



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113402612 A

(43) 申请公布日 2021.09.17

(21) 申请号 202010188038.1

A61K 39/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.03.17

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 西比曼生物科技(香港)有限公司

地址 中国香港金钟道89号力宝中心2座四
楼417室

(72) 发明人 姚意弘 李延峰 魏雨恬 朱恃贵
姚昕 黄家琪

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 肖艳 徐迅

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

权利要求书1页 说明书28页

序列表49页 附图14页

(54) 发明名称

靶向CD19和CD20的联合嵌合抗原受体及其
应用

(57) 摘要

本发明提供了一种靶向CD19和CD20的联合嵌合抗原受体及其应用。具体地,本发明提供了一种靶向CD19和CD20联合嵌合抗原受体,其包括靶向CD19和CD20的scFv,铰链区,跨膜区,和胞内信号结构域。本发明提供编码该嵌合抗原受体的核酸分子和相应的表达载体、CAR-T细胞及其应用。实验结果表明,本发明提供的嵌合抗原受体显示出了极高的对肿瘤细胞的杀伤能力。本发明的嵌合抗原受体靶向CD19和/或CD20阳性细胞,可以用于治疗CD19和/或CD20阳性B细胞淋巴瘤,白血病等疾病。

1. 一种嵌合抗原受体 (CAR), 其特征在于, 所述嵌合抗原受体的结构如下式I所示:

$$L-scFv1-I-scFv2-H-TM-C-CD3\zeta \quad (I)$$

式中,

各“-”独立地为连接肽或肽键;

L为任选的信号肽序列;

I为柔性接头;

H为任选的铰链区;

TM为跨膜结构域;

C为共刺激信号分子;

CD3 ζ 为源于CD3 ζ 的胞浆信号传导序列;

scFv1和scFv2两者中一个为靶向CD19的抗原结合结构域, 另一个为靶向CD20的抗原结合结构域。

2. 权利要求1所述的CAR, 其特征在于, 所述scFv1为靶向CD20的抗原结合结构域, 所述scFv2为靶向CD19的抗原结合结构域。

3. 权利要求1所述的CAR, 其特征在于, 所述嵌合抗原受体的结构如下式II所示:

$$L-V_{L1}-V_{H1}-I-V_{H2}-V_{L2}-H-TM-C-CD3\zeta \quad (II)$$

式中, V_{H1} 为抗CD20抗体重链可变区; V_{L1} 为抗CD20抗体轻链可变区; V_{L2} 为抗CD19抗体轻链可变区; V_{H2} 为抗CD19抗体重链可变区;“-”为连接肽或肽键;

元件L、I、H、TM、C、CD3 ζ 如权利要求1所述。

4. 权利要求1所述的CAR, 其特征在于, 所述CAR的氨基酸序列如SEQ ID NO:15或16所示。

5. 一种核酸分子, 其特征在于, 所述核酸分子编码权利要求1所述的嵌合抗原受体。

6. 一种载体, 其特征在于, 所述的载体含有权利要求2所述的核酸分子。

7. 一种宿主细胞, 其特征在于, 所述的宿主细胞含有权利要求3所述的载体或染色体中整合有外源的权利要求2所述的核酸分子或表达权利要求1所述的嵌合抗原受体。

8. 一种制备CAR-T细胞的方法, 其特征在于, 所述的CAR-T细胞表达权利要求1所述的嵌合抗原受体, 包括以下步骤: 将权利要求2所述的核酸分子或权利要求3所述的载体转导入T细胞内, 从而获得所述CAR-T细胞。

9. 一种制剂, 其特征在于, 所述制剂含有权利要求1所述的嵌合抗原受体、权利要求2所述的核酸分子、权利要求3所述的载体、或权利要求4所述的宿主细胞, 以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

10. 一种权利要求1所述的嵌合抗原受体、权利要求2所述的核酸分子、权利要求3所述的载体、或权利要求4所述的宿主细胞的用途, 其特征在于, 用于制备预防和/或治疗癌症或肿瘤的药物或制剂。

靶向CD19和CD20的联合嵌合抗原受体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,更具体地涉及靶向CD19和CD20的联合嵌合抗原受体及其应用。

背景技术

[0002] 血液系统的恶性肿瘤占人类恶性肿瘤约10%,95%血液系统的恶性肿瘤是B淋巴细胞来源的。传统的化疗和放疗对治疗血液系统的恶性肿瘤起着重要作用,有的病人亦疗效显著,但大部份都难以治愈。新的、有效的治疗方法一直是这一领域探索的热点。

[0003] 过继性T细胞治疗针对恶性肿瘤的临床治疗中已经显示了其强大疗效和光明前景,目前其被誉为最有前途的治疗血液肿瘤的方法之一。绝大多数的B细胞性恶性肿瘤表面都高表达CD19,多个中心独立开展的利用嵌合抗原受体(Chimeric Antigen Receptor, CAR)修饰的T细胞靶向表达CD19的B细胞复发、难治性恶性肿瘤取得了前所未有的成功。目前,FDA批准上市的两款CAR-T产品,均针对CD19抗原,其适应证也在扩大,如慢性淋巴细胞白血病。尽管抗CD19 CAR-T的疗效突出,然而很多研究表明CD19嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法也存在很多问题,仍有部分患者的治疗效果不佳,容易复发,这包括肿瘤细胞对抗原逃逸的易感性。例如,最近的CD19 CAR-细胞治疗试验显示90%的患者达到完全缓解,但是这些患者中有11%最终复发,主要为CD19阴性肿瘤。尤其是在宾夕法尼亚大学医学院开展的一项利用CART19治疗复发、难治性急性B细胞淋巴瘤(R/R B-ALL)的临床试验中有高达94%的患者达到了完全缓解。尽管此项临床试验的初始反应率很高,但有近40%的患者在治疗1个月达到完全缓解之后又出现了复发,并且复发的患者中高于60%比例的患者出现了CD19阴性肿瘤细胞的逃逸。抗原逃脱已经被发现在过继转移的表达NY-ESO1特异性T细胞受体,和癌症疫苗治疗黑色素瘤。自发突变和选择性扩增是抗原逃逸主要原因。

[0004] 因此,本领域迫切需要开发有效治疗肿瘤并预防抗原逃逸的方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供有效治疗肿瘤并预防抗原逃逸的方法。

[0006] 本发明的目的在于提供靶向CD19和CD20的联合嵌合抗原受体及其制备方法和应用。

[0007] 具体地,本发明的目的在于提供一种靶向CD19和CD20联合抗原嵌合抗原受体的序列,及其修饰T细胞(CAR-T19/20)的制备方法和活性鉴定。本发明提供了一种用于治疗CD19CD20阳性B细胞淋巴瘤的嵌合性抗原受体结构。

[0008] 在本发明的第一方面,提供了一种嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体的结构如下式I所示:

[0009]
$$\text{L-scFv1-I-scFv2-H-TM-C-CD3}\zeta \quad (\text{I})$$

[0010] 式中,

[0011] 各“-”独立地为连接肽或肽键;

- [0012] L为任选的信号肽序列；
- [0013] I为柔性接头；
- [0014] H为任选的铰链区；
- [0015] TM为跨膜结构域；
- [0016] C为共刺激信号分子；
- [0017] CD3 ζ 为源于CD3 ζ 的胞浆信号传导序列；
- [0018] scFv1和scFv2两者中一个为靶向CD19的抗原结合结构域，另一个为靶向CD20的抗原结合结构域。
- [0019] 在另一优选例中，所述scFv1为靶向CD20的抗原结合结构域，所述scFv2为靶向CD19的抗原结合结构域。
- [0020] 在另一优选例中，所述靶向CD20的抗原结合结构域的结构如下式A或式B所示：
- [0021] $V_{H1}-V_{L1}$ (A) ; $V_{L1}-V_{H1}$ (B)
- [0022] 式中， V_{H1} 为抗CD20抗体重链可变区； V_{L1} 为抗CD20抗体轻链可变区；“-”为连接肽或肽键。
- [0023] 在另一优选例中，所述靶向CD20的抗原结合结构域的结构如式B所示。
- [0024] 在另一优选例中，所述 V_{H1} 的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示，所述 V_{L1} 的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示；或
- [0025] 所述 V_{H1} 的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示，所述 V_{L1} 的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。
- [0026] 在另一优选例中，所述的 V_{H1} 和 V_{L1} 通过柔性接头(或连接肽)相连，所述的柔性接头(或连接肽)为1-4个连续的SEQ ID NO:7(GGGGS)所示的序列，较佳地2-4个，更佳地3-4个。
- [0027] 在另一优选例中，所述靶向CD19的抗原结合结构域的结构如下式C或式D所示：
- [0028] $V_{L2}-V_{H2}$ (C) ; $V_{H2}-V_{L2}$ (D)
- [0029] 式中， V_{L2} 为抗CD19抗体轻链可变区； V_{H2} 为抗CD19抗体重链可变区；“-”为连接肽或肽键。
- [0030] 在另一优选例中，所述靶向CD19的抗原结合结构域的结构如式D所示。
- [0031] 在另一优选例中，所述 V_{L2} 的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示， V_{H2} 的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。
- [0032] 在另一优选例中，所述的 V_{H2} 和 V_{L2} 通过柔性接头(或连接肽)相连，所述的柔性接头(或连接肽)为1-4个连续的SEQ ID NO:7(GGGGS)所示的序列，较佳地2-4个，更佳地3-4个。
- [0033] 在另一优选例中，所述的scFv1和/或scFv2为鼠源、人源、人源和鼠源嵌合、或者全人源化的单链抗体可变区片段。
- [0034] 在另一优选例中，所述嵌合抗原受体的结构如下式II所示：
- [0035] $L-V_{L1}-V_{H1}-I-V_{H2}-V_{L2}-H-TM-C-CD3\zeta$ (II)
- [0036] 式中，各元件分别如上所述。
- [0037] 在另一优选例中，所述柔性接头I的序列包含2-6个，较佳地为3-4个连续的SEQ ID NO:7(GGGGS)所示的序列。
- [0038] 在另一优选例中，所述L为选自下组的蛋白的信号肽：CD8、CD28、GM-CSF、CD4、CD137、或其组合。

- [0039] 在另一优选例中,所述L为CD8来源的信号肽。
- [0040] 在另一优选例中,所述L的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。
- [0041] 在另一优选例中,所述H为选自下组的蛋白的铰链区:CD8、CD28、CD137、Ig4、或其组合。
- [0042] 在另一优选例中,所述H为Ig4来源的铰链区。
- [0043] 在另一优选例中,所述H的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。
- [0044] 在另一优选例中,所述TM为选自下组的蛋白的跨膜区:CD28、CD3 epsilon、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、或其组合。
- [0045] 在另一优选例中,所述TM为CD8或CD28来源的跨膜区。
- [0046] 在另一优选例中,所述TM的序列如SEQ ID NO:10或11所示。
- [0047] 在另一优选例中,所述C为选自下组的蛋白的共刺激信号分子:OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD134、4-1BB (CD137)、PD1、Dap10、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、NKG2D、GITR、TLR2、或其组合。
- [0048] 在另一优选例中,所述C为4-1BB或CD28来源的共刺激信号分子。
- [0049] 在另一优选例中,所述C的氨基酸序列如SEQ ID NO:12或13所示。
- [0050] 在另一优选例中,所述CD3 ζ 的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示。
- [0051] 在另一优选例中,所述CAR的氨基酸序列如SEQ ID NO:15或16所示。
- [0052] 在本发明的第二方面,提供了一种核酸分子,所述核酸分子编码本发明第一方面所述的嵌合抗原受体。
- [0053] 在另一优选例中,所述核酸分子为分离的。
- [0054] 在另一优选例中,所述核酸分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:17或18所示。
- [0055] 在本发明的第三方面,提供了一种载体,所述的载体含有本发明第二方面所述的核酸分子。
- [0056] 在另一优选例中,所述的载体包括DNA、RNA。
- [0057] 在另一优选例中,所述的载体选自下组:质粒、病毒载体、转座子、或其组合。
- [0058] 在另一优选例中,所述的载体包括DNA病毒、逆转录病毒载体。
- [0059] 在另一优选例中,所述的载体选自下组:慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、或其组合。
- [0060] 在另一优选例中,所述载体为慢病毒载体。
- [0061] 在本发明的第四方面,提供了一种宿主细胞,所述的宿主细胞含有本发明第三方面所述的载体或染色体中整合有外源的本发明第二方面所述的核酸分子或表达本发明第一方面所述的嵌合抗原受体。
- [0062] 在另一优选例中,所述细胞为分离的细胞。
- [0063] 在另一优选例中,所述细胞为基因工程化的细胞。
- [0064] 在另一优选例中,所述细胞为哺乳动物细胞。
- [0065] 在另一优选例中,所述细胞为CAR-T细胞和/或CAR-NK细胞。
- [0066] 在另一优选例中,所述细胞同时靶向CD19和CD20。
- [0067] 在本发明的第五方面,提供了一种制备CAR-T细胞的方法,所述的CAR-T细胞表达

本发明第一方面所述的嵌合抗原受体,包括以下步骤:将本发明第二方面所述的核酸分子或本发明第三方面所述的载体转入T细胞内,从而获得所述CAR-T细胞。

[0068] 在另一优选例中,所述的方法还包括对获得的CAR-T细胞进行功能和有效性检测的步骤。

[0069] 在本发明的第六方面,提供了一种制剂,所述制剂含有本发明第一方面所述的嵌合抗原受体、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的载体、或本发明第四方面所述的宿主细胞,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0070] 在另一优选例中,所述制剂为液态制剂。

[0071] 在另一优选例中,所述制剂的剂型为注射剂。

[0072] 在另一优选例中,所述制剂中含有本发明第四方面所述的宿主细胞,所述宿主细胞的浓度为 1×10^3 – 1×10^8 个细胞/ml,较佳地 1×10^4 – 1×10^7 个细胞/ml。

[0073] 在本发明的第七方面,提供了一种本发明第一方面所述的嵌合抗原受体、本发明第二方面所述的核酸分子、本发明第三方面所述的载体、或本发明第四方面所述的宿主细胞的用途,用于制备预防和/或治疗癌症或肿瘤的药物或制剂。

[0074] 在另一优选例中,所述肿瘤选自下组:血液肿瘤、实体瘤、或其组合;较佳地,所述肿瘤为血液肿瘤。

[0075] 在另一优选例中,所述血液肿瘤选自下组:急性髓细胞白血病(AML)、多发性骨髓瘤(MM)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴白血病(ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、或其组合。

[0076] 在另一优选例中,所述实体瘤选自下组:胃癌、胃癌腹膜转移、肝癌、白血病、肾脏肿瘤、肺癌、小肠癌、骨癌、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、大肠癌、宫颈癌、卵巢癌、淋巴瘤、鼻咽癌、肾上腺肿瘤、膀胱肿瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、脑胶质瘤、子宫内膜癌、或其组合。

[0077] 在本发明的第八方面,提供了一种用于制备本发明第四方面所述细胞的试剂盒,所述试剂盒含有容器,以及位于容器内的本发明第二方面所述的核酸分子、或本发明第三方面所述的载体。

[0078] 在本发明的第九方面,提供了一种本发明第四方面所述细胞、或本发明第六方面所述的制剂的用途,用于预防和/或治疗癌症或肿瘤。

[0079] 在本发明的第十方面,提供了一种治疗疾病的方法,包括给需要治疗的对象施用适量的本发明第四方面所述的细胞、或本发明第六方面所述的制剂。

[0080] 在另一优选例中,所述疾病为癌症或肿瘤。

[0081] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0082] 图1显示了靶向CD19CD20联合嵌合型抗原受体结构示意图。CAR的结构包括前导序列、抗原识别序列、连接区、跨膜区、共刺激因子信号区和CD3zeta信号传导区。

[0083] 图2显示了靶向CD19CD20联合嵌合型抗原受体工程化T细胞转染效率的检测。Protein L方法鉴定培养到第7天的CAR-T19/20s细胞中CAR基因编码蛋白在T细胞膜表面的

表达水平。

[0084] 图3显示了T细胞膜表面CD137的表达水平(图3A)和培养上清中IFN γ 的分泌水平(图3B)。具体地,依次取 1×10^5 个培养到第7天的CAR-T19/20s细胞,分别与CD19阳性的K562-CD19+肿瘤细胞系,CD20阳性的K562-CD20+肿瘤细胞系,CD19CD20双阳性的K562-CD19+CD20+肿瘤细胞系,天然表达CD19和CD20的RAJI肿瘤细胞系,以及CD19CD20双阴性的K562肿瘤细胞系或不添加肿瘤细胞,在200 μ l GT-551培养基中按照1:1比例培养18h后分别检测T细胞膜表面CD137的表达水平和培养上清中IFN γ 的分泌水平。

[0085] 图4显示了CAR-T19/20s细胞肿瘤杀伤活性检测,主要通过检测共培养后上清中LDH的分泌水平。具体地,分别取 1×10^4 个CD19阳性的K562-CD19+肿瘤细胞系,CD20阳性的K562-CD20+肿瘤细胞系,CD19CD20双阳性的K562-CD19+CD20+肿瘤细胞系,天然表达CD19和CD20的RAJI, RAMOS肿瘤细胞系或CD19CD20双阴性的K562肿瘤细胞系,在100 μ l GT-551培养基中按照图示比例与相应的T细胞分别共培养8h后检测LDH的分泌水平,此图显示了LDH释放百分比在相应共培养样品中的统计分析结果。

[0086] 图5显示了CAR-T19/20s细胞肿瘤杀伤活性检测,主要通过检测共培养后T细胞膜表面CD107a的表达水平。具体地,分别取 1×10^5 个CAR-T19/20s细胞,分别与CD19阳性的K562-CD19+肿瘤细胞系,CD20阳性的K562-CD20+肿瘤细胞系,CD19CD20双阳性的K562-CD19+CD20+肿瘤细胞系,天然表达CD19和CD20的RAJI, RAMOS肿瘤细胞系或CD19CD20双阴性的K562肿瘤细胞系或不添加肿瘤细胞,在200 μ l GT-551培养基中按照1:2比例培养4h后分别检测T细胞膜表面CD107a的表达水平。

[0087] 图6显示了CAR-T19/20s细胞在RAJI-Luc/NSG白血病模型小鼠体内对肿瘤细胞杀伤的结果。图6A显示了CAR-T19/20s细胞转染效率的检测,Protein L方法鉴定培养到第9天的CAR-T19/20s细胞中CAR基因编码蛋白在T细胞膜表面的表达水平。依次取 1×10^5 培养到第10天(图6B),第18天(图6C)的CAR-T19/20s细胞,分别与CD19阳性的K562-CD19+肿瘤细胞系,CD20阳性的K562-CD20+肿瘤细胞系,CD19CD20双阳性的K562-CD19+CD20+肿瘤细胞系,天然表达CD19和CD20的RAJI, RAMOS肿瘤细胞系,以及CD19CD20双阴性的K562, MOLT4肿瘤细胞系或不添加肿瘤细胞,在200 μ l GT-551培养基中按照1:1比例培养18h后分别检测T细胞膜表面CD137的表达水平。图6D显示了培养上清中IFN γ 的分泌水平。图6E显示了注射了CAR-T19/20s细胞的小鼠在21天内的平均体重变化图和平均荧光强度变化图,每7天记录一次。图6F显示了注射了CAR-T19/20s细胞的小鼠在注射CAR T细胞第0天(D0),第7天(D7),第14天(D14)和第21天(D21)的活体成像影像图。

[0088] 图7显示了CAR-T20.1, CAR-T20.2, CAR-T20.4的初步功能验证结果。

[0089] 图7A显示了T细胞转染效率的检测,通过DNA拷贝数方法鉴定培养到第7天的CAR-T20s细胞中CAR基因编码蛋白在T细胞膜表面的表达水平。图7B显示了CAR-T20s细胞与靶细胞共培养后上清中TFN γ 的分泌水平。图7C显示了共培养后T细胞膜表面CD137的表达水平。

[0090] 图8显示了CAR-T20.5, CAR-T20.6, CAR-T20.7, CAR-T20.8, CAR-T20.9, CAR-T20.10的功能验证结果

[0091] 图8A显示了T细胞转染效率的检测,通过Protein L方法鉴定培养到第7天的CAR-T20s细胞中CAR基因编码蛋白在T细胞膜表面的表达水平。图8B显示了CAR-T20s细胞与

靶细胞共培养后上清中IFN γ 的分泌水平。图8C显示了共培养后T细胞膜表面CD137的表达水平。

[0092] 图9显示了CAR-T20.11, CAR-T20.12, CAR-T20.13, CAR-T20.14, CAR-T20.15, CAR-T20.16的功能验证结果。图9A显示了T细胞转染效率的检测结果,通过Protein L方法鉴定培养到第7天的CAR-T20s细胞中CAR基因编码蛋白在T细胞膜表面的表达水平。图9B显示了CAR-T20s细胞与靶细胞共培养后上清中IFN γ 的分泌水平。图9C显示了共培养后T细胞膜表面CD137的表达水平。

[0093] 图10显示了CAR-T20.17, CAR-T20.18, CAR-T20.19的功能验证结果。

[0094] 图10A显示了T细胞转染效率的检测结果。图10B显示了共培养后上清中IFN γ 的分泌水平。图10C显示了CAR-T20s细胞对肿瘤细胞杀伤能力检测,主要通过检测共培养后上清中LDH的分泌水平。图10D显示了T细胞膜表面CD137的表达水平。

[0095] 图11显示了CAR-T19/20s细胞在小鼠体内对移植肿瘤细胞的抑制效果。

[0096] 图12显示了CART-20TN-OF-19I期临床试验的实验流程。

[0097] 图13显示了对CAR拷贝数的检测结果。

[0098] 图14显示了一个实验对象的肿瘤大小变化。

[0099] 附图中, TN-OF-19与TN-20OF-19具有相同含义, TN-LEU-19与TN-20LEU-19具有相同含义,表示具有相应CAR结构的CART细胞。

具体实施方式

[0100] 本发明人经过广泛而深入地研究,首次意外地发现一种同时靶向CD19和CD20的CAR-T细胞。具体地,本发明提供了一种同时靶向CD19和CD20的嵌合抗原受体,其包括信号肽、抗CD20的scFv、抗CD19的scFv、铰链区、跨膜区和胞内T细胞信号区,且抗CD20scFv和CD19scFv是经过大量筛选得到的,两者通过多个重复结构(G4S)肽段连接。本发明的CAR-T细胞可以同时识别CD19和CD20两种抗原,减少了识别单靶点CAR-T细胞治疗过程中因抗原表达下调或者缺失产生的免疫逃逸风险。与靶向单抗原的CAR-T和其他双靶向(靶向CD19和CD20)的CAR-T细胞相比,本发明同时识别两个靶点的CAR-T细胞对肿瘤细胞的杀伤能力更强,而且细胞毒性较小,副作用低,治疗的范围更广,复发率降低,疗效更佳。在此基础上完成了本发明。

[0101] 术语

[0102] 为了可以更容易地理解本公开,首先定义某些术语。如本申请中所使用的,除非本文另有明确规定,否则以下术语中的每一个应具有下面给出的含义。在整个申请中阐述了其它定义。

[0103] 术语“约”可以是指在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成,其将部分地取决于如何测量或测定值或组成。

[0104] 术语“给予”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任一种将本发明的产品物理引入受试者,包括静脉内,肌内,皮下,腹膜内,脊髓或其它肠胃外给药途径,例如通过注射或输注。

[0105] 术语“抗体”(Ab)应包括但不限于免疫球蛋白,其特异性结合抗原并包含通过二硫键互连的至少两条重(H)链和两条轻(L)链,或其抗原结合部分。每条H链包含重链可变区

(本文缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个恒定结构域CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个恒定结构域CL。VH和VL区可以进一步细分为称为互补决定区(CDR)的高变区,其散布有更保守的称为框架区(FR)的区域。每个VH和VL包含三个CDR和四个FR,从氨基末端到羧基末端按照以下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。

[0106] CD20

[0107] 尽管抗CD19 CAR-T的疗效突出,然而很多研究表明CD19嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法也存在很多问题,仍有部分患者的治疗效果不佳,容易复发,这包括肿瘤细胞对抗原逃逸的易感性。

[0108] 为了预防CD19 CAR-T抗原逃逸,本发明设计了联合双特异性CAR(即BICAR),既靶向CD19又可以靶向CD20,这样当CD19抗原逃逸,不在肿瘤细胞中表达时,可以通过识别CD20来清除体内肿瘤细胞。

[0109] CD20表达于大多数B细胞性急性淋巴细胞白血病患者,包括一些抗CD19CAR-T治疗后CD19阴性的患者,CD20是糖基化蛋白,是第一个被确定的B细胞膜标识,也被称为B1,由MS4A基因编码。CD20分子是有四个跨膜的疏水区,其N段和C端均位于胞质一侧,从而在胞外形成两个闭环,分别称为大环和小环。CD20特异性地表达在95%以上的正常和癌变的B细胞,这些细胞处于前B细胞及之后的发育阶段,直至分化为浆细胞CD20才停止表达。本发明采用CD20作为B细胞恶性肿瘤免疫治疗的另一个靶点。

[0110] 靶向CD19和CD20的双特异性嵌合抗原受体

[0111] 细胞免疫治疗是一种新兴的、具有显著疗效的肿瘤治疗模式,是一种自身免疫抗癌的新型治疗方法。它是运用生物技术和生物制剂对从病人体内采集的免疫细胞进行体外培养和扩增后回输到病人体内的方法,来激发、增强机体自身免疫功能,从而达到治疗肿瘤的目的。本领域技术人员一直致力于开发新的细胞免疫疗法,以提高细胞免疫疗法的效果,并降低其副作用。

[0112] 本发明提出了一种合理的优化的单链设计和系统,即联合双特异性CAR,所述CAR可以有效地整合到初级人类T细胞,当T细胞激活时可同时靶向CD19和CD20。本发明CAR-T细胞能够识别两种抗原(CD19和CD20),是一种很有效的潜在的预防抗原逃逸的方法。

[0113] 本发明使用双向靶向的CD19和CD20的CAR,与靶向单抗原的CAR相比,亲和力增强,T细胞的活性增加,具有相加或协同效应。此外,由于CD19和CD20在肿瘤细胞中的表达水平不均一,双靶向CAR-T治疗范围更广泛。同时靶向肿瘤细胞表面的CD19和CD20的CAR-T可以减少因单一表面抗原下调或者缺失造成的抗原逃逸的可能性。

[0114] 双特异性是指同一个CAR可以特异结合、免疫识别两个不同的抗原,CAR结合任意一个抗原都能产生免疫反应。

[0115] 本发明的CD19和CD20双特异性的CAR为单一结构,包含抗CD19和CD20的scFv。其中CAR包含CD19 scFv和CD20 scFv,CD19 scFv和CD20 scFv的氨基酸序列、排序和铰链是其功能的主要影响因素。

[0116] 具体地,本发明的嵌合抗原受体(CAR)包括细胞外结构域、跨膜结构域、和细胞内结构域。胞外结构域包括靶-特异性结合元件(也称为抗原结合结构域)。细胞内结构域包括

共刺激信号传导区和 ζ 链部分。共刺激信号传导区指包括共刺激分子的细胞内结构域的一部分。共刺激分子为淋巴细胞对抗原的有效应答所需要的细胞表面分子,而不是抗原受体或它们的配体。

[0117] 在CAR的胞外结构域和跨膜结构域之间,或在CAR的胞浆结构域和跨膜结构域之间,可并入接头。如本文所用的,术语“接头”通常指起到将跨膜结构域连接至多肽链的胞外结构域或胞浆结构域作用的任何寡肽或多肽。接头可包括0-300个氨基酸,优选地2至100个氨基酸和最优选地3至50个氨基酸。

[0118] 在本发明的一个较佳的实施方式中,本发明提供的CAR的胞外结构域包括靶向CD19CD20联合的抗原结合结构域。本发明的CAR当在T细胞中表达时,能够基于抗原结合特异性进行抗原识别。当其结合其关联抗原时,影响肿瘤细胞,导致肿瘤细胞不生长、被促使死亡或以其他方式被影响,并导致患者的肿瘤负荷缩小或消除。抗原结合结构域优选与来自共刺激分子和 ζ 链中的一个或多个的细胞内结构域融合。优选地,抗原结合结构域与4-1BB信号传导结构域、和CD3 ζ 信号结构域组合的细胞内结构域融合。

[0119] 如本文所用,“抗原结合结构域”“单链抗体片段”均指具有抗原结合活性的Fab片段,Fab'片段,F(ab')₂片段,或单一Fv片段。Fv抗体含有抗体重链可变区、轻链可变区,但没有恒定区,并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般的,Fv抗体还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,且能够形成抗原结合所需的结构。抗原结合结构域通常是scFv(single-chain variable fragment)。scFv的大小一般是一个完整抗体的1/6。单链抗体优选是由一条核苷酸链编码的一条氨基酸链序列。作为本发明的优选方式,所述scFv包含特异性识别CD19CD20的抗体。

[0120] 对于铰链区和跨膜区(跨膜结构域),CAR可被设计以包括融合至CAR的胞外结构域的跨膜结构域。在一个实施方式中,使用天然与CAR中的结构域之一相关联的跨膜结构域。在一些例子中,可选择跨膜结构域,或通过氨基酸置换进行修饰,以避免将这样的结构域结合至相同或不同的表面膜蛋白的跨膜结构域,从而最小化与受体复合物的其他成员的相互作用。

[0121] 本发明的CAR中的胞内结构域包括4-1BB的信号传导结构域和CD3 ζ 的信号传导结构域。

[0122] 优选的,本发明的CAR的结构依次包括信号肽序列(又称前导序列)、抗原识别序列(抗原结合结构域)、铰链区、跨膜区、共刺激因子信号区和CD3zeta信号传导区(ζ 链部分),连接顺序如图1所示。

[0123] 在另一优选例中,本发明CAR为TN-LEU-19。其中,靶向CD20的抗原结合结构域包含Leu16抗体来源的单链可变区重链序列(SEQ ID NO:1)和单链可变区轻链(VL)序列(SEQ ID NO:2)。

[0124] Leu16抗体来源的单链可变区重链(VH)序列:

[0125] EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFVDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:1)

[0126] Leu16抗体来源的单链可变区轻链(VL)序列:

[0127] DIVLTQSPAILLSASPGKEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:2)

[0128] 在另一优选例中,本发明CAR为TN-OF-19。其中,靶向CD20的抗原结合结构域包含Ofatumumab抗体来源的单链可变区重链序列(SEQ ID NO:3)和单链可变区轻链序列(SEQ ID NO:4)。

[0129] Ofatumumab抗体来源的单链可变区重链(VH)序列:

[0130] EVQLVESGGGLVQPGRSRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:3)

[0131] Ofatumumab抗体来源的单链可变区轻链(VL)序列:

[0132] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTTRLEIK (SEQ ID NO:4)

[0133] 在另一优选例中,本发明CAR中靶向CD19的抗原结合结构域包含FMC63抗体来源的单链可变区轻链(VL)序列(SEQ ID NO:5)和单链可变区重链序列(SEQ ID NO:6)。

[0134] FMC63抗体来源的单链可变区轻链(VL)氨基酸序列:

[0135] DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT (SEQ ID NO:5)

[0136] FMC63抗体来源的单链可变区轻链(VL)核苷酸序列:

[0137] gacatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aatatattaa attggtatca gcagaaacca 120
gatggaactg ttaaactcct gatctaccat acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240
gaagatatcg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtacac gtccggaggg 300
gggaccaagc tggagatcac a 321 (SEQ ID NO: 21)

[0138] FMC63抗体来源的单链可变区重链(VH)氨基酸序列:

[0139] EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:6)

[0140] FMC63抗体来源的单链可变区重链(VH)核苷酸序列:

[0141] gaggtgaaac tgcaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccgtc 60
acatgcactg tctcaggggt ctcattacc gactatggtg taagctggat tcgccagcct 120
ccacgaaagg gtctggagtg gctgggagta atatggggta gtgaaaccac atactataat 180
tcagctctca aatccagact gaccatcatc aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240
aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatttact actgtgccaa acattattac 300
tacggtggta gctatgctat ggactactgg ggccaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360
(SEQ ID NO: 22)

[0142] 具体地,在本发明CAR中其它元件的序列如下:

[0143] 前导序列为CD8抗原的前导序列:

[0144] MALPVTALLPLALLHAARP (SEQ ID NO:8)

[0145] 单链可变区重链与轻链之间的连接序列(即柔性接头I)为:

[0146] 氨基酸序列:GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:19)

[0147] 核酸序列:ggtggcggtg gctcgggcgg tgggtgggtcg ggtggcggcg gatct (SEQ ID NO: 20)

[0148] 铰链区选自IgG4 Hinge-CH2-CH3的序列:

[0149] ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSLGK (SEQ ID NO:9)

[0150] 跨膜区为CD8 (CD8TM) 或CD28 (CD28TM) 抗原的跨膜区序列:

[0151] CD8TM: IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC (SEQ ID NO:10)

[0152] CD28TM: FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:11)

[0153] 共刺激因子信号区来自4-1BB或者CD28的胞内信号传导基序的序列:

[0154] 4-1BB: KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:12)

[0155] CD28: RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:13)

[0156] CD3 ζ 的信号传导区来自TCR复合体中CD3 ζ 的以酪氨酸为中心的免疫受体激活基序
(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 的序列:

[0157] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:14)

[0158] 在优选的实施方式中, 本发明构建的两个CAR完整的核酸序列和氨基酸序列如下
所示:

[0159] TN-OF-19的完整核酸序列

[0160] ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAAT
TGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAG
AGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAACTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA
ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCT
AGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGA
CTGGAGATTAAAGGCAGTACTAGCGGTGGTGGCTCCGGGGCGGTTCCGGTGGGGGCGGCAGCAGCGAAGTGCAGC
TGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTT
TAATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAACTATTAGTTGGAAT
AGTGGTTCCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCCCTGT
ATCTGCAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATATACAGTACGGCAACTA
CTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGTGGTGGATCCGAGGTGAAG
CTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCC
TGCCCCACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAG
CGAGACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTT
CTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCT
ACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGCAAGCCTGG
CAGCGGCGAGGGCAGCACCAAGGGCGACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGAC
CGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCCGACGGCA
CCGTCAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGG
CACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGCAACACA
CTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAATCACCAGAGCAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCC
CTATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTTCGGAGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCAT

CTTTTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACT
CAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGGGTGAAGTTCAGCA
GAAGCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGA
GTACGACGTCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAA
GGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGC
GGGGAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCA
GGCCCTGCCCCCAAGG (SEQ ID NO:18)

[0161] TN-OF-19的完整氨基酸序列

[0162] MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLL
IYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKGSTSGGSGGGSGGGG
SSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDN
AKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWQGTTTVTVSSGGGSEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCT
VSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY
YYGGSYAMDYWGQTSVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIMTQTSSLSASLGDRVITSCRASQDISKYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITESKYGP
PCPPCPMFVWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
KGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:16)

[0163] TN-LEU-19的完整核酸序列

[0164] ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTCCACAGGTGACATTGT
GCTGACCCAATCTCCAGCTATCCTGTCTGCATCTCCAGGGAGAAGGTCACAATGACTTGACGGGCCAGCTCAAGT
GTAAATTACATGGACTGGTACCAGAAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACCCTGGATTTATGCCACATCCAACCTGG
CTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAGGC
TGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTTTAAATCCACCCACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAA
ATAAAAGGCAGTACTAGCGGTGGTGGCTCCGGGGGCGGTTCGGGTGGGGGCGGCAGCAGCGAGGTGCAGCTGCAGC
AGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAG
TTACAATATGCACTGGGTAAAGCAGACACCTGGACAGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCAGGAAATGGT
GATACTTCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGC
AGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGACTATTACTGTGCAAGATCTAATTATTACGGTAGTAGCTACTG
GTTCTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGTGGTGGATCCGAGGTGAAGCTGCAG
GAAAGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCG
ACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGAC
CACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAG
ATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCA
TGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGG
CGAGGGCAGCACCAAGGGCGACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACCGGGTG
ACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCCACGGCACCGTCA
AGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGA
CTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCCC

TACACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAATCACCGAGAGCAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCTATGT
TCTGGGTGCTGGTGGTGGTCGGAGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTTG
GGTGAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAG
GAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCG
CCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGA
CGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTG
TATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGCA
AGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCT
GCCCCAAGG (SEQ ID NO:17)

[0165] TN-LEU-19的完整氨基酸序列

[0166] METDTLLLVLLLWVPGSTGDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIY
ATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPTFGGGTKLEIKGSTSGGSGGGSGGGSS
EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSS
STAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVS
GVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYY
GGSYAMDYWGQGTSTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQK
PDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITESKYGPCC
PPCPMFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV
KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
ERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:15)

[0167] 本发明的BICAR的设计有以下优势：

[0168] 首先，CD19、CD20在绝大多数恶性B细胞肿瘤中均有表达。其次，一般来说，扩大CAR结构增加T细胞识别能力经常遇到不良靶向性增加、细胞毒性和副作用的增加，然而，CD19、CD20没有这种情况，因为两者都只表达于B细胞中，具有相同的肿瘤毒性曲线。最后，CD19、CD20在B细胞中表达可以促进B细胞的存活。而且在治疗过程中两种抗原都的丢失是非常低概率的事件。因此，针对CD19和CD20有望在恶性B细胞对抗原的逃生提供有效保障。

[0169] BICAR与CD19、CD20的单CAR混在一起相比具有以下优势：

[0170] 首先，在一个单独的T细胞里表达BICAR比表达两个独立的CAR时，DNA足迹显著减少 (DNA长度减少40%)，结构大小尺寸长短会显著影响病毒载体的包装和转导效率，进而直接影响临床疗效。其次，相比两种不同单CAR的混合，BICAR可以显著降低治疗成本 (BICAR是完全可以与目前的T细胞生产过程相兼容，且不增加额外的负担。) 和增加临床的治愈率。最后CD19、CD20在大量临床研究中验证比较明确，比较安全。

[0171] 本发明中，我们以CD19的鼠源单抗FMC63的序列和CD20鼠源单抗leu-16，Ofatumumab序列为基础构建了靶向CD19CD20抗原的2种类型的嵌合型抗原受体结构即TN-LEU-19，TH-OF-19，并完成了这2种嵌合型抗原受体在原代T细胞中的表达水平、体外活化能力及肿瘤细胞杀伤效能等层面的分析与鉴定。最终发现了以TN-LEU-19，TH-OF-19嵌合型抗原受体修饰的T细胞在体外杀伤和体内清除携带CD19、CD20阳性抗原的恶性肿瘤的能力都很强，而且Ofatumumab更优于leu16，这为临床应用CAR-T治疗CD19，CD20阳性的白血病和淋巴瘤提供了新的有效方法和制剂。

[0172] 本发明针对单链,双特异CAR进行设计和优化,这些CAR针对表达CD19或CD20的B细胞恶性肿瘤具有强大的杀伤能力。BICAR可使单一的T-细胞产物靶向两种与B细胞白血病和淋巴瘤相关的临床验证抗原,最终降低由于单个抗原丢失或逃逸所引起的肿瘤复发的风险。本发明可进一步用于新的BICAR设计,增加抗原对扩大适用性和提高T细胞疗法的疗效癌症。

[0173] 嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T细胞)

[0174] 如本文所用,术语“CAR-T细胞”、“CAR-T”、“CART”、“本发明CAR-T细胞”均指本发明第四方面所述的同时靶向CD19和CD20的CAR-T细胞。具体的所述CAR-T细胞的CAR结构依次包括抗CD19的scFv,抗CD20的scFv,铰链区,跨膜区,和胞内T细胞信号区,并且抗CD20scFv和CD19scFv通过多个重复结构(G4S)肽段连接。与靶向单抗原的CAR-T相比,同时识别两个靶点的CAR-T细胞杀伤性更强,治疗的范围更广。

[0175] 载体

[0176] 编码期望分子的核酸序列可利用在本领域中已知的重组方法获得,诸如例如通过从表达基因的细胞中筛选文库,通过从已知包括该基因的载体中得到该基因,或通过利用标准的技术,从包含该基因的细胞和组织中直接分离。可选地,感兴趣的基因可被合成生产。

[0177] 本发明也提供了其中插入本发明的表达盒的载体。源于逆转录病毒诸如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因长期、稳定的整合并且其在子细胞中增殖。慢病毒载体具有超过源自致癌逆转录病毒诸如鼠科白血病病毒的载体的优点,因为它们可转导非增殖的细胞,诸如肝细胞。它们也具有低免疫原性的优点。

[0178] 简单概括,通常可操作地连接本发明的表达盒或核酸序列至启动子,并将其并入表达载体。该载体适合于复制和整合真核细胞。典型的克隆载体包含可用于调节期望核酸序列表达的转录和翻译终止子、初始序列和启动子。

[0179] 本发明的表达构建体也可利用标准的基因传递方案,用于核酸免疫和基因疗法。基因传递的方法在本领域中是已知的。见例如美国专利号5,399,346、5,580,859、5,589,466,在此通过引用全文并入。在另一个实施方式中,本发明提供了基因疗法载体。

[0180] 该核酸可被克隆入许多类型的载体。例如,该核酸可被克隆入如此载体,其包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特定的感兴趣载体包括表达载体、复制载体、探针产生载体和测序载体。

[0181] 进一步地,表达载体可以以病毒载体形式提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是公知的并在例如Sambrook等(2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)和其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒和慢病毒。通常,合适的载体包含在至少一种有机体中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制酶位点和一个或多个可选择的标记(例如,W001/96584;W001/29058;和美国专利号6,326,193)。

[0182] 已经开发许多基于病毒的系统,用于将基因转移入哺乳动物细胞。例如,逆转录病毒提供了用于基因传递系统的方便的平台。可利用在本领域中已知的技术将选择的基因插入载体并包装入逆转录病毒颗粒。该重组病毒可随后被分离和传递至体内或离体的对象细胞。许多逆转录病毒系统在本领域中是已知的。在一些实施方式中,使用腺病毒载体。许多

腺病毒载体在本领域中是已知的。在一个实施方式中,使用慢病毒载体。

[0183] 额外的启动子元件,例如增强子,可以调节转录开始的频率。通常地,这些位于起始位点上游的30-110bp区域中,尽管最近已经显示许多启动子也包含起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔经常是柔性的,以便当元件相对于另一个被倒置或移动时,保持启动子功能。在胸苷激酶(tk)启动子中,启动子元件之间的间隔可被增加隔开50bp,活性才开始下降。取决于启动子,表现出单个元件可合作或独立地起作用,以启动转录。

[0184] 合适的启动子的一个例子为即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列为能够驱动可操作地连接至其上的任何多核苷酸序列高水平表达的强组成型启动子序列。合适的启动子的另一个例子为延伸生长因子-1 α (EF-1 α)。然而,也可使用其他组成型启动子序列,包括但不限于类人猿病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳癌病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、鸟类白血病毒启动子、艾伯斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒即时早期启动子、鲁斯氏肉瘤病毒启动子、以及人基因启动子,诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红素启动子和肌酸激酶启动子。进一步地,本发明不应被限于组成型启动子的应用。诱导型启动子也被考虑为本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关,其能够当这样的表达是期望的时,打开可操作地连接诱导型启动子的多核苷酸序列的表达,或当表达是不期望的时关闭表达。诱导型启动子的例子包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0185] 为了评估CAR多肽或其部分的表达,被引入细胞的表达载体也可包含可选择的标记基因或报道基因中的任一个或两者,以便于从通过病毒载体寻求被转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。在其他方面,可选择的标记可被携带在单独一段DNA上并用于共转染程序。可选择的标记和报道基因两者的侧翼都可具有适当的调节序列,以便能够在宿主细胞中表达。有用的可选择标记包括例如抗生素抗性基因,诸如neo等等。

[0186] 报道基因用于鉴定潜在转染的细胞并用于评价调节序列的功能性。通常地,报道基因为以下基因:其不存在于受体有机体或组织或由受体有机体或组织进行表达,并且其编码多肽,该多肽的表达由一些可容易检测的性质例如酶活性清楚表示。在DNA已经被引入受体细胞后,报道基因的表达在合适的时间下进行测定。合适的报道基因可包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白的基因(例如,Ui-Tei等,2000FEBS Letters479:79-82)。合适的表达系统是公知的并可利用已知技术制备或从商业上获得。通常,显示最高水平的报道基因表达的具有最少5个侧翼区的构建体被鉴定为启动子。这样的启动子区可被连接至报道基因并用于评价试剂调节启动子-驱动转录的能力。

[0187] 将基因引入细胞和将基因表达入细胞的方法在本领域中是已知的。在表达载体的内容中,载体可通过在本领域中的任何方法容易地引入宿主细胞,例如,哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如,表达载体可通过物理、化学或生物学手段转移入宿主细胞。

[0188] 将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染法、粒子轰击、微注射、电穿孔等等。生产包括载体和/或外源核酸的细胞的方法在本领域中是公知的。见例如Sambrook等(2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)。将多核苷酸引入宿主细胞的优选方法为磷酸钙转染。

[0189] 将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载

体,特别是逆转录病毒载体,已经成为最广泛使用的将基因插入哺乳动物例如人细胞的方法。其他病毒载体可源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺伴随病毒等等。见例如美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0190] 将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统,诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠;和基于脂质的系统,包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外和体内传递工具(delivery vehicle)的示例性胶体系统为脂质体(例如,人造膜囊)。

[0191] 在使用非病毒传递系统的情况下,示例性传递工具为脂质体。考虑使用脂质制剂,以将核酸引入宿主细胞(体外、离体(ex vivo)或体内)。在另一方面,该核酸可与脂质相关联。与脂质相关联的核酸可被封装入脂质体的水性内部中,散布在脂质体的脂双层内,经与脂质体和寡核苷酸两者都相关联的连接分子附接至脂质体,陷入脂质体,与脂质体复合,分散在包含脂质的溶液中,与脂质混合,与脂质联合,作为悬浮液包含在脂质中,包含在胶束中或与胶束复合,或以其他方式与脂质相关联。与组合物相关联的脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体不限于溶液中的任何具体结构。例如,它们可存在于双分子层结构中,作为胶束或具有“坍塌的(collapsed)”结构。它们也可简单地被散布在溶液中,可能形成大小或形状不均一的聚集体。脂质为脂肪物质,其可为天然发生或合成的脂质。例如,脂质包括脂肪小滴,其天然发生在细胞质以及包含长链脂肪族烃和它们的衍生物诸如脂肪酸、醇类、胺类、氨基醇类和醛类的该类化合物中。

[0192] 在本发明的一个优选地实施方式中,所述载体为慢病毒载体。

[0193] 制剂

[0194] 本发明提供了一种含有本发明第四方面所述的CAR-T细胞,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一个实施方式中,所述制剂为液态制剂。优选地,所述制剂为注射剂。优选地,所述制剂中所述CAR-T细胞的浓度为 1×10^3 - 1×10^8 个细胞/ml,更优地 1×10^4 - 1×10^7 个细胞/ml。

[0195] 在一个实施方式中,所述制剂可包括缓冲液诸如中性缓冲盐水、硫酸盐缓冲盐等等;碳水化合物诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸诸如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂诸如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。本发明的制剂优选配制用于静脉内施用。

[0196] 治疗性应用

[0197] 本发明包括用编码本发明表达盒的慢病毒载体(LV)转导的细胞(例如,T细胞)进行的治疗性应用。转导的T细胞可靶向肿瘤细胞的标志物CD19和CD20,协同激活T细胞,引起T细胞免疫应答,从而显著提高其对肿瘤细胞的杀伤效率。

[0198] 因此,本发明也提供了刺激对哺乳动物的靶细胞群或组织的T细胞-介导的免疫应答的方法,其包括以下步骤:给哺乳动物施用本发明的CAR-T细胞。

[0199] 在一个实施方式中,本发明包括一类细胞疗法,分离病人自体T细胞(或者异源供体),激活并进行基因改造产生CAR-T细胞,随后注入同一病人体内。这种方式患移植物抗宿主病概率极低,抗原被T细胞以无MHC限制方式识别。此外,一种CAR-T就可以治疗表达该抗原的所有癌症。不像抗体疗法,CAR-T细胞能够体内复制,产生可导致持续肿瘤控制的长期持久性。

[0200] 在一个实施方式中,本发明的CAR-T细胞可经历稳固的体内T细胞扩展并可持续延

长的时间量。另外，CAR介导的免疫应答可为过继免疫疗法步骤的一部分，其中CAR-修饰T细胞诱导对CAR中的抗原结合结构域特异性的免疫应答。例如，抗CD19CD20的CAR-T细胞引起抗表达CD19和CD20的细胞的特异性免疫应答。

[0201] 尽管本文公开的数据具体公开了包括抗CD19CD20scFv、铰链和跨膜区、和4-1BB和CD3 ζ 信号传导结构域的慢病毒载体，但本发明应被解释为包括对构建体组成部分中的每一个的任何数量的变化。

[0202] 可治疗的癌症包括没有被血管化或基本上还没有被血管化的肿瘤，以及血管化的肿瘤。癌症可包括非实体瘤（诸如血液学肿瘤，例如白血病和淋巴瘤）或可包括实体瘤。用本发明的CAR治疗的癌症类型包括但不限于癌、胚细胞瘤和肉瘤，和某些白血病或淋巴恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤、和恶性瘤，例如肉瘤、癌和黑素瘤。也包括成人肿瘤/癌症和儿童肿瘤/癌症。

[0203] 血液学癌症为血液或骨髓的癌症。血液学（或血原性）癌症的例子包括白血病，包括急性白血病（诸如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性骨髓性白血病和成髓细胞性、前髓细胞性、粒-单核细胞型、单核细胞性和红白血病）、慢性白血病（诸如慢性髓细胞（粒细胞性）白血病、慢性骨髓性白血病和慢性淋巴细胞白血病）、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金氏疾病、非霍奇金氏淋巴瘤（无痛和高等级形式）、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓增生异常综合征、多毛细胞白血病和脊髓发育不良。

[0204] 实体瘤为通常不包含囊肿或液体区的组织的异常肿块。实体瘤可为良性或恶性的。不同类型的实体瘤以形成它们的细胞类型命名（诸如肉瘤、癌和淋巴瘤）。实体瘤诸如肉瘤和癌的例子包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤间皮瘤、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌卵巢癌、。

[0205] 本发明的CAR-修饰T细胞也可用作对哺乳动物离体免疫和/或体内疗法的疫苗类型。优选地，哺乳动物为人。

[0206] 对于离体免疫，以下中的至少一项在将细胞施用进入哺乳动物前在体外发生：i) 扩增细胞，ii) 将编码CAR的核酸引入细胞，和/或iii) 冷冻保存细胞。

[0207] 离体程序在本领域中是公知的，并在以下更完全地进行讨论。简单地说，细胞从哺乳动物（优选人）中分离并用表达本文公开的CAR的载体进行基因修饰（即，体外转导或转染）。CAR-修饰的细胞可被施用给哺乳动物接受者，以提供治疗益处。哺乳动物接受者可为人，和CAR-修饰的细胞可相对于接受者为自体的。可选地，细胞可相对于接受者为同种异基因的、同基因的（syngeneic）或异种的。

[0208] 除了就离体免疫而言使用基于细胞的疫苗之外，本发明也提供了体内免疫以引起针对患者中抗原的免疫应答的组合物和方法。

[0209] 本发明提供了治疗肿瘤的方法，其包括施用给需要其的对象治疗有效量的本发明的CAR-修饰的T细胞。

[0210] 本发明的CAR-修饰的T细胞可被单独施用或作为药物组合物与稀释剂和/或其他组分诸如IL-2、IL-17或其他细胞因子或细胞群结合施用。简单地说，本发明的药物组合物可包括如本文所述的靶细胞群，与一种或多种药学或生理学上可接受载体、稀释剂或赋形剂结合。这样的组合物可包括缓冲液诸如中性缓冲盐水、硫酸盐缓冲盐水等等；碳水化合物诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇；蛋白质；多肽或氨基酸诸如甘氨酸；抗氧化剂；螯合剂诸如EDTA或谷胱甘肽；佐剂（例如，氢氧化铝）；和防腐剂。本发明的组合物优选配

制用于静脉内施用。

[0211] 本发明的药物组合物可以以适于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量和频率将由这样的因素确定,如患者的病症、和患者疾病的类型和严重程度——尽管适当的剂量可由临床试验确定。

[0212] 当指出“免疫学上有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤-抑制有效量”或“治疗量”时,待施用的本发明组合物的精确量可由医师确定,其考虑患者(对象)的年龄、重量、肿瘤大小、感染或转移程度和病症的个体差异。可通常指出:包括本文描述的T细胞的药物组合物可以以 10^4 至 10^9 个细胞/kg体重的剂量,优选 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重的剂量(包括那些范围内的所有整数值)施用。T细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。细胞可通过使用免疫疗法中公知的注入技术(见例如Rosenberg等, New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988)施用。对于具体患者的最佳剂量和治疗方案可通过监测患者的疾病迹象并因此调节治疗由医学领域技术人员容易地确定。

[0213] 对象组合物的施用可以以任何方便的方式进行,包括通过喷雾法、注射、吞咽、输液、植入或移植。本文描述的组合物可被皮下、皮内、瘤内、结内、脊髓内、肌肉内、通过静脉内(i.v.)注射或腹膜内施用给患者。在一个实施方式中,本发明的T细胞组合物通过皮内或皮下注射被施用给患者。在另一个实施方式中,本发明的T细胞组合物优选通过i.v.注射施用。T细胞的组合物可被直接注入肿瘤,淋巴结或感染位置。

[0214] 在本发明的某些实施方式中,利用本文描述的方法或本领域已知的其他将T细胞扩展至治疗性水平的方法活化和扩展的细胞,与任何数量的有关治疗形式结合(例如,之前、同时或之后)施用给患者,所述治疗形式包括但不限于用以下试剂进行治疗:所述试剂诸如抗病毒疗法、西多福韦和白细胞介素-2、阿糖胞苷(也已知为ARA-C)或对MS患者的那他珠单抗治疗或对牛皮癣患者的厄法珠单抗治疗或对PML患者的其他治疗。在进一步的实施方式中,本发明的T细胞可与以下结合使用:化疗、辐射、免疫抑制剂,诸如,环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨喋呤、麦考酚酯和FK506,抗体或其他免疫治疗剂。在进一步的实施方式中,本发明的细胞组合物与骨髓移植、利用化疗剂诸如氟达拉滨、外部光束放射疗法(XRT)、环磷酰胺结合(例如,之前、同时或之后)而施用给患者。例如,在一个实施方式中,对象可经历高剂量化疗的标准治疗,之后进行外周血干细胞移植。在一些实施方式中,在移植后,对象接受本发明的扩展的免疫细胞的注入。在一个额外的实施方式中,扩展的细胞在外科手术前或外科手术后施用。

[0215] 施用给患者的以上治疗的剂量将随着治疗病症的精确属性和治疗的接受者而变化。病人施用的剂量比例可根据本领域接受的实践实施。通常,每次治疗或每个疗程,可将 1×10^6 个至 1×10^{10} 个本发明经修饰的T细胞(如, CAR-T-19/20细胞),通过例如静脉回输的方式,施用于患者。

[0216] 本发明的优点包括:

[0217] (1) 本发明的嵌合抗原受体,其细胞外抗原结合结构域为特定的抗CD20 scFv和抗CD19 scFv,该特定的抗CD20 scFv和抗CD19 scFv结合特定的绞链区和胞内结构域形成的CAR显示出了极大的对肿瘤细胞的杀伤能力,而且细胞毒性较小,副作用低。

[0218] (2) 本发明提供的嵌合抗原受体可在携带CAR基因的慢病毒感染T细胞后实现CAR蛋白的稳定表达和膜定位。

[0219] (3) 本发明的CAR修饰的T细胞在体内存活时间较长,且抗肿瘤效力较强;对IgG4 Hinge-CH2-CH3连接区优化后的CAR,能够避免Fc受体的结合及后续的ADCC作用(抗体依赖性细胞毒作用)。

[0220] (4) 相比两个独立的CAR,本发明的双特异性嵌合抗原受体同时含有抗CD20scFv和抗CD19 scFv,DNA足迹显著减少(DNA长度减少40%),结构大小尺寸短,有利于病毒载体的包装和转导效率,从而直接提高临床疗效。并且本发明的双特异性CAR成本更低、治愈率更高、更安全。

[0221] (5) 本发明TN-LEU-19,TH-OF-19嵌合型抗原受体修饰的T细胞在体外杀伤和体内清除携带CD19、CD20阳性抗原的恶性肿瘤的能力都非常强,而且Ofatumumab更强,这为临床应用CAR-T治疗CD19,CD20阳性的白血病和淋巴瘤提供了新的有效方法和制剂。

[0222] (6) 本发明CAR-T细胞对绝大多数恶性B细胞肿瘤均有杀伤作用,治疗范围更广、覆盖率更大,能更有效防止肿瘤细胞逃逸。

[0223] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0224] 实施例1慢病毒表达载体的构建

[0225] 全长DNA合成和克隆,实现编码质粒的构建。选择pWPT慢病毒载体作为克隆载体,克隆位点为BamH I和Sal I位点。其中,本发明中所设计的2种CAR的结构如图1所示。TN-LEU-19的核酸序列如SEQ ID NO:17所示,TN-OF-19的核酸序列如SEQ ID NO:18所示。

[0226] 实施例2 CAR-T细胞的制备

[0227] (1) 取健康人静脉血,通过密度梯度离心方法,分离获得单个核细胞(PBMCs)。

[0228] (2) 在第0天,将PBMCs接种于预先经过终浓度为5 μ g/mL CD3单克隆抗体(OKT3)及终浓度为10 μ g/mL的Retronectin(购自TAKARA公司)包被的细胞培养瓶中,培养基为含1%人血白蛋白的GT-551细胞培养基,培养基里添加终浓度为1000U/mL的重组人白介素2(IL-2),在37 $^{\circ}$ C,饱和湿度为5%CO₂培养箱中培养。

[0229] (3) 在第1天,缓慢吸取并弃去培养PBMCs的上清液,并加入新的含1%人血白蛋白的GT-551细胞培养基,培养基里添加终浓度为1000U/mL的重组人白介素2(IL-2),在37 $^{\circ}$ C,饱和湿度为5%CO₂培养箱继续培养。

[0230] (4) 在第3天,加入新鲜培养液,浓缩纯化的TN-LEU-19或TN-OF-19慢病毒液,鱼精蛋白硫酸盐(protamine sulfate,12 μ g/ml),以及终浓度为1000U/mL IL-2。置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中感染12小时后,弃培养液,加入新鲜的培养基,于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱继续进行培养。

[0231] (5) 从第6天开始,可取CAR-T19/20s(CART-TN-OF-19和CART-TN-LEU-19)细胞进行相应的活性检测试验。

[0232] 实施例3 CAR基因在T细胞基因组整合率及其编码蛋白在膜表面表达水平的检测

[0233] 分别取0.5 $\times 10^6$ 个实施例2中培养到第7天的CAR-T19/20s细胞样品,进行靶向CD19CD20联合嵌合型抗原受体工程化T细胞转染效率的检测。Protein L方法鉴定培养到第7天的CAR-T19/20s细胞中CAR基因编码蛋白在T细胞膜表面的表达水平。

[0234] 结果如图2所示,本发明中所设计的2种CAR结构(图1)均可在其相应修饰的T细胞

中表达并完成细胞膜表面定位。

[0235] 实施例4 CAR-T19/20s体外激活能力的检测

[0236] 采用实施例2中培养到第7天的CAR-T19/20s细胞进行细胞激活水平指标蛋白CD137和IFN γ 的检测。依次取 1×10^5 个培养到第7天的CAR-T19/20细胞,分别与CD19,CD20阳性的K562-CD19+,K562-CD20+,K562-CD19+CD20+,以及Raji (天然表达CD19CD20) 肿瘤细胞系,和CD19CD20阴性的K562肿瘤细胞系或不添加肿瘤细胞,在200 μ l GT-551培养基中按照1:1比例培养18h后分别检测T细胞膜表面CD137的表达水平和培养上清中IFN γ 的分泌水平。

[0237] 结果如图3A和3B所示,2种CART细胞的表面均可以检测到CD137的表达,并且均可以在培养上清中检测到IFN γ 的表达。其中,TN-OF-19的CD137活化水平和IFN γ 释放水平高于TN-LEU-19。

[0238] 实施例5 CAR-T19/20s细胞体外杀伤靶向肿瘤释放LDH水平的检测

[0239] 对实施例2制得的CAR-T19/20s细胞进行检测,方法如下:

[0240] 分别设置实验孔,效应细胞对照孔,靶细胞对照孔,靶细胞最大释放孔,培养基对照孔,体积对照孔(靶细胞有CD19,CD20阳性的K562-CD19,K562-CD20,K562-CD19-CD20,以及Raji细胞;效应细胞有NT,CART-TN-LEU-19,CART-TN-OF-19)。

[0241] 设置效靶比,即效应细胞:靶细胞=5:1,10:1,20:1,40:1。细胞数量:靶细胞 1×10^4 ,50u1/孔。效应细胞分别为 5×10^4 /孔, 1×10^5 /孔, 2×10^5 /孔, 5×10^5 /孔。实验孔,加不同稀释比例效应细胞:靶细胞=5:1,10:1,20:1,40:1,两种细胞共100u1(效应细胞50u1+靶细胞50u1)到细胞培养板,设置3个重复;效应细胞对照孔,即效应细胞:靶细胞=5:0,10:0,20:0,40:0,加入效应细胞 5×10^4 /孔, 10^5 /孔, 2×10^5 /孔, 5×10^5 /孔细胞+50u1培养基,设置2个重复。靶细胞对照孔,加入靶细胞 1×10^4 /孔,50u1,+50u1培养基。靶细胞最大释放孔,即加入靶细胞 1×10^4 ,50u1,+50u1培养基,在孵育3h15min后加入10u1裂解液;培养基对照孔,即加入100u1培养基;体积对照孔,即加入100u1培养基。

[0242] 孵育3h15min后,向靶细胞最大释放孔中加入10u1裂解液的同时,加入10u1裂解液,37 $^{\circ}$ C孵育。250g,4min离心,转移50u1/孔细胞上清到新的酶标版。加50u1/孔底物混合物(避光,12ml检测缓冲液加到一瓶底物混合物中混匀)。室温避光孵育30min。最后加50u1/孔终止液,1h内490nm读板,并分析数据。

[0243] 结果如图4所示,2种CART细胞均可以较好的诱导BCMA阳性肿瘤细胞凋亡并释放LDH。其中,CART-TN-LEU-19比CART-TN-OF-19可以更好地杀伤CD19CD20阳性的肿瘤细胞,释放更高的LDH或者类似。

[0244] 实施例6 CAR-T19/20s细胞诱导肿瘤细胞杀伤过程中CD107a释放水平的检测

[0245] 分别取 1×10^5 效应细胞CAR-T19/20s (CART-TN-OF-19和CART-TN-LEU-19) 与靶细胞肿瘤细胞 2×10^5 个进行共培养。靶细胞分别有K562-CD19+,K562-CD20+,K562-CD19+CD20+,以及K562细胞,Raji细胞,Romas细胞。同时每孔加入3 μ l Anti-Human CD107Ape进行染色,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养1小时,然后每孔加入3 μ l 1%Golgi-stop置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养3.5小时。接着每孔加入2 μ l CD8FITC,1.5 μ l CD3APC置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养30min。每孔加入200uL FACS Buffer,300g离心5min,迅速倒掉酶标板内液体,用吸水纸吸除剩余液体,再用FACS Buffer洗一遍。7-AAD染色,用FACS Buffer (1:300) 稀释,每孔用200uL重悬细胞,

10min后用流式细胞仪检测,注意避光,统计分析结果。

[0246] 结果如图5所示,2种CART细胞均可以较好的诱导肿瘤细胞杀伤过程中CD107a释放。其中,CART-TN-OF-19与CART-TN-LEU-19相比杀伤过程中CD107a释放稍高一些,杀伤效果更强。

[0247] 实施例7 CAR-T19/20s在小鼠体内对移植肿瘤细胞的抑制效果

[0248] 动物体内注射的肿瘤细胞为Raji,肿瘤细胞Raji带有荧光素酶报告基因(表达荧光素酶的Raji)。本实验采取先将肿瘤细胞Raji在小鼠体内注射生长一周后,再注射效应T细胞,效应T细胞分为三组即NT,CART-TN-LEU-19,CART-TN-OF-19。

[0249] 图6A靶向CD19CD20联合嵌合型抗原受体工程化T细胞转染效率的检测的Protein L方法,CD137的表达水平,培养上清中IFN γ 的分泌水平等同之前一样,图6A结果显示TN-LEU-19,TN-OF-19均有较高的转染效率。图6B和图6C显示了第10天和第18天T细胞膜表面CD137的表达水平,TN-LEU-19,TN-OF-19均可以表达均很高。图6D显示了第10天培养上清中IFN γ 的分泌水平,结果表明TN-OF-19明显高于TN-LEU-19。

[0250] 在第21天时将扩增好的效应T细胞(送到南京医科大学动物实验中心),通过尾静脉注射到小鼠体内,然后每七天记录一次小鼠体内的荧光强度(通过IVIS荧光成像)和小鼠的体重,第21天停止实验,分析统计结果。

[0251] 结果如图6E所示,CART-TN-OF-19与CART-TN-LEU-19两种CART细胞与NT相比均可以较好的抑制小鼠肿瘤细胞的生长。图6E(左)显示三组小鼠输入效应T细胞后小鼠的体重变化,NT与CART-TN-OF-19和CART-TN-LEU-19两种CART细胞相比小鼠体重明显下降,两种CART细胞组的小鼠体重稍微增加。图6E(右)显示了三组小鼠体内荧光强度的平均值,结果表明,NT组小鼠体内荧光强度的平均值明显增加,而两种CART细胞组小鼠体内荧光强度的平均值显著下降,甚至很难检测。

[0252] 图6F为小鼠体内荧光强度IVIS成像图片。结果显示,尾静脉注射效应T细胞后,第七天后两种CART细胞组小鼠体内荧光强度很弱,而NT组很强,第14天也是如此,第21天NT组小鼠已经全部死亡,而两种CART细胞组小鼠依然正常生长。

[0253] 实施例8 CAR-T20.1,CAR-T20.2,CAR-T20.4的筛选及功能验证

[0254] CART细胞的构建以及检测参考实施例2,3,4,5进行。

[0255] 先进行全长DNA合成和克隆,实现编码质粒的构建。设计CAR-T20.1,20.2,20.4(结构如表1所示,序列如表2所示),之后进行功能验证。

[0256] 复苏PBMC,感染获得CAR-T20s细胞,从第6天开始,可取CAR-T20s细胞进行相应的活性检测试验

[0257] 分别取 0.5×10^6 个培养到第7天的CAR-T20s细胞样品,通过DNA拷贝数检测细胞转染效率的检测。

[0258] 结果如图7A所示,与阳性对照相比,DNA拷贝数不是很高。接下来进行共培养,采用培养到第7天的CAR-T20s细胞进行细胞激活水平指标蛋白CD137和IFN γ 的检测。

[0259] 依次取 1×10^5 个培养到第7天的CAR-T20细胞,分别与CD20阳性的Raji,Ramos及阴性细胞K562,Karpas肿瘤细胞系按照1:1比例培养18h后分别检测T细胞膜表面CD137的表达水平和培养上清中IFN γ 的分泌水平。

[0260] 结果如图7B和7C所示,本实施例构建的CAR-T20.1,CAR-T20.2,CAR-T20.4无效。

[0261] 实施例9 CAR-T20.5, CAR-T20.6, CAR-T20.7, CAR-T20.8, CAR-T20.9, CAR-T20.10的筛选及功能验证

[0262] CART细胞的构建以及检测参考实施例2,3,4,5进行。

[0263] 先进行全长DNA合成和克隆,实现编码质粒的构建。设计CAR-T20.5, CAR-T20.6, CAR-T20.7, CAR-T20.8, CAR-T20.9, CAR-T20.10 (结构如表1所示,序列如表2所示),之后进行功能验证。

[0264] 复苏PBMC,感染获得CAR-T20s细胞,从第6天开始,可取CAR-T20s细胞进行相应的活性检测试验

[0265] 分别取 0.5×10^6 个培养到第7天的CAR-T20s细胞样品,分别取 0.5×10^6 个培养到第7天的CAR-T20s细胞样品,进行T细胞转染效率的检测。用Protein L方法鉴定培养到第7天的CAR-T20s细胞中CAR基因编码蛋白在T细胞膜表面的表达水平。

[0266] 结果如图8A所示,同CAR-T20.1相比,在CAR-T20.5, CAR-T20.6, CAR-T20.7, CAR-T20.8, CAR-T20.9, CAR-T20.10中只有CAR-T20.9, CAR-T20.10阳性率较高。

[0267] 接下来进行共培养,采用培养到第7天的CAR-T20s细胞进行细胞激活水平指标蛋白CD137和IFN γ 的检测。依次取 1×10^6 个培养到第7天的CAR-T20s细胞,分别与CD20阳性的Raji, Ramos及阴性细胞K562, Karpas肿瘤细胞系按照1:1比例培养18h后分别检测T细胞膜表面CD137的表达水平和培养上清中IFN γ 的分泌水平。

[0268] 结果如图8B和8C所示,结果表明在CAR-T20.5, CAR-T20.6, CAR-T20.7, CAR-T20.8, CAR-T20.9, CAR-T20.10中只有CAR-T20.9, CAR-T20.10 T细胞膜表面CD137的表达水平被激活和培养上清中IFN γ 有释放,即CAR-T20.9, CAR-T20.10有效。

[0269] 实施例10 CAR-T20.11, CAR-T20.12, CAR-T20.13, CAR-T20.14, CAR-T20.15, CAR-T20.16的筛选及功能验证

[0270] CART细胞的构建以及检测参考实施例2,3,4,5进行。

[0271] 先进行全长DNA合成和克隆,实现编码质粒的构建。设计CAR-T20.11, CAR-T20.12, CAR-T20.13, CAR-T20.14, CAR-T20.15, CAR-T20.16 (结构如表1所示,序列如表2所示),之后进行功能验证。

[0272] 复苏PBMC,感染获得CAR-T20s细胞,从第6天开始,可取CAR-T20s细胞进行相应的活性检测试验

[0273] 分别取 0.5×10^6 个培养到第7天的CAR-T20s细胞样品,分别取 0.5×10^6 个培养到第7天的CAR-T20s细胞样品,进行T细胞转染效率的检测。用Protein L方法鉴定培养到第7天的CAR-T20s细胞中CAR基因编码蛋白在T细胞膜表面的表达水平。

[0274] 结果如图9A所示,同CAR-T20.1, CAR-T20.9, CAR-T20.10相比,在CAR-T20.11, CAR-T20.12, CAR-T20.14, CAR-T20.16阳性率较高,而CAR-T20.13, CAR-T20.15中阳性率很低。

[0275] 接下来进行共培养,采用培养到第7天的CAR-T20s细胞进行细胞激活水平指标蛋白CD137和IFN γ 的检测。依次取 1×10^6 个培养到第7天的CAR-T20s细胞,分别与CD20阳性的Raji, Ramos及阴性细胞K562, Molt-4肿瘤细胞系按照1:1比例培养18h后分别检测T细胞膜表面CD137的表达水平和培养上清中IFN γ 的分泌水平。

[0276] 结果如图9B和图9C所示,结果表明与CD20阳性的Raji, Ramos共培养后CAR-T20.9, CAR-T20.10, CAR-T20.11, CAR-T20.12, CAR-T20.13, CAR-T20.14, CAR-T20.16中T细胞膜表

面CD137的表达水平被激活,且释放很高,CAR-T20.10,CAR-T20.14最高,其余次之,只有CAR-T20.15无反应。相应,培养上清中IFN γ 有释放也一样。结果表明此次筛选中CAR-T20.10,CAR-T20.14活性最好。

[0277] 实施例11 CAR-T20.17,CAR-T20.18,CAR-T20.19的筛选及功能验证

[0278] CART细胞的构建以及检测方法参考实施例2,3,4,5进行。

[0279] 先进行全长DNA合成和克隆,实现编码质粒的构建。设计CAR-T20.17,CAR-T20.18,CAR-T20.19(结构如表1所示,序列如表2所示)之后进行功能验证。

[0280] 复苏PBMC,感染获得CAR-T20s细胞,从第6天开始,可取CAR-T20s细胞进行相应的活性检测试验

[0281] 分别取 0.5×10^6 个培养到第7天的CAR-T20s细胞样品,分别取 0.5×10^6 个培养到第7天的CAR-T20s细胞样品,进行T细胞转染效率的检测。用Protein L方法鉴定培养到第7天的CAR-T20s细胞中CAR基因编码蛋白在T细胞膜表面的表达水平。

[0282] 结果如图10A所示,同CAR-T20.9,CAR-T20.12,CAR-T20.14相比,在CAR-T20.17,CAR-T20.18,CAR-T20.19阳性率较高,表达很好。

[0283] 接下来进行共培养,采用培养到第7天的CAR-T20s细胞进行细胞激活水平指标蛋白CD137和IFN γ 的检测。依次取 1×10^6 个培养到第7天的CAR-T20s细胞,分别与CD20阳性的Raji,Ramos及阴性细胞Karpas-620,Molt-4肿瘤细胞系按照1:1比例培养18h后分别检测T细胞膜表面CD137的表达水平和培养上清中IFN γ 的分泌水平。

[0284] 结果如图10B,10D所示,CD20阳性的Raji,Ramos共培养后CAR-T20.17,CAR-T20.18,CAR-T20.19,中T细胞膜表面CD137的表达水平被激活,且释放很高。相应,培养上清中IFN γ 有释放也一样CAR-T20.17,CAR-T20.18,CAR-T20.19均很高。随后进行CAR-T20s细胞体外杀伤靶向肿瘤释放LDH水平的检测,具体试验方法参考实施例5

[0285] 靶细胞有CD20阳性的Raji,Romas,CD20阴性的Molt4。最终杀伤结果表明CAR-T20.17,CAR-T20.18,CAR-T20.19对靶细胞CD20阳性的Raji,Romas均有很强杀伤效果。

[0286] 实施例8-11的结果总结如下:

[0287] 本发明的申请人进行了大量的实验,筛选出多个效果较好CAR,通过比较发现20.1,20.2,20.4,20.5,20.6,20.7,20.8,20.15基本无效,20.11,20.12,20.13有一定的效果,但不及20.9,20.10,20.14,20.16,20.17,20.18,20.19,其中20.18,20.19效果最好。在上述结构的基础上,将CD20 Scfv与CD19的scFv(FMC63)进行串联,作为新的双特异性嵌合抗原受体。

[0288] 实施例8-11中涉及的CART细胞包含的嵌合抗原受体结构如下表1所示,序列如下表2所示。

[0289] 表1嵌合抗原受体及其结构

[0290]

CAR-T 变化	结构
CAR-T20. 1	[CD8LS]- CD20 (AY16076. 1) [VL-Linker-VH]-[hinge-CD8DE]-[4-1BB]-[CD3zeta]
CAR-T20. 5	[CD8LS]- CD20 (AY16076. 1) [VL-Linker-VH]-[hinge-CD8TM]-[4-1BB]-[CD3zeta]
CAR-T20. 6	[CD8LS]- CD20 (AY16076. 1) [VH-Linker-VL]-[hinge-CD8TM]-[4-1BB]-[CD3zeta]
CAR-T20. 7	[CD8LS]- CD20 (IDEC-C2B8) [VL-Linker-VH]-[hinge-CD8TM]-[4-1BB]-[CD3zeta]
CAR-T20. 8	[CD8LS]- CD20 (IDEC-C2B8) [VL-Linker-VH]-[hinge-CD8TM]-[4-1BB]-[CD3zeta]
CAR-T20. 9	[CD8LS]- LEU16 [VH-Linker-VL]-[hinge-CH2-CH3-CD28TM] -[CD28] -[4-1BB]-[CD3zeta]
CAR-T20. 10	[CD8LS]- LEU16 [VL-Linker-VH]-[hinge-CH2-CH3-CD28TM] -[CD28] -[4-1BB]-[CD3zeta]
CAR-T20. 11	[CD8LS]- LEU16 [VL-Linker-VH]-[hinge-CH2-CH3-CD8TM]-[4-1BB]-[CD3zeta]
CAR-T20. 12	[CD8LS]- LEU16 [VH-Linker-VL]-[hinge-CH2-CH3-CD8TM] -[4-1BB]-[CD3zeta]
CAR-T20. 13	[CD8LS]- Obinutuzumab [VH-Linker-VL]-[hinge-CH2-CH3-CD8TM] -[4-1BB]-[CD3zeta]
CAR-T20. 14	[CD8LS]- Ofatuzumab [VH-Linker-VL]-[hinge-CH2-CH3-CD8TM]

[0291]

	-[4-1BB]-[CD3zeta]
CAR-T20. 15	[CD8LS]- CD20 (AY16076. 1) [VH-Linker-VL]-[hinge-CH2-CH3-CD8TM] -[4-1BB]-[CD3zeta]
CAR-T20. 16	[CD8LS]- Rituximab [VH-Linker-VL]-[hinge-CH2-CH3-CD8TM] -[4-1BB]-[CD3zeta]
CAR-T20. 17	[CD8LS]- LEU16 [VH-Linker-VL]-[hinge-CH2-CH3-CD28TM] -[CD28] -[4-1BB]-[CD3zeta] (L235E N297Q)
CAR-T20. 18	[CD8LS]- LEU16 [VH-Linker-VL]-[hinge-CH2-CH3-CD8TM]-[4-1BB]-[CD3zeta] (L235E N297Q)
CAR-T20. 19	[CD8LS]- Ofatuzumab [VH-Linker-VL]-[hinge-CH2-CH3-CD8TM] -[4-1BB]-[CD3zeta] (L235E N297Q)

[0292] 表2嵌合抗原受体及其序列

[0293]

CAR-T	序列	SEQ ID NO.
CAR-T20. 1	MDIQLTQSPAILASPGKEVTMTCRASSSLSFMHWYQQKPGSSPKWIYATSNLASGVPA RFSGSGSGTSYSLTISTVEAEDAASYFCHQWSSNPLTFGAGTKLEISSGGGSGGGSGD VMGVDSGGGLVQPGGSRKLSAAPGFTFSSFGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSPSSTLHYA DRVKGRTISRDNPKNTLFLQMKLPSLCYGLLGRPDHVRLLKTRLSNSIMYFSHFVPVF LPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT CGVLLLSLVITLYCRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELEF RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	23
CAR-T20. 4	MALPVTALLPLALLHAARPDIQLTQSPAILASPGKEVTMTCRASSSLSFMHWYQQK GSSPKWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTVEAEDAASYFCHQWSSNPLTFGA GTKLEISSGGGSGGGSGGSDVMGVDSGGGLVQPGGSRKLSAAPGFTFSSFGMHWVRQA PEKGLEWVAYISSPSSTLHYADRVKGRTISRDNPKNTLFLQMKLPSLCYGLLGRPDHVR LLKTRLSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFEEEEGGCELEFRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	24
CAR-T20. 5	MALPVTALLPLALLHAARPDIQLTQSPAILASPGKEVTMTCRASSSLSFMHWYQQK GSSPKWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTVEAEDAASYFCHQWSSNPLTFGA GTKLEIGGGSGGGSGGGSDVMGVDSGGGLVQPGGSRKLSAAPGFTFSSFGMHWVRQ APEKGLEWVAYISSPSSTLHYADRVKGRTISRDNPKNTLFLQMKLPSLCYGLLGRPDH HRLTRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG TCGVLLLSLVITLYCRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELE FELGTFKTNDLQGSCRS	25
CAR-T20. 6	MALPVTALLPLALLHAARPDVMGVDSGGGLVQPGGSRKLSAAPGFTFSSFGMHWVRQ APEKGLEWVAYISSPSSTLHYADRVKGRTISRDNPKNTLFLQMKLPSLCYGLLGRPDH HRLGGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPAILASPGKEVTMTCRASSSLSFMHWYQQKPGS SPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTVEAEDAASYFCHQWSSNPLTFGAGT KLEITRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG TCGVLLLSLVITLYCRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELE FELGTFKTNDLQGSCRS	26
CAR-T20. 7	MALPVTALLPLALLHAARPQIVLSQSPAILASPGKEVTMTCRASSSVSYIHWQQKP GSSPKWIYATSNLASGVPRFSGSGSGTSYSLTISRVEADAATYYCQQTWSNPPTFGG	27

[0294]

	GTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR STYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSATRTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCELEFELGTFKTNLDLQGSCRS	
CAR-T20. 8	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQ TPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARS TYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSQIVLSQSPAILSASPGEKVTMT RASSSVSYIHWQKPGSSPKPIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAA TYQCQWTSNPPTFGGGTKLEIKTRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCELEFELGTFKTNLDLQGSCRS	28
CAR-T20. 9	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQ TPQGQLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARS NYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMT CRASSSVNYMDWYQKPGSSPKPIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQWFSNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSLGKFVWL VVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	29
CAR-T20. 10	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQ TPQGQLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARS NYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMT CRASSSVNYMDWYQKPGSSPKPIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQWFSNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSLGKFVWL VVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	30
CAR-T20. 11	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKPG SSPKPIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWFSNPPTFGG GTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK QTPQGQLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCAR SNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	31
CAR-T20. 12	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQ TPQGQLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARS NYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMT	32

[0295]

	CRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQWQSFNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	
CAR-T20. 13	MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWINWVRQ APGQGLEWMGRIFPGDGTIDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARN VFDGYWLVYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRS SKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCAQNLLEPYTFGGGTKEIKRTVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MEALHNHYTQKSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR	33
CAR-T20. 14	MALPVTALLLPLALLHAARPEVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFTFNDYAMHWVRQ APGKGLEWVSTISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMSNLRSEDVAVYYCAKD IQYGNYYYGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPED FAVYYCQQRNWPITFGGQTRLEIKESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALH NHYTQKSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	34
CAR-T20. 15	MALPVTALLLPLALLHAARPGDVMGVDGSGGLVQPGSRKLSAAPGFTFSSFGMHWVR QAPEKGLEWVAYISSPSTLHYADRVKGRFTISRDNPKNTLFLQMKLPSLCYGLLGRPDH VHRLKGGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSLSFMHWYQKPK GSSPKWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTVEAEDAASYFCHQWSSNPLTFGA GTKLEIESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGKIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	35
CAR-T20. 16	MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLQPGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQ TPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARS TYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAGGGSGGGSGGGGSQIVLSQSPAILSASPGEKVTMT RASSSVSYIHWYQKPGSSPKWIYATSNLASGVVPRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAA TYYCQQTWTSNPPTFGGGTKLEIKESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS	36

[0296]

	DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNH YTQKSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR	
CAR-T20. 17	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQ TPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDADYYCARS NYYGSSYWFVDVWGAGTTTVSSGGGSGGGSGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMT CRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQWFSNPPTFGGGTKLEIKESKYGPCCPPCAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLGKFWLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	37
CAR-T20. 18	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQ TPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDADYYCARS NYYGSSYWFVDVWGAGTTTVSSGGGSGGGSGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMT CRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQWFSNPPTFGGGTKLEIKESKYGPCCPPCAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY	38
CAR-T20. 19	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFTFNDYAMHWVRQ APGKGLEWVSTISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRRAEDTALYYCAKD IQYGNYYYGMDVWGQGTITVTVSSGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPED FAVYYCQQRSNWPIITFGQGTREIKESKYGPCCPPCAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	39

[0297] 实施例12 CART-TN-OF-19与CART-TN-LEU-19的小鼠体内实验

[0298] 对CART-TN-OF-19和CART-TN-LEU-19细胞在小鼠体内对移植肿瘤细胞的抑制效果进行检测,检测方法参考实施例7进行,对照组为NT。

[0299] 结果如图11所示,2种CART细胞均可以较好的抑制肿瘤细胞扩增,CART细胞组小鼠体内荧光强度很弱,而NT组很强。其中,CART-TN-OF-19比CART-TN-LEU-19在体内实验中可以更好地抑制或杀灭肿瘤细胞。

[0300] 实施例13 CART-TN-OF-19的I期临床试验

[0301] 经伦理委员会审批,共有3名志愿者(编号C001、C002和C003)进行I期临床试验,志愿者选择的关键标准如下:年龄18-75岁,已经接受DLBCL治疗的次数大于2,PD after or ineligible for auto-SCT,未接受过抗CD19治疗,无活性CNS,具有足够的肝肾、心脏和造

血功能。

[0302] 实验流程如图12所示。

[0303] 各实验对象的临床反应如表3所示。结果显示,治疗4周后,三例患者均获得部分缓解(PR),治疗12周后,一名患者完全缓解(CR)。由于另外两名患者实验仍在进行中,部分数据尚未提供。

[0304] 表3实验对象的临床反应

Parameter	C001		C003		C004	
Infusion time	11/20/2019		12/20/2019		12/30/2019	
	Response	SPD	Response	SPD	Response	SPD
Baseline		2203.12		1751.13		4956.14
4w	PR	862.86 (60.8%)	PR	796.77 (54.5%)	PR	1645.45 (66.8%)
8w	uCR	211.32 (90.4%) All LDi ≤1.5 cm	NA*		PR	1501.39 (69.7%)
12w	CR					

[0306] 治疗后发生的不良事件的情况如表4所示,3例患者中有1例发生2级细胞因子释放综合征,2例发生1级细胞因子释放综合征,没有神经毒性事件,在剂量增加中未观察到剂量限制毒性(DLTs),且细胞减少主要与Cy/Flu淋巴细胞清除有关。需要说明的是,在治疗后发生一定程度的细胞因子释放综合征也从侧面说明CART治疗的有效性,3患者中均未发生特别严重的细胞因子细胞因子,CART-TN-OF-19具有较好的安全性。

[0307] 表4实验对象的治疗后不良反应

Parameter	C001	C003	C004
Cytokine release syndrome	Grade 2	Grade 1	Grade 1
Neurotoxicity	No	No	No
Neutropenia	Grade 4	Grade 3	Grade 2
Thrombocytopenia	No	No	No
Anemia	Grade 3	No	No

[0309] 对CAR拷贝数的检测结果如图13所示,显示在14天,CAR拷贝数达到峰值(高于 10^5 拷贝/微克gDNA),并且在56天后仍有非常高的拷贝数。

[0310] 一个实验对象的肿瘤大小变化如图14所示,显示在治疗4周后,肿瘤体积显著缩小,几乎消失。

[0311] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

<110> 上海赛比曼生物科技有限公司

无锡赛比曼生物科技有限公司

<120> 靶向CD19 和CD20 的联合嵌合抗原受体及其应用

<130> P2018-1802

<140> CN 202010188038.1

<141> 2020-03-17

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

```

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met

```

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

<210> 3

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

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

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1			5					10					15		

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

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

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

<210> 6

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

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

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

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

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 10

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 10

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu	Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu	Leu Leu
1	5	10
15		

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 11

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 11

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 20 25

<210> 12

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 12

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 35 40

<210> 13

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 13

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 14

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45

Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 50 55 60

37

210	215	220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys		
225	230	235
Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp		240
	245	250
Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu		255
	260	265
Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser		270
	275	280
Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly		285
290	295	300
Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly		
305	310	315
Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser		320
	325	330
Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys		335
	340	345
Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys		350
355	360	365
His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
370	375	380
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro		
385	390	395
Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr		400
	405	410
Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys		415
	420	425
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys		430
435	440	445
Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His		
450	455	460
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr		
465	470	475
Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe		480
	485	490
Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys		495
	500	505
Leu Glu Ile Thr Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro		510
515	520	525

Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser			
530	535	540	
Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg			
545	550	555	560
Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln			
	565	570	575
Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu			
	580	585	590
Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala			
	595	600	605
Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu			
	610	615	620
Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp			
625	630	635	640
Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu			
	645	650	655
Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile			
	660	665	670
Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr			
	675	680	685
Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met			
690	695	700	
Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
705	710		
<210> 16			
<211> 712			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<400> 16			
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu			
1	5	10	15
His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu			
	20	25	30
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln			
	35	40	45
Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala			
50	55	60	
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro			
65	70	75	80

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

385	390	395	400
Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Gln Met Thr			
	405	410	415
Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile			
	420	425	430
Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln			
	435	440	445
Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg			
	450	455	460
Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr			
465	470	475	480
Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr			
	485	490	495
Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly			
	500	505	510
Thr Lys Leu Glu Ile Thr Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro			
	515	520	525
Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys			
	530	535	540
Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg			
545	550	555	560
Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro			
	565	570	575
Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu			
	580	585	590
Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala			
	595	600	605
Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu			
	610	615	620
Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly			
625	630	635	640
Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu			
	645	650	655
Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser			
	660	665	670
Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly			
	675	680	685
Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu			
	690	695	700

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

705

710

<210> 17

<211> 2130

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 17

```

atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60
gacattgtgc tgacccaatc tccagctatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 120
atgacttgca gggccagctc aagtgtaaat tacatggact ggtaccagaa gaagccagga 180
tcctcccca aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 240
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcagcagagt ggaggctgaa 300
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agttttaatc caccacgtt cggagggggg 360
accaagctgg aaataaaaagg cagtactagc ggtggtggct ccgggggcgg ttccggtggg 420
ggcggcagca gcgaggtgca gctgcagcag tctggggctg agctggtgaa gcctggggcc 480
tcagtgaaga tgcctgcaa ggcttctggc tacacattta ccagttacaa tatgcactgg 540
gtaaagcaga cacctggaca gggcctggaa tggattggag ctatttatcc aggaaatggt 600
gatacttcct acaatcagaa gttcaaaggc aaggccacat tgactgcaga caaatcctcc 660
agcacagcct acatgcagct cagcagcctg acatctgagg actctgcgga ctattactgt 720
gcaagatcta attattacgg tagtagctac tggttcttcg atgtctgggg cgcagggacc 780
acggtcaccg tctcctcagg aggtggtgga tccgaggtga agctgcagga aagcggccct 840
ggcctgggtg ccccagcca gagcctgagc gtgacctgca ccgtgagcgg cgtgagcctg 900
cccgactacg gcgtgagctg gatccggcag ccccagga agggcctgga atggctgggc 960
gtgatctggg gcagcgagac cacctactac aacagcgccc tgaagagccg gctgaccatc 1020
atcaaggaca acagcaagag ccaggtgttc ctgaagatga acagcctgca gaccgacgac 1080
accgccatct actactgcgc caagcactac tactacggcg gcagctacgc catggactac 1140
tggggccagg gcaccagcgt gaccgtgagc agcggcagca cctccggcag cggcaagcct 1200
ggcagcggcg agggcagcac caagggcgac atccagatga ccagaccac ctccagcctg 1260
agcgccagcc tgggcgaccg ggtgaccatc agctgccggg ccagccagga catcagcaag 1320
tacctgaact ggtatcagca gaagcccgac ggcaccgtca agctgctgat ctaccacacc 1380
agccggctgc acagcggcgt gcccagccgg tttagcggca gcggctccgg caccgactac 1440
agcctgacca tctccaacct ggaacaggaa gatatcgcca cctacttttg ccagcagggc 1500
aacacactgc cctacacctt tggcggcgga acaaagctgg aaatcaccga gagcaagtac 1560
ggaccgccct gcccccttg ccctatgttc tgggtgctgg tgggtggtcg aggcgtgctg 1620
gcctgctaca gcctgctggt caccgtggcc ttcacatct tttgggtgaa acggggcaga 1680
aagaaactcc tgtatatatt caaacaacca tttatgagac cagtacaaac tactcaagag 1740
gaagatggct gtagctgccg atttcagaa gaagaagaag gaggatgtga actgcgggtg 1800
aagttcagca gaagcgccga cgcccctgcc taccagcagg gccagaatca gctgtacaac 1860
gagctgaacc tgggcagaag ggaagagtac gacgtcctgg ataagcgag aggccgggac 1920

```

cctgagatgg gcggaagcc tcggcggaag aacccccagg aaggcctgta taacgaactg 1980
 cagaaagaca agatggccga ggcctacagc gagatcgga tgaaggcgga gcgaggcg 2040
 ggcaagggcc acgacggcct gtatcagggc ctgtccaccg ccaccaagga tacctacgac 2100
 gccctgcaca tgcaggccct gcccacaagg 2130

<210> 18

<211> 2136

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 18

atggccttac cagtaccgc cttgtcctg ccgtggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
 ccggaattg tgttgacaca gtctccagcc acctgtctt tgtctccagg ggaaagagcc 120
 accctctcct gcagggccag tcagagtgtt agcagctact tagcctggta ccaacagaaa 180
 cctggccagg ctcccaggt cctcatctat gatgcatcca acagggccac tggcatccca 240
 gccaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagcctagag 300
 cctgaagatt ttgcagtta ttactgtcag cagcgtagca actggccgat caccttcggc 360
 caagggacac gactggagat taaaggcagt actagcgtg gtggctccg gggcggttcc 420
 ggtggggcg gcagcagca agtgcagctg gtggagtctg ggggaggctt ggtacagcct 480
 ggcaggctcc tgagactctc ctgtgcagcc tctggattca cttttaatga ttatgccatg 540
 cactgggtcc ggcaagctcc aggaaggcg ctggagtggg tctcaactat tagttggaat 600
 agtggttcca taggctatgc ggactctgtg aaggccgat tcaccatctc cagagacaac 660
 gccagaagt cctgtatct gcaaatgaac agtctgagag ctgaggacac ggccttgtat 720
 tactgtgcaa aagatataca gtacggcaac tactactacg gtatggacgt ctggggccaa 780
 gggaccacgg tcaccgtctc ctccaggagt ggtggatccg aggtgaagct gcaggaaagc 840
 ggccctggcc tgggtggccc cagccagagc ctgagcgtga cctgcaccgt gagcggcgtg 900
 agcctgcccg actacggcgt gagctggatc cggcagcccc ccaggaaggg cctggaatgg 960
 ctgggcgtga tctggggcag cgagaccacc tactacaaca gcgccctgaa gagccggctg 1020
 accatcatca aggacaacag caagagccag gtgttctga agatgaacag cctgcagacc 1080
 gacgacaccg ccatctacta ctgcgccaag cactactact acggcggcag ctacgccatg 1140
 gactactggg gccagggcac cagcgtgacc gtgagcagcg gcagcacctc cggcagcggc 1200
 aagcctggca gcggcgaggg cagcaccaag ggcgacatcc agatgacca gaccacctcc 1260
 agcctgagcg ccagcctggg cgaccgggtg accatcagct gccgggccag ccaggacatc 1320
 agcaagtacc tgaactggta tcagcagaag ccgacggca ccgtcaagct gctgatctac 1380
 cacaccagcc ggctgcacag cggcgtgccc agccggttta gcggcagcgg ctccggcacc 1440
 gactacagcc tgaccatctc caacctggaa caggaagata tcgccaccta cttttgccag 1500
 cagggaaca cactgcccta cacctttggc ggcggaacaa agctggaaat caccgagagc 1560
 aagtaaggac cgccctgccc cccttgccct atgttctggg tgctggtggt ggtcggaggc 1620
 gtgctggcct gctacagcct gctggtcacc gtggccttca tcactttttg ggtgaaacgg 1680
 ggcagaaaga aactcctgta tatattcaaa caaccattta tgagaccagt acaactact 1740
 caagaggaag atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg 1800

cgggtgaagt tcagcagaag cgccgacgcc cctgcctacc agcagggcca gaatcagctg 1860
 tacaacgagc tgaacctggg cagaagggaa gactacgacg tcctggataa gcggagaggc 1920
 cgggaccctg agatgggcgg caagcctcgg cggaagaacc ccaggaagg cctgtataac 1980
 gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagcgg 2040
 aggcggggca agggccacga cggcctgtat cagggcctgt ccaccgccac caaggatacc 2100
 tacgacgccc tgcacatgca ggccctgccc ccaagg 2136

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 19

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 20

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 20

ggtggcgggtg gctcgggcgg tggtgggtcg ggtggcggcg gatct 45

<210> 21

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 21

gacatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
 atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aaatatataa attggtatca gcagaaacca 120
 gatggaactg ttaaactcct gatctacat acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240
 gaagatatgt ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggagatcac a 321

<210> 22

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 22

gaggtgaaac tgcaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccgtc 60
 acatgcactg tctcaggggt ctcatcacc gactatggtg taagctggat tcgccagcct 120
 ccacgaaagg gtctggagt gctgggagta atatggggtg gtgaaaccac atactataat 180
 tcagctctca aatccagact gaccatcatc aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240

aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatttact actgtgccaa acattattac 300
tacggtggtgta gctatgctat ggactactgg ggccaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 23

<211> 472

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 23

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

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys		
260	265	270
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala		
275	280	285
Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu		
290	295	300
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Gly Arg		
305	310	315
Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln		
325	330	335
Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu		
340	345	350
Glu Gly Gly Cys Glu Leu Glu Phe Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala		
355	360	365
Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu		
370	375	380
Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly		
385	390	395
Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu		
405	410	415
Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser		
420	425	430
Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly		
435	440	445
Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu		
450	455	460
His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
465	470	
<210> 24		
<211> 492		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<400> 24		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu		
20	25	30
Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser		
35	40	45

Ser	Leu	Ser	Phe	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro
50						55					60				
Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr	Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala
65					70					75					80
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser
				85					90					95	
Thr	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Tyr	Phe	Cys	His	Gln	Trp	Ser
			100					105					110		
Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Ser	Ser
		115					120					125			
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Asp	Val	Met	Gly	Val
	130					135					140				
Asp	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Arg	Lys	Leu	Ser
145					150					155					160
Cys	Ala	Ala	Pro	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	Gly	Met	His	Trp	Val
				165					170					175	
Arg	Gln	Ala	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser
			180					185						190	
Pro	Ser	Ser	Thr	Leu	His	Tyr	Ala	Asp	Arg	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr
		195					200					205			
Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Pro	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe	Leu	Gln	Met	Lys	Leu
	210					215					220				
Pro	Ser	Leu	Cys	Tyr	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Arg	Asp	His	Val	His	Arg
225					230					235					240
Leu	Leu	Lys	Thr	Arg	Leu	Ser	Asn	Ser	Ile	Met	Tyr	Phe	Ser	His	Phe
				245					250					255	
Val	Pro	Val	Phe	Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg
			260					265					270		
Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg
		275					280					285			
Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly
	290					295					300				
Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr
305					310				315						320
Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Arg	Ser
				325					330				335		
Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met
			340					345					350		
Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe

355	360	365
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Glu Phe Arg Val Lys Phe		
370	375	380
Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu		
385	390	395
Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp		400
405	410	415
Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys		
420	425	430
Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala		
435	440	445
Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys		
450	455	460
Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr		
465	470	475
Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		480
485	490	
<210> 25		
<211> 377		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<400> 25		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu		15
20	25	30
Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser		
35	40	45
Ser Leu Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro		
50	55	60
Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala		
65	70	75
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser		
85	90	95
Thr Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser		
100	105	110
Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gly Gly		
115	120	125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Met		

130	135	140
Gly Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Arg Lys		
145	150	155
Leu Ser Cys Ala Ala Pro Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His		
165	170	175
Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile		
180	185	190
Ser Ser Pro Ser Ser Thr Leu His Tyr Ala Asp Arg Val Lys Gly Arg		
195	200	205
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met		
210	215	220
Lys Leu Pro Ser Leu Cys Tyr Gly Leu Leu Gly Pro Arg Asp His Val		
225	230	235
His Arg Leu Leu Thr Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr		
245	250	255
Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala		
260	265	270
Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe		
275	280	285
Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val		
290	295	300
Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Gly		
305	310	315
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val		
325	330	335
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu		
340	345	350
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Glu Phe Glu Leu Gly Thr Phe Lys Thr		
355	360	365
Asn Asp Leu Gln Gly Ser Cys Arg Ser		
370	375	
<210> 26		
<211> 377		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<400> 26		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Asp Val Met Gly Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu		

20	25	30
Val Gln Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Pro Gly Phe		
35	40	45
Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys		
50	55	60
Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Pro Ser Ser Thr Leu His		
65	70	75
Tyr Ala Asp Arg Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro		
85	90	95
Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Lys Leu Pro Ser Leu Cys Tyr Gly		
100	105	110
Leu Leu Gly Pro Arg Asp His Val His Arg Leu Leu Gly Gly Gly Gly		
115	120	125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr		
130	135	140
Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met		
145	150	155
Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Leu Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln		
165	170	175
Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu		
180	185	190
Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser		
195	200	205
Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr		
210	215	220
Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr		
225	230	235
Lys Leu Glu Ile Thr Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr		
245	250	255
Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala		
260	265	270
Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe		
275	280	285
Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val		
290	295	300
Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Gly		
305	310	315
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val		
325	330	335

Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
 340 345 350
 Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Glu Phe Glu Leu Gly Thr Phe Lys Thr
 355 360 365
 Asn Asp Leu Gln Gly Ser Cys Arg Ser
 370 375
 <210> 27
 <211> 396
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 27
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu
 20 25 30
 Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser
 35 40 45
 Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro
 50 55 60
 Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr
 100 105 110
 Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
 130 135 140
 Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val
 145 150 155 160
 Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met
 165 170 175
 His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
 180 185 190
 Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
 195 200 205
 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
 210 215 220

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 225 230 235 240
 Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly
 245 250 255
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Thr Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
 260 265 270
 Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
 275 280 285
 Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
 290 295 300
 Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
 305 310 315 320
 Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser
 325 330 335
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 340 345 350
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 355 360 365
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Glu Phe Glu Leu Gly Thr
 370 375 380
 Phe Lys Thr Asn Asp Leu Gln Gly Ser Cys Arg Ser
 385 390 395

<210> 28

<211> 396

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 28

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

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

<210> 29

<211> 715

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 29

```

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

```

275	280	285
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
290	295	300
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln		
305	310	315
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
325	330	335
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
340	345	350
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
355	360	365
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
370	375	380
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
385	390	395
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
405	410	415
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
420	425	430
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
435	440	445
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
450	455	460
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
465	470	475
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Phe Trp Val		
485	490	495
Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr		
500	505	510
Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu		
515	520	525
His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg		
530	535	540
Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg		
545	550	555
Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe		
565	570	575
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg		
580	585	590

Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	
595					600					605						
Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	
610					615					620						
Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	
625					630					635					640	
Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	
645					650					655						
Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	
660					665					670						
Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	
675					680					685						
His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	
690					695					700						
Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg						
705					710					715						
<210> 30																
<211> 715																
<212> PRT																
<213> 人工序列(Artificial Sequence)																
<400> 30																
Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	
1		5				10				15						
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	
20					25					30						
Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	
35					40					45						
Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Gln	
50					55					60						
Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	
65					70					75					80	
Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	
85					90					95						
Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	
100					105					110						
Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Tyr	Trp	
115					120					125						
Phe	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	
130					135					140						

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

450	455	460
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
465	470	475
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Phe Trp Val		
	485	490
Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr		
	500	505
Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu		
	515	520
His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg		
530	535	540
Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg		
545	550	555
Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe		
	565	570
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg		
	580	585
Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser		
595	600	605
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
610	615	620
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		
625	630	635
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn		
	645	650
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu		
	660	665
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly		
	675	680
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr		
690	695	700
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
705	710	715
<210> 31		
<211> 671		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<400> 31		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		

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

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

625	630	635	640
Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr			
	645	650	655
Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	660	665	670
<210> 32			
<211> 671			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<400> 32			
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu			
1	5	10	15
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu			
	20	25	30
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr			
	35	40	45
Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln			
	50	55	60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser			
65	70	75	80
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser			
	85	90	95
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser			
	100	105	110
Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp			
	115	120	125
Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly			
	130	135	140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile			
145	150	155	160
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys			
	165	170	175
Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp			
	180	185	190
Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr			
	195	200	205
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser			
	210	215	220
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala			

225	230	235	240
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly			
	245	250	255
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys			
	260	265	270
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu			
	275	280	285
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
	290	295	300
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln			
305	310	315	320
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
	325	330	335
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
	340	345	350
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
	355	360	365
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
	370	375	380
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
385	390	395	400
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys			
	405	410	415
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln			
	420	425	430
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly			
	435	440	445
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
	450	455	460
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn			
465	470	475	480
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr Ile			
	485	490	495
Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val			
	500	505	510
Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe			
	515	520	525
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly			
	530	535	540

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg			
545	550	555	560
Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln			
	565	570	575
Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp			
	580	585	590
Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro			
	595	600	605
Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp			
	610	615	620
Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg			
625	630	635	640
Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr			
	645	650	655
Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	660	665	670

<210> 33

<211> 677

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 33

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

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

450	455	460
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
465	470	475
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
	485	490
Leu Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val		
	500	505
Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys		
	515	520
Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr		
	530	535
Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu		
545	550	555
Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro		
	565	570
Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly		
	580	585
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro		
	595	600
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr		
	610	615
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly		
625	630	635
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln		
	645	650
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln		
	660	665
Ala Leu Pro Pro Arg		670
675		
<210> 34		
<211> 672		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<400> 34		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu		
	20	25
Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe		

35	40	45
Thr Phe Asn Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
50	55	60
Gly Leu Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly		
65	70	75
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala		
85	90	95
Lys Lys Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr		
100	105	110
Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr		
115	120	125
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly		
130	135	140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile		
145	150	155
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg		
165	170	175
Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala		
180	185	190
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp		
195	200	205
Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly		
210	215	220
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp		
225	230	235
Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr Phe		
245	250	255
Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro		
260	265	270
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe		
275	280	285
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
290	295	300
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val		
305	310	315
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
325	330	335
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
340	345	350

Leu Thr Val	Leu His Gln Asp Trp	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
355	360	365
Lys Val Ser Asn Lys Gly	Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser	
370	375	380
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
385	390	395 400
Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
	405	410 415
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
	420	425 430
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
	435	440 445
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
	450	455 460
Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
	465	470 475 480
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr		
	485	490 495
Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu		
	500	505 510
Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile		
	515	520 525
Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp		
	530	535 540
Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu		
	545	550 555 560
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly		
	565	570 575
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr		
	580	585 590
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys		
	595	600 605
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys		
	610	615 620
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		
	625	630 635 640
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala		
	645	650 655
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		

660	665	670
<210> 35		
<211> 653		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<400> 35		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1 5 10 15		
His Ala Ala Arg Pro Gly Asp Val Met Gly Val Asp Ser Gly Gly Gly		
20 25 30		
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Pro Gly		
35 40 45		
Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu		
50 55 60		
Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Pro Ser Ser Thr Leu		
65 70 75 80		
His Tyr Ala Asp Arg Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn		
85 90 95		
Pro Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Lys Leu Pro Ser Leu Cys Tyr		
100 105 110		
Gly Leu Leu Gly Pro Arg Asp His Val His Arg Leu Leu Lys Gly Gly		
115 120 125		
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln		
130 135 140		
Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val		
145 150 155 160		
Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Leu Ser Phe Met His Trp Tyr		
165 170 175		
Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser		
180 185 190		
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly		
195 200 205		
Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala		
210 215 220		
Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala		
225 230 235 240		
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro		
245 250 255		
Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro		

260	265	270
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
275	280	285
Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn		
290	295	300
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
305	310	315
Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		
325	330	335
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser		
340	345	350
Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
355	360	365
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu		
370	375	380
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe		
385	390	395
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu		
405	410	415
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe		
420	425	430
Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly		
435	440	445
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr		
450	455	460
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala		
465	470	475
Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr		
485	490	495
Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln		
500	505	510
Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser		
515	520	525
Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys		
530	535	540
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln		
545	550	555
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu		
565	570	575

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg		
580	585	590
Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met		
595	600	605
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly		
610	615	620
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp		
625	630	635
Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
645	650	
<210> 36		
<211> 670		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<400> 36		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu		
20	25	30
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr		
35	40	45
Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg		
50	55	60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser		
65	70	75
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser		
85	90	95
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser		
100	105	110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr		
115	120	125
Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Gly Gly		
130	135	140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val		
145	150	155
Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val		
165	170	175
Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe		
180	185	190

Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser		
195	200	205
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly		
210	215	220
Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala		
225	230	235 240
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly		
245	250	255
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro		
260	265	270
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
275	280	285
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
290	295	300
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe		
305	310	315 320
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
325	330	335
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
340	345	350
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
355	360	365
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
370	375	380
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln		
385	390	395 400
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
405	410	415
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
420	425	430
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
435	440	445
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu		
450	455	460
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
465	470	475 480
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr Ile Trp		
485	490	495
Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile		

500	505	510
Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys		
515	520	525
Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys		
530	535	540
Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val		
545	550	555
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn		
565	570	575
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val		
580	585	590
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg		
595	600	605
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys		
610	615	620
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg		
625	630	635
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys		
645	650	655
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
660	665	670

<210> 37

<211> 715

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 37

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

100						105						110					
Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Tyr	Trp		
115						120						125					
Phe	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly		
130						135						140					
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile		
145						150						155					
Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys		
165						170						175					
Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Asn	Tyr	Met	Asp	Trp		
180						185						190					
Tyr	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr	Ala	Thr		
195						200						205					
Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser		
210						215						220					
Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala		
225						230						235					
Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly		
245						250						255					
Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys		
260						265						270					
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu		
275						280						285					
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu		
290						295						300					
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln		
305						310						315					
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys		
325						330						335					
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Gln	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu		
340						345						350					
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys		
355						360						365					
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys		
370						375						380					
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser		
385						390						395					
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys		
405						410						415					

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

<210> 38

<211> 660

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 38

```

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

```

275	280	285
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
290	295	300
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln		
305	310	315
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
325	330	335
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
340	345	350
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
355	360	365
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
370	375	380
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
385	390	395
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
405	410	415
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
420	425	430
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
435	440	445
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
450	455	460
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
465	470	475
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr Ile		
485	490	495
Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val		
500	505	510
Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe		
515	520	525
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly		
530	535	540
Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg		
545	550	555
Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln		
565	570	575
Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp		
580	585	590

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 595 600 605
 Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 610 615 620
 Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 625 630 635 640
 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 645 650 655
 Lys Asp Thr Tyr
 660
 <210> 39
 <211> 672
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 39
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45
 Thr Phe Asn Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly
 65 70 75 80
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 85 90 95
 Lys Lys Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr
 115 120 125
 Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile
 145 150 155 160
 Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
 165 170 175
 Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 180 185 190

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp		
195	200	205
Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly		
210	215	220
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp		
225	230	235
Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr Phe		
245	250	255
Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro		
260	265	270
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe		
275	280	285
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
290	295	300
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val		
305	310	315
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
325	330	335
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
340	345	350
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
355	360	365
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
370	375	380
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
385	390	395
Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
405	410	415
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
420	425	430
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
435	440	445
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
450	455	460
Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
465	470	475
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr		
485	490	495
Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu		

500	505	510
Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile		
515	520	525
Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp		
530	535	540
Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu		
545	550	555
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly		
565	570	575
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr		
580	585	590
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys		
595	600	605
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys		
610	615	620
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		
625	630	635
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala		
645	650	655
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
660	665	670

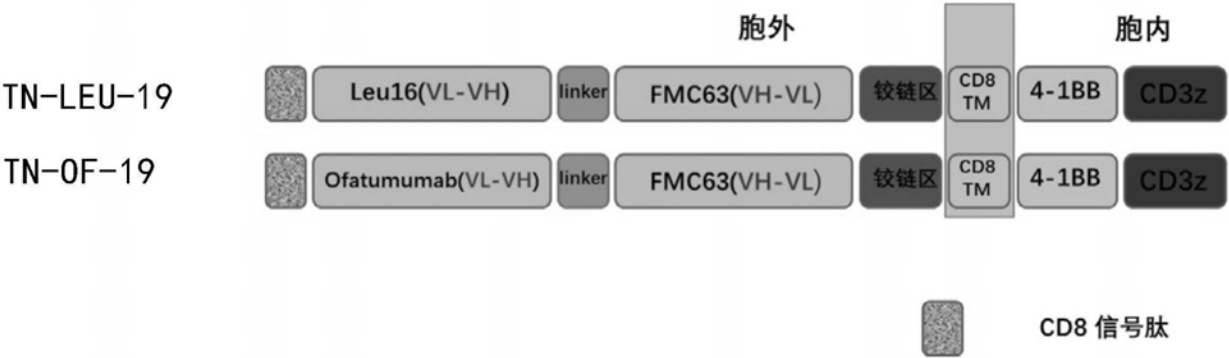


图1

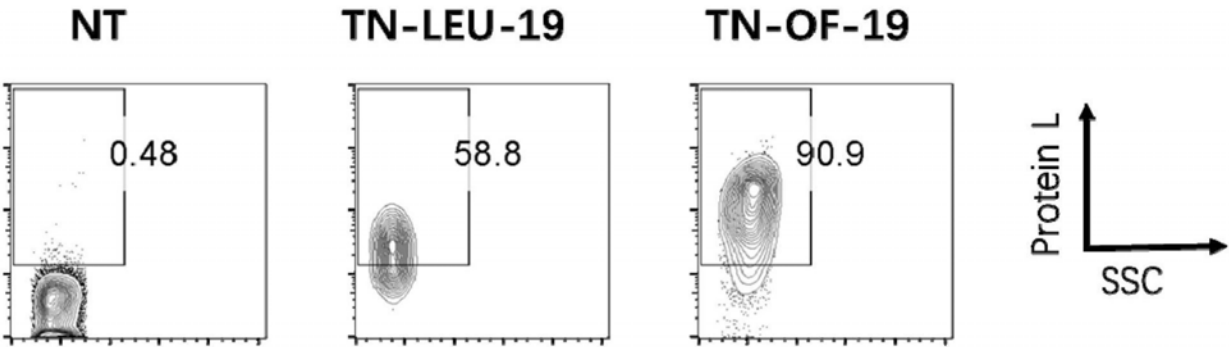


图2

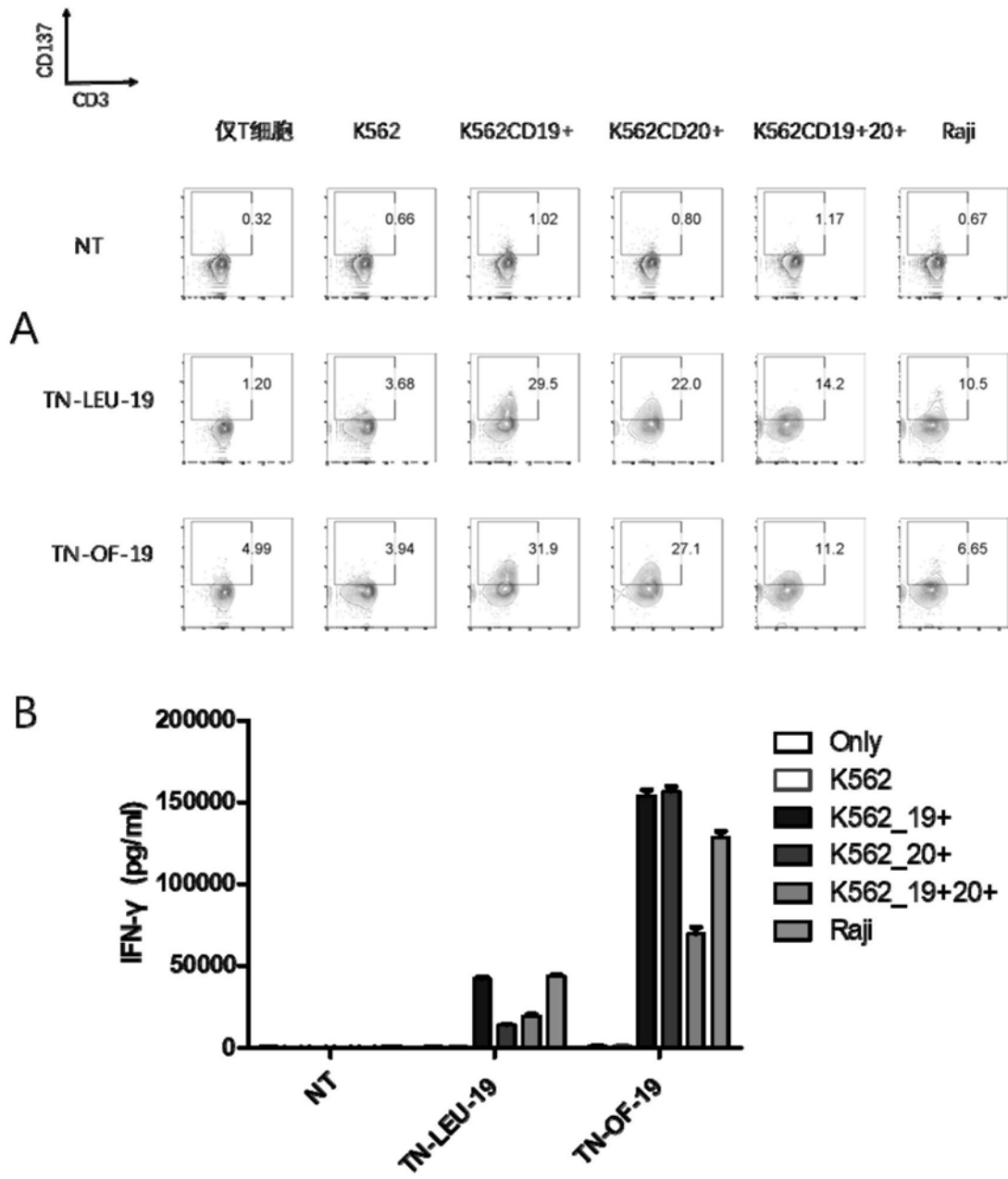


图3

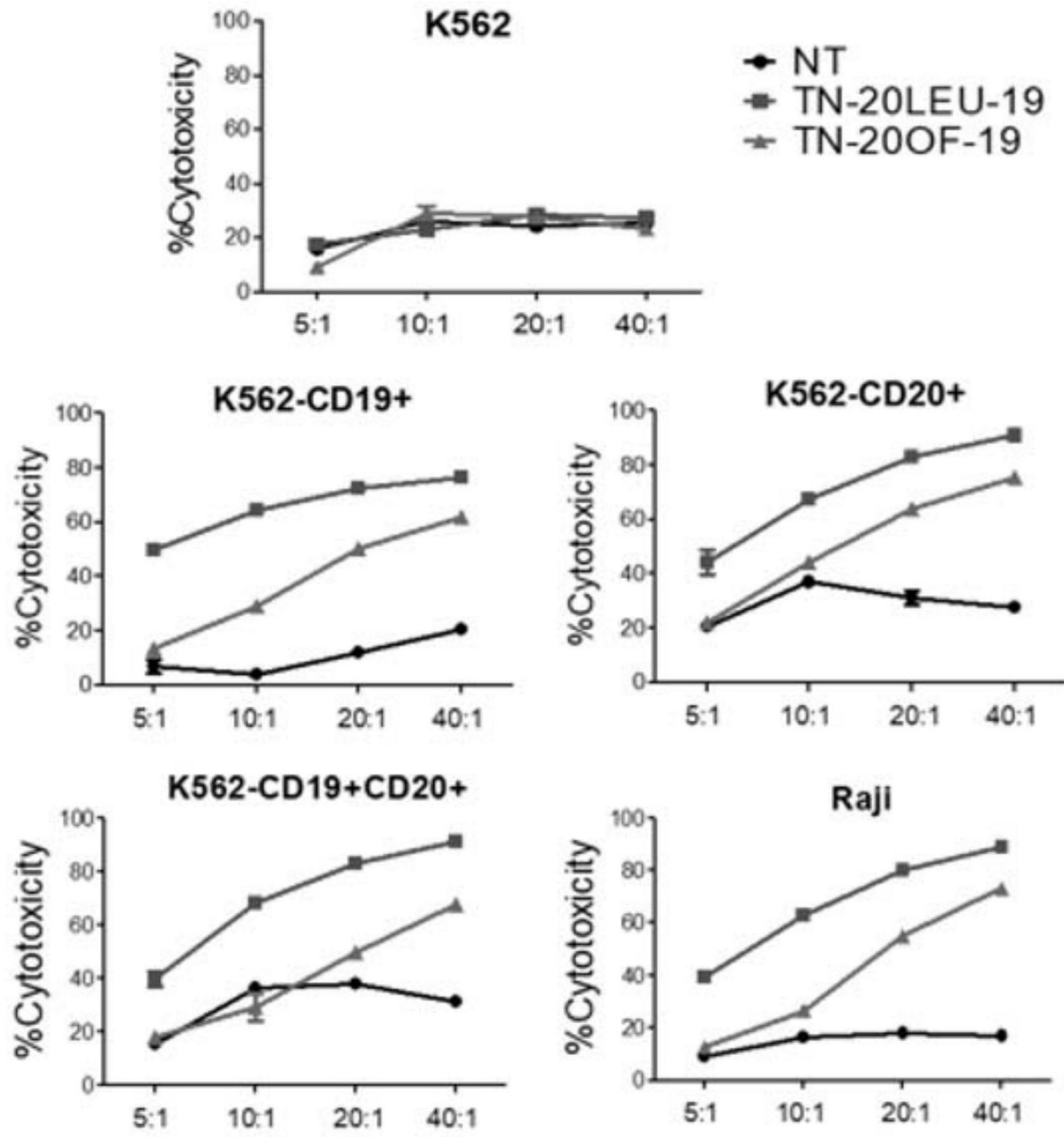


图4

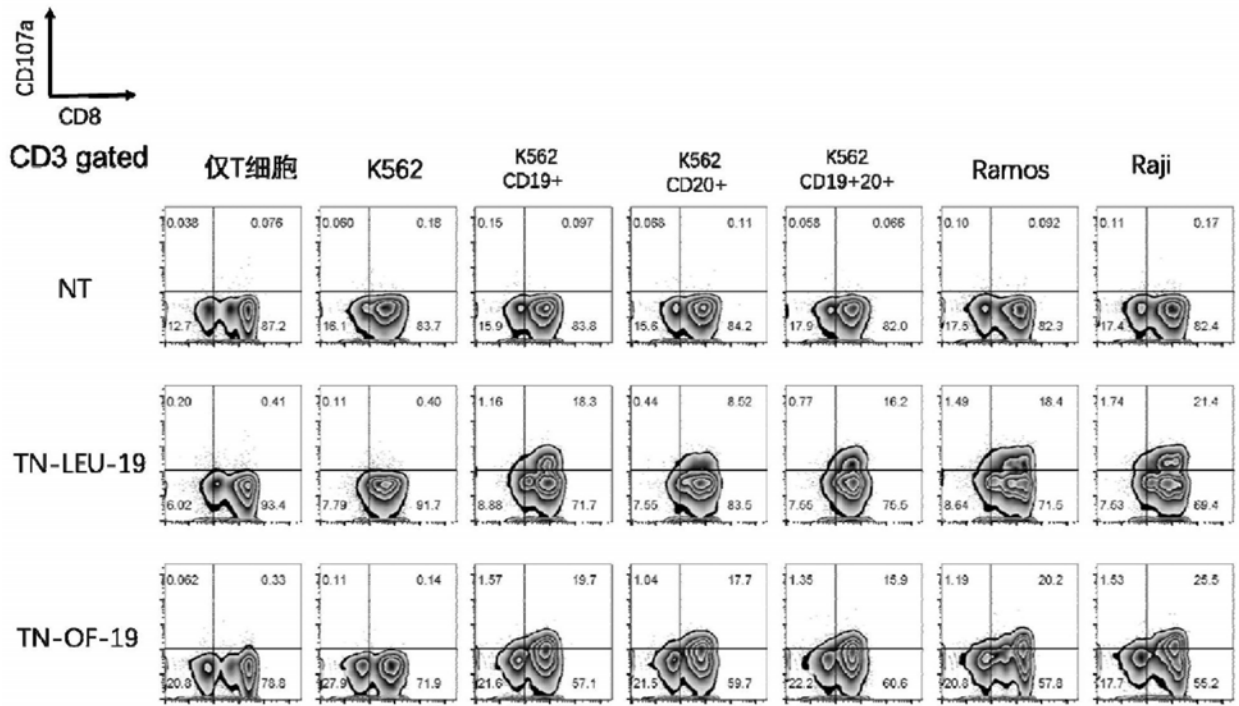


图5

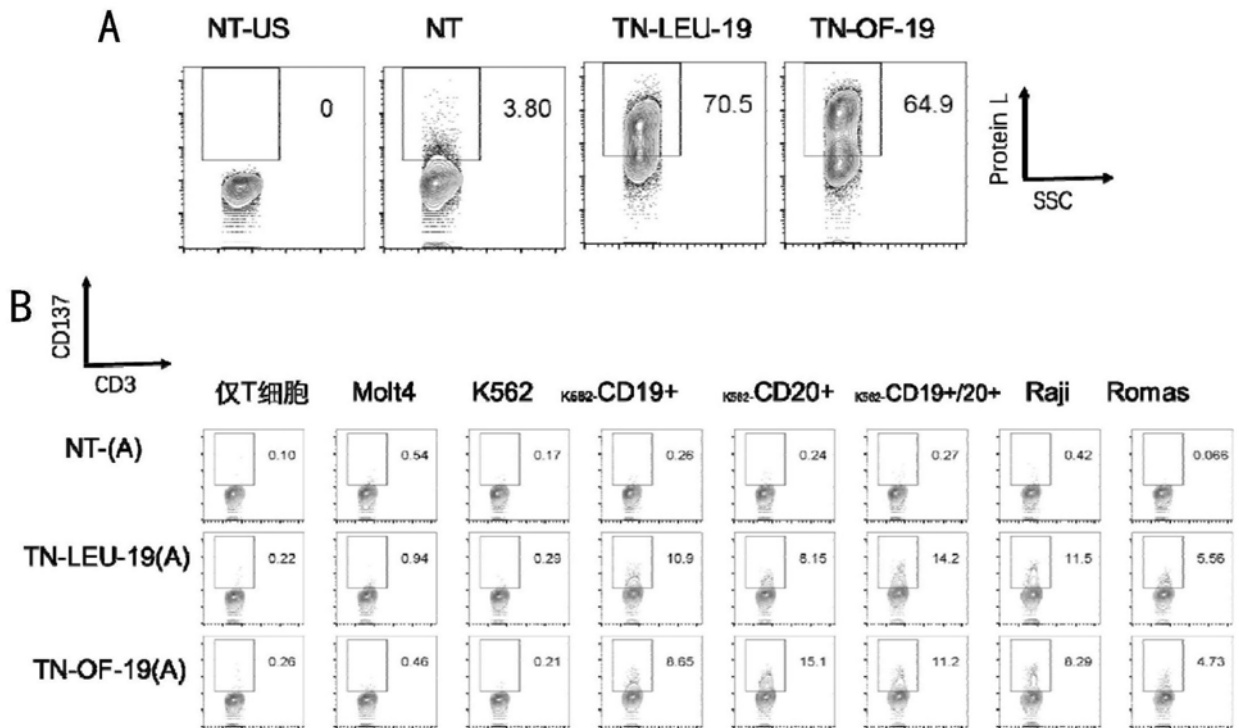


图6

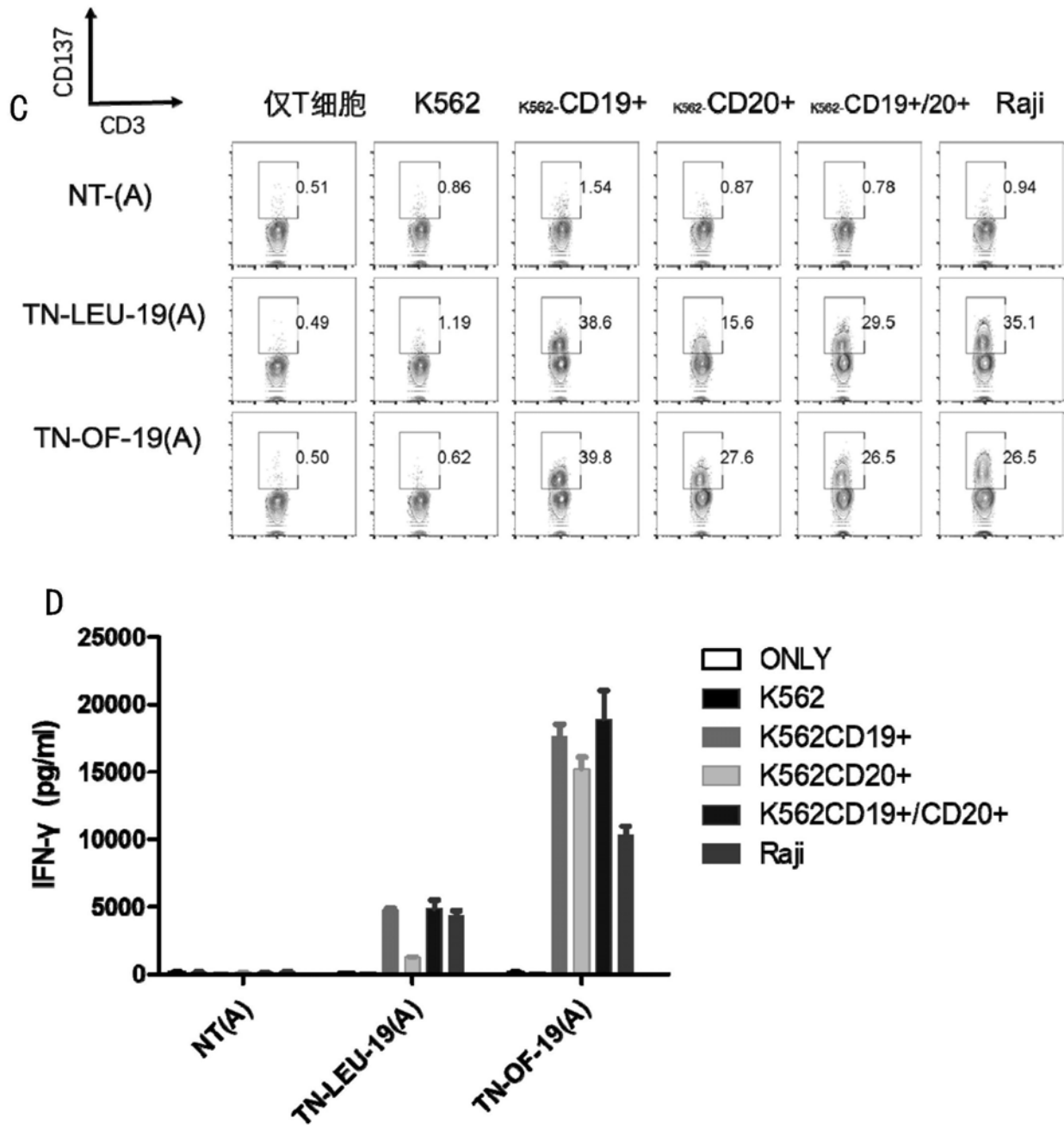


图6 (续)

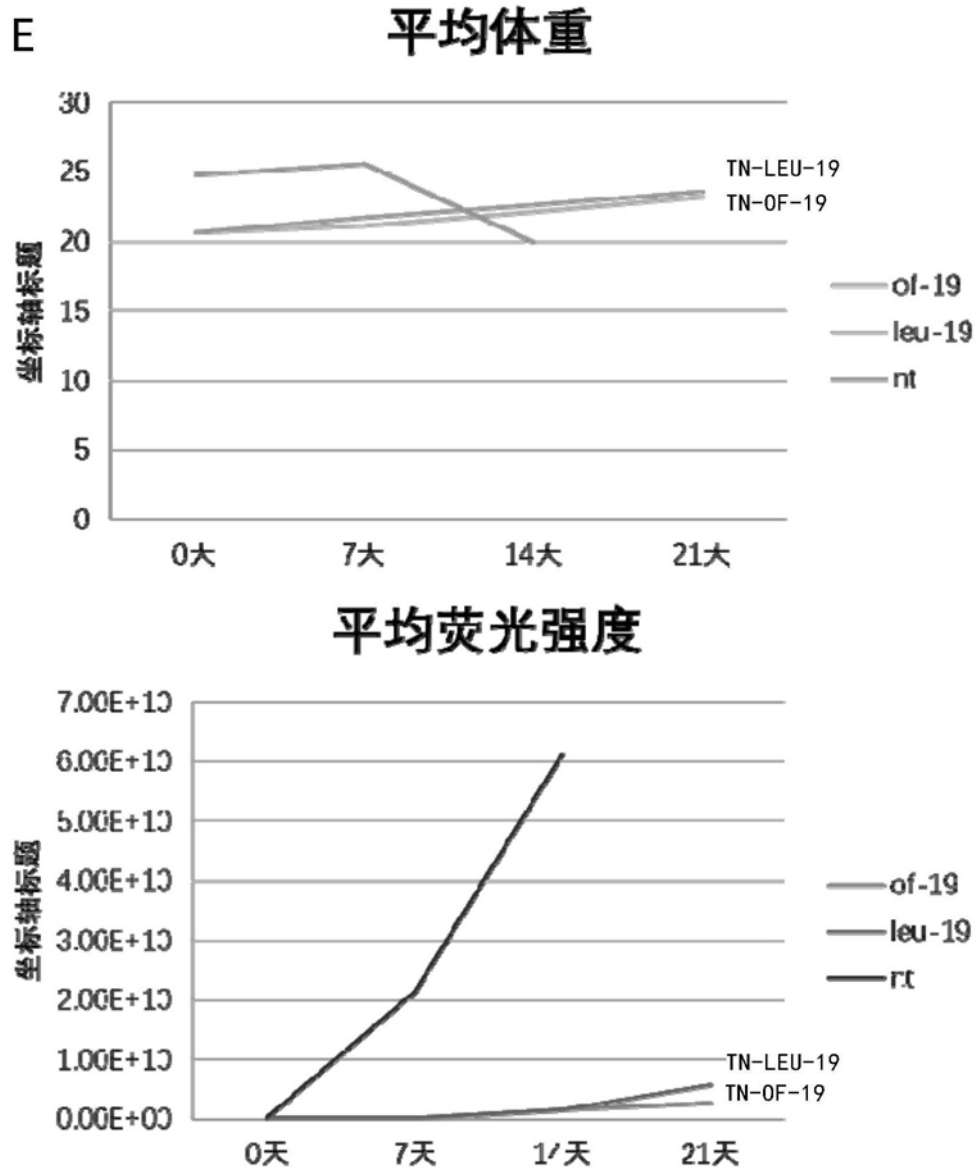


图6(续)

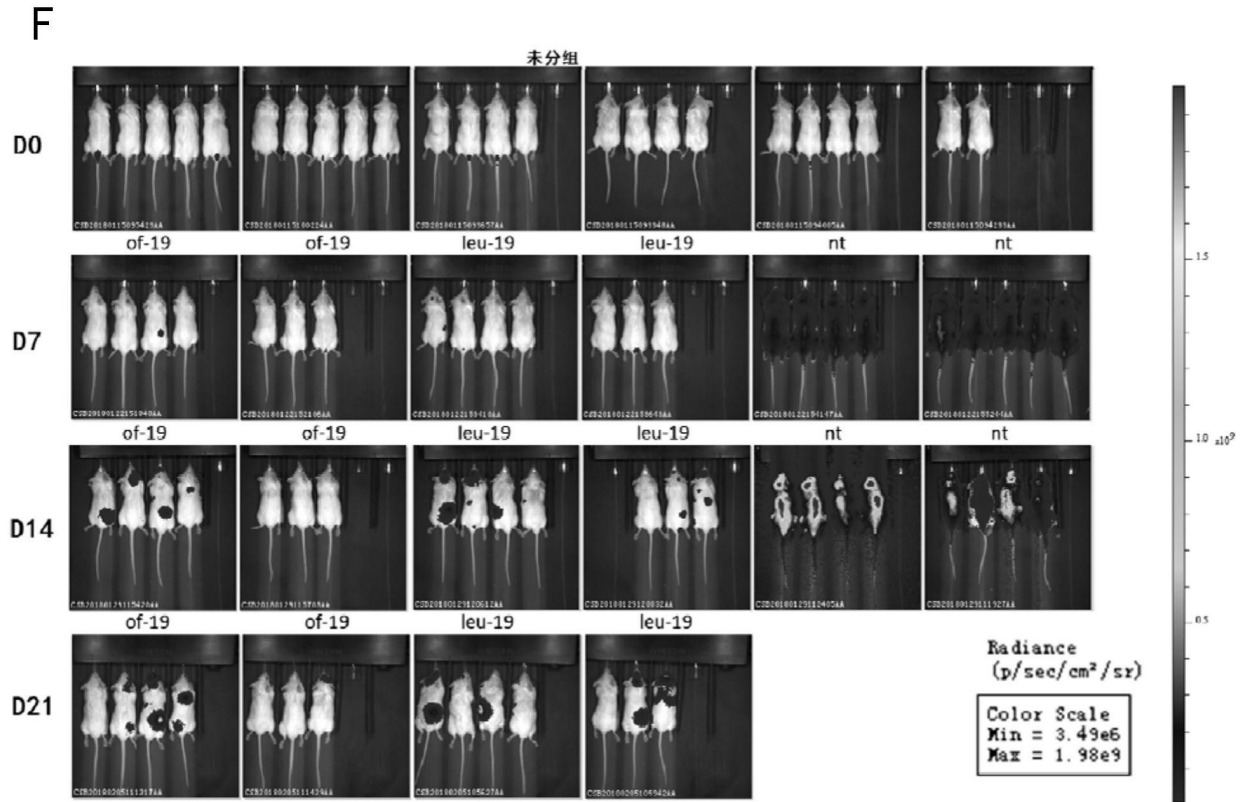


图6(续)

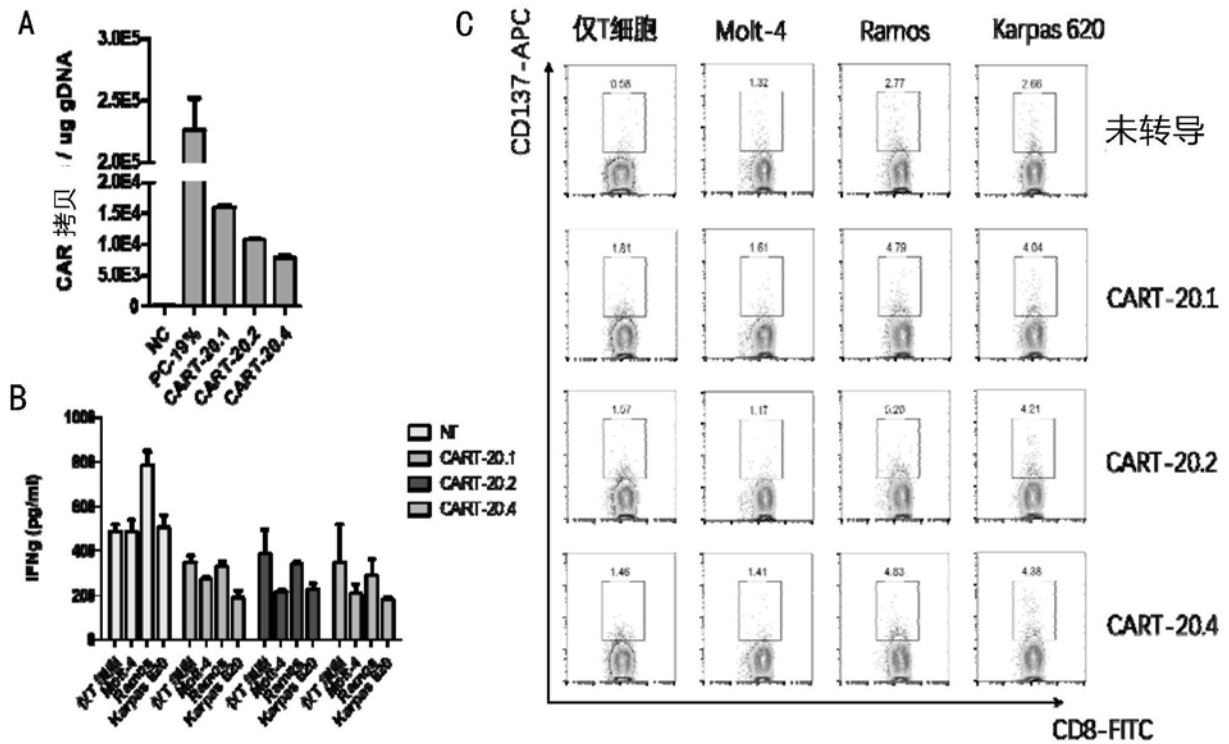


图7

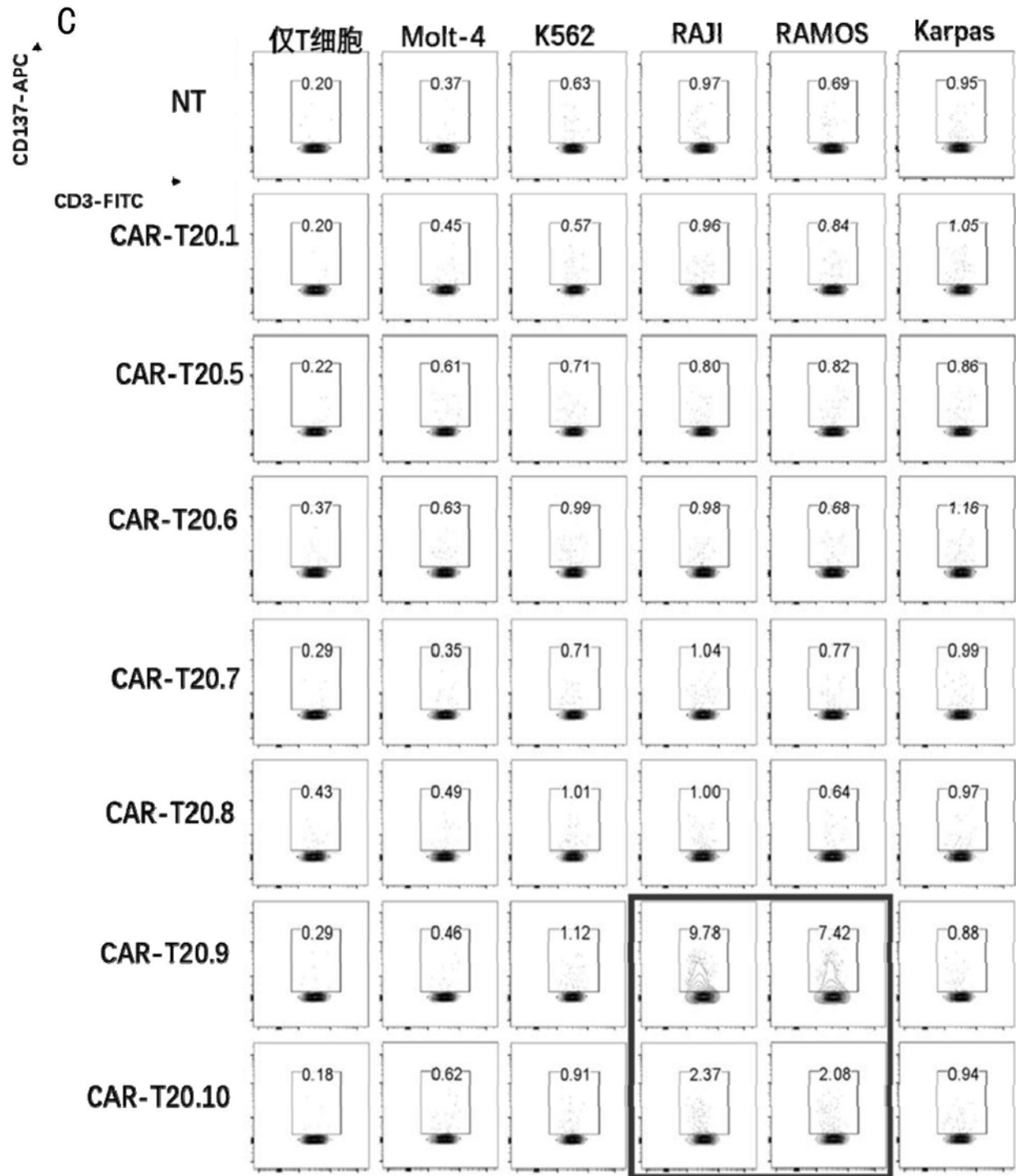


图8(续)

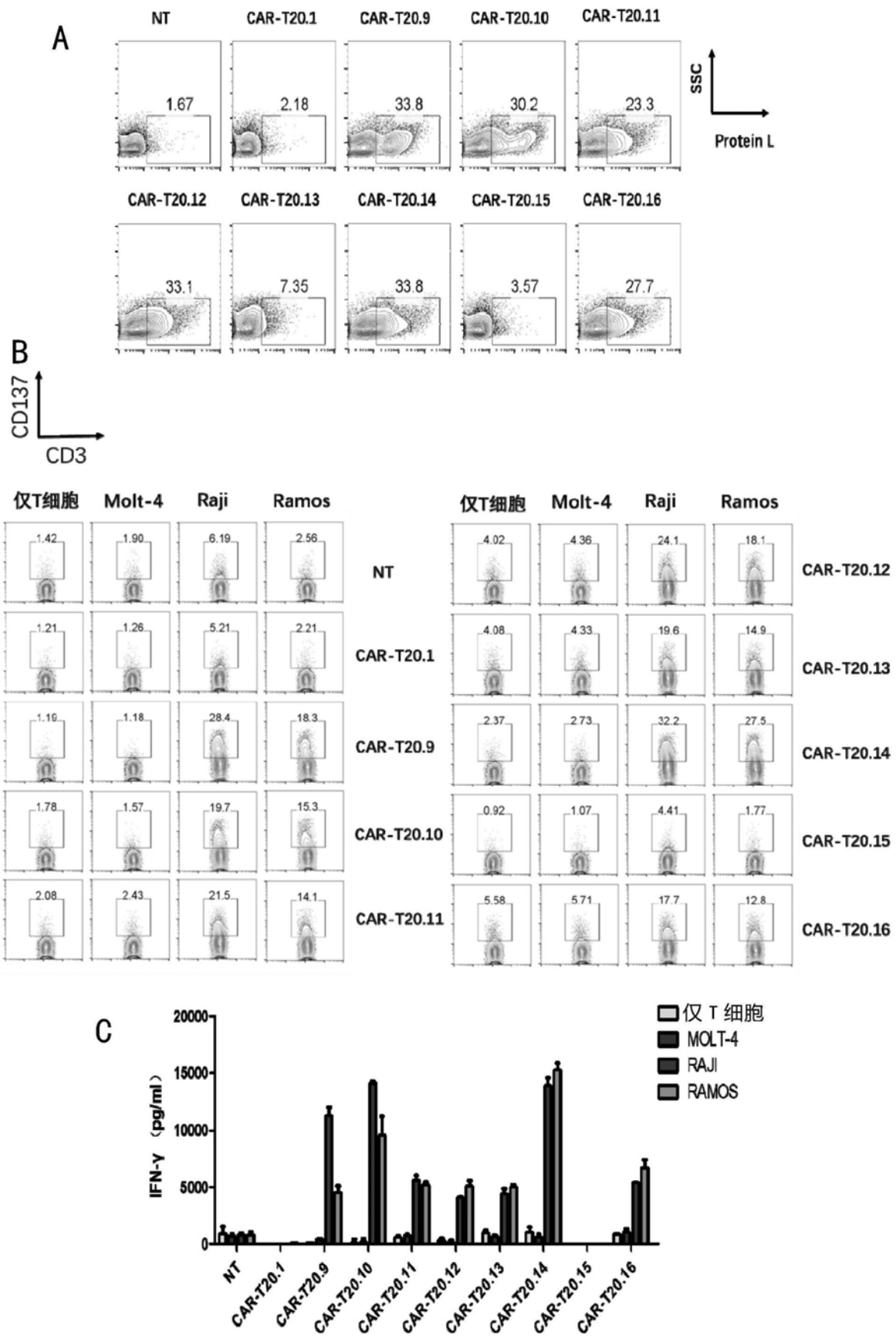


图9

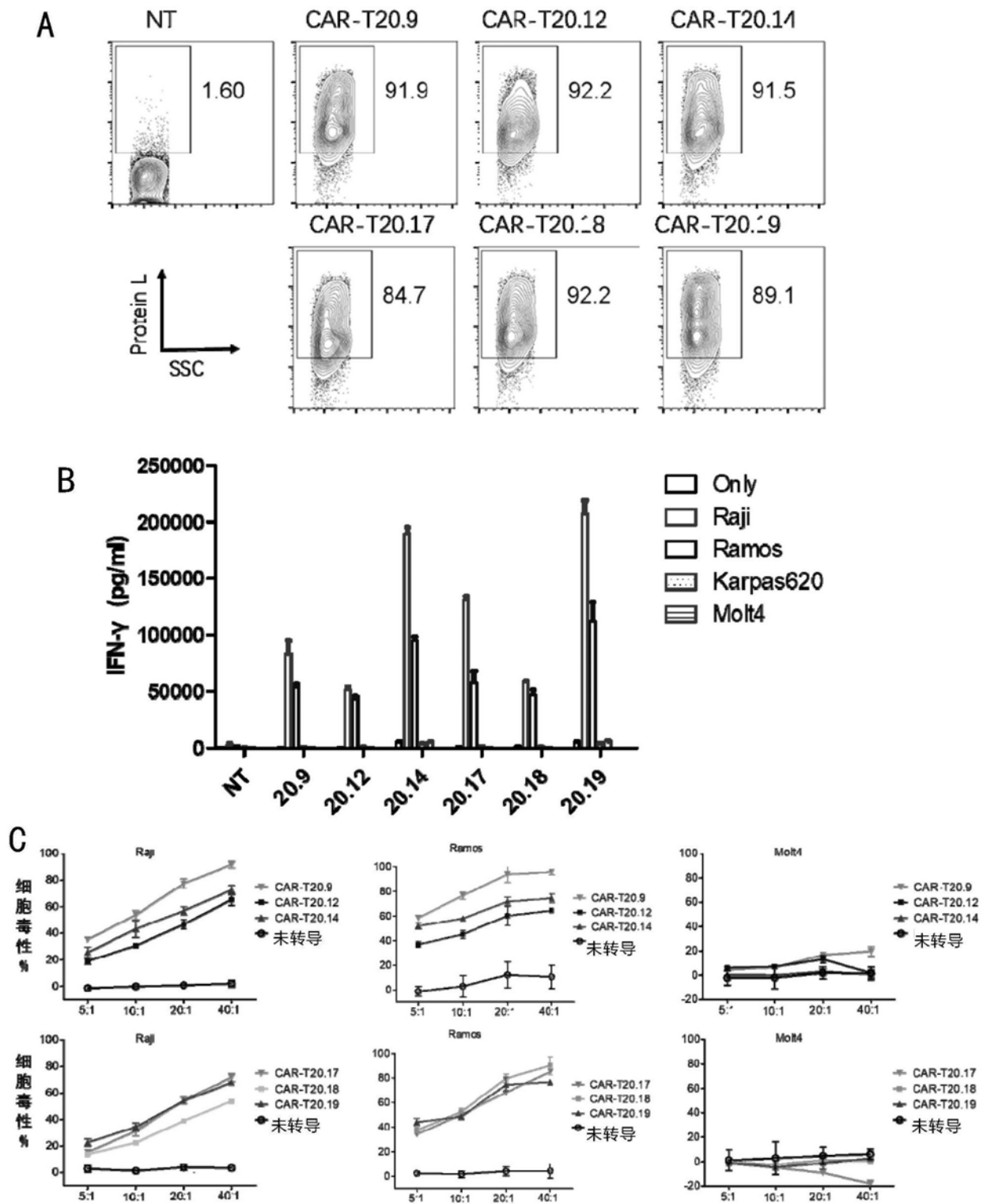


图10

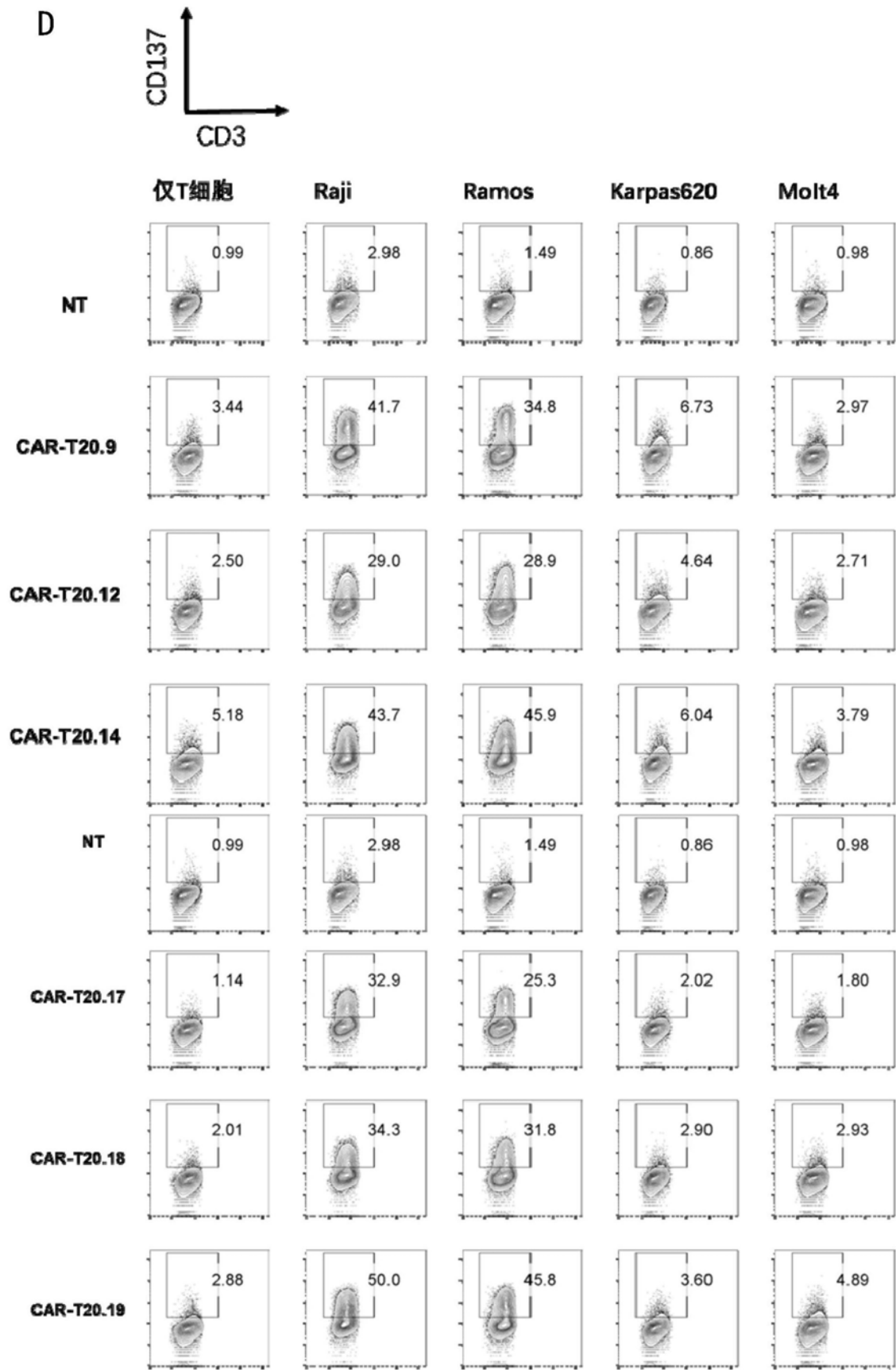


图10(续)

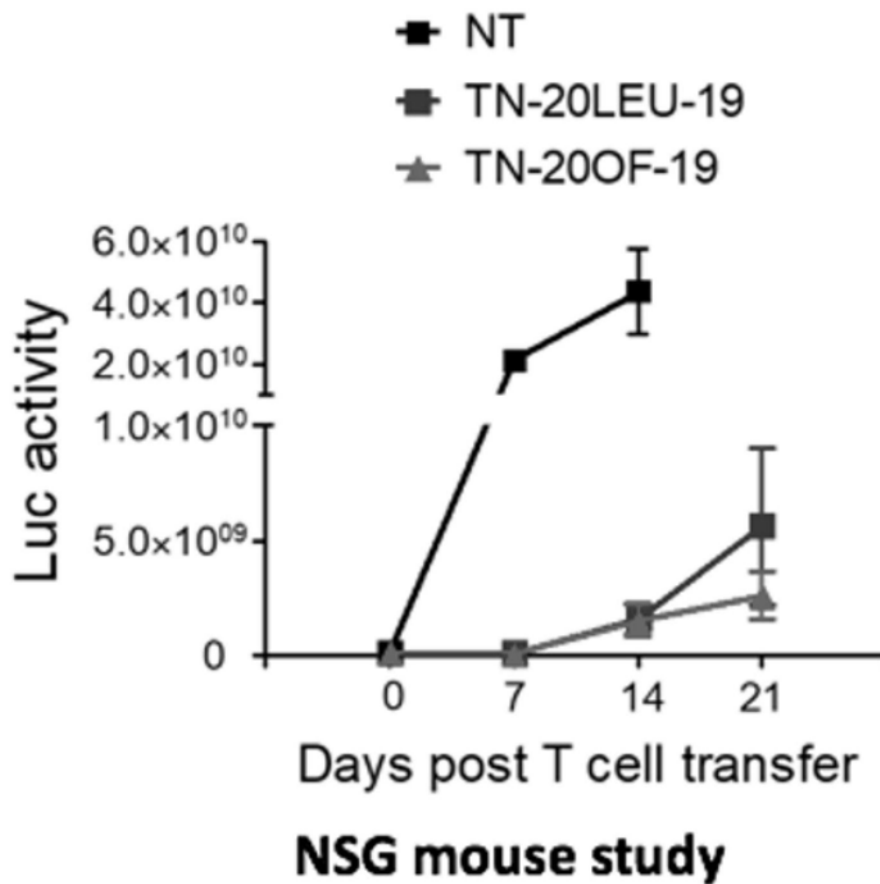


图11

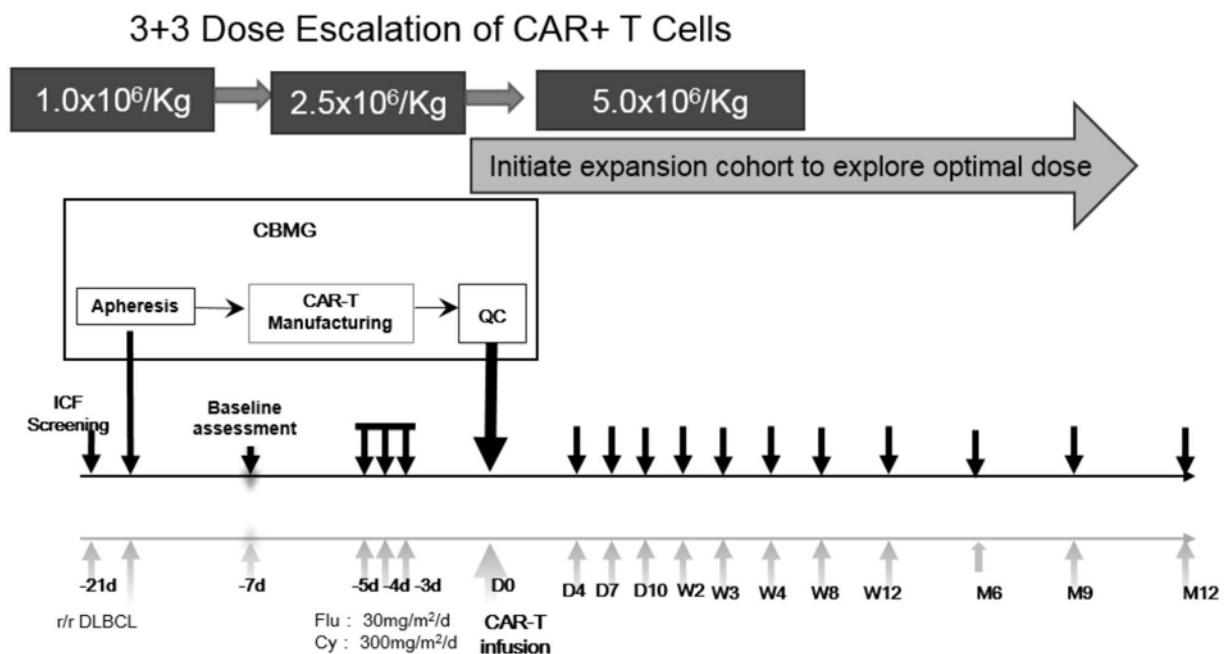


图12

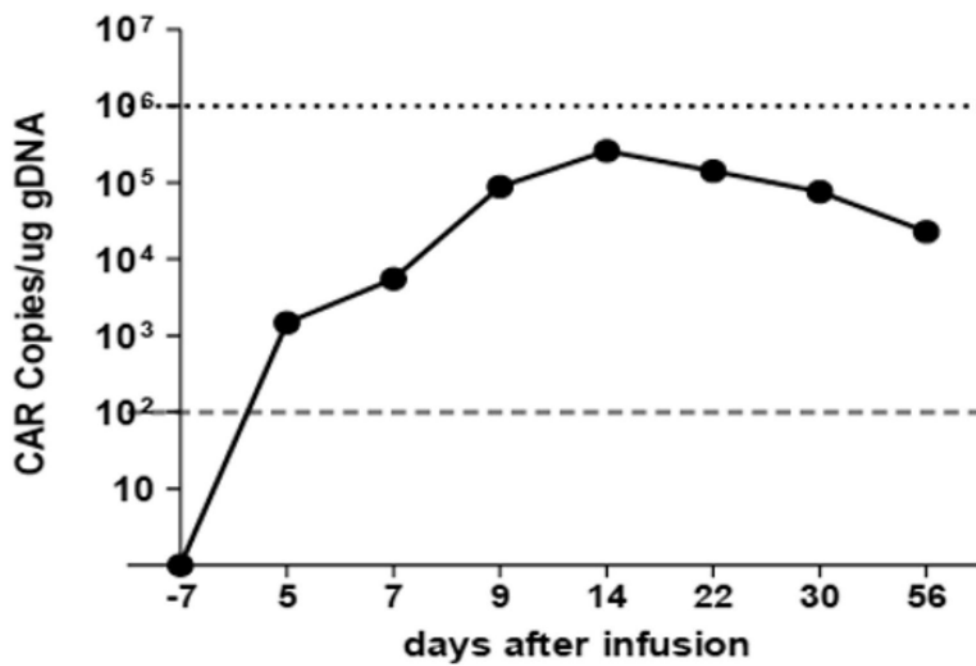
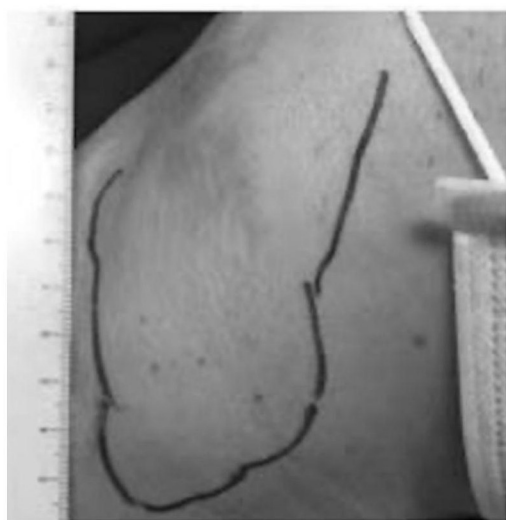


图13

Tumor size decreasing



Baseline



4w after infusion

图14