



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109963590 B

(45) 授权公告日 2024. 03. 15

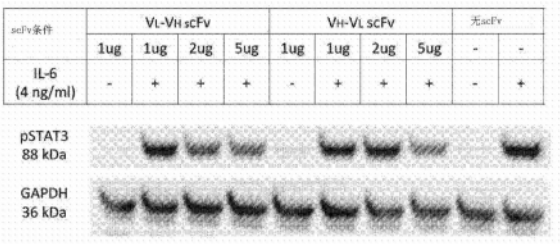
(21) 申请号 201780067444.9	(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
(22) 申请日 2017.09.01	专利代理师 郑斌 蔡胜有
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 109963590 A	(51) Int.Cl.
(43) 申请公布日 2019.07.02	A61K 39/395 (2006.01)
(30) 优先权数据	A61K 51/10 (2006.01)
62/383,237 2016.09.02 US	C07K 16/28 (2006.01)
62/440,991 2016.12.30 US	C07K 14/705 (2006.01)
62/443,509 2017.01.06 US	(56) 对比文件
(85) PCT国际申请进入国家阶段日	WO 2006046661 A1,2006.05.04
2019.04.29	WO 9412520 A1,1994.06.09
(86) PCT国际申请的申请数据	WO 2011140170 A1,2011.11.10
PCT/IB2017/055281 2017.09.01	MAUDE等.Managing Cytokine Release
(87) PCT国际申请的公布数据	Syndrome Associated With Novel T Cell-
W02018/042385 EN 2018.03.08	Engaging Therapies.《Cancer J.》.2014,第20
(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会	卷(第2期),
地址 美国加利福尼亚州	审查员 邢维玲
(72) 发明人 伊冯娜·于-轩·陈 林梦茵	权利要求书2页 说明书42页
	序列表41页 附图8页

(54) 发明名称

涉及白介素-6受体 α 结合单链可变片段的方法和组合物

(57) 摘要

公开了包含分离的嵌合白介素6受体 α (IL-6R α) 结合蛋白或表达分离的嵌合IL-6R α 结合蛋白之细胞的组合物。所分离的IL-6R α 嵌合结合蛋白和表达所述蛋白质的细胞可用于治疗癌症和降低细胞因子释放综合征风险的方法。



1. 包含含有异源核酸的T细胞的组合物在制备用于降低细胞因子释放综合征风险的药物中的用途,所述降低包括向处于细胞因子释放综合征风险的患者施用所述组合物,所述异源核酸编码嵌合抗白介素6受体 α IL-6R α 单链可变片段scFv,其中所述IL-6R α scFv包含通过异源接头与轻链可变区连接的重链可变区,所述轻链可变区包含如SEQ ID NO: 8所示的CDR4、如SEQ ID NO: 9所示的CDR5和如SEQ ID NO: 10所示的CDR6,并且所述重链可变区包含如SEQ ID NO: 5所示的CDR1、如SEQ ID NO: 6所示的CDR2和如SEQ ID NO: 7所示的CDR3。

2. 权利要求1所述的用途,其中所述重链可变区位于所述轻链可变区的N端侧。

3. 权利要求1所述的用途,其中所述轻链可变区位于所述重链可变区的N端侧。

4. 权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述接头包含如SEQ ID NO: 11所示的氨基酸序列GSTSGSGKPGSGEGSTKG。

5. 权利要求1至3中任一项所述的用途,所述T细胞还包含前导肽。

6. 权利要求1至3中任一项所述的用途,所述T细胞还包含分离标签。

7. 包含异源核酸的T细胞在制备用于降低细胞因子释放综合征风险的药物中的用途,所述降低包括向处于细胞因子释放综合征风险的患者施用所述药物,所述异源核酸编码嵌合抗IL-6R α scFv,其包含前导肽、通过异源接头与轻链可变区连接的重链可变区,所述轻链可变区包含如SEQ ID NO: 8所示的CDR4、如SEQ ID NO: 9所示的CDR5和如SEQ ID NO: 10所示的CDR6,所述重链可变区包含如SEQ ID NO: 5所示的CDR1、如SEQ ID NO: 6所示的CDR2和如SEQ ID NO: 7所示的CDR3,其中所述异源接头包含如SEQ ID NO: 11所示的氨基酸序列GSTSGSGKPGSGEGSTKG。

8. 权利要求1至3和7中任一项所述的用途,其中所述核酸还包含控制所述嵌合IL-6R scFv表达的启动子。

9. 权利要求8所述的用途,其中所述启动子是组成型的。

10. 权利要求8所述的用途,其中所述启动子正响应于至少一种细胞因子或T细胞活化。

11. 权利要求10所述的用途,其中所述至少一种细胞因子是IL-6、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-8或IL-10或正响应于NFAT-1或NF- κ B的启动子。

12. 权利要求1至3和7中任一项所述的用途,其中所述异源核酸是表达构建体。

13. 权利要求12所述的用途,其中所述表达构建体是病毒载体。

14. 权利要求12所述的用途,其中所述表达构建体是质粒。

15. 权利要求1至3和7中任一项所述的用途,其中所述T细胞还包含编码嵌合抗原受体CAR的异源核酸。

16. 权利要求1至3和7中任一项所述的用途,其中编码嵌合白介素6受体 α IL-6R α scFv的异源核酸在所述T细胞中表达。

17. 权利要求15所述的用途,其中编码所述CAR的异源核酸在所述T细胞中表达。

18. 权利要求1所述的用途,其中所述患者患有癌症。

19. 权利要求1或18所述的用途,其中所述患者已经或将要接受过继性T细胞治疗。

20. 权利要求19所述的用途,其中所述患者已经或将要接受淋巴细胞清除。

21. 权利要求1所述的用途,其中所述患者患有自身免疫疾病。

22. 权利要求1至3和7中任一项所述的用途,其中所述T细胞是自体的。

23. 权利要求1至3和7中任一项所述的用途,其中所述患者是这样的患者,其还被施用或正接受抗组胺、皮质类固醇、类固醇、醋氨酚、呋塞米和/或静脉内流体。

24. 权利要求1至3和7中任一项所述的用途,其中所述患者患有细胞因子释放综合征的一种或更多种症状。

涉及白介素-6受体 α 结合单链可变片段的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉应用

[0002] 本申请要求于2016年9月2日提交的美国临时专利申请No.62/383,237、2016年12月30日提交的美国临时专利申请No.62/440,991和2017年1月6日提交的美国临时专利申请No.62/443,509的权益。这些申请的全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 使用与T细胞相互作用的抗体以利用新的有效治疗来治疗多种疾病和病症(包括癌症、微生物感染和自身免疫疾病)的前景持续发展。然而,存在可导致的副作用和毒性,包括细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)。CRS可使患者经历类似于高烧发作的低血压、发热和寒战(rigor)(随着温度升高,伴随着颤抖突然感觉寒冷)。需要预防或减轻使用T细胞的治疗的副作用和毒性的治疗。

发明内容

[0004] 以涉及分离的和经改造的嵌合白介素6受体 α (chimeric interleukin 6receptor alpha, IL-6R α)结合蛋白的方法、组合物、医疗装置和药盒(kit)的形式提供一些实施方案。

[0005] 组合物、医疗装置和药盒包含治疗组合物或具有至少一种治疗组合物的药盒,所述医疗组合物包含以下的一种或更多种:分离的嵌合白介素6受体 α (IL-6R α)结合蛋白、编码嵌合IL-6R α 结合蛋白的核酸、一种或更多种表达嵌合IL-6R α 结合蛋白的细胞、或一种或更多种具有编码嵌合IL-6R α 结合蛋白的核酸的细胞。

[0006] 在一些实施方案中,存在嵌合白介素6受体 α (IL-6R α)结合蛋白,其包含通过异源接头与包含CDR4(SEQ ID NO:8)、CDR5(SEQ ID NO:9)和CDR6(SEQ ID NO:10)的轻链可变区连接的包含CDR1(SEQ ID NO:5)、CDR2(SEQ ID NO:6)和CDR3(SEQ ID NO:7)的重链可变区。在一些实施方案中,嵌合IL-6R α 结合蛋白在CDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5和/或CDR6的一个或更多个中具有至少或至多1、2、3、4、5或6个氨基酸替换、缺失或添加。在另一些实施方案中,嵌合IL-6R α 结合蛋白与CDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5和/或CDR6、或与重链可变结构域(SEQ ID NO:3)、或与轻链可变结构域(SEQ ID NO:4)、或与V_L-V_H单链可变片段(scFv)(SEQ ID NO:1)、或与V_L-V_H scFv(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列具有60、65、70、75、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%(或其中可导出的任何范围)的序列同一性。在某些实施方案中,嵌合IL-6R α 结合蛋白是分离的和/或纯化的。在一些实施方案中,IL6R α 结合蛋白包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2。另一些实施方案涉及基本上包含或包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的scFv。

[0007] 在一些实施方案中,嵌合IL-6R α 结合蛋白是scFv、(scFv)₂、scFvFc、Fab、Fab'或F(ab)₂。在一些情况下,scFv部分包含SEQ ID NO:1至10的全部或部分。在某些实施方案中,蛋白质是1、2、3、4或更多条多肽。在一些具体的实施方案中,IL-6R α 结合蛋白是一条多肽。在另一些具体实施方案中,嵌合IL-6R α 结合蛋白是融合蛋白。在一些实施方案中,融合蛋白是一条多肽。

[0008] 某些实施方案涉及是单链可变片段(scFv)的嵌合IL-6R α 结合蛋白。在涉及包含重链可变区和轻链可变区二者的单一多肽的一些实施方案中,考虑了这些可变区的两个取向。在一些情况下,重链可变区位于轻链可变区的N端侧,这意味着重链可变区更靠近多肽的N端。SEQ ID NO:2是这种结构的一个实例。在另一些情况下,轻链可变区位于重链可变区的N端侧,这意味着轻链可变区比重链可变区更靠近多肽的N端。SEQ ID NO:1是这种结构的一个实例。

[0009] 在一些实施方案中,嵌合IL-6R α 结合蛋白包含接头。在一些情况下,接头位于重链可变区和轻链可变区(或反之亦然)之间。在一些实施方案中,接头包含氨基酸序列GSTSGSGKPGSGEGSTKG(SEQ ID NO:11)或具有来自SEQ ID NO:11的序列的10、11、12、13、14、15、16、17或18个连续氨基酸。在另一些实施方案中,接头与SEQ ID NO:11具有80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%的氨基酸序列同一性。

[0010] 一些嵌合IL-6R α 结合蛋白还在多肽的N端或接近多肽的N端具有前导肽或信号肽。前导肽或信号肽是指存在于多肽的N端以促进或允许该多肽的分泌的短(5至30个氨基酸长)肽。

[0011] 在一些具体实施方案中,嵌合IL-6R α 结合蛋白可包含分离标签,其是指用于分离或纯化蛋白质或多肽的肽标签。标签可以是可去除的(例如通过切割),或者可以不是可去除的。标签可以是几丁质结合蛋白(chitin binding protein,CBP)、麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein,MBP)、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase,GST)、His标签(例如Hisx6)。在一些情况下,分离标签是用于改变蛋白质的色谱特性以在特定的分离技术中提供不同分辨率的色谱标签。它的一个实例是FLAG标签,例如DYKDDDDK,其是一系列的聚阴离子氨基酸。另一种分离标签可以是表位标签,其是指可以与抗体结合使用的短肽序列。表位标签包括但不限于V5标签、c-myc标签、HA标签或NE标签。

[0012] 一些实施方案涉及分离的嵌合白介素6受体 α (IL-6R α)结合蛋白,其包含前导肽、通过异源接头与包含CDR4(SEQ ID NO:8)、CDR5(SEQ ID NO:9)和CDR6(SEQ ID NO:10)的轻链可变区连接的包含CDR1(SEQ ID NO:5)、CDR2(SEQ ID NO:6)和CDR3(SEQ ID NO:7)的重链可变区,其中所述异源接头包含氨基酸序列GSTSGSGKPGSGEGSTKG(SEQ ID NO:11)并且所述IL-6R α 结合蛋白是单链可变片段(scFv)。一些实施方案不涉及托珠单抗(tocilizumab)(也称为atlizumab),其以商品名Actemra和RoActemra出售,并且除非明确地指出,否则其是人源化单克隆抗体。在具体的实施方案中,IL-6R α 结合蛋白降低来自T细胞的一种或更多种细胞因子的表达。在一些实施方案中,T细胞表达嵌合抗原受体或活化T细胞的另一种蛋白质。在某些实施方案中,IL-6R α 结合蛋白降低任何以下细胞因子的表达:TNF- α 、IL-6、IL-2、IL-4和GM-CSF(或其任意组合)。在一些情况下,与未暴露于IL-6R α 结合蛋白的细胞相比,IL-6R α 结合蛋白将那些细胞因子中的一种或更多种的表达降低、降低至少、或降低至多10%、20%、30%、40%或50%(或其中可导出的任何范围)。在一些实施方案中,IL-6R α scFv降低任何以下细胞因子的表达:TNF- α 、IL-6、IL-2、IL-4和GM-CSF(或其任意组合)。在一些情况下,与暴露于托珠单抗的细胞相比,IL-6R α scFv将那些细胞因子中的一种或更多种的表达降低、降低至少、或降低至多10%、20%、30%、40%或50%(或其中可导出的任何范围)。在另一些实施方案中,IL-6R α scFv比托珠单抗更强地降低一种或更多种细胞因子的表达。类似地,一些方法可涉及比托珠单抗更强地降低一种或更多种细胞因子的表达的

IL-6R α scFv。在某些实施方案中,方法涉及比托珠单抗更强地降低TNF- α 、IL-6、IL-2、IL-4和/或GM-CSF的表达的IL-6R α scFv。在一些实施方案中,降低一种或更多种细胞因子的表达的IL-6受体 α 单链可变片段包含通过异源接头与包含CDR4 (SEQ ID NO:8)、CDR5 (SEQ ID NO:9) 和CDR6 (SEQ ID NO:10) 的轻链可变区连接的包含CDR1 (SEQ ID NO:5)、CDR2 (SEQ ID NO:6) 和CDR3 (SEQ ID NO:7) 的重链可变区。在其他段落中讨论的其他IL-6R α scFv可以降低本文中所述的细胞因子的表达。

[0013] “嵌合白介素6受体 α (IL-6R α) 结合蛋白”是指特异性结合IL-6受体 α 并且包含至少两个氨基酸区域(每个区域至少10个连续氨基酸)的蛋白质,每个区域来自不同的基因,并且其中嵌合蛋白质未在自然界中发现。在一些实施方案中,嵌合IL-6R α 蛋白是单一多肽。嵌合IL-6R α 结合蛋白不是指在自然界中发现的IL-6R α 抗体。“分离的”是指蛋白质从任何其他蛋白质或细胞的一种或更多种其他组分分离或纯化。

[0014] 另一些方面涉及表达嵌合IL-6R α 结合蛋白的一种或更多种细胞。细胞可在其表面表达嵌合IL-6R α 结合蛋白,或者其可表达和分泌嵌合IL-6R α 结合蛋白。在某些实施方案中,T细胞表达嵌合IL-6R α 结合蛋白。T细胞可在其他血细胞中或其可在富集的T细胞库中。T细胞可以是稚细胞(naive)的、中枢记忆、效应记忆或效应表型的常规T细胞;或者其可以是天然或诱导表型的调节性T细胞。在一些情况下,T细胞表达以下标志物的一种或更多种:CD4、CD8、CD25、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、CD57、CD62L、CD69、CD95、CD127、CCR7、IL-7R α 或Foxp3。在一些实施方案中,T细胞是CD4+T细胞。在一些实施方案中,T细胞是CD8+T细胞。

[0015] 在一些实施方案中,存在编码嵌合IL-6R α 结合蛋白的核酸分子。某些实施方案涉及还包含控制嵌合IL-6R结合蛋白表达的启动子的核酸分子。在一些实施方案中,启动子是组成型的。在另一些实施方案中,启动子正响应于至少一种细胞因子或者响应于当细胞因子上调时表达或活性上调的一种或更多种转录因子。启动子可正响应于以下细胞因子中的一种或更多种:IL-6、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-8或IL-10。在另一些实施方案中,启动子响应于当T细胞活化时增加的转录因子;NFAT-1是这样的转录因子,NF- κ B也是如此。

[0016] 在另一些实施方案中,存在包含编码IL-6R α 结合蛋白的核酸分子的表达构建体。一些实施方案涉及是病毒载体的表达构建体,而另一些实施方案涉及是质粒的表达构建体。

[0017] 某些实施方案涉及包含编码IL-6R α 结合蛋白的核酸构建体的一种或更多种细胞。在一些实施方案中,细胞是T细胞。在具体的实施方案中,细胞已经用表达构建体转染或感染,所述表达构建体可以或不整合到一种或更多种宿主细胞的基因组中。在一些情况下,存在包含编码IL-6R α scFv的异源表达构建体的T细胞,所述IL-6R α scFv包含前导肽、通过异源接头与包含CDR4 (SEQ ID NO:8)、CDR5 (SEQ ID NO:9) 和CDR6 (SEQ ID NO:10) 的轻链可变区连接的包含CDR1 (SEQ ID NO:5)、CDR2 (SEQ ID NO:6) 和CDR3 (SEQ ID NO:7) 的重链可变区,其中异源接头包含氨基酸序列GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:11)。在一些实施方案中,IL-6R α 结合蛋白是单链抗体片段(scFv)。在一些实施方案中,表达构建体包含细胞因子响应型启动子(意指当细胞因子增加时启动子具有提高的表达)。在一些实施方案中,当T细胞活化时,细胞因子增加。在一些实施方案中,当T细胞活化引发全身免疫应答时,细胞因子增加。在一些实施方案中,当肿瘤细胞裂解引发全身免疫应答时,细胞因子增加。

[0018] 另一些实施方案涉及制备或使用IL-6R α 结合蛋白、编码这样的蛋白质的核酸分子

或表达这样的蛋白质的细胞的方法。在某些实施方案中,存在用于降低细胞因子释放综合征(CRS)风险的方法、用于抑制IL-6R α 的方法、用于治疗癌症的方法、用于治疗自身免疫疾病的方法、用于降低一种或更多种细胞因子毒性的方法、用于降低T细胞活化毒性的方法、以及用于制备IL-6R α 治疗组合物的方法。一些实施方案还涉及嵌合IL-6R α 结合蛋白用于治疗细胞因子释放综合征、用于治疗癌症和/或用于治疗自身免疫疾病的用途。

[0019] 在一些实施方案中,方法包括向处于细胞因子释放综合征风险的患者施用包含分离的IL-6受体 α (IL-6R α) 结合蛋白或包含编码IL-6R α 结合蛋白的异源核酸分子的细胞的组合物。在一些情况下,患者患有癌症和/或自身免疫疾病。在一些情况下,患者已经或将要接受过继性T细胞治疗。在一些情况下,在过继性T细胞转移之后向患者施用组合物。在一些情况下,组合物与过继性T细胞转移一起施用于患者。在一些情况下,患者已经或将要接受淋巴细胞清除。患者可在接受涉及IL-6R α 结合蛋白的治疗组合物的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24天(或其中可导出的任何范围)内接受或已经接受过继T细胞治疗。在另一些实施方案中,患者患有自身免疫疾病。

[0020] 在一些实施方案中,向患者施用包含编码IL-6R α 结合蛋白的异源核酸分子的T细胞。在另一些实施方案中,向患者施用自体T细胞。

[0021] 在另一些实施方案中,方法还包括向患者施用抗组胺、皮质类固醇、类固醇、醋氨酚、呋塞米和/或静脉内流体,或用于细胞因子释放综合征或与使用T细胞的治疗相关的其他毒性或副作用的任何其他治疗。在一些情况下,患者患有细胞因子释放综合征的一种或更多种症状。

[0022] 在一些实施方案中,存在用于在癌症患者中降低过继性细胞治疗的毒性的方法,包括向患者施用包含分离的IL-6受体 α (IL-6R α) 结合蛋白或包含编码IL-6R α 结合蛋白的异源核酸分子的细胞的组合物。一些另外的实施方案包括用于在患者中治疗自身免疫疾病的方法,包括向患者施用包含以下的组合物:包含分离的IL-6受体 α (IL-6R α) 结合蛋白或包含编码IL-6R α 结合蛋白的异源核酸分子的细胞的组合物。另一些实施方案涉及用于治疗癌症患者的方法,包括向患者施用包含分离的IL-6受体 α (IL-6R α) 结合蛋白或包含编码IL-6R α 结合蛋白的异源核酸分子的细胞的组合物,其中所述患者已经或将要用免疫治疗进行治疗。在一些实施方案中,患者已经或将要用抗T细胞抗体治疗。抗T细胞抗体的一些非限制性实例包括抗胸腺细胞球蛋白、莫罗单抗-CD3、TGN1412、抗CD20、抗CD19、利妥昔单抗和tisagenlecleucel。在一些实施方案中,免疫治疗是过继性细胞治疗。在一些实施方案中,本公开内容的方法包括向患者施用包含含有编码IL-6R α 结合蛋白和肿瘤靶向受体的异源核酸分子的细胞的组合物。另一些实施方案涉及用于降低一种或更多种细胞因子毒性的方法,包括向患有自身免疫疾病或病症的患者或用免疫治疗进行治疗的患者施用有效量的包含单链可变片段的组合物,所述单链可变片段包含含有通过异源接头与包含CDR4 (SEQ ID NO:8)、CDR5 (SEQ ID NO:9) 和CDR6 (SEQ ID NO:10) 的轻链可变区连接的包含CDR1 (SEQ ID NO:5)、CDR2 (SEQ ID NO:6) 和CDR3 (SEQ ID NO:7) 的重链可变区的分离的IL-6R α 结合蛋白。

[0023] 本文中所述的多肽可包含在SEQ ID NO:1至11中任一个的至少、或至多3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、

58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、300、400、500、550、1000或更多个连续氨基酸、或其中可导出的任何范围内的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个变体氨基酸。

[0024] 在本文中所述方法的一个实施方案中,对象是人对象。本文中互换使用的术语“个体”、“对象”“宿主”和“患者”是指哺乳动物,包括但不限于:鼠(例如大鼠、小鼠)、兔类(例如兔子)、非人灵长类、人、犬、猫、有蹄类(例如马、牛、羊、猪、山羊)等。

[0025] 在进一步描述本发明之前,应理解本发明不限于所描述的具体实施方案,因为这些当然可以变化。还应理解,本文中使用的术语仅用于描述一些具体实施方案的目的,而不是限制性的,因为本发明的范围仅受所附权利要求书的限制。

[0026] 当提供值的范围时,应理解,除非上下文另有明确说明,否则在该范围的上限和下限以及在该规定范围内的任何其他规定值或中间值之间的每个中间值至下限单位的十分之一,涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包含在较小范围内,并且也涵盖在本发明内,遭受所规定范围中的任何明确排除的限制。当所规定范围包含一个或两个限制时,排除了那些被包含的限制之一或两者的范围也包含在本发明中。

[0027] 特别地考虑了可以排除本文中描述的实施方案。还考虑了当描述范围时,可以排除某些范围。

[0028] 如本文在说明书中所用的,没有数量词修饰的名词可意指一个/种或更多个/种。如本文在权利要求书中所用的,当与词语“包含/包括”联合使用时,没有数量词修饰的名词可意指一个/种或多于一个/种。

[0029] 虽然本公开内容支持指仅替代方案和“和/或”的定义,但是权利要求书中术语“或/或者”的使用用于意指“和/或”,除非明确地指出仅指替代方案或者替代方案相互排斥。本文中使用的“另一”可意指至少第二个或更多个。

[0030] 在本申请通篇,术语“约/大约”用于表示值包括用于确定所述值的装置、方法之误差的固有变化或研究对象之间存在的变化。从以下详细描述中,本发明的其他目标、特征和优点将变得明显。然而,应理解,虽然指示了本发明的优选实施方案,但是详细描述和具体实施例仅以举例说明的方式给出,因为对于本领域技术人员,根据该详细描述,在本发明的精神和范围内的多种变化和修改将变得明显。

附图说明

[0031] 以下附图构成本说明书的一部分,并且被包括在内以进一步说明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个结合本文中给出的具体实施方案的详细描述可以更好地理解本发明。

[0032] 图1.抗IL-6R α scFv抑制HepG2细胞中的IL-6信号传导。将HepG2人肝癌细胞接种在12孔板中,并用指定量的scFv孵育3小时。随后用4ng/ml的IL-6处理指定的孔,并再孵育30分钟,然后收获细胞。通过western印迹探测磷酸化STAT3(phosphorylated STAT3, pSTAT3)(IL-6信号传导途径中的主要信号传导分子)以及GAPDH(上样对照)的存在。

[0033] 图2.抗IL-6R α scFv抑制原代人T细胞中的IL-6信号传导。将原代人CD4+和CD8+T细胞接种在12孔板中,并如图1所述进行处理。以指定的量添加V_L-V_H scFv(SEQ ID NO:1),并将IL-6添加至指定的孔。通过western印迹检测pSTAT3和GAPDH(上样对照)。

[0034] 图3.抗IL-6R α scFv的组成型表达显著降低了通过原代人T细胞的炎性细胞因子的产生。将表达抗CD19嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)的具有(“抗IL-6R α scFv”,中间栏)或不具有(“无scFv或mAb”;左栏)IL-6R α scFv的组成型表达的原代人CD4+T细胞与来自相同供体的外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)以及野生型(CD19+)Raji淋巴瘤细胞以1:1:1的比例共同孵育12小时。包含用90 μ g/ml单克隆抗体托珠单抗处理的不表达scFv的CD19CAR-T细胞作为对照样品(“托珠单抗”;右栏)。通过基于细胞计数珠的测定法来定量培养基中的细胞因子水平。示出的值是三次技术重复的平均值,具有表示 ± 1 标准偏差的误差条。通过双尾、等方差Student's t检验来评价统计学显著性;*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001。示出的结果代表使用来自两个不同健康血液供体的细胞的两个独立实验。

[0035] 图4.抗IL-6R α scFv的组成型表达不抑制CD4+T细胞中的T细胞增殖或细胞毒性。将组成型表达抗CD19CAR的具有或不具有抗IL-6R α scFv的原代人CD4+T细胞与野生型(WT;CD19+)或CD19-突变Raji淋巴瘤细胞以2:1的效应物比靶标(effector-to-target,E:T)比例共同孵育。每两天通过流式细胞术获得活的T细胞和Raji细胞计数。两种Raji细胞系均稳定表达EGFP以在流式细胞术分析期间能够与T细胞分离。在第8天细胞计数之后,收获与WT Raji共同孵育的T细胞,并用新鲜的WT Raji细胞以2:1的E:T比例再次攻击。在第二次攻击期间再监测活细胞计数12天。示出的值是三次技术重复的平均值,具有表示 ± 1 标准偏差的误差条。示出的结果代表使用来自两个不同健康血液供体的细胞的四个独立实验。

[0036] 图5.抗IL-6R α scFv的组成型表达在CD4+T细胞中在抗原刺激之后不改变T细胞亚型分化。在图4所示的相同实验中,以用于CCR7、CD45RA和CD57的抗体对CD4+原代人T细胞进行表面染色以确定T细胞亚型。T_{E/EM}:CCR7-/CD45RA-/CD57-;T_{E/Exh}:CCR7-/CD45RA-/CD57+;T_{EMRA}:CCR7-/CD45RA+;T_{cm}:CCR7+/CD45RA-;T_{耗竭}:CCR7+/CD45RA+。示出的值是三次技术重复的平均值,具有表示 ± 1 标准偏差的误差条。示出的结果代表使用来自两个不同健康血液供体的细胞的四个独立实验。

[0037] 图6.抗IL-6R α scFv的组成型表达不抑制CD8+T细胞中的T细胞增殖或细胞毒性。将组成型表达抗CD19CAR的具有或不具有抗IL-6R α scFv的原代人CD8+T细胞与野生型(WT;CD19+)或CD19-突变Raji淋巴瘤细胞以2:1的效应物比靶标(E:T)比例共同孵育。每两天通过流式细胞术获得活的T细胞和Raji细胞计数。两种Raji细胞系均稳定表达EGFP以在流式

细胞术分析期间能够与T细胞分离。示出的值是三次技术重复的平均值,具有表示 ± 1 标准偏差的误差条。示出的结果代表使用来自两个不同健康血液供体的细胞的三个独立实验。

[0038] 图7.抗IL-6R α scFv的组成型表达在CD8+T细胞中在抗原刺激之后不改变T细胞亚型分化。在图1所示的相同实验中,以用于CCR7、CD45RA和CD57的抗体对原代CD8+人T细胞进行表面染色以确定T细胞亚型。 $T_{E/EM}$:CCR7-/CD45RA-/CD57-; $T_{E/Exh}$:CCR7-/CD45RA-/CD57+; T_{EMRA} :CCR7-/CD45RA+; T_{cm} :CCR7+/CD45RA-; $T_{耗竭}$:CCR7+/CD45RA+。示出的值是三次技术重复的平均值,具有表示 ± 1 标准偏差的误差条。示出的结果代表使用来自三个不同健康血液供体的细胞的四个独立实验。

[0039] 图8.抗IL-6R α scFv的组成型表达在抗原刺激之后不改变原代人T细胞中的衰竭标志物表达。将组成型表达抗CD19 CAR的具有或不具有抗IL-6R α scFv的原代人T细胞与WT Raji细胞以2:1的E:T比例共同孵育。每两天通过表面抗体染色和流式细胞术定量PD-1、TIM-3和LAG-3表达水平。用CD8+T细胞进行三次试验并用CD4+T细胞进行四次试验,总共七次独立实验。每项试验包括每种条件三次技术重复。图中的每个数据点代表来自一项试验的三次重复的平均值。每个时间点的七次试验的平均值由黑色水平条表示。

具体实施方式

[0040] 本文中公开的实施方案包含与调节IL-6的炎性作用的IL-6R α 结合的多肽。另一些实施方案包含表达IL-6R α 结合多肽的细胞,以及在癌症治疗、自身免疫治疗和抗炎性治疗等中使用细胞和多肽的方法。在以下部分中更详细地讨论了本发明的这些方面和其他非限制性方面。

[0041] I. 定义

[0042] 本文中公开的实施方案可包含嵌合抗原受体(CAR),其可由T细胞或另一些免疫细胞类型表达。CAR是经改造的受体,其将任意特异性移植到免疫效应细胞上。一般来说,这些受体用于将单克隆抗体的特异性移植到T细胞上。所述受体被称为嵌合体,因为它们由来自不同来源的部分组成。

[0043] 当提及基因产物时,术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文中互换使用。

[0044] “同源性”、“同一性”或“相似性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。可以通过比较每个序列中为了比较目的可比对的位置来确定同一性。当比较序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,那么分子在该位置共享序列同一性。序列之间同一性的程度是由序列共享的匹配或同源位置的数目的函数。“无关的”或“非同源的”序列与本公开内容的序列之一共享小于40%的同一性、或小于25%的同一性。

[0045] 本文中使用的术语“氨基部分”、“N端”、“氨基端”等用于指多肽区域的顺序。此外,当某物对于区域为N端时,它不一定位于整个多肽的端(或末端)处,而是仅位于该区域或结构域的端处。类似地,本文中使用的术语“羧基部分”、“C端”、“羧基端”等用于指多肽区域的顺序,并且当某物对于区域为C端时,它不一定位于整个多肽的端(或末端)处,而是仅位于该区域或结构域的端处。

[0046] 术语“对象”、“个体”或“患者”在本文中互换使用,并且是指脊椎动物,例如灵长类、哺乳动物或优选人。哺乳动物包括但不限于马、犬、牛、羊、鼠、大鼠、猿猴、人、农场动物、运动动物和宠物。

[0047] 当涉及培养基、细胞外基质或培养条件使用时,术语“无异源(xeno-free, XF)”或“无动物组分(animal component-free, ACF)”或“无动物”是指培养基、细胞外基质或培养条件基本上不含异源动物来源的组分。对于培养人细胞,非人动物(例如小鼠)的任何蛋白质将是异源组分。在某些方面,无异源基质可基本上不含任何非人动物来源的组分,因此排除小鼠饲养细胞或Matrigel™。Matrigel™是从Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 小鼠肉瘤提取的可溶性基底膜制备物,所述EHS小鼠肉瘤是富含细胞外基质蛋白,包括层黏连蛋白(主要组分)、胶原蛋白IV、硫酸肝素蛋白多糖和内功素/巢蛋白的肿瘤。在一些实施方案中,本文中所述的组合物或本公开内容的细胞在/用无异源或无动物组分或无动物的培养基中培养和/或制备。

[0048] 如本文中使用的,当细胞具有少于10%的要素时,细胞“大体上不含”某些试剂或要素,例如血清、信号传导抑制剂、动物组分或饲养细胞、外源遗传元件或载体元件,并且当细胞具有少于1%的要素时,其“基本上不含”某些试剂或要素。然而,更期望的是其中总细胞群中的少于0.5%或少于0.1%包含外源遗传元件或载体元件的细胞群。

[0049] 当培养物、基质或培养基分别具有低于使用本领域普通技术人员已知的常规检测方法可检测的水平的某些试剂的水平,或者这些试剂没有外在地添加至培养物、基质或培养基时,培养基、基质或培养基“基本上不含”这些试剂或要素,例如血清、信号传导抑制剂、动物组分或饲养细胞。无血清培养基可基本上不含血清。

[0050] “编码”特定蛋白质的“基因”、“多核苷酸”、“编码区”、“序列”、“区段”、“片段”或“转基因”是当置于合适的调节序列的控制下时在体外或体内被转录并且任选地还被翻译成基因产物(例如多肽)的核酸分子。编码区可以以cDNA、基因组DNA或RNA形式存在。当以DNA形式存在时,核酸分子可以为单链(即有义链)或双链的。编码区的边界由在5' (氨基)端处的起始密码子和在3' (羧基)端处的翻译终止密码子来确定。基因可以包括但不限于:来自原核或真核mRNA的cDNA、来自原核或真核DNA的基因组DNA序列、和合成的DNA序列。转录终止序列一般位于基因序列的3'。

[0051] 术语“细胞”在本文中以其在本领域中最广泛的含义使用,并且是指以下活体:作为多细胞生物体的组织的结构单元,被将其与外部隔离的膜结构包围,具有自我复制的能力,并且具有遗传信息和用于表达其的机制。本文中使用的细胞可以是天然存在的细胞或经人工修饰的细胞(例如融合细胞、经遗传修饰的细胞等)。

[0052] 本文中使用的术语“干细胞”是指能够自我复制并且具有多能性或多潜能性的细胞。一般来说,干细胞可以再生受伤组织。本文中的干细胞可以是但不限于:胚胎干(embryonic stem, ES)细胞、诱导的多能干细胞或组织干细胞(也称为组织特异性干细胞或体干细胞)。

[0053] “胚胎干(ES)细胞”是源自早期胚胎的多能干细胞。ES细胞最初于1981年建立,其自1989年以来也应用于敲除小鼠的产生。在1998年,建立了人ES细胞,其目前正变得可用于再生医学。

[0054] 与ES细胞不同,组织干细胞具有有限的分化潜能。组织干细胞存在于组织中的特定位置,并具有未分化的细胞内结构。因此,组织干细胞的多能性一般较低。组织干细胞具有较高的细胞核/细胞质比率,并且具有较少的细胞内细胞器。大多数组织干细胞具有低多能性、长细胞周期和超过个体寿命的增殖能力。基于细胞来源的部位,例如真皮系统、消化

系统、骨髓系统、神经系统等,将组织干细胞分类。真皮系统中的组织干细胞包括表皮干细胞、毛囊干细胞等。消化系统中的组织干细胞包括胰腺(普通)干细胞、肝干细胞等。骨髓系统中的组织干细胞包括造血干细胞、间充质干细胞等。神经系统中的组织干细胞包括神经干细胞、视网膜干细胞等。

[0055] “诱导的多能干细胞”通常缩写为iPS细胞或iPSC,是指通过引入称为重编程因子的某些因子,由非多能细胞(通常为成年体细胞)或终末分化的细胞(例如成纤维细胞、造血细胞、肌细胞、神经元、表皮细胞等)人工制备的一类多能干细胞。

[0056] “多能性”是指具有分化成构成一个或更多个组织或器官、或者特别地以下三种胚层中任一种的所有细胞的潜能的干细胞:内胚层(胃黏膜、胃肠道、肺)、中胚层(肌肉、骨骼、血液、泌尿生殖器)或外胚层(表皮组织和神经系统)。本文中使用的“多能干细胞”是指可分化成源自三种胚层中的任一种的细胞的细胞,例如全能细胞的直接后代或诱导的多能细胞。

[0057] 本文中使用的术语“治疗”等是指获得期望的药理学和/或生理学作用。就完全或部分地预防疾病或其症状而言,该作用可为预防性的,和/或就疾病和/或归因于该疾病的不良反应的部分或完全治愈而言,可以为治疗性的。本文中使用的“治疗”涵盖哺乳动物(例如人)中的疾病的任何治疗,并且包括:(a)预防疾病在可能易患疾病但尚未被诊断为患有其的对象中发生;(b)抑制疾病,即阻止其发展;和(c)缓解疾病,即引起疾病消退。

[0058] 在一些实施例中,该方法可用于减小实体瘤的尺寸和/或细胞数目。在一些实施例中,本公开内容的方法可用于抑制对象中的肿瘤(例如实体瘤)的生长。

[0059] 术语“抗原”是指引起免疫系统产生针对其的抗体或T细胞对其作出响应的任何物质。在一些实施例中,抗原是长度为5至50个氨基酸或者至少、至多、或正好5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、250或300个氨基酸或其中可导出的任何范围的肽。

[0060] 术语“抗体”包括单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体和抗体片段,其可以为人、小鼠、人源化、嵌合的或源自另一个物种。“单克隆抗体”是从针对特定抗原位点的基本上同质的抗体群体获得的抗体。

[0061] “抗体或其功能片段”意指与特定抗原或表位特异性结合或免疫反应的免疫球蛋白分子,并且包括多克隆抗体和单克隆抗体两者。术语抗体包括经遗传改造或其他修饰形式的免疫球蛋白,例如胞内抗体、肽体、嵌合抗体、全人抗体、人源化抗体和异源缀合抗体(例如双特异性抗体、双抗体、三抗体和四抗体)。术语功能性抗体片段包括抗体的抗原结合片段,包括例如Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rIgG和scFv片段。术语scFv是指单链Fv抗体,其中传统双链抗体的重链和轻链的可变结构域已连接形成一条链。

[0062] 单链可变片段(scFv)的使用是特别有利的。scFv是重组分子,其中编码抗原结合结构域的轻免疫球蛋白链和重免疫球蛋白链的可变区被改造成单一多肽。一般来说,V_H和V_L序列通过接头序列连接。参见例如Ahmad(2012)Clinical and Developmental Immunology Article ID 980250,通过引用明确并入本文。

[0063] “治疗有效量”或“有效量”是指当向哺乳动物或其他对象施用以用于治疗疾病时,足以产生这样的疾病治疗的试剂的量或两种试剂的组合量。“治疗有效量”将根据试剂、疾病及其严重程度、和待治疗的对象的年龄、体重等而变化。

[0064] 如本文在说明书中所用的,没有数量词修饰的名词可意指一个/种或更多个/种。如本文在权利要求书中所用的,当与词语“包含/包括”联合使用时,没有数量词修饰的名词可意指一个/种或多于一个/种。

[0065] 虽然本公开内容支持指仅替代方案和“和/或”的定义,但是权利要求书中术语“或/或者”的使用用于意指“和/或”,除非明确地指出仅指替代方案或者替代方案相互排斥。本文中使用的“另一”可意指至少第二个或更多个。

[0066] 在本申请通篇,术语“约/大约”用于表示值包括用于确定所述值的装置、方法之误差的固有变化或研究对象之间存在的变化。

[0067] II. 多肽

[0068] A. IL-6R α 结合多肽

[0069] 本文中公开的一些实施方案包含与IL-6R α 结合的多肽,包括人IL-6R α 。IL-6R α 结合蛋白可以以药物制剂的形式施用,或者可以由施用至对象的细胞表达。在任何一种情况下,IL-6R α 结合蛋白影响涉及IL-6的免疫过程。当IL-6R α 结合蛋白由细胞(例如T细胞)表达时,IL-6R α 可调节细胞自身和/或附近其他细胞的免疫功能。在一些实施方案中,IL-6R α 结合蛋白通过表达IL-6R α 结合蛋白的细胞或通过附近的其他细胞降低促炎性细胞因子的分泌。这样的促炎性细胞因子可包括TNF- α 、IL-6、IL-2、IL-4、GM-CSF和IL-1 β 。通过表达IL-6R α 结合蛋白的细胞的细胞因子分泌的降低可以使细胞更有效和安全地用于治疗,例如过继性T细胞治疗。表达IL-6R α 结合蛋白的细胞可以自我调节IL-6信号传导水平以预防和/或改善不利的炎症事件,例如细胞因子释放综合征。

[0070] IL-6R α 结合蛋白还可以用于治疗自身免疫病症。在一些实施方案中,这可通过在调节性T细胞中表达IL-6R α 结合蛋白来实现,IL-6R α 结合蛋白将抑制不期望的炎性应答并改善自身免疫攻击的严重性。这也可通过施用IL-6R α 结合蛋白本身以调节通过IL-6R α 的信号传导来实现。

[0071] 在一些实施方案中,IL-6R α 结合多肽是单链Fv(scFv),其包含抗体的V_H和V_L结构域,其中这些结构域存在于单一多肽链中。在一些实施方案中,抗原结合结构域还包含V_H和V_L结构域之间的肽接头,其可以使scFv形成用于抗原结合的期望的结构。在以下的实施例部分中使用两种不同的scFv构建体:(1)V_L-V_H-scFv和(2)V_H-V_L-scFv。这两种构建体仅序列的顺序不同。V_L-V_H-scFv构型是N端-V_L-接头-V_H-C端,而V_H-V_L-scFv构型是N端-V_H-接头-V_L-C端,其中V_L是指轻链可变片段并且V_H是指重链可变片段。这些scFv构建体的氨基酸序列列于下表中:

单链可变片段	氨基酸序列（单字母缩写）
[0072] 抗 IL-6R α V _L -V _H scFv	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGGSDYKDDDDKGGSDIQMTQSP SSLSASVGDRTITCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR LHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQGNTLPYTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKH</p> <p>KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGSTSGSGKPGSGEGSTKGE VQLQESGPGLVPRPSQTLSTCTVSGYSITSDHAWSWVRQPPGRGL EWIGYISYSGITTYNPSLKSRTVTLRDTSKNQFSLRLSSVTAADTA VYYCARSLARTTAMDYWGQGS LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G (SEQ ID NO:1)</p>
[0073] 抗 IL-6R α V _H -V _L scFv	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGGSDYKDDDDKGGSEVQLQESG PGLVRPSQTLSTCTVSGYSITSDHAWSWVRQPPGRGLEWIGYIS YSGITTYNPSLKSRTVTLRDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAR SLARTTAMDYWGQGS LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGSTSG SGKPGSGEGSTKGD IQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQ PEDATYYCQQGNTLPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO:2)</p>

[0074] SEQ ID NO:1和2的抗IL-6R α scFv的V_H和V_L序列,以及这些序列内的CDR的序列和scFv中V_H和V_L序列之间的接头序列列于下表中:

序列名称	氨基酸序列（单字母缩写）
[0075] 抗 IL-6R α scFvs 的 V _H	EVQLQESGPGGLVRPSQTLSTCTVSGYSITSDHAWSWVRQPPGRGLEWIGYISYSGITTYNPSLKSRTVMTLRDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARSLARTTAMDYWGQGSGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP
	G (SEQ ID NO:3)
	抗 IL-6R α scFvs 的 V _L
	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQGNLTPYTFGQGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:4)
	CDR1 (V _H)
[0076]	SDHAW (SEQ ID NO:5)
	CDR2 (V _H)
	YISYSGITTYNPSLKS (SEQ ID NO:6)
	CDR3 (V _H)
	SLARTTAMDY (SEQ ID NO:7)
[0076]	CDR4 (V _L)
	RASQDISSYLN (SEQ ID NO:8)
	CDR5 (V _L)
	YTSRLHS (SEQ ID NO:9)
	CDR6 (V _L)
	QQGNTLPYT (SEQ ID NO:10)
[0076]	接头
	GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:11)

[0077] SEQ ID NO:1和2的scFv通过用SEQ ID NO:11的接头将V_H结构域与V_L结构域连接,由托珠单抗(WO 1992019759A1、US 5670373、US7479543、US8580264)和先前开发的抗IL-6R α 单克隆抗体构建。

[0078] 除了scFv之外,IL-6R α 结合蛋白可以采取多种形式,其可包含本文中公开的V_H(SEQ ID NO:3)、V_L或CDR(SEQ ID NO:5至11)序列或其衍生物或变体的一种或更多种。例如,结合蛋白可以是具有抗原结合区的抗体样分子,包括抗体片段例如Fab'、Fab、F(ab')₂、F(ab)₂、(scFv)₂,单结构域抗体(single domain antibody,DAB),Fv,以及具有抗体CDR和展示CDR的支架结构域(例如抗运载蛋白(anticalin))的多肽,或纳米抗体。例如,纳米抗体可以是来自骆驼IgG2或IgG3的抗原特异性VHH(例如重组VHH),或者是来自这样的骆驼Ig的CDR展示框架。用于制备和使用多种基于抗体的构建体和片段的技术是本领域中公知的。用于制备和表征抗体的方法也是本领域中公知的(参见例如,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,1988;通过引用并入本文)。

[0079] “微型抗体(mini-antibody)”或“微抗体(minibody)”也被考虑用于实施方案。微

抗体是在其C端包含通过铰链区与sFv分开的寡聚化结构域的sFv多肽链。Pack等(1992)。寡聚化结构域包含自缔合 α 螺旋(例如亮氨酸拉链),其可以通过另外的二硫键进一步稳定化。寡聚化结构域被设计成与跨膜矢量折叠相容,所述跨膜矢量折叠是被认为促进将多肽在体内折叠成功能性结合蛋白质的过程。一般来说,微抗体使用本领域中公知的重组方法来产生。参见例如, Pack等(1992);Cumber等(1992)。

[0080] 实施方案中还考虑了抗体样结合肽模拟物。Liu等(2003)描述了“抗体样结合肽模拟物”(antibody like binding peptidomimetic, ABiP),其为用作简化抗体的肽并且具有某些优点(血清半衰期更长以及合成方法较不麻烦)。

[0081] 用于抗原结合肽的替代支架(例如CDR)也是可用的,并且可以用于根据实施方案产生IL-6R α 结合分子。一般来说,本领域技术人员知道如何确定在其上移植由原始抗体产生的至少一个CDR的蛋白质支架的类型。更具体地,已知要选择这样的支架,其必须满足最大数量的如下标准(Skerra, 2000):良好的系统发育保护;已知的三维结构(例如,通过晶体学、NMR波谱学或本领域技术人员已知的任何其他技术);小尺寸;很少或没有转录后修饰;和/或易于生产、表达和纯化。

[0082] 这样的蛋白质支架的来源可以是但不限于选自以下的结构:纤连蛋白和优选纤连蛋白III型结构域10、脂质运载蛋白、抗运载蛋白(Skerra, 2001)、由金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的蛋白A的结构域B产生的蛋白Z、硫氧还蛋白A或具有重复基序(例如“锚蛋白重复”(Kohl等, 2003)、“犰狳重复(armadillo repeat)”、“富含亮氨酸的重复”和“四三共肽重复”)的蛋白质。例如,抗运载蛋白或脂质运载蛋白衍生物是对多种靶分子具有亲和力和特异性的结合蛋白类型,并且可以用作靶结合分子。这样的蛋白质描述于通过引用并入本文的美国专利公开No. 20100285564、20060058510、20060088908、20050106660和PCT公开No. W02006/056464中。

[0083] 支架来源于毒素,例如如来自蝎子、昆虫、植物、软体动物等的毒素,并且在某些方面,也可使用神经型NO合酶(neuronal NO synthase, PIN)的蛋白质抑制剂。

[0084] 认识到单克隆抗体(monoclonal antibody, MAb)具有某些优点,例如可重现性和大规模生产。一些实施方案包含人、鼠、猴、大鼠、仓鼠、兔和鸡来源的单克隆抗体。

[0085] 还考虑了“人源化”抗体,如携带人恒定区结构域和/或可变区结构域的来自小鼠、大鼠或其他物种的嵌合抗体、双特异性抗体、重组和经改造的抗体、及其片段。本文中使用的术语“人源化”免疫球蛋白是指包含人框架区和来自非人(通常为小鼠或大鼠)免疫球蛋白的一个或更多个CDR的免疫球蛋白。提供CDR的非人免疫球蛋白被称作“供体”并且提供框架的人免疫球蛋白被称作“接纳体(acceptor)”。“人源化抗体”是包含人源化轻链和人源化重链免疫球蛋白的抗体。为了描述一些实施方案的抗体,可以测量抗体分子结合表位的强度(称为亲和力)。抗体的亲和力可通过测量缔合常数(K_a)或解离常数(K_d)来确定。在某些实施方案中被认为有用的抗体可具有约、至少约、或至多约 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 或 10^{10} M或其中可导出的任何范围的缔合常数。类似地,在一些实施方案中,抗体可具有约、至少约或至多约 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 或 10^{-10} M或其中可导出的任何范围的解离常数。

[0086] 在某些实施方案中,特异性结合IL-6R α 的多肽能够中和IL-6R α 和/或阻止IL-6与IL-6R α 的结合或阻止通过IL-6R α 的信号传导。

[0087] B. IL-6R α 结合多肽的修饰

[0088] 1. 信号肽

[0089] 可以用前导(即信号)肽标记任何IL-6R α 结合蛋白。“信号肽”是指指导蛋白质在细胞内的转运和定位的肽序列,例如导向某个细胞器(例如内质网)和/或细胞表面。信号肽指导新生蛋白质进入内质网内。一般来说,使用天然地连接至氨基端最大组分的信号肽(例如在具有定向轻链-接头-重链的scFv中,使用轻链的天然信号)。在一些实施方案中,使用来自鼠 κ 轻链的信号肽,使得蛋白质从表达细胞分泌。这也允许从培养生产细胞的培养基中直接收集表达的蛋白质。也可以使用本领域技术人员已知的其他前导/信号肽。

[0090] 在一些实施方案中,信号肽在通过内质网(endoplasmic reticulum,ER)之后被切割,即是可切割的信号肽。在一些实施方案中,限制性位点位于信号肽的羧基末端以促进切割。

[0091] 2. 标志物和表位标签

[0092] IL-6R α 结合蛋白还可以用标志物(例如DYKDDDDK(FLAG)表位、HA标签或cMyc标签或本领域中已知的其他表位标签、标志物和亲和标签)标记。这可以促进IL-6R α 结合蛋白的分离、纯化、定位和靶向结合。在一些实施方案中,标志物以GGG接头为侧翼。

[0093] 3. 接头

[0094] 在一些实施方案中,本公开内容的多肽包括肽接头(有时称为接头)。肽接头可分开本文中所述的任何肽结构域/区域。例如,接头可在信号肽和抗原结合结构域之间、抗原结合结构域的V_H和V_L之间、抗原结合结构域和肽间隔区之间、肽间隔区和跨膜结构域之间。肽接头可具有多种氨基酸序列中的任一种。结构域和区域可以通过一般具有柔性性质的肽接头连接,但不排除其他化学连接。接头可以是长度为约6至约40个氨基酸、或长度为约6至约25个氨基酸的肽。这些接头可以通过使用合成的编码接头的寡核苷酸偶联蛋白质来产生。

[0095] 可以使用具有一定柔性程度的肽接头。肽接头实际上可具有任何氨基酸序列,应记住合适的肽接头将具有产生一般柔性的肽的序列。使用小氨基酸(例如甘氨酸和丙氨酸)可用于产生柔性肽。这样的序列的产生对于本领域技术人员是常规的。

[0096] 合适的接头可以容易地选择并且可以是任何合适的不同长度,例如1个氨基酸(例如Gly)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸、或7个氨基酸至8个氨基酸,并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0097] 示例性柔性接头包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如(GS)_n、(GSGGS)_n和(GGGGS)_n,其中n为至少1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其他柔性接头。可以使用甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物;Gly和Ser二者都是相对未结构化的,并且因此可以用作组分之间的中性链。可以使用甘氨酸聚合物;甘氨酸比甚至丙氨酸获得显著更多的phi-psi空间,并且比具有更长侧链的残基限制得少得多。示例性间隔区可以包含氨基酸序列,包括但不限于GGSG、GGSGG、GSGSG、GSGGG、GGGSG、GSSSG等。

[0098] 4. 抗原结合域的修饰

[0099] 本公开内容的IL-6R α 结合蛋白的抗原结合结构域的可变区可以通过使V_H和/或V_LCDR区内的氨基酸残基突变来修饰,以改善蛋白质的一种或更多种结合特性(例如亲和

力)。术语“CDR”是指互补决定区,其基于分别由B细胞和T细胞产生的免疫球蛋白(抗体)和T细胞受体中的部分可变链,其中这些分子与其特异性抗原结合。由于在CDR中发现了与免疫球蛋白和T细胞受体相关的大部分序列变异,因此这些区域有时被称为高变区。可通过定点诱变或PCR介导的诱变来引入突变,并且可以在适当的体外或体内测定中评估对抗体结合或其他感兴趣的功能特性的作用。优选引入保守修饰并且通常改变CDR区内不超过一、二、三、四或五个残基。突变可以是氨基酸替换、添加或缺失。

[0100] 可以对IL-6R α 结合蛋白进行框架修饰以降低免疫原性,例如通过将一个或多个框架残基“回复突变”为相应的种系序列。

[0101] 还考虑通过将抗原结合结构域与结合相同抗原(多价)或不同抗原(多特异性)的VH和VL区对进行多聚化,抗原结合结构域可以是多特异性或多价的。

[0102] 本文中使用的术语“亲和力”是指两种试剂的可逆结合的平衡常数,并且表示为解离常数(K_d)。亲和力可以比抗体对无关氨基酸序列的亲和力大至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍或至少1000倍或更多(或其中可导出的任何范围)。本文中使用的术语“亲合力”是指在稀释之后两种或更多种试剂的复合物对解离的抗性。术语“免疫反应性”和“优先结合”在本文中关于抗体和/或抗原结合片段互换使用。

[0103] 术语“结合”是指由于例如共价、静电、疏水和离子和/或氢键相互作用(包括诸如盐桥和水桥的相互作用),两个分子之间的直接缔合。

[0104] 5.化学修饰

[0105] 另外,本公开内容的多肽可经化学修饰。可以改变多肽的糖基化,例如,通过修饰多肽序列内的一个或多个糖基化位点以提高多肽对抗原的亲和力(美国专利No.5,714,350和6,350,861)。

[0106] 本发明的多肽可以被聚乙二醇化以提高生物半衰期,通过在其中一个或多个PEG基团变得连接至多肽的条件下使多肽与聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG)或PEG的反应性酯或醛衍生物反应。多肽聚乙二醇化可通过与反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应进行。本文中使用的术语“聚乙二醇”旨在涵盖已用于衍生其他蛋白质的任何形式的PEG,例如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。用于使蛋白质聚乙二醇化的方法是本领域已知的,并且可以应用于本发明的多肽(EP 0 154 316和EP 0 401384)。

[0107] 另外,可通过将多肽与血清蛋白(例如人血清白蛋白)缀合或融合来化学修饰多肽,以提高所得到的分子的半衰期。这样的方法例如在EP0322094和EP 0 486 525中描述。

[0108] 本公开内容的多肽可与诊断剂或治疗剂缀合并可在诊断上使用,例如,以监测疾病的发展或进展并确定给定治疗方案的效力。多肽还可与治疗剂缀合以提供与多肽的治疗作用组合的治疗。诊断剂的一些实例包括酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射性材料、使用多种正电子发射断层摄影术的正电子发射金属和非放射性顺磁性金属离子。可检测物质可与多肽直接偶联或缀合,或者使用本领域已知的技术通过接头间接偶联或缀合。合适的酶的一些实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶。合适的辅基复合物的一些实例包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物

素。合适的荧光材料的一些实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白。发光材料的一个实例包括鲁米诺。生物发光材料的一些实例包括萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白。合适的放射性材料的一些实例包括¹²⁵I、¹³¹I、镭-111、镭-171、铋-212、铋-213、碲-211、铜-62、铜-64、铜-67、钇-90、碘-125、碘-131、磷-32、磷-33、钷-47、银-111、镓-67、镱-142、钆-153、铽-161、镱-166、铈-166、镱-186、钷-188、镱-189、铅-212、镭-223、镭-225、铁-59、硒-75、砷-77、铟-89、钼-99、铷-1105、钇-109、镱-143、铈-149、钆-169、铈-194、金-198、金-199和铅-211。螯合剂可通过助剂(amities) (Meares等, 1984 Anal. Biochem. 142:68-78); 氨基酸残基的巯基(Koyama 1994 Chem. Abstr. 120:217262t) 和碳水化合物基团(Rodwell等1986 PNAS USA 83:2632-2636; Quadri等1993 Nucl. Med. Biol. 20:559-570) 连接。

[0109] 多肽还可与治疗剂缀合以提供与多肽的治疗作用组合的治疗。

[0110] 另一些合适的缀合分子包括核糖核酸酶(RNA酶)、DNA酶I、反义核酸、抑制性RNA分子例如siRNA分子、免疫刺激性核酸、适体、核酶、形成三链体的分子和外部指导序列。适体是长度为15至50个碱基的小核酸, 其折叠成限定的二级和三级结构(例如尾环或G-四重体), 并且可以结合小分子(例如ATP(美国专利No. 5,631,146)和茶碱(美国专利No. 5,580,737)), 以及大分子(例如逆转录酶(美国专利No. 5,786,462)和凝血酶(美国专利No. 5,543,293))。核酶是能够分子内或分子间催化化学反应的核酸分子。核酶通常通过识别和结合靶底物伴随随后切割来切割核酸底物。形成三链体的功能性核酸分子可以通过形成三链体与双链或单链核酸相互作用, 其中三条DNA链形成依赖于Watson-Crick和Hoogsteen碱基配对的复合物。三链体分子可以以高亲和力和特异性结合靶区域。

[0111] 功能性核酸分子可用作靶分子所具有的特定活性的效应物、抑制剂、调节剂和刺激物, 或者功能性核酸分子可具有不依赖于任何其他分子的从头活性。

[0112] C. IL-6 α 结合蛋白的表达

[0113] IL-6 α 结合蛋白可以在多种细胞类型中表达。可以根据本领域已知的多种方法将编码IL-6 α 结合蛋白的表达构建体转染到细胞中。在一些实施方案中, IL-6 α 结合蛋白表达构建体可以在组成型启动子的控制下。在一些实施方案中, 它可以在仅在某些条件下驱动表达的可调节启动子的控制下。这可以仅在必要时提供IL-6 α 结合蛋白的表达以响应潜在有害的情况或期望通过IL-6 α 降低信号传导的情况(例如如, 当存在的细胞因子水平提高时)。为了实现这一点, 可以将IL-6 α 结合蛋白表达构建体置于响应于细胞因子(例如IL-6、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-8和IL-10)响应的启动子的控制下。IL-6 α 结合蛋白表达构建体也可以置于与T细胞活化相关的启动子的控制下, 例如受NFAT-1或NF- κ B控制的启动子, 这两者都是可以在T细胞活化之后被活化转录因子。控制IL-6 α 结合蛋白表达允许T细胞(例如肿瘤靶向T细胞)感知其周围环境并对T细胞本身和周围内源性免疫细胞中的细胞因子信号传导进行实时调节。

[0114] III. 核酸

[0115] 在某些实施方案中, 存在编码本文中所述的蛋白质、多肽或肽的重组多核苷酸。考虑的多核苷酸序列包括编码IL-6 α 结合蛋白和CAR的那些。

[0116] 本申请中使用的术语“多核苷酸”是指重组的或已分离的不含总基因组核酸的核酸分子。术语“多核苷酸”中包括寡核苷酸(长度为100个残基或更少的核酸)、重组载体, 包

括例如质粒、黏粒、噬菌体、病毒等。在某些方面,多核苷酸包括基本上从其天然存在的基因或蛋白质编码序列中分离出来的调控序列。多核苷酸可以是单链(编码链或反义链)或双链的,并且可以是RNA、DNA(基因组、cDNA或合成的)、其类似物,或其组合。另外的编码序列或非编码序列可以但不一定存在于多核苷酸内。

[0117] 在此方面,术语“基因”、“多核苷酸”或“核酸”用于指编码蛋白质、多肽或肽的核酸(包括合适的转录、翻译后修饰或定位所需的任何序列)。如本领域技术人员将理解的,该术语涵盖表达或可适合于表达蛋白质、多肽、结构域、肽、融合蛋白和突变体的基因组序列、表达盒、cDNA序列和更小的经工程化核酸区段。编码全部或部分多肽的核酸可包含编码全部或部分这样的多肽的连续核酸序列。还考虑了可通过包含具有轻微不同的核酸序列的变化,但是仍编码相同的或基本上相似的蛋白质的核酸来编码特定的多肽。

[0118] 在一些特定的实施方案中,存在并入了编码与IL-6R α 结合的多肽(例如抗体或其片段)之核酸序列的分离的核酸区段和重组载体。术语“重组”可与多肽或具体多肽的名称结合使用,并且其一般是指由已在体外操作的核酸分子或者是这样的分子的复制产物的核酸分子产生的多肽。

[0119] 不管编码序列自身的长度如何,核酸区段可与另一些核酸序列(例如启动子、多腺苷酸化信号、另外的限制性酶位点、多克隆位点、另一些编码区段等)组合,使得其总长度可以有很大变化。因此考虑了可使用几乎任何长度的核酸片段,其总长度优选受制备的方便性和在预期的重组核酸方案中应用的限制。在一些情况下,核酸序列可与另外的异源编码序列一起编码多肽序列,例如以允许纯化多肽、转运、分泌、翻译后修饰或治疗益处例如靶向或效力。如以上所讨论,可将标签或其他异源多肽添加至经修饰的多肽编码序列,其中“异源”是指与经修饰的多肽不同的多肽。

[0120] 在某些实施方案中,存在与本文公开的序列具有基本同一性的多核苷酸变体;与使用本文描述的方法(例如,使用标准参数的BLAST分析)提供的多核苷酸序列相比,包含至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或更高序列同一性的那些序列,包括其间的所有值和范围。在某些方面,分离的多核苷酸将包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽在序列的整个长度上与本文所述的氨基酸序列具有至少90%,优选95%及以上的同源性;或与所述分离的多核苷酸互补的核苷酸序列。

[0121] A. 载体

[0122] 可通过核酸分子编码多肽。核酸分子可以是核酸载体的形式。术语“载体”是用于指其中可以插入异源核酸序列用于引入到其可以被复制和表达的细胞中的载体核酸分子。核酸序列可以是“异源的”,这意味着核酸序列在对其中已引入载体的细胞或向其中掺入的核酸而言是外来的环境中,其包含与该细胞或该核酸的序列同源的但在宿主细胞或核酸内一般不被发现的位置中的序列。载体包括DNA、RNA、质粒、黏粒、病毒(噬菌体、动物病毒和植物病毒)以及人工染色体(例如,YAC)。本领域技术人员将通过标准重组技术(例如,Sambrook等,2001;Ausubel等,1996;二者均通过引用并入本文)熟练地构建载体。载体可用于宿主细胞中以产生结合IL-6R α 的抗体。

[0123] 术语“表达载体”是指包含编码能够被转录的基因产物的至少一部分的核酸序列的载体。在一些情况下,然后将RNA分子翻译为蛋白质、多肽或肽。表达载体可以包含多种“控制序列”,其是指在特定宿主生物体中转录并可以翻译有效连接的编码序列所需的核酸

序列。除了管理转录和翻译的控制序列之外,载体和表达载体也可包含还具有其他功能并且在本文中进行了描述的核酸序列。

[0124] “启动子”是控制序列。启动子通常是控制转录的起始和速率的核酸序列区域。其可包含调节蛋白和分子(例如RNA聚合酶和其他转录因子)可结合在其上的遗传元件。短语“有效地设置”、“有效地连接”、“在控制下”和“在转录控制下”意指启动子对于核酸序列处在正确功能位置和/或取向中以控制该序列的转录起始和表达。启动子可以与“增强子”联合使用或者可不与“增强子”联合使用,“增强子”是指参与核酸序列的转录激活的顺式作用调控序列。

[0125] 编码序列的有效翻译也可需要特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子或邻近序列。可能需要提供包括ATG起始密码子的外源翻译调控信号。本领域普通技术人员将能够容易地对此进行确定并提供所需信号。

[0126] 载体可包含多克隆位点(multiple cloning site,MCS),其是包含多个限制酶位点的核酸区域,其中任一个可以与标准重组技术结合使用来消化载体(参见Carbonelli等,1999,Levenson等,1998和Coccea,1997,其通过引用并入本文)。

[0127] 大多数转录的真核生物RNA分子将经历RNA剪接以从初级转录物除去内含子。包含基因组真核序列的载体可需要供体和/或受体剪接位点以确保正确处理转录物用于蛋白质表达。(参见Chandler等,1997,其通过引用并入本文。)

[0128] 载体或构建体一般包含至少一种终止信号。“终止信号”或“终止子”由通过RNA聚合酶参与RNA转录物的特异性终止的DNA序列构成。因此,在某些实施方案中,考虑了结束RNA转录物产生的终止信号。终止子可能是在体内达到期望信使水平所必需的。在真核生物系统中,终止子区域还可包含特异性DNA序列,该序列允许新转录物的位点特异性切割以暴露多腺苷酸化位点。其发出信号使特化的内源聚合酶将一段约200个A残基(polyA)的序列添加至转录物的3'末端。用这种聚A尾部修饰的RNA分子似乎更稳定并且更有效地翻译。因此,在涉及真核生物的另一一些实施方案中,优选地,终止子包含用于RNA切割的信号,并且更优选地,终止子信号促进信使的多腺苷酸化。

[0129] 在表达中,特别是在真核生物表达中,通常将包含多腺苷酸化信号以实现转录物合适的多腺苷酸化。

[0130] 为了在宿主细胞中增殖载体,其可包含一个或更多个复制起始位点(一般被称为“ori”),其是在此处起始复制的特异性核酸序列。或者,如果宿主细胞是酵母,则可使用自主复制序列(ARS)。

[0131] B. 宿主细胞

[0132] 如本文中所用,术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用。所有这些术语也包括其子代,即任何和所有的后代。应理解的是由于有意或无意的突变,所有子代可能不相同。在表达异源核酸序列的情况中,“宿主细胞”是指原核或真核细胞,其包括能够复制载体或表达载体编码的异源基因的任何可转化生物体。宿主细胞可以并已经用作载体或病毒的接受者。宿主细胞可以是“经转染的”或“经转化的”,这是指通过其将外源核酸(例如编码重组蛋白的序列)转移或引入宿主细胞中的过程。经转化的细胞包括原代对象细胞及其子代。

[0133] 一些载体可使用允许其在原核细胞和真核细胞两者中复制和/或表达的控制序

列。本领域技术人员将进一步了解孵育所有上述宿主细胞以维持它们并且使载体复制的条件。也了解并知晓允许大规模生产载体以及生产由载体编码的核酸及其同源多肽、蛋白质或肽的技术和条件。

[0134] C. 表达系统

[0135] 存在许多表达系统,其包含至少部分或全部上述组合物。基于原核生物和/或真核生物的系统可用于与实施方案一起使用以产生核酸序列或其同源多肽、蛋白质和肽。许多这样的系统是商业化和广泛可用的。

[0136] 昆虫细胞/杆状病毒系统可产生高水平的异源核酸片段的蛋白质表达,如美国专利5,871,986、4,879,236中所述,二者均通过引用并入本文,并且其可以从例如 **INVITROGEN®** 和 **BACPACK™ BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM FROM CLONTECH®** 以名称 **MAXBAC® 2.0** 购买。

[0137] 除了公开的表达系统之外,表达系统的另一些实例包括 **STRATAGENE®** 的 **COMPLETE CONTROL™** 诱导型哺乳动物表达系统,其涉及合成的蜕皮激素诱导型受体,或其 pET 表达系统、大肠杆菌表达系统。诱导型表达系统的另一个实例可从 **INVITROGEN®** 获得,其携带 T-REX™ (四环素调节的表达) 系统,该系统是使用全长 CMV 启动子的诱导型哺乳动物表达系统。**INVITROGEN®** 还提供被称为甲醇毕赤酵母表达系统的酵母表达系统,该系统设计用于在甲基营养酵母甲醇毕赤酵母中高水平生产重组蛋白。本领域技术人员将知道如何表达载体(例如表达构建体),以产生核酸序列或其同源多肽、蛋白质或肽。

[0138] D. 基因转移方法

[0139] 据信,用于实现组合物表达的核酸递送的合适方法被认为实际上包括可以将核酸(例如,DNA,包括病毒和非病毒载体)引入细胞、组织或生物体的任何方法,如本文所述或如本领域普通技术人员已知的。这样的方法包括但不限于直接递送DNA,例如通过注射(美国专利5,994,624、5,981,274、5,945,100、5,780,448、5,736,524、5,702,932、5,656,610、5,589,466和5,580,859,其各自通过引用并入本文),包括显微注射(Harland和Weintraub, 1985;美国专利5,789,215,其通过引用并入本文);通过电穿孔(美国专利No.5,384,253,其通过引用并入本文);通过磷酸钙沉淀(Graham和Van Der Eb, 1973;Chen和Okayama, 1987;Rippe等, 1990);通过使用DEAE葡聚糖,然后使用聚乙二醇(Gopal, 1985);通过直接声波加载(Fechheimer等, 1987);通过脂质体介导的转染(Nicolau和Sene, 1982;Fraley等, 1979;Nicolau等, 1987;Wong等, 1980;Kaneda等, 1989;Kato等, 1991);通过微粒轰击(PCT中请No.WO 94/09699和95/06128;美国专利5,610,042;5,322,783、5,563,055、5,550,318、5,538,877和5,538,880,并且其各自通过引用并入本文);通过与碳化硅纤维搅拌(Kaeppler等, 1990;美国专利5,302,523和5,464,765,其各自通过引用并入本文);通过农杆菌介导的转化(美国专利5,591,616和5,563,055,其各自通过引用并入本文);或通过PEG介导的原生质体的转化(Omirulלה等, 1993;美国专利4,684,611和4,952,500,其各自通过引用并入本文);通过干燥/抑制介导的DNA摄取(Potrykus等, 1985)。通过应用诸如这些的技术,细胞器、细胞、组织或生物体可以被稳定或瞬时转化。另一些方法包括病毒转导,例如通过慢病毒或逆转录病毒转导的基因转化。

[0140] E. IL-6Rα结合蛋白表达构建体

[0141] 在一些实施方案中, IL-6R α 结合蛋白由具有以下结构的表达构建体编码: 鼠5' - IgG κ 前导序列-FLAG标签-V_L-scFv接头-V_H3'。以下DNA序列编码这样的构建体(下划线序列是鼠IgG kappa前导序列和scFv接头序列):

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCA
CAGGTGACGGAGGCAGCGACTATAAAGATGACGATGACAAAGGAGGTAGCGAT
ATACAAATGACTCAATCACCTTCCTCACTTTCCGCCAGCGTGGGTGATCGAGTGA
[0142] CCATCACATGCCGCGCTTCACAGGACATCTCCTCTTACCTGAACTGGTACCAGCA
GAAACCCGGGAAAGCCCCAAAGCTGTTGATCTACTATACATCAAGACTGCACTCT
GGCGTCCCCCTCTAGGTTCAAGTGGATCTGGCTCAGGTACTGACTTCACGTTCACCTA
TTTCCAGCCTGCAGCCGGAAGATATTGCTACCTACTATTGTCAGCAGGGAAATAC

[0143]

CCTCCCATATACCTTTGGGCAGGGGACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACGGTAGC
TGCTCCGTCAGTGTTTCATCTTTCCACCTTCAGATGAGCAGCTGAAGTCCGGAACC
GCCAGTGTGGTGTGCCTCCTGAATAACTTTTATCCACGAGAAGCCAAGGTGCAGT
GGAAAGTGGATAACGCTTTTGCAAAGTGGCAATTCTCAAGAGAGCGTAACTGAGC
AAGATAGCAAGGACAGTACTTACAGCTTGAGCAGCACGCTGACCCTGAGCAAGG
CCGATTACGAGAAACACAAGGTGTATGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTTA
GCTCACCTGTGACCAAGTCCTTCAACAGAGGCGAGTGTGGCAGCACCTCCGGCA
GCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCAGCACCAAGGGCGAGGTCCAACTGCAG
GAAAGCGGTCCAGGCTTGGTGAGACCATCCCAGACCCTGAGCCTCACCTGTACC
GTGTCCGGGTACAGTATCACCTCCGACCATGCATGGTCCTGGGTGCGCCAGCCTC
CCGGAAGAGGTCTGGAATGGATCGGGTATATCTCCTACTCAGGAATCACCACCTA
CAATCCCTCCCTTAAGTCAAGGGTGACTATGCTCCGCGATACATCCAAAAATCAG
TTCTCCCTTCGGTTGTCAAGTGTTACAGCCGCCGACACCGCAGTCTACTACTGTGC
AAGGAGCCTCGCCAGGACGACTGCAATGGATTATTGGGGCCAGGGCTCCCTGGT
GACTGTCAGCAGCGCCTCAACAAAGGGCCCATCTGTTTTTCCACTTGCCCCAAGC
TCTAAAAGTACCTCAGGAGGAACCGCTGCCCTCGGGTGCCTCGTCAAAGATTACT
TTCCAGAACCCGTTACAGTGTCTTGGAACTCCGGAGCTCTTACCTCCGGGGTGCA
TACATTCCCCGGCCGTTCTTCAAAGCTCTGGACTCTACTCCCTGAGCTCCGTTGTGA
CAGTTCCTAGCAGCAGCCTCGGCACCCAGACATACATCTGCAACGTAAACCACA
AGCCTTCAAACACTAAAGTGGACAAAAAAGTGGAAACCGAAGTCCTGTGACAAAA
CTCACACATGCCCTCCGTGCCCTGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGGCCATCCGTATT
TCTCTTCCCTCCAAAGCCAAAGGATACCCTCATGATCAGCCGGACGCCCCAAGTG
ACCTGCGTTCGTAGTGGATGTGAGTCACGAGGACCCAGAGGTAAAGTTCAACTGG
TACGTAGACGGCGTGGAGGTCCATAATGCGAAGACGAAACCCAGAGAGGAGCA
GTACAACTCAACTTACAGAGTGGTCAGCGTGCTCACTGTCTCCACCAGGACTGG
TTGAACGGCAAAGAATATAAGTGTAAGGTGAGCAATAAGGCCCTCCCCGCCCT
ATCGAGAAAACCTATTTCCAAGGCTAAAGGCCAGCCTCGAGAACCTCAGGTTTAC
AACTGCCTCCTAGCCGCGATGAACTGACAAAAAATCAGGTGAGTCTCACCTGC
CTCGTTAAAGGTTTCTACCCTTCAGATATCGCAGTCGAGTGGGAGAGCAACGGGC
AGCCGGAAAATAACTATAAGACCACCCCCCAGTCCTTGACAGTGACGGCTCTTT
CTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAATCTAGGTGGCAGCAAGGAAATGTT

TTTAGTTGTTCTGTAATGCACGAGGCTCTGCATAATCATTATACCCAAAAGTCTTT
GTCCCTCTCCCCCGGC (SEQ ID NO:89)

[0144] IV. 细胞

[0145] A. 细胞类型

[0146] 某些实施方案涉及包含本公开的多肽或核酸的细胞。在一些实施方案中,细胞是免疫细胞或T细胞。“T细胞”包括表达CD3的所有类型的免疫细胞,包括T辅助细胞(CD4⁺细胞)、细胞毒性T细胞(CD8⁺细胞)、T调节细胞(T_{reg})、抑制性T细胞和 γ - δ T细胞。“细胞毒性细胞”包括CD8⁺T细胞、自然杀伤(NK)细胞和嗜中性粒细胞,这些细胞能够介导细胞毒性反应。在一些实施方案中,细胞是祖细胞或干细胞。在一些实施方案中,祖细胞或干细胞在体外分化成免疫细胞。在一些实施方案中,细胞是离体的。术语免疫细胞包括免疫系统的细胞,其参与保护身体免受传染病和外来物质的侵害。免疫细胞可包括例如嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、自然杀伤细胞、淋巴细胞(例如B细胞和T细胞),以及单核细胞。

[0147] 合适的哺乳动物细胞包括原代细胞和永生化细胞系。合适的哺乳动物细胞系包括人细胞系、非人灵长类动物细胞系、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠)细胞系等。合适的哺乳动物细胞系包括但不限于HeLa细胞(例如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC) No. CCL-2)、CHO细胞(例如ATCC Nos. CRL9618、CCL61、CRL9096)、人胚肾(HEK) 293细胞(例如ATCC No. CRL-1573)、Vero细胞、NIH 3T3细胞(例如ATCC No. CRL-1658)、Huh-7细胞、BHK细胞(例如ATCC No. CCL10)、PCI2细胞(ATCC No. CRL1721)、COS细胞、COS-7细胞(ATCC No. CRL1651)、RAT1细胞、小鼠L细胞(ATCC No. CCL1.3)、HLHepG2细胞、Hut-78、Jurkat、HL-60、NK细胞系(例如NKL、NK92和YTS)等。

[0148] 在一些情况下,细胞不是永生化细胞系,而是从个体获得的细胞(例如,原代细胞)。例如,在一些情况下,细胞是从个体获得的免疫细胞。例如,细胞是从个体获得的T淋巴细胞。作为另一个实例,细胞是从个体获得的细胞毒性细胞。作为另一个实例,细胞是从个体获得的干细胞或祖细胞。

[0149] B. 过继性细胞治疗

[0150] 在一些实施方案中,本文公开的细胞用于过继性细胞治疗或过继性细胞转化,其涉及向对象施用治疗细胞。该治疗可包括施用肿瘤浸润性淋巴细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、辅助性T(Th)细胞和Treg细胞,以及其他免疫细胞和其他类型的细胞。治疗细胞可以源自患者或供体。在一些实施方案中,从患者中提取细胞,进行遗传修饰并在体外培养并返回同一患者。

[0151] 本文公开的细胞可以向对象施用以治疗例如癌症、自身免疫性疾病、感染和炎症病症。在一些实施方案中,过继性T细胞治疗中使用的细胞表达IL-6R α 结合蛋白可以降低或消除过继性T细胞治疗可能发生的副作用,例如细胞因子释放综合征和涉及IL-6通过IL-6R α 进行信号转导的其他炎症或自身免疫病症。此外,IL-6R α 结合蛋白与治疗性T细胞结合施用可以消除、降低或减轻过继性T细胞治疗的副作用。

[0152] 1. 嵌合抗原受体

[0153] a. 在过继性细胞治疗中的用途

[0154] 在一些实施方案中,过继性细胞治疗中使用的治疗细胞表达嵌合抗原受体(CAR)。CAR是融合蛋白,通常由细胞外抗原结合结构域(其可能是scFv)、细胞外间隔区、跨膜结构域、共刺激信号区域(其数量根据特定CAR设计而变化),以及CD3-zeta信号传导结构域/内结构域组成。可以通过本领域已知的多种方法将包括T细胞和自然杀伤(NK)细胞的免疫细胞工程化以表达CAR,包括病毒转导、DNA核转染和RNA核转染。与抗原靶标结合的CAR可以激活表达CAR的人T细胞,这可能导致杀死携带抗原或一些其他免疫应答的细胞。

[0155] 在一些实施方案中,细胞包含癌症特异性CAR。在CAR的背景下,术语“癌症特异性”是指对癌症特异性分子(例如癌症特异性抗原)具有抗原结合特异性的CAR。在一些实施方案中,癌症特异性CAR在具有对另一个靶标(例如TGF- β CAR)特异的CAR的细胞中。在一些实施方案中,癌症特异性CAR和另一种CAR在分开的多肽上。在一些实施方案中,CAR是双特异性CAR,其与癌症特异性分子和另一种抗原(例如TGF- β)具有抗原结合。例如,双特异性CAR可具有信号肽、癌症分子特异性scFv、任选地肽接头/间隔区、然后是结合另一抗原的scFv、然后是间隔区、跨膜结构域和共刺激结构域。在一些实施方案中,双特异性CAR包含本文所述的一种或更多种另外的肽片段。

[0156] 在一些实施方案中,本公开的CAR可包含CD20scFv。示例性的CD20scFv包含以下序列:

DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGV
PARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKGSTSGGGSG
[0157] GSGGGGSSEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHVWKQTPGQGLE
WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYY
GSSYWFFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:12)。

[0158] 在一些实施方案中,本公开的CAR可包含CD19scFv。示例性的CD19scFv包含以下序列:

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGV
PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPG
[0159] SGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG
VIWGSETTYYNALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYA

[0160] MD YWGQGSVTVSS (SEQ ID NO:13)。在一些实施方案中,抗CD19CAR由具有以下结构的DNA构建体编码:GM-CSF信号肽-HA标签-CD19scFv-IgG4铰链-CD28tm-4-1BB共刺激结构域-CD3 ζ 。该结构具有以下序列:

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCCTTTC
[0161] TGCTGATCCCCGGCGGAAGTTACCCATATGACGTTCCCGACTACGCTGGCGACAT
CCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACCGGGTGAC

[0162]

CATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCA
GAAGCCCGACGGCACC GTCAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAG
CGGCGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGAC
CATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGCAA
CACACTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAATCACCGGCAGCAC
CTCCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCAGCACCAAGGGCGAGGTGA
AGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGA
CCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCC GACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGC
AGCCCCCAGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCA
CCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCA
AGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCT
ACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGG
GCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGCGAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCC
CCCCTTGCCCTATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTCGGAGGCGTGCTGGCCTGCTA
CAGCCTGCTGGTCAACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAACGGGGCAGAAAG
AAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAG
AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAAC
TGCGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGA
ATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAAGGAAGAGTACGACGTCCTGG
ATAAGCGGAGAGGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAAC
CCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTAC
AGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCT
GTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCA
GGCCCTGCCCCCAAGG (SEQ ID NO:88).

[0163] 可以被CAR靶向的其他癌症特异性分子(除了CD19和CD20之外)可以包括CAIX、CD33、CD44v7/8、CEA、EGP-2、EGP-40、erb-B2、erb-B3、erb-B4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、Her2/neu、IL-13R-a2、KDR、k-轻链、LeY、L1细胞黏附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、NKG2D配体、癌胚抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、由mAb IgE、TAG-72和VEGF-R2靶向的TAA。在一些实施方案中,癌症特异性分子包含Her2。

[0164] b. 信号肽

[0165] 在一些实施方案中,CAR包括信号肽,其指导蛋白质在细胞内,例如特定细胞器官(例如内质网)和/或细胞表面的转运和定位。信号肽引导新生蛋白进入内质网。如果要将受体糖基化并锚定在细胞膜中,这是必要的。一般来说,使用天然附着于氨基末端大部分组分的信号肽(例如在具有定向轻链-接头-重链的scFv中,使用轻链的天然信号)。在一些实施方案中,信号肽具有以下序列:METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO:14)、MLLVTSLLLCELPHPAFLIPDT (SEQ ID NO:15) 或MGTSLLCWMALCLLGADHADG (SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,信号肽在内质网(ER)通过后被切割,即是可切割的信号肽。在一些实施方案中,限制性位点位于信号肽的羧基末端以促进切割。

[0166] c. 抗原结合结构域

[0167] CAR的抗原结合结构域是抗原结合蛋白,例如基于针对靶抗原的抗体的单链可变片段(scFv)。可以对抗原结合结构域进行框架修饰以降低免疫原性,例如,通过将一个或多个框架残基“回复突变”到相应的种系序列。还考虑抗原结合结构域可以是多特异性或多价的,通过将抗原结合结构域与结合相同抗原(多价)或不同抗原(多特异性)的V_H和V_L区对多聚化。

[0168] d. 肽间隔物

[0169] 间隔区连接CAR的抗原结合结构域与跨膜结构域。它应该是足够柔性的,以允许抗原结合结构域在不同方向上定向,以促进抗原识别。最简单的形式是来自IgG的铰链区。替代方案包括免疫球蛋白的CH₂CH₃区和CD3的一部分。在一些实施例中,CH₂CH₃区可具有L235E/N297Q或L235D/N297Q修饰,或者CH₂CH₃区的至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性。对于大多数基于scFv的构建体,IgG铰链就足够了。然而,最好的间隔物常常必须凭经验确定。在一些实施例中,间隔物来自IgG4。

[0170] 如本文使用的,术语“铰链”指对侧翼多肽区提供结构柔性和间隔的柔性多肽连接子区(本文也称为“铰链区”或“间隔物”),并且可由天然或合成多肽组成。源自免疫球蛋白(例如IgG1)的“铰链”一般定义为从人IgG1的Glu216延伸到Pro230(Burton(1985)Molec.Immunol.,22:161-206)。通过将形成重链间二硫(S-S)键的第一个和最后一个半胱氨酸残基置于相同的位置,可将其他IgG同种型的铰链区与IgG1序列进行比对。铰链区可以为天然存在的或非天然存在的,包括但不限于改变的铰链区,如美国专利No.5,677,425中所述。铰链区可包括源自与CH₁结构域的那种不同类别或亚类的抗体的完整铰链区。术语“铰链”还可包括源自CD8和其他受体的区域,其在对侧翼区提供柔性和间隔中提供了类似功能。

[0171] 肽间隔物可具有至少、至多、或正好4、5、6、7、8、9、10、15、16、17、18、19、20、20、25、30、35、40、45、50、75、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、260、270、280、290、300、325、350或400个氨基酸(或其中任何可衍生的范围)。在一些实施例中,肽间隔物由来自免疫球蛋白的铰链区组成或包含来自免疫球蛋白的铰链区。免疫球蛋白铰链区氨基酸序列是本领域已知的;参见例如Tan等(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:162;和Huck等(1986)Nucl.Acids Res。

[0172] 肽间隔物的长度可对靶抗原的响应和/或扩增性质具有影响。在一些实施例中,例如小于50、45、40、30、35、30、25、20、15或10个氨基酸的较短间隔物可具有降低有效激活应答反应所需的靶抗原浓度的优点。在一些实施例中,较长的间隔物(例如至少50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、260、270、280或290个氨基酸的间隔物)可具有在体内或体外增加扩增的优点。

[0173] 作为非限制性例子,免疫球蛋白铰链区可包括下述氨基酸序列之一:DKTHT (SEQ

ID NO:17);CPPC(SEQ ID NO:18);CPEPKSCDTPPPCPR(SEQ ID NO:19);ELKTPLGDTTHT(SEQ ID NO:20);KSCDKTHTCP(SEQ ID NO:21);KCCVDCP(SEQ ID NO:22);KYGPPCP(SEQ ID NO:23);EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:24)(人IgG1铰链);ERKCCVECPCP(SEQ ID NO:25)(人IgG2铰链);ELKTPLGDTTHTCPRCP(SEQ ID NO:26)(人IgG3铰链);SPNMVPHAHHAQ(SEQ ID NO:27);ESKYGPPCPPCP(SEQ ID NO:28)或ESKYGPPCPSCP(SEQ ID NO:29)(基于人IgG4铰链)等等。

[0174] 铰链区可包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4铰链区的氨基酸序列。与野生型(天然存在的)铰链区相比,铰链区可包括一个或多个氨基酸取代和/或插入和/或缺失。例如,人IgG1铰链的His229可被Tyr取代,使得铰链区包含序列EPKSCDKTYTCPPCP(SEQ ID NO:30)。

[0175] 铰链区可包含源自人CD8的氨基酸序列;例如铰链区可包含氨基酸序列:TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(SEQ ID NO:31)或其变体。

[0176] e.跨膜结构域

[0177] CAR的跨膜结构域是跨越膜的疏水性 α 螺旋。一般地,使用来自胞内结构域的最近侧膜组分的跨膜结构域。不同的跨膜结构域导致不同的受体稳定性。

[0178] 跨膜结构域介于肽间隔物和胞内结构域之间。在一些实施例中,跨膜结构域介于肽间隔物和共刺激区之间。在一些实施例中,接头位于跨膜结构域和共刺激区或胞内结构域之间。

[0179] 提供将多肽插入真核(例如哺乳动物)细胞的细胞膜内的任何跨膜结构域都适合于使用。作为一个非限制性实例,可使用跨膜序列IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC(SEQ ID NO:32)。在一些实施例中,跨膜结构域是CD8 β 来源的:LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC(SEQ ID NO:33);CD4来源的:ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRC(SEQ ID NO:34);CD3 ζ 来源的:LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV(SEQ ID NO:35);CD28来源的:WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV(SEQ ID NO:36);CD134(OX40)来源的:VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL(SEQ ID NO:37);或CD7来源的:ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA(SEQ ID NO:38)。

[0180] f.胞内结构域

[0181] 在抗原识别后,受体簇和信号通过胞内结构域和/或共刺激结构域传递到细胞。在一些实施例中,本文所述的共刺激结构域是胞内结构域的一部分。最常用的胞内结构域组分是CD3- ζ ,其含有3个ITAM。这在抗原结合后向T细胞传递激活信号。CD3- ζ 可能不提供完全胜任的激活信号,并且需要额外的共刺激信号传导。例如,嵌合CD28和OX40可与CD3- ζ 一起使用以传递增殖/存活信号,或者所有三者可一起使用。

[0182] 适用于CAR中的其他胞内结构域包括任何所期望的信号传导结构域,其响应于通过抗原与抗原结合结构域结合的激活而提供不同且可检测的信号(例如,通过细胞提高的一种或更多种细胞因子的产生;靶基因转录的变化;蛋白质活性的变化;细胞行为的变化,例如细胞死亡;细胞增殖;细胞分化;细胞存活;细胞信号传导应答的调节等)。在一些实施方案中,胞内结构域包括至少一个(例如一个、两个、三个、四个、五个、六个等)如本文所述的ITAM基序。在一些实施方案中,胞内结构域包括DAP10/CD28型信号传导链。

[0183] 适用于CAR的胞内结构域包括含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的胞内信号传导多肽。ITAM基序是YX₁X₂(L/I),其中X₁和X₂独立地为任何氨基酸(SEQ ID NO:39)。在一些情况下,胞内结构域包含1、2、3、4或5个ITAM基序。在一些情况下,ITAM基序在胞

内结构域中重复两次,其中ITAM基序的第一和第二个实例彼此由6至8个氨基酸分开,例如 $(YX_1X_2(L/I)) (X_3)_n (YX_1X_2(L/I))$,其中n是6至8的整数,并且6至8个 X_3 各自可以为任何氨基酸(SEQ ID NO:40)。

[0184] 合适的胞内结构域可以为源自包含ITAM基序的多肽的含ITAM基序的部分。例如,合适的胞内结构域可以为来自任何包含ITAM基序蛋白质的包含ITAM基序的结构域。因此,合适的胞内结构域无需包含它源自其的完整蛋白质的完整序列。合适的含ITAM基序多肽的实例包括但不限于:DAP12;FCER1G(Fcε受体I γ链);CD3D(CD3δ);CD3E(CD3ε);CD3G(CD3γ);CD3Z(CD3ζ);和CD79A(抗原受体复合物相关蛋白α链)。

[0185] 在一些情况下,胞内结构域源自DAP12(也被称为TYROBP;TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白;KARAP;PLOS;DNAX-激活蛋白12;KAR相关蛋白;TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白;杀伤激活受体相关蛋白;杀伤激活受体相关蛋白等)。例如,合适的胞内结构域多肽可包含与以下具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLI

ALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKORITETESPYOELGORSVDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO: 41) ;

[0186] MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLI

ALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKORITETESPYOELGORSVDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO: 42) ;

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLI

ALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKORITETESPYOELGORSVDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO: 43) ; 或

[0187] MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLI

ALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKORITETESPYOELGORSVDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO: 44) 。

[0188] 在一些实施方案中,合适的胞内结构域多肽可包含全长DAP12氨基酸序列的包含ITAM基序的部分。因此,合适的胞内结构域多肽可包含与ESPYOELGORSVDVYSDLNT0(SEQ ID NO:45)具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0189] 在一些实施方案中,胞内结构域源自FCER1G(也被称为FCRG;Fcε受体I γ链;Fc受体 γ链;fc-εR1- γ;fcR γ;fceRI γ;高亲和力免疫球蛋白ε受体亚基 γ;免疫球蛋白E受体,高亲和力, γ链等)。例如,合适的胞内结构域多肽可包含与MTPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLLKIQRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYLKHEKPPQ(SEQ ID NO:46)具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0190] 在一些实施方案中,合适的胞内结构域多肽可以包含全长FCER1G氨基酸序列的包

含ITAM基序的部分。因此,合适的胞内结构域多肽可包含与DGVYTGLSTRNOETYETLKHE (SEQ ID NO:47) 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0191] 在一些实施方案中,胞内结构域源自T细胞表面糖蛋白CD3 δ 链(也被称为CD3D; CD3- δ ; T3D; CD3抗原, δ 亚基; CD3 δ ; CD3d抗原, δ 多肽(TiT3复合物); OKT3, δ 链; T细胞受体T3 δ 链; T细胞表面糖蛋白CD3 δ 链; 等)。例如,合适的胞内结构域多肽可以包含与下述氨基酸序列(2种同种型)中任一种的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110个aa至约115个aa、约115个aa至约120个aa、约120个aa至约130个aa、约130个aa至约140个aa、约140个aa至约150个aa、或约150个aa至约170个aa的连续段具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLD
LGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLL
LALGVFCFAGHETGRLSGAADTOALLRNDOVYOPLRDRDDAOYSHLGGNWARNK (SEQ

[0192] ID NO: 48) 或
MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLD
LGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVOVHYRTADTOALLRNDOVYOPLRDRDDAQ
YSHLGGNWARNK (SEQ ID NO: 49)。

[0193] 在一些实施方案中,合适的胞内结构域多肽可包含全长CD3 δ 氨基酸序列的包含ITAM基序的部分。因此,合适的胞内结构域多肽可以包含与DOVYOPLRDRDDAOYSHLGGN (SEQ ID NO:50) 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0194] 在一些实施方案中,胞内结构域源自T细胞表面糖蛋白CD3链(也被称为CD3e、T细胞表面抗原T3/Leu-4链、T细胞表面糖蛋白CD3链、AI504783、CD3、CD3、T3e等)。例如,合适的胞内结构域多肽可以包含与下述氨基酸序列的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110个aa至约115个aa、约115个aa至约120个aa、约120个aa至约130个aa、约130个aa至约140个aa、约140个aa至约150个aa、或约150个aa至约205个aa的连续段具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEI
LWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLY
LRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVEYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAG
GRQRGQNKERPPVPNPDIYEPIRKGQRDLYSGLNQRR (SEQ ID NO: 51)。

[0195] 在一些实施方案中,合适的胞内结构域多肽可以包含全长CD3氨基酸序列的包含ITAM基序的部分。因此,合适的胞内结构域多肽可以包含与NPDIYEPIRKGQRDLYSGLNQR (SEQ ID NO:52) 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0196] 在一些实施方案中,胞内结构域源自T细胞表面糖蛋白CD3 γ 链(也被称为CD3G、T细胞受体T3 γ 链、CD3-GAMMA、T3G、 γ 多肽(TiT3复合物)等)。例如,合适的胞内结构域多肽

可以包含与下述氨基酸序列的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110个aa至约115个aa、约115个aa至约120个aa、约120个aa至约130个aa、约130个aa至约140个aa、约140个aa至约150个aa、或约150个aa至约180个aa的连续段具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

MEQKGGLAVLILAILLLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFK
DGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNA
[0197] ATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGODGVROSASDKOTLLPNDOLYOPLKDREDDQ
YSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO: 53)。

[0198] 在一些实施方案中,合适的胞内结构域多肽可以包含全长CD3 γ 氨基酸序列的包含ITAM基序的部分。因此,合适的胞内结构域多肽可以包含与DOLYOPLKDREDDOYSHLOGN (SEQ ID NO: 54) 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0199] 在一些实施方案中,胞内结构域源自T细胞表面糖蛋白CD3 ζ 链(也被称为CD3Z、T细胞受体T3 ζ 链、CD247、CD3- ζ 、CD3H、CD3Q、T3Z、TCRZ等)。例如,合适的细胞内信号传导结构域多肽可以包含与下述氨基酸序列(2种同种型)中任一种的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110个aa至约115个aa、约115个aa至约120个aa、约120个aa至约130个aa、约130个aa至约140个aa、约140个aa至约150个aa、或约150个aa至约160个aa的连续段具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELO
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYOGGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID
[0200] NO: 55) 或
MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
OKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYOGGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ
ID NO: 56) 。

[0201] 在一些实施方案中,合适的胞内结构域多肽可以包含全长CD3 ζ 氨基酸序列的包含ITAM基序的部分。因此,合适的胞内结构域多肽可以包含与下述氨基酸序列中的任一种具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

RVKFSRSADAPAYQQGONOLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPO
EGLYNELOKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYOGGLSTATKDTYDALHMQALP PR
[0202] (SEQ ID NO: 82) ; NOLYNELNLGRREEYDVLDKR (SEQ ID NO: 57) ;
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK (SEQ ID NO: 58) ; 或
DGLYOGGLSTATKDTYDALHMO (SEQ ID NO: 59) 。

[0203] 在一些实施方案中,胞内结构域源自CD79A(也被称为B细胞抗原受体复合物相关

蛋白 α 链;CD79a抗原(免疫球蛋白相关 α);MB-1膜糖蛋白;ig- α ;膜结合免疫球蛋白相关蛋白;表面IgM相关蛋白;等)。例如,合适的胞内结构域多肽可以包含与下述氨基酸序列(2种同种型)中任一种的约100个氨基酸至约110个氨基酸(aa)、约110个aa至约115个aa、约115个aa至约120个aa、约120个aa至约130个aa、约130个aa至约150个aa、约150个aa至约200个aa、或约200个aa至约220个aa的连续段具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPH
 NSSNNANVTWWRVLHGNYTWPEFLGPGEDPNGTLIIQNVNKS HGGIYVCRVQEGN
 ESYQQSCGTYLVRVQPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCVVPGTLLLFRKRWO
 NEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLOGTYQDVGSLNIGDVQLEKP (SEQ
 [0204] ID NO: 60) ; 或
 MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPH
 NSSNNANVTWWRVLHGNYTWPEFLGPGEDPNEPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGIIL
 LFCVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYE
 DISRGLQGTYYQDVGSLNIGDVQLEKP (SEQ ID NO: 61)。

[0205] 在一些实施方案中,合适的胞内结构域多肽可以包含全长CD79A氨基酸序列的包含ITAM基序的部分。因此,合适的胞内结构域多肽可以包含与下述氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列:ENLYEGLNLDDCSMYEDISRG (SEQ ID NO:62)。

[0206] 在一些实施方案中,合适的胞内结构域可以包含DAP10/CD28型信号传导链。DAP10信号传导链的实例是氨基酸序列:RPRRSPAQDGKVIYNMPGRG (SEQ ID NO:63)。在一些实施方案中,合适的胞内结构域包含与氨基酸序列RPRRSPAQDGKVIYNMPGRG (SEQ ID NO:64)的全长具有至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0207] CD28信号传导链的实例是氨基酸序列FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFi IFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:65)。在一些实施方案中,合适的胞内结构域包含与氨基酸序列FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFi IFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:66)的全长具有至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0208] 适用于本公开的多肽中的其他胞内结构域包括ZAP70多肽,例如包含与下述氨基酸序列的约300个氨基酸至约400个氨基酸、约400个氨基酸至约500个氨基酸,或约500个氨基酸至619个氨基酸的连续段具有至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

MPDPAAHLPPFFYGSIS

RAEAEHLKLAGMADGLFLLRQCLRSLLGGYVLSLVHDVRFHHFPIERQLNGTYAIAG

GKAHCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLRKPCNRPSGLEPQPGVFDCLRDAMVRDYVRQ

TWKLEGEALEQAIISQAPQVEKLIATTAHERMPWYHSSLTREEAERKLYSGAQTGDK

FLLRPRKEQGTIALSLIYGKTVYHYLISQDKAGKYCIPEGTKFDTLWQLVEYLKKA

[0209]

DGLIYCLKEACPNSSASNASGAAAPTLPAPSTLTHPQRRIDTLNSDGYTPEPARITSP

DKPRPMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKLFLKRDNLLIADIELGCGNFGSVRQGVYRM

RKKQIDVAIKVLKQGTEKADTEEMMREAQIMHQLDNPYIVRLIGVCQAEALMLVME

MAGGGPLHKFLVGKREEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRDLAARNVLLV

NRHYAKISDFGLSKALGADDSYTTARSAGKWPLKWYAPECINFRKFSSRSDVWSYG

VTMWEALSYGQKPYKKMKGPVMAFIEQGKRMECPPECPELYALMSDCWIYKWE

DRPDFLTVEQRMRYCYSLASKVEGPPGSTQKAEACA (SEQ ID NO: 67)。

[0210] g. 检测肽

[0211] CAR可以包含检测肽。合适的检测肽包括血凝素(HA;例如YPYDVDPYA (SEQ ID NO: 68)); FLAG (例如DYKDDDDK (SEQ ID NO: 69)); c-myc (例如EQKLISEEDL; SEQ ID NO: 70)等等。其他合适的检测肽是本领域已知的。

[0212] h. 肽接头

[0213] 在一些实施方案中, CAR也可包括肽接头(有时被称为接头)。肽接头可分开本文所述的任何肽结构域/区域。例如, 接头可在信号肽和抗原结合结构域之间、抗原结合结构域的 V_H 和 V_L 之间、抗原结合结构域和肽间隔物之间、肽间隔物和跨膜结构域之间、侧接共刺激区或在共刺激区的N-或C-区上、和/或在跨膜结构域和胞内结构域之间。肽接头可具有多种氨基酸序列中的任一种。结构域和区域可以通过一般具有柔性性质的肽接头连接, 尽管不排除其他化学连接。接头可以为长度约6至约40个氨基酸、或长度约6至约25个氨基酸的肽。这些接头可以通过使用合成的编码接头的寡核苷酸来偶联蛋白质而产生。

[0214] 可使用具有一定柔性程度的肽接头。肽接头实际上可具有任何氨基酸序列, 应记住合适的肽接头将具有导致一般柔性肽的序列。使用小氨基酸例如甘氨酸和丙氨酸可用于产生柔性肽。这样的序列的产生对于本领域技术人员是常规的。

[0215] 合适的接头可以容易地选择并且可以具有任何合适的不同长度, 例如1个氨基酸(例如Gly)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸, 包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸、或7个氨基酸至8个氨基酸, 并且可以为1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0216] 示例性的柔性接头包括甘氨酸聚合物(G_n)、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如 $(GS)_n$ / $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO: 71) 和 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 72), 其中n为至少1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其他柔性接头。可使用甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物; Gly和Ser两者是相对未结构化的, 并且因此可充当组分之间的中性链。可使用甘氨酸聚合物; 甘氨酸比甚至丙氨酸获得明显更多的phi-psi空间, 并且比具有

更长侧链的残基限制得少得多。示例性的间隔物可包含氨基酸序列,包括但不限于GGSG (SEQ ID NO:73)、GGSGG (SEQ ID NO:74)、GSGSG (SEQ ID NO:75)、GSGGG (SEQ ID NO:76)、GGGSG (SEQ ID NO:77)、GSSSG (SEQ ID NO:78) 等等。

[0217] i. 共刺激区

[0218] CAR中合适的共刺激区的非限制性实例包括但不限于来自4-1BB (CD137)、CD28、ICOS、OX-40、BTLA、CD27、CD30、GITR和HVEM的多肽。

[0219] 共刺激区可具有至少、至多、或正好20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200或300个氨基酸或其中可衍生的任何范围的长度。在一些实施方案中,共刺激区源自跨膜蛋白4-1BB(也被称为TNFRSF9;CD137;4-1BB;CDw137;ILA等)的细胞内部分。例如,合适的共刺激区可以包含与KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO:79) 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0220] 在一些实施方案中,共刺激区源自跨膜蛋白CD28(也被称为Tp44)的细胞内部分。例如,合适的共刺激区可以包含与FWVRSKRSRLHSDYMNTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:80) 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0221] 在一些实施方案中,共刺激区源自跨膜蛋白ICOS(也被称为AILIM、CD278和CVID1)的细胞内部分。例如,合适的共刺激区可以包含与TKKKYSSSVHDPNGEYFMRAVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID NO:81) 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0222] 在一些实施方案中,共刺激区源自跨膜蛋白OX-40(也被称为TNFRSF4、RP5-902P8.3、ACT35、CD134、OX40、TXGP1L)的细胞内部分。例如,合适的共刺激区可以包含与RRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO:82) 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0223] 在一些实施方案中,共刺激区源自跨膜蛋白BTLA(也被称为BTLA1和CD272)的细胞内部分。例如,合适的共刺激区可以包含与CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSHVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO:83) 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0224] 在一些实施方案中,共刺激区源自跨膜蛋白CD27(也被称为S152、T14、TNFRSF7和Tp55)的细胞内部分。例如,合适的共刺激区可以包含与HQRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO:84) 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0225] 在一些实施方案中,共刺激区源自跨膜蛋白CD30(也被称为TNFRSF8、D1S166E和Ki-1)的细胞内部分。例如,合适的共刺激区可以包含与

RRACRKIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRSSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMS
QPLMETCHSVGAAYLESPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKAD
TVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEE

EGKEDPLPTAASGK (SEQ ID NO: 85) 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0226] 在一些实施方案中,共刺激区源自跨膜蛋白GITR(也被称为TNFRSF18、RP5-902P8.2、AITR、CD357和GITR-D)的细胞内部分。例如,合适的共刺激区可以包含与HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPSTEDARSCQFPPEERGERSAEEKGRLGDLWV (SEQ ID NO:86) 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0227] 在一些实施方案中,共刺激区源自跨膜蛋白HVEM(也被称为TNFRSF14、RP3-395M20.6、ATAR、CD270、HVEA、HVEM、LIGHTR和TR2)的细胞内部分。例如,合适的共刺激区可以包含与CVKRRKPRGDIVVKVIVSVQRKRQEAGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRSP NH (SEQ ID NO:87) 具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0228] V. 方法

[0229] 本公开的方面涉及治疗病症、刺激免疫应答、调节免疫应答、抑制免疫应答和降低不利免疫应答(例如细胞因子释放综合征)的风险的方法。这些作用可在体外、体内或离体完成。在一些实施方案中,该方法涉及在癌细胞的存在下能够刺激免疫应答的细胞。该方法一般涉及用表达载体或RNA(例如体外转录的RNA)遗传修饰哺乳动物细胞,所述表达载体包含编码本公开内容的多肽的核苷酸序列,或直接将所述多肽转移至细胞。细胞可以为免疫细胞(例如T淋巴细胞或NK细胞)、干细胞、祖细胞等。在一些实施方案中,细胞是本文描述的细胞。

[0230] 在一些实施方案中,遗传修饰是离体进行的。例如,从个体获得T淋巴细胞、干细胞或NK细胞(或本文所述的细胞);并且从个体获得的细胞被遗传修饰,以表达本公开的多肽。在一些情况下,遗传修饰的细胞被离体激活(即,靶抗原与细胞离体接触)。在另一些情况下,将遗传修饰的细胞引入个体(例如,从其获得细胞的个体)内;并且遗传修饰的细胞在体内被激活(即,通过内源产生的靶抗原)。

[0231] 在一些实施方案中,该方法还包括施用另外的治疗剂,例如双特异性T细胞衔接器(BITE)。这样的治疗剂可以肽形式施用于患者或者在本公开内容的细胞中表达,例如那些包含IL-6R α 结合蛋白的细胞。BITE可对于本领域已知和/或本文所述的癌抗原/癌症分子具有抗原特异性,并且还可对T细胞分子(例如CD3)具有抗原特异性。

[0232] 在一些实施方案中,该方法涉及施用本文所述的细胞或肽以治疗癌症或施用于患有癌症的个人。在一些实施方案中,癌症是肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、儿童或成人中的脑/CNS肿瘤、乳腺癌、宫颈癌、结肠/直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、尤文家族肿瘤、眼癌、胆囊癌、胃肠道类癌瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、妊娠滋养细胞疾病、霍奇金病、卡波西肉瘤、肾癌、喉和下咽癌、白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓样白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓样白血病、慢性骨髓单核细胞白血病、肝癌、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肺类癌瘤、淋巴瘤、恶性间皮瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、口腔或口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体瘤、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、皮肤癌、肉瘤、基底皮肤癌、

鳞状细胞皮肤癌、黑素瘤、梅克尔细胞皮肤癌、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、沃尔登斯特伦巨球蛋白血症或肾母细胞瘤。

[0233] 实施方案可用于治疗或改善许多免疫介导的、炎症或自身免疫炎性疾病,例如变态反应、哮喘、糖尿病(例如1型糖尿病)、移植排斥等。这些疾病或病症的实例还包括但不限于关节炎(类风湿性关节炎例如急性关节炎、慢性类风湿性关节炎、痛风或痛风性关节炎、急性痛风性关节炎、急性免疫性关节炎、慢性炎性关节炎、退行性关节炎、II型胶原诱发性关节炎、感染性关节炎、莱姆关节炎、增生性关节炎、银屑病关节炎、斯蒂尔病、脊椎关节炎和全身性幼年型类风湿性关节炎、骨关节炎、慢性进行性关节炎(arthritis chronica progrediente)、变形性关节炎、慢性原发性多关节炎(polyarthritis chronica primaria)、反应性关节炎和强直性脊柱炎)、炎性过度增殖性皮肤病、银屑病(例如斑块状银屑病、点状银屑病、脓疱性银屑病和指甲银屑病)、特应性包括特应性疾病(例如花粉热和乔布综合征)、皮炎(包括接触性皮炎、慢性接触性皮炎、剥脱性皮炎、过敏性皮炎、过敏性接触性皮炎、疱疹样皮炎、钱币状皮炎、脂溢性皮炎、非特异性皮炎、原发性刺激性接触性皮炎和特应性皮炎)、x连锁高IgM综合征、变应性眼内炎性疾病、荨麻疹(例如慢性变应性荨麻疹和慢性特发性荨麻疹,包括慢性自身免疫性荨麻疹)、肌炎、多肌炎/皮肌炎、幼年型皮肌炎、中毒性表皮坏死松解症、硬皮病(包括系统性硬皮病)、硬化症例如系统性硬化症、多发性硬化症(MS)例如脊柱视觉MS、原发进展型MS(PPMS)和复发缓解型MS(RRMS)、进行性系统性硬化症、动脉粥样硬化、动脉硬化、播散性硬化症(sclerosis disseminata)、共济失调性硬化症、视神经脊髓炎(NMO)、炎症肠病(IBD)(例如克罗恩病、自身免疫介导的胃肠疾病、结肠炎例如溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)、溃疡性结肠炎(colitis ulcerosa)、显微镜下结肠炎、胶原性结肠炎、息肉状结肠炎、坏死性小肠结肠炎和透壁性结肠炎、以及自身免疫性炎性肠病)、肠炎症、坏疽性脓皮病、结节性红斑、原发性硬化性胆管炎、呼吸窘迫综合征包括成人或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、脑膜炎、葡萄膜全部或部分发炎、虹膜炎、脉络膜炎、自身免疫性血液病症、类风湿性脊柱炎、类风湿性滑膜炎、遗传性血管性水肿、例如脑膜炎中的颅神经损伤、妊娠疱疹、妊娠性类天疱疮、阴囊瘙痒、自身免疫性卵巢早衰、由于自身免疫状况的突发性听力丧失、IgE-介导的疾病例如超敏反应和变应性和特应性鼻炎、脑炎例如Rasmussen's enc眼炎和边缘叶和/或脑干脑炎、葡萄膜炎(例如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、晶状体抗原性葡萄膜炎、后葡萄膜炎或自身免疫性葡萄膜炎)、伴有和不伴有肾病综合征的肾小球肾炎(GN)(例如慢性或急性肾小球肾炎例如原发性GN、免疫介导的GN、膜性GN(膜性肾病)、特发性膜性GN或特发性膜性肾病、膜或膜增生性GN(MPGN)包括I型和II型、以及快速进展性GN)、增生性肾炎、自身免疫性多腺体内分泌衰竭、龟头炎包括浆细胞性局限性龟头炎、龟头包皮炎、离心性环状红斑、持久性色素异常性红斑、多形红斑、环状肉芽肿、光泽苔癣、硬化萎缩性苔癣、慢性单纯性苔癣、小棘苔癣、扁平苔癣、板层状鱼鳞病、表皮松解性角化过度症、恶化前角化症、坏疽性脓皮病、变应性状况和应答、变态反应、湿疹(包括变应性或特应性湿疹、干性湿疹、汗疱性湿疹和小泡样掌跖湿疹、哮喘(例如细支气管哮喘、支气管哮喘和自身免疫性哮喘)、涉及T细胞浸润和慢性炎症应答的状况、在怀孕期间针对外来抗原例如胎儿A-B-O血型的免疫反应、慢性肺部炎性疾病、自身免疫性心肌炎、白细胞黏附缺陷、狼疮(包括狼疮肾炎、狼疮性脑炎、小儿狼疮、非肾脏性狼疮、肾外狼疮、盘状狼疮和盘状红斑狼疮、脱发性狼疮、系统性红

斑狼疮 (SLE) 例如皮肤SLE或亚急性皮肤SLE、新生儿狼疮综合征 (NLE) 和播散性红斑狼疮)、幼年发作型 (I型) 糖尿病包括小儿胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM) 和成人发作型糖尿病 (II型糖尿病) 和自身免疫性糖尿病。还考虑了与由细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏反应相关的免疫应答、肉状瘤病、肉芽肿病 (包括淋巴瘤样肉芽肿病、韦格纳氏肉芽肿病)、粒细胞缺乏症、血管炎病 (包括血管炎、大血管血管炎 (包括风湿性多肌痛和巨细胞 (高安氏) 动脉炎)、中血管血管炎 (包括川崎氏病和结节性多动脉炎/结节性多动脉炎)、显微镜下多动脉炎、免疫血管炎、CNS血管炎、皮肤血管炎、超敏性血管炎、坏死性血管炎例如系统性坏死性血管炎和ANCA相关血管炎例如丘-施二氏血管炎或综合征 (CSS) 和ANCA相关小血管血管炎)、颞动脉炎、再生障碍性贫血、自身免疫性再生障碍性贫血、库姆斯阳性贫血、戴-布二氏贫血、溶血性贫血或免疫性溶血性贫血包括自身免疫性溶血性贫血 (AIHA)、阿狄森氏病、自身免疫性中性粒细胞减少症、全血细胞减少症、白细胞减少症、涉及白细胞血细胞渗出的疾病、CNS炎性病症、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、多器官损伤综合征 (例如继发于败血症、创伤或出血的那些)、抗原-抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜疾病、抗磷脂抗体综合征、变应性神经炎、白塞氏病/综合征、淋巴结增生症、古德帕斯彻氏综合征、雷诺氏综合征、干燥综合征、史蒂文斯-约翰逊综合征、类天疱疮例如大疱性类天疱疮和皮肤类天疱疮、天疱疮 (包括寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、天疱疮黏膜类天疱疮和红斑型天疱疮)、自身免疫性多内分泌腺疾病、莱特氏病或综合征、热损伤、先兆子痫、免疫复合物病症例如免疫复合物肾炎、抗体介导的肾炎、多发性神经病、慢性神经病例如IgM多发性神经病或IgM介导的神经病、自身免疫或免疫介导的血小板减少症例如特发性血小板减少性紫癜 (ITP) 包括慢性或急性ITP、巩膜炎例如特发性角膜巩膜炎、巩膜外层炎、睾丸和卵巢的自身免疫病包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎、原发性甲状腺功能减退症、甲状旁腺功能减退、自身免疫性内分泌疾病包括甲状腺炎例如自身免疫性甲状腺炎、桥本氏病、慢性甲状腺炎 (桥本氏甲状腺炎)、或亚急性甲状腺炎、自身免疫性甲状腺病、特发性甲状腺功能减退症、格雷夫斯氏病、多腺体综合征例如自身免疫性多腺体综合征 (或多腺体内分泌病综合征)、副肿瘤综合征包括神经副肿瘤综合征例如兰伯特-伊顿肌无力综合征或伊顿-兰伯特综合征、僵人 (stiff-man) 或僵人 (stiff-person) 综合征、脑脊髓炎 (例如变应性脑脊髓炎或过敏性脑脊髓炎和实验性变应性脑脊髓炎 (EAE)、实验性自身免疫性脑脊髓炎)、重症肌无力例如胸腺瘤相关重症肌无力、小脑变性、神经性肌强直、斜视性眼阵挛或斜视性眼阵挛-肌阵挛综合征 (OMS) 和感觉神经病变、多灶性运动神经病变、席汉氏综合征、自身免疫性肝炎、慢性肝炎、类狼疮性肝炎、巨细胞肝炎、慢性活动性肝炎或自身免疫慢性活动性肝炎、淋巴样间质性肺炎 (LIP)、闭塞性细支气管炎 (非移植) 相对于NSIP、格-巴二氏综合征、伯格氏病 (IgA肾病)、特发性IgA肾病、线性IgA皮肤病、急性发热性嗜中性皮肤病、角质层下脓疱皮肤病、暂时性棘层松解性皮肤病、硬化例如原发性胆汁性肝硬化和肺硬变、自身免疫性肠病综合征、乳糜泻或乳糜泻病、口炎性腹泻 (麸质肠病)、顽固性口炎性腹泻、特发性口炎性腹泻、冷球蛋白血症、肌萎缩性侧索硬化症 (ALS; Lou Gehrig's病)、冠状动脉疾病、自身免疫性耳病例如自身免疫性内耳病 (AIED)、自身免疫性听力丧失、多软骨炎例如难治性或复发性或复发型多软骨炎、肺泡蛋白沉积症、科干氏综合征/非梅毒性间质性角膜炎、贝尔氏麻痹、Sweet's病/综合征、自身免疫性红斑痤疮、带状疱疹相关性疼痛、淀粉样变性、非癌性淋巴细胞增多症、原发性淋巴细胞增多症包括单克隆B细胞淋巴细胞增多症 (例如良性单克隆丙种球蛋白

白病和意义未明的单克隆丙种球蛋白病、MGUS)、周围神经病变、副肿瘤综合征、通道病变(例如癫痫、偏头痛、心律失常、肌肉病症、耳聋、失明、周期性瘫痪和CNS的通道病变)、孤独症、炎症性肌病、局灶性或节段性或局灶节段性肾小球硬化症(FSGS)、内分泌性眼病变、葡萄膜视网膜炎、脉络膜视网膜炎、自身免疫性肝病、纤维肌痛、多发性内分泌衰竭、施密特氏综合征、肾上腺炎、胃萎缩、早老性痴呆、脱髓鞘疾病例如自身免疫性脱髓鞘疾病和慢性炎性脱髓鞘性多神经病、心肌梗塞后综合征、斑秃、全秃、CREST综合征(钙质沉着、雷诺氏现象、食管运动功能障碍、指端硬化)和毛细血管扩张)、男性和女性自身免疫性不育症例如由于抗精子抗体、混合性结缔组织病、恰加斯氏病、风湿热、复发性流产、农民肺、多形红斑、心脏切开后综合征、库欣综合征、养鸟人肺、变应性肉芽肿性血管炎、良性淋巴细胞性血管炎、Alport综合征、肺泡炎例如变应性肺泡炎和纤维化肺泡炎、间质性肺病、输血反应、麻风病、疟疾、寄生虫病例如利什曼病、锥虫病、血吸虫病、蛔虫病、曲霉菌病、Sampter综合征、卡普兰综合征、登革热、心内膜炎、心内膜心肌纤维化、弥漫性间质性肺纤维化、间质性肺纤维化、肺纤维化、特发性肺纤维化、囊性纤维化、眼内炎、持久性隆起性红斑、胎儿成红细胞增多症、嗜酸性粒细胞性筋膜炎、舒曼氏综合征、费尔蒂氏综合征、丝虫病、睫状体炎(例如慢性睫状体炎、异时性睫状体炎、虹膜睫状体炎(急性或慢性)或福斯氏睫状体炎)、过敏性紫癜、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染、SCID、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、埃可病毒感染、败血症、内毒素血症、胰腺炎、甲状腺毒症(thyroxinosis)、细小病毒感染、风疹病毒感染、疫苗接种后综合征、先天性风疹感染、EB病毒感染、腮腺炎、埃文氏综合征、自身免疫性性腺衰竭、西登哈姆氏舞蹈病、链球菌感染后肾炎、血栓闭塞性脉管炎(thromboangitis obliterans)、甲状腺毒症、脊髓痨、脉络膜炎、巨细胞多肌痛、慢性超敏性肺炎、干燥性角结膜炎、流行性角结膜炎、特发性肾病综合征、微小病变肾病、良性家族性和局部缺血-再灌注损伤、移植器官再灌注、视网膜自身免疫、关节炎、支气管炎、慢性阻塞性气道/肺部疾病、矽肺、口疮、口腔溃疡性口炎、动脉硬化性病、无精子产生症(azoospermia)、自身免疫性溶血、伯克氏病、冷球蛋白血症、Dupuytren's挛缩、晶状体过敏性眼内炎、过敏性肠炎、麻风结节性红斑、特发性面瘫、慢性疲劳综合征、风湿性热病、Hamman-Rich病、感觉神经性听力丧失、阵发性血红蛋白尿、性腺功能减退症、局限性回肠炎、白细胞减少症、感染性单核细胞增多症、横贯性脊髓炎、原发性特发性黏液水肿、肾病、交感性眼炎、肉芽肿性睾丸炎、胰腺炎、急性多发性神经根炎(polyradiculitis acuta)、坏疽性脓皮病、Quervain甲状腺炎、获得性脾萎缩、非恶性胸腺瘤、白癜风、中毒性休克综合征、食物中毒、涉及T细胞浸润的状况、白细胞黏附缺陷、与由细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏反应相关的免疫应答、涉及白细胞细胞渗出的疾病、多发性器官损伤综合征、抗原-抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜疾病、过敏性神经炎、自身免疫性多内分泌腺疾病、卵巢炎、原发性黏液水肿、自身免疫性萎缩性胃炎、交感性眼炎、风湿性疾病、混合结缔组织病、肾病综合征、胰岛炎、多内分泌腺衰竭、I型自身免疫性多内分泌腺综合征、成人发作型特发性甲状旁腺功能减退症(AOIH)、心肌病例如扩张型心肌病、获得性大疱性表皮松解症(EBA)、血色病、心肌炎、肾病综合征、原发性硬化性胆管炎、化脓性或非脓性鼻窦炎、获得性或慢性鼻窦炎、筛窦、额叶、上颌或蝶窦炎、嗜酸性粒细胞相关病症例如嗜酸性粒细胞增多症、肺浸润嗜酸性粒细胞增多症、嗜酸性粒细胞增多症-肌痛综合征、吕弗勒氏综合征、慢性嗜酸性粒细胞性肺炎、热带肺嗜酸性粒细胞增多症、支气管肺曲霉病、曲霉肿或包含嗜酸性粒细胞的肉芽肿、过敏症、血清反应阴

性脊柱关节炎、多内分泌腺自身免疫疾病、硬化性胆管炎、巩膜、巩膜外层、慢性皮肤黏膜念珠菌病、布鲁顿氏综合征、婴儿期短暂性低丙种球蛋白血症、维-奥二氏综合征、共济失调毛细血管扩张综合征、血管扩张、与胶原疾病相关的自身免疫性病症、风湿病、神经系统疾病、淋巴结炎、血压反应降低、血管功能障碍、组织损伤、心血管缺血、痛觉过敏、肾缺血、脑缺血和伴随血管形成的疾病、过敏性超敏反应病症、肾小球肾炎、再灌注损伤、缺血再灌注病症、心肌或其他组织的再灌注损伤、淋巴瘤性气管支气管炎、炎症性皮肤病、具有急性炎症组分的皮肤病、多器官衰竭、大疱性疾病、肾皮质坏死、急性化脓性脑膜炎或其他中枢神经系统炎性病症、眼和眶炎性病症、粒细胞输注相关综合征、细胞因子诱发性毒性、发作性睡病、急性严重炎症、慢性难治性炎症、肾盂炎、动脉内膜增生、消化性溃疡、瓣膜炎、移植物抗宿主病、接触性超敏反应、哮喘气道高反应和子宫内膜异位症。

[0234] 在一些实施方案中,患者是不具有上述特定适应症的患者。例如,在一些实施方案中,患者患有和/或尚未被诊断患有类风湿性关节炎。在一些实施方案中,患者不具有慢性自身免疫病症。慢性病是指持续很长时间或不断复发的疾病。

[0235] VI. 药物组合物

[0236] 本公开包括用于调节有此需要的对象中的免疫应答的方法。本公开包括可以为药物组合物形式的细胞和蛋白质,所述药物组合物可以用于诱导或修饰免疫应答。

[0237] 根据本公开的组合物的施用通常经由任何常见途径进行。这包括但不限于肠胃外、原位、皮内、皮下、肌内、腹膜内、鼻内或静脉内注射。

[0238] 通常,本发明的组合物以与剂量配方相容的方式施用,并且其量将为治疗有效和免疫修饰的量。待施用的数量取决于待治疗的对象。需要施用的活性成分的精确量取决于从业者的判断。

[0239] 应用的方式可广泛地变化。用于施用包含细胞组分的药物组合物的任何常规方法都是适用的。药物组合物的剂量将取决于施用途径,并且将根据对象的大小和健康而变化。

[0240] 在许多情况下,期望具有至多约或至少约3、4、5、6、7、8、9、10或更多次的多次施用。施用范围可以为2天至12周间隔,更通常为一至两周间隔。施用过程之后可以进行关于同种异体反应性免疫应答和T细胞活性的测定。

[0241] 短语“可药用的”或“药理学可接受的”指当施用于动物或人时,不产生不利反应、过敏反应或其他不良反应的分子实体和组合物。如本文使用的,“可药用的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等等。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容,否则考虑其在免疫原性和治疗性组合物中的使用。本公开的药物组合物是可药用的组合物。

[0242] 本公开的组合物可配制用于肠胃外施用,例如配制用于经由静脉内、肌内、皮下或甚至腹膜内途径注射。通常,这样的组合物可以制备为注射剂,或液体溶液剂或悬浮剂;也可以制备为适用于在注射前添加液体时制备溶液剂或悬浮剂的固体形式;并且,制备物也可以被乳化。

[0243] 适合于注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体;包括芝麻油、花生油或水性丙二醇的制剂。其在制造和贮存条件下也应该是稳定的,并且必须防止微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。

[0244] 通过将活性成分(即本公开的细胞)以需要的量掺入具有上文列举的多种其他成分的适当溶剂中(如果需要),随后过滤灭菌,来制备无菌注射溶液。一般地,通过将多种经灭菌的活性成分掺入无菌媒介物内来制备分散体,所述无菌媒介物包含基本分散介质和来自上文列举的那些的所需其他成分。

[0245] 基于预期目标确定组合物的有效量。术语“单位剂量”或“剂量”指适用于对象的物理离散单位,每个单位含有计算为产生与其施用(即适当途径和方案)相关的本文讨论的所期望应答的预定数量的组合物。根据治疗次数和单位剂量两者,待施用的量取决于所期望的结果和/或保护。组合物的精确量还取决于从业者的判断,并且对于每个个体是独特的。影响剂量的因素包括对象的身体和临床状态、施用途径、预期的治疗目标(症状缓解与治愈),以及特定组合物的效力、稳定性和毒性。在配制时,溶液将以与剂量配方相容的方式施用并且以治疗或预防有效的量施用。该制剂易于以多种剂型施用,例如上述可注射溶液的类型。

[0246] VII. 实施例

[0247] 包括下述实例以证实本发明的实施例。本领域技术人员应该理解,在下述实施例中公开的技术代表由发明人发现的在本发明的实践中发挥良好作用的技术,并且因此可以视为构成用于其实践的优选模式。然而,根据本公开,本领域技术人员应该理解,可在所公开的具体实施例中做出许多改变,并且仍然获得相似或类似的结果,而不背离本发明的精神和范围。

[0248] 实施例1

[0249] 抗IL-6R α scFv构建体抑制IL-6信号传导

[0250] 本公开描述了与IL6R α 结合的单链可变片段(scFv)。在该实施例中,使用两种不同的抗IL-6R α scFv构建体: $V_H V_L$ 构建体(SEQ ID NO:2)和 $V_L V_H$ 构建体(SEQ ID NO:1)。这些构建体的不同之处仅在于切换 V_H 和 V_L 序列的位置。

[0251] IL-6是具有促炎作用的细胞因子。IL-6通过IL-6R α 发出信号,IL-6R α 是IL-6的细胞表面受体的配体结合组分。通过IL-6R α 的IL-6信号传导在促炎细胞因子信号传导过程中起作用,包括在细胞因子释放综合征中起作用。IL-6还刺激许多疾病的炎症和自身免疫过程,包括糖尿病、动脉粥样硬化、抑郁症、阿尔茨海默病、系统性红斑狼疮、多发性骨髓瘤、前列腺癌、白血病和类风湿性关节炎。

[0252] 两种抗IL-6R α scFv均有效抑制HepG2细胞中的IL-6信号传导。将HepG2人肝癌细胞接种在12孔板中,并与1、2或5 μ g的scFv一起孵育3小时。如图1中所示,随后用4ng/ml的IL-6处理一些孔并在细胞收获前再孵育30分钟。通过蛋白质印迹探测磷酸化STAT3(pSTAT3)(IL-6信号传导通路中的主要信号传导分子)的存在。图1中的结果表明具有 $V_L V_H$ (SEQ ID NO:1)或 $V_H V_L$ (SEQ ID NO:2)取向的scFv能够以剂量依赖性方式抑制IL-6信号传导,因为较高浓度的scFv导致响应IL-6的pSTAT3表达水平较低。使用 $V_L V_H$ scFv(SEQ ID NO:1)进行后续实验。

[0253] 为了确定抗-IL-6R α scFv是否抑制原代人T细胞中的IL-6信号传导,将原代人CD4⁺和CD8⁺T细胞接种在12孔板中,并如图1中针对HepG2细胞所述进行处理。将 $V_L V_H$ scFv(SEQ ID NO:1)以图2中所示的浓度添加至孔,并将IL-6添加至指定的孔。通过蛋白质印迹再次探测pSTAT3的存在。结果如图2所示。图2中的结果表明抗-IL-6R α scFv在CD4⁺和CD8⁺原代人T

细胞中以剂量依赖性方式抑制IL-6信号传导。

[0254] 这些结果表明向对象施用有效量的抗IL-6R α scFv将治疗炎症病症,例如CRS和自身免疫以及其中涉及IL-6信号传导的其他疾病。

[0255] 实施例2

[0256] 通过T细胞表达抗IL-6R α scFv构建体

[0257] 制备表达抗CD19嵌合抗原受体(CAR)和抗IL-6R α scFv的原代人CD4+和CD8+细胞:在分离当天用CD3/CD28dynabead分离和刺激人原代T细胞。分离之后两天,用编码抗CD19CAR(SEQ ID NO:88)的慢病毒或逆转录病毒载体和编码SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的IL-6R α scFv构建体转导T细胞(或无IL-6R α scFv用于对照)。分离之后第9天除去Dynabead。基于抗CD19 CAR上的HA标签,通过磁性细胞分离法对细胞进行分选。在CD4T细胞的第21天和CD8T细胞的第14天,通过快速扩增方案扩增原代T细胞,其中将 0.5×10^6 个T细胞与 3.5×10^6 个辐射的TM-LCL、50U/ml rhIL-2和1ng/ml rhIL-15在T25烧瓶中的25ml完全RPMI培养基中混合。细胞因子每2天补充一次。细胞在REP第9天后用于实验。

[0258] 本发明人测试了在T细胞中表达抗IL-6R α scFv的效果。将表达抗CD19嵌合抗原受体(CAR)的具有或不具有组成型表达抗-IL-6R α scFv的原代人CD4+T细胞与跟来自CD4+T细胞相同的供体的外周血单核细胞(PBMC)加野生型(CD19+)Raji淋巴瘤细胞以1:1:1的比例共孵育12小时。包含不表达scFv的CD19CAR-T细胞与90 μ g/ml单克隆抗体tocilizumab作为对照样品。通过基于细胞计数珠的测定法对图3中所示的培养基中的细胞因子的水平进行量化。图3中所示的值是三个技术重复的平均值,误差棒表示 ± 1 标准偏差。通过双尾、等方差Student's t检验评估统计学显著性;*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001。显示的结果代表了使用来自两个不同健康献血者的细胞的两个独立实验。图3中的结果显示,原代人T细胞的抗-IL-6R α scFv的组成型表达显著降低了T细胞产生的炎症细胞因子。这表明通过使用表达抗IL-6R α scFv的T细胞可以降低过继性T细胞治疗中CRS的发生率。

[0259] 发明人接下来测试了T细胞的抗IL-6R α scFv的表达是否会抑制它们的增殖或细胞毒性。将组成型表达抗CD19 CAR的具有或不具有抗-IL-6R α scFv的原代人CD4+和CD8+T细胞与野生型(WT;CD19+)或CD19-突变型Raji淋巴瘤细胞以2:1效应物与靶细胞(E:T)比例共孵育。每两天通过流式细胞术获得活的T细胞和Raji细胞计数。在流式细胞术分析期间,两种Raji细胞系均稳定表达EGFP以便能够从T细胞中分离。在第8天细胞计数之后,收获与WT Raji共孵育的CD4+T细胞,并用新鲜的WT Raji细胞以2:1的E:T比例再次激发。在第二次激发期间,监测活细胞计数另外的12天。图4和6中所示的值是三个技术重复的平均值,误差棒表示 ± 1 标准偏差。图4中显示的结果代表了使用来自两个不同健康献血者的细胞的四个独立实验并且图6中的结果代表了使用来自两个不同健康献血者的细胞的三个独立实验。图4和6中的结果表明T细胞的抗-IL-6R α scFv的组成型表达不会抑制T细胞增殖或细胞毒性,这表明使用表达抗-IL-6R α scFv的T细胞不会降低过继性T细胞治疗的效果。

[0260] 为了测试抗IL-6R α scFv的表达是否改变抗原刺激后的T细胞亚型分化,将前述段落中描述的实验中的T细胞用CCR7、CD45RA和CD57的抗体进行表面染色以确定T细胞亚型。亚型T_{E/EM}:CCR7-/CD45RA-/CD57-;亚型T_{E/Exh}:CCR7-/CD45RA-/CD57+;亚型T_{EMRA}:CCR7-/CD45RA+;亚型T_{cm}:CCR7+/CD45RA-;亚型T_{耗竭细胞}:CCR7+/CD45RA+。图5和7中所示的值是三个技术重复的平均值,误差棒表示 ± 1 标准偏差。图5中显示的结果代表了使用来自两个不同健

康献血者的细胞的四个独立实验并且图7中的结果代表了使用来自三个不同健康献血者的细胞的四个独立实验。从图5和7中可以看出,在任何样品中都存在非常少的 T_{EMRA} 或 $T_{耗竭}$ 细胞。图5至7的结果显示抗IL-6 α scFv的组成型表达不会改变T细胞在抗原刺激后的亚型分化,进一步确定使用表达抗IL-6 α scFv的T细胞不会降低过继性T细胞治疗的效果。

[0261] T细胞衰竭是T细胞功能障碍的状态,其特征不在于效应功能差、抑制性受体的表达和不同的转录状态。衰竭可以限制T细胞在过继性T细胞治疗中的效力。衰竭的标记物包括PD-1、TIM-3和LAG-3。为了确定抗IL-6 α scFv的表达是否会影响T细胞衰竭,将组成型表达抗CD19 CAR的具有或不具有抗-IL-6 α scFv的原代人T细胞与WT Raji淋巴瘤细胞以2:1的E:T比例共孵育。每两天通过表面抗体染色和流式细胞术对PD-1、TIM-3和LAG-3表达水平进行量化。用CD8⁺T细胞进行三个试验,用CD4⁺T细胞进行四个试验,总共进行七个独立实验。每项试验包括每种条件下的三个技术重复。图8中的图中的每个数据点表示来自一个试验的一式三份的平均值。每个时间点的七个试验的平均值由图8中的黑色水平条表示。图8中的结果显示抗-IL-6 α scFv的组成型表达不改变在抗原刺激后原代人T细胞中的衰竭标志物表达,进一步证实抗-IL-6 α scFv的表达不会降低过继性T细胞治疗的效力。

[0262] 根据本公开,本文公开和请求保护的所有方法都可无需过度实验而制备且执行。虽然本发明的组合物和方法已根据优选实施例进行描述,但对于本领域技术人员显而易见的是,可对本文所述的方法以及所述方法的步骤或步骤顺序应用变化,而不背离本发明的概念、精神和范围。更具体而言,显而易见化学和生理学相关的某些试剂可代替本文所述的试剂,同时获得相同或相似的结果。对于本领域技术人员显而易见的所有这些类似的替代和修改视为在如由所附权利要求限定的本发明的精神、范围和概念内。所有参考文献、引用的文献文章、专利出版物和与任何所述GenBank登录号相关的序列都特别以引用的方式整体并入本文用于所有目的。

[0263] 参考文献

[0264] 下述参考文献,就其提供补充本文所述那些的示例性程序性或其他细节补充的程度而言,通过引用的方式明确地并入本文。

[0265] 美国专利4,684,611

[0266] 美国专利4,879,236

[0267] 美国专利4,952,500

[0268] 美国专利5,302,523

[0269] 美国专利5,322,783

[0270] 美国专利5,384,253

[0271] 美国专利5,464,765

[0272] 美国专利5,538,877

[0273] 美国专利5,538,880

[0274] 美国专利5,543,293

[0275] 美国专利5,550,318

[0276] 美国专利5,563,055

[0277] 美国专利5,580,737

[0278] 美国专利5,580,859

- [0279] 美国专利5,589,466
- [0280] 美国专利5,591,616
- [0281] 美国专利5,610,042
- [0282] 美国专利5,631,146
- [0283] 美国专利5,656,610
- [0284] 美国专利5,670,373
- [0285] 美国专利5,677,425
- [0286] 美国专利5,702,932
- [0287] 美国专利5,714,350
- [0288] 美国专利5,736,524
- [0289] 美国专利5,780,448
- [0290] 美国专利5,786,462
- [0291] 美国专利5,789,215
- [0292] 美国专利5,871,986
- [0293] 美国专利5,945,100
- [0294] 美国专利5,981,274
- [0295] 美国专利5,994,624
- [0296] 美国专利6,350,861
- [0297] 美国专利7,479,543
- [0298] 美国专利8,580,264
- [0299] 美国专利公开2005/0106660
- [0300] 美国专利公开2006/0058510
- [0301] 美国专利公开2006/0088908
- [0302] 美国专利公开2010/0285564
- [0303] Ahmad(2012)Clinical and Developmental Immunology Article ID980250
- [0304] Burton(1985)Molec.Immunol.,22:161-206
- [0305] Carbonelli et al.,FEMS Microbiol.Lett.,177(1):75-82,1999.
- [0306] Chandler et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94(8):3596-601,1997.
- [0307] Chen and Okayama,Mol.Cell Biol.,7(8):2745-2752,1987.
- [0308] Cocea,Biotechniques,23(5):814-816,1997.
- [0309] Cumber et al.,J.Immunology,149B:120-126,1992.
- [0310] 欧洲专利0 154 316
- [0311] 欧洲专利0 322 094
- [0312] 欧洲专利0 401 384
- [0313] 欧洲专利0 486 525
- [0314] Fechheimer,et al.,Proc Natl.Acad.Sci.USA,84:8463-8467,1987.
- [0315] Fraley et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,76:3348-3352,1979.
- [0316] Gopal,Mol.Cell Biol.,5:1188-1190,1985.
- [0317] Graham and Van Der Eb,Virology,52:456-467,1973.

- [0318] Harland and Weintraub, J. Cell Biol., 101(3):1094-1099, 1985.
- [0319] Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., Chapter 8, 1988. Ausubel et al., 1996
- [0320] Huck et al. (1986) Nucl. Acids Res.
- [0321] Kaeppler et al., Plant Cell Rep., 8:415-418, 1990.
- [0322] Kaneda et al., Science, 243:375-378, 1989.
- [0323] Kato et al., J. Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991.
- [0324] Kohl et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 100(4):1700-1705, 2003.
- [0325] Koyama 1994 Chem. Abstr. 120:217262t
- [0326] Levenson et al., Hum. Gene Ther., 9(8):1233-1236, 1998.
- [0327] Liu et al. Cell Mol. Biol., 49(2):209-216, 2003.
- [0328] Meares et al., 1984 Anal. Biochem. 142:68-78
- [0329] Nicolau and Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190, 1982.
- [0330] Nicolau et al., Methods Enzymol., 149:157-176, 1987.
- [0331] Omirulleh et al., Plant Mol. Biol., 21(3):415-28, 1993.
- [0332] Pack et al., Biochem., 31:1579-1584, 1992.
- [0333] PCT申请 WO 94/09699
- [0334] PCT申请 WO 95/06128;
- [0335] PCT申请 WO 1992019759
- [0336] PCT申请 WO 2006/056464
- [0337] Potrykus et al., Mol. Gen. Genet., 199(2):169-177, 1985.
- [0338] Quadri et al. 1993 Nucl. Med. Biol. 20:559-570
- [0339] Rippe, et al., Mol. Cell Biol., 10:689-695, 1990.
- [0340] Rodwell et al. 1986 PNAS USA 83:2632-2636;
- [0341] Sambrook et al., In: Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001. Skerra, J. Mol. Recogn., 13:167-187, 2000.
- [0342] Skerra, J. Biotechnol., 74(4):257-75, 2001.
- [0343] Tan et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:162;
- [0344] Wong et al., Gene, 10:87-94, 1980.

[0001]	序列表															
[0002]	<110>	加利福尼亚大学董事会														
[0003]	<120>	涉及白介素-6受体 α 结合单链可变片段的方法和组合物														
[0004]	<130>	UCLA.P0043W0														
[0005]	<140>	PCT/IB2017/055281														
[0006]	<141>	2017-09-01														
[0007]	<150>	62383237														
[0008]	<151>	2016-09-02														
[0009]	<150>	62440991														
[0010]	<151>	2016-12-30														
[0011]	<150>	62443509														
[0012]	<151>	2017-01-06														
[0013]	<160>	89														
[0014]	<170>	PatentIn version 3.5														
[0015]	<210>	1														
[0016]	<211>	715														
[0017]	<212>	PRT														
[0018]	<213>	智人(Homo sapiens)														
[0019]	<400>	1														
[0020]	Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro
[0021]	1				5					10					15	
[0022]	Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Gly	Gly	Ser	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys
[0023]				20					25					30		
[0024]	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala
[0025]			35					40					45			
[0026]	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile
[0027]		50					55					60				
[0028]	Ser	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
[0029]	65				70					75					80	
[0030]	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg
[0031]				85					90					95		
[0032]	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser
[0033]			100					105						110		
[0034]	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr
[0035]			115					120					125			
[0036]	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr
[0037]		130					135						140			
[0038]	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu
[0039]	145					150				155					160	
[0040]	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro
[0041]				165					170						175	

[0042]	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly
[0043]				180				185					190			
[0044]	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
[0045]				195				200					205			
[0046]	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His
[0047]				210				215					220			
[0048]	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
[0049]				225				230				235				240
[0050]	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly
[0051]					245					250					255	
[0052]	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Gln
[0053]				260						265					270	
[0054]	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr
[0055]				275						280					285	
[0056]	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp	His	Ala	Trp	Ser	Trp
[0057]				290				295					300			
[0058]	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser
[0059]				305				310				315				320
[0060]	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr
[0061]					325						330				335	
[0062]	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Ser
[0063]				340						345					350	
[0064]	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Leu	Ala
[0065]				355						360					365	
[0066]	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Val
[0067]				370						375					380	
[0068]	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser
[0069]				385				390				395				400
[0070]	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys
[0071]					405					410					415	
[0072]	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu
[0073]				420						425					430	
[0074]	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu
[0075]				435						440					445	
[0076]	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr
[0077]				450						455					460	
[0078]	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val
[0079]				465						470					475	480
[0080]	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
[0081]					485					490					495	
[0082]	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe
[0083]				500						505					510	

[0084]	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
[0085]			515					520						525		
[0086]	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
[0087]		530						535					540			
[0088]	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
[0089]	545					550					555					560
[0090]	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr
[0091]					565					570					575	
[0092]	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
[0093]					580					585					590	
[0094]	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
[0095]			595					600							605	
[0096]	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg
[0097]		610						615					620			
[0098]	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
[0099]	625					630						635				640
[0100]	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
[0101]					645						650				655	
[0102]	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
[0103]					660										670	
[0104]	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln
[0105]			675												685	
[0106]	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
[0107]		690													700	
[0108]	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly					
[0109]	705					710									715	
[0110]	<210>	2														
[0111]	<211>	715														
[0112]	<212>	PRT														
[0113]	<213>	智人														
[0114]	<400>	2														
[0115]	Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro
[0116]	1				5					10					15	
[0117]	Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Gly	Gly	Ser	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys
[0118]					20					25					30	
[0119]	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg
[0120]			35						40					45		
[0121]	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile
[0122]		50							55					60		
[0123]	Thr	Ser	Asp	His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly
[0124]	65					70						75				80
[0125]	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn

[0126]		85		90		95
[0127]	Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn					
[0128]		100		105		110
[0129]	Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val					
[0130]		115		120		125
[0131]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp					
[0132]		130		135		140
[0133]	Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro					
[0134]	145		150		155	160
[0135]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr					
[0136]		165		170		175
[0137]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr					
[0138]		180		185		190
[0139]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro					
[0140]		195		200		205
[0141]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr					
[0142]		210		215		220
[0143]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn					
[0144]	225		230		235	240
[0145]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser					
[0146]		245		250		255
[0147]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu					
[0148]		260		265		270
[0149]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu					
[0150]		275		280		285
[0151]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser					
[0152]		290		295		300
[0153]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu					
[0154]	305		310		315	320
[0155]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr					
[0156]		325		330		335
[0157]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn					
[0158]		340		345		350
[0159]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro					
[0160]		355		360		365
[0161]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln					
[0162]		370		375		380
[0163]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val					
[0164]	385		390		395	400
[0165]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val					
[0166]		405		410		415
[0167]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro					

[0168]	420	425	430
[0169]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
[0170]	435	440	445
[0171]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
[0172]	450	455	460
[0173]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
[0174]	465	470	475
[0175]	Ser Pro Gly Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu		
[0176]	485	490	495
[0177]	Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu		
[0178]	500	505	510
[0179]	Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln		
[0180]	515	520	525
[0181]	Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala		
[0182]	530	535	540
[0183]	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro		
[0184]	545	550	555
[0185]	Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile		
[0186]	565	570	575
[0187]	Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly		
[0188]	580	585	590
[0189]	Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0190]	595	600	605
[0191]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
[0192]	610	615	620
[0193]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
[0194]	625	630	635
[0195]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
[0196]	645	650	655
[0197]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
[0198]	660	665	670
[0199]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
[0200]	675	680	685
[0201]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
[0202]	690	695	700
[0203]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0204]	705	710	715
[0205]	<210> 3		
[0206]	<211> 448		
[0207]	<212> PRT		
[0208]	<213> 智人		
[0209]	<400> 3		

[0210]	Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
[0211]	1 5 10 15
[0212]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
[0213]	20 25 30
[0214]	His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
[0215]	35 40 45
[0216]	Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
[0217]	50 55 60
[0218]	Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
[0219]	65 70 75 80
[0220]	Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0221]	85 90 95
[0222]	Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[0223]	100 105 110
[0224]	Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
[0225]	115 120 125
[0226]	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
[0227]	130 135 140
[0228]	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
[0229]	145 150 155 160
[0230]	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
[0231]	165 170 175
[0232]	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
[0233]	180 185 190
[0234]	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
[0235]	195 200 205
[0236]	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
[0237]	210 215 220
[0238]	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
[0239]	225 230 235 240
[0240]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[0241]	245 250 255
[0242]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
[0243]	260 265 270
[0244]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[0245]	275 280 285
[0246]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[0247]	290 295 300
[0248]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[0249]	305 310 315 320
[0250]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
[0251]	325 330 335

[0252]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
[0253]		340	345 350
[0254]	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
[0255]		355	360 365
[0256]	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
[0257]		370	375 380
[0258]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
[0259]		385	390 395 400
[0260]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
[0261]		405	410 415
[0262]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
[0263]		420	425 430
[0264]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0265]		435	440 445
[0266]	<210>	4	
[0267]	<211>	214	
[0268]	<212>	PRT	
[0269]	<213>	智人	
[0270]	<400>	4	
[0271]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0272]	1	5	10 15
[0273]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr		
[0274]		20	25 30
[0275]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
[0276]		35	40 45
[0277]	Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0278]		50	55 60
[0279]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0280]	65	70	75 80
[0281]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr		
[0282]		85	90 95
[0283]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
[0284]		100	105 110
[0285]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
[0286]		115	120 125
[0287]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
[0288]		130	135 140
[0289]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
[0290]	145	150	155 160
[0291]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
[0292]		165	170 175
[0293]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		

[0294]	180	185	190
[0295]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
[0296]	195	200	205
[0297]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0298]	210		
[0299]	<210> 5		
[0300]	<211> 6		
[0301]	<212> PRT		
[0302]	<213> 智人		
[0303]	<400> 5		
[0304]	Ser Asp His Ala Trp Ser		
[0305]	1 5		
[0306]	<210> 6		
[0307]	<211> 16		
[0308]	<212> PRT		
[0309]	<213> 智人		
[0310]	<400> 6		
[0311]	Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser		
[0312]	1 5 10 15		
[0313]	<210> 7		
[0314]	<211> 10		
[0315]	<212> PRT		
[0316]	<213> 智人		
[0317]	<400> 7		
[0318]	Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr		
[0319]	1 5 10		
[0320]	<210> 8		
[0321]	<211> 11		
[0322]	<212> PRT		
[0323]	<213> 智人		
[0324]	<400> 8		
[0325]	Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn		
[0326]	1 5 10		
[0327]	<210> 9		
[0328]	<211> 7		
[0329]	<212> PRT		
[0330]	<213> 智人		
[0331]	<400> 9		
[0332]	Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser		
[0333]	1 5		
[0334]	<210> 10		
[0335]	<211> 9		

[0336]	<212>	PRT																	
[0337]	<213>	智人																	
[0338]	<400>	10																	
[0339]	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr										
[0340]	1				5														
[0341]	<210>	11																	
[0342]	<211>	18																	
[0343]	<212>	PRT																	
[0344]	<213>	智人																	
[0345]	<400>	11																	
[0346]	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu	Gly	Ser	Thr			
[0347]	1				5					10						15			
[0348]	Lys	Gly																	
[0349]	<210>	12																	
[0350]	<211>	246																	
[0351]	<212>	PRT																	
[0352]	<213>	智人																	
[0353]	<400>	12																	
[0354]	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly			
[0355]	1				5					10						15			
[0356]	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Asn	Tyr	Met			
[0357]				20					25					30					
[0358]	Asp	Trp	Tyr	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr			
[0359]		35						40					45						
[0360]	Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser			
[0361]		50					55					60							
[0362]	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu			
[0363]	65					70				75						80			
[0364]	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr			
[0365]				85					90							95			
[0366]	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly			
[0367]			100						105					110					
[0368]	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Val	Gln	Leu			
[0369]			115					120					125						
[0370]	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met			
[0371]		130						135				140							
[0372]	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn	Met	His	Val			
[0373]	145					150					155					160			
[0374]	Trp	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Ala	Ile	Tyr			
[0375]				165						170						175			
[0376]	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala			
[0377]			180						185					190					

[0378]	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser
[0379]				195					200					205		
[0380]	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Asn
[0381]				210					215					220		
[0382]	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Tyr	Trp	Phe	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr
[0383]				225					230				235			240
[0384]	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
[0385]															245	
[0386]	<210>			13												
[0387]	<211>			245												
[0388]	<212>			PRT												
[0389]	<213>			智人												
[0390]	<400>			13												
[0391]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
[0392]	1				5					10					15	
[0393]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr
[0394]					20					25					30	
[0395]	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile
[0396]					35					40					45	
[0397]	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
[0398]					50					55					60	
[0399]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln
[0400]	65						70					75				80
[0401]	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr
[0402]							85					90				95
[0403]	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly
[0404]							100					105				110
[0405]	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Glu	Val	Lys
[0406]							115					120				125
[0407]	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser
[0408]							130					135				140
[0409]	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser
[0410]	145						150					155				160
[0411]	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile
[0412]							165					170				175
[0413]	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu
[0414]							180					185				190
[0415]	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn
[0416]							195					200				205
[0417]	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr
[0418]							210					215				220
[0419]	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser

[0420]	225	230	235	240
[0421]	Val Thr Val Ser Ser			
[0422]		245		
[0423]	<210> 14			
[0424]	<211> 20			
[0425]	<212> PRT			
[0426]	<213> 智人			
[0427]	<400> 14			
[0428]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro			
[0429]	1	5	10	15
[0430]	Gly Ser Thr Gly			
[0431]		20		
[0432]	<210> 15			
[0433]	<211> 23			
[0434]	<212> PRT			
[0435]	<213> 智人			
[0436]	<400> 15			
[0437]	Met Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala			
[0438]	1	5	10	15
[0439]	Phe Leu Leu Ile Pro Asp Thr			
[0440]		20		
[0441]	<210> 16			
[0442]	<211> 21			
[0443]	<212> PRT			
[0444]	<213> 智人			
[0445]	<400> 16			
[0446]	Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala			
[0447]	1	5	10	15
[0448]	Asp His Ala Asp Gly			
[0449]		20		
[0450]	<210> 17			
[0451]	<211> 5			
[0452]	<212> PRT			
[0453]	<213> 智人			
[0454]	<400> 17			
[0455]	Asp Lys Thr His Thr			
[0456]	1	5		
[0457]	<210> 18			
[0458]	<211> 4			
[0459]	<212> PRT			
[0460]	<213> 智人			
[0461]	<400> 18			

[0462]	Cys Pro Pro Cys
[0463]	1
[0464]	<210> 19
[0465]	<211> 15
[0466]	<212> PRT
[0467]	<213> 智人
[0468]	<400> 19
[0469]	Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
[0470]	1 5 10 15
[0471]	<210> 20
[0472]	<211> 12
[0473]	<212> PRT
[0474]	<213> 智人
[0475]	<400> 20
[0476]	Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr
[0477]	1 5 10
[0478]	<210> 21
[0479]	<211> 10
[0480]	<212> PRT
[0481]	<213> 智人
[0482]	<400> 21
[0483]	Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
[0484]	1 5 10
[0485]	<210> 22
[0486]	<211> 7
[0487]	<212> PRT
[0488]	<213> 智人
[0489]	<400> 22
[0490]	Lys Cys Cys Val Asp Cys Pro
[0491]	1 5
[0492]	<210> 23
[0493]	<211> 7
[0494]	<212> PRT
[0495]	<213> 智人
[0496]	<400> 23
[0497]	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
[0498]	1 5
[0499]	<210> 24
[0500]	<211> 15
[0501]	<212> PRT
[0502]	<213> 智人
[0503]	<400> 24

[0504]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro														
[0505]	1	5				10				15					
[0506]	<210>	25													
[0507]	<211>	12													
[0508]	<212>	PRT													
[0509]	<213>	智人													
[0510]	<400>	25													
[0511]	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro														
[0512]	1	5				10									
[0513]	<210>	26													
[0514]	<211>	17													
[0515]	<212>	PRT													
[0516]	<213>	智人													
[0517]	<400>	26													
[0518]	Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys														
[0519]	1	5				10				15					
[0520]	Pro														
[0521]	<210>	27													
[0522]	<211>	12													
[0523]	<212>	PRT													
[0524]	<213>	智人													
[0525]	<400>	27													
[0526]	Ser Pro Asn Met Val Pro His Ala His His Ala Gln														
[0527]	1	5				10									
[0528]	<210>	28													
[0529]	<211>	12													
[0530]	<212>	PRT													
[0531]	<213>	智人													
[0532]	<400>	28													
[0533]	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro														
[0534]	1	5				10									
[0535]	<210>	29													
[0536]	<211>	12													
[0537]	<212>	PRT													
[0538]	<213>	智人													
[0539]	<400>	29													
[0540]	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro														
[0541]	1	5				10									
[0542]	<210>	30													
[0543]	<211>	15													
[0544]	<212>	PRT													
[0545]	<213>	智人													

[0546]	<400>	30															
[0547]	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro		
[0548]	1				5					10						15	
[0549]	<210>	31															
[0550]	<211>	45															
[0551]	<212>	PRT															
[0552]	<213>	智人															
[0553]	<400>	31															
[0554]	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	
[0555]	1				5					10						15	
[0556]	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	
[0557]				20					25						30		
[0558]	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp				
[0559]			35					40					45				
[0560]	<210>	32															
[0561]	<211>	24															
[0562]	<212>	PRT															
[0563]	<213>	智人															
[0564]	<400>	32															
[0565]	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	
[0566]	1				5					10						15	
[0567]	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys									
[0568]				20													
[0569]	<210>	33															
[0570]	<211>	23															
[0571]	<212>	PRT															
[0572]	<213>	智人															
[0573]	<400>	33															
[0574]	Leu	Gly	Leu	Leu	Val	Ala	Gly	Val	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Ser	Leu	Gly	
[0575]	1				5					10						15	
[0576]	Val	Ala	Ile	His	Leu	Cys	Cys										
[0577]				20													
[0578]	<210>	34															
[0579]	<211>	25															
[0580]	<212>	PRT															
[0581]	<213>	智人															
[0582]	<400>	34															
[0583]	Ala	Leu	Ile	Val	Leu	Gly	Gly	Val	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Phe	Ile	Gly	
[0584]	1				5					10						15	
[0585]	Leu	Gly	Ile	Phe	Phe	Cys	Val	Arg	Cys								
[0586]				20					25								
[0587]	<210>	35															

[0588] <211> 23
 [0589] <212> PRT
 [0590] <213> 智人
 [0591] <400> 35
 [0592] Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu
 [0593] 1 5 10 15
 [0594] Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val
 [0595] 20
 [0596] <210> 36
 [0597] <211> 26
 [0598] <212> PRT
 [0599] <213> 智人
 [0600] <400> 36
 [0601] Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu
 [0602] 1 5 10 15
 [0603] Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 [0604] 20 25
 [0605] <210> 37
 [0606] <211> 26
 [0607] <212> PRT
 [0608] <213> 智人
 [0609] <400> 37
 [0610] Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro
 [0611] 1 5 10 15
 [0612] Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
 [0613] 20 25
 [0614] <210> 38
 [0615] <211> 24
 [0616] <212> PRT
 [0617] <213> 智人
 [0618] <400> 38
 [0619] Ala Leu Pro Ala Ala Leu Ala Val Ile Ser Phe Leu Leu Gly Leu Gly
 [0620] 1 5 10 15
 [0621] Leu Gly Val Ala Cys Val Leu Ala
 [0622] 20
 [0623] <210> 39
 [0624] <211> 4
 [0625] <212> PRT
 [0626] <213> 智人
 [0627] <220>
 [0628] <221> misc_feature
 [0629] <222> (2) .. (3)

[0630]	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0631]	<220>	
[0632]	<221>	MISC_FEATURE
[0633]	<222>	(4) .. (4)
[0634]	<223>	X是L或I
[0635]	<400>	39
[0636]		Tyr Xaa Xaa Xaa
[0637]		1
[0638]	<210>	40
[0639]	<211>	16
[0640]	<212>	PRT
[0641]	<213>	智人
[0642]	<220>	
[0643]	<221>	misc_feature
[0644]	<222>	(2) .. (3)
[0645]	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0646]	<220>	
[0647]	<221>	MISC_FEATURE
[0648]	<222>	(4) .. (4)
[0649]	<223>	X是I或L
[0650]	<220>	
[0651]	<221>	MISC_FEATURE
[0652]	<222>	(5) .. (12)
[0653]	<223>	X是任何氨基酸或不存在
[0654]	<220>	
[0655]	<221>	misc_feature
[0656]	<222>	(14) .. (15)
[0657]	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0658]	<220>	
[0659]	<221>	MISC_FEATURE
[0660]	<222>	(16) .. (16)
[0661]	<223>	X是I或L
[0662]	<400>	40
[0663]		Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa
[0664]		1 5 10 15
[0665]	<210>	41
[0666]	<211>	113
[0667]	<212>	PRT
[0668]	<213>	智人
[0669]	<220>	
[0670]	<221>	MISC_FEATURE
[0671]	<222>	(82) .. (82)

[0672] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0673] <220>
 [0674] <221> MISC_FEATURE
 [0675] <222> (92) .. (92)
 [0676] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0677] <220>
 [0678] <221> MISC_FEATURE
 [0679] <222> (95) .. (95)
 [0680] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0681] <220>
 [0682] <221> MISC_FEATURE
 [0683] <222> (97) .. (97)
 [0684] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0685] <400> 41
 [0686] Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
 [0687] 1 5 10 15
 [0688] Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln Ser Asp
 [0689] 20 25 30
 [0690] Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met
 [0691] 35 40 45
 [0692] Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu
 [0693] 50 55 60
 [0694] Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 [0695] 65 70 75 80
 [0696] Lys Xaa Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Xaa Glu Leu Xaa Gly
 [0697] 85 90 95
 [0698] Xaa Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr
 [0699] 100 105 110
 [0700] Lys
 [0701] <210> 42
 [0702] <211> 112
 [0703] <212> PRT
 [0704] <213> 智人
 [0705] <220>
 [0706] <221> MISC_FEATURE
 [0707] <222> (81) .. (81)
 [0708] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0709] <220>
 [0710] <221> MISC_FEATURE
 [0711] <222> (91) .. (91)
 [0712] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0713] <220>

[0714] <221> MISC_FEATURE
[0715] <222> (94) .. (94)
[0716] <223> X是吡咯赖氨酸
[0717] <220>
[0718] <221> MISC_FEATURE
[0719] <222> (96) .. (96)
[0720] <223> X是吡咯赖氨酸
[0721] <400> 42
[0722] Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
[0723] 1 5 10 15
[0724] Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln Ser Asp
[0725] 20 25 30
[0726] Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met
[0727] 35 40 45
[0728] Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu
[0729] 50 55 60
[0730] Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Thr Arg Lys
[0731] 65 70 75 80
[0732] Xaa Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Xaa Glu Leu Xaa Gly Xaa
[0733] 85 90 95
[0734] Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr Lys
[0735] 100 105 110
[0736] <210> 43
[0737] <211> 102
[0738] <212> PRT
[0739] <213> 智人
[0740] <220>
[0741] <221> MISC_FEATURE
[0742] <222> (71) .. (71)
[0743] <223> X是吡咯赖氨酸
[0744] <220>
[0745] <221> MISC_FEATURE
[0746] <222> (81) .. (81)
[0747] <223> X是吡咯赖氨酸
[0748] <220>
[0749] <221> MISC_FEATURE
[0750] <222> (84) .. (84)
[0751] <223> X是吡咯赖氨酸
[0752] <220>
[0753] <221> MISC_FEATURE
[0754] <222> (86) .. (86)
[0755] <223> X是吡咯赖氨酸

[0756] <400> 43
 [0757] Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
 [0758] 1 5 10 15
 [0759] Leu Ala Val Ser Asp Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu
 [0760] 20 25 30
 [0761] Ala Gly Ile Val Met Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu
 [0762] 35 40 45
 [0763] Ala Val Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala
 [0764] 50 55 60
 [0765] Glu Ala Ala Thr Arg Lys Xaa Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr
 [0766] 65 70 75 80
 [0767] Xaa Glu Leu Xaa Gly Xaa Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr
 [0768] 85 90 95
 [0769] Gln Arg Pro Tyr Tyr Lys
 [0770] 100
 [0771] <210> 44
 [0772] <211> 101
 [0773] <212> PRT
 [0774] <213> 智人
 [0775] <220>
 [0776] <221> MISC_FEATURE
 [0777] <222> (70) .. (70)
 [0778] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0779] <220>
 [0780] <221> MISC_FEATURE
 [0781] <222> (80) .. (80)
 [0782] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0783] <220>
 [0784] <221> MISC_FEATURE
 [0785] <222> (83) .. (83)
 [0786] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0787] <220>
 [0788] <221> MISC_FEATURE
 [0789] <222> (85) .. (85)
 [0790] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0791] <400> 44
 [0792] Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
 [0793] 1 5 10 15
 [0794] Leu Ala Val Ser Asp Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu
 [0795] 20 25 30
 [0796] Ala Gly Ile Val Met Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu
 [0797] 35 40 45

[0798]	Ala Val Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala
[0799]	50 55 60
[0800]	Glu Ala Thr Arg Lys Xaa Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Xaa
[0801]	65 70 75 80
[0802]	Glu Leu Xaa Gly Xaa Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln
[0803]	85 90 95
[0804]	Arg Pro Tyr Tyr Lys
[0805]	100
[0806]	<210> 45
[0807]	<211> 21
[0808]	<212> PRT
[0809]	<213> 智人
[0810]	<220>
[0811]	<221> MISC_FEATURE
[0812]	<222> (5) .. (5)
[0813]	<223> X是吡咯赖氨酸
[0814]	<220>
[0815]	<221> MISC_FEATURE
[0816]	<222> (8) .. (8)
[0817]	<223> X是吡咯赖氨酸
[0818]	<220>
[0819]	<221> MISC_FEATURE
[0820]	<222> (10) .. (10)
[0821]	<223> X是吡咯赖氨酸
[0822]	<220>
[0823]	<221> MISC_FEATURE
[0824]	<222> (21) .. (21)
[0825]	<223> X是吡咯赖氨酸
[0826]	<400> 45
[0827]	Glu Ser Pro Tyr Xaa Glu Leu Xaa Gly Xaa Arg Ser Asp Val Tyr Ser
[0828]	1 5 10 15
[0829]	Asp Leu Asn Thr Xaa
[0830]	20
[0831]	<210> 46
[0832]	<211> 86
[0833]	<212> PRT
[0834]	<213> 智人
[0835]	<400> 46
[0836]	Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala
[0837]	1 5 10 15
[0838]	Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu
[0839]	20 25 30

[0840] Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile
 [0841] 35 40 45
 [0842] Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val
 [0843] 50 55 60
 [0844] Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys
 [0845] 65 70 75 80
 [0846] His Glu Lys Pro Pro Gln
 [0847] 85
 [0848] <210> 47
 [0849] <211> 21
 [0850] <212> PRT
 [0851] <213> 智人
 [0852] <220>
 [0853] <221> MISC_FEATURE
 [0854] <222> (12) .. (12)
 [0855] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0856] <400> 47
 [0857] Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Xaa Glu Thr Tyr Glu
 [0858] 1 5 10 15
 [0859] Thr Leu Lys His Glu
 [0860] 20
 [0861] <210> 48
 [0862] <211> 171
 [0863] <212> PRT
 [0864] <213> 智人
 [0865] <220>
 [0866] <221> MISC_FEATURE
 [0867] <222> (140) .. (140)
 [0868] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0869] <220>
 [0870] <221> MISC_FEATURE
 [0871] <222> (147) .. (147)
 [0872] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0873] <220>
 [0874] <221> MISC_FEATURE
 [0875] <222> (150) .. (150)
 [0876] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0877] <220>
 [0878] <221> MISC_FEATURE
 [0879] <222> (159) .. (159)
 [0880] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0881] <400> 48

[0882] Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
 [0883] 1 5 10 15
 [0884] Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
 [0885] 20 25 30
 [0886] Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
 [0887] 35 40 45
 [0888] Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
 [0889] 50 55 60
 [0890] Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
 [0891] 65 70 75 80
 [0892] Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys
 [0893] 85 90 95
 [0894] Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val
 [0895] 100 105 110
 [0896] Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His
 [0897] 115 120 125
 [0898] Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Xaa Ala Leu Leu Arg
 [0899] 130 135 140
 [0900] Asn Asp Xaa Val Tyr Xaa Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Xaa Tyr
 [0901] 145 150 155 160
 [0902] Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
 [0903] 165 170
 [0904] <210> 49
 [0905] <211> 127
 [0906] <212> PRT
 [0907] <213> 智人
 [0908] <220>
 [0909] <221> MISC_FEATURE
 [0910] <222> (87) .. (87)
 [0911] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0912] <220>
 [0913] <221> MISC_FEATURE
 [0914] <222> (96) .. (96)
 [0915] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0916] <220>
 [0917] <221> MISC_FEATURE
 [0918] <222> (103) .. (103)
 [0919] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0920] <220>
 [0921] <221> MISC_FEATURE
 [0922] <222> (106) .. (106)
 [0923] <223> X是吡咯赖氨酸

[0924] <400> 49
 [0925] Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
 [0926] 1 5 10 15
 [0927] Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
 [0928] 20 25 30
 [0929] Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
 [0930] 35 40 45
 [0931] Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
 [0932] 50 55 60
 [0933] Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
 [0934] 65 70 75 80
 [0935] Asp Lys Glu Ser Thr Val Xaa Val His Tyr Arg Thr Ala Asp Thr Xaa
 [0936] 85 90 95
 [0937] Ala Leu Leu Arg Asn Asp Xaa Val Tyr Xaa Pro Leu Arg Asp Arg Asp
 [0938] 100 105 110
 [0939] Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
 [0940] 115 120 125
 [0941] <210> 50
 [0942] <211> 21
 [0943] <212> PRT
 [0944] <213> 智人
 [0945] <220>
 [0946] <221> MISC_FEATURE
 [0947] <222> (2) .. (2)
 [0948] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0949] <220>
 [0950] <221> MISC_FEATURE
 [0951] <222> (5) .. (5)
 [0952] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0953] <220>
 [0954] <221> MISC_FEATURE
 [0955] <222> (14) .. (14)
 [0956] <223> X是吡咯赖氨酸
 [0957] <400> 50
 [0958] Asp Xaa Val Tyr Xaa Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Xaa Tyr Ser
 [0959] 1 5 10 15
 [0960] His Leu Gly Gly Asn
 [0961] 20
 [0962] <210> 51
 [0963] <211> 207
 [0964] <212> PRT
 [0965] <213> 智人

[0966]	<400>	51
[0967]	Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser	
[0968]	1	5 10 15
[0969]	Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr	
[0970]		20 25 30
[0971]	Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr	
[0972]		35 40 45
[0973]	Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys	
[0974]		50 55 60
[0975]	Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp	
[0976]	65	70 75 80
[0977]	His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr	
[0978]		85 90 95
[0979]	Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu	
[0980]		100 105 110
[0981]	Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met	
[0982]		115 120 125
[0983]	Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu	
[0984]		130 135 140
[0985]	Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys	
[0986]	145	150 155 160
[0987]	Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn	
[0988]		165 170 175
[0989]	Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg	
[0990]		180 185 190
[0991]	Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile	
[0992]		195 200 205
[0993]	<210>	52
[0994]	<211>	21
[0995]	<212>	PRT
[0996]	<213>	智人
[0997]	<400>	52
[0998]	Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser	
[0999]	1	5 10 15
[1000]	Gly Leu Asn Gln Arg	
[1001]		20
[1002]	<210>	53
[1003]	<211>	182
[1004]	<212>	PRT
[1005]	<213>	智人
[1006]	<220>	
[1007]	<221>	MISC_FEATURE

[1008]	<222>	(139) .. (139)
[1009]	<223>	X是吡咯赖氨酸
[1010]	<220>	
[1011]	<221>	MISC_FEATURE
[1012]	<222>	(144) .. (144)
[1013]	<223>	X是吡咯赖氨酸
[1014]	<220>	
[1015]	<221>	MISC_FEATURE
[1016]	<222>	(151) .. (151)
[1017]	<223>	X是吡咯赖氨酸
[1018]	<220>	
[1019]	<221>	MISC_FEATURE
[1020]	<222>	(158) .. (158)
[1021]	<223>	X是吡咯赖氨酸
[1022]	<220>	
[1023]	<221>	MISC_FEATURE
[1024]	<222>	(161) .. (161)
[1025]	<223>	X是吡咯赖氨酸
[1026]	<400>	53
[1027]	Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu	
[1028]	1	5 10 15
[1029]	Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys	
[1030]	20	25 30
[1031]	Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala	
[1032]	35	40 45
[1033]	Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe	
[1034]	50	55 60
[1035]	Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp	
[1036]	65	70 75 80
[1037]	Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro	
[1038]	85	90 95
[1039]	Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala	
[1040]	100	105 110
[1041]	Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val	
[1042]	115	120 125
[1043]	Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Xaa Asp Gly Val Arg Xaa	
[1044]	130	135 140
[1045]	Ser Arg Ala Ser Asp Lys Xaa Thr Leu Leu Pro Asn Asp Xaa Leu Tyr	
[1046]	145	150 155 160
[1047]	Xaa Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly	
[1048]	165	170 175
[1049]	Asn Gln Leu Arg Arg Asn	

[illegible]

[1092]	20	25	30
[1093]	Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala		
[1094]	35	40	45
[1095]	Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr		
[1096]	50	55	60
[1097]	Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg		
[1098]	65	70	75
[1099]	Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met		
[1100]	85	90	95
[1101]	Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu		
[1102]	100	105	110
[1103]	Leu Xaa Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys		
[1104]	115	120	125
[1105]	Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Xaa Gly Leu		
[1106]	130	135	140
[1107]	Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu		
[1108]	145	150	155
[1109]	Pro Pro Arg		
[1110]	<210> 56		
[1111]	<211> 164		
[1112]	<212> PRT		
[1113]	<213> 智人		
[1114]	<220>		
[1115]	<221> MISC_FEATURE		
[1116]	<222> (115) .. (115)		
[1117]	<223> X是吡咯赖氨酸		
[1118]	<220>		
[1119]	<221> MISC_FEATURE		
[1120]	<222> (143) .. (143)		
[1121]	<223> X是吡咯赖氨酸		
[1122]	<400> 56		
[1123]	Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu		
[1124]	1	5	10
[1125]	Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys		
[1126]	20	25	30
[1127]	Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala		
[1128]	35	40	45
[1129]	Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr		
[1130]	50	55	60
[1131]	Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg		
[1132]	65	70	75
[1133]	Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met		

[1134]	85	90	95
[1135]	Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn		
[1136]	100	105	110
[1137]	Glu Leu Xaa Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met		
[1138]	115	120	125
[1139]	Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Xaa Gly		
[1140]	130	135	140
[1141]	Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala		
[1142]	145	150	155
[1143]	Leu Pro Pro Arg		160
[1144]	<210> 57		
[1145]	<211> 21		
[1146]	<212> PRT		
[1147]	<213> 智人		
[1148]	<220>		
[1149]	<221> MISC_FEATURE		
[1150]	<222> (2) .. (2)		
[1151]	<223> X是吡咯赖氨酸		
[1152]	<400> 57		
[1153]	Asn Xaa Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp		
[1154]	1	5	10
[1155]	Val Leu Asp Lys Arg		15
[1156]	20		
[1157]	<210> 58		
[1158]	<211> 22		
[1159]	<212> PRT		
[1160]	<213> 智人		
[1161]	<400> 58		
[1162]	Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr		
[1163]	1	5	10
[1164]	Ser Glu Ile Gly Met Lys		15
[1165]	20		
[1166]	<210> 59		
[1167]	<211> 21		
[1168]	<212> PRT		
[1169]	<213> 智人		
[1170]	<220>		
[1171]	<221> MISC_FEATURE		
[1172]	<222> (5) .. (5)		
[1173]	<223> X是吡咯赖氨酸		
[1174]	<220>		
[1175]	<221> MISC_FEATURE		

[1176]	<222>	(21) .. (21)
[1177]	<223>	X是吡咯赖氨酸
[1178]	<400>	59
[1179]	Asp Gly Leu Tyr Xaa Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp	
[1180]	1	5 10 15
[1181]	Ala Leu His Met Xaa	
[1182]		20
[1183]	<210>	60
[1184]	<211>	226
[1185]	<212>	PRT
[1186]	<213>	智人
[1187]	<220>	
[1188]	<221>	MISC_FEATURE
[1189]	<222>	(170) .. (170)
[1190]	<223>	X是吡咯赖氨酸
[1191]	<220>	
[1192]	<221>	MISC_FEATURE
[1193]	<222>	(207) .. (207)
[1194]	<223>	X是吡咯赖氨酸
[1195]	<400>	60
[1196]	Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe	
[1197]	1	5 10 15
[1198]	Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala	
[1199]		20 25 30
[1200]	Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu	
[1201]		35 40 45
[1202]	Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val	
[1203]	50	55 60
[1204]	Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe	
[1205]	65	70 75 80
[1206]	Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ile Ile Gln Asn Val	
[1207]		85 90 95
[1208]	Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln Glu Gly Asn	
[1209]		100 105 110
[1210]	Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val Arg Gln Pro	
[1211]		115 120 125
[1212]	Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile	
[1213]	130	135 140
[1214]	Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly	
[1215]	145	150 155 160
[1216]	Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Xaa Asn Glu Lys Leu Gly Leu	
[1217]		165 170 175

[1218]	Asp	Ala	Gly	Asp	Glu	Tyr	Glu	Asp	Glu	Asn	Leu	Tyr	Glu	Gly	Leu	Asn
[1219]					180				185						190	
[1220]	Leu	Asp	Asp	Cys	Ser	Met	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Arg	Gly	Leu	Xaa	Gly
[1221]					195				200						205	
[1222]	Thr	Tyr	Gln	Asp	Val	Gly	Ser	Leu	Asn	Ile	Gly	Asp	Val	Gln	Leu	Glu
[1223]					210				215						220	
[1224]	Lys	Pro														
[1225]	225															
[1226]	<210>	61														
[1227]	<211>	188														
[1228]	<212>	PRT														
[1229]	<213>	智人														
[1230]	<400>	61														
[1231]	Met	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Val	Leu	Gln	Ala	Leu	Pro	Ala	Thr	Ile	Phe
[1232]	1				5					10					15	
[1233]	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Ala	Val	Tyr	Leu	Gly	Pro	Gly	Cys	Gln	Ala
[1234]					20					25					30	
[1235]	Leu	Trp	Met	His	Lys	Val	Pro	Ala	Ser	Leu	Met	Val	Ser	Leu	Gly	Glu
[1236]					35					40					45	
[1237]	Asp	Ala	His	Phe	Gln	Cys	Pro	His	Asn	Ser	Ser	Asn	Asn	Ala	Asn	Val
[1238]					50					55					60	
[1239]	Thr	Trp	Trp	Arg	Val	Leu	His	Gly	Asn	Tyr	Thr	Trp	Pro	Pro	Glu	Phe
[1240]	65					70					75					80
[1241]	Leu	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Pro	Asn	Glu	Pro	Pro	Pro	Arg	Pro	Phe	Leu
[1242]						85					90					95
[1243]	Asp	Met	Gly	Glu	Gly	Thr	Lys	Asn	Arg	Ile	Ile	Thr	Ala	Glu	Gly	Ile
[1244]						100					105					110
[1245]	Ile	Leu	Leu	Phe	Cys	Ala	Val	Val	Pro	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Phe	Arg
[1246]						115					120					125
[1247]	Lys	Arg	Trp	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala	Gly	Asp	Glu	Tyr
[1248]						130					135					140
[1249]	Glu	Asp	Glu	Asn	Leu	Tyr	Glu	Gly	Leu	Asn	Leu	Asp	Asp	Cys	Ser	Met
[1250]	145						150					155				160
[1251]	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Arg	Gly	Leu	Gln	Gly	Thr	Tyr	Gln	Asp	Val	Gly
[1252]							165					170				175
[1253]	Ser	Leu	Asn	Ile	Gly	Asp	Val	Gln	Leu	Glu	Lys	Pro				
[1254]						180						185				
[1255]	<210>	62														
[1256]	<211>	21														
[1257]	<212>	PRT														
[1258]	<213>	智人														
[1259]	<400>	62														

[1260]	Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu
[1261]	1 5 10 15
[1262]	Asp Ile Ser Arg Gly
[1263]	20
[1264]	<210> 63
[1265]	<211> 20
[1266]	<212> PRT
[1267]	<213> 智人
[1268]	<400> 63
[1269]	Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met
[1270]	1 5 10 15
[1271]	Pro Gly Arg Gly
[1272]	20
[1273]	<210> 64
[1274]	<211> 20
[1275]	<212> PRT
[1276]	<213> 智人
[1277]	<400> 64
[1278]	Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met
[1279]	1 5 10 15
[1280]	Pro Gly Arg Gly
[1281]	20
[1282]	<210> 65
[1283]	<211> 68
[1284]	<212> PRT
[1285]	<213> 智人
[1286]	<400> 65
[1287]	Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
[1288]	1 5 10 15
[1289]	Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
[1290]	20 25 30
[1291]	Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
[1292]	35 40 45
[1293]	Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
[1294]	50 55 60
[1295]	Ala Tyr Arg Ser
[1296]	65
[1297]	<210> 66
[1298]	<211> 68
[1299]	<212> PRT
[1300]	<213> 智人
[1301]	<400> 66

[1302]	Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
[1303]	1 5 10 15
[1304]	Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
[1305]	20 25 30
[1306]	Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
[1307]	35 40 45
[1308]	Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
[1309]	50 55 60
[1310]	Ala Tyr Arg Ser
[1311]	65
[1312]	<210> 67
[1313]	<211> 619
[1314]	<212> PRT
[1315]	<213> 智人
[1316]	<400> 67
[1317]	Met Pro Asp Pro Ala Ala His Leu Pro Phe Phe Tyr Gly Ser Ile Ser
[1318]	1 5 10 15
[1319]	Arg Ala Glu Ala Glu Glu His Leu Lys Leu Ala Gly Met Ala Asp Gly
[1320]	20 25 30
[1321]	Leu Phe Leu Leu Arg Gln Cys Leu Arg Ser Leu Gly Gly Tyr Val Leu
[1322]	35 40 45
[1323]	Ser Leu Val His Asp Val Arg Phe His His Phe Pro Ile Glu Arg Gln
[1324]	50 55 60
[1325]	Leu Asn Gly Thr Tyr Ala Ile Ala Gly Gly Lys Ala His Cys Gly Pro
[1326]	65 70 75 80
[1327]	Ala Glu Leu Cys Glu Phe Tyr Ser Arg Asp Pro Asp Gly Leu Pro Cys
[1328]	85 90 95
[1329]	Asn Leu Arg Lys Pro Cys Asn Arg Pro Ser Gly Leu Glu Pro Gln Pro
[1330]	100 105 110
[1331]	Gly Val Phe Asp Cys Leu Arg Asp Ala Met Val Arg Asp Tyr Val Arg
[1332]	115 120 125
[1333]	Gln Thr Trp Lys Leu Glu Gly Glu Ala Leu Glu Gln Ala Ile Ile Ser
[1334]	130 135 140
[1335]	Gln Ala Pro Gln Val Glu Lys Leu Ile Ala Thr Thr Ala His Glu Arg
[1336]	145 150 155 160
[1337]	Met Pro Trp Tyr His Ser Ser Leu Thr Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys
[1338]	165 170 175
[1339]	Leu Tyr Ser Gly Ala Gln Thr Asp Gly Lys Phe Leu Leu Arg Pro Arg
[1340]	180 185 190
[1341]	Lys Glu Gln Gly Thr Tyr Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Val
[1342]	195 200 205
[1343]	Tyr His Tyr Leu Ile Ser Gln Asp Lys Ala Gly Lys Tyr Cys Ile Pro

[1344]	210	215	220
[1345]	Glu Gly Thr Lys Phe Asp Thr Leu Trp Gln Leu Val Glu Tyr Leu Lys		
[1346]	225	230	235 240
[1347]	Leu Lys Ala Asp Gly Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Glu Ala Cys Pro Asn		
[1348]		245	250 255
[1349]	Ser Ser Ala Ser Asn Ala Ser Gly Ala Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala		
[1350]		260	265 270
[1351]	His Pro Ser Thr Leu Thr His Pro Gln Arg Arg Ile Asp Thr Leu Asn		
[1352]		275	280 285
[1353]	Ser Asp Gly Tyr Thr Pro Glu Pro Ala Arg Ile Thr Ser Pro Asp Lys		
[1354]	290	295	300
[1355]	Pro Arg Pro Met Pro Met Asp Thr Ser Val Tyr Glu Ser Pro Tyr Ser		
[1356]	305	310	315 320
[1357]	Asp Pro Glu Glu Leu Lys Asp Lys Lys Leu Phe Leu Lys Arg Asp Asn		
[1358]		325	330 335
[1359]	Leu Leu Ile Ala Asp Ile Glu Leu Gly Cys Gly Asn Phe Gly Ser Val		
[1360]		340	345 350
[1361]	Arg Gln Gly Val Tyr Arg Met Arg Lys Lys Gln Ile Asp Val Ala Ile		
[1362]		355	360 365
[1363]	Lys Val Leu Lys Gln Gly Thr Glu Lys Ala Asp Thr Glu Glu Met Met		
[1364]	370	375	380
[1365]	Arg Glu Ala Gln Ile Met His Gln Leu Asp Asn Pro Tyr Ile Val Arg		
[1366]	385	390	395 400
[1367]	Leu Ile Gly Val Cys Gln Ala Glu Ala Leu Met Leu Val Met Glu Met		
[1368]		405	410 415
[1369]	Ala Gly Gly Gly Pro Leu His Lys Phe Leu Val Gly Lys Arg Glu Glu		
[1370]		420	425 430
[1371]	Ile Pro Val Ser Asn Val Ala Glu Leu Leu His Gln Val Ser Met Gly		
[1372]		435	440 445
[1373]	Met Lys Tyr Leu Glu Glu Lys Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala		
[1374]	450	455	460
[1375]	Arg Asn Val Leu Leu Val Asn Arg His Tyr Ala Lys Ile Ser Asp Phe		
[1376]	465	470	475 480
[1377]	Gly Leu Ser Lys Ala Leu Gly Ala Asp Asp Ser Tyr Tyr Thr Ala Arg		
[1378]		485	490 495
[1379]	Ser Ala Gly Lys Trp Pro Leu Lys Trp Tyr Ala Pro Glu Cys Ile Asn		
[1380]		500	505 510
[1381]	Phe Arg Lys Phe Ser Ser Arg Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr		
[1382]		515	520 525
[1383]	Met Trp Glu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln Lys Pro Tyr Lys Lys Met Lys		
[1384]	530	535	540
[1385]	Gly Pro Glu Val Met Ala Phe Ile Glu Gln Gly Lys Arg Met Glu Cys		

[1386]	545	550	555	560
[1387]	Pro Pro Glu Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Ala Leu Met Ser Asp Cys Trp			
[1388]		565	570	575
[1389]	Ile Tyr Lys Trp Glu Asp Arg Pro Asp Phe Leu Thr Val Glu Gln Arg			
[1390]		580	585	590
[1391]	Met Arg Ala Cys Tyr Tyr Ser Leu Ala Ser Lys Val Glu Gly Pro Pro			
[1392]		595	600	605
[1393]	Gly Ser Thr Gln Lys Ala Glu Ala Ala Cys Ala			
[1394]	610	615		
[1395]	<210> 68			
[1396]	<211> 9			
[1397]	<212> PRT			
[1398]	<213> 智人			
[1399]	<400> 68			
[1400]	Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala			
[1401]	1	5		
[1402]	<210> 69			
[1403]	<211> 8			
[1404]	<212> PRT			
[1405]	<213> 智人			
[1406]	<400> 69			
[1407]	Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys			
[1408]	1	5		
[1409]	<210> 70			
[1410]	<211> 10			
[1411]	<212> PRT			
[1412]	<213> 智人			
[1413]	<400> 70			
[1414]	Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu			
[1415]	1	5	10	
[1416]	<210> 71			
[1417]	<211> 5			
[1418]	<212> PRT			
[1419]	<213> 智人			
[1420]	<220>			
[1421]	<221> MISC_FEATURE			
[1422]	<222> (1) .. (5)			
[1423]	<223> 序列可重复n次			
[1424]	<400> 71			
[1425]	Gly Ser Gly Gly Ser			
[1426]	1	5		
[1427]	<210> 72			

[1428]	<211>	4
[1429]	<212>	PRT
[1430]	<213>	智人
[1431]	<220>	
[1432]	<221>	MISC_FEATURE
[1433]	<222>	(1) .. (4)
[1434]	<223>	序列可重复n次
[1435]	<400>	72
[1436]	Gly Gly Gly Ser	
[1437]	1	
[1438]	<210>	73
[1439]	<211>	4
[1440]	<212>	PRT
[1441]	<213>	智人
[1442]	<400>	73
[1443]	Gly Gly Ser Gly	
[1444]	1	
[1445]	<210>	74
[1446]	<211>	5
[1447]	<212>	PRT
[1448]	<213>	智人
[1449]	<400>	74
[1450]	Gly Gly Ser Gly Gly	
[1451]	1	5
[1452]	<210>	75
[1453]	<211>	5
[1454]	<212>	PRT
[1455]	<213>	智人
[1456]	<400>	75
[1457]	Gly Ser Gly Ser Gly	
[1458]	1	5
[1459]	<210>	76
[1460]	<211>	5
[1461]	<212>	PRT
[1462]	<213>	智人
[1463]	<400>	76
[1464]	Gly Ser Gly Gly Gly	
[1465]	1	5
[1466]	<210>	77
[1467]	<211>	5
[1468]	<212>	PRT
[1469]	<213>	智人

[1470]	<400>	77																
[1471]	Gly Gly Gly Ser Gly																	
[1472]	1	5																
[1473]	<210>	78																
[1474]	<211>	5																
[1475]	<212>	PRT																
[1476]	<213>	智人																
[1477]	<400>	78																
[1478]	Gly Ser Ser Ser Gly																	
[1479]	1	5																
[1480]	<210>	79																
[1481]	<211>	42																
[1482]	<212>	PRT																
[1483]	<213>	智人																
[1484]	<400>	79																
[1485]	Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met																	
[1486]	1	5	10	15														
[1487]	Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe																	
[1488]		20	25	30														
[1489]	Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu																	
[1490]		35	40															
[1491]	<210>	80																
[1492]	<211>	44																
[1493]	<212>	PRT																
[1494]	<213>	智人																
[1495]	<400>	80																
[1496]	Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met																	
[1497]	1	5	10	15														
[1498]	Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro																	
[1499]		20	25	30														
[1500]	Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser																	
[1501]		35	40															
[1502]	<210>	81																
[1503]	<211>	35																
[1504]	<212>	PRT																
[1505]	<213>	智人																
[1506]	<400>	81																
[1507]	Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr																	
[1508]	1	5	10	15														
[1509]	Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp																	
[1510]		20	25	30														
[1511]	Val Thr Leu																	

[1512]	35	
[1513]	<210>	82
[1514]	<211>	37
[1515]	<212>	PRT
[1516]	<213>	智人
[1517]	<400>	82
[1518]	Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly	
[1519]	1	5 10 15
[1520]	Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser	
[1521]	20	25 30
[1522]	Thr Leu Ala Lys Ile	
[1523]	35	
[1524]	<210>	83
[1525]	<211>	114
[1526]	<212>	PRT
[1527]	<213>	智人
[1528]	<400>	83
[1529]	Cys Cys Leu Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr	
[1530]	1	5 10 15
[1531]	Ala Gly Arg Glu Ile Asn Leu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Glu Gln	
[1532]	20	25 30
[1533]	Thr Glu Ala Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr	
[1534]	35	40 45
[1535]	Gly Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly	
[1536]	50	55 60
[1537]	Ser Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile	
[1538]	65	70 75 80
[1539]	Val Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Pro Asn Ser Arg Leu	
[1540]	85	90 95
[1541]	Ala Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val	
[1542]	100	105 110
[1543]	Arg Ser	
[1544]	<210>	84
[1545]	<211>	49
[1546]	<212>	PRT
[1547]	<213>	智人
[1548]	<400>	84
[1549]	His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu	
[1550]	1	5 10 15
[1551]	Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser	
[1552]	20	25 30
[1553]	Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser	

[1554]	35	40	45
[1555]	Pro		
[1556]	<210> 85		
[1557]	<211> 187		
[1558]	<212> PRT		
[1559]	<213> 智人		
[1560]	<400> 85		
[1561]	Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile Arg Gln Lys Leu His Leu Cys Tyr		
[1562]	1 5 10 15		
[1563]	Pro Val Gln Thr Ser Gln Pro Lys Leu Glu Leu Val Asp Ser Arg Pro		
[1564]	20 25 30		
[1565]	Arg Arg Ser Ser Thr Gln Leu Arg Ser Gly Ala Ser Val Thr Glu Pro		
[1566]	35 40 45		
[1567]	Val Ala Glu Glu Arg Gly Leu Met Ser Gln Pro Leu Met Glu Thr Cys		
[1568]	50 55 60		
[1569]	His Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Ala		
[1570]	65 70 75 80		
[1571]	Ser Pro Ala Gly Gly Pro Ser Ser Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg		
[1572]	85 90 95		
[1573]	Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met		
[1574]	100 105 110		
[1575]	Lys Ala Asp Thr Val Ile Val Gly Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu		
[1576]	115 120 125		
[1577]	Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu Leu		
[1578]	130 135 140		
[1579]	Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro		
[1580]	145 150 155 160		
[1581]	Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly Lys		
[1582]	165 170 175		
[1583]	Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala Ser Gly Lys		
[1584]	180 185		
[1585]	<210> 86		
[1586]	<211> 54		
[1587]	<212> PRT		
[1588]	<213> 智人		
[1589]	<400> 86		
[1590]	His Ile Trp Gln Leu Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln		
[1591]	1 5 10 15		
[1592]	Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln		
[1593]	20 25 30		
[1594]	Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg		
[1595]	35 40 45		

[1596] Leu Gly Asp Leu Trp Val
 [1597] 50
 [1598] <210> 87
 [1599] <211> 60
 [1600] <212> PRT
 [1601] <213> 智人
 [1602] <400> 87
 [1603] Cys Val Lys Arg Arg Lys Pro Arg Gly Asp Val Val Lys Val Ile Val
 [1604] 1 5 10 15
 [1605] Ser Val Gln Arg Lys Arg Gln Glu Ala Glu Gly Glu Ala Thr Val Ile
 [1606] 20 25 30
 [1607] Glu Ala Leu Gln Ala Pro Pro Asp Val Thr Thr Val Ala Val Glu Glu
 [1608] 35 40 45
 [1609] Thr Ile Pro Ser Phe Thr Gly Arg Ser Pro Asn His
 [1610] 50 55 60
 [1611] <210> 88
 [1612] <211> 1422
 [1613] <212> DNA
 [1614] <213> 智人
 [1615] <400> 88
 [1616] atgtctgtgc tggtagaccag cctgtctgtg tgcgagctgc cccacccgc ctttctgtg 60
 [1617] atccccggcg gaagttaccc atatgacgtt cccgactacg ctggcgacat ccagatgacc 120
 [1618] cagaccacct ccagcctgag cgccagcctg ggcgaccggg tgaccatcag ctgccgggcc 180
 [1619] agccaggaca tcagcaagta cctgaactgg tatcagcaga agcccgacgg caccgtcaag 240
 [1620] ctgtgatct accacaccag ccggtgcac agcggcgtgc ccagccggt tagcggcagc 300
 [1621] ggctccggca ccgactacag cctgaccatc tccaacctgg aacaggaaga tatcgccacc 360
 [1622] tacttttgcc agcagggcaa cactgccc tacaccttg gcggcggaac aaagctggaa 420
 [1623] atcaccggca gcacctccg cagcggcaag cctggcagcg gcgaggcgag caccaaggcg 480
 [1624] gaggtgaagc tgcaggaaag cggcctggc ctggtggccc ccagccagag cctgagcgtg 540
 [1625] acctgcaccg tgagcggcgt gacctgccc gactacggcg tgagctggat ccggcagccc 600
 [1626] cccaggaagg gcctggaatg gctggcgctg atctggggca gcgagaccac ctactacaac 660
 [1627] agcgccctga agagccggct gaccatcatc aaggacaaca gcaagagcca ggtgttcctg 720
 [1628] aagatgaaca gcctgcagac cgacgacacc gccatctact actgcgcaa gcactactac 780
 [1629] tacggcggca gctacgcat ggactactgg ggccagggca ccagcgtgac cgtgagcagc 840
 [1630] gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgccctatgt tctgggtgct ggtggtggtc 900
 [1631] ggaggcgtgc tggcctgcta cagcctgctg gtcaccgtgg cttcatcat cttttgggtg 960
 [1632] aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 1020
 [1633] actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 1080
 [1634] gaactgcggg tgaagtcag cagaagcgcc gacggccctg cctaccagca gggccagaat 1140
 [1635] cagctgtaca acgagctgaa cctgggcaga aggaagagt acgacgtcct ggataagcgg 1200
 [1636] agaggccggg accctgagat gggcggcaag cctcgcgga agaaccacca ggaaggcctg 1260
 [1637] tataacgaac tgcagaaaga caagatggcc gaggcctaca gcgagatcgg catgaaggcg 1320

[1638]	gagcggaggc ggggcaaggg ccacgacggc ctgtatcagg gcctgtccac cgccaccaag	1380
[1639]	gatacctacg acgccctgca catgcaggcc ctgccccaa gg	1422
[1640]	<210> 89	
[1641]	<211> 2145	
[1642]	<212> DNA	
[1643]	<213> 智人	
[1644]	<400> 89	
[1645]	atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt	60
[1646]	gacggaggca gcgactataa agatgacgat gacaaaggag gtagcgatat acaaatgact	120
[1647]	caatcacctt ctcactttc cgccagcgtg ggtgatcgag tgaccatcac atgccgcgct	180
[1648]	tcacaggaca tctctcttta cctgaactgg taccagcaga aaccgggaa agcccaaaag	240
[1649]	ctgttgatct actatacatc aagactgcac tctggcgtcc cctctaggtt cagtggatct	300
[1650]	ggctcaggta ctgacttcac gttcactatt tccagcctgc agccggaaga tattgctacc	360
[1651]	tactattgtc agcagggaaa taccctccca tataccttg ggcaggggac aaaggtggaa	420
[1652]	atcaagcgga cggtagctgc tccgtcagtg ttcatcttc caccttcaga tgagcagctg	480
[1653]	aagtccgga ccgccagtgt ggtgtgcctc ctgaataact tttatccacg agaagccaag	540
[1654]	gtgcagtgga aagtggataa cgctttgcaa agtggcaatt ctcaagagag cgtaactgag	600
[1655]	caagatagca aggacagtac ttacagcttg agcagcacgc tgaccctgag caaggccgat	660
[1656]	tacgagaaac acaaggtgta tgcctgcgag gtgaccacc agggccttag ctcacctgtg	720
[1657]	accaagtcct tcaacagagg cgagtgtggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	780
[1658]	ggcgagggca gcaccaagg cgaggtccaa ctgcaggaaa gcggtccagg cttggtgaga	840
[1659]	ccatcccaga ccctgagcct cacctgtacc gtgtccgggt acagtatcac ctccgacat	900
[1660]	gcatggtcct ggggtgcgca gcctcccga agaggtcttg aatggatcgg gtatatctcc	960
[1661]	tactcaggaa tcaccaccta caatccctcc cttaagtcaa gggtgactat gctccgcgat	1020
[1662]	acatccaaaa atcagttctc ctttcggttg tcaagtgtta cagccgccga caccgcagtc	1080
[1663]	tactactgtg caaggagcct cgccaggacg actgcaatgg attattgggg ccagggtcc	1140
[1664]	ctggtgactg tcagcagcgc ctcaacaaag ggcccatctg tttttccact tgccccagc	1200
[1665]	tctaaaagta cctcaggagg aaccgtgcc ctcggtgcc tcgtcaaaga ttactttcca	1260
[1666]	gaaccggtta cagtgtcctg gaactccgga gctcttacct ccgggtgca tacattccc	1320
[1667]	gccgttcttc aaagctctgg actctactcc ctgagctccg ttgtgacagt tcttagcagc	1380
[1668]	agcctcgga cccagacata catctgcaac gtaaaccaca agccttcaa cactaaagt	1440
[1669]	gacaaaaaag tggaaccgaa gtccgtgac aaaactcaca catgccctcc gtgccctgcc	1500
[1670]	ccagagctgc tgggcgggcc atccgtatct ctcttcctc caaagccaa ggataccctc	1560
[1671]	atgatcagcc ggacgcccga agtgacctgc gtcgtagtgg atgtgagtca cgaggacca	1620
[1672]	gaggtaaagt tcaactggta cgtagacggc gtggaggtcc ataatgcgaa gacgaaacc	1680
[1673]	agagaggagc agtacaactc aacttacaga gtggtcagcg tgctcactgt cctccaccag	1740
[1674]	gactggttga acggcaaaga atataagtgt aaggtgagca ataaggccct cccgccccct	1800
[1675]	atcgagaaaa ctatttccaa ggctaaaggc cagcctcgag aacctcaggt ttacacactg	1860
[1676]	cctcctagcc gcgatgaact gacaaaaaat caggtgagtc tcacctgcct cgttaaaggt	1920
[1677]	ttctaccctt cagatatcgc agtcgagtgg gagagcaacg ggcagccgga aaataactat	1980
[1678]	aagaccaccc cccagtcct tgacagtgc ggctctttct tcctgtactc caaactgacc	2040
[1679]	gtggacaaat ctaggtggca gcaaggaaat gtttttagtt gttctgtaat gcacgaggt	2100

[1680]	ctgcataatc attataccca aaagtctttg tccctctccc ccggc	2145
--------	---	------

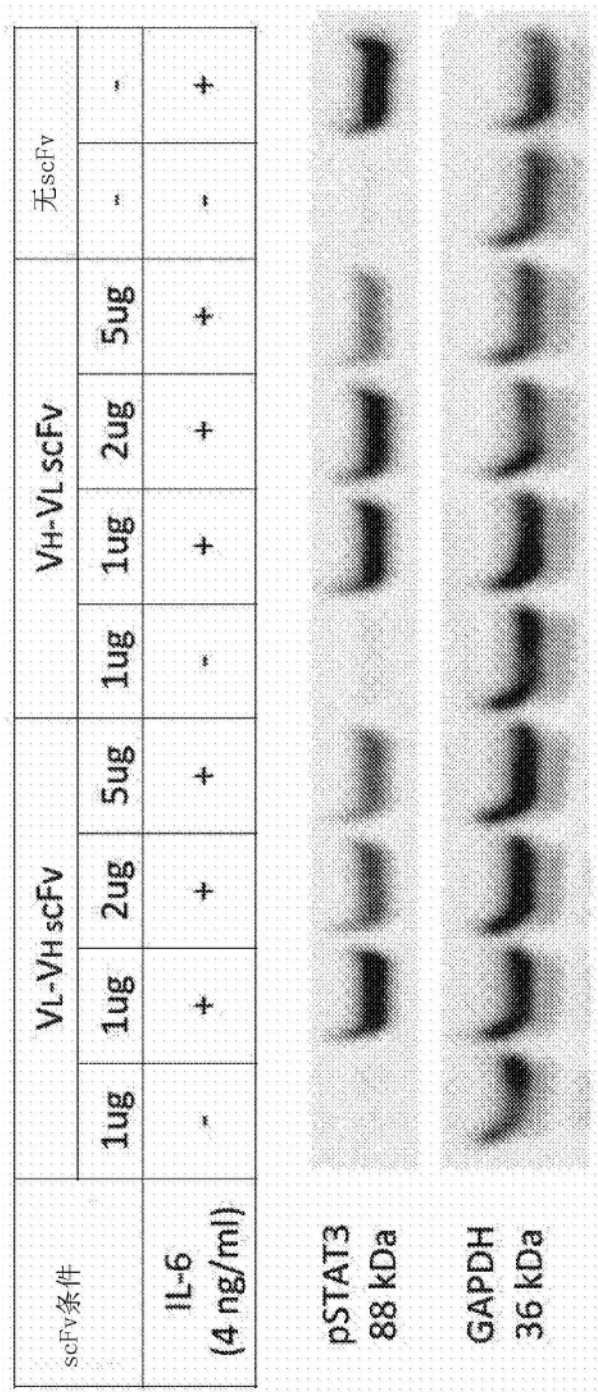


图1

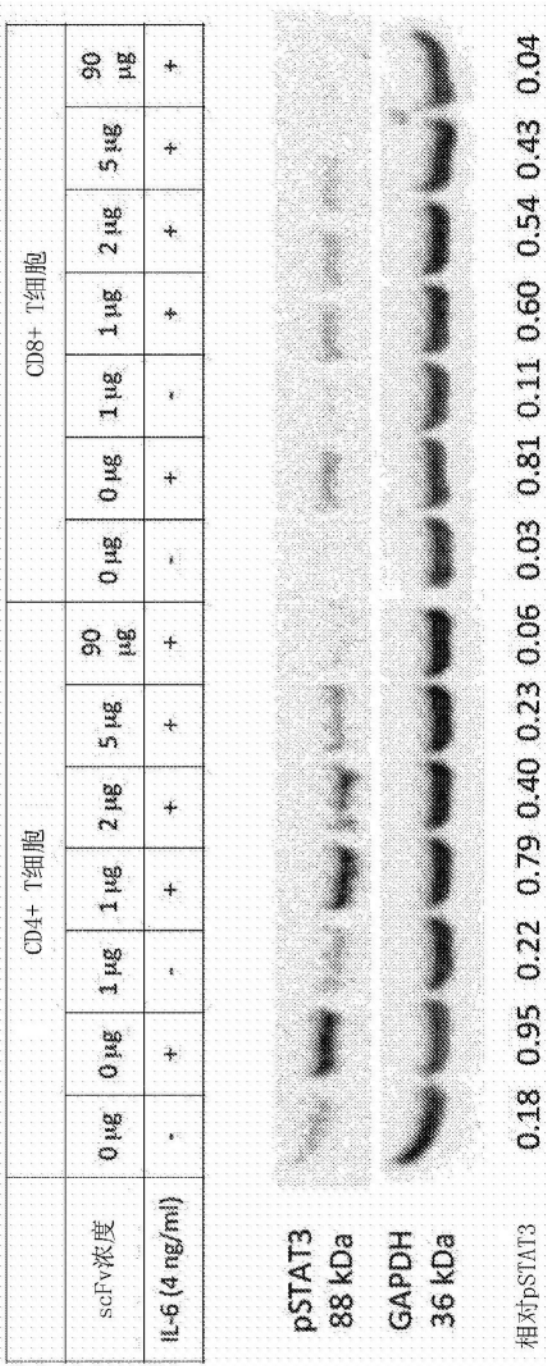


图2

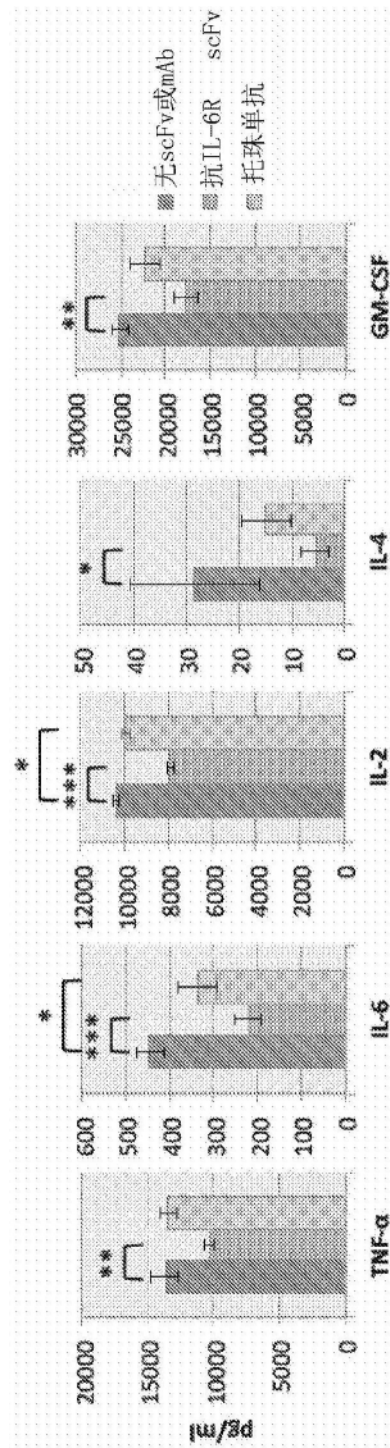


图3

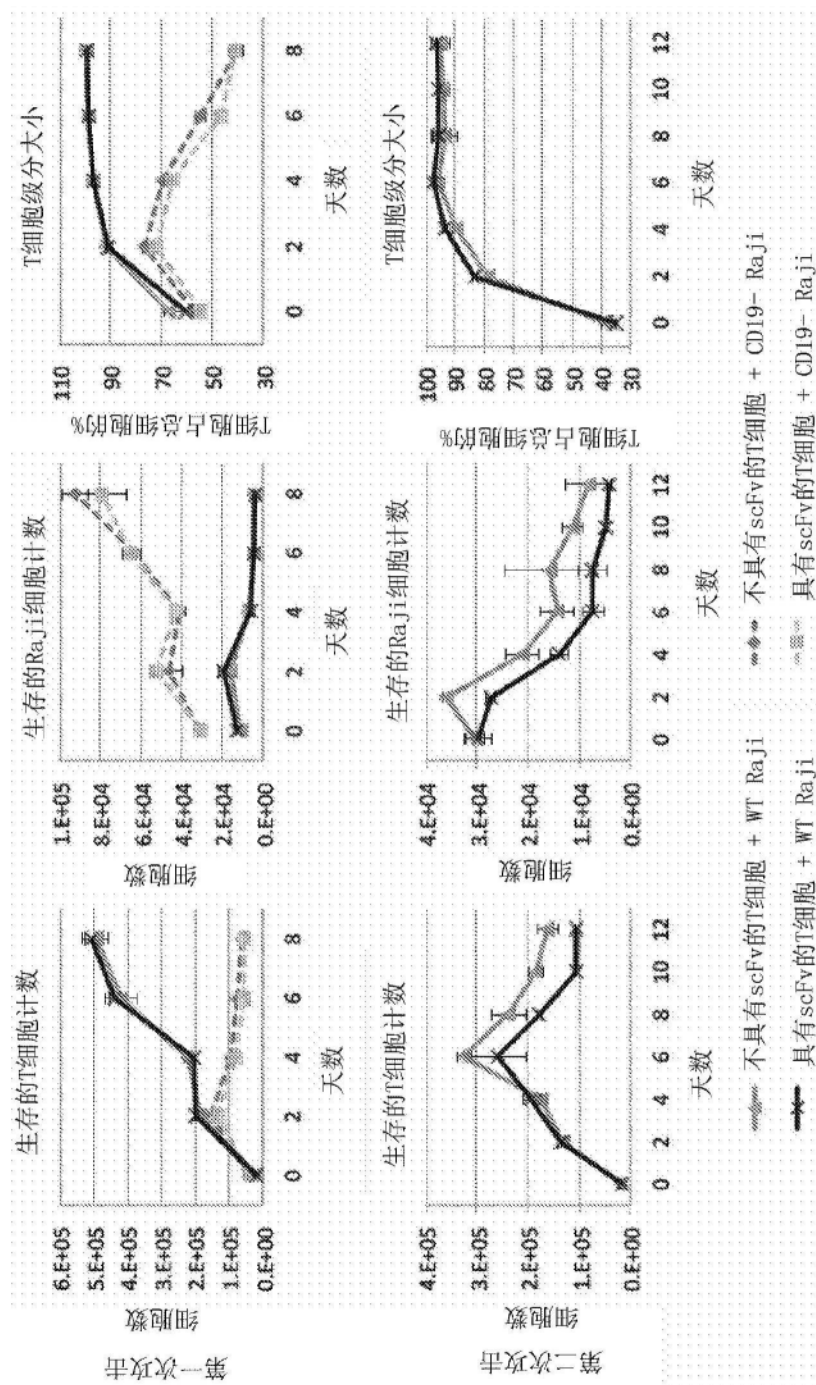


图4

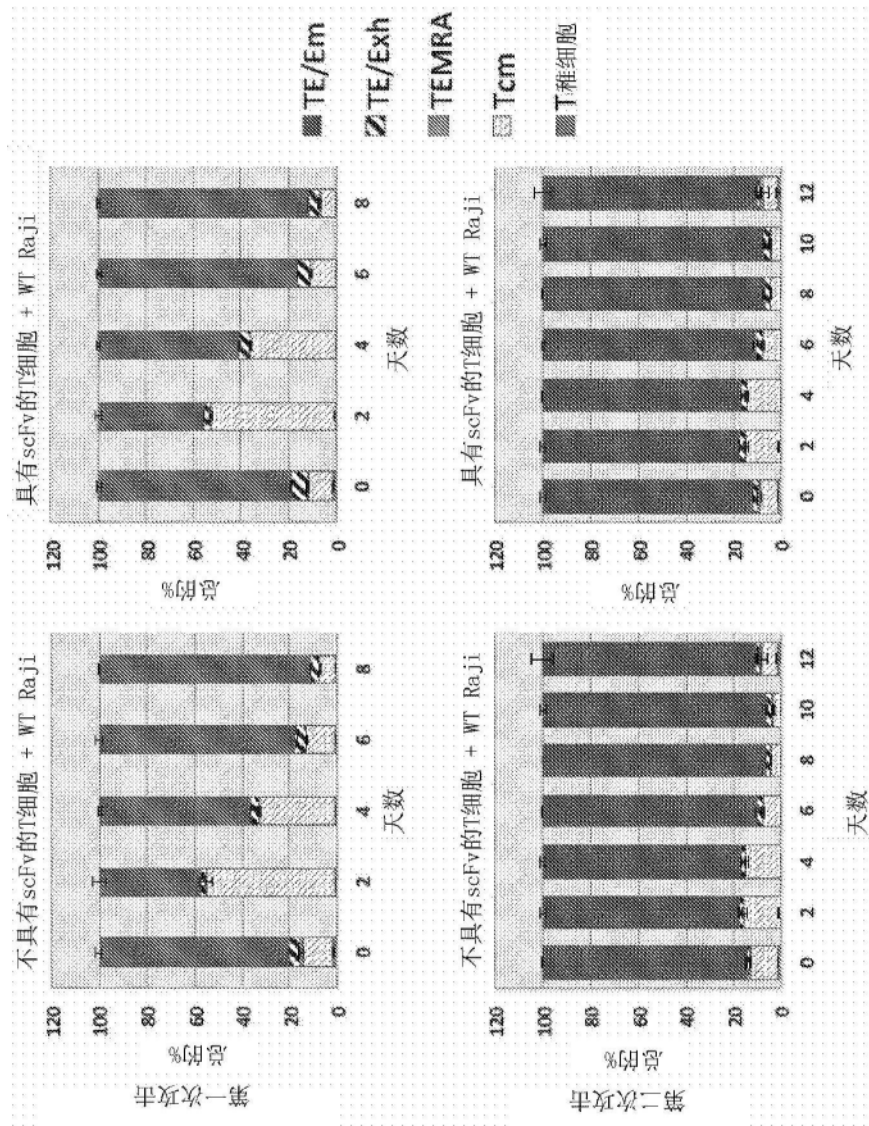


图5

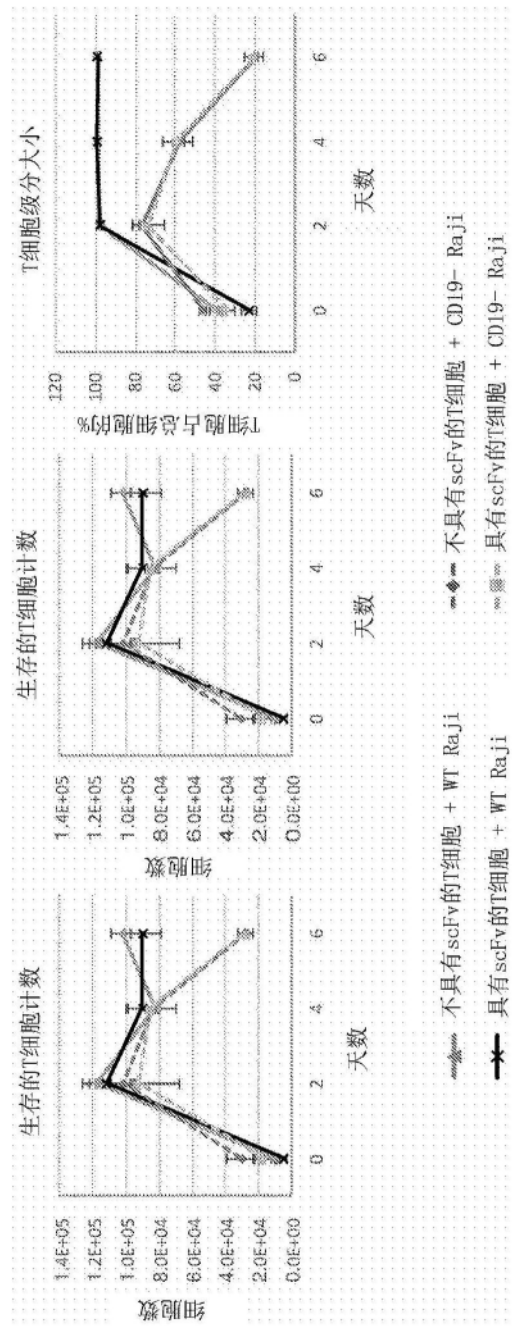


图6

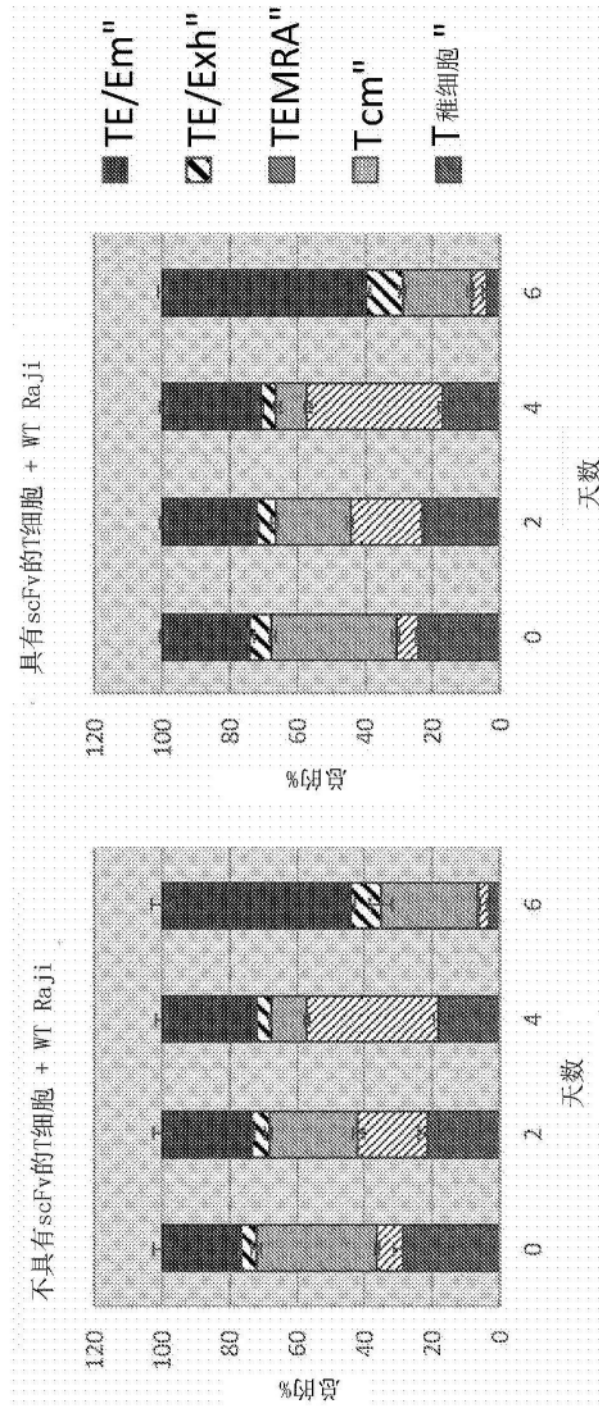


图7

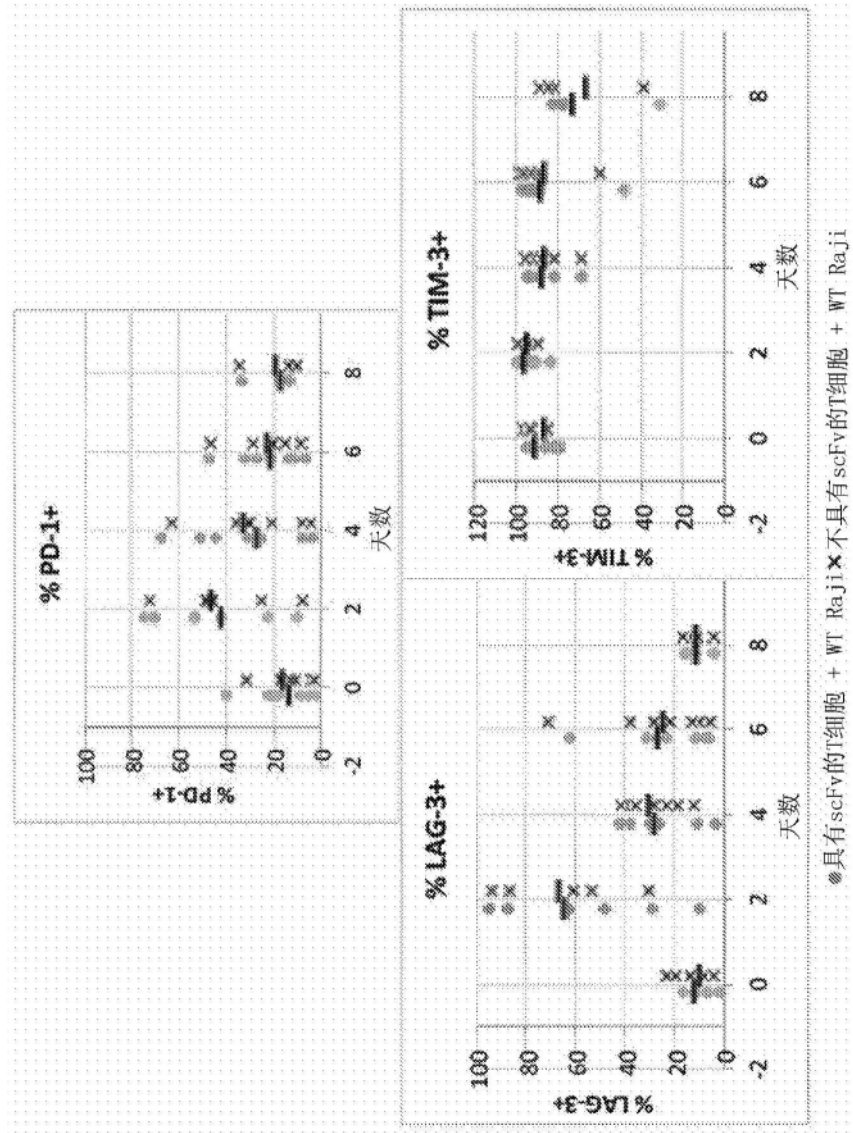


图8