



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110662839 A

(43)申请公布日 2020.01.07

(21)申请号 201880024308.6

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(22)申请日 2018.02.17

代理人 张文辉

(30)优先权数据

62/460,118 2017.02.17 US

(51)Int.Cl.

C12N 15/62(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 15/63(2006.01)

2019.10.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/018557 2018.02.17

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/152451 EN 2018.08.23

(71)申请人 珀杜研究基金会

地址 美国印第安纳州

(72)发明人 P.S.洛 M.斯里尼瓦萨劳 B.张

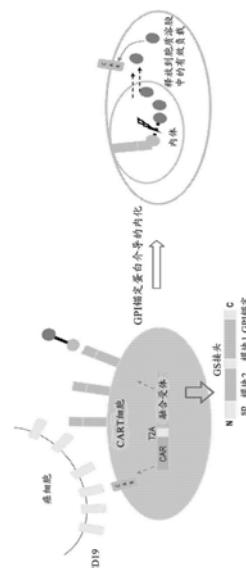
权利要求书6页 说明书32页
序列表54页 附图20页

(54)发明名称

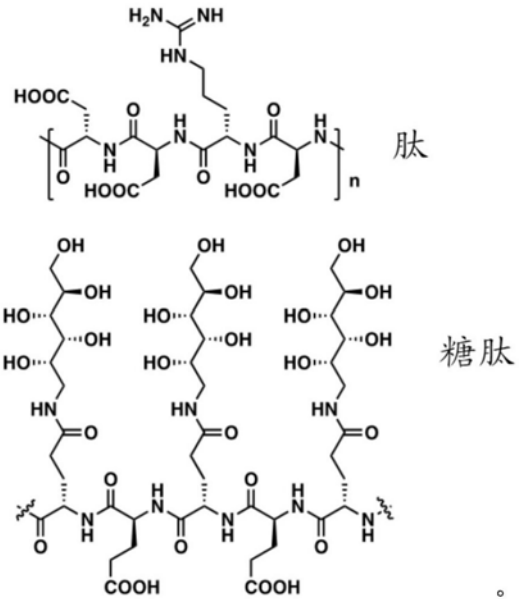
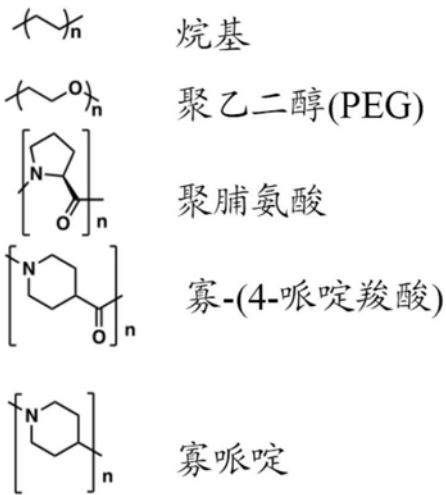
用于细胞疗法的基于靶向性配体-有效负载
的药物递送

(57)摘要

本文中公开了提供细胞疗法的灵活微调的
药物递送平台。特别地,将工程化融合蛋白与要
被移植细胞内化的携带至少一种药物有效负载
的高亲和力配体偶联,以观察或调节移植的细胞
疗法效果。

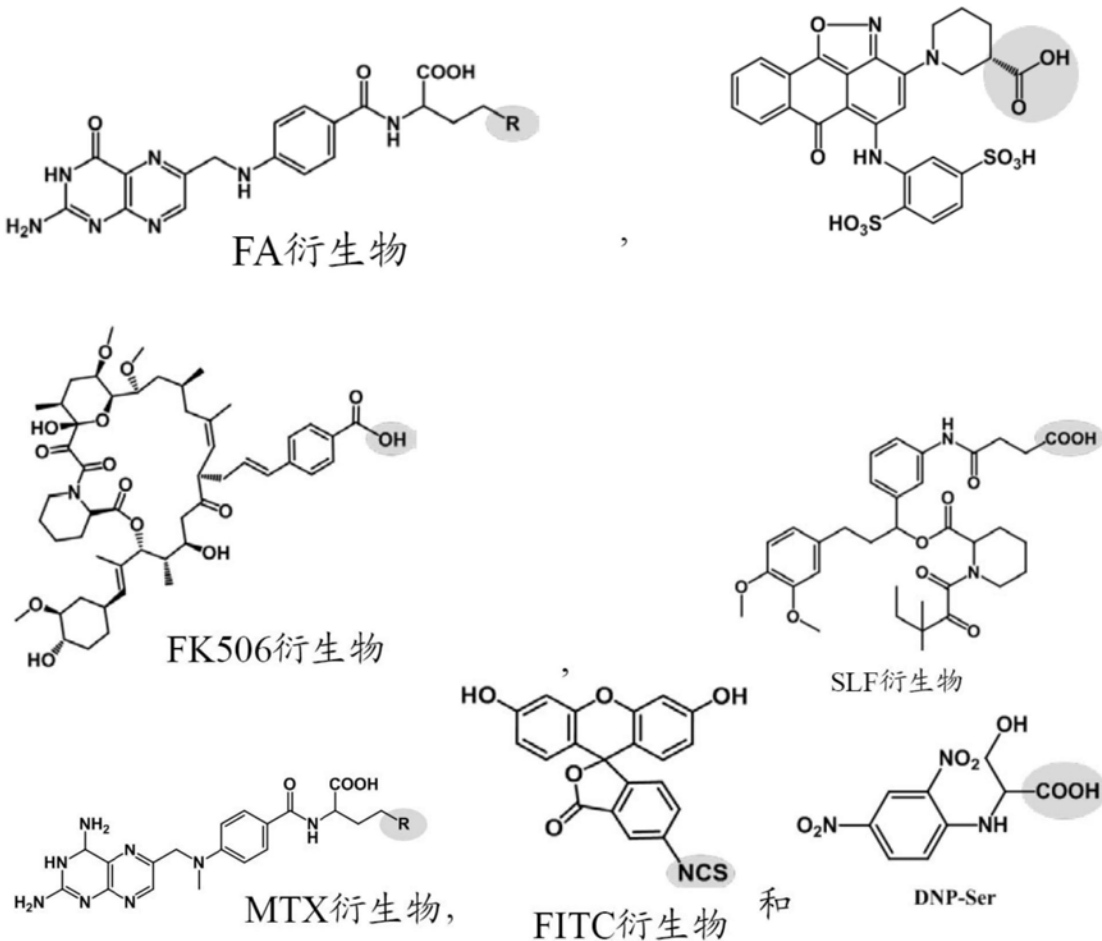


1. 用于细胞疗法的药物递送平台,其包含:
 - a. 用于移植的靶细胞上的工程化蛋白质,其中所述工程化蛋白质包含第一组分和第二组分,所述第一组分和所述第二组分通过肽接头连接,所述第一组分是非膜蛋白,所述第二组分是膜锚定的肽或蛋白质;
 - b. 至少一种与接头缀合的小配体,其中所述至少一种小配体对所述工程化蛋白质的至少一种组分具有内在的高亲和力;和
 - c. 至少一种与所述接头缀合的药物有效负载,其中当所述小配体结合所述工程化蛋白质的至少一种组分时,所述药物有效负载与所述靶细胞缔合。
2. 根据权利要求1所述的药物递送平台,其中所述药物有效负载是成像剂。
3. 根据权利要求1所述的药物递送平台,其中所述药物有效负载是细胞毒性药物。
4. 根据权利要求1所述的药物递送平台,其中所述药物有效负载是基因表达调节剂。
5. 根据权利要求1所述的药物递送平台,其中所述药物有效负载是所述细胞活性的调节剂。
6. 根据权利要求2所述的药物递送平台,其中所述成像剂选自下组:荧光染料罗丹明、荧光素和S0456。
7. 根据权利要求2所述的药物递送平台,其中成像剂选自下组:放射性同位素螯合成像部分、EC 20螯合头、NOTA和DOTA。
8. 根据权利要求3所述的药物递送平台,其中所述细胞毒性药物选自下组:微管溶素、DM1、DM4和奥利斯他汀。
9. 根据权利要求4所述的药物递送平台,其中所述调节剂选自下组:达沙替尼、MEK1/2抑制剂和PI3K抑制剂。
10. 根据权利要求4所述的药物递送平台,其中所述调节剂选自下组:HDAC抑制剂、激酶抑制剂和代谢抑制剂。
11. 根据权利要求4所述的药物递送平台,其中所述调节剂选自下组:GSK3B抑制剂、MAO-B抑制剂和Cdk5抑制剂。
12. 根据权利要求4所述的药物递送平台,其中所述调节剂是ROR γ t激动剂。
13. 根据权利要求4所述的药物递送平台,其中所述药物有效负载是siRNA mi181a1。
14. 根据权利要求4所述的药物递送平台,其中所述药物有效负载是磷酸酶抑制剂,包括但不限于针对SHP1/2、TC-PTP的抑制剂。
15. 根据权利要求1所述的药物递送平台,其中当所述小配体结合所述工程化蛋白质的至少一种组分时,所述药物有效负载被所述靶细胞进一步内化。
16. 根据权利要求1所述的药物递送平台,其中连接所述小配体和所述有效负载药物的接头选自下组:



17. 根据权利要求1所述的药物递送平台,其中所述工程化蛋白质组分选自下组:叶酸受体 α (FR α)、叶酸受体 β (FR β)、尿激酶受体 (uPAR)、FK506结合蛋白 (FKBP)、二氢叶酸还原酶 (DHFR)、针对异硫氰酸荧光素的单链可变片段 (针对FITC的scFv) 和针对二硝基酚的单链可变片段 (针对DNP的scFv)。

18. 根据权利要求1所述的药物递送平台,其中所述小配体选自下组:



19. 根据权利要求1所述的药物递送平台,其中所述第一组分是FKBP,所述第二组分是

对所述第一组分赋予糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚的肽, 并且所述小配体是FK506或其衍生物。

20. 根据权利要求18所述的药物递送平台, 其中所述第二组分是全长或截短的叶酸受体 (FR)。

21. 根据权利要求1所述的药物递送平台, 其中所述肽接头是SGGGS的至少一个区段。

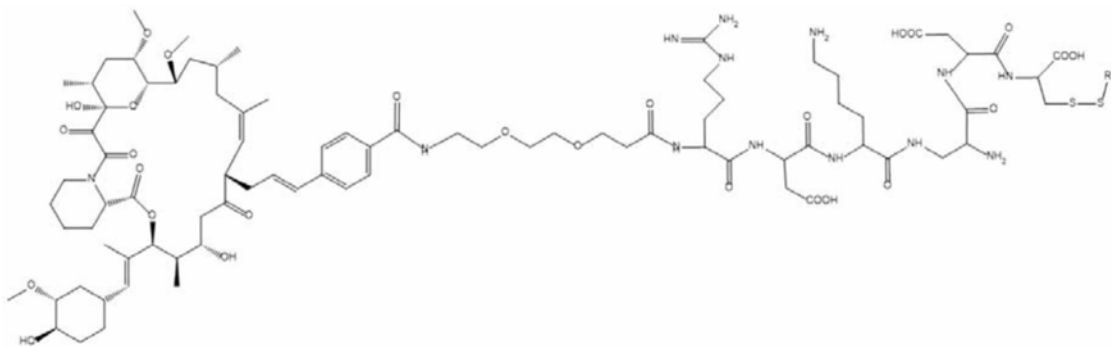
22. 根据权利要求1所述的药物递送平台, 其中所述工程化蛋白质选自下组: SEQ ID NO:1-2。

23. 根据权利要求1所述的药物递送平台, 其中所述工程化蛋白质选自下组: SEQ ID NO:12-15。

24. 根据权利要求1所述的药物递送平台, 其中所述用于移植的靶细胞是免疫细胞。

25. 根据权利要求1所述的药物递送平台, 其中所述用于移植的靶细胞是表达选自SEQ ID NO:3-4的氨基酸序列的CAR T细胞。

26. 根据权利要求1所述的药物递送平台, 其中所述小配体缀合物具有式I:



I

27. 根据权利要求1所述的药物递送平台, 其中所述用于移植的靶细胞是经设计的用于合成患者缺乏的生物化学物质的干细胞、祖细胞或移植细胞。

28. 根据权利要求1所述的药物递送平台, 其中所述用于移植的靶细胞是嵌合抗原受体 (CAR) T细胞。

29. 根据权利要求1所述的药物递送平台, 其中所述小配体进一步与荧光染料或放射性探针缀合。

30. 根据权利要求1所述的药物递送平台, 其中所述小配体进一步与内源基因表达的调节剂缀合。

31. 根据权利要求1所述的药物递送平台, 其中所述小配体进一步与转导的转基因表达的调节剂缀合。

32. 嵌合抗原受体T细胞, 其包含表达选自SEQ ID NO:12-15的氨基酸序列的构建体。

33. DNA构建体, 其编码选自SEQ ID NO:12-15的氨基酸序列。

34. 编码FKBP-FR α 融合受体的DNA构建体, 其包含与表达载体中的EF1a启动子可操作连接的SEQ ID NO:1-2中的任一项。

35. 权利要求34的DNA构建体, 其中所述表达载体是pWPI SEQ ID NO:5。

36. DNA构建体, 其包含SEQ ID NO:6-8中的任一项。

37. 移植的细胞, 其包含插入基因hFKBP-FR (SEQ ID NO:7) 和人抗CD19CAR (SEQ ID NO:9)。

38. 移植细胞,其包含插入基因mFKBP-FR (SEQ ID NO:8) 和小鼠抗CD19 CAR (SEQ ID NO:10)。

39. 调节细胞疗法效果的方法,其包括:

a. 鉴定用于移植的靶细胞,其中移植的靶细胞具有细胞疗法功能;

b. 在所述用于移植的靶细胞表面上提供工程化蛋白质,所述工程化蛋白质包含第一组分和第二组分,所述第一组分和所述第二组分通过肽接头连接,所述第一组分是非膜蛋白质,所述第二组分是膜锚定的肽或蛋白质;

c. 向所述靶细胞提供药物缀合物的有效负载,其中所述药物有效负载通过接头与小配体缀合,并任选与荧光染料缀合,其中所述小配体以高亲和力结合所述工程化蛋白质的至少一种组分,并且与所述药物有效负载一起被所述靶细胞内化;

d. 在所述靶细胞内释放所述有效负载药物以调节所述靶细胞的疗法功能。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述细胞疗法功能是向受试者提供光学引导手术。

41. 根据权利要求39所述的方法,其中所述细胞疗法功能是控制靶细胞增殖。

42. 根据权利要求39所述的方法,其中所述细胞疗法功能是对所述靶细胞衔接的癌细胞执行细胞毒性。

43. 根据权利要求39的方法,其中所述用于移植的靶细胞是免疫细胞。

44. 根据权利要求39的方法,其中所述用于移植的靶细胞是CAR T细胞。

45. 根据权利要求39所述的方法,其中所述用于移植的靶细胞是设计用于合成患者缺乏的生物化学物质的干细胞、祖细胞或移植细胞。

46. 根据权利要求39所述的方法,其中所述药物有效负载是选自罗丹明和FITC的荧光染料的成像剂,或选自EC20螯合头、NOTA和DOTA的放射性同位素成像剂。

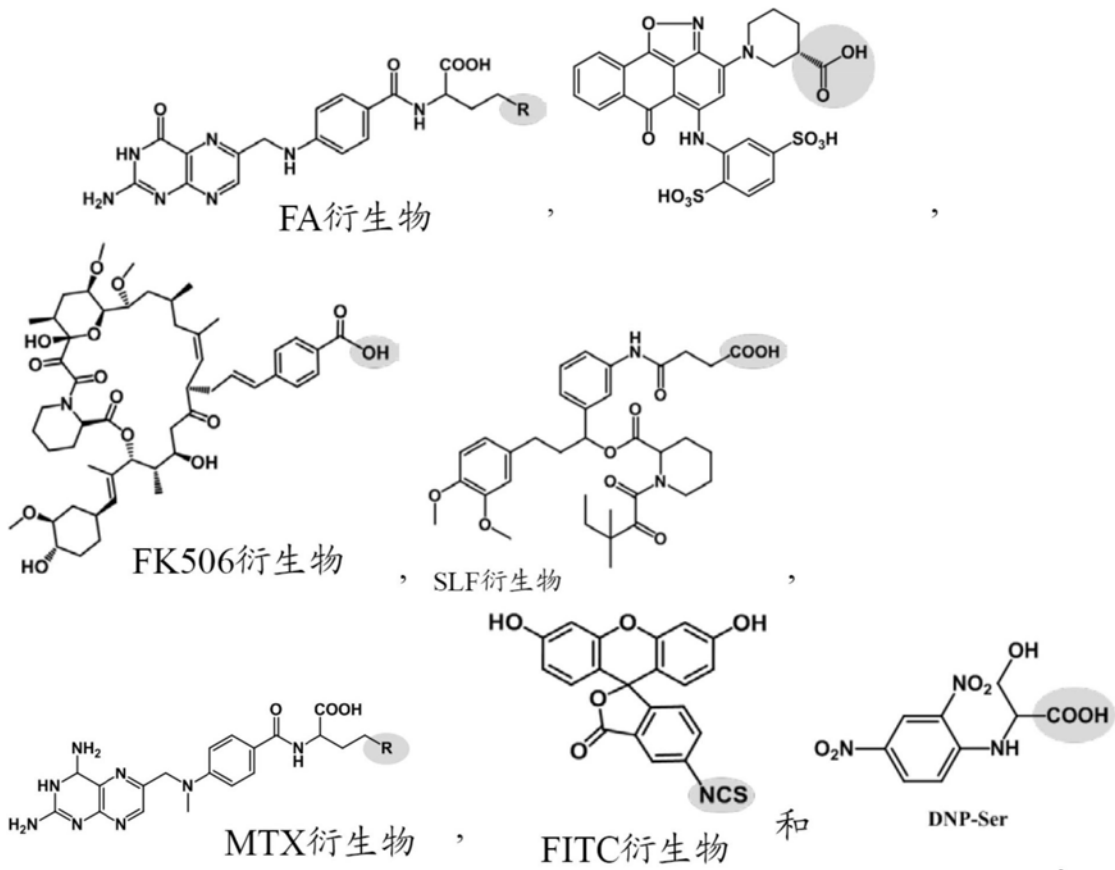
47. 根据权利要求38所述的方法,其中药物有效负载是选自下组的细胞毒性药物:微管溶素、DM1、DM4和奥利斯他汀。

48. 根据权利要求38所述的方法,其中所述有效负载药物是基因表达调节剂,其选自由达沙替尼、MEK1/2抑制剂和PI3激酶抑制剂组成的激酶抑制剂或mi181a1的siRNA。

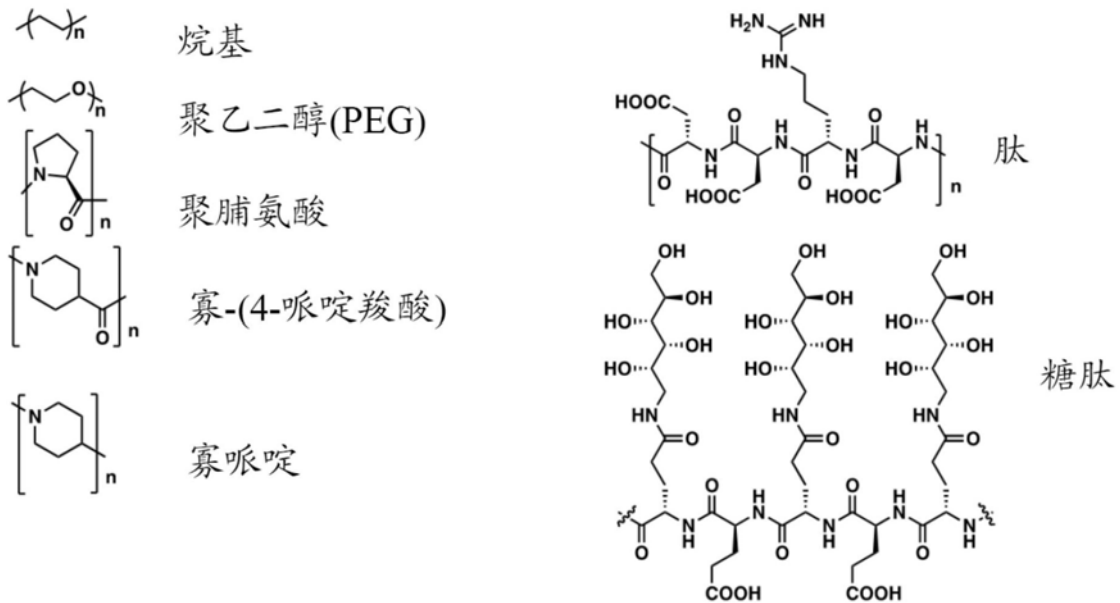
49. 根据权利要求38所述的方法,其中所述移植的靶细胞包含选自下组的融合蛋白: SEQ ID NO:12-15。

50. 根据权利要求39所述的方法,其中所述工程化蛋白质组分选自下组:FRa、FRb、uPAR、FKBP、DHFR、针对FITC的scFv和针对DNP的scFv。

51. 根据权利要求39所述的方法,其中所述小配体选自下组:



52. 根据权利要求39所述的方法, 其中连接所述小配体和所述有效负载药物的接头选自下组:

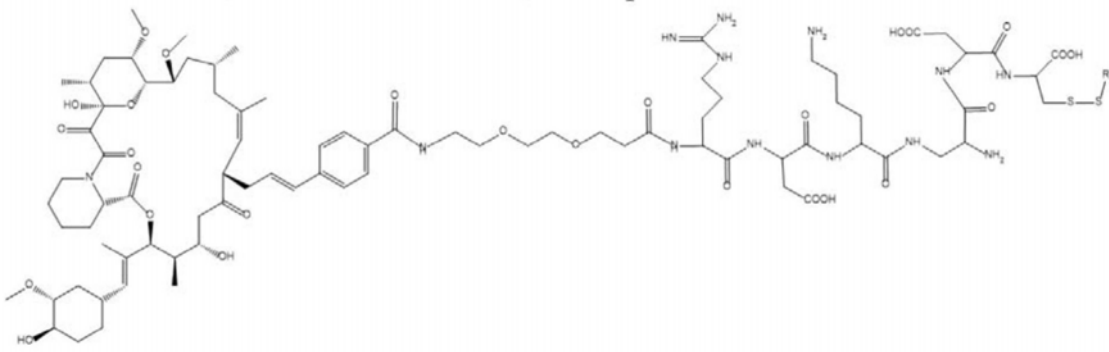


53. 根据权利要求39所述的方法, 其中所述移植的靶细胞包含选自下组的工程化FKBP-接头-FRa融合蛋白: SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2。

54. 根据权利要求39所述的方法, 其中所述移植的靶细胞是CAR T细胞, 其包含选自下组的工程化抗CD19 CAR T构建体: SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4。

55. 根据权利要求39所述的方法, 其中所述药物缀合物FK506可释放接头包含式I, 其中

FK506的结合域具有约100pM的对FKBP的亲合力：



I

56. 根据权利要求39所述的方法,其中所述移植的靶细胞是CAR T细胞,并且所述药物缀合物被设计用于控制由所述移植的CAR T细胞诱导的细胞因子风暴。

57. 根据权利要求39所述的方法,其中所述移植的靶细胞是CAR T细胞,并且所述药物缀合物含有设计用于控制不需要的T细胞增殖的调节剂。

58. 根据权利要求39所述的方法,其中所述移植的靶细胞是经设计的用于合成患者缺乏的生物化学物质的干细胞、祖细胞或移植细胞。

59. 根据权利要求39所述的方法,其中所述移植的靶细胞是NK细胞,并且所述药物缀合物是ROR γ t激动剂以控制Th17细胞介导的免疫应答。

60. 根据权利要求39所述的方法,其中所述药物有效负载是磷酸酶抑制剂,包括但不限于针对SHP1/2、TC-PTP的抑制剂。

用于细胞疗法的基于靶向性配体-有效负载的药物递送

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2017年2月17日提交的根据35 U.S.C. §119 (e) 的美国临时申请62/460,118的权益。该申请的内容明确完整并入本文。

发明领域

[0003] 本公开提供了用于细胞疗法的药物递送平台。特别地,工程化蛋白质与携带至少一种药物有效负载的高亲和力配体偶联,以通过工程化蛋白质被移植的细胞内化,从而调节移植的细胞疗法效果。

[0004] 发明背景

[0005] 在过去的几十年中,在本领域中已经在细胞类型、递送方法和合适的疾病模型方面取得了巨大进步。就细胞类型而言,目前的细胞疗法可大致分类为嵌合抗原受体(CAR)、用于肿瘤模型的细胞和基于干细胞的再生医学。

[0006] CAR T,也称为嵌合T细胞受体、嵌合免疫受体或人工T细胞受体,使免疫效应细胞(通常为T细胞或NK细胞)能够识别具有相应抗原的靶细胞并行使其细胞毒性活性。CAR-T技术的出现和发展为某些类型的癌症提供了希望,这使CAR-T成为生物医学研究和临床研究两者的领域的超级明星。

[0007] 再生医学是一个改变游戏规则医学领域,具有完全治愈受损组织和器官的潜力,为那些患有目前无法修复的状况的人提供解决方案和希望。发育和细胞生物学、免疫学和其他领域的进步为改进现有的再生疗法和开发新的疗法提供了新的机会。

[0008] 干细胞具有通过称为分化的过程发展成许多不同类型的细胞的能力,例如皮肤细胞、脑细胞、肺细胞等。干细胞是再生医学的关键组成部分,因为它们为新的临床应用打开了大门。

[0009] 多种干细胞(包括成体和胚胎干细胞)可用于再生医学。此外,在再生医学中使用各种类型的祖细胞,例如在脐带血中发现的那些祖细胞和称为诱导多能干细胞的生物工程化细胞。每种类型具有独特的特性,其中一些比其他类型更通用。

[0010] 许多正在开发的再生疗法始于特定患者自身的细胞。例如,可以收集患者自身的皮肤细胞,在实验室中重新编程以赋予它们某些特征,并递送回到患者以治疗他或她的疾病。

[0011] 尽管抗CD19 CAR T在白血病治疗的临床应用中取得了巨大成功,但致死性副作用如自肿瘤细胞快速裂解产生的细胞因子风暴,以及快速增殖的抗CD19 CAR T细胞对正常CD19+B细胞的杀伤需要CAR T细胞的更精细控制。在基于干细胞的再生疗法中,已经努力更好地了解移植细胞在靶组织中的分化过程和营养作用。同时,这些过程可被一些特异性递送到干细胞的小分子药物改变,从而进一步促进靶组织的再生。

[0012] 对CAR T细胞以及其他基于干细胞的再生疗法的另一个长期关注是这些移植细胞的致癌潜力。总之,具有控制移植细胞(CAR T细胞或干细胞)在它们被移植后的活性的私人门道会是理想的。

[0013] 发明概述

[0014] 本公开内容提供了用于微调细胞疗法的药物递送平台。药物递送系统包含：

[0015] a. 用于移植的靶细胞上的工程化蛋白质，其中融合蛋白包含第一组分和第二组分，所述第一组分和所述第二组分通过肽接头连接，所述第一组分是非膜蛋白，所述第二组分是膜锚定的肽或蛋白质；

[0016] b. 至少一种与接头缀合的小配体，其中所述至少一种小配体对所述工程化蛋白质的至少一种组分具有内在的高亲和力；和

[0017] c. 至少一种与所述接头缀合的药物有效负载，其中当所述小配体结合所述工程化蛋白质的至少一种组分时，所述药物有效负载与所述靶细胞缔合。

[0018] 在一些实施方案中，前述药物递送平台具有显像剂的药物有效负载。此类显像剂可以选自下组：荧光染料罗丹明、荧光素和S0456。或者，此类成像剂选自下组：放射性同位素螯合成像部分、EC 20螯合头、NOTA和DOTA。

[0019] 在一些实施方案中，前述药物递送平台具有细胞毒性药物的药物有效负载。此类细胞毒性药物可以选自下组：微管溶素、DM1、DM4和奥利斯他汀。

[0020] 在一些实施方案中，前述药物递送平台具有基因表达调节剂的药物有效负载。

[0021] 在一些实施方案中，前述药物递送平台具有细胞活性调节剂的药物有效负载。

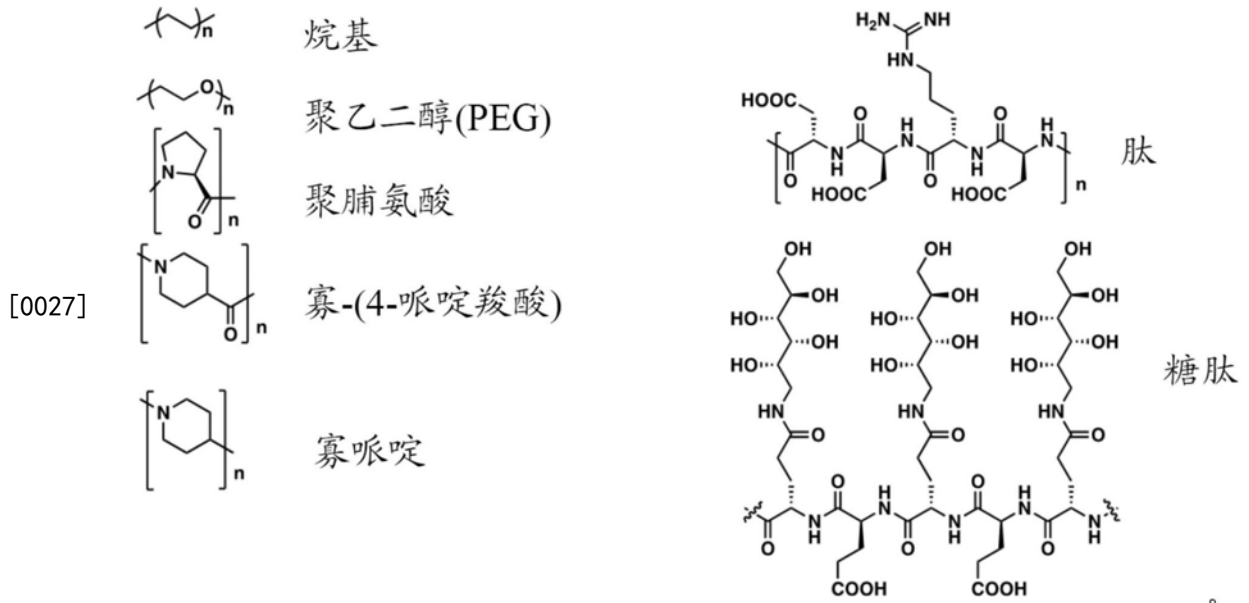
[0022] 在一些实施方案中，前述调节剂可以选自下组：达沙替尼、MEK1/2抑制剂和PI3K抑制剂；HDAC抑制剂、激酶抑制剂和代谢抑制剂；GSK3 β 抑制剂、MAO-B抑制剂和Cdk5抑制剂的组。

[0023] 在一些实施方案中，前述调节剂是磷酸酶抑制剂、ROR γ t激动剂或siRNA mi181a1。

[0024] 在一些实施方案中，前述药物有效负载是磷酸酶抑制剂，包括但不限于针对SHP1/2、TC-PTP的抑制剂。

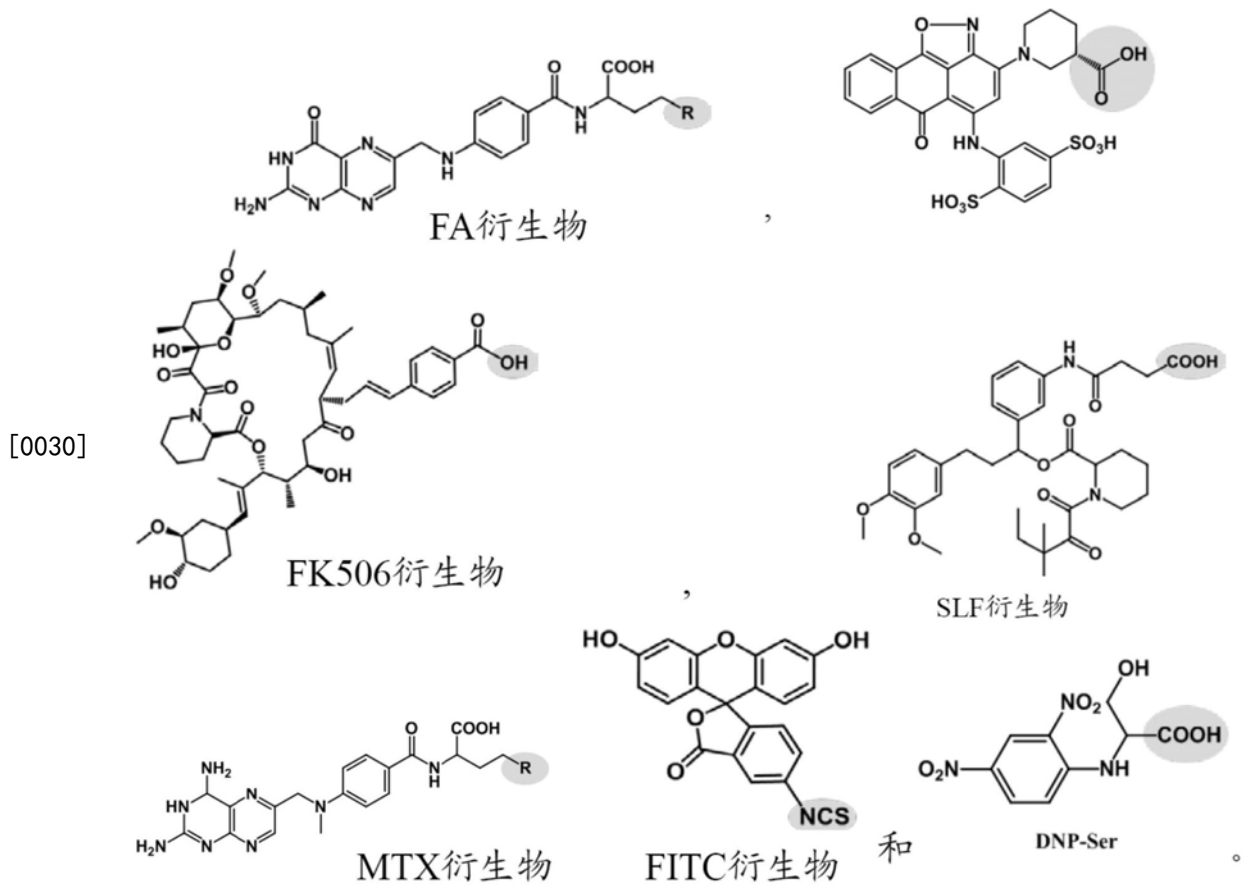
[0025] 在一些实施方案中，当小配体结合工程化蛋白质的至少一种组分时，药物递送平台中的前述药物有效负载被所述靶细胞进一步内化。

[0026] 在一些实施方案中，前述药物递送平台具有可释放的接头以连接小配体和有效负载药物。接头可以选自下组：



[0028] 在一些实施方案中,前述工程化蛋白质组分选自下组:叶酸受体 α (FR α)、叶酸受体 β (FR β)、尿激酶受体 (uPAR)、FK506结合蛋白 (FKBP)、二氢叶酸还原酶 (DHFR)、针对异硫氰酸荧光素的单链可变片段 (针对FITC的scFv) 和针对二硝基酚的单链可变片段 (针对DNP的scFv)。

[0029] 在一些实施方案中,前述小配体选自下组:



[0031] 在一些实施方案中,前述药物递送平台具有作为FKBP的第一组分,第二组分是对所述第一组分赋予糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚的肽,并且小配体是FK506或其衍生物。在一些

实施方案中,FK506衍生物消除钙神经素结合位点。

[0032] 在一些实施方案中,前述第二组分是全长或截短的叶酸受体 (FR)。

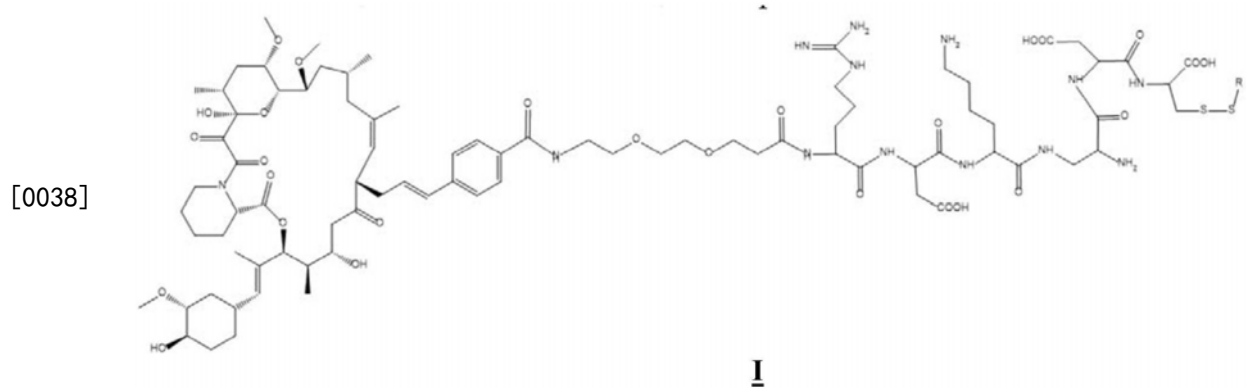
[0033] 在一些实施方案中,前述药物递送平台具有柔性肽接头SGGGS的至少一个区段以连接工程化蛋白质的第一组分和第二组分。

[0034] 在一些实施方案中,前述药物递送平台包含选自SEQ ID NO:1-2 (分别为小鼠FKBP-FR α 的氨基酸序列和人FKBP-FR α 的氨基酸序列)的工程化蛋白质。

[0035] 在一些实施方案中,前述药物递送平台包含选自SEQ ID NO:12-15的工程化蛋白质。

[0036] 在一些实施方案中,前述用于移植的靶细胞是免疫细胞。例如,免疫细胞可以是NK细胞或嵌合抗原受体T (CAR T) 细胞。此类CAR T细胞可以表达选自SEQ ID NO:3-4的氨基酸序列。

[0037] 在一些实施方案中,前述药物递送平台具有式I的小配体缀合物。



[0039] 在一些实施方案中,前述药物递送平台具有用于移植的靶细胞,其为表达SEQ ID NO:3 (小鼠抗CD19 CAR T构建体的氨基酸序列) 或SEQ ID NO:4 (人抗CD19 CAR T构建体的氨基酸序列) 的CAR T细胞。

[0040] 在一些实施方案中,前述小配体进一步与荧光染料或放射性探针缀合,用于追踪药物内化。

[0041] 在一些实施方案中,前述药物递送平台包含小配体,其进一步与内源基因表达的调节剂或转导的转基因表达的调节剂缀合。

[0042] 在一些实施方案中,前述药物递送平台,用于移植的靶细胞是设计用于合成患者缺乏的生物化学物质的干细胞、祖细胞或移植细胞。

[0043] 本公开内容还提供了CAR T细胞,其包含表达选自SEQ ID NO:12-15的氨基酸序列的构建体。

[0044] 本发明还提供了编码选自SEQ ID NO:12-15的氨基酸序列的DNA构建体。

[0045] 本公开内容还提供了编码FKBP-FR α 融合受体的DNA构建体,其包含与表达载体中的EF1a启动子可操作连接的SEQ ID NO:1-2中的任一项。在一些实施方案中,此类表达载体是具有SEQ ID NO:5的pWPI。

[0046] 本发明还提供了包含SEQ ID NO:6-8中任一项的DNA构建体。

[0047] 本公开内容还提供了包含插入基因hFKBP-FR (SEQ ID NO:7) 和人抗CD19 CAR (SEQ ID NO:9) 的移植的细胞。

[0048] 本公开内容还提供了包含插入基因mFKBP-FR (SEQ ID NO:8) 和小鼠抗CD19 CAR

(SEQ ID NO:10)的移植细胞。

[0049] 本公开内容还提供了调节细胞疗法效果的方法。所述方法包括：

[0050] a. 鉴定用于移植的靶细胞，其中移植的靶细胞具有细胞疗法功能；

[0051] b. 在所述用于移植的靶细胞表面上提供工程化融合蛋白质，所述融合蛋白包含第一组分和第二组分，所述第一组分和所述第二组分通过柔性肽接头连接，所述第一组分是非膜蛋白质，所述第二组分是糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定的肽或蛋白质；

[0052] c. 向所述靶细胞提供药物缀合物的有效负载，其中所述药物有效负载通过接头与小配体缀合，并任选与荧光染料缀合，其中所述小配体以高亲和力结合所述工程化融合蛋白质的至少一种组分，并且与所述药物有效负载一起被靶细胞内化；

[0053] d. 在所述靶细胞内释放所述药物以调节所述靶细胞的疗法功能。

[0054] 在一些实施方案中，前述细胞疗法功能是向受试者提供光学引导手术。

[0055] 在一些实施方案中，前述细胞疗法功能是控制靶细胞增殖。

[0056] 在一些实施方案中，前述细胞疗法功能是对靶细胞衔接的癌细胞执行细胞毒性。

[0057] 在一些实施方案中，前述移植的靶细胞是免疫细胞。例如，靶细胞是CAR T细胞。

[0058] 在一些实施方案中，前述移植的靶细胞是设计用于合成患者缺乏的生物化学物质的干细胞、祖细胞或移植细胞。

[0059] 在一些实施方案中，前述药物有效负载是选自罗丹明和FITC的荧光染料的成像剂，或选自EC20螯合头、NOTA和DOTA的放射性同位素成像剂。

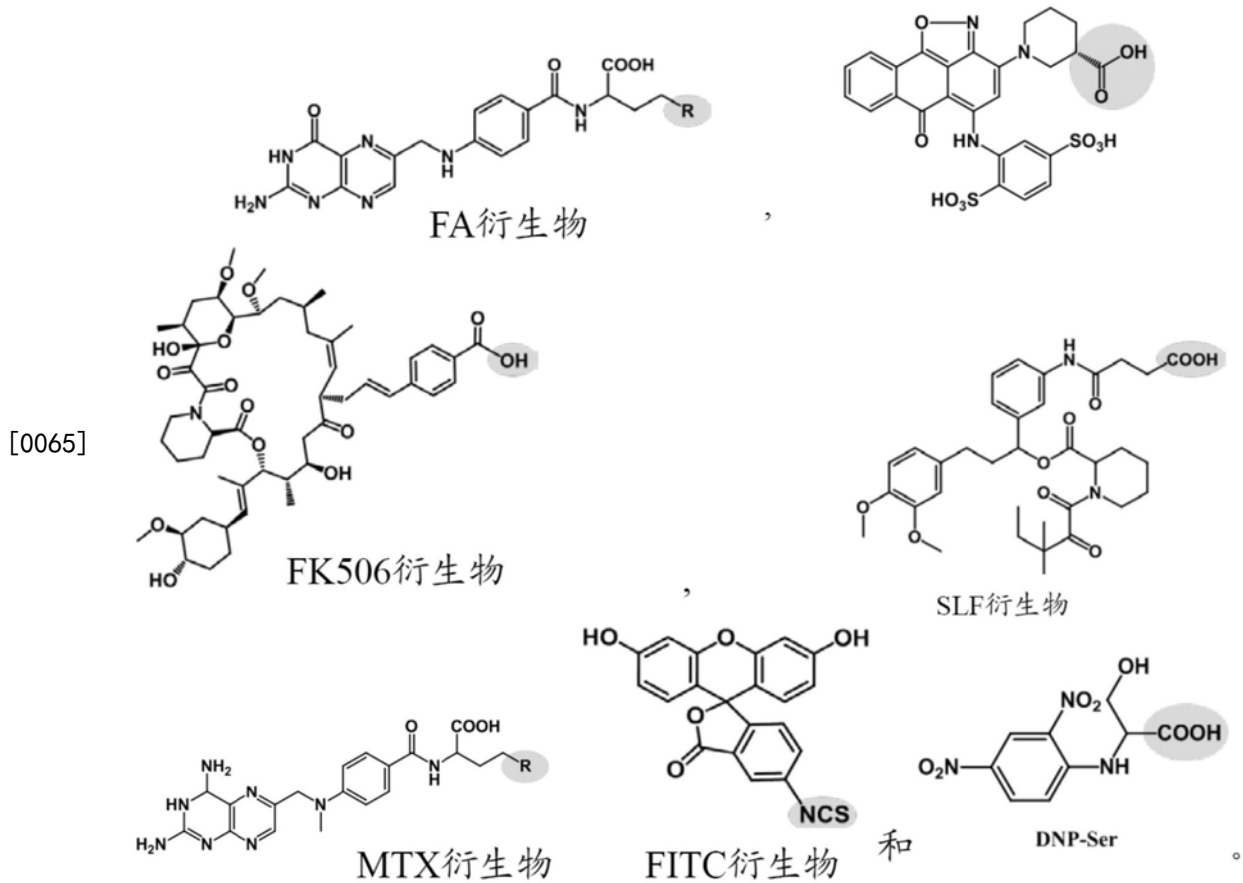
[0060] 在一些实施方案中，前述药物有效负载是选自下组的细胞毒性药物：微管溶素、DM1、DM4和奥利斯他汀。

[0061] 在一些实施方案中，前述药物有效负载是基因表达调节剂，其选自由达沙替尼、MEK1/2抑制剂和PI3激酶抑制剂组成的激酶抑制剂或mi181a1的siRNA。

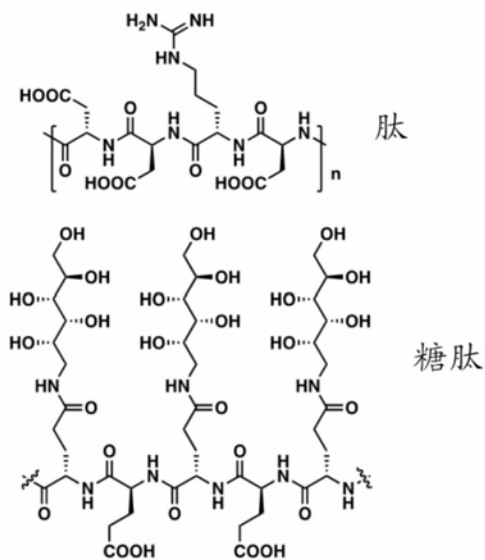
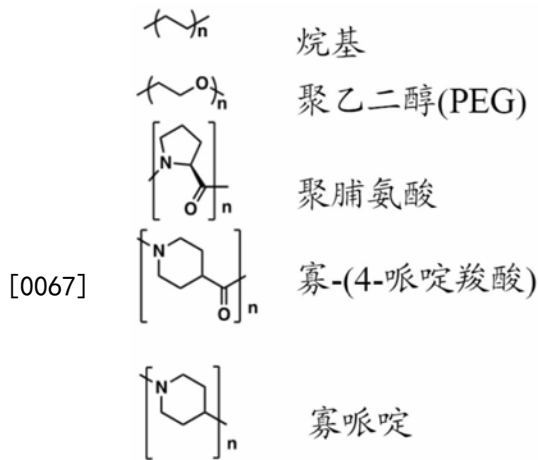
[0062] 在一些实施方案中，前述移植的靶细胞包含选自SEQ ID NO:12-15的融合蛋白。

[0063] 在一些实施方案中，前述工程化蛋白质组分选自FRa、FRb、uPAR、FKBP、DHFR、针对FITC的scFv和针对DNP的scFv。

[0064] 在一些实施方案中，前述的小配体选自下组：



[0066] 在一些实施方案中,连接小配体和有效负载药物的前述接头选自下组:

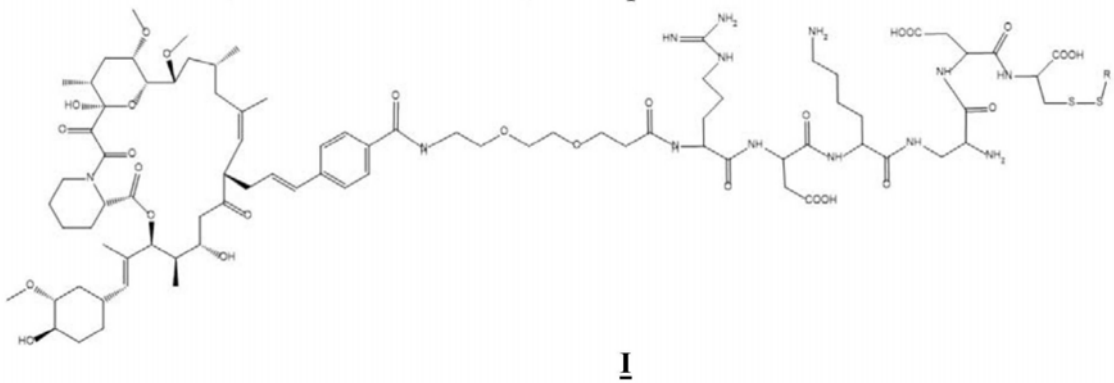


[0068] 在一些实施方案中,前述移植的靶细胞包含选自下组的工程化FKBP-接头-FRa融合蛋白:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2

[0069] 在一些实施方案中,前述移植的靶细胞是CAR T细胞,其包含选自SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的工程化抗CD19 CAR T构建体。

[0070] 在一些实施方案中,前述药物缀合物是包含式I的FK506可释放接头,其中FK506的结合结构域具有约4pM至约100pM的对FKBP的亲合力。

[0071]



[0072] 在一些实施方案中,前述移植的靶细胞是CAR T细胞,并且药物缀合物选自下组:GSK3b抑制剂,MAPK抑制剂以控制移植的CAR T细胞的过度细胞因子风暴。

[0073] 在一些实施方案中,前述移植的靶细胞是CAR T细胞,并且药物缀合物是设计用于控制不需要的T细胞增殖的调节剂。

[0074] 在一些实施方案中,前述移植的靶细胞是干细胞或祖细胞,并且药物缀合物是GSK3b抑制剂以加强骨折修复。

[0075] 在一些实施方案中,前述移植的靶细胞是设计用于合成患者缺乏的生物化学物质的干细胞、祖细胞或移植细胞;并且药物缀合物选自下组:MAO-B抑制剂和cdk5抑制剂,以治疗帕金森病或其他神经变性疾病。

[0076] 在一些实施方案中,前述移植的靶细胞是NK细胞,并且药物缀合物是ROR γ t激动剂以控制Th17细胞介导的免疫应答。

[0077] 参考以下附图、相关描述和权利要求书,将更好地理解本发明的这些和其他特征、方面和优点。

[0078] 附图简述

[0079] 图1:A.用于细胞疗法的基于FKBP-FRa和FK506-有效负载的药物递送平台的概述;B.用于CAR T细胞有效负载递送的秘密途径平台的图示。

[0080] 图2A.左:FK506的化学结构,其中FKBP结合位点(黄色)和衍生化位点(红色)突出显示。右:钙神经素A片段(绿色)、钙神经素B(青色)、FKBP12(紫色)和FK506(黄色)的三元复合物的共晶结构,PDB:1TC0

[0081] 图2B.工程化融合蛋白中两个模块的各种组合选择及其各自的配体选择,突出显示了潜在的衍生化位点。

[0082] 图3:左:CAR T细胞活性的负和正调节,改编自The quest for spatio-temporal control of CAR T cells,Sun J.etc.2015。右:AP1903(FK506二聚体)诱导的FKBP-胱天蛋白酶9介导的凋亡机制和AP1903的结构,改编自Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell Therapy,Malcolm K.B.etc.2011

[0083] 图4:a.具有FKBP-FRa插入物的pWPI表达载体图谱(hFRa 1-24:红色,FKBP:黄色,hFRa 25-258:红色)b.与FRa阳性KB细胞和未转导的K562细胞相比,FKBP-FRa转导的K562细胞显示出更高的约50kDa的条带(FRa的37kDa加上FKBP的12kDa)。c.有效负载载体构建体和CAR T构建体设计。d.FKBPFR3GS的构建体设计(记录为FF3)。从N末端到C末端,它具有作为信号肽的人FRa的1-24aa、人FKBP蛋白、三个Gly-Ser的接头,然后是人FRa的25-258aa。在FKBPFR1GS(记录为FF1)中,FF3的三个Gly-Ser的接头用一个Gly-Ser的接头替换,其他部分

未改变。e.4m5.3FR的构建体设计。从N末端到C末端,它具有hCD8信号肽、针对FITC的4M5.3抗体的scFv、GS接头、人FRa的25-258aa。

[0084] 图5.FKBPFR1GS融合受体中FR和FKBP之间的干扰。FKBPFR1GS融合蛋白中的叶酸的结合在低至0.01nM时阻断FK506-罗丹明的结合,并在50nM时完全消除FK506-罗丹明结合。

[0085] 图6.FKBPFR1GS jurkat细胞在结合OTL38后显示降低的FK506-罗丹明强度。融合受体自FK506-罗丹明(供体)至OTL38(FA-S0456,受体,ex/em:774/794nm)的FRET指示FR和FKBP之间的相互作用。

[0086] 图7.增加FKBP和FR之间的接头长度显著降低了两个部分之间的干扰。与FF1(FKBP和FR之间的1GS)相比,FF3(FKBP和FR之间的3GS)在10nM FA(其与人体中FA的生理浓度相当)存在下保留FK506-罗丹明的结合。

[0087] 图8.PI-PLC处理释放GPI锚定的融合受体FF3。具有FF3融合受体的Jurkat T细胞显示与20nM FA-FITC(EC17)的饱和结合,而在5mU PI-PLC或50mU PI-PLC处理后,FA-FITC丧失与细胞的结合,这指示GPI锚定的FF3融合受体的释放。

[0088] 图9.FKBPFR3GS融合受体中的FA-罗丹明结合曲线。在人T细胞上稳定表达的FKBPFR3GS融合受体可以以高亲和力($K_d=0.95\text{nM}$)结合叶酸衍生物(FA-罗丹明),所述亲和力与FR+KB细胞中的FA-罗丹明亲和力(K_d 约1nM)相当。因此,保留了融合受体中FR的结合特性。

[0089] 图10.FKBPFR3GS融合受体中的FK506-罗丹明结合曲线。在人T细胞上稳定表达的FKBPFR3GS融合受体能够以高亲和力($K_d=3.93\text{nM}$)结合FK506衍生物(FK506-罗丹明),这意味着融合受体中FKBP的结合特性得以保留。

[0090] 图11.SLF-FITC以相对高的结合亲和力($K_d=62\text{nM}$)结合FKBPFR3GS融合受体,而与游离SLF(100x,预温育)的竞争阻断此种结合。与亲本配体FK506相比,SLF(FK506的模拟物)呈现低10倍的对FKBPFR融合受体的结合亲和力,这与先前的报道一致。

[0091] 图12. 4M5.3FR融合受体中的FA-罗丹明结合曲线。FA-罗丹明可以以高亲和力($K_d=2.25\text{nM}$)结合人T细胞上稳定表达的4M5.3FR融合受体,所述亲和力与FR+KB细胞中的FA-罗丹明亲和力(K_d 约1nM)相当。因此,FR结合特性在4M5.3FR融合受体中得到保留。

[0092] 图13. 4M5.3FR融合受体中的FITC-AF647结合曲线。FITC-AF647可以以高亲和力($K_d=8.03\text{nM}$)结合人T细胞上稳定表达的4M5.3FR融合受体。100x comp表示游离的FITC钠。scFv 4M5.3与FITC的结合特性在4M5.3FR融合受体中得到保留。

[0093] 图14.FA-微管溶素能够介导针对FF3+人T细胞的受体特异性杀伤效果。用FA补偿(与FA的100x预温育)阻断该效果。这意味着通过FF3融合受体系统成功内化和释放游离药物微管溶素。

[0094] 图15.FA-微管溶素特异性杀伤混合人T细胞培养物中的hFF3+群体。随着FA-Tub浓度增加,hFF3+细胞的绝对数量减少,而在高浓度时hFF3-细胞也通过释放的药物和旁观者效应被杀伤。

[0095] 图16.SLF-Tub以 $IC_{50}=138\text{nM}$ 特异性杀伤hFF3+Jurkat细胞。这指示通过FKBPFR3GS融合受体成功内化SLF-Tub并在细胞内释放微管溶素。

[0096] 图17.FITC-DM4和FITC-Tub均可以特异性杀伤4M5.3FR+人T细胞,而FITC-Tub具有更高的 IC_{50} 。游离FITC钠(100x预温育)的补偿阻断受体介导的杀伤效果。这意味着通过

4M5.3FR融合受体将FITC-细胞毒性药物的成功内化和释放到T细胞中。

[0097] 图18 FITC-微管溶素特异性杀伤混合人T细胞培养物中的4M5.3FR+群体。随着FITC-Tub浓度增加,4M5.3FR+细胞的绝对数量减少,而在高浓度时4M5.3FR-细胞也通过释放的药物和旁观者效应被杀伤。

[0098] 图19.FITC-DM4特异性杀伤混合人T细胞培养物中的4M5.3FR+群体。随着FITC-DM4浓度增加,4M5.3FR+细胞的绝对数量减少,而在高浓度时4M5.3FR-细胞也通过释放的药物和旁观者效应被杀伤。

[0099] 图20.浓度10nM的达沙替尼(Lck抑制剂)和依鲁替尼(ITK抑制剂)降低抗CD19 CAR T细胞(FMC63 CAR T,效应器)对CD19+Raji肿瘤细胞(靶物)的裂解效果。测试了两个效应器:靶物比率(E:T)。将正常T细胞和抗CD19 CAR T与CD19-K562细胞用作阴性对照。

[0100] 图21. FITC-达沙替尼可降低FMC63+4M5.3FR+hT细胞对Raji细胞的裂解效应。这意味着通过4M5.3FR融合受体成功将FITC-达沙替尼内化和释放到T细胞中并且将达沙替尼释放到T细胞中。

[0101] 图22. 100nM浓度的TC-PTP抑制剂减少耗尽的抗CD19 CAR T细胞中的共抑制剂分子群(通过用CD19+Raji细胞刺激7次产生,参见下面的详细程序)。PD-1、LAG3和双阳性群体在治疗后均降低。这意味着磷酸酶抑制剂,如TC-PTP抑制剂可以用作用于使耗尽的CAR T细胞恢复活力的秘密门道平台的有效负载。

[0102] 表1.FKBP-FRa细胞疗法平台和相应有效负载的潜在应用。

[0103] 序列表

[0104] SEQ ID NO:1小鼠FKBP-FRa的氨基酸序列

[0105] SEQ ID NO:2人FKBP-FRa的氨基酸序列

[0106] SEQ ID NO:3小鼠抗CD19 CAR T构建体的氨基酸序列

[0107] SEQ ID NO:4人抗CD19 CAR T构建体的氨基酸序列

[0108] SEQ ID NO:5用于人T细胞转导的载体pWPI

[0109] SEQ ID NO:6pMP71 gb NotIEcoRI小鼠抗CD19,用于小鼠T细胞转导

[0110] SEQ ID NO:7pWPI-FRa 1-24 FKBP FRa

[0111] SEQ ID NO:8pWPI mFKBP-mFRa SGGGS

[0112] SEQ ID NO:9pHR EcorI hAnti cd19 1D3 myc铰链cd28 cd3zeta

[0113] SEQ ID NO:10pWPI pmeimAnti cd19 1D3 myc铰链cd28 cd3zeta

[0114] SEQ ID NO:11具有GPI锚氨基酸序列的FKBP-1SG-FR

[0115] SEQ ID NO:12具有GPI锚氨基酸序列的FKBP-3SG-FR

[0116] SEQ ID NO:13具有GPI锚氨基酸序列的4M5.3-FR

[0117] SEQ ID NO:14FMC63-T2A-FKBP3SGFR

[0118] SEQ ID NO:15FMC63-T2A-4M5.3SGFR

[0119] SEQ ID NO:16具有信号肽的FRb

[0120] SEQ ID NO:17具有信号肽的uPAR

[0121] SEQ ID NO:18DHFR

[0122] SEQ ID NO:19针对FITC:4M5.3的scFv (Kd=200pM)

[0123] SEQ ID NO:20针对FITC 4D5Flu的scFv (Kd=10nM)

[0124] SEQ ID NO:21针对DNP SPE7的scFv

[0125] 发明详述

[0126] 虽然在本文的附图和说明书中详细说明和描述了本公开内容的构思,但是附图中的结果及其描述应当认为是示例性的而非限制性的;应当理解,仅示出和描述了说明性实施方案,并且希望保护落入本公开内容的精神内的所有改变和修改。

[0127] 除非另外定义,否则科学和技术命名法具有属于本公开内容的领域中普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0128] 本公开内容提供了通过在移植的细胞表面上遗传掺入融合受体来控制移植细胞活性的新平台。然后,使用小分子配体和移植细胞表面上的融合受体之间的内在高亲和力通过小分子配体缀合的药物有效负载特异性靶向这些移植的细胞。融合受体的一部分负责内化缀合物,并且一旦有效负载在移植的细胞内,它将通过可释放的接头释放。根据移植的细胞类型和要对移植细胞施加的期望调节,药物有效负载可以是各种功能。通过改变缀合物中的有效负载,例如作为细胞毒性药物或激酶抑制剂,药物有效负载可用于控制移植细胞的多个方面,例如增殖、分化或细胞因子释放概况。

[0129] 肽基-脯氨酸异构酶(PPI酶)家族由FK506结合蛋白(FKBP)、亲环蛋白和细蛋白(parvulin)组成。在人类中有18种FKBP、24种亲环蛋白和3种细蛋白。这些中,与FKBP12($KD^{FK506} \approx 0.2nM$)相比,FKBP51和FKBP52共享高至中等的FK506结合亲和力,分别为 $KD^{FK506} \approx 104nM$ 和 $KD^{FK506} \approx 23nM$ 。另外,这两种FKBP无一在细胞膜上表达,导致我们的系统中很少交叉结合活性。还努力设计对FKBP12^{F36V}以及FKBP51^{F67V}具有比FKB^{PWT}更高亲和力的合成配体,其保留野生型蛋白质的整体结构。所有同源物和突变蛋白质以及它们的上述配体可以适用于本公开内容。

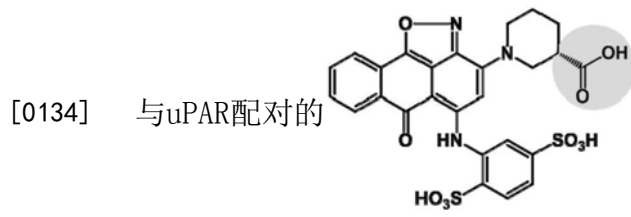
[0130] 特别地,在一个实施方案中,选择一对示例性的小分子配体和融合受体作为FK506-FKBP。整个过程可以在图1A中概括,其中FK-506-有效负载首先与FKBP-FRa工程化细胞结合;在此结合后,跨膜融合蛋白将内化有效负载-接头-FK506。接下来,内化的FK506-有效负载在接头处被切割,并且有效负载在细胞中被释放。根据细胞类型和有效负载类型,释放的有效负载药物可以发挥其期望的功能。

[0131] 在图1B中,显示了特定嵌合抗原受体T细胞介导的细胞疗法。在此模型中,将表达融合蛋白的CAR T细胞呈递给癌细胞,所述融合蛋白具有从N末端到C末端包含合适的信号肽、与GPI锚的蛋白质模块1连接的蛋白质模块2的结构。在一些实施方案中,癌细胞具有CD19表面蛋白,其在靶向配体结合融合受体的至少一个模块时将被CAR T细胞识别并衔接与CAR T细胞相关的有效负载。通常,凭借靶向配体对这些模块中任一个的高亲和力,与配体相关的有效负载可以通过嵌合抗原受体内化到靶细胞中并释放以衔接癌细胞。

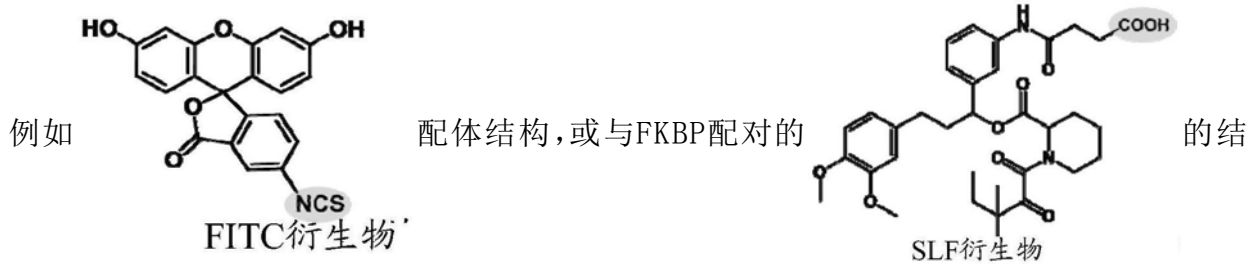
[0132] 可以存在许多不同的GPI锚定蛋白组合,表示为模块1及其配体,和模块2靶细胞表面蛋白及其各自的配体,在图2B中呈现。涵盖模块1蛋白质或模块2蛋白质或两者可以衔接高亲和力靶向配体以促进配体缀合的有效负载递送。例如,具有包含FRa-接头-FKBP结构的融合蛋白是可行的,其中FRa与FA衍生物的衔接同时FKBP与FK506衍生物衔接,FA衍生物或FK 506衍生物或两者都可以与有效负载,例如细胞毒性药物、成像剂或调节剂连接。利用携带相同或不同有效负载的此种灵活性,可以实现不同或相同有效负载的一些出乎意料的协同效应或调节效应,或者若有效负载是成像剂则观察到靶细胞。通过更多实例将理解此系

统的有效负载递送的灵活性和多样性的优点。

[0133] 类似地,与GPI锚定蛋白配对的配体的另一个实施方案可以是



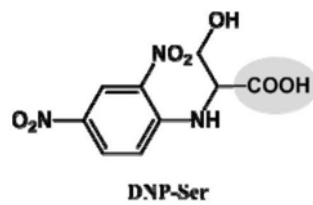
[0135] 还涵盖的是,FITC或其衍生物可以结合针对FITC的抗体的单链可变片段(scFv),



构,或与DHFR配对的

MTX衍生物

或与针对DNP的scFv配对的



[0136] 值得提及选择FK506-FKBP作为此递送系统中的示例性配体-蛋白质对的一些优点。1. FKBP不是天然存在于哺乳动物细胞膜上的膜蛋白,因此FK506-有效负载缀合物将特异性结合靶细胞;2. FKBP蛋白是一种具有分子量12kDa的相对较小的蛋白质,这使得它在对受体结构和内化特性的最小扰动的情況下更容易与其他受体融合。3. FK506不天然存在于人体内,因此融合受体不会被阻断;4. FK506-FKBP之间的结合亲和力为约4pM,因此有效负载药物可以以高亲和力递送;5. 可获得FK506-FKBP的共晶结构,并且FK506的完善建立的衍生位点在消除FK506和钙神经素之间的不需要的结合的情况下保留FK506-FKBP的结合(参见图2A)。

[0137] 涵盖可以修饰FKBP的序列,并且可以相应地修饰相应的FK506配体,使得FKBP的修饰形式和FK506的修饰形式仍然具有如本文示例的或者优于本公开的期望亲和力。

[0138] 对于融合蛋白的其他部分,叶酸受体(FR)由于其充分理解的内化过程而选择作为单体。先前的研究显示“魔术碳酸盐”连接的叶酸缀合物可以通过FR内化,并被细胞内的还原环境切割。使用此种机制,FK506-FKBP缀合的药物有效负载被FR内化,然后释放到细胞质中。

[0139] 由于CAR T疗法的巨大潜力以及严重的副作用,已经报道了几种受控的CAR T细胞设计。它们中的大多数通过掺入Boolean门或用于T细胞激活的级联途径来关注开/关转换(参见图3,左图,其描绘了CAR T细胞活性的负调节和正调节,改编自The quest for

spatio-temporal control of CAR T cells, Sun J. etc. 2015)。Malcolm K.B.小组设计了FKBP-胱天蛋白酶9融合蛋白,并使用FK506二聚体诱导靶细胞凋亡(参见图3,右图,其描绘了AP1903(FK506二聚体)诱导的FKBP-胱天蛋白酶9介导的凋亡的机制和AP1903的结构,改编自Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell Therapy, Malcolm K.B. etc. 2011)。

[0140] 本公开内容与这些报道的方法相比具有以下几个优点:1. 替换二元开/关转换,我们的平台可以递送多个种类的调节有效负载,修饰靶细胞的许多方面,因此与二元开/关转换相比它具有大的灵活性;2. 控制部分FK506-有效负载是一种小分子,其与预先工程化细胞相比可以进行线性控制和剂量优化。3. 平台不仅可用于CAR T细胞,而且还可用于许多其他基于干细胞的再生疗法。

[0141] 此平台的最大的新颖性和最重要的部分是多功能有效负载,其可以进行选择以解决潜在的副作用或改善细胞疗法的效率。例如,若出现以下情况,可以将细胞毒性药物递送至移植细胞:1. 细胞过度增殖并影响正常器官或系统,如抗CD19 CAR T细胞。2. 细胞变得致癌,这在于基于慢病毒的基因修饰和干细胞的内在特征。

[0142] 另一方面,由于靶组织的抑制性微环境,一些细胞疗法不太成功。例如,在针对实体瘤的CAR T细胞疗法中,除低穿透率之外,CAR T的增殖和活化受到MDSC和肿瘤细胞高度抑制。这可以通过RORrt激动剂或MAP激酶抑制剂诱导的T细胞活化以及TLR8激动剂诱导的CAR T细胞中颗粒酶B的表达来潜在减轻。尽管胞内靶物(如RORrt)可更适合于我们的有效负载,但由于细胞膜上的接近性,膜受体如TLR8也可以是可接近的。

[0143] 在干细胞再生疗法中,根据疾病模型,有效负载更加多样化。替代递送已经通过使用干细胞作为基因递送平台开发的预先固定的基因,本公开为移植的细胞及其微环境提供微调,并通过多种多样的小分子有效负载获得期望的表型。由于小分子与特异性靶向FKBP-FRa过表达的移植细胞的FK506缀合,也避免了小分子的正常组织的非特异性靶向。

[0144] 许多实例之一是诱导间充质干细胞(MSC)中BMP2的过表达,用于骨骼再生疗法中的骨折修复。同时,通过经由此种药物有效负载递送系统将GSK3 β 抑制剂引入移植的细胞中,可以提高BMP2和/或VEGF的表达水平。GSK3 β 抑制剂是骨折修复期望的药物。因此,GSK3 β 抑制剂作为潜在的有效负载是理想的,用于进一步调节移植的MSC的功能以及骨折部位内的微环境。

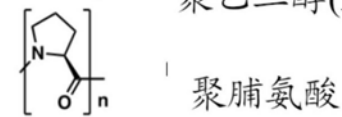
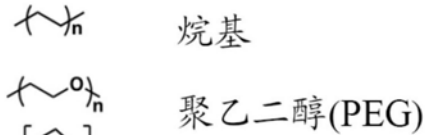
[0145] 此药物有效负载递送系统的另一个例子涉及神经变性疾病,包括阿尔茨海默病、帕金森病等,其中基于MSC的疗法拥有有希望的未来。已经修饰MSC以过表达GDNF、VEGF和许多其他细胞因子以促进神经元再生。同时,已经证实小分子如MAO-B抑制剂增加星形胶质细胞中GDNF、NGF和BDNF的表达。还提出了几种激酶抑制剂用于治疗阿尔茨海默病,例如PI3K抑制剂(BEZ235)、Cdk5抑制剂(roscovitine)和GSK3 β 抑制剂(NP-12)。在神经变性模型中使用这些小分子对MSC的FK506-FKBP对靶向性特异性递送将在避免这些有效抑制剂和激动剂在其他非靶向组织中的副作用的情况下改善再生功效。

[0146] 材料与方法:

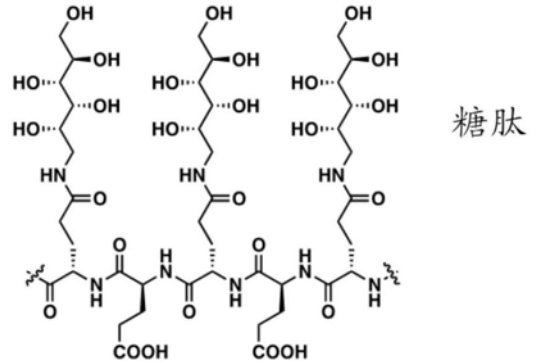
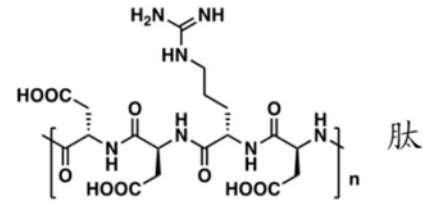
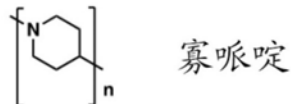
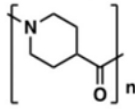
[0147] 化合物和合成程序:

[0148] 靶向配体通过接头与有效负载连接。接头优化选项如下列出。有效负载表征为3类:I成像、II细胞毒性药物、III调节性小分子药物。

[0149] 接头优化:



[0150] 寡-(4-哌啶羧酸)



[0151] 化合物分类:

类别	功能	实例
I	成像	荧光染料: 罗丹明, FITC 放射性同位素成像: EC20螯合头、NOTA、DOTA
II	细胞毒性药物	抗微管药物: 微管溶素、DM1、DM4
III	调节剂	激酶抑制剂: 达沙替尼、MEK1/2i、PI3Ki siRNA: mi181a1

[0153] 详细的化合物结构和合成路径

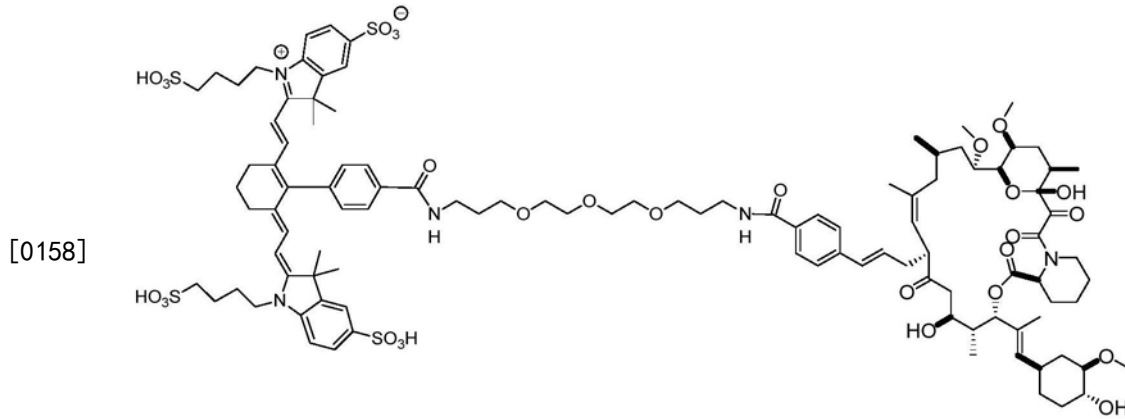
[0154] FK506-罗丹明:



[0156] 程序: 将二甲基甲酰胺中的罗丹明-NHS酯 (1.0当量) 与Boc-NH-PEG₃-NH₂ (1.2当量) 和二异丙基乙胺 (3.0当量) 在室温反应2小时。通过具有UV检测器的制备型反相HPLC纯化产物。通过在1:10TFA-二氯甲烷系统中搅拌2小时, 将纯化的罗丹明-PEG₃-NH-Boc缀合物 (1.0当量) 进行Boc去保护。然后将粗游离胺产物溶解在二甲基甲酰胺中, 并在二异丙基乙胺 (3.0当量) 存在下用EDC (2.0当量), HOBT (2.0当量) 活化。15分钟后, 加入FK506-CO₂H (1.2当量)

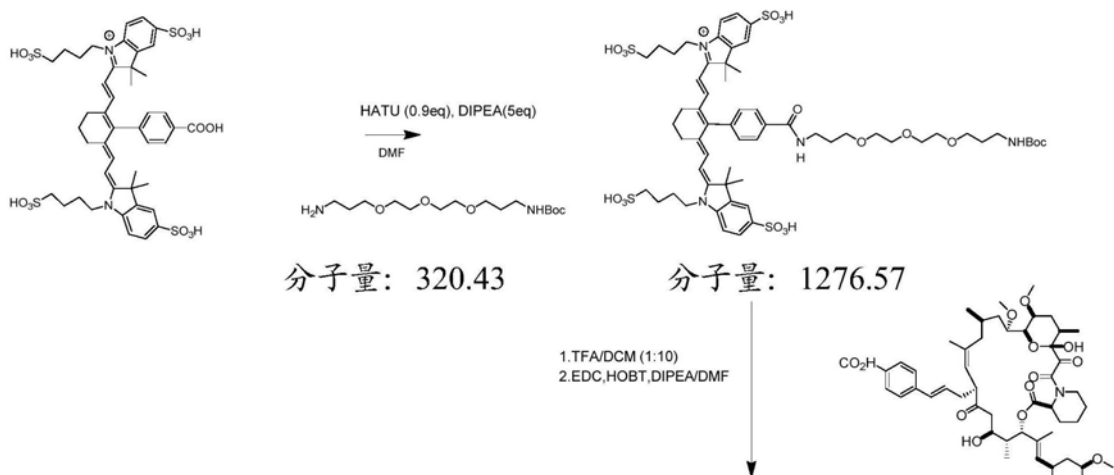
量,使用下述参考文献中的程序合成:Bioorg.Med.Chem.,17(2009)5763-5768)并将反应混合物搅拌过夜。在具有UV检测器(在280nm波长下监测)的制备型反相HPLC上纯化后,分离出最终的FK506-罗丹明缀合物。将粗产物加载到Xterra RP18制备型HPLC柱(Waters)上,并且用梯度条件洗脱,所述梯度条件开始于95%5mM磷酸钠(流动相A,pH7.4)和5%乙腈(流动相B),并且在35分钟内以12mL/min的流速达到0%A和50%B。在7分钟分析型HPLC-MS分析中的梯度(0-50%B)期间产物峰的保留时间=2.5分钟。ESI $m/z=1539.6$ 。缩写:PEG=聚乙二醇;EDC=1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺;HOBT=羟基苯并三唑;HPLC=高效液相色谱。

[0157] FK506-NIR染料:

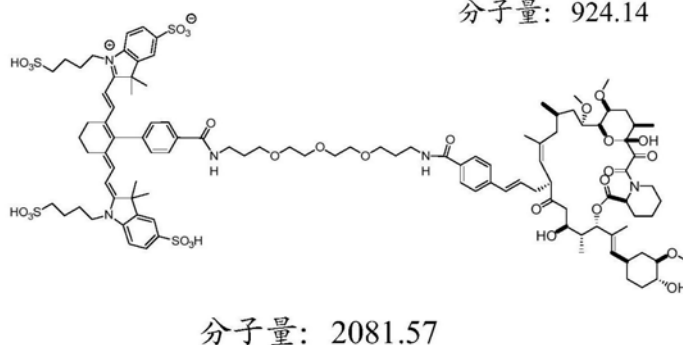


分子量 2081.57

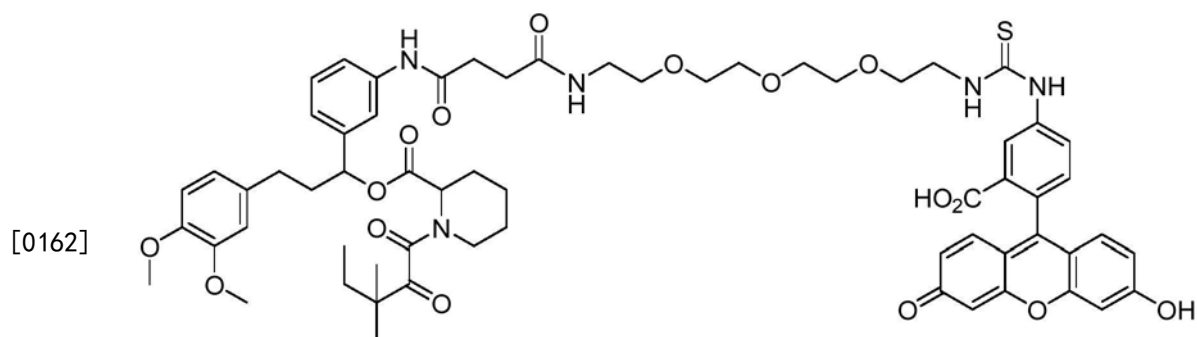
[0159] 合成程序:



[0160]



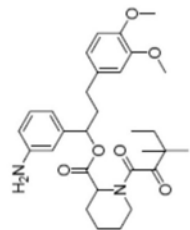
[0161] SLF-FITC:



[0162]

[0163]

合成程序:

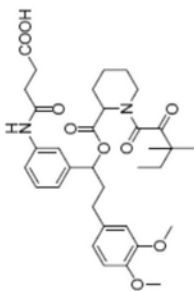


化学式: $C_{30}H_{40}N_2O_6$
 正确质量: 524.29
 分子量: 524.66

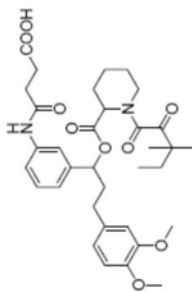


化学式: $C_4H_4O_3$
 正确质量: 100.02
 分子量: 100.07

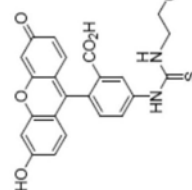
DMAP, DMF



化学式: $C_{34}H_{44}N_2O_9$
 正确质量: 624.30
 分子量: 624.73

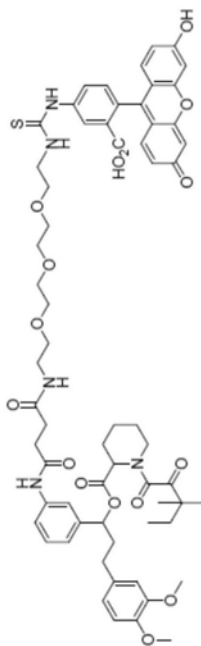


化学式: $C_{34}H_{44}N_2O_9$
 正确质量: 624.30
 分子量: 624.73



化学式: $C_{29}H_{31}N_3O_8S$
 正确质量: 581.18
 分子量: 581.64

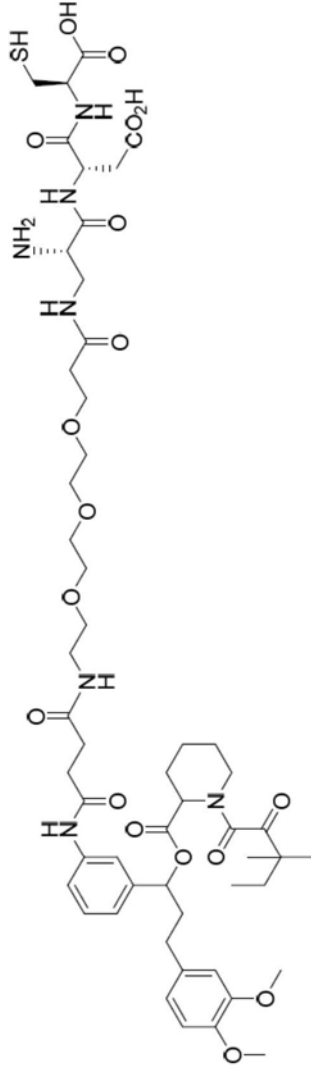
HATU, DIPEA, DMF



化学式: $C_{63}H_{73}N_5O_{16}S$
 正确质量: 1187.48
 分子量: 1188.36

[0164]

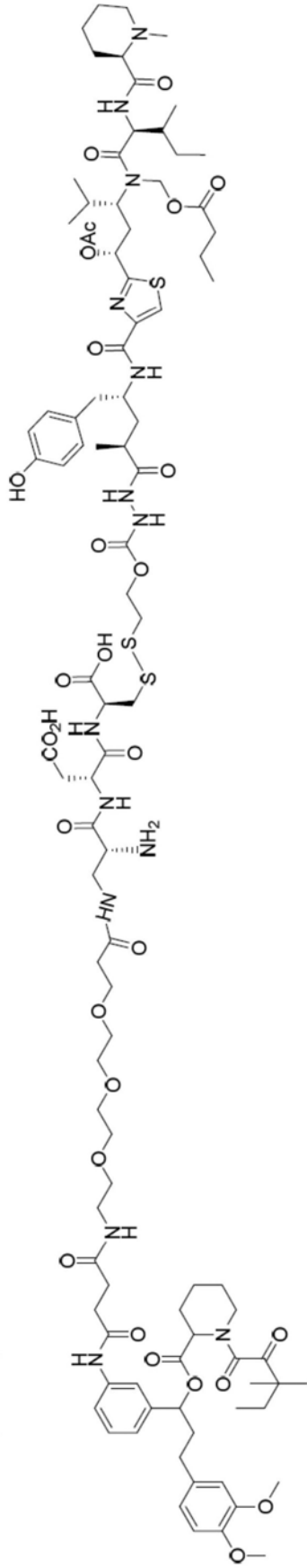
SLF-EC20:



化学式: C₅₃H₇₇N₇O₁₈S
正确质量: 1131.50
分子量: 1132.29

[0166]

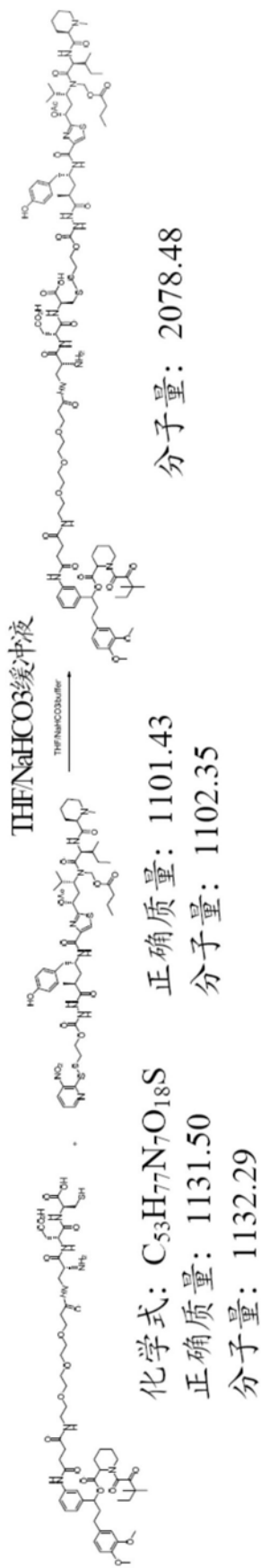
SLF-微管溶素:



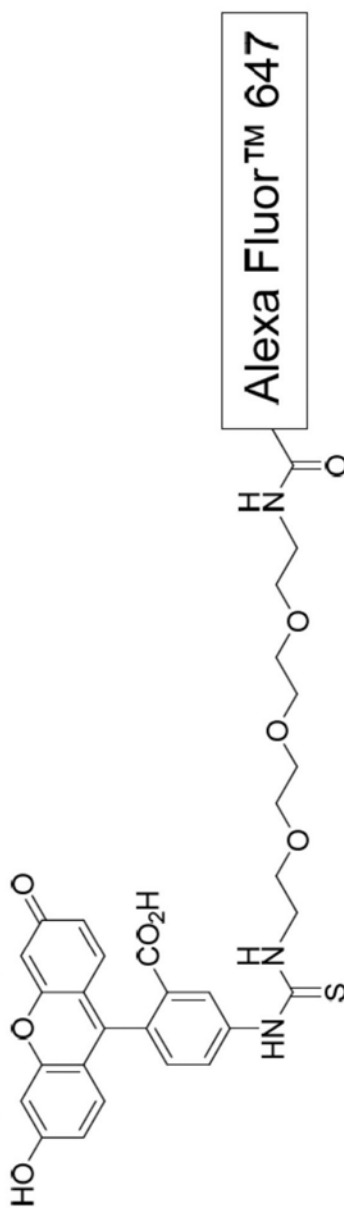
分子量: 2078.48

[0167]

合成程序:

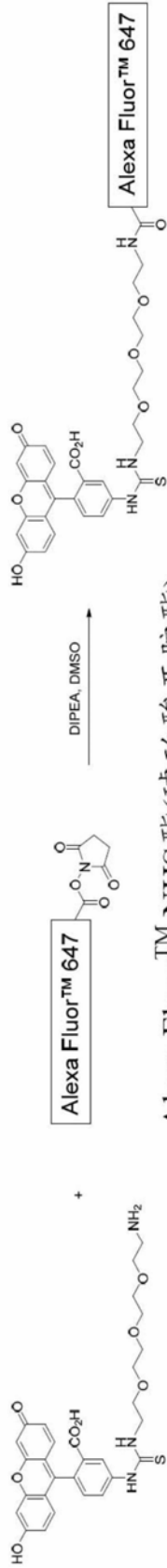


FITC-AF647:



[0168]

合成程序:

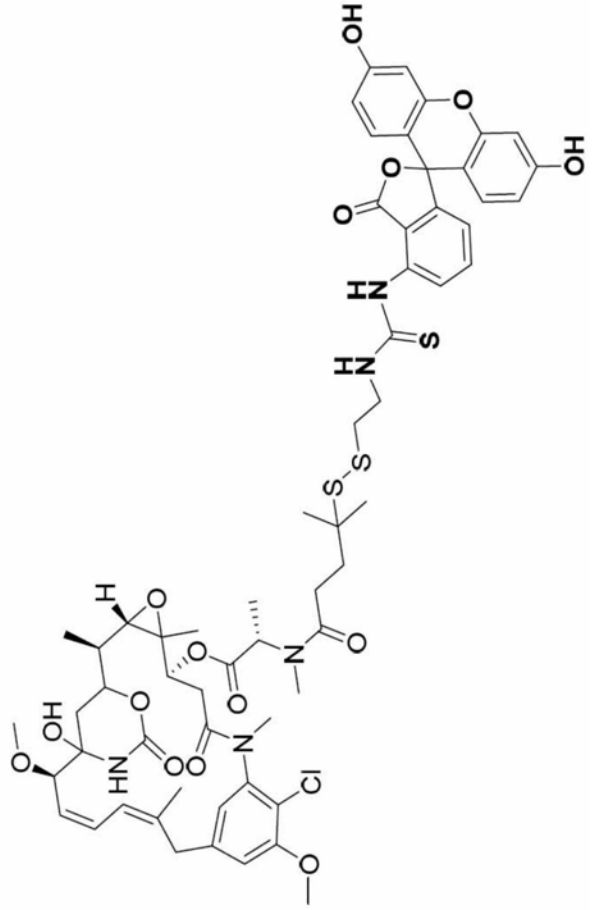


化学式: $C_{29}H_{31}N_3O_8S$

正确质量: 581.18

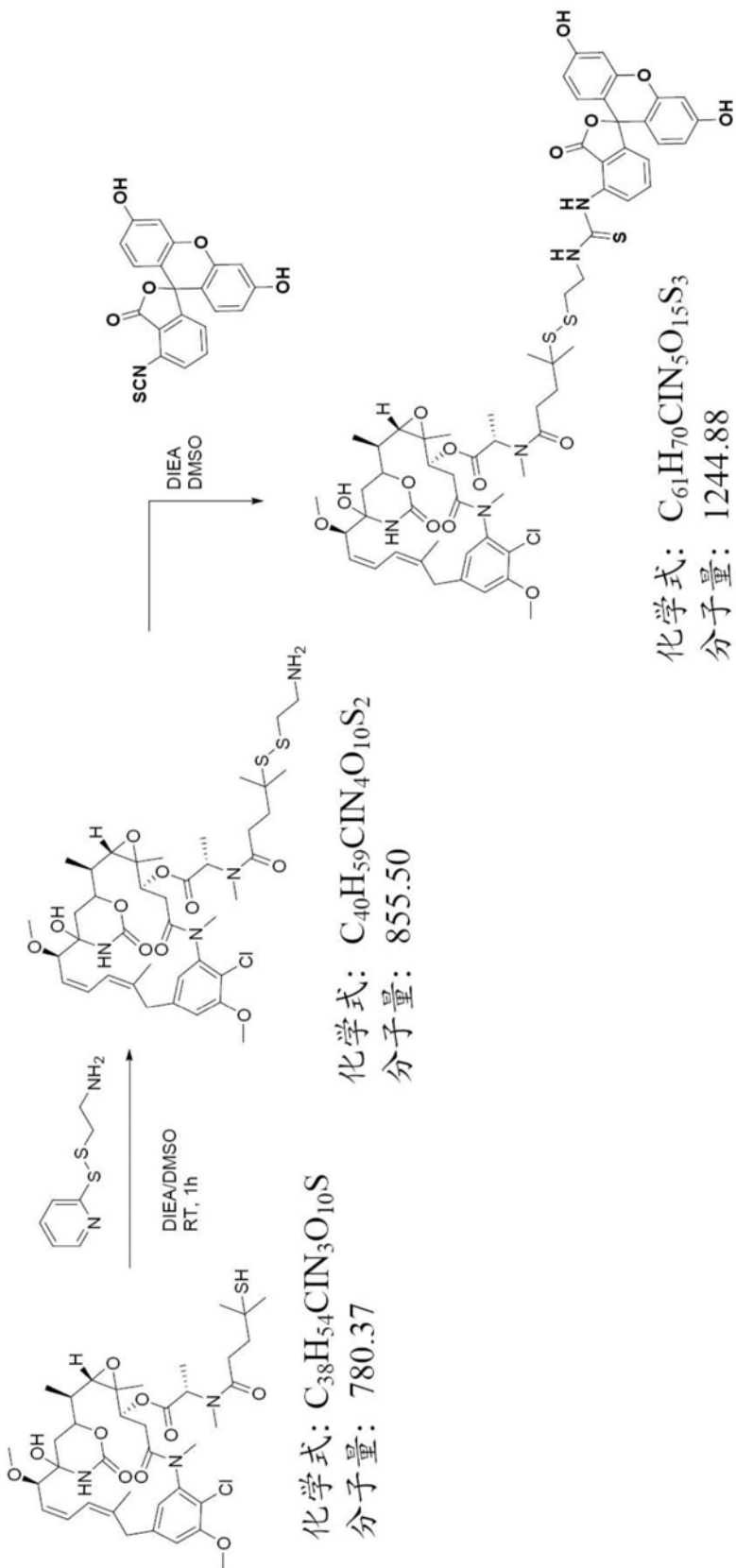
分子量: 581.64

FITC-DM4:



合成程序

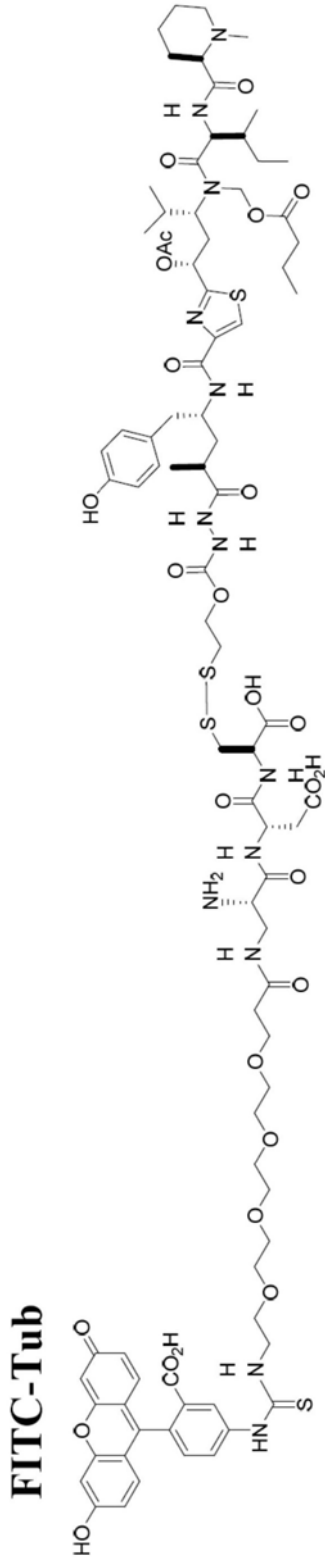
[0169]



[0170] 程序:在室温下使二甲亚砷中的DM4 (1.0当量) 与2-(吡啶-2-基二硫烷基) 乙-1-胺 (1.0当量) 和二异丙基乙胺 (3.0当量) 反应1小时。然后将所得粗产物与FITC (1.0当量) 反

应,并将反应混合物搅拌1小时。在具有UV检测器(在280nm波长下监测)的制备型反相HPLC上纯化后分离出最终的FITC-DM4缀合物。将粗产物加载到Xterra RP18制备型HPLC柱(Waters)上,并且用梯度条件洗脱,所述梯度条件开始于95%5mM磷酸钠(流动相A,pH7.4)和5%乙腈(流动相B),并且在10分钟内以流速12mL/min达到0%A和100%B。在7分钟分析型HPLC-MS分析中,梯度(0-100%B)期间产物峰的保留时间=4.23分钟。ESI $m/z=1244.8$ 。缩写:FITC=异硫氰酸荧光素;HPLC=高效液相色谱。

[0171]

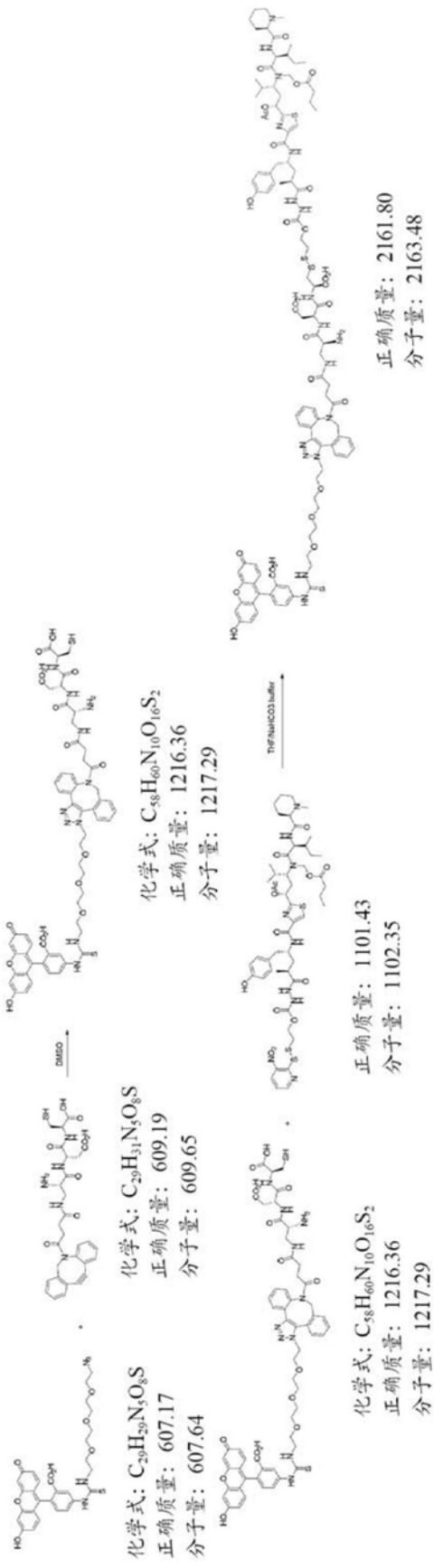
化学式: $C_{87}H_{117}N_{13}O_{27}S_4$

正确质量: 1903.71

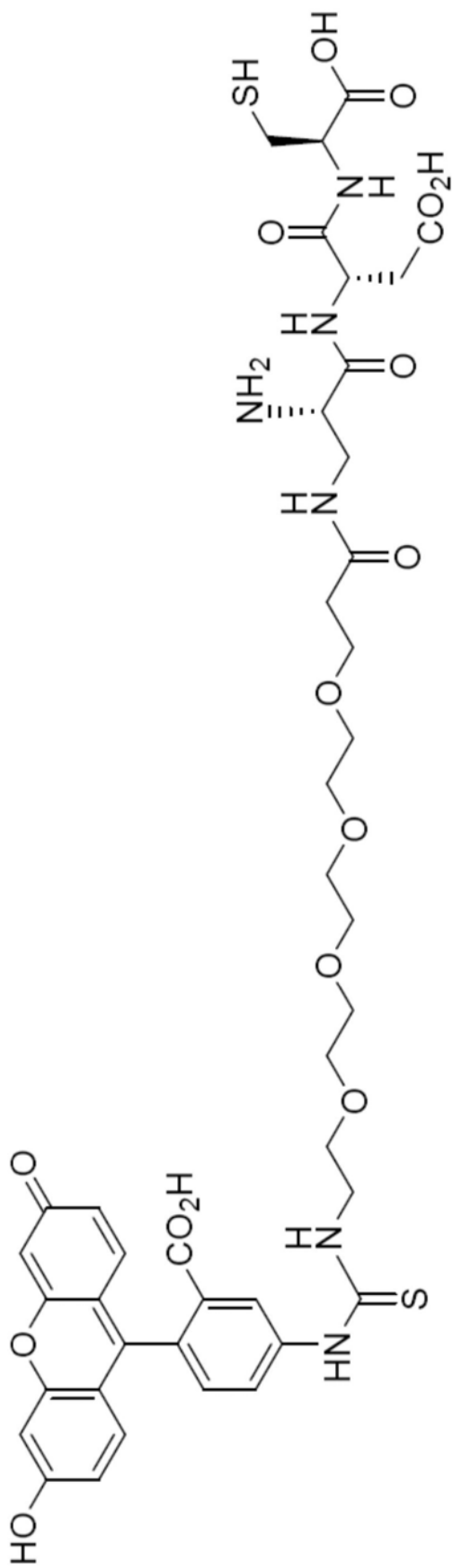
分子量: 1905.20

[0172]

合成程序:



[0173]

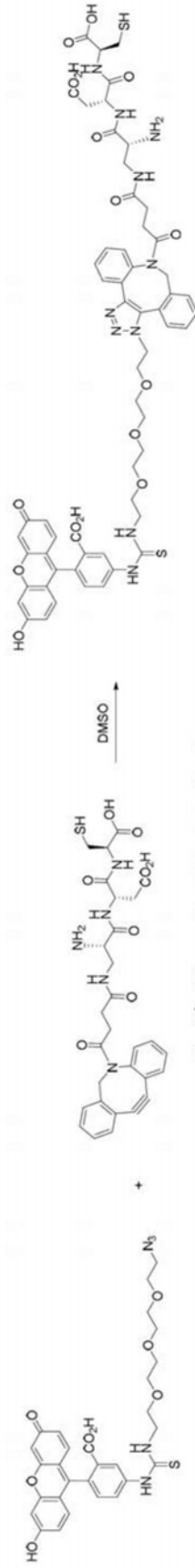
FITC-EC20化学式: $C_{42}H_{50}N_6O_{16}S_2$

正确质量: 958.27

分子量: 959.01

[0174]

合成程序:

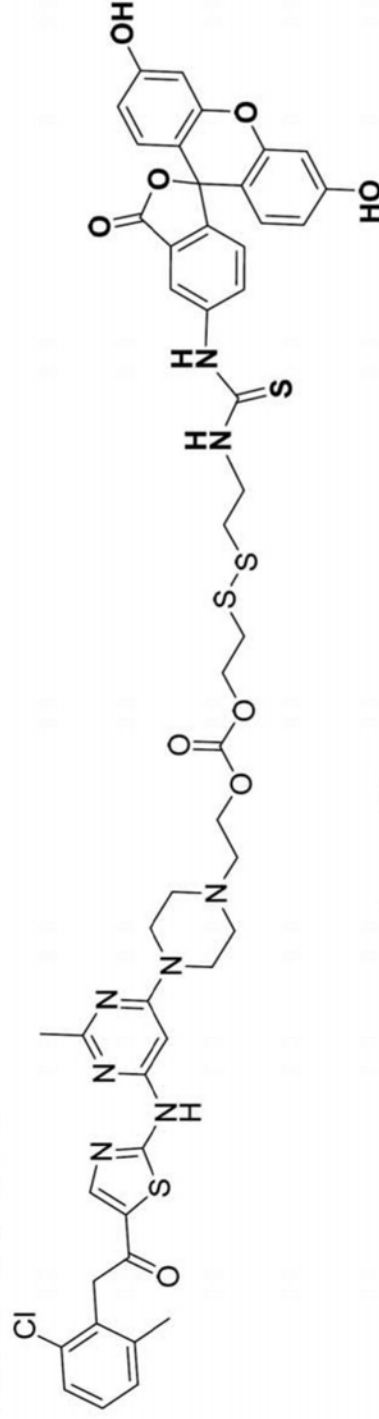


化学式: $C_{29}H_{29}N_5O_8S$
 正确质量: 607.17
 分子量: 607.64

化学式: $C_{29}H_{31}N_5O_8S$
 正确质量: 609.19
 分子量: 609.65

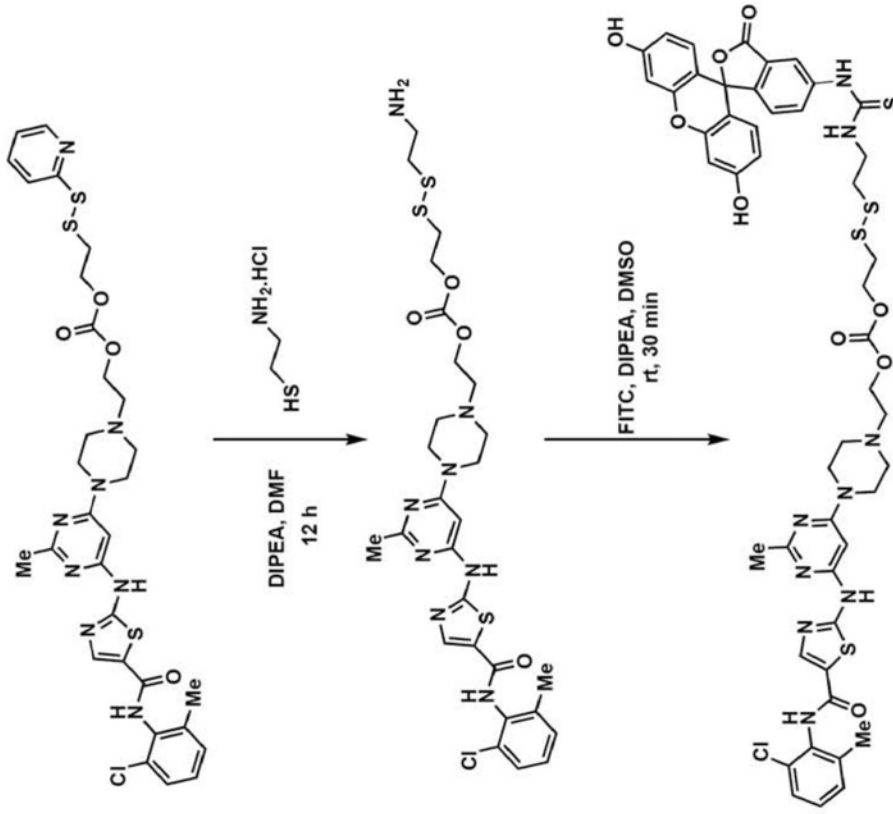
化学式: $C_{58}H_{60}N_{10}O_{16}S_2$
 正确质量: 1216.36
 分子量: 1217.29

FITC-达沙替尼

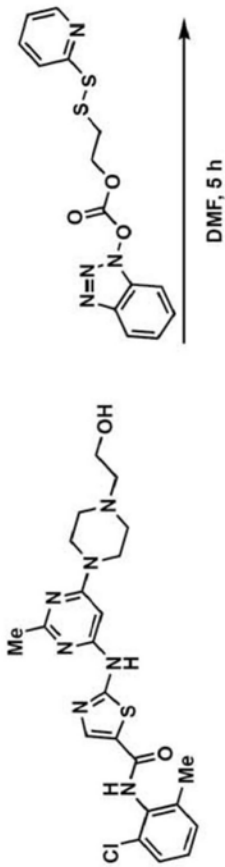


分子量: 1055.65

合成程序:



[0175]



达沙替尼

[0176] 实验程序:

[0177] 细胞培养

[0178] 将293TN细胞在含有10%FBS且没有抗生素的DMEM中培养,用于慢病毒包装。将Raji和Jurkat细胞在含有10%FBS、10%青霉素/链霉素的RPMI-1640中培养。使用ficoll从hPBMC分离原代人T细胞,通过使用EasySep™人T细胞富集试剂盒(19051,Stemcell Tech)进行阴性选择富集,通过Dynabeads CD3/CD28(11161D,Thermo Fisher)活化1天,用补充有30IU hIL2(130-097-745,Miltenyi Biotec Inc.)的TexMACS培养基培养。将T细胞在含有20%人AB血清(HP1022,Valley Biomedical)和10%DMSO的RPMI-1640中冷冻保存。

[0179] 慢病毒包装

[0180] 通过使用Lipofectamine 2000用转基因表达载体和包装质粒混合物(CPCP-K2A,Cellecta)转染293TN细胞产生泛向性VSV-G假型化慢病毒。在24小时时,收获病毒上清液,浓缩,然后添加到在同一天解冻的某些细胞系或原代T细胞。对于T细胞转导,在添加病毒上清液和8ug/ml聚凝胺后,将细胞在37度以2500rpm离心90分钟。

[0181] 结合测定法

[0182] 对于结合测定法,在4度将细胞与单独的配体-染料或与配体-染料和游离配体(100x,预温育30分钟)一起温育30分钟。温育后将细胞洗涤3次,并重悬于2%FBS PBS中,添加7-AAD以除去死细胞。FK506-罗丹明和FA-S0456的FRET成像:为了了解融合受体的占据,将FKBP-FRα+jurkat细胞与FA/FA-S0456,FK506/FK506-罗丹明以指定的顺序和浓度一起温育。FRET通过FA-罗丹明的强度损失(由于其能量转移到相同或附近受体上的FA-OTL38)显现,由BD Fortessa流式细胞仪检测。使用FlowJo软件分析结果。

[0183] PI-PLC处理以释放GPI锚定蛋白

[0184] 将 1×10^5 个细胞与消化缓冲液(2%BSA)中5mU或50mU PI-PLC(P5542-5UN,Sigma)于37度温育30分钟;温育后,用PBS洗涤细胞三次,然后在冰上与配体-染料一起温育30分钟。

[0185] 细胞存活力测定法

[0186] 将细胞接种到96孔板中并与不同浓度的某些配体-细胞毒性药物一起温育2小时,有或没有100x预温育游离配体竞争。温育2小时后,用温热的培养基洗涤细胞3次,并补充新鲜培养基。72小时后,通过CellTiter-Glo®测定法(G7570,Promega)测试细胞数或通过受体阳性细胞的配体-染料染色定量。

[0187] CAR T细胞裂解效应

[0188] 根据E:T比率,在有或没有处理药物的情况下,将 1×10^5 CAR T细胞和一定数量的Raji细胞在96孔板中共温育。24小时后,取出100ul上清液进行LDH测定法。裂解百分比计算为(处理组-仅CAR T)/(最大裂解-仅CAR T) %

[0189] CAR T细胞的耗尽

[0190] 每12小时将 1×10^6 个Raji细胞重复添加到24孔板中的 1×10^6 个CAR T细胞,不更换培养基。耗尽状态以较低的裂解效应和共抑制分子:PD-1,LAG-3和Tim-3的较高表达为特征。

[0191] 通过配体-细胞毒性药物体内消融融合受体阳性CAR T。

[0192] 将 4×10^5 luc+Raji细胞静脉内注射到NSG小鼠中。6天后,静脉内注射 1×10^7 个融合受体阳性CAR T细胞。在第8天,静脉内注射配体-细胞毒性药物(0.5umole/kg,1umole/kg)一次。使用在CAR T注射后每3天取得的血清样品通过ELISA测量IL2,INFr。通过流式细胞术计数外周血中的CAR T细胞。

[0193] 通过配体-药物体内调节融合受体阳性CAR T

[0194] 将 4×10^5 luc+Raji细胞静脉内注射到NSG小鼠中。6天后,静脉内注射 1×10^7 个融合受体阳性CAR T细胞。在第7天,静脉内注射配体-药物(0.5umole/kg, 1umole/kg)一次。在CAR T耗尽模型的情况下,在第6天静脉内注射 1×10^5 CAR T,一旦在外周血中显示CAR T群体并且肿瘤负荷不稳定并且继续增加,静脉内注射配体-药物(0.5umole/kg, 1umole/kg)。

[0195] 融合受体阳性CAR T的体内成像和追踪。

[0196] 对NSG小鼠右体侧皮下注射 2×10^6 Raji。14天后,静脉内注射 1×10^7 融合受体阳性CAR T。在第16天,通过静脉内注射给动物施用^{99m}Tc结合的缀合物(10nmol, 150μCi)并通过SPECT成像仪成像。

实施例

[0197] 1. 融合蛋白的设计及其表达

[0198] 1.1 FKBP-FR融合受体(SEQ ID NO:2)的设计

[0199] FK506衍生物的合成:FK506-罗丹明和FK506-微管溶。在材料和方法部分中描述合成。

[0200] hFR α 是一种GPI锚定的膜蛋白,其在N端具有24个氨基酸作为信号肽。为了保持膜呈现和内化特性,我们选择使用全长的FR α ,并在hFR α 的T24和R25之间掺入hFKBP序列以及柔性肽接头(SGGGS)(图4a)。选择柔性接头以对人体中常见的酶消化有抗性。然后将整个序列插入pWPI慢病毒表达载体中,其中EF1a作为期望启动子用于转导的T细胞中蛋白质表达。

[0201] 1.2 FKBP-FR融合受体在转导细胞中的表达

[0202] 在慢病毒转导的K562中通过蛋白质印迹证实FKBP-FR α 的表达。针对hFR α 抗体与非转导细胞相比,转导的K562细胞裂解显示约50kDa的特异性条带(图4b)。

[0203] 1.3 FKBPFR3GS(记录为FF3)融合蛋白的构建

[0204] 参见图4d(SEQ ID NO:12)。从N末端到C末端,它具有人FR α 的1-24aa作为信号肽、人FKBP蛋白、三个Gly-Ser的接头,然后是人FR α 的2-258aa。在FKBPFR1GS(标记为FF1)的构建体设计中,FF3的三个Gly-Ser的接头用一个Gly-Ser的接头替换,其他部分未改变。如将在结合测定法中显示,增加接头长度减少融合蛋白中两种组分之间的干扰。

[0205] 1.4具有GS接头的FITC-svFv-FR融合蛋白的构建。

[0206] 参见图4e。构建体也称为4M5.3FR(SEQ ID NO:13)。从N末端到C末端,它具有hCD8信号肽、4M5.3(针对FITC)的svFv、GS接头、人FR α 的25-258aa。

[0207] 1.5.通过FK506-^{99m}Tc PET成像对FKBP-FR α /FKBPtFR α 阳性细胞的体内非侵入性追踪

[0208] 对于CAR T细胞模型,将 1×10^6 KB细胞皮下植入NSG(Jackson laboratory)。在肿瘤达到100mm³后,将1500万抗FITC CAR+FKBP-FR α +或抗FITC CAR+FKBP-FR α -人T细胞静脉内注射给小鼠。在指定的天数注射FITC-FA以诱导CAR T的增殖。通过以下程序在CAR T植入后每两天对小鼠进行成像。在成像当天,根据以前的报告,将FK506-EC20头与^{99m}Tc进行配制。将100u溶液中的200uCi ^{99m}Tc静脉内注射到每只小鼠,并且通过MiLab PET/CT拍摄全身图像,聚焦于肿瘤区域、脾和淋巴结。通过PMOD软件重建3D图像。在CAR T植入后约第10天

的最后一次成像后,对小鼠实施安乐死,并通过 γ 计数器计数每个器官中的 ^{99m}Tc 分布。

[0209] 对于造血干细胞移植模型,如前报告产生人源化NSG小鼠。将1000万 $\text{CD}34+\text{FKBP-FRa}+\text{hHSC}$ 静脉内注射到人源化NSG小鼠中。4个月后,如上所述使用 $\text{FK}506-^{99m}\text{Tc}$ 拍摄全身图像,聚焦于骨髓和脊柱。

[0210] 2. FKBP-FRa 融合受体特异性结合并内化 $\text{FK}506$ -有效负载

[0211] 2.1 FKBP-FRa 融合受体特异性结合 $\text{FK}506$ -罗丹明

[0212] 对于结合测定法,在4度将细胞与单独的配体-染料或与配体-染料和游离配体(100x,预温育30分钟)一起温育30分钟。温育后将细胞洗涤3次,并重悬于2%FBS PBS中,添加7-AAD以除去死细胞。使用BD Fortessa流式细胞仪。使用FlowJo软件分析结果。

[0213] 2.2. FKBP-FRa 融合受体对 $\text{FK}506$ -罗丹明的结合 ($\text{FK}506$ -罗丹明和 FA-S0456 的FRET成像)

[0214] 为了了解融合受体的占据,将 $\text{FKBP-FRa}+\text{jurkat}$ 细胞与 FA/FA-S0456 , $\text{FK}506/\text{FK}506$ -罗丹明以指定的顺序和浓度一起温育。FRET通过 FA -罗丹明的强度损失(由于其能量转移到相同或附近受体上的 FA-OTL38)显现,由BD Fortessa流式细胞仪检测。

[0215] 图5显示了 FKBPFR1GS 融合蛋白中叶酸的结合在低至 0.01nM 时阻断 $\text{FK}506$ -罗丹明的结合,并在 50nM 下完全消除 $\text{FK}506$ 罗丹明结合。

[0216] 图6显示了 FKBPFR1GS jurkat细胞在结合 OTL38 (叶酸受体靶向性染料)后显示降低的 $\text{FK}506$ -罗丹明强度。自 $\text{FK}506$ -罗丹明(供体)至 OTL38 (FA-S0456 ,受体, $\text{ex/em}:774/794\text{nm}$)的FRET指示融合受体内部FR和FKBP之间的相互作用。

[0217] 图7显示了增加FKBP和FR之间的接头长度显著降低了融合蛋白的两个组分之间的干扰。与FF1(FKBP和FR之间的1GS)相比,FF3(FKBP和FR之间的3GS)在 10nM FA(其与人体中FA的生理浓度相当)存在下保留 $\text{FK}506$ -罗丹明的结合。

[0218] 2.3. 释放GPI锚定的FF3融合受体

[0219] 使用PI-PLC处理具有FF3融合蛋白的T细胞导致GPI锚定受体FF3的释放。具有FF3融合受体的Jurkat T细胞显示与 20nM FA-FITC (EC17)的饱和结合,而在 $5\mu\text{M}$ PI-PLC或 50mU PI-PLC处理后, FA-FITC 丧失与细胞的结合,这指示GPI锚定的FF3融合受体的释放。见图8。

[0220] 2.4人T细胞中的融合蛋白 FKBPFR3GS 保留FR结合特性

[0221] 显示了 FKBPFR3GS 融合受体中的 FA -罗丹明结合曲线。在人T细胞上稳定表达的 FKBPFR3GS 融合受体可以以高亲和力($K_d=0.95\text{nM}$)结合叶酸衍生物(FA -罗丹明),所述亲和力与FR+KB细胞中的 FA -罗丹明亲和力(K_d 约 1nM)相当。因此,保留了融合受体中FR的结合特性。见图9。

[0222] 2.5人T细胞中的融合蛋白 FKBPFR3GS 保留FKBP结合特性

[0223] FKBPFR3GS 融合受体中的 $\text{FK}506$ -罗丹明结合曲线。在人T细胞上稳定表达的 FKBPFR3GS 融合受体能够以高亲和力($K_d=3.93\text{nM}$)结合 $\text{FK}506$ 衍生物($\text{FK}506$ -罗丹明),这意味着FKBP的结合特性在融合受体中得以保留。见图10。

[0224] 2.6 SLF-FITC以相对较高的结合亲和力($K_d=62\text{nM}$)结合 FKBPFR3GS 融合受体

[0225] 游离SLF(100,预温育)的竞争阻断SLF-FITC结合。与母体配体 $\text{FK}506$ 相比,SLF($\text{FK}506$ 的模拟物)呈现低10倍的对 FKBPFR 融合受体的结合亲和力。参见图11并与图10进行比较。

[0226] 2.7 FA-罗丹明在4M5.3FR融合受体中的结合曲线。

[0227] FA-罗丹明可以以高亲和力 ($K_d=2.25\text{nM}$) 结合人T细胞上稳定表达的4M5.3FR融合受体,所述亲和力与FR+KB细胞中的FA-罗丹明的亲和力 (K_d 约1nM) 相当。因此,FR结合特性在4M5.3FR融合受体中得到保留。见图12。

[0228] 2.8 FITC-AF647在4M5.3FR融合受体中的结合曲线。

[0229] FITC-AF647可以以高亲和力 ($K_d=8.03\text{nM}$) 结合人T细胞上稳定表达的4M5.3FR融合受体。100x comp表示游离的FITC钠。scFv 4M5.3与FITC的结合特性在4M5.3FR融合受体中得到保留。见图13。

[0230] 3.1.FA-微管溶素对FF3+人T细胞的杀伤效果。

[0231] FA-微管溶素能够介导针对FF3+人T细胞的受体特异性杀伤效果。用FA补偿(与FA的100x预温育)阻断该效果。这意味着通过FF3融合受体系统成功内化和释放游离药物微管溶素。见图14。

[0232] 3.2 FA-微管溶素对混合人T细胞培养物中hFF3+群体的杀伤效果。

[0233] FA-微管溶素特异性杀伤混合人T细胞培养物中的hFF3+群体。随着FA-Tub浓度增加,hFF3+细胞的百分比降低。见图15。

[0234] 3.3 SLF-Tub以 $IC_{50}=138\text{nM}$ 特异性杀伤hFF3+Jurkat细胞。

[0235] 将SLF-Tub与hFF3 Jurkat细胞温育2小时能够杀伤受体阳性细胞。这指示FKBPFR3GS融合受体成功内化SLF-Tub以及在细胞内释放微管溶素。见图16。

[0236] 3.4.FITC-DM4和FITC-Tub对4M5.3FR+人T细胞的杀伤效果。

[0237] FITC-DM4和FITC-Tub均可以特异性杀伤4M5.3FR+人T细胞,而FITC-Tub具有更高的 IC_{50} 。游离FITC钠(100x预温育)的补偿阻断受体介导的杀伤效果。这意味着通过4M5.3FR融合受体将FITC-细胞毒性药物的成功内化和释放到T细胞中。见图17。

[0238] 3.5.FITC-微管溶素特异性杀伤混合人T细胞培养物中的4M5.3FR+群体。

[0239] 随着FITC-Tub浓度增加,4M5.3FR+细胞的绝对数量减少,而在高浓度时4M5.3FR-细胞也通过释放的药物和旁观者效应被杀伤。见图18。

[0240] 3.6.FITC-DM4特异性杀伤混合人T细胞培养物中的4M5.3FR+群体。

[0241] 随着FITC-DM4浓度增加,4M5.3FR+细胞的绝对数量减少,而在高浓度时4M5.3FR-细胞也通过释放的药物和旁观者效应被杀伤。见图19。

[0242] 3.7激酶抑制剂对针对CD19+Raji的抗CD19 CAR T细胞的调节效果

[0243] 浓度10nM的达沙替尼(Lck抑制剂)和依鲁替尼(ITK抑制剂)降低抗CD19 CAR T细胞(FMC63 CAR T,效应器)对CD19+Raji肿瘤细胞(靶物)的裂解效果。测试了两个效应器:靶物比率(E:T)。将正常T细胞和抗CD19 CAR T与CD19-K562细胞用作阴性对照。见图20。

[0244] 3.8.FITC-达沙替尼可降低FMC63+4MFR+hT细胞对Raji细胞的裂解效果。

[0245] 这意味着通过4M5.3FR融合受体成功将FITC-达沙替尼内化和释放到T细胞中并且将达沙替尼释放到T细胞中。见图21。

[0246] 3.9浓度100nM的TC-PTP抑制剂降低耗尽的抗CD19 CAR T细胞中的共抑制剂分子群

[0247] 通过用CD19+Raji细胞刺激7次产生耗尽的抗CD19 CAR T细胞,参见材料和方法部分中的详细程序)。PD-1阳性、LAG3阳性和双阳性群体在处理后将降低。见图22。

[0248] 4.其他FK506-有效负载以控制细胞疗法的活性

[0249] 本药物有效负载递送系统的技术有利特征是具有多功能性。下面列出了潜在的有有效负载和相应的影响(表1)。基于以下参数选择小分子有效负载:1.体外和体内游离药物的功能性测定法已经由已发表的文献或我们实验室中的工作确认。2.药物的化学结构具有对于衍生化相对更易接近的游离胺。3.以下任一种都是优选的:FDA证明的药物;以合理的价格商购。首先测试FK506-有效负载用于体外实验,通过多重免疫测定法监测T细胞活化和干细胞细胞因子释放。对于体内疾病模型,我们在我们的实验室中完善建立了CAR T疗法和骨折小鼠模型,并且几个潜在合作者建立了神经变性小鼠模型。

疾病模型	亚型	细胞类型	细胞来源	有效负载类型
[0250] 干细胞疗法	HSC 移植	BMSC	鼠BM	GSK3b抑制剂
肿瘤	肿瘤微环境	CAR T	hPBMC T细胞	GSK3b抑制剂、HDAC抑制剂、MAPK抑制剂

序列表

<110> 珀杜研究基金会

<120> 用于细胞疗法的基于靶向性配体-有效负载的药物递送

<130> 67762-02

<150> 62/460,118

<151> 2017-02-17

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 367

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 具有接头肽的小鼠FKBP-FRa的氨基酸序列

<400> 1

```

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

```

	180		185		190														
Arg	Phe	Asn	Trp	Asn	His	Cys	Gly	Thr	Met	Thr	Ser	Glu	Cys	Lys	Arg				
	195						200					205							
His	Phe	Ile	Gln	Asp	Thr	Cys	Leu	Tyr	Glu	Cys	Ser	Pro	Asn	Leu	Gly				
	210						215					220							
Pro	Trp	Ile	Gln	Gln	Val	Asp	Gln	Ser	Trp	Arg	Lys	Glu	Arg	Ile	Leu				
225						230				235					240				
Asp	Val	Pro	Leu	Cys	Lys	Glu	Asp	Cys	Gln	Gln	Trp	Trp	Glu	Asp	Cys				
				245					250				255						
Gln	Ser	Ser	Phe	Thr	Cys	Lys	Ser	Asn	Trp	His	Lys	Gly	Trp	Asn	Trp				
			260					265					270						
Ser	Ser	Gly	His	Asn	Glu	Cys	Pro	Val	Gly	Ala	Ser	Cys	His	Pro	Phe				
	275						280					285							
Thr	Phe	Tyr	Phe	Pro	Thr	Ser	Ala	Ala	Leu	Cys	Glu	Glu	Ile	Trp	Ser				
	290						295					300							
His	Ser	Tyr	Lys	Leu	Ser	Asn	Tyr	Ser	Arg	Gly	Ser	Gly	Arg	Cys	Ile				
305						310				315					320				
Gln	Met	Trp	Phe	Asp	Pro	Ala	Gln	Gly	Asn	Pro	Asn	Glu	Glu	Val	Ala				
				325					330					335					
Arg	Phe	Tyr	Ala	Glu	Ala	Met	Ser	Gly	Ala	Gly	Phe	His	Gly	Thr	Trp				
			340						345					350					
Pro	Leu	Leu	Cys	Ser	Leu	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Trp	Val	Ile	Ser					
	355						360						365						

<210> 2
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 具有接头肽的人FKBP-FRa的氨基酸序列
 <400> 2

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

65	70	75	80
Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala			
	85	90	95
Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro			
	100	105	110
Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu			
	115	120	125
Lys Leu Glu Ser Gly Gly Gly Ser Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu			
	130	135	140
Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly			
145	150	155	160
Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala			
	165	170	175
Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr			
	180	185	190
Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys			
	195	200	205
Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn			
	210	215	220
Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg			
225	230	235	240
Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu			
	245	250	255
Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp			
	260	265	270
Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln			
	275	280	285
Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile			
	290	295	300
Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg			
305	310	315	320
Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu			
	325	330	335
Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala			
	340	345	350
Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu			
	355	360	365

Ser

<210> 3

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

<210> 4

<211> 496

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人抗CD19 CAR T构建体的氨基酸序列

<400> 4

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
1			5						10				15		
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asp

Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser
 340 345 350
 Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His
 355 360 365
 Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg
 370 375 380
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 385 390 395 400
 Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 405 410 415
 Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 420 425 430
 Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 435 440 445
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 450 455 460
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 465 470 475 480
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490 495

<210> 5

<211> 12182

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 人T细胞转导的pWPI的载体序列

<400> 5

ttggaagggc taattcactc ccaaagaaga caagatatcc ttgatctgtg gatctaccac 60
 acacaaggct acttcctga ttagcagaac tacacaccag ggccaggggt cagatatcca 120
 ctgacctttg gatggtgcta caagctagta ccagttgagc cagataaggt agaagaggcc 180
 aataaaggag agaacaccag cttgttacac cctgtgagcc tgcattggat ggatgaccgc 240
 gagagagaag tgtagagtg gaggtttgac agccgctag catttcatca cgtggcccca 300
 gagctgcatc cggagtactt caagaactgc tgatategag cttgctacaa gggactttcc 360
 gctggggact ttccagggag gcggtggcctg ggcgggactg gggagtggcg agccctcaga 420
 tcctgcataat aagcagctgc tttttgctg tactgggtct ctctggttag accagatctg 480
 agcctgggag ctctctgget aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgcc 540
 ttgagtgctt caagtagtgt gtgccctct gttgtgtgac tctggtaact agagatccct 600
 cagacccttt tagtcagtgt ggaaaatctc tagcagtggc gcccgaaacag ggacttgaaa 660
 gcgaaagggg aaccagagga gctctctcga cgcaggactc ggcttgctga agcgcgcacg 720

gcaagaggcg aggggcggcg actggtgagt acgccaaaaa ttttgactag cggaggctag 780
aaggagagag atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgcgatgg 840
gaaaaaattc ggtaaggcc agggggaaag aaaaaatata aattaaaca tatagtatgg 900
gcaagcaggg agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc tgtagaaaac atcagaaggc 960
tgtagacaaa tactgggaca gctacaacca tcccttcaga caggatcaga agaacttaga 1020
tcattatata atacagtagc aaccctctat tgtgtgcatc aaaggataga gataaaagac 1080
accaaggaag ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagac caccgcacag 1140
caagcggccg ctgatcttca gacctggagg aggagatatg agggacaatt ggagaagtga 1200
attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca ccaaggcaaa 1260
gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt tccttggggtt 1320
cttgggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg acgctgacgg tacaggccag 1380
acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaattg ctgagggcta ttgaggcgca 1440
acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa gaatcctggc 1500
tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact 1560
catttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat 1620
ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt acaattaca caagcttaat 1680
acactcctta attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag aattattgga 1740
attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaattggc tgtggtatat 1800
aaaattattc ataatgatag taggaggctt gtaggttta agaatagttt ttgctgtact 1860
ttctatagtg aatagagtta ggcaaggata ttcaccatta tcgtttcaga cccacctccc 1920
aaccgaggg ggacctgaca ggcccgaagg aatagaagaa gaaggtggag agagagacag 1980
agacagatcc attcgattag tgaacggatc tcgacggtat cgatgtcgac gataagcttt 2040
gcaaatgatg ataaagtttt aaacagagag gaatctttgc agctaatgga ctttctaggt 2100
cttgaaagga gtgggaattg gctccggtgc ccgtcagtgg gcagagcgca catcgcccac 2160
agtccccgag aagttggggg gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga gaaggtggcg 2220
cggggtaaac tgggaaagtg atgtcgtgta ctggctccgc ctttttcccg aggggtggggg 2280
agaaccgtat ataagtgcag tagtcgccgt gaacgttctt tttcgcaacg ggtttgccgc 2340
cagaacacag gtaagtgccg tgtgtggttc ccgcgggctt ggctcttta cgggttatgg 2400
cccttgcgtg ccttgaatta cttccactgg ctgcagtacg tgattcttga tcccagctt 2460
cgggttgaa gtgggtggga gagttcgagg ctttgcgtt aaggagcccc ttcgctctgt 2520
gcttgagttg aggcctggcc tgggcgctgg ggccgccgcg tcgcaatctg gtggcacctt 2580
cgcgctgtc tcgctgctt cgataagtct ctagecattt aaaatttttg atgacctgct 2640
gcgacgcttt ttttctggca agatagtctt gtaaatgcgg gccaagatct gcacactggt 2700
atctcggtt ttggggccgc gggcgccgac ggggccctg cgtcccagcg cacatgttcg 2760
gcgagcggg gcctgcgagc gcggccaccg agaatcggac ggggtagtc tcaagctggc 2820
cggcctgctc tggtgcttg cctcgcgccg ccgtgtatcg ccccgcctg ggcggcaagg 2880
ctggcccgt cggcaccagt tgcgtgagcg gaaagatggc cgcttcccgg ccttctgca 2940
gggagctcaa aatggaggac gcggcgctcg ggagagcggg cgggtgagtc acccacaaa 3000
aggaaaagg cctttccgtc ctccagccgtc gttcatgtg actccacgga gtaccggcg 3060

ccgtccaggc acctcgatta gttctcgagc ttttgagta cgtcgtcttt aggttggggg 3120
 gaggggtttt atgcgatgga gtttccccac actgagtggg tggagactga agttaggcca 3180
 gcttggcact tgatgtaatt ctcttggaa tttgcccttt ttgagtttg atcttggttc 3240
 attctcaagc ctgagacagt ggttcaaagt tttttcttc catttcaggt gtcgtgagga 3300
 atttcgacat ttaaatttaa ttaatctcga cggtatcggg taacttttaa aagaaaaggg 3360
 gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca taatagcaac agacatacaa 3420
 actaaagaat tacaaaaaca aattacaaaa attcaaaatt ttatcgatca cgagactagc 3480
 ctcgaggttt atggctcacc tgatgactgt gcagttgttg ctctggtga tgtggatggc 3540
 cgaatgtgct cagtccagag ctggagtgc ggtggagacc atctctctg gagacgggcg 3600
 caccttccca aagcgcggcc agacctgct ggtgcactac acggggatgc ttgaagatgg 3660
 aaagaaaatt gattcctctc gggacagaaa caagcctttt aagtttacac taggcaagca 3720
 ggaggtgatc cgaggetggg aggaaggggt agcccagatg agtgtgggtc agagagccaa 3780
 actgataatc tcctcagact atgcctatgg agccaccggg caccaggca tcatcccacc 3840
 acatgccact ctgtttttg atgtggagct tctaaaactg gaaagcggcg gcggcagcac 3900
 tcgggccagg actgaacttc tcaatgtctg catggatgcc aacaccaca aagaaaacc 3960
 gggccctgag gacaatttac acgaccagtg cagcccctgg aagacgaatt cctgctgttc 4020
 cacgaacaca agccaggaag cacataagga catttctac ctgtaccggt tcaactggaa 4080
 ccaactgcgga actatgacat cggaatgcaa acggcacttt atccaagaca cctgcctcta 4140
 tgagtgttcc ccgaacttgg gaccctggat ccagcaggtg gaccagagct ggcgcaaaga 4200
 gcggatcctt gatgttccc tgtgcaaaga ggactgtcag cagtgggtgg aggactgcca 4260
 gagctctttt acctgcaaga gcaattggca caaggatgg aactggtcct cggggcataa 4320
 cgagtgtcct gtgggagcct cctgccatcc cttcacctc tacttccca catctgctgc 4380
 tctgtgtgag gaaatctgga gtcactccta caagctcagc aactacagtc gagggagcgg 4440
 ccgctgcatt cagatgtggt tcgaccagc ccagggaac cccaacgagg aagtggcgag 4500
 gttctatgcc gaggccatga gtggagctgg gtttcatggg acctggccac tcttgtgcag 4560
 cctgtcctta gtgctgctc gggtgatcag ctgaaaacta cgggctgcag gaattccgcc 4620
 ccccccccc taacgttact ggccgaagcc gcttggaaata aggccggtgt gcgtttgtct 4680
 atatgttatt ttccaccata ttgccgtctt ttggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc 4740
 ctgtcttctt gacgagcatt cctaggggtc tttcccctc cgccaaagga atgcaaggtc 4800
 tgttgaatgt cgtgaaggaa gcagttctc tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg 4860
 tagcgaccct ttgcaggcag cggaaccccc cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa 4920
 agccacgtgt ataagataca cctgcaaagg cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt 4980
 ggatagttgt ggaaagagtc aatggctct cctcaagct attcaacaag gggctgaagg 5040
 atgccagaaa ggtacccat tgtatgggat ctgatctggg gctctggtgc acatgcttta 5100
 catgtgttta gtcgaggta aaaaactct aggcccccg aaccacgggg acgtggtttt 5160
 cctttgaaaa acacgatgat aataccatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg 5220
 tggtgcccat cctggtcgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg 5280
 gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca agctgacct gaagttcatc tgcaccaccg 5340
 gcaagctgcc cgtgccctgg cccaccctcg tgaccacct gacctacggc gtgcagtgtc 5400

tcagccgcta ccccgaccac atgaagcagc acgacttett caagtccgcc atgcccgaag 5460
gctacgtcca ggagcgcacc atcttttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg 5520
aggatgaagt cgagggcgac accctggatg accgcatcga gctgaagggc atcgacttca 5580
aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct 5640
atatcatggc cgacaagcag aagaacggca tcaagggtgaa cttcaagatc cgccacaaca 5700
tcgaggacgg cagcgtgcag ctgcccacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg 5760
gccccgtgct gctgcccacc aaccactacc tgagcaccca gtccgccctg agcaaagacc 5820
ccaacgagaa gcgcgatcac atggtcctgc tggagtctgt gaccgccgcc gggatcactc 5880
tcggcatgga cgagctgtac aagtccggac tcagatctcg actagctagt agctagctag 5940
ctagtcgagc tcaagcttcg aattcgatat caagcttacc gcgatacctg cgacctcgag 6000
ggaattccga taatcaacct ctggattaca aaatttgtga aagattgact ggtattctta 6060
actatgttgc tccttttacg ctatgtggat acgctgcttt aatgcctttg tatcatgcta 6120
ttgcttcccg tatggcttcc attttctct ccttgataaa atcctggttg ctgtctcttt 6180
atgaggagtt gtggcccgtt gtcaggcaac gtggcgtggt gtgactgtg tttgctgacg 6240
caacccccac tggttggggc attgccacca cctgtcagct cctttccggg actttctgctt 6300
tccccctccc tattgccacg gcggaactca tcgccgctg ccttgcccgc tgctggacag 6360
gggctcggct gttgggcaact gacaattccg tgggtgtgtc ggggaagctg acgtcctttc 6420
catggctgct cgctgtgtt gccacctgga ttctgcgcgg gacgtccttc tgctacgtcc 6480
cttcggccct caatccagcg gaccttctt cccgcggcct gctgccggt ctgcggcctc 6540
ttccgcgtct tcgccttgc cctcagacga gtcggatctc cctttgggcc gcctccccgc 6600
atcgggaatt cgagctcggc accttaaga ccaatgactt acaaggcagc ttagatctt 6660
agccactttt taaaagaaaa ggggggactg gaagggctaa ttcactcca acgaagaaa 6720
gatgggatca attcaccatg ggaataactt cgtatagcat acattatacg aagttatgct 6780
gctttttgct tgtactgggt ctctctgggt agaccagatc tgagcctggg agctctctgg 6840
ctaactaggg aaccactgc ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc ttcaagtagt 6900
gtgtgcccgt ctgttgtgt actctggtaa ctagagatcc ctgagacct ttagttagt 6960
gtggaaaatc tctagcagca tctagaatta attcctgta ttctatagtg tcacctaat 7020
cgtatgtgta tgatacataa gttatgtat taattgtagc cgcgttctaa cgacaatatg 7080
tacaagccta attgtgtagc atctggctta ctgaagcaga ccctatcatc tctctcgtaa 7140
actgccgtca gactcggttt ggttgacga acctctgag tttctggtaa cgccgtcccg 7200
caccggaaa tggtcagcga accaatcagc agggctatcg ctagccagat cctctacgcc 7260
ggacgcatcg tggccggcat caccggcgcc acaggctcgg ttgctggcgc ctatatgcc 7320
gacatcaccg atggggaaga tcgggctcgc cacttcgggc tcatgagcgc ttgtttcggc 7380
gtgggtatgg tggcaggccc cgtggccggg ggactgttg gcgccatctc cttgcatgca 7440
ccattccttg cggcggcggt gctcaacggc ctcaacctac tactgggctg ctctctaatg 7500
caggagtgcg ataagggaga gcgtcgaatg gtgactctc agtacaatct gctctgatgc 7560
cgcatagtta agccagcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct gacgggcttg 7620
tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca 7680
gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt 7740

tttatagggt aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg 7800
 aaatgtgcgc ggaacccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct 7860
 catgagacaa taaccctgat aatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat 7920
 tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc 7980
 tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg 8040
 ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg 8100
 ttttccaatg atgagcactt ttaaagtctt gctatgtggc gcggtattat cccgtattga 8160
 cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgat acactattct cagaatgact tggttgagta 8220
 ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc 8280
 tgccataacc atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc 8340
 gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg 8400
 ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgctgtagc 8460
 aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca 8520
 acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct 8580
 tccggtggc tggtttattg ctgataaatc tggagccgt gagcgtgggt ctcgcggtat 8640
 cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg 8700
 gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat 8760
 taagcattgg taactgtcag accaagtta ctcatatata ctttagattg atttaaaact 8820
 tcatttttaa tttaaaagga tctagtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat 8880
 cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 8940
 ttcttgagat ccttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaa aaccaccgct 9000
 accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg 9060
 cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt cttctagt tagccgtagt taggccacca 9120
 cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc 9180
 tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga 9240
 taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac 9300
 gacctacacc gaactgagat acctacagc tgagcattga gaaagcgcca cgcttcccga 9360
 agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 9420
 ggagcttcca gggggaaaacg cctggtatct ttatagtctt gtcgggtttc gccacctctg 9480
 acttgagcgt cgatttttgt gatgctctc agggggcgag agcctatgga aaaacgccag 9540
 caacgcggcc tttttacggt tcttgccctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc 9600
 tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc 9660
 tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcggcc 9720
 aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgtt gccgattcat taatgcagct gtggaatgtg 9780
 tgtcagttag ggtgtgga gtcgccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg 9840
 catctcaatt agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 9900
 atgcaaagca tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cggccctaac tccgcccctc 9960
 ccgcccctaa ctccgcccag ttccgcccct tctccgccc atggctgact aatttttttt 10020
 atttatgcag aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc 10080

ttttttggag gcctaggcct ttgcaaaaag cttggacaca agacaggcct gcgagatatg 10140
 tttgagaata ccactttatc ccgcgtcagg gagaggcagt gcgtaaaaag acgcggactc 10200
 atgtgaaata ctggttttta gtgcgccaga tctctataat ctgcgcgaac ctattttccc 10260
 ctccaacact ttttaagccg tagataaaca ggctgggaca cttcacatga gcgaaaaata 10320
 catcgtcacc tgggacatgt tgcagatcca tgcacgtaa ctcgcaagcc gactgatgcc 10380
 ttctgaacaa tggaaaggca ttattgccgt aagccgtggc ggtctgtacc ggtgctgta 10440
 ctggcgcgtg aactgggtat tcgtcatgtc gataccgttt gtatttccag ctacgatcac 10500
 gacaaccagc gcgagcttaa agtgctgaaa cgcgcagaag gcgatggcga aggcttcac 10560
 gttattgatg acctgggtga taccgggtgg actgcggttg cgattcgtga aatgtatcca 10620
 aaagcgcact ttgtcacat cttcgcaaaa ccggctggtc gtccgctggg tgatgactat 10680
 gttgttgata tcccgaaga tacttgatt gaacagccgt gggatatggg cgtcgtattc 10740
 gtcccgccaa tctccggtcg ctaatctttt caacgctgg cactgccggg cgttgttctt 10800
 ttttaactca ggcggttac aatagtttcc agtaagtatt ctggaggctg catccatgac 10860
 acaggcaaac ctgagcgaaa cctgttcaa accccgttt aacatcctg aaacctgac 10920
 gctagtcgc cgctttaatc acggcgcaaca accgctgtg cagtcggccc ttgatggtaa 10980
 aaccatccct cactggtatc gcatgattaa ccgtctgat tggatctggc gcggcattga 11040
 cccacgcgaa atcctcgacg tccaggcacg tattgtgatg agcgatgccg aacgtaccga 11100
 cgatgattta tacgatacgg tgattggcta ccgtggcggc aactggattt atgagtgggc 11160
 cccgatcct tgtgaaggaa ccttacttct gtgggtgtgac ataattggac aaactaccta 11220
 cagagattta aagctctaag gtaaataaa aatttttaag tgtataatgt gttaaactac 11280
 tgattctaata tgtttgtgta ttttagattc caacctatgg aactgatgaa tgggagcagt 11340
 ggtggaatgc cttaatgag gaaaacctgt tttgctcaga agaaatgcca tctagtgatg 11400
 atgaggctac tgctgactct caacattcta ctctccaaa aaagaagaga aaggtagaag 11460
 accccaagga ctttccttca gaattgctaa gttttttgag tcatgctgtg tttagtaata 11520
 gaactcttgc ttgctttgct atttacacca caaaggaaaa agctgcaact ctatacaaga 11580
 aaattatgga aaaatattct gtaaccttta taagtaggca taacagttat aatcataaca 11640
 tactgttttt tcttactcca cacaggcata gagtgtctgc tattaataac tatgctcaaa 11700
 aattgtgtac ctttagcttt ttaatttgta aaggggttaa taaggaatat ttgatgtata 11760
 gtgccttgac tagagatcat aatcagccat accacattg tagaggtttt acttgcttta 11820
 aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tgttgttggt 11880
 aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca 11940
 aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct 12000
 tatcatgtct ggatcaactg gataactcaa gctaaccaaa atcatcccaa acttcccacc 12060
 ccatacccta ttaccactgc caattaceta gtggtttcat ttactctaaa cctgtgatcc 12120
 ctctgaatta ttttcatttt aaagaaattg tatttgtaa atatgtacta caaacttagt 12180
 ag 12182
 <210> 6
 <211> 6939
 <212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 用于小鼠T细胞转导的pMP71 gb NotIEcoRI 小鼠抗CD19

<400> 6

```
tcaaggtag gaacagagag acaggagaat atgggcaaaa caggatatct gtgtaagca 60
gttcctgccc cggctcaggg ccaagaacag ttggaacagc agaatatggg ccaaacagga 120
tatctgtggt aagcagttcc tgccccggct caggccaag aacagatggt cccagatgc 180
ggtccccgcc tcagcagttt ctagagaacc atcagatggt tccagggtgc cccaaggacc 240
tgaaatgacc ctgtgcctta tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc 300
gcgcttctgc tccccgagct caataaaaga gccacaacc cctcactcgg cgcgccagtc 360
ctccgattga ctgcgtcgcc cgggtaccgc tatteccaat aaagcctctt gctgtttgca 420
tccgaatcgt ggactcgetg atccttggga ggtctctctc agattgattg actgcccacc 480
tcgggggtct ttcatlgtga ggttccaccg agatttggag acccctgcc agggaccacc 540
gacccccccg ccgggaggta agctggccag cggctgttcc gtgtctgtct ctgtctttgg 600
gcgtgtttgt gccggcatct aatgtttgcg cctgcgtctg tactagttgg ctaactagat 660
ctgtatctgg cggccccgca gaagaactga cgagttcgta ttccccgccg cagcccctgg 720
gagacgtccc agcggcctcg ggggccccgt ttgtggccca ttctgtatca gttaacctac 780
ccgagtcgga ctttttggag ctccgccact gtccgagggg tacgtggctt tgttggggga 840
cgagagacag agacacttcc cgccccgctc tgaatltttg ctttcggttt tacgccgaaa 900
ccgcgccgca cgtcttgtct gctgcagcat cgttctgtgt tgtctctgtc tgactgtgtt 960
tctgtatltg tctgaaaatt agctcgacaa agttaagtaa tagtccctct ctccaagctc 1020
acttacaggc atgggggttc ccaccagct gttggggttg ctgctcctct ggatcactga 1080
tgccatctgc gaacagaagc tcatttctga agaagatctg gacatacaga tgaccagag 1140
tcctgccagc ttgtccacat ccctcggaga gaccgtgaca attcaatgcc aggccctctga 1200
ggacatatat tctggattgg cttggtacca gcaaaagcca ggtaaaagtc ctcagttggt 1260
gatatacggc gcttctgatt tgcaagacgg ggtgccctca cgatttagcg ggtctggaag 1320
tgccactcag tacagctctga agattacttc aatgcaaaca gaagacgagg gtgtgtatlt 1380
ttgccaacag gggctgacct acccaaggac attcgggggc ggtacaaagc ttgaacttaa 1440
ggcgccgggt gggctctggag gtggtggatc tggcggaggg ggaagtgagg tacagctgca 1500
acagtccggc gccgaactcg ttcgccctgg aacctcagtc aaattgtcat gcaaggtgag 1560
tgccgacaca ataacctttt actatatgca cttcgttaaa cagaggccag gtcaaggtct 1620
ggaatggata ggcagaattg atccagaaga tgagtcacc aaatactcag aaaagttcaa 1680
aaacaaagcc actcttactg ccgacacctc aagcaacaca gcatactta agctcagttc 1740
acttaccagc gaagacaccg ccacctatlt ttgtatltat ggtggctatt actlttgacta 1800
ctgggggcaa ggtgttatgg taacaglttc ttccattgaa ttcatgtatc cccccctta 1860
tttgataat gaacgatcta atgggactat aatacatatc aaggaaaagc atctgtgtca 1920
taccacaaag tcccctaagc ttttctgggc cctcgtcgtt gtggcaggag tgctlttttg 1980
ctatggattg ttggttactg tggtctctct cgtcatttgg acaaatagta ggaggaatcg 2040
ggggggacaa tctgattaca tgaacatgac accacggagg ccaggcctta ccagaaagcc 2100
```

ctaccaacct tatgcaccag cacgagactt cgccgcatac aggccaaggg ctaagttttc 2160
ccgcagcgcc gaaaccgcag ccaacctcca agatcctaata cagctctata acgaattgaa 2220
tcttggccgc agagaggagt acgacgtact tgagaaaaag agagctaggg accctgaaat 2280
gggtgggaag caacagcgaa gaaggaacc acaggaaggg gtgtataatg cccttcaaaa 2340
ggataaaatg gcagaggcat acagtgaaat cggaaccaag ggggagagac gcagagggaa 2400
aggccatgac ggcctttatc agggtttgc aactgctact aaagacactt atgatgcctt 2460
gcatatgcaa actctcgcac ccagatgacg agcatcttac cgccatttat tcccatattt 2520
gttctgtttt tcttgatttg ggtatacatt taaatgtaa taaaacaaaa tgggtggggca 2580
atcatttaca ttttatggga tatgtaatta ctagttcagg tgtattgcca caagacaaac 2640
atgttaagaa actttcccgt tatttacgct ctgttctgt taatcaacct ctggattaca 2700
aaatttgtga aagattgact gatattetta actatgttgc tecttttacg ctgtgtggat 2760
atgctgcttt aatgcctctg tatcatgcta ttgcttcccg tacggctttc gttttctct 2820
ccttgataaa atcctgggtg ctgtctcttt atgaggagtt gtggcccgtt gtccgtcaac 2880
gtggcgtggg gtgctctgtg tttgctgacg caacccccac tggctggggc attgccacca 2940
cctgtcaact cctttctggg actttcgett tccccctcc gatcgccacg gcagaactca 3000
tcgccgctg ccttgcccgc tgetggacag gggctaggtt gctgggact gataattccg 3060
tggtgttgtc ggggaagctg acgtccttc catggctgct cgctgtgtt gccactgga 3120
tctgcgcg gacgtcctt tgctacgtc cttegctct caatccagcg gacctcctt 3180
cccaggcct tctgccggtt ctgcccctc tcccgcgtc tcgctttcgg cctccgacga 3240
gtcggatctc cctttgggccc gctccccgc ctgtttcgc tcggcgtccg gtccgtgttg 3300
cttggctgac acctgtgcag aattgcgaac catggattcc accgtgaact ttgtctctg 3360
gcatgcaaat cgtcaacttg gcatgccaag aattaattcg gatccaagct taggcctgct 3420
cgctttcttg ctgtcccatt tctattaaag gttcctttgt tccctaagtc caactactaa 3480
actgggggat attatgaagg gccttgagca tctggattct gcctagcgt aagcttccta 3540
acacgagcca tagatagaat aaaagatfff atttagtctc cagaaaaagg ggggaatgaa 3600
agaccccacc tgtaggtttg gcaagctagc ttaagtaagc cattttgcaa ggcatggaaa 3660
aatacataac tgagaataga gaagttcaga tcaaggttag gaacagagag acaggagaat 3720
atgggcaaaa caggatatct gtgtaagca gttcctgccc cggctcaggg ccaagaacag 3780
ttggaacagc agaatatggg ccaaacagga tatctgtggg aagcagttcc tgccccggct 3840
cagggcaag aacagatggt ccccagatgc ggtcccgcc tcagcagttt ctagagaacc 3900
atcagatggt tccagggtgc cccaaggacc tgaatgacc ctgtgcctta tttgaactaa 3960
ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc tccccagct caataaaaga 4020
gcccacaacc cctcaactcgg cgcgccagtc ctccgataga ctgcgtcgc cggggtacc 4080
gtattcccaa taaagcctct tgetgtttgc atccgaatcg tggactcgt gatccttggg 4140
agggtctct cagattgatt gactgcccac ctgggggtc tttcattctc gagagctttg 4200
gcgtaatcat ggtcatagct gtttctgtg tgaattgtt atccgctcac aattccacac 4260
aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg cctaatgagt gagctaactc 4320
acattaattg cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg 4380
cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct 4440

tcctcgcctca ctgactcgcct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggc atcagctcac 4500
 tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga 4560
 gcaaaaaggcc agcaaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat 4620
 aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtacagag gtggcgaaac 4680
 ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctcccctcgt gcgctctcct 4740
 gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg 4800
 ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg 4860
 ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt 4920
 cttgagtcca acccggtaa acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg 4980
 attagcagag cgaggtatgt aggcgggtgct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac 5040
 ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga 5100
 aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt 5160
 gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt 5220
 tctacggggc ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga 5280
 ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc 5340
 taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct 5400
 atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc atagttgctt gactccccgt cgtgtagata 5460
 actacgatac gggagggctt accatctggc cccagtgcct caatgatacc gcgagacca 5520
 cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga 5580
 agtggctcctg caactttatc cgctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga 5640
 gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtt ccattgctgc tggcatcgtg 5700
 gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga 5760
 gttacatgat ccccatggtt gtgcaaaaa gcggttagct ccttcgggtcc tccgatcgtt 5820
 gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcact gcataattct 5880
 cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca 5940
 ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat 6000
 accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga 6060
 aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcacc 6120
 aactgatctt cagcatcttt tactttacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg 6180
 caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc 6240
 ctttttcaat attattgaag ctttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt 6300
 gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc 6360
 cctgacgtct aagaaacatc tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg 6420
 aggccctttc gtcttcaagc tgctcgcgc gtttcgggtg tgacggtgaa aacctctgac 6480
 acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag 6540
 cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttgccg ggtgtcgggg cgcagccatg acccagtcac 6600
 gtagcgatag ttactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggt 6660
 gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgcctt tcgccattca 6720
 ggctgcgcaa ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggctc ttcgctatta cgccagctgg 6780

cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac 6840
gacgttgtaa aacgacggcc agtgaattag tactctagct taagtaagcc attttgcaag 6900
gcatggaaaa atacataact gagaatagag aagttcaga 6939

<210> 7

<211> 12188

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> pWPI-FRa 1-24 FKBP FRa

<400> 7

ttggaagggc taattcactc ccaaagaaga caagatatcc ttgatctgtg gatctaccac 60
acacaaggct acttcctga ttagcagaac tacacaccag ggccaggggt cagatatcca 120
ctgacctttg gatggtgcta caagctagta ccagttgagc cagataaggt agaagaggcc 180
aataaaggag agaacaccag cttgttacac cctgtgagcc tgcattggat ggatgaccgc 240
gagagagaag tgtagagtg gaggtttgac agccgctag catttcatca cgtggcccca 300
gagctgcatc cggagtactt caagaactgc tgatatcgag cttgctaca gggactttcc 360
gctggggact ttccaggag gcgtggcctg ggccggactg gggagtggcg agccctcaga 420
tctgcatat aagcagctgc tttttgctg tactgggtct ctctggttag accagatctg 480
agcctgggag ctctctggct aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgcc 540
ttgagtgctt caagtagtgt gtgcccgtct gttgtgtgac tctggtaact agagatccct 600
cagacccttt tagtcagtgt ggaaaatctc tagcagtggc gcccgaacag ggacttgaaa 660
gcgaaagggg aaccagagga gctctctcga cgcaggactc ggcttgctga agcgcgcacg 720
gcaagaggcg aggggcggcg actggtgagt acgcaaaaa ttttgactag cggaggctag 780
aaggagagag atgggtgca gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgcgatgg 840
gaaaaaattc ggtaaggcc agggggaaag aaaaaatata aattaaaca tatagtatgg 900
gcaagcaggg agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc tgtagaaac atcagaaggc 960
tgtagacaaa tactgggaca gctacaacca tccctcaga caggatcaga agaacttaga 1020
tcattatata atacagtagc aaccctctat tgtgtgcatc aaaggataga gataaaagac 1080
accaaggaag ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagac caccgcacag 1140
caagcggccg ctgatcttca gacctggagg aggagatag agggacaatt ggagaagtga 1200
attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca ccaaggcaaa 1260
gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt tccttgggtt 1320
cttgggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg acgctgacgg tacaggccag 1380
acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaattg ctgagggcta ttgaggcgca 1440
acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa gaatcctggc 1500
tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact 1560
catttgacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat 1620
ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttaat 1680
acactcctta attgaagaat cgcaaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag aattattgga 1740

attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaattggc tgtggtatat 1800
aaaattattc ataatgatag taggaggctt gtagggtta agaatagttt ttgctgtact 1860
ttctatagtg aatagagtta ggcaggata ttaccatta tcgtttcaga cccacctccc 1920
aaccccgagg ggacccgaca ggcccgaagg aatagaagaa gaaggtggag agagagacag 1980
agacagatcc attcgattag tgaacggatc tcgacggat c gatgtcgac gataagcttt 2040
gcaaagatgg ataaagtttt aaacagagag gaatctttgc agctaattgga ctttctaggt 2100
cttgaaagga gtgggaattg gctccgggtc ccgtcagttg gcagagcgca catcgcccac 2160
agtccccgag aagttggggg gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga gaaggtggcg 2220
cggggtaaac tgggaaagt atgtcgtgta ctggctccgc ctttttcccg aggggtggggg 2280
agaaccgtat ataagtgcag tagtcgccgt gaacgttctt tttcgcaacg ggtttgccgc 2340
cagaacacag gtaagtgccg tgtgtggttc ccgcgggctt ggctcttta cgggttatgg 2400
cccttgctg ccttgaatta cttccactgg ctgcagtac tgattcttga tcccagctt 2460
cgggttgga gtgggtggga gagttcgagg cttgctgctt aaggagcccc ttcgctcgt 2520
gcttgagttg aggctggcc tgggcgctgg ggccgcccgc tgcgaatctg gtggcacctt 2580
cgcgcctgtc tcgctgcttt cgataagtct ctagccattt aaaatTTTTg atgacctgct 2640
gcgacgcttt ttttctggca agatagtctt gtaaattcgg gccaagatct gcacactggt 2700
atctcgcttt ttggggccgc gggcggcgac ggggccctg cgtcccagcg cacatgttcg 2760
gcgaggcggg gcctgcgagc gcggccaccg agaatcggac ggggtagtc tcaagctggc 2820
cggcctgctc tgggtgctgg cctcgcgccg ccgtgtatcg ccccgcctg ggcggcaagg 2880
ctggcccgt cggcaccagt tgcgtgagcg gaaagatggc cgcttcccgg ccctgctgca 2940
gggagctcaa aatggaggac gcggcgctcg ggagagcggg cgggtgagtc acccacaaa 3000
aggaaaagg cctttccgtc ctgagccgtc gttcatgtg actccacgga gtaccggcg 3060
ccgtccaggc acctcgatta gttctgagc ttttgagta cgtcgtcttt aggttggggg 3120
gaggggttt atgcgatgga gttccccac actgagtggg tggagactga agttaggcca 3180
gcttggcact tgatgtaatt ctcttgga tttgccctt ttgagtttg atcttggttc 3240
attctcaagc ctgagacagt gttcaaagt tttttctt catttcaggt gtcgtgagga 3300
atctcgacat ttaaatttaa ttaatctcga cggatcggg taactttta aagaaaagg 3360
gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca taatagcaac agacatacaa 3420
actaaagaat tacaaaaaca aattacaaa attcaaaatt ttatcgatca cgagactagc 3480
ctcgaggttt atggctcagc ggatgacaac acagctgctg ctcttctag tgtgggtggc 3540
tgtagtaggg gaggtcaga caggagtgc ggtggagact atctcccag gagacggcg 3600
caccttccc aagcgcggcc agacctgct ggtgcactac accgggatgc ttgaagatgg 3660
aaagaaattt gattcctccc gggacagaaa caagccctt aagtttatgc taggcaagca 3720
ggaggtgatc cgaggtggg aagaaggggt tgcccagatg agtgtgggtc agagagccaa 3780
actgactata tctccagatt atgcctatgg tgccactggg caccagga tcateccacc 3840
acatgccact ctgctcttc atgtggagct tctaaaactg gaatctggcg gtggatccag 3900
gattgcatgg gccaggactg agcttctcaa tgtctgcatg aacgccaagc accacaagga 3960
aaagccaggc cccgaggaca agttgcatga gcagtgtcga ccctggagga agaattgctg 4020
ctgttctacc aacaccagcc aggaagccca taagatggtt tcctacctat atagattcaa 4080

ctggaaccac tgtggagaga tggcacctgc ctgcaaacgg catttcatcc aggacacctg 4140
cctctacgag tgctccccc acttggggcc ctggatccag caggtggatc agagctggcg 4200
caaagagcgg gtactgaacg tgcccctgtg caaagaggac tgtgagcaat ggtgggaaga 4260
ttgtcgcacc tcctacacct gcaagagcaa ctggcacaag ggctggaact ggacttcagg 4320
gtttaacaag tgcgcagtgg gagctgctg ccaacctttc catttctact tccccacacc 4380
cactgttctg tgcaatgaaa tctggactca ctctacaag gtcagcaact acagccgagg 4440
gagtgccgc tgcatccaga tgtggttca cccagcccag ggcaaccca atgaggaggt 4500
ggcgaggttc tatgctgcag ccatgagtgg ggctgggccc tgggcagcct ggcctttcct 4560
gcttagcctg gccctaagc tgctgtggct gctcagctga aaactacggg ctgcaggaat 4620
tccgcccccc cccccctaac gttactggcc gaagccgctt ggaataaggc cgggtgtcgt 4680
ttgtctatat gttattttcc accatattgc cgtcttttgg caatgtgagg gcccgaaac 4740
ctggccctgt cttcttgacg agcattccta ggggtctttc cctctctgcc aaaggaatgc 4800
aaggtctgtt gaatgtcgtg aaggaagcag ttctcttggg agcttcttga agacaaaca 4860
cgtctgtagc gaccctttgc aggcagcggg accccccacc tggcgacagg tgctctctgcg 4920
gcaaaaagcc acgtgtataa gatacacctg caaaggcggc acaaccccag tgccacgttg 4980
tgagttggat agttgtggaa agagtcaaat ggctctctc aagcgtattc aacaaggggc 5040
tgaaggatgc ccagaaggta cccatttga tgggatctga tctggggcct cgggtgcat 5100
gctttacatg tgtttagtcg aggttaaaaa acgtctaggg cccccgaacc acggggacgt 5160
ggttttcctt tgaaaaacac gatgataata ccatggtgag caagggcgag gagctgttca 5220
ccgggggtgt gcccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg 5280
tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag ttcatctgca 5340
ccaccggcaa gctgcccgtg ccctggccca cctctgtgac caccctgacc tacggcgtgc 5400
agtgttcag ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgcatgc 5460
ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacc 5520
gcgccgagggt gaagttcgag ggcgacacc tgggtgaacc catcgagctg aagggcatcg 5580
acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca 5640
acgtctatat catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc 5700
acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccata ccagcagaac acccccatcg 5760
gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag caccagtcg gccctgagca 5820
aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tctgtctgga gttcgtgacc gccgccggga 5880
tcaactctcg catggacgag ctgtacaagt ccggactcag atctcgacta gctagtagct 5940
agctagctag tcgagctcaa gcttcaatt cgatatcaag cttatcgca taccgtcgac 6000
ctcgagggaa ttccgataat caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggta 6060
ttcttaacta tgttgetcct tttacgetat gtggatacgc tgctttaatg cttttgtatc 6120
atgctattgc ttcccgtatg gctttcattt tctctctctt gtataaatcc tggttgctgt 6180
ctctttatga ggagttgtgg cccgttgcga ggcaacgtgg cgtgggtgtgc actgtgtttg 6240
ctgacgcaac cccactggt tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt 6300
tcgctttccc cctccctatt gccacggcgg aactcatcgc cgctctcctt gcccgctgct 6360
ggacaggggc tcggctgttg ggcaactgaca attccgtggt gttgtcgggg aagctgacgt 6420

cctttccatg gctgctcgcc tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg tccttctgct 6480
acgtcccttc ggccctcaat ccagcggacc ttcttcccg cggcctgctg ccggtctgct 6540
ggcctcttcc gcgtcttcgc cttcgcctc agacgagtcg gatctccctt tgggccgctt 6600
ccccgcatcg ggaattcgag ctcggtacct ttaagaccaa tgacttaciaa ggcagctgta 6660
gatcttagcc actttttaa agaaaagggg ggactggaag ggctaattca ctcccaacga 6720
agacaagatg ggatcaattc accatgggaa taacttcgta tagcatacat tatacgaagt 6780
tatgctgctt tttgcttgta ctgggtctct ctggttagac cagatctgag cctgggagct 6840
ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgccctt gactgcttca 6900
agtagtgtgt gcccgtctgt tgtgtgactc tggtactag agatccctca gaccctttta 6960
gtcagtggtg aaaatctcta gcagcatcta gaattaattc cgtgtattct atagtgtcac 7020
ctaaatcgta tgtgatgat acataagggt atgtattaat tgtagccgcg ttctaacgac 7080
aatatgtaca agcctaattg ttagcatctt ggcttactga agcagacct atcatctctc 7140
tcgtaaactg ccgtcagagt cggtttggtt ggacgaacct tctgagttc tggtaacgcc 7200
gtcccgcacc cggaaatggt cagcgaacca atcagcaggg tcacgctag ccagatcctc 7260
tacgccggac gcatcgtggc cggcatcacc ggcgccacag gtgcggttgc tggcgctat 7320
atgcccgaca tcaccgatgg ggaagatcgg gctcgccact tcgggctcat gagcgcttgt 7380
ttcggcgtgg gtatggtggc aggccccgtg gccgggggac tgttgggagc catctccttg 7440
catgcacat tccttgccgc ggcggtgctc aacggcctca acctactact gggctgcttc 7500
ctaatgcagg agtcgataa gggagagcgt cgaatggtgc actctcagta caatctgctc 7560
tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgccctgacg 7620
ggcttgctctg ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat 7680
gtgtcagagg ttttcaccgt catcaccgaa acgcgcgaga cgaaagggcc tcgtgatacg 7740
cctattttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt 7800
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 7860
tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 7920
gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt 7980
ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 8040
agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaaagtc cttgagagtt ttcgccccga 8100
agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgagg tattatcccc 8160
tattgacgcc gggcaagagc aactcggctg ccgcatacac tattctcaga atgacttggg 8220
tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 8280
cagtgtctgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 8340
aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga 8400
tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 8460
ttagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attactggc gaactactta ctctagcttc 8520
ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 8580
ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 8640
cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 8700
gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgtcgaga taggtgcctc 8760

actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 8820
 aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 8880
 caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 8940
 aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 9000
 accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt 9060
 aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 9120
 ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tcctgttacc 9180
 agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 9240
 accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg 9300
 gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag cattgagaaa gcgccacgct 9360
 tcccgaaggg agaaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggctcgaa caggagagcg 9420
 cacgagggag cttccagggg gaaacgctg gtatctttat agtctgtcg ggtttcgcca 9480
 cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa 9540
 cgccagcaac gcggcctttt tacggttcc ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt 9600
 ctttctgcg ttatccccg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 9660
 taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagc cagcagtcg gtgagcagg aagcggaga 9720
 gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctgtgg 9780
 aatgtgtgtc agttaggggtg tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa 9840
 agcatgcatc tcaattagtc agcaaccagg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc 9900
 agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagtccccgc cctaactccg 9960
 cccatcccgc ccctaactcc gccagttcc gccattctc cgccccatgg ctgactaatt 10020
 ttttttattt atgcagaggc cgaggccgcc tcggcctctg agctattcca gaagtagtga 10080
 ggaggctttt ttggaggcct aggttttgc aaaaagcttg gacacaagac aggcttgcca 10140
 gatatgtttg agaataccac tttatccccgc gtcagggaga ggcaagtgcgt aaaaagacgc 10200
 ggactcatgt gaaatactgg ttttagtgc gccagatctc tataatctcg cgcaacctat 10260
 tttccccctg aacacttttt aagccgtaga taacaggct gggacacttc acatgagcga 10320
 aaaatacatc gtcacctggg acatgttgca gatccatgca cgtaaactcg caagccgact 10380
 gatgccttct gaacaatgga aaggcattat tgccgtaagc cgtggcggtc tgtaccgggt 10440
 gcgttactgg cgcgtgaact gggtattcgt catgtcgata ccgtttgtat ttccagctac 10500
 gatcacgaca accagcgcga gcttaaagtg ctgaaacgcg cagaaggcga tggcgaaggc 10560
 ttcacgttta ttgatgacct ggtggatacc ggtggactg cggttgcgat tcgtgaaatg 10620
 tatccaaaag cgcactttgt caccatctc gcaaaaccgg ctggtcgtcc gctggttgat 10680
 gactatgttg ttgatatccc gcaagatacc tggattgaac agccgtggga tatgggcgctc 10740
 gtattcgtcc cgccaatctc cggtcgtctaa tcttttcaac gcctggcact gccgggcgtt 10800
 gttcttttta acttcaggcg gggttacaata gtttccagta agtattctgg aggctgcac 10860
 catgacacag gcaaacctga gcgaaaccct gttcaaaccc cgctttaaac atcctgaaac 10920
 ctcgacgcta gtccgccgct ttaatcacgg cgcacaaccg cctgtgcagt cggcccttga 10980
 tggtaaaacc atccctcact ggtatcgcac gattaaccgt ctgatgtgga tctggcgcgg 11040
 cattgacca cgcgaaatcc tcgacgtcca ggcacgtatt gtgatgagcg atgccgaacg 11100

taccgacgat gatttatacg atacggtgat tggctaccgt ggcggcaact ggatttatga 11160
gtgggccccg gatctttgtg aaggaacctt acttctgtgg tgtgacataa ttggacaaac 11220
tacctacaga gatttaaagc tctaaggtaa atataaaatt ttttaagtga taatgtgtta 11280
aactactgat tctaattggt tgtgtatfff agattccaac ctatggaact gatgaatggg 11340
agcagtggtg gaatgccttt aatgaggaaa acctgttttg ctcagaagaa atgccatcta 11400
gtgatgatga ggctactgct gactctcaac attctactcc tccaaaaaag aagagaaagg 11460
tagaagacc caaggacttt ccttcagaat tgctaagttt tttgagtcac gctgtgttta 11520
gtaatagaac tcttgcttgc tttgctatff acaccacaaa ggaaaaagct gcaactgctat 11580
acaagaaaaat tatggaaaaa tattctgtaa cttttataag taggcataac agttataatc 11640
ataacatact gttttttctt actccacaca ggcatagagt gtctgtctatt aataactatg 11700
ctcaaaaatt gtgtaccttt agctttttta tttgtaaagg ggttaataag gaatatttga 11760
tgtatagtgc cttgactaga gatcataatc agccatacca catttgtaga ggttttactt 11820
gctttaaaaa acctcccaca cctcccctg aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattggt 11880
gttggttaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaat 11940
ttcacaataa aagcattttt ttcaactgat tctagttgtg gtttgtccaa actcatcaat 12000
gtatcttata atgtctggat caactggata actcaagcta accaaaatca tcccaaactt 12060
cccaccccat acctatttac cactgccaat tacctagtgg tttcatttac tctaaacctg 12120
tgattcctct gaattatfff cattttaaag aaattgtatt tgttaaatat gtactacaaa 12180
cttagtag 12188

<210> 8

<211> 12182

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> pWPI mFKBP-mFRa SGGGS

<400> 8

ttggaagggc taattcactc ccaaagaaga caagatatcc ttgatctgtg gatctaccac 60
acacaaggct acttccctga ttagcagaac tacacaccag ggccaggggt cagatatcca 120
ctgacctttg gatggtgcta caagctagta ccagttgagc cagataaggt agaagaggcc 180
aataaaggag agaacaccag cttgtttacac cctgtgagcc tgcatgggat ggatgaccgc 240
gagagagaag tgtagagtg gaggtttgac agccgcctag catttcatca cgtggcccga 300
gagctgcatc cggagtactt caagaactgc tgatategag cttgctacaa gggactttcc 360
gctggggact ttccagggag gcgtggcctg ggcgggactg gggagtggcg agccctcaga 420
tctgcatat aagcagctgc tttttgctg tactgggtct ctctggttag accagatctg 480
agcctgggag ctctctggct aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgcc 540
ttgagtgtct caagtagtgt gtgcccgtct gttgtgtgac tctggtaact agagatccct 600
cagacccttt tagtcagtgt ggaaaatctc tagcagtggc gcccgaacag ggacttgaaa 660
gcgaaagggg aaccagagga gctctctcga cgcaggactc ggcttgctga agcgcgcacg 720
gcaagaggcg aggggaggcg actggtgagt acgccaataa ttttgactag cggaggctag 780

aaggagagag atgggtgcca gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgcgatgg 840
gaaaaaattc ggtaaggcc agggggaaaag aaaaaatata aattaaaca tatagtatgg 900
gcaagcaggg agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc tgtagaaac atcagaaggc 960
tgtagacaaa tactgggaca gctacaacca tcccttcaga caggatcaga agaacttaga 1020
tcattatata atacagtagc aaccctctat tgtgtgcatc aaaggataga gataaaagac 1080
accaaggaag ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagac caccgcacag 1140
caagcggccg ctgatcttca gacctggagg aggagatatg aggacaatt ggagaagtga 1200
attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca ccaaggcaaa 1260
gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt tccttggggtt 1320
cttgggagca gcaggaagca ctatgggagc agcgtcaatg acgctgacgg tacaggccag 1380
acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaattg ctgagggcta ttgaggcgca 1440
acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa gaatcctggc 1500
tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact 1560
catttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat 1620
ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttaat 1680
acactcctta attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag aattattgga 1740
attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaattggc tgtggtatat 1800
aaaattattc ataagtag taggaggctt gtaggttta agaatagttt ttgctgtact 1860
ttctatagtg aatagagtta ggccaggata ttcaccatta tcgtttcaga cccacctccc 1920
aaccgagagg ggacctgaca ggcccgaagg aatagaagaa gaaggtggag agagagacag 1980
agacagatcc attcgattag tgaacggatc tcgacggtat cgatgctgac gataagcttt 2040
gcaaagatgg ataaagtttt aaacagagag gaatctttgc agctaattga ctttctaggt 2100
cttgaaagga gtgggaattg gctccggtgc ccgtcagtgg gcagagcgca catgccccac 2160
agtccccgag aagttggggg gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga gaaggtggcg 2220
cggggtaaac tgggaaagtg atgtcgtgta ctggctccgc ctttttcccg aggggtggggg 2280
agaaccgtat ataagtgcag tagtcgccgt gaacgttctt tttcgcaacg ggtttgccgc 2340
cagaacacag gtaagtgccg tgtgtggttc ccgcccggct ggcccttcta cgggttatgg 2400
cccttgctg ccttgaatta cttccactgg ctgcagtac tgattcttga tcccgagctt 2460
cgggttgga gtgggtggga gagttcagg cttgcgctt aaggagcccc ttcgctcgt 2520
gcttgagttg aggcctggcc tgggcgctgg ggccgcccg tcggaatctg gtggcacctt 2580
cgcgcctgtc tcgctgcttt cgataagtct ctagecattt aaaatTTTTg atgacctgct 2640
gcgacgcttt ttttctggca agatagtctt gtaaattcgg gccaagatct gcacactggt 2700
atctcggttt ttggggccgc gggcggcgac ggggcccgtg cgtcccagcg cacatgttcg 2760
gcgagcggg gcctgcgagc gcggccaccg agaatcggac ggggtagtc tcaagctggc 2820
cggcctgctc tggtgctgg cctcgcgccg ccgtgtatcg ccccgcctg ggcggcaagg 2880
ctggcccggg cggcaccagt tgcgtgagcg gaaagatggc cgcttcccgg cctgtctgca 2940
gggagctcaa aatggaggac gcggcgctcg ggagagcggg cgggtgagtc accacacaa 3000
aggaaaagg cctttccgtc ctccagccgtc gttcatgtg actccacgga gtaccggcg 3060
ccgtccaggc acctcgatta gttctcgagc ttttgagta cgtcgtcttt aggttggggg 3120

gaggggtttt atgcatgga gttccccac actgagtggg tggagactga agttaggcca 3180
gcttggcact tgatgtaatt ctcttggaa tttgcccttt ttgagtttg atcttggttc 3240
attctcaagc ctgagacagt ggttcaaagt tttttcttc catttcaggt gtcgtgagga 3300
atttcgacat ttaaatttaa ttaatctcga cggatcggg taacttttaa aagaaaaggg 3360
gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca taatagcaac agacatacaa 3420
actaaagaat tacaaaaaca aattacaaa attcaaaatt ttatcgatca cgagactagc 3480
ctcgaggttt atggctcacc tgatgactgt gcagttgtg ctctgggtga tgtggatggc 3540
cgaatgtgct cagtccagag ctggagtgc ggtggagacc atctctctg gagacgggcg 3600
caccttcca aagcgcggcc agacctgct ggtgcactac acggggatgc ttgaagatgg 3660
aaagaaattt gattcctctc gggacagaaa caagccttt aagtttacac taggcaagca 3720
ggaggtgatc cgaggetggg aggaaggggg agcccagatg agtgtgggtc agagagccaa 3780
actgataatc tctcagaact atgcctatgg agccaccggg caccagga tcatcccacc 3840
acatgccact cttgtttttg atgtggagct tctaaaactg gaaagcggcg gcggcagcac 3900
tcgggccagg actgaacttc tcaatgtctg catggatgcc aacaccaca aagaaaacc 3960
gggccctgag gacaatttac acgaccagtg cagcccctgg aagacgaatt cctgctgttc 4020
cacgaacaca agccaggaag cacataagga catttctac ctgtaccggt tcaactggaa 4080
ccactgcgga actatgacat cggaatgcaa acggcacttt atccaagaca cctgcctcta 4140
tgagtgttcc ccgaacttg gaccctggat ccagcaggtg gaccagagct ggcgcaaaga 4200
gcggatcctt gatgttcccc tgtgcaaaga ggactgtcag cagtgggtggg aggactgcca 4260
gagctctttt acctgcaaga gcaattggca caaggatgg aactggtcct cggggcataa 4320
cgagtgtcct gtgggagcct cctgccatcc ctacacctc tacttcccca catctgtctc 4380
tctgtgtgag gaaatctgga gtcactccta caagctcagc aactacagtc gagggagcgg 4440
ccgctgcatt cagatgtggt tcgaccagc ccagggaac cccaacgagg aagtggcgag 4500
gttctatgcc gaggccatga gtggagctgg gtttcatggg acctggccac tcttgtgcag 4560
cctgtcctta gtgtgtctt gggatgatcag ctgaaaacta cgggctgcag gaattccgcc 4620
ccccccccc taacgttact ggccgaagcc gcttgaata aggccgtgt gcgtttgtct 4680
atatgttatt ttccaccata ttgccgtctt ttggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc 4740
ctgtcttctt gacgagcatt cctaggggtc tttcccctc cgccaaagga atgcaaggtc 4800
tgttgaatgt cgtgaaggaa gcagttctc tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg 4860
tagcgaccct ttgcaggcag cggaaccccc cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa 4920
agccacgtgt ataagataca cctgcaaagg cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt 4980
ggatagttgt ggaaagagtc aaatggctct cctcaagct attcaacaag gggctgaagg 5040
atgcccagaa ggtaccccat tgtatgggat ctgatctggg gcctcgggtc acatgcttta 5100
catgtgttta gtcgaggtta aaaaacgtct agggccccg aaccacgggg acgtggtttt 5160
cctttgaaaa acacgatgat aataccatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttaccgggg 5220
tggtgcccc cctggctcag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg 5280
gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca agctgacct gaagtctc tgcaccaccg 5340
gcaagctgcc cgtgccctgg cccacctcg tgaccacct gacctacggc gtgcagtgtc 5400
tcagccgcta ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag 5460

gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg 5520
agggtgaagtt cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca 5580
aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct 5640
atatcatggc cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca 5700
tcgaggacgg cagcgtgcag ctgcgccacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg 5760
gccccgtgct gctgcccgac aaccactacc tgagcaccca gtccgccctg agcaaagacc 5820
ccaacgagaa gcgcgatcac atggtcctgc tggagtctgt gaccgccgcc gggatcactc 5880
tcggcatgga cgagctgtac aagtccggac tcagatctcg actagctagt agctagctag 5940
ctagtcgagc tcaagcttcg aattcgatat caagcttacc gcgataccgt cgacctcgag 6000
ggaattccga taatcaacct ctggattaca aaatttgtga aagattgact ggtattctta 6060
actatgttgc tccitttacg ctatgtggat acgctgcttt aatgcctttg tatcatgcta 6120
ttgcttcccg tatggettcc attttctct ccttgtataa atcctggttg ctgtctcttt 6180
atgaggagtt gtggcccgtt gtcaggcaac gtggcgtggt gtgactgtg tttgctgacg 6240
caacccccac tggttggggc attgccacca cctgtcagct cctttccggg actttcgctt 6300
tccccctccc tattgccacg gcggaactca tcgccgctg ccttgcccgc tgctggacag 6360
gggctcggct gttgggcaact gacaattccg tgggtttgtc ggggaagctg acgtcctttc 6420
catggctgct cgctgtgtt gccacctgga ttctgcgagg gacgtccttc tgctacgtcc 6480
cttcggccct caatccagcg gaccttctt cccgcggcct gctgccggct ctgcggcctc 6540
ttccgctct tcgccttgc cctcagacga gtcggatctc cctttgggcc gcctccccgc 6600
atcgggaatt cgagctcggc accttaaga ccaatgactt acaaggcagc tgtagatctt 6660
agccactttt taaaagaaaa ggggggactg gaagggctaa ttcactcca acgaagacaa 6720
gatgggatca attcaccatg ggaataactt cgtatagcat acattatacg aagttatgct 6780
gctttttgct tgfactgggt ctctctgggt agaccagatc tgagcctggg agctctctgg 6840
ctaactaggg aaccactgc ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc ttcaagtagt 6900
gtgtgcccgt ctgttgtgtg actctggtaa ctagagatcc ctgagacct ttagtctagt 6960
gtggaaaatc tctagcagca tctagaatta attcctgtga ttctatagtg tcacctaaat 7020
cgtatgtgta tgatacataa ggttatgtat taattgtagc cgcgttctaa cgacaatatg 7080
tacaagccta attgtgtagc atctggctta ctgaagcaga ccctatcatc tctctcgtaa 7140
actgccgtca gactcggttt ggttggacga acctctgag tttctggtaa cgccgtcccg 7200
caccgggaaa tggtcagcga accaatcagc agggctatcg ctagccagat cctctacgcc 7260
ggacgcatcg tggccggcat caccggcgcc acaggtcggg ttgctggcgc ctatatcgcc 7320
gacatcaccg atggggaaga tcgggctcgc cacttcgggc tcatgagcgc ttgtttcggc 7380
gtgggtatgg tggcaggccc cgtggccggg ggactgttgg gcgccatctc cttgcatgca 7440
ccattccttg cggcggcggt gctcaacggc ctcaacctac tactgggctg ctctctaatg 7500
caggagtgcg ataagggaga gcgtcgaatg gtgactctc agtacaatct gctctgatgc 7560
cgcatagtta agccagcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct gacgggcttg 7620
tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca 7680
gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt 7740
tttatagggt aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg 7800

aaatgtgcgc ggaacccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct 7860
catgagacaa taacctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat 7920
tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc 7980
tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg 8040
ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg 8100
ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga 8160
cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgat acactattct cagaatgact tggttgagta 8220
ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc 8280
tgccataacc atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc 8340
gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactgcc ttgatcgttg 8400
ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgctgtagc 8460
aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca 8520
acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct 8580
tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat 8640
cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg 8700
gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgt gagataggtg cctcactgat 8760
taagcattgg taactgtcag accaagtta ctcatatata ctttagattg atttaaaact 8820
tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat 8880
cccttaacgt gagttttctg tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 8940
ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaa aaccaccgct 9000
accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg 9060
cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt cttctagt tagccgtagt taggccacca 9120
cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcctctg ctaatcctgt taccagtggc 9180
tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga 9240
taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac 9300
gacctacacc gaactgagat acctacagc tgagcattga gaaagcgcca cgcttcccga 9360
agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 9420
ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtctt gtcgggtttc gccacctctg 9480
acttgagcgt cgatttttgt gatgctctc agggggcgg agcctatgga aaaacgccag 9540
caacgcggcc tttttacggt tcttgccctt ttgctggcct tttgctcaca gtttctttcc 9600
tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc 9660
tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgc 9720
aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgtt gccgattcat taatgcagct gtggaatgtg 9780
tgtcagttag ggtgtggaaa gtccccagc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg 9840
catctcaatt agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 9900
atgcaaagca tgcatctcaa ttagtcagca accatagtec cgccttaac tccgcccac 9960
ccgcccctaa ctccgcccag ttccgcccac tctccgccc atggctgact aatttttttt 10020
atttatgcag aggccgaggc cgctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc 10080
ttttttggag gcctaggctt ttgcaaaaag cttggacaca agacaggctt gcgagatatg 10140

tttgagaata ccactttatc ccgcgtcagg gagaggcagt gcgtaaaaag acgcggactc 10200
atgtgaaata ctggttttta gtgcgccaga tctctataat ctgcgcgaac ctatthttccc 10260
ctcgaacact ttttaagccg tagataaaca ggctgggaca cttcacatga gcgaaaaata 10320
catcgtcacc tgggacatgt tgcagatcca tgcacgtaa ctcgcaagcc gactgatgcc 10380
ttctgaacaa tggaaaggca ttattgccgt aagccgtggc ggtctgtacc ggggtcgtta 10440
ctggcgcgtg aactgggtat tcgtcatgtc gataccgttt gtatthccag ctacgatcac 10500
gacaaccagc gcgagcttaa agtgctgaaa cgcgcagaag gcgatggcga aggcttcatc 10560
gttattgatg acctgggtga taccgggtgg actgcggttg cgattcgtga aatgtatcca 10620
aaagcgcact ttgtcaccat cttcgcaaaa ccggctggtc gtccgctggg tgatgactat 10680
gttgttgata tcccgaaga tacctggatt gaacagccgt gggatatggg cgtcgtattc 10740
gtcccgccaa tctccggtcg ctaatctttt caacgcctgg cactgccggg cgttgttctt 10800
tttaacttca ggccgggttac aatagtttcc agtaagtatt ctggaggctg catccatgac 10860
acaggcaaac ctgagcgaac cctgttcaa accccgtttt aaacatcctg aaacctcgac 10920
gctagtccgc cgctttaatc acggcgcaca accgcctgtg cagtcggccc ttgatggtaa 10980
aaccatccct cactggtatc gcatgattaa ccgtctgatg tggatctggc gcggcattga 11040
cccacgcgaa atcctcgacg tccaggcacg tattgtgatg agcgatgccg aacgtaccga 11100
cgatgattta tacgatacgg tgattggcta ccgtggcggc aactggattt atgagtgggc 11160
cccggatcct tgtgaaggaa cttacttct gtggtgtgac ataattggac aaactaccta 11220
cagagattta aagctctaag gtaaatataa aatthttaag tgtataatgt gttaaactac 11280
tgattctaata tgthttgtga thtttagatt caacctatgg aactgatgaa tgggagcagt 11340
ggtggaatgc ctthaatgag gaaaacctgt thtgcctcaga agaatgcca tctagtgatg 11400
atgaggctac tgctgactct caacattcta ctctccaaa aaagaagaga aaggtagaag 11460
acccaagga ctthccttca gaattgctaa gththttgag tcatgctgtg thtagtaata 11520
gaactcttgc thgctthtgc atttacacca caaaggaaaa agctgcactg ctatacaaga 11580
aaattatgga aaaatattct gtaacctta taagtaggca taacagttat aatcataaca 11640
tactgththt thtactcca cacaggcata gagtgtctgc tattaataac tatgctcaaa 11700
aattgtgtac ctthtagctth ttaatttgta aaggggttaa taaggaatat thgatgtata 11760
gtgccttgac tagagatcat aatcagccat accacatttg tagaggthth actthgctthta 11820
aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat thgtthttgtt 11880
aactthgtthta thgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatthcaca 11940
aataaagcat thththtcaact gcattctagt thtggtthtgc ccaaactcat caatgtatct 12000
tatcatgtct ggatcaactg gataactcaa gtaaccaaa atcatcccaa actthcccacc 12060
ccatacccta thaccactgc caattaccta thggtthtcat thtactctaaa cctgtgatthc 12120
ctctgaatta ththtcttht aaagaaattg ththttgtaa atatgtacta caaacttagt 12180
ag 12182
<210> 9
<211> 10447
<212> DNA
<213> 人工

<220>

<223> pHR EcorI hAnti cd19 1D3 myc铰链cd28 cd3zeta

<400> 9

cgataccgtc gaccaaggca gctgtagatc ttagccactt tttaaaagaa aaggggggac 60
 tggaagggct aattcactcc caacgaagac aagatctgct ttttgcttgt actgggtctc 120
 tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac cactgctta 180
 agcctcaata aagcttgccct tgagtgcctc aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact 240
 ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagcatct 300
 agaattaatt ccgtgtattc tatagtgtca cctaaatcgt atgtgtatga tacataaggt 360
 tatgtattaa ttgtagccgc gttctaacga caatatgtac aagcctaatt gtgtagcatc 420
 tggcttactg aagcagacc tatcattctc ctgtaaaact gccgtcagag tcggtttggg 480
 tggacgaacc ttctgagttt ctggtaacgc cgtcccgcac ccggaatgg tcagcgaacc 540
 aatcagcagg gtcatcgcta gccagatcct ctacgccgga cgcacgtgtg ccggcatcac 600
 cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcta tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg 660
 ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg tttcggcgtg ggtatggtg caggccccgt 720
 ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt gcatgcacca ttccttgccg cggcgggtgt 780
 caacggcctc aacctactac tgggctgctt cctaatgcag gagtcgata agggagagcg 840
 tcgaatggtg cactctcagt acaatctagc tctgatgccg catagttaag ccagccccga 900
 caccgccaa caccgctga cgcgccctga cgggcttgtc tgctcccggc atccgcttac 960
 agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc atgtgtcaga ggttttcacc gtcacaccg 1020
 aaacgcgcga gacgaaaggg cctcgtgata cgctatctt tataggtaa tgtcatgata 1080
 ataatggttt cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt 1140
 tgtttatctt tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa 1200
 atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgctgccctt 1260
 attccctttt ttgcggcatt ttgccttctt gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa 1320
 gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac 1380
 agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt 1440
 aaagtctctg tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg 1500
 cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat 1560
 cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg ccataacat gagtgataac 1620
 actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg 1680
 cacaacatgg gggatcatgt aactcgctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc 1740
 ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa 1800
 ctattaactg gcgaactact tactetaget tcccggcaac aattaataga ctggatggag 1860
 gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct 1920
 gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat 1980
 ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa 2040
 cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac 2100
 caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaagatc 2160

taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 2220
cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg 2280
cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg 2340
gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 2400
aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 2460
cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtgc 2520
tgtcttaccg ggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgagcgc gtcgggctga 2580
acgggggggtt cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 2640
ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat 2700
ccggaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 2760
tggtatcttt atagtctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 2820
tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcgccctt tttacggttc 2880
ctggcctttt gctggccttt tgetcacatg ttctttctg cgttatcccc tgattctgtg 2940
gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag 3000
cgcagcgagt cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 3060
gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt 3120
ccccaggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca 3180
gggtgtggaag gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 3240
agtcagcaac catagtcccc ccctaactc cgccatccc gccctaact ccgcccagtt 3300
ccgcccattc tccgcccatt ggctgactaa tttttttat ttatgcagag gccgaggccg 3360
cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt ttttgaggc ctaggctttt 3420
gcaaaaagct tggacacaag acaggcttgc gagatatgtt tgagaatacc actttatccc 3480
gcgtcagggg gaggcagtgc gtaaaaagac gcggactcat gtgaaatact ggttttttagt 3540
gcgccagatc tctataatct cgcgcaacct attttccct cgaacacttt ttaagccgta 3600
gataaacagg ctgggacact tcacatgagc gaaaaataca tcgtcacctg ggacatgttg 3660
cagatccatg cacgtaaact cgcaagccga ctgatgcctt ctgaacaatg gaaaggcatt 3720
attgccgtaa gccgtggcgg tctgtaccgg gtgcgttact ggcgctgaa ctgggtattc 3780
gtcatgtcga taccgtttgt atttccagct acgatcacga caaccagcgc gagcttaaag 3840
tgctgaaacg cgcagaaggc gatggcgaag gttcatcgt tattgatgac ctgggtgata 3900
ccggtgttac tgcggttgcg attcgtgaaa tgtatccaaa agcgcacttt gtcaccatct 3960
tcgcaaaaacc ggctggctgt ccgctggttg atgactatgt tgttgatata ccgcaagata 4020
cctggattga acagccgtgg gatatgggag tcgtatctgt cccgccaatc tccggtcgtc 4080
aatcttttca acgcctggca ctgccgggag ttgttctttt taacttcagg cgggttacia 4140
tagtttccag taagtattct ggaggetgca tccatgacac aggcaaact gagcgaaacc 4200
ctgttcaaac cccgctttaa acatcctgaa acctcgacgc tagtccgccc cttaatacac 4260
ggcgcaaac cgctgtgca gtcggccctt gatggtaaaa ccatecctca ctgggtatcgc 4320
atgattaacc gtctgatgtg gatctggcgc ggcatgacc cacgcgaaat cctcgacgtc 4380
caggcacgta ttgtgatgag cgatgccgaa cgtaccgacg atgatttata cgatacgggtg 4440
attggctacc gtggcggcaa ctggatttat gagtgggccc cggatctttg tgaaggaacc 4500

ttacttctgt ggtgtgacat aattggacaa actacctaca gagatttaaa gctctaaggt 4560
aaatataaaa tttttaagtg tataatgtgt taaactactg attctaattg tttgtgtatt 4620
ttagattcca acctatggaa ctgatgaatg ggagcagtgg tggaatgcct ttaatgagga 4680
aaacctgttt tgctcagaag aaatgccatc tagtgaatg gaggctactg ctgactctca 4740
acattctact cctccaaaaa agaagagaaa ggtagaagac cccaaggact ttccttcaga 4800
attgctaagt tttttgagtc atgctgtgtt tagtaataga actcttgctt gctttgctat 4860
ttacaccaca aaggaaaaag ctgcactgct atacaagaaa attatggaaa aatattctgt 4920
aacctttata agtaggcata acagttataa tcataacata ctgttttttc ttactccaca 4980
caggcataga gtgtctgcta ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt 5040
aatttgtaaa ggggttaata aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa 5100
tcagccatac cacatttcta gaggttttac ttgctttaa aaacctceca cacctceccc 5160
tgaacctgaa acataaaaatg aatgcaattg ttgttgtaa cttgtttatt gcagcttata 5220
atggttacia ataaagcaat agcatcacia attcaciaa taaagcattt ttttactgc 5280
attctagttg tggttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcaactgga 5340
taactcaagc taacccaaaat catcccaaac tcccacccc ataccctatt accactgcca 5400
attacctagt ggtttcattt actctaaacc tgtgattcct ctgaattatt ttcattttaa 5460
agaaattgta tttgttaaat atgtactaca aacttagtag ttggaagggc taattcactc 5520
ccaaagaaga caagatatcc ttgatctgtg gatctaccac acacaaggct acttcctga 5580
ttagcagaac tacacaccag ggccagggtt cagatatcca ctgaccttg gatggtgcta 5640
caagctagta ccagttgagc cagataaggt agaagaggcc aataaaggag agaacaccag 5700
cttgttacac cctgtgagcc tgcatgggat ggatgaccg gagagagaag tgttagagtg 5760
gaggtttgac agccgcctag catttcatca cgtggcccga gagctgcatc cggagtactt 5820
caagaactgc tgatatcgag cttgctacia gggactttcc gctggggact ttccaggag 5880
gcgtggcctg ggccgggactg gggagtggcg agccctcaga tctgcatat aagcagctgc 5940
tttttgccctg tactgggtct ctctgggttag accagatctg agcctgggag ctctctggct 6000
aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgc ttgagtgtt caagtagtgt 6060
gtgcccgtct gttgtgtgac tctggtact agagatccct cagaccctt tagtcagtgt 6120
ggaaaatctc tagcagtggc gcccgaacag ggacttgaaa gcgaaagga aaccagagga 6180
gctctctcga cgcaggactc ggcttgctga agcgcgcac gcaagaggcg agggcgggcg 6240
actggtgagt acgcaaaaaa ttttgactag cggaggctag aaggagagag atgggtgca 6300
gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgcgatgg gaaaaattc ggttaaggcc 6360
agggggaaaag aaaaaatata aattaaaca tatagtatgg gcaagcagg agctagaacg 6420
attcgcagtt aatcctggcc ttttagaac atcagaaggc ttagacaaa tactgggaca 6480
gctacaacca tcccttcaga caggatcaga agaacttaga tcattatata atacagtagc 6540
aaccctctat tgtgtgcatc aaaggataga gataaaagac accaaggaag ctttagacia 6600
gatagaggaa gagcaaaaaca aaagtaagac caccgcacag caagcgccg gtgatcttca 6660
gacctggacg atatatatga gggacaattg gagaagtga ttatataaat ataaagtagt 6720
aaaaattgaa ccattaggag tagcaccac caaggcaag agaagagtgg tgcagagaga 6780
aaaaagagca gtgggaatag gagctttgtt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac 6840

tatgggcgca gcgtcaatga cgctgacggt acaggccaga caattattgt ctggtatagt 6900
gcagcagcag aacaatttgc tgagggtat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac 6960
agtctggggc atcaagcagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga 7020
tcaacagctc ctggggattt ggggttgctc tggaaaactc atttgacca ctgctgtgcc 7080
ttggaatgct agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaatcaca cgacctggat 7140
ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc 7200
gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt 7260
gtggaattgg ttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt 7320
aggaggcttg gtaggtttaa gaatagtttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag 7380
gcagggatat tcaccattat cgtttcagac ccacctcca accccgaggg gaccgcagac 7440
gcccgaagga atagaagaag aaggtggaga gagagacaga gacagatcca ttcgattagt 7500
gaacggatct cgacggtcgc caaatggcag tattcatcca caattttaa agaaaagggg 7560
ggattggggg gtacagtgca ggggaaagaa tagtagacat aatagcaaca gacatacaa 7620
ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaaa ttcaaaattt tcgggtttat tacagggaca 7680
gcagagatcc agtttgatc gataagcttg atatcgaatt gggtagggga ggcgcttttc 7740
ccaaggcagt ctggagcatg cgctttagca gcccgcctgg gcacttggcg ctacacaagt 7800
ggcctctggc ctgcacaca ttccacatcc accgtaggc gccaacggc tccgttcttt 7860
ggtggcccct tcgcgccacc ttctactcct ccctagtca ggaagtccc cccgccccg 7920
cagctcgcgt cgtgcaggac gtgacaaatg gaagtagcac gtctcactag tctcgtgcag 7980
atggacagca ccgctgagca atggaagcgg gtaggccttt ggggcagcgg ccaatagcag 8040
ctttgctcct tcgctttctg ggctcagagg ctgggaaggg gtgggtccgg gggcgggctc 8100
aggggcgggc tcaggggcgg ggcgggcgcc cgaaggtcct ccggaggccc ggcattctgc 8160
acgcttcaaa agcgcacgtc tgccgcgctg ttctctctt cctcatctcc ggccttttcg 8220
atggctcttc cagtactgc tcttctctc ccgcttgcgc tgctgttgca tgcggctcgg 8280
ccggagcaaa agctgattc agaagaggac ttggatatcc agatgacaca gaccattca 8340
tctctttctg ctagcctggg ggatcgggtc acaataagct gtcgcgcatc ccaagacata 8400
agcaaatatc tgaattgta tcaacagaaa cccgatggaa ctgtgaaact tctcatctac 8460
catacgagca gactgcattc tgggttctc agccgcttt cagggtctgg atctggaacg 8520
gactattcac ttaccatc taatttggaa caagaagaca tcgcgacctt tttctgtcag 8580
caaggcaata cgctccctta tacttttggg gggggaacga agttggagat cacaggtgga 8640
ggcggcagtg gcgggggagg atctggtgga ggtggttctg aggtcaagct gcaggagagt 8700
ggtcccgggc tggtagcccc gagccagagt ctgtctgtta cttgcaactgt gtcaggcgtg 8760
agtctcccag actatggtgt atcatggatt cgacagccgc cccggaaagg acttgagtgg 8820
ctcggagtga tctggggatc cgaaacgacg tactacaata gcgcgctcaa aagccggctg 8880
accatcatta aggataactc taaaagccag gtgttcttga aatgaattc cttgcagaca 8940
gatgatacgg cgatctatta ctgtgccaag cactactact atggaggcag ctatgccatg 9000
gattattggg gtcaaggcac ttctgtgaca gtgagcagtg ccgcagctat tgaagtgatg 9060
taccgcctc cgatcttga taatgagaaa tctaacggaa ccataataca cgtgaaaggc 9120
aaacatttgt gtccgtctcc tctgttcccc ggcctagta aaccgttttg ggtactggtg 9180

gtggtaggcg gagtacttgc atgttactca ctctctgta cegtcgcatt cattatcttc 9240
 tgggtacgga gcaagagatc tcggctgctt catagcgatt atatgaatat gacaccaga 9300
 cgcccaggtc ctactaggaa acattaccag ccgatgcmc cgccgaggga cttcgccgca 9360
 tacagatctc gcgtgaagtt ctcaagatct gccgatgcac cggcttatca gcagggacaa 9420
 aaccaactgt ataatgagct gaacctgggg cggagggagg agtatgatgt cctggacaag 9480
 cgaagagggc gagaccccga aatgggaggc aagcctcaac ggcggaagaa cccacaagag 9540
 ggctgtata acgagcttca aaaggacaaa atggcggaag cgtatagcga gatcggaatg 9600
 aagggcgaac gaaggagagg gaaaggctac gatgggctct accaggggct cagcacggca 9660
 acaaaagaca catatgacgc attgcatatg caggcgtgc caccgagatg actcacgct 9720
 caagtggagc aaggcaggct gacagtggat cttgacttg cggccgcaac tcccacctgc 9780
 aacatgcgtg actgactgag gccgcgactc tagagtcgac ctgcaggcat gcaagcttga 9840
 tatcaagctt atcgataatc aacctctgga ttacaaaatt tgtgaaagat tgactggtat 9900
 tcttaactat gttgctcctt ttacgctatg tggatacgt gctttaatgc ctttgatca 9960
 tgctattgct tcccgtatgg ctttcatttt ctctccttg tataaatcct gtttgctgtc 10020
 tctttatgag gaggttgtgg ccgttgtcag gcaacgtggc gtggtgtgca ctgtgtttgc 10080
 tgacgcaacc cccactggtt ggggcattgc caccacctgt cagctccttt ccgggacttt 10140
 cgctttcccc ctccctattg ccacggcgga actcatgcc gctgccttg cccgctgctg 10200
 gacaggggct cggctgttgg gcaactgaaa ttccgtggtg ttgtcgggga aatcatcgtc 10260
 ctttccttgg ctgctgcct gtgttgccac ctgattctg cgcgggacgt cttctgcta 10320
 cgtcccttcg gccctcaatc cagcggacct tcctccccg gcctgctgc cggctctgcg 10380
 gcctcttcg cgtcttcgcc ttgccctca gacgagtcgg atctcccttt gggccgcctc 10440
 cccgcat 10447

<210> 10

<211> 12536

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> pWPI pmei mAnti cd19 1D3 myc铰链cd28 cd3zeta

<400> 10

ttggaagggc taattcactc ccaaagaaga caagatatcc ttgatctgtg gatctaccac 60
 acacaaggct acttcctga ttagcagaac tacacaccag ggccaggggt cagatatcca 120
 ctgacctttg gatggtgcta caagctagta ccagttgagc cagataaggt agaagaggcc 180
 aataaaggag agaacaccag cttgttacac cctgtgagcc tgcatgggat ggatgaccgc 240
 gagagagaag tgtagagtg gaggtttgac agccgctag catttcatca cgtggcccga 300
 gagctgcac cggagtactt caagaactgc tgatategag cttgctaaa gggactttcc 360
 gctggggact ttccaggag gcgtggcctg ggcgggactg gggagtggcg agccctcaga 420
 tcctgcatat aagcagctgc tttttgctg tactgggtct ctctggttag accagatctg 480
 agcctgggag ctctctggct aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgcc 540
 ttgagtgctt caagtagtgt gtgccctct gttgtgtgac tctgtaact agagatcct 600

cagacccttt tagtcagtgt ggaaaatctc tagcagtggc gcccgaacag ggacttgaaa 660
gcgaaagggga aaccagagga gctctctcga cgcaggactc ggcttgctga agcgcgcacg 720
gcaagaggcg aggggcggcg actggtgagt acgccaaaaa ttttgactag cggaggctag 780
aaggagagag atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgcgatgg 840
gaaaaaattc ggtaaggcc agggggaaag aaaaaatata aattaaaca tatagtatgg 900
gcaagcaggg agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc tgtagaaaac atcagaaggc 960
tgtagacaaa tactgggaca gctacaacca tcccttcaga caggatcaga agaacttaga 1020
tcattatata atacagtagc aacctctat tgtgtgcatc aaaggataga gataaaagac 1080
accaaggaag ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagac caccgcacag 1140
caagcggccg ctgatcttca gacctggagg aggagatag agggacaatt ggagaagtga 1200
attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcacca ccaaggcaaa 1260
gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt tccttgggtt 1320
cttgggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg acgtgacgg tacaggccag 1380
acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaattg ctgagggcta ttgaggcgca 1440
acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa gaatcctggc 1500
tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact 1560
catttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat 1620
ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt acaattaca caagcttaat 1680
acactcctta attgaagaat cgcaaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag aattattgga 1740
attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaattggc tgtggtatat 1800
aaaattattc ataattgatag taggaggctt gtaggttta agaattagttt ttgctgtact 1860
ttctatagtg aatagagtta ggcagggata ttaccatta tcgtttcaga cccacctccc 1920
aaccccgagg ggacctgaca ggcccgaagg aatagaagaa gaaggtggag agagagacag 1980
agacagatcc attcgattag tgaacggatc tcgacggtat cgatgtcgac gataagcttt 2040
gcaaagatgg ataaagtttt aaacagagag gaatctttgc agctaatgga ctttctaggt 2100
cttgaaagga gtgggaattg gctccggtgc ccgtcagtgg gcagagcgca catcgcccac 2160
agtccccgag aagtggggg gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga gaaggtggcg 2220
cggggtaaac tgggaaagt atgtcgtgta ctggctccgc ctttttcccg aggggtgggg 2280
agaaccgtat ataagtgcag tagtcgccgt gaacgttctt tttcgcaacg ggtttgccgc 2340
cagaacacag gtaagtgccg tgtgtggttc ccgcgggctt ggctcttta cgggttatgg 2400
cccttgcgtg ccttgaatta cttccactgg ctgcagtac tgattcttga tcccagctt 2460
cgggttgga gtgggtggga gagttcagg cttgcgctt aaggagcccc ttcgctcgt 2520
gcttgagttg aggcctggcc tgggcgctgg ggccgccgcg tgcgaatctg gtggcacctt 2580
cgcgcctgtc tcgctgcttt cgataagtct ctagccattt aaaatttttg atgacctgct 2640
gcgacgcttt ttttctggca agatagtctt gtaaattcgg gccaagatct gcacactggt 2700
atctcggttt ttggggccgc gggcggcgac ggggcccgct cgtcccagcg cacatgttcg 2760
gcgaggcggg gcctgcgagc gcggccaccg agaatcggac ggggtagtc tcaagctggc 2820
cggcctgctc tgggtcctgg cctcgcgccg ccgtgtatcg ccccgcctg ggcggcaagg 2880
ctggcccggc cggcaccagt tgcgtgagcg gaaagatggc cgcttcccgg ccttctgca 2940

gggagctcaa aatggaggac gcggcgctcg ggagagcggg cgggtgagtc acccacacaa 3000
 aggaaaaggg cctttccgtc ctccagccgtc gcttcatgtg actccacgga gtaccgggcg 3060
 ccgtccaggc acctcgatta gttctcgagc ttttgagta cgtcgtcttt aggttggggg 3120
 gaggggtttt atgcgatgga gttccccac actgagtggg tggagactga agttaggcca 3180
 gcttggcact tgatgtaatt ctcttggaa tttgcccttt ttgagtttg atcttggttc 3240
 attctcaagc ctccagacagt gttcaaagt tttttcttc catttcaggt gtcgtgagga 3300
 atttcgacat ttaaatttaa ttaatctcga cggtatcggg taacttttaa aagaaaaggg 3360
 gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca taatagcaac agacatacaa 3420
 actaaagaat tacaanaaaca aattacaaaa attcaaaatt ttatcgatca cgagactagc 3480
 ctccaggttt atgggggttc ccaccagct gttgggggtg ctgctctctt ggatcactga 3540
 tgccatctgc gaacagaagc tcatttctga agaagatctg gacatacaga tgaccagag 3600
 tcctgccagc ttgtccacat cctcggaga gaccgtgaca attcaatgcc aggcctctga 3660
 ggacataat tctggattgg cttggtacca gcaaaagcca ggtaaaagtc ctccagttgtt 3720
 gatatacggc gcttctgatt tgcaagacgg ggtgccctca cgatttagcg ggtctggaag 3780
 tggcactcag tacagtctga agattacttc aatgcaaca gaagacgagg gtgtgtattt 3840
 ttgccaacag gggctgacct acccaaggac attcgggggc ggtacaaagc ttgaacttaa 3900
 gggcggcggg gggctctggag gtggtggatc tggcggaggg ggaagtgagg tacagctgca 3960
 acagtccggc gccgaactcg ttcgccctgg aacctcagtc aaattgtcat gcaaggtgag 4020
 tggcgacaca ataacctttt actatatgca cttcgttaa cagaggccag gtcaaggtct 4080
 ggaatggata ggcagaattg atccagaaga tgagtccacc aaatactcag aaaagttcaa 4140
 aaacaaagcc actcttactg ccgacacctc aagcaacaca gcatactta agctcagttc 4200
 acttaccagc gaagacaccg ccacctattt ttgtatttat ggtggctatt actttgacta 4260
 ctgggggcaa ggtgttatgg taacagttc ttccattgaa ttcatgtatc caccctccta 4320
 tttggataat gaacgatcta atgggactat aatacatatc aaggaaaagc atctgtgtca 4380
 taccacaaag tcccctaagc ttttctgggc cctcgtcgtt gtggcaggag tgcttttttg 4440
 ctatggattg ttggttactg tggctctctg cgtcatttgg acaaatagta ggaggaatcg 4500
 ggggggacaa tctgattaca tgaacatgac accacggagg ccaggcctta ccagaaagcc 4560
 ctaccaacct tatgcaccag cacgagactt cgccgcatc agccaaggg ctaagttttc 4620
 ccgagcggc gaaaccgag ccaacctca agatcctaat cagctctata acgaattgaa 4680
 tcttggccgc agagaggagt acgacgtact tgagaaaaag agagctaggg accctgaaat 4740
 ggggtgggaag caacagcga gaaggaacc acaggaagg gtgtataatg cccttcaaaa 4800
 ggataaaatg gcagaggcat acagtgaaat cggaaccaag ggggagagac gcagagggaa 4860
 aggccatgac ggctttatc aggtttgtc aactgctact aaagacactt atgatgcctt 4920
 gcataatgcaa actctcgac ccagatgaaa actacgggt gcaggaatc cccccccc 4980
 cccctaactg tactggccga agccgttgg aataaggcc gtgtgcgttt gtctatatgt 5040
 tattttccac catattgcc tcttttggca atgtgagggc ccgaaacct ggccctgtct 5100
 tcttgacgag cattcctagg ggtctttccc ctctcgcaa agaatgcaa ggtctgttga 5160
 atgtcgtgaa ggaagcagtt cctctggaag cttcttgaag acaacaacg tctgtagcga 5220
 ccctttgcag gcagcggaac cccccacct gcgacaggtg cctctgcggc caaaagccac 5280

gtgtataaga tacacctgca aaggcggcac aaccccagtg ccacgttgtg agttggatag 5340
ttgtggaaag agtcaaagtg ctctcctcaa gcgtattcaa caaggggctg aaggatgccc 5400
agaagggtacc ccattgtatg ggatctgatc tggggcctcg gtgcacatgc tttacatgtg 5460
tttagtcgag gttaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac ggggacgtgg ttttcctttg 5520
aaaaacacga tgataatacc atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc 5580
ccatcctggt cgagctggac ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg 5640
gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc 5700
tgcccgtgcc ctggcccacc ctctgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc 5760
gctaccccga ccacatgaag cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg 5820
tccaggagcg caccatcttc ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga 5880
agttcgaggg cgacacctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg 5940
acggcaacat cctggggcac aagctggagt acaactaaa cagccacaac gtctatatca 6000
tgcccgacaa gcagaagaac ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg 6060
acggcagcgt gcagctcgcc gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg 6120
tgctgctgcc cgacaaccac tacctgagca cccagtcgc cctgagcaaa gaccccaacg 6180
agaagcgcga tcacatggtc ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca 6240
tggaagcagc gtacaagtcc ggactcagat ctgactagc tagtagctag ctagctagtc 6300
gagctcaagc ttcgaattcg atatcaagct tatcgcgata ccgtcgacct cgagggaatt 6360
ccgataatca acctctggat tacaaaattt gtgaaagatt gactggtatt cttactatg 6420
ttgctccttt tacgctatgt ggatacgtg ctttaatgcc tttgtatcat gctattgctt 6480
cccgtatggc tttcattttc tctccttgt ataaatcctg gttgctgtct ctttatgagg 6540
agttgtggcc cgttgtcagg caacgtggcg tgggtgtcac tgtgtttgct gacgcaacce 6600
ccactgggtg gggcattgcc accacctgtc agctccttc cgggacttcc gctttcccc 6660
tccctattgc cacggcggaa ctcatcgccg cctgccttgc ccgctgctgg acaggggctc 6720
ggctgttggg cactgacaat tccgtggtgt tgcggggaa gctgacgtcc tttccatggc 6780
tgctcgcctg tgttggcacc tggattctgc gcgggacgtc cttctgctac gtcccttcgg 6840
ccctcaatcc agcggacctt cttcccgcg gcttctgccc ggctctgccc cctcttccgc 6900
gtcttcgcct tcgcccctcag acgagtcgga tctcccttg gcccgcctcc ccgcatcggg 6960
aattcgagct cggtagcttt aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac 7020
tttttaaaaag aaaagggggg actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatggg 7080
atcaattcac catggaata acttcgtata gcataatta tacgaagtta tgctgctttt 7140
tgcttgaact gggctctctt ggtagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact 7200
aggaaccca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc 7260
ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cctttttagt cagtgtggaa 7320
aatctctagc agcatctaga attaattccg tgtattctat agtgtcacct aaatcgtatg 7380
tgtatgatac ataaggttat gtattaattg tagccgcgtt ctaacgacaa tatgtacaag 7440
cctaattgtg tagcatctgg ctactgaag cagaccctat catctctctc gtaaactgcc 7500
gtcagagtcg gtttggttg acgaacctc tgagtttctg gtaacgccgt cccgcaccgc 7560
gaaatggtca gcgaaccaat cagcagggtc atcgttagcc agatcctcta cgccggacgc 7620

atcgtggccg gcatcaccgg cgccacaggt gcggttgctg ggcctatat cgccgacatc 7680
accgatgggg aagatcgggc tcgccacttc gggctcatga gcgcttgttt cggcgtgggt 7740
atggtggcag gccccgtggc cgggggactg ttgggcgcca tctccttgca tgcaccattc 7800
cttgccggcg cgggtgctca cggcctcaac ctactactgg gctgcttctt aatgcaggag 7860
tcgcataagg gagagcgtcg aatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 7920
gttaagccag ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct 7980
cccggcatcc gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt 8040
ttcaccgtca tcaccgaaac gcgcgagacg aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata 8100
ggttaatgtc atgataataa tggtttctta gacgtcagggt ggcacttttc ggggaaatgt 8160
gcgcggaacc cctatttggt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag 8220
acaataacc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaagg aagagtatga gtattcaaca 8280
tttccgtgtc gcccttattc cttttttg cgcattttgc cttctgttt ttgctcacc 8340
agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat 8400
cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc 8460
aatgatgagc acttttaag ttctgctatg tggcgcggtt ttatcccgtt ttgacgccgg 8520
gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc 8580
agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat 8640
aacatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga 8700
gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc 8760
ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc 8820
aacaacgctg cgcaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt 8880
aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc 8940
tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtagcgt gggctctcgg gtatcattgc 9000
agcactgggg ccagatggta agccctcccg tctcgtagtt atctacacga cggggagtca 9060
ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca 9120
ttggttaactg tcagaccaag ttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt 9180
ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct tttgataat ctcatgacca aatccctta 9240
acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga cccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg 9300
agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaca aaaaaccac cgctaccagc 9360
ggtggtttgt ttgccgcatc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggcttcag 9420
cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa 9480
gaactctgta gcaccgcta catacctcgc tctgctaate ctgttaccag tggctgctgc 9540
cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc 9600
gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc gaacgacct 9660
caccgaactg agatacctac agcgtgagca ttgagaaagc gccacgctc ccgaaggag 9720
aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcga cgaggagct 9780
tccaggggga aacgcctggt atctttatag tctgtcggg tttcggcacc tctgacttga 9840
gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcagggg gcgagccta tggaaaaacg ccagcaacgc 9900
ggccttttta cggttcctgg ctttttctg gccttttct cacatgttct ttctgcgctt 9960

atccccgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgcgg 10020
cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg 10080
caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctgtggaa tgtgtgtcag 10140
ttaggggtgtg gaaagtcccc aggctccccca gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc 10200
aattagtcag caaccaggtg tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa 10260
agcatgcatc tcaattagtc agcaaccata gtcccccccc taactccgcc catccccgcc 10320
ctaactccgc ccagttccgc ccattctccg ccccatggct gactaatttt ttttatttat 10380
gcagaggccg aggccgcctc ggctctgag ctattccaga agtagtgagg aggctttttt 10440
ggaggcctag gcttttgcaa aaagcttggc cacaagacag gcttgcgaga tatgtttgag 10500
aataccactt tatccccgct cagggagagg cagtgcgtaa aaagacgagg actcatgtga 10560
aatactgggt tttagtgccg cagatcteta taatctcggc caacctattt tcccctcgaa 10620
cactttttaa gccgtagata aacaggctgg gacactteac atgagcgaaa aatacatcgt 10680
cacctgggac atgttgacaga tccatgcacg taaactcgca agccgactga tgccttctga 10740
acaatggaaa ggcatattg ccgtaagccg tggcggtctg taccgggtgc gttactggcg 10800
cgtgaaactgg gtattcgta tgtcgatacc gtttgtattt ccagctacga tcacgacaac 10860
cagcgcgagc ttaaagtgt gaaacgcgca gaaggcgatg gcgaaggctt catcgttatt 10920
gatgacctgg tggataccgg tggactgagc gttgcgattc gtgaaatgta tccaaaagcg 10980
cactttgtca ccatcttcgc aaaaccggct ggtcgtccgc tggttgatga ctatgttggt 11040
gatatccgc aagataactg gattgaacag ccgtgggata tgggcgtcgt attcgtcccc 11100
ccaatctccg gtcgctaata tttcaacgc ctggcactgc cgggcgttgt tctttttaac 11160
ttcaggcggg ttacaatagt ttccagtaag tattctggag gctgcatcca tgacacaggc 11220
aaacctgagc gaaaccctgt tcaaaccccg cttaaacad cctgaaacct cgacgctagt 11280
ccgccgcttt aatcacggcg cacaaccgcc tgtgcagtcg gcccttgatg gtaaaacct 11340
ccctcactgg tatcgcatga ttaaccgtct gatgtggatc tggcgcggca ttgaccacg 11400
cgaaatcctc gacgtccagg cacgtattgt gatgagcgat gccgaacgta ccgacgatga 11460
tttatacgat acggtgattg gctaccgtgg cggcaactgg atttatgagt gggccccgga 11520
tctttgtgaa ggaaccttac ttctgtggtg tgacataatt ggacaaacta cctacagaga 11580
tttaaagctc taaggtaaat ataaaatttt taagtgtata atgtgttaa ctactgattc 11640
taattgtttg tgtattttag attccaacct atggaactga tgaatgggag cagtgggtga 11700
atgcctttta tgaggaaaac ctgttttgct cagaagaaat gccatctagt gatgatgagg 11760
ctactgctga ctctcaacat tctactctc caaaaaagaa gagaaaggta gaagacccca 11820
aggactttcc ttcagaattg ctaagttttt tgagtcatgc tgtgttttagt aatagaactc 11880
ttgcttgctt tgctatttac accacaaagg aaaaagctgc actgctatac aagaaaatta 11940
tggaaaaaata ttctgtaacc tttataagta ggcataacag ttataatcat aacatactgt 12000
tttttcttac tccacacagg catagagtgt ctgctattaa taactatgct caaaaattgt 12060
gtacctttag ctttttaatt tgtaaagggg ttaataagga atatttgatg tatagtgcct 12120
tgactagaga tcataatcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac 12180
ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgtaacttg 12240
tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa 12300

gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat 12360
 gtctggatca actggataac tcaagctaac caaatcacc ccaaacttcc cacccatac 12420
 cctattacca ctgccaatta cctagtggtt tcatttactc taaacctgtg attcctctga 12480
 attattttca ttttaaagaa attgtatttg ttaaatatgt actacaaact tagtag 12536

<210> 11

<211> 365

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 具有GPI锚的FKBP-1SG-FR氨基酸序列

<400> 11

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

Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Ile
 130 135 140
 Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His
 145 150 155 160
 His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg
 165 170 175
 Pro Trp Arg Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala
 180 185 190
 His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly
 195 200 205
 Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu
 210 215 220
 Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln
 225 230 235 240
 Ser Trp Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp
 245 250 255
 Cys Glu Gln Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser
 260 265 270
 Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala
 275 280 285
 Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr
 290 295 300
 Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr
 305 310 315 320
 Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln
 325 330 335
 Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser
 340 345 350
 Gly Ala Gly Pro Trp Ala Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu
 355 360 365
 Met Leu Leu Trp Leu Leu Ser
 370 375
 <210> 13
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>

<223> 具有GPI锚的4M5.3-FR氨基酸序列

<400> 13

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

290	295	300
Pro Glu Asp Lys Leu His	Glu Gln Cys Arg Pro Trp	Arg Lys Asn Ala
305	310	315
Cys Cys Ser Thr Asn Thr	Ser Gln Glu Ala His Lys	Asp Val Ser Tyr
	325	330
Leu Tyr Arg Phe Asn Trp	Asn His Cys Gly Glu Met	Ala Pro Ala Cys
	340	345
Lys Arg His Phe Ile Gln	Asp Thr Cys Leu Tyr Glu	Cys Ser Pro Asn
	355	360
Leu Gly Pro Trp Ile Gln	Gln Val Asp Gln Ser Trp	Arg Lys Glu Arg
370	375	380
Val Leu Asn Val Pro Leu	Cys Lys Glu Asp Cys Glu	Gln Trp Trp Glu
385	390	395
Asp Cys Arg Thr Ser Tyr	Thr Cys Lys Ser Asn Trp	His Lys Gly Trp
	405	410
Asn Trp Thr Ser Gly Phe	Asn Lys Cys Ala Val Gly	Ala Ala Cys Gln
	420	425
Pro Phe His Phe Tyr Phe	Pro Thr Pro Thr Val Leu	Cys Asn Glu Ile
	435	440
Trp Thr His Ser Tyr Lys	Val Ser Asn Tyr Ser Arg	Gly Ser Gly Arg
	450	455
Cys Ile Gln Met Trp Phe	Asp Pro Ala Gln Gly Asn	Pro Asn Glu Glu
465	470	475
Val Ala Arg Phe Tyr Ala	Ala Ala Met Ser Gly Ala	Gly Pro Trp Ala
	485	490
Ala Trp Pro Phe Leu Leu	Ser Leu Ala Leu Met Leu	Leu Leu Trp Leu Leu
	500	505
		510
Ser		
<210> 14		
<211> 895		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> FMC63-T2A-FKBP3SGFR		
<400> 14		
Met Ala Leu Pro Val Thr	Ala Leu Leu Leu Pro Leu	Ala Leu Leu Leu
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Glu	Gln Lys Leu Ile Ser Glu	Glu Asp Leu Asp
	20	25
		30

Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Asp
		35					40					45			
Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu
		50					55					60			
Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
65					70					75					80
His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
				85					90						95
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln	Glu
				100					105						110
Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr
		115					120								125
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
		130					135								140
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser
145							150				155				160
Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr
				165											175
Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln
				180											190
Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu
				195											205
Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys
				210											220
Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr
225															240
				230											235
Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly
				245											255
Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser
				260											270
Ser	Ala	Ala	Ala	Ile	Glu	Val	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asn
				275											285
Glu	Lys	Ser	Asn	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Val	Lys	Gly	Lys	His	Leu	Cys
				290											300
Pro	Ser	Pro	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Lys	Pro	Phe	Trp	Val	Leu	Val
305															320
				310											315
Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala
				325											330
Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu Leu
 660 665 670
 Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu
 675 680 685
 Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala Cys Cys
 690 695 700
 Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr
 705 710 715 720
 Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg
 725 730 735
 His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly
 740 745 750
 Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Val Leu
 755 760 765
 Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu Asp Cys
 770 775 780
 Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp
 785 790 795 800
 Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe
 805 810 815
 His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr
 820 825 830
 His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile
 835 840 845
 Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala
 850 855 860
 Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala Ala Trp
 865 870 875 880
 Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu Ser
 885 890 895
 <210> 15
 <211> 1029
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> FMC63-T2A-4M5.3SGFR
 <400> 15
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

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

	325		330		335
Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser					
	340		345		350
Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His					
	355		360		365
Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg					
	370		375		380
Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln					
385		390		395	400
Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp					
	405		410		415
Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro					
	420		425		430
Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp					
	435		440		445
Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg					
	450		455		460
Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr					
465		470		475	480
Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly					
	485		490		495
Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu					
	500		505		510
Asn Pro Gly Pro Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu					
	515		520		525
Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Thr					
	530		535		540
Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys					
545		550		555	560
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg					
	565		570		575
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys					
	580		585		590
Val Ser Asn Arg Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly					
	595		600		605
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp					
	610		615		620
Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe					
625		630		635	640

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Ser Ala Asp Asp Ala Lys
 645 650 655
 Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys
 660 665 670
 Asp Gly Gly Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 675 680 685
 Gly Gly Ala Met Lys Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Thr Phe Gly
 690 695 700
 His Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu
 705 710 715 720
 Trp Val Ala Gln Phe Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr
 725 730 735
 Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys
 740 745 750
 Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly
 755 760 765
 Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Ala Ser Tyr Gly Met Glu Tyr Leu Gly Gln
 770 775 780
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Arg Ile Ala Trp
 785 790 795 800
 Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys
 805 810 815
 Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp
 820 825 830
 Arg Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys
 835 840 845
 Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met
 850 855 860
 Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu
 865 870 875 880
 Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp
 885 890 895
 Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu
 900 905 910
 Gln Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp
 915 920 925
 His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly
 930 935 940
 Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu

945 950 955 960
 Cys Asn Glu Ile Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg
 965 970 975
 Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn
 980 985 990
 Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala
 995 1000 1005
 Gly Pro Trp Ala Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met
 1010 1015 1020
 Leu Leu Trp Leu Leu Ser
 1025
 <210> 16
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 具有信号肽的FRb
 <400> 16
 Met Val Trp Lys Trp Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Val Cys Val Ala
 1 5 10 15
 Thr Met Cys Ser Ala Gln Asp Arg Thr Asp Leu Leu Asn Val Cys Met
 20 25 30
 Asp Ala Lys His His Lys Thr Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His
 35 40 45
 Asp Gln Cys Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Thr Ala Ser Thr
 50 55 60
 Ser Gln Glu Leu His Lys Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Asn Phe Asn Trp
 65 70 75 80
 Asp His Cys Gly Lys Met Glu Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln
 85 90 95
 Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln
 100 105 110
 Gln Val Asn Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Phe Leu Asp Val Pro Leu
 115 120 125
 Cys Lys Glu Asp Cys Gln Arg Trp Trp Glu Asp Cys His Thr Ser His
 130 135 140
 Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Arg Gly Trp Asp Trp Thr Ser Gly Val
 145 150 155 160
 Asn Lys Cys Pro Ala Gly Ala Leu Cys Arg Thr Phe Glu Ser Tyr Phe

	165		170		175
Gly Ser Asn Gly Phe His Asn Asn Asp Thr Phe His Phe Leu Lys Cys					
	180		185		190
Cys Asn Thr Thr Lys Cys Asn Glu Gly Pro Ile Leu Glu Leu Glu Asn					
	195		200		205
Leu Pro Gln Asn Gly Arg Gln Cys Tyr Ser Cys Lys Gly Asn Ser Thr					
	210		215		220
His Gly Cys Ser Ser Glu Glu Thr Phe Leu Ile Asp Cys Arg Gly Pro					
225		230		235	240
Met Asn Gln Cys Leu Val Ala Thr Gly Thr His Glu Pro Lys Asn Gln					
	245		250		255
Ser Tyr Met Val Arg Gly Cys Ala Thr Ala Ser Met Cys Gln His Ala					
	260		265		270
His Leu Gly Asp Ala Phe Ser Met Asn His Ile Asp Val Ser Cys Cys					
	275		280		285
Thr Lys Ser Gly Cys Asn His Pro Asp Leu Asp Val Gln Tyr Arg Ser					
	290		295		300
Gly Ala Ala Pro Gln Pro Gly Pro Ala His Leu Ser Leu Thr Ile Thr					
305		310		315	320
Leu Leu Met Thr Ala Arg Leu Trp Gly Gly Thr Leu Leu Trp Thr					
	325		330		335
<210> 18					
<211> 187					
<212> PRT					
<213> 人工					
<220>					
<223> DHFR					
<400> 18					
Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly					
1	5		10		15
Ile Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe					
	20		25		30
Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln					
	35		40		45
Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys					
	50		55		60
Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu					
65		70		75	80
Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp					

	85	90	95
Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met			
	100	105	110
Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His			
	115	120	125
Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu			
	130	135	140
Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu			
145	150	155	160
Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile			
	165	170	175
Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp			
	180	185	
<210> 19			
<211> 255			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> 针对FITC的scFv: 4M5.3 (Kd = 200pM)			
<400> 19			
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser			
	20	25	30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
	35	40	45
Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Val Ser Gly Val Pro			
	50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser			
	85	90	95
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	110
Ser Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala			
	115	120	125
Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Gly Gly Val Lys Leu Asp Glu Thr			
	130	135	140
Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ala Met Lys Leu Ser Cys Val			

145	150	155	160
Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr			
	165	170	175
Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe			
	180	185	190
Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn			
	195	200	205
Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly			
	210	215	220
Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
225	230	235	240
Thr Val Ser Ser			
<210> 21			
<211> 244			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> 针对DNP SPE7的scFv			
<400> 21			
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu			
1	5	10	15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser			
	20	25	30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly			
	35	40	45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe			
	50	55	60
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala			
65	70	75	80
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn			
	85	90	95
His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly			
	100	105	110
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu			
	115	120	125
Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu			
	130	135	140
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His Trp			
145	150	155	160

Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Asp
					165				170					175	
Pro	Asn	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Ser	Lys	Ala
					180				185					190	
Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Pro	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser
					195			200					205		
Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Met	Trp
					210			215				220			
Tyr	Tyr	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu
					225			230			235				240
Thr	Val	Ser	Ser												

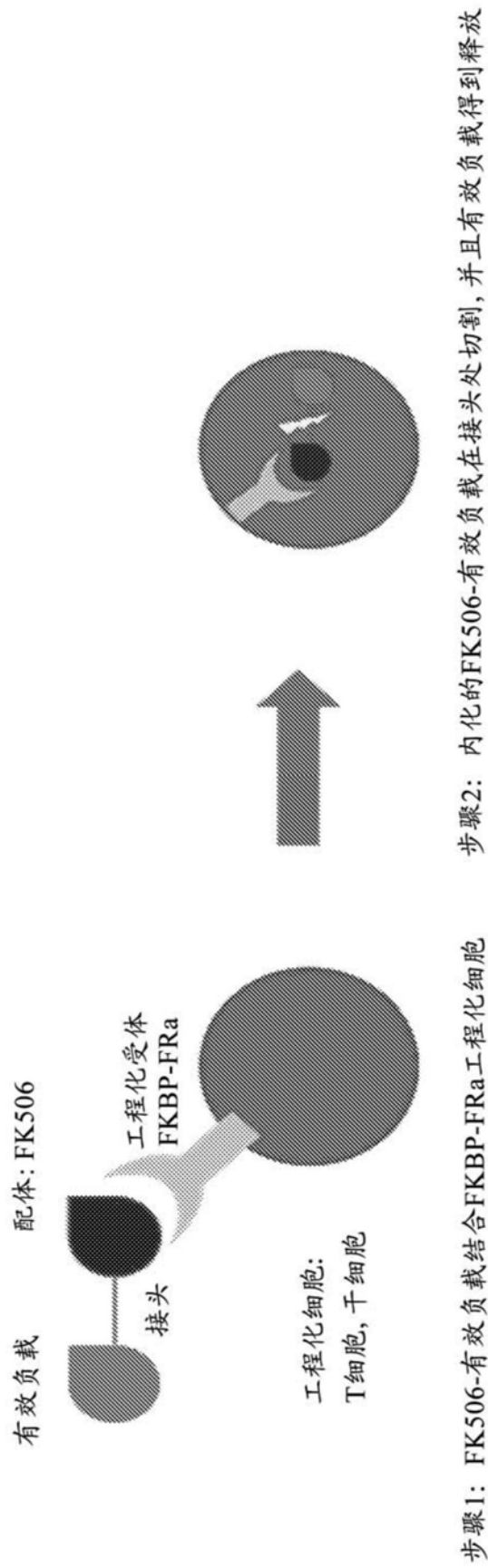


图1A

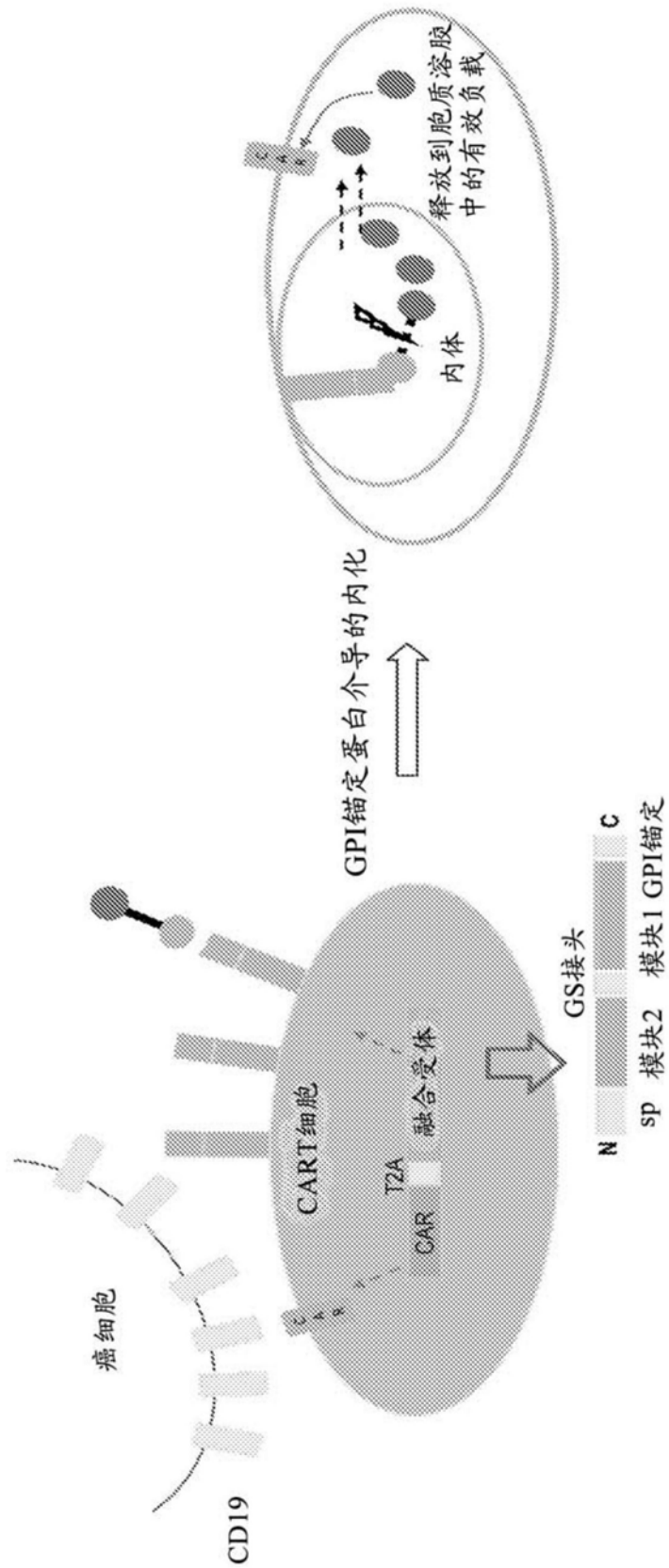


图1B

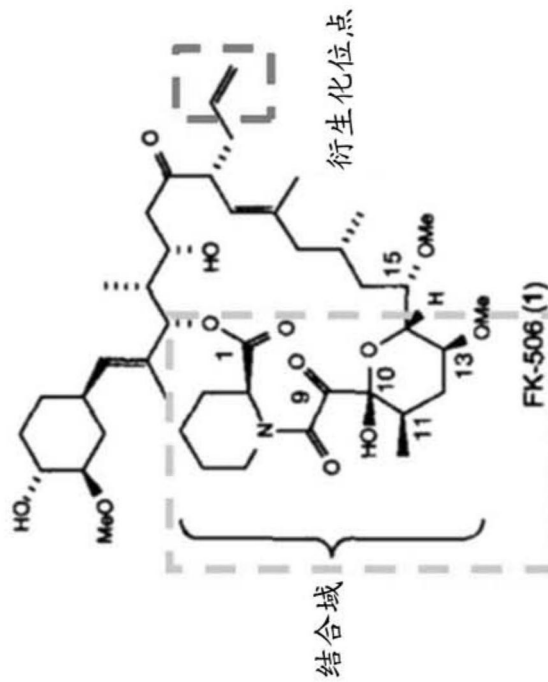
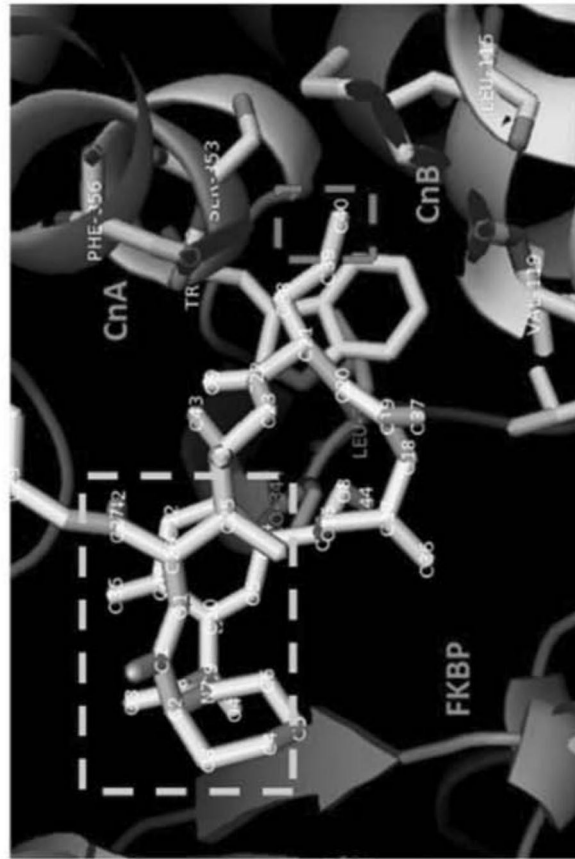


图2A

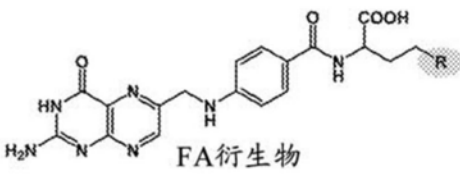
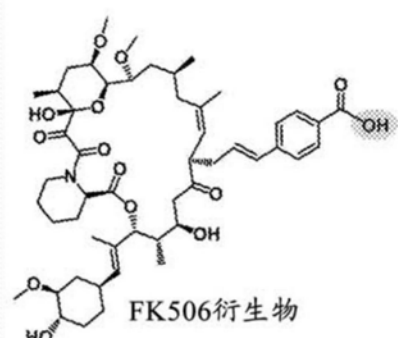
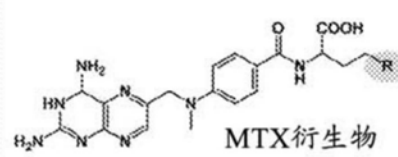
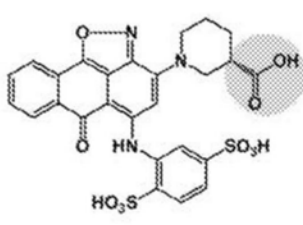

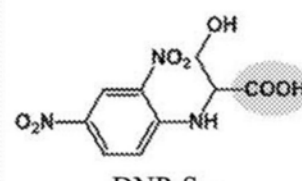
模块1: GPI锚定蛋白		模块2	
蛋白	配体	蛋白	配体
FRa	 <p>FA 衍生物</p>	FKBP	 <p>FK506 衍生物</p>
FRb		DHFR	 <p>MTX 衍生物</p>
uPAR	 <p>FITC 衍生物</p>	针对 FITC 的 scFv	 <p>FITC 衍生物</p>
		针对 DNP 的 scFv	 <p>DNP-Ser</p>

图2B

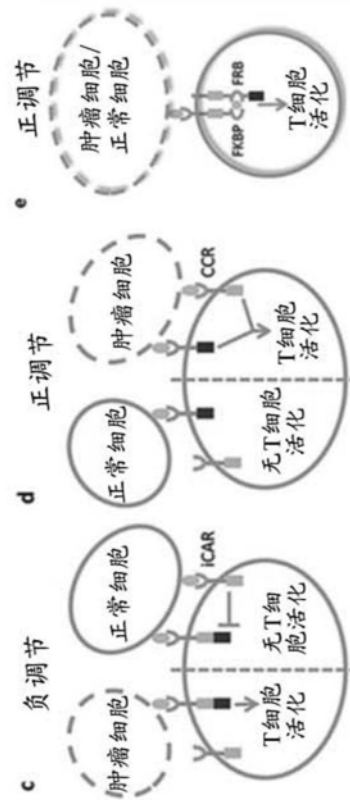
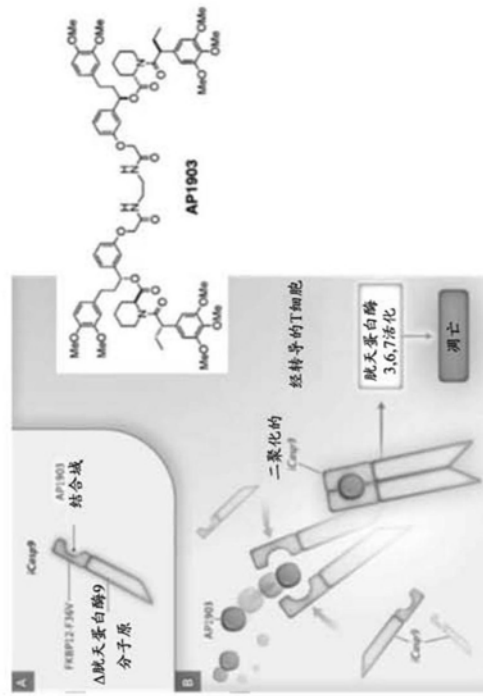


图3

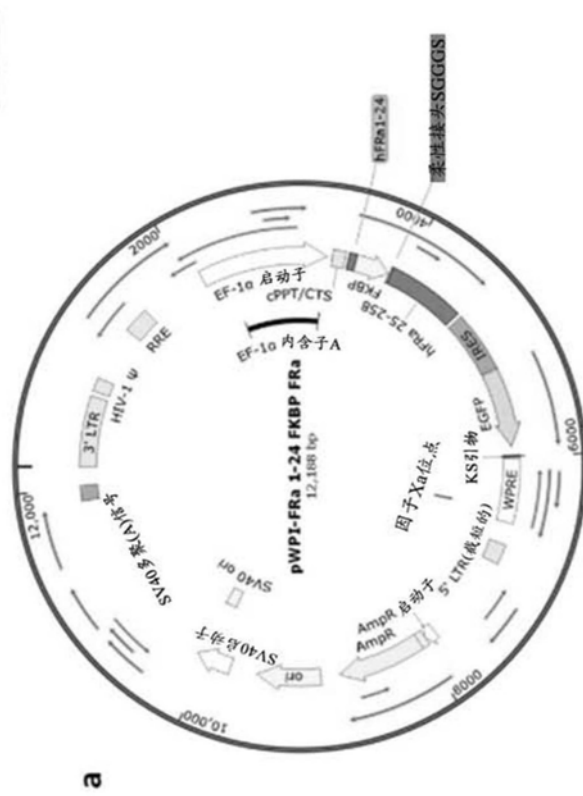


图4A

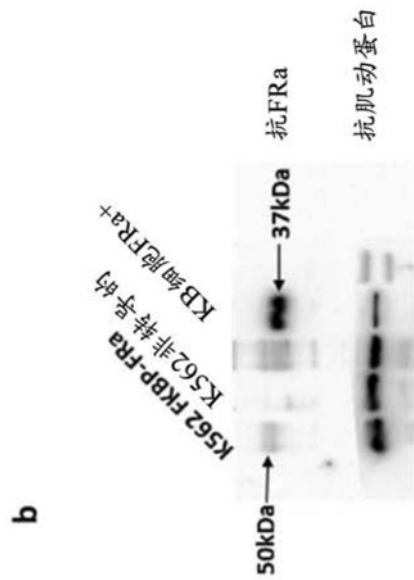


图4B

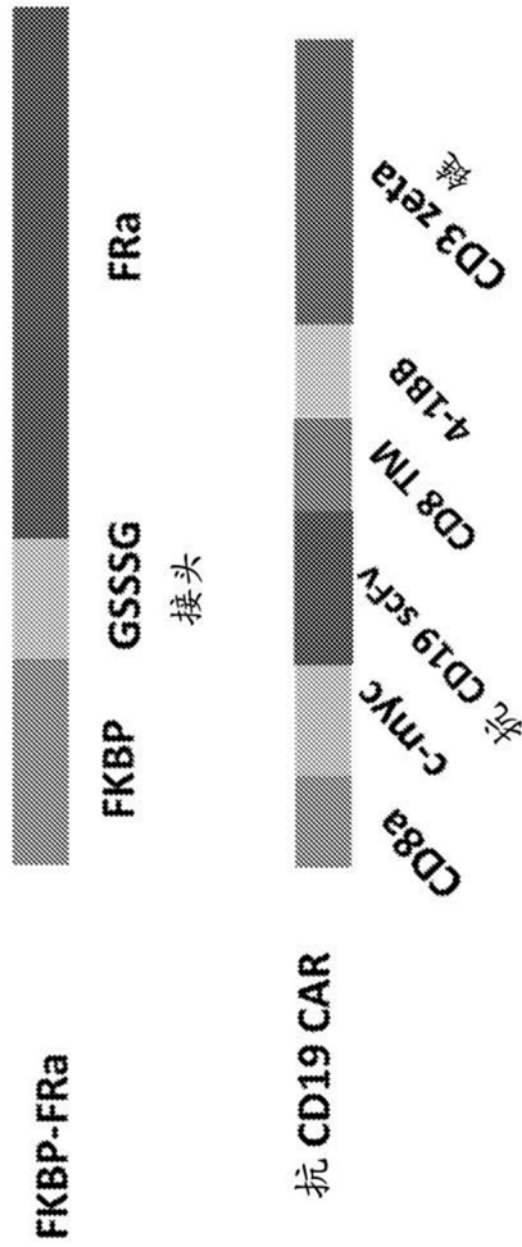


图4C

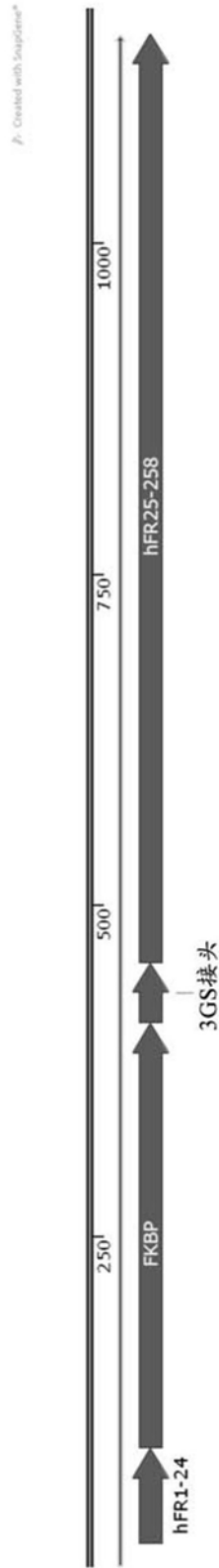


图4D

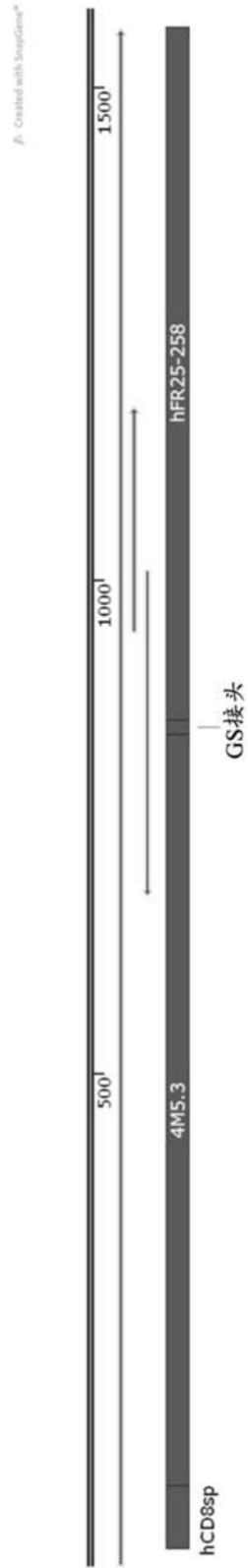


图4E

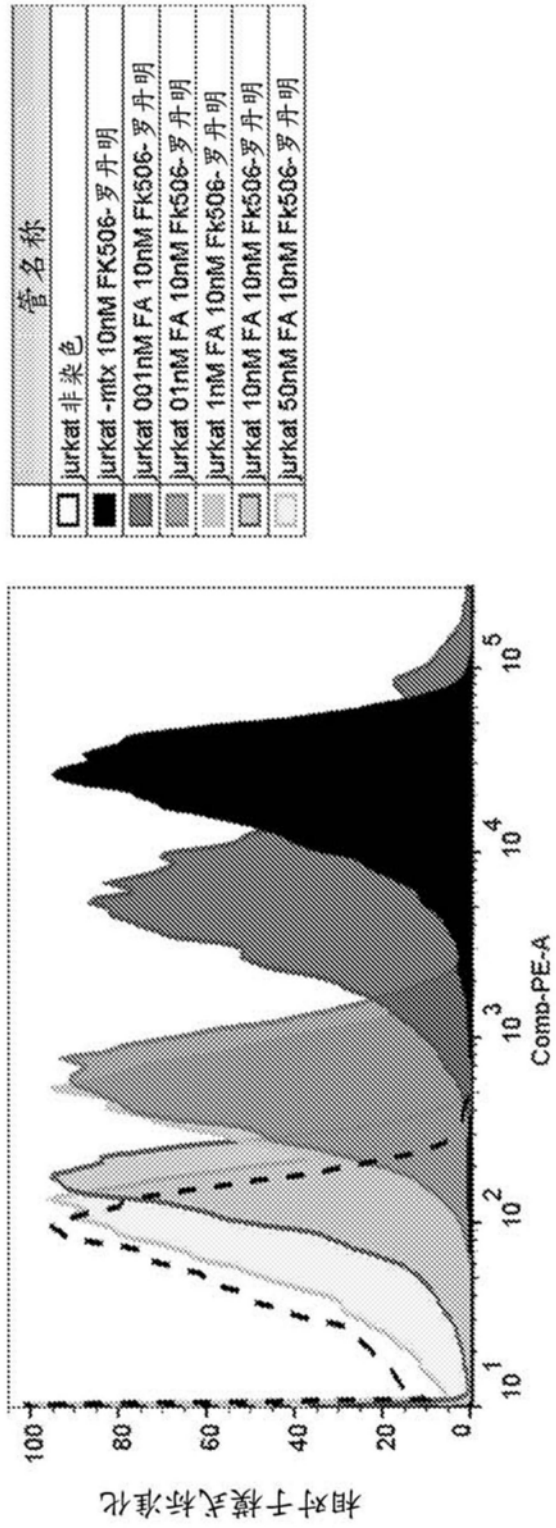


图5

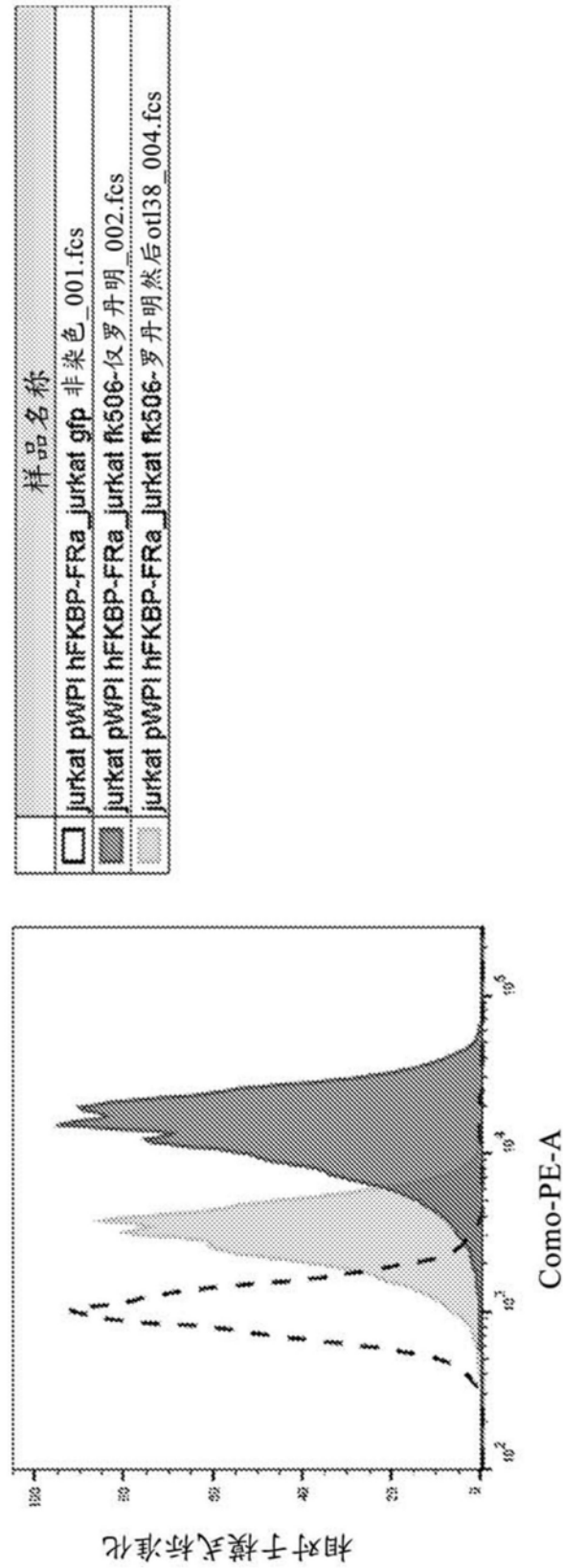


图6

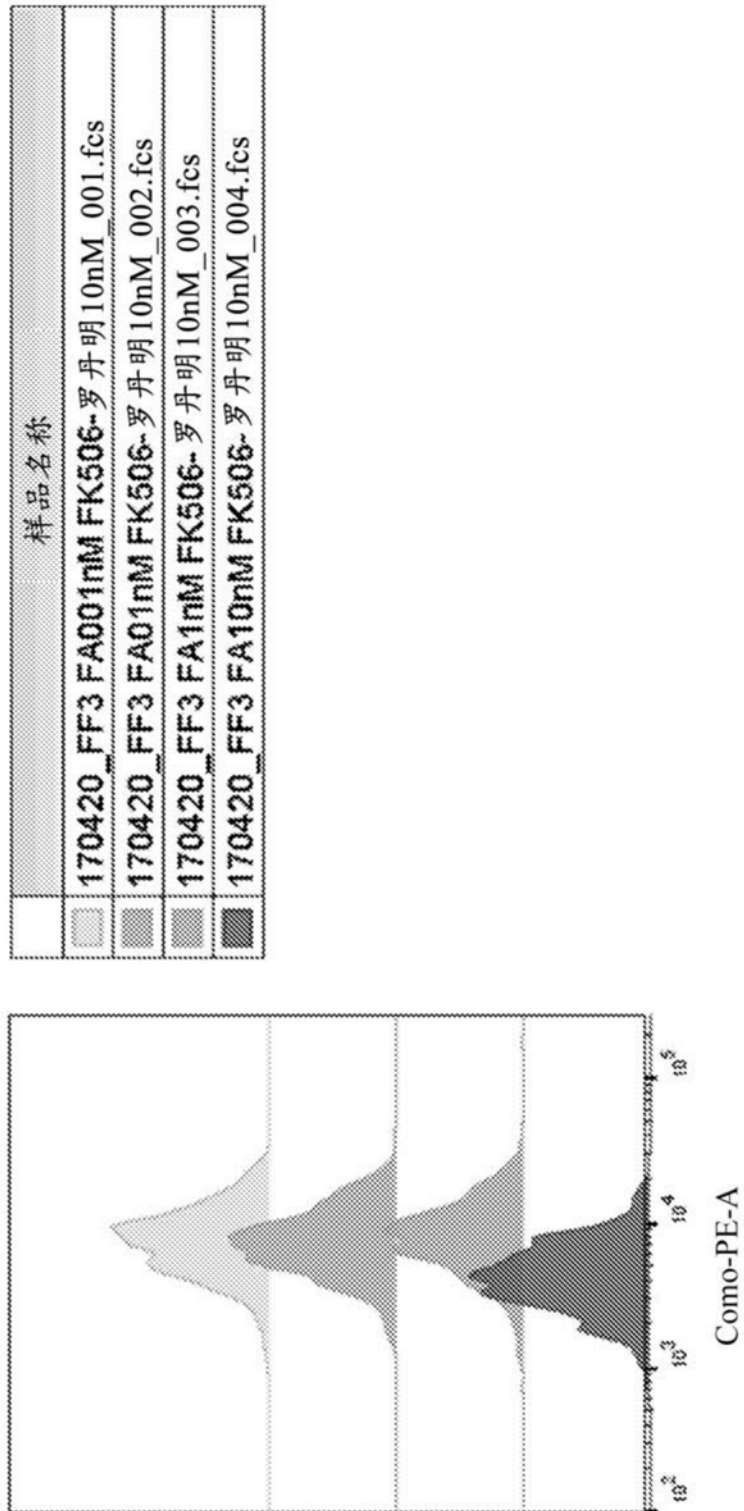


图7

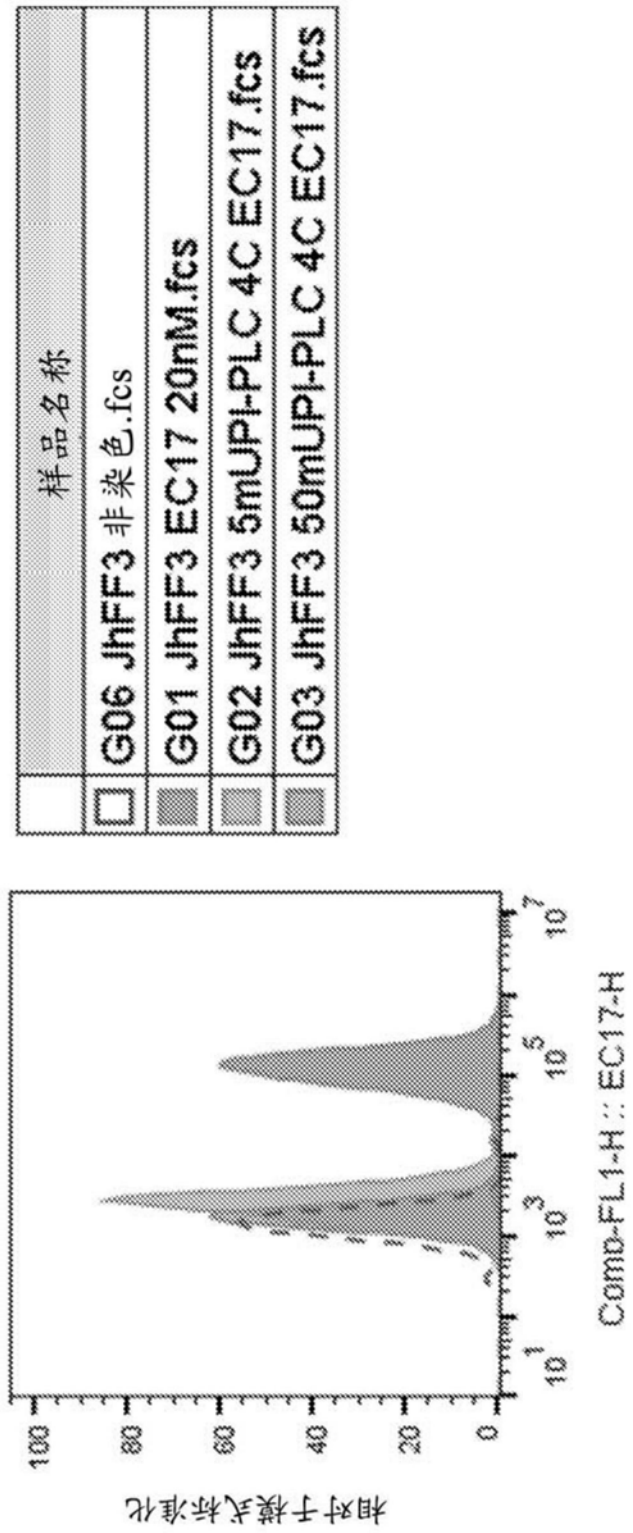


图8

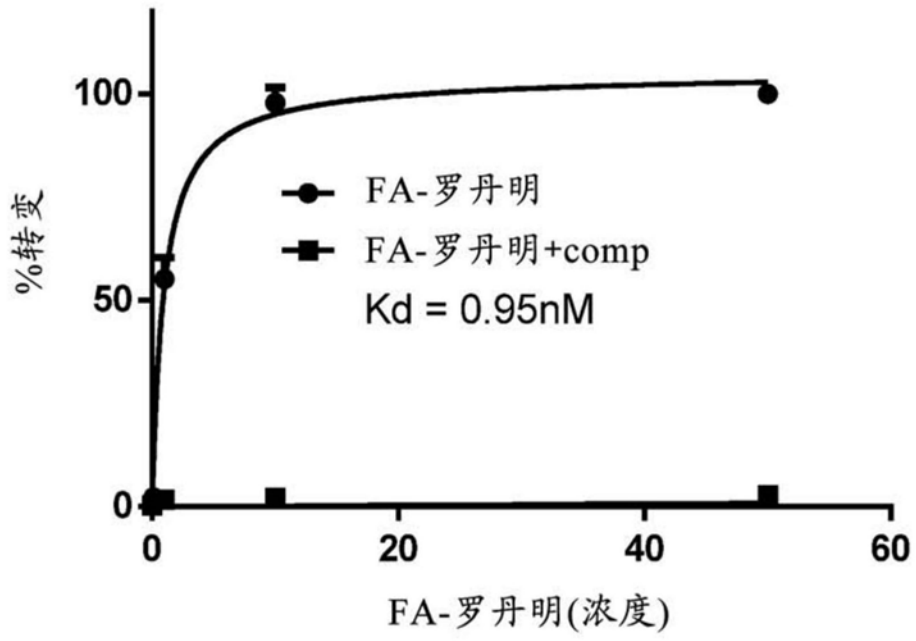


图9

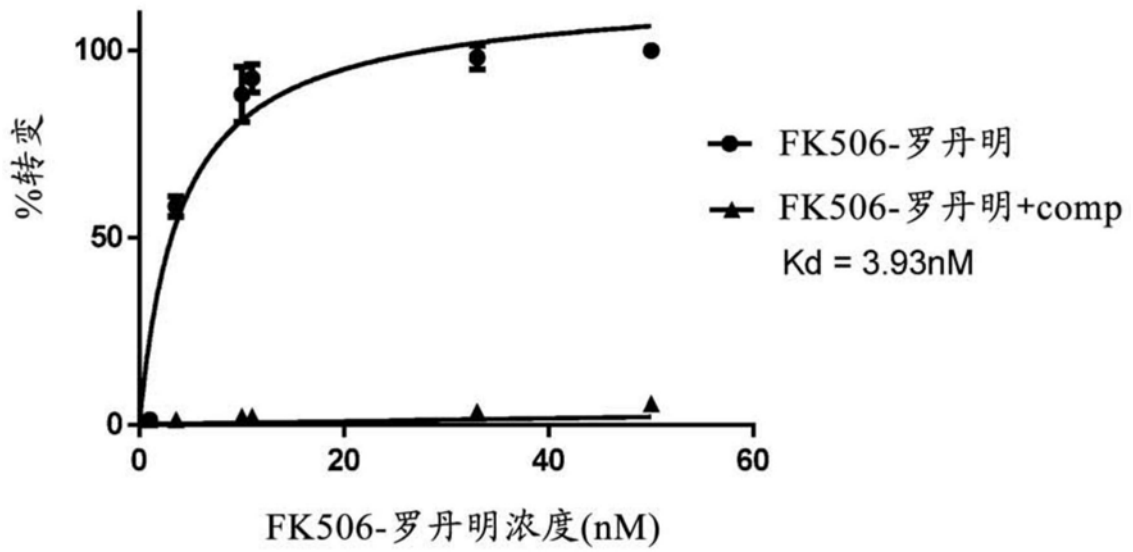


图10

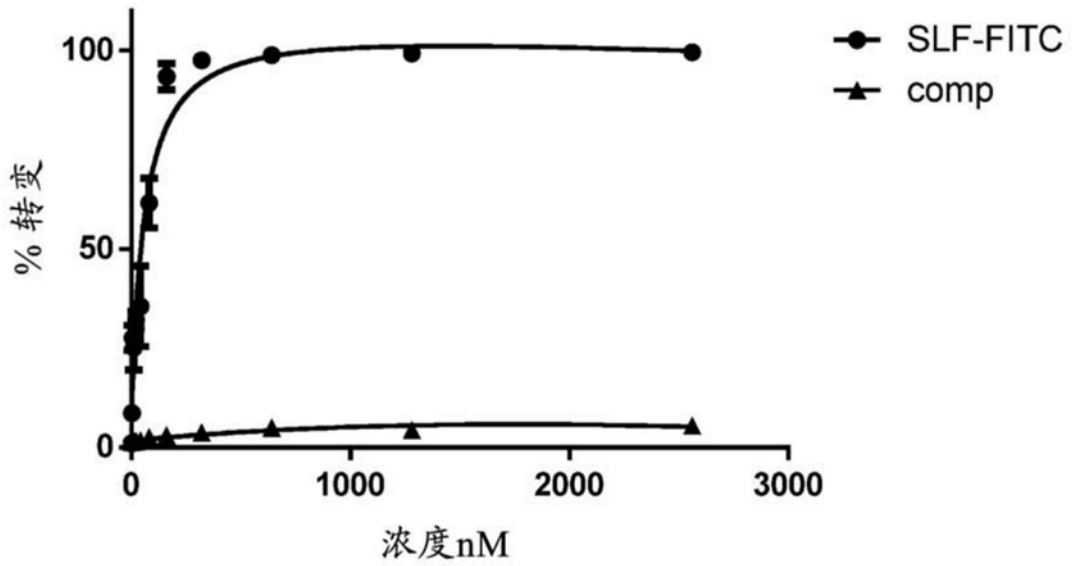


图11

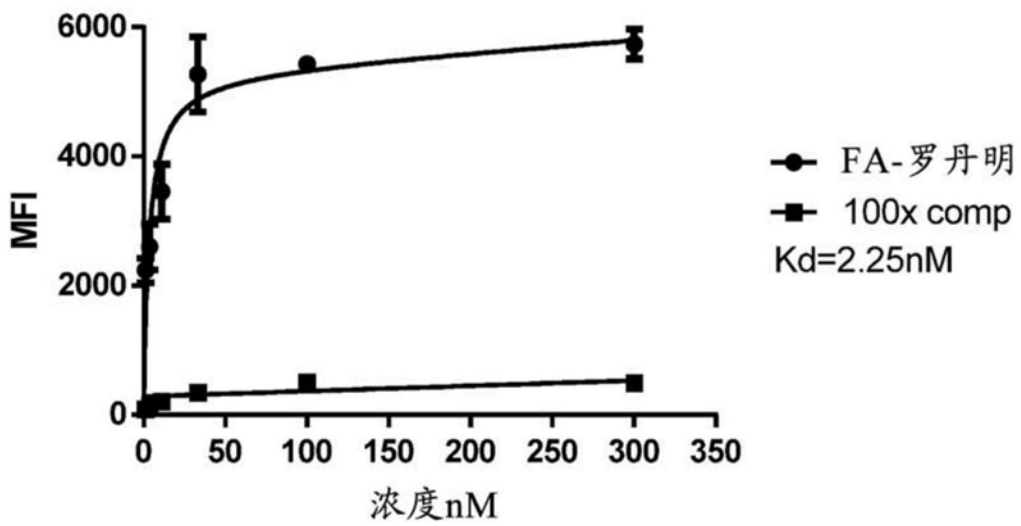


图12

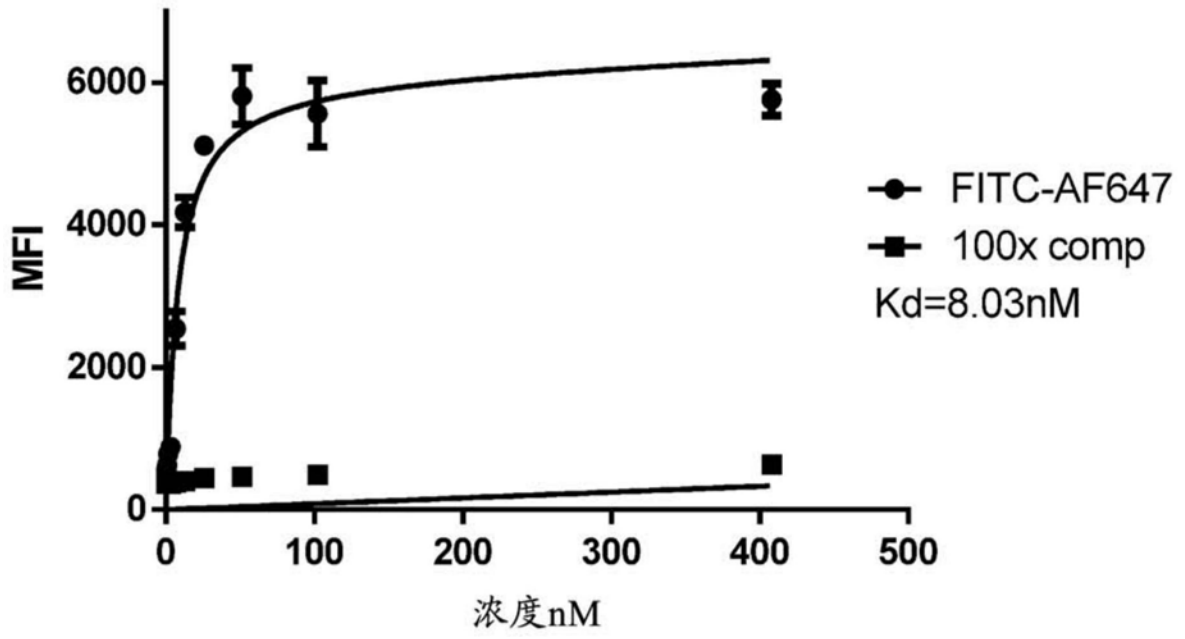


图13

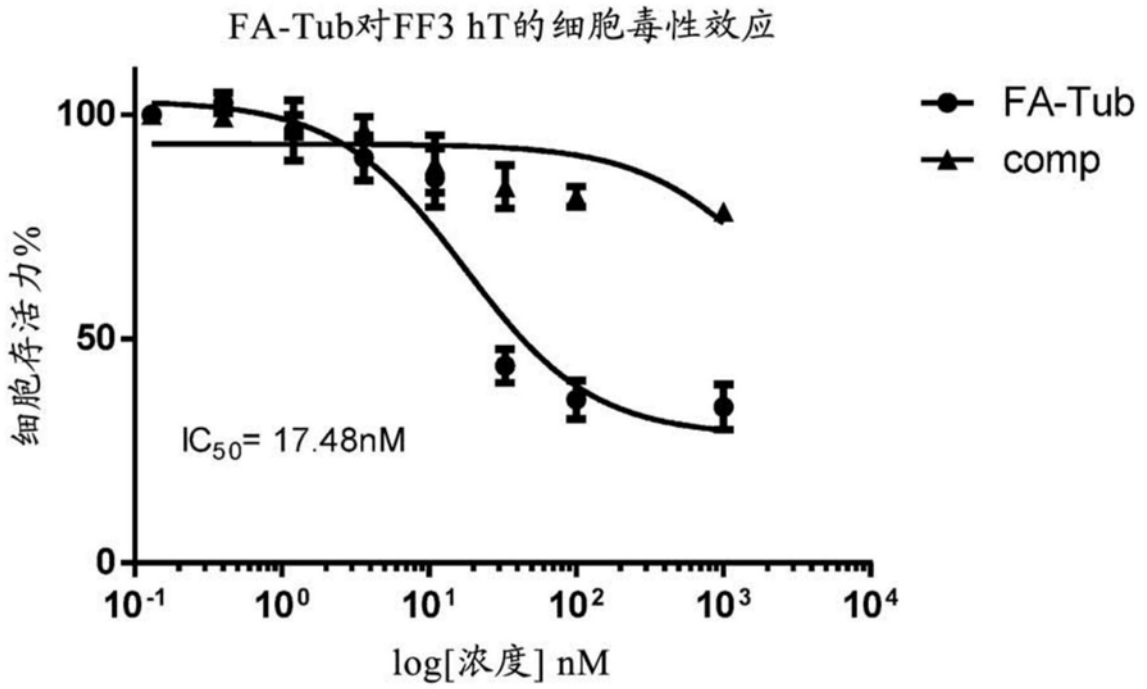


图14

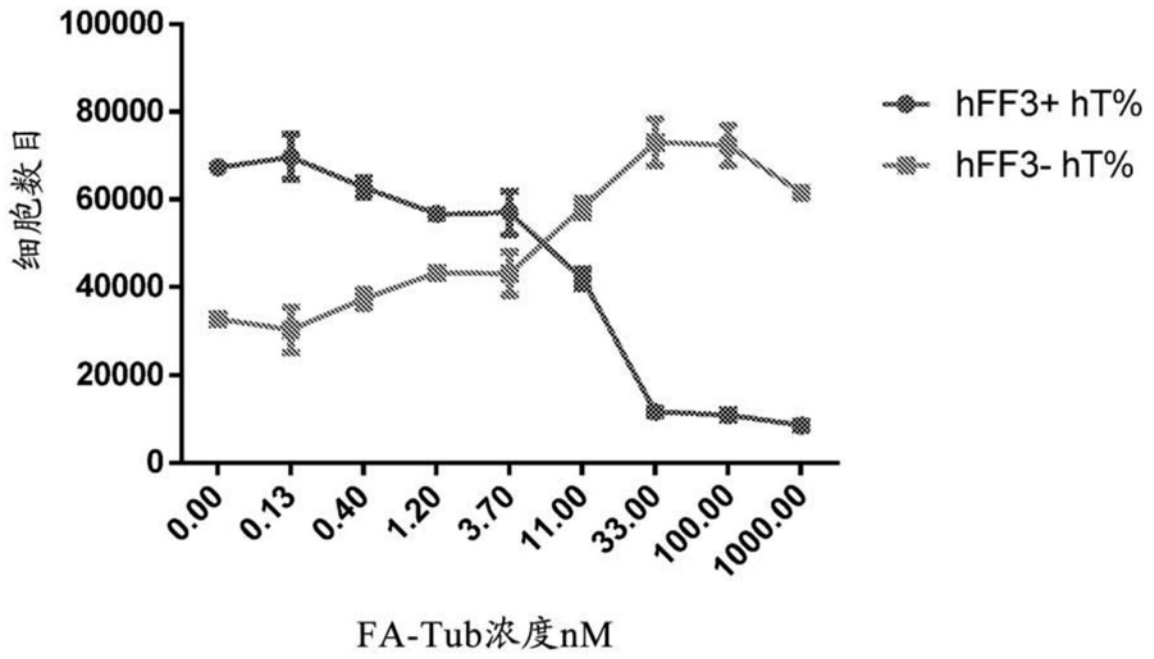


图15

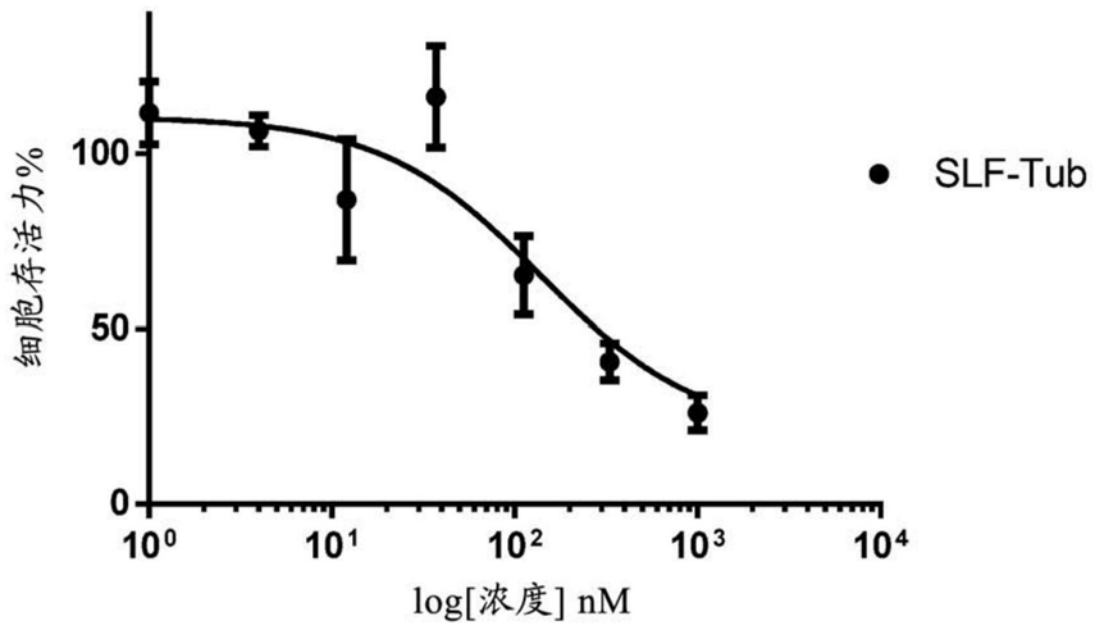


图16

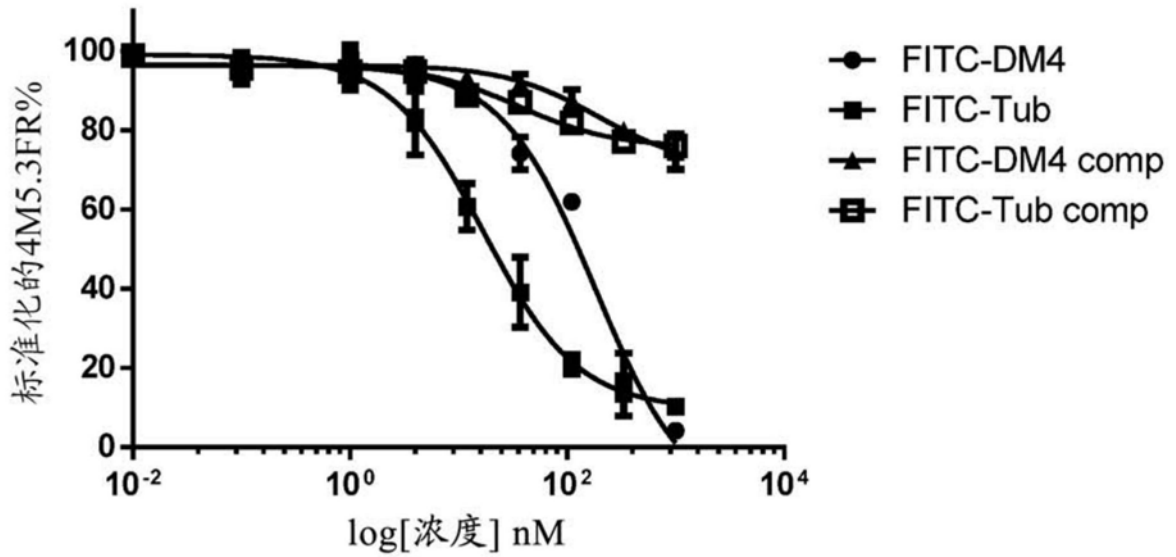


图17

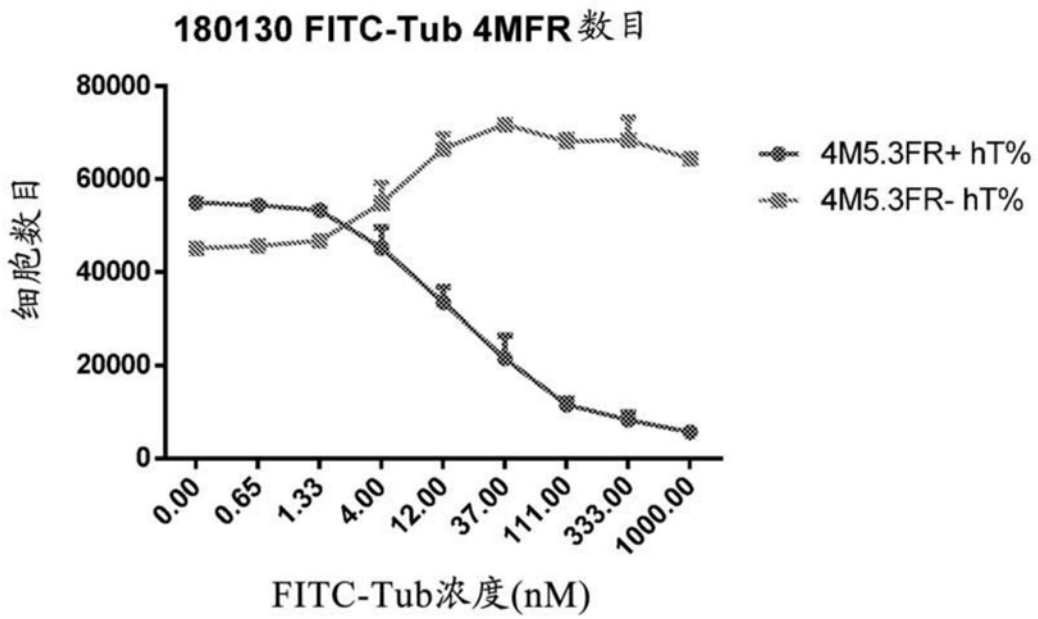


图18

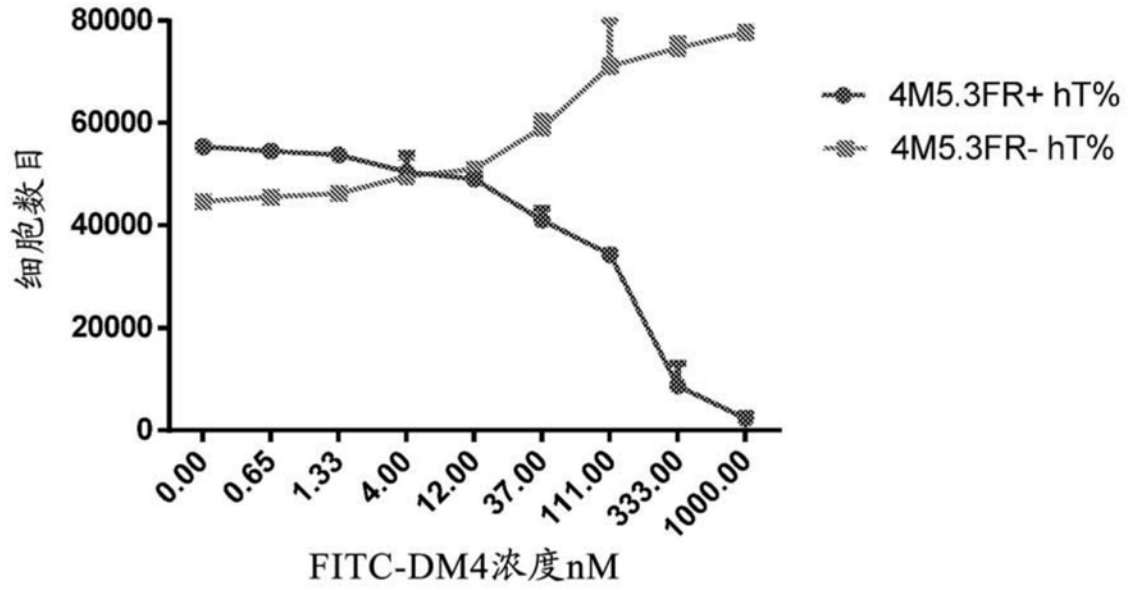


图19

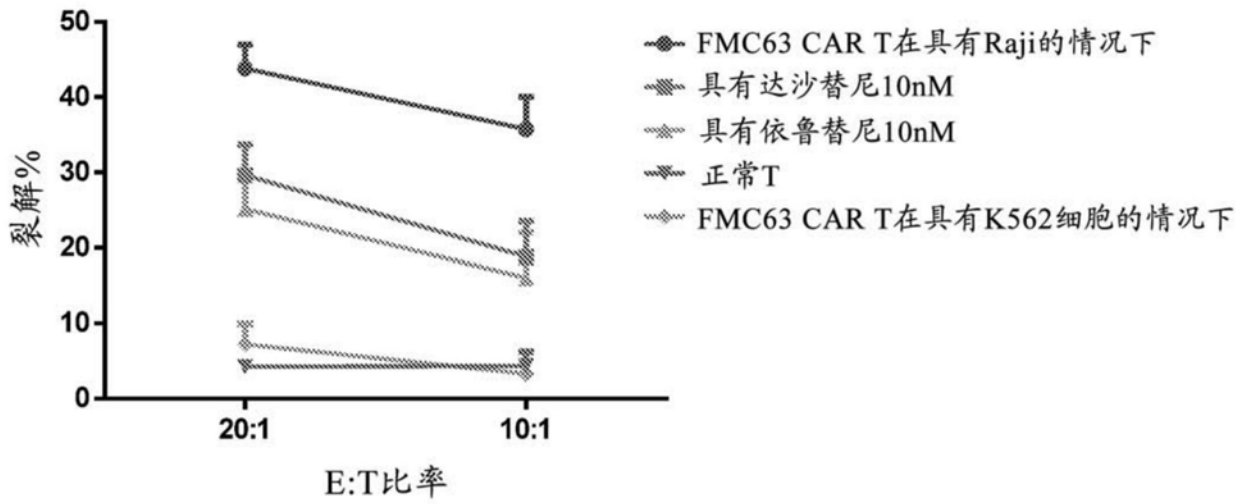


图20

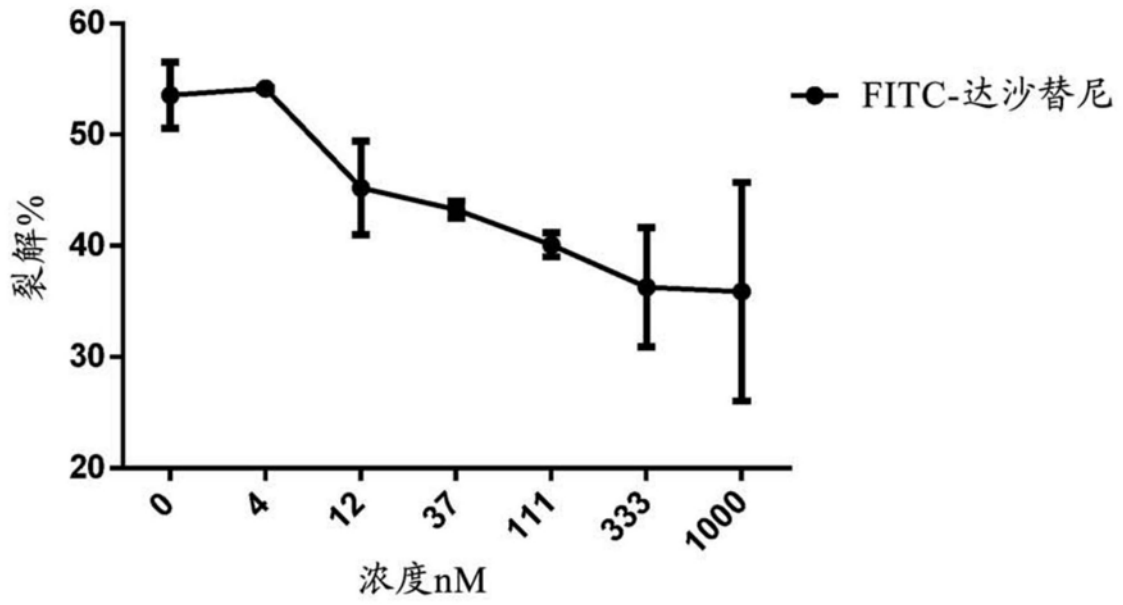


图21

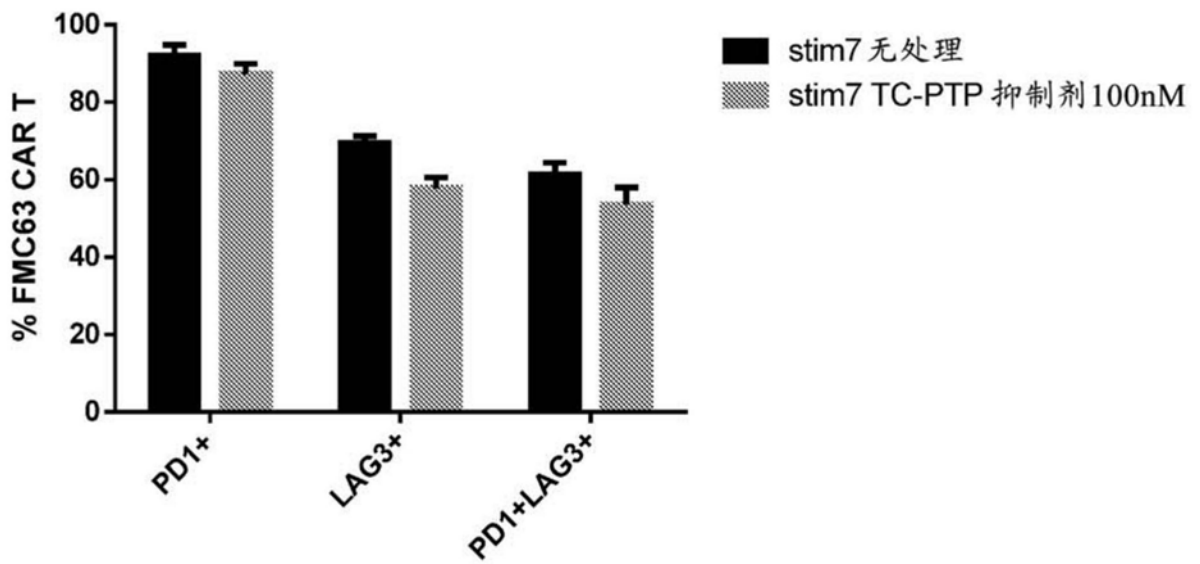


图22