



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113272320 A

(43) 申请公布日 2021.08.17

(21) 申请号 201980086243.2

(22) 申请日 2019.11.18

(30) 优先权数据

62/769,405 2018.11.19 US

62/773,372 2018.11.30 US

62/791,464 2019.01.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.06.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/062009 2019.11.18

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/106619 EN 2020.05.28

(71) 申请人 得克萨斯大学体系董事会

地址 美国得克萨斯

(72) 发明人 K·雷兹瓦尼 E·施帕尔

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

代理人 陈晓娜

(51) Int.Cl.

C07K 14/725 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

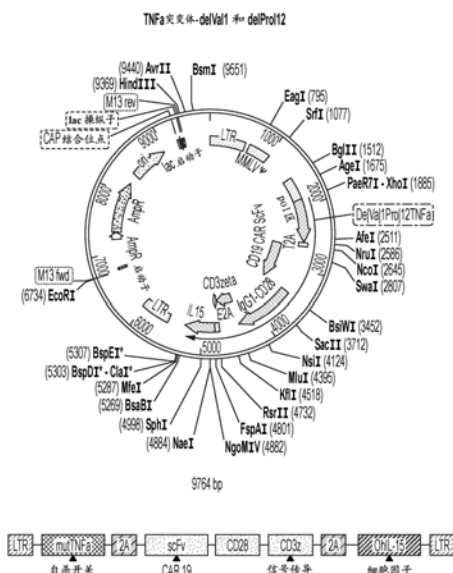
C07K 14/525 (2006.01)

(54) 发明名称

自杀基因

(57) 摘要

本公开内容的实施方案包括是非分泌性的和膜结合的特定TNF- α 突变体,从而在表达该突变体的细胞中的抑制作用提供靶标。在具体的实施方案中,TNF- α 突变体在用于个体的过继细胞疗法的细胞中用作自杀基因,其中在所需时间向个体提供一种或多种与膜结合的TNF- α 结合的抗TNF- α 抗体并引发细胞的补体依赖性细胞毒性。TNF- α 突变体也可用作在体内追踪转导的细胞的方式。



1. 一种包含转导的细胞的组合物,所述转导的细胞包含编码一种或多种工程化的非分泌性肿瘤坏死因子(TNF)- α 突变多肽的核酸和编码一种或多种治疗性基因产物的核酸。

2. 权利要求1所述的组合物,其中所述TNF- α 突变多肽包含关于SEQ ID NO:8的以下缺失:

氨基酸残基1和氨基酸残基12;

氨基酸残基1和氨基酸残基13;

氨基酸残基1-12;

氨基酸残基1-13;或者

氨基酸残基-1至13。

3. 权利要求1或2所述的组合物,其中所述治疗性基因产物是工程化的受体。

4. 权利要求1、2或3中任一项所述的组合物,其中所述工程化的受体是T细胞受体、嵌合抗原受体(CAR)、细胞因子受体、归巢受体或趋化因子受体。

5. 权利要求3或4所述的组合物,其中所述工程化的受体靶向癌抗原。

6. 权利要求3-5中任一项所述的组合物,其中所述工程化的受体是包含一个或多个共刺激性结构域的CAR。

7. 权利要求6所述的组合物,其中所述一个或多个共刺激性结构域包括CD28、DAP12、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40或其组合的共刺激性结构域。

8. 权利要求1-7任一项所述的组合物,其中编码TNF- α 突变多肽的核酸和编码治疗性基因产物的核酸是相同的核酸分子。

9. 权利要求1-7任一项所述的组合物,其中编码TNF- α 突变多肽的核酸和编码治疗性基因产物的核酸是不同的核酸分子。

10. 权利要求8或9所述的组合物,其中所述核酸分子是载体。

11. 权利要求10所述的组合物,其中所述载体是病毒载体或非病毒载体。

12. 权利要求11所述的组合物,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或腺相关病毒载体。

13. 权利要求11所述的组合物,其中所述非病毒载体是质粒、脂质或转座子。

14. 权利要求1-13中任一项所述的组合物,其中所述细胞是免疫细胞或干细胞。

15. 权利要求14所述的组合物,其中所述免疫细胞是T细胞、NK细胞、NKT细胞、iNKT细胞、B细胞、调节性T细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或间充质基质细胞。

16. 权利要求1-15中任一项所述的组合物,其中所述TNF- α 突变多肽包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:41。

17. 权利要求1-16中任一项所述的组合物,其中所述TNF- α 突变多肽由包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:40的序列编码。

18. 权利要求1-17中任一项所述的组合物,其中所述细胞表达外源提供的细胞因子。

19. 权利要求18所述的组合物,其中所述细胞因子是IL-7、IL-2、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21或其组合。

20. 权利要求18或19所述的组合物,其中所述细胞因子由与TNF- α 突变基因相同的载体编码。

21. 权利要求18-20中任一项所述的组合物,其中所述细胞因子表达为作为TNF- α 突变体的单独多肽分子和作为细胞的工程化的受体的单独多肽分子。

22. 权利要求1-21中任一项所述的组合物,其中所述TNF- α 突变多肽缺乏一种或多种阻止TNF- α 突变多肽与TNF受体结合的其他突变。

23. 一种诱导表达工程化的非分泌性TNF- α 突变多肽的转导的细胞死亡的方法,所述方法包括提供有效量的至少一种与转导的细胞上的TNF- α 突变体结合的药剂的步骤。

24. 权利要求23所述的方法,其中与TNF- α 结合的药剂是抗体、小分子、多肽、核酸或其组合。

25. 权利要求24所述的方法,其中所述抗体是单克隆抗体。

26. 权利要求23-25中任一项所述的方法,其中所述细胞进一步表达工程化的受体。

27. 权利要求26所述的方法,其中所述工程化的受体是T细胞受体或CAR。

28. 权利要求26或27所述的方法,其中所述工程化的受体靶向癌抗原。

29. 权利要求23-28中任一项所述的方法,其中所述方法在患有医学病况的个体中体内进行,并且已经向所述个体提供了用于所述医学病况的包括多个转导的细胞的疗法。

30. 权利要求29所述的方法,其中所述医学病况是癌症。

31. 权利要求29或30所述的方法,其中在来自疗法的一种或多种不良事件发生时向个体提供所述药剂。

32. 权利要求31所述的方法,其中所述个体表现出细胞因子释放综合征、神经毒性、过敏反应/变态反应和/或靶向/非靶向肿瘤毒性的一种或多种症状。

33. 权利要求29-32中任一项所述的方法,其中已经向所述个体提供、向所述个体提供和/或将向所述个体提供用于所述医学病况的另外的疗法。

34. 权利要求23-33中任一项所述的方法,其中TNF- α 突变多肽缺乏阻止TNF- α 突变多肽与TNF受体结合或阻止反向信号传导的一个或多个其他突变。

35. 一种在已经接受和/或正在接受用表达非分泌性TNF- α 突变体的细胞的细胞疗法的个体中降低细胞因子释放综合征的影响的方法,所述方法包括提供有效量的一种或多种药剂的步骤,所述药剂结合突变体以在个体中引起:(a) 细胞疗法的至少一些细胞的清除;和(b) 可溶性TNF- α 水平的降低。

36. 一种降低细胞疗法对个体的毒性风险的方法,所述方法包括修饰细胞疗法的细胞以表达非分泌性TNF- α 突变体的步骤。

37. 权利要求36所述的方法,其中所述细胞疗法用于癌症。

38. 权利要求36或37所述的方法,其中所述细胞疗法包括靶向抗原的工程化的受体。

39. 一种载体,其包含编码非分泌性TNF- α 突变体和编码工程化的受体的序列。

40. 权利要求39所述的载体,其中所述非分泌性TNF- α 突变体和所述工程化的受体作为单独的多肽从所述载体编码。

41. 权利要求39或40所述的载体,其中所述载体编码非分泌性TNF- α 突变体的序列和所述载体编码工程化的受体的序列在所述载体上被2A元件或IRES元件隔开。

42. 权利要求39-41中任一项所述的载体,其中所述工程化的受体是CAR。

43. 权利要求39-42中任一项所述的载体,其中所述载体进一步编码细胞因子。

44. 权利要求43所述的载体,其中所述细胞因子是IL-7、IL-2、IL-15、IL-12、IL-18或

IL-21。

45. 权利要求43或44所述的载体,其中所述细胞因子从载体表达为作为TNF- α 突变体和工程化的受体的单独多肽。

46. 包含SEQ ID NO:15的核酸序列,其作为物质组合物。

47. 包含SEQ ID NO:16的核酸序列,其作为物质组合物。

自杀基因

[0001] 本申请要求以下申请的优先权：2018年11月19日提交的美国临时专利申请序列号62/769,405；2018年11月30日提交的美国临时专利申请序列号62/773,372；以及2019年1月11日提交的美国临时专利申请序列号62/791,464，所有这些申请的全部内容通过引用并入本文。

序列表

本申请包含序列表，该序列表已经以ASCII格式电子提交并且通过引用将其全部内容并入本文。所述ASCII副本于2019年11月13日创建，命名为UTFC_P1151W0_SL.txt，大小为108,130字节。

技术领域

[0002] 本公开内容的实施方案至少包括细胞生物学、分子生物学、免疫学、细胞疗法和医学领域。

背景技术

[0003] 用嵌合抗原受体 (CAR) 工程化的和T细胞受体 (TCR) 转导的T细胞进行的过继性细胞疗法与严重不良事件的报告有关，如细胞因子释放综合征和神经毒性，以及靶向/非靶向肿瘤毒性。随着越来越多的患者通过过继细胞疗法进行治疗，引入一种安全机制以允许在面对毒性时选择性地去除过继输注的细胞是有用的。

[0004] 本公开内容提供了在用于细胞疗法的安全机制领域中长期需求的解决方案。

发明内容

[0005] 本公开内容的实施方案涉及与细胞疗法相关的系统、方法和组合物，包括控制细胞疗法的安全机制。在特定的实施方案中，独特的自杀基因与任何种类的细胞疗法组合使用以控制其使用并允许在期望的事件和/或时间可控地终止细胞疗法。自杀基因用在转导的细胞中，目的是在需要时引发转导的细胞死亡。在特定的实施方案中，自杀/耗竭基因是肿瘤坏死因子 (TNF) - α 突变体，其不能被天然裂解TNF的标准酶如TNF- α 转化酶 (也称为TACE) 裂解。因此，在特定的实施方案中，TNF- α 突变体是膜结合的、非活性的和非分泌性的。本公开内容的TNF- α 突变体可由结合突变体的一种或多种药剂靶向，所述药剂至少包括抗体，使得在药剂与细胞表面上的TNF- α 突变体结合后，细胞死亡。本公开内容的实施方案允许将TNF- α 突变体用作表达该突变体的细胞的标志物。

[0006] 本公开内容的实施方案包括包含转导的细胞的组合物，所述转导的细胞包含编码一个或多个工程化的非分泌性肿瘤坏死因子 (TNF) - α 突变多肽的核酸和编码一个或多个治疗性基因产物的核酸。在特定的实施方案中，TNF- α 突变多肽包含关于SEQ ID NO:8的以下缺失：氨基酸残基1和氨基酸残基12；氨基酸残基1和氨基酸残基13；氨基酸残基1-12；氨基酸残基1-13；或氨基酸残基1-14。组合物的治疗性基因产物可以是或可以不是工程化的受体，例如T细胞受体、嵌合抗原受体 (CAR)、细胞因子受体、归巢受体或趋化因子受体。任何工

程化的受体都可以靶向或可以不靶向抗原,例如癌症抗原。当工程化的受体是CAR时,CAR可以包含或可以不包含一个或多个共刺激性结构域,例如CD28、DAP12或两者。

[0007] 在特定的实施方案中,编码TNF- α 突变多肽的核酸和编码治疗性基因产物的核酸是相同的核酸分子,尽管编码TNF- α 突变多肽的核酸和编码治疗性基因产物的核酸可以是不同的核酸分子。在任何情况下,核酸分子可以是载体,包括病毒载体(逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或腺相关病毒载体)或非病毒载体,例如包含质粒、脂质、转座子或其组合的载体。

[0008] 例如,本公开内容组合物的转导的细胞可以是免疫细胞或干细胞。免疫细胞的实例包括T细胞、NK细胞、NKT细胞、iNKT细胞、B细胞、调节性T细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或间充质基质细胞。细胞可以表达或可以不表达一种或多种外源提供的细胞因子,例如IL-15、IL-12、IL-18、IL-21或其组合。细胞因子可以从与TNF α 突变基因相同的载体编码,也可以不从与TNF α 突变基因相同的载体编码。在特定的情况下,细胞因子作为单独的多肽分子表达为TNF α 突变体和细胞的工程化的受体。

[0009] 在本公开内容的特定实施方案中,TNF- α 突变多肽包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:39。TNF- α 突变多肽可以由包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:38的序列编码。在某些方面,TNF- α 突变多肽缺乏一种或多种其他突变,这些突变阻止TNF- α 突变多肽与TNF受体结合。

[0010] 本公开内容的实施方案包括诱导表达至少工程化的非分泌性TNF- α 突变多肽和任选地表达治疗性基因例如工程化的受体的转导的细胞死亡的方法,所述方法包括提供有效量的至少一种与转导的细胞上的TNF- α 突变体结合的药剂。与TNF- α 的药剂结合可以是例如抗体、小分子、多肽、核酸或其组合。当药剂是抗体时,抗体可以是任何种类,包括至少单克隆抗体。在该方法中,细胞可以进一步表达工程化的受体,包括T细胞受体、嵌合抗原受体(CAR)、细胞因子受体、归巢受体或趋化因子受体。任何工程化的受体均可结合癌症或其他抗原。在特定情况下,方法在具有医学病况的个体中体内进行,并且在已经向个体提供用于医学病况的包括多个转导的细胞疗法时进行。尽管医学病况可以是任何种类,但在特定的情况下,医学病况是癌症。可以在发生疗法的一种或多种不良事件时或在怀疑发生不良事件时向个体提供药剂。个体可以表现出细胞因子释放综合征、神经毒性、过敏反应/变态反应和/或靶向/非靶向的肿瘤毒性的一种或多种症状。在一些情况下,已经向个体提供了、向个体提供和/或将向个体提供用于医学病况的另外的疗法。在本公开内容的特定方面,TNF- α 突变多肽缺乏或包含一种或多种其他突变,所述突变阻止TNF- α 突变多肽与TNF受体的结合或防止反向信号传导。

[0011] 本公开内容的实施方案包括在已接受和/或正在接受用表达非分泌性TNF α 突变体的细胞的细胞疗法的个体中降低细胞因子释放综合征的影响的方法,所述方法包括提供有效量的一种或多种药剂的步骤,所述一种或多种药剂结合突变体以在个体中引起:(a)细胞疗法的至少一些细胞的清除;和(b)可溶性TNF- α 的水平降低。

[0012] 本公开内容的实施方案包括降低细胞疗法对个体的毒性风险的方法,所述方法包括修饰细胞疗法的细胞以表达非分泌性TNF- α 突变体的步骤。细胞疗法例如可以用于癌症。细胞疗法可包括靶向抗原的工程化的受体。

[0013] 具体实施方案包括载体,所述载体包含编码非分泌性TNF- α 突变体和编码工程化

的受体的序列。非分泌性TNF- α 突变体和工程化的受体可以作为单独的多肽从载体中编码或可以不作为单独的多肽从载体中编码。在特定的情况下,载体编码非分泌性TNF- α 突变体的序列和载体编码工程化的受体的序列在载体上被2A元件或IRES元件分开。载体可以或可以不进一步编码细胞因子,例如IL-15、IL-12、IL-18、IL-2、IL-7或IL-21。细胞因子可以从载体表达为单独的多肽作为TNF- α 突变体和工程化的受体。

[0014] 本公开内容的实施方案包括物质的组合物,所述物质的组合物包括包含SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16的核酸序列。

[0015] 特别考虑到的是,关于本发明的一个实施方案讨论的任何限制可以应用于本发明的任何其他实施方案。此外,本发明的任何组合物可用于本发明的任何方法中,并且本发明的任何方法可用于生产或利用本发明的任何组合物。在实施例中阐述的实施方案的各方面也是可以在不同实施例的其他地方或本申请的其他地方(例如在发明内容、具体实施方式、权利要求和附图简要说明中)讨论的实施方案的情形中实施的实施方案。

[0016] 前面已经相当广泛地概述了本公开内容的特征和技术优点,以便可以更好地理解以下的详细描述。在下文中将描述形成本文权利要求的主题的附加特征和优点。本领域技术人员应当理解,所公开的概念和特定实施方案可以容易地用作修改或设计用于实现本设计的相同目的的其他结构的基础。本领域技术人员还应该认识到,这样的等同构造不脱离所附权利要求书中阐述的精神和范围。当结合附图考虑时,从以下描述中将更好地理解被认为是本文公开的设计特征的新颖特征(关于组织和操作方法二者)以及进一步的优点和目的。然而,应明确地理解,提供每个附图仅出于说明和描述的目的,并且不旨在作为对本公开内容的限制的定义。

附图简要说明

[0017] 为了更完整地理解本公开内容,现在参考结合附图进行的以下描述。

[0018] 图1是诱变TNF- α 以消除膜切割位点的实验计划的一个实例。Perez等人(1990)报道了TNF- α 的细胞外部分的第1位缬氨酸和第12位脯氨酸的缺失产生具有生物活性但不可切割的TNF- α 。左图中加下划线的核苷酸显示了诱变期间缺失的核苷酸,对应于核苷酸序列的第229-279位。野生型引物TCGAGAAGATGATCTGACTGCCTGGGCCAGAGG是SEQ ID NO:42,Del VAL1突变引物TCG AGA AGA TGA TCT TGC CTG GGC CAG AGG-3是SEQ ID NO:43,和CP496寡核苷酸TGA TCT TGC CTG是SEQ ID NO:44。野生型引物TAC AAC ATG GGC TACAGGCTTGCTACTCGGGGT是SEQ ID NO:45,Del PRO 12突变引物TAC AAC ATG GGC TAC CTT GTC ACT CGG GGT是SEQ ID NO:46,和CP498寡核苷酸GGC TAC CTT GTC是SEQ ID NO:47。Perez等人(1990)序列CAGGCAGTCAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGT GACAAGCCTGTAGCC是SEQ ID NO:48,和序列QAVRSSSRTPSDKPVA是SEQ ID NO:49。

[0019] 图2A示出了单独编码TNF- α 突变体(delVal1和delPro112)和CD19特异性嵌合抗原受体(CAR)的实例的载体的一个实例(左图)。右图示出了载体构型的一个实例,其中突变的TNF- α 被编码为与CAR分子和细胞因子分开的多肽。图2B示出了单独编码TNF- α 突变体(delVal113)、CAR的实例和细胞因子的载体的一个实例。图2C示出了单独编码TNF- α 突变体(delVal1和delVal113)和CAR的实例的载体的一个实例。图2D示出了单独编码TNF- α 突变体(其中缺失了跨越Val 1至Val 13的13个氨基酸)和CAR的实例的载体的一个实例。图2E示出了单独编码TNF- α 突变体(delAla-1至delVal113,其中已经缺失了从Ala-1至Val113的14个氨

基酸)和CAR的实例的载体的一个实例。

[0020] 图3显示了用载体转导的NK细胞在其表面表达CAR和TNF- α 两者,该载体具有单独编码TNF- α 突变体和CAR两者的构建体。

[0021] 图4A示出了TNF- α 抑制剂的实例。

[0022] 图4B表明用载体转导的NK细胞被TNF α 拮抗剂靶向并被补体依赖性细胞毒性(CDC)清除,该载体具有单独编码TNF α 突变体和CAR两者的构建体。在用英夫利昔单抗治疗的90分钟内,CDC清除了超过70%的表达突变TNF- α 的NK细胞。

[0023] 图5A显示了与CAR19-NK细胞相比,用具有单独编码TNF- α 突变体和CAR两者的构建体的载体转导的NK细胞对Raji靶标应答而产生更多的效应细胞因子并更有效地脱粒。图5B显示了用具有单独编码TNF- α 突变体和CAR构建体两者的构建体的载体转导的NK细胞有效杀伤Raji靶标。

[0024] 图6表明用单独表达CD19特异性CAR和TNF- α 突变体的载体转导的NK细胞不显示脱靶活性。

[0025] 图7表明用分别表达CD19特异性CAR和TNF- α 突变体的载体转导的NK细胞不显示脱靶活性并且不非特异性地分泌TNF- α 。

[0026] 图8示出了TNF受体1和2的TNF- α 受体结合位点与TNF- α 抗体英夫利昔单抗和阿达木单抗(adalimumab)不同。图中的序列是SEQ ID NO:50。

[0027] 图9提供了TNF- α 的结构,其中标注了结构域。图中的序列分别为SEQ ID NOS 17、54-59、51、18和18-21(按出现顺序排列)。

[0028] 图10示出了TNF α 突变,该突变组合了细胞质结构域中酪蛋白激酶I(CKI)共有序列中的突变(加下划线)与Ala-3和Gln-2的缺失(除了Ala-1至未描绘的Val13并包括未描绘的Val13的缺失以外)以及干扰与TNF受体1和TNF受体2结合的其他突变的六个实例(这种突变序列是双下划线的)。图中核苷酸序列为SEQ ID NO:52,图中多肽序列为SEQ ID NO:53。

[0029] 图11A-11B表明用TNF- α 突变体-CAR19-IL15构建体转导的NK细胞的抗肿瘤活性优于iC9-CAR19-IL15构建体。在图11A中,具有Raji肿瘤的NSG小鼠接受用TNF- α mut-CAR19-IL15构建体或iC9-CAR19-IL15构建体转导的 3×10^6 个CAR脐血NK细胞。图11B表明存活率百分比随时间的变化。

具体实施方式

[0030] 本公开内容通过引用并入于2018年11月19日提交的美国临时专利申请序列号62/769,414;于2018年11月30日提交的美国临时专利申请序列号62/773,394;以及于2019年1月11日提交的美国临时专利申请序列号62/791491。

[0031] 如本文在说明书中所使用的,“一个”或“一种”可指一个或多个或者一种或多种。如本文在权利要求书中所使用的,当与词语“包括”一起使用时,词语“一个”或“一种”可表示一个或多于一个或者一种或多于一种。如本文所用,“另一个”可指至少第二个或更多个。在具体实施方案中,例如,本公开内容的方面可以例如“基本上由本公开内容的一个或多个序列组成”或“由本公开内容的一个或多个序列组成”。本发明的一些实施方案可以由本公开内容的一个或多个元件、方法步骤和/或方法组成或基本上由本公开内容的一个或多个元件、方法步骤和/或方法组成。可以包括根据本文所述的任何其他方法或组合物来实现的

本文所述的任何方法或组合物。本申请的范围并不旨在限于说明书中描述的过程、机器、制造、物质的组合物、手段、方法和步骤的特定实施方案。如本文所使用的，术语“或”和“和/或”用于描述组合或彼此排斥的多个组分。例如，“x、y和/或z”可以分别指仅“x”、仅“y”、仅“z”、“x、y和z”、“(x和y)或z”、“x或(y和z)”或“x或y或z”。特别包括的是，可以将x、y或z明确地排除在某个实施方案之外。

[0032] 在本申请中，术语“约”根据其在细胞和分子生物学领域中的常见和普通含义而使用，以表明值包括用于确定值的装置或方法的误差的标准偏差。

[0033] 本文所使用的术语“工程化的”是指通过人工生成的实体，包括细胞、核酸、多肽、载体等。在至少一些情况下，工程化的实体是合成的，并且包括并非自然存在或以本公开内容中使用的方式配置的元素。

[0034] 本说明书中对“一个实施方案”、“实施方案”、“特定的实施方案”、“相关的实施方案”、“某个实施方案”、“另外的实施方案”或“其他实施方案”或其组合的引用表示结合实施方案描述的特定特征、结构或特征包括在本发明的至少一个实施方案中。因此，在本说明书中，上述短语在各个地方的出现不一定都是指同一实施方案。此外，在一个或多个实施方案中，可以以任何合适的方式组合特定特征、结构或特性。

[0035] I. 一般实施方案

[0036] 本公开内容的实施方案涉及提供待终止的细胞疗法的方法和组合物。本公开内容基于26kd TNF- α 的不可切割的突变体提供了用于细胞疗法的标志物部分和自杀/耗竭部分。TNF- α 突变体不可切割，使它们是膜结合的且非分泌性的。可以靶向表达不可切割的TNF- α 突变体的细胞用于选择性缺失，例如，包括使用目前临床上使用的FDA批准的TNF- α 抗体，例如依那西普、英夫利昔单抗或阿达卢单抗(adalimumab)。突变的TNF- α 多肽可以与一种或多种治疗性转基因例如编码TCR或CAR的基因共表达。另外，表达TNF- α 突变体的细胞具有针对肿瘤靶标的优异活性，这是由膜结合的TNF- α 蛋白的生物活性介导的。

[0037] II. TNF- α 突变体

[0038] 本公开内容包括TNF- α 的突变体，其在特定细胞中的表达允许突变体TNF被结合突变体的试剂靶向，从而引起特定的带有TNF- α 突变体的细胞死亡。在特定的实施方案中，突变TNF- α 多肽由于一个或多个突变而是不可切割的且非分泌性的，并且这种不可切割的且非分泌性的多肽使突变TNF- α 成为膜结合的。当膜结合的TNF- α 被直接或间接结合它的试剂(包括抑制剂)靶向时，与细胞中膜结合的TNF- α 的缔合使细胞被杀伤。在其中TNF- α 抑制剂是抗体的实施方案中，细胞可以由于补体依赖性细胞毒性而死亡，而在其中TNF- α 抑制剂不是抗体的实施方案中，细胞可以由于另一种机制，例如细胞凋亡而死亡。

[0039] 因此，在突变体的特定实施方案中，消除了一个或多个膜切割位点，从而保留了细胞上的表面表达并赋予了细胞被靶向而破坏的能力。因此，本公开内容包括突变膜结合TNF- α 作为自杀基因，用于选择性去除转导的细胞。

[0040] TNF- α 具有26kD的跨膜形式和17kD的分泌组分。本文的图1(来自Perez等人(1990)的右图)示出了本公开内容涵盖的一些突变体。在特定的实施方案中，关于17kD TNF，本公开内容的TNF- α 突变体的实例至少包括以下：(1) Val11的缺失和Pro112的缺失；(2) Val113的缺失；(3) Val11的缺失和Val113的缺失；(4) Val11至Pro112并包括Pro112的缺失，以及Val113的缺失(缺失13aa)；(5) Ala-3至并包括Val 13的缺失(缺失16aa)；(6) Ala-1至Val113并包括

Val13的缺失(缺失14aa)。在具体的实施方案中,TNF- α 突变体包括在位置-3、-2、-1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13的相应氨基酸的缺失或其组合。特定的组合包括在以下位置的缺失:位置-3至13并包括13;位置-3至12并包括12;位置-3至11并包括11;位置-3至10并且包括10;位置-3至9并且包括9;位置-3至8并且包括8;位置-3至7并且包括7;位置-3至6并且包括6;位置-3至5并且包括5;位置-3至4并且包括4;位置-3至3并且包括3;位置-3至2并且包括2;位置-3至1并且包括1;位置-3至-1并且包括-1;位置-3至-2并且包括-2;位置-2至13并且包括13;位置-2至12并且包括12;位置-2至11并且包括11;位置-2至10并且包括10;位置-2至9并且包括9;位置-2至8并且包括8;位置-2至7并且包括7;位置-2至6并且包括6;位置-2至5并且包括5;位置-2至4并且包括4;位置-2至3并且包括3;位置-2至2并且包括2;位置-2至1并且包括1;位置-2至-1并且包括-1;位置-1至13并且包括13;位置-1至12并且包括12;位置-1至11并且包括11;位置-1至10并且包括10;位置-1至9并且包括9;位置-1至8并且包括8;位置-1至7并且包括7;位置-1至6并且包括6;位置-1至5并且包括5;位置-1至4并且包括4;位置-1至3并且包括3;位置-1至2并且包括2;位置-1至1并且包括1;位置1至13并且包括13;位置1至12并且包括12;位置1至11并且包括11;位置1至10并且包括10;位置1至9并且包括9;位置1至8并且包括8;位置1至7并且包括7;位置1至6并且包括6;位置1至5并且包括5;位置1至4并且包括4;位置1至3并且包括3;位置1至2并且包括2;等等。

[0041] TNF- α 突变体可以通过任何合适的方法生成,但是在特定的实施方案中,它们是通过定点诱变生成的。在某些情况下,TNF- α 突变体可以具有使蛋白质不可切割的突变以外的突变。在特定情况下,除了在Val1、Pro12和/或Val13或它们之间的区域的缺失外,TNF- α 突变体可以具有1、2、3或更多个突变。除了使突变体成为非分泌性的突变以外的突变可以是氨基酸取代、缺失、添加、倒置等中的一种或多种。例如,在另外的突变是氨基酸取代的情况下,取代可以是或可以不是保守氨基酸。在某些情况下,蛋白质的N末端和/或C末端上可以存在1、2、3、4、5或更多个其他氨基酸。在某些情况下,TNF- α 突变体具有(1)一种或多种使突变体成为非分泌性的突变;(2)一种或多种阻止突变体由外而内的信号传导的突变;和/或(3)一种或多种干扰突变体与TNF受体1和/或TNF受体2的结合并使它们失活的突变。

[0042] TNF- α 突变体delVal1 delPro12的氨基酸序列

[0043] MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLS
LISPLAQARSSSRTPSDKVAHVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFGQGCP
STHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAE
SGQVYFGIIAL (SEQ ID NO:1)

[0044] TNF- α 突变体-delVal1 del Pro12的核酸序列

[0045] atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacaggggg
gccccagggtccaggcggtgcttgttctctcagcctcttctccttctctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttc
tgcttgcctgcactttggagtgatcgccccagagggaagagttccccaggacgtctctctaatcagccctcttg
cccaggcaagatcatcttctcgaacccccagtgacaaggtagcccatgtttagcaaacctcaagctgaggggca
gctccagtggctgaaccgccgggccaatgcctctctggccaatggcgctggagctgagagataaccagctggtggtg
ccatcagagggcctgtacctcatctactcccaggtcctcttcaagggccaaaggtgccccctccacccatgtgctcc
tccccacaccatcagccgcacgcctctctaccagaccaaggtcaacctctctctgcatcaagagccccctg
ccagaggggagaccccagagggggctgaggccaagccctggtatgagcccatctatctgggaggggtcttccagctg

gagaagggtgaccgactcagcgctgagatcaatcggcccgactatctcgactttgccgagctctgggcaggtctact
ttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO:2)

[0046] TNFa突变体-del Val1至Val13的氨基酸序列(缺失13aa)

[0047] MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLS
LISPLAQAAHVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGPCSTHVLLTHTIS
RIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
(SEQ ID NO:3)

[0048] TNFa突变体-del Val1至Pro112 delVal13(缺失13aa)的核酸序列

[0049] atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacaggggg
gccccagggtccaggcggtgcttgttctctcagcctcttctccttctctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttc
tgcttctctgcactttggagtgatcgccccccagagggaagagttccccagggacctctctctaatcagccctcttg
cccaggcagcccatgtttagcaaacctcaagctgaggggcagctccagtggctgaaccgccgggccaatgcct
cctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggctgtacctcatctactcccag
gtctctcttaagggccaaaggctgccccctccacctatgtgtctctcaccacacccatcagccgcatcgccgtctct
accagaccaaggtcaacctctctcttgccatcaagagccccctgccagaggagagacccagagggggctgaggccaa
gccctggtatgagcccatctatctgggaggggtcttccagctggagaagggtgaccgactcagcgctgagatcaat
cgccccgactatctcgactttgccgagctctgggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO:4)

[0050] TNF- α delVal1 delVal13的氨基酸序列

[0051] MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLS
LISPLAQARSSSRTPSDKPAHVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGPC
STHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAE
SGQVYFGIIAL (SEQ ID NO:5)

[0052] TNF- α delVal1 delVal13的核酸序列

[0053] atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacaggggg
gccccagggtccaggcggtgcttgttctctcagcctcttctccttctctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttc
tgcttctctgcactttggagtgatcgccccccagagggaagagttccccagggacctctctctaatcagccctcttg
cccaggcaagatcatcttctcgaaccccagtgacaagcctgcccatgtttagcaaacctcaagctgaggggca
gctccagtggctgaaccgccgggccaatgcctcctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtg
ccatcagagggctgtacctcatctactcccagggtcctcttcaagggccaaaggctgccccctccacctatgtgtctc
taccacacccatcagccgcatcgccgtctctctaccagaccaaggtcaacctctctcttgccatcaagagccccctg
ccagaggagagacccagagggggctgaggccaagccctggtatgagcccatctatctgggaggggtcttccagctg
gagaagggtgaccgactcagcgctgagatcaatcggcccgactatctcgactttgccgagctctgggcaggtctact
ttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO:6)

[0054] TNF- α delAla-3至Val 13的核酸序列

[0055] TCGAGTCGAGATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCGAGGAGGCGCTCCCCAAGA
AGACAGGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTCTCTCAGCCTCTTCTCCTTCCTGATCGTGGCAGGCGCCAC
CACGCTCTTCTGCCTGCTGCACTTTGGAGTGATCGGCCCCCAGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGACCTCTCTCTAATC
AGCCCTCTGCAGGCAGCCCATGTTGTAGCAAACCCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGCCA
ATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTA

CTCCCAGGTCCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCCTCCACCCATGTGCTCCTCACCACACCATCAGCCGCATCGCC
GTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCCTGCCAGAGGGAGACCCAGAGGGGGCTG
AGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGA
GATCAATCGGCCCCGACTATCTCgACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTCGTCG (SEQ
ID NO:38)

[0056] TNF- α del Ala-3和del Val 1至Val 13并且包括Val 13的氨基酸序列 (del-3和
del 1-13 (但不缺失-2和-1)):

[0057] MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLS
LISPLQAAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFGQGCPSTHVLLTHTISR
IAVSQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGI IAL
(SEQ ID NO:39)

[0058] 除了防止由外向内信号传导的CIK基序突变的实例和其他干扰TNF α 与TNF受体1和
TNF受体2结合的突变外,具有del Ala-3至Val113核酸序列的TNF- α 突变体 (见图10)

[0059] ATGAGCACTGAAATGCATCCCGGAAGGGGGTCTGGCACGAGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGG
GCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTCCTCAGCCTCTTCTCCTTCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTC
TTCCTGCTGCACTTTGGAGTGATCGGCCCCCAGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGACCTCTCTCTAATCAGCCCTCTGG
CCCATGTTGTAGCAAACCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGCCAATGCCCTCCTGGCCAA
TGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTACCTCATCTACTCCCAGGTCCTCTTC
AAGGGCCAAGGCTGCCCCCTCCACCCATGTGCTCCTCACCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCCCACCAGACCA
AGGTCAACCTCCTCTTCGCCATCAAGAGCCCCTGCCAGAGGGAGACCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTA
TGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTGACCGACTCATCGCTGAGATCAATCGGCCCCGAC
TATCTCTACTTTGCCGAGTATGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGTCG (SEQ ID NO:40)

[0060] 具有由SEQ ID NO:40编码的del Ala-3至Val113氨基酸序列的TNF- α 突变体

[0061] MSTEMHPGRGSWHEELPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFFLLHFGVIGPQREEFPRDLS
LISPLAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFGQGCPSTHVLLTHTISR
IAVSHQTKVNLLFAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYIYLGGVFQLEKGDRLIAEINRPDYLYFAEYGGVYFGI IALS
(SEQ ID NO:41)

[0062] 在具体的实施方案中,TNF- α 突变体可包含Ala-3至Val113的缺失,但不还包含CIK
基序突变和干扰与TNF受体1和/或TNF受体2结合的突变。

[0063] 作为参考,TNF野生型26kD版本的氨基酸序列

[0064] MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLS
LISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAVHVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFGQG
CPSTHVLLTHTISR IAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLD
FAESGQVYFGI IAL (SEQ ID NO:7)

[0065] 作为参考,TNF野生型17kD版本的氨基酸序列

[0066] VRSSSRTPSDKPVAVHVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFGQG
CPSTHVLLTHTISR IAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLD
FAESGQVYFGI IAL (SEQ ID NO:8)

[0067] 缺乏细胞内TNF信号传导或TNF受体结合能力的TNF- α 突变体

[0068] 这些突变体在胞质信号传导结构域内和/或在TNF-受体结合区内具有突变,并且因此由于它们分别缺乏反向信号传导能力和/或结合TNF-受体的能力而没有发挥任何生物学活性。这使得构建体中的TNF- α 成为TNF抑制剂的靶标,同时不发挥生物学活性。

[0069] 在本公开的一些实施方案中,TNF- α 突变体缺少TNF- α 的部分或全部胞质内结构域,使得TNF- α 突变体不能发挥细胞内信号传导(反向信号传导)。非分泌性TNF- α 突变体也可以或不突变为缺少部分或全部胞质内结构域。

[0070] 图9提供了TNF- α 的一些结构。如图9所示,胞质内结构域包含MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFL (SEQ ID NO:17)。酪蛋白激酶I (CKI) 位点是STES (SEQ ID NO:18)。跨膜结构域是FSFLIVAGATTLFCLLHFGVI (SEQ ID NO:19)。SPPL2b切割位点是SL/LI。接头包含GPQREEFPRDLSLISPLAQA (SEQ ID NO:20)。TACE切割位点是VRSSSRTPSDKPV (SEQ ID NO:21)。P01375为该蛋白质的UniProt号。图9中的序列仅涉及TNF蛋白的部分。

[0071] CKI基序的TNF- α 突变体的具体实例(突变的序列加下划线),对于核酸和氨基酸分别如下所示:

[0072] atgagcactgaaaTGCATCCCGGAAGGGGGTCCTGGCACgaggaggcgctccccaagaagacaggggggccccagggctccaggcggtgcttgttctctcagcctcttctccttctctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttctgcctgctgcacttttgagtgatcgccccccagagggaagagttccccaggacctctctctaatcagccctctggcccaggcagcccatgtttagcaaacctcaagctgaggggcagctccagtggctgaaccgcccgggccaatgcctcctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggcctgtacctcatctactcccaggtcctcttcaagggccaaaggctgccccctccaccatgtgtctctcaccacacaccatcagccgcatcgccgtctctaccagaccaaggtcaacctcctctctgccatcaagagccccctgccagaggagaccccagagggggctgaggccaa gccctggtatgagcccatctatctgggaggggtcttccagctggagaagggtgaccgactcagcgctgagatcaatcgccccgactatctcgactttgccgagctctgggcaggtctactttgggatcattgccctgctg (SEQ ID NO:22)

[0073] MSTEMHPGRGSWHEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLSLISPLAQA VRSSSRTPSDKPV AHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL (SEQ ID NO:23)

[0074] 在胞质内序列中的M-71K处具有突变和在Y87H处具有另一个突变的TNF- α 突变体的一个实例(突变的序列加下划线),对于核酸和氨基酸分别如下所示:

[0075] atgagcactgaaagcaAgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacaggggggccccagggctccaggcggtgcttgttctctcagcctcttctccttctctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttctgcctgctgcacttttgagtgatcgccccccagagggaagagttccccaggacctctctctaatcagccctctggcccaggcagcccatgtttagcaaacctcaagctgaggggcagctccagtggctgaaccgcccgggccaatgcctcctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggcctgtacctcatctactcccaggtcctcttcaagggccaaaggctgccccctccaccatgtgtctctcaccacacaccatcagccgcatcgccgtctctccaccagaccaaggtcaacctcctctctgccatcaagagccccctgccagaggagaccccagagggggctgaggccaa gccctggtatgagcccatctatctgggaggggtcttccagctggagaagggtgaccgactcagcgctgagatcaatcgccccgactatctcgactttgccgagctctgggcaggtctactttgggatcattgccctgctg (SEQ ID NO:24)

[0076] MSTEKIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLSLISPLAQA AHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCCPSTHVLLTHTIS

RIAVSHQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
(SEQ ID NO:25)

[0077] 在S95F和C-28F处具有突变的TNF- α 突变体的一个实例(突变的序列加下划线),对于核酸和氨基酸分别如下所示:

[0078] atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacaggggg
gccccagggctccaggcggtgcttgttctctcagcctcttctccttctctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttc
tTcctgctgcactttggagtgatcgccccccagagggaagagttccccagggacctctctctaatcagccctctgg
cccaggcagcccatgttgttagcaaaccctcaagctgaggggcagctccagtggctgaaccgccccggccaatgcctt
cctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggcctgtacctcatctactcccag
gtcctcttcaaggccaaggctgccccctccacctatgtgtctctcaccacacacctcagccgcatcgccgtctcct
accagaccaaggtcaacctcctctTCgcatcaagagccccctgccagaggagaccccagagggggctgaggccaa
gccctggatatgagcccatctatctgggaggggtcttccagctggagaagggtgaccgactcagcgtgagatcaat
cgccccgactatctcgactttgccgagctctgggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO:26)

[0079] MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFFLLHFGVIGPQREEFPRDLS
LISPLAQAAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGPCSTHVLLTHTIS
RIAVSYQTKVNLLFAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
(SEQ ID NO:27)

[0080] 在S133I和S147Y处具有突变的TNF- α 突变体的一个实例(突变的序列加下划线),对于核酸和氨基酸分别如下所示:

[0081] atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacaggggg
gccccagggctccaggcggtgcttgttctctcagcctcttctccttctctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttc
tgcttgcctgcactttggagtgatcgccccccagagggaagagttccccagggacctctctctaatcagccctctgg
cccaggcagcccatgttgttagcaaaccctcaagctgaggggcagctccagtggctgaaccgccccggccaatgcctt
cctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggcctgtacctcatctactcccag
gtcctcttcaaggccaaggctgccccctccacctatgtgtctctcaccacacacctcagccgcatcgccgtctcct
accagaccaaggtcaacctcctctctgcatcaagagccccctgccagaggagaccccagagggggctgaggccaa
gccctggatatgagcccatctatctgggaggggtcttccagctggagaagggtgaccgactcaTcgctgagatcaat
cgccccgactatctcgactttgccgagtAtgggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO:28)

[0082] MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLS
LISPLAQAAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGPCSTHVLLTHTIS
RIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLIAEINRPDYLDFAEYGQVYFGIIAL
(SEQ ID NO:29)

[0083] 在Asp143Tyr处具有突变和在位置-1缺失Ala的TNF- α 突变体的一个实例(突变的序列加下划线和删除的序列由删除线表示),对于核酸和氨基酸分别如下所示:

[0084] atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacaggggg
gccccagggctccaggcggtgcttgttctctcagcctcttctccttctctgatcgtggcaggcgccaccacgctcttc
tgcttgcctgcactttggagtgatcgccccccagagggaagagttccccagggacctctctctaatcagccctctgg
cccaggcagcccatgttgttagcaaaccctcaagctgaggggcagctccagtggctgaaccgccccggccaatgcctt
cctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggcctgtacctcatctactcccag

gtcctcttcaagggccaaggctgccccctccacccatgtgtcctcaccacacccatcagccgcatcgccgtctcct
accagaccaaggtcaacctctctctgcatcaagagccccctgccagagggagaccccagagggggctgaggccaa
gccctggtatgagcccatctatctgggaggggtcttccagctggagaaggggtgaccgactcagcgctgagatcaat
cgccccgactatctcTactttgccgagctctgggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO:30)

[0085] MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLS
LISPLAQAAHVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGPCSTHVLLTHTIS
RIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLYFAESGQVYFGIIAL
(SEQ ID NO:31)

[0086] 缺少缺失的序列的SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31的版本分别如下所示(突变序列仍加下划线)。

[0087] atgagcactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcgctccccaagaagacaggggg
gccccagggtccaggcggtgcttgttctcagcctcttctccttctgatcgtggcaggcgccaccacgtctcttc
tgctgtctgcactttggagtgatcgccccccagaggggaagagttccccagggacctctctctaatcagccctctgc
aggcagcccatgtttagcaaaccctcaagctgaggggcagctccagtggctgaaccgccgggccaatgccctcct
ggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggcctgtacctcatctactcccaggtc
ctcttcaagggccaaggctgccccctccacccatgtgtcctcaccacacccatcagccgcatcgccgtctctacc
agaccaaggtcaacctcctctctgccatcaagagccccctgccagagggagaccccagagggggctgaggccaagcc
ctggtatgagcccatctatctgggaggggtcttccagctggagaaggggtgaccgactcagcgctgagatcaatcgg
cccgactatctcTactttgccgagctctgggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ ID NO:32)

[0088] MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLS
LISPLAQAHVAVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGPCSTHVLLTHTISR
IAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLYFAESGQVYFGIIAL
(SEQ ID NO:33)

[0089] 具有CIK基序突变和上述引用突变的组合的TNF α 突变的一个实例如下所示,其中突变加下划线:

[0090] ATGCTCGAGtcgagatgagcactgaaaTGCATCCCGGAAGGGGTCCTGGCACgaggaggcgctcccc
aagaagacagggggggccccagggtccaggcggtgcttgttctcagcctcttctccttctgatcgtggcaggcg
ccaccacgtcttctTcctgtctgcactttggagtgatcgccccccagaggggaagagttccccagggacctctctct
aatcagccctctggcagcccatgtttagcaaaccctcaagctgaggggcagctccagtggctgaaccgccggggcc
aatgccctcctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggcctgtacctcatct
actcccaggctcctcttcaagggccaaggctgccccctccacccatgtgtcctcaccacacccatcagccgcatcgc
cgtctccCaccagaccaaggtcaacctcctctTCgcatcaagagccccctgccagagggagaccccagagggggct
gaggccaagccctggtatgagcccatctatctgggaggggtcttccagctggagaaggggtgaccgactcaTcgctg
agatcaatcgggccgactatctcTactttgccgagTatgggcaggtctactttgggatcattgccctgtcg (SEQ
ID NO:34)

[0091] MSTEMHPGRGSWHEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFFLLHFGVIGPQREEFPRDLS
LISPLAQAHVAVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGPCSTHVLLTHTISR
IAVSHQTKVNLLFAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLIAEINRPDYLYFAEYQVYFGIIAL
(SEQ ID NO:35)

[0092] III. 治疗性基因

[0093] 在某些情况下,表达TNF- α 突变体的细胞也可以表达一种或多种治疗性基因。在其中使用一种以上治疗性基因的情况下,治疗性基因可以属于或可以不属于同一类型的分子。例如,除了TNF- α 突变体外,单个细胞还可表达工程化的受体、细胞因子、细胞因子受体、归巢受体、趋化因子受体或其组合。本文包括治疗性基因核酸;治疗性基因产品,包括多肽;包含治疗性基因核酸的载体;以及携带其中任何一种的细胞。

[0094] 在特定实施方案中,突变体与至少一种治疗性基因,包括治疗转基因共表达。治疗性转基因可以是任何种类,但在特定实施方案中它编码工程化的受体。工程化的受体的实例至少包括T细胞受体、嵌合抗原受体(CAR)、趋化因子受体、细胞因子受体、归巢受体或其组合。任何工程化的受体可以靶向任何特定配体,例如抗原,包括癌抗原(例如肿瘤抗原)。癌症抗原可以是任何种类,包括那些与待治疗的特定癌症相关并且期望被靶向以特异性清除癌症的抗原。

[0095] 在其中治疗性基因产物是工程化的受体的情况下,受体包含可以靶向任何抗原例如肿瘤抗原的抗原结合结构域。例如,抗原结合域可包含scFv。例如,抗原分子可以来自传染原、自身/自体抗原、肿瘤/癌症相关抗原或肿瘤新抗原。可以靶向的抗原的实例包括但不限于在B细胞上表达的抗原;在癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病、生殖细胞肿瘤和母细胞瘤上表达的抗原;在各种免疫细胞上表达的抗原;以及在与各种血液疾病、自身免疫疾病和/或炎症疾病相关的细胞上表达的抗原。靶向的特定抗原的实例包括CD19、CD5、CD99、CD33、CLL1、CD123、4-1BB、5T4、腺癌抗原、甲胎蛋白、BAFF、B-淋巴瘤细胞、C242抗原、CA-125、碳酸酐酶9(CA-IX)、C-MET、CCR4、CD152、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23(IgE受体)、CD28、CD30(TNFRSF8)、CD33、CD4、CD40、CD44 v6、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CEA、CNT0888、CTLA-4、DRS、EGFR、EpCAM、CD3、FAP、纤连蛋白胞外结构域-B、叶酸受体1、GD2、GD3神经节苷脂、糖蛋白75、GPNMB、HER2/neu、HGF、人类散射因子受体激酶、IGF-1受体、IGF-I、IgG1、L1-CAM、IL-13、IL-6、胰岛素样生长因子I受体、整联蛋白- $\alpha 5\beta 1$ 、整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、MORAb-009、MS4A1、MUC1、粘蛋白CanAg、N-羟乙酰神经氨酸、NPC-1C、PDGF-R.alpha.、PDL192、磷脂酰丝氨酸、前列腺癌细胞、RANKL、RON、ROR1、SCH 900105、SDC1、SLAMF7、TAG-72、生腱蛋白C、TGF $\beta 2$ 、TGF β 、TRAIL-R1、TRAIL-R2、肿瘤抗原CTAA16.88、VEGF-A、VEGFR-1、VEGFR2、波形蛋白及其组合。可用于本公开内容的方法和组合物中的任何抗原受体可靶向任何一种上述提及的抗原或者一种或多种其他抗原,并且此类抗原受体可以是CAR或TCR。在特定实施方案中,用于疗法的相同细胞可以利用CAR和TCR两者。

[0096] 在其中治疗性基因编码CAR的情况下,CAR可以是例如第一代、第二代、第三代或后续代。CAR可以对两种或更多种不同的抗原具有双特异性或可以不具有双特异性。CAR可以包含一种或多种共刺激域。每种共刺激性结构域可包含以下任何一种或多种共刺激性结构域,例如,TNFR超家族成员、CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、Dap10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40或其组合。在具体实施方案中,CAR包含CD3 ζ 。在某些实施方案中,CAR缺乏一种或多种特定的共刺激性结构域;例如,CAR可以缺少4-1BB。

[0097] 在具体的实施方案中,CAR至少包含DAP12作为共刺激性结构域,并且在某些方面,CAR多肽包含特定DAP12氨基酸序列或由特定DAP12核酸序列编码。实例如下:

[0098] DAP12氨基酸序列

[0099] MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLV
PRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO:9)

[0100] DAP12核酸序列

[0101] ATGGGGGGACTTGAACCCTGCAGCAGGCTCCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCG
TCCTGTCCAGGCCAGGCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATG
GGAGACCTGGTGTGACAGTGCTCATTGCCCTGGCCGTGTACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGG
CTGCGGAGGCAGCGACCCGAAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTC
GGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTACAAATGA (SEQ ID NO:10)

[0102] 在具体的实施方案中,CAR至少包含CD28作为共刺激性结构域,并且在某些方面,CAR多肽包含特定CD28氨基酸序列或由特定CD28核酸序列编码。实例如下:

[0103] CD28氨基酸序列

[0104] KFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR
SRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRG (SEQ ID NO:11)

[0105] CD28核酸序列

[0106] ATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTA
TTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGG
GCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCACGCG (SEQ ID NO:
12)

[0107] 在特定的实施方案中,CAR多肽包含连接抗原结合结构域和跨膜结构域的细胞外间隔子结构域。细胞外间隔子结构域可包括但不限于抗体或其片段或衍生物的Fc片段、抗体或其片段或衍生物的铰链区、抗体的CH2区、CH3区抗体、人工间隔子序列或其组合。细胞外间隔子结构域的实例包括但不限于CD8- α 铰链、由多肽例如Gly3制成的人工间隔子或者IgG (例如人IgG1或IgG4) 的CH1、CH3结构域。在特定情况下,细胞外间隔子结构域可包含:
(i) IgG4的铰链、CH2和CH3区,(ii) IgG4的铰链区,(iii) IgG4的铰链和CH2,(iv) CD8- α 的铰链区,(v) IgG1的铰链、CH2和CH3区,(vi) IgG1的铰链区或(vi) IgG1的铰链和CH2或者其组合。

[0108] 在具体的实施方案中,铰链来自IgG1,并且在某些方面,CAR多肽包含特定的IgG1铰链氨基酸序列或由特定的IgG1铰链核酸序列编码。实例如下:

[0109] IgG1铰链氨基酸序列

[0110] SYVTVSSQDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPK (SEQ ID NO:13)

[0111] IgG1铰链核酸序列

[0112] GTACGTCACTGTCTCTTCACAGGATCCCCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACACACATGCCCAC
CGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC

GTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
CGCTCCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC
AGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC
CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAAAAGATC (SEQ ID NO:14)

[0113] IV. 载体

[0114] TNF- α 突变体可以通过任何合适的载体(包括通过病毒载体或通过非病毒载体)递送至受体细胞。病毒载体的实例至少包括逆转录病毒、慢病毒、腺病毒或腺相关病毒载体。非病毒载体的实例至少包括质粒、转座子、脂质、纳米颗粒等。

[0115] 在其中用编码TNF- α 突变体的载体转导细胞并且还需要将另一种基因(例如治疗性基因产物)转导到细胞中的情况下, TNF α 突变基因和治疗性基因可以或可以不包含在同一载体上或与同一载体一起。在一些情况下, TNF- α 突变基因和治疗性基因由相同的载体分子, 例如相同的病毒载体分子表达。在这种情况下, TNF- α 突变基因和治疗性基因的表达可以或可以不通过一种或多种相同的调控元件进行调控。当TNF- α 突变基因和治疗性基因位于同一载体上时, 它们可以或可以不作为单独的多肽表达。在其中它们作为单独的多肽表达的情况下, 它们可以通过例如2A元件或IRES元件在载体上分开。在一些实施方案中, TNF- α 突变体和治疗性基因产物作为融合蛋白产生。

[0116] 在特定的实施方案中, 从多顺反子载体表达TNF- α 突变基因。多顺反子载体可编码除TNF- α 突变基因外的至少一种治疗性基因。在特定的实施方案中, 多顺反子载体编码TNF- α 突变体和至少一种工程化的受体, 例如T细胞受体和/或CAR。在某些情况下, 多顺反子载体编码至少一种TNF- α 突变体、至少一种工程化的受体和至少一种细胞因子。细胞因子可以属于特定类型的细胞因子, 例如人或小鼠或任何物种。在特定情况下, 细胞因子为白细胞介素(IL) 15、IL12、IL2、IL18和/或IL21。

[0117] 编码TNF- α 突变体del Val1 del Pro12并单独编码具有IgG1铰链、CD28和CD3 ζ 的CD19-特异性CAR并单独编码IL15的载体的核酸序列的一个实例如下:

[0118] AATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGAAGGCATGGAAAA
ATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGAT
ATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATA
TCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGT
TTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAA
TCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTATGCTCCCCGAGCTCAATAAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGG
GGCGCCAGTCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGCAAGTTCATCCGACT
TGTGGTCTCGCTGTTCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGTCTTTTCAATTTGGGGG
CTCGTCCGGGATCGGGAGACCCCTGCCAGGGACACCGACCCACCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTATC
TGTGTCTGTCCGATTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGCGCCTGCGTCCGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTG
TATCTGGCGGACCCGTGGTGGAACTGACGAGTTGGAACACCCGGCCGCAACCCCTGGGAGACGTCCCAGGGACTTC
GGGGGCCGTTTTTTGTGGCCCGACCTGAGTCCTAAAATCCCGATCGTTTAGGACTCTTGGTGCACCCCCCTTAGAG

GAGGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAAACAGTTCCCGCCTCCGTCTGAATTTTGGCTTTCGGTTT
GGGACCGAAGCCGCGCCGCGCTTGTCTGCTGCAGCATCGTTCTGTGTTGTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTA
TTTGTCTGAAAATATGGGCCCCGGGCTAGCCTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCACCTGGAAGATGTC
GAGCGGATCGCTCACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCTTCTGCTCTGCAGAATGGCCAA
CCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTAACCGAGACCTCATCACCCAGGTAAAGATCAAGGTCTTTTC
ACCTGGCCCCGATGGACACCCAGACCAGGTGGGGTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCCCTCCC
TGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCTCCATCCGCCCCGTCTCTCCCCCTTGAACCTC
CTCGTTTCGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGCGCCCCCATATGGCCATATGA
GATCTTATATGGGGCACCCCCGCCCTTGTAACCTTCCCTGACCCTGACATGACAAGAGTTACTAACAGCCCCCTCT
CTCCAAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAAC
AACTGGACCGACCGGTGGTACCTACCCCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGCGACACCAGACTAAGAA
CCTAGAACCTCGCTGGAAGGACCTTACACAGTCCTGCTGACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCA
GCTTGATACACGCCGCCACGTGAAGGTGCCGACCCCGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGAT
GAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCGAGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGGGCCCCAGGGC
TCCAGGCGGTGCTTGTTCCTCAGCCTCTTCTCCTTCTGATCGTGGCAGGCGCCACCAGCTCTTCTGCCTGCTGC
ACTTTGGAGTGATCGGCCCCCAGAGGAAGAGTTCCCAGGGACCTCTCTCTAATCAGCCCTCTGGCCCAGGCAAG
ATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGGTAGCCCATGTTGTAGCAAACCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGG
CTGAACCGCCGGGCCAATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGAGG
GCCTGTACCTCATCTACTCCCAGGTCTCTTCAAGGGCCAAGGTGCCCCCTCCACCCATGTGCTCCTCACCCACAC
CATCAGCCGCATCGCCGTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCCTGCCAGAGGGAG
ACCCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTG
ACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCGACTATCTCGACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCAT
TGCCCTGTGCGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGAG
TTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGCTCTAGAGACATCCAGATGACACAGA
CTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATA
TTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGA
GTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATA
TTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACG
TGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGCAG
CAGTCTGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCG
ACTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAAC
CACATACTATAATTAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAA
ATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTA
TGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTCCTCGTACGTCACTGTCTCTTACAGGATCCCGCCGAGCC
CAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA
GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG
TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCC

[illegible]

TAATAGCGAAGAGGCCCCGACCCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGG
TATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCG
CATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGC
TTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGA
CGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTAAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCA
CTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAG
ACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCCTT
ATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAG
ATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGA
AGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAA
GAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTA
CGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCT
GACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGT
TGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGT
TGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAA
AGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGT
GGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGA
GTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTC
AGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATC
CTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGA
TCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACACCGCTACCAGC
GGTGGTTTGTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCA
AATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTC
TGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTT
ACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACC
GAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGG
TAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGT
CGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCC
AGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTG
ATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGA
GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGC
AGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATT
AGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACAC
AGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGCTCTTAGGAGTTTCTTAATACATCCCAAACCTCAAATATAT
AAAGCATTTGACTTGTTCTATGCCCTAGGGGGCGGGGGGAAGCTAAGCCAGCTTTTTTTAACATTTAAAATGTTAA
TTCCATTTTAAATGCACAGATGTTTTATTTTATAAGGGTTTCAATGTGCATGAATGCTGCAATATTCCTGTTACC
AAAGCTAGTATAAATAAAAAATAGATAAACGTGGAAATTACTTAGAGTTTCTGTCATTAACGTTTCCTTCCTCAGTT
GACAACATAAATGCGCTGCTGAGCAAGCCAGTTTGCATCTGTGAGGATCAATTTCCCATTTATGCCAGTCATATTAA
TACTAGTCAATTAGTTGATTTTTATTTTTGACATATACATGTG (SEQ ID NO:15)

[0119] 编码TNF- α 突变体del Val1 del Pro12并单独编码具有IgG1铰链、CD28和CD3 ζ 的CD19-特异性CAR并单独编码IL15的载体的氨基酸序列的一个实例如下：

[0120] MSTESMIRDVELAEELPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLS
LISPLAQARSSSRTPSKVAHVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCP
STHVLTTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYILGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAE
SGQVYFGIIALSRAEGRGSLTTCGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCSRDIQMTQTSSLSASLGDRVTISC
RASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG
GGTKLELKRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEW
LGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTTVTVSSYVT
VSSQDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHY
TQKSLSLSPGKKDPKFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR
DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSI
SIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFASGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA
MKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
(SEQ ID NO:36)

[0121] 编码TNF- α 突变体del Val1 del Pro12并单独编码具有IgG1铰链、DAP12和CD3 ζ 的CD19-特异性CAR并单独编码IL15的载体的核酸序列的一个实例如下：

[0122] AATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGAAGGCATGGAAAA
ATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGAT
ATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATA
TCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGT
TTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACAAACAA
TCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTATGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCAACCCCTCACTCGG
GGCGCCAGTCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGCAGTTGCATCCGACT
TGTGGTCTCGCTGTTCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGTCTTTTCAATTTGGGGG
CTCGTCCGGGATCGGGAGACCCCTGCCAGGGACACCGACCCACCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTATC
TGTGTCTGTCCGATTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGCGCTGCGTCTAGTCTAGTCTAGTCTAGTCTG
TATCTGGCGGACCCGTGGTGGAACGACGAGTTCGGAACACCCGCGCGCAACCCTGGGAGACGTCCCAGGGACTTC
GGGGGCCGTTTTTGTGGCCCGACCTGAGTCCTAAATCCCGATCGTTTAGGACTCTTGGTGCACCCCTTAGAG
GAGGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAACAGTTCCCGCCTCCGTCTGAATTTTTGCTTTTCGGTTT
GGGACCGAAGCCGCGCGCGCTTGTCTGCTGCAGCATCGTTCTGTGTTGTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTA
TTTGTCTGAAAATATGGGCCCCGGCTAGCCTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCAGTGGAAAGATGTC
GAGCGGATCGCTCACAACAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCTTCTGCTCTGCAGAATGGCCAA
CCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTAACCGAGACCTCATCACCCAGGTAAAGATCAAGGTCTTTTC
ACCTGGCCCGCATGGACACCCAGACAGGTGGGGTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCTCC
TGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTCTCTTCTCCATCCGCCCCGTCTCTCCCCCTTGAACCTC

CTCGTTGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGCGCCCCCATATGGCCATATGA
GATCTTATATGGGGACCCCGCCCTTGTAAGTTCCTGACCTGACATGACAAGAGTTACTAACAGCCCTCT
CTCCAAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAAC
AACTGGACCGACCGGTGGTACCTACCCCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGCCGACACCAGACTAAGAA
CCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCCTGCTGACCACCCCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCA
GCTTGGATACACGCCGCCACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGTGGACCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGAT
GAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCGAGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGGGCCCCAGGGC
TCCAGGCGGTGCTTGTTCCTCAGCCTCTTCTCCTTCCCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCCTGCTGC
ACTTTGGAGTGATCGCCCCCAGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGACCTCTCTCTAATCAGCCCTCTGGCCCAGGCAAG
ATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGGTAGCCCATGTTGTAGCAAACCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGG
CTGAACCGCCGGGCCAATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGAGG
GCCTGTACCTCATCTACTCCCAGGTCCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCCCACCACCATGTGCTCCTCACCCACAC
CATCAGCCGCATCGCCGTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCTGCCAGAGGGAG
ACCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTG
ACCGACTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCCGACTATCTCGACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCAT
TGCCCTGTGCGGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGAG
TTTGGGCTGAGCTGGCTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGCTCTAGAGACATCCAGATGACACAGA
CTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATA
TTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACCATAACATCAAGATTACACTCAGGA
GTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATA
TTGCCACTTACTTTTGGCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACG
TGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGCAG
CAGTCTGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCG
ACTATGGTGTAAGCTGGATTCCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAAC
CACATACTATAATTACAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAA
ATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTA
TGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTCCTCGTACGTCACTGTCTCTTACAGGATCCCGCCGAGCC
CAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA
GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG
TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC
GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGT
CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACTACAAGACCACG
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC
GGGTAAAAAAGATCCCAAATTTGGGGCGTGCTGGCCGGAATCGTGATGGGCGACCTGGTGTGACAGTGTGATC
GCCCTGGCTGTGTACTTCTGGGAGACTGGTGGCCAGAGGAAGAGGCGCTGCCGAAGCCGCCACCCGGAAGCAGA
GAATCACCGAGACAGAGAGCCCCTATCAGGAAGTGCAGGGCCAGCGGAGCGACGTGTACAGCGACCTGAATACCCA

24

ATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGA
TCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACC
GGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAA
CTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAG
GACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCG
CGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCA
ACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACCAAG
TTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGA
TAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGA
TCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTT
GTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGT
TCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATC
CTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATA
AGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG
ATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGC
AGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTC
GCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGC
GGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTG
GATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGA
GCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCA
CGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCC
CAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACA
GCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGCTCTTAGGAGTTTCCTAATACATCCCAAACCTCAAATATATAAAGCATT
TGACTTGTTCTATGCCCTAGGGGGCGGGGGAAGCTAAGCCAGCTTTTTTTAACATTTAAAATGTTAATTCCATTT
TAAATGCACAGATGTTTTATTTTATAAGGGTTTCAATGTGCATGAATGCTGCAATATTCCTGTTACCAAAGCTAG
TATAAATAAAAAATAGATAAACGTGGAAATTACTTAGAGTTTCTGTCATTAACGTTTCCTTCCTCAGTTGACAACAT
AAATGCGCTGCTGAGCAAGCCAGTTTGCATCTGTGAGGATCAATTTCCCATATATGCCAGTCATATTAATTACTAGT
CAATTAGTTGATTTTTATTTTTGACATATACATGTG (SEQ ID NO:16)。

[0123] 编码TNF- α 突变体del Val1 del Pro12并单独编码具有IgG1铰链、DAP12和CD3 ζ 的CD19-特异性CAR并单独编码IL15的载体的氨基酸序列的一个实例如下：

[0124] MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTFLCLLHFGVIGPQREEFPRDLS
LISPLAQARSSSRTPSDKVAHVANPQAEQLQLNRRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFGQGCP
STHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAE
SGQVYFGIIALSRAEGRGSLLTCGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVCQRDIQMTQTSSLSASLGDRVTISC
RASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG
GGTKLELKRGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEW
LGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTTVTVSSYVT
VSSQDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK

NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHY
TQKSLSLSPGKKDPKFWGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRS
DVYSDLNTQRPYYKRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRIS
KPHLRISISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVH
PSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ
MFINTS (SEQ ID NO:37)

[0125] V. 细胞

[0126] 本公开内容的实施方案涵盖表达一种或多种本文涵盖的TNF- α 突变体的细胞。在具体的实施方案中,细胞包含编码一种或多种工程化的非分泌性的、膜结合的TNF- α 突变多肽的重组核酸。在具体的实施方案中,除了表达一种或多种TNF- α 突变多肽之外,细胞还包含编码一种或多种治疗性基因产物的核酸。核酸可以是任何种类的载体。编码一种或多种TNF- α 突变多肽的核酸可以是或可以不是编码一种或多种治疗性基因产物的相同核酸分子。

[0127] 本公开的细胞可以是任何种类的,至少包括T细胞、NK细胞、NKT细胞、iNKT细胞、巨噬细胞、B细胞、MSC或任何种类的干细胞,至少包括造血干细胞、多能胚胎干细胞或胚胎干细胞。

[0128] 细胞可以直接从个体获得,或者可以从保藏单位或其他储藏机构获得。作为疗法的细胞对于提供细胞作为疗法的个体而言可以是自体的或同种异体的。

[0129] 细胞可以来自需要疗法用于医学病况的个体,并且在它们的操作以表达TNF- α 突变体和治疗性基因产物(例如使用用于过继细胞疗法的转导和扩增的标准技术)之后,可以将它们返回给最初来源的个体。在某些情况下,细胞储存起来供个体或另一个个体以后使用。

[0130] 携带一种或多种工程化的受体并且可能需要被驻留TNF- α 自杀基因清除的细胞可以是任何种类。在具体的实施方案中,细胞是免疫细胞或干细胞,包括例如用于过继细胞疗法的那些细胞。免疫细胞可以是T细胞、NK细胞、NKT细胞、iNKT细胞、B细胞等。细胞可包含在细胞群体中,并且该群体可具有用一种或多种TNF- α 突变自杀基因或者一种或多种工程化的受体和一种或多种TNF- α 突变自杀基因两者转导的大多数细胞。细胞群体可包含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或100%的细胞转导有一种或多种TNF- α 突变自杀基因和任选的一种或多种工程化的受体。一种或多种TNF- α 突变体和一种或多种工程化的受体是分开的多肽。

[0131] 细胞可以用TNF- α 突变自杀基因产生,旨在针对特定目的进行模块化。例如,可以生成细胞,包括用于商业分发,表达TNF- α 突变体(或与编码突变体的核酸一起分发以用于后续转导),并且用户可以根据它们预期目的而修饰它们以表达一种或多种目标治疗性基因。仅作为一个实例,目标在于治疗CD5-阳性癌症的个体可以获得或生成表达TNF- α 突变体的细胞并修饰它们以表达包含CD5-特异性scFv的CAR。备选地,目标在于治疗CD5阳性癌症的个体可以获得待转导的细胞,获得编码TNF- α 突变体的载体,并修饰载体以编码CD5-特异性CAR,然后进行细胞的后续转导。这些实施方案中的任一个可以应用于除CD5之外的任何

其他癌抗原。

[0132] 在特定的实施方案中,可以修饰表达TNF- α 突变体的转导的细胞的基因组。基因组可以以任何方式进行修饰,但在具体的实施方案中,基因组例如通过CRISPR基因编辑进行修饰。可以修饰细胞的基因组以增强TNF- α 突变体作为自杀基因的有效性、增强治疗性基因产物的使用有效性或用于其他目的。可在细胞中修饰的基因的具体实例包括下述:ADAM13/TACE的敲除、增加表达TNF- α 突变体的细胞对肿瘤微环境(如TGF- β 受体1或2, IDO, 检查点分子, 如PD1、TIGIT、KLRG1、TIM3等)的抗性。

[0133] VI. TNF- α 突变体作为自杀基因的用途

[0134] 在特定实施方案中,使用TNF- α 突变自杀基因的细胞是具有有害潜力的细胞,例如对于体内暴露于细胞的个体有害。细胞在递送时或之后可能对个体有毒,并因此对于细胞而言可能始终存在能够清除该细胞的需要。例如,用于个体体内的任何类型的细胞疗法都能够在细胞中使用所公开的TNF- α 突变体,从而允许在需要时终止细胞疗法。当正接受细胞疗法和/或已经接受细胞疗法的个体表现出一种或多种不良事件的一种或多种症状,例如细胞因子释放综合征、神经毒性、过敏反应/变态反应和/或靶向/非靶向肿瘤毒性(举例而言)或被认为有出现一种或多种症状的风险,包括即将出现时,细胞疗法可以进行利用TNF- α 突变自杀基因。使用TNF- α 突变体作为自杀基因可以是疗法的计划方案的部分,或者可能仅在认识到需要其使用时使用。在某些情况下,由于不再需要进行疗法,因此使用靶向TNF- α 自杀基因的一种或多种药剂终止细胞疗法。

[0135] 在特定实施方案中,利用TNF- α 自杀基因的细胞可以是工程化用于哺乳动物细胞疗法的细胞。在这种情况下,细胞疗法可以是任何种类并且细胞可以是任何种类。在具体的实施方案中,细胞是已经被工程化以表达一种或多种治疗性基因产物的免疫细胞或干细胞。在具体的实施方案中,细胞是用一种或多种用于细胞的工程化的受体转导的细胞。工程化的受体可在靶向时赋予细胞以治疗性特性,例如通过结合受体的配体。在具体的实施方案中,工程化的受体是非天然的并且由人类人工制成。工程化的受体可以是任何种类,包括T细胞受体、嵌合抗原受体(CAR)、趋化因子受体、细胞因子受体、归巢受体、基因编辑的细胞或其组合。工程化的受体可以经工程化以能够结合例如靶标,特定抗原,例如至少包括肿瘤抗原。在某些情况下,工程化的受体可以对于一种以上的抗原是双特异性或多特异性的,从而允许转导的细胞通过工程化的受体与表达多种抗原的细胞结合。

[0136] 在特定实施方案中,在递送有效量的一种或多种试剂以结合表达TNF- α 突变体的细胞时,大部分表达TNF- α 突变体的细胞被清除。在具体的实施方案中,在个体中大于50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的表达TNF- α 突变体的细胞被清除。在认识到需要清除细胞后,可继续向个体递送一种或多种药剂直至一种或多种症状不再存在或直至足够数量的细胞已被清除。可以使用TNF- α 突变体作为标记物来监测个体中的细胞数量。

[0137] 本公开内容的方法的实施方案可以包括向有此需要的个体提供有效量的细胞疗法的第一步,其中细胞包含一种或多种非分泌性TNF- α 突变体;以及,使用TNF- α 突变体作为自杀基因(通过任何机制直接或间接地通过细胞死亡)清除细胞的第二步。可以在个体发生至少一种不良事件时启动第二步,并且可以通过任何方式识别该不良事件,包括从细胞疗法开始时可以连续或可以不连续的常规监测。可以在检查和/或测试时检测到不良事件。

在个体患有细胞因子释放综合征(也称为细胞因子风暴)的情况下,个体可能具有例如升高的一种或多种炎性细胞因子(仅作为实例:干扰素- γ 、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、IL-10、IL-6和TNF- α);发热;疲劳;低血压;缺氧;心动过速;恶心;毛细管渗漏;心脏/肾/肝功能障碍;或者它们的组合。在个体具有神经毒性的情况下,个体可能有意识模糊、谵妄、发育不全和/或癫痫发作。在某些情况下,对个体测试与细胞因子释放综合征的发作和/或严重程度相关的标记物,例如C反应蛋白、IL-6、TNF- α 和/或铁蛋白。

[0138] 在另外的实施方案中,例如,在细胞因子释放综合征或神经毒性期间施用一种或多种结合非分泌性TNF- α 的药剂具有中和导致疗法毒性的高水平可溶性TNF- α 的额外益处。可溶性TNF- α 在细胞因子释放综合征期间以高水平释放,并且是CAR T细胞疗法的毒性调节剂。在这种情况下,本文包括的TNF- α 抗体的施用具有双重有益效果——即选择性去除表达TNF- α 突变体的细胞以及中和引起毒性的可溶性TNF- α 。因此,本公开内容的实施方案包括在正在接受或已接受过继细胞疗法的个体中清除或降低细胞因子释放综合征的严重性的方法,其中在过继细胞疗法中所述细胞表达非分泌性TNF- α 突变体,所述方法包括提供有效量的结合非分泌性TNF- α 突变体的药剂,所述药剂在个体中引起(a)细胞疗法的至少一些细胞的清除;和(b)可溶性TNF- α 水平的降低。

[0139] 本公开内容的实施方案包括在已经接受或正在接受用表达非分泌性TNF- α 突变体的细胞的细胞治疗的个体中降低细胞因子释放综合征的影响的方法,包括提供有效量的一种或多种结合突变体的药剂以在个体中引起(a)细胞疗法的至少一些细胞的清除;和(b)可溶性TNF- α 水平的降低。

[0140] 当需要利用TNF- α 自杀基因时,向个体提供有效量的一种或多种能够抑制(例如通过直接结合)细胞表面上的TNF- α 突变体的抑制剂。在一些实施方案中,可以全身地和/或局部地向个体提供抑制剂。抑制剂可以是多肽(例如抗体)、核酸、小分子(例如黄嘌呤衍生物)、肽或其组合。在具体的实施方案中,抗体是FDA批准的。当抑制剂是抗体时,至少在某些情况下,抑制剂可以是单克隆抗体。当应用抗体的混合物时,混合物中的一种或多种抗体可以是单克隆抗体。小分子TNF- α 抑制剂的实例包括例如美国专利号5,118,500中描述的小分子,该专利通过引用整体并入本文。多肽TNF- α 抑制剂的实例包括多肽,例如美国专利号6,143,866中描述的那些,该专利通过引用整体并入本文。

[0141] 在特定的实施方案中,至少一种抗体用于靶向TNF- α 突变体以触发其作为自杀基因的活性。例如,抗体的实例至少包括阿达木单抗、阿达木单抗-atto、聚乙二醇结合赛妥珠单抗、依那西普、依那西普-szzs、戈利木单抗、英夫利昔单抗、英夫利昔单抗-dyyb或其混合物。

[0142] 本公开内容的实施方案包括通过修饰细胞疗法的细胞以表达非分泌性TNF- α 突变体来降低细胞疗法对个体的毒性风险的方法。在具体的实施方案中,细胞疗法用于癌症,并且它可以包含靶向抗原(包括癌症抗原)的工程化的受体。

[0143] 在特定的实施方案中,除了本公开内容的创造性细胞疗法之外,向个体可能已经提供、可能提供和/或可能将要提供用于医学病况的另外的疗法。在其中医学病况是癌症的情况下,可以向个体提供手术、放射、免疫疗法(本公开内容的细胞疗法除外)、激素疗法、基因疗法、化学疗法等中的一种或多种。

[0144] 在其中用本公开内容的细胞疗法治疗的个体患有癌症的情况下,个体可能患有任

何类型的癌症。个体可能患有白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、脑癌、肺癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、宫颈癌、卵巢癌、睾丸癌、骨癌、皮肤癌、肾癌、肝癌、胃癌、脾脏癌、甲状腺癌、头颈癌、胆囊癌等。

[0145] VII. 本公开内容的试剂盒

[0146] 本文所述的任何组合物可包含在试剂盒中。在一个非限制性实例中,细胞、产生细胞的试剂、载体和产生载体及其组分的试剂可包括在试剂盒中。在某些实施方案中, α - β T细胞、 γ - δ T细胞、NK细胞、NKT细胞、iNKT细胞、B细胞或干细胞可包括在试剂盒中。这种试剂盒可以具有或不具有一种或多种用于操作细胞的试剂。例如,此类试剂包括小分子、蛋白质、核酸、抗体、缓冲液、引物、核苷酸、盐和/或它们的组合。试剂盒中可以包括编码一种或多种TNF- α 突变体、工程化的受体或细胞因子的核苷酸。试剂盒中可以包括蛋白质,例如细胞因子或抗体,包括单克隆抗体。试剂盒中可以包括编码工程化的受体(例如嵌合抗原受体或T细胞受体)的组分的核苷酸,包括生成它们的试剂。

[0147] 在特定方面,试剂盒包括本公开内容的细胞疗法以及另一种癌症疗法。在一些情况下,除了细胞疗法实施方案之外,试剂盒还包括第二癌症疗法,例如化学疗法、激素疗法和/或免疫疗法。试剂盒可以针对个体的特定癌症进行定制,并且包括针对个体的相应的第二癌症疗法。

[0148] 试剂盒可以包括适当等分的本公开内容的组合物。试剂盒的组分可以以水性介质或以冻干形式进行包装。试剂盒的容器装置通常包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其他容器装置,可将组分放入其中并优选地适当等分。当试剂盒中有多于一种组分时,试剂盒通常还可以包括第二、第三或其他另外的容器,可将另外的组分单独放置在其中。然而,小瓶中可以包含组分的各种组合。本发明的试剂盒通常还包括用于盛装组合物的装置和任何其他试剂容器在密闭空间中用于商业销售。这种容器可以包括注塑或吹塑塑料容器,所需的小瓶保持在其中。

实施例

[0149] 包括以下实施例以说明本公开的优选实施方案。本领域技术人员应当理解,以下实施例中公开的技术代表了本发明人发现的在本公开内容的实践中发挥良好作用的技术,因此可以被认为构成其实践的优选模式。然而,本领域技术人员根据本公开内容应当理解,在不脱离本公开内容的精神和范围的情况下,可以对所公开的具体实施例进行许多改变并且仍然获得类似或相似的结果。

实施例1

TNF- α 自杀基因

[0150] 本公开内容提供了用于细胞疗法的标记物部分和自杀部分,它们基于通常被加工成17kD组分的26kD肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的不可切割突变体。使用这种方法有许多优点。图1显示了诱变TNF- α 以消除膜切割位点的实验计划的实例。正如Perez等人(1990)所述,图1的右图示出了使TNF- α 突变体不可切割的三个实例性TNF- α 突变体:(1) 17kD TNF的氨基酸残基1-12的缺失;(2) 17kD TNF的氨基酸残基1和12的缺失;和(3) 17kD TNF的氨基酸残基1和13的缺失。图1的左图提供了用于定点诱变的引物的实例作为生成突变体的实例。

[0151] 图2A、2B、2C、2D和2E提供了可以编码TNF- α 突变体的载体的实例。图2A示出了具有氨基酸Val11和Pro12缺失的TNF- α 突变体的载体图谱实例,并且该突变体与CD19特异性CAR

共表达并且还与IL-15共表达,它们均作为单独的多肽,作为实例。图2B示出了在缬氨酸13处具有缺失的TNF- α 突变体的载体图谱实例,并且该突变体单独地与CD19特异性CAR共表达并且单独地与IL-15共表达,作为实例。图2C示出了具有氨基酸Val11和Val 13缺失的TNF- α 突变体的载体图谱实例,并且该突变体单独地与CD19特异性CAR和IL-15共表达。作为实例。图2D示出了具有氨基酸Val11至Val 13缺失(13个氨基酸缺失)的TNF- α 突变体的载体图谱实例,并且该突变体单独地与CD19特异性CAR和IL-15共表达,作为实例。图2E示出了具有氨基酸Ala-1至Val 13缺失(14个氨基酸缺失)的TNF- α 突变体的载体图谱实例,并且该突变体单独地与CD19特异性CAR和IL-15共表达,作为实例。

[0152] 突变的不可切割的TNF- α (在用编码具有在Val11和Pro12处缺失的TNF- α 突变体和CD19特异性CAR两者的载体转导的细胞中,作为实例) 在例如其编码序列的病毒转导或电穿孔后在细胞表面上稳定表达(图3)。

[0153] 可以使用FDA批准的TNF- α 抗体(例如),如依那西普、英夫利昔单抗或阿达卢单抗靶向表达不可切割的TNF- α 突变体的细胞进行选择性地去除。图4A示出了抗TNF抗体的实例。图4B表明在用英夫利昔单抗治疗的90分钟内,超过70%的表达突变TNF- α 的NK细胞被补体依赖性细胞毒性(CDC)清除。

[0154] 图5A证明与只表达抗CD19 CAR的NK细胞相比,响应Raji靶标,用共表达TNF- α 突变体和CD19特异性CAR的载体转导的NK细胞产生更多的效应细胞因子并更有效地脱颗粒。在图5B中,Raji靶标被用载体转导的NK细胞有效杀伤,该载体单独地共表达TNF- α 突变体(Val11和Pro12的缺失,作为实例)和CD19特异性CAR。具有位置1处缬氨酸、位置12处脯氨酸的缺失的TNF- α 突变蛋白具有生物活性,并在直接细胞-细胞接触时介导强烈的抗肿瘤应答,进一步促进转导的细胞的抗肿瘤活性。

[0155] 携带单独表达CD19特异性CAR和TNF- α 突变体的载体的转导的NK细胞不表现出脱靶活性(图6)。图7表明用单独地表达CD19特异性CAR和TNF- α 突变体的载体转导的NK细胞不表现出脱靶活性并且不非特异性地分泌TNF- α 。图8示出了TNF受体1和2与TNF- α 抗体英夫利昔单抗和阿达木单抗的TNF- α 受体结合位点不同。这表明TNF α 基因中的突变不会对TNF α 抗体识别TNF α 突变蛋白的能力产生负面影响;即TNF α 突变体仍可用作自杀基因并被抗体靶向。

[0156] 可以采用另外的安全性研究。例如,可以使用CD19特异性CAR NK细胞进行体内鼠毒性研究。例如,在已建立的Raji NSG小鼠模型中,可以比较TNF- α WT对比TNF- α 突变体、CD19特异性CAR NK细胞(也表达IL15)。然而,这些突变体之前在小鼠中进行了测试,并证明了它们的安全性(Karp等人,1992)。

[0157] 可以采用突触和信号传导研究来表征TNF- α 突变体对比TNF- α 野生型对比外源性TNF- α 与TNF- α 受体1(TNF-R1)和TNF- α 受体2(TNF-R2)的相互作用。此类研究可能包括对Ramos细胞(其表达TNFR1但不表达TNFR2)中细胞凋亡诱导和胱天蛋白酶(TNF-R1的下游)的测量。此外或备选地,可以在表达TNFR2和TNFR1两者的Jurkat细胞中测量NFkappaB。

实施例2

用TNFAMUT-CAR19-IL15对比IC9-CAR19-IL15构建体转导的CAR-NK细胞的抗肿瘤活性比较

[0158] 图11提供了来自用TNF- α mut-CAR19-IL15构建体或诱导型胱天蛋白酶9(iC9) -

CAR19-IL15构建体转导的来自脐带血的CAR-NK细胞的抗肿瘤活性比较。在图11A中,具有Raji肿瘤的NSG小鼠接受用TNF- α mut-CAR19-IL15构建体转导的或用iC9-CAR19-IL15构建体转导的 3×10^6 CAR脐带血NK细胞。图11B表明随时间推移的百分比存活率。用TNF- α mut-CAR19-IL15构建体转导的小鼠比对照小鼠和用iC9-CAR19-IL15构建体转导的小鼠存活更久。

参考文献

[0159] 说明书中提及的所有专利和出版物均表示本公开内容的实施方案所涉及领域的技术人员的水平。所有专利和出版物均通过引用将其全部并入本文,其程度与每个单独的出版物明确地和单独地指示通过引用并入一样。

专利

[0160] 美国专利号5,118,500

[0161] 美国专利号6,143,866

出版物

[0162] Karp, Stephen E., Hwu, Patrick等人(1992) In vivo Activity of Tumor Necrosis Factor (TNF) Mutants: Secretory but non Membrane-Bound TNF Mediates the Regression of Retrovirally Transduced Murine Tumor. J. Immunol., vol. 149 (6): 2076-2081.

[0163] Perez, C., Albert, I.等人(1990) A Nonsecretable Cell Surface Mutant of Tumor Necrosis Factor (TNF) Kills by Cell-to-Cell Contact. Cell, vol. 63, 251-258.

[0164] 尽管已经详细描述了本公开内容及其优点,但是应当理解,在不脱离由所附权利要求书限定的设计的精神和范围的情况下,可以在本文中进行各种改变、变化、替换和变更。此外,本申请的范围不旨在限于说明书中描述的过程、机器、制造、物质的组合物、手段、方法和步骤的特定实施方案。作为本领域的普通技术人员将容易地从本公开内容中理解,目前存在的或以后将开发的与本文描述的相应实施方案执行基本上相同的功能或基本上实现相同结果的过程、机器、制造、物质的组合物、手段、方法或步骤可以根据本公开内容来应用。因此,所附权利要求旨在将这样的过程、机器、制造、物质的组合物、手段、方法或步骤包括在它们的范围内。

序列表

<110> 得克萨斯大学体系董事会

<120> 自杀基因

<130> UTF8.P1151W0

<140>

<141>

<150> 62/791,464

<151> 2019-01-11

<150> 62/773,372

<151> 2018-11-30

<150> 62/769,405

<151> 2018-11-19

<160> 59

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 231

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 1

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala

1 5 10 15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe

20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe

35 40 45

Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro

50 55 60

Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Arg Ser Ser Ser

65 70 75 80

Arg Thr Pro Ser Asp Lys Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala

85 90 95

Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala

100 105 110

Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly

115	120	125
Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro		
130	135	140
Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser		
145	150	155
Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln		
165	170	175
Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile		
180	185	190
Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala		
195	200	205
Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val		
210	215	220
Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu		
225	230	

<210> 2

<211> 696

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多核苷酸"

<400> 2

```

atgagcactg aaagcatgat ccgggacgtg gagctggccg aggaggcgct cccaagaag      60
acaggggggc cccagggtc caggcgggtg ttgttctca gcctcttctc cttcctgac      120
gtggcaggcg ccaccacgct cttctgcctg ctgcactttg gactgatcgg ccccagagg      180
gaagagtcc ccagggacct ctctctaate agccctctgg cccaggcaag atcatcttct      240
cgaaccccg gtagacaagg agcccatgtt gtagcaaacc ctcaagctga ggggcagctc      300
cagtggctga accgccgggc caatgcctc ctggccaatg gcgtggagct gagagataac      360
cagctgggtg tgccatcaga gggcctgtac ctcatctact cccaggctc cttcaagggc      420
caaggctgcc cctccacca tgtgtctctc acccacacca tcagccgcat cgccgtctcc      480
taccagacca aggtcaacct cctctctgcc atcaagagcc cctgccagag ggagacccca      540
gagggggctg agccaagcc ctggtatgag cccatctatc tgggaggggt cttccagctg      600
gagaagggtg accgactcag cgtgagatc aatcgccccg actatctcga ctttgccgag      660
tctgggcagg tctactttgg gatcattgcc ctgtcg      696

```

<210> 3

<211> 220

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 3

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

<210> 4

<211> 663

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多核苷酸"

<400> 4

```

atgagcactg aaagcatgat ccgggacgtg gagctggccg aggaggcgct cccaagaag      60
acaggggggc cccagggctc caggcgggtc ttgttctca gcctcttctc cttcctgac      120
gtggcaggcg ccaccacgct cttctgctg ctgcactttg gactgatcgg ccccagagg      180
gaagagttcc ccagggacct ctctctaate agccctctgg cccaggcagc ccatgttgta      240
gcaaaccttc aagctgaggg gcagctccag tggtgaacc gccgggcaa tgccctcctg      300
gccaatggcg tggagctgag agataaccag ctggtggtgc catcagaggg cctgtacctc      360
atctactccc aggtcctctt caagggccaa ggctgccctt ccacctatgt gctcctcacc      420
cacaccatca gccgcatcgc cgtctctac cagaccaagg tcaacctctt ctctgccatc      480
aagagcccct gccagaggga gaccccagag ggggtgagg ccaagccctg gtatgagccc      540
atctatctgg gaggggtctt ccagctggag aagggtgacc gactcagcgc tgagatcaat      600
cggcccgaact atctcgactt tgccgagtct gggcaggtct actttgggat cattgccctg      660
tcg

```

<210> 5

<211> 231

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 5

```

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
1              5              10              15
Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
              20              25              30
Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
              35              40              45
Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
              50              55              60
Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Arg Ser Ser Ser
65              70              75              80
Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala
              85              90              95
Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala
              100              105              110

```

Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly	
115	120 125
Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro	
130	135 140
Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser	
145	150 155 160
Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln	
	165 170 175
Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile	
	180 185 190
Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala	
	195 200 205
Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val	
	210 215 220
Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu	
225	230

<210> 6

<211> 696

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多核苷酸"

<400> 6

atgagcactg aaagcatgat ccgggacgtg gagctggccg aggaggcgct cccaagaag	60
acaggggggc cccagggtc caggcggtgc ttgttctca gcctcttctc cttcctgatc	120
gtggcaggcg ccaccacgct cttctgctg ctgcactttg gaggatcg cccagagg	180
gaagagtcc ccaggacct ctctctaate agccctctgg cccaggcaag atcatcttct	240
cgaaccccg gtagacaagcc tgcccatgtt gtagcaaacc ctcaagctga ggggcagctc	300
cagtggctga accgccgggc caatgcctc ctggccaatg gcgtggagct gagagataac	360
cagctggtgg tgccatcaga gggcctgtac ctcatctact cccaggctc cttcaagggc	420
caaggctgcc cctccacca tgtgtctctc acccacacca tcagccgcat cgccgtctcc	480
taccagacca aggtcaacct cctctctgcc atcaagagcc cctgccagag ggagacccca	540
gagggggctg aggccaagcc ctggtatgag cccatctatc tgggagggt cttccagctg	600
gagaagggtg accgactcag cgctgagatc aatcgccccg actatctcga ctttgccgag	660
tctgggcagg tctactttgg gatcattgcc ctgtcg	696

<210> 7

<211> 233

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 7

```

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

```

<210> 8

<211> 157

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

```

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val

```

1	5	10	15
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg			
	20	25	30
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu			
	35	40	45
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe			
	50	55	60
Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala			
	85	90	95
Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys			
	100	105	110
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys			
	115	120	125
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe			
	130	135	140
Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu			
145	150	155	

<210> 9

<211> 113

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<221> 来源

<223> /注释="未知的说明:

DAP12序列"

<400> 9

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

				85				90				95			
Gln	Arg	Ser	Asp	Val	Tyr	Ser	Asp	Leu	Asn	Thr	Gln	Arg	Pro	Tyr	Tyr
				100				105				110			
Lys															
<210> 10															
<211> 342															
<212> DNA															
<213> 未知的															
<220>															
<221> 来源															
<223> /注释="未知的说明:															
DAP12序列"															
<400> 10															
atgggggggac ttgaaccctg cagcaggctc ctgctcctgc ctctcctgct ggctgtaagt 60															
ggctctccgtc ctgtccaggc ccaggcccag agcgattgca gttgctctac ggtgagcccg 120															
ggcgtgctgg cagggatcgt gatgggagac ctgggtgctga cagtgtcat tgccctggcc 180															
gtgtacttcc tgggccggct ggtccctcgg gggcgagggg ctgcggaggc agcgaccgg 240															
aaacagcgta tctactgagac cgagtgcct tatcaggagc tccagggtca gaggtcggat 300															
gtctacacgcg acctcaacac acagaggccg tattacaaat ga 342															
<210> 11															
<211> 182															
<212> PRT															
<213> 未知的															
<220>															
<221> 来源															
<223> /注释="未知的说明:															
CD28序列"															
<400> 11															
Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser															
				5				10				15			
Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg															
				20				25				30			
Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro															
35								40				45			
Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe															
50								55				60			
Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro															
65				70				75				80			
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly															

	85		90		95
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro					
100		105		110	
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr					
115		120		125	
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly					
130		135		140	
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln					
145		150		155	160
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln					
165		170		175	
Ala Leu Pro Pro Arg Gly					
180					

<210> 12

<211> 209

<212> DNA

<213> 未知的

<220>

<221> 来源

<223> /注释="未知的说明:

CD28序列"

<400> 12

at tt t t g g g t g	ct g g t g g t g g	tt g g t g g a g t	c c t g g c t t g c	t a t a g c t t g c	t a g t a a c a g t	60
g g c c t t t a t t	a t t t t c t g g g	t g a g g a g t a a	g a g g a g c a g g	c t c c t g c a c a	g t g a c t a c a t	120
g a a c a t g a c t	c c c c g c c g c c	c c g g g c c c a c	c c g c a a g c a t	t a c c a g c c c t	a t g c c c c a c c	180
a c g c g a c t t c	g c a g c c t a t c	g c t c a c g c g				209

<210> 13

<211> 247

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<221> 来源

<223> /注释="未知的说明:

IgG1铰链序列"

<400> 13

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

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

<210> 14

<211> 734

<212> DNA

<213> 未知的

<220>

<221> 来源

<223> /注释="未知的说明:

IgG1铰链序列"

<400> 14

gtacgtcact gtctcttcac aggatcccg cgagcccaaa tctcctgaca aaactcacac 60
 atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc 120

aaaacccaag gacaccctca tgatctcccc gaccctgag gtcacatgcg tgggtggtgga	180
cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca	240
taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt	300
cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa	360
caaagccctc ccagccccc tgcagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga	420
accacaggtg tacaccctgc ccccatcccc ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct	480
gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg	540
gcaaccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt	600
cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg	660
ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc	720
gggtaaaaaa gatc	734
<210> 15	
<211> 9764	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列说明：合成的多核苷酸"	
<400> 15	
aatgaaagac cccacctgta ggtttggcaa gctagcttaa gtaacgccat tttgcaaggc	60
atggaaaaat acataactga gaatagaaaa gttcagatca aggtcaggaa cagatggaac	120
agctgaatat gggccaaaca ggatatctgt ggtaagcagt tcctgccccg gtcagggcc	180
aagaacagat ggaacagctg aatatgggcc aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg	240
ccccggctca gggccaagaa cagatggctc ccagatgcgg tccagccctc agcagtttct	300
agagaaccat cagatgtttc cagggtgccc caaggacctg aaatgaccct gtgccttatt	360
tgaactaacc aatcagttcg cttctcgctt ctgttcgcgc gcttatgctc cccgagctca	420
ataaaagagc ccacaacccc tcaactcgggg cgccagtcct ccgattgact gagtcgcccc	480
ggtagccgtg tatccaataa accctcttgc agttgcatcc gacttgtggt ctgctgttc	540
cttgggaggg tctcctctga gtgattgact acccgtcagc gggggtcttt catttggggg	600
ctcgtccggg atcgggagac ccctgcccag ggaccaccga cccaccaccg ggaggtaagc	660
tggccagcaa cttatctgtg tctgtccgat tgtctagtgt ctatgactga ttttatgcgc	720
ctgcgtcggg actagttagc taactagctc tgtatctggc ggaccctggg tggaactgac	780
gagttcggaa caccggccg caacctggg agacgtccca gggacttcgg gggccgtttt	840
tgtggcccgga cctgagtcct aaaatcccga tcgttttagga ctctttggtg cccccctt	900
agaggaggga tatgtggttc tggtaggaga cgagaaccta aaacagttcc cgcctccgctc	960
tgaatttttg ctttcggttt gggaccgaag ccgcgccgcg cgtcttgtct gctgcagcat	1020
cgttctgtgt tgtctctgtc tgactgtgtt tctgtatttg tctgaaaata tgggcccggg	1080
ctagcctgtt accactccct taagtttgac cttaggtcac tggaaagatg tcgagcggat	1140

cgctcacaac	cagtcggtag	atgtcaagaa	gagacgttgg	gttaccttct	gctctgcaga	1200
atggccaacc	tttaacgtcg	gatggccgcg	agacggcacc	tttaaccgag	acctcatcac	1260
ccaggttaag	atcaaggctct	tttcacctgg	cccgcattga	caccagacc	aggtggggta	1320
catcgtgacc	tgggaagcct	tggcttttga	ccccctccc	tgggtcaagc	cctttgtaca	1380
ccctaagcct	ccgcctcctc	ttcctccatc	cgccccgtct	ctcccccttg	aacctcctcg	1440
ttcgacccccg	cctcgatcct	ccctttatcc	agccctcact	ccttctctag	gcgcccccat	1500
atggccatat	gagatcttat	atggggcacc	cccggccctt	gtaaacttcc	ctgaccctga	1560
catgacaaga	gttactaaca	gccccctctc	ccaagctcac	ttacaggctc	tctacttagt	1620
ccagcacgaa	gtctggagac	ctctggcggc	agcctaccaa	gaacaactgg	accgaccggt	1680
ggtacctcac	ccttaccgag	tcggcgacac	agtgtgggtc	cgccgacacc	agactaagaa	1740
cctagaacct	cgctggaaaag	gaccttacac	agtctgtctg	accacccccca	ccgcccctcaa	1800
agtagacggc	atcgagctt	ggatacacgc	cgcccacgtg	aaggctgccg	accccggggg	1860
tggaccatcc	tctagactgc	catgtctgag	atgagcactg	aaagcatgat	ccgggacgtg	1920
gagctggccg	aggaggcgct	ccccaaagaag	acaggggggc	cccagggtc	caggcggtgc	1980
ttgttctca	gcctcttctc	cttctctgatc	gtggcaggcg	ccaccacgct	cttctgcctg	2040
ctgcactttg	gagtgatcgg	ccccagagg	gaagagtcc	ccagggacct	ctctctaate	2100
agccctctgg	cccaggcaag	atcatcttct	cgaacccga	gtgacaaggt	agcccatgtt	2160
gtagcaaacc	ctcaagctga	ggggcagctc	cagtggctga	accgccgggc	caatgccctc	2220
ctggccaatg	gcgtggagct	gagagataac	cagctggtgg	tgccatcaga	gggcctgtac	2280
ctcatctact	cccaggctct	cttcaagggc	caaggctgcc	cctccacca	tgtgtctctc	2340
acccacacca	tcagccgcat	cgccgtctcc	taccagacca	aggtcaacct	cctctctgcc	2400
atcaagagcc	cctgccagag	ggagacccca	gagggggctg	aggccaagcc	ctggtatgag	2460
cccatctatc	tgggaggggt	cttccagctg	gagaagggtg	accgactcag	cgctgagatc	2520
aatcgggccg	actatctcga	ctttgccgag	tctgggcagg	tctactttgg	gatcattgcc	2580
ctgtcgcgag	ccgagggcag	gggaagtctt	ctaactgcg	gggacgtgga	ggaaaatccc	2640
gggcccattg	agtttgggct	gagctggctt	tttcttgtgg	ctattttaaa	aggtgtccag	2700
tgtcttagag	acatccagat	gacacagact	acatcctccc	tgtctgcctc	tctgggagac	2760
agagtcacca	tcagttgcag	ggcaagtcag	gacattagta	aatattttaa	ttggtatcag	2820
cagaaaccag	atggaactgt	taaactcctg	atctaccata	catcaagatt	acactcagga	2880
gtcccatcaa	ggttcagtgg	cagtgggtct	ggaacagatt	attctctcac	cattagcaac	2940
ctggagcaag	aagatatgtc	cacttacttt	tgccaacagg	gtaatacgct	tccgtacacg	3000
ttcgaggggg	ggaccaagct	ggagctgaaa	cgtggtgggtg	gtggttcttg	tgggtggtgt	3060
tctggcggcg	gcggctccgg	tgggtggtgga	tccgaggtgc	agctgcagca	gtctggacct	3120
ggcctggtgg	cgccctcaca	gagcctgtcc	gtcacatgca	ctgtctcagg	ggtctcatta	3180
cccgaactatg	gtgtaagctg	gattcgccag	cctccacgaa	agggtctgga	gtggctggga	3240
gtaatatggg	gtagtgaaac	cacatactat	aattcagctc	tcaaateccag	actgaccatc	3300
atcaaggaca	actccaagag	ccaagttttc	ttaaaaatga	acagtctgca	aactgatgac	3360
acagccattt	actactgtgc	caaacattat	tactacgggtg	gtagctatgc	tatggactac	3420
tggggccaag	ggaccacggt	cactgtctcc	tcgtacgtca	ctgtctcttc	acaggatccc	3480

gccgagccca	aatctcctga	caaaactcac	acatgcccac	cgtgcccagc	acctgaactc	3540
ctgggggggac	cgtcagtcct	cctcttcccc	ccaaaaccca	aggacaccct	catgatctcc	3600
cggaccccctg	aggctcacatg	cgtgggtggtg	gacgtgagcc	acgaagaccc	tgaggtcaag	3660
ttcaactggt	acgtggacgg	cgtggagggtg	cataatgcc	agacaaagcc	gcgggaggag	3720
cagtacaaca	gcacgtaccg	tgtgggtcagc	gtcctcaccg	tcctgcacca	ggactggctg	3780
aatggcaagg	agtacaagtg	caaggtctcc	aacaaagccc	tcccagcccc	catcgagaaa	3840
accatctcca	aagccaaaagg	gcagccccga	gaaccacagg	tgtacaccct	gcccccatcc	3900
cgggatgagc	tgaccaagaa	ccaggtcagc	ctgacctgcc	tgggtcaaagg	cttctatccc	3960
agcgacatcg	ccgtggagtg	ggagagcaat	gggcaaccgg	agaacaacta	caagaccacg	4020
cctcccgtgc	tggactccga	cggctccttc	ttcctctaca	gcaagctcac	cgtggacaag	4080
agcaggtggc	agcaggggaa	cgtctttctca	tgtctcgtga	tgcattgaggc	tctgcacaac	4140
cactacacgc	agaagagcct	ctccctgtct	ccgggtaaaa	aagatcccaa	attttgggtg	4200
ctgggtggtg	ttggtggagt	cctggcttgc	tatagcttgc	tagtaacagt	ggcctttatt	4260
attttctggg	tgaggagtaa	gaggagcagg	ctcctgcaca	gtgactacat	gaacatgact	4320
ccccgccgcc	ccgggcccac	ccgcaagcat	taccagccct	atgccccacc	acgcgacttc	4380
gcagcctatc	gctcacgcgt	gaagttcagc	aggagcgcag	acgccccgcg	gtaccagcag	4440
ggccagaacc	agctctataa	cgagctcaat	ctaggacgaa	gagaggagta	cgatgttttg	4500
gacaaaagac	gtggccggga	ccctgagatg	gggggaaagc	cgagaaggaa	gaaccctcag	4560
gaaggcctgt	acaatgaact	gcagaaagat	aagatggcgg	aggcctacag	tgagattggg	4620
atgaaaggcg	agcgccggag	gggcaagggg	cacgatggcc	tttaccaggg	tctcagtaca	4680
gccaccaagg	acacctacga	cgcccttcac	atgcaggccc	tgccccctcg	cggaccgcag	4740
tgtactaatt	atgctctctt	gaaattggct	ggagatgttg	agagcaatcc	cgggccccatg	4800
cgcattagca	agccccacct	gcggagcatc	agcatccagt	gctacctgtg	cctgctgctg	4860
aacagccact	tcctgaccga	ggccggcatc	cacgtgttca	tcctgggctg	cttcagcgcc	4920
ggactgcccc	agaccgaggc	caactgggtg	aacgtgatca	gcgacctgaa	gaagatcgag	4980
gacctgatcc	agagcatgca	catcgacgcc	accctgtaca	ccgagagcga	cgtgcacccc	5040
agctgcaagg	tgaccgccat	gaagtgcctt	ctgctggaac	tgcaggtgat	cagcctggaa	5100
agcggcgacg	ccagcatcca	cgacaccgtg	gagaacctga	tcctcctggc	caacaacagc	5160
ctgagcagca	acggcaacgt	gaccgagagc	ggctgcaaag	agtgcgagga	actggaagag	5220
aagaacatca	aagagtttct	gcagagcttc	gtgcacatcg	tgcagatgtt	catcaacacc	5280
agctgacaat	tgcgcgtcat	catcgatccg	gattagtcca	atttgttaaa	gacaggatat	5340
cagtgggtcca	ggctctagtt	ttgactcaac	aatatcacca	gctgaagcct	atagagtacg	5400
agccatagat	aaaataaaaag	attttattta	gtctccagaa	aaagggggga	atgaaagacc	5460
ccacctgtag	gtttggcaag	ctagcttaag	taacgccatt	ttgcaaggca	tggaataata	5520
cataactgag	aatagagaag	ttcagatcaa	ggtcaggaac	agatggaaca	gctgaatatg	5580
ggccaaacag	gatatctgtg	gtaagcagtt	cctgccccgg	ctcagggccca	agaacagatg	5640
gaacagctga	atatgggcca	aacaggatat	ctgtggtaag	cagttcctgc	cccggctcag	5700
ggccaagaac	agatgggtccc	cagatgcggt	ccagccctca	gcagtttcta	gagaaccatc	5760
agatgtttcc	agggtgcccc	aaggacctga	aatgacctg	tgccttattt	gaactaacca	5820

atcagttcgc	ttctcgcctc	tgttcgcgcg	cttctgctcc	ccgagctcaa	taaaagagcc	5880
cacaacccct	cactcggggc	gccagtcctc	cgattgactg	agtcgcccgg	gtacccgtgt	5940
atccaataaa	ccctcttgca	gttgcatccg	acttgtggtc	tcgctgttcc	ttgggagggt	6000
ctcctctgag	tgattgacta	cccgtcagcg	ggggtctttc	acacatgcag	catgtatcaa	6060
aattaatttg	gttttttttc	ttaagtattt	acattaaatg	gccatagtac	ttaaagttac	6120
attggcttcc	ttgaaaataa	catggagtat	tcagaatgtg	tcataaatat	ttctaatttt	6180
aagatagtat	ctccattggc	tttctacttt	ttctttttatt	tttttttgtc	ctctgtcttc	6240
catttgttgt	tgttgttggt	tgtttgtttg	tttgttggtt	ggttggttaa	ttttttttta	6300
aagatcctac	actatagttc	aagctagact	attagctact	ctgtaaccca	gggtgacctt	6360
gaagtcatgg	gtagcctgct	gttttagcct	tcccacatct	aagattacag	gtatgagcta	6420
tcatttttgg	tatatgtgatt	gattgattga	ttgatgtgtg	tgtgtgtgat	tgtgtttgtg	6480
tgtgtgactg	tgaaaaatgt	tgtatgggtg	tgtgtgaatg	tgtgtatgta	tgtgtgtgtg	6540
tgagtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgcatgtgtg	tgtgtgtgac	tgtgtctatg	tgtatgactg	6600
tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgttgtga	aaaaatatcc	6660
tatggtagtg	agagccaacg	ctccggtcca	ggtgtcaggt	tggtttttga	gacagagtct	6720
ttcacttagc	ttggaattca	ctggccgtcg	ttttacaacg	tcgtgactgg	gaaaaccctg	6780
gcgttaccca	acttaatcgc	cttgccagcac	atcccccttt	cgccagctgg	cgtaatagcg	6840
aagaggcccc	caccgatcgc	ccttcccaac	agttgcgcag	cctgaatggc	gaatggcgcc	6900
tgatgcggta	ttttctcctt	acgcatctgt	gcggtatttc	acaccgcata	tggtgcactc	6960
tcagtacaat	ctgctctgat	gccgcatagt	taagccagcc	ccgacacccg	ccaacacccg	7020
ctgacgcgcc	ctgacgggct	tgtctgctcc	cggcatccgc	ttacagacaa	gctgtgaccg	7080
tctccgggag	ctgcatgtgt	cagaggtttt	caccgtcatc	accgaaacgc	gcgagacgaa	7140
agggcctcgt	gatacgccta	tttttatagg	ttaatgtcat	gataataatg	gtttcttaga	7200
cgtcaggtag	cacttttcgg	ggaaatgtgc	gcggaacccc	tatttgttta	tttttctaaa	7260
tacattcaaa	tatgtatccg	ctcatgagac	aataaccctg	ataaatgctt	caataatatt	7320
gaaaaaggaa	gagtatgagt	attcaacatt	tccgtgtcgc	ccttattccc	ttttttgcgg	7380
cattttgcct	tcctgttttt	gctcaccag	aaacgctggt	gaaagtaaaa	gatgctgaag	7440
atcagttggg	tgcacgagtg	ggttacatcg	aactggatct	caacagcggg	aagatccttg	7500
agagttttcg	ccccgaagaa	cgttttccaa	tgatgagcac	ttttaagtt	ctgctatgtg	7560
gcgcggtatt	atcccgtatt	gacgccgggc	aagagcaact	cggtcgccgc	atacactatt	7620
ctcagaatga	cttggttgag	tactcaccag	tcacagaaaa	gcactttacg	gatggcatga	7680
cagtaagaga	attatgcagt	gctgccataa	ccatgagtga	taacactgcg	gccaaacttac	7740
ttctgacaac	gatcggagga	ccgaaggagc	taaccgcttt	tttgcaaac	atgggggatc	7800
atgtaactcg	ccttgatcgt	tggaaccgg	agctgaatga	agccatacca	aacgacgagc	7860
gtgacaccac	gatgcctgta	gcaatggcaa	caacgttgcg	caactatta	actggcgaa	7920
tacttactct	agcttcccgg	caacaattaa	tagactggat	ggaggcggat	aaagttgcag	7980
gaccacttct	gcgctcggcc	cttccggctg	gctggtttat	tgctgataaa	tctggagccg	8040
gtgagcgtgg	gtctcgcggt	atcattgcag	cactggggcc	agatggtaag	ccctcccgtta	8100
tcgtagttat	ctacacgacg	gggagtcagg	caactatgga	tgaacgaaat	agacagatcg	8160

ctgagatagg	tgccctcactg	attaagcatt	ggtaactgtc	agaccaagtt	tactcatata	8220
tacttttagat	tgatttataaa	cttcattttt	aatttataaag	gatctaggtg	aagatccttt	8280
ttgataatct	catgaccaa	atcccttaac	gtgagttttc	gttccactga	gcgtcagacc	8340
ccgtagaaaa	gatcaaagga	tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgct	8400
tgcaaacaaa	aaaaccaccg	ctaccagcgg	tggtttgttt	gccggatcaa	gagctaccaa	8460
ctctttttcc	gaaggtaact	ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	gttcttctag	8520
tgtagccgta	gttaggccac	cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	tacctcgctc	8580
tgctaatacct	gttaccagtg	gctgctgcca	gtggcgataa	gtcgtgtctt	accgggttgg	8640
actcaagacg	atagttaccg	gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	ggttcgtgca	8700
cacagcccag	cttgagcga	acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	cgtgagctat	8760
gagaaaagcgc	cacgcttccc	gaaggagaa	aggcggacag	gtatccggtg	agcggcaggg	8820
tcggaacagg	agagcgcacg	aggagcttc	cagggggaaa	cgcttggtat	ctttatagtc	8880
ctgtcgggtt	tcgccacctc	tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	tcaggggggc	8940
ggagcctatg	gaaaaacgcc	agcaacgcgg	cctttttacg	gttcttggtc	ttttgctggc	9000
cttttgcctca	catgttcttt	cctgcgttat	cccctgattc	tgttgataac	cgtattaccg	9060
cctttgagtg	agctgatacc	gctcgccgca	gccgaacgac	cgagcgcagc	gagtcagtga	9120
gcgaggaagc	ggaagagcgc	ccaatacgca	aaccgcctct	ccccgcgcgt	tggtccgattc	9180
attaatgcag	ctggcacgac	aggtttccc	actggaaagc	gggcagttag	cgcaacgcaa	9240
ttaatgtgag	ttagctcact	cattagggac	cccaggtttt	acactttatg	cttccggctc	9300
gtatgttgtg	tggaattgtg	agcggataac	aatttcacac	aggaaacagc	tatgaccatg	9360
attacgcaa	gctttgctct	taggagtttc	ctaatacatc	ccaaactcaa	atatataaag	9420
catttgactt	gttctatgcc	ctagggggcg	gggggaagct	aagccagctt	tttttaacat	9480
ttaaaatggt	aattccattt	taaatgcaca	gatgttttta	tttcataagg	gtttcaatgt	9540
gcatgaatgc	tgcaatatc	ctgttaccaa	agctagtata	aataaaaata	gataaacgtg	9600
gaaattactt	agagtttctg	tcattaacgt	ttccttcctc	agttgacaac	ataaatgcgc	9660
tgctgagcaa	gccagtttgc	atctgtcagg	atcaatttcc	cattatgcca	gtcatattaa	9720
ttactagtca	attagttgat	ttttattttt	gacatataca	tgtg		9764

<210> 16

<211> 9452

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多核苷酸"

<400> 16

aatgaaagac	cccacctgta	ggttttggcaa	gctagcttaa	gtaacgcat	tttgcaaggc	60
atggaaaaat	acataactga	gaatagaaaa	gttcagatca	aggtcaggaa	cagatggaac	120
agctgaatat	gggccaacaa	ggatatctgt	ggtaagcagt	tcctgccccg	gctcagggcc	180

aagaacagat	ggaacagctg	aatatgggcc	aaacaggata	tctgtggtaa	gcagttcctg	240
ccccggctca	gggccaagaa	cagatgggtcc	ccagatgcgg	tccagccctc	agcagtttct	300
agagaaccat	cagatgtttc	caggggtgccc	caaggacctg	aatgaccct	gtgccttatt	360
tgaactaacc	aatcagttcg	cttctcgctt	ctgttcgcgc	gcttatgctc	cccagactca	420
ataaaaagagc	ccacaacccc	tcactcgggg	cgccagtcct	ccgattgact	gagtcgcccc	480
ggtaccccg	tatccaataa	accctcttgc	agttgcatcc	gacttgtggt	ctcgctgttc	540
cttgggaggg	tctcctctga	gtgattgact	accctgcagc	gggggtcttt	catttggggg	600
ctcgtccggg	atcgggagac	ccctgcccag	ggaccaccga	cccaccaccg	ggaggtgaagc	660
tggccagcaa	cttatctgtg	tctgtccgat	tgtctagtgt	ctatgactga	ttttatgcgc	720
ctgcgtcgg	actagttagc	taactagctc	tgtatctggc	ggaccctggt	tggaactgac	780
gagttcgga	cacccggccg	caacctggg	agacgtccca	gggacttcgg	gggccgtttt	840
tgtggcccg	cctgagtcct	aaaatcccga	tcgttttaga	ctctttggtg	cacccccctt	900
agaggaggga	tatgtggttc	tggtaggaga	cgagaaccta	aaacagttcc	cgctctcgctc	960
tgaatttttg	ctttcggttt	gggaccgaag	ccgcgccgcg	cgtcttgtct	gctgcagcat	1020
cgttctgtgt	tgtctctgtc	tgactgtgtt	tctgtatttg	tctgaaaata	tgggccccggg	1080
ctagcctgtt	accactccct	taagtttgac	cttaggtcac	tggaaagatg	tcgagcggat	1140
cgctcacaac	cagtcggtag	atgtcaagaa	gagacgttgg	gttaccttct	gctctgcaga	1200
atggccaacc	tttaacgtcg	gatggccgcg	agacggcacc	tttaaccgag	acctcatcac	1260
ccaggttaag	atcaaggtct	tttcacctgg	cccgcattga	caccagacc	aggtggggta	1320
catcgtgacc	tgggaagcct	tggtttttga	ccccctccc	tgggtcaagc	cctttgtaca	1380
ccctaagcct	cgccctcctc	ttcctccatc	cgccccgtct	ctcccccttg	aacctcctcg	1440
ttcgaccccg	cctcgatcct	ccctttatcc	agccctcact	ccttctctag	gcgcccccat	1500
atggccatat	gagatcttat	atggggcacc	cccggccctt	gtaaacttcc	ctgaccctga	1560
catgacaaga	gttactaaca	gcccctctct	ccaagctcac	ttacaggctc	tctacttagt	1620
ccagcacgaa	gtctggagac	ctctggcggc	agcctaccaa	gaacaactgg	accgaccggt	1680
ggtacctcac	ccttaccgag	tcggcgacac	agtgtgggtc	cgccgacacc	agactaagaa	1740
cctagaacct	cgctggaaag	gaccttacac	agtcctgctg	accacccccca	ccggccctcaa	1800
agtagacggc	atcgcagctt	ggatacacgc	cgcccacgtg	aaggctgccg	accccggggg	1860
tggaccatcc	tctagactgc	catgctcgag	atgagcactg	aaagcatgat	ccgggacgtg	1920
gagctggccg	aggaggcgct	ccccaaagaag	acaggggggc	cccagggtc	caggcggtgc	1980
ttgttcctca	gcctcttctc	cttctgatac	gtggcaggcg	ccaccacgct	cttctgcctg	2040
ctgcactttg	gagtgatcgg	ccccagagg	gaagagtcc	ccagggacct	ctctctaatac	2100
agccctctgg	cccaggcaag	atcatcttct	cgaacccga	gtgacaaggt	agcccatggt	2160
gtagcaaacc	ctcaagctga	ggggcagctc	cagtggctga	accgccgggc	caatgcctc	2220
ctggccaatg	gcgtggagct	gagagataac	cagctggtgg	tgccatcaga	gggcctgtac	2280
ctcatctact	cccaggtcct	cttcaagggc	caaggtgcc	cctccacca	tgtgtctctc	2340
acccacacca	tcagccgat	cgccgtctcc	taccagacca	aggtcaacct	cctctctgcc	2400
atcaagagcc	cctgccagag	ggagaccca	gagggggctg	aggccaagcc	ctggtatgag	2460
cccatctatc	tgggaggggt	cttccagctg	gagaagggtg	accgactcag	cgctgagatc	2520

aatcgccccg	actatctcga	ctttgccgag	tctgggcagg	tctacttttg	gatcattgcc	2580
ctgtcgcgag	ccgagggcag	gggaagtctt	ctaacatgcg	gggacgtgga	ggaaaatccc	2640
gggccccatgg	agtttgggct	gagctggctt	tttcttgttg	ctattttaaa	aggtgtccag	2700
tgctctagag	acatccagat	gacacagact	acatcctccc	tgtctgcctc	tctgggagac	2760
agagtcacca	tcagttgcag	ggcaagtcag	gacattagta	aatattttaa	ttggtatcag	2820
cagaaaccag	atggaactgt	taaactcctg	atctaccata	catcaagatt	acactcagga	2880
gtcccatcaa	ggttcagtgg	cagtgggtct	ggaacagatt	attctctcac	cattagcaac	2940
ctggagcaag	aagatatattg	cacttacttt	tgccaacagg	gtaatacgct	tccgtacacg	3000
ttcggagggg	ggaccaagct	ggagctgaaa	cgtgggtggtg	gtggttcttg	tggtggtggt	3060
tctggcgggc	gcggctccgg	tggtgggtgga	tccgaggtgc	agctgcagca	gtctggacct	3120
ggcctggtgg	cgccctcaca	gagcctgtcc	gtcacatgca	ctgtctcagg	ggtctcatta	3180
cccgactatg	gtgtaagctg	gattcgccag	cctccacgaa	agggtctgga	gtggctggga	3240
gtaatatggg	gtagtgaaac	cacatactat	aattcagctc	tcaaattccag	actgaccatc	3300
atcaaggaca	actccaagag	ccaagttttc	ttaaaaatga	acagtctgca	aactgatgac	3360
acagccattt	actactgtgc	caaacattat	tactacggtg	gtagctatgc	tatggactac	3420
tggggccaag	ggaccacggt	cactgtctcc	tcgtacgtca	ctgtctcttc	acaggatccc	3480
gccgagccca	aatctcctga	caaaactcac	acatgcccac	cgtgcccagc	acctgaactc	3540
ctgggggggac	cgtcagtctt	cctcttcccc	ccaaaaccca	aggacaccct	catgatctcc	3600
cggacccctg	aggtcacatg	cgtgggtggtg	gacgtgagcc	acgaagaccc	tgaggtcaag	3660
ttcaactggg	acgtggacgg	cgtggaggtg	cataatgcca	agacaaagcc	gcgggaggag	3720
cagtacaaca	gcacgtaccg	tgtggtcagc	gtcctcaccg	tcctgcacca	ggactggctg	3780
aatggcaagg	agtacaagtg	caaggtctcc	aacaaagccc	tcccagcccc	catcgagaaa	3840
accatctcca	aagccaaagg	gcagccccga	gaaccacagg	tgtacaccct	gcccccatcc	3900
cgggatgagc	tgaccaagaa	ccaggtcagc	ctgacctgcc	tggtcaaagg	cttctatccc	3960
agcgacatcg	ccgtggagtg	ggagagcaat	gggcaaccgg	agaacaacta	caagaccacg	4020
cctcccgtgc	tggactccga	cggctccttc	ttcctctaca	gcaagctcac	cgtggacaag	4080
agcaggtggc	agcaggggaa	cgtctttctca	tgctccgtga	tgcatgaggc	tctgcacaac	4140
cactacacgc	agaagagcct	ctccctgtct	ccgggtaaaa	aagatcccaa	attttggggc	4200
gtgctggccg	gaatcgatg	gggcgacctg	gtgctgacag	tgctgatcgc	cctggctgtg	4260
tacttccctg	gcagactggg	gcccagagga	agaggcgctg	ccgaagccgc	caccgggaag	4320
cagagaatca	ccgagacaga	gagcccctat	caggaaactgc	agggccagcg	gagcgacgtg	4380
tacagcgacc	tgaataccca	gcggccctac	tacaaacgcg	gaccgcagtg	tactaattat	4440
gctctcttga	aattggctgg	agatgttgag	agcaatcccc	ggcccatgcg	cattagcaag	4500
ccccacctgc	ggagcatcag	catccagtgc	tacctgtgcc	tgctgctgaa	cagccacttc	4560
ctgaccgagg	ccggcatcca	cgtgttcatc	ctgggctgct	tcagcgccgg	actgcccag	4620
accgaggcca	actgggtgaa	cgtgatcagc	gacctgaaga	agatcgagga	cctgatccag	4680
agcatgcaca	tcgacgccac	cctgtacacc	gagagcgacg	tgacccccag	ctgcaaggtg	4740
accgcatga	agtgttttct	gctggaaactg	caggtgatca	gcctggaaag	cggcgacgcc	4800
agcatccacg	acaccgtgga	gaacctgatc	atcctggcca	acaacagcct	gagcagcaac	4860

ggcaacgtga	ccgagagcgg	ctgcaaagag	tgcgaggaac	tggaagagaa	gaacatcaaa	4920
gagtttctgc	agagcttcgt	gcacatcgtg	cagatgttca	tcaacaccag	ctgacaattg	4980
cgcgtcatca	tcgatccgga	ttagtccaat	ttgttaaaga	caggatatca	gtggtccagg	5040
ctctagtttt	gactcaacaa	tatcaccagc	tgaagcctat	agagtacgag	ccatagataa	5100
aataaaaagat	tttattttagt	ctccagaaaa	aggggggaat	gaaagacccc	acctgtaggt	5160
ttggcaagct	agcttaagta	acgccatttt	gcaaggcatg	gaaaaataca	taactgagaa	5220
tagagaagtt	cagatcaagg	tcaggaacag	atggaacagc	tgaatatggg	ccaaacagga	5280
tatctgttgt	aagcagttcc	tgccccggct	cagggccaaag	aacagatgga	acagctgaat	5340
atgggccaaa	caggatatct	gtggtaagca	gttcttgccc	cggctcaggg	ccaagaacag	5400
atgggtcccca	gatgcggtcc	agccctcagc	agtttctaga	gaaccatcag	atgtttccag	5460
ggtgccccaa	ggacctgaaa	tgacctgtg	ccttatttga	actaaccaat	cagttcgctt	5520
ctcgcttctg	ttcgcgcgct	tctgtcctcc	gagctcaata	aaagagccca	caaccctca	5580
ctcggggcgc	cagtcctccg	attgactgag	tcgccccggg	acccgtgtat	ccaataaacc	5640
ctcttgcaagt	tgcacccgac	ttgtggtctc	gctgttcctt	gggagggtct	cctctgagtg	5700
attgactacc	cgtcagcggg	ggtctttcac	acatgcagca	tgtatcaaaa	ttaatttggt	5760
tttttttctt	aagtatttac	attaaatggc	catagtactt	aaagttacat	tggcttcctt	5820
gaaataaaca	tggagtattc	agaatgtgtc	ataaatattt	ctaattttta	gatagtatct	5880
ccattggctt	tctacttttt	cttttatttt	tttttgcct	ctgtcttcca	tttgttggtg	5940
ttgttggttg	ttgttggttg	tggttggttg	ttgttgtaatt	tttttttaaa	gacctacac	6000
tatagttcaa	gctagactat	tagctactct	gtaaccagc	gtgacctga	agtcattggg	6060
agcctgctgt	tttagccttc	ccacatctaa	gattacaggt	atgagctatc	atgttttggt	6120
tattgattga	ttgattgatt	gatgtgtgtg	tgtgtgattg	tgtttgtgtg	tgtgactgtg	6180
aaaatgtgtg	tatgggtgtg	tgtgaatgtg	tgtatgtatg	tgtgtgtgtg	agtgtgtgtg	6240
tgtgtgtgtg	catgtgtgtg	tgtgtgactg	tgtctatgtg	tatgactgtg	tgtgtgtgtg	6300
tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgaa	aaatattcta	tggtagtgag	6360
agccaacgct	ccggctcagg	tgtcagggtg	gtttttgaga	cagagtcttt	cacttagctt	6420
ggaattcact	ggccgtcgtt	ttacaacgtc	gtgactggga	aaaccctggc	gttacccaac	6480
ttaatcgctt	tgcagcacat	ccccctttcg	ccagctggcg	taatagcgaa	gaggcccgc	6540
ccgatcgccc	ttccaacag	ttgcgcagcc	tgaatggcga	atggcgccctg	atgcggtatt	6600
ttctccttac	gcatctgtgc	ggtattttac	accgcataatg	gtgcactctc	agtacaatct	6660
gctctgatgc	cgcatagtta	agccagcccc	gacaccgcc	aacaccgct	gacgcgccct	6720
gacgggcttg	tctgctcccc	gcatccgctt	acagacaagc	tgtgaccgtc	tccgggagct	6780
gcatgtgtca	gaggttttca	ccgtcatcac	cgaacgcgc	gagacgaaag	ggcctcgtga	6840
tacgcctatt	tttataggtt	aatgtcatga	taataatggt	ttcttagacg	tcagggtggca	6900
cttttcgggg	aaatgtgcgc	ggaaccctta	tttgtttatt	tttctaaata	cattcaaata	6960
tgtatccgct	catgagacaa	taaccctgat	aaatgcttca	ataatattga	aaaaggaaga	7020
gtatgagtat	tcaacatttc	cgtgtcgcgc	ttattccctt	ttttgcggca	ttttgccttc	7080
ctgtttttgc	tcaccagaaa	acgctgggtga	aagtaaaaga	tgctgaagat	cagttgggtg	7140
cacgagtggg	ttacatcgaa	ctggatctca	acagcggtaa	gacccctgag	agttttcgcc	7200

ccgaagaacg	ttttccaatg	atgagcactt	ttaaagttct	gctatgtggc	gcggtattat	7260
cccgtattga	cgccgggcaa	gagcaactcg	gtcgccgcat	acactattct	cagaatgact	7320
tggttgagta	ctcaccagtc	acagaaaagc	atcttacgga	tggcatgaca	gtaagagaat	7380
tatgcagtgc	tgccataacc	atgagtata	acactgcggc	caacttactt	ctgacaacga	7440
tcggaggacc	gaaggagcta	accgcttttt	tgcacaacat	gggggatcat	gtaactcgcc	7500
ttgatcggtg	ggaaccggag	ctgaatgaag	ccataccaaa	cgacgagcgt	gacaccacga	7560
tgctgttagc	aatggcaaca	acgttgcgca	aactattaac	tggcgaacta	cttactctag	7620
cttcccgga	acaattaata	gactggatgg	aggcggataa	agttgcagga	ccacttctgc	7680
gctcgccct	tccggctggc	tggtttattg	ctgataaatc	tggagccggt	gagcgtgggt	7740
ctcgcggtat	cattgcagca	ctggggccag	atggtaagcc	ctcccgtatc	gtagttatct	7800
acacgacggg	gagtcaggca	actatggatg	aacgaaatag	acagatcgct	gagataggtg	7860
cctcactgat	taagcattgg	taactgtcag	accaagttta	ctcatatata	ctttagattg	7920
atttaaaact	tcatTTTTAA	tttaaaagga	tctaggtgaa	gacctTTTT	gataatctca	7980
tgacaaaaat	cccttaacgt	gagttttcgt	tccactgagc	gtcagacccc	gtagaaaaga	8040
tcaaaggatc	ttcttgagat	cctttttttc	tgcgcgtaat	ctgctgcttg	caaacaaaaa	8100
aaccaccgct	accagcgggtg	gtttgtttgc	cggatcaaga	gctaccaact	ctttttccga	8160
aggtaactgg	cttcagcaga	gcgcagatac	caaatactgt	tcttctagt	tagccgtagt	8220
taggccacca	cttcaagaac	tctgtagcac	cgctacata	cctcgctctg	ctaactctgt	8280
taccagtggc	tgctgccagt	ggcgataagt	cgtgtcttac	cgggttgga	tcaagacgat	8340
agttaccgga	taaggcgag	cggtcgggct	gaacgggggg	ttcgtgcaca	cagcccagct	8400
tggagcgaac	gacctacacc	gaactgagat	acctacagcg	tgagctatga	gaaagcgcca	8460
cgcttcccga	agggagaaaag	gcggacaggt	atccggtaag	cggcagggtc	ggaacaggag	8520
agcgcacgag	ggagcttcca	gggggaaacg	cctgggtatct	ttatagtcct	gtcgggtttc	8580
gccacctctg	acttgagcgt	cgatttttgt	gatgctcgtc	aggggggcgg	agcctatgga	8640
aaaacgccag	caacgcggcc	tttttacggt	tcctggcctt	ttgctggcct	tttgtcaca	8700
tgttctttcc	tgcgttatcc	cctgattctg	tggataaccg	tattaccgcc	tttgagttag	8760
ctgataaccgc	tcgccgcagc	cgaacgaccg	agcgcagcga	gtcagtgagc	gaggaagcgg	8820
aagagcgccc	aatacgcaaa	ccgcctctcc	ccgcgcgttg	gccgattcat	taatgcagct	8880
ggcacgacag	gtttcccgac	tggaaagcgg	gcagtgagcg	caacgcaatt	aatgtgagtt	8940
agctcactca	ttaggcaccc	caggctttac	actttatgct	tccggctcgt	atgttgtgtg	9000
gaattgtgag	cggataacaa	ttcacacag	gaaacagcta	tgaccatgat	tacgccaagc	9060
tttgccttta	ggagtttcct	aatacatccc	aaactcaaat	atataaagca	tttgacttgt	9120
tctatgccct	agggggcggg	gggaagctaa	gccagctttt	tttaacattt	aaaatgttaa	9180
ttccatttta	aatgcacaga	tgTTTTtatt	tcataagggt	ttcaatgtgc	atgaatgctg	9240
caatatccct	gttaccaaaag	ctagtataaa	taaaaataga	taaacgtgga	aattacttag	9300
agtttctgtc	attaacgttt	ccttcctcag	ttgacaacat	aatgcgctg	ctgagcaagc	9360
cagtttgcat	ctgtcaggat	caatttccca	ttatgccagt	catattaatt	actagtcaat	9420
tagttgattt	ttatTTTTga	catatacatg	tg			9452

<210> 17

<211> 33

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala

1 5 10 15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe

20 25 30

Leu

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

Ser Thr Glu Ser

1

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<400> 19

Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe Cys Leu Leu

1 5 10 15

His Phe Gly Val Ile

20

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro

1 5 10 15

Leu Ala Gln Ala

20

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 21

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val

1 5 10

<210> 22

<211> 662

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多核苷酸"

<400> 22

atgagcactg	aaatgcatcc	cggaaggggg	tectggcacg	aggaggcgct	ccccaagaag	60
acaggggggc	cccagggttc	caggcggtgc	ttgttctca	gcctcttctc	cttctctgac	120
gtggcaggcg	ccaccacgct	cttctgcctg	ctgcactttg	gagtgatcgg	ccccagagg	180
gaagagtcc	ccagggtacc	ctctctaatc	agcctcttgg	cccaggcagc	ccatgttgta	240
gcaaaccctc	aagctgaggg	gcagctccag	tggctgaacc	gccgggcca	tgccctcctg	300
gccaatggcg	tggagctgag	agataaccag	ctgggtgtgc	catcagaggg	cctgtacctc	360
atctactccc	aggtcctctt	caagggtcca	ggctgcccct	ccacccatgt	gctcctcacc	420
cacaccatca	gccgcatcgc	cgtctcctac	cagaccaagg	tcaacctcct	ctctgccatc	480
aagagcccct	gccagaggga	gacccagag	ggggctgagg	ccaagccctg	gtatgagccc	540
atctatctgg	gaggggtctt	ccagctggag	aagggtgacc	gactcagcgc	tgagatcaat	600
cggcccgcact	atctcgactt	tgccgagtct	gggcaggtct	actttgggat	cattgccctg	660
cg						662

<210> 23

<211> 233

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 23

Met Ser Thr Glu Met His Pro Gly Arg Gly Ser Trp His Glu Glu Ala

1 5 10 15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe

20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe

35 40 45

Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro

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

<210> 24

<211> 663

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多核苷酸"

<400> 24

atgagcactg aaagcaagat ccgggacgtg gagctggccg aggaggcgct cccaagaag	60
acaggggggc cccagggtc caggcggtgc ttgttctca gctcttctc cttctgac	120
gtggcaggcg ccaccacgct cttctgctg ctgcactttg gactgacgg ccccagagg	180
gaagagtcc ccagggacct ctctctaata agcctcttg cccaggcagc ccatgttgta	240
gcaaaccctc aagctgaggg gcagctccag tggctgaacc gccgggcaa tgccctctg	300
gccaatggcg tggagctgag agataaccag ctggtggtgc catcagagg cctgtacct	360
atctactccc aggtcctctt caagggcaa ggctgccct ccacccatgt gctctcacc	420

cacaccatca gccgcatcgc cgtctccac cagaccaagg tcaacctcct ctctgccatc 480
aagagcccct gccagaggga gaccccagag ggggctgagg ccaagccctg gtatgagccc 540
atctatctgg gaggggtctt ccagctggag aagggtgacc gactcagcgc tgagatcaat 600
cggcccgact atctcgactt tgccgagtct gggcaggtct actttgggat cattgccctg 660
tcg 663

<210> 25

<211> 220

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 25

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

195	200	205	
Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu			
210	215	220	
<210> 26			
<211> 663			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注释="人工序列说明：合成的多核苷酸"			
<400> 26			
atgagcactg aaagcatgat ccgggacgtg gagctggccg aggaggcgct cccaagaag			60
acaggggggc cccagggtc caggcgggtgc ttgttctca gcctcttctc ctctctgac			120
gtggcaggcg ccaccacgt cttcttctg ctgcactttg gactgacgg ccccagagg			180
gaagagttcc ccagggacct ctctctaata agccctctgg cccaggcagc ccatgttgta			240
gcaaacctc aagctgaggg gcagctccag tggctgaacc gccgggcaa tgccctcctg			300
gccaatggcg tggagctgag agataaccag ctggtggtgc catcagagg cctgtacctc			360
atctactccc aggtcctctt caagggcaa ggctgccctt ccacccatgt gctctcacc			420
cacaccatca gccgcacgc cgtctcctac cagaccaagg tcaacctcct ctctgccatc			480
aagagcccct gccagaggga gacccagag ggggctgagg ccaagccctg gtatgagccc			540
atctatctgg gaggggtctt ccagctggag aagggtgacc gactcagcgc tgagatcaat			600
cggcccgcact atctcgactt tgccgagtct gggcaggtct actttgggat cattgccctg			660
tcg			663
<210> 27			
<211> 220			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"			
<400> 27			
Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala			
1 5 10 15			
Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe			
20 25 30			
Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe			
35 40 45			

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

<210> 28

<211> 663

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多核苷酸"

<400> 28

atgagcactg aaagcatgat ccgggacgtg gagctggccg aggaggcgct cccaagaag	60
acaggggggc cccagggctc caggcgggtgc ttgttctca gctcttctc cttctgata	120
gtggcaggcg ccaccacgt cttctgctg ctgcactttg gactgacgg ccccagagg	180
gaagagttcc ccagggacct ctctctaata agccctctgg cccaggcagc ccatgttgta	240
gcaaacctc aagctgaggg gcagctccag tggctgaacc gccgggcca tgccctctg	300
gccaatggcg tggagctgag agataaccag ctggtggtgc catcagagg cctgtacct	360
atctactccc aggtcctctt caagggcca ggctgccct ccacccatgt gctctcacc	420
cacaccatca gccgcatcgc cgtctctac cagaccaagg tcaacctct ctctgccatc	480

aagagcccct gccagaggga gaccccagag ggggctgagg ccaagccctg gtatgagccc 540
 atctatcttg gaggggtctt ccagctggag aagggtgacc gactcatcgc tgagatcaat 600
 cggcccgcact atctcgactt tgccgagtat gggcaggtct actttgggat cattgcctg 660
 tcg 663

<210> 29

<211> 220

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的
多肽"

<400> 29

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

Glu Tyr Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 210 215 220

<210> 30

<211> 663

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的
多核苷酸"

<400> 30

atgagcactg aaagcatgat ccgggacgtg gagctggccg aggaggcgct cccaagaag	60
acaggggggc cccagggtc caggcggtgc ttgttctca gcctcttctc cttctgate	120
gtggcaggcg ccaccacgct cttctgcctg ctgcactttg gactgatcgg cccccagagg	180
gaagagtcc ccaggacct ctctctaata agcctcttg cccaggcagc ccatgttgta	240
gcaaaccctc aagctgaggg gcagctccag tggctgaacc gccgggcaa tgccctcctg	300
gccaatggcg tggagctgag agataaccag ctgggtgtgc catcagaggg cctgtacctc	360
atctactccc aggtcctctt caagggcaa ggctgccctt ccacccatgt gctcctcacc	420
cacaccatca gccgcatgc cgtctcctac cagaccaagg tcaacctcct ctctgccatc	480
aagagcccct gccagaggga gacccagag ggggtgagg ccaagccctg gtatgagccc	540
atctatctgg gaggggtctt ccagctggag aagggtgacc gactcagcgc tgagatcaat	600
cggcccgact atctctactt tgccgagtct gggcaggtct actttgggat cattgccctg	660
tcg	663

<210> 31

<211> 220

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的
多肽"

<400> 31

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

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

<210> 32

<211> 660

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多核苷酸"

<400> 32

atgagcactg aaagcatgat ccgggacgtg gagctggccg aggaggcgct cccaagaag	60
acaggggggc ccaggggtc caggcgggtg ttgttctca gctcttctc cttctgac	120
gtggcaggcg ccaccacgt cttctgctg ctgcactttg gactgatcg ccccagagg	180
gaagagttcc ccaggacct cttctetaatc agcctctgc aggcagcca tgtttagca	240
aacctcaag ctgaggggca gctccagtgg ctgaaccgcc gggccaatgc cctctggcc	300
aatggcgtgg agctgagaga taaccagctg gtggtgcat cagagggcct gtacctcatc	360
tactcccagg tcctcttcaa gggccaaggc tgcccctcca cccatgtgct cctcaccac	420
accatcagcc gcatcgccgt ctcctaccag accaaggtca acctcctctc tgccatcaag	480
agcccctgcc agagggagac ccagagggg gctgaggcca agcctggta tgagcccatc	540

tatctgggag gggctcttcca gctggagaag ggtgaccgac tcagcgctga gatcaatcgg 600
 cccgactatc tctactttgc cgagtctggg caggtctact ttgggatcat tgccctgtcg 660
 <210> 33
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列说明：合成的
 多肽"
 <400> 33
 Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
 20 25 30
 Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
 35 40 45
 Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
 50 55 60
 Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala His Val Val Ala
 65 70 75 80
 Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn
 85 90 95
 Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val
 100 105 110
 Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly
 115 120 125
 Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg
 130 135 140
 Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys
 145 150 155 160
 Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp
 165 170 175
 Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp
 180 185 190
 Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Tyr Phe Ala Glu
 195 200 205
 Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 210 215

<210> 34

<211> 671

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多核苷酸"

<400> 34

```

atgctcgagt cgagatgagc actgaaatgc atcccggaag ggggtcctgg cacgaggagg      60
cgctcccca gaagacaggg gggccccagg gctccaggcg gtgcttggtc ctcagcctct      120
tctccttcct gatcgtggca ggcgccacca cgctcttctt cctgctgcac tttggagtga      180
tcggcccca gaggaagag ttccccaggg acctctctct aatcagccct ctggcagccc      240
atgtttagtc aaaccctcaa gctgaggggc agctccagtg gctgaaccgc cgggccaatg      300
ccctcctggc caatggcgtg gagctgagag ataaccagct ggtggtgcca tcagagggcc      360
tgtacctcat ctactcccag gtctcttcca agggccaagg ctgcccctcc acccatgtgc      420
tcctcaccca caccatcagc cgcacgccc tctccacca gaccaaggtc aacctctct      480
tcgccatcaa gagcccctgc cagagggaga cccagagggg ggctgaggcc aagccctggt      540
atgagcccat ctatctggga ggggtcttcc agctggagaa gggtgaccga ctcacgctg      600
agatcaatcg gcccgactat ctctactttg ccgagtatgg gcaggtctac tttgggatca      660
ttgccctgtc g                                     671

```

<210> 35

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 35

```

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

```

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

<210> 36

<211> 1131

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 36

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

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

Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	
Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	
Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	
Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	
Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	
Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	
Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Tyr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gln	
Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	

705	710	715	720
Phe Leu Tyr Ser Lys	Leu Thr Val Asp Lys	Ser Arg Trp Gln Gln Gly	
725	730	735	
Asn Val Phe Ser Cys	Ser Val Met His Glu	Ala Leu His Asn His Tyr	
740	745	750	
Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro Gly	Lys Lys Asp Pro Lys Phe	
755	760	765	
Trp Val Leu Val Val	Val Gly Gly Val Leu	Ala Cys Tyr Ser Leu Leu	
770	775	780	
Val Thr Val Ala Phe	Ile Ile Phe Trp Val	Arg Ser Lys Arg Ser Arg	
785	790	795	800
Leu Leu His Ser Asp	Tyr Met Asn Met Thr	Pro Arg Arg Pro Gly Pro	
805	810	815	
Thr Arg Lys His Tyr	Gln Pro Tyr Ala Pro	Pro Arg Asp Phe Ala Ala	
820	825	830	
Tyr Arg Ser Arg Val	Lys Phe Ser Arg Ser	Ala Asp Ala Pro Ala Tyr	
835	840	845	
Gln Gln Gly Gln Asn	Gln Leu Tyr Asn Glu	Leu Asn Leu Gly Arg Arg	
850	855	860	
Glu Glu Tyr Asp Val	Leu Asp Lys Arg Arg	Gly Arg Asp Pro Glu Met	
865	870	875	880
Gly Gly Lys Pro Arg	Arg Lys Asn Pro Gln	Glu Gly Leu Tyr Asn Glu	
885	890	895	
Leu Gln Lys Asp Lys	Met Ala Glu Ala Tyr	Ser Glu Ile Gly Met Lys	
900	905	910	
Gly Glu Arg Arg Arg	Gly Lys Gly His Asp	Gly Leu Tyr Gln Gly Leu	
915	920	925	
Ser Thr Ala Thr Lys	Asp Thr Tyr Asp Ala	Leu His Met Gln Ala Leu	
930	935	940	
Pro Pro Arg Gly Pro	Gln Cys Thr Asn Tyr	Ala Leu Leu Lys Leu Ala	
945	950	955	960
Gly Asp Val Glu Ser	Asn Pro Gly Pro Met	Arg Ile Ser Lys Pro His	
965	970	975	
Leu Arg Ser Ile Ser	Ile Gln Cys Tyr Leu	Cys Leu Leu Leu Asn Ser	
980	985	990	
His Phe Leu Thr Glu	Ala Gly Ile His Val	Phe Ile Leu Gly Cys Phe	
995	1000	1005	
Ser Ala Gly Leu Pro	Lys Thr Glu Ala Asn	Trp Val Asn Val Ile	
1010	1015	1020	

Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile
 1025 1030 1035
 Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys
 1040 1045 1050
 Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser
 1055 1060 1065
 Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu
 1070 1075 1080
 Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr
 1085 1090 1095
 Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
 1100 1105 1110
 Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
 1115 1120 1125

Asn Thr Ser
 1130

<210> 37

<211> 1138

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的
 多肽"

<400> 37

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
 20 25 30
 Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
 35 40 45
 Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
 50 55 60
 Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Arg Ser Ser Ser
 65 70 75 80
 Arg Thr Pro Ser Asp Lys Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala
 85 90 95
 Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala
 100 105 110

Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly		
115	120	125
Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro		
130	135	140
Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser		
145	150	155
Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln		
165	170	175
Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile		
180	185	190
Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala		
195	200	205
Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val		
210	215	220
Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu Ser Arg Ala Glu Gly Arg Gly Ser Leu		
225	230	235
Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Glu Phe Gly		
245	250	255
Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly Val Gln Cys Ser		
260	265	270
Arg Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu		
275	280	285
Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys		
290	295	300
Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu		
305	310	315
Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser		
325	330	335
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu		
340	345	350
Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro		
355	360	365
Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Gly Gly Gly		
370	375	380
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
385	390	395
Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser		
405	410	415
Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp		

420	425	430
Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp		
435	440	445
Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu		
450	455	460
Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe		
465	470	475
Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys		
485	490	495
Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly		
500	505	510
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Tyr Val Thr Val Ser Ser Gln		
515	520	525
Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro		
530	535	540
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro		
545	550	555
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
565	570	575
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn		
580	585	590
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
595	600	605
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		
610	615	620
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser		
625	630	635
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
645	650	655
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp		
660	665	670
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe		
675	680	685
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu		
690	695	700
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe		
705	710	715
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly		
725	730	735

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr		
740	745	750
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe		
755	760	765
Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met Gly Asp Leu Val Leu Thr Val		
770	775	780
Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly		
785	790	795
Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr		
805	810	815
Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser		
820	825	830
Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr Lys Arg Val Lys Phe Ser Arg		
835	840	845
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn		
850	855	860
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg		
865	870	875
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro		
885	890	895
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala		
900	905	910
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His		
915	920	925
Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp		
930	935	940
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Pro Gln Cys Thr Asn		
945	950	955
Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro		
965	970	975
Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr		
980	985	990
Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His		
995	1000	1005
Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu		
1010	1015	1020
Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp		
1025	1030	1035
Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser		

1040	1045	1050
Asp Val His Pro Ser Cys	Lys Val Thr Ala Met	Lys Cys Phe Leu
1055	1060	1065
Leu Glu Leu Gln Val Ile	Ser Leu Glu Ser Gly	Asp Ala Ser Ile
1070	1075	1080
His Asp Thr Val Glu Asn	Leu Ile Ile Leu Ala	Asn Asn Ser Leu
1085	1090	1095
Ser Ser Asn Gly Asn Val	Thr Glu Ser Gly Cys	Lys Glu Cys Glu
1100	1105	1110
Glu Leu Glu Glu Lys Asn	Ile Lys Glu Phe Leu	Gln Ser Phe Val
1115	1120	1125
His Ile Val Gln Met Phe	Ile Asn Thr Ser	
1130	1135	

<210> 38

<211> 673

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的
多核苷酸"

<400> 38

tcgagtcgag atgagcactg aaagcatgat ccgggacgtg gagctggccg aggaggcgct	60
ccccaaagaag acaggggggc cccagggctc caggcgggtgc ttgttctca gcctcttctc	120
cttcctgatc gtggcaggcg ccaccacgct cttctgcctg ctgcactttg gactgatcgg	180
ccccagagg gaagagtcc ccagggacct ctctctaata agccctctgc aggagccca	240
tgtttagtagca aaccctcaag ctgaggggca gctccagtgg ctgaaccgcc gggccaatgc	300
cctcctggcc aatggcgtgg agctgagaga taaccagctg gtggtgccat cagagggcct	360
gtacctcatc tactcccagg tcctcttcaa gggccaaggc tgcccctcca cccatgtgct	420
cctcaccac accatcagcc gcatcgccgt ctctaccag accaaggta acctcctctc	480
tgccatcaag agcccctgcc agaggggagac cccagagggg gctgaggcca agcccctggt	540
tgagcccatc tatctgggag gggctctcca gctggagaag ggtgaccgac tcagcgctga	600
gatcaatcgg cccgactatc tcgactttgc cgagtctggg caggtctact ttgggatcat	660
tgccctgtcg tcg	673

<210> 39

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的多肽"

<400> 39

```

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

```

<210> 40

<211> 654

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的"

多核苷酸”

<400> 40

atgagcactg aaatgcatcc cggaaggggg tcctggcacg aggaggcgct cccaagaag	60
acaggggggc cccagggctc caggcgggtgc ttgttctca gcctcttctc cttcctgac	120
gtggcaggcg ccaccacgct cttcttctctg ctgcactttg gaggatcg cccagagg	180
gaagagtcc ccaggacct ctctctaate agccctctgg cccatgttgt agcaaaccct	240
caagctgagg ggcagctcca gtggctgaac cgccgggcca atgccctcct ggccaatggc	300
gtggagctga gagataacca gctggtggtg ccatcagagg gcctgtacct catctactcc	360
caggctctct tcaagggcca aggctgcccc tccacctatg tgctcctcac ccacaccatc	420
agccgcatcg ccgtctccca ccagaccaag gtcaacctcc tcttcgcat caagagcccc	480
tgccagagg agaccccaga gggggctgag gccaaacct ggtatgagcc catctatctg	540
ggaggggtct tccagctgga gaagggtgac cgactcatcg ctgagatcaa tcggcccgac	600
tatctctact ttgccgagta tgggcaggtc tactttggga tcattgccct gtcg	654

<210> 41

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的

多肽”

<400> 41

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

130	135	140
Val Ser His Gln Thr Lys	Val Asn Leu Leu Phe	Ala Ile Lys Ser Pro
145	150	155
Cys Gln Arg Glu Thr Pro	Glu Gly Ala Glu Ala	Lys Pro Trp Tyr Glu
165	170	175
Pro Ile Tyr Leu Gly Gly	Val Phe Gln Leu Glu	Lys Gly Asp Arg Leu
180	185	190
Ile Ala Glu Ile Asn Arg	Pro Asp Tyr Leu Tyr	Phe Ala Glu Tyr Gly
195	200	205
Gln Val Tyr Phe Gly Ile	Ile Ala Leu Ser	
210	215	

<210> 42

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的引物"

<400> 42

tcgagaagat gatctgactg cctgggccag agg

33

<210> 43

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的引物"

<400> 43

tcgagaagat gatcttgcct gggccagagg

30

<210> 44

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的寡核苷酸"

<400> 44	
tgatcttgcc tg	12
<210> 45	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列说明：合成的引物"	
<400> 45	
tacaacatgg gctacagget tgtcactcgg ggt	33
<210> 46	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列说明：合成的引物"	
<400> 46	
tacaacatgg gctaccttgt cactcggggt	30
<210> 47	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列说明：合成的寡核苷酸"	
<400> 47	
ggctaccttg tc	12
<210> 48	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列说明：合成的	

寡核苷酸”

<400> 48

caggcagtca gatcatcttc tcgaaccccg agtgacaagc ctgtagcc

48

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=”人工序列说明：合成的

肽”

<400> 49

Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala

1

5

10

15

<210> 50

<211> 220

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<221> 来源

<223> /注释=”未知的说明：

TNF alpha序列”

<400> 50

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala

1

5

10

15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe

20

25

30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe

35

40

45

Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro

50

55

60

Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Ala His Val Val

65

70

75

80

Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala

85

90

95

Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val

100

105

110

Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys

115

120

125

Gly	Gln	Gly	Cys	Pro	Ser	Thr	His	Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Ile	Ser
130						135					140				
Arg	Ile	Ala	Val	Ser	Tyr	Gln	Thr	Lys	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Ala	Ile
145					150					155					160
Lys	Ser	Pro	Cys	Gln	Arg	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Ala	Glu	Ala	Lys	Pro
				165					170					175	
Trp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly
			180					185					190		
Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Glu	Ile	Asn	Arg	Pro	Asp	Tyr	Leu	Asp	Phe	Ala
	195						200					205			
Glu	Ser	Gly	Gln	Val	Tyr	Phe	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu				
210						215					220				
<210> 51															
<211> 233															
<212> PRT															
<213> 智人															
<400> 51															
Met	Ser	Thr	Glu	Ser	Met	Ile	Arg	Asp	Val	Glu	Leu	Ala	Glu	Glu	Ala
1			5						10					15	
Leu	Pro	Lys	Lys	Thr	Gly	Gly	Pro	Gln	Gly	Ser	Arg	Arg	Cys	Leu	Phe
			20					25					30		
Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Leu	Phe
		35					40					45			
Cys	Leu	Leu	His	Phe	Gly	Val	Ile	Gly	Pro	Gln	Arg	Glu	Glu	Phe	Pro
	50					55					60				
Arg	Asp	Leu	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Ser	Ser
65					70					75					80
Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys	Pro	Val	Ala	His	Val	Val	Ala	Asn	Pro
				85					90					95	
Gln	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Asn	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Leu
			100					105					110		
Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Arg	Asp	Asn	Gln	Leu	Val	Val	Pro	Ser
		115					120					125			
Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe	Lys	Gly	Gln	Gly
130						135					140				
Cys	Pro	Ser	Thr	His	Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Ile	Ser	Arg	Ile	Ala
145					150					155					160
Val	Ser	Tyr	Gln	Thr	Lys	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Pro
				165					170					175	

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
 180 185 190
 Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
 195 200 205
 Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
 210 215 220
 Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 225 230

<210> 52

<211> 660

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的
多核苷酸"

<220>

<221> misc_feature

<222> (214) .. (219)

<223> /注释="该区域可以存在或可以不存在"

<400> 52

atgagcactg aaatgcatcc cggaaggggg tcctggcacg aggaggcgct cccaagaag	60
acaggggggc ccaggggctc caggcggtgc ttgttctca gcctcttctc cttctgac	120
gtggcaggcg ccaccacgct cttcttctg ctgcactttg gaggatcg ccccgagg	180
gaagagttcc ccagggacct ctctctaata agccctctgg ccgcagccca tgtttagca	240
aacctcaag ctgaggggca gctccagtgg ctgaaccgcc gggccaatgc cctcctggcc	300
aatggcgtag agctgagaga taaccagctg gtgggtgcat cagagggcct gtacctatc	360
tactcccagg tcctcttcaa gggccaaggc tgcccccca ccatgtgct cctcaccac	420
accatcagcc gcatcgccgt ctcccaccag accaaggtea acctcctctt cgccatcaag	480
agccccctgcc agaggagac ccagagggg gctgaggcca agccctggta tgagcccatc	540
tatctgggag gggcttcca gctggagaag ggtgaccgac tcacgctga gatcaatcg	600
cccactatc tctactttgc cgagtatggg caggtctact ttgggatcat tgccctgtcg	660

<210> 53

<211> 220

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列说明：合成的

多肽”

<220>

<221> SITE

<222> (74) .. (75)

<223> /注释=“该区域可以存在或可以不存在”

<400> 53

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

<210> 54

<211> 56

<212> PRT

<213> 未知的

<220>

<221> 来源

<223> /注释="未知的说明:

猴TNF alpha序列"

<400> 54

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

<210> 55

<211> 56

<212> PRT

<213> 猪(Sus sp.)

<400> 55

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

<210> 56

<211> 56

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus sp.)

<400> 56

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

<210> 57

<211> 56

<212> PRT

<213> 兔 (*Oryctolagus* sp.)

<400> 57

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

<210> 58

<211> 56

<212> PRT

<213> 山羊 (*Capra* sp.)

<400> 58

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

<210> 59

<211> 56

<212> PRT

<213> 绵羊 (*Ovis* sp.)

<400> 59

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

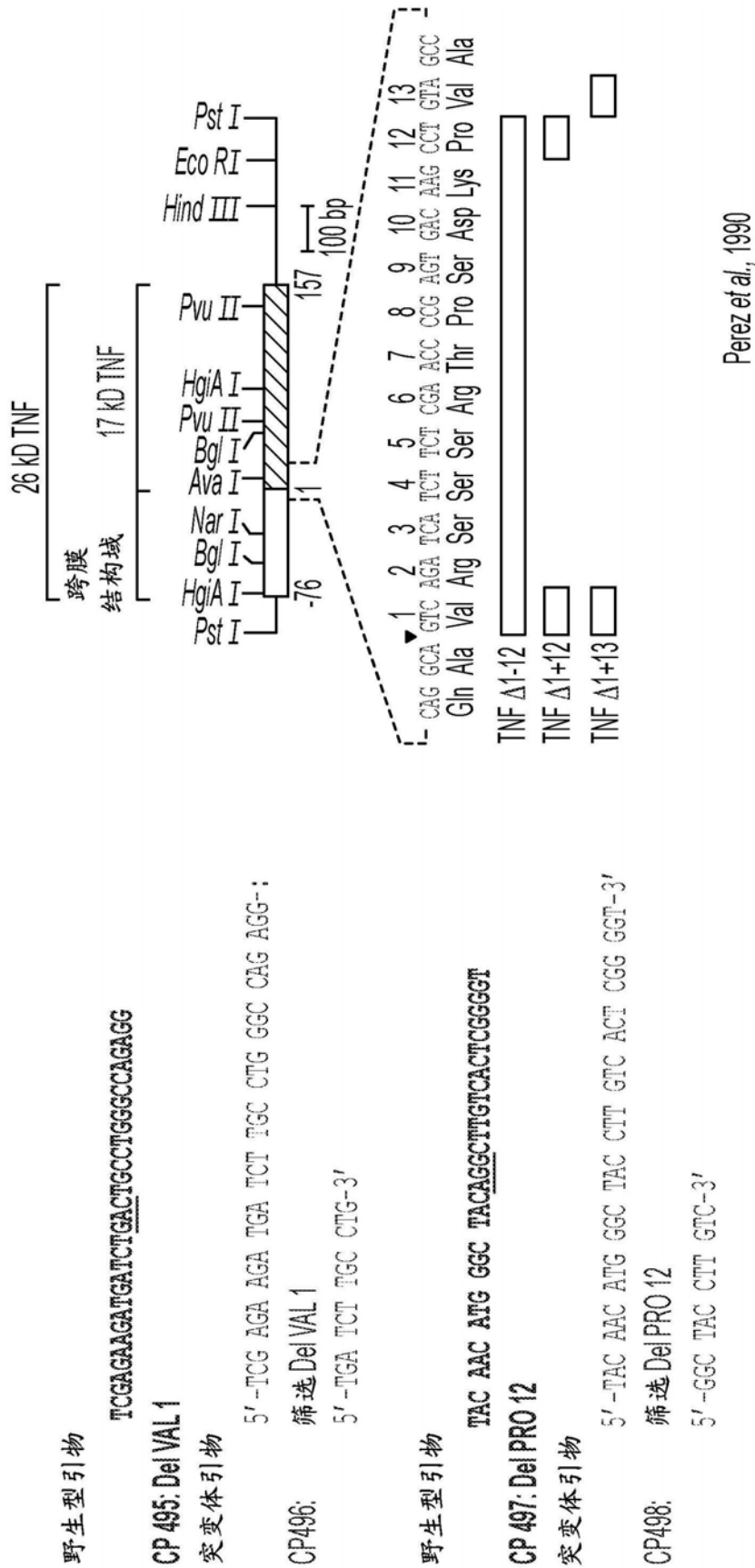


图1

TNFa突变体-delVal1 和 delPro12

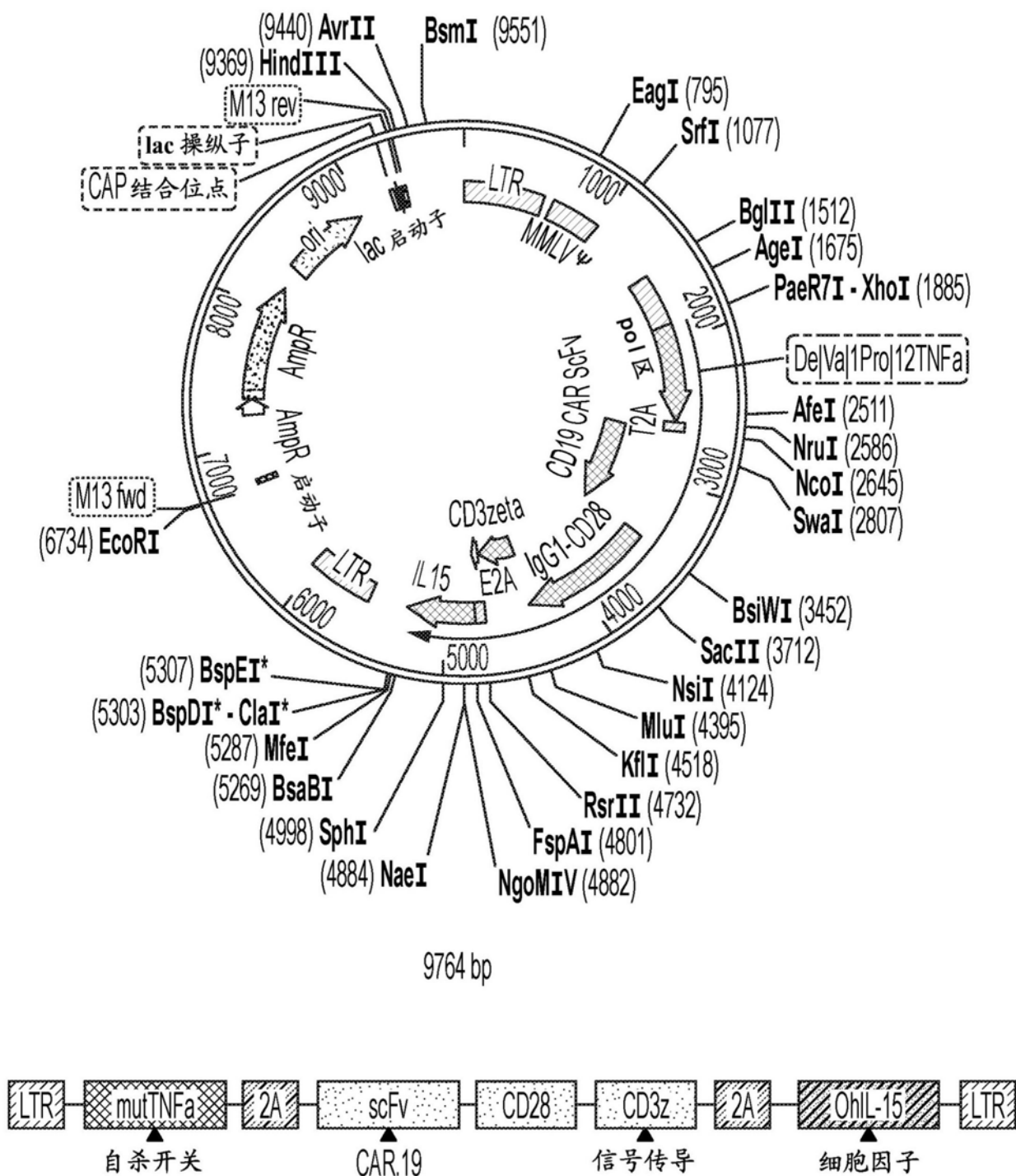
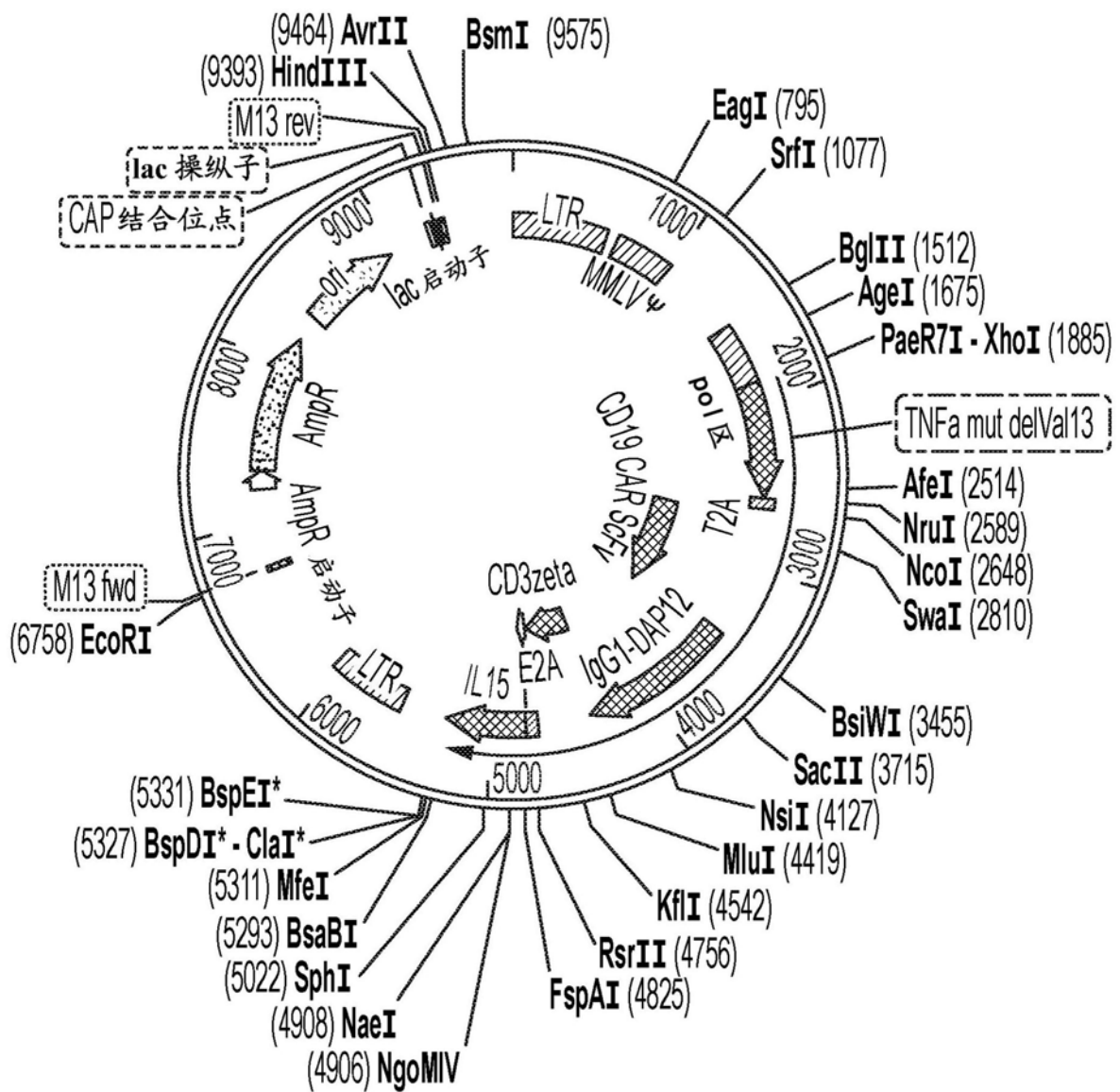


图2A

TNFa突变体-delVal13



构建体 ID 18ACIQEP- TNFa mut delVal13 CAR.CD19.IgG1.DAP12.CD3z.IL15
9788bp

图2B

TNF α 突变体-delVal1 和 delVal13

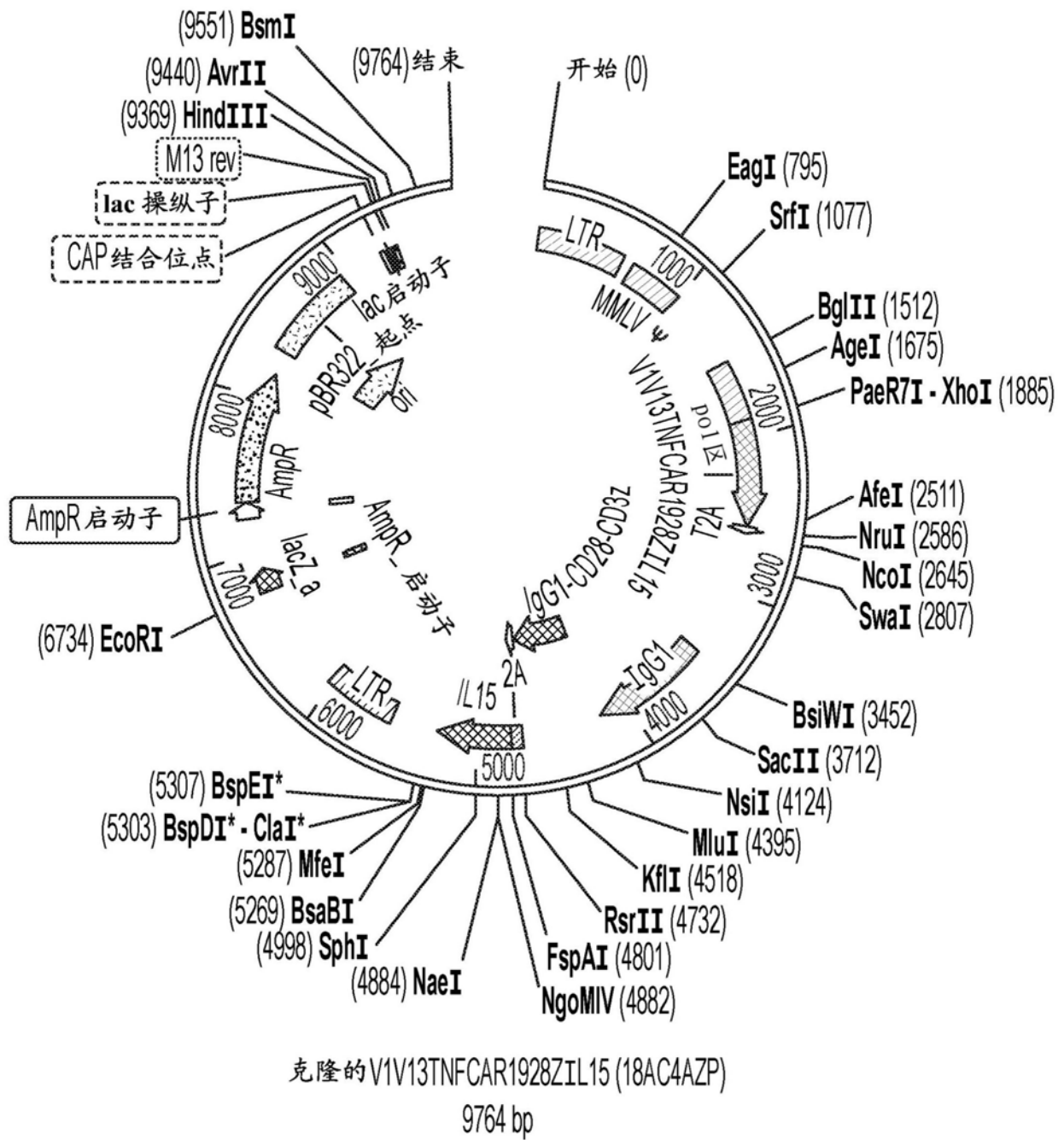


图2C

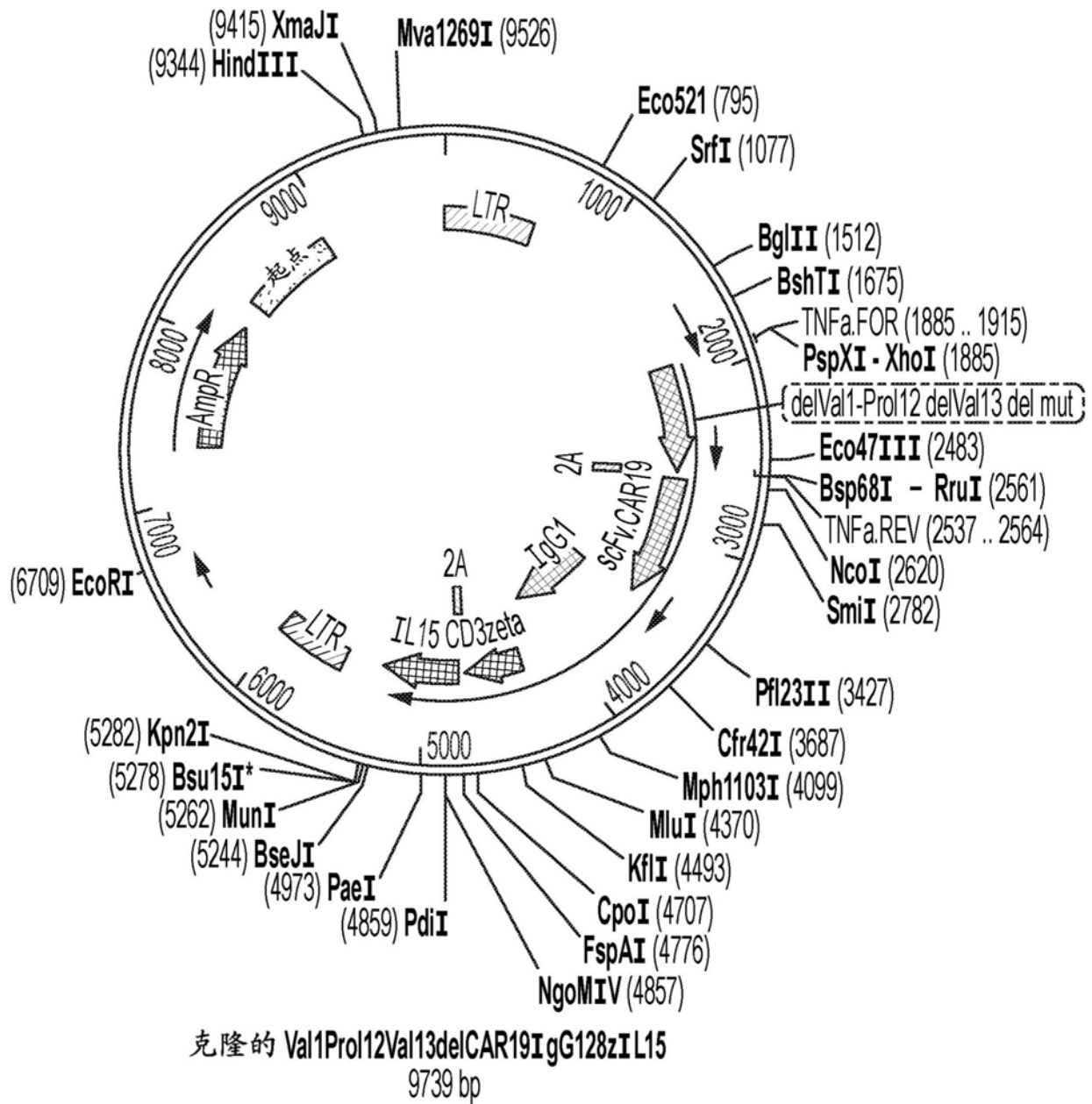
TNF α 突变体-delVal1至Prol12 del Val13 (缺失 13 aa)

图2D

TNF α 突变体-delAla-1至 Val13 (缺失 14aa)

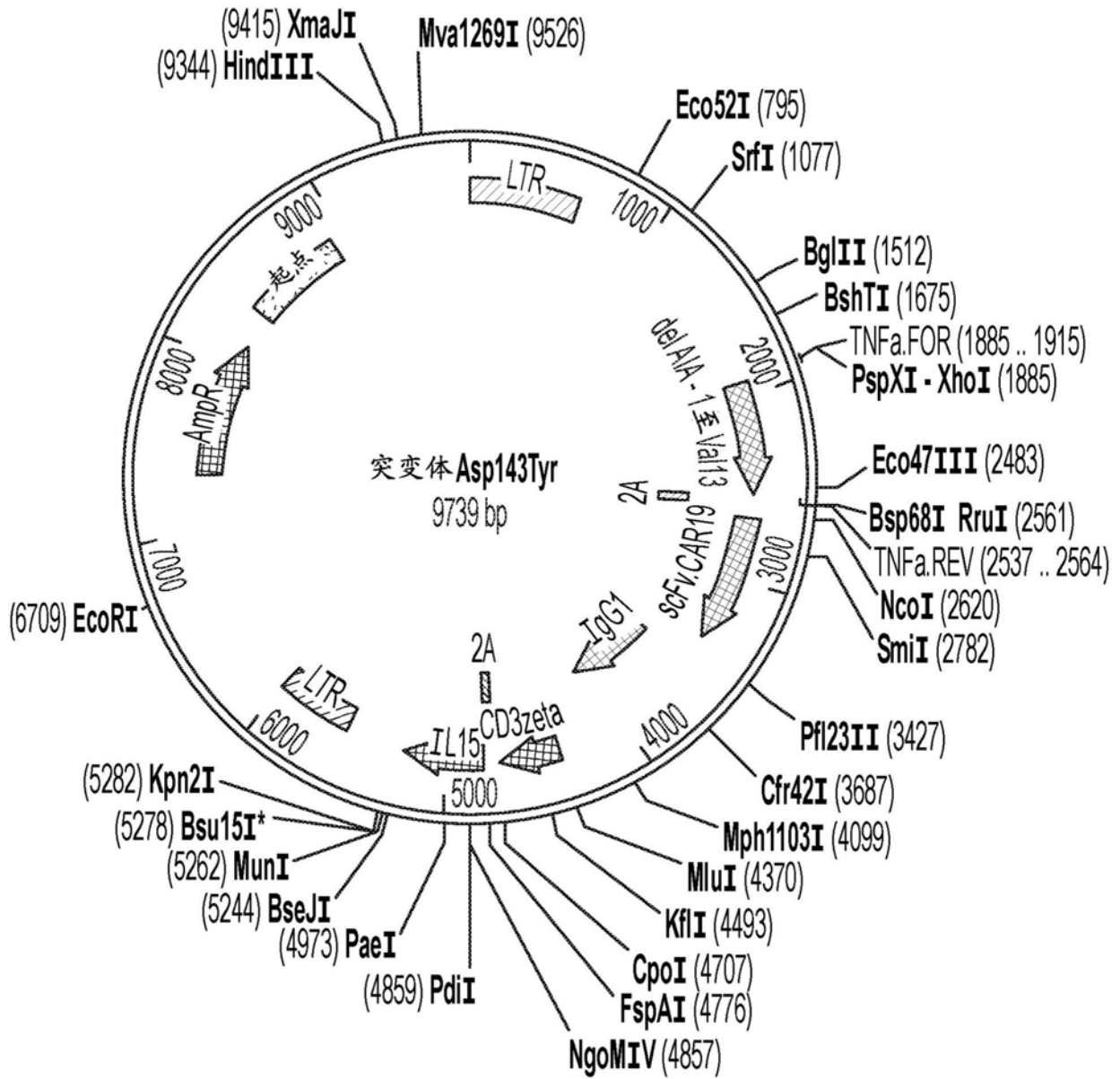


图2E

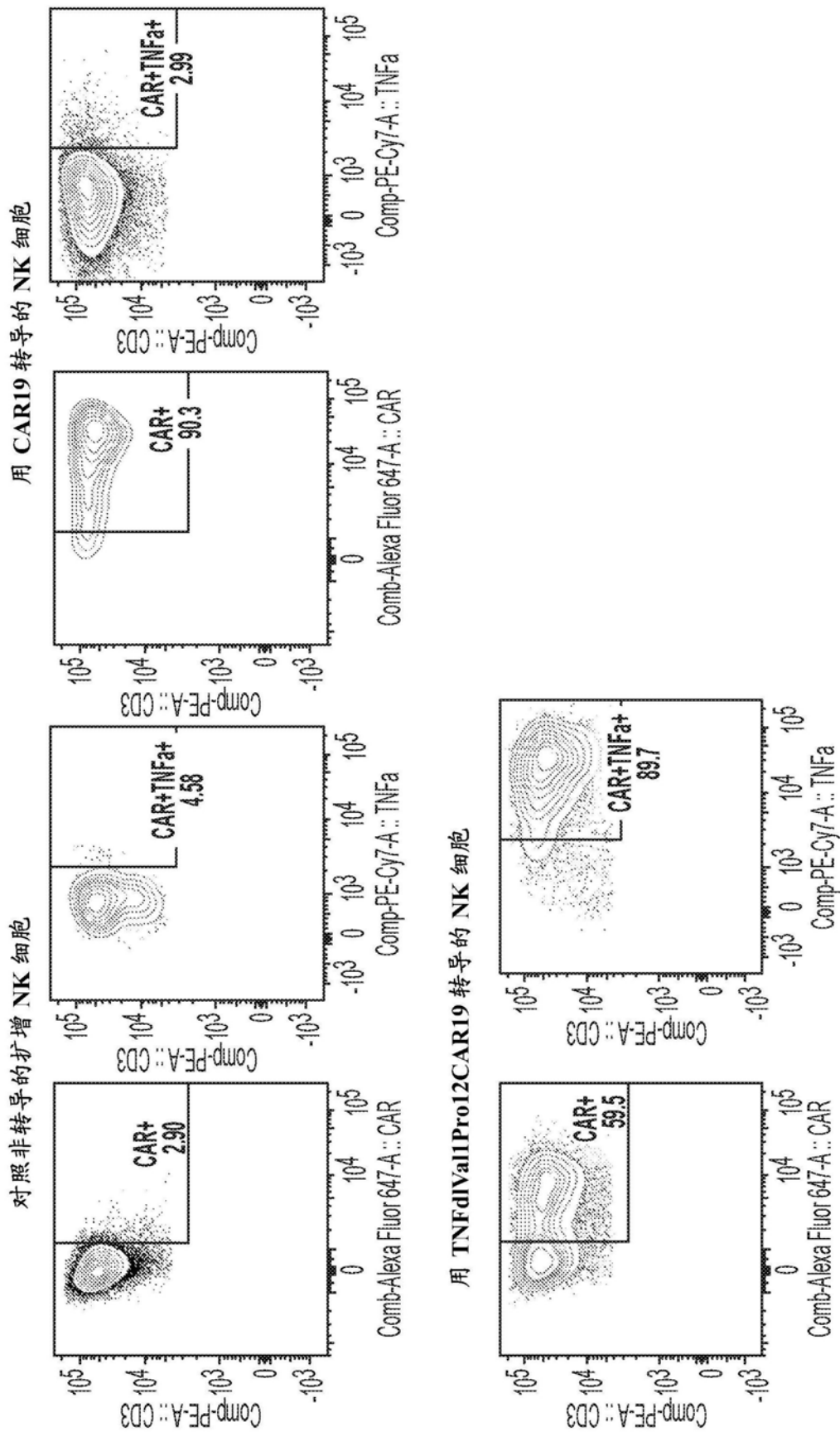


图3

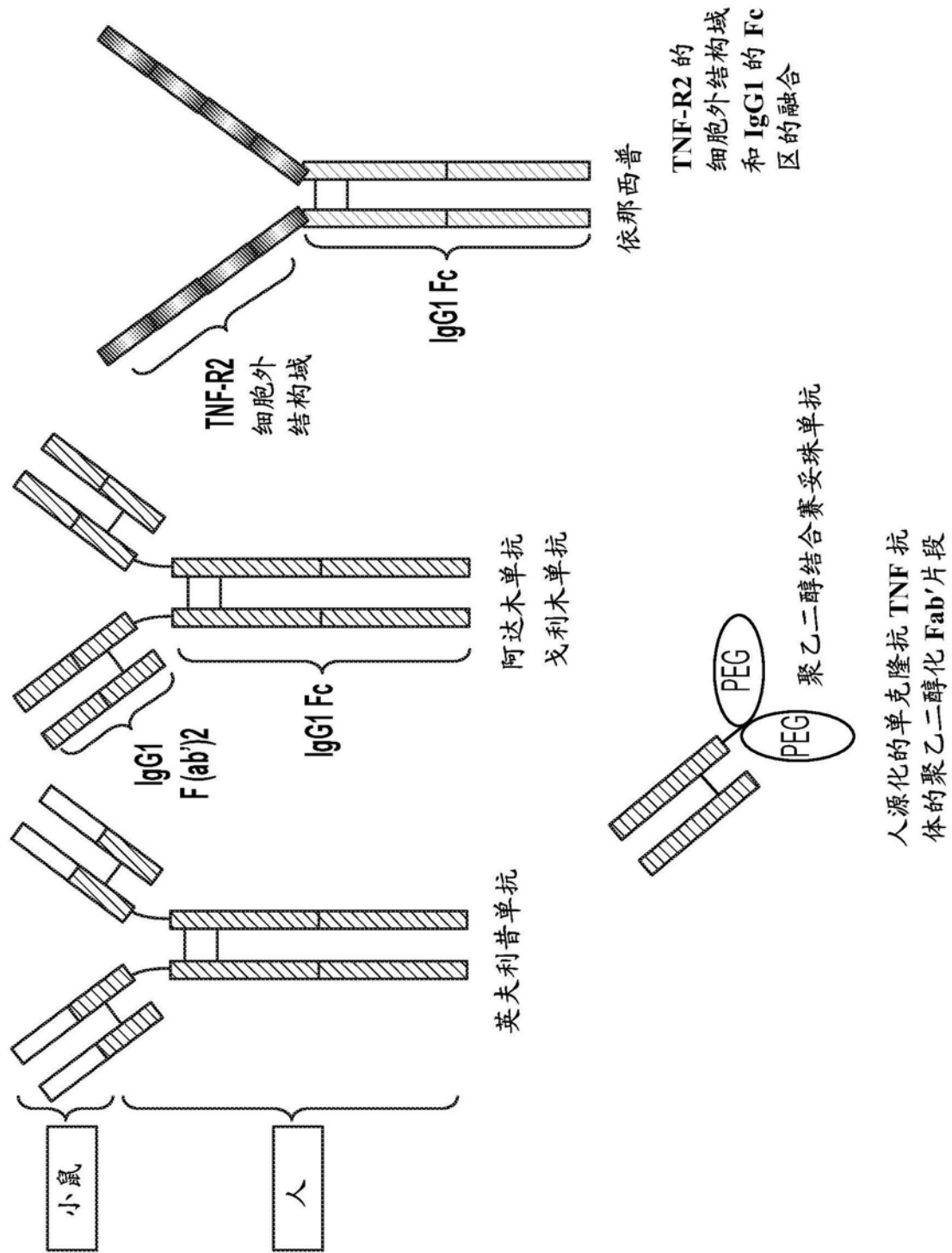


图4A

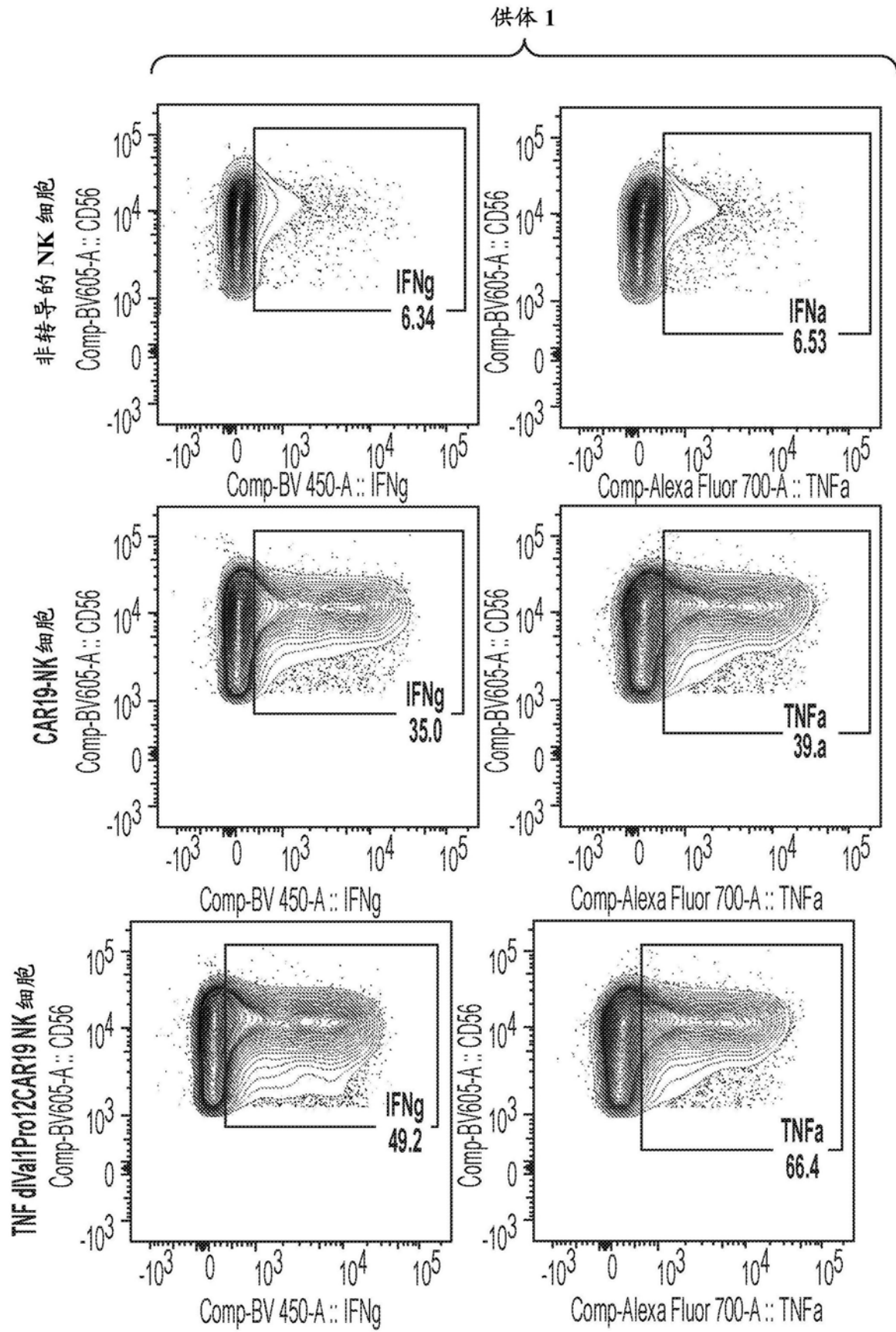


图5A

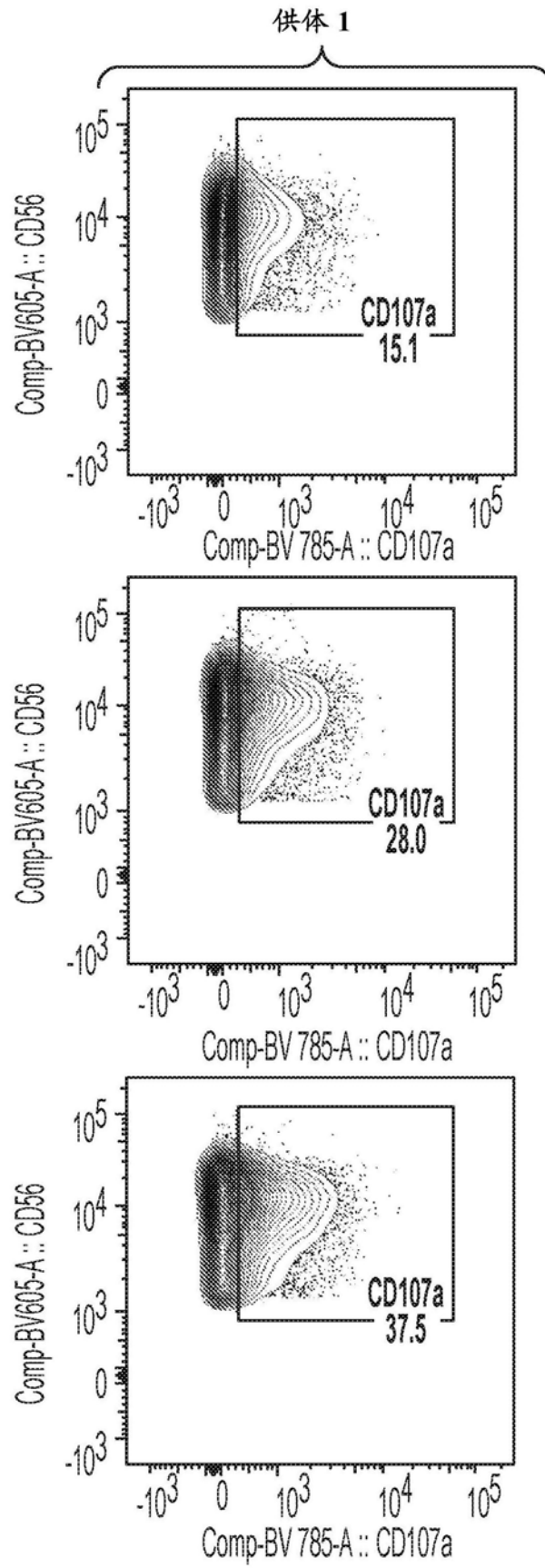


图5A (续)

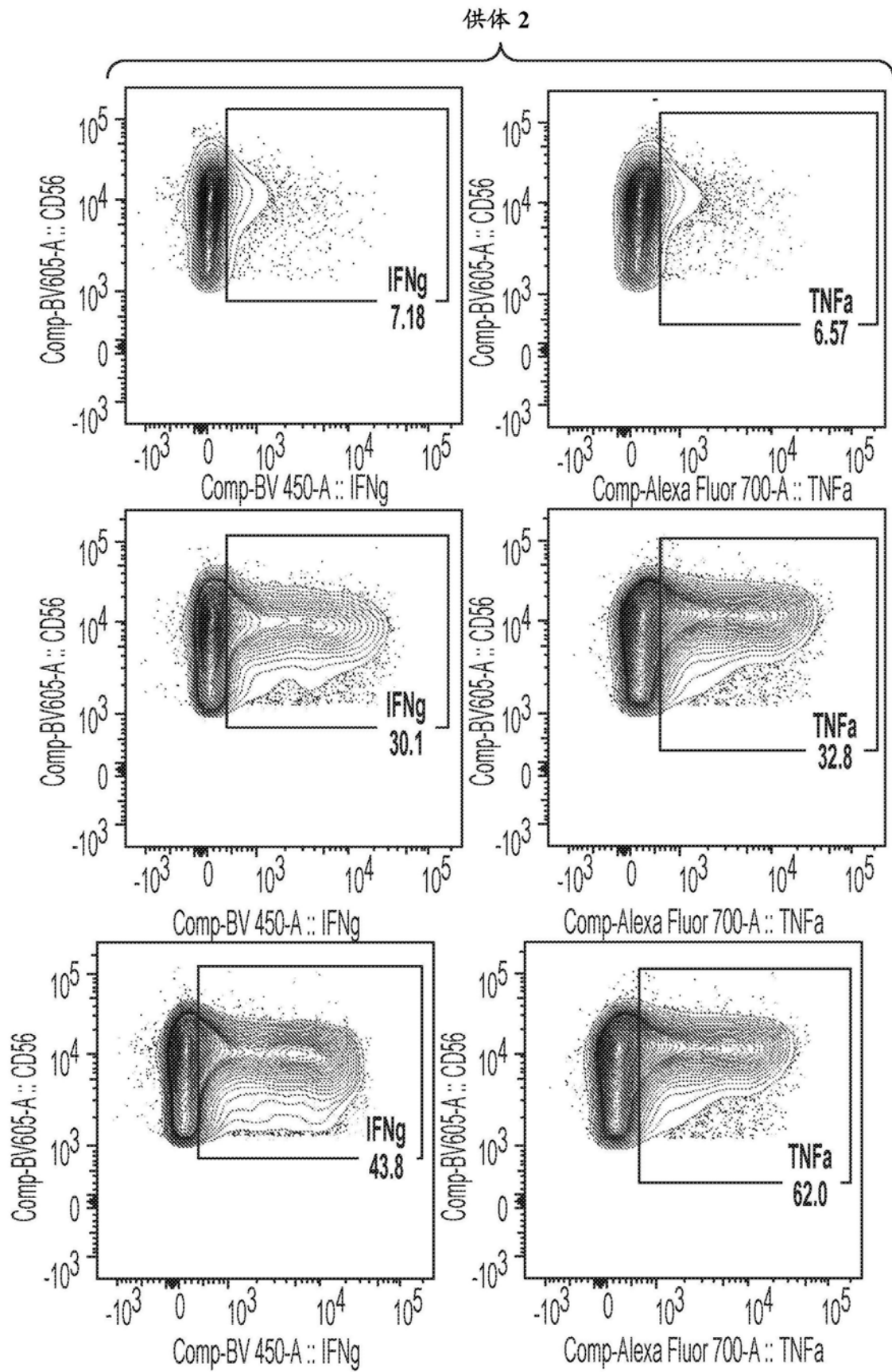


图5A (续)

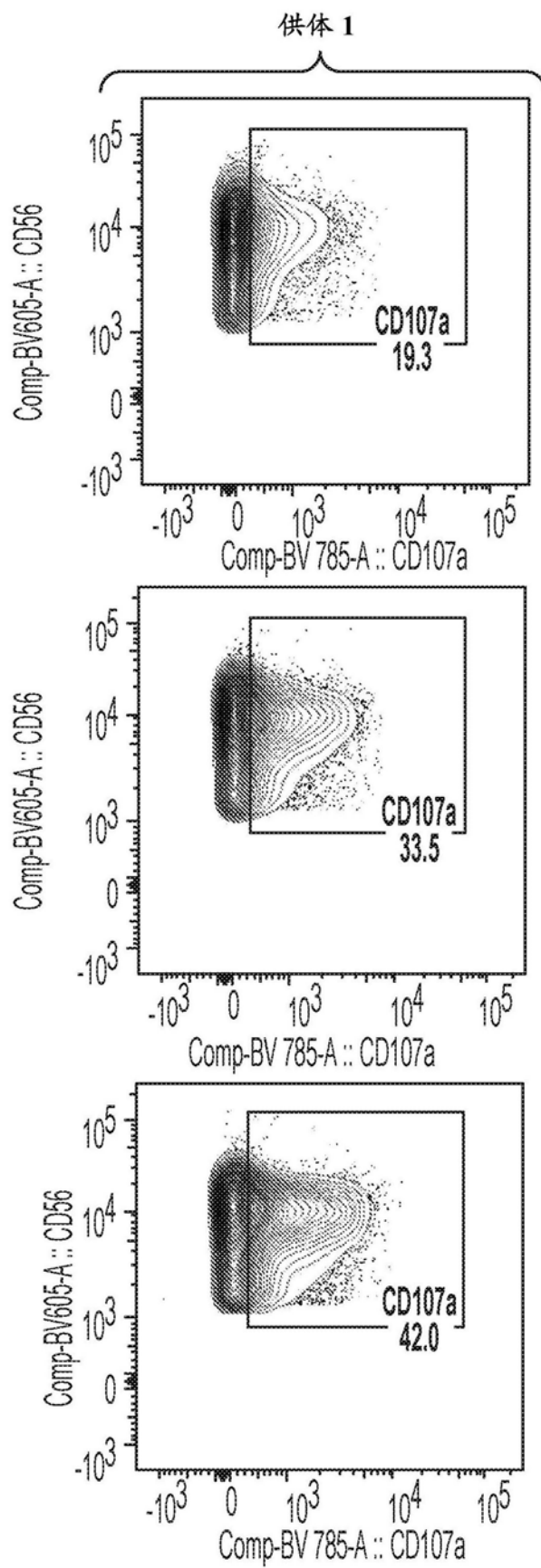


图5A (续)

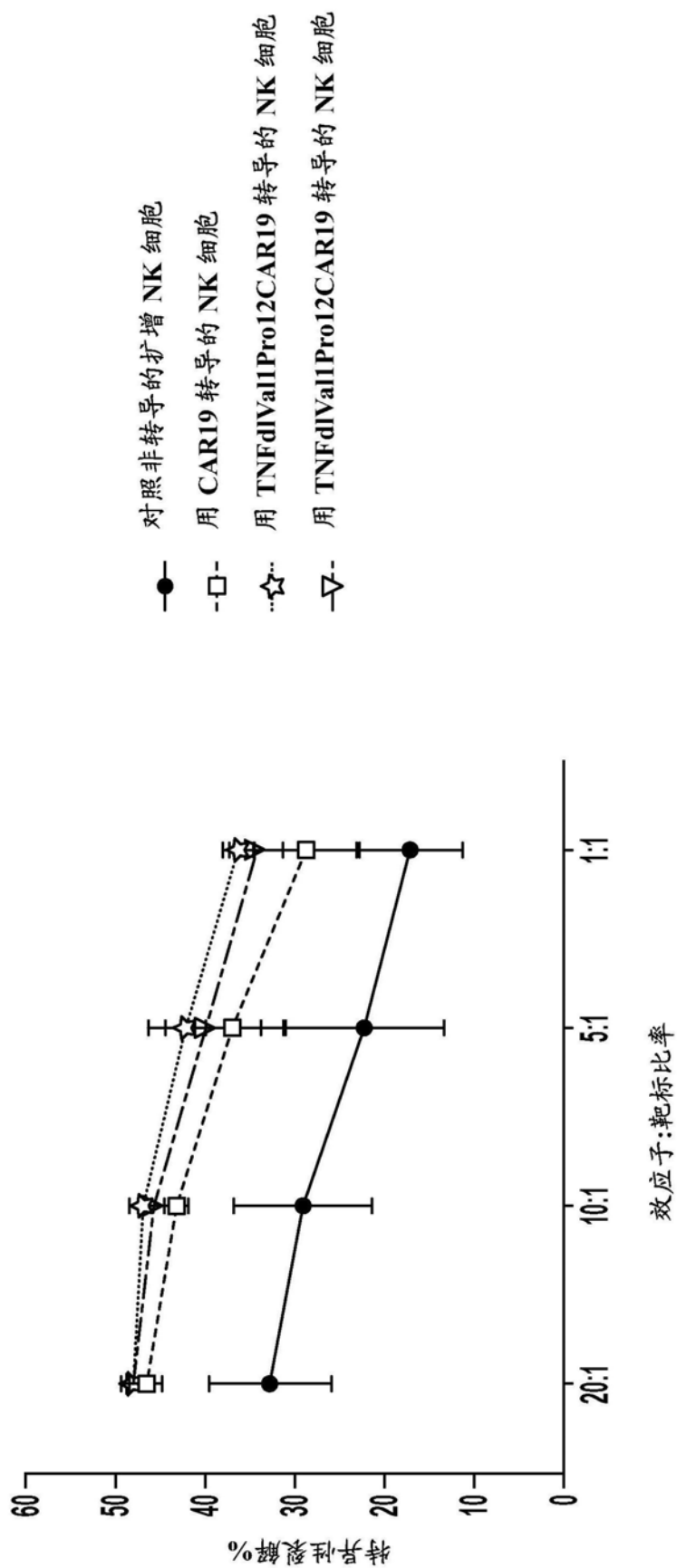


图5B

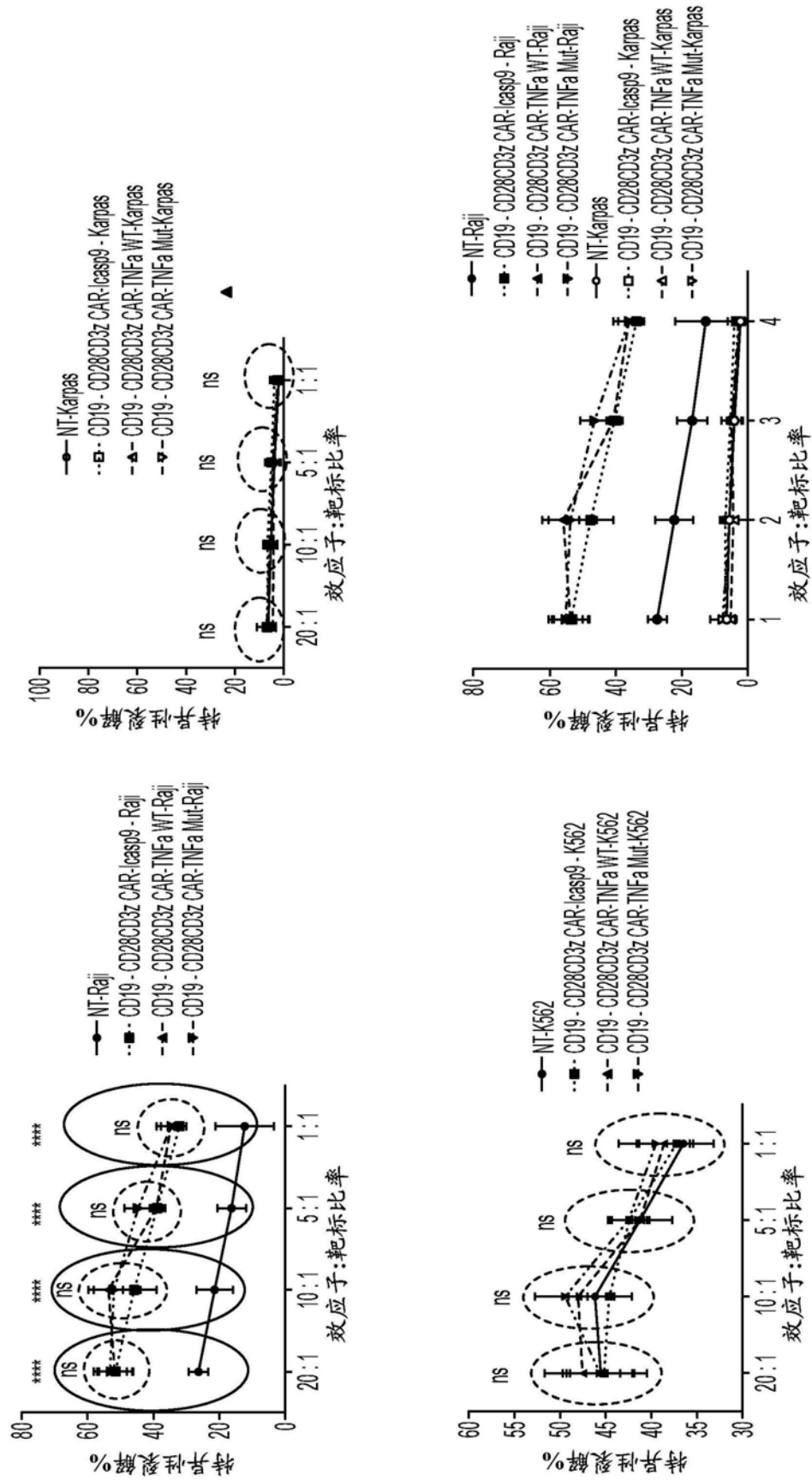


图6

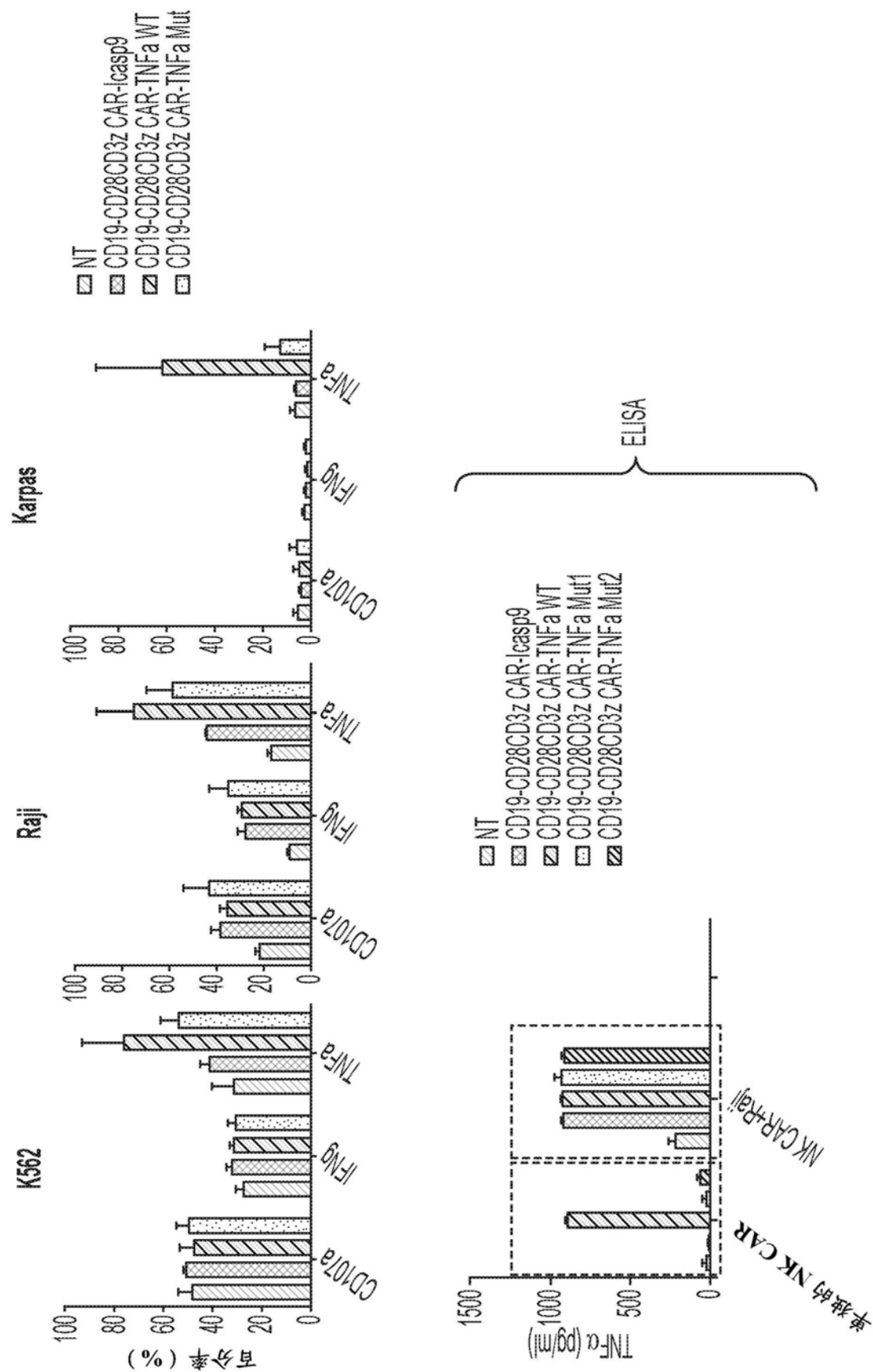


图7

MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREFFPRD
 LSLISPLAQAAHVVANPQAEGLQMTNFRANALLANGVELRDNLVWPSEGLIYISQVLFKG
 QGCPSTHVLLTHITISRIASVYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAENPWEPIYLLGGVFQLEKGDRL
 SAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIL

图8

单下划线表示 TNF 受体 1 和 2 的受体结合位点——这些位点可以被突变以削弱 TNF α 与其受体的相互作用。

双下划线 E-F 环-靶标用于与阿达木单抗和英夫利昔单抗 Fab 片段的相互作用。相反，E-F 环不参与 TNF α 与 TNFR1 或 TNFR2 的复杂相互作用

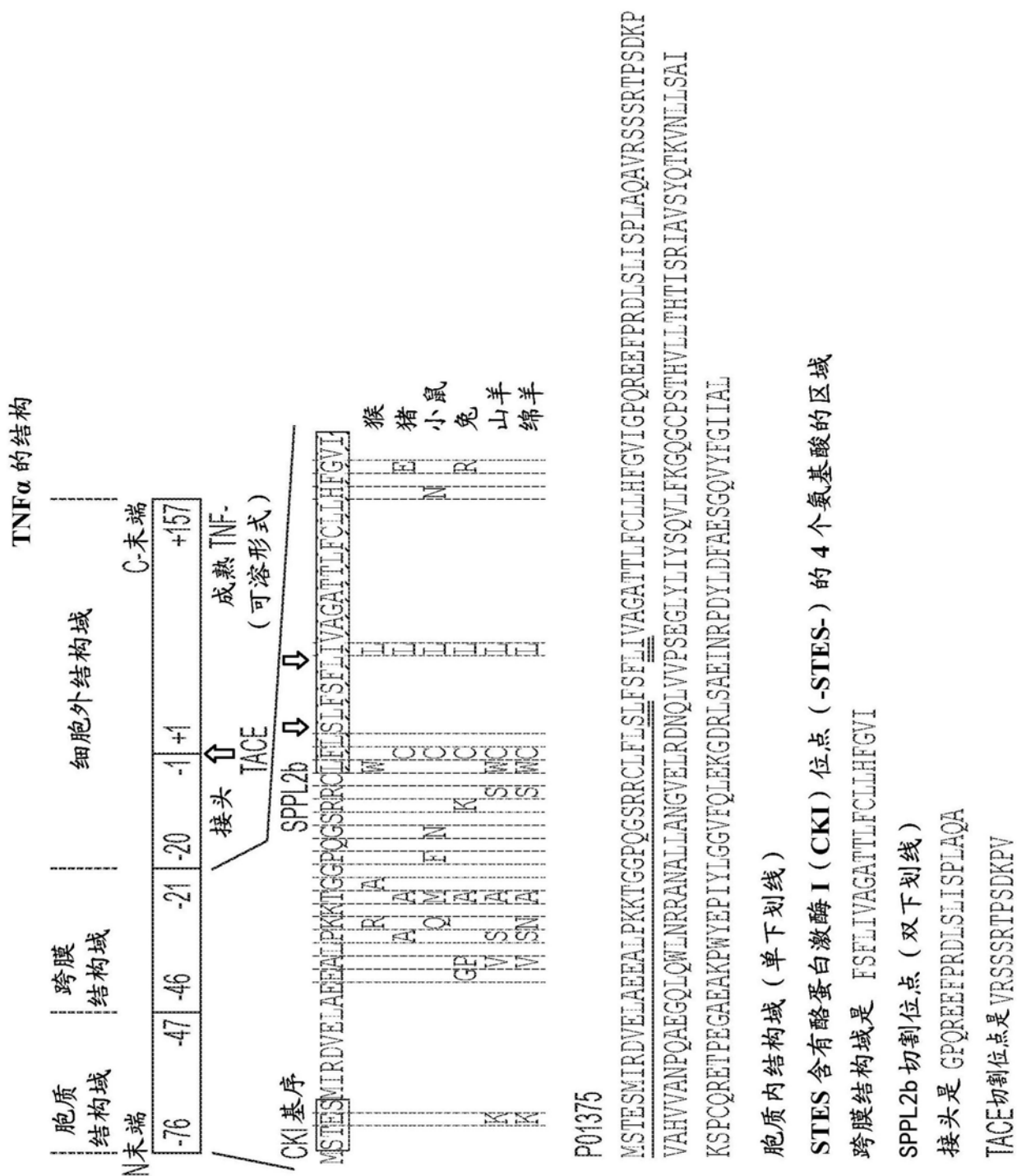


图9

```

atgagcactgaaaTGCATCCCGGAAGCGGTCCTGGCACgaggaggcgctccccagaagacagggggccccagggtct
ccaggcgggtgcttgctcagcctcttctcctcctgatcggtggcaggcgccaccagctcttctTcctgctgactttggagtgatcgggccc
ccagaggggaagagtccccagggaacctctctaatcagceetctggccgcgagcccatgtttagcaaacccctcaagctgaggggcagct
ccagtggctgaaccgcgggccaatgccctcctggccaatggcgtggagctgagagataaccagctggtggtgccatcagagggcctgt
acctcatctactccaggtcctcttcaaggccaaggctgccctccaccatgtgctcctcaccacaccatcagccgcatcgccgtctcc
CaccagaccaaggtcaacctctctTCgccatcaagagccccctgccagaggagagacccagaggggctgagggccaagccctggtat
gagcccatctatctgggaggggtcttccagctggagaagggtgaccgactcaTcgctgagatcaatcgggccgactatctcTactttgccg
agtAtgggcagggtctactttgggatcattgccctgtcg

MSTEMHPGRGSWHEEALPKKTGGPOGSRRCFLSLFSFLIVAGATTLLFFLLHFGVIGPOREEFPRDLSLSPLAAAAHVVAN
POAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNLVWPSEGLYLIYSQVLFKGQGPCSTHVLTLHTISRIAVSHQTKVNLLEFAIKSP
CORETPEGAEAKPWYEPIYLGVFQLEKGDRLIAEINRPDLYLFAEYGVYFGIIALS

```

图10

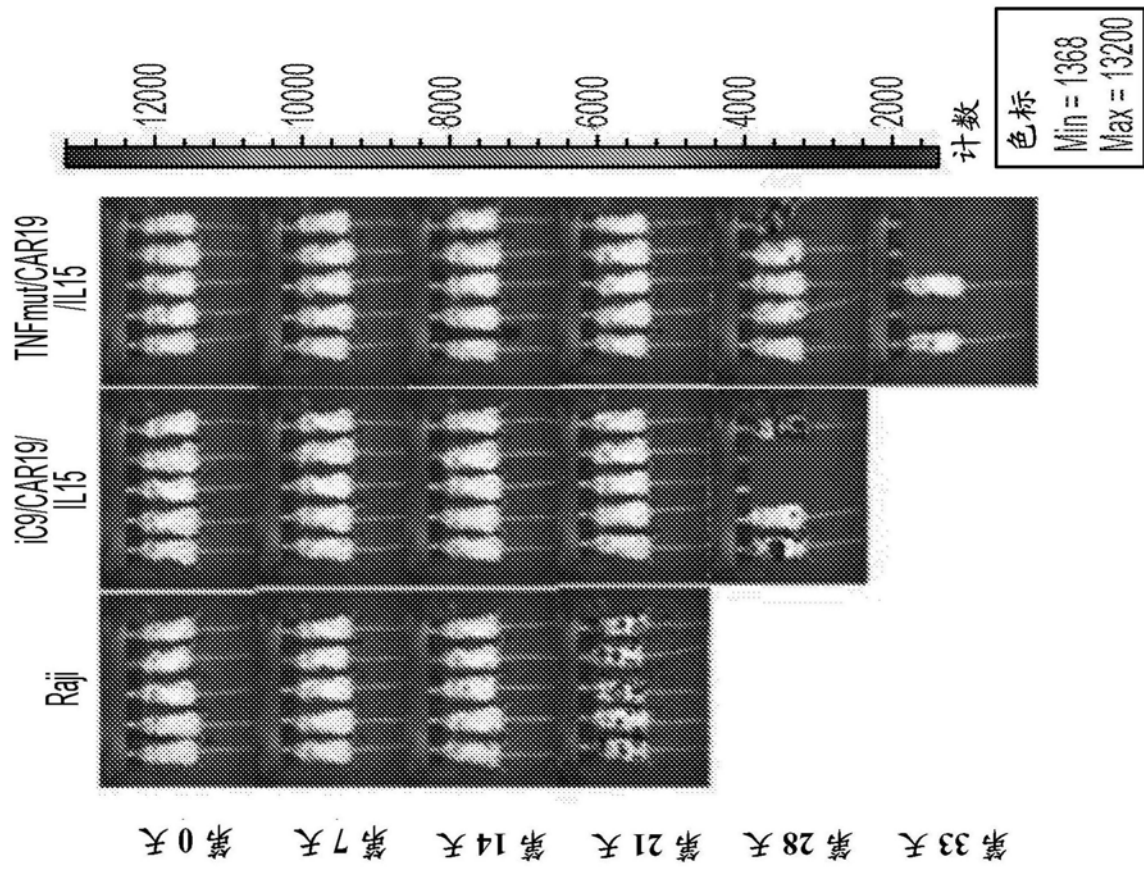


图11A

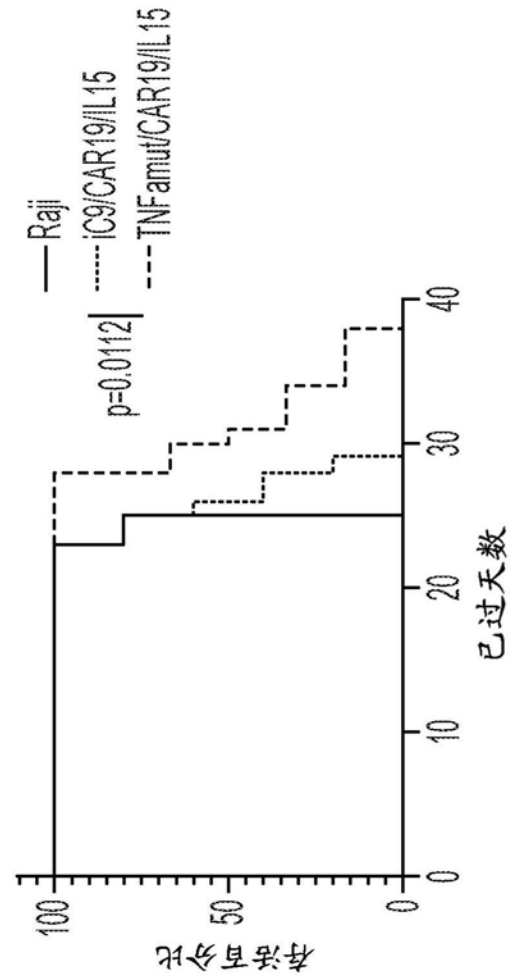


图11B