202444897

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202444897 A

(43)公開日： 中華民國 113 (2024) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：113103577 (22)申請日： 中華民國 105 (2016) 年 06 月 24 日

(51)Int. Cl.：

C12N5/0783	*(2010.01)*	*C12N5/10*	*(2006.01)*
C07K14/705	*(2006.01)*	*C07K14/725*	*(2006.01)*
C07K16/28	*(2006.01)*	*C07K19/00*	*(2006.01)*
A61K35/17	*(2015.01)*	*A61K39/00*	*(2006.01)*
A61P35/00	*(2006.01)*		

(30)優先權：2015/06/25 美國 62/184,321

2015/10/01 美國 62/235,840

2015/10/21 美國 62/244,435

(71)申請人：美商生物細胞基因治療有限公司 (美國) ICELL GENE THERAPEUTICS LLC (US) 美國

(72)發明人：馬 鈺波 MA, YUPO (US)；賓茲 凱文 PINZ, KEVIN (US)；江 旭 JIANG, XUN (US)；和田 雅之 WADA, MASAYUKI (US)；陳 凱文 CHEN, KEVIN (US)

(74)代理人：陳長文；呂光；王淑靜

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：75 項 圖式數：45 共 252 頁

(54)名稱

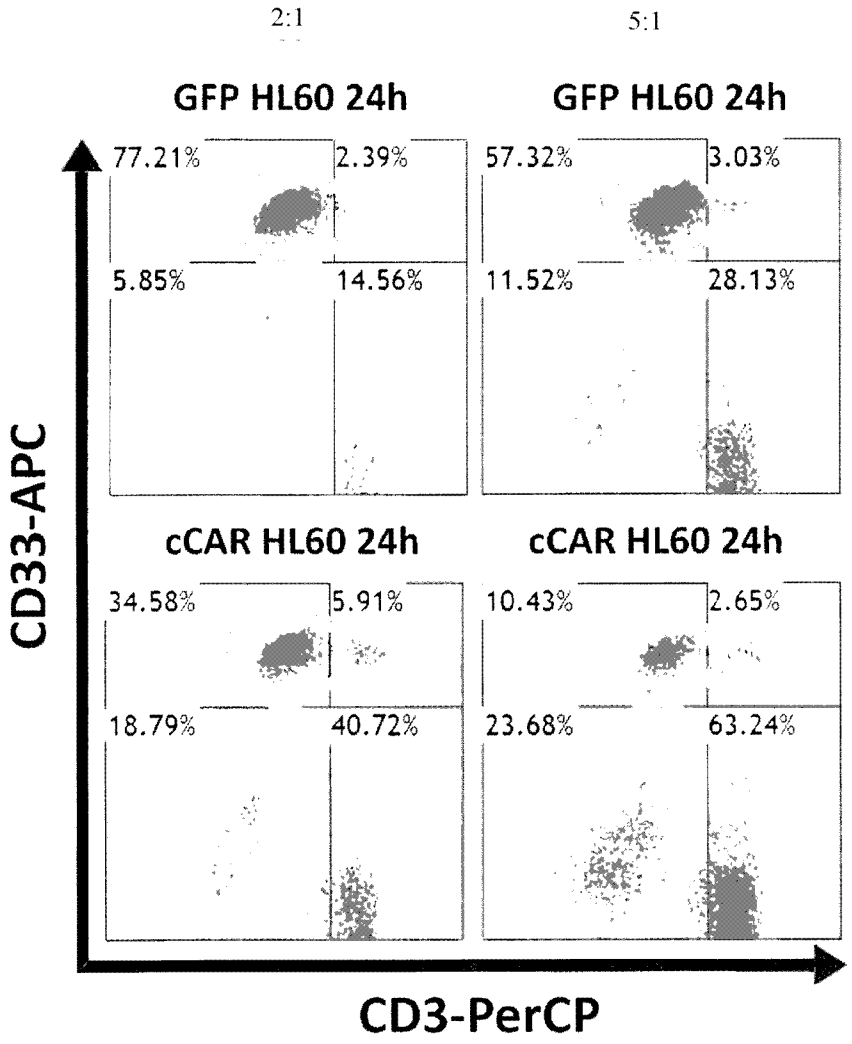
嵌合抗原受體(CAR)、組合物及其使用方法

(57)摘要

本發明係關於與嵌合抗原受體(CAR)多肽相關之組合物及方法，以及與其有關之方法。在一個實施例中，本發明係關於經工程改造之細胞，其具有針對至少兩個標靶之嵌合抗原受體多肽。在另一實施例中，本發明係關於經工程改造之細胞，其具有嵌合抗原受體多肽及強化子部分。

The present invention relates to compositions and methods relating to chimeric antigen receptor (CAR) polypeptides and methods relating thereto. In one embodiment, the present invention relates to engineered cells having chimeric antigen receptor polypeptides directed to at least two targets. In another embodiment, the present invention relates to engineered cells having chimeric antigen receptor polypeptides and an enhancer moiety.

指定代表圖：


2:1
5:1
GFP HL60 24h
77.21%
2.39%
5.85%
14.56%
GFP HL60 24h
57.32%
3.03%
11.52%
28.13%
cCAR HL60 24h
34.58%
5.91%
18.79%
40.72%
cCAR HL60 24h
10.43%
2.65%
23.68%
63.24%
CD33-APC
CD3-PerCP

【圖4】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

嵌合抗原受體(CAR)、組合物及其使用方法

【英文發明名稱】

CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS (CARs), COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF

【中文】

本發明係關於與嵌合抗原受體(CAR)多肽相關之組合物及方法，以及與其有關之方法。在一個實施例中，本發明係關於經工程改造之細胞，其具有針對至少兩個標靶之嵌合抗原受體多肽。在另一實施例中，本發明係關於經工程改造之細胞，其具有嵌合抗原受體多肽及強化子部分。

【英文】

The present invention relates to compositions and methods relating to chimeric antigen receptor (CAR) polypeptides and methods relating thereto. In one embodiment, the present invention relates to engineered cells having chimeric antigen receptor polypeptides directed to at least two targets. In another embodiment, the present invention relates to engineered cells having chimeric antigen receptor polypeptides and an enhancer moiety.

【指定代表圖】

圖4

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

嵌合抗原受體(CAR)、組合物及其使用方法

【英文發明名稱】

CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS (CARs), COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF

【技術領域】

【先前技術】

T細胞，其為一種類型之淋巴細胞，在細胞介導之免疫性中起重要作用。其與其他淋巴細胞(諸如B細胞及自然殺手細胞(NK細胞))之區別在於細胞表面上存在T細胞受體(TCR)。T輔助細胞，亦稱為CD4+ T或CD4 T細胞，在其表面上表現CD4醣蛋白。輔助T細胞在暴露於由MHC (主要組織相容複合體)II類分子呈遞之肽抗原時活化。一旦活化，此等細胞快速增殖且分泌可調節免疫反應之細胞激素。細胞毒性T細胞，亦稱為CD8+ T細胞或CD8 T細胞，在細胞表面上表現CD8醣蛋白。CD8+ T細胞在暴露於由MHC I類分子呈遞之肽抗原時活化。記憶T細胞，其為T細胞之子集，長期留存且對其同源抗原起反應，因此向免疫系統提供針對過去感染及/或腫瘤細胞之「記憶」。

可對T細胞進行基因工程改造以在其表面上產生特定受體，稱為嵌合抗原受體(CAR)。CAR為允許T細胞識別腫瘤細胞上之特異性蛋白質(抗原)之蛋白質。此等經工程改造之CAR T細胞接著在實驗室中生長直至其數目達到數十億。接著將擴增之CAR T細胞群輸注至患者中。

迄今為止，臨床試驗已證實嵌合抗原受體(CAR)T細胞在對標準化學療法具有抗性之血液科惡性疾病中具有巨大前景。最值得注意的

是，CD19特異性CAR (CD19CAR)T細胞療法具有顯著結果，包括B細胞惡性病之長期緩解(Kochenderfer, Wilson等人 2010，Kalos, Levine等人 2011，Porter, Levine等人 2011，Davila, Riviere等人 2013, Grupp, Frey等人 2013，Grupp, Kalos等人 2013，Kalos, Nazimuddin等人 2013，Kochenderfer, Dudley等人 2013，Kochenderfer, Dudley等人 2013，Lee, Shah等人 2013，Park, Riviere等人 2013，Maude, Frey等人 2014)。

儘管CAR療法在B細胞白血病及淋巴瘤中取得成功，但尚未明確CAR療法應用於T細胞惡性病。鑒於與B細胞惡性病之結果相比，T細胞惡性病與顯著較不良結果相關(Abramson, Feldman等人 2014)，在此態樣中，CAR療法具有進一步解決巨大臨床需求之潛力。

迄今為止，當前成果集中於在多種B細胞惡性病中顯示功效之CAR T細胞。儘管在使用CD19CAR之B-ALL中約90%之初始緩解率為常見的，但大部分在一年內復發。復發可至少部分歸因於抗原逃逸。因此，迫切地需要更有效的CAR T細胞治療以防止復發。標靶探索及選擇為初始步驟，因為不存在可確保或引導有效CAR設計之一般法則。

存在一些阻礙CAR治療性方法之更廣泛應用之障礙。其中最常見挑戰為：(1)抗原標靶及嵌合抗原受體之選擇；(2)CAR設計；(3)腫瘤非均質性，尤其腫瘤抗原之表面表現之差異。靶向單一抗原具有免疫逃逸之風險且此可由靶向多個所需抗原來解決。

大部分CAR嵌合抗原受體為來源於單株抗體之scFv且一些此等單株抗體已用於臨床試驗或疾病治療。然而，其具有有限功效，表明需要替代性及更強效的靶向方法，諸如CAR。scFvs為CAR之最常用的嵌合抗原受體。然而，抗原上所識別之抗原決定基之CAR親和力結合及位置可影響功能。此外，T細胞或NK細胞上之表面CAR表現量受適

合的前導序列及啟動子影響。此外，過表現之CAR蛋白質可對細胞具有毒性。

因此，仍然需要經改良之基於嵌合抗原受體之療法，其可實現T細胞相關惡性病之更有效、安全及有效靶向。

【發明內容】

在一個實施例中，本發明提供經工程改造之細胞，其具有第一嵌合抗原受體多肽，其包括第一抗原識別域、第一信號肽、第一鉸鏈區、第一跨膜域、第一共刺激域及第一信號傳導域；及第二嵌合抗原受體多肽，其包括第二抗原識別域、第二信號肽、第二鉸鏈區、第二跨膜域、第二共刺激域及第二信號傳導域；其中第一抗原識別域與第二抗原識別域不同。

在另一實施例中，本發明提供經工程改造之多肽，其包括嵌合抗原受體及強化子。

在另一實施例中，本發明提供經工程改造之多肽，其包括嵌合抗原受體多肽及強化子。

在另一實施例中，本發明提供經工程改造之嵌合抗原受體多肽，該多肽包括：信號肽、CD45抗原識別域、鉸鏈區、跨膜域、至少一個共刺激域及信號傳導域。在另一實施例中，本發明提供編碼前述多肽之聚核苷酸。

在另一實施例中，本發明提供經工程改造之細胞，其具有上述經工程改造之多肽或聚核苷酸。

在另一實施例中，本發明提供降低標靶細胞數量之方法，其包括以下步驟(i.)使該等標靶細胞與有效量之具有至少一個嵌合抗原受體多肽之經工程改造之細胞接觸，關於經工程改造之細胞具有多個嵌合抗原受體多肽，各嵌合抗原受體多肽為獨立的；及(ii.)視情況分析該等細胞之數量之降低。標靶細胞包括至少一個選自由以下組成之群

的細胞表面抗原：介白素6受體、NY-ESO-1、α胎蛋白(AFP)、磷脂醯肌醇蛋白聚醣-3 (GPC3)、BAFF-R、BCMA、TACI、LeY、CD5、CD13、CD14、CD15 CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD45、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受體及CS1。

在另一實施例中，本發明提供藉由向有需要之患者投與任一種上述經工程改造之細胞來治療B細胞淋巴瘤、T細胞淋巴瘤、多發性骨髓瘤、慢性骨髓性白血病、B細胞急性淋巴母細胞白血病(B-ALL)及細胞增殖性疾病之方法。

【圖式簡單說明】

圖1. cCAR構築體(下文中，「多個CAR或複合CAR」)之示意圖。多重或複合CAR靶向多種抗原(例如細胞類型1或細胞類型2或相同細胞類型)。多重或cCAR T細胞免疫療法包含個別組分CAR，其包含不同或相同的抗原識別域、鉸鏈區、跨膜域、多種共刺激域及胞內信號傳導域。

圖2A. cCAR-T構築體之示意圖。構築體包含驅使由P2A肽連接之CAR之多個模組單元之表現的SFFV啟動子。在連接子裂解後，cCAR裂解且在標靶表現CD33及/或CD123時接合。作為新穎的cCAR構築體，構築體之活化域可包括(但不限於)CD33 CAR區段上之4-1BB及CD123 CAR上之CD28區域。

圖2B. 描繪經轉導之CD33CD123 cCAR-T細胞之表現之西方墨點法。該圖描繪兩種不同CAR蛋白質，亦即CD33 CAR及CD123 CAR之表現。在連接子裂解時表現CD33及CD123 CAR之cCAR-T細胞產生兩種不同且始終強烈的蛋白質譜帶。包括綠色螢光蛋白質(GFP)作為陰性對照。

圖2C. 表示轉導功效之流式細胞測量術。上圖展示在用於UCB

(臍帶血液)及PB (末梢血液)T細胞之前，在293FT HEK (人胚腎)細胞上測試以檢驗最大轉導功效之CD33CD123 cCAR (亦稱為CD33CD123-2G-CAR)之慢病毒效價。下圖展示經包含CD33CD123 cCAR構築體之慢病毒載體轉導之CD33CD123 cCAR (亦稱為CD33CD123-2G-CAR)T細胞及作為對照物之經GFP轉導之細胞。由黃色環指示之百分比為轉導功效之替代物。

圖3. 展示產生高效複合CAR (cCAR)之方法的示意圖。

圖4. 表示CD33CD123-2G CAR-T細胞(cCAR)與前髓細胞性白血病細胞株HL60一起培育之共同培養分析法。比較cCAR-T細胞(下圖)與對照性經GFP轉導之T細胞(上圖)。藉由在培育約24小時之後留存之CD33+細胞群體(黃色環中包圍)來量測殺死功效。

圖5. 表示cCAR-T細胞與骨髓性白血病細胞株KG-1a一起培育之共同培養分析法，其表現約100% CD33及約50-80% CD123。比較cCAR-T細胞(下圖)與對照性經GFP轉導之T細胞(上圖)。藉由在培育約24小時之後留存之CD33+細胞群體來量測殺死功效。

圖6. 表示cCAR-T細胞與AML患者樣品(此處稱為AML-9)一起培育之共同培養分析法。患者細胞包括混合細胞群，諸如白血病細胞、單核細胞及其他類型之母細胞。CD33充當CAR-T作用以及CD34 (白血病細胞之特異性標記物)之標記物。比較CAR-T圖(右側)與對照性經GFP轉導之T細胞(中間)。藉由在培育至少24小時之後留存之CD33+/CD34+細胞群體來量測殺死功效。

圖7. 表示cCAR-T細胞與B-ALL患者樣品(此處稱為Sp-BM-B6)一起培育之共同培養分析法。患者細胞包括混合細胞群，諸如白血病細胞、單核細胞及其他類型之母細胞。CD34充當白血病細胞之特異性標記物。比較CAR-T圖(右側)與對照性經GFP轉導之T細胞(中間)。藉由在培育至少24小時之後留存之CD34+細胞群體來量測殺死功效。

圖8. NK-92細胞中之CD33CD123 cCAR表現。使用山羊抗小鼠抗體F(ab)2偵測CD33CD123 cCAR表現。

圖9. 表示cCAR NK-92細胞與HL-60一起培育之共同培養分析法。比較cCAR NK-92細胞與經GFP轉導之NK-92細胞。藉由在培育約24小時之後留存之CD33+細胞群體來量測殺死功效。

圖10. 表示cCAR NK-92細胞與KG1a一起培育之共同培養分析法。比較cCAR NK細胞圖與經GFP轉導之NK-92細胞。藉由在培育約24小時之後留存之CD33+細胞群體來量測殺死功效。

圖11. 具有HL-60或KG1a之CD33CD123 cCAR (CAR-CD33/123) NK-92細胞之劑量反應。藉由在培育約24小時之後留存之CD33+細胞群體來量測殺死功效。

圖12. 兩個KG11細胞群中CD33CD123 cCAR NK-92細胞殺死能力與對照物之比較。在CAR-CD33/123 (CD33CD123 cCAR NK-92細胞)及標靶細胞kG1a之不同比率下進行分析法。藉由在培育約24小時之後留存之CD33+CD123+或CD33+CD123-細胞群體來量測殺死功效。

圖13. cCAR之示意圖。構築體包含驅使由連接子連接之CAR之多個模組單元之表現的SFFV啟動子。當連接子裂解時，cCAR裂解且在標靶表現多種標靶抗原(CD19及/或CD20，及/或CD22及/或138)之組合時接合。多種cCAR使用相同或不同共刺激域，諸如(但不限於)4-1BB (亦標記為4-BB)及/或CD28。

圖14A-C. BCMA-CS1 cCAR構築體流程(BC1cCAR)。(A)構築體由驅使由P2A肽連接之CAR之兩個模組單元之表現的SFFV啟動子組成。當此P2A肽裂解時，cCAR裂解且在標靶表現BCMA及/或CS1時接合。兩個單元CAR使用相同共刺激域4-1BB。(B)關於載體(左側)及對F(ab)2展示15.3%陽性之BC1cCAR (右側，由正方形突出顯示)之T細胞表面上BC1cCAR表現之流式細胞測量術分析。針對同型對照物進行

閘控。(C)藉由共同培養經BCMA cDNA (BCMA-K562)轉導之K562細胞(自Kochenderfer, NIH獲得)進行BC1cCAR-T細胞之基本功能性驗證。柱狀圖展示BCMA-K562細胞株之溶解對比對照性T細胞以及野生型K562 (wt-K562)之溶解對比對照物。

圖14D. 各單元使用兩種不同共刺激域(4-1BB或CD28)之BCMA-CS1-2G構築體。構築體包括驅使由P2A肽連接之CAR之兩個模組單元之表現的SFFV啟動子。當此P2A肽裂解時，cCAR裂解且接合表現BCMA及/或CS1之標靶。兩個單元CAR使用不同共刺激域，亦即4-1BB或CD28。關於載體(左側)及對F(ab)2展示罕見陽性細胞之BC1cCAR (右側，由正方形突出顯示)之T細胞表面上BC1cCAR表現之流式細胞測量術分析。針對同型對照物進行閘控。

圖14E. HEK-293FT細胞中BC1cCAR及BCMA-CS1-2G之蛋白質表現。HEK-293FT細胞用GFP (泳道1)、BC1cCAR (泳道2)、CD269-CS1-2G (泳道3)之慢病毒質體轉染48小時，在轉染之後移出上清液，且亦移出細胞。細胞與小鼠抗人類CD3z抗體一起溶解以用於西方墨點法及探針。

圖15A-15B. MM1S細胞株共同培養。在24小時下進行共培養且收集且經由流式細胞測量術分析。標靶MM1S細胞(骨髓瘤細胞)用Cytotracker (CMTMR)染料標記以區分其與效應子T細胞。藉由抗BCMA (CD269)及抗CS1 (CD319)抗體閘控群體。圖15A：共同培養之流式細胞測量術繪圖。圖15B：右側：溶解對比E:T比率之圖形概述。

圖16A-16B. RPMI-8226細胞株共同培養。在24小時下進行共同培養且收集且經由流式細胞測量術分析。標靶RPMI-8226細胞用Cytotracker (CMTMR)染料標記以區分其與效應子T細胞。藉由抗BCMA (CD269)及抗CS1 (CD319)抗體閘控群體。圖16A：共同培養之

流式細胞測量術繪圖。圖16B：溶解對比E:T比率之圖形概述。

圖17A-17B. U266細胞株共同培養。在24小時下進行共同培養且收集，且經由流式細胞測量術分析。標靶U266細胞用Cytotracker (CMTMR)染料標記以區分其與效應子T細胞。藉由抗BCMA (CD269)及抗CS1 (CD319)抗體閘控群體。左側：共同培養之流式細胞測量術繪圖，右側：溶解對比E:T比率之圖形概述。

圖18A-18B. MM10-G原發性患者樣品共同培養及比溶胞率。在24小時下進行共同培養且收集且經由流式細胞測量術分析。標靶MM10-G細胞用Cytotracker (CMTMR)染料標記以區分其與效應子T細胞。藉由抗BCMA (CD269)及抗CS1 (CD319)抗體閘控群體。值得注意的是，閘控展示呈現不同$BCMA^+$及$CS1^+$群體之MM10-G。圖18A：共同培養之流式細胞測量術繪圖。圖18B：溶解對比E:T比率之圖形概述。

圖19A-19B. MM7-G原發性患者樣品共同培養及比溶胞率。在24小時下進行共同培養且收集且經由流式細胞測量術分析。標靶MM7-G細胞用Cytotracker (CMTMR)染料標記以區分其與效應子T細胞。藉由抗BCMA (CD269)及抗CS1 (CD319)抗體閘控群體。圖19A：共同培養之流式細胞測量術繪圖。圖19B：溶解對比E:T比率之圖形概述。

圖20A-20B. MM11-G原發性患者樣品共同培養及比溶胞率。在24小時下進行共同培養且收集且經由流式細胞測量術分析。標靶MM11-G細胞用Cytotracker (CMTMR)染料標記以區分其與效應子T細胞。藉由抗BCMA (CD269)及抗CS1 (CD319)抗體閘控群體。圖20A：共同培養之流式細胞測量術繪圖。圖20B：溶解對比E:T比率之圖形概述。

圖21. CD269 CS1-BBCAR NK細胞展現活體內抗白血病作用。NSG小鼠以亞致死劑量輻射且在第二天靜脈內注射表現螢光素酶之MM.1S多發性骨髓瘤細胞以誘導可量測之腫瘤形成。在3天之後，向

小鼠靜脈內注射8×10^6個CD269-CS1-BBCAR NK細胞或載體對照性NK對照細胞。在第3、6及8天，向小鼠皮下注射RediJect D-螢光素且經歷IVIS成像。比較所量測之經CD269-CS1-BBCAR NK注射之小鼠之平均光強度與經載體對照性NK注射之小鼠。

圖22. 量測小鼠之存活百分比且基於來自圖21之研究在兩個組之間進行比較。

圖23. CRISPR/Cas9干擾系統。分別藉由U6及SFFV促進劑驅使sgRNA及Cas9嘌呤黴素之表現。Cas9藉由E2A自裂解序列與嘌呤黴素抗性基因連接。

圖24. 提供用於產生靶向血液科惡性疾病之CAR T或NK細胞之步驟之實例的示意圖。

圖25. 使用CRISPR/Cas9慢病毒系統之穩定CD45阻斷基因表現NK-92細胞之產生及細胞分選。流式細胞測量術分析指示NK-92細胞表面上之CD45表現量(左圖)。在sgCD45B CRISPR轉導至NK-92細胞中之後，經轉導之細胞在含有嘌呤黴素之培養基中培養數週。使用CD45抗體測定CD45陰性NK-92細胞且進行分選。藉由流式細胞測量術分析測定穩定NK^{45i}-92 (CD45阻斷基因表現)NK-92細胞之純度(右圖)。此資料證實成功產生及獲得NK^{45i}-92細胞。

圖26. 野生型、經GFP轉導之NK-92或NK^{45i}-92NK細胞之細胞生長曲線。為了評估NK-92細胞中由CD45阻斷基因表現(KD)引起之細胞增殖作用，在接種至24孔板中之後第48小時及第96小時對NK-92 (●)、經GFP轉導之-92 (■)及NK^{45i}-92 (▲)細胞之數目進行計數。在第48小時時間點時添加IL-2 (一式兩份地進行n=3獨立實驗)。資料為平均值+S.D.。此等資料指示NK-92上CD45受體之阻斷基因表現與未經轉導之NK-92或經GFP轉導之NK-92細胞相比展示類似的細胞生長曲線。

圖27A-27B. 用CCRF-CEM (標靶:T)及GFP NK-92或GFP NK^{45i}-92細胞(效應子:E)，5:1(E:T)比率進行之共同培養分析法。16小時培育。(A)對僅CCRF-CEM (左圖中之藍點)、在與CCRF-CEM及對照性經GFP轉導之NK-92細胞(中間圖)或GFP NK^{45i}-92細胞(右圖)之共同培養之流式細胞測量術分析。所有圖中之藍點指示殘餘標靶CCRF-CEM細胞且紅點展示共同培養分析法之效應細胞。總培育時間為16小時且效應子T細胞:標靶細胞之比率為5:1。一式兩份地進行所有實驗。(B)柱狀圖指示在用CCRF-CEM進行之共同培養分析法中，經GFP轉導之NK^{45i}-92細胞與對照性經GFP轉導之NK92細胞相比之細胞溶解百分比。此等資料表明與GFP對照性NK-92細胞活體外共同培養分析法相比，NK-92細胞中CD45之阻斷基因表現在針對CCRF-CEM細胞之殺死活性方面不展示顯著差異。藍點位於左上方部分中。

圖28A-28B. 用CCRF-CEM (標靶:T)及GFP NK-92、CD5CAR NK-92或CD5CAR NK^{45i}-92細胞(效應子:E)進行之共同培養分析法。5:1 (E:T)比率。16小時培育(A)自右向左，對僅CCRF-CEM (左圖)、在與CCRF-CEM及對照性GFP NK-92細胞(中間左圖)、CD5CAR NK-92細胞(中間右圖)、CD5CAR NK^{45i}-92細胞(右圖)之共同培養之流式細胞測量術分析。所有圖中之藍點指示殘餘標靶CCRF-CEM細胞且紅點展示共同培養分析法之效應細胞。總培育時間為16小時且效應子T細胞:標靶細胞之比率為5:1。一式兩份地進行所有實驗。(B)柱狀圖指示在用CCRF-CEM進行之共同培養分析法中，CD5CAR NK-92細胞或CD5CAR NK^{45i}-92細胞與對照性GFP NK92細胞相比之細胞溶解百分比。資料為平均值+S.D.。與對照性GFP NK-92細胞相比，CD5CAR NK細胞及CD5CAR NK^{45i}-92細胞皆展示針對CD5陽性CCRF-CEM之約100%細胞殺死活性。此等資料表明與GFP對照性NK-92細胞活體外共同培養分析法相比，CD5CAR NK細胞及CD5CAR NK^{45i}-92細胞可有

效地溶解表現CD5之CCRF-CEM細胞，且提供CD45之阻斷基因表現不影響NK-92細胞中關於殺死活性之細胞功能的證據。藍斑位於自左側開始之前面兩個圖之左上方部分中。

圖29A-29B. CD45CAR構築體之組織及其表現。(A)CD45CAR慢病毒載體(lentiviral vector)之示意圖。CD45CAR構築體為模組化信號傳導域，其含有：前導序列、抗CD45scFv、鉸鏈域(H)、跨膜域(TM)、兩個定義構築體為第3代CAR之共刺激域(CD28及4-1BB)及胞內信號傳導域CD3ζ。(B)HEK-293FT細胞用GFP (泳道1)及CD45CAR (泳道2)之慢病毒質體轉染。在轉染之後48小時，移出上清液，且亦移出細胞。細胞與小鼠抗人類CD3z抗體一起溶解以用於西方墨點法及探針。

圖30A-30B. 將CD45CAR轉導至NK^{45i}-92細胞中且進行經CD45CAR轉導之細胞之細胞分選。在CD45CAR慢病毒轉導至NK^{45i}-92細胞中之後，與NK^{45i}-92細胞(左圖)相比，藉由流式細胞測量術分析測定之NK^{45i}-92上CD45CAR之表現量(中間圖中之藍圈)。分選表現CD45CAR之NK^{45i}-92細胞且藉由流式細胞測量術分析測定細胞表面上之CD45表現量(右圖)。藉由流式細胞測量術分析偵測到細胞表面上約87% CD45CAR表現。

圖31A-31B. 用CCRF-CEM (標靶:T)及GFP NK-92或CD45CAR NK^{45i}-92細胞(效應子:E)進行之共同培養分析法。5:1 (E:T)比率。16小時培育。(A)對與CCRF-CEM及對照性經GFP轉導之NK-92細胞(左圖)或CD45CAR NK^{45i}-92細胞(右圖)之共同培養之流式細胞測量術分析。所有圖中之藍點指示殘餘標靶CCRF-CEM細胞且紅點展示共同培養分析法之效應子NK-92細胞。總培育時間為16小時且效應子T細胞:標靶細胞之比率為5:1。一式兩份地進行所有實驗。(B)柱狀圖指示在用CCRF-CEM進行之共同培養分析法中，與對照性GFP NK92細胞相

比，CD45CAR NK^{45i}-92細胞之細胞溶解百分比。資料為平均值±S.D.。與對照性GFP NK-92細胞相比，CD45CAR NK^{45i}-92細胞展示針對CCRF-CEM細胞之約70%細胞溶解。此等資料表明與GFP對照性NK-92細胞活體外共同培養分析法相比，CD45CAR NK^{45i}-92細胞有效溶解表現CD45之CCRF-CEM細胞。

圖32A-32C. 與Jurkat細胞(標靶:T)及GFP對照性或CD45CAR NK^{45i}-92細胞(效應子:E)之共同培養分析法。5:1或2:1 (E:T)比率。6小時培育。(A)在用CMTMR細胞追蹤劑染料將Jurkat細胞染色之後，進行流式細胞測量術分析。此等資料證實Jurkat細胞為CD45陽性(左圖)且大部分為CD56陰性細胞(右圖)。(B)對與Jurkat細胞(標靶:T)及對照物或CD45CAR NK^{45i}-92細胞(效應子:E)之共同培養分析法之流式細胞測量術分析。以5:1或2:1 (E:T)進行共同培養分析法之比率。左圖展示以5:1 (E:T)比率進行之與對照性GFP或CD45CAR/CD45KD NK-92細胞之共同培養且右圖指示以2:1 (E:T)比率進行之與對照性GFP或CD45CAR NK^{45i}-92細胞之共同培養。圖中之藍點指示殘餘標靶Jurkat細胞且紅點表示共同培養分析法之效應細胞。總培育時間為6小時。一式兩份地進行所有實驗。(C)柱狀圖展示在5:1或2:1 (E:T)比率下，與對照性GFP NK92細胞相比，CD45CAR NK^{45i}-92細胞之細胞溶解百分比。資料為平均值±S.D.。在兩種條件下，與對照性GFP NK-92細胞相比，CD45CAR NK^{45i}-92細胞展示針對Jurkat細胞之約60%細胞溶解。此資料表明與GFP對照性NK-92細胞活體外共同培養分析法相比，CD45CAR NK^{45i}-92細胞有效溶解在細胞表面上表現CD45之Jurkat細胞。

圖33A-33C. 用GFP-NK-92細胞(標靶:T)及未經轉導之NK-92細胞或CD45CAR NK^{45i}-92細胞(效應子:E)進行之共同培養分析法。5:1或2:1 (E:T)比率。6小時培育(A)使用GFP對照性NK-92細胞進行流式細

胞測量術分析。此等資料證實GFP對照性NK-92細胞為約99% GFP陽性細胞(綠點)。(B)對與GFP對照性NK-92細胞(標靶:T)及未經轉導或CD45CAR NK^{45i}-92細胞(效應子:E)之共同培養分析法之流式細胞測量術分析。以5:1或2:1 (E:T)進行共同培養分析法之比率。左圖展示以5:1 (E:T)比率進行之與未經轉導或CD45CAR NK^{45i}-92細胞之共同培養且右圖指示以2:1 (E:T)比率進行之與未經轉導或CD45CAR NK^{45i}-92細胞之共同培養。圖中之綠點指示殘餘標靶GFP NK-92細胞且紅點表示共同培養分析法之效應細胞。培育時間為6小時。一式兩份地進行所有實驗。(C)柱狀圖展示在5:1或2:1 (E:T)比率下，與未經轉導之NK-92細胞相比，由CD45CAR NK^{45i}-92細胞進行之GFP NK-92細胞之細胞溶解百分比。資料為平均值±S.D.。與未經轉導之NK-92細胞相比，針對GFP NK-92細胞，CD45CAR NK^{45i}-92細胞在2:1 (E:T)比率下展示約20%細胞溶解且在5:1 (E:T)比率下展示約55%細胞溶解。此資料表明與未經轉導之NK-92細胞活體外共同培養分析法相比，CD45CAR NK^{45i}-92細胞有效溶解在細胞表面上表現CD45之GFP NK-92細胞。綠點位於各圖之右上方部分中。

圖33D-E. 將CD45b-BB或CD45b-28轉導至NK^{45i}-92細胞中且進行經CD45b-BB或CD45b-28轉導之NK^{45i}-92細胞之細胞分選。(D)在CD45b-BB或CD45b-28慢病毒轉導至NK45i-92細胞中之後，與NK^{45i}-92細胞(左圖)相比，藉由流式細胞測量術分析來測定NK^{45i}-92上CD45b-BB CAR或CD45b-28 CAR之表面表現量(中間圖中之藍圈)。(E)藉由流式細胞測量術分析分選表現CD45b-BB或CD45b-28 CAR之NK45i-92細胞。藉由流式細胞測量術分析偵測到細胞表面上約74% CD45b-BB CAR或82% CD45b-28 CAR表現。

圖33F-G. 與REH細胞(標靶:T)及GFP NK-92細胞或CD45CAR NK^{45i}-92細胞或CD45b-BB NK^{45i}-92細胞或CD45b-28 NK^{45i}-92細胞(效

應子:E)之共同培養分析法。5:1 (E:T)比率。20小時培育。(F)對僅REH細胞(左圖)、與REH細胞及對照性經GFP轉導之NK-92細胞(左側第2個圖)、CD45CAR NK^{45i}-92細胞(中間圖)、CD45b-BB NK^{45i}-92細胞(左側第4個圖)或CD45b-28 NK^{45i}-92細胞(右圖)之共同培養之流式細胞測量術分析。所有圖中之藍點指示殘餘標靶REH細胞且紅點展示共同培養分析法之效應子GFP或CAR-NK-92細胞。REH為B急性淋巴母細胞性細胞株。總培育時間為20小時且效應子NK-細胞:標靶細胞之比率為5:1。一式兩份地進行所有實驗。(G)柱狀圖指示在用REH細胞進行之共同培養分析法中，與對照性GFP NK92細胞相比，CD45CAR NK^{45i}-92細胞、CD45b-BB NK^{45i}-92細胞或CD45b-28 NK45i-92細胞之細胞溶解百分比。資料為平均值+S.D.。與對照性GFP NK-92細胞相比，針對REH細胞，CD45CAR NK^{45i}-92細胞展示約76%細胞溶解，CD45b-BB NK^{45i}-92細胞展示約79%細胞溶解且CD45b-28 NK^{45i}-92展示100%細胞溶解。此等資料表明所有三種CD45CAR皆有效溶解REH細胞。

圖34A-34B. 說明T或NK細胞中構築體及其表現之示意圖。(A)在表現載體上組裝CAR (第三代)、sushi/IL-15之組合且藉由SFFV啟動子驅使其表現。具有sushi/IL-15之CAR與P2A裂解序列連接。sushi/IL-15部分由與sushi域融合之IL-2信號肽組成且經由26胺基酸聚脯胺酸連接子連接至IL-5。(B)CAR及sushi/IL15存在於T或NK細胞上。

圖35A-35B. CD4IL15RA-CAR表現。(A)HEK-293FT細胞用GFP (泳道1)及CD4IL15RA CAR (泳道2)以及陽性對照CD4CAR (泳道3)之慢病毒質體轉染。在轉染之後48小時，移出上清液，且亦移出細胞以用於用小鼠抗人類CD3z抗體進行之西方墨點法。(B)HEK-293細胞用來自經轉染之HEK-293FT細胞之GFP (左側)或CD4IL15RA-CAR (右側)病毒上清液轉導。在3天培育之後，收集細胞，用山羊抗小鼠

F(Ab')2染色且藉由流式細胞測量術分析。

圖36. 用CD4IL15RACAR進行之NK細胞之轉導。NK-92細胞用來自經轉染之HEK-293FT細胞之GFP (左側)或CD4IL15RACAR (右側)病毒上清液轉導。在第一次轉導之後24小時進行第二次轉導。在第二次轉導之後24小時，收集細胞，洗滌且與新鮮的培養基及IL-2一起移至組織培養盤中。在3天培育之後，收集細胞且用山羊抗小鼠F(Ab')2抗體或山羊IgG (對照物)以1:250染色30分鐘。洗滌細胞且用抗生蛋白鏈菌素-PE結合物以1:500染色，洗滌，懸浮於2%福馬林(formalin)中且藉由流式細胞測量術分析。

圖37. 用CD4IL15RACAR轉導T細胞。左側為西方墨點法。HEK-293FT細胞用GFP (泳道1)及CD4IL15RA-CAR (泳道2)之慢病毒質體轉染。在轉染之後48小時，移出上清液，且亦收集細胞以用於用小鼠抗人類CD3ζ抗體進行之西方墨點法。右側為CD4IL15RACAR表現。來自臍帶血液白血球層之經活化之T細胞用來自經轉染之HEK-293FT細胞之GFP (左側)或CD4IL15RACAR (右側)病毒上清液轉導。在第一次轉導之後24小時進行第二次轉導。在第二次轉導之後24小時，收集細胞，洗滌且與新鮮培養基及IL-2一起移至組織培養盤中。在3天培育之後，收集細胞且用山羊抗小鼠F(Ab')2或同型對照染色30分鐘。用GFP (左側)或CD4IL15RA (右側)轉導。洗滌細胞且用抗生蛋白鏈菌素-PE結合物以1:250染色，洗滌，懸浮於2%福馬林(formalin)中且藉由流式細胞測量術分析。

圖38A-38B. CD4CAR NK-92細胞及CD4IL15RA CAR NK-92細胞消除共同培養中之KARPAS 299 T白血病細胞。經GFP對照物(右上方)、CD4CAR (左下方)或CD4IL15RA (右下方)慢病毒上清液轉導之NK-92細胞以5:1之比率與KARPAS 299細胞一起培育。在4小時共同培養之後，細胞用小鼠抗人類CD4 (APC)及CD3 (PerCp)抗體染色且藉由流式

細胞測量術(N=2)分析。左上圖展示單獨的經標記之Karpas 299細胞。溶解之標靶細胞之百分比展示於圖中。

圖39. CD4CAR NK-92細胞及CD4IL15RA CAR NK-92細胞消除共同培養中表現CD4之MOLT4 T白血病細胞。經GFP對照物(左側)、CD4CAR (中間)或CD4IL15RA (自右側起第二個)慢病毒上清液轉導之NK-92細胞以1:1或2:1之效應子:標靶比率與MOLT4細胞一起培育。在隔夜共同培養之後，細胞用小鼠抗人類CD4 (APC)及CD56 (PerCp)抗體染色且藉由流式細胞測量術(N=2)分析。右上圖展示單獨的經標記之MOLT4細胞。溶解之標靶細胞之百分比展示於圖中。

圖40. CD4IL15RACAR T細胞展示比CD4CAR更強效的活體內抗白血病作用。NSG小鼠以亞致死劑量輻射且在第二天靜脈內(尾部靜脈)注射表現螢光素酶之MOLM13細胞以誘導可量測之腫瘤形成。在3天之後，向小鼠靜脈內注射一個療程之8×10^6個CD4CAR，或CD4IL15RACAR T細胞或載體對照性T對照細胞。在第3、6、9及11天，向小鼠皮下注射RediJect D-螢光素且經歷IVIS成像。

圖41. 量測小鼠中之腫瘤減小百分比且基於來自圖40之研究在三個組之間進行比較。比較經CD4CAR及CD4IL15RACAR T注射之小鼠之所量測的平均光強度與經載體對照性T注射之小鼠，且與剩餘腫瘤負荷相關。在每個由兩種注射情況組成之組中，CD4CAR T位於左側且CD4IL15RA CAR T位於右側。

圖42. 在6孔組織培養盤中，在具有10% FBS之DMEM中，使用所指示之體積，HEK 293細胞用EF1-GFP或SFFV-GFP病毒上清液轉導。在第二天早晨更換培養基。四十八小時之後，在10×下使用GFP在EVOS螢光顯微鏡上觀測經轉導之細胞。

圖43. 使用來自前述圖之體積，使經EF1-GFP或SFFV-GFP病毒上清液轉導之HEK 293細胞胰蛋白酶化，懸浮於福馬林中且經歷流式

細胞測量術分析，使用FITC通道以測定GFP+細胞之百分比。

圖44A-44B. 在轉導之後第7、14、21及28天，在少量或大量病毒上清液情況下，使經EF1-GFP或SFFV-GFP病毒上清液轉導之經活化之臍帶血液白血球層T細胞胰蛋白酶化，懸浮於福馬林中且經歷流式細胞測量術分析，使用FITC通道以測定GFP+細胞之百分比。

(A) 在少量或大量上清液情況下經轉導之細胞之GFP+ T細胞百分比。

(B) 相對於在少量SFFV-GFP上清液情況下經轉導之T細胞中之GFP+細胞百分比，在大量EF1-GFP上清液情況下經轉導之GFP+ T細胞之百分比。(使用50 μL SFFV-GFP及1 mL EF1-GFP上清液)。(N=2)。

圖45. 惡性漿細胞中之配位體受體相互作用。APRIL配位體結合TAC1或BCMA。BAFF配位體結合TAC1、BCMA或BAFF-R。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

本申請案為國際PCT申請案，其主張2015年6月25日申請之美國臨時申請案第62/184,321號；2015年10月1日申請之第62/235,840號；及2015年10月21日申請之第62/244,435號之優先權，其皆以全文引用之方式併入本文中。

本發明提供嵌合抗原受體(CAR)組合物，其製造及使用方法。

嵌合抗原受體(CAR)多肽包括信號肽、抗原識別域、鉸鏈區、跨膜域、至少一個共刺激域及信號傳導域。

第一代CAR包括CD3z作為胞內信號傳導域，而第二代CAR包括來源於多種蛋白質之至少一個單一共刺激域。共刺激域之實例包括(但不限於)CD28、CD2、4-1BB (CD137，亦稱為「4-BB」)及OX-40 (CD124)。第三代CAR包括兩個共刺激域，諸如(但不限於)CD28、4-

1BB、CD134 (OX-40)、CD2及/或CD137 (4-1BB)。

如本文中所使用，術語「肽」、「多肽」及「蛋白質」可互換地使用，且係指具有由肽鍵共價連接之胺基酸殘基之化合物。蛋白質或肽必須含有至少兩個胺基酸，且對可包括蛋白質或肽序列之胺基酸最大數目無限制。多肽包括任何具有兩個或更多個藉由肽鍵彼此接合之胺基酸之肽或蛋白質。如本文所使用之術語係指短鏈(其在此項技術中亦通常稱為例如肽、寡肽及寡聚物)及長鏈(其在此項技術中通常稱為蛋白質，其存在多種類型)。「多肽」尤其包括例如生物活性片段、實質上同源多肽、寡肽、均二聚體、雜二聚體、多肽變異體、經修飾之多肽、衍生物、類似物、融合蛋白。多肽包括天然肽、重組型肽、合成肽或其組合。

「信號肽」包括肽序列，其引導細胞內肽及任何連接之多肽之傳遞及定位，例如傳遞及定位至某一細胞器(諸如內質網)及/或細胞表面。

信號肽為任何分泌或跨膜蛋白之肽，其引導所揭示之多肽傳遞至細胞膜及細胞表面，且提供本發明之多肽之正確定位。特定言之，本發明之信號肽將本發明之多肽引導至細胞膜，其中多肽之細胞外部分在細胞表面上顯示，跨膜部分橫跨質膜，且活性域位於細胞質部分或細胞之內部中。

在一個實施例中，信號肽在通過內質網(ER)之後裂解，亦即為可裂解之信號肽。在一個實施例中，信號肽為I、II、III或IV型人類蛋白質。在一個實施例中，信號肽包括免疫球蛋白重鏈信號肽。

「抗原識別域」包括對以下各者具有選擇性或靶向以下各者之多肽：標靶之抗原、受體、肽配位體或蛋白質配位體；或標靶之多肽。

抗原識別域可自與配位體結合及/或信號轉導相關之廣泛多種細

胞外域或分泌蛋白質中之任一者獲得。抗原識別域可包括與Ig輕鏈之一部分連接之Ig重鏈之一部分，其組成特異性結合於標靶抗原之可變單鏈片段(scFv)。抗體可為單株或多株抗體或可具有任何特異性結合於標靶抗原之類型。在另一實施例中，抗原識別域可為受體或配位體。在特定實施例中，標靶抗原對特定疾病病狀具有特異性且該疾病病狀可為任何類型，只要其具有細胞表面抗原即可，該細胞表面抗原可由複合CAR架構中存在之嵌合受體構築體中之至少一者識別。在特定實施例中，嵌合受體可用於任何其中存在特異性單株或多株抗體或能夠產生特異性單株或多株抗體之癌症。特定言之，諸如神經母細胞瘤、小細胞肺癌、黑素瘤、卵巢癌、腎細胞癌、結腸癌、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)及兒童急性淋巴母細胞白血病之癌症具有對嵌合受體具有特異性之抗原。

標靶特異性抗原識別域較佳包括來源於針對標靶之抗原之抗體的抗原結合域，或結合標靶之抗原之肽，或結合抗體(其結合標靶之抗原)之肽或蛋白質，或結合標靶上之受體之肽或蛋白質配位體(包括(但不限於)生長因子、細胞激素或荷爾蒙)，或來源於結合標靶上之肽或蛋白質配位體之受體(包括(但不限於)生長因子受體、細胞激素受體或荷爾蒙受體)之域。

在一個實施例中，抗原識別域包括針對標靶(對標靶具有選擇性)之單株或多株抗體之結合部分或可變區。

在另一實施例中，抗原識別域包括駱駝科(camelid)單域抗體，或其部分。在一個實施例中，駱駝科單域抗體包括在駱駝中發現之重鏈抗體，或VHH抗體。駱駝科(例如駱駝、單峰駝、大羊駝及羊駝)之VHH抗體係指駱駝單鏈抗體之可變片段(參見Nguyen等人，2001；Muyldermans，2001)，且亦包括經分離之駱駝VHH抗體、重組型駱駝VHH抗體或合成駱駝VHH抗體。

在另一實施例中，抗原識別域包括接合其同源受體之配位體。作為實例，APRIL為結合TAC1受體或BCMA受體之配位體。根據本文中所揭示之本發明，抗原識別域包括APRIL，或其片段。作為另一實例，BAFF為結合BAFF-R受體或BCMA受體之配位體。根據本文中所揭示之本發明，抗原識別域包括BAFF，或其片段。在另一實施例中，抗原識別域經人類化。

應理解，抗原識別域可在其序列內包括一些可變性且仍對本文中所揭示之標靶具有選擇性。因此，預期抗原識別域之多肽可與本文中所揭示之抗原識別域多肽具有至少95%、至少90%、至少80%或至少70%一致性，且仍對本文中所描述之標靶具有選擇性且屬於本發明之範疇內。

標靶包括介白素6受體、NY-ESO-1、α胎蛋白(AFP)、磷脂醯肌醇蛋白聚醣-3 (GPC3)、BCMA、BAFF-R、TACI、LeY、CD5、CD13、CD14、CD15 CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受體、CS1、CD45、ROR1、PSMA、MAGE A3、醣脂、磷脂醯肌醇蛋白聚醣3、F77、GD-2、WT1、CEA、HER-2/neu、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、α-胎蛋白、CA 19-9、CA 72-4、NY-ESO、FAP、ErbB、c-Met、MART-1、CD30、EGFRvIII、免疫球蛋白κ及λ、CD38、CD52、CD3、CD4、CD8、CD5、CD7、CD2及CD138。

在另一實施例中，標靶包括任何部分介白素6受體、NY-ESO-1、α胎蛋白(AFP)、磷脂醯肌醇蛋白聚醣-3 (GPC3)、BCMA、BAFF-R、TACI、LeY、CD5、CD13、CD14、CD15 CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受體、CS1、CD45、TACI、ROR1、PSMA、MAGE A3、醣脂、磷脂醯肌醇蛋白聚醣3、F77、GD-2、

WT1、CEA、HER-2/neu、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、α-胎蛋白、CA 19-9、CA 72-4、NY-ESO、FAP、ErbB、c-Met、MART-1、CD30、EGFRvIII、免疫球蛋白κ及λ、CD38、CD52、CD3、CD4、CD8、CD5、CD7、CD2及CD138。

在一個實施例中，標靶包括以下各者之表面暴露部分：介白素6受體、NY-ESO-1、α胎蛋白(AFP)、磷脂醯肌醇蛋白聚醣-3 (GPC3)、BCMA、BAFF-R、TACI、LeY、CD5、CD13、CD14、CD15 CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受體、CS1、CD45、TACI、ROR1、PSMA、MAGE A3、醣脂、磷脂醯肌醇蛋白聚醣3、F77、GD-2、WT1、CEA、HER-2/neu、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、α-胎蛋白、CA 19-9、CA 72-4、NY-ESO、FAP、ErbB、c-Met、MART-1、CD30、EGFRvIII、免疫球蛋白κ及λ、CD38、CD52、CD3、CD4、CD8、CD5、CD7、CD2及CD138多肽。

在另一實施例中，標靶抗原包括病毒或真菌抗原，諸如來自人類乳突狀瘤病毒(HPV)之E6及E7，或EBV(埃-巴二氏病毒(Epstein Barr virus))抗原；其部分；或其表面暴露區域。

在一個實施例中，TACI抗原識別域包括SEQ ID NO:24。

在一個實施例中，BCMA抗原識別域包括SEQ ID NO:25。

在一個實施例中，CS1抗原識別域包括SEQ ID NO:26。

在一個實施例中，BAFF-R抗原識別域包括SEQ ID NO:27。

在一個實施例中，CD33抗原識別域包括SEQ ID NO:28。

在一個實施例中，CD123抗原識別域包括SEQ ID NO:29。

在一個實施例中，CD19抗原識別域包括SEQ ID NO:30。

在一個實施例中，CD20抗原識別域包括SEQ ID NO:31。在另一實施例中，CD20抗原識別域包括SEQ ID NO:32。

在一個實施例中，CD22抗原識別域包括SEQ ID NO:33。

在一個實施例中，CD45抗原識別域包括SEQ ID NO:34。

鉸鏈區為安置於例如包括(但不限於)嵌合抗原受體與至少一個共刺激域及信號傳導域之間的序列。可獲得鉸鏈序列，包括例如來自任何屬之任何適合的序列，包括人類或其部分。此項技術中已知此類鉸鏈區。在一個實施例中，鉸鏈區包括人類蛋白質之鉸鏈區，包括CD-8α、CD28、4-1BB、OX40、CD3-ζ、T細胞受體α或β鏈、CD3ζ鏈、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD8a、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154、其功能衍生物及其組合。

在一個實施例中，鉸鏈區包括CD8 a鉸鏈區。

在一些實施例中，鉸鏈區包括選自(但不限於)免疫球蛋白(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4及IgD)之一者。

跨膜域包括橫跨細胞膜之疏水性多肽。特定言之，跨膜域自細胞膜之一側(細胞外)橫跨細胞膜之另一側(細胞內或細胞質)。

跨膜域可呈α螺旋或β筒或其組合形式。跨膜域可包括異地同型蛋白質，其具有多個跨膜區段，各呈α-螺旋、β片或其組合形式。

在一個實施例中，使用與CAR中之一個域天然相關之跨膜域。在另一實施例中，選擇跨膜域或藉由胺基酸取代修飾以避免此類域與相同或不同表面膜蛋白質之跨膜域之結合，從而最小化與受體複合物之其他成員之相互作用。

舉例而言，跨膜域包括以下各者之跨膜域：T細胞受體α或β鏈、CD3ζ鏈、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD68、CD134、CD137、ICOS、CD41、CD154、其功能衍生物及其組合。

在一個實施例中，跨膜域經人工設計使得域中超過25%、超過

50%或超過75%胺基酸殘基為疏水性殘基，諸如白胺酸及纈胺酸。在一個實施例中，在合成跨膜域之各端發現苯丙胺酸、色胺酸及纈胺酸之三聯體。

在一個實施例中，跨膜域為CD8跨膜域。在另一實施例中，跨膜域為CD28跨膜域。此類跨膜域為此項技術中已知的。

信號傳導域及共刺激域包括可提供免疫細胞之活化以刺激或活化免疫細胞信號傳導路徑之至少一些態樣之多肽。

在一個實施例中，信號傳導域包括以下各者之功能性信號傳導域之多肽：CD3ζ、共同FcRγ (FCER1G)、FcγRlla、FcRβ (Fcε Rib)、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD79a、CD79b、DNAX活化蛋白質10 (DAP10)、DNAX活化蛋白質12 (DAP12)、其活性片段、其功能衍生物及其組合。此類信號傳導域為此項技術中已知的。

在一個實施例中，CAR多肽進一步包括一或多個共刺激域。在一個實施例中，共刺激域為來自包括以下之蛋白質之功能性信號傳導域：OX40；CD27；CD28；CD30；CD40；PD-1；CD2；CD7；CD258；自然殺手第2組成員C (NKG2C)；自然殺手第2組成員D (NKG2D)、B7-H3；結合於CD83、ICAM-1、LFA-1 (CDl la/CD18)、ICOS及4-1BB (CD137)中之至少一者之配位體；CDS；ICAM-1；LFA-1 (CD1a/CD18)；CD40；CD27；CD7；B7-H3；NKG2C；PD-1；ICOS；其活性片段；其功能衍生物；及其組合。

如本文中所使用，至少一個共刺激域及信號傳導域可共同稱為胞內域。如本文中所使用，鉸鏈區及抗原識別可共同稱為細胞外域。

本發明亦提供編碼上述嵌合抗原受體多肽之聚核苷酸。

如本文所使用之術語「聚核苷酸」定義為核苷酸鏈。聚核苷酸包括DNA及RNA。此外，核酸為核苷酸之聚合物。因此，如本文所使用之核酸及聚核苷酸為可互換的。熟習此項技術者具有核酸為聚核苷

酸之常識，聚核苷酸其可水解成單體「核苷酸」。單體核苷酸可水解成核苷。如本文所使用，聚核苷酸包括(但不限於)藉由此項技術中可使用的任何手段獲得的所有核酸序列，包括(但不限於)重組手段，亦即使用一般選殖技術自重組型文庫或細胞基因體選殖核酸序列，及聚合酶鏈反應(PCR)，及其類似手段，及藉由合成成段。

編碼CAR之聚核苷酸可藉由任何習知方法自指定CAR之胺基酸序列容易地製備。關於各域之胺基酸序列，編碼胺基酸序列之基底序列可自前述NCBI RefSeq ID或GenBenk之寄存編號獲得，且本發明之核酸可使用標準分子生物及/或化學程序製備。舉例而言，基於基底序列，可合成聚核苷酸，且可藉由組合DNA片段來製備本發明之聚核苷酸，該等DNA片段係使用聚合酶鏈反應(PCR)自cDNA文庫獲得。

在一個實施例中，本文中所揭示之聚核苷酸為基因之一部分，或表現或選殖卡匣。

上述聚核苷酸可選殖至載體中。「載體」為物質之組合物，其包括經分離之聚核苷酸，且其可用於將經分離之聚核苷酸傳遞至細胞內部。此項技術中已知的大量載體包括(但不限於)線性聚核苷酸、與離子性或兩性化合物相關之聚核苷酸、質體、噬菌粒、黏質體及病毒。病毒包括噬菌體、噬菌體衍生物。因此，術語「載體」包括自主複製質體或病毒。該術語亦應視為包括非質體及非病毒化合物，其促進核酸轉移至細胞中，諸如聚離胺酸化合物、脂質體及其類似物。病毒載體之實例包括(但不限於)腺病毒載體、腺相關病毒載體、反轉錄病毒載體、慢病毒載體及其類似物。在一個實施例中，載體包括選殖載體、表現載體、複製載體、探針產生載體、整合載體及測序載體。

在一實施例中，載體為病毒載體。在一個實施例中，病毒載體為反轉錄病毒載體或慢病毒載體。在一個實施例中，經工程改造之細胞以病毒方式轉導以表現聚核苷酸序列。

已針對基因轉移至哺乳動物細胞中開發出許多基於病毒之系統。舉例而言，反轉錄病毒提供基因傳遞系統之適宜平台。所選基因可插入載體中且使用此項技術中已知之技術封裝於反轉錄病毒粒子中。接著可分離重組型病毒且活體內或離體傳遞至患者之細胞中。此項技術中已知許多反轉錄病毒系統。在一些實施例中，使用腺病毒載體。此項技術中已知許多腺病毒載體。在一個實施例中，使用慢病毒載體。

病毒載體技術為此項技術中熟知的且描述於例如Sambrook等人(2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)及其他病毒學及分子生物學手冊中。適用作載體之病毒包括(但不限於)反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒及慢病毒。通常，適合的載體含有在至少一種生物體、啟動子序列、適宜的限制內切酶位點及一或多種可選標記物中具有功能性的複製起點(例如WO 01/96584；WO 01/29058；及美國專利第6,326,193號)。

已熟知慢病毒載體將基因高效轉移至人類T細胞中之能力，但載體編碼之基因之表現取決於驅使其表現之內部啟動子。對於具有其他編碼增生性細胞激素之共刺激域或基因之第三代或第四代CAR，強啟動子尤其重要，因為增加之CAR主體尺寸並不確保等效表現量。存在多種具有不同強度及細胞類型特異性之啟動子。使用CAR T細胞之基因療法依賴於T細胞表現充分的CAR主體及長時間段維持表現之能力。通常選擇EF-1α啟動子用於CAR表現。

本發明係關於含有用於T細胞或NK細胞中高基因表現量之強啟動子之表現載體。在其他實施例中，本發明者揭示適用於T細胞或NK細胞中之高CAR表現量之強啟動子。在特定實施例中，強啟動子與SFFV啟動子有關，其被選擇性引入表現載體中，以在T細胞或NK細

胞中獲得高表現量及長時間段維持表現。所表現之基因偏好CAR、T細胞共刺激因子及用於免疫療法之細胞激素。

適合的啟動子之一個實例為前早期巨細胞病毒(CMV)啟動子序列。此啟動子序列為能夠驅使任何與其以操作方式連接之聚核苷酸序列之高表現量的強組成性啟動子序列。適合的啟動子之另一實例為延長生長因子-1 a (EF -1 a)。然而，亦可使用其他組成性啟動子序列，包括(但不限於)猴病毒40 (SV40)早期啟動子、小鼠乳房腫瘤病毒(MMTV)、人類免疫缺陷病毒(HIV)長末端重複序列(LTR)啟動子、MoMuLV啟動子、禽類白血病病毒啟動子、埃-巴二氏病毒前早期啟動子、勞斯肉瘤病毒啟動子(Rous sarcoma virus promoter)，以及人類基因啟動子，諸如(但不限於)肌動蛋白啟動子、肌球蛋白啟動子、血紅蛋白啟動子及肌酸激酶啟動子。此外，本發明不應限於使用組成性啟動子，亦涵蓋誘導性啟動子作為本發明之一部分。誘導性啟動子之使用提供分子開關，該分子開關能夠在需要此類表現時打開其以操作方式連接之聚核苷酸序列表現，或在不需要時關閉表現。誘導性啟動子之實例包括(但不限於)金屬硫蛋白啟動子、糖皮質激素啟動子、孕酮啟動子及四環素啟動子。

可使用例如表現載體獲得嵌合抗原受體聚核苷酸之表現，包括(但不限於)SFFV (脾病灶形成病毒)(例如SEQ ID NO:23)或人類延長因子11α (EF)啟動子、CAG (具有CMV強化子之雞β-肌動蛋白啟動子)啟動子人類延長因子1α (EF)啟動子中之至少一者。所使用之強度較弱/表現量較低之啟動子之實例可包括(但不限於)猴病毒40 (SV40)早期啟動子、巨細胞病毒(CMV)前早期啟動子、泛素C (UBC)啟動子及磷酸甘油酸激酶1 (PGK)啟動子或其部分。嵌合抗原受體之誘導性表現可使用例如四環素反應啟動子獲得，包括(但不限於)TRE3GV (Tet反應元件，包括所有世代且較佳為第3代)、誘導性啟動子(Clontech

Laboratories, Mountain View, CA)或其部分或組合。

在一個較佳實施例中，啟動子為SFFV啟動子或其衍生物。已意外發現SFFV啟動子在根據本發明之經轉導之細胞中提供更強表現及更大程度的持久性。

「表現載體」係指包括重組性聚核苷酸之載體，該重組性聚核苷酸包含與待表現之核苷酸序列以操作方式連接之表現控制序列。表現載體包括足夠的順式作用元素用於表現；用於表現之其他元素可由宿主細胞供應或在活體外表現系統中。表現載體包括此項技術中已知之所有表現載體，諸如併入重組性聚核苷酸之黏質體、質體(例如裸露或含於脂質體中)及病毒(例如慢病毒、反轉錄病毒、腺病毒及腺相關病毒)。表現載體可為雙順反子或多順反子表現載體。雙順反子或多順反子表現載體，可包括(1)與每個開放閱讀框架融合之多個啟動子；(2)在基因之間插入編接信號；表達由單個啟動子驅使之基因之融合；(3)在基因(自裂解肽)之間插入蛋白水解分裂位點；及(iv)在基因之間插入內部核糖體進入位點(IRES)。

在一個實施例中，本發明提供具有至少一個嵌合抗原受體多肽或聚核苷酸之經工程改造之細胞。

「經工程改造之細胞」意謂任何生物體之經修飾、經轉型或藉由基因、DNA或RNA序列或蛋白質或多肽之添加或修飾而操作之任何細胞。本發明之經分離之細胞、宿主細胞及經基因工程改造之細胞包括經分離之免疫細胞，諸如含有編碼嵌合抗原受體或嵌合抗原受體複合物之DNA或RNA序列且在細胞表面上表現嵌合受體之NK細胞及T細胞。經分離之宿主細胞及經工程改造之細胞可用於例如增強NK細胞活性或T淋巴細胞活性、治療癌症及治療感染性疾病。

在一個實施例中，經工程改造之細胞包括免疫調節細胞。免疫調節細胞包括T細胞，諸如CD4 T細胞(輔助T細胞)、CD8 T細胞(細胞

毒性T細胞、CTL)及記憶體T細胞或記憶體幹細胞T細胞。在另一實施例中，T細胞包括自然殺手T細胞(NK T細胞)。

在一個實施例中，經工程改造之細胞包括自然殺手細胞。自然殺手細胞為此項技術中所熟知的。在一個實施例中，自然殺手細胞包括細胞株，諸如NK-92細胞。NK細胞株之其他實例包括NKG、YT、NK-YS、HANK-1、YTS細胞及NKL細胞。

NK細胞在無GvHD風險情況下介導抗腫瘤作用且相對於T細胞為短生命期。因此，NK細胞將在毀壞癌細胞之後不久耗竭，減少對CAR構築體上將消融經修飾之細胞之誘導性自殺基因之需要。

根據本發明，意外發現NK細胞提供易於獲得的經工程改造以含有及表現本文中所揭示之嵌合抗原受體多肽之細胞。

同種異體或自體NK細胞誘導快速免疫反應，但歸因於其有限使用壽命而自循環相對快速地消失。因此，申請人意外發現使用基於CAR細胞之療法可減少持續性副作用問題。

本發明包括產生cCAR之方法。在一些實施例中，使用T細胞產生cCAR。在其他實施例中，cCAR為使用自末梢血液或臍帶血液及NK-92細胞分離之原生NK細胞，使得其「現成地」投與任何患有疾病或癌症之哺乳動物。

根據本發明之一個態樣，NK細胞可用根據本發明之CAR聚核苷酸擴增及轉染，NK細胞可來源於臍帶血液、末梢血液、iPS細胞及胚胎幹細胞。根據本發明之一個態樣，NK-92細胞用CAR擴增及轉染。NK-92為連續生長細胞株，其具有自然殺手(NK)細胞之特性及特徵(Arai, Meagher等人 2008)。NK-92細胞株為IL-2依賴性且已證實為安全(Arai, Meagher等人 2008)及可行的。表現CAR之NK-92細胞可在與或不與飼養細胞共同培養之情況下，在不含血清之培養基中擴增。可藉由分選獲得攜帶相關CAR之NK-92之純群體。

在一個實施例中，經工程改造之細胞包括自供體獲得之同種異體T細胞，其經修飾以不活化涉及MHC識別之TCR (T細胞受體)之組分。因此，TCR缺失型T細胞將不引起移植體對抗宿主疾病(GVHD)。

在一些實施例中，經工程改造之細胞可經修飾以防止細胞表面抗原之表現。舉例而言，經工程改造之細胞可經遺傳修飾以缺失原生CD45基因，以防止其表現及細胞表面呈現。

在一些實施例中，經工程改造之細胞包括誘導性自殺基因(「安全開關」)或安全開關之組合，其可在載體上組裝，諸如(但不限於)反轉錄病毒載體、慢病毒載體、腺病毒載體或質體。引入「安全開關」可極大地增加安全概況及限制複合CAR之命中標靶或偏離腫瘤毒性。「安全開關」可為誘導性自殺基因，諸如(但不限於)卡斯蛋白酶9基因、胸苷激酶、胞嘧啶脫胺酶(CD)或細胞色素P450。其他用於消除不合需要之經修飾之T細胞之安全開關涉及T細胞中CD20或CD19或經截短之表皮生長因子受體之表現。已涵蓋所有有可能的安全開關且在本發明中實施。

在一些實施例中，將自殺基因整合至經工程改造之細胞基因體中。

在一個實施例中，本發明提供具有CD45嵌合抗原受體聚核苷酸之經工程改造之細胞。在一個實施例中，CD45 CAR多肽包括SEQ ID NO:13及相應的聚核苷酸序列SEQ ID NO:14。在另一實施例中，CD45 CAR多肽包括SEQ ID NO:15，及相應的聚核苷酸序列SEQ ID NO:16。在另一實施例中，CD45 CAR多肽包括SEQ ID NO:17，及相應的聚核苷酸序列SEQ ID NO:18。

多個CAR單元

本發明提供具有至少兩種不同的CAR多肽之經工程改造之細胞。

如本文中所使用，複合CAR (cCAR)或多個CAR係指具有至少兩

種不同的嵌合抗原受體多肽之經工程改造之細胞。如本文中所使用，「不同的嵌合抗原受體多肽」具有獨特抗原識別域、信號肽、鉸鏈區、跨膜域、至少一個共刺激域及信號傳導域。因此，兩個獨特的嵌合抗原受體多肽將具有不同的抗原識別域。在兩個不同的嵌合抗原受體多肽之間，信號肽、鉸鏈區、跨膜域、至少一個共刺激域及信號傳導域可相同或不同。如本文中所使用，嵌合抗原受體(CAR)單元係指不同的嵌合抗原受體多肽，或編碼不同的嵌合抗原受體多肽之聚核苷酸。

如本文中所使用，獨特抗原識別域為對單個標靶或標靶之單個抗原決定基具有特異性或靶向其之抗原識別域。

在一些實施例中，複合CAR靶向相同抗原。舉例而言，cCAR靶向單個抗原之不同抗原決定基或部分。在一些實施例中，複合CAR中之CAR單元中之每一者靶向對相同或不同疾病病狀或由疾病病狀引起之副作用具有特異性的不同抗原。

在一些實施例中，複合CAR靶向兩種不同抗原。

產生攜帶不同CAR單元之複合CAR可極具挑戰性：(1)CAR-CAR相互作用可具有不利作用且適合的CAR設計為抵消此作用之關鍵；(2)單一構築體中之複合CAR可增加表現卡匣之長度，其可引起病毒效價及蛋白質表現量降低；(3)需要適合的設計以包括多種CAR主體元素，尤其選擇策略以在單一載體中表現多個CAR；(4)強啟動子對於攜帶其他CAR單元之複合CAR尤其重要；(5)CAR中之鉸鏈區需要經設計使得較佳避免各CAR單元之間鉸鏈區之相互相用；(6)表現於細胞中之兩個或更多個CAR單元可引起毒性作用(CAR-CAR相互相用)。本文中之申請人提供可解決此等障礙之新穎及出人意料的CAR組合物及方法。

在一個實施例中，本發明提供具有多個CAR單元之經工程改造之

細胞。此使得單個經工程改造之細胞靶向多個抗原。一個多個CAR單元同時靶向多個表面標記物或抗原可防止抗性純系之選擇及減少腫瘤復發。尚未研發用於任何惡性病之多個CAR T細胞免疫療法，其中每個個別組分CAR包含多個域及活化位點。

在本發明之一個態樣中，cCAR包括多個CAR單元。在一些實施例中，cCAR包括至少兩個CAR單元。在另一實施例中，cCAR包括至少三個CAR單元。在另一實施例中，cCAR包括至少四個單元。

在一個實施例中，本發明提供經工程改造之細胞，其具有至少兩種不同的嵌合抗原受體多肽，各自具有不同的抗原識別域。

在一個較佳實施例中，具有至少兩種不同嵌合抗原受體多肽之經工程改造之細胞為自末梢血液或臍帶血液及NK-92細胞分離之原生NK細胞，使得其「現成地」投與任何患有疾病或癌症之哺乳動物。

在一個實施例中，經工程改造之細胞包括(i.)第一嵌合抗原受體多肽，其包含第一抗原識別域、第一信號肽、第一鉸鏈區、第一跨膜域、第一共刺激域及第一信號傳導域；及(ii.)第二嵌合抗原受體多肽，其包含第二抗原識別域、第二信號肽、第二鉸鏈區、第二跨膜域、第二共刺激域及第二信號傳導域。第一抗原識別域與第二抗原識別域不同。

在一個較佳實施例中，每個經工程改造之CAR單元聚核苷酸具有不同核苷酸序列以避免同源重組。

在一個實施例中，第一抗原識別域之標靶選自由以下組成之群：介白素6受體、NY-ESO-1、α胎蛋白(AFP)、磷脂醯肌醇蛋白聚醣-3 (GPC3)、BAFF-R、BCMA、TACI、LeY、CD5、CD13、CD14、CD15 CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受體及CS1；且第二識別域之標靶選自由以下組成之群：介白素6受體、NY-ESO-

1、α胎蛋白(AFP)、磷脂醯肌醇蛋白聚醣-3 (GPC3)、BAFF-R、BCMA、TACI、LeY、CD5、CD13、CD14、CD15 CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受體及CS1。

在一個實施例中，經工程改造之細胞包括具有CD19抗原識別域之第一嵌合抗原受體多肽及具有CD20識別域之第二嵌合抗原受體多肽。在一個實施例中，此經工程改造之細胞包括SEQ ID NO:3之多肽及相應的SEQ ID NO:4之聚核苷酸。

在一個實施例中，經工程改造之細胞包括具有CD19抗原識別域之第一嵌合抗原受體多肽及具有CD22識別域之第二嵌合抗原受體多肽。在一個實施例中，此經工程改造之細胞包括SEQ ID NO:5之多肽及相應的SEQ ID NO:6之聚核苷酸。

在一個實施例中，經工程改造之細胞包括具有CD19抗原識別域之第一嵌合抗原受體多肽及具有CD123識別域之第二嵌合抗原受體多肽。在一個實施例中，此經工程改造之細胞包括SEQ ID NO:7之多肽及相應的SEQ ID NO:8之聚核苷酸。

在一個實施例中，經工程改造之細胞包括具有CD33抗原識別域之第一嵌合抗原受體多肽及具有CD123抗原識別域之第二嵌合抗原受體多肽。在一個實施例中，此經工程改造之細胞包括SEQ ID NO:9之多肽及相應的SEQ ID NO:10之聚核苷酸。在另一實施例中，此經工程改造之細胞包括SEQ ID NO:11之多肽及相應的SEQ ID NO:12之聚核苷酸。

在一個實施例中，經工程改造之細胞包括具有BAFF-R抗原識別域之第一嵌合抗原受體多肽及具有CS1抗原識別域之第二嵌合抗原受體多肽。

在一個實施例中，經工程改造之細胞包括具有CD269抗原識別域

之第一嵌合抗原受體多肽及具有CS1識別域之第二嵌合抗原受體多肽。在一個實施例中，經工程改造之細胞包括有包括SEQ ID NO:19之多肽及相應的聚核苷酸SEQ ID NO:20。在一個實施例中，經工程改造之細胞包括有包括SEQ ID NO:21之多肽及相應的聚核苷酸SEQ ID NO:22。

在一個實施例中，經工程改造之細胞包括具有CD33抗原識別域之第一嵌合抗原受體多肽及具有CD123識別域之第二嵌合抗原受體多肽。

在一個實施例中，各CAR單元包括相同或不同鉸鏈區。在另一實施例中，各CAR單元包括相同或不同跨膜區。在另一實施例中，各CAR單元包括相同或不同胞內域。

在一個實施例中，各CAR單元包括CD3ζ鏈信號傳導域。

在一個實施例中，每個不同的CAR單元包括不同的共刺激域以避免相互相用。舉例而言，第一嵌合抗原受體多肽包括4-BB共刺激域；且第二嵌合抗原受體多肽包括CD28共刺激域。

在另一實施例中，鉸鏈區經設計以排除可能引起不合需要的分子內或分子間相互作用之胺基酸。舉例而言，鉸鏈區可經設計以排除或最小化半胱胺酸殘基以防止形成二硫鍵。在另一實施例中，鉸鏈區可經設計以排除或最小化疏水性殘基以防止不合需要之疏水相互作用。

複合CAR可獨立地或組合進行殺死。多重或複合CAR包含相同或不同鉸鏈區、相同或不同跨膜、相同或不同共刺激及相同或不同細胞內域。較佳選擇鉸鏈區以避免相互相用位點。

本發明之複合CAR可靶向T或NK細胞中之相同或不同腫瘤群。第一個CAR例如可靶向大型腫瘤群且隨後或第二個CAR例如可根除癌症或白血病幹細胞，以避免癌症復發。

根據本發明，意外發現T或NK細胞中靶向不同或相同腫瘤群之複合CAR對抗可引起對CAR殺死活性之抗性之癌細胞的腫瘤因子，藉此產生自癌細胞表面之標靶抗原之下調。亦意外發現此能夠引起癌細胞「躲避」CAR療法，稱為「抗原逃逸」，及腫瘤非均質性，由此不同腫瘤細胞可呈現不同表面抗原表現概況。

具有CAR多肽及強化子之經工程改造之細胞

在另一實施例中，本發明提供具有至少一個嵌合抗原受體多肽及強化子之經工程改造之細胞。

在一個實施例中，本發明提供具有至少兩種不同嵌合抗原受體多肽及強化子之經工程改造之細胞。

如本文中所使用，強化子包括生物分子，其促進或增強具有嵌合抗原受體多肽之經工程改造之細胞之活性。強化子包括細胞激素。在另一實施例中，強化子包括IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、PD-1、PD-L1、CSF1R、CTAL-4、TIM-3及TGFRβ、其受體及其功能片段。

強化子可由本文中所描述之經工程改造之細胞表現且在經工程改造之細胞之表面上呈現，或強化子可由經工程改造之細胞分泌至周圍細胞外空間中。表面呈現及分泌之方法為此項技術中所熟知的。舉例而言，強化子可為融合蛋白，其具有提供表面呈現或對細胞外空間之分泌的肽。

強化子之作用可由其他因子補充，諸如強化子受體及其功能片段。其他因子可與強化子一起以融合蛋白形式共表現或表現為單獨的肽且分泌至細胞外空間中。

在一個實施例中，強化子為IL-15。在此情況下，其他因子為IL-15受體，及其功能片段。功能片段包括IL-15受體、IL-15RA及IL-15RA之sushi域。適合的域之實例包括SEQ ID NO:35。根據本發明，

本文中所揭示之任何嵌合抗原受體多肽包括具有人類介白素2信號肽SEQ ID NO:36之人類介白素15。

介白素(IL)-15及其特異性受體鏈IL-15Rα (IL-15-RA)在多種效應細胞(包括NK及CD8 T細胞)中起重要功能性作用。CD8+ T細胞可經修飾以表現自分泌生長因子，包括(但不限於)IL-2、IL-7、IL21或IL-15，以在活體內轉移後維持存活。不希望受理論約束，咸信IL-15可解決CD4缺陷以誘導原生及召回記憶體CD8 T細胞。CD8 T細胞上IL-15-RA或IL-15 IL-RA融合物之過表現顯著增強其存活期以及活體外及活體內增殖。在一些實施例中，CD4CAR或任何CAR可包括表現各部分、IL-15、IL15RA及IL-15/IL-15R或IL-15-RA/IL-15中之任一或多者或其一部分或組合，以增強CAR T或NK之存活或增殖，及改良記憶體CAR CD8+ T細胞之擴增。

本發明係關於經工程改造之細胞，其具有如本文中所描述之CAR及IL-15、IL15RA及IL-15/IL-15R或IL15-RA/IL-15之部分中之任一或多者或其一部分或組合，以增強CAR T或NK之存活期或持續性或增殖以用於治療患者中之癌症。

在一個實施例中，經工程改造之細胞包括CD4嵌合抗原受體多肽及IL至15RA (SEQ ID NO:1)，及相應的聚核苷酸(SEQ ID NO:2)。

產生經工程改造之細胞之方法

可藉由此項技術中已知之任何方法將本文中所揭示之任一種聚核苷酸引入經工程改造之細胞。

在一個實施例中，藉由如本文中所揭示之任何病毒載體將CAR聚核苷酸傳遞至經工程改造之細胞中。

在一個實施例中，為了獲得增強之安全概況或治療指數，將本文中所揭示之任一種經工程改造之細胞構築為經短暫RNA修飾之「可生物降解」版本或衍生物，或其組合。本發明之經RNA修飾之CAR可

電致孔至T細胞或NK細胞中。複合CAR之表現可在數天內逐漸減弱。

在本發明之一些實施例中，本文中所揭示之任一種經工程改造之細胞可在轉座子系統(亦稱為「睡美人(Sleeping Beauty)」)中構築，其在無病毒載體情況下將CAR DNA整合至主體基因體中。

產生具有多個CAR單元之經工程改造之細胞之方法

在另一實施例中，本發明提供製造具有至少兩個CAR單元之經工程改造之細胞之方法。

在一些實施例中，使用雙順反子或多順反子表現載體在T或NK細胞中表現多個CAR單元。存在若干種可用於構築雙順反子或多順反子載體之策略，包括(但不限於)(1)多個啟動子與CAR之開放閱讀框架融合；(2)在CAR單元之間插入編接信號；表現由單個啟動子驅使之CAR之融合；(3)在CAR單元(自裂解肽)之間插入蛋白水解分裂位點；及(iv)插入內部核糖體進入位點(IRES)。

在一個較佳實施例中，多個CAR單元表現於單個開放閱讀框架(ORF)中，藉此產生具有多個CAR單元之單個多肽。在此實施例中，含有高效裂解位點之胺基酸序列或連接子安置在各CAR單元之間。

如本文中所使用，高裂解功效定義為超過50%、超過70%、超過80%或超過90%經轉譯之蛋白質裂解。可藉由西方墨點分析量測裂解功效，如由Kim 2011所描述。

此外，在一個較佳實施例中，存在等量裂解產物，如西方墨點分析所示。

高效裂解位點之實例包括豬捷申病毒-1 2A(porcine teschovirus-1 2A；P2A)、FMDV 2A (本文中簡稱為F2A)；馬鼻炎A病毒(ERAV)2A(E2A)；及明脈扁刺蛾β四體病毒(Thoseaasigna virus)2A (T2A)、細胞質多角體病毒2A (BmCPV2A)及軟化病病毒(flacherie Virus)2A (BmIFV2A)或其組合。在一個較佳實施例中，高效裂解位點

為P2A。高效裂解位點描述於Kim JH, Lee S-R, Li L-H, Park H-J, Park J-H, Lee KY等人, (2011) High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice. PLoS ONE 6(4): e18556中，其內容以引用之方式併入本文中。

在其中在單個開放閱讀框架(ORF)中表現多個CAR單元之實施例中，表現受強啟動子控制。強啟動子之實例包括SFFV啟動子，及其衍生物。

具有CAR多肽及強化子之經工程改造之細胞

在另一實施例中，本發明提供製造表現至少一個CAR單元及強化子之經工程改造之細胞之方法。

在一些實施例中，使用雙順反子或多順反子表現載體在T或NK細胞中表現至少一個CAR單元及強化子。存在若干種可用於構築雙順反子或多順反子載體之策略，包括(但不限於)(1)多個啟動子與CAR之開放閱讀框架融合；(2)在CAR單元之間插入編接信號；表現由單個啟動子驅使之CAR之融合；(3)在CAR單元(自裂解肽)之間插入蛋白水解分裂位點；及(iv)插入內部核糖體進入位點(IRES)。

在一個較佳實施例中，在單個開放閱讀框架(ORF)中表現至少一個CAR單元及強化子，藉此產生具有至少一個CAR單元及強化子之單個多肽。在此實施例中，在各CAR單元之間及在CAR單元與強化子之間安置含有高效裂解位點之胺基酸序列或連接子。在此實施例中，ORF受強啟動子控制。強啟動子之實例包括SFFV啟動子，及其衍生物。

此外，在一個較佳實施例中，存在等量裂解產物，如西方墨點分析所示。

使用本文中所揭示之組合物之治療方法

在另一實施例中，本發明提供在癌症治療中在同種移植之前靶

向CD45以用於調節之方法。CD45亦稱為白細胞共同抗原(LCA)且為在除紅血球及血小板以外的幾乎所有造血來源細胞上表現之酪胺酸磷酸酶。大部分血液科惡性疾病表現CD45。舉例而言，85%至90%急性淋巴及骨髓白血病表現CD45。在非造血來源中未發現CD45。此外，CD45以每個細胞約200,000個分子之高密度平均複本數表現於惡性細胞及白細胞上。CD45呈現多種血液科惡性疾病之理想標靶。然而，CAR T及NK細胞亦表現CD45。在無內源性CD45之不活化情況下，具有靶向CD45之CAR之CAR T或NK細胞可引起自殺。

CD45與TCR複合物之關聯為回應於抗原而調節T細胞活化所必需的。CD45缺失型T細胞呈現抗原之不可能性係歸因於經由T細胞受體(TCR)之信號傳導降低。TCR為在回應於抗原呈現之T細胞活化中起重要作用的細胞表面受體。TCR通常由兩個鏈，即α及β製成，該兩個鏈與轉導子單元CD3相關聯以形成呈現於細胞表面上之T細胞受體複合物。

意外發現本發明之多個CAR (複合CAR、cCAR)對抗癌細胞用於抵抗CAR活性之重要機制，亦即來自癌細胞表面之標靶抗原之下調或不均勻表現。此機制使得癌細胞「躲避」CAR療法，一種稱為『抗原逃逸』之現象。本發明藉由識別可快速消除腫瘤之兩種或更多種抗原之組合來搶佔癌症抗原逃逸。

本發明提供使用cCAR同時靶向多個抗原之方法，其藉由基於標靶抗原損失或下調而最小化腫瘤選擇之可能性來引起改良之腫瘤控制。

所揭示之本發明包括靶向腫瘤細胞中呈現之不同或相同表面抗原之T或NK細胞中之複合(多重或複合)cCAR。本發明之複合嵌合抗原受體至少包含多個由連接子連接之嵌合受體構築體且靶向相同或不同抗原。舉例而言，複合CAR (cCAR)構築體中之每個CAR構築體包

括抗原識別域、細胞外域、跨膜域及/或細胞質域。細胞外域及跨膜域可來源於此類域之任何所需來源。多個CAR構築體由連接子連接。複合CAR構築體之表現由啟動子驅使。連接子可為肽或蛋白質之一部分，其產生蛋白質或肽之後自裂解(亦稱為自裂解肽)。

在一個實施例中，本發明之複合CAR靶向骨髓發育不良症候群及急性骨髓白血病(AML)群體。骨髓發育不良症候群(MDS)仍為不可治癒的造血幹細胞惡性疾病，其最通常在老年人中發生，在美國每年出現約14,000例新病例。約30-40% MDS病例發展成AML。MDS之發病率隨人群老化而持續增加。儘管已廣泛研究MDS及AML，但未研發出令人滿意的治療。

本發明之組合物及方法可用於產生傳遞用於癌症治療(尤其肺癌、黑素瘤、乳癌、前列腺癌、結腸癌、腎細胞癌、卵巢癌、腦癌、肉瘤、白血病及淋巴瘤之治療)中之免疫療法之原發性及共刺激信號之T淋巴細胞或NK細胞群體。

免疫治療劑通常依賴於使用免疫效應細胞及分子以靶向及摧毀癌細胞。效應子可為攜帶直接或間接與腫瘤細胞標靶相互作用之表面分子的淋巴細胞。多種效應細胞包括細胞毒性T細胞、NK細胞及NK-92細胞。本發明中所描述之組合物及方法可與其他類型之癌症療法結合使用，諸如化學療法、手術、放射、基因療法等。本發明中所描述之組合物及方法可用於其他依賴於免疫反應之疾病病狀，諸如炎症、免疫疾病及感染性疾病。

在一些實施例中，本發明之複合CAR藉由實現具有微小殘留病及不再對化學療法起反應之患者之完全緩解而可充當骨髓移植之橋樑。在其他實施例中，複合CAR消除白血病細胞，接著解救骨髓幹細胞以支援白細胞減少症。

在一些實施例中，本發明之複合CAR可藉由下調標靶抗原來對抗

癌細胞用於抵抗CAR活性之重要機制。在另一實施例中，本發明複合CAR亦可對抗癌細胞之非均質性，該非均質性在常規CAR T/NK細胞療法中產生顯著挑戰。在另一實施例中，所揭示之複合CAR經設計使得第一個CAR靶向大型腫瘤群體且另一個根除癌症或白血病幹細胞以避免癌症復發。

在一個實施例中，本發明提供毀壞具有CD33抗原或CD123抗原之細胞之方法，或藉由使該等細胞與含有具有CD33抗原識別域之嵌合抗原受體多肽及具有CD23抗原識別域之嵌合抗原受體多肽中之至少一者之經工程改造之細胞接觸。經工程改造之細胞可為T或NK細胞。

具有CD33抗原及CD123抗原中之至少一者之細胞包括急性骨髓白血病、前驅體急性淋巴母細胞白血病、慢性骨髓增生性贅瘤、慢性骨髓性白血病、骨髓發育不良症候群、母細胞性漿細胞樣樹突狀贅瘤(BPDCN)、霍奇金氏淋巴瘤、肥大細胞增多症及毛細胞白血病細胞。

在另一實施例中，本發明提供可提供用於造血幹細胞移植之脊髓抑制調節方案之方法。在此實施例中，向有需要之患者投與具有CD33單元及CD123單元之T或NK經工程改造之細胞。

在其他實施例中，本發明提供根除或殺死表現CD123或CD33或其兩者之白血病幹細胞(LSC)或主體白血病細胞之方法。在此實施例中，向有需要之患者投與具有CD33單元及CD123單元之T或NK經工程改造之細胞。

在其他實施例中，T或NK細胞中之複合CAR可用於根除或殺死表現CD123或CD33或其兩者之CD34+ CD38-白血病幹細胞或主體白血病細胞。

在一些實施例中，複合CAR靶向表現CD19或CD20抗原或其兩者之細胞。在另一實施例中，複合CAR靶向表現CD19或CD22抗原或其

兩者之細胞。所靶向之細胞可為癌細胞，諸如(但不限於)B細胞淋巴瘤或白血病。在其他實施例中，標靶抗原可包括(但不限於)此群中之至少一者：ROR1、PSMA、MAGE A3、醣脂、磷脂醯肌醇蛋白聚醣3、F77、GD-2、WT1、CEA、HER-2/neu、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、α-胎蛋白、CA 19-9、CA 72-4、NY-ESO、FAP、ErbB、c-Met、MART-1、CD30、EGFRvIII、免疫球蛋白κ及λ、CD38、CD52、CD3、CD4、CD8、CD5、CD7、CD2及CD138。標靶抗原亦可包括病毒或真菌抗原，諸如來自人類乳突狀瘤病毒(HPV)之E6及E7或EBV (埃-巴二氏病毒)抗原。

在一些實施例中，複合CAR靶向表現CD19或CD123抗原或其兩者之細胞。所靶向之細胞為癌細胞，諸如(但不限於)B細胞淋巴瘤或白血病。

在其他實施例中，複合CAR靶向表現CS1及/或B細胞成熟抗原(BCMA)或其兩者之細胞。在另一實施例中，標靶細胞為惡性漿細胞，諸如(但不限於)多發性骨髓瘤。

在一些實施例中，複合CAR靶向表現多個抗原之細胞，包括(但不限於)CS1、BCMA、CD267、BAFF-R、CD38、CD138、CD52、CD19、CD20、介白素6受體及NY-ESO-1抗原。在另一實施例中，標靶細胞為惡性漿細胞，諸如(但不限於)多發性骨髓瘤。

在一些實施例中，複合CAR靶向表現多個抗原之細胞，包括(但不限於)α胎蛋白(AFP)及磷脂醯肌醇蛋白聚醣-3 (GPC3)。在另一實施例中，標靶細胞為肝細胞癌、纖維板層癌瘤、肝母細胞瘤、未分化之胚胎肉瘤及肝臟之間葉細胞錯構瘤、肺鱗狀細胞癌、睪丸非精原細胞性生殖細胞腫瘤、脂肪肉瘤、卵巢及性腺外卵黃囊腫瘤、卵巢絨膜癌、畸胎瘤、卵巢透明細胞癌瘤及胎盤位點滋養層腫瘤。

根據本發明，包含靶向不同或相同抗原之複合CAR之T或NK細胞

可抵消腫瘤逃逸且同時能夠靶向腫瘤細胞。

包含本文中所揭示之複合CAR之T或NK宿主細胞在本發明中實施。複合CAR之核苷酸及多肽構築體、序列、宿主細胞、載體視為本發明之一部分且在本文中實施。

在一些實施例中，複合CAR與當前正在研究或市場上可獲得的任何化學療法試劑組合投與。在一些實施例中，複合CAR作為疾病之第一線治療投與，包括(但不限於)血液科惡性疾病、癌症、非血液科癌瘤、發炎疾病、感染性疾病，諸如HIV及HTLV等。在一個實施例中，表現複合CAR之T細胞與作為適應性免疫療法之表現相同或不同複合CAR之NK細胞共同投與。複合CAR NK細胞提供靶向細胞之快速、先天性活性，而複合T細胞提供相對持久的適應性免疫活性。

在一個實施例中，表現複合CAR之細胞作為用於哺乳動物之骨髓莖幹移植之橋投與，例如對化學療法具有抗性且不適合骨髓幹細胞移植之患者。

在一些實施例中，複合CAR在標靶腫瘤病灶中共同表現轉基因且釋放轉殖基因產物(諸如IL-12)且進一步調節腫瘤微環境。

在一個實施例中，投與骨髓髓樣消融之哺乳動物表現複合CAR之細胞作為疾病之治療之一部分。

在一個特定實施例中，投與哺乳動物(例如人類)之表現複合CAR之細胞可為T細胞或NK細胞。本發明包括藉由投與複合CAR來治療患有病症或疾病之哺乳動物之方法。標靶細胞可為諸如癌細胞，或受任何其他疾病病狀(諸如感染性疾病、炎症及自身免疫病症)影響之細胞。

本發明意欲包括保留誘導T/NK細胞之刺激及增殖之能力的複合CAR或抗原之片段、突變體或變異體(例如經修飾之形式)之用途。「蛋白質之形式」意欲意謂與至少一種CAR或抗原共有顯著同源性且

能夠實現T/NK細胞之刺激及增殖的蛋白質。如本文中所使用，術語「生物活性」或「蛋白質之生物活性形式」意謂包括能夠實現細胞之抗腫瘤活性的蛋白質或變異體之形式。

本發明之組合物及方法可用於產生可傳遞用於癌症之治療之免疫療法的主要及共同刺激信號的T/NK細胞群體，尤其肺癌、黑素瘤、乳癌、前列腺癌、結腸癌、腎細胞癌、卵巢癌、神經母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、白血病及淋巴瘤之治療。本發明中所描述之組合物及方法可與其他類型之癌症療法結合使用，諸如化學療法、手術、放射、基因療法等。

在一些實施例中，本發明揭示藉由投與患者CAR或複合CAR T細胞或NK細胞來消耗自體免疫疾病患者中之B細胞、不成熟B細胞、記憶體B細胞、漿母細胞、長壽漿細胞或漿細胞之方法。CAR靶向之細胞為表現抗原、BCMA、TACI及BAFF-R中之一者或兩者之B或漿細胞。自身免疫疾病包括全身性硬皮病、多發性硬化、牛皮癬、皮膚炎、發炎性腸病(諸如克羅恩氏病(Crohn's disease)及潰瘍性結腸炎)、全身性紅斑性狼瘡症、脈管炎、類風濕性關節炎、休格連氏症候群(Sjorgen's syndrome)、多發性肌炎、肉芽腫及脈管炎、艾迪森氏病(Addison's disease)、抗原-抗體複合物介導之疾病及抗腎絲球底膜疾病。

目前正在研究多種細胞外細胞標記物作為腫瘤相關抗原且因此作為CAR T/NK細胞療法之潛在標靶的價值。然而，除脫靶毒性以外，健康組織上引起命中標靶、偏離腫瘤不良事件之此等抗原之表現仍為主要安全性問題。此外，CAR T/NK細胞療法之主要限制為在靶向非腫瘤發生所必需之分子時可能選擇抗原逃逸變異體。因此，保持極少標靶抗原表現或不表現標靶抗原之惡性細胞可躲避CAR T/NK細胞，即使其具有高親和力作用。

根據本發明，自然殺手(NK)細胞表示CAR驅使殺死之替代性細胞毒性效應子。與T細胞不同，NK細胞無需預先活化及組成性呈現溶胞功能。NK細胞中cCAR之進一步表現使NK細胞可有效殺死癌症，尤其對NK細胞治療具有抗性之癌細胞。

此外，已知NK細胞可介導抗癌作用而無誘導移植物抗宿主病(GvHD)之風險。

研究展示CD34+ CD38- AML細胞上CD123之異常過表現，而正常骨髓對應物CD34+ CD38-不表現CD123 (Jordan, Upchurch等人2000)。將此CD123+、CD34+CD38-群體視為LSC，因為此等細胞能夠起始及維持免疫缺陷小鼠中之白血病過程。

可使用CD34+/CD38-/CD123+ LSC之數目來預測AML患者之臨床結果。CD34+/CD38-/CD123+細胞(在AML患者中大於15%)與未完全緩解及不利細胞遺傳學概況相關聯。此外，存在超過1%CD34+/CD38-/CD123+細胞亦可對無疾病存活期及總存活期具有不利影響。

當前，MDS及AML之療法集中於白血病母細胞，因為其極充分且明確地代表患者之大部分面臨的問題。重要的是，白血病幹細胞(LSC)與其他白血病細胞(「母」細胞)顯著不同，且其組成罕見的子群。儘管殺死母細胞可提供短期緩解，但若不摧毀，則LSC將始終重新生長，引起患者復發。必須摧毀LSC以實現MDS疾病之持久治癒。不幸的是，標準藥物方案對MDS或AML LSC無效。因此，重要的是發展新療法，其可特定靶向白血病幹細胞群體及大型白血病群體。本發明中所揭示之複合CAR靶向此等群體且在本文中實施。

根據本發明，意外發現NK細胞提供現成的產物，其可用作治療之同種異體產物。因此，根據本發明，如當前技術水平需要，需要基於患者特異性進行cCAR細胞療法。本發明之申請人發現新穎的免疫

療法，其中無需分離患者之淋巴細胞或腫瘤浸潤之淋巴細胞即可實現有效的基於CAR細胞之療法。

預期同種異體或自體NK細胞可誘導快速免疫反應，但由於其有限的使用壽命而自循環相對快速地消失。因此，申請人意外發現使用基於cCAR細胞之療法可減少持續性副作用問題。

根據本發明之一個態樣，NK細胞可用根據本發明之cCAR擴增及轉染。NK細胞可來源於臍帶血液、末梢血液、iPS細胞及胚胎幹細胞。根據本發明之一個態樣，NK-92細胞用cCAR擴增及轉染。NK-92為連續地生長細胞株，其具有自然殺手(NK)細胞之特性及特徵。NK-92細胞株為IL-2依賴性且已證實為安全及可行的。表現cCAR之NK-92細胞可在與或不與飼養細胞共同培養之情況下，在不含血清之培養基中擴增。可藉由分選獲得攜帶相關cCAR之NK-92之純群體。

適合的表面標靶抗原之鑑別為在適應性免疫療法中產生CAR T/NK細胞之前提條件。

在本發明之一個態樣中，CD123抗原為cCAR療法之標靶之一。CD123 (介白素3受體之α鏈)在多種血液科惡性疾病中過表現，包括急性骨髓白血病(AML)、B細胞急性淋巴母細胞白血病(B-ALL)、毛細胞白血病及母細胞性漿細胞樣樹突狀贅瘤。CD123在正常造血幹細胞上不存在或最低限度地表現。更重要的是，CD123在與白血病幹細胞(LSC)有關之白血病細胞之子集上表現，消除該等白血病幹細胞為預防疾病難治性及復發所必需的。

在本發明之一個態樣中，CD 33抗原為cCAR療法之標靶之一。CD33為在急性骨髓白血病中表現於90%惡性細胞上之跨膜受體。因此，根據本發明，CD123及CD33標靶抗原在安全性觀點方面尤其有吸引力。

根據本發明，複合CD33CD123 CAR可在慢性骨髓性白血病

(CML)群體之治療性治療中極有效。在慢性骨髓性白血病(CML)中，存在罕見的細胞子集，其為CD34+CD38-。認為此群體包含LSC。增加之LSC數目與疾病之進程相關。證實小分子Bcr-Abl酪胺酸激酶抑制劑(TKI)可顯著改良CP-CML患者之總存活期。然而，認為LSC對TKI療法具有抗性。迫切地需要靶向CML抗性LSC之新穎療法以用於治療CML，且新穎療法以本發明中所揭示之複合CD33CD123 CAR形式實施。CD34+CD38-群體中之CD123表現較高。根據本發明，複合CD33CD123 CAR在此群體之治療性治療中極有效。

在本發明之一個實施例中，使用在cCAR中表現CD123及CD33之白血病細胞作為治療性治療。CD33表現於骨髓系細胞、骨髓白血病母細胞及成熟單核細胞而非正常多能性造血幹細胞上(Griffin, Linch等人 1984)。CD33廣泛表現於CML、骨髓增生贅瘤及MDS中之白血病細胞中。

由於大量急性骨髓白血病(AML)患者難以用標準化學療法方案治療或在治療後經歷疾病復發(Burnett 2012)，AML之CAR T細胞免疫療法之研究具有解決巨大臨床需要之潛力。在大部分此等患者中，白血病細胞表現CD123及CD33，提供本文中所揭示之複合CD33CD123 CAR之廣泛臨床適用性。因此，本發明揭示新穎的多重cCAR T/NK細胞構築體，其包含靶向多個白血病相關抗原之多重CAR，藉此抵消抗原逃逸機制，藉由共刺激域活化之協同效應靶向白血病細胞，包括白血病幹細胞，且藉此提供更強效、安全且有效的療法。

本發明亦揭示複合CAR構築體，其具有增強之針對共同表現標靶抗原之細胞之抗腫瘤活性效能，且仍保持對僅表現一個抗原之腫瘤細胞之敏感性。此外，複合CAR中之各CAR包括一個或兩個共刺激域及在特定標靶存在下之強效殺死能力。

在靶向實體腫瘤(包括乳癌及上皮卵巢癌)之雙重特異性、反信號

傳導CAR之臨床前研究中，自來自第二代CAR之共刺激域分離CD3ζ胞內信號傳導域。換言之，一個CAR含有第一代CAR而無任何共刺激域，且另一個不具有CD3ζ胞內域。因此，需要存在兩種標靶抗原以用於T細胞活化及強效殺死。因此，提出其作為降低由兩種標靶抗原中之一者之健康組織表現引起的偏離腫瘤毒性之方式，增加標靶特異性，但以敏感性為代價。在一個實施例中，複合CAR為複合CD123CD19 CAR。已證實群體子集中超過90% B-ALL表現CD123。與AML及MDS類似，認為B-ALL中存在罕見的LSC群體。因此，根據本發明，靶向白血病幹細胞及大型白血病群體可應用於B-ALL。根據本發明，表現於B-ALL中之CD123及CD19表面抗原可為標靶，因為CD19在B細胞淋巴群體之不同階段中大量表現。

多發性骨髓瘤(MM)為在美國第二最常見的惡性血液病，且由在骨髓或髓外位點中積聚之純系漿細胞引起。MM為不可治癒的疾病，其中值存活期為約4.5年(Kumar, Rajkumar等人 2008)。已研究臨床前研究中之抗骨髓瘤CAR且CAR標靶包括CD38、CS1、B細胞成熟抗原(BCMA)及CD38。然而，惡性漿細胞中通常存在表面抗原表現之非均質性(Ruiz-Arguelles及San Miguel 1994)，使得其難以成為CAR之標靶。惡性漿細胞亦表現少量CD19。先前已證實骨髓瘤幹細胞亦表現一些B細胞標記物，包括CD19。與標準及其他骨髓瘤CAR療法結合，靶向此群體可在骨髓瘤之治療中有效。

多發性骨髓瘤(MM)為具有漿細胞之純系擴增之血液惡性疾病。儘管治療獲得重要發展，但骨髓瘤仍未不可治癒的疾病；因此迫切地需要新穎的治療方法。

CS1 (亦稱為CD319或SLAMF7)為由SLAMF7基因編碼之蛋白質。表面抗原CS1為正常漿細胞及骨髓瘤細胞(惡性漿細胞)之穩定標記物。

腫瘤壞死因子受體超家族，成員17 (TNFRSF17)，亦稱為B細胞成熟抗原(BCMA)或CD269在漿細胞及惡性漿細胞之末期幾乎完全表現。其他組織中不存在其表現，表明作為CAR T或NK細胞之標靶的潛力。

惡性漿細胞顯示可變程度之CD269及CS1之抗原非均質性。靶向CD269或CS1之單一CAR單元產物可靶向主體腫瘤中之大部分細胞，引起初始穩定抗腫瘤反應。接著，殘餘的極少數未經靶向之細胞擴增且引起疾病復發。儘管多發性骨髓瘤尤其為異質性，但此現象必然適用於其他白血病或腫瘤。在NIH使用BCMA CAR T細胞之當前臨床試驗展示有前景的結果，其中在一些多發性骨髓瘤患者中具有完全反應。然而，此等患者在17週之後復發，其可歸因於抗原逃逸。亦在CD19 CAR及NY-ESO1 CAR T細胞治療中發現抗原逃逸。因此，迫切需要更有效的CAR T細胞治療以防止復發。

在本發明之一個態樣中，BCMA及CS1為BCMACS1 CAR療法之標靶。

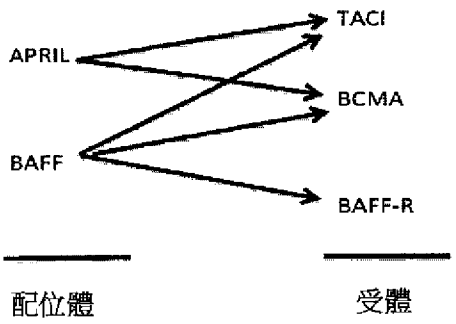
在一些實施例中，複合CAR靶向表現BCMA或CS1抗原或其兩者之細胞。標靶細胞可為癌細胞，諸如(但不限於)淋巴瘤，或白血病或漿細胞贅瘤。在其他實施例中，漿細胞贅瘤選自漿細胞白血病、多發性骨髓瘤、漿細胞瘤、重鏈疾病、澱粉樣變性、瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症(waldestrom's macroglobulinema)、重鏈疾病、孤立性骨漿細胞瘤、意義不明確之單株球蛋白症(MGUS)及鬱積型多發性骨髓瘤。

BAFF (B細胞活化因子)及APRIL (增殖誘導之配位體)為兩種TNF同系物，其以高親和力特異性結合TACI (亦稱為TNFRSF1 3B或CD267)及BCMA。BAFF (亦稱為BLyS)結合BAFF-R且在功能性方面涉及B細胞之存活及晚期增殖之促進。已證實BAFF與一些自身免疫病症有關。APRIL在促進抗體類別轉換中起重要作用。已表明BAFF及

APRIL為惡性漿細胞之生長及存活因子。

惡性漿細胞中之配位體-受體相互作用描述於下文中：

惡性漿細胞中之配位體與受體相互作用



在一些實施例中，複合CAR靶向表現TACI或CS1抗原或其兩者之細胞。在另一實施例中，複合CAR靶向表現TACI或CS1抗原或其兩者之細胞。標靶細胞可為癌細胞，諸如(但不限於)淋巴瘤，或白血病或漿細胞贅瘤。在其他實施例中，漿細胞贅瘤選自漿細胞白血病、多發性骨髓瘤、漿細胞瘤、重鏈疾病、澱粉樣變性、瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症、重鏈疾病、孤立性骨漿細胞瘤、意義不明確之單株球蛋白症(MGUS)及鬱積型多發性骨髓瘤。標靶細胞亦可為一種或兩種或多種不同細胞類型之B細胞、不成熟B細胞、原生B細胞、中心母細胞、中心細胞、記憶體B細胞、漿母細胞、長壽漿細胞、漿細胞。此等細胞與自身免疫疾病有關，包括全身性硬皮病、多發性硬化、牛皮癬、皮膚炎、發炎性腸病(諸如克羅恩氏病及潰瘍性結腸炎)、全身性紅斑性狼瘡症、脈管炎、類風濕性關節炎、休格連氏症候群、多發性肌炎、肉芽腫及脈管炎、艾迪森氏病、抗原-抗體複合物介導之疾病及抗腎絲球底膜疾病。

在一些實施例中，複合CAR靶向表現BAFF-R或CS1抗原或其兩者之細胞。在另一實施例中，複合CAR靶向表現BAFF-R或CS1抗原或其兩者之細胞。標靶細胞可為癌細胞，諸如(但不限於)淋巴瘤，或白血病或漿細胞贅瘤。在其他實施例中，漿細胞贅瘤選自漿細胞白血

病、多發性骨髓瘤、漿細胞瘤、重鏈疾病、澱粉樣變性、瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症、重鏈疾病、孤立性骨漿細胞瘤、意義不明確之單株球蛋白症(MGUS)及鬱積型多發性骨髓瘤。

在一些實施例中，複合CAR (cCAR)靶向表現BAFF-R、BCMA、TACI及CS1抗原中之一者或兩者或全部之細胞。

在一些實施例中，cCAR中CAR之單元可包含：1)針對BAFF-R、BCMA、TACI及CS1之scFv；2)鉸鏈區；3)共刺激域及胞內信號傳導域。

在一些實施例中，cCAR中CAR之單元可包含:1)BCMA或TACI或BAFF-R結合域，或APRIL結合域；2)鉸鏈區；3)共刺激域及胞內信號傳導域。

在另一實施例中，BCMA或TAC1或BAFF-R結合域可為整個APRIL及BAFF分子或其一部分。

在一些實施例中，cCAR中CAR之單元可包含:1)針對BCMA或CS1之scFv；2)鉸鏈區；3)共刺激域及胞內信號傳導域。

在其他實施例中，cCAR可包含一個或兩個或多個CAR之單元。各單元CAR可具有相同或不同鉸鏈區及共刺激域。

在其他實施例中，標靶抗原可包括(但不限於)此群中之至少一者：ROR1、PSMA、MAGE A3、醣脂、磷脂醯肌醇蛋白聚醣3、F77、GD-2、WT1、CEA、HER-2/neu、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、α-胎蛋白、CA 19-9、CA 72-4、NY-ESO、FAP、ErbB、c-Met、MART-1、CD30、EGFRvIII、免疫球蛋白κ及λ、CD38、CD52、CD3、CD4、CD8、CD5、CD7、CD2及CD138。標靶抗原亦可包括病毒或真菌抗原，諸如來自人類乳突狀瘤病毒(HPV)之E6及E7或EBV (埃-巴二氏病毒)抗原。

在一些實施例中，cCAR靶向表現CD19或CD20抗原或其兩者之

細胞。在另一實施例中，cCAR靶向表現CD19或CD22抗原或其兩者之細胞。標靶細胞為癌細胞，諸如B細胞淋巴瘤或白血病。

急性移植物抗宿主病(GVHD)仍為同種異體造血幹細胞移植之後最重要的致病率及死亡率起因。在GVHD之效應子階段，T細胞受體(TCR)，α及β鏈之雜二聚體，表現於T細胞之表面上，TCR識別宿主細胞上HLA分子上之一些抗原，增強T細胞增殖，且釋放引起對宿主細胞之損害的細胞毒素劑。TCR基因在防止潛在移植物抗宿主反應中為有效的。TCR之不活化可引起防止同種異體抗原且因此GVHD之TCR識別。

CD45對NK細胞之作用與T細胞顯著不同。來自CD45缺失型小鼠之NK細胞具有針對原型腫瘤細胞株Yac-1之正常細胞毒活性。此外，CD45缺失型NK細胞會正常增殖且對IL15及IL-21起反應。因此，破壞或刪除CD45將不影響NK細胞之殺死及增殖性。

本發明包括在T或NK細胞中永久刪除CD45之後接著穩定引入CD45-特異性CAR的方法。因此，經工程改造之T細胞顯示重新導向針對CD45之特異性之所需特性，而不引起自殺及對抗原呈現之反應。在另一實施例中，經工程改造之T細胞可具有作為用於治療惡性病或其他疾病之現成的療法之功效。

本發明係關於一種方法，其中T細胞經工程改造，以允許在經由內源性CD45不活化或刪除而降低或損失TCR信號傳導時仍可以進行增殖。降低或損失TCR信號傳導之結果可以防止GVHD。

在另一實施例中，藉由CD45之不活化而降低或損失TCR信號傳導之T細胞可用作「現成的」治療產品。

本發明包括經修飾之T或NK細胞之方法，其包含：(a)藉由不活化CD45來修飾T或NK細胞；(b)擴展此等經修飾之細胞；(c)分選不表現CD45之經修飾之T或NK細胞；(d)引入CD45CAR。

在實施例中，CD45CAR基因編碼嵌合抗原受體(CAR)，其中CAR包含抗原識別域、鉸鏈區、跨膜域及T細胞活化域中之至少一者，且抗原識別域重新導向針對細胞上呈現之CD45表面抗原。抗原識別域包括針對CD45抗原之單株抗體或多株抗體。抗原識別域包括單株或多株抗體之結合部分或可變區。

在一些實施例中，自同種異體供體獲得經修飾之T細胞且用作「現成的產物」。

使用CAR T或NK細胞靶向CD45可引起自殺，因為T及NK細胞表現此表面抗原。為了克服此缺點，本發明人提出使用經工程改造之CRISPR/Cas9系統、鋅指核酸酶(ZFN)及TALE核酸酶(TALEN)及大範圍核酸酶不活化CD45基因。T或NK細胞中CD45之損失由靶向表現CD45之贅瘤之CAR進一步轉導。

本發明包括用於消除或減少骨髓、血液及器官中之異常或惡性細胞之方法。在一些實施例中，表現CD45之惡性細胞存在於以下疾病之患者中：急性白血病、慢性白血病、B及T細胞淋巴瘤、骨髓白血病、急性淋巴母細胞性淋巴瘤或白血病、原發性滲出性淋巴瘤、網狀組織細胞瘤、唐氏症候群(Down's syndrome)之短暫性骨髓增生病症、淋巴細胞主導性霍奇金氏淋巴瘤、骨髓白血病或肉瘤、樹突細胞瘤、組織細胞肉瘤、肌腱外鞘之巨細胞瘤、嚙合樹突狀細胞肉瘤、移植後淋巴增生病症等。

在一些實施例中，CD45CAR細胞可用於藉由移除造血細胞來在骨髓中製造用於骨髓幹細胞移植之空間，同時移除能夠移植排斥之白血病/淋巴瘤細胞或免疫細胞。

在另一實施例中，CD45CAR細胞可用於在患者經歷骨髓移植以接收幹細胞之前預先治療患者。在另一實施例中，CD45CAR可用作造血幹細胞移植之脊髓抑制調節方案。

在一些實施例中，CD45CAR細胞用於治療或預防幹細胞移植及/或化學療法之後的殘餘疾病。

在一些實施例中，CD45CAR為表現基因或卡匣之一部分。在一個較佳實施例中，除CD45CAR以外，表現基因或卡匣可包括附件基因或標籤或其部分。附件基因可為誘導性自殺基因或其一部分，包括(但不限於)卡斯蛋白酶9基因、胸苷激酶、胞嘧啶脫胺酶(CD)或細胞色素P450。「自殺基因」消除方法可僅在由特定化合物或分子啟動時改良基因療法之安全性且殺死細胞。在一些實施例中，自殺基因為誘導性且使用特定的二聚作用化學誘導劑(CID)活化。

在一些實施例中，安全開關可包括附件標籤，其為c-myc標籤、CD20、CD52 (Campath)、經截短之EGFR基因(EGFRt)或其一部分或組合。附件標籤可用作非免疫基因選擇工具或用於追蹤標記物。

在一些實施例中，安全開關可包括24殘基肽，其對應於RSV F醣蛋白A2菌株之殘基254-277 (NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN)。

在一些實施例中，安全開關可包括由單株抗TNFα藥物結合之TNFα之胺基酸序列。

本文中所描述之經工程改造之細胞中任一者之投藥可補充有CAR增強劑之共同投藥。CAR增強劑之實例包括免疫調節藥物，其增強CAR活性，諸如(但不限於)靶向免疫核查點路徑之藥劑，用於更好的治療結果之群落刺激因子-1受體(CSF1R)之抑制劑。靶向免疫核查點路徑之藥劑包括結合抑制性免疫受體CTLA-4、PD-1及PD-L1且引起CTLA-4及PD-1/PD-L1阻斷之小分子、蛋白質或抗體。如本文中所使用，增強劑包括如上文所描述之強化子。

如本文中所使用，「患者」包括哺乳動物。本文中參考之哺乳動物可為任何哺乳動物。如本文所使用，術語「哺乳動物」係指任何哺乳動物，包括(但不限於)嚙齒目(Rodentia)之哺乳動物(諸如小鼠及

倉鼠)及兔形目(Logomorpha)之哺乳動物(諸如兔)。哺乳動物可來自食肉目(Carnivora)包括貓科動物(Felines)(貓)及犬科動物(Canines)(犬)。哺乳動物可來自偶蹄目(Artiodactyla)，包括牛科動物(Bovines)(奶牛)及豬科動物(Swines)(豬)或奇蹄目(Perssodactyla)，包括馬科動物(Equines)(馬)。哺乳動物可為靈長目、四足猴目(Ceboids)或猴目(Simoids)(猴)或類人猿目(Anthropoids)(人類及猿)。哺乳動物較佳為人類。患者包括個體。

在某些實施例中患者為年齡為0至6個月、6至12個月、1至5歲、5至10歲、5至12歲、10至15歲、15至20歲、13至19歲、20至25歲、25至30歲、20至65歲、30至35歲、35至40歲、40至45歲、45至50歲、50至55歲、55至60歲、60至65歲、65至70歲、70至75歲、75至80歲、80至85歲、85至90歲、90至95歲或95至100歲之人類。

如本文所使用，術語經工程改造之細胞之「有效量」及「治療有效量」意謂足以提供所需治療性或生理學或作用或結果之經工程改造之細胞之量。此類作用或結果包括細胞疾病之症狀之減少或改善。不合需要的作用，例如副作用有時與所需治療性作用一起顯現；因此，醫師在確定何為適合的「有效量」時針對潛在風險平衡潛在益處。視患者之物種、年齡及一般健康狀況、投藥模式及其類似因素而定，所需精確量將在各患者之間不同。因此，有可能不能指定精確「有效量」。然而，在任何個別情況下之適合的「有效量」可由一般技術者僅使用常規實驗來確定。通常，經工程改造之細胞以足以降低標靶細胞之增殖的量及條件投與。

在投與用於治療、抑制或預防癌症之傳遞系統之後，可以熟習此項技術者熟知的多種方法評估治療性經工程改造之細胞之功效。舉例而言，一般熟習此項技術者應理解，藉由觀測到治療性經工程改造之細胞降低癌細胞負荷或防止癌細胞負荷進一步增加，與化學佐劑結

合傳遞之治療性經工程改造之細胞可有效治療或抑制患者中之癌症。癌細胞負荷可藉由此項技術中已知的方法量測，例如使用聚合酶鏈反應分析法以偵測是否存在某些癌細胞核酸或鑑別血液中之某些癌細胞標記物，使用例如抗體分析法以偵測來自個體或患者之樣品(例如(但不限於)血液)中是否存在標記物，或藉由患者中循環癌細胞抗體含量之含量。

遍及本說明書，由範圍以及範圍之下限及上限定義量。各下限可與各上線組合以定義範圍。下限及上限應各自視為單獨的元素。

遍及本說明書，對「一個實施例」或「一個實例」之參考意謂在本發明實施例之至少一個實施例中包括結合該實施例或實例所描述之特定特性、結構或特徵。因此，遍及本說明書，在多處出現之短語「在一個實施例中」或「一個實例」未必皆參考相同實施例或實例。此外，在一或多個實施例或實例中，特定特性、結構或特徵可以任何適合的組合及/或子組合形式組合。此外，應瞭解，與其一起提供之圖式係出於對一般熟習此項技術者說明目的且圖式未必按比例繪製。

如本文中所使用，術語「包含(comprises/comprising)」、「包括(includes/including)」、「具有(has/having)」或其任何其他變體意欲涵蓋非排他性的包涵。舉例而言，包含元素列表之過程、物件或裝置未必僅限於此等元素，而是可包括未明確列舉或此類製程、物件或裝置所固有的其他元素。

此外，除非明確地相反陳述，否則「或」係指包涵性「或」且不為排他性「或」。舉例而言，條件A或條件B藉由以下中之任一者得以滿足：A為真(或存在)且B為假(或不存在)；A為假(或不存在)且B為真(或存在)；以及A與B皆為真(或存在)。

此外，本文中提供之任何實例或說明不應視為以任何方式對其所使用之任何術語造成約束、限制或表示定義。實情為，此等實例或

說明視為關於一個特定實施例描述且僅為說明性。一般熟習此項技術者將瞭解，與此等實例或說明一起使用之任何術語將涵蓋可或可不與其一起提供或在說明書中之其他地方提供之其他實施例，且所有此等實施例意欲包括在該或該等術語之範疇內。指定此類非限制性實例及說明之語言包括(但不限於)：「舉例而言(for example/for instance)」、「例如」及「在一個實施例中」。

在本說明書中，描述含有多個成員之多種參數之群。在參數群內，各成員可與任何一或多個其他成員組合以形成其他子群。舉例而言，若群成員為a、b、c、d及e，則特定涵蓋之其他子群包括該等成員中之任一、二、三或四者，例如a及c；a、d及e；b、c、d及e；等。

如本文中所使用，XXXX抗原識別域為對XXXX具有選擇性之多肽。因此，XXXX為標靶。舉例而言，CD38抗原識別域為對CD38具有特異性之多肽。

如本文中所使用，CDXCAR係指具有CDX抗原識別域之嵌合抗原受體。

可參考下文闡述之實例更好地理解本發明。提供以下實例以向一般熟習此項技術者提供如何製造及評估本文中主張之化合物、組合物、物品、裝置及/或方法之完全揭示內容及說明，且意欲僅為例示性且不意欲限制本發明。

實例

產生複合CAR (cCAR)

CD33CD123 cCAR之建築遵循圖1A中之示意圖。其包括驅動具有兩個不同CAR單元之功能性複合CAR (cCAR)之表現的SFFV (脾病灶形成病毒)啟動子。抗原受體朝向，抗CD33及抗CD123之scFv (單鏈可變片段)核苷酸序列。由於對於雙順反子基因構築體之自裂解動力

學之高效機制而使用來源於小RNA病毒之P2A肽。自裂解P2A肽用於在表現期間將CAR、CD33CAR及CD123CAR中之兩個獨立單元連接在一起。此方法相比於文獻中通常使用之內部核糖體進入位點(IRES)之優勢包括其尺寸較小及在2A肽之兩個上游及下游單元蛋白質之間的高裂解功效。此外，當使用IRES時，使用自裂解P2A肽可避免IRES之前及之後基因之間的表現量差異問題。

模組單元，CD33CAR包括CD33 scFv域、CD8a鉸鏈區、CD8a跨膜域、4-BB共刺激域及CD3ζ鏈之胞內域。第二模組CAR，CD123CAR具有與CD33CAR相同的鉸鏈、跨膜及細胞內信號傳導域，但具有不同的scFv及共刺激域。CD33 CAR識別其相應抗原且CD123 CAR結合於其相應抗原。鉸鏈區經設計使得避免其中二硫化物相互作用之序列。使用不同的共刺激域4-BB及CD28。將CD33CD123複合CAR次選殖至慢病毒質體中。

產生高效複合CAR (cCAR)

藉由根據製造商說明用脂染胺2000 (Lipofectamine 2000)轉染HEK-293 FT細胞來產生複合CAR慢病毒，但由於插入物之尺寸較大而使用2倍載體DNA以增加效價，如圖2中所示。在約12-16小時培育之後，移出含有脂染胺之培養基且置換為含有10% FBS、20 mM HEPES、1 mM丙酮酸鈉及1 mM丁酸鈉之DMEM。在約24小時之後，收集且冷藏上清液，且置換為新鮮培養基。在約24小時之後，收集上清液且與前述上清液合併，且經由0.45 μM濾片過濾。將上清液分成等分試樣，用液氮急驟冷凍且在-80℃下儲存。收集HEK-293 FT細胞，冷凍儲存，且溶解用於後續電泳及西方墨點法。

PB (末梢血液)或CB (人類臍帶血液)白血球層細胞用抗CD3抗體及IL-2活化2天。將cCAR慢病毒上清液旋塗在經重組人纖維蛋白片段塗佈之多孔培養盤上。在多個孔中用慢病毒上清液以約0.3×10^6個個

細胞/毫升之低濃度轉導經活化之T細胞，以增加轉導功效(圖2)。

在第一次隔夜轉導之後，除非細胞看起來不健康，否則細胞在不洗滌情況下直接添加至第二個經病毒塗佈之盤中以用於第二次轉導。在第二次隔夜轉導之後，洗滌細胞，合併且在經組織培養物處理之培養盤中培育。使CAR T細胞擴增至多約5天，隨後進行共同培養殺死分析。在培育約3天之後，細胞與結合有生物素之山羊抗小鼠F(ab')2或山羊IgG (同型)抗體一起培育，洗滌且接著與抗生蛋白鏈菌素-PE及結合之抗人類CD3一起培育。在洗滌且懸浮於2%福馬林中之後，接著藉由流式細胞測量術分析細胞以測定轉導功效百分比。

CD33CD123 cCAR之表徵

經轉染之CD33CD123 cCAR HEK293T細胞經歷西方墨點分析以確認複合構築體。用抗CD3ζ單株抗體進行之免疫墨點法展示複合CAR CD3ζ融合蛋白之預測尺寸之譜帶(圖1B)。重要的是，如所預期，在信號傳導P2A肽之成功高裂解作用之墨點上觀測到具有類似強度之兩個不同譜帶。如所預期，未發現GFP對照載體之CD3ζ表現。亦在HEK 293細胞(圖1C)及原生T細胞(圖1C)上測試scFv之表面表現。

在HEK293細胞株中測試複合CD33CD23CAR慢病毒之轉導功效且藉由流式細胞測量術分析(Beckman Coulter)(圖1C)。流式細胞測量術表明約67% HEK細胞表現CD33CD123 CAR。人類末梢血液(PB)通常用於自體T細胞療法。人類PB白血球層細胞用抗CD3抗體及IL-2活化，且用CD4CAR或對照性(GFP)慢病毒轉導。在轉導之後，流式細胞測量術分析表明約22% T細胞表現CD33CD123CAR (圖1C)。

結果

來源於臍帶血液(UCB)及末梢血液(PB)之CD33CD123 cCAR T細胞特異性殺死表現CD33之腫瘤細胞

分別在約100,000、200,000、500,000、約1百萬或2百萬個效應細

胞至約50,000、100,000、200,000個標靶細胞下，CD33CD123 cCAR T細胞或GFP T細胞(對照物)以0.5:1、50:1範圍內之比率，較佳以約2:1、5:1、10:1、20:1、50:1之比率與標靶細胞一起在約1-2 mL T細胞培養基中，在無IL-2之情況下培育約24小時。標靶細胞為來自白血病患者之白血病細胞株及白血病細胞。在共同培養約24小時之後，細胞用小鼠抗人類CD33、CD123、CD34及CD3抗體染色。

產生表現CD33CAR及CD123 CAR之CD33CD123 cCAR T細胞且使用HL60及KG-1a細胞株測試抗白血病功能。HL60細胞株為高度富集CD33之前髓細胞性白血病細胞株。約100%其細胞群體為CD33+，其中其小型子集(<10%)為dim CD123+。在培養物中，測試此細胞株以測定CD33CD123 CAR之效用，其中強調靶向表現CD33之白血病細胞。此外，歸因於HL60中之強CD33表現，CD33CD123 cCAR作用可為顯著的。實際上，在具有多種效應子:標靶細胞之比率之24小時共同培養條件期間，CD33CD123 cCAR呈現顯著白血病細胞殺死特性(圖3)。首先測試CB衍生之CD33CD123 CAR T細胞殺死HL60細胞之能力。在約24小時培育及在約0.5:1至50:1，較佳1:1至約5:1，更佳約2:1至4:1範圍內之低效應子:標靶(E:T)比率下，當與GFP對照物比較時，CD33CD123 CAR細胞消除約55%表現CD33之HL60細胞。在約5:1之比率下，殺死作用提昇至約82%。

來源於周邊血液單核細胞(PBMC)之CD33CD123 CAR與骨髓性白血病細胞株KG1a共同培養，與HL60及50-80% CD123相比，KG1a亦以適度表現約100% CD33。因此，KG1a為相對雙重標靶細胞群體，其對由CD33CD123 CAR靶向之抗原具有雙重陽性。使用約24小時培育及約0.5:1至50:1範圍內之低效應子:標靶(E:T)比率。儘管在約2:1之低E:T比率下，CD33CD123 CAR仍呈現適度的約26%之抗白血病活性，與GFP對照物相比，E:T比率增加至10:1可引起殺死約62% KG1a

(圖4)，表明CD33標記物之強度可為殺死功效之指示物，其中強烈呈現HL60且與KG1a相比利用更多的CAR作用。此等實驗提供完全CD33CD123 CAR針對其相關抗原呈現細胞群體之功能的證據。

已產生其他複合CAR，CD33CD123-BB cCAR。此複合CAR包含兩個獨立CAR單元，CD33及CD123。第一CAR包含結合於CD33之scFv且第二CAR具有不同的識別CD123之scFv。兩個CAR皆含有相同鉸鏈區、跨膜、共刺激及細胞內域。產生CD33CD123-BB cCAR慢病毒且在KG-1a細胞中測試其殺死能力。如圖5中所示，在約10:1之比率下存在實質性殺死，但其與CD33CD123 cCAR相比強度較弱。

CD33CD123 cCAR具有針對表現CD33及/或CD123之患者樣品之活性

除細胞株實驗以外，亦對患者樣品進行研究以測試每個個別CAR單元之功能。使用侵襲性急性骨髓白血病(AML)，AML-9測試CD33CD123 cCAR之功效。歸因於患者細胞群體之非均質性，該細胞群體包括AML-9樣品中之多種細胞類型，用CD34及CD33閘控白血病母細胞，因為其對此等兩種標記物呈陽性。在CAR T細胞:標靶細胞之某一比率下，觀測到白血病細胞之此CD33+CD34+群體之消耗比GFP對照物高48% (圖6)。

亦測試CD123陽性且CD33陰性之白血病細胞。為此目的，選擇人類B細胞急性淋巴細胞白血病(B-ALL)樣品，Sp-BM-B6。此樣品中之所有白血病母細胞為CD34+CD33-，且超過約50%對CD123呈陽性。與GFP對照物相比，CD33CD123 cCAR T細胞之CD34+白血病細胞群體消耗率為約86% (圖7)。基於細胞株及人類樣品研究，吾人之資料明確表明複合CD33CD123 CAR能夠靶向表現CD33或CD123或其兩者之白血病細胞。

CD33CD123 cCAR NK細胞靶向表現CD33或CD23或其兩者之白血病細胞

自然殺手(NK)細胞為CD56+ CD3-且可有效殺死受感染及腫瘤細胞類CD8+ T細胞。與CD8+ T細胞不同，NK細胞發起針對腫瘤之細胞毒性而無需活化以殺死細胞。NK細胞比效應細胞更安全，因為其可避免細胞激素風暴(cytokine storms)之潛在致死性併發症。然而，完全未探索使用CD33或CD123或兩種CAR NK細胞殺死白血病。

產生CD33CD123 cCAR NK細胞

NK-92細胞用CD33CD123 CAR慢病毒上清液轉導兩個連續隔夜，轉導之間的變化在於經重組人纖維蛋白片段塗佈之培養盤及經病毒塗佈之培養盤。經轉導之細胞擴增3或4天且接著藉由流式細胞測量術分析CAR表現。收集細胞且以約1:250與山羊抗小鼠F(Ab')2一起培育約30分鐘。洗滌細胞，懸浮且用抗生蛋白鏈菌素-PE染色約30分鐘。洗滌細胞且懸浮於2%福馬林中，且藉由流式細胞測量術分析。接著如上文所述標記表現CD33CD123 cCAR之NK-92細胞且在FACSAria上分選，其中收集且培養頂部0.2%表現F(Ab')2之細胞。經分選、擴增之細胞之後續標記展示約89% NK-92細胞對抗小鼠F(ab')2呈陽性(圖8)。

CD33CD123 cCAR NK細胞有效溶解或消除白血病細胞

首先，吾人藉由評估CD33CD123 cCAR NK-92細胞殺死共同培養物中HL-60癌細胞株之能力來測試其功能。幾乎所有HL-60細胞皆高度表現CD33，但此細胞株中之CD123表現僅小於10% (弱)。因此，CD33CD123cCAR之殺死能力可能取決於cCAR正確靶向CD33之能力。

CD33CD123 cCAR NK-92細胞與HL-60細胞一起在無IL-2之NK細胞培養基中共同培養約24小時。在培育之後，標記CD33CD123 cCAR NK-92細胞且與非CAR之對照物GFP NK-92細胞比較。與對照物GFP NK-92細胞相比，觀測到CD33CD123 cCAR NK-92細胞顯著殺死HL-

60細胞。此外，CD33CD123 cCAR NK-92細胞之殺死能力具有劑量依賴性，其中與對照物比較，約10:1比率為約100% (圖9及11)。

使用KG1a、使用骨髓白血病細胞株進行第二共同培養實驗，KG1a在所有細胞中表現CD33，但與HL-60相比以中等量表現。CD123抗原表現於約50-80% KG1a細胞中。實驗設計與上述HL-60殺死分析法之第一實驗類似，其具有相同培育時間、效應子:癌細胞比率及GFP NK-92細胞對照物。結果展示與GFP NK-92細胞對照物相比，CD33CD123 cCAR NK-92細胞以劑量依賴性方式顯著殺死KG1a細胞。在10:1之效應子:標靶之比率下，與GFP對照物相比，CD33CD123 cCAR NK-92細胞殺死約85% KG1a細胞(圖10及11)。

KG1a細胞之分析展示兩種不同群體CD33+CD123-及CD33+CD123-。圖11展示在兩個群體中發現之細胞殺死之劑量依賴性增加。驚人的是，雙重陽性群體在各增加之比率下展示較高有效殺死，表明CD33及CD123之兩個模組CAR之可能的協同作用(圖12)。

產生CD19CD20、CD19CD22、CD19CD138 cCAR

已使用與上述CD33CD123 cCAR類似之策略產生三種cCAR (圖13)。

產生包括BCMA CS1 cCAR及BCMA CD19 cCAR之用於治療多發性骨髓瘤之cCAR

已進行cCAR之臨床前研究以靶向表面抗原，包括CD38、CS1、CD138、B細胞成熟抗原(BCMA)及CD38。CD19 CAR亦在I期臨床試驗中顯示一些用於治療多發性骨髓瘤之功效。然而，鑒於惡性漿細胞中通常存在表面抗原表現之非均質性(Ruiz-Arguelles及San Miguel 1994)，單個標靶不大可能足以消除此疾病。產生BCMA CS1 cCAR、BCMA CD19 cCAR、BCMA CD38 cCAR及BCMA CD138 cCAR且實驗設計與如上文所描述之CD33CD123 cCAR類似。

產生包括BCMA CS1 cCAR (BC1cCAR)之用於治療多發性骨髓瘤之cCAR

產生及表徵BCMA-CS1 cCAR (BC1cCAR)構築體

BC1cCAR之模組設計由藉由自裂解P2A肽與抗CD319 (CS1)融合之抗CD269 (BCMA，B細胞成熟抗原)單鏈可變片段(scFv)區域、CD8衍生之鉸鏈(H)及跨膜(TM)區域以及連接至CD3ζ信號傳導域之串聯4-1BB共活化域組成(圖14A)。強脾病灶形成病毒啟動子(SFFV)及CD8前導序列用於T細胞表面上BC1cCAR)CAR分子之有效表現。兩個單元CAR使用相同共刺激域4-1BB。經轉染之BC1cCAR HEK293T細胞經歷西方墨點分析以確認複合構築體。用抗CD3ζ單株抗體進行之免疫墨點法展示複合CAR CD3ζ融合蛋白之預測尺寸之譜帶(圖14E)。重要的是，如所預期，在信號傳導P2A肽之成功高裂解作用之墨點上觀測到具有類似強度之兩個不同譜帶。如所預期，未發現GFP對照載體之CD3ζ表現。

產生BC1cCAR (cCAR)T細胞

在活化2天之後，自臍帶血液(UCB)白血球層分離之T細胞用BC1cCAR慢病毒轉導。兩個單元CAR使用相同共刺激域4-1BB。測定BC1cCAR之轉導功效為約15%，如藉由流式細胞測量術所測定(圖14B)。首先在對骨髓瘤標記物BCMA及CS1呈陰性之CML (慢性骨髓性白血病)細胞株上測試BC1cCAR T細胞。如所預期，不存在針對野生型K562之對照物T細胞或BC1cCAR T細胞引起之溶解(圖14C)。BCMA-K562 (Kochenderfer, NIH)為用表現cDNA之BCMA轉導以在>80%細胞群體中表現BCMA之K562細胞。BC1cCAR T細胞以2:1及5:1之E:T比率與此細胞株共同培養且與對照物相比展示超過30%溶解(不可偵測)(圖14C)。此等結果與在經抗原轉導之其他CAR之細胞株(諸如CS1CAR T細胞)上進行其他培養相容。

然而，當BCMA-CS1-2G (cCAR)使用不同的共刺激域時，對於各單元使用4-BB或CD28，偵測到罕見的表面CAR表現，其表明適合的共刺激域選擇對於確保T細胞上之表面CAR表現可為重要的(圖14D)。儘管在HEK細胞藉由西方墨點法偵測蛋白質(圖14E)，但吾人不能在經CD269-CS1-2G慢病毒上清液轉導之經活化之T細胞中偵測表面表現。此可歸因於無法將經表現之蛋白質匯出至細胞膜。在未來，吾人可能需要最佳化此構築體之序列以允許更大的細胞表面表現。

BC1cCAR T細胞特異性溶解BCMA$^+$及CS1$^+$細胞株

為了評估BC1cCAR T細胞之細胞毒性能力，吾人用骨髓瘤細胞株：MM1S (BMCA$^+$CS1$^+$)、RPMI-8226 (BCMA$^+$CS1$^-$)及U266 (BCMA$^+$ CS1^{dim})進行共同培養分析。藉由流式細胞測量術分析定量BC1cCAR T細胞溶解標靶細胞之能力，且標靶細胞用Cytotracker染料(CMTMR)染色。在24小時共同培養中，BC1cCAR呈現MM1S細胞之幾乎完全溶解，其中在2:1之E:T比率下消耗超過90%標靶細胞且在5:1之E:T下消耗超過95% (圖15)。在RPMI-8226細胞中，BC1cCAR在2:1之E:T比率下溶解超過70% BCMA$^+$標靶細胞，且在5:1之E:T下溶解超過75%標靶細胞(圖16)。在與U266標靶細胞之24小時共同培養中，BC1cCAR在2:1之E:T比率下溶解80% BCMA$^+$ U266細胞，達到飽和(圖17)。

原生患者骨髓瘤樣品中BC1cCAR T細胞特異性靶向BCMA$^+$及CS1$^+$群體

對MM10-G患者樣品之流式細胞測量術分析顯示不同及不變的BCMA$^+$及CS1$^+$群體子集(圖18)。MM7-G樣品展示完全BCMA$^+$ CS1$^+$表現型，而MM11-G呈現有雜質的BCMA^{dim} CS1^{dim}表現型，可能可歸因於其作為骨髓抽出物之性質。在24小時之後，BC1cCAR T細胞展示MM7-G原生患者樣品之穩定消除，其中在5:1之E:T比率下溶解超過75%，在10:1下增加至超過85% (圖19)。針對MM11-G (圖20)，

BC1cCAR T細胞在10:1之E:T下能夠溶解超過45% $BCMA^+$ $CS1^+$群體。

BC1cCAR藉由在24小時內在MM10-G共培養中顯著消除$BCMA^+$ $CS1^+$及$BCMA^-$ $CS1^+$群體子集來展示靶向及比溶胞率能力。在2:1之E:T比率下，BC1cCAR T細胞消除超過60% $BCMA^+$ $CS1^+$群體，且消除70%單獨的$CS1^+$群體。在5:1之E:T比率下，單獨的$CS1^+$群體之消除增加至80% (圖18)。

BC1cCAR T細胞呈現活體內腫瘤之顯著控制及降低

為了評估BC1cCAR T細胞之活體內抗腫瘤活性，吾人研究使用經亞致死劑量輻射且靜脈內注射表現螢光素酶之MM.1S細胞(一種多發性骨髓瘤細胞株)以誘導可量測之白血病形成的NSG小鼠之異種小鼠模型。在腫瘤細胞注射之後第三天，以單次給藥方式向小鼠靜脈內注射8×10^6個BC1cCAR T細胞或載體對照細胞。在第3、6及8天，向小鼠皮下注射RediJect D-Luciferin (Perkin Elmer)且經歷IVIS成像以量測腫瘤負荷(圖21)。比較所量測之經BC1cCAR T細胞注射之小鼠之平均光強度與經載體對照物注射之小鼠之平均光強度以測定經處理之小鼠對比對照小鼠中之腫瘤細胞百分比(圖21及22)。不成對T測試分析顯示在第8天兩個組之間的極顯著差異(P=0.0001)，其中經BC1cCAR T細胞注射之組與對照組相比具有較低光強度且因此具有較低腫瘤負荷($p<0.0001$)。在第1天且隨後每隔一天，量測腫瘤尺寸面積且比較兩個組之間的平均腫瘤尺寸(圖21)。總而言之，此等活體內資料表明當與載體對照性NK對照細胞相比時，CD269-CS1-BBCAR T細胞顯著降低經MM.1S注射之NSG小鼠中之腫瘤負荷。

CD45 CAR療法

用CHOPCHOP設計三對sgRNA以靶向相關基因。接著將基因特異性sgRNAs選殖至與E2A自裂解連接子連接之表現人類Cas9及嘌呤黴素抗性基因之慢病毒載體(Lenti U6-sgRNA-SFFV-Cas9-puro-wpre)

中。U6-sgRNA卡匣位於Cas9元件之前。sgRNA及Cas9puro之表現分別由U6啟動子及SFFV驅使(圖23)。

使用及構築以下基因特異性sgRNA序列。

在本發明之非限制性實施例中，已如下文所闡述設計及構築例示性基因特異性sgRNA：

CD45 sgRNA構築體：

Lenti-U6-sgCD45a-SFFV-Cas9-puro GTGGTGTGAGTAGGTAA

Lenti-U6-sgCD45b-SFFV-Cas9-puro GAGTTTTGCATTGGCGG

Lenti-U6-sgCD45c-SFFV-Cas9-puro GAGGGTGGTTGTCAATG

圖24展示產生靶向血液科惡性疾病之CD45 CAR T或NK細胞之步驟。

CRISPR/Cas核酸酶靶向NK細胞上之CD45

使用具有基因特異性sgRNA之慢病毒轉導NK-92細胞。藉由流式細胞測量術分析測定NK-92細胞上CD45表現之減少。分選及擴增NK-92細胞之CD45陰性群體(圖25)。使用經分選及擴增之CD45陰性NK-92細胞產生CD45CAR NK細胞。使用所得CD45CAR NK細胞測試其殺死CD45+細胞之能力。

在CRISPR/Cas核酸酶標靶之後，經CD45不活化之NK-92細胞(NK^{45i}-92)之功能性表徵。吾人證明，在CD45之CRISPR/Cas核酸酶不活化之後，NK^{45i}-92細胞之生長與野生型NK-92細胞類似(圖26)。CD45之不活化不顯著影響NK-92之細胞增殖。此外，吾人證實當細胞與白血病細胞CCRF共同培養時，NK^{45i}-92細胞之溶解能力與野生型NK-92相容(圖27)。

為了說明經CD45不活化之NK-92與CAR溶解相容，NK^{45i}-92細胞及其野生型NK-92用表現CD5CAR或GFP之慢病毒轉導。藉由FACS分

選所得CD5CAR NK^{45i}-92細胞及GFP NK^{45i}-92且用於比較其殺死標靶細胞之能力。CD5CAR NK^{45i}-92細胞在其與CCRF-CEM細胞共同培養時，在2:1及5:1之比率(E:T)下顯示穩定殺死CD5標靶白血病細胞之能力。吾人CD5CAR NK^{45i}-92與CD5 CAR NK-92細胞之間存在類似的活體外CCRF-CEM細胞消除功效(圖28)。此表明CD45表現之減少不會降低CAR NK細胞之抗腫瘤活性。

產生CD45CAR構築體

吾人隨後研究白血病細胞中，NK^{45i}-92細胞中CD45CAR對CD45抗原之反應。吾人產生CD45CAR。CD45CAR由抗CD45單鏈可變片段(scFv)區域、CD8衍生之鉸鏈(H)及跨膜(TM)區域以及連接至CD3ζ信號傳導域之串聯CD28及4-1BB共活化域組成(圖29A)。使用強脾病灶形成病毒啟動子(SFFV)及CD8前導序列。用適合的載體對照，藉由經CD45CAR慢病毒質體轉染之HEK293-FT細胞之西方墨點法表徵CD45CAR蛋白質。此外，抗CD3ζ單株抗體免疫墨點法顯示CD45CAR蛋白質之預測尺寸之譜帶，其中在載體對照物中未觀測到譜帶(圖29B)。

CD45CAR NK^{45i} -92 NK細胞

在經螢光活化之細胞分選(FACS)以富集NK^{45i}-92細胞之後，測定CD45CAR NK-92轉導功效為87%，如在分選之後藉由流式細胞測量術測定(圖30)。在NK^{45i}-92細胞之FACS收集之後，CD45CAR表現量在至少10次繼代中保持始終穩定。

CD45CAR NK^{45i}-92細胞特異性溶解CD45+白血病細胞

為了評估CD45CAR NK^{45i}-92抗白血病活性，吾人使用T-ALL細胞株、CCRF-CEM及Jurkat以及NK細胞株及NK-92細胞進行共同培養分析，因為其皆表現CD45 (圖31、32及33)。吾人證明CD45CAR NK^{45i}-92細胞持續顯示白血病細胞之穩定溶解。在針對標靶細胞之低

有效性下培育6小時(E:T比率5:1)之後，CD45CAR NK^{45i}-92細胞有效溶解超過60% CCRF-CEM細胞(圖31)。在6小時共同培養之後，CD45CAR NK^{45i}-92細胞在2:1或5:1之E:T比率下亦能夠消除約60% Jurkat細胞(圖32)。在6小時共同培養之後，CD45CAR NK^{45i}-92細胞在2:1之E:T比率下有效溶解20% CD45陽性NK-92細胞，其中在5:1之E:T下將近60%溶解(圖33A-33C)。

為了進一步分析血液科惡性疾病之CD45標靶，吾人亦產生另外兩種CAR：CD45-28及CD45-BB，且使用表現CD45-28或CD45-BB CAR之慢病毒轉導NK45i-92細胞。CD45-28及CD45-BB CAR含有新型抗CD45 scFv，其與上述CD45CAR不同。CD45-28 CAR使用CD28共刺激域，而CD45-BB具有4-BB共刺激域。CARs使用CD8衍生之鉸鏈(H)、跨膜(TM)區域及CD3ζ信號傳導域。CD45CAR顯示B急性淋巴母細胞性細胞株REH之穩定溶解。CD45CAR NK45i-92細胞溶解約76% REH細胞。與對照性GFP NK-92細胞相比，CD45b-BB CAR NK45i-92細胞及CD45b-28 CAR NK45i-92細胞分別展示約79%及100%REH細胞溶解(圖33D-G)。CD45b-28 CAR NK45i-92細胞呈現最高的REH細胞溶解能力。

IL15及其受體增強CAR T及NK細胞功能

近期研究表明T細胞持久性與CAR T細胞治療功效良好相關。當前試驗表明強效及持續性抗腫瘤活性可藉由輸注少數CAR T細胞產生，表明輸注產物之品質而非數量對促進抗腫瘤活性更重要。介白素(IL)-15為促進淋巴細胞之發育及止血之細胞激素。增加之含量之IL-15可促進T細胞增殖及增強T細胞效應子反應。來自近期研究之資料證實IL-15對記憶體CD8 T細胞(一種與抗腫瘤活性相關之重要因子)之產生及維持為重要的。IL-15結合IL-15受體α鏈(亦稱為IL15RA或RA)，促進IL-15介導之作用，諸如T細胞存活、增殖及記憶

體T細胞產生。

IL-15RA結合T細胞之表面中之βγ複合物且IL15藉由與T細胞及其他類型之細胞之細胞表面上之此IL-15RA/βγ複合物結合來進行信號傳導。

當前資料表明單獨的IL-15轉染不顯著影響T細胞功能，但IL-15/1IL-15RA使T細胞自發地存活及增殖。

所投與之單獨的IL-15之功效可受自由IL-15RA及其短半衰期之可用性限制。投與可溶性IL-15/RA複合物極大增強活體內II-15半衰期及生物可用性。因此，用此複合物而非單獨的IL-15處理小鼠可引起記憶體CD8 T細胞及NK細胞之穩定增殖及維持。近期研究表明IL-15RA之一部分細胞外區域(稱為sushi域)為其與IL15之結合所需的(WEI等人，J. Immunol.，第167(1)卷，第277-282頁，2001)。含有連接子之IL-15/RA融合蛋白或IL-15/sushi融合蛋白比單獨的IL-15及可溶性IL-15RA更強效。IL-15/RA或IL-15/sushi之組合可最大化IL-15活性。然而，尚不明確在同一個構築體中合併有CAR及IL-15/RA或IL15/sushi之設計能否維持其在T或NK細胞中之所需生物特性，因為插入物序列長度能夠影響轉染功效及基因表現量。

本發明提供經工程改造之細胞，其在單一構築體中具有CAR及IL15/RA或IL15/sushi。在一些實施例中，本發明包括產生較高病毒效價及使用更強的啟動子驅使CAR及IL15/RA或IL-15/sushi之方法。

在一些實施例中，本發明提供經工程改造之細胞，其具有：(1)靶向抗原之CAR，該抗原包括(但不限於)CD4、CD2、CD3、CD7、CD5、CD45、CD20、CD19、CD33、CD123、CS1及B細胞成熟抗原(BCMA)；及(2)IL-15；(3)IL15RA(RA)或sushi。在其他實施例中，CAR包含嵌合抗原受體，共刺激胞內域中之一或多者，諸如CD28、CD2、4-1BB及OX40以及CD3ζ鏈之胞內域。在其他實施例中，強啟

動子可為(但不限於)SFFV、CAR、IL-15/RA或sushi以及誘導性自殺基因(「安全開關」)，或可在載體(諸如慢病毒載體、腺病毒載體及反轉錄病毒載體或質體)上組裝組合。引入「安全開關」可顯著增加安全概況，且限制CAR之命中標靶或偏離腫瘤毒性。

表徵CD4IL15RA-CAR

已產生CD4IL15RA-CAR且其含有連接至IL15RA之第三代CD4CAR (圖34)。在表現載體上組裝CAR (第三代)、sushi/IL-15之組合且藉由SFFV啟動子驅動其表現(圖34)。具有sushi/IL-15之CAR與P2A裂解序列連接。sushi/IL-15部分由與sushi域融合之IL-2信號肽組成且經由26胺基酸聚脯胺酸連接子連接至IL-5 (圖34)。

為了驗證CD4IL15RA構築體，HEK293FT細胞用GFP (對照物)或CD4IL15RA之慢病毒質體轉染。在轉染之後約60小時，收集HEK-293FT細胞及上清液。細胞溶解於含有蛋白酶抑制劑混合物之RIPA緩衝液中且進行電泳。凝膠轉移至Immobilon FL墨點膜，阻斷且在1:500下用小鼠抗人類CD3z抗體探測。在洗滌之後，薄膜用山羊抗小鼠HRP結合物探測，洗滌，且在用HyGlo HRP受質處理之後暴露於薄膜。CD4IL15RA-CAR在HEK 293細胞中成功表現(泳道2，圖35a，如緊鄰泳道3中之重組型IL-15蛋白質所示(箭頭))。藉由新鮮HEK-293細胞之轉導進一步檢驗CD4IL15RA-CAR慢病毒上清液(圖35a)。HEK-293細胞用來自經轉染之HEK-293FT細胞之GFP或CD4IL15RA-CAR病毒上清液轉導。添加凝聚胺達到4 μL/mL。在16小時之後更換培養基且用不含病毒上清液或凝聚胺之培養基置換。在轉導之後三天，收集細胞且用山羊抗小鼠F(ab')2抗體以1:250染色30分鐘。洗滌細胞且用抗生蛋白鏈菌素-PE結合物以1:500染色，洗滌，懸浮於2%福馬林中且藉由流式細胞測量術分析。圖34b展示經CD4IL15RA-CAR慢病毒轉導之HEK-293細胞對F(ab)2-PE呈現80%陽性(圓圈，圖35b)，而經GFP對

照性慢病毒轉導之細胞對F(ab)2-PE最小(圖35b，左側)。

產生CD4IL15RA-CAR NK細胞

NK-92細胞用CD4IL15RA-CAR慢病毒上清液轉導。在培育5天之後，收集細胞且以1:250與山羊抗小鼠F(ab')2一起培育30分鐘。洗滌細胞，懸浮且用抗生蛋白鏈菌素-PE染色30分鐘。洗滌細胞且懸浮於2%福馬林中，且藉由流式細胞測量術分析，引起約70%經轉導之細胞表現CD4IL15RA-CAR (圓圈，圖36)。CD4IL15RA-CAR之其他實驗測試將包括活體外及活體內白血病/淋巴瘤殺死分析，及經CD4CAR轉導之細胞之標靶殺死及增殖率之對比。本發明者亦使用與上文所述相同的策略產生CD19IL15RA-CAR。

產生CD4IL15RA-CAR T細胞

人類臍帶白血球層細胞用CD4IL15RA-CAR慢病毒上清液轉導。在培育5天之後，收集細胞且以1:250與山羊抗小鼠F(Ab')2一起培育30分鐘。洗滌細胞，懸浮且用抗生蛋白鏈菌素-PE染色30分鐘。洗滌細胞且懸浮於2%福馬林中，且藉由流式細胞測量術分析，引起63%經轉導之細胞表現CD4IL15RA-CAR (圓圈，圖37)。CD4IL15RA-CAR之其他實驗測試將包括活體外及活體內白血病/淋巴瘤殺死分析，及經CD4CAR轉導之細胞之標靶殺死及增殖率之對比。

藉由將CD4IL15RACAR NK細胞與以下CD4陽性細胞株共同培養來測試其相對於CD4CAR NK細胞之活體外抗白血病活性：Karpas 299及MOLT4

Karpas 299細胞株來源於具有多形性大型T細胞淋巴瘤之患者。自19週歲急性淋巴母細胞白血病(T-ALL)患者之末梢血液產生表現CD4之MOLT4細胞株。在4小時共同培養實驗期間，CD4IL15RA CAR NK細胞在5:1之效應子:標靶比率下，在甚至高於CD4CAR NK細胞之比率下展示Karpas 299細胞之顯著殺死(95%)(82%，圖38)。類似地，

當以1:1與MOLT4細胞共同培養時，在隔夜分析法中，CD4IL15RA CAR NK細胞以高於CD4CAR NK細胞之比率(84%至65%)溶解標靶細胞(圖39)。此等結果證實CD4IL15 CAR NK細胞至少可與CD4CAR NK細胞相同地消除腫瘤細胞。

CD4CAR及CD4IL15RA CAR T細胞呈現比CD4CAR更強效的活體內抗腫瘤活性

為了評估CD4CAR及CD4IL15RACAR T細胞之活體內抗腫瘤活性，及測定CD4IL15RA CAR T細胞相對於CD4CAR T細胞之持久性之可能增加，吾人研究使用經亞致死劑量輻射及靜脈內注射表現螢光素酶之MOLM13細胞(一種急性骨髓白血病細胞株(M5)，其為100% CD4)以誘導可量測之腫瘤形成之NSG小鼠的異種小鼠模型。在腫瘤細胞注射之後三天，向6隻小鼠各自靜脈內注射8×10^6個CD4CAR、CD4IL15RACAR T細胞或載體對照性T細胞之療程。在第3、6、9及11天，向小鼠皮下注射RediJect D-Luciferin (Perkin Elmer)且經歷IVIS成像以量測腫瘤負荷(圖40)。在第6天，經CD4CAR T細胞處理之小鼠相對於對照物具有52%腫瘤負荷降低，而經CD4IL15RA CAR T細胞處理之小鼠具有74%腫瘤負荷降低(圖41)。在第11天，在此等組中之兩者中，幾乎所有腫瘤細胞溶解。在第9天，不成對T測試分析顯示對照物與兩個組之間的極顯著差異(P=0.0045)，其中與對照物相比經CD4CAR及CD4IL15RACAR T細胞處理之組中存在較低光強度且因此存在較低腫瘤負荷。

使用GFP報導子之啟動子測試

HEK293FT細胞在SFFV、EF1或CAG啟動子下用表現GFP之慢病毒質體轉染。在轉染之後約60小時，自各樣品收集上清液。藉由首先用來自3種啟動子中之每一者之上清液轉導HEK293細胞來測定相對病毒效價。用來自3種經轉染之HEK-293FT細胞中之每一者之GFP病毒

上清液轉導HEK-293細胞。添加凝聚胺達到4 μL/mL。在16小時之後更換培養基且用不含病毒上清液或凝聚胺之培養基置換。在轉導之後三天，收集細胞且洗滌，懸浮於2%福馬林中，且藉由流式細胞測量術分析GFP表現(FITC)。在各樣品中發現GFP表現，但在經使用SFFV啟動子製得之病毒轉導之細胞中最高。

經活化之人類臍帶白血球層細胞用來自各啟動子之GFP慢病毒上清液(基於HEK293轉導功效之結果的量)轉導。在培育5天之後，收集細胞，洗滌且懸浮於2%福馬林中，且藉由流式細胞測量術分析GFP表現。43%細胞大量(>10^3)表現GFP，而經使用啟動子EF1 (15%)及CAG (3%)之病毒轉導之細胞之GFP表現顯著較低。五天後，以相同方式分析之細胞展示幾乎相同的各百分比(分別為46%、15%及3%；圖23)。此等結果表明，SFFV啟動子引起比EF1或CAG啟動子更強的表現，且該表現在轉導後至少10天保持較高。其他實驗測試將包括除10天窗口以外的經轉導之細胞之更長培育時間。

提供產生包括T抗原識別部分(CD4、CD8、CD3、CD5、CD7及CD2中之至少一者或其一部分或組合)、鉸鏈區及T細胞活化域中之至少一者的CAR基因之方法。

提供產生靶向抗原之多個CAR (cCAR)單元之方法，該(該等)抗原包括CD33、CD123、CD19、CD20、CD22、CD269、CS1、CD38、CD52、ROR1、PSMA、CD138及GPC3中之至少一者，或鉸鏈區及T細胞活化域之一部分或組合。本文中所引用及/或揭示之所有參考文獻以全文引用的方式併入本文中。

所提供之方法亦包括：1)產生靶向表現CD45之白血病及淋巴瘤之CAR T或NK細胞且避免自殺；2)產生「披甲」CAR T或NK細胞，其經設計以克服抑制性腫瘤微環境且呈現增強之抗腫瘤活性及長期持久性。

本發明不限於上文描述及例示之實施例，且能夠在隨附申請專利範圍之範疇內進行變化及修改。貫穿本說明書引用多種公開案，包括專利案、公開申請案、技術論文及學術論文。各所引用之公開案以全文引用的方式併入本文中且用於所有目的。貫穿本說明書及申請專利範圍使用與本發明之態樣相關之多種術語。除非另有指示，否則此類術語將具有其在此項技術中之普通含義。其他特定定義之術語以符合本文中提供之定義的方式解釋。

上清液中病毒載體粒子之功能性效價(*如藉由流式細胞測量術所測定之GFP細胞%允許代理病毒效價調節，因為較高效價病毒浸潤較多細胞，引起較高GFP細胞群%*)。

為了測定每種吾人之上清液中病毒載體粒子之功能性效價，在12孔經組織培養物處理之盤中，HEK 293細胞以30 μL (低)、125 μL (中等)或500 μL (高)/孔用EF1-GFP或SFFV-GFP病毒上清液轉導。在第二天早晨將培養基更換成DMEM加10% FBS。

接著使經轉導之細胞胰蛋白酶化，洗滌且懸浮於福馬林中且經歷流式分析。使用FITC通道藉由流式細胞測量術測定各條件下GFP+細胞之百分比(圖43)。在各種情況下，經SFFV-GFP轉導之細胞中之GFP+百分比高於經相應體積之EF1-GFP病毒上清液轉導之細胞(50%對18% (低)，80%對40%(中等)及82%對70% (高))。由此，吾人確定就效價而言，使用最高體積之EF1啟動子病毒與使用最低體積之SFFV啟動子病毒類似，且將比較以下轉導實驗之相對啟動子濃度。

亦在各孔之相同曝光條件下，使用GFP在20×下在EVOS螢光顯微鏡上觀測經轉導之細胞(圖42)。經SFFV-GFP病毒上清液轉導之細胞明顯比經EF1-GFP轉導之細胞更亮。此外，比較在高病毒體積負荷下EF1啟動子之影像與使用低病毒體積負荷之SFFV啟動子之影像可展示類似的螢光強度。此表明SFFV啟動子為更強的基因表現驅使物。

原生T細胞中不同啟動子之表面表現及持久性之對比(如藉由流式細胞測量術所測定之T細胞轉導之GFP細胞%展示如自HEK293細胞之先前實驗預期之GFP細胞群中之預期差異)

為了測定原生T細胞中之啟動子轉導功效及表面表現持久性，在預先塗有重組人纖維蛋白片段(Clontech)之12孔經組織培養物處理之培養盤中，經活化之臍帶血液白血球層T細胞用50 μL SFFV-GFP或1 mL EF1-GFP EF1-GFP病毒上清液轉導。在兩次隔夜轉導之後，細胞在T細胞培養基上與300 IU/mL IL-2 (Peprotech)一起培養且保持在1.0-4.0×10^6個/毫升下。在轉導之後第7、14、21及28天，洗滌細胞，懸浮於福馬林中，且經歷流式細胞測量術分析，使用FITC通道以測定GFP+細胞之百分比。與經EF1-GFP轉導之T細胞相比，經SFFV-GFP轉導之T細胞之GFP+細胞百分比始終較高(圖44A)，即使在此週期內總GFP+細胞百分比降低。另一對比證實，在第7天與第28天之間，相對於經較低量(50 μL，或低20倍)SFFV-GFP轉導之GFP+細胞之百分比，經較高(1 mL)量之EF1-GFP上清液轉導之T細胞之百分比實際上降低，自超過60%降低至低於40% (圖44B)。此表明使用SFFV啟動子之轉導引起經轉導之細胞之較大持久性。

靶向表現BCMA或TACI或BAFF-R CAR抗原中之至少一者之BCMA或TACI或BAFF-R CAR NK細胞或T細胞

為了評估靶向BCMA或TACI或BAFF-R NK細胞或T細胞中之至少一者之CAR之細胞毒性能力，用表現BCMA或TACI或BAFF-R中之至少一者之細胞株或原生人類細胞進行共同培養分析。藉由流式細胞測量術分析來定量前述CAR NK細胞或T細胞溶解標靶細胞之能力，且標靶細胞用Cytotracker染料(CMTMR)染色。在持續24小時的培養中觀測溶解。

靶向表現BCMA或TACI或BAFF-R抗原中之至少一者之細胞之

BAFF或APRIL CAR NK或T細胞。

CAR中之嵌合抗原受體為BCMA或TACI或BAFF-R之配位體。

為了評估靶向BCMA或TACI或BAFF-R NK或T細胞中之至少一者之CAR之細胞毒性能力，用表現BCMA或TACI或BAFF-R中之至少一者之細胞株或人類原生細胞進行共同培養分析。藉由流式細胞測量術分析來定量前述CAR NK或T細胞溶解標靶細胞之能力，且標靶細胞用Cytotracker染料(CMTMR)染色。在持續24小時的培養中觀測溶解。

參考文獻

Arai, S., R. Meagher, M. Swearingen, H. Myint, E. Rich, J. Martinson and H. Klingemann (2008). "Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial." **Cytotherapy 10**(6): 625-632.

Boissel, L., M. Betancur-Boissel, W. Lu, D. S. Krause, R. A. Van Etten, W. S. Wels and H. Klingemann (2013). "Retargeting NK-92 cells by means of CD19- and CD20-specific chimeric antigen receptors compares favorably with antibody-dependent cellular cytotoxicity." **Oncoimmunology 2**(10): e26527.

Burnett, A. K. (2012). "Treatment of acute myeloid leukemia: are we making progress?" **Hematology-American Society Hematology Education Program**: 1-6.

Chu, J., Y. Deng, D. M. Benson, S. He, T. Hughes, J. Zhang, Y. Peng, H. Mao, L. Yi, K. Ghoshal, X. He, S. M. Devine, X. Zhang, M. A. Caligiuri, C. C. Hofmeister and J. Yu (2014). "CS1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered natural killer cells enhance in vitro and in vivo antitumor activity against human multiple myeloma." **Leukemia 28**(4): 917-927.

Corbin, A. S., A. Agarwal, M. Loriaux, J. Cortes, M. W. Deininger and B. J. Druker (2011). "Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity." **J Clin Invest 121**(1): 396-409.

Dinndorf, P. A., R. G. Andrews, D. Benjamin, D. Ridgway, L. Wolff and I. D. Bernstein (1986). "Expression of normal myeloid-associated antigens by acute leukemia cells." **Blood 67**(4): 1048-1053.

Djokic, M., E. Bjorklund, E. Blennow, J. Mazur, S. Soderhall and A. Porwit (2009). "Overexpression of CD123 correlates with the hyperdiploid genotype in acute lymphoblastic leukemia." **Haematologica 94**(7): 1016-1019.

Ehninger, A., M. Kramer, C. Rollig, C. Thiede, M. Bornhauser, M. von Bonin, M. Wermke, A. Feldmann, M. Bachmann, G. Ehninger and U. Oelschlagel (2014). "Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia." **Blood Cancer J 4**: e218.

Firor, A. E., A. Jares and Y. Ma (2015). "From humble beginnings to success in the clinic: Chimeric antigen receptor-modified T-cells and implications for immunotherapy." **Exp Biol Med (Maywood)**.

Garfall, A. L., M. V. Maus, W. T. Hwang, S. F. Lacey, Y. D. Mahnke, J. J. Melenhorst, Z. Zheng, D. T. Vogl, A. D. Cohen, B. M. Weiss, K. Dengel, N. D. Kerr, A. Bagg, B. L. Levine, C. H. June and E. A. Stadtmauer (2015). "Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma." **N Engl J Med 373**(11): 1040-1047.

Ghosh, N. and W. Matsui (2009). "Cancer stem cells in multiple myeloma." **Cancer Lett 277**(1): 1-7.

Griffin, J. D., D. Linch, K. Sabbath, P. Larcom and S. F. Schlossman (1984). "A monoclonal antibody reactive with normal and leukemic human myeloid progenitor cells." **Leuk Res 8**(4): 521-534.

Jilani, I., E. Estey, Y. Huh, Y. Joe, T. Manshouri, M. Yared, F. Giles, H. Kantarjian, J. Cortes, D. Thomas, M. Keating, E. Freireich and M. Albitar (2002). "Differences in CD33 intensity between various myeloid neoplasms." **Am J Clin Pathol 118**(4): 560-566.

Jordan, C. T., D. Upchurch, S. J. Szilvassy, M. L. Guzman, D. S. Howard, A. L. Pettigrew, T. Meyerrose, R. Rossi, B. Grimes, D. A. Rizzieri, S. M. Luger and G. L. Phillips (2000). "The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells." **Leukemia 14**(10): 1777-1784.

Klingemann, H. (2014). "Are natural killer cells superior CAR drivers?" **Oncoimmunology 3**: e28147.

Kumar, S. K., S. V. Rajkumar, A. Dispenzieri, M. Q. Lacy, S. R. Hayman, F. K. Buadi, S. R. Zeldenrust, D. Dingli, S. J. Russell, J. A. Lust, P. R. Greipp, R. A. Kyle and M. A. Gertz (2008). "Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies." **Blood 111**(5): 2516-2520.

Lang, S., N. L. Vujanovic, B. Wollenberg and T. L. Whiteside (1998). "Absence of B7.1-CD28/CTLA-4-mediated co-stimulation in human NK cells." **Eur J Immunol 28**(3): 780-786.

Lanitis, E., M. Poussin, A. W. Klattenhoff, D. Song, R. Sandaltzopoulos, C. H. June and D. J. Powell, Jr. (2013). "Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumor activity with reduced potential for toxicity in vivo."

Cancer Immunol Res 1(1): 43-53.

Loke, J., J. N. Khan, J. S. Wilson, C. Craddock and K. Wheatley (2015). "Mylotarg has potent anti-leukaemic effect: a systematic review and meta-analysis of anti-CD33 antibody treatment in acute myeloid leukaemia." **Annals of Hematology 94**(3): 361-373.

Maus, M. V., J. A. Fraietta, B. L. Levine, M. Kalos, Y. Zhao and C. H. June (2014). "Adoptive immunotherapy for cancer or viruses." **Annu Rev Immunol 32**: 189-225.

Olson, J. A., D. B. Leveson-Gower, S. Gill, J. Baker, A. Beilhack and R. S. Negrin (2010). "NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects." **Blood 115**(21): 4293-4301.

Ruiz-Arguelles, G. J. and J. F. San Miguel (1994). "Cell surface markers in multiple myeloma." **Mayo Clin Proc 69**(7): 684-690.

Testa, U., E. Pelosi and A. Frankel (2014). "CD 123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies." **Biomark Res 2**(1): 4.

Vergez, F., A. S. Green, J. Tamburini, J. E. Sarry, B. Gaillard, P. Cornillet-Lefebvre, M. Pannetier, A. Neyret, N. Chapuis, N. Ifrah, F. Dreyfus, S. Manenti, C. Demur, E. Delabesse, C. Lacombe, P. Mayeux, D. Bouscary, C. Recher and V. Bardet (2011). "High levels of CD34+CD38low/-CD123+ blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia: a Groupe Ouest-Est des Leucemies Aigues et Maladies du Sang (GOELAMS) study." **Haematologica 96**(12): 1792-1798.

Wilkie, S., M. C. van Schalkwyk, S. Hobbs, D. M. Davies, S. J. van

der Stegen, A. C. Pereira, S. E. Burbridge, C. Box, S. A. Eccles and J. Maher (2012). "Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling." **J Clin Immunol 32**(5): 1059-1070.

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商生物細胞基因治療有限公司(iCell Gene Therapeutics LLC)

<120> 嵌合抗原受體(CAR)、組合物及其使用方法

<130> TW105120100

<150> US 62/184,321
<151> 2015-06-25

<150> US 62/235,840
<151> 2015-10-01

<150> US 62/244,435
<151> 2015-10-21

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 830
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 1

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu
20 25 30

Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln
35 40 45

Ser Leu Leu Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
50 55 60

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr
65 70 75 80

Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
85 90 95

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val
145 150 155 160

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
165 170 175

Phe Thr Ser Tyr Val Ile His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly
180 185 190

Leu Asp Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asp Tyr
195 200 205

Asp Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Thr
210 215 220

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
225 230 235 240

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Lys Asp Asn Tyr Ala Thr Gly Ala Trp
245 250 255

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr
260 265 270

Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln
275 280 285

Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
290 295 300

Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala
305 310 315 320

Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
325 330 335

Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
340 345 350

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
355 360 365

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg
370 375 380

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
385 390 395 400

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
405 410 415

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
420 425 430

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
435 440 445

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
450 455 460

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
465 470 475 480

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
485 490 495

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
500 505 510

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
515 520 525

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu
530 535 540

Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Tyr Arg
545 550 555 560

Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn
565 570 575

Ser Gly Ile His Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro
580 585 590

Lys Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile
595 600 605

Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu
610 615 620

Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu
625 630 635 640

Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His
645 650 655

Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser
660 665 670

Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu
675 680 685

Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln
690 695 700

Met Phe Ile Asn Thr Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
705 710 715 720

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Gln
725 730 735

Ala Pro Arg Arg Ala Arg Gly Cys Arg Thr Leu Gly Leu Pro Ala Leu
740 745 750

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Pro Pro Ala Thr Arg Gly Ile Thr Cys
755 760 765

Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr
770 775 780

Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg
785 790 795 800

Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr
805 810 815

Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg
820 825 830

<210> 2
<211> 2509
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 2
gcgatcgcat ggccttacca gtgaccgcct tgctcctgcc gctggccttg ctgctccacg 60

ccgccaggcc ggacatcgtg atgacccaaa gccccgacag cctggccgtg agcctgggcg 120

agagggtgac catgaactgc aaaagcagcc agtccctgct gtactccacc aaccagaaga 180

actacctggc ttggtatcaa cagaagcccg gacagagccc caagctgctg atctattggg 240

ccagcactag ggaaagcggc gtgcccgata ggttcagcgg cagcgggagc ggcacagact 300

tcactctgac cattagcagc gtgcaggctg aggatgtggc cgtctactac tgccagcagt 360

actacagcta caggaccttt gggggcggaa ctaagctgga gatcaaggga ggggggggat 420

ccgggggagg aggctccggc ggaggcggaa gccaagtgca actgcagcag agcggcccag 480

aggtggtcaa acctggggca agcgtgaaga tgagctgcaa ggctagcggc tataccttca 540

ccagctatgt gatccactgg gtgaggcaga aaccaggaca gggcctggac tggatcggct 600

acatcaaccc ctacaatgac ggcaccgatt atgacgaaaa attcaagggg aaggccaccc 660

tgaccagcga caccagcaca agcaccgcct acatggagct gtccagcctg aggtccgagg 720

acaccgccgt gtattactgt gccagggaga aggacaatta cgccaccggc gcttggttcg 780

cctactgggg ccagggcaca ctggtgacag tgagcagcac cacgacgcca gcgccgcgac 840

caccaacacc ggcgcccacc atcgcgtcgc agcccctgtc cctgcgccca gaggcgtgcc 900

ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggctgga cttcgcctgt gatatctaca 960

tctgggcgcc cttggccggg acttgtgggg tccttctcct gtcactggtt atcacccttt 1020

actgcaggag taagaggagc aggctcctgc acagtgacta catgaacatg actccccgcc 1080

gccccgggcc cacccgcaag cattaccagc cctatgcccc accacgcgac ttcgcagcct 1140

atcgctccaa acggggcaga aagaaactcc tgtatatatt caaacaacca tttatgagac 1200

cagtacaaac tactcaagag gaagatggct gtagctgccg atttccagaa gaagaagaag 1260

gaggatgtga actgagagtg aagttcagca ggagcgcaga cgcccccgcg taccagcagg 1320

gccagaacca gctctataac gagctcaatc taggacgaag agaggagtac gatgttttgg 1380

acaagagacg tggccgggac cctgagatgg ggggaaagcc gcagagaagg aagaaccctc 1440

aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg 1500

ggatgaaagg cgagcgccgg aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta 1560

cagccaccaa ggacacctac gacgcccttc acatgcaggc cctgcccccct cgcggaagcg 1620

gagccaccaa cttcagcctg ctgaagcagg ccggcgacgt ggaggagaac cccggcccca 1680

tgtacagaat gcagctgctg agctgcatcg ccctgagcct ggccctggtg accaacagcg 1740

gcatccacgt gttcatcctg ggctgcttca gcgccggcct gcccaagacc gaggccaact 1800

gggtgaacgt gatcagcgac ctgaagaaga tcgaggacct gatccagagc atgcacatcg 1860

acgccaccct gtacaccgag agcgacgtgc accccagctg caaggtgacc gccatgaagt 1920

gcttcctgct ggagctgcag gtgatcagcc tggagagcgg cgacgccagc atccacgaca 1980

ccgtggagaa cctgatcatc ctggccaaca acagcctgag cagcaacggc aacgtgaccg 2040

agagcggctg caaggagtgc gaggagctgg aggagaagaa catcaaggag ttcctgcaga 2100

gcttcgtgca catcgtgcag atgttcatca acaccagctc cggcggcggc tccggcggcg 2160

gcggctccgg cggcggcggc tccggcggcg gcggctccgg cggcggctcc ctgcaggccc 2220

ccagaagagc cagaggctgc agaaccctgg gcctgcccgc cctgctgctg ctgctgctgc 2280

tgagaccccc cgccaccaga ggcatcacct gcccccccccc catgagcgtg gagcacgccg 2340

acatctgggt gaagagctac agcctgtaca gcagagagag atacatctgc aacagcggct 2400

tcaagagaaa ggccggcacc agcagcctga ccgagtgcgt gctgaacaag gccaccaacg 2460

tggcccactg gaccaccccc agcctgaagt gcatcagata agtttaaac 2509

<210> 3
<211> 995
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
50 55 60

Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
130 135 140

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser
145 150 155 160

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
195 200 205

Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
210 215 220

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys
225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
275 280 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
290 295 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
305 310 315 320

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
325 330 335

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
340 345 350

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
355 360 365

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
370 375 380

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
385 390 395 400

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
405 410 415

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
420 425 430

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
435 440 445

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
450 455 460

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
465 470 475 480

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu
485 490 495

Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Leu
500 505 510

Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala
515 520 525

Arg Pro Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser
530 535 540

Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
545 550 555 560

Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp
565 570 575

Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser
580 585 590

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu
595 600 605

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro
610 615 620

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
625 630 635 640

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln
645 650 655

Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser
660 665 670

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val
675 680 685

Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro
690 695 700

Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr
705 710 715 720

Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser
725 730 735

Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr
740 745 750

Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val
755 760 765

Thr Val Ser Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
770 775 780

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
785 790 795 800

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
805 810 815

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
820 825 830

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu
835 840 845

Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr
850 855 860

Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr
865 870 875 880

Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
885 890 895

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
900 905 910

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
915 920 925

Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
930 935 940

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
945 950 955 960

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
965 970 975

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
980 985 990

Pro Pro Arg
995

<210> 4
<211> 3004
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 4
gcgatcgcat ggccttacca gtgaccgcct tgctcctgcc gctggccttg ctgctccacg 60

ccgccaggcc ggacatccag atgacacaga ctacatcctc cctgtctgcc tctctgggag 120

acagagtcac catcagttgc agggcaagtc aggacattag taaatattta aattggtatc 180

agcagaaacc agatggaact gttaaactcc tgatctacca tacatcaaga ttacactcag 240

gagtcccatc aaggttcagt ggcagtgggt ctggaacaga ttattctctc accattagca 300

acctggagca agaagatatt gccacttact tttgccaaca gggtaatacg cttccgtaca 360

cgttcggagg ggggaccaag ctggagatca caggtggcgg tggctcgggc ggtggtgggt 420

cgggtggcgg cggatctgag gtgaaactgc aggagtcagg acctggcctg gtggcgccct 480

cacagagcct gtccgtcaca tgcactgtct caggggtctc attacccgac tatggtgtaa 540

gctggattcg ccagcctcca cgaaagggtc tggagtggct gggagtaata tggggtagtg 600

aaaccacata ctataattca gctctcaaat ccagactgac catcatcaag gacaactcca 660

agagccaagt tttcttaaaa atgaacagtc tgcaaactga tgacacagcc atttactact 720

gtgccaaaca ttattactac ggtggtagct atgctatgga ctactggggc caaggaacct 780

cagtcaccgt ctcctcaacc acgacgccag cgccgcgacc accaacaccg gcgcccacca 840

tcgcgtcgca gcccctgtcc ctgcgcccag aggcgtgccg gccagcggcg gggggcgcag 900

tgcacacgag ggggctggac ttcgcctgtg atatctacat ctgggcgccc ttggccggga 960

cttgtggggt ccttctcctg tcactggtta tcacccttta ctgcaaacgg ggcagaaaga 1020

aactcctgta tatattcaaa caaccattta tgagaccagt acaaactact caagaggaag 1080

atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg agagtgaagt 1140

tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc tataacgagc 1200

tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc cgggaccctg 1260

agatgggggg aaagccgcag agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc 1320

agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg 1380

gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg 1440

cccttcacat gcaggccctg ccccctcgcg gaagcggagc caccaacttc agcctgctga 1500

agcaggccgg cgacgtggag gagaaccccg gccccatggc cttaccagtg accgccttgc 1560

tcctgccgct ggccttgctg ctccacgccg ccaggccgca gatcgtgctg agccagagcc 1620

ctgccatcct gtccgcaagc ccaggcgaga aggtgaccat gacctgtagg gccagcagct 1680

ccgtgagcta catccactgg tttcagcaga agcctggaag cagccctaag ccctggatct 1740

acgccacaag caatctggct agcggcgtgc ccgtgaggtt cagcggcagc gggagcggga 1800

ccagctacag cctgactatc agcagggtgg aggccgagga cgccgccaca tactactgcc 1860

aacagtggac ctccaaccca cccacctttg gaggagggac aaaactggag atcaaagggg 1920

gcggagggtc cggaggcggc ggaagcgggg gagggggaag ccaggtccaa ctgcaacagc 1980

ccggagcaga actggtcaaa ccaggcgcca gcgtgaagat gagctgcaag gccagcgggt 2040

acaccttcac ttcctataac atgcactggg tgaagcagac cccaggaagg ggcctggagt 2100

ggatcggggc aatctatccc ggcaacggcg acacaagcta caaccagaag ttcaagggga 2160

aagccactct gaccgccgac aagtccagct ccaccgccta catgcagctg agctccctga 2220

ccagcgagga cagcgccgtg tactattgcg ccagaagcac ttattacgga ggggactggt 2280

acttcaacgt gtgggggggca gggaccaccg tgaccgtgtc cgccaccacg acgccagcgc 2340

cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg 2400

cgtgccggcc agcggcgggg ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc gcctgtgata 2460

tctacatctg ggcgcccttg gccgggactt gtggggtcct tctcctgtca ctggttatca 2520

ccctttactg caggagtaag aggagcaggc tcctgcacag tgactacatg aacatgactc 2580

cccgccgccc cgggcccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca cgcgacttcg 2640

cagcctatcg ctccagagtg aagttcagca ggagcgcaga cgcccccgcg taccagcagg 2700

gccagaacca gctctataac gagctcaatc taggacgaag agaggagtac gatgttttgg 2760

acaagagacg tggccgggac cctgagatgg ggggaaagcc gcagagaagg aagaaccctc 2820

aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg 2880

ggatgaaagg cgagcgccgg aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta 2940

cagccaccaa ggacacctac gacgcccttc acatgcaggc cctgcccccct cgctaagttt 3000

aaac 3004

<210> 5
<211> 1001
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 5

Asp Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser
20 25 30

Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala
35 40 45

Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp
50 55 60

Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
100 105 110

Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser
145 150 155 160

Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp
165 170 175

Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp
180 185 190

Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu
195 200 205

Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe
210 215 220

Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
225 230 235 240

Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
260 265 270

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
275 280 285

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
290 295 300

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
305 310 315 320

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
325 330 335

Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
340 345 350

Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
355 360 365

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
370 375 380

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
385 390 395 400

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
405 410 415

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
420 425 430

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
435 440 445

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
450 455 460

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
465 470 475 480

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser
485 490 495

Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala
500 505 510

Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala
515 520 525

Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
530 535 540

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
545 550 555 560

Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
565 570 575

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
580 585 590

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
595 600 605

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
610 615 620

Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
625 630 635 640

Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
645 650 655

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
660 665 670

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
675 680 685

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
690 695 700

Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly
705 710 715 720

Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr
725 730 735

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
740 745 750

Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
755 760 765

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro
770 775 780

Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
785 790 795 800

Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
805 810 815

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
820 825 830

Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys
835 840 845

Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg
850 855 860

Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
865 870 875 880

Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
885 890 895

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
900 905 910

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
915 920 925

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
930 935 940

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
945 950 955 960

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
965 970 975

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
980 985 990

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
995 1000

<210> 6
<211> 3016
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 6
gcgatcgcat ggccttacca gtgaccgcct tgctcctgcc gctggccttg ctgctccacg 60

ccgccaggcc ggacatccag atgacacaga ctacatcctc cctgtctgcc tctctgggag 120

acagagtcac catcagttgc agggcaagtc aggacattag taaatattta aattggtatc 180

agcagaaacc agatggaact gttaaactcc tgatctacca tacatcaaga ttacactcag 240

gagtcccatc aaggttcagt ggcagtgggt ctggaacaga ttattctctc accattagca 300

acctggagca agaagatatt gccacttact tttgccaaca gggtaatacg cttccgtaca 360

cgttcggagg ggggaccaag ctggagatca caggtggcgg tggctcgggc ggtggtgggt 420

cgggtggcgg cggatctgag gtgaaactgc aggagtcagg acctggcctg gtggcgccct 480

cacagagcct gtccgtcaca tgcactgtct caggggtctc attacccgac tatggtgtaa 540

gctggattcg ccagcctcca cgaaagggtc tggagtggct gggagtaata tggggtagtg 600

aaaccacata ctataattca gctctcaaat ccagactgac catcatcaag gacaactcca 660

agagccaagt tttcttaaaa atgaacagtc tgcaaactga tgacacagcc atttactact 720

gtgccaaaca ttattactac ggtggtagct atgctatgga ctactggggc caaggaacct 780

cagtcaccgt ctcctcaacc acgacgccag cgccgcgacc accaacaccg gcgcccacca 840

tcgcgtcgca gcccctgtcc ctgcgcccag aggcgtgccg gccagcggcg gggggcgcag 900

tgcacacgag ggggctggac ttcgcctgtg atatctacat ctgggcgccc ttggccggga 960

cttgtggggt ccttctcctg tcactggtta tcacccttta ctgcaaacgg ggcagaaaga 1020

aactcctgta tatattcaaa caaccattta tgagaccagt acaaactact caagaggaag 1080

atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg agagtgaagt 1140

tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc tataacgagc 1200

tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc cgggaccctg 1260

agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga 1320

aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca 1380

aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgccc 1440

ttcacatgca ggccctgccc cctcgcggaa gcggagccac caacttcagc ctgctgaagc 1500

aggccggcga cgtggaggag aaccccggcc ccatggcctt accagtgacc gccttgctcc 1560

tgccgctggc cttgctgctc cacgccgcca ggccggatat ccagatgacc cagagcccca 1620

gctccctgtc cgcatccgtg ggcgacagag tgacaattac ctgtagaagc agccaaagca 1680

tcgtgcatag cgtcggcaac acttttctgg agtggtatca acagaagccc gggaaggccc 1740

ccaaactgct gatctacaag gtgagcaaca gattcagcgg ggtcccaagc agattctccg 1800

gcagcggctc cgggactgac ttcaccctga ccattagcag cctgcagcca gaggacttcg 1860

ccacatacta ctgcttccaa gggagccagt tcccctacac cttcggccaa ggcactaagg 1920

tggagatcaa agggggggga ggaagcggcg gaggagggag cggaggcggg ggatccgaag 1980

tgcaactggt cgaatccgga ggggggctgg tccagcctgg agggtccctg agactgagct 2040

gcgccgcaag cggctacgag ttctccaggt cctggatgaa ctgggtgagg caggccccag 2100

gaaaagggct ggaatgggtg ggcaggatct accctggcga cggcgatacc aactactccg 2160

gaaagttcaa gggcaggttc actatcagcg ccgacactag caagaatacc gcctacctgc 2220

agatgaatag cctgagggcc gaggacaccg ccgtgtatta ctgcgctaga gacggcagca 2280

gctgggattg gtacttcgac gtgtggggcc agggcactct ggtgactgtg agcagcacca 2340

cgacgccagc gccgcgacca ccaacaccgg cgcccaccat cgcgtcgcag cccctgtccc 2400

tgcgcccaga ggcgtgccgg ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg gggctggact 2460

tcgcctgtga tatctacatc tgggcgccct tggccgggac ttgtggggtc cttctcctgt 2520

cactggttat cacccttac tgcaaacggg gcagaaagaa actcctgtat atattcaaac 2580

aaccatttat gagaccagta caaactactc aagaggaaga tggctgtagc tgccgatttc 2640

cagaagaaga agaaggagga tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgccc 2700

ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga cgaagagagg 2760

agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga aagccgagaa 2820

ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg gcggaggcct 2880

acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat ggcctttacc 2940

agggtctcag tacagccacc aaggacacct acgacgccct tcacatgcag gccctgcccc 3000

ctcgctaagt ttaaac 3016

<210> 7
<211> 990
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 7

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
50 55 60

Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
130 135 140

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser
145 150 155 160

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
195 200 205

Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
210 215 220

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys
225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
275 280 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
290 295 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
305 310 315 320

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
325 330 335

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
340 345 350

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
355 360 365

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
370 375 380

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
385 390 395 400

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
405 410 415

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
420 425 430

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
435 440 445

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
450 455 460

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
465 470 475 480

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu
485 490 495

Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Leu
500 505 510

Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala
515 520 525

Arg Pro Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser
530 535 540

Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser
545 550 555 560

Lys Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu
565 570 575

Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe
580 585 590

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
595 600 605

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Lys Tyr
610 615 620

Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly
625 630 635 640

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
645 650 655

Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu
660 665 670

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp
675 680 685

Val Lys Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp
690 695 700

Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala
705 710 715 720

Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
725 730 735

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asn
740 745 750

Trp Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Thr
755 760 765

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
770 775 780

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly
785 790 795 800

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp
805 810 815

Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile
820 825 830

Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr
835 840 845

Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln
850 855 860

Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys
865 870 875 880

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
885 890 895

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
900 905 910

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg
915 920 925

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
930 935 940

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
945 950 955 960

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
965 970 975

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
980 985 990

<210> 8
<211> 2989
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 8
gcgatcgcat ggccttacca gtgaccgcct tgctcctgcc gctggccttg ctgctccacg 60

ccgccaggcc ggacatccag atgacacaga ctacatcctc cctgtctgcc tctctgggag 120

acagagtcac catcagttgc agggcaagtc aggacattag taaatattta aattggtatc 180

agcagaaacc agatggaact gttaaactcc tgatctacca tacatcaaga ttacactcag 240

gagtcccatc aaggttcagt ggcagtgggt ctggaacaga ttattctctc accattagca 300

acctggagca agaagatatt gccacttact tttgccaaca gggtaatacg cttccgtaca 360

cgttcggagg ggggaccaag ctggagatca caggtggcgg tggctcgggc ggtggtgggt 420

cgggtggcgg cggatctgag gtgaaactgc aggagtcagg acctggcctg gtggcgccct 480

cacagagcct gtccgtcaca tgcactgtct caggggtctc attacccgac tatggtgtaa 540

gctggattcg ccagcctcca cgaaagggtc tggagtggct gggagtaata tggggtagtg 600

aaaccacata ctataattca gctctcaaat ccagactgac catcatcaag gacaactcca 660

agagccaagt tttcttaaaa atgaacagtc tgcaaactga tgacacagcc atttactact 720

gtgccaaaca ttattactac ggtggtagct atgctatgga ctactggggc caaggaacct 780

cagtcaccgt ctcctcaacc acgacgccag cgccgcgacc accaacaccg gcgcccacca 840

tcgcgtcgca gcccctgtcc ctgcgcccag aggcgtgccg gccagcggcg gggggcgcag 900

tgcacacgag ggggctggac ttcgcctgtg atatctacat ctgggcgccc ttggccggga 960

cttgtggggt ccttctcctg tcactggtta tcacccttta ctgcaaacgg ggcagaaaga 1020

aactcctgta tatattcaaa caaccattta tgagaccagt acaaactact caagaggaag 1080

atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg agagtgaagt 1140

tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc tataacgagc 1200

tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc cgggaccctg 1260

agatgggggg aaagccgcag agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc 1320

agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg 1380

gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg 1440

cccttcacat gcaggccctg ccccctcgcg gaagcggagc caccaacttc agcctgctga 1500

agcaggccgg cgacgtggag gagaaccccg gccccatggc cttaccagtg accgccttgc 1560

tcctgccgct ggccttgctg ctccacgccg ccaggccgga cgtgcagatc acccagagcc 1620

ccagctacct ggccgccagc cccggcgaga ccatcaccat caactgcaga gccagcaaga 1680

gcatcagcaa ggacctggcc tggtaccagg agaagcccgg caagaccaac aagctgctga 1740

tctacagcgg cagcaccctg cagagcggca tccccagcag attcagcggc agcggcagcg 1800

gcaccgactt caccctgacc atcagcagcc tggagcccga ggacttcgcc atgtactact 1860

gccagcagca caacaagtac ccctacacct tcggcggcgg caccaagctg gagatcaagg 1920

gagggggggg atccgggggga ggaggctccg gcggaggcgg aagccaggtg cagctgcagc 1980

agcccggcgc cgagctggtg agacccggcg ccagcgtgaa gctgagctgc aaggccagcg 2040

gctacacctt caccagctac tggatgaact gggtgaagca gagacccgac cagggcctgg 2100

agtggatcgg cagaatcgac ccctacgaca gcgagaccca ctacaaccag aagttcaagg 2160

acaaggccat cctgaccgtg gacaagagca gcagcaccgc ctacatgcag ctgagcagcc 2220

tgaccagcga ggacagcgcc gtgtactact gcgccagagg caactgggac gactactggg 2280

gccagggcac caccctgacc gtgagcagca ccacgacgcc agcgccgcga ccaccaacac 2340

cggcgcccac catcgcgtcg cagcccctgt ccctgcgccc agaggcgtgc cggccagcgg 2400

cgggggggcgc agtgcacacg agggggctgg acttcgcctg tgatatctac atctgggcgc 2460

ccttggccgg gacttgtggg gtccttctcc tgtcactggt tatcaccctt tactgcagga 2520

gtaagaggag caggctcctg cacagtgact acatgaacat gactccccgc cgccccgggc 2580

ccacccgcaa gcattaccag ccctatgccc caccacgcga cttcgcagcc tatcgctcca 2640

gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct 2700

ataacgagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc 2760

gggaccctga gatgggggga aagccgcaga gaaggaagaa ccctcaggaa ggcctgtaca 2820

atgaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc 2880

gccggagggg caaggggcac gatggccttt accagggtct cagtacagcc accaaggaca 2940

cctacgacgc ccttcacatg caggccctgc cccctcgcta agtttaaac 2989

<210> 9
<211> 1066
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 9

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met
20 25 30

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser
35 40 45

Ser Ile Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro
50 55 60

Lys Leu Trp Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser
100 105 110

Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
130 135 140

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala Ser Val
145 150 155 160

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Arg Met
165 170 175

His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr
180 185 190

Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp
195 200 205

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
210 215 220

Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
225 230 235 240

Gly Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
245 250 255

Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
260 265 270

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
275 280 285

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
290 295 300

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
305 310 315 320

Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His
325 330 335

Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys
340 345 350

His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
355 360 365

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
370 375 380

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
385 390 395 400

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
405 410 415

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
420 425 430

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
435 440 445

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
450 455 460

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
465 470 475 480

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
485 490 495

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
500 505 510

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn
515 520 525

Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
530 535 540

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
545 550 555 560

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu
565 570 575

Ala Ala Ser Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys
580 585 590

Ser Ile Ser Lys Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr
595 600 605

Asn Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro
610 615 620

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
625 630 635 640

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His
645 650 655

Asn Lys Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
660 665 670

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
675 680 685

Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser
690 695 700

Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
705 710 715 720

Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
725 730 735

Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
740 745 750

Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
755 760 765

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
770 775 780

Arg Gly Asn Trp Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
785 790 795 800

Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
805 810 815

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
820 825 830

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
835 840 845

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
850 855 860

Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His
865 870 875 880

Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys
885 890 895

His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
900 905 910

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
915 920 925

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
930 935 940

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
945 950 955 960

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
965 970 975

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
980 985 990

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
995 1000 1005

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
1010 1015 1020

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
1025 1030 1035

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
1040 1045 1050

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
1055 1060 1065

<210> 10
<211> 3217
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 10
gcgatcgcat ggccttacca gtgaccgcct tgctcctgcc gctggccttg ctgctccacg 60

ccgccaggcc gcagatcgtg ctgacccaga gccccgccat catgagcgcc agccccggcg 120

agaaggtgac catcacctgc agcgccagca gcagcatcag ctacatgcac tggttccagc 180

agaagcccgg caccagcccc aagctgtgga tctacaccac cagcaacctg gccagcggcg 240

tgcccgccag attcagcggc agcggcagcg gcaccagcta cagcctgacc atcagcagaa 300

tggaggccga ggacgccgcc acctactact gccaccagag aagcacctac cccctgacct 360

tcggcagcgg caccaagctg gagctgaagg gagggggggg atccgggggga ggaggctccg 420

gcggaggcgg aagccaggtg cagctgcagc agagcggcgc cgagctggcc aagcccggcg 480

ccagcgtgaa gatgagctgc aaggccagcg gctacacctt caccagctac agaatgcact 540

gggtgaagca gagacccggc cagggcctgg agtggatcgg ctacatcaac cccagcaccg 600

gctacaccga gtacaaccag aagttcaagg acaaggccac cctgaccgcc gacaagagca 660

gcagcaccgc ctacatgcag ctgagcagcc tgaccttcga ggacagcgcc gtgtactact 720

gcgccagagg cggcggcgtg ttcgactact ggggccaggg caccaccctg accgtgagca 780

gcaccacgac gccagcgccg cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg tcgcagcccc 840

tgtccctgcg cccagaggcg tgccggccag cggcgggggg cgcagtgcac acgagggggc 900

tggacttcgc ctgtgatatc tacatctggg cgcccttggc cgggacttgt ggggtccttc 960

tcctgtcact ggttatcacc ctttactgca ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg 1020

actacatgaa catgactccc cgccgccccg ggcccacccg caagcattac cagccctatg 1080

ccccaccacg cgacttcgca gcctatcgct ccaaacgggg cagaaagaaa ctcctgtata 1140

tattcaaaca accatttatg agaccagtac aaactactca agaggaagat ggctgtagct 1200

gccgatttcc agaagaagaa gaaggaggat gtgaactgag agtgaagttc agcaggagcg 1260

cagacgcccc cgcgtacaag cagggccaga accagctcta taacgagctc aatctaggac 1320

gaagagagga gtacgatgtt ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag atgggggggaa 1380

agccgagaag gaagaaccct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg 1440

cggaggccta cagtgagatt gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg 1500

gcctttacca gggtctcagt acagccacca aggacaccta cgacgccctt cacatgcagg 1560

ccctgccccc tcgcggaagc ggagctacta acttcagcct gctgaagcag gctggagacg 1620

tggaggagaa ccctggacct atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct 1680

tgctgctcca cgccgccagg ccggacgtgc agatcaccca gagccccagc tacctggccg 1740

ccagccccgg cgagaccatc accatcaact gcagagccag caagagcatc agcaaggacc 1800

tggcctggta ccaggagaag cccggcaaga ccaacaagct gctgatctac agcggcagca 1860

ccctgcagag cggcatcccc agcagattca gcggcagcgg cagcggcacc gacttcaccc 1920

tgaccatcag cagcctggag cccgaggact tcgccatgta ctactgccag cagcacaaca 1980

agtaccccta caccttcggc ggcggcacca agctggagat caagggaggg gggggatccg 2040

ggggaggagg ctccggcgga ggcggaagcc aggtgcagct gcagcagccc ggcgccgagc 2100

tggtgagacc cggcgccagc gtgaagctga gctgcaaggc cagcggctac accttcacca 2160

gctactggat gaactgggtg aagcagagac ccgaccaggg cctggagtgg atcggcagaa 2220

tcgaccccta cgacagcgag acccactaca accagaagtt caaggacaag gccatcctga 2280

ccgtggacaa gagcagcagc accgcctaca tgcagctgag cagcctgacc agcgaggaca 2340

gcgccgtgta ctactgcgcc agaggcaact gggacgacta ctggggccag ggcaccaccc 2400

tgaccgtgag cagcaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg 2460

cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggcgcagtgc 2520

acacgagggg gctggacttc gcctgtgata tctacatctg ggcgcccttg gccgggactt 2580

gtggggtcct tctcctgtca ctggttatca ccctttactg caggagtaag aggagcaggc 2640

tcctgcacag tgactacatg aacatgactc cccgccgccc cgggcccacc cgcaagcatt 2700

accagcccta tgccccacca cgcgacttcg cagcctatcg ctccaaacgg ggcagaaaga 2760

aactcctgta tatattcaaa caaccattta tgagaccagt acaaactact caagaggaag 2820

atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg agagtgaagt 2880

tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc tataacgagc 2940

tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc cgggaccctg 3000

agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga 3060

aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca 3120

aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgccc 3180

ttcacatgca ggccctgccc cctcgctaag tttaaac 3217

<210> 11
<211> 985
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 11

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met
20 25 30

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser
35 40 45

Ser Ile Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro
50 55 60

Lys Leu Trp Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser
100 105 110

Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
130 135 140

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala Ser Val
145 150 155 160

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Arg Met
165 170 175

His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr
180 185 190

Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp
195 200 205

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
210 215 220

Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
225 230 235 240

Gly Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
245 250 255

Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
260 265 270

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
275 280 285

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
290 295 300

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
305 310 315 320

Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr
325 330 335

Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu
340 345 350

Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu
355 360 365

Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
370 375 380

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
385 390 395 400

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
405 410 415

Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
420 425 430

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
435 440 445

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
450 455 460

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
465 470 475 480

Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly
485 490 495

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu
500 505 510

Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Asp Val Gln
515 520 525

Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly Glu Thr Ile
530 535 540

Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Asp Leu Ala Trp
545 550 555 560

Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly
565 570 575

Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
580 585 590

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe
595 600 605

Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Lys Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly
610 615 620

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
625 630 635 640

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala
645 650 655

Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
660 665 670

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro
675 680 685

Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu
690 695 700

Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp
705 710 715 720

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
725 730 735

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Trp Asp Asp Tyr Trp
740 745 750

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro
755 760 765

Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
770 775 780

Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
785 790 795 800

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
805 810 815

Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg
820 825 830

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
835 840 845

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
850 855 860

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
865 870 875 880

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
885 890 895

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
900 905 910

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln
915 920 925

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
930 935 940

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
945 950 955 960

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
965 970 975

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
980 985

<210> 12
<211> 2974
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 12
gcgatcgcat ggccttacca gtgaccgcct tgctcctgcc gctggccttg ctgctccacg 60

ccgccaggcc gcagatcgtg ctgacccaga gccccgccat catgagcgcc agccccggcg 120

agaaggtgac catcacctgc agcgccagca gcagcatcag ctacatgcac tggttccagc 180

agaagcccgg caccagcccc aagctgtgga tctacaccac cagcaacctg gccagcggcg 240

tgcccgccag attcagcggc agcggcagcg gcaccagcta cagcctgacc atcagcagaa 300

tggaggccga ggacgccgcc acctactact gccaccagag aagcacctac cccctgacct 360

tcggcagcgg caccaagctg gagctgaagg gagggggggg atccggggga ggaggctccg 420

gcggaggcgg aagccaggtg cagctgcagc agagcggcgc cgagctggcc aagcccggcg 480

ccagcgtgaa gatgagctgc aaggccagcg gctacacctt caccagctac agaatgcact 540

gggtgaagca gagacccggc cagggcctgg agtggatcgg ctacatcaac cccagcaccg 600

gctacaccga gtacaaccag aagttcaagg acaaggccac cctgaccgcc gacaagagca 660

gcagcaccgc ctacatgcag ctgagcagcc tgaccttcga ggacagcgcc gtgtactact 720

gcgccagagg cggcggcgtg ttcgactact ggggccaggg caccaccctg accgtgagca 780

gcaccacgac gccagcgccg cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg tcgcagcccc 840

tgtccctgcg cccagaggcg tgccggccag cggcgggggg cgcagtgcac acgagggggc 900

tggacttcgc ctgtgatatc tacatctggg cgcccttggc cgggacttgt ggggtccttc 960

tcctgtcact ggttatcacc ctttactgca aacggggcag aaagaaactc ctgtatatat 1020

tcaaacaacc atttatgaga ccagtacaaa ctactcaaga ggaagatggc tgtagctgcc 1080

gatttccaga agaagaagaa ggaggatgtg aactgagagt gaagttcagc aggagcgcag 1140

acgcccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa 1200

gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc 1260

cgcagagaag gaagaaccct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg 1320

cggaggccta cagtgagatt gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg 1380

gcctttacca gggtctcagt acagccacca aggacaccta cgacgccctt cacatgcagg 1440

ccctgccccc tcgcggaagc ggagctacta acttcagcct gctgaagcag gctggagacg 1500

tggaggagaa ccctggacct atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct 1560

tgctgctcca cgccgccagg ccggacgtgc agatcaccca gagccccagc tacctggccg 1620

ccagccccgg cgagaccatc accatcaact gcagagccag caagagcatc agcaaggacc 1680

tggcctggta ccaggagaag cccggcaaga ccaacaagct gctgatctac agcggcagca 1740

ccctgcagag cggcatcccc agcagattca gcggcagcgg cagcggcacc gacttcaccc 1800

tgaccatcag cagcctggag cccgaggact tcgccatgta ctactgccag cagcacaaca 1860

agtaccccta caccttcggc ggcggcacca agctggagat caagggaggg gggggatccg 1920

ggggaggagg ctccggcgga ggcggaagcc aggtgcagct gcagcagccc ggcgccgagc 1980

tggtgagacc cggcgccagc gtgaagctga gctgcaaggc cagcggctac accttcacca 2040

gctactggat gaactgggtg aagcagagac ccgaccaggg cctggagtgg atcggcagaa 2100

tcgaccccta cgacagcgag acccactaca accagaagtt caaggacaag gccatcctga 2160

ccgtggacaa gagcagcagc accgcctaca tgcagctgag cagcctgacc agcgaggaca 2220

gcgccgtgta ctactgcgcc agaggcaact gggacgacta ctggggccag ggcaccaccc 2280

tgaccgtgag cagcaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg 2340

cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggcgcagtgc 2400

acacgagggg gctggacttc gcctgtgata tctacatctg ggcgcccttg gccgggactt 2460

gtggggtcct tctcctgtca ctggttatca ccctttactg caggagtaag aggagcaggc 2520

tcctgcacag tgactacatg aacatgactc cccgccgccc cgggcccacc cgcaagcatt 2580

accagcccta tgccccacca cgcgacttcg cagcctatcg ctccagagtg aagttcagca 2640

ggagcgcaga cgcccccgcg taccagcagg gccagaacca gctctataac gagctcaatc 2700

taggacgaag agaggagtac gatgttttgg acaagagacg tggccgggac cctgagatgg 2760

ggggaaagcc gcagagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag 2820

ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg aggggcaagg 2880

ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac gacgcccttc 2940

acatgcaggc cctgcccccct cgctaagttt aaac 2974

<210> 13
<211> 546
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 13

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
20 25 30

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Lys Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
165 170 175

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg
180 185 190

Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
195 200 205

Ile Gly Glu Ile Asn Pro Thr Ser Ser Thr Ile Asn Phe Thr Pro Ser
210 215 220

Leu Lys Asp Lys Val Phe Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
225 230 235 240

Tyr Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
245 250 255

Cys Ala Arg Gly Asn Tyr Tyr Arg Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp
260 265 270

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
275 280 285

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
290 295 300

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
305 310 315 320

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
325 330 335

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser
340 345 350

Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
355 360 365

Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
370 375 380

Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr
385 390 395 400

Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu
405 410 415

Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu
420 425 430

Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
435 440 445

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
450 455 460

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
465 470 475 480

Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
485 490 495

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
500 505 510

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
515 520 525

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
530 535 540

Pro Arg
545

<210> 14
<211> 1657
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 14
gcgatcgcat ggccttacca gtgaccgcct tgctcctgcc gctggccttg ctgctccacg 60

ccgccaggcc gagcgacatc gtgctgaccc agagccccgc cagcctggcc gtgagcctgg 120

gccagagagc caccatcagc tgcagagcca gcaagagcgt gagcaccagc ggctacagct 180

acctgcactg gtaccagcag aagcccggcc agcccccaa gctgctgatc tacctggcca 240

gcaacctgga gagcggcgtg cccgccagat tcagcggcag cggcagcggc accgacttca 300

ccctgaacat ccaccccgtg gaggaggagg acgccgccac ctactactgc cagcacagca 360

gagagctgcc cttcaccttc ggcagcggca ccaagctgga gatcaagaag atcagcggcg 420

gcggcggcag cggcggcggc ggcagcggcg gcggcggcag cggcggcggc ggcagcggcg 480

gcggcggcag ccaggtgcag ctggtggaga gcggcggcgg cctggtgcag cccggcggca 540

gcctgaagct gagctgcgcc gccagcggct tcgacttcag cagatactgg atgagctggg 600

tgagacaggc ccccggcaag ggcctggagt ggatcggcga gatcaacccc accagcagca 660

ccatcaactt cacccccagc ctgaaggaca aggtgttcat cagcagagac aacgccaaga 720

acaccctgta cctgcagatg agcaaggtga gaagcgagga caccgccctg tactactgcg 780

ccagaggcaa ctactacaga tacggcgacg ccatggacta ctggggccag ggcaccagcg 840

tgaccgtgag caccacgacg ccagcgccgc gaccaccaac accggcgccc accatcgcgt 900

cgcagcccct gtccctgcgc ccagaggcgt gccggccagc ggcgggggc gcagtgcaca 960

cgagggggct ggacttcgcc tgtgatatct acatctgggc gcccttggcc gggacttgtg 1020

gggtccttct cctgtcactg gttatcaccc tttactgcag gagtaagagg agcaggctcc 1080

tgcacagtga ctacatgaac atgactcccc gccgccccgg gcccacccgc aagcattacc 1140

agccctatgc cccaccacgc gacttcgcag cctatcgctc caaacggggc agaaagaaac 1200

tcctgtatat attcaaacaa ccatttatga gaccagtaca aactactcaa gaggaagatg 1260

gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga gtgaagttca 1320

gcaggagcgc agacgccccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca 1380

atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gaccctgaga 1440

tgggggaaa gccgcagaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga 1500

aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca 1560

aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgccc 1620

ttcacatgca ggccctgccc cctcgctaag tttaaac 1657

<210> 15
<211> 490
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 15

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
20 25 30

Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys
35 40 45

Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
100 105 110

Cys Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
145 150 155 160

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe
165 170 175

Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
180 185 190

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Thr Ser Ser Thr Ile Asn Phe Thr
195 200 205

Pro Ser Leu Lys Asp Lys Val Phe Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
210 215 220

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Tyr Tyr Arg Tyr Gly Asp Ala Met Asp
245 250 255

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Thr Thr Thr Pro Ala
260 265 270

Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
275 280 285

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
290 295 300

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305 310 315 320

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
325 330 335

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
340 345 350

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
355 360 365

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
370 375 380

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
385 390 395 400

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
405 410 415

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro
420 425 430

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
435 440 445

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
450 455 460

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
465 470 475 480

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 16
<211> 1489
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 16
gcgatcgcat ggccttacca gtgaccgcct tgctcctgcc gctggccttg ctgctccacg 60

ccgccaggcc ggacatcgtg ctgacccaga gccccgccag cctggccgtg agcctgggcc 120

agagggccac catcagctgc agggccagca agagcgtgag caccagcggc tacagctacc 180

tgcactggta ccagcagaag cccggccagc cccccaagct gctgatctac ctggccagca 240

acctggagag cggcgtgccc gccaggttca gcggcagcgg cagcggcacc gacttcaccc 300

tgaacatcca ccccgtggag gaggaggacg ccgccaccta ctactgccag cacagcaggg 360

agctgccctt caccttcggc agcggcacca agctggagat caagggaggg gggggatccg 420

ggggaggagg ctccggcgga ggcggaagcc aggtgcagct ggtggagagc ggcggcggcc 480

tggtgcagcc cggcggcagc ctgaagctga gctgcgccgc cagcggcttc gacttcagca 540

ggtactggat gagctgggtg aggcaggccc ccggcaaggg cctggagtgg atcggcgaga 600

tcaaccccac cagcagcacc atcaacttca cccccagcct gaaggacaag gtgttcatca 660

gcagggacaa cgccaagaac accctgtacc tgcagatgag caaggtgagg agcgaggaca 720

ccgccctgta ctactgcgcc aggggcaact actacaggta cggcgacgcc atggactact 780

ggggccaggg caccagcgtg accgtgagca ccacgacgcc agcgccgcga ccaccaacac 840

cggcgcccac catcgcgtcg cagcccctgt ccctgcgccc agaggcgtgc cggccagcgg 900

cgggggcgc agtgcacacg agggggctgg acttcgcctg tgatatctac atctgggcgc 960

ccttggccgg gacttgtggg gtccttctcc tgtcactggt tatcaccctt tactgcagga 1020

gtaagaggag caggctcctg cacagtgact acatgaacat gactccccgc cgccccgggc 1080

ccacccgcaa gcattaccag ccctatgccc caccacgcga cttcgcagcc tatcgctcca 1140

gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct 1200

ataacgagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc 1260

gggaccctga gatgggggga aagccgcaga gaaggaagaa ccctcaggaa ggcctgtaca 1320

atgaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc 1380

gccggagggg caaggggcac gatggccttt accagggtct cagtacagcc accaaggaca 1440

cctacgacgc ccttcacatg caggccctgc cccctcgcta agtttaaac 1489

<210> 17
<211> 491
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 17

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
20 25 30

Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys
35 40 45

Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
100 105 110

Cys Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
145 150 155 160

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe
165 170 175

Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
180 185 190

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Thr Ser Ser Thr Ile Asn Phe Thr
195 200 205

Pro Ser Leu Lys Asp Lys Val Phe Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
210 215 220

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Tyr Tyr Arg Tyr Gly Asp Ala Met Asp
245 250 255

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Thr Thr Thr Pro Ala
260 265 270

Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
275 280 285

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
290 295 300

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305 310 315 320

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
325 330 335

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
340 345 350

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
355 360 365

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
370 375 380

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
385 390 395 400

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
405 410 415

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn
420 425 430

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
435 440 445

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
450 455 460

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
465 470 475 480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 18
<211> 1492
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 18
gcgatcgcat ggccttacca gtgaccgcct tgctcctgcc gctggccttg ctgctccacg 60

ccgccaggcc ggacatcgtg ctgacccaga gccccgccag cctggccgtg agcctgggcc 120

agagggccac catcagctgc agggccagca agagcgtgag caccagcggc tacagctacc 180

tgcactggta ccagcagaag cccggccagc cccccaagct gctgatctac ctggccagca 240

acctggagag cggcgtgccc gccaggttca gcggcagcgg cagcggcacc gacttcaccc 300

tgaacatcca ccccgtggag gaggaggacg ccgccaccta ctactgccag cacagcaggg 360

agctgccctt caccttcggc agcggcacca agctggagat caagggaggg gggggatccg 420

ggggaggagg ctccggcgga ggcggaagcc aggtgcagct ggtggagagc ggcggcggcc 480

tggtgcagcc cggcggcagc ctgaagctga gctgcgccgc cagcggcttc gacttcagca 540

ggtactggat gagctgggtg aggcaggccc ccggcaaggg cctggagtgg atcggcgaga 600

tcaaccccac cagcagcacc atcaacttca cccccagcct gaaggacaag gtgttcatca 660

gcagggacaa cgccaagaac accctgtacc tgcagatgag caaggtgagg agcgaggaca 720

ccgccctgta ctactgcgcc aggggcaact actacaggta cggcgacgcc atggactact 780

ggggccaggg caccagcgtg accgtgagca ccacgacgcc agcgccgcga ccaccaacac 840

cggcgcccac catcgcgtcg cagcccctgt ccctgcgccc agaggcgtgc cggccagcgg 900

cgggggcgc agtgcacacg agggggctgg acttcgcctg tgatatctac atctgggcgc 960

ccttggccgg gacttgtggg gtccttctcc tgtcactggt tatcaccctt tactgcaaac 1020

ggggcagaaa gaaactcctg tatatattca aacaaccatt tatgagacca gtacaaacta 1080

ctcaagagga agatggctgt agctgccgat ttccagaaga agaagaagga ggatgtgaac 1140

tgagagtgaa gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc cagaaccagc 1200

tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttggac aagagacgtg 1260

gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccgc agagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt 1320

acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg 1380

agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg 1440

acacctacga cgcccttcac atgcaggccc tgccccctcg ctaagtttaa ac 1492

<210> 19
<211> 997
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 19

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Ser His Arg Phe Met
20 25 30

Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45

Asp Val Asn Thr Ala Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
50 55 60

Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His
100 105 110

Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
130 135 140

Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr
145 150 155 160

Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe Gly
165 170 175

Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Lys Trp Met Ala
180 185 190

Trp Ile Asn Thr Thr Arg Tyr Thr Gly Glu Ser Tyr Phe Ala Asp Asp
195 200 205

Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Val Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala
210 215 220

Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
225 230 235 240

Cys Ala Arg Gly Glu Ile Tyr Tyr Gly Tyr Asp Gly Gly Phe Ala Tyr
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Thr Thr Thr Pro Ala
260 265 270

Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
275 280 285

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
290 295 300

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
305 310 315 320

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
325 330 335

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
340 345 350

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
355 360 365

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
370 375 380

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
385 390 395 400

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
405 410 415

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn
420 425 430

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
435 440 445

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
450 455 460

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
465 470 475 480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr
485 490 495

Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
500 505 510

Pro Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
515 520 525

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
530 535 540

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln
545 550 555 560

Asp Val Gly Ile Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val
565 570 575

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro
580 585 590

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
595 600 605

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
610 615 620

Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
625 630 635 640

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
645 650 655

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
660 665 670

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp
675 680 685

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
690 695 700

Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys
705 710 715 720

Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
725 730 735

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
740 745 750

Arg Pro Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
755 760 765

Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr
770 775 780

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
785 790 795 800

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe
805 810 815

Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val
820 825 830

Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Ser
835 840 845

Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
850 855 860

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
865 870 875 880

Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
885 890 895

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
900 905 910

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
915 920 925

Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
930 935 940

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
945 950 955 960

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
965 970 975

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
980 985 990

Ala Leu Pro Pro Arg
995

<210> 20
<211> 2994
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 20
atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccggatgtgg tgatgaccca gagccatcgc tttatgagca ccagcgtggg cgatcgcgtg 120

agcattacct gccgcgcgag ccaggatgtg aacaccgcgg tgagctggta tcagcagaaa 180

ccgggccaga gcccgaaact gctgattttt agcgcgagct atcgctatac cggcgtgccg 240

gatcgcttta ccggcagcgg cagcggcgcg gattttaccc tgaccattag cagcgtgcag 300

gcggaagatc tggcggtgta ttattgccag cagcattata gcaccccgtg gacctttggc 360

ggcggcacca aactggaaat taaaggaggg gggggatccg ggggaggagg ctccggcgga 420

ggcggaagcc agattcagct ggtgcagagc ggcccggatc tgaaaaaacc gggcgaaacc 480

gtgaaactga gctgcaaagc gagcggctat acctttacca actttggcat gaactgggtg 540

aaacaggcgc cgggcaaagg ctttaaatgg atggcgtgga ttaacaccac ccgctatacc 600

ggcgaaagct attttgcgga tgattttaaa ggccgctttg cgtttagcgt ggaaaccagc 660

gcgaccaccg cgtatctgca gattaacaac ctgaaaaccg aagataccgc gacctatttt 720

tgcgcgcgcg gcgaaattta ttatggctat gatggcggct ttgcgtattg gggccagggc 780

accctggtga ccgtgagcgc gaccacgacg ccagcgccgc gaccaccaac accggcgccc 840

accatcgcgt cgcagcccct gtccctgcgc ccagaggcgt gccggccagc ggcgggggggc 900

gcagtgcaca cgagggggct ggacttcgcc tgtgatatct acatctgggc gcccttggcc 960

gggacttgtg gggtccttct cctgtcactg gttatcaccc tttactgcaa acggggcaga 1020

aagaaactcc tgtatatatt caaacaacca tttatgagac cagtacaaac tactcaagag 1080

gaagatggct gtagctgccg atttccagaa gaagaagaag gaggatgtga actgagagtg 1140

aagttcagca ggagcgcaga cgcccccgcg taccagcagg gccagaacca gctctataac 1200

gagctcaatc taggacgaag agaggagtac gatgttttgg acaagagacg tggccgggac 1260

cctgagatgg ggggaaagcc gcagagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa 1320

ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg 1380

aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 1440

gacgcccttc acatgcaggc cctgcccccct cgcggaagcg gagccaccaa cttcagcctg 1500

ctgaagcagg ccggcgacgt ggaggagaac cccggccccg ccttaccagt gaccgccttg 1560

ctcctgccgc tggccttgct gctccacgcc gccaggccgg atattcagat gacccagagc 1620

ccgagcagcc tgagcgcgag cgtgggcgat cgcgtgacca ttacctgcaa agcgagccag 1680

gatgtgggca ttgcggtggc gtggtatcag cagaaaccgg gcaaagtgcc gaaactgctg 1740

atttattggg cgagcacccg ccataccggc gtgccggatc gctttagcgg cagcggcagc 1800

ggcaccgatt ttaccctgac cattagcagc ctgcagccgg aagatgtggc gacctattat 1860

tgccagcagt atagcagcta tccgtatacc tttggccagg gcaccaaagt ggaaattaaa 1920

ggagggggg gatccggggg aggaggctcc ggcggaggcg gaagcgaagt gcagctggtg 1980

gaaagcggcg gcggcctggt gcagccgggc ggcagcctgc gcctgagctg cgcggcgagc 2040

ggctttgatt ttagccgcta ttggatgagc tgggtgcgcc aggcgccggg caaaggcctg 2100

gaatggattg gcgaaattaa cccggatagc agcaccatta actatgcgcc gagcctgaaa 2160

gataaattta ttattagccg cgataacgcg aaaaacagcc tgtatctgca gatgaacagc 2220

ctgcgcgcgg aagataccgc ggtgtattat tgcgcgcgcc cggatggcaa ctattggtat 2280

tttgatgtgt ggggccaggg caccctggtg accgtgagca gcaccacgac gccagcgccg 2340

cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg tcgcagcccc tgtccctgcg cccagaggcg 2400

tgccggccag cggcgggggg cgcagtgcac acgagggggc tggacttcgc ctgtgatatc 2460

tacatctggg cgcccttggc cgggacttgt ggggtccttc tcctgtcact ggttatcacc 2520

ctttactgca ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg actacatgaa catgactccc 2580

cgccgccccg ggcccacccg caagcattac cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca 2640

gcctatcgct ccagagtgaa gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc 2700

cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttggac 2760

aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccgc agagaaggaa gaaccctcag 2820

gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg 2880

atgaaaggcg agcgccggag gggcaaggggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca 2940

gccaccaagg acacctacga cgcccttcac atgcaggccc tgccccctcg ctaa 2994

<210> 21
<211> 997
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 21

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Ser His Arg Phe Met
20 25 30

Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45

Asp Val Asn Thr Ala Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
50 55 60

Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His
100 105 110

Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
130 135 140

Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr
145 150 155 160

Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe Gly
165 170 175

Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Lys Trp Met Ala
180 185 190

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Tyr Phe Ala Asp Asp Phe Lys
195 200 205

Gly Arg Phe Ala Phe Ser Val Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr Leu
210 215 220

Gln Ile Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
225 230 235 240

Arg Gly Glu Ile Tyr Tyr Gly Tyr Asp Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
260 265 270

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
275 280 285

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
290 295 300

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
305 310 315 320

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg
325 330 335

Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
340 345 350

Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
355 360 365

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
370 375 380

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
385 390 395 400

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
405 410 415

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln
420 425 430

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
435 440 445

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
450 455 460

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
465 470 475 480

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe
485 490 495

Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met
500 505 510

Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His
515 520 525

Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
530 535 540

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
545 550 555 560

Val Gly Ile Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro
565 570 575

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
580 585 590

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
595 600 605

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser
610 615 620

Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
625 630 635 640

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
645 650 655

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
660 665 670

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp Met
675 680 685

Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu
690 695 700

Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys Asp
705 710 715 720

Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
725 730 735

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
740 745 750

Pro Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
755 760 765

Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
770 775 780

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
785 790 795 800

Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
805 810 815

Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu
820 825 830

Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys
835 840 845

Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr
850 855 860

Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly
865 870 875 880

Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
885 890 895

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
900 905 910

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
915 920 925

Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
930 935 940

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
945 950 955 960

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
965 970 975

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
980 985 990

Ala Leu Pro Pro Arg
995

<210> 22
<211> 3009
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 22
cgatcgcatg gccttaccag tgaccgcctt gctcctgccg ctggccttgc tgctccacgc 60

cgccaggccg gatgtggtga tgacccagag ccatcgcttt atgagcacca gcgtgggaga 120

tcgagtgagc attacctgcc gcgcgagcca ggatgtgaac accgcggtga gctggtatca 180

gcagaaaccg ggccagagcc cgaaactgct gatttttagc gcgagctatc gctataccgg 240

cgtgccggat cgctttaccg gcagcggcag cggcgcggat tttaccctga ccattagcag 300

cgtgcaggcg gaagatctgg cggtgtatta ttgccagcag cattatagca ccccgtggac 360

ctttggcggc ggcaccaaac tggatattaa aggagggggg ggatccgggg gaggaggctc 420

cggcggaggc ggaagccaga ttcagctggt gcagagcggc ccggatctga aaaaaccggg 480

cgaaaccgtg aaactgagct gcaaagcgag cggctatacc tttaccaact ttggcatgaa 540

ctgggtgaaa caggcgccgg gcaaaggctt taaatggatg gcgtggatta acacctatac 600

cggcgaaagc tattttgcgg atgattttaa aggccgcttt gcgtttagcg tggaaaccag 660

cgcgaccacc gcgtatctgc agattaacaa cctgaaaacc gaagataccg cgacctattt 720

ttgcgcgcgc ggcgaaattt attatggcta tgatggcggc tttgcgtatt ggggccaggg 780

caccctggtg accgtgagcg cgaccacgac gccagcgccg cgaccaccaa caccggcgcc 840

caccatcgcg tcgcagcccc tgtccctgcg cccagaggcg tgccggccag cggcgggggg 900

cgcagtgcac acgagggggc tggacttcgc ctgtgatatc tacatctggg cgcccttggc 960

cgggacttgt ggggtccttc tcctgtcact ggttatcacc ctttactgca aacggggcag 1020

aaagaaactc ctgtatatat tcaagcaacc atttatgaga ccagtacaaa ctactcaaga 1080

ggaagatggc tgtagctgcc gatttccaga agaagaagaa ggaggatgtg aactgagagt 1140

gaagttcagc aggagcgcag acgcccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa 1200

cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga 1260

ccctgagatg gggggaaagc cgcagagaag gaagaaccct caggaaggcc tgtacaatga 1320

actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagtgagatt gggatgaaag gcgagcgccg 1380

gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca gggtctcagt acagccacca aggacaccta 1440

cgacgccctt cacatgcagg ccctgccccc tcgcggaagc ggagccacca acttcagcct 1500

gctgaagcag gccggcgacg tggaggagaa ccccggcccc atggccttac cagtgaccgc 1560

cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg ccggatattc agatgaccca 1620

gagcccgagc agcctgagcg cgagcgtggg cgaccgcgtg accattacct gcaaagcgag 1680

ccaggatgtg ggcattgcgg tggcgtggta tcagcagaaa ccgggcaaag tgccgaaact 1740

gctgatttat tgggcgagca cccgccatac cggcgtgccg gatcgcttta gcggcagcgg 1800

cagcggcacc gattttaccc tgaccattag cagcctgcag ccggaagatg tggcgaccta 1860

ttattgccag cagtatagca gctatccgta tacctttggc cagggcacca aagtggaaat 1920

taaaggaggg gggggatccg ggggaggagg ctccggcgga ggcggaagcg aagtgcagct 1980

ggtggaaagc ggcggcggcc tggtgcagcc gggcggcagc ctgcgcctga gctgcgcggc 2040

gagcggcttt gattttagcc gctattggat gagctgggtg cgccaggcgc cgggcaaagg 2100

cctggaatgg attggcgaaa ttaacccgga tagcagcacc attaactatg cgccgagcct 2160

gaaagataaa tttattatta gccgcgataa cgcgaaaaac agcctgtatc tgcagatgaa 2220

cagcctgcgc gcggaagata ccgcggtgta ttattgcgcg cgcccggatg gcaactattg 2280

gtattttgat gtgtggggcc agggcaccct ggtgaccgtg agcagcacca cgacgccagc 2340

gccgcgacca ccaacaccgg cgcccaccat cgcgtcgcag cccctgtccc tgcgcccaga 2400

ggcgtgccgg ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg gggctggact tcgcctgtga 2460

tatctacatc tgggcgccct tggccgggac ttgtggggtc cttctcctgt cactggttat 2520

cacccttttac tgcaaacggg gcagaaagaa actcctgtat atattcaagc aaccatttat 2580

gagaccagta caaactactc aagaggaaga tggctgtagc tgccgatttc cagaagaaga 2640

agaaggagga tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgccc ccgcgtacca 2700

gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt 2760

tttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga aagccgcaga gaaggaagaa 2820

ccctcaggaa ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga 2880

gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt accagggtct 2940

cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc ccttcacatg caggccctgc cccctcgcta 3000

agtttaaac 3009

<210> 23
<211> 423
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 23
agctagctgc agtaacgcca ttttgcaagg catggaaaaa taccaaacca agaatagaga 60

agttcagatc aagggcgggt acatgaaaat agctaacgtt gggccaaaca ggatatctgc 120

ggtgagcagt ttcggccccg gcccggggcc aagaacagat ggtcaccgca gtttcggccc 180

cggcccgagg ccaagaacag atggtcccca gatatggccc aaccctcagc agtttcttaa 240

gacccatcag atgtttccag gctcccccaa ggacctgaaa tgaccctgcg ccttatttga 300

attaaccaat cagcctgctt ctcgcttctg ttcgcgcgct tctgcttccc gagctctata 360

aaagagctca caacccctca ctcggcgcgc cagtcctccg acagactgag tcgcccgggt 420

acc 423

<210> 24
<211> 165
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 24

Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
1 5 10 15

Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg
20 25 30

Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met
35 40 45

Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala
50 55 60

Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp
65 70 75 80

His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His
85 90 95

Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val
100 105 110

Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn
115 120 125

Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser
130 135 140

Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val
145 150 155 160

Ala Leu Val Tyr Ser
165

<210> 25
<211> 54
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 25

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
20 25 30

Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala
50

<210> 26
<211> 204
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 26

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

Phe Pro Leu Lys Ser Lys Val Lys Gln Val Asp Ser Ile Val Trp Thr
20 25 30

Phe Asn Thr Thr Pro Leu Val Thr Ile Gln Pro Glu Gly Gly Thr Ile
35 40 45

Ile Val Thr Gln Asn Arg Asn Arg Glu Arg Val Asp Phe Pro Asp Gly
50 55 60

Gly Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Lys Leu Lys Lys Asn Asp Ser Gly Ile
65 70 75 80

Tyr Tyr Val Gly Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Gln Gln Pro Ser Thr Gln
85 90 95

Glu Tyr Val Leu His Val Tyr Glu His Leu Ser Lys Pro Lys Val Thr
100 105 110

Met Gly Leu Gln Ser Asn Lys Asn Gly Thr Cys Val Thr Asn Leu Thr
115 120 125

Cys Cys Met Glu His Gly Glu Glu Asp Val Ile Tyr Thr Trp Lys Ala
130 135 140

Leu Gly Gln Ala Ala Asn Glu Ser His Asn Gly Ser Ile Leu Pro Ile
145 150 155 160

Ser Trp Arg Trp Gly Glu Ser Asp Met Thr Phe Ile Cys Val Ala Arg
165 170 175

Asn Pro Val Ser Arg Asn Phe Ser Ser Pro Ile Leu Ala Arg Lys Leu
180 185 190

Cys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Asp Ser Ser Met
195 200

<210> 27
<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 27

Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
1 5 10 15

Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro
20 25 30

Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys
35 40 45

<210> 28
<211> 242
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 28

Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln Glu
1 5 10 15

Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro Tyr
20 25 30

Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly Ala
35 40 45

Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln Glu
50 55 60

Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro Ser
65 70 75 80

Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp Asn
85 90 95

Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Tyr
100 105 110

Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg Pro
115 120 125

Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn Leu
130 135 140

Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile Phe
145 150 155 160

Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr His
165 170 175

Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr Asn
180 185 190

Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu Arg
195 200 205

Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr Gly
210 215 220

Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly Val
225 230 235 240

Val His

<210> 29
<211> 287
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 29

Thr Lys Glu Asp Pro Asn Pro Pro Ile Thr Asn Leu Arg Met Lys Ala
1 5 10 15

Lys Ala Gln Gln Leu Thr Trp Asp Leu Asn Arg Asn Val Thr Asp Ile
20 25 30

Glu Cys Val Lys Asp Ala Asp Tyr Ser Met Pro Ala Val Asn Asn Ser
35 40 45

Tyr Cys Gln Phe Gly Ala Ile Ser Leu Cys Glu Val Thr Asn Tyr Thr
50 55 60

Val Arg Val Ala Asn Pro Pro Phe Ser Thr Trp Ile Leu Phe Pro Glu
65 70 75 80

Asn Ser Gly Lys Pro Trp Ala Gly Ala Glu Asn Leu Thr Cys Trp Ile
85 90 95

His Asp Val Asp Phe Leu Ser Cys Ser Trp Ala Val Gly Pro Gly Ala
100 105 110

Pro Ala Asp Val Gln Tyr Asp Leu Tyr Leu Asn Val Ala Asn Arg Arg
115 120 125

Gln Gln Tyr Glu Cys Leu His Tyr Lys Thr Asp Ala Gln Gly Thr Arg
130 135 140

Ile Gly Cys Arg Phe Asp Asp Ile Ser Arg Leu Ser Ser Gly Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ser His Ile Leu Val Arg Gly Arg Ser Ala Ala Phe Gly Ile Pro
165 170 175

Cys Thr Asp Lys Phe Val Val Phe Ser Gln Ile Glu Ile Leu Thr Pro
180 185 190

Pro Asn Met Thr Ala Lys Cys Asn Lys Thr His Ser Phe Met His Trp
195 200 205

Lys Met Arg Ser His Phe Asn Arg Lys Phe Arg Tyr Glu Leu Gln Ile
210 215 220

Gln Lys Arg Met Gln Pro Val Ile Thr Glu Gln Val Arg Asp Arg Thr
225 230 235 240

Ser Phe Gln Leu Leu Asn Pro Gly Thr Tyr Thr Val Gln Ile Arg Ala
245 250 255

Arg Glu Arg Val Tyr Glu Phe Leu Ser Ala Trp Ser Thr Pro Gln Arg
260 265 270

Phe Glu Cys Asp Gln Glu Glu Gly Ala Asn Thr Arg Ala Trp Arg
275 280 285

<210> 30
<211> 272
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 30

Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val
1 5 10 15

Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr
20 25 30

Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly
35 40 45

Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe
50 55 60

Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro
65 70 75 80

Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val
85 90 95

Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
100 105 110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
115 120 125

Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
130 135 140

Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser
145 150 155 160

Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
165 170 175

Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro
180 185 190

Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser
195 200 205

Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu
210 215 220

Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr
245 250 255

Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys
260 265 270

<210> 31
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 31

Pro Ile Cys Val Thr Val
1 5

<210> 32
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 32

Lys Ile Ser His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala
1 5 10 15

His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser
20 25 30

Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser
35 40 45

<210> 33
<211> 480
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 33

Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu Tyr Ala Trp
1 5 10 15

Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Gly
20 25 30

Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn
35 40 45

Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly
50 55 60

Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn
65 70 75 80

Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly
85 90 95

Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg
100 105 110

Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu
115 120 125

Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu
130 135 140

Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu
145 150 155 160

Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile
165 170 175

Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser
180 185 190

His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp Gly Lys
195 200 205

Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Thr Pro Lys
210 215 220

Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg Glu Gly Asp
225 230 235 240

Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Thr
245 250 255

Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys Gln Asn Thr
260 265 270

Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr
275 280 285

Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val
290 295 300

Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu
305 310 315 320

His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser
325 330 335

Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys
340 345 350

Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu
355 360 365

Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly
370 375 380

Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro
385 390 395 400

Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly
405 410 415

Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val
420 425 430

Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu
435 440 445

Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala
450 455 460

Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu
465 470 475 480

<210> 34
<211> 480
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 34

Gln Ser Pro Thr Pro Ser Pro Thr Gly Leu Thr Thr Ala Lys Met Pro
1 5 10 15

Ser Val Pro Leu Ser Ser Asp Pro Leu Pro Thr His Thr Thr Ala Phe
20 25 30

Ser Pro Ala Ser Thr Phe Glu Arg Glu Asn Asp Phe Ser Glu Thr Thr
35 40 45

Thr Ser Leu Ser Pro Asp Asn Thr Ser Thr Gln Val Ser Pro Asp Ser
50 55 60

Leu Asp Asn Ala Ser Ala Phe Asn Thr Thr Gly Val Ser Ser Val Gln
65 70 75 80

Thr Pro His Leu Pro Thr His Ala Asp Ser Gln Thr Pro Ser Ala Gly
85 90 95

Thr Asp Thr Gln Thr Phe Ser Gly Ser Ala Ala Asn Ala Lys Leu Asn
100 105 110

Pro Thr Pro Gly Ser Asn Ala Ile Ser Asp Val Pro Gly Glu Arg Ser
115 120 125

Thr Ala Ser Thr Phe Pro Thr Asp Pro Val Ser Pro Leu Thr Thr Thr
130 135 140

Leu Ser Leu Ala His His Ser Ser Ala Ala Leu Pro Ala Arg Thr Ser
145 150 155 160

Asn Thr Thr Ile Thr Ala Asn Thr Ser Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Ser
165 170 175

Glu Thr Thr Thr Leu Ser Pro Ser Gly Ser Ala Val Ile Ser Thr Thr
180 185 190

Thr Ile Ala Thr Thr Pro Ser Lys Pro Thr Cys Asp Glu Lys Tyr Ala
195 200 205

Asn Ile Thr Val Asp Tyr Leu Tyr Asn Lys Glu Thr Lys Leu Phe Thr
210 215 220

Ala Lys Leu Asn Val Asn Glu Asn Val Glu Cys Gly Asn Asn Thr Cys
225 230 235 240

Thr Asn Asn Glu Val His Asn Leu Thr Glu Cys Lys Asn Ala Ser Val
245 250 255

Ser Ile Ser His Asn Ser Cys Thr Ala Pro Asp Lys Thr Leu Ile Leu
260 265 270

Asp Val Pro Pro Gly Val Glu Lys Phe Gln Leu His Asp Cys Thr Gln
275 280 285

Val Glu Lys Ala Asp Thr Thr Ile Cys Leu Lys Trp Lys Asn Ile Glu
290 295 300

Thr Phe Thr Cys Asp Thr Gln Asn Ile Thr Tyr Arg Phe Gln Cys Gly
305 310 315 320

Asn Met Ile Phe Asp Asn Lys Glu Ile Lys Leu Glu Asn Leu Glu Pro
325 330 335

Glu His Glu Tyr Lys Cys Asp Ser Glu Ile Leu Tyr Asn Asn His Lys
340 345 350

Phe Thr Asn Ala Ser Lys Ile Ile Lys Thr Asp Phe Gly Ser Pro Gly
355 360 365

Glu Pro Gln Ile Ile Phe Cys Arg Ser Glu Ala Ala His Gln Gly Val
370 375 380

Ile Thr Trp Asn Pro Pro Gln Arg Ser Phe His Asn Phe Thr Leu Cys
385 390 395 400

Tyr Ile Lys Glu Thr Glu Lys Asp Cys Leu Asn Leu Asp Lys Asn Leu
405 410 415

Ile Lys Tyr Asp Leu Gln Asn Leu Lys Pro Tyr Thr Lys Tyr Val Leu
420 425 430

Ser Leu His Ala Tyr Ile Ile Ala Lys Val Gln Arg Asn Gly Ser Ala
435 440 445

Ala Met Cys His Phe Thr Thr Lys Ser Ala Pro Pro Ser Gln Val Trp
450 455 460

Asn Met Thr Val Ser Met Thr Ser Asp Asn Ser Met His Val Lys Cys
465 470 475 480

<210> 35
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 35

Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
50 55 60

Arg
65

<210> 36
<211> 153
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 36

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

Val Thr Asn Ser Gly Ile His Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala
20 25 30

Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu
35 40 45

Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu
50 55 60

Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys
65 70 75 80

Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala
85 90 95

Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser
100 105 110

Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu
115 120 125

Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His
130 135 140

Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
145 150

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種經工程改造之細胞，其包含：

(i.) 第一嵌合抗原受體多肽，其包含第一抗原識別域、第一信號肽、第一鉸鏈區、第一跨膜域、第一共刺激域及第一信號傳導域；及

(ii.) 第二嵌合抗原受體多肽，其包含第二抗原識別域、第二信號肽、第二鉸鏈區、第二跨膜域、第二共刺激域及第二信號傳導域；

其中該第一抗原識別域與該第二抗原識別域不同。

【請求項2】

如請求項1之經工程改造之細胞，其中該第一嵌合抗原受體多肽及該經工程改造之第二嵌合多肽位於單一多肽分子上，且其中包含高效裂解位點之胺基酸序列安置在該第一嵌合抗原受體多肽與該第二嵌合抗原受體多肽之間。

【請求項3】

如請求項2之經工程改造之細胞，其中該高效裂解位點係選自由以下組成之群：P2A、T2A、E2A及F2A。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一共刺激域與該第二共刺激域不同。

【請求項5】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一共刺激域包含CD28，且該第二共刺激域包含4-1BB。

【請求項6】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶係選自由以下組成之群：介白素6受體、NY-ESO-1、α胎蛋白(AFP)、磷脂醯肌醇蛋白聚醣-3 (GPC3)、BCMA、BAFF-R、BCMA、TACI、LeY、CD5、CD13、CD14、CD15 CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受體及CS1；且該第二抗原識別域之標靶係選自由以下組成之群：介白素6受體、NY-ESO-1、α胎蛋白(AFP)、磷脂醯肌醇蛋白聚醣-3 (GPC3)、BCMA、BAFF-R、BCMA、TACI、LeY、CD5、CD13、CD14、CD15 CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受體及CS1。

【請求項7】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶包含CD267或CD269；且該第二抗原識別域之標靶係選自由以下組成之群：CD19、CD38、CD138、CD138及CS1。

【請求項8】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶包含CD19；且該第二抗原識別域之標靶係選自由以下組成之群：CD20、CD22、CD33、CD123、CD267、CD269、CD38及CS1。

【請求項9】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶包含CD19；且該第二抗原識別域之標靶係選自由以下

組成之群：CD20、CD22及CD123。

【請求項10】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶包含CD33；且該第二抗原識別域之標靶包含LeY或CD123。

【請求項11】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶包含BCMA；且該第二抗原識別域之標靶包含CS1、CD19、CD38、CD138或CS1。

【請求項12】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該經工程改造之細胞為T細胞或自然殺手細胞。

【請求項13】

如請求項12中任一項之經工程改造之細胞，其中該T細胞為CD4 T細胞或CD8 T細胞。

【請求項14】

如請求項12中任一項之經工程改造之細胞，其中該自然殺手細胞為NKT細胞或NK-92細胞。

【請求項15】

一種經工程改造之多肽，其包含嵌合抗原受體多肽及強化子。

【請求項16】

如請求項15之經工程改造之多肽，其中該嵌合抗原受體多肽包含對選自由以下組成之群的標靶具有選擇性的抗原識別域：CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD45及CD52。

【請求項17】

如請求項15之經工程改造之多肽，其中該嵌合抗原受體多肽包含對選自由以下組成之群的標靶具有選擇性之抗原識別域：CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38及CS1。

【請求項18】

如請求項15之經工程改造之多肽，其中該嵌合抗原受體多肽包含該CD45抗原識別域。

【請求項19】

如請求項15至18中任一項之經工程改造之多肽，其中該強化子係選自由以下組成之群：PD-1、PD-L1、CSF1R、CTAL-4、TIM-3、TGFRβ、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、其功能片段及其組合。

【請求項20】

如請求項15至18中任一項之經工程改造之多肽，其中該經工程改造之多肽進一步包含強化子受體或其功能片段。

【請求項21】

如請求項20之經工程改造之多肽，其中該強化子受體包含IL-15RA或其功能片段。

【請求項22】

如請求項21之經工程改造之多肽，其中該功能片段包含sushi域。

【請求項23】

如請求項15至18中任一項之經工程改造之多肽，其中嵌合抗原受體多肽及強化子位於單一多肽分子上。

【請求項24】

如請求項23之經工程改造之多肽，其中高效裂解位點安置在該嵌合抗原受體與強化子之間。

【請求項25】

如請求項24之經工程改造之多肽，其中該高效裂解位點係選自由以下組成之群：P2A、T2A、E2A及F2A。

【請求項26】

如請求項15至18、21至22及24至25中任一項之經工程改造之多肽，其中該嵌合抗原受體多肽包含對選自由以下組成之群的標靶具有選擇性之抗原識別域：CD2、CD4及CD19；且該強化子包含IL-15或IL-15RA。

【請求項27】

一種經工程改造之聚核苷酸，該聚核苷酸編碼如請求項15至18、21至22及24至25之多肽中之任一者。

【請求項28】

如請求項27之經工程改造之聚核苷酸，其中該聚核苷酸位於載體中。

【請求項29】

一種經工程改造之細胞，其包含如請求項15至18、21至22及24至25中任一項之多肽。

【請求項30】

一種經工程改造之細胞，其包含如請求項24至25中任一項之聚核苷酸。

【請求項31】

如請求項30之經工程改造之細胞，其中該經工程改造之細胞包含T細胞或自然殺手細胞。

【請求項32】

如請求項31中任一項之經工程改造之細胞，其中該細胞為T細胞或自然殺手細胞。

【請求項33】

如請求項32中任一項之經工程改造之細胞，其中該T細胞為CD4 T細胞或CD8 T細胞。

【請求項34】

如請求項31中任一項之經工程改造之細胞，其中該自然殺手細胞為NKT細胞或NK-92細胞。

【請求項35】

一種治療B細胞淋巴瘤之方法，其包含向有需要之患者投與如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞。

【請求項36】

一種治療T細胞淋巴瘤之方法，其包含向有需要之患者投與如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞。

【請求項37】

一種治療多發性骨髓瘤之方法，其包含向有需要之患者投與如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞。

【請求項38】

一種治療慢性骨髓性白血病之方法，其包含向有需要之患者投與如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶包含CD33；且該第二抗原識別域之標靶包含CD123。

【請求項39】

一種治療B細胞急性淋巴母細胞白血病(B-ALL)之方法，其包含向有需要之患者投與如請求項1至3之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶包含CD19；且該第二抗原識別域之標靶包含CD123。

【請求項40】

一種治療多發性骨髓瘤之方法，其包含向有需要之患者投與如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶係選自由以下組成之群：CD38、CS1、BCMA及CD38；且該第二抗原識別域之標靶係選自由以下組成之群：CD38、CS1、BCMA及CD38。

【請求項41】

一種治療細胞增殖性疾病之方法，其包含向有需要之患者投與如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶係選自由以下組成之群：BCMA、TAC1、CS1及BAFF-R；且該第二抗原識別域之標靶係選自由以下組成之群：BCMA、TAC1、CS1及BAFF-R。

【請求項42】

如請求項41之治療細胞增殖性疾病之方法，其中該細胞增殖性疾病係選自由以下組成之群：淋巴瘤、白血病及漿細胞贅瘤。

【請求項43】

如請求項42之治療細胞增殖性疾病之方法，其中漿細胞贅瘤選自漿細胞白血病、多發性骨髓瘤、漿細胞瘤、澱粉樣變性、瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症(waldestrom's macroglobulinema)、重鏈疾病、孤

立性骨漿細胞瘤、意義不明確之單株球蛋白症(MGUS)及鬱積型多發性骨髓瘤。

【請求項44】

一種治療細胞增殖性疾病之方法，其包含：向有需要之患者投與如請求項30之經工程改造之細胞。

【請求項45】

一種治療細胞增殖性疾病之方法，其包含：向有需要之患者投與包含嵌合抗原受體多肽之經工程改造之細胞，該嵌合抗原受體多肽具有對選自由以下組成之群的標靶具選擇性的抗原識別域：介白素6受體、NY-ESO-1、α胎蛋白(AFP)、磷脂醯肌醇蛋白聚醣-3 (GPC3)、BCMA、BAFF-R、TACI、LeY、CD5、CD13、CD14、CD15、CD45、CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受體及CS1；及CAR增強劑。

【請求項46】

如請求項45之治療細胞增殖性疾病之方法，其中該CAR增強劑係選自由以下組成之群：靶向免疫核查點路徑之藥劑；群落刺激因子-1受體(CSF1R)、PD-1、PD-L1、IL-2、IL-12、IL-15、CSF1R、CTAL-4、TIM-3及TGFRβ之抑制劑。

【請求項47】

一種治療細胞增殖性疾病之方法，其包含向有需要之患者投與經工程改造之細胞，該細胞包含如請求項1至3中任一項之經工程改造之多肽。

【請求項48】

一種經工程改造之嵌合抗原受體多肽，該多肽包含：信號肽、CD45抗原識別域、鉸鏈區、跨膜域、至少一個共刺激域及信號傳導域。

【請求項49】

如請求項48之經工程改造之嵌合抗原受體多肽，其中該CD45抗原識別域包含對CD45具有選擇性之單株抗體之結合部分或可變區。

【請求項50】

如請求項48至49中任一項之經工程改造之嵌合抗原受體多肽，其中該CD45抗原識別域包含CD45 scFv。

【請求項51】

如請求項48至49中任一項之經工程改造之嵌合抗原受體多肽，其中該鉸鏈區包含選自由以下組成之群的人類蛋白質之鉸鏈區：CD-8α、CD28、4-1BB、OX40、CD3-ζ、其功能衍生物及其組合。

【請求項52】

如請求項48至49中任一項之經工程改造之嵌合抗原受體多肽，其中該跨膜域包含選自由以下組成之群的人類蛋白質之跨膜區：CD-8α、CD28、4-1BB、OX40、CD3-ζ、其功能衍生物及其組合。

【請求項53】

如請求項48至49中任一項之經工程改造之嵌合抗原受體多肽，其中該信號傳導域包含選自由以下組成之群的信號傳導域：CD3ζ、共同FcRγ (FCER1G)、FcγRlla、FcRβ (FcεRib)、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD79a、CD79b、DAP10、DAP12、其活性片段及其組合。

【請求項54】

如請求項48至49中任一項之經工程改造之嵌合抗原受體多肽，

其中該共刺激域包含來自選自由以下組成之群的蛋白質之共刺激域：OX40、CD27、CD28、CD30、CD40、PD-1、CD2、CD7、CD258、NKG2C、NKG2D、B7-H3、結合於CD83、ICAM-1、LFA-1 (CDl la/CD18)、ICOS及4-1BB (CD137)之配位體、其活性片段及其組合。

【請求項55】

一種經工程改造之聚核苷酸，其編碼如請求項48至49中任一項之多肽。

【請求項56】

如請求項55之經工程改造之聚核苷酸，其中該聚核苷酸位於載體中。

【請求項57】

一種經工程改造之細胞，其包含如請求項55之聚核苷酸。

【請求項58】

一種經工程改造之細胞，其包含如請求項48至49中任一項之多肽。

【請求項59】

如請求項57之經工程改造之細胞，其中該細胞為T細胞或自然殺手細胞。

【請求項60】

如請求項59之經工程改造之細胞，其中該T細胞為CD4 T細胞或CD8 T細胞。

【請求項61】

如請求項59之經工程改造之細胞，其中該自然殺手細胞為NKT細胞或NK-92細胞。

【請求項62】

一種減少標靶細胞數目之方法，該方法包含以下步驟：

i. 使該等標靶細胞與有效量之如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞接觸；及

ii. 視情況分析該等細胞之數目之減少；

其中該等標靶細胞包含至少一種選自由以下組成之群的細胞表面抗原：介白素6受體、NY-ESO-1、α胎蛋白(AFP)、磷脂醯肌醇蛋白聚醣-3 (GPC3)、BCMA、BAFF-R、TACI、LeY、CD5、CD13、CD14、CD15 CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD45、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受體及CS1。

【請求項63】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶包含BCMA；且該第二抗原識別域包含CS1。

【請求項64】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶包含CD19；且該第二抗原識別域包含BCMA。

【請求項65】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶包含CD19；且該第二抗原識別域之標靶包含CD22。

【請求項66】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶包含CD19；且該第二抗原識別域之標靶包含CD20。

【請求項67】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶包含CD19；且該第二抗原識別域之標靶包含CD123。

【請求項68】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶包含CD33；且該第二抗原識別域之標靶包含CD123。

【請求項69】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一抗原識別域之標靶包含CD269；且該第二抗原識別域之標靶包含CS1。

【請求項70】

如請求項29之經工程改造之細胞，其中該抗原識別域之標靶包含CD4且該強化子包含IL-15RA。

【請求項71】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中TAC1抗原識別域包含APRIL配位體或BAFF配位體或其一部分。

【請求項72】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該BCMA抗原識別域包含APRIL配位體或BAFF配位體或其一部分。

【請求項73】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該BAFF-R抗原識別域包含BAFF配位體或其一部分。

【請求項74】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一共刺激域與該第二共刺激域相同。

【請求項75】

如請求項1至3中任一項之經工程改造之細胞，其中該第一共刺激域及該第二共刺激域包含4-1BB共刺激域。

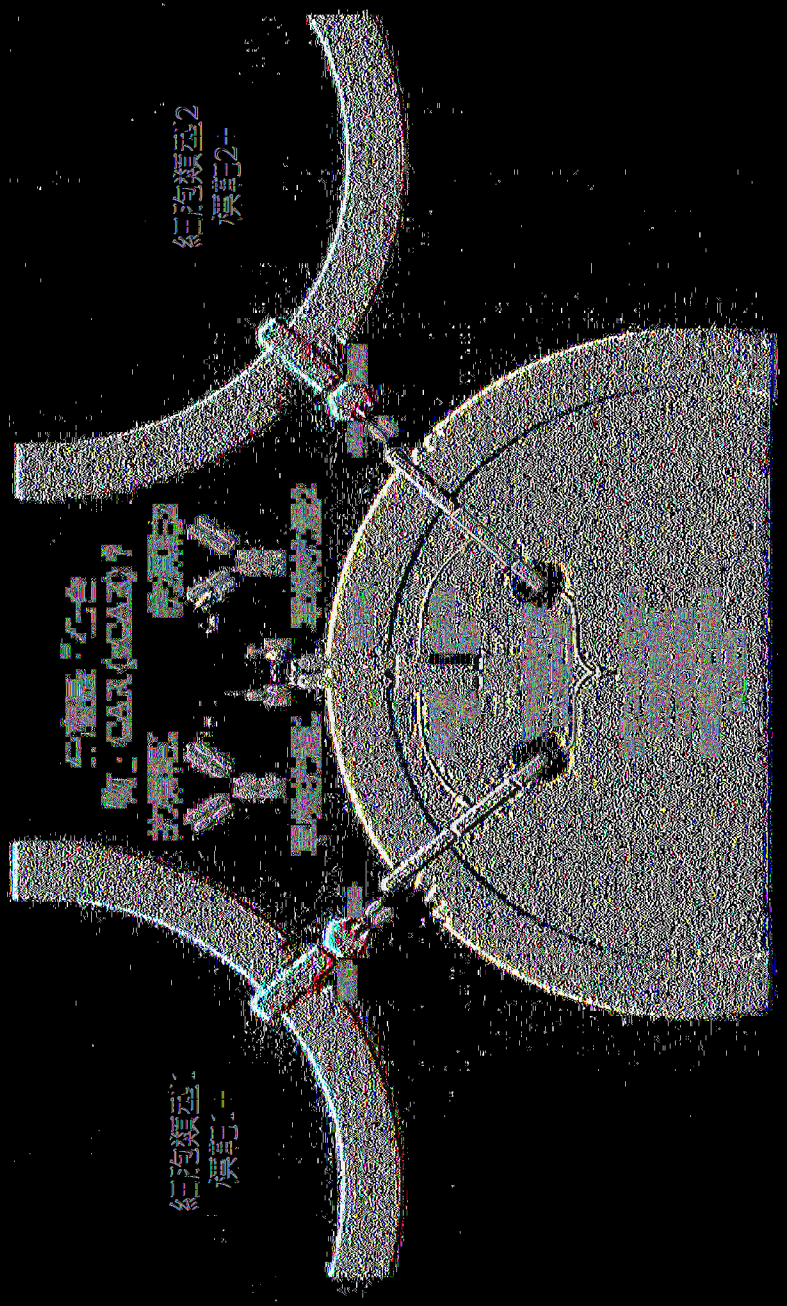
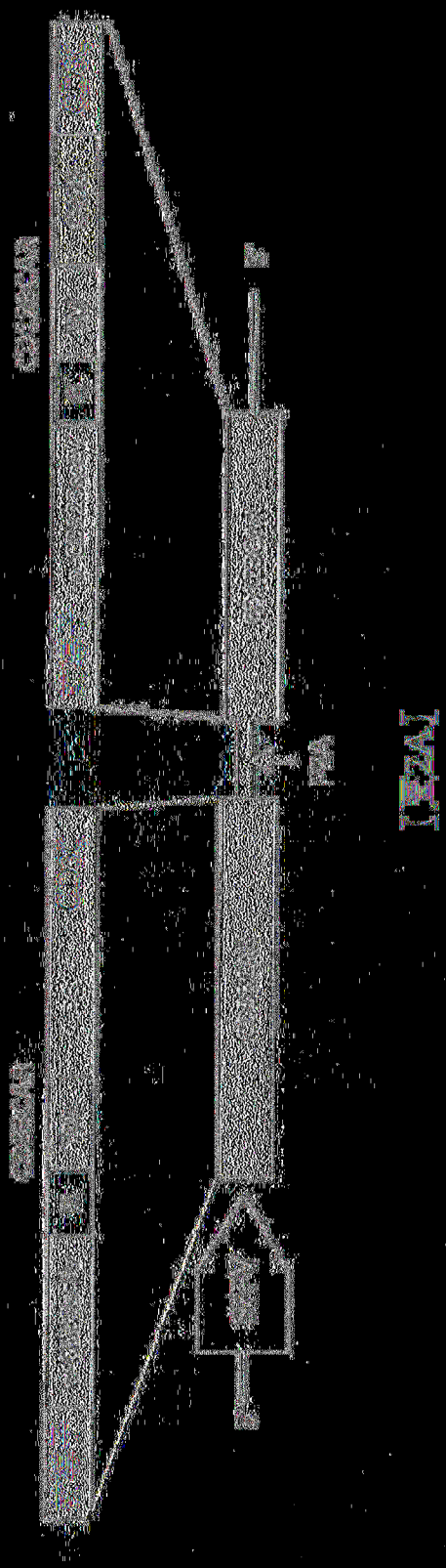
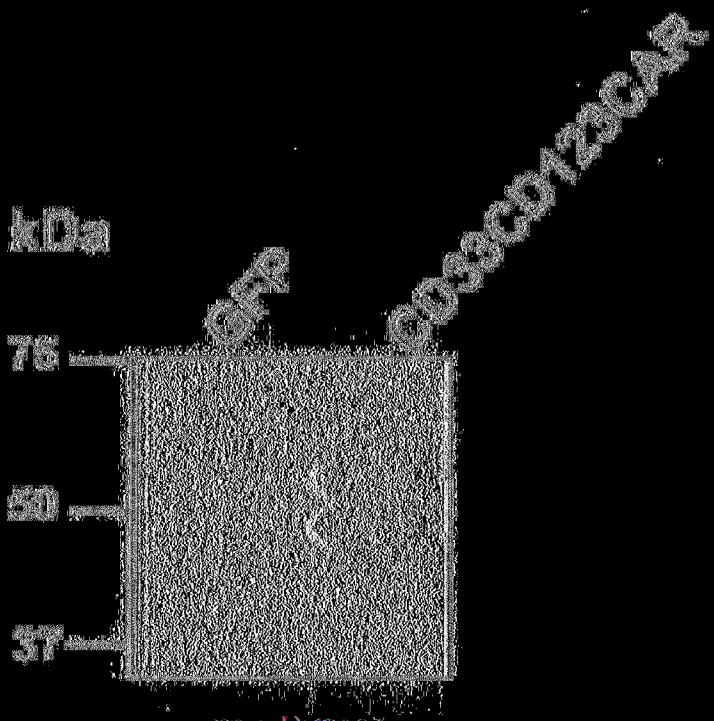

第一流體流路
第二流體流路
第一流體流路2
第二流體流路2
第一CAR/MAT
第二CAR/MAT
第一流體
第二流體

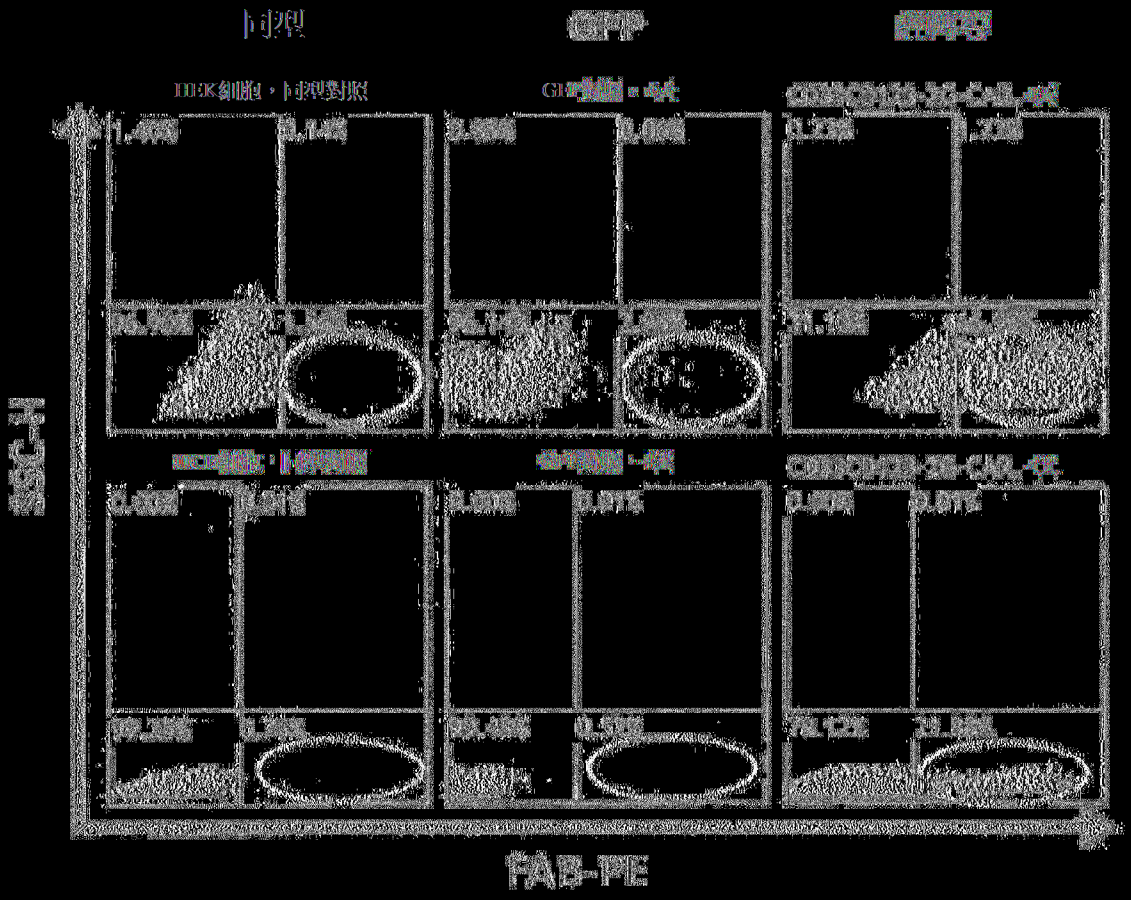
圖1


[圖7]

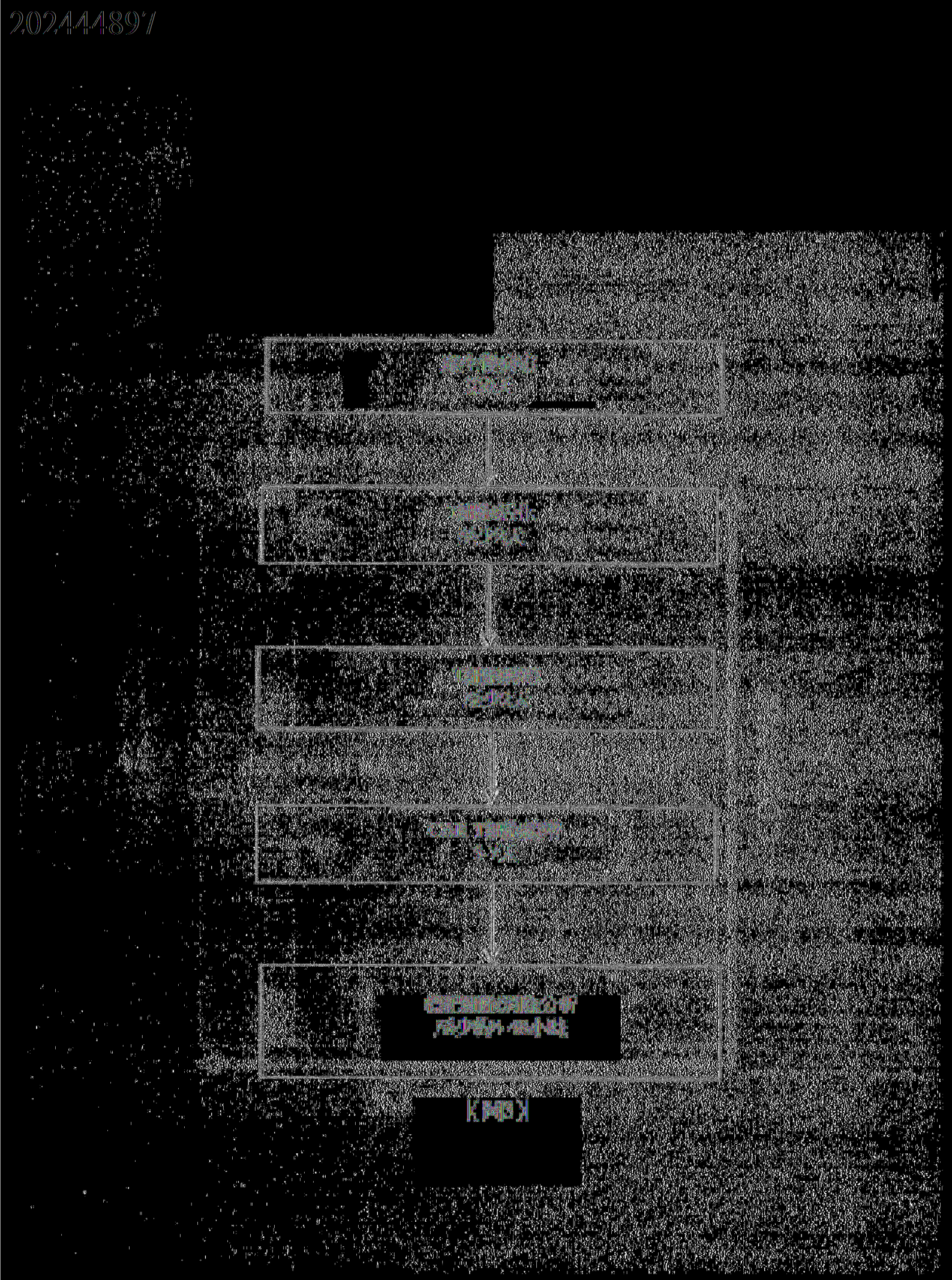


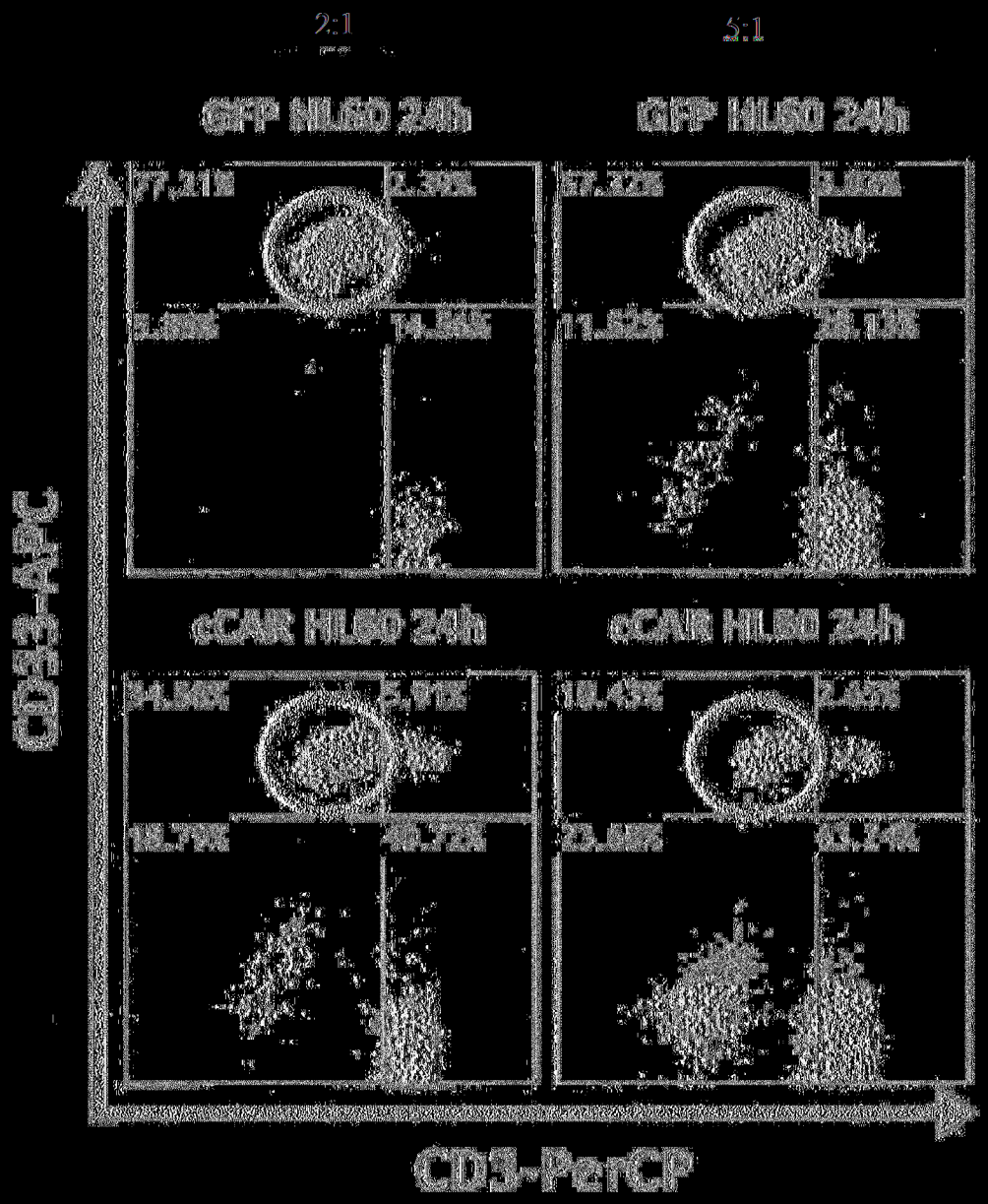
IB：抗CD3ζ

[圖2B]


時程
GPP
DDK細胞，時程對照
GDF表現 ＝ 模式
CDK2/CYB-2B-CAIL-4F
WNT表現，時程表現
細胞表現 ＝ 模式
CDK2/CYB-2B-CAIL-4F
HESC-H9
FAB-HE

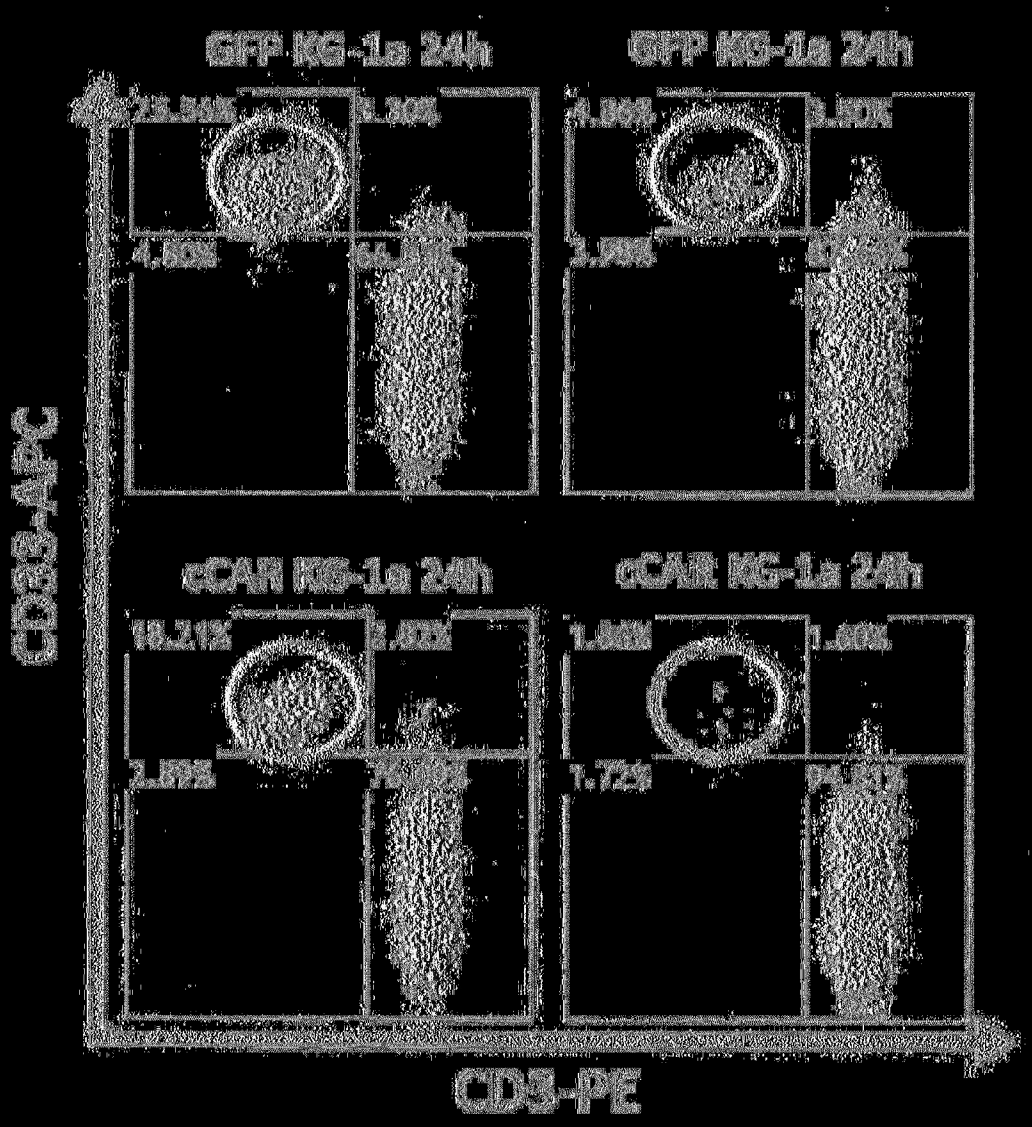
|(H2C)|


[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]

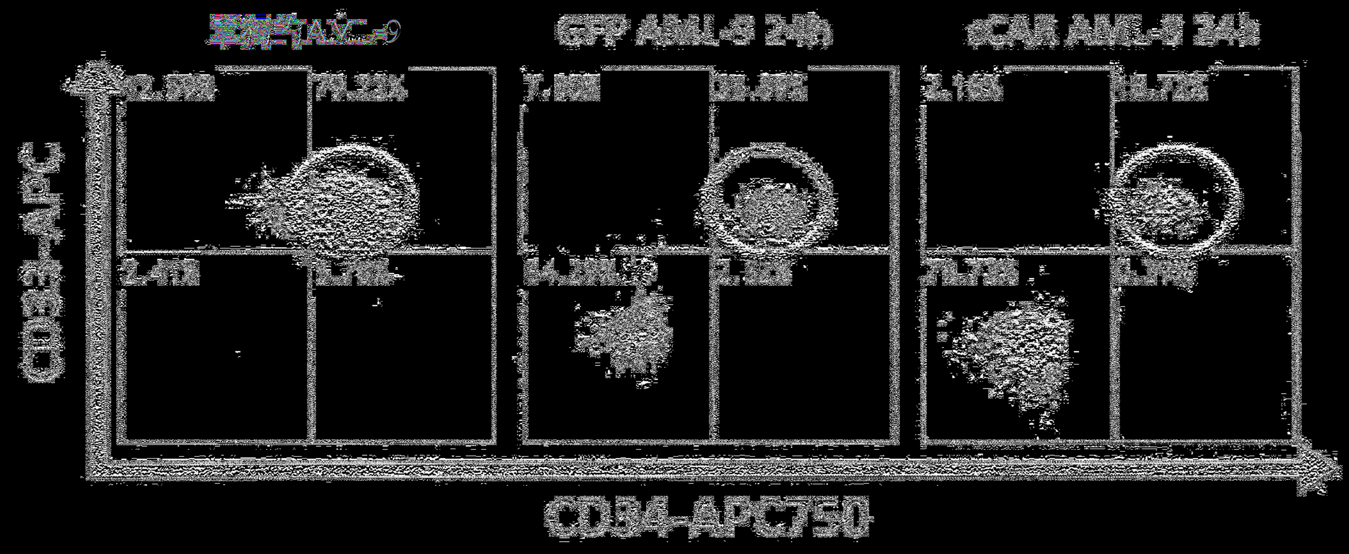

2:1
5:1
GFP HL60 24h
GFP HL60 24h
77.21%
1.39%
2.08%
14.84%
57.32%
1.06%
11.52%
30.10%
cCAR HL60 24h
cCAR HL60 24h
4.06%
5.71%
18.77%
71.72%
10.43%
1.47%
23.06%
64.74%
CD3-APC
CD3-PerCP

圖(圖4)

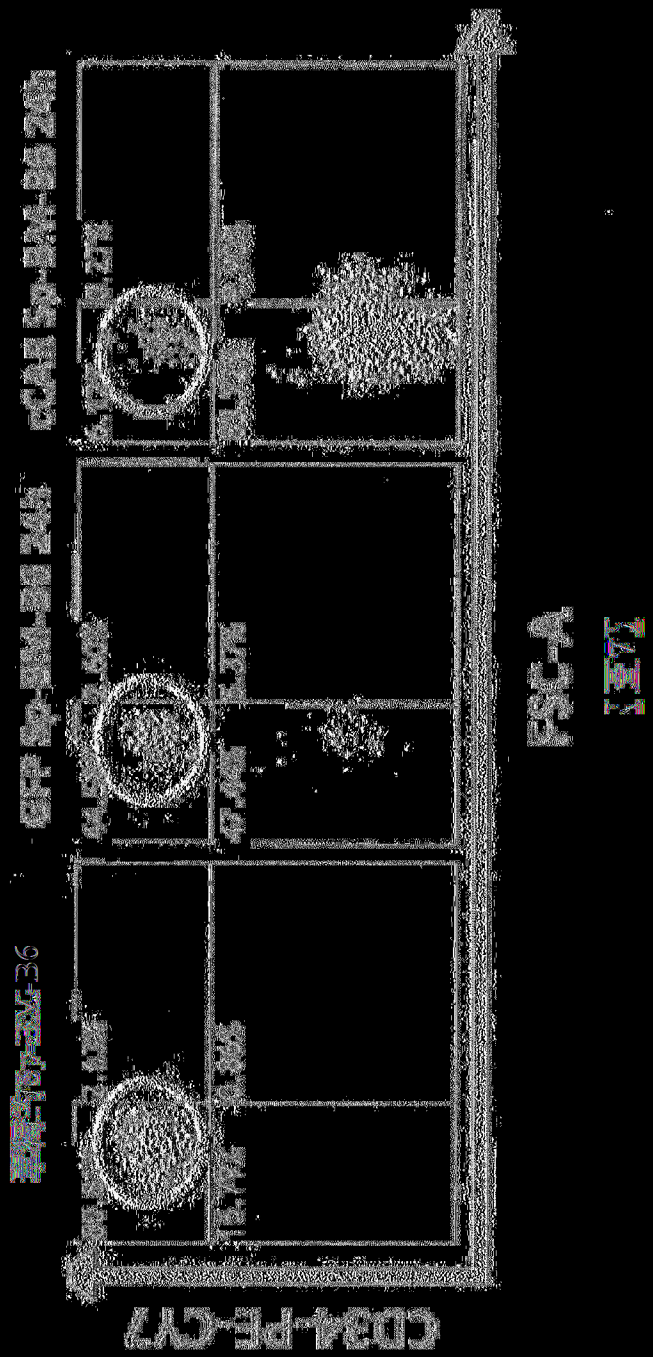
2:1　　10:1

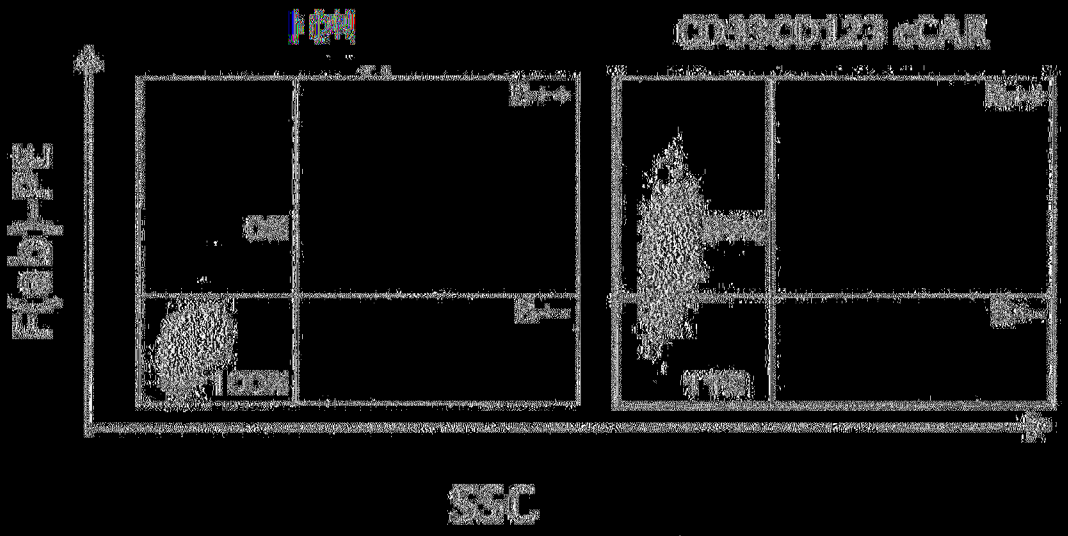

GFP KG-1a 24h
GFP KG-1a 24h
cCAR KG-1a 24h
cCAR KG-1a 24h
CD69-APC
CD3-PE

代表圖

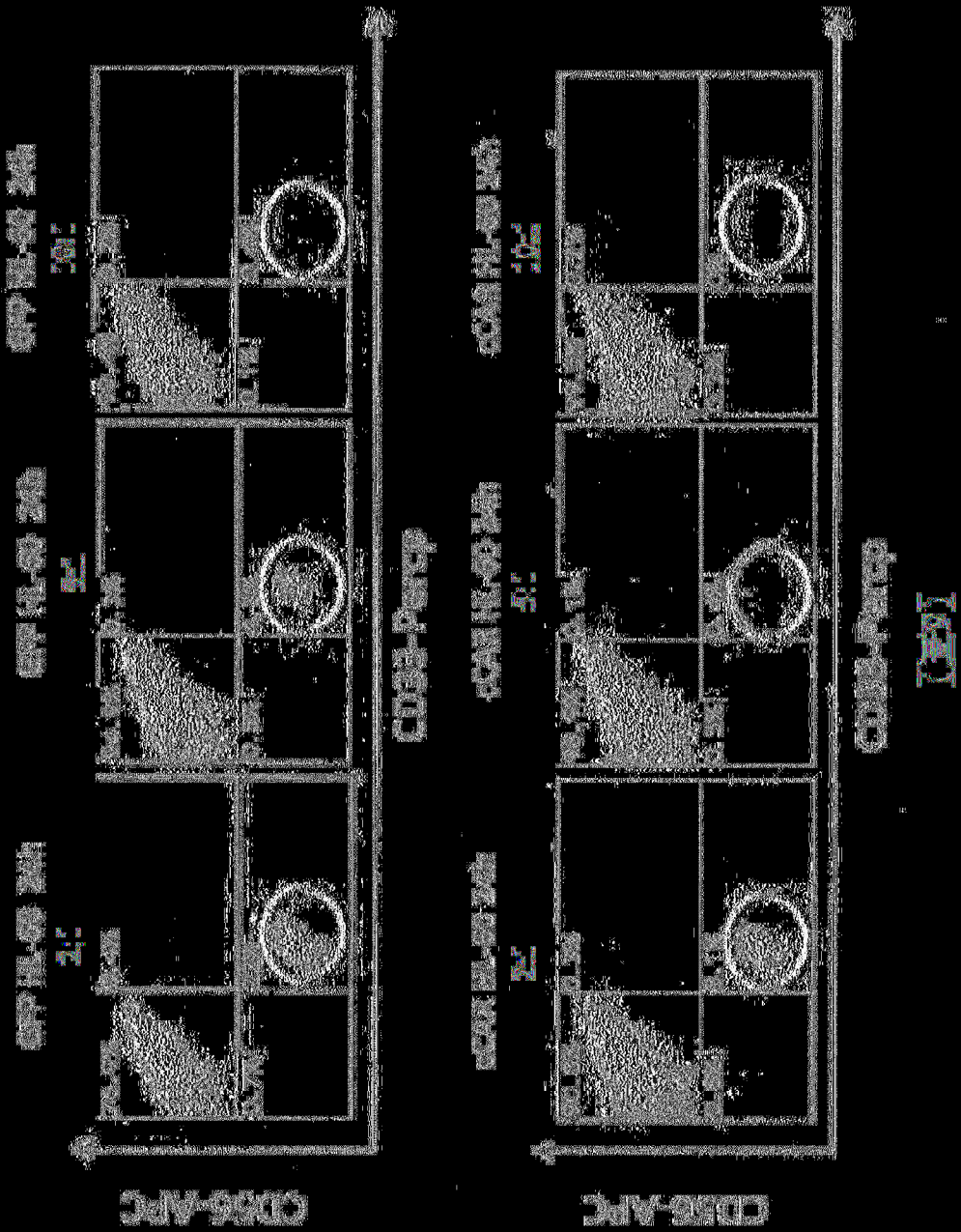

AML-9
GFP AML-9 24h
sCAR AML-9 24h
12.59%
79.22%
2.41%
7.10%
28.59%
64.29%
2.16%
18.72%
78.73%
CD33-APC
CD34-APC750

【圖6】





|(圖8)|


CDR-ARC
CDR-Power
CDR-ARC

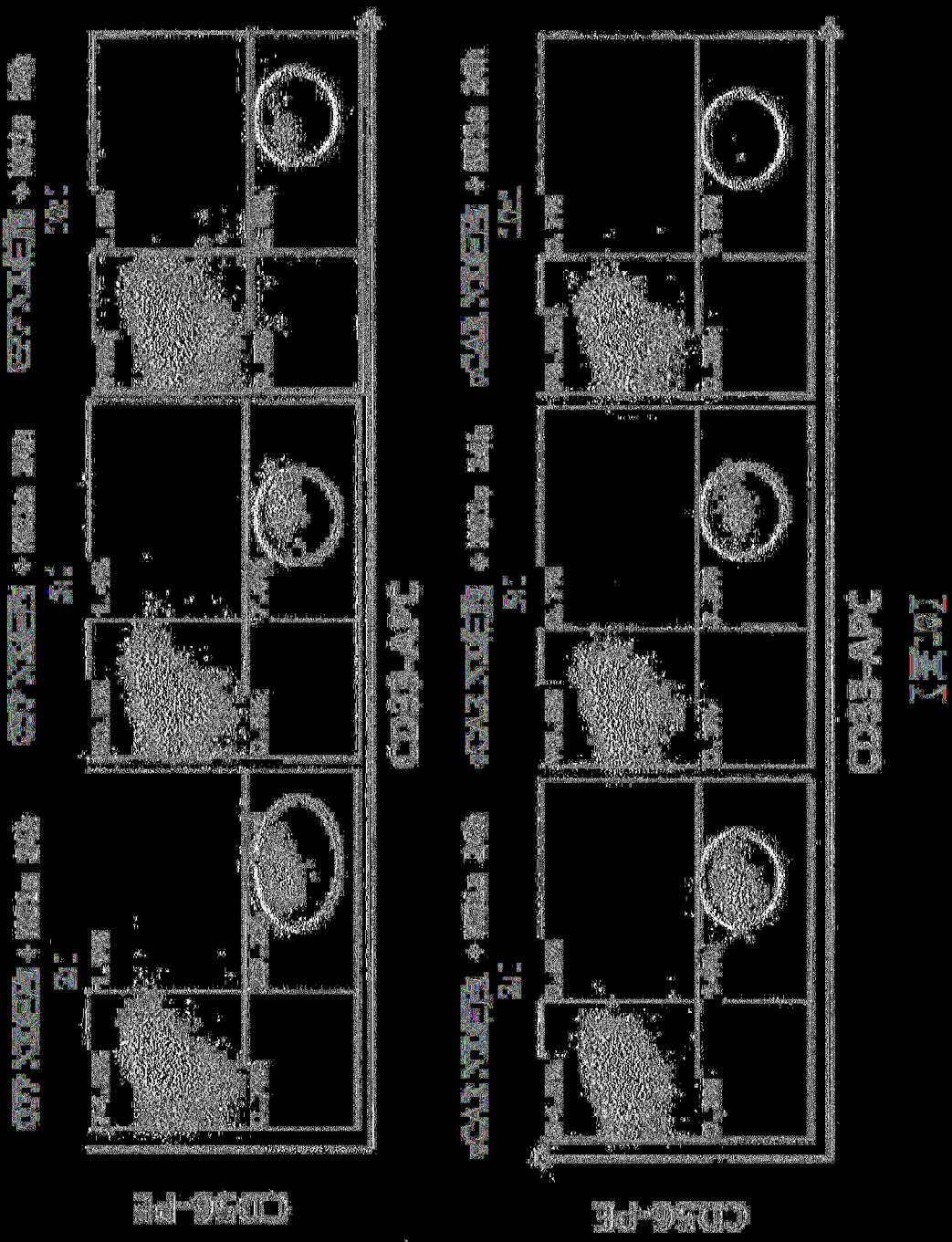

COSCO-PE
COSLANT
COSCO-PE
COSLANT

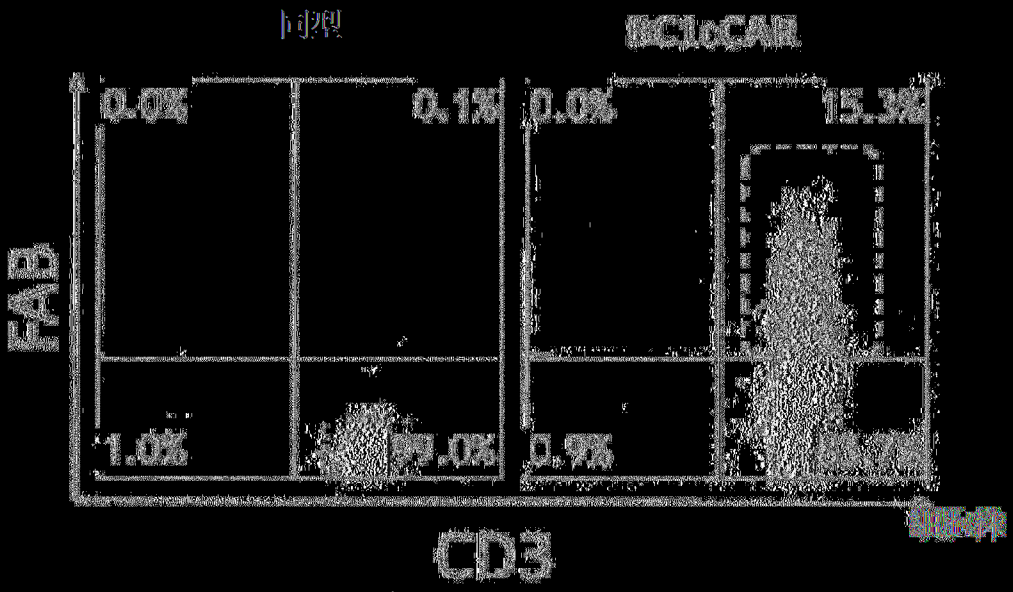
図11

図GHP-NKA11に、
送信データ(CD3)を付加した状態を示す。

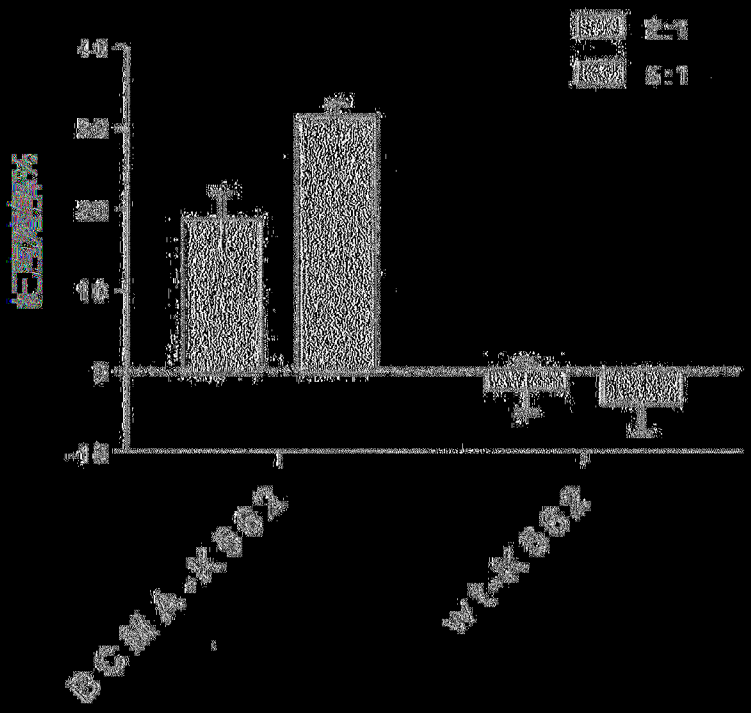
圖1E1

與GHP-NK細胞，
活化的CD4+T細胞

圖1



|(圖14B)|



（圖14C）

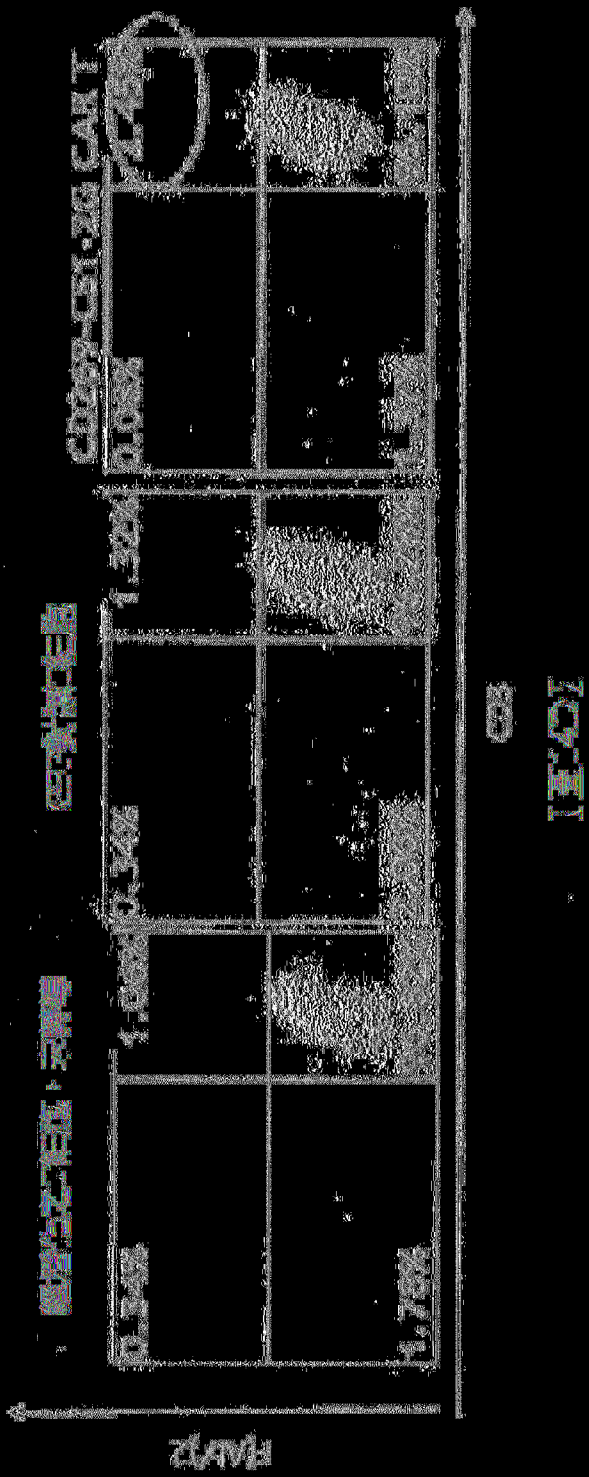
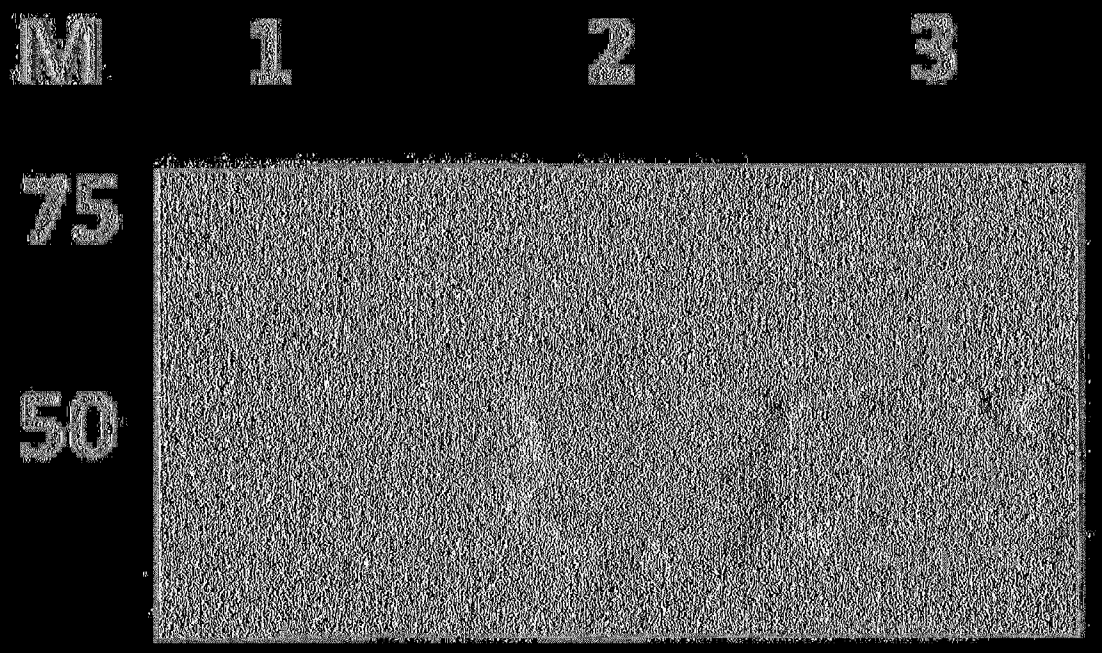


FIG.1
B
FIG.2



|(圖14E)|

CMTMR
ROMA
第二圖

第一圖

CMTMR
CMTMR
第

CMTMR
ECMA
CMTMR
CSI

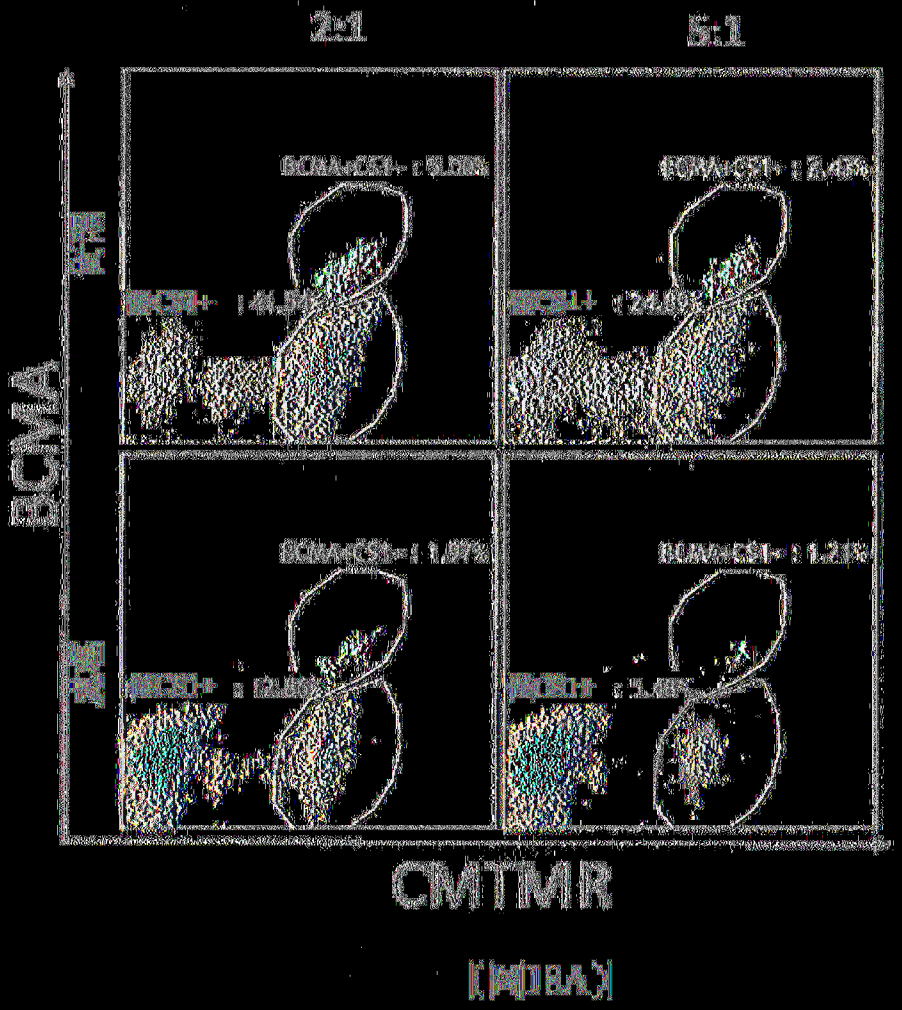
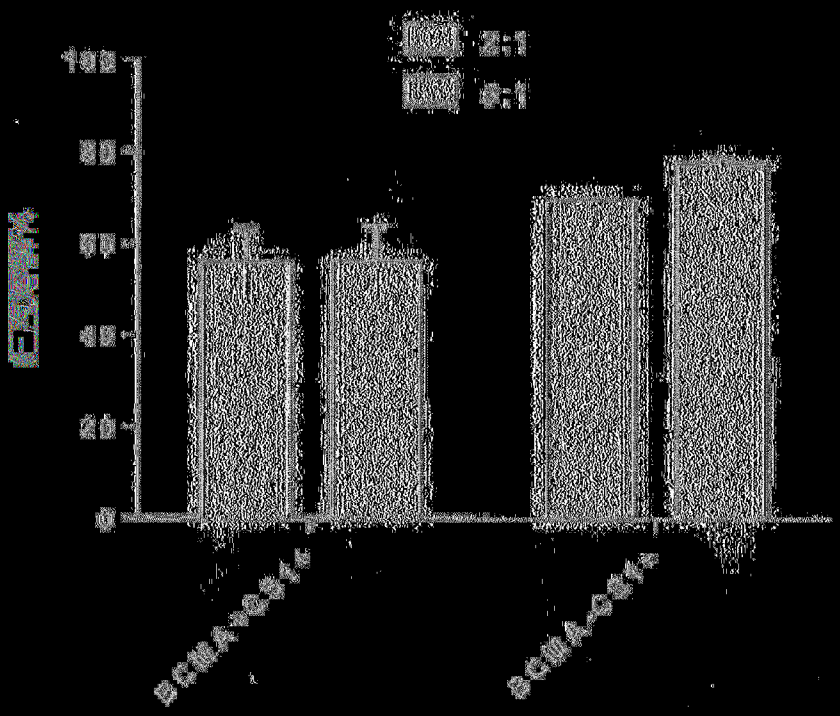
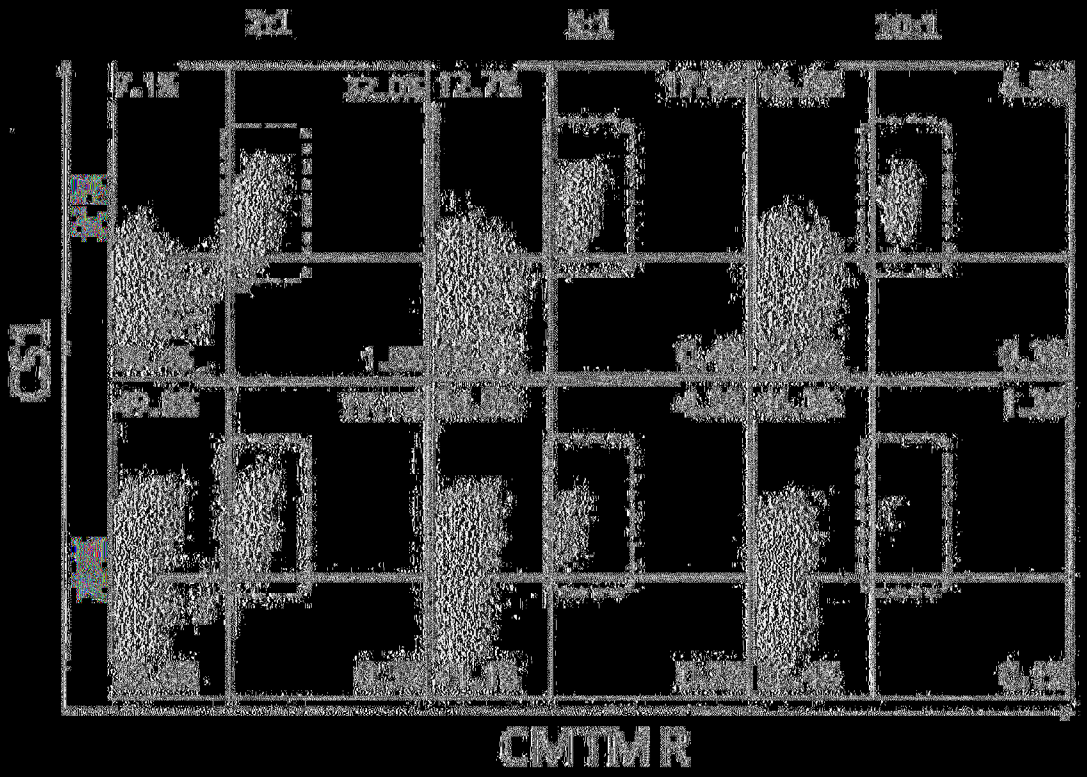


圖 [illegible]

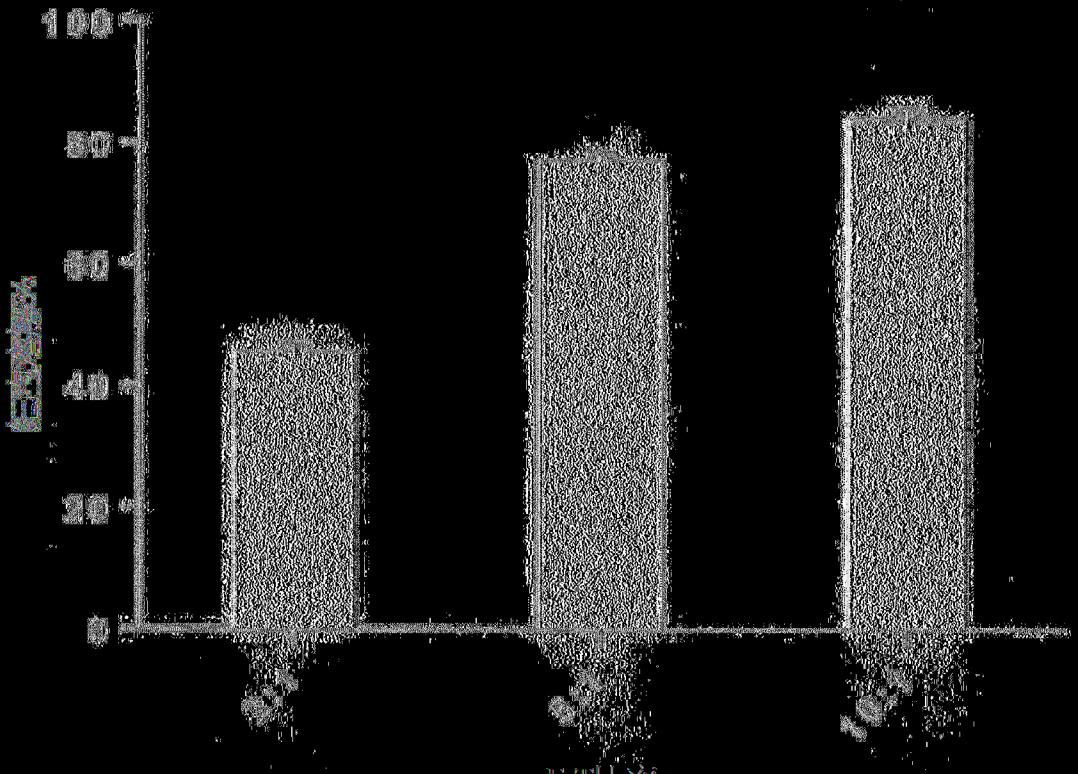


表現

|(圖18B)|

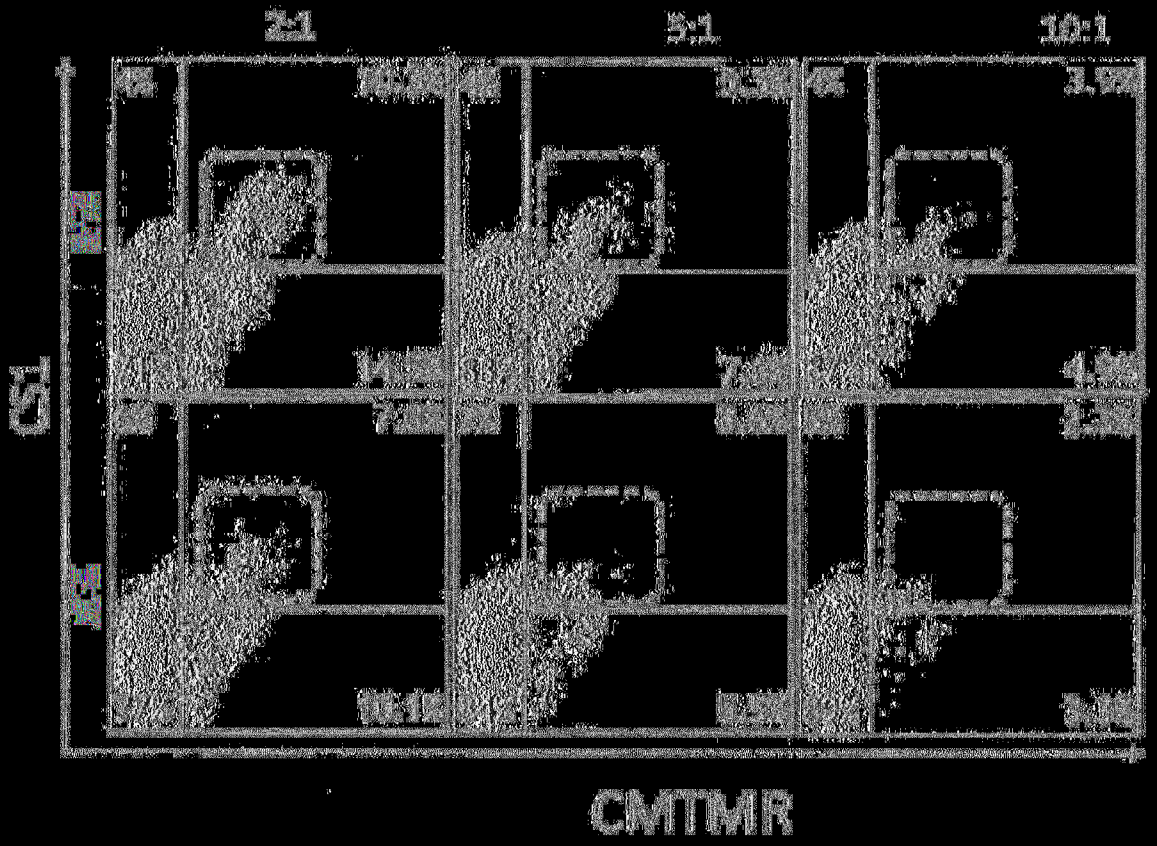


【圖15A】



[illegible]

[(圖19B)]



|(圖20A)|

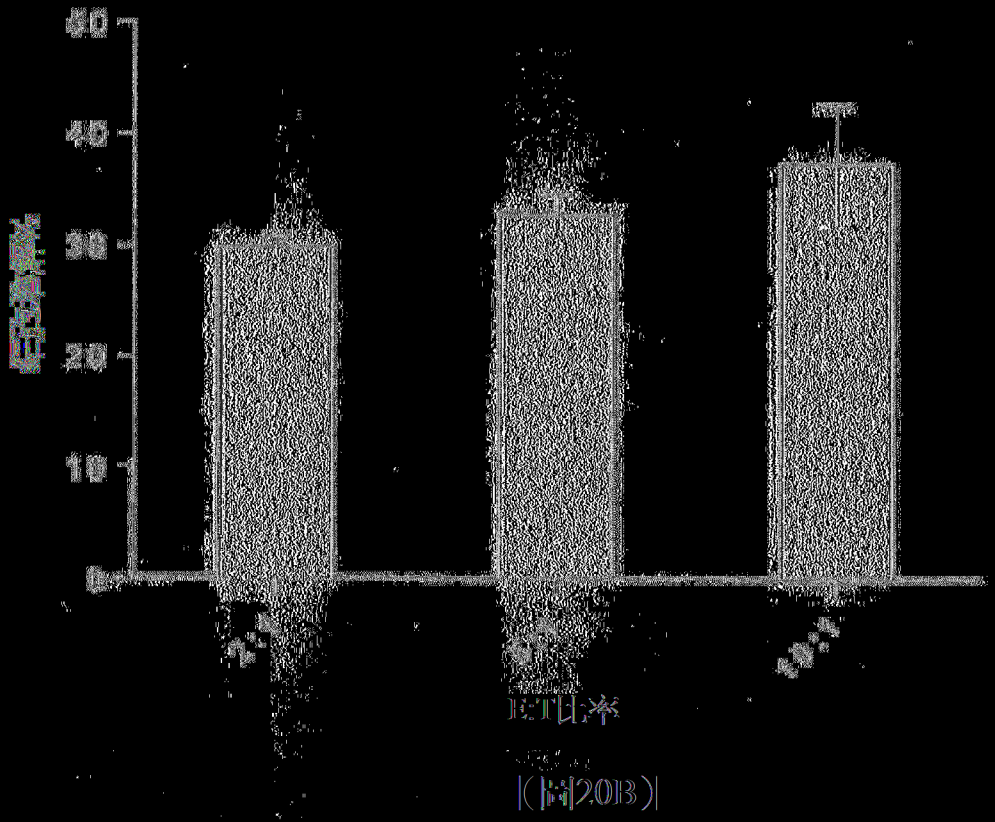
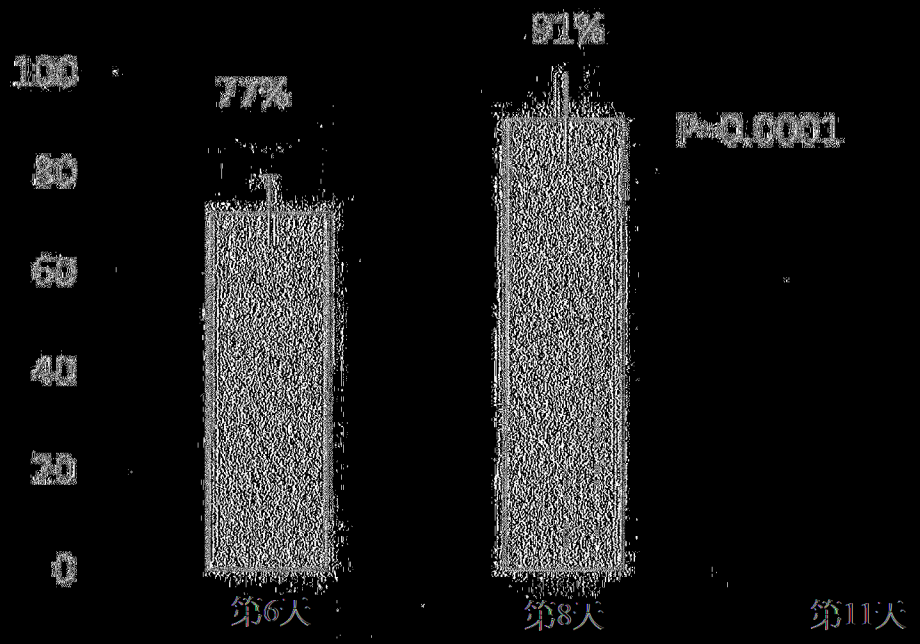


圖20B

圖29



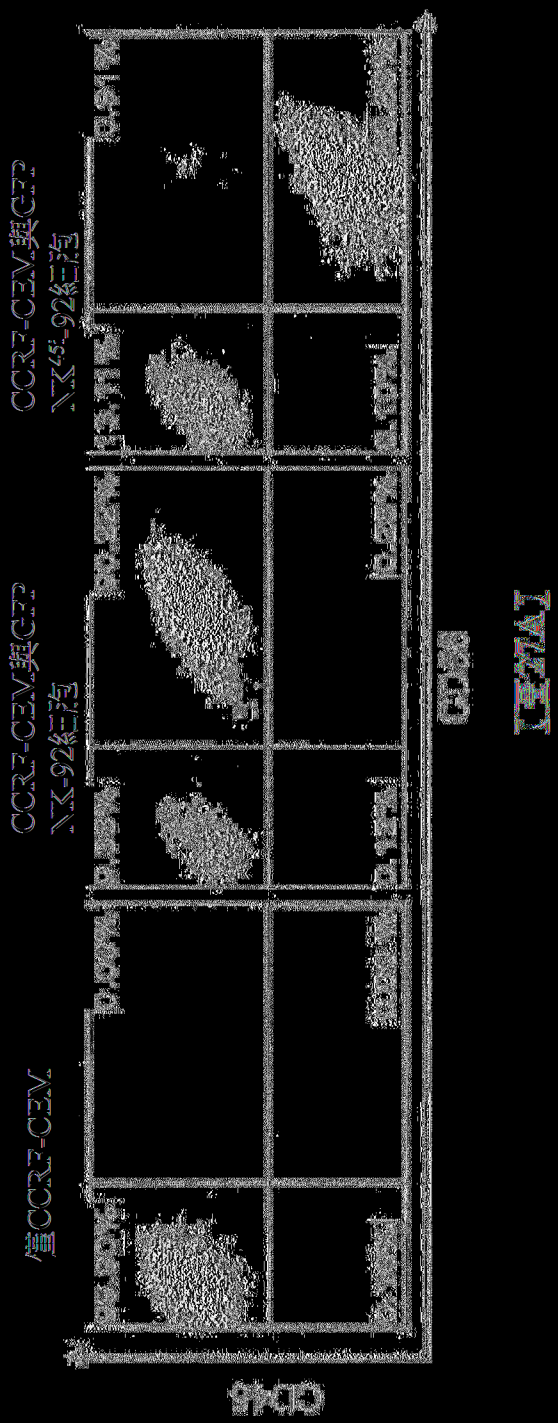
|(圖22)|

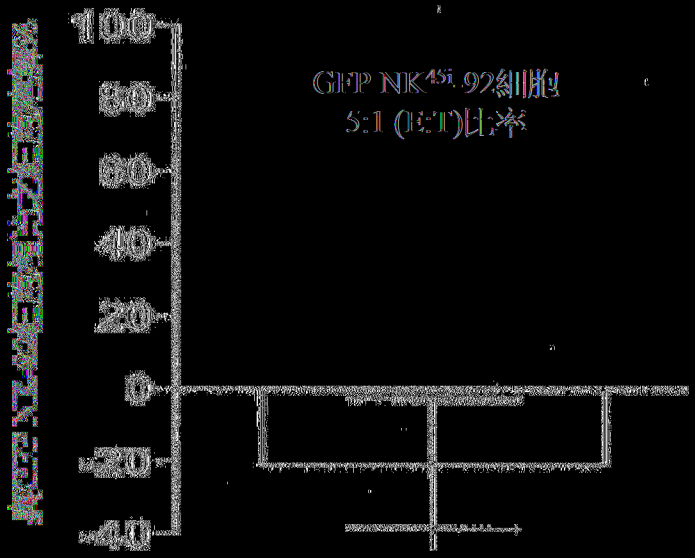
圖3

第1圖

CONE
CN6
[圖2]
ATK-92給油
給油ノズル
給油ノズル
給油ノズル
給油ノズル
ATK-92給油
給油ノズル
給油ノズル
給油ノズル
給油ノズル

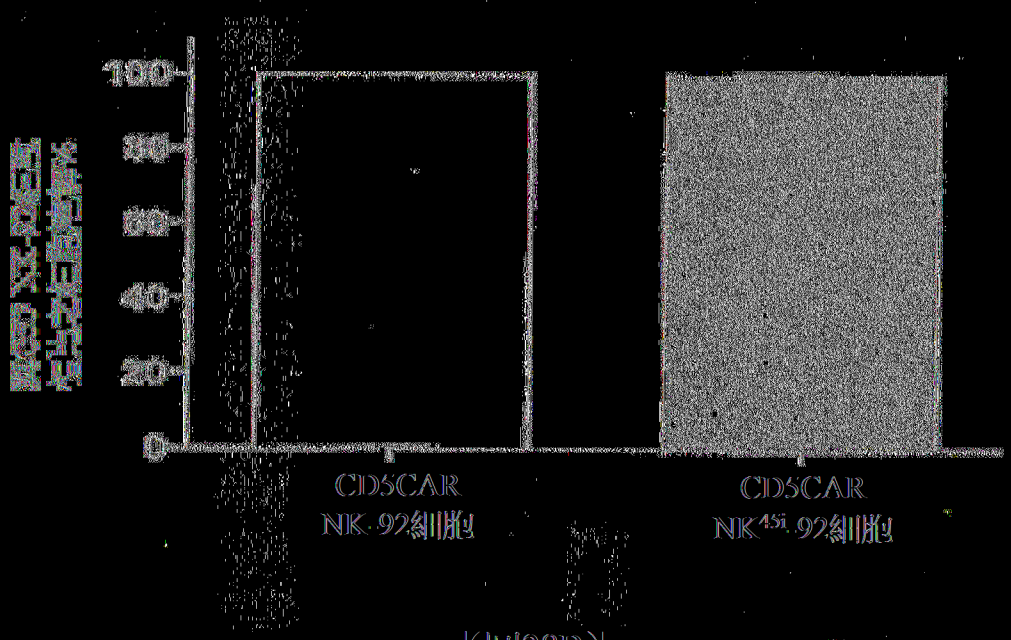
圖1


CCM4
CCRF-CEM/兼GFP
NK-92細胞
CCRF-CEM/兼GFP
NK-92細胞
CCRF-CEM/兼GFP
NK-92細胞
GFP
DAPI



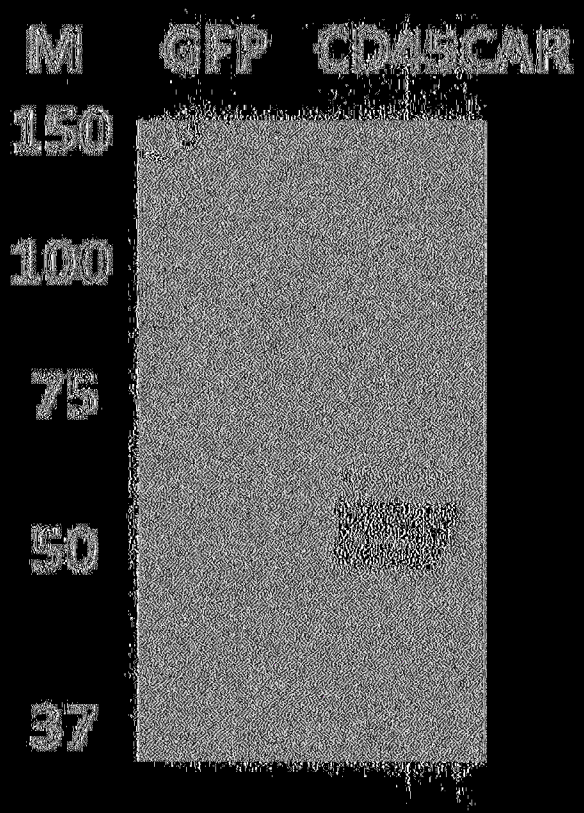
[圖27B]

CCR2-CEV與CD5CAR
CCR2-CEV與
CCR2-CEV與CD2
CCR2-CEV
CD3
CD8
LEGAL



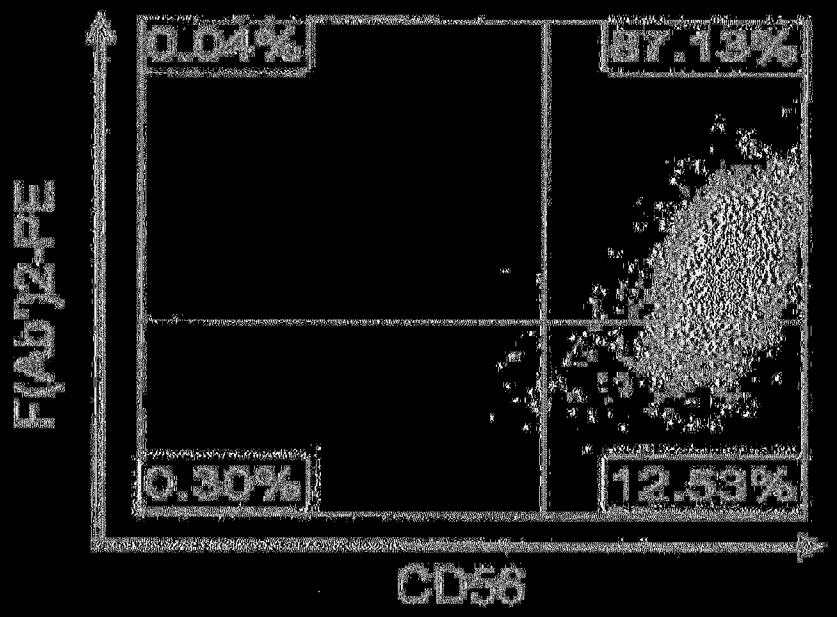
[圖28B]

圖29A



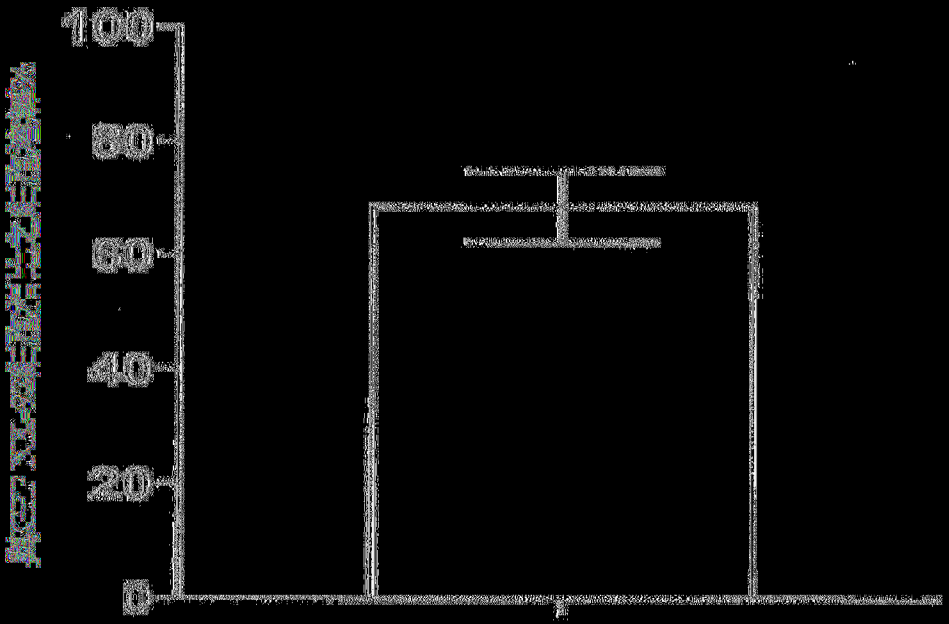
[圖29B]

CDS9
F(AV)2-PE
0.21%
0.34%
0.00%
8.70%
0.00%
1.14%
0.00%
0.00%



[圖30B]

CD45
CD8
圖 A1
112.13%
87.57%
0.06%
0.24%
3.44%
4.34%
0.14%
94.05%
圖 A2 第CD45-CD8+細胞
圖 A3 第CD45-CD8+細胞



CONCAUSE™-82[illegible]
5:1 OVERLAY

|(圖31B)|

圖 7

圖 1

與GFP NK 92細胞相比之細胞毒性%
圖式
圖1

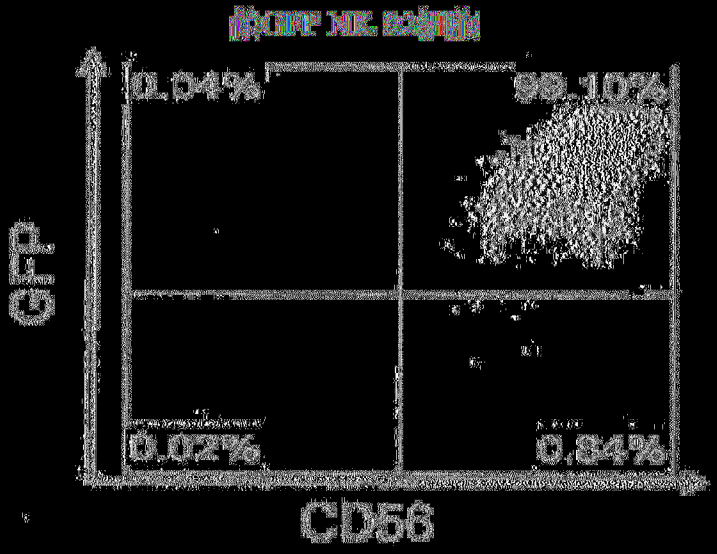
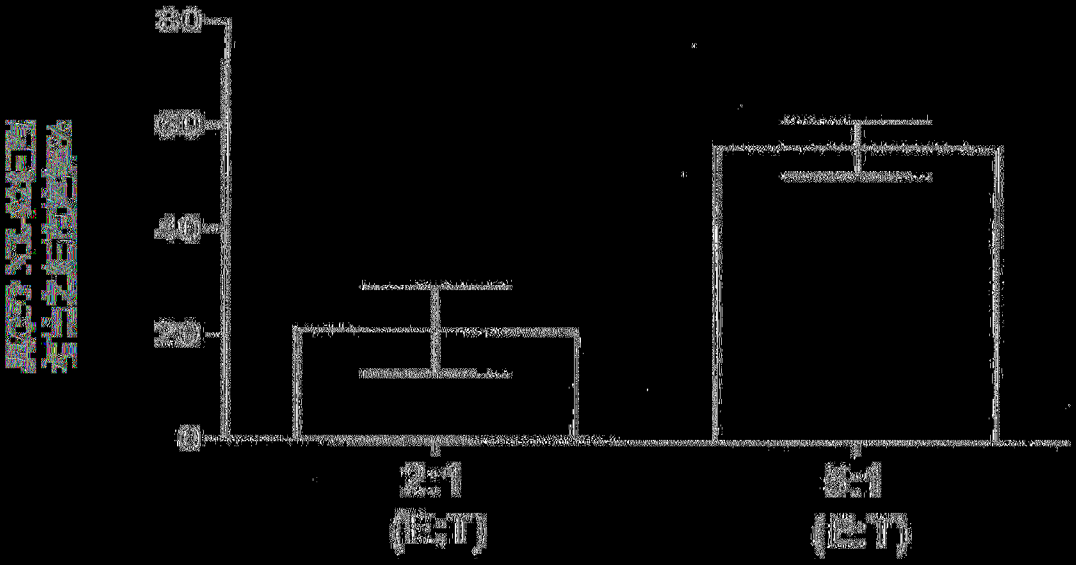
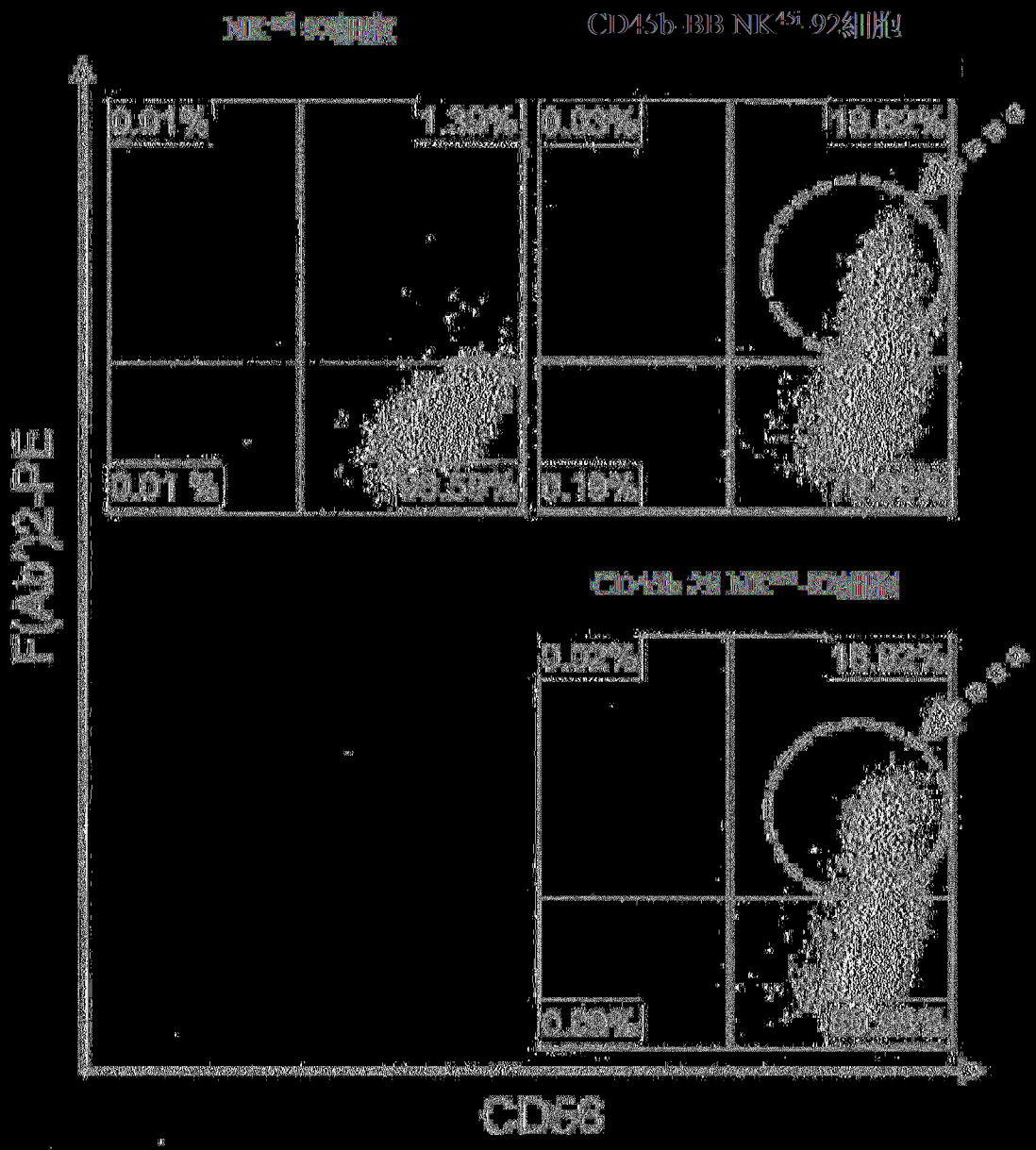


圖3A)

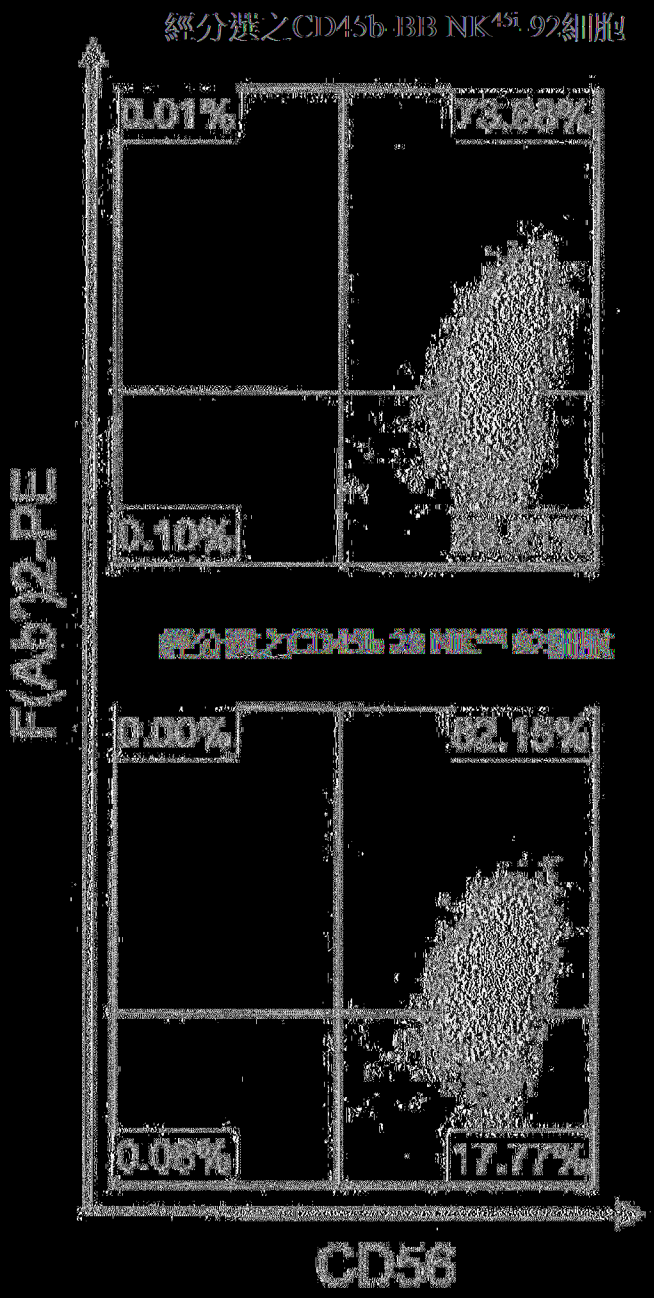
圖 1



|(圖33C)|


NK-92細胞
CD45b-BB NK45i-92細胞
0.01%
1.39%
0.03%
10.82%
0.01%
98.58%
0.10%
89.05%
CD45b-28 NK-92細胞
0.02%
10.22%
0.00%
89.76%
FIAb72-PE
CD63

|(圖33D)|


經分選之CD45b-BB NK45- 92細胞
0.01%
73.68%
0.10%
經分選之CD45b-BB NK45- 92細胞
0.00%
82.15%
0.03%
17.77%
FAb'2-PE
CD56

圖(圖33E)


CNTMR
CDB
CDB
單R三-絲二汽
R三-絲二汽製
NK-92絲二汽
R三-絲二汽製CDP
NK-92絲二汽
R三-絲二汽製
CD45CAR
NK45-92絲二汽
R三-絲二汽製
CD45-133
NK45-92絲二汽
R三-絲二汽製
CD45-28
NK45-92絲二汽

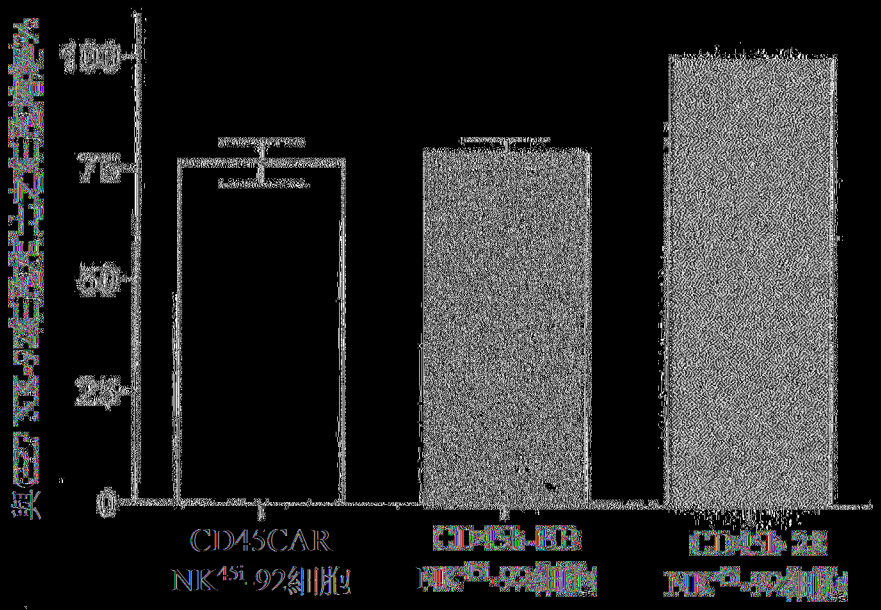
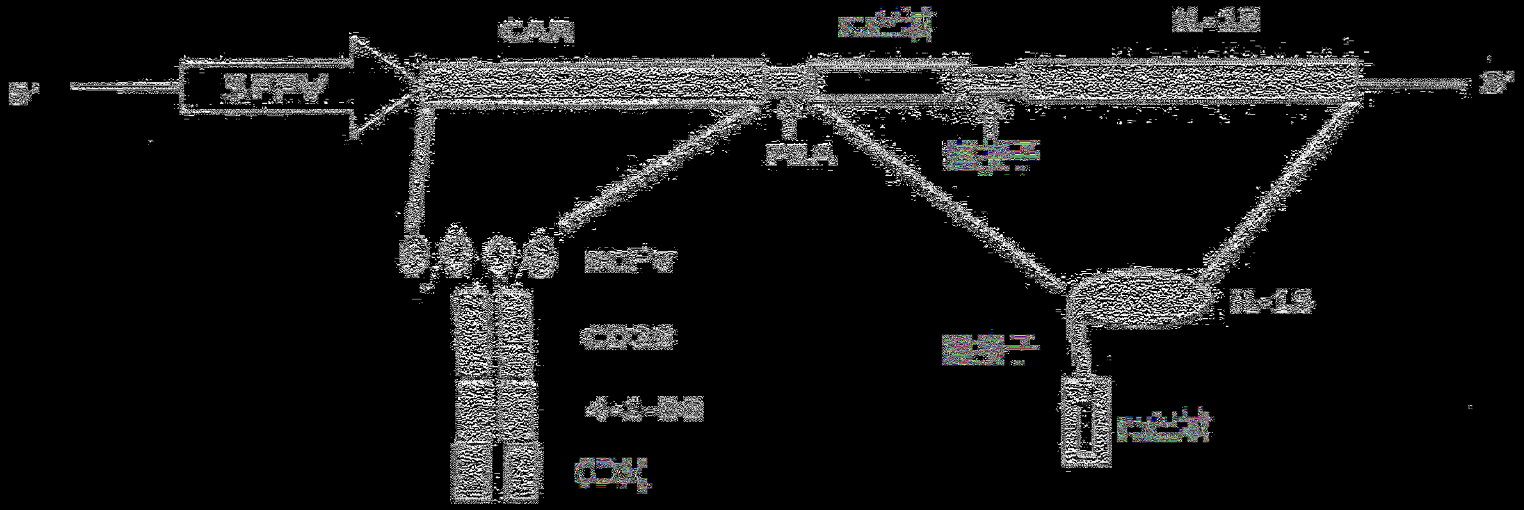

殺CD7 NK-92細胞比例(%)
100
75
50
25
0
CD45CAR
NK45i 92細胞
CD45i-BB
NK45i 92細胞
CD45i-28
NK45i 92細胞

圖33G



【圖34A】

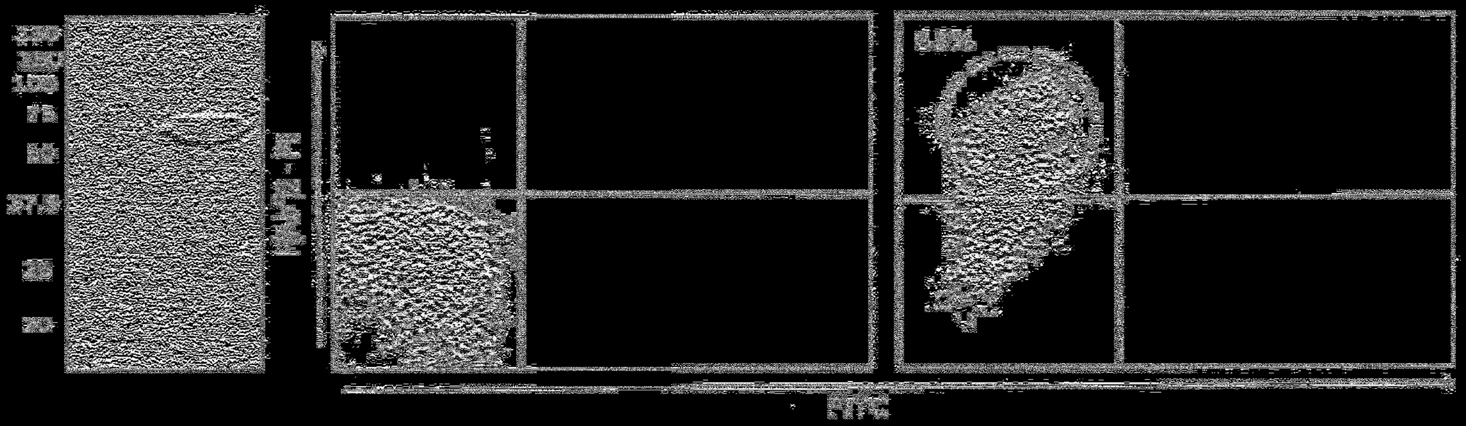
圖1-5

圖1-4
圖1-3

HEK CD41L5RA
圖1-2-1
圖1-2-2

CDLLSRA NKE主演
FIG.2B
FIG.2B-IV

CD4IL15RA^{+}T細胞



【圖37】

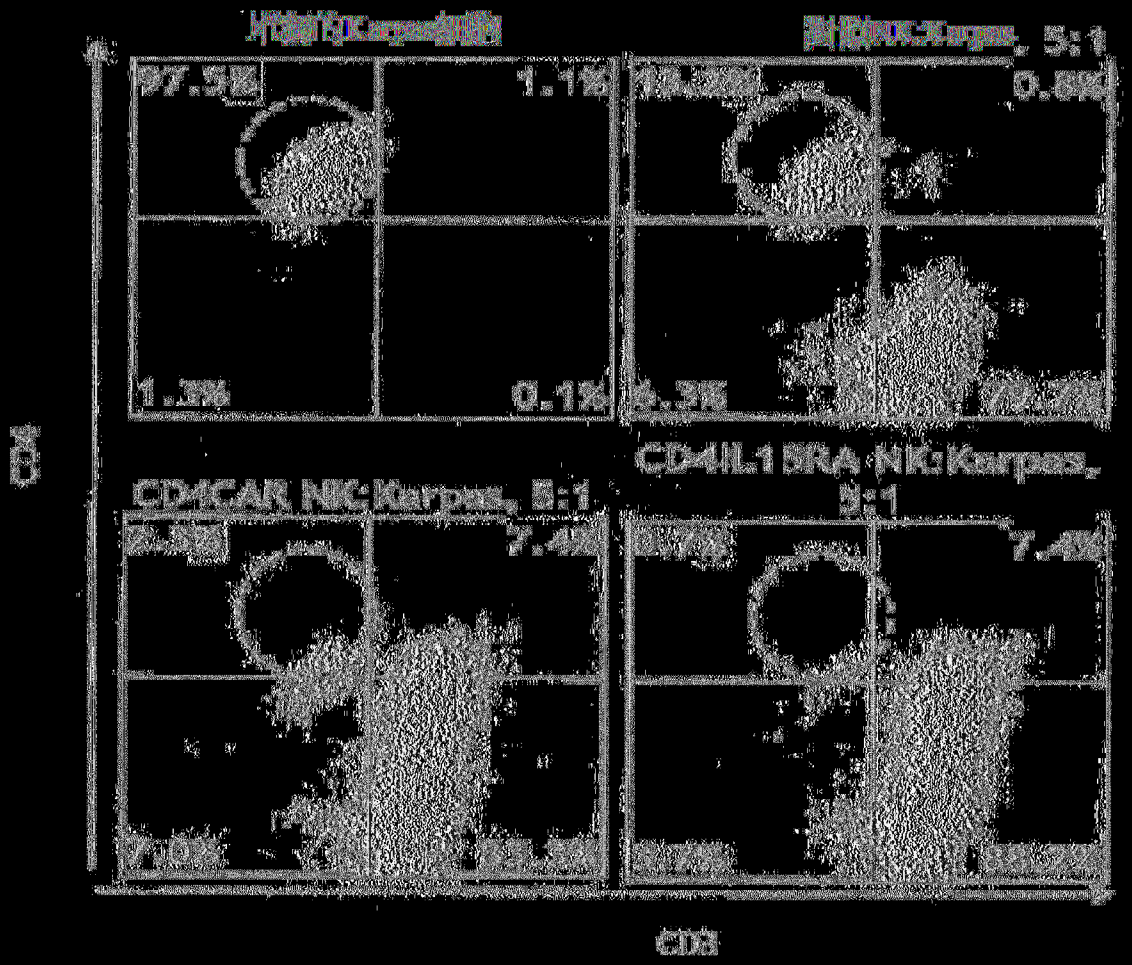
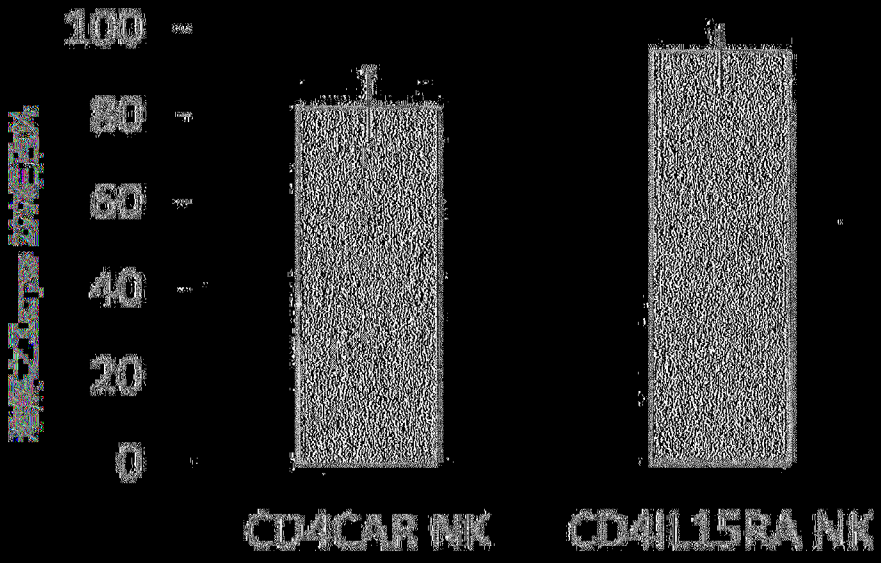
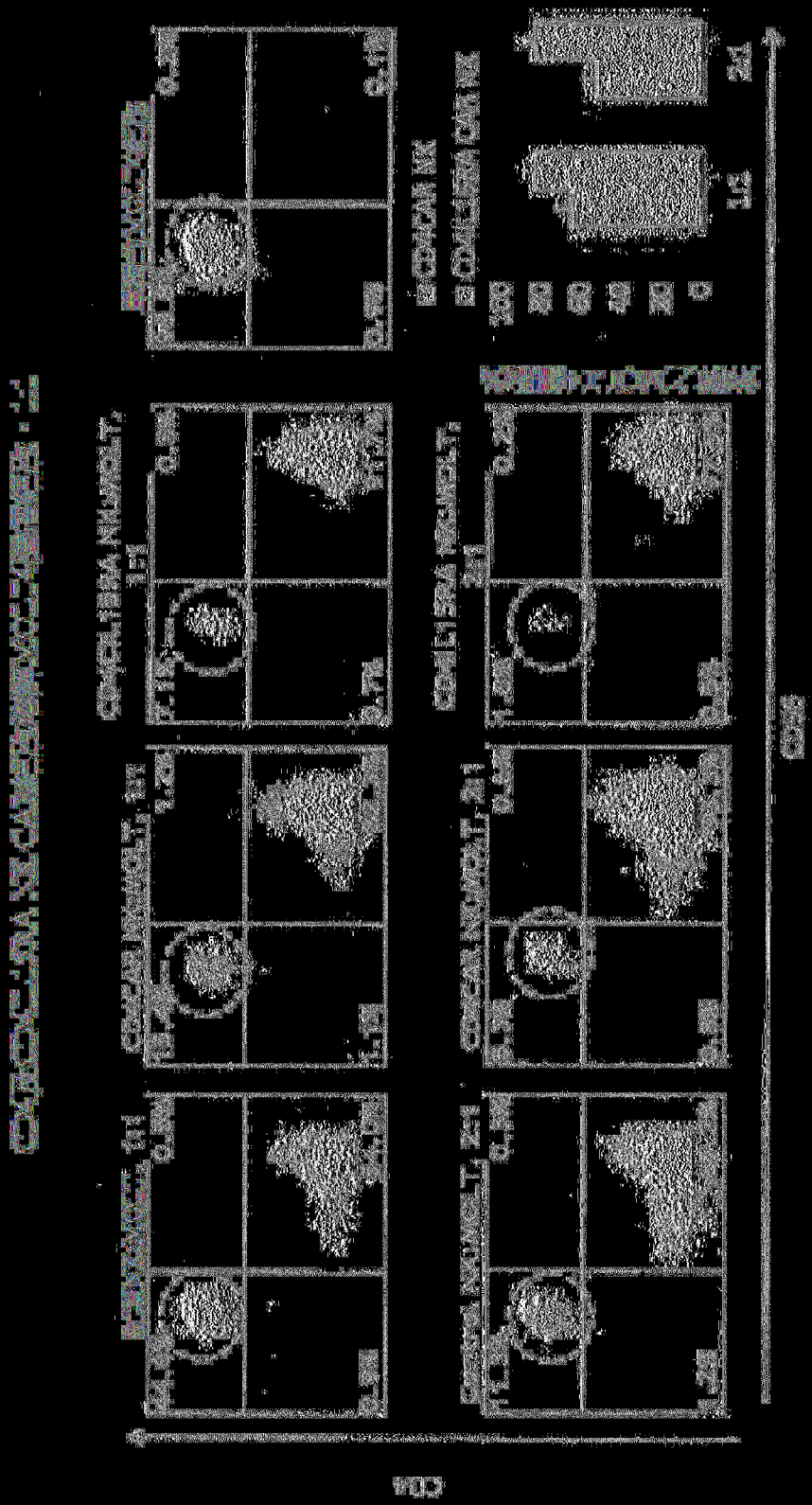


圖38A

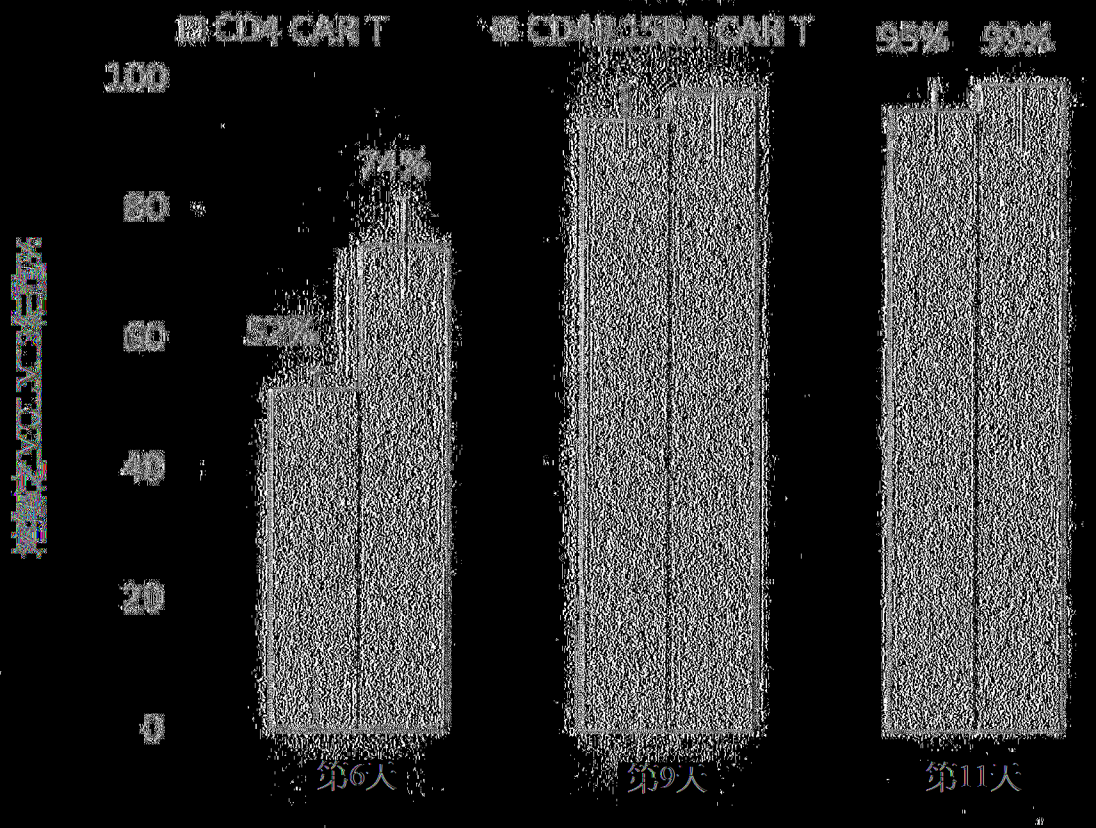


(圖58B)


CD4CAR NK:MOLT, 1:1
CD4/IL15RA NK:MOLT, 1:1
Control NK:MOLT, 2:1
CD4CAR NK:MOLT, 2:1
CD4/IL15RA NK:MOLT, 2:1
CD4CAR NK
CD4/IL15RA CAR NK
100
80
60
40
20
0
1:1
2:1
CD4
CD56

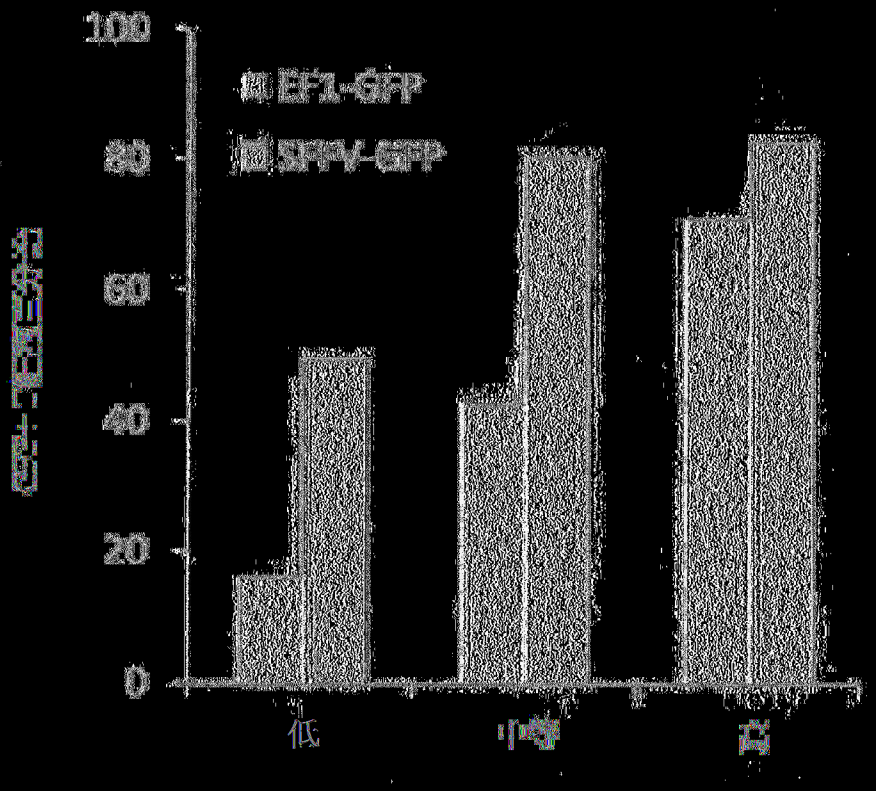
【圖39】

[圖1]

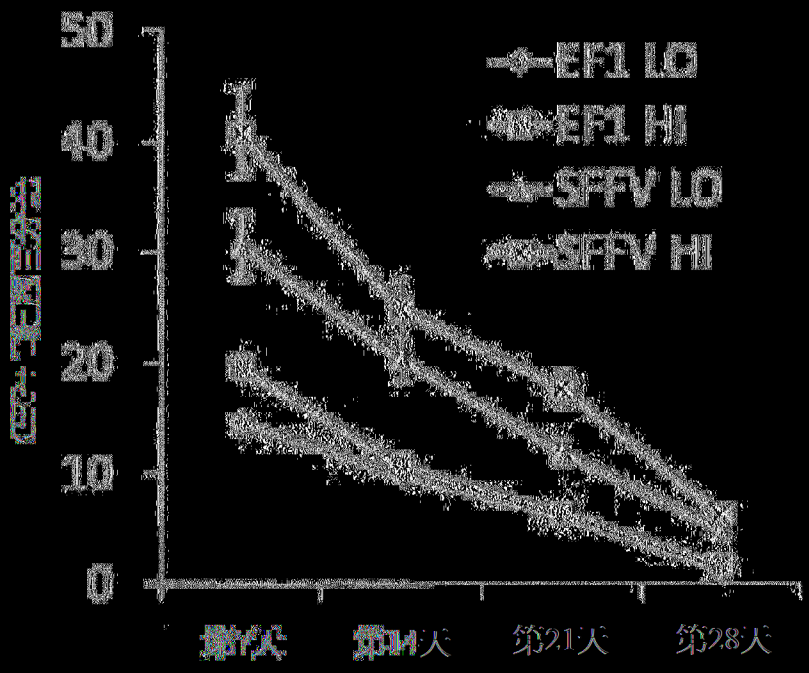

CD4 CAR T
CD4/CD45RA CAR T
95%
99%
100
80
60
40
20
0
74%
52%
第6天
第9天
第11天

[圖41]

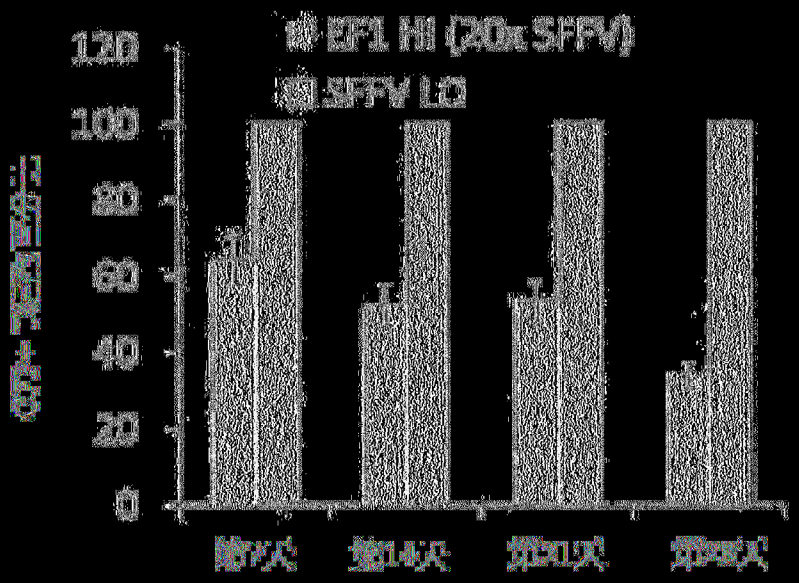
圖5



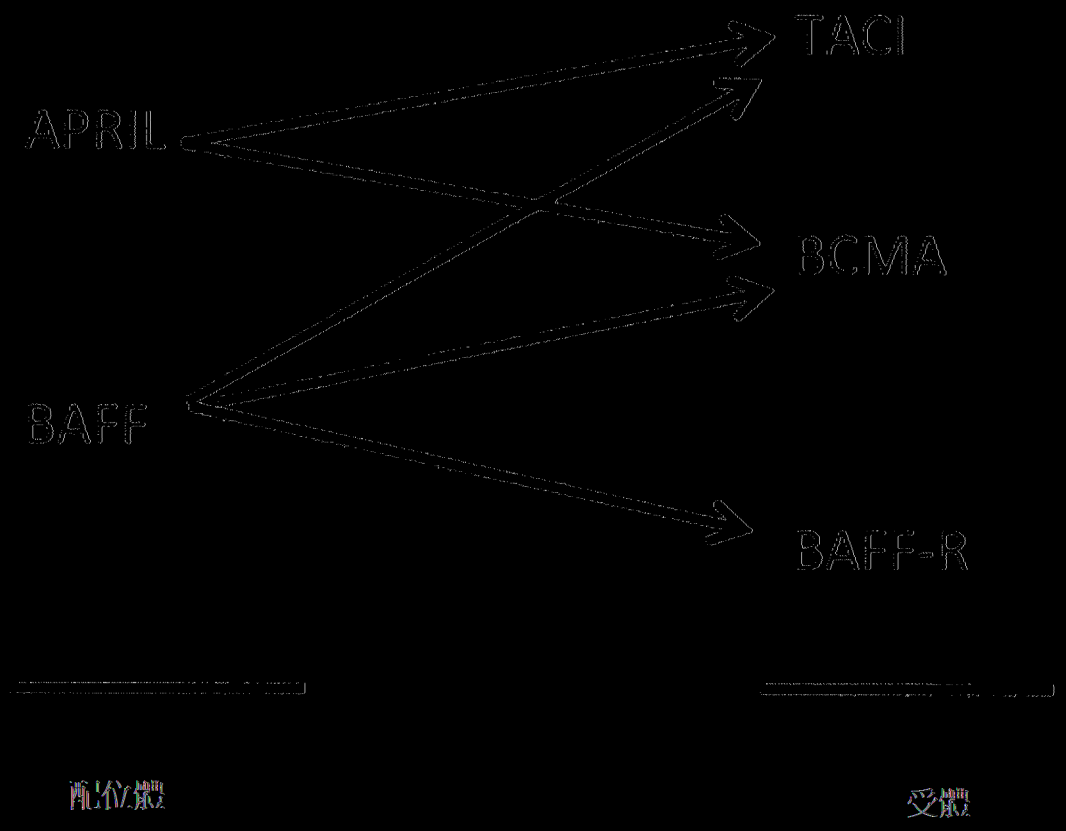
|(圖43)|


50
40
30
20
10
0
EF1 LO
EF1 HI
SFFV LO
SFFV HI
第7天
第14天
第21天
第28天

|(圖44A)|


120
100
80
60
40
20
0
EF1 HI (2.0x SFFV)
SFFV LO
第7天
第14天
第21天
第28天

|(圖44B)|



[圖45]