



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 109790211 B

(45) 授权公告日 2024. 03. 26

(21) 申请号 201780059356.4

(22) 申请日 2017.07.31

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109790211 A

(43) 申请公布日 2019.05.21

(30) 优先权数据
62/369,883 2016.08.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.03.26

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/044615 2017.07.31

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/026691 EN 2018.02.08

(73) 专利权人 美国卫生和人力服务部
地址 美国马里兰州

(72) 发明人 埃里克·特兰 保罗·F·罗宾斯

史蒂文·A·罗森伯格

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204
专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/82 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 2016085904 A1,2016.06.02
US 2014137274 A1,2014.05.15
US 2016089434 A1,2016.03.31
Qiong J Wang,et al.Identification of
T-cell Receptors Targeting KRAS-Mutated
Human Tumors.《Cancer Immunol Res.》.2015,
第4卷(第3期),

审查员 李雪莹

权利要求书2页 说明书29页
序列表34页 附图10页

(54) 发明名称

抗KRAS-G12D T细胞受体

(57) 摘要

公开了分离的或纯化的T细胞受体(TCR),其具有针对在HLA-Cw*0802分子的背景下呈递的突变的Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(KRAS)的抗原特异性。还提供了相关的多肽和蛋白以及相关的核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群和药物组合物。还公开了检测哺乳动物中癌症存在的方法以及治疗或预防哺乳动物中癌症的方法。

1. 分离的或纯化的KRAS G12D特异性TCR,其包含氨基酸序列为SEQ ID NO:25的 α 链CDR1、氨基酸序列为SEQ ID NO:26的 α 链CDR2、氨基酸序列为SEQ ID NO:27的 α 链CDR3、氨基酸序列为SEQ ID NO:28的 β 链CDR1、氨基酸序列为SEQ ID NO:29的 β 链CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:30的 β 链CDR3。

2. 如权利要求1所述的分离的或纯化的TCR,其包含氨基酸序列为SEQ ID NO:31的 α 链可变区和氨基酸序列为SEQ ID NO:32的 β 链可变区。

3. 如权利要求1或2所述的分离的或纯化的TCR,其还包含:

(A) SEQ ID NO:46的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:46的第48位的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:46的第112位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:46的第114位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;

并且

(iv) SEQ ID NO:46的第115位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

和

(B) SEQ ID NO:47的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:47的第57位的X是Ser或Cys。

4. 如权利要求1或2所述的分离的或纯化的TCR,其包含氨基酸序列为SEQ ID NO:54的 α 链和氨基酸序列为SEQ ID NO:55的 β 链。

5. 分离的或纯化的多肽,其包含对由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的突变表位具有抗原特异性的TCR的功能部分,其中所述功能部分包含:

氨基酸序列为SEQ ID NO:25的TCR α 链CDR1、氨基酸序列为SEQ ID NO:26的TCR α 链CDR2、氨基酸序列为SEQ ID NO:27的TCR α 链CDR3、氨基酸序列为SEQ ID NO:28的TCR β 链CDR1、氨基酸序列为SEQ ID NO:29的TCR β 链CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:30的TCR β 链CDR3。

6. 如权利要求5所述的分离的或纯化的多肽,其包含氨基酸序列为SEQ ID NO:31的TCR α 链可变区和氨基酸序列为SEQ ID NO:32的TCR β 链可变区。

7. 如权利要求5或6所述的分离的或纯化的多肽,其还包含:

(A) SEQ ID NO:46的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:46的第48位的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:46的第112位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:46的第114位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;

并且

(iv) SEQ ID NO:46的第115位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

和

(B) SEQ ID NO:47的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:47的第57位的X是Ser或Cys。

8. 如权利要求5或6所述的分离的或纯化的多肽,其包含氨基酸序列为SEQ ID NO:54的TCR α 链和氨基酸序列为SEQ ID NO:55的TCR β 链。

9. 分离的或纯化的蛋白,其对由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的突变表位具有抗原特异性,其中所述蛋白包含TCR α 链和TCR β 链,所述TCR α 链包含氨基酸序列为SEQ ID NO:25的TCR α 链CDR1、氨基酸序列为SEQ ID NO:26的TCR α 链CDR2、氨基酸序列为SEQ ID NO:27的

TCR α 链CDR3,所述TCR β 链包含氨基酸序列为SEQ ID NO:28的TCR β 链CDR1、氨基酸序列为SEQ ID NO:29的TCR β 链CDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:30的TCR β 链CDR3。

10. 如权利要求9所述的分离的或纯化的蛋白,其包含含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的TCR α 链和含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的TCR β 链。

11. 如权利要求9或10所述的分离的或纯化的蛋白,其中:

(A) 所述TCR α 链还包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:46的第48位的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:46的第112位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:46的第114位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;

并且

(iv) SEQ ID NO:46的第115位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

并且

(B) 所述TCR β 链还包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:47的第57位的X是Ser或Cys。

12. 如权利要求9或10所述的分离的或纯化的蛋白,其中:

所述TCR α 链包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列并且所述TCR β 链包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列。

13. 分离的或纯化的核酸,其包含编码权利要求1-4中任一项所述的TCR、权利要求5-8中任一项所述的多肽、或权利要求9-12中任一项所述的蛋白的核苷酸序列。

14. 重组表达载体,其包含权利要求13所述的核酸。

15. 分离的或纯化的宿主细胞,其包含权利要求14所述的重组表达载体。

16. 细胞群,其包含至少一种权利要求15所述的分离的或纯化的宿主细胞。

17. 药物组合物,其包含权利要求1-4中任一项所述的TCR、权利要求5-8中任一项所述的多肽、权利要求9-12中任一项所述的蛋白、权利要求13所述的核酸、权利要求14所述的重组表达载体、权利要求15所述的宿主细胞、或权利要求16所述的细胞群,以及药学上可接受的载体。

18. 权利要求1-4中任一项所述的TCR、权利要求5-8中任一项所述的多肽、权利要求9-12中任一项所述的蛋白、权利要求13所述的核酸、权利要求14所述的重组表达载体、权利要求15所述的宿主细胞、权利要求16所述的细胞群、或权利要求17所述的药物组合物在制备用于检测、治疗或预防哺乳动物中癌症的药物中的用途,其中所述癌症是KRAS G12D阳性癌症。

19. 如权利要求18所述的用途,其中所述KRAS G12D阳性癌症是胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌或前列腺癌。

抗KRAS-G12D T细胞受体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2016年8月2日提交的美国临时专利申请第62/369,883号的权益,所述临时专利申请通过引用整体并入本文。

[0003] 以电子方式提交的材料通过引用并入

[0004] 通过引用整体并入本文的是随本文同时提交的并且如下确定的计算机可读的核苷酸/氨基酸序列表:名称为“728242_ST25.txt”,日期为2017年7月26日的一份60,828字节ASCII(文本)文件。

[0005] 关于在政府资助的研究或开发中完成的发明的权利声明

[0006] 本发明是由国立卫生研究院国家癌症研究所在项目号ZIABC 010984的政府资助下完成的。政府享有本申请的某些权利。

[0007] 发明背景

[0008] 一些癌症可具有非常有限的治疗选择,特别是当癌症转移和不可切除时。尽管在诸如例如手术、化疗和放射疗法的治疗中取得进展,但诸如例如胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌和前列腺癌的许多癌症的预后可能很差。因此,存在对癌症的另外治疗的未得到满足的需求。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明的一个实施方案提供了分离的或纯化的TCR,其包含以下的氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:9-14;(b)SEQ ID NO:17-22;(c)SEQ ID NO:25-30;或(d)SEQ ID NO:33-38。

[0011] 本发明的另一个实施方案提供了分离的或纯化的多肽,其包含以下的氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:9-14;(b)SEQ ID NO:17-22;(c)SEQ ID NO:25-30;或(d)SEQ ID NO:33-38。

[0012] 本发明的另一个实施方案提供了分离的或纯化的蛋白,其包含:(a)含有SEQ ID NO:9-11的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:12-14的氨基酸序列的第二多肽链;(b)含有SEQ ID NO:17-19的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:20-22的氨基酸序列的第二多肽链;(c)含有SEQ ID NO:25-27的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:28-30的氨基酸序列的第二多肽链;或(d)含有SEQ ID NO:33-35的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:36-38的氨基酸序列的第二多肽链。

[0013] 本发明还提供了涉及本发明的TCR、多肽和蛋白的相关的核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群和药物组合物。

[0014] 本发明还提供了检测哺乳动物中癌症存在的方法以及治疗或预防哺乳动物中癌症的方法。

[0015] 附图中几个视图的简述

[0016] 图1A是显示IFN- γ 产生(斑点/2e4个细胞)的图,如通过与用不相关的串联小基因(TMG)RNA(实心圆圈),或编码通过全外显子和转录组测序鉴定的61个突变的指示的TMG构建体(TMG-1(星形)、TMG-2(Δ)、TMG-3(∇)、TMG-4(空心菱形)、TMG-5(实心菱形))转染的自体树突细胞共培养后,24个单独的TIL培养物的ELISPOT测定所确定的。

[0017] 图1B是显示在与用不相关的TMG RNA或TMG-1转染的或与用TMG-1编码的突变长肽一起孵育过夜的树突细胞(DC)共培养后,TIL培养物#6的通过ELISPOT测定所确定的IFN- γ 产生(斑点/2e4个细胞)(左轴;无阴影柱条)和CD8+T细胞上的4-1BB表达(%)的流式细胞术分析(右轴;阴影柱条)的图。

[0018] 图1C是显示在与用指示的TMG RNA转染的或与24-AA长的KRAS-野生型(WT)或KRAS^{G12D}肽一起孵育过夜的DC共培养后,输注产物(在经历临床级的快速扩增后TIL培养物#6)的通过ELISPOT测定所确定的IFN- γ 产生(左轴;无阴影柱条)和CD8+T细胞上的4-1BB表达(%)的流式细胞术分析(右轴;阴影柱条)的图。

[0019] 图2A-2D是显示TCR-V β 深度测序分析结果的图,所述TCR-V β 深度测序分析定量在输注产物(Rx1,填实柱条)、在细胞转移之前的三种转移性肺样品(Tu-1,菱形;Tu-2A,方形;和Tu-2B,三角形)、细胞转移后的一种进展性病变(Tu-Pro,倒三角形)、以及细胞输注之前和之后不同时间点的患者外周血(圆圈)中的四种鉴定的KRAS^{G12D}-反应性T细胞克隆中的每一种的频率。括号中的数字表示给定样品中TCR序列的排名。 $\otimes$ 和ND,未检测到(<0.0002%)。A (TRAV4/TRBV5-6(A))。B (TRAV12-2/TRBV10-2)。C (TRAV4/TRBV5-6(B))。D (TRAV4/TRBV5-6(C))。

[0020] 图3A-3D是显示与用滴定量的KRAS野生型(WT)9-mer(空心圆圈)、G12D突变体KRAS 9mer(实心圆圈)、KRAS WT 10-mer(空心三角形)或KRAS G12D突变体KRAS 10-mer肽(实心三角形)孵育的自体PBMC进行共培养过夜后,用包含以下氨基酸序列的TCR工程改造的T细胞上T细胞活化标志物4-1BB的表达的图:SEQ ID NO:50和51 (TRAV4/TRBV5-6(A)) (图3A), SEQ ID NO:56和57 (TRAV12-2/TRBV10-2) (图3B), SEQ ID NO:54和55 (TRAV4/TRBV5-6(B)) (图3C),或SEQ ID NO:52和53 (TRAV4/TRBV5-6(C)) (图3D)。

[0021] 图4A和4B是显示与用不表达(模拟)或表达HLA-C*08:02等位基因的两种KRAS^{G12D}-阳性胰腺癌细胞系共培养过夜后,具有指示的TCR的基因工程改造的T细胞的IFN- γ 产生(斑点/2e4个细胞)(A)和4-1BB表达(B)的图。TRBV5-6(A) TCR(无阴影柱条);TRBV10-02TCR(阴影柱条);TRBV5-6(B) TCR(水平条纹);TRBV5-6(C) TCR(斜条纹)。MD,MDA-Panc48;HP,HPAC。流式细胞术数据在CD8+KRAS^{G12D}-特异性TCR+细胞上进行门控。“>”大于~500个斑点(不精确)。

[0022] 图5A-5D是显示与用全长野生型(wt)KRAS(无阴影柱条)或KRAS-G12D基因(阴影柱条)和指示的HLA等位基因转导的靶COS细胞共培养过夜后,具有指示的TCR的基因工程改造的T细胞的4-1BB表达(%)的图。TRBV5-6(A) TCR(图5A);TRBV10-02TCR(图5B);TRBV5-6(B) TCR(图5C);TRBV5-6(C) TCR(图5D)。

[0023] 发明详述

[0024] Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(KRAS),也被称为GTP酶KRas、V-Ki-Ras2Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因或KRAS2,是小GTP酶超家族的成员。KRAS有两种转录物变体:KRAS变体A和KRAS变体B。下文中,除非另有说明,否则提及“KRAS”(突变或未突变的)是指变体A和变体B。不受特定理论或机制的束缚,认为,当突变时,KRAS可在许多人类癌症的瘤形成早期参与信号转导。单个氨基酸取代可以活化蛋白。当活化时,突变的KRAS结合鸟苷-5'-三磷酸(GTP)并将GTP转化为鸟苷5'-二磷酸(GDP)。突变的KRAS蛋白产物可以被组成型活化。突变的KRAS蛋白可以在多种人类癌症中的任一种中表达,诸如例如胰腺癌

(pancreatic cancer) (如,胰腺癌(pancreatic carcinoma))、结肠直肠癌、肺癌(如,肺腺癌)、子宫内膜癌、卵巢癌(如,上皮卵巢癌)和前列腺癌。

[0025] 本发明的一个实施方案提供了对突变的人KRAS(下文称为“突变的KRAS”)具有抗原特异性的分离的或纯化的TCR。在下文中,除非另有说明,否则提及“TCR”还指TCR的功能部分和功能变体。本发明的TCR可以对具有G12D突变的任何KRAS(蛋白、多肽或肽)具有抗原特异性。

[0026] 在本发明的一个实施方案中,TCR对具有G12D突变的KRAS蛋白具有抗原特异性,所述KRAS蛋白包含SEQ ID NO:3或4的氨基酸序列或由SEQ ID NO:3或4的氨基酸序列组成。SEQ ID NO:3的突变的KRAS变体A蛋白氨基酸序列通常对应于SEQ ID NO:1的未突变的野生型(WT)KRAS蛋白变体A氨基酸序列的第1-189位,除了在SEQ ID NO:3中,第12位的甘氨酸被天冬氨酸取代。SEQ ID NO:4的突变的KRAS变体B蛋白氨基酸序列通常对应于SEQ ID NO:2的未突变的WT KRAS蛋白变体B氨基酸序列的第1-188位,除了在SEQ ID NO:4中,第12位的甘氨酸被天冬氨酸取代。

[0027] 在本发明的一个实施方案中,TCR对具有上述G12D突变的KRAS肽具有抗原特异性,所述KRAS肽具有任何长度。例如,TCR可对具有G12D突变的KRAS肽具有抗原特异性,所述KRAS肽的长度为约8至约24个氨基酸残基,优选约9至约11个氨基酸残基。在本发明的一个实施方案中,TCR可对具有G12D突变的KRAS肽具有抗原特异性,所述KRAS肽的长度为约8个氨基酸残基、约9个氨基酸残基、约10个氨基酸残基、约11个氨基酸残基、约12个氨基酸残基或约24个氨基酸残基。例如,TCR可对具有G12D突变的KRAS₁₀₋₁₈肽具有抗原特异性,所述肽包含GADGVGKSA(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列或由GADGVGKSA(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列组成。具有G12D突变的SEQ ID NO:8的突变的KRAS肽氨基酸序列通常对应于SEQ ID NO:7的未突变的WT KRAS₁₀₋₁₈肽氨基酸序列的第1-9位,除了在SEQ ID NO:8中,第3位的甘氨酸被天冬氨酸取代。

[0028] 在本发明的又一个实施方案中,TCR可对具有G12D突变的KRAS肽具有抗原特异性,所述突变的KRAS肽包含以下的氨基酸序列或由以下的氨基酸序列组成:GADGVGKSA(突变的KRAS₁₀₋₁₈;SEQ ID NO:8)或GADGVGKSAL(突变的KRAS₁₀₋₁₉;SEQ ID NO:6)。在一个示例性实施方案中,TCR对突变的KRAS表位具有抗原特异性,所述突变的KRAS表位包含以下的氨基酸序列或由以下的氨基酸序列组成:GADGVGKSA(突变的KRAS₁₀₋₁₈;SEQ ID NO:8)或GADGVGKSAL(突变的KRAS₁₀₋₁₉;SEQ ID NO:6)。

[0029] 在本发明的一个实施方案中,本发明的TCR能够在HLA-Cw8分子的背景下识别突变的KRAS。在这方面,TCR可以在HLA-Cw8分子的背景下结合突变的KRAS后引发免疫应答。本发明的TCR能够识别由HLA-Cw8分子呈递的突变的KRAS,并且除了突变的KRAS之外,还可以结合HLA-Cw8分子。在本发明的TCR识别突变的KRAS的背景下,示例性HLA-Cw8分子包括由HLA-Cw*0801、HLA-Cw*0802、HLA-Cw*0803、HLA-Cw*0804、HLA-Cw*0805、HLA-Cw*0806、HLA-Cw*0807、HLA-Cw*0808和HLA-Cw*0809等位基因编码的那些。在一个优选的实施方案中,TCR在HLA-Cw*0802分子的背景下识别突变的KRAS。

[0030] 在本发明的一个实施方案中,除了具有在HLA-Cw8分子的背景下识别突变的KRAS的能力之外,本发明的TCR之一(TRAV12-2/TRBV10-2(表5))还能够在HLA-Cw5分子的背景下识别突变的KRAS。在这方面,TCR可以在HLA-Cw5分子的背景下结合突变的KRAS后引发免疫

应答。本发明的TCR能够识别由HLA-Cw5分子呈递的突变的KRAS,并且除了突变的KRAS之外,还可以结合HLA-Cw5分子。在本发明的TCR识别突变的KRAS的背景下,示例性HLA-Cw5分子包括由HLA-Cw*0501、HLA-Cw*0502、HLA-Cw*0503、HLA-Cw*0504、HLA-Cw*0505、HLA-Cw*0506、HLA-Cw*0508、HLA-Cw*0509和HLA-Cw*0510等位基因编码的那些。在一个优选的实施方案中,TCR在HLA-Cw*0501分子背景下识别突变的KRAS。HLA-Cw*0802和HLA-Cw*0501的氨基酸序列彼此仅有两个氨基酸残基不同。不受特定理论或机制的束缚,认为TRAV12-2/TRBV10-2TCR也可识别由其他HLA分子呈递的突变的KRAS,所述其他HLA分子与HLA-Cw*0802和HLA-Cw*0501中的一种或两种相似。

[0031] 本发明的TCR提供许多优点,包括当由用于过继细胞转移的细胞表达时。突变的KRAS由癌细胞表达,并且不由正常的非癌细胞表达。不受特定理论或机制的束缚,认为本发明的TCR有利地靶向癌细胞的破坏,同时最小化或消除正常的非癌细胞的破坏,从而减少,例如通过最小化或消除,毒性。此外,本发明的TCR可以有利地成功治疗或预防对其他类型的治疗(诸如例如化疗、手术或辐射)无应答的突变的KRAS-阳性癌症。另外,本发明的TCR可以提供对突变的KRAS的高度亲合识别,这可以提供识别未经处理的肿瘤细胞(如,未用干扰素(IFN)- γ 处理的、未用编码突变的KRAS和HLA-Cw*0802中的一者或两者的载体转染的、未用具有G12D突变的KRAS肽脉冲或它们的组合处理的肿瘤细胞)的能力。此外,HLA-Cw*0802等位基因分别在高达约8%和约11%的美国白人和非洲裔美国人的种族中表达。因此,本发明的TCR可以增加免疫疗法合格的癌症患者的数量,以包括那些表达HLA-Cw*0802等位基因的患者,所述患者可能不适合使用在其他MHC分子的背景下识别抗原的TCR进行免疫疗法。

[0032] 如本文所用的短语“抗原特异性”意指TCR能够以高亲合力特异性结合并免疫识别突变的KRAS。例如,在与(a)用低浓度的突变的KRAS肽(如,约0.05ng/mL至约10ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、5ng/mL、8ng/mL、10ng/mL或由前述值中的任两个所限定的范围)脉冲的抗原阴性HLA-Cw*0802⁺靶细胞或(b)引入编码突变的KRAS的核苷酸序列,使得抗原阴性HLA-Cw*0802⁺靶细胞表达突变的KRAS的靶细胞共培养后,如果约 1×10^4 至约 1×10^5 个表达TCR的T细胞分泌至少约200pg/mL或更多(如,200pg/mL或更多、300pg/mL或更多、400pg/mL或更多、500pg/mL或更多、600pg/mL或更多、700pg/mL或更多、1000pg/mL或更多、5,000pg/mL或更多、7,000pg/mL或更多、10,000pg/mL或更多、20,000pg/mL或更多、或由前述值中的任两个所限定的范围)的IFN- γ ,则TCR可被认为对突变的KRAS具有“抗原特异性”。表达本发明TCR的细胞也可以在与用较高浓度的突变的KRAS肽脉冲的抗原阴性HLA-Cw*0802⁺靶细胞共培养后分泌IFN- γ 。

[0033] 可选地或另外地,在与(a)用低浓度的突变的KRAS肽脉冲的抗原阴性HLA-Cw*0802⁺靶细胞,或(b)引入编码突变的KRAS的核苷酸序列,使得抗原-阴性HLA-Cw*0802⁺靶细胞表达突变的KRAS的靶细胞共培养后,如果表达TCR的T细胞分泌的IFN- γ 是阴性对照表达的IFN- γ 量的至少两倍,则TCR可被认为对突变的KRAS具有“抗原特异性”。阴性对照可以是,例如(i)表达TCR的T细胞,其与(a)用相同浓度的不相关肽(如,具有与突变的KRAS肽不同序列的一些其他肽)脉冲的抗原阴性HLA-Cw*0802⁺靶细胞,或(b)引入编码不相关肽的核苷酸序列,使得抗原-阴性HLA-Cw*0802⁺靶细胞表达不相关肽的靶细胞共培养,或(ii)未转导的T细胞(如,来源于PBMC,其不表达TCR),其与(a)用相同浓度的突变的KRAS肽脉冲的抗原阴性HLA-Cw*0802⁺靶细胞,或(b)引入编码突变的KRAS的核苷酸序列、使得抗原阴性HLA-Cw*

0802⁺靶细胞表达突变的KRAS的靶细胞共培养。IFN- γ 分泌可以通过本领域已知的方法诸如例如酶联免疫吸附测定(ELISA)测量。

[0034] 可选地或另外地,与分泌IFN- γ 的阴性对照T细胞的数量相比,在与(a)用低浓度的突变的KRAS肽脉冲的抗原-阴性HLA-Cw*0802⁺靶细胞或(b)引入编码突变的KRAS的核苷酸序列,使得抗原阴性HLA-Cw*0802⁺靶细胞表达突变的KRAS的靶细胞共培养后,如果至少两倍数量的表达TCR的T细胞分泌IFN- γ ,则TCR可被认为对突变的KRAS具有“抗原特异性”。肽和阴性对照的浓度可以如本文关于本发明的其他方面所述。分泌IFN- γ 的细胞的数量可以通过本领域已知的方法诸如例如ELISPOT测量。

[0035] 可选地或另外地,如果在用表达突变的KRAS的靶细胞刺激后通过例如流式细胞术所测量的表达TCR的T细胞上调一种或多种T细胞活化标志物的表达,则TCR可被认为对突变的KRAS具有“抗原特异性”。T细胞活化标志物的实例包括在抗原刺激后上调的4-1BB、OX40、CD107a、CD69和细胞因子(如,肿瘤坏死因子(TNF)、白介素(IL)-2等)。

[0036] 本发明提供了TCR,其包含两条多肽(即,多肽链),如TCR的 α 链、TCR的 β 链、TCR的 γ 链、TCR的 δ 链或其组合。本发明的TCR的多肽可以包含任何氨基酸序列,前提是TCR对突变的KRAS具有抗原特异性。

[0037] 在本发明的一个实施方案中,TCR包含两条多肽链,所述多肽链中的每一条包含可变区,所述可变区包含TCR的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3。在本发明的一个实施方案中,TCR包含第一多肽链,其包含含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1(α 链的CDR1)、含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2(α 链的CDR2)和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR3(α 链的CDR3);以及第二多肽链,其包含含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR1(β 链的CDR1)、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR2(β 链的CDR2)和含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR3(β 链的CDR3)。

[0038] 在本发明的另一个实施方案中,TCR包含第一多肽链,其包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR1(α 链的CDR1)、含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR2(α 链的CDR2)和含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR3(α 链的CDR3);以及第二多肽链,其包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR1(β 链的CDR1)、含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR2(β 链的CDR2)和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR3(β 链的CDR3)。

[0039] 在本发明的另一个实施方案中,TCR包含第一多肽链,其包含含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的CDR1(α 链的CDR1)、含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的CDR2(α 链的CDR2)和含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR3(α 链的CDR3);以及第二多肽链,其包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR1(β 链的CDR1)、含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR2(β 链的CDR2)和含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR3(β 链的CDR3)。

[0040] 在本发明的另一个实施方案中,TCR包含第一多肽链,其包含含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR1(α 链的CDR1)、含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR2(α 链的CDR2)和含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR3(α 链的CDR3);以及第二多肽链,其包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR1(β 链的CDR1)、含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR2(β 链的CDR2)和含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR3(β 链的CDR3)。

[0041] 在这方面,本发明的TCR可包含选自以下的任何一个或多个氨基酸序列:SEQ ID NO:9-14、17-22、25-30和33-38。在本发明的一个实施方案中,TCR包含以下的氨基酸序列:

(i)SEQ ID NO:9-11;(ii);SEQ ID NO:12-14;(iii)SEQ ID NO:17-19;(iv)SEQ ID NO:20-22;(v)SEQ ID NO:25-27;(vi)SEQ ID NO:28-30;(vii)SEQ ID NO:33-35;或(viii)SEQ ID NO:36-38。在一个特别优选的实施方案中,TCR包含以下的氨基酸序列:(a)所有SEQ ID NO:9-14;(b)所有SEQ ID NO:17-22;(c)所有SEQ ID NO:25-30;或(d)所有SEQ ID NO:33-38。

[0042] 在本发明的一个实施方案中,TCR包含含有上文示出的CDR的TCR的可变区的氨基酸序列。在这方面,TCR可包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:15(α 链的可变区);SEQ ID NO:23(α 链的可变区);SEQ ID NO:31(α 链的可变区);SEQ ID NO:39(α 链的可变区);SEQ ID NO:16(β 链的可变区);SEQ ID NO:24(β 链的可变区);SEQ ID NO:32(β 链的可变区);SEQ ID NO:40(β 链的可变区);SEQ ID NO:15和16两者;SEQ ID NO:23和24两者;SEQ ID NO:31和32两者;或SEQ ID NO:39和40两者。优选地,本发明的TCR包含以下的氨基酸序列:(i)SEQ ID NO:15-16两者;(ii)SEQ ID NO:23-24两者;(iii)SEQ ID NO:31-32两者;或(iv)SEQ ID NO:39-40两者。

[0043] 本发明的TCR还可以包含 α 链恒定区和 β 链恒定区。恒定区可以来源于任何适合的物种,诸如例如,如人或小鼠。在本发明的一个实施方案中,TCR还包含鼠 α 链和 β 链恒定区或人 α 链和 β 链恒定区。当提及本文所述的TCR或TCR的任何成分(如,互补决定区(CDR)、可变区、恒定区、 α 链和/或 β 链)时,本文使用的术语“鼠”或“人”分别意指来源于小鼠或人的TCR(或其成分),即分别源自或同时由小鼠T细胞或人T细胞表达的TCR(或其成分)。

[0044] 在本发明的一个实施方案中,TCR还包含人 α 链和 β 链恒定区。在这方面,TCR可以包含以下氨基酸序列:SEQ ID NO:41,其中第1位的X是任何天然存在的氨基酸残基(人 α 链的恒定区)、SEQ ID NO:42(人 β 链的恒定区)、SEQ ID NO:43(人 β 链的恒定区)、SEQ ID NO:41和42两者、或SEQ ID NO:41和43两者。在本发明的一个实施方案中,TCR包含本文所述的任何人恒定区与本文所述的任何CDR区的组合。在这方面,TCR可以包含以下的氨基酸序列:(a)所有SEQ ID NO:9-14、41和42;(b)所有SEQ ID NO:17-22、41和42;(c)所有SEQ ID NO:25-30、41和42;(d)所有SEQ ID NO:33-38、41和42;(e)所有SEQ ID NO:9-14、41和43;(f)所有SEQ ID NO:17-22、41和43;(g)所有SEQ ID NO:25-30、41和43;或(h)所有SEQ ID NO:33-38、41和43。在本发明的一个实施方案中,TCR包含本文所述的任何人恒定区与本文所述的任何可变区的组合。在这方面,TCR可以包含以下的氨基酸序列:(i)所有SEQ ID NO:15-16、41和42;(ii)所有SEQ ID NO:23-24、41和42;(iii)所有SEQ ID NO:31-32、41和42;(iv)所有SEQ ID NO:39-42;(v)所有SEQ ID NO:15-16、41和43;(vi)所有SEQ ID NO:23-24、41和43;(vii)所有SEQ ID NO:31-32、41和43;或(viii)所有SEQ ID NO:39-40、41和43。

[0045] 本发明的一个实施方案提供了包含人可变区和鼠恒定区的嵌合TCR,其中TCR对在HLA-Cw8分子的背景下呈递的突变的KRAS具有抗原特异性。鼠恒定区可以提供任何一种或多种优点。例如,鼠恒定区可以减少本发明的TCR与引入了本发明的TCR的宿主细胞的内源性TCR的错配。可选地或另外地,与具有人恒定区的相同TCR相比,鼠恒定区可以增加本发明的TCR的表达。嵌合TCR可包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:44(野生型(WT)鼠 α 链恒定区)、SEQ ID NO:45(WT鼠 β 链恒定区)或SEQ ID NO:44和45两者。优选地,本发明的TCR包含SEQ ID NO:44和45两者的氨基酸序列。嵌合TCR可包含本文所述的任何鼠恒定区与本文关于本发明的其他方面所述的任何CDR区的组合。在这方面,TCR可以包含以下的氨基酸序列:(a)所有SEQ ID NO:9-14、44和45;(b)所有SEQ ID NO:17-22、44和45;(c)所有SEQ ID NO:

25-30、44和45；或(d)所有SEQ ID NO:33-38、44和45。在本发明的另一个实施方案中，嵌合TCR可以包含本文所述的任何鼠恒定区与本文关于本发明的其他方面所述的任何可变区的组合。在这方面，TCR可以包含以下的氨基酸序列：(i) SEQ ID NO:15-16、44和45；(ii) SEQ ID NO:23-24、44和45；(iii) SEQ ID NO:31-32、44和45；或(iv) SEQ ID NO:39-40、44和45；

[0046] 在本发明的一个实施方案中，TCR包含取代的恒定区。在这方面，TCR可以包含本文所述的任何TCR的氨基酸序列，其中 α 链和 β 链之一或两者的恒定区中具有一个、两个、三个或四个氨基酸取代。优选地，TCR包含鼠恒定区，其中 α 链和 β 链之一或两者的鼠恒定区中具有一个、两个、三个或四个氨基酸取代。在一个特别优选的实施方案中，TCR包含鼠恒定区，其中 α 链的鼠恒定区中具有一个、两个、三个或四个氨基酸取代并且 β 链的鼠恒定区中具有一个氨基酸取代。在一些实施方案中，与包含未取代的(野生型)恒定区的亲本TCR相比，包含取代的恒定区的TCR有利地提供以下的一种或多种：突变的KRAS⁺靶标识别增加、宿主细胞表达增加、与内源性TCR的错配减少和抗肿瘤活性增加。通常，TCR α 链和 β 链的鼠恒定区的取代的氨基酸序列SEQ ID NO:46和47分别对应于未取代的鼠恒定区氨基酸序列SEQ ID NO:44和45的全部或部分，其中与SEQ ID NO:44相比时，SEQ ID NO:46具有一个、两个、三个或四个氨基酸取代，并且与SEQ ID NO:45相比时，SEQ ID NO:47具有一个氨基酸取代。在这方面，本发明的一个实施方案提供了包含以下的氨基酸序列的TCR：(a) SEQ ID NO:46 (α 链的恒定区)，其中(i)第48位的X是Thr或Cys；(ii)第112位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；(iii)第114位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp；并且(iv)第115位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；和(b) SEQ ID NO:47 (β 链的恒定区)，其中第57位的X是Ser或Cys。在本发明的一个实施方案中，包含SEQ ID NO:46的TCR不包含SEQ ID NO:44 (α 链的未取代的鼠恒定区)。在本发明的一个实施方案中，包含SEQ ID NO:47的TCR不包含SEQ ID NO:45 (β 链的未取代的鼠恒定区)。

[0047] 在本发明的一个实施方案中，取代的恒定区包含在 α 链和 β 链之一或两者的恒定区中的半胱氨酸取代，以提供半胱氨酸取代的TCR。在 α 链和 β 链中相对的半胱氨酸提供了二硫键，所述二硫键将取代的TCR中 α 链和 β 链的恒定区彼此连接，并且其在包含未取代的鼠恒定区的TCR中不存在。在这方面，TCR可以是半胱氨酸取代的TCR，其中SEQ ID NO:44的第48位的天然Thr (Thr48) 和SEQ ID NO:45的第57位的天然Ser (Ser57) 之一或两者可以被Cys取代。优选地，SEQ ID NO:44的天然Thr48和SEQ ID NO:45的天然Ser57都被Cys取代。在一个实施方案中，半胱氨酸取代的TCR包含含有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的 α 链恒定区，其中第48位的X是Cys，第112位的X是天然Ser，第114位的X是天然Met，并且第115位的X是天然Gly；以及含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 β 链恒定区，其中第57位的X是Cys。除了本文所述的任何CDR或可变区之外，本发明的半胱氨酸取代的TCR还可以包含取代的恒定区。

[0048] 在本发明的一个实施方案中，取代的氨基酸序列包含用疏水性氨基酸取代 α 链和 β 链之一或两者的恒定区的跨膜(TM)结构域中的一个、两个或三个氨基酸，以提供疏水性氨基酸取代的TCR。与在TM结构域中缺乏疏水性氨基酸取代的TCR相比，TCR的TM结构域中的疏水性氨基酸取代可以增加TCR的TM结构域的疏水性。在这方面，TCR是疏水性氨基酸取代的TCR，其中SEQ ID NO:44的天然Ser112、Met114和Gly115中的一个、两个或三个可以独立地被Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp取代；优选被Leu、Ile或Val取代。优选地，SEQ ID NO:44的天然Ser112、Met114和Gly115的所有三个可以独立地被Ala、Val、Leu、Ile、Pro、

Phe、Met或Trp取代；优选被Leu、Ile或Val取代。在一个实施方案中，疏水性氨基酸取代的TCR包含含有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的 α 链恒定区，其中第48位的X是天然Thr，第112位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp，第114位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp，并且第115位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；以及含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 β 链恒定区，其中第57位的X是天然Ser，其中包含SEQ ID NO:46的疏水性氨基酸取代的TCR不包含SEQ ID NO:44(α 链的未取代的鼠恒定区)。在一个优选的实施方案中，疏水性氨基酸取代的TCR包含含有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的 α 链恒定区，其中第48位的X是天然Thr，第112位的X是Leu，第114位的X是Ile并且第115位的X是Val；以及含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 β 链恒定区，其中第57位的X是天然Ser。除了本文所述的任何CDR或可变区之外，本发明的疏水性氨基酸取代的TCR还可以包含取代的恒定区。

[0049] 在本发明的一个实施方案中，取代的氨基酸序列包括在 α 链和 β 链之一或两者的恒定区中的半胱氨酸取代与用疏水性氨基酸取代 α 链和 β 链之一或两者的恒定区的跨膜(TM)结构域中的一个、两个或三个氨基酸的组合(在本文中还被称为“半胱氨酸取代的、疏水性氨基酸取代的TCR”)。在这方面，TCR是半胱氨酸取代的、疏水性氨基酸取代的TCR，其中SEQ ID NO:46的天然Thr48被Cys取代；SEQ ID NO:46的天然Ser112、Met114和Gly115中的一个、两个或三个独立地被Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp取代；优选被Leu、Ile或Val取代；并且SEQ ID NO:47的天然Ser57被Cys取代。优选地，SEQ ID NO:46的天然Ser112、Met114和Gly115的所有三个可以独立地被Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp取代；优选被Leu、Ile或Val取代。在一个实施方案中，半胱氨酸取代的、疏水性氨基酸取代的TCR包含含有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的 α 链，其中第48位的X是Cys，第112位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp，第114位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp，并且第115位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；以及含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 β 链，其中第57位的X是Cys，其中SEQ ID NO:46不包含SEQ ID NO:44(未取代的 α 链)，并且SEQ ID NO:47不包含SEQ ID NO:45(未取代的 β 链)。优选地，半胱氨酸取代的、疏水性氨基酸取代的TCR包含含有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的 α 链，其中第48位的X是Cys，第112位的X是Leu，第114位的X是Ile，第115位X是Val；以及含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 β 链，其中第57位的X是Cys。在这方面，半胱氨酸取代的、疏水性氨基酸取代的TCR包含含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的 α 链恒定区和含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的 β 链恒定区。除了本文所述的任何CDR或可变区之外，本发明的半胱氨酸取代的、疏水性氨基酸取代的TCR还可以包含取代的恒定区。

[0050] 在本发明的一个实施方案中，本发明的半胱氨酸取代的、疏水性氨基酸取代的TCR可以包含TCR的 α 链和TCR的 β 链。本发明的TCR的 α 链和 β 链中的每一条可独立地包含任何氨基酸序列。在这方面，本发明TCR的 α 链可包含SEQ ID NO:50、52、54或56的氨基酸序列。这种类型的 α 链可以与TCR的任何 β 链配对。在这方面，本发明TCR的 β 链可包含SEQ ID NO:51、53、55或57的氨基酸序列。因此，本发明的TCR可包含以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:50和51两者、SEQ ID NO:52和53两者、SEQ ID NO:54和55两者、或SEQ ID NO:56和57两者。优选地，本发明的TCR包含以下的氨基酸序列：(1) SEQ ID NO:50-51两者；(2) SEQ ID NO:52-53两者；(3) SEQ ID NO:54-55两者；或(4) SEQ ID NO:56-57两者。

[0051] 本发明还提供了一种多肽,其包含本文所述的任何TCR的功能部分。如本文所用的术语“多肽”包括寡肽,并且是指通过一个或多个肽键连接的氨基酸的单链。

[0052] 关于本发明的多肽,功能部分可以是包含所述部分来源的TCR的连续氨基酸的任何部分,前提是所述功能部分特异性结合突变的KRAS。当用于提及TCR时,术语“功能部分”是指本发明的TCR的任何部分或片段,所述部分或片段保留所述部分或片段来源的TCR(亲本TCR)的生物活性。功能部分涵盖,例如,保留与亲本TCR相似程度、相同程度或比亲本TCR更高程度地特异性结合突变的KRAS(如,在HLA-Cw*0802分子的背景下),或者检测、治疗或预防癌症的能力的TCR的那些部分。提及亲本TCR,功能部分可以包含例如亲本TCR的约10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%或更多。

[0053] 功能部分可在该部分的氨基或羧基末端或两个末端包含另外的氨基酸,所述另外的氨基酸不存在于亲本TCR的氨基酸序列中。可取地,另外的氨基酸不会干扰功能部分的生物功能,如特异性结合突变的KRAS;和/或具有检测癌症、治疗或预防癌症等的功能。更可取地,与亲本TCR的生物活性相比,另外的氨基酸增强了生物活性。

[0054] 多肽可以包含本发明的TCR的 α 链和 β 链中的任一个或两个的功能部分,如包含本发明的TCR的 α 链和/或 β 链的可变区的CDR1、CDR2和CDR3中的一个或多个的功能部分。在本发明的一个实施方案中,多肽可以包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:9(α 链的CDR1)、SEQ ID NO:10(α 链的CDR2)、SEQ ID NO:11(α 链的CDR3)、SEQ ID NO:12(β 链的CDR1)、SEQ ID NO:13(β 链的CDR2)、SEQ ID NO:14(β 链的CDR3)或它们的组合。在本发明的另一个实施方案中,多肽可以包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:17(α 链的CDR1)、SEQ ID NO:18(α 链的CDR2)、SEQ ID NO:19(α 链的CDR3)、SEQ ID NO:20(β 链的CDR1)、SEQ ID NO:21(β 链的CDR2)、SEQ ID NO:22(β 链的CDR3)或它们的组合。在本发明的另一个实施方案中,多肽可以包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:25(α 链的CDR1)、SEQ ID NO:26(α 链的CDR2)、SEQ ID NO:27(α 链的CDR3)、SEQ ID NO:28(β 链的CDR1)、SEQ ID NO:29(β 链的CDR2)、SEQ ID NO:30(β 链的CDR3)或它们的组合。在本发明的另一个实施方案中,多肽可以包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:33(α 链的CDR1)、SEQ ID NO:34(α 链的CDR2)、SEQ ID NO:35(α 链的CDR3)、SEQ ID NO:36(β 链的CDR1)、SEQ ID NO:37(β 链的CDR2)、SEQ ID NO:38(β 链的CDR3)或它们的组合。优选地,多肽包含以下的氨基酸序列:(a)所有SEQ ID NO:9-14;(b)所有SEQ ID NO:17-22;(c)所有SEQ ID NO:25-30;或(d)所有SEQ ID NO:33-38。

[0055] 在本发明的一个实施方案中,本发明的多肽可以包含例如含有上文示出的CDR区的组合的本发明TCR的可变区。在这方面,多肽可以包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:15(α 链的可变区)、SEQ ID NO:16(β 链的可变区)、SEQ ID NO:15和16两者、SEQ ID NO:23(α 链的可变区)、SEQ ID NO:24(β 链的可变区)、SEQ ID NO:23和24两者、SEQ ID NO:31(α 链的可变区)、SEQ ID NO:32(β 链的可变区)、SEQ ID NO:31和32两者、SEQ ID NO:39(α 链的可变区)、SEQ ID NO:40(β 链的可变区)或SEQ ID NO:39和40两者。优选地,多肽包含以下的氨基酸序列:(i)SEQ ID NO:15和16两者,(ii)SEQ ID NO:23和24两者,(iii)SEQ ID NO:31和32两者,或(iv)SEQ ID NO:39和40两者。

[0056] 在本发明的一个实施方案中,本发明的多肽还可以包含上文示出的本发明TCR的恒定区。在这方面,多肽还可以包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:41(人 α 链的恒定区)、SEQ ID NO:42(人 β 链的恒定区)、SEQ ID NO:43(人 β 链的恒定区)、SEQ ID NO:44(WT鼠 α 链

的恒定区)、SEQ ID NO:45(WT鼠 β 链的恒定区)、SEQ ID NO:46(鼠 α 链的取代的恒定区)、SEQ ID NO:47(鼠 β 链的取代的恒定区)、SEQ ID NO:48(鼠 α 链的半胱氨酸取代的、疏水性氨基酸取代的恒定区)、SEQ ID NO:49(鼠 α 链的半胱氨酸取代的、疏水性氨基酸取代的恒定区)、SEQ ID NO:44和45两者、SEQ ID NO:46和47两者、或SEQ ID NO:48和49两者、SEQ ID NO:41和42两者、或SEQ ID NO:41和43两者。优选地,多肽还包含以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:44和45两者,(ii) SEQ ID NO:46和47两者,(iii) SEQ ID NO:48和49两者,(iv) SEQ ID NO:41和42两者,或(v) SEQ ID NO:41和43两者与本文关于本发明的其他方面描述的CDR区或可变区中任一种的组合。

[0057] 在本发明的一个实施方案中,本发明的多肽可包含本文所述的TCR的 α 链或 β 链的整个长度。在这方面,本发明的多肽可包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:57。可选地,本发明的多肽可以包含本文所述的TCR的两条链。例如,本发明的多肽可以包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:50和51两者、SEQ ID NO:52和53两者、SEQ ID NO:54和55两者、或SEQ ID NO:56和57两者。优选地,多肽包含以下的氨基酸序列:(1) SEQ ID NO:50-51两者;(2) SEQ ID NO:52-53两者;(3) SEQ ID NO:54-55两者;或(4) SEQ ID NO:56-57两者。

[0058] 本发明还提供了包含本文所述的至少一种多肽的蛋白。“蛋白”意指包含一条或多条多肽链的分子。

[0059] 在一个实施方案中,本发明的蛋白可以包含(a)含有SEQ ID NO:9-11的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:12-14的氨基酸序列的第二多肽链;(b)含有SEQ ID NO:17-19的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:20-22的氨基酸序列的第二多肽链;(c)含有SEQ ID NO:25-27的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:28-30的氨基酸序列的第二多肽链;或(d)含有SEQ ID NO:33-35的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:36-38的氨基酸序列的第二多肽链。

[0060] 在本发明的另一个实施方案中,蛋白可以包含(i)含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的第二多肽链;(ii)含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的第二多肽链;(iii)含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的第二多肽链;或(iv)含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的第二多肽链。

[0061] 本发明的蛋白还可以包含本文关于本发明的其他方面描述的任何恒定区。在这方面,在本发明的一个实施方案中,第一多肽链还可以包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列,其中:(i) SEQ ID NO:46的第48位的X是Thr或Cys;(ii) SEQ ID NO:46的第112位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(iii) SEQ ID NO:46的第114位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;和(iv) SEQ ID NO:46的第115位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;并且(B)第二多肽链还可以包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:47的第57位的X是Ser或Cys。在本发明的另一个实施方案中,第一多肽链还可以包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:41(人 α 链的恒定区)、SEQ ID NO:44(WT鼠 α 链的恒定区)或SEQ ID NO:48(鼠 α 链的半胱氨酸取代的、疏水性氨基酸取代的恒定区),并且第二多肽链还可以

包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:42(人 β 链的恒定区)、SEQ ID NO:43(人 β 链的恒定区)、SEQ ID NO:45(WT鼠 β 链的恒定区)或SEQ ID NO:49(鼠 β 链的半胱氨酸取代的、疏水性氨基酸取代的恒定区)。

[0062] 可选地或另外地,本发明的蛋白可以包含:(1)含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的第二多肽链;(2)含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的第二多肽链;(3)含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的第二多肽链;或(4)含有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的第二多肽链。在这种情况下,本发明的蛋白可以是TCR。可选地,如果例如该蛋白包含SEQ ID NO:50和51两者、SEQ ID NO:52和53两者、SEQ ID NO:54和55两者、或SEQ ID NO:55和56两者的氨基酸序列的单个多肽链,或者如果蛋白的第一和/或第二多肽链还包含其它氨基酸序列,如编码免疫球蛋白或其部分的氨基酸序列,则本发明的蛋白可以是融合蛋白。在这方面,本发明还提供了融合蛋白,其包含至少一种本文所述的本发明多肽和至少一种其它多肽。其它多肽可以作为融合蛋白的单独的多肽存在,或者可以以这样的多肽存在:其与本文所述的本发明多肽之一框内(串联)表达。其它多肽可以编码任何肽分子或蛋白分子或它们的部分,包括但不限于免疫球蛋白、CD3、CD4、CD8、MHC分子、CD1分子,如CD1a、CD1b、CD1c、CD1d等。

[0063] 融合蛋白可以包含一个或多个拷贝的本发明多肽和/或一个或多个拷贝的其它多肽。例如,融合蛋白可以包含1、2、3、4、5或多个拷贝的本发明多肽和/或其它多肽。合适的制备融合蛋白的方法是本领域已知的,并且包括例如重组方法。

[0064] 在本发明的一些实施方案中,本发明的TCR、多肽和蛋白可以被表达为包含连接 α 链和 β 链的接头肽的单一蛋白。在这方面,本发明的TCR、多肽和蛋白还可以包含接头肽。接头肽可以有利地促进宿主细胞中重组TCR、多肽和/或蛋白的表达。接头肽可以包含任何合适的氨基酸序列。例如,接头肽可以包含SEQ ID NO:58。在宿主细胞表达包含接头肽在内的构建体后,接头肽可以被切除,产生分开的 α 链和 β 链。在本发明的一个实施方案中,TCR、多肽或蛋白可以包含这样的氨基酸序列,其包含全长 α 链、全长 β 链和位于 α 链和 β 链之间的接头肽。

[0065] 本发明的蛋白可以是重组抗体或其抗原结合部分,包含至少一种本文所述的本发明多肽。如本文所用,“重组抗体”是指重组(如,基因工程改造的)蛋白,其包含本发明的多肽和抗体的多肽链或其抗原结合部分中的至少一种。抗体或其抗原结合部分的多肽可以是抗体的重链,轻链,重链或轻链的可变区或恒定区,单链可变片段(scFv),或Fc、Fab或F(ab)₂'片段等。抗体或其抗原结合部分的多肽链可以作为重组抗体的单独多肽存在。可选地,抗体或其抗原结合部分的多肽链可以以这样的多肽存在:其与本发明的多肽框内(串联)表达。抗体或其抗原结合部分的多肽可以是任何抗体或任何抗体片段的多肽,包括本文所述的任何抗体和抗体片段。

[0066] 包括在本发明范围内的是本文所述的本发明的TCR、多肽或蛋白的功能变体。如本文所用的术语“功能变体”是指与亲本TCR、多肽或蛋白具有大量或显著的序列同一性或相似性的TCR、多肽或蛋白,所述功能变体保留该变体来源的TCR、多肽或蛋白的生物活性。功能变体包括,例如,本文所述的TCR、多肽或蛋白(亲本TCR、多肽或蛋白)的那些变体,其保留

与亲本TCR相似程度、相同程度或比亲本TCR更高程度地特异性结合突变的KRAS,所述亲本TCR对突变的KRAS具有抗原特异性或者亲本多肽或蛋白特异性结合突变的KRAS。提及亲本TCR、多肽或蛋白,功能变体可以分别与亲本TCR、多肽或蛋白在氨基酸序列方面例如至少约30%、50%、75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同。

[0067] 功能变体可以例如包含具有至少一个保守性氨基酸取代的亲本TCR、多肽或蛋白的氨基酸序列。保守性氨基酸取代是本领域已知的,并包括这样的氨基酸取代,其中具有某些物理和/或化学特性的一个氨基酸被换成具有相同化学或物理特性的另一个氨基酸。例如,保守性氨基酸取代可以是酸性氨基酸取代为另一酸性氨基酸(如,Asp或Glu)、具有非极性侧链的氨基酸取代为具有非极性侧链的另一氨基酸(如,Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val等)、碱性氨基酸取代为另一碱性氨基酸(Lys、Arg等)、具有极性侧链的氨基酸取代为具有极性侧链的另一氨基酸(Asn、Cys、Gln、Ser、Thr、Tyr等)等。

[0068] 可选地或另外地,功能变体可以包含具有至少一个非保守性氨基酸取代的亲本TCR、多肽或蛋白的氨基酸序列。在这种情况下,非保守性氨基酸取代优选不干扰或抑制功能变体的生物活性。优选地,非保守性氨基酸取代增强功能变体的生物活性,使得与亲本TCR、多肽或蛋白相比,功能变体的生物活性增加。

[0069] TCR、多肽或蛋白可以基本上由本文所述的一条或多条指定的氨基酸序列组成,使得TCR、多肽或蛋白的其他组分,如其它氨基酸,不会实质上改变TCR、多肽或蛋白的生物活性。在这方面,本发明的TCR、多肽或蛋白可以例如基本上由以下的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、(1) SEQ ID NO:50-51两者;(2) SEQ ID NO:52-53两者;(3) SEQ ID NO:54-55两者;或(4) SEQ ID NO:56-57两者。此外,例如,本发明的TCR、多肽或蛋白可以基本上由以下的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、(i) SEQ ID NO:15-16两者;(ii) SEQ ID NO:23-24两者;(iii) SEQ ID NO:31-32两者;或(iv) SEQ ID NO:39-40两者。此外,本发明的TCR、多肽或蛋白可以基本上由以下的氨基酸序列组成:(a) 所有SEQ ID NO:9-14;(b) 所有SEQ ID NO:17-22;(c) 所有SEQ ID NO:25-30;或(d) 所有SEQ ID NO:33-38。

[0070] 本发明的TCR、多肽和蛋白可以具有任何长度,即可以包含任何数量的氨基酸,前提是TCR、多肽或蛋白保留其生物活性,例如能够特异性结合突变的KRAS;检测哺乳动物中的癌症;或者治疗或预防哺乳动物中的癌症等。例如,多肽的长度范围可为约50至约5000个氨基酸,如50、70、75、100、125、150、175、200、300、400、500、600、700、800、900、1000或更多个氨基酸。在这方面,本发明的多肽还包括寡肽。

[0071] 本发明的TCR、多肽和蛋白可以包含合成的氨基酸代替一个或多个天然存在的氨基酸。此类合成的氨基酸是本领域已知的,并且包括例如氨基环己烷羧酸、正亮氨酸、 α -氨基正癸酸、高丝氨酸、S-乙酰基氨基甲基-半胱氨酸、反式-3-和反式-4-羟基脯氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-硝基苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、4-羧基苯丙氨酸、 β -苯基丝氨酸 β -羟基苯丙氨酸、苯基甘氨酸、 α -萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、吡啶啉-2-羧酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、氨基丙二酸、氨基丙二酸单酰胺、N'-苄基-N'-甲基-赖氨酸、N',N'-二苄基-赖氨酸、6-羟基赖氨酸、鸟氨酸、 α -氨基环戊烷羧酸、 α -氨基环己烷羧酸、 α -氨基环庚烷

羧酸、 α -(2-氨基-2-降冰片烷)-羧酸、 α, γ -二氨基丁酸、 α, β -二氨基丙酸、高苯丙氨酸和 α -叔丁基甘氨酸。

[0072] 本发明的TCR、多肽和蛋白可以被糖基化、酰胺化、羧化、磷酸化、酯化、N-酰化、经由例如二硫桥环化、或转化成酸加成盐和/或任选二聚化或聚合或缀合。

[0073] 本发明的TCR、多肽和/或蛋白可以通过本领域已知的方法,诸如例如从头合成,获得。此外,可以使用标准重组方法使用本文所述的核酸重组产生多肽和蛋白。参见,例如,Green和Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第4版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)。可选地,本文所述的TCR、多肽和/或蛋白可以由诸如Synpep (Dublin, CA)、Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) 和 Multiple Peptide Systems (San Diego, CA) 的公司商业合成。在这方面,本发明的TCR、多肽和蛋白可以是合成的、重组的、分离的和/或纯化的。

[0074] 包括在本发明范围内的是缀合物(如生物缀合物),其包含本发明的TCR、多肽或蛋白(包括其任何功能部分或变体)、核酸、重组表达载体、宿主细胞、宿主细胞群、或抗体、或其抗原结合部分中的任一种。缀合物以及合成缀合物的方法通常是本领域已知的。

[0075] 本发明的一个实施方案提供了包含编码本文所述的TCR、多肽或蛋白中的任一种的核苷酸序列的核酸。如本文所用的“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”,并且通常意指DNA或RNA的聚合物,其可以是单链或双链的,可以含有天然的、非天然的或改变的核苷酸,并且可以含有天然的、非天然的或改变的核苷酸间连键,如氨基磷酸酯键或硫代磷酸酯键,替代未修饰的寡核苷酸的核苷酸之间存在的磷酸二酯。在一个实施方案中,核酸包含互补DNA(cDNA)。通常优选的是核酸不包含任何插入、缺失、倒位和/或取代。然而,在一些情况下,如本文所论述的,核酸包含一个或多个插入、缺失、倒位和/或取代可能是合适。

[0076] 优选地,本发明的核酸是重组体。如本文所用,术语“重组体”是指(i)通过将天然或合成的核酸区段与可以在活细胞中复制的核酸分子连接而在活细胞外构建的分子,或者(ii)由上述(i)中描述的那些分子复制产生的分子。为了本文的目的,复制可以是体外复制或体内复制。

[0077] 可以使用本领域已知的程序基于化学合成和/或酶促连接反应来构建核酸。参见,例如,Green和Sambrook等人,同上。例如,可以使用天然存在的核苷酸或经设计以增加分子的生物稳定性或增加杂交后形成的双链体的物理稳定性的各种修饰的核苷酸(如,硫代磷酸酯衍生物和吡啶取代的核苷酸)化学合成核酸。可用于生成核酸的修饰的核苷酸的实例包括但不限于:5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧甲基氨甲基-2-硫尿苷、5-羧甲基氨甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D-半乳糖基腺苷、肌苷、 N^6 -异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、 N^6 -取代的腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨甲基-2-硫尿嘧啶、 β -D-甘露糖基腺苷、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基硫基- N^6 -异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、怀丁氧苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、腺苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、3-(3-氨基-3-N-2-羧基丙基)尿嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。可选地,本发明的一种或多种核酸可以从诸如Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) 和Synthegen (Houston, TX) 的公司购买。

[0078] 核酸可以包含任何核苷酸序列,其编码本文所述的TCR、多肽或蛋白中的任一种。在本发明的一个实施方案中,核酸可以包含SEQ ID NO:63-70中任一个的核苷酸序列(表1)。在本发明的一个实施方案中,该核酸包含SEQ ID NO:63-64两者、SEQ ID NO:65-66两者、SEQ ID NO:67-68两者、或SEQ ID NO:69-70两者的核苷酸序列。

[0079] 表1

TCR ID	TCR 链	指示的 TCR 链可变区的核苷酸序列
1	α (TRAV4*01)	SEQ ID NO: 63 (野生型)
	β (TRBV5-6*01) (A)	SEQ ID NO: 64 (野生型)
2	α	SEQ ID NO: 65

TCR ID	TCR 链	指示的 TCR 链可变区的核苷酸序列
	(TRAV4*01)	(密码子优化的)
	β (TRBV5-6*01) (C)	SEQ ID NO: 66 (密码子优化的)
3	α (TRAV4*01)	SEQ ID NO: 67 (野生型)
	β (TRBV5-6*01) (B)	SEQ ID NO: 68 (野生型)
4	α (TRAV12-2*01)	SEQ ID NO: 69 (野生型)
	β (TRBV10-2*01)	SEQ ID NO: 70 (野生型)

[0082] 在本发明的一个实施方案中,该核酸包含编码本文所述的TCR、多肽或蛋白中的任一种的密码子优化的核苷酸序列。不受任何特定理论或机制束缚,认为核苷酸序列的密码子优化提高了mRNA转录物的翻译效率。核苷酸序列的密码子优化可以包含将天然密码子取代为编码相同氨基酸,但可以通过在细胞内更容易获得的tRNA翻译的另一种密码子,从而提高翻译效率。核苷酸序列的优化还可以减少会干扰翻译的mRNA二级结构,从而提高翻译效率。

[0083] 本发明还提供了这样的核酸,其包含与本文所述的任何核酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列,或在严格条件下与本文所述的任何核酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

[0084] 在严格条件下杂交的核苷酸序列优选在高严格条件下杂交。“高严格条件”意指核苷酸序列以可检测地强于非特异性杂交的量与靶序列(本文所述的任何核酸的核苷酸序列)特异性杂交。高严格条件包括将具有精确互补序列的多核苷酸,或者仅包含一些分散错配的多核苷酸与恰好具有与核苷酸序列相匹配的一些小区域(如,3-10个碱基)的随机序列区分开的条件。此类小的互补区比14-17个或更多个碱基的全长互补体更容易熔解,并且高严格杂交使它们易于区分。相对高的严格条件包括,例如低盐和/或高温条件,如在约50-70℃的温度下由约0.02-0.1M NaCl或等效物提供的。此类高严格条件容许核苷酸序列与模板或靶链之间很少的错配(如果有的话),并且特别适用于检测本发明的TCR中的任一种的表达。通常认为,通过添加增加量的甲酰胺可以使条件更严格。

[0085] 本发明还提供了包含与本文所述的核酸中的任一种至少约70%或更多、如约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%相同的核苷酸序列的核酸。在这方面,核酸可以基本上由本文所述的任何核苷酸序列组成。

[0086] 本发明的核酸可以掺入重组表达载体中。在这方面,本发明提供了包含本发明的核酸中的任一种的重组表达载体。在本发明的一个实施方案中,重组表达载体包含编码 α 链、 β 链和接头肽的核苷酸序列。

[0087] 为了本文的目的,术语“重组表达载体”意指基因修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,当构建体包含编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列,并且在足以使细胞内表达的mRNA、蛋白质、多肽或肽表达的条件下将载体与细胞接触时,所述基因修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体允许宿主细胞表达mRNA、蛋白质、多肽或肽。本发明的载体整体上不是天然存在的。然而,载体的一部分可以是天然存在的。本发明的重组表达载体可以包含任何类型的核苷酸,包括但不限于DNA和RNA,其可以是单链或双链的、合成的或部分从天然来源获得的,并且可以含有天然的、非天然的或改变的核苷酸。重组表达载体可以包含天然存在的、非天然存在的核苷酸间连键,或这两种类型的连键。优选地,非天然存在的或改变的核苷酸或核苷酸间连键不妨碍载体的转录或复制。

[0088] 本发明的重组表达载体可以是任何适合的重组表达载体,并且可以用于转化或转染任何合适的宿主细胞。合适的载体包括设计用于繁殖和扩增或用于表达或两者的那些载体,如质粒和病毒。载体可以选自:pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene, La Jolla, CA)、pET系列(Novagen, Madison, WI)、pGEX系列(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)和pEX系列(Clontech, Palo Alto, CA)。也可以使用噬菌体载体,如 λ GT10、 λ GT11、 λ ZapII(Stratagene)、 λ EMBL4和 λ NM1149。植物表达载体的实例包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的实例包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。优选地,重组表达载体是病毒载体,如逆转录病毒载体。在一个特别优选的实施方案中,重组表达载体是MSGV1载体。

[0089] 本发明的重组表达载体可以使用例如Green和Sambrook等人,同上所述的标准重组DNA技术制备。可以将环状或线性的表达载体的构建体可以制备成含有在原核或真核宿主细胞中发挥功能的复制系统。复制系统可以源自如ColE1、2 μ 质粒、 λ 、SV40、牛乳头瘤病毒等。

[0090] 可取地,重组表达载体包含调控序列,如转录和翻译起始和终止密码子,视情况而定并且考虑载体是基于DNA的还是基于RNA的,其对于待引入载体的宿主细胞的类型(如细

菌、真菌、植物或动物)具有特异性。

[0091] 重组表达载体可以包含允许选择转化或转染的宿主细胞的一种或多种标志物基因。标志物基因包括杀生物剂抗性,如对抗生素、重金属等的抗性,在营养缺陷型宿主细胞中互补以提供原养型等。对于本发明的表达载体合适的标志物基因包括例如新霉素/G418抗性基因、潮霉素抗性基因、组氨酸抗性基因、四环素抗性基因和氨苄青霉素抗性基因。

[0092] 重组表达载体可以包含与编码TCR、多肽或蛋白的核苷酸序列,或者与编码TCR、多肽或蛋白的核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列可操作地连接的天然或非天然启动子。启动子的选择,如强、弱、可诱导型、组织特异性和发育特异性,在技术人员的普通技能范围内。类似地,核苷酸序列与启动子的组合也在技术人员的技能范围内。启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子和在鼠干细胞病毒的长末端重复中存在的启动子。

[0093] 本发明的重组表达载体可以经设计用于瞬时表达、用于稳定表达,或用于两者。此外,可以将重组表达载体制备为用于组成型表达或用于诱导型表达。

[0094] 此外,可以将重组表达载体制备成包含自杀基因。如本文所用,术语“自杀基因”是指导致表达自杀基因的细胞死亡的基因。自杀基因可以是这样的基因,其赋予表达基因的细胞对药剂(如药物)敏感性并且当细胞与药剂接触或暴露于药剂时使细胞死亡。自杀基因是本领域已知的,并且包括例如单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因、胞嘧啶脱氨酶、嘌呤核苷磷酸化酶、硝基还原酶和诱导型半胱天冬酶9基因系统。

[0095] 本发明的另一个实施方案还提供了包含本文所述的重组表达载体中的任一种的宿主细胞。如本文所用,术语“宿主细胞”是指任何类型的可以包含本发明的重组表达载体的细胞。宿主细胞可以是真核细胞,如植物、动物、真菌或藻类,或者可以是原核细胞,如细菌或原生动物。宿主细胞可以是培养的细胞或原代细胞,即直接从生物体如人类中分离的。宿主细胞可以是贴壁细胞或悬浮细胞,即悬浮生长的细胞。合适的宿主细胞是本领域已知的,并且包括例如DH5 α 大肠杆菌细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴VERO细胞、COS细胞、HEK293细胞等。为了扩增或复制重组表达载体的目的,宿主细胞优选是原核细胞,如DH5 α 细胞。为了产生重组TCR、多肽或蛋白的目的,宿主细胞优选是哺乳动物细胞。最优选地,宿主细胞是人细胞。虽然宿主细胞可以是任何细胞类型,可以来源于任何类型的组织,并且可以处于任何发育阶段,宿主细胞优选是外周血淋巴细胞(PBL)或外周血单核细胞(PBMC)。更优选地,宿主细胞是T细胞。

[0096] 为了本文的目的,T细胞可以是任何T细胞,如培养的T细胞,如,原代T细胞,或来自培养的T细胞系的T细胞,如,Jurkat、SupT1等,或从哺乳动物获得的T细胞。如果从哺乳动物获得,则T细胞可以从许多来源获得,包括但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其他组织或流体。T细胞也可以是富集或纯化的。优选地,T细胞是人T细胞。T细胞可以是任何类型的T细胞,并且可以处于任何发育阶段,包括但不限于CD4⁺/CD8⁺双阳性T细胞、CD4⁺辅助T细胞,如Th₁和Th₂细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞(如,细胞毒性T细胞)、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、记忆T细胞(如,中枢记忆T细胞和效应记忆T细胞)、初始T细胞等。

[0097] 本发明还提供了包含至少一种本文所述的宿主细胞的细胞群。细胞群可以是除了至少一种其它细胞外还包含含有所述任何重组表达载体的宿主细胞的异质群,所述其它细胞例如不包含任何重组表达载体的宿主细胞(例如T细胞)或者除了T细胞之外的细胞,例如

B细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、红细胞、肝细胞、内皮细胞、上皮细胞、肌细胞、脑细胞等。可选地,细胞群可以是基本同质的群体,其中所述群体主要包含含有重组表达载体的宿主细胞(例如基本由含有重组表达载体的宿主细胞组成)。群体也可以是克隆细胞群,其中群体的所有细胞均为含有重组表达载体的单个宿主细胞的克隆,以使群体的所有细胞均包含重组表达载体。在本发明的一个实施方案中,细胞群是包含含有本文所述的重组表达载体的宿主细胞的克隆群。

[0098] 在本发明的一个实施方案中,群体中的细胞数量可以快速扩增。T细胞数量的扩增可以通过例如美国专利8,034,334;美国专利8,383,099;美国专利申请公布号2012/0244133;Dudley等人,J.Immunother.,26:332-42(2003);和Riddell等人,J.Immunol.Methods,128:189-201(1990)中所述的本领域已知的许多方法中的任何一种来实现。在一个实施方案中,通过将T细胞与OKT3抗体、IL-2和饲养PBMC(如,辐射的同种异体PBMC)一起培养来进行T细胞数量的扩增。

[0099] 本发明的TCR、多肽、蛋白、核酸、重组表达载体和宿主细胞(包括其群体)可以是分离的和/或纯化的。如本文所用的术语“分离的”意指已从其自然环境中移出。如本文所用的术语“纯化的”意指纯度增加,其中“纯度”是相对术语,并不一定被解释为绝对纯度。例如,纯度可以是至少约50%,可以大于60%、70%、80%、90%、95%,或者可以是100%。

[0100] 本发明的TCR、多肽、蛋白、核酸、重组表达载体和宿主细胞(包括其群体),所有这些在下文中统称为“本发明的TCR材料”,可以被配制成组合物,如药物组合物。在这方面,本发明提供了药物组合物,其包含本文所述的TCR、多肽、蛋白、核酸、表达载体和宿主细胞(包括其群体)中的任一种以及药物上可接受的载体。含有本发明的TCR材料中的任一种的本发明的药物组合物可以包含多种本发明的TCR材料,如多肽和核酸,或两种或更多种不同的TCR。可选地,药物组合物可以包含本发明的TCR材料与另一药物活性剂或药物的组合,所述药物活性剂或药物如化学治疗剂,如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、道诺霉素、阿霉素、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱、长春新碱等。

[0101] 优选地,载体是药学上可接受的载体。对于药物组合物,载体可以为考虑中任何常规地用于本发明的具体TCR材料的那些。用于制备可施用组合物的方法是本领域技术人员已知的或对于本领域技术人员是显而易见的,并且在例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy,第22版,Pharmaceutical Press(2012)中有更详细的描述。优选的是药物上可接受的载体是在使用条件下没有有害副作用或毒性的载体。

[0102] 载体的选择部分将由特定的本发明的TCR材料以及由用于施用本发明的TCR材料的特定方法决定。因此,存在多种合适的本发明的药物组合物的制剂。合适的制剂可以包括用于肠胃外、皮下、静脉内、肌内、动脉内、鞘内、瘤内或腹膜内施用的那些中的任一种。可以使用多种途径来施用本发明的TCR材料,并且在某些情况下,特定途径可以提供比另一种途径更直接和更有效的应答。

[0103] 优选地,本发明的TCR材料通过注射,如静脉内施用。当本发明的TCR材料是表达本发明TCR的宿主细胞时,用于注射用细胞的药学上可接受的载体可以包括任何等渗载体,诸如例如生理盐水(约0.90%w/v的NaCl水溶液、约300mOsm/L NaCl水溶液、或约9.0g NaCl/升水)、NORMOSOL R电解质溶液(Abbott,Chicago,IL)、血浆-LYTE A(Baxter,Deerfield,IL)、约5%右旋糖水溶液、或乳酸林格氏液(Ringer's lactate)。在一个实施方案中,药学

上可接受的载体补充有人血清白蛋白。

[0104] 出于本发明的目的,施用的本发明TCR材料的量或剂量(如,本发明的TCR材料是一个或多个细胞时的细胞数量)应足以在合理的时间范围内引起受试者或动物的如治疗性或预防性应答。例如,本发明的TCR材料的剂量应足以在离施用时间约2小时或更长,如12至24或更多个小时的时段内结合癌症抗原(如,突变的KRAS),或者检测、治疗或预防癌症。在某些实施方案中,时间段可能甚至更长。剂量将通过特定的本发明的TCR材料的功效和动物(如人)的状况、以及待治疗的动物(如人)的体重来确定。

[0105] 用于确定施用剂量的许多测定在本领域中是已知的。出于本发明的目的,可使用一种测定来确定施用于哺乳动物的初始剂量,该测定包括在一组哺乳动物中比较向哺乳动物施用给定剂量的此类T细胞时,靶细胞溶解的程度或者表达本发明的TCR、多肽或蛋白的T细胞分泌IFN- γ 的程度,其中向所述哺乳动物的每一个给予不同剂量的T细胞。可以通过本领域已知的方法测定在施用一定剂量后靶细胞裂解或IFN- γ 分泌的程度。

[0106] 本发明的TCR材料的剂量也将由可能伴随特定的本发明TCR材料的施用的任何不良副作用的存在、性质和程度确定。通常,主治医师会考虑多种因素,如年龄、体重、一般健康状况、饮食、性别、待施用的本发明TCR材料、施用途径以及所治疗癌症的严重程度来决定用于治疗每个个体患者的本发明TCR材料的剂量。在本发明的TCR材料是细胞群的实施方案中,每次输注施用的细胞数量可以变化,如,从约 1×10^6 个至约 1×10^{12} 个细胞或更多。在某些实施方案中,可以施用少于 1×10^6 个细胞。

[0107] 本领域普通技术人员将容易理解,本发明TCR材料可以以任何多种方式进行修饰,使得本发明TCR材料的治疗性或预防性功效通过修饰得以提高。例如,本发明的TCR材料可以直接或通过桥接间接与化学治疗剂缀合。将化合物与化学治疗剂缀合的实践在本领域中是已知的。本领域普通技术人员认识到,对于本发明的TCR材料的功能而言不是必需的本发明的TCR材料上的位点是用于附接桥和/或化学治疗剂的理想位点,前提是桥和/或化疗治疗剂,一旦附接至本发明的TCR材料,就不会干扰本发明的TCR材料的功能,即能够结合突变的KRAS或检测、治疗或预防癌症。

[0108] 预期本发明的药物组合物、TCR、多肽、蛋白、核酸、重组表达载体、宿主细胞和细胞群可以用于治疗或预防癌症的方法中。不受特定理论束缚,认为本发明的TCR与突变的KRAS特异性结合,使得TCR(或相关的本发明多肽或蛋白)当由细胞表达时,能够介导针对表达突变的KRAS的靶细胞的免疫应答。在这方面,本发明提供了治疗或预防哺乳动物中的癌症的方法,其包括以有效治疗或预防哺乳动物中的癌症的量向哺乳动物施用本文所述的药物组合物、TCR、多肽或蛋白质中的任一种,包含编码本文所述的TCR、多肽或蛋白中的任一种的核苷酸序列的任何核酸或重组表达载体,或包含编码本文所述的TCR、多肽或蛋白中的任一种的重组载体的任何宿主细胞或细胞群。

[0109] 本发明的一个实施方案提供了本文所述的药物组合物、TCR、多肽或蛋白中的任一种,包含编码本文所述的TCR、多肽、蛋白中的任一种的核苷酸序列的任何核酸或重组表达载体,或包含编码本文所述的TCR、多肽或蛋白中的任一种的重组载体的任何宿主细胞或细胞群,其用于治疗或预防哺乳动物中的癌症。

[0110] 如本文所用的术语“治疗”和“预防”以及由其衍生的词语,并不一定意味着100%或完全的治疗或预防。而是,存在本领域普通技术人员认为具有潜在益处或治疗效果的不

同程度的治疗或预防。在这方面,本发明的方法可以提供任何量任何水平的哺乳动物中癌症的治疗或预防。此外,本发明的方法提供的治疗或预防可以包括被治疗或预防的癌症的一种或多种病况或症状的治疗或预防。例如,治疗或预防可以包括促进肿瘤的消退。此外,为了本文的目的,“预防”可以包括延迟癌症或其症状或病况的发作。可选地或另外地,“预防”可以包括预防或延迟癌症或其症状或病况的复发。

[0111] 还提供了检测哺乳动物中癌症存在的方法。该方法包括(i)使包含来自哺乳动物的一个或多个细胞的样品与本文所述的本发明的TCR、多肽、蛋白、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群或药物组合物中的任一种接触,从而形成复合物,以及检测该复合物,其中检测到该复合物指示哺乳动物中存在癌症。

[0112] 关于检测哺乳动物中的癌症的本发明的方法,细胞样品可以是包括全细胞、其裂解物或全细胞裂解物级分(如细胞核或细胞质的级分、全蛋白级分或核酸级分)的样品。

[0113] 出于本发明的检测方法的目的,关于哺乳动物,接触可以发生在体外或体内。优选地,接触是在体外。

[0114] 此外,复合物的检测可以通过本领域已知的许多方式进行。例如,本文所述的本发明的TCR、多肽、蛋白、核酸、重组表达载体、宿主细胞或细胞群可以用可检测的标记物,例如放射性同位素、荧光团(如,异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红素(PE))、酶(如,碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶)和元素颗粒(如金颗粒)进行标记。

[0115] 出于本发明方法的目的,其中施用宿主细胞或细胞群时,细胞可以是与哺乳动物同种异体或自体的细胞。优选地,细胞是哺乳动物自体的。

[0116] 关于本发明的方法,癌症可以是任何癌症,包括以下中的任一种:急性淋巴细胞癌、急性髓性白血病、腺泡状横纹肌肉瘤、骨癌、脑癌、乳腺癌、肛门癌、肛管癌或肛门直肠癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌或中耳癌、口腔癌、阴道癌、外阴癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓系癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、宫颈癌、胃肠道类癌肿瘤、胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、肾癌、喉癌、肝癌、肺癌、恶性间皮瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、口咽癌、卵巢癌、阴茎癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌和肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、输尿管癌、和膀胱癌。优选的癌症是胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌或前列腺癌。优选地,肺癌是肺腺癌,卵巢癌是上皮卵巢癌,并且胰腺癌是胰腺腺癌。在另一个优选的实施方案中,癌症是表达具有G12D突变的突变的KRAS氨基酸序列的癌症。

[0117] 本发明方法中提及的哺乳动物可以是任何哺乳动物。如本文所用,术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物,包括但不限于啮齿目的哺乳动物,如小鼠和仓鼠,和兔形目的哺乳动物,如兔。优选地,哺乳动物来自食肉目,包括猫科动物(猫)和犬科动物(狗)。更优选地,哺乳动物来自偶蹄目,包括牛科动物(牛)和猪科动物(猪),或来自奇蹄目,包括马科动物(马)。最优选地,哺乳动物来自灵长目、猿(Ceboids)目或猴(Simoids)目(猴)或来自类人猿目(人和猿)。特别优选的是哺乳动物是人。

[0118] 以下实施例进一步说明了本发明,但当然不应被解释为以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0119] 下一代测序

[0120] 根据制造商的建议,使用QIAGEN ALLPREP DNA/RNA试剂盒(Qiagen,Venlo,Netherlands)从多种肿瘤和匹配的正常单采样品中纯化基因组DNA(gDNA)和总RNA。将一种样品(Tu-Pri)经福尔马林固定,石蜡包埋(FFPE),并且如制造商(Covaris,Woburn,MA)所指导的,使用Covaris TRUXTRACTM FFPE DNA试剂盒提取gDNA。使用与人全外显子V6RNA诱饵偶联的用于配对末端文库的Agilent Technologies SURESELECTXT靶标富集系统(Agilent Technologies,Santa Clara,CA,USA),制备约20,000个编码基因的全外显子组文库构建和外显子捕获。随后在NEXTSEQ 500台式测序仪(Illumina, San Diego,CA,USA)上对全外显子组测序(WES)文库进行测序。根据制造商的方案,使用来自新鲜肿瘤组织样品的3 μ g gDNA和来自FFPE肿瘤样品的200ng gDNA制备文库。使用ILLUMINA高输出流动池试剂盒(300个循环)完成配对末端测序,最初使用v1的试剂/流动池试剂盒,然后在v2的试剂/流动池试剂盒上随后运行相同的文库制备物。使用2 μ g总RNA,用ILLUMINA TRUSEQ RNA Stranded Library Prep Kit,按照制造商的方案制备RNA-seq文库。将RNA-seq文库在NEXTSEQ 500台式测序仪(Illumina, San Diego,CA,USA)上进行配对末端测序。

[0121] 比对、加工和变体识别

[0122] 对于WES,使用来自Novocraft (Selangor,Malaysia) (novocraft.com/)的NOVOALIGN MPI程序对人基因组构建hg19进行比对。使用Picard的MARKDUPLICATES工具标记重复项。根据GATK最佳实践工作流程(broadinstitute.org/gatk/)进行In/del重新比对和碱基重新校准。清理数据后,使用SAMTOOLS实用程序(samtools.sourceforge.net)创建pileup文件,并使用VARSCAN2平台-独立突变识别程序(varscan.sourceforge.net)使用以下标准识别体细胞变体:肿瘤和正常读取计数为10或更多,变体等位基因频率为10%或更多,并且肿瘤变体读取为4或更多。然后使用ANNOVAR软件工具(annovar.openbioinformatics.org)注释这些变体。

[0123] 对于RNA-seq,使用STAR (github.com/alexdobin/STAR) 双通法对人基因组构建hg19进行比对。使用Picard的MARKDUPLICATES工具标记重复项。使用GATK SPLITNTRIM工具拆分和修剪读取。之后使用GATK工具箱进行In/del重新比对和碱基重新校准。使用最终重新校准的bam文件和SAMTOOLS MPILEUP工具创建pileup文件。最后,使用VARSCAN2平台-独立突变识别程序来识别变体。

[0124] 在三种转移性新鲜肿瘤样品(Tu-1、Tu-2A和Tu-2B)上进行WES和RNA-seq。然后使用Integrated Genomics Viewer(IGV)工具(Broad Institute,Cambridge,MA)手动策划具有7%的最小外显子组频率和最少三个备选读取的变体,以便去除似乎由测序或作图错误产生的假阳性识别。为了尝试集中于可能是克隆或在主要克隆群体中代表的突变,基于它们多于两种或更多种肿瘤样品中的检测,选择了61个突变用于进一步分析。这61个突变中的一个突变是KRAS(表2)。这些包括在最少一个WES和一个RNA-seq文库中鉴定的29个突变,以及在来自两个或更多个转移性病变的WES文库中鉴定的32个突变。

[0125] 表2

[0126]	基因符号	KRAS
	转录物 ID	NM_004985
	突变位置	chr12:25398284
	突变类型*	NS SNV
	cDNA 变化	c.G35A
	氨基酸变化	p.G12D
	%突变体读取† (外显子组)	27
	%突变体读取† (RNA)	38
	FPKM‡	7.94

[0127] 肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL)、输注TIL和抗原呈递树突细胞 (DC) 的生成

[0128] 如Tran等人, Science, 350:1387-90 (2015) 中所述生成TIL、输注TIL和树突细胞。简而言之, 为了生成TIL, 将手术切除的肿瘤切成24个大小约1-2mm的碎块, 并将每个碎块置于含有2ml含高剂量IL-2 (6000IU/ml, Chiron, Emeryville, CA) 的完全培养基 (CM) 的24孔板中的单独孔中。CM含有补充有10%内部人血清、2mM L-谷氨酰胺、25mM HEPES和10 μ g/ml庆大霉素的RPMI培养基。选择TIL碎块培养物#6进行处理, 然后使用被辐射的PBMC以1:100的比例在气体可渗透的G-REX100烧瓶中的补充有5%人AB血清、3000IU/ml IL-2和30ng/ml OKT3抗体 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 的400ml 50/50培养基内进行快速扩增程序。50/50培养基含有1:1的CM与AIM-V培养基的混合物。所有细胞在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂下培养。

[0129] 使用塑料贴壁方法从外周血单核细胞生成未成熟的DC。简而言之, 将患者单样品解冻, 洗涤, 用AIM-V培养基 (Life Technologies, Carlsbad, CA) 调到7.5-10e6个细胞/ml, 然后在组织培养烧瓶 (162cm²表面积) 中以约1e6个细胞/cm²孵育, 并在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂下孵育。在90分钟 (min) 后, 收集非贴壁细胞, 并用AIM-V培养基剧烈洗涤烧瓶中的贴壁细胞, 然后用AIM-V培养基进一步孵育60分钟。除去培养基和非贴壁细胞, 然后用AIM-V培养基再次剧烈洗涤烧瓶中的贴壁细胞, 然后用DC培养基孵育。DC培养基含有RPMI, 所述RPMI含有5%人血清、100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素、2mM L-谷氨酰胺、800IU/ml GM-CSF (Leukine (沙格司亭)) 和200U/ml IL-4 (Peprotech, Rocky Hill, NJ)。在第2-3天, 向培养物中添加新鲜的DC培养基。在培养开始后第4天或第5天冷冻保存DC。在培养开始后第4天至第6天, 在实验中使用DC。

[0130] 鉴定突变-反应性T细胞和共培养实验

[0131] 详细方法描述于Tran等人, Science, 350:1387-90 (2015) 中。简而言之, 通过全外显子组和转录组测序鉴定了61个突变。这61个突变中的一个突变是KRAS (表2)。对于每个突变, 生成编码亲本蛋白任一侧上侧翼连接有12个氨基酸的突变的小基因, 并将其串联合成以产生串联小基因 (TMG) 构建体。制备5个编码61个突变的TMG (TMG 1-5), 将其在体外转录成RNA, 然后电穿孔到自体抗原呈递DC中, 允许在患者自身HLA-I和HLA-II分子的背景下处

理和呈递所有突变(表4)。野生型和突变的KRAS的TMG显示在表3中。表4中示出的HLA数据是使用如Bai等人,BMC Genomics,15:325(2014)中所述的算法PHLAT从下一代测序数据确定的。然后将来自患者的二十四个单独的TIL培养物与这些表达TMG的DC共培养,并通过IFN- γ 酶联免疫斑点(ELISPOT)测定(图1A)和流式细胞术分析T细胞活化标志物4-1BB和OX40来测定T细胞反应性。鉴定了对TMG-1具有反应性的多个TIL培养物。为了鉴定TIL培养物#6识别TMG-1中哪种突变的抗原,合成TMG-1中编码的肽(ThermoFisher Scientific(Waltham, MA)和GenScript Inc.(Piscataway Township,NJ)),然后单独脉冲到DC上过夜,然后与TIL培养物#6共培养(图1B)。

[0132] 表3

[0133]	基因符号	KRAS
	氨基酸变化	p • G12D
	野生型小基因(氨基酸)	MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLI (SEQ ID NO:61)
	突变的小基因(氨基酸)	MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLI (SEQ ID NO:62)
	TMG构建体	1

[0134] 表4

	HLA-I						HLA-II					
[0135]	A	A	B	B	C	C	DRB1	DRB1	DQA1	DQA1	DQB1	DQB1
	02:01	03:01	14:01	44:03	08:02	16:01	07:01		02:01		02:02	

[0136] 将以下HPLC纯化的肽(GenScript Inc.)用于肽滴定实验中:野生型(WT)-9mer:GAGGVGKSA (SEQ ID NO:7);突变的(G12D)-9mer:GADGVGKSA (SEQ ID NO:8);WT-10mer:GAGGVGKSAL (SEQ ID NO:5);G12D-10mer:GADGVGKSAL (SEQ ID NO:6)。

[0137] 如Tran等人,Science,344:641-5(2014)中所述,细胞内细胞因子染色(ICS)和流式细胞术用于测定细胞因子IFN- γ 、TNF和IL-2,以及脱粒标志物CD107a的表达。简而言之,将靶细胞和效应细胞在96孔板的各孔中合并,并将GOLGISTOP和GOLGIPLUG蛋白转运抑制剂(均为推荐浓度的1/2)添加到培养物(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)中。在刺激后t=6小时,根据制造商的说明书,使用CYTOFIX/CYTOPERM试剂盒(BD Biosciences)处理细胞。在FACSCANTOII流式细胞仪上捕获细胞,并使用FLOWJO软件(TreeStar Inc., Ashland, OR)分析数据。布尔门分析用于确定表达指示数量的效应功能(细胞因子和脱粒标志物)的细胞的百分比。

[0138] KRAS^{G12D}反应性T细胞克隆的鉴定

[0139] 使用多种方法鉴定了四种KRAS^{G12D}-反应性TCR。输注袋中的主要TRBV5-6 (V β 5.2)克隆在快速扩增之前从TIL碎块培养物#6中分离。简而言之,用抗-V β 5.2-PE(藻红蛋白)抗体(Beckman Coulter, Schaumburg, IL)对TIL培养物#6进行染色,并按照制造商(Miltenyi Biotec)的指示使用与磁性微珠缀合的抗PE特异性抗体富集V β 5.2+细胞。从V β 5.2+T细胞分离总RNA(RNEASY MINI试剂盒,Qiagen),然后使用TCR- α 链和 β 链恒定引物按照制造商(SMARTER RACE cDNA扩增试剂盒, Clontech)的指示进行5'RACE。 α 链和 β 链恒定引物的序列是:TCR- α , 5'-GCC ACA GCA CTG TTG CTC TTG AAG TCC-3' (SEQ ID NO:59);TCR- β , 5'-CAG GCA GTA TCT GGA GTC ATT GAG-3 (SEQ ID NO:60)。将试剂盒的程序1用于PCR,其中对延伸时间进行修改(2分钟而不是3分钟)。然后通过标准琼脂糖凝胶电泳和凝胶提取(酶原)分离

TCR PCR产物,然后对产物进行测序(Macrogen,Seoul,Korea)。

[0140] 输注袋中排名第二和第三的TCR也是KRAS^{G12D}-反应性的,并且通过首先用与KRAS^{G12D}长肽脉冲过夜的DC刺激细胞转移后第40天单采样品来对其进行分离。然后通过FACS分别对过夜刺激后上调T细胞活化标志物4-1BB的Vβ5.2-阳性和阴性CD8+T细胞进行分选。如上所述,在进行5' RACE之前进一步扩增Vβ5.2+细胞,然后是TCR PCR产物的TOPO-TA克隆和单独集落的测序以鉴定TCR-α链和β链。如Pasetto等人,Cancer Immunol.Res.,(2016)中所述,对Vβ5.2-阴性细胞进行单细胞多重TCR PCR以鉴定TCR-α链和β链。

[0141] 使用另一种单细胞技术方法从不同的TIL碎块(TIL碎块#5)鉴定第四KRAS^{G12D}-反应性TCR(在输注袋中排名第45位)。简而言之,将TIL培养物#5与用TMG-1(其编码KRAS^{G12D})转染的DC共培养,并在4小时(h)后收获TIL,并根据制造商的方案使TIL经受FLUIDIGM C1系统(Fluidigm,San Francisco,CA)以制备单细胞RNA-seq样品。然后通过ILLUMINA MISEQ系统对单细胞RNA-seq样品进行测序,并通过内部生物信息学程序分析数据。从样品中提取TCR-α和β序列,证明刺激后IFN-γ转录物上调。

[0142] 体内追踪KRAS^{G12D}-反应性T细胞

[0143] 为了确定样品中KRAS^{G12D}-反应性T细胞的频率,首先鉴定KRAS^{G12D}-反应性T细胞克隆的TCR序列,并且针对来自指示样品的TCR-Vβ深度测序数据对这些序列进行查询。样品中的框内生产性TCR读取的数量范围为522,499至1,990,345。

[0144] 流式细胞术抗体

[0145] 本报告使用以下抗人流式细胞术抗体:CD3-AF700(克隆:UCHT1,BioLegend),CD8-PE-Cy7(克隆:SK1,BD Biosciences),CD4-APC-Cy7(克隆:SK3,BioLegend),OX40-FITC(克隆:Ber-ACT35,BD Biosciences),4-1BB-APC(克隆:4B4-1,BioLegend)和Vβ5.2-PE(Beckman Coulter)。荧光染料缀合的抗小鼠TCR-β恒定区抗体(H57-597,eBioscience)用于评价TCR的转导效率。IO TEST Beta Mark TCR V试剂盒用于评估TCR-Vβ库(Beckman Coulter)。

[0146] 突变-反应性T细胞的鉴定和输注产物的生成

[0147] 先前描述的方法(Lu等人,Clin.Cancer Res.,20:3401-10(2014);Tran等人,Science,344:641-5(2014);Tran等人,Science,350:1387-90(2015))用于测试来自患者4095的TIL是否识别由其转移性肺肿瘤表达的体细胞突变。TIL培养物#6含有最高频率的KRAS^{G12D}-反应性CD8+T细胞,因此在如在Tran等人,Science,344:641-5(2014)中所述的细胞输注之前进行了两周的快速扩增程序。

[0148] 体内追踪KRAS^{G12D}-特异性T细胞克隆

[0149] T细胞受体(TCR)-Vβ深度测序是对从患者的输注产物、治疗前3种单独的肺结节、进展性病变(病变3)以及在细胞输注(Adaptive Biotechnologies,Seattle WA)之前和之后的不同时间的外周血中分离的gDNA进行的,以询问KRAS^{G12D}-反应性TCR序列的频率。

[0150] 评估KRAS^{G12D}-特异性TCR的反应性

[0151] 鉴定了四种KRAS^{G12D}-反应性TCR,并合成了TCR-α链和β链序列,然后将其克隆到MSGV1逆转录病毒载体(GenScript Inc.)中。生成编码TCR的逆转录病毒上清液,并将其用于转导自体外周血T细胞,如Tran等人,Science,344:641-5(2014)中所述。然后将TCR转导的T细胞与负载有滴定剂量的各种KRAS肽的自体外周血单核细胞(PBMC),或者稳定表达或

不表达限制性HLA-C*08:02等位基因的KRAS^{G12D}-阳性胰腺癌细胞系共培养(Tran等人, Science, 350:1387-90 (2015))。第二天,通过IFN- γ ELISPOT测定和流式细胞术分析T细胞活化标志物4-1BB和OX40来确定T细胞反应性(Tran等人, Science, 350:1387-90 (2015))。

[0152] 实施例1

[0153] 该实施例证明了KRAS^{G12D}突变-反应性CD8+T细胞的体内频率。

[0154] 患者为患有结肠直肠癌和多发性双侧肺转移的49岁女性。她先前在乙状结肠切除术和膀胱部分切除术后接受了12个周期的FOLF0X化疗,然后对膀胱缝合线进行了4182cGy辐射。此后不久,她经历了FDG亲合的双侧肺结节的数量和大小的增加。右下叶结节的活检与转移性结肠直肠癌一致。

[0155] 该患者被登记在机构审查委员会批准的II期临床试验(ClinicalTrials.gov编号, NCT01174121)中,其经设计以测试含有靶向癌症突变的T细胞的体外扩增的肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的过继性转移是否可以介导转移性实体瘤的消退。基线CT扫描显示肺病是癌症进展的唯一来源。使用电视辅助胸腔镜手术(VATS)切除了三个肺部病变,并且从多个肿瘤碎块生成24个单独的TIL培养物。对3个病变也进行了全外显子组和转录组测序,以鉴定肿瘤表达的突变(表2)。评价每种TIL培养物对这些突变的反应性。发现患者的TIL含有特异性识别KRAS^{G12D}突变的CD8+T细胞(图1A和图1B)。选择显示出最高频率的KRAS^{G12D}-反应性CD8+T细胞的TIL培养物。扩增所选细胞的数量以进行治疗(图1B和图1C)。在细胞输注之前,患者经历非骨髓性淋巴清除化疗方案,包括60mg/kg环磷酰胺,持续2天,然后25mg/m²氟达拉滨,持续5天(Dudley等人, J. Clin. Oncol., 23:2346-57 (2005))。患者接受单次输注 1.48×10^{11} 个TIL,然后5个剂量的720,000IU/kg的白介素-2(IL-2),由于疲劳而停止。该疗法耐受性良好,并且患者在细胞输注后两周被送回家。大约75%的输注产物含有特异性识别KRAS^{G12D}突变的CD8+T细胞,这些T细胞中的大多数产生多种效应细胞因子(IFN- γ 、TNF和IL-2),并显示出细胞裂解潜力。所有7个转移性肺部病变在细胞转移后40天的第一次随访时消退,并且6/7的病变继续消退或完全响应直至一个病变(病变3)在治疗后约9个月进展。在细胞转移后约9个月时进行左下肺的VATS切除术,以去除唯一的进展性病变(病变3)以及响应病变(病变2),其为PET阴性的且完全坏死,以及通过病理分析确定没有活肿瘤细胞。在肺切除后3个月,患者保持临床上无疾病。

[0156] 输注TIL产物含有至少四种不同频率的KRAS^{G12D}-反应性T细胞克隆型。输注产物中三个最高频率的TCR对KRAS^{G12D}具有反应性,占输注袋的49.5%、19.1%和6.9%,而第四KRAS^{G12D}-反应性TCR是第45个最常见的,并且仅以输注袋的0.04%存在(图2A-2D和表5)。在输注前一周,在患者的外周血中未检测到这些KRAS^{G12D}-反应性TCR中的任一种(频率<0.0002%) (图2A-2D)。细胞转移后,观察到KRAS^{G12D}-反应性TCR植入的显著差异。在细胞转移后第40天的血液中未检测到最主要的输注T细胞克隆型($\sim 7.3 \times 10^{10}$ 个细胞),而在此时间点检测到剩余的KRAS^{G12D}-反应性T细胞克隆(图2A-2D)。存留在外周血中的KRAS^{G12D}-反应性T细胞克隆占细胞转移后约9个月时所有外周血T细胞的10.4%、4.5%和0.005%,并且此时外周血中最主要的T细胞克隆是TRBV10-02突变体KRAS^{G12D}-反应性TCR(图2A-2D和表5)。相对于外周血,在进展性肿瘤中似乎没有KRAS^{G12D}-反应性T细胞克隆的富集(图2A-2D)。

[0157]

表 5

患者 ID	TCR- α /TCR- β 基因名称	TCR- α /TCR- β CDR3 氨基酸序列	肿瘤样品中的频率†	肿瘤样品中的排序†	肿瘤样品中 TCR- α /TCR- β CDR3 氨基酸序列	肿瘤样品中的频率†	肿瘤样品中的排序†	输出产物中的频率	输出产物中的排序	d+266 血液中的频率	d+266 血液中的排序
4095	TRAV4/ TRBV5-6 (A)	CLVGDMDQAGTALIF (SEQ ID NO: 11)/ CASSLGEGRVDGYTF (SEQ ID NO: 14)	0.21	20		0.21	20	49.5	1	不可检测	不适用
			0.20	26		0.20	26				
			0.16	33		0.16	33				
4095	TRAV12-2/ TRBV10-2	CAAAMDSSYKLIF (SEQ ID NO: 35)/ CASSDPGTEAFF (SEQ ID NO: 38)	2.7	1		2.7	1	19.1	2	10.4	1
			3.0	1		3.0	1				
			2.9	2		2.9	2				
4095	TRAV4/ TRBV5-6 (B)	CLVGDRDQAGTALIF (SEQ ID NO: 27)/ CASSFGQSSSTYGYTF (SEQ ID NO: 30)	不可检测	NA		不可检测	NA	6.9	3	4.5	5
4095	TRAV4/ TRBV5-6 (C)	CLVGDMDQAGTALIF (SEQ ID NO: 19)/ CASSLGRASNQPQHF (SEQ ID NO: 19)	0.02	917		0.02	917	0.04	45	0.005	1784
			0.01	1589		0.01	1589				
			0.008	2243		0.008	2243				

[0158]

NO: 22)

† 对患者 4095 评估三种不同的转移性肿瘤碎块。
d+266 = 细胞转移后 266 天。

[0159] 实施例2

[0160] 该实施例证明了KRAS^{G12D}-反应性TCR的特异性和敏感性。

[0161] 从实施例1的四种KRAS^{G12D}-反应性T细胞克隆型中的每一种克隆编码TCR的核苷酸序列。将每种TCR克隆到MSGV1-逆转录病毒载体中。四种TCR中每一种的 α 链和 β 链的氨基酸序列显示在表6中。

[0162] 表6

[0163]

TCR- α /TCR- β 基因名称	可变区 α 链氨基酸序列	可变区 β 链氨基酸序列
TRAV4/ TRBV5-6 (A)	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
TRAV12-2/ TRBV10-2	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40
TRAV4/ TRBV5-6 (B)	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32
TRAV4/ TRBV5-6 (C)	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24

[0164] 克隆到MSGV1-逆转录病毒载体中的核苷酸序列编码TCR α 链的可变区(表6所示)和鼠TCR α 链恒定区,接着是P2A接头序列(SEQ ID NO:58)以及编码TCR β 链的可变区(表6所示)和鼠TCR β 链恒定区的核苷酸序列。进一步修饰TCR以在鼠 α 链和 β 链的恒定区中包含半胱氨酸取代与在鼠的具有疏水性氨基酸的 α 链的恒定区的TM结构域中的三个氨基酸的取代的组合。四种TCR中每一种的全长氨基酸序列显示在表7中。不受特定理论或机制的束缚,认为鼠TCR α 和 β 恒定链可减少与内源性TCR的错配,并可促进宿主细胞表达引入的TCR。还认为,通过在TCR α 恒定链中掺入疏水性氨基酸,并在 α 链和 β 链恒定区之间引入第二个二硫键,可以实现引入的TCR α 链和 β 链的增强的表达和配对。

[0165] 表7

[0166]

TCR- α /TCR- β 基因名称	α 链氨基酸序列	β 链氨基酸序列
TRAV4/ TRBV5-6 (A)	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 51
TRAV12-2/ TRBV10-2	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 57
TRAV4/ TRBV5-6 (B)	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 55
TRAV4/ TRBV5-6 (C)	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 53

[0167]

[0168] 将自体外周血T细胞进行基因修饰,以表达这四种TCR中的一种。在TCR基因修饰后第10天通过鼠TCR- β 恒定区(mTCR- β)的流式细胞术分析,评价引入的TCR的细胞表面表达,因为TCR经设计具有鼠TCR- α 和 β 恒定区。载体转导的细胞用作阴性对照。门控数据在CD8+T

细胞上门控。表达鼠TCR- β 恒定区的细胞百分比显示在表8中。

[0169] 表8

[0170]	转导的载体	%
	TRAV4/ TRBV5-6 (A)	83
	TRAV12-2/ TRBV10-2	83
	TRAV4/ TRBV5-6 (B)	83
	TRAV4/ TRBV5-6 (C)	79
	空载体(对照)	0

[0171] 将TCR工程改造的T细胞与自体PBMC过夜共培养,所述自体PBMC与滴定量的KRAS野生型(WT)或G12D突变的9mer或10mer肽一起孵育。测量表达T细胞活化标志物4-1BB的细胞百分比。结果显示在图3A-3D中。四种TCR中的三种优先对9个氨基酸长的KRAS^{G12D}肽GADGVGKSA (SEQ ID NO:8) 具有反应性,而一种TCR仅对10个氨基酸长的KRAS^{G12D}肽GADGVGKSAL (SEQ ID NO:6) 具有反应性(图3A-3D)。所有TCR都对突变具有特异性,并且不识别野生型KRAS肽(图3A-3D)。肽滴定实验证明,当脉冲到自体PBMC上时,TCR能够识别浓度为1-10nM的肽(图3A-3D)。

[0172] 将TCR工程改造的T细胞与不表达或表达HLA-C*08:02等位基因的两种KRAS^{G12D}-阳性胰腺癌细胞系(MDA-Panc48或HPAC)中的一种共培养过夜。通过ELISPOT测定来测量IFN- γ 分泌,并通过流式细胞术测量4-1BB表达。结果显示在图4A-4B中。只有当TCR表达KRAS^{G12D}突变和HLA-C*08:02等位基因两者时,它们才特异性识别胰腺癌细胞系(图4A-4B)。

[0173] 实施例3

[0174] 该实施例证明经转导以表达TRAV12-2/TRBV10-2TCR (SEQ ID NO:56和57) 的细胞在HLA等位基因C*08:02或C*05:01的背景下识别突变的KRAS。

[0175] 如实施例2中所述,将自体外周血T细胞进行基因修饰,以表达四种TCR中的一种。将COS7细胞用全长野生型(wt)KRAS或KRAS-G12D基因和HLA等位基因C*07:01、C*08:02或C*05:01共转染,然后与指示的KRAS^{G12D}-反应性TCR转导的细胞共培养。第二天通过流式细胞术分析细胞的4-1BB表达。结果显示在图5A-5D中。数据在TCR-转导的(小鼠TCR β +) CD8+T细胞上进行门控。HLA-C*07:01用作阴性对照HLA等位基因。

[0176] 在此将本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利通过引用并入,其程度如同将各参考文献单独且明确指明通过引用并入,并且在本文整体示出一样。

[0177] 术语“一个/一种(a)”和“一个/一种(an)”和“所述(the)”和“至少一个/一种”以及类似的指代物在描述本发明的上下文中(特别是在下述权利要求的上下文中)的使用被解释为既涵盖单数又涵盖复数,除非本文另外指明或者上下文明显矛盾。术语“至少一种/一

个”之后一项或多项列表(例如,“A和B中的至少一种/一个”)的使用应被解释为意指选自列出的项中的一项(A或B)或两个或更多个列出的项的组合(A和B),除非本文另外指出或与上文明显矛盾。术语“包含(comprising)”、“具有(having)”、“包括(including)”以及“含有(containing)”被解释为开放式术语(即,意为“包括但不限于”),除非另外标注。本文数值范围的叙述仅意图作为单独指落入范围内的各独立数值的速记法,除非本文另外指明,并且各独立的数值并入说明书如同本文单独对其进行叙述一样。可以以任何合适的顺序实施本文所述的所有方法,除非本文另外指明或者在其它方面与上文明显矛盾。本文提供的任何或所有实施例或者示例性语言(例如“如”)的使用仅意图更好地阐明本发明,并且不对本发明的范围构成限制,除非另外声明。说明书中的语言均不应被解释为指示任何未要求保护的元素对于本发明的实践是必要的。

[0178] 本文描述了本发明的优选实施方案,包括发明人已知的实施本发明的最佳方式。经阅读前述描述,那些优选实施方案的改变对于本领域普通技术人员而言可以变得显而易见。发明人期望本领域技术人员视情况应用此类改变,并且发明人意图以与本文具体所述的不同的方式实践本发明。因此,如适用的法律所允许的,本发明包括在此所附的权利要求中所述的主题的所有修饰和等同物。此外,本发明涵盖以上所述元素的所有可能的改变的任何组合,除非本文另外指明或者在其它方面与上文明显矛盾。

[0001]	序列表																
[0002]	<110>	美国卫生和人力服务部 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE															
[0003]		SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES)															
[0004]	<120>	抗KRAS-G12D T细胞受体															
[0005]	<130>	728242															
[0006]	<150>	US 62/369,883															
[0007]	<151>	2016-08-02															
[0008]	<160>	70															
[0009]	<170>	SIPOSequenceListing 1.0															
[0010]	<210>	1															
[0011]	<211>	189															
[0012]	<212>	PRT															
[0013]	<213>	智人 (Homo sapiens)															
[0014]	<400>	1															
[0015]	Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys																
[0016]	1	5	10	15													
[0017]	Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr																
[0018]	20	25	30														
[0019]	Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly																
[0020]	35	40	45														
[0021]	Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr																
[0022]	50	55	60														
[0023]	Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys																
[0024]	65	70	75	80													
[0025]	Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr																
[0026]	85	90	95														
[0027]	Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val																
[0028]	100	105	110														
[0029]	Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys																
[0030]	115	120	125														
[0031]	Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr																
[0032]	130	135	140														
[0033]	Ser Ala Lys Thr Arg Gln Arg Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val																
[0034]	145	150	155	160													
[0035]	Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Ile Ser Lys Glu Glu Lys																
[0036]	165	170	175														
[0037]	Thr Pro Gly Cys Val Lys Ile Lys Lys Cys Ile Ile Met																

[0038]		180		185
[0039]	<210>	2		
[0040]	<211>	188		
[0041]	<212>	PRT		
[0042]	<213>	智人 (Homo sapiens)		
[0043]	<400>	2		
[0044]	Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys			
[0045]	1	5	10	15
[0046]	Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr			
[0047]		20	25	30
[0048]	Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly			
[0049]		35	40	45
[0050]	Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr			
[0051]		50	55	60
[0052]	Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys			
[0053]	65	70	75	80
[0054]	Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr			
[0055]		85	90	95
[0056]	Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val			
[0057]		100	105	110
[0058]	Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys			
[0059]		115	120	125
[0060]	Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr			
[0061]		130	135	140
[0062]	Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val			
[0063]	145	150	155	160
[0064]	Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys			
[0065]		165	170	175
[0066]	Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met			
[0067]		180	185	
[0068]	<210>	3		
[0069]	<211>	189		
[0070]	<212>	PRT		
[0071]	<213>	智人 (Homo sapiens)		
[0072]	<400>	3		
[0073]	Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys			
[0074]	1	5	10	15
[0075]	Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr			
[0076]		20	25	30

[0077]	Asp	Pro	Thr	Ile	Glu	Asp	Ser	Tyr	Arg	Lys	Gln	Val	Val	Ile	Asp	Gly
[0078]				35					40					45		
[0079]	Glu	Thr	Cys	Leu	Leu	Asp	Ile	Leu	Asp	Thr	Ala	Gly	Gln	Glu	Glu	Tyr
[0080]			50					55				60				
[0081]	Ser	Ala	Met	Arg	Asp	Gln	Tyr	Met	Arg	Thr	Gly	Glu	Gly	Phe	Leu	Cys
[0082]	65					70					75					80
[0083]	Val	Phe	Ala	Ile	Asn	Asn	Thr	Lys	Ser	Phe	Glu	Asp	Ile	His	His	Tyr
[0084]					85					90					95	
[0085]	Arg	Glu	Gln	Ile	Lys	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Glu	Asp	Val	Pro	Met	Val
[0086]				100					105					110		
[0087]	Leu	Val	Gly	Asn	Lys	Cys	Asp	Leu	Pro	Ser	Arg	Thr	Val	Asp	Thr	Lys
[0088]			115					120					125			
[0089]	Gln	Ala	Gln	Asp	Leu	Ala	Arg	Ser	Tyr	Gly	Ile	Pro	Phe	Ile	Glu	Thr
[0090]		130					135					140				
[0091]	Ser	Ala	Lys	Thr	Arg	Gln	Arg	Val	Glu	Asp	Ala	Phe	Tyr	Thr	Leu	Val
[0092]	145					150					155					160
[0093]	Arg	Glu	Ile	Arg	Gln	Tyr	Arg	Leu	Lys	Lys	Ile	Ser	Lys	Glu	Glu	Lys
[0094]					165					170					175	
[0095]	Thr	Pro	Gly	Cys	Val	Lys	Ile	Lys	Lys	Cys	Ile	Ile	Met			
[0096]				180						185						
[0097]	<210>	4														
[0098]	<211>	188														
[0099]	<212>	PRT														
[0100]	<213>	智人 (Homo sapiens)														
[0101]	<400>	4														
[0102]	Met	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Val	Val	Val	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Lys
[0103]	1				5					10					15	
[0104]	Ser	Ala	Leu	Thr	Ile	Gln	Leu	Ile	Gln	Asn	His	Phe	Val	Asp	Glu	Tyr
[0105]				20					25					30		
[0106]	Asp	Pro	Thr	Ile	Glu	Asp	Ser	Tyr	Arg	Lys	Gln	Val	Val	Ile	Asp	Gly
[0107]			35						40					45		
[0108]	Glu	Thr	Cys	Leu	Leu	Asp	Ile	Leu	Asp	Thr	Ala	Gly	Gln	Glu	Glu	Tyr
[0109]		50						55				60				
[0110]	Ser	Ala	Met	Arg	Asp	Gln	Tyr	Met	Arg	Thr	Gly	Glu	Gly	Phe	Leu	Cys
[0111]	65					70					75					80
[0112]	Val	Phe	Ala	Ile	Asn	Asn	Thr	Lys	Ser	Phe	Glu	Asp	Ile	His	His	Tyr
[0113]					85					90					95	
[0114]	Arg	Glu	Gln	Ile	Lys	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Glu	Asp	Val	Pro	Met	Val
[0115]				100					105					110		

[0116]	Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
[0117]	115 120 125
[0118]	Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
[0119]	130 135 140
[0120]	Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
[0121]	145 150 155 160
[0122]	Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys
[0123]	165 170 175
[0124]	Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met
[0125]	180 185
[0126]	<210> 5
[0127]	<211> 10
[0128]	<212> PRT
[0129]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0130]	<400> 5
[0131]	Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu
[0132]	1 5 10
[0133]	<210> 6
[0134]	<211> 10
[0135]	<212> PRT
[0136]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0137]	<400> 6
[0138]	Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu
[0139]	1 5 10
[0140]	<210> 7
[0141]	<211> 9
[0142]	<212> PRT
[0143]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0144]	<400> 7
[0145]	Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys Ser Ala
[0146]	1 5
[0147]	<210> 8
[0148]	<211> 9
[0149]	<212> PRT
[0150]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0151]	<400> 8
[0152]	Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala
[0153]	1 5
[0154]	<210> 9

[0155]	<211>	7
[0156]	<212>	PRT
[0157]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0158]	<400>	9
[0159]	Asn Ile Ala Thr Asn Asp Tyr	
[0160]	1	5
[0161]	<210>	10
[0162]	<211>	5
[0163]	<212>	PRT
[0164]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0165]	<400>	10
[0166]	Gly Tyr Lys Thr Lys	
[0167]	1	5
[0168]	<210>	11
[0169]	<211>	15
[0170]	<212>	PRT
[0171]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0172]	<400>	11
[0173]	Cys Leu Val Gly Asp Met Asp Gln Ala Gly Thr Ala Leu Ile Phe	
[0174]	1	5 10 15
[0175]	<210>	12
[0176]	<211>	5
[0177]	<212>	PRT
[0178]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0179]	<400>	12
[0180]	Ser Gly His Asp Thr	
[0181]	1	5
[0182]	<210>	13
[0183]	<211>	6
[0184]	<212>	PRT
[0185]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0186]	<400>	13
[0187]	Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu	
[0188]	1	5
[0189]	<210>	14
[0190]	<211>	15
[0191]	<212>	PRT
[0192]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0193]	<400>	14

[0194]	Cys	Ala	Ser	Ser	Leu	Gly	Glu	Gly	Arg	Val	Asp	Gly	Tyr	Thr	Phe	
[0195]	1				5					10					15	
[0196]	<210>	15														
[0197]	<211>	129														
[0198]	<212>	PRT														
[0199]	<213>	智人 (Homo sapiens)														
[0200]	<400>	15														
[0201]	Met	Arg	Gln	Val	Ala	Arg	Val	Ile	Val	Phe	Leu	Thr	Leu	Ser	Thr	Leu
[0202]	1				5					10						15
[0203]	Ser	Leu	Ala	Lys	Thr	Thr	Gln	Pro	Ile	Ser	Met	Asp	Ser	Tyr	Glu	Gly
[0204]				20					25					30		
[0205]	Gln	Glu	Val	Asn	Ile	Thr	Cys	Ser	His	Asn	Asn	Ile	Ala	Thr	Asn	Asp
[0206]			35					40					45			
[0207]	Tyr	Ile	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Phe	Pro	Ser	Gln	Gly	Pro	Arg	Phe	Ile
[0208]		50					55					60				
[0209]	Ile	Gln	Gly	Tyr	Lys	Thr	Lys	Val	Thr	Asn	Glu	Val	Ala	Ser	Leu	Phe
[0210]	65					70					75					80
[0211]	Ile	Pro	Ala	Asp	Arg	Lys	Ser	Ser	Thr	Leu	Ser	Leu	Pro	Arg	Val	Ser
[0212]				85						90					95	
[0213]	Leu	Ser	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Val	Gly	Asp	Met	Asp	Gln
[0214]				100					105					110		
[0215]	Ala	Gly	Thr	Ala	Leu	Ile	Phe	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	Leu	Ser	Val	Ser
[0216]			115					120					125			
[0217]	Ser															
[0218]	<210>	16														
[0219]	<211>	133														
[0220]	<212>	PRT														
[0221]	<213>	智人 (Homo sapiens)														
[0222]	<400>	16														
[0223]	Met	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Cys	Trp	Ala	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Gly	Ala
[0224]	1				5					10						15
[0225]	Gly	Leu	Val	Asp	Ala	Gly	Val	Thr	Gln	Ser	Pro	Thr	His	Leu	Ile	Lys
[0226]				20					25					30		
[0227]	Thr	Arg	Gly	Gln	Gln	Val	Thr	Leu	Arg	Cys	Ser	Pro	Lys	Ser	Gly	His
[0228]			35					40					45			
[0229]	Asp	Thr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Ala	Leu	Gly	Gln	Gly	Pro	Gln	Phe
[0230]		50					55					60				
[0231]	Ile	Phe	Gln	Tyr	Tyr	Glu	Glu	Glu	Glu	Arg	Gln	Arg	Gly	Asn	Phe	Pro
[0232]	65					70				75						80

[0233]	Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn
[0234]	85 90 95
[0235]	Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
[0236]	100 105 110
[0237]	Ser Leu Gly Glu Gly Arg Val Asp Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr
[0238]	115 120 125
[0239]	Arg Leu Thr Val Val
[0240]	130
[0241]	<210> 17
[0242]	<211> 7
[0243]	<212> PRT
[0244]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0245]	<400> 17
[0246]	Asn Ile Ala Thr Asn Asp Tyr
[0247]	1 5
[0248]	<210> 18
[0249]	<211> 5
[0250]	<212> PRT
[0251]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0252]	<400> 18
[0253]	Gly Tyr Lys Thr Lys
[0254]	1 5
[0255]	<210> 19
[0256]	<211> 15
[0257]	<212> PRT
[0258]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0259]	<400> 19
[0260]	Cys Leu Val Gly Asp Met Asp Gln Ala Gly Thr Ala Leu Ile Phe
[0261]	1 5 10 15
[0262]	<210> 20
[0263]	<211> 5
[0264]	<212> PRT
[0265]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0266]	<400> 20
[0267]	Ser Gly His Asp Thr
[0268]	1 5
[0269]	<210> 21
[0270]	<211> 6
[0271]	<212> PRT

[0272] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [0273] <400> 21
 [0274] Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu
 [0275] 1 5
 [0276] <210> 22
 [0277] <211> 15
 [0278] <212> PRT
 [0279] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [0280] <400> 22
 [0281] Cys Ala Ser Ser Leu Gly Arg Ala Ser Asn Gln Pro Gln His Phe
 [0282] 1 5 10 15
 [0283] <210> 23
 [0284] <211> 129
 [0285] <212> PRT
 [0286] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [0287] <400> 23
 [0288] Met Arg Gln Val Ala Arg Val Ile Val Phe Leu Thr Leu Ser Thr Leu
 [0289] 1 5 10 15
 [0290] Ser Leu Ala Lys Thr Thr Gln Pro Ile Ser Met Asp Ser Tyr Glu Gly
 [0291] 20 25 30
 [0292] Gln Glu Val Asn Ile Thr Cys Ser His Asn Asn Ile Ala Thr Asn Asp
 [0293] 35 40 45
 [0294] Tyr Ile Thr Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Ser Gln Gly Pro Arg Phe Ile
 [0295] 50 55 60
 [0296] Ile Gln Gly Tyr Lys Thr Lys Val Thr Asn Glu Val Ala Ser Leu Phe
 [0297] 65 70 75 80
 [0298] Ile Pro Ala Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Ser Leu Pro Arg Val Ser
 [0299] 85 90 95
 [0300] Leu Ser Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Val Gly Asp Met Asp Gln
 [0301] 100 105 110
 [0302] Ala Gly Thr Ala Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Thr Leu Ser Val Ser
 [0303] 115 120 125
 [0304] Ser
 [0305] <210> 24
 [0306] <211> 133
 [0307] <212> PRT
 [0308] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [0309] <400> 24
 [0310] Met Gly Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala

[0311]	1	5	10	15
[0312]	Gly Leu Val Asp Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys			
[0313]	20	25	30	
[0314]	Thr Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Lys Ser Gly His			
[0315]	35	40	45	
[0316]	Asp Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe			
[0317]	50	55	60	
[0318]	Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro			
[0319]	65	70	75	80
[0320]	Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn			
[0321]	85	90	95	
[0322]	Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser			
[0323]	100	105	110	
[0324]	Ser Leu Gly Arg Ala Ser Asn Gln Pro Gln His Phe Gly Asp Gly Thr			
[0325]	115	120	125	
[0326]	Arg Leu Ser Ile Leu			
[0327]	130			
[0328]	<210> 25			
[0329]	<211> 7			
[0330]	<212> PRT			
[0331]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[0332]	<400> 25			
[0333]	Asn Ile Ala Thr Asn Asp Tyr			
[0334]	1	5		
[0335]	<210> 26			
[0336]	<211> 5			
[0337]	<212> PRT			
[0338]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[0339]	<400> 26			
[0340]	Gly Tyr Lys Thr Lys			
[0341]	1	5		
[0342]	<210> 27			
[0343]	<211> 15			
[0344]	<212> PRT			
[0345]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[0346]	<400> 27			
[0347]	Cys Leu Val Gly Asp Arg Asp Gln Ala Gly Thr Ala Leu Ile Phe			
[0348]	1	5	10	15
[0349]	<210> 28			

[0389]	Ala Gly Thr Ala Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Thr Leu Ser Val Ser
[0390]	115 120 125
[0391]	Ser
[0392]	<210> 32
[0393]	<211> 133
[0394]	<212> PRT
[0395]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0396]	<400> 32
[0397]	Met Gly Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala
[0398]	1 5 10 15
[0399]	Gly Leu Val Asp Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys
[0400]	20 25 30
[0401]	Thr Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Lys Ser Gly His
[0402]	35 40 45
[0403]	Asp Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe
[0404]	50 55 60
[0405]	Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro
[0406]	65 70 75 80
[0407]	Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn
[0408]	85 90 95
[0409]	Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
[0410]	100 105 110
[0411]	Ser Phe Gly Gln Ser Ser Thr Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr
[0412]	115 120 125
[0413]	Arg Leu Thr Val Val
[0414]	130
[0415]	<210> 33
[0416]	<211> 6
[0417]	<212> PRT
[0418]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0419]	<400> 33
[0420]	Asp Arg Gly Ser Gln Ser
[0421]	1 5
[0422]	<210> 34
[0423]	<211> 6
[0424]	<212> PRT
[0425]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0426]	<400> 34
[0427]	Ile Tyr Ser Asn Gly Asp

[illegible]

[0467]	35	40	45
[0468]	Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser		
[0469]	50	55	60
[0470]	Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly		
[0471]	65	70	75
[0472]	Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu		
[0473]	85	90	95
[0474]	Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala		
[0475]	100	105	110
[0476]	Ala Met Asp Ser Ser Tyr Lys Leu Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu		
[0477]	115	120	125
[0478]	Leu Val Arg Pro		
[0479]	130		
[0480]	<210> 40		
[0481]	<211> 130		
[0482]	<212> PRT		
[0483]	<213> 智人(Homo sapiens)		
[0484]	<400> 40		
[0485]	Met Gly Thr Arg Leu Phe Phe Tyr Val Ala Leu Cys Leu Leu Trp Ala		
[0486]	1	5	10
[0487]	Gly His Arg Asp Ala Gly Ile Thr Gln Ser Pro Arg Tyr Lys Ile Thr		
[0488]	20	25	30
[0489]	Glu Thr Gly Arg Gln Val Thr Leu Met Cys His Gln Thr Trp Ser His		
[0490]	35	40	45
[0491]	Ser Tyr Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Leu Gly His Gly Leu Arg Leu		
[0492]	50	55	60
[0493]	Ile Tyr Tyr Ser Ala Ala Ala Asp Ile Thr Asp Lys Gly Glu Val Pro		
[0494]	65	70	75
[0495]	Asp Gly Tyr Val Val Ser Arg Ser Lys Thr Glu Asn Phe Pro Leu Thr		
[0496]	85	90	95
[0497]	Leu Glu Ser Ala Thr Arg Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser		
[0498]	100	105	110
[0499]	Ser Asp Pro Gly Thr Glu Ala Phe Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Thr		
[0500]	115	120	125
[0501]	Val Val		
[0502]	130		
[0503]	<210> 41		
[0504]	<211> 141		
[0505]	<212> PRT		

[0506]	<213>	智人 (Homo sapiens)
[0507]	<220>	
[0508]	<221>	SITE
[0509]	<222>	(1) .. (1)
[0510]	<223>	Xaa可为任何天然存在的氨基酸
[0511]	<400>	41
[0512]	Xaa	Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
[0513]	1	5 10 15
[0514]	Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr	
[0515]	20	25 30
[0516]	Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr	
[0517]	35	40 45
[0518]	Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala	
[0519]	50	55 60
[0520]	Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser	
[0521]	65	70 75 80
[0522]	Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp	
[0523]	85	90 95
[0524]	Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe	
[0525]	100	105 110
[0526]	Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala	
[0527]	115	120 125
[0528]	Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser	
[0529]	130	135 140
[0530]	<210>	42
[0531]	<211>	177
[0532]	<212>	PRT
[0533]	<213>	智人 (Homo sapiens)
[0534]	<400>	42
[0535]	Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro	
[0536]	1	5 10 15
[0537]	Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu	
[0538]	20	25 30
[0539]	Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn	
[0540]	35	40 45
[0541]	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys	
[0542]	50	55 60
[0543]	Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu	
[0544]	65	70 75 80

[0545]	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys
[0546]						85				90					95	
[0547]	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp
[0548]						100				105					110	
[0549]	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg
[0550]						115				120					125	
[0551]	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Ser
[0552]						130				135					140	
[0553]	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala
[0554]	145					150				155					160	
[0555]	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg	Lys	Asp
[0556]						165				170					175	
[0557]	Phe															
[0558]	<210>	43														
[0559]	<211>	179														
[0560]	<212>	PRT														
[0561]	<213>	智人 (Homo sapiens)														
[0562]	<400>	43														
[0563]	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro
[0564]	1					5				10					15	
[0565]	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu
[0566]						20				25					30	
[0567]	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn
[0568]						35				40					45	
[0569]	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys
[0570]						50				55					60	
[0571]	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu
[0572]	65					70				75					80	
[0573]	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys
[0574]						85				90					95	
[0575]	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp
[0576]						100				105					110	
[0577]	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg
[0578]						115				120					125	
[0579]	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Ser
[0580]						130				135					140	
[0581]	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala
[0582]	145					150				155					160	
[0583]	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg	Lys	Asp

[0584]		165		170		175
[0585]	Ser Arg Gly					
[0586]	<210> 44					
[0587]	<211> 137					
[0588]	<212> PRT					
[0589]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)					
[0590]	<400> 44					
[0591]	Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg					
[0592]	1	5		10		15
[0593]	Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile					
[0594]		20		25		30
[0595]	Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr					
[0596]		35		40		45
[0597]	Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala					
[0598]		50		55		60
[0599]	Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr					
[0600]	65	70		75		80
[0601]	Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr					
[0602]		85		90		95
[0603]	Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser					
[0604]		100		105		110
[0605]	Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu					
[0606]		115		120		125
[0607]	Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser					
[0608]		130		135		
[0609]	<210> 45					
[0610]	<211> 173					
[0611]	<212> PRT					
[0612]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)					
[0613]	<400> 45					
[0614]	Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro					
[0615]	1	5		10		15
[0616]	Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu					
[0617]		20		25		30
[0618]	Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn					
[0619]		35		40		45
[0620]	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys					
[0621]		50		55		60
[0622]	Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala					

[0623]	65	70	75	80
[0624]	Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe			
[0625]		85	90	95
[0626]	His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro			
[0627]		100	105	110
[0628]	Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly			
[0629]		115	120	125
[0630]	Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu			
[0631]		130	135	140
[0632]	Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser			
[0633]	145	150	155	160
[0634]	Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser			
[0635]		165	170	
[0636]	<210>	46		
[0637]	<211>	137		
[0638]	<212>	PRT		
[0639]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0640]	<220>			
[0641]	<221>	PEPTIDE		
[0642]	<222>	() .. ()		
[0643]	<223>	合成		
[0644]	<220>			
[0645]	<221>	SITE		
[0646]	<222>	(48) .. (48)		
[0647]	<223>	Xaa是Thr或Cys		
[0648]	<220>			
[0649]	<221>	SITE		
[0650]	<222>	(112) .. (112)		
[0651]	<223>	Xaa是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp		
[0652]	<220>			
[0653]	<221>	SITE		
[0654]	<222>	(114) .. (114)		
[0655]	<223>	Xaa是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp		
[0656]	<220>			
[0657]	<221>	SITE		
[0658]	<222>	(115) .. (115)		
[0659]	<223>	Xaa是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp		
[0660]	<400>	46		
[0661]	Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg			

[0662]	1	5	10	15
[0663]	Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile			
[0664]	20	25	30	
[0665]	Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Xaa			
[0666]	35	40	45	
[0667]	Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala			
[0668]	50	55	60	
[0669]	Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr			
[0670]	65	70	75	80
[0671]	Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr			
[0672]	85	90	95	
[0673]	Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Xaa			
[0674]	100	105	110	
[0675]	Val Xaa Xaa Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu			
[0676]	115	120	125	
[0677]	Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser			
[0678]	130	135		
[0679]	<210>	47		
[0680]	<211>	173		
[0681]	<212>	PRT		
[0682]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0683]	<220>			
[0684]	<221>	PEPTIDE		
[0685]	<222>	()..()		
[0686]	<223>	合成		
[0687]	<220>			
[0688]	<221>	SITE		
[0689]	<222>	(57)..(57)		
[0690]	<223>	Xaa是Ser或Cys		
[0691]	<400>	47		
[0692]	Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro			
[0693]	1	5	10	15
[0694]	Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu			
[0695]	20	25	30	
[0696]	Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn			
[0697]	35	40	45	
[0698]	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Xaa Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys			
[0699]	50	55	60	
[0700]	Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala			

[0701]	65	70	75	80
[0702]	Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe			
[0703]		85	90	95
[0704]	His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro			
[0705]		100	105	110
[0706]	Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly			
[0707]		115	120	125
[0708]	Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu			
[0709]		130	135	140
[0710]	Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser			
[0711]	145	150	155	160
[0712]	Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser			
[0713]		165	170	
[0714]	<210>	48		
[0715]	<211>	137		
[0716]	<212>	PRT		
[0717]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0718]	<220>			
[0719]	<221>	PEPTIDE		
[0720]	<222>	()..()		
[0721]	<223>	合成		
[0722]	<400>	48		
[0723]	Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg			
[0724]	1	5	10	15
[0725]	Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile			
[0726]		20	25	30
[0727]	Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Cys			
[0728]		35	40	45
[0729]	Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala			
[0730]	50	55	60	
[0731]	Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr			
[0732]	65	70	75	80
[0733]	Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr			
[0734]		85	90	95
[0735]	Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Leu			
[0736]		100	105	110
[0737]	Val Ile Val Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu			
[0738]		115	120	125
[0739]	Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser			

[0740]	130	135
[0741]	<210> 49	
[0742]	<211> 173	
[0743]	<212> PRT	
[0744]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0745]	<220>	
[0746]	<221> PEPTIDE	
[0747]	<222> ()..()	
[0748]	<223> 合成	
[0749]	<400> 49	
[0750]	Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro	
[0751]	1 5 10 15	
[0752]	Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu	
[0753]	20 25 30	
[0754]	Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn	
[0755]	35 40 45	
[0756]	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys	
[0757]	50 55 60	
[0758]	Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala	
[0759]	65 70 75 80	
[0760]	Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe	
[0761]	85 90 95	
[0762]	His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro	
[0763]	100 105 110	
[0764]	Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly	
[0765]	115 120 125	
[0766]	Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu	
[0767]	130 135 140	
[0768]	Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser	
[0769]	145 150 155 160	
[0770]	Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser	
[0771]	165 170	
[0772]	<210> 50	
[0773]	<211> 266	
[0774]	<212> PRT	
[0775]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0776]	<220>	
[0777]	<221> PEPTIDE	
[0778]	<222> ()..()	

[0779] <223> 合成
 [0780] <400> 50
 [0781] Met Arg Gln Val Ala Arg Val Ile Val Phe Leu Thr Leu Ser Thr Leu
 [0782] 1 5 10 15
 [0783] Ser Leu Ala Lys Thr Thr Gln Pro Ile Ser Met Asp Ser Tyr Glu Gly
 [0784] 20 25 30
 [0785] Gln Glu Val Asn Ile Thr Cys Ser His Asn Asn Ile Ala Thr Asn Asp
 [0786] 35 40 45
 [0787] Tyr Ile Thr Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Ser Gln Gly Pro Arg Phe Ile
 [0788] 50 55 60
 [0789] Ile Gln Gly Tyr Lys Thr Lys Val Thr Asn Glu Val Ala Ser Leu Phe
 [0790] 65 70 75 80
 [0791] Ile Pro Ala Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Ser Leu Pro Arg Val Ser
 [0792] 85 90 95
 [0793] Leu Ser Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Val Gly Asp Met Asp Gln
 [0794] 100 105 110
 [0795] Ala Gly Thr Ala Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Thr Leu Ser Val Ser
 [0796] 115 120 125
 [0797] Ser Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro
 [0798] 130 135 140
 [0799] Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
 [0800] 145 150 155 160
 [0801] Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys
 [0802] 165 170 175
 [0803] Cys Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile
 [0804] 180 185 190
 [0805] Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu
 [0806] 195 200 205
 [0807] Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu
 [0808] 210 215 220
 [0809] Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu
 [0810] 225 230 235 240
 [0811] Leu Val Ile Val Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn
 [0812] 245 250 255
 [0813] Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 [0814] 260 265
 [0815] <210> 51
 [0816] <211> 306
 [0817] <212> PRT

[0818]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)															
[0819]	<220>																
[0820]	<221>	PEPTIDE															
[0821]	<222>	() .. ()															
[0822]	<223>	合成															
[0823]	<400>	51															
[0824]	Met Gly Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala																
[0825]	1	5				10				15							
[0826]	Gly Leu Val Asp Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys																
[0827]		20				25				30							
[0828]	Thr Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Lys Ser Gly His																
[0829]		35				40				45							
[0830]	Asp Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe																
[0831]		50				55				60							
[0832]	Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro																
[0833]	65	70				75				80							
[0834]	Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn																
[0835]		85				90				95							
[0836]	Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser																
[0837]		100				105				110							
[0838]	Ser Leu Gly Glu Gly Arg Val Asp Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr																
[0839]		115				120				125							
[0840]	Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val																
[0841]		130				135				140							
[0842]	Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala																
[0843]	145	150				155				160							
[0844]	Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu																
[0845]		165				170				175							
[0846]	Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp																
[0847]		180				185				190							
[0848]	Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg																
[0849]		195				200				205							
[0850]	Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg																
[0851]		210				215				220							
[0852]	Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu																
[0853]	225	230				235				240							
[0854]	Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly																
[0855]		245				250				255							
[0856]	Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu																

[0857]	260	265	270
[0858]	Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr		
[0859]	275	280	285
[0860]	Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys		
[0861]	290	295	300
[0862]	Asn Ser		
[0863]	305		
[0864]	<210> 52		
[0865]	<211> 266		
[0866]	<212> PRT		
[0867]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0868]	<220>		
[0869]	<221> PEPTIDE		
[0870]	<222> () .. ()		
[0871]	<223> 合成		
[0872]	<400> 52		
[0873]	Met Arg Gln Val Ala Arg Val Ile Val Phe Leu Thr Leu Ser Thr Leu		
[0874]	1 5 10 15		
[0875]	Ser Leu Ala Lys Thr Thr Gln Pro Ile Ser Met Asp Ser Tyr Glu Gly		
[0876]	20 25 30		
[0877]	Gln Glu Val Asn Ile Thr Cys Ser His Asn Asn Ile Ala Thr Asn Asp		
[0878]	35 40 45		
[0879]	Tyr Ile Thr Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Ser Gln Gly Pro Arg Phe Ile		
[0880]	50 55 60		
[0881]	Ile Gln Gly Tyr Lys Thr Lys Val Thr Asn Glu Val Ala Ser Leu Phe		
[0882]	65 70 75 80		
[0883]	Ile Pro Ala Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Ser Leu Pro Arg Val Ser		
[0884]	85 90 95		
[0885]	Leu Ser Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Val Gly Asp Met Asp Gln		
[0886]	100 105 110		
[0887]	Ala Gly Thr Ala Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Thr Leu Ser Val Ser		
[0888]	115 120 125		
[0889]	Ser Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro		
[0890]	130 135 140		
[0891]	Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln		
[0892]	145 150 155 160		
[0893]	Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys		
[0894]	165 170 175		
[0895]	Cys Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile		

[0896]	180	185	190
[0897]	Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu		
[0898]	195	200	205
[0899]	Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu		
[0900]	210	215	220
[0901]	Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu		
[0902]	225	230	235
[0903]	Leu Val Ile Val Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn		
[0904]	245	250	255
[0905]	Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0906]	260	265	
[0907]	<210> 53		
[0908]	<211> 306		
[0909]	<212> PRT		
[0910]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0911]	<220>		
[0912]	<221> PEPTIDE		
[0913]	<222> () .. ()		
[0914]	<223> 合成		
[0915]	<400> 53		
[0916]	Met Gly Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala		
[0917]	1 5 10 15		
[0918]	Gly Leu Val Asp Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys		
[0919]	20 25 30		
[0920]	Thr Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Lys Ser Gly His		
[0921]	35 40 45		
[0922]	Asp Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe		
[0923]	50 55 60		
[0924]	Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro		
[0925]	65 70 75 80		
[0926]	Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn		
[0927]	85 90 95		
[0928]	Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser		
[0929]	100 105 110		
[0930]	Ser Leu Gly Arg Ala Ser Asn Gln Pro Gln His Phe Gly Asp Gly Thr		
[0931]	115 120 125		
[0932]	Arg Leu Ser Ile Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val		
[0933]	130 135 140		
[0934]	Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala		

[0935]	145	150	155	160
[0936]	Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu			
[0937]		165	170	175
[0938]	Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp			
[0939]		180	185	190
[0940]	Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg			
[0941]		195	200	205
[0942]	Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg			
[0943]		210	215	220
[0944]	Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu			
[0945]	225	230	235	240
[0946]	Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly			
[0947]		245	250	255
[0948]	Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu			
[0949]		260	265	270
[0950]	Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr			
[0951]		275	280	285
[0952]	Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys			
[0953]		290	295	300
[0954]	Asn Ser			
[0955]	305			
[0956]	<210> 54			
[0957]	<211> 266			
[0958]	<212> PRT			
[0959]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0960]	<220>			
[0961]	<221> PEPTIDE			
[0962]	<222> () .. ()			
[0963]	<223> 合成			
[0964]	<400> 54			
[0965]	Met Arg Gln Val Ala Arg Val Ile Val Phe Leu Thr Leu Ser Thr Leu			
[0966]	1	5	10	15
[0967]	Ser Leu Ala Lys Thr Thr Gln Pro Ile Ser Met Asp Ser Tyr Glu Gly			
[0968]		20	25	30
[0969]	Gln Glu Val Asn Ile Thr Cys Ser His Asn Asn Ile Ala Thr Asn Asp			
[0970]		35	40	45
[0971]	Tyr Ile Thr Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Ser Gln Gly Pro Arg Phe Ile			
[0972]		50	55	60
[0973]	Ile Gln Gly Tyr Lys Thr Lys Val Thr Asn Glu Val Ala Ser Leu Phe			

[0974]	65	70	75	80
[0975]	Ile Pro Ala Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Ser Leu Pro Arg Val Ser			
[0976]		85	90	95
[0977]	Leu Ser Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Val Gly Asp Arg Asp Gln			
[0978]		100	105	110
[0979]	Ala Gly Thr Ala Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Thr Leu Ser Val Ser			
[0980]		115	120	125
[0981]	Ser Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro			
[0982]		130	135	140
[0983]	Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln			
[0984]	145	150	155	160
[0985]	Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys			
[0986]		165	170	175
[0987]	Cys Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile			
[0988]		180	185	190
[0989]	Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu			
[0990]		195	200	205
[0991]	Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu			
[0992]		210	215	220
[0993]	Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu			
[0994]	225	230	235	240
[0995]	Leu Val Ile Val Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn			
[0996]		245	250	255
[0997]	Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser			
[0998]		260	265	
[0999]	<210>	55		
[1000]	<211>	306		
[1001]	<212>	PRT		
[1002]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[1003]	<220>			
[1004]	<221>	PEPTIDE		
[1005]	<222>	() .. ()		
[1006]	<223>	合成		
[1007]	<400>	55		
[1008]	Met Gly Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala			
[1009]	1	5	10	15
[1010]	Gly Leu Val Asp Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys			
[1011]		20	25	30
[1012]	Thr Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Lys Ser Gly His			

[1013]	35	40	45
[1014]	Asp Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe		
[1015]	50	55	60
[1016]	Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro		
[1017]	65	70	75
[1018]	Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn		
[1019]	85	90	95
[1020]	Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser		
[1021]	100	105	110
[1022]	Ser Phe Gly Gln Ser Ser Thr Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr		
[1023]	115	120	125
[1024]	Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val		
[1025]	130	135	140
[1026]	Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala		
[1027]	145	150	155
[1028]	Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu		
[1029]	165	170	175
[1030]	Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp		
[1031]	180	185	190
[1032]	Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg		
[1033]	195	200	205
[1034]	Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg		
[1035]	210	215	220
[1036]	Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu		
[1037]	225	230	235
[1038]	Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly		
[1039]	245	250	255
[1040]	Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu		
[1041]	260	265	270
[1042]	Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr		
[1043]	275	280	285
[1044]	Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys		
[1045]	290	295	300
[1046]	Asn Ser		
[1047]	305		
[1048]	<210> 56		
[1049]	<211> 269		
[1050]	<212> PRT		
[1051]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		

[1052]	<220>	
[1053]	<221>	PEPTIDE
[1054]	<222>	()..()
[1055]	<223>	合成
[1056]	<400>	56
[1057]	Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser	
[1058]	1	5 10 15
[1059]	Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu	
[1060]		20 25 30
[1061]	Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp	
[1062]		35 40 45
[1063]	Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser	
[1064]		50 55 60
[1065]	Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly	
[1066]	65	70 75 80
[1067]	Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu	
[1068]		85 90 95
[1069]	Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala	
[1070]		100 105 110
[1071]	Ala Met Asp Ser Ser Tyr Lys Leu Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu	
[1072]		115 120 125
[1073]	Leu Val Arg Pro Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu	
[1074]		130 135 140
[1075]	Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe	
[1076]	145	150 155 160
[1077]	Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile	
[1078]		165 170 175
[1079]	Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn	
[1080]		180 185 190
[1081]	Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile	
[1082]		195 200 205
[1083]	Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp	
[1084]		210 215 220
[1085]	Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe	
[1086]	225	230 235 240
[1087]	Gln Asn Leu Leu Val Ile Val Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala	
[1088]		245 250 255
[1089]	Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser	
[1090]		260 265

[1091]	<210>	57															
[1092]	<211>	303															
[1093]	<212>	PRT															
[1094]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)															
[1095]	<220>																
[1096]	<221>	PEPTIDE															
[1097]	<222>	() .. ()															
[1098]	<223>	合成															
[1099]	<400>	57															
[1100]	Met	Gly	Thr	Arg	Leu	Phe	Phe	Tyr	Val	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Trp	Ala	
[1101]	1				5					10					15		
[1102]	Gly	His	Arg	Asp	Ala	Gly	Ile	Thr	Gln	Ser	Pro	Arg	Tyr	Lys	Ile	Thr	
[1103]				20					25					30			
[1104]	Glu	Thr	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Leu	Met	Cys	His	Gln	Thr	Trp	Ser	His	
[1105]			35					40				45					
[1106]	Ser	Tyr	Met	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Leu	Gly	His	Gly	Leu	Arg	Leu	
[1107]		50					55				60						
[1108]	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Ala	Ala	Asp	Ile	Thr	Asp	Lys	Gly	Glu	Val	Pro	
[1109]	65				70					75						80	
[1110]	Asp	Gly	Tyr	Val	Val	Ser	Arg	Ser	Lys	Thr	Glu	Asn	Phe	Pro	Leu	Thr	
[1111]				85					90						95		
[1112]	Leu	Glu	Ser	Ala	Thr	Arg	Ser	Gln	Thr	Ser	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Ser	
[1113]				100				105					110				
[1114]	Ser	Asp	Pro	Gly	Thr	Glu	Ala	Phe	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	
[1115]			115				120					125					
[1116]	Val	Val	Glu	Asp	Leu	Arg	Asn	Val	Thr	Pro	Pro	Lys	Val	Ser	Leu	Phe	
[1117]		130					135				140						
[1118]	Glu	Pro	Ser	Lys	Ala	Glu	Ile	Ala	Asn	Lys	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	
[1119]	145				150					155						160	
[1120]	Cys	Leu	Ala	Arg	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	
[1121]				165					170						175		
[1122]	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln	Ala	
[1123]				180					185					190			
[1124]	Tyr	Lys	Glu	Ser	Asn	Tyr	Ser	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	
[1125]			195				200						205				
[1126]	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	His	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	
[1127]		210					215					220					
[1128]	Gln	Phe	His	Gly	Leu	Ser	Glu	Glu	Asp	Lys	Trp	Pro	Glu	Gly	Ser	Pro	
[1129]	225				230					235						240	

[1130]	Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp	
[1131]	245	250 255
[1132]	Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr	
[1133]	260	265 270
[1134]	Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu	
[1135]	275	280 285
[1136]	Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser	
[1137]	290	295 300
[1138]	<210>	58
[1139]	<211>	27
[1140]	<212>	PRT
[1141]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1142]	<220>	
[1143]	<221>	PEPTIDE
[1144]	<222>	() .. ()
[1145]	<223>	合成
[1146]	<400>	58
[1147]	Arg Ala Lys Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys	
[1148]	1	5 10 15
[1149]	Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro	
[1150]	20	25
[1151]	<210>	59
[1152]	<211>	27
[1153]	<212>	DNA
[1154]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1155]	<220>	
[1156]	<221>	gene
[1157]	<222>	() .. ()
[1158]	<223>	合成
[1159]	<400>	59
[1160]	gccacagcac tgttgctctt gaagtcc	27
[1161]	<210>	60
[1162]	<211>	24
[1163]	<212>	DNA
[1164]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1165]	<220>	
[1166]	<221>	gene
[1167]	<222>	() .. ()
[1168]	<223>	合成

[1169]	<400>	60	
[1170]	caggcagtat ctggagtc	at tgag	24
[1171]	<210>	61	
[1172]	<211>	24	
[1173]	<212>	PRT	
[1174]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[1175]	<220>		
[1176]	<221>	PEPTIDE	
[1177]	<222>	()..()	
[1178]	<223>	合成	
[1179]	<400>	61	
[1180]	Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys		
[1181]	1	5	10 15
[1182]	Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile		
[1183]		20	
[1184]	<210>	62	
[1185]	<211>	24	
[1186]	<212>	PRT	
[1187]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[1188]	<220>		
[1189]	<221>	PEPTIDE	
[1190]	<222>	()..()	
[1191]	<223>	合成	
[1192]	<400>	62	
[1193]	Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys		
[1194]	1	5	10 15
[1195]	Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile		
[1196]		20	
[1197]	<210>	63	
[1198]	<211>	388	
[1199]	<212>	DNA	
[1200]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[1201]	<400>	63	
[1202]	atgaggcaag tggcgagagt gatcgtgttc ctgaccctga gtactttgag ccttgctaag	60	
[1203]	accaccacgc ccattctccat ggactcatat gaaggacaag aagtgaacat aacctgtagc	120	
[1204]	cacaacaaca ttgctacaaa tgattatata acgtggtagc aacagtttcc cagccaagga	180	
[1205]	ccacgattta ttattcaagg atacaagaca aaagttacaa acgaagtggc ctccctgttt	240	
[1206]	atccctgccg acagaaagtc cagcactctg agcctgcccc gggtttccct gagegcacact	300	
[1207]	gctgtgtact actgcctcgt gggtgacatg gaccaggcag gaactgctct gatctttggg	360	

[1208]	aagggaacca ccttatcagt gagttcca	388
[1209]	<210> 64	
[1210]	<211> 400	
[1211]	<212> DNA	
[1212]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[1213]	<400> 64	
[1214]	atgggccccg ggctcctctg ctgggcactg ctttgtctcc tgggagcagg cttagtggac	60
[1215]	gctggagtca cccaaagtcc cacacacctg atcaaaacga gaggacagca agtgactctg	120
[1216]	agatgctctc ctaagtctgg gcatgacact gtgtcctggg accaacaggc cctgggtcag	180
[1217]	gggccccagt ttatctttca gtattatgag gaggaagaga gacagagagg caacttccct	240
[1218]	gatcgattct caggtcacca gttccctaac tatagctctg agctgaatgt gaacgccttg	300
[1219]	ttgctggggg actcggecct ctatctctgt gccagcagct tgggtgaggg aagagtggac	360
[1220]	ggctacacct teggttcggg gaccaggtta accgtttag	400
[1221]	<210> 65	
[1222]	<211> 387	
[1223]	<212> DNA	
[1224]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[1225]	<220>	
[1226]	<221> gene	
[1227]	<222> ()..()	
[1228]	<223> 合成	
[1229]	<400> 65	
[1230]	atgcgccagg tggctcgcgt aatcggtgtt ctgactctga gcactctgtc actcgccaag	60
[1231]	acgaccagc ccatttcaat ggactcatac gaaggtcagg aggtgaatat cacatgctcc	120
[1232]	cacaataaca ttgctacaaa cgattacatt acatggtatc aacagtttcc ctctcaaggg	180
[1233]	cctcgattca taatacaagg gtataagacc aaagttacga atgaggtcgc atccctcttt	240
[1234]	attcccgccg accggaagag ttctactctt tccctgccta gggtgagcct gaggatgact	300
[1235]	gctgtttact actgcctggg tggagacatg gaccaggcgg gaactgccct catattcggc	360
[1236]	aagggcacga cactctctgt gtcattct	387
[1237]	<210> 66	
[1238]	<211> 399	
[1239]	<212> DNA	
[1240]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[1241]	<220>	
[1242]	<221> gene	
[1243]	<222> ()..()	
[1244]	<223> 合成	
[1245]	<400> 66	
[1246]	atggggccag gcctgctttg ctgggcgctg ctgtgcctcc tgggtgccgg tttggtggac	60

[1247]	gctggtgtaa ctcagtcctc aacacatctg atcaagacac gcggccagca ggttacactg	120
[1248]	cgctgttcac ccaagagtgg gcacgataca gtttccttgg accagcaagc tctgggtcaa	180
[1249]	ggacctcagt ttatatcca atattacgaa gaggaggagc gccagcgagg aaatttccca	240
[1250]	gacagattct ccgggcacca gtttcccaac tactcatctg agctgaacgt taacgccctg	300
[1251]	ctgctgggag actccgctct ctacctgtgc gcacttagcc tcgggagggc tagtaaccag	360
[1252]	ccccagcact tcggcgacgg aaccaggctg tctattctg	399
[1253]	<210>	67
[1254]	<211>	388
[1255]	<212>	DNA
[1256]	<213>	智人 (Homo sapiens)
[1257]	<400>	67
[1258]	atgaggcaag tggcgagagt gatcgtgttc ctgacctga gtactttgag ccttgctaag	60
[1259]	accaccacgc ccattctcat ggactcatat gaaggacaag aagtgaacat aacctgtagc	120
[1260]	cacaacaaca ttgctacaaa tgattatata acgtggtagc aacagtttcc cagccaagga	180
[1261]	ccacgattta ttattcaagg atacaagaca aaagttacaa acgaagtggc ctccctgttt	240
[1262]	atccctgccg acagaaagtc cagcactctg agcctgcccc gggtttccct gagcgacact	300
[1263]	gctgtgtact actgcctcgt ggggtgacagg gaccaggcag gaactgctct gatctttggg	360
[1264]	aagggaacca cttatcagt gatttcca	388
[1265]	<210>	68
[1266]	<211>	400
[1267]	<212>	DNA
[1268]	<213>	智人 (Homo sapiens)
[1269]	<400>	68
[1270]	atgggccccg ggctcctctg ctgggcactg ctttgtctcc tgggagcagg cttagtggac	60
[1271]	gctggagtca ccaaaagtcc cacacacctg atcaaaacga gaggacagca agtgactctg	120
[1272]	agatgctctc ctaagtctgg gcatgacact gtgtccttgg accaacaggc cctgggtcag	180
[1273]	gggccccagt ttatctttca gtattatgag gaggaagaga gacagagagg caacttccct	240
[1274]	gatcgattct caggtcacca gttccctaac tatagctctg agctgaatgt gaacgccttg	300
[1275]	ttgctggggg actcggccct ctatctctgt gccagcagct ttggacagtc aagcacatat	360
[1276]	ggctacacct tcggttcggg gaccaggtta accgtttag	400
[1277]	<210>	69
[1278]	<211>	397
[1279]	<212>	DNA
[1280]	<213>	智人 (Homo sapiens)
[1281]	<400>	69
[1282]	atgaaatcct tgagagtttt actagtgate ctgtggcttc agttgagctg ggtttgagc	60
[1283]	caacagaagg aggtggagca gaattcttga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc	120
[1284]	tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat	180
[1285]	tctgggaaaa gccctgagtt gataatgttc atatactcca atggtgacaa agaagatgga	240

[1286]	aggtttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc	300
[1287]	cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgcggcga tggatagcag ctataaattg	360
[1288]	atcttcggga gtgggaccag actgctggtc aggcctg	397
[1289]	<210>	70
[1290]	<211>	391
[1291]	<212>	DNA
[1292]	<213>	智人 (Homo sapiens)
[1293]	<400>	70
[1294]	atgggcacca ggctcttctt ctatgtggcc ctttgtctgc tgtgggcagg acacagggat	60
[1295]	gctggaatca cccagagccc aagatacaag atcacagaga caggaaggca ggtgaccttg	120
[1296]	atgtgtcacc agacttggag ccacagctat atgttctggg atcgacaaga cctgggacat	180
[1297]	gggctgagge tgatctatta ctcagcagct gctgatatta cagataaagg agaagtcccc	240
[1298]	gatggctatg ttgtctccag atccaagaca gagaatttcc cctcactct ggagtcagct	300
[1299]	acccgctccc agacatctgt gtatttctgc gccagcagtg accccggcac tgaagctttc	360
[1300]	tttgacaag gcaccagact cacagttgta g	391

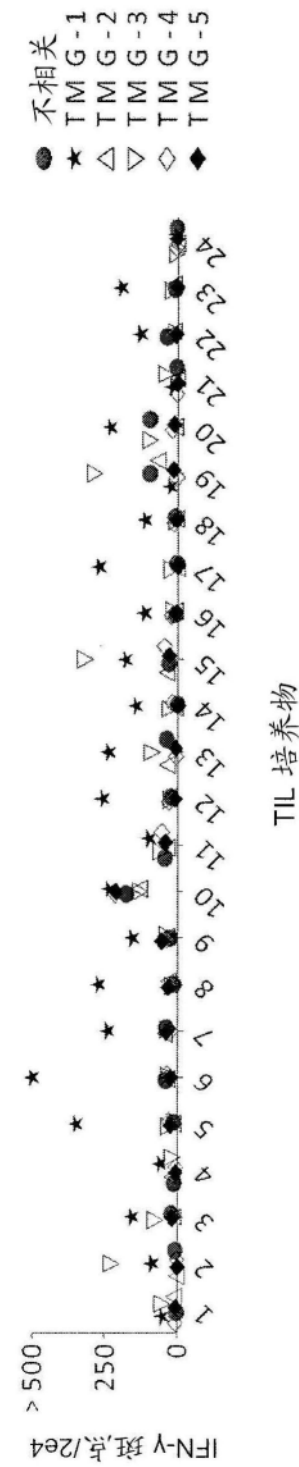


图1A

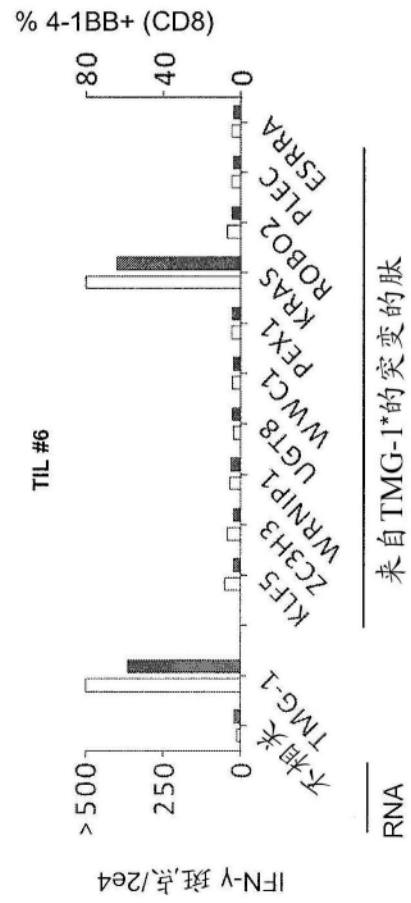


图1B

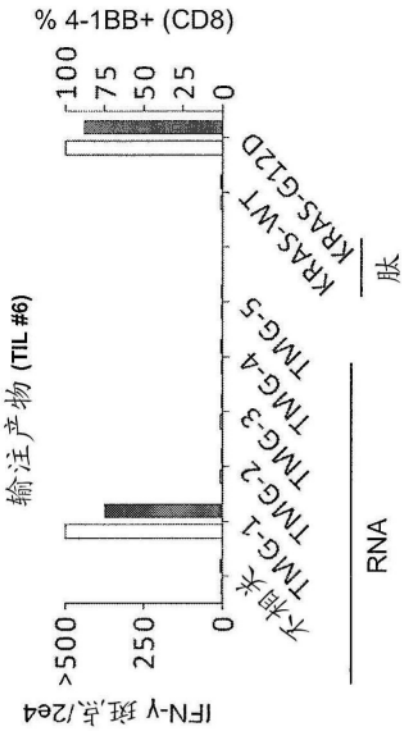


图1C

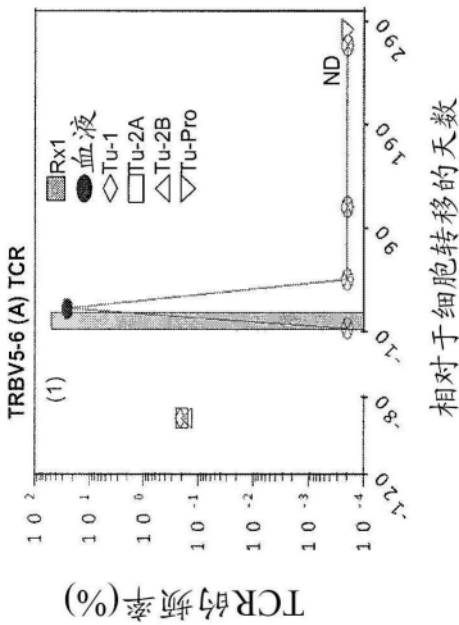


图2A

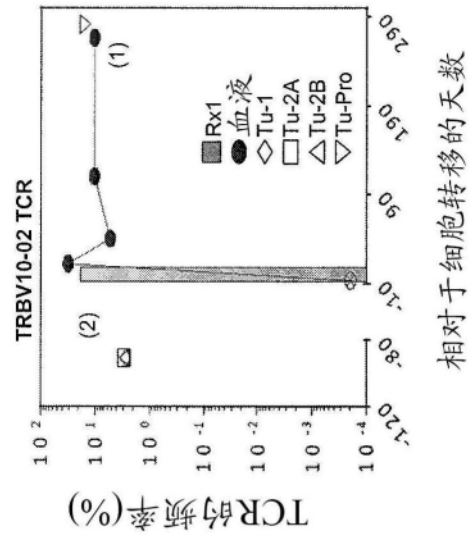


图2B

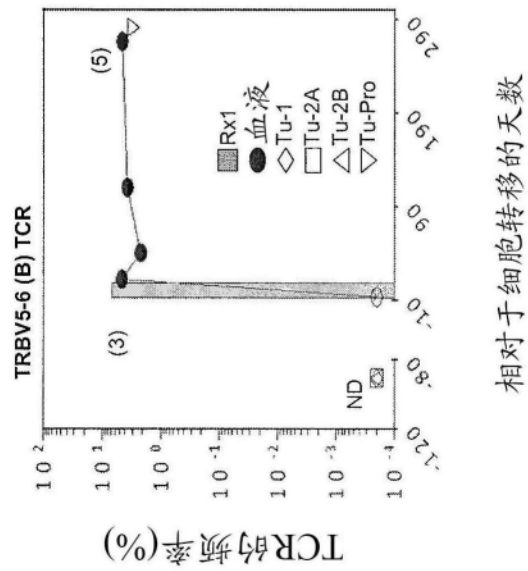


图2C

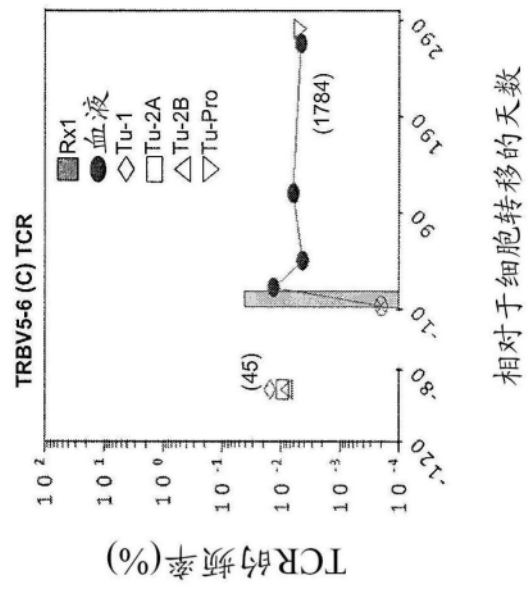


图2D

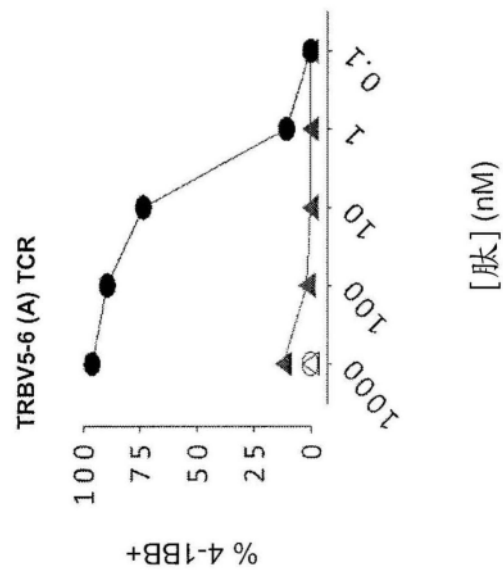


图3A

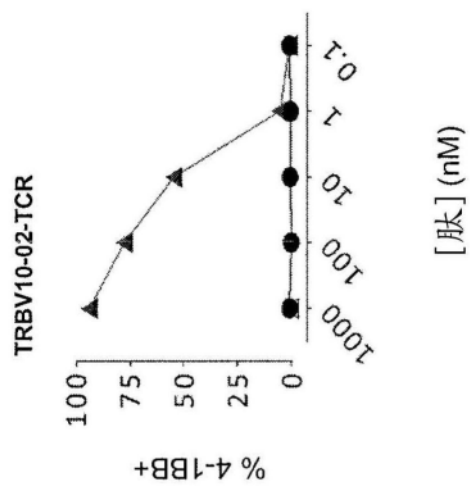


图3B

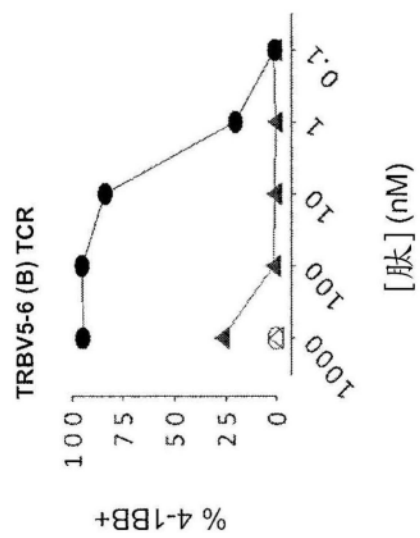


图3C

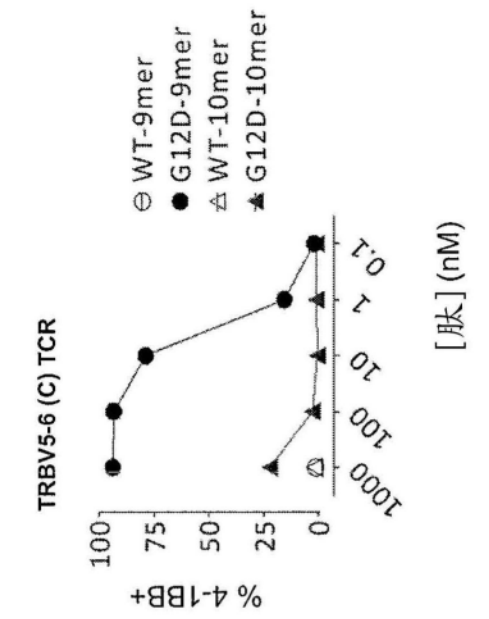


图3D

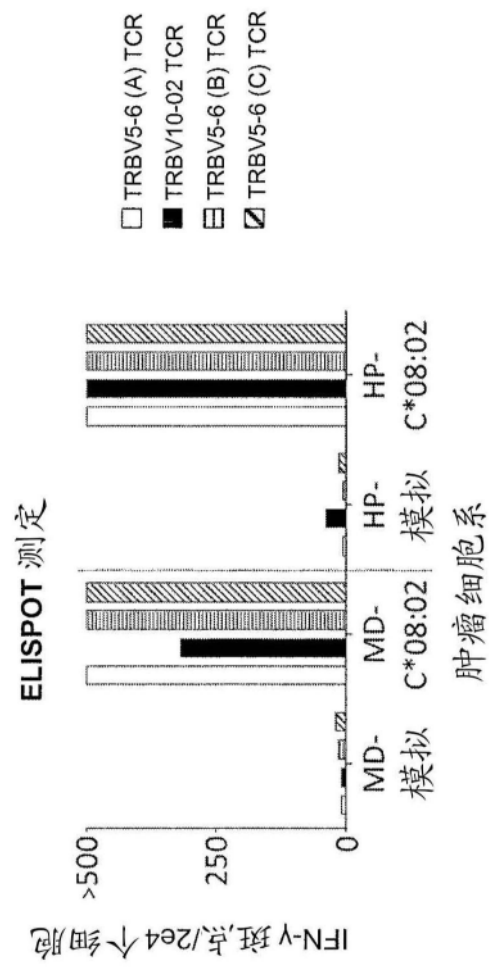


图4A

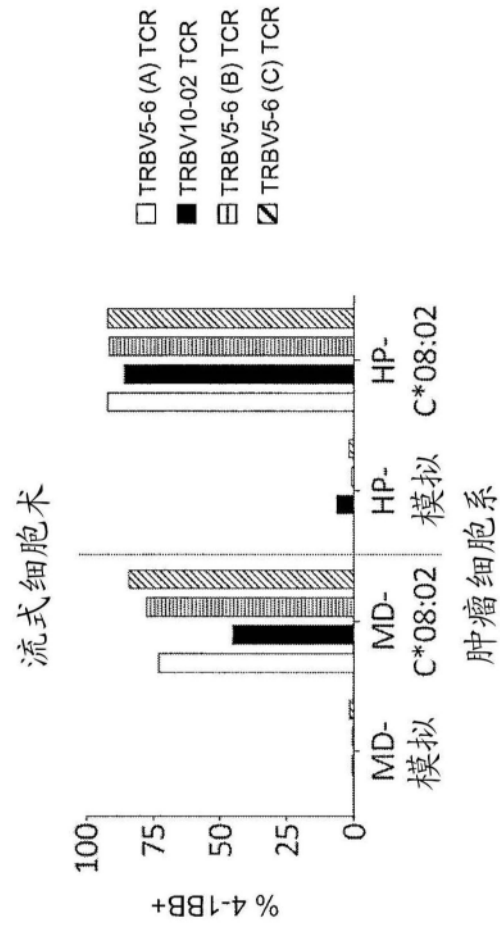


图4B

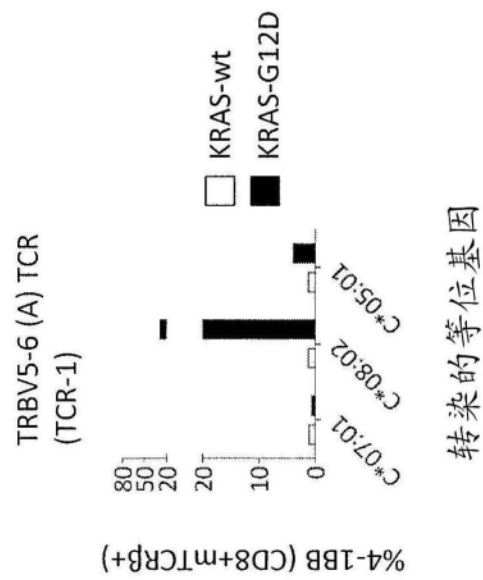
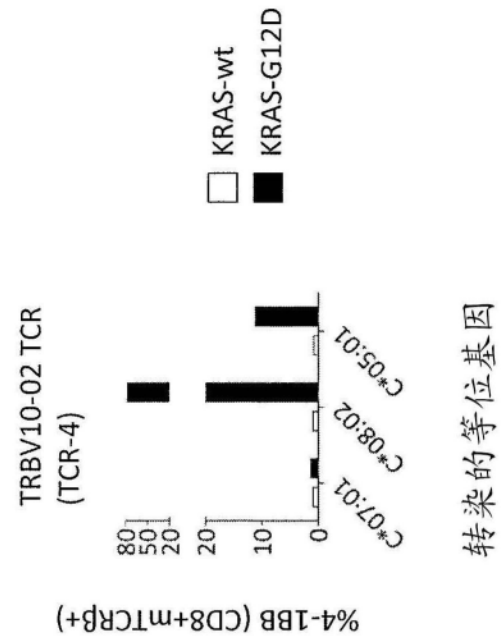
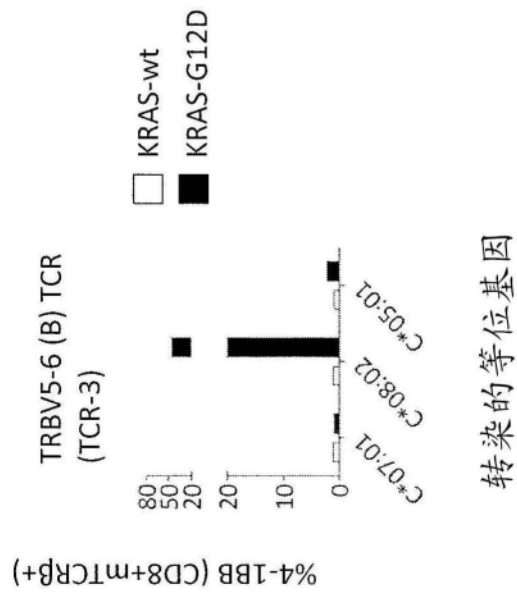


图5A



转染的等位基因

图5B



转染的等位基因

图5C

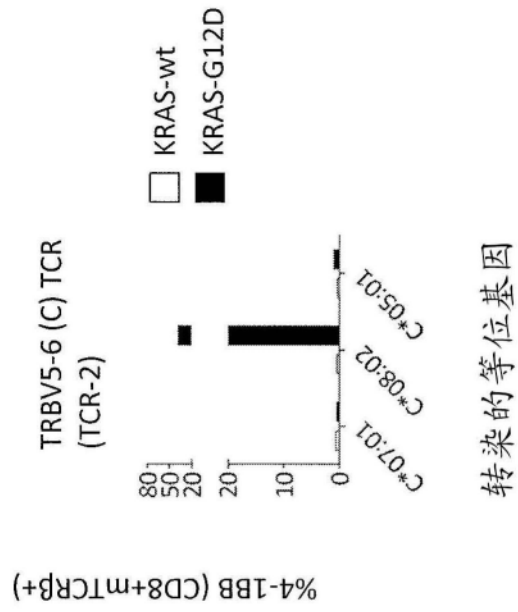


图5D