



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107074970 B

(45) 授权公告日 2021. 07. 30

(21) 申请号 201580049647.6

菲利普·D·格林伯格 希尤·阮

(22) 申请日 2015.07.30

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107074970 A

代理人 高丽娜

(43) 申请公布日 2017.08.18

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C07K 19/00 (2006.01)

62/033,045 2014.08.04 US

A61K 35/14 (2015.01)

62/164,783 2015.05.21 US

A61K 38/17 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.03.15

A61K 38/20 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/042986 2015.07.30

(56) 对比文件

CN 102574906 A, 2012.07.11

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/022400 EN 2016.02.11

Willenbrock K. et.al., 《BV17S1J2.7, partial [Homo sapiens]》.《Genbank》.2005, 第1页.

(73) 专利权人 弗雷德哈钦森癌症研究中心
地址 美国华盛顿州

审查员 陈仕高

(72) 发明人 托马斯·M·施米特

权利要求书4页 说明书29页
序列表69页 附图17页

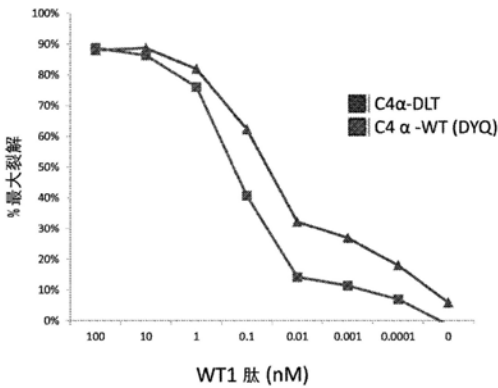
(54) 发明名称

特异性针对WT-1的T细胞免疫疗法

(57) 摘要

本公开内容提供特异性针对人肾母细胞瘤蛋白1 (WT-1) 表位的高亲和性的和增强的亲和性的T细胞受体,其用于治疗疾病或病症,诸如过表达WT-1的癌细胞。

C.



1. 一种分离的多核苷酸,所述多核苷酸是密码子优化的,编码结合蛋白,所述结合蛋白包含:

(a) T细胞受体 (TCR) α 链可变 (V_α) 结构域,其中编码的 V_α 结构域由SEQ ID NO.:1或SEQ ID NO.:2的氨基酸序列组成;和

(b) TCR β 链可变 (V_β) 结构域,其中编码的 V_β 结构域由SEQ ID NO.:9的氨基酸序列组成,其中所编码的结合蛋白能够:

(i) 独立于CD8或在不存在CD8的条件下特异性结合细胞表面上的RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA复合物; 和/或

(ii) 以小于或等于8nM的 K_d 结合RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):人白细胞抗原 (HLA) 复合物。

2. 权利要求1的多核苷酸,其中所述编码的结合蛋白能够以小于或等于5nM的 K_d 与RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA复合物结合。

3. 权利要求1或2的多核苷酸,其中所述编码的结合蛋白进一步包含:

(a) 由SEQ ID NO.:3或4的氨基酸序列组成的 α -链恒定结构域;和/或

(b) 由SEQ ID NO.:10或11的氨基酸序列组成的 β -链恒定结构域。

4. 权利要求3的多核苷酸,其中所述编码的结合蛋白包括:

(a) α 链恒定结构域,其由SEQ ID NO.:4的氨基酸序列组成; 和

(b) β 链恒定结构域,其由SEQ ID NO.:11的氨基酸序列组成。

5. 权利要求3的多核苷酸,其中所述编码的结合蛋白包含由SEQ ID NO.:5-8中任一个氨基酸序列组成的TCR α -链和由SEQ ID NO.:12或13的氨基酸序列组成的TCR β -链。

6. 权利要求5的多核苷酸,其中所述编码的结合蛋白包含TCR α -链和TCR β -链,所述TCR α -链由SEQ ID NO.:5的氨基酸序列组成,TCR β -链由SEQ ID NO.:12的氨基酸序列组成。

7. 权利要求5的多核苷酸,其中所述编码的结合蛋白包含TCR α -链和TCR β -链,所述TCR α -链由SEQ ID NO.:7的氨基酸序列组成,TCR β -链由SEQ ID NO.:12的氨基酸序列组成。

8. 权利要求5的多核苷酸,其中所述编码的结合蛋白包含TCR α -链和TCR β -链,所述TCR α -链由SEQ ID NO.:6的氨基酸序列组成,TCR β -链由SEQ ID NO.:13的氨基酸序列组成。

9. 权利要求5的多核苷酸,其中所述编码的结合蛋白包含TCR α -链和TCR β -链,所述TCR α -链由SEQ ID NO.:8的氨基酸序列组成,TCR β -链由SEQ ID NO.:13的氨基酸序列组成。

10. 权利要求1或2的多核苷酸,其中所述编码的结合蛋白能够与RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA-A*0201复合物特异性结合。

11. 权利要求1或2的多核苷酸,其中所述编码的结合蛋白能够以小于或等于3 nM的 K_d 结合到RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA-A*0201复合物。

12. 权利要求1或2的多核苷酸,其中所述编码的结合蛋白是T细胞受体 (TCR) 或TCR的抗原结合片段。

13. 一种表达载体,其包含与表达控制序列可操作性连接的权利要求1或2所述的多核苷酸。

14. 根据权利要求13所述的表达载体,其中所述载体能够将所述多核苷酸递送至宿主细胞。

15. 根据权利要求14所述的表达载体,其中所述宿主细胞是造血祖细胞或人免疫系统

细胞。

16. 根据权利要求15所述的表达载体,其中所述免疫系统细胞是CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁻ CD8⁻ 双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、天然杀伤细胞、树突细胞或它们的任意组合。

17. 根据权利要求16所述的表达载体,其中所述T细胞是稚T细胞、中枢记忆T细胞和效应记忆T细胞或它们的任意组合。

18. 根据权利要求13-17中任一项所述的表达载体,其中所述载体是病毒载体。

19. 根据权利要求18所述的表达载体,其中所述病毒载体是慢病毒载体或 γ -逆转录病毒载体。

20. 一种重组宿主细胞,其包含根据权利要求1或2所述的多核苷酸或根据权利要求13-17中任一项所述的表达载体,其中所述宿主细胞在其细胞表面上表达由所述多核苷酸编码的结合蛋白。

21. 根据权利要求20所述的重组宿主细胞,其中编码V_α结构域的多核苷酸由SEQ ID NO.: 78-80中任一项所示的核苷酸序列组成,并且编码V_β结构域的多核苷酸由SEQ ID NO.: 89所示的核苷酸序列组成。

22. 根据权利要求20或21所述的重组宿主细胞,其中编码V_α结构域的多核苷酸由SEQ ID NO.: 78所示的核苷酸序列组成。

23. 根据权利要求20或21所述的重组宿主细胞,其中编码V_α结构域的多核苷酸由SEQ ID NO.: 79或80所示的核苷酸序列组成。

24. 根据权利要求20所述的重组宿主细胞,其中编码V_β结构域的多核苷酸由SEQ ID NO.: 89所示的核苷酸序列组成。

25. 根据权利要求20或21所述的重组宿主细胞,其中编码V_α结构域的多核苷酸还包含编码α-链恒定结构域并且由SEQ ID NO.: 81-84中任一项所示的核苷酸序列组成的核苷酸序列。

26. 根据权利要求20或21所述的重组宿主细胞,其中编码V_β结构域的多核苷酸还包含编码β-链恒定结构域并且由SEQ ID NO.: 90-93中任一项所示的核苷酸序列组成的核苷酸序列。

27. 根据权利要求20或21所述的重组宿主细胞,其中编码TCR α-链的多核苷酸由SEQ ID NO.: 86或 87所示的核苷酸序列组成,并且编码TCR β-链的多核苷酸由SEQ ID NO.: 95所示的核苷酸序列组成。

28. 根据权利要求26所述的重组宿主细胞,其中所述编码TCR α-链的多核苷酸由SEQ ID NO.: 86所示的核苷酸序列组成,并且所述编码TCR β-链的多核苷酸序列由SEQ ID NO.: 95所示的核苷酸序列组成。

29. 根据权利要求26所述的重组宿主细胞,其中所述编码TCR α-链的多核苷酸由SEQ ID NO.: 87所示的核苷酸序列组成,并且所述编码TCR β-链的多核苷酸序列由SEQ ID NO.: 95所示的核苷酸序列组成。

30. 根据权利要求20或21所述的重组宿主细胞,其中多核苷酸编码位于编码TCR α-链的多核苷酸与编码TCR β-链的多核苷酸之间的自身切割肽。

31. 根据权利要求30所述的重组宿主细胞,其中所述编码自身切割肽的多核苷酸由SEQ ID NO.: 98-101中任一项所示的核苷酸序列组成。

32. 根据权利要求30所述的重组宿主细胞,其中所述多核苷酸编码由SEQ ID NO.:17-20中任一项所示的氨基酸序列组成的自身切割肽。

33. 根据权利要求30所述的重组宿主细胞,其中所述编码TCR α -链、自身切割肽和TCR β -链的多核苷酸由SEQ ID NO.:96或97所示的核苷酸序列组成。

34. 根据权利要求20或21所述的重组宿主细胞,其中所述宿主细胞是同种异体的、同基因的或自体的。

35. 根据权利要求20或21所述的重组宿主细胞,其中所述宿主细胞是造血祖细胞或人免疫系统细胞。

36. 根据权利要求35所述的重组宿主细胞,其中所述免疫系统细胞是CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁻ CD8⁻ 双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、天然杀伤细胞、树突细胞或它们的任意组合。

37. 根据权利要求35所述的重组宿主细胞,其中所述免疫系统细胞是T细胞。

38. 根据权利要求37所述的重组宿主细胞,其中所述T细胞是稚T细胞、中枢记忆T细胞、效应记忆T细胞或它们的任意组合。

39. 根据权利要求37所述的重组宿主细胞,其中,与内源性TCR相比,由所述T细胞表达的所述结合蛋白能够更有效地与CD3蛋白缔合。

40. 根据权利要求37所述的重组宿主细胞,其中,与内源性TCR相比,所述结合蛋白具有更高的T细胞表面表达。

41. 根据权利要求20或21所述的重组宿主细胞在制备用于治疗受试者急性髓细胞白血病(AML)的药物中的用途。

42. 根据权利要求41所述的用途,其中所述重组宿主细胞被离体修饰。

43. 根据权利要求41或42所述的用途,其中所述宿主细胞是同种异体细胞、同基因细胞或自体细胞。

44. 根据权利要求41所述的用途,其中所述宿主细胞是造血祖细胞或人免疫系统细胞。

45. 根据权利要求44所述的用途,其中所述免疫系统细胞是CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁻ CD8⁻ 双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、天然杀伤细胞、树突细胞或它们的任意组合。

46. 根据权利要求45所述的用途,其中所述T细胞是稚T细胞、中枢记忆T细胞、效应记忆T细胞或它们的任意组合。

47. 根据权利要求41或42所述的用途,其中所述治疗包括向所述受试者肠胃外施用所述重组宿主细胞。

48. 根据权利要求41或42所述的用途,其中所述治疗包括向所述受试者施用多次剂量的所述重组宿主细胞。

49. 根据权利要求48所述的用途,其中所述治疗包括在各次施用之间以两周至四周的时间间隔施用多次剂量。

50. 根据权利要求41或42所述的用途,其中所述治疗包括以 10^7 个细胞/ m^2 至 10^{11} 个细胞/ m^2 的剂量将所述重组宿主细胞施用给所述受试者。

51. 根据权利要求41或42所述的用途,其中所述治疗还包括向所述受试者施用细胞因子。

52. 根据权利要求51所述的用途,其中所述细胞因子是IL-2、IL-15、IL-21或它们的任意组合。

53. 根据权利要求52所述的用途,其中所述细胞因子是IL-2,并且所述治疗包括将所述细胞因子与所述重组宿主细胞同时或顺序地施用给所述受试者。

54. 根据权利要求53所述的用途,其中所述治疗包括将所述细胞因子与所述重组宿主细胞按顺序施用,条件是在细胞因子施用之前,向所述受试者施用至少三次或四次的所述重组宿主细胞。

55. 根据权利要求52所述的用途,其中所述细胞因子是IL-2,并且所述治疗包括皮下施用所述细胞因子。

56. 根据权利要求41或42所述的用途,其中所述治疗还包括向所述受试者施用免疫抑制疗法。

57. 根据权利要求56所述的用途,其中所述免疫抑制疗法选自钙神经素抑制剂,皮质类固醇,微管抑制剂,低剂量的霉酚酸前药,或它们的任意组合。

58. 根据权利要求41或42所述的用途,其中所述受试者已经接受非清髓性或清髓性造血细胞移植。

59. 根据权利要求58所述的用途,其中所述治疗包括在非清髓性造血细胞移植后至少三个月,向所述受试者施用所述重组宿主细胞。

60. 根据权利要求58所述的用途,其中所述治疗包括在清髓性造血细胞移植后至少两个月,向所述受试者施用所述重组宿主细胞。

61. 一种单位剂型,其包含权利要求20或21所述的重组宿主细胞。

62. 根据权利要求61所述的单位剂型,其中所述重组宿主细胞为 10^7 个细胞/ m^2 至 10^{11} 个细胞/ m^2 的剂量。

63. 根据权利要求20或21所述的重组宿主细胞,其用于急性髓细胞白血病(AML)的过继性免疫疗法。

特异性针对WT-1的T细胞免疫疗法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 依据35U.S.C.§119(e),本申请要求于2014年8月04日提交的美国临时申请号62/033,045和于2015年5月21日提交的美国临时申请号62/164,783的权益,所述申请通过引用完全结合在本文中。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 以文本格式代替纸质拷贝提供与本申请相关的序列表,该序列表由此通过引用并入说明书中。含有序列表的文本文件的名称为360056_427WO_SEQUENCE_LISTING.txt。该文本文件为138KB,创建于2015年7月29日,并且通过EFS-Web以电子形式提交。

[0005] 背景

技术领域

[0006] 本公开内容一般涉及特异性针对与过度增生疾病相关的抗原的高亲和性的或增强的亲和性的T细胞受体(TCRs)。更具体地,本公开内容涉及对人肾母细胞瘤(Wilms tumor)蛋白1(WT-1)表位有高亲和性或增强的亲和性的TCRs,表达所述WT-1-特异性的TCRs的T细胞,编码其的核酸,和用于治疗其中细胞过表达WT-1的疾病或病症(如用于癌症)的组合物。

[0007] 相关技术的描述

[0008] T细胞受体(TCR)基因疗法是一种新兴的治疗方法,其设计为克服与常规T细胞过继性免疫疗法相关的障碍,诸如分离、表征和增殖肿瘤抗原特异性T细胞所需要的大量时间和劳动力(Schmitt等人,Hum.Gene Ther.20:1240,2009)。另一个障碍是大部分鉴定的可以被常规T细胞免疫疗法靶向的肿瘤抗原是过表达的自身蛋白,因此,特异性针对这些抗原的高亲和性T细胞通常在胸腺选择过程中被清除,并且在外周组库(repertoire)中是罕见的或不存在的。

[0009] 正在开发增强意欲用在TCR基因疗法中的TCR的亲和性的策略(Udyavar等人,J.Immunol.182:4439,2009;Zhao等人,J.Immunol.179:5845,2007;Richman和Kranz,Biomol.Eng.24:361,2007)。这些方法通常需要产生突变的TCR基因的文库,然后筛选赋予更高的针对靶标肽与主要组织相容性复合物(MHC)配体的复合物的亲和力的突变。突变通常靶向已知与肽(CDR3)和/或MHC(CDR1/2)相互作用的互补决定区(CDRs)(Wucherpfennig等人,Cold Spring Harb.Perspect.Biol.2:a005140,2010)。但是,MHC接触残基的变化可能在临床状态下产生危险,原因在于这可能不依赖于肽增加针对MHC的亲合力或者增加交叉反应的可能性(脱靶效应)。这一观念已经通过试验结果强调,在试验中,将表达含有CDR2突变的TCR的T细胞输注到患者中,并且介导来自与在心脏中表达的全异自身抗原的出乎意料的交叉反应性的快速且致死性的毒性(Cameron等人,Sci.Transl.Med.5:197ra103,2013;Linette等人,Blood 122:863,2013)。某些用于靶向特异性的CDR残基进行氨基酸置换的可行的方法限制产生的文库的多样性,原因在于这些通常受母本CDR序列的长度所限制。相反,天然过程通常在胸腺中产生更大的多样性,在胸腺中,在T细胞发育过程中有活性

的V(D)J重组机制导致TCR基因重排,这产生高度多样性的CDR,特别是CDR3,它们在长度和氨基酸组成二者中都不同。

[0010] 实现最大临床效果(将伴有最低免疫学毒性)的靶向性T细胞疗法的策略涉及鉴定这样的疾病相关抗原,所述抗原例如在恶性细胞隔室中具有高表达并且被其呈递,但是在正常的组织中没有明显的表达。例如,已经描述了一些与急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia,AML)相关的抗原,并且已经证明肾母细胞瘤蛋白1(WT-1)在大部分AML患者的白血病干细胞(LSC)隔室中以比在生理学造血干细胞(HSCs)中显著更高的水平表达。在临床试验中,利用过继性T-细胞转移和肽接种而靶向WT-1(参见,例如,美国专利号7,342,092;7,608,685;7,622,119)。另外,已经报道WT-1表达是微小残留病变(minimal residual disease)的标记,原因在于在形态缓解时在AML患者中增加的转录水平预示明显的临床复发(Inoue等人,Blood 84:3071,1994;Ogawa等人,Blood 101:1698,2003)。

[0011] 由于WT-1是一种细胞内(通常是核)蛋白,因此,靶向WT-1的免疫疗法通常使用细胞方法,旨在产生WT-1-特异性的CD8+细胞毒性T淋巴细胞(CTL)反应,该反应识别由I类MHC分子呈递在细胞表面上的肽。为了诱导CTL反应,通常用蛋白酶体或核内体/溶酶体降解细胞内蛋白,得到的肽片段结合I类或II类MHC分子。这些肽-MHC复合物展示在细胞表面上,在此处,经由肽-MHC-TCR相互作用,它们被T细胞结合。来源于WT-1蛋白的肽可以用于在人的疫苗中,用来诱导能够杀伤肿瘤细胞的人白细胞抗原(HLA)-限制性细胞毒性CD8+T细胞。然而,由于WT-1是自身蛋白,该免疫可能仅引发具有低亲和性TCR的T细胞的反应。另外,在患有恶性血液肿瘤(hematological malignancy)和实体瘤的患者中,可检测到针对WT-1的抗体是,这表明WT-1可能是高度免疫原性的抗原(Gaiger等人,Clin.Cancer Res.7(Suppl.3):761,2001)。

[0012] 清楚地,对于用作针对多种癌症(如白血病和肿瘤)的高特异性WT-1靶向性免疫疗法的替代TCR基因疗法存在需求。本发明公开的实施方案解决这一需求并且提供其他相关的优点。

[0013] 简要概述

[0014] 按照某些实施方案,本公开内容提供一种结合蛋白(例如,免疫球蛋白超家族结合蛋白,TCR等),其具有:(a)具有SEQ ID NO.:23所示的CDR1氨基酸序列,SEQ ID NO.:24所示的CDR2氨基酸序列和SEQ ID NOS.:25,26,32,38,44,50和51中任一项所示的CDR3氨基酸序列的 α -链可变(V_α)结构域,和/或 β -链可变(V_β)结构域;或(b)(a)的 V_α 结构域和具有SEQ ID NO.:27所示的CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO.:28所示的CDR2氨基酸序列和/或SEQ ID NO.:29所示的CDR3氨基酸序列的 V_β 结构域;其中所述结合蛋白能够以高亲和力结合WT1-衍生的肽:人白细胞抗原(HLA)复合物,例如,以小于或等于约8nM的 K_d 结合诸如RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:16):人白细胞抗原(HLA)复合物。

[0015] 在某些实施方案中,所述免疫球蛋白超家族结合蛋白包含:(a)与SEQ ID NO.:1或2中任一项所示的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性的 α -链可变(V_α)结构域,和/或 β -链可变(V_β)结构域;或(b) V_α 结构域,和与SEQ ID NO.:9所示的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性的 V_β 结构域;或(c)(a)的 V_α 结构域和/或(b)的 V_β 结构域;其中所述结合蛋白能够以小于或等于约5nM的 K_d 结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:16):HLA复合物。

[0016] 在另一方面,提供一种高亲和性重组T细胞受体(TCR),其包含 α -链和 β -链,其中所

述 α -链包含与SEQ ID NO.:1或2所示的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的V _{α} 结构域,其中所述TCR独立于CD8或在不存在CD8的条件下结合RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16)::HLA-A*201复合物。

[0017] 在另一方面,提供一种用于治疗过度增生病症的方法,所述方法包括向有此需要的人受试者施用包含种前述的特异性针对人肾母细胞瘤蛋白1(WT-1)的结合蛋白或高亲和性重组TCR中的任一种的组合物。在另一方面,提供用于治疗以在患有过度增生病症的受试者的细胞中的WT-1过表达为特征的病况的过继免疫治疗方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的表达前述的结合蛋白或高亲和性重组TCR中的任一种的重组宿主细胞。

[0018] 在某些实施方案中,提供的方法用于治疗过度增生病症,所述过度增生病症为恶性血液肿瘤或实体瘤。例如,要治疗的恶性血液肿瘤可以是急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia,ALL),急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia AML),慢性髓细胞白血病(chronic myelogenous leukemia,CML),慢性嗜酸性粒细胞白血病(chronic eosinophilic leukemia,CEL),骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome,MDS),非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma,NHL),或多发性骨髓瘤(multiple myeloma,MM)。要治疗的示例性的实体癌可以是胆囊癌(biliary cancer),膀胱癌(bladder cancer),骨骼和软组织癌(bone and soft tissue carcinoma),脑瘤(brain tumor),乳腺癌(breast cancer),宫颈癌(cervical cancer),结肠癌(colon cancer),结直肠腺癌(colorectal adenocarcinoma),结直肠癌(colorectal cancer),硬纤维瘤(desmoid tumor),胚胎性癌(embryonal cancer),子宫内膜癌(endometrial cancer),食管癌(esophageal cancer),胃癌(gastric cancer),胃腺癌(gastric adenocarcinoma),多形性成胶质细胞瘤(glioblastoma multiforme),妇科肿瘤(gynecological tumor),头颈鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma),肝癌(hepatic cancer),肺癌(lung cancer),恶性黑素瘤(malignant melanoma),骨肉瘤(osteosarcoma),卵巢癌(ovarian cancer),胰腺癌(pancreatic cancer),胰腺管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma),原发性星形细胞瘤(primary astrocytic tumor),原发性甲状腺癌(primary thyroid cancer),前列腺癌(prostate cancer),肾癌(renal cancer),肾细胞癌(renal cell carcinoma),横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma),皮肤癌(skin cancer),软组织肉瘤(soft tissue sarcoma),睾丸生殖细胞瘤(testicular germ-cell tumor),泌尿道上皮癌(urothelial cancer),子宫肉瘤(uterine sarcoma),或子宫癌(uterine cancer)。

[0019] 参考下述详细描述和附图,本文所述的发明的这些和其他方面以及实施方案将变得清楚。在本说明书中提及的和/或在申请数据单中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利公开都通过引用整体并入本文,如同将每篇单独地并入。如果必要的话,可以修改本发明的方面和实施方案,以采用不同的专利、申请和公开的理念来提供其他实施方案。

[0020] 附图简述

[0021] 图1显示来自与WT-1肽:HLA-A四聚体结合的WT-1特异性TCR滴定的平衡结合曲线。从多于50名捐献者的外周组库产生特异性针对WT-1¹²⁶⁻¹³⁴(具有氨基酸序列RMFPNAPYL,如SEQ ID NO.:16所示)的T细胞克隆,并且分析一些候选的高亲和性T细胞克隆,以确定它们

的相对亲和力。将每种WT-1-特异性T细胞克隆用WT-1¹²⁶⁻¹³⁴肽/MHC四聚体(“WT1四聚体”)染色,并且通过流式细胞术分析,并使用FlowJo软件(Treestar)确定四聚体染色的平均荧光强度。使用在一定浓度范围(1-33nM)内的PE-缀合的四聚体的2-倍稀释液进行K_D测量。通过非线性回归,由结合曲线确定表观K_D值,其作为产生半最大结合(Bmax)的配体浓度。

[0022] 图2A和2B显示评估的高亲和性TCR克隆可能有效地竞争性抑制内源性TCR链并且独立于CD8结合WT-1¹²⁶⁻¹³⁴四聚体。从由针对该WT-1表位具有最高亲和力的外周组库产生的三个TCR(C4,P1,P22)产生密码子优化的包含TCR α 和TCR β 的TCR α -P2A- β 构建体。(A)将这些构建体转导到PBMC中,并且通过流式细胞术评估在所转导的细胞群体中WT-1¹²⁶⁻¹³⁴四聚体染色细胞的百分数,四聚体染色在Y轴上表示,并且各自的转基因 β -链染色在X轴上表示。转导的群体计算为表达转基因TCR β 链的细胞的总百分数减去在非转导的相同PBMC培养物中内源性表达所述TCR β 链的T细胞的百分数。(B)通过测量在转导的PBMC群体内在转导的CD4⁺细胞(CD8阴性,CD8⁻)相对于CD8⁺细胞上的WT-1四聚体染色来评估在不存在CD8时不同TCR的四聚体结合。这些TCR克隆中的一种,即C4,表现出对CD4⁺CD8⁻细胞的最高程度的四聚体结合。

[0023] 图3A-3C显示对于多种不同的C4-衍生的TCR构建体的TCR表面表达的比较。三种不同的C4-衍生的TCR构建体(每种具有来自猪捷申病毒(teschovirus)(P2A)的连接 α 和 β 链的2A元件)具有下述特征:(1)C4 α -P2A- β (C4 α β WT),(2)C4 α -P2A- β (C4 α β CO)的密码子优化的版本,和(3)密码子优化的TCR的变体,其中C4 β ,而不是C4 α ,在P2A元件之前(C4 β α CO)。(A)检测表面表达,作为WT-1:HLA-A四聚体结合的量度。(B)检验C4 α -P2A- β CO与C4 β -P2A- α CO构建体之间随时间的TCR表达的不同,并且观察到及于T细胞周期末期时更明显,此时内源性TCR以较高水平表达。(C)显示C4 TCR β α 构建体的示意图。

[0024] 图4A-4C显示通过饱和诱变鉴定的C4 TCR的增强亲和性变体的检测和分析。(A)转导PBMC以表达野生型C4 α -P2A-C4 β 构建体或增强亲和性的C4 α -P2A-C4- β (DLT)构建体;通过细胞分选将转导的细胞分离,扩增,并且在表达相等水平的引入的TCR的细胞上分析相对WT-1¹²⁶⁻¹³⁴四聚体染色(如通过VB17染色测量的)。(B)将分选的表达野生型C4 α -P2A-C4 β 构建体或增强亲和性的C4 α -P2A-C4- β (DLT)的PBMC用WT-1肽/MHC四聚体染色,通过流式细胞术分析,并用FlowJo软件(Treestar)确定四聚体染色的平均荧光强度。使用在一定浓度范围的PE-缀合的四聚体的2-倍稀释液进行K_D测量。通过非线性回归,由结合曲线确定表观K_D值,其作为产生半数最大结合的配体浓度。(C)将分选的表达野生型C4 α -P2A-C4 β 构建体或增强亲和性的C4 α -P2A-C4- β (DLT)的PBMC与负载⁵¹铬(⁵¹Chromium)的靶细胞一起温育,如所示,以减少浓度的WT-1¹²⁶⁻¹³⁴肽脉冲(pulsed),并且作为最大铬释放的百分数检测特异性的T细胞介导的杀伤。

[0025] 图5显示转导了C4 α β (DLT)TCR的PBMC表现出对天然呈递WT-1抗原的肿瘤细胞的增强的杀伤。使用HLA-A2阴性K562肿瘤细胞系或转导表达HLA-A2的K562细胞作为用于表达野生型C4 α -P2A-C4 β 构建体或增强亲和性的C4 α -P2A-C4- β (DLT)TCR的PBMC的靶细胞。通过流式细胞术测量肿瘤细胞中切割的胱天蛋白酶(caspase)-3来确定肿瘤杀伤。

[0026] 图6A-6C显示产生并筛选人激动剂选择的TCR β 文库的结果。从脐带血纯化CD34⁺HPCs,利用慢病毒转导C4 α -IRES-GFP或C4 α β ,并且在存在1 μ g/mL WT-1肽的条件下与OP9-A2-DL1细胞系共同培养。(A)在第31天分析培养物的CD3和CD27表达。(B)在第34天,分析培

养物的CD27和V β 17表达,并且分选大约 2.5×10^5 个V β 17+CD27+细胞用于产生TCR β 文库。(C)产生V β 17-C β 1和V β 17-C β 2文库,转导入H9.CD8-C4 α 细胞系中,然后分选转导的C4 α -GFP+V β 17+细胞。然后将细胞用WT-1-四聚体分选两次,并且通过流式细胞术分析四聚体和V β 17染色。

[0027] 图7显示转导表达C4 β TCR构建体的捐赠者来源的病毒特异性CD8T细胞在9名白血病患者中的持久性。将供体T细胞用来自EBV或CMV的肽刺激,以特异性激活具有中枢记忆表型的病毒特异性T细胞群体,并且使慢病毒转导优先靶向这些被激活的并且由此快速分化的细胞。将细胞用C4 β TCR构建体转导,并且通过流式细胞术细胞分选法分选对HLA-A2/WT-1和HLA-A2/病毒肽-特异性四聚体二者染色为阳性的T细胞。将分选的细胞增殖,并且在朝下的箭头所示的时间点输注到白血病患者中。

[0028] 图8A-8C显示证明功能性WT-1-特异性TCR的细胞表面稳定性的结果。(A)将供体PBMC用呈递EBV肽GLCTLVAML (SEQ ID NO.:127)的树突细胞刺激,24小时后用C4 TCR构建体转导,并且如所示的,在第12天分选WT_1四聚体⁺的、EBV四聚体⁺的、或双阳性的群体。(B)在分选后立即或在另外体外培养12天后,分析分选的群体。(C)将供体PBMC用呈递EBV肽GLCTLVAML (SEQ ID NO.:127)的DC刺激,然后在培养12天后分选EBV四聚体⁺的T细胞。然后,将分选出的细胞在刺激后第1天用或不用C4 TCR转导再刺激,并且在第6天通过流式细胞术进行分析。

[0029] 详述

[0030] 在一方面,本公开内容提供具有针对与主要组织相容性复合物(MHC)(例如,人白细胞抗原,HLA)缔合的WT-1肽抗原具有高亲和性的T细胞受体(TCRs),例如,其用在过继免疫疗法中用于治疗癌症。作为背景,由于肿瘤是由之前正常的组织产生的,因此,大部分用于基于T细胞的免疫疗法的肿瘤靶标是自身抗原。例如,所述肿瘤相关的抗原(TAAs)可以在癌细胞中以高水平表达,但是在其他细胞中可以不表达或可以最低程度表达。在胸腺中的T细胞发育过程中,允许与自身抗原微弱结合的T细胞在胸腺中存活,其可以进行进一步的发育,以增加针对外来侵入者的特异性,而与自身抗原强结合的T细胞则被免疫系统清除,原因在于这些细胞将引起不需要的自身免疫反应。因此,通过T细胞结合抗原的相对能力来分选T细胞,从而使免疫系统准备响应外来侵入者(即,识别非自身抗原),与此同时防止自身免疫反应(即,识别自身抗原)。这种耐受性机制限制能够以高亲和力识别肿瘤(自身)抗原的天然存在的T细胞,并且因此清除掉将有效地消除肿瘤细胞的T细胞。因而,分离具有特异性针对肿瘤抗原的高亲和性TCR的T细胞是困难的,原因在于这些细胞基本上被免疫系统清除了。

[0031] 本公开内容的一个优点在于提供特异性针对WT-1肽的高亲和性或增强亲和性的TCR,其中表达所述TCR的细胞能够独立于CD8或在CD8不存在时结合WT-1::HLA复合物,与内源性TCR相比,能够更有效地与CD3蛋白缔合,或者能够实现二者。在某些实施方案中,特异性针对WT-1肽的增强亲和性的TCR包含SEQ ID NO.:7或8所示的T细胞受体(TCR) α -链,和SEQ ID NO.:12或13所示的TCR β -链可变(V β)结构域,其中所述增强亲和性的TCR能够以小于或等于约3nM的K_d结合RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA复合物,或者,其中,与由SEQ ID NO.:5或6的 α -链或SEQ ID NO.:12或13的 β -链构成的TCR相比,所述增强亲和性的TCR以减小的k_{off}速率与RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA复合物解离。

[0032] 在某些实施方案中,本文所述的组合物和方法将对与WT-1过表达例如,处于以统计学显著方式在量级上大于在正常的或无疾病的细胞中可检测的WT-1表达水平的水平的可检测的WT-1表达)相关的疾病或病况的治疗有治疗功效。(所述疾病包括多种形式的过度增生病症,诸如恶性血液肿瘤和实体癌。本文中描述了这些和相关的应用的非限制性实例,并且包括WT-1抗原特异性的T细胞反应的体外、离体和体内刺激,诸如通过使用表达特异性针对WT-1肽(例如,RMFPNAPYL,SEQ ID NO.:16)的增强亲和性的TCR的重组T细胞。

[0033] 在更详细陈述本公开内容之前,对要在本文中使用的某些术语提供定义对于其理解可以是有帮助的。贯穿本公开内容陈述另外的定义。

[0034] 在本说明书中,任意浓度范围、百分比范围、比例范围、或整数范围要理解为包括所引用的范围内任意整数的值,并且在适当的时候,包括其分数(诸如整数的十分之一和百分之一),除非另外指明。此外,本文关于任意物理特征(诸如聚合物亚基、尺寸或厚度)引用的任意数值范围要理解为包括所引用范围的任意整数,除非另外指明。用于本文时,术语“约”意为指出的范围、值、或结构的 $\pm 20\%$,除非另有指示。应该理解,本文所使用的术语“一个(a)”和“一个(an)”是指“一个以上”列举的组分。备选方案(例如,“或”)的使用应该被理解为意为备选方案中的一个、二者或其任意组合。如本文使用的,术语“包括,”“具有”和“包含”同义使用,所述术语和其变化形式意在被理解为不受限制的。

[0035] 另外,应该理解,由本文所述的结构和取代基的多种组合衍生的个体化合物、或多组化合物被本申请以同每种化合物或每组化合物单独阐述相同的程度公开。因此,选择特定的结构或特定的取代基在本公开内容的范围之内。

[0036] 术语“基本上由……组成”将权利要求的范围限制为指定的材料或步骤,或限制为不实质性影响要求的发明的基本特征的那些。例如,当结构域、区域、模块或蛋白的氨基酸序列包括联合起来组成结构域、区域、模块或蛋白的长度的至多20%(例如,至多15%,10%,8%,6%,5%,4%,3%,2%或1%),并且基本上不影响所述一个或多个结构域、一个或多个区域、一个或多个模块或蛋白的活性(例如,对结合蛋白的靶标结合活性)(即,不使活性减少超过50%,诸如不超过40%,30%,25%,20%,15%,10%,5%,或1%)的延伸、缺失、突变或它们的组合(例如,在氨基端或羧基端或在结构域之间的氨基酸)时,蛋白结构域、区域或模块(例如,结合结构域、铰链区、接头分子)或蛋白(其可以具有一个或多个结构域、区域或模块)“由特定的氨基酸序列组成”。

[0037] 用于本文时,“免疫系统细胞”意指免疫系统的起源于骨髓中的造血干细胞的任意细胞,其产生两种主要的谱系:骨髓祖细胞(其产生骨髓细胞,诸如单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、巨核细胞(meagakaryocytes)和粒细胞)和淋巴祖细胞(其产生淋巴细胞,诸如T细胞、B细胞和天然杀伤(NK)细胞)。示例性的免疫系统细胞包括CD4+T细胞、CD8+T细胞、CD4-CD8-双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞,调节性T细胞、天然杀伤细胞和树突细胞。巨噬细胞和树突细胞可以称为“抗原呈递细胞”或“APC”,其是在APC表面上与肽复合的主要组织相容性复合物(MHC)受体与T细胞表面上的TCR相互作用时能够激活T细胞的专门的细胞。

[0038] “主要组织相容性复合物”(MHC)是指递送肽抗原至细胞表面的糖蛋白。I类MHC分子是异二聚体,其具有跨膜 α 链(具有三个 α 结构域)和非共价关联的 $\beta 2$ 微球蛋白。II类MHC分子由两个跨膜糖蛋白 α 和 β 构成,二者都跨膜。各个链具有两个结构域。I类MHC分子将源自胞质中的肽递送至细胞表面,在那里,肽:MHC复合物被CD8⁺T细胞识别。II类MHC分子将源自囊

泡系统中的肽递送至细胞表面,在那里它们被CD4⁺T细胞识别。人MHC称为人白细胞抗原(HLA)。

[0039] “T细胞”是在胸腺中成熟并且产生T细胞受体(TCRs)的免疫系统细胞。T细胞可以是首次用于免疫的(naïve)(没有暴露于抗原;与T_{CM}相比,增加的CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127和CD45RA表达和减少的CD45RO表达)、记忆T细胞(T_M)(经历过抗原的并且是长期存在的)和效应细胞(经历过抗原的,细胞毒性的)。T_M可以进一步分成下述亚组:中枢记忆T细胞(T_{CM},与稚T细胞相比,增加的CD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45RO和CD95表达,和减少的CD54RA表达),和效应记忆T细胞(T_{EM},与稚T细胞或T_{CM}相比,减少的CD62L、CCR7、CD28、CD45RA表达和增加的CD127表达)。效应T细胞(T_E)是指经历过抗原的CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞,与T_{CM}相比,其具有减少的CD62L、CCR7、CD28表达,并且是颗粒酶(granzyme)和穿孔素(perforin)阳性的。其他示例性的T细胞包括调节性T细胞,诸如CD4⁺CD25⁺(Foxp3⁺)调节性T细胞和Treg17细胞,以及Tr1, Th3, CD8⁺CD28⁻, 和Qa-1限制性T细胞。

[0040] “T细胞受体”(TCR)是指能够特异性结合结合在MHC受体上的抗原肽的免疫球蛋白超家族成员(具有可变结合结构域、恒定结构域、跨膜区和短的细胞质尾;例如,参见Janeway等人,Immunobiology:The Immune System in Health and Disease,第3版,Current Biology Publications,p.4:33,1997)。TCR可以存在于细胞表面上或以可溶形式存在,并且通常由具有α和β链(也分别称为TCRα和TCRβ)或γ和δ链(也分别称为TCRγ和TCRδ)的异二聚体构成。如免疫球蛋白,TCR链(例如,α-链,β-链)的细胞外部分在N端包含两个免疫球蛋白结构域、可变结构域(例如,α-链可变结构域或V_α,β-链可变结构域或V_β;典型地基于Kabat编号的氨基酸1-116,Kabat等人,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services,Public Health Service National Institutes of Health,1991,第5版)和邻近细胞膜的一个恒定结构域(例如,α-链恒定结构域或C_α,典型地基于Kabat的氨基酸117-259,β-链恒定结构域或C_β,典型地基于Kabat的氨基酸117-295)。还如同免疫球蛋白,可变结构域包含由构架区(FRs)分隔的互补决定区(CDRs)(例如,参见Jores等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.U.S.A.87:9138,1990;Chothia等人,EMBO J.7:3745,1988;还参见Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.27:55,2003)。在某些实施方案中,TCR存在于T细胞(或T淋巴细胞)表面上,并且与CD3复合物缔合。用于本公开内容的TCR的来源可以来自多种动物物种,诸如人、小鼠、大鼠、兔或其他哺乳动物。

[0041] 在本领域中已知“CD3”是六条链的多蛋白复合体(参见Abbas和Lichtman,2003;Janeway等人,p172和178,1999)。在哺乳动物中,所述复合物包含CD3γ链、CD3δ链、两条CD3ε链,以及CD3ζ链的同型二聚体。所述CD3γ、CD3δ和CD3ε是含有单个免疫球蛋白结构域的免疫球蛋白超家族的高度相关的细胞表面蛋白。CD3γ、CD3δ和CD3ε链的跨膜区域带负电荷,其是允许这些链与带正电荷T细胞受体链关联的特征。CD3γ、CD3δ和CD3ε链的细胞内尾各自包含单个保守的基序(其称为免疫受体基于酪氨酸的激活基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif)或ITAM),而每个CD3ζ链包含三个保守的基序。不希望受理论限制,相信ITAM对于TCR复合物的信号传导能力是重要的。用在本公开内容中的CD3可以来自多种动物物种,包括人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。

[0042] 用于本文时,“TCR复合物”是指由CD3与TCR缔合形成的复合物。例如,TCR复合物可以由CD3γ链、CD3δ链、两个CD3ε链、CD3ζ链的同型二聚体、TCRα链和TCRβ链构成。备选地,

TCR复合物可以由CD3 γ 链、CD3 δ 链、两个CD3 ϵ 链、CD3 ζ 链的同型二聚体、TCR γ 链和TCR δ 链构成。

[0043] 用于本文时,“TCR复合物的组分”是指TCR链(即,TCR α ,TCR β ,TCR γ 或TCR δ),CD3链(即,CD3 γ ,CD3 δ ,CD3 ϵ 或CD3 ζ),或由两个以上TCR链或CD3链形成的复合物(例如,TCR α 和TCR β 的复合物,TCR γ 和TCR δ 的复合物,CD3 ϵ 和CD3 δ 的复合物,CD3 γ 和CD3 ϵ 的复合物,或TCR α 、TCR β 、CD3 γ 、CD3 δ 和两个CD3 ϵ 链的亚-TCR复合物)。

[0044] 用于本文时,“结合结构域”(还称为“结合区”或“结合结构部分”)是指具有特异性且非共价与靶标(例如,WT-1或WT-1肽:MHC复合物)缔合、联合、或组合的能力的分子或其部分(例如,肽,寡肽,多肽,蛋白)。结合结构域包括用于生物学分子、分子复合物(即,包含两种以上生物学分子的复合物)或其他目的靶标的任意天然存在的、合成的、半合成的或重组产生的结合配偶体(partner)。示例性的结合结构域包括单链免疫球蛋白可变区(例如,scTCR,scFv),受体胞外结构域,配体(例如,细胞因子,趋化因子),或合成的多肽,它们是针对它们特异性结合生物学分子、分子复合物或其他目的靶标的能力选择出来的。

[0045] 用于本文时,“特异性结合”或“特异性针对”是指结合蛋白(例如,TCR受体)或结合结构域(或其融合蛋白)与靶标分子以等于或大于 10^5M^{-1} (其等于该缔合反应的结合速率(on-rate) $[k_{\text{on}}]$:解离速率(off-rate) $[k_{\text{off}}]$ 的比例)的亲和力或 K_a (即,以1/M为单位的特定结合相互作用的平衡缔合常数)的缔合或联合,而不明显与样品中的任意其他分子或成分缔合或联合。结合蛋白或结合结构域(或其融合蛋白)可以分为“高亲和性”结合蛋白或结合结构域(或其融合蛋白)或“低亲和性”结合蛋白或结合结构域(或其融合蛋白)。“高亲和性”结合蛋白或结合结构域是指那些具有至少 10^7M^{-1} ,至少 10^8M^{-1} ,至少 10^9M^{-1} ,至少 10^{10}M^{-1} ,至少 10^{11}M^{-1} ,至少 10^{12}M^{-1} ,或至少 10^{13}M^{-1} 的 K_a 的结合蛋白或结合结构域。“低亲和性”结合蛋白或结合结构域是指那些具有至少多至 10^7M^{-1} ,多至 10^6M^{-1} ,多至 10^5M^{-1} 的 K_a 的结合蛋白或结合结构域。备选地,亲和力可以定义为以M为单位的特定结合相互作用的平衡解离常数(K_d)(例如, 10^{-5}M 至 10^{-13}M)。

[0046] 在某些实施方案中,受体或结合结构域可以具有“增强的亲和性”,这是指具有比野生型(或母本)结合结构域更强的与靶抗原的结合的选择的或改造的受体或结合结构域。例如,增强的亲和性可以是由于高于野生型结合结构域的针对靶抗原的 K_a (平衡缔合常数),由于小于野生型结合结构域的针对靶抗原的 K_d (解离常数),由于小于野生型结合结构域的针对靶抗原的解离速率(k_{off}),或它们的组合引起。在某些实施方案中,增强亲和性的TCR可以进行密码子优化,以增加在特定宿主细胞(如T细胞)中的表达(Scholten等人, Clin.Immunol.119:135,2006)。

[0047] 已知有多种测定用于鉴定本公开内容中特异性结合特定靶标的结合结构域,以及确定结合结构域或融合蛋白亲和性,诸如蛋白质印迹,ELISA,分析性超速离心,光谱学和表面等离子体共振(Biacore®)分析(参见,例如,Scatchard等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.51:660,1949;Wilson,Science295:2103,2002;Wolff等人,Cancer Res.53:2560,1993;和美国专利号5,283,173,5,468,614,或相当的文献)。

[0048] 术语“WT-1-特异性的结合蛋白”是指特异性结合WT-1或其肽的蛋白或多肽。在一些实施方案中,蛋白或多肽以处于或至少约特定的亲和力结合WT-1或其肽,诸如与MHC或HLA分子复合的WT-1肽,例如,在细胞表面上。在某些实施方案中,WT-1-特异性的结合蛋白

以小于约 10^{-8} M、小于约 10^{-9} M、小于约 10^{-10} M、小于约 10^{-11} M、小于约 10^{-12} M或小于约 10^{-13} M的 K_d 或以与本文提供的示例性WT-1特异性结合蛋白(诸如本文提供的任一种WT-1-特异性TCR)展现的亲合力大约相同、至少大约相同、或大于或大约处于该亲和力的亲合力(例如,通过相同的测定测量的)结合WT-1-衍生的肽:HLA复合物(或WT-1-衍生的肽:MHC复合物)。用于评估亲合力或表观亲合力或相对亲和力的测定是已知的。在某些实例中,通过评估与不同浓度的四聚体的结合,例如,使用标记的四聚体通过流式细胞术进行,来测量针对TCR的表观亲合力。在一些实例中,使用在一定浓度范围的标记的四聚体的2-倍稀释液测量TCR的表观 K_d ,然后通过非线性回归确定结合曲线,表观 K_d 被确定为产生半数最大结合的配体浓度。在某些实施方案中,WT-1-特异性的结合蛋白包含WT-1-特异性的免疫球蛋白超家族结合蛋白或其结合部分。

[0049] 术语“WT-1结合结构域”或“WT-1结合片段”是指WT-1-特异性结合蛋白负责特异性WT-1结合的结构域或部分。单独的WT-1-特异性结合结构域(即,没有WT-1-特异性结合蛋白的任意其他部分)可以是可溶的,并且可以以小于约 10^{-8} M、小于约 10^{-9} M、小于约 10^{-10} M、小于约 10^{-11} M、小于约 10^{-12} M或小于约 10^{-13} M的 K_d 结合WT-1。示例性的WT-1-特异性结合结构域包括本文所述的WT-1-特异性的scTCR(例如,单链 $\alpha\beta$ TCR蛋白,如 $V\alpha$ -L- $V\beta$, $V\beta$ -L- $V\alpha$, $V\alpha$ -C α -L- $V\alpha$, 或 $V\alpha$ -L- $V\beta$ -C β , 其中 $V\alpha$ 和 $V\beta$ 分别是TCR α 和 β 可变结构域,C α 和C β 分别是TCR α 和 β 恒定结构域,并且L是接头)和scFv片段,其可以来源于抗-WT-1TCR或抗体。

[0050] “WT-1抗原”或“WT-1肽抗原”是指长度范围在约7个氨基酸至约15个氨基酸的天然的或合成制备的WT-1蛋白部分,其可以与MHC(例如,HLA)分子形成复合物,并且所述复合物可以与特异性针对WT-1肽:MHC(例如,HLA)复合物的TCR结合。充分确定了由抗原呈递细胞(APC)(诸如树突细胞、巨噬细胞、淋巴细胞或其他细胞类型)进行的抗原加工的原理,以及通过APC向T细胞抗原呈递(包括在免疫相容性(例如,共有至少一个与抗原呈递相关的MHC基因的等位基因形式)APC与T细胞之间的主要组织相容性复合物(MHC)-限制性呈递)的原理(例如,参见Murphy, Janeway's Immunobiology(第8版)2011Garland Science, NY;第6、9和16章)。例如,起始于细胞溶质的加工的抗原肽(例如,肿瘤抗原,细胞内病原体)长度通常为约7个氨基酸至约11个氨基酸,并且将与I类MHC分子缔合,而在囊泡系统中加工的肽(例如,细菌的、病毒的)的长度在约10个氨基酸至约25个氨基酸之间变化,并且与II类MHC分子缔合。由于WT-1是内部宿主蛋白,因此,WT-1抗原肽将在I类MHC的情形中被呈递。在具体的实施方案中,WT-1肽是RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:16),已知其与人I类HLA缔合(并且,更具体地,与等位基因HLA-A*201缔合)。

[0051] “接头”是指连接两个蛋白、多肽、肽、结构域、区域或基序的氨基酸序列,并且可以提供与两个亚结合结构域的相互作用相容的间隔臂功能,从而使得到的多肽保留特定的针对靶分子的结合亲和性(例如,scTCR)或保留信号传导活性(例如,TCR复合物)。在某些实施方案中,接头由约两个至约35个氨基酸构成,例如,或约四个至约20个氨基酸或约八个至约15个氨基酸或约15个至约25个氨基酸构成。

[0052] “连接氨基酸”或“连接氨基酸残基”是指在多肽的两个相邻的基序、区域或结构域之间(诸如在结合结构域与相邻的恒定结构域之间或在TCR链与相邻的自切割肽之间)的一个或多个(例如,约2-10个)氨基酸残基。连接氨基酸可以由融合蛋白的构建设计得到(例如,由在构建编码融合蛋白的核酸分子的过程中使用限制性酶位点产生的氨基酸残基)。

[0053] “改变的结构域”或“改变的蛋白”是指与野生型基序、区域、结构域、肽、多肽或蛋白(例如,野生型TCR α 链,TCR β 链,TCR α 恒定结构域,TCR β 恒定结构域)具有至少85%(例如,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,99.1%,99.2%,99.3%,99.4%,99.5%,99.6%,99.7%,99.8%,99.9%)的非全同序列同一性(non-identical sequence identity)的基序、区域、结构域、肽、多肽或蛋白。

[0054] 用于本文时,“核酸”或“核酸分子”是指下述中的任一种:脱氧核糖核酸(DNA),核糖核酸(RNA),寡核苷酸,例如通过聚合酶链式反应(PCR)或通过体外翻译产生的片段,以及通过连接、切断、内切酶作用或外切酶作用中的任一种产生的片段。在某些实施方案中,本公开内容的核酸通过PCR产生。核酸可以由单体构成,所述单体是天然存在的核苷酸(诸如脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸)、天然存在的核苷酸的类似物(例如,天然存在的核苷酸的 α -对应体形式)或二者的组合。修饰的核苷酸可以在糖结构部分、或嘧啶或嘌呤碱基结构部分中具有修饰或替代糖结构部分、或嘧啶或嘌呤碱基结构部分。核酸单体可以通过磷酸二酯键或所述键的类似物连接。磷酸二酯键的类似物包括硫代磷酸酯,二硫代磷酸酯,硒代磷酸酯(phosphoroselenoate),二硒代磷酸酯(phosphorodiselenoate),苯胺基硫代磷酸酯(phosphoroanilothioate),苯胺基磷酸酯(phosphoranilidate),氨基磷酸酯(phosphoramidate)等。核酸分子可以是单链的或双链的。

[0055] 术语“分离的”意指从其原环境(例如,当其天然存在时的天然环境)去除的物质。例如,存在于活动物中的天然存在的核酸或多肽不是分离的,但是与在天然系统中的一些或全部共存的物质分离的相同核酸或多肽是分离的。所述核酸可以是载体的一部分和/或所述核酸或多肽可以是组合物(例如,细胞裂解物)的一部分,并且仍然是分离的,原因在于所述载体或组合物不是所述核酸或多肽的天然环境的一部分。术语“基因”意指参与产生多肽链的DNA片段;其包括在编码区之前和之后的区域,即“前导和尾区(trailer)”以及在各个编码片段(外显子)之间的间插序列(内含子)。

[0056] 用于本文时,术语“重组子”是指已经通过引入外源核酸分子进行修饰的细胞、微生物、核酸分子或载体,或者是指已经改变使得内源性核酸分子或基因的表达受到控制的、不受调节的或组成型的细胞或微生物,其中所述改变或修饰可以通过基因工程引入。遗传改变可以包括,例如,引入编码一种或多种蛋白或酶的核酸分子(其可以包括表达控制元件,诸如启动子)的修饰,或引入其他核酸分子添加、缺失、置换或细胞的遗传物质的其他功能性破坏或向细胞的遗传物质进行添加的修饰。示例性的修饰包括与参比或母本分子相比,在异源或同源多肽的编码区或其功能性片段中的那些修饰。

[0057] 用于本文时,“突变”是指与参比或野生型核酸分子或多肽分子相比分别在核酸分子或多肽分子的序列中的变化。突变可以导致一些不同类型的序列变化,包括一个或多个核苷酸或一个或多个氨基酸的置换、插入或缺失。在某些实施方案中,突变是一个或三个密码子或氨基酸的置换、一个至约5个密码子或氨基酸的缺失或它们的组合。

[0058] “保守置换”在本领域中被认为是一个氨基酸置换为另一个具有相似的性质的氨基酸。在本领域中示例性的保守置换是公知的(参见,例如WO 97/09433,第10页;Lehninger,Biochemistry,第2版;Worth Publishers,Inc.NY,NY,第71-77页,1975;Lewin,Genes IV,Oxford University Press,NY and Cell Press,Cambridge,MA,第8页,1990)。

[0059] 术语“构建体”是指包含重组核酸分子的任意多核苷酸。构建体可以存在于载体

(例如,细菌载体、病毒载体)中,或者可以整合在基因组中。“载体”是能够转运另一种核酸分子的核酸分子。载体可以是,例如,质粒、粘粒、病毒、RNA载体或线性的或环形的DNA或RNA分子,它们可以包含染色体的、非染色体的、半合成的或合成的核酸分子。示例性的载体是能够自主复制(附加型载体)或表达与其连接的核酸分子(表达载体)的那些载体。

[0060] 病毒载体包括逆转录病毒(retrovirus)、腺病毒(adenovirus)、细小病毒属(parvovirus)(例如,腺伴随病毒(adeno-associated viruses))、冠状病毒(coronavirus)、负链RNA病毒(如正粘病毒(ortho-myxovirus)(例如,流感病毒))、棒状病毒(rhabdovirus)(例如,狂犬病和水疱性口炎病毒(rabies and vesicular stomatitis virus))、副粘病毒属(paramyxovirus)(例如,麻疹(measles)和仙台病毒(Sendai))、正链RNA病毒(如微小核糖核酸病毒(picornavirus)和甲病毒属(alphavirus))、以及双链DNA病毒(包括腺病毒)、疱疹病毒(herpesvirus)(例如,1型和2型单纯疱疹病毒(Herpes Simplex virus),EB病毒(Epstein-Barr virus),巨细胞病毒(cytomegalovirus))和痘病毒(poxvirus)(例如,痘苗(vaccinia),禽痘(fowlpox)和金丝雀痘(canarypox))。其他病毒包括例如诺沃克病毒(Norwalk virus)、囊膜病毒(togavirus)、黄病毒属(flavivirus)、呼肠孤病毒(reoviruses)、乳多泡病毒(papovavirus)、嗜肝性DNA病毒(hepadnavirus)和肝炎病毒(hepatitis virus)。逆转录病毒的实例包括禽造白细胞组织增生-肉瘤(avian leukosis-sarcoma),哺乳动物C型、B型病毒、D型病毒,HTLV-BLV组,慢病毒属(lentivirus),泡沫病毒属(spumavirus)(Coffin,J.M.,Retroviridae:The viruses and their replication,In Fundamental Virology,第三版,B.N.Fields等人,Eds.,Lippincott-Raven Publishers,Philadelphia,1996)。

[0061] 用于本文时,“慢病毒载体”意指用于基因递送的基于HIV的慢病毒载体,其可以是可整合的(integrative)或不可整合的(non-integrative),具有较大的包装能力,并且可以转导一系列不同的细胞型。慢病毒载体通常在向生产细胞中瞬时转染三种(包装、包封和转移)或更多种质粒后产生。如同HIV,慢病毒载体通过病毒表面糖蛋白与细胞表面上的受体的相互作用进入靶细胞。一旦进入,病毒RNA进行反转录,这由病毒反转录酶复合物调节。反转录的产物是双链线性病毒DNA,其是用于病毒整合到被感染的细胞的DNA中的底物。

[0062] 术语“可操作地连接的”是指两个以上的核酸分子缔合成单一核酸片段,从而一个核酸分子的功能受另一个核酸分子的影响。例如,启动子与编码序列可操作地连接,此时其能够影响所述编码序列的表达(即,所述编码序列处在所述启动子的转录控制下)。“未连接的”意指缔合的遗传元件不彼此紧密缔合,并且一个的功能不受另一个的影响。

[0063] 用于本文时,“表达载体”是指DNA构建体,其包含与能够影响核酸分子在适当的宿主中的表达的适当的控制序列可操作地连接的核酸分子。所述控制序列包括影响转录的启动子、控制所述转录的可选的操纵子序列、编码适当的mRNA核糖体结合位点的序列、和控制转录和翻译终止的序列。载体可以是质粒、噬菌体颗粒、病毒、或仅是可能的基因组插入物。一旦转化到适当的宿主中时,载体可以复制并且独立于宿主基因组起作用,或者,在一些情形中,可以整合到基因组本身中。在本说明书中,“质粒”、“表达质粒”、“病毒”和“载体”通常可互换使用。

[0064] 用于本文时,术语“表达”是指基于核酸分子(如基因)的编码序列产生多肽的过程。所述过程可以包括转录、转录后控制、转录后修饰、翻译、翻译后控制、翻译后修饰、或它

们的任意组合。

[0065] 术语“引入的”在将核酸分子插入到细胞中的情形中意指“转染”或“转化”或“转导”，并且包括对将核酸分子结合到真核或原核细胞中的涉及，其中所述核酸分子可以结合到细胞的基因组（例如，染色体、质粒、质体、或线粒体DNA）中，转化为自主复制子或瞬时表达（例如，转染的mRNA）。

[0066] 用于本文时，“异源的”或“外源的”核酸分子、构建体或序列是指不是宿主细胞固有的但是可以与来自所述宿主细胞的核酸分子或核酸分子的部分同源的核酸分子或核酸分子的部分。异源的或外源的核酸分子、构建体或序列的来源可以是来自不同的种属或物种。在某些实施方案中，例如，通过缀合、转化、转染、电穿孔等向宿主细胞或宿主基因组中加入（即，不是内源的或固有的）异源的或外源的核酸分子，其中所加入的分子可以整合到宿主基因组中或者作为染色体外遗传物质存在（例如，作为质粒或其他形式的自我复制载体），并且可以以多个拷贝存在。另外，“异源的”是指由引入到宿主细胞中的外源核酸分子编码的非固有的酶、蛋白或其他活性，即使所述宿主细胞编码内源性蛋白或活性。

[0067] 用于本文时，可以将多于一种的异源或外源的核酸分子作为分开的核酸分子、作为多个单独控制的基因、作为多顺反子核酸分子、作为编码融合蛋白的单个核酸分子、或它们的任意组合引入到宿主细胞中。例如，如本文公开的，宿主细胞可以进行修饰，从而表达两种以上的编码需要的特异性针对WT-1抗原肽的TCR（例如，TCR α 和TCR β ）的异源或外源的核酸分子。当将两种以上的外源核酸分子引入到宿主细胞中时，应该理解该两种以上的外源核酸分子可以作为单一核酸分子（例如，在单个载体上）、在分开的载体上引入、在单个位点或多个位点整合到宿主染色体中、或它们的任意组合。提到的异源核酸分子或蛋白活性的数目是指编码核酸分子的数目或蛋白活性的数目，不是引入到宿主细胞中的分开的核酸分子的数目。

[0068] 用于本文时，术语“内源性的”或“固的”是指正常存在于宿主细胞中的基因、蛋白或活性。并且，与母本基因、蛋白或活性相比被突变、过表达、改组（shuffle）、复制或另外改变的基因、蛋白或活性仍然认为是对该具体的宿主细胞是内源性的或固有的。例如，来自第一基因的内源性控制序列（例如，启动子、翻译减弱序列）可以用于改变或调节第二固有基因或核酸分子的表达，其中第二固有基因或核酸分子的表达或调节与在母本细胞中的正常表达或调节不同。

[0069] 术语“同源的”或“同源物”是指在宿主细胞、物种或株系中发现或来自于宿主细胞、物种或株系的分子或活性。例如，异源的或外源的核酸分子可以与固有的宿主细胞基因是同源的，并且可以任选地具有改变的表达水平、不同的序列、改变的活性、或它们的任意组合。

[0070] 用于本文时，“序列同一性”是指在比对序列并在需要时引入缺口以得到最大的序列同一性百分数，并且不认为任意的保守置换是序列同一性的一部分后，在一种序列中与在另一种参比多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分数。序列同一性百分数值可以使用NCBI BLAST2.0软件使用设置为默认值的参数产生，如Altschul等人（1997）“Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”，Nucleic Acids Res.25:3389-3402定义。

[0071] 用于本文时，“造血祖细胞”是可以来源于造血干细胞或胚胎组织并且能够进一步

分化成成熟的细胞类型(例如,免疫系统细胞)的细胞。示例性的造血祖细胞包括具有 $CD24^{Lo} Lin^{-}CD117^{+}$ 表型的那些细胞或存在于胸腺中的那些细胞(称为祖胸腺细胞)。

[0072] 用于本文时,术语“宿主”是指这样的细胞(例如,T细胞)或微生物,其目的是用于使用异源或外源核酸分子进行遗传修饰,从而产生目的多肽(例如,高亲和性或增强亲和性的抗-WT-1TCR)。在某些实施方案中,宿主细胞可以任选地已经具有或者被修饰而包含其他遗传修饰,所述其他遗传修饰赋予与异源或外源蛋白的生物合成相关的或不相关的需要的特性(例如,包含可检测的标记;缺失的、改变的或截短的内源性TCR;增加的共刺激性因子表达)。在某些实施方案中,宿主细胞是用编码特异性针对WT-1抗原肽的TCR α 链的异源或外源核酸分子转导的人造血祖细胞。

[0073] 用于本文时,“过度增生病症”是指与正常的或未患病的细胞相比过度的生长或增殖。示例性的过度增生病症包括肿瘤、癌症、肿瘤组织、癌、肉瘤、恶性细胞、恶化前细胞、以及非肿瘤性或非恶性的过度增生病症(例如,腺瘤(adenoma),纤维瘤(fibroma),脂肪瘤(lipoma),平滑肌瘤(leiomyoma),血管瘤(hemangioma),纤维化(fibrosis),再狭窄(restenosis),以及自身免疫病(autoimmune diseases),如类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis),骨关节炎(osteoarthritis),银屑病(psoriasis),炎性肠病(inflammatory bowel disease)等)。

[0074] 特异性针对WT-1抗原肽的结合蛋白

[0075] 在某些方面中,本公开内容提供一种结合蛋白(例如,免疫球蛋白超家族结合蛋白或其部分),其包含:(a)具有SEQ ID NO.:23所示的CDR1氨基酸序列,SEQ ID NO.:24所示的CDR2氨基酸序列和SEQ ID NOS.:25,26,32,38,44,50和51中任一项所示的CDR3氨基酸序列的T细胞受体(TCR) α -链可变(V_{α})结构域,和TCR β -链可变(V_{β})结构域;或(b)(a)的 V_{α} 结构域和具有SEQ ID NO.:27所示的CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO.:28所示的CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO.:29所示的CDR3氨基酸序列的 V_{β} 结构域。所述结合蛋白能够以高亲和力与WT1-衍生的肽:人白细胞抗原(HLA)复合物结合。在具体的实施方案中,所述结合蛋白以小于或等于约8nM的 K_d 结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:16):人白细胞抗原(HLA)复合物。

[0076] 在某些实施方案中,本文所述的特异性针对WT-1的结合蛋白(例如,免疫球蛋白超家族结合蛋白或其部分)或高亲和性重组T细胞受体(TCR)包括变体多肽种类,相对于本文所述的SEQ ID NOS:1-15、21和22的序列,其在氨基酸序列中具有一个或多个氨基酸置换、插入或缺失,条件是所述结合蛋白保留或基本上保留其特异性结合功能。氨基酸的保守置换是公知的,并且可以天然存在或可以在重组产生所述结合蛋白或TCR时引入。可以使用本领域已知的诱变方法将氨基酸置换、缺失和添加引入到蛋白中(例如,参见Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3d ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY,2001)。可以利用寡核苷酸定向位点特异性(或片段特异性)诱变方法提供改变的多核苷酸,其具有依据需要的置换、缺失或插入而改变的特定密码子。备选地,可以使用随机或饱和诱变技术,诸如丙氨酸扫描诱变,易错聚合酶链式反应诱变,和寡核苷酸定向诱变,来制备免疫原多肽变体(例如,参见Sambrook等人,同前所述)。

[0077] 特异性针对WT-1的特定免疫球蛋白超家族结合蛋白或高亲和性重组T细胞受体(TCR)的种类(或变体)可以包括与本文公开的任一种示例性氨基酸序列(例如,SEQ ID NOS:1-15,21和22)具有至少85%,90%,95%,或99%的氨基酸序列同一性的蛋白,条件是:

(a) 至少三种或四个CDR不具有突变, (b) 具有突变的CDR仅具有多至两个氨基酸置换, 多至连续五个氨基酸的缺失、或它们的组合, 并且 (c) 结合蛋白保留其以小于或等于约8nM的 K_d 结合RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA复合物的能力。

[0078] 在其他方面中, 本公开内容提供一种免疫球蛋白超家族结合蛋白, 其包含: (a) 与SEQ ID NO.:1或2所示的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性的T细胞受体 (TCR) α -链可变 (V_α) 结构域, 和TCR β -链可变 (V_β) 结构域; 或 (b) V_α 结构域, 和与SEQ ID NO.:9所示的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性的 V_β 结构域; 或 (c) (a) 的 V_α 结构域和 (b) 的 V_β 结构域; 其中所述结合蛋白能够以小于或等于约5nM的 K_d 结合RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA复合物。在某些实施方案中, 所述 V_α 结构域包含SEQ ID NO.:1或2所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO.:1或2所示的氨基酸序列组成, 所述 V_β 结构域包含SEQ ID NO.:9所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO.:9所示的氨基酸序列组成, 或它们的组合。

[0079] 在其他方面中, 本公开内容提供高亲和性重组T细胞受体 (TCR), 其包含 α -链和 β -链, 其中所述 α -链包含与SEQ ID NO.:1或2所示的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性的 V_α 结构域, 其中所述TCR独立于CD8或在不存在CD8的条件下结合细胞表面上的RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA-A*201复合物。在某些实施方案中, 所述 V_α 结构域包含SEQ ID NO.:1或2所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO.:1或2所示的氨基酸序列组成, 所述 V_β 结构域包含SEQ ID NO.:9所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO.:9所示的氨基酸序列组成, 或它们的组合。在某些实施方案中, V_β 链是 V_β 17等位基因。

[0080] 本领域技术人员已知的多种标准表明在肽或多肽的特定位置置换的氨基酸是否是保守的 (或相似的)。例如, 相似的氨基酸或保守氨基酸置换是其中用具有相似侧链的氨基酸残基替换氨基酸残基的置换。相似的氨基酸可以包括在下述分类中: 具有碱性侧链的氨基酸 (例如, 赖氨酸, 精氨酸, 组氨酸); 具有酸性侧链的氨基酸 (例如, 天冬氨酸, 谷氨酸); 具有不带电荷的极性侧链的氨基酸 (例如, 甘氨酸, 天冬酰胺, 谷氨酰胺, 丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸, 半胱氨酸, 组氨酸); 具有非极性侧链的氨基酸 (例如, 丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 脯氨酸, 苯丙氨酸, 甲硫氨酸, 色氨酸); 具有 β -分支侧链的氨基酸 (例如, 苏氨酸, 缬氨酸, 异亮氨酸), 和具有芳香侧链的氨基酸 (例如, 酪氨酸, 苯丙氨酸, 色氨酸)。认为更难分类的脯氨酸与具有脂族侧链的氨基酸 (例如, 亮氨酸, 缬氨酸, 异亮氨酸, 和丙氨酸) 共有特性。在某些情形中, 用谷氨酰胺置换谷氨酸或用天冬酰胺置换天冬氨酸可以认为是相似的置换, 原因在于谷氨酰胺和天冬酰胺分别是谷氨酸和天冬氨酸的酰胺衍生物。如本领域中理解的, 通过将多肽的氨基酸序列和其保守氨基酸置换与第二多肽的序列进行比较 (例如, 使用GENEWORKS, Align, BLAST算法, 或本文所述的以及本领域实施的其他算法) 来确定两种多肽之间的“相似性”。

[0081] 在某些实施方案中, WT-1特异性结合蛋白或TCR包含与SEQ ID NO.:21或22所示的氨基酸序列至少约90%相同的 V_α 结构域, 并且包含与SEQ ID NO.:9所示的氨基酸序列至少约90%相同的 V_β 结构域, 条件是: (a) 至少三个或四个CDR不具有突变, 和 (b) 具有突变的CDR仅具有多至两个氨基酸置换, 多至连续五个氨基酸缺失, 或它们的组合。在进一步的实施方案中, WT-1特异性结合蛋白或TCR包含与SEQ ID NO.:1或2所示的氨基酸序列至少约95%相同的 V_α 结构域, 并且包含与SEQ ID NO.:9所示的氨基酸序列至少约95%相同的 V_β 结构域, 条件是所述结合蛋白能够以小于或等于约5nM的 K_d 结合RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA复合

物。

[0082] 在任一前述实施方案中,WT-1特异性结合蛋白或TCR能够:(a)独立于CD8或在不存在CD8的条件下特异性结合细胞表面上的RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA复合物,(b)特异性结合RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA-A*201复合物,(c)以小于或等于约3nM的 K_d 结合RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16):HLA-A*201复合物,或(d)它们的任意组合。

[0083] 在某些实施方案中,WT-1特异性结合蛋白或TCR的 V_α 结构域包含SEQ ID NO.:1或2所示的氨基酸序列或由其组成。在其他实施方案中, V_β 结构域包含SEQ ID NO.:9所示的氨基酸序列或由其组成。

[0084] 在另一些实施方案中,WT-1特异性结合蛋白或TCR包含与SEQ ID NO.:3或4所示的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性的 α -链恒定结构域,包含与SEQ ID NO.:10或11所示的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性的 β -链恒定结构域,或它们的任意组合。在某些实施方案中, V_β 链是 V_β 17等位基因。

[0085] 在某些实施方案中,WT-1特异性结合蛋白是T细胞受体(TCR),嵌合抗原受体或TCR的抗原结合片段,它们中的任一种可以是嵌合的、人源化的或人的。在其他实施方案中,TCR的抗原结合片段包含单链TCR(scTCR)或嵌合抗原受体(CAR)。在某些实施方案中,WT-1特异性结合蛋白是TCR。在相关的实施方案中,WT-1特异性结合蛋白:(a)包含具有SEQ ID NOS.:5-8中任一项所示的氨基酸序列的TCR α -链,并且包含具有SEQ ID NO.:12或13所示的氨基酸序列的TCR β -链;(b)具有包含SEQ ID NO.:5所示的氨基酸序列或由其组成的TCR α -链,并且TCR β -链包含SEQ ID NO.:12所示的氨基酸序列或由其组成;(c)具有包含SEQ ID NO.:7所示的氨基酸序列或由其组成的TCR α -链,并且TCR β -链包含SEQ ID NO.:12所示的氨基酸序列或由其组成;(d)具有包含SEQ ID NO.:6所示的氨基酸序列或由其组成的TCR α -链,并且TCR β -链包含SEQ ID NO.:13所示的氨基酸序列或由其组成;或(e)具有包含SEQ ID NO.:8所示的氨基酸序列或由其组成的TCR α -链,并且TCR β -链包含SEQ ID NO.:13所示的氨基酸序列或由其组成。

[0086] 在某些实施方案中,提供一种组合物,其包含根据任一前述实施方案所述的WT-1特异性结合蛋白或高亲和性重组TCR以及药用载体、稀释剂或赋形剂。

[0087] 用于分离和纯化重组生产的可溶性TCR的方法例如可以包括:从将重组的可溶性TCR分泌进入培养基中的合适宿主细胞/载体系统获得上清液,然后使用商购可得的过滤器浓缩培养基。在浓缩后,可以将浓缩物应用于单个合适的纯化基质或一系列合适的基质,诸如亲和基质或离子交换树脂。可以采用一个或多个反相HPLC步骤来进一步纯化重组多肽。当从其天然环境分离免疫原时,也可以采用这些纯化方法。用于大规模生产本文描述的分离的/重组的可溶性TCR中的一种或多种方法包括分批细胞培养,监测和控制所述培养以维持适当的培养条件。根据本文描述的和本领域已知的并且与国内和外国管理机构法律和指南相符的方法,可以进行可溶性TCR的纯化。

[0088] 在某些实施方案中,使用编码特异性针对WT-1的免疫球蛋白超家族结合蛋白或增强亲和性的TCR的核酸分子转染/转导宿主细胞(例如,T细胞),以用在过继性转移疗法中。已经描述了TCR测序中的进展(例如,Robins等人,2009Blood 114:4099;Robins等人,2010Sci.Translat.Med.2:47ra64,PMID:20811043;Robins等人2011(Sept.10)J.Imm.Meth.电子公布(Epub)先于印刷公布,PMID:21945395;Warren等人,2011Genome

Res.21:790),并且可以用在实施本公开内容所述的实施方案的过程中。类似地,已经描述了用需要的核酸转染/转导T细胞的方法(例如,US2004/0087025),其作为使用具有需要的抗原特异性的T细胞的过继性转移方法(例如,Schmitt等人,Hum.Gen.20:1240,2009;Dosssett等人,Mol.Ther.17:742,2009;Till等人,Blood 112:2261,2008;Wang等人,Hum.Gene Ther.18:712,2007;Kuball等人,Blood 109:2331,2007;US 2011/0243972;US2011/0189141;Leen等人,Ann.Rev.Immunol.25:243,2007),从而基于本文的教导,包括涉及特异性针对与HLA受体复合的WT-1肽抗原RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16)的增强亲和性的TCR的那些教导,考虑修改这些方法以适应本文公开的实施方案。

[0089] 本文所述的WT-1-特异性结合蛋白或结构域(例如,SEQ ID NOS:1-15和21-31,及其变体)可以按照大量本领域公认用于测定T细胞活性的方法中的任一种进行功能表征,包括确定T细胞结合,激活或诱导,并且还包括确定抗原特异性的T细胞反应。实例包括确定T细胞增殖,T细胞细胞因子释放,抗原特异性T细胞刺激,MHC限制的T细胞刺激,CTL活性(例如,通过检测预先负载的靶细胞的⁵¹Cr释放),T细胞表型标记表达的变化,和T细胞功能的其他量度。例如,用于进行这些和类似的测定的方法可见于Lefkovits(Immunology Methods Manual:The Comprehensive Sourcebook of Techniques,1998)。还参见Current Protocols in Immunology;Weir,Handbook of Experimental Immunology,Blackwell Scientific,Boston,MA(1986);Mishell和Shigii(编)Selected Methods in Cellular Immunology,Freeman Publishing,San Francisco,CA(1979);Green和Reed,Science 281:1309(1998)和其中引用的参考文献)。

[0090] “MHC-肽四聚体染色”是指用于检测抗原-特异性T细胞的测定,其特征是MHC分子的四聚体,所述MHC分子各自包含具有与至少一个抗原(例如,WT-1)同源(例如,相同或相关)的氨基酸序列的相同肽,其中所述复合物能够结合对所述同源抗原特异的T细胞。每个MHC分子可以用生物素分子标签标记。通过加入链霉亲和素将生物素化的MHC/肽四聚化,所述链亲和素可以是荧光标记的。可以由流式细胞术通过荧光标记检测四聚体。在某些实施方案中,MHC-肽四聚体测定用于检测或选择本公开内容的增强的亲和性的TCR。

[0091] 根据本文中描述的和本领域实践的方法,可以确定细胞因子的水平,所述方法包括例如ELISA、ELISPOT、细胞内细胞因子染色和流式细胞术和它们的组合(例如,细胞内细胞因子染色和流式细胞术)。可以如下确定由免疫应答的抗原特异性引发或刺激引起的免疫细胞增殖和克隆扩增:分离淋巴细胞,诸如周围血细胞样品中的循环淋巴细胞或来自淋巴结的细胞,用抗原刺激所述细胞,和测量细胞因子产生、细胞增殖和/或细胞生存力(诸如通过氘化胸苷的掺入或非放射性测定诸如MTT测定等)。例如,通过确定Th1细胞因子(诸如IFN- γ 、IL-12、IL-2和TNF- β)以及2型细胞因子(诸如IL-4、IL-5、IL-9、IL-10和IL-13)的水平,可以检查本文描述的免疫原对Th1免疫应答和Th2免疫应答之间的平衡的影响。编码特异性针对WT-1抗原肽的结合蛋白的多核苷酸

[0092] 可以按照分子生物学或多肽纯化领域中的多种方法和技术产生并制备编码本文所述的特异性针对WT-1的免疫球蛋白超家族结合蛋白或高亲和性重组T细胞受体(TCR)的分离的或重组的核酸分子。可以通过使用本领域已知的任意适当的分子生物学改造技术完成表达载体的构建,所述表达载体用于重组产生感兴趣的特异性针对WT-1的免疫球蛋白超家族结合蛋白或高亲和性重组TCR,所述技术包括使用限制性内切核酸酶消化,连接,转化,

质粒纯化,和DNA测序,例如,如Sambrook等人(1989和2001年编撰;Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY)和Ausubel等人(Current Protocols in Molecular Biology(2003))所述。为了获得有效的转录和翻译,每个重组表达构建体中的多核苷酸包含至少一个适当的表达控制序列(也称为调节序列),诸如与编码免疫原的核苷酸序列可操作(operably)(即,可操作地(operatively))连接的前导序列和特别是启动子。在某些实施方案中,将多核苷酸进行密码子优化,以用于在靶标宿主细胞中有效的表达。

[0093] 某些实施方案涉及编码本文考虑的多肽的核酸,本文考虑的多肽例如特异性针对WT-1的免疫球蛋白超家族结合蛋白或高亲和性重组TCR。本领域技术人员将认识到,核酸可以是指任意形式的单链的或双链的DNA、cDNA或RNA,并且可以包括彼此互补的核酸正链和负链,包括反义DNA、cDNA和RNA。还包括siRNA、微RNA、RNA-DNA杂合体、核酶和其他不同的天然存在的或合成的DNA或RNA形式。

[0094] 可以使用标准技术进行重组DNA、肽和寡核苷酸合成、免疫测定以及组织培养和转化(例如,电穿孔、脂转染)。根据生产商的说明书,或如本领域常用的或如本文中所述的,可以进行酶反应和纯化技术。通常,根据本领域公知的和贯穿本说明书引用和讨论的微生物学、分子生物学、生物化学、分子遗传学、细胞生物学、病毒学和免疫学技术中的多种一般和更具体的参考文献中所述的常规方法,可以实施这些和有关的技术和过程。参见,例如Sambrook,等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley和Sons,2008年7月更新);Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience;Glover,DNA Cloning:A Practical Approach,第I和II卷(IRL Press,Oxford Univ.Press USA,1985);Current Protocols in Immunology(John E.Coligan,Ada M.Kruisbeek,David H.Margulies,Ethan M.Shevach,Warren Strober编2001John Wiley&Sons,NY,NY);Real-Time PCR:Current Technology and Applications,Julie Logan,Kirstin Edwards和Nick Saunders编,2009,Caister Academic Press,Norfolk,UK;Anand,Techniques for the Analysis of Complex Genomes,(Academic Press,New York,1992);Guthrie和Fink,Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology(Academic Press,New York,1991);Oligonucleotide Synthesis(N.Gait,编,1984);Nucleic Acid Hybridization(B.Hames&S.Higgins,编,1985);Transcription and Translation(B.Hames&S.Higgins,编,1984);Animal Cell Culture(R.Freshney,编,1986);Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning(1984);Next-Generation Genome Sequencing(Janitz,2008Wiley-VCH);PCR Protocols(Methods in Molecular Biology)(Park,编,第3版,2010Humana Press);Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press,1986);专著,Methods In Enzymology(Academic Press,Inc.,N.Y.);Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(J.H.Miller和M.P.Calos编,1987,Cold Spring Harbor Laboratory);Harlow和Lane,Antibodies,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1998);Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer和Walker,编,Academic Press,London,1987);Handbook

Of Experimental Immunology,第I-IV卷(D.M.Weir和CC Blackwell,编,1986);Roitt, Essential Immunology,第6版,(Blackwell Scientific Publications,Oxford,1988); Embryonic Stem Cells:Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology)(Kurstad Turksen,编,2002);Embryonic Stem Cell Protocols:Volume I:Isolation and Characterization(Methods in Molecular Biology)(Kurstad Turksen,编,2006); Embryonic Stem Cell Protocols:Volume II:Differentiation Models(Methods in Molecular Biology)(Kurstad Turksen,编,2006);Human Embryonic Stem Cell Protocols(Methods in Molecular Biology)(Kursad Turksen编,2006);Mesenchymal Stem Cells:Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology)(Darwin J.Prockop,Donald G.Phinney,和Bruce A.Bunnell编,2008);Hematopoietic Stem Cell Protocols(Methods in Molecular Medicine)(Christopher A.Klug,和Craig T.Jordan 编,2001);Hematopoietic Stem Cell Protocols(Methods in Molecular Biology)(Kevin D.Bunting编,2008)Neural Stem Cells:Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology)(Leslie P.Weiner编,2008)。

[0095] 某些实施方案包括在载体中所含的核酸。本领域技术人员可以容易地确定用于与本文中公开的某些实施方案一起使用的合适载体。一种典型载体可以包含这样的核酸分子:其能够运输已经与它连接的另一核酸,或者其能够在宿主生物体中复制。载体的一些例子包括质粒、病毒载体、粘粒等。有些载体可以能够在它们所引入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体),而其他载体在被引入到宿主细胞中以后可以整合进宿主细胞的基因组中,并由此与宿主基因组一起复制。另外,有些载体能够指导它们可操作地连接的基因的表达(这些载体可以被称作“表达载体”)。根据有关的实施方案,进一步理解,如果将一种或多种试剂(例如,如本文中所述的编码特异性针对WT-1的免疫球蛋白超家族结合蛋白或高亲和性重组TCR的多核苷酸,或其变体)共同施用给受试者,那么每种试剂可以存在于单独的或相同的载体中,且可以将多个载体(每个含有不同试剂或相同试剂)引入一个细胞或细胞群体或施用给受试者。

[0096] 在某些实施方案中,编码特异性针对WT-1的免疫球蛋白超家族结合蛋白或高亲和性重组TCR的核酸可以可操作地连接于载体的某些元件。例如,可以可操作地连接实现它们所连接的编码序列的表达和加工所需要的多核苷酸序列。表达控制序列可以包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的RNA加工信号如剪接和聚腺苷酸化信号;稳定胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即Kozak共有序列);增强蛋白稳定性的序列;和可能增强蛋白分泌的序列。可以可操作地连接表达控制序列(如果它们与目标基因邻近),并且表达控制序列以反式或在一定距离处起作用以控制目标基因。

[0097] 在特定实施方案中,将重组表达载体递送至适当的细胞,例如,T细胞或抗原呈递细胞,即,在它的细胞表面(例如,树突细胞)上展示肽/MHC复合物并且缺少CD8的细胞。因此重组表达载体还可以包括,例如,淋巴组织-特异性转录调节元件(TRE)诸如B淋巴细胞、T淋巴细胞,或树突细胞特异性TRE。淋巴组织特异性TRE是本领域已知的(参见,例如,Thompson等人,Mol.Cell.Biol.12:1043,1992);Todd等人,J.Exp.Med.177:1663,1993);Penix等人,J.Exp.Med.178:1483,1993)。

[0098] 除了载体以外,某些实施方案涉及包含本发明公开的载体的宿主细胞。本领域技

术人员容易理解,本领域可得到许多合适的宿主细胞。宿主细胞可以包括可接受载体或结合核酸和/或蛋白的任意单个细胞或细胞培养物,以及任意后代细胞。该术语也包括宿主细胞的后代,无论在遗传上或在表型上相同还是不同。合适的宿主细胞可以取决于载体,且可以包括哺乳动物细胞、动物细胞、人细胞、猿猴细胞、昆虫细胞、酵母细胞和细菌细胞。通过使用病毒载体、经由磷酸钙沉淀的转化、DEAE-葡聚糖、电穿孔、显微注射或其他方法,可以诱导这些细胞以结合所述载体或其他物质。例如,参见Sambrook等人,Molecular Cloning: A Laboratory Manual第2版(Cold Spring Harbor Laboratory,1989)。

[0099] 治疗方法

[0100] 在某些方面中,本公开内容涉及用于治疗过度增生病症或以WT-1过表达为特征的病况的方法,所述方法通过向有此需要的人受试者施用包含根据任意前述结合蛋白或TCR所述的特异性针对人肾母细胞瘤蛋白1(WT-1)的结合蛋白或高亲和性重组TCR的组合物。

[0101] 受试者中存在过度增生病症或恶性病况是指在所述受试者中存在发育异常的、癌性的和/或转化的细胞,包括,例如赘生性的、肿瘤、非接触抑制的或癌转化的细胞等(例如,实体癌;血癌,包括淋巴瘤和白血病,诸如急性髓细胞白血病,慢性髓细胞白血病等),其在本领域中是已知的,并且对于其建立了诊断和分类的标准(例如,Hanahan和Weinberg,2011 Cell 144:646;Hanahan和Weinberg 2000 Cell 100:57;Cavallo等人,2011 Canc.Immunol.Immunother.60:319;Kyrigideis等人,2010J.Carcinog.9:3)。在某些实施方案中,所述癌细胞可以是急性髓细胞白血病、B细胞淋巴细胞白血病、T细胞淋巴细胞白血病或骨髓瘤的细胞,包括能够起始并连续移植这些癌症类型中的任一种的癌症干细胞(参见,例如,Park等人2009Molec.Therap.17:219)。

[0102] 在某些实施方案中,提供用于治疗过度增生病症(如恶性血液肿瘤或实体癌)的方法。示例性的恶性血液肿瘤包括急性淋巴细胞白血病(ALL),急性髓细胞白血病(AML),慢性髓细胞白血病(CML),慢性嗜酸性粒细胞白血病(CEL),骨髓增生异常综合征(MDS),非霍奇金淋巴瘤(NHL),或多发性骨髓瘤(MM)。

[0103] 在其他实施方案中,提供用于治疗过度增生病症的方法,所述过度增生病症如实体癌,其选自胆囊癌,膀胱癌,骨骼和软组织癌,脑瘤,乳腺癌,宫颈癌,结肠癌,结直肠腺癌,结直肠癌,硬纤维瘤,胚胎性癌,子宫内膜癌,食管癌,胃癌,胃腺癌,多形性成胶质细胞瘤,妇科肿瘤,头颈鳞状细胞癌,肝癌,肺癌,恶性黑素瘤,骨肉瘤,卵巢癌,胰腺癌,胰腺管腺癌,原发性星形细胞瘤,原发性甲状腺癌,前列腺癌,肾癌,肾细胞癌,横纹肌肉瘤,皮肤癌,软组织肉瘤,睾丸生殖细胞瘤,泌尿道上皮癌,子宫肉瘤,或子宫癌。

[0104] 医学领域的技术人员应该理解,术语“治疗”(“treat”和“treatment”)是指对受试者(即,患者、宿主,其可以是人或非人动物)的疾病、病症或病况的医学管理(参见,例如,Stedman's Medical Dictionary)。一般而言,适当的剂量和治疗方案会以足够提供治疗或预防益处的量提供特异性针对人WT-1(例如,SEQ ID NOS:1-15和21-31,及其变体)的结合蛋白或高亲和性重组TCR或表达其的宿主细胞中的一种或多种,以及可选地提供辅助疗法(例如,细胞因子,诸如IL-2,IL-15,IL-21,或它们的任意组合)。由治疗性处理或预防性或防止性方法产生的治疗或预防益处包括例如改善的临床结果,其中目标是阻止或延迟或以其他方式减少(例如,相对于未经治疗的对照组以统计上显著的方式减少)不希望的生理学变化或紊乱,或阻止、延迟、或以其他方式减少这样的疾病或病症的扩张或严重程度。得自

治疗受试者的有益的或期望的临床结果包括:由待治疗的疾病或病症引起的或与其相关的症状的缓和、减轻或缓解;减少的症状发生;改善的生活质量;更长的无病状态(即,减小受试者呈现症状(基于所述症状进行疾病的诊断)的可能性或倾向);疾病程度的减轻;疾病的稳定(即,未恶化)状态;疾病进展的延迟或减慢;疾病状态的改善或缓和;和缓解(无论是部分的还是完全的),无论是可检测的还是不可检测的;和/或总存活率。

[0105] “治疗”还可以是指,与如果受试者不接受治疗所预期的存活期相比,延长存活。需要本文中描述的方法和组合物的受试者包括:已患有疾病或病症的受试者,以及易于患有所述疾病或病症或处于发展所述疾病或病症的风险中的受试者。需要预防性处理的受试者包括将在其中预防疾病、病况或病症(即,减小疾病或病症的发生或复发的可能性)的受试者。如在实施例中所描述,通过体外测定、临床前研究和在预期所述组合物的施用对其有益的受试者中的临床研究的设计和执行,可以评价由本文中描述的组合物(和包含所述组合物的制剂)和方法提供的临床益处。

[0106] 可以将表达本文所述的特异性针对人WT-1的结合蛋白或高亲和性重组TCR的细胞以药学上或生理上可接受的或合适的赋形剂或载体施用给受试者。药学上可接受的赋形剂是生物学上相容的媒介物(vehicles),例如,生理盐水,其在本文中更详细地描述,其适合于施用给人或其他非人哺乳动物受试者。

[0107] 治疗有效剂量是能够在治疗的人或非人哺乳动物中产生临床需要的结果的用于过继性转移的宿主细胞(表达特异性针对人WT-1的结合蛋白或高亲和性重组TCR)的量(即,足以统计学显著方式诱导或增强针对过表达WT-1的细胞的特异性T细胞免疫应答(例如,细胞毒性T细胞应答)的量)。如医学领域中公知的,用于任一名患者的剂量取决于多种因素,包括患者的大小、体重、身体表面积、年龄、要实施的具体的疗法、性别、施用的时间和途径、一般健康情况、和同时施用的其他药物。剂量将变化,但是优选的施用包含本文所述的重组表达载体的宿主细胞的剂量是约 10^7 个细胞/ m^2 ,约 5×10^7 个细胞/ m^2 ,约 10^8 个细胞/ m^2 ,约 5×10^8 个细胞/ m^2 ,约 10^9 个细胞/ m^2 ,约 5×10^9 个细胞/ m^2 ,约 10^{10} 个细胞/ m^2 ,约 5×10^{10} 个细胞/ m^2 ,或约 10^{11} 个细胞/ m^2 。

[0108] 可以以适于待治疗(或预防)的疾病或病况的方式(如由医学领域内的技术人员确定的)施用药物组合物。组合物施用的适当剂量和合适持续时间以及频率将由诸如以下的因素决定:患者的健康状况、患者的大小(即,重量、质量或身体面积)、患者的疾病的类型和严重程度、活性成分的具体形式和施用方法。一般而言,适当的剂量和治疗方案以足以提供治疗和/或预防益处(诸如本文中描述的,包括改善的临床结果,诸如更频繁的完全或部分缓解,或更长久的无病存活期和/或总存活期,或症状严重程度减轻)的量提供一种或多种组合物。对于预防性应用而言,剂量应当足以防止与疾病或病症相关的疾病、延迟其发作或减轻其严重程度。可以通过下述各项确定根据本文所述的方法施用的免疫原性组合物的预防性益处:进行临床前研究(包括体外和体内动物研究)和临床研究,并通过适当的统计学、生物学以及临床方法和技术(它们都可以由本领域技术人员容易地实践)分析从其获得的数据。

[0109] 与WT-1过表达相关的病症包括任意这样的病症或病况:相对于正常细胞,其中存在WT-1细胞或分子事件的活动低下、活动过度或不适当的活动,并且典型地由受影响的细胞(例如,白血病细胞)中异常高(具有统计学意义)水平的WT-1表达引起。具有所述病症或

病况的受试者将得益于使用本文所述的实施方案的组合物或方法的治疗。因此,一些与WT-1过表达相关的病况可以包括急性以及慢性病症和疾病,诸如使受试者倾向于特定病症的那些病理学病况。

[0110] 与WT-1过表达相关的病况的一些实例包括过度增生病症,其是指受试者中活跃的和/或增生的细胞的状态(其也可以是转录上过度活跃的),包括肿瘤、赘生物、癌症、恶性肿瘤等。除了活跃的或增生的细胞之外,过度增生病症还可以包括细胞死亡过程的异常或失调,不管是坏死还是凋亡。所述细胞死亡过程的异常可以与多种病况相关,包括癌症(包括原发性、继发性恶性肿瘤以及转移)或其他病况。

[0111] 按照某些实施方案,通过使用本文公开的组合物和方法,实质上可以治疗的任意类型的以WT-1过表达为特征的癌症,包括血癌(例如,白血病,包括急性髓细胞白血病(AML),T或B细胞淋巴瘤,骨髓瘤等)。此外,“癌症”可以指细胞的任意加速的增殖,包括实体瘤、腹水瘤、血液或淋巴或其他恶性肿瘤;结缔组织恶性肿瘤;转移疾病;器官或干细胞移植后的微小残留病变;多药耐药性癌症,原发性或继发性恶性肿瘤,与恶性肿瘤相关的血管发生,或其他形式的癌症。在本文公开的实施方案中还考虑下述具体的实施方案:其中仅包括一种上述类型的疾病,或者其中可以排除特定的病况,不管其是否以WT-1过表达为特征。

[0112] 本文考虑的某些治疗或预防方法包括施用宿主细胞(其可以是自体的、同种异体的或同基因的),所述宿主细胞包含稳定整合到细胞染色体中的本文所述的需要的核酸分子。例如,所述细胞组合物可以使用自体的、同种异体的或同基因的免疫系统细胞(例如,T细胞、抗原呈递细胞、天然杀伤细胞)离体产生,从而向受试者中施用需要的WT-1-靶向的T细胞组合物作为过继性免疫疗法。

[0113] 用于本文时,组合物或疗法的施用表示将它们递送给受试者,无论递送的途径或模式。可以连续地或间歇地、肠胃外地实现施用。施用可以用于治疗已经证实患有确认的病况、疾病或疾病状态的受试者,或用于治疗容易发展所述病况、疾病或疾病状态或处于发展所述病况、疾病或疾病状态的风险中的受试者。与辅助疗法共同施用可以包括同时和/或以任意顺序和以任意给药时间表按顺序递送多种药剂(例如,WT-1特异性重组宿主细胞与一种或多种细胞因子;免疫抑制疗法,如钙神经素抑制剂,皮质类固醇,微管抑制剂,低剂量的霉酚酸前药,或它们的任意组合)。

[0114] 在某些实施方案中,向受试者施用多个剂量的本文所述的重组宿主细胞,其可以在施用之间大约两周至大约四周的时间间隔施用。在其他实施方案中,按顺序施用细胞因子,条件是在细胞因子施用之前,向受试者施用所述重组宿主细胞至少三次或四次。在某些实施方案中,皮下施用细胞因子(例如,IL-2,IL-15,IL-21)。在另一些实施方案中,被治疗的受试者还接受免疫抑制疗法,诸如钙神经素抑制剂,皮质类固醇,微管抑制剂,低剂量的霉酚酸前药,或它们的任意组合。在其他实施方案中,被治疗的受试者已经接受非清髓性或清髓性造血细胞移植,其中可以在非清髓性造血细胞移植后至少两个月到至少三个月实施治疗。

[0115] 有效量的治疗剂或药物组合物表示,在需要的剂量和时期,足以实现如本文中所述的期望的临床结果或有益治疗的量。可以在一次或多次施用中递送有效量。如果所述施用是针对已经知道或证实具有疾病或疾病状态的受试者,那么可以使用术语“治疗量”来表示治疗,而可以使用“预防有效量”来描述作为预防过程,给易感疾病或疾病状态(例如,复

发)或者处于发展疾病或疾病状态(例如,复发)的风险中的受试者施用有效量。

[0116] CTL免疫应答的水平可以通过本文所述的和本领域常规实践的多种免疫学方法中的任一种来确定。可以在施用本文所述的任一种WT-1-特异性结合蛋白(例如由T细胞表达的)之前和之后确定CTL免疫应答的水平。可以使用本领域常规实践的数种技术和方法中的任一种,进行用于确定CTL活性的细胞毒性测定(例如,参见Henkart等人,“Cytotoxic T-Lymphocytes”于Fundamental Immunology,Paul(编)(2003Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA中),第1127-50页,以及其中引用的参考文献)。

[0117] 通常通过对比观察到的根据本文中描述的T细胞功能参数(例如,增殖、细胞因子释放、CTL活性、改变的细胞表面标志物表型等)中的任一种的T细胞应答来确定抗原特异性T细胞应答,所述对比可以在适当背景下暴露于同源抗原(例如,当被免疫相容的抗原呈递细胞呈递时用于引发或活化T细胞的抗原)的T细胞和得自相同来源群体的、作为替代暴露于在结构上不同的或无关的对照抗原的T细胞之间进行。具有统计显著性的比针对对照抗原的应答更大的针对同源抗原的应答提示抗原特异性。

[0118] 可以从受试者得到生物样品,用于确定对如本文中所述的WT-1-衍生的抗原肽的免疫应答的存在和水平。本文中使用的“生物样品”可以是血液样品(可从其制备血清或血浆)、活组织检查样本、体液(例如,肺灌洗液、腹水、粘膜洗液、滑液)、骨髓、淋巴结、组织外植体、器官培养物、或得自受试者或生物学来源的任意其他组织或细胞制备物。还可在接受任何免疫原性组合物之前从受试者获得生物样品,所述生物样品可用于建立基线(即,免疫接种前)数据的对照。

[0119] 本文描述的药物组合物可以提供在单位剂量或多次剂量容器中,诸如密封的安瓿或小瓶中。所述容器可以冷冻以保存制剂的稳定性直到。在某些实施方案中,单位剂量包含约 10^7 个细胞/ m^2 至约 10^{11} 个细胞/ m^2 的剂量的本文所述的重组宿主细胞。为在多种治疗方案(包括例如,胃肠外或静脉内施用和制剂)使用本文描述的特定组合物开发合适的给药和治疗方案。

[0120] 如果胃肠外施用主题组合物,所述组合物还可以包括无菌的水性或油性的溶液或混悬液。合适的无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂包括水、林格氏(Ringer's)溶液、等渗盐溶液、1,3-丁二醇、乙醇、丙二醇或与水混合的聚乙二醇。水性溶液或混悬液可以进一步包含一种或多种缓冲剂,诸如醋酸钠、柠檬酸钠、硼酸钠或酒石酸钠。当然,在制备任意剂量单位制剂中使用的任意材料应当是药学上纯的,且在使用量是基本上无毒的。另外,可以将活性化合物掺入到缓释制备物和制剂中。本文中使用的剂量单位形式表示,适合作为用于治疗的受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位可以含有与合适的药用载体组合的预定量的重组细胞或活性化合物,该量经计算会产生期望的治疗效果。

[0121] 一般而言,适当的剂量和治疗方案以足以提供治疗或预防益处的量提供活性分子或细胞。通过与未治疗的受试者相比在治疗的受试者中确立改善的临床结果(例如,更频繁的缓解,完全或部分的或更长久的无疾病存活),可以监测这样的应答。针对肿瘤蛋白的既存的免疫应答的增加通常与改善的临床结果有关。这样的免疫应答通常可以使用标准的增殖、细胞毒性或细胞因子测定来评价,所述测定是本领域中常规的,且可以使用在治疗之前和之后从受试者得到的样品来进行。

实施例

[0122] 实施例1

[0123] 方法

[0124] 慢病毒构建体

[0125] 产生多种TCR表达构建体,其包含密码子优化的TCR α 和TCR β 基因,所述基因来源于HLA-A2-限制的CD8⁺T细胞克隆(C4),编码特异性针对与HLA受体复合的WT-1肽RMFPNAPYL (SEQ ID NO.:16)的高亲和性TCR。编码TCR α -和TCR β -的核酸分子由来自猪捷申病毒的2A元件(P2A)连接,以确保在鼠干细胞病毒(MSCV)U3启动子控制下的协调表达。在某些实施方案中,将编码C4 TCR α 和TCR β 的恒定结构域的核酸分子的多个部分修饰,以分别在位置48(Thr变为Cys)和57(Ser变为Cys)表达互补的半胱氨酸残基,从而促进C4 TCR链的链间配对,并且使外源C4 TCR链与内源TCR链的错误配对减至最少。

[0126] 载体pRRLSIN-C4 α -P2A-C4 β 包含连接在pRRLSIN.cPPT.MSCV/GFP.WPRE慢病毒载体中的Asc I与Sal I限制性内切核酸酶位点之间的TCR表达构建体(替代GFP)。pRRLSIN.cPPT.MSCV/GFP.WPRE质粒是第三代自身灭活的慢病毒载体(参见Yang等人, J.Immunother.31:830,2008)。

[0127] 饱和诱变文库

[0128] 构建两个饱和诱变文库,以产生并鉴定C4 α CDR区(特别是CDR3)中导致更高的或增强的针对HLA-A2/WT-1复合物的亲和性的突变。C4 α 的CDR3区包含下述氨基酸:CAATEDYQLIW (SEQ ID NO.:25)。使用Quikchange II定点诱变试剂盒(Agilent),使用慢病毒载体pRRLSIN-C4 α -P2A- β 作为模板,构建两个随机的包含残基ATE和DYQ的文库。按照Zheng等人(Nucleic Acids Res.32:e115,2004)所述的改良的Quikchange流程设计诱变引物,并且为每个要被随机化的氨基酸位置结合随机化的核苷酸NNK(其中N=A,C,G,或T,并且K=G或T)。这产生32种不同的密码子,它们编码全部20种氨基酸,和一个终止密码子。用诱变反应组合物转化高转化效率(大于 1×10^{10})Electromax DH10B T1细胞,并且通过滴定和在LB-氨苄青霉素平板上培养转化反应的级分而确定独立克隆的数目。在确定克隆总数后,将转化混合物以约5,000个克隆/平板涂布在LB-氨苄青霉素平板上。在37°C培养18小时后,向文库平板中加入0.5-1mL LB,并且将所有的菌落收集在一起,离心,并使用Endofree质粒Maxi试剂盒(Qiagen)分离高质量的质粒文库DNA。

[0129] 估计文库尺寸为包括大约100,000个独立的克隆,估计这产生大约95%完整性的文库。为了测量诱变反应的效率和文库的多样性,对组合的文库质粒DNA测序,并且,通过比较测序色谱图上每个核苷酸的相对信号(数据未显示)确定在每个随机化位置处的每个核苷酸的比例是相当的。

[0130] 饱和诱变文库的筛选

[0131] 对于每个文库,通过用高质量的质粒文库、同时用三种包装载体pMDLg/pRRE、pMD2-G和pRSV-REV转导三个平板的293T细胞(约 7×10^6 个细胞/平板),产生慢病毒。2天后,合并来自三个平板的上清液,并且冷冻等分试样以备将来使用。

[0132] 滴定慢病毒上清液,以确定用于转导的最佳浓度,从而使靶细胞被多于一种文库来源的TCR转导的可能性最小化。通过分析表达转基因 β 链(V β 17)的细胞的百分数确定总转导效率。选择产生大约20%转导率的稀释液,并且用于转导大约 $2-5 \times 10^7$ 个J.RT3细胞。在存

在或不存在1 μ g/ml竞争性抗-I类MHC抗体的条件下,通过对高水平WT-1四聚体染色的流式细胞术,分选文库转导的细胞,并且在培养中扩增多次。将以比用母本C4 α -P2A-C4 β 构建体转导的J.RT3细胞更高的水平结合WT-1四聚体的分选出的群体裂解,并且使用DNeasy试剂盒(Qiagen)分离基因组DNA。使用侧连TCR表达构建体并且产生对应尺寸的单一条带的引物,使用该分离的DNA进行慢病毒插入物的PCR扩增。将PCR产物克隆到pENTR-D-Topo (Invitrogen)中,并且通过DNA测序分析表征克隆。

[0133] 在对分离的克隆测序分析后,从候选克隆切下750bp包含C4 α CDR3区的AscI-BamHI片段,并且连接到母本pRRLSIN-C4 α -P2A-C4 β 载体中。然后将候选突变体与母本C4构建体一起转导到J.RT3细胞和PBMC中,并且评估突变体针对HLA-A2/WT-1¹²⁶⁻¹³⁴ (RMFPNAPYL, SEQ ID NO.:16)的结合亲和力。

[0134] 通过四聚体滴定确定的相对亲和力

[0135] 将T细胞克隆用WT-1四聚体的2-倍连续稀释液染色,并且通过流式细胞术进行分析。在Graphpad Prism中进行统计学分析。对具有式 $Y = B_{\max} * X / [K_d + X]$ 的饱和结合曲线使用非线性回归算法推测KD值。

[0136] 实施例2

[0137] 高亲和性WT-1-特异性TCR的鉴定和克隆

[0138] 为了鉴定高亲和性HLA-A2-限制的WT-1¹²⁶⁻¹³⁴-特异性T细胞克隆,由多于50名捐献者的外周组库产生T细胞克隆。将通过四聚体染色表现出最高表观亲和力的前十个克隆通过将每个克隆用滴定浓度的WT-1四聚体染色并且将得到的平均荧光强度数据针对饱和结合曲线拟合而进行进一步的评估(图1)。TCR α 和TCR β 基因序列通过RACE PCR鉴定,并且对具有最高相对亲和力的四个克隆进行测序(C4,P1,P20和P22)。

[0139] 为了进一步表征来自这些候选T细胞克隆的WT-1¹²⁶⁻¹³⁴-特异性TCR,为每个TCR α 和TCR β 链对产生密码子优化的表达构建体。对于每个构建体, α 和 β 链由P2A元件隔开,以促进TCR α 和TCR β 链的协调表达(例如,参见Szymczak等人,Nat.Biotechnol.22:589,2004; Dossett等人,Mol.Ther.17:742,2009)。另外,引入点突变,以在TCR α 和TCR β 恒定结构域的外膜近侧区中产生第二对半胱氨酸残基,从而促进引入的TCR链的优先配对(Kuball等人,Blood 109:2331,2007)。最后,将这些密码子优化的、半胱氨酸修饰的构建体克隆到慢病毒载体pRRLSIN.cPPT-MSCV.WPRE中(见图3C)。

[0140] 接着,检验每个引入的TCR $\alpha\beta$ 对竞争性抑制内源性TCR链与CD3组分缔合,以及在T细胞表面上的表达的能力(例如,参见Heemskerk等人,Blood 109:235,2007)。将密码子优化的、半胱氨酸修饰的TCR_{C4}、TCR_{P20}和TCR_{P22}转导到PBMC中,并且确定在转导的CD8⁺T细胞群体内四聚体阳性细胞的百分数(图2A)。通过从转导群体中TCR V β -特异性T细胞的百分数中减去在未转导的对照中内源性V β 链表达的百分数而确定总转导的群体(图2A)。

[0141] 为了确定每个TCR独立于CD8(其以针对肽/MHC的高亲和力缔合)结合四聚体的能力,将转导的PBMC针对CD4⁺T细胞门控(gated),并且评估WT-1四聚体染色(图2B)。TCR_{C4}和TCR_{P1}二者克隆都独立于CD8结合四聚体。此外,TCR_{C4}表现出最高水平的CD8-不依赖性四聚体染色,并且转导了TCR_{C4}构建体的PBMC表现出最高百分数的WT-1四聚体阳性T细胞。选择密码子优化的、半胱氨酸修饰的TCR_{C4}克隆(该克隆也在所有研究的克隆中表现出最高的相对亲和性)用于修饰和功能研究。

[0142] 实施例3

[0143] 改善高亲和性WT-1-特异性TCR_{C4}构建体

[0144] 如实施例2所述,从通过5'-RACE PCR由TCR_{C4}克隆产生的全长TCR α 和TCR β 产生野生型(WT) TCR_{C4}表达构建体(C4 α β WT)。该构建体包含在5'-位置的编码C4 TCR α 链的核酸,之后是P2A元件,然后是编码C4 TCR β 链的核酸。尽管表达该构建体的T细胞在细胞表面上表达相似水平的转基因V β 17链,但是基本上检测不到WT-1四聚体染色,这表明尽管有半胱氨酸修饰,该构建体没有导致竞争性抑制内源性TCR的足够的TCR基因表达。如在实施例2中所述,下一步是产生密码子优化的TCR_{C4}构建体(参见Scholten等人,Clin.Immunol.119:135,2006),其在四聚体染色中表现出实质性的增加(见图2A和3A)。

[0145] 检验C4 α β 和C4 β α 构建体,以确定可变链的位置效应是否可能影响TCR_{C4}的表面表达(参见Leisegang等人,J.Mol.Med.86:573,2008)。图3A和3B显示当C4 TCR β 链位于P2A元件的5'时,四聚体染色的明显增加,并且该效应在刺激后的靠后的时间点更明显,这表明,在与内源性TCR竞争表面表达方面,C4 α β TCR构建体相对不如C4 β α TCR构建体有效,其在初始T细胞刺激后下调,并且随时间逐渐增加。

[0146] 这些数据表明:(1)在与内源性TCR竞争表面表达方面,C4 β α TCR构建体比C4 α β TCR构建体更有效,并且(2)当位于P2A-连接的TCR_{C4}构建体的5'位置时,21个P2A氨基酸比TCR β 蛋白更多地影响TCR α 蛋白功能。

[0147] 实施例4

[0148] 功能性WT-1-特异性TCR_{C4}的细胞表面稳定性

[0149] 为了研究功能性TCR_{C4}表达在转导的T细胞表面上的稳定性,将来自A2+供体的CD8⁺T细胞用EBV肽GLCTLVAML(SEQ ID NO.:127)刺激,以产生EBV-特异性T细胞群体,对于该细胞群体可以通过EBV四聚体染色监测内源性TCR表达。在EBV肽刺激后24小时,将T细胞用TCR_{C4}表达构建体转导,导致EBV-特异性T细胞的优先转导。该方法产生EBV+T细胞群体,一种容易检测的转导了TCR_{C4}的WT-1四聚体⁺/EBV四聚体⁺双阳性(DP)T细胞群体,和TCR_{C4}-转导的WT-1四聚体⁺和EBV四聚体⁻T细胞群体,由于与TCR_{C4}的竞争,它们要么不与EBV反应要么已经失去EBV TCR表面表达(图8A)。

[0150] 然后,将这些群体中的每一个进行分选,并且增殖,以直接评估功能性TCR_{C4}表达在共表达EBV-反应性TCR的细胞上的稳定性(图8B)。12天后,分析培养物的WT-1和EBV四聚体染色。初始仅结合一种四聚体的T细胞群体保持几乎专门的单阳性(SP)。然而,在细胞分选后这对两种四聚体一致为DP的T细胞在体外培养12天后优先变成对WT-1四聚体表达是单一阳性的,而非常少量的细胞失去WT-1-四聚体染色,变成EBV SP(图8B)。这些结果表明TCR_{C4}可以容易地竞争性抑制内源性TCR的表面表达。

[0151] 为了确定WT-1四聚体SP群体是否主要包含已经竞争性抑制内源性TCR表面表达的细胞,分选EBV四聚体⁺T细胞,然后将该纯化的群体在用抗-CD3/CD28重刺激后用TCR_{C4}构建体转导,或者进行重刺激而没有进一步操作(图8C)。用TCR_{C4}构建体转导的EBV-特异性T细胞几乎专门地结合WT-1-四聚体,这表明,TCR_{C4}能够竞争性抑制大部分内源性TCR在T细胞表面上的表达。

[0152] 实施例5

[0153] 变体高亲和性WT-1-特异性TCR的产生

[0154] 与特异性针对非自身抗原(例如,病毒抗原)的T细胞相比,由于T细胞发育过程中的负选择(其促进自身耐受性并且保护免受自身免疫性)的影响,甚至由外周T细胞组库鉴定的最高亲和性的WT-1-特异性T细胞克隆通常具有减弱的亲和性。因此,使用饱和诱变技术来产生并鉴定在体外具有增强的亲和性的高亲和性TCR。产生两个饱和诱变文库,其跨越C4 TCR α 链的CDR3区(CAATEDYQLIW,SEQ ID NO.:25),如在实施例1中所述。在转导到J.RT3细胞中后,筛选两个文库中具有增强的针对WT-1表位的亲和力的变体,然后基于高水平的HLA-A2/WT-1四聚体结合进行细胞分选。

[0155] 从两个文库分离候选HLA-A2/WT-1四聚体结合性变体,并且,与未突变的C4 TCR(C4-WT)相比,一个具有DYQ到DLT突变(C4-DLT)的变体表现出较高水平的HLA-A2/WT-1四聚体结合,并且发现其具有提高的HLA-A2/WT-1四聚体平衡结合动力学(图4A)。应该注意,这些实验在存在CD8的条件下进行,CD8显著有助于TCR-肽/MHC相互作用,由此这可能降低各个TCR之间的相对亲和力的表现差异。

[0156] 当转移到CD8+T细胞中并且评估杀伤用减少浓度的肽脉冲的靶细胞的能力时,与C4-WT相比,C4-DLT表现出5-10倍的抗原敏感性增加(图4B),并且,当测定响应限制的肽浓度的细胞因子(IFN γ)产生时,观察到类似的抗原敏感性增加(图4C)。同样地,与表达C4-WT的T细胞相比,表达C4-DLT的T细胞在靶向白血病细胞系K562的HLA-2表达版本(其表达WT-1)时表现出增强的杀伤(通过胱天蛋白酶3活化),并且当用HLA-A2转导时能够加工并将WT-1肽RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:16)表位呈递到C4-WT和C4-DLT(图5)。

[0157] 实施例6

[0158] 与野生型TCR C4相比,TCR C4 α 突变体的动力学和细胞毒性活性

[0159] 转导脐带血来源的CD34⁺HPC,以表达在临床试验中研究的高亲和性HLA-A2-限制性WT-1-特异性TCR(TCR_{C4})的TCR α 链,如实施例7所述。将转导的细胞在存在WT1肽的条件下在表达HLA-A2的OP9-DL1细胞(OP9-A2-DL1)上培养。作为阳性对照,还将脐带血HSC用TCR_{C4}(C4 $\alpha\beta$)的TCR α 和TCR β 链转导。在OP9-DL1上发育过程中,大部分的人 $\gamma\delta$ -T细胞祖先表达CD4和CD8(Van Coppenolle等人,Leukemia26:127,2011),但是由于表型成熟的 $\gamma\delta$ T细胞(与鼠DN CD24⁻细胞相似)表达高水平的CD27(Van Coppenolle等人,J.Immunol.183:4859,2009),利用CD27和母本V β 17TCR β 链的表达来富集激动剂选择的T细胞。在体外培养31天后,分析未转导的、C4 α -转导的和C4 $\alpha\beta$ -转导的细胞的CD3⁺CD27⁺细胞的相对比例。在C4 $\alpha\beta$ -转导的培养物中大部分细胞是CD3⁺CD27⁺。与未转导的对照相比,C4 α -转导的培养物具有增加百分数的CD3⁺CD27⁺细胞,并且具有表达母本V β 17的CD3⁺细胞的百分数的5-倍增加(图6A)。在培养的第34天,仅收集V β 17⁺CD27⁺细胞用于TCR β 文库构建(图6B)。

[0160] 将V β 17-C β 1和V β 17-C β 2文库转导到H9.CD8-C4 α 细胞中,并且在转导的群体中分选WT-1四聚体⁺细胞。在单次WT-1MHC四聚体分选后,转导了V β 17-C β 1文库的细胞表现出一系列的四聚体反应性,表明存在于V β 17-分选的群体中的多个TCR β 链可能赋予WT-1抗原特异性。通过第二次WT-1MHC四聚体分选分离表现出最高水平的WT-1MHC四聚体染色的细胞,并且与表达母本C4 β 链的H9.CD8-C4 α 细胞相比较。尽管两种转导的细胞群体都表达相似水平的V β 17,但是,对于从V β 17-C β 1文库富集的四聚体^{hi}细胞观察到实质上更高的四聚体染色(图6C)。在一些实施方案中,这些高亲和性的C β 1文库来源的TCR β 链可以在TCR基因疗法试验中作为第二代WT-1-特异性受体具有实用性。

[0161] 逆转录病毒包装系PlatE获自Cell Biolabs (San Diego, CA)。通过用含有D11-1基因后接IRES和H-2D^b (以产生OP9-K^bDL1细胞) 的逆转录病毒构建体转导OP9细胞系 (Riken, 日本) 并且分开用H-2K^b转导产生OP9-K^bD^bDL1细胞系。将OP9-K^bD^bDL1-WT1细胞系进一步转导以表达鼠WT1。通过用编码HLA-A2-IRES-人β2M的逆转录病毒构建体转导OP9-K^bDL1细胞产生OP9-A2-DL1细胞系。OP9细胞和含有后接IRES-GFP的D111基因的逆转录病毒构建体获自Juan Carlos **Zúñiga-Pflücker** 实验室。通过用Mig2-3D-PYYα反转录病毒转导TCRα/TCRβ-缺陷型细胞系58^{-/-}产生58^{-/-}3D-PYYα细胞系。通过用CD8α-P2A-β构建体慢病毒转导人T细胞系H9然后慢病毒转导以表达C4α-IRES-GFP而产生H9.CD8-C4α细胞系。

[0162] 实施例7

[0163] 表达WT-1-特异性T细胞受体的捐赠者来源的病毒特异性CD8⁺T细胞在AML患者中提供抗白血病复发活性

[0164] 复发是在对恶性血液肿瘤进行同种异体造血细胞移植 (HCT) 后主要的死亡原因。尽管证据表明, 有益的供体T细胞介导的移植物抗白血病 (GVL) 作用可以降低HCT后复发率, 但是这种作用通常被与伴随的移植物抗宿主疾病 (graft versus host disease, GVHD) 相关的发病率和死亡率减低。由此, 提供选择性靶向白血病相关抗原 (LAA) 的抗原特异性T细胞能够可以提供一种截然不同的促进GVL活性而不诱导GVHD的机会。肾母细胞瘤蛋白1 (WT-1) 是一种非多态性锌指转录因子, 其在细胞生长和分化中起关键作用。WT-1在正常的成人组织中具有非常有限的表达, 与正常的CD34⁺细胞相比, 在白血病细胞中多表达10-1000倍, 并且已经表明其有助于白血病生成。并且, 在白血病细胞中WT-1表达的规模与预后和临床侵袭性相关。WT-1是免疫原性的, 并且由此组成用于诱导的CD8⁺细胞毒性T细胞 (CTL) 应答的有吸引力的候选免疫治疗剂靶点 (Cheever等人, Clin.Cancer Res.15:5323, 2009)。转移的供体来源的WT-1-反应性CD8⁺CTL克隆能够在移植后患者中持续存在, 并且调节抗白血病活性 (Chapuis等人, Sci.Transl.Med.5:174ra27, 2013)。

[0165] 在本研究中, 将递增剂量的已转导表达特异性针对HLA A*02:01-限制的WT1₁₂₆₋₁₃₄ (RMFPNAPYL, SEQ ID NO.:16) 表位的高亲和性T细胞受体的供体来源的病毒特异性CD8⁺T细胞在同种异体HCT后施用给高危险性急性髓细胞白血病 (AML) 患者, 如果之前的剂量以>3%外周血CD8⁺T细胞的频率持续存在, 则停止递增剂量。在一个观察点, 在此处已经在研究中治疗了九名患者, 并且他们接受总共22次输注, 三 (3) 名患者已经完成了四次T细胞输注, 最后一次输注后接着进行两周的IL-2疗程。CTC等级≥3的不利事件是一过性低血压 (transient hypotension) 和发热反应 (febrile reaction) 以及一过性白血球减少症 (transient leukopenia)、淋巴细胞减少 (lymphopenia) 和血小板减少 (thrombocytopenia)。没有观察到归因于输注的T细胞的终末器官毒性。一名患者在T细胞输注后经历了急性GVHD恶化, 并且一名患者发展了慢性GVHD, 尽管没有证据表明在每名患者中的GVHD反映输注的T细胞的活性。

[0166] 在用于复发的AML的第二次同种异体HCT后用T细胞治疗的三名患者 (他们中的两名在第二次移植后具有持久的/复发疾病) 存活, 在T细胞输注开始后14、8和7个月 (相应地, 在第二次移植后16、26和9个月) 没有疾病迹象, 在研究治疗结束后没有使用另外的抗白血病疗法。在第二完全缓解期 (CR2) 中在针对AML的同种异体HCT后预防性治疗的一名具有AML高风险的患者存活, 并且在研究治疗开始后13个月 (移植后15个月) 没有疾病迹象 (表1)。

[0167] 观察到体内转导的CTL的持续性是可变的,在T细胞输注后4-至少290天之间具有可检测到的转移的CTL(表1,图7)。

[0168] 表1.临床结果

[0169]

患者	诊断	在研究治疗前的疾病状态	T 细胞输注过程中的疾病负担	输注次数	CTL 持续期 (最后一次输注后的天数)	结果*	存活*
1	AML	在同种异体 HCT 后 5 年复发 (髓质和髓外疾病)	存在	3	14+	进行性疾病	存活
2	AML	在第一次同种异体 HCT 后 10 年复发。在第二次 HCT 后早期 MRD	存在	4(+IL2)	290+	移植后 16 个月减退	存活
3	AML	在 CR2 的 HCT。HCT 后没有疾病迹象	不存在	4(+IL2)	20	移植后 15 个月减退	存活
4	AML	在第二次同种异体 HCT 后一年复发,并具有髓外疾病	不存在	1	210+	移植后 26 个月 (治疗后 8 个月) 减退	存活
5	MDS → AML	在 HCT 后的持续性疾病	存在	1	5+	进行性疾病	死亡
6	AML	针对第一次 HCT 后 4 年的复发的第二次 HCT	不存在	4(+IL2)	4	移植后 9 个月减退	存活
7	AML	在 HCT 后的持续性疾病	存在	1	30+	进行性疾病	死亡
8	AML	在 CR2 的 HCT。移植后早期 MRD	存在	1	50+	正在进行治疗	存活
9	AML	在 CR2 的 HCT。移植后早期复发	不存在	3	14+	正在进行治疗	存活

[0170] *截至2014年7月

[0171] +截至评分在最近的分析中检测到持续的T细胞

[0172] 本研究的这些初步结果表明,转导表达实施方案中提供的WT-1-特异性T细胞受体(分别地, α -链,SEQ ID NO.:5或6和 β -链为SEQ ID NO.:12或13)的供体来源的病毒特异性CD8⁺T细胞的转移可能在没有显著毒性的情况下实现,并且所述治疗可以提供抗白血病活性。

[0173] 可以组合上述不同实施方案以提供其他实施方案。在本说明书中提及的和/或在申请数据单中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利公开通过引用整体并入本文。如果必要的话,可以修改实施方案的方面以采用不同的专利、申请和公开的理念来提供其他实施方案。

[0174] 考虑到上面的详细描述,可以对实施方案做出这些和其他变化。一般而言,在下述权利要求中,使用的术语不应当理解为将权利要求限制为在说明书和权利要求书中公开的特定实施方案,而是应当解释为包括所有可能的实施方案以及这样的权利要求所具有的等同方案的整个范围。因此,本公开内容没有限制权利要求。

[0042]	<212> PRT
[0043]	<213> 人工序列
[0044]	<220>
[0045]	<223> C4 α -DLT链可变结构域
[0046]	<400> 2
[0047]	Met Thr Ser Ile Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp
[0048]	1 5 10 15
[0049]	Leu Val Asn Gly Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val
[0050]	20 25 30
[0051]	Gln Glu Gly Asp Ser Ala Val Ile Lys Cys Thr Tyr Ser Asp Ser Ala
[0052]	35 40 45
[0053]	Ser Asn Tyr Phe Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Arg Pro Gln
[0054]	50 55 60
[0055]	Leu Ile Ile Asp Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg
[0056]	65 70 75 80
[0057]	Ile Ala Val Thr Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile
[0058]	85 90 95
[0059]	Thr Glu Thr Gln Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Thr
[0060]	100 105 110
[0061]	Glu Asp Leu Thr Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys
[0062]	115 120 125
[0063]	Pro
[0064]	<210> 3
[0065]	<211> 141
[0066]	<212> PRT
[0067]	<213> 人工序列
[0068]	<220>
[0069]	<223> (C4 α , P1, P18)链恒定结构域
[0070]	<400> 3
[0071]	Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
[0072]	1 5 10 15
[0073]	Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
[0074]	20 25 30
[0075]	Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
[0076]	35 40 45
[0077]	Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
[0078]	50 55 60
[0079]	Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
[0080]	65 70 75 80
[0081]	Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp
[0082]	85 90 95
[0083]	Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe

[0084]	100	105	110
[0085]	Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala		
[0086]	115	120	125
[0087]	Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0088]	130	135	140
[0089]	<210> 4		
[0090]	<211> 141		
[0091]	<212> PRT		
[0092]	<213> 人工序列		
[0093]	<220>		
[0094]	<223> (C4 α , P1, P18) (T177C, T185C, T184C) 链恒定结构域		
[0095]	<400> 4		
[0096]	Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys		
[0097]	1 5 10 15		
[0098]	Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr		
[0099]	20 25 30		
[0100]	Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys		
[0101]	35 40 45		
[0102]	Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala		
[0103]	50 55 60		
[0104]	Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser		
[0105]	65 70 75 80		
[0106]	Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp		
[0107]	85 90 95		
[0108]	Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe		
[0109]	100 105 110		
[0110]	Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala		
[0111]	115 120 125		
[0112]	Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0113]	130 135 140		
[0114]	<210> 5		
[0115]	<211> 270		
[0116]	<212> PRT		
[0117]	<213> 人工序列		
[0118]	<220>		
[0119]	<223> C4 α 链		
[0120]	<400> 5		
[0121]	Met Thr Ser Ile Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp		
[0122]	1 5 10 15		
[0123]	Leu Val Asn Gly Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val		
[0124]	20 25 30		
[0125]	Gln Glu Gly Asp Ser Ala Val Ile Lys Cys Thr Tyr Ser Asp Ser Ala		

[0126]	35	40	45
[0127]	Ser Asn Tyr Phe Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Arg Pro Gln		
[0128]	50	55	60
[0129]	Leu Ile Ile Asp Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg		
[0130]	65	70	75
[0131]	Ile Ala Val Thr Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile		
[0132]	85	90	95
[0133]	Thr Glu Thr Gln Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Thr		
[0134]	100	105	110
[0135]	Glu Asp Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys		
[0136]	115	120	125
[0137]	Pro Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser		
[0138]	130	135	140
[0139]	Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln		
[0140]	145	150	155
[0141]	Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys		
[0142]	165	170	175
[0143]	Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val		
[0144]	180	185	190
[0145]	Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn		
[0146]	195	200	205
[0147]	Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys		
[0148]	210	215	220
[0149]	Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn		
[0150]	225	230	235
[0151]	Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val		
[0152]	245	250	255
[0153]	Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0154]	260	265	270
[0155]	<210> 6		
[0156]	<211> 270		
[0157]	<212> PRT		
[0158]	<213> 人工序列		
[0159]	<220>		
[0160]	<223> C4 α (T177C) 链		
[0161]	<400> 6		
[0162]	Met Thr Ser Ile Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp		
[0163]	1	5	10
[0164]	Leu Val Asn Gly Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val		
[0165]	20	25	30
[0166]	Gln Glu Gly Asp Ser Ala Val Ile Lys Cys Thr Tyr Ser Asp Ser Ala		
[0167]	35	40	45

[0168]	Ser Asn Tyr Phe Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Arg Pro Gln
[0169]	50 55 60
[0170]	Leu Ile Ile Asp Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg
[0171]	65 70 75 80
[0172]	Ile Ala Val Thr Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile
[0173]	85 90 95
[0174]	Thr Glu Thr Gln Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Thr
[0175]	100 105 110
[0176]	Glu Asp Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys
[0177]	115 120 125
[0178]	Pro Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser
[0179]	130 135 140
[0180]	Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
[0181]	145 150 155 160
[0182]	Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys
[0183]	165 170 175
[0184]	Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val
[0185]	180 185 190
[0186]	Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn
[0187]	195 200 205
[0188]	Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys
[0189]	210 215 220
[0190]	Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn
[0191]	225 230 235 240
[0192]	Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val
[0193]	245 250 255
[0194]	Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[0195]	260 265 270
[0196]	<210> 7
[0197]	<211> 270
[0198]	<212> PRT
[0199]	<213> 人工序列
[0200]	<220>
[0201]	<223> C4 α -DLT链
[0202]	<400> 7
[0203]	Met Thr Ser Ile Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp
[0204]	1 5 10 15
[0205]	Leu Val Asn Gly Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val
[0206]	20 25 30
[0207]	Gln Glu Gly Asp Ser Ala Val Ile Lys Cys Thr Tyr Ser Asp Ser Ala
[0208]	35 40 45
[0209]	Ser Asn Tyr Phe Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Arg Pro Gln

[0210]	50	55	60
[0211]	Leu Ile Ile Asp Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg		
[0212]	65	70	75
[0213]	Ile Ala Val Thr Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile		
[0214]	85	90	95
[0215]	Thr Glu Thr Gln Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Thr		
[0216]	100	105	110
[0217]	Glu Asp Leu Thr Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys		
[0218]	115	120	125
[0219]	Pro Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser		
[0220]	130	135	140
[0221]	Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln		
[0222]	145	150	155
[0223]	Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys		
[0224]	165	170	175
[0225]	Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val		
[0226]	180	185	190
[0227]	Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn		
[0228]	195	200	205
[0229]	Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys		
[0230]	210	215	220
[0231]	Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn		
[0232]	225	230	235
[0233]	Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val		
[0234]	245	250	255
[0235]	Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0236]	260	265	270
[0237]	<210> 8		
[0238]	<211> 270		
[0239]	<212> PRT		
[0240]	<213> 人工序列		
[0241]	<220>		
[0242]	<223> C4 α -DLT (T177C)链		
[0243]	<400> 8		
[0244]	Met Thr Ser Ile Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp		
[0245]	1	5	10
[0246]	Leu Val Asn Gly Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val		
[0247]	20	25	30
[0248]	Gln Glu Gly Asp Ser Ala Val Ile Lys Cys Thr Tyr Ser Asp Ser Ala		
[0249]	35	40	45
[0250]	Ser Asn Tyr Phe Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Arg Pro Gln		
[0251]	50	55	60

[0252]	Leu	Ile	Ile	Asp	Ile	Arg	Ser	Asn	Val	Gly	Glu	Lys	Lys	Asp	Gln	Arg
[0253]	65					70					75					80
[0254]	Ile	Ala	Val	Thr	Leu	Asn	Lys	Thr	Ala	Lys	His	Phe	Ser	Leu	His	Ile
[0255]						85				90						95
[0256]	Thr	Glu	Thr	Gln	Pro	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Ala	Thr
[0257]						100				105						110
[0258]	Glu	Asp	Leu	Thr	Leu	Ile	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Ile	Ile	Lys
[0259]						115				120						125
[0260]	Pro	Asp	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser
[0261]						130				135						140
[0262]	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln
[0263]	145					150					155					160
[0264]	Thr	Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys
[0265]						165				170						175
[0266]	Cys	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val
[0267]						180				185						190
[0268]	Ala	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn
[0269]						195				200						205
[0270]	Ser	Ile	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys
[0271]						210				215						220
[0272]	Asp	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn
[0273]	225					230					235					240
[0274]	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val
[0275]						245				250						255
[0276]	Ala	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser		
[0277]						260				265						270
[0278]	<210> 9															
[0279]	<211> 131															
[0280]	<212> PRT															
[0281]	<213> 人工序列															
[0282]	<220>															
[0283]	<223> C4 β 链可变结构域															
[0284]	<400> 9															
[0285]	Met	Ser	Asn	Gln	Val	Leu	Cys	Cys	Val	Val	Leu	Cys	Phe	Leu	Gly	Ala
[0286]	1					5					10					15
[0287]	Asn	Thr	Val	Asp	Gly	Gly	Ile	Thr	Gln	Ser	Pro	Lys	Tyr	Leu	Phe	Arg
[0288]						20				25					30	
[0289]	Lys	Glu	Gly	Gln	Asn	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Gln	Asn	Leu	Asn	His
[0290]						35				40						45
[0291]	Asp	Ala	Met	Tyr	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Arg	Leu
[0292]						50				55						60
[0293]	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Ile	Val	Asn	Asp	Phe	Gln	Lys	Gly	Asp	Ile	Ala

[0294]	65	70	75	80
[0295]	Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr			
[0296]		85	90	95
[0297]	Val Thr Ser Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser			
[0298]		100	105	110
[0299]	Ser Pro Gly Ala Leu Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu			
[0300]		115	120	125
[0301]	Thr Val Thr			
[0302]	130			
[0303]	<210> 10			
[0304]	<211> 179			
[0305]	<212> PRT			
[0306]	<213> 人工序列			
[0307]	<220>			
[0308]	<223> (C4, P1, P15, P22) β 链恒定结构域			
[0309]	<400> 10			
[0310]	Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro			
[0311]	1	5	10	15
[0312]	Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu			
[0313]		20	25	30
[0314]	Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn			
[0315]		35	40	45
[0316]	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys			
[0317]	50	55	60	
[0318]	Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu			
[0319]	65	70	75	80
[0320]	Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys			
[0321]		85	90	95
[0322]	Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp			
[0323]		100	105	110
[0324]	Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg			
[0325]		115	120	125
[0326]	Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser			
[0327]	130	135	140	
[0328]	Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala			
[0329]	145	150	155	160
[0330]	Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp			
[0331]		165	170	175
[0332]	Ser Arg Gly			
[0333]	<210> 11			
[0334]	<211> 179			
[0335]	<212> PRT			

[0336]	<213>	人工序列
[0337]	<220>	
[0338]	<223>	(C4, P1, P15, P22)β链 (S188C, S191C, S190C,
[0339]		S186C) 恒定结构域
[0340]	<400>	11
[0341]	Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro	
[0342]	1	5 10 15
[0343]	Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu	
[0344]	20 25 30	
[0345]	Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn	
[0346]	35 40 45	
[0347]	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys	
[0348]	50 55 60	
[0349]	Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu	
[0350]	65 70 75 80	
[0351]	Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys	
[0352]	85 90 95	
[0353]	Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp	
[0354]	100 105 110	
[0355]	Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg	
[0356]	115 120 125	
[0357]	Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser	
[0358]	130 135 140	
[0359]	Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala	
[0360]	145 150 155 160	
[0361]	Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp	
[0362]	165 170 175	
[0363]	Ser Arg Gly	
[0364]	<210>	12
[0365]	<211>	310
[0366]	<212>	PRT
[0367]	<213>	人工序列
[0368]	<220>	
[0369]	<223>	C4β 链
[0370]	<400>	12
[0371]	Met Ser Asn Gln Val Leu Cys Cys Val Val Leu Cys Phe Leu Gly Ala	
[0372]	1 5 10 15	
[0373]	Asn Thr Val Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg	
[0374]	20 25 30	
[0375]	Lys Glu Gly Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His	
[0376]	35 40 45	
[0377]	Asp Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu	

[0378]	50	55	60
[0379]	Ile Tyr Tyr Ser Gln Ile Val Asn Asp Phe Gln Lys Gly Asp Ile Ala		
[0380]	65	70	75
[0381]	Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr		
[0382]	85	90	95
[0383]	Val Thr Ser Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser		
[0384]	100	105	110
[0385]	Ser Pro Gly Ala Leu Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu		
[0386]	115	120	125
[0387]	Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val		
[0388]	130	135	140
[0389]	Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu		
[0390]	145	150	155
[0391]	Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp		
[0392]	165	170	175
[0393]	Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln		
[0394]	180	185	190
[0395]	Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser		
[0396]	195	200	205
[0397]	Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His		
[0398]	210	215	220
[0399]	Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp		
[0400]	225	230	235
[0401]	Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala		
[0402]	245	250	255
[0403]	Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly		
[0404]	260	265	270
[0405]	Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr		
[0406]	275	280	285
[0407]	Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys		
[0408]	290	295	300
[0409]	Arg Lys Asp Ser Arg Gly		
[0410]	305	310	
[0411]	<210> 13		
[0412]	<211> 310		
[0413]	<212> PRT		
[0414]	<213> 人工序列		
[0415]	<220>		
[0416]	<223> C4β (S188C) 链		
[0417]	<400> 13		
[0418]	Met Ser Asn Gln Val Leu Cys Cys Val Val Leu Cys Phe Leu Gly Ala		
[0419]	1	5	10
			15

[0420]	Asn Thr Val Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg
[0421]	20 25 30
[0422]	Lys Glu Gly Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His
[0423]	35 40 45
[0424]	Asp Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu
[0425]	50 55 60
[0426]	Ile Tyr Tyr Ser Gln Ile Val Asn Asp Phe Gln Lys Gly Asp Ile Ala
[0427]	65 70 75 80
[0428]	Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr
[0429]	85 90 95
[0430]	Val Thr Ser Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser
[0431]	100 105 110
[0432]	Ser Pro Gly Ala Leu Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
[0433]	115 120 125
[0434]	Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val
[0435]	130 135 140
[0436]	Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
[0437]	145 150 155 160
[0438]	Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
[0439]	165 170 175
[0440]	Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln
[0441]	180 185 190
[0442]	Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
[0443]	195 200 205
[0444]	Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
[0445]	210 215 220
[0446]	Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
[0447]	225 230 235 240
[0448]	Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
[0449]	245 250 255
[0450]	Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly
[0451]	260 265 270
[0452]	Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr
[0453]	275 280 285
[0454]	Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys
[0455]	290 295 300
[0456]	Arg Lys Asp Ser Arg Gly
[0457]	305 310
[0458]	<210> 14
[0459]	<211> 602
[0460]	<212> PRT
[0461]	<213> 人工序列

[0462]	<220>
[0463]	<223> C4 β (S188C) -P2A-C4 α (T177C)
[0464]	<400> 14
[0465]	Met Ser Asn Gln Val Leu Cys Cys Val Val Leu Cys Phe Leu Gly Ala
[0466]	1 5 10 15
[0467]	Asn Thr Val Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg
[0468]	20 25 30
[0469]	Lys Glu Gly Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His
[0470]	35 40 45
[0471]	Asp Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu
[0472]	50 55 60
[0473]	Ile Tyr Tyr Ser Gln Ile Val Asn Asp Phe Gln Lys Gly Asp Ile Ala
[0474]	65 70 75 80
[0475]	Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr
[0476]	85 90 95
[0477]	Val Thr Ser Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser
[0478]	100 105 110
[0479]	Ser Pro Gly Ala Leu Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
[0480]	115 120 125
[0481]	Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val
[0482]	130 135 140
[0483]	Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
[0484]	145 150 155 160
[0485]	Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
[0486]	165 170 175
[0487]	Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln
[0488]	180 185 190
[0489]	Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
[0490]	195 200 205
[0491]	Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
[0492]	210 215 220
[0493]	Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
[0494]	225 230 235 240
[0495]	Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
[0496]	245 250 255
[0497]	Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly
[0498]	260 265 270
[0499]	Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr
[0500]	275 280 285
[0501]	Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys
[0502]	290 295 300
[0503]	Arg Lys Asp Ser Arg Gly Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu

[0504]	305	310	315	320
[0505]	Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Thr Ser Ile			
[0506]		325	330	335
[0507]	Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp Leu Val Asn Gly			
[0508]		340	345	350
[0509]	Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val Gln Glu Gly Asp			
[0510]		355	360	365
[0511]	Ser Ala Val Ile Lys Cys Thr Tyr Ser Asp Ser Ala Ser Asn Tyr Phe			
[0512]		370	375	380
[0513]	Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Arg Pro Gln Leu Ile Ile Asp			
[0514]		385	390	395
[0515]	Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg Ile Ala Val Thr			
[0516]		405	410	415
[0517]	Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile Thr Glu Thr Gln			
[0518]		420	425	430
[0519]	Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Thr Glu Asp Tyr Gln			
[0520]		435	440	445
[0521]	Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys Pro Asp Ile Gln			
[0522]		450	455	460
[0523]	Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp			
[0524]		465	470	475
[0525]	Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser			
[0526]		485	490	495
[0527]	Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp			
[0528]		500	505	510
[0529]	Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn			
[0530]		515	520	525
[0531]	Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro			
[0532]		530	535	540
[0533]	Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu			
[0534]		545	550	555
[0535]	Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu			
[0536]		565	570	575
[0537]	Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn			
[0538]		580	585	590
[0539]	Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser			
[0540]		595	600	
[0541]	<210> 15			
[0542]	<211> 602			
[0543]	<212> PRT			
[0544]	<213> 人工序列			
[0545]	<220>			

[0546]	<223> C4β (S188C) -P2A-C4α-DLT (T177C)																			
[0547]	<400> 15																			
[0548]	Met	Ser	Asn	Gln	Val	Leu	Cys	Cys	Val	Val	Leu	Cys	Phe	Leu	Gly	Ala				
[0549]	1				5					10					15					
[0550]	Asn	Thr	Val	Asp	Gly	Gly	Ile	Thr	Gln	Ser	Pro	Lys	Tyr	Leu	Phe	Arg				
[0551]				20					25					30						
[0552]	Lys	Glu	Gly	Gln	Asn	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Gln	Asn	Leu	Asn	His				
[0553]				35				40					45							
[0554]	Asp	Ala	Met	Tyr	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Arg	Leu				
[0555]		50					55					60								
[0556]	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Ile	Val	Asn	Asp	Phe	Gln	Lys	Gly	Asp	Ile	Ala				
[0557]	65				70					75					80					
[0558]	Glu	Gly	Tyr	Ser	Val	Ser	Arg	Glu	Lys	Lys	Glu	Ser	Phe	Pro	Leu	Thr				
[0559]				85				90					95							
[0560]	Val	Thr	Ser	Ala	Gln	Lys	Asn	Pro	Thr	Ala	Phe	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser				
[0561]				100				105					110							
[0562]	Ser	Pro	Gly	Ala	Leu	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg	Leu				
[0563]				115				120					125							
[0564]	Thr	Val	Thr	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val				
[0565]		130					135					140								
[0566]	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu				
[0567]	145				150					155					160					
[0568]	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp				
[0569]				165				170					175							
[0570]	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln				
[0571]				180				185					190							
[0572]	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser				
[0573]				195				200					205							
[0574]	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His				
[0575]		210					215					220								
[0576]	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp				
[0577]	225				230					235					240					
[0578]	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala				
[0579]				245				250					255							
[0580]	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly				
[0581]				260				265					270							
[0582]	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr				
[0583]				275				280					285							
[0584]	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys				
[0585]		290					295					300								
[0586]	Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu				
[0587]	305				310					315					320					

[0588]	Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Thr Ser Ile		
[0589]		325	330 335
[0590]	Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp Leu Val Asn Gly		
[0591]		340	345 350
[0592]	Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val Gln Glu Gly Asp		
[0593]		355	360 365
[0594]	Ser Ala Val Ile Lys Cys Thr Tyr Ser Asp Ser Ala Ser Asn Tyr Phe		
[0595]		370	375 380
[0596]	Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Arg Pro Gln Leu Ile Ile Asp		
[0597]		385	390 395 400
[0598]	Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg Ile Ala Val Thr		
[0599]		405	410 415
[0600]	Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile Thr Glu Thr Gln		
[0601]		420	425 430
[0602]	Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Thr Glu Asp Leu Thr		
[0603]		435	440 445
[0604]	Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys Pro Asp Ile Gln		
[0605]		450	455 460
[0606]	Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp		
[0607]		465	470 475 480
[0608]	Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser		
[0609]		485	490 495
[0610]	Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp		
[0611]		500	505 510
[0612]	Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn		
[0613]		515	520 525
[0614]	Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro		
[0615]		530	535 540
[0616]	Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu		
[0617]		545	550 555 560
[0618]	Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu		
[0619]		565	570 575
[0620]	Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn		
[0621]		580	585 590
[0622]	Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0623]		595	600
[0624]	<210> 16		
[0625]	<211> 9		
[0626]	<212> PRT		
[0627]	<213> 人工序列		
[0628]	<220>		
[0629]	<223> WT-1肽抗原		

[0630]	<400> 16
[0631]	Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
[0632]	1 5
[0633]	<210> 17
[0634]	<211> 22
[0635]	<212> PRT
[0636]	<213> 人工序列
[0637]	<220>
[0638]	<223> 猪捷申病毒-1 2A (P2A) 肽
[0639]	<400> 17
[0640]	Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
[0641]	1 5 10 15
[0642]	Glu Glu Asn Pro Gly Pro
[0643]	20
[0644]	<210> 18
[0645]	<211> 21
[0646]	<212> PRT
[0647]	<213> 人工序列
[0648]	<220>
[0649]	<223> Thoseaasigna病毒2A (T2A) 肽
[0650]	<400> 18
[0651]	Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
[0652]	1 5 10 15
[0653]	Glu Asn Pro Gly Pro
[0654]	20
[0655]	<210> 19
[0656]	<211> 23
[0657]	<212> PRT
[0658]	<213> 人工序列
[0659]	<220>
[0660]	<223> 马鼻炎A病毒(Equine rhinitis A virus) (ERAV) 2A (E2A) 肽
[0661]	<400> 19
[0662]	Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
[0663]	1 5 10 15
[0664]	Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[0665]	20
[0666]	<210> 20
[0667]	<211> 25
[0668]	<212> PRT
[0669]	<213> 人工序列
[0670]	<220>
[0671]	<223> 口蹄疫病毒2A (F2A) 肽

[0672]	<400> 20
[0673]	Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
[0674]	1 5 10 15
[0675]	Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[0676]	20 25
[0677]	<210> 21
[0678]	<211> 134
[0679]	<212> PRT
[0680]	<213> 人工序列
[0681]	<220>
[0682]	<223> C4 (P1-CDR3) α 链可变结构域
[0683]	<400> 21
[0684]	Met Thr Ser Ile Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp
[0685]	1 5 10 15
[0686]	Leu Val Asn Gly Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val
[0687]	20 25 30
[0688]	Gln Glu Gly Asp Ser Ala Val Ile Lys Cys Thr Tyr Ser Asp Ser Ala
[0689]	35 40 45
[0690]	Ser Asn Tyr Phe Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Arg Pro Gln
[0691]	50 55 60
[0692]	Leu Ile Ile Asp Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg
[0693]	65 70 75 80
[0694]	Ile Ala Val Thr Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile
[0695]	85 90 95
[0696]	Thr Glu Thr Gln Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Leu Ser
[0697]	100 105 110
[0698]	Glu Ala His Arg Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr
[0699]	115 120 125
[0700]	Lys Leu Ile Ile Lys Pro
[0701]	130
[0702]	<210> 22
[0703]	<211> 133
[0704]	<212> PRT
[0705]	<213> 人工序列
[0706]	<220>
[0707]	<223> C4 (P18-CDR3) α 链可变结构域
[0708]	<400> 22
[0709]	Met Thr Ser Ile Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp
[0710]	1 5 10 15
[0711]	Leu Val Asn Gly Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val
[0712]	20 25 30
[0713]	Gln Glu Gly Asp Ser Ala Val Ile Lys Cys Thr Tyr Ser Asp Ser Ala

[0714]	35	40	45
[0715]	Ser Asn Tyr Phe Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Arg Pro Gln		
[0716]	50	55	60
[0717]	Leu Ile Ile Asp Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg		
[0718]	65	70	75
[0719]	Ile Ala Val Thr Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile		
[0720]	85	90	95
[0721]	Thr Glu Thr Gln Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ile Pro		
[0722]	100	105	110
[0723]	Thr Leu Met Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys		
[0724]	115	120	125
[0725]	Leu Ile Ile Lys Pro		
[0726]	130		
[0727]	<210> 23		
[0728]	<211> 6		
[0729]	<212> PRT		
[0730]	<213> 人工序列		
[0731]	<220>		
[0732]	<223> C4 α CDR1		
[0733]	<400> 23		
[0734]	Asp Ser Ala Ser Asn Tyr		
[0735]	1	5	
[0736]	<210> 24		
[0737]	<211> 7		
[0738]	<212> PRT		
[0739]	<213> 人工序列		
[0740]	<220>		
[0741]	<223> C4 α CDR2		
[0742]	<400> 24		
[0743]	Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu		
[0744]	1	5	
[0745]	<210> 25		
[0746]	<211> 11		
[0747]	<212> PRT		
[0748]	<213> 人工序列		
[0749]	<220>		
[0750]	<223> C4 α (DYQ) CDR3		
[0751]	<400> 25		
[0752]	Cys Ala Ala Thr Glu Asp Tyr Gln Leu Ile Trp		
[0753]	1	5	10
[0754]	<210> 26		
[0755]	<211> 11		

[0756] <212> PRT
[0757] <213> 人工序列
[0758] <220>
[0759] <223> C4 α (DLT) CDR3
[0760] <400> 26
[0761] Cys Ala Ala Thr Glu Asp Leu Thr Leu Ile Trp
[0762] 1 5 10
[0763] <210> 27
[0764] <211> 5
[0765] <212> PRT
[0766] <213> 人工序列
[0767] <220>
[0768] <223> C4 β CDR1
[0769] <400> 27
[0770] Leu Asn His Asp Ala
[0771] 1 5
[0772] <210> 28
[0773] <211> 6
[0774] <212> PRT
[0775] <213> 人工序列
[0776] <220>
[0777] <223> C4 β CD2
[0778] <400> 28
[0779] Ser Gln Ile Val Asn Asp
[0780] 1 5
[0781] <210> 29
[0782] <211> 13
[0783] <212> PRT
[0784] <213> 人工序列
[0785] <220>
[0786] <223> C4 β CDR3
[0787] <400> 29
[0788] Cys Ala Ser Ser Pro Gly Ala Leu Tyr Glu Gln Tyr Phe
[0789] 1 5 10
[0790] <210> 30
[0791] <211> 7
[0792] <212> PRT
[0793] <213> 人工序列
[0794] <220>
[0795] <223> P1 α CDR1
[0796] <400> 30
[0797] Thr Arg Asp Thr Thr Tyr Tyr

[0798]	1	5	
[0799]	<210>	31	
[0800]	<211>	7	
[0801]	<212>	PRT	
[0802]	<213>	人工序列	
[0803]	<220>		
[0804]	<223>	P1 α CDR2	
[0805]	<400>	31	
[0806]	Arg Asn Ser Phe Asp Glu Gln		
[0807]	1	5	
[0808]	<210>	32	
[0809]	<211>	16	
[0810]	<212>	PRT	
[0811]	<213>	人工序列	
[0812]	<220>		
[0813]	<223>	P1 α CDR3	
[0814]	<400>	32	
[0815]	Cys Ala Leu Ser Glu Ala His Arg Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp		
[0816]	1	5	10 15
[0817]	<210>	33	
[0818]	<211>	5	
[0819]	<212>	PRT	
[0820]	<213>	人工序列	
[0821]	<220>		
[0822]	<223>	P1 β CDR1	
[0823]	<400>	33	
[0824]	Leu Gly His Asn Ala		
[0825]	1	5	
[0826]	<210>	34	
[0827]	<211>	6	
[0828]	<212>	PRT	
[0829]	<213>	人工序列	
[0830]	<220>		
[0831]	<223>	P1 β CD2	
[0832]	<400>	34	
[0833]	Tyr Asn Phe Lys Glu Gln		
[0834]	1	5	
[0835]	<210>	35	
[0836]	<211>	15	
[0837]	<212>	PRT	
[0838]	<213>	人工序列	
[0839]	<220>		

[0840] <223> P1 β CDR3
[0841] <400> 35
[0842] Cys Ala Ser Ser Gln Asp Glu Gln Phe Leu Tyr Asn Glu Gln Phe
[0843] 1 5 10 15
[0844] <210> 36
[0845] <211> 6
[0846] <212> PRT
[0847] <213> 人工序列
[0848] <220>
[0849] <223> P15 α CDR1
[0850] <400> 36
[0851] Asn Thr Ala Phe Asp Tyr
[0852] 1 5
[0853] <210> 37
[0854] <211> 7
[0855] <212> PRT
[0856] <213> 人工序列
[0857] <220>
[0858] <223> P15 α CDR2
[0859] <400> 37
[0860] Ile Arg Pro Asp Val Ser Glu
[0861] 1 5
[0862] <210> 38
[0863] <211> 15
[0864] <212> PRT
[0865] <213> 人工序列
[0866] <220>
[0867] <223> P15 α CDR3
[0868] <400> 38
[0869] Cys Ala Ala Ser Pro Gln Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe
[0870] 1 5 10 15
[0871] <210> 39
[0872] <211> 5
[0873] <212> PRT
[0874] <213> 人工序列
[0875] <220>
[0876] <223> P15 β CDR1
[0877] <400> 39
[0878] Ser Glu His Asn Arg
[0879] 1 5
[0880] <210> 40
[0881] <211> 6

[0882]	<212>	PRT
[0883]	<213>	人工序列
[0884]	<220>	
[0885]	<223>	P15 β CD2
[0886]	<400>	40
[0887]	Phe Gln Asn Glu Ala Gln	
[0888]	1	5
[0889]	<210>	41
[0890]	<211>	14
[0891]	<212>	PRT
[0892]	<213>	人工序列
[0893]	<220>	
[0894]	<223>	P15 β CDR3
[0895]	<400>	41
[0896]	Cys Ala Ser Ser Leu Ala Tyr Gly Lys Asp Thr Gln Tyr Phe	
[0897]	1	5 10
[0898]	<210>	42
[0899]	<211>	7
[0900]	<212>	PRT
[0901]	<213>	人工序列
[0902]	<220>	
[0903]	<223>	P18 α CDR1
[0904]	<400>	42
[0905]	Thr Ser Asp Gln Ser Tyr Gly	
[0906]	1	5
[0907]	<210>	43
[0908]	<211>	7
[0909]	<212>	PRT
[0910]	<213>	人工序列
[0911]	<220>	
[0912]	<223>	P18 α CDR2
[0913]	<400>	43
[0914]	Gln Gly Ser Tyr Asp Glu Gln	
[0915]	1	5
[0916]	<210>	44
[0917]	<211>	15
[0918]	<212>	PRT
[0919]	<213>	人工序列
[0920]	<220>	
[0921]	<223>	P18 α CDR3
[0922]	<400>	44
[0923]	Cys Ala Ile Pro Thr Leu Met Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp	

[0924]	1	5	10	15
[0925]	<210> 45			
[0926]	<211> 5			
[0927]	<212> PRT			
[0928]	<213> 人工序列			
[0929]	<220>			
[0930]	<223> P18 β CDR1			
[0931]	<400> 45			
[0932]	Ser Gly His Asp Tyr			
[0933]	1	5		
[0934]	<210> 46			
[0935]	<211> 6			
[0936]	<212> PRT			
[0937]	<213> 人工序列			
[0938]	<220>			
[0939]	<223> P18 β CD2			
[0940]	<400> 46			
[0941]	Phe Asn Asn Asn Val Pro			
[0942]	1	5		
[0943]	<210> 47			
[0944]	<211> 11			
[0945]	<212> PRT			
[0946]	<213> 人工序列			
[0947]	<220>			
[0948]	<223> P18 β CDR3			
[0949]	<400> 47			
[0950]	Cys Ala Ser Ser Val Ser Gly Ser Glu Ala Phe			
[0951]	1	5	10	
[0952]	<210> 48			
[0953]	<211> 6			
[0954]	<212> PRT			
[0955]	<213> 人工序列			
[0956]	<220>			
[0957]	<223> (P20, P22) α CDR1			
[0958]	<400> 48			
[0959]	Asp Arg Gly Ser Gln Ser			
[0960]	1	5		
[0961]	<210> 49			
[0962]	<211> 7			
[0963]	<212> PRT			
[0964]	<213> 人工序列			
[0965]	<220>			

[0966] <223> (P20, P22) α CDR2
[0967] <400> 49
[0968] Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp
[0969] 1 5
[0970] <210> 50
[0971] <211> 11
[0972] <212> PRT
[0973] <213> 人工序列
[0974] <220>
[0975] <223> P20 α CDR3
[0976] <400> 50
[0977] Cys Ala Val Leu Glu Gly Gln Lys Leu Leu Phe
[0978] 1 5 10
[0979] <210> 51
[0980] <211> 12
[0981] <212> PRT
[0982] <213> 人工序列
[0983] <220>
[0984] <223> P22 α CDR3
[0985] <400> 51
[0986] Cys Ala Ala Asn Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe
[0987] 1 5 10
[0988] <210> 52
[0989] <211> 5
[0990] <212> PRT
[0991] <213> 人工序列
[0992] <220>
[0993] <223> (P20, P22) β CDR1
[0994] <400> 52
[0995] Met Asp His Glu Asn
[0996] 1 5
[0997] <210> 53
[0998] <211> 6
[0999] <212> PRT
[1000] <213> 人工序列
[1001] <220>
[1002] <223> (P20, P22) β CD2
[1003] <400> 53
[1004] Ser Tyr Asp Val Lys Met
[1005] 1 5
[1006] <210> 54
[1007] <211> 10

[1008]	<212>	PRT
[1009]	<213>	人工序列
[1010]	<220>	
[1011]	<223>	P20 β CDR3
[1012]	<400>	54
[1013]	Cys	Ala Thr Ser His Gln Pro Gln His Phe
[1014]	1	5 10
[1015]	<210>	55
[1016]	<211>	10
[1017]	<212>	PRT
[1018]	<213>	人工序列
[1019]	<220>	
[1020]	<223>	P22 β CDR3
[1021]	<400>	55
[1022]	Cys	Ala Ser Ser Ser Ile Asn Glu Gln Phe
[1023]	1	5 10
[1024]	<210>	56
[1025]	<211>	137
[1026]	<212>	PRT
[1027]	<213>	人工序列
[1028]	<220>	
[1029]	<223>	P1 α 链可变结构域
[1030]	<400>	56
[1031]	Met	Leu Thr Ala Ser Leu Leu Arg Ala Val Ile Ala Ser Ile Cys Val
[1032]	1	5 10 15
[1033]	Val	Ser Ser Met Ala Gln Lys Val Thr Gln Ala Gln Thr Glu Ile Ser
[1034]		20 25 30
[1035]	Val	Val Glu Lys Glu Asp Val Thr Leu Asp Cys Val Tyr Glu Thr Arg
[1036]		35 40 45
[1037]	Asp	Thr Thr Tyr Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Gly Glu
[1038]		50 55 60
[1039]	Leu	Val Phe Leu Ile Arg Arg Asn Ser Phe Asp Glu Gln Asn Glu Ile
[1040]	65	70 75 80
[1041]	Ser	Gly Arg Tyr Ser Trp Asn Phe Gln Lys Ser Thr Ser Ser Phe Asn
[1042]		85 90 95
[1043]	Phe	Thr Ile Thr Ala Ser Gln Val Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
[1044]		100 105 110
[1045]	Ala	Leu Ser Glu Ala His Arg Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly
[1046]		115 120 125
[1047]	Ala	Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys Pro
[1048]		130 135
[1049]	<210>	57

[1050]	<211> 142
[1051]	<212> PRT
[1052]	<213> 人工序列
[1053]	<220>
[1054]	<223> P15 α 链可变结构域
[1055]	<400> 57
[1056]	Met Asp Lys Ile Leu Gly Ala Ser Phe Leu Val Leu Trp Leu Gln Leu
[1057]	1 5 10 15
[1058]	Cys Trp Val Ser Gly Gln Gln Lys Glu Lys Ser Asp Gln Gln Gln Val
[1059]	20 25 30
[1060]	Lys Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Val Gln Lys Gly Gly Ile Ser Ile
[1061]	35 40 45
[1062]	Ile Asn Cys Ala Tyr Glu Asn Thr Ala Phe Asp Tyr Phe Pro Trp Tyr
[1063]	50 55 60
[1064]	Gln Gln Phe Pro Gly Lys Gly Pro Ala Leu Leu Ile Ala Ile Arg Pro
[1065]	65 70 75 80
[1066]	Asp Val Ser Glu Lys Lys Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Phe Asn Lys
[1067]	85 90 95
[1068]	Ser Ala Lys Gln Phe Ser Leu His Ile Met Asp Ser Gln Pro Gly Asp
[1069]	100 105 110
[1070]	Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Ala Ser Pro Gln Gly Ala Gly Ser Tyr
[1071]	115 120 125
[1072]	Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Ile Pro
[1073]	130 135 140
[1074]	<210> 58
[1075]	<211> 136
[1076]	<212> PRT
[1077]	<213> 人工序列
[1078]	<220>
[1079]	<223> P18 α 链可变结构域
[1080]	<400> 58
[1081]	Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu
[1082]	1 5 10 15
[1083]	Gly Pro Gly Ile Ala Gln Lys Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe
[1084]	20 25 30
[1085]	Val Gln Glu Lys Glu Ala Val Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser
[1086]	35 40 45
[1087]	Asp Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu
[1088]	50 55 60
[1089]	Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn Ala Thr
[1090]	65 70 75 80
[1091]	Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn

[1092]	85	90	95
[1093]	Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln Leu Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys		
[1094]	100	105	110
[1095]	Ala Ile Pro Thr Leu Met Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ala		
[1096]	115	120	125
[1097]	Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys Pro		
[1098]	130	135	
[1099]	<210> 59		
[1100]	<211> 131		
[1101]	<212> PRT		
[1102]	<213> 人工序列		
[1103]	<220>		
[1104]	<223> P20 α 链可变结构域		
[1105]	<400> 59		
[1106]	Met Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu		
[1107]	1	5	10
[1108]	Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro		
[1109]	20	25	30
[1110]	Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser		
[1111]	35	40	45
[1112]	Asp Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys		
[1113]	50	55	60
[1114]	Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp		
[1115]	65	70	75
[1116]	Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu		
[1117]	85	90	95
[1118]	Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala		
[1119]	100	105	110
[1120]	Val Leu Glu Gly Gln Lys Leu Leu Phe Ala Arg Gly Thr Met Leu Lys		
[1121]	115	120	125
[1122]	Val Asp Leu		
[1123]	130		
[1124]	<210> 60		
[1125]	<211> 132		
[1126]	<212> PRT		
[1127]	<213> 人工序列		
[1128]	<220>		
[1129]	<223> P22 α 链可变结构域		
[1130]	<400> 60		
[1131]	Met Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu		
[1132]	1	5	10
[1133]	Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro		

[1134]	20	25	30
[1135]	Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser		
[1136]	35	40	45
[1137]	Asp Arg Val Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys		
[1138]	50	55	60
[1139]	Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp		
[1140]	65	70	75
[1141]	Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu		
[1142]	85	90	95
[1143]	Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala		
[1144]	100	105	110
[1145]	Ala Asn Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu		
[1146]	115	120	125
[1147]	Met Val Lys Pro		
[1148]	130		
[1149]	<210> 61		
[1150]	<211> 141		
[1151]	<212> PRT		
[1152]	<213> 人工序列		
[1153]	<220>		
[1154]	<223> (P15, P20) α 链恒定结构域		
[1155]	<400> 61		
[1156]	Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys		
[1157]	1	5	10
[1158]	Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr		
[1159]	20	25	30
[1160]	Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr		
[1161]	35	40	45
[1162]	Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala		
[1163]	50	55	60
[1164]	Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser		
[1165]	65	70	75
[1166]	Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp		
[1167]	85	90	95
[1168]	Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe		
[1169]	100	105	110
[1170]	Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala		
[1171]	115	120	125
[1172]	Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[1173]	130	135	140
[1174]	<210> 62		
[1175]	<211> 141		

[1176]	<212>	PRT
[1177]	<213>	人工序列
[1178]	<220>	
[1179]	<223>	(P15, P20) α 链
[1180]	<400>	62
[1181]	Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys	
[1182]	1 5 10 15	
[1183]	Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr	
[1184]	20 25 30	
[1185]	Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys	
[1186]	35 40 45	
[1187]	Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala	
[1188]	50 55 60	
[1189]	Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser	
[1190]	65 70 75 80	
[1191]	Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp	
[1192]	85 90 95	
[1193]	Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe	
[1194]	100 105 110	
[1195]	Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala	
[1196]	115 120 125	
[1197]	Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser	
[1198]	130 135 140	
[1199]	<210>	63
[1200]	<211>	141
[1201]	<212>	PRT
[1202]	<213>	人工序列
[1203]	<220>	
[1204]	<223>	P22 α 链恒定结构域
[1205]	<400>	63
[1206]	His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys	
[1207]	1 5 10 15	
[1208]	Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr	
[1209]	20 25 30	
[1210]	Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr	
[1211]	35 40 45	
[1212]	Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala	
[1213]	50 55 60	
[1214]	Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser	
[1215]	65 70 75 80	
[1216]	Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp	
[1217]	85 90 95	

[1218]	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn	Phe
[1219]				100					105					110		
[1220]	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala
[1221]				115					120					125		
[1222]	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser			
[1223]				130					135					140		
[1224]	<210> 64															
[1225]	<211> 141															
[1226]	<212> PRT															
[1227]	<213> 人工序列															
[1228]	<220>															
[1229]	<223> P22 α 链 (T180C) 恒定结构域															
[1230]	<400> 64															
[1231]	His	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser	Lys
[1232]	1			5						10					15	
[1233]	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Thr
[1234]				20						25					30	
[1235]	Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Cys
[1236]				35						40					45	
[1237]	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val	Ala
[1238]				50						55					60	
[1239]	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn	Ser
[1240]	65					70					75					80
[1241]	Ile	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys	Asp
[1242]						85					90					95
[1243]	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn	Phe
[1244]				100						105					110	
[1245]	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala
[1246]				115						120					125	
[1247]	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser			
[1248]				130						135					140	
[1249]	<210> 65															
[1250]	<211> 134															
[1251]	<212> PRT															
[1252]	<213> 人工序列															
[1253]	<220>															
[1254]	<223> P1 β 链可变结构域															
[1255]	<400> 65															
[1256]	Met	Gly	Cys	Arg	Leu	Leu	Cys	Cys	Ala	Val	Leu	Cys	Leu	Leu	Gly	Ala
[1257]	1				5						10					15
[1258]	Val	Pro	Met	Glu	Thr	Gly	Val	Thr	Gln	Thr	Pro	Arg	His	Leu	Val	Met
[1259]					20						25					30

[1260]	Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Leu Gly His
[1261]	35 40 45
[1262]	Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Lys Lys Pro Leu Glu Leu
[1263]	50 55 60
[1264]	Met Phe Val Tyr Asn Phe Lys Glu Gln Thr Glu Asn Asn Ser Val Pro
[1265]	65 70 75 80
[1266]	Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser His Leu Phe Leu His
[1267]	85 90 95
[1268]	Leu His Thr Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
[1269]	100 105 110
[1270]	Ser Gln Asp Glu Gln Phe Leu Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly
[1271]	115 120 125
[1272]	Thr Arg Leu Thr Val Leu
[1273]	130
[1274]	<210> 66
[1275]	<211> 133
[1276]	<212> PRT
[1277]	<213> 人工序列
[1278]	<220>
[1279]	<223> P15 β 链可变结构域
[1280]	<400> 66
[1281]	Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
[1282]	1 5 10 15
[1283]	Asp His Ala Asp Thr Gly Val Ser Gln Asp Pro Arg His Lys Ile Thr
[1284]	20 25 30
[1285]	Lys Arg Gly Gln Asn Val Thr Phe Arg Cys Asp Pro Ile Ser Glu His
[1286]	35 40 45
[1287]	Asn Arg Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Thr Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe
[1288]	50 55 60
[1289]	Leu Thr Tyr Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Glu Lys Ser Arg Leu Leu
[1290]	65 70 75 80
[1291]	Ser Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Pro Lys Gly Ser Phe Ser Thr Leu
[1292]	85 90 95
[1293]	Glu Ile Gln Arg Thr Glu Gln Gly Asp Ser Ala Met Tyr Leu Cys Ala
[1294]	100 105 110
[1295]	Ser Ser Leu Ala Tyr Gly Lys Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr
[1296]	115 120 125
[1297]	Arg Leu Thr Val Leu
[1298]	130
[1299]	<210> 67
[1300]	<211> 131
[1301]	<212> PRT

[1302]	<213> 人工序列															
[1303]	<220>															
[1304]	<223> P18 β 链可变结构域															
[1305]	<400> 67															
[1306]	Met	Gly	Ser	Trp	Thr	Leu	Cys	Cys	Val	Ser	Leu	Cys	Ile	Leu	Val	Ala
[1307]	1				5					10					15	
[1308]	Lys	His	Thr	Asp	Ala	Gly	Val	Ile	Gln	Ser	Pro	Arg	His	Glu	Val	Thr
[1309]				20					25					30		
[1310]	Glu	Met	Gly	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Arg	Cys	Lys	Pro	Ile	Ser	Gly	His
[1311]			35						40					45		
[1312]	Asp	Tyr	Leu	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr	Met	Met	Arg	Gly	Leu	Glu	Leu
[1313]		50					55					60				
[1314]	Leu	Ile	Tyr	Phe	Asn	Asn	Asn	Val	Pro	Ile	Asp	Asp	Ser	Gly	Met	Pro
[1315]	65				70					75					80	
[1316]	Glu	Asp	Arg	Phe	Ser	Ala	Lys	Met	Pro	Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Thr	Leu
[1317]				85						90					95	
[1318]	Lys	Ile	Gln	Pro	Ser	Glu	Pro	Arg	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala
[1319]				100					105						110	
[1320]	Ser	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Glu	Ala	Phe	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu
[1321]			115					120						125		
[1322]	Thr	Val	Val													
[1323]		130														
[1324]	<210> 68															
[1325]	<211> 128															
[1326]	<212> PRT															
[1327]	<213> 人工序列															
[1328]	<220>															
[1329]	<223> P20 β 链可变结构域															
[1330]	<400> 68															
[1331]	Met	Gly	Ile	Arg	Leu	Leu	Cys	Arg	Val	Ala	Phe	Cys	Phe	Leu	Ala	Val
[1332]	1				5					10					15	
[1333]	Gly	Leu	Val	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Gln	Ser	Ser	Arg	Tyr	Leu	Val	Lys
[1334]				20					25					30		
[1335]	Arg	Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Phe	Leu	Glu	Cys	Val	Gln	Asp	Met	Asp	His
[1336]			35						40					45		
[1337]	Glu	Asn	Met	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu
[1338]		50					55					60				
[1339]	Ile	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Asp	Val	Lys	Met	Lys	Glu	Lys	Gly	Asp	Ile	Pro
[1340]	65				70					75					80	
[1341]	Glu	Gly	Tyr	Ser	Val	Ser	Arg	Glu	Lys	Lys	Glu	Arg	Phe	Ser	Leu	Ile
[1342]				85						90					95	
[1343]	Leu	Glu	Ser	Ala	Ser	Thr	Asn	Gln	Thr	Ser	Met	Tyr	Leu	Cys	Ala	Thr

[1344]	100	105	110
[1345]	Ser His Gln Pro Gln His Phe Gly Asp Gly Thr Arg Leu Ser Ile Leu		
[1346]	115	120	125
[1347]	<210> 69		
[1348]	<211> 129		
[1349]	<212> PRT		
[1350]	<213> 人工序列		
[1351]	<220>		
[1352]	<223> P22 β 链可变结构域		
[1353]	<400> 69		
[1354]	Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val		
[1355]	1 5 10 15		
[1356]	Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys		
[1357]	20 25 30		
[1358]	Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His		
[1359]	35 40 45		
[1360]	Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu		
[1361]	50 55 60		
[1362]	Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro		
[1363]	65 70 75 80		
[1364]	Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile		
[1365]	85 90 95		
[1366]	Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser		
[1367]	100 105 110		
[1368]	Ser Ser Ile Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val		
[1369]	115 120 125		
[1370]	Leu		
[1371]	<210> 70		
[1372]	<211> 177		
[1373]	<212> PRT		
[1374]	<213> 人工序列		
[1375]	<220>		
[1376]	<223> (P18, P20) β 链恒定结构域		
[1377]	<400> 70		
[1378]	Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro		
[1379]	1 5 10 15		
[1380]	Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu		
[1381]	20 25 30		
[1382]	Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn		
[1383]	35 40 45		
[1384]	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys		
[1385]	50 55 60		

[1386]	Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
[1387]	65 70 75 80
[1388]	Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
[1389]	85 90 95
[1390]	Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
[1391]	100 105 110
[1392]	Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
[1393]	115 120 125
[1394]	Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
[1395]	130 135 140
[1396]	Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
[1397]	145 150 155 160
[1398]	Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
[1399]	165 170 175
[1400]	Phe
[1401]	<210> 71
[1402]	<211> 177
[1403]	<212> PRT
[1404]	<213> 人工序列
[1405]	<220>
[1406]	<223> (P18, P20)β链
[1407]	<400> 71
[1408]	Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
[1409]	1 5 10 15
[1410]	Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
[1411]	20 25 30
[1412]	Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
[1413]	35 40 45
[1414]	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
[1415]	50 55 60
[1416]	Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
[1417]	65 70 75 80
[1418]	Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
[1419]	85 90 95
[1420]	Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
[1421]	100 105 110
[1422]	Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
[1423]	115 120 125
[1424]	Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
[1425]	130 135 140
[1426]	Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
[1427]	145 150 155 160

[1428]	Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
[1429]	165 170 175
[1430]	Phe
[1431]	<210> 72
[1432]	<211> 613
[1433]	<212> PRT
[1434]	<213> 人工序列
[1435]	<220>
[1436]	<223> P1 α (T185C) -P2A-P1 β
[1437]	<400> 72
[1438]	Met Leu Thr Ala Ser Leu Leu Arg Ala Val Ile Ala Ser Ile Cys Val
[1439]	1 5 10 15
[1440]	Val Ser Ser Met Ala Gln Lys Val Thr Gln Ala Gln Thr Glu Ile Ser
[1441]	20 25 30
[1442]	Val Val Glu Lys Glu Asp Val Thr Leu Asp Cys Val Tyr Glu Thr Arg
[1443]	35 40 45
[1444]	Asp Thr Thr Tyr Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Gly Glu
[1445]	50 55 60
[1446]	Leu Val Phe Leu Ile Arg Arg Asn Ser Phe Asp Glu Gln Asn Glu Ile
[1447]	65 70 75 80
[1448]	Ser Gly Arg Tyr Ser Trp Asn Phe Gln Lys Ser Thr Ser Ser Phe Asn
[1449]	85 90 95
[1450]	Phe Thr Ile Thr Ala Ser Gln Val Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
[1451]	100 105 110
[1452]	Ala Leu Ser Glu Ala His Arg Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly
[1453]	115 120 125
[1454]	Ala Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys Pro Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro
[1455]	130 135 140
[1456]	Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys
[1457]	145 150 155 160
[1458]	Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp
[1459]	165 170 175
[1460]	Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met
[1461]	180 185 190
[1462]	Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe
[1463]	195 200 205
[1464]	Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe
[1465]	210 215 220
[1466]	Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser
[1467]	225 230 235 240
[1468]	Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly
[1469]	245 250 255

[1470]	Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr		
[1471]		260	265
[1472]	Leu Arg Leu Trp Ser Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu		270
[1473]		275	280
[1474]	Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Cys Arg		285
[1475]		290	300
[1476]	Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala Val Pro Met Glu		
[1477]		305	310
[1478]	Thr Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg His Leu Val Met Gly Met Thr Asn		315
[1479]		325	330
[1480]	Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Leu Gly His Asn Ala Met Tyr		335
[1481]		340	345
[1482]	Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Lys Lys Pro Leu Glu Leu Met Phe Val Tyr		350
[1483]		355	360
[1484]	Asn Phe Lys Glu Gln Thr Glu Asn Asn Ser Val Pro Ser Arg Phe Ser		365
[1485]		370	375
[1486]	Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser His Leu Phe Leu His Leu His Thr Leu		380
[1487]		385	390
[1488]	Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Gln Asp Glu		395
[1489]		405	410
[1490]	Gln Phe Leu Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr		415
[1491]		420	425
[1492]	Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe		430
[1493]		435	440
[1494]	Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val		445
[1495]		450	455
[1496]	Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp		460
[1497]		465	470
[1498]	Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro		475
[1499]		485	490
[1500]	Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser		495
[1501]		500	505
[1502]	Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe		510
[1503]		515	520
[1504]	Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr		525
[1505]		530	535
[1506]	Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp		540
[1507]		545	550
[1508]	Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val		555
[1509]		565	570
[1510]	Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu		575
[1511]		580	585
			590

[1512]	Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg
[1513]	595 600 605
[1514]	Lys Asp Ser Arg Gly
[1515]	610
[1516]	<210> 73
[1517]	<211> 617
[1518]	<212> PRT
[1519]	<213> 人工序列
[1520]	<220>
[1521]	<223> P15 α (T190C) -P2A-P15 β (S190C)
[1522]	<400> 73
[1523]	Met Asp Lys Ile Leu Gly Ala Ser Phe Leu Val Leu Trp Leu Gln Leu
[1524]	1 5 10 15
[1525]	Cys Trp Val Ser Gly Gln Gln Lys Glu Lys Ser Asp Gln Gln Gln Val
[1526]	20 25 30
[1527]	Lys Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Val Gln Lys Gly Gly Ile Ser Ile
[1528]	35 40 45
[1529]	Ile Asn Cys Ala Tyr Glu Asn Thr Ala Phe Asp Tyr Phe Pro Trp Tyr
[1530]	50 55 60
[1531]	Gln Gln Phe Pro Gly Lys Gly Pro Ala Leu Leu Ile Ala Ile Arg Pro
[1532]	65 70 75 80
[1533]	Asp Val Ser Glu Lys Lys Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Phe Asn Lys
[1534]	85 90 95
[1535]	Ser Ala Lys Gln Phe Ser Leu His Ile Met Asp Ser Gln Pro Gly Asp
[1536]	100 105 110
[1537]	Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Ala Ser Pro Gln Gly Ala Gly Ser Tyr
[1538]	115 120 125
[1539]	Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Ile Pro Asn Ile
[1540]	130 135 140
[1541]	Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser
[1542]	145 150 155 160
[1543]	Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val
[1544]	165 170 175
[1545]	Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu
[1546]	180 185 190
[1547]	Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser
[1548]	195 200 205
[1549]	Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile
[1550]	210 215 220
[1551]	Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys
[1552]	225 230 235 240
[1553]	Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn

[1554]		245		250		255
[1555]	Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe					
[1556]		260		265		270
[1557]	Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser Gly Ser Gly Ala Thr					
[1558]		275		280		285
[1559]	Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly					
[1560]		290		295		300
[1561]	Pro Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly					
[1562]	305		310		315	320
[1563]	Ala Asp His Ala Asp Thr Gly Val Ser Gln Asp Pro Arg His Lys Ile					
[1564]		325		330		335
[1565]	Thr Lys Arg Gly Gln Asn Val Thr Phe Arg Cys Asp Pro Ile Ser Glu					
[1566]		340		345		350
[1567]	His Asn Arg Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Thr Leu Gly Gln Gly Pro Glu					
[1568]		355		360		365
[1569]	Phe Leu Thr Tyr Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Glu Lys Ser Arg Leu					
[1570]		370		375		380
[1571]	Leu Ser Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Pro Lys Gly Ser Phe Ser Thr					
[1572]	385		390		395	400
[1573]	Leu Glu Ile Gln Arg Thr Glu Gln Gly Asp Ser Ala Met Tyr Leu Cys					
[1574]		405		410		415
[1575]	Ala Ser Ser Leu Ala Tyr Gly Lys Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly					
[1576]		420		425		430
[1577]	Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu					
[1578]		435		440		445
[1579]	Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys					
[1580]		450		455		460
[1581]	Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu					
[1582]	465		470		475	480
[1583]	Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr					
[1584]		485		490		495
[1585]	Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr					
[1586]		500		505		510
[1587]	Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro					
[1588]		515		520		525
[1589]	Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn					
[1590]		530		535		540
[1591]	Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser					
[1592]	545		550		555	560
[1593]	Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr					
[1594]		565		570		575
[1595]	Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly					

[1596]	580	585	590
[1597]	Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala		
[1598]	595	600	605
[1599]	Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly		
[1600]	610	615	
[1601]	<210> 74		
[1602]	<211> 607		
[1603]	<212> PRT		
[1604]	<213> 人工序列		
[1605]	<220>		
[1606]	<223> P18 α (T184C) -P2A-P18 β (S188C)		
[1607]	<400> 74		
[1608]	Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu		
[1609]	1	5	10
[1610]	Gly Pro Gly Ile Ala Gln Lys Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe		
[1611]	20	25	30
[1612]	Val Gln Glu Lys Glu Ala Val Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser		
[1613]	35	40	45
[1614]	Asp Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu		
[1615]	50	55	60
[1616]	Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn Ala Thr		
[1617]	65	70	75
[1618]	Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn		
[1619]	85	90	95
[1620]	Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln Leu Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys		
[1621]	100	105	110
[1622]	Ala Ile Pro Thr Leu Met Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ala		
[1623]	115	120	125
[1624]	Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys Pro Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala		
[1625]	130	135	140
[1626]	Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu		
[1627]	145	150	155
[1628]	Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser		
[1629]	165	170	175
[1630]	Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp		
[1631]	180	185	190
[1632]	Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala		
[1633]	195	200	205
[1634]	Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe		
[1635]	210	215	220
[1636]	Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe		
[1637]	225	230	235
			240

[1638]	Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe		
[1639]		245	250 255
[1640]	Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu		
[1641]		260	265 270
[1642]	Arg Leu Trp Ser Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys		
[1643]		275	280 285
[1644]	Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Ser Trp Thr		
[1645]		290	295 300
[1646]	Leu Cys Cys Val Ser Leu Cys Ile Leu Val Ala Lys His Thr Asp Ala		
[1647]		305	310 315 320
[1648]	Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly Gln Glu		
[1649]		325	330 335
[1650]	Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His Asp Tyr Leu Phe Trp		
[1651]		340	345 350
[1652]	Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu Leu Ile Tyr Phe Asn		
[1653]		355	360 365
[1654]	Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly Met Pro Glu Asp Arg Phe Ser		
[1655]		370	375 380
[1656]	Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ser		
[1657]		385	390 395 400
[1658]	Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Val Ser Gly		
[1659]		405	410 415
[1660]	Ser Glu Ala Phe Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp		
[1661]		420	425 430
[1662]	Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu		
[1663]		435	440 445
[1664]	Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr		
[1665]		450	455 460
[1666]	Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys		
[1667]		465	470 475 480
[1668]	Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln		
[1669]		485	490 495
[1670]	Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val		
[1671]		500	505 510
[1672]	Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val		
[1673]		515	520 525
[1674]	Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala		
[1675]		530	535 540
[1676]	Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp		
[1677]		545	550 555 560
[1678]	Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr		
[1679]		565	570 575

[1680]	Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu
[1681]	580 585 590
[1682]	Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Phe
[1683]	595 600 605
[1684]	<210> 75
[1685]	<211> 599
[1686]	<212> PRT
[1687]	<213> 人工序列
[1688]	<220>
[1689]	<223> P20 α (T179C) -P2A-P20 β (S185C)
[1690]	<400> 75
[1691]	Met Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu
[1692]	1 5 10 15
[1693]	Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro
[1694]	20 25 30
[1695]	Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser
[1696]	35 40 45
[1697]	Asp Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys
[1698]	50 55 60
[1699]	Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp
[1700]	65 70 75 80
[1701]	Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu
[1702]	85 90 95
[1703]	Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala
[1704]	100 105 110
[1705]	Val Leu Glu Gly Gln Lys Leu Leu Phe Ala Arg Gly Thr Met Leu Lys
[1706]	115 120 125
[1707]	Val Asp Leu Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
[1708]	130 135 140
[1709]	Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
[1710]	145 150 155 160
[1711]	Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr
[1712]	165 170 175
[1713]	Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
[1714]	180 185 190
[1715]	Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe
[1716]	195 200 205
[1717]	Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser
[1718]	210 215 220
[1719]	Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn
[1720]	225 230 235 240
[1721]	Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu

[1722]		245		250		255
[1723]	Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser					
[1724]		260		265		270
[1725]	Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val					
[1726]		275		280		285
[1727]	Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala					
[1728]		290		295		300
[1729]	Phe Cys Phe Leu Ala Val Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser					
[1730]	305		310		315	320
[1731]	Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys					
[1732]		325		330		335
[1733]	Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro					
[1734]		340		345		350
[1735]	Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys					
[1736]		355		360		365
[1737]	Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys					
[1738]		370		375		380
[1739]	Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser					
[1740]	385		390		395	400
[1741]	Met Tyr Leu Cys Ala Thr Ser His Gln Pro Gln His Phe Gly Asp Gly					
[1742]		405		410		415
[1743]	Thr Arg Leu Ser Ile Leu Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu					
[1744]		420		425		430
[1745]	Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys					
[1746]		435		440		445
[1747]	Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu					
[1748]		450		455		460
[1749]	Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr					
[1750]	465		470		475	480
[1751]	Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr					
[1752]		485		490		495
[1753]	Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro					
[1754]		500		505		510
[1755]	Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn					
[1756]		515		520		525
[1757]	Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser					
[1758]		530		535		540
[1759]	Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr					
[1760]	545		550		555	560
[1761]	Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly					
[1762]		565		570		575
[1763]	Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala					

[1764]	580	585	590
[1765]	Met Val Lys Arg Lys Asp Phe		
[1766]	595		
[1767]	<210> 76		
[1768]	<211> 603		
[1769]	<212> PRT		
[1770]	<213> 人工序列		
[1771]	<220>		
[1772]	<223> P22 α (T180C) -P2A-P22 β (S186C)		
[1773]	<400> 76		
[1774]	Met Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu		
[1775]	1 5 10 15		
[1776]	Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro		
[1777]	20 25 30		
[1778]	Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser		
[1779]	35 40 45		
[1780]	Asp Arg Val Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys		
[1781]	50 55 60		
[1782]	Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp		
[1783]	65 70 75 80		
[1784]	Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu		
[1785]	85 90 95		
[1786]	Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala		
[1787]	100 105 110		
[1788]	Ala Asn Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu		
[1789]	115 120 125		
[1790]	Met Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu		
[1791]	130 135 140		
[1792]	Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe		
[1793]	145 150 155 160		
[1794]	Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile		
[1795]	165 170 175		
[1796]	Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn		
[1797]	180 185 190		
[1798]	Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala		
[1799]	195 200 205		
[1800]	Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu		
[1801]	210 215 220		
[1802]	Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr		
[1803]	225 230 235 240		
[1804]	Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu		
[1805]	245 250 255		

[1806]	Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser		
[1807]		260	265
[1808]	Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp		270
[1809]		275	280
[1810]	Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val		285
[1811]		290	295
[1812]	Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln		300
[1813]		305	310
[1814]	Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu		315
[1815]		325	330
[1816]	Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp		335
[1817]		340	345
[1818]	Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met		350
[1819]		355	360
[1820]	Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys		365
[1821]		370	375
[1822]	Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr		380
[1823]		385	390
[1824]	Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Ile Asn Glu Gln Phe Phe Gly		395
[1825]		405	410
[1826]	Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro		415
[1827]		420	425
[1828]	Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr		430
[1829]		435	440
[1830]	Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His		445
[1831]		450	455
[1832]	Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val		460
[1833]		465	470
[1834]	Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser		475
[1835]		485	490
[1836]	Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln		495
[1837]		500	505
[1838]	Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser		510
[1839]		515	520
[1840]	Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile		525
[1841]		530	535
[1842]	Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu		540
[1843]		545	550
[1844]	Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu		555
[1845]		565	570
[1846]	Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu		575
[1847]		580	585
			590

[1848]	Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
[1849]	595 600
[1850]	<210> 77
[1851]	<211> 387
[1852]	<212> DNA
[1853]	<213> 人工序列
[1854]	<220>
[1855]	<223> C4 α 链可变结构域 WT
[1856]	<400> 77
[1857]	atgacatcca ttcgagctgt atttatattc ctgtggctgc agctggactt ggtgaatgga 60
[1858]	gagaatgtgg agcagcatcc ttcaaccctg agtgtccagg agggagacag cgctgtttatc 120
[1859]	aagtgtactt attcagacag tgcctcaaac tactttccctt ggtataagca agaacttgga 180
[1860]	aaaagacctc agcttattat agacattcgt tcaaattgtg gcgaaaagaa agaccaacga 240
[1861]	attgctgtta cattgaacaa gacagccaaa catttctccc tgcacatcac agagacccaa 300
[1862]	cctgaagact cggctgtcta cttctgtgca gcgaccgaag actatcagtt aatctggggc 360
[1863]	gctgggacca agctaattat aaagcca 387
[1864]	<210> 78
[1865]	<211> 387
[1866]	<212> DNA
[1867]	<213> 人工序列
[1868]	<220>
[1869]	<223> C4 α 链可变结构域 - 密码子优化的
[1870]	<400> 78
[1871]	atgaccagca tccgggccgt gttcatcttc ctgtggctgc agctggacct cgtcaacggc 60
[1872]	gagaacgtgg aacagcacc cagcaccctg agcgtgcagg aaggcgacag cgccgtcatc 120
[1873]	aagtgcacct acagcgactc cgccagcaac tactttccctt ggtacaagca ggaactgggc 180
[1874]	aagcggcccc agctgatcat cgacatccgg tccaacgtgg gcgagaagaa ggaccagcgg 240
[1875]	atcgccgtga ccctgaacaa gaccgccaag cacttcagcc tgcacatcac cgagacacag 300
[1876]	cccgaggact ccgccgtgta cttctgtgcc gccaccgagg attaccagct gatctgggga 360
[1877]	gccggcacca agctgatcat taagccc 387
[1878]	<210> 79
[1879]	<211> 387
[1880]	<212> DNA
[1881]	<213> 人工序列
[1882]	<220>
[1883]	<223> C4 α -DLT链可变结构域
[1884]	<400> 79
[1885]	atgacatcca ttcgagctgt atttatattc ctgtggctgc agctggactt ggtgaatgga 60
[1886]	gagaatgtgg agcagcatcc ttcaaccctg agtgtccagg agggagacag cgctgtttatc 120
[1887]	aagtgtactt attcagacag tgcctcaaac tactttccctt ggtataagca agaacttgga 180
[1888]	aaaagacctc agcttattat agacattcgt tcaaattgtg gcgaaaagaa agaccaacga 240
[1889]	attgctgtta cattgaacaa gacagccaaa catttctccc tgcacatcac agagacccaa 300

[1890]	cctgaagact cggctgtcta cttctgtgca gcgaccgaag acctgacgtt aatctggggc 360
[1891]	gctgggacca agctaattat aaagcca 387
[1892]	<210> 80
[1893]	<211> 387
[1894]	<212> DNA
[1895]	<213> 人工序列
[1896]	<220>
[1897]	<223> C4 α -DLT链可变结构域, 密码子优化的
[1898]	<400> 80
[1899]	atgaccagca tccgggccgt gttcatcttc ctgtggctgc agctggacct cgtcaacggc 60
[1900]	gagaacgtgg aacagcaccc cagcaccttg agcgtgcagg aaggcgacag cgccgtcatc 120
[1901]	aagtgcacct acagcgactc cgccagcaac tacttcccct ggtacaagca ggaactgggc 180
[1902]	aagcgccccc agctgatcat cgacatccgg tccaacgtgg gcgagaagaa ggaccagcgg 240
[1903]	atgccgtga ccctgaacaa gaccgccaag cacttcagcc tgcacatcac cgagacacag 300
[1904]	cccaggact ccgccgtgta cttctgtgcc gccaccgagg atctgacgt gatctgggga 360
[1905]	gccggcacca agctgatcat taagccc 387
[1906]	<210> 81
[1907]	<211> 426
[1908]	<212> DNA
[1909]	<213> 人工序列
[1910]	<220>
[1911]	<223> C4 α 链恒定结构域 WT
[1912]	<400> 81
[1913]	gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag 60
[1914]	tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaatg tgtcacaag taaggattct 120
[1915]	gatgtgtata tcacagacaa aactgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac 180
[1916]	agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc 240
[1917]	attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggtc 300
[1918]	gagaaaagct ttgaaacaga tacgaacctt aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc 360
[1919]	cgaatcctcc tctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgtgcg gctgtgtgcc 420
[1920]	agctga 426
[1921]	<210> 82
[1922]	<211> 426
[1923]	<212> DNA
[1924]	<213> 人工序列
[1925]	<220>
[1926]	<223> C4 α 链恒定结构域 - 密码子优化的
[1927]	<400> 82
[1928]	gacatccaga accccgaccc tgccgtgtac cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag 60
[1929]	agcgtgtgcc tgttcaccga cttcgacagc cagaccaacg tgtccagag caaggacagc 120
[1930]	gacgtgtaca tcaccgataa gaccgtgctg gacatgcgga gcatggactt caagagcaac 180
[1931]	agcgccgtgg cctggtccaa caagagcgac ttgcctgcg ccaacgcctt caacaacagc 240

[1932]	attatccccg aggacacatt cttcccaagc cccgagagca gctgcgacgt gaagctgggtg 300
[1933]	gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg aacttccaga acctcagcgt gatcggttc 360
[1934]	cggatcctgc tgctgaaggt ggccggcttc aacctgctga tgaccctgcg gctgtggtcc 420
[1935]	agctga 426
[1936]	<210> 83
[1937]	<211> 426
[1938]	<212> DNA
[1939]	<213> 人工序列
[1940]	<220>
[1941]	<223> C4 α 链恒定结构域 - Cys 修饰
[1942]	<400> 83
[1943]	gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag 60
[1944]	tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaatg tgtcacaag taaggattct 120
[1945]	gatgtgtata tcacagacaa atgcgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac 180
[1946]	agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc 240
[1947]	attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagt cctgtgatgt caagctggtc 300
[1948]	gagaaaagct ttgaaacaga tacgaacctt aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc 360
[1949]	cgaatcctcc tcctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgtgcg gctgtggtcc 420
[1950]	agctga 426
[1951]	<210> 84
[1952]	<211> 426
[1953]	<212> DNA
[1954]	<213> 人工序列
[1955]	<220>
[1956]	<223> C4 α 链恒定结构域 - Cys修饰,
[1957]	密码子优化的
[1958]	<400> 84
[1959]	gacatccaga accccgaccc tgccgtgtac cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag 60
[1960]	agcgtgtgcc tgttcaccga cttcgacagc cagaccaacg tgtccagag caaggacagc 120
[1961]	gacgtgtaca tcaccgataa gtgcgtgctg gacatgcgga gcatggactt caagagcaac 180
[1962]	agcgccgtgg cctggtccaa caagagcgac ttcgcctgcg ccaacgcctt caacaacagc 240
[1963]	attatccccg aggacacatt cttcccaagc cccgagagca gctgcgacgt gaagctgggtg 300
[1964]	gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg aacttccaga acctcagcgt gatcggttc 360
[1965]	cggatcctgc tgctgaaggt ggccggcttc aacctgctga tgaccctgcg gctgtggtcc 420
[1966]	agctga 426
[1967]	<210> 85
[1968]	<211> 813
[1969]	<212> DNA
[1970]	<213> 人工序列
[1971]	<220>
[1972]	<223> C4 α 链 WT
[1973]	<400> 85

[1974]	atgacatcca ttcgagctgt atttatatc ctgtggctgc agctggactt ggtgaatgga	60
[1975]	gagaatgtgg agcagcatcc ttcaaccctg agtgtccagg agggagacag cgctgttata	120
[1976]	aagtgtactt attcagacag tgcctcaaac tacttccctt ggtataagca agaacttgga	180
[1977]	aaaagacctc agcttattat agacattcgt tcaaatgtgg gcgaaaagaa agaccaacga	240
[1978]	attgctgtta cattgaacaa gacagccaaa catttctccc tgcacatcac agagacccaa	300
[1979]	cctgaagact cggctgtcta cttctgtgca gcgaccgaag actatcagtt aatctggggc	360
[1980]	gctgggacca agctaattat aaagccagat atccagaacc ctgaccctgc cgtgtaccag	420
[1981]	ctgagagact ctaaattccag tgacaagtct gtctgcctat tcaccgattt tgattctcaa	480
[1982]	acaaatgtgt cacaaagtaa ggattctgat gtgtatatca cagacaaaac tgtgctagac	540
[1983]	atgaggctta tggacttcaa gagcaacagt gctgtggcct ggagcaacaa atctgacttt	600
[1984]	gcatgtgcaa acgccttcaa caacagcatt attccagaag acaccttctt cccagccca	660
[1985]	gaaagtccct gtgatgtcaa gctggtcgag aaaagctttg aaacagatac gaacctaac	720
[1986]	tttcaaaccc tgtcagtgat tgggttccga atcctcctcc tgaagtggc cgggtttaat	780
[1987]	ctgctcatga cgctgcggct gtggtccagc tga	813
[1988]	<210>	86
[1989]	<211>	813
[1990]	<212>	DNA
[1991]	<213>	人工序列
[1992]	<220>	
[1993]	<223>	C4 α 链 - Cys修饰, 密码子优化的
[1994]	<400>	86
[1995]	atgaccagca tccgggccgt gttcatcttc ctgtggctgc agctggacct cgtcaacggc	60
[1996]	gagaacgtgg aacagacccc cagcacctg agcgtgcagg aaggcgacag cgccgtcatc	120
[1997]	aagtgcacct acagcgactc cgccagcaac tacttccctt ggtacaagca ggaactgggc	180
[1998]	aagcggcccc agctgatcat cgacatccgg tccaacgtgg gcgagaagaa ggaccagcgg	240
[1999]	atcgccgtga ccctgaacaa gaccgccaag cacttcagcc tgcacatcac cgagacacag	300
[2000]	cccaggact ccgccgtgta cttctgtgcc gccaccgagg actaccagct gatctgggga	360
[2001]	gccggcacca agctgatcat taagcccagc atccagaacc ccgaccctgc cgtgtaccag	420
[2002]	ctgcgggaca gcaagagcag cgacaagagc gtgtgcctgt tcaccgactt cgacagccag	480
[2003]	accaacgtgt ccagagcaa ggacagcgac gtgtacatca ccgataagt cgtgctggac	540
[2004]	atgcggagca tggacttcaa gagcaacagc gccgtggcct ggtccaacaa gagcgacttc	600
[2005]	gcctgcgcca acgccttcaa caacagcatt atccccgagg acacattctt cccaagcccc	660
[2006]	gagagcagct gcgacgtgaa gctggtggaa aagagcttcg agacagacac caacctgaac	720
[2007]	ttccagaacc tcagcgtgat cggcttccgg atcctgctgc tgaagtggc cggcttcaac	780
[2008]	ctgctgatga ccctgcggct gtggtccagc tga	813
[2009]	<210>	87
[2010]	<211>	813
[2011]	<212>	DNA
[2012]	<213>	人工序列
[2013]	<220>	
[2014]	<223>	C4 α -DLT链 - Cys修饰, 密码子优化的
[2015]	<400>	87

[2016]	atgaccagca tccgggccgt gttcatcttc ctgtggctgc agctggacct cgtcaacggc	60
[2017]	gagaacgtgg aacagcaccc cagcaccttg agcgtgcagg aaggcgacag cgccgtcatc	120
[2018]	aagtgcacct acagcgactc cgccagcaac tacttcccct ggtacaagca ggaactgggc	180
[2019]	aagcggcccc agctgatcat cgacatccgg tccaacgtgg gcgagaagaa ggaccagcgg	240
[2020]	atgccgtga ccctgaacaa gaccgccaag cacttcagcc tgcacatcac cgagacacag	300
[2021]	cccaggact ccgccgtgta cttctgtgcc gccaccgagg atctgacgt gatctgggga	360
[2022]	gccggcacca agctgatcat taagcccgac atccagaacc ccgacctgc cgtgtaccag	420
[2023]	ctgcgggaca gcaagagcag cgacaagagc gtgtgcctgt tcaccgactt cgacagccag	480
[2024]	accaacgtgt ccagagcaa ggacagcgac gtgtacatca ccgataagt cgtgtctggac	540
[2025]	atgcggagca tggacttcaa gagcaacagc gccgtggcct ggtccaacaa gagcgacttc	600
[2026]	gcctgcgcca acgccttcaa caacagcatt atccccgagg acacattctt cccaagcccc	660
[2027]	gagagcagct gcgacgtgaa gctggtggaa aagagcttcg agacagacac caacctgaac	720
[2028]	ttccagaacc tcagcgtgat cggttccgg atcctgctgc tgaaggtggc cggcttcaac	780
[2029]	ctgctgatga ccctgcggct gtggtccagc tga	813
[2030]	<210>	88
[2031]	<211>	393
[2032]	<212>	DNA
[2033]	<213>	人工序列
[2034]	<220>	
[2035]	<223>	C4β链可变结构域 WT
[2036]	<400>	88
[2037]	atgagcaacc agtgctctg ctgtgtggtc ctttgtttcc tgggagcaaa caccgtggat	60
[2038]	ggtggaatca ctacgtcccc aaagtacctg ttccagaaagg aaggacagaa tgtgacctg	120
[2039]	agttgtgaac agaatttgaa ccacgatgcc atgtactggt accgacagga ccaggggcaa	180
[2040]	gggtgagat tgatctacta ctacagata gtaaataact ttccagaaagg agatatagct	240
[2041]	gaagggtaca gcgtctctcg ggagaagaag gaatccttcc ctctcactgt gacatcgccc	300
[2042]	caaaagaacc cgacagcttt ctatctctgt gccagtagcc ccggggccct ctacgagcag	360
[2043]	tacttcgggc cgggcaccag gctcacggtc aca	393
[2044]	<210>	89
[2045]	<211>	393
[2046]	<212>	DNA
[2047]	<213>	人工序列
[2048]	<220>	
[2049]	<223>	C4β链可变结构域 -密码子优化的
[2050]	<400>	89
[2051]	atgagcaacc agtgctgtg ctgcgtggtg ctgtgtttcc tgggcgcaa caccgtggac	60
[2052]	ggcggcatca ccagagccc caagtacctg ttccggaaag agggccagaa cgtcacctg	120
[2053]	agctgcgagc agaacctgaa ccacgacgcc atgtactggt acagacagga ccccgacag	180
[2054]	ggcctgcggc tgatctacta cagccagatc gtgaacgact tccagaagg agatatcgcc	240
[2055]	gagggtaca gcgtgtccag agagaagaaa gaggccttcc cactgacctg gaccagcgcc	300
[2056]	cagaagaacc ccaccgctt ctacctgtgc gccagctctc ctggcgccct gtacgagcag	360
[2057]	tacttcggcc ctggcaccgg gctgacagt acc	393

[2058]	<210> 90
[2059]	<211> 540
[2060]	<212> DNA
[2061]	<213> 人工序列
[2062]	<220>
[2063]	<223> (C4, P1, P15, P22) β 链恒定结构域 WT
[2064]	<400> 90
[2065]	gaggacctga aaaacgtgtt cccacccgag gtcgtgtgt ttgagccatc agaagcagag 60
[2066]	atctcccaca cccaaaaggc cacactgggtg tgcctggcca caggcttcta ccccgaccac 120
[2067]	gtggagctga gctggtgggt gaatgggaag gaggtgcaca gtggggtcag cacagaccgc 180
[2068]	cagcccctca aggagcagcc cgccctcaat gactccagat actgcctgag cagccgcctg 240
[2069]	agggtctcgg ccacctctg gcagaacccc cgcaaccact tccgctgtca agtccagttc 300
[2070]	tacgggctct cggagaatga cgagtggacc caggataggg ccaaacctgt caccagatc 360
[2071]	gtcagcgccg aggcctgggg tagagcagac tgtggcttca cctccgagtc ttaccagcaa 420
[2072]	gggtcctgt ctgccaccat cctctatgag atcttgctag ggaaggccac cttgtatgcc 480
[2073]	gtgctgggtca gtgccctcgt gctgatggcc atggtaaga gaaaggattc cagaggctag 540
[2074]	<210> 91
[2075]	<211> 540
[2076]	<212> DNA
[2077]	<213> 人工序列
[2078]	<220>
[2079]	<223> (C4, P1, P15, P22) β 链恒定结构域 - Cys修饰
[2080]	<400> 91
[2081]	gaggacctga aaaacgtgtt cccacccgag gtcgtgtgt ttgagccatc agaagcagag 60
[2082]	atctcccaca cccaaaaggc cacactgggtg tgcctggcca caggcttcta ccccgaccac 120
[2083]	gtggagctga gctggtgggt gaatgggaag gaggtgcaca gtggggtcag cacagaccgc 180
[2084]	cagcccctca aggagcagcc cgccctcaat gactccagat actgcctgag cagccgcctg 240
[2085]	agggtctcgg ccacctctg gcagaacccc cgcaaccact tccgctgtca agtccagttc 300
[2086]	tacgggctct cggagaatga cgagtggacc caggataggg ccaaacctgt caccagatc 360
[2087]	gtcagcgccg aggcctgggg tagagcagac tgtggcttca cctccgagtc ttaccagcaa 420
[2088]	gggtcctgt ctgccaccat cctctatgag atcttgctag ggaaggccac cttgtatgcc 480
[2089]	gtgctgggtca gtgccctcgt gctgatggcc atggtaaga gaaaggattc cagaggctag 540
[2090]	<210> 92
[2091]	<211> 540
[2092]	<212> DNA
[2093]	<213> 人工序列
[2094]	<220>
[2095]	<223> (C4, P1, P15, P22) β 链恒定结构域 -
[2096]	密码子优化的
[2097]	<400> 92
[2098]	gaggacctga agaactgtt ccccccagag gtggccgtgt tcgagcctag cgaggccgag 60
[2099]	atcagccaca ccagaaaage caccctcgtg tgcctggcca ccggctttta ccccgaccac 120

[2100]	gtggaactgt cttggtgggt caacggcaaa gaggtgcaca gcggcgtcag caccgacccc	180
[2101]	cagcccctga aagagcagcc cgccctgaac gacagccggt actgtctgag cagcagactg	240
[2102]	agagtgtccg ccacctctg gcagaacccc cggaaccact tcagatgccg ggtgcagtgc	300
[2103]	tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc caggaccggg ccaagcccgt gaccagatc	360
[2104]	gtgtctctg aggctgggg cagagccgat tgcggcttca ccagcgagag ctaccagcag	420
[2105]	ggcgtgctga gcgccaccat cctgtacgag atcctgctgg gcaaggccac cctgtacgcc	480
[2106]	gtgtggtgt ccgccctggt gctgatggcc atggtcaagc ggaaggacag ccggggctga	540
[2107]	<210> 93	
[2108]	<211> 540	
[2109]	<212> DNA	
[2110]	<213> 人工序列	
[2111]	<220>	
[2112]	<223> (C4, P1, P15, P22) β 链恒定结构域 - Cys修饰,	
[2113]	密码子优化的	
[2114]	<400> 93	
[2115]	gaggacctga agaactgtt cccccagag gtggccgtgt tcgagcctag cgaggccgag	60
[2116]	atcagccaca ccagaaagc caccctcgtg tgccctggcca ccggctttta cccgaccac	120
[2117]	gtggaactgt cttggtgggt caacggcaaa gaggtgcaca gcggcgtctg caccgacccc	180
[2118]	cagcccctga aagagcagcc cgccctgaac gacagccggt actgtctgag cagcagactg	240
[2119]	agagtgtccg ccacctctg gcagaacccc cggaaccact tcagatgccg ggtgcagtgc	300
[2120]	tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc caggaccggg ccaagcccgt gaccagatc	360
[2121]	gtgtctctg aggctgggg cagagccgat tgcggcttca ccagcgagag ctaccagcag	420
[2122]	ggcgtgctga gcgccaccat cctgtacgag atcctgctgg gcaaggccac cctgtacgcc	480
[2123]	gtgtggtgt ccgccctggt gctgatggcc atggtcaagc ggaaggacag ccggggctga	540
[2124]	<210> 94	
[2125]	<211> 933	
[2126]	<212> DNA	
[2127]	<213> 人工序列	
[2128]	<220>	
[2129]	<223> C4 β 链 WT	
[2130]	<400> 94	
[2131]	atgagcaacc aggtgctctg ctgtgtggtc ctttgtttcc tgggagcaaa caccgtggat	60
[2132]	ggtggaatca ctacgtcccc aaagtacctg ttcagaaagg aaggacagaa tgtgacctg	120
[2133]	agttgtgaac agaatttgaa ccacgatgcc atgtactggt accgacagga ccagggcaa	180
[2134]	gggctgagat tgatctacta ctcacagata gtaaatgact ttcagaaagg agatatagct	240
[2135]	gaagggtaca gcgtctctcg ggagaagaag gaatccttc ctctactgt gacatcgcc	300
[2136]	caaaagaacc cgacagcttt ctatctctgt gccagtagcc ccggggccct ctacgagcag	360
[2137]	tacttcgggc cgggcaccag gctcacggtc acagaggacc tgaaaaacgt gttcccacc	420
[2138]	gaggtcgtg tgtttgagcc atcagaagca gagatctccc acacccaaaa ggccacactg	480
[2139]	gtgtgcctgg ccacaggctt ctaccccgac cacgtggagc tgagctggtg ggtgaatggg	540
[2140]	aaggaggtgc acagtggggc cagcacagac ccgagcccc tcaaggagca gcccgccctc	600
[2141]	aatgactcca gatactgct gagcagccgc ctgagggtct cggccacctt ctggcagaac	660

[2142]	ccccgcaacc acttccgctg tcaagtccag ttctacgggc tctcggagaa tgacgagtgg	720
[2143]	accagagata gggccaaacc tgtcaccag atcgtcagcg ccgaggcctg gggtagagca	780
[2144]	gactgtggct tcacctcga gtcttaccag caaggggtcc tgtctgccac cactctctat	840
[2145]	gagatcttgc tagggaaggc caccttgat gccgtgctgg tcagtgcct cgtgctgatg	900
[2146]	gccatggtca agagaaagga ttccagaggc tag	933
[2147]	<210> 95	
[2148]	<211> 933	
[2149]	<212> DNA	
[2150]	<213> 人工序列	
[2151]	<220>	
[2152]	<223> C4 β 链 - Cys修饰, 密码子优化的	
[2153]	<400> 95	
[2154]	atgagcaacc aggtgctgtg ctgcgtggtg ctgtgtttcc tgggcgcaa caccgtggac	60
[2155]	ggcgcatca ccagagccc caagtacctg ttccggaaag agggccagaa cgtcaccctg	120
[2156]	agctgcgagc agaacctgaa ccacgacgcc atgtactggt acagacagga ccccgacag	180
[2157]	ggcctgcggc tgatctacta cagccagatc gtgaacgact tccagaagg agatatgcc	240
[2158]	gagggtaca gcgtgtccag agagaagaaa gagtccttcc cactgaccgt gaccagcgc	300
[2159]	cagaagaacc ccaccgcctt ctacctgtgc gccagctctc ctggcgccct gtacgagcag	360
[2160]	tacttcggcc ctggcaccgc gctgacagt accgaggacc tgaagaacgt gttccccca	420
[2161]	gaggtggccg gtctcagacc tagcaggacc gagatcagcc acaccagaa agccaccctc	480
[2162]	gtgtgcctgg ccaccgcctt ttaccccgac cagtggaac tgtcttggt ggtcaacgc	540
[2163]	aaagaggtgc acagcggcgt ctgcaccgac cccagcccc tgaaagagca gcccgccctg	600
[2164]	aacgacagcc ggtactgtct gagcagcaga ctgagagtgt ccgccacctt ctggcagaac	660
[2165]	ccccggaacc acttcagatg ccagggtcag ttctacggcc tgagcgagaa cgacgagtgg	720
[2166]	accaggacc gggccaagcc cgtgaccag atcgtgtctg ctgaggcctg gggcagagcc	780
[2167]	gattgcggct tcaccagca gagctaccag cagggcgtgc tgagcgccac cactctgtac	840
[2168]	gagatcctgc tgggcaaggc caccctgtac gccgtgctgg tgtccgcct ggtgctgatg	900
[2169]	gccatggtca agcggaagga cagccgggc tga	933
[2170]	<210> 96	
[2171]	<211> 1809	
[2172]	<212> DNA	
[2173]	<213> 人工序列	
[2174]	<220>	
[2175]	<223> C4 β -P2A-C4 α 构建体 - Cys修饰,	
[2176]	密码子优化的	
[2177]	<400> 96	
[2178]	atgagcaacc aggtgctgtg ctgcgtggtg ctgtgtttcc tgggcgcaa caccgtggac	60
[2179]	ggcgcatca ccagagccc caagtacctg ttccggaaag agggccagaa cgtcaccctg	120
[2180]	agctgcgagc agaacctgaa ccacgacgcc atgtactggt acagacagga ccccgacag	180
[2181]	ggcctgcggc tgatctacta cagccagatc gtgaacgact tccagaagg agatatgcc	240
[2182]	gagggtaca gcgtgtccag agagaagaaa gagtccttcc cactgaccgt gaccagcgc	300
[2183]	cagaagaacc ccaccgcctt ctacctgtgc gccagctctc ctggcgccct gtacgagcag	360

[2184]	tacttcggcc ctggcaccgc gctgacagt accgaggacc tgaagaacgt gttccccca	420
[2185]	gaggtggccg tgttcgagcc tagcgaggcc gagatcagcc acaccagaa agccaccctc	480
[2186]	gtgtgcctgg ccaccgctt ttaccccgac cacgtggaac tgtcttggtg ggtcaacggc	540
[2187]	aaagaggtgc acagcggcgt ctgcaccgac cccagcccc tgaaagagca gcccgcctg	600
[2188]	aacgacagcc ggtactgtct gagcagcaga ctgagagtgt ccgccacctt ctggcagaac	660
[2189]	ccccggaacc acttcagatg ccagggtcag ttctacggcc tgagcgagaa cgacgagtgg	720
[2190]	accagggacc gggccaagcc cgtgaccag atcgtgtctg ctgaggcctg gggcagagcc	780
[2191]	gattgcggct tcaccagcga gagctaccag cagggcgtgc tgagcgccac catcctgtac	840
[2192]	gagatcctgc tgggcaaggc caccctgtac gccgtgctgg tgtccgcctt ggtgctgatg	900
[2193]	gccatggtca agcgggaagga cagccggggc ggttcggag ccacgaactt ctctctgtta	960
[2194]	aagcaagcag gagacgtgga agaaaacccc ggtcccatga ccagcatccg ggccgtgttc	1020
[2195]	atcttcctgt ggctgcagct ggacctcgtc aacggcgaga acgtggaaca gacccccagc	1080
[2196]	accctgagcg tgcaggaagg cgacagcgcc gtcataaagt gcacctacag cgactccgcc	1140
[2197]	agcaactact tcccctggta caagcaggaa ctgggcaagc ggccccagct gatcatcgac	1200
[2198]	atccggtcca acgtgggcga gaagaaggac cagcggatcg ccgtgaccct gaacaagacc	1260
[2199]	gccaagcact tcagcctgca catcaccgag acacagcccc aggactccgc cgtgtacttc	1320
[2200]	tgtgccgcca ccgaggacta ccagctgac tggggagccg gcaccaagct gatcattaag	1380
[2201]	cccacatcc agaacccga ccctgccgtg taccagctgc gggacagcaa gagcagcgac	1440
[2202]	aagagcgtgt gcctgttcac cgacttcgac agccagacca acgtgtccca gagcaaggac	1500
[2203]	agcgacgtgt acatcaccga taagtgcgtg ctggacatgc ggagcatgga cttcaagagc	1560
[2204]	aacagcgccg tggcctggtc caacaagagc gacttcgcct gcgccaacgc cttcaacaac	1620
[2205]	agcattatcc ccgaggacac attcttccca agccccgaga gcagctgcga cgtgaagctg	1680
[2206]	gtggaaaaga gcttcgagac agacaccaac ctgaacttcc agaacctcag cgtgatcggc	1740
[2207]	ttccgcatcc tgctgtgaa ggtggccggc ttcaacctgc tgatgaccct gcggctgtgg	1800
[2208]	tccagctga	1809
[2209]	<210>	97
[2210]	<211>	1809
[2211]	<212>	DNA
[2212]	<213>	人工序列
[2213]	<220>	
[2214]	<223>	C4 β -P2A-C4 α -DLT构建体 - Cys修饰,
[2215]	密码子优化的	
[2216]	<400>	97
[2217]	atgagcaacc aggtgctgtg ctgcgtgggtg ctgtgtttcc tgggcgcaa caccgtggac	60
[2218]	ggcggcatca cccagagccc caagtacctg ttccggaaag agggccagaa cgtcaccctg	120
[2219]	agctgcgagc agaacctgaa ccacgacgcc atgtactggt acagacagga ccccgacag	180
[2220]	ggcctgcggc tgatctacta cagccagatc gtgaacgact tccagaaggg agatatcgcc	240
[2221]	gagggtaca gcgtgtccag agagaagaaa gagtccttcc cactgaccgt gaccagcgcc	300
[2222]	cagaagaacc ccaccgctt ctacctgtgc gccagctctc ctggcgccct gtacgagcag	360
[2223]	tacttcggcc ctggcaccgc gctgacagt accgaggacc tgaagaacgt gttccccca	420
[2224]	gaggtggccg tgttcgagcc tagcgaggcc gagatcagcc acaccagaa agccaccctc	480
[2225]	gtgtgcctgg ccaccgctt ttaccccgac cacgtggaac tgtcttggtg ggtcaacggc	540

[2226]	aaagaggtgc acagcggcgt ctgcaccgac cccagcccc tgaaagagca gcccgccctg	600
[2227]	aacgacagcc ggtactgtct gagcagcaga ctgagagtgt ccgccacctt ctggcagaac	660
[2228]	ccccggaacc acttcagatg ccaggtgcag ttctacggcc tgagcgagaa cgacgagtgg	720
[2229]	accaggacc gggccaagcc cgtgaccag atcgtgtctg ctgaggcctg gggcagagcc	780
[2230]	gattgcggct tcaccagcga gagctaccag cagggcgtgc tgagcgccac catcctgtac	840
[2231]	gagatcctgc tgggcaaggc caccctgtac gccgtgctgg tgtccgccct ggtgctgatg	900
[2232]	gccatggtca agcggaaagga cagccggggc ggttccggag ccacgaactt ctctctgtta	960
[2233]	aagcaagcag gagacgtgga agaaaacccc ggtcccatga ccagcatccg ggccgtgttc	1020
[2234]	atcttctgtt ggctgcagct ggacctcgtc aacggcgaga acgtggaaca gcacccagc	1080
[2235]	acctgagcgt tgcaggaagg cgacagcgcc gtcatacaagt gcacctacag cgactccgcc	1140
[2236]	agcaactact tcccttggtt caagcaggaa ctgggcaagc ggccccagct gatcatcgac	1200
[2237]	atccgggtcca acgtgggcga gaagaaggac cagcggatcg ccgtgacctt gaacaagacc	1260
[2238]	gccaaagcact tcagcctgca catcaccgag acacagcccc aggactccgc cgtgtacttc	1320
[2239]	tgtgccgcca ccgaggatct gacgctgata tggggagccg gcaccaagct gatcattaag	1380
[2240]	cccacatcc agaaccccga ccctgccgtg taccagctgc gggacagcaa gagcagcgac	1440
[2241]	aagagcgtgt gcctgttcac cgacttcgac agccagacca acgtgtccca gagcaaggac	1500
[2242]	agcgacgtgt acatcaccga taagtgcgtg ctggacatgc ggagcatgga cttcaagagc	1560
[2243]	aacagcgccg tggcctggtc caacaagagc gacttcgcct gcgccaacgc cttcaacaac	1620
[2244]	agcattatcc ccgaggacac attcttccca agccccgaga gcagctgcga cgtgaagctg	1680
[2245]	gtggaaaaga gcttcgagac agacaccaac ctgaacttcc agaacctcag cgtgatcggc	1740
[2246]	ttccggatcc tgctgtgtaa ggtggccggc ttcaacctgc tgatgacctt gcggctgtgg	1800
[2247]	tccagctga	1809
[2248]	<210>	98
[2249]	<211>	66
[2250]	<212>	DNA
[2251]	<213>	人工序列
[2252]	<220>	
[2253]	<223>	猪捷申病毒-1 2A (P2A) 肽
[2254]	<400>	98
[2255]	ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct	60
[2256]	ggacct	66
[2257]	<210>	99
[2258]	<211>	66
[2259]	<212>	DNA
[2260]	<213>	人工序列
[2261]	<220>	
[2262]	<223>	猪捷申病毒-1 2A (P2A) 肽 - 密码子优化的
[2263]	<400>	99
[2264]	ggttccggag ccacgaactt ctctctgtta aagcaagcag gagacgtgga agaaaacccc	60
[2265]	ggtccc	66
[2266]	<210>	100
[2267]	<211>	63

[2268]	<212> DNA
[2269]	<213> 人工序列
[2270]	<220>
[2271]	<223> Thoseaasigna病毒2A (T2A) 肽
[2272]	<400> 100
[2273]	ggaagcggag agggcagagg aagtctgcta acatgcggtg acgtcgagga gaatcctgga 60
[2274]	cct 63
[2275]	<210> 101
[2276]	<211> 69
[2277]	<212> DNA
[2278]	<213> 人工序列
[2279]	<220>
[2280]	<223> 马鼻炎A病毒 (ERAV) 2A (E2A) 肽
[2281]	<400> 101
[2282]	ggaagcggac agtgtactaa ttatgctctc ttgaaattgg ctggagatgt tgagagcaac 60
[2283]	cctggacct 69
[2284]	<210> 102
[2285]	<211> 75
[2286]	<212> DNA
[2287]	<213> 人工序列
[2288]	<220>
[2289]	<223> 口蹄疫病毒2A (F2A) 肽
[2290]	<400> 102
[2291]	ggaagcggag tgaaacagac tttgaatttt gaccttctca agttggcggg agacgtggag 60
[2292]	tccaaccctg gacct 75
[2293]	<210> 103
[2294]	<211> 411
[2295]	<212> DNA
[2296]	<213> 人工序列
[2297]	<220>
[2298]	<223> P1 α 链可变结构域
[2299]	<400> 103
[2300]	atgctgactg ccagcctgtt gagggcagtc atagcctcca tctgtgttgt atccagcatg 60
[2301]	gctcagaagg taactcaagc gcagactgaa atttctgtgg tggagaagga ggatgtgacc 120
[2302]	ttggactgtg tgtatgaaac ccgtgatact acttattact tattcttgga caagcaacca 180
[2303]	ccaagtggag aattggtttt cttattcgt cggaactctt ttgatgagca aaatgaaata 240
[2304]	agtggtcggg attcttggaa cttccagaaa tccaccagtt cttcaactt caccatcaca 300
[2305]	gcctcacaag tcgtggactc agcagtatac ttctgtgctc tgagtgaggc gcatagggat 360
[2306]	agcaactatc agttaatctg gggcgcctggg accaagctaa ttataaagcc a 411
[2307]	<210> 104
[2308]	<211> 426
[2309]	<212> DNA

[2310]	<213> 人工序列
[2311]	<220>
[2312]	<223> P15 α 链可变结构域
[2313]	<400> 104
[2314]	atggacaaga tcttaggagc atcattttta gttctgtggc ttcaactatg ctgggtgagt 60
[2315]	ggccaacaga aggagaaaag tgaccagcag caggtgaaac aaagtcctca atctttgata 120
[2316]	gtccagaaag gagggatttc aattataaac tgtgcttatg agaacactgc gtttgactac 180
[2317]	tttccatggt accaacaatt ccctgggaaa ggccctgcat tattgatagc catacgtcca 240
[2318]	gatgtgagtg aaaagaaaga aggaagattc acaatctcct tcaataaaaag tgccaagcag 300
[2319]	ttctcattgc atatcatgga ttcccagcct ggagactcag ccacctactt ctgtgcagca 360
[2320]	agccccagg gggctgggag ttaccaactc actttcggga aggggaccaa actctcggtc 420
[2321]	atacca 426
[2322]	<210> 105
[2323]	<211> 408
[2324]	<212> DNA
[2325]	<213> 人工序列
[2326]	<220>
[2327]	<223> P18 α 链可变结构域
[2328]	<400> 105
[2329]	atgtcacttt ctagcctgct gaaggtggtc acagcttcac tgtggctagg acctggcatt 60
[2330]	gccagaaga taactcaaac ccaaccagga atgttcgtgc aggaaaagga ggctgtgact 120
[2331]	ctggactgca catatgacac cagtgatcaa agttatggtc tattcttgta caagcagccc 180
[2332]	agcagtgggg aaatgatattt tcttatttat caggggtcct atgacgagca aaatgcaaca 240
[2333]	gaaggtcgct actcattgaa tttccagaag gcaagaaaat ccgccaacct tgtcatctcc 300
[2334]	gcttcacaac tgggggactc agcaatgtat ttctgtgcaa tcccgactct catggatagc 360
[2335]	aactatcagt taatctgggg cgctgggacc aagctaatta taaagcca 408
[2336]	<210> 106
[2337]	<211> 393
[2338]	<212> DNA
[2339]	<213> 人工序列
[2340]	<220>
[2341]	<223> P20 α 链可变结构域
[2342]	<400> 106
[2343]	atgatgaaat ccttgagagt ttactagtgt atcctgtggc ttcagttgag ctgggtttgg 60
[2344]	agccaacaga aggaggtgga gcagaattct ggaccctca gtgttccaga gggagccatt 120
[2345]	gcctctctca actgcactta cagtgaccga ggttcccagt ctttctcttg gtacagacaa 180
[2346]	tattctggga aaagccctga gttgataatg tccatatact ccaatgggtga caaagaagat 240
[2347]	ggaaggttta cagcacagct caataaagcc agccagtatg tttctctgct catcagagac 300
[2348]	tcccagccca gtgattcagc cacctacctc tgtgccgtgt tagaaggcca gaagctgctc 360
[2349]	tttgcaaggg ggacatggtt aaaggtggat ctt 393
[2350]	<210> 107
[2351]	<211> 396

[2352]	<212> DNA
[2353]	<213> 人工序列
[2354]	<220>
[2355]	<223> P22 α 链可变结构域
[2356]	<400> 107
[2357]	atgatgaaat ccttgagagt ttactagtg atcctgtggc ttcagttgag ctgggtttgg 60
[2358]	agccaacaga aggaggtgga gcagaattct ggacccctca gtgttcaga gggagccatt 120
[2359]	gcctctctca actgcactta cagtgaccga gtttcccagt ccttcttctg gtacagacaa 180
[2360]	tattctggga aaagccctga gttgataatg tccatatact ccaatggtga caaagaagat 240
[2361]	ggaaggttta cagcacagct caataaagcc agccagtatg tttctctgct catcagagac 300
[2362]	tcccagccca gtgattcagc cacctacctc tgtgccgcaa ataatgcagg caacatgctc 360
[2363]	acctttggag ggggaacaag gttaatggtc aaaccc 396
[2364]	<210> 108
[2365]	<211> 423
[2366]	<212> DNA
[2367]	<213> 人工序列
[2368]	<220>
[2369]	<223> (P1, P18) α 链恒定结构域 - Cys修饰
[2370]	<400> 108
[2371]	gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag 60
[2372]	tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaaatg tgtcacaag taaggattct 120
[2373]	gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac 180
[2374]	agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc 240
[2375]	attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggtc 300
[2376]	gagaaaagct ttgaaacaga tacgaacctt aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc 360
[2377]	cgaatcctcc tcctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgtgcg gctgtgtgcc 420
[2378]	agc 423
[2379]	<210> 109
[2380]	<211> 423
[2381]	<212> DNA
[2382]	<213> 人工序列
[2383]	<220>
[2384]	<223> (P15, P20) α 链恒定结构域 - Cys修饰
[2385]	<400> 109
[2386]	aatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag 60
[2387]	tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaaatg tgtcacaag taaggattct 120
[2388]	gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac 180
[2389]	agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc 240
[2390]	attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggtc 300
[2391]	gagaaaagct ttgaaacaga tacgaacctt aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc 360
[2392]	cgaatcctcc tcctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgtgcg gctgtgtgcc 420
[2393]	agc 423

[2394]	<210> 110
[2395]	<211> 423
[2396]	<212> DNA
[2397]	<213> 人工序列
[2398]	<220>
[2399]	<223> P22 α 链恒定结构域 - Cys修饰
[2400]	<400> 110
[2401]	catatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag 60
[2402]	tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaaatg tgtcacaaag taaggattct 120
[2403]	gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac 180
[2404]	agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc 240
[2405]	attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagt cctgtgatgt caagctggtc 300
[2406]	gagaaaagct ttgaaacaga tacgaaccta aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc 360
[2407]	cgaatcctcc tcctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgtgcg gctgtgtcc 420
[2408]	agc 423
[2409]	<210> 111
[2410]	<211> 402
[2411]	<212> DNA
[2412]	<213> 人工序列
[2413]	<220>
[2414]	<223> P1 β 链可变结构域
[2415]	<400> 111
[2416]	atgggctgca ggctgctctg ctgtgcggtt ctctgtctcc tgggagcggc ccccatggaa 60
[2417]	acgggagtta cgcagacacc aagacacctg gtcattggaa tgacaaataa gaagtctttg 120
[2418]	aaatgtgaac aacatctggg gcataacgt atgtatttgt acaagcaaag tgctaagaag 180
[2419]	ccactggagc tcatgtttgt ctacaacttt aaagaacaga ctgaaaacaa cagtgtgcca 240
[2420]	agtcgtttct cacctgaatg cccaacagc tctcacttat tccttcacct acacaccctg 300
[2421]	cagccagaag actcggccct gtatctctgt gccagcagcc aagatgaaca gttcctctac 360
[2422]	aatgagcagt tcttcgggcc agggacacgg ctcaccgtgc ta 402
[2423]	<210> 112
[2424]	<211> 399
[2425]	<212> DNA
[2426]	<213> 人工序列
[2427]	<220>
[2428]	<223> P15 β 链可变结构域
[2429]	<400> 112
[2430]	atgggcacca gcctcctctg ctggatggcc ctgtgtctcc tgggggcaga tcacgcagat 60
[2431]	actggagtct cccaggaccc cagacacaag atcacaaaga ggggacagaa tgtaactttc 120
[2432]	aggtgtgatc caatttctga acacaaccgc ctttatttgt accgacagac cctggggcag 180
[2433]	ggcccagagt ttctgactta cttccagaat gaagctcaac tagaaaaatc aaggctgctc 240
[2434]	agtgatcggt tctctgcaga gaggcctaag ggatctttct ccaccttga gatccagcgc 300
[2435]	acagagcagg gggactcggc catgtatctc tgtgccagca gcttagctta cgggaaagat 360

[2436]	acgcagttatt ttggcccagg caccggctg acagtgtc 399
[2437]	<210> 113
[2438]	<211> 393
[2439]	<212> DNA
[2440]	<213> 人工序列
[2441]	<220>
[2442]	<223> P18 β 链可变结构域
[2443]	<400> 113
[2444]	atgggctcct ggaccctctg ctgtgtgtcc ctttgcattc tggtagcaaa gcacacagat 60
[2445]	gctggagtta tccagtcacc ccggcacgag gtgacagaga tgggacaaga agtgactctg 120
[2446]	agatgtaaac caatttcagg acatgactac cttttctggt acagacagac catgatgcgg 180
[2447]	ggactggagt tgctcattta ctttaacaac aacgttccga tagatgattc agggatgccc 240
[2448]	gaggatcgat tctcagctaa gatgcctaata gcatcattct ccactctgaa gatccagccc 300
[2449]	tcagaaccca gggactcagc tgtgtacttc tgtgccagca gtgtctcggg ttcggaagct 360
[2450]	ttctttggac aaggcaccag actcacagtt gta 393
[2451]	<210> 114
[2452]	<211> 384
[2453]	<212> DNA
[2454]	<213> 人工序列
[2455]	<220>
[2456]	<223> P20 β 链可变结构域
[2457]	<400> 114
[2458]	atgggaatca ggctcctgtg tcgtgtggcc ttttgtttcc tggctgtagg cctcgtagat 60
[2459]	gtgaaagtaa ccagagctc gagatatcta gtcaaaagga cgggagagaa agtttttctg 120
[2460]	gaatgtgtcc aggatatgga ccatgaaaat atgttctggt atcgacaaga ccaggtctg 180
[2461]	gggctacggc tgatctatct ctcataatgat gttaaaatga aagaaaaagg agatattcct 240
[2462]	gaggggtaca gtgtctctag agagaagaag gagcgcttct ccctgattct ggagtccgcc 300
[2463]	agcaccaacc agacatctat gtacctctgt gccaccagtc atcagcccca gcattttggt 360
[2464]	gatgggactc gactctccat ccta 384
[2465]	<210> 115
[2466]	<211> 387
[2467]	<212> DNA
[2468]	<213> 人工序列
[2469]	<220>
[2470]	<223> P22 β 链可变结构域
[2471]	<400> 115
[2472]	atgggaatca ggctcctgtg tcgtgtggcc ttttgtttcc tggctgtagg cctcgtagat 60
[2473]	gtgaaagtaa ccagagctc gagatatcta gtcaaaagga cgggagagaa agtttttctg 120
[2474]	gaatgtgtcc aggatatgga ccatgaaaat atgttctggt atcgacaaga ccaggtctg 180
[2475]	gggctacggc tgatctatct ctcataatgat gttaaaatga aagaaaaagg agatattcct 240
[2476]	gaggggtaca gtgtctctag agagaagaag gagcgcttct ccctgattct ggagtccgcc 300
[2477]	agcaccaacc agacatctat gtacctctgt gccagcagtt ctataaatga gcagttcttc 360

[2478]	gggccaggga cacggctcac cgtgcta 387
[2479]	<210> 116
[2480]	<211> 534
[2481]	<212> DNA
[2482]	<213> 人工序列
[2483]	<220>
[2484]	<223> (P18, P20) β 链恒定结构域 - Cys修饰
[2485]	<400> 116
[2486]	gaggacctga acaaggtgtt cccacccgag gtcgtgtgt ttgagccatc agaagcagag 60
[2487]	atctcccaca cccaaaaggc cacactggtg tgcctggcca caggcttctt ccccgaccac 120
[2488]	gtggagctga gctggtgggt gaatgggaag gaggtgcaca gtggggtctg cacggacccg 180
[2489]	cagccccctca aggagcagcc cgccctcaat gactccagat actgcctgag cagecgctg 240
[2490]	agggtctcgg ccacctctg gcagaacccc cgcaaccact tccgctgtca agtccagttc 300
[2491]	tacgggctct cggagaatga cgagtggacc caggataggg ccaaaccctg caccagatc 360
[2492]	gtcagcgccg aggcttggg tagagcagac tgtggcttta cctcggtgtc ctaccagcaa 420
[2493]	ggggtcctgt ctgccaccat cctctatgag atcctgctag ggaaggccac cctgtatgct 480
[2494]	gtgctggtca gcgcccttgt gttgatggcc atggtcaaga gaaaggattt ctga 534
[2495]	<210> 117
[2496]	<211> 1842
[2497]	<212> DNA
[2498]	<213> 人工序列
[2499]	<220>
[2500]	<223> P1 α -P2A-P1 β 构建体 - Cys修饰
[2501]	<400> 117
[2502]	atgctgactg ccagcctgtt gagggcagtc atagcctcca tctgtgttgt atccagcatg 60
[2503]	gtcagaagg taactcaagc gcagactgaa atttctgtgg tggagaagga ggatgtgacc 120
[2504]	ttggactgtg tgtatgaaac ccgtgatact acttattact tattctggta caagcaacca 180
[2505]	ccaagtggag aattggtttt cttattcgt cggaactctt ttgatgagca aaatgaaata 240
[2506]	agtgttcggt attcttggaa cttccagaaa tccaccagtt cttcaactt caccatcaca 300
[2507]	gcctcacaag tcgtggactc agcagtatac ttctgtgtc tgagtgagc gcatagggat 360
[2508]	agcaactatc agttaatctg gggcgctggg accaagctaa ttataaagcc agatatccag 420
[2509]	aaccctgacc ctgccgtgta ccagctgaga gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc 480
[2510]	ctattcaccg attttgattc tcaaacaat gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat 540
[2511]	atcacagaca aatgtgtgct agacatgagg tctatggact tcaagagcaa cagtgtgtg 600
[2512]	gcctggagca acaaatctga ctttgcattg gcaaacgcct tcaacaacag cattattcca 660
[2513]	gaagacacct tcttccccag ccagaaaagt tcctgtgatg tcaagctggt cgagaaaagc 720
[2514]	tttgaacag atacgaacct aaactttcaa aacctgtcag tgattgggtt ccgaatcctc 780
[2515]	ctctgaaag tggccgggtt taatctgtc atgacgtgc ggctgtggtc cageggttcc 840
[2516]	ggagccacga acttctctct gttaaagcaa gcaggagacg tggaagaaaa ccccggtccc 900
[2517]	atgggctgca ggctgtctct ctgtgcggtt ctctgtctcc tgggagcggc ccccatggaa 960
[2518]	acgggagtta cgcagacacc aagacacctg gtcattggaa tgacaaataa gaagtctttg 1020
[2519]	aatgtgaac aacatctggg gcataacgct atgtattggt acaagcaaag tgctaagaag 1080

[2520]	ccactggagc tcatgtttgt ctacaacttt aaagaacaga ctgaaaacaa cagtgtgcca	1140
[2521]	agtcgcttct cacctgaatg ccccaacagc tctcacttat tccttcacct acacaccctg	1200
[2522]	cagccagaag actcggccct gtatctctgt gccagcagcc aagatgaaca gtctctctac	1260
[2523]	aatgagcagt tcttcgggcc agggacacgg ctcaccgtgc tagaggacct gaaaaacgtg	1320
[2524]	ttcccccccg aggtcgctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctccca caccctaaag	1380
[2525]	gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc taccctgacc acgtggagct gagctggtgg	1440
[2526]	gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc tgcacagacc cgcagccct caaggagcag	1500
[2527]	cccgcctca atgactccag atactgcctg agcagccgcc tgagggtctc ggccaccttc	1560
[2528]	tggcagaacc cccgaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcggagaat	1620
[2529]	gacgagtgga cccaggatag ggccaaacct gtcaccaga tcgtcagcgc cgaggcctgg	1680
[2530]	ggtagagcag actgtgctt cacctccgag tcttaccagc aaggggtcct gtctgccacc	1740
[2531]	atcctctatg agatcttget agggaaggcc accttgatg ccgtgctggt cagtgccttc	1800
[2532]	gtgctgatgg ccatgtcaa gagaaaggat tccagaggct ag	1842
[2533]	<210>	118
[2534]	<211>	1842
[2535]	<212>	DNA
[2536]	<213>	人工序列
[2537]	<220>	
[2538]	<223>	P1 α -P2A-P1 β 构建体 - Cys修饰,
[2539]	密码子优化的	
[2540]	<400>	118
[2541]	atgctgacag cctctctgct gagagccgtg atgccagca tctgcgtggt gtccagcatg	60
[2542]	gccagaaaag tgaccaggc ccagaccgag atcagcgtgg tggaaaaaga agatgtgacc	120
[2543]	ctggactgcg tgtacgagac acgggacacc acctactacc tgttctggta caagcagccc	180
[2544]	cccagcggcg agctggtgtt cctgatccgg cggaacagct tcgacgagca gaacgagatc	240
[2545]	tccggccggt acagctggaa cttccagaag tccaccagca gcttcaactt caccatcacc	300
[2546]	gccagccagg tggtagacag cgccgtgtac ttctgcgcc tgagcgaggc ccaccgggac	360
[2547]	agcaactacc agctgatctg gggagccggc accaagctga tcatcaagcc cgacatccag	420
[2548]	aaccccgacc ccgccgtgta ccagctgaga gacagcaaga gcagcgacaa gacgtgtgc	480
[2549]	ctgttcaccg acttcgacag ccagaccaac gtgtcccaga gcaaggactc cgacgtgtac	540
[2550]	atcaccgata agtgcgtgct ggacatgcgg agcatggact tcaagagcaa ctccgccgtg	600
[2551]	gcctggtcca acaagagcga cttgcctgc gccaacgcct tcaacaacag cattatcccc	660
[2552]	gaggacacat tcttccaag ccccgagagc agctgcgacg tgaagctggt ggaaaagagc	720
[2553]	ttcgagacag acaccaacct gaatttccag aacctgagcg tgatcggtt ccggtatcctg	780
[2554]	ctgctgaagg tggccggctt caacctgctg atgacctgc ggctgtggtc ctcaggttcc	840
[2555]	ggagccacga acttctctct gttaaagcaa gcaggagacg tggaagaaaa ccccggtccc	900
[2556]	atgggctgcc ggctgctgtg ttgcgccgtg ctgtgtctgc tgggcgccgt gcctatggaa	960
[2557]	accggcgtga cccagacccc cagacacctg gtcatgggca tgaccaacaa gaaaagcctg	1020
[2558]	aagtgcgagc agcacctggg ccacaacgcc atgtactggt ataagcagag cgccaagaaa	1080
[2559]	cccctggaac tgatgttcgt gtacaacttc aaagagcaga ccgagaacaa cagcgtgccc	1140
[2560]	agccggttca gccccgagtg ccccaatagc agccacctgt ttctgcatct gcacaccctg	1200
[2561]	cagccccagg actccgccct gtacctgtgt gccagcagcc aggacgagca gtctctgtac	1260

[2562]	aatgagcagt tcttcggccc tggcacccga ctgaccgtgc tggaagatct gaagaacgtg	1320
[2563]	ttccccccag aggtggccgt gttcgagcct agcgaggccg agatctccca caccagaaa	1380
[2564]	gccaccctcg tgtgcctggc caccggcttc taccgacc acgtggaact gtcttggtgg	1440
[2565]	gtcaacggca aagaggtgca cagcggcgtc tgcaccgacc cccagcccct gaaagagcag	1500
[2566]	cccgccctga acgacagccg gtactgcctg agcagccgac tcagagtgtc cgccaccttc	1560
[2567]	tggcagaacc cccggaacca cttcagatgc caggtgcagt tctacggcct gagcgagaac	1620
[2568]	gacgagtgga cccaggaccg ggccaagcct gtgaccaga tcgtgtcagc cgaggcctgg	1680
[2569]	ggcagagccg attgcggctt caccagcgag agctaccagc agggcgtgct gagcgccacc	1740
[2570]	atcctgtacg agatcctgct gggcaaggcc accctgtacg ctgtgctggt gtccgccctg	1800
[2571]	gtgctgatgg ccatggtcaa gcggaaggac agccggggct ga	1842
[2572]	<210>	119
[2573]	<211>	1854
[2574]	<212>	DNA
[2575]	<213>	人工序列
[2576]	<220>	
[2577]	<223>	P15 α -P2A-P15 β 构建体 - Cys修饰
[2578]	<400>	119
[2579]	atggacaaga tcttaggagc atcattttta gttctgtggc ttcaactatg ctgggtgagt	60
[2580]	ggccaacaga aggagaaaag tgaccagcag caggtgaaac aaagtcctca atctttgata	120
[2581]	gtccagaaag gagggatttc aattataaac tgtgttatg agaacactgc gtttgactac	180
[2582]	tttccatggt accaacaatt ccctgggaaa ggccctgcat tattgatagc catacgtcca	240
[2583]	gatgtgagtg aaaagaaaga aggaagattc acaatctcct tcaataaaaag tgccaagcag	300
[2584]	ttctcattgc atatcatgga ttcccagcct ggagactcag ccacctactt ctgtgcagca	360
[2585]	agcccccagg gggctgggag ttaccaactc actttcggga aggggaccaa actctcggtc	420
[2586]	ataccaaata tccagaaccc tgacctgcc gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt	480
[2587]	gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag	540
[2588]	gattctgatg tgtatatcac agacaaatgt gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag	600
[2589]	agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa tctgactttg catgtgcaa cgccttcaac	660
[2590]	aacagcatta ttccagaaga cactttcttc cccagcccag aaagttcctg tgatgtcaag	720
[2591]	ctggtcgaga aaagctttga aacagatacg aacctaaact ttcaaacct gtcagtgatt	780
[2592]	gggttccgaa tcctcctcct gaaagtggcc gggtttaatc tgctcatgac gctgcggctg	840
[2593]	tggtccagcg gttccggagc cacgaacttc tctctgttaa agcaagcagg agacgtggaa	900
[2594]	gaaaaccccg gtcccatggg caccagcctc ctctgctgga tggccctgtg tctcctgggg	960
[2595]	gcagatcacg cagatactgg agtctcccag gacccagac acaagatcac aaagagggga	1020
[2596]	cagaatgtaa ctttcaggtg tgatccaatt tctgaacaca accgccttta ttggtaccga	1080
[2597]	cagaccctgg ggcaggggcc agagtttctg acttacttcc agaataaagc tcaactagaa	1140
[2598]	aaatcaaggc tgctcagtga tcggttctct gcagagaggc ctaagggatc tttctccacc	1200
[2599]	ttggagatcc agcgcacaga gcagggggac tcggccatgt atctctgtgc cagcagctta	1260
[2600]	gcttacggga aagatacgca gtatttttggc ccaggcacc ggctgacagt gctcgaggac	1320
[2601]	ctgaaaaacg tgttcccacc cgaggtcgct gtgtttgagc catcagaagc agagatctcc	1380
[2602]	cacacccaaa aggccacact ggtgtgcctg gccacaggct tctaccccga ccacgtggag	1440
[2603]	ctgagctggt ggggtgaatgg gaaggaggtg cacagtgggg tctgcacaga cccgcagccc	1500

[2604]	ctcaaggagc agccccccct caatgactcc agatactgcc tgagcagccg cctgagggtc	1560
[2605]	tcggccacct tctggcagaa cccccgcaac cacttccgct gtcaagtcca gttctacggg	1620
[2606]	ctctcggaga atgacgagtg gaccaggat agggccaaac ctgtcaccca gatcgtcagc	1680
[2607]	gccgaggcct ggggtagagc agactgtggc ttcacctccg agtcttacca gcaaggggtc	1740
[2608]	ctgtctgcca ccatctcta tgagatcttg ctaggggaagg ccaccttgta tgccgtgctg	1800
[2609]	gtcagtgcct tcgtgctgat ggccatggtc aagagaaagg attccagagg ctag	1854
[2610]	<210>	120
[2611]	<211>	1854
[2612]	<212>	DNA
[2613]	<213>	人工序列
[2614]	<220>	
[2615]	<223>	P15 α -P2A-P15 β 构建体 - Cys修饰,
[2616]	密码子优化的	
[2617]	<400>	120
[2618]	atggacaaga tcctgggcgc cagcttcctg gtgctgtggc tgcagctgtg ctgggtgtcc	60
[2619]	ggccagcaga aagagaagtc cgaccagcag caggtcaaac agagccccca gacctgac	120
[2620]	gtgcagaagg gcggcatcag catcatcaac tgcgcctacg agaataccgc cttcgactac	180
[2621]	ttccccctggt atcagcagtt ccccggaag ggacctgccc tgctgatcgc catcagaccc	240
[2622]	gacgtgtccg agaagaaaga gggccggttc accatcagct tcaacaagag cgccaagcag	300
[2623]	ttcagcctgc acatcatgga cagccagccc ggagacagcg ccacctactt ttgtgccgcc	360
[2624]	agccctcagg gcgctggcag ctaccacctg accttcggca agggcaccaa gctgagcgtg	420
[2625]	atccccaaaca tccagaaccc cgaccccgcc gtgtaccagc tgcgggacag caagagcagc	480
[2626]	gacaagagcg tgtgcctgtt caccgacttc gacagccaga ccaacgtgtc ccagagcaag	540
[2627]	gacagcgacg tgtacatcac cgataagtgc gtgctggaca tgcggagcat ggacttcaag	600
[2628]	agcaacagcg ccgtggcctg gtccaacaag tccgacttcg cctgcgcaa cgccttcaac	660
[2629]	aacagcatca tccccgagga cacattcttc ccaagccccg agagcagctg cgacgtgaag	720
[2630]	ctgggtgaaa agagcttcca gacagacacc aacctgaact tccagaacct gtccgtgac	780
[2631]	ggcttccgga tcctgtgct gaaggtggcc ggcttcaacc tgctgatgac cctgcggctg	840
[2632]	tggtccagcg gttccggagc caggaacttc tctctgttaa agcaagcagg agacgtggaa	900
[2633]	gaaaaccccg gtcccatggg caccagcctg ctgtgctgga tggccctgtg cctgctgggc	960
[2634]	gccgatcacg ctgataccgg cgtgtcccag gacccccgc acaagatcac caagcggggc	1020
[2635]	cagaacgtga ccttcagatg cgaccccatc agcgagcaca accggctgta ctggtacaga	1080
[2636]	cagaccctcg gccagggacc cgagttcctg acctacttcc agaattgaggc ccagctggaa	1140
[2637]	aagtcccgcc tgctgagcga ccggttcagc gccgaacggc ccaagggcag cttcagcacc	1200
[2638]	ctggaatatcc agcggaccga gcaggagac tccgcatgt acctgtgtgc cagcagcctg	1260
[2639]	gcctacggca aggacacaca gtacttcggc cctggcaccg ggctgaccgt gctggaagat	1320
[2640]	ctgaagaacg tgttcccccc agaggtggcc gtgttcgagc ccagcgaggc cgagatctct	1380
[2641]	cacaccaga aagccacct ggtctgcctg gccaccgct tctacccga ccacgtggaa	1440
[2642]	ctgtcttggt gggctcaacg caaagaggtc cacagcggcg tctgcaccga cccccagccc	1500
[2643]	ctgaaagagc agccccccct gaacgactct cggtactgcc tgagcagccg gctgagagt	1560
[2644]	tccgccacct tctggcagaa cccccggaac cacttcagat gccaggtgca gttctacggc	1620
[2645]	ctgagcgaga acgacgagtg gaccaggac cgggccaagc ccgtgacca gattgtgtct	1680

[2646]	gccgaggcct ggggcagagc cgattgcggc ttcaccagcg agagctacca gcagggcgtg	1740
[2647]	ctgagcgcca ccatcctgta cgagatcctg ctgggcaagg ccaccctgta cgccgtgctg	1800
[2648]	gtgtccgctc tgggtctgat ggccatggtc aaacggaagg acagccgggg ctga	1854
[2649]	<210>	121
[2650]	<211>	1824
[2651]	<212>	DNA
[2652]	<213>	人工序列
[2653]	<220>	
[2654]	<223>	P18 α -P2A-P18 β 构建体 - Cys修饰
[2655]	<400>	121
[2656]	atgtcacttt ctagcctgct gaaggtggtc acagcttcac tgtggctagg acctggcatt	60
[2657]	gcccagaaga taactcaaac ccaaccagga atgttcgtgc aggaaaagga ggctgtgact	120
[2658]	ctggactgca catatgacac cagtgatcaa agttatggtc tattctggta caagcagccc	180
[2659]	agcagtgggg aaatgatttt tcttatttat caggggtctt atgacgagca aaatgcaaca	240
[2660]	gaaggtcgct actcattgaa tttccagaag gcaagaaaat ccgccaacct tgtcatctcc	300
[2661]	gcttcacaac tgggggactc agcaatgtat ttctgtgcaa tccgactct catggatagc	360
[2662]	aactatcagt taatctgggg cgctgggacc aagctaatta taaagccaga tatccagaac	420
[2663]	cctgaccctg ccgtgtacca gctgagagac tctaaatcca gtgacaagtc tgtctgccta	480
[2664]	ttcaccgatt ttgattctca aacaaatgtg tcacaaagta aggattctga tgtgtatatc	540
[2665]	acagacaaat gtgtgctaga catgaggctc atggacttca agagcaacag tgctgtggcc	600
[2666]	tggagcaaca aatctgactt tgcattgtga aacgccttca acaacagcat tattccagaa	660
[2667]	gacaccttct tccccagccc agaaagtcc tgtgatgtca agctggtcga gaaaagcttt	720
[2668]	gaaacagata cgaacctaaa ctttcaaacc ctgtcagtga ttgggttccg aatcctcctc	780
[2669]	ctgaaagtgg ccgggtttaa tctgctcatg acgctgcggc tgtgggtccag cggttccgga	840
[2670]	gccacgaact tctctctgtt aaagcaagca ggagacgtgg aagaaaaccc cgggtccatg	900
[2671]	ggctcctgga ccctctgctg tgtgtccctt tgcctcctgg tagcaaagca cacagatgct	960
[2672]	ggagtatatc agtcaccccg gcacgagggtg acagagatgg gacaagaagt gactctgaga	1020
[2673]	tgtaaaccaa tttcaggaca tgactacctt ttctggtaca gacagaccat gatgcgggga	1080
[2674]	ctggagtgtc tcatttactt taacaacaac gttccgatag atgattcagg gatgcccgag	1140
[2675]	gatcgattct cagctaagat gcctaatac tcatctcca ctctgaagat ccagccctca	1200
[2676]	gaaccaggg actcagctgt gtacttctgt gccagcagtg tctcgggttc ggaagctttc	1260
[2677]	tttggacaag gcaccagact cacagtgtga gaggacctga acaaggtgtt cccaccgag	1320
[2678]	gtcgtgtgt ttgagccatc agaagcagag atctcccaca cccaaaaggc cactctggtg	1380
[2679]	tgcttgcca caggttctt ccccgaccac gtggagctga gctggtgggt gaatgggaag	1440
[2680]	gaggtgcaca gtgggtctg cacggacccg cagccctca aggagcagcc cgccctcaat	1500
[2681]	gactccagat actgcctgag cagccgctg agggctctcg ccacctctg gcagaacccc	1560
[2682]	cgcaaccact tccgtgtca agtccagttc tacgggtctc cgagaaatga cgagtggacc	1620
[2683]	caggatagg ccaaaccgt caccagatc gtcagcgccg aggcctgggg tagagcagac	1680
[2684]	tgtggttta cctcggtgtc ctaccagcaa ggggtcctgt ctgccaccat cctctatgag	1740
[2685]	atcctgctag ggaaggccac cctgtatgct gtgctggtca gcgccctgt gttgatggcc	1800
[2686]	atgtcaaga gaaaggattt ctga	1824
[2687]	<210>	122

[2688]	<211> 1824
[2689]	<212> DNA
[2690]	<213> 人工序列
[2691]	<220>
[2692]	<223> P18 α -P2A-P18 β 构建体 - Cys修饰,
[2693]	密码子优化的
[2694]	<400> 122
[2695]	atgagcctga gcagcctgct gaaggtggtg accgcctctc tgtggctggg ccctggcatt 60
[2696]	gcccagaaga tcaccagac ccagcccggc atgttcgtgc aggaaaaaga agccgtcacc 120
[2697]	ctggactgca cctacgacac cagcgatcag agctacggcc tgttctggta caagcagccc 180
[2698]	agcagcggcg agatgatctt cctgatctac cagggcagct acgacgagca gaacgccacc 240
[2699]	gagggccggt acagcctgaa cttccagaag gcccggaagt ccgccaatct ggtgatcagc 300
[2700]	gccagccagc tgggcgacag cgccatgtac ttttgcgcca tccccaccct gatggacagc 360
[2701]	aactaccagc tgatctgggg agccggcacc aagctgatca tcaagcccga catccagaac 420
[2702]	cccgaccccg ccgtgtacca gctgagagac agcaagagca gcgacaagag cgtgtgcctg 480
[2703]	ttcaccgact tcgacagcca gaccaacgtg tccagagca aggactccga cgtgtacatc 540
[2704]	accgataagt gcgtgctgga catgcggagc atggacttca agagcaactc cgccgtggcc 600
[2705]	tggtccaaca agagcgactt cgcctgcgcc aacgccttca acaacagcat tatccccgag 660
[2706]	gacacattct tcccaagccc cgagagcagc tgcgacgtga agctggtgga aaagagcttc 720
[2707]	gagacagaca ccaacctgaa tttccagaac ctgagcgtga tcggcttccg gatcctgctg 780
[2708]	ctgaagggtg ccggttcaa cctgctgatg accctgcggc tgttggtcctc tggttccgga 840
[2709]	gccacgaact tctctctgtt aaagcaagca ggagacgtgg aagaaaaccc cggtcccatg 900
[2710]	ggcagctgga ccctgtgctg cgtgagcctg tgcacctctg tggccaagca caccgacgcc 960
[2711]	ggcgtcatcc agagccccag gcacgaggtg accgagatgg gccaggaagt gaccctgcgc 1020
[2712]	tgcaagccca tcagcggcca cgactacctg ttctggtaca ggcagaccat gatgcggggc 1080
[2713]	ctggaactgc tgatctactt caacaacaac gtgcccacgc acgacagcgg catgcccag 1140
[2714]	gaccggttca gcgccaagat gcccaacgcc agcttcagca ccctgaagat ccagcccagc 1200
[2715]	gagccccggg actctgccgt gtatttctgt gcctcctccg tgtccggcag cgaggccttc 1260
[2716]	tttgggcagg gcaccagact gacagtgggt gaggacctga acaaggtgtt cccccccgag 1320
[2717]	gtggccgtgt ttgagcccag cgaggccgag atcagccaca cccagaaagc caccctggtg 1380
[2718]	tgcttggcca ccggcttttt ccccgaccac gtggagctgt cttggtgggt gaacggcaaa 1440
[2719]	gaggtgcaca gcggcgtctg caccgacccc cagcccctga aagagcagcc cgccctgaac 1500
[2720]	gacagccggt actgcctgag cagcagactg cgggtgtccg ccaccttctg gcagaacccc 1560
[2721]	cggaaccact tccggtgcca ggtgcagtgc tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc 1620
[2722]	caggatagag ccaagcctgt gaccagatc gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgac 1680
[2723]	tgcggttca ccagcgtgtc ctaccagcag ggggtgctgt ccgccacaat cctgtacgag 1740
[2724]	atcctgctgg gcaaggccac actgtacgcc gtgctggtgt ccgctctggt gctgatggcc 1800
[2725]	atggtgaagc ggaaggactt ctga 1824
[2726]	<210> 123
[2727]	<211> 1800
[2728]	<212> DNA
[2729]	<213> 人工序列

[2730]	<220>	
[2731]	<223> P20 α -P2A-P20 β 构建体 - Cys修饰	
[2732]	<400> 123	
[2733]	atgatgaaat ccttgagagt ttactagtg atcctgtggc ttcagttgag ctgggtttgg	60
[2734]	agccaacaga aggaggtgga gcagaattct ggaccctca gtgttcaga gggagccatt	120
[2735]	gcctctctca actgcactta cagtgaccga ggttcccagt cttcttctg gtacagacaa	180
[2736]	tattctggga aaagccctga gttgataatg tccatatact ccaatggtga caaagaagat	240
[2737]	ggaaggttta cagcacagct caataaagcc agccagtatg tttctctgct catcagagac	300
[2738]	tcccagccca gtgattcagc cacctacctc tgtgccgtgt tagaaggcca gaagctgctc	360
[2739]	tttgcagggg ggaccatgtt aaaggtggat cttaatatcc agaaccctga ccctgccgtg	420
[2740]	taccagctga gagactctaa atccagtac aagtctgtct gcctattcac cgattttgat	480
[2741]	tctcaaacaa atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaatgtgtg	540
[2742]	ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgtg tggcctggag caacaaatct	600
[2743]	gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattatc cagaagacac cttcttcccc	660
[2744]	agcccagaaa gttcctgtga tgtcaagctg gtcgagaaaa gctttgaaac agatacgaac	720
[2745]	ctaaactttc aaaacctgtc agtgattggg ttccgaatcc tctcctgaa agtggccggg	780
[2746]	tttaatctgc tcatgacgct gcggctgtgg tccagcggt cggagccac gaacttctct	840
[2747]	ctgttaaagc aagcaggaga cgtggaagaa aaccccggtc ccatgggaat caggctcctg	900
[2748]	tgtcgtgtgg cttttgttt cctggctgta ggcctcgtag atgtgaaagt aaccagagc	960
[2749]	tcgagatata tagtcaaaag gacgggagag aaagttttct tggaatgtgt ccaggatatg	1020
[2750]	gaccatgaaa atatgttctg gtatcgacaa gaccaggtc tggggctacg gctgatctat	1080
[2751]	ttctcatatg atgttaaaat gaaagaaaaa ggagatatc ctgaggggta cagtgtctct	1140
[2752]	agagagaaga aggagcgtt ctccctgatt ctggagtcg ccagcaccaa ccagacatct	1200
[2753]	atgtacctct gtgccaccag tcatcagccc cagcattttg gtgatgggac tcgactctcc	1260
[2754]	atcctagagg acctgaacaa ggtgttccca cccaggtcg ctgtgtttga gccatcagaa	1320
[2755]	gcagagatct cccacacca aaaggccaca ctggtgtgcc tggccacagg cttcttcccc	1380
[2756]	gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat gggaaggagg tgcacagtgg ggtctgcacg	1440
[2757]	gaccgcagc ccctcaagga gcagcccgcc ctcaatgact ccagatactg cctgagcagc	1500
[2758]	cgctgaggg tctcgccac cttctggcag aacccccgca accacttccg ctgtcaagtc	1560
[2759]	cagttctacg ggctctcgga gaatgacgag tggaccagc ataggccaa acccgtcacc	1620
[2760]	cagatcgtea gcgccgagc ctggggtaga gcagactgtg gctttacctc ggtgtcctac	1680
[2761]	cagcaagggg tctgtctgc caccatctc tatgagatcc tgctagggaa ggccaccctg	1740
[2762]	tatgtgtgct tggtcagcgc cttgtgttg atggccatgg tcaagagaaa ggatttctga	1800
[2763]	<210> 124	
[2764]	<211> 1800	
[2765]	<212> DNA	
[2766]	<213> 人工序列	
[2767]	<220>	
[2768]	<223> P20 α -P2A-P20 β 构建体 - Cys修饰,	
[2769]	密码子优化的	
[2770]	<400> 124	
[2771]	atgatgaagt ccctgcgggt gctgctggc atcctgtggc tgcagctgag ctgggtctgg	60

[2772]	tcccagcaga aagaggtgga acagaacagc ggccctctga gcgtgcccga aggcgctatc	120
[2773]	gccagcctga actgcaccta cagcgaccgg ggcagccaga gcttctttctg gtacagacag	180
[2774]	tacagcgga agagccccga gctgatcatg agcatctaca gcaacggcga caaagaggac	240
[2775]	ggccggttca ccgcccagct gaacaaggcc agccagtacg tgtccctgct gatccgggac	300
[2776]	agccagccca gcgacagcgc cacatactg tgcgccgtgc tggaaggcca gaagctgctg	360
[2777]	ttcgccagag gcacatgct gaaggtggac ctgaacatcc agaaccgccga ccccgccgtg	420
[2778]	taccagctgc gggatagcaa gagcagcgac aagagcgtgt gcctgttcac cgacttcgac	480
[2779]	agccagacca acgtgtccca gagcaaggac agcgacgtgt acatcaccga taagtgcgtg	540
[2780]	ctggacatgc ggagcatgga cttcaagagc aacagcgccg tggcctggtc caacaagagc	600
[2781]	gacttcgcct gcgccaacgc cttcaacaac agcattatcc ccgaggacac attcttccca	660
[2782]	agccccgaga gcagctgcga cgtgaagctg gtggaaaaga gcttcgagac agacaccaac	720
[2783]	ctcaacttcc agaacctgag cgtgatcggc ttccggatcc tgctgctgaa agtggccggc	780
[2784]	ttcaacctgc tgatgacct gcggtgtgg tccagcggtt ccgagaccac gaacttctct	840
[2785]	ctgttaaagc aagcaggaga cgtggaagaa aaccccggtc ccatgggcat ccggtgctg	900
[2786]	tgcagagtgg cttctgctt cctggccgtg ggcctggtg acgtgaaagt gaccagagc	960
[2787]	agcagatacc tggtaagcg gaccggcgag aaggtgttcc tggaatgcgt gcaggatatg	1020
[2788]	gaccacgaga acatgttttg gtacaggcag gaccctggac tgggcctgcg gctgatctac	1080
[2789]	ttctctacg acgtgaagat gaagggaaag ggcgacatcc ccgagggcta cagcgtgtcc	1140
[2790]	agagagaaga aagagcggtt cagcctgatc ctggaaagcg ccagcaccaa ccagaccagc	1200
[2791]	atgtacctgt gtgccacctc ccaccagccc cagcactttg gcgacggcac ccggtgagc	1260
[2792]	atcctggaag atctgaacaa ggtgttcccc ccagaggtgg ccgtgttcga gcctagcgag	1320
[2793]	gccgagatca gccacacca gaaagccacc ctctgtgtcc tggccaccgg ctttttcccc	1380
[2794]	gaccacgtgg aactgtcttg gtgggtcaac ggcaaagagg tgcacagcgg cgtctgcacc	1440
[2795]	gacccccagc ccctgaaaga gcagcccgc ctgaacgaca gccggtactg cctgagcagc	1500
[2796]	cgactgagag tgtccgccac cttctggcag aacccccgga accacttcag atgccaggtg	1560
[2797]	cagtctacg gcctgagcga gaacgacgag tggacacagg accgggcaa gccctgacc	1620
[2798]	cagatcgtgt cagccgaggc ctggggcaga gccgattgcg gcttcaccag cgtgtcctat	1680
[2799]	cagcagggcg tgctgagcgc caccatcctg tacgagatcc tgctgggcaa ggccaccctg	1740
[2800]	tatgccgtgc tgggtgccgc cctggtgctg atggccatgg tcaagagaaa ggacttctga	1800
[2801]	<210>	125
[2802]	<211>	1812
[2803]	<212>	DNA
[2804]	<213>	人工序列
[2805]	<220>	
[2806]	<223>	P22 α -P2A-P22 β 构建体 - Cys修饰
[2807]	<400>	125
[2808]	atgatgaaat ccttgagagt tttactagt atcctgtggc ttcagttgag ctgggtttgg	60
[2809]	agccaacaga aggagtgga gcagaattct ggaccctca gtgttcaga gggagccatt	120
[2810]	gcctctctca actgcactta cagtgaccga gtttccagc ctttcttctg gtacagacaa	180
[2811]	tattctggga aaagccctga gttgataatg tccatatact ccaatggtga caaagaagat	240
[2812]	ggaaggttta cagcacagct caataaagcc agccagtatg tttctctgct catcagagac	300
[2813]	tcccagccca gtgattcagc cacctacctc tgtgccgcaa ataatgcagg caacatgctc	360

[2814]	acctttggag ggggaacaag gttaatggtc aaacccata tccagaaccc tgaccctgcc	420
[2815]	gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt	480
[2816]	gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg tgtatatcac agacaaatgt	540
[2817]	gtgctagaca tgaggctctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa	600
[2818]	tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc	660
[2819]	cccagcccag aaagttcctg tgatgtcaag ctggctcgaga aaagctttga aacagatacg	720
[2820]	aacctaaact ttcaaaacct gtcagtgatt gggttccgaa tcttctctct gaaagtggcc	780
[2821]	gggtttaatc tgctcatgac gctgcggctg tggctccagcg gttccggagc cacgaacttc	840
[2822]	tctctgttaa agcaagcagg agacgtggaa gaaaaccccg gtcccatggg aatcaggctc	900
[2823]	ctgtgtcgtg tggccttttg tttcctggct gtaggcctcg tagatgtgaa agtaaccag	960
[2824]	agctcgagat atctagtcaa aaggacggga gagaaagttt ttctggaatg tgtccaggat	1020
[2825]	atggaccatg aaaatatgtt ctggtatcga caagaccag gtctggggct acggctgac	1080
[2826]	tatttctcat atgatgttaa aatgaaagaa aaaggagata ttcttgaggg gtacagtgtc	1140
[2827]	tctagagaga agaaggagcg cttctccctg attctggagt ccgccagcac caaccagaca	1200
[2828]	tctatgtacc tctgtgccag cagttctata aatgagcagt tcttcgggccc agggacacgg	1260
[2829]	ctcaccgtgc tagaggacct gaaaaacgtg ttcccacccg aggtcgtctgt gtttgagcca	1320
[2830]	tcagaagcag agatctccca caccctaaag gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc	1380
[2831]	taccccgacc acgtggagct gagctggtgg gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc	1440
[2832]	tgcacagacc cgcagcccct caaggagcag cccgccctca atgactccag atactgcctg	1500
[2833]	agcagccgcc tgagggtctc ggccaccttc tggcagaacc cccgcaacca cttccgctgt	1560
[2834]	caagtccagt tctacgggct ctcgagaaat gacgagtga cccaggatag ggccaaacct	1620
[2835]	gtcaccaga tcgtcagcgc cgaggcctgg ggtagagcag actgtggctt cacctccag	1680
[2836]	tcttaccagc aaggggtcct gtctgccacc atcctctatg agatcttgct aggggaaggcc	1740
[2837]	accttgtatg ccgtgctggt cagtgccttc gtgctgatgg ccatgggtcaa gagaaaggat	1800
[2838]	tccagagget ag	1812
[2839]	<210>	126
[2840]	<211>	1812
[2841]	<212>	DNA
[2842]	<213>	人工序列
[2843]	<220>	
[2844]	<223>	P22 α -P2A-P22 β 构建体 - Cys修饰,
[2845]	密码子优化的	
[2846]	<400>	126
[2847]	atgatgaagt ccctgcgggt gctgctggtc atcctgtggc tgcagctgag ctgggtctgg	60
[2848]	tcccagcaga aagaggtgga acagaacagc ggccctctga gcgtgcccga aggcgctatc	120
[2849]	gccagcctga actgcaccta cagcgaccgg gtgtcccaga gcttcttctg gtacagacag	180
[2850]	tacagcggca agagccccga gctgatcatg agcatctaca gcaacggcga caaagaggac	240
[2851]	ggccggttca ccgccagct gaacaaggcc agccagtacg tgctcctgct gatccgggac	300
[2852]	agccagccca gcgacagcgc cacatacctg tgcgccgcca acaacgccgg caacatgctg	360
[2853]	accttcggcg gaggcacccg gctgatggtc aagccccaca tccagaaccc cgaccccgcc	420
[2854]	gtgtaccagc tgcgggtag caagagcagc gacaagagcg tgtgcctgtt caccgacttc	480
[2855]	gacagccaga ccaacgtgtc ccagtccaag gacagcgacg tgtacatcac cgataagtgc	540

[2856]	gtgctggaca tgcggagcat ggacttcaag agcaacagcg ccgtggcctg gtccaacaag	600
[2857]	agcgacttcg cctgcgcaa cgccttcaac aacagcatta tccccgagga cacattcttc	660
[2858]	ccaagccccg agagcagctg cgacgtgaag ctggtggaaa agagcttcga gacagacacc	720
[2859]	aacctgaact tccagaacct gagcgtgac ggcttccgga tcctgctgct gaaggtggcc	780
[2860]	ggcttcaacc tgctgatgac cctgcggctg tggtccagcg gttccggagc cacgaacttc	840
[2861]	tctctgttaa agcaagcagg agacgtggaa gaaaaccccc gtcccatggg catccggctg	900
[2862]	ctgtgcagag tggccttctg cttcctggcc gtgggcctgg tggacgtgaa agtgaccag	960
[2863]	agcagcagat acctgtcaa gcggaccggc gagaaggtgt tcctggaatg cgtgcaggat	1020
[2864]	atggaccacg agaacatgtt ttggtacagg caggatcctg gactgggact gcggctgac	1080
[2865]	tacttctcct acgacgtgaa gatgaaggaa aagggcgaca tccccgaggg ctacagcgtg	1140
[2866]	tccagagaga agaaagagcg gttcagcctg atcctggaaa gcgccagcac caaccagacc	1200
[2867]	agcatgtacc tgtgtgccag cagcagcatc aacgagcagt tcttcggccc tggcaccaga	1260
[2868]	ctgaccgtgc tggaagatct gaagaacgtg ttccccccag aggtggccgt gttcagcct	1320
[2869]	agcgaggccg agatcagcca caccagaaa gccaccctcg tgtgcctggc caccggcttc	1380
[2870]	taccccgacc acgtggaact gtcttggtgg gtcaacggca aagaggtgca cagcggcgtc	1440
[2871]	tgcaccgacc cccagcccct gaaagagcag cccgccctga acgacagccg gtactgcctg	1500
[2872]	agcagcagac tgagagtgtc cgccaccttc tggcagaacc cccggaacca cttcagatgc	1560
[2873]	caggtgcagt ttacggcct gagcgagaac gacgagtga cccaggaccg ggccaagccc	1620
[2874]	gtgaccaga tcgtgtcagc cgaggcctgg ggcagagccg attgcggctt caccagcgag	1680
[2875]	agctaccagc agggcgtgct gagcgccacc atcctgtacg agatcctgct gggcaaggcc	1740
[2876]	acctgtacg ccgtgctggt gtccgccctg gtgctgatgg ccatggtcaa gagaaaggac	1800
[2877]	agccggggct ga	1812
[2878]	<210>	127
[2879]	<211>	9
[2880]	<212>	PRT
[2881]	<213>	人工序列
[2882]	<220>	
[2883]	<223>	EBV肽
[2884]	<400>	127
[2885]	Gly Leu Cys Thr Leu Val Ala Met Leu	
[2886]	1	5

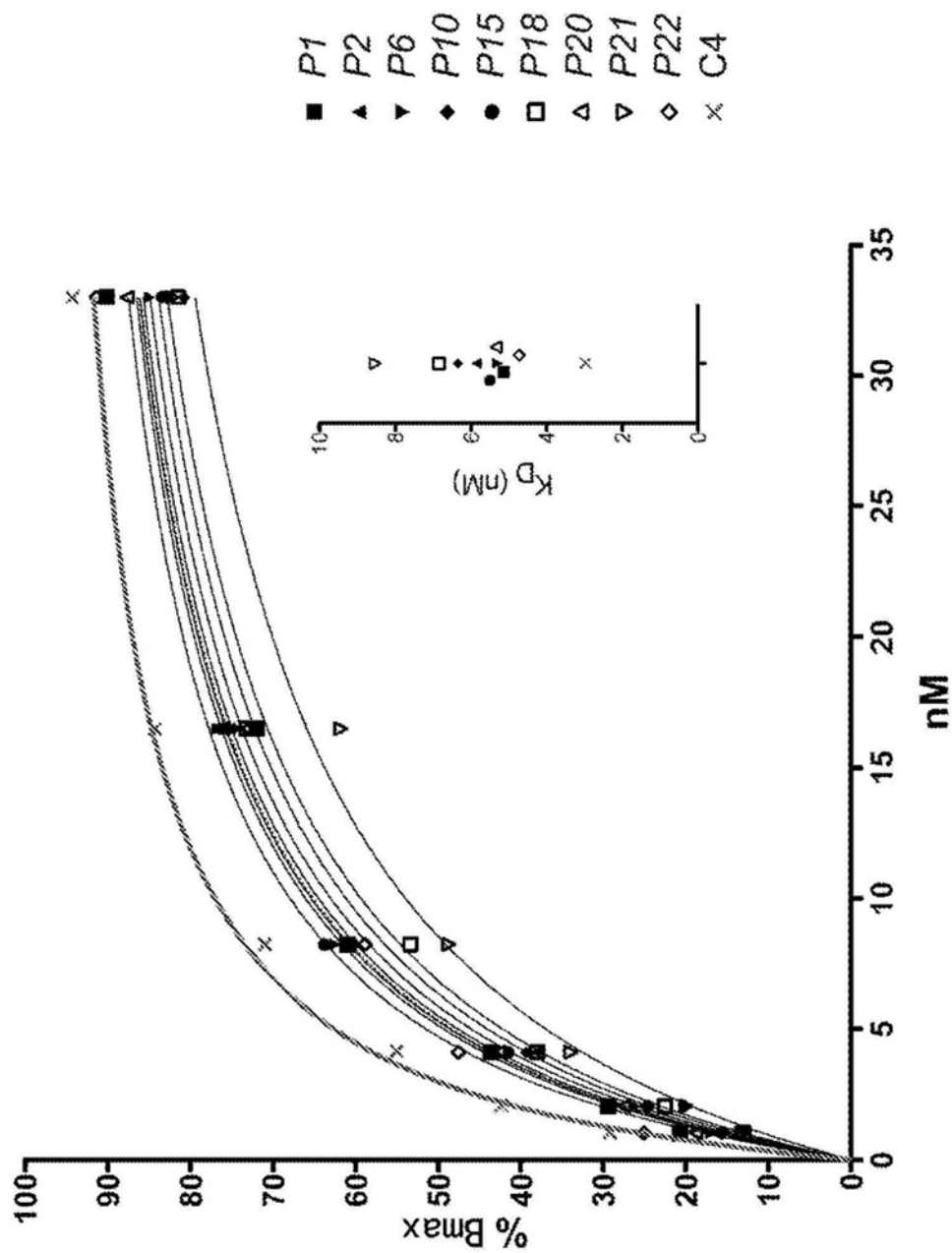


图1

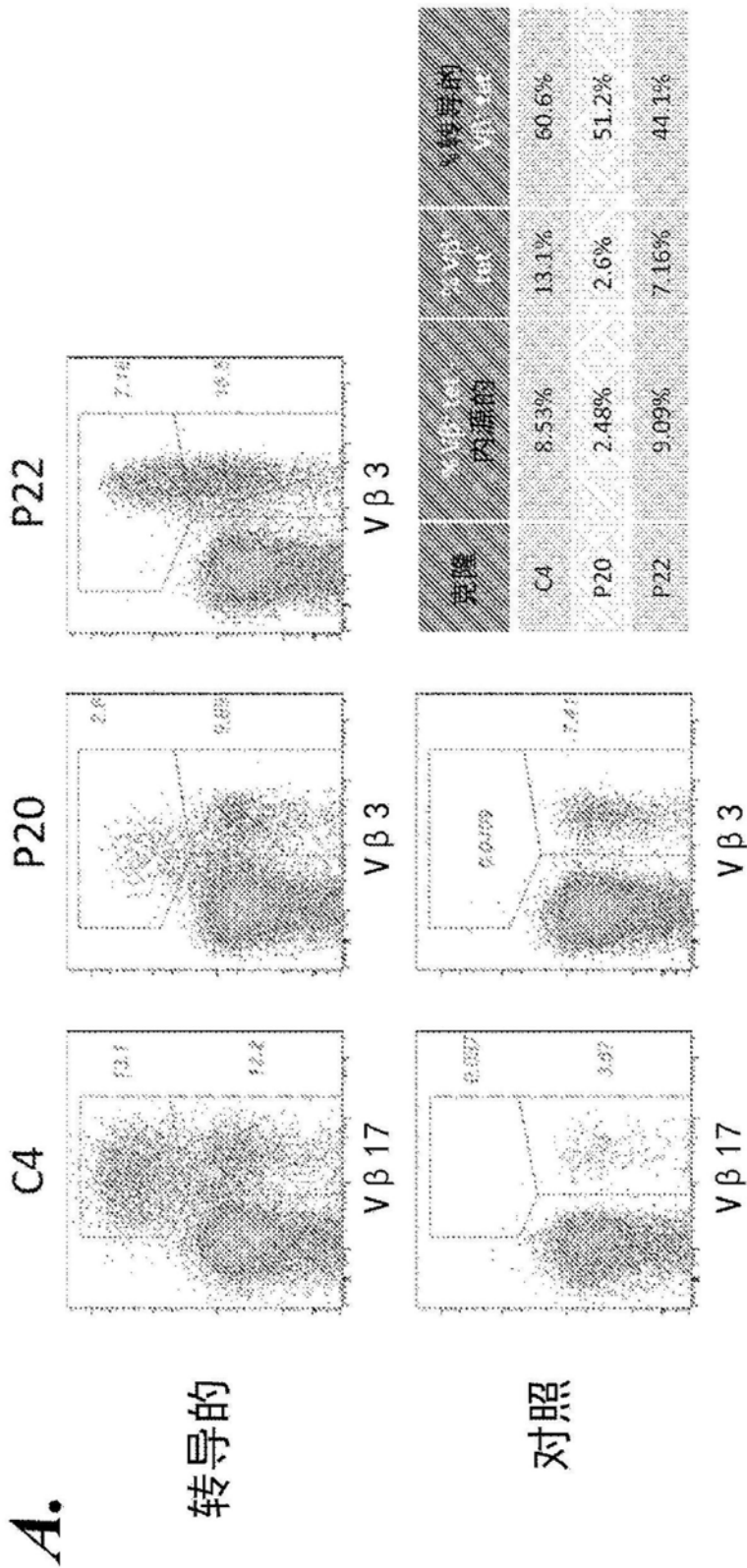


图2A

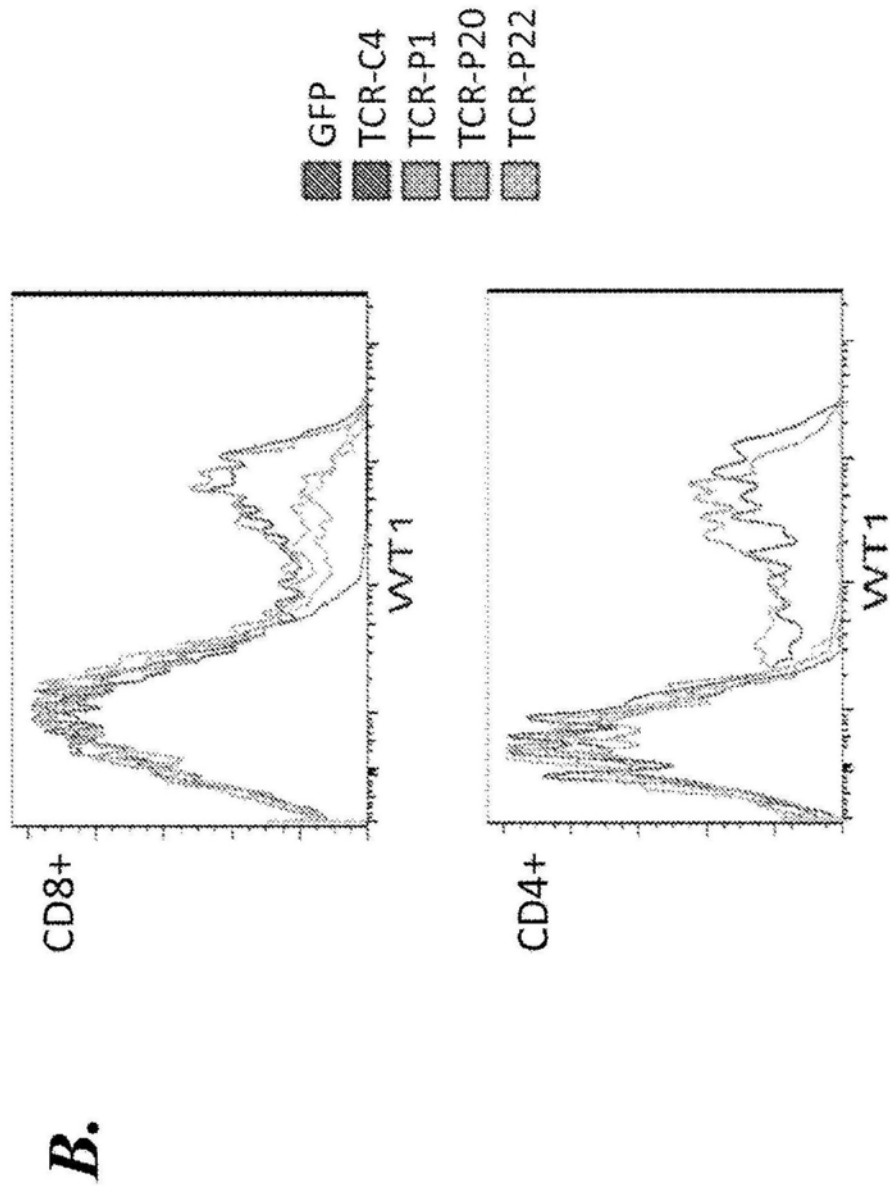


图2B

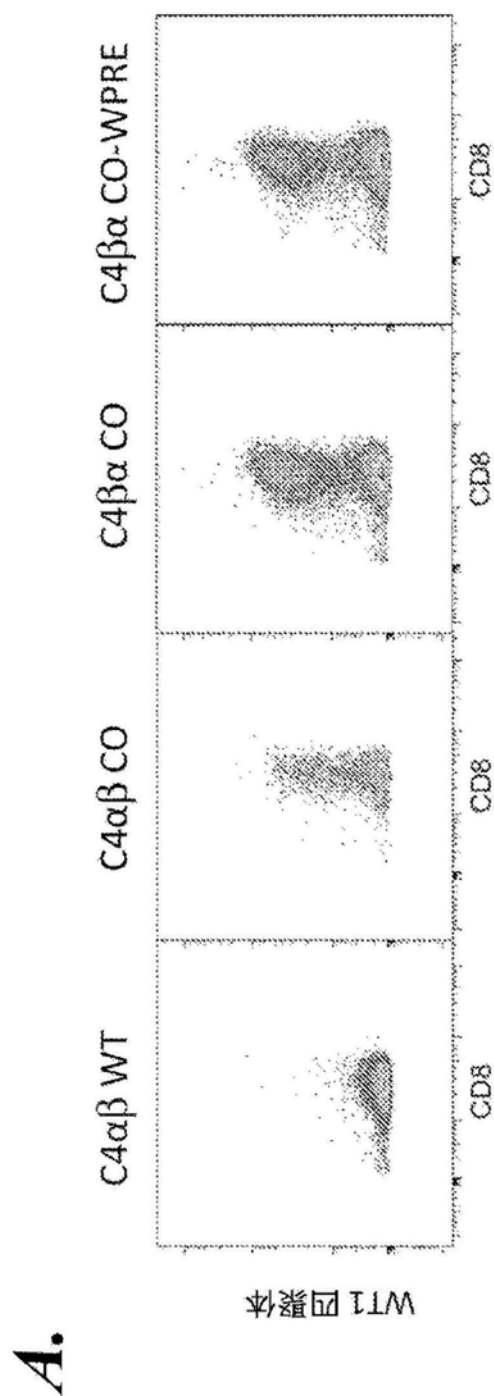


图3A

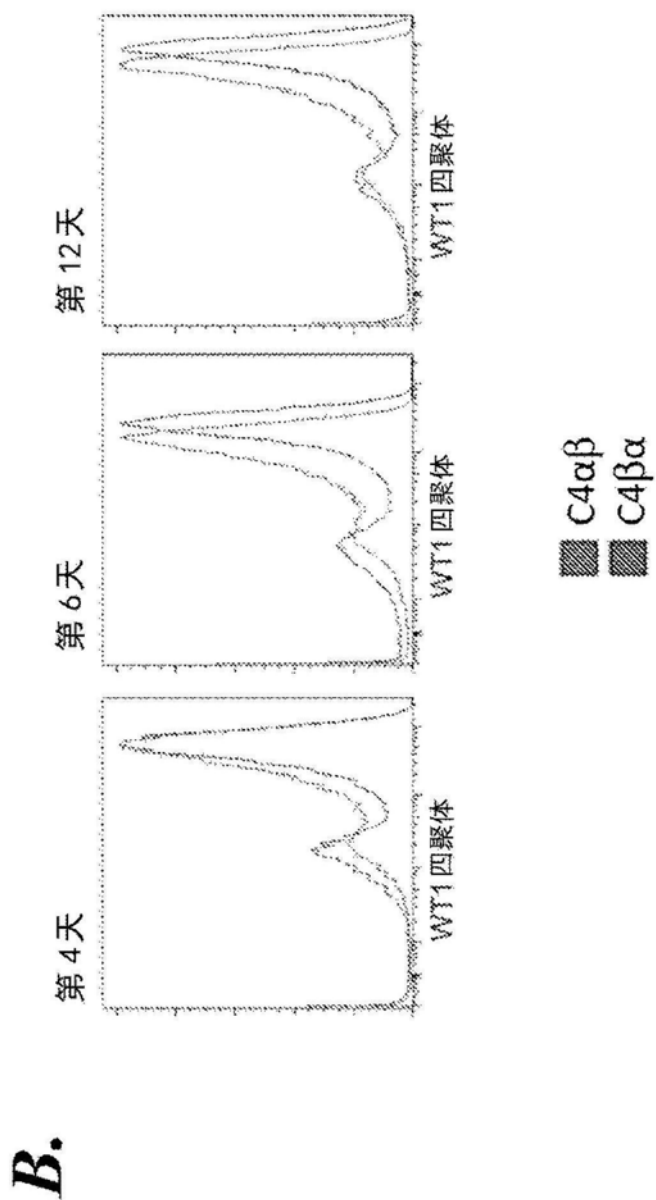


图3B

C.

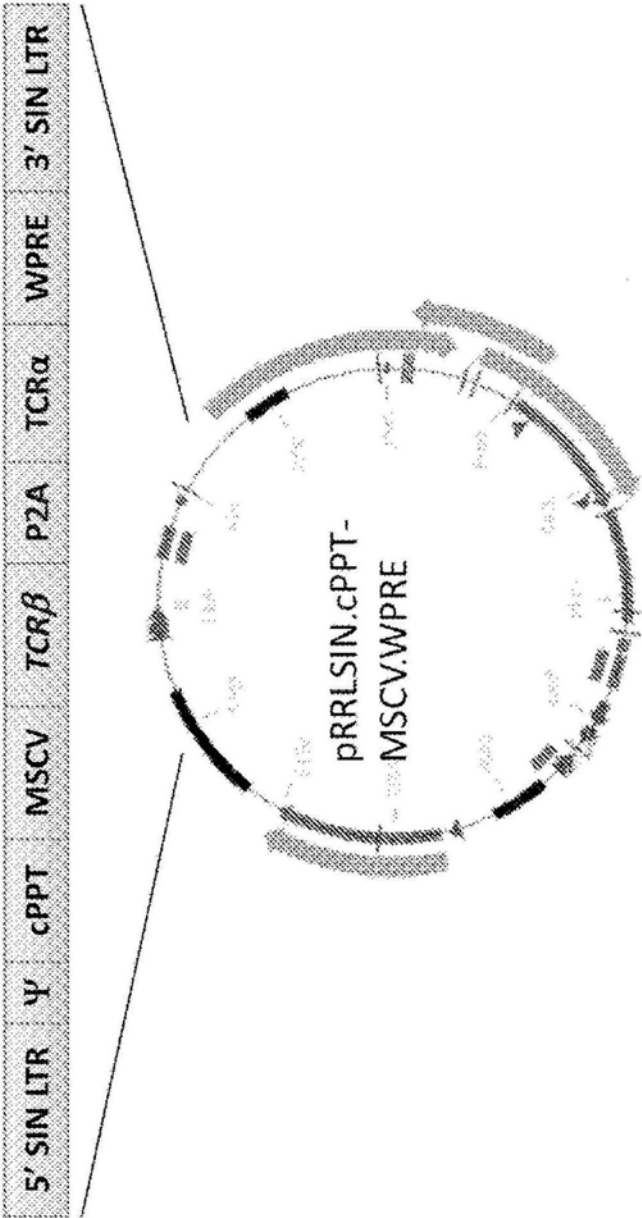


图3C

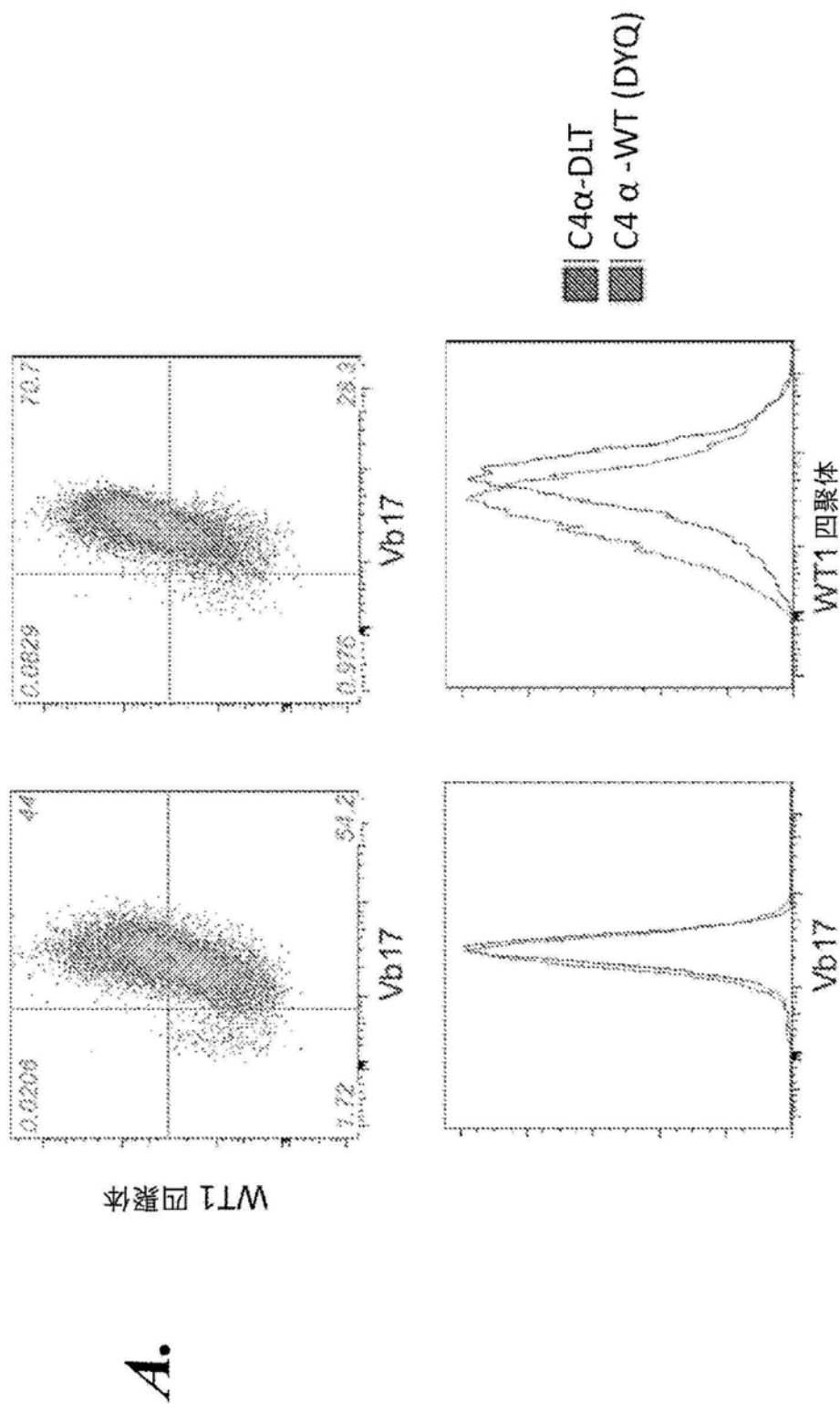


图4A

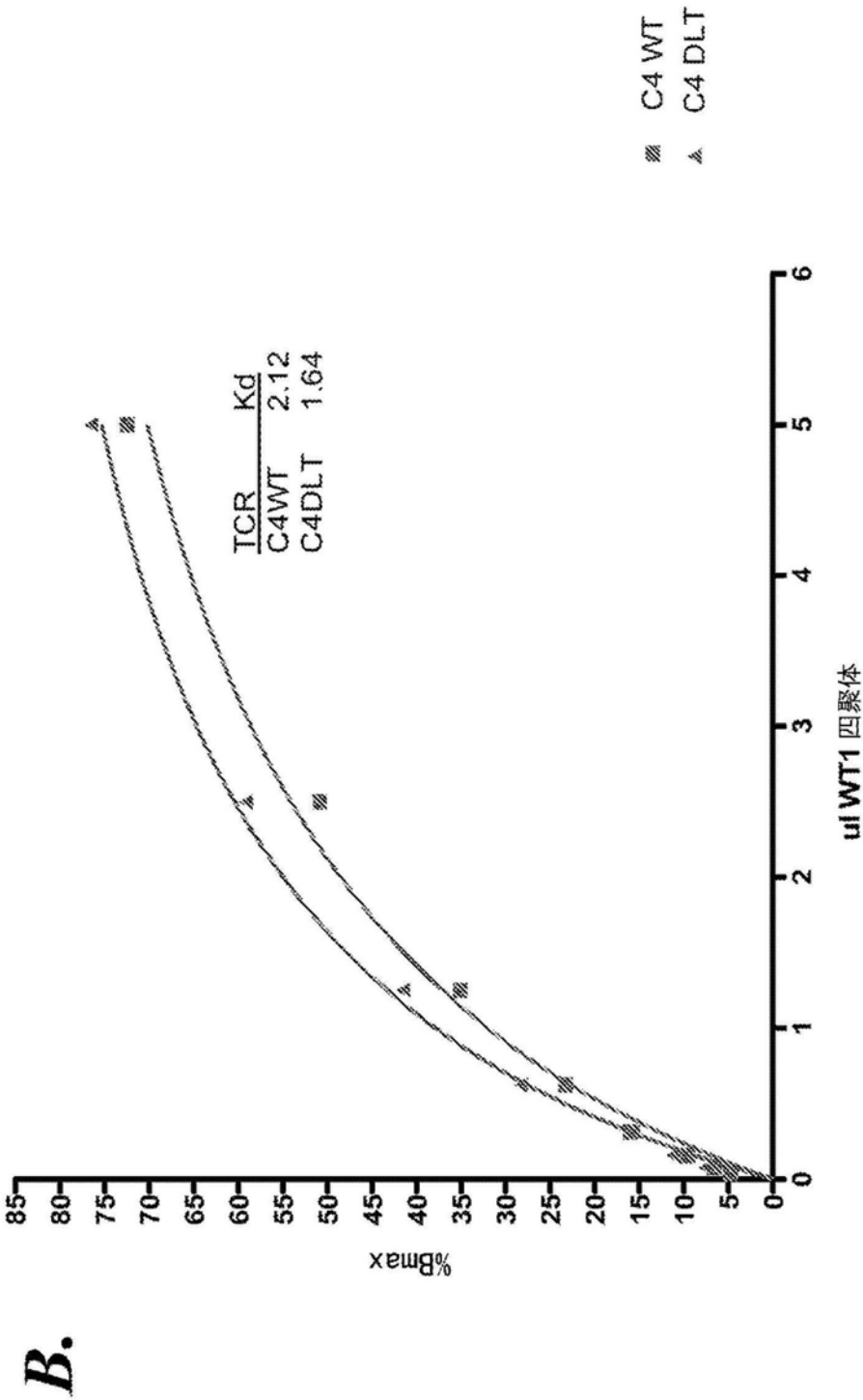


图4B

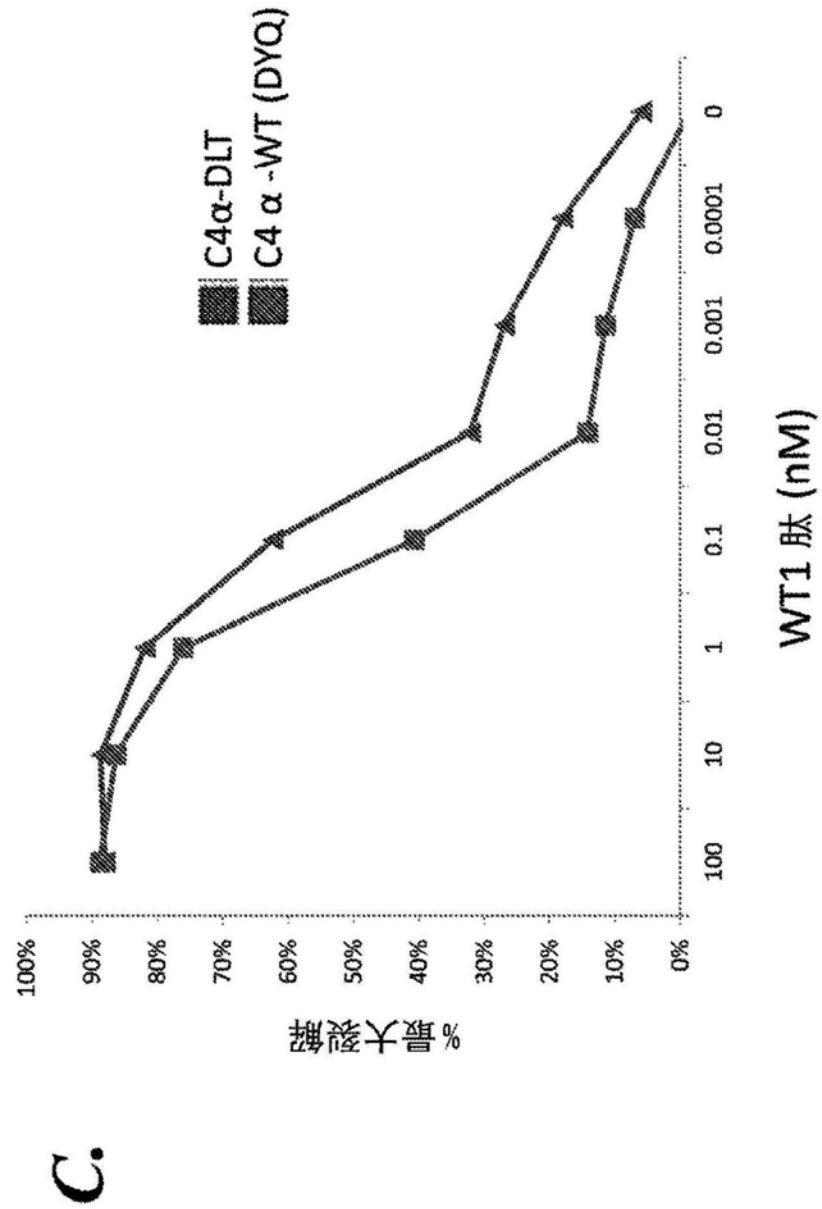


图4C

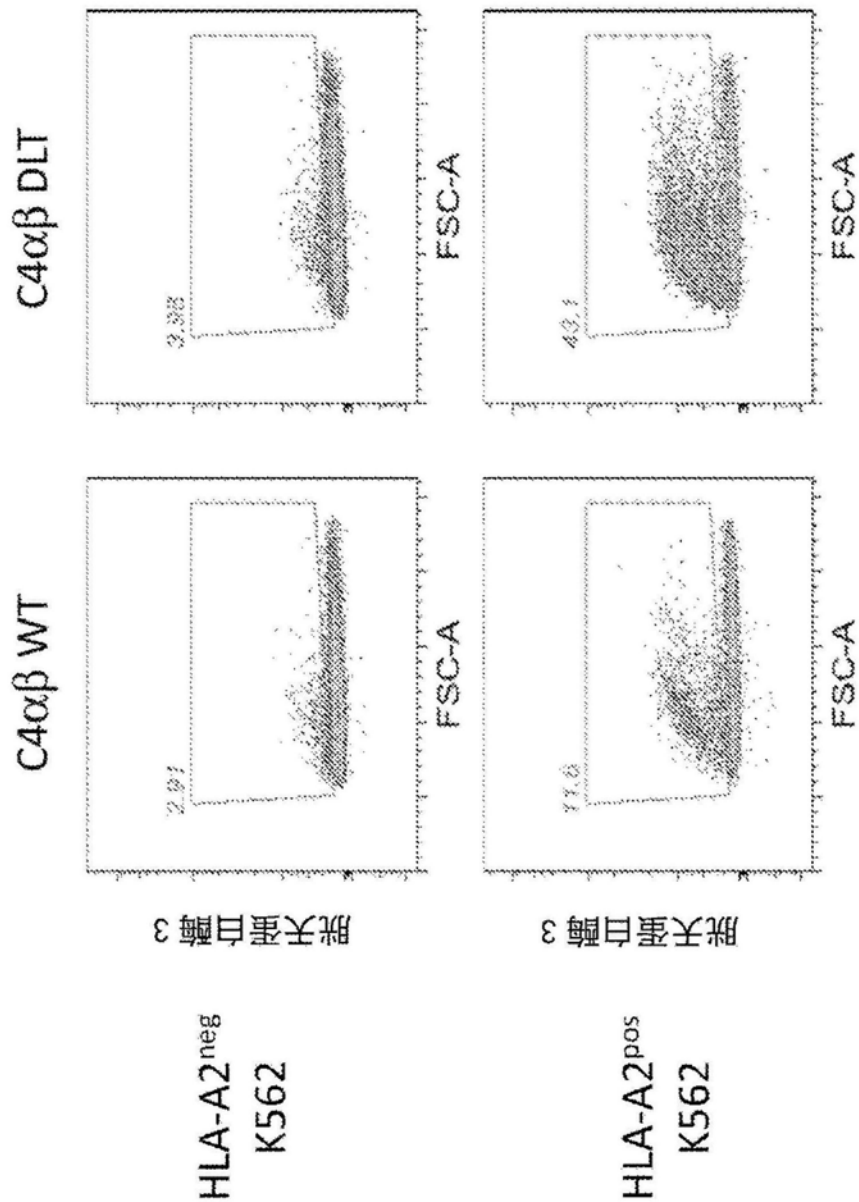


图5

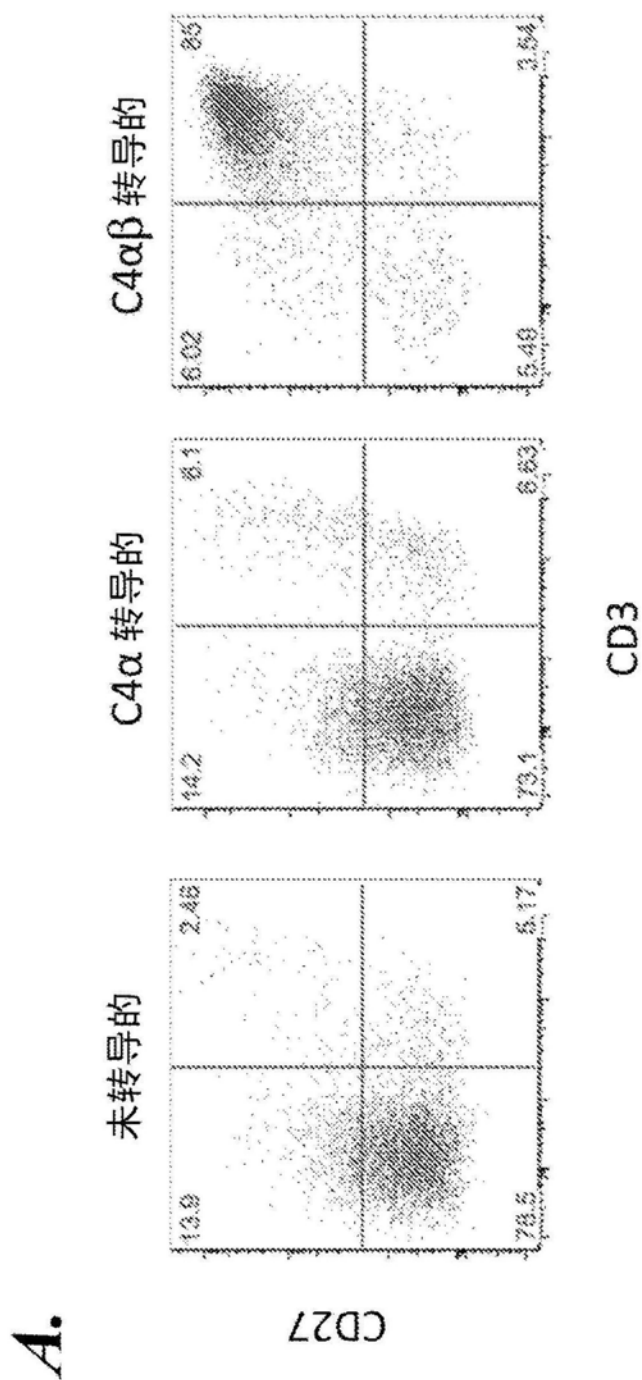


图6A

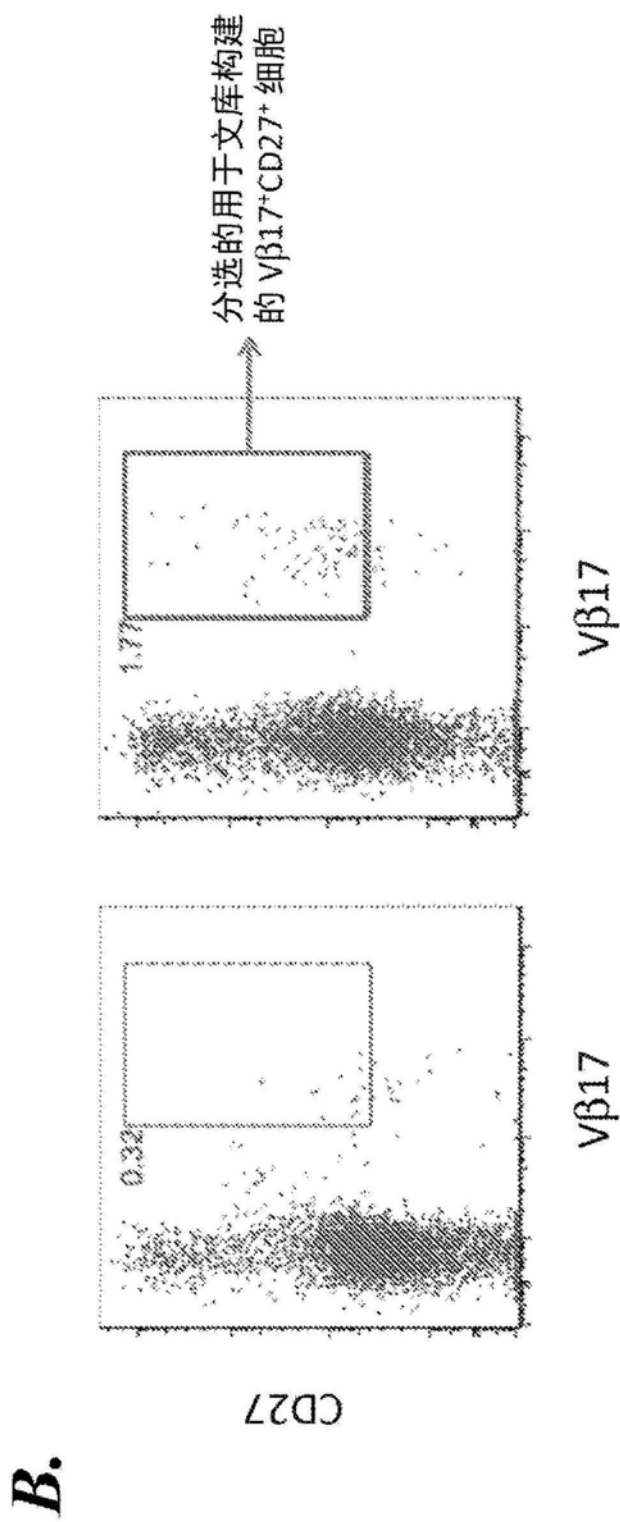


图6B

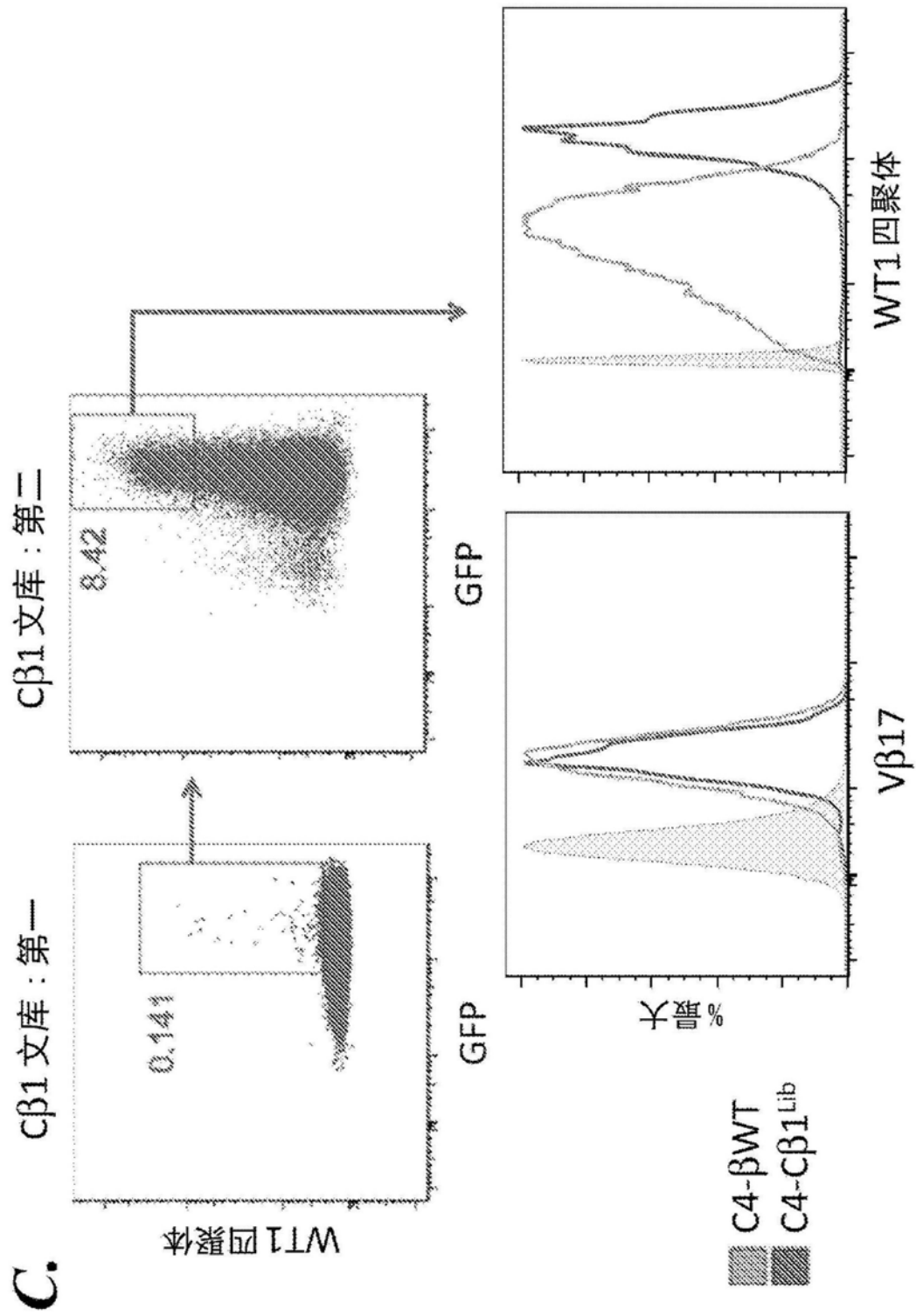


图6C

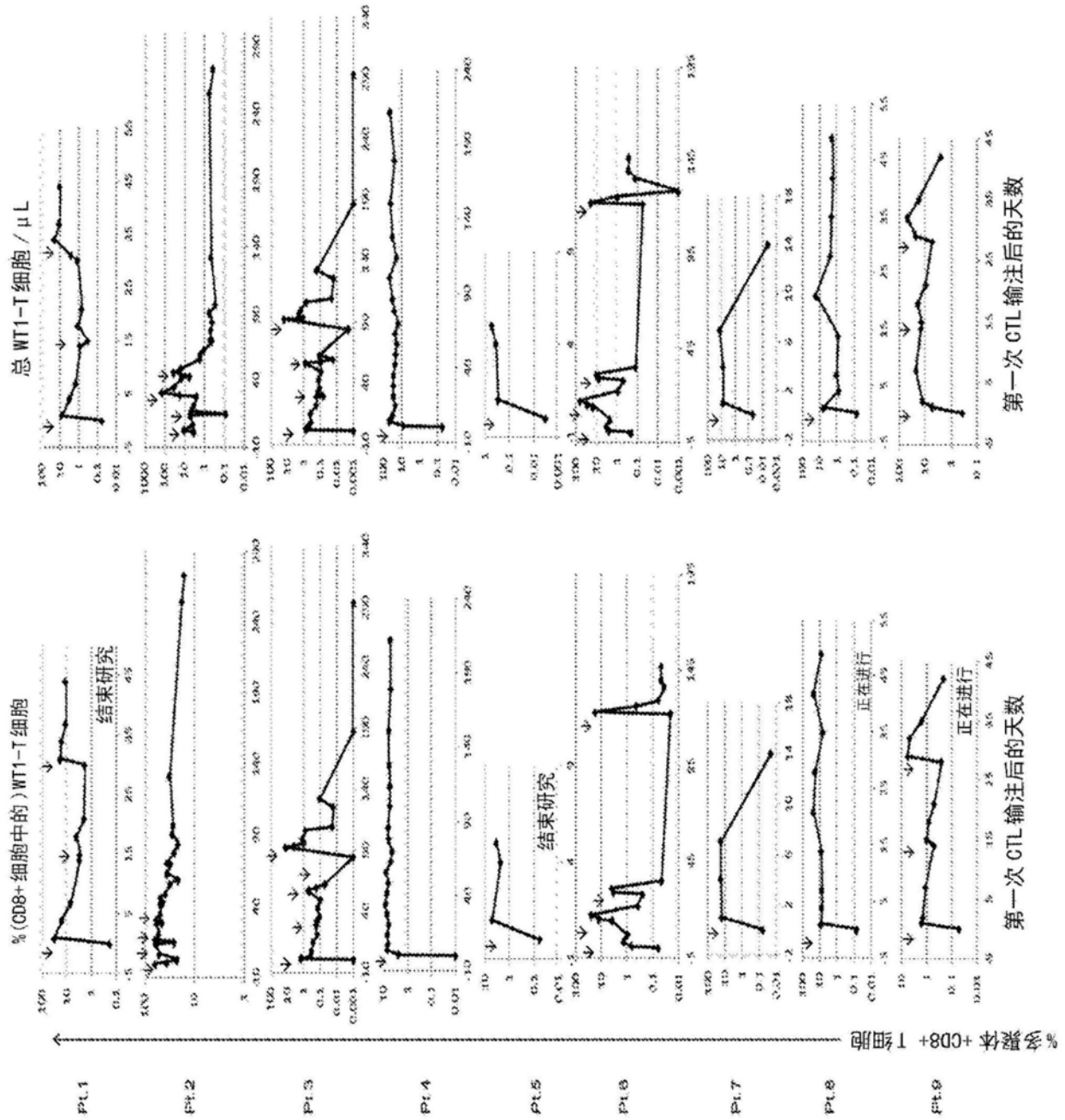


图7

A.

图8A

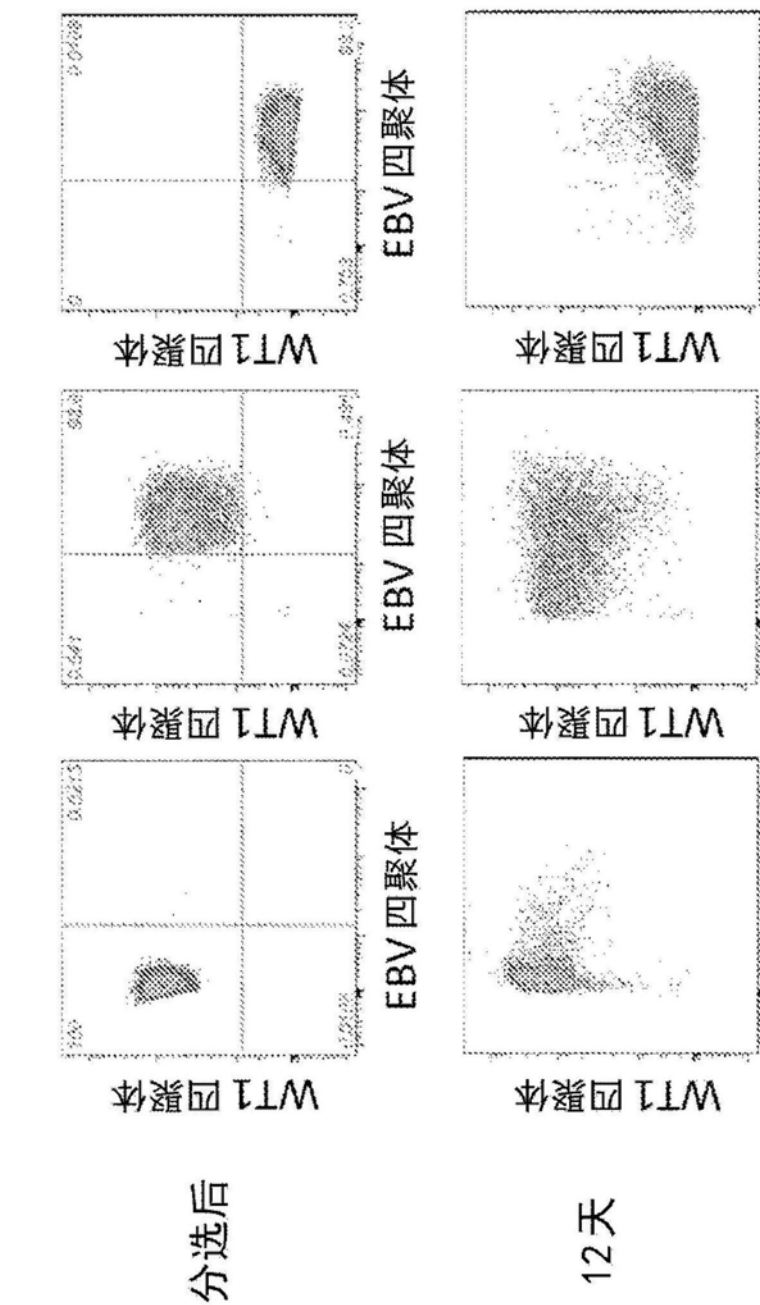


图8B

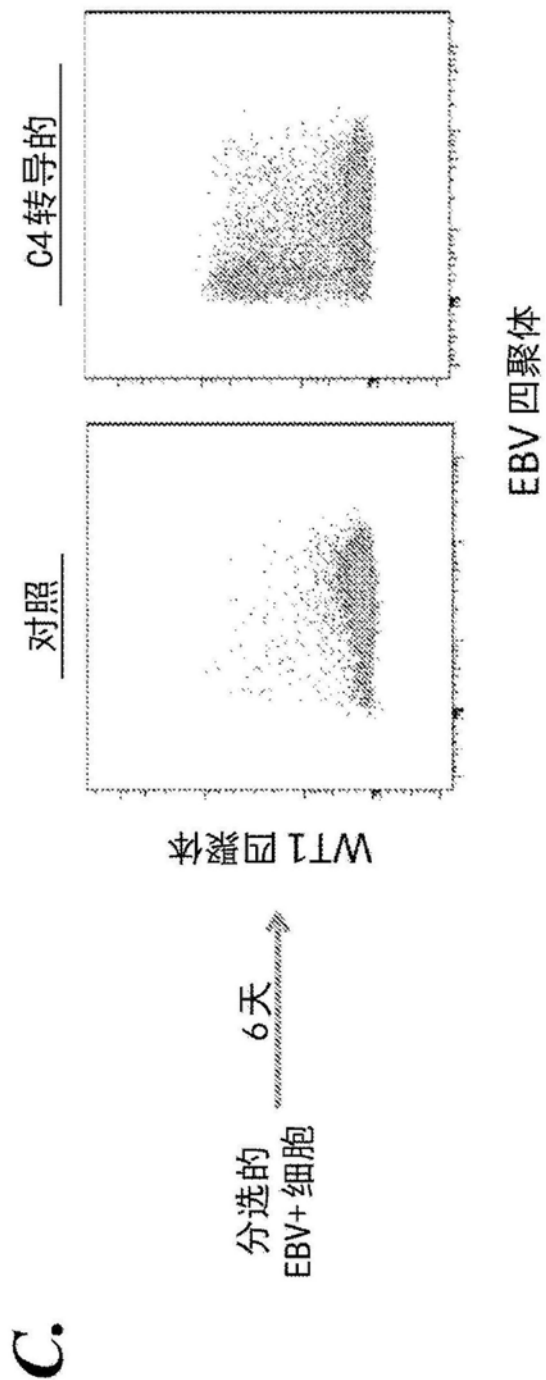


图8C