



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113631575 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 09

(21) 申请号 202080020956.1

(22) 申请日 2020.03.13

(30) 优先权数据

62/819,068 2019.03.15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.09.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/022671 2020.03.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/190737 EN 2020.09.24

(71) 申请人 笛卡尔疗法股份有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 张毅 C·A·斯图尔特

M·库尔特奥卢

M·V·卡拉约格鲁 M·S·辛格

(74) 专利代理机构 北京汇知杰知识产权代理有限公司 11587

代理人 杨巍 柴春玲

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

权利要求书9页 说明书68页

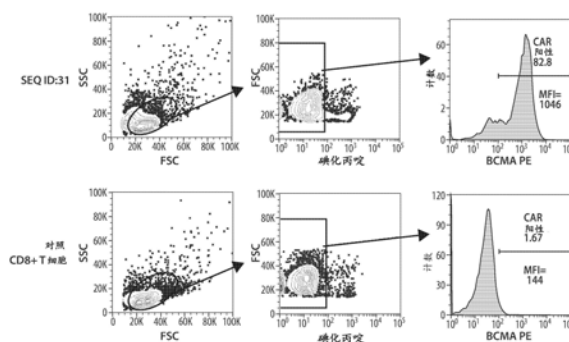
序列表90页 附图4页

(54) 发明名称

抗BCMA嵌合抗原受体

(57) 摘要

本发明提供了具有改进特性的嵌合抗原受体(CAR),例如对BCMA具有特异性的那些嵌合抗原受体,所述改进特性包括增加的CAR T细胞与BCMA的结合和提高了的CAR T细胞对表达BCMA的癌细胞的杀伤。还考虑了CAR在免疫细胞(例如T细胞)、组合物(例如CAR和编码CAR的核酸构建体)中的用途和方法。



1. 一种嵌合抗原受体 (CAR), 包含:
 - (i) 抗B细胞成熟抗原 (BCMA) 结合域;
 - (ii) 跨膜域; 和
 - (iii) 胞浆域,其中所述抗BCMA结合域包含SEQ ID NO:1-18中任一个的氨基酸序列。
2. 根据权利要求1所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含SEQ ID NO:2、3、5、6、8、9、11、13、14、15、17或18中任一个的氨基酸序列。
3. 根据权利要求1或2所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含SEQ ID NO:7-9中任一个的重链互补决定区 (CDRH) 3。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含SEQ ID NO:8或9的重链互补决定区 (CDRH) 3。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含SEQ ID NO:16-18中任一个的轻链互补决定区 (CDRL) 3。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含SEQ ID NO:17或18的轻链互补决定区 (CDRL) 3。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含重链互补决定区 CDRH1、CDRH2和CDRH3, 其中
 - (i) 所述CDRH1包含SEQ ID NO:1-3中的任一个;
 - (ii) 所述CDRH2包含SEQ ID NO:4-6中的任一个; 以及
 - (iii) 所述CDRH3包含SEQ ID NO:7-9中的任一个。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含重链互补决定区 CDRL1、CDRL2和CDRL3, 其中,
 - (i) 所述CDRL1包含SEQ ID NO:10-11中的任一个;
 - (ii) 所述CDRL2包含SEQ ID NO:12-15中的任一个; 以及
 - (iii) 所述CDRL3包含SEQ ID NO:16-18中的任一个。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含重链互补决定区 CDRH1、CDRH2和CDRH3, 以及轻链互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3, 其中,
 - (i) 所述CDRH1包含SEQ ID NO:1-3中的任一个;
 - (ii) 所述CDRH2包含SEQ ID NO:4-6中的任一个;
 - (iii) 所述CDRH3包含SEQ ID NO:7-9中的任一个;
 - (iv) 所述CDRL1包含SEQ ID NO:10-11中的任一个;
 - (v) 所述CDRL2包含SEQ ID NO:12-15中的任一个; 和
 - (vi) 所述CDRL3包含SEQ ID NO:16-18中的任一个。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含重链互补决定区 CDRH1、CDRH2和CDRH3, 以及轻链互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3, 其中
 - (i) 所述CDRH1包含SEQ ID NO:3;
 - (ii) 所述CDRH2包含SEQ ID NO:4;
 - (iii) 所述CDRH3包含SEQ ID NO:7;
 - (iv) 所述CDRL1包含SEQ ID NO:10;

(v) 所述CDRL2包含SEQ ID NO:12;和

(vi) 所述CDRL3包含SEQ ID NO:16。

11. 根据权利要求1-9中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含重链互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3, 以及轻链互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3, 其中,

(i) 所述CDRH1包含SEQ ID NO:1;

(ii) 所述CDRH2包含SEQ ID NO:4;

(iii) 所述CDRH3包含SEQ ID NO:8;

(iv) 所述CDRL1包含SEQ ID NO:10;

(v) 所述CDRL2包含SEQ ID NO:12;和

(vi) 所述CDRL3包含SEQ ID NO:16。

12. 根据权利要求1-9中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含重链互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3, 以及轻链互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3, 其中

(i) 所述CDRH1包含SEQ ID NO:1;

(ii) 所述CDRH2包含SEQ ID NO:4;

(iii) 所述CDRH3包含SEQ ID NO:7;

(iv) 所述CDRL1包含SEQ ID NO:11;

(v) 所述CDRL2包含SEQ ID NO:14;以及

(vi) 所述CDRL3包含SEQ ID NO:17。

13. 根据权利要求1-9中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含重链互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3, 以及轻链互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3, 其中,

(i) 所述CDRH1包含SEQ ID NO:1;

(ii) 所述CDRH2包含SEQ ID NO:4;

(iii) 所述CDRH3包含SEQ ID NO:7;

(iv) 所述CDRL1包含SEQ ID NO:11;

(v) 所述CDRL2包含SEQ ID NO:14;以及

(vi) 所述CDRL3包含SEQ ID NO:18。

14. 根据权利要求1-9中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含重链互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3, 以及轻链互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3, 其中,

(i) 所述CDRH1包含SEQ ID NO:2;

(ii) 所述CDRH2包含SEQ ID NO:6;

(iii) 所述CDRH3包含SEQ ID NO:9;

(iv) 所述CDRL1包含SEQ ID NO:10;

(v) 所述CDRL2包含SEQ ID NO:12;以及

(vi) 所述CDRL3包含SEQ ID NO:16。

15. 根据权利要求1-9中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含重链互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3, 以及轻链互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3, 其中,

(i) 所述CDRH1包含SEQ ID NO:3;

(ii) 所述CDRH2包含SEQ ID NO:5;

(iii) 所述CDRH3包含SEQ ID NO:8;

- (iv) 所述CDRL1包含SEQ ID NO:10;
- (v) 所述CDRL2包含SEQ ID NO:12;以及
- (vi) 所述CDRL3包含SEQ ID NO:16。

16. 根据权利要求1-9中任一项所述的CAR,其中所述抗BCMA结合域包含重链互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3,以及轻链互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3,其中,

- (i) 所述CDRH1包含SEQ ID NO:3;
- (ii) 所述CDRH2包含SEQ ID NO:4;
- (iii) 所述CDRH3包含SEQ ID NO:9;
- (iv) 所述CDRL1包含SEQ ID NO:10;
- (v) 所述CDRL2包含SEQ ID NO:12;以及
- (vi) 所述CDRL3包含SEQ ID NO:18。

17. 根据权利要求1-9中任一项所述的CAR,其中所述抗BCMA结合域包含重链互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3,以及轻链互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3,其中,

- (i) 所述CDRH1包含SEQ ID NO:2;
- (ii) 所述CDRH2包含SEQ ID NO:6;
- (iii) 所述CDRH3包含SEQ ID NO:9;
- (iv) 所述CDRL1包含SEQ ID NO:11;
- (v) 所述CDRL2包含SEQ ID NO:13;以及
- (vi) 所述CDRL3包含SEQ ID NO:17。

18. 根据权利要求1-9中任一项所述的CAR,其中所述抗BCMA结合域包含重链互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3,以及轻链互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3,其中,

- (i) 所述CDRH1包含SEQ ID NO:1;
- (ii) 所述CDRH2包含SEQ ID NO:4;
- (iii) 所述CDRH3包含SEQ ID NO:7;
- (iv) 所述CDRL1包含SEQ ID NO:10;
- (v) 所述CDRL2包含SEQ ID NO:15;以及
- (vi) 所述CDRL3包含SEQ ID NO:16。

19. 根据权利要求1-9中任一项所述的CAR,其中所述抗BCMA结合域包含重链互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3,以及轻链互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3,其中,

- (i) 所述CDRH1包含SEQ ID NO:2;
- (ii) 所述CDRH2包含SEQ ID NO:6;
- (iii) 所述CDRH3包含SEQ ID NO:9;
- (iv) 所述CDRL1包含SEQ ID NO:11;
- (v) 所述CDRL2包含SEQ ID NO:14;以及
- (vi) 所述CDRL3包含SEQ ID NO:17。

20. 根据权利要求1-9中任一项所述的CAR,其中所述抗BCMA结合域包含重链互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3,以及轻链互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3,其中,

- (i) 所述CDRH1包含SEQ ID NO:2;
- (ii) 所述CDRH2包含SEQ ID NO:6;

- (iii) 所述CDRH3包含SEQ ID NO:9;
- (iv) 所述CDRL1包含SEQ ID NO:11;
- (v) 所述CDRL2包含SEQ ID NO:14;以及
- (vi) 所述CDRL3包含SEQ ID NO:18。

21. 根据权利要求1-9中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含重链互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3, 以及轻链互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3, 其中,

- (i) 所述CDRH1包含SEQ ID NO:1;
- (ii) 所述CDRH2包含SEQ ID NO:4;
- (iii) 所述CDRH3包含SEQ ID NO:8;
- (iv) 所述CDRL1包含SEQ ID NO:10;
- (v) 所述CDRL2包含SEQ ID NO:15;以及
- (vi) 所述CDRL3包含SEQ ID NO:17。

22. 根据权利要求1-9中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含重链互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3, 以及轻链互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3, 其中,

- (i) 所述CDRH1包含SEQ ID NO:1;
- (ii) 所述CDRH2包含SEQ ID NO:4;
- (iii) 所述CDRH3包含SEQ ID NO:7;
- (iv) 所述CDRL1包含SEQ ID NO:10;
- (v) 所述CDRL2包含SEQ ID NO:12;以及
- (vi) 所述CDRL3包含SEQ ID NO:16。

23. 根据权利要求1-22中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含针对BCMA的单克隆抗体的抗原结合片段。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含与来自SEQ ID NO:19-28中的任一个的可变区至少80%、85%、90%、95%、98%或99%相同的氨基酸序列。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含来自SEQ ID NO:19-28中任一个的可变区。

26. 根据权利要求1-23中任一项所述的CAR, 其中所述抗BCMA结合域包含针对BCMA的单链可变片段(scFv)。

27. 根据权利要求26所述的CAR, 其中所述单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:48-72中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%相同的氨基酸序列。

28. 根据权利要求26或27所述的CAR, 其中所述单链可变片段(scFv)包含SEQ ID NO:48-72中任一个的氨基酸序列。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的CAR, 还包含信号肽。

30. 根据权利要求29所述的CAR, 其中所述信号肽是CD8信号肽。

31. 根据权利要求29或30所述的CAR, 其中所述CD8信号肽包含与SEQ ID NO:110至少80%、85%、90%、95%、98%或99%相同的氨基酸序列。

32. 根据权利要求29-31中任一项所述的CAR, 其中所述信号肽包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列。

33. 根据权利要求1-32中任一项所述的CAR, 其中所述跨膜域是选自由CD3- ζ 、CD4、CD8

和CD28组成的组的跨膜域。

34. 根据权利要求1-33中任一项所述的CAR,其中所述跨膜域是CD8跨膜域。

35. 根据权利要求33或34所述的CAR,其中所述跨膜域包含与SEQ ID NO:118至少80%、85%、90%、95%、98%或99%相同的氨基酸序列。

36. 根据权利要求33-35中任一项所述的CAR,其中所述跨膜域包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列。

37. 根据权利要求1-36中任一项所述的CAR,还包含铰链区。

38. 根据权利要求37所述的CAR,其中所述铰链区位于所述抗BCMA结合域和所述跨膜(TM)域之间。

39. 根据权利要求37或38所述的CAR,其中铰链TM区包含与SEQ ID NO:111至少80%、85%、90%、95%、98%或99%相同的氨基酸序列。

40. 根据权利要求37-39中任一项所述的CAR,其中铰链TM区包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列。

41. 根据权利要求1-40中任一项所述的CAR,其中所述胞浆域包含T细胞信号传导域。

42. 根据权利要求1-41中任一项所述的CAR,其中所述胞浆域包含选自由CD8- α 蛋白、CD28蛋白、CD3 ζ 蛋白、FcR γ 蛋白、CD27蛋白质、OX40蛋白质、41BB蛋白质以及它们的任何组合组成的组的T细胞信号传导域。

43. 根据权利要求1-42中任一项所述的CAR,其中所述胞浆域包含选自由CD28-CD3 ζ 蛋白、41BB-CD3 ζ 蛋白、OX40-CD3 ζ 蛋白和41BB-OX40-CD3 ζ 蛋白组成的组的T细胞信号传导域。

44. 根据权利要求41-43中任一项所述的CAR,其中所述T细胞信号传导域是人的。

45. 根据权利要求41-44中任一项所述的CAR,其中所述胞浆域包含与SEQ ID NO:100-107中任一个至少80%、85%、90%、95%、98%或99%相同的氨基酸序列。

46. 根据权利要求41-45中任一项所述的CAR,其中所述胞浆域包含SEQ ID NO:100-107中任一个的氨基酸序列。

47. 一种多核苷酸,所述多核苷酸编码权利要求1-46中任一项所述的CAR。

48. 根据权利要求47所述的多核苷酸,还包含编码5'非翻译区(5'UTR)的核酸。

49. 根据权利要求48所述的多核苷酸,其中所述编码所述5'UTR的多核苷酸是编码来自IgG、CD8、Myo、CD3、AFP、肌动蛋白、IFNG或ACTBL2的5'UTR的至少一部分的多核苷酸,其中所述部分是来自IgG、CD8、Myo、CD3、AFP、肌动蛋白、IFNG或ACTBL2的5'UTR的至少60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%或99%部分。

50. 根据权利要求48或49所述的多核苷酸,其中所述编码所述5'UTR的多核苷酸包含与SEQ ID NO:73-82中任一个至少80%、85%、90%、95%、98%或99%相同的多核苷酸序列。

51. 根据权利要求48-50中任一项所述的多核苷酸,其中所述编码所述5'UTR的多核苷酸包含SEQ ID NO:73-82中任一个的多核苷酸序列。

52. 根据权利要求47-51中任一项所述的多核苷酸,还包含编码3'非翻译区(3'UTR)的多核苷酸。

53. 根据权利要求52所述的多核苷酸,其中所述编码所述3'UTR的多核苷酸是编码来自人 β 珠蛋白、IgG、肌动蛋白、AFP、CD3、IFNG、Myo、FoxP3、GAPDH、GATA3、H2AFV、RORC、SOD2或小鼠 α 珠蛋白的3'UTR的至少一部分的多核苷酸,其中所述部分是来自人 β 珠蛋白、IgG、肌动蛋

白、AFP、CD3、IFNG、Myo、FoxP3、GAPDH、GATA3、H2AFV、RORC、SOD2或小鼠α珠蛋白的3'UTR的至少60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%或99%部分。

54. 根据权利要求52或53所述的多核苷酸,其中所述编码所述3'UTR的多核苷酸包含与SEQ ID NO:83-99中的任一个至少80%、85%、90%、95%、98%或99%相同的多核苷酸序列。

55. 根据权利要求52-54中任一项所述的多核苷酸,其中所述编码所述3'UTR的多核苷酸包含SEQ ID NO:83-99中任一个的多核苷酸序列。

56. 根据权利要求47-55中任一项所述的多核苷酸,包含与SEQ ID NO:29-47中任一个至少80%、85%、90%、95%、98%或99%相同的多核苷酸序列。

57. 根据权利要求47-56中任一项所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸是DNA。

58. 一种载体,所述载体包含权利要求47-57中任一项的多核苷酸。

59. 根据权利要求58所述的载体,其中所述载体包含驱动所述多核苷酸的表达的异源启动子。

60. 根据权利要求58或59所述的载体,其中所述载体是粘粒、质粒、逆转录转座子、病毒、慢病毒、逆转录病毒、腺病毒或腺相关病毒载体。

61. 一种mRNA构建体,所述mRNA构建体由权利要求47-57中任一项所述的多核苷酸或权利要求58-60中任一项所述的载体编码。

62. 根据权利要求61所述的mRNA构建体,其中所述mRNA构建体包含7-甲基鸟苷帽。

63. 根据权利要求61或62所述的mRNA构建体,其中所述mRNA构建体通过体外转录产生。

64. 根据权利要求61-63中任一项所述的mRNA构建体,其中所述mRNA构建体在细胞中产生。

65. 根据权利要求61-64中任一项所述的mRNA构建体,还包含多腺嘌呤尾。

66. 根据权利要求65所述的mRNA构建体,其中所述多腺嘌呤尾包含至少50、100、150或200个腺嘌呤残基。

67. 一种细胞,包含权利要求1-46中任一项所述的CAR、权利要求47-57中任一项所述的多核苷酸、权利要求58-60中任一项所述的载体、和/或权利要求61-66中任一项所述的mRNA构建体。

68. 一种细胞,包含权利要求61-66中任一项所述的mRNA构建体。

69. 根据权利要求67或68所述的细胞,其中所述细胞是免疫效应子细胞。

70. 根据权利要求67-69中任一项所述的细胞,其中所述细胞是干细胞、NK细胞或T细胞。

71. 根据权利要求67-70中任一项所述的细胞,其中所述细胞是T细胞。

72. 根据权利要求67-71中任一项所述的细胞,其中所述细胞是CD8+细胞。

73. 根据权利要求67-72中任一项所述的细胞,其中所述细胞是通过将权利要求61-66中任一项所述的mRNA构建体转染到所述细胞中而产生的。

74. 根据权利要求73所述的细胞,其中所述转染包括电穿孔。

75. 一种组合物,所述组合物包含多个权利要求67-74中任一项所述的细胞。

76. 根据权利要求74所述的组合物,其中至少80%、85%、90%、95%、98%或99%的所述细胞是CD8+细胞。

77. 一种组合物,所述组合物包含多个权利要求58-60中任一项所述的载体。
78. 一种组合物,所述组合物包含多个权利要求61-66中任一项所述的mRNA构建体。
79. 根据权利要求75-78中任一项所述的组合物,其中所述组合物是包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物。
80. 一种制备细胞的方法,包括用权利要求58-60中任一项所述的载体或权利要求61-66中任一项所述的mRNA构建体转导免疫效应子细胞。
81. 根据权利要求80所述的方法,其中用多个权利要求58-60中任一项所述的载体或权利要求61-66中任一项所述的mRNA构建体转导多个细胞。
82. 根据权利要求80或81所述的方法,其中所述转导包括转染。
83. 根据权利要求82所述的方法,其中所述转染包括电穿孔。
84. 根据权利要求80-83中任一项所述的方法,其中所述转导包括感染。
85. 根据权利要求80-84中任一项所述的方法,其中所述细胞是免疫效应子细胞。
86. 根据权利要求80-85中任一项所述的方法,其中所述细胞是T细胞。
87. 根据权利要求80-86中任一项所述的方法,其中所述细胞是CD8⁺T细胞。
88. 根据权利要求80-87中任一项所述的方法,其中所述细胞获自人。
89. 根据权利要求80-88中任一项所述的方法,其中所述细胞通过单采术获得。
90. 一种产生细胞群的方法,包括将体外转录的RNA或合成RNA引入细胞中,其中所述体外转录的RNA包含权利要求61-66中任一项所述的mRNA构建体。
91. 根据权利要求90所述的方法,其中所述引入包括转染。
92. 根据权利要求90所述的方法,其中所述引入包括感染。
93. 根据权利要求90所述的方法,其中所述转染包括电穿孔。
94. 根据权利要求90-93中任一项所述的方法,其中所述细胞是免疫效应子细胞。
95. 根据权利要求90-94中任一项所述的方法,其中所述细胞是T细胞。
96. 根据权利要求90-95中任一项所述的方法,其中所述细胞是CD8⁺T细胞。
97. 根据权利要求90-96中任一项所述的方法,其中所述细胞获自人。
98. 根据权利要求90-97中任一项所述的方法,其中所述细胞通过单采术获得。
99. 一种在受试者中提供抗肿瘤免疫性的方法,包括向受试者施用有效量的权利要求67-74中任一项所述的细胞或权利要求75-79中任一项所述的组合物。
100. 根据权利要求86所述的方法,其中所述细胞是通过权利要求80-98中任一项所述的方法产生的。
101. 根据权利要求99或100所述的方法,其中所述细胞获自与施用所述细胞相同的受试者。
102. 一种治疗患有癌症、怀疑患有癌症或有发展成癌症的风险的受试者的方法,所述方法包括:
- 向所述受试者施用权利要求67-74中任一项所述的细胞、权利要求75-79中任一项所述的组合物、或通过权利要求80-98中任一项所述的方法产生的细胞。
103. 根据权利要求102所述的方法,其中所述癌症与BCMA的表达相关。
104. 根据权利要求102或103所述的方法,其中所述癌症是多发性骨髓瘤。
105. 根据权利要求102-104中任一项所述的方法,还包括施用检查点抑制剂。

106. 根据权利要求102-105中任一项所述的方法,还包括施用选自IMiD、蛋白酶体抑制剂或其组合组成的组的治疗。

107. 根据权利要求102-106中任一项所述的方法,还包括自体干细胞移植。

108. 根据权利要求102-106中任一项所述的方法,还包括同种异体干细胞移植。

109. 一种治疗患有自身免疫性疾病、怀疑患有自身免疫性疾病或有发展成自身免疫性疾病的风险的受试者的方法,所述方法包括:

向所述受试者施用权利要求67-74中任一项所述的细胞、权利要求75-79中任一项所述的组合物、或通过权利要求80-98中任一项所述的方法产生的细胞。

110. 根据权利要求109所述的方法,其中所述自身免疫性疾病与BCMA的表达相关。

111. 根据权利要求109或110所述的方法,其中所述自身免疫性疾病选自重症肌无力、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、天疱疮、银屑病、炎性肠病、乳糜泻、恶性贫血、特发性血小板减少性紫癜、硬皮病、格雷夫斯病、干燥综合征、肺出血-肾炎综合征和1型糖尿病组成的组。

112. 一种治疗患有变应性疾病、怀疑患有变应性疾病或有发展成变应性疾病的风险的受试者的方法,所述方法包括:

向所述受试者施用权利要求67-74中任一项所述的细胞、权利要求75-79中任一项所述的组合物、或通过权利要求80-98中任一项所述的方法产生的细胞。

113. 根据权利要求112所述的方法,其中所述变应性疾病与BCMA的表达相关。

114. 根据权利要求112或113所述的方法,其中所述变应性疾病选自过敏反应、哮喘、食物变应、昆虫叮咬变应、药物变应、变应性鼻炎、荨麻疹、血管性水肿、湿疹、特应性皮炎、接触性皮炎和嗜酸性食管炎组成的组。

115. 根据权利要求99-115中任一项所述的方法,还包括施用选自以下组成的组的剂:

- (i) 增加所述细胞的功效的剂;
- (ii) 改善与所述细胞的施用相关的一种或多种副作用的剂;
- (iii) 治疗所述癌症的剂;和
- (iv) 两种或三种所述剂的组合。

116. 权利要求67-74中任一项所述的细胞用于治疗癌症的用途。

117. 权利要求75-79中任一项所述的组合物用于治疗癌症的用途。

118. 通过权利要求80-98中任一项所述的方法产生的细胞用于治疗癌症的用途。

119. 根据权利要求116-118中任一项所述的用途,其中所述癌症与BCMA的表达相关。

120. 根据权利要求116或119中任一项所述的用途,其中所述癌症是多发性骨髓瘤。

121. 根据权利要求116-120中任一项所述的用途,还包括使用检查点抑制剂。

122. 根据权利要求116-121中任一项所述的用途,还包括使用IMiD、蛋白酶体抑制剂或其组合。

123. 根据权利要求116-122中任一项所述的用途,还包括使用人工分离的自体干细胞。

124. 根据权利要求116-122中任一项所述的用途,还包括使用人工分离的异源干细胞。

125. 权利要求67-74中任一项所述的细胞用于治疗自身免疫性疾病的用途。

126. 权利要求75-79中任一项所述的组合物用于治疗自身免疫性疾病的用途。

127. 通过权利要求80-98中任一项所述的方法产生的细胞用于治疗自身免疫性疾病的用途。

128. 根据权利要求125-127中任一项所述的用途, 其中所述自身免疫病与BCMA的表达相关。

129. 根据权利要求125-138中任一项所述的用途, 其中所述自身免疫性疾病选自由重症肌无力、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、天疱疮、银屑病、炎性肠病、乳糜泻、恶性贫血、特发性血小板减少性紫癜、硬皮病、格雷夫斯病、干燥综合征、肺出血-肾炎综合征和1型糖尿病组成的组。

130. 权利要求67-74中任一项所述的细胞用于治疗变应性疾病的用途。

131. 权利要求75-79中任一项所述的组合物用于治疗变应性疾病的用途。

132. 通过权利要求80-98中任一项的方法产生的细胞用于治疗变应性疾病的用途。

133. 根据权利要求130-132中任一项所述的用途, 其中所述变应性疾病与BCMA的表达相关。

抗BCMA嵌合抗原受体

背景技术

[0001] B细胞成熟抗原 (BCMA) 是在B细胞谱系的细胞上表达的肿瘤坏死家族受体 (TNFR) 成员。BCMA表达在终末分化的B细胞上最高。BCMA参与介导浆细胞的存活以维持长期的体液免疫。BCMA的表达最近与许多癌症、自身免疫性疾病、变应性疾病和传染病关联起来。BCMA表达增加的癌症包括一些血液癌症,例如多发性骨髓瘤、霍奇金 (Hodgkin) 淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤、各种白血病和胶质母细胞瘤。与BCMA相关的自身免疫性疾病包括,但不限于,重症肌无力、系统性红斑狼疮 (SLE)、类风湿性关节炎、水疱性皮肤病例如天疱疮、银屑病、炎症肠病、乳糜泻、恶性贫血、特发性血小板减少性紫癜、硬皮病、格雷夫斯 (Graves) 病、干燥 (Sjögren) 综合征、肺出血-肾炎 (Goodpasture) 综合征和1型糖尿病。许多自身抗体介导的自身免疫性疾病需要使用全身性类固醇或免疫抑制剂进行长期治疗,其涉及显著的毒性。与BCMA相关的变应性疾病包括过敏反应、哮喘、食物变应、昆虫叮咬变应、药物变应、变应性鼻炎、荨麻疹、血管性水肿、湿疹、特应性皮炎、接触性皮炎和嗜酸性食管炎。许多变应性疾病需要使用全身性或局部类固醇、免疫调节疗法或免疫疗法进行长期治疗。受环境、食物、药物和昆虫变应影响的患者通常必须改变他们的生活方式以避免有害的变应原。

[0002] 治疗BCMA相关病症的一种有前景的新方法是过继转移经过基因修饰的T细胞以识别恶性肿瘤相关抗原。参见,例如,Kochenderfer的美国专利号9,765,342。T细胞可以通过引入核酸构建体进行基因修饰,以表达嵌合抗原受体 (CAR), 其是包含胞外抗原识别部分和胞内信号传导域的融合蛋白。参见,例如,Eshhar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993; 90:720-724, 和 Sadelain et al., Curr. Opin. Immunol, 2009; 21:215-223。CAR T细胞,例如经过修饰以识别BCMA的那些,已显示出治疗例如多发性骨髓瘤的病症的益处。参见,例如, Blood, 2016; 128:1688-1700; Brudno et al., J. Clin. Oncol., 2018; 36:2267-2280。

[0003] 先前已经描述了针对BCMA的CAR蛋白和CAR T细胞。参见,例如,Kochenderfer的美国专利号9,765,342; Brogdon等的美国专利号10,174,095和Morgan等的美国专利公开号2017/0226216 A1, 其公开内容通过引用并入本文。

[0004] 先前公开的抗BCMA CAR T细胞疗法的形式具有若干缺点,包括制造困难、次优表达、次优靶标接合和肿瘤杀伤、炎症副作用和免疫原性。

[0005] 因此,需要用于治疗BCMA相关病症的改进的CAR组合物和方法。

发明内容

[0006] 本发明的一些方面至少部分基于令人惊讶的发现,即表达经修饰的嵌合抗原受体的新构建体表现出改进的特性,包括增加的与BCMA的结合,以及在体外和体内对多发性骨髓瘤细胞的杀伤。示例性的改进包括使CAR T细胞更有效地与BCMA结合并更有效地杀伤癌细胞的CDR序列的修饰;提高CAR表达的5'和3'非翻译序列 (UTR);提高CAR表达的胞浆域;和其他改进,例如也可以提高表达的改进的多腺嘌呤 (polyA) 尾。

[0007] 在一些方面,本发明提供了对BCMA具有特异性的嵌合抗原受体 (CAR)。在一些实施方案中,所述CAR包含来自SEQ ID NO:2、3、5、6、8、9、11、13、14、15、17或18中任一个的至少

一个新的CDR序列。在一个具体的实施方案中,所述CAR包含SEQ ID NO:2、6、9、11、14和17的CDR序列(即CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3)。

[0008] 在一些实施方案中,所述CAR还包含跨膜域。在一些实施方案中,所述跨膜域是CD8跨膜域。然而,根据本发明可以使用其他跨膜域。在一些实施方案中,所述CAR还包含共刺激域和/或信号传导域。在一些实施方案中,所述共刺激域是4-1BB共刺激域、CD28共刺激域和/或OX40共刺激域。在一些实施方案中,所述CAR包含信号转导域。在一些实施方案中,所述信号转导域是CD3 ζ 信号转导域。在一些实施方案中,所述CD3 ζ 信号转导域包含在具有一个或多个共刺激域(例如,41BB、CD28和/或OX40共刺激域)的CDR中。

[0009] 本发明的其他方面涉及一种核酸,该核酸包含编码如以上实施方案的任一个中所述或如本文另外描述的CAR的序列。在一些实施方案中,本文提供的核酸序列中的任一个包括一个或多个可用于改善所述CAR的表达的特征。例如,所述核酸可以包含5'非翻译区(5'UTR)、3'非翻译区(3'UTR)、多腺嘌呤尾(polyA)、7-甲基鸟苷帽(m⁷G)和/或开放阅读框架。所述核酸还可包括内部核糖体进入位点(IRES)。

[0010] 其他方面涉及适合用于例如通过如以上实施方案的任一个中所述或如本文另外描述的电穿孔引入到细胞中的mRNA构建体。本发明的其他方面涉及包含如以上实施方案的任一个中所述或如本文另外描述的核酸的载体。在一些实施方案中,所述载体是慢病毒载体。

[0011] 本发明的其他方面涉及一种细胞,该细胞包含如以上实施方案的任一个中所述或如本文另外描述的CAR和/或CAR编码核酸。在一些实施方案中,所述细胞是干细胞、NK细胞或T细胞。在一些实施方案中,所述细胞是T细胞。

[0012] 本发明的其他方面涉及包含多个细胞(例如,T细胞)的组合物,该细胞包含如以上实施方案的任一个中所述或如本文另外描述的CAR。在一些实施方案中,所述组合物还包含药学上可接受的载体。

[0013] 本发明的其他方面涉及一种产生多个CAR修饰的细胞的方法,该方法包括将如以上实施方案的任一个中所述或如本文另外描述的CAR编码核酸通过电穿孔、细胞的物理破坏例如细胞挤压、或通过使用包含所述核酸的纳米颗粒引入到多个免疫细胞中。在一些实施方案中,所述免疫细胞是T细胞。在一些实施方案中,mRNA构建体包含CAR编码核酸。

[0014] 本发明的其他方面涉及一种产生多个CAR修饰的细胞的方法,该方法包括将包含如以上实施方案的任一个中所述或如本文另外描述的核酸的慢病毒载体引入到多个免疫细胞中。在一些实施方案中,提供了包含以上实施方案的任一个中或如本文另外描述的一种或多种核酸的一种或多种慢病毒载体。在一些实施方案中,所述免疫细胞是T细胞。

[0015] 本发明的其他方面涉及一种治疗患有癌症或有患癌症风险的受试者的方法,该方法包括将包含如以上实施方案的任一个中所述或如本文另外描述的CAR的T细胞、如以上实施方案的任一个中所述或如本文另外描述的组合物、或通过如以上实施方案的任一个中所述或如本文另外描述的方法产生的多个细胞施用到患有癌症或有患癌症风险的受试者中。在一些实施方案中,所述癌症是多发性骨髓瘤。

[0016] 还提供了治疗患有自身免疫性疾病或变应性疾病的受试者的方法。还提供了包含如本文公开的CAR的一种或者多种T细胞用于治疗癌症、自身免疫性疾病或变应性疾病的用途。

附图说明

[0017] 图1显示了用SEQ ID:31的CAR或对照(无mRNA)产生的CAR T细胞在转染后24小时对细胞存活率、CAR表达和BCMA结合的评估。

[0018] 图2显示了用由SEQ ID:20、21或25的CAR产生的人源化抗BCMA CAR T细胞治疗后可体内多发性骨髓瘤MM.1S细胞肿瘤的测量。CAR T细胞或对照(CAR-阴性)细胞在第6天作为单剂量施用。肿瘤负荷表示为来自荧光肿瘤细胞的平均生物发光强度(通量,光子/秒)。

[0019] 图3显示了通过睡美人转座子系统修饰以表达SEQ ID:31的CAR的T细胞的CAR表达、抗BCMA细胞毒性和干扰素- γ 分泌的测量。

[0020] 定义

[0021] 如本文和权利要求所用,单数形式的不定冠词(“a”,“an”)和定冠词(“the”)包括了单数和复数的所指物,除非上下文中另有明确规定。因此,例如,不定冠词(“an”)修饰的“剂”的所指物包括单个剂和多个这样的剂。

[0022] 如本文所用,术语“激活”是指T细胞、NK细胞、干细胞或其他细胞已被充分刺激以诱导可检测的细胞增殖的状态。激活也可能与诱导的细胞因子产生和可检测的效应子功能有关。术语“激活的T细胞”是指除了别的以外,正在进行细胞分裂的T细胞。

[0023] 如本文所用,术语“变应反应”和“变应性的”是指参与对通常无害的物质即变应原的异常超敏反应的医学病症。示例性的变应性病症包括过敏反应、哮喘、食物变应、昆虫叮咬变应、药物变应、变应性鼻炎、荨麻疹、血管性水肿、湿疹、特应性皮炎、接触性皮炎和嗜酸性食管炎。

[0024] 如本文所用,术语“抗体”泛指包含四个多肽链即两条重(H)链和两条轻(L)链的任何免疫球蛋白(Ig)分子,或其保留了Ig分子的基本表位结合特征的任何功能性片段、突变体、变体或其衍生物。这种突变体、变体或衍生物抗体形式是本领域已知的。下面讨论其非限制性实施方案。

[0025] 在全长抗体中,每条重链包含重链可变区(本文缩写为HCVR或VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个域CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为LCVR或VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个域CL。VH和VL区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),散布着更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL包含三个CDR和四个FR,从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。

[0026] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)是指保留与抗原(例如,BCMA)特异性结合的能力的抗体的一个或多个片段。已经表明,抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段来执行。此类抗体实施方案也可以是双特异性的、双特异性的或多特异性的形式;特异性结合至两种或多种不同的抗原。多特异性的、双特异性的和双特异性的抗体构建体是本领域众所周知的,并且在Kontermann(ed.), *Bispecific Antibodies*, Springer, NY (2011), and Spiess et al., *Mol. Immunol.* 67 (2):96-106 (2015) 中进行了表征。

[0027] 包含在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括(i) Fab片段,一种由VL、VH、CL和CH1域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,一种包含通过铰链区的二硫键连接

的两个Fab片段的二价片段；(iii)Fd片段，由VH和CH1域组成；(iv)Fv片段，由抗体的单臂的VL和VH域组成，(v)dAb片段(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546, Winter et al., PCT publication WO 90/05144A1, 通过引用并入本文)，其包含单个可变域；(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外，虽然Fv片段的两个域VL和VH由分开的基因编码，但它们可以使用重组方法通过合成接头连接起来，使它们能够制成单个蛋白质链，其中VL和VH区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv)；参见例如，Bird et al. (1988) Science 242:423-426；以及Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。此类单链抗体也旨在包含在术语抗体的“抗原结合部分”内。其他形式的单链抗体，例如双特异性抗体也包括在内。双特异性抗体是二价的双特异性抗体，其中VH和VL域在单个多肽链上表达，但使用的接头太短而无法在同一条链上的两个域之间进行配对，从而迫使这些域与另一条链的互补域配对并产生两个抗原结合位点(参见，例如，Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448；Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123)。此类抗体结合部分是本领域已知的(Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, New York. 790pp. (ISBN 3-540-41354-5)。

[0028] 如本文所用，“抗体重链”是指在天然构象的所有抗体分子中存在的两种类型的多肽链中较大者。

[0029] 如本文所用，“抗体轻链”是指在天然构象的所有抗体分子中存在的两种类型的多肽链中较小者， κ 和 λ 轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

[0030] 如本文所用，术语“合成抗体”是指使用重组DNA技术产生的抗体，例如由病毒载体表达的抗体。该术语还应解释为表示通过合成编码抗体的DNA分子产生的抗体，并且该DNA分子表达抗体蛋白，或表示指定抗体的氨基酸序列，其中该DNA或氨基酸序列使用本领域可得且众所周知的合成DNA或氨基酸序列技术获得。

[0031] 在一些实施方案中，如本文所用，术语“抗原”或“Ag”定义为激发免疫反应的分子。这种免疫反应可涉及抗体的产生，或特异性免疫活性细胞的激活，或两者。技术人员将理解任何大分子，包括几乎所有的蛋白质或肽，都可以用作抗原。此外，抗原可以来自重组或基因组DNA。技术人员将理解，包含编码引发免疫反应的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因此编码本文所使用的术语“抗原”。此外，本领域技术人员将理解抗原不需要仅由基因的全长核苷酸序列编码。很明显，本发明包括，但不限于，使用多于一个基因的部分核苷酸序列，并且这些核苷酸序列以各种组合排列以引发所需的免疫反应。此外，技术人员将理解抗原根本不需要由“基因”编码。很明显，抗原可以合成产生或可以从生物样本中获得。这种生物样本可以包括，但不限于，组织样本、肿瘤样本、细胞或生物流体。

[0032] 如本文所用，术语“肿瘤抗原”是指与癌细胞例如多发性骨髓瘤细胞相关的抗原。肿瘤抗原的实例包括，但不限于，BCMA。

[0033] 如本文所用，术语“抗肿瘤作用”是指可表现为肿瘤体积减小、肿瘤细胞数量减少、转移数量减少、预期寿命增加、或与癌症病况相关的各种生理学症状改善的生物学作用。“抗肿瘤作用”还可以通过本发明的肽、多核苷酸、细胞和抗体首先预防肿瘤发生的能力来体现。

[0034] 术语“自身免疫”是指其中个体的免疫系统或其组成部分攻击该个体的正常身体组织的疾病或病症。自身免疫性疾病可由自身抗体即个体产生的识别该个体的自身组织的

抗原的抗体介导。示例性自身免疫性疾病包括重症肌无力、系统性红斑狼疮 (SLE)、类风湿性关节炎、水疱性皮肤病例如天疱疮、银屑病、炎性肠病、乳糜泻、恶性贫血、特发性血小板减少性紫癜、硬皮病、格雷夫斯病、干燥综合征、肺出血-肾炎和1型糖尿病。

[0035] 如本文所用,术语“自体的”是指源自同一个体的随后将其重新引入该个体中的任何材料。

[0036] 如本文所用,术语“同种异体的”是指源自相同物种的不同动物的移植物。“异种的”是指源自不同物种的动物的移植物。

[0037] 如本文所用,术语“癌症”被定义为特征在于异常细胞的快速和不受控制的生长的疾病。癌细胞可以局部扩散或通过血流和淋巴系统扩散到身体的其他部位。各种癌症的实例包括,但不限于,乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。在一些实施方案中,癌症是表达BCMA的癌症。表达BCMA的示例性癌症包括多发性骨髓瘤、淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 和胶质母细胞瘤。在一些实施方案中,癌症是指多发性骨髓瘤。多发性骨髓瘤是浆细胞癌。多发性骨髓瘤可以通过血液检查 (血清蛋白电泳、血清游离 κ/λ 轻链测定)、骨髓检查、尿蛋白电泳和/或通常受累骨骼的X射线来诊断。在一些实施方案中,癌症是指霍奇金淋巴瘤 (HL)。HL是B细胞癌。

[0038] “有效量”是指疗法的量足以降低或改善障碍或其一种或多种症状的严重性和/或持续时间,预防障碍的发展,引起障碍的消退,预防与障碍相关的一种或多种症状的复发、发展、发作或进展,检测障碍,或增强或改善另一种疗法 (例如,预防剂或治疗剂) 的预防或治疗效果。

[0039] 如本文所用,术语“外源的”是指从生物体、细胞、组织或系统的外部引入或产生于生物体、细胞、组织或系统的外部的任何材料。

[0040] “表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,所述重组多核苷酸包含与待表达的核苷酸序列可操作地连接的表达调控序列。表达载体包含足够的用于表达的顺式作用元件;用于表达的其他元件可以由宿主细胞供应或在体外表达系统中供应。表达载体包括所有本领域已知的那些,例如并入该重组多核苷酸的粘粒、质粒 (例如,裸露的或包含在脂质体中的) 和病毒 (例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。表达载体可以例如通过RNA病毒载体提供自我扩增的RNA。参见,例如,U.S.S.N.12/831,252。

[0041] 如本文所用,术语“免疫球蛋白”或“Ig”被定义为用作抗体的一类蛋白质。B细胞表达的抗体有时称为BCR (B细胞受体) 或抗原受体。包括在此类蛋白质中的五个成员是IgA、IgG、IgM、IgD和IgE。IgA是存在于身体分泌物 (例如唾液、眼泪、母乳、胃肠道分泌物以及呼吸道和泌尿生殖道的粘液分泌物) 中的主要抗体。IgG是最常见的循环抗体。IgM是大多数受试者在初次免疫反应中产生的主要免疫球蛋白。它是凝集、补体结合和其他抗体反应中最有效的免疫球蛋白,并且在防御细菌和病毒方面很重要。IgD是一种没有已知的抗体功能、但可以作为抗原受体的免疫球蛋白。IgE是一种通过在暴露于变应原时导致肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放介质来介导速发型超敏反应的免疫球蛋白。

[0042] “分离的”是指相对于自然状态改变的或脱离自然状态的。例如,天然存在于活体动物中的核酸或肽不是“分离的”,但与其天然状态的共存材料部分或完全分离的相同的核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在,或者可以存在于

非天然环境例如宿主细胞中。

[0043] 除非另有说明,“编码氨基酸序列的核苷酸序列或核酸”包括为彼此的简并形式并编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列也可以包括内含子,以使得编码该蛋白质的核苷酸序列在某些版本中可以包含一个或多个内含子。

[0044] 如本文所用,“慢病毒”是指逆转录病毒科的一个属。慢病毒在逆转录病毒中是独一无二的,因为它能够感染非分裂细胞;它们可以将大量遗传信息递送到宿主细胞的DNA中,因此它们是基因递送载体的最有效方法之一。HIV、SIV和FIV都是慢病毒的实例。源自慢病毒的载体提供了在体内、离体或体外实现显著水平的基因转移的手段。

[0045] 如本文所用,术语“调节”是指与没有治疗或化合物的情况下受试者的反应水平相比,和/或与其他方面相同但没有治疗的受试者的反应水平相比,介导受试者的反应水平的可检测的增加或减少。该术语包括扰乱和/或影响天然信号或反应,从而在受试者、优选人中介导有益的治疗反应。

[0046] “密码子优化的”是指针对感兴趣基因的翻译效率优化与特定氨基酸相关的密码子。密码子优化通常涉及评估感兴趣的基因或序列,并利用用于特定细胞或物种中的相同氨基酸的更普遍或常见的密码子替换该密码子。本领域技术人员用来评估密码子优化的程序包括由Integrated DNA Technologies,EnCor Biotechnology,Inc.,JCat,OptimumGene™(GenScript USA,Inc.,Pisataway,NJ 08854)等提供的那些。本文描述的编码CAR实施方案的序列可以经密码子优化,其可以提高它们的翻译效率。

[0047] 如本文所用,术语“接头”是指连接两个分子或部分例如融合蛋白的两个域(例如,核酸酶失活的Cas9域和编辑核酸的域(例如,腺苷脱氨酶))的键(例如,共价键)、化学基团或分子。在一些实施方案中,接头连接RNA可编程核酸酶的gRNA结合域(包括Cas9核酸酶域)和编辑核酸的蛋白的催化域。在一些实施方案中,接头连接dCas9和编辑核酸的蛋白。通常,接头位于两个基团、分子或其他部分之间或侧翼,并通过共价键与每一者连接,从而将两者连接起来。在一些实施方案中,接头是一个氨基酸或多个氨基酸(例如,肽或蛋白质)。在一些实施方案中,接头是有机分子、基团、聚合物或化学部分。在一些实施方案中,接头的长度为5-100个氨基酸,例如,长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、30-35、35-40、40-45、45-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100、100-150或150-200个氨基酸。也可以考虑更长或更短的接头。

[0048] 术语“可操作地连接”是指调控序列和异源核酸序列之间的功能性连接,导致后者的表达。例如,当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能性关系时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则启动子可操作地连接至编码序列。通常,可操作地连接的DNA序列是连续的,并且在需要连接两个蛋白质编码区时,在同一阅读框中。

[0049] 术语“过表达的”或“过表达”旨在表示来自疾病区域(例如,患者的特定组织或器官内的实体瘤)的细胞中的(例如,肿瘤抗原的)异常表达水平,相对于来自该组织或器官的正常细胞中的表达水平而言。具有以肿瘤抗原的过表达为特征的实体瘤或血液恶性肿瘤的患者可以通过本领域已知的标准测定法来确定。

[0050] 免疫原性组合物的“肠胃外”施用包括例如皮下(s.c)、静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)或胸骨内注射,或输注技术。

[0051] 术语“患者”、“受试者”、“个体”等在本文中可互换使用,并且指适用于本文所述的方法的任何动物或其细胞,无论是体外的还是原位的。在一些实施方案中,患者、受试者或个体是人。

[0052] 如本文所用,术语“启动子”定义为被细胞的合成机器或引入的合成机器识别的启动多核苷酸序列的特异性转录所需的DNA序列。

[0053] 如本文所用,术语“启动子/调控序列”是指表达与启动子/调控序列可操作地连接的基因产物所需的核酸序列。在某些情况下,该序列可以是核心启动子序列,而在其他情况下,该序列还可以包括增强子序列和基因产物表达所需的其他调控元件。例如,启动子/调控序列可以是以组织特异性方式表达基因产物的序列。“组成型”启动子是这样一种核苷酸序列:当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,所述核苷酸序列导致该基因产物在细胞的大部分或所有生理条件下在细胞中产生。

[0054] “诱导型”启动子是这样一种核苷酸序列:当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,所述核苷酸序列导致该基因产物基本上仅当在细胞中存在对应于该启动子的诱导物时才在细胞中产生。

[0055] “组织特异性”启动子是这样一种核苷酸序列:当与编码或指定基因的多核苷酸可操作地连接时,所述核苷酸序列导致该基因产物基本上仅当细胞是对应于启动子的组织类型的细胞时才在细胞中产生。

[0056] 如本文所用,术语“特异性结合”或“对……具有特异性”关于抗体(例如scFv)是指识别特定抗原但基本上不识别或结合样本中的其他分子的抗体。例如,与来自一个物种的抗原特异性结合的抗体也可以与来自一个或多个物种的抗原结合。但是,这种跨物种反应性本身不会改变抗体的特异性分类。在另一个实例中,特异性结合抗原的抗体也可以结合不同等位基因形式的抗原。然而,这种跨物种反应性本身不会改变抗体的特异性分类。在一些情况下,术语“特异性结合”或“特异性地结合”可用于指抗体、蛋白质或肽与第二化学物质的相互作用,以表示相互作用取决于化学物质上存在的特定结构(例如,抗原决定簇或表位);例如,抗体识别并结合特定的蛋白质结构,而不是一般的蛋白质。如果抗体对表位“A”具有特异性,则在含有标记的“A”和抗体的反应中存在含有表位A(或游离的、未标记的A)的分子将减少与抗体结合的标记的A的数量。

[0057] 术语“受试者”旨在包括其中可以引发免疫反应的生物体(例如,哺乳动物)。受试者的实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因种。在一些实施方案中,受试者是非人哺乳动物。在一些实施方案中,受试者是非人灵长类动物。在一些实施方案中,受试者是啮齿类动物。在一些实施方案中,受试者是绵羊、山羊、牛、猫或狗。在一些实施方案中,受试者是脊椎动物、两栖动物、爬行动物、鱼、昆虫、苍蝇或线虫。在一些实施方案中,受试者是研究动物。在一些实施方案中,受试者是基因工程化的,例如基因工程化的非人受试者。受试者可以是任何性别,也可以处于任何发展阶段。在一些实施方案中,受试者患有癌症(例如,多发性骨髓瘤)。在其他实施方案中,受试者是健康的志愿者。

[0058] 如本文所用,术语“治疗”是指治疗和/或预防。通过抑制、缓解或根除疾病状态获得治疗效果。

[0059] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指将引起研究人员、兽医、医生或其他临床医生正在寻求的组织、系统或受试者的生物学或医学反应的目标化合物的量。术语“治疗有效

量”包括化合物在施用时足以预防所治疗的病症或障碍的一种或多种体征或症状的发展或在一定程度上减轻所治疗的病症或障碍的一种或多种体征或症状的量。治疗有效量将根据化合物、疾病及其严重程度以及待治疗受试者的年龄、体重等而变化。

[0060] 如本文所用,术语“治疗”是指旨在逆转、减轻、延迟疾病或障碍或其一个或多个症状的发作,或抑制疾病或障碍或其一个或多个症状的进展的临床干预,如本文所述。在一些实施方案中,治疗可以在一个或多个症状出现后和/或疾病被诊断后施用。在其他实施方案中,治疗可以在没有症状的情况下施用,例如以预防或延迟症状的发作或抑制疾病的发作或进展。例如,可以在症状发作之前对易感个体施用治疗(例如,根据症状史和/或根据遗传或其他易感因素)。在症状消退后也可以继续治疗,例如,以防止或延迟其复发。

[0061] 如本文所用,术语“转染的”或“转化的”或“转导的”是指将外源的核酸转移或引入到宿主细胞中的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经用外源的核酸转染的、转化的或转导的细胞。该细胞包括原代目标细胞及其后代。

[0062] “载体”是包含分离的核酸并且可用于将分离的核酸递送至细胞内部的物质组合物。许多载体是本领域已知的,包括,但不限于,线性多核苷酸、与离子或两亲性子化合物关联的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。该术语还应解释为包括促进核酸转移到细胞中的非质粒和非病毒化合物,例如聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体的实例包括,但不限于,腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体等。

具体实施方式

[0063] 嵌合抗原受体(CAR)技术是一种抗癌免疫治疗方法,旨在产生效应T细胞以靶向特定肿瘤抗原。CAR是重组受体,其提供抗原结合和T细胞激活功能。CAR是本领域已知的并且之前已经描述过,例如在Sadelain M., et al., “The basic principles of chimeric antigen receptor (CAR) design” *Cancer Discov.* 2013 Apr; 3 (4) : 388-398中;其全部内容在此通过引入并入本文。一般而言,CAR T细胞(本文中也称为CART细胞或CART)是基于单链Fv(scFv)抗体部分的工程化的T细胞。在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)部分包含结合抗原结合域(例如,scFv)和T细胞的信号传导域(例如包括CD3ζ链)的受体复合物。

[0064] 如本文所提供,抗B细胞成熟抗原(BCMA) CAR和它们相应的核酸表达构建体被工程化以赋予改进的特性,包括改进的表达、改进的CAR T细胞与BCMA的结合、改进的半衰期、改进的表达BCMA的细胞(例如,骨髓瘤细胞)的杀伤,以及在人中的降低的免疫原性。为了产生表达改进的抗BCMA CAR的核酸构建体,突变在一个或多个互补决定区(CDR)中进行,将突变引入到开放阅读框(ORF)中,将突变引入到框架区中,使用可选的5'和3'非翻译区(UTR),使用可选的共刺激域,以及设计可选的多腺嘌呤尾。与先前描述的抗BCMA CAR(例如Ali等人(2016)的临床试验中使用的(即SEQ ID:19的)CAR)相比,这种改进的抗BCMA CAR及其表达构建体显示出改进的特性。

[0065] 如本文所述,CAR基于与BCMA(一种多发性骨髓瘤(MM)抗原)结合的scFv进行工程化。示例性的CAR可由CD8信号肽、抗BCMA scFv(例如SEQ ID NO:60的抗BCMA scFv)、CD8铰链和跨膜域、4-1BB共刺激域和CD3ζ信号传导域组成。为了生成CAR T细胞,将表达CAR的mRNA构建体转染到通过单采术(apheresis)从健康人类供体获得的CD8+淋巴细胞中。表达所测试的CAR蛋白之一的CAR T细胞(例如,表达SEQ ID NO:21的CAR的CAR T细胞)表现出与

BCMA的结合增加,在体外对表达BCMA的骨髓瘤细胞的杀伤增加,并且在动物模型中显著抑制人类骨髓瘤的生长。因此,本发明的方面涉及抗BCMA CAR及其使用方法。在一些实施方案中,CAR由T细胞表达并且可用于治疗癌症,例如用于治疗多发性骨髓瘤。

[0066] 在一些实施方案中,CAR对BCMA具有特异性。B细胞成熟抗原(BCMA,也称为BCM、CD269、TNFRSF17或TNFRSF13A)是在B细胞上表达的TNFR超家族的成员。下面提供了示例性的、非限制性的人类BCMA序列。

[0067] >gi|23238192|ref|NP_001183.2|肿瘤坏死因子受体超家族成员17,

[0068] BCMA[人类]

MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCSSTNPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIIISLAV

[0069] FVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIIILPRGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDS
DHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR (SEQ ID NO: 121)

[0070] 在一些实施方案中,本文提供的任何CAR包含特异性结合BCMA的单链Fv(scFv),其可以在单个多肽上(例如,通过接头连接)或在两个多肽上(例如,一个在第一个CAR多肽,一个在第二个CAR多肽上,一旦引入到细胞中就可以形成二聚体)。

[0071] 组合物

[0072] CAR

[0073] 在一些方面,本发明提供了对BCMA具有特异性(例如,与BCMA特异性结合)的嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,CAR包含对BCMA具有特异性的抗原结合域、跨膜域和胞浆域。在一些实施方案中,抗BCMA结合域是人源化抗BCMA结合域。在一些实施方案中,胞浆域或胞内域包含T细胞信号传导域,其能够在抗BCMA CAR结合BCMA蛋白(例如,在癌细胞的表面上表达的BCMA蛋白)时在细胞中转导信号,例如T细胞激活信号。在一些实施方案中,T细胞信号传导域能够转导T细胞增殖信号、记忆信号、细胞毒性效应子功能信号或细胞因子产生信号。在一些实施方案中,T细胞信号传导域包含共刺激分子。在一些实施方案中,胞浆域还包含 ζ 链部分。示例性的T细胞信号传导域包括但不限于CD8- α 蛋白、CD28蛋白、CD3 ζ 蛋白、FcR γ 蛋白、CD27蛋白、OX40蛋白、41BB蛋白及其任何组合。然而,应当理解,本文提供的T细胞信号传导域是示例性的,并且本公开考虑了可以根据本发明使用的已知或尚待公开的额外的T细胞信号传导域。

[0074] 在一些实施方案中,在CAR的胞外域和跨膜域之间,或在CAR的胞浆域和跨膜域之间,或在BCMA结合域之间,可以掺入间隔域和/或铰链域。如本文所用,术语“间隔域”通常是指起到使跨膜域连接多肽链中的胞外域或胞浆域的作用的任何寡肽或多肽。在一些实施方案中,间隔域可包含最高达300个氨基酸,例如,1至5个氨基酸、1至10个氨基酸、1至20个氨基酸、1至40个氨基酸、1至60个氨基酸、1至100个氨基酸、1至150个氨基酸、1至200个氨基酸、1至250个氨基酸、1至300个氨基酸、5至10个氨基酸、5至20个氨基酸、5至40个氨基酸、5至60个氨基酸、5至100个氨基酸、10至20个氨基酸、10至40个氨基酸、10至60个氨基酸、10至100个氨基酸、20至40个氨基酸、20至60个氨基酸、20至100个氨基酸、40至60个氨基酸、40至100个氨基酸或60至100个氨基酸。在一些实施方案中,间隔域可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。还应当理解,一个或多个间隔域可以包括在CAR的其他区域中,因为本公开的方面不限于这方面。示例性的间隔区序列包括但不限于以下的一个或多个:

GGGGS (SEQ ID NO: 124); GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 125); (GGGGS)₃

[0075] (SEQ ID NO: 126); GSTSGGGSGGGSGGGGSS (SEQ ID NO: 127);

GSTSGSGKPGSSEGSTKG (SEQ ID NO: 128); GGGSGGG (SEQ ID NO: 129);
和 GGGGS (SEQ ID NO: 130)。

[0076] 在一些实施方案中,本文提供的任何CAR包含铰链区,其通常将CAR的胞外域连接至胞内域。在一些实施方案中,铰链区位于CAR的BCMA结合域和跨膜域之间,或位于CAR的间隔域和跨膜域之间。在一些实施方案中,跨膜域可以通过铰链(例如来自人类蛋白质的铰链)连接至CAR的胞外域,例如CAR的抗BCMA结合域。例如,在一个实施方案中,铰链可以来自人Ig(免疫球蛋白)铰链,例如IgG4铰链、CD8 α 铰链或CD28铰链。在一些实施方案中,铰链包含天然存在的Ig分子的铰链的氨基酸序列,例如IgG4铰链、CD8 α 铰链或CD28铰链,或与其至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,铰链包含与FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:117)至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,铰链包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列。然而,应当理解,铰链的这些实例并不意味着是限制性的并且可以预期其他铰链。例如,铰链还可以包括细胞表面蛋白的一个或多个胞外域。参见,例如,Watanabe等人,“Fine-tuning the CAR spacer improves T-cell potency,”*Oncoimmunology*.2016;5(12):e1253656,其内容通过引用并入本文。

[0077] 在一些实施方案中,本文提供的任何CAR包含结构NH₂-[BCMA结合域]-[跨膜域]-[胞浆域]-COOH。在一些实施方案中,CAR包含结构NH₂-[BCMA结合域]-[铰链区]-[跨膜域]-[胞浆域]-COOH。在一些实施方案中,CAR包含一个或多个间隔序列。在一些实施方案中,“-”的每个实例表示存在任选的间隔序列。在一些实施方案中,胞浆域包括CD8- α 蛋白、CD28蛋白、CD3 ζ 蛋白、FcR γ 蛋白、CD27蛋白、OX40蛋白、41BB蛋白及其任何组合。在一些实施方案中,本文提供的任何CAR包含结构[BCMA结合域]-[跨膜域]-[胞浆域];[BCMA结合域]-[铰链区]-[跨膜域]-[胞浆域];[信号肽]-[BCMA结合域]-[跨膜域]-[胞浆域];或[信号肽]-[BCMA结合域]-[铰链区]-[跨膜域]-[胞浆域];

[0078] 在一些实施方案中,CAR包含具有选自以下示例性、非限制性排列之一的排列的胞浆域:

[0079] [CD3 ζ];

[0080] [CD28]-[CD3 ζ];

[0081] [41BB]-[CD3 ζ];

[0082] [OX40]-[CD3 ζ];或

[0083] [41BB]-[OX40]-[CD3 ζ]

[0084] 在一些实施方案中,上述示例性非限制性排列从左到右为CAR的N-末端至C-末端。在一些实施方案中,“-”的每个实例表示存在可选的间隔序列。

[0085] 在一方面,本发明的CAR的抗BCMA结合域例如人或人源化的scFv部分由序列已经进行密码子优化从而用于在哺乳动物细胞中表达的转基因编码。一方面,本发明的整个CAR构建体由整个序列已经进行密码子优化从而用于在哺乳动物细胞中表达的转基因编码。密

码子优化是指发现编码DNA中同义密码子(即编码相同氨基酸的密码子)的出现频率在不同物种中存在偏差。这种密码子简并性允许由多种核苷酸序列编码相同的多肽。多种密码子优化方法是本领域已知的,并且包括,例如,至少在美国专利号5,786,464和6,114,148中所公开的方法。

[0086] 本公开提供了编码本文提供的任何分子(例如抗BCMA结合蛋白、scFv、CAR和RNA构建体)的核酸序列,其可以使用本领域已知的重组方法来获得,例如,通过来自于表达该基因的细胞的筛选文库,通过从已知包含该基因的载体中衍生该基因,或通过使用标准技术直接从包含该基因的细胞和组织中分离来获得。或者,感兴趣的核酸可以合成产生,而不是克隆产生。

[0087] 本发明还包括表达可直接转导到细胞中的CAR的逆转录病毒和慢病毒载体构建体。

[0088] 本发明还包括可以直接转染到细胞中的RNA构建体。产生用于转染的mRNA的一种方法包括使用专门设计的引物对模板进行体外转录(IVT),任选随后加入polyA,以产生含有3'和5'非翻译序列("UTR")、5'帽和/或内部核糖体进入位点(IRES)、待表达的核酸和polyA尾的构建体,其长度通常为50-2000个碱基,但在下文中更详细地描述。这样产生的RNA可以有效地转染不同种类的细胞。在一个实施方案中,模板包括CAR的序列。在一个实施方案中,通过电穿孔将RNA CAR载体转导到细胞(例如T细胞或NK细胞)中。

[0089] 抗BCMA结合域

[0090] 在一些实施方案中,本文提供的CAR包含抗B细胞成熟抗原(BCMA)结合域。在一些实施方案中,本文提供的CAR包含能够以比其他已知抗BCMA结合域更大的亲和力结合BCMA的BCMA结合域,例如来自Ali et al. (2016)的临床试验中使用的(即SEQ ID:19的)CAR的抗BCMA结合域。在一些实施方案中,本发明的任何CAR都可以通过工程化与肿瘤细胞上的BCMA抗原特异性结合的所需的BCMA结合部分来工程化以靶向感兴趣的肿瘤抗原。在一些实施方案中,抗BCMA结合域是本文所述的任何CAR的跨膜域和/或胞内域的N端。

[0091] BCMA结合域可以是与BCMA结合的任何域,包括但不限于单克隆抗体、scFv、多克隆抗体、合成抗体、人抗体、人源化抗体及其抗原结合(例如,BCMA结合)片段。在一些实施方案中,BCMA结合域被人源化(例如,部分人源化或完全人源化)是有益的。在某些情况下,BCMA结合域源自CAR最终用于其中的相同物种是有益的。例如,对于用于人类,CAR的BCMA结合域包含人抗体或其片段可能是有益的。因此,在一些实施方案中,BCMA结合域部分包含人抗体或其片段。对于抗体在人类中的体内应用,可优选使用人抗体。完全人类抗体对于人类受试者的治疗性治疗是特别需要的。人抗体可通过本领域已知的多种方法制备,包括使用源自人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法,包括对这些技术的改进。另见美国4,444,887和4,716,111;以及PCT公开WO 98/46645、WO98/50433、WO 98/24893、WO98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735和WO91/10741;其全部内容通过引用并入本文。人抗体也可以是其中重链和轻链由源自人DNA的一种或多种来源的核苷酸序列编码的抗体。人抗体或人源化抗体也可以使用不能表达功能性内源性免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠产生。例如,人重链和轻链免疫球蛋白基因复合物可以随机或通过同源重组引入到小鼠胚胎干细胞中。或者,除了人重链和轻链基因之外,还可以将人可变区、恒定区和多变区引入到小鼠胚胎干细胞中。可以与通过同源重组引入人免疫球蛋白基因座分别地或同

时地使小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因失去功能。例如,已经描述了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合子缺失导致内源性抗体产生的完全抑制。修饰的胚胎干细胞被扩增并显微注射到囊胚中以产生嵌合小鼠。然后培育嵌合小鼠以产生表达人抗体的纯合子代。转基因小鼠以正常方式用选定的抗原(例如本发明的多肽的全部或部分)进行免疫。

[0092] 在一方面,抗BCMA结合域是片段,例如单链可变片段(scFv)或来自抗BCMA抗体的片段。在一方面,抗BCMA结合域是Fv、Fab、(Fab')₂或双功能(例如双特异性)杂合抗体(例如Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987))。在一方面,本发明的抗体及其片段以野生型或增强的亲和力结合BCMA蛋白。

[0093] 在一些情况下,scFv可以根据本领域已知的方法(参见,例如,Bird et al., (1988) Science 242:423-426 and Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883)来制备。ScFv分子可以通过使用柔性多肽接头将VH区和VL区连接在一起产生。scFv分子包含具有优化长度和/或氨基酸组成的接头(例如,Ser-Gly接头)。接头长度可以极大地影响scFv的可变区如何折叠和相互作用。事实上,如果使用短的多肽接头(例如,在5-10个氨基酸之间),链内折叠被阻止。还需要链间折叠使两个可变区在一起以形成功能性表位结合位点。接头方向和大小的实例参见,例如Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, 美国专利申请公开号2005/0100543、2005/0175606、2007/0014794, 以及PCT公开号W02006/020258和W02007/024715, 其每个的全部内容在此通过引用并入本文。

[0094] scFv可包含在其VL区和VH区之间具有至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50或更多个氨基酸残基的接头。接头序列可以包含任何天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,接头序列包含氨基酸甘氨酸和丝氨酸。在另一个实施方案中,接头序列包含多组甘氨酸和丝氨酸重复序列,例如(Gly₄Ser)_n, 其中n是等于或大于1的正整数(SEQ ID NO:131)。在一个实施方案中,接头可以是(Gly₄Ser)₄ (SEQ ID NO:132) 或(Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO:133)。在一些实施方案中,scFv包含与GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:108) 或GSTSGSGKPGSGEGSTKSGGGSGGG (SEQ ID NO:109) 的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的接头。在一些实施方案中,scFv包含含有SEQ ID NO:108或109的氨基酸序列的接头。

[0095] 可以使用常规的杂交瘤技术从免疫的转基因小鼠获得针对抗原(例如,BCMA)的抗体。转基因小鼠携带的人免疫球蛋白转基因在B细胞分化过程中重新排列,随后发生类别转换和体细胞突变。因此,使用这样的技术,有可能产生治疗上有用的IgG、IgA、IgM和IgE抗体,包括但不限于IgG1(γ1)和IgG3。对于用于产生人抗体和人单克隆抗体的这种技术以及用于生产这种抗体的方案的详细讨论,参见例如PCT公开号W02014/055771、W0 98/24893、W0 96/34096和W0 96/33735; 以及美国专利号5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318和5,939,598, 其每个的全部内容在此通过引用并入本文。“人源化”抗体保留与原始抗体相似的抗原特异性,即,在本发明中,结合例如BCMA的能力。

[0096] 在一些实施方案中,抗体(例如,用于制造BCMA结合域的抗体)是包含两条各自约25kDa的轻(L)链和两条各自约50kDa的重(H)链的四聚糖基化蛋白质。抗体中存在两种类型

的轻链,称为 λ 和 κ 。根据重链恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以分为五个主要类别:A、D、E、G和M,其中一些可以进一步分为亚类(亚型),例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。每条轻链通常包括N端可变(V)域(V_L)和恒定(C)域(C_L)。每条重链通常包括一个N端V域(V_H)、三个或四个C域(C_H1-3)和一个铰链区。最接近V_H的C_H域被指定为C_H1。V_H和V_L域由四个称为框架区(FR1、FR2、FR3和FR4)的相对保守序列的区域组成,它们形成三个高变序列区域(互补决定区,CDR)的支架。CDR包含负责抗体与抗原特异性相互作用的大部分残基。CDR被称为CDR1、CDR2和CDR3。因此,重链上的CDR成分称为CDRH1、CDRH2和CDRH3,而轻链上的CDR成分称为CDRL1、CDRL2和CDRL3。CDR通常指Kabat CDR,如Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Department of Health and Human Services(1991), eds.Kabat et al中所描述的。表征抗原结合位点的另一个标准是指如Chothia所描述的高变环。参见,例如,Chothia,D.et al.(1992) J.Mol.Biol.227:799-817;和Tomlinson et al.(1995) EMBO J.14:4628-4638。还有一个标准是Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用的AbM定义。一般参见,例如,Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains.In:Antibody Engineering Lab Manual (Ed.:Duebel,S,and Kontermann,R.,Springer-Verlag,Heidelberg)。关于Kabat CDR描述的实施方案可替代地使用关于Chothia高变环或关于AbM定义的环或这些方法中的任意组合的类似描述关系来实施。

[0097] 本文提供的CAR T细胞能够以比本领域已知的其他CAR T细胞(例如Ali等人(2016)在临床试验中使用的CAR T细胞,即SEQ ID:19的CAR)更高的亲和力和/或更有效地杀伤BCMA表达细胞(例如,骨髓瘤细胞)结合BCMA。在一些实施方案中,本文提供的抗BCMA结合域可以以比另一个抗BCMA结合域与BCMA(例如来自Ali等人(2016)的临床试验中使用的(即SEQ ID:19的)CAR的BCMA结合域)的亲和力高至少5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、160%、180%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、600%、700%、800%、900%或1,000%的亲和力结合BCMA。在一些实施方案中,本文提供的抗BCMA结合域,当包含于在T细胞上表达的CAR中时,可以以比另一抗BCMA CAR(例如Ali等人(2016)在临床试验中使用的(即SEQ ID:19的)CAR)更有效地(例如,效率提高至少5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、140%、160%、180%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%)杀伤癌细胞(例如,BCMA表达的骨髓瘤细胞)。下面提供了在抗BCMA结合域中使用的示例性CDR序列。与参考CDR序列(即,SEQ ID NO:1、4、7、10、12和16)不同的那些氨基酸残基用粗体和下划线表示。

CDRH1:

DYSIN (SEQ ID NO: 1); SYSIN (SEQ ID NO: 2); SYDIN (SEQ ID NO: 3)

CDRH2:

WINTETREPAYAYDFRG (SEQ ID NO: 4); WINTNTGNPTYAQGFTG (SEQ ID NO: 5);

WINTETREPAYAQGFTG (SEQ ID NO: 6)

CDRH3:

DYSYAMDY (SEQ ID NO: 7); DYTYGMDY (SEQ ID NO: 8); DYLYSLDF (SEQ ID NO:

9)

[0098]

CDRL1:

RASESVTILGSHLIH (SEQ ID NO: 10); RASESVSFLGINLIH (SEQ ID NO: 11)

CDRL2:

QLASNVQT (SEQ ID NO: 12); YLASNLET (SEQ ID NO: 13); YSASNLQS (SEQ ID NO:

14); NLASNVNT (SEQ ID NO: 15)

CDRL3:

LQSRTIPRT (SEQ ID NO: 16); LQSRTLPRT (SEQ ID NO: 17); LQSKNFPRT (SEQ ID

NO: 18)

[0099] 在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含选自SEQ ID NO:2、3、5、6、8、9、11、13、14、15、17和18中任一个的至少一个CDR序列(例如,至少2、3、4、5或6个CDR序列)。在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含SEQ ID NO:1-3中任一个的CDRH1氨基酸序列中的至少一个。在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含SEQ ID NO:4-6中任一个的CDRH2氨基酸序列中的至少一个。在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含SEQ ID NO:7-9中任一个的CDRH3氨基酸序列中的至少一个。在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含SEQ ID NO:10-11中任一个的CDRL1氨基酸序列中的至少一个。在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含SEQ ID NO:12-15中任一个的CDRL2氨基酸序列中的至少一个。在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含SEQ ID NO:16-18中任一个的CDRL3氨基酸序列中的至少一个。在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含SEQ ID NO:8或9的CDRH3。在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含SEQ ID NO:17或18的CDRL3。

[0100] 在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2或CDRL3或其组合,如表1中所示的任一scFv克隆所提供的。在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含表1中所示的任一scFv克隆的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3。本公开还包括编码包含如表1中所示的任一scFv克隆所提供的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2或CDRL3的分子的任何核酸序列。抗体重链和轻链CDR3域在抗体对抗原的结合特异性/亲和力中可能起特别重要的作用。因此,本公开的抗BCMA结合域可包含至少如表1所示的人抗体的重链和/或轻链CDR3。本公开的方面涉及结合BCMA蛋白(例如,肿瘤细胞上的BCMA蛋白)并且包含

六个互补决定区 (CDR) :CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3的抗BCMA结合域。

[0101]

新 scFv	亲本 框架 SEQ ID NO:	CDRH 1 SEQ ID NO:	CDRH 2 SEQ ID NO:	CDRH 3 SEQ ID NO:	CDRL 1 SEQ ID NO:	CDRL 2 SEQ ID NO:	CDRL 3 SEQ ID NO:
R1	48	1	4	7	10	12	16
Y32	57	1	4	7	10	12	16
Y37	60	1	4	7	10	12	16
1'	57	3*	4	7	10	12	16
4'	57	1	4	8*	10	12	16
8'	57	1	4	7	11*	14*	17*
9'	57	1	4	7	11*	14*	18*
10'	57	2*	6*	9*	10	12	16
11'	57	3*	5*	8*	10	12	16
12'	57	3*	4	9*	10	12	18*
13'	57	2*	6*	9*	11*	13*	17*
21'	57	1	4	7	10	15*	16
K'	60	2*	6*	9*	11*	14*	17*
R'	60	2*	6*	9*	11*	14*	17*
J'	60	2*	6*	9*	11*	14*	18*
L'	60	2*	6*	9*	11*	14*	18*
O'	60	1	4	8*	10	15*	17*
S'	60	1	4	8*	10	15*	17*

[0102] 表1-本文提供的CAR中使用的每个scFv的CDR序列 (CDRH 1-3和CDRL 1-3) 的组合。用于每个scFv的亲本框架区也由所示SEQ ID NO的亲本框架指示。每个CDR由它们的SEQ ID NO表示。那些标有“*”的SEQ ID NO与SEQ ID NO:1、4、7、10、12和16的参考CDR序列不同。

[0103] 在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含六个互补决定区 (CDR) :CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3。在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含以下CDR组中的任一个,其以CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3的顺序列出:

[0104] SEQ ID NO:3、4、7、10、12和16;

[0105] SEQ ID NO:1、4、8、10、12和16;

[0106] SEQ ID NO:1、4、7、11、14和17;

[0107] SEQ ID NO:1、4、7、11、14和18;

[0108] SEQ ID NO:2、6、9、10、12和16;

[0109] SEQ ID NO:3、5、8、10、12和16;

[0110] SEQ ID NO:3、4、9、10、12和18;

[0111] SEQ ID NO:2、6、9、11、13和17;

[0112] SEQ ID NO:1、4、7、10、15和16;

[0113] SEQ ID NO:2、6、9、11、14和17;

[0114] SEQ ID NO:2、6、9、11、14和18;

[0115] SEQ ID NO:1、4、8、10、15和17;和

[0116] SEQ ID NO:1、4、7、10、12和16。

[0117] 应当理解,本公开涵盖了本文提供的具有1、2或3个但不超过三个保守突变的任何CDR序列(例如,SEQ ID NO:1-18)。因此,在一些实施方案中,本文提供的任何CDR序列,即本文提供的CDH1、CDH2、CDH3、CDL1、CDL2或CDL3中的任一个,可包含1、2或3个保守突变。如本文所用,“保守氨基酸置换”是指不改变进行氨基酸置换的蛋白质的相对电荷或大小特征的氨基酸置换。变体可以根据本领域普通技术人员已知的改变多肽序列的方法来制备,例如在汇编这类方法的参考文献中发现的方法,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook,et al.,eds.,Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989,或Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel,et al.,eds.,John Wiley&Sons,Inc.,New York。氨基酸的保守置换包括在以下组内的氨基酸之间进行的置换:(a) M、I、L、V; (b) F、Y、W; (c) K、R、H; (d) A、G; (e) S、T; (f) Q、N; 和 (g) E、D。

[0118] 在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含重链可变域和/或轻链可变域。在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含与来自SEQ ID No:48-72中任一个的scFv的重链可变域框架序列或来自SEQ ID No:48-72中任一个的scFv的轻链可变域框架序列至少75% (例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%) 相同的重链可变域框架序列。在一些实施方案中,同源重链可变域框架序列和/或轻链可变域框架序列在本文提供的任何CDR序列内不变化。例如,在一些实施方案中,序列变异的程度(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)可发生在不包括本文提供的任何CDR序列的重链可变序列和/或轻链可变序列内。在下面提供的scFv氨基酸序列(SEQ ID NO:48-72)中,重链可变序列用粗体表示,轻链可变序列用斜体表示,接头序列用下划线表示。在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含由可变重链(VH)和可变轻链(VL)构成的单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,抗BCMA结合域包含SEQ ID NO:48-72中任一个的氨基酸序列。

[0119] 使用Karlin and Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-68,1990(在Karlin and Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-77,1993中进行改进)的算法确定两个氨基酸序列的“同一性百分比”。这种算法并入到Altschul,et al.J.Mol.Biol.215:403-10,1990的NBLAST和XBLAST程序(version 2.0)中。BLAST蛋白质搜索可以用XBLAST程序(得分=50,字长=3)进行,以获得与感兴趣的蛋白质分子同源的氨基酸序列。在两个序列之间存在空位的情况下,可以使用如Altschul et al.,Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402,1997所述的空位化BLAST。当使用BLAST和空位化BLAST程序时,可以使用各自程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。

scFv – R1

[0120]

DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVP
*ARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRITPRTFGGGTKLEIK**GSTSGSGKPGSGE*
GSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWM
GWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYA
MDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 48)

scFv – J1

DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPKLLIQLASNVQTGV
*PDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCLQSRITPRTFGGGTKVEIK**GSTSGSGKPGSGE*
GSTKGQIQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYSINWVRQAPGQGLEWM

GWINTETREPAYAYDFRGRVTMTRDTSASTAYLQISSLKAEDTAVYFCALDYSYA
MDYWGQGS�TVSS (SEQ ID NO: 49)

scFv – J2

DIVLTQSPASLAVSLGERATISCRASESVSILGSHLLHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLTGVPA
*RFSGSGSGTDFTLTISSLEAEDVAVYYCLQSRTPRTFGQGTKLEIK**GSTSGSGKPGSGEGS*
TKGQIQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYSINWVRQAPGQGLEWMGW
INTETREPAYAYDFRGRVTMTRDTSASTAYLQISSLKAEDTAVYFCALDYSYAMD
YWGQGS�TVSS (SEQ ID NO: 50)

scFv – J3

DIVLTQSPASLAVSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNVTGVPA
*RFSGSGSGTDFTLTISSLEAEDVAVYYCLQSRTPRTFGQGTKLEIK**GSTSGSGKPGSGEGS*
TKGQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYSINWVRQAPGQGLEWMG
WINTETREPAYAYDFRGRVTMTRDTSASTAYLQISSLKAEDTAVYFCALDYSYAM
DYWGQGS�TVSS (SEQ ID NO: 51)

[0121]

scFv – J4

DIVMTQSPDSLVSLSGERATINCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPKLLIQLASNVTGV
*PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCLQSRTPRTFGGGTKVEIK**GSTSGSGKPGSGE*
GSTKGQIQLVQSGAEVKKPGESVKISCKASGYTFTDYSINWVRQAPGQGLKWM
GWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLDTSASTAYLQISSLKAEDTAVYFCALDYSYAM
DYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 52)

scFv – J5

DIVLTQSPASLAVSLGERATISCRASESVSILGSHYLAWYQQKPGQPPKLLIYLASNLTGVPA
*RFSGSGSGTDFTLTISSLEAEDVAVYYCQQSRTPRTFGQGTKLEIK**GSTSGSGKPGSGEGS*
TKGQIQLVQSGAEVKKPGESVKISCKASGYTFTDYSINWVRQAPGQGLKWMGW
INTETREPAYAYDFRGRFAFSLDTSASTAYLQISSLKAEDTAVYFCALDYSYAMDY
WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 53)

scFv – Yi1

DIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVP
*ARFSGSGSGTDFTLTISSEVPDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIKG**STSGSGKPGSGEG*
STKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVKQAPGKGLEWVG
WINTETREPAYAYDFRGRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAM
DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 54)

scFv – Yi2

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVTILGSHLIHWYQQKPGKAPKLLIQLASNVQTGVP
*SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCLQSRTIPRTFGQG**GTKLEIKGSTSGSGKPGSGEG*
STKGQVQLVQSGGGLVQPGRSVKLSCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLEWVG
WINTETREPAYAYDFRGRFTISRDTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYSYAM
DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 55)

[0122]

scFv – Y31

DIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVP
*ARFSGSGSGTDFTLTISSEVPEDVAVYYCLQSRTIPRTFGQG**GTKVEIKGSTSGSGKPGSGEG*
STKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVKQAPGKGLEWVG
WINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAM
DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 56)

scFv – Y32

DIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVP
*ARFSGSGSGTDFTLTISSEVPEDVAVYYCLQSRTIPRTFGQG**GTKVEIKGSTSGSGKPGSGEG*
STKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLEWVG
WINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAM
DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 57)

scFv – Y33

DIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVP
*ARFSGSGSGTDFTLTSSVEPEDVAVYYCLQSRTIPRTFGQGTKVEIK**GSTSGSGKPGSGEG*
STKGQIQLVESGAIEVKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVKQAPGKGLEWVG
WINTETREPAYAYDFRGRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAM
DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 58)

scFv – Y34

DIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVP
*ARFSGSGSGTDFTLTSSVEPEDVAVYYCLQSRTIPRTFGQGTKVEIK**GSTSGSGKPGSGEG*
STKGQIQLVESGAIEVKKPGGSVKVSKKASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLEWVG
WINTETREPAYAYDFRGRFAISAETSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAM
DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 59)

[0123]

scFv – Y37

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPKLLIQLASNVQTGVP
*ARFSGSGSGTDFTLTSSVEPEDTANYYYCLQSRTIPRTFGQGTKVEIK**GSTSGSGKPGSGEG*
STKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCKASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLEWVG
WINTETREPAYAYDFTGRFTFSADTSKSMAYLQINSLRAEDTAVYYCALDYSYAM
DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 60)

scFv – CAS2 (C2)

DIVLTQSPASLAVSPGQRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPKLLIQLASNVQTGVP
*ARFSGSGSRTDFTLTSSLEPEDVAVYYCLQSRTIPRTFGQGTKVEIK**GSTSGSGKPGSGEG*
STKGQITLKESGPTLVKPTQTLTLSCKASGYTFTDYSINWVRRAPGKGLEWMG
WINTETREPAYAYDFRGRFVFSLDTSVSMAYLQISSLKAEDTAVYYCALDYSYAM
DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 61)

scFv – 1'

DIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVP
*ARFSGSGSGTDFTLTSSVEPEDVAVYYCLQSRTPRTFGQGTKVEIK**GSTSGSGKPGSGEG*
STKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTSYDINWVRQAPGKGLEWVG
WINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAM
DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 62)

scFv – 4'

DIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVP
*ARFSGSGSGTDFTLTSSVEPEDVAVYYCLQSRTPRTFGQGTKVEIK**GSTSGSGKPGSGEG*
STKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLEWVG
WINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDITYG
MDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 63)

[0124]

scFv – 8'

DIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVSFLGINLIHWYQQKPGQAPKLLIYSASNLQSGVPA
*RFSGSGSGTDFTLTSSVEPEDVAVYYCLQSRTPRTFGQGTKVEIK**GSTSGSGKPGSGEGS*
TKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLEWVGWI
NTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAMDY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 64)

scFv – 9'

DIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVSFLGINLIHWYQQKPGQAPKLLIYSASNLQSGVPA
*RFSGSGSGTDFTLTSSVEPEDVAVYYCLQSKNFPRTFGQGTKVEIK**GSTSGSGKPGSGEG*
STKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLEWVG
WINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAM
DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65)

scFv – 10'

DIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVP
*ARFSGSGSGTDFTLTSSVEPEDVAVYYCLQSRTPRTFGQGTKVEIK**GSTSGSGKPGSGEG*
STKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTSYSINWVRQAPGKGLEWVGW
INTETREPAYAQGFTGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYLYSLD
FWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 66)

scFv – 11'

DIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVP
*ARFSGSGSGTDFTLTSSVEPEDVAVYYCLQSRTPRTFGQGTKVEIK**GSTSGSGKPGSGEG*
STKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTSYDINWVRQAPGKGLEWVG
WINTNTGNPTYAQGFTGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYTYG
MDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 67)

scFv – 12'

[0125]

DIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVP
*ARFSGSGSGTDFTLTSSVEPEDVAVYYCLQSKNFPRTFGQGTKVEIK**GSTSGSGKPGSGE*
GSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTSYDINWVRQAPGKGLEWVG
WINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYLYSL
DFWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 68)

scFv – 13'

DIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVSFLGINLIHWYQQKPGQAPKLLIYLASNLETGVPA
*RFSGSGSGTDFTLTSSVEPEDVAVYYCLQSRTPRTFGQGTKVEIK**GSTSGSGKPGSGEGS*
TKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTSYSINWVRQAPGKGLEWVGWI
NTETREPAYAQGFTGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYLYSLDF
WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 69)

scFv – 21'

DIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLINLASNVNTGVP
*ARFSGSGSGTDFTLTSSVEPEDVAVYYCLQSRTPRTFGQGTKVEIK**GSTSGSGKPGSGEG*
STKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLEWVG

WINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAM

DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 70)

scFv – 2'

DIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVP

ARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDVAVYYCLQSRTLPRTFGQGTKVEIKGSGSGKPGSGEG

STKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLEWVG

WINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAM

[0126]

DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 71)

scFv – 3'

DIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVP

ARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDVAVYYCLQSRTLPRTFGQGTKVEIKGSGSGKPGSGEG

STKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGYTFTDYSINWVRQAPGKGLEWVG

WINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCALDYSYAM

DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 72)

[0127] 前导域

[0128] 在一些实施方案中，CAR设计为具有前导域（也称为“信号肽”），用于将翻译的嵌合蛋白引导至膜。在一些实施方案中，CAR包含位于CAR蛋白的氨基末端（N末端）处的前导序列。在一方面，CAR进一步包含位于胞外BCMA结合域的N末端处的前导序列，其中在细胞加工以及将CAR定位到细胞膜期间，前导序列任选地从BCMA结合域（例如，scFv）切割。前导域通常在15到30个氨基酸的范围中。前导域的实例包括CD8a前导（21个氨基酸）、CD33前导（17个氨基酸）、CD4前导（25个氨基酸）、IL-2R（CD25）前导（21个氨基酸）、胰蛋白酶原-2前导（15个氨基酸）、VEGFR1前导（26个氨基酸）、EGFR前导（24个氨基酸）、GMCSFR前导（22个氨基酸）、IgVL前导、IgVK前导或IgVH前导。在一些实施方案中，前导序列与本文提供的前导域中的任一个至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。在一些实施方案中，前导序列与MALPVTALLLPLALLLHAARP（SEQ ID NO:110）的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。在一些实施方案中，前导序列包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列。

[0129] 跨膜域和铰链域

[0130] 关于跨膜域，在各个实施方案中，CAR可以被设计为包含连接至CAR的胞外域的跨膜域。跨膜域可包含与跨膜区相邻的一个或多个额外的氨基酸，例如，与衍生跨膜的蛋白质的胞外区关联的一个或多个氨基酸（例如，胞外区域的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10至15个氨基酸）和/或与衍生跨膜蛋白的蛋白质的胞内区关联的一个或多个额外的氨基酸（例如，胞内区域的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10至15个氨基酸）。在一方面，跨膜域是与使用的CAR的其他域之一关联的跨膜域。在一些情况下，可以选择或通过氨基酸置换来修饰跨膜域以避免这种域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜域结合，例如以最小化与受体复合物的其他成员的相互

作用。在一方面,跨膜域能够与表达CAR的细胞(例如CAR T细胞)表面上的另一CAR同源二聚化。在一个不同的方面,跨膜域的氨基酸序列可以被修饰或置换,以最小化与存在于同一表达CAR的细胞(例如CAR T细胞)中的天然结合配偶体的结合域的相互作用。

[0131] 跨膜域可以源自天然来源或重组来源。如果来源是天然的,该域可以来自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。在一方面,只要CAR与靶标结合,跨膜域就能够向胞内域传导信号。本发明中特别使用的跨膜域可以至少包含例如T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8(例如、CD8 α 、CD8 β)、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154的跨膜区。在一些实施方案中,跨膜域可以至少包括共刺激分子(例如MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整联蛋白、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、激活NK细胞受体、BTLA、Toll配体受体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、Nkp80(KLRF1)、Nkp44、Nkp30、Nkp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a)的跨膜区以及与CD83特异性结合的配体。跨膜域可以使用本领域已知的或本文描述的任何方法(例如通过使用UniProt数据库)来识别。

[0132] 在一些实施方案中,跨膜域可以是合成的,在这种情况下,它将主要包含疏水残基,例如亮氨酸和缬氨酸。在一些实施方案中,在合成的跨膜域的每端会存在苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。任选地,短的寡肽或多肽接头(例如长度为2至10个氨基酸)可以在CAR的跨膜域和胞浆信号传导域之间形成连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供了示例性的合适接头。

[0133] 在一些实施方案中,本发明的CAR中的跨膜域是CD8跨膜域。用于此目的的CD8序列在PCT公开号W02014/055771中有教导,其通过引用并入本文。在一些实施方案中,CAR中的跨膜域是CD8 α 跨膜域。在一些实施方案中,跨膜域包含IYIWAPLAGTCGVLLSLVIT(SEQ ID NO 118)、IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRN(SEQ ID NO:120)的氨基酸序列或与其至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。应当理解,跨膜域的一部分可以是胞外的或胞质的,例如,在一些实施方案中,跨膜域包含含有LYCNHRN(SEQ ID NO:119)的氨基酸序列的胞质部分。

[0134] 在一些实施方案中,本发明的CAR中的跨膜域是CD28跨膜域。本领域技术人员将理解,完整的跨膜域或其部分与胞浆域或其部分一起实施。通常,使用的跨膜域和胞浆域是CD28序列的连续部分。在一些实施方案中,CD28跨膜域包含能够将包含该序列的CAR锚定到细胞膜的片段或其变体。

[0135] 在一些情况下,跨膜域通过铰链(例如来自人蛋白质的铰链)连接至CAR的胞外区,例如CAR的抗原结合域。例如,在一个实施方案中,铰链可以是人Ig(免疫球蛋白)铰链,例如IgG4铰链或CD8 α 铰链。在一个实施方案中,铰链或间隔区包含(例如,由以下组成)FVPVFLP

AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:117) 的氨基酸序列或与其至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一方面,跨膜域和铰链域包含(例如,由以下组成)FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO:111) 的氨基酸序列。

[0136] 胞浆域

[0137] 本公开的一些方面提供了具有胞浆域(也称为胞内域或胞内信号传导域)的CAR。本发明的CAR的胞浆域或胞浆区域包含胞内信号传导域。胞内信号传导域通常负责激活已引入CAR的免疫细胞的至少一种正常效应子功能。在一些实施方案中,CAR的胞浆域负责激活已引入CAR的免疫细胞的至少一种正常效应子功能。术语“效应子功能”是指细胞的特化功能。例如,T细胞的效应子功能可以是细胞溶解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。因此,术语“胞内信号传导域”是指转导效应子功能信号并指导细胞执行特化功能的蛋白质的部分。虽然通常可以使用整个胞内信号传导域,但在许多情况下没有必要使用整个域。就使用胞内信号传导域的截短部分而言,这种截短部分可以代替完整的域使用,只要它转导效应子功能信号。因此,术语胞内信号传导域旨在包括足以转导效应子功能信号的胞内信号传导域的任何截短部分。

[0138] 用于本发明的CAR的胞内信号传导域的实例包括T细胞受体(TCR)的胞浆序列和在抗原受体结合后协同作用以启动信号转导的共受体,以及这些序列的任何衍生物或变体,以及具有相同功能能力的任何重组序列。

[0139] 已知仅通过TCR产生的信号不足以完全激活T细胞并且还需要次级和/或共刺激信号。因此,可以说T细胞活化是由两类不同的胞浆信号传导序列介导的:通过TCR启动依赖抗原的初级活化的那些(初级胞内信号传导域),以及以不依赖抗原的方式起作用以提供次级或共刺激信号的那些(次级胞浆域,例如共刺激域)。

[0140] 初级信号传导域以刺激方式或抑制方式调节TCR复合物的初级活化。以刺激方式起作用的初级胞内信号传导域可以包含称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM的信号传导基序。

[0141] 包含本发明中特别使用的初级胞内信号传导域的ITAM的实例包括TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(也称为“ICOS”)、Fc ϵ .RI、DAP10、DAP12和CD66d的那些。在一个实施方案中,本发明的CAR包含胞内信号传导域,例如CD3 ζ 的初级信号传导域。下面提供了示例性的CD3 ζ 信号传导域。

[0142] 在一个实施方案中,初级信号传导域包含修饰的ITAM域,例如,与天然ITAM域相比具有改变的(例如,增加的或减少的)活性的突变的ITAM域。在一个实施方案中,初级信号传导域包含修饰的含有ITAM的初级胞内信号传导域,例如优化的和/或截短的含有ITAM的初级胞内信号传导域。在一个实施方案中,初级信号传导域包含一个、两个、三个、四个或更多个ITAM基序。含有初级胞内信号传导域的分子的其他实例包括DAP10、DAP12和CD32的那些。

[0143] CAR的胞内信号传导域可包含初级信号传导域自身,例如CD3- ζ 信号传导域,或可与在本发明的CAR的上下文中有用的任何其他所需的胞内信号传导域组合。例如,CAR的胞内信号传导域可包含初级信号传导域(例如CD3 ζ 链部分)和一个或多个共刺激信号传导域。共刺激信号传导域是指包含共刺激分子的胞内域的CAR的一部分。共刺激分子是淋巴细胞对抗原起到有效反应所需的并非抗原受体的细胞表面分子或其配体。此类分子的实例包括

MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整联蛋白、信号传导淋巴细胞激活分子(SLAM蛋白)、激活NK细胞受体、BTLA、Toll配体受体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、4-1BB (CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS (CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、Nkp80 (KLRF1)、Nkp44、Nkp30、Nkp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、和与CD83特异性结合的配体等。例如,CD27共刺激已被证明可增强体外人类CAR T细胞的扩增、效应子功能和存活,并增强体内人类T细胞的持久性和抗肿瘤活性(Song et al. Blood. 2012; 119 (3): 696-706)。本发明的CAR的胞浆部分内的胞内信号传导序列可以以随机或特定顺序彼此连接。任选地,短寡肽或多肽接头(例如长度为2至10个氨基酸(例如,2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸))可以在胞内信号传导序列之间形成连接。在一个实施方案中,甘氨酸-丝氨酸双联体可用作合适的接头。在一个实施方案中,单个氨基酸,例如丙氨酸、甘氨酸,可以用作合适的接头。

[0144] 在一方面,胞内信号传导域被设计为包含两个或更多个例如2、3、4、5个或更多个共刺激信号传导域。下面提供了示例性的共刺激域。在一个实施方案中,两个或更多个例如2、3、4、5或更多个共刺激信号传导域被接头分子例如本文所述的接头分子隔开。在一个实施方案中,胞内信号传导域包含两个共刺激信号传导域。在一些实施方案中,接头分子是甘氨酸残基。在一些实施方案中,接头是丙氨酸残基。

[0145] 示例性CD3 ζ 信号域:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKPNPQE

[0146] GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
R (SEQ ID NO: 107)

[0147] 示例性共刺激域:

CD28

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 100)

41BB

[0148] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 101)

OX40

RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO: 102)

[0149] 示例性的信号传导域和共刺激域的组合

[0150] CD28-CD3 ζ

- RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQG
- [0151] QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 103)
- [0152] 41BB-CD3ζ
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ
- [0153] GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 104)
- [0154] OX40-CD3ζ
RRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY
- [0155] NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 105)
- [0156] 41BB-OX40-CD3ζ
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRRDQRLPPDAHKKPPG
GGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
- [0157] DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY
QGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 106)

[0158] CAR的胞浆域可以被设计为包含CD3-ζ信号传导域自身或与在本发明的CAR的背景中有用的任何其他所需的胞浆域(例如4-1BB域,CD28域和/或OX40域)组合。例如,CAR的胞浆域可以包含CD3ζ链部分和共刺激信号传导区。共刺激信号传导区是指包含共刺激分子的胞内域的CAR的一部分。因此,虽然本发明主要以4-1BB、CD28和OX40作为共刺激或信号传导元件来举例说明,但其他额外的共刺激或信号传导元件也在本发明的范围内。本文提供了共刺激域和胞内域的示例性序列。其他示例性4-1BB共刺激域在美国专利公开US20050113564中进行描述,其通过引用并入本文。

[0159] 在一些实施方案中,本文提供的任何CAR包含CD3ζ信号传导域。在一些实施方案中,CD3ζ域源自人。在一些实施方案中,CD3ζ域包含与SEQ ID NO:107的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,CD3ζ域包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列。

[0160] 在一些实施方案中,本文提供的任何CAR包含一个或多个(例如,2、3、4或5个)共刺激域。在一些实施方案中,本文提供的任何CAR包含CD28、41BB和/或OX40共刺激域。在一些实施方案中,共刺激域源自人。在一些实施方案中,CAR包含SEQ ID NO:100-102中任一个或与其至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的其任何变体的一个或多个氨基酸序列。应当理解,CAR的胞浆域可以包含信号传导域和/或胞浆域的任何组合。例如,胞浆域可以包含任何以下示例性域的组合:CD28-CD3ζ;41BB-CD3ζ;OX40-CD3ζ;或41BB-OX40-CD3ζ。在一些实施方案中,CAR的胞浆域包含SEQ ID NO:103-106中任一个或与其至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的其任何变体的

氨基酸序列。

[0161] 示例性全长CAR

[0162] 如本文所提供的,本公开考虑了包含抗BCMA结合域(例如,如本文所述的人或人源化BCMA结合域)、跨膜域和胞浆域的CAR_x。应当理解,本文提供的任何CAR可以使用本文描述的域或肽的任何组合来产生,例如CAR可以包含本文提供的任何抗BCMA结合域、跨膜域、胞浆域、信号肽或铰链区。下面提供了示例性的CAR及其变体。

[0163] CAR-R1

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIH
WYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSR
TIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASG
YTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQI
[0164] NNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSTVTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPT
IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQG
QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 19)

[0165] CAR-K'

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSFLGINLIHW
YQQKPGQPPKLLIYSASNLQSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDTANYCYCLQSRTL
PRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCKASGY
TFTSYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAQGFTGRFTFSADTSKSMAYLQIN

[0166] SLRAEDTAVYYCALDYLYSLDFWGQGTTLTVTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIA
SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR
VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
R (SEQ ID NO: 20)

[0167] CAR-R'

- MALPVTALLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSFLGINLIHW
YQQKPGQPPKLLIYSASNLSQSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSEVEDTANYCYCLQSRRL
PRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCKASGY
TFTSYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAQGFTGRFTFSADTSKSMAYLQIN
[0168] SLRAEDTAVYYCALDYLSLDFWGQGTTLTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIA
SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNK
RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG
QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 21)
- [0169] CAR-J'
MALPVTALLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSFLGINLIHW
YQQKPGQPPKLLIYSASNLSQSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSEVEDTANYCYCLQSKNF
PRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCKASGY
TFTSYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAQGFTGRFTFSADTSKSMAYLQIN
[0170] SLRAEDTAVYYCALDYLSLDFWGQGTTLTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIA
SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR
VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
R (SEQ ID NO: 22)
- [0171] CAR-L'
MALPVTALLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSFLGINLIHW
YQQKPGQPPKLLIYSASNLSQSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSEVEDTANYCYCLQSKNF
PRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCKASGY
TFTSYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAQGFTGRFTFSADTSKSMAYLQIN
[0172] SLRAEDTAVYYCALDYLSLDFWGQGTTLTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIA
SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNK
RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG
QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 23)

- [0173] CAR-O'
MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVTILGSHLIHW
YQQKPGQPPKLLINLASNVNTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDTANYCYCLQSRTL
PRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCKASGY
TFTDYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAYDFTGRFTFSADTSKSMAYLQIN
- [0174] SLRAEDTAVYYCALDYTYGMDYWGGTLVTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTI
ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
R (SEQ ID NO: 24)
- [0175] CAR-S'
MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVTILGSHLIHW
YQQKPGQPPKLLINLASNVNTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDTANYCYCLQSRTL
PRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCKASGY
TFTDYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAYDFTGRFTFSADTSKSMAYLQIN
- [0176] SLRAEDTAVYYCALDYTYGMDYWGGTLVTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTI
ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ
GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 25)
- [0177] CAR-II

- MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVTILGSHLIHW
YQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSEVEDVAVYYCLQSRTI
PRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGY
TFTDYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMN
[0178] SLRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGTTLTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTI
ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
R (SEQ ID NO: 26)
- [0179] CAR-10dU
MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPSSLSASVGDRATISCRASESVTILGSHLIHW
YQQKPGQAPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSEVEDVAVYYCLQSRTI
PRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCAASGY
TFTDYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAYDFRGRFTFSADTSKSTAYLQMN
[0180] SLRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGTTLTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTI
ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
R (SEQ ID NO: 27)
- [0181] CAR-17'
MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVTILGSHLIHW
YQQKPGQPPKLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSEVEDTANYYYCLQSRTI
PRTFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGGSVKISCKASGY
TFTDYSINWVRQAPGKGLEWVGWINTETREPAYAYDFTGRFTFSADTSKSMAYLQIN
[0182] SLRAEDTAVYYCALDYSYAMDYWGQGTTLTVSSFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTI
ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
R (SEQ ID NO: 28)

[0183] 在一些实施方案中,CAR的全长氨基酸序列与SEQ ID NO:19-28中任一个或本文提供的任何CAR中所述的氨基酸序列的任一个至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%相同。在一些实施方案中,CAR包含与SEQ ID NO:19-28或本文提供的任何融合蛋白中所述的任一氨基酸序列相比具有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、21个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个或更多个突变的氨基酸序列。在一些实施方案中,CAR包含与SEQ ID NO:19-28或本文提供的任何融合蛋白中所述的任一氨基酸序列相比具有至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少35个、至少40个、至少45个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少110个、至少120个、至少130个、至少140个、至少150个、至少160个、至少170个、至少200个、至少300个、至少400个或至少500个相同的连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0184] 核酸和载体

[0185] 在一些实施方案中,本发明包括编码CAR(例如,本文提供的任何CAR)的核酸分子(例如,DNA或RNA)。在一些实施方案中,核酸分子是DNA。在一些实施方案中,核酸分子是RNA。在一些实施方案中,核酸分子包含CAR的序列,其中该序列包含编码抗原结合域(例如抗BCMA结合域)的核酸序列,该抗原结合域与编码胞外域、跨膜域和胞内域的一个或多个的核酸序列可操作地连接。在一些实施方案中,核酸分子编码具有选自以下示例性、非限制性排列之一的排列的CAR:

[0186] [抗原结合域]-[跨膜域]-[胞浆域];

[0187] [抗原结合域]-[铰链区]-[跨膜域]-[胞浆域];

[0188] [信号肽]-[抗原结合域]-[跨膜域]-[胞浆域];或

[0189] [信号肽]-[抗原结合域]-[铰链区]-[跨膜域]-[胞浆域];

[0190] 在一些实施方案中,CAR的核酸序列包含具有选自以下示例性、非限制性排列之一的排列的胞浆域:

[0191] [CD3 ζ];

[0192] [CD28]-[CD3 ζ];

[0193] [41BB]-[CD3 ζ];

[0194] [OX40]-[CD3 ζ];或

[0195] [41BB]-[OX40]-[CD3 ζ]

[0196] 在一些实施方案中,上述示例性、非限制性排列从左到右为CAR的N-末端到C-末端。在一些实施方案中,“-”的每个实例表示存在任意的间隔序列。

[0197] 应当理解,本文提供的任何核酸分子可以编码或包括其他特征,例如5'非翻译区(5'UTR)、3'非翻译区(3'UTR)、多腺嘌呤尾(polyA)、7-甲基鸟苷帽(m⁷G)、内部核糖体进入位点(IRES)和/或开放阅读框。在一些实施方案中,本公开提供具有以下特征排列的RNA或其编码DNA:

[0198] 5'-[5'UTR]-[CAR]-3'

[0199] 5'-[m⁷G帽]-[5'UTR]-[CAR]-3'

[0200] 5' - [m⁷G帽] - [5'UTR] - [CAR] - [polyA] - 3'

[0201] 5' - [CAR] - [3'UTR] - [polyA] - 3'

[0202] 5' - [5'UTR] - [CAR] - [3'UTR] - 3'

[0203] 5' - [5'UTR] - [CAR] - [3'UTR] - [polyA] - 3'

[0204] 5' - [m⁷G帽] - [5'UTR] - [CAR] - [3'UTR] - [PolyA] - 3'

[0205] 在一些实施方案中,所提供的核酸包括具有促进稳定性和/或翻译效率的能力的化学结构。在一些实施方案中, RNA优选地具有5'和3'UTR。在一个实施方案中, 5'UTR的长度为1至3000个核苷酸。要添加至编码区的5'和3'UTR序列的长度可以通过不同的方法(包括,但不限于,设计对UTR的不同区域进行退火的PCR引物)来改变。使用这种方法,本领域普通技术人员可以修改所需的5'和3'UTR长度,以在转染转录的RNA后实现最佳翻译效率。

[0206] 在一些实施方案中, 5'和3'UTR可以是感兴趣的核酸的天然存在的内源性5'和3'UTR。或者,对感兴趣的核酸而言不是内源性的UTR序列可以通过将UTR序列并入正向和反向引物或通过模板的任何其他修饰来添加。使用对感兴趣的核酸而言不是内源性的UTR序列可用于改变RNA的稳定性和/或翻译效率。例如,众所周知, 3'UTR序列中富含AU的元件会降低mRNA的稳定性。因此,基于本领域公知的UTR的特性,可以选择或设计3'UTR以增加转录的RNA的稳定性。

[0207] 在一个实施方案中, 5'UTR可以包含内源性核酸的Kozak序列。或者,当如上所述通过PCR添加对感兴趣的核酸而言不是内源性的5'UTR时,可以通过添加5'UTR序列来重新设计共有的Kozak序列。Kozak序列可以提高某些RNA转录本的翻译效率,但似乎并不是所有RNA实现高效翻译所需要的。许多mRNA对Kozak序列的要求是本领域已知的。在其他实施方案中, 5'UTR可以是其RNA基因组在细胞中是稳定的RNA病毒的5'UTR。在其他实施方案中,各种核苷酸类似物可在3'或5'UTR中使用以阻止核酸外切酶对mRNA的降解。

[0208] 在一些实施方案中,本公开提供了特别用于在细胞(例如, T细胞)中表达CAR的5'和/或3'UTR。在一些实施方案中, 5'UTR是来自Yi1、IgG、CD8、Myo、CD3、AFP、肌动蛋白、IFNG、ACTBL2、合成序列或其变体的5'UTR。在一些实施方案中, 5'UTR来自人或小鼠。下面提供了示例性的5'UTR序列。在一些实施方案中, 5'UTR包含与SEQ ID NO:73-82中任一所述的任一核酸序列至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%相同的核酸序列。在一些实施方案中, 5'UTR包含与SEQ ID NO:71-82中所述的任一核酸序列相比具有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个或更多个突变的核酸序列。在一些实施方案中, 5'UTR包含与SEQ ID NO:71-82中所述的任一核酸序列相比具有至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少35个、至少40个、至少45个或至少50个相同的连续核苷酸的核酸序列。

[0209] 5'UTR-Yi1

- GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCCTCGCAGTTCGGCGGTCCCGCGGGTCTGTCTGTT
- [0210] GCTTCAACAGTGTTTGGACGGAACAGATCCGGGGACTCTCTTCCAGCC (SEQ ID NO: 73)
- [0211] 5'UTR-IgG
AGACCCAAGCTGGCTAGCTCTAAAGAAGCCCCTGGGAGCACAGCTCATCACC
- [0212] (SEQ ID NO: 74)
- [0213] 5'UTR-CD8
AGACCCAAGCTGGCTAGCAGCTCCTCACCCACCCAGCCGCGACTGTCTCCGCCG
- [0214] AGCCCCCGGGGCCAGGTGTCCCGGGCGCGCCCCG (SEQ ID NO: 75)
- [0215] 5'UTR-Myo
GTGGAACACTTCTGAACCTGCATTTTATCTGGAAGTCCAGAAGCAGAATCCTTTG
- [0216] CTAAATAAATCGCAGCC (SEQ ID NO: 76)
- [0217] 5'UTR-CD3
AGAGAAGCAGACATCTTCTAGTTCCTCCCCACTCTCCTCTTTCCGGTACCTGTGA
- [0218] GTCAGCTAGGGGAGGGCAGCTCTCACCCAGGCTGATAGTTCGGTGACCTGGCTTT
ATCTACTGGATGAGTTCCGCTGGGAG (SEQ ID NO: 77)
- [0219] 5'UTR-AFP
AGACCCAAGCTGGCTAGCATATTGTGCTTCCACCACTGCCAATAACAAAATAACTA
- [0220] GCAACC (SEQ ID NO: 78)
- [0221] 5'UTR-R1合成序列
AAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC (SEQ ID NO:
- [0222] 79)
- [0223] 5'UTR-肌动蛋白
CGCGTCCGCCCCGCGAGCACAGAGCCTCGCCTTTGCCGATCCGCCGCCCGTCCAC
- [0224] ACCCGCCGCCAGCTCACC (SEQ ID NO: 80)
- [0225] 5'UTR-IFNG
CACATTGTTCTGATCATCTGAAGATCAGCTATTAGAAGAGAAAGATCAGTTAAGTC
- [0226] CTTTGGACCTGATCAGCTTGATAACAAGAACTACTGATTTCAACTTCTTTGGCTTAAT
TCTCTCGGAAACG (SEQ ID NO: 81)
- [0227] 5'UTR-ACTBL2

GTGTCTGAAAGCATTCTGGAGTGTTTTAGGCCTGTTCACTTTCTCTTACTCACTGT

[0228] CTATTCACCTGTCCTGTTCACTCGTCTGGAAGATCTCAGCCAGCACC (SEQ ID NO: 82)

[0229] 在一些实施方案中,本公开提供了特别用于在细胞(例如,T细胞)中表达CAR的3' UTR。在一些实施方案中,3' UTR是来自人β珠蛋白、IgG、肌动蛋白、AFP、CD3、IFNG、Myo、FoxP3、GAPDH、GATA3、H2AFV、RORC、SOC2、小鼠α珠蛋白、GATA3或其变体的3' UTR。在一些实施方案中,3' UTR来自人或小鼠。下面提供了示例性的3' UTR序列。在一些实施方案中,3' UTR包含与SEQ ID NO:83-99中任一个所述的任一核酸序列至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%相同的核酸序列。在一些实施方案中,3' UTR包含与SEQ ID NO:83-99中所述的任一核酸序列相比具有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、21个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个或更多个突变的核酸序列。在一些实施方案中,3' UTR包含与SEQ ID NO:83-99中所述的任一核酸序列相比具有至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少35个、至少40个、至少45个或至少50个相同的连续核苷酸的核酸序列。

[0230] 3'UTR-人β珠蛋白

GGGCCCCGTTTAAACCCGCTGGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTT

[0231] CTTTGTTCCGTAAGTCCAATACTAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCA
TCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGC (SEQ ID NO: 83)

[0232] 3'UTR-IgG

TGAGTGCGACGGCCGGCAAGCCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTCGCACGAGG

[0233] ATGCTTGGCACGTACCCCGTGTACATACTTCCCGGGCGCCCAGCATGGAAATAAAG
CACCCAGCGCTGCCCTGGGCCCCTGCG (SEQ ID NO: 84)

[0234] 3'UTR-肌动蛋白

- GCGGACTATGACTTAGTTGCGTTACACCCTTTCTTGACAAAACCTAACTTGCGCAG
AAAACAAGATGAGATTGGCATGGCTTTATTTGTTTTTTTTGTTTTGTTTTGGTTTTT
TTTTTTTTTTGGCTTGACTCAGGATTTAAAACTGGAACGGTGAAGGTGACAGCA
GTCGGTTGGAGCGAGCATCCCCAAAGTTCTCAATGTGGCCGAGGACTTTGATTG
CACATTGTTGTTTTTTTAATAGTCATTCCAAATATGAGATGCGTTGTTACAGGAAGT
[0235] CCCTTGCCATCCTAAAAGCCACCCCACTTCTCTCTAAGGAGAATGGCCCAGTCCTC
TCCCAAGTCCACACAGGGGAGGTGATAGCATTGCTTTCGTGTAAATTATGTAATGC
AAAATTTTTTTAATCTTCGCCTTAATACTTTTTTATTTTGTTTTATTTTGAATGATGAG
CCTTCGTGCCCCCCTTCCCCCTTTTTTGTCCCCAACTTGAGATGTATGAAGGCTT
TTGGTCTCCCTGGGAGTGGGTGGAGGCAGCCAGGGCTTACCTGTACACTGACTTG
AGACCAGTTGAATAAAAGTGCACACCTT (SEQ ID NO: 85)
- [0236] 3'UTR-AFP
ATTACTTCAGGGGAAGAGATGACAAAACGAGTCTTTCATTCGGTGTGAACTTTTCT
CTTTAATTTTAACTGATTTAACACTTTTTGTGAATTAATGAAATGATAAAGACTTTTA
- [0237] TGTGAGATTTTCCTTATCACAGAAATAAAATATCTCCAAATGTTTCCTTTTC (SEQ ID
NO: 86)
- [0238] 3'UTR-CD3
ACCTGAGACTGGTGGCTTCTAGAAGCAGCCATTACCAACTGTACCTTCCCTTCTTG
- [0239] CTCAGCCAATAAATATATCCTCTTTCACTCAG (SEQ ID NO: 87)
- [0240] 3'UTR-IFNG

- TGGTTGTCCTGCCTGCAATATTTGAATTTTAAATCTAAATCTATTTATTAATATTTAAC
ATTATTTATATGGGGAATATATTTTTAGACTCATCAATCAAATAAGTATTTATAATAGC
AACTTTTGTGTAATGAAAATGAATATCTATTAATATATGTATTATTTATAATTCCTATAT
CCTGTGACTGTCTCACTTAATCCTTTGTTTTCTGACTAATTAGGCAAGGCTATGTGA
TTACAAGGCTTTATCTCAGGGGCCAACTAGGCAGCCAACCTAAGCAAGATCCCAT
[0241] GGGTTGTGTGTTTATTTCACTTGATGATACAATGAACACTTATAAGTGAAGTGATAC
TATCCAGTTACTGCCGGTTTGAAAATATGCCTGCAATCTGAGCCAGTGCTTTAATG
GCATGTCAGACAGAACTTGAATGTGTCAGGTGACCCTGATGAAAACATAGCATCT
CAGGAGATTTCATGCCTGGTGCTTCCAAATATTGTTGACAACTGTGACTGTACCCA
AATGGAAAGTAACTCATTTGTAAATTTATCAATATCTAATATATATGAATAAAGTGT
AAGTTCACAAC (SEQ ID NO: 88)
[0242] 3'UTR-Myo
ACACACCTGCCTGATGCTATCAAGAGGCTGAAGAAAGCGCCAAATGTGCTATTTTT
[0243] TGGTCACTTGCTTTATGACGTTTATTTTCCTGTAAAGCTGAATAAATAAAAACTAC
AGTAAATGTA (SEQ ID NO: 89)
[0244] 3'UTR-FoxP3

- CCTCAAGATCAAGGAAAGGAGGATGGACGAACAGGGGCCAACTGGTGGGAGG
CAGAGGTGGTGGGGGCAGGGATGATAGGCCCTGGATGTGCCCACAGGGACCAAG
AAGTGAGGTTTCCACTGTCTTGCCTGCCAGGGCCCCTGTTCCCCCGCTGGCAGCC
ACCCCCTCCCCATCATATCCTTTGCCCCAAGGCTGCTCAGAGGGGGCCCCGGTCCT
GGCCCCAGCCCCACCTCCGCCCCAGACACACCCCCCAGTCGAGCCCTGCAGCC
AAACAGAGCCTTCACAACCAGCCACACAGAGCCTGCCTCAGCTGCTCGCACAGA
TTACTTCAGGGCTGGAAAAGTCACACAGACACACAAAATGTCACAATCCTGTCCC
TCACTCAACACAAACCCCCAAAACACAGAGAGCCTGCCTCAGTACACTCAAACAA
[0245] CCTCAAAGCTGCATCATCACACAATCACACACAAGCACAGCCCTGACAACCCACA
CACCCCAAGGCACGCACCCACAGCCAGCCTCAGGGCCCACAGGGGGCACTGTCAA
CACAGGGGTGTGCCCAGAGGCCTACACAGAAGCAGCGTCAGTACCCTCAGGATC
TGAGGTCCCAACACGTGCTCGCTCACACACACGGCCTGTTAGAATTCACCTGTGT
ATCTCACGCATATGCACACGCACAGCCCCCAGTGGGTCTCTTGAGTCCCGTGCA
GACACACACAGCCACACACACTGCCTTGCCAAAAATACCCCGTGTCTCCCCTGCC
ACTCACCTCACTCCCATTCCCTGAGCCCTGATCCATGCCTCAGCTTAGACTGCAGA
GGAATACTCATTTATTTGGGATCCAAGGCCCCCAACCCACAGTACCGTCCCCAAT
AAACTGCAGCCGAGCTCCCCAC (SEQ ID NO: 90)
- [0246] 3'UTR-GAPDH
GAAGTCTGTTCTCTGTCCTCCCTGTGCAGGGTATCCTGTAGGGTGACCTGGAATTCG
- [0247] AATTCTGTTTCCCTTGTAATAATTTGTCTGTCTCTTTTTT (SEQ ID NO: 91)
- [0248] 3'UTR-GATA3 (ORF序列)
CTATGAAGAAGGAAGGCATCCAGACCAGAAACCGAAAAATGTCTAGCAAATCCA
AAAAGTGCAAAAAGTGCATGACTCACTGGAGGACTTCCCCAAGAACAGCTCGT
- [0249] TTAACCCGGCCGCCCTCTCCAGACACATGTCCTCCCTGAGCCACATCTCGCCCTTC
AGCCACTCCAGCCACATGCTGACCACGCCCACGCCGATGCACCCGCCATCCAGC
(SEQ ID NO: 92)
- [0250] 3'UTR-H2AFV

[0251]

AGGGATGCTTTAACCAACCCTCTTCCTCCCCGTCATTGTACTGTAACCTGGGACAGA
AGAAATAATGGGGATATGTGGAATTTTTAACAAACAGTTAAATGGAAAAGCATAGAC
AATTACTGTAGACATGATAAAAGAAACATTTGTATGTTCTTAGACTCGAAGTTTGAT
AAAAGTACCTTTTCATGTGGTGACAGTTGTGTGTTGATTGGCTAGGTTTCTCCCGT
GTGTTTTATACAAAAATGGAATTGATAAACCATTTTTTACAAAATTAATTTGTCTCA
AAACTGTTCTGTTTCATGATGTATTAGAAATATTTTACTCAGACTTTAAATATTTTAAA
TCTCAGATTGGTTATTCAGAGTAACCTTAGAACAGAAATTGGGAATATATCTTTACA
ATGATTGATACCATGGTATATTGACTCTTAGATGCTATTGATCTGTAGCACCATTTTT
TACAAACGACTAAGGAAAAAACCTGCCAATTAAATCATGATATGCCATCAATTATG
AGACATCCCAATTTGAGAGATGTTAGATTATAGAAAAGTATGCATTTATGACTGAA
ATGGTAGTGGAATTATTTGAATTCTACACCAAGCACTTACCATGTGCCAGGCCCTTT
GCAGAGTGCTCTACTGACCAAGAAAGTTGTTGCTGCCACATTATAGATGTGGAGC
CTAAGGGTCACAGAAATTGTGTGCTATGCCAAAAAACATTGAACTGGTAGATAGA
AAATGACAGAGCTAGGATTCAAACCTAGATCTGGCTGACTCCAGAGCCTAGTTTTTA
CCTGGAATTGATGTTTCAGTTTATCAAAGGTTTCTCCTTTTGGTTTAAATCCCAATT
TTTGGCCTGGCATTGTGGTTTACGCCTGTAATCCCAACAC (SEQ ID NO: 93)

[0252]

3'UTR-RORC

CCTGGAAGAGGGACTCCTTGCCTCTCCCTATGGCCTGCTGGCCCACCTCCCTGGA
CCCCGTTCCACCCTCACCCTTTTCCTTTCCCATGAACCCTGGAGGGTGGTCCCCAC
CAGCTCTTTGGAAGTGAGCAGATGCTGCGGCTGGCTTTCTGTCAGCAGGCCGGCC
TGGCAGTGGGACAATCGCCAGAGGGTGGGGCTGGCAGAACACCATCTCCAGCCT
CAGCTTTGACCTGTCTCATTTCCCATATTCCTTCACACCCAGCTTCTGGAAGGCATG

[0253]

GGGTGGCTGGGATTTAAGGACTTCTGGGGGACCAAGACATCCTCAAGAAAACAG
GGGCATCCAGGGCTCCCTGGATGAATAGAATGCAATTCATTCAGAAGCTCAGAAG
CTAAGAATAAGCCTTTGAAATACCTCATTGCATTTCCCTTTGGGCTTCGGCTTGGG
GAGATGGATCAAGCTCAGAGACTGGCAGTGAGAGCCCAGAAGGACCTGTATAAA
ATGAATCTGGAGCTTTACATTTTCTGCCTCTGCCTTCCTCCCAGCTCAGCAAGGAA
GTATTTGGGCACCCTACCCTTTACCT (SEQ ID NO: 94)

[0254]

3'UTR-SOD2

- ACCACGATCGTTATGCTGATCATACCCTAATGATCCCAGCAAGATAATGTCCTGTCC
TCTAAGATGTGCATCAAGCCTGGTACATACTGAAAACCCTATAAGGTCCTGGATAA
[0255] TTTTGTGTTGATTATTCATTGAAGAAACATTTATTTTCCAATTGTGTGAAGTTTTTGA
CTGTTAATAAAAGAATCTGTCAACCATCAAAGAGGTCTGCATTATGCTTGCATGTC
AAAAACTTTAAAAATCCTATAATCTTC (SEQ ID NO: 95)
- [0256] 3'UTR-小鼠 α 珠蛋白
GCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCT
- [0257] TCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCT
AG (SEQ ID NO: 96)
- [0258] 3'UTR-GATA3 (全长)
GCCCTGCTCGATGCTCACAGGGCCCCCAGCGAGAGTCCCTGCAGTCCCTTTTCGAC
- [0259] TTGCATTTTTGCAGGAGCAGTATCATGAAGCCTAAACGCGATGGATATATGTTTTTG

[0260]

AAGGCAGAAAGCAAAATTATGTTTGCCACTTTGCAAAGGAGCTCACTGTGGTGTC
TGTGTTCCAACCACTGAATCTGGACCCCATCTGTGAATAAGCCATTCTGACTCATAT
CCCCTATTTAACAGGGTCTCTAGTGCTGTGAAAAAAAAAATGCTGAACATTGCATA
TAACTTATATTGTAAGAAATACTGTACAATGACTTTATTGCATCTGGGTAGCTGTAA
GGCATGAAGGATGCCAAGAAGTTTAAGGAATATGGGAGAAATAGTGTGGAAATTA
AGAAGAAACTAGGTCTGATATTCAAATGGACAAACTGCCAGTTTTGTTTCCTTTCA
CTGGCCACAGTTGTTTGATGCATTAAAAGAAAATAAAAAAAAAAGAAAAAGAGAA
AAGAAAAAAAAAGAAAAAGTTGTAGGCGAATCATTGTTCAAAGCTGTTGGCC
TCTGCAAAGGAAATACCAGTTCTGGGCAATCAGTGTTACCGTTCACCAGTTGCCG
TTGAGGGTTTCAGAGAGCCTTTTTCTAGGCCTACATGCTTTGTGAACAAGTCCCTG
TAATTGTTGTTTGTATGTATAATTCAAAGCACCAAAATAAGAAAAGATGTAGATTTA
TTTCATCATATTATACAGACCGAACTGTTGTATAAATTTATTTACTGCTAGTCTTAAG
AACTGCTTTCTTTTCGTTTGTGTTTCAATATTTTCCTTCTCTCTCAATTTTGGTTG
AATAAACTAGATTACATTCAGTTGGCCTAAGGTGGTTGTGCTCGGAGGGTTTCTTG
TTTCTTTTCCATTTTGTGTTTTGGATGATATTTATTAATAGCTTCTAAGAGTCCGGCG
GCATCTGTCTTGTCCCTATTCCTGCAGCCTGTGCTGAGGGTAGCAGTGTATGAGCT
ACCAGCGTGCATGTCAGCGACCCTGGCCCGACAGGCCACGTCCTGCAATCGGCCC
GGCTGCCTCTTCGCCCTGTCGTGTTCTGTGTTAGTGATCACTGCCTTTAATACAGTC
TGTTGGAATAATATTATAAGCATAATAATAAAGTGAAAATATTTTAAACTACAA
(SEQ ID NO: 97)

[0261]

3'UTR-GATA3 (前半)

GCCCTGCTCGATGCTCACAGGGCCCCCAGCGAGAGTCCCTGCAGTCCCTTTTCGAC
TTGCATTTTTGCAGGAGCAGTATCATGAAGCCTAAACGCGATGGATATATGTTTTTG

[0262]

AAGGCAGAAAGCAAAATTATGTTTGCCACTTTGCAAAGGAGCTCACTGTGGTGTC
TGTGTTCCAACCACTGAATCTGGACCCCATCTGTGAATAAGCCATTCTGACTCATAT

[0263] CCCCTATTTAACAGGGTCTCTAGTGCTGTGAAAAAAAAAATGCTGAACATTGCATA
TAACTTATATTGTAAGAAATACTGTACAATGACTTTATTGCATCTGGGTAGCTGTAA
GGCATGAAGGATGCCAAGAAGTTTAAGGAATATGGGAGAAATAGTGTGGAAATTA
AGAAGAAACTAGGTCTGATATTCAAATGGACAAACTGCCAGTTTTGTTTCCTTTCA
CTGGCCACAGTTGTTTGATGCATTAAAAGAAAATAAAAAAAGAAAAAAGAGAA
AAGAAAAAAAAGAAAAAA (SEQ ID NO: 98)

[0264] 3'UTR-GATA3 (后半)
GTTGTAGGCGAATCATTGTTCAAAGCTGTTGGCCTCTGCAAAGGAAATACCAGTT
CTGGGCAATCAGTGTTACCGTTCACCAGTTGCCGTTGAGGGTTTCAGAGAGCCTT
TTTCTAGGCCTACATGCTTTGTGAACAAGTCCCTGTAATTGTTGTTTGTATGTATAAT
TCAAAGCACCAAAATAAGAAAAGATGTAGATTTATTTTCATCATATTATACAGACCG
AACTGTTGTATAAATTTATTTACTGCTAGTCTTAAGAACTGCTTTCTTTCGTTTGTTT
GTTTCAATATTTTCCTTCTCTCAATTTTGGTTGAATAAACTAGATTACATTCACT
TGGCCTAAGGTGGTTGTGCTCGGAGGGTTTCTTGTTTCTTTTCCATTTTGTTTTTGG
ATGATATTTATTAAATAGCTTCTAAGAGTCCGGCGGCATCTGTCTTGTCCCTATTCTT
GCAGCCTGTGCTGAGGGTAGCAGTGTATGAGCTACCAGCGTGCATGTCAGCGACC
CTGGCCCGACAGGCCACGTCCTGCAATCGGCCCGGCTGCCTCTTCGCCCTGTCGT
GTTCTGTGTTAGTGATCACTGCCTTTAATACAGTCTGTTGGAATAATATTATAAGCAT
AATAATAAAGTGAAAATATTTTAAACTACAA (SEQ ID NO: 99)

[0265]

[0266] 在一些实施方案中,本公开提供了核酸序列,每个核酸序列编码本文提供的一种或多种CAR。编码这种CAR的示例性核酸序列在SEQ ID NO:29-47中提供。然而,应当理解,还考虑了本文提供的序列的变体。在一些实施方案中,CAR由与SEQ ID NO:29-47中任一个所述的任一核酸序列至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%相同的核酸序列编码。在一些实施方案中,CAR由与SEQ ID NO:29-47中所述的任一核酸序列相比具有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、21个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个或更多个突变(例如、至少50个、100个、200个、300个、400个、500个或600个)的核酸序列编码。在一些实施方案中,编码CAR的核酸序列包含与SEQ ID NO:29-47中所述的任一核酸序列相比具有至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少35个、至少40个、至少45个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少110个、至少120个、至少130个、至少140个、至少150个、至少

160个、至少170个、至少200个、至少300个、至少400个、至少500个、至少600个、至少700个、至少800个、至少900个、至少1000个、至少1100个、至少1200个、至少1300、至少1400个、至少1500个、至少1600个或至少1700个相同的连续核苷酸的核酸序列。

[0267] 在一些实施方案中,本公开提供了核酸序列,每个核酸序列编码本文提供的一个或多个开放阅读框(ORF)。SEQ ID NO:112-116、122和123中提供了编码这种ORF的示例性核酸序列。然而,应当理解,还考虑了本文提供的ORF序列的变体。在一些实施方案中,ORF由与SEQ ID NO:112-116、122和123中任一所述的任一核酸序列至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%相同的核酸序列编码。在一些实施方案中,ORF由与SEQ ID NO:112-116、122和123中所述的任一核酸序列相比具有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、21个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个或更多个突变(例如、至少50个、100个、200个、300个、400个、500个或600个)的核酸序列编码。在一个实施方案中,编码ORF的核酸序列包含与SEQ ID NO:112-116、122和123中所述的任一核酸序列相比具有具有至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少35个、至少40个、至少45个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少110个、至少120个、至少130个、至少140个、至少150个、至少160个、至少170个、至少200个、至少300个、至少400个、至少500个、至少600个、至少700个、至少800个、至少900个、至少1000个、至少1100个、至少1200个、至少1300、至少1400个、至少1500个、至少1600个或至少1700个相同的连续核苷酸的核酸序列。

[0268] 为了能够在不需要基因克隆的情况下从DNA模板合成RNA,转录的启动子应该连接到DNA模板的待转录序列的上游。当用作RNA聚合酶的启动子的序列添加到正向引物的5'端时,RNA聚合酶启动子被整合到PCR产物中的待转录开放阅读框的上游。在一个优选的实施方案中,启动子是T7聚合酶启动子,如本文其他地方所述。其他有用的启动子包括但不限于T3和SP6 RNA聚合酶启动子。T7、T3和SP6启动子的共有核苷酸序列是本领域已知的。

[0269] 在一个优选的实施方案中,mRNA具有在5'端的帽和3'polyA尾,其决定核糖体结合、翻译启动和mRNA在细胞中的稳定性。

[0270] 将polyA/T延伸段整合到DNA模板中的常规方法是分子克隆。然而,整合到质粒DNA中的polyA/T序列会导致质粒不稳定,这就是为什么从细菌细胞获得的质粒DNA模板经常受到缺失和其他畸变的严重污染。这使得克隆程序不仅费力费时,而且往往不可靠。这就是为什么非常需要一种在不进行克隆的情况下实现构建具有polyA/T 3'延伸段的DNA模板的方法。

[0271] 转录的DNA模板的polyA/T区段可以在PCR过程中通过使用含有polyT尾例如100T尾(大小可以是50-500T)的反向引物产生,或在PCR后通过任何其他方法(包括,但不限于,酶促加成、DNA连接或体外重组)产生。polyA尾还为RNA提供稳定性并减少其降解。通常,polyA尾的长度与转录的RNA的稳定性呈正相关。在一个实施方案中,多腺嘌呤尾是100至5000个腺嘌呤。在一些实施方案中,polyA尾是至少150个腺嘌呤(例如,至少150个、180个或200个腺嘌呤)。在一些实施方案中,polyA尾为100至200个、100至300个、100至400个、100至500个、100至600个、100至700个、100至800个、100至900个、100至1000个、200至300个、200

至400个、200至500个、200至600个、200至700个、200至800个、200至900个、200至1000个、300至400个、300至500个、300至600个、300至700个、300至800个、300至900个、300至1000个、400至500个、400至600个、400至700个、400至800个、400至900个、400至1000个、500至600个、500至700个、500至800个、500至900个、500至1000个、600至700个、600至800个、600至900个、600至1000个、700至800个、700至900个、700至1000个、800至900个、800至1000个、或900至1000个腺嘌呤。

[0272] RNA的polyA尾可以在体外转录后使用polyA聚合酶诸如大肠杆菌polyA聚合酶(E-PAP)进一步延伸。此外,将不同的化学基团连接至3'端可以增加mRNA的稳定性。这种连接可以包含修饰的/人工的核苷酸、适体和其他化合物。例如,可以使用polyA聚合酶将ATP类似物并入polyA尾。ATP类似物可以进一步增加RNA的稳定性。

[0273] 5'帽也为RNA分子提供稳定性。在一个优选的实施方案中,通过本文公开的方法产生的RNA包括5'帽。使用本领域已知的和本文描述的技术(Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005))提供5'帽。

[0274] 本文提供的RNA还可以包含内部核糖体进入位点(IRES)序列。IRES序列可以是任何病毒的序列、染色体的序列或人工设计的序列,其启动不依赖帽的核糖体与mRNA的结合并促进翻译的启动。任何适用于细胞电穿孔的溶质都可以包括在内,这些溶质可以包含促进细胞渗透性和存活的因素,例如糖、肽、脂类、蛋白质、抗氧化剂和表面活性剂。

[0275] 编码所需的分子(例如,CAR)的核酸序列可以使用本领域已知的重组方法(例如通过来自于表达该基因的细胞的筛选文库,通过从已知包含该基因的载体衍生该基因,或通过使用标准技术直接从包含该基因的细胞和组织中分离)来获得。或者,感兴趣的基因可以合成产生,而不是克隆产生。示例性的载体包括,但不限于,并入本文提供的任何核酸的粘粒、质粒(例如,裸露的或包含在脂质体中)、逆转录转座子(例如piggyback、睡美人)和病毒(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0276] 本发明还提供了其中插入了本发明的DNA的载体。源自逆转录病毒诸如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因长期稳定的整合及其在子细胞中的繁殖。慢病毒载体比源自癌逆转录病毒(例如鼠白血病病毒)的载体具有额外的优势,因为它们可以转导非增殖细胞,例如肝细胞。它们还具有低免疫原性的额外优势。在另一个实施方案中,所需的CAR可以通过转座子的方式在细胞中表达。在另一个实施方案中,所需的CAR可以通过同源介导重组的方式在细胞中表达。

[0277] 载体可以适合于复制和整合到真核生物中。典型的克隆载体包含转录和翻译终止子、启动序列和用于调节所需核酸序列的表达的启动子。本发明的表达构建体还可使用标准基因递送方案用于核酸免疫和基因治疗。基因递送的方法是本领域已知的。参见,例如,美国专利号5,399,346、5,580,859、5,589,466,其全部内容通过引用并入本文。在另一实施方案中,本发明提供了基因治疗载体。可以将核酸克隆到多种类型的载体中。例如,可以将核酸克隆到载体中,所述载体包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特别感兴趣的载体包括表达载体、复制载体、探针生成载体和测序载体。

[0278] 此外,表达载体可以以病毒载体的形式提供给细胞。病毒载体技术是本领域公知的,并且例如在Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold

Spring Harbor Laboratory, New York) 中以及其他病毒学和分子生物学手册中进行描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。一般而言,合适的载体包含在至少一种生物体中有功能的复制起点、启动子序列、方便的限制性核酸内切酶位点和一种或多种可选择标记物(例如,WO 01/96584;WO 01/29058;和美国专利号6,326,193)。

[0279] 已经开发了许多基于病毒的系统以用于将基因转移到哺乳动物细胞中。例如,逆转录病毒为基因递送系统提供了一个方便的平台。可以使用本领域已知的技术将选定的基因插入到载体中并包装在逆转录病毒颗粒中。然后可以分离重组病毒并将其递送至受试者体内或离体的细胞。许多逆转录病毒系统是本领域已知的。在一些实施方案中,使用逆转录病毒载体。许多逆转录病毒载体是本领域已知的。在一些实施例中,使用慢病毒载体。

[0280] 额外的启动子元件例如增强子调节转录起始的频率。通常,这些位于起始位点上游30-110bp的区域中,尽管许多启动子最近已经证明也包含在起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔通常是灵活的,因此当元件相对于彼此颠倒或移动时,启动子功能得以保留。在胸苷激酶(tk)启动子中,在活性开始下降之前,启动子元件之间的间隔可以增加至50bp。根据启动子,个体元件似乎可以协同或独立地激活转录。

[0281] 合适的启动子的一个实例是即刻早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是强组成型启动子序列,能够驱动与其可操作连接的任何多核苷酸序列的高水平表达。合适的启动子的另一个实例是延伸因子-1a(EF-1a)。然而,也可以使用其他组成型启动子序列,包括但不限于猿病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)长端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、爱泼斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒即刻早期启动子、鲁斯氏(Rous)肉瘤病毒启动子、以及人类基因启动子例如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。此外,本发明不应限于使用组成型启动子。诱导型启动子也被考虑作为本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了一种分子开关,当需要这种表达时,所述分子开关能够开启与其可操作连接的多核苷酸序列的表达,或者当不需要表达时,所述分子开关关闭表达。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白(metallothionein)启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。在一些实施方案中,启动子是EF-1a启动子。

[0282] 为了评估CAR多肽或其部分的表达,要引入到细胞中的表达载体也可以含有可选择标记物基因或报告基因或两者,以促进从寻求通过病毒载体进行转染或感染的细胞群中识别和选择表达细胞。在其他方面,可选择标记物可携带在单独的DNA片段上并用于共转染程序中。可选择标记物和报告基因的侧翼可以具有适当的调控序列以能够在宿主细胞中表达。有用的可选择标记物包括例如抗生素抗性基因,例如neo等。报告基因用于识别潜在转染的细胞并用于评估调控序列的功能。一般而言,报告基因是不存在于接受者生物体或组织中或不由接受者生物体或组织表达的基因,并且该基因编码其表达通过一些易于检测的特性(例如酶活性、抗生素抗性 or 荧光)来证明的多肽。在将DNA引入接受者细胞后,在合适的时间测定报告基因的表达。合适的报告基因可以包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌的碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白基因的基因(例如,Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479:79-82)。合适的表达系统是众所周知的并且可以使用已知技术制备或商购获得。一般而言,显示出报告基因的最高表达水平的具有最小5'侧翼区域的构建体被

识别为启动子。这种启动子区域可与报告基因连接并用于评估剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0283] 将基因导入细胞中并在其中表达的方法是本领域已知的。在表达载体的情况下，可以通过本领域的任何方法将载体容易地引入宿主细胞，例如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫的细胞。例如，表达载体可以通过物理、化学或生物手段转移到宿主细胞中。在一些实施方案中，宿主细胞是T细胞。用于将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括电穿孔、机械膜破裂（例如，细胞挤压或基于纳米颗粒的递送）、磷酸钙沉淀、脂质转染、颗粒轰击、显微注射等。生产包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域公知的。参见，例如，Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。将多核苷酸引入宿主细胞的优选方法是电穿孔。

[0284] 将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体，尤其是逆转录病毒载体，已成为最广泛使用的将基因插入哺乳动物细胞例如人类细胞的方法。其他病毒载体可以源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺相关病毒等。参见，例如，美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0285] 用于将多核苷酸引入宿主细胞的化学方法包括胶体分散系统（例如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠）和基于脂质的系统（包括水包油乳剂、微束、混合微束和脂质体）。用作体外和体内递送载体的示例性胶体系统是脂质体（例如，人工膜囊泡）。

[0286] 在使用非病毒递送系统的情况下，示例性的递送载体是脂质体。考虑使用脂质制剂将核酸引入宿主细胞（体外、离体或体内）。在另一方面，核酸可以与脂质关联。与脂质关联的核酸可以被包裹在脂质体的水性内部，散布在脂质体的脂质双层内，通过与脂质体和寡核苷酸关联的连接分子连接到脂质体，包裹在脂质体中，与脂质体复合，分散在含有脂质的溶液中，与脂质混合，与脂质结合，作为悬浮液包含在脂质中，包含在胶束中或与胶束复合，或以其他方式与脂质关联。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体关联的组合物不限于溶液中的任何特定结构。例如，它们可能以双层结构、作为胶束或“倒塌的”结构存在。它们也可以只是散布在溶液中，可能形成大小或形状不均匀的聚集体。脂质是脂肪物质，可以是天然存在的或合成的脂质。例如，脂质包括天然存在于细胞质中的脂肪液滴以及含有长链脂肪烃及其衍生物的化合物类别，例如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛。

[0287] 适用的脂质可以从商业来源获得。例如，二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱（“DMPC”）可以从Sigma, St. Louis, MO获得；二鲸蜡醇磷酸酯（“DCP”）可以从K&K Laboratories (Plainview, NY) 获得；胆固醇（“Choi”）可以从Calbiochem-Behring获得；二肉豆蔻酰磷脂酰甘油（“DMPG”）和其他脂质可以从Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL) 获得。脂质在氯仿或氯仿/甲醇中的储备溶液可在约-20℃下储存。氯仿被用作唯一的溶剂，因为它比甲醇更容易蒸发。“脂质体”是一个通用术语，包括通过产生封闭的脂质双层或聚集体而形成的各种单层和多层脂质载体。脂质体的特征在于具有囊泡结构，该结构具有磷脂双层膜和内部水性介质。多层脂质体具有多个被水性介质隔开的脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时，它们会自发形成。脂质组分在形成封闭结构之前进行自我重排，并在脂质双层之间包裹水和溶解的溶质 (Ghosh et al., 1991 *Glycobiology* 5:505-10)。然而，也包括在溶液中具有与正常泡状结构不同的结构的组合物。例如，脂质可以呈现胶束结构或仅作为脂质分子的不均匀聚集体存在。还考虑了脂质体 (lipofectamine) - 核酸复合物。

[0288] 不管用于将外源核酸引入宿主细胞或以其他方式将细胞暴露于本发明的抑制剂的方法如何,为了确认宿主细胞中重组DNA序列的存在,可以实施多种测定。此类测定包括例如本领域技术人员熟知的“分子生物学”测定,例如Southern和Northern印迹、RT-PCR和PCR;“生化”测定,例如检测特定肽的存在或不存在,例如通过免疫学手段(ELISA和Western印迹)或通过本文所述的测定,以识别落入本发明范围内的剂。

[0289] RNA转染

[0290] 在一些实施方案中,本发明的修饰的T细胞通过引入RNA(例如,包含编码如本文所述的CAR的序列的mRNA)来修饰。在一些实施方案中,体外转录的RNA CAR可以以瞬时转染的形式引入细胞。RNA是使用聚合酶链反应(PCR)生成的模板通过体外转录产生的。任何来源的感兴趣的DNA都可以通过PCR直接转化为模板,从而使用适当的引物和RNA聚合酶进行体外mRNA合成。DNA的来源可以是例如基因组DNA、质粒DNA、噬菌体DNA、cDNA、合成DNA序列或任何其他合适的DNA来源。体外转录所需的模板是本发明的CAR。

[0291] 可以使用多种不同方法中的任一种将RNA引入靶细胞,例如市售方法,包括但不限于电穿孔(**Amaxa® Nucleofector-II®** (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.))、或**Gene Pulser II®** (BioRad, Denver, Colo.), **Multiporator®** (Eppendorf, Hamburg Germany)、机械膜破坏(例如细胞挤压,参见美国专利公开号2014/287509A1),阳离子脂质体介导的使用脂质转染的转染、聚合物封装、肽介导的转染或biolistic颗粒递送系统诸如“基因枪”(参见例如Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12 (8):861-70 (2001))。

[0292] 本文公开了用于产生体外转录的RNA CAR的方法。本发明还包括可以直接转染到细胞中的编码CAR的RNA构建体。产生用于转染的mRNA的方法可以涉及用专门设计的引物体外转录(IVT)模板,然后添加多腺嘌呤,以产生包含3'和5'非翻译序列(“UTR”)、5'帽和/或内部核糖体进入位点(IRES)、待表达的核酸和多腺嘌呤尾(长度通常为50-400个、50-2000个碱基或150-400个碱基或150-2000个碱基)的构建体。这样产生的RNA可以有效地转染不同种类的细胞。在一方面,模板包括CAR的序列。

[0293] 在一方面,抗BCMA CAR由信使RNA(mRNA)编码。在一方面,将编码抗BCMA CAR的mRNA引入免疫效应子细胞,例如T细胞或NK细胞,以产生表达CAR的细胞(例如,CAR T细胞或表达CAR的NK细胞)。

[0294] 在一个实施方案中,体外转录的RNA CAR可以以瞬时转染的形式引入细胞。RNA是使用聚合酶链反应(PCR)生成的模板通过体外转录产生的。任何来源的感兴趣的DNA都可以通过PCR直接转化为模板,从而使用适当的引物和RNA聚合酶进行体外mRNA合成。DNA的来源可以是例如基因组DNA、质粒DNA、噬菌体DNA、cDNA、合成DNA序列或任何其他合适的DNA来源。体外转录所需的模板是本发明的CAR。例如,RNA CAR的模板包含:含有抗肿瘤抗体的单链可变域的胞外区、铰链区、跨膜域(例如,CD8a的跨膜域)、和包括胞内信号传导域(例如,包括CD3ζ的信号传导域和/或CD28、41BB和/或OX40的信号传导域)的胞浆区。

[0295] 在一个实施方案中,待用于PCR的DNA包含开放阅读框。DNA可以来自生物体的基因组的天然存在的DNA序列。在一个实施方案中,核酸可包括部分或全部的5'和/或3'非翻译区(UTR),例如本文提供的任何非翻译区。核酸可以包括外显子和内含子。在一个实施方案

中,待用于PCR的DNA是人核酸序列。在另一个实施方案中,待用于PCR的DNA是包括5'和3' UTR的人核酸序列。或者,DNA可以是在天然存在的生物体中通常不表达的人工DNA序列。示例性人工DNA序列是包含连接在一起以形成编码融合蛋白的开放阅读框的基因的部分的序列。连接在一起的DNA的部分可以来自单个生物体或来自多于一个生物体。

[0296] PCR用于产生用于转染的mRNA的体外转录的模板。进行PCR的方法是本领域公知的。用于PCR的引物被设计为具有与待用作PCR的模板的DNA的区域基本互补的区域。如本文所用,“基本互补”是指其中引物序列中的大部分或所有碱基是互补的、或者一个或多个碱基是非互补的或错配的核苷酸序列。基本互补的序列能够在用于PCR的退火条件下与预期的DNA靶标退火或杂交。引物可以设计成与DNA模板的任何部分基本互补。例如,引物可以设计为扩增通常在细胞中转录的核酸的部分(开放阅读框),包括5'和3'UTR。引物还可以设计为扩增编码特定感兴趣域的核酸的部分。在一个实施方案中,引物被设计为扩增人cDNA的编码区,包括5'和3'UTR的全部或部分。用于PCR的引物可通过本领域公知的合成方法产生。“正向引物”是包含与DNA模板上的核苷酸基本互补的在待扩增DNA序列上游的核苷酸区域的引物。“上游”在本文中用于指相对于编码链在待扩增的DNA序列的位置5'。“反向引物”是包含与双链DNA模板基本互补的在待扩增DNA序列下游的核苷酸区域的引物。“下游”在本文中用于指相对于编码链的在待扩增的DNA序列的位置3'。

[0297] 可用于PCR的任何高保真DNA聚合酶可用于本文公开的方法中。试剂和聚合酶可从许多来源商购获得。

[0298] 转基因免疫细胞

[0299] 在一些实施方案中,使用逆转录病毒或慢病毒载体将CAR序列(例如,编码如本文所述的CAR的核酸序列)递送到细胞(例如,T细胞、干细胞或NK细胞)中。表达CAR的逆转录病毒和慢病毒载体可以使用转导的细胞作为载体或无细胞局部或全身递送封装载体、结合载体或裸载体被递送到不同类型的真核细胞以及组织和整个生物体中。所使用的方法可用于需要稳定表达或稳定表达就足够的任何目的。

[0300] 在另一个实施方案中,所需的CAR可以通过转座子的方式在细胞(例如,T细胞或NK细胞)中表达。

[0301] 所公开的方法可以应用于在癌症、干细胞、急性和慢性感染和自身免疫疾病领域的基础研究和治疗中调节免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞)活性,包括评估遗传修饰的T细胞或NK细胞杀伤/死靶细胞例如靶癌细胞的能力。载体使单独调节表达水平成为可能。例如,改变相同细胞中多个嵌合受体上不同的胞内效应子/共刺激分子域,可以确定受体组合的结构,从而评估针对多抗原靶标的最高细胞毒性水平,同时评估针对正常细胞的最低细胞毒性。

[0302] 细胞的克隆不是必需的,因为用慢病毒载体或癌逆转录病毒载体转导CAR的效率,其可以稳定且均匀地修饰整个淋巴细胞群。

[0303] 免疫细胞的来源

[0304] 在对本发明的免疫细胞(例如,T细胞)进行扩增和遗传修饰之前,从受试者获得免疫细胞(例如,T细胞)的来源。免疫细胞(例如,T细胞)可以从多种来源(包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤)获得。免疫细胞(例如,T细胞)也可以由经诱导的多能干细胞或造血干细胞或祖细胞产生。

在本发明的一些实施方案中,可以使用本领域可获得的任何数量的免疫细胞系,包括但不限于T细胞和NK细胞系。在本发明的一些实施方案中,免疫细胞(例如,T细胞)可以使用本领域技术人员已知的任何数量的技术例如Ficoll™分离从收集自受试者的一单位血液获得。在一些实施方案中,来自个体的循环血液的细胞通过单采术获得。单采术产物通常包含淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、NK细胞、其他有核白血细胞、红细胞和血小板。在一些实施方案中,可以洗涤通过单采术收集的细胞以去除血浆部分并将细胞置于合适的缓冲液或培养基中以用于后续处理步骤。在本发明的一些实施方案中,细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。在可选的实施方案中,洗涤溶液缺乏钙并且可能缺乏镁或可能缺乏许多(如果不是全部的话)二价阳离子。同样,令人惊讶的是,在没有钙的情况下的初始活化步骤会导致放大的活化。本领域普通技术人员将容易理解,洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法完成,例如根据制造商的说明通过使用半自动“流通式”离心机(例如,Cobe®2991细胞处理机、Baxter®CytoMate®或者Haemonetics®Cell Saver 5®)。洗涤后,可将细胞重悬于多种生物相容性缓冲液,例如无Ca²⁺、无Mg²⁺的PBS,PlasmaLyte A或其他含或不含缓冲液的盐水溶液。或者,可以去除单采术样本中不需要的组分,并将细胞直接重悬于培养基中。

[0305] 在另一个实施方案中,免疫细胞(例如,T细胞)通过裂解红细胞并消耗单核细胞(例如,通过PERCOLL™梯度的离心或通过逆流离心淘析)从外周血淋巴细胞中分离。特定的T细胞亚群,例如CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和CD45RO⁺T细胞,可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离。例如,在一些实施方案中,T细胞通过与抗-CD3/抗-CD28(即3x28)缀合的珠例如DYNABEADS®M-450CD3/CD28 T一起孵育足以阳性选择所需的T细胞的时间段来分离。在一些实施方案中,该时间段是约30分钟。在进一步的实施方案中,时间段的范围是从30分钟到36小时或更长,以及它们之间的所有整数值。在另一个实施方案中,该时间段是至少1、2、3、4、5或6小时。在又一优选实施方案中,该时间段为10至24小时。在一个优选实施方案中,孵育时间段为24小时。为了从白血病患者中分离T细胞,使用更长的孵育时间例如24小时可以增加细胞产量。在与其他细胞类型相比T细胞很少的任何情况下,如在从肿瘤组织或从免疫受损的个体中分离肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的情况下,可使用更长的孵育时间来分离T细胞。此外,使用更长的孵育时间可以提高捕获CD8⁺T细胞的效率。因此,仅通过缩短或延长允许T细胞与CD3/CD28珠结合的时间和/或通过增加或减少珠与T细胞的比率(如本文进一步描述的),可以在培养起始或该过程中的其他时间点处优先正向或者负向选择T细胞亚群。此外,通过增加或减少珠或其他表面上抗CD3和/或抗CD28抗体的比率,可以在培养起始或在其他所需时间点处优先正向或者负向选择T细胞亚群。技术人员将意识到,在本发明的上下文中也可以使用多轮选择。在某些实施方案中,可能需要执行选择程序并在激活和扩增过程中使用“未选择的”细胞。“未选择”的细胞也可以进行进一步的多轮选择。

[0306] 通过负选择富集T细胞群可以利用针对负选择细胞特有的表面标记物的抗体的组合来完成。一种方法是通过使用针对存在于负选择的细胞上的细胞表面标记物的单克隆抗体的混合物的负磁性免疫细胞粘连或流式细胞术进行细胞分选和/或选择。例如,为了通过负选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些实施方案中,可能需要富集或正选择通常表达CD4⁺、CD25⁺、CD62L^{hi}、GITR⁺

和FoxP3⁺的调节性T细胞。

[0307] 或者,在某些实施方案中,T调节细胞被抗C25结合的珠或其他类似的选择方法耗尽。

[0308] 为了通过正选择或负选择分离所需的细胞群,可以改变细胞和表面(例如,诸如珠的颗粒)的浓度。在某些实施方案中,可能需要显著减少珠和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞的浓度),以确保细胞和珠的最大接触。例如,在一些实施方案中,使用20亿个细胞/ml的浓度。在另一些实施方案中,使用10亿个细胞/ml的浓度。在另一个实施方案中,使用大于1亿个细胞/ml。在另一个实施方案中,使用1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在又一个实施方案中,使用7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在进一步的实施方案中,可以使用1.25或1.5亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可提高细胞产量、细胞活化和细胞扩增。此外,使用高细胞浓度可以更有效地捕获可能弱表达感兴趣的目标抗原的细胞,例如CD28阴性T细胞,或来自存在许多肿瘤细胞的样本(例如白血病血液、肿瘤组织等)的细胞。这样的细胞群可能具有治疗价值并且需要获得。例如,使用高浓度的细胞可以更有效地选择通常具有较弱的CD28表达的CD8⁺T细胞。

[0309] 在相关的实施方案中,可能需要使用较低浓度的细胞。通过显著稀释T细胞和表面的混合物(例如,诸如珠的颗粒),颗粒和细胞之间的相互作用被最小化。这将选择表达大量待与颗粒结合的所需抗原的细胞。例如,在稀释浓度下,与CD8⁺T细胞相比,CD4⁺T细胞表达更高水平的CD28,并且更有效地被捕获。在一些实施方案中,所使用的细胞浓度为 5×10^6 /ml。在其他实施方案中,所使用的浓度可为约 1×10^5 /ml至 1×10^6 /ml,以及介于两者之间的任何整数值。

[0310] 在其他实施方案中,细胞可以在旋转器上以不同的速度在2-10℃或室温下孵育不同的时间长度。

[0311] 用于刺激的T细胞也可以在洗涤步骤后进行冷冻。不希望受到理论的束缚,冷冻和随后的解冻步骤通过去除细胞群中的粒细胞和一定程度上的单核细胞来提供更均匀的产物。在去除血浆和血小板的洗涤步骤之后,可以将细胞悬浮在冷冻溶液中。虽然许多冷冻溶液和参数是本领域已知的并且在这方面有用,但一种方法涉及使用含有20%DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或含有10%葡聚糖(Dextran) 40和5%葡萄糖(Dextrose)、20%人血清白蛋白和7.5%DMSO的培养基,或含有31.25%Plasmalyte-A、31.25%葡萄糖(Dextrose) 5%、0.45%NaCl、10%葡聚糖(Dextran) 40和5%葡萄糖(Dextrose)、20%人血清白蛋白和7.5%DMSO的培养基,或包含例如Hespan和PlasmaLyte A的其他合适的细胞冷冻培养基,然后将细胞以每分钟1°的速度冷冻至-80℃,并储存在液氮储罐的气相中。可以使用受控冷冻以及立即在-20℃或液氮中进行非受控冷冻的其他方法。在某些实施方案中,冷冻保存的细胞如本文所述进行解冻和洗涤,并且在使用本发明的方法活化之前允许在室温下静置一小时。

[0312] 在本发明的上下文中还考虑了在可能需要如本文所述的扩增细胞之前的时间段从受试者收集血液样本或单采术产物。因此,可以在任何必要的时间点收集待扩增细胞的来源,分离所需的细胞例如T细胞,并进行冷冻,以便以后用于T细胞疗法,从而用于将受益于T细胞疗法的任何数量的疾病或病症,例如本文所述的那些。在一些实施方案中,血液样本或单采术样取自一般健康的受试者。在某些实施方案中,血液样本或单采术样取自处于

具有发展成疾病的风险但尚未发展成疾病的一般健康的受试者,并且分离感兴趣的细胞并进行冷冻以备后用。在某些实施方案中,T细胞可以被扩增、冷冻并在以后使用。在某些实施方案中,在诊断出如本文所述的特定疾病后不久但在任何治疗之前从患者收集样本。在进一步的实施方案中,在任何数量的相关治疗方式(包括但不限于用诸如那他珠单抗、依法珠单抗、抗病毒剂、化疗、辐射、免疫抑制剂例如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、麦考酚酯和FK506、抗体或其他免疫消融剂例如**CAMPATH®**、抗CD3抗体、环磷酰胺、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228和照射进行治疗)之前,从受试者的血液样本或单采术样中分离细胞。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶钙调磷酸酶(环孢菌素和FK506)或抑制对生长因子诱导的信号传导很重要的p70S6激酶(雷帕霉素)(Liu et al., Cell 66:807-815,1991;Henderson et al., Immun.73:316-321,1991;Bierer et al., Curr.Opin.Immun.5:763-773,1993)。在进一步的实施方案中,为患者分离细胞并冷冻,以供以后与骨髓或干细胞移植、使用化疗剂例如氟达拉滨、外束放射疗法(XRT)、环磷酰胺或抗体例如OKT3或**CAMPATH®**的T细胞消融疗法结合使用(如,之前、同时或者之后)。在另一个实施方案中,细胞在B细胞消融疗法例如与CD20反应的剂例如**RITUXAN®**之前被分离并且可以被冷冻以供在B细胞消融疗法例如与CD20反应的剂例如**RITUXAN®**之后用于治疗。

[0313] 在本发明的另一个实施方案中,T细胞在治疗后直接从患者获得。在这方面,已经观察到,在某些癌症治疗后,特别是使用损害免疫系统的药物治疗后,在患者通常从治疗中恢复期间的治疗后不久,获得的T细胞的质量就其体外扩增的能力来说可能是最佳的或改善的。同样,在使用本文所述的方法进行离体操作后,这些细胞可能处于增强移植和体内扩增的优选状态。因此,在本发明的上下文中考虑在该恢复阶段收集血细胞,包括T细胞、树突细胞或造血谱系的其他细胞。此外,在某些实施方案中,动员(例如,用GM-CSF动员)和调理方案可用于在受试者中创造一种条件,其中有利于特定细胞类型的种群恢复、再循环、再生和/或扩增,尤其是在治疗后的规定时间窗口期间。示例性的细胞类型包括T细胞、B细胞、树突细胞和免疫系统的其他细胞。

[0314] T细胞的激活和扩增

[0315] 无论是在对T细胞进行基因修饰以表达所需的CAR之前还是之后,通常都可以使用如美国专利6,352,694、6,534,055、6,905,680、6,692,964、5,858,358、6,887,466、6,905,681、7,144,575、7,067,318、7,172,869、7,232,566、7,175,843、5,883,223、6,905,874、6,797,514、6,867,041和美国专利申请公开号20060121005中所述的方法来激活和扩增T细胞。

[0316] 一般而言,本发明的T细胞通过与附着有刺激CD3/TCR复合物相关信号的剂和刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体的表面接触来扩增。特别地,可以如本文所述刺激T细胞群,例如通过与固定在表面上的抗CD3抗体或其抗原结合片段或者抗CD2抗体接触,或通过与蛋白激酶C接触激活剂(例如苔藓抑素)(与钙离子载体结合)接触。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子,使用结合辅助分子的配体。例如,在适合刺激T细胞增殖的条件下,可以将T细胞群与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激CD4+T细胞或CD8+T细胞的增殖,需要使用抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone, Besancon,

France), 可使用本领域公知的其他方法 (Berg et al., Transplant Proc. 30 (8): 3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190 (9): 1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol. Meth. 227 (1-2): 53-63, 1999)。

[0317] 在某些实施方案中, T细胞的初级刺激信号和共刺激信号可以由不同的方法步骤提供。例如, 提供每种信号的剂可以在溶液中或结合至表面。当结合至表面时, 该剂可结合至相同表面 (即, 以“顺式”形式) 或结合至分开的表面 (即, 以“反式”形式)。或者, 一种剂可以结合至表面, 而另一种剂在溶液中。在一些实施方案中, 提供共刺激信号的剂结合至细胞表面, 提供初级激活信号的剂在溶液中或结合至表面。在某些实施方案中, 两种剂都可以在溶液中。在另一个实施方案中, 剂可以是可溶形式, 然后交联至表面, 例如表达Fc受体的细胞或抗体或将与该剂结合的其他结合剂。在这方面, 参见例如美国专利申请公开号 20040101519 和 20060034810 中的人工抗原呈递细胞 (aAPC), 其预期用于在本发明中激活和扩增T细胞。

[0318] 在一些实施方案中, 将这两种剂固定在珠上, 或者固定在同一个珠上, 即“顺式”, 或固定在分开的珠上, 即“反式”。例如, 提供初级激活信号的剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段, 提供共刺激信号的剂是抗CD28抗体或其抗原结合片段; 以及这两种剂以相同的分子含量共同固定至同一个珠。在一些实施方案中, 使用1:1比例的与珠结合的每种抗体, 从而用于CD4+T细胞扩增和T细胞生长。在本发明的某些方面, 使用与珠结合的抗CD3:CD28抗体的比例, 使得与使用1:1的比例观察到的扩增相比, 观察到T细胞扩增增加。在一个特定实施方案中, 与使用1:1的比例观察到的扩增相比, 观察到约1至约3倍的增加。在一些实施方案中, 与珠结合的CD3:CD28抗体的比例范围为100:1至1:100以及其间的所有整数值。在本发明的一方面, 与颗粒结合的抗CD28抗体多于抗CD3抗体, 即CD3:CD28的比率小于1。在本发明的某些实施方案中, 与珠结合的抗CD28抗体与抗CD3抗体的比例大于2:1。在一个特定的实施方案中, 使用1:100 CD3:CD28比例的抗体与珠子结合。在另一个实施方案中, 使用1:75 CD3:CD28比例的与珠结合的抗体。在又一个实施方案中, 使用1:50 CD3:CD28比例的与珠结合的抗体。在另一个实施方案中, 使用1:30 CD3:CD28比例的与珠结合的抗体。在一个优选的实施方案中, 使用1:10 CD3:CD28比例的与珠结合的抗体。在另一个实施方案中, 使用1:3 CD3:CD28比例的与珠结合的抗体。在又一个实施方案中, 使用3:1 CD3:CD28比例的与珠结合的抗体。

[0319] 1:500至500:1的颗粒与细胞的比例以及介于两者之间的任何整数值可用于刺激T细胞或其他靶细胞。本领域普通技术人员可以容易地理解, 颗粒与细胞的比例可取决于相对于靶细胞的颗粒大小。例如, 小尺寸的珠只能结合少数细胞, 而较大的珠可以结合许多细胞。在某些实施方案中, 细胞与颗粒的比例范围为从1:100至100:1以及介于两者之间的任何整数值, 并且在进一步的实施方案中, 该比例包括1:9至9:1以及介于两者之间的任何整数值, 也可以用于刺激T细胞。如上所述, 可以改变导致刺激T细胞的抗CD3和抗CD28结合的颗粒与T细胞的比例, 但是某些优选值包括1:100、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1和15:1, 其中一个优选比例为每个T细胞至少1:1个颗粒。在一些实施方案中, 使用1:1或更小的颗粒与细胞的比例。在一个特定的实施方案中, 优选的颗粒:细胞比例为1:5。在进一步的实施方案中, 颗粒与细胞的比例可以根据刺激的天数而变化。例如, 在一些实施方案中, 在第一天, 颗粒与

细胞的比例为1:1至10:1,并且在此后每天或每隔一天,将额外的颗粒添加至细胞中,一直持续10天,最终比例为从1:1至1:10(基于添加当天的细胞计数)。在一个特定的实施方案中,颗粒与细胞的比例在刺激的第一天为1:1,并在刺激的第三天和第五天调整为1:5。在另一个实施方案中,每天或每隔一天添加颗粒,以在刺激的第一天达到1:1的最终比例,并且在刺激的第三天和第五天达到1:5的最终比例。在另一个实施方案中,颗粒与细胞的比例在刺激的第一天为2:1,并在刺激的第三天和第五天调整为1:10。在另一个实施方案中,每天或每隔一天添加颗粒,以在刺激的第一天达到1:1的最终比例,并且在刺激的第三天和第五天达到1:10的最终比例。本领域技术人员将理解,多种其他比例可适用于本发明。特别是,比例将根据颗粒大小和细胞大小和类型而变化。

[0320] 在本发明的进一步的实施方案中,将细胞例如T细胞与剂涂覆的珠组合,随后将珠和细胞分离,然后培养细胞。在一个可选的实施方案中,在培养之前,剂涂覆的珠和细胞不分离而是一起培养。在进一步的实施方案中,珠和细胞首先通过施加力例如磁力而浓缩,导致细胞表面标记物的连接增加,从而诱导细胞刺激。

[0321] 举例来说,可以通过使抗-CD3和抗-CD28所附着的顺磁珠(3x28个珠)接触T细胞来连接细胞表面蛋白。在一些实施方案中,将细胞(例如, 10^4 至 10^9 个T细胞)和珠(例如,比例为1:1的DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T顺磁珠)组合在缓冲液中,优选在PBS(不含二价阳离子诸如钙和镁)中。同样,本领域普通技术人员可以容易地理解可以使用任何细胞浓度。例如,靶细胞在样本中可能非常稀少,并且包括样本的仅0.01%或整个样本(即100%)可能包括感兴趣的靶细胞。因此,任何细胞数量都在本发明的范围内。在某些实施方案中,可能需要显著减少其中颗粒和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞的浓度),以确保细胞和颗粒的最大接触。例如,在一些实施方案中,使用约20亿个细胞/ml的浓度。在另一个实施方案中,使用大于1亿个细胞/ml。在另一个实施方案中,使用1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在又一个实施方案中,使用7500、8000、8500、9000、9500或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在进一步的实施方案中,可以使用1.25或1.50亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可提高细胞产量、细胞活化和细胞扩增。此外,使用高细胞浓度可以更有效地捕获可能弱表达感兴趣的目标抗原的细胞,例如CD28阴性T细胞。这样的细胞群可能具有治疗价值并且在某些实施方案中将是期望获得的。例如,使用高浓度的细胞可以更有效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8+T细胞。

[0322] 在本发明的一些实施方案中,可将混合物培养数小时(约3小时)至约14天或两者之间的任何整数值小时。在另一实施方案中,混合物可以培养21天。在本发明的一些实施方案中,珠和T细胞一起培养约八天。在另一实施方案中,珠和T细胞一起培养2-3天。也可能需要几轮刺激,使得T细胞的培养时间可以是60天或更长。适合T细胞培养的条件包括适当的培养基(例如,Minimal Essential Media or RPMI Media 1640或X-vivo 15, (Lonza)),其中可以含有增殖和存活所必需的因子,包括血清(例如,胎牛血清或人血清)、白细胞介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF- β 和TNF- α 或本领域技术人员已知的用于细胞生长的任何其他添加剂。用于细胞生长的其他添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白粉和还原剂例如N-乙酰半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可包括添加有氨基酸、丙酮酸钠和维生素的RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15和X-Vivo 20、Optimizer,无血清或补充适量的血清(或血浆)或一组确定的激素,和/或一

定数量的足以使T细胞生长和扩增的细胞因子。抗生素例如青霉素和链霉素仅包含在实验培养物中,而不包含在要注入受试者的细胞的培养物中。靶细胞保持在支持生长所需的条件下,例如适当的温度(例如,37℃)和气氛(例如,空气加5%CO₂)。

[0323] 已经暴露于不同刺激时间的T细胞可能表现出不同的特征。例如,典型的血液或单采的外周血单核细胞产物中的辅助T细胞群(3/4,CD4+)大于细胞毒性的或抑制性的T细胞群(Tc,CD8+)。通过刺激CD3和CD28受体进行的T细胞的离体扩增,在约第8-9天之前产生主要由3/4细胞组成的T细胞群,而在约第8-9天之后,T细胞群包括越来越多的Tc细胞群。因此,根据治疗目的,将主要包含TH细胞的T细胞群注入受试者可能是有利的。类似地,如果已经分离出抗原特异性的Tc细胞亚群,则将这个亚群扩增到更大的程度可能是有益的。

[0324] 此外,除了CD4和CD8标记物之外,在细胞扩增过程中,其他表型标记物显著地但在很大程度上可再现地变化。因此,这种可再现性使得有能力针对特定目的定制活化的T细胞产物。

[0325] 治疗应用

[0326] 在一些实施方案中,本发明包括经修饰以表达组合了抗原识别域(例如,BCMA特异的scFv)、跨膜域(例如,CD8跨膜域)和胞浆域(例如CD3- ζ 、CD28、OX40、4-1BB或其任何组合的胞内域)的CAR的细胞(例如,T细胞)。因此,在某些情况下,转导的免疫细胞(例如T细胞)可以引发CAR介导的免疫(例如T细胞)反应。在一些实施方案中,本发明提供了CAR将原代T细胞的特异性重定向至肿瘤抗原的用途。因此,在一些实施方案中,本发明还提供了一种用于在哺乳动物中刺激T细胞介导的对靶细胞群或组织的免疫应答的方法,包括以下步骤:向该哺乳动物施用表达CAR的T细胞,其中CAR包含与预定靶标(例如BCMA)特异性相互作用的结合部分、包含例如人CD3 ζ 的胞内域的 ζ 链部分和共刺激信号传导区。在一些实施方案中,本发明包括一种类型的细胞疗法,其中T细胞被遗传修饰以表达CAR,并且将该CAR T细胞注入给有需要的接受者。注入的细胞能够杀伤接受者的肿瘤细胞。与抗体疗法不同,CAR T细胞能够在体内复制,导致长期持续存在,从而导致持续的肿瘤控制。

[0327] 不希望受任何特定理论的束缚,由CAR修饰的T细胞引发的抗肿瘤免疫反应可以是主动或被动免疫反应。此外,CAR介导的免疫反应可能是过继性免疫疗法的一部分,其中CAR修饰的T细胞诱导特异性针对CAR中的抗原结合部分的免疫反应。例如,BCMA特异性的CAR T细胞会引发特异针对性对表达BCMA的细胞的免疫反应。虽然本文公开的数据具体公开了包含抗BCMA scFv、CD8跨膜域和41BB、CD28和CD3 ζ 信号传导域的慢病毒载体,但本发明应被解释为包括本文其他地方所述的构建体的每个组分的任何数量的变体。即,本发明包括使用CAR中的任何抗原结合部分来产生特异性针对抗原结合部分的CAR介导的T细胞反应。例如,本发明的CAR中的抗原结合部分可以靶向肿瘤抗原,从而用于治疗癌症的目的。在一些实施方案中,本发明的CAR的抗原结合部分被设计为用于治疗特定的癌症,例如多发性骨髓瘤。

[0328] 本发明的CAR修饰的T细胞还可以作为一种类型的疫苗,从而用于哺乳动物的离体免疫和/或体内治疗。优选地,哺乳动物是人。

[0329] 关于离体免疫,在将细胞施用于哺乳动物之前在体外发生以下至少一种:i)细胞的扩增,ii)将编码CAR的核酸引入细胞,和/或iii)细胞的冷冻保存。离体方法步骤是本领域公知的并且在下面更充分地讨论。简而言之,细胞从哺乳动物(优选人)分离并用表达本文公开的CAR的载体进行遗传修饰(例如,体外转导或转染)。可以将CAR修饰的细胞施用于

哺乳动物接受者以提供治疗益处。哺乳动物接受者可以是人并且CAR修饰的细胞对于接受者可以是自体同源的。或者,细胞对于接受者可以是同种异体的、同基因的或异种的。

[0330] 用于造血干细胞和祖细胞的离体扩增的方法步骤(描述于美国专利号5,199,942中,通过引用并入本文)可应用于本发明的细胞。其他合适的方法是本领域已知的,因此本发明不限于细胞的离体扩增的任何特定方法。简而言之,T细胞的离体培养和扩增包括:(1)从哺乳动物的外周血收获物或骨髓外植体中收集CD34⁺造血干细胞和祖细胞;以及(2)离体扩增此类细胞。除了美国专利号5,199,942中描述的细胞生长因子之外,其他因子例如flt3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体也可用于细胞的培养和扩增。除了在离体免疫方面使用基于细胞的疫苗之外,本发明还提供了用于体内免疫以在患者体内引发针对抗原的免疫应答的组合物和方法。

[0331] 通常,如本文所述活化和扩增的细胞可用于治疗和预防在免疫功能受损的个体例如患有癌症的个体中出现的疾病。特别地,本发明的CAR修饰的T细胞用于治疗多发性骨髓瘤。在某些实施方案中,本发明的细胞用于治疗有患多发性骨髓瘤风险的患者。

[0332] 本发明的CAR修饰的免疫细胞(例如,CAR T细胞)或包含此类细胞的组合物可用于或可施用于有需要的受试者,以提供抗肿瘤免疫,治疗或预防癌症,治疗或预防自身免疫性病症,或治疗或预防变应性病症。在一些实施方案中,癌症是多发性骨髓瘤、霍奇金(Hodgkin)淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、白血病或胶质母细胞瘤。在一些实施方案中,自身免疫性病症是重症肌无力、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、天疱疮、银屑病、炎性肠病、乳糜泻、恶性贫血、特发性血小板减少性紫癜、硬皮病、格雷夫(Graves)斯病、干燥综合征(Sjögren syndrome)、肺出血肾炎综合征、1型糖尿病。在一些实施方案中,变应性病症是过敏反应、哮喘、食物变应、叮咬性昆虫变应、药物变应、变应性鼻炎、荨麻疹、血管性水肿、湿疹、特应性皮炎、接触性皮炎和嗜酸性食管炎。

[0333] 本发明的CAR修饰的免疫细胞(例如,CAR T细胞)可以单独施用,或与稀释剂和/或与其他组分例如IL-2或其他细胞因子或细胞群组合以作为组合物(例如,药物组合物)施用。简而言之,本发明的药物组合物可包含如本文所述的靶细胞群,其与一种或多种药学或生理学可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合。此类组合物可包含缓冲剂例如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸例如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂例如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如氢氧化铝);和防腐剂。

[0334] 本发明的组合物优选配制成用于静脉内施用。

[0335] 本发明的药物组合物可以以适合于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量和频率将取决于诸如患者病状、患者疾病的类型和严重程度等因素,但适当的剂量可通过临床试验确定。

[0336] 当表示“免疫有效量”、“抗肿瘤有效量”,“肿瘤抑制有效量”或“治疗量”时,待施用的本发明的组合物的准确量可由医师考虑在年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移的程度方面的个体差异以及患者(受试者)的病状来确定。一般而言,包含本文所述的CAR修饰的免疫细胞(例如,CAR T细胞)的药物组合物可以以 10^4 至 10^9 个细胞/kg体重、优选 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重的剂量施用,包括这些范围内的所有整数值。T细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。可以通过使用免疫疗法中公知的输注技术来施用细胞(参见例如Rosenberg et al.,

New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988)。医学领域的技术人员可以通过监测患者的疾病迹象并相应地调整治疗来容易地确定特定患者的最佳剂量和治疗方案。

[0337] 在某些实施方案中,可能需要向受试者施用活化的免疫(例如,T细胞),然后随后重新抽血(或进行单采术),根据本发明活化来自其的T细胞,并将这些活化和扩增的T细胞重新输入患者。这个过程可以每隔几周进行多次。在某些实施方案中,T细胞可以从10cc到400cc的抽取血液被激活。在某些实施方案中,T细胞从20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc或100cc的抽取血液被激活。不受理论的束缚,使用这种多次抽血/多次重新输注的方案可用于选择出某些T细胞群。

[0338] 目标组合物的施用可以任何方便的方式进行,包括通过雾化吸入、注射、摄取、输注、植入或移植。本文所述的组合物可以皮下、皮内、瘤内、结内、髓内、肌内、通过静脉内(i.v.)注射、或腹膜内施用于患者。在一些实施方案中,本发明的免疫细胞(例如,T细胞)组合物通过皮内或皮下注射施用于患者。在另一个实施方案中,本发明的免疫细胞(例如,T细胞)组合物优选通过静脉内注射施用。免疫细胞(例如T细胞)的组合物可以直接注射到肿瘤、淋巴结或疾病部位。

[0339] 在本发明的某些实施方案中,使用本文所述的方法或本领域已知的其中将T细胞扩增至治疗水平的其他方法活化和扩增的细胞与任何数量的相关治疗方式(包括,但不限于,使用剂的治疗例如抗病毒治疗、西多福韦和白细胞介素2、阿糖胞苷(也称为ARA-C)或用于MS患者的那他珠单抗治疗或用于银屑病患者的依法珠单抗治疗或用于PML患者的其他治疗)结合(例如,之前、同时或随后)施用于患者。在进一步的实施方案中,本发明的T细胞可以与化疗、放疗、免疫抑制剂例如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、麦考酚酯和FK506、抗体或其他免疫消融剂例如CAMPATH(阿仑单抗)、抗CD3抗体或其他抗体疗法、细胞毒素、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228、细胞因子和辐射组合使用。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶钙调神经磷酸酶(环孢菌素和FK506)或抑制对生长因子诱导的信号传导很重要的p70S6激酶(雷帕霉素)。在另一个实施方案中,将本发明的细胞组合物与骨髓移植、使用化疗剂例如氟达拉滨、外束放射疗法(XRT)、环磷酰胺或抗体例如OKT3或CAMPATH的T细胞消融疗法结合(例如,之前、同时或之后)施用于患者。在另一个实施方案中,本发明的细胞组合物在B细胞消融疗法例如与CD20反应的剂例如Rituxan之后施用。例如,在一些实施方案中,受试者可能经受高剂量化疗、然后是外周血干细胞移植的标准治疗。在某些实施方案中,在移植后,受试者接受本发明的扩增的免疫细胞的输注。在另外的实施方案中,在手术之前或之后施用扩增的细胞。

[0340] 可根据本领域公认的实践进行人施用剂量的缩放。例如,对于成年患者,CAMPATH的剂量通常在1至约100毫克的范围,通常每天给药,持续1至30天。优选的日剂量是每天1至10毫克,尽管在某些情况下可以使用最高达每天40毫克的更大剂量(美国专利号6,120,766中描述)。已经讨论了CAR T细胞剂量和安排的策略(Ertl et al., 2011, Cancer Res, 71: 3175-81; Junghans, 2010, Journal of Translational Medicine, 8:55)。

[0341] 无需进一步阐述,相信本领域技术人员可以基于以上描述充分利用本公开。因此,以下特定实施方案应被解释为仅是说明性的,而不以任何方式限制本公开的其余部分。出于本文引用的目的或主题,本文引用的所有出版物通过引用并入。

[0342] 实施例

[0343] 为了可以更充分地理解本文所述的发明,提出以下实施例。提供本申请中描述的合成实施例以说明本文提供的化合物和方法,并且不应以任何方式解释为限制它们的范围。

[0344] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文所述的那些相似或等效的任何方法和材料都可用于测试本发明的实践中,但本文描述了优选的材料和方法。在描述和要求保护本发明时,将使用以下术语。

[0345] 实施例1:从本发明的mRNA构建体产生功能性CAR T细胞

[0346] 人CAR T细胞是通过使用编码本发明的CAR蛋白的本发明的mRNA构建体产生的。观察到CAR T细胞是有活力的,可以结合BCMA,并杀伤BCMA+肿瘤细胞。

[0347] 包含SEQ ID:31的核苷酸序列的本发明的mRNA构建体通过体外转录从DNA质粒产生。体外转录由T7 RNA聚合酶从线性化的质粒模板进行,并且酶促地添加约150个腺嘌呤核苷酸的多腺嘌呤尾。在共转录mRNA合成过程中,在mRNA的5'端掺入了一个7-甲基鸟苷帽。

[0348] 本发明的mRNA构建体从5'到3'包含:5'帽、如SEQ ID:74描述的5'UTR、如SEQ ID:112描述的开放阅读框(ORF)、如SEQ ID:92描述的3'UTR,以及150个或更多腺嘌呤单位的3'多腺嘌呤尾。ORF编码具有SEQ ID:21的氨基酸序列的本发明的CAR蛋白。

[0349] 为了从mRNA构建体制备CAR T细胞,淋巴细胞通过单采术从健康人供体获得。从这些淋巴细胞中,CD8+T细胞通过与抗CD8抗体缀合的顺磁性微珠被阳性选择。这产生了95%的CD8+T细胞和95%存活的细胞。这些富集的CD8+T细胞通过在37℃和5%CO₂下在抗CD3抗体(克隆OKT3)存在下孵育约14天而扩增。将细胞重悬于P3转染缓冲液(Lonza)中,并根据制造商的说明通过电穿孔(4D Nucleofector®,Lonza)用mRNA构建体转染。然后将细胞返回到含有IL-15的标准培养基中培养约8小时。

[0350] 测试从上述过程获得的CAR T细胞的存活率、CAR蛋白表达、BCMA结合和细胞毒性,即杀伤BCMA+骨髓瘤(肿瘤)细胞的能力。存活率、CAR表达和BCMA结合在GUAVA® EASYCYTE®12HT流式细胞仪(EMD Millipore)上通过流式细胞术测定。为了测试活力,将CAR T细胞样本与碘化丙啶混合,并在流式细胞仪上运行,在近红外通道中进行荧光电子门控(electronic gating)。为了测试CAR蛋白表达和BCMA结合,将CAR T细胞样本与0.4ug/mL藻红蛋白(PE)缀合的BCMA(重组人TNFRSF17蛋白,带有Fc/His标签,R-PE标记;Creative Biomart,Creative Biomart,Shirley,NY)一起孵育。在流式细胞仪上评估CAR表达,在黄色通道中进行荧光电子门控,以检测CAR阳性和CAR阴性细胞上BCMA-PE发射的存在与否。BCMA结合是通过测量黄色通道中的荧光强度以确定与标记的CAR阳性细胞结合的BCMA-PE的相对数量来确定的。对于存活率、表达和BCMA结合测定,在没有mRNA的情况下电穿孔的CD8+T细胞(CAR阴性T细胞)作为平行对照进行测试。

[0351] 为了测试CAR T细胞杀伤BCMA+骨髓瘤细胞的能力,将CAR-T细胞与表达绿色荧光蛋白(MM.1S-GFP)的BCMA+骨髓瘤细胞系共孵育。将50,000MM.1S-GFP肿瘤细胞的等分试样置于96孔板的孔中。将约2500至50,000个CAR T细胞添加到每个孔中以获得约1:1至1:20的各种效应子:靶标比例(即,CAR T细胞与BCMA+骨髓瘤细胞的比例)。孵育过夜后,碘化丙啶用于染色死细胞。鉴定出活的靶细胞,并通过流式细胞术测定细胞密度。CAR T细胞杀伤骨髓瘤细胞的程度通过与不含CAR T细胞的对照孔同时的孔中的骨髓瘤细胞的数量进行比较

来计算。结果反映在图1和表2中,其显示了通过SEQ ID:31的CAR或对照(无mRNA)产生的CAR T细胞在转染后24小时评估细胞存活率、CAR表达、BCMA结合,以及杀伤BCMA+骨髓瘤(肿瘤)细胞的百分比。

[0352]		存活率*	CAR+细胞 (%) *	BCMA 结合 (MFI) *	杀伤%**
	CAR T 细胞	83.9	86.6	1333	94.4
	对照 CD8+ T 细胞 (没有 mRNA 情况下的 电穿孔)	90.9	1.8	20	0

[0353] 表2-通过SEQ ID:31的CAR产生的CAR T细胞评估细胞存活率、CAR表达、BCMA结合,以及杀伤BCMA+骨髓瘤(肿瘤)细胞的百分比。*在转染后4小时测量。**1:10效应子与靶标比例,用于杀伤试验(杀伤试验孵育4天)。

[0354] 总之,mRNA构建体用于产生CAR T细胞。mRNA构建体编码本发明的CAR蛋白。CAR T细胞显示出高的存活率、CAR蛋白表达、BCMA结合以及对BCMA+骨髓瘤(肿瘤)细胞的杀伤。在没有mRNA构建体的情况下电穿孔的CD8+T细胞基本上没有CAR表达,基本上没有BCMA结合,并且没有杀伤肿瘤细胞。

[0355] 实施例2:CAR互补决定区中的氨基酸替换

[0356] 将各种氨基酸替换引入抗BCMA CAR的互补决定区(CDR)以产生具有改进特性的CAR。幸运的是,与Ali等人(2016)的临床试验中使用的(即SEQ ID:19的)CAR T细胞和相应的CAR相比,这些修饰显著改善了通过CAR T细胞的BCMA结合和肿瘤的杀死。

[0357] 使用SEQ ID:29作为参考序列制备了许多编码CAR的mRNA构建体。新构建体在一个或多个CDR中的一个或多个氨基酸残基方面有所不同。

[0358] 下面,表3提供了本实施例中描述的mRNA构建体。表3显示了三个重链和三个轻链CDR:CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3中的每个中包含的各自的亲本序列和序列片段。CAR的对应于或基本对应于CAR的scFv区域的部分在表3中称为“新scFv序列”。

[0359]

新scFv序列	scFv框架的亲本序列	重链			轻链		
		CDRH 1	CDRH 2	CDRH 3	CDRL 1	CDRL 2	CDRL 3
48	48	1	4	7	10	12	16
57	57	1	4	7	10	12	16
60	60	1	4	7	10	12	16
62	57	3*	4	7	10	12	16
63	57	1	4	8*	10	12	16
64	57	1	4	7	11*	14*	17*
65	57	1	4	7	11*	14*	18*
66	57	2*	6*	9*	10	12	16
67	57	3*	5*	8*	10	12	16
68	57	3*	4	9*	10	12	18*
69	57	2*	6*	9*	11*	13*	17*
70	57	1	4	7	10	15*	16

[0360] 表3-“新scFv”序列的序列识别号 (SEQ ID NO) 列表,包括它们的亲本序列和相应的CDR序列。星号(*)表示相对于亲本序列的氨基酸替换,并且不是序列ID的一部分。

[0361] 对于每个mRNA构建体,通过转染到人CD8+细胞中制备CAR T细胞,如实施例1中所述。然后在电穿孔后3天测试由每个mRNA构建体制备的CAR T细胞的BCMA结合和肿瘤杀伤,如实施例1中所述。结果总结在表4中,如下所示。

[0362]

新scFv序列	BCMA结合 (任意单位)	杀伤情况* (杀伤%)
SEQ ID: 48	100 (参考标准)	46%
SEQ ID: 57	343	85%
SEQ ID: 60	381	83%
SEQ ID: 62	189	3%
SEQ ID: 63	439	78%
SEQ ID: 64	496	26%
SEQ ID: 65	173	86%
SEQ ID: 66	269	81%
SEQ ID: 67	310	0%
SEQ ID: 68	446	7%
SEQ ID: 69	230	77%
SEQ ID: 70	404	83%

[0363] 表4-BCMA结合结果和使用表达相应的scFv部分的CAR T细胞杀死的人骨髓瘤细胞的百分比。*效应子:靶标比例为1:2。

[0364] 因此,修饰CDR的若干尝试均未成功,因为它们降低了BCMA结合。然而,某些CAR,例如包含SEQ ID:57、SEQ ID:60、SEQ ID:65、SEQ ID:66、SEQ ID:69和SEQ ID:70的序列的那些,相比于SEQ ID:19的初始CAR,不仅明显修饰了其CDR残基,也提供了显著更好的CAR表达和对人骨髓瘤细胞的杀伤。

[0365] 实施例3.通过氨基酸替换在CAR scFv框架区域中人源化

[0366] 在CAR的scFv框架区中引入各种氨基酸替换以使CAR人源化。幸运的是,与Ali等人(2016)的临床试验中使用的(即SEQ ID:19的)未人源化的CAR CAR T细胞相比,这些修饰显著改善了CAR T细胞的BCMA结合和肿瘤杀伤。

[0367] 使用SEQ ID:29的mRNA构建体作为起点(其编码序列SEQ ID:19的CAR并包含序列SEQ ID:48的scFv)制备了许多编码CAR的mRNA构建体。这些构建体编码scFv互补决定区(CDR)中的相同或基本相同的氨基酸残基,但相对于scFv框架区中的氨基酸残基有所变化。在进行这些变化时,实验者的目的是在不降低表达CAR的CAR T细胞的BCMA结合和肿瘤杀伤特性的情况下对scFv框架区进行人源化。对于每个mRNA构建体,CAR T细胞通过转染到人CD8+细胞中来制备,基本上如实施例1中所述。然后在电穿孔后的第3天测试由每个mRNA构建体制备的CAR T细胞的BCMA结合和/或肿瘤杀伤,如实施例1中所述。

[0368] 在第一轮实验中,对CAR的scFv框架残基进行各种修饰,结果如表5所示:

[0369]	scFv 序列	BCMA结合 (相对于SEQ ID: 48)
	SEQ ID: 48	100 (参考标准)
	SEQ ID: 54	141
[0370]	SEQ ID: 49	76
	SEQ ID: 50	51
	SEQ ID: 51	54
	SEQ ID: 52	82
	SEQ ID: 53	103
	SEQ ID: 55	12

[0371] 表5-使用表达具有框架残基修饰的相应scFv序列的CAR T细胞的BCMA结合结果。

[0372] 因此,使scFv框架人源化的若干尝试都没有成功,因为它们降低了BCMA结合。然而,包含SEQ ID:54的scFv的CAR在CAR T细胞的BCMA结合方面提供了比可比的包含SEQ ID:48的参考scFv高41%的改进。因此,选择SEQ ID:54的scFv作为进一步优化的先导。在第二轮实验中,对CAR的scFv框架残基进行了进一步的各种修改,BCMA结合的结果如下表6所示:

[0373]	scFv 序列	BCMA结合 (相对于SEQ ID: 54)
	SEQ ID: 54	100 (参考标准)
	SEQ ID: 56	58
	SEQ ID: 57	124
	SEQ ID: 58	40
	SEQ ID: 59	79

[0374] 表6-使用表达具有进一步框架残基修饰的相应scFv序列的CAR T细胞的BCMA结合结果。

[0375] 使scFv框架人源化的若干尝试都没有成功,因为它们降低了BCMA结合。然而,与SEQ ID:54的scFv相比,SEQ ID:57的scFv在CAR T细胞BCMA结合方面提供了进一步的24%的改进。因此,选择包含SEQ ID:57的scFv的CAR作为进一步优化的先导。

[0376] 在第三轮实验中,将包含SEQ ID:57的scFv的CAR与以下进行比较:(1)包含SEQ ID:48的初始scFv的CAR;(2)SEQ ID:60的scFv,其由SEQ ID:57的scFv进一步修饰;以及(3)SEQ ID:61的scFv,其是通过独立的方法由SEQ ID:48的scFv开发的(Antibody

Humanization by a Single Cycle of CDR-Grafting, Hu et al. in Ricin Toxin; Bentham Science Publishers Eds. JW Cherwonwogrodzky)。以下的BCMA结合和肿瘤杀伤的结果参见表7:

[0377]	scFv序列	BCMA结合*	杀伤情况** (杀伤%)
[0378]	SEQ ID: 48	100 (参考标准)	46%
	SEQ ID: 57	460	85%
	SEQ ID: 60	382	83%
	SEQ ID: 61	34	未测试

[0379] 表7-使用表达相应scFv部分的CAR T细胞的BCMA结合结果和人骨髓瘤细胞的杀伤%。**效应子:靶标比例为1:10。

[0380] 最后,为了测量所实现的人源化的量,将上述每个序列的scFv的框架区中的氨基酸与从免疫遗传学数据库 (IMGT) (IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. Lefranc M-P et al., Nucleic Acids Res. 2015 Jan; 43:D413-22) 中的序列识别的该序列最近的种系邻居的氨基酸进行比较。SEQ ID: 48、SEQ ID: 57和SEQ ID: 60与最近的种系邻居的平均氨基酸同一性分别为78%、84%和88%。因此,在这一系列的序列修饰和分析结束时,包含SEQ ID: 57和SEQ ID: 60的scFv的CAR不仅与SEQ ID: 19的初始CAR相比其scFv框架残基基本上人源化,而且还提供了具有显著更好的BCMA结合和肿瘤杀伤的CAR T细胞。

[0381] 实施例4. 组合人源化框架和CDR区的CAR

[0382] 进行实验以测试实施例2和3中描述的人源化scFv框架和CDR序列的各种组合。目的是确定各种组合中的哪一种将提供具有优异BCMA结合和肿瘤杀伤的CAR T细胞。下面提供的是本实施例的序列的参考表。对于表中所示的每个组合,基本上如实施例1中所述制备和测试CAR T细胞。为了比较,还用与Ali等人 (2016) 的 (SEQ ID: 19的) CAR蛋白对应的CAR蛋白制备CAR T细胞。

[0383] 表8显示了三个重链和三个轻链CDR: CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3中的每个中包含的各自的亲本序列和序列片段。

		重链			轻链		
		CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
[0384]	全长CAR序列	scFv框架的亲本序列					
	19	48	1	4	7	10	12
	28	60	1	4	7	10	12
[0385]	20	60	2*	6*	9*	11*	14*
	21	60	2*	6*	9*	11*	14*
	22	60	2*	6*	9*	11*	14*
	23	60	2*	6*	9*	11*	14*
	24	60	1	4	8*	10	15*
	25	60	1	4	8*	10	15*
	26	60	1	4	8*	10	15*

[0386] 表8-“全长CAR”序列的序列识别号(SEQ ID NO)的列表,包括它们的scFv框架的亲本序列和相应的CDR序列。星号(*)表示相对于亲本序列的氨基酸替换,并且不是序列ID的一部分。CAR序列SEQ ID NO:21、23和25分别是SEQ ID NO:20、22和24的版本,其进一步包含41BB胞内共刺激域。

[0387] 在电穿孔后约3天测试由每个mRNA构建体制备的CAR T细胞的BCMA结合和肿瘤杀伤。其结果如表9所示:

[0388]

CAR序列	BCMA结合*	杀伤**(杀伤%)
SEQ ID:19	100(参考标准)	46%(现有实验)
SEQ ID:28	377	83%
SEQ ID:20	189	84%
SEQ ID:21	439	69%
SEQ ID:22	496	73%
SEQ ID:23	173	67%
SEQ ID:24	269	74%
SEQ ID:25	310	60%

[0389] 表9-使用表达相应CAR部分的CAR T细胞的BCMA结合结果和人骨髓瘤细胞的杀伤%。

[0390] 因此,与SEQ ID:19相比,SEQ ID:28、SEQ ID:20、SEQ ID:21、SEQ ID:22、SEQ ID:23、SEQ ID:24和SEQ ID:25的人源化构建体为提供了具有优异的BCMA结合和人骨髓瘤细胞杀伤的CAR T细胞。

[0391] 这些构建体的scFv中组合的框架和CDR区的人源化的程度使用Lazar的方法(A molecular immunology approach to antibody humanization and functional optimization,Lazar GA.et al.Molecular Immunology(2007) 44:1986)进行测量以确定人类字符串含量(Human String Content)和完美的(Perfect)9mer分数。结果总结在表10中:

[0392]

序列	人类字符串含量	完美的9mer分数
SEQ ID:19	72%	13
SEQ ID:28	81%	69
SEQ ID:20	86%	92
SEQ ID:21	86%	92
SEQ ID:22	87%	96
SEQ ID:23	87%	96
SEQ ID:24	81%	69
SEQ ID:25	81%	69

[0393] 表10-用于每个指定的CAR氨基酸序列的人源化的程度,包括人类字符串含量和完美的9mer分数。

[0394] 人类字符串含量和完美的9mer分数表明已经实现了亲本序列的成功人源化。总之,在对CAR的scFv区域进行一系列重复、经验性残基修饰后,获得了几个CAR,它们不仅在其scFv区中相对于SEQ ID:19的CAR进行了人源化,而且还提供了具有显著更好的BCMA结合

和杀伤骨髓瘤细胞的CAR T细胞。

[0395] 实施例5:CAR共刺激域中的氨基酸替换

[0396] 进行受控的实验以测试在CAR蛋白中包含或修饰某些胞内共刺激域是否提高了CAR蛋白的表达并提高了相应CAR T细胞的BCMA结合和对肿瘤的杀伤。

[0397] 制备了多个mRNA构建体,其中它们编码的CAR蛋白包含相同的信号肽、scFv、茎(stalk)和跨膜域,但在它们的共刺激域中有一个或多个氨基酸不同。对于每个mRNA构建体,CAR T细胞通过转染到人CD8+细胞中来制备,基本上如实施例1中所述。然后在电穿孔后约24小时测试由每个mRNA构建体制备的CAR T细胞的CAR表达和抗肿瘤毒性,基本上如实施例1中所述。Ali等人(2016)的临床试验中使用的mRNA构建体作为对照(SEQ ID:29)进行测试。mRNA构建体及其表达结果如下表11所示。对于每个共刺激域,显示了序列的SEQ ID号和天然来源。

[0398]	序列	共刺激域的基因来源	相对表达	杀伤情况*(杀伤%)
	SEQ ID: 29	CD28-CD3z	100 (参考标准)	50%
	SEQ ID: 103	CD28-CD3z	136	52%
	SEQ ID: 107	CD3z	206	64%
	SEQ ID: 104	41BB-CD3z	197	58%
	SEQ ID: 105	OX40-CD3z	214	46%
	SEQ ID: 106	41BB-OX40-CD3z	217	43%

[0399] 表11-使用表达相应CAR共刺激域的CAR T细胞的相对表达和人骨髓瘤细胞的杀伤%。*效应子:靶标比例为1:10。

[0400] 与包含CD28-CD3z域的构建体相比,包含仅CD3z、41BB-CD3z、OX40-CD3z或41BB-OX40-CD3z的那些构建体显示出优异的表达。这是出乎意料的,因为预期一个天然存在的共刺激域替换另一个共刺激域通常不会影响蛋白质表达。

[0401] 包含为仅CD3z或41BB-CD3z的共刺激域的构建体也提供了更好的BCMA+肿瘤细胞杀伤。尽管它们具有出色的表达,但与包含CD28-CD3z域的构建体相比,包含OX40-CD3z或41BB-OX40-CD3z的构建体显示出较差的肿瘤杀伤。

[0402] 因此,在测试共刺激区中的变化的受控实验中,SEQ ID:107和SEQ ID:104的构建体提供了优异表达和肿瘤杀伤的组合。改进的表达并不一定与改进的杀伤同时发生。

[0403] 实施例6:编码CAR的mRNA构建体中非翻译区的替换

[0404] 进行实验以测试编码CAR的mRNA构建体的5'和/或3'非翻译区的变化将如何影响人T细胞中的CAR表达。

[0405] 制备了许多编码相同CAR蛋白(即,SEQ ID:59的)但其5'和/或3'非翻译区(UTR)的核苷酸序列不同的mRNA构建体。这些构建体在其他方面是相同的,例如,就5'帽和多腺嘌呤尾而言。目的是比较几种构建体,这些构建体纳入天然存在于一个或多个人类基因(例如CD3D和CD8B2基因)中的不同5'和3'UTR序列。

[0406] 对于一种构建体,出现在GATA3基因(即,SEQ ID NO:92)的ORF中的218个核苷酸部分而不是其3'UTR用作3'UTR并且功能特别好。

[0407] 对于每个mRNA构建体,基本上如实施例1中所述制备CAR T细胞。转染后约24小时,基本上通过实施例1中所述的方法测试由每个mRNA构建体制备的CAR T细胞的CAR表达水

平。mRNA构建体及其表达结果如下表12所示。对于每个构建体,显示了各自的SEQ ID号和序列的天然来源。

构建体	5' UTR序列 (天然来源)	CAR ORF 序列	3'UTR 序列 (天然来源)	相对表达*
A	SEQ ID: 77 (CD3D)	SEQ ID: 59	SEQ ID: 87 (CD3D)	100
B	SEQ ID: 75 (CD8B2)	SEQ ID: 59	SEQ ID: 87 (CD3D)	146
C	SEQ ID: 75 (CD8B2)	SEQ ID: 59	SEQ ID: 89 (MYH8)	63
D	SEQ ID: 74 (IgG)	SEQ ID: 59	SEQ ID: 86 (AFP)	103
E	SEQ ID: 74 (IgG)	SEQ ID: 59	SEQ ID: 87 (CD3D)	165
F	SEQ ID: 74 (IgG)	SEQ ID: 59	SEQ ID: 92 (GATA3 ORF)	264
G	SEQ ID: 74 (IgG)	SEQ ID: 59	SEQ ID: 84 (IgG)	136
H	SEQ ID: 74 (IgG)	SEQ ID: 59	SEQ ID: 89 (MYH8)	70

[0409] 表12-使用5'和3'UTR序列的指定组合的SEQ ID N0:59(Y34)的CAR的相对表达。SEQ ID N0:92的序列,即GATA3的开放阅读框(ORF),对改善表达特别好。*平均荧光强度,标准化为构建体A=100。IgG=IgG重链,染色体14。

[0410] 对于5'UTR,SEQ ID:74赋予最佳表达(比较构建体A、B和E)。对于3'UTR,SEQ ID:92赋予最佳表达(比较构建体E和F)。

[0411] 总之,实验测试了编码CAR的mRNA构建体的5'和/或3'非翻译区的变化将如何影响人T细胞中的CAR表达。在先前看起来同样合理的几种可选方案中,构建体F表现出最佳表达,超过其他七个构建体的平均表达的2.6倍。构建体F的优异性能是由于包含含有SEQ ID:74的核苷酸的5'UTR和含有SEQ ID:92的核苷酸的3'UTR。

[0412] 该结果令人惊讶,部分原因是SEQ ID:92不是天然存在的UTR。包含在构建体F中的SEQ ID:92预期会减少而不是增加CAR表达。

[0413] 实施例7:编码CAR的mRNA构建体的改进的多腺嘌呤尾

[0414] 进行受控实验以测试将某些3'多腺嘌呤尾添加到编码CAR的mRNA构建体中。

[0415] 制备了多种mRNA构建体,其包含相同的5'UTR、开放阅读框和3'UTR,编码抗BCMA CAR蛋白,但包括或不包括78个或更多个核苷酸的3'多腺嘌呤尾。每个构建体恰好包含一个选自SEQ ID:46、SEQ ID:41、SEQ ID:42、SEQ ID:43、SEQ ID:44或SEQ ID:45的mRNA序列。在每个构建体中,多腺嘌呤尾位于3'UTR的3',如实施例2中所述的3'UTR。对包含SEQ ID:36的核苷酸序列的mRNA构建体酶促地进行额外的多腺苷酸化,以获得在其他方面相同的mRNA构建体,其中多腺嘌呤尾包含超过150个核苷酸。对于每个mRNA构建体,CAR T细胞通过转染到人CD8+细胞中来制备,基本上如实施例1中所述。转染后约24小时,基本上如实施例1中所述测试CAR T细胞的CAR表达水平。两个实验的结果如下表13和14所示。

[0416]

	相对表达*		
构建体	没有PolyA	78-mer PolyA	提高倍数
SEQ ID: 46	100	578	5.8
SEQ ID: 41	99	310	3.1
SEQ ID: 42	50	210	4.2
SEQ ID: 43	105	222	2.1
SEQ ID: 44	106	335	3.2
SEQ ID: 45	57	425	7.5
平均值	86	347	4.3 (p < 0.001)

[0417] 表13-与没有PolyA尾的CAR相比,具有78-mer PolyA尾的全长CAR的相对表达。为每个CAR构建体提供了表达提高倍数。*平均荧光强度,标准化至SEQ ID:46,没有PolyA=100。

[0418]		相对表达*		
	构建体	78-mer PolyA	>150-mer PolyA	提高倍数
	SEQ ID: 36	100	243	2.4

[0419] 表14-具有78-mer PolyA尾或具有超过150个A残基的PolyA尾的SEQ ID NO 36的CAR的表达提高倍数。为SEQ ID NO:36的CAR构建体提供了表达提高倍数。*平均荧光强度,标准化至SEQ ID:46,没有PolyA=100。*平均荧光强度,标准化至SEQ ID:36,具有78-mer PolyA=100。

[0420] 因此,直接实验比较表明,在mRNA构建体中包含78-mer多腺嘌呤尾,将本发明CAR蛋白的表达提高了4.3倍 (p<0.001)。与78-mer相比,包含>150-mer的多腺嘌呤尾巴进一步将CAR表达提高了2.4倍。

[0421] 实施例8:编码CAR的mRNA构建体中的同义核苷酸替换

[0422] 进行受控实验以测试编码CAR的mRNA构建体的ORF的某些同义核苷酸替换是否影响抗BCMA CAR T细胞的功能。

[0423] 制备了多个mRNA构建体,其中ORF编码SEQ ID:26的相同的CAR蛋白,但其中那些ORF的核苷酸序列不同,即,通过引入同义核苷酸替换。SEQ ID:116的包含ORF核苷酸序列的构建体用作对照。对于每个mRNA构建体,通过将mRNA转染到人CD8+T细胞中来制备CAR T细胞,如实施例1中所述。转染后约24小时,如实施例1中所述测试CAR T细胞的BCMA结合。

[0424] 与SEQ ID:116的构建体相比,SEQ ID:122 (II新密码子优化)和SEQ ID:123 (II dU)的构建体产生的CAR T细胞的BCMA结合分别提高至1.65倍和3.43倍。这是令人惊讶的,因为同义核苷酸替换并没有改变CAR蛋白序列。总之,编码CAR的mRNA构建体的ORF中的某些同义核苷酸替换改善了CAR T细胞的BCMA结合特性。

[0425] 实施例9:CAR特异性和交叉反应性的测试

[0426] 测试从包含SEQ ID:31的核苷酸序列的本发明的mRNA构建体产生的CAR T细胞与细胞微阵列文库的CAR相互作用,该细胞微阵列文库包括5528种人血浆膜蛋白和细胞表面栓系的人分泌的蛋白 ((Retrogenix,High Peak,UK)。在其他方面可比的CAR T细胞,其中

mRNA构建体是SEQ ID:35或SEQ ID:40的mRNA构建体,在较小的蛋白质亚组上进行测试,从而用于确认的目的。缺少CAR的在其他方面可比的T细胞用于测试非CAR特异性相互作用。SEQ ID:31、SEQ ID:35和SEQ ID:40中的每个CAR都与人BCMA特异性相互作用,但未观察到CAR与任何其他蛋白质之间的相互作用。总之,三种本发明的CAR特异性结合至BCMA但不与另一种抗原发生交叉反应。

[0427] 实施例10:CAR T细胞抗肿瘤活性的体内评估

[0428] 在测量人骨髓瘤肿瘤细胞在动物中的生长的动物模型中测试由包含SEQ ID:30、SEQ ID:31和SEQ ID:35的核苷酸序列的本发明的mRNA构建体产生的CAR T细胞。这些mRNA构建体编码分别包含SEQ ID:20、SEQ ID:21和SEQ ID:25的序列的CAR蛋白。

[0429] 如实施例1中所述,通过将mRNA CAR构建体转染到人CD8⁺细胞中来制备CAR T细胞。本研究中使用的阴性对照包括(1)未修饰的CD8⁺细胞和(2)仅载体。NOD-scid-gamma(NSG)小鼠接种了200万个MM.1S-fluc人骨髓瘤肿瘤细胞。通过连续生物发光成像监测肿瘤生长。在第6天,小鼠随机接受载体、未修饰的CD8⁺T细胞或转染以表达SEQ ID:20、SEQ ID:21或SEQ ID:25的CAR的CAR T细胞。图2显示了肿瘤测量的结果。到第11天,肿瘤在用载体或修饰的CD8⁺细胞处理的小鼠中广泛生长。相比之下,转染以表达SEQ ID:20($p=0.006$)、SEQ ID:21($p=0.01$)或SEQ ID:25($p=0.004$)的CAR的CAR T细胞显著抑制了肿瘤生长。总之,从本发明的编码抗BCMA CAR的mRNA构建体的三个实例制备的CAR T细胞在动物模型中显著抑制了人骨髓瘤肿瘤的生长。

[0430] 实施例11:mRNA对CAR T细胞存活的影响

[0431] 进行受控实验以评估编码CAR的mRNA对由两名骨髓瘤患者捐赠的细胞产生的CAR T细胞的存活的影响。将两批CAR T细胞(每批由来自两名骨髓瘤患者的细胞并通过使用包含SEQ ID:31的核苷酸序列的本发明的mRNA构建体产生)与两个相应批次的CAR T细胞(每批由来自这两名骨髓瘤患者的细胞但使用包含SEQ ID:29的核苷酸序列的参考mRNA构建体产生)进行比较。除此指出外,每批CAR T细胞基本上通过实施例1中描述的方法产生。mRNA电穿孔后将细胞培养21小时,收获细胞并评估存活率。结果如下:

[0432]			存活率(%)
	SEQ ID:31	患者1	90
		患者2	81
	SEQ ID:29	患者1	83
		患者2	67

[0433] SEQ ID:29的CAR T细胞的存活率显著低于SEQ ID:31的CAR T细胞的存活率。总之,与SEQ ID:29的比较mRNA构建体相比,本发明的SEQ ID:31的mRNA构建体赋予CAR T细胞更好的存活率。

[0434] 实施例12:使用睡美人转座子系统制造表达本发明的嵌合抗原受体的永久修饰的CAR T细胞

[0435] 睡美人转座子系统用于制造表达本发明的嵌合抗原受体的永久修饰的CAR T细胞。

[0436] 构建第一质粒,其包含元件EF1a启动子、IgG 5'UTR、编码SEQ ID:21的氨基酸序列的开放阅读框和polyA尾,其中前述元件共同地侧接睡美人转座子的反向末端重复序列(“Seq-21转座子质粒”)。构建包含EF1a启动子、IgG 5'UTR、Kozak共有序列、编码SB11的开放阅读框和polyA尾的第二质粒(“SB11质粒”)。

[0437] 洗涤来自正常人供体的外周血单核细胞并将其重悬于在单独的Seq-21转座子质粒存在或在Seq-21转座子质粒和SB11质粒两者存在的情况下的P3缓冲液(Lonza)中。将细胞电穿孔((4D **Nucleofector**®,Lonza)以将质粒引入细胞。然后将细胞转移到培养物中并持续5小时。将细胞转移到包含CD3/CD28 **Dynabeads**®(ThermoFisher)的刺激培养物中。在扩增过程中,如实施例1所述,通过用BCMA-PE试剂染色和流式细胞术来分析CD4+和CD8+T细胞的CAR表达。到第14天,T细胞扩增了30倍。用SB11和Seq-21转座子质粒修饰的细胞显示5-10%的细胞对BCMA-PE的反应性(图3A)。仅用Seq-21转座子质粒转染后扩增的细胞显示无反应性。使用采用多发性骨髓瘤靶细胞系MM1S-GFP的细胞毒性测定来评估功能性CAR T细胞活性,如实施例1中所述,使用基于总活细胞的细胞数的多个效应子:靶标比例。细胞因子(干扰素- γ)的产生也通过ELISA对来自4:1效应子:靶标比例的共培养上清液进行了评估。图3B显示了来自第9天细胞的数据,说明了通过使用Seq-21转座子质粒和SB11质粒而不是单独的Seq-21转座子质粒递送的抗BCMA CAR进行的永久修饰赋予的特异性细胞毒性和干扰素- γ 产生。

[0438] 因此,睡美人转座子系统成功地用于产生表达本发明的抗BCMA CAR的CAR T细胞。这些细胞表现出抗BCMA细胞毒性和细胞因子分泌。预计他们将永久地表达CAR。

[0439] 本文提及的所有出版物、专利、专利申请、公开和数据库条目(例如序列数据库条目),例如在背景、发明内容、具体实施方式、实施例和/或参考文献部分,在此通过引用将其全部内容并入,就好像每个单独的出版物、专利、专利申请、公开和数据库条目都通过引用具体和单独地并入本文。在发生冲突的情况下,以本申请(包括本文的任何定义)为准。

[0440] 等同物和范围

[0441] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定本文描述的实施方案的许多等同物。本公开的范围不旨在限于以上描述,而是如所附权利要求中所阐述的。

[0442] 诸如不定冠词(“a”、“an”)和定冠词(“the”)的冠词可以表示一个或多个,除非有相反的指示或可以从上下文中以其他方式明显看出。如果存在一个、更多个或所有组成员,则在一个组的两个或多个成员之间包含“或”的权利要求或描述被视为得到满足,除非有相反的指示或从上下文中以其他方式明显看出。在两个或更多个组成员之间包括“或”的组的公开提供了其中恰好存在该组的一个成员的实施方案、其中存在该组的两个或多个成员的实施方案、以及其中存在所有该组成员的实施方案。出于简洁的目的,这些实施方案没有在本文中单独阐述,但是应当理解,这些实施方案中的每个在本文中提供并且可以被具体要求保护或放弃。

[0443] 应当理解,本发明包括来自一个或多个权利要求或来自本发明的描述的一个或多个相关部分的所有变化、组合和排列,其中一个或多个限制、要素、条款或描述性术语,被引入到另一个权利要求中。例如,从属于另一权利要求的权利要求可以修改为包括在从属于同一基本权利要求的任何其他权利要求中发现的一个或多个限制。此外,当权利要求记载组合物时,应理解包括根据本文公开的任何制备或使用的方法或根据本领域已知的方法(如

果有的话)制备或使用组合物的方法,除非另有说明,或者除非对于本领域的普通技术人员来说,显然会出现矛盾或不一致。

[0444] 在要素以列表形式呈现的情况下,例如,以马库什组格式,应当理解,还公开了要素的每个可能的子组,并且可以从该组中去除任何要素或要素的子组。还应注意,术语“包括”旨在是开放式的并且允许包括额外的要素或步骤。应当理解,一般而言,当实施方案、产物或方法被称为包括特定要素、特征或步骤时,还提供了由这种要素、特征或步骤组成或基本上由其组成的实施方案、产物或方法。出于简洁的目的,这些实施方案没有在本文中单独阐述,但是应当理解,这些实施方案中的每个在本文中提供并且可以被明确要求保护或放弃。

[0445] 在给出范围的情况下,包括端点。此外,应当理解,除非另有说明或从上下文中和/或本领域普通技术人员的理解中以其他方式明显看出,表示为范围的值在一些实施方案中可以采用所述范围内的任何特定值,到该范围的下限的单位的十分之一,除非上下文另有明确规定。处于简洁的目的,每个范围内的值在本文中并未单独说明,但应理解,这些值中的每个均在本文中提供并且可被明确要求保护或放弃。还应理解,除非另有说明或从上下文中和/或本领域普通技术人员的理解中以其他方式明显看出,表示为范围的值可以采用给定范围内的任何子范围,其中子范围的端点表示为以与该范围的下限的单位的十分之一相同的精度。

[0446] 此外,应当理解,本发明的任何特定实施方案可以从任何一项或多项权利要求明确地排除。在给出范围的情况下,该范围内的任何值可以明确地从任何一项或多项权利要求中排除。本发明的组合物和/或方法的任何实施方案、要素、特征、应用或方面可以从任何一项或多项权利要求中排除。出于简洁的目的,本文未明确阐述其中排除一个或多个要素、特征、目的或方面的所有实施方案。

序列表

<110> 笛卡尔疗法股份有限公司

<120> 抗BCMA嵌合抗原受体

<130> C1540.70001W000

<140>

<141>

<150> US 62/819,068

<151> 2019-03-15

<160> 133

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 1

Asp Tyr Ser Ile Asn

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 2

Ser Tyr Ser Ile Asn

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 3

Ser Tyr Asp Ile Asn

1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 4

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 5

Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 6

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Gln Gly Phe Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 7

Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 8

Asp Tyr Thr Tyr Gly Met Asp Tyr

1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 9

Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Asp Phe

1 5

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 10

Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His

1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 11

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Phe Leu Gly Ile Asn Leu Ile His

1 5 10 15

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 12

Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr

1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 13

Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr

1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 14

Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser

1 5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 15

Asn Leu Ala Ser Asn Val Asn Thr

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 16

Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 17

Leu Gln Ser Arg Thr Leu Pro Arg Thr

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 18

Leu Gln Ser Lys Asn Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 19

<211> 503

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 19

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu

35 40 45

Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys

50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln

65 70 75 80

Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe

85 90 95

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

405	410	415
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg		
420	425	430
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly		
435	440	445
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu		
450	455	460
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu		
465	470	475
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His		
485	490	495
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
500		
<210> 20		
<211> 462		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 20		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1 5 10 15		
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu		
20 25 30		
Ala Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu		
35 40 45		
Ser Val Ser Phe Leu Gly Ile Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys		
50 55 60		
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln		
65 70 75 80		
Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe		
85 90 95		
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Pro Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr		
100 105 110		
Cys Leu Gln Ser Arg Thr Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys		
115 120 125		
Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly		
130 135 140		
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu		

145	150	155	160
Leu Lys Lys Pro Gly Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly			
	165	170	175
Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly			
	180	185	190
Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro			
	195	200	205
Ala Tyr Ala Gln Gly Phe Thr Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr			
	210	215	220
Ser Lys Ser Met Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp			
225	230	235	240
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Leu Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Asp Phe			
	245	250	255
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe			
	260	265	270
Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro			
	275	280	285
Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys			
	290	295	300
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala			
305	310	315	320
Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu			
	325	330	335
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Val			
	340	345	350
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn			
	355	360	365
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val			
	370	375	380
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg			
385	390	395	400
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys			
	405	410	415
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg			
	420	425	430
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys			
	435	440	445
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	450	455	460

<210> 21

<211> 504

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 21

```

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

```

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

<210> 22

<211> 462

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 22

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

305	310	315	320
Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu			
	325	330	335
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Val			
	340	345	350
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn			
	355	360	365
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val			
	370	375	380
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg			
385	390	395	400
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys			
	405	410	415
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg			
	420	425	430
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys			
	435	440	445
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	450	455	460
<210> 23			
<211> 504			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 合成多肽			
<400> 23			
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu			
1	5	10	15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu			
	20	25	30
Ala Val Ser Pro Gly Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu			
	35	40	45
Ser Val Ser Phe Leu Gly Ile Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys			
	50	55	60
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln			
65	70	75	80
Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe			
	85	90	95
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Pro Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr			

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

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 420 425 430
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 435 440 445
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 450 455 460
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 465 470 475 480
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 485 490 495
 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 500

<210> 24

<211> 462

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 24

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

Leu Lys Lys Pro Gly Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly		
165	170	175
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly		
180	185	190
Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro		
195	200	205
Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Thr Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr		
210	215	220
Ser Lys Ser Met Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp		
225	230	235
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Leu Asp Tyr Thr Tyr Gly Met Asp Tyr		
245	250	255
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe		
260	265	270
Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro		
275	280	285
Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys		
290	295	300
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala		
305	310	315
Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu		
325	330	335
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Val		
340	345	350
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn		
355	360	365
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val		
370	375	380
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg		
385	390	395
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys		
405	410	415
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg		
420	425	430
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys		
435	440	445
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
450	455	460

<210> 25

<211> 504

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 25

```

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

```

260	265	270
Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr	Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro	
275	280	285
Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys		
290	295	300
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala		
305	310	315
Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu		
325	330	335
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Lys Arg		
340	345	350
Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro		
355	360	365
Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu		
370	375	380
Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala		
385	390	395
Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu		
405	410	415
Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly		
420	425	430
Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu		
435	440	445
Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser		
450	455	460
Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly		
465	470	475
Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu		
485	490	495
His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
500		
<210> 26		
<211> 462		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 26		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		

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

Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu			
325	330	335	
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Val			
340	345	350	
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn			
355	360	365	
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val			
370	375	380	
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg			
385	390	395	400
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys			
405	410	415	
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg			
420	425	430	
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys			
435	440	445	
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
450	455	460	
<210> 27			
<211> 462			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 合成多肽			
<400> 27			
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu			
1	5	10	15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu			
20	25	30	
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu			
35	40	45	
Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys			
50	55	60	
Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln			
65	70	75	80
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe			
85	90	95	
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr			
100	105	110	

Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Thr	Ile	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	
115					120					125						
Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	
130					135					140						
Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	
145					150					155					160	
Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	
165					170					175						
Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	
180					185					190						
Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro	
195					200					205						
Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Ala	Asp	Thr	
210					215					220						
Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
225					230					235					240	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	
245					250					255						
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Phe	Val	Pro	Val	Phe	
260					265					270						
Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	
275					280					285						
Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	
290					295					300						
Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	
305					310					315					320	
Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	
325					330					335						
Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Asn	His	Arg	Asn	Arg	Val	
340					345					350						
Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	
355					360					365						
Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	
370					375					380						
Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	
385					390					395					400	
Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	
405					410					415						
Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	

420					425					430					
Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys
435					440					445					
Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg		
450					455					460					
<210> 28															
<211> 462															
<212> PRT															
<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
<220>															
<223> 合成多肽															
<400> 28															
Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
1			5					10					15		
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu
			20					25					30		
Ala	Val	Ser	Pro	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu
			35					40					45		
Ser	Val	Thr	Ile	Leu	Gly	Ser	His	Leu	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
			50					55					60		
Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Gln	Leu	Ala	Ser	Asn	Val	Gln
65					70					75				80	
Thr	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
					85					90				95	
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Glu	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Asn	Tyr	Tyr
			100					105					110		
Cys	Leu	Gln	Ser	Arg	Thr	Ile	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
			115					120					125		
Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly
			130					135					140		
Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu
145					150					155				160	
Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
					165					170				175	
Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
					180				185					190	
Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Arg	Glu	Pro
					195				200					205	
Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Phe	Thr	Gly	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Ala	Asp	Thr

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

<210> 29

<211> 1753

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 29

aggaaataag agagaaaaga agagtaagaa gaaatataag agccaccatg gccctgccccg 60

tgacagctct gctgctccct ctggctctgc tgctgcacgc tgccagaccc gacatcgtgc 120
 tgacacaaag cccccctagc ctggccatga gcctgggcaa gagggccaca atctcctgca 180
 gggccagcga gtccgtgacc atcctgggca gccacctgat ccaactggtac cagcagaagc 240
 ctggccagcc ccctaccctg ctgatccagc tggcctccaa cgtgcagaca ggagtgtccc 300
 ctaggttctc cggtctccgc agcagaaccg actttaccct gaccatcgac cccgtcgagg 360
 aggacgacgt ggctgtctac tattgcctgc agagcaggac catccccagg accttcggag 420
 gcggcacaaa gctggagatc aagggcagca ccagcggctc cggaaagcct ggcagcggag 480
 aaggctccac caagggacag attcagctgg tgcagagcgg acccgagctg aagaagcccc 540
 gcgaaacagt caagatcagc tgcaaagctt ccggtacac cttcacagac tacagcatca 600
 actgggtgaa aagggccccc ggcaagggcc tgaaatggat gggctggatc aacaccgaga 660
 ccaggagacc cgcctacgcc tacgacttta ggggcaggtt cgccttcagc ctggagacat 720
 ccgctagcac cgcttacctg caaattaata acctgaagta cgaggacacc gccacctatt 780
 tttgtgccct ggactacagc tacgcaatgg actattgggg acaggaacc tccgtgaccg 840
 tgagcagctt tgtgtcccgtg ttctgtcccg ccaaaccac caccacacct gctcctagge 900
 cccctacacc tgcccctacc atcgcttccc agcccctgag cctcagacct gaagcctgca 960
 gacctgctgc tggaggcgcc gtccacacaa ggggactgga cttgcctgt gacatctaca 1020
 tctgggctcc tctgcgggc acctgtggag tgctgtgct gtccttggtc atcacctgt 1080
 actgcaacca caggaacagg agcaagaggt ccaggctgct gcatagcgac tacatgaaca 1140
 tgacccccag aaggcccga cccaccagga agcactacca gccctacgcc cccctaggg 1200
 attttctgct ctacaggctc agagtgaagt tcagcagatc cgctgatgcc cctgcctatc 1260
 agcagggccga gaaccaactc tacaacgagc tgaacctggg aaggaggag gactacgacg 1320
 tgctcgacaa gagaagggga agggatcctg aaatgggcgg caagcccagg agaaagaacc 1380
 ctcaggaggg cctgtacaac gaactgcaga aggataagat ggccgaggcc tacagcgaaa 1440
 tcggcatgaa aggcgagaga aggagaggca agggccacga cggactgtac cagggcctgt 1500
 ccaccgccac caaagacacc tacgatgccc tgcacatgca ggccctgccc cccaggtgag 1560
 cggccgctta attaaactgc cttctgcggg gcttgccctt tggccatgcc cttcttctct 1620
 cccttgccacc tgtacctctt ggtctttgaa taaagcctga gtaggaagtc tagaaaaaaa 1680
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
 aaaaaaaaaa aaa 1753

<210> 30

<211> 1660

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 30

agaccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggcact 60
 gccagtcaca gcaactgctc tgccactggc actgctgctc cacgccgcca gacccgacat 120
 cgtgctgaca cagagcccag caagcctggc cgtgagccca ggccagagag ccacaatcac 180

atgcagagcc agcgagtccg tgtccttcct gggcatcaac ctgatccact ggtaccagca 240
 gaagcccgga cagccacca aactgctgat ctactccgcc agcaacctgc agtcaggcgt 300
 gccagccaga ttcagcggca gcggcagcgg aaccgacttc accctgacaa tcagctcagt 360
 ggaaccagaa gacaccgcca actactactg cctgcagagc agaaccctgc ccagaacctt 420
 cggccaaggc accaaggtcg aaatcaaggg ctccacaagc ggcagcggaa agcccggaag 480
 cggcgaggga agcaccaagg gccagatcca gctggtgcag agcggccccg aactgaagaa 540
 acccggcgga agcgtgaaaa tctcctgcaa ggccagcggc tacaccttca cctcctacag 600
 catcaactgg gtgcgccagg ccccaggcaa gggcctggaa tgggtcggct ggatcaacac 660
 cgagacaaga gagcccgctt acgcccaggg cttcacaggc agattcacct tcagcgcaga 720
 cacaagcaag agcatggcct acctgcagat caactccctg agagcagagg acaccgccgt 780
 ctactactgc gccctggact acctctactc cctggacttc tggggccagg gcacctctgt 840
 gaccgtgtcc agcttcgtgc ccgtgttctt gccagccaag ccaaccacaa caccagcacc 900
 cagaccacca acaccagcac caacaatcgc cagccagcca ctgtccctga ggccagaggc 960
 atgcagacca gcagcaggcg gagccgtgca caccagagga ctggacttcg cctgcgacat 1020
 ctacatctgg gcaccactgg ccggaacatg cggcgtgctg ctgctgagcc tgggtcatcac 1080
 cctgtactgc aaccaccgga acagagtga gttcagcaga tccgccgacg caccagccta 1140
 ccagcaggga cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg gggagaagag aagagtacga 1200
 cgtgctggat aagcggagag gcagagaccg tgagatgggc ggcaagccca gacggaagaa 1260
 ccacaagag ggctgtaca acgagctgca gaaagacaag atggccgagg cctacagcga 1320
 gatcggaatg aagggcgagc gcagaagagg caaggacac gacggactgt accagggcct 1380
 gagcacagcc accaaggata cctacgatgc cctgcacatg caggccctgc caccaagatg 1440
 actatgaaga aggaaggcat ccagaccaga aaccgaaaaa tgtctagcaa atccaaaaag 1500
 tgcaaaaaag tgcatgactc actggaggac ttccccaaga acagctcggt taaccgggcc 1560
 gccctctcca gacacatgtc ctccctgagc cacatctcgc ccttcagcca ctccagccac 1620
 atgctgacca cgcccacgcc gatgcacccg ccatccagca 1660

<210> 31

<211> 1786

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 31

agacccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggcact 60
 gccagtcaca gcaactgctgc tgccactggc actgctgctc cacgccgcca gaccgacat 120
 cgtgctgaca cagagcccag caagcctggc cgtgagccca ggccagagag ccacaatcac 180
 atgcagagcc agcgagtccg tgtccttcct gggcatcaac ctgatccact ggtaccagca 240
 gaagcccgga cagccacca aactgctgat ctactccgcc agcaacctgc agtcaggcgt 300
 gccagccaga ttcagcggca gcggcagcgg aaccgacttc accctgacaa tcagctcagt 360
 ggaaccagaa gacaccgcca actactactg cctgcagagc agaaccctgc ccagaacctt 420

cggccaaggc accaaggtcg aaatcaaggg ctccacaagc ggcagcggaa agcccgaag 480
 cggcgaggga agcaccaagg gccagatcca gctggtgcag agcggccccg aactgaagaa 540
 acccggcgga agcgtgaaaa tctcctgcaa ggccagcggc tacaccttca cctcctacag 600
 catcaactgg gtgcgccagg ccccaggcaa gggcctggaa tgggtcggct ggatcaacac 660
 cgagacaaga gagcccgctt acgcccaggg cttcacaggc agattcacct tcagcgcaga 720
 cacaagcaag agcatggcct acctgcagat caactccctg agagcagagg acaccgccgt 780
 ctactactgc gccctggact acctctactc cctggacttc tggggccagg gcaccctcgt 840
 gaccgtgtcc agcttcgtgc ccgtgttctt gccagccaag ccaaccacaa caccagcacc 900
 cagaccacca acaccagcac caacaatcgc cagccagcca ctgtccctga ggccagaggc 960
 atgcagacca gcagcaggcg gagccgtgca caccagagga ctggacttcg cctgcgacat 1020
 ctacatctgg gcaccactgg ccggaacatg cggcgtgctg ctgctgagcc tgggtcatcac 1080
 cctgtactgc aaccaccgga acaaacgcgg gagaaaaaag ctctctaca tcttcaagca 1140
 accattcatg cgcccagtcc aaaccacaca ggaggaagac ggatgcagct gcaggttccc 1200
 cgaagaggag gaaggcggat gcgagctcag agtgaagttc agcagatccg ccgacgcacc 1260
 agcctaccag caggacaga accagctgta caacgagctg aacctgggga gaagagaaga 1320
 gtacgacgtg ctggataagc ggagaggcag agaccctgag atgggcggca agcccagacg 1380
 gaagaaccca caagagggcc tgtacaacga gctgcagaaa gacaagatgg ccgaggccta 1440
 cagcgagatc ggaatgaagg gcgagcgagc aagaggcaag ggacacgacg gactgtacca 1500
 gggcctgagc acagccacca aggataccta cgatgccctg cacatgcagg ccctgccacc 1560
 aagatgacta tgaagaagga aggcatccag accagaaacc gaaaaatgtc tagcaaatec 1620
 aaaaagtgc aaaaagtgc tgactactg gaggaattcc ccaagaacag ctctgttaac 1680
 ccggccgccc tctccagaca catgtcctcc ctgagccaca tctcgccctt cagccactcc 1740
 agccacatgc tgaccagcc cagccgatg caccgccat ccagca 1786

<210> 32

<211> 1660

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 32

agacccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggcact 60
 gccagtcaca gactgctgc tgccactggc actgctgctc cacgccgcca gaccgacat 120
 cgtgctgaca cagagcccag caagcctggc cgtgagccca ggccagagag ccacaatcac 180
 atgcagagcc agcgagtccg tgtccttctt gggcatcaac ctgatccact ggtaccagca 240
 gaagcccgga cagccacca aactgctgat ctactccgcc agcaacctgc agtcaggcgt 300
 gccagccaga ttcagcggca gcggcagcgg aaccgacttc accctgacaa tcagctcagt 360
 ggaaccagaa gacaccgcca actactactg cctgcagagc aagaacttcc ccagaacctt 420
 cggccaaggc accaaggtcg aaatcaaggg ctccacaagc ggcagcggaa agcccgaag 480
 cggcgaggga agcaccaagg gccagatcca gctggtgcag agcggccccg aactgaagaa 540

acccggcgga agcgtgaaaa tctcctgcaa ggccagcggc tacaccttca cctcctacag 600
 catcaactgg gtgcgccagg ccccaggcaa gggcctggaa tgggtcggct ggatcaacac 660
 cgagacaaga gagcccgctt acgcccaggg cttcacaggc agattcacct tcagcgcaga 720
 cacaagcaag agcatggcct acctgcagat caactccctg agagcagagg acaccgccgt 780
 ctactactgc gccctggact acctctactc cctggacttc tggggccagg gcaccctcgt 840
 gaccgtgtcc agcttcgtgc ccgtgttcct gccagccaag ccaaccacaa caccagcacc 900
 cagaccacca acaccagcac caacaatcgc cagccagcca ctgtccctga ggccagaggc 960
 atgcagacca gcagcaggcg gagccgtgca caccagagga ctggacttcg cctgcgacat 1020
 ctacatctgg gcaccactgg ccggaacatg cggcgtgctg ctgctgagcc tggatcatcac 1080
 cctgtactgc aaccaccgga acagagtga gttcagcaga tccgccgacg caccagccta 1140
 ccagcaggga cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg gggagaagag aagagtacga 1200
 cgtgctggat aagcggagag gcagagacc ttagatgggc ggcaagccca gacggaagaa 1260
 cccacaagag ggctgtaca acgagctgca gaaagacaag atggccgagg cctacagcga 1320
 gatcggaatg aaggcgagc gcagaagagg caaggacac gacggactgt accaggcctt 1380
 gagcacagcc accaaggata cctacgatgc cctgcacatg caggccctgc caccaagatg 1440
 actatgaaga aggaaggcat ccagaccaga aaccgaaaaa tgtctagcaa atccaaaaag 1500
 tgcaaaaaag tgcatgactc actggaggac ttccccaaga acagctcggt taaccgggcc 1560
 gccctctcca gacacatgtc ctccctgagc cacatctcgc ccttcagcca ctccagccac 1620
 atgctgacca cgcccagcc gatgcacccg ccatccagca 1660

<210> 33

<211> 1786

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 33

agacccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggcact 60
 gccagtcaca gactgctgc tgccactggc actgctgctc cacgccgcca gaccgacat 120
 cgtgctgaca cagagcccag caagcctggc cgtgagccca ggccagagag ccacaatcac 180
 atgcagagcc agcgagtcgg tgtccttctt gggcatcaac ctgatccact ggtaccagca 240
 gaagcccgga cagccacca aactgctgat ctactccgcc agcaacctgc agtcaggcgt 300
 gccagccaga ttcagcggca gcggcagcgg aaccgacttc accctgacaa tcagctcagt 360
 ggaaccagaa gacaccgcca actactactg cctgcagagc aagaacttcc ccagaacctt 420
 cggccaagc accaaggctc aaatcaaggg ctccacaagc ggcagcggaa agcccggaag 480
 cggcgaggga agcaccaagg gccagatcca gctggtgcag agcggccccg aactgaagaa 540
 acccggcgga agcgtgaaaa tctcctgcaa ggccagcggc tacaccttca cctcctacag 600
 catcaactgg gtgcgccagg ccccaggcaa gggcctggaa tgggtcggct ggatcaacac 660
 cgagacaaga gagcccgctt acgcccaggg cttcacaggc agattcacct tcagcgcaga 720
 cacaagcaag agcatggcct acctgcagat caactccctg agagcagagg acaccgccgt 780

ctactactgc gccctggact acctctactc cctggacttc tggggccagg gcaccctcgt 840
 gaccgtgtcc agcttcgtgc ccgtgttcct gccagccaag ccaaccacaa caccagcacc 900
 cagaccacca acaccagcac caacaatcgc cagccagcca ctgtccctga ggccagaggc 960
 atgcagacca gcagcaggcg gagccgtgca caccagagga ctggacttcg cctgcgacat 1020
 ctacatctgg gcaccactgg ccggaacatg cggcgtgctg ctgctgagcc tggatcatcac 1080
 cctgtactgc aaccaccgga acaaacgcgg gagaaaaaag ctctctaca tcttcaagca 1140
 accattcatg cgcccagtcc aaaccacaca ggaggaagac ggatgcagct gcaggttccc 1200
 cgaagaggag gaaggcggat gcgagctcag agtgaagtcc agcagatccg ccgacgcacc 1260
 agcctaccag cagggacaga accagctgta caacgagctg aacctgggga gaagagaaga 1320
 gtacgacgtg ctggataagc ggagaggcag agacctgag atgggcggca agcccagacg 1380
 gaagaaccca caagagggcc tgtacaacga gctgcagaaa gacaagatgg ccgaggccta 1440
 cagcgagatc ggaatgaagg gcgagcgcag aagaggcaag ggacacgacg gactgtacca 1500
 gggcctgagc acagccacca aggataccta cgatgccttg cacatgcagg ccctgccacc 1560
 aagatgacta tgaagaagga aggcattccag accagaaacc gaaaaatgtc tagcaaatcc 1620
 aaaaagtgc aaaaagtgc tgactactg gaggacttcc ccaagaacag ctcgtttaac 1680
 ccggccgccc tctccagaca catgtcctcc ctgagccaca tctcgccctt cagccactcc 1740
 agccacatgc tgaccacgcc cagccgatg caccgcctat ccagca 1786

<210> 34

<211> 1660

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 34

agacccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggcact 60
 gccagtcaca gactgctgc tgccactggc actgctgctc cacgccgcca gacccgacat 120
 cgtgctgaca cagagcccag caagcctggc cgtgagccca ggccagagag ccacaatcac 180
 atgcagagcc agcgagtccg tgacaatcct gggtcccccac ctgatccact ggtaccagca 240
 gaagcccgga cagccacca aactgctgat caacctggcc agcaacgtga acacaggcgt 300
 gccagccaga ttcagcggca gcggcagcgg aaccgacttc accctgacaa tcagctcagt 360
 ggaaccagaa gacaccgcca actactactg cctgcagagc agaacactgc ccagaacctt 420
 cggccaagc accaaggtcg aaatcaaggc ctccacaagc ggcagcggaa agcccggaag 480
 cggcgaggga agcaccaagg gccagatcca gctggtgcag agcggccccg aactgaagaa 540
 acccggcgga agcgtgaaaa tctcctgcaa ggccagcggc tacaccttca ccgactacag 600
 catcaactgg gtgcgccagg ccccaggcaa gggcctggaa tgggtcggct ggatcaacac 660
 cgagacaaga gagcccgctt acgcctacga ctacacagc agattcacct tcagcgcaga 720
 cacaagcaag agcatggcct acctgcagat caactccctg agagcagagg acaccgccgt 780
 ctactactgc gccctggact acacctacgg catggactac tggggccagg gcaccctcgt 840
 gaccgtgtcc agcttcgtgc ccgtgttcct gccagccaag ccaaccacaa caccagcacc 900

cagaccacca acaccagcac caacaatcgc cagccagcca ctgtccctga ggccagaggc 960
 atgcagacca gcagcaggcg gagccgtgca caccagagga ctggacttcg cctgcgacat 1020
 ctacatctgg gcaccactgg ccggaacatg cggcgtgctg ctgctgagcc tggatcatcac 1080
 cctgtactgc aaccaccgga acagagtga gttcagcaga tccgcccagc caccagccta 1140
 ccagcaggga cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg gggagaagag aagagtacga 1200
 cgtgctggat aagcggagag gcagagaccc tgagatgggc ggcaagccca gacggaagaa 1260
 cccacaagag ggccctgtaca acgagctgca gaaagacaag atggccgagg cctacagcga 1320
 gatcggaatg aagggcgagc gcagaagagg caaggacac gacggactgt accagggcct 1380
 gagcacagcc accaaggata cctacgatgc cctgcacatg caggccctgc caccaagatg 1440
 actatgaaga aggaaggcat ccagaccaga aaccgaaaaa tgtctagcaa atccaaaaag 1500
 tgcaaaaaaag tgcatgactc actggaggac ttccccaaga acagctcggt taaccggcc 1560
 gccctctcca gacacatgtc ctccctgagc cacatctcgc ccttcagcca ctccagccac 1620
 atgctgacca cgcccagcc gatgcacccg ccatccagca 1660

<210> 35

<211> 1786

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 35

agaccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggcact 60
 gccagtcaca gactgctgc tgccactggc actgctgctc cacgccgcca gacccgacat 120
 cgtgctgaca cagagcccag caagcctggc cgtgagccca ggccagagag ccacaatcac 180
 atgcagagcc agcgagtccg tgacaatcct gggctccac ctgatccact ggtaccagca 240
 gaagcccgga cagccacca aactgctgat caacctggcc agcaacgtga acacaggcgt 300
 gccagccaga ttacgcggca gcggcagcgg aaccgacttc accctgacaa tcagctcagt 360
 ggaaccagaa gacaccgcca actactactg cctgcagagc agaacactgc ccagaacctt 420
 cggccaagc accaaggtcg aaatcaaggc ctccacaagc ggcagcggaa agcccggaag 480
 cggcgaggga agcaccagg gccagatcca gctggtgcag agcggccccg aactgaagaa 540
 acccggcgga agcgtgaaaa tctcctgcaa ggccagcggc tacaccttca ccgactacag 600
 catcaactgg gtgcgccagg ccccaggcaa gggcctggaa tgggtcggct ggatcaacac 660
 cgagacaaga gagcccgctt acgcctacga cttcacaggc agattcacct tcagcgcaga 720
 cacaagcaag agcatggcct acctgcagat caactccctg agagcagagg acaccgccgt 780
 ctactactgc gccctggact acacctacgg catggactac tggggccagg gcacctctgt 840
 gaccgtgtcc agcttcgtgc ccgtgttctt gccagccaag ccaaccacaa caccagcacc 900
 cagaccacca acaccagcac caacaatcgc cagccagcca ctgtccctga ggccagaggc 960
 atgcagacca gcagcaggcg gagccgtgca caccagagga ctggacttcg cctgcgacat 1020
 ctacatctgg gcaccactgg ccggaacatg cggcgtgctg ctgctgagcc tggatcatcac 1080
 cctgtactgc aaccaccgga acaaacgcgg gagaaaaaag ctcctctaca tcttcaagca 1140

accattcatg cgcccagtcc aaaccacaca ggaggaagac ggatgcagct gcaggttccc 1200
 cgaagaggag gaaggcggat gcgagctcag agtgaagttc agcagatccg ccgacgcacc 1260
 agcctaccag cagggacaga accagctgta caacgagctg aacctgggga gaagagaaga 1320
 gtacgacgtg ctggataagc ggagaggcag agaccctgag atgggcggca agcccagacg 1380
 gaagaaccca caagagggcc tgtacaacga gctgcagaaa gacaagatgg ccgaggccta 1440
 cagcgagatc ggaatgaagg gcgagcgcag aagaggcaag ggacacgacg gactgtacca 1500
 gggcctgagc acagccacca aggataccta cgatgccctg cacatgcagg ccctgccacc 1560
 aagatgacta tgaagaagga aggcatccag accagaaacc gaaaaatgtc tagcaaatcc 1620
 aaaaagtgca aaaaagtgca tgactcactg gaggacttcc ccaagaacag ctcgtttaac 1680
 ccggccgccc tctccagaca catgtctctc ctgagccaca tctcgccctt cagccactcc 1740
 agccacatgc tgaccacgcc cacgccgatg caccgcgat ccagca 1786

<210> 36

<211> 1739

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 36

agaccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggctct 60
 gccggtaca gcgttcttc tccgcttgc cctcctcttg cacgtgctc ggccagatat 120
 tgtctcaca cagagcccg tctactttc agcgagcgtc ggggaccgct ctaccatcag 180
 ttgtcgagcc agtgaaagcg tcaactattct ggggagccac cttatacatt ggtatcaaca 240
 aaagccaggc caggccccc aactgctgat tcagctcgca tctaattgtc agactggagt 300
 gcctgcaagg tttagcggta gtgggtcagg gacagatttc accttgacca ttagctcagt 360
 tgagcctgaa gatgtggccg tttattactg cctccaaagc cgcactatac ctcgacatt 420
 cggccaggga acaaaggtgg agattaagg tagtacctca gtagtggca agccaggag 480
 cggcgagggg tctacaaagg gtcaaattca attggtgcag tccggaccag aactgaaaaa 540
 accgggcggg agcgtcaaga tttcctgtgc agcatcaggc tatacattta ctgattacag 600
 tattaactgg gtgagacaag cgcctggaaa gggccttgag tgggtgggtt ggattaacac 660
 ggagactaga gaaccgcgt acgcctacga ttttagaggc cggttcactt tctccgccga 720
 tacaagtaaa tccacagcat atctccaaat gaatagcctt agagcggagg ataccgccgt 780
 gtattattgc gcgtcgaact attcttacgc aatggactac tgggggcagg gtactctcgt 840
 caccgtatcc tcatttggtc ccgtattttt gcccgccaag ccgaccacta ctccggcccc 900
 tcgacctccg acccctgctc cgactattgc gagtcaacca ttgagccttc ggcctgaggc 960
 atgtagaccg gcagctggtg gcgcagtcca tacacgaggc cttgattttg cgtgcgacat 1020
 ctatatatgg gcgccattgg ctgggacgtg cggcgtcctt ctcttgteac tcgtgataac 1080
 tctgtactgc aatcacagaa accgcgtgaa gttttccaga agcgcggacg cgccggccta 1140
 tcaacaaggg cagaatcagc tgtacaacga actcaatttg gggcgaaggg aggagtatga 1200
 tgttttggac aaaaggcgag gccgcgacct tgaaatgggc ggtaagccac gcagaaaaaa 1260

cccccaagag ggattgtaca atgaactgca aaaagacaag atggctgagg catacagtga 1320
 gataggaatg aaaggtgaac ggcgccgggg aaaaggacat gacgggttgt accagggtct 1380
 tagcactgca acgaaagata cctatgacgc cctgcacatg caagcattgc cccacggtg 1440
 actatgaaga aggaaggcat ccagaccaga aaccgaaaaa tgtctagcaa atccaaaaag 1500
 tgcaaaaaaag tgcatgactc actggaggac ttccccaaga acagctcggt taaccgggcc 1560
 gccctctcca gacacatgtc ctccctgagc cacatctcgc cttcagcca ctccagccac 1620
 atgctgacca cgcccacgcc gatgcacccg ccatccagca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1680
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1739

<210> 37

<211> 1529

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 37

agaccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggcact 60
 gccgtaaca gcgtcctcc tcccgtcgc ctcctcctc cacgcagcac ggccagacat 120
 cgtcctcaca cagagcccga gcagcctcag cgcgagcgtc ggggaccgcg caaccatcag 180
 ctgccgagcc agcgaagcg tcacaatcct cgggagccac ctgatacact ggtaccaaca 240
 aaagccaggc caggccccca aactgctgat ccagctcgca agcaacgtcc agacaggagt 300
 gccagcaagg ttcagcggaa gcgggagcgg aacagacttc accctacca tcagcagcgt 360
 cgagccagaa gatgtggccg tctactactg cctccaaagc cgcacaatac cacggacctt 420
 cggccaggga acaaaggtgg agatcaaggg aagcaccagc ggaagcggca agccagggag 480
 cggcgagggg agcacaagc gacaaatcca actcgtgcag agcggaccag aactgaaaaa 540
 gccgggcgga agcgtcaaga tcagctgcgc agcaagcggc tacacattca cagactacag 600
 catcaactgg gtgagacaag cgccaggaaa gggcctcgaa tgggtgggat ggatcaacac 660
 ggagacaaga gaacccgcat acgcctacga cttcagaggc cggttcacat tcagcgccga 720
 cacaagcaag agcacagcat acctccaaat gaacagcctc agagcggagg acaccgccgt 780
 gtactactgc gcgtcgcact acagctacgc aatggactac tggggacagg gaacactcgt 840
 caccgtaagc agcttcgtac ccgtattcct ccccgccaag ccgaccacaa caccggcccc 900
 acgaccacca acaccagccc cgacaatcgc gagccaacca ctcagcctcc ggccagaggc 960
 gtgcagaccg gcagcaggag gcgcagtcca cacacagga ctcgacttcg cgtgcgacat 1020
 atacatctgg gcaccactcg caggaaactg cggcgtcctc ctctcagcc tcgtgataac 1080
 actgtactgc aaccacagaa accgcgtgaa gttcagcaga agcgcggacg cgccggccta 1140
 ccaacaagga cagaaccagc tgtacaacga actcaacctc ggacgaaggg aggagtacga 1200
 cgtcctcgac aaaaggcgag gccgcgaccc agaaatgggc ggaaagccac gcagaaaaaa 1260
 cccccaagag ggactctaca acgaactgca aaaggacaag atggcagagg catacagcga 1320
 gataggaatg aaaggagaac ggcgccgggg aaaaggacac gacgggtctt accagggact 1380
 cagcacagca acgaaagaca cctacgacgc cctgcacatg caagcactcc cccacggtg 1440

aacctgagac tgggtggcttc tagaagcagc cattaccaac tgtaccttcc cttcttgctc 1500
 agccaataaa tataatcctct ttcactcag 1529
 <210> 38
 <211> 1724
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成多核苷酸
 <400> 38
 gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcgggtccc gcgggtctgt ctgttgcttc 60
 aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gccatggcac tgccctgttac 120
 agctctgctg ctgcctctgg cactgctgct tcatgccgcc agacctgaca ttgttctgac 180
 acagtccctt tctagtttga gcgcgagtggt tggcgaccga gctacgataa gctgtcgagc 240
 tagcgaaagc gtgacgatcc tgggttccca ccttattcat tggatatcaac agaaaccagg 300
 gcaggctcct aaacttctca tacagttggc cagcaatggt caaacccgtg tgcccgcacg 360
 cttcagcgga tcagggtcag gaaccgattt cacgctcaca attagcagtg tggagcctga 420
 tgacgtagcc gtgtactact gtctgcaaag ccgcaccatc ccgagaacgt ttgggggcg 480
 cacgaaattg gaaattaaag gaagcacttc cgggagtggg aagcctggga gtggcgaagg 540
 gtcaacaaaag gggcagatac agttggtcca gagcgggccc gagttgaaaa agccaggtgg 600
 atcagttaaa atttcttgtg ctgcgtccgg atatactttt actgactatt ctatcaactg 660
 ggtcaaacaa gctcccggta aaggattgga atgggtcgga tggataaaca ctgaaacccg 720
 cgagcctgct tatgcttacg attttcgagg tagattcacc ttctcacttg atacatccaa 780
 aagtacggct tacctgcaaa tgaactcact gagagcagaa gataccgccg tttactattg 840
 tgccctcgac tatagttacg ccatggatta ttggggacaa gggactctcg tgaccgtaag 900
 tagcttttgt cctgtgttcc tgcctgccaa gcctaccaca acaccagctc ctagacctcc 960
 aactcctgct cctacaatcg cctctcagcc actgtctctg aggcctgaag cttgtagacc 1020
 tgctgctggc ggagccgtgc ataccagagg actggatttc gcctgcgaca tctacatctg 1080
 ggctcctctg gctggaacat gtggcgtgct gctgctgagc ctgggtcatca ccctgtactg 1140
 caaccaccgg aacagagtga agttcagcag atccgccgat gctcctgcct accagcaggg 1200
 acagaaccag ctgtacaacg agctgaacct ggggagaaga gaagagtacg acgtgctgga 1260
 taagcggaga ggcagagatc ctgagatggg cggcaagccc agacggaaga atcctcaaga 1320
 gggcctgtat aatgagctgc agaaagacaa gatggccgag gcctacagcg agatcggaat 1380
 gaagggcgag cgcagaagag gcaagggaca cgatggactg taccagggcc tgagcacagc 1440
 caccaaggat acctatgatg ccctgcacat gcaggccctg cctccaagat gagggcccg 1500
 ttaaaccgcg tggtcgtctt tcttgctgtc caatttctat taaaggttcc tttgttccgt 1560
 aagtccaact actaaactgg gggatattat gaagggcctt gagcatctgg attctgccta 1620
 ataaaaaaca tttattttca ttgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1680
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1724
 <210> 39

<211> 1660

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 39

```

agacccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggctct 60
gccggtaaca gcgcttcttc tcccgttgc cctcctcttg cacgctgctc ggccagacat 120
agtattgacg caatcccccg cctctctcgc agtctctccc ggacaacggg ccactataac 180
ttgcagggca agtgagagtg tgacaatcct gggatcacac ctgatacatt ggtatcagca 240
aaagccgggt caacccccta agttgctgat acaactggca tctaattgtac aaacgggagt 300
ccccgcacgg ttctctgggt ctggttctgg cactgacttc acattgacaa tctcaagtgt 360
tgaacctgag gacacagcca attattattg cttgcaatct cgaacaattc ctgcacttt 420
cggtcagggc acgaagggtg aaattaaagg tagtacctca ggtagtggca agccaggag 480
cggcgagggg tctacaaagg gtcaaatcca gcttggtcaa tctggcccgg agctgaaaaa 540
acccggtgga tctgtgaaaa ttagctgcaa agcgtcagga tatacattca cagactatag 600
catcaactgg gtccggcagg cacccggtaa gggctctggaa tgggttggtt ggattaacac 660
tgagaccctg gagcccgctt atgcatacga ttttacggga cggtttactt tcagcgccga 720
cacgagcaag agcatggcgt acctccagat taacagtctg agggcggagg acacagccgt 780
ctactattgc gcgttggtt atagctacgc gatggactac tgggggcaag gtacacttgt 840
cacggtgtca tcttttgttc ccgtattttt gcccgccaag ccgaccacta ctccggcccc 900
tcgacctccg acccctgctc cgactattgc gagtcaacca ttgagccttc ggctgaggc 960
atgtagaccg gcagctgggt gcgcagtcca tacacgaggg cttgattttg cgtgcgacat 1020
ctatatatgg gcgccattgg ctgggacgtg cggcgtcctt ctcttgctac tcgtgataac 1080
tctgtactgc aatcacagaa accgcgtgaa gttttccaga agcgcggacg cgccggccta 1140
tcaacaaggg cagaatcagc tgtacaacga actcaatttg gggcgaaggg aggagtatga 1200
tgttttggac aaaaggcgag gccgcgaccc tgaaatgggc ggtaagccac gcagaaaaaa 1260
cccccaagag ggattgtaca atgaactgca aaaagacaag atggctgagg catacagtga 1320
gataggaatg aaaggtgaac ggcgccgggg aaaaggacat gacgggttgt accagggtct 1380
tagcactgca acgaaaagata cctatgacgc cctgcacatg caagcattgc cccacgggtg 1440
actatgaaga aggaaggcat ccagaccaga aaccgaaaaa tgtctagcaa atccaaaaag 1500
tgcaaaaaaag tgcatgactc actggaggac ttcccaaga acagctcggt taaccgggcc 1560
gccctctcca gacacatgtc ctccctgagc cacatctcgc cttcagcca ctccagccac 1620
atgctgacca cgcccagcc gatgcacccg ccatccagca 1660

```

<210> 40

<211> 1660

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 40

```

agacccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagctcatca ccatggcact 60
gccagtcaca gcactgctgc tgccactggc actgctgctc cacgccgcca gacccgacat 120
cgtgctgaca cagagcccag caagcctggc cgtgagccca ggccagagag ccacaatcac 180
atgcagagcc agcgagtcgg tgacaatcct gggctcccac ctgatccact ggtaccagca 240
gaagcccgga cagccaccca aactgctgat ccagctggcc agcaacgtgc agacaggcgt 300
gccagccaga ttcagcggca gcggcagcgg aaccgacttc accctgacaa tcagctcagt 360
ggaaccagaa gacaccgcca actactactg cctgcagagc agaacaatcc ccagaacctt 420
cggccaaggc accaaggtcg aaatcaaggg ctccacaagc ggcagcggaa agcccggaag 480
cggcgaggga agcaccaagg gccagatcca gctggtgcag agcggccccg aactgaagaa 540
acccggcgga agcgtgaaaa tctcctgcaa ggccagcggc tacaccttca ccgactacag 600
catcaactgg gtgcgccagg ccccaggcaa gggcctggaa tgggtcggct ggatcaacac 660
cgagacaaga gagcccgctt acgcctacga cttcacaggc agattcacct tcagcgcaga 720
cacaagcaag agcatggcct acctgcagat caactccctg agagcagagg acaccgccgt 780
ctactactgc gccctggact acagctacgc catggactac tggggccagg gcaccctcgt 840
gaccgtgtcc agcttcgtgc cctgtttcct gccagccaag ccaaccacaa caccagcacc 900
cagaccacca acaccagcac caacaatcgc cagccagcca ctgtccctga ggccagaggc 960
atgcagacca gcagcaggcg gagccgtgca caccagagga ctggacttcg cctgcgacat 1020
ctacatctgg gcaccactgg ccggaacatg cggcgtgctg ctgctgagcc tggctcatcac 1080
cctgtactgc aaccaccgga acagagtga gttcagcaga tccgccgacg caccagccta 1140
ccagcaggga cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg gggagaagag aagagtacga 1200
cgtgctggat aagcggagag gcagagaccc tgagatgggc ggcaagccca gacggaagaa 1260
cccacaagag ggctgtaca acgagctgca gaaagacaag atggccgagg cctacagcga 1320
gatcggaatg aagggcgagc gcagaagagg caaggacac gacggactgt accaggcctt 1380
gagcacagcc accaaggata cctacgatgc cctgcacatg caggccctgc caccaagatg 1440
actatgaaga aggaaggcat ccagaccaga aaccgaaaaa tgtctagcaa atccaaaaag 1500
tgcaaaaaaag tgcatgactc actggaggac ttccccaaga acagctcggt taaccgggcc 1560
gccctctcca gacacatgtc ctccctgagc cacatctcgc ccttcagcca ctccagccac 1620
atgctgacca cgcccacgcc gatgcacccg ccatccagca 1660

```

<210> 41

<211> 1644

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 41

```

gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcgggtccc gcgggtctgt ctgttgcttc 60
aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gccatggctc tgcccgtaac 120

```

cgccctgctc ctgccactcg cactcctcct gcatgcggct aggccggata ttgtaatgac 180
gcaatccccct gactcactga gtgtgtcctt gggagagaga gccacgataa attgtcgggc 240
ctccgagtca gtcactatac tcggttctca cctgatccac tggtagcaac aaaagcctgg 300
gcagccaccg aaacttttga tacagttagc ctccaatgtc caaactgggg ttcccggaccg 360
cttttagcga agcgggagcg gtaccgattt taccctcacc atatcatcac tccaagctga 420
ggacgtggcc gtttactact gtctccagtc aaggacaata ccgcgaacat tcggtggagg 480
tactaaagtt gaaataaaaag gttccacaag tggctcaggg aagccaggga gtggtgagg 540
aagcacaanaa ggccaaatac aactggtgca gtctggagca gaagtcaaga agccaggtgc 600
ctccgttaag atttcttgta aagcttccgg ctataccttt accgattaca gcattaattg 660
ggtccgccag gcccctgggc agggccttga gtggatgggc tggataaata cagagactag 720
agaacccgag tatgcatacg attttcgagg ccgggtgact atgacgcgcg acacctccgc 780
gtctactgca tacctgcaga tcagtagcct gaaagccgaa gataccgcgc tttacttctg 840
cgccctcgac tattcttacg caatggacta ctggggacaa ggttctctcg ttactgtatc 900
tagctttgtt ccagtgttcc tcccggcgaa acccaccact accccagccc ctgccccacc 960
gactccggcg ccgacgattg ccagtcagcc gttgagcctc cgaccggagg cgtgtcgccc 1020
cgcggcagga ggggccgtgc atactagggg acttgatttt gcctgtgaca tatatatatg 1080
ggcccccttg gccggtacct gtggtgtcct gctgcttagt ttggtgataa cactctattg 1140
taaccatcgc aatcgagtta agttcagtcg gtcagctgat gctccggctt accagcaagg 1200
ccagaatcag ctgtacaatg agtcaacct gggtcggcga gaagagtatg atgtactgga 1260
caaacggaga ggtcgggatc ccgaaatggg gggtaaacca cgcaggaaga acccacaaga 1320
gggggtgtac aatgaactgc agaaagataa gatggccgag gcttacagtg aaatcgggat 1380
gaaaggagaa cggagacgag gtaaggggca cgacggactc tatcaaggac tcagcaccgc 1440
tacaaaggat acctatgatg cactccatat gcaagccctt cccccaaggt agggggccgt 1500
ttaaacccgc tggctcgctt tcttgctgtc caatttctat taaaggttcc tttgttccgt 1560
aagtccaact actaaactgg gggatattat gaagggcctt gagcatctgg attctgccta 1620
ataaaaaaca tttattttca ttgc 1644

<210> 42

<211> 1644

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 42

gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcgggtccc gcgggtctgt ctgttgcttc 60
aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gccatggcgc tcccagttac 120
agccttggtg ttgcccttgg ccctccttct ccacgtgca cggccggaca tagttttgac 180
ccagagccct gcaagtttgg ctgtcagtc tggagagcga gctacaatta gttgcagagc 240
gtctgaaagc gtctccatat tgggcagtc ccttttgcac tggtagcaac agaagccagg 300
acagccacca aagctgctta tttacctcgc ctccaatttg caaactggag taccggctcg 360

attctccgga tctggttctg gaacagactt cacccttacg atatcaagtc tggaggctga 420
 ggatgtcgcg gtttactact gcctccaatc acgaacaata ccgagaacgt tcgccagg 480
 gactaaactt gaaatcaagg gtagtacgag tggaagtggg aaacctgggt ctggtgagg 540
 gtctacgaaa gggcaaatac agctggttca atcaggcgcc gaagtaaaaa aaccgggggc 600
 atctgtgaaa atatcctgca aagcgtctgg atacacattt acagactatt ccatcaactg 660
 ggtccgccag gccccggcc aaggtctgga atggatgggc tggatcaaca cagaaacccg 720
 ggaacctgca tacgcttacg attttcgagg ccgggtcact atgaccgcg atacaagtgc 780
 ctccaccgca tatctccaaa tctcatctt gaaggcagaa gatacagccg tctacttttg 840
 tgcactggac tatagctatg cgatggatta ctgggggtcaa ggcagccttg ttactgtgtc 900
 cagctttgtg cccgtatttc tcccggccaa gccaaactact acccctgccc cgcgaccgcc 960
 aacgccagcg cctaccattg cgagtcaacc actctcactg cggccagaag cctgccgacc 1020
 tgccgccggg ggggcagtac aactcgcgg tcttgatttt gcttgcgaca tatatatctg 1080
 ggccccactg gctgggacgt gtggcgtttt gctgcttagt ttggtcataa ccctctattg 1140
 caaccacaga aatcgcgtta aatttagcag aagtgtgac gcacctgcat accagcaagg 1200
 tcagaaccaa ctgtataatg aactgaattt gggacgcagg gaagagtatg acgtcttgga 1260
 taaaagaaga ggacgcgatc cggagatggg tgggaaacct cgccgaaaga accccaaga 1320
 aggtttgtat aatgaactcc agaaggacaa aatggcggag gcgtatagcg agattggaat 1380
 gaagggggaa agacgacgcg gcaaaggtca tgacggattg tatcagggcc tctctacggc 1440
 tactaaagat acttatgatg ctctccatat gcaggcgttg ccaccaaggt gagggcccg 1500
 ttaaaccgcg tggctcgctt tcttgctgtc caatttctat taaaggttcc tttgttccgt 1560
 aagtccaact actaaactgg gggatattat gaagggcctt gagcatctgg attctgccta 1620
 ataaaaaaca tttattttca ttgc 1644

<210> 43

<211> 1644

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 43

gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcggtccc gcgggtctgt ctgttgcttc 60
 aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gccatggctc tgcccgtaac 120
 cgcaactgctt ctgccactcg ctctgttget ccacgccgt agacctgaca tcgtgctgac 180
 gcaaagcccc gcgtcactcg ccgttagttt gggaaaacgg gcgacaatat cttgtagagc 240
 ttctgaaagc gtactatcc tgggttcaca tctgatacac tgggtaccagc agaagccagg 300
 acagccaccc aaactgctga tatatcttgc ttctaagtga caaacaggcg taccagcccc 360
 cttcagcggg tccgggtctg gtacagattt tactttgacc atatccagtt tggaggctga 420
 ggacgttgcc gtctactact gtctccaaag tcggactata ccgaggacct ttggtcagg 480
 gacaaagctt gagataaaag ggtccacatc cgggtcagga aaacctggaa gtggggagg 540
 atctacaaaa gggcaggtac aactggtcca gtccggggcg gaagtaaaaa aaccgggggc 600

ctctgtaaaa atttcctgta aggcctctgg ttacacgttt accgactaca gtatcaattg 660
 ggtgcggaac gccccgggcc aagggttgga atggatgggt tggataaata ctgagacacg 720
 ggaaccagca tacgcctacg attttcgggg tcgagtcaca atgacgagag atactttctgc 780
 cagtactgct tatctccaga tcagttccct caaagcggaa gacaccgcag tatactttctg 840
 tgccctcgac tattcatacg caatggatta ttgggggtcaa ggctcacttg tgacgggtgag 900
 ttctttcgtc cccgtcttct tgccggcgaa gccactact acgccggcac cacgcccccc 960
 cactcctgcg ccaactatag cttcacaacc cttgagcctg aggcctgagg cgtgtaggcc 1020
 agcagcaggt ggggcagtg acactagggg cctcgatttt gcctgcgata tctatatattg 1080
 ggcaccgctc gcgggtacgt gcggcggttct tttgttgtcc ttggtcatca cactgtactg 1140
 taaccatcgg aatcgcgtaa aattcagccg gaggccgat gcaccggcgt accagcaagg 1200
 tcaaaaccag ctctacaatg agctgaatct gggaagacgc gaagagtatg acgttcttga 1260
 taagaggaga ggccgagacc ccgaaatggg ggggaagccc aggcgaaaga atccccagga 1320
 gggtttgtac aatgagcttc aaaaagacaa gatggcagag gcctactccg aaatagggat 1380
 gaaaggggaa agacggagag gcaagggctc tgacggactc tatcagggtc ttagcaccgc 1440
 cacgaaggac acatacgatg cccttcatat gcaagcactc ccccttagat gagggcccg 1500
 ttaaaccgcg tggtcgtctt tcttgcgtgc caatttctat taaaggttcc tttgttccgt 1560
 aagtccaact actaaactgg gggatattat gaagggcctt gagcatctgg attctgccta 1620
 ataaaaaaca tttattttca ttgc 1644

<210> 44

<211> 1644

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 44

gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcgggtccc gcgggtctgt ctgttgcttc 60
 aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gccatggcgc ttccagtcac 120
 cgctctcctt ttgccgctcg cactgcttct gcatgcggcc cgccccgata tcgttatgac 180
 ccagtctcct gacagtctga gtgtcagtct cggagagcgg gcaacgatta attgtcgcgc 240
 ctccgaaagc gttaccatac tcgggagcca tcttatccat tggtagcaac aaaagccagg 300
 tcagcctcct aagttgttga ttcaacttgc tagcaacgtg caaacgggcg ttccagacag 360
 gtttagcgga tccggaagcg gaacagactt cactctgacg atatcaagtt tgcaagcgga 420
 ggacgtagcg gtttactact gccttcagag taggacaatc cctagaacat tcggcggcgg 480
 gacaaagggt gaaaataaagg gatccaccag tggaagcggg aagccgggta gcggtgaagg 540
 cagcactaag ggacaaatcc aactcgtaca gagggtggca gaggtgaaga aacctgggga 600
 gagggtaaaa atttcttga aagcctcagg ctacacattc acgattata gcattaattg 660
 ggtgacgacg gcgcccgtc aaggacttaa gtggatgggc tggatcaaca cggaacgcg 720
 cgaaccggcg tatgcctatg actttcgagg aaggttcgca ttcagccttg acacgtccgc 780
 atcaaccgcc taccttcaga tcagttcact caaagctgaa gatacggctg tgtatttttg 840

cgcacttgat tatagctatg ccatggacta ctggggtcag ggaaccttgg ttactgtatc 900
 ttcttttcgta ccagtttttt tgccggctaa accgactacc acgccggcac cacggccccc 960
 gacacccgct ccaacaatag cgtcccaacc cttttcactt aggccggagg cctgcagacc 1020
 tgctgctggg ggagctgtcc atactcgggg acttgacttc gcgtgcgaca tatacatctg 1080
 ggcgcctctt gccggcacct gtggtgtatt gttgttgtct cttgttatca ctctgtactg 1140
 taaccaccgc aacagggtta agttcagccg ctccgcagat gctcctgcct accagcaggg 1200
 acaaaatcaa ctttataacg aattgaacct tgggcgaagg gaggaatatg atgttcttga 1260
 caaaaggcgc ggcagggtatc cggagatggg aggtaagcca cgcaggaaga atccgcagga 1320
 gggcttgat aacgaactcc agaaagataa aatggcagaa gcctattccg agataggaat 1380
 gaagggggag cgaagacggg gaaaagggtca cgatgggctg tatcagggcc tctctaccgc 1440
 cactaaggac acttatgacg cattgcacat gcaggcgttg ccaccacggt gagggcccg 1500
 ttaaaccgc tggtcgtt tcttctgtc caatttctat taaaggttcc tttgttccgt 1560
 aagtccaact actaaactgg gggatattat gaagggcctt gagcatctgg attctgccta 1620
 ataaaaaaca tttattttca ttgc 1644

<210> 45

<211> 1644

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 45

gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcgggtccc gcgggtctgt ctgttgcttc 60
 aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gccatggcac tcccagttac 120
 ggctttgttg ctcccgctcg cgttggtgct gcatgctgct cgcccagaca tcgtcctcac 180
 gcaaagtccc gcaagtctcg ccgtctcatt gggcgaaaga gcgacaatat cctgtcgagc 240
 gtcagagtct gttagtatcc ttggcagcca ctatctggct tggatcagc agaaaccagg 300
 gcagcctccc aagctgctga tttatctcgc gagcaatctc cagacagggtg tcccagcacg 360
 cttcagtgga tctggcagcg gaacagattt tacactcacg atttcttccc tggaggctga 420
 agatgtggca gtgtactatt gtcaacagag cagaactatc ccgagaacat ttgggcaggg 480
 cactaaactt gaaatcaaag ggagtacgag tggtagtgga aaaccgggat ccggcgaagg 540
 ctccacaaaag gggcaaatac agctgggtcca gtctggagct gaggtgaaaa agcccgggtga 600
 gtctgtaaag atttcttga aggcaagtgg ttacactttt acggattact caatcaattg 660
 ggttcggcaa gcacctggac agggtttgaa gtggatggga tggataaata cagaaacaag 720
 ggaacctgcc tatgcctatg actttcgggg tagattcgcc ttctcacttg acacaagtgc 780
 cagtacagcc tatcttcaga tttcaagcct gaaggcgga gatacgccg tctatTTTTG 840
 tgcgttgac tatagttatg cgatggatta ttggggccaa ggcacactgg tcacagttag 900
 ctcttttgtc cctgttttcc tcccagcaaa accaacaact acaccgcgc cgaggccgcc 960
 caccctgcc cctaccatcg cctcacagcc attgagcctc cgccccgagg catgcagacc 1020
 ggcagctgga ggtgccgtac aactcagagg gctcgacttc gcatgtgata tttatatctg 1080

ggcgccattg gcggttactt gcggtgtgct gctccttagc cttgtcataa ccctctactg 1140
 caatcatcgc aataggggtca aattttcaag gtcagcagat gtcgccggt atcagcaggg 1200
 gcaaaaccaa ctttacaatg agctcaacct gggtagacgc gaggagtacg acgtgctcga 1260
 caaaaggagg ggtcgggacg cggaaatggg gggcaaacc cgcaggaaga acccacagga 1320
 aggactgtat aatgagctcc agaaagacaa aatggcagag gcatattctg agataggaat 1380
 gaaaggcgag cggagaagag gtaaagggca cgacggactt tatcagggtc tttcaacagc 1440
 gactaaggat acatatgacg cattgcacat gcaagctctc ccacctagat gagggcccg 1500
 ttaaaccgcg tggtcgcgtt tcttgctgtc caatttctat taaaggttcc tttgttccgt 1560
 aagtccaact actaaactgg gggatattat gaagggcctt gagcatctgg attctgccta 1620
 ataaaaaaca tttattttca ttgc 1644

<210> 46

<211> 1644

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 46

gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcggtccc gcggtctgt ctgttgcttc 60
 aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gccatggcac tgccgtttac 120
 agctctgctg ctgcctctgg cactgctgct tcatgccgcc agacctgaca ttgttctgac 180
 acagtccctt tctagtttga gcgcgagtg tggcgaccga gctacgataa gctgtcgagc 240
 tagcgaaagc gtgacgatcc tgggttccca ccttattcat tggatatcaac agaaaccagg 300
 gcaggctcct aaacttctca tacagttggc cagcaatgtt caaacgggtg tgcccgccacg 360
 cttcagcgga tcagggtcag gaaccgattt cacgctcaca attagcagtg tggagcctga 420
 tgacgtagcc gtgtactact gtctgcaaag ccgcaccatc ccgagaacgt ttgggggcg 480
 cacgaaattg gaaattaaag gaagcacttc cgggagtggg aagcctggga gtggcgaagg 540
 gtcaacaaaag gggcagatac agttgggtcca gagcggggcc gagttgaaaa agccaggtg 600
 atcagttaaa atttcttggt ctgcgtccgg atatactttt actgactatt ctatcaactg 660
 ggtcaaaaca gctcccggta aaggattgga atgggtcgga tggataaaca ctgaaaccg 720
 cgagcctgct tatgcttacg attttcgagg tagattcacc ttctcacttg atacatccaa 780
 aagtacggct tacctgcaaa tgaactcact gagagcagaa gataccgccg tttactattg 840
 tgccctcgac tatagttacg ccatggatta ttggggacaa gggactctcg tgaccgtaag 900
 tagctttgtg cctgtgttcc tgctgccaa gcctaccaca acaccagctc ctagacctcc 960
 aactcctgct cctacaatcg cctctcagcc actgtctctg aggcctgaag cttgtagacc 1020
 tgctgctggc ggagccgtgc ataccagagg actggatttc gcctgcgaca tctacatctg 1080
 ggctcctctg gctggaacat gtggcgtgct gctgctgagc ctggtcatca ccctgtactg 1140
 caaccaccgg aacagagtga agttcagcag atccgccgat gctcctgcct accagcaggg 1200
 acagaaccag ctgtacaacg agctgaacct ggggagaaga gaagagtacg acgtgctgga 1260
 taagcggaga ggcagagatc ctgagatggg cggcaagccc agacggaaga atcctcaaga 1320

gggcctgtat aatgagctgc agaaagacaa gatggccgag gcctacagcg agatcggaat 1380
 gaagggcgag cgcagaagag gcaagggaca cgatggactg taccagggcc tgagcacagc 1440
 caccaaggat acctatgatg ccctgcacat gcaggccctg cctccaagat gagggcccgt 1500
 ttaaaccgcg tggtcgcgtt tcttgctgtc caatttctat taaaggttcc ttgtttccgt 1560
 aagtccaact actaaactgg gggatattat gaagggcctt gagcatctgg attctgccta 1620
 ataaaaaaca tttattttca ttgc 1644

<210> 47

<211> 1644

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 47

gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcggtccc gcgggtctgt ctgttgcttc 60
 aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gccatggcac tgctgtttac 120
 agctctgctg ctgcctctgg cactgctgct tcatgccgcc agacctgata tacaactcac 180
 acaatcacct tcttctctta gcgcatcagt cggggatcgg gttaccatta cttgtcgcgc 240
 atcacagtcc gtaacgatac tcgggtccca tctgatccat tggtatcagc aaaaaccagg 300
 caaagcacc aagctcttga tccaattggc aagcaacgtg caaactggag tcccttctcg 360
 gttttccgga agtggctctg gcactgactt tacgttgacc attagtagcc tccaacctga 420
 ggatgttgcc acttattatt gtcttcagtc cagaaccatt ccgcgcacat tcggacaggg 480
 tactaagttg gaaataaagg gctcaacgtc aggctctggt aagccgggta gcggggaggg 540
 atcaacaaaa ggtcaagttc agctggtaca aagtgggtgt ggacttgtgc aacctggcag 600
 gtctgtgaaa ctctcctgtg ccgctagcgg gtacactttt actgactaca gtataaactg 660
 ggtgagacaa gctccaggca aaggactcga atgggttggg tggataaata cagagactag 720
 agagccggcc tacgcatacg acttcagggg aaggttcacc atcagtcggg acacttcaaa 780
 gaatacggcg taccttcaaa tgaatagttt gagagcagag gacacagctg tgtattattg 840
 tgcgcgcgac tactcctatg ctatggacta ctgggggcaa ggaaccttgg tgactgtcag 900
 tagctttgtg cctgtgttcc tgctgcca gctaccaca acaccagctc ctagacctcc 960
 aactcctgct cctacaatcg cctctcagcc actgtctctg aggctgaag cttgtagacc 1020
 tgctgctggc ggagccgtgc ataccagagg actggatttc gcctgcgaca tctacatctg 1080
 ggctcctctg gctggaacat gtggcgtgct gctgctgagc ctggtcatca ccctgtactg 1140
 caaccaccgg aacagagtga agttcagcag atccgccgat gctcctgcct accagcaggg 1200
 acagaaccag ctgtacaacg agctgaacct ggggagaaga gaagagtacg acgtgctgga 1260
 taagcggaga ggcagagatc ctgagatggg cggcaagccc agacggaaga atcctcaaga 1320
 gggcctgtat aatgagctgc agaaagacaa gatggccgag gcctacagcg agatcggaat 1380
 gaagggcgag cgcagaagag gcaagggaca cgatggactg taccagggcc tgagcacagc 1440
 caccaaggat acctatgatg ccctgcacat gcaggccctg cctccaagat gagggcccgt 1500
 ttaaaccgcg tggtcgcgtt tcttgctgtc caatttctat taaaggttcc ttgtttccgt 1560

aagtccaact actaaactgg gggatattat gaagggcctt gagcatctgg attctgccta 1620
ataaaaaaca tttattttca ttgc 1644

<210> 48

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 48

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

Ser Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 49

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 49

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly

130 135 140

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 50

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 50

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile Leu

20 25 30

Gly Ser His Leu Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Glu Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly

130 135 140

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 51

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 51

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Glu Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly

130 135 140

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 52

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 52

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly

130 135 140

Glu Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp

165 170 175

Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 53

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 53

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile Leu

20 25 30

Gly Ser His Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Glu Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly

130 135 140

Glu Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp

165 170 175

Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 54

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 54

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 55

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 55

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Leu

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ser

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

130 135 140

Arg Ser Val Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Arg Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 56

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 56

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 57

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 57

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 58

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 58

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

Gly Gln Ile Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly

130 135 140

Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 59

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 59

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

Gly Gln Ile Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly

130 135 140

Gly Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Ala Ile Ser Ala Glu Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 60

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 60

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Thr Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Met Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 61

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 61

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

Gly Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr

130 135 140

Gln Thr Leu Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Met Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 62

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 62

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser

145 150 155 160

Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 63

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 63

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Thr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 64

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 64

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Phe Leu

20 25 30

Gly Ile Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 65

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 65

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Phe Leu

20 25 30

Gly Ile Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Lys

85 90 95

Asn Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 66

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 66

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Gln Gly

180 185 190

Phe Thr Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 67

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 67

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser

145 150 155 160

Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly

180 185 190

Phe Thr Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Thr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 68

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 68

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Lys

85 90 95

Asn Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser

145 150 155 160

Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 69

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 69

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Phe Leu

20 25 30

Gly Ile Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Gln Gly

180 185 190

Phe Thr Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Leu Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 70

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 70

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Asn Leu Ala Ser Asn Val Asn Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 71

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 71

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 72

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 72

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ser Val Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp

180 185 190

Phe Arg Gly Arg Phe Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala

195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

210 215 220

Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 73

<211> 103

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 73

gggagaccca agctggctag cctcgcagtt cggcggtecc gcgggtctgt ctgttgcttc 60
aacagtgttt ggacggaaca gatccgggga ctctcttcca gcc 103

<210> 74

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 74

agacccaagc tggctagctc taaagaagcc cctgggagca cagtcatca cc 52

<210> 75

<211> 89

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 75

agacccaagc tggctagcag ctcttcaccc accccagccg cgactgtctc cgccgagccc 60
ccggggccag gtgtcccggg cgcgccccg 89

<210> 76

<211> 73

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 76

gtggaacct tctgaacctg cattttttatc tggaactcca gaagcagaat cctttgctaa 60
ataaatcgca gcc 73

<210> 77

<211> 137

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 77

agagaagcag acatcttcta gttcctcccc cactctcctc tttccggtac ctgtgagtca 60
gctaggggag ggcagctctc acccaggetg atagtccggt gacctggctt tatctactgg 120
atgagttccg ctgggag 137

<210> 78

<211> 62

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 78

agaccaagc tggctagcat attgtgcttc caccactgcc aataacaaaa taactagcaa 60
cc 62

<210> 79

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 79

aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc cacc 44

<210> 80

<211> 73

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 80

cgcggtccgcc ccgcgagcac agagcctcgc ctttgccgat ccgcgcgccg tccacacccg 60
ccgccagctc acc 73

<210> 81

<211> 126

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 81

cacattgttc tgatcatctg aagatcagct attagaagag aaagatcagt taagtccttt 60
ggacctgatac agcttgatac aagaactact gatttcaact tctttggctt aattctctcg 120
gaaacg 126

<210> 82

<211> 104

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 82

gtgtctgaaa gcatttctgg agtgttttag gcctgttcac tttctcttac tcactgtcta 60
ttcacttgctc ctgttcactc gtctggaaga tctcagccag cacc 104

<210> 83

<211> 152

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 83

gggcccgttt aaacccgctg gctcgctttc ttgctgtcca atttctatta aaggttcctt 60
tgttccgtaa gtccaactac taaactgggg gatattatga agggccttga gcatctggat 120
tctgcctaataaaaaacatt tattttcatt gc 152

<210> 84

<211> 137

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 84

tgagtgcgac ggccggcaag cccccgctcc ccgggtcttc gcggtcgcac gaggatgctt 60
ggcacgtacc ccgtgtacat acttcccggg cgcccagcat ggaaataaag caccagcgc 120
tgccctgggc ccctgcg 137

<210> 85

<211> 591

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 85

```
gcggactatg acttagttgc gttacaccct ttcttgacaa aacctaactt gcgcagaaaa 60
caagatgaga ttggcatggc tttatattgtt ttttttggtt tgtttttggtt tttttttttt 120
tttggttga ctcaggattt aaaaactgga acggtgaagg tgacagcagt cggttggagc 180
gagcatcccc caaagtcttc aatgtggccg aggactttga ttgcacattg ttgttttttt 240
aatagtcatt ccaaatatga gatgcgttgt tacaggaagt cccttgccat cctaaaagcc 300
accccacttc tctctaagga gaatggccca gtctctctcc aagtccacac aggggaggtg 360
atagcattgc tttcgtgtaa attatgtaat gcaaaatttt tttaatcttc gccttaatac 420
ttttttatatt tgttttatatt tgaatgatga gccttcgtgc ccccccttcc cccttttttg 480
tcccccaact tgagatgtat gaaggtttt ggtctccctg ggagtgggtg gaggcagcca 540
gggcttacct gtacactgac ttgagaccag ttgaataaaa gtgcacacct t 591
```

<210> 86

<211> 165

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 86

```
attacttcag gggaagagat gacaaaacga gtctttcatt cggtgtgaac ttttctcttt 60
aattttaact gatttaacac tttttgtgaa ttaatgaaat gataaagact tttatgtgag 120
atttccttat cacagaaata aaatatctcc aaatgtttcc ttttc 165
```

<210> 87

<211> 88

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 87

```
acctgagact ggtggcttct agaagcagcc attaccaact gtaccttccc ttcttgctca 60
gccataaat atatcctctt tcactcag 88
```

<210> 88

<211> 583

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 88

```
tggttgtcct gcctgcaata tttgaatttt aaatctaaat ctatttatta atatttaaca 60
```

ttattttatat ggggaatata ttttttagact catcaatcaa ataagtat tt ataatagcaa 120
 cttttgtgta atgaaaatga atatctatta atatatgtat tttttataat tcctatatcc 180
 tgtgactgtc tcacttaatc ctttgttttc tgactaatta ggcaaggcta tgtgattaca 240
 aggctttatc tcaggggcca actaggcagc caacctaagc aagatcccat gggttgtgtg 300
 tttattttcac ttgatgatac aatgaacact tataagtga gtgatactat ccagttactg 360
 ccggtttgaa aatatgcctg caatctgagc cagtgcctta atggcatgtc agacagaact 420
 tgaatgtgtc aggtgaccct gatgaaaaca tagcatctca ggagatttca tgcctggtgc 480
 ttccaaatat tgttgacaac tgtgactgta cccaaatgga aagtaactca tttgttaaaa 540
 ttatcaatat ctaatatata tgaataaagt gtaagttcac aac 583

<210> 89

<211> 123

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 89

acacacctgc ctgatgctat caagaggctg aagaaagcgc caaatgtgct attttttgg 60
 cacttgcttt atgacgttta ttttcctgtt aaagctgaat aaataaaaac tacagtaa 120
 gta 123

<210> 90

<211> 897

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 90

cctcaagatc aaggaaagga ggatggacga acaggggcca aactggtggg aggagaggt 60
 ggtgggggca gggatgatag gccctggatg tgcccacagg gaccaagaag tgaggtttcc 120
 actgtcttgc ctgccagggc cctgtttccc ccgtggcag ccacccctc ccccatcata 180
 tcctttgccc caaggtgct cagaggggccc ccggtcctgg cccagcccc cacctccgcc 240
 ccagacacac cccccagtcg agccctgcag ccaaacagag ccttcacaac cagccacaca 300
 gagcctgcct cagctgctcg cacagattac ttcagggtg gaaaagtcac acagacacac 360
 aaaatgtcac aatcctgtcc ctcaactcaac acaaaccaca aaacacagag agcctgcctc 420
 agtacactca aacaacctca aagctgcac atcacacaat cacacacaag cacagccctg 480
 acaaccacac caccacaagg cacgcacca cagccagcct cagggccac aggggactg 540
 tcaacacagg ggtgtgcccc gaggcctaca cagaagcagc gtcagtacc tcaggtctg 600
 aggtcccaac acgtgctcg tcacacacac ggctgttag aattcacctg tgtatctcac 660
 gcatatgcac acgcacagcc cccagtgagg tctcttgagt cccgtgcaga cacacacagc 720
 cacacacact gccttgccaa aaataccccc tgtctccct gccactcacc tcaactccat 780

tccctgagcc ctgatccatg cctcagctta gactgcagag gaactactca tttatttggg 840
atccaaggcc cccaaccac agtaccgtcc ccaataaact gcagccgagc tccccac 897

<210> 91

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 91

gaagtctgtt cctgtcctcc ctgtgcaggg tatectgtag ggtgacctgg aattcgaatt 60
ctgtttccct tgtaaaatat ttgtctgtct ctttttt 97

<210> 92

<211> 218

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 92

ctatgaagaa ggaaggcatc cagaccagaa accgaaaaat gtctagcaaa tccaaaaagt 60
gcaaaaaagt gcatgactca ctggaggact tccccaagaa cagctcgttt aaccggccg 120
ccctctccag acacatgtcc tccctgagcc acatctcgcc cttcagccac tccagccaca 180
tgctgaccac gccacgccg atgcacccgc catccagc 218

<210> 93

<211> 887

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 93

agggatgctt taaccaaccc tcttctccc cgtcattgta ctgtaactgg gacagaagaa 60
ataatgggga tatgtggaat ttttaacaac agttaaatgg aaaagcatag acaattactg 120
tagacatgat aaaagaaaca tttgtatgtt cttagactcg aagtttgata aaagtacctt 180
ttcatgtggt gacagttgtg tgttgattgg ctaggtttct cccgtgtgtt ttatacaaaa 240
atggaattga taaaccattt tttacaaaat taatttgtct caaaactgtt ctgttcatga 300
tgtattagaa atattttact cagactttaa atatttttaa tctcagattg gttattcaga 360
gtaaccttag aacagaaatt gggaatatat ctttacaatg attgatacca tggtatattg 420
actcttagat gctattgatc tgtagacca ttttttacia acgactaagg aaaaaacctg 480
ccaattaaat catgatatgc catcaattat gagacatccc aatttgagag atgttagatt 540
atagaaaagt atgcatttat gactgaaatg gtagtggaat tatttgaatt ctacaccaag 600

cacttaccat gtgccaggcc ctttgagag tgctctactg accaagaaag ttgttgctgc 660
cacattatag atgtggagcc taagggtcac agaaattgtg tgctatgcca aaaaacattg 720
aactggtaga tagaaaatga cagagctagg attcaaacct agatctggct gactccagag 780
cctagtttta cctggaattg atgttcagtt tatcaaaggt ttctcctttt ggtttaaaat 840
cccaattttt ggccctggcat tgtggtttac gcctgtaatc ccaacac 887

<210> 94

<211> 578

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 94

cctggaagag ggactccttg cctctcceta tggcctgctg gcccacctcc ctggaccccg 60
ttccaccctc acccttttcc tttcccatga accctggagg gtggtcccca ccagctcttt 120
ggaagtgagc agatgctgcg gctggctttc tgtcagcagg ccggcctggc agtgggacaa 180
tcgccagagg gtggggctgg cagaacacca tctccagcct cagctttgac ctgtctcatt 240
tcccatattc cttcacaccc agcttctgga aggcattggg tggctgggat ttaaggactt 300
ctggggggacc aagacatcct caagaaaaca ggggcatcca gggctccctg gatgaataga 360
atgcaattca ttcagaagct cagaagctaa gaataagcct ttgaaatacc tcattgcatt 420
tccctttggg cttcggcttg gggagatgga tcaagctcag agactggcag tgagagccca 480
gaaggacctg tataaaatga atctggagct ttacattttc tgccctctgcc ttccctccag 540
ctcagcaagg aagtatttgg gcaccctacc ctttacct 578

<210> 95

<211> 254

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 95

accacgatcg ttatgctgat cataccetaa tgatcccagc aagataatgt cctgtcctct 60
aagatgtgca tcaagcctgg tacatactga aaacctata aggtcctgga taatttttgt 120
ttgattattc attgaagaaa cttttatttt ccaatttgtt gaagtttttg actgttaata 180
aaagaatctg tcaaccatca aagaggtctg cattatgctt gcatgtcaaa aactttaaaa 240
atcctataat cttc 254

<210> 96

<211> 114

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 96

gcggccgctt aattaagctg ccttctgcgg ggcttgcctt ctggccatgc ctttcttctc 60
tcccttgcac ctgtacctct tggctcttga ataaagcctg agtaggaagt ctag 114

<210> 97

<211> 1177

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 97

gccctgctcg atgctcacag ggccccagc gagagtcctt gcagtcctt tcgacttgca 60
tttttgcagg agcagtatca tgaagcctaa acgcgatgga tatatgtttt tgaaggcaga 120
aagcaaaatt atgtttgcca ctttgcaaag gagctcactg tgggtgtctgt gttccaacca 180
ctgaatctgg accccatctg tgaataagcc attctgactc atatccccta tttaacaggg 240
tctctagtgc tgtgaaaaaa aaaatgctga acattgcata taacttatat tgtaagaaat 300
actgtacaat gactttattg catctgggta gctgtaaggc atgaaggatg ccaagaagtt 360
taaggaatat gggagaaata gtgtggaaat taagaagaaa ctaggtctga tattcaaattg 420
gacaaactgc cagttttgtt tcctttcact ggccacagtt gtttgatgca ttaaaagaaa 480
ataaaaaaaaa gaaaaaagag aaaagaaaaa aaaagaaaaa agttgtaggc gaatcatttg 540
ttcaaagctg ttggcctctg caaaggaaat accagttctg ggcaatcagt gttaccgttc 600
accagttgcc gttgagggtt tcagagagcc tttttctagg cctacatgct ttgtgaacaa 660
gtccctgtaa ttgttgttt tatgtataat tcaaagcacc aaaataagaa aagatgtaga 720
tttatttcat catattatac agaccgaact gttgtataaa tttatttact gctagtctta 780
agaactgctt tctttcgttt gtttgtttca atattttcct tctctctcaa tttttggttg 840
aataaactag attacattca gttggcctaa ggtggttggtg ctcgagggtt ttcttgtttc 900
ttttccattt tgtttttgga tgatatttat taaatagctt ctaagagtcc ggcggcattc 960
gtcttggtccc tattcctgca gcctgtgctg agggtagcag tgtatgagct accagcgtgc 1020
atgtcagcga ccctggcccg acaggccacg tcttgcaatc ggcccggctg cctcttcgcc 1080
ctgtcgtgtt ctgtgttagt gatcactgcc tttataacag tctgttgga taatattata 1140
agcataataa taaagtgaat atattttaaa actacaa 1177

<210> 98

<211> 521

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 98

gccctgctcg atgctcacag ggccccagc gagagtcctt gcagtcctt tcgacttgca 60

tttttgcagg agcagtatca tgaagcctaa acgcgatgga tatatgtttt tgaaggcaga 120
 aagcaaaatt atgtttgccca ctttgcaaag gagctcactg tgggtgtctgt gttccaacca 180
 ctgaatctgg accccatctg tgaataagcc attctgactc atatccccta tttaacaggg 240
 tctctagtgc tgtgaaaaaa aaaatgctga acattgcata taacttatat tgtaagaaat 300
 actgtacaat gactttattg catctgggta gctgtaaggc atgaaggatg ccaagaagtt 360
 taaggaatat gggagaaaata gtgtggaaat taagaagaaa ctaggtctga tattcaaag 420
 gacaaactgc cagttttgtt tcctttcact ggccacagtt gtttgatgca ttaaaagaaa 480
 ataaaaaaaa gaaaaaagag aaaagaaaaa aaaagaaaaa a 521

<210> 99

<211> 656

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 99

gttgtaggcg aatcatttgt tcaaagctgt tggcctctgc aaaggaaata ccagttcttg 60
 gcaatcagtg ttaccgttca ccagttgccg ttgagggttt cagagagcct ttttctaggc 120
 ctacatgctt tgtgaacaag tccctgtaat tgttgtttgt atgtataatt caaagcacca 180
 aaataagaaa agatgtagat ttatttcatac atattataca gaccgaactg ttgtataaat 240
 ttattttactg ctagtcttaa gaactgcttt ctttcgtttg tttgtttcaa tattttcctt 300
 ctctctcaat ttttggttga ataaactaga ttacattcag ttggcctaag gtggttgtgc 360
 tcggagggtt tcttgtttct tttccatttt gtttttgat gatatttatt aaatagcttc 420
 taagagtccg gcggcactctg tctgtccct attcctgcag cctgtgctga gggtagcagt 480
 gtatgagcta ccagcgtgca tgtcagcgac cctggcccca caggccacgt cctgcaatcg 540
 gcccggtgc ctcttcgccc tgtcgtgttc tgtgtagtg atcactgcct ttaatacagt 600
 ctgttggaat aatattataa gcataataat aaagtgaata ttttttaaaa ctacaa 656

<210> 100

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 100

Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr
1				5					10					15	
Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro
				20					25					30	
Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser							
				35					40						

<210> 101

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 101

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

<210> 102

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 102

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

<210> 103

<211> 153

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 103

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

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
 50 55 60
 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 65 70 75 80
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
 85 90 95
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 100 105 110
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 115 120 125
 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 130 135 140
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 145 150

<210> 104

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 104

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

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

145

150

<210> 105

<211> 149

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 105

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly

1

5

10

15

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser

20

25

30

Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro

35

40

45

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly

50

55

60

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro

65

70

75

80

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr

85

90

95

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly

100

105

110

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln

115

120

125

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln

130

135

140

Ala Leu Pro Pro Arg

145

<210> 106

<211> 191

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 106

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1

5

10

15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

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

<210> 107

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 107

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

156

<220>

<223> 合成多肽

<400> 111

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

<210> 112

<211> 1515

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 112

atggcactgc cagtcacagc actgctgctg ccaactggcac tgctgctcca cgccgccaga 60
 cccgacatcg tgctgacaca gagcccagca agcctggccg tgagcccagg ccagagagcc 120
 acaatcacat gcagagccag cgagtccgtg tccttctctg gcatcaacct gatccactgg 180
 taccagcaga agcccgga gcccacaaa ctgctgatct actccgccag caacctgcag 240
 tcaggcgtgc cagccagatt cagcggcagc ggcagcggaa ccgacttcac cctgacaatc 300
 agctcagtgg aaccagaaga caccgccaac tactactgcc tgcagagcag aaccctgccc 360
 agaaccttcg gccaaggcac caaggtcgaa atcaagggtt ccacaagcgg cagcggaaag 420
 cccggaagcg gcgagggaag caccaagggc cagatccagc tgggtgcagag cggccccgaa 480
 ctgaagaaac ccggcggaag cgtgaaaatc tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc 540
 tcctacagca tcaactgggt gcgccaggcc ccaggcaagg gcctggaatg ggtcggctgg 600
 atcaacaccg agacaagaga gcccgcctac gccagggtt tcacaggcag attcaccttc 660
 agcgcagaca caagcaagag catggcctac ctgcagatca actccctgag agcagaggac 720
 accgccgtct actactgcgc cctggactac ctctactccc tggacttctg gggccagggc 780
 accctcgtga ccgtgtccag cttcgtgccc gtgttctctg cagccaagcc aaccacaaca 840
 ccagcaccca gaccaccaac accagacca acaatcgcca gccagccact gtccttgagg 900
 ccagaggcat gcagaccagc agcaggcgga gccgtgcaca ccagaggact ggacttcgcc 960
 tgcgacatct acatctgggc accactggcc ggaacatgcg gcgtgctgct gctgagcctg 1020
 gtcacacccc tgtactgcaa ccaccggaac aaacgcggga gaaaaaagct cctctacatc 1080

ttcaagcaac cattcatgcg ccaggtccaa accacacagg aggaagacgg atgcagctgc 1140
 aggttccccg aagaggagga aggcggatgc gagctcagag tgaagttcag cagatccgcc 1200
 gacgcaccag cctaccagca gggacagaac cagctgtaca acgagctgaa cctggggaga 1260
 agagaagagt acgacgtgct ggataagcgg agaggcagag accctgagat gggcggcaag 1320
 ccagacgga agaaccaca agaggcctg tacaacgagc tgcagaaaga caagatggcc 1380
 gaggcctaca gcgagatcgg aatgaagggc gagcgcagaa gaggcaaggg acacgacgga 1440
 ctgtaccagg gcctgagcac agccaccaag gatacctacg atgccctgca catgcaggcc 1500
 ctgccaccaa gatga 1515

<210> 113

<211> 1515

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 113

atggcactgc cagtcacagc actgctgctg ccactggcac tgctgctcca cgccgccaga 60
 ccgacatcgc tgctgacaca gagcccagca agcctggccg tgagcccagg ccagagagcc 120
 acaatcacat gcagagccag cgagtccgtg acaatcctgg gctcccacct gatccactgg 180
 taccagcaga agcccgga gcccacaaa ctgctgatca acctggccag caacgtgaac 240
 acaggcgtgc cagccagatt cagcggcagc ggcagcggaa ccgacttcac cctgacaatc 300
 agctcagtgg aaccagaaga caccgccaac tactactgcc tgcagagcag aacactgccc 360
 agaaccttcg gccaaaggcac caaggtcgaa atcaagggtt ccacaagcgg cagcggaaag 420
 cccggaagcg gcgagggaag caccaagggc cagatccagc tgggtgcagag cggccccgaa 480
 ctgaagaaac ccggcggaag cgtgaaaatc tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc 540
 gactacagca tcaactgggt gcgccaggcc ccaggcaagg gcctggaatg ggtcggctgg 600
 atcaacaccg agacaagaga gcccgcctac gcctacgact tcacaggcag attcaccttc 660
 agcgcagaca caagcaagag catggcctac ctgcagatca actccctgag agcagaggac 720
 accgccgtct actactgcgc cctggactac acctacggca tggactactg gggccagggc 780
 accctcgtga ccgtgtccag cttcgtgccc gtgttctgc cagccaagcc aaccacaaca 840
 ccagcaccca gaccaccaac accagcacca acaatcgcca gccagccact gtccctgagg 900
 ccagaggcat gcagaccagc agcaggcggg gccgtgcaca ccagaggact ggacttcgcc 960
 tgcgacatct acatctgggc accactggcc ggaacatgcg gcgtgctgct gctgagcctg 1020
 gtcacacccc tgtactgcaa ccaccggaac aaacgcggga gaaaaagct cctctacatc 1080
 ttcaagcaac cattcatgcg ccaggtccaa accacacagg aggaagacgg atgcagctgc 1140
 aggttccccg aagaggagga aggcggatgc gagctcagag tgaagttcag cagatccgcc 1200
 gacgcaccag cctaccagca gggacagaac cagctgtaca acgagctgaa cctggggaga 1260
 agagaagagt acgacgtgct ggataagcgg agaggcagag accctgagat gggcggcaag 1320
 ccagacgga agaaccaca agaggcctg tacaacgagc tgcagaaaga caagatggcc 1380
 gaggcctaca gcgagatcgg aatgaagggc gagcgcagaa gaggcaaggg acacgacgga 1440

ctgtaccagg gcctgagcac agccaccaag gatacctacg atgccctgca catgcaggcc 1500
ctgccaccaa gatga 1515

<210> 114

<211> 462

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 114

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

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr		
245								250				255					
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Phe	Val	Pro	Val	Phe		
260								265				270					
Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro		
275								280				285					
Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys		
290								295				300					
Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala		
305								310				315				320	
Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu		
325								330				335					
Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Asn	His	Arg	Asn	Arg	Val		
340								345				350					
Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn		
355								360				365					
Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val		
370								375				380					
Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg		
385								390				395				400	
Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys		
405								410				415					
Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg		
420								425				430					
Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys		
435								440				445					
Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg				
450								455				460					

<210> 115

<211> 1389

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 115

atggcactgc ctgttaccgc gctgctctc ccccttgctc tcttgcttca cgcagcgagg 60
cctgacatcg tactcaccca gtctccgagt agcctgtctg caagtgtcgg cgacagggcg 120
acgataagtt gcagagccag cgaaagcgtc acaattttgg gttctcactt gattcactgg 180
tatcagcaga aaccggcca ggcgccaaaa cttttgattc agctcgcttc aaatgttcag 240

accgggggtcc cagctcgggt ctcaggctcc ggttcaggaa cggacttcac tcttaccatc 300
 tcatccgtgg agcctgagga tgttgctgtg tattattgtt tgcagtccag aactatccca 360
 cgcacttttg gccaaaggcac caaagtggag ataaaaggat caacatcagg aagcggcaag 420
 cctggttccg gcgaaggctc aactaaaggt cagatccaat tggtcgagtc aggtgcagag 480
 gttaaaaagc ccggcgggtc tgtgaagggt agttgtaagg catccgggta cactttttacg 540
 gactatagca tcaattgggt gcgacaggcc cccggaaaag gtcttgaatg ggtgggttgg 600
 attaataaccg aaacgcggga accggcctat gcctatgact ttagaggctg cttcgctatt 660
 tcagcagaaa cctcaaagtc cactgcgtat ctgcagatga acagtctccg ggccgaggac 720
 accgccgttt actactgcgc cttggattat agctacgcaa tggactattg gggtcaggga 780
 accctggtga ctgttagcag cttcgttcca gtgtttctgc ccgctaagcc cacaaccact 840
 cctgcaccgc gaccacccac acctgcgcct acaattgcgt cacagcccct gaggccttca 900
 ccggaagcct gtcggccagc cgcaggcggg gcggtccata ctaggggact ggactttgct 960
 tgtgatattt acatctgggc tccccctgcc ggaacgtgtg gcgttttctg cttttctctg 1020
 gtaataaccc tgtattgcaa tcaccggaat cgagtgaagt tctccagaag cgccgatgca 1080
 cccgcgtatc aacagggtca aaatcaattg tataacgaac ttaaccttgg gaggcgcgag 1140
 gagtacgatg tactcgacaa aagacgcgga agggaccccg aaatgggcgg caagccgcgg 1200
 aggaaaaacc cgcaagaggg actctataac gaacttcaga aggataagat ggcagaagcc 1260
 tactcagaga ttggaatgaa gggtagcgcg cgcaggggga agggtcacga tggctctgtat 1320
 caaggactgt ctacggcaac caaagacacg tatgacgcat tgcacatgca agccttgcc 1380
 ccccggtga 1389

<210> 116

<211> 1389

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 116

atggctctgc cggtaacagc gcttcttctc ccgcttgccc tcctcttgca cgctgctcgg 60
 ccagatatgt tcctcacaca gagcccgtcc tcaatttcag cgagcgctcg ggaccgcgct 120
 accatcagtt gtcgagccag tgaaagcgtc actattctgg ggagccacct tatacattgg 180
 tatcaacaaa agccaggcca ggccccaaa ctgctgattc agctcgcatc taatgttcag 240
 actggagtgct ctgcaagggt tagcggtagt gggtcaggga cagatttcac cttgaccatt 300
 agctcagttg agcctgaaga tgtggccgtt tattactgcc tccaaagccg cactatacct 360
 cggaccttcg gccagggaac aaaggtggag attaagggtg gtacctcagg tagtggcaag 420
 ccagggagcg gcgaggggtc tacaaagggt caaattcaat tgggtgcagtc cggaccagaa 480
 ctgaaaaaac cgggcggggag cgtcaagatt tcctgtgcag catcaggcta tacatttact 540
 gattacagta ttaactgggt gagacaagcg cctggaaagg gccttgagtg ggtgggttgg 600
 attaacacgg agactagaga acccgcgctac gcctacgatt ttagaggccg gttcactttc 660
 tccgccgata caagtaaatt cacagcatat ctccaaatga atagccttag agcggaggat 720

accgccgtgt attattgcgc gctcgactat tcttacgcaa tggactactg ggggcagggt 780
 actctcgtca ccgtatcctc atttgttccc gtatttttgc ccgccaagcc gaccactact 840
 ccggccccctc gacctccgac ccctgctccg actattgcga gtcaaccatt gagccttcgg 900
 cctgaggcat gtagaccggc agctggtggc gcagtccata cacgagggtg tgatttttgcg 960
 tgcgacatct atatatgggc gccattggct gggacgtgcg gcgtccttct cttgtcactc 1020
 gtgataactc tgtactgcaa tcacagaaac cgcgtgaagt tttccagaag cgcgacgcg 1080
 ccggcctatc aacaagggca gaatcagctg tacaacgaac tcaatttggg gcgaaggag 1140
 gagtatgatg ttttggacaa aaggcgaggc cgcgaccctg aaatgggcgg taagccacgc 1200
 agaaaaaacc cccaagaggg attgtacaat gaactgcaa aagacaagat ggctgaggca 1260
 tacagtgaga taggaatgaa aggtgaacgg cgccggggaa aaggacatga cgggttgtag 1320
 cagggtctta gcaactgcaac gaaagatacc tatgacgcc tgcacatgca agcattgccc 1380
 ccacggtga 1389

<210> 117

<211> 55

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 117

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

<210> 118

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 118

Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu
1				5				10				15			
Ser	Leu	Val	Ile	Thr											
				20											

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 119

Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn

1 5

<210> 120

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 120

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn

20 25

<210> 121

<211> 184

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 121

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser

1 5 10 15

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr

20 25 30

Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser

35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu

50 55 60

Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile

65 70 75 80

Asn Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu

85 90 95

Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu

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

<210> 122

<211> 1389

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 122

atggcactgc ctgttacagc tctgctgctg cctctggcac tgctgcttca tgccgccaga 60
cctgacatcg tgctgacaca gtctccttcc agcctgagcg catctgtcgg cgacagagcc 120
acaatcagct gcagagccag cgagtctgtg acaatcctgg gctctcacct gatccactgg 180
tatcagcaga agcccgga ggcacctaaa ctgctgatcc agctggcctc taatgtgcag 240
acaggcgtgc cagccagatt ttctggcagc ggcagcggaa ccgacttcac cctgacaatc 300
agctcagtgg aaccagaaga tgtggccgtg tactactgcc tgcagagcag aacaatcccc 360
agaacctttg gccaaggcac caaggtcgaa atcaagggtct ctacaagcgg cagcggaaag 420
cctggatctg gcgagggatc taccaagggc cagattcagc tgggtgcagtc tggccccgaa 480
ctgaagaaac ctggcggaag cgtgaaaatc tcctgcgcag ccagcggcta caccttcacc 540
gactacagca tcaactgggt tcgccaggcc cctggcaagg gcctggaatg ggtcggctgg 600
atcaacaccg agactagaga gcccgcctac gcctacgact tcagaggcag attcaccttc 660
agcgcagaca caagcaagag cacagcctac ctgcagatga actccctgag agcagaggac 720
accgccgtct actattgcgc cctggattac agctacgcca tggattattg gggccagggc 780
accctcgtga ccgtgtcatc ttttgtgcct gtgttctgc ctgccaagcc taccacaaca 840
ccagctccta gacctccaac tcctgtctct acaatgcct ctcagccact gtctctgagg 900
cctgaggcat gtagacctgc tgctggcgga gccgtgcata ccagaggact ggatttcgcc 960
tgcgacatct acatctgggc tcctctggct ggaacatgtg gcgtgctgct gctgagcctg 1020
gtcatcacc tgtagctcaa ccaccggaac agagtgaagt tcagcagatc cgccgatgct 1080
cctgcctacc agcagggaca gaaccagctg tacaacgagc tgaacctggg gagaagagaa 1140
gagtacgacg tgctggataa gcggagaggc agagatcctg agatgggcgg caagcccaga 1200
cggaagaatc ctcaagaggg cctgtataat gagctgcaga aagacaagat ggccgaggcc 1260

tacagcgaga tcggaatgaa gggcgagcgc agaagaggca agggacacga tggactgtac 1320
 cagggcctga gcacagccac caaggatacc tatgatgccc tgcacatgca ggccctgcct 1380
 ccaagatga 1389

<210> 123

<211> 1389

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 123

atggcactgc cggtaacagc gctcctctc ccgctcgccc tctcctcca cgcagcacgg 60
 ccagacatcg tcctcacaca gagcccgagc agcctcagcg cgagcgtcgg ggaccgcgca 120
 accatcagct gccgagccag cgaaagcgtc acaatcctcg ggagccacct gatacactgg 180
 taccaacaaa agccaggcca ggccccaaa ctgctgatcc agctcgcaag caacgtccag 240
 acaggagtgc cagcaaggtt cagcggaagc gggagcggaa cagacttcac cctcaccatc 300
 agcagcgtcg agccagaaga tgtggccgtc tactactgcc tccaaagccg cacaatacca 360
 cggaccttcg gccagggaac aaaggtggag atcaaggga gcaccagcgg aagcggcaag 420
 ccagggagcg gcgaggggag cacaaaggga caaatccaac tcgtgcagag cggaccagaa 480
 ctgaaaaagc cgggcggaag cgtcaagatc agctgcgcag caagcggcta cacattcaca 540
 gactacagca tcaactgggt gagacaagcg ccaggaaagg gcctcgaatg ggtgggatgg 600
 atcaacacgg agacaagaga acccgcatat gcctacgact tcagaggccg gttcacattc 660
 agcggccgaca caagcaagag cacagcatat ctccaaatga acagcctcag agcggaggac 720
 accgccgtgt actactgcgc gctcgactac agctacgcaa tggactactg gggacaggga 780
 acactcgtca ccgtaagcag cttcgtaccc gtattcctcc ccgccaagcc gaccacaaca 840
 ccggccccac gaccaccaac accagccccg acaatcgca gcccaaccact cagcctccgg 900
 ccagaggcgt gcagaccggc agcaggaggc gcagtccaca cacgaggact cgacttcgcg 960
 tgcgacatat acatctgggc accactcgca ggaacgtgcg gcgtcctcct cctcagcctc 1020
 gtgataacac tgtactgcaa ccacagaaac cgcgtgaagt tcagcagaag cgcggacgcg 1080
 ccggcctacc aacaaggaca gaaccagctg tacaacgaac tcaacctcgg acgaaggag 1140
 gagtacgacg tcctcgacaa aaggcgaggc cgcgaccag aaatgggcgg aaagccacgc 1200
 agaaaaaacc cccaagaggg actctacaac gaactgcaaa aggacaagat ggcagaggca 1260
 tacagcgaga taggaatgaa aggagaacgg cgccggggaa aaggacacga cgggctctac 1320
 cagggactca gcacagcaac gaaagacacc tacgacgccc tgcacatgca agcactcccc 1380
 ccacgtga 1389

<210> 124

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 124

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 125

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 126

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 126

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

1 5 10 15

<210> 127

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 127

Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Ser

<210> 128

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 128

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Ser Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15
Lys Gly
<210> 129
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成多肽
<400> 129
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5
<210> 130
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成多肽
<400> 130
Gly Gly Gly Ser
1
<210> 131
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成多肽
<400> 131
Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ser Glu Arg
1 5 10 15
<210> 132
<211> 60
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成多肽
<400> 132
Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly
1 5 10 15

Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly Leu
20 25 30
Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly Leu Tyr
35 40 45
Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ser Glu Arg
50 55 60

<210> 133

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 133

Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly
1 5 10 15
Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly Leu
20 25 30
Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Ser Glu Arg
35 40 45

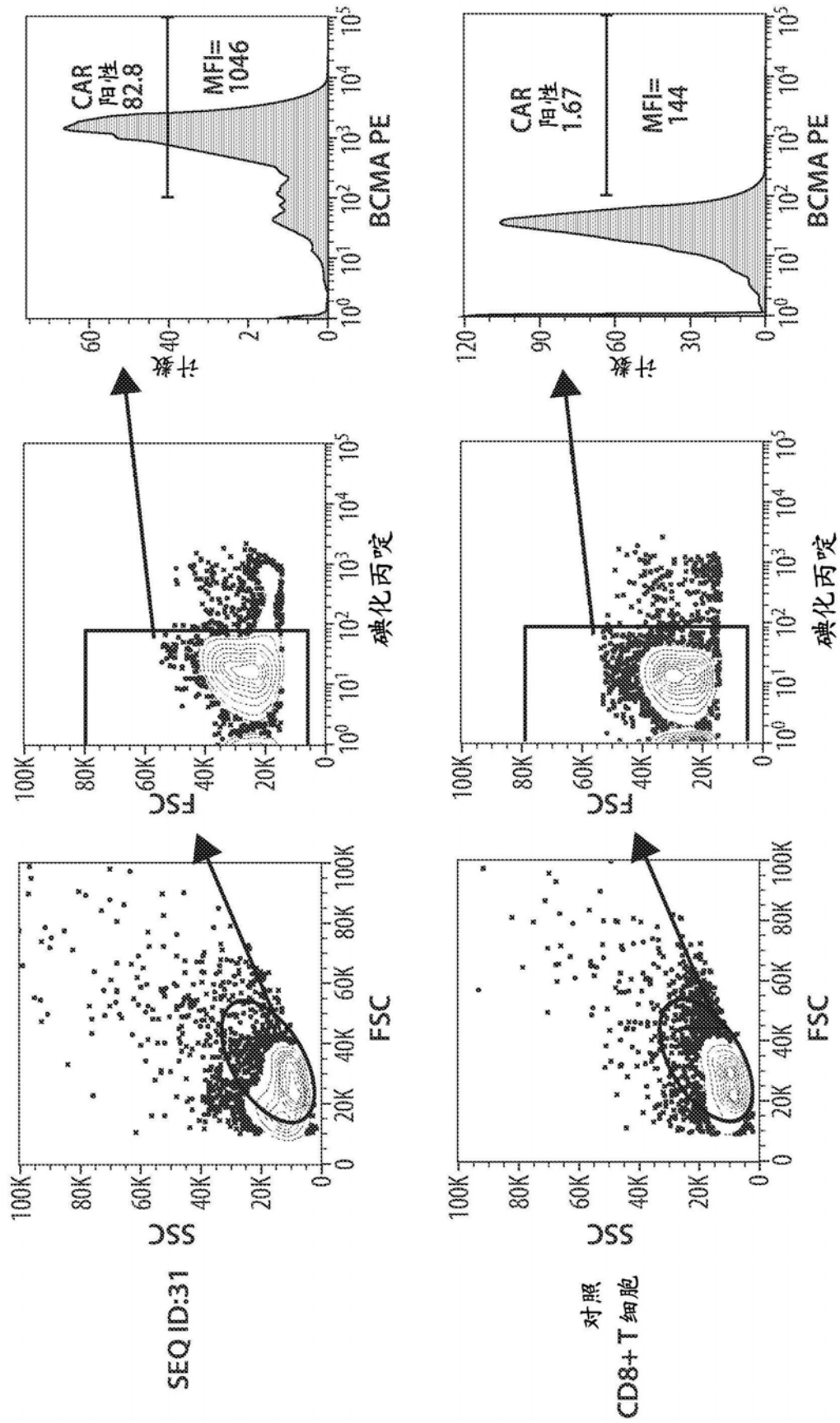


图1

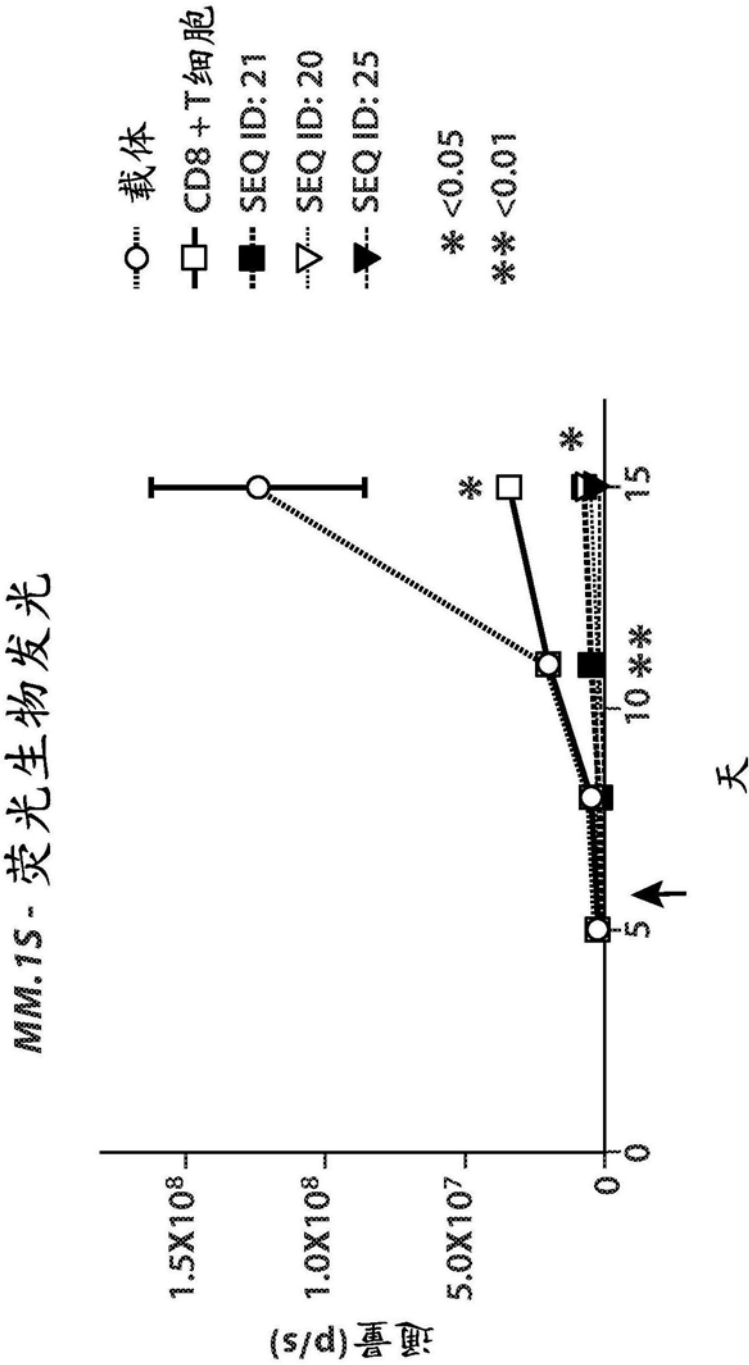


图2

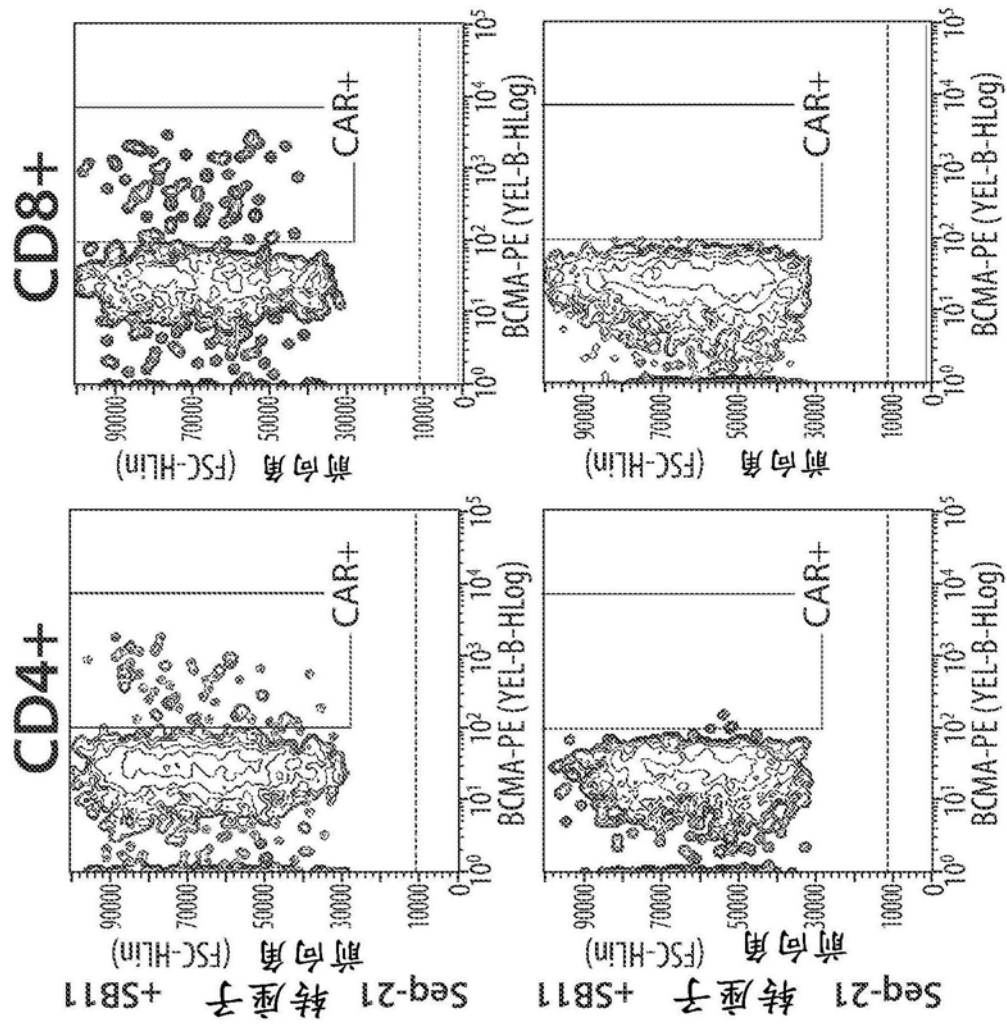


图3A

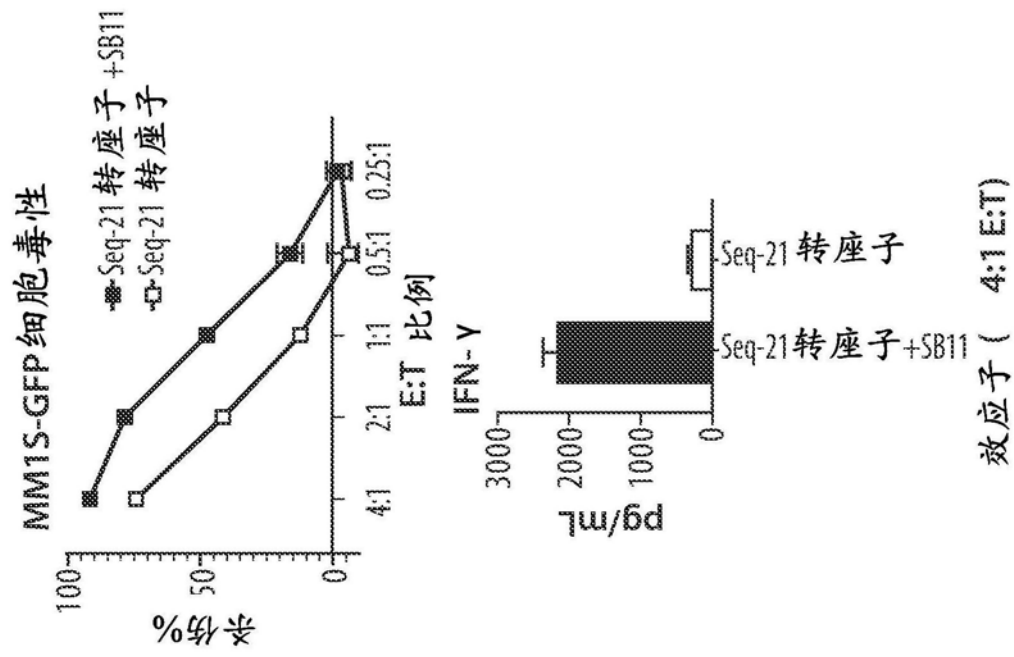


图3B