaccttc 660
aactggaaca ccaccaagca agagcacttc cctgacaatg gatctggcgg cggaggttct 720
ggcggaggtg gaagcggagg cggaggatct gctgagtcta agtatggccc tccttgtcct 780
ccatgtcctg ctccagaagc tgttggcgga ccctctgtgt tcctgtttcc tccaaagcct 840
aaggaccagc tcatgatctc tcggacaccc gaagtgcct gcgtggtggt ggatgtgtct 900
caagaggacc ctgaggtgca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 960
aagaccaagc ctagagagga acagttcaac tccacctaca gagtgggtgc cgtgctgacc 1020
gtgctgcacc aggattggct gaacggcaaa gagtacaagt gcaaggtgtc caacaagggc 1080
ctgccttcca gcatcgaaaa gaccatctcc aaggctaagg gccagcctag ggaaccccag 1140
gtttacacc tgctccaag ccaagaggaa atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc 1200
ctgggtcaagg gcttctaccc ttccgacatt gccgtggaat gggagtccaa tggccagcct 1260
gagaacaact acaagaccac acctcctgtg ctggactccg acggctcctt ctttctgtac 1320
tctcgctga ccgtggacaa gtctagatgg caagagggca acgtgttctc ctgctctgtg 1380
ctgcacgagg ccctgcacaa tctactaccc cagaagtccc tgtctctgtc tcttgaggt 1440
ggtggcgggt ctgcccctac cagctcctct accaagaaaa ccagctcca gttggagcat 1500
ctgctgctgg acctccagat gattctgaac gggatcaaca actataagaa cccaagctg 1560
accgccatgc tgaccgctaa gttctacatg cccaagaagg ccaccgagct gaagcacctc 1620
cagtgcctgg aagaagaact gaagcccctg gaagaggtgc tgaatggggc ccagtccaag 1680
aacttccacc tgaggccacg ggacctgatc agcaacatca acgtgatcgt gctggaactg 1740
aagggctccg agacaacctt tatgtgcgag tacgccgacg agacagccac catcgtggaa 1800
tttctgaacc ggtggatcac cttctgccag agcatcatct ccacactgac ctgatga 1857

```

<210> 30

<211> 592

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白 (GI102-M72)

<400> 30

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

1

5

10

15

Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile	Tyr	Trp
20				25				30							
Gln	Lys	Glu	Lys	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp	Met	Asn
35				40				45							
Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn
50				55				60							
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr
65				70				75				80			
Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg	Glu	His
85				90				95							
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser
100				105				110							
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys
115				120				125							
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn
130				135				140							
Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu
145				150				155				160			
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr
165				170				175							
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn
180				185				190							
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn
195				200				205							
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
210				215				220							
Ser	Ala	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
225				230				235				240			
Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
245				250				255							
Asp	Gln	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
260				265				270							
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
275				280				285							
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe
290				295				300							
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
305				310				315				320			
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu

				325				330				335			
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
				340				345				350			
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
				355				360				365			
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
				370				375				380			
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
385				390				395				400			
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
				405				410				415			
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				420				425				430			
Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
				435				440				445			
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser
				450				455				460			
Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu
465				470				475				480			
Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr
				485				490				495			
Ala	Met	Leu	Thr	Ala	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu
				500				505				510			
Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val
				515				520				525			
Leu	Asn	Gly	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu
				530				535				540			
Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr
545				550				555				560			
Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe
				565				570				575			
Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr
				580				585				590			

<210> 31

<211> 1851

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码融合蛋白 (GI101w) 的核苷酸

<400> 31

```

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60
tctccttctc acgctgtgat ccacgtgacc aaagaagtga aagaggtcgc cacactgtcc 120
tgcggccaca acgtttcagt ggaagaactg gccagacca ggatctactg gcagaaagaa 180
aagaaaatgg tgctgaccat gatgtccggc gacatgaaca tctggcctga gtacaagaac 240
cggaccatct tcgacatcac caacaacctg tccatcgtga ttctggccct gaggccttct 300
gatgagggca cctatgagtg cgtggtgctg aagtacgaga aggacgcctt caagcgcgag 360
cacctggctg aagtgacact gtccgtgaag gccgactttc ccacaccttc catctccgac 420
ttcgagatcc ctacctcaa catccggcgg atcatctgtt ctacctctgg cggctttcct 480
gagcctcacc tgtcttggct ggaaaacggc gaggaactga acgcatcaa caccaccgtg 540
tctcaggacc ccgaaaccga gctgtacgct gtgtcttcca agctggactt caacatgacc 600
accaaccaca gttcatgtg cctgattaag tacggccacc tgagagtga ccagaccttc 660
aactggaaca ccaccaagca agagcacttc cctgacaatg gatctggcgg cggaggttct 720
ggcggaggtg gaagcggagg cggaggatct gctgagtcta agtatggccc tccttgtcct 780
ccatgtcctg ctccagaagc tgctggcgga ccctctgtgt tcctgtttcc tccaaagcct 840
aaggaccagc tcatgatctc tcggacaccc gaagtgacct gcgtggtggt ggatgtgtct 900
caagaggacc ctgaggtgca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 960
aagaccaagc ctagagagga acagttcaac tccacctaca gagtgggtgc cgtgctgacc 1020
gtgctgcacc aggattggct gaacggcaaa gagtacaagt gcaaggtgtc caacaagggc 1080
ctgccttcca gcatcgaaaa gaccatctcc aaggctaagg gccagcctag ggaaccccag 1140
gtttacaccc tgcttccaag ccaagaggaa atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc 1200
ctgggtcaagg gcttctaccc ttccgacatt gccgtggaat gggagtccaa tggccagcct 1260
gagaacaact acaagaccac acctcctgtg ctggactccg acggctcctt ctttctgtac 1320
tctcgctga ccgtggacaa gtctagatgg caagagggca acgtgttctc ctgctctgtg 1380
ctgcacgagg ccctgcacaa tcactacacc cagaagtccc tgtctctgtc tcttgaggt 1440
ggtggcgggt ctgcccctac cagctcctct accaagaaaa ccagctcca gttggagcat 1500
ctgctgctgg acctccagat gattctgaac gggatcaaca actataagaa cccaagctg 1560
acccgcatgc tgacctttaa gttctacatg cccaagaagg ccaccgagct gaagcacctc 1620
cagtgcctgg aagaagaact gaagccctg gaagaggtgc tgaatctggc ccagtccaag 1680
aacttccacc tgaggccacg ggacctgatc agcaacatca acgtgatcgt gctggaactg 1740
aagggtccg agacaacctt tatgtgcgag tacgccgacg agacagccac catcgtggaa 1800
tttctgaacc ggtggatcac cttctgccag agcatcatct ccactgac c 1851

```

<210> 32

<211> 592

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白 (GI101w)

<400> 32

Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
1				5					10					15	
Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile	Tyr	Trp
			20					25					30		
Gln	Lys	Glu	Lys	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp	Met	Asn
		35					40					45			
Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn
	50					55					60				
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr
65					70					75					80
Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg	Glu	His
				85					90					95	
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser
			100					105					110		
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys
		115					120					125			
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn
	130					135					140				
Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu
145				150						155					160
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr
				165					170					175	
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn
			180					185					190		
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn
	195					200						205			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
	210					215					220				
Ser	Ala	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
225				230					235						240
Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
				245					250					255	
Asp	Gln	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
		260					265						270		
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
	275					280						285			
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe
	290					295					300				
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp

305	310	315	320
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu			
	325	330	335
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
	340	345	350
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys			
	355	360	365
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
	370	375	380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
385	390	395	400
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
	405	410	415
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser			
	420	425	430
Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
	435	440	445
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser			
	450	455	460
Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu			
465	470	475	480
Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr			
	485	490	495
Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu			
	500	505	510
Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val			
	515	520	525
Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu			
	530	535	540
Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr			
545	550	555	560
Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe			
	565	570	575
Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr			
	580	585	590

<210> 33

<211> 1848

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码融合蛋白 (mGI102-M61) 的核苷酸

<400> 33

```
atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60
tctccttctc acgctgtgga cgagcagctc tccaagtccg tgaaggataa ggtcctgctg 120
ccttgccggt acaactctcc tcacgaggac gagtctgagg accggatcta ctggcagaaa 180
cacgacaagg tgggtgctgtc cgtgatcgcc ggaaagctga aagtgtggcc tgagtacaag 240
aacaggaccc tgtacgacaa caccacctac agcctgatca tcctgggcct cgtgctgagc 300
gatagaggca cctattcttg cgtggtgcag aagaaagagc ggggcaccta cgaagtgaag 360
cacctggctc tgggtcaagct gtccatcaag gccgacttca gcaccctaa catcaccgag 420
tctggcaacc cttccgccga caccaagaga atcacctgtt tcgcctctgg cggcttccct 480
aagcctcggc tctcttggtt ggaaaacggc agagagctgc ccggcatcaa taccaccatt 540
tctcaggacc cagagtccga gctgtacacc atctccagcc agctcgactt taacaccacc 600
agaaaccaca ccatcaagtg cctgattaag tacggcgacg cccacgtgtc cgaggacttt 660
acttgggaga aacctcctga ggacctcct gactctggat ctggcggcgg aggttctggc 720
ggaggtggaa gcggaggcgg aggatctgct gagtctaagt atggccctcc ttgtcctcca 780
tgtcctgctc cagaagctgc tggcggaccc tctgtgttcc tgtttcctcc aaagcctaag 840
gaccagctca tgatctctcg gaccttgaa gtgacctgcg tgggtgtgga tgtgtctcaa 900
gaggaccctg aggtgcagtt caattggtac gtggacggcg tggaaagtga caacgccaa 960
accaagccta gagaggaaca gttcaactcc acctatagag tgggtgtccgt gctgaccgtg 1020
ctgcaccagg attggctgaa cggcaaagag tacaagtga aggtgtccaa caagggcctg 1080
ccttccagca tcgaaaagac catcagcaag gctaagggcc agcctaggga accccaggtt 1140
tacacctgc ctccaagcca agaggaaatg accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg 1200
gtcaagggtc tctacccttc cgacattgcc gtggaatggg agtccaatgg ccagcctgag 1260
aacaactaca agaccacacc tcctgtgctg gactccgacg gctccttctt tctgtactct 1320
cgcctgaccg tggacaagtc taggtggcaa gagggcaacg tgttctcctg ctctgtgctg 1380
cacgaggctc tgcacaacca ctacaccag aagtccctgt ctctgtctct tggaggtggt 1440
ggcggttctg cccctacctc cagctctacc aagaaaaccc agctccagtt ggagcatctg 1500
ctgctggacc tcagatgat cctgaatggc atcaacaatt acaagaaccc caagctgacc 1560
gccatgctga ccgctaagtt ctacatgcc aagaaggcca ccgagctgaa gcacttgag 1620
tgcctggaaa gggaactgaa gcccctggaa gaagtgtga atctggccca gtccaagaac 1680
ttccacctga ggcctaggga cctgatctcc aacatcaacg tgatcgtgct ggaactgaaa 1740
ggctccgaga caaccttcat gtgcgagtac gccgacgaga cagccaccat cgtggaattt 1800
ctgaaccggt ggatcacctt ctgccagagc atcatctcca cactgacc 1848
```

<210> 34

<211> 616

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白 (mGI102-M61)

<400> 34

```

Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1           5           10           15
Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys
20           25           30
Ser Val Lys Asp Lys Val Leu Leu Pro Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His
35           40           45
Glu Asp Glu Ser Glu Asp Arg Ile Tyr Trp Gln Lys His Asp Lys Val
50           55           60
Val Leu Ser Val Ile Ala Gly Lys Leu Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys
65           70           75           80
Asn Arg Thr Leu Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly
85           90           95
Leu Val Leu Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys
100          105          110
Glu Arg Gly Thr Tyr Glu Val Lys His Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser
115          120          125
Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro
130          135          140
Ser Ala Asp Thr Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro
145          150          155          160
Lys Pro Arg Phe Ser Trp Leu Glu Asn Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile
165          170          175
Asn Thr Thr Ile Ser Gln Asp Pro Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser
180          185          190
Ser Gln Leu Asp Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu
195          200          205
Ile Lys Tyr Gly Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys
210          215          220
Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
225          230          235          240
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
245          250          255
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
260          265          270
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr
275          280          285
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

```

290	295	300
Val Gln Phe Asn Trp Tyr	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys	
305	310	315
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		320
	325	330
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		335
	340	345
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		350
	355	360
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		365
370	375	380
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
385	390	395
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		400
	405	410
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		415
	420	425
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		430
435	440	445
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu		
450	455	460
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly		
465	470	475
Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln		480
	485	490
Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn		495
	500	505
Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr		510
515	520	525
Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Arg		
530	535	540
Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn		
545	550	555
Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val		560
	565	570
Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp		575
	580	585
Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys		590
595	600	605

Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
610 615

<210> 35

<211> 153

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 野生型hIL-2

<400> 35

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

<210> 36

<211> 158

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IL-2 with signal sequence

<400> 36

Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr

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

<210> 37

<211> 474

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码带有信号序列的IL-2的核苷酸序列

<400> 37

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60
tctccttctc acgctgcccc taccagctcc tctaccaaga aaaccagct ccagttggag 120
catctgctgc tggacctcca gatgattctg aacgggatca acaactataa gaacccaag 180
ctgacccgca tgctgacctt taagttctac atgccaaga aggccaccga gctgaagcac 240
ctccagtgcc tggaagaaga actgaagccc ctggaagagg tgctgaatct ggcccagtcc 300
aagaacttcc acctgaggcc acgggacctg atcagcaaca tcaacgtgat cgtgctggaa 360
ctgaagggtc ccgagacaac ctttatgtgc gactacgccg acgagacagc caccatcgtg 420
gaattttctga accggtggat caccttctgc cagagcatca tctccacact gacc 474

<210> 38

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 38

Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 39

<211> 1461

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> nucleotides coding CD80-Fc protein

<400> 39

```

ggatccgcca ccatggatgc tatgctgaga ggctgtgttt gcgtgctgct gctgtgtggc 60
gctgtgttcg tgtctccttc tcacgctgtg atccacgtga ccaaagaagt gaaagaggtc 120
gccacactgt cctgcggcca caacgtttca gtggaagaac tggcccagac caggatctac 180
tggcagaaaag aaaagaaaat ggtgctgacc atgatgtccg gcgacatgaa catctggcct 240
gagtacaaga accggaccat cttcgacatc accaacaacc tgtccatcgt gattctggcc 300
ctgaggcctt ctgatgaggg cacctatgag tgcgtggtgc tgaagtacga gaaggacgcc 360
ttcaagcgcg agcacctggc tgaagtgaca ctgtccgtga aggccgactt tcccacacct 420
tccatctccg acttcgagat ccctacctcc aacatccggc ggatcatctg ttctacctct 480
ggcggctttc ctgagcctca cctgtcttgg ctggaaaacg gcgaggaact gaacgccatc 540
aacaccaccg tgtctcagga ccccgaacc gagctgtacg ctgtgtcctc caagctggac 600
ttcaacatga ccaccaacca cagcttcatg tgcctgatta agtacggcca cctgagagtg 660
aaccagacct tcaactggaa caccaccaag caagagcact tccctgacaa tggatctggc 720
ggcggagggt ctggcggagg tggaaagcga ggcggaggat ctgctgagtc taagtatggc 780
cctccttgtc ctccatgtcc tgctccagaa gctgctggcg gaccctctgt gttcctgttt 840
cctccaaagc ctaaggacca gctcatgac tctcggacac ccgaagtac ctgcgtggtg 900
gtggatgtgt ctcaagagga ccctgaggtg cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa 960
gtgcacaacg ccaagaccaa gcctagagag gaacagtta actccaccta cagagtgggtg 1020
tccgtgctga ccgtgctgca ccaggattgg ctgaacggca aagagtacaa gtgcaagggtg 1080
tccaacaagg gcctgccttc cagcatcgaa aagaccatct ccaaggctaa gggccagcct 1140
agggaacccc aggtttacac cctgcctcca agccaagagg aaatgaccaa gaaccagggtg 1200
tccctgacct gcctgggtcaa gggctttctac cttccgaca ttgccgtgga atgggagttc 1260
aatggccagc ctgagaacaa ctacaagacc acacctctg tgctggactc cgacggctcc 1320
ttctttctgt actctcgct gaccgtggac aagtctaggt ggcaagaggg caacgtgttc 1380
tcctgctctg tgctgcacga ggccctgcac aatcactaca cccagaagtc cctgtctctg 1440
tccctgggct gatgactcga g 1461

```

<210> 40

<211> 479

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD80-Fc蛋白

<400> 40

Met	Asp	Ala	Met	Leu	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5				10						15	
Ala	Val	Phe	Val	Ser	Pro	Ser	His	Ala	Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu
			20					25						30	
Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu
			35					40						45	
Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile	Tyr	Trp	Gln	Lys	Glu	Lys	Lys	Met	Val
			50					55						60	
Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp	Met	Asn	Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn
65						70				75					80
Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn	Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala
					85					90					95
Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr	Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr
					100					105					110
Glu	Lys	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg	Glu	His	Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser
					115					120					125
Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser	Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro
Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro
145						150									160
Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn	Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile
						165									175
Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu	Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser
						180									190
Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr	Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu
Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn	Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr
Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
225						230									240
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly
Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Gln	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro

290	295	300
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
305	310	315
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		320
	325	330
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		335
	340	345
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		350
	355	360
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		365
370	375	380
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
385	390	395
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
	405	410
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
	420	425
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
435	440	445
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala		
450	455	460
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly		
465	470	475

<210> 41

<211> 1851

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码融合蛋白 (hCD80-Fc-IL2wt) 的核苷酸

<400> 41

```

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60
tctccttctc acgtgtgat ccacgtgacc aaagaagtga aagaggtcgc cacactgtcc 120
tgcgccaca acgtttcagt ggaagaactg gccagacca ggatctactg gcagaaagaa 180
aagaaaatgg tgctgaccat gatgtccggc gacatgaaca tctggcctga gtacaagaac 240
cggaccatct tcgacatcac caacaacctg tccatcgtga ttctggccct gaggccttct 300
gatgagggca cctatgagtg cgtgggtgctg aagtacgaga aggacgcctt caagcgcgag 360
cacctggctg aagtgacact gtccgtgaag gccgactttc ccacaccttc catctccgac 420
ttcgagatcc ctacctcaa catccggcgg atcatctgtt ctacctctgg cggctttcct 480
gagcctcacc tgtcttggct ggaaaacggc gaggaactga acgcatcaa caccaccgtg 540

```

tctcaggacc ccgaaaccga gctgtacgct gtgtcctcca agctggactt caacatgacc 600
 accaaccaca gcttcatgtg cctgattaag tacggccacc tgagagtga ccagaccttc 660
 aactggaaca ccaccaagca agagcacttc cctgacaatg gatctggcgg cggaggttct 720
 ggcggagggtg gaagcggagg cggaggatct gctgagtcta agtatggccc tccttgtcct 780
 ccatgtcctg ctccagaagc tgctggcgga ccctctgtgt tcctgtttcc tccaaagcct 840
 aaggaccagc tcatgatctc tcggacaccc gaagtgcct gcgtgggtgg ggatgtgtct 900
 caagaggacc ctgagggtga gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 960
 aagaccaagc ctagagagga acagttcaac tccacctaca gagtgggtgtc cgtgctgacc 1020
 gtgctgcacc aggattggct gaacggcaaa gagtacaagt gcaagggtgtc caacaagggc 1080
 ctgccttcca gcatcgaaaa gaccatctcc aaggctaagg gccagcctag ggaaccccag 1140
 gtttacaccc tgcttccaag ccaagaggaa atgaccaaga accagggtgtc cctgacctgc 1200
 ctgggtcaagg gcttctaccc ttccgacatt gccgtggaat gggagtccaa tggccagcct 1260
 gagaacaact acaagaccac acctcctgtg ctggactccg acggctcctt ctttctgtac 1320
 tctcgctga ccgtggacaa gtctagatgg caagaggga acgtgttctc ctgctctgtg 1380
 ctgcacgagg ccctgcacaa tcactacacc cagaagtccc tgtctctgtc tcttgagggt 1440
 ggtggcggtt ctgcccctac cagtcctct accaagaaaa cccagctcca gttggagcat 1500
 ctgctgctgg acctccagat gattctgaac gggatcaaca actataagaa cccaagctg 1560
 acccgcatgc tgacctttaa gttctacatg cccaagaagg ccaccgagct gaagcacctc 1620
 cagtgcctgg aagaagaact gaagcccctg gaagagggtc tgaatctggc ccagtccaag 1680
 aacttccacc tgaggccacg ggacctgatc agcaacatca acgtgatcgt gctggaactg 1740
 aagggctccg agacaacctt tatgtgcgag tacgccgacg agacagccac catcgtggaa 1800
 tttctgaacc ggtggatcac cttctgccag agcatcatct ccacactgac c 1851

<210> 42

<211> 367

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc-IL2wt

<400> 42

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

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
85	90	95
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro		
100	105	110
Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
115	120	125
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn		
130	135	140
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
145	150	155
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
165	170	175
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg		
180	185	190
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys		
195	200	205
Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
210	215	220
Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser		
225	230	235
Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln		
245	250	255
Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg		
260	265	270
Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys		
275	280	285
His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu		
290	295	300
Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile		
305	310	315
Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr		
325	330	335
Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu		
340	345	350
Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr		
355	360	365

<210> 43

<211> 1176

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc-IL2wt

<400> 43

```

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60
tctccttctc acgctgctga gtctaagtat ggccctcctt gtcctccatg tcctgctcca 120
gaagctgctg gcggaacctc tgtgttcctg tttcctccaa agcctaagga ccagctcatg 180
atctctcgga cacccgaaat gacctgcgtg gtggtggatg tgtctcaaga ggacctgag 240
gtgcagttca attggtacgt ggacggcgtg gaagtgcaca acgccaagac caagcctaga 300
gaggaacagt tcaactccac ctacagagtg gtgtccgtgc tgacctgct gcaccaggat 360
tggtgaacg gcaaagagta caagtgaag gtgtccaaca agggcctgcc ttccagcatc 420
gaaaagacca tctccaaggc taagggccag cctagggaaac cccaggttta caccctgcct 480
ccaagccaag aggaatgac caagaaccag gtgtccctga cctgcctggt caagggttc 540
tacccttccg acattgccgt ggaatgggag tccaatggcc agcctgagaa caactacaag 600
accacacctc ctgtgctgga ctccgacggc tccttctttc tgtactctcg cctgacctg 660
gacaagtcta gatggcaaga gggcaacgtg ttctcctgct ctgtgctgca cgaggccctg 720
cacaatcact acaccagaa gtccctgtct ctgtctcttg gagtggttg cggttctgcc 780
cctaccagct cctctaccaa gaaaaccag ctccagttgg agcatctgct gctggacctc 840
cagatgattc tgaacgggat caacaactat aagaaccca agctgacctg catgctgacc 900
tttaagttct acatgccccaa gaaggccacc gagctgaagc acctccagtg cctggaagaa 960
gaactgaagc ccctggaaga ggtgctgaat ctggcccagt ccaagaactt ccacctgagg 1020
ccacgggacc tgatcagcaa catcaacgtg atcgtgctgg aactgaagg ctccgagaca 1080
acctttatgt gcgagtacgc cgacgagaca gccaccatcg tggaatttct gaaccggtgg 1140
atcaccttct gccagagcat catctccaca ctgacc 1176

```

<210> 44

<211> 392

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc-IL2v2

<400> 44

```

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

```

Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu
65					70					75					80
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
			85						90					95	
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
			100						105					110	
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
		115					120						125		
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
		130					135					140			
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
145						150					155				160
Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
					165					170					175
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
			180						185					190	
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
		195						200					205		
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
		210						215					220		
Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Ala	Leu
225						230					235				240
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Gly	Gly
					245					250				255	
Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln
			260						265				270		
Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn
		275						280					285		
Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Ala	Met	Leu	Thr	Ala	Lys	Phe	Tyr
		290						295				300			
Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu
305						310					315				320
Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn
					325					330				335	
Phe	His	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val
			340						345					350	
Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp
		355						360					365		
Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys

370	375	380
Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr		
385	390	
<210> 45		
<211> 1200		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> nucleotides coding Fc-IL2v2		
<400> 45		
ggatccgccca ccatggatgc tatgctgaga ggctgtgttt gcgtgctgct gctgtgtggc 60		
gctgtgttcg tgtctccatc tcacgccgct gagtetaagt acggccctcc ttgtcctcca 120		
tgtcctgctc cagaagctgc tggcggaccc tctgtgttcc tgtttcctcc aaagcctaag 180		
gaccagctca tgatctctcg gacccttgaa gtgacctgcg tgggtggtgga tgtgtctcaa 240		
gaggaccctg aggtgcagtt caattggtac gtggacggcg tggagtgca caacgccaaag 300		
accaagccta gagaggaaca gttcaactcc acctacagag tgggtgtccgt gctgaccgtg 360		
ctgcaccagg attggctgaa cggcaaagag tacaagtgca aggtgtccaa caagggcctg 420		
ccttccagca tcgaaaagac catctccaag gctaagggcc agcctaggga accccaggtt 480		
tacaccctgc ctccaagcca agaggaaatg accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg 540		
gtcaagggtc tctacccttc cgacattgcc gtggaatggg agtccaatgg ccagcctgag 600		
aacaactaca agaccacacc tcctgtgctg gactccgacg gctccttctt tctgtactct 660		
cgcctgaccg tggacaagtc taggtggcaa gagggcaacg tgttctcctg ctctgtgctg 720		
cacgaggccc tgcacaatca ctacaccag aagtccctgt ctctgtctct tggcggaggc 780		
ggaggatctg ctctacctc cagctccacc aagaaaacc agctccagtt ggagcatctg 840		
ctgctggacc tccagatgat cctgaatggc atcaacaatt acaagaacc caagctgacc 900		
gccatgctga ccgctaagtt ctacatgccc aagaaggcca ccgagctgaa gcacctccag 960		
tgcttggaa aggaactgaa gcccctggaa gaagtgtgta atctggccca gtccaagaac 1020		
ttccacctga ggcctaggga cctgatctcc aacatcaacg tgatcgtgct ggaactgaaa 1080		
ggctccgaga caaccttcat gtgcgagtac gccgacgaga cagccacat cgtggaattt 1140		
ctgaaccggt ggatcacctt ctgccagtc atcatctcca cactgacctg atgactcgag 1200		
<210> 46		
<211> 592		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CD80-Fc-IL2wt		
<400> 46		
Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys		
1	5	10 15

Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile	Tyr	Trp
20				25				30							
Gln	Lys	Glu	Lys	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp	Met	Asn
35				40				45							
Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn
50				55				60							
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr
65				70				75				80			
Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg	Glu	His
				85				90				95			
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser
100				105				110							
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys
115				120				125							
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn
130				135				140							
Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu
145				150				155				160			
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr
				165				170				175			
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn
180				185				190							
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn
195				200				205							
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
210				215				220							
Ser	Ala	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
225				230				235				240			
Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
				245				250				255			
Asp	Gln	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
260				265				270							
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
275				280				285							
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe
290				295				300							
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
305				310				315				320			
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu

				325					330					335			
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg		
				340					345					350			
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys		
				355					360					365			
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp		
				370					375					380			
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys		
385									390					395			400
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser		
				405					410					415			
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser		
				420					425					430			
Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser		
				435					440					445			
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser		
				450					455					460			
Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu		
465									470					475			480
Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr		
				485					490					495			
Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu		
				500					505					510			
Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val		
				515					520					525			
Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu		
				530					535					540			
Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr		
545									550					555			560
Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe		
				565					570					575			
Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr		
				580					585					590			

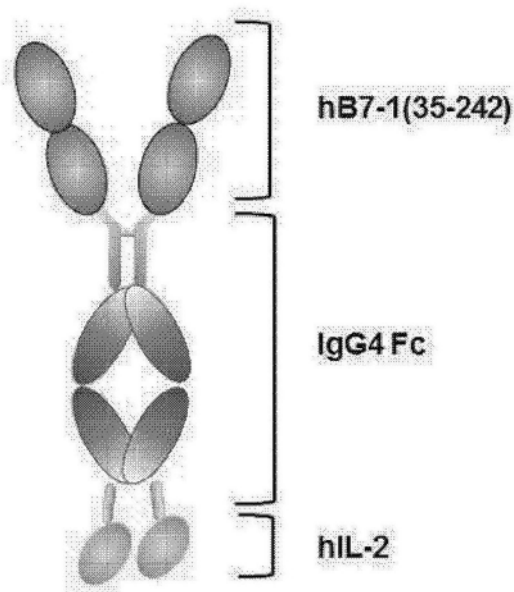


图1A

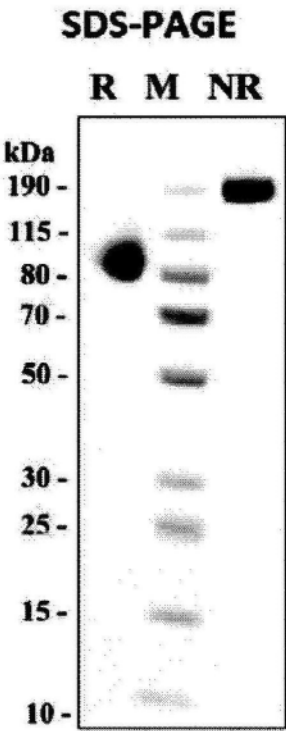


图1B

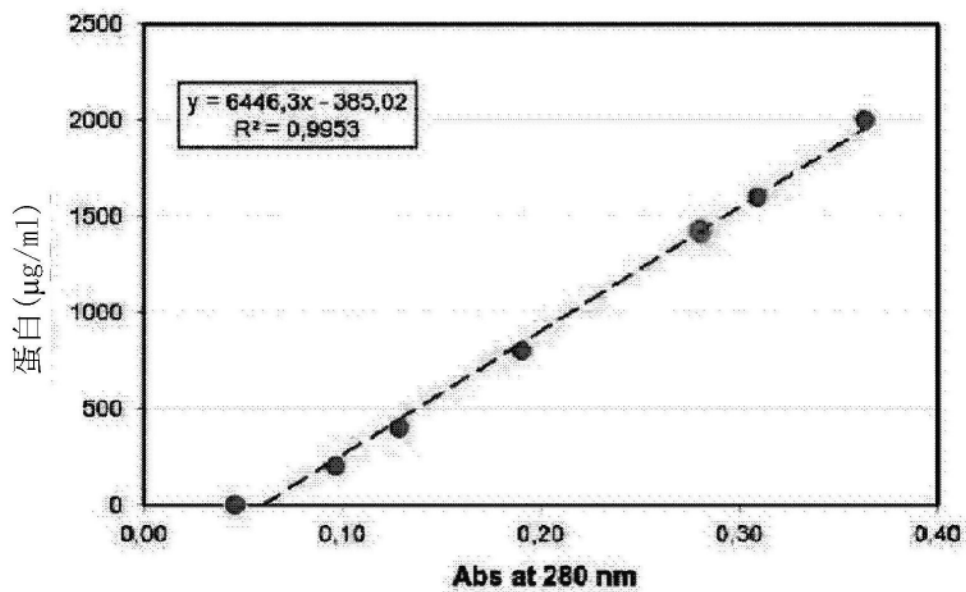


图1C

分析型尺寸排除色谱法 (SEC)

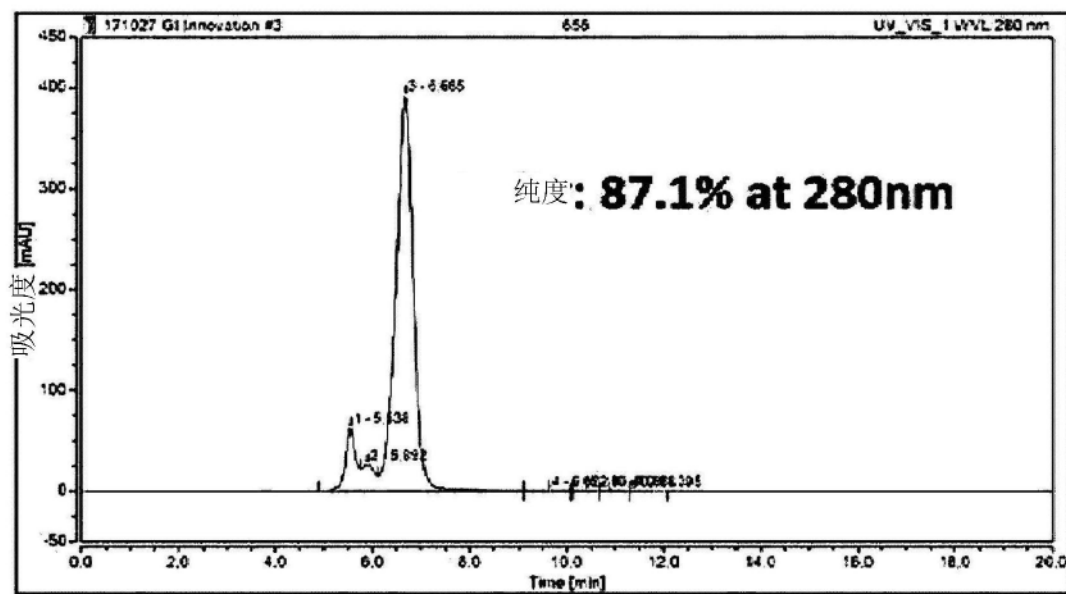


图1D

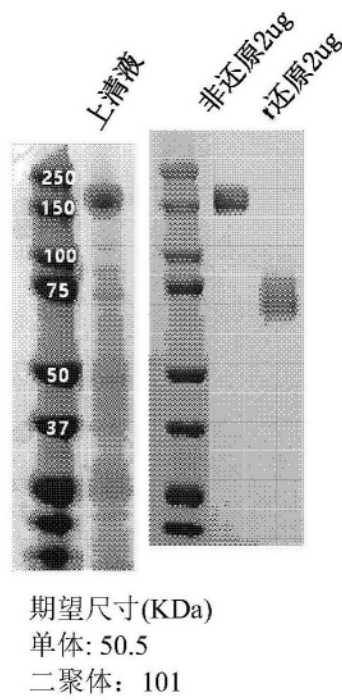
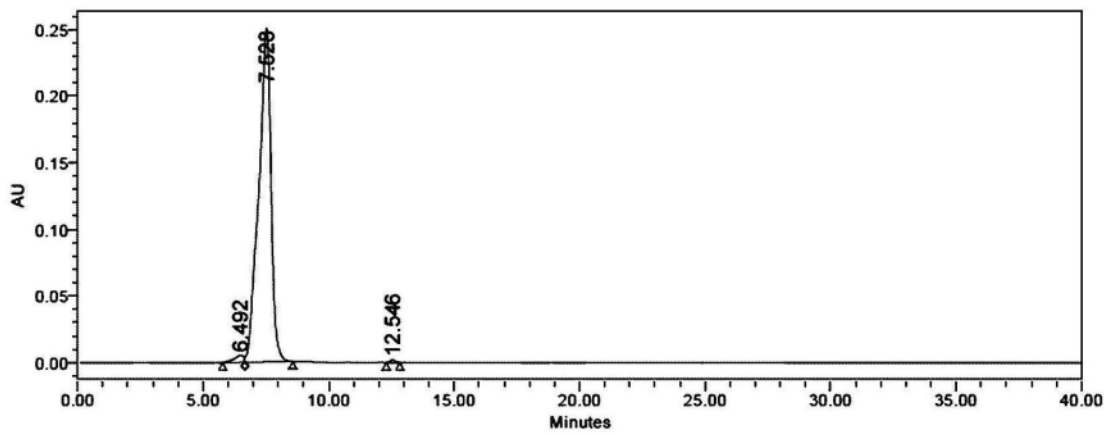


图2A



	RT	面积	面积%	高度
1	6.492	143663	1.66	5185
2	7.528	8497629	98.06	250509
3	12.546	24077	0.28	2005

图2B

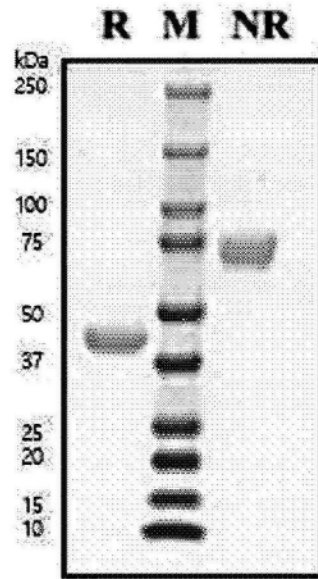
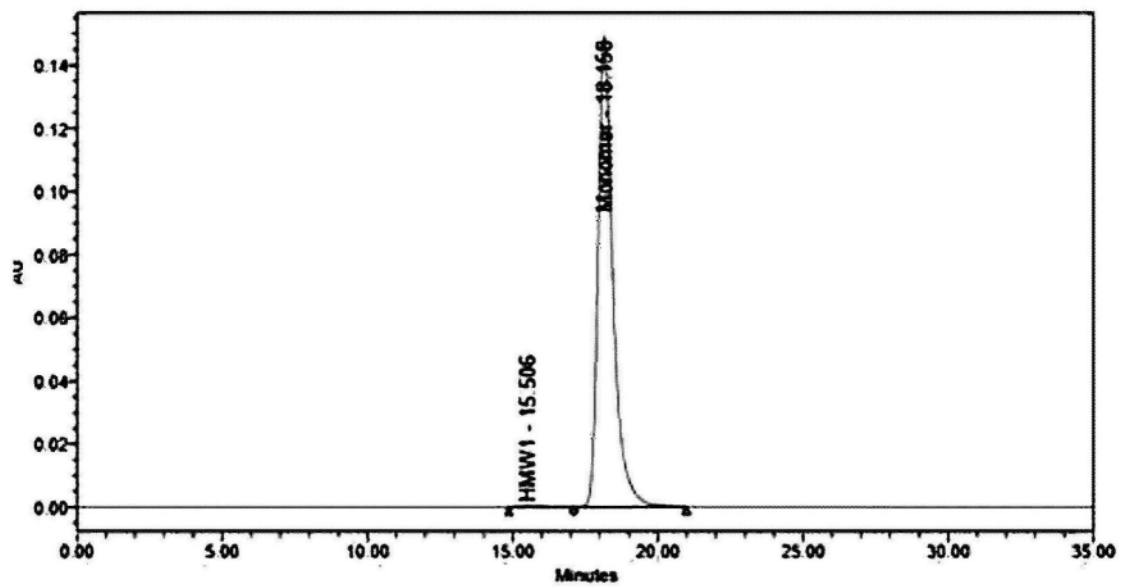


图3A



峰名	RT	面积	面积%	高度
1 HMW1	15.506	28137	0.52	426
2 Monomer	18.158	5363386	99.48	148945

图3B

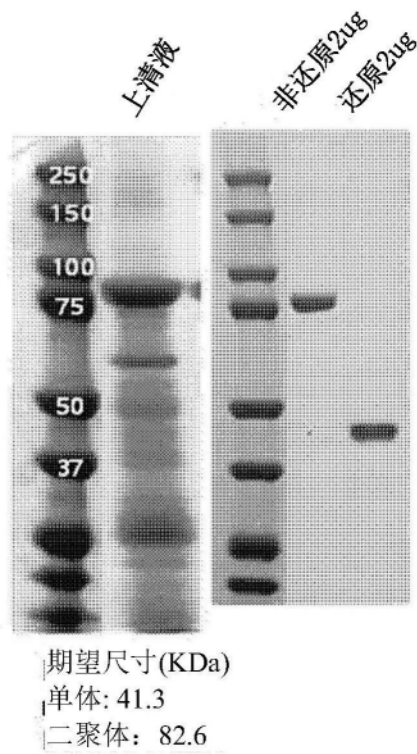


图3C

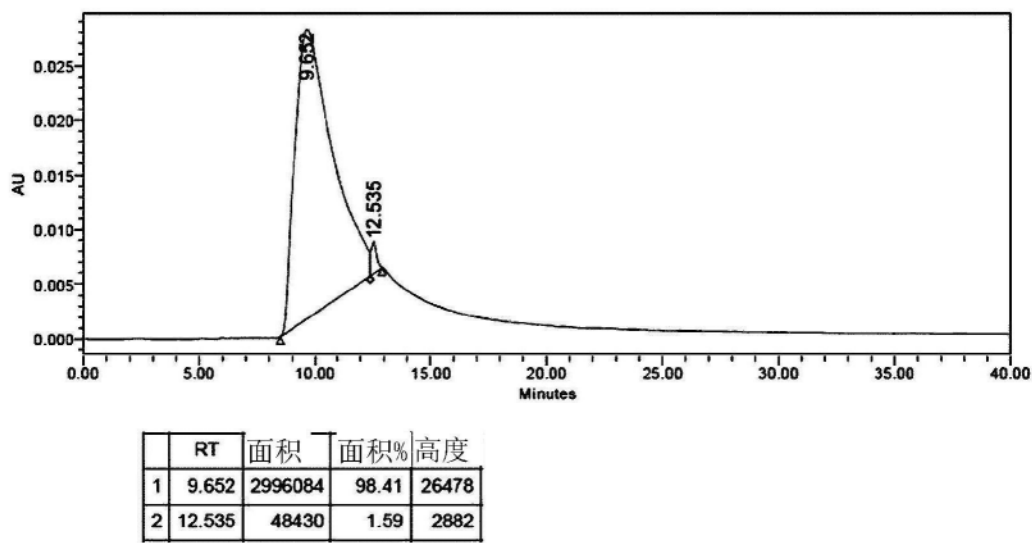


图3D

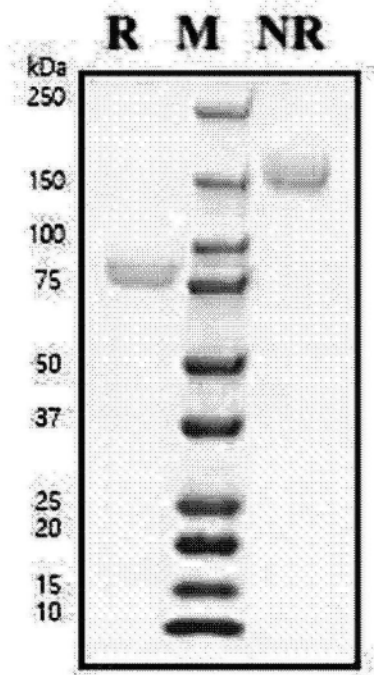


图4A

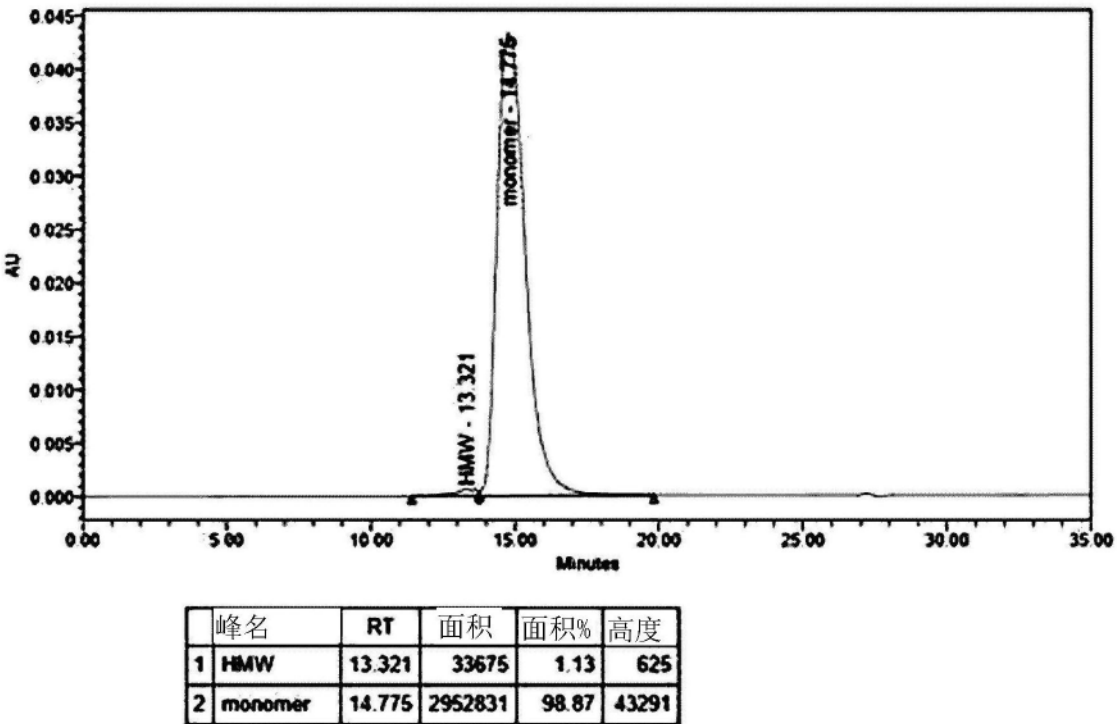


图4B

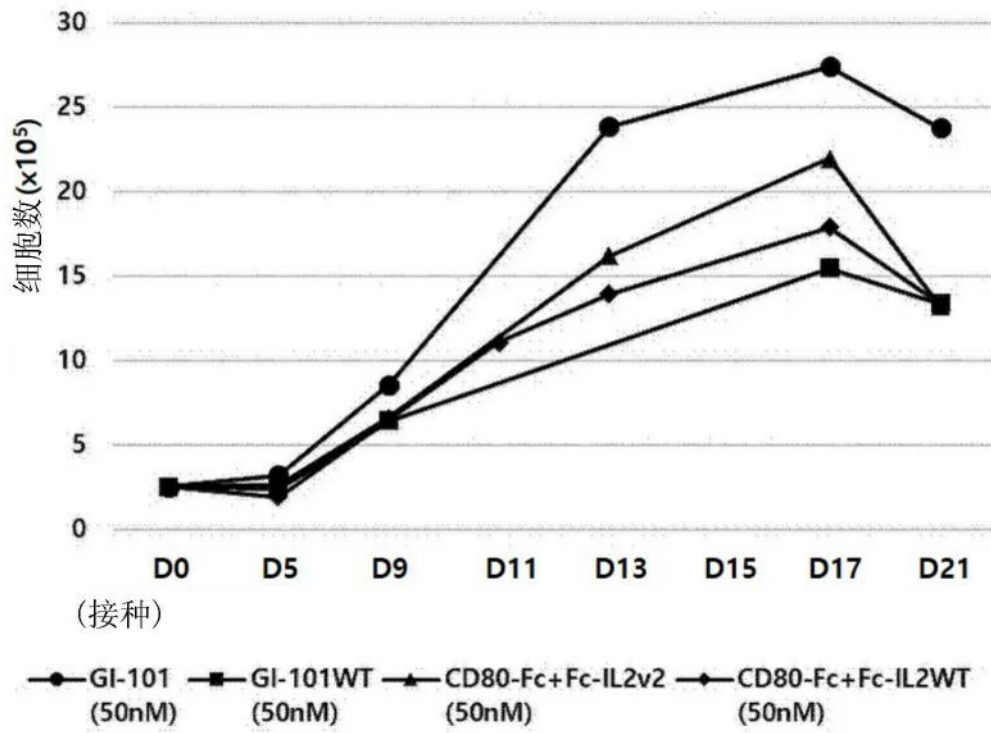


图5A

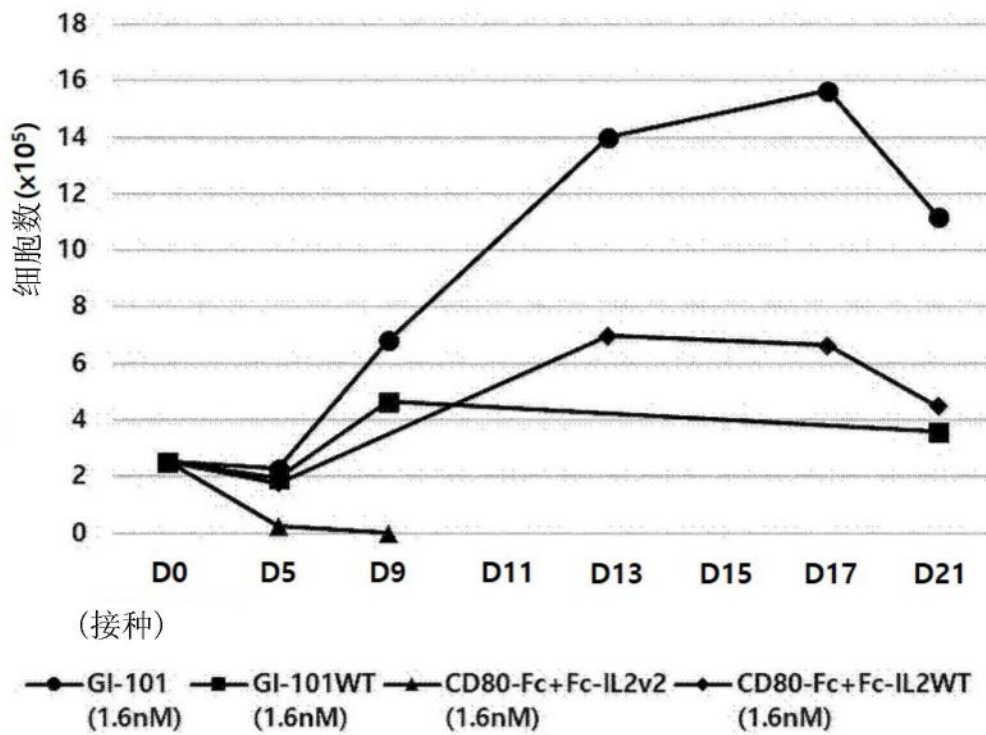


图5B

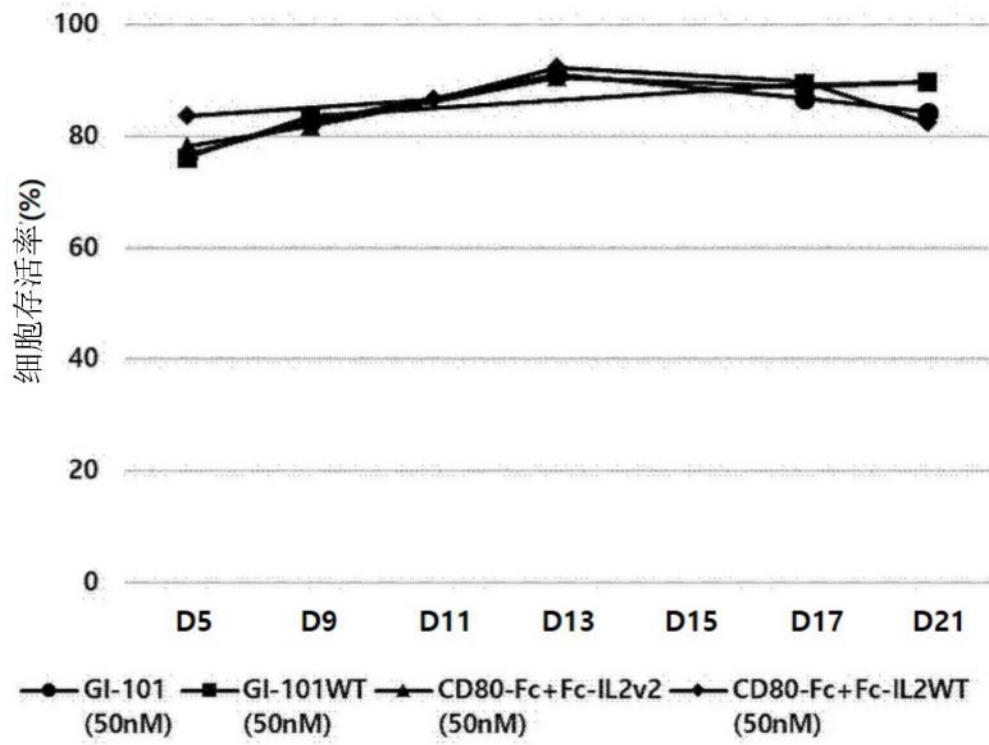


图6A

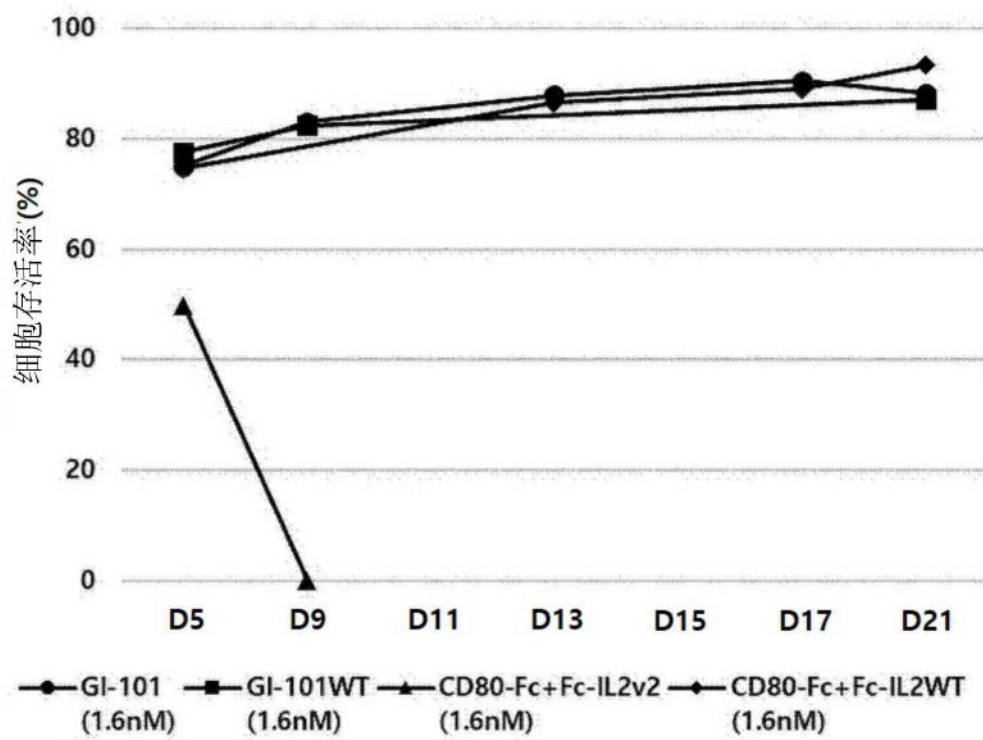


图6B

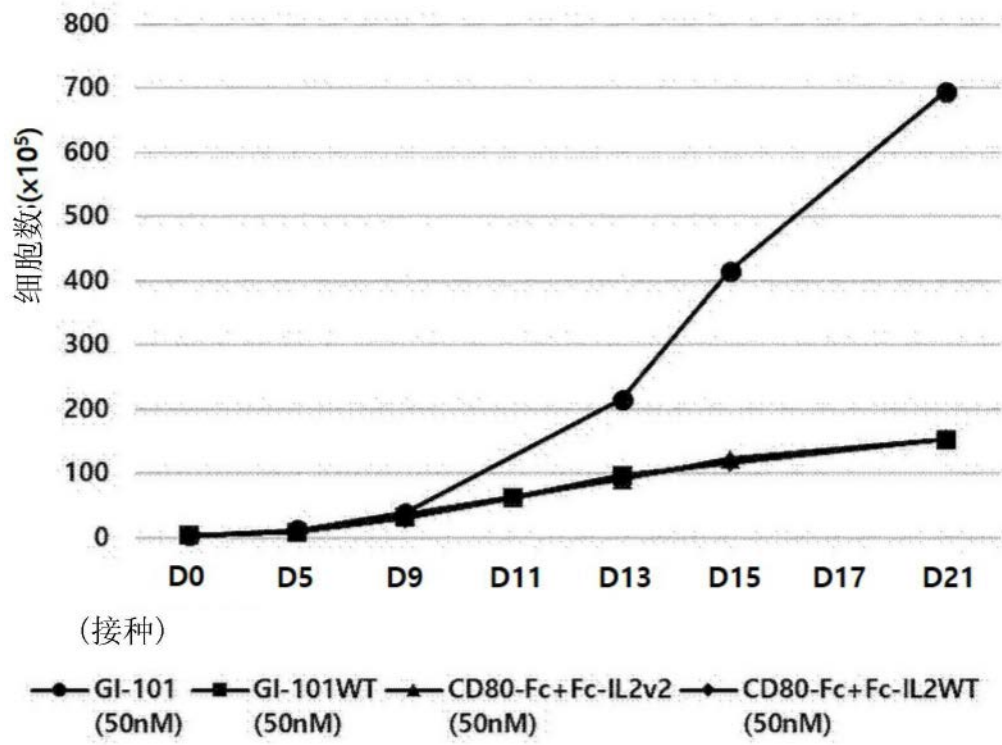


图7A

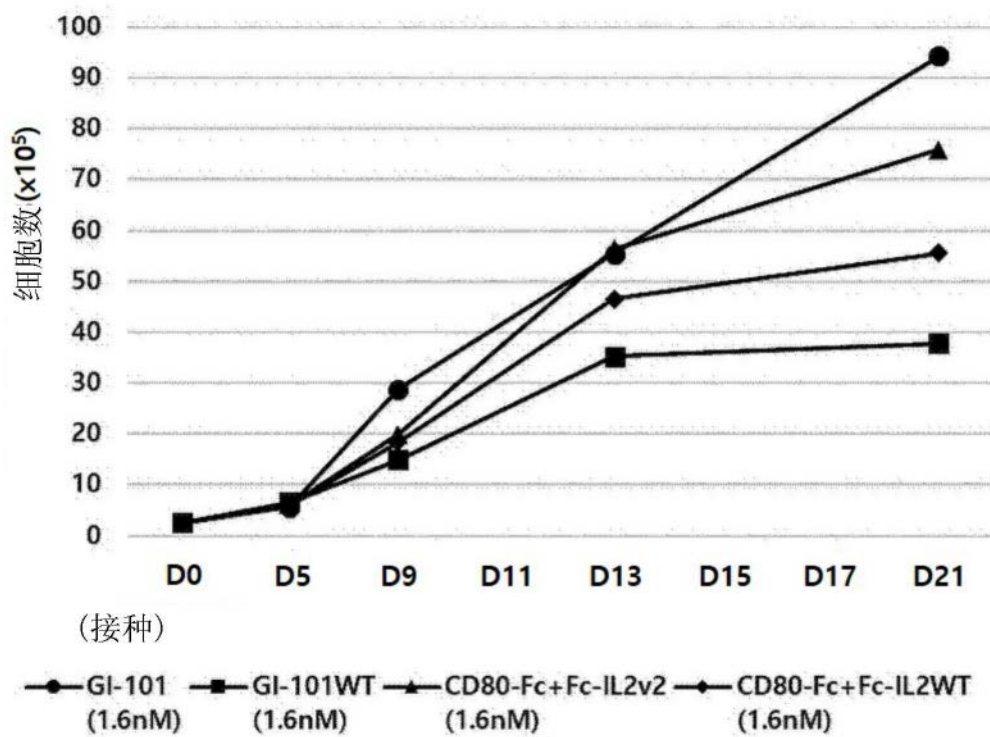


图7B

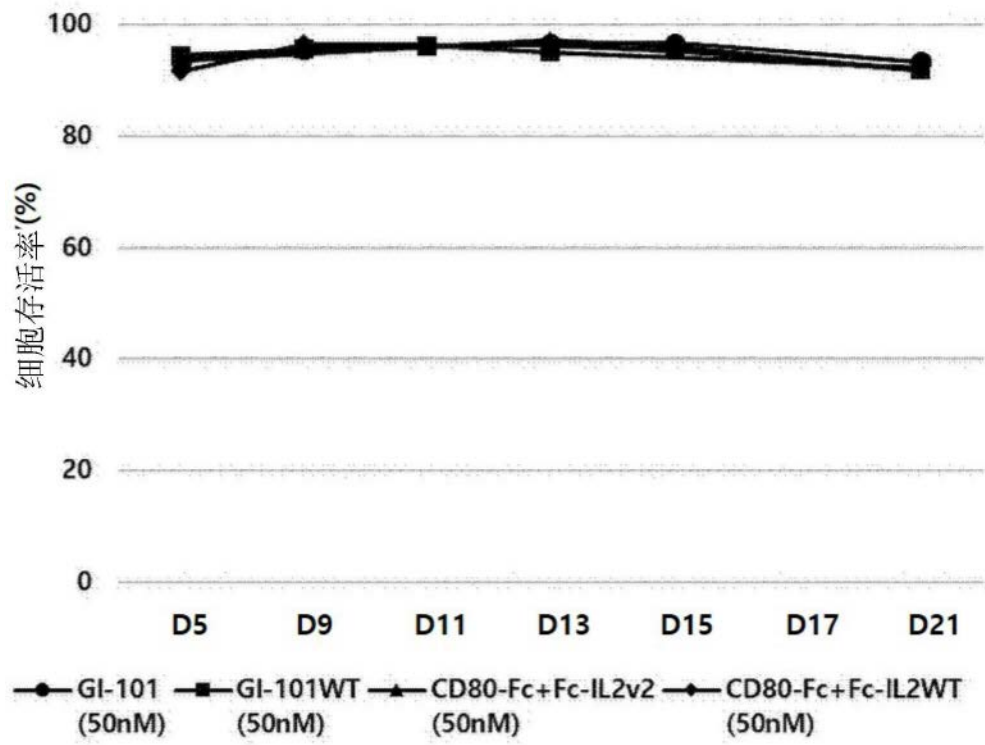


图8A

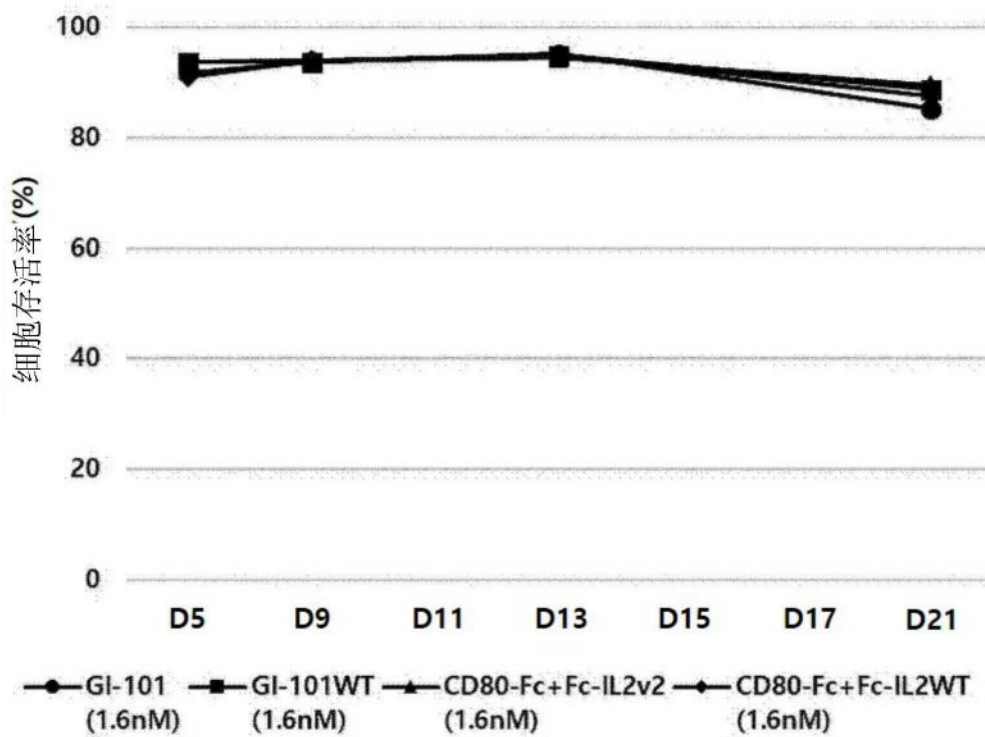


图8B

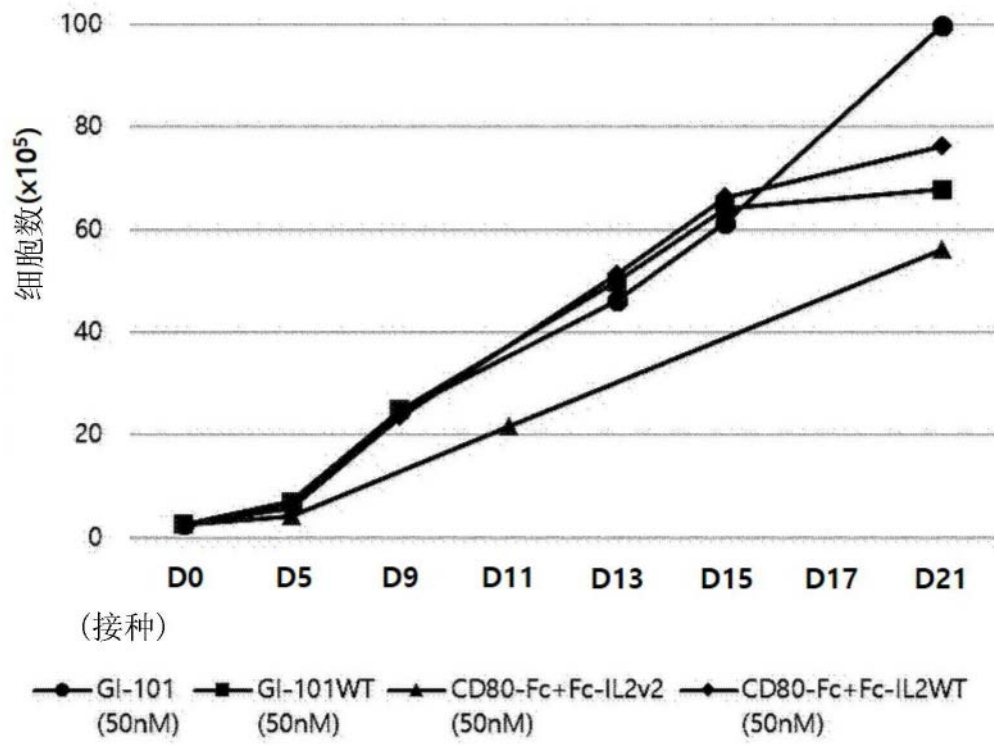


图9A

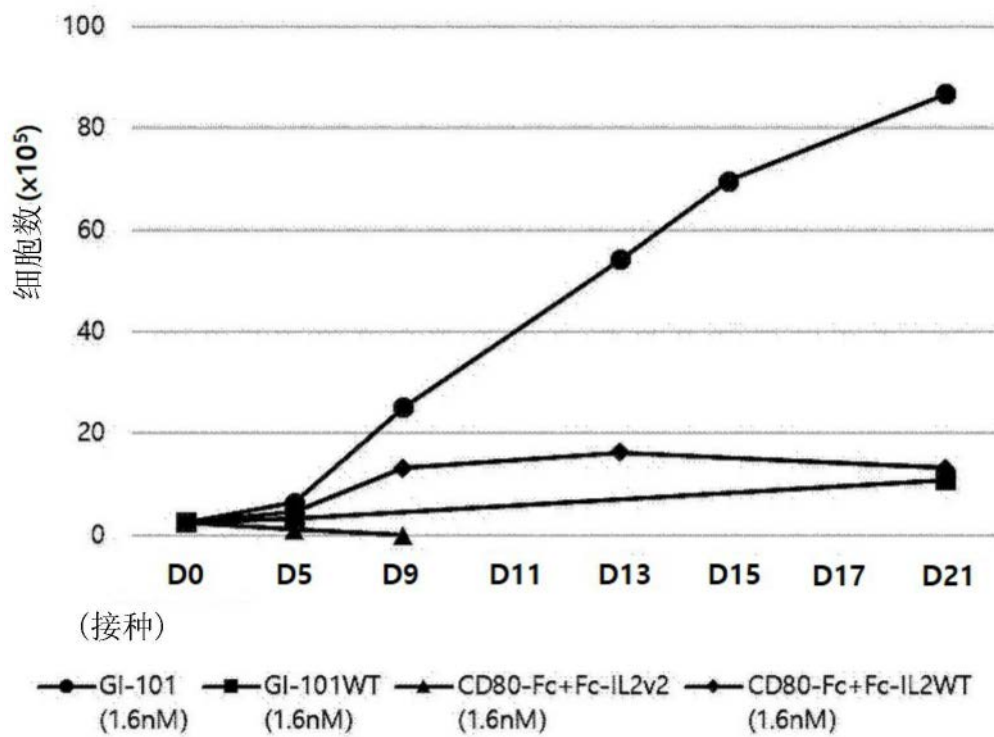


图9B

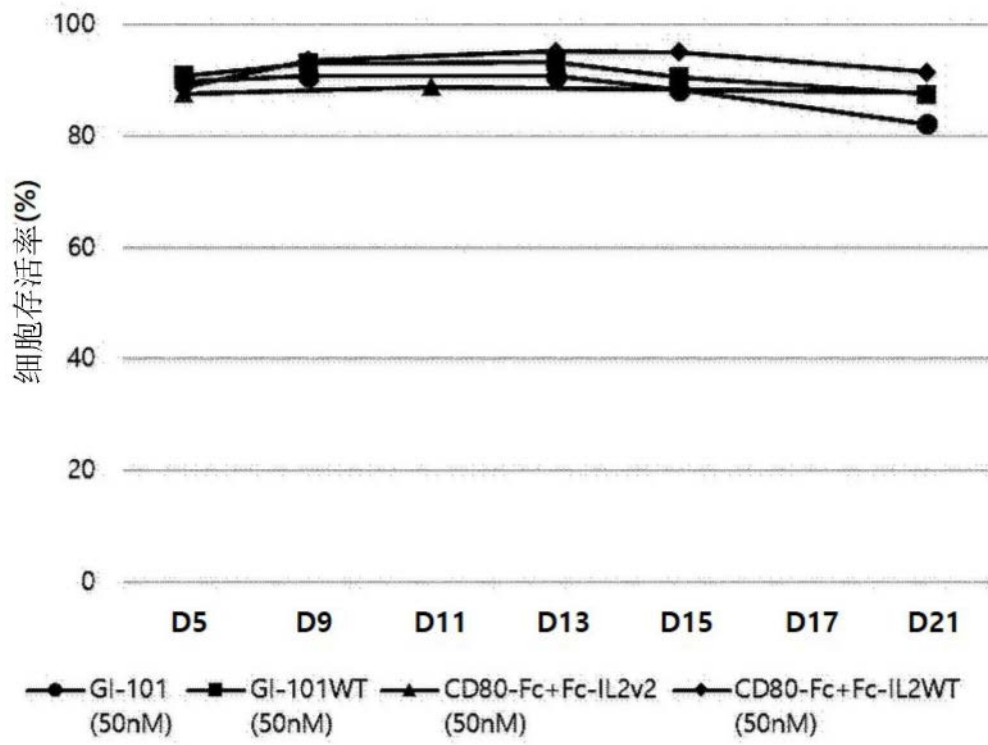


图10A

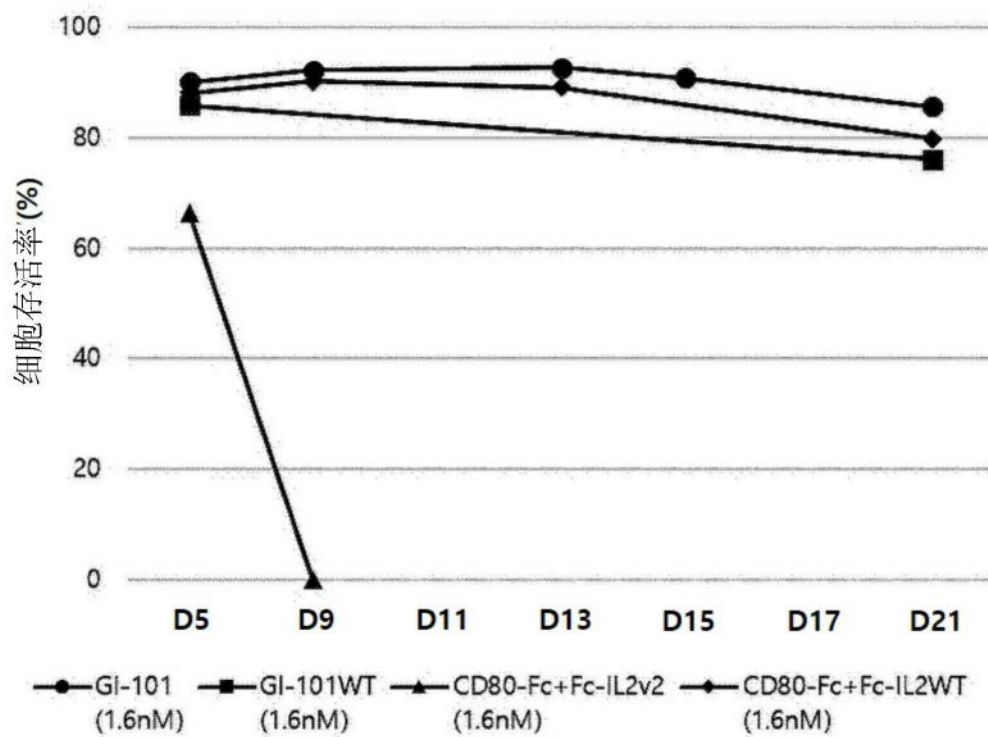


图10B

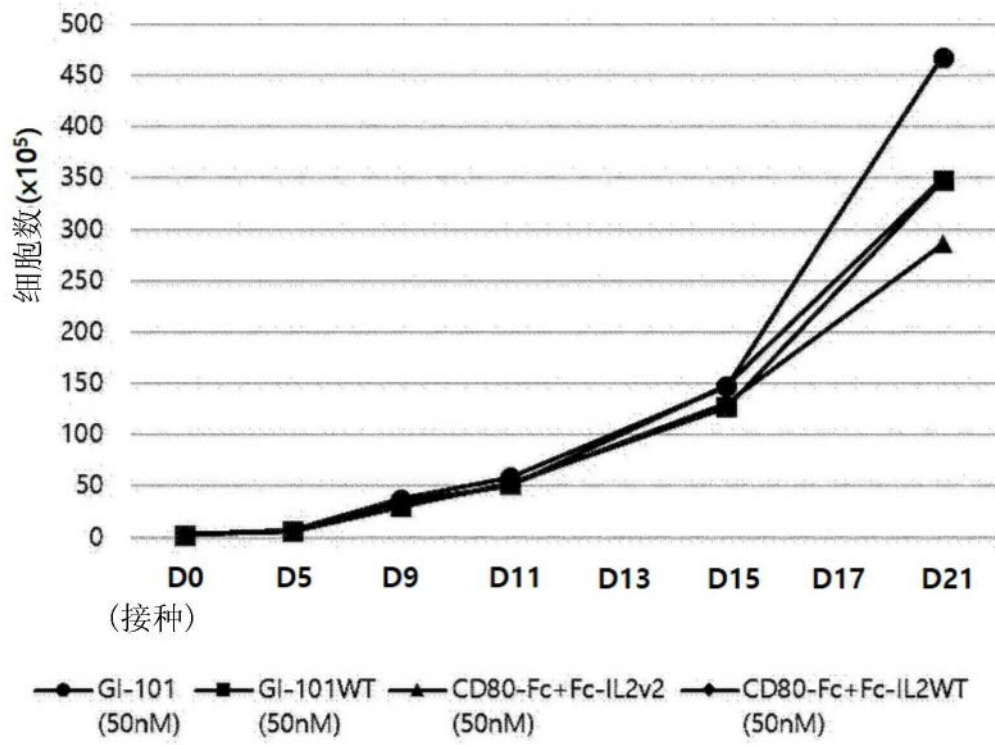


图11A

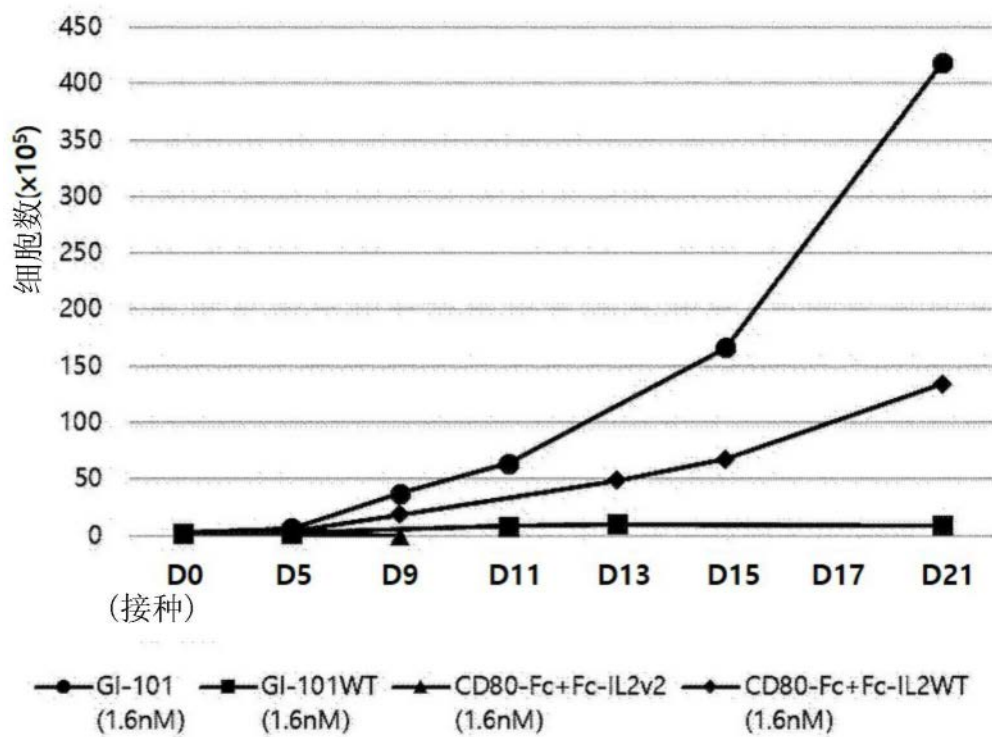


图11B

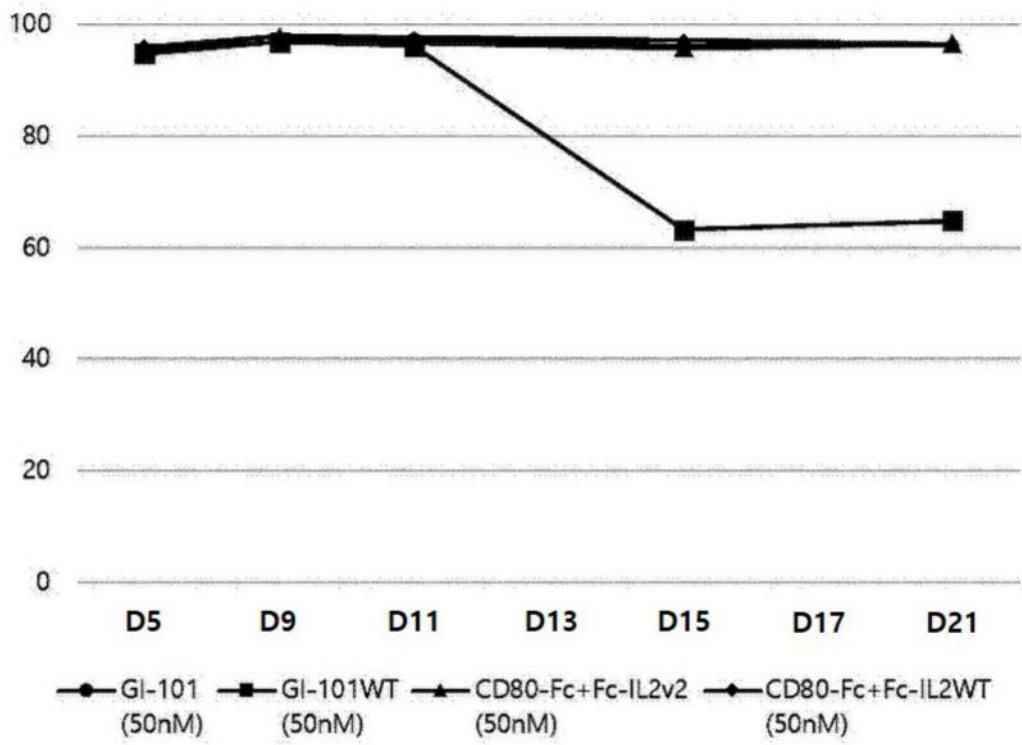


图12A

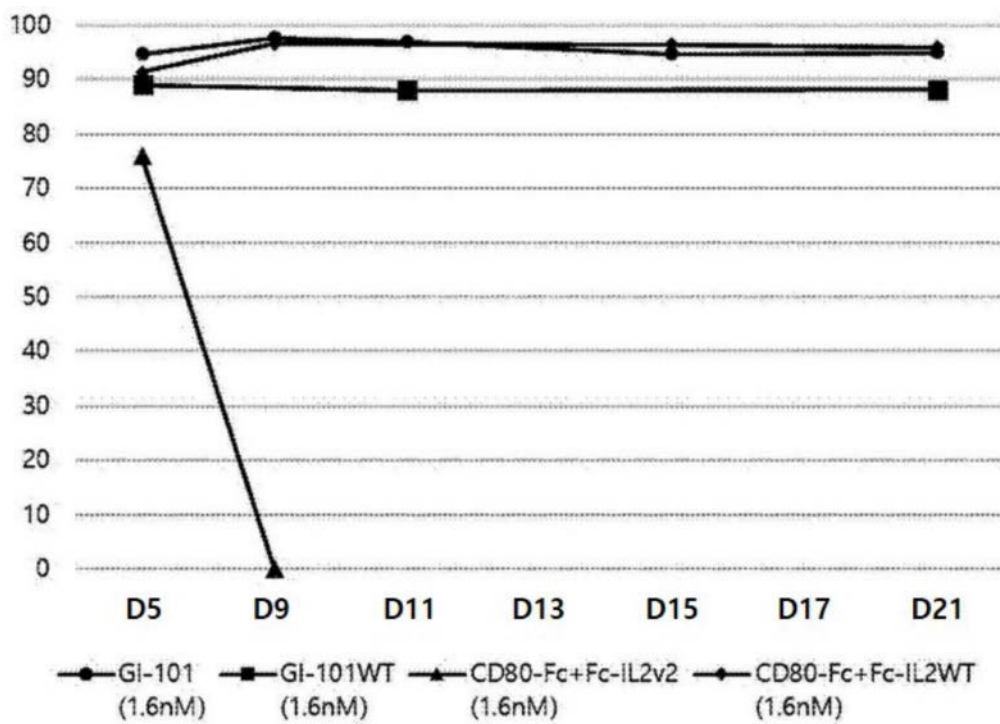


图12B

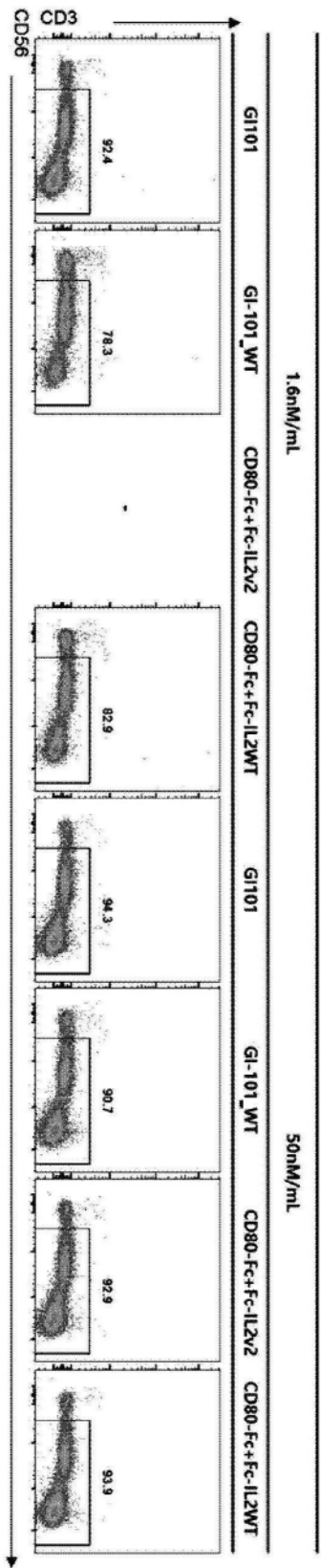


图13

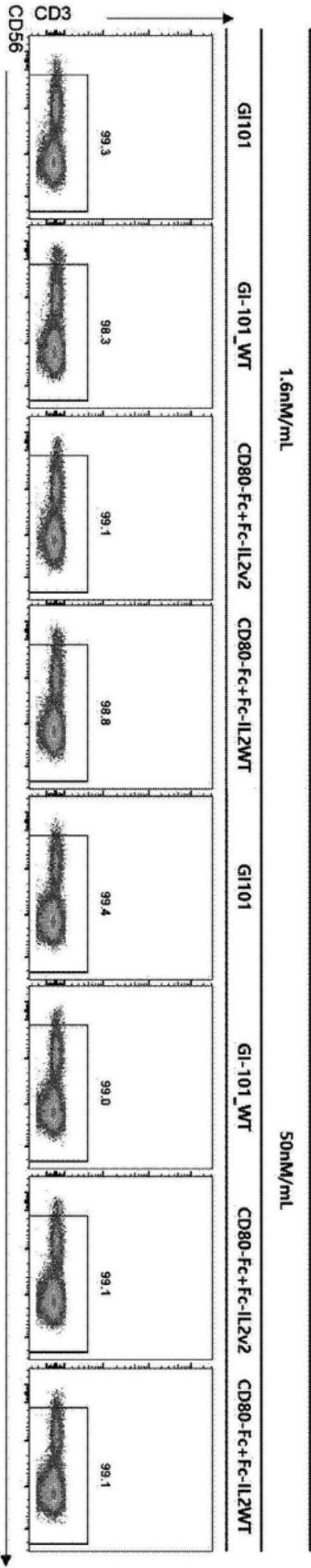


图14

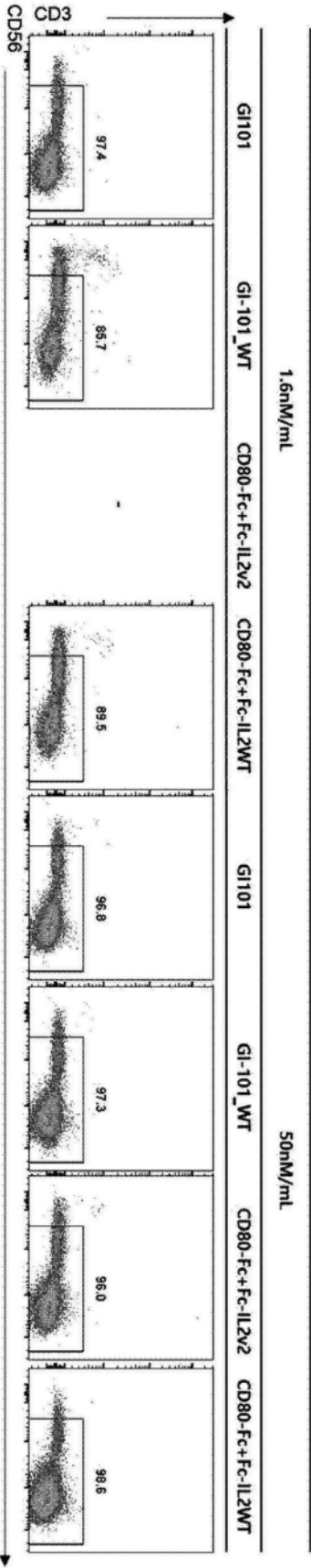


图15

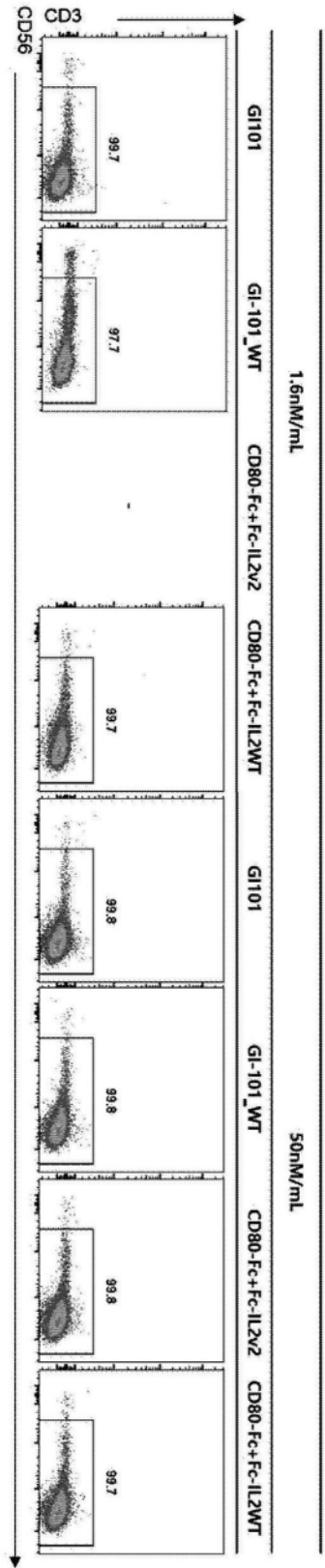


图16

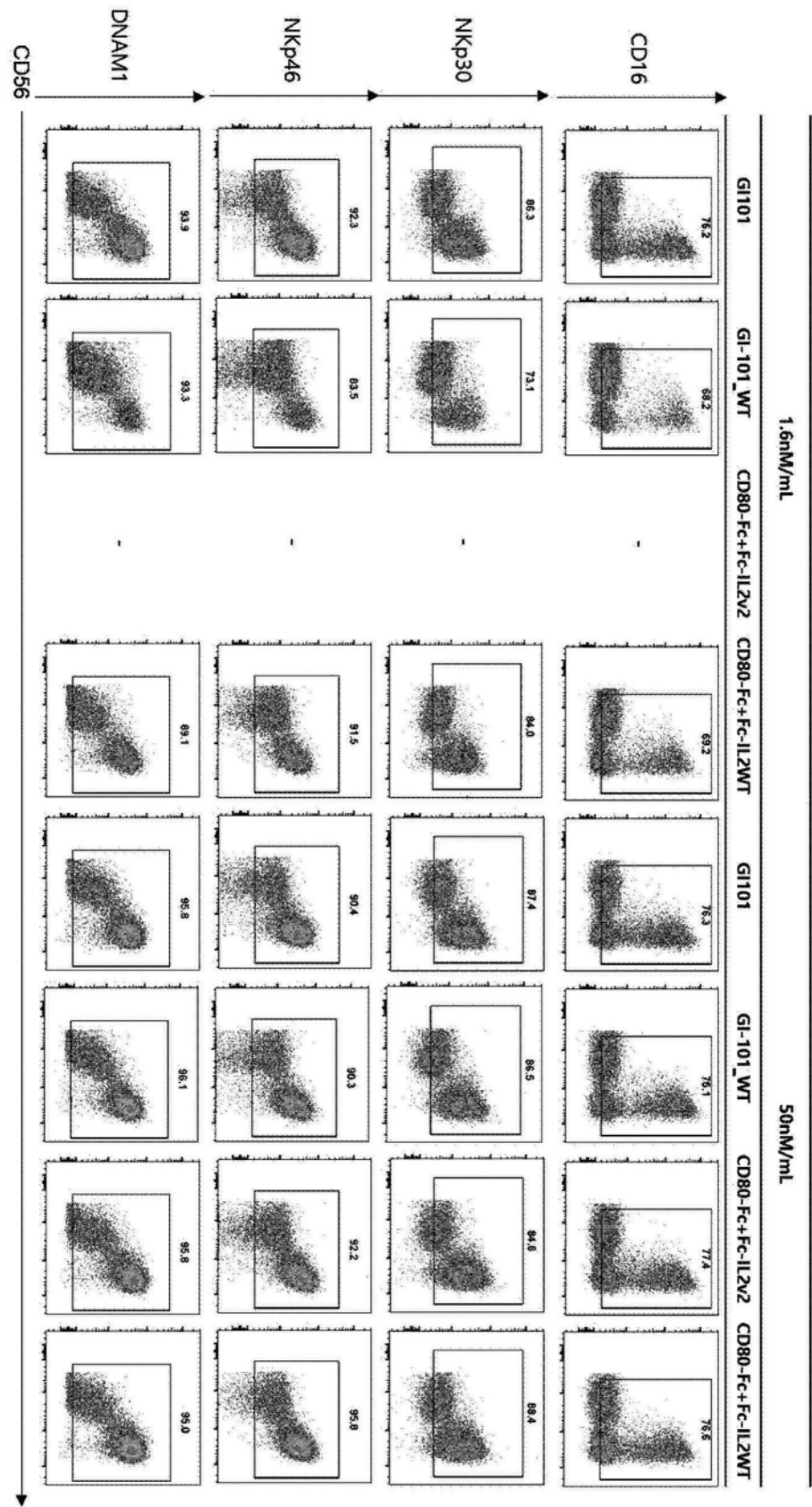


图17

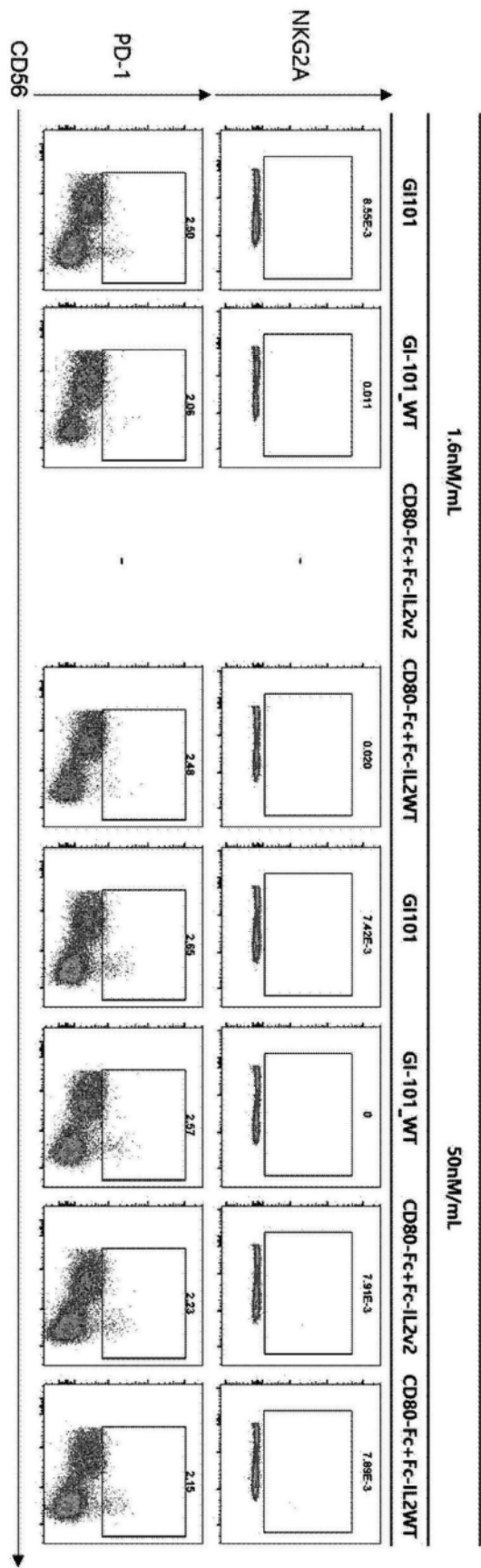


图18

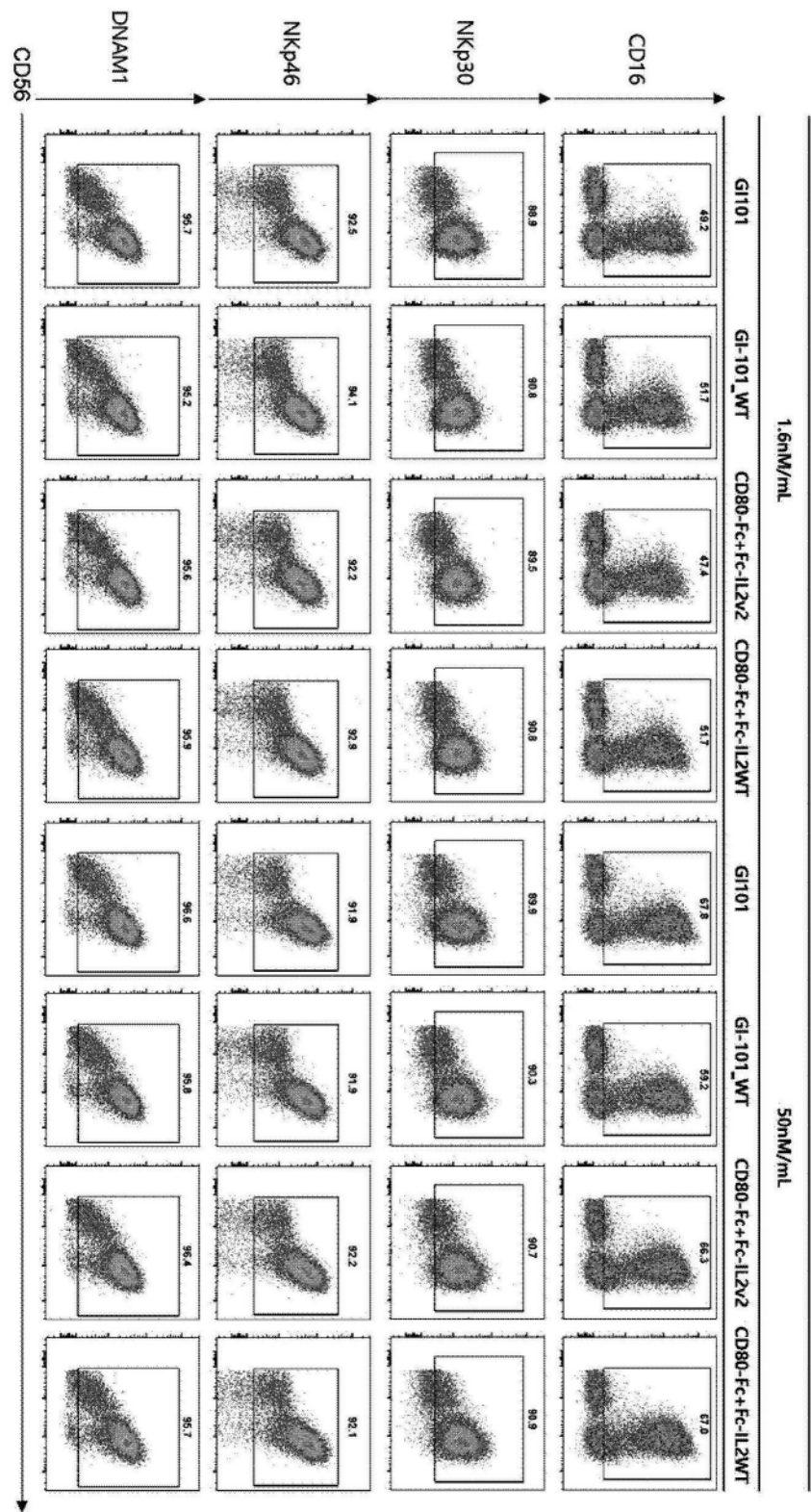


图19

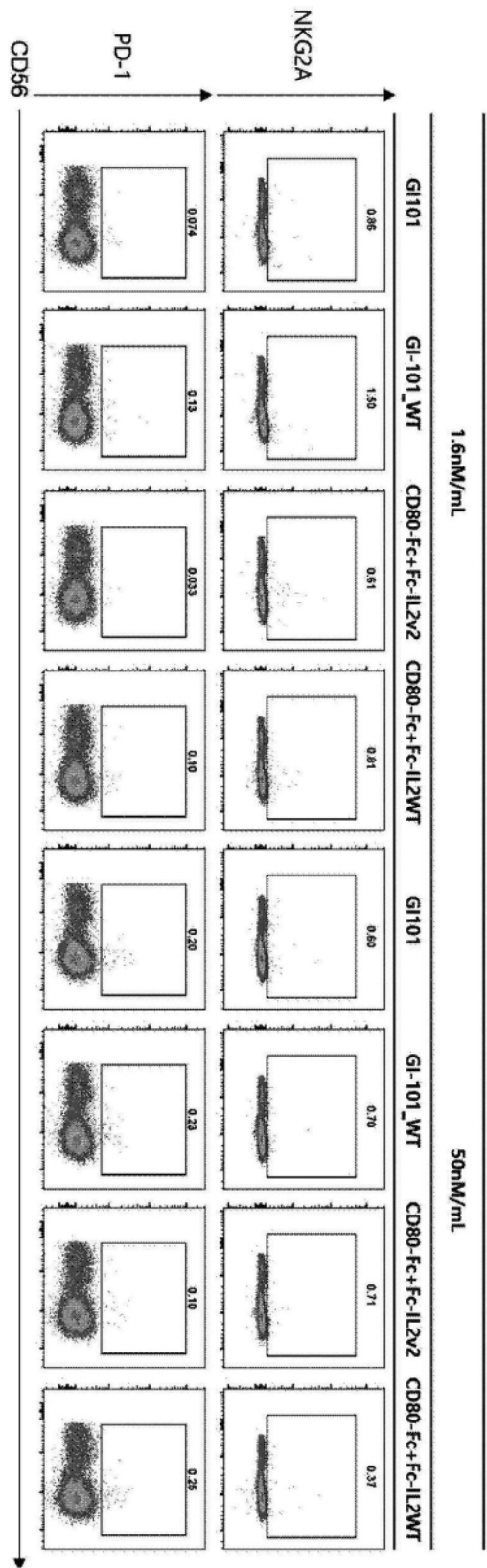


图20

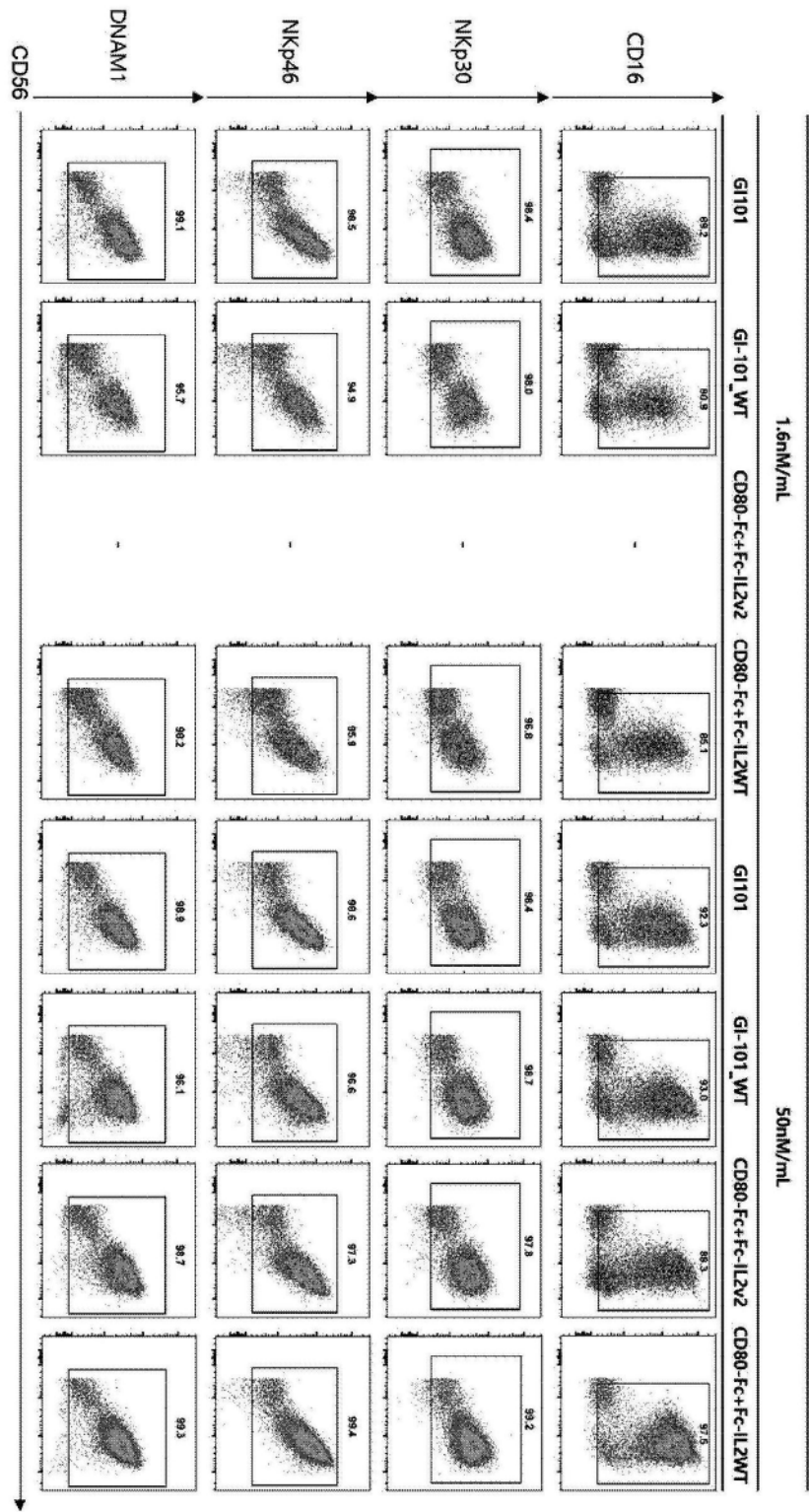


图21

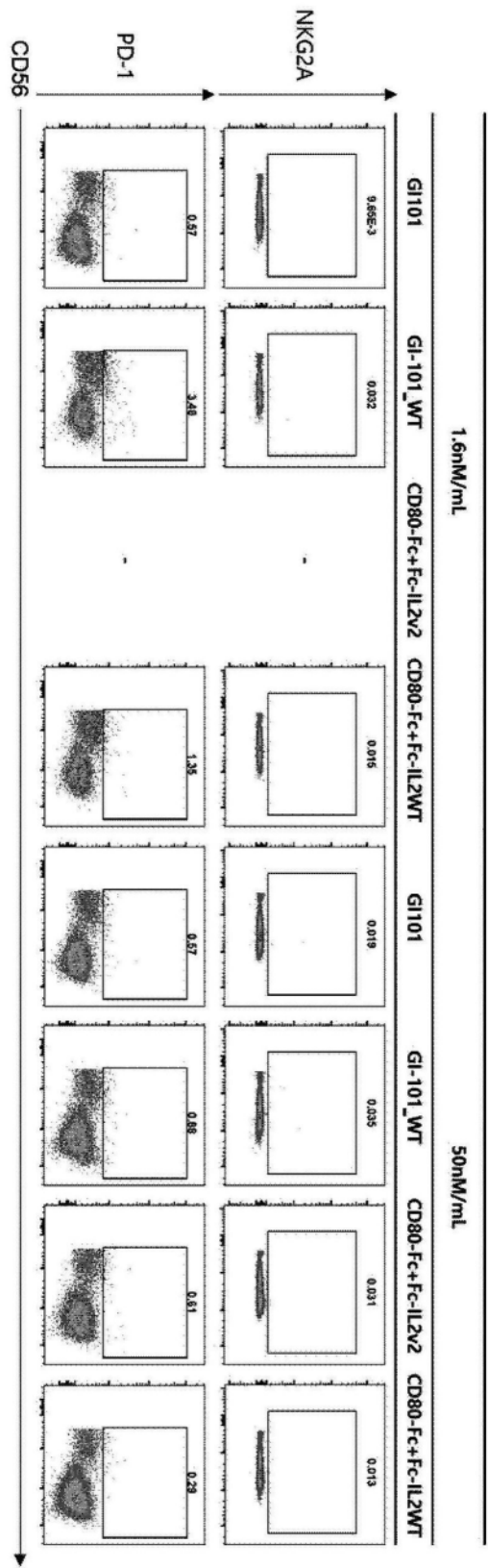


图22

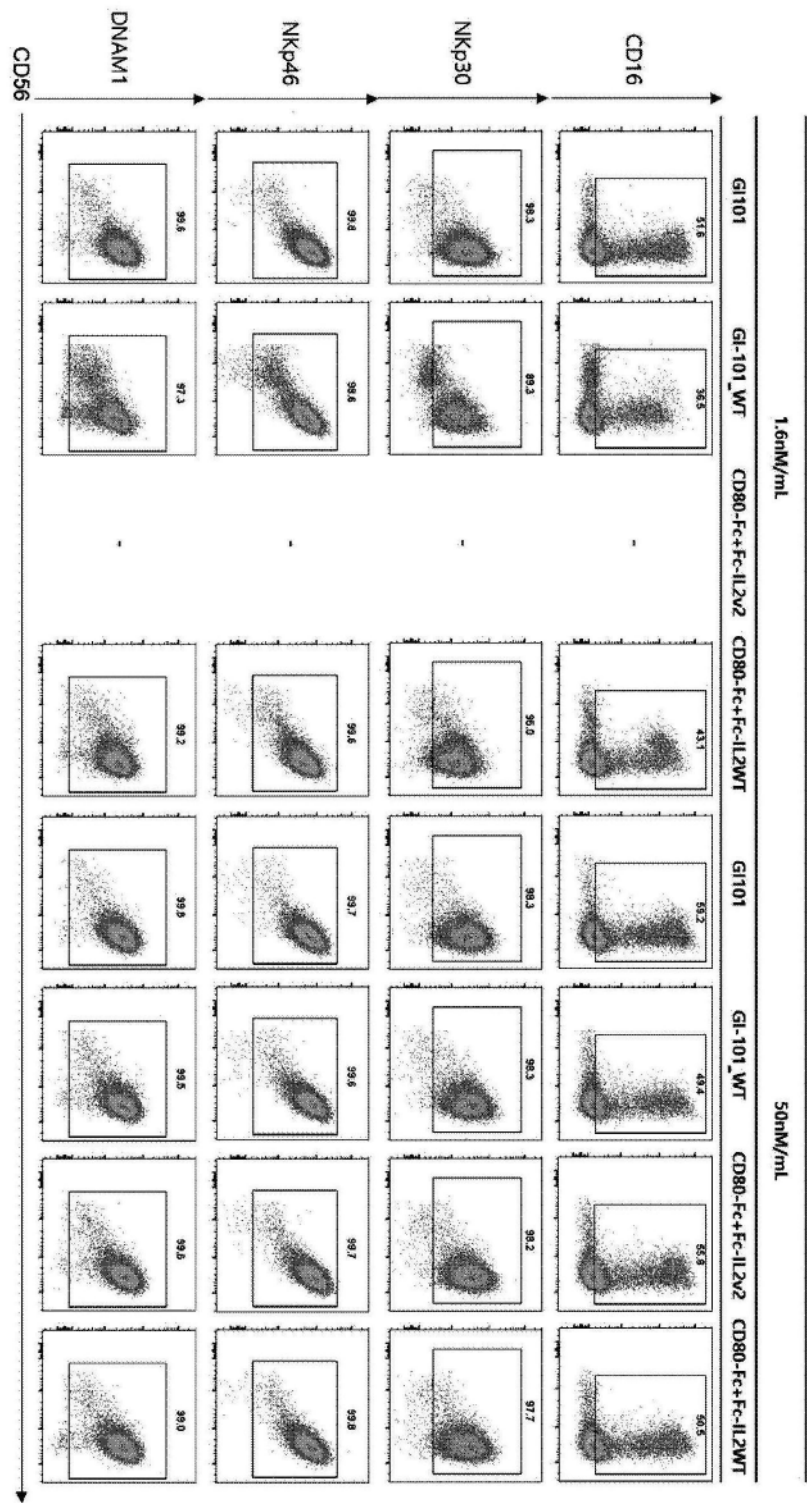


图23

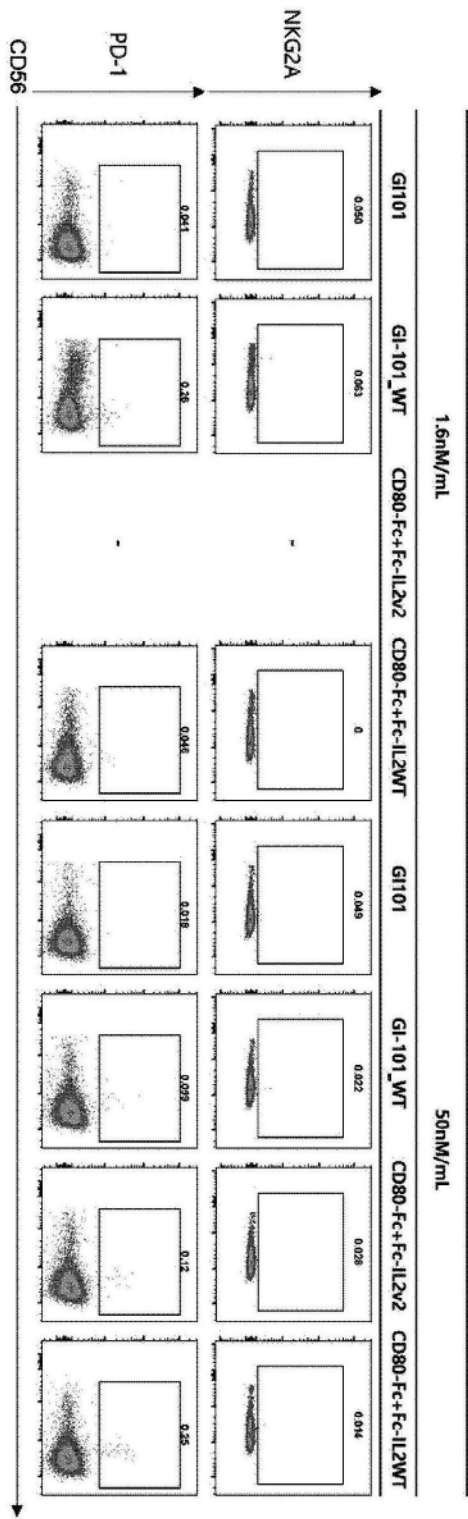


图24

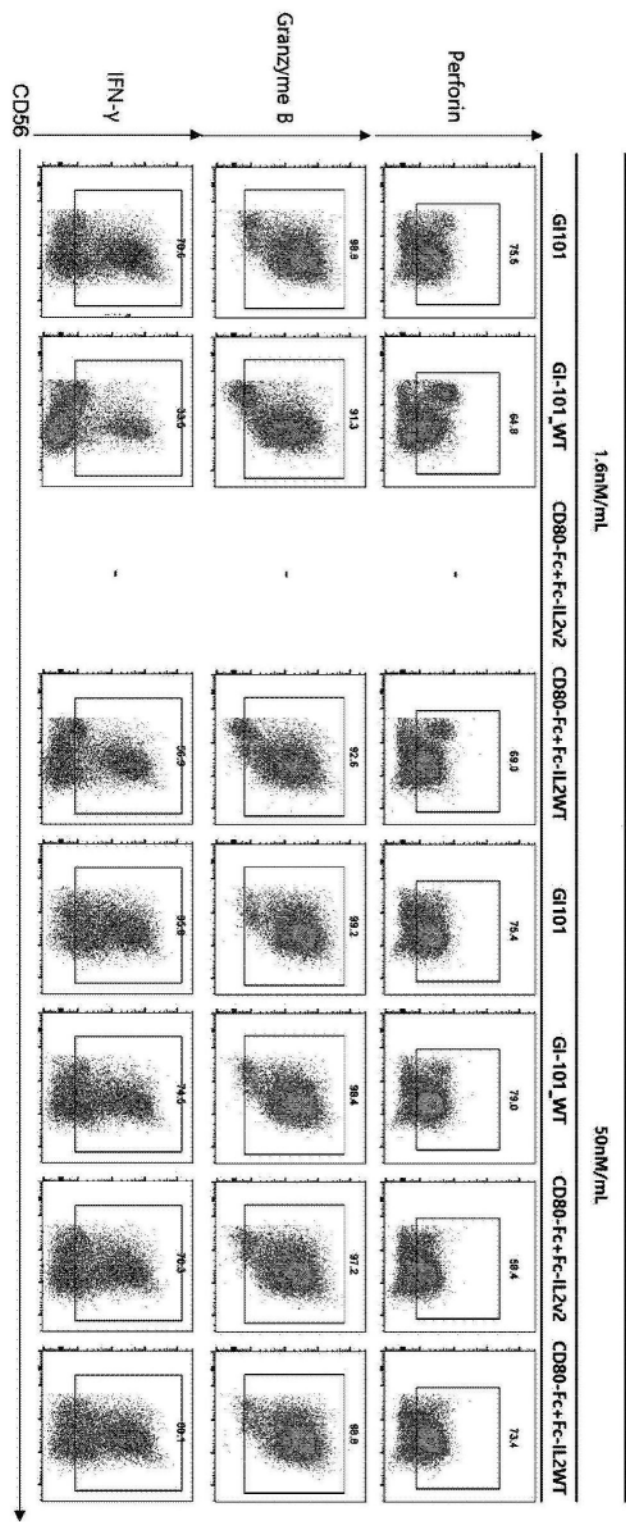


图25

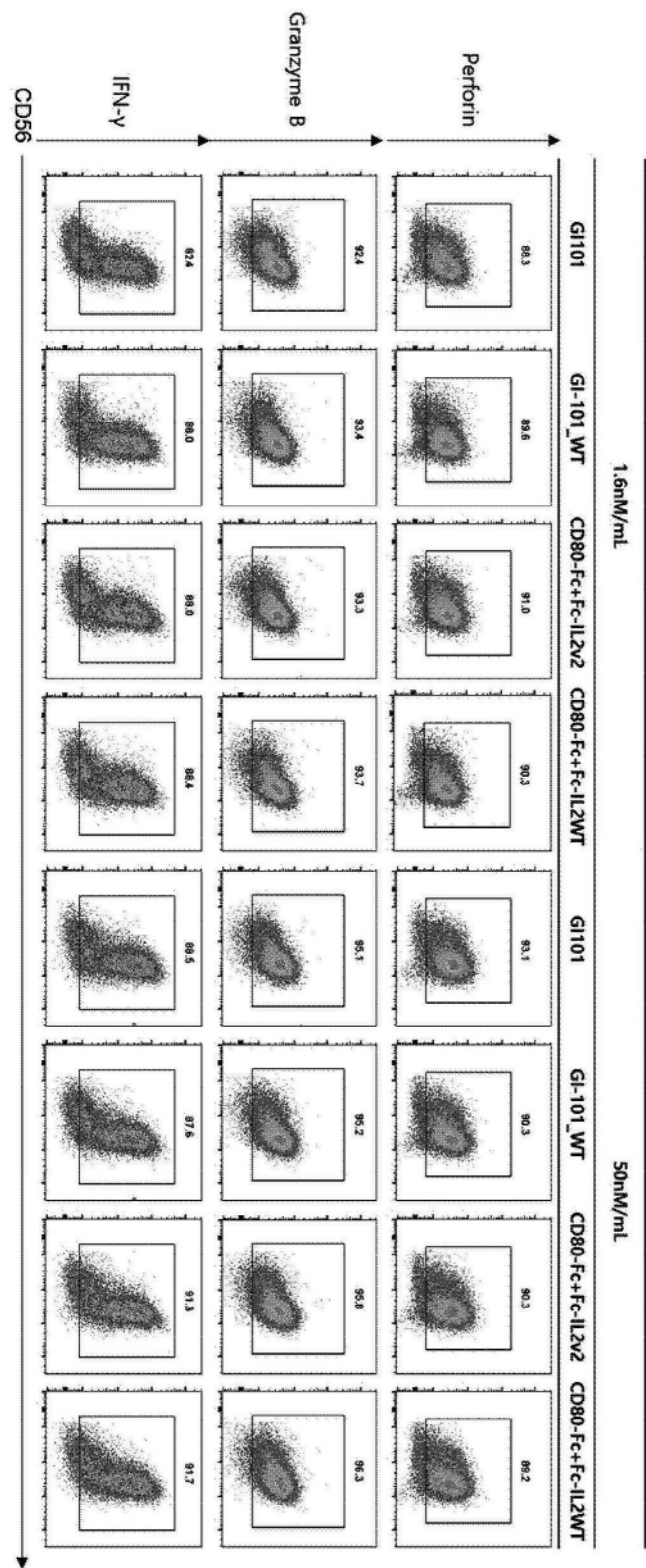


图26

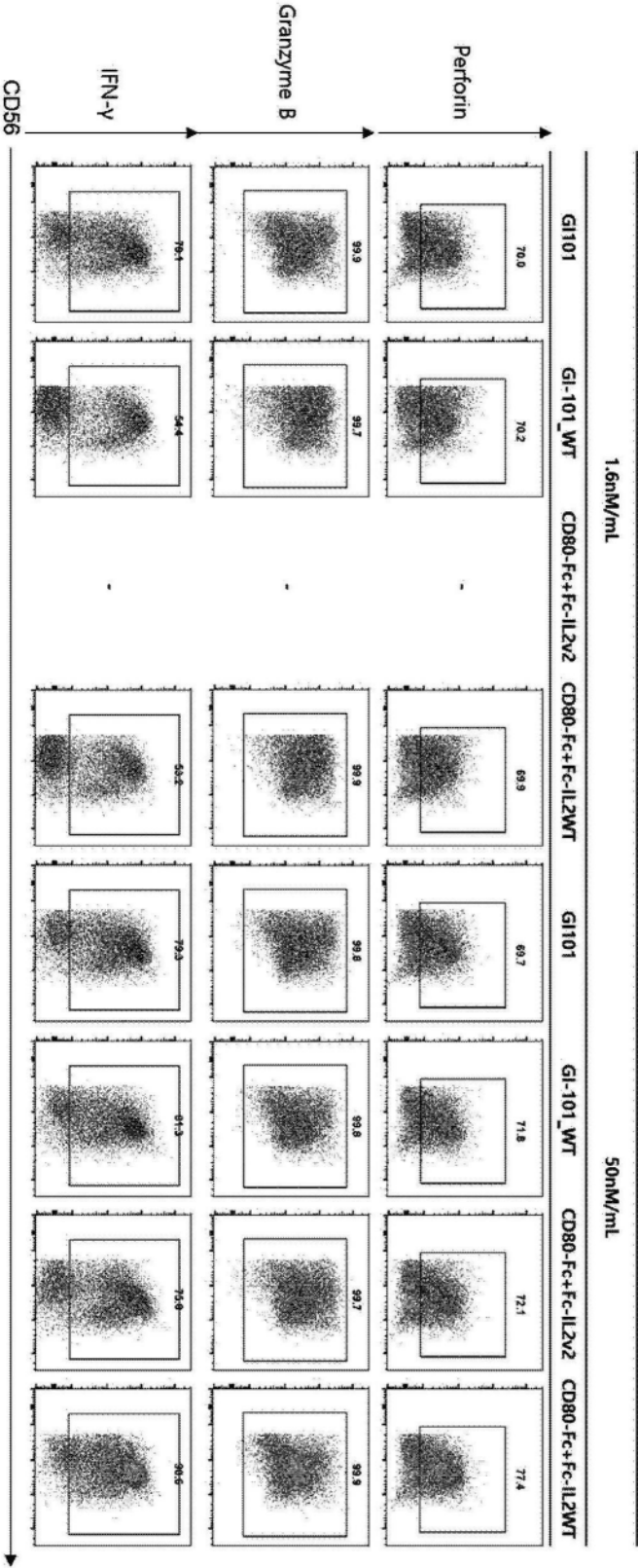


图27

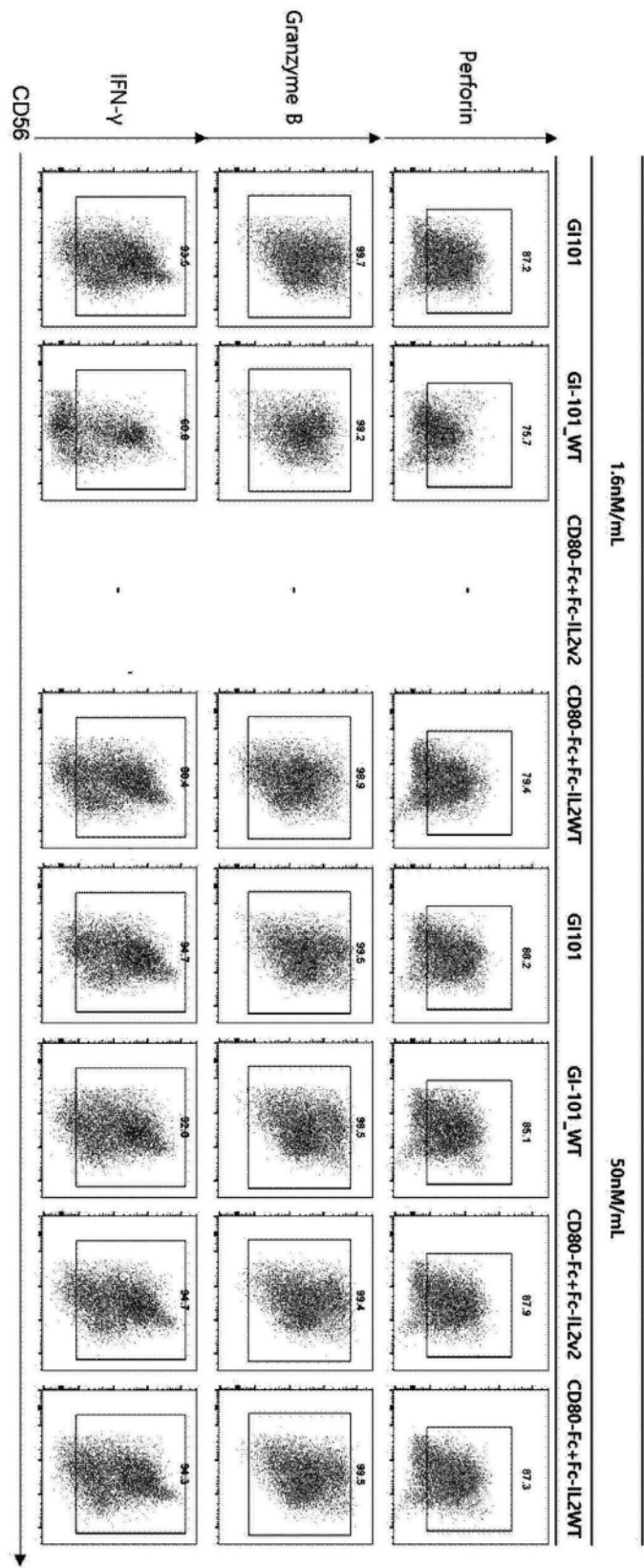


图28

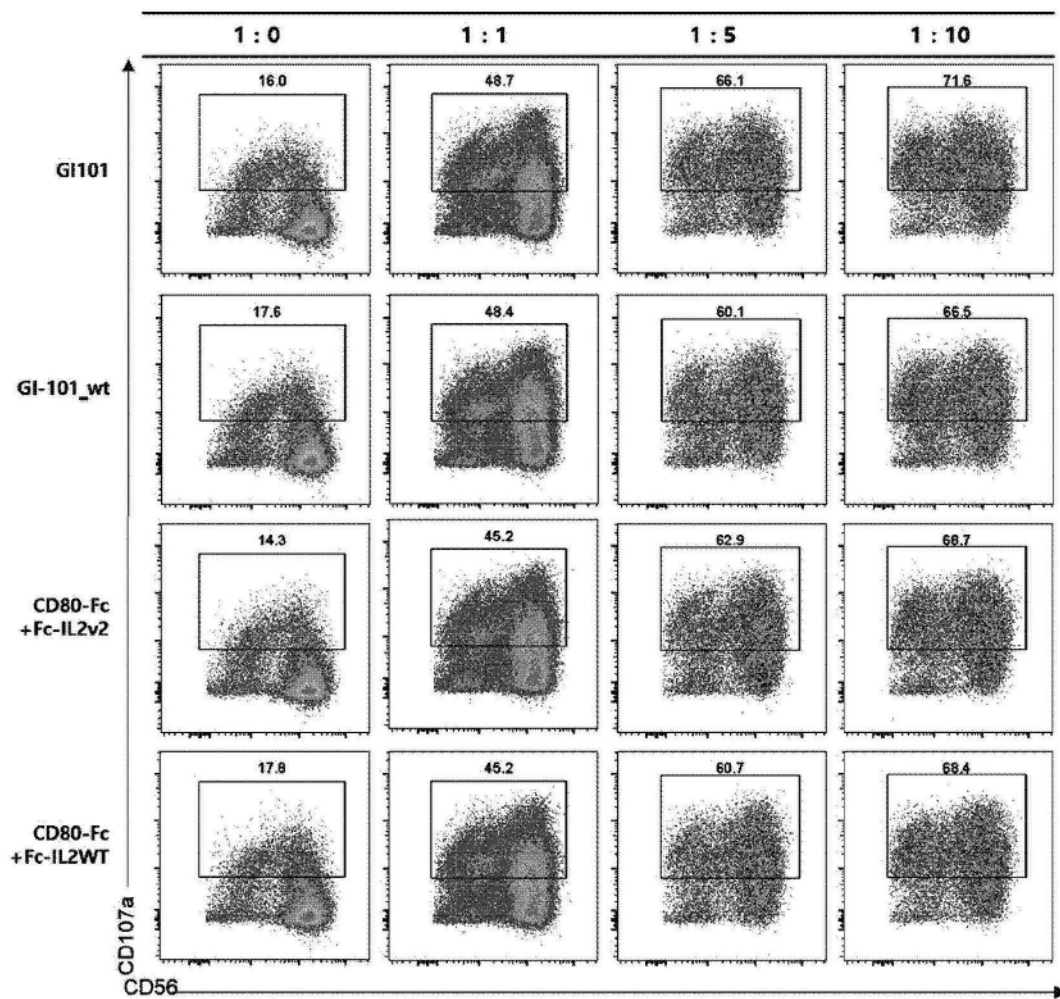


图29

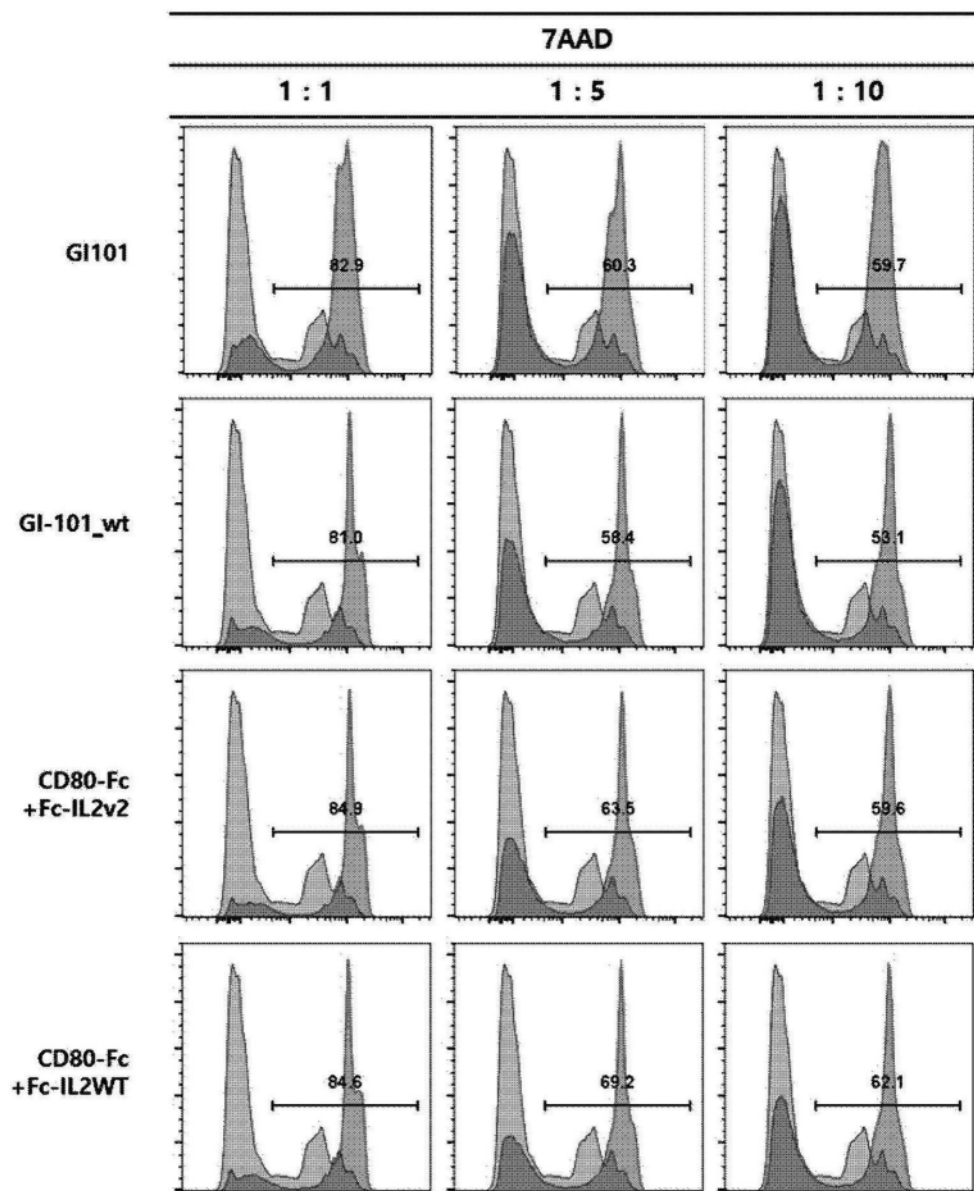


图30

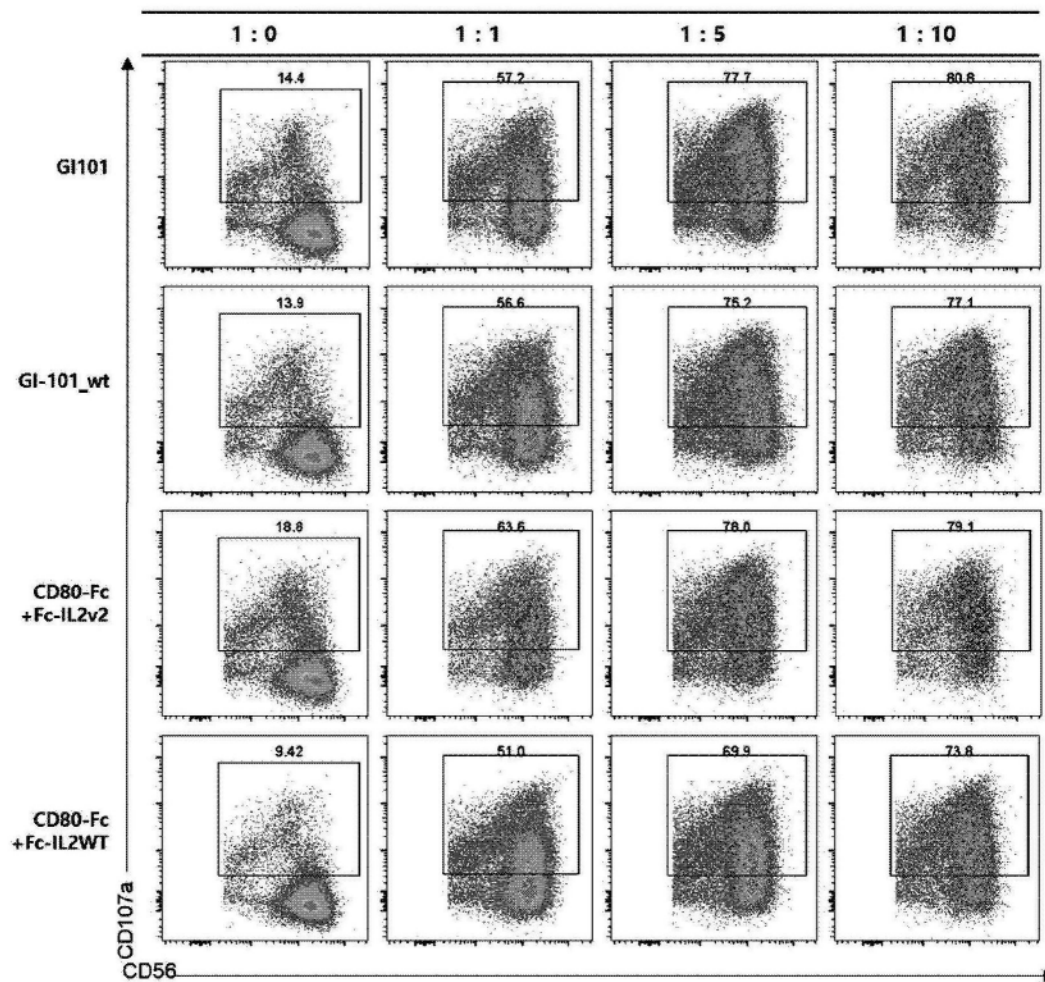


图31

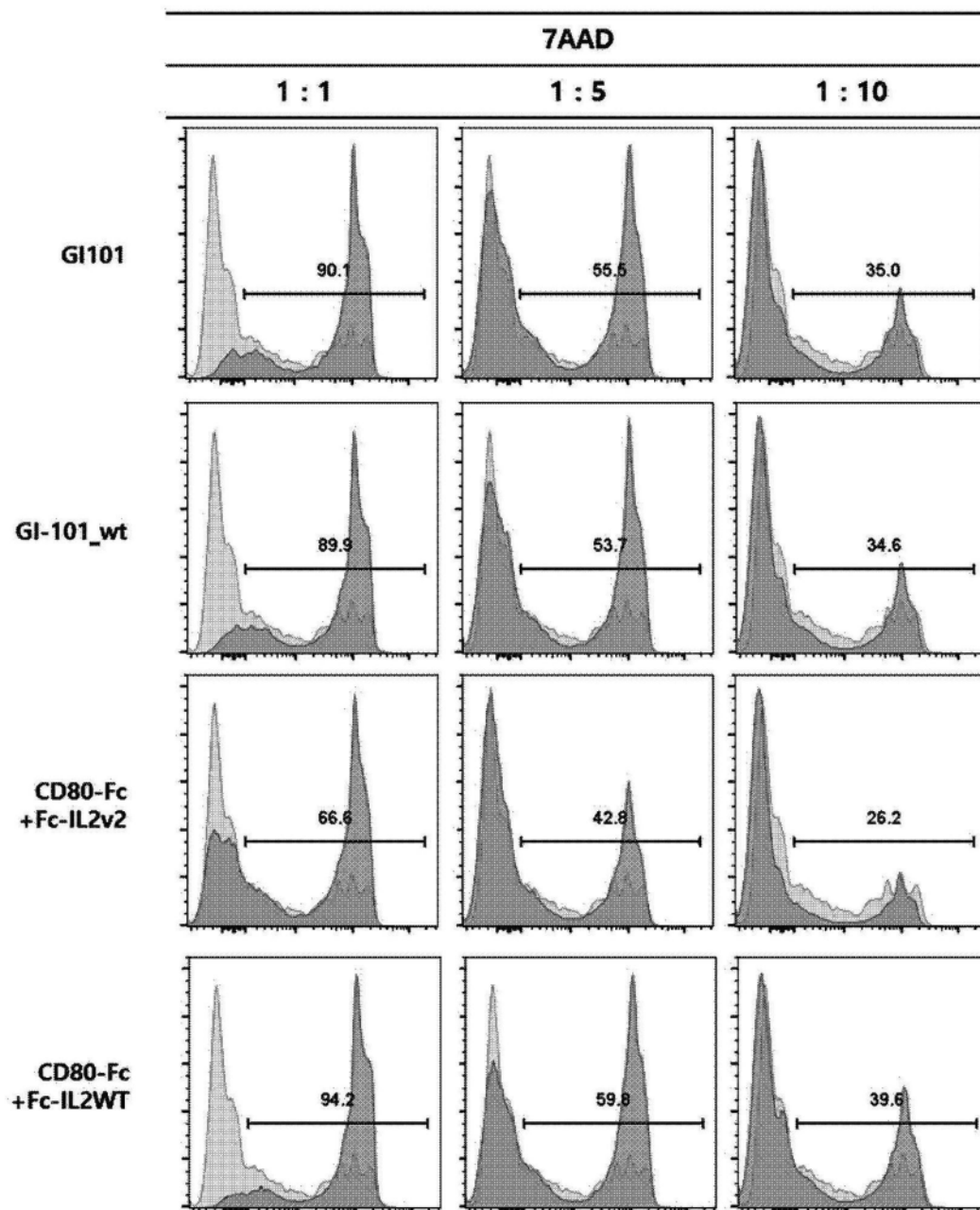


图32

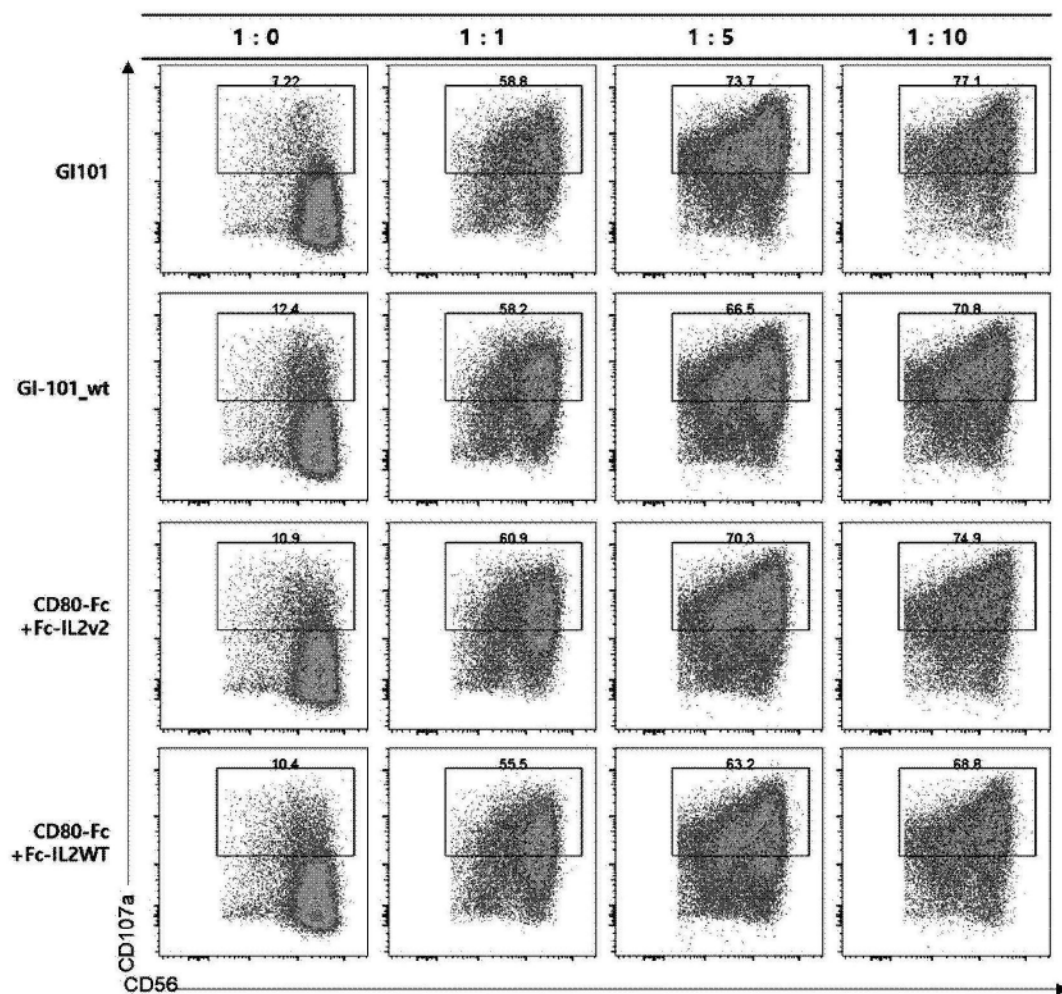


图33

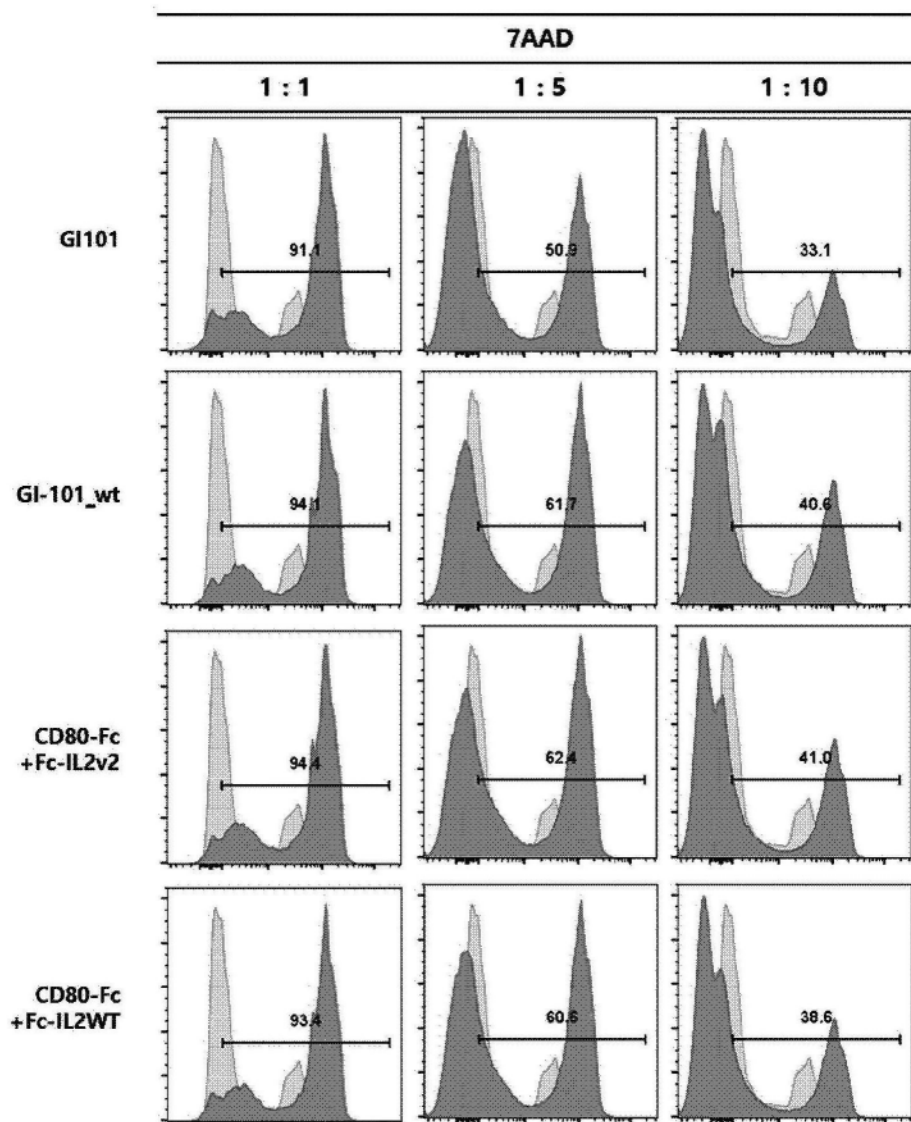


图34