



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115836129 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 21

(21) 申请号 202180045995.1

(22) 申请日 2021.04.27

(30) 优先权数据

63/016707 2020.04.28 US

63/035437 2020.06.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.12.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/029289 2021.04.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/222168 EN 2021.11.04

(71) 申请人 索拉生物科学有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 菱谷彰德 圭三古屋

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 任晓华 初明明

(51) Int.Cl.

C12N 15/86 (2006.01)

权利要求书4页 说明书41页
序列表67页 附图25页

(54) 发明名称

用于治疗TDP-43蛋白病的组合物和方法

(57) 摘要

公开了一类新型融合蛋白来募集细胞的先天伴侣机制,特别是Hsp70介导的系统,以特异性减少TDP-43介导的蛋白质聚集和相关的蛋白质构象病。

1. 因此,在第一个方面,本文公开的是分离的融合蛋白,其包含J蛋白的J结构域和TDP-43结合结构域。

2. 权利要求1的融合蛋白,其中所述J蛋白的J结构域是真核起源的。

3. 权利要求1或权利要求2中任一项的融合蛋白,其中所述J蛋白的J结构域是人起源的。

4. 权利要求1-3中任一项的融合蛋白,其中所述J蛋白的J结构域是胞质定位的。

5. 权利要求1-4中任一项的融合蛋白,其中所述J蛋白的J结构域选自SEQ ID NO: 1-50。

6. 权利要求1-5中任一项的融合蛋白,其中所述J结构域包含选自SEQ ID NO: 1、5、6、10、16、24、25、31和49的序列。

7. 权利要求1-6中任一项的融合蛋白,其中所述J结构域包含SEQ ID NO: 5的序列。

8. 权利要求1-6中任一项的融合蛋白,其中所述J结构域包含SEQ ID NO: 10的序列。

9. 权利要求1-6中任一项的融合蛋白,其中所述J结构域包含SEQ ID NO: 16的序列。

10. 权利要求1-6中任一项的融合蛋白,其中所述J结构域包含SEQ ID NO: 25的序列。

11. 权利要求1-6中任一项的融合蛋白,其中所述J结构域包含SEQ ID NO: 31的序列。

12. 权利要求1-11中任一项的融合蛋白,其中例如当使用ELISA测定进行测量时,所述TDP-43结合结构域对于TDP-43 (例如,使用包含TDP-43的C末端207个氨基酸的报告子构建体)具有1 μ M或更小,例如300 nM或更小、100 nM或更小、30 nM或更小、10 nM或更小的 K_D 。

13. 权利要求1-12中任一项的融合蛋白,其中所述TDP-43结合结构域包含选自SEQ ID NO: 51-55的序列。

14. 权利要求1-13中任一项的融合蛋白,其中所述TDP-43结合结构域包含SEQ ID NO: 51-53的序列。

15. 权利要求1-13中任一项的融合蛋白,其中所述TDP-43结合结构域包含SEQ ID NO: 51的序列。

16. 权利要求1-13中任一项的融合蛋白,其中所述TDP-43结合结构域包含SEQ ID NO: 53的序列。

17. 权利要求1-16中任一项的融合蛋白,其包含多个TDP-43结合结构域。

18. 权利要求1-17中任一项的融合蛋白,其由两个TDP-43结合结构域组成。

19. 权利要求1-18中任一项的融合蛋白,其由三个TDP-43结合结构域组成。

20. 权利要求1-19中任一项的融合蛋白,其包含下述构建体之一:

a. DNAJ-X-T,

b. DNAJ-X-T-X-T,

c. DNAJ-X-T-X-T-X-T,

d. T-X-DNAJ,

e. T-X-T-X-DNAJ,

f. T-X-T-X-T-X-DNAJ,

g. T-X-DNAJ-X-T,

h. T-X-DNAJ-X-T-X-T,

i. TDNAJ-X-TTTTDDNAJ-X-T,

- j. T-X-T-X-DNAJ-X-TT,
- k. TTDNAJ-X-T-X-TTTTDDNAJ-X-T,
- l. T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T-X-T,
- m. T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T,
- n. T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T,
- o. T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T-X-T,
- p. DnaJ-X-DnaJ-X-T-X-T,
- q. T-X-DnaJ-X-DnaJ,
- r. T-X-T-X-DnaJ-X-DnaJ, 和
- s. T-X-TDnaJ-X-TDnaJ-X-TTTT

其中,

T是TDP-43结合结构域,

DNAJ是J蛋白的J结构域, 和

X是任选的接头。

21. 权利要求1-20中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO: 5的J结构域序列和SEQ ID NO: 51的TDP-43结合结构域序列。

22. 权利要求1-21中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO: 5的J结构域序列和两个拷贝的SEQ ID NO: 53的TDP-43结合结构域序列。

23. 权利要求1-22中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含选自SEQ ID NO: 80-85和89-97的序列。

24. 权利要求1-23中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含选自SEQ ID NO: 80、82-85、89-90和92-97的序列。

25. 权利要求1-23中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO: 80的序列。

26. 权利要求1-23中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO: 90的序列。

27. 权利要求1-23中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO: 92的序列。

28. 权利要求1-23中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO: 94的序列。

29. 权利要求1-23中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO: 95的序列。

30. 权利要求1-23中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO: 96的序列。

31. 权利要求1-30中任一项的融合蛋白, 其进一步包含靶向试剂。

32. 权利要求1-31中任一项的融合蛋白, 其进一步包含表位。

33. 权利要求32的融合蛋白, 其中所述表位是选自SEQ ID NO: 67-73的多肽。

34. 权利要求1至权利要求33中任一项的融合蛋白, 其进一步包含细胞穿透剂。

35. 权利要求34的融合蛋白, 其中所述细胞穿透剂选自SEQ ID NO: 74-77。

36. 权利要求1-35中任一项的融合蛋白,其进一步包含信号序列。
37. 权利要求36的融合蛋白,其中所述信号序列包含选自SEQ ID NO: 98-100的肽序列。
38. 权利要求1-37中任一项的融合蛋白,其能够减少细胞中的TDP-43蛋白聚集。
39. 权利要求1-38中任一项的融合蛋白,其能够减少TDP-43介导的细胞毒性。
40. 一种核酸序列,其编码权利要求1-39中任一项的融合蛋白。
41. 权利要求40的核酸序列,其中所述核酸是DNA。
42. 权利要求40中任一项的核酸序列,其中所述核酸是RNA。
43. 权利要求40-42中任一项的核酸序列,其中所述核酸包含至少一种修饰的核酸。
44. 权利要求40-43中任一项的核酸序列,其进一步包含启动子区、5' UTR、3' UTR例如多聚(A)信号。
45. 权利要求44的核酸序列,其中所述启动子区包含选自CMV增强子序列、CMV启动子、CBA启动子、UBC启动子、GUSB启动子、NSE启动子、突触素启动子、MeCP2启动子和GFAP启动子的序列。
46. 一种载体,其包含权利要求40-45中任一项的核酸序列。
47. 权利要求46的载体,其中所述载体选自腺相关病毒(AAV)、腺病毒、慢病毒、逆转录病毒、疱疹病毒、痘病毒(牛痘或粘液瘤)、副粘病毒(麻疹病毒、RSV或新城疫病毒)、杆状病毒、呼肠孤病毒、甲病毒和黄病毒。
48. 权利要求46或权利要求47的载体,其中所述载体是AAV。
49. 一种病毒颗粒,其包含衣壳和权利要求46-48中任一项的载体。
50. 权利要求49的病毒颗粒,其中所述衣壳选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、假型AAV、恒河猴衍生的AAV、AAVrh8、AAVrh10和AAV-DJan AAV衣壳突变体、AAV杂合血清型、器官嗜性AAV、嗜心性AAV和嗜心性AAVM41突变体。
51. 权利要求49或权利要求50的病毒颗粒,其中所述衣壳选自AAV2、AAV5、AAV8、AAV9和AAVrh10。
52. 权利要求49至权利要求51中任一项的病毒颗粒,其中所述衣壳是AAV2。
53. 权利要求49至权利要求51中任一项的病毒颗粒,其中所述衣壳是AAV5。
54. 权利要求49至权利要求51中任一项的病毒颗粒,其中所述衣壳是AAV8。
55. 权利要求49至权利要求51中任一项的病毒颗粒,其中所述衣壳是AAV9。
56. 权利要求49至权利要求51中任一项的病毒颗粒,其中所述衣壳是AAV rh10。
57. 一种药物组合物,其包含选自以下的药剂和药学上可接受的载体或赋形剂:权利要求1-39中任一项的融合蛋白、表达权利要求1-39的融合蛋白的细胞、权利要求40-45中任一项的核酸、权利要求46-48中任一项的载体、权利要求49-56中任一项的病毒颗粒。
58. 一种减少细胞中的TDP-43蛋白的毒性的方法,其包括使所述细胞与有效量的选自以下的一种或多种药剂接触:权利要求1-39中任一项的融合蛋白、表达权利要求1-39的融合蛋白的细胞、权利要求40-45中任一项的核酸、权利要求46-48中任一项的载体、权利要求49-56中任一项的病毒颗粒和权利要求57的药物组合物。
59. 权利要求58的方法,其中所述细胞在受试者中。
60. 权利要求58至权利要求59中任一项的方法,其中所述受试者是人。

61. 权利要求58至权利要求60中任一项的方法,其中所述细胞是中枢神经系统的细胞。
62. 权利要求58至权利要求61中任一项的方法,其中所述受试者被鉴定为患有TDP-43疾病。
63. 权利要求62的方法,其中所述TDP-43疾病选自ALS、FTD、帕金森氏病、亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏病、海马硬化和路易体痴呆。
64. 权利要求62或权利要求63的方法,其中所述TDP-43疾病是ALS。
65. 权利要求58至权利要求64中任一项的方法,其中当与对照细胞相比时,存在所述细胞中的聚集TDP-43蛋白的量的减少。
66. 一种在有此需要的受试者中治疗TDP-43疾病、预防TDP-43疾病或延迟TDP-43疾病的进展的方法,所述方法包括施用有效量的选自以下的一种或多种药剂:权利要求1-39中任一项的融合蛋白、表达权利要求1-39的融合蛋白的细胞、权利要求40-45中任一项的核酸、权利要求46-48中任一项的载体、权利要求49-56中任一项的病毒颗粒和权利要求57的药物组合物。
67. 权利要求66的方法,其中所述TDP-43疾病选自ALS、FTD、帕金森氏病、亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏病、海马硬化和路易体痴呆。
68. 权利要求67的方法,其中所述TDP-43疾病是ALS。
69. 以下中的一种或多种制备可用于预防或延迟受试者中的TDP-43疾病进展的药物的用途:权利要求1-39中任一项的融合蛋白、表达权利要求1-39的融合蛋白的细胞、权利要求40-45中任一项的核酸、权利要求46-48中任一项的载体、权利要求49-56中任一项的病毒颗粒和权利要求57的药物组合物。
70. 权利要求69的用途,其中所述TDP-43疾病选自ALS、FTD、帕金森氏病、亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏病、海马硬化和路易体痴呆。
71. 权利要求69或权利要求70的用途,其中所述TDP-43疾病是ALS。

用于治疗TDP-43蛋白病的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请根据35 U.S.C. § 119 (e) 要求于2020年4月28日提交的美国临时专利申请63/016,707,以及于2020年6月5日提交的美国临时专利申请63/035,437的优先权。上述申请的全部内容在此通过引用以其整体并入。

背景技术

[0002] 细胞内表达的所有蛋白质都需要正确折叠成其预期结构,以便正常发挥功能。越来越多的疾病和病症显示与蛋白质的不适当折叠和/或蛋白质和脂蛋白以及传染性蛋白质物质的不适当沉积和聚集相关。也称为构象疾病或蛋白质构象病,由错误折叠引起的疾病的实例包括阿尔茨海默氏病(AD)、肌萎缩侧索硬化(ALS)和额颞叶痴呆(FTLD)。突变蛋白在细胞中聚集,导致典型的细胞毒性细胞包涵体。

[0003] 各种各样的神经退行性疾病的病理学特征在于由淀粉样原纤维构成的细胞内或细胞外蛋白质聚集物的积累(Forman等人,(2004) *Nat Med.* 10:1055-1063)。例如,阿尔茨海默氏病(AD)的病理学通过分别由 β -淀粉样蛋白和微管相关蛋白tau构成的老年斑和神经原纤维缠结进行限定,而由 α -突触核蛋白构成的路易体是帕金森病的定义疾病的病变。直到最近,具有泛素包涵体的额颞叶变性(FTLD-U) (Kumar-Singh & Van (2007) *Brain Pathol.*,17:104-114) (与FTLD综合征相关的最常见表型)以及肌萎缩侧索硬化(ALS) (Xiao等人,(2006) *Biochim Biophys Acta*,1762:1001-1012) 两者的神经病理学通过非淀粉样蛋白原性泛素化包涵体(UBI)进行定义。

[0004] FTLD,第二常见的早老性痴呆形式,指具有共同的行为和/或语言功能障碍的一组异质性神经退行性病症(Kumar-Singh & Van,同上)。一些受累个体表现出运动障碍,例如帕金森症或运动神经元病(MND)。虽然指名FTLD反映了突出的额叶和颞叶退化,但在这些患者中鉴定了多重神经病理学异常(Cairns等人,(2007) *Acta Neuropathol.*,1145:5-22)。FTLD的两大病理学细分是公认的:具有tau阳性包涵体的脑(即tau蛋白病),以及具有未被针对tau、 α -突触核蛋白和 β -淀粉样蛋白的抗体检测到的UBI的脑(即FTLD-U)。高达40%的FTLD显示了家族遗传模式,具有与FTLD-U病理学相关的三种不同遗传异常,包括颗粒蛋白前体(PGRN)和含缬酪氨酸蛋白(VCP)中的突变、以及与染色体9p上的新型基因座的连锁。

[0005] 肌萎缩侧索硬化(ALS),也称为运动神经元病或卢伽雷氏病,是一种神经退行性疾病,其特征不在于脑干和脊髓中的上下运动神经元的进行性退化,导致进行性肌萎缩和无力(Al-Chalabi等人,(2016) *Amyotrophic lateral sclerosis.*,15 (11):1182-1194;Robberecht & Philips,(2013) *Nat Rev Neurosci.*,14 (4):248-264;Talbot等人,(2018) *Nucleic Acids Res.*,37 (8):e64)。ALS具有对于54-67岁的中位发病年龄,每100,000人约5.4例的中位患病率,其中与女性相比,男性处于略微更高的风险中(Chio等人,(2009) *Amyotroph Lateral Scler.*,10 (5-6):310-323;Chio等人,(2013) *Neuroepidemiology*,41 (2):118-130;McCombe & Henderson,(2010) *Genet Med.*,7 (6):557-570)。ALS是一种破坏性的神经退行性疾病,没有任何有效的治疗,并且患者通常在发

病后2-4年内死亡,主要是由于呼吸衰竭和吞咽问题(Chio等人,(2009) *Amyotroph Lateral Scler.*,10 (5-6):310-323;del Aguila等人,(2003) *Neurology*,60 (5):813-819;Tabata等人,(2009) *Nucleic Acids Res.*,7 (8):e64)。

[0006] 大多数ALS病例是原因不明散发性的(sALS),而仅~10%的病例涉及称为家族性ALS(fALS)的家族性基因突变的孟德尔遗传模式(Renton等人,(2014) *Nat Neurosci.*,17 (1):17-23;Taylor等人,(2016) *Nature*,539 (7628):197-206;Turner等人,(2017) *J Neurol Neurosurg Psychiatry*,88 (12):1042-1044)。迄今为止,多达30种基因被描述为ALS的单基因原因,其中最频繁的是C9orf72、SOD1、FUS和TARDBP/TDP43 (Chia等人,(2018) *Lancet Neurol.*,17 (1):94-102;Nicolas等人,(2018) *Neuron*,97 (6):1268-1283;Volk等人,(2018) *Med Genet.*,30 (2):252-258)。

[0007] ALS的患病率中的可变性以及大量基因中的基因突变鉴定提示了,多重因素例如多基因组分和环境因素可以是疾病易感性的基础。事实上,已提出了细胞途径的组合可以导致ALS中的神经毒性结果,所述细胞途径例如蛋白质错误折叠/聚集(Ross & Poirier,(2004) *Nat Med.*,10Suppl:S10-17)、谷氨酸介导的兴奋性毒性(Blasco等人,(2014) *Curr Med Chem.*,21 (31):3551-3575)、线粒体动态异常(Cappello & Francolini,(2017) *Int J Mol Sci.*,18 (10);Delic等人,(2018) *J Neurosci Res.*,96 (8):1353-1366;Onesto等人,(2016) *Acta Neuropathol Commun.*,4 (1):47)、以及氧化性应激的贡献者(Anand等人,(2013) *Oxid Med Cell Longev.*,2013:635831;Sharma等人,(2016) *Neurochem Res.*,41 (5):965-984)。

[0008] 分子量为43 KDa的交互应答(TAR)-DNA结合蛋白(TDP-43)被鉴定为FTLD-U和ALS的UBI中的主要疾病蛋白(Neumann等人,(2006) *Science* 314:130-133)。在这两种病症中的TDP-43病理学的鉴定提供了关于下述的机制联系:1)大比例的ALS患者表现出属于FTLD范围的一系列行为和认知变化(Murphy等人,(2007) *Arch. Neurol.*,64:330-334);2)MND通常在FTLD-U患者中观察到(McKhann等人,(2001) *Arch. Neurol.*,58:1803-1809);3)存在ALS和FTLD-U中观察到的泛素病理学中的显著重叠(MacKenzie & Feldman (2005) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64:730-739);以及4)具有ALS和FTLD两者的共分离的家族中的特定基因的遗传基因座和突变的鉴定(Talbot & Ansorge (2006) *Hum. Mol. Genet.*,15:R183-R187)。TDP-43还已显示为多重其它神经退行性疾病的组织病理学标记物,所述神经退行性疾病包括阿尔茨海默氏病(Amador-Ortiz等人,(2007) *Ann Neurol.*,61:435-45)、帕金森氏病(Lin和Dickson,(2008) *Acta Neuropathol.*,116:205-13)、以及亨廷顿氏病(Schwab等人,(2008) *J Neuropathol Exp Neurol.*,67:1159-65)、海马硬化(Amador-Ortiz等人,(2007),同上)和路易体痴呆(Lin和Dickson,(2008),同上);在(Lagier-Tourenne等人,(2010) *Human Molecular Genetics*,19:R46-R64)中进行综述。

[0009] 因此,存在开发新的治疗模态的需要,其对于靶特定性抗原、蛋白质、糖蛋白或脂蛋白进行优化,特别是针对具有基于蛋白质错误折叠和聚集的病理学的疾病,以及在异质聚集物的情况下。

[0010] 热休克70 kDa蛋白(在本文中被称为“Hsp70s”)构成各种各样物种的细胞中普遍存在的一类伴侣蛋白(Tavaria等人,(1996) *Cell Stress Chaperones* 1,23-28)。Hsp70需要称为共伴侣蛋白的辅助蛋白质,例如J结构域蛋白和核苷酸交换因子(NEF) (Hartl等人,

(2009) *Nat Struct Mol Biol* 16,574-581),以便发挥功能。在用于折叠蛋白质的Hsp70伴侣机制的目前模型中,Hsp70在ATP和ADP结合状态之间循环,并且J结构域蛋白与需要折叠或重新折叠的另一种蛋白质(称为“客户蛋白质”)结合,与Hsp70的ATP结合形式(Hsp70-ATP)相互作用(Young (2010) *Biochem Cell Biol* 88,291-300;Mayer,(2010) *Mol Cell* 39,321-331)。J结构域蛋白-客户蛋白质复合物与Hsp70-ATP的结合刺激ATP水解,其导致Hsp70蛋白中的构象变化,关闭螺旋盖,且从而稳定客户蛋白质与Hsp70-ADP之间的相互作用,以及引发J结构域蛋白的释放,所述J结构域蛋白然后自由结合另一个客户蛋白质。

[0011] 因此,根据这一模型,J结构域蛋白通过充当桥梁在Hsp70机制内发挥关键作用,并且促进各种各样客户蛋白质的捕获和提交到Hsp70机制内,以促进折叠或重新折叠成正确的构象(Kampinga & Craig (2010) *Nat Rev Mol Cell Biol* 11,579-592)。J结构域家族在范围从原核生物(DnaJ蛋白)到真核生物(Hsp40蛋白家族)的物种中是广泛保守的。J结构域(约60-80 aa)由四个螺旋构成:I、II、III和IV。螺旋II和III经由含有“HPD基序”的柔性环连接,所述HPD基序在J结构域之间是高度保守的,并且被认为对于活性是至关重要的(Tsai & Douglas,(1996) *J Biol Chem* 271,9347-9354)。已发现HPD序列内的突变消除了J结构域功能。

[0012] 鉴于上文提供的蛋白质构象病如ALS的背景,似乎明确的是,减少错误折叠蛋白质的水平可以充当治疗、预防或以其它方式改善这些破坏性病症症状的手段,并且细胞修复蛋白质错误折叠的先天能力的募集将是合乎逻辑的选择。

发明内容

[0013] 发明人已开发了一类新型融合蛋白来募集细胞的先天伴侣机制,特别是Hsp70介导的系统,以特异性减少TDP-43介导的蛋白质聚集。与发明人使用包含Hsp40蛋白(也称为J蛋白)(与Hsp70相互作用的共-伴侣)片段的融合蛋白来增强蛋白质分泌和表达的先前研究不同,本研究采用含有J结构域的融合蛋白用于减少通过突变型TDP-43蛋白的聚集引起的蛋白质聚集和细胞毒性的目的。在这个背景下,本发明人已意外地发现了,功能所需的J结构域元件在增强蛋白质表达和分泌方面与J结构域的用途截然不同,证实了关于本融合蛋白的作用模式的不同机制。本文所述的融合蛋白包含J结构域以及对于TDP-43具有亲和力的结构域。融合蛋白内的TDP-43结合结构域的存在导致突变型TDP-43蛋白聚集的特异性减少。

[0014] E1. 因此,在第一个方面,本文公开的是分离的融合蛋白,其包含J蛋白的J结构域和TDP-43结合结构域。

[0015] E2. E1的融合蛋白,其中所述J蛋白的J结构域是真核起源的。

[0016] E3. E1-E2中任一项的融合蛋白,其中所述J蛋白的J结构域是人起源的。

[0017] E4. E1-E3中任一项的融合蛋白,其中所述J蛋白的J结构域是胞质定位的。

[0018] E5. E1-E4中任一项的融合蛋白,其中所述J蛋白的J结构域选自SEQ ID No: 1-50。

[0019] E6. E1-E5中任一项的融合蛋白,其中所述J结构域包含选自SEQ ID NO: 1、5、6、10、16、24、25、31和49的序列。

[0020] E7. E1-E6中任一项的融合蛋白,其中所述J结构域包含SEQ ID NO: 5的序列。

- [0021] E8. E1-E6中任一项的融合蛋白,其中所述J结构域包含SEQ ID NO: 10的序列。
- [0022] E9. E1-E6中任一项的融合蛋白,其中所述J结构域包含SEQ ID NO: 16的序列。
- [0023] E10. E1-E6中任一项的融合蛋白,其中所述J结构域包含SEQ ID NO: 25的序列。
- [0024] E11. E1-E6中任一项的融合蛋白,其中所述J结构域包含SEQ ID NO: 31的序列。
- [0025] E12. E1-E11中任一项的融合蛋白,其中例如当使用ELISA测定进行测量时,所述TDP-43结合结构域对于TDP-43 (例如,使用包含TDP-43的C末端207个氨基酸的报告子构建体)具有1 μ M或更小,例如300 nM或更小、100 nM或更小、30 nM或更小、10 nM或更小的 K_D 。
- [0026] E13. E1-E12中任一项的融合蛋白,其中所述TDP-43结合结构域包含选自SEQ ID NO: 51-55的序列。
- [0027] E14. E1-E13中任一项的融合蛋白,其中所述TDP-43结合结构域包含SEQ ID NO: 51-53的序列。
- [0028] E15. E1-E13中任一项的融合蛋白,其中所述TDP-43结合结构域包含SEQ ID NO: 51的序列。
- [0029] E16. E1-E13中任一项的融合蛋白,其中所述TDP-43结合结构域包含SEQ ID NO: 53的序列。
- [0030] E17. E1-E16中任一项的融合蛋白,其包含多个TDP-43结合结构域。
- [0031] E18. E1-E17中任一项的融合蛋白,其由两个TDP-43结合结构域组成。
- [0032] E19. E1-E18中任一项的融合蛋白,其由三个TDP-43结合结构域组成。
- [0033] E20. E1-E19中任一项的融合蛋白,其包含下述构建体之一:
- DNAJ-X-T,
 - DNAJ-X-T-X-T,
 - DNAJ-X-T-X-T-X-T,
 - T-X-DNAJ,
 - T-X-T-X-DNAJ,
 - T-X-T-X-T-X-DNAJ,
 - T-X-DNAJ-X-T,
 - T-X-DNAJ-X-T-X-T,
 - TDNAJ-X-TTTTDDNAJ-X-T,
 - T-X-T-X-DNAJ-X-TT,
 - TTDNAJ-X-T-X-TTTTDDNAJ-X-T,
 - T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T-X-T,
 - T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T,
 - T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T,
 - T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T-X-T,
 - DnaJ-X-DnaJ-X-T-X-T,
 - T-X-DnaJ-X-DnaJ,

r. T-X-T-X-DnaJ-X-DnaJ, 和
s. T-X-TDnaJ-X-TDnaJ-X-TTTT
其中,
T是TDP-43结合结构域,
DNAJ是J蛋白的J结构域, 和
X是任选的接头。

[0034] E21. E1-E20中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO: 5的J结构域序列和SEQ ID NO: 51的TDP-43结合结构域序列。

[0035] E22. E1-E21中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO: 5的J结构域序列和两个拷贝的SEQ ID NO: 53的TDP-43结合结构域序列。

[0036] E23. E1-E22中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含选自SEQ ID NO: 80-85和89-97的序列。

[0037] E24. E1-E23中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含选自SEQ ID NO: 80、82-85、89-90和92-97的序列。

[0038] E25. E1-E23中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO: 80的序列。

[0039] E26. E1-E23中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO: 90的序列。

[0040] E27. E1-E23中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO: 92的序列。

[0041] E28. E1-E23中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO: 94的序列。

[0042] E29. E1-E23中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO: 95的序列。

[0043] E30. E1-E23中任一项的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO: 96的序列。

[0044] E31. E1-E30中任一项的融合蛋白, 其进一步包含靶向试剂。

[0045] E32. E1-E31中任一项的融合蛋白, 其进一步包含表位。

[0046] E33. E32的融合蛋白, 其中所述表位是选自SEQ ID NO: 67-73的多肽。

[0047] E34. E1 - E33中任一项的融合蛋白, 其进一步包含细胞穿透剂。

[0048] E35. E34的融合蛋白, 其中所述细胞穿透剂选自SEQ ID NO: 74-77。

[0049] E36. E1-E35中任一项的融合蛋白, 其进一步包含信号序列。

[0050] E37. E36的融合蛋白, 其中所述信号序列包含选自SEQ ID NO: 98-100的肽序列。

[0051] E38. E1-E37中任一项的融合蛋白, 其能够减少细胞中的TDP-43蛋白聚集。

[0052] E39. E1-E38中任一项的融合蛋白, 其能够减少TDP-43介导的细胞毒性。

[0053] E40. 一种核酸序列, 其编码E1-E39中任一项的融合蛋白。

[0054] E41. E40的核酸序列, 其中所述核酸是DNA。

[0055] E42. E40中任一项的核酸序列, 其中所述核酸是RNA。

[0056] E43. E40-E42中任一项的核酸序列, 其中所述核酸包含至少一种修饰的核酸。

[0057] E44. E40-E43中任一项的核酸序列,其进一步包含启动子区、5' UTR、3' UTR例如多聚(A)信号。

[0058] E45. E44的核酸序列,其中所述启动子区包含选自CMV增强子序列、CMV启动子、CBA启动子、UBC启动子、GUSB启动子、NSE启动子、突触素(Synapsin)启动子、MeCP2启动子和GFAP启动子的序列。

[0059] E46. 一种载体,其包含E40-E45中任一项的核酸序列。

[0060] E47. E46的载体,其中所述载体选自腺相关病毒(AAV)、腺病毒、慢病毒、逆转录病毒、疱疹病毒、痘病毒(牛痘或粘液瘤)、副粘病毒(麻疹病毒、RSV或新城疫病毒)、杆状病毒、呼肠孤病毒、甲病毒和黄病毒。

[0061] E48. E46或E47的载体,其中所述载体是AAV。

[0062] E49. 一种病毒颗粒,其包含衣壳和E46-E48中任一项的载体。

[0063] E50. E49的病毒颗粒,其中所述衣壳选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、假型AAV、恒河猴衍生的AAV、AAVrh8、AAVrh10和AAV-DJan AAV衣壳突变体、AAV杂合血清型、器官嗜性AAV、嗜心性AAV和嗜心性AAVM41突变体。

[0064] E51. E49或E50的病毒颗粒,其中所述衣壳选自AAV2、AAV5、AAV8、AAV9和AAVrh10。

[0065] E52. E49 - E51中任一项的病毒颗粒,其中所述衣壳是AAV2。

[0066] E53. E49 - E51中任一项的病毒颗粒,其中所述衣壳是AAV5。

[0067] E54. E49 - E51中任一项的病毒颗粒,其中所述衣壳是AAV8。

[0068] E55. E49 - E51中任一项的病毒颗粒,其中所述衣壳是AAV9。

[0069] E56. E49 - E51中任一项的病毒颗粒,其中所述衣壳是AAV rh10。

[0070] E57. 一种药物组合物,其包含选自以下的药剂和药学上可接受的载体或赋形剂: E1-E39中任一项的融合蛋白、表达E1-E39的融合蛋白的细胞、E40-E45中任一项的核酸、E46-E48中任一项的载体、E49-E56中任一项的病毒颗粒。

[0071] E58. 一种减少细胞中的TDP-43蛋白的毒性的方法,其包括使所述细胞与有效量的选自以下的一种或多种药剂接触:E1-E39中任一项的融合蛋白、表达E1-E39的融合蛋白的细胞、E40-E45中任一项的核酸、E46-E48中任一项的载体、E49-E56中任一项的病毒颗粒和E57的药物组合物。

[0072] E59. E58的方法,其中所述细胞在受试者中。

[0073] E60. E58 - E59中任一项的方法,其中所述受试者是人。

[0074] E61. E58 - E60中任一项的方法,其中所述细胞是中枢神经系统和周围神经系统的细胞。

[0075] E62. E58 - E61中任一项的方法,其中所述受试者被鉴定为患有TDP-43疾病。

[0076] E63. E62的方法,其中所述TDP-43疾病选自ALS、FTD、帕金森氏病、亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏病、海马硬化、路易体痴呆和边缘叶受累为主的年龄相关TDP-43脑病(limbic predominant age-related TDP-43 encephalopathy)。

[0077] E64. E62或E63的方法,其中所述TDP-43疾病是ALS。

[0078] E65. E58 - E64中任一项的方法,其中当与对照细胞相比时,存在所述细胞中的聚集TDP-43蛋白的量的减少。

[0079] E66. 一种在有此需要的受试者中治疗TDP-43疾病、预防TDP-43疾病或延迟TDP-

43疾病的进展的方法,所述方法包括施用有效量的选自以下的一种或多种药剂:E1-E39中任一项的融合蛋白、表达E1-E39的融合蛋白的细胞、E40-E45中任一项的核酸、E46-E48中任一项的载体、E49-E56中任一项的病毒颗粒和E57的药物组合物。

[0080] E67. E66的方法,其中所述TDP-43疾病选自ALS、FTD、帕金森氏病、亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏病、海马硬化、路易体痴呆和边缘叶受累为主的年龄相关TDP-43脑病。

[0081] E68. E67的方法,其中所述TDP-43疾病是ALS。

[0082] E69. 以下中的一种或多种制备可用于预防或延迟受试者中的TDP-43疾病进展的药物的用途:E1-E39中任一项的融合蛋白、表达E1-E39的融合蛋白的细胞、E40-E45中任一项的核酸、E46-E48中任一项的载体、E49-E56中任一项的病毒颗粒和E57的药物组合物。

[0083] E70. E69的用途,其中所述TDP-43疾病选自ALS、FTD、帕金森氏病、亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏病、海马硬化、路易体痴呆和边缘叶受累为主的年龄相关TDP-43脑病。

[0084] E71. E69或E70的用途,其中所述TDP-43疾病是ALS。

附图说明

[0085] 图1A显示了代表性的人J结构域序列的Clustal Omega序列比对。高度保守的HPD结构域显示于突出显示的框中。

[0086] 图1B显示了代表性的人J结构域序列的Clustal Omega序列比对。

[0087] 图2显示了包含J结构域和TDP-43结合结构域的一些说明性融合蛋白构建体。

[0088] 图3显示了如通过荧光显微镜检查测量的,细胞中的TDP43-GFP融合构建体聚集的可视化,以及J结构域融合蛋白在减少聚集方面的效应。用GFP报告子构建体转染的细胞的荧光显微镜检查与仅用报告子构建体转染的细胞(小图1和5)进行比较,所述GFP报告子构建体含有全长TDP-43 (GFP-TDP43FL;小图1-4)或TDP-43的C末端片段(GFP-TDPCTF;小图5-8),进一步含有scFv对照(小图2和6)、DnaJB1-scFv (3B12A)融合蛋白(小图3和7)、以及在保守HPD结构域中含有P33Q突变的DnaJB1-scFv (3B12A)融合蛋白(小图4和8)。

[0089] 图4显示了针对仅表达GFP-TDP43CTF构建体的对照细胞标准化的、来自图3的不同构建体中的聚集的定量。

[0090] 图5显示了表达GFP报告子构建体、伴随或不伴随融合蛋白构建体的细胞提取物的免疫印迹分析。上图是使用抗GFP抗体的蛋白质印迹分析,检测到较大的GFP-TDP43FL(泳道1-4)和较小的GFP-TDP43CTF(泳道5-8)。下图是使用抗FLAG表位抗体的蛋白质印迹分析,所述抗FLAG表位抗体检测scFv (3B12A)对照(泳道2和6)、融合蛋白构建体(DnaJB1-scFv (3B12A),泳道3和7)、以及在保守的HPD结构域中含有P33Q突变的DnaJB1-scFv (3B12A)融合蛋白(小图4和8)。

[0091] 图6显示了来自细胞提取物的可溶级分或不可溶级分的GFP报告子构建体的免疫印迹检测,所述细胞表达GFP-TDP43FL或GFP-TDP43CTF报告子构建体,并且还不表达(阴性对照)或者表达构建体2或3。

[0092] 图7显示了如通过荧光显微镜检查测量的,细胞中的TDP43-GFP融合构建体聚集的可视化,以及J结构域融合蛋白在减少聚集方面的效应。用GFP报告子构建体转染,并且进一步含有构建体2、3、5、6和7的细胞的荧光显微镜检查与表达单独的报告子的对照(无)进行比较,所述GFP报告子构建体含有全长TDP-43 (GFP-TDP43FL)或TDP-43的C末端片段(GFP-

TDPCTF)。

[0093] 图8显示了如通过荧光显微镜检查测量的,细胞中的TDP43-GFP融合构建体聚集的可视化,以及J结构域融合蛋白在减少聚集方面的效应。用GFP报告子构建体转染,并且进一步含有构建体1、2、3、4、9、10、11或14的细胞的荧光显微镜检查与表达单独的报告子的对照(无)进行比较,所述GFP报告子构建体含有全长TDP-43 (GFP-TDP43FL) 或TDP-43的C末端片段 (GFP-TDPCTF)。

[0094] 图9显示了TDP-43报告子构建体的定量和检测:图9A显示了来自图8所示的实验中的细胞中的聚集的定量差异。图9B显示了使用抗GFP抗体对细胞提取物的免疫印迹分析,以定量细胞提取物中的报告子构建体水平。

[0095] 图10显示了晚期自噬的有力抑制剂巴佛洛霉素A1 (BFA) 和蛋白酶体抑制剂MG132对共表达构建体3的细胞中的GFP-TDP43CTF减少的作用。细胞用报告子转染构建体GFP-TDP43FL (泳道2) 或GFP-TDP43CTF (泳道3-8) 进行转染,并且用编码构建体3 (泳道4-8) 的核酸进行共转染。如通过免疫印迹检测的,用任一BFA (以0.01 μ M,泳道5,以及以0.1 μ M,泳道6) 处理细胞导致更高水平的GFP-TDP43CTF报告蛋白。相比之下,用0.1或1.0 μ M的MG132 (分别为泳道7和8) 处理几乎没有乃至没有效应。

[0096] 图11显示了共表达构建体3 (泳道4和8) 对细胞提取物的可溶(非聚集) 和不可溶(聚集) 级分中的GFP-TDP43CTF报告子水平的作用,如用抗TDP43抗体(图11A) 和抗磷酸化TDP43抗体(图11B) 探测到的。

[0097] 图12显示了构建体3 (泳道3)、构建体7 (泳道4)、构建体2 (泳道5)、构建体15 (泳道6) 和构建体16 (泳道7) 的共表达在减少细胞提取物中的磷酸化GFP-TDP43CTF报告子水平方面的效应,如用抗磷酸化TDP43抗体探测到的。

[0098] 图13显示了在表达TDP43FL (泳道2、3、7和8) 和TDP43 Δ NLS构建体(泳道4、5、9和10) 的细胞中共表达构建体3 (泳道3、5、8和10),对 TDP-43 (如用抗TDP43抗体探测到的,上图)、磷酸化TDP-43 (如用抗磷酸TDP-43抗体探测到的,第二个小图)、Flag表位(用抗FLAG抗体探测到的,第三个小图) 和微管蛋白(抗微管蛋白抗体,下图) 水平的作用。

[0099] 图14显示了对于减少磷酸化TDP-43的能力进行测试的另外构建体。表达GFP-TDP43FL (泳道1和7) 或GFP-TDP43CTF (泳道2-6、8-12) 的细胞用构建体3 (泳道3和9)、构建体17 (泳道4和10)、构建体18 (泳道5和11) 和构建体19 (泳道6和12) 进行共转染。用抗磷酸化TDP43抗体探测可溶级分(泳道1-6) 和不可溶级分(泳道7-12)。

[0100] 图15显示了通过鞘内(IT) 或脑血管内(ICV) 注射施用的,用含有对照或编码构建体3的载体的AAV rh10注射的C57小鼠的结果概括。图15A概括了研究时间表。图15B显示了在用含有对照(泳道1和2) 或含有构建体3的载体(泳道3和4) 的AAV rh10 IT施用后3周,来自小鼠的大脑提取物的免疫印迹。图15C显示了在ICV注射后,来自小鼠的大脑提取物的免疫印迹。泳道1 - 3显示了在用含有对照(泳道1和2) 或含有构建体3的载体(泳道3) 的AAV rh10 ICV施用后3周,来自小鼠的大脑提取物的免疫印迹。泳道4-8显示来自对照(泳道4 - 6) 和构建体3 (泳道7和8) 小鼠的8周小鼠的免疫印迹。

[0101] 图16显示了使用 Δ NLS8小鼠的结果概括,通过ICV注射施用,向所述小鼠注射含有对照或编码构建体3的载体的AAV rh10。图16A显示了研究时间表。图16B显示了来自每组的雄性的平均重量。图16C显示了来自不同组的小鼠的存活。

[0102] 定义

如在说明书和权利要求中使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”包括复数指示物,除非上下文另有明确说明。例如,术语“细胞”包括多个细胞,包括其混合物。

[0103] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,以指任何长度的氨基酸聚合物。聚合物可以是线性或分支的,它可以包含修饰的氨基酸,并且它可以被非氨基酸中断。该术语还包括这样的氨基酸聚合物,其已例如通过二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操纵例如与标记组分缀合进行修饰。

[0104] 如本文使用的,术语“氨基酸”指天然和/或非天然或合成氨基酸,包括但不限于D或L旋光异构体、以及氨基酸类似物和拟肽。标准的单字母或三字母代码用于指定氨基酸。

[0105] “宿主细胞”包括个别细胞或细胞培养物,其可以是或已是主题载体的接受者。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代。由于自然、意外或有意的突变,后代可能不一定与原始亲本细胞完全等同(在形态学或总DNA互补体的基因组方面)。宿主细胞包括在体内用本发明的载体转染的细胞。

[0106] 当用于描述本文公开的各种多肽时,“分离的”意指已鉴定并且与其自然环境的组分分开和/或从其中回收的多肽。其自然环境的污染物组分是通常将干扰多肽的诊断或治疗用途的材料,并且可能包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。如对于本领域技术人员显而易见的,非天然存在的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段不需要“分离”,以将其与其天然存在的对应物区分开。另外,“浓缩的”、“分开的”或“稀释的”多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段与其天然存在的对应物是可区别的,因为每体积的分子浓度或数目一般大于其天然存在的对应物。一般而言,通过重组手段制备并在宿主细胞中表达的多肽被视为“分离的”。

[0107] “分离的”多核苷酸或多肽编码核酸或其它多肽编码核酸是被鉴定且与至少一种污染物核酸分子分开的核酸分子,其通常在多肽编码核酸的天然来源中与所述污染物核酸分子结合。分离的多肽编码核酸分子与其在自然界中发现的形式或背景不同。因此,分离的多肽编码核酸分子不同于如天然细胞中存在的特定多肽编码核酸分子。然而,分离的多肽编码核酸分子包括在通常表达多肽的细胞中包含的多肽编码核酸分子,在所述细胞中,例如,所述核酸分子在不同于天然细胞的染色体或染色体外定位中。

[0108] 术语“多核苷酸”、“核酸”、“核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用。它们指任何长度的核苷酸的聚合形式,所述核苷酸或脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸、或其类似物。多核苷酸可以具有任何三维结构,并且可以执行已知或未知的任何功能。下述是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段的编码区或非编码区、由连锁分析限定的基因座(loci)(基因座(locus))、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离DNA、任何序列的分离RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。如果存在的话,可以在聚合物组装之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸序列可能被非核苷酸组分中断。多核苷酸可以例如通过与标记组分缀合,在聚合后进行进一步修饰。

[0109] 如本文定义的,术语“TDP-43病症”或“TDP-43介导的疾病”指与细胞内TDP-43聚集物,特别是TDP-43突变蛋白聚集物的形成相关的病症。TDP-43病症的实例包括但不限于优选指肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、帕金森氏病、亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏病、

海马硬化、路易体痴呆和边缘叶受累为主的年龄相关TDP-43脑病。

[0110] “载体”是优选在适当的宿主中自主复制的核酸分子,其将插入的核酸分子转移到宿主细胞内和/或之间。该术语包括主要发挥功能用于将DNA或RNA插入细胞内的载体,主要发挥功能用于复制DNA或RNA的复制载体,以及发挥功能用于转录和/或翻译DNA或RNA的表达载体。还包括的是提供多于一种上述功能的载体。“表达载体”是这样的多核苷酸,当引入适当的宿主细胞内时,其可以被转录并翻译成多肽。“表达系统”通常意味着由表达载体构成的合适的宿主细胞,所述表达载体可以发挥功能以产生所需的表达产物。

[0111] 术语“可操作地连接的”指所述组分的并置,其中所述组分处于允许它们以其预期方式发挥功能的关系中。“可操作地连接”到编码序列的控制序列以这样的方式进行连接,使得编码序列的表达在与控制序列相容的条件下实现。“可操作连接的”序列既可以包括与目的基因邻接的表达控制序列,又可以包括反式或在一定距离处起作用以控制目的基因的表达控制序列。术语“表达控制序列”指实现它们与之连接的编码序列的表达和加工所必需的多核苷酸序列。表达控制序列包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的RNA加工信号,例如剪接和多聚腺苷酸化信号;稳定细胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(例如,Kozak共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;以及在需要时,增强蛋白质分泌的序列。此类控制序列的性质取决于宿主生物而不同;在原核生物中,此类控制序列一般包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列;在真核生物中,一般地,此类控制序列包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”预期包括其存在对于表达和加工是必需的组分,并且还可以包括其存在是有利的另外组分,例如前导序列和融合配偶体序列。除非另有说明,否则本文将编码本发明的融合蛋白的核酸分子插入表达载体内的描述或陈述,意指所插入的核酸也已载体内可操作地连接至启动子以及其它转录和翻译控制元件,当含有所插入的核酸分子的表达载体引入相容的宿主细胞或生物的相容细胞内时,所述元件是所编码的融合蛋白表达所需的。

[0112] 当应用于多核苷酸时,“重组”意指多核苷酸是体外克隆、限制和/或连接步骤以及其它程序的各种组合的产物,所述其它程序导致可能潜在地在宿主细胞中表达的构建体。

[0113] 术语“基因”和“基因片段”在本文中可互换使用。它们指含有至少一个开放读码框的多核苷酸,在转录和翻译后,所述开放读码框能够编码特定的蛋白质。基因或基因片段可以是基因组或cDNA,只要该多核苷酸含有至少一个开放读码框,其可以覆盖整个编码区或其区段。“融合基因”是由连接在一起的至少两种异源多核苷酸构成的基因。

[0114] 术语“疾病”和“病症”可互换使用,以指示根据本领域可接受的医学标准和实践鉴定的病理状态。

[0115] 如本文使用的,术语“有效量”指疗法的量,其足以减少或改善疾病或者其一种或多种症状的严重程度和/或持续时间;预防有害状态或病理状态的进展;引起病理状态的消退;预防与病理状态相关的一种或多种症状的复发、发展、发作或进展;检测病症;或者增强或改善疗法的预防效应或治疗效应(例如,施用另一种预防剂或治疗剂)。

[0116] 如本文使用的,术语“J结构域”指保留加速Hsp70及其同源物的固有ATP酶催化活性的能力的片段。已确定了各种J蛋白的J结构域(参见例如,Kampinga等人(2010) Nat. Rev., 11 : 579-592;Hennessy等人(2005) Protein Science, 14: 1697-1709,其各自通过引用以其整体并入),并且通过许多标志进行表征:其特征在于四个 α -螺旋(I、II、III、IV),

并且通常具有在螺旋II和III之间,具有组氨酸、脯氨酸和天冬氨酸的高度保守的三肽序列基序(称为“HPD基序”)。通常,J蛋白的J结构域的长度为50至70个氨基酸,并且J结构域与Hsp70-ATP伴侣蛋白的相互作用(结合)位点被认为是从螺旋II内延伸的区域,并且HPD基序是刺激Hsp70 ATP酶活性所必需的。如本文使用的,术语“J结构域”意欲包括保留加速Hsp70固有ATP酶活性的能力的天然J结构域序列及其功能变体,所述能力可以使用本领域众所周知的方法进行测量(参见例如,Horne等人(2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 21679-21688,其通过引用以其整体并入本文)。表1中提供了人J结构域的非限制性列表。

具体实施方式

[0117] 本发明人已发现了使细胞与包含J蛋白的J结构域和TDP-43结合结构域的融合蛋白构建体接触具有出乎意料的减少突变型TDP43蛋白聚集的效应。突变型TDP-43的聚集被认为导致许多破坏性疾病,包括但不限于肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆和阿尔茨海默氏病。相应地,本文提供了例如在有此需要的受试者中治疗TDP-43病症的有用组合物和方法。

[0118] 为了克服与基于伴侣的疗法相关的问题,我们调查了是否有可能设计具有高度特异性的人工伴侣蛋白。我们设计了一系列融合蛋白构建体,其包含用于Hsp70结合/激活的效应结构域(J结构域序列)和赋予对TDP-43蛋白的特异性的结构域。所得到的融合蛋白作用于加速Hsp70及其同源物的固有ATP酶催化活性,导致增加的蛋白质折叠、减少的聚集和/或加速的清除。

[0119] I. 融合蛋白构建体

a. 可用于本发明中的J结构域

已确定了各种J蛋白的J结构域。参见例如,Kampinga等人,*Nat. Rev.*, 11: 579-592 (2010); Hennessy等人, *Protein Science*, 14: 1697-1709 (2005)。可用于制备本发明的融合蛋白的J结构域具有主要加速HSP70 ATP酶活性的J结构域的关键限定特征。相应地,可用于本发明中的分离的J结构域包含多肽结构域,其特征在于四个 α -螺旋(I、II、III、IV),并且通常具有在螺旋II和III之间,具有组氨酸、脯氨酸和天冬氨酸的高度保守的三肽序列(称为“HPD基序”)。通常,J蛋白的J结构域的长度为50至70个氨基酸,并且J结构域与Hsp70-ATP伴侣蛋白的相互作用(结合)位点被认为是从螺旋II内延伸的区域,并且HPD基序是原始活性的基础。代表性的J结构域包括但不限于DnaJB1、DnaJB2、DnaJB6、DnaJC6的J结构域,SV40的大T抗原的J结构域和哺乳动物半胱氨酸串联蛋白(cysteine string protein) (CSP- α)的J结构域。表1中提供了可以用于本发明的融合蛋白中的这些和其它J结构域的氨基酸序列。保守的HPD基序以粗体突出显示。在一个实施方案中,本文公开的融合蛋白包含选自SEQ ID NO: 1 - 50的J结构域。如下文实施例节段中所示,发明人发现使用缺少保守“HPD”基序的J结构域不能减少蛋白质聚集。像这样,在另一个实施方案中,本文公开的融合蛋白包括包含共有HPD基序的J结构域。在一个特定实施方案中,选自SEQ ID NO: 1-15、17-50。

[0120] 在一个特定实施方案中,融合蛋白包含选自SEQ ID NO: 1、5、6、10、16、24、25、31和49的J结构域。

[0121] 表1. 代表性的人J结构域序列

蛋白质 名称	SEQ ID NO:	长度	J结构域氨基酸序列
DNAJA1	1	63	TYDYDLGVKPNATQEELKKAYRKLALKY HPD KNPNEGEKFK QISQAYEVLSDAKKRELYDKGG
DNAJA2	2	63	KLYDILGVPPGASENELKKAYRKLAKY HPD KNPAGDKFK EISFAYEVLSDNPEKRELYDRYG
DNAJA3	3	66	DYYQILGVPRNASQKEIKKAYYQLAKKY HPD TNKDDPKAKE KFSQLAEAYEVLSDDEVKRKQYDAYG
DNAJA4	4	67	ETQYYDILGVKPSASPEEIKKAYRKLALKY HPD KNPDEGEK FKLISQAYEVLSDPKKRDVYDQGGEQ
DNAJB1	5	69	GKDYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRY HPD KNKEPGAE EKFKIEIAEAYDVLS DPRKREIFDRYGEE
DNAJB2	6	70	ASYYEILDVPRSASADDIKKAYRRKALQW HPD KNPDNKEFA EKKFKEVAEAYEVLSDKHKREIYDRYGRE
DNAJB3	7	69	MVDYYEVLDPVPRQASSEAIKKAYRKLALKW HPD KNPENKEE AERRFKQVAEAYEVLSDAKKRDIYDRYG
DNAJB4	8	69	GKDYCILGLIEKGASDEDIKKAYRKQALKF HPD KNKSPQAE EKFKVEAEAYEVLSDPKKREIYDQFGEE
DNAJB5	9	65	DYYKILGIPSGANEDEIKKAYRKMALKY HPD KNKEPNAEEK FKEIAEAYDVLS DPRKRGlyDQYG
DNAJB6	10	68	VDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKLALKW HPD KNPENKEEA ERKFKQVAEAYEVLSDAKKRDIYDKYG
DNAJB7	11	67	DYYEVLGLQRYASPEDIKKAYHKVALKW HPD KNPENKEEAE RKFKVEAEAYEVLSDNDEKRDIYDKYG
DNAJB8	12	67	NYEVLGVQASASPEDIKKAYRKLALRW HPD KNPDNKEEAE KKFKLVSEAYEVLSDSKKRSlyDRAG
DNAJB9	13	65	SYDILGVPKSASERQIKKAFHKLAMKY HPD KNKSPDAEAK FREIAEAYETLSDANRRKEYDTLG
DNAJB11	14	66	DFYKILGVPRSASIKDIKKAYRKLALQL HPD RNPDDPQAE KFQDLGAAYEVLSDSEKRRQYDTYG
DNAJB12	15	65	YEILGVSRGASDEDLKKAYRRLALKF HPD KNHAPGATEAFK AIGTAYAVLSNPEKRRQYDQFGDD
DNAJB13	16	66	DYYSVLGITRNSDAQIKQAYRRLALKHHPLKSNEPSSAEI FRQIAEAYDVLS DPMKRGlyDKFG
DNAJB14	17	65	NYEVLGVTKDAGDEDLKKAYRKLALKF HPD KNHAPGATDA FKKIGNAYAVLSNPEKRRQYDLTG
DNAJC1	18	65	NFYQFLGVQQDASSADIRKAYRKLSTL HPD KNKDENAETQ FRQLVAIYEVLKDDERRQRYDDIL
DNAJC2	19	74	DHYAVLGLGHVRYKATQRQIKAAHKAMVLKH HPD KRKAAGE PIKEGDNDYFTCITKAYEMLSDPVKRRAFNSVD
DNAJC3	20	69	DYYKILGVKRNAKKQEIIKAYRKLALQW HPD NFQNEEEKKK AEKKFIDIAAAKEVLSDPEMRKKFDDGE
DNAJC4	21	66	TYYELLGVHPGASTEVEVKRAFFSKSKEL HPD RDPGNPSLHS RFVELSEAYRVLRSREQSRRSYDDQL

DNAJC5	22	70	GESLYHVLGLDKNATSDDIKKSYRKLALKY HPD KNPDNPEA ADKFKEINNAHAILTDATKRNIYDKYGS
DNAJC5B	23	66	ALYEILGLHKGASNEEIKKTYRKLALKH HPD KNPDDPAATE KFKEINNAHAILTDISKRSIYDKYG
DNAJC6	24	65	TKWKPVGMADLVTPEQVKKVYRKAVLVV HPD KATGQPYEQY AKMIFMELNDAWSEFENQGGKPLY
DNAJC7	25	71	DYYKILGVVDKNASEDEIKKAYRKRALMH HPD RHSGASAEVQ KEEEKKFKEVGEAFTILSDPKKKTRYDSGQ
DNAJC8	26	68	NPFEVLQIDPEVTDDEIKKRFRQLSILV HPD KNQDDADRAQ KAFAVDKAYKLLLDQEQKKRALDVIQ
DNAJC9	27	68	DLYRVLGVRREASDGEVRRGYHKVSLQV HPD RVGEGDKEDA TRRFQILGKVYSVLSDREQRAVYDEQG
DNAJC10	28	66	DFYSLLGVSKTASSREIRQAFKKLALKL HPD KNPNPNNAHG DFLKINRAYEVLKDEDLRKKYDKYG
DNAJC11	29	69	DYYSLLNVRREASSEELKAAVRRCLMLY HPD KHRDPELKSQ AERLFNLVHQAYEVLSDPQTRAIYDIYG
DNAJC12	30	66	DYYTLLGCDELSSVEQILAEFKVRALECH HPD KHPENPKAVE TFQKLQKAKEILTNEESRARYDHWR
DNAJC13	31	66	DAYEVLNLPQGGPHDESKIRKAYFRLAQKY HPD KNPEGRD MFEKVNKAYEFLCTKSAKIVDGPDP
DNAJC14	32	65	NPFHVLGVEATASDVELKKAYRQLAVMV HPD KNHHPRAEEA FKVLRAAWDIVSNAEKREKEYEMKR
DNAJC15	33	55	EAGLILGVSPSAGKAKIRTAHRRVMILN HPD KGGSPYVAAK INEAKDLLETTTKH
DNAJC16	34	65	DPYRVLGVSRITASQADIKKAYKKLAREW HPD KNKDPGAEDK FIQISKAYEILSNEEKRSNYDQYG
DNAJC17	35	66	DLYALLGIEEKAADKEVKKAYRQKALSCH HPD KNPDNPRAAE LFHQLSQALEVLTDAARAAYDKVR
DNAJC18	36	65	NYYEILGVSRDASDEELKKAYRKLALK HPD KNCAPGATDA FKAIGNAFVLSNPDKRLRYDEYG
DNAJC19	37	55	EAALILGVSPSTANKGKIRDHRRIMLLN HPD KGGSPYIAAK INEAKDLLEGQAKK
DNAJC20	38	72	DYFSLMDCNRSFRVDTAKLQHRYQQLQRLV HPD FFSQRSQT EKDFSEKHSTLVNDAYKTLLAPLSRGLYLLK
DNAJC21	39	67	CHYEALGVRRDASEEELKKAYRKLALKW HPD KNLDNAEEAA EQFKLIQAAYDVLSDPQERAWYDNHR
DNAJC22	40	65	LAYQVLGLSEGATNEEIHRSYQELVKVW HPD HNLDQTEEAQ RHFLEIQAAEVLSPQPRKPWGSRR
DNAJC23	41	62	NPYEVNLNPDGATVAEIKKQYRLLSLKY HPD KGGDEVFMFR IAKAYAALTDEESRKNWEEFG
DNAJC24	42	72	DWYSILGADPSANISDLKQKYQKLILMY HPD KQSTDVPAGT VEECVQKFIEIDQAWKILGNEETKREYDLQR
DNAJC25	43	76	DCYEVLGVSRSAGKAEIARAYRQLARRY HPD RYRPQPGDEG PGRTPQSAEEAFLLVATAYETLKDEETRKDYDYML
DNAJC26	44	65	SRWTPVGMADLVAPEQVKKHYRRAVLAV HPD KAAGQPYEQH AKMIFMELNDAWSEFENQGSRLPF
DNAJC27	45	57	DSWDMLGVKPGASRDEVNKAYRKLAVLL HPD KCVAPGSEDA FKAVVNARTALLKNIK
DNAJC28	46	65	EYYRLLNVEEGCSADEVRESFHKLAKQY HPD SGSNTADSAT FIRIEKAYRKVLSHVIEQTNASQS

DNAJC29	47	88	ILKEVTSVVEQAWKLPESEKIKIIRRLYLKWH HPD KNPENHD IANEVFKHLQNEINRLEKQAFLDQADNRASRRFTSTASRF QSDKYS
DNAJC30	48	66	ALYDLLGVSTATQAQIKAAYYRQCFLY HPD RNSGSAEAAE RFTRISQAYVVLGSATLRRKYDRGL
SV40 J结构域	49	64	QLMDLLGLERSAWGNIPLMRKAYLKCKE FHPD KGGDEEKM KKMNTLYKKMEDGVKYAHQPDFG
细菌 J-结构域	50	70	KQDYIEILGVSKTAEEREIRKAYKRLAMKY HPD RNQGDKEA EAKFKEIKEAYEVLTDTSQKRAAYDQYGA

[0122] b. TDP-43结合结构域

融合蛋白还包含至少一个TDP-43结合结构域。TDP-43结合结构域可以是单链多肽,或与J结构域连接以形成融合蛋白的多聚体多肽。

[0123] 理想的是TDP-43结合结构域具有足够的亲和力,以能够结合当在细胞内以病理水平存在时的TDP-43蛋白。因此,在一个实施方案中,融合蛋白包含TDP-43结合结构域,当在96孔微量滴定板上通过ELISA进行测试时,所述TDP-43结合结构域对于TDP-43报告子构建体(例如,全长TDP-43 (Novus Biologicals,NBP2-22850,Centennial,CO)具有例如2 μ M或更小、1 μ M或更小、500 nM或更小、300 nM或更小、100 nM或更小、30 nM或更小的 K_D 。

[0124] TDP-43结合结构域先前已得到鉴定且进行表征(参见例如,美国专利号10,259,866、WO 2016/53610、WO 2018/218252、WO 2019/134981、WO 2019/177138,其各自通过引用并入本文)。因此,在另一个实施方案中,融合蛋白包含选自SEQ ID NO: 51-55的TDP-43结合结构域(参见例如,表2)。在一个特定实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO: 51的TDP-43结合结构域。在另一个实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO: 53的TDP-43结合结构域。在另外一个实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO: 52的TDP-43结合结构域。

[0125] 在另一个实施方案中,融合蛋白还考虑了使用与J结构域化学缀合的TDP-43结合结构域。TDP-43结合结构域可以直接缀合至J结构域。可替代地,它可以通过接头与J结构域缀合。例如,存在大量化学交联剂,其是本领域技术人员已知的,并且可用于使TDP-43结合结构域与J结构域交联,或者使靶向结构域与包含TDP-43结合结构域和J结构域的融合蛋白交联。例如,交联剂是异双功能交联剂,其可以用于以逐步的方式连接分子。异双功能交联剂提供了设计用于缀合蛋白质的更特异性偶联方法的能力,从而减少了不需要的副反应例如同蛋白聚合物的发生。各种各样的异双功能交联剂是本领域已知的,包括琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、间马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS);N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)、琥珀酰亚胺基4-(对马来酰亚胺苯基)丁酸酯(SMPB)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC);4-琥珀酰亚胺基氧羰基- α -甲基- α -(2-吡啶二硫代)-甲苯(SMPT)、N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基6-[3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯]己酸酯(LC-SPDP)。具有N-羟基琥珀酰亚胺部分的那些交联剂可以作为N-羟基磺基琥珀酰亚胺类似物获得,其一般具有更大的水溶性。另外,在连接链内具有二硫桥的那些交联剂可以相反地作为烷基衍生物合成,以便减少体内的接头切割量。除异双功能交联剂之外,还存在许多其它交联剂,包括同双功能交联剂和光反应性交联剂。辛二酸二琥珀酰亚胺酯(DSS)、二马来酰亚胺基己烷(BMH)和庚二亚氨酸二甲酯2 HCl (Forbes-Cori病)是有用的同双功能交联剂的实例,并且

双-[B-(4-叠氨基水杨基氨基)乙基]二硫化物(BASED)和N-琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氨基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(SANPAH)是用于本公开内容中的有用的光反应性交联剂的实例。关于蛋白质偶联技术的最新综述,参见通过引用并入本文的Means等人,(1990) *Bioconj. Chem.* 1:2-12。

[0126] 表2:TDP-43结合结构域的实例

名称	SEQ ID NO:	长度	序列
3B12A	51	241	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYMHVWKQ RTEQGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQGKATITADTSSNT AYLQLSSLTSEDTAVYYCTIIYYYGSRYVDYWGQGTTLT VSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPPTMAASPEKITIT CSASSSISSSYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPA RFSGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSSIPLTFG SGTKLEI
51C1	52	239	EVQLVESGGGLVQPGGSLRISCTTSGFIFSDYWMHWVRQ APGKGLTWVSRINLDGSDTIYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRVEDTAIYYCARSRKSVWGQGTMTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSNT DVGAYDYVSWSQQLPGKAPKFVIFDQVDRPSGISDRFSG SKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTKSGTLVFGGGT KVTVV
3F10	53	248	EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSQAMSWVRQ APGKGLEWVSALSRTGDTWYADSVRGRFTVSRDDSKNI FYLEMNSLRAEDTAVYYCAKNYYSSFGYNWAAFHIWGQG TMVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLISLSPGE RATLSCRASQDVNNNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRR TGVPDRFSGRSGTDFTLTINRLEPEDFAMYFCQQYGGG PPYTFGQGTKLEIK
多聚Q (Q25)	54	25	QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ
QBP1	55	11	SNWKWWPGIFD

[0127] c. 任选的接头

本文所述的融合蛋白可以任选地含有一种或多种接头。接头可以是肽的或非肽的。接头的目的尤其是在蛋白质内的功能结构域之间提供足够的距离(例如,在J结构域和TDP-43结合结构域之间、在TDP-43结合结构域的串联排列之间、在J结构域和TDP-43结合结构域和任选的靶向试剂之间、或在J结构域和TDP-43结合结构域和任选的检测结构域或表位之间),用于结构域各自的最佳功能。显然,接头优选并不干扰J结构域的分别功能,所述J结构域是根据本发明的融合蛋白的靶蛋白结合结构域。如果存在于本发明的融合蛋白中,则接头选择为减弱由靶蛋白(TDP-43蛋白)引起的细胞毒性,并且如果直接附着达到所需效应,则可以省略接头。存在于本发明的融合蛋白中的接头可以包含一个或多个氨基酸,其由存在于表达载体的克隆位点内或周围的核酸区段上的核苷酸序列编码,在所述表达载体内,在框内插入如本文所述的编码蛋白质结构域或整个融合蛋白的核酸区段。在一个实施方案中,肽接头的长度为1个氨基酸至20个氨基酸。在另一个实施方案中,肽接头的长度为2个氨基酸至15个氨基酸。在另外一个实施方案中,肽接头的长度为2个氨基酸至10个氨基酸。

[0128] 选择一种或多种多肽接头以产生根据本发明的融合蛋白在本领域从业人员的知识和技术内。参见例如, Arai等人, *Protein Eng.*, 14 (8): 529-532 (2001); Crasto等人, *Protein Eng.*, 13 (5): 309-314 (2000); George等人, *Protein Eng.*, 15 (11): 871-879 (2003); Robinson等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5929-5934 (1998), 所述参考文献各自通过引用以其整体并入本文。可以用于制备根据本发明的融合蛋白、具有两个或更多个氨基酸的接头的实例包括但不限于下表3中提供的那些接头。

[0129] 表3: 接头序列

SEQ ID NO:	长度	序列
56	2	SR
57	4	GTGS
58	5	GLESR
59	4	GGSG
60	4	GGGS
61	5	DIAAA
62	9	DIAAALESR
63	15	GGGSGGGSGGGGS
64	11	AEAAAKEAAK
65	15	SGGSGGGSGGGGS
66	25	DIGGGSGGGSGGGSGGGGSAAA

[0130] d. 靶向试剂

本文公开的融合蛋白可以进一步包含靶向部分。如本文使用的, 术语“靶向部分”和“靶向试剂”可互换使用, 并且指与融合蛋白相关的物质, 其增强融合蛋白的结合、转运、累积、停留时间、生物利用度, 或者修饰融合蛋白在细胞或受试者体内的生物活性或疗效。靶向部分可以在组织、细胞和/或亚细胞水平上具有功能性。例如, 在融合蛋白施用到受试者内之后, 靶向部分可以指导融合蛋白定位到特定细胞、组织或器官, 或者细胞内分布。在一个实施方案中, 靶向部分定位于融合蛋白的N末端处。在另一个实施方案中, 靶向部分定位于融合蛋白的C末端处。在另外一个实施方案中, 靶向部分内部定位。在另一个实施方案中, 靶向部分经由化学缀合附着至融合蛋白。

[0131] 靶向部分可以尤其包括但不限于有机或无机分子、肽、肽模拟物、蛋白质、抗体或其片段、生长因子、酶、凝集素、抗原或免疫原、病毒或其组分、病毒载体、受体、受体配体、毒素、多核苷酸、寡核苷酸或适体、核苷酸、碳水化合物、糖、脂质、糖脂、核蛋白、糖蛋白、脂蛋白、类固醇、激素、生长因子、化学引诱剂、细胞因子、趋化因子、药物或小分子。

[0132] 在本发明的一个示例性实施方案中, 靶向部分增强平台或其相关配体和/或活性剂的结合、转运、累积、停留时间、生物利用度, 或者修饰平台或其相关配体和/或活性剂在靶细胞或组织中的生物活性或疗效, 所述靶细胞或组织例如神经元细胞、中枢神经系统和/或周围神经系统。因此, 靶向部分可以对于与中枢神经系统相关的细胞受体具有特异性, 或者以其它方式与经由血脑屏障 (BBB) 向CNS的增强递送相关。因而, 如上所述, 配体既可以是配体又可以是靶向部分。

[0133] 在一些实施方案中, 靶向部分可以是细胞穿透肽, 例如, 如通过引用以其整体并入

的美国专利号10,111,965中所述。在另一个实施方案中,靶向部分可以是抗体或其抗原结合片段或单链衍生物,例如,如通过引用以其整体并入本文的美国序列号16/131,591中所述。在进一步的实施方案中,靶向部分可以是用于核定位信号或核输出信号的氨基酸序列。

[0134] 靶向部分可以通过与核心直接或间接结合而偶联到用于靶向细胞递送的平台。例如,在其中核心包含纳米颗粒的实施方案中,靶向部分与纳米颗粒的缀合可以利用用于将PEG栓系到纳米颗粒的类似官能团。因此,靶向部分可以通过靶向部分的功能化而与纳米颗粒直接结合。可替代地,如上文讨论的,靶向部分可以通过靶向部分与功能化PEG的缀合而与纳米颗粒间接结合。靶向部分可以通过共价、非共价或静电相互作用附着到核心。在一个实施方案中,靶向部分是肽。在一个特定实施方案中,靶向部分是共价附着到融合蛋白的N末端的肽。

[0135] e. 表位

在某些实施方案中,本发明的融合蛋白含有任选的表位或标签,其可以赋予融合蛋白另外的性质。如本文使用的,术语“表位”和“标签”可互换使用,以指通常长度为300个氨基酸或更少的氨基酸序列,其通常附着到融合蛋白的N末端或C末端端部。在一个实施方案中,本发明的融合蛋白进一步包含用于促进纯化的表位。下表4中提供的可用于纯化的此类表位的实例包括人IgG1 Fc序列(SEQ ID NO: 67)、FLAG表位(DYKDDDDK,SEQ ID NO: 68)、His6表位(SEQ ID NO: 69)、c-myc (SEQ ID NO: 70)、HA (SEQ ID NO: 71)、V5表位(SEQ ID NO: 72)或谷胱甘肽-s-转移酶(SEQ ID NO: 73)。在另一个实施方案中,本发明的融合蛋白进一步包含表位,当施用到受试者例如人内时,所述表位用于增加融合蛋白的半衰期。可用于增加半衰期的此类表位的实例包括人Fc序列。因此,在一个特定实施方案中,除J结构域和TDP-43结合结构域之外,融合蛋白还包含人Fc表位。表位位于融合蛋白的C末端端部处。

[0136] 表4:表位的代表性实例

SEQ ID NO:	表位	长度	序列
67	人IgG1 Fc结构域	232	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
68	FLAG 表位	8	DYKDDDDK
69	His6	6	HHHHHH
70	c-myc	10	EQKLISEEDL
71	HA	9	YPYDVPDYA
72	V5 表位	14	GKPIPNLLGLDST
73	谷胱甘肽-s- 转移酶	220	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEELHYRDEGDKWR NKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMARIYIADKHNLGG CPKERAELSMLEGAVALDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDLFLSKLPE MLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDP MCLDAFPKLVCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQAT FGGGDHPKSD

[0137] f. 细胞穿透肽

在另外其它实施方案中,本文所述的融合蛋白可以进一步包含细胞穿透肽。已知细胞穿透肽将缀合的货物携带到细胞内,所述缀合的货物无论是小分子、肽、蛋白质还是核酸。本发明的融合蛋白中的细胞穿透肽的非限制性实例包括但不限于聚阳离子肽,例如HIV TAT肽49-57、聚精氨酸和穿透蛋白 (penetratin) pAntan (43-58)、两亲性肽例如pep-1、疏水肽例如C405Y等等。参见下表5。

[0138] 表5:细胞穿透肽的实例

SEQ ID NO:	长度	序列
74	9	RKKRRQRRR
75	15	RQIKWFAQNRRMKWKK
76	21	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV
77	17	CSIPPEVKFNKPFVYLI

[0139] 因此,在一个实施方案中,融合蛋白包含细胞穿透肽和融合蛋白,其中所述细胞穿透肽选自SEQ ID NO: 74-77,并且所述融合蛋白包含J结构域和TDP-43结合结构域。在一个实施方案中,融合蛋白选自SEQ ID NO: 80-85和89-96。在另一个实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO: 74的信号序列,并且所述融合蛋白选自SEQ ID NO: 80-85、89-90和92-96。在另一个实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO: 75的细胞穿透肽,并且所述融合蛋白选自SEQ ID NO: 80-85、89-90和92-96。在另外一个实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO: 76的细胞穿透肽,并且所述融合蛋白选自SEQ ID NO: 80-85、89-90和92-96。在又一个实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO: 77的细胞穿透肽,并且所述融合蛋白选自SEQ ID NO: 80-85、89-90和92-96。可以将表达具有细胞穿透肽的融合蛋白构建体的细胞施用于受试者,例如人受试者(例如患有或处于患有TDP-43病症的风险中的患者)。融合蛋白从细胞中进行分泌,其帮助减少含TDP-43蛋白的聚集和/或相关的细胞毒性。

[0140] g. J结构域和TDP-43结合结构域的排列

本文所述的融合蛋白可以多种方式进行排列。在一个实施方案中,TDP-43结合结构域附着到J结构域的C末端侧。在另一个实施方案中,TDP-43结合结构域附着到J结构域的N末端侧。在任一配置中,TDP-43结合结构域和J结构域可以任选地经由如上所述的接头分开。

[0141] 在一些实施方案中,J结构域可以附着到多个TDP-43结合结构域,例如两个TDP-43结合结构域、三个TDP-43结合结构域、四个TDP-43结合结构域或更多个。TDP-43结合结构域可以附着到J结构域的N末端侧。可替代地,TDP-43结合结构域可以附着到J结构域的C末端侧。在另外一个实施方案中,TDP-43结合结构域可以附着到J结构域的N末端和C末端侧上。多个TDP-43结合结构域各自可以是相同的TDP-43结合结构域。在另一个实施方案中,融合蛋白中的多个TDP-43结合结构域各自可以是不同的TDP-43结合结构域(即,不同的序列)。

[0142] 在一些实施方案中,融合蛋白可以包含选自下组的结构:

- a. DNAJ-X-T,
- b. DNAJ-X-T-X-T,
- c. DNAJ-X-T-X-T-X-T,
- d. T-X-DNAJ,
- e. T-X-T-X-DNAJ,
- f. T-X-T-X-T-X-DNAJ,
- g. T-X-DNAJ-X-T,
- h. T-X-DNAJ-X-T-X-T,
- i. TDNAJ-X-TTTT-DNAJ-X-T,
- j. T-X-T-X-DNAJ-X-TT,
- k. TTDNAJ-X-T-X-TTTT-DNAJ-X-T,
- l. T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T-X-T,
- m. T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T,
- n. T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T,
- o. T-X-T-X-T-X-DNAJ-X-T-X-T-X-T,
- p. DnaJ-X-DnaJ-X-T-X-T,
- q. T-X-DnaJ-X-DnaJ,
- r. T-X-T-X-DnaJ-X-DnaJ, 和
- s. T-X-TDnaJ-X-TDnaJ-X-TTTT

其中,

T是TDP-43结合结构域,

DNAJ是J蛋白的J结构域,和

X是任选的接头。

[0143] 在一个实施方案中,融合蛋白包含选自SEQ ID NO: 5、6、10、24和31的J结构域。在一个特定实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO: 5的J结构域。

[0144] 在另一个实施方案中,TDP-43结合结构域选自SEQ ID NO:51-55。在一个特定实施方案中,TDP-43结合结构域选自SEQ ID NO:51-53。

[0145] 在另外一个实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO: 5的J结构域和SEQ ID NO: 51的TDP-43结合结构域。在另一个实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO: 5的J结构域和SEQ ID NO: 53的TDP-43结合结构域的至少两个拷贝。

[0146] 包含J结构域和TDP-43结合结构域的融合蛋白构建体的非限制性实例在图2中示意性地进行描绘,并且还在下表6中显示。在另一个实施方案中,特定融合蛋白构建体选自SEQ ID NO: 80-85和89-96。

[0147] 表6:融合蛋白构建体和对照构建体

构建体 编号	SEQ ID NO:	构建体 名称	长度	序列
1	78	仅J-结构域	75	MGKDYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEPGAE EKFKIEAEAYDVLS DPRKREIFDRYGEEGLKGS
2	79	scFv(3B12A)	253	MGTGSEFDIAAAEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK DYMHVWKQRTQQGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQGGKATITA DTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTIIYYGSRVVDYWGQGT TLTVSGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPPTMAASPGEKITIT CSASSSISSSYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFS GSGSGTSYSLTIGTMEADVATYYCQQGSSIPLTFGSGTKLE I
3	80	JB1- scFv(3B12A)	341	MGKDYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEPGAE EKFKIEAEAYDVLS DPRKREIFDRYGEEGLKGS DIGGGSGG GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPPTMAASPGK FNIKDYMHVWKQRTQQGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQGKA TITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTIIYYGSRVVDYW GQGTTLTVSGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPPTMAASPGK ITITCSASSSISSSYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVP ARFSGSGSGTSYSLTIGTMEADVATYYCQQGSSIPLTFGSG TKLEI
4	81	JB1(P33Q)- scFv(3B12A)	341	MGKDYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEPGAE EKFKIEAEAYDVLS DPRKREIFDRYGEEGLKGS DIGGGSGG GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPPTMAASPGK FNIKDYMHVWKQRTQQGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQGKA TITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTIIYYGSRVVDYW GQGTTLTVSGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPPTMAASPGK ITITCSASSSISSSYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVP ARFSGSGSGTSYSLTIGTMEADVATYYCQQGSSIPLTFGSG TKLEI
5	82	scFv(3B12A)- JB1	323	MGTEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYMHVWKQ RTEQQGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQGGKATITADTSSNTAYL QLSSLTSEDTAVYYCTIIYYGSRVVDYWGQGTTLTVSGGGG SGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPPTMAASPGKITITCSASSSISS SYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYS LTIGTMEADVATYYCQQGSSIPLTFGSGTKLEIGSEFMGKD YYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEPGAE EKFK EIAEAYDVLS DPRKREIFDRYGEEGLKGS
6	83	scFv(3B12A)- JB1- scFv(3B12A)	589	MGTEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYMHVWKQ RTEQQGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQGGKATITADTSSNTAYL QLSSLTSEDTAVYYCTIIYYGSRVVDYWGQGTTLTVSGGGG SGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPPTMAASPGKITITCSASSSISS SYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYS LTIGTMEADVATYYCQQGSSIPLTFGSGTKLEIGSEFMGKD YYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEPGAE EKFK EIAEAYDVLS DPRKREIFDRYGEEGLKGS DIGGGSGGGSGG GGSGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPPTMAASPGKITIT DYMHVWKQRTQQGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQGGKATITA DTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTIIYYGSRVVDYWGQGT TLTVSGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPPTMAASPGKITIT CSASSSISSSYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFS GSGSGTSYSLTIGTMEADVATYYCQQGSSIPLTFGSGTKLE I

7	84	JB6- scFv(3B12A)	342	MVDYYEVLGVQRHASPEDIKKAYRKLALKWHPDKNPENKEEA ERKFKQVAEAYEVLSDAKKRDIYDKYGKEGLNGGDI GGGGSG GGSGGGGSGGGGSAAEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS GFNIKDYMHVWKQRTEQGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQ GK ATITADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCTIIYYGSRVVDY WQGTTTLTVSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPTTMAAS PGE KITITCSASSSISSSYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGV PARFSGSGSGTSYSLTIGTMEAEADVATYYCQQGSSIPLTFGS GTKLEI
8	85	JC6- scFv(3B12A)	346	MTKWKVPGMADLVTPEQVKVYRKAVLVVHPDKATGQPYEQY AKMIFMELNDAWSEFENQGGKPLYDIYDKYGKEGLNGGDI G GGSGGGGSGGGGSGGGGSAAEVQLQQSGAELVKPGASVKLS CTASGFNIKDYMHVWKQRTEQGLEWIGRIDPEDGETKYAPK FQ GKATITADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCTIIYYGSR YVDYWGQGTTLTVSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPTTMAA SPG EKITITCSASSSISSSYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNL ASGV PARFSGSGSGTSYSLTIGTMEAEADVATYYCQQGSSIPL TFGSGTKLEI
9	86	DnaJB1	343	MGTMGKDYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEP GAEEKFKEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEGLKSGSPSGGS GGGANGTSFSYTFHGDPHAMFAEFFGGRNPFDTFFGQRNGEE GMDIDDPFSGFPMGMGGFTNVNFGRSRSAQEPARKKQDPPVT HDLRVSLEEIYSGCTKMKISHKRLNPDGKSI RNEDKILTIE VKKGWKEGTKITFPKEGDQTSNNIPADIVFLKDKPHNIFKR DGS DVIYPARISLREALCGCTVNVPTLDGRTIPVVF KDVI RP GMRKVPGEGLPLPKTPEKRGDLIEFEVIFPERIPQTSRTV LEQVLPI
10	87	Hsp70	840	MSVVGIDLGFQSCYVAVARAGGIETIANEYS DRCTPACISFG PKNRSIGAAAKSQVISNAKNTVQGFKRFHGRAFS DP FVEAEK SNLAYDIVQLPTGLTGIKVTYMEEERNFTTEQVTAMLLSKLK ETAESVLKKPVVDCVSVPCFYTDAERRSVMDATQIAGLNCL RLMNETTAVALAYGIYKQDLPALEEKPRNVFVDMGHSAYQV SVCAFNRGKLVLTAFDTTLGGRKFDEVLVNHFECEFFGKKY KLDIKSKI RALLRLSQECEKLLKMSANASDLPLSIECFMND VDVSGTMNRGKFLEMCNDLLARVEPPLRSVLEQTKLKKEDIY AVEIVGATRI PAVKEKISKFFGKELSTTLNADEAVTRGCAL QCAILSPA FKVREFSITDVVPYPI SLRWNSPAEEGSSDCEVF SKNHAAPFSKVLTFYRKEPFTLEAYYSSPQDL PYPDPAIAQF SVQKVPQSDGSSSKVKVVRVNVHGI FSVSSASLVEVHKSE ENEEP METDQNAKEEEKMQVDQEEPHVEEQQQTPAENKAES EEMETSQAGSKDKKMDQPPQAKKAKVKTSTVDLP IENQLLWQ IDREMLNLYIENEGKMIMQDKLEKERNDAKNAVEEYVYEMRD KLSGEYEFVSEDDRNSFTLKLED TENWLYEDGEDQPKQVYV DKLAELKNLGQPIKIRFQSEERPKLFEELGKQIQQYMKIIS SFKNKEDQYDHLDAADMTKVEKSTNEAMEWMNNKLN LQNKQS LTMDPVVKSKEIEAKIKELTSTCSP IISKPKKVEPPKEEQK NAEQNGPVDGQGDNP GPQAAEQGTD TAVPSDS DKKLP EMDID
11	88	Hsp110	814	MSVVGIDLVGSQSCYI AVARAGGIETIANEFSDRCTPSVISFG SKNRTIGVAAKNQQITHANNTVSNFKRFHGRAFN DPFIQKEK ENLSYDLVPLKNGGVGKVMYMGEEHLFSVEQITAMLLTKLK ETAENSLKKPVTD CVISVPSFFTDAERRSVLDAAQIVGLNCL RLMNDMTAVALNYGIYKQDLPSLDEKPRIVFVDMGHS AFQV SACAFNRGKLVLTAFDPFLGGKNFDEKLVEHFCAEFKTKY KLDASKIRALLRLYQECEKLLKLMSSNSTDLPLNIECFMND KDVSGKMNRSQFEELCAELLQKIEVPLYSLLEQTHLKVEDVS AVEIVGATRI PAVKERIAKFFGKDI STTLNADEAVARGCAL QCAILSPA FKVREFSVTD AVPPFISLIWNHDS EDTEGVHEVF SRNHAAPFSKVLTF LRGPFELEAFYSDPQGV PYPEAKIGRF VVQNVSAQKDGEKSRVKVVRVNTHGIFTI STASMVEKV PTE ENEMSS EADMECLNQRPPENPD TAN EKKVDQPEAKKPKIK VVNVELPIE ANLVWL GKDLLNMYIETEGKMIMQDKLEKERN DAKNAVEEYVYEF RDKLCGPYEKFI CEQDHQNFRLLLTETED

				WLYEEGEDQAKQAYVDKLEELMKIGTPVKVRFQEAERPKMF EELGQRLQHYAKIAADFRNKDEKYNHIDSEMKKVEKSVNEV MEWMNNVMNAQAKKSLDQDPVVRQAEIKTKIKELNNTCEPVV TQPKPKIESPKLERTPNGPNIDKKEEDLEDKNNFGAEPHQN GECYPNEKNSVNMDD
12	89	JB1- scFv(51C1)	339	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEPGAE EKFKIEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSIDIGGGSGG GGSGGGSGGGGSAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRISCTTSG FIFSDYWMHWVRQAPGKGLTWVSRINLDGSDTIYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNLSRVEDTAIYYCARSRSKSVWGQGTMTV TVSSGGGGSGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCT GSNTDVGAYDYVSWSQQLPGKAPKFVIFDQVVRPVGISDRFS GSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTKSGTLVFGGGTKV TVV
13	90	JB1- scFv(3F10)	348	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEPGAE EKFKIEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSIDIGGGSGG GGSGGGSGGGGSAAEVQLLESGLDLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSQAMSWVRQAPGKGLEWVSALSRTGDTYTWYADSVRGRF TVSRDDSKNIFYLEMNSLRAEDTAVYYCAKNYSSSFGYNWAA FHIWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSL SPGERATLSRASQDVNNNYLAWYQQKPGQAPRLIYGASRR ATGVPDRFSGRSGTDFTLTINRLEPEDFAMFYCQQYGGSPF YTFGQGTKEIK
14	91	JB1-2XQBP1	135	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEPGAE EKFKIEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSIDIGGGSGG GGSGGGSGGGGSAASNWKWWPGIFDGLSNWKWWPGIFDS RDYKDDDDK
15	92	JC7- scFv(3B12A)	338	MDYYKILGVDKNASEDEIKKAYRKRALMHHPDRHSGASAEVQ KEEEKKFKEVGEAFITLSDPKKKTRYDSGGDIDGGGGSGGGG GGGGSGGGGSAAEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNI KDYYMHWVKQRTTEQGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQGKATIT ADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCTIIYYGSRVVDYWGQ TTLTVSGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPPTMAASPGEKITI TCSASSSISSSYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPARF SGSGSGTSYSLTIGTMEADVATYYCQQGSSIPLTFGSGTKL EI
16	93	JB13- scFv(3B12A)	341	MGQDYYSVLGITRNSEDAQIKQAYRRALKHHPLKSNEPSSA EIFRQIAEAYDVLSDPMKRGIIYDKFGEGLKGGDIDGGGGSGG GGSGGGSGGGGSAAEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASG FNIKDYMHVVKQRTTEQGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQGA TITADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCTIIYYGSRVVDYWG QGTTLTVSGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPPTMAASPGEKITI TCSASSSISSSYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPARF ARFSGSGTSYSLTIGTMEADVATYYCQQGSSIPLTFGSG TKLEI
17	94	JB1- scFv(3B12A) (1)	321	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEPGAE EKFKIEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSIDIGGGSEVQL QQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYMHVVKQRTTEQGLE WIGRIDPEDGETKYAPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLT EDTAVYYCTIIYYGSRVVDYWGQGTTLTVSGGGSGGGSGG GGGSEIVLTQSPPTMAASPGEKITITCSASSSISSSYLHWYQ QKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIGTME ADVATYYCQQGSSIPLTFGSGTKLEI
18	95	JB1- scFv(3B12A) (2)	321	MGKDYYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEPGAE EKFKIEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSIAAAKEVQL QQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYMHVVKQRTTEQGLE WIGRIDPEDGETKYAPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLT EDTAVYYCTIIYYGSRVVDYWGQGTTLTVSGGGSGGGSGG GGGSEIVLTQSPPTMAASPGEKITITCSASSSISSSYLHWYQ QKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIGTME ADVATYYCQQGSSIPLTFGSGTKLEI

19	96	JB1- scFv(3B12A) (3)	316	MGKDYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEPGAE EKFKIEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSEVQLQQSGA ELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYMHVWKQRTQQGLEWIGRI DPEDGETKYAPKFQGGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDNAV YYCTIIYYYGSRYVDYWGQGTTLTVSGGGSGGGSGGGSGGSE IVLTQSPTTMAASPGEKITITCSASSSISSSYLHWYQQKPGF SPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVA TYYCQQGSSIPLTFGSGTKLEI
20	97	JB1- scFv(3F10)- DD	497	MGKDYQTLGLARGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEPGAE EKFKIEIAEAYDVLSDPRKREIFDRYGEEGLKGSDIGGGSGGG GGSGGGGSAAEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKD YYMHVWKQRTQQGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQGGKATITAD TSSNTAYLQLSSLTSEDNAVYYCTIIYYYGSRYVDYWGQGT LTVSGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPTTMAASPGEKITITC SASSSISSSYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSG SGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSSIPLTFGSGTKLEI LEGDYKDDDDKGSRETRRGEDLFMCMDIQLVEALCGFQKPI SLDNRITIVITSHPGQIVKHGDIKCVLNEMPIYRRPYEKGR LIIIEFKVNFPENGFLSPDKLSLLEKLLPERKEVEETDEMDQVE LVDFDPNQERRRHYNGEAYEDDEHHPRGGVQCQTS

[0148] II. 编码融合蛋白构建体的核酸

根据本发明的另一个方面,提供了分离的核酸,其包含选自以下的多核苷酸序列:

(a) 编码任何前述实施方案的融合蛋白的多核苷酸,或 (b) (a) 的多核苷酸的互补体。本发明提供了编码包含J结构域和TDP-43结合结构域的融合蛋白的分离的核酸,以及与编码融合蛋白的此类核酸分子互补的序列,包括其同源变体。在另一个方面,本发明包括产生编码本文公开的融合蛋白的核酸,以及与编码融合蛋白的核酸分子互补的序列,包括其同源变体的方法。根据本发明的这个方面的核酸可以是前信使RNA (mRNA前体)、信使RNA (mRNA)、RNA、基因组DNA (gDNA)、PCR扩增的DNA、互补DNA (cDNA)、合成DNA或重组DNA。

[0149] 在又一个方面,公开的是生产融合蛋白的方法,其包括 (a) 合成和/或组装编码融合蛋白的核苷酸, (b) 将编码基因掺入适合于宿主细胞的表达载体内, (c) 用表达载体转化适当的宿主细胞,并且 (d) 在引起或允许融合蛋白在转化的宿主细胞中表达的条件下,培养宿主细胞,从而产生具有生物活性的融合蛋白,其通过本领域已知的标准蛋白质纯化方法,作为分离的融合蛋白进行回收。分子生物学中的标准重组技术用于制备本发明的多核苷酸和表达载体。

[0150] 按照本发明,编码本文公开的融合蛋白的核酸序列(或其互补体)用于生成指导融合蛋白在适当的宿主细胞中的表达的重组DNA分子。几种克隆策略适合于执行本发明,其中许多用于生成包含编码本发明的融合蛋白的基因或其互补体的构建体。在一些实施方案中,克隆策略用于产生编码本发明的融合蛋白或其互补体的基因。

[0151] 在某些实施方案中,编码一种或多种融合蛋白的核酸是RNA分子,并且可以是前信使RNA (mRNA前体)、信使RNA (mRNA)、RNA、基因组DNA (gDNA)、PCR扩增的DNA、互补DNA (cDNA)、合成DNA或重组DNA。

[0152] 在各个实施方案中,核酸是引入细胞内以便瞬时表达所需多肽的mRNA。如本文使用的,“瞬时”指非整合的转基因表达数小时、数天或数周的时期,其中所述表达的时间段小于多核苷酸整合到基因组内或包含在细胞中的稳定的质粒复制子内时的表达时间段。

[0153] 在特定实施方案中,编码多肽的mRNA是体外转录的mRNA。如本文使用的,“体外转录的RNA”指RNA,优选已在体外合成的mRNA。一般地,体外转录的RNA由体外转录载体生成。体外转录载体包含用于生成体外转录的RNA的模板。

[0154] 在特定实施方案中,mRNA可以进一步包含5'帽或修饰的5'帽和/或多聚(A)序列。如本文使用的,5'帽(也称为RNA帽、RNA7-甲基鸟苷帽或RNA m7G帽)是在转录起始后不久,已加入真核信使RNA的“前端”或5'端的修饰的鸟嘌呤核苷酸。5'帽包含末端基团,其连接到第一个转录的核苷酸,并且被核糖体识别并被保护免受RNA酶。可以修饰加帽部分以调节mRNA的功能性,例如其稳定性或翻译效率。在特定实施方案中,mRNA包含约50至约5000个腺嘌呤的多聚(A)序列。在一个实施方案中,mRNA包含约100至约1000个碱基、约200至约500个碱基、或约300至约400个碱基的多聚(A)序列。在一个实施方案中,mRNA包含约65个碱基、约100个碱基、约200个碱基、约300个碱基、约400个碱基、约500个碱基、约600个碱基、约700个碱基、约800个碱基、约900个碱基、或者约1000个或更多个碱基的多聚(A)序列。多聚(A)序列可以用化学方法或酶促进行修饰,以调节mRNA功能性例如定位、稳定性或翻译效率。

[0155] 如本文使用的,术语“多核苷酸变体”和“变体”等等指展示与参考多核苷酸序列的基本序列同一性的多核苷酸、或在下文定义的严格条件下与参考序列杂交的多核苷酸。这些术语包括这样的多核苷酸,其中与参考多核苷酸相比,一个或多个核苷酸已被添加或缺失或替换为不同的核苷酸。在这方面,本领域众所周知的是,可以对参考多核苷酸进行某些改变,包括突变、添加、缺失和取代,由此改变的多核苷酸保留参考多核苷酸的生物学功能或活性。

[0156] 在某些实施方案中,核酸序列包含编码核酸盒内的目的基因(例如,包含J结构域和聚谷氨酰胺结合结构域的融合蛋白)的核苷酸序列。如本文使用的,术语“核酸盒”或“表达盒”指载体内的遗传序列,其可以表达RNA,且随后表达多肽。在一个实施方案中,核酸盒含有目的基因,例如目的多核苷酸。在另一个实施方案中,核酸盒含有一种或多种表达控制序列,例如启动子、增强子、多聚(A)序列和目的基因例如目的多核苷酸。载体可以包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个核酸盒。核酸盒在载体内按位置且序贯地进行定向,使得盒中的核酸可以转录成RNA,并且在必要时,翻译成蛋白质或多肽,在转化细胞中经历活性所需的适当的翻译后修饰,并且通过靶向适当的细胞内区室或分泌到细胞外区室内而易位到适当的区室用于生物活性。优选地,盒具有适于容易地插入载体内的其3'和5'端,例如,它在每一端处具有限制性核酸内切酶位点。盒可以作为单一单元被取出并插入质粒或病毒载体内。

[0157] 适用于特定实施方案中的说明性遍在表达控制序列包括但不限于巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子,病毒猿猴病毒40(SV40)(例如早期或晚期),莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV) LTR启动子,劳斯肉瘤病毒(RSV) LTR,单纯疱疹病毒(HSV)(胸苷激酶)启动子,来自牛痘病毒的H5、P7.5和P1 1启动子,延伸因子1- α (EF1a)启动子,早期生长应答1(EGF1),铁蛋白H(FerH),铁蛋白L(FerL),甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH),真核翻译起始因子4A1(EIF4A1),热休克70kDa蛋白5(HSPA5),热休克蛋白90kDa β ,成员1(HSP90B1),热休克蛋白70kDa(HSP70), β -驱动蛋白(b-KIN),人ROSA 26基因座(Irions等人,Nature Biotechnology 25,1477 - 1482 (2007)),泛素C启动子(UBC),磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子,巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白(CAG)启动子(Okabe等人(1997) *FEBS Lett.* 407: 313-9), β -肌动蛋白启动子和骨髓增生性肉瘤病毒增强子,负控制区缺失,d1587rev引物结合位点取代(MND) U3启动子(Haas等人,Journal of Virology. 2003;77 (17): 9439-9450)。

[0158] 在一个实施方案中,至少一种元件可以与本文所述的多核苷酸一起使用,以增强转基因靶特异性和表达(参见例如,Powell等人(2015) *Discovery Medicine* 19(102):49-57,其内容通过引用以其整体并入本文),例如启动子。在大多数组织中促进表达的启动子包括但不限于人延伸因子1a-亚基(EF1a)、立即早期巨细胞病毒(CMV)、鸡 β -肌动蛋白(CBA)及其衍生物CAG、 β 葡萄糖醛酸酶(GUSB)或泛素C(UBC)。组织特异性表达元件可以用于限制对某些细胞类型的表达,例如但不限于神经系统启动子,其可以用于限制对神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞的表达。关于神经元的组织特异性表达元件的非限制性实例包括神经元特异性烯醇化酶(NSE)、血小板衍生生长因子(PDGF)、血小板衍生生长因子B链(PDGF- β)、突触蛋白(Syn)、甲基-CpG结合蛋白2(MeCP2)、CaMKII、mGluR2、NFL、NFH、 $\eta\beta$ 2、PPE、Enk和EAAT2启动子。关于星形胶质细胞的组织特异性表达元件的非限制性实例包括胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)和EAAT2启动子。关于少突胶质细胞的组织特异性表达元件的非限制性实例包括髓鞘碱性蛋白(MBP)启动子。Yu等人(2011) *Molecular Pain*,7:63,通过引用以其整体并入)使用慢病毒载体评估在大鼠DRG细胞和原代DRG细胞中,在CAG、EF1a、PGK和UBC启动子下的eGFP表达,并且发现了UBC显示比其它3种启动子更弱的表达,并且存在对于所有启动子可见的仅10-12%的神经胶质细胞表达。Soderblom等人(E. Neuro 2015,通过引用以其整体并入)在运动皮层中注射后,在具有CMV和UBC启动子的AAV8以及具有CMV启动子的AAV2中的eGFP表达。含有UBC或EF1a启动子的质粒的鼻内施用显示了比具有CMV启动子的表达更大的持续气道表达(参见例如,Gill等人,(2001) *Gene Therapy*,第8卷,1539-1546;通过引用以其整体并入)。Husain等人(2009) *Gene Therapy*,通过引用以其整体并入)评估了具有hGUSB启动子、HSV-1LAT启动子和NSE启动子的HBH构建体,并且发现了HBH构建体显示在小鼠脑中比NSE更弱的表达。Passini和Wolfe(J. Virol. 2001,12382-12392,通过引用以其整体并入)评估了HBH载体在新生小鼠中的脑室内注射之后的长期效应,并且发现了存在至少1年的持续表达。与CMV-lacZ、CMV-luc、EF、GFAP、hENK、nAChR、PPE、PPE + wpre、NSE(0.3 kb)、NSE(1.8 kb)和NSE(1.8 kb + wpre)相比,当使用NF-L和NF-H启动子时,通过Xu等人(2001) *Gene Therapy*,8,1323-1332;通过引用以其整体并入)发现了在所有脑区域中的低表达。Xu等人发现了启动子活性按降序为NSE(1.8 kb)、EF、NSE(0.3 kb)、GFAP、CMV、hENK、PPE、NFL和NFH。NFL是650核苷酸的启动子,而NFH是920核苷酸的启动子,其均不存在于肝中,但NFH在感觉本体神经元、脑和脊髓中是丰富的,而NFH存在于心脏中。Scn8a是470核苷酸的启动子,其在DRG、脊髓和脑各处表达,其中在海马神经元和小脑浦肯野细胞、皮质、丘脑和下丘脑中可见特别高的表达(参见例如,Drews等人2007和Raymond等人2004;通过引用以其整体并入)。

[0159] III. 包含编码融合蛋白的核酸的载体

还提供了包含根据本发明的核酸的载体。此类载体优选包含另外的核酸序列,例如编码磷酸酶的核酸序列转录/翻译所必需的元件(例如启动子和/或终止子序列)。所述载体还可以包含编码选择标记物(例如抗生素)的核酸序列,以选择或维持用所述载体转化的宿主细胞。术语“载体”在本文中用于指能够转移或转运另一种核酸分子的核酸分子。转移的核酸一般与载体核酸分子连接,例如插入到其内。载体可以包括指导细胞中的自主复制的序列,或可以包括足以允许整合到宿主细胞DNA内的序列。在特定实施方案中,非病毒载体用于将本文考虑的一种或多种多核苷酸递送至受影响的细胞(例如神经元细胞)。在一个

实施方案中,载体是编码融合蛋白的体外合成或合成制备的mRNA,所述融合蛋白包含J结构域和TDP-43结合结构域。非病毒载体的说明性实例包括但不限于mRNA、质粒(例如DNA质粒或RNA质粒)、转座子、粘粒和细菌人工染色体。

[0160] 载体的说明性实例包括但不限于质粒、自主复制序列和转座元件,例如piggyBac、睡美人、Mos1、Tcl/mariner、Tol2、mini-Tol2、Tc3、MuA、Himar I、Frog Prince及其衍生物。载体的另外说明性实例包括但不限于质粒,噬菌粒,粘粒,人工染色体例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1衍生的人工染色体(PAC),细菌噬菌体例如 λ 噬菌体或M13噬菌体和动物病毒。可用作载体的病毒的说明性实例包括但不限于逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(例如,单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头状瘤病毒和乳多空病毒(例如,SV40)。表达载体的说明性实例包括但不限于用于在哺乳动物细胞中表达的pCIneo载体(Promega);用于慢病毒介导的哺乳动物细胞中的基因转移和表达的pLenti4/V 5-DEST™、pLenti6/V 5-DEST™和pLenti6.2/V 5-GW/lacZ (Invitrogen)。在特定实施方案中,本文公开的多肽的编码序列可以连接到此类表达载体内,用于在哺乳动物细胞中表达多肽。

[0161] 在特定实施方案中,载体是游离型载体或在染色体外维持的载体。如本文使用的,术语“游离型”指能够复制而不整合到宿主的染色体DNA内且不从分裂的宿主细胞中逐渐丢失的载体,其也意味着所述载体在染色体外或游离型复制。

[0162] 载体可以包含用于各种各样的位点特异性重组酶中任一种的一个或多个重组位点。应理解,关于位点特异性重组酶的靶位点加上载体整合所需的任何位点,所述载体例如逆转录病毒载体或慢病毒载体。如本文使用的,术语“重组序列”、“重组位点”或“位点特异性重组位点”指重组酶识别且与之结合的特定核酸序列。

[0163] 例如,关于Cre重组酶的一个重组位点是loxP,其是34碱基对序列,包含侧接8碱基对核心序列的两个13碱基对反向重复(充当重组酶结合位点)(参见Sauer, B., *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527 (1994)的图1)。关于FLP重组酶的合适识别位点包括但不限于:FRT (McLeod等人,1996)、FI、F2、F3 (Schlake和Bode,1994)、FyFs (Schlake和Bode,1994)、FRT (LE) (Senecoff等人,1988)、FRT (RE) (Senecoff等人,1988)。

[0164] 识别序列的其它实例是attB、attP、attL和attR序列,其被重组酶1整合酶例如phi-c31识别。(pC31 SSR仅介导异型位点attB(长度为34 bp)和attP(长度为39 bp)之间的重组(Groth等人,2000)。因噬菌体整合酶分别在细菌和噬菌体基因组上的附着位点而命名的attB和attP,均含有很可能被 ϕ 031同源二聚体结合的不完全的反向重复(Groth等人,2000)。产物位点attL和attR对进一步的tpQA 1介导的重组有效惰性(Belteki等人,2003),使得反应不可逆。对于催化插入,已发现将携带attB的DNA插入基因组attP位点内比将attP位点插入基因组attB位点内更容易(Thyagarajan等人,2001;Belteki等人,2003)。因此,典型的策略通过同源重组将携带attP的“对接位点”定位到限定的基因座内,其然后与携带attB的进入序列配对用于插入。

[0165] 如本文使用的,“内部核糖体进入位点”或“IRES”指促进直接内部核糖体进入顺反子(蛋白质编码区)的起始密码子例如ATG的元件,从而导致基因的帽不依赖性翻译。参见例如,Jackson等人,1990. *Trends Biochem Sci* 15 (12):477-83以及Jackson和Kaminski. 1995. *RNA* 1 (10):985-1000。在特定实施方案中,载体包括编码一种或多种多肽的一种或

多种目的多核苷酸。在特定实施方案中,为了实现多种多肽各自的有效翻译,所述多核苷酸序列可以被一种或多种IRES序列或编码自切割多肽的多核苷酸序列分开。在一个实施方案中,在本文考虑的多核苷酸中使用的IRES是EMCV IRES。

[0166] 如本文使用的,术语“Kozak序列”指一种短核苷酸序列,其极大地促进了mRNA与核糖体的小亚基的初始结合并增加了翻译。(Kozak,1986. Cell. 44 (2):283-92和Kozak,1987. Nucleic Acids Res. 15 (20):8125-48)。在特定实施方案中,载体包含这样的多核苷酸,其具有共有Kozak序列,并且编码包含J结构域和TDP-43结合结构域的融合蛋白。指导异源核酸转录物的有效终止和多聚腺苷酸化的元件增加了异源基因表达。转录终止信号一般在多聚腺苷酸化信号的下流发现。在特定实施方案中,载体包含编码待表达多肽的多核苷酸3'的多聚腺苷酸化序列。

[0167] 适用于本文考虑的特定实施方案中的病毒载体系统的说明性实例包括但不限于腺相关病毒(AAV)、逆转录病毒、单纯疱疹病毒、腺病毒和牛痘病毒载体。

[0168] 在各个实施方案中,通过用包含一种或多种多核苷酸的重组腺相关病毒(rAAV)转导细胞,将编码包含J结构域和聚谷氨酰胺结合结构域的融合蛋白的一种或多种多核苷酸引入细胞例如神经元细胞内。AAV是一种小型(~26 nm)复制缺陷型,主要是游离型无包膜病毒。AAV可以感染分裂细胞和非分裂细胞两者,并且可以将其基因组掺入宿主细胞的基因组内。重组AAV(rAAV)通常最低限度由转基因及其调控序列以及5'和3' AAV反向末端重复(ITR)构成。ITR序列的长度为约145 bp。在特定实施方案中,rAAV包含从以下中分离的ITR和衣壳序列:AAV1、AAV2(例如,在通过引用以其整体并入本文的US6962815B2中描述)、AAV3、AAV4、AAV5(例如,在通过引用以其整体并入本文的US7479554B2中描述)、AAV6、AAV7、AAV8(例如,在通过引用以其整体并入本文的US7282199B2中描述)、AAV9(例如,在通过引用以其整体并入本文的US9737618B2中描述)、AAV rh10(例如,在通过引用以其整体并入本文的US9790472B2中描述)或AAV10。在一个实施方案中,本发明的载体封装在选自AAV2、AAV5、AAV8、AAV9和AAV rh10的衣壳内。在一个实施方案中,载体封装在AAV2中。在一个实施方案中,载体封装在AAV5中。在一个实施方案中,载体封装在AAV8中。在一个实施方案中,载体封装在AAV9中。在另外一个实施方案中,载体封装在AAV rh10中。

[0169] 在一些实施方案中,使用嵌合rAAV,ITR序列从一种AAV血清型中进行分离,而衣壳序列从不同的AAV血清型中进行分离。例如,具有衍生自AAV2的ITR序列和衍生自AAV6的衣壳序列的rAAV被称为AAV2/AAV6。在特定实施方案中,rAAV载体可以包含来自AAV2的ITR,以及来自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10中任何一种的衣壳蛋白。在一个优选实施方案中,rAAV包含衍生自AAV2的ITR序列和衍生自AAV6的衣壳序列。在一个优选实施方案中,rAAV包含衍生自AAV2的ITR序列和衍生自AAV2的衣壳序列。

[0170] 在一些实施方案中,改造和选择方法可以应用于AAV衣壳,以使其更有可能转导目的细胞。

[0171] rAAV载体的构建、生产及其纯化已公开于例如美国专利号9,169,494;9,169,492;9,012,224;8,889,641;8,809,058;和8,784,799中,所述专利各自通过引用以其整体并入本文。

[0172] IV. 递送

在特定实施方案中,编码包含J结构域和TDP-43结合结构域的融合蛋白的一种或

多种多核苷酸通过非病毒载体或病毒载体引入细胞内。在特定实施方案中考虑的多核苷酸的非病毒递送的示例性方法包括但不限于：电穿孔、声致穿孔、脂转染、显微注射、生物弹道、病毒体、脂质体、免疫脂质体、纳米颗粒、聚阳离子或脂质核酸缀合物、裸露DNA、人工病毒粒子、DEAE-葡聚糖介导的转移、基因枪和热休克。

[0173] 在特定实施方案中考虑的适用于特定实施方案中的多核苷酸递送系统的说明性实例包括但不限于由Amaxa Biosystems、Maxcyte, Inc.、BTX Molecular Delivery Systems和Copernicus Therapeutics Inc提供的那些递送系统。脂转染试剂是商业销售的（例如，Transfectam™ 和Lipofectin™）。适合于多核苷酸的有效受体识别脂转染的阳离子脂质和中性脂质已在文献中进行描述。参见例如，Liu等人，(2003) Gene Therapy. 10: 180-187；和Balazs等人，(20W) Journal of Drug Delivery. 2011 :1-12。在特定实施方案中也考虑了抗体靶向的、细菌衍生的、基于无生命的纳米细胞的递送。

[0174] 在特定实施方案中考虑的包含多核苷酸的病毒载体可以通过施用于个别患者进行体内递送，通常通过全身施用（例如，静脉内、腹膜内、肌内、皮下或颅内输注），通过鞘内注射、脑室内注射或局部应用，如下所述。可替代地，载体可以离体递送至细胞，例如从个别患者外植的细胞（例如，动员的外周血、淋巴细胞、骨髓抽吸物、组织活检组织检查等）或通用供体造血干细胞，随后将细胞重新植入患者内。

[0175] 在一个实施方案中，将包含编码本文公开的融合蛋白的多核苷酸的病毒载体直接施用于生物用于在体内的细胞转导。

[0176] 适当地包装且配制的病毒载体可以经由鞘内递送而递送到中枢神经系统 (CNS) 内。例如，腺相关病毒载体可以使用美国系列号15/771,481中描述的方法进行递送，所述专利通过引用以其整体并入本文。

[0177] 可替代地，可以施用裸露DNA。施用是通过通常用于将分子引入与血液或组织细胞的最终接触的任何途径，包括但不限于注射、输注、局部应用和电穿孔。施用此类核酸的合适方法是可用的并且是本领域技术人员众所周知的，并且尽管多于一种途径可以用于施用特定组合物，但特定途径经常可以促进提供比另一种途径更直接和更有效的反应。

[0178] 在各个实施方案中，通过用包含一种或多种多核苷酸的逆转录病毒例如慢病毒转导细胞，将编码本文公开的融合蛋白的一种或多种多核苷酸引入细胞例如神经元细胞或神经元干细胞内。如本文使用的，术语“逆转录病毒”指这样的RNA病毒，其将其基因组RNA逆转录成线性双链DNA拷贝，并且随后将其基因组DNA共价整合到宿主基因组内。适用于特定实施方案中的说明性逆转录病毒包括但不限于：莫洛尼鼠白血病病毒 (M-MuLV)、莫洛尼鼠肉瘤病毒 (MoMSV)、哈维鼠肉瘤病毒 (HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒 (MuMTV)、长臂猿白血病病毒 (GaLV)、猫白血病病毒 (FLV)、泡沫病毒、Friend鼠白血病病毒、鼠干细胞病毒 (MSCV) 和劳斯肉瘤病毒 (RSV) 和慢病毒。如本文使用的，术语“慢病毒”指一组 (或属) 复杂逆转录病毒。示例性慢病毒包括但不限于：HIV (人免疫缺陷病毒；包括HIV 1型和HIV 2)；梅迪维斯纳病毒 (visna-maedi virus) (VMV) 病毒；山羊关节炎脑炎病毒 (CAEV)；马传染性贫血病毒 (EIAV)；猫免疫缺陷病毒 (FIV)；牛免疫缺陷病毒 (BIV)；以及猿猴免疫缺陷病毒 (SIV)。在一个实施方案中，基于HIV的载体主链 (即HIV顺式作用序列元件) 是优选的。

[0179] 作为修饰LTR的结果，慢病毒载体优选含有几种安全性增强。“自我失活” (SIN) 载体指复制缺陷型载体，例如，其中右 (3') LTR增强子-启动子区 (称为U3区) 已 (例如，通过缺

失或取代)进行修饰,以防止病毒转录超出第一轮病毒复制。通过用异源启动子替换5' LTR的U3区,以在病毒颗粒的生产过程中驱动病毒基因组的转录,提供了另外的安全性增强。可以使用的异源启动子的实例包括例如病毒性猿猴病毒40 (SV40) (例如早期或晚期)、巨细胞病毒(CMV) (例如立即早期)、莫洛尼鼠白血病毒(MoMLV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)和单纯疱疹病毒(HSV) (胸苷激酶)启动子。在某些实施方案中,慢病毒载体根据已知方法进行产生。参见例如,Kutner等人,BMC Biotechnol. 2009;9:10. Doi: 10.1186/1472-6750-9-10;Kutner等人,Nat. Protoc. 2009;4 (4):495-505. Doi: 10.1038/nprot.2009.22。

[0180] 根据本文考虑的某些特定实施方案,大部分或所有病毒载体主链序列衍生自慢病毒,例如HIV-1。然而,应理解,可以使用或组合许多不同来源的逆转录病毒和/或慢病毒序列,并且可以适应某些慢病毒序列中的众多取代和改变,而不损害转移载体执行本文所述功能的能力。此外,各种慢病毒载体是本领域已知的,参见Naldini等人,(1996a、1996b和1998);Zufferey等人,(1997);Dull等人,1998,美国专利号6,013,516;和5,994,136,其中许多可以适于生产本文考虑的病毒载体或转移质粒。

[0181] 在各个实施方案中,通过用包含一种或多种多核苷酸的腺病毒转导细胞,将编码本文公开的融合蛋白的一种或多种多核苷酸引入靶细胞内。基于腺病毒的载体能够在许多细胞类型中具有非常高的转导效率,并且不需要细胞分裂。使用此类载体,已获得了高滴度和高水平的表达。这种载体可以在相对简单的系统中以大数量进行生产。大多数腺病毒载体这样进行改造,使得用转基因替换Ad E1a、E1b和/或E3基因;随后,复制缺陷型载体在人293细胞中进行繁殖,所述人293细胞反式供应缺失的基因功能。Ad载体可以在体内转导多重类型的组织,包括非分裂的分化细胞,例如在肝、肾和肌肉中发现的那些细胞。常规Ad载体具有较大的携带容量。

[0182] 复制缺陷型的目前腺病毒载体的生成和繁殖可以利用指定为293的独特的辅助细胞系,其通过Ad5 DNA片段从人胚肾细胞进行转化,并且组成地表达E1蛋白(Graham等人,1977)。由于E3区域在腺病毒基因组中是可有可无的(Jones & Shenk,1978),在293细胞的帮助下,目前的腺病毒载体在E1、D3或这两个区域中携带外来DNA(Graham & Prevec,1991)。腺病毒载体已用于真核基因表达(Levrero等人,1991;Gomez-Foix等人,1992)和疫苗开发(Grunhaus & Horwitz,1992;Graham & Prevec,1992)中。将重组腺病毒施用于不同组织的研究包括气管滴注(Rosenfeld等人,1991;Rosenfeld等人,1992)、肌肉注射(Ragot等人,1993)、外周静脉内注射(Herz & Gerard,1993)和立体定向接种到脑内(Le Gal La Salle等人,1993)。在临床试验中使用Ad载体的实例涉及通过肌肉注射用于抗肿瘤免疫的多核苷酸疗法(Sterman等人,Hum. Gene Ther. 7: 1083-9 (1998))。

[0183] 在各个实施方案中,通过用包含一种或多种多核苷酸的单纯疱疹病毒例如HSV-1、HSV-2转导细胞,将编码本发明的融合蛋白的一种或多种多核苷酸引入受试者的靶细胞内。

[0184] 成熟的HSV病毒粒子由具有病毒基因组的有包膜的二十面体衣壳组成,所述病毒基因组由其152 kb的线性双链DNA分子组成。在一个实施方案中,基于HSV的病毒载体缺乏一种或多种必需或非必需的HSV基因。在一个实施方案中,基于HSV的病毒载体是复制缺陷型的。大多数复制缺陷型HSV载体含有缺失,以去除一种或多种立即早期、早期或晚期HSV基因,以防止复制。例如,HSV载体可能缺乏选自以下的立即早期基因:ICP4、ICP22、ICP27、ICP47及其组合。HSV载体的优点在于其进入可以导致长期DNA表达的潜伏阶段的能力,以及

可以容纳高达25 kb的外源DNA插入片段的其大型病毒DNA基因组。基于HSV的载体在例如美国专利号5,837,532、5,846,782和5,804,413,以及国际专利申请W0 91/02788、W0 96/04394、W0 98/15637和W0 99/06583中进行描述,所述专利各自通过引用以其整体并入本文。

[0185] V. 表达融合蛋白的细胞

在又一个方面,本发明提供了表达本文所述的融合蛋白的细胞。可以用编码如本文上文所述的融合蛋白的载体转染细胞。在一个实施方案中,细胞是原核细胞。在另一个实施方案中,细胞是真核细胞。在另外一个实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在一个特定实施方案中,细胞是人细胞。在另一个实施方案中,细胞是衍生自患者的人细胞,所述患者患有或处于患有TDP-43介导的病症的风险中,所述病症包括但不限于ALS、FTD和阿尔茨海默氏病。细胞可以是神经元细胞或肌细胞。

[0186] 表达融合蛋白的细胞可以用于生产融合蛋白。在该实施方案中,细胞用过表达融合蛋白的载体进行转染。融合蛋白可以任选地含有表位,例如,人Fc结构域或FLAG表位,如本文上文所述的,其将促进纯化(分别使用蛋白A或抗FLAG抗体柱)。表位可以经由接头或蛋白酶底物序列连接到融合蛋白的剩余部分,使得在纯化期间或之后,表位可以从融合蛋白中去除。

[0187] 表达融合蛋白的细胞也可以用于治疗背景下。在一个实施方案中,从需要治疗的患者(例如,患有或处于患有TDP-43介导的病症的风险中的患者)中收集细胞。在一个实施方案中,细胞是神经元细胞。然后用表达融合蛋白的载体转染收集的细胞。然后可以加工转染的细胞以富集或选择转染的细胞。也可以处理转染的细胞,以分化成不同类型的细胞,例如神经元细胞。在加工后,可以将转染的细胞施用于患者。在一个实施方案中,通过经由鞘内注射、颅内注射或脑室内注射直接注射到中枢神经系统内来施用细胞。

[0188] 在另一个实施方案中,可以使用表达融合蛋白的分泌形式的细胞。例如,融合蛋白构建体可以设计为在N末端端部上具有信号序列。代表性信号序列显示于下表7中。

[0189] 表7:代表性信号序列

SEQ ID NO:	序列
98	MGVKVLFALICIAVAEA
99	MAPVQLLGLLVFLPAMRC
100	MAVLGLLFCLVTFPSCVLS

[0190] 因此,在一个实施方案中,融合蛋白包含信号序列和融合蛋白,其中所述信号序列选自SEQ ID NO: 98 - 100,并且所述融合蛋白包含J结构域和TDP-43结合结构域。在一个实施方案中,信号序列选自SEQ ID NO: 98 - 100,并且所述融合蛋白选自SEQ ID NO: 80-85、89-90和92-96。在另一个实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO: 98的信号序列,并且所述融合蛋白选自SEQ ID NO: 80-85、89-90和92-96。在另一个实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO: 99的信号序列,并且所述融合蛋白选自SEQ ID NO: 80-85、89-90和92-96。在另一个实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO: 100的信号序列,并且所述融合蛋白选自SEQ ID NO: 80-85、89-90和92-96。可以将表达具有信号序列的融合蛋白构建体的细胞施用于受试者,例如人受试者(例如患有或处于患有TDP-43病症的风险中的患者)。融合蛋白从细胞中进行分泌,其帮助减少TDP-43蛋白的聚集和/或相关的细胞毒性。

[0191] 如本文上文所述,在某些实施方案中,融合蛋白可以进一步包含细胞穿透肽。表达包含信号序列和细胞穿透肽的融合蛋白的细胞将能够分泌缺乏信号序列的融合蛋白。也包含细胞穿透肽的分泌的融合蛋白,然后能够进入附近的细胞,并且具有减少这些细胞中由TDP-43蛋白介导的聚集和/或细胞毒性的潜力。

[0192] VI. 使用方法

在另一个方面,本发明提供了用于在病症和/或TDP-43病症、由TDP-43聚集介导的病症或状况中实现有益效应的方法。TDP-43病症选自肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、帕金森氏病、亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏病、海马硬化、路易体痴呆和边缘叶受累为主的年龄相关TDP-43脑病。

[0193] 在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗患有TDP-43疾病、病症或状况的受试者例如人的方法,其包括以下步骤:向受试者施用治疗或预防有效量的融合蛋白、编码此类融合蛋白的核酸、或编码本文所述的融合蛋白的病毒载体,其中所述施用导致与TDP-43疾病、病症或状况相关的一种或多种生物化学或生理参数或临床终点的改善。

[0194] 在其它实施方案中,本发明提供了减少细胞中的TDP-43聚集的方法。细胞可以是培养的细胞或分离的细胞。细胞也可以来自受试者,例如人受试者。在一个实施方案中,细胞在人受试者的中枢神经系统中。在另一个实施方案中,人受试者患有或处于患有TDP-43病症疾病的风险中,所述疾病包括但不限于肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)和阿尔茨海默氏病。在一个特定实施方案中,TDP-43病症是肌萎缩侧索硬化。

[0195] 可以以多种方式来检测TDP-43蛋白的聚集。在一个实例中,例如,通过使细胞裂解物通过选择性过滤器来截留不可溶聚集物,聚集的TDP-43蛋白可以基于溶解度与游离的(即,可溶的)含TDP-43蛋白区分开。非聚集的蛋白质通过这些过滤器,而聚集物将保留在过滤器上,其可以使用任何数目的试剂进行检测,所述试剂包括针对TDP-43蛋白的抗体。用如本文所述的融合蛋白,表达融合蛋白的细胞,或者编码融合蛋白的核酸、载体或病毒颗粒处理的细胞样品的裂解物中截留的聚集蛋白的量,可以与来自未处理或对照处理的细胞的裂解物进行比较,其中当与对照样品相比时,处理样品中的聚集TDP-43蛋白量的减少指示了融合蛋白或者编码融合蛋白的核酸、载体或病毒颗粒的功效(参见例如, Kim等人, (2014) *Mol. Cell. Biol.*, 34: 643-652和实施例1)。当与对照相比时,聚集的TDP-43蛋白的更大减少指示了更高的效力。TDP-43蛋白聚集的减少也可以直接在细胞中进行检测,例如,使用免疫荧光显微镜检查伴随检测TDP-43蛋白的标记试剂(参见例如, Ding等人, (2015) *Oncotarget*, 6: 24178-24191; Chou等人, (2015) *Hum. Mol. Genet.* 24:5154-5173和实施例1)。在某些实施方案中,当与对照相比时,TDP-43多肽水平的更大减少指示了更高的效力。

[0196] 因此,在一个实施方案中,该方法包括使细胞与一定量的融合蛋白或者编码融合蛋白的核酸、载体或病毒颗粒接触,当与未处理的细胞或对照细胞相比时,所述量使TDP-43蛋白的聚集有效减少至少10%,例如至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%。

[0197] 如下文实施例中1所示,已发现了包含J结构域和TDP-43结合结构域的融合蛋白的表达减少含有TDP-43的报告子构建体的总体水平。像这样,在另一个实施方案中,该方法包括使细胞与一定量的融合蛋白,表达融合蛋白的细胞,编码融合蛋白的核酸、载体或病毒颗

粒接触,当与未处理的细胞或对照细胞相比时,所述量使TDP-43蛋白的水平有效减少至少10%,例如至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%。

[0198] VII. 药物组合物

本文考虑的组合物可以包括包含J结构域和TDP-43结合结构域的一种或多种融合蛋白、编码此类融合蛋白的多核苷酸、包含其的载体、遗传修饰的细胞等,如本文考虑的。组合物包括但不限于药物组合物。“药物组合物”指在药学上可接受或生理学上可接受的溶液中配制的组合物,用于单独或者与一种或多种其它治疗模态组合施用于细胞或动物。还应理解,需要时,组合物也可以与其它药剂组合进行施用,所述其它药剂例如细胞因子、生长因子、激素、小分子、化学治疗剂、前药、药物、抗体或其它各种药物活性剂。关于也可以包括在组合物中的其它组分实际上没有限制,条件是另外的药剂并不不利地影响组合物递送预期疗法的能力。

[0199] 短语“药学上可接受的”在本文中用于指这样的化合物、材料、组合物、载体和/或剂型,其在合理医学判断的范围内,适用于与人体和动物的组织接触,而无过度毒性、刺激、变应性应答或其它问题或并发症,与合理的收益/风险比相称。

[0200] 如本文使用的,“药学上可接受的载体”、“稀释剂”或“赋形剂”包括但不限于任何佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、稳定剂、等渗剂、溶剂、表面活性剂或乳化剂,其已被美国食品和药物管理局(United States Food and Drug Administration)批准为对于人或驯养动物中的使用可接受的。示例性的药学上可接受的载体包括但不限于糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素、乙酸纤维素;黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;可可脂、蜡、动物脂肪和植物脂肪、石蜡、硅酮、膨润土、硅酸、氧化锌;油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,例如丙二醇;多元醇,例如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;以及药物制剂中采用的任何其它相容物质。

[0201] VIII. 剂量

本文所述的组合物(例如,包括融合蛋白构建体、核酸或基因治疗病毒颗粒的组合物)的剂量可以取决于多种因素而变,所述因素例如化合物的药效学性质;施用模式;接受者的年龄、健康和重量;症状的性质和程度;治疗的频率和并发治疗的类型(如果存在的话);以及化合物在待治疗动物中的清除率。本文所述的组合物最初可以以合适的剂量进行施用,所述剂量可以取决于临床应答根据需要进行调整。在一些方面,组合物的剂量是预防有效量或治疗有效量。

[0202] IX. 试剂盒

考虑了包括以下的试剂盒:(a)包括本文所述的融合蛋白构建体、编码此类融合蛋白的核酸或包含此类核酸的病毒颗粒的药物组合物,其减少细胞或受试者中的TDP-43蛋白聚集,以及(b)具有执行本文描述的任何方法的指令的包装说明书。在一些方面,试剂盒包括(a)包含本文描述的组合物药物组合物,其减少本文所述的细胞或受试者中的TDP-43蛋白聚集,(b)另外的治疗剂,以及(c)具有执行本文描述的任何方法的指令的包装说明书。

实施例

[0203] 为了测试是否可以专门改造J结构域以促进聚集蛋白的正确折叠,我们设计并测试了设计为靶向TDP-43蛋白的许多融合蛋白构建体。

[0204] 实施例1:融合蛋白设计

A. 方法

一般技术和材料

除非另有说明,否则本发明的实践采用免疫学、生物化学、化学、分子生物学、微生物学、细胞生物学、基因组学和重组DNA的常规技术,其在本领域的技术内。参见Sambrook, J.等人,“Molecular Cloning: A Laboratory Manual,” 第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001;“Current protocols in molecular biology”,F. M. Ausubel 等人,编辑,1987;系列“Methods in Enzymology,” Academic Press,San Diego,Calif.; “PCR 2: a practical approach”,M. J. MacPherson,B. D. Hames和G. R. Taylor 编辑,Oxford University Press,1995;“Antibodies,a laboratory manual” Harlow,E.和 Lane,D. 编辑,Cold Spring Harbor Laboratory,1988;“Goodman & Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics,” 第11版,McGraw-Hill,2005;以及Freshney, R. I.,“Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique,” 第4版,John Wiley & Sons,Somerset,N J,2000,所述参考文献的内容通过引用以其整体并入本文。HEK-293细胞(人胚肾细胞)购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(Manassas,VA)。抗FLAG抗体购自Thermo Fisher Scientific。兔抗GFP抗体购自GenScripts (Piscataway,NJ)。为了易于纯化和表征,除SEQ ID NO: 80-85和89-96中提供的序列之外,本实施例1中使用的一些融合蛋白构建体还含有在蛋白质的C末端或N末端处的SEQ ID NO:68的FLAG表位,加上短的接头序列。

[0205] 蛋白质在HEK293细胞中的表达与检测

用Lipofectamine 3000转染试剂(Thermo Fisher Scientific),将编码各种蛋白质构建体的表达载体质粒转染到HEK293细胞内。使用免疫印迹测定,就表达的蛋白质分析细胞裂解物。在分析之前,将培养基的样品离心,以去除碎片。细胞在含有2 mM PMSF和蛋白酶混合物(Complete Protease Inhibitor Cocktail;Sigma)的裂解缓冲液(10 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl、10 mM EDTA、2% SDS)中进行裂解。在短暂的超声处理后,使用免疫印迹测定,就表达的蛋白质分析样品。对于免疫印迹分析,使样品在SDS样品缓冲液中煮沸并且在聚丙烯酰胺电泳上运行。其后,将分离的蛋白质条带转移到PVDF膜上。

[0206] 使用化学发光信号检测表达的蛋白质。简言之,使印迹与能够结合特定表位(例如GFP)的一抗反应。在冲洗掉未反应的一抗后,允许酶联的二抗(例如,HRP连接的抗IgG抗体)与结合到印迹的一抗分子反应。在冲洗后,加入化学发光试剂,并且在X光片上捕获印迹中所得的化学发光信号。

[0207] 荧光显微镜检查

在一些情况下,使用荧光显微镜检查,在体内检测到TDP-43 (C末端片段的全长)GFP报告子构建体(下文所述的)的聚集。表达报告子构建体以及包含J结构域和TDP-43结合结构域的融合蛋白的培养细胞用PBS进行洗涤,并且用4%多聚甲醛的PBS溶液固定5分钟。在用PBS的3次5分钟洗涤后,核DNA用DAPI进行染色。计数转染细胞中的含TDP-43 (GFP病灶)

细胞的百分比。

[0208] 分级测定

转染的HEK293细胞在RIPA缓冲液(50mM Tris pH7.5、150mM NaCl、0.1% NP-40、0.5%脱氧胆酸钠、0.1% SDS)中进行匀浆化,所述RIPA缓冲液补充有蛋白酶抑制剂混合物、2mM PMSF、10mM NaF和2mM Na3VO4。在短暂的超声处理后,通过BCA测定试剂盒(Pierce)测量蛋白质浓度。相等量的蛋白质通过在4℃下以16,000 x g离心30分钟进行向下旋转,以分级成可溶级分(上清液)和不可溶级分(团块)。不可溶级分在SDS裂解缓冲液(10mM Tris pH8.0、150mM NaCl、2% SDS)中进行进一步溶解。可溶级分和不可溶级分两者在还原条件下应用于SDS-PAGE,随后为通过用抗GFP抗体的免疫印迹测定。

[0209] B. 报告子构建体

我们首先调查了本发明的靶向TDP-43的融合分子是否改善其在培养细胞中的聚集。为此,我们生成了基于GFP的报告子构建体GFP-TDP43和GFP-TDP43,其中GFP在其C末端处与全长人TDP-43蛋白或TDP-43的C末端片段融合,后者已知形成细胞质聚集和细胞毒性(参见下表8)。HEK293细胞进行培养,并且用编码作为GFP融合物的全长TDP43或TDP43的C末端片段的质粒[GFP-TDP43FL (SEQ ID NO: 101)或GFP-TDP43CTF (SEQ ID NO: 102)]进行转染,所述C末端片段含有TDP-43的C末端207个氨基酸(人TDP-43的氨基酸208-414)。我们发现了大多数表达的GFP-TDP43FL定位于细胞的核中(图3,小图1),而GFP-TDP43CTF制备明显的细胞质包涵体(图3,小图5),如先前报告的(Zhang等人,(2009) Proc Natl Acad Sci U S A.,106 (18):7607-12)。

[0210] 表8:TDP-43报告子构建体

构建体名称	SEQ ID NO:	长度	序列
GFP-TDP43FL	101	660	MVSKGEELFTGVVPI LVELDGDVNGHKFSVS GEGEGDATYG KLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQH DFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNR IELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYSNHN VYIMADKQKNGIKV NFKIRHNI EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQ SALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKEFDIAAA MSEYIRVTEDEND EPIEI PSEDDGT VLLSTVTAQFP GACGL R YRNPVSQCMRGVRLVEGILHAPDAGWGNLVYV VNYPKDNK RKMD ETDASSAVKVKRAVQKTS DLIVLGLPWKTTEQDLKEY FSTFGEVLMVQVKDLKTGH SKGFGFVRFT EYETQVKVMSQ RHMIDGRWCDCKLPNSKQSQDEPLRSRKVFVGRCTEDMTED ELREFFSQYGDVMDVFI PKPFRAFAFVT FADDQIAQSLCGE DLI IKGISVHISNAEPKHNSNRQLERSGRFGGNPGGFGNQG GFGNSRGGGAGLGNNGGSGNMGGGMNFGAFSINPAMMAAAQA ALQSSWGMGMLASQQNQSGPSGNNQNGNMQREPNQAFGS GNNSYSGSNSGAAI GWGSASNAGSGSGFNGGFGSSMDSKSS GWGM
GFP-TDP43CTF	102	453	MVSKGEELFTGVVPI LVELDGDVNGHKFSVS GEGEGDATYG KLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQH DFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNR IELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYSNHN VYIMADKQKNGIKV NFKIRHNI EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQ SALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKEFDIAAA REFFSQYGDVMDVFI PKPFRAFAFVT FADDQIAQSLCGEDL I IKGISVHISNAEPKHNSNRQLERSGRFGGNPGGFGNQGGF GNSRGGGAGLGNNGGSGNMGGGMNFGAFSINPAMMAAAQAAL QSSWGMGMLASQQNQSGPSGNNQNGNMQREPNQAFGSGN NSYSGSNSGAAI GWGSASNAGSGSGFNGGFGSSMDSKSSGW GM
TDP43FL	103	415	MSEYIRVTEDEND EPIEI PSEDDGT VLLSTVTAQFP GACGL R YRNPVSQCMRGVRLVEGILHAPDAGWGNLVYV VNYPKDNK RKMD ETDASSAVKVKRAVQKTS DLIVLGLPWKTTEQDLKEY FSTFGEVLMVQVKDLKTGH SKGFGFVRFT EYETQVKVMSQ RHMIDGRWCDCKLPNSKQSQDEPLRSRKVFVGRCTEDMTED ELREFFSQYGDVMDVFI PKPFRAFAFVT FADDQIAQSLCGE DLI IKGISVHISNAEPKHNSNRQLERSGRFGGNPGGFGNQG GFGNSRGGGAGLGNNGGSGNMGGGMNFGAFSINPAMMAAAQA
TDP43ΔNL S	104	415	ALQSSWGMGMLASQQNQSGPSGNNQNGNMQREPNQAFGS GNNSYSGSNSGAAI GWGSASNAGSGSGFNGGFGSSMDSKSS GWGM* MSEYIRVTEDEND EPIEI PSEDDGT VLLSTVTAQFP GACGL R YRNPVSQCMRGVRLVEGILHAPDAGWGNLVYV VNYPKDNA AAMDET DASSAVKVKRAVQKTS DLIVLGLPWKTTEQDLKEY FSTFGEVLMVQVKDLKTGH SKGFGFVRFT EYETQVKVMSQ RHMIDGRWCDCKLPNSKQSQDEPLRSRKVFVGRCTEDMTED ELREFFSQYGDVMDVFI PKPFRAFAFVT FADDQIAQSLCGE DLI IKGISVHISNAEPKHNSNRQLERSGRFGGNPGGFGNQG GFGNSRGGGAGLGNNGGSGNMGGGMNFGAFSINPAMMAAAQA ALQSSWGMGMLASQQNQSGPSGNNQNGNMQREPNQAFGS GNNSYSGSNSGAAI GWGSASNAGSGSGFNGGFGSSMDSKSS GWGM*

[0211] C. 融合蛋白构建体

为了确定本发明的融合蛋白是否可以用于减少TDP-43聚集,首先通过共表达包含衍生自人Hsp40 J结构域蛋白的J结构域序列的融合蛋白进行初始实验,所述J结构域序列缀合至识别GFP的单链可变片段(scFv) (数据未显示)。令人惊讶的是,当用该构建体表达GFP-TDP43CTF时,大部分聚集消失,而当用GFP-TDP43CTF表达GFP scFv (无J结构域序列)时,并未观察到显著效应。这提示了可以使用HSP70介导的途径(未显示)解决TDP-43聚集。

[0212] 我们然后设计了一系列融合蛋白构建体,如表9中描绘的。

[0213] 表9. 融合蛋白构建体和对照

构建体编号	SEQ ID NO:	构建体名称	备注
1	78	仅J-结构域	对照,含有来自DnaJB1的J结构域
2	79	scFv (3B12A)	仅scFv (3B12A) 的对照;结合TDP-43
3	80	JB1-scFv (3B12A)	与scFv (3B12A) 融合的DnaJB1 J结构域
4	81	JB1 (P33Q)-scFv (3B12A)	与构建体3相同,具有在保守的HPD基序中的P33Q突变
5	82	scFv (3B12A)-JB1	来自构建体3的J结构域和TDP-43的相反排列
6	83	scFv (3B12A)-JB1-scFv (3B12A)	夹在结合TDP-43的两种scFv之间的J结构域
7	84	JB6-scFv (3B12A)	来自DnaJB6的J结构域
8	85	JC6-scFv (3B12A)	来自DnaJC6的J结构域
9	86	DnaJB1	全长J蛋白对照
10	87	Hsp70	HSP70对照
11	88	Hsp110	HSP110对照
12	89	JB1-scFv (51C1)	与结合TDP-43的替代scFv融合的来自DnaJB1的J结构域
13	90	JB1-scFv (3F10)	与结合TDP-43的替代scFv融合的来自DnaJB1的J结构域
14	91	JB1-2XQBP1	与两个串联拷贝的QBP1融合的来自DnaJB1的J结构域

[0214] 进行初始实验以测试融合蛋白构建体在减少TDP-43聚集方面的能力。构建体3 (JB1-scFv (3B12A)) 以及伴侣对照构建体2 (仅TDP-43结合结构域) 和构建体4 (与构建体3相同,但含有在J结构域的保守HPD基序内的突变P33Q), 并且转染到表达GFP-TDP43FL或GFP-TDP43CTF报告子构建体的细胞内。图3显示了表达GFP-TDP43CTF报告子的细胞中GFP构建体的聚集大于表达GFP-TDP43FL的细胞。表达构建体3的细胞显示了基本上减少的聚集,而对照(构建体2和构建体4)的表达并未减少聚集(图4;还参见下表10)。含有P33Q的构建体4中的活性的不存在,强烈提示了减少聚集的能力由通过Hsp70途径起作用的J结构域驱动。

[0215] 表10:融合蛋白构建体在减少聚集方面的功效

报告子	构建体编号	构建体名称	%聚集(针对单独的 GFP-TDP43CTF 标准化的)
GFP-TDP43FL	无		9.07%
GFP-TDP43FL	2	scFv(3B12A)	5.86%
GFP-TDP43FL	3	JB1-scFv(3B12A)	8.54%
GFP-TDP43FL	4	JB1(P33Q)-scFv(3B12A)	10.56%
GFP-TDP43CTF	无		100%
GFP-TDP43CTF	2	scFv(3B12A)	80.05%
GFP-TDP43CTF	3	JB1-scFv(3B12A)	14.58%
GFP-TDP43CTF	4	JB1(P33Q)-scFv(3B12A)	91.25%

[0216] 使用免疫印迹分析这些细胞的细胞提取物,分别使用抗GFP或抗FLAG抗体来确定含有GFP的报告子构建体或含有FLAG表位的融合蛋白的水平(图5)。当用抗GFP抗体探测时,表达GFP-TDP43FL的细胞提取物显示了占优势的~70 kDa条带的存在,而表达GFP-TDP43CTF的细胞显示了~50kDa条带的存在。有趣的是,当与阴性对照、scFv对照(构建体2)或P33Q突变体(构建体4)相比时,包含GFP-TDP43CTF报告子并且还表达构建体3 (JB1-scFv (3B12A)) 的细胞显示了报告蛋白的量的显著减少。全长报告子构建体(GFP-TDP43FL)的水平中的差异不可见。

[0217] 为了调查TDP-43水平的减少是否取决于蛋白质聚集,将表达GFP-TDP43FL或GFP-TDP43CTF并且还表达构建体2或3的细胞的提取物分级成可溶(非聚集)和不可溶(聚集)级分,并且通过用抗GFP抗体探测来检测报告子的存在。如图6中所示,在表达全长报告子

(GFP-TDP43FL)的细胞中,在可溶级分和不可溶级分两者中的报告子水平中不存在显著变化。相比之下,在表达GFP-TDP43CTF报告子的细胞中,在表达构建体3 (JB1-scFv (3B12A))的细胞的可溶级分中可见报告子的适度降低,但在表达构建体2 (scFv (3B12A))的细胞中不可见。相比之下,存在报告子的水平的显著减少,不可溶级分(推测为聚集形式)中的报告子的几乎完全消失。

[0218] 总的来说,这些数据强烈提示了融合蛋白能够减少细胞中的TDP-43水平,并且可能作用于优先加速聚集的TDP43蛋白的清除。

[0219] 基于上文结果,生成了几种另外的构建体(构建体5-7),其含有与J结构域有关的TDP-43结合结构域的不同配置。这些构建体就其减少聚集的能力进行测试。将这些新的构建体与构建体3 (JB1-scFv (3B12A)),以及不表达任何(阴性对照)或表达单独的scFv (构建体2)的细胞进行比较。图7显示了这些实验的结果(也在下表11中进行概括)。

[0220] 表11:另外的构建体和对照

报告子	构建体编号	构建体名称
GFP-TDP43FL	无	
GFP-TDP43FL	2	scFv(3B12A)
GFP-TDP43FL	3	JB1-scFv(3B12A)
GFP-TDP43FL	5	scFv(3B12A)-JB1
GFP-TDP43FL	6	scFv(3B12A)-JB1-scFv(3B12A)
GFP-TDP43FL	7	JB6-scFv(3B12A)
GFP-TDP43CTF	无	
GFP-TDP43CTF	2	scFv(3B12A)
GFP-TDP43CTF	3	JB1-scFv(3B12A)
GFP-TDP43CTF	5	scFv(3B12A)-JB1
GFP-TDP43CTF	6	scFv(3B12A)-JB1-scFv(3B12A)
GFP-TDP43CTF	7	JB6-scFv(3B12A)

[0221] 如图7中可见的,当与阴性对照和表达构建体2 (单独的scFv)的细胞相比时,构建体3 (JB1-scFv (3B12A))、构建体5 (scFv (3B12A) - JB1)、构建体6 (scFv (3B12A) - JB1-scFv (3B12A))和构建体7 (JB6-scFv (3B12A))显示了表达GFP-TDP43FL报告子构建体的细胞中的聚集水平的适度减少。相比之下,在表达GFP-TDP43CTF构建体的细胞中,存在阴性对照和表达构建体2的细胞中的蛋白质聚集的更高总体水平,与较早的观察一致。此外,还表达构建体3、构建体5、构建体6和构建体7的细胞都具有急剧减少的蛋白质聚集水平,证实了融合蛋白的下述配置是有效的:DNAJ-T、T-DNAJ、T-DNAJ-T (其中DNAJ是J结构域,而T是TDP-43结合结构域)。此外,发现多重J结构域(例如,来自DnaJB1和DnaJB6)在融合蛋白中具有活性。然后生成并测试了另外的构建体,如图8和9中所示(也参见下表12)。有趣的是,与通过构建体3 (JB1-scFv (3B12A))的> 90%减少相比,不含TDP-43结合结构域的全长DnaJB1的表达能够将TDP-43聚集减少~43%。另外,含有QBP1肽的两个串联拷贝的构建体14的表达也显示了聚集的显著减少(~71%减少)。QBP1先前显示与TDP-43相互作用(参见例如,Mompean等人,(2019) Arch. Biochem. Biophys. 675: 108113)。因此,当置于融合蛋白中时,发现多重TDP-43结合结构域(scFv (3B12A)和QBP1)具有活性。此外,当使用抗GFP抗体通过免疫印迹分析细胞提取物,以定量报告子构建体的水平时(图9B),发现表达构建体3 (JB1-scFv

(3B12A))、构建体9 (全长DnaJB1) 和构建体14 (JB1-2XQBP1) 的细胞具有较低水平的报告子构建体。

[0222] 表12: 另外的融合蛋白构建体的生成和测试

报告子	构建体 编号	构建体 名称	%聚集(针对单独的 GFP-TDP43CTF 标 准化的)
GFP-TDP43FL	无		
GFP-TDP43CTF	无		100%
GFP-TDP43CTF	2	scFv(3B12A)	98.40%
GFP-TDP43CTF	1	仅 JB1 结构域	115.66%
GFP-TDP43CTF	3	JB1-scFv(3B12A)	9.29%
GFP-TDP43CTF	4	JB1(p33Q)-scFv(3B12A)	103.40%
GFP-TDP43CTF	10	Hsc70 对照	97.96%
GFP-TDP43CTF	9	全长 DnaJB1	56.31%
GFP-TDP43CTF	11	Hsp110	115.34%
GFP-TDP43CTF	14	JB1-2XQBP1	28.55%

[0223] 测试了另外的构建体,如下表13和14中所示。

[0224] 表13: 另外的融合蛋白构建体的生成和测试

报告子	构建体 编号	构建体 名称	SEQ ID NO:	%磷酸化 TDP43 密度(针 对 单 独 的 GFP- TDP43CTF 标准化的)
GFP-TDP43FL	无			3.36%
GFP-TDP43CTF	无			100.00%
GFP-TDP43CTF	3	JB1-scFv(3B12A)	80	51.84%
GFP-TDP43CTF	7	JB6-scFv(3B12A)	84	42.21%
GFP-TDP43CTF	2	scFv(3B12A)	79	122.81%
GFP-TDP43CTF	15	JC7-scFv(3B12A)	92	47.89%
GFP-TDP43CTF	16	JB13-scFv(3B12A)	93	106.49%

[0225] 表14: 另外的融合蛋白构建体的生成和测试

报告子	构建体 编号	构建体 名称	SEQ ID NO:	%磷酸化 TDP43 密度(针 对单独的 GFP- TDP43CTF 标准化的)	
				可溶级分	不可溶级分
GFP-TDP43FL	无			30.00%	68.63%
GFP-TDP43CTF	无			100.00%	100.00%
GFP-TDP43CTF	3	JB1-scFv(3B12A)	80	7.91%	92.59%
GFP-TDP43CTF	17	JB1-scFv(3B12A) (1)	94	9.80%	66.34%
GFP-TDP43CTF	18	JB1-scFv(3B12A) (2)	95	9.93%	23.49%
GFP-TDP43CTF	19	JB1-scFv(3B12A) (3)	96	11.20%	22.77%

[0226] 如上文所示,众多构建体,包括使用替代J结构域(参见例如JB6和JC7结构域)的那些构建体,有效减少GFP-TDP43CTF聚集。其它融合蛋白构建体指示了来自DNAJC6的J结构域和来自SV40或细菌J结构域蛋白(DnaJ)的J结构域,也被发现有效减少其它报告子构建体的

聚集(数据未显示)。然而,包含不含共有HPD序列的J结构域的构建体16(参见表1,SEQ ID NO: 16)不能减少GFP-TDP43CTF报告子构建体的聚集。

[0227] 测试了另外的构建体,如下表15中所示。使用结合TDP-43的scFv 3F10的构建体13(JB1-scFv(3F10),SEQ ID NO: 90)与DNAJB1的J结构域融合。构建体20(JB1-scFv(3B12A)-DD),SEQ ID NO: 97,含有来自人DnaJA1的二聚化结构域。如下文所示,构建体13显示了减少GFP-TDP43CTF的聚集的适度能力。构建体20(含有二聚化结构域的构建体3)的表达显示了GFP-TDP43CTF聚集的有力减少。效应通过二聚化结构域的进一步增强很可能是由于二聚化构建体3和GFP-TDP43CTF之间的相互作用增强,与一些天然J结构域蛋白中发现的结构域配置一致(Sha (2000) *Structure* 8 (8),799-807)。

[0228] 表15:另外的融合蛋白构建体的生成和测试

报告子	构建体 编号	构建体 名称	% TDP43 密度(针对单独的 GFP-TDP43CTF 标准化的)	
			可溶级分	不可溶级分
GFP-TDP43FL	无		191.46%	90.99%
GFP-TDP43CTF	无		100.00%	100.00%
GFP-TDP43CTF	3	JB1-scFv(3B12A)	24.46%	38.15%
GFP-TDP43CTF	13	JB1-scFv(3F10)	43.90%	61.58%
GFP-TDP43CTF	20	JB1-scFv(3B12A)-DD	12.41%	14.41%

[0229] 我们接下来调查了融合蛋白在减少聚集方面的机制。HEK293细胞用GFP-TDP43FL或GFP-TDP43CTF报告子构建体进行转染,所述构建体或单独或与构建体3(JB1-scFv(3B12A))以及BFA(巴佛洛霉素A1,自噬晚期的抑制剂)或MG132(蛋白酶体抑制剂)一起。如图10中所示,用10 nM或100 nM BFA处理细胞导致致病性TDP43以剂量依赖性方式的再次出现。相比之下,用0.1 μ M或1.0 μ M MG132处理对致病性TDP43形式的累积具有很少的作用至没有作用。总的来说,这些结果提示了融合蛋白构建体经由伴侣介导的自噬发挥其效应。

[0230] 实施例2:编码融合蛋白构建体的AAV载体

示例性基因治疗载体由携带密码子优化的cDNA的AAV9载体进行构建,所述cDNA编码表6的融合蛋白构建体,具体而言构建体2、4、6、7、17和20-31,以及对照构建体1(仅DnaJB1 J结构域)、GFP(阴性对照),在含有巨细胞病毒(CMV)早期增强子元件和鸡 β -肌动蛋白启动子的CAG启动子的控制下。编码构建体的cDNA定位于Kozak序列的下游,并且通过牛生长激素多聚腺苷酸化(BGHpA)信号进行多聚腺苷酸化。整个盒的侧翼为AAV-2的两个非编码末端反向序列。

[0231] 使用类似于上述的杆状病毒表达系统来制备重组AAV载体(Urabe等人,2002,Unzu等人,2011(Kotin,2011中综述的))。简言之,三种重组杆状病毒(编码用于复制和包装的REP的一种、编码关于AAV9衣壳的CAP-5的一种、以及具有表达盒的一种)用于感染SF9昆虫细胞。使用AVB Sepharose高速亲和介质(GE Healthcare Life Sciences,Piscataway,NJ)执行纯化。使用QPCR伴随用于转基因的引物-探针组合来滴定载体,并且滴度表示为每ml的基因组拷贝(GC/ml)。载体的滴度为大约 8×10^{13} 至 2×10^{14} GC/ml。

[0232] 实施例3:在ALS的小鼠模型中的表达和功效测试

首先在野生型C57BL/6J小鼠中进行实验,以确认构建体3的表达,并且确定表达是否对动物具有有害作用。 6×10^{10} vg如上所述含有对照或构建体3的AAV rh10衣壳通过鞘内或

脑室内注射进行注射,如下表16中所示。

[0233] 表16:含有编码构建体3的表达载体的AAV rh10的IT和ICV注射

组	N	性别	化合物	剂量(vg/小鼠)	给药途径	给药频率和年龄
1	6	雄性	AAV (空的)	1×10^{11}	鞘内	在5周时的1 x
2	6	雄性	AAV (构建体-3)	1×10^{11}	鞘内	在5周时的1 x
3	6	雄性	AAV (空的)	6×10^{10}	ICV	1xP1
4	6	雄性	AAV (构建体-3)	6×10^{10}	ICV	1xP1

[0234] 观察小鼠的共济失调、后肢无力或拖足。在AAV注射后一周,每周进行体重和临床观察。小鼠(n=3)在3周时通过CO₂实施人道安乐死,以确认AAV表达。在ICV或IT注射后的三周过程中没有发现体重差异(数据未显示)。如图15中所示,通过鞘内(图15B)或ICV(图15C)注射进行注射的小鼠导致构建体3的表达,如使用大脑提取物的免疫印迹检测到的,而在对照小鼠中未检测到。此外,发现表达在ICV注射后8周显著高于3周。

[0235] 上文制备的载体对新型AAV NEFH-tTA × hTDP-43 Δ NLS双基因小鼠(bigenic mice)(rNLS小鼠)的TDP-43相关病理学进行测试。该模型具有表达致病性TDP-43(人TDP-43 Δ NLS)的多西环素(DOX)可阻遏构建体。在DOX去除后,TDP-43 Δ NLS表达导致动物的快速和进行性恶化,导致严重的重量减轻,并且一般在6-8周内死亡。我们测试了构建体3(JB1-scFv(3B12A),SEQ ID NO: 80)在减缓TDP-43 Δ NLS介导的病理学进展方面的功效。如下表17中所示,在不同组中以2ul(最大4 ul)的体积在P1/P2处单侧ICV施用含有对照或构建体3的AAV rh10。除了对照组1之外,DOX去除在第5周时发生。组中的对照小鼠。

[0236] 表17: Δ NLS8小鼠的ICV注射

组	数目	小鼠品系	性别	处理	剂量	施用时间
1	4	rNLS8小鼠(Dox +)	4雄	AAV (对照)	6×10^{10} vg	P1
2	8	rNLS8小鼠(Dox -)	5M/3F	AAV (对照)	6×10^{10} vg	P1
3	10	rNLS8小鼠(Dox -)	4M/6F	AAV (构建体3)	6×10^{10} vg	P1

[0237] 在断奶后每周测量两次体重。在测试完成后,从所有存活的小鼠中收集样品。收集整个脑并拆分成2个半球。将一个半球称重并冷冻在干冰上。第二个半球在4% PFA中进行后固定用于组织学评价。

[0238] 如图16B中所示,在DOX去除后,第2组对照小鼠在接下来的几周内开始显著减轻体重,导致与第1组的统计学显著的重量差异。令人惊讶的是,当与第2组相比时,表达构建体3的第3组也显示出统计学显著的重量增加(由于第1组仅含有雄性,关于第2组和第3组的结果仅显示了雄性体重,以解释性别差异)。

[0239] 当检查存活时,我们发现了对照第2组(DOX关闭)中的动物在健康方面迅速恶化,导致第10周时仅37.5%的小鼠存活(0%的雄性)。然而,表达构建体3的小鼠显示了在第10周时100%的存活,与第1组(DOX开启)对照没有区别。

[0240] 其它方面

本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都通过引用以其整体并入本文,其程度如同每个个别出版物、专利或专利申请特别地且个别地指示通过引用以其整体并入。当发现本申请中的术语在通过引用并入本文的文件中不同时定义时,本文提供的定义将充当该术语的定义。

[0241] 虽然本发明已与其具体方面结合进行描述,但应理解,本发明能够具有进一步修改,并且本申请预期涵盖本发明的任何变化、用途或适应,一般而言遵循本发明的原则且包括与本公开内容的此类偏离,其在本发明所属领域内的已知或习惯实践内,并且可以应用于上文阐述的基本特征,并且遵循所请求保护的范围。

序列表

<110> SOLA BioSciences LLC
<120> 用于治疗TDP-43蛋白病的组合物和方法
<130> 269548-489650
<160> 104
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DNAJA1
<400> 1

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

<210> 2
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DNAJA2
<400> 2

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

<210> 3
<211> 66

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJA3

<400> 3

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

65

<210> 4

<211> 67

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJA4

<400> 4

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

65

<210> 5

<211> 69

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJB1

<400> 5

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

Arg Tyr Gly Glu Glu

65

<210> 6

<211> 70

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJB2

<400> 6

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

Asp Arg Tyr Gly Arg Glu

65

70

<210> 7

<211> 69

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJB3

<400> 7

Met Val Asp Tyr Tyr Glu Val Leu Asp Val Pro Arg Gln Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Glu Ala Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Lys Trp His Pro
 20 25 30
 Asp Lys Asn Pro Glu Asn Lys Glu Glu Ala Glu Arg Arg Phe Lys Gln

35 40 45
Val Ala Glu Ala Tyr Glu Val Leu Ser Asp Ala Lys Lys Arg Asp Ile
50 55 60
Tyr Asp Arg Tyr Gly
65
<210> 8
<211> 69
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DNAJB4
<400> 8
Gly Lys Asp Tyr Tyr Cys Ile Leu Gly Ile Glu Lys Gly Ala Ser Asp
1 5 10 15
Glu Asp Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Gln Ala Leu Lys Phe His Pro
20 25 30
Asp Lys Asn Lys Ser Pro Gln Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Val Ala
35 40 45
Glu Ala Tyr Glu Val Leu Ser Asp Pro Lys Lys Arg Glu Ile Tyr Asp
50 55 60
Gln Phe Gly Glu Glu
65
<210> 9
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DNAJB5
<400> 9
Asp Tyr Tyr Lys Ile Leu Gly Ile Pro Ser Gly Ala Asn Glu Asp Glu
1 5 10 15
Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Met Ala Leu Lys Tyr His Pro Asp Lys
20 25 30
Asn Lys Glu Pro Asn Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile Ala Glu Ala
35 40 45
Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Lys Lys Arg Gly Leu Tyr Asp Gln Tyr
50 55 60
Gly
65

<210> 10

<211> 68

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJB6

<400> 10

Val Asp Tyr Tyr Glu Val Leu Gly Val Gln Arg His Ala Ser Pro Glu

1 5 10 15

Asp Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Lys Trp His Pro Asp

20 25 30

Lys Asn Pro Glu Asn Lys Glu Glu Ala Glu Arg Lys Phe Lys Gln Val

35 40 45

Ala Glu Ala Tyr Glu Val Leu Ser Asp Ala Lys Lys Arg Asp Ile Tyr

50 55 60

Asp Lys Tyr Gly

65

<210> 11

<211> 67

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJB7

<400> 11

Asp Tyr Tyr Glu Val Leu Gly Leu Gln Arg Tyr Ala Ser Pro Glu Asp

1 5 10 15

Ile Lys Lys Ala Tyr His Lys Val Ala Leu Lys Trp His Pro Asp Lys

20 25 30

Asn Pro Glu Asn Lys Glu Glu Ala Glu Arg Lys Phe Lys Glu Val Ala

35 40 45

Glu Ala Tyr Glu Val Leu Ser Asn Asp Glu Lys Arg Asp Ile Tyr Asp

50 55 60

Lys Tyr Gly

65

<210> 12

<211> 67

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJB8

<400> 12

Asn Tyr Tyr Glu Val Leu Gly Val Gln Ala Ser Ala Ser Pro Glu Asp

1 5 10 15

Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Arg Trp His Pro Asp Lys

20 25 30

Asn Pro Asp Asn Lys Glu Glu Ala Glu Lys Lys Phe Lys Leu Val Ser

35 40 45

Glu Ala Tyr Glu Val Leu Ser Asp Ser Lys Lys Arg Ser Leu Tyr Asp

50 55 60

Arg Ala Gly

65

<210> 13

<211> 65

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJB9

<400> 13

Ser Tyr Tyr Asp Ile Leu Gly Val Pro Lys Ser Ala Ser Glu Arg Gln

1 5 10 15

Ile Lys Lys Ala Phe His Lys Leu Ala Met Lys Tyr His Pro Asp Lys

20 25 30

Asn Lys Ser Pro Asp Ala Glu Ala Lys Phe Arg Glu Ile Ala Glu Ala

35 40 45

Tyr Glu Thr Leu Ser Asp Ala Asn Arg Arg Lys Glu Tyr Asp Thr Leu

50 55 60

Gly

65

<210> 14

<211> 66

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJB11

<400> 14

Asp Phe Tyr Lys Ile Leu Gly Val Pro Arg Ser Ala Ser Ile Lys Asp

1 5 10 15

Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Gln Leu His Pro Asp Arg

	20		25		30
Asn Pro Asp Asp Pro Gln Ala Gln Glu Lys Phe Gln Asp Leu Gly Ala					
	35		40		45
Ala Tyr Glu Val Leu Ser Asp Ser Glu Lys Arg Lys Gln Tyr Asp Thr					
	50		55		60
Tyr Gly					
65					
<210> 15					
<211> 65					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> DNAJB12					
<400> 15					
Tyr Glu Ile Leu Gly Val Ser Arg Gly Ala Ser Asp Glu Asp Leu Lys					
1	5		10		15
Lys Ala Tyr Arg Arg Leu Ala Leu Lys Phe His Pro Asp Lys Asn His					
	20		25		30
Ala Pro Gly Ala Thr Glu Ala Phe Lys Ala Ile Gly Thr Ala Tyr Ala					
	35		40		45
Val Leu Ser Asn Pro Glu Lys Arg Lys Gln Tyr Asp Gln Phe Gly Asp					
	50		55		60
Asp					
65					
<210> 16					
<211> 65					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> DNAJB13					
<400> 16					
Asp Tyr Tyr Ser Val Leu Gly Ile Thr Arg Asn Ser Glu Asp Ala Gln					
1	5		10		15
Ile Lys Gln Ala Tyr Arg Arg Leu Ala Leu Lys His His Pro Leu Lys					
	20		25		30
Ser Asn Glu Pro Ser Ser Ala Glu Ile Phe Arg Gln Ile Ala Glu Ala					
	35		40		45
Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Met Lys Arg Gly Ile Tyr Asp Lys Phe					
	50		55		60

Gly

65

<210> 17

<211> 65

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJB14

<400> 17

Asn Tyr Tyr Glu Val Leu Gly Val Thr Lys Asp Ala Gly Asp Glu Asp

1 5 10 15

Leu Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Lys Phe His Pro Asp Lys

20 25 30

Asn His Ala Pro Gly Ala Thr Asp Ala Phe Lys Lys Ile Gly Asn Ala

35 40 45

Tyr Ala Val Leu Ser Asn Pro Glu Lys Arg Lys Gln Tyr Asp Leu Thr

50 55 60

Gly

65

<210> 18

<211> 65

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC1

<400> 18

Asn Phe Tyr Gln Phe Leu Gly Val Gln Gln Asp Ala Ser Ser Ala Asp

1 5 10 15

Ile Arg Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ser Leu Thr Leu His Pro Asp Lys

20 25 30

Asn Lys Asp Glu Asn Ala Glu Thr Gln Phe Arg Gln Leu Val Ala Ile

35 40 45

Tyr Glu Val Leu Lys Asp Asp Glu Arg Arg Gln Arg Tyr Asp Asp Ile

50 55 60

Leu

65

<210> 19

<211> 74

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC2

<400> 19

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

<210> 20

<211> 69

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC3

<400> 20

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

<210> 21

<211> 66

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC4

<400> 21

Thr Tyr Tyr Glu Leu Leu Gly Val His Pro Gly Ala Ser Thr Glu Glu

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

65

<210> 22

<211> 70

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC5

<400> 22

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

Asp Lys Tyr Gly Ser Leu

65

70

<210> 23

<211> 66

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC5B

<400> 23

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

Ala His Ala Ile Leu Thr Asp Ile Ser Lys Arg Ser Ile Tyr Asp Lys
50 55 60

Tyr Gly

65

<210> 24

<211> 65

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC6

<400> 24

Thr Lys Trp Lys Pro Val Gly Met Ala Asp Leu Val Thr Pro Glu Gln
1 5 10 15

Val Lys Lys Val Tyr Arg Lys Ala Val Leu Val Val His Pro Asp Lys
20 25 30

Ala Thr Gly Gln Pro Tyr Glu Gln Tyr Ala Lys Met Ile Phe Met Glu
35 40 45

Leu Asn Asp Ala Trp Ser Glu Phe Glu Asn Gln Gly Gln Lys Pro Leu
50 55 60

Tyr

65

<210> 25

<211> 71

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC7

<400> 25

Asp Tyr Tyr Lys Ile Leu Gly Val Asp Lys Asn Ala Ser Glu Asp Glu
1 5 10 15

Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Arg Ala Leu Met His His Pro Asp Arg
20 25 30

His Ser Gly Ala Ser Ala Glu Val Gln Lys Glu Glu Glu Lys Lys Phe
35 40 45

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

Thr Arg Tyr Asp Ser Gly Gln
65 70

<210> 26

<211> 68

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC8

<400> 26

Asn Pro Phe Glu Val Leu Gln Ile Asp Pro Glu Val Thr Asp Glu Glu

1 5 10 15

Ile Lys Lys Arg Phe Arg Gln Leu Ser Ile Leu Val His Pro Asp Lys

20 25 30

Asn Gln Asp Asp Ala Asp Arg Ala Gln Lys Ala Phe Glu Ala Val Asp

35 40 45

Lys Ala Tyr Lys Leu Leu Leu Asp Gln Glu Gln Lys Lys Arg Ala Leu

50 55 60

Asp Val Ile Gln

65

<210> 27

<211> 68

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC9

<400> 27

Asp Leu Tyr Arg Val Leu Gly Val Arg Arg Glu Ala Ser Asp Gly Glu

1 5 10 15

Val Arg Arg Gly Tyr His Lys Val Ser Leu Gln Val His Pro Asp Arg

20 25 30

Val Gly Glu Gly Asp Lys Glu Asp Ala Thr Arg Arg Phe Gln Ile Leu

35 40 45

Gly Lys Val Tyr Ser Val Leu Ser Asp Arg Glu Gln Arg Ala Val Tyr

50 55 60

Asp Glu Gln Gly

65

<210> 28

<211> 66

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC10

<400> 28

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

<210> 29

<211> 69

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC11

<400> 29

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

<210> 30

<211> 66

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC12

<400> 30

Asp Tyr Tyr Thr Leu Leu Gly Cys Asp Glu Leu Ser Ser Val Glu Gln
 1 5 10 15
 Ile Leu Ala Glu Phe Lys Val Arg Ala Leu Glu Cys His Pro Asp Lys
 20 25 30

His Pro Glu Asn Pro Lys Ala Val Glu Thr Phe Gln Lys Leu Gln Lys
35 40 45
Ala Lys Glu Ile Leu Thr Asn Glu Glu Ser Arg Ala Arg Tyr Asp His
50 55 60
Trp Arg
65
<210> 31
<211> 66
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DNAJC13
<400> 31
Asp Ala Tyr Glu Val Leu Asn Leu Pro Gln Gly Gln Gly Pro His Asp
1 5 10 15
Glu Ser Lys Ile Arg Lys Ala Tyr Phe Arg Leu Ala Gln Lys Tyr His
20 25 30
Pro Asp Lys Asn Pro Glu Gly Arg Asp Met Phe Glu Lys Val Asn Lys
35 40 45
Ala Tyr Glu Phe Leu Cys Thr Lys Ser Ala Lys Ile Val Asp Gly Pro
50 55 60
Asp Pro
65
<210> 32
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DNAJC14
<400> 32
Asn Pro Phe His Val Leu Gly Val Glu Ala Thr Ala Ser Asp Val Glu
1 5 10 15
Leu Lys Lys Ala Tyr Arg Gln Leu Ala Val Met Val His Pro Asp Lys
20 25 30
Asn His His Pro Arg Ala Glu Glu Ala Phe Lys Val Leu Arg Ala Ala
35 40 45
Trp Asp Ile Val Ser Asn Ala Glu Lys Arg Lys Glu Tyr Glu Met Lys
50 55 60
Arg

65

<210> 33

<211> 55

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC15

<400> 33

Glu Ala Gly Leu Ile Leu Gly Val Ser Pro Ser Ala Gly Lys Ala Lys

1 5 10 15

Ile Arg Thr Ala His Arg Arg Val Met Ile Leu Asn His Pro Asp Lys

20 25 30

Gly Gly Ser Pro Tyr Val Ala Ala Lys Ile Asn Glu Ala Lys Asp Leu

35 40 45

Leu Glu Thr Thr Thr Lys His

50 55

<210> 34

<211> 65

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC16

<400> 34

Asp Pro Tyr Arg Val Leu Gly Val Ser Arg Thr Ala Ser Gln Ala Asp

1 5 10 15

Ile Lys Lys Ala Tyr Lys Lys Leu Ala Arg Glu Trp His Pro Asp Lys

20 25 30

Asn Lys Asp Pro Gly Ala Glu Asp Lys Phe Ile Gln Ile Ser Lys Ala

35 40 45

Tyr Glu Ile Leu Ser Asn Glu Glu Lys Arg Ser Asn Tyr Asp Gln Tyr

50 55 60

Gly

65

<210> 35

<211> 66

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC17

<400> 35

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

65

<210> 36

<211> 65

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC18

<400> 36

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

Gly

65

<210> 37

<211> 55

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC19

<400> 37

Glu Ala Ala Leu Ile Leu Gly Val Ser Pro Thr Ala Asn Lys Gly Lys
1 5 10 15
Ile Arg Asp Ala His Arg Arg Ile Met Leu Leu Asn His Pro Asp Lys
 20 25 30

Gly Gly Ser Pro Tyr Ile Ala Ala Lys Ile Asn Glu Ala Lys Asp Leu
 35 40 45

Leu Glu Gly Gln Ala Lys Lys
 50 55

<210> 38

<211> 72

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC20

<400> 38

Asp Tyr Phe Ser Leu Met Asp Cys Asn Arg Ser Phe Arg Val Asp Thr
 1 5 10 15

Ala Lys Leu Gln His Arg Tyr Gln Gln Leu Gln Arg Leu Val His Pro
 20 25 30

Asp Phe Phe Ser Gln Arg Ser Gln Thr Glu Lys Asp Phe Ser Glu Lys
 35 40 45

His Ser Thr Leu Val Asn Asp Ala Tyr Lys Thr Leu Leu Ala Pro Leu
 50 55 60

Ser Arg Gly Leu Tyr Leu Leu Lys
 65 70

<210> 39

<211> 67

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC21

<400> 39

Cys His Tyr Glu Ala Leu Gly Val Arg Arg Asp Ala Ser Glu Glu Glu
 1 5 10 15

Leu Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Lys Trp His Pro Asp Lys
 20 25 30

Asn Leu Asp Asn Ala Ala Glu Ala Ala Glu Gln Phe Lys Leu Ile Gln
 35 40 45

Ala Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Gln Glu Arg Ala Trp Tyr Asp
 50 55 60

Asn His Arg
 65

<210> 40

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

<210> 43

<211> 76

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC25

<400> 43

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

<210> 44

<211> 65

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC26

<400> 44

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

Leu Asn Asp Ala Trp Ser Glu Phe Glu Asn Gln Gly Ser Arg Pro Leu
50 55 60

Phe

65

<210> 45

<211> 57

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC27

<400> 45

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

Val Asn Lys Ala Tyr Arg Lys Leu Ala Val Leu Leu His Pro Asp Lys
20 25 30

Cys Val Ala Pro Gly Ser Glu Asp Ala Phe Lys Ala Val Val Asn Ala
35 40 45

Arg Thr Ala Leu Leu Lys Asn Ile Lys
50 55

<210> 46

<211> 65

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC28

<400> 46

Glu Tyr Tyr Arg Leu Leu Asn Val Glu Glu Gly Cys Ser Ala Asp Glu
1 5 10 15

Val Arg Glu Ser Phe His Lys Leu Ala Lys Gln Tyr His Pro Asp Ser
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Ala Asp Ser Ala Thr Phe Ile Arg Ile Glu Lys Ala
35 40 45

Tyr Arg Lys Val Leu Ser His Val Ile Glu Gln Thr Asn Ala Ser Gln
50 55 60

Ser

65

<210> 47

<211> 88

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC29

<400> 47

Ile Leu Lys Glu Val Thr Ser Val Val Glu Gln Ala Trp Lys Leu Pro

1 5 10 15

Glu Ser Glu Arg Lys Lys Ile Ile Arg Arg Leu Tyr Leu Lys Trp His

20 25 30

Pro Asp Lys Asn Pro Glu Asn His Asp Ile Ala Asn Glu Val Phe Lys

35 40 45

His Leu Gln Asn Glu Ile Asn Arg Leu Glu Lys Gln Ala Phe Leu Asp

50 55 60

Gln Asn Ala Asp Arg Ala Ser Arg Arg Thr Phe Ser Thr Ser Ala Ser

65 70 75 80

Arg Phe Gln Ser Asp Lys Tyr Ser

85

<210> 48

<211> 66

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DNAJC30

<400> 48

Ala Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Val Pro Ser Thr Ala Thr Gln Ala Gln

1 5 10 15

Ile Lys Ala Ala Tyr Tyr Arg Gln Cys Phe Leu Tyr His Pro Asp Arg

20 25 30

Asn Ser Gly Ser Ala Glu Ala Ala Glu Arg Phe Thr Arg Ile Ser Gln

35 40 45

Ala Tyr Val Val Leu Gly Ser Ala Thr Leu Arg Arg Lys Tyr Asp Arg

50 55 60

Gly Leu

65

<210> 49

<211> 64

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SV40 J结构域

<400> 49

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

<210> 50

<211> 70

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 细菌J-结构域

<400> 50

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

<210> 51

<211> 241

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 3B12A

<400> 51

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

Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Glu	Thr	Lys	Tyr	Ala	Pro	Lys	Phe
50						55					60				
Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Thr	Ile	Ile	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Tyr	Val	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
			115					120				125			
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Thr	Thr
						130		135				140			
Met	Ala	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Ile	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser
145						150				155					160
Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly
						165				170				175	
Phe	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly
						180				185				190	
Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu
						195				200				205	
Thr	Ile	Gly	Thr	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln
						210				215				220	
Gln	Gly	Ser	Ser	Ile	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
225						230				235					240

Ile

<210> 52

<211> 239

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 51C1

<400> 52

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

50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Ser Arg Lys Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val		
100	105	110
Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
115	120	125
Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly		
130	135	140
Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Asn Thr Asp Val Gly Ala		
145	150	155
Tyr Asp Tyr Val Ser Trp Ser Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys		
165	170	175
Phe Val Ile Phe Asp Val Asp Val Arg Pro Ser Gly Ile Ser Asp Arg		
180	185	190
Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly		
195	200	205
Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Lys		
210	215	220
Ser Gly Thr Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Val		
225	230	235
<210> 53		
<211> 248		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 3F10		
<400> 53		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Gln		
20	25	30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Ala Leu Ser Arg Thr Gly Asp Tyr Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Arg Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ile Phe Tyr		

65	70	75	80
Leu Glu Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr	Cys
	85	90	95
Ala Lys Asn Tyr Tyr	Ser Ser Phe Gly Tyr Asn Trp	Ala Ala Phe	His
	100	105	110
Ile Trp Gly Gln Gly	Thr Met Val Thr Val Ser Ser	Gly Gly Gly	Gly
	115	120	125
Ser Gly Gly Gly Gly	Ser Gly Gly Gly Gly	Ser Glu Ile Val	Leu Thr
	130	135	140
Gln Ser Pro Gly Thr	Leu Ser Leu Ser Pro Gly	Glu Arg Ala Thr	Leu
145	150	155	160
Ser Cys Arg Ala Ser	Gln Asp Val Asn Asn Asn	Tyr Leu Ala Trp	Tyr
	165	170	175
Gln Gln Lys Pro Gly	Gln Ala Pro Arg Leu Leu	Ile Tyr Gly Ala	Ser
	180	185	190
Arg Arg Ala Thr Gly	Val Pro Asp Arg Phe Ser	Gly Arg Gly Ser	Gly
	195	200	205
Thr Asp Phe Thr Leu	Thr Ile Asn Arg Leu Glu	Pro Glu Asp Phe	Ala
	210	215	220
Met Tyr Phe Cys Gln	Gln Tyr Gly Gly Ser Pro	Pro Tyr Thr Phe	Gly
225	230	235	240
Gln Gly Thr Lys Leu	Glu Ile Lys		
	245		

<210> 54

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PolyQ (Q25)

<400> 54

Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Gln Gln Gln Gln
1	5	10
Gln Gln Gln Gln Gln	Gln Gln Gln Gln Gln	
	20	25

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> QBP1
<400> 55
Ser Asn Trp Lys Trp Trp Pro Gly Ile Phe Asp
1 5 10
<210> 56
<211> 2
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> SR
<400> 56
Ser Arg
1
<210> 57
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GTGS
<400> 57
Gly Thr Gly Ser
1
<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GLESR
<400> 58
Gly Leu Glu Ser Arg
1 5
<210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GGSG
<400> 59
Gly Gly Ser Gly

1
<210> 60
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GGGG
<400> 60
Gly Gly Gly Ser
1
<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DIAAA
<400> 61
Asp Ile Ala Ala Ala
1 5
<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DIAAALESR
<400> 62
Asp Ile Ala Ala Ala Leu Glu Ser Arg
1 5
<210> 63
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> GGGGSGGGGSGGGGS
<400> 63
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 64
<211> 11

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> AEAAAKEAAAK
 <400> 64
 Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
 1 5 10
 <210> 65
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> SGGGSGGGGSGGGGS
 <400> 65
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 66
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> DIGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAAA
 <400> 66
 Asp Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala
 20 25
 <210> 67
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人IgG1 Fc 结构域
 <400> 67
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

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

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FLAG表位

<400> 68

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 69

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> His6
<400> 69
His His His His His His
1 5
<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> c-myc
<400> 70
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10
<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HA
<400> 71
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5
<210> 72
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> V5表位
<400> 72
Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
1 5 10
<210> 73
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 谷胱甘肽-S-转移酶
<400> 73
Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro

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

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RKKRRQRRR

<400> 74

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 75

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RQIKWQNRNRMKWK

<400> 75

Arg Gln Ile Lys Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 76

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> KETWWETWWTEWSQPKKKRKV

<400> 76

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val

20

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CSIPPEVKFNKPFVYLI

<400> 77

Cys Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Tyr Leu

1 5 10 15

Ile

<210> 78

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 仅J-结构域

<400> 78

Cys Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Tyr Leu

1 5 10 15

Ile

<210> 79

<211> 253

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> scFv (3B12A)

<400> 79

```

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

```

<210> 80

<211> 341

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> JB1-scFv (3B12A)

<400> 80

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

Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn
 275 280 285
 Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 290 295 300
 Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr
 305 310 315 320
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly
 325 330 335
 Thr Lys Leu Glu Ile
 340
 <210> 81
 <211> 341
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> JB1 (P33Q) - scFv (3B12A)
 <400> 81
 Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His
 20 25 30
 Gln Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile
 35 40 45
 Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe
 50 55 60
 Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Asp Ile Gly Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 85 90 95
 Ser Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val
 100 105 110
 Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn
 115 120 125
 Ile Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly
 130 135 140
 Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Lys Tyr
 145 150 155 160
 Ala Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser
 165 170 175

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala		
180	185	190
Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr Val Asp		
195	200	205
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
210	215	220
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln		
225	230	235
Ser Pro Thr Thr Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Ile Thr Ile Thr		
245	250	255
Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln		
260	265	270
Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn		
275	280	285
Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr		
290	295	300
Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr		
305	310	315
Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly		
325	330	335
Thr Lys Leu Glu Ile		
340		

<210> 82

<211> 323

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> scFv (3B12A) -JB1

<400> 82

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

Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	
				85					90					95		
Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ile	Ile	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Tyr	Val	Asp	Tyr	
				100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
				115					120					125		
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	
				130					135					140		
Pro	Thr	Thr	Met	Ala	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Ile	Thr	Ile	Thr	Cys	
				145					150					155		
Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	
				165					170					175		
Lys	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Thr	Ser	Asn	Leu	
				180					185					190		
Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	
				195					200					205		
Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Gly	Thr	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	
				210					215					220		
Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Ser	Ser	Ile	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	
				225					230					235		
Lys	Leu	Glu	Ile	Gly	Ser	Glu	Phe	Met	Gly	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Gln	Thr	
				245					250					255		
Leu	Gly	Leu	Ala	Arg	Gly	Ala	Ser	Asp	Glu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Tyr	
				260					265					270		
Arg	Arg	Gln	Ala	Leu	Arg	Tyr	His	Pro	Asp	Lys	Asn	Lys	Glu	Pro	Gly	
				275					280					285		
Ala	Glu	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu	Ile	Ala	Glu	Ala	Tyr	Asp	Val	Leu	Ser	
				290					295					300		
Asp	Pro	Arg	Lys	Arg	Glu	Ile	Phe	Asp	Arg	Tyr	Gly	Glu	Glu	Gly	Leu	
				305					310					315		
Lys Gly Ser																
<210> 83																
<211> 589																
<212> PRT																
<213> 人工序列																
<220>																
<223> scFv (3B12A) - JB1 - scFv (3B12A)																
<400> 83																
Met	Gly	Thr	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	

1	5	10	15
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile			
20	25	30	
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu			
35	40	45	
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Lys Tyr Ala			
50	55	60	
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn			
65	70	75	80
Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val			
85	90	95	
Tyr Tyr Cys Thr Ile Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr Val Asp Tyr			
100	105	110	
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly			
115	120	125	
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser			
130	135	140	
Pro Thr Thr Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys			
145	150	155	160
Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln			
165	170	175	
Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu			
180	185	190	
Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser			
195	200	205	
Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr			
210	215	220	
Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr			
225	230	235	240
Lys Leu Glu Ile Gly Ser Glu Phe Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr			
245	250	255	
Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr			
260	265	270	
Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His Pro Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly			
275	280	285	
Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser			
290	295	300	
Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu			
305	310	315	320

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

<210> 84

<211> 342

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> JB6-scFv (3B12A)

<400> 84

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

290	295	300
Thr Ser Tyr Ser Leu Thr	Ile Gly Thr Met Glu Ala Glu Asp Val Ala	
305	310	315 320
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser	Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ser	
	325	330 335
Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
340		
<210> 85		
<211> 346		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> JC6-scFv (3B12A)		
<400> 85		
Met Thr Lys Trp Lys Pro Val Gly Met Ala Asp Leu Val Thr Pro Glu		
1	5 10 15	
Gln Val Lys Lys Val Tyr Arg Lys Ala Val Leu Val Val His Pro Asp		
	20 25 30	
Lys Ala Thr Gly Gln Pro Tyr Glu Gln Tyr Ala Lys Met Ile Phe Met		
	35 40 45	
Glu Leu Asn Asp Ala Trp Ser Glu Phe Glu Asn Gln Gly Gln Lys Pro		
50	55 60	
Leu Tyr Asp Ile Tyr Asp Lys Tyr Gly Lys Glu Gly Leu Asn Gly Gly		
65	70 75 80	
Asp Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
	85 90 95	
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser		
	100 105 110	
Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr		
	115 120 125	
Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln		
130	135 140	
Arg Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp		
145	150 155 160	
Gly Glu Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr		
	165 170 175	
Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr		
	180 185 190	
Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Ile Tyr Tyr Tyr Gly		

195	200	205
Ser Arg Tyr Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser		
210	215	220
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu		
225	230	235
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu		
245	250	255
Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser Tyr		
260	265	270
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
275	280	285
Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
290	295	300
Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu Ala		
305	310	315
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro Leu		
325	330	335
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
340	345	
<210> 86		
<211> 343		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> DnaJB1		
<400> 86		
Met Gly Thr Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg		
1	5	10
Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu		
20	25	30
Arg Tyr His Pro Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe		
35	40	45
Lys Glu Ile Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg		
50	55	60
Glu Ile Phe Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Gly Pro		
65	70	75
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Asn Gly Thr Ser Phe Ser Tyr Thr		
85	90	95
Phe His Gly Asp Pro His Ala Met Phe Ala Glu Phe Phe Gly Gly Arg		

Met Ala Lys Ala Ala Ala Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser

1	5	10	15
Cys Val Gly Val Phe Gln His Gly Lys Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp			
20	25	30	
Gln Gly Asn Arg Thr Thr Pro Ser Tyr Val Ala Phe Thr Asp Thr Glu			
35	40	45	
Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala Lys Asn Gln Val Ala Leu Asn Pro Gln			
50	55	60	
Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys Arg Leu Ile Gly Arg Lys Phe Gly Asp			
65	70	75	80
Pro Val Val Gln Ser Asp Met Lys His Trp Pro Phe Gln Val Ile Asn			
85	90	95	
Asp Gly Asp Lys Pro Lys Val Gln Val Ser Tyr Lys Gly Glu Thr Lys			
100	105	110	
Ala Phe Tyr Pro Glu Glu Ile Ser Ser Met Val Leu Thr Lys Met Lys			
115	120	125	
Glu Ile Ala Glu Ala Tyr Leu Gly Tyr Pro Val Thr Asn Ala Val Ile			
130	135	140	
Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ser Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp			
145	150	155	160
Ala Gly Val Ile Ala Gly Leu Asn Val Leu Arg Ile Ile Asn Glu Pro			
165	170	175	
Thr Ala Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Asp Arg Thr Gly Lys Gly Glu			
180	185	190	
Arg Asn Val Leu Ile Phe Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser			
195	200	205	
Ile Leu Thr Ile Asp Asp Gly Ile Phe Glu Val Lys Ala Thr Ala Gly			
210	215	220	
Asp Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp Asn Arg Leu Val Asn His			
225	230	235	240
Phe Val Glu Glu Phe Lys Arg Lys His Lys Lys Asp Ile Ser Gln Asn			
245	250	255	
Lys Arg Ala Val Arg Arg Leu Arg Thr Ala Cys Glu Arg Ala Lys Arg			
260	265	270	
Thr Leu Ser Ser Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Ile Asp Ser Leu Phe			
275	280	285	
Glu Gly Ile Asp Phe Tyr Thr Ser Ile Thr Arg Ala Arg Phe Glu Glu			
290	295	300	
Leu Cys Ser Asp Leu Phe Arg Ser Thr Leu Glu Pro Val Glu Lys Ala			
305	310	315	320

Leu Arg Asp Ala Lys Leu Asp Lys Ala Gln Ile His Asp Leu Val Leu		
325	330	335
Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys Val Gln Lys Leu Leu Gln Asp		
340	345	350
Phe Phe Asn Gly Arg Asp Leu Asn Lys Ser Ile Asn Pro Asp Glu Ala		
355	360	365
Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val Gln Ala Ala Ile Leu Met Gly Asp Lys		
370	375	380
Ser Glu Asn Val Gln Asp Leu Leu Leu Leu Asp Val Ala Pro Leu Ser		
385	390	395
Leu Gly Leu Glu Thr Ala Gly Gly Val Met Thr Ala Leu Ile Lys Arg		
405	410	415
Asn Ser Thr Ile Pro Thr Lys Gln Thr Gln Ile Phe Thr Thr Tyr Ser		
420	425	430
Asp Asn Gln Pro Gly Val Leu Ile Gln Val Tyr Glu Gly Glu Arg Ala		
435	440	445
Met Thr Lys Asp Asn Asn Leu Leu Gly Arg Phe Glu Leu Ser Gly Ile		
450	455	460
Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile		
465	470	475
Asp Ala Asn Gly Ile Leu Asn Val Thr Ala Thr Asp Lys Ser Thr Gly		
485	490	495
Lys Ala Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn Asp Lys Gly Arg Leu Ser Lys		
500	505	510
Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Gln Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Ala Glu		
515	520	525
Asp Glu Val Gln Arg Glu Arg Val Ser Ala Lys Asn Ala Leu Glu Ser		
530	535	540
Tyr Ala Phe Asn Met Lys Ser Ala Val Glu Asp Glu Gly Leu Lys Gly		
545	550	555
Lys Ile Ser Glu Ala Asp Lys Lys Lys Val Leu Asp Lys Cys Gln Glu		
565	570	575
Val Ile Ser Trp Leu Asp Ala Asn Thr Leu Ala Glu Lys Asp Glu Phe		
580	585	590
Glu His Lys Arg Lys Glu Leu Glu Gln Val Cys Asn Pro Ile Ile Ser		
595	600	605
Gly Leu Tyr Gln Gly Ala Gly Gly Pro Gly Pro Gly Gly Phe Gly Ala		
610	615	620
Gln Gly Pro Lys Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro Thr Ile Glu Glu Val		

625	630	635	640
Asp			
<210> 88			
<211> 814			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> Hsp110			
<400> 88			
Met Ser Val Val Gly Leu Asp Val Gly Ser Gln Ser Cys Tyr Ile Ala			
1 5 10 15			
Val Ala Arg Ala Gly Gly Ile Glu Thr Ile Ala Asn Glu Phe Ser Asp			
20 25 30			
Arg Cys Thr Pro Ser Val Ile Ser Phe Gly Ser Lys Asn Arg Thr Ile			
35 40 45			
Gly Val Ala Ala Lys Asn Gln Gln Ile Thr His Ala Asn Asn Thr Val			
50 55 60			
Ser Asn Phe Lys Arg Phe His Gly Arg Ala Phe Asn Asp Pro Phe Ile			
65 70 75 80			
Gln Lys Glu Lys Glu Asn Leu Ser Tyr Asp Leu Val Pro Leu Lys Asn			
85 90 95			
Gly Gly Val Gly Ile Lys Val Met Tyr Met Gly Glu Glu His Leu Phe			
100 105 110			
Ser Val Glu Gln Ile Thr Ala Met Leu Leu Thr Lys Leu Lys Glu Thr			
115 120 125			
Ala Glu Asn Ser Leu Lys Lys Pro Val Thr Asp Cys Val Ile Ser Val			
130 135 140			
Pro Ser Phe Phe Thr Asp Ala Glu Arg Arg Ser Val Leu Asp Ala Ala			
145 150 155 160			
Gln Ile Val Gly Leu Asn Cys Leu Arg Leu Met Asn Asp Met Thr Ala			
165 170 175			
Val Ala Leu Asn Tyr Gly Ile Tyr Lys Gln Asp Leu Pro Ser Leu Asp			
180 185 190			
Glu Lys Pro Arg Ile Val Val Phe Val Asp Met Gly His Ser Ala Phe			
195 200 205			
Gln Val Ser Ala Cys Ala Phe Asn Lys Gly Lys Leu Lys Val Leu Gly			
210 215 220			
Thr Ala Phe Asp Pro Phe Leu Gly Gly Lys Asn Phe Asp Glu Lys Leu			
225 230 235 240			

Val Glu His Phe Cys Ala Glu Phe Lys Thr Lys Tyr Lys Leu Asp Ala		
245	250	255
Lys Ser Lys Ile Arg Ala Leu Leu Arg Leu Tyr Gln Glu Cys Glu Lys		
260	265	270
Leu Lys Lys Leu Met Ser Ser Asn Ser Thr Asp Leu Pro Leu Asn Ile		
275	280	285
Glu Cys Phe Met Asn Asp Lys Asp Val Ser Gly Lys Met Asn Arg Ser		
290	295	300
Gln Phe Glu Glu Leu Cys Ala Glu Leu Leu Gln Lys Ile Glu Val Pro		
305	310	320
Leu Tyr Ser Leu Leu Glu Gln Thr His Leu Lys Val Glu Asp Val Ser		
325	330	335
Ala Val Glu Ile Val Gly Gly Ala Thr Arg Ile Pro Ala Val Lys Glu		
340	345	350
Arg Ile Ala Lys Phe Phe Gly Lys Asp Ile Ser Thr Thr Leu Asn Ala		
355	360	365
Asp Glu Ala Val Ala Arg Gly Cys Ala Leu Gln Cys Ala Ile Leu Ser		
370	375	380
Pro Ala Phe Lys Val Arg Glu Phe Ser Val Thr Asp Ala Val Pro Phe		
385	390	400
Pro Ile Ser Leu Ile Trp Asn His Asp Ser Glu Asp Thr Glu Gly Val		
405	410	415
His Glu Val Phe Ser Arg Asn His Ala Ala Pro Phe Ser Lys Val Leu		
420	425	430
Thr Phe Leu Arg Arg Gly Pro Phe Glu Leu Glu Ala Phe Tyr Ser Asp		
435	440	445
Pro Gln Gly Val Pro Tyr Pro Glu Ala Lys Ile Gly Arg Phe Val Val		
450	455	460
Gln Asn Val Ser Ala Gln Lys Asp Gly Glu Lys Ser Arg Val Lys Val		
465	470	480
Lys Val Arg Val Asn Thr His Gly Ile Phe Thr Ile Ser Thr Ala Ser		
485	490	495
Met Val Glu Lys Val Pro Thr Glu Glu Asn Glu Met Ser Ser Glu Ala		
500	505	510
Asp Met Glu Cys Leu Asn Gln Arg Pro Pro Glu Asn Pro Asp Thr Asp		
515	520	525
Ala Asn Glu Lys Lys Val Asp Gln Pro Pro Glu Ala Lys Lys Pro Lys		
530	535	540
Ile Lys Val Val Asn Val Glu Leu Pro Ile Glu Ala Asn Leu Val Trp		

545	550	555	560
Gln Leu Gly Lys Asp	Leu Leu Asn Met Tyr	Ile Glu Thr Glu Gly Lys	
565	570	575	
Met Ile Met Gln Asp	Lys Leu Glu Lys Glu Arg Asn Asp	Ala Lys Asn	
580	585	590	
Ala Val Glu Glu Tyr	Val Tyr Glu Phe Arg Asp	Lys Leu Cys Gly Pro	
595	600	605	
Tyr Glu Lys Phe Ile	Cys Glu Gln Asp His Gln Asn	Phe Leu Arg Leu	
610	615	620	
Leu Thr Glu Thr Glu	Asp Trp Leu Tyr Glu Glu Gly Glu	Asp Gln Ala	
625	630	635	640
Lys Gln Ala Tyr Val	Asp Lys Leu Glu Glu Leu Met	Lys Ile Gly Thr	
645	650	655	
Pro Val Lys Val Arg	Phe Gln Glu Ala Glu Glu Arg	Pro Lys Met Phe	
660	665	670	
Glu Glu Leu Gly Gln	Arg Leu Gln His Tyr Ala Lys	Ile Ala Ala Asp	
675	680	685	
Phe Arg Asn Lys Asp	Glu Lys Tyr Asn His Ile Asp	Glu Ser Glu Met	
690	695	700	
Lys Lys Val Glu Lys	Ser Val Asn Glu Val Met Glu	Trp Met Asn Asn	
705	710	715	720
Val Met Asn Ala Gln	Ala Lys Lys Ser Leu Asp	Gln Asp Pro Val Val	
725	730	735	
Arg Ala Gln Glu Ile	Lys Thr Lys Ile Lys Glu	Leu Asn Asn Thr Cys	
740	745	750	
Glu Pro Val Val Thr	Gln Pro Lys Pro Lys Ile Glu	Ser Pro Lys Leu	
755	760	765	
Glu Arg Thr Pro Asn	Gly Pro Asn Ile Asp Lys Lys	Glu Glu Asp Leu	
770	775	780	
Glu Asp Lys Asn Asn	Phe Gly Ala Glu Pro Pro	His Gln Asn Gly Glu	
785	790	795	800
Cys Tyr Pro Asn Glu	Lys Asn Ser Val Asn Met	Asp Leu Asp	
805	810		

<210> 89

<211> 339

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> JB1-scFv (51C1)

<400> 89

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

Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser
 305 310 315 320
 Ser Tyr Thr Lys Ser Gly Thr Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 325 330 335
 Thr Val Val
 <210> 90
 <211> 348
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> JB1-scFv (3F10)
 <400> 90
 Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His
 20 25 30
 Pro Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile
 35 40 45
 Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe
 50 55 60
 Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Asp Ile Gly Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 85 90 95
 Ser Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val
 100 105 110
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 115 120 125
 Phe Ser Ser Gln Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 130 135 140
 Leu Glu Trp Val Ser Ala Leu Ser Arg Thr Gly Asp Tyr Thr Trp Tyr
 145 150 155 160
 Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Ser Lys
 165 170 175
 Asn Ile Phe Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 180 185 190
 Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Tyr Tyr Ser Ser Phe Gly Tyr Asn Trp
 195 200 205
 Ala Ala Phe His Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

210	215	220
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu		
225	230	235
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu		
245	250	255
Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Asn Asn Tyr		
260	265	270
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
275	280	285
Tyr Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly		
290	295	300
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Arg Leu Glu Pro		
305	310	315
Glu Asp Phe Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Gly Gly Ser Pro Pro		
325	330	335
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
340	345	

<210> 91

<211> 135

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> JBI-2XQBP1

<400> 91

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

115	120	125
Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys		
130	135	
<210> 92		
<211> 338		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> JC7-scFv (3B12A)		
<400> 92		
Met Asp Tyr Tyr Lys Ile Leu Gly Val Asp Lys Asn Ala Ser Glu Asp		
1 5 10 15		
Glu Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Lys Arg Ala Leu Met His His Pro Asp		
20 25 30		
Arg His Ser Gly Ala Ser Ala Glu Val Gln Lys Glu Glu Glu Lys Lys		
35 40 45		
Phe Lys Glu Val Gly Glu Ala Phe Thr Ile Leu Ser Asp Pro Lys Lys		
50 55 60		
Lys Thr Arg Tyr Asp Ser Gly Gln Asp Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
65 70 75 80		
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala		
85 90 95		
Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly		
100 105 110		
Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp		
115 120 125		
Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp		
130 135 140		
Ile Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Lys Tyr Ala Pro Lys		
145 150 155 160		
Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala		
165 170 175		
Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
180 185 190		
Cys Thr Ile Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr Val Asp Tyr Trp Gly		
195 200 205		
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
210 215 220		
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr		

225	230	235	240
Thr Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala			
	245	250	255
Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro			
	260	265	270
Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser			
	275	280	285
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser			
	290	295	300
Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys			
305	310	315	320
Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu			
	325	330	335
Glu Ile			
<210>	93		
<211>	341		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	JB13-scFv (3B12A)		
<400>	93		
Met Gly Gln Asp Tyr Tyr Ser Val Leu Gly Ile Thr Arg Asn Ser Glu			
1	5	10	15
Asp Ala Gln Ile Lys Gln Ala Tyr Arg Arg Leu Ala Leu Lys His His			
	20	25	30
Pro Leu Lys Ser Asn Glu Pro Ser Ser Ala Glu Ile Phe Arg Gln Ile			
	35	40	45
Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Met Lys Arg Gly Ile Tyr			
	50	55	60
Asp Lys Phe Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Gly Asp Ile Gly Gly Gly			
65	70	75	80
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
	85	90	95
Ser Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val			
	100	105	110
Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn			
	115	120	125
Ile Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly			
	130	135	140

Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Glu	Thr	Lys	Tyr
145						150					155				160
Ala	Pro	Lys	Phe	Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser
				165						170					175
Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala
				180						185					190
Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ile	Ile	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Tyr	Val	Asp
			195						200						205
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
			210						215						220
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln
225										230					240
Ser	Pro	Thr	Thr	Met	Ala	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Ile	Thr	Ile	Thr
				245						250					255
Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln
				260						265					270
Gln	Lys	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Thr	Ser	Asn
				275						280					285
Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr
				290						295					300
Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Gly	Thr	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Thr
305										310					320
Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Ser	Ser	Ile	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly
				325						330					335
Thr	Lys	Leu	Glu	Ile											
				340											
<210>	94														
<211>	321														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	JB1-scFv (3B12A) (1)														
<400>	94														
Met	Gly	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Gln	Thr	Leu	Gly	Leu	Ala	Arg	Gly	Ala	Ser
1				5						10				15	
Asp	Glu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Tyr	Arg	Arg	Gln	Ala	Leu	Arg	Tyr	His
				20						25				30	
Pro	Asp	Lys	Asn	Lys	Glu	Pro	Gly	Ala	Glu	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu	Ile
				35						40				45	

Ala	Glu	Ala	Tyr	Asp	Val	Leu	Ser	Asp	Pro	Arg	Lys	Arg	Glu	Ile	Phe
50						55					60				
Asp	Arg	Tyr	Gly	Glu	Glu	Gly	Leu	Lys	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
65					70					75					80
Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
				85					90					95	
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr
			100					105					110		
Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Thr	Glu	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			115					120					125		
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Glu	Thr	Lys	Tyr	Ala	Pro	Lys	Phe
			130					135					140		
Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr
145					150					155					160
Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					165					170					175
Thr	Ile	Ile	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Tyr	Val	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			180					185					190		
Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
			195					200					205		
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Thr	Thr
					210			215					220		
Met	Ala	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Ile	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser
225					230					235					240
Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly
					245					250					255
Phe	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly
					260					265					270
Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu
					275					280					285
Thr	Ile	Gly	Thr	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln
					290					295					300
Gln	Gly	Ser	Ser	Ile	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
305					310					315					320
Ile															
<210>	95														
<211>	321														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														

<220>

<223> JB1-scFv (3B12A) (2)

<400> 95

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

Thr Ile Gly Thr Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 290 295 300
 Gln Gly Ser Ser Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
 305 310 315 320
 Ile
 <210> 96
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> JB1-scFv (3B12A) (3)
 <400> 96
 Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His
 20 25 30
 Pro Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile
 35 40 45
 Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe
 50 55 60
 Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln
 65 70 75 80
 Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser
 85 90 95
 Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val
 100 105 110
 Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro
 115 120 125
 Glu Asp Gly Glu Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr
 130 135 140
 Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Ile Tyr Tyr
 165 170 175
 Tyr Gly Ser Arg Tyr Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 180 185 190
 Val Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 195 200 205
 Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Ala Ala Ser Pro

210	215	220
Gly Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser		
225	230	235
Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu		240
	245	250
Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe		255
	260	265
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met		270
	275	280
Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ile		285
	290	300
Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
305	310	315
<210> 97		
<211> 497		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> JBI-scFv (3F10) -DD		
<400> 97		
Met Gly Lys Asp Tyr Tyr Gln Thr Leu Gly Leu Ala Arg Gly Ala Ser		
1	5	10
Asp Glu Glu Ile Lys Arg Ala Tyr Arg Arg Gln Ala Leu Arg Tyr His		15
	20	25
Pro Asp Lys Asn Lys Glu Pro Gly Ala Glu Glu Lys Phe Lys Glu Ile		30
	35	40
Ala Glu Ala Tyr Asp Val Leu Ser Asp Pro Arg Lys Arg Glu Ile Phe		45
	50	55
Asp Arg Tyr Gly Glu Glu Gly Leu Lys Gly Ser Asp Ile Gly Gly Gly		60
65	70	75
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala Glu		80
	85	90
Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser		95
	100	105
Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr		110
	115	120
Met His Trp Val Lys Gln Arg Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly		125
	130	135
Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln		140

145	150	155	160
Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu			
	165	170	175
Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr			
	180	185	190
Ile Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	195	200	205
Thr Thr Leu Thr Val Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
	210	215	220
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met			
225	230	235	240
Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser			
	245	250	255
Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe			
	260	265	270
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val			
	275	280	285
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr			
	290	295	300
Ile Gly Thr Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln			
305	310	315	320
Gly Ser Ser Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
	325	330	335
Leu Glu Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Arg Phe Thr			
	340	345	350
Arg Arg Gly Glu Asp Leu Phe Met Cys Met Asp Ile Gln Leu Val Glu			
	355	360	365
Ala Leu Cys Gly Phe Gln Lys Pro Ile Ser Thr Leu Asp Asn Arg Thr			
	370	375	380
Ile Val Ile Thr Ser His Pro Gly Gln Ile Val Lys His Gly Asp Ile			
385	390	395	400
Lys Cys Val Leu Asn Glu Gly Met Pro Ile Tyr Arg Arg Pro Tyr Glu			
	405	410	415
Lys Gly Arg Leu Ile Ile Glu Phe Lys Val Asn Phe Pro Glu Asn Gly			
	420	425	430
Phe Leu Ser Pro Asp Lys Leu Ser Leu Leu Glu Lys Leu Leu Pro Glu			
	435	440	445
Arg Lys Glu Val Glu Glu Thr Asp Glu Met Asp Gln Val Glu Leu Val			
450	455	460	

Asp Phe Asp Pro Asn Gln Glu Arg Arg Arg His Tyr Asn Gly Glu Ala
465 470 475 480
Tyr Glu Asp Asp Glu His His Pro Arg Gly Gly Val Gln Cys Gln Thr
485 490 495

Ser

<210> 98

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MGVKVLFALICIAVAEA

<400> 98

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu
1 5 10 15

Ala

<210> 99

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MAPVQLLGLLVFLPAMRC

<400> 99

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
1 5 10 15

Met Arg Cys

<210> 100

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MAVLGLLFCLVTFPSCVLS

<400> 100

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

Val Leu Ser

<210> 101

<211> 660

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GFP-TDP43FL

<400> 101

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

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

595	600	605
Pro Asn Gln Ala Phe Gly Ser	Gly Asn Asn Ser Tyr	Ser Gly Ser Asn
610	615	620
Ser Gly Ala Ala Ile Gly Trp	Gly Ser Ala Ser Asn Ala	Gly Ser Gly
625	630	635
Ser Gly Phe Asn Gly Gly Phe	Gly Ser Ser Met Asp Ser	Lys Ser Ser
645	650	655
Gly Trp Gly Met		
660		
<210> 102		
<211> 453		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> GFP-TDP43CTF		
<400> 102		
Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu		
1	5	10
Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly		
20	25	30
Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile		
35	40	45
Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr		
50	55	60
Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys		
65	70	75
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu		
85	90	95
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu		
100	105	110
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly		
115	120	125
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr		
130	135	140
Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn		
145	150	155
Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser		
165	170	175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly		

180	185	190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu		
195	200	205
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe		
210	215	220
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Glu		
225	230	235
Phe Asp Ile Ala Ala Ala Arg Glu Phe Phe Ser Gln Tyr Gly Asp Val		
245	250	255
Met Asp Val Phe Ile Pro Lys Pro Phe Arg Ala Phe Ala Phe Val Thr		
260	265	270
Phe Ala Asp Asp Gln Ile Ala Gln Ser Leu Cys Gly Glu Asp Leu Ile		
275	280	285
Ile Lys Gly Ile Ser Val His Ile Ser Asn Ala Glu Pro Lys His Asn		
290	295	300
Ser Asn Arg Gln Leu Glu Arg Ser Gly Arg Phe Gly Gly Asn Pro Gly		
305	310	315
Gly Phe Gly Asn Gln Gly Gly Phe Gly Asn Ser Arg Gly Gly Gly Ala		
325	330	335
Gly Leu Gly Asn Asn Gln Gly Ser Asn Met Gly Gly Gly Met Asn Phe		
340	345	350
Gly Ala Phe Ser Ile Asn Pro Ala Met Met Ala Ala Ala Gln Ala Ala		
355	360	365
Leu Gln Ser Ser Trp Gly Met Met Gly Met Leu Ala Ser Gln Gln Asn		
370	375	380
Gln Ser Gly Pro Ser Gly Asn Asn Gln Asn Gln Gly Asn Met Gln Arg		
385	390	395
Glu Pro Asn Gln Ala Phe Gly Ser Gly Asn Asn Ser Tyr Ser Gly Ser		
405	410	415
Asn Ser Gly Ala Ala Ile Gly Trp Gly Ser Ala Ser Asn Ala Gly Ser		
420	425	430
Gly Ser Gly Phe Asn Gly Gly Phe Gly Ser Ser Met Asp Ser Lys Ser		
435	440	445
Ser Gly Trp Gly Met		
450		
<210> 103		
<211> 414		
<212> PRT		
<213> 人工序列		

<220>

<223> TDP43FL

<400> 103

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

Phe Gly Asn Ser Arg Gly Gly Gly Ala Gly Leu Gly Asn Asn Gln Gly
 290 295 300
 Ser Asn Met Gly Gly Gly Met Asn Phe Gly Ala Phe Ser Ile Asn Pro
 305 310 315 320
 Ala Met Met Ala Ala Ala Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ser Trp Gly Met
 325 330 335
 Met Gly Met Leu Ala Ser Gln Gln Asn Gln Ser Gly Pro Ser Gly Asn
 340 345 350
 Asn Gln Asn Gln Gly Asn Met Gln Arg Glu Pro Asn Gln Ala Phe Gly
 355 360 365
 Ser Gly Asn Asn Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Ser Gly Ala Ala Ile Gly
 370 375 380
 Trp Gly Ser Ala Ser Asn Ala Gly Ser Gly Ser Gly Phe Asn Gly Gly
 385 390 395 400
 Phe Gly Ser Ser Met Asp Ser Lys Ser Ser Gly Trp Gly Met
 405 410
 <210> 104
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> TDP43deltaNLS
 <400> 104
 Met Ser Glu Tyr Ile Arg Val Thr Glu Asp Glu Asn Asp Glu Pro Ile
 1 5 10 15
 Glu Ile Pro Ser Glu Asp Asp Gly Thr Val Leu Leu Ser Thr Val Thr
 20 25 30
 Ala Gln Phe Pro Gly Ala Cys Gly Leu Arg Tyr Arg Asn Pro Val Ser
 35 40 45
 Gln Cys Met Arg Gly Val Arg Leu Val Glu Gly Ile Leu His Ala Pro
 50 55 60
 Asp Ala Gly Trp Gly Asn Leu Val Tyr Val Val Asn Tyr Pro Lys Asp
 65 70 75 80
 Asn Ala Ala Ala Met Asp Glu Thr Asp Ala Ser Ser Ala Val Lys Val
 85 90 95
 Lys Arg Ala Val Gln Lys Thr Ser Asp Leu Ile Val Leu Gly Leu Pro
 100 105 110
 Trp Lys Thr Thr Glu Gln Asp Leu Lys Glu Tyr Phe Ser Thr Phe Gly
 115 120 125

Glu Val Leu Met Val Gln Val Lys Lys Asp Leu Lys Thr Gly His Ser		
130	135	140
Lys Gly Phe Gly Phe Val Arg Phe Thr Glu Tyr Glu Thr Gln Val Lys		
145	150	155
Val Met Ser Gln Arg His Met Ile Asp Gly Arg Trp Cys Asp Cys Lys		
	165	170
Leu Pro Asn Ser Lys Gln Ser Gln Asp Glu Pro Leu Arg Ser Arg Lys		
	180	185
Val Phe Val Gly Arg Cys Thr Glu Asp Met Thr Glu Asp Glu Leu Arg		
	195	200
Glu Phe Phe Ser Gln Tyr Gly Asp Val Met Asp Val Phe Ile Pro Lys		
	210	215
Pro Phe Arg Ala Phe Ala Phe Val Thr Phe Ala Asp Asp Gln Ile Ala		
225	230	235
Gln Ser Leu Cys Gly Glu Asp Leu Ile Ile Lys Gly Ile Ser Val His		
	245	250
Ile Ser Asn Ala Glu Pro Lys His Asn Ser Asn Arg Gln Leu Glu Arg		
	260	265
Ser Gly Arg Phe Gly Gly Asn Pro Gly Gly Phe Gly Asn Gln Gly Gly		
	275	280
Phe Gly Asn Ser Arg Gly Gly Gly Ala Gly Leu Gly Asn Asn Gln Gly		
	290	295
Ser Asn Met Gly Gly Gly Met Asn Phe Gly Ala Phe Ser Ile Asn Pro		
305	310	315
Ala Met Met Ala Ala Ala Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ser Trp Gly Met		
	325	330
Met Gly Met Leu Ala Ser Gln Gln Asn Gln Ser Gly Pro Ser Gly Asn		
	340	345
Asn Gln Asn Gln Gly Asn Met Gln Arg Glu Pro Asn Gln Ala Phe Gly		
	355	360
Ser Gly Asn Asn Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Ser Gly Ala Ala Ile Gly		
	370	375
Trp Gly Ser Ala Ser Asn Ala Gly Ser Gly Ser Gly Phe Asn Gly Gly		
385	390	395
Phe Gly Ser Ser Met Asp Ser Lys Ser Ser Gly Trp Gly Met		
	405	410

CLUSTAL O (1.2.4) 多序列比对

DNAJC20	---DYFSLMDCNRS--FRVDTAKLQHRYYQQQLQRLVHPDFFFSQRS-----QTEKDFSEKHST	51
DNAJC15	---EAGLILGVS---PSAGKAKIRTAHRRVMILNHPDKGGSP-----YVAA	40
DNAJC19	---EAALILGVS---PTANKGKIRDAHRRIMLLNHPDKGGSP-----YIAA	40
DNAJC13	---DAYEVLNLPQGGPHDESKIRKAYFRLAQKYHPDKNPEGR-----DMFE	44
DNAJC2	---DHYAVLGLGHVRYKATQRIKAAHKAMVLKHHHPDKRKAAG-----EPIKEGNDYFT	52
DNAJC22	---LAYQVLGLS---EGATNEEIHRSYQELVKVWHPDHNLDQT-----EEAQRHFL	45
DNAJC9	---DLYRVLGVR---REASDGEVRRGYHKVSLQVHPDRVGEQ-----DKEDATRRFQ	46
DNAJC25	---DCYEVLGVS---RSAGKAEIARAYRQLARRYHPDRYRPQPGDEGPGRTPPQSAEEAFL	54
DNAJC10	---DFYSLLGVS---KTASSREIRQAFKKLALKIHPDKNPNP-----NAHGDFL	44
DNAJC1	---NFYQFLGVQ---QDASSADIRKAYRKLSTLHPDKNKDE-----NAETQFR	43
DNAJC11	---DYYSLLNVR---REASSEELKAAVRRLCMLYHPDKHRDPE-----LKSOAERLFN	47
DNAJC3	---DYYKILGVK---RNAKKQEI IKAYRKLALQWHPDNFQNEE-----EKKKAEKKFI	47
DNAJC7	---DYYKILGVD---KNASEDEIKKAYRKRALMHPDRHSGASA-----EVQKEEEKKFK	49
DNAJB13	---DYYSVLGIT---RNSEDAQIKQAYRRRLALKHHPIKSNPE-----SSAEIFR	43
DNAJA3	---DYYQILGVP---RNASQKEIKKAYYQLAKKYHPDTNKDDP-----KAKEKFS	44
DNAJB11	---DFYKILGVP---RSASIKDIKKAYRKLALQIHPDRNPDDP-----QAQEKFQ	44
DNAJC16	---DPYRVLGVS---RTASQADIKKAYKKLAREWHIPDKNKDP-----GAEDKFI	43
DNAJB9	---SYYDILGVP---KSASERQIKKAFHKLAMKYHPDKNKSP-----DAEAKFR	43
DNAJB1	---GKDYQTLGLA---RGASDEEIKRAYRRQALRYHPDKNKEP-----GAEEKFK	45
DNAJB4	---GKDYCICILGIE---KGASDEDIKKAYRKQALKFHPDKNKSP-----QAEKKFK	45
DNAJB5	---DYYKILGIP---SGANEDEIKKAYRKMALKYHPDKNKEP-----NAEEKFK	43
DNAJB2	---ASYEILDVP---RSASADDIKKAYRRKALQWHPDKNPDNK-----EFAEKKFK	46
DNAJB8	---NYEVLGVQ---ASASPEDIKKAYRKLALRWHPDKNPDNK-----EEAEKKFK	45

DNAJB7	---DYYEVLGLQ---	RYASPEDIKKAYHKVALKWHPDKNPENK---	EEAERKFK	45
DNAJB3	---MVDYVEVLDP---	ROASSEAIKKAYRKLALKWHPDKNPENK---	EEAERRFK	47
DNAJB6	---VDYVEVLGVQ---	RHASPEDIKKAYRKLALKWHPDKNPENK---	EEAERKFK	46
DNAJC6	---TKWKPVGMA---	DLVTPEQVKKVYRKAVLVVHPDKATGQP---	YEQYAKMIFM	47
DNAJC26	---SRWTFVGMA---	DLVAPEQVKKHYRRRAVLAVHPDKAAGQP---	YEQHAKMIFM	47
DNAJC28	---EYRLLNVE---	EGCSADEVRESFHKLAKQYHPDSCSNTA---	DSATFI	43
DNAJC29	ILKEVTSVVEQA---	WKLPESEKKIIRRLYLKWHHPDKNPENH---	DIANEVFK	48
DNAJC24	---DWYSILGAD---	PSANISDLKQYQKLILMYHPDKQSTDV---	PAGTVEECVQKFI	50
DNAJC12	---DYTTLLGCD---	ELSSVEQILAEFKVRALECHHPDKHPENP---	KAVETFO	44
DNAJC4	---TYYEILLGVH---	PGASTEVEVKRAFFSKSEIHPDRDPGNP---	SLHSRFV	44
DNAJC8	---NPFEVLQID---	PEVTDEEIKKFRQLSILVHPDKNQDDA---	DRAQKAFE	45
DNAJC30	---ALYDLLGVP---	STATQAQIKAAYYRQCFLYHPDRNSGSA---	EAAERFT	44
DNAJC23	---NPYEVLNLD---	PGATVAEIKQYRLLSLKYHPDKGGDEV---	---MFM	40
DNAJC27	---DSWDMLGVK---	PGASRDEVNKAYRKLAVLHHPDKCVAPG---	SEDAFK	43
DNAJC14	---NPFHVLGVE---	ATASDVELKKAYRQLAVMVHPDKNHHFR---	AEEAFK	43
DNAJC17	---DLYALLGIE---	EKAADKEVKKAYRQKALSCHHPDKNPDNP---	RAAELEFH	44
DNAJC5	---GESLYHVLGLD---	KNATSDDIKKSYRKLALKYHPDKNPDNP---	EAADKFK	46
DNAJC5B	---ALYEILGLH---	KGASNEEIKKTYRKLALKWHHPDKNPDDP---	AATEKFK	44
DNAJC21	---CHYEALGVR---	RDASEEELKKAYRKLALKWHPDKNLDNA---	AEAAEQFK	45
DNAJC18	---NYYEILGVS---	RDASDEELKKAYRKLALKFHPDKNCAPG---	ATDAFK	43
DNAJB12	---YEILGVS---	RGASDEDLKKAYRRLALKFHPDKNHAPG---	ATEAFK	41
DNAJB14	---NYYEVLGVT---	KDAGDEDLKKAYRKLALKFHPDKNHAPG---	ATDAFK	43
DNAJA2	---KLYDILGVP---	PGASENELKKAYRKLAKYHPDKNPNNA---	GDKFK	41
DNAJA1	---TYDYDVLGVK---	PNATQEELKKAYRKLALKYHPDKNPNNE---	GEKFK	41
DNAJA4	---ETQYDILGVK---	PSASPEEIKKAYRKLALKYHPDKNPNDE---	GEKFK	43

图 1A

DNAJC20	LVNDAYKTLLAPL-----SRGLYLLK-----	72
DNAJC15	KINEAKDLLETTT-----KH-----	55
DNAJC19	KINEAKDLLEGQA-----KK-----	55
DNAJC13	KVNKAYEFLCTKS-----AKIVDGPDP-----	66
DNAJC2	CITKAYEMLSDPV-----KRRAFNSVD-----	74
DNAJC22	EIQAAAYEVLSPQR-----KPWGSRR-----	65
DNAJC9	ILGKVYSVLSDRE-----QRAVYDEQG-----	68
DNAJC25	LVATAYETLKDEE-----TRKDYDYML-----	76
DNAJC10	KINRAYEVLKDED-----LRKKYDKYG-----	66
DNAJC1	QLVAIYEVLKDDE-----RRQRYDDIL-----	65
DNAJC11	LVHQAYEVLSDPQ-----TRAIYDIYG-----	69
DNAJC3	DIAAAKEVLSDPE-----MRKKFDDGE-----	69
DNAJC7	EVGEAFTILSDPK-----KKTRYDSGQ-----	71
DNAJB13	QIAEAYDVLSDPM-----KRGYDKFG-----	65
DNAJA3	QLAEAYEVLSDSE-----KRKQYDAYG-----	66
DNAJB11	DLGAAYEVLSDSE-----KRKQYDTYG-----	66
DNAJC16	QISKAYEILSNEE-----KRSNYDQYG-----	65
DNAJB9	EIAEAYETLSAN-----RRKEYDTLG-----	65
DNAJB1	EIAEAYDVLS DPR-----KREIFDRYGEE-----	69
DNAJB4	EVAEAYEVLSDPK-----KREIYDQFGEE-----	69
DNAJB5	EIAEAYDVLS DPR-----KRGLYDQYG-----	65
DNAJB2	EVAEAYEVLSDKH-----KREIYDRYGRE-----	70
DNAJB8	LVSEAYEVLSDSK-----KRSLYDRAG-----	67
DNAJB7	EVAEAYEVLNDE-----KRDIYDKYG-----	67

DNAJB3	QVAEAYEVLSDAK-----KRDIYDRYG-----	69
DNAJB6	QVAEAYEVLSDAK-----KRDIYDKYG-----	68
DNAJC6	ELNDAWSEFENQG-----QKPLY-----	65
DNAJC26	ELNDAWSEFENQG-----SRPLF-----	65
DNAJC28	RIEKAYRKVLSHVIEQTNASQS-----	65
DNAJC29	HLQNEINRLEKQAFLDQNADRASRRTFSTASRFQSDKYS	88
DNAJC24	EIDQAWKILGNEE-----TKREYDLQR-----	72
DNAJC12	KLQKAKEILTNEE-----SRARYDHWR-----	66
DNAJC4	ELSEAYRVLSREQ-----SRRSYDDQL-----	66
DNAJC8	AVDKAYKLLLDQE-----QKKRALDVIQ-----	68
DNAJC30	RISQAYVVLGSAT-----LRRKYDRGL-----	66
DNAJC23	RIAKAYAALTDEE-----SRKNWEEFG-----	62
DNAJC27	AVVNARTALLKNI-----K-----	57
DNAJC14	VLRAAWDIVSNAE-----KRKEYEMKR-----	65
DNAJC17	QLSQALEVLTDA-----ARAYDKVR-----	66
DNAJC5	EINNAHAILTDAT-----KRNIYDKYGSL-----	70
DNAJC5B	EINNAHAILTDIS-----KRSIYDKYG-----	66
DNAJC21	LIQAAYDVLSDPQ-----ERAWYDNHR-----	67
DNAJC18	AIGNAFVLSNPD-----KRLRYDEYG-----	65
DNAJB12	AIGTAYAVLSNPE-----KRKQYDQFGDD-----	65
DNAJB14	KIGNAYAVLSNPE-----KRKQYDLTG-----	65
DNAJA2	EISFAYEVLNPE-----KRELYDRYG-----	63
DNAJA1	QISQAYEVLSDAK-----KRELYDKGG-----	63
DNAJA4	LISQAYEVLSDPK-----KRDVYDQGGEQ-----	67

图 1B

构建体 编号	构建体名称	SEQ ID NO:	J 结构域	TDP-43 结合结构域
1	仅JB1-结构域	81	DnaJB1	N/A
2	scFv (3B12A)	82	DnaJB1	scFv (3B12A)
3	JB1-scFv(3B12A)	83	DnaJB1	scFv (3B12A)
4	JB1(P33Q)-scFv(3B12A)	84	DnaJB1	scFv (3B12A)
5	scFv(3B12A)-JB1	85	DnaJB1	scFv (3B12A)
6	scFv(3B12A)-JB1-scFv(3B12A)	86	DnaJB1	scFv (3B12A)
7	JB6-scFv(3B12A)	87	DnaJB6	scFv (3B12A)
8	JC6-scFv(3B12A)	88	DnaJC6	scFv (3B12A)
9	DnaJB1	89	DnaJB1	N/A
10	Hsc70 (伴侣蛋白)	90	N/A	N/A
11	Hsp110 (NEF)	91	N/A	N/A
12	JB1-scFv(51C1)	92	DnaJB1	scFv(51C1)
13	JB1-scFv(3F10)	93	DnaJB1	scFv(3F10)
14	JB1-2XQBP1	94	DnaJB1	QBP1 (2 个拷贝)
15	JC7-scFv(3B12A)	95	DnaJC7	scFv (3B12A)
16	JB13-scFv(3B12A)	96	DnaJB1 3	scFv (3B12A)
17	JB1-scFv(3B12A) (1)	97	DnaJB1	scFv (3B12A)
18	JB1-scFv(3B12A) (2)	98	DnaJB1	scFv (3B12A)
19	JB1-scFv(3B12A) (3)	99	DnaJB1	scFv (3B12A)
20	JB1-scFv(3B12A)-DD	100	DnaJB1	scFv (3B12A)

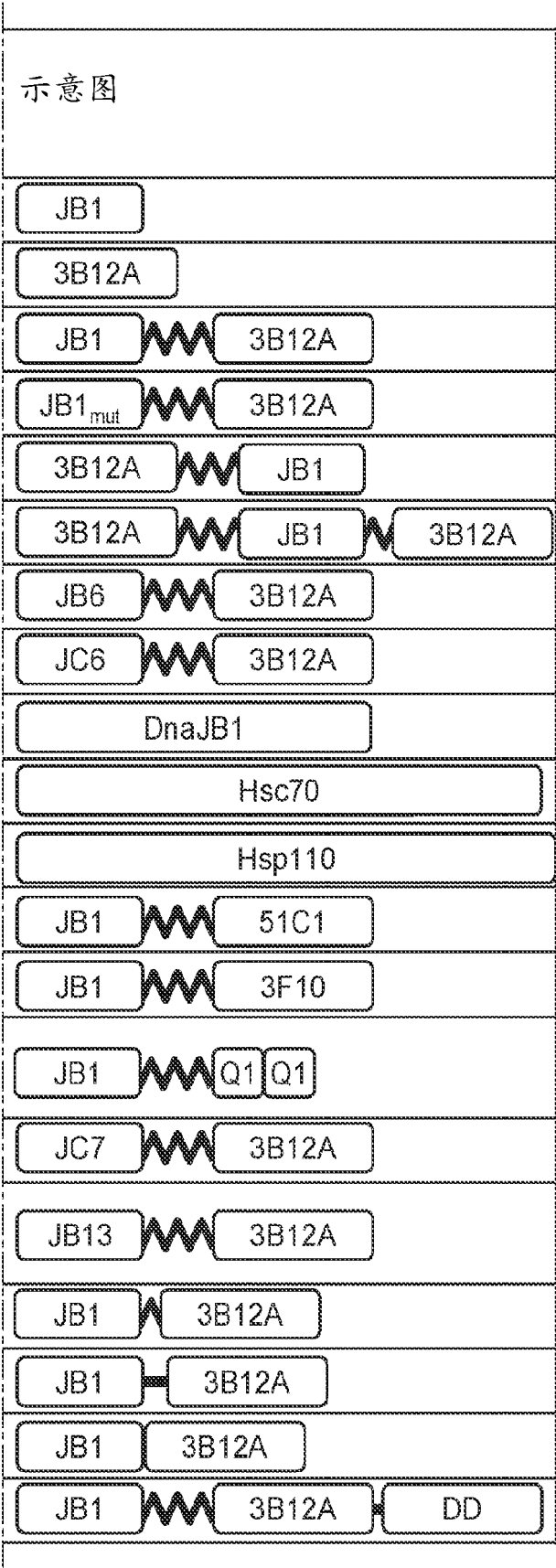


图 2

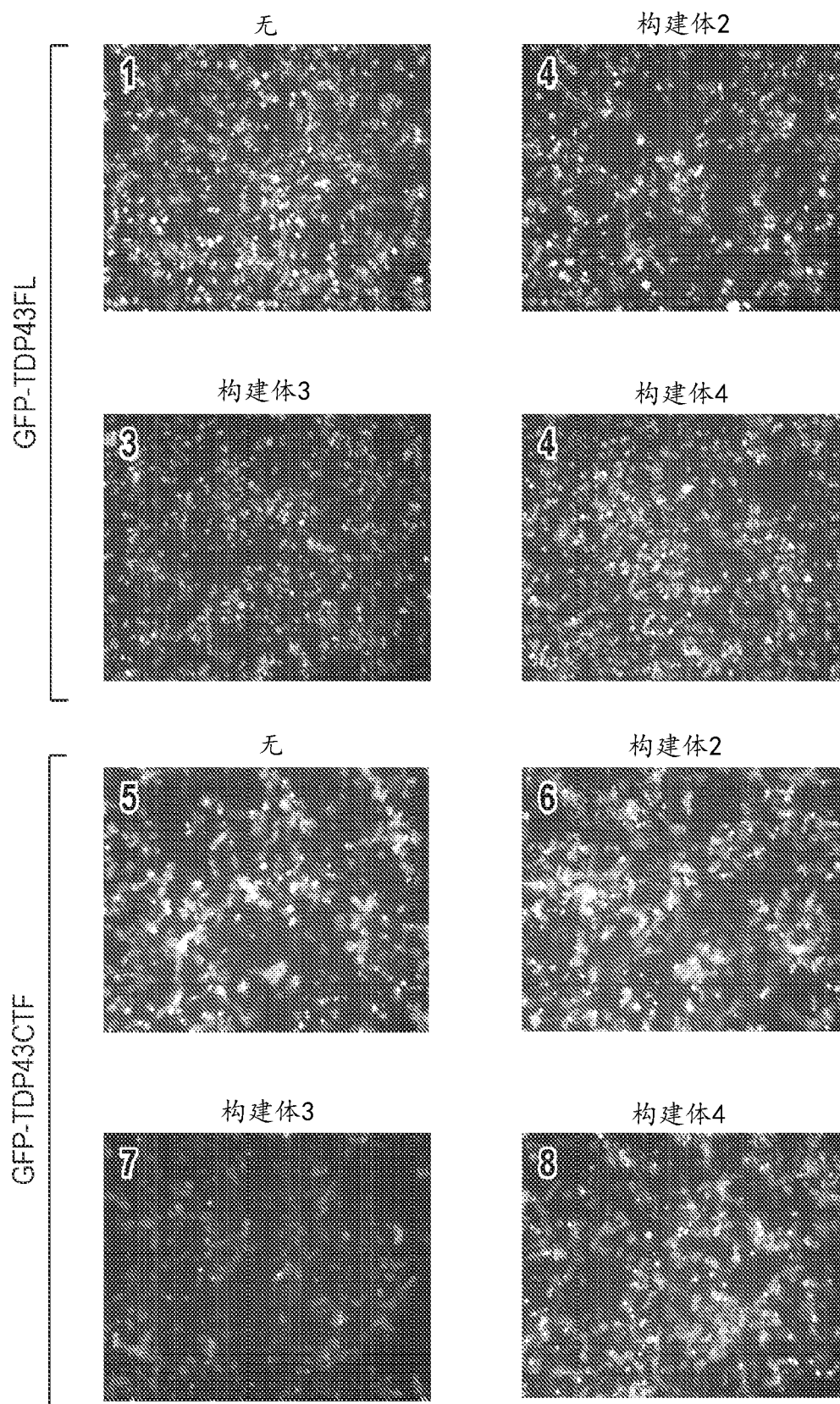


图 3

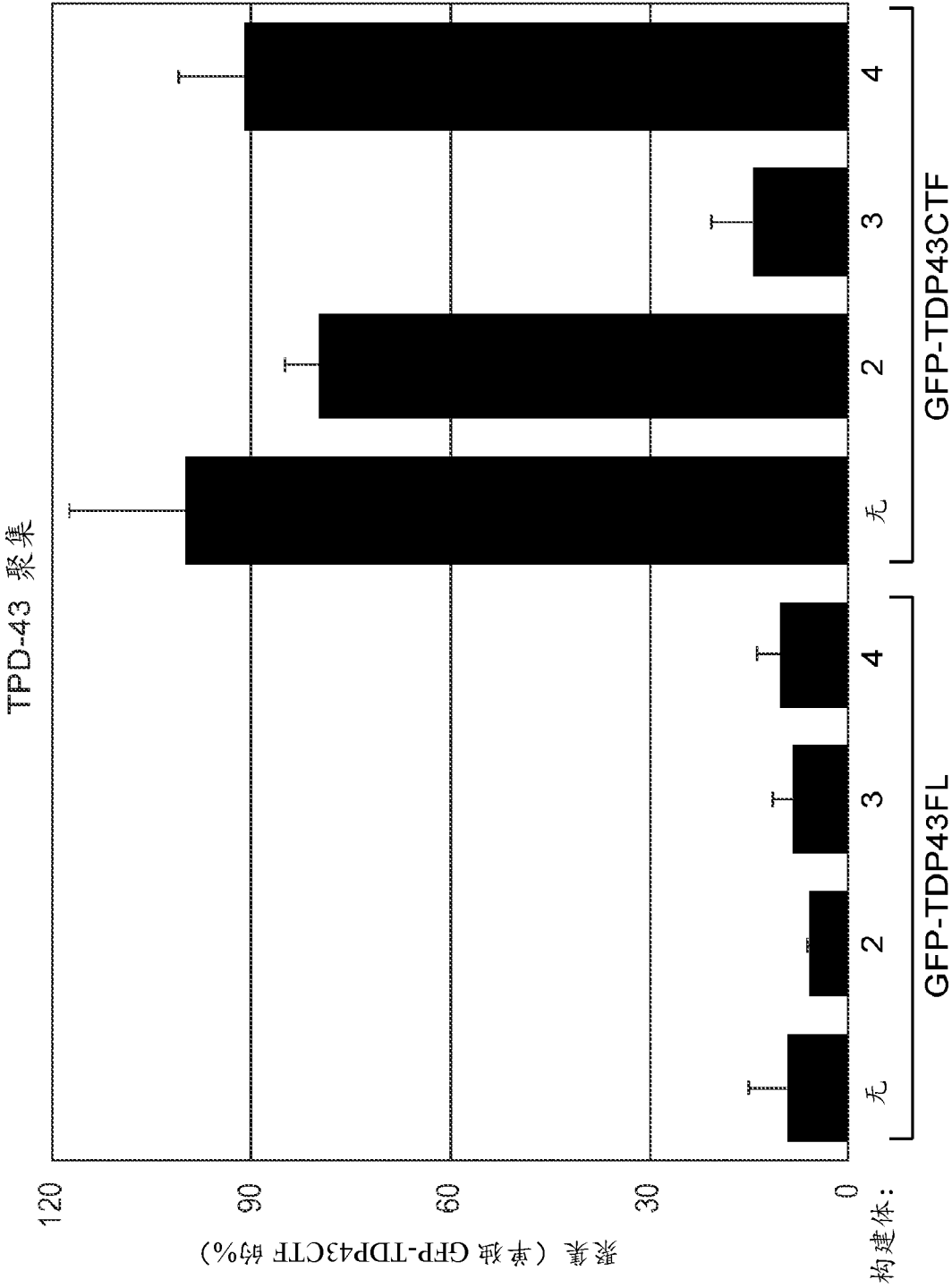


图 4

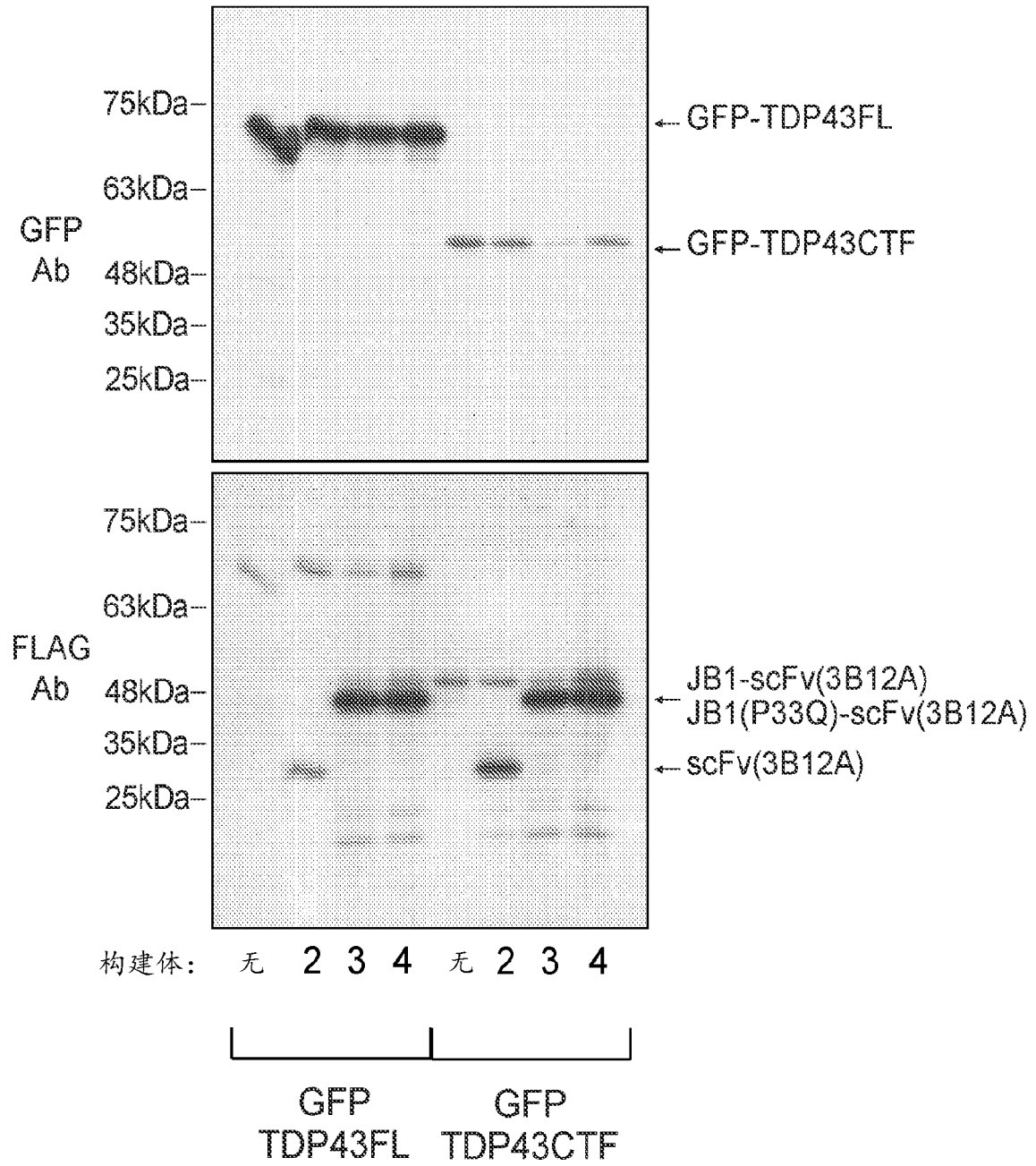


图 5

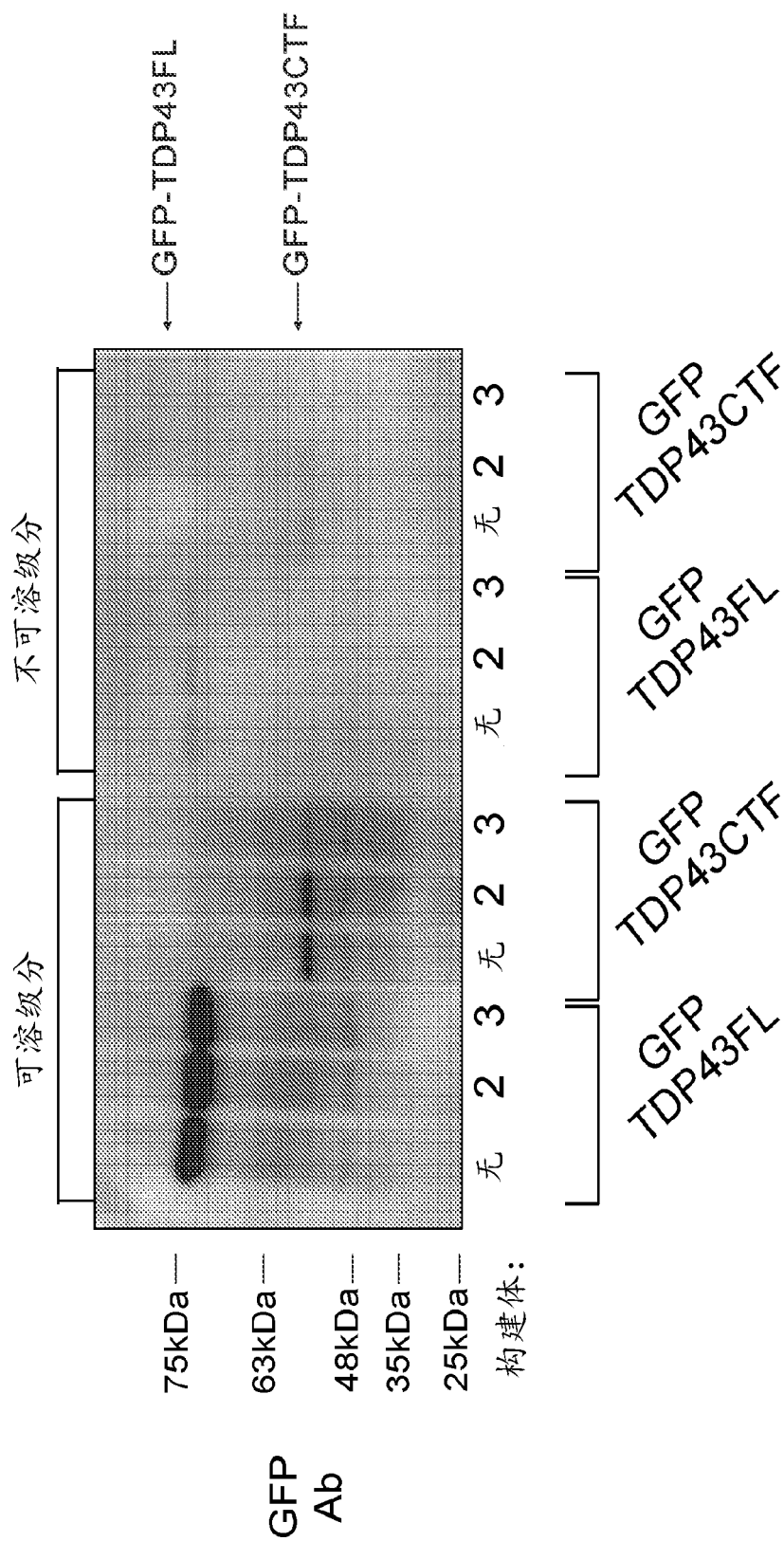


图 6

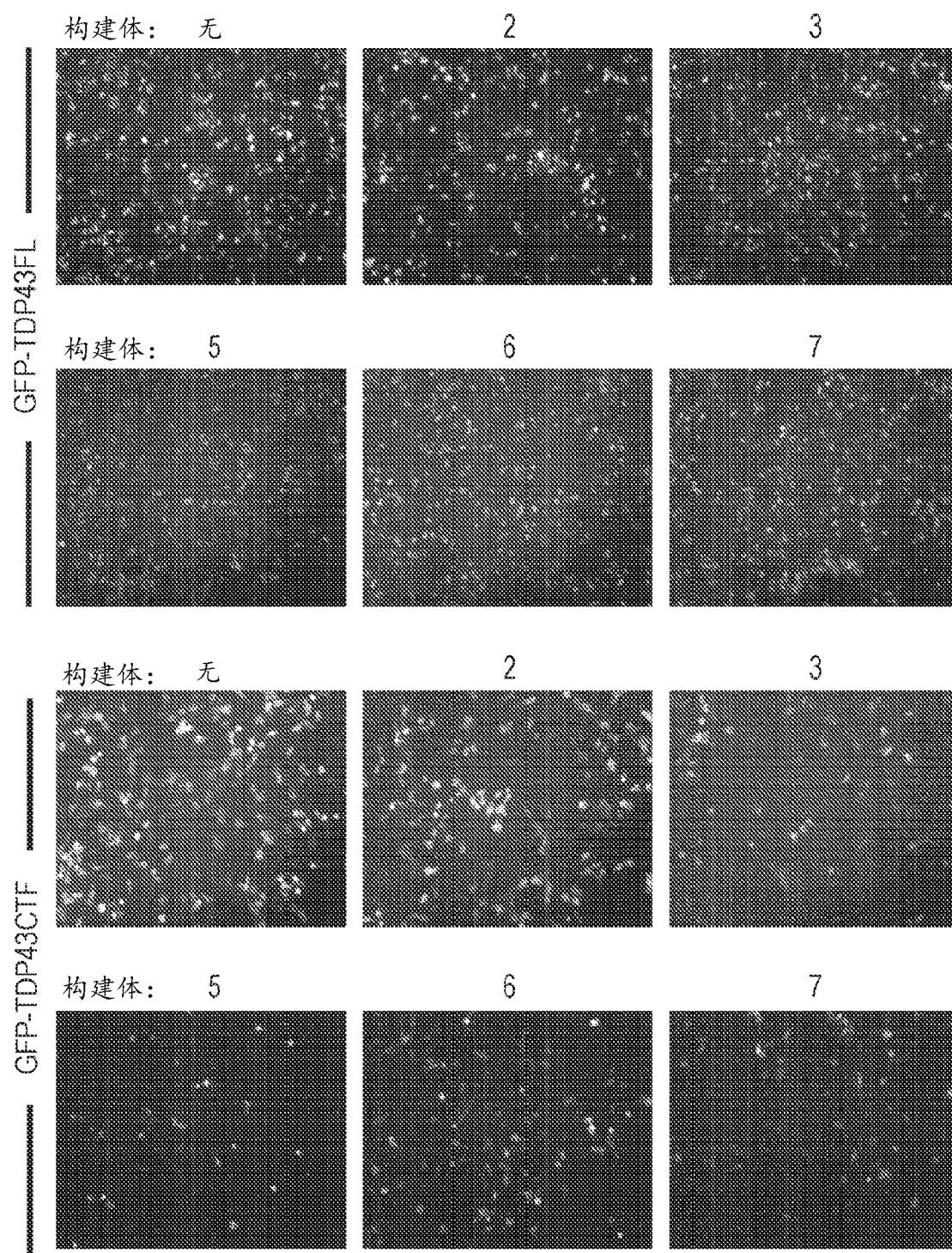


图 7

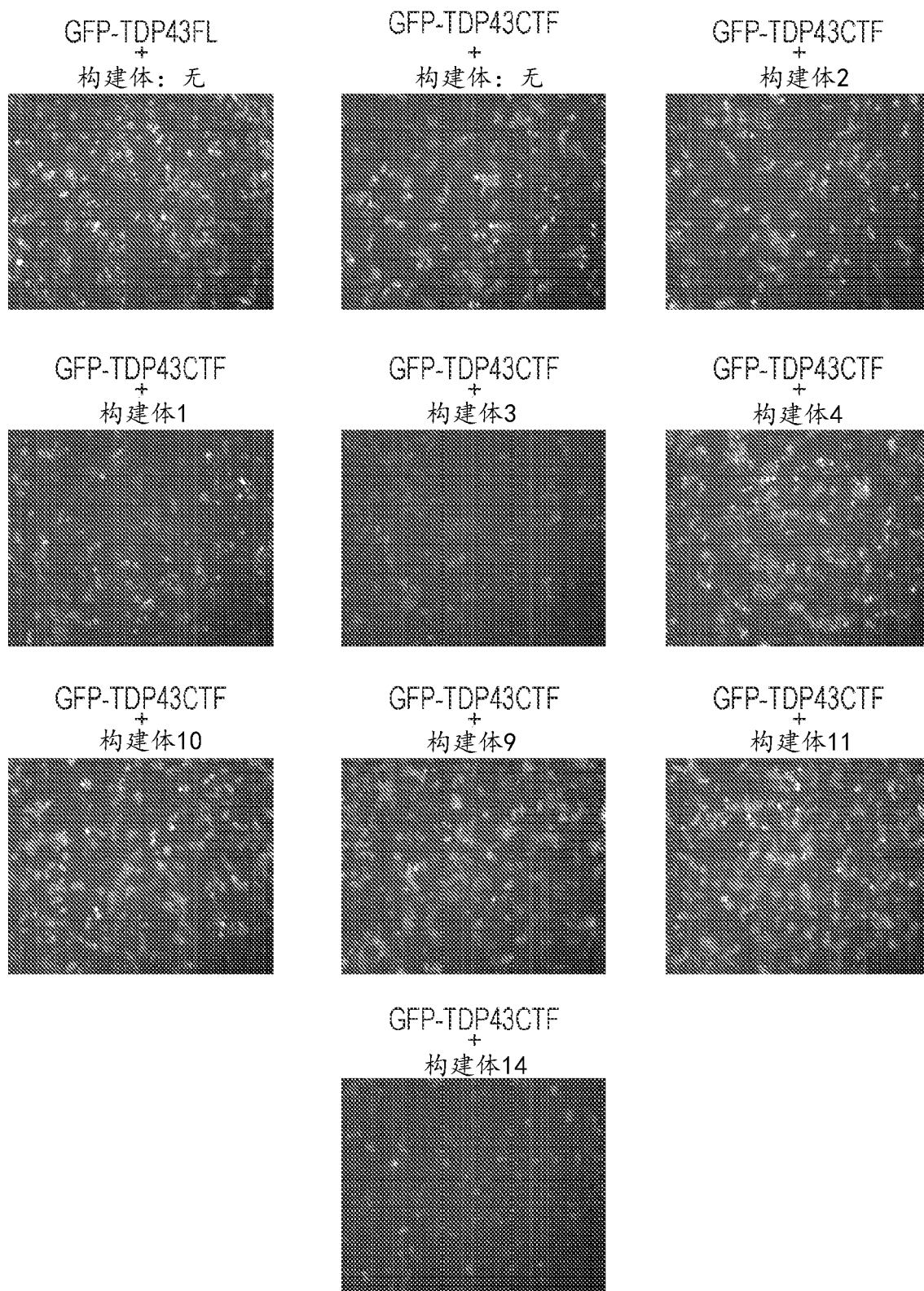


图 8

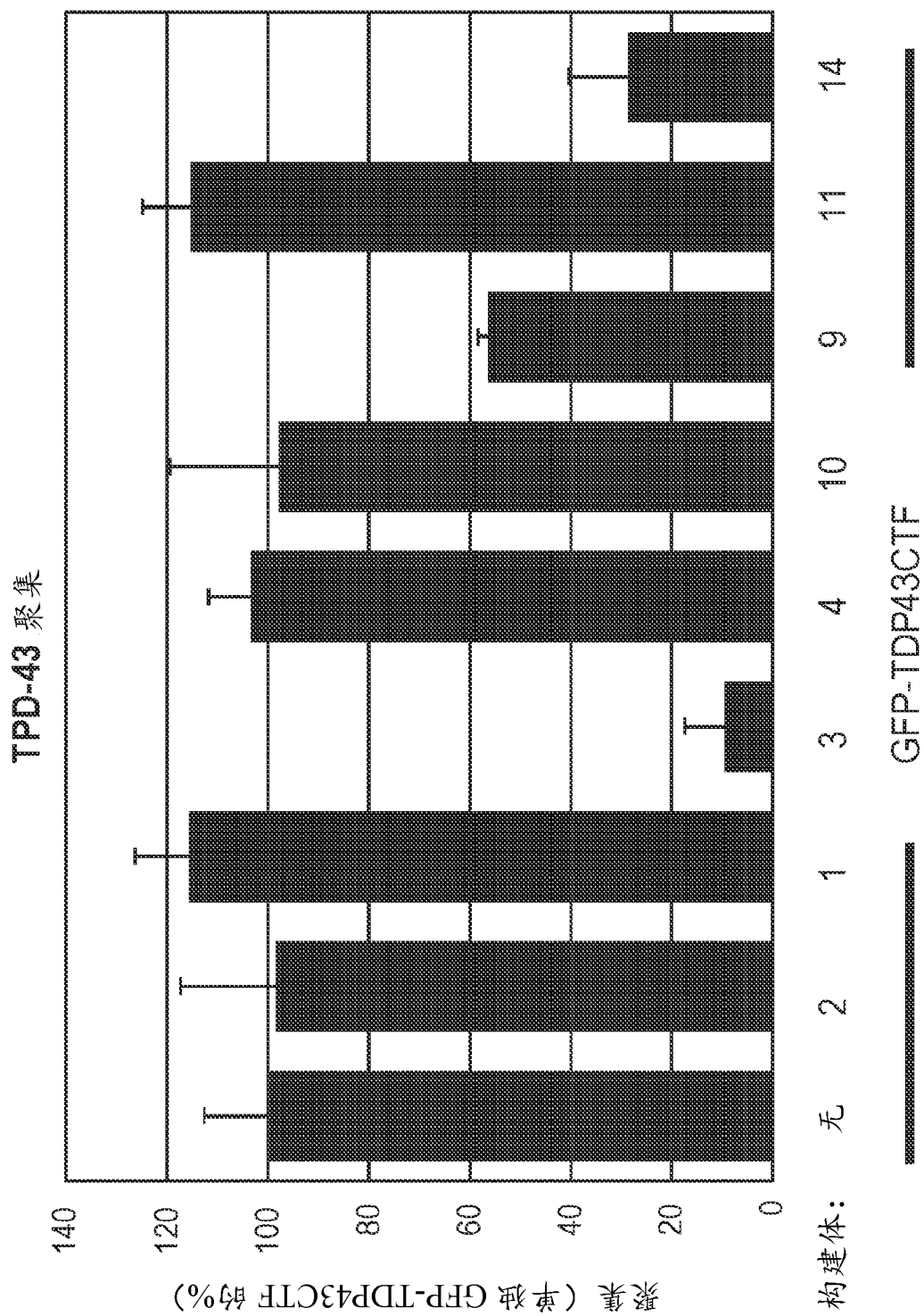


图 9A

免疫印迹测定 (抗-GFP抗体)

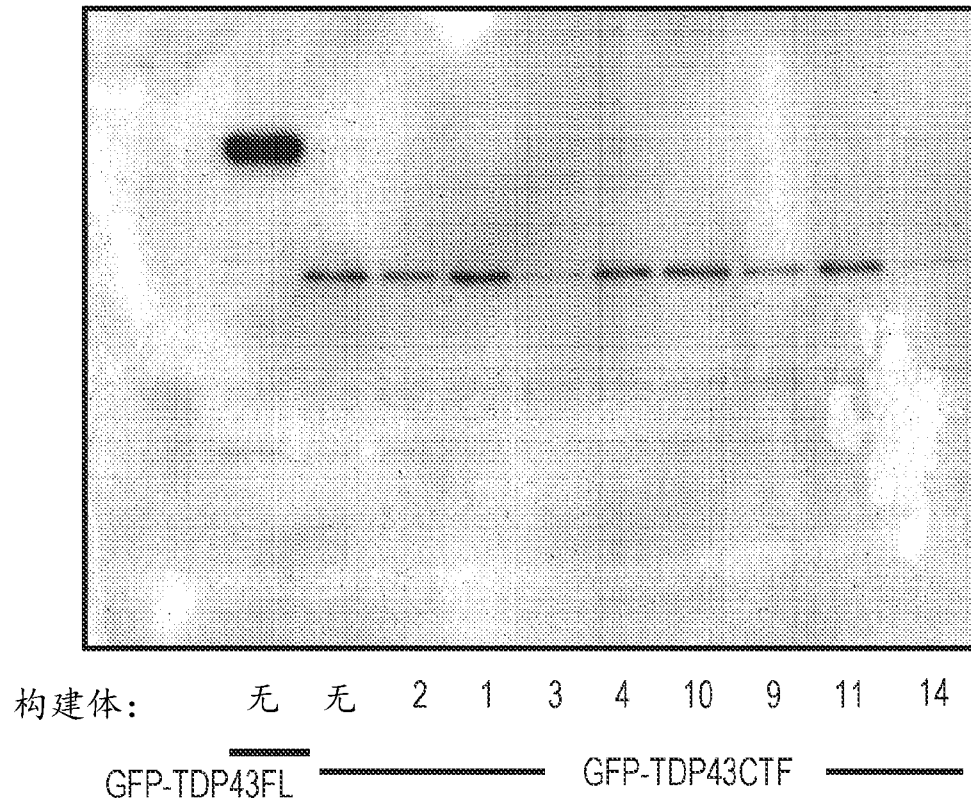
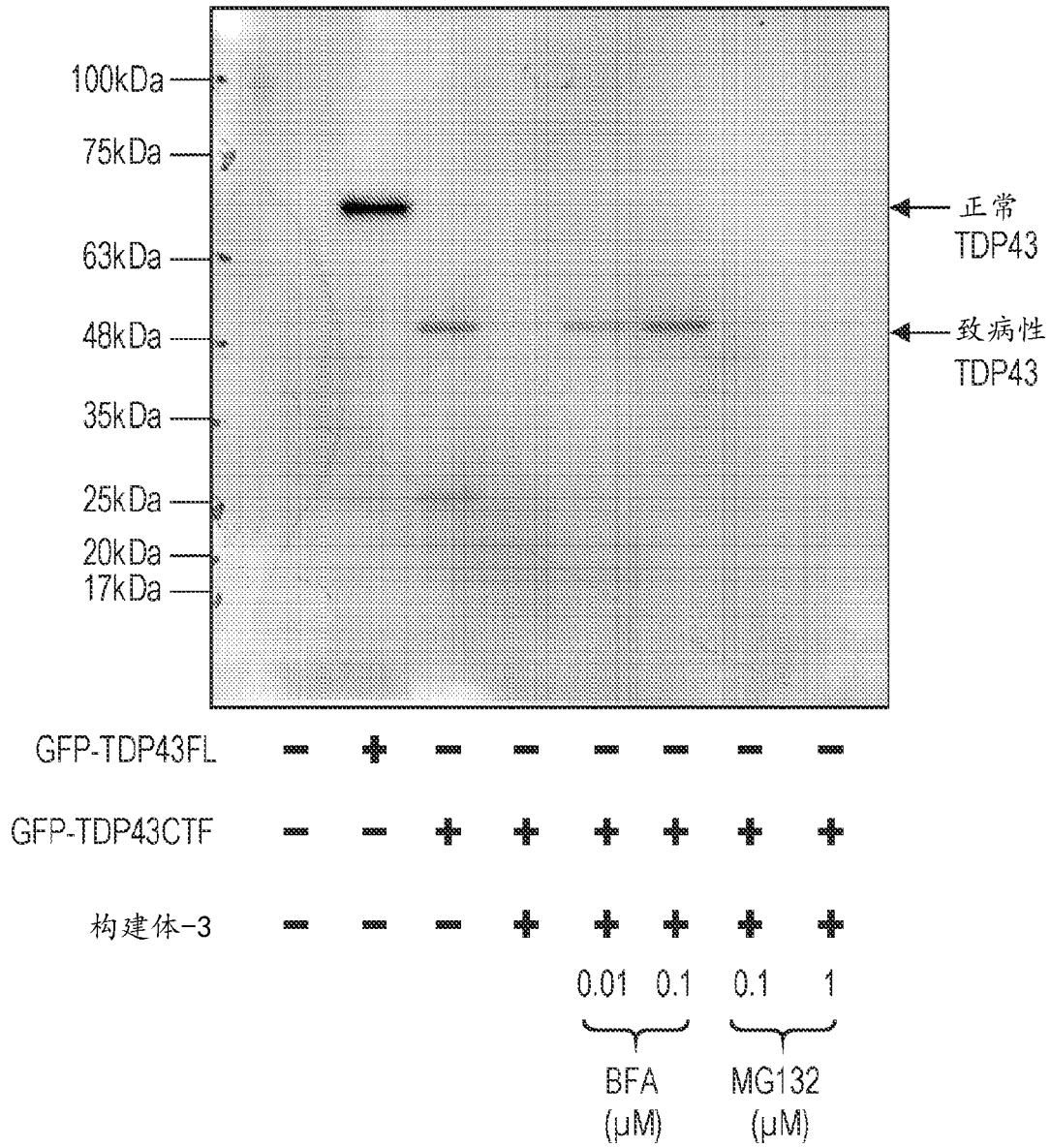


图 9B

免疫印迹测定



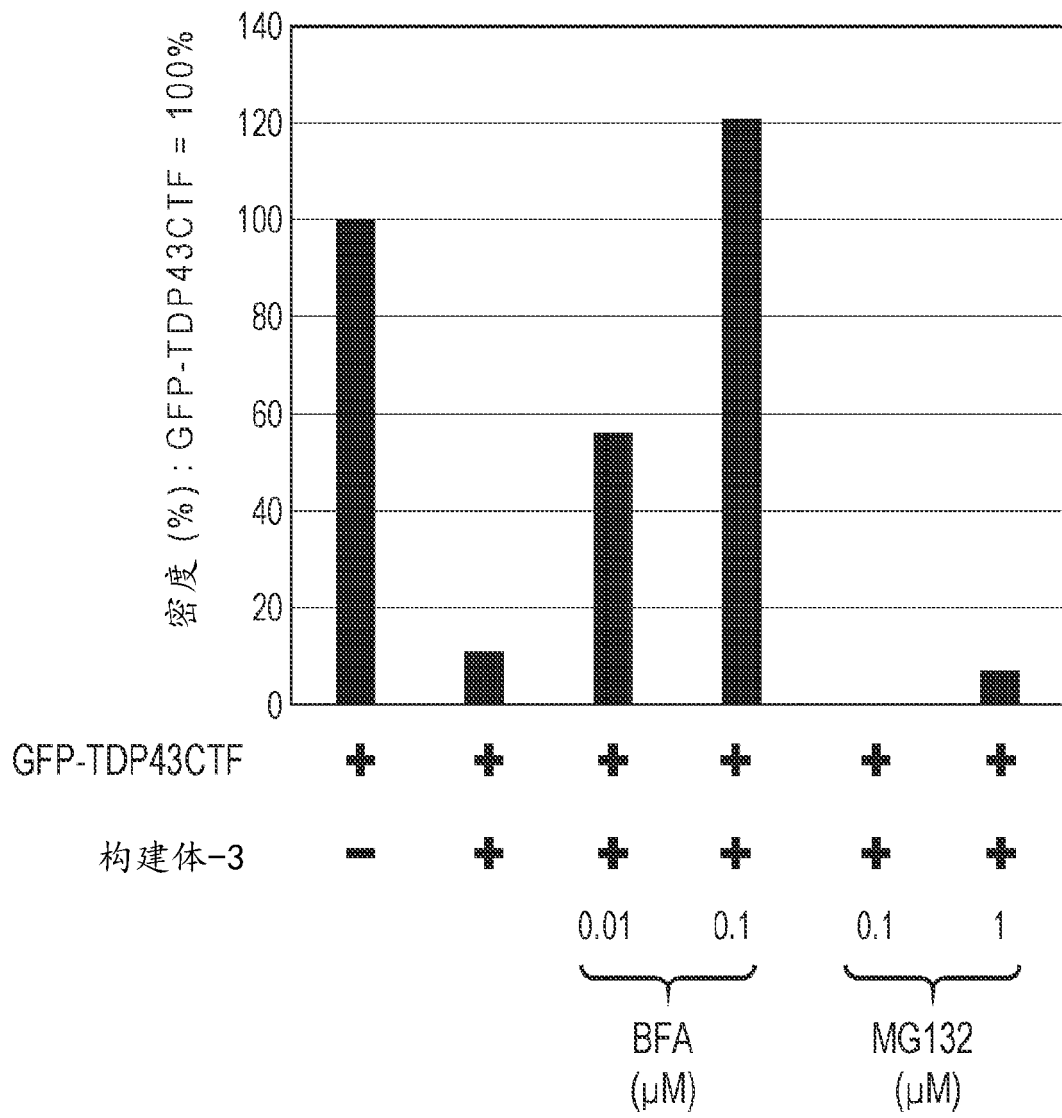


图 10

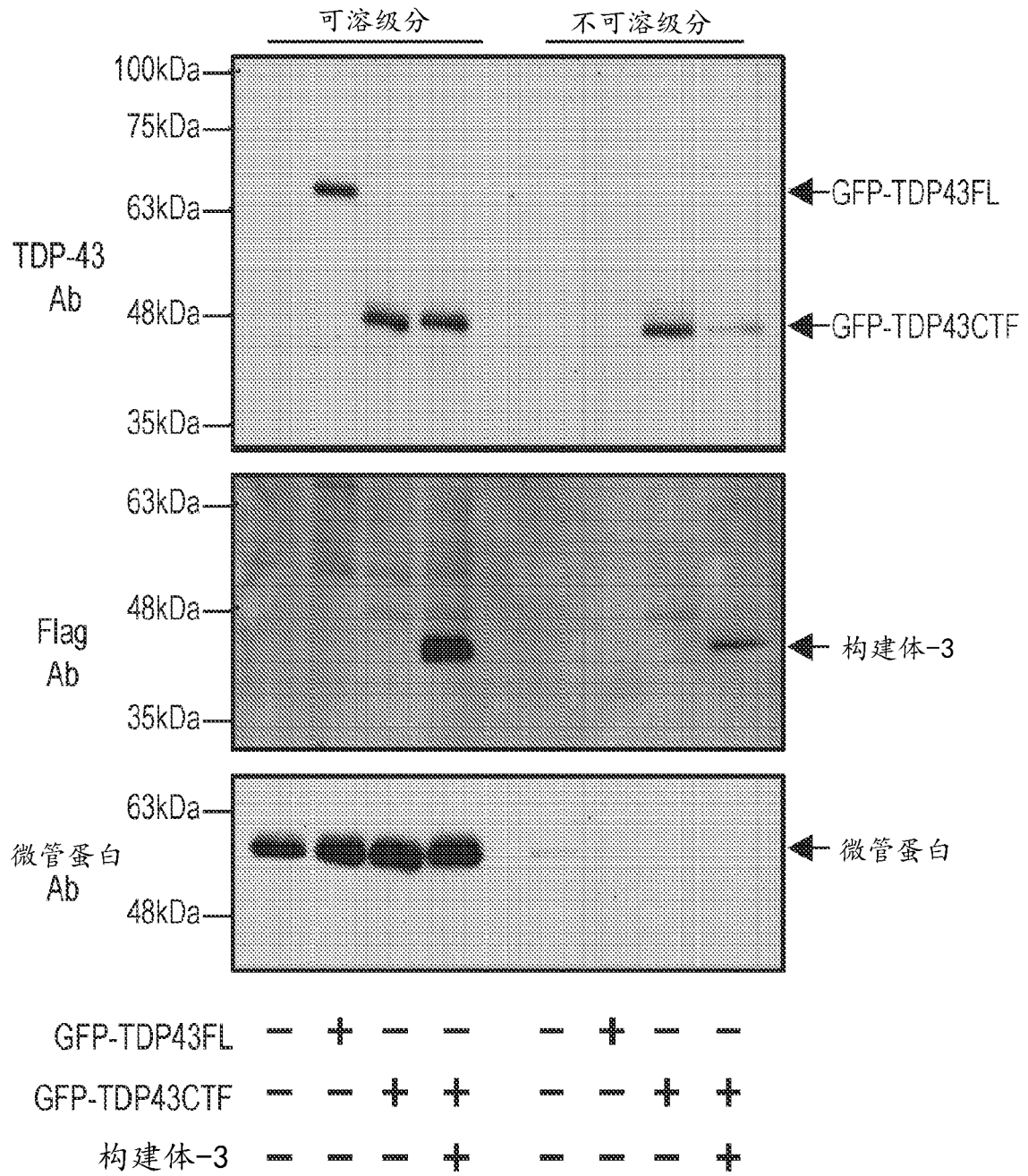


图 11A

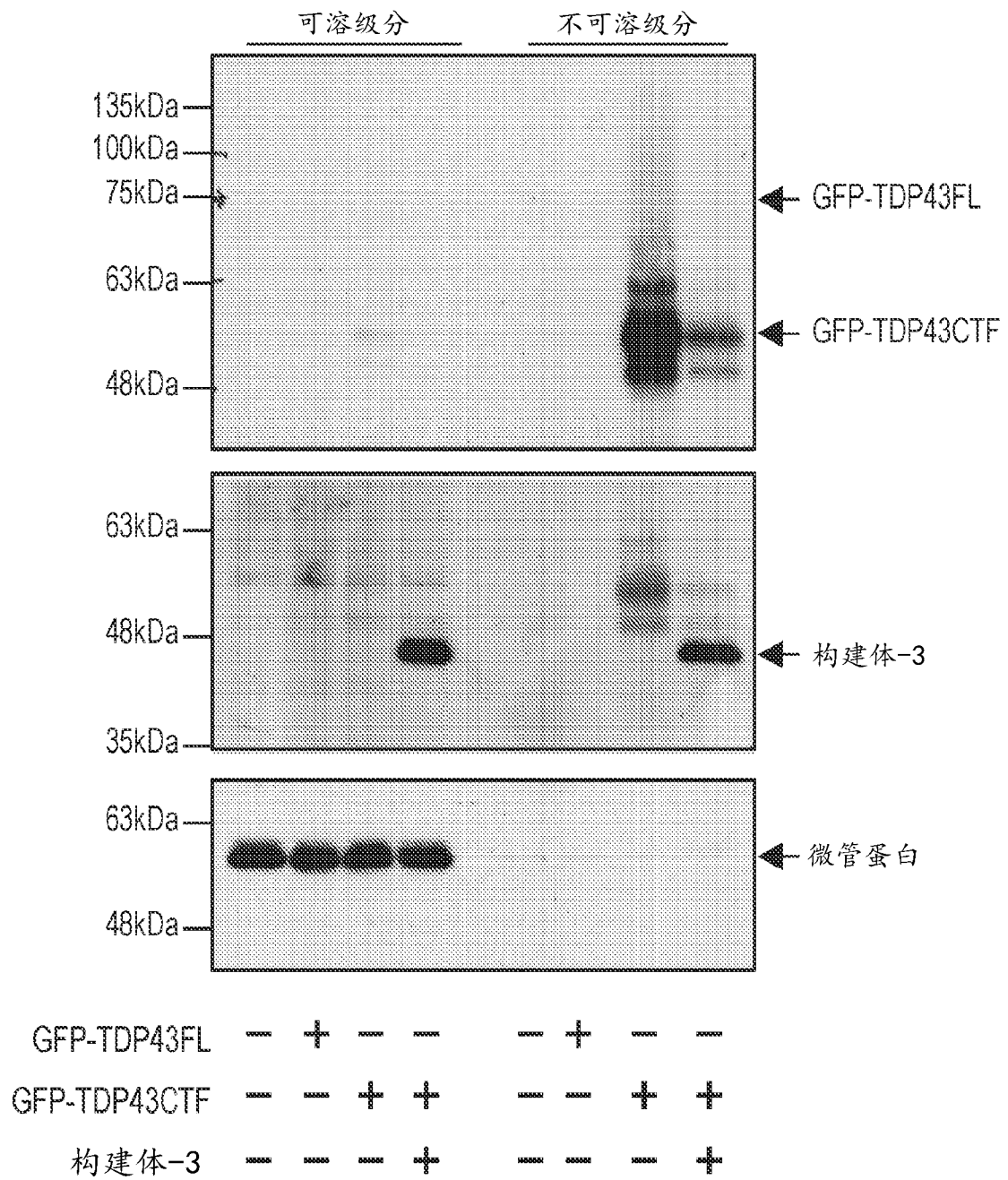


图 11B

免疫印迹测定 (抗-pTDP43抗体)

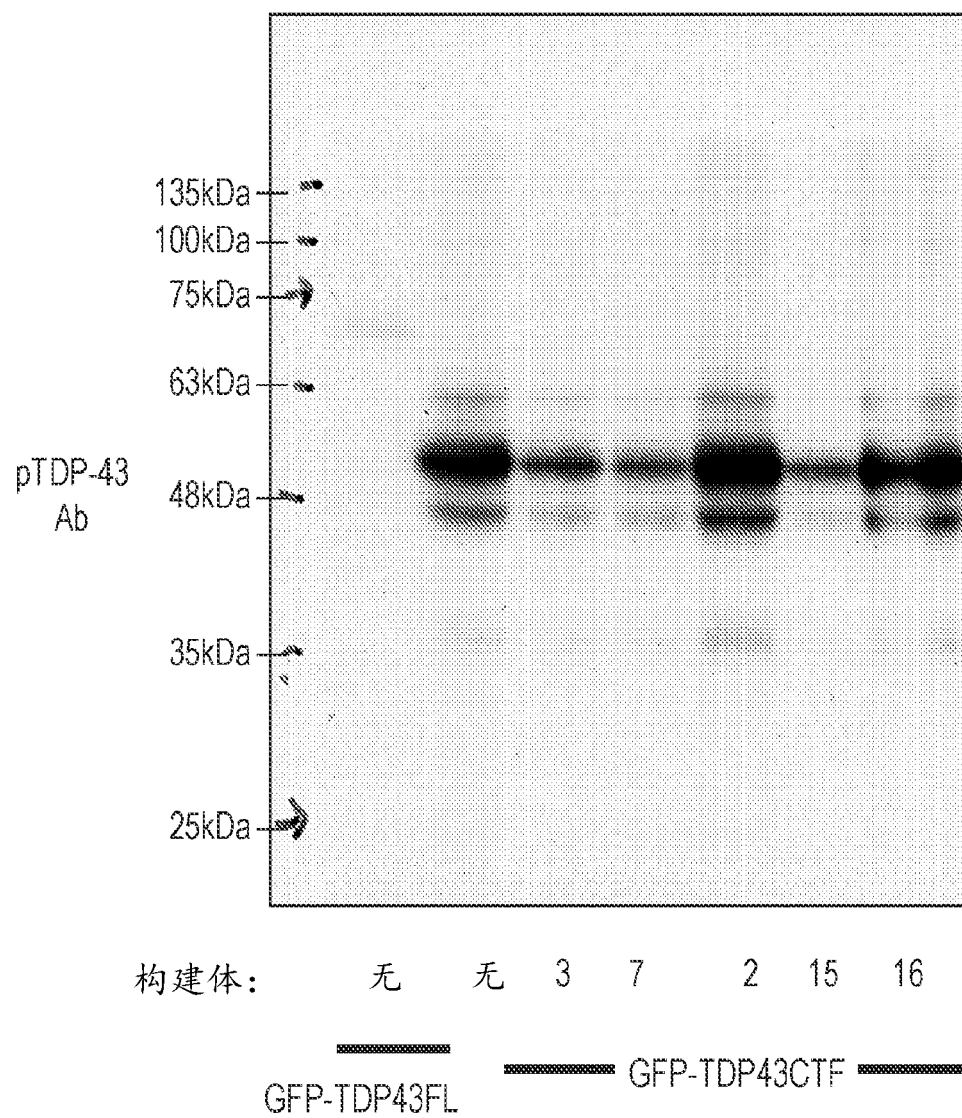


图 12

免疫印迹测定

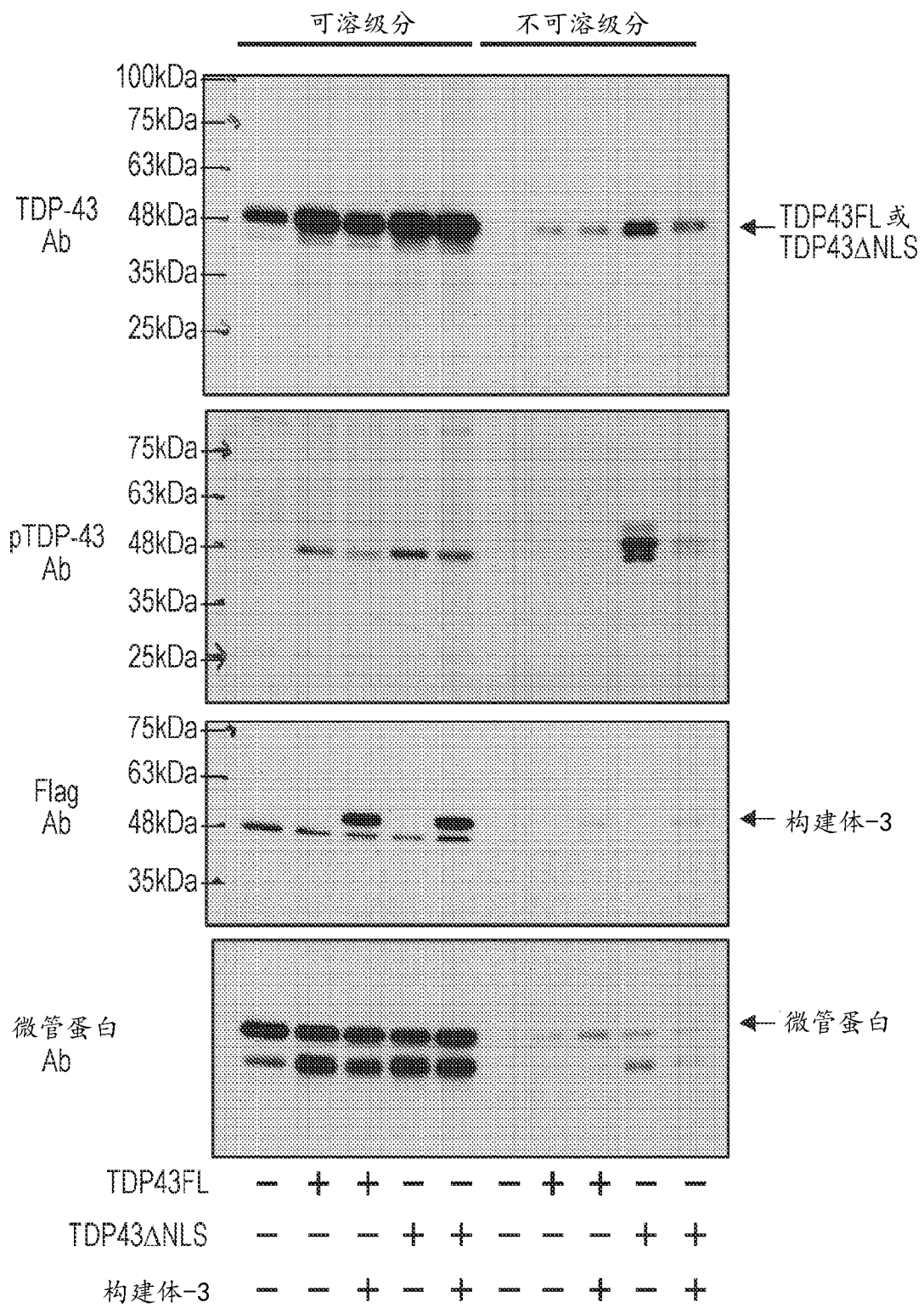


图 13

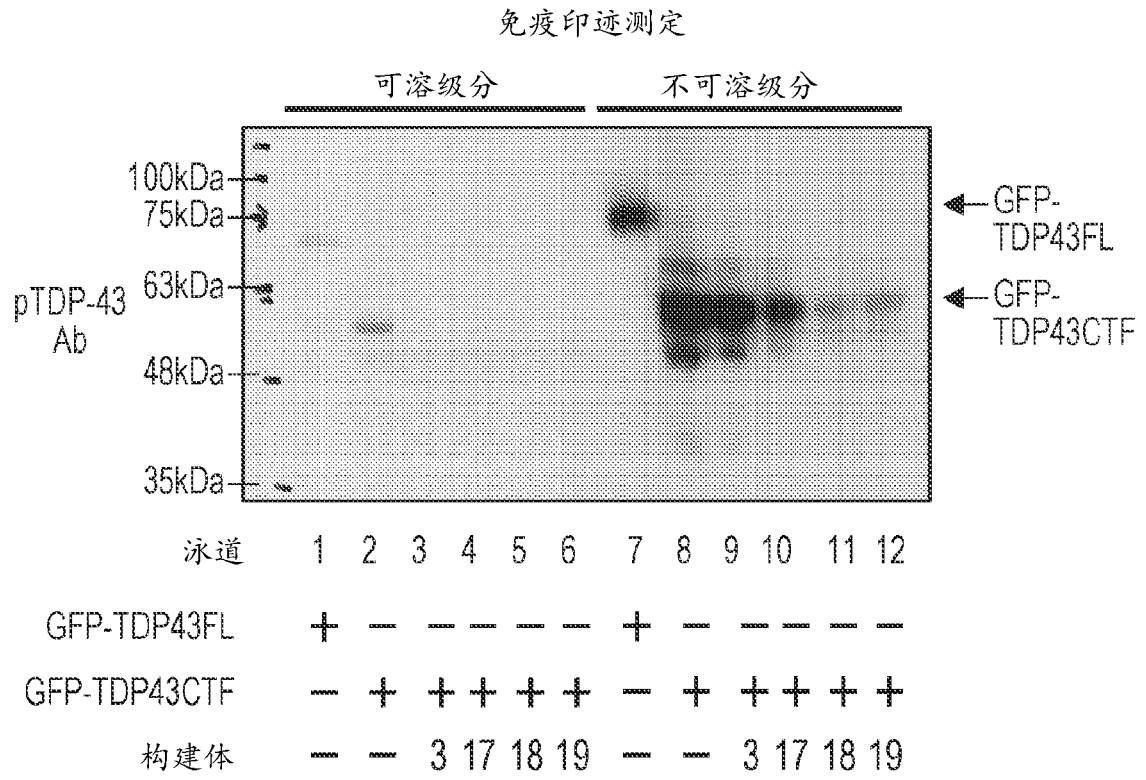


图 14

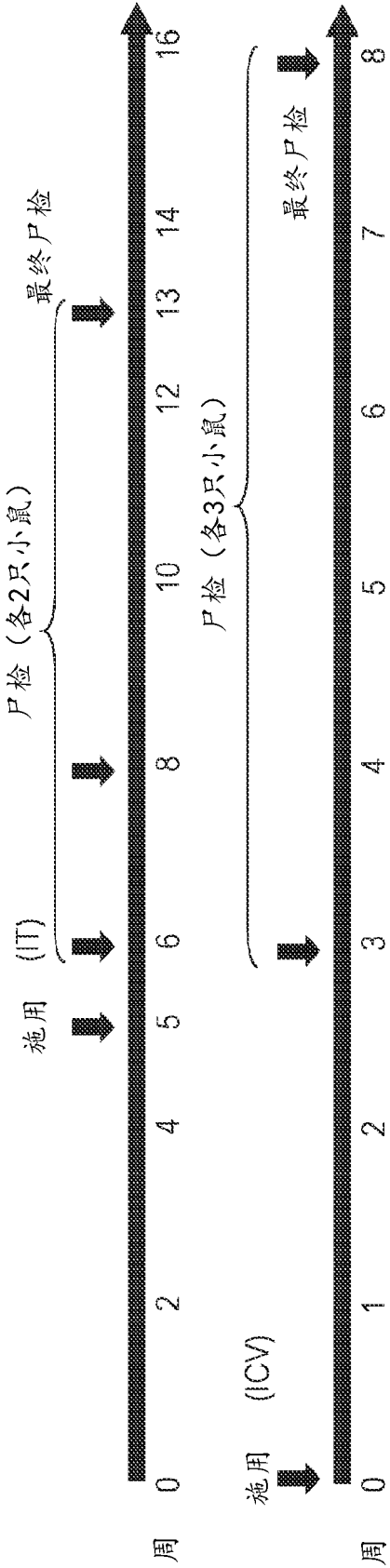


图 15A

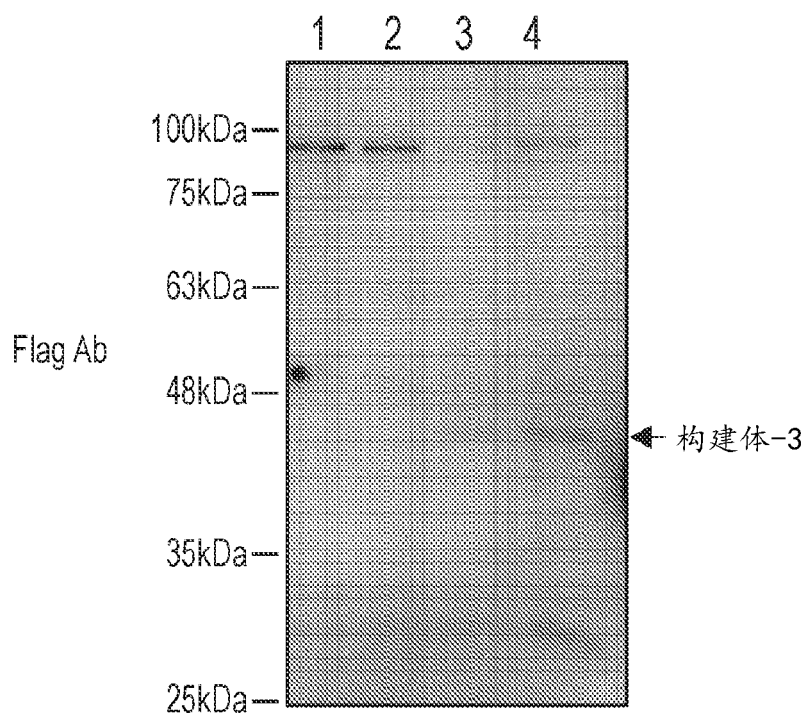


图 15B

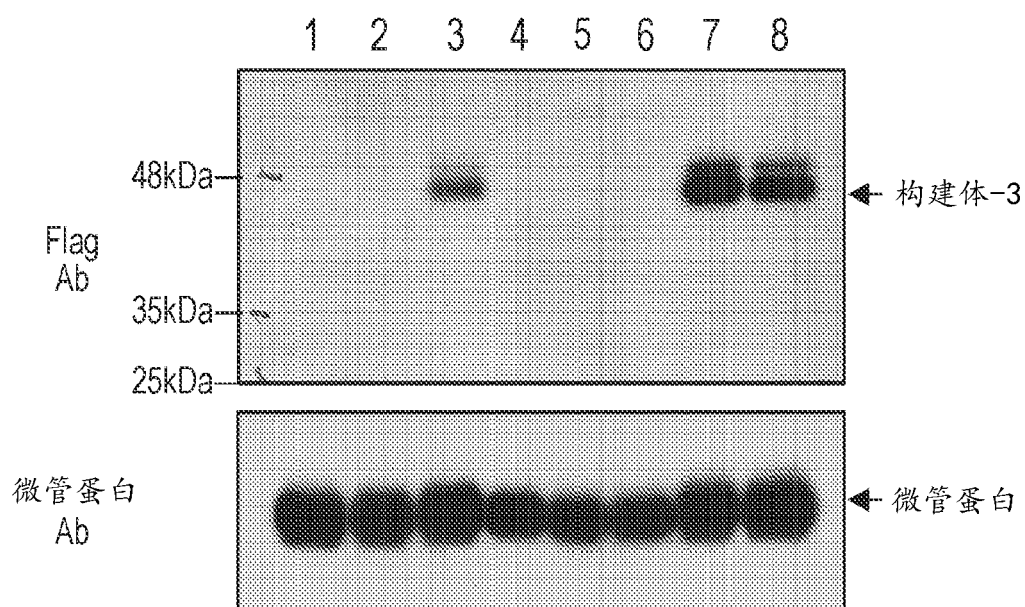


图 15C

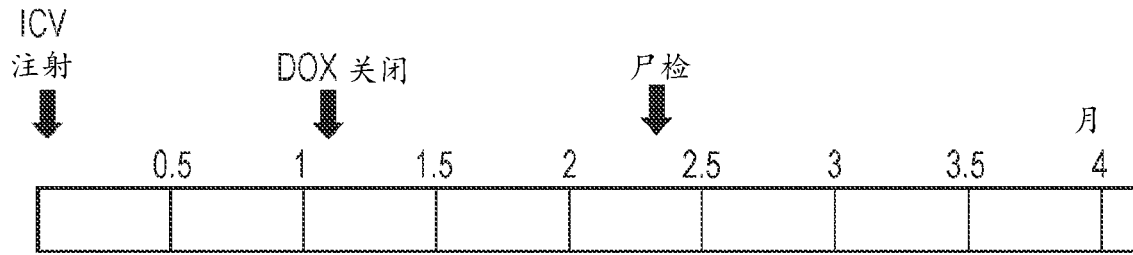


图 16A

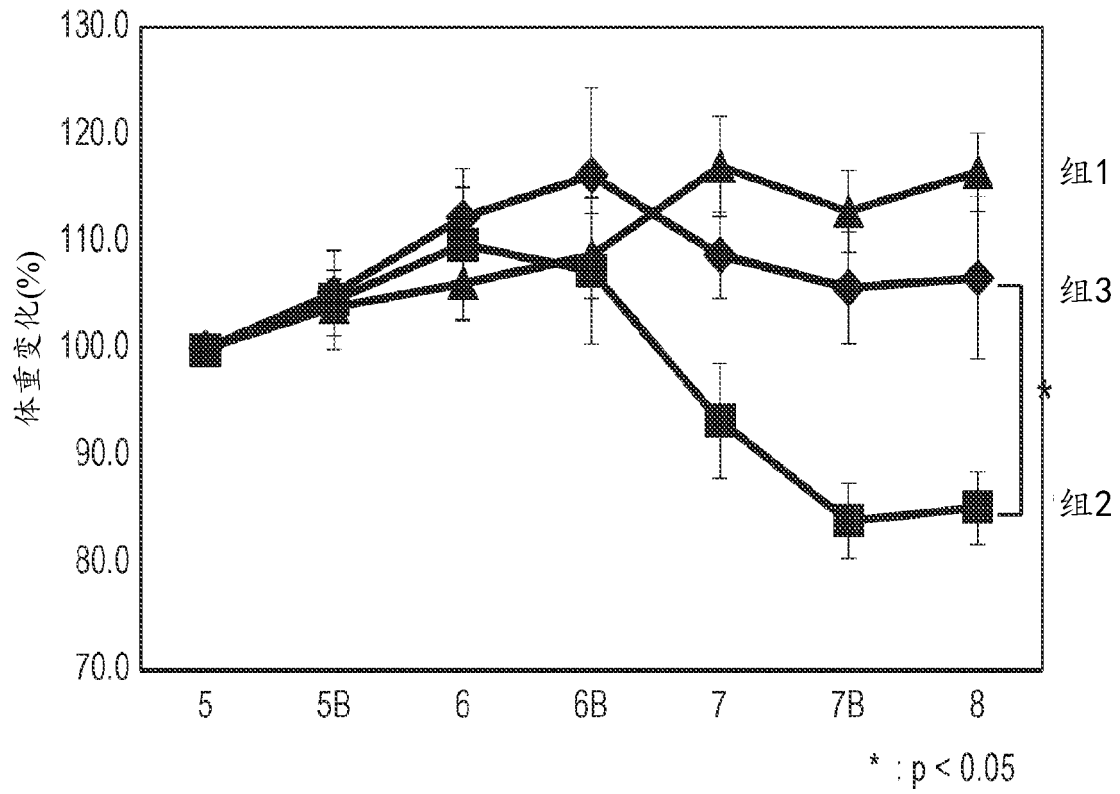


图 16B

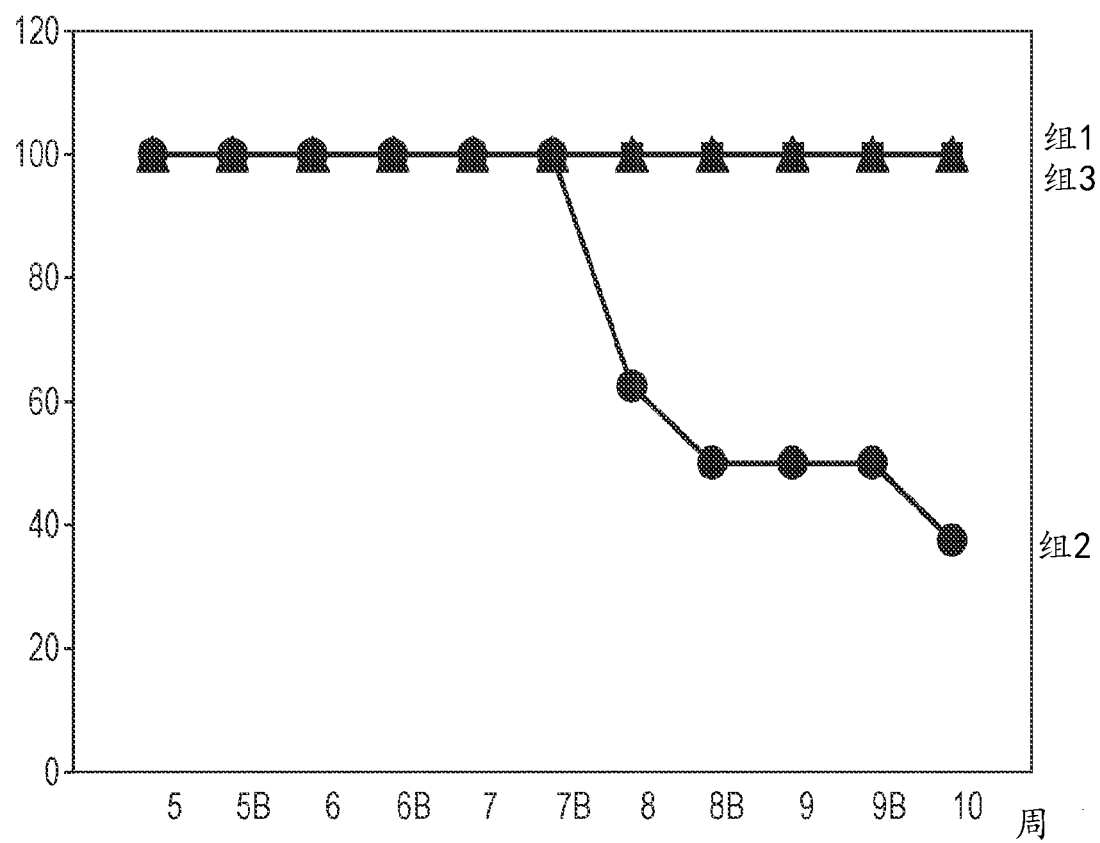


图 16C