



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108395482 B

(45) 授权公告日 2021.02.05

(21) 申请号 201710069569.7

(22) 申请日 2017.02.08

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108395482 A

(43) 申请公布日 2018.08.14

(73) 专利权人 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 黄家琪 朱恃贵 朱蔚  
姚昕 李志远 张丽 朱琳  
马安云 魏雨恬 李延峰 王庆霞  
何佳平

(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 陈详 刘妍珺

(51) Int.Cl.

*C07K 19/00* (2006.01)

*C12N 15/62* (2006.01)

*C12N 5/10* (2006.01)

*C12N 15/867* (2006.01)

*A61K 35/17* (2015.01)

*A61P 35/00* (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101544694 A, 2009.09.30

CN 106279434 A, 2017.01.04

RUFENER, G.A.等.Preserved Activity of  
CD20-Specific Chimeric Antigen Receptor-  
Expressing T cells in the Presence of  
Rituximab.《Cancer Immunol Res.》.2016,第4  
卷(第6期),

审查员 王翔宇

权利要求书1页 说明书23页

序列表26页 附图4页

(54) 发明名称

一种靶向CD20抗原嵌合抗原受体的构建及  
其工程化T细胞的活性鉴定

(57) 摘要

本发明公开了一种靶向CD20抗原嵌合抗原  
受体的构建及其工程化T细胞的活性鉴定,具体  
地本发明提供了一种CD20靶向性的嵌合抗原受  
体及其制法和应用,所述嵌合抗原受体的细胞外  
抗原结合结构域包括SEQ ID NO.7或9或33所示  
的抗体重链可变区,和SEQ ID NO.11或13或35所  
示的抗体轻链可变区。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。

1. 一种嵌合抗原受体 (CAR), 其特征在于, 所述嵌合抗原受体的抗原结合结构域包括 SEQ ID NO: 7所示的抗体重链可变区, 和SEQ ID NO: 11所示的抗体轻链可变区;

并且所述嵌合抗原受体的结构如下式所示:

$$L-V_H-V_L-H-TM-CS-CD3\zeta$$

其中,

L为任选的引导序列, 即信号肽序列;

H为绞链区;

TM为跨膜结构域;

CS为源于4-1BB和/或CD28的共刺激分子;

CD3 $\zeta$ 为源于CD3 $\zeta$ 的胞浆信号传导序列;

V<sub>H</sub>为抗体重链可变区; V<sub>L</sub>为抗体轻链可变区; “-”为连接肽或肽键;

其中所述嵌合抗原受体的序列如SEQ ID NO: 1、5或31所示。

2. 如权利要求1所述的嵌合抗原受体, 其特征在于, 所述嵌合抗原受体的序列如SEQ ID NO: 5所示。

3. 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 (CAR)。

4. 如权利要求3所述的核酸分子, 其特征在于, 所述核酸分子的核酸序列如SEQ ID NO: 2、32、或6所示。

5. 一种载体, 其特征在于, 所述的载体含有权利要求3所述的核酸分子。

6. 一种宿主细胞, 其特征在于, 所述的宿主细胞中含有权利要求5所述的所述的载体或染色体中整合有外源的权利要求3所述的核酸分子。

7. 如权利要求6所述的宿主细胞, 其特征在于, 所述细胞为T细胞。

8. 一种药物组合物, 其特征在于, 所述组合物含有药学上可接受的载体以及权利要求1所述的嵌合抗原受体、权利要求3所述的核酸分子、权利要求5所述的载体、或权利要求6所述的细胞。

9. 权利要求1所述的嵌合抗原受体、权利要求3所述的核酸分子、权利要求5所述的载体、或权利要求6所述的细胞的用途, 用于制备治疗肿瘤的药物或制剂。

10. 如权利要求9所述的用途, 其特征在于, 所述的肿瘤包括CD20阳性肿瘤。

11. 一种制备CAR-T细胞的方法, 其特征在于, 所述CAR-T细胞表达权利要求1所述的嵌合抗原受体,

所述方法包括步骤: 将权利要求3所述的核酸分子或权利要求5所述的载体转导入T细胞内, 从而获得所述CAR-T细胞。

## 一种靶向CD20抗原嵌合抗原受体的构建及其工程化T细胞的活性鉴定

### 技术领域

[0001] 本发明提供了一种靶向CD20抗原嵌合抗原受体的序列组分,及其修饰T细胞(CART20)的制备方法和活性鉴定;本发明鉴定出了一种治疗CD20阳性B细胞淋巴瘤的嵌合性抗原受体结构。

### 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。这其中,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。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。因此,迫切需要筛选出靶向除CD19之外的B细胞淋巴瘤相关抗原的CART结构,来治疗恶性淋巴瘤患者。

[0004] 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。因此,CD20是理想的B细胞恶性肿瘤免疫治疗的靶点。

[0005] Rituximab(MabThera®, Rituxan®)是第一个经美国FDA和欧洲EMA批准的用于治疗惰性淋巴瘤的第一代靶向CD20的嵌合性单克隆抗体。Rituximab识别并结合CD20胞外区的大环结构,只要通过ADCC介导的杀伤作用对肿瘤细胞杀伤。然而,Rituximab的单独使用活性有限且反应持续时间较短,但与化疗联合使用可显著增强化疗的疗效。Rituximab用于淋巴瘤的治疗,半数的病人有完全(CR)或部分(PR)的反应。

[0006] Ofatumumab(Arzerra®)是第一个全人源的CD20治疗性抗体。与Rituximab不同,Ofatumumab识别的表位包含CD20大环和小环的各一部分;同时,Ofatumumab的肿瘤杀伤方式主要是通过补体依赖的途径,其次是ADCC依赖的肿瘤杀伤作用。

[0007] Obinutuzumab(Gazyvaro®, Gazyva®)是一种人源化的,通过降低岩藻糖基化水平和优化Fc $\gamma$ RIIIa亲和力的II型CD20抗体。Obinutuzumab识别并结合CD20胞外分子的大环部分,主要通过ADCC作用介导肿瘤的杀伤作用,同时,Obinutuzumab与CD20分子的结合还具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用。Obinutuzumab对Rituximab治疗无效的NHL与氮芥类药物bendamustine联合用药,三期临床试验发现Obinutuzumab与bendamustine联合用药比

bendamustine单独用药的无恶化时间长一倍, (前者是29个月, 后者是14个月)。Obinutuzumab在治疗CLL时, 总有效率(ORR, 包括CR和PR)达到77.3%, Rituximab是65.7%。

[0008] 相比于治疗性抗体而言, 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。尽管这些年开发了如上所言的很多治疗性抗体, 但其临床治疗效果均没有达到类似CART19同样水平的治疗效果。因此, 开发出靶向CD20的CART疗法具有极大的市场价值和社会意义。

## 发明内容

[0009] 鉴于靶向CD20治疗性抗体在亲和力、杀伤机制的不同, 我们利用不同抗体的抗原结合区域的DNA序列构建靶向CD20的系列嵌合性抗原受体, 并完成了这些嵌合性抗原受体工程化T细胞体外抗肿瘤活性的鉴定及差异比较, 为临床应用CAR-T治疗CD20阳性的白血病和淋巴瘤提供了新的, 有效方法和制剂。

[0010] 本发明的目的是提供一种CD20靶向性的嵌合抗原受体及其制法和应用。

[0011] 本发明涉及靶向CD20嵌合抗原受体结构的构建、靶向CD20嵌合抗原受体工程化T细胞的制备方法及其活性鉴定。

[0012] 本发明的第一方面, 提供了一种嵌合抗原受体(CAR) (序列), 所述嵌合抗原受体的抗原结合结构域(即, scFv)包括SEQ ID NO.7或9或33所示的抗体重链可变区, 和SEQ ID NO.11或13或35所示的抗体轻链可变区。

[0013] 在另一优选例中, 所述嵌合抗原受体的抗原结合结构域如下式所示:

[0014]  $V_H-V_L$

[0015] 其中,  $V_H$ 为抗体重链可变区;  $V_L$ 为抗体轻链可变区; “-”为连接肽或肽键。

[0016] 在另一优选例中, 所述连接肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.15所示。

[0017] 在另一优选例中,  $V_H$ 的氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示, 且 $V_L$ 的氨基酸序列如SEQ ID NO.11所示。

[0018] 在另一优选例中,  $V_H$ 的氨基酸序列如SEQ ID NO.9所示, 且 $V_L$ 的氨基酸序列如SEQ ID NO.13所示。

[0019] 在另一优选例中,  $V_H$ 的氨基酸序列如SEQ ID NO.33所示, 且 $V_L$ 的氨基酸序列如SEQ ID NO.35所示。

[0020] 在另一优选例中, 所述嵌合抗原受体的结构如下式所示:

[0021]  $L-V_H-V_L-H-TM-CS-CD3\zeta$

[0022] 其中,

[0023] L为任选的引导序列(Leader sequence, 即信号肽序列);

[0024] H为绞链区;

[0025] TM为跨膜结构域;

[0026] CS为为源于4-1BB和/或CD28的共刺激分子;

[0027]  $CD3\zeta$ 为源于 $CD3\zeta$ 的胞浆信号传导序列;

- [0028]  $V_H$ 、 $V_L$ 和“—”分别如上所述。
- [0029] 在另一优选例中,L的序列如SEQ ID NO.27所示。
- [0030] 在另一优选例中,H的序列如SEQ ID NO.17或19所示。
- [0031] 在另一优选例中,TM的序列包括源于CD8a的跨膜区或CD28的跨膜区,优选地TM的序列如SEQ ID NO.21或37所示。
- [0032] 在另一优选例中,所述CS结构为:CD28-4-1BB,其中CD28为源于CD28的共刺激分子;4-1BB为源于4-1BB的共刺激分子。
- [0033] 在另一优选例中,源于4-1BB的共刺激分子的序列如SEQ ID NO.23所示。
- [0034] 在另一优选例中,源于CD28的共刺激分子的序列如SEQ ID NO.39所示。
- [0035] 在另一优选例中,CD3 $\zeta$ 的序列如SEQ ID NO.25所示。
- [0036] 在另一优选例中,所述嵌合抗原受体的序列如SEQ ID NO.1、3、5、29、31所示。
- [0037] 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(CAR)。
- [0038] 在另一优选例中,所述核酸分子包含选自下组的编码所述较链区核酸序列:
- [0039] (a) 编码如SEQ ID NO.17或19所示多肽的多核苷酸;
- [0040] (b) 序列如SEQ ID NO.18或20所示的多核苷酸;
- [0041] (c) 核苷酸序列与SEQ ID NO.18或20所示序列的同源性 $\geq 90\%$ (较佳地 $\geq 95\%$ ),并且编码SEQ ID NO.17或19所示氨基酸序列的多核苷酸;
- [0042] (d) 与(a)-(c)任一所述的多核苷酸互补的多核苷酸。
- [0043] 在另一优选例中,所述核酸分子包含选自下组的编码所述CD8a的跨膜区的核酸序列:
- [0044] (a) 编码如SEQ ID NO.21所示多肽的多核苷酸;
- [0045] (b) 序列如SEQ ID NO.22所示的多核苷酸;
- [0046] (c) 核苷酸序列与SEQ ID NO.22所示序列的同源性 $\geq 90\%$ (较佳地 $\geq 95\%$ ),并且编码SEQ ID NO.21所示氨基酸序列的多核苷酸;
- [0047] (d) 与(a)-(c)任一所述的多核苷酸互补的多核苷酸。
- [0048] 在另一优选例中,所述核酸分子包含选自下组的编码所述4-1BB(CD137)的胞内信号结构域的核酸序列:
- [0049] (a) 编码如SEQ ID NO.23所示多肽的多核苷酸;
- [0050] (b) 序列如SEQ ID NO.24所示的多核苷酸;
- [0051] (c) 核苷酸序列与SEQ ID NO.24所示序列的同源性 $\geq 90\%$ (较佳地 $\geq 95\%$ ),并且编码SEQ ID NO.23所示氨基酸序列的多核苷酸;
- [0052] (d) 与(a)-(c)任一所述的多核苷酸互补的多核苷酸。
- [0053] 在另一优选例中,所述酸分子包含选自下组的编码所述CD28的胞内信号结构域的核酸序列:
- [0054] (a) 编码如SEQ ID NO.39所示多肽的多核苷酸;
- [0055] (b) 序列如SEQ ID NO.40所示的多核苷酸;
- [0056] (c) 核苷酸序列与SEQ ID NO.40所示序列的同源性 $\geq 90\%$ (较佳地 $\geq 95\%$ ),并且编码SEQ ID NO.39所示氨基酸序列的多核苷酸;

- [0057] (d) 与(a)-(c)任一所述的多核苷酸互补的多核苷酸。
- [0058] 在另一优选例中,所述核酸分子包含选自下组的编码所述CD3 $\zeta$ 的胞内信号结构域的核酸序列:
- [0059] (a) 编码如SEQ ID NO.25所示多肽的多核苷酸;
- [0060] (b) 序列如SEQ ID NO.26所示的多核苷酸;
- [0061] (c) 核苷酸序列与SEQ ID NO.26所示序列的同源性 $\geq 90\%$  (较佳地 $\geq 95\%$ ),并且编码SEQ ID NO.25所示氨基酸序列的多核苷酸;
- [0062] (d) 与(a)-(c)任一所述的多核苷酸互补的多核苷酸。
- [0063] 在另一优选例中,所述核酸分子包含选自下组的核酸序列:
- [0064] (a) 编码如SEQ ID NO.1、35、29或31所示多肽的多核苷酸;
- [0065] (b) 序列如SEQ ID NO.2、4、6、30或32所示的多核苷酸;
- [0066] (c) 核苷酸序列与SEQ ID NO.2、4、6、30或32所示序列的同源性 $\geq 95\%$  (较佳地 $\geq 98\%$ ),并且编码SEQ ID NO.1、35、29或31所示氨基酸序列的多核苷酸;
- [0067] (d) 与(a)-(c)任一所述的多核苷酸互补的多核苷酸。
- [0068] 在另一优选例中,所述核酸分子为分离的。
- [0069] 在另一优选例中,所述核酸分子还包括编码前导序列(引导序列,信号肽)的多核苷酸,所述前导序列的氨基酸序列如SEQ ID NO.27所示;优选地所述编码前导序列(信号肽)的多核苷酸如SEQ ID NO.28所示。
- [0070] 在另一优选例中,所述核酸分子的序列如SEQ ID NO.2、46、30或32所示。
- [0071] 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。
- [0072] 在另一优选例中,所述载体为慢病毒载体。
- [0073] 本发明的第四方面,提供了一种宿主细胞,所述的宿主细胞中含有本发明第三方面所述的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。
- [0074] 在另一优选例中,所述细胞为分离的细胞,和/或所述细胞为基因工程化的细胞。
- [0075] 在另一优选例中,所述细胞为哺乳动物细胞。
- [0076] 在另一优选例中,所述细胞为T细胞。
- [0077] 本发明的第五方面,提供了一种药物组合物,所述组合物含有药学上可接受的载体以及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细胞。
- [0078] 本发明的第六方面,提供了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细胞的用途,用于制备治疗肿瘤的药物或制剂。
- [0079] 在另一优选例中,所述的肿瘤包括CD20阳性肿瘤。
- [0080] 本发明的第七方面,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细胞、或本发明第五方面所述的药物组合物。
- [0081] 在另一优选例中,所述疾病为肿瘤。
- [0082] 本发明的第八方面,提供了一种制备CAR-T细胞(CAR-修饰的T细胞)的方法,所述

CAR-T细胞表达本发明第一方面所述的嵌合抗原受体，

[0083] 所述方法包括步骤：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。

[0084] 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

[0085] 图1. 靶向CD20嵌合型抗原受体结构图。所设计CAR结构各元件如图所示，所列元件包括：前导序列、抗原识别序列(Ofatumumab, Obinutuzumab, Rituximab)、铰链区、跨膜区、共刺激因子信号区和CD3zeta信号传导区。其中，CAR-T20.14, CAR-T20.13和CAR-T20.16分别是基于Ofatumumab, Obinutuzumab和Rituximab抗体可变区序列为基础构建的CAR结构；而CAR-T20.19和CAR-T20.20是CAR-T20.14在IgG4Hinge-CH2-CH3连接区的L235E-N297Q突变形式；CAR-T20.20又是同时带有CD28和4-1BB共刺激信号分子编码序列的三代嵌合抗原受体结构。

[0086] 图2. 靶向CD20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(A)和第11天(B)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。

[0087] 图3. 依次取 $1 \times 10^5$ 培养到第6天的NT, CART-20.13, CART-20.14及CAR-T20.16细胞，分别与CD20阳性的RAJI和RAMOS肿瘤细胞系，以及CD20阴性的MOLT-4肿瘤细胞系，在200 $\mu$ l GT-551培养基中按照1:1比例共培养18h后检测T细胞膜表面CD137的表达水平(A)和共培养上清中IFN $\gamma$ 的分泌水平(B)。

[0088] 图4. CART-20诱导肿瘤细胞凋亡水平的检测。分别取 $1 \times 10^4$ 经过CFSE标记的CD20阴性(MOLT-4)或CD20阳性的(RAJI, RAMOS)肿瘤细胞系，在200 $\mu$ l GT-551培养基中按照图示比例分别与培养到第11天的NT, CART-20.13, CART-20.14及CAR-T20.16细胞共培养4h后离心收集细胞沉淀，细胞经PBS洗两遍后用Annexin V-APC染料按1:50的比例100 $\mu$ l染液中染色30min, PBS洗1遍后在流式细胞仪上分析CFSE阳性细胞中Annexin V阳性细胞的比例。图示结果显示了Annexin V阳性细胞在相应共培养样品中的统计分析结果。

[0089] 图5. 以Ofatumumab抗体序列为基础构建的铰链区突变嵌合抗原受体和三代嵌合抗原受体体外活化能力的鉴定。Protein L方法检测培养到第7天的CAR-T20.14, CAR-T20.19和CAR-T20.20中CAR基因编码蛋白在T细胞膜表面的表达水平(A)；依次取 $1 \times 10^5$ 培养到第7天的NT, CART-20.14, CART-20.19及CAR-T20.20细胞，分别与K562, CD19单阳、CD20单阳、CD19和CD20双阳的K562稳转株细胞，以及RAJI靶细胞按照1:1比例，在200 $\mu$ l GT-551培养基中培养18h后分别检测T细胞膜表面CD137的表达水平(B)和培养上清中IFN $\gamma$ 的分泌水平(C)。

### 具体实施方式

[0090] 本发明人通过广泛而深入的研究，获得一种CD20靶向性的嵌合抗原受体及其制法和应用，所述嵌合抗原受体的细胞外抗原结合结构域包括SEQ ID NO.1所示的抗体重链可

变区和SEQ ID NO.2所示的抗体轻链可变区。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。

[0091] 鉴于靶向CD20治疗性抗体亲和力、杀伤机制等方面的不同,以及不同的跨膜结构域、胞内结构域对嵌合抗原受体活性的显著影响,在本发明中,利用多种抗CD20抗体可变区氨基酸序列构结合不同的跨膜和胞内部分,建了靶向CD20的系列嵌合性抗原受体,并完成了这类嵌合性抗原受体在原代T细胞中的表达,建立了受体表达强度的检测方法,鉴定了这些CAR-T细胞体外、体内识别CD20抗原的能力,及其体外杀伤和体内清除携带CD20抗原的恶性肿瘤的活性差异,为临床应用CAR-T治疗CD20阳性的白血病和淋巴瘤提供了新的有效方法和制剂。

[0092] 嵌合抗原受体

[0093] 本发明提供了包括细胞外结构域、跨膜结构域、和细胞内结构域的嵌合抗原受体(CAR)。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 $\zeta$ 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。

[0094] 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。

[0095] 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CD20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 $\zeta$ 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/或CD28信号传导结构域、和CD3 $\zeta$ 信号结构域组合的细胞内结构域融合。

[0096] 在一个实施方式中,本发明的CD20靶向性CAR包括本发明特定信号传导结构域(CD8的跨膜区、CD137和CD3 $\zeta$ 的胞内信号结构域串联而成)。与其他方式的CD20靶向性CAR相比,本发明的信号传导结构域显著增加了抗肿瘤活性和CAR-T细胞的体内持久性。

[0097] 在本发明的一个较佳的实施方式中,本发明提供的嵌合抗原受体(CAR)的氨基酸序列如下:

[0098] CAR-T20.13 (SEQ ID NO.29)

MALPVTALLL PLALLLHAAR PQVQLVQSGA EVKPKGSSVK VSCKASGYAF SYSWINWVRQ 60  
 APGQGLEWMG RIFPGDGD TD YNGKFKGRVT ITADKSTSTA YMELSSLRSE DTAVYYCARN 120  
 VFDGYWLVIYW GQGLTVTVSS GGGGSGGGGS GGGGSDIVMT QTPLSLPVTP GEPASISCRS 180  
 SKSLLHSNGI TYLYWYLQKP GQSPQLLIYQ MSNLVSGVPD RFSGSGSGTD FTLKISRVEA 240  
 EDVGVYYCAQ NLELPYTFGG GTKVEIKRTV ESKYPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK 300  
 [0099] DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV 360  
 LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL 420  
 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFCSSVM 480  
 HEALHNHYTQ KSLSLSLGKI YIWAPLAGTC GVLLLSLVIT LYCKRGRKKL LYIFKQPFMR 540  
 PVQTTQEEDG CSCRFPEEEE GGCELRVKFS RSADAPAYKQ GQNQLYNELN LGRREEYDVL 600  
 DKRRGRDPEM GKGPRRKNPQ EGLYNELQKD KMAEAYSEIG MKGERRRGKG HDGLYQGLST 660  
 ATKDITYDALH MQALPPR 677

[0100] CAR-T20.13的编码DNA序列 (SEQ ID NO.30) 如下:

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg cegetggcct tgetgctcca cgccgccagg 60  
 ccgcaggtgc aattggtgca gtctggcgct gaagttaaga agcctgggag ttcagtgaag 120  
 gtctcctgca aggcttccgg atacgccttc agctattctt ggatcaattg ggtgcggcag 180  
 gcgcctggac aagggtcga gtggatggga cggatcttcc cgggcgatgg ggatactgac 240  
 tacaatggga aattcaaggc cagagtcaca attaccgccg acaaatccac tagcacagcc 300  
 tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg tgtattactg tgcaagaaat 360  
 gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa ccttggtcac cgtctcctca 420  
 [0101] ggtggcgggtg gctcgggcgg tgggtgggtcg ggtggcggcg gatctgatat cgtgatgacc 480  
 cagactccac tctccctgcc cgtcaccctt ggagagcccc ccagcattag ctgcaggtct 540  
 agcaagagcc tcttgacacag caatggcatc acttatttgt attggtacct gcaaaagcca 600  
 gggcagcttc cacagctcct gatttatcaa atgtccaacc ttgtctctgg cgtccctgac 660  
 cggttctccg gctccgggtc aggcactgat ttcacactga aatcagcag ggtggaggct 720  
 gaggatggtg gagtttatta ctgcgctcag aatctagaac ttccttacac cttcggcgga 780  
 gggaccaagg tggagatcaa acgtacgggtg gagagcaagt acggaccgcc ctgccccct 840  
 tgccctgccc ccgagttcct gggcgggacc agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag 900  
 gacaccctga tgatcagccg gacccccgag gtgacctgcg tgggtggtgga cgtgagccag 960

gaagatcccg aggtccagtt caattggtac gtggacggcg tggaaagtgca caacgcccaag 1020  
 accaagccca gagaggaaca gttcaacagc acctaccggg tgggtgtctgt gctgaccgtg 1080  
 ctgcaccagg actggctgaa cggcaaagaa tacaagtgca aggtgtccaa caagggcctg 1140  
 cccagcagca tcgaaaagac catcagcaag gccaaaggcc agcctcgcga gccccaggtg 1200  
 tacaccctgc ctccctccca ggaagagatg accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg 1260  
 gtgaagggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaacgg ccagcctgag 1320  
 aacaactaca agaccacccc tcccgtgctg gacagcgacg gcagcttctt cctgtacage 1380  
 cggctgaccg tggacaagag ccgggtggcag gaaggcaacg tcttttagctg cagcgtgatg 1440  
 cagcaggccc tgcacaacca ctacaccag aagagcctga gcctgtccct gggcaagatc 1500  
 [0102] tacatctggg cgcccttggc cgggacttgt ggggtcctt cctgtcact ggttatcacc 1560  
 ctttactgca aacggggcag aaagaaactc ctgtatata tcaaacaacc atttatgaga 1620  
 ccagtacaaa ctactcaaga ggaagatggc tgtagctgcc gatttccaga agaagaagaa 1680  
 ggaggatgtg aactgagagt gaagttcagc aggagcgcag acgccccgc gtacaagcag 1740  
 ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 1800  
 gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 1860  
 gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg 1920  
 atgaaaggcg agcgcgggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca 1980  
 gccaccaagg acacctacga cgcccttca atgcaggccc tgccccctcg ctag 2034

[0103] CAR-T20.14 (SEQ ID NO.1) :

MALPVTALLL PLALLLHAAR PEVQLVESGG GLVQPGRSLR LSCAASGFTF NDYAMHWVRQ 60  
 APGKGLEWVS TISWNSGSIG YADSVKGRFT ISRDNAKSL YLQMNSLRAE DTALYYCAKD 120  
 IQYGNYYYGM DVWQGTTVT VSSGGGSGG GSGGGGSEI VLTQSPATLS LSPGERATLS 180  
 CRASQSVSSY LAWYQQKPGQ APRLLIYDAS NRATGIPARF SSGSGTDFD LTISSLEPED 240  
 FAVYYCQRS NWPIITFGQT RLEIKESKYG PPCPPCAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI 300  
 [0104] SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW 360  
 LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY 420  
 PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH 480  
 NHYTQKSLSL SLGKIYIWAP LAGTCGVLLL SLVITLYCKR GRKKLLYIFK QPFMRPVQTT 540  
 QEEDGCSCRF PEEEEGGCEL RVKFSRSADA PAYKQQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG 600  
 RDPENGGKPR RKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGDGLY QGLSTATKDT 660  
 YDALHMQUALP PR 672

[0105] CAR-T20.14的编码DNA序列 (SEQ ID NO.2) 如下:

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgetgctcca cgccgccagg 60  
 ccggaagtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtac agcctggcag gtccttgaga 120  
 ctctcctgtg cagcctctgg attcaccctt aatgattatg ccatgcactg ggtccggcaa 180  
 gctccaggga agggcctgga gtgggtctca actattagtt ggaatagtgg ttccataggc 240  
 tatgcgact ctgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaacgcaa gaagtccctg 300  
 [0106] tatctgcaaa tgaacagtct gagagctgag gacacggcct tgtattactg tgcaaaagat 360  
 atacagtacg gcaactacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 420  
 gtctcctcag gtggcggtgg ctcgggcggt ggtgggtcgg gtggcggcgg atctgaaatt 480  
 gtgttgacac agtctccagc caccctgtct ttgtctccag gggaaagagc caccctctcc 540  
 tgcagggcca gtcagagtgt tagcagctac ttagcctggt accaacagaa acctggccag 600  
 gctcccaggc tctcatcta tgatgcatcc aacagggcca ctggcatccc agccaggttc 660  
 agtggcagtg ggtctgggac agacttcaact ctcacatca gcagcctaga gcctgaagat 720

ttgagcagttt attactgtca gcagcgtagc aactggcccga tcaccttcgg ccaagggaca 780  
 cgactggaga ttaaagagag caagtacgga ccgccctgcc ccccttgccc tgcccccgag 840  
 ttcttgggcg gaccagcgt gtctctgttc ccccccaagc ccaaggacac cctgatgate 900  
 agccggaccc ccgaggtgac ctgctgtggt gtggacgtga gccaggaaga tcccagagtc 960  
 cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtgga gtgcacaacg ccaagaccaa gcccagagag 1020  
 gaacagttca acagcaccta ccgggtggtg tctgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg 1080  
 ctgaacggca aagaatacaa gtgcaaggtg tccaacaagg gcctgcccag cagcatcgaa 1140  
 aagaccatca gcaaggccaa gggccagcct cgcgagcccc aggtgtacac cctgcctccc 1200  
 tcccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg tccctgacct gcctggtgaa gggcttctac 1260  
 cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aacggccagc ctgagaacaa ctacaagacc 1320  
 [0107] acccctcccg tgctggacag cgacggcagc ttcttctgt acagccggct gaccgtggac 1380  
 aagagccggt ggcaggaagg caacgtcttt agctgcagcg tgatgcacga ggccctgcac 1440  
 aaccactaca cccagaagag cctgagcctg tccctgggca agatctacat ctgggcgccc 1500  
 ttggccggga cttgtggggt ctttctctg tcaactggta tcacccttta ctgcaaacgg 1560  
 ggcagaaaga aactcctgta tatattcaa caaccattta tgagaccagt acaactact 1620  
 caagaggaag atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg 1680  
 agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc 1740  
 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc 1800  
 cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 1860  
 gaactgcaga aagataagat ggcgaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 1920  
 cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 1980  
 tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgctag 2019

[0108] CAR-T20.16 (SEQ ID NO.3)

MALPVTALLL PLALLLHAAR PQVQLQQPGA ELVKPGASVK MSCKASGYTF TSYNMHWVKQ 60  
 TPGRGLEWIG AIYPGNGDTS YNQKFKGKAT LTADKSSSTA YMLSSLTSE DSAVYYCARS 120  
 TYYGGDWYFN VWGAGTTVTV SAGGGGSGGG GSGGGGSQIV LSQSPAILSA SPGEKVTMTC 180  
 RASSSVSYIH WFQQKPGSSP KPWIYATSNL ASGVPVRFSG SSGGTSYSLT ISRVEAEDAA 240  
 TYYCQQWTSN PPTFGGGTKL EIKESKYGPP CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR 300  
 [0109] TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN 360  
 GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS 420  
 DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNH 480  
 YTQKSLSLSL GKIYIWAPLA GTCGVLLLSL VITLYCKRGR KLLYIFKQP FMRPVQTTQE 540  
 EDGCSCRFPE EEEGGCELRV KFSRSADAPA YKQQNQLYN ELNLGRREEY DVLDKRRGRD 600  
 PEMGGKPRRK NPQEGLYNEL QKDKMAEAYS EIGMKGERRR GKGDGLYQG LSTATKDTYD 660  
 ALHMQUALPPR 670

[0110] CAR-T20.16的编码DNA序列 (SEQ ID NO.4) 如下:

ATGGCCTTAC CAGTGACCGC CTTGCTCCTG CCGCTGGCCT TGCTGCTCCA CGCCGCCAGG 60  
 CCGCAGGTGC AGTTGCAACA GCCTGGAGCT GAGTTGGTGA AGCCTGGTGC TTCTGTGAAG 120  
 ATGTCTTGTA AGGCTTCTGG ATACACATTC ACTTCTTACA ACATGCACTG GGTGAAGCAG 180  
 [0111] ACTCCTGGTA GGGGTTTGA GTGGATCGGA GCTATCTACC CAGGAAACGG AGACACATCT 240  
 TACAACCAGA AGTTCAAGGG TAAGGCTACA TTGACTGCTG ACAAGTCTTC ATCTACTGCT 300  
 TACATGCAAT TGTCTTCTTT GACATCTGAG GACTCTGCAG TTTACTACTG CGCTAGGTCT 360  
 ACATACTACG GAGGTGACTG GTACTTCAAC GTGTGGGGAG CAGGTACCAC GGTCACTGTC 420  
 TCTGCAGGTG GAGGTGGATC TGGAGGAGGA GGATCTGGTG GAGGAGGTTT TCAAATTGTT 480

CTCTCCCAGT CTCCAGCAAT CCTGTCAGCT TCTCCTGGAG AGAAGGTGAC TATGACTTGC 540  
 AGGGCTTCTT CATCTGTTTC TTACATCCAC TGGTTCACGC AGAAGCCTGG TTCTTCACCT 600  
 AAGCCTTGGA TCTACGCTAC ATCTAACTTG GCATCTGGAG TGCCTGTGAG GTTCTCTGGT 660  
 TCTGGTTCAG GTRACTTCTTA CTCTTTGACA ATCTCTAGGG TGGAGGCTGA GGACGCTGCT 720  
 ACTTACTACT GCCAGCAGTG GACATCTAAC CCTCCAACAT TCGGAGGTGG TACTAAGTTG 780  
 GAGATCAAGG AGAGCAAGTA CGGACCGCCC TGCCCCCCTT GCCCTGCCCC CGAGTTCCTG 840  
 GGGCGACCCA GCGTGTTCCT GTTCCCCCCC AAGCCCAAGG ACACCCTGAT GATCAGCCGG 900  
 ACCCCCGAGG TGACCTGCGT GGTGGTGGAC GTGAGCCAGG AAGATCCCGA GGTCCAGTTC 960  
 AATTGGTACG TGGACGGCGT GGAAGTGAC AACGCCAAGA CCAAGCCCAG AGAGGAACAG 1020  
 TTCAACAGCA CCTACCGGGT GGTGTCTGTG CTGACCGTGC TGCACCAGGA CTGGCTGAAC 1080  
 GGCAAAGAAT ACAAGTGCAA GGTGTCCAAC AAGGGCCTGC CCAGCAGCAT CGAAAAGACC 1140  
 ATCAGCAAGG CCAAGGGCCA GCCTCGCGAG CCCAGGTGT ACACCCTGCC TCCCTCCAG 1200  
 [0112] GAAGAGATGA CCAAGAACCA GGTGTCCCTG ACCTGCCTGG TGAAGGGCTT CTACCCCAGC 1260  
 GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAACGGC CAGCCTGAGA ACAACTACAA GACCACCCCT 1320  
 CCCGTGCTGG ACAGCGACGG CAGCTTCTTC CTGTACAGCC GGCTGACCGT GGACAAGAGC 1380  
 CGGTGGCAGG AAGGCAACGT CTTTAGCTGC AGCGTGATGC ACGAGGCCCT GCACAACCAC 1440  
 TACACCCAGA AGAGCCTGAG CCTGTCCCTG GGCAAGATCT ACATCTGGGC GCCCTTGGCC 1500  
 GGGACTTGTG GGGTCCTTCT CCGTCACTG GTTATCACCC TTTACTGCAA ACGGGGACAG 1560  
 AAGAACTCC TGTATATATT CAAACAACCA TTTATGAGAC CAGTACAAAC TACTCAAGAG 1620  
 GAAGATGGCT GTAGCTGCCG ATTTCCAGAA GAAGAAGAAG GAGGATGTGA ACTGAGAGTG 1680  
 AAGTTCAGCA GGAGCGCAGA CGCCCCCGC TACAAGCAGG GCCAGAACCA GCTCTATAAC 1740  
 GAGCTCAATC TAGGACGAAG AGAGGAGTAC GATGTTTTGG ACAAGAGACG TGGCCGGGAC 1800  
 CCTGAGATGG GGGGAAAGCC GAGAAGGAAG AACCTCAGG AAGGCCTGTA CAATGAACTG 1860  
 CAGAAAGATA AGATGGCGGA GGCCTACAGT GAGATTGGGA TGAAAGGCGA GCGCCGGAGG 1920  
 GGCAAGGGGC ACGATGGCCT TTACCAGGGT CTCAGTACAG CCACCAAGGA CACCTACGAC 1980  
 GCCCTTACA TGCAGGCCCT GCCCCCTCGC TAG 2013

[0113] 在本发明的另一个更佳的实施方式中,本发明提供的嵌合抗原受体(CAR)的氨基酸序列如下:

[0114] CAR-T20.19 (SEQ ID NO.5)

MALPVTALLL PLALLLHAAR PEVQLVESGG GLVQPGRSLR LSCAASGFTF NDYAMHWVRQ 60  
 APGKGLEWVS TISWNSGSIG YADSVKGRFT ISRDNKKSL YLQMNSLRAE DTALYYCAKD 120  
 IQYGNYYYGM DVWQQTTVT VSSGGGSGG GSGGGGSEI VLTQSPATLS LSPGERATLS 180  
 CRASQSVSSY LAWYQQKPGQ APRLLIYDAS NRATGIPARF SGSGGTDFD LTSSLEPED 240  
 FAVYYCQQRS NWPITFGQGT RLEIKESKYG PPCPPCAPE FEGGPSVFLF PPKPKDTLMI 300  
 [0115] SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFQSTYRVV SVLTVLHQDW 360  
 LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY 420  
 PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH 480  
 NHYTQKSLSL SLGKIYIWAP LAGTCVLLL SLVITLYCKR GRKKLLYIFK QPFMRPVQTT 540  
 QEEDGCSCRF PEEEEGGCEL RVKFSRSADA PAYKQQNQL YNELNLGRRE EYDVLKRRG 600  
 RDPEMGGKPR RKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGDGLY QGLSTATKDT 660  
 YDALHMQALP PR 672

[0116] CAR-T20.19的编码DNA序列(SEQ ID NO.6)如下:

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60  
 ccggaagtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtac agcctggcag gtccctgaga 120  
 ctctcctgtg cagcctctgg attcaccctt aatgattatg ccatgcaactg ggtccggcaa 180  
 gctccaggga agggcctgga gtgggtctca actattagtt ggaatagtggt ttccataggc 240  
 tatgcggaact ctgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaacgccaa gaagtcctctg 300  
 tatctgcaaa tgaacagtct gagagctgag gacacggcct tgtattactg tgcaaaagat 360  
 atacagtacg gcaactacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 420  
 gtctcctcag gtggcggtgg ctggggcggt ggtgggtcgg gtggcgcggt atctgaaatt 480  
 gtgttgacac agtctccagc caccctgtct ttgtctccag gggaaagagc caccctctcc 540  
 tgcagggcca gtcagagtgt tagcagctac ttagcctggt accaacagaa acctggccag 600  
 gctcccaggc tcctcatcta tgatgcatcc aacagggcca ctggcatccc agccaggttc 660  
 agtggcagtg ggtctgggac agacttcaact ctaccatca gcagcctaga gcctgaagat 720  
 tttgcagttt attactgtca gcagcgtagc aactggccga tcaccttcgg ccaagggaca 780  
 cgactggaga ttaaagagag caagtacgga ccgacctgcc ccccttgccc tgcccccgag 840  
 ttcgaggcg gaccagcgt gttcctgttc ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc 900  
 agccggacc ccgaggtgac ctgctgggtg gtggacgtga gccaggaaga tcccagggtc 960  
 [0117] cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtgga gtgcacaacg ccaagaccaa gcccagagag 1020  
 gaacagttcc aaagcaccta ccgggtggtg tctgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg 1080  
 ctgaacggca aagaatacaa gtgcaaggtg tccaacaagg gcctgccag cagcatcgaa 1140  
 aagaccatca gcaaggccaa gggccagcct cgcgagcccc aggtgtacac cctgcctccc 1200  
 tcccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg tccctgacct gcctggtgaa gggcttctac 1260  
 cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aacggccagc ctgagaacaa ctacaagacc 1320  
 acccctcccg tgctggacag cgacggcagc ttcttctgt acagccggt gaccgtggac 1380  
 aagagccggt ggcaggaagg caacgtcttt agctgcagcg tgatgcacga ggccctgcac 1440  
 aaccactaca cccagaagag cctgagcctg tcctgggca agatctacat ctgggcgccc 1500  
 ttggccggga cttgtggggt ctttctcctg tcaactggtta tcaccttta ctgcaaacgg 1560  
 ggcagaaaga aactcctgta tatattcaaa caaccattta tgagaccagt acaactact 1620  
 caagaggaag atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg 1680  
 agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc 1740  
 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc 1800  
 cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 1860  
 gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 1920  
 cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 1980  
 tacgagccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgctag 2019

[0118] 在本发明的另一个最优的实施方式中,本发明提供的嵌合抗原受体(CAR)的氨基酸序列如下:

[0119] CAR-T20.20 (SEQ ID NO.31)

MALPVTALLL PLALLLHAAR PEVQLVESGG GLVQPGRSLR LSCAASGFTF NDYAMHWVRQ 60  
 APGKGLEWVS TISWNSGSIG YADSVKGRFT ISRDNKKSL YLQMNSLRAE DTALYYCAKD 120  
 IQYGNYYYGM DVWQGQTTVT VSSGGGSGG GSGGGGSEI VLTQSPATLS LSPGERATLS 180  
 [0120] CRASQSVSSY LAWYQKPGQ APRLLIYDAS NRATGIPARF SSGSGTDFD LTISSLEPED 240  
 FAVYYCQRS NWPITFGQT RLEIKESKYG PPCPPCAPE FEGGPSVFLF PPKPKDTLMI 300  
 SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFQSTYRVV SVLTVLHQDW 360

[0121] LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY 420  
 PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH 480  
 NHYTQKLSLSL SLGKFWVLVV VGGVLACYSL LVTVAFIIFW VRSKRSRLLH SDYMNMPRR 540  
 PGPTRKHYQP YAPPRDFAAY RSKRGRKLL YIFKQPFMRP VQTTQEEDGC SCRFPEEEEEG 600  
 GCELRVKFSR SADAPAYKQG QNQLYNELNL GRREEYDVL D KRRGRDPEMG GKPRRKNPQE 660  
 GLYNELQKDK MAEAYSEIGM KGERRRGKGH DGLYQGLSTA TKD TYDALHM QALPPR 716

[0122] CAR-T20.20的编码DNA序列 (SEQ ID NO.32) 如下:

atggccttac cagtgaccgc cttgetcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60  
 ccggaagtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtac agcctggcag gtccctgaga 120  
 ctctcctgtg cagcctctgg attcaccctt aatgattatg ccatgcaactg ggtccggcaa 180  
 gctccaggga agggcctgga gtgggtctca actattagtt ggaatagtggt ttccataggc 240  
 tatgctgact ctgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaacgcca gaagtcctctg 300  
 tatctgcaaa tgaacagtct gagagctgag gacacggcct tgtattactg tgcaaaagat 360  
 atacagtacg gcaactacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 420  
 gtctcctcag gtggcgggtg ctctgggcgg ggtgggtcgg gtggcggcgg atctgaaatt 480  
 gtgttgacac agtctccagc caccctgtct ttgtctccag gggaaagagc caccctctcc 540  
 tgcagggcca gtcagagtgt tagcagctac ttagcctggt accaacagaa acctggccag 600  
 gctcccaggc tcctcatcta tgatgcatcc aacagggcca ctggcatccc agccaggctc 660  
 agtggcagtg ggtctgggac agacttcaact ctaccatca gcagcctaga gcctgaagat 720  
 tttgcagttt attactgtca gcagcgtagc aactggccga tcacctcgg ccaagggaca 780  
 cgactggaga ttaaagagag caagtacgga ccgacctgcc ccccttgccc tgcccccgag 840  
 ttcgagggcg gaccagcgt gttcctgttc ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc 900  
 agccggaccc ccgaggtgac ctgctggtg gtggcagtg gccaggaaga tcccagggtc 960  
 cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtgga gtgcacaac ccaagaccaa gccagagag 1020  
 gaacagttcc aaagcaccta ccgggtggtg tctgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg 1080  
 [0123] ctgaacggca aagaatacaa gtgcaagtg tccaacaagg gcctgcccag cagcatcgaa 1140  
 aagaccatca gcaaggccaa gggccagcct cgcgagccc aggtgtacac cctgcctccc 1200  
 tcccaggaag agatgaccaa gaaccagtg tcctgacct gcctggtgaa gggcttctac 1260  
 cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aacggccagc ctgagaacaa ctacaagacc 1320  
 acccctcccg tgctggacag cgacggcagc ttcttctgt acagccggt gaccgtggac 1380  
 aagagccggt ggcaggaagg caacgtctt agctgcagcg tgatgcacga ggccctgcac 1440  
 aaccactaca cccagaagag cctgagcctg tcctgggca agttttgggt gctggtggtg 1500  
 gttggtggag tcctggcttg ctatagcttg ctagtaacag tggcctttat tattttctgg 1560  
 gtgaggagta agaggagcag gctcctgcac agtgactaca tgaacatgac tccccgccc 1620  
 cccgggcccc cccgcaagca ttaccagccc tatgccccac cacgcgactt cgcagcctat 1680  
 cgctccaaac ggggcagaaa gaaactcctg tataatattca aacaaccatt tatgagacca 1740  
 gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt agctgccgat ttccagaaga agaagaagga 1800  
 ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta caagcagggc 1860  
 cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttgac 1920  
 aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg gaaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa 1980  
 ggctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattgggatg 2040  
 aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt accagggtct cagtacagcc 2100  
 accaaggaca cctacgacgc cttcacatg caggccctgc cccctcgcta a 2151

[0124] 抗原结合结构域

[0125] 在一个实施方式中,本发明的CAR包括被称为抗原结合结构域的靶-特异性结合元

件。本发明CAR的抗原结合结构域为靶向CD20的特异性结合元件。

[0126] 在本发明的一个优选地实施方式中,所述抗原结合结构域包括抗CD20抗体的重链可变区和轻链可变区。

[0127] 在另一优选例中,所述Ofatumumaband抗体重链可变区的氨基酸序列如下:

EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFN DYAMHWVRQA PGKGLEWVST ISWNSGSIGY 60

[0128] ADSVKGRFTI SRDNAKKSly LQMNSLRAED TALYYCAKDI QYGNYYYYGMD VWGQGTTVTV 120  
SS 122 (SEQ ID NO. 7);

[0129] Ofatumumaband抗体重链可变区编码DNA序列如下:

GAAGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGCAGGTC CCTGAGACTC 60

TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAAT GATTATGCCA TGCCTGGGT CCGGCAAGCT 120

CCAGGGAAGG GCCTGGAGTG GGTCTCAACT ATTAGTTGGA ATAGTGGTTC CATAGGCTAT 180

[0130] GCGGACTCTG TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA GTCCTGTAT 240

CTGCAAAATGA ACAGTCTGAG AGCTGAGGAC ACGGCCTTGT ATTACTGTGC AAAAGATATA 300

CAGTACGGCA ACTACTACTA CGGTATGGAC GTCTGGGGCC AAGGGACCAC GGTCACCGTC 360

TCCTCA 366 (SEQ ID NO. 8);

[0131] 或者,

[0132] 所述Rituximab抗体重链可变区的氨基酸序列如下:

QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYNMHWVKQT PGRGLEWIGA IYPNGDTSY 60

[0133] NQKFKGKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARST YGGDWYFNV WGAGTTVTVS 120

A 121 (SEQ ID NO. 9);

[0134] Rituximab抗体重链可变区编码DNA序列如下:

CAGGTGCAGT TGCAACAGCC TGGAGCTGAG TTGGTGAAGC CTGGTGCTTC TGTGAAGATG 60

TCTTGTAAGG CTTCTGGATA CACATTCCT TCTTACAACA TGCCTGGGT GAAGCAGACT 120

CCTGGTAGGG GTTTGGAGTG GATCGGAGCT ATCTACCCAG GAAACGGAGA CACATCTTAC 180

[0135] AACCAGAAGT TCAAGGGTAA GGCTACATTG ACTGCTGACA AGTCTTCATC TACTGCTTAC 240

ATGCAATTGT CTTCTTTGAC ATCTGAGGAC TCTGCAGTTT ACTACTGCGC TAGGTCTACA 300

TACTACGGAG GTGACTGGTA CTTCAACGTG TGGGGAGCAG GTACCACGGT CACTGTCTCT 360

GCA 363 (SEQ ID NO. 10)。

[0136] 此外,本发明中用到的Obinutuzumab抗体重链可变区的氨基酸序列如下:

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQA PGQGLEWVGR IFPGDGDY 60

[0137] NGKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARNV FDGYWLVYWG QGTLVTVSS 119

(SEQ ID NO. 33)

[0138] Obinutuzumab抗体重链可变区编码DNA序列如下:

caggtgcaat tggcagtc tggcgcgtaa gtaagaagc ctgggagttc agtgaagtc 60

tcttgcaagg ctccggata cgccttcagc tattcttggg tcaattgggt gcggcaggcg 120

[0139] cctggacaag ggctcgagt gatgggacgg atcttcccgc gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt acccccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgct 300

[0140] tttgatggtt actggttgt ttactggggc cagggaacce tggcaccgt ctctca 357

(SEQ ID NO. 34)

[0141] 在另一优选例中,所述Ofatumumaband抗体轻链可变区的氨基酸序列如下:

[0142] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQKPK GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60  
RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPITFGQ GTRLEIK 107 (SEQ ID  
NO. 11)

[0143] Ofatumumaband抗体编码DNA序列如下:

GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC 60  
CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCTACTTAG CCTGGTACCA ACAGAAACCT 120  
GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC 180  
[0144] AGGTTTCAGTG GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT 240  
GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCCGATCAC CTTCGGCCAA 300  
GGGACACGAC TGGAGATTAA A 321 (SEQ ID NO. 12)

[0145] 或者,

[0146] 所述Rituximab抗体抗体轻链可变区的氨基酸序列如下:

[0147] QIVLSQSPAI LSASPGEKVT MTCRASSVS YIHWFQKPKG SSPKPWIYAT SNLASGVPVR 60  
FSGSGSGTSY SLTISRVEAE DAATYYCQQW TSNPPTFGGG TKLEIK 106 (SEQ ID NO. 13)

[0148] Rituximab抗体来源的单链可变区轻链 (VL) 编码DNA序列:

CAAATTGTTC TCTCCAGTC TCCAGCAATC CTGTCAGCTT CTCCTGGAGA GAAGGTGACT 60  
ATGACTTGCA GGGCTTCTTC ATCTGTTTCT TACATCCACT GGTCCAGCA GAAGCCTGGT 120  
TCTTCACCTA AGCCTTGGAT CTACGCTACA TCTAACTTGG CATCTGGAGT GCCTGTGAGG 180  
[0149] TTCTCTGGTT CTGGTTCAGG TACTTCTTAC TCTTTGACAA TCTCTAGGGT GGAGGCTGAG 240  
GACGCTGCTA CTTACTACTG CCAGCAGTGG ACATCTAACC CTCCAACATT CGGAGGTGGT 300  
ACTAAGTTGG AGATCAAG 318 (SEQ ID NO. 14)。

[0150] 此外,本发明中用到的Obinutuzumab抗体轻链可变区的氨基酸序列如下:

[0151] DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSL LHSNGITYLYW YLQKPGQSPQ LLIYQMSNLV 60  
SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCAQNLELP YTFGGGTKVE IKRTV 115 (SEQ  
ID NO. 35)

[0152] Obinutuzumab抗体重链可变区编码DNA序列如下:

gatatcgtga tgaccagac tccactctcc ctgcccgtea cccctggaga gcccgccage 60  
attagctgca ggtctagcaa gagectcttg cacagcaatg gcactactta tttgtattgg 120  
tacctgcaaa agccagggca gtctccacag ctctgattt atcaaatgac caacctgtc 180  
[0153] tctggcgtec ctgaccggtt ctccggctcc gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240  
agcagggtgg aggctgagga tgttggagtt tattactgcg ctcaaatct agaacttct 300  
tacaccttcg gcgaggagac caaggtggag atcaaacgta cgggtg 345 (SEQ ID NO. 36)

[0154] 在本发明的一个优选地实施方式中,重链可变区与轻链可变区之间的氨基酸连接序列如下:

[0155] GGGSGGGGS GGGGS 15 (SEQ ID NO.15)

[0156] 其编码DNA序列如下:

[0157] GGTGGCGGTG GCTCGGCGG TGGTGGGTCG GGTGGCGGCG GATCT 45 (SEQ ID NO.16)

[0158] 绞链区和跨膜区

[0159] 对于绞链区和跨膜区(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。

[0160] 在本发明的一个优选的实施方式中,绞链区包括以下氨基酸序列(IgG4Hinge-CH2-CH3绞链区):

ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY 60  
VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK 120  
[0161] AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL 180  
DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFCFSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK 229 (SEQ ID  
NO. 17)

[0162] 其编码DNA序列如下:

GAGAGCAAGT ACGGACCGCC CTGCCCCCCT TGCCCTGCCC CCGAGTTCCT GGGCGGACCC 60  
AGCGTGTTC TGTTCACCCC CAAGCCCAAG GACACCCTGA TGATCAGCCG GACCCCCGAG 120  
GTGACCTGCG TGGTGGTGGA CGTGAGCCAG GAAGATCCCG AGGTCCAGTT CAATTGGTAC 180  
GTGGACGGCG TGGAAGTGCA CAACGCCAAG ACCAAGCCCA GAGAGGAACA GTTCAAACAGC 240  
ACCTACCGGG TGGTGTCTGT GCTGACCGTG CTGCACCAGG ACTGGCTGAA CGGCAAAGAA 300  
[0163] TACAAGTGCA AGGTGTCCAA CAAGGGCCTG CCCAGCAGCA TCGAAAAGAC CATCAGCAAG 360  
GCCAAGGGCC AGCCTCGCGA GCCCCAGGTG TACACCCTGC CTCCCTCCCA GGAAGAGATG 420  
ACCAAGAACC AGGTGTCCCT GACCTGCCTG GTGAAGGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC 480  
GTGGAGTGGG AGAGCAACGG CCAGCCTGAG AACAACTACA AGACCACCC TCCCGTGCTG 540  
GACAGCGACG GCAGCTTCTT CCTGTACAGC CGGCTGACCG TGGACAAGAG CCGGTGGCAG 600  
GAAGGCAACG TCTTTAGCTG CAGCGTGATG CACGAGGCC TGCACAACCA CTACACCCAG 660  
AAGAGCCTGA GCCTGTCCCT GGGCAAG 687 (SEQ ID NO. 18);

[0164] 或者,所述绞链区包括以下氨基酸序列(IgG4Hinge-CH2-CH3 (L235E,N297Q)):

ESKYGPPCPP CPAPEFEGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY 60  
VDGVEVHNAK TKPREEQFQS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK 120  
[0165] AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL 180  
DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFCFSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK 229 (SEQ ID  
NO. 19)

[0166] 其编码DNA序列如下:

GAGAGCAAGT ACGGACCGCC CTGCCCCCCT TGCCCTGCCC CCGAGTTCGA GGGCGGACCC 60  
[0167] AGCGTGTTC TGTTCACCCC CAAGCCCAAG GACACCCTGA TGATCAGCCG GACCCCCGAG 120  
GTGACCTGCG TGGTGGTGGA CGTGAGCCAG GAAGATCCCG AGGTCCAGTT CAATTGGTAC 180  
GTGGACGGCG TGGAAGTGCA CAACGCCAAG ACCAAGCCCA GAGAGGAACA GTTCAAACAGC 240  
ACCTACCGGG TGGTGTCTGT GCTGACCGTG CTGCACCAGG ACTGGCTGAA CGGCAAAGAA 300  
TACAAGTGCA AGGTGTCCAA CAAGGGCCTG CCCAGCAGCA TCGAAAAGAC CATCAGCAAG 360  
[0168] GCCAAGGGCC AGCCTCGCGA GCCCCAGGTG TACACCCTGC CTCCCTCCCA GGAAGAGATG 420  
ACCAAGAACC AGGTGTCCCT GACCTGCCTG GTGAAGGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC 480  
GTGGAGTGGG AGAGCAACGG CCAGCCTGAG AACAACTACA AGACCACCC TCCCGTGCTG 540  
GACAGCGACG GCAGCTTCTT CCTGTACAGC CGGCTGACCG TGGACAAGAG CCGGTGGCAG 600  
GAAGGCAACG TCTTTAGCTG CAGCGTGATG CACGAGGCC TGCACAACCA CTACACCCAG 660  
AAGAGCCTGA GCCTGTCCCT GGGCAAG 687 (SEQ ID NO. 20)。

[0169] 在本发明的一个优选的实施方式中,CD8来源的跨膜区(CD8TM)氨基酸序列如下:

- [0170] IYIWAPLAGT CGVLLLSLVI TLYC 24 (SEQ ID NO.21)
- [0171] 其编码DNA序列如下：
- [0172] ATCTACATCT GGGCGCCCTT GGCCGGGACT TGTGGGGTCC TTCTCCTGTC ACTGGTTATC 60  
ACCCTTTACT GC 72 (SEQ ID NO. 22)
- [0173] 在本发明的一个优选的实施方式中,CD28来源的跨膜区(CD28TM)氨基酸序列如下：
- [0174] FWLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWV 27 (SEQ ID NO.37)；
- [0175] CD28来源的跨膜区(CD28TM)编码DNA序列：
- [0176] TTTTGGGTGC TGGTGGTGGT TGGTGGAGTC CTGGCTTGCT ATAGCTTGCT AGTAACAGTG 60  
GCCTTTATTA TTTTCTGGGT G 81 (SEQ ID NO. 38)。
- [0177] 胞内结构域
- [0178] 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 $\zeta$ 的信号传导结构域。
- [0179] 优选地,4-1BB的胞内信号传导结构域包含如下氨基酸序列：
- [0180] KRGRKLLLYI FKQPFMRPVQ TTQEEDGCSC RFPEEEEGGC EL 42 (SEQ ID NO.23)
- [0181] 其编码DNA序列如下：
- [0182] AAACGGGGCA GAAAGAACT CCTGTATATA TTCAAACAAC CATTATGAG ACCAGTACAA 60  
ACTACTCAAG AGGAAGATGG CTGTAGCTGC CGATTTCCAG AAGAAGAAGA AGGAGGATGT 120  
GAACTG 126 (SEQ ID NO. 24)
- [0183] 优选地,CD28来源的胞内信号传导结构域包含如下氨基酸序列：
- [0184] RSKRSRLLHS DYMNMTPRRP GPTRKHYQPY APPRDFAAAYR S 41 (SEQ ID NO.39)
- [0185] 其编码DNA序列如下：
- [0186] AGGAGTAAGA GGAGCAGGCT CCTGCACAGT GACTACATGA ACATGACTCC CCGCCGCCCC 60  
GGGCCACCC GCAAGCATT A CCAGCCCTAT GCCCACCAC GCGACTTCGC AGCCTATCGC 120  
TCC 123 (SEQ ID NO. 40)
- [0187] 优选地,CD3 $\zeta$ 的胞内信号传导结构域包含如下氨基酸序列：
- [0188] RVKFSRSADA PAYQQGQNL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPEMGGKPQ RRKNPQEGLY 60  
NELQKDKMAE AYSEIGMKGE RRRGKGDHGL YQGLSTATKD TYDALHMQUAL PPR 113 (SEQ  
ID NO. 25)
- [0189] 其编码DNA序列如下：
- [0190] AGAGTGAAGT TCAGCAGGAG CGCAGACGCC CCCGCGTACA AGCAGGGCCA GAACCAGCTC 60  
TATAACGAGC TCAATCTAGG ACGAAGAGAG GAGTACGATG TTTTGGACAA GAGACGTGGC 120  
CGGGACCCTG AGATGGGGG AAAGCCGAGA AGGAAGAACC CTCAGGAAGG CCTGTACAAT 180  
GAACTGCAGA AAGATAAGAT GCGGAGGCC TACAGTGAGA TTGGGATGAA AGGCGAGCGC 240  
CGGAGGGGCA AGGGCACGA TGGCCTTTAC CAGGGTCTCA GTACAGCCAC CAAGGACACC 300  
TACGACGCC TTCACATGCA GGCCCTGCC CCTCGC 336 (SEQ ID NO. 26)
- [0191] 载体
- [0192] 本发明还提供了编码本发明CAR序列的DNA构建体。
- [0193] 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。

[0194] 本发明也提供了其中插入本发明的DNA构建体的载体。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。

[0195] 简单概括,通常通过可操作地连接编码CAR多肽或其部分的核酸至启动子,并将构建体并入表达载体,实现编码CAR的天然或合成核酸的表达。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。

[0196] 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。

[0197] 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。

[0198] 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)。

[0199] 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。

[0200] 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。

[0201] 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 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )。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。

[0202] 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。

[0203] 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、 $\beta$ -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基因的基因(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。

[0204] 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。

[0205] 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,ColdSpring 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。

[0206] 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。

[0207] 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)。

[0208] 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。

[0209] 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。

[0210] 在本发明的一个优选地实施方式中,所述DNA构建体中还包括信号肽编码序列。优选地,所述信号肽序列连接在所述抗原结合结构域核酸序列的上游。优选地所述信号肽为人源CD8a信号肽。

[0211] 优选地,所述信号肽氨基酸序列如下:

[0212] CD8前导序列(CD8Leader sequence)的氨基酸序列:

[0213] MALPVTALLL PLALLLHAAR P 21 (SEQ ID NO.27)

[0214] CD8前导序列(CD8Leader sequence)的编码DNA序列序列:

[0215] ATGGCCTTAC CAGTGACCGC CTTGCTCCTG CCGCTGGCCT TGCTGCTCCA CGCCGCCAGG 60  
CCG 63 (SEQ ID NO.28)。

[0216] 治疗性应用

[0217] 本发明包括用编码本发明CAR的慢病毒载体(LV)转导的细胞(例如,T细胞)。转导的T细胞可引起CAR-介导的T-细胞应答。

[0218] 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:施用给哺乳动物表达本发明CAR的T细胞。

[0219] 在一个实施方式中,本发明包括一类细胞疗法,其中T细胞被基因修饰以表达本发明的CAR,和CAR-T细胞被注入需要其的接受者中。注入的细胞能够杀死接受者的肿瘤细胞。不像抗体疗法,CAR-T细胞能够在体内复制,产生可导致持续肿瘤控制的长期持久性。

[0220] 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CD20 CAR-T细胞引起抗表达CD20的细胞的特异性免疫应答。

[0221] 尽管本文公开的数据具体公开了包括抗-CD20scFv、铰链和跨膜区、和4-1BB和CD3 $\zeta$ 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。

[0222] 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。

[0223] 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。

[0224] 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。

[0225] 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。

[0226] 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) 扩展细胞,ii) 将编码CAR的核酸引入细胞,和/或iii) 冷冻保存细胞。

[0227] 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。

[0228] 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。

[0229] 通常地,如本文所述活化和扩展的细胞可用于治疗和预防无免疫应答的个体中产生的疾病。特别地,本发明的CAR-修饰的T细胞用于治疗CCL。在某些实施方式中,本发明的细胞用于治疗处于形成CCL风险中的患者。因此,本发明提供了治疗或预防CCL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。

[0230] 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。

[0231] 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。

[0232] 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,NewEng.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。

[0233] 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。

[0234] 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)、环磷酸胺结合(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。

[0235] 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。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 $1 \times 10^6$ 个至 $1 \times 10^{10}$ 个本发明经修饰的T细胞(如,CAR-T20细胞),通过例如静脉回输的方式,施用于患者。

[0236] 本发明的优点包括:

[0237] (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CD20scFv,该特定的抗CD20scFv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。

[0238] (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;

[0239] (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IgG4Hinge-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)。

[0240] 实施例1慢病毒表达载体的构建

[0241] 编码质粒为委托上海博益生物科技有限公司做全长DNA合成和克隆构建。各编码质粒中,分别使用不同的抗CD20scFv编码序列,克隆载体选用的是pWPT慢病毒载体,克隆位点为BamH I和Sal I位点。具体序列结构如图1所示。各元件的氨基酸和核苷酸序列如上所述。

[0242] 以下实施例中以效果较好的CAR-T20.13、CAR-T20.14、CAR-T20.16、CAR-T20.19、CAR-T20.20作示例性说明。

[0243] 实施例2 CAR-T细胞的制备

[0244] (1) 取健康人静脉血,密度梯度离心方法分离获得单个核细胞(PBMCs)。

[0245] (2) 第0天,PBMCs采用含2%人血白蛋白的GT-T551细胞培养基培养,调整细胞终浓度为 $2 \times 10^6$  cell/mL。将细胞接种于预先经过终浓度为 $5 \mu\text{g/mL}$  CD3单克隆抗体(OKT3)及终浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 的Retronectin(购自TAKARA公司)包被的细胞培养瓶。培养基里添加终浓度为

1000U/mL的重组人白介素2 (IL-2), 在37℃, 饱和湿度为5%CO<sub>2</sub>培养箱培养。

[0246] (3) 第2天, 加入新鲜培养液, 浓缩纯化的CAR20s慢病毒液, protamine sulfate (12ug/ml), 以及终浓度为1000U/mL IL-2。置于37℃, 5%CO<sub>2</sub>培养箱中感染12小时后, 弃培养液, 加入新鲜的培养基, 于37℃, 5%CO<sub>2</sub>培养箱继续进行培养。

[0247] (4) 第6天开始, 可取CAR20s细胞做相应的活性检测试验。

[0248] 本发明中, 对靶向CD20抗原CAR结构修饰T细胞的制备工艺作了改进, 选用补加2%人血白蛋白的GT-551无血清培养基在体外培养淋巴细胞。

[0249] 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。

[0250] 分别取 $0.5 \times 10^6$ 实施例2中培养到第7天(图2A和图5A)和第11天(图2B)的CAR-T20s细胞样品, 经过Protein L染色在流式细胞仪上分析CAR20蛋白在T细胞膜表面的表达水平。结果显示: 本研究中所设计的CAR结构除CAR-T20.13外均可用Protein L检测到嵌合抗原受体在相应修饰的T细胞的细胞膜表面定位。

[0251] 实施例4 CAR-T20s体外激活能力的检测

[0252] 采用实施例2中培养到第6天deCAR-T20s细胞与靶细胞共培养后检测CD137的上调水平和培养上清中IFN $\gamma$ 的分泌水平。依次取 $1 \times 10^5$ 培养到第6天的CAR-T20细胞, 分别与CD20阳性的RAJI和RAMOS肿瘤细胞系, 以及CD20阴性的MOLT-4肿瘤细胞系或不添加肿瘤细胞, 在200 $\mu$ l GT-551培养基中按照1:1比例培养18h后流式方法检测T细胞膜表面CD137的表达水平(图3A), ELISA方法检测培养上清中IFN $\gamma$ 的分泌水平(图3B)。

[0253] 从图3的结果我们可以得出如下结论: 以Obinutuzumab为基础的CAR也实现了在相应修饰细胞的表达和膜表面定位, 但以Ofatumumab序列为基础的CAR结构比以Obinutuzumab和Rituximab为基础构建的CAR显示出更好的体外活化能力和靶抗原特异性。

[0254] 实施例5 CAR-T20s细胞诱导肿瘤细胞早期凋亡活性的检测

[0255] 采用实施例2中培养到第11天CAR-T20.13、CAR-T20.14和CAR-T20.16细胞按图4所示比例分别与 $1 \times 10^4$ 经过CFSE标记的CD20阴性(MOLT-4)或CD20阳性的(RAJI, RAMOS)肿瘤细胞系, 在200 $\mu$ l GT-551培养基中共培养4h, 离心收集细胞沉淀, 细胞经PBS洗两遍后用Annexin V-APC染料按1:50的比例100 $\mu$ l染液中染色30min, PBS洗1遍后在流式细胞仪上分析CFSE阳性细胞中Annexin V阳性细胞的比例。

[0256] 图4的结果显示以Ofatumumab序列为基础的CAR结构比以Obinutuzumab和Rituximab为基础构建的CAR显示出更好的体外诱导CD20靶细胞早期凋亡的能力。

[0257] 实施例6铰链区突变嵌合抗原受体及第三代嵌合抗原受体体外活化能力的鉴定

[0258] (1) 采用实施例2中方法制备的培养到第7天的CAR-T20s细胞, 在保证转染率基本相当的情况下(图5A), 分别与K562, CD19单阳、CD20单阳、CD19和CD20双阳的K562稳转株细胞, 以及RAJI靶细胞按照1:1比例, 各取 $1 \times 10^5$ 细胞, 在200 $\mu$ lGT-551培养基中培养18h后细胞后检测CD137的上调水平(图5B)和培养上清中IFN $\gamma$ 的分泌水平(图5C)。

[0259] (2) 图5所示结果表明, 在感染效率基本一致的情况下, 铰链区突变的嵌合抗原受体CAR-T20.19与CAR-T20.14的体外活化能力(CD137和IFN $\gamma$ )基本相当, 而三代CAR结构CAR-T20.20比二代的CAR-T20.14和CAR-T20.19显示出更好的体外活化能力(CD137和IFN $\gamma$ )。

[0260] 以上详细描述了本发明的优选实施方式, 但是, 本发明并不限于上述实施方式中的具体细节, 在本发明的技术构思范围内, 可以对本发明的技术方案进行多种简单变型, 这

些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0261] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

[0262] 此外,本发明的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合,只要其不违背本发明的思想,其同样应当视为本发明所公开的内容。

[0001] 序列表  
 [0002] <110> 西比曼生物科技(上海)有限公司  
 [0003] 西比曼生物科技(无锡)有限公司  
 [0004] <120> 一种靶向CD20抗原嵌合抗原受体的构建及其工程化T细胞的活性鉴定  
 [0005] <130> P2016-1975  
 [0006] <160> 40  
 [0007] <170> PatentIn version 3.5  
 [0008] <210> 1  
 [0009] <211> 672  
 [0010] <212> PRT  
 [0011] <213> 人工序列  
 [0012] <400> 1  
 [0013] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 [0014] 1 5 10 15  
 [0015] His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu  
 [0016] 20 25 30  
 [0017] Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe  
 [0018] 35 40 45  
 [0019] Thr Phe Asn Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 [0020] 50 55 60  
 [0021] Gly Leu Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly  
 [0022] 65 70 75 80  
 [0023] Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala  
 [0024] 85 90 95  
 [0025] Lys Lys Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr  
 [0026] 100 105 110  
 [0027] Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr  
 [0028] 115 120 125  
 [0029] Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly  
 [0030] 130 135 140  
 [0031] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile  
 [0032] 145 150 155 160  
 [0033] Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg  
 [0034] 165 170 175  
 [0035] Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
 [0036] 180 185 190  
 [0037] Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp  
 [0038] 195 200 205  
 [0039] Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 [0040] 210 215 220  
 [0041] Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp

[0042]	225	230	235	240
[0043]	Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr Phe			
[0044]		245	250	255
[0045]	Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro			
[0046]		260	265	270
[0047]	Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe			
[0048]		275	280	285
[0049]	Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro			
[0050]		290	295	300
[0051]	Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val			
[0052]	305	310	315	320
[0053]	Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr			
[0054]		325	330	335
[0055]	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val			
[0056]		340	345	350
[0057]	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys			
[0058]		355	360	365
[0059]	Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser			
[0060]		370	375	380
[0061]	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro			
[0062]	385	390	395	400
[0063]	Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val			
[0064]		405	410	415
[0065]	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly			
[0066]		420	425	430
[0067]	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp			
[0068]		435	440	445
[0069]	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp			
[0070]		450	455	460
[0071]	Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His			
[0072]	465	470	475	480
[0073]	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr			
[0074]		485	490	495
[0075]	Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu			
[0076]		500	505	510
[0077]	Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile			
[0078]		515	520	525
[0079]	Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp			
[0080]		530	535	540
[0081]	Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu			
[0082]	545	550	555	560
[0083]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly			

[0084]		565		570		575
[0085]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr					
[0086]		580		585		590
[0087]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys					
[0088]		595		600		605
[0089]	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys					
[0090]		610		615		620
[0091]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg					
[0092]		625		630		635
[0093]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala					
[0094]		645		650		655
[0095]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg					
[0096]		660		665		670
[0097]	<210> 2					
[0098]	<211> 2019					
[0099]	<212> DNA					
[0100]	<213> 人工序列					
[0101]	<400> 2					
[0102]	atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60				
[0103]	ccggaagtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtac agcctggcag gtccctgaga	120				
[0104]	ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttt aatgattatg ccatgcactg ggtccggcaa	180				
[0105]	gctccagggga agggcctgga gtgggtctca actattagtt ggaatagtgg ttccataggc	240				
[0106]	tatgcggact ctgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaacgcaa gaagtccctg	300				
[0107]	tatctgcaaa tgaacagtct gagagctgag gacacggcct tgtattactg tgcaaaagat	360				
[0108]	atacagtacg gcaactacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc	420				
[0109]	gtctcctcag gtggcggtgg ctcgggcggg ggtgggtcgg gtggcgggcg atctgaaatt	480				
[0110]	gtgttgacac agtctccagc caccctgtct ttgtctccag gggaaagagc caccctctcc	540				
[0111]	tgcaggcca gtcagagtgt tagcagctac ttagcctggt accaacagaa acctggccag	600				
[0112]	gctcccagge tctcatcta tgatgcatcc aacagggcca ctggcatccc agccaggttc	660				
[0113]	agtggcagtg ggtctgggac agacttcaact ctcacatca gcagcctaga gcctgaagat	720				
[0114]	tttgagttt attactgtca gcagcgtagc aactggccga tcacctcgg ccaagggaca	780				
[0115]	cgactggaga ttaaagagag caagtacgga ccgccctgcc ccccttgccc tgccccgag	840				
[0116]	ttctgggagc gaccagcgt gttctgttc cccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc	900				
[0117]	agccggaccc ccgaggtgac ctgcgtggtg gtggacgtga gccaggaaga tcccgagtc	960				
[0118]	cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag	1020				
[0119]	gaacagttca acagcaccta ccgggtggtg tctgtgtgta ccgtgctgca ccaggactgg	1080				
[0120]	ctgaacggca aagaatacaa gtgcaaggtg tccaacaagg gcctgcccag cagcatcga	1140				
[0121]	aagaccatca gcaaggccaa gggccagcct cgcgagcccc aggtgtacac cctgcctccc	1200				
[0122]	tcccaggaag agatgaccaa gaaccagtg tccctgacct gcctggtgaa gggcttctac	1260				
[0123]	cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aacggccagc ctgagaacaa ctacaagacc	1320				
[0124]	accctcccg tgctggacag cgacggcagc ttcttctgt acagccggct gaccgtggac	1380				
[0125]	aagaccggg ggcaggaagg caacgtcttt agctgcagcg tgatgcacga ggccctgcac	1440				

[0126] aaccactaca cccagaagag cctgagcctg tccctgggca agatctacat ctgggcgccc 1500  
 [0127] ttggccggga cttgtgggt ctttctctg tcaactgtta tcaccctta ctgcaaacgg 1560  
 [0128] ggcagaaaga aactcctgta tatattcaaa caaccattta tgagaccagt acaactact 1620  
 [0129] caagaggaag atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg 1680  
 [0130] agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggccca gaaccagctc 1740  
 [0131] tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc 1800  
 [0132] cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 1860  
 [0133] gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 1920  
 [0134] cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 1980  
 [0135] tacgacgcc ttacatgca ggccctgccc cctcgctag 2019  
 [0136] <210> 3  
 [0137] <211> 670  
 [0138] <212> PRT  
 [0139] <213> 人工序列  
 [0140] <400> 3  
 [0141] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 [0142] 1 5 10 15  
 [0143] His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu  
 [0144] 20 25 30  
 [0145] Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr  
 [0146] 35 40 45  
 [0147] Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg  
 [0148] 50 55 60  
 [0149] Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser  
 [0150] 65 70 75 80  
 [0151] Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser  
 [0152] 85 90 95  
 [0153] Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser  
 [0154] 100 105 110  
 [0155] Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr  
 [0156] 115 120 125  
 [0157] Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Gly Gly  
 [0158] 130 135 140  
 [0159] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val  
 [0160] 145 150 155 160  
 [0161] Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val  
 [0162] 165 170 175  
 [0163] Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe  
 [0164] 180 185 190  
 [0165] Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser  
 [0166] 195 200 205  
 [0167] Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

[0168]	210	215	220
[0169]	Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala		
[0170]	225	230	235
[0171]	Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly		
[0172]		245	250
[0173]	Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro		
[0174]		260	265
[0175]	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
[0176]		275	280
[0177]	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
[0178]	290	295	300
[0179]	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe		
[0180]	305	310	315
[0181]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
[0182]		325	330
[0183]	Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
[0184]		340	345
[0185]	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
[0186]		355	360
[0187]	Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
[0188]	370	375	380
[0189]	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln		
[0190]	385	390	395
[0191]	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
[0192]		405	410
[0193]	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
[0194]		420	425
[0195]	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
[0196]		435	440
[0197]	Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu		
[0198]		450	455
[0199]	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
[0200]	465	470	475
[0201]	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr Ile Trp		
[0202]		485	490
[0203]	Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile		
[0204]		500	505
[0205]	Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys		
[0206]		515	520
[0207]	Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys		
[0208]	530	535	540
[0209]	Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val		

[0210]	545	550	555	560
[0211]	Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn			
[0212]		565	570	575
[0213]	Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val			
[0214]		580	585	590
[0215]	Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg			
[0216]		595	600	605
[0217]	Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys			
[0218]		610	615	620
[0219]	Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg			
[0220]	625	630	635	640
[0221]	Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys			
[0222]		645	650	655
[0223]	Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
[0224]		660	665	670
[0225]	<210> 4			
[0226]	<211> 2013			
[0227]	<212> DNA			
[0228]	<213> 人工序列			
[0229]	<400> 4			
[0230]	atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60		
[0231]	ccgcaggtgc agttgcaaca gcctggagct gagttggtga agcctggtgc ttctgtgaag	120		
[0232]	atgtcttgta aggcttctgg atacacattc acttcttaca acatgcactg ggtgaagcag	180		
[0233]	actcctggta ggggtttgga gtggatcgga gctatctacc caggaaacgg agacacatct	240		
[0234]	tacaaccaga agttcaaggg taaggetaca ttgactgctg acaagtcttc atctactget	300		
[0235]	tacatgcaat tgtcttcttt gacatctgag gactctgcag tttactactg cgctaggtct	360		
[0236]	acatactacg gagtgactg gtacttcaac gtgtggggag caggtaccac ggtcactgtc	420		
[0237]	tctgcaggtg gagtggtatc tggaggagga ggatctggtg gaggaggttc tcaaattgtt	480		
[0238]	ctctcccagt ctccagcaat cctgtcagct tctctggag agaaggtgac tatgacttgc	540		
[0239]	aggcttctt catctgtttc ttacatccac tggttccagc agaagcctgg ttcttcacct	600		
[0240]	aagccttgga tctacgtac atctaacttg gcatctggag tgcctgtgag gttctctggt	660		
[0241]	tctggttcag gtacttctta ctctttgaca atctctaggg tggaggctga ggacgctgct	720		
[0242]	acttactact gccagcagtg gacatctaac cctccaacat tccgaggtgg tactaagttg	780		
[0243]	gagatcaagg agagcaagta cggaccgcc tgccccctt gccctgcccc cgagttcctg	840		
[0244]	ggcggacca gcgtgttct gttcccccc aagcccaagg acaccctgat gatcagccgg	900		
[0245]	acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac gtgagccagg aagatcccga ggtccagttc	960		
[0246]	aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggaacag	1020		
[0247]	ttcaacagca cctaccgggt ggtgtctgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac	1080		
[0248]	ggcaaagaat acaagtgcaa ggtgtccaac aagggcctgc ccagcagcat cgaaaagacc	1140		
[0249]	atcagcaagg ccaagggcca gcctcgcgag ccccaggtgt acaccctgcc tcctcccag	1200		
[0250]	gaagagatga ccaagaacca ggtgtccctg acctgcttgg tgaagggctt ctaccccagc	1260		
[0251]	gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcctgaga acaactacaa gaccaccct	1320		

[0252] cccgtgctgg acagcgacgg cagcttcttc ctgtacagcc ggctgaccgt ggacaagagc 1380  
 [0253] cggtagcagg aaggcaactg ctttagctgc agcgtgatgc acgaggecct gcacaaccac 1440  
 [0254] tacaccaga agagcctgag cctgtccctg ggcaagatct acatctgggc gcccttgccc 1500  
 [0255] gggacttgtg gggtccttct cctgtcactg gttatcacc tttactgcaa acggggcaga 1560  
 [0256] aagaaactcc tgtatatatt caaacaacca tttatgagac cagtacaaac tactcaagag 1620  
 [0257] gaagatggct gtagctgccg atttccagaa gaagaagaag gaggatgtga actgagagt 1680  
 [0258] aagttcagca ggagcgaga cgccccgcg tacaagcagg gccagaacca gctctataac 1740  
 [0259] gagtcaatc taggacgaag agaggagtac gatgttttgg acaagagacg tggccgggac 1800  
 [0260] cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag aaccctcagg aaggcctgta caatgaactg 1860  
 [0261] cagaaagata agatggcgga ggcctacagt gagattggga tgaaaggcga gcgccggagg 1920  
 [0262] ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt ctcagtacag ccaccaagga cacctacgac 1980  
 [0263] gcccttcaca tgcaggecct gcccctcgc tag 2013  
 [0264] <210> 5  
 [0265] <211> 672  
 [0266] <212> PRT  
 [0267] <213> 人工序列  
 [0268] <400> 5  
 [0269] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 [0270] 1 5 10 15  
 [0271] His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu  
 [0272] 20 25 30  
 [0273] Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe  
 [0274] 35 40 45  
 [0275] Thr Phe Asn Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 [0276] 50 55 60  
 [0277] Gly Leu Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly  
 [0278] 65 70 75 80  
 [0279] Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala  
 [0280] 85 90 95  
 [0281] Lys Lys Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr  
 [0282] 100 105 110  
 [0283] Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr  
 [0284] 115 120 125  
 [0285] Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly  
 [0286] 130 135 140  
 [0287] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile  
 [0288] 145 150 155 160  
 [0289] Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg  
 [0290] 165 170 175  
 [0291] Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
 [0292] 180 185 190  
 [0293] Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp

[0294]	195	200	205
[0295]	Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly		
[0296]	210	215	220
[0297]	Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp		
[0298]	225	230	235
[0299]	Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr Phe		
[0300]	245	250	255
[0301]	Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro		
[0302]	260	265	270
[0303]	Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe		
[0304]	275	280	285
[0305]	Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
[0306]	290	295	300
[0307]	Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val		
[0308]	305	310	315
[0309]	Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
[0310]	325	330	335
[0311]	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
[0312]	340	345	350
[0313]	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
[0314]	355	360	365
[0315]	Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
[0316]	370	375	380
[0317]	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
[0318]	385	390	395
[0319]	Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
[0320]	405	410	415
[0321]	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
[0322]	420	425	430
[0323]	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
[0324]	435	440	445
[0325]	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
[0326]	450	455	460
[0327]	Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
[0328]	465	470	475
[0329]	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Tyr		
[0330]	485	490	495
[0331]	Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu		
[0332]	500	505	510
[0333]	Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile		
[0334]	515	520	525
[0335]	Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp		

[0336]	530	535	540
[0337]	Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu		
[0338]	545	550	555 560
[0339]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly		
[0340]		565	570 575
[0341]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr		
[0342]		580	585 590
[0343]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys		
[0344]		595	600 605
[0345]	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys		
[0346]	610	615	620
[0347]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		
[0348]	625	630	635 640
[0349]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala		
[0350]		645	650 655
[0351]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[0352]		660	665 670
[0353]	<210> 6		
[0354]	<211> 2019		
[0355]	<212> DNA		
[0356]	<213> 人工序列		
[0357]	<400> 6		
[0358]	atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60		
[0359]	ccggaagtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtac agcctggcag gtccctgaga 120		
[0360]	ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttt aatgattatg ccatgcaactg ggtccggcaa 180		
[0361]	gctccaggga agggcctgga gtgggtctca actattagtt ggaatagtgg ttccataggc 240		
[0362]	tatgcgact ctgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaacgcaa gaagtccctg 300		
[0363]	tatctgcaaa tgaacagtct gagagctgag gacacggcct tgtattactg tgcaaaagat 360		
[0364]	atacagtacg gcaactacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 420		
[0365]	gtctcctcag gtggcgggtg ctcgggcggt ggtgggtcgg gtggcggcgg atctgaaatt 480		
[0366]	gtgttgacac agtctccagc caccctgtct ttgtctccag gggaaagagc caccctctcc 540		
[0367]	tgcaggcca gtcagagtgt tagcagctac ttagcctggt accaacagaa acctggccag 600		
[0368]	gctcccaggc tcctcatcta tgatgcatcc aacaggcca ctggcatccc agccagggtc 660		
[0369]	agtggcagtg ggtctgggac agacttcaact ctcacatca gcagcctaga gctgaagat 720		
[0370]	tttgcagttt attactgtca gcagcgtagc aactggcca tcaccttcgg ccaagggaca 780		
[0371]	cgactggaga ttaaagagag caagtacgga ccgcccctgcc ccccttgccc tgcccccgag 840		
[0372]	ttcagggcgc gaccacgct gttcctgttc ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc 900		
[0373]	agccggaccc ccgaggtgac ctgcgtggtg gtggacgtga gccaggaaga tcccagagtc 960		
[0374]	cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtgga gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag 1020		
[0375]	gaacagttcc aaagcaccta ccgggtggtg tctgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg 1080		
[0376]	ctgaacggca aagaatacaa gtgcaagtg tccaacaagg gcctgcccag cagcatcgaa 1140		
[0377]	aagaccatca gcaaggccaa gggccagcct cgcgagcccc aggtgtacac cctgcctccc 1200		

[0378] tcccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg tccctgacct gcctggtgaa gggcttctac 1260  
 [0379] cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aacggccagc ctgagaacaa ctacaagacc 1320  
 [0380] acccctcccg tgctggacag cgacggcagc ttcttctgt acagccgget gaccgtggac 1380  
 [0381] aagagccggt ggcaggaagg caacgtcttt agctgcagcg tgatgcacga ggccttgca 1440  
 [0382] aaccactaca cccagaagag cctgagcctg tccctgggca agatctacat ctgggcgccc 1500  
 [0383] ttggccggga cttgtggggt ctttctctg tcaactggta tcaccctta ctgcaaacgg 1560  
 [0384] ggcagaaaga aactcctgta tatattcaaa caaccattta tgagaccagt acaaactact 1620  
 [0385] caagaggaag atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg 1680  
 [0386] agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc 1740  
 [0387] tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttggacaa gagacgtggc 1800  
 [0388] cgggacctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 1860  
 [0389] gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 1920  
 [0390] cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 1980  
 [0391] tacgacgcc ttacatgca ggcctgccc cctcgctag 2019  
 [0392] <210> 7  
 [0393] <211> 122  
 [0394] <212> PRT  
 [0395] <213> 人工序列  
 [0396] <400> 7  
 [0397] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 [0398] 1 5 10 15  
 [0399] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr  
 [0400] 20 25 30  
 [0401] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [0402] 35 40 45  
 [0403] Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 [0404] 50 55 60  
 [0405] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr  
 [0406] 65 70 75 80  
 [0407] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 [0408] 85 90 95  
 [0409] Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
 [0410] 100 105 110  
 [0411] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 [0412] 115 120  
 [0413] <210> 8  
 [0414] <211> 366  
 [0415] <212> DNA  
 [0416] <213> 人工序列  
 [0417] <400> 8  
 [0418] gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggagc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60  
 [0419] tctgtgcag cctctggatt cacctttaat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120

[0420] ccaggaagg gcctggagt ggtctcaact attagttgga atagtggtc cataggctat 180  
 [0421] gcggactctg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa gtcctgtat 240  
 [0422] ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagatata 300  
 [0423] cagtacggca actactacta cggtatggac gtctggggcc aaggaccac ggtcaccgtc 360  
 [0424] tcctca 366  
 [0425] <210> 9  
 [0426] <211> 121  
 [0427] <212> PRT  
 [0428] <213> 人工序列  
 [0429] <400> 9  
 [0430] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 [0431] 1 5 10 15  
 [0432] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 [0433] 20 25 30  
 [0434] Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile  
 [0435] 35 40 45  
 [0436] Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 [0437] 50 55 60  
 [0438] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 [0439] 65 70 75 80  
 [0440] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0441] 85 90 95  
 [0442] Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly  
 [0443] 100 105 110  
 [0444] Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala  
 [0445] 115 120  
 [0446] <210> 10  
 [0447] <211> 363  
 [0448] <212> DNA  
 [0449] <213> 人工序列  
 [0450] <400> 10  
 [0451] caggtgcagt tgcaacagcc tggagctgag ttggtgaagc ctggtgcttc tgtgaagatg 60  
 [0452] tcttgtaagg cttctggata cacattcact tcttaacaaca tgcactgggt gaagcagact 120  
 [0453] cctggtaggg gtttggagt gatcgagct atctaccag gaaacggaga cacatcttac 180  
 [0454] aaccagaagt tcaaggtaa ggctacattg actgctgaca agtcttcatc tactgcttac 240  
 [0455] atgcaattgt cttctttgac atctgaggac tctgcagttt actactgcgc taggtctaca 300  
 [0456] tactacggag gtgactggta cttcaactgt tggggagcag gtaccacggt cactgtctct 360  
 [0457] gca 363  
 [0458] <210> 11  
 [0459] <211> 107  
 [0460] <212> PRT  
 [0461] <213> 人工序列

[0462] <400> 11  
 [0463] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 [0464] 1 5 10 15  
 [0465] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 [0466] 20 25 30  
 [0467] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 [0468] 35 40 45  
 [0469] Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 [0470] 50 55 60  
 [0471] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 [0472] 65 70 75 80  
 [0473] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile  
 [0474] 85 90 95  
 [0475] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 [0476] 100 105  
 [0477] <210> 12  
 [0478] <211> 321  
 [0479] <212> DNA  
 [0480] <213> 人工序列  
 [0481] <400> 12  
 [0482] gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
 [0483] ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120  
 [0484] ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180  
 [0485] aggttcagtg gcagtggttc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240  
 [0486] gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgateac cttcggccaa 300  
 [0487] gggacacgac tggagattaa a 321  
 [0488] <210> 13  
 [0489] <211> 106  
 [0490] <212> PRT  
 [0491] <213> 人工序列  
 [0492] <400> 13  
 [0493] Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
 [0494] 1 5 10 15  
 [0495] Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile  
 [0496] 20 25 30  
 [0497] His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 [0498] 35 40 45  
 [0499] Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser  
 [0500] 50 55 60  
 [0501] Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu  
 [0502] 65 70 75 80  
 [0503] Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

[0504]	85	90	95
[0505]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0506]	100	105	
[0507]	<210> 14		
[0508]	<211> 318		
[0509]	<212> DNA		
[0510]	<213> 人工序列		
[0511]	<400> 14		
[0512]	caaattgttc tctcccagtc tccagcaatc ctgtcagctt ctcctggaga gaaggtgact	60	
[0513]	atgacttgca gggcttcttc atctgtttct tacatccact ggttccagca gaagcctggt	120	
[0514]	tcttcaccta agcettgat ctacgtaca tctaacttg catctggagt gcctgtgagg	180	
[0515]	ttctctggtt ctggttcagg tacttcttac tctttgaaa tctctagggt ggaggctgag	240	
[0516]	gacgtgcta cttactactg ccagcagtg acatctaacc ctccaacatt cggaggtggt	300	
[0517]	actaagttgg agatcaag	318	
[0518]	<210> 15		
[0519]	<211> 15		
[0520]	<212> PRT		
[0521]	<213> 人工序列		
[0522]	<400> 15		
[0523]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
[0524]	1	5	10 15
[0525]	<210> 16		
[0526]	<211> 45		
[0527]	<212> DNA		
[0528]	<213> 人工序列		
[0529]	<400> 16		
[0530]	ggtggcggtg gctcggcgg tggtgggtcg ggtggcggcg gatct	45	
[0531]	<210> 17		
[0532]	<211> 229		
[0533]	<212> PRT		
[0534]	<213> 人工序列		
[0535]	<400> 17		
[0536]	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe		
[0537]	1	5	10 15
[0538]	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
[0539]	20	25	30
[0540]	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
[0541]	35	40	45
[0542]	Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
[0543]	50	55	60
[0544]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser		
[0545]	65	70	75 80

[0546]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
[0547]	85 90 95
[0548]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
[0549]	100 105 110
[0550]	Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
[0551]	115 120 125
[0552]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
[0553]	130 135 140
[0554]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
[0555]	145 150 155 160
[0556]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
[0557]	165 170 175
[0558]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
[0559]	180 185 190
[0560]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
[0561]	195 200 205
[0562]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
[0563]	210 215 220
[0564]	Leu Ser Leu Gly Lys
[0565]	225
[0566]	<210> 18
[0567]	<211> 687
[0568]	<212> DNA
[0569]	<213> 人工序列
[0570]	<400> 18
[0571]	gagagcaagt acggaccgcc ctgccccct tgccctgccc ccgagttcct gggcggacc 60
[0572]	agcgtgttcc tgttcccc caagccaag gacacctga tgatcagccg gacccccgag 120
[0573]	gtgacctgcg tgggtgtgga cgtgagccag gaagatcccg aggtccagtt caattgttac 180
[0574]	gtggacggcg tggaagtgca caagccaag accaagcca gagaggaaca gttcaacagc 240
[0575]	acctaccggg tgggtgtctgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaagaa 300
[0576]	tacaagtgca aggtgtccaa caagggcctg cccagcagca tcgaaaagac catcagcaag 360
[0577]	gccaagggcc agcctcgca gccccagtg tacacctgc ctccctcca ggaagagatg 420
[0578]	accaagaacc aggtgtccct gacctgctg gtgaagggt tctaccccag cgacatgcc 480
[0579]	gtggagtggg agagcaacgg ccagcctgag aacaactaca agaccacccc tcccgtgctg 540
[0580]	gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggctgaccg tggacaagag ccggtggcag 600
[0581]	gaaggcaacg tctttagctg cagcgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag 660
[0582]	aagacctga gcctgtccct gggcaag 687
[0583]	<210> 19
[0584]	<211> 229
[0585]	<212> PRT
[0586]	<213> 人工序列
[0587]	<400> 19

[0588] Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe  
 [0589] 1 5 10 15  
 [0590] Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 [0591] 20 25 30  
 [0592] Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 [0593] 35 40 45  
 [0594] Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 [0595] 50 55 60  
 [0596] Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser  
 [0597] 65 70 75 80  
 [0598] Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 [0599] 85 90 95  
 [0600] Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
 [0601] 100 105 110  
 [0602] Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 [0603] 115 120 125  
 [0604] Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 [0605] 130 135 140  
 [0606] Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 [0607] 145 150 155 160  
 [0608] Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 [0609] 165 170 175  
 [0610] Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
 [0611] 180 185 190  
 [0612] Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 [0613] 195 200 205  
 [0614] Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 [0615] 210 215 220  
 [0616] Leu Ser Leu Gly Lys  
 [0617] 225  
 [0618] <210> 20  
 [0619] <211> 687  
 [0620] <212> DNA  
 [0621] <213> 人工序列  
 [0622] <400> 20  
 [0623] gagagcaagt acggaccgcc ctgccccct tgcctgccc ccgagttcga gggcggacc 60  
 [0624] agcgtgttcc tgttcccc caagcccaag gacacctga tgatcagccg gacccccgag 120  
 [0625] gtgacctgcg tgggtgtgga cgtgagccag gaagatccc aggtccagtt caattgttac 180  
 [0626] gtggacggcg tggaagtga caacccaag accaagcca gagaggaaca gttccaaagc 240  
 [0627] acctaccggg tgggtgtctgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaagaa 300  
 [0628] tacaagtga aggtgtccaa caagggctg cccagcagca tcgaaaagac catcagcaag 360  
 [0629] gcccaaggcc agcctcgca gccccagtg tacacctgc ctccctcca ggaagagatg 420

- [0630] accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggt tctaccccag cgacatcgcc 480
- [0631] gtggagtggg agagcaacgg ccagcctgag aacaactaca agaccacccc tcccgtgctg 540
- [0632] gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggctgaccg tggacaagag ccggtggcag 600
- [0633] gaaggcaacg tctttagctg cagcgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag 660
- [0634] aagagcctga gcctgtccct gggcaag 687
- [0635] <210> 21
- [0636] <211> 24
- [0637] <212> PRT
- [0638] <213> 人工序列
- [0639] <400> 21
- [0640] Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
- [0641] 1 5 10 15
- [0642] Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
- [0643] 20
- [0644] <210> 22
- [0645] <211> 72
- [0646] <212> DNA
- [0647] <213> 人工序列
- [0648] <400> 22
- [0649] atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtgggtcc ttctctgtc actggttate 60
- [0650] accctttact gc 72
- [0651] <210> 23
- [0652] <211> 42
- [0653] <212> PRT
- [0654] <213> 人工序列
- [0655] <400> 23
- [0656] Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
- [0657] 1 5 10 15
- [0658] Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
- [0659] 20 25 30
- [0660] Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
- [0661] 35 40
- [0662] <210> 24
- [0663] <211> 126
- [0664] <212> DNA
- [0665] <213> 人工序列
- [0666] <400> 24
- [0667] aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaacaac catttatgag accagtacaa 60
- [0668] actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
- [0669] gaactg 126
- [0670] <210> 25
- [0671] <211> 113

[0672] <212> PRT  
 [0673] <213> 人工序列  
 [0674] <400> 25  
 [0675] Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
 [0676] 1 5 10 15  
 [0677] Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
 [0678] 20 25 30  
 [0679] Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
 [0680] 35 40 45  
 [0681] Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln  
 [0682] 50 55 60  
 [0683] Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu  
 [0684] 65 70 75 80  
 [0685] Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr  
 [0686] 85 90 95  
 [0687] Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro  
 [0688] 100 105 110  
 [0689] Arg  
 [0690] <210> 26  
 [0691] <211> 336  
 [0692] <212> DNA  
 [0693] <213> 人工序列  
 [0694] <400> 26  
 [0695] agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc 60  
 [0696] tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120  
 [0697] cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180  
 [0698] gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240  
 [0699] cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300  
 [0700] tacgacgecc ttcacatgca ggccctgecc cctcgc 336  
 [0701] <210> 27  
 [0702] <211> 21  
 [0703] <212> PRT  
 [0704] <213> 人工序列  
 [0705] <400> 27  
 [0706] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 [0707] 1 5 10 15  
 [0708] His Ala Ala Arg Pro  
 [0709] 20  
 [0710] <210> 28  
 [0711] <211> 63  
 [0712] <212> DNA  
 [0713] <213> 人工序列

[0714] <400> 28  
 [0715] atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60  
 [0716] ccg 63  
 [0717] <210> 29  
 [0718] <211> 677  
 [0719] <212> PRT  
 [0720] <213> 人工序列  
 [0721] <400> 29  
 [0722] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 [0723] 1 5 10 15  
 [0724] His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val  
 [0725] 20 25 30  
 [0726] Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr  
 [0727] 35 40 45  
 [0728] Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln  
 [0729] 50 55 60  
 [0730] Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp  
 [0731] 65 70 75 80  
 [0732] Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser  
 [0733] 85 90 95  
 [0734] Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr  
 [0735] 100 105 110  
 [0736] Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val  
 [0737] 115 120 125  
 [0738] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
 [0739] 130 135 140  
 [0740] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr  
 [0741] 145 150 155 160  
 [0742] Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile  
 [0743] 165 170 175  
 [0744] Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr  
 [0745] 180 185 190  
 [0746] Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile  
 [0747] 195 200 205  
 [0748] Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 [0749] 210 215 220  
 [0750] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala  
 [0751] 225 230 235 240  
 [0752] Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr  
 [0753] 245 250 255  
 [0754] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Glu Ser  
 [0755] 260 265 270

[0756]	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
[0757]	275 280 285
[0758]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[0759]	290 295 300
[0760]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
[0761]	305 310 315 320
[0762]	Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[0763]	325 330 335
[0764]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
[0765]	340 345 350
[0766]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[0767]	355 360 365
[0768]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
[0769]	370 375 380
[0770]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[0771]	385 390 395 400
[0772]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
[0773]	405 410 415
[0774]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[0775]	420 425 430
[0776]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[0777]	435 440 445
[0778]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
[0779]	450 455 460
[0780]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[0781]	465 470 475 480
[0782]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[0783]	485 490 495
[0784]	Leu Gly Lys Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val
[0785]	500 505 510
[0786]	Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys
[0787]	515 520 525
[0788]	Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
[0789]	530 535 540
[0790]	Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu
[0791]	545 550 555 560
[0792]	Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
[0793]	565 570 575
[0794]	Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
[0795]	580 585 590
[0796]	Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
[0797]	595 600 605

[0798] Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr  
 [0799] 610 615 620  
 [0800] Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly  
 [0801] 625 630 635 640  
 [0802] Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln  
 [0803] 645 650 655  
 [0804] Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln  
 [0805] 660 665 670  
 [0806] Ala Leu Pro Pro Arg  
 [0807] 675  
 [0808] <210> 30  
 [0809] <211> 2034  
 [0810] <212> DNA  
 [0811] <213> 人工序列  
 [0812] <400> 30  
 [0813] atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60  
 [0814] ccgcaggtgc aattggtgca gtctggcgct gaagttaaga agcctgggag ttcagtgaag 120  
 [0815] gtctcctgca aggettccgg atacgccttc agctattctt ggatcaattg ggtgcgcgag 180  
 [0816] gcgcctggac aagggctcga gtggatggga cggatctttc ccggcgatgg ggatactgac 240  
 [0817] tacaatggga aattcaaggc cagagtaca attaccgccc acaaatccac tagcacagcc 300  
 [0818] tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccc tgtattactg tgcaagaaat 360  
 [0819] gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccaggaa ccctggtcac cgtctcctca 420  
 [0820] ggtggcggtg gctcgggcgg tgggtggctg ggtggcggcg gatctgatat cgtgatgacc 480  
 [0821] cagactccac tctcctgcc cgtcaccct ggagagccc ccagcattag ctgcaggtct 540  
 [0822] agcaagagcc tcttgacag caatggcatc acttattgt attggtacct gcaaaagcca 600  
 [0823] gggcagtctc cacagctcct gatttatcaa atgtccaacc ttgtctctgg cgtccctgac 660  
 [0824] cggttctccg gctccgggtc aggcactgat ttcacactga aaatcagcag ggtggaggct 720  
 [0825] gaggatgttg gagtttatta ctgcgctcag aatctagaac ttccttacac ctccggcgga 780  
 [0826] gggaccaagg tggagatcaa acgtacggtg gagagcaagt acggaccgcc ctgccccct 840  
 [0827] tgccctgccc ccgagttcct gggcggacc agcgtgttcc tgttcccc caagcccaag 900  
 [0828] gacacctga tgatcagccg gacccccgag gtgacctgcg tgggtggtgga cgtgagccag 960  
 [0829] gaagatccc aggtccagtt caattggtac gtggacggcg tggaagtgca caacgccaag 1020  
 [0830] accaagccca gagaggaaca gttcaacagc acctaccggg tgggtgtctgt gctgaccgtg 1080  
 [0831] ctgcaccagg actggtgaa cggcaaagaa tacaagtga aggtgtccaa caagggctg 1140  
 [0832] cccagcagca tcgaaaagac catcagcaag gccaaaggcc agcctcgcga gccccaggtg 1200  
 [0833] tacacctgc ctccctcca ggaagagatg accaagaacc aggtgtccct gacctgctg 1260  
 [0834] gtgaagggt tctaccccag cgacatgcc gtggagtgg agagcaacgg ccagcctgag 1320  
 [0835] aacaactaca agaccacccc tcccgtgctg gacagcgac gcagcttctt cctgtacagc 1380  
 [0836] cggctgaccg tggacaagag ccggtggcag gaaggcaac tcttttagctg cagcgtgatg 1440  
 [0837] cacgaggccc tgcacaacca ctacaccag aagagcctga gcctgtccct gggcaagatc 1500  
 [0838] tacatctggg cgcccttggc cgggacttgt ggggtccttc tctgtcact ggttatcacc 1560  
 [0839] ctttactgca aacggggcag aaagaaactc ctgtatatat tcaacaacc atttatgaga 1620

[0840] ccagtacaaa ctactcaaga ggaagatggc tgtagctgcc gatttccaga agaagaagaa 1680  
 [0841] ggaggatgtg aactgagagt gaagttcagc aggagcgag acgccccgc gtacaagcag 1740  
 [0842] ggccagaacc agctetataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 1800  
 [0843] gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 1860  
 [0844] gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg 1920  
 [0845] atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca 1980  
 [0846] gccaccaagg acacctacga cgcccttcac atgcaggecc tgccccctcg ctag 2034  
 [0847] <210> 31  
 [0848] <211> 716  
 [0849] <212> PRT  
 [0850] <213> 人工序列  
 [0851] <400> 31  
 [0852] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 [0853] 1 5 10 15  
 [0854] His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu  
 [0855] 20 25 30  
 [0856] Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe  
 [0857] 35 40 45  
 [0858] Thr Phe Asn Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 [0859] 50 55 60  
 [0860] Gly Leu Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly  
 [0861] 65 70 75 80  
 [0862] Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala  
 [0863] 85 90 95  
 [0864] Lys Lys Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr  
 [0865] 100 105 110  
 [0866] Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr  
 [0867] 115 120 125  
 [0868] Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly  
 [0869] 130 135 140  
 [0870] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile  
 [0871] 145 150 155 160  
 [0872] Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg  
 [0873] 165 170 175  
 [0874] Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
 [0875] 180 185 190  
 [0876] Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp  
 [0877] 195 200 205  
 [0878] Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 [0879] 210 215 220  
 [0880] Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp  
 [0881] 225 230 235 240

[0882]	Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr Phe
[0883]	245 250 255
[0884]	Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
[0885]	260 265 270
[0886]	Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe
[0887]	275 280 285
[0888]	Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
[0889]	290 295 300
[0890]	Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
[0891]	305 310 315 320
[0892]	Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
[0893]	325 330 335
[0894]	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
[0895]	340 345 350
[0896]	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
[0897]	355 360 365
[0898]	Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
[0899]	370 375 380
[0900]	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
[0901]	385 390 395 400
[0902]	Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
[0903]	405 410 415
[0904]	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
[0905]	420 425 430
[0906]	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
[0907]	435 440 445
[0908]	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
[0909]	450 455 460
[0910]	Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
[0911]	465 470 475 480
[0912]	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Phe Trp
[0913]	485 490 495
[0914]	Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val
[0915]	500 505 510
[0916]	Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu
[0917]	515 520 525
[0918]	Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr
[0919]	530 535 540
[0920]	Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr
[0921]	545 550 555 560
[0922]	Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro
[0923]	565 570 575

[0924]	Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys		
[0925]		580	585
[0926]	Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe		
[0927]		595	600
[0928]	Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu		
[0929]		610	615
[0930]	Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp		
[0931]		625	630
[0932]	Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys		
[0933]		645	650
[0934]	Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala		
[0935]		660	665
[0936]	Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys		
[0937]		675	680
[0938]	Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr		
[0939]		690	695
[0940]	Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[0941]		705	710
[0942]	<210> 32		
[0943]	<211> 2151		
[0944]	<212> DNA		
[0945]	<213> 人工序列		
[0946]	<400> 32		
[0947]	atggccttac cagtgaccgc cttgctctcg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg	60	
[0948]	ccggaagtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtac agcctggcag gtccctgaga	120	
[0949]	ctctctctgtg cagcctctgg attcaccttt aatgattatg ccatgcactg ggtccggcaa	180	
[0950]	gctccaggga agggcctgga gtgggtctca actattagtt ggaatagtgg ttccataggc	240	
[0951]	tatgcggact ctgtgaaggc cggattcacc atctccagag acaacgcaa gaagtcacctg	300	
[0952]	tatctgcaaa tgaacagtct gagagctgag gacacggcct tgtattactg tgcaaaagat	360	
[0953]	atacagtacg gcaactacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc	420	
[0954]	gtctctcag gtggcgggtg ctcgggcggt ggtgggtcgg gtggcggcgg atctgaaatt	480	
[0955]	gtgttgacac agtctccagc caccctgtct ttgtctccag gggaaagagc caccctctcc	540	
[0956]	tgcaggcca gtcagagtgt tagcagctac ttagcctggt accaacagaa acctggccag	600	
[0957]	gctcccagc tctcatcta tgatgcatcc aacaggcca ctggcatccc agccaggttc	660	
[0958]	agtggcagtg ggtctgggac agacttact ctcacatca gcagcctaga gcctgaagat	720	
[0959]	tttgagttt attactgtca gcagcgtagc aactggccga tcaccttcgg ccaagggaca	780	
[0960]	cgactggaga ttaaagagag caagtacgga ccgccctgcc ccccttgccc tgcccccgag	840	
[0961]	ttcgagggcg gaccagcgt gttctgttc ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc	900	
[0962]	agccggacc cagagtgac ctgcgtggtg gtggacgtga gccaggaaga tcccgagtc	960	
[0963]	cagttcaatt ggtacgtgga cggcgtgaa gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag	1020	
[0964]	gaacagttcc aaagcaccta ccgggtggtg tctgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg	1080	
[0965]	ctgaacggca aagaatacaa gtgcaaggtg tccaacaagg gcctgcccag cagcatcgaa	1140	

[0966] aagaccatca gcaaggccaa gggccagcct cgcgagcccc aggtgtacac cctgcctccc 1200  
 [0967] tcccaggaag agatgaccaa gaaccagggtg tccctgacct gcctggtgaa gggcttctac 1260  
 [0968] cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aacggccagc ctgagaacaa ctacaagacc 1320  
 [0969] acccctcccg tgctggacag cgacggcagc ttcttctgt acagccggct gaccgtggac 1380  
 [0970] aagagccggt ggcaggaagg caacgtcttt agctgcagcg tgatgcacga ggccctgcac 1440  
 [0971] aaccactaca cccagaagag cctgagcctg tccctgggca agttttgggt gctggtggtg 1500  
 [0972] gttggtggag tcttgcttg ctatagcttg ctagtaacag tggcctttat tattttctgg 1560  
 [0973] gtgaggagta agaggagcag gctcctgcac agtgactaca tgaacatgac tccccgccgc 1620  
 [0974] cccgggcccc cccgcaagca ttaccagccc tatgccccac cacgcgactt cgcagcctat 1680  
 [0975] cgctccaaac ggggcagaaa gaaactcctg tatatatca aacaaccatt tatgagacca 1740  
 [0976] gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt agctgccgat ttccagaaga agaagaagga 1800  
 [0977] ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta caagcagggc 1860  
 [0978] cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttgac 1920  
 [0979] aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa 1980  
 [0980] ggctgtaca atgaaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattgggatg 2040  
 [0981] aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt accagggtet cagtacagcc 2100  
 [0982] accaaggaca cctacgacgc cttcacatg caggccctgc ccctcgcta a 2151  
 [0983] <210> 33  
 [0984] <211> 119  
 [0985] <212> PRT  
 [0986] <213> 人工序列  
 [0987] <400> 33  
 [0988] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 [0989] 1 5 10 15  
 [0990] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser  
 [0991] 20 25 30  
 [0992] Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [0993] 35 40 45  
 [0994] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
 [0995] 50 55 60  
 [0996] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 [0997] 65 70 75 80  
 [0998] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0999] 85 90 95  
 [1000] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
 [1001] 100 105 110  
 [1002] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [1003] 115  
 [1004] <210> 34  
 [1005] <211> 357  
 [1006] <212> DNA  
 [1007] <213> 人工序列

[1008] <400> 34  
 [1009] caggtgcaat tggcgcagtc tggcgcctgaa gtttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60  
 [1010] tcttcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttggga tcaattgggt gcggcaggcg 120  
 [1011] cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180  
 [1012] aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240  
 [1013] atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300  
 [1014] tttgatggtt actggettgt ttactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctctca 357  
 [1015] <210> 35  
 [1016] <211> 115  
 [1017] <212> PRT  
 [1018] <213> 人工序列  
 [1019] <400> 35  
 [1020] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 [1021] 1 5 10 15  
 [1022] Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 [1023] 20 25 30  
 [1024] Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 [1025] 35 40 45  
 [1026] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro  
 [1027] 50 55 60  
 [1028] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 [1029] 65 70 75 80  
 [1030] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn  
 [1031] 85 90 95  
 [1032] Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 [1033] 100 105 110  
 [1034] Arg Thr Val  
 [1035] 115  
 [1036] <210> 36  
 [1037] <211> 345  
 [1038] <212> DNA  
 [1039] <213> 人工序列  
 [1040] <400> 36  
 [1041] gatatcgtga tgaccagac tccactctcc ctgcccgtca cccttgaga gcccgccagc 60  
 [1042] attagctgca ggtctagcaa gagcctcttg cacagcaatg gcatcactta tttgtattgg 120  
 [1043] tacctgcaaa agccagggca gtctccacag ctctgattt atcaaatgtc caaccttgtc 180  
 [1044] tctggcgtcc ctgaccggtt ctccggctcc gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240  
 [1045] agcagggtgg aggetgagga tgttgagtt tattactgcg ctcagaatct agaacttctc 300  
 [1046] tacaccttcg gcggagggac caagtgagg atcaaactga cggtg 345  
 [1047] <210> 37  
 [1048] <211> 27  
 [1049] <212> PRT

- [1050] <213> 人工序列
- [1051] <400> 37
- [1052] Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
- [1053] 1 5 10 15
- [1054] Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
- [1055] 20 25
- [1056] <210> 38
- [1057] <211> 81
- [1058] <212> DNA
- [1059] <213> 人工序列
- [1060] <400> 38
- [1061] ttttgggtgc tgggtggtgt tgggtggagtc ctggcttget atagcttget agtaacagtg 60
- [1062] gcctttatta ttttctgggt g 81
- [1063] <210> 39
- [1064] <211> 41
- [1065] <212> PRT
- [1066] <213> 人工序列
- [1067] <400> 39
- [1068] Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
- [1069] 1 5 10 15
- [1070] Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
- [1071] 20 25 30
- [1072] Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
- [1073] 35 40
- [1074] <210> 40
- [1075] <211> 123
- [1076] <212> DNA
- [1077] <213> 人工序列
- [1078] <400> 40
- [1079] aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60
- [1080] gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttgc agcctatgc 120
- [1081] tcc 123

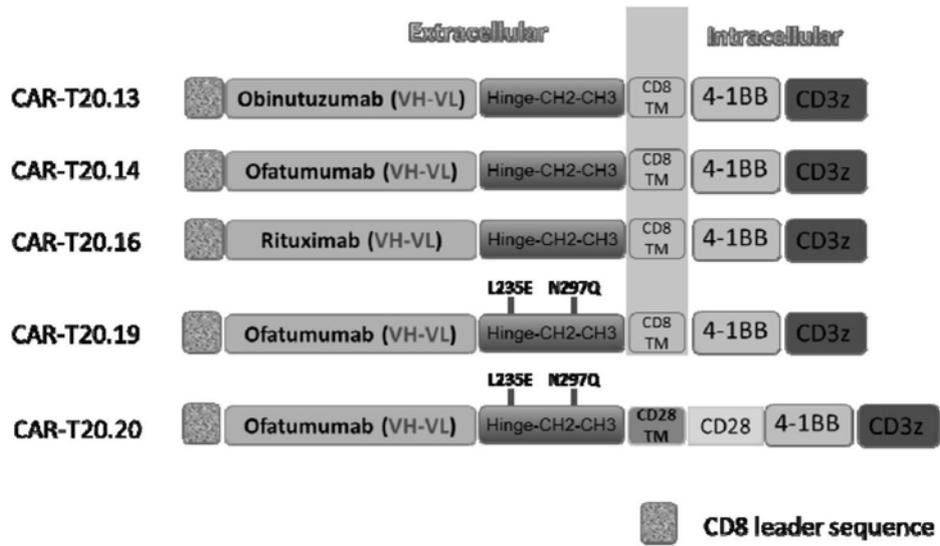


图1

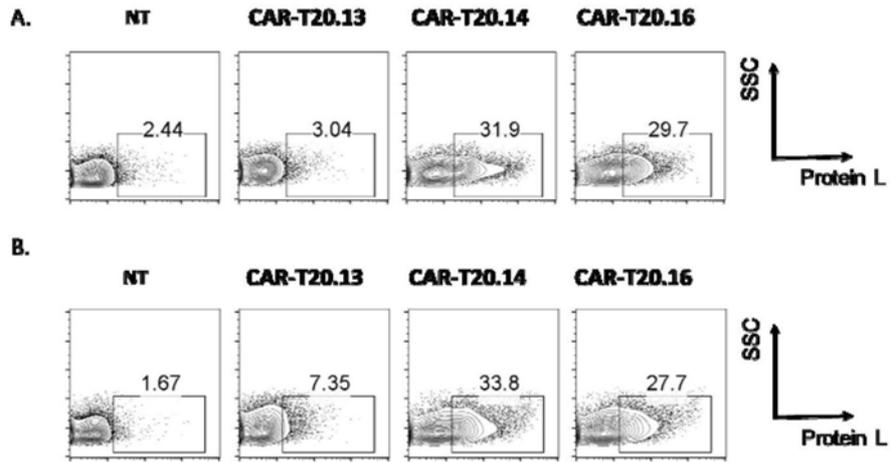
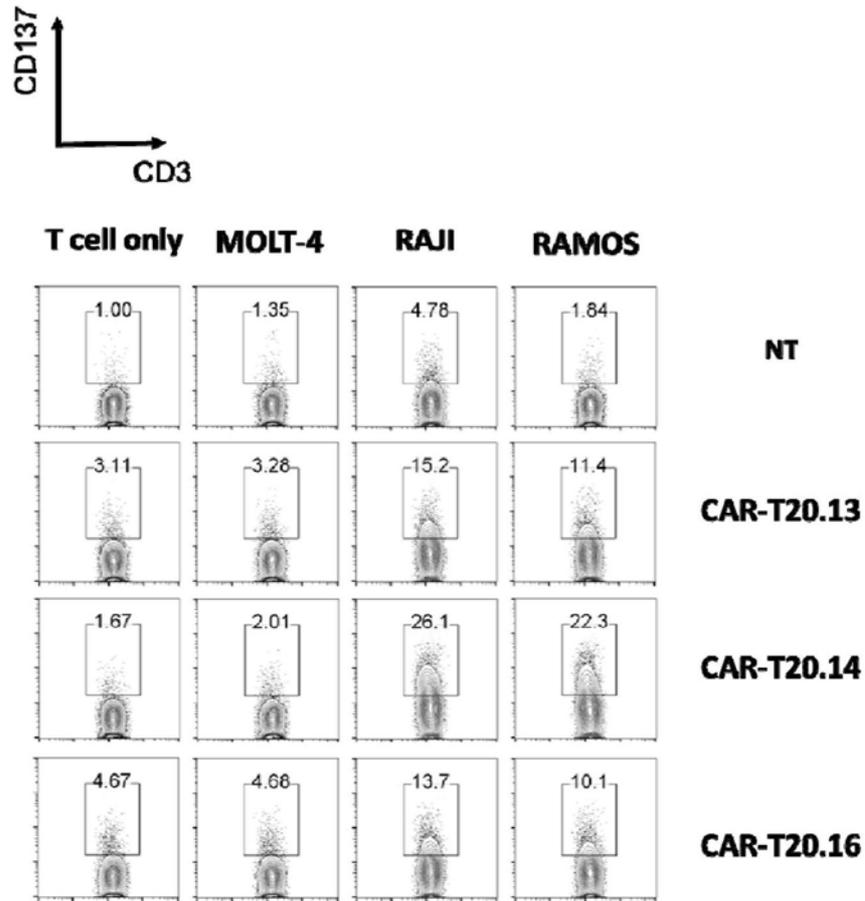


图2

A.



B.

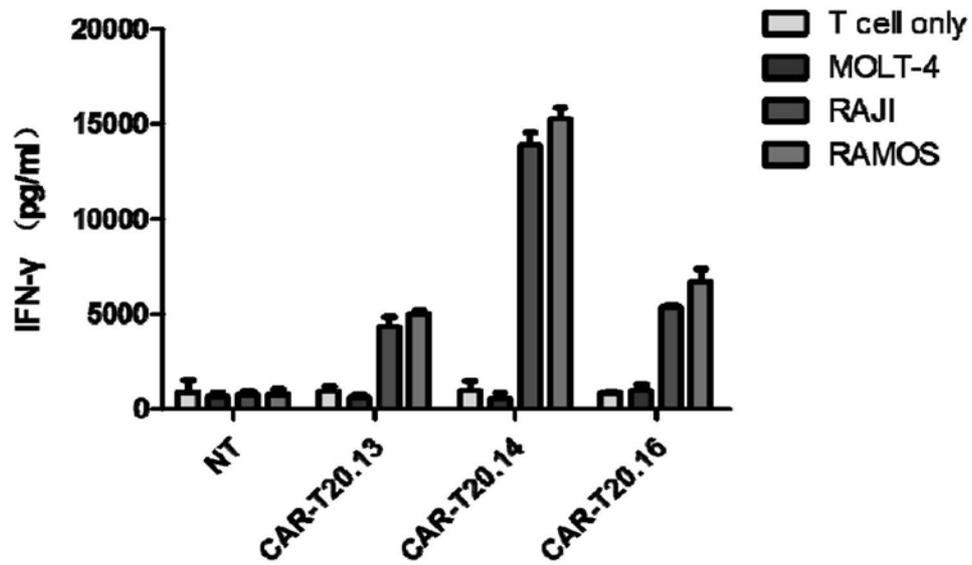


图3

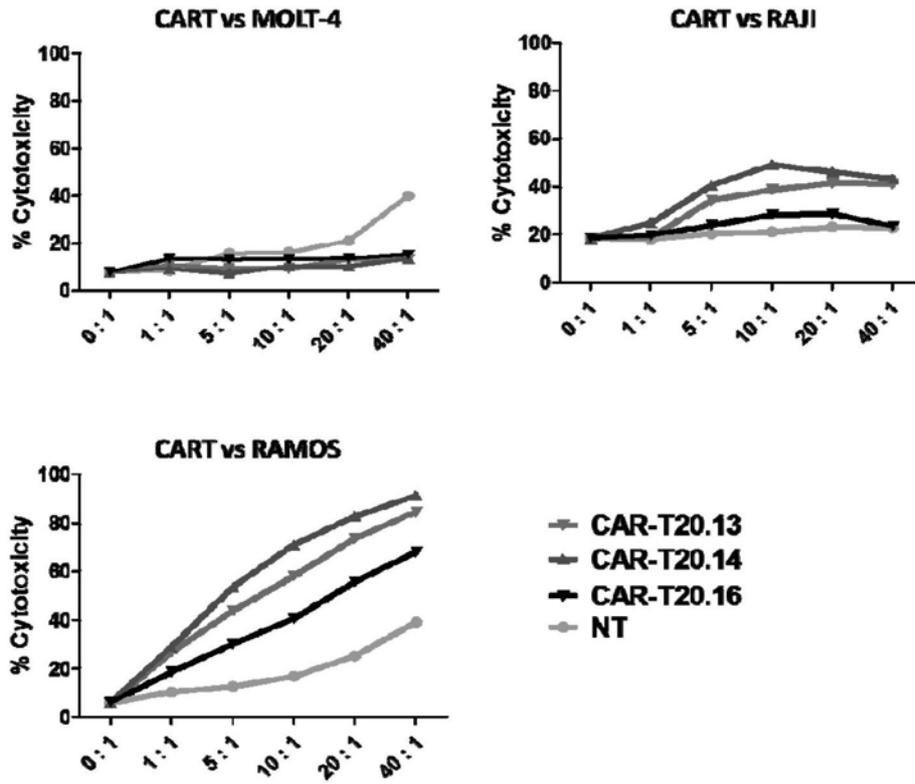


图4

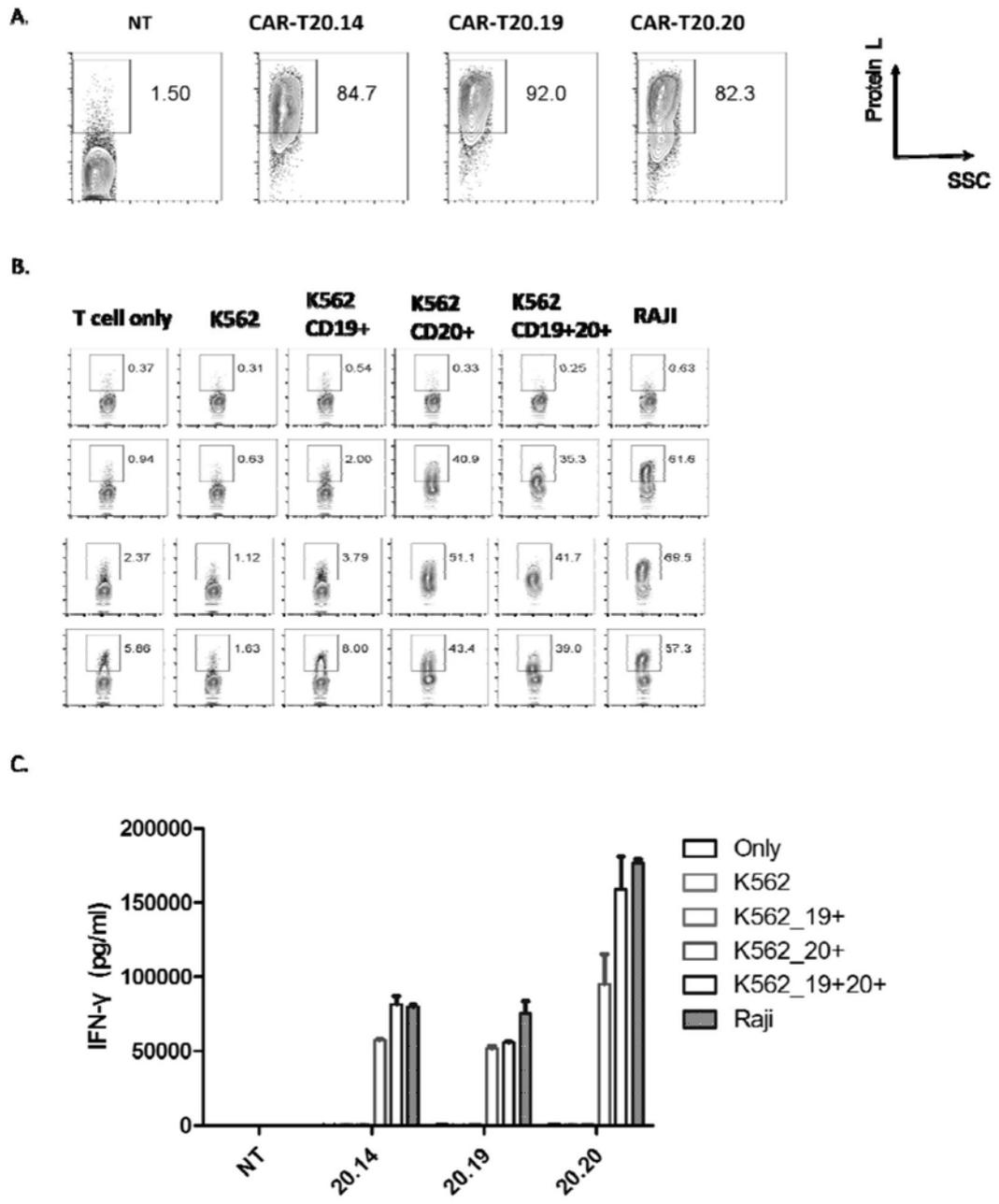


图5