(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109862912 B
(45)授权公告日 2024.08.02

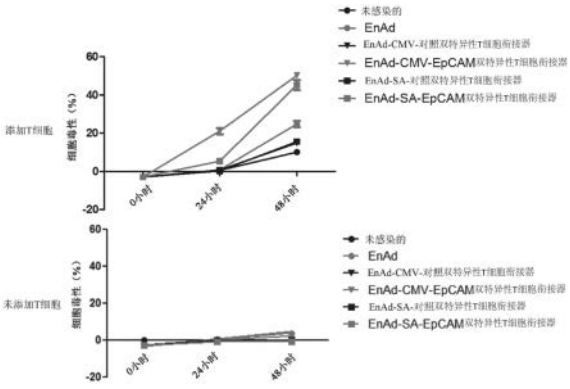
(21)申请号 201780056486.2
(22)申请日 2017.08.29
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109862912 A
(43)申请公布日 2019.06.07
(30)优先权数据
1614607.8 2016.08.29 GB
1700663.6 2017.01.13 GB
1706219.1 2017.04.19 GB
1713765.4 2017.08.28 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.03.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/071655 2017.08.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/041827 EN 2018.03.08
(73)专利权人 阿卡米斯生物公司
地址 英国牛津郡
(72)发明人 B·R·查姆皮昂
A·C·N·布罗姆利
J·D·福瑞德曼 K·D·费希尔
L·W·塞莫尔
(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
专利代理师 王永伟 赵蓉民
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61K 35/761(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)
C07K 16/40(2006.01)
C12N 15/861(2006.01)
(56)对比文件
WO 2015059303 A1,2015.04.30
WO 2014138314 A1,2014.09.12
审查员 封丽娜
权利要求书2页 说明书100页
序列表153页 附图139页

(54)发明名称

携带双特异性T细胞衔接器的腺病毒

(57)摘要

提供了一种经修饰的腺病毒,具体的说Enadenotucirev(EnAd),其携带各自包括至少两个结合结构域的至少两个双特异性T细胞衔接器(BiTE),其中所述结构域中的至少一个对如感兴趣的T细胞等感兴趣的免疫细胞上的表面抗原具有特异性。还提供了一种组合物,如包括所述病毒的药物配制品;所述病毒和病毒配制品用于治疗,如治疗癌症的用途。本公开还扩展到用于制备所述病毒的方法。



CN 109862912 B

1.一种包括式(I)的序列的溶瘤腺病毒:

5'ITR-B_1-B_A-B_2-B_X-B_B-B_Y-B_3-3'ITR(I)

其中:

B_1是不存在或包括:E1A、E1B或E1A-E1B;

B_A包括:E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B_2是不存在或包括:E3;

B_X是不存在或包括以下的DNA序列:限制性位点、一个或多个转基因或两者;

B_B包括L5;

B_Y是包括以下的DNA序列:限制性位点、一个或多个转基因或两者;

B_3是不存在或包括:E4;

其中所述腺病毒编码:

第一双特异性T细胞衔接器,其包括两个结合结构域Bd1和Bd2,其中Bd1对CD3具有特异性,并且Bd2对EpCAM或成纤维细胞活化蛋白(FAP)具有特异性,以及

第二双特异性T细胞衔接器,其包括两个结合结构域Bd3和Bd4,其中Bd3对CD3具有特异性,并且Bd4对EpCAM或FAP具有特异性;

其中两个双特异性T细胞衔接器均编码在位置B_Y中;

其中Bd1和Bd3包括选自以下的VH结构域和VL结构域:

a)由如SEQ ID NO:8所述的氨基酸序列组成的VH结构域和由如SEQ ID NO:9中所述的氨基酸序列组成的VL结构域;和

b)分别由SEQ ID NO:93所述的抗CD3结合结构域的VH和VL结构域氨基酸序列组成的VH结构域和VL结构域;

其中Bd2和Bd4包括选自以下的VH结构域和VL结构域:

a)由如SEQ ID NO:13所述的氨基酸序列组成的VH结构域和由如SEQ ID NO:12所述的氨基序列组成的VL结构域;和

b)由如SEQ ID NO:18所述的氨基酸序列组成的VH结构域和由如SEQ ID NO:17所述的氨基酸序列组成的VL结构域;并且

其中所述腺病毒是Enadenotucirev(EnAd)或血清型11腺病毒(Ad11)。

2.根据权利要求1所述的溶瘤腺病毒,其中所述腺病毒是EnAd。

3.根据权利要求1所述的溶瘤腺病毒,其中Bd2和Bd4结合同一抗原。

4.根据权利要求1所述的溶瘤腺病毒,其中Bd2和Bd4结合不同抗原。

5.根据权利要求1所述的溶瘤腺病毒,其中所述腺病毒是嵌合的。

6.根据权利要求1所述的溶瘤腺病毒,其中所述腺病毒能够进行复制。

7.根据权利要求6所述的溶瘤腺病毒,其中所述腺病毒具有复制能力。

8.根据权利要求1所述的溶瘤腺病毒,其中所述腺病毒具有复制缺陷。

9.根据权利要求1所述的溶瘤腺病毒,其中转基因或转基因盒受内源主要晚期启动子的控制。

10.根据权利要求1所述的溶瘤腺病毒,其中所述第一双特异性T细胞衔接器和/或所述第二双特异性T细胞衔接器包括scFv,所述scFv由如SEQ ID NO:7所述的氨基酸序列组成。

11.根据权利要求1所述的溶瘤腺病毒,其中所述第一双特异性T细胞衔接器和/或所述

第二双特异性T细胞衔接器包括scFv,所述scFv由如SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:75所述的氨基酸序列组成。

12.根据权利要求1所述的溶瘤腺病毒,其中所述第一双特异性T细胞衔接器和/或所述第二双特异性T细胞衔接器包括scFv,所述scFv由如SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:73所述的氨基酸序列组成。

13.根据权利要求1所述的溶瘤腺病毒,其中所述腺病毒包括由SEQ ID NO:120中所示的序列组成的基因组。

14.根据权利要求1到13中任一项所述的溶瘤腺病毒,其中所述腺病毒编码至少一个另外的转基因。

15.根据权利要求14所述的溶瘤腺病毒,其中所述至少一个另外的转基因编码细胞因子、趋化因子和/或免疫调节因子。

16.根据权利要求14所述的溶瘤腺病毒,其中至少一个另外的转基因编码细胞因子。

17.根据权利要求16所述的溶瘤腺病毒,其中所述细胞因子选自MIP1α、IL-1α、IL-1β、IL-6、IL-9、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-33、IL-35、IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、IL-25、IL-1RA、IFNα、IFNβ、IFNγ、TNFα、淋巴毒素α(LTA)、Flt3L、GM-CSF和IL-8。

18.根据权利要求14所述的溶瘤腺病毒,其中至少一个另外的转基因编码趋化因子。

19.根据权利要求18所述的溶瘤腺病毒,其中所述趋化因子选自CCL2、CCL3、CCL5、CCL17、CCL20、CCL22、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL13、CXCL12、CCL2、CCL19和CCL21。

20.一种组合物,其包括根据权利要求1到19中任一项所述的腺病毒以及稀释剂或载剂。

21.根据权利要求20所述的组合物,其中所述组合物包括第二溶瘤病毒。

22.根据权利要求21所述的组合物,其中所述第二溶瘤病毒是Ad11、其衍生物或EnAd。

23.根据权利要求1到19中任一项所述的腺病毒或根据权利要求20-22中任一项所述的组合物在制备用于治疗癌症患者的药物中的用途,其中所述癌症包括结肠直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌和/或肺癌。

携带双特异性T细胞衔接器的腺病毒

[0001] 本公开涉及一种经修饰的腺病毒,具体的说Enadenotucirev(EnAd),其携带包括至少两个结合结构域的双特异性T细胞衔接器,其中结构域中的至少一个对感兴趣的T细胞上的表面抗原具有特异性。本公开进一步涉及一种组合物,如包括病毒的药物配制品;所述病毒和病毒配制品用于治疗,具体的说治疗癌症的用途。本公开还扩展到用于制备病毒的方法和编码病毒的DNA。

背景技术

[0002] 就患者及其亲人的困难和痛苦,以及治疗、照顾和支持患者的高昂经济成本而言,癌症仍然是社会的巨大负担。

[0003] 已经开发了多种用于治疗癌症的疗法,包含化学治疗剂、放射疗法和最近的如抗体等生物制剂。在过去的15年中,基于抗体的癌症治疗已经建立,并且目前是用于治疗血液学恶性肿瘤和实体瘤患者最成功和最重要的策略之一。目前临床使用的基于单克隆抗体的抗癌疗法的实例包含靶向CD20的利妥昔单抗、靶向VEGF的贝伐单抗、靶向EGFR的西妥昔单抗和靶向CEA的拉贝珠单抗。

[0004] 在开发的各种抗体形式中,双特异性T细胞衔接器显示出很大的希望。这些是相对简单的双特异性分子,其特异于T细胞的TCR复合物的CD3ε亚基,并且还靶向如癌抗原等感兴趣的抗原。由于双特异性T细胞衔接器对TCR复合物具有特异性,这使得双特异性T细胞衔接器能够活化驻留的T细胞以杀死在其细胞表面上表达特定靶抗原的细胞,例如癌细胞。双特异性T细胞衔接器的重要性质是其能够制造$CD4^+$和未活化的$CD8^+$T细胞靶向癌细胞。换句话说,可以使由双特异性T细胞衔接器活化的T细胞杀死不依赖于细胞表面上的MHC表达的细胞。因为一些肿瘤细胞下调MHC,这使得其对如CAR-T细胞和immTAC等试剂具有抗性,这很重要。

[0005] 不幸的是,相对于全长抗体,双特异性T细胞衔接器具有差的循环动力学。这意味着当向患者施用时,大部分双特异性T细胞衔接器不能到达其靶细胞。此外,使用高亲和力抗CD3 ScFv作为双特异性T细胞衔接器的一部分可能导致与血液中T细胞的强烈结合,这也干扰向肿瘤的递送。结果,双特异性T细胞衔接器不能充分发挥其作为抗癌疗法的潜力,因为其不能有效地递送给肿瘤细胞。

[0006] 将如双特异性T细胞衔接器等治疗剂有效递送到肿瘤细胞的要求已经变得越来越重要,因为实体肿瘤在体内以多种方式保护自身变得越来越明显,例如通过在肿瘤周围形成基质。癌症的进展与上皮细胞(有丝分裂细胞)的增殖以及活化的肿瘤基质的发展有关。在这种情况下,由于周转增加,如胶原束等细胞外基质(ECM)组分被降解。炎性细胞的数量增加并且成纤维细胞分化成肌成纤维细胞,导致其表达生长因子、基质组分和降解的蛋白酶。维持血管生成,导致大量渗漏的肿瘤血管。在活化具有持续血管生成的肿瘤基质后,肿瘤细胞的侵入通过降解的基底膜开始,并且血管渗入肿瘤组织。

[0007] 这种基质是物理保护,因为其可能具有诱捕免疫细胞以对抗肿瘤的功能。此外,基质屏蔽了肿瘤的缺氧微环境,这对于肿瘤的生长是允许的和最佳的。存在一些理论认为基

质中的细胞是肿瘤中的能量来源。

[0008] 肿瘤基质的一个大组分是成纤维细胞,所述成纤维细胞已经被破坏以起到引发癌症的作用。渗入基质的其它细胞是肿瘤相关巨噬细胞(TAM),其是2型(M2)巨噬细胞,所述巨噬细胞可以通过分泌如抑制免疫应答的IL-10等细胞因子和趋化因子来促进肿瘤生长。

[0009] 因为产生环境的细胞是遍布全身的"天然的"免疫细胞或结缔组织细胞,所以靶向肿瘤基质特别困难。因此,用治疗剂靶向这些细胞可能导致严重的脱靶效应。

[0010] 因此,需要一种将双特异性T细胞衔接器直接递送到肿瘤细胞的改进方法,其中它可以提供最大的治疗益处,具体的说递送到由基质成纤维细胞包围的肿瘤细胞。

发明内容

[0011] 诸位发明人认为,将治疗剂直接递送到肿瘤的最有效方式之一是使用经过工程化以表达例如活化如在基质中的T细胞并且靶向抗原的试剂的溶瘤腺病毒。

[0012] 因此,本公开提供了一种包括式(I)的序列的腺病毒:

[0013] 5'ITR-B_1-B_A-B_2-B_X-B_B-B_Y-B_3-3'ITR(I)

[0014] 其中:

[0015] B_1是键或包括:E1A、E1B或E1A-E1B;

[0016] B_A包括-E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

[0017] B_2是键或包括:E3;

[0018] B_X是键或包括以下的DNA序列:限制性位点、一个或多个转基因或两者;

[0019] B_B包括L5;

[0020] B_Y是键或包括以下的DNA序列:限制性位点、一个或多个转基因或两者;

[0021] B_3是键或包括:E4;

[0022] 其中所述腺病毒编码双特异性T细胞衔接器,所述双特异性T细胞衔接器包括至少两个结合结构域,其中所述结构域中的至少一个对如感兴趣的T细胞等感兴趣的免疫细胞上的表面抗原具有特异性,并且所述腺病毒进一步编码第二双特异性T细胞衔接器;

[0023] 其中所述腺病毒是EnAd或Ad11。

[0024] 根据本公开的一个或多个双特异性T细胞衔接器不包括跨膜结构域,并且因此不在癌细胞表面上表达,而是包括促进双特异性T细胞衔接器分子从癌细胞中释放的信号序列。

[0025] 以下段落是本公开的概述:

[0026] 1.一种包括式(I)的序列的腺病毒:

[0027] 5'ITR-B_1-B_A-B_2-B_X-B_B-B_Y-B_3-3'ITR(I)

[0028] 其中:

[0029] B_1是键或包括:E1A、E1B或E1A-E1B;

[0030] B_A包括-E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

[0031] B_2是键或包括:E3;

[0032] B_X是键或包括以下的DNA序列:限制性位点、一个或多个转基因或两者;

[0033] B_B包括L5;

[0034] B_Y是键或包括以下的DNA序列:限制性位点、一个或多个转基因或两者;

[0035] B_3是键或包括:E4;

[0036] 其中所述腺病毒编码第一双特异性T细胞衔接器和第二双特异性T细胞衔接器,所述第一双特异性T细胞衔接器包括至少两个结合结构域Bd1和Bd2,其中所述结构域中的至少一个如Bd1对如T细胞等免疫细胞上的表面抗原具有特异性,并且所述第二双特异性T细胞衔接器包括至少两个结合结构域Bd3和Bd4,并且所述结合结构域中的至少一个如Bd3对如T细胞等免疫细胞上的表面抗原具有特异性;并且

[0037] 其中所述腺病毒是EnAd或Ad11。

[0038] 2.根据段落1所述的腺病毒,其中所述腺病毒是EnAd。

[0039] 3.根据段落1或2所述的腺病毒,其中所述表面抗原是T细胞受体复合物(TCR)的组分,所述组分如CD3、TCR-α和TCR-β。

[0040] 4.根据段落3所述的腺病毒,其中所述表面抗原是CD3,如CD3ε、CD3γ和CD3δ,具体的说CD3ε。

[0041] 5.根据段落1或2所述的腺病毒,其中所述双特异性T细胞衔接器中的所述结合结构域之一对如CD31、CD2和CD277等非TCR活化蛋白具有特异性。

[0042] 6.根据段落1到5中任一项所述的腺病毒,其中所述第一双特异性T细胞衔接器中的结合结构域(如Bd1)和所述第二双特异性T细胞衔接器中的结合结构域(如Bd3)对如T细胞等所述免疫细胞上的同一表面抗原具有特异性。

[0043] 7.根据段落1到5中任一项所述的腺病毒,其中所述第一双特异性T细胞衔接器中的结合结构域(如Bd1)和所述第二双特异性T细胞衔接器中的结合结构域(如Bd2)对例如相同或不同免疫细胞上的不同表面抗原具有特异性。

[0044] 8.根据段落1到7中任一项所述的腺病毒,其中所述第一双特异性T细胞衔接器中的Bd2和所述第二双特异性T细胞衔接器中的Bd4结合感兴趣的同一抗原。

[0045] 9.根据段落1到7中任一项所述的腺病毒,其中所述第一双特异性T细胞衔接器中的Bd2和所述第二双特异性T细胞衔接器中的Bd4结合感兴趣的不同抗原。

[0046] 10.根据段落1到9中任一项所述的腺病毒,其中所述结合结构域之一对肿瘤抗原具有特异性,所述肿瘤抗原如CEA;MUC-1;EpCAM;HER受体HER1、HER2、HER3、HER4;PEM;A33;G250;碳水化合物抗原Ley、Lex、Leb;PSMA;TAG-72;STEAP1;CD166;CD24;CD44;E-钙粘蛋白;SPARC;ErbB2和ErbB3。

[0047] 11.根据段落10所述的腺病毒,其中所述结合结构域之一,例如Bd2和/或Bd4对EpCAM具有特异性,例如包括SEQ ID NO:28所阐述的氨基酸序列的EpCAM。

[0048] 12.根据段落1到4中任一项所述的腺病毒,其中所述结合结构域之一对肿瘤基质抗原具有特异性,所述肿瘤基质抗原例如成纤维细胞活化蛋白(FAP)、TREM1、IGFBP7、FSP-1、血小板源性生长因子-α受体(PDGFR-α)、血小板源性生长因子-β受体(PDGFR-β)和波形蛋白。

[0049] 13.根据段落12所述的腺病毒,其中所述结合结构域之一,例如Bd2和/或Bd4对FAP具有特异性,例如包括SEQ ID NO:30所阐述的氨基酸序列的FAP。

[0050] 14.根据段落12或13所述的腺病毒,其中所述基质抗原是选自髓源性抑制细胞抗原、肿瘤相关巨噬细胞和其组合的抗原。

[0051] 15.根据段落14所述的腺病毒,其中所述抗原是选自CD163、CD206、CD68、CD11c、

CD11b、CD14、CSF1受体、CD15、CD33、CD66b和其中两种或更多种的组合。

[0052] 16.根据段落1到15中任一项所述的腺病毒,其中B_X或B_Y中的至少一个不是键。

[0053] 17.根据段落1到16中任一项所述的腺病毒,其中所述腺病毒是嵌合的。

[0054] 18.根据段落1到17中任一项所述的腺病毒,其中所述腺病毒是溶瘤的。

[0055] 19.根据段落1到18中任一项所述的腺病毒,其中所述腺病毒能够进行复制。

[0056] 20.根据段落19所述的腺病毒,其中所述腺病毒是具有复制能力的。

[0057] 21.根据段落1到18中任一项所述的腺病毒,其中所述腺病毒具有复制缺陷。

[0058] 22.根据段落1到121中任一项所述的腺病毒,其中B_X包括一个或多个转基因或转基因盒。

[0059] 23.根据段落1到22中任一项所述的腺病毒,其中B_Y包括一个或多个转基因或转基因盒。

[0060] 24.根据段落1到23中任一项所述的腺病毒,其中所述一个或多个转基因或转基因盒受内源或外源启动子,如内源启动子的控制。

[0061] 25.根据段落24所述的腺病毒,其中所述转基因或转基因盒受选自由以下组成的组的内源启动子的控制:E4启动子和主要晚期启动子,具体的说所述主要晚期启动子。

[0062] 26.根据段落24所述的腺病毒,其中转基因或转基因盒受如CMV等外源启动子的控制。

[0063] 27.根据段落1到26中任一项所述的腺病毒,其中转基因盒进一步包括独立地选自以下的调节元件:

[0064] a.剪接受体序列

[0065] b.内部核糖体进入序列或高自切割效率A肽,

[0066] c.Kozak序列及

[0067] d.其组合。

[0068] 28.根据段落27所述的腺病毒,其中转基因盒包括位于蛋白质编码序列起始处的Kozak序列。

[0069] 29.根据段落1到28中任一项所述的腺病毒,其中所述转基因盒编码高自切割效率A肽。

[0070] 30.根据段落1到29中任一项所述的腺病毒,其中所述转基因盒进一步包括多腺苷酸化序列。

[0071] 31.根据段落1到30中任一项所述的腺病毒,其中所述转基因盒进一步包括位于DNA序列末端处和/或DNA序列末端处的限制性位点。

[0072] 32.根据段落1到31中任一项所述的腺病毒,其中至少一个转基因盒编码单顺反子mRNA。

[0073] 33.根据段落1到32中任一项所述的腺病毒,其中所述双特异性T细胞衔接器半衰期短,例如48小时或更少。

[0074] 34.根据段落1到33中任一项所述的腺病毒,其中所述双特异性T细胞衔接器编码在选自E1、E3、B_X、B_Y和其组合的区域中。

[0075] 35.根据段落34所述的腺病毒,其中双特异性T细胞衔接器例如在所述主要晚期启动子的控制下至少编码在位置B_X中。

[0076] 36.根据段落1到35中任一项所述的腺病毒,其中所述第一双特异性T细胞衔接器分子对肿瘤抗原具有特异性,例如肿瘤抗原(例如本文所列),并且所述第二双特异性T细胞衔接器分子对肿瘤基质抗原具有特异性,例如基质抗原(例如本文所列)。

[0077] 37.根据段落1到36中任一项所述的腺病毒,其中所述腺病毒进一步包括细胞因子或趋化因子或免疫调节因子(如细胞因子或趋化因子)。

[0078] 38.根据段落37所述的腺病毒,其中细胞因子或趋化因子选自MIP1α、IL-1α、IL-1β、IL-6、IL-9、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-33、IL-35、IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、IL-25、IL-1RA、IFNα、IFNβ、IFNγ、TNFα、淋巴毒素α(LTA)、Flt3L、GM-CSF、IL-8、CCL2、CCL3、CCL5、CCL17、CCL20、CCL22、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL13、CXCL12、CCL2、CCL19、CCL21、(例如IL-1α、IL-1β、IL-6、IL-9、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-33、IL-35、IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、IL-25、IL-1RA、IFNα、IFNβ、IFNγ、TNFα、淋巴毒素α(LTA)、GM-CSF、IL-8、CCL2、CCL3、CCL5、CCL17、CCL20、CCL22、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL13、CXCL12、CCL2、CCL19、CCL21),如IL-12、IL-18、IL-22、IL-7、IL-15、IL-21、IFNγ、TNFα、淋巴毒素α(LTA)、CCL3、CCL5、CXCL9、CXCL10、CXCL12、CCL2、CCL19和CCL21。

[0079] 39.根据段落1到38中任一项所述的腺病毒,其中所述腺病毒进一步包括免疫调节因子,如抗体或抗体片段,或蛋白质或肽配体,对检查点蛋白如CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、VISTA、B7-H3、B7-H4、HVEM、ILT-2、ILT-3、ILT-4、TIM-3、LAG-3、BTLA、LIGHT或CD160具有特异性,例如CTLA-4、PD-1、PD-L1和PD-L2或对共刺激分子如CD28、CD80、CD86、CD83、ICOS、B7H2、TL1A和4-1BB具有特异性。

[0080] 40.根据段落1到39中任一项所述的腺病毒,其中所述双特异性T细胞衔接器包括:VH结构域,其包括SEQ ID NO:8、13或18中任一项所阐述的氨基酸序列或与其至少95%相同的氨基酸序列。

[0081] 41.根据段落1到40中任一项所述的腺病毒,其中所述双特异性T细胞衔接器包括:VL结构域,其包括SEQ ID NO:9、12或17中任一项所阐述的氨基酸序列或与其至少95%相同的氨基酸序列。

[0082] 42.根据段落1到41中任一项所述的腺病毒,其中所述双特异性T细胞衔接器包括scFv,所述scFv包括SEQ ID NO:7、11或16中任一项所阐述的氨基酸序列或与其至少95%相同的氨基酸序列。

[0083] 43.根据段落1到42中任一项所述的腺病毒,其中所述双特异性T细胞衔接器包括SEQ ID NO:2或4中所阐述的氨基酸序列或与其至少95%相同的氨基酸序列,例如SEQ ID NO:73或75中所阐述的氨基酸序列。

[0084] 44.根据段落1到43中任一项所述的腺病毒,其中所述腺病毒包括SEQ ID NO:120所阐述的DNA序列。

[0085] 45.一种组合物,其包括根据段落1到41中任一项所述的腺病毒以及稀释剂或载剂。

[0086] 46.根据段落45所述的组合物,其中所述配制品包括第二溶瘤病毒,例如Ad11或其衍生物,如EnAd,具体的说其中所述额外的病毒是根据本公开的。

[0087] 47.一种治疗患者的方法,其包括施用治疗有效量的根据段落1到44中任一项所述

的腺病毒或根据段落46所述的组合物。

[0088] 48.根据段落47所述的方法,其用于治疗癌症,具体的说实体瘤。在一个实施例中,根据本公开的腺病毒编码至少一个另外的转基因,例如1个、2个、3个或4个另外的转基因。

[0089] 在一个实施例中,在每个基因之间编码不同的切割肽。

[0090] 在一个实施例中,所有转基因都位于病毒的一个位置,例如位于B_Y位置。

[0091] 有利地,诸位发明人已经发现,用双特异性T细胞衔接器分子携带腺病毒允许双特异性抗体片段分子"背负"腺病毒选择性感染癌细胞的能力,由此能够将双特异性T细胞衔接器靶向递送到肿瘤细胞。

[0092] 有利地,双特异性T细胞衔接器很小并且可以在哺乳动物细胞中制备。因此,一旦被本公开的腺病毒感染,双特异性T细胞衔接器分子由肿瘤细胞合成、分泌并且可以局部起作用,从而扩散到病毒的直接足迹之外。因此,这允许双特异性T细胞衔接器扩散到感染的直接位点之外,但同时限制病毒的传播范围远远超过感染的肿瘤细胞巢。这最大限度地降低了不希望的脱靶效应的风险。

[0093] 在一个实施例中,腺病毒是EnAd。与现有技术的腺病毒相比,EnAd已经示出了具有增强的溶瘤活性。EnAd还已经示出了对人类上皮来源的癌细胞具有高选择性,如结肠癌、肺癌、膀胱癌和肾癌细胞。这使其成为双特异性T细胞衔接器分子的理想递送媒剂,因为T细胞可以被双特异性T细胞衔接器分子活化以攻击靶细胞,而EnAd同时感染和溶解癌细胞。这导致对肿瘤的双管齐下的攻击,其具有协同的溶瘤作用。

[0094] 在一个实施例中,所述表面抗原是T细胞受体复合物(TCR)的组分,所述组分如CD3、TCR-α和TCR-β。

[0095] 在一个实施例中,所述表面抗原是CD3,如CD3ε、CD3γ和CD3δ,具体的说CD3ε。

[0096] 在一个实施例中,所述结合结构域之一对肿瘤抗原具有特异性,所述肿瘤抗原如CEA;MUC-1;EpCAM;HER受体(如HER1、HER2、HER3、HER4);PEM;A33;G250;碳水化合物抗原Le^y、Le^x、Le^b;PSMA;TAG-72;STEAP1;CD166;CD24;CD44;E-钙粘蛋白;SPARC;ErbB2和ErbB3,具体的说EpCAM。

[0097] 在一个实施例中,结合结构域之一对EpCAM具有特异性,例如包括SEQ ID NO:28所阐述的氨基酸序列的EpCAM或与其至少95%相同的序列。

[0098] 在一个实施例中,所述结合结构域之一对肿瘤基质抗原具有特异性,所述肿瘤基质抗原例如成纤维细胞活化蛋白(FAP)、TREM1、IGFBP7、FSP-1、血小板源性生长因子-α受体(PDGFR-α)、血小板源性生长因子-β受体(PDGFR-β)和波形蛋白。有利地,表达这些抗原的基质细胞(非转化细胞)不经历与转化细胞相同水平的突变抗性选择过程。因此,这些细胞更容易靶向癌症疗法,因为它们不是"移动靶"。此外,在基质细胞中发现的受体类型通常在不同类型的癌症中是常见的。因此,靶向上述抗原之一可能对多种癌症类型有效。

[0099] 在一个实施例中,结合结构域之一对FAP具有特异性,例如包括SEQ ID NO:30所阐述的氨基酸序列的FAP或与其至少95%相同的序列。有利地,FAP在肿瘤相关成纤维细胞上被上调。成纤维细胞是固体癌的重要组分,支持干预的生长、侵袭和恢复。它们通常占晚期癌症中40%到60%的细胞。有利地,成纤维细胞是遗传上稳定的细胞,其比癌细胞更不可能逃避治疗。活化的成纤维细胞在各种肿瘤类型中也相对相似。因此,通过活化T细胞以靶向并且杀死表达FAP的肿瘤相关成纤维细胞,本公开的腺病毒可以帮助减少免疫抑制途径的

谱,如由IL-10、TGFβ和IDO介导的途径。

[0100] 其它基质靶,其包含肿瘤相关巨噬细胞和髓源性抑制细胞抗原,例如CD163、CD206、CD68、CD11c、CD11b、CD14、CSF1受体、CD15、CD33、CD66b和其中两种或更多种的组合。

[0101] 在一个实施例中,所述双特异性T细胞衔接器中的所述结合结构域之一对如CD31、CD2和CD277等非TCR活化蛋白具有特异性。

[0102] 在一个实施例中,结合结构域之一对感兴趣的T细胞上的表面抗原具有特异性,如选自CD3(如CD3δ、CD3ε或CD3γ)、TCR-α链和TCR-β链,并且一个结合结构域对肿瘤抗原具有特异性。

[0103] 在一个实施例中,结合结构域之一对CD3具有特异性,并且另一个结合结构域对肿瘤抗原具有特异性,例如选自由以下组成的组:CEA、MUC-1、EpCAM、HER受体HER1、HER2、HER3、HER4、PEM、A33、G250、碳水化合物抗原Le^y、Le^x、Le^b、PSMA、TAG-72、STEAP1、CD166、CD24、CD44、E-钙粘蛋白、SPARC、ErbB2和ErbB3。

[0104] 在一个实施例中,结合结构域之一对CD3具有特异性(如CD3δ、CD3ε或CD3γ),并且另一个结合结构域对EpCAM具有特异性。

[0105] 在一个实施例中,结合结构域之一对CD3ε具有特异性,并且另一个结合结构域对EpCAM具有特异性。

[0106] 在一个实施例中,结合结构域之一对感兴趣的T细胞上的表面抗原具有特异性,如选自CD3(如CD3δ、CD3ε或CD3γ)、TCR-α和TCR-β,并且另一个结合结构域对肿瘤基质抗原具有特异性。

[0107] 在一个实施例中,结合结构域之一对CD3具有特异性(如CD3δ、CD3ε或CD3γ),并且另一个结合结构域对肿瘤基质抗原具有特异性,例如选自由以下组成的组:成纤维细胞活化蛋白(FAP)、TREM1、IGFBP7、FSP-1、血小板源性生长因子-α受体(PDGFR-α)、血小板源性生长因子-β受体(PDGFR-β)和波形蛋白。

[0108] 在一个实施例中,结合结构域之一对CD3具有特异性(如CD3δ、CD3ε或CD3γ),并且另一个结合结构域对FAP具有特异性。

[0109] 在一个实施例中,结合结构域之一对CD3ε具有特异性,并且另一个结合结构域对FAP具有特异性。

[0110] 在一个实施例中,结合结构域之一对感兴趣的T细胞上的表面抗原具有特异性,如CD3、TCR-α和TCR-β,并且另一个结合结构域对非TCR活化蛋白具有特异性。

[0111] 在一个实施例中,结合结构域之一对CD3具有特异性(如CD3δ、CD3ε或CD3γ),并且另一个结合结构域对选自由以下组成的组的非TCR活化蛋白具有特异性:CD31、CD2和CD277。

[0112] 在一个实施例中,结合结构域之一对CD3ε具有特异性,并且另一个结合结构域对选自由以下组成的组的非TCR活化蛋白具有特异性:CD31、CD2和CD277。

[0113] 在一个实施例中,B_X或B_Y中的至少一个不是键。

[0114] 在一个实施例中,B_X不是键。

[0115] 在一个实施例中,B_Y不是键。

[0116] 在一个实施例中,B_X和B_Y均不是键。

[0117] 在一个实施例中,所述腺病毒是嵌合的。

[0118] 在一个实施例中,所述腺病毒是溶瘤的。

[0119] 在一个实施例中,所述腺病毒是嵌合的和溶瘤的。

[0120] 在一个实施例中,所述腺病毒能够进行复制。

[0121] 在一个实施例中,所述腺病毒是嵌合的、溶瘤的和能够进行复制的。

[0122] 在一个实施例中,所述腺病毒是具有复制能力的。

[0123] 在另一个实施例中,所述腺病毒是嵌合的、溶瘤的和具有复制能力的。

[0124] 在一个实施例中,所述腺病毒具有复制缺陷,即是载体。

[0125] 在一个实施例中,B_X包括转基因或转基因盒,具体的说编码根据本公开的双特异性T细胞衔接器的转基因盒。

[0126] 在一个实施例中,B_Y包括转基因或转基因盒,具体的说编码根据本公开的双特异性T细胞衔接器的转基因盒。

[0127] 在一个实施例中,B_Y包括转基因或转基因盒,具体的说编码根据本公开的双特异性T细胞衔接器的转基因盒并且B_X代表键。

[0128] 在一个实施例中,B_X和B_Y均包括转基因或转基因盒。

[0129] 在一个实施例中,所述一个或多个转基因或转基因盒受内源或外源启动子,如内源启动子的控制。有利地,当在这些启动子的控制下,病毒保持具有复制能力并且还能够表达双特异性T细胞衔接器和/或其它蛋白质。因此,选择的双特异性T细胞衔接器将由癌细胞表达。在一些实施例中采用外源启动子可能是有利的,因为所述外源启动子可以强烈地和组成性地表达抗体或片段,这在某些情况下可能特别有用,例如在患者具有严重弥漫性癌症的情况下。采用内源启动子可能是有利的,因为所述内源启动子减少了需要掺入以表达双特异性T细胞衔接器的转基因盒的大小,即因为不需要包含外源启动子,所述盒可以更小。

[0130] 因此,在一个实施例中,所述转基因或转基因盒受选自由以下组成的组的内源启动子的控制:E4启动子和主要晚期启动子,具体的说所述主要晚期启动子。在病毒中采用内源启动子在治疗环境中也可能是有利的,因为转基因仅在病毒在癌细胞而不是组成型外源启动子中复制时表达,所述组成型外源启动子将连续转录转基因并且可能导致抗体或片段的不适当浓度。

[0131] 在一个实施例中,转基因或转基因盒(例如编码双特异性T细胞衔接器)受如CMV等外源启动子的控制。有利地,组成型外源启动子的使用导致转基因的连续转录,这在某些情况下可能是期望的。

[0132] 在一个实施例中,一个转基因或转基因盒(例如编码双特异性T细胞衔接器)受内源启动子的控制,并且另一个转基因或转基因盒(例如编码双特异性T细胞衔接器)受外源启动子的控制。

[0133] 在一个实施例中,病毒中的所有转基因或转基因盒(例如编码双特异性T细胞衔接器)都受内源启动子的控制。

[0134] 在另一个实施例中,病毒中的所有转基因或转基因盒(例如编码双特异性T细胞衔接器)都受外源启动子的控制。

[0135] 在一个实施例中,转基因或转基因盒进一步包括独立地选自以下的调节元件:

[0136] i)剪接受体序列,

[0137] ii)内部核糖体进入序列或高自切割2A肽,

[0138] iii)Kozak序列及

[0139] iv)其组合。

[0140] 因此,在一个实施例中,转基因盒包括i)或ii)或iii)或iv)。

[0141] 在一个实施例中,转基因盒包括i)和ii)、或i)和iii)、或i)和iv)、或ii)和iii)、或ii)和iv)、或iii)和iv)。

[0142] 在一个实施例中,转基因盒包括i)和ii)和iii)、或i)和ii)和iv)、或i)和iii)和iv)、或ii)和iii)和iv)。

[0143] 在一个实施例中,转基因盒包括i)和ii)和iii)和iv)。

[0144] 在一个实施例中,转基因盒包括在蛋白质(例如双特异性T细胞衔接器)编码序列的起始处的Kozak序列,其有助于mRNA的转译。

[0145] 在一个实施例中,转基因盒编码高自切割效率2A肽。

[0146] 在一个实施例中,转基因盒进一步包括多腺苷酸化序列。

[0147] 在一个实施例中,所述转基因盒进一步包括位于DNA序列3'末端处和/或DNA序列5'末端处的限制性位点。

[0148] 在一个实施例中,至少一个转基因盒编码单顺反子mRNA。

[0149] 在一个实施例中,双特异性T细胞衔接器分子半衰期短,例如48小时或更少。

[0150] 在一个实施例中,双特异性T细胞衔接器分子在选自E1、E3、B_X、B_Y和其组合的区域中编码。有利地,诸位发明人已经确定,可以在外源或内源启动子的控制下将多种个基因插入B_X和/或B_Y中,而不会不利地影响病毒的生命周期或载体的稳定性。

[0151] 在一个实施例中,双特异性T细胞衔接器分子例如在主要晚期启动子的控制下至少编码在位置B_X中。有利地,转基因或转基因盒允许双特异性T细胞衔接器或任何其它分子与腺病毒本身一起表达。重要的是,诸位发明人成功地证明了双特异性T细胞衔接器的表达不会显著影响EnAd复制的能力,也不会对其溶瘤活性产生负面影响。

[0152] 在一个实施例中,双特异性T细胞衔接器分子例如在主要晚期启动子的控制下至少编码在位置B_Y中。有利地,转基因或转基因盒允许双特异性T细胞衔接器或任何其它分子与腺病毒本身一起表达。重要的是,诸位发明人成功地证明了双特异性T细胞衔接器的表达不会显著影响EnAd复制的能力,也不会对其溶瘤活性产生负面影响。

[0153] 在一个实施例中,腺病毒进一步编码第二双特异性T细胞衔接器。

[0154] 在一个实施例中,所述第一双特异性T细胞衔接器分子对肿瘤抗原具有特异性,例如如上文所描述的肿瘤抗原,并且所述第二双特异性T细胞衔接器分子对肿瘤基质抗原具有特异性,例如如上文所描述的基质抗原。

[0155] 在一个实施例中,第一双特异性T细胞衔接器分子对选自由以下组成的组的肿瘤抗原具有特异性:CEA、MUC-1、EpCAM、HER受体HER1、HER2、HER3、HER4、PEM、A33、G250、碳水化合物抗原Le^y、Le^x、Le^b、PSMA、TAG-72、STEAP1、CD166、CD24、CD44、E-钙粘蛋白、SPARC、ErbB2和ErbB3,并且第二双特异性T细胞衔接器分子对选自由以下组成的组的肿瘤基质抗原具有特异性:成纤维细胞活化蛋白(FAP)、TREM1、IGFBP7、FSP-1、血小板源性生长因子-α受体(PDGFR-α)、血小板源性生长因子-β受体(PDGFR-β)和波形蛋白。

[0156] 在一个实施例中,第一双特异性T细胞衔接器分子对EpCAM具有特异性,并且第二

双特异性T细胞衔接器分子对选自由以下组成的组的肿瘤基质抗原具有特异性:成纤维细胞活化蛋白(FAP)、TREM1、IGFBP7、FSP-1、血小板源性生长因子-α受体(PDGFR-α)、血小板源性生长因子-β受体(PDGFR-β)和波形蛋白。

[0157] 在一个实施例中,第一双特异性T细胞衔接器分子对选自由以下组成的组的肿瘤抗原具有特异性:CEA、MUC-1、EpCAM、HER受体HER1、HER2、HER3、HER4、PEM、A33、G250、碳水化合物抗原Le^y、Le^x、Le^b、PSMA、TAG-72、STEAP1、CD166、CD24、CD44、E-钙粘蛋白、SPARC、ErbB2和ErbB3,并且第二双特异性T细胞衔接器对FAP具有特异性。

[0158] 在一个实施例中,第一双特异性T细胞衔接器分子对EpCAM具有特异性并且第二双特异性T细胞衔接器分子对FAP具有特异性。

[0159] 在另一个实施例中,所述第一双特异性T细胞衔接器分子对肿瘤抗原具有特异性,并且所述第二双特异性T细胞衔接器分子对非TCR活化蛋白具有特异性。

[0160] 在一个实施例中,第一双特异性T细胞衔接器分子对选自由以下组成的组的肿瘤抗原具有特异性:CEA、MUC-1、EpCAM、HER受体HER1、HER2、HER3、HER4、PEM、A33、G250、碳水化合物抗原Le^y、Le^x、Le^b、PSMA、TAG-72、STEAP1、CD166、CD24、CD44、E-钙粘蛋白、SPARC、ErbB2和ErbB3。

[0161] 在一个实施例中,第一双特异性T细胞衔接器分子对EpCAM具有特异性,并且第二双特异性T细胞衔接器分子对选自由以下组成的组的非TCR活化蛋白具有特异性:CD31、CD2和CD277。

[0162] 在一个实施例中,第一双特异性T细胞衔接器分子对肿瘤基质抗原具有特异性并且第二双特异性T细胞衔接器分子对非TCR活化蛋白具有特异性。

[0163] 在一个实施例中,第一双特异性T细胞衔接器分子对选自由以下组成的组的肿瘤基质抗原具有特异性:成纤维细胞活化蛋白(FAP)、TREM1、IGFBP7、FSP-1、血小板源性生长因子-α受体(PDGFR-α)、血小板源性生长因子-β受体(PDGFR-β)和波形蛋白,并且第二双特异性T细胞衔接器分子对选自由以下组成的组的非TCR活化蛋白具有特异性:CD31、CD2和CD277。

[0164] 在一个实施例中,第一双特异性T细胞衔接器分子对FAP具有特异性,并且第二双特异性T细胞衔接器分子对选自由以下组成的组的非TCR活化蛋白具有特异性:CD31、CD2和CD277。

[0165] 在一个实施例中,腺病毒仅包括一个双特异性T细胞衔接器。

[0166] 在另一个实施例中,腺病毒包括两个双特异性T细胞衔接器。

[0167] 在另一个实施例中,腺病毒包括三个双特异性T细胞衔接器。

[0168] 除了编码一种、两种或三个双特异性T细胞衔接器之外,病毒还可以编码1个、2个、3个或4个另外的转基因。

[0169] 在一个实施例中,腺病毒进一步编码细胞因子或趋化因子。

[0170] 在一个实施例中,腺病毒进一步编码细胞因子。

[0171] 在一个实施例中,腺病毒进一步编码趋化因子。

[0172] 在另一个实施例中,腺病毒进一步编码细胞因子和趋化因子。

[0173] 在一个实施例中,腺病毒包括一个双特异性T细胞衔接器和至少一个细胞因子或趋化因子,例如1个、2个或3个细胞因子,1个、2个或3个趋化因子或2个或3个基因的组合,每

个基因独立地编码趋化因子的细胞因子。

[0174] 在另一个实施例中,腺病毒包括两个双特异性T细胞衔接器和至少一种细胞因子或趋化因子,例如1种或2种细胞因子,1种或2种趋化因子或细胞因子和趋化因子的组合。

[0175] 在另一个实施例中,腺病毒包括三个双特异性T细胞衔接器和至少一种细胞因子或趋化因子。

[0176] 在一个实施例中,细胞因子或趋化因子选自:IL-1α、IL-1β、IL-6、IL-9、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-33、IL-35、IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、IL-25、IL-1RA、IFNα、IFNβ、IFNγ、TNFα、淋巴毒素α(LTA)和GM-CSF、IL-8、CCL2、CCL3、CCL5、CCL17、CCL20、CCL22、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL13、CXCL12、CCL2、CCL19、CCL21、例如IL-12、IL-18、IL-22、IL-7、IL-15、IL-21、IFNγ、TNFα、淋巴毒素α(LTA)、CCL3、CCL5、CXCL9、CXCL12、CCL2、CCL19和CCL21。

[0177] 在一个实施例中,经编码细胞因子选自:TNFα超家族(TNFRSF包含TNF-α、TNF-C、OX40L、CD154、FasL、LIGHT、TL1A、CD70、Siva、CD153、4-1BB配体、TRAIL、RANKL、TWEAK、APRIL、BAFF、CAMLG、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、GITR配体、EDA-A、EDA-A2)、TGF-β超家族、IL-1家族(即IL-1和IL-8)、IL-2家族、IL-10家族、IL-17家族、干扰素家族。

[0178] 在一个实施例中,趋化因子选自由以下组成的组:MIP-1α、RANTES、IL-8、CCL5、CCL17、CCL20、CCL22、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL13、CXCL12、CCL2、CCL19和CCL21。

[0179] 在一个实施例中,腺病毒进一步包括对检查点蛋白或共刺激分子具有特异性的免疫调节因子,如抗体或抗体片段,或蛋白质或肽配体,或这些分子的特异性结合配体。

[0180] 在一个实施例中,免疫调节因子是对检查点蛋白具有特异性的抗体或抗体片段,或蛋白质或肽配体,如CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、VISTA、B7-H3、B7-H4、HVEM、ILT-2、ILT-3、ILT-4、TIM-3、LAG-3、BTLA、LIGHT或CD160、例如CTLA-4、PD-1、PD-L1和PD-L2。

[0181] 在一个实施例中,免疫调节因子是抑制剂,例如检查点抑制剂。

[0182] 在一个实施例中,免疫调节因子是激动剂。

[0183] 在另一个实施例中,免疫调节因子是对共刺激分子具有特异性的抗体或抗体片段,或蛋白质或肽配体,如CD28、CD80、CD86、CD83、ICOS、B7H2、TL1A和4-1BB。

[0184] 在一个实施例中,腺病毒包括对检查点蛋白具有特异性的第一抗体、抗体片段、蛋白质或肽配体以及对共刺激分子具有特异性的第二抗体、抗体片段、蛋白质或肽配体。

[0185] 在一个实施例中,所述双特异性T细胞衔接器包括:VH结构域,其包括SEQ ID NO:8、13或18中任一个所阐述的氨基酸序列或与其至少95%相同的氨基酸序列。

[0186] 在一个实施例中,所述双特异性T细胞衔接器包括:VL结构域,其包括SEQ ID NO:9、12或17中任一个所阐述的氨基酸序列或与其至少95%相同的氨基酸序列。

[0187] 在一个实施例中,所述双特异性T细胞衔接器包括scFv,所述scFv包括SEQ ID NO:7、11或16中任一个所阐述的氨基酸序列或与其至少95%相同的氨基酸序列。

[0188] 在一个实施例中,本公开中采用的双特异性T细胞衔接器(即由腺病毒编码)包括以下两种结合结构域:具有VH结构域,其具有SEQ ID NO:8所示的序列或与其至少95%相同的序列,以及具有VL结构域,其具有SEQ ID NO:9所示的序列或与其至少95%相同的序列。

[0189] 在一个实施例中,本公开中采用的双特异性T细胞衔接器(即由腺病毒编码)包括以下两种结合结构域:具有VH结构域,其具有SEQ ID NO:13所示的序列或与其至少95%相

同的序列,以及具有VL结构域,其具有SEQ ID NO:12所示的序列或与其至少95％相同的序列。

[0190] 在一个实施例中,本公开中采用的双特异性T细胞衔接器(即由腺病毒编码)包括以下两种结合结构域:具有VH结构域,其具有SEQ ID NO:18所示的序列或与其至少95％相同的序列,以及具有VL结构域,其具有SEQ ID NO:17所示的序列或与其至少95％相同的序列。

[0191] 在一个实施例中,本公开中采用的双特异性T细胞衔接器(即由腺病毒编码)包括以下四种结合结构域:具有VH结构域,其具有SEQ ID NO:8所示序列或与其至少95％相同的序列;和具有VL结构域,其具有SEQ ID NO:9所示序列或与其至少95％相同的序列;和具有VH结构域,其具有SEQ ID NO:13所示序列或与其至少95％相同的序列的结合结构域;以及具有VL结构域,其具有SEQ ID NO:12所示序列或与其至少95％相同的序列。

[0192] 在一个实施例中,本公开中采用的双特异性T细胞衔接器(即由腺病毒编码)包括以下四种结合结构域:具有VH结构域,其具有SEQ ID NO:8所示序列或与其至少95％相同的序列;和具有VL结构域,其具有SEQ ID NO:9所示序列或与其至少95％相同的序列;和具有VH结构域,其具有SEQ ID NO:18所示序列或与其至少95％相同的序列的结合结构域;以及具有VL结构域,其具有SEQ ID NO:17所示序列或与其至少95％相同的序列。

[0193] 在一个实施例中,本公开中采用的双特异性T细胞衔接器(即由腺病毒编码)包括SEQ ID NO:7、11、16中所示的序列或与任何一种序列至少95％相同的序列。

[0194] 在一个实施例中,本公开中采用的双特异性T细胞衔接器(即由腺病毒编码)包括SEQ ID NO:7中所示的序列或与其至少95％相同的序列。

[0195] 在一个实施例中,本公开中采用的双特异性T细胞衔接器(即由腺病毒编码)包括SEQ ID NO:11中所示的序列或与其至少95％相同的序列。

[0196] 在一个实施例中,本公开中采用的双特异性T细胞衔接器(即由腺病毒编码)包括SEQ ID NO:16中所示的序列或与其至少95％相同的序列。

[0197] 在一个实施例中,所述双特异性T细胞衔接器包括SEQ ID NO:2或4中所阐述的氨基酸序列或与其至少95％相同的氨基酸序列,例如SEQ ID NO:73或75中所阐述的氨基酸。

[0198] 在一个实施例中,根据本公开的腺病毒包括SEQ ID NO:34到37中任一个所阐述的DNA序列,或在严格条件下与其杂交的DNA酸序列。

[0199] 在一个实施例中,根据本公开的腺病毒包括SEQ ID NO中任一个所阐述的DNA序列:SEQ ID NO:79到82。

[0200] 在一个实施例中,根据本公开的腺病毒包括SEQ ID NO:34、35、36、37、79、80、82、96、97、98、99、100、101、102、103、120、298中任一个所示的DNA序列或编码相同病毒的序列,或在严格条件下与其中任何一个杂交的序列。

[0201] 在一个实施例中,根据本公开的腺病毒包括SEQ ID NO:34、35、36、37、79、80、82、96、97、98、99、100、101、102、103、120或298中任一个所示的DNA序列。

[0202] 技术人员意识到DNA代码中存在冗余,因此本公开扩展到编码具有本文公开的氨基酸的双特异性T细胞衔接器的EnAd或Ad11。

[0203] C-末端deca-His(HHHHHHHHHH SEQ ID NO:24)亲和标记可用于纯化双特异性T细胞衔接器或腺病毒。但是,它是可选的,并且可以例如在最终产品中排除。技术人员还将意

识到可以使用除deca-His之外的其它亲和标签,并且同样可以排除这些标签而不影响双特异性T细胞衔接器或腺病毒的生物学功能。因此,在一个实施例中,双特异性T细胞衔接器包括SEQ ID NO:2或4中任一个所阐述的氨基酸序列,但不包括序列C-末端的deca-His亲和标签,例如如SEQ ID NO:73或75所阐述。在另一个实施例中,腺病毒包括SEQ ID NO:34到37中任一个所阐述的DNA序列,但不包括deca-His亲和标签,例如如SEQ ID NO:79到82中任一个所阐述的DNA序列。

[0204] 排除deca-His亲和标签进一步延伸到本文公开的包括deca-His亲和标签的所有其它序列,即本公开包含缺少C-末端deca-His标签的相同氨基酸或DNA序列(HHHHHHHHHH或CATCACCATCACCATCACCACCATCACCAT),例如如SEQ ID NO:72到82中任一个所阐述的序列。

[0205] 在一个实施例中,由本公开的病毒编码的双特异性T细胞衔接器受外源启动子,例如CMV启动子的控制。当转基因在L5和E4区之间时,外源子可以置于MPL与经编码转基因之间。

[0206] 当转基因在L5和E3区之间时,外源子可以置于经编码转基因与L5之间。

[0207] 在一个方面,提供了包括如本文所描述的腺病毒以及稀释剂或载剂的组合物。

[0208] 在一个方面,提供了治疗患者的方法,包括施用治疗有效量的如本文所描述的腺病毒或组合物。

[0209] 在一个实施例中,所述方法用于治疗癌症,例如上皮癌,具体的说实体瘤。

[0210] 在一个实施例中,提供了一种治疗方法,其包括将根据本公开的病毒与检查点抑制剂(如PD-1或PDL1抑制剂)组合施用,具体的说其中检查点抑制剂在病毒中编码。

[0211] 在一个实施例中,提供了一种治疗方法,其包括施用根据本公开的病毒,其不与检查点抑制剂(例如本文其它地方所列出的,如PD-1或PDL1抑制剂)组合,具体的说其中检查点抑制剂不在病毒编码中。

[0212] 根据本公开由病毒编码的双特异性T细胞衔接器具有增强病毒细胞毒性的能力。

[0213] 令人惊讶的是,根据本公开的由病毒编码的双特异性T细胞衔接器可以活化CD4+细胞和/或CD8+细胞,例如甚至在肿瘤的抑制环境中的细胞,包含肿瘤的如腹水等液体环境中的T细胞。

[0214] 有利地,根据本公开的由病毒编码的双特异性T细胞衔接器可以活化细胞毒性T细胞,例如甚至在肿瘤的抑制环境中的T细胞,包含肿瘤的如腹水等液体环境中的T细胞。

[0215] 甚至更令人惊讶的是,根据本公开的由病毒编码的双特异性T细胞衔接器能够刺激(活化)T细胞增殖。

[0216] 根据本公开的编码双特异性T细胞衔接器的病毒似乎能够绕过、克服或逆转肿瘤的免疫抑制微环境。

[0217] 在一个实施例中,T细胞的活化导致T细胞标记物,例如CD25的上调。

[0218] 在一个实施例中,根据本公开的病毒中双特异性T细胞衔接器的结合对新抗原具有特异性。

[0219] 本公开还扩展到本文公开的新序列。

具体实施方式

[0220] 如本文所采用的第一双特异性T细胞衔接器是给予根据本公开的腺病毒编码的两

个双特异性T细胞衔接器之一的标记。其不是双特异性T细胞衔接器位置的参考或限制或双特异性T细胞衔接器相对于第二双特异性T细胞衔接器的相对位置。

[0221] 如本文所采用的第二双特异性T细胞衔接器是给予根据本公开的腺病毒编码的两个双特异性T细胞衔接器之一的标记。其不是双特异性T细胞衔接器位置的参考或限制或双特异性T细胞衔接器相对于第一双特异性T细胞衔接器的相对位置。

[0222] 如本文所采用的Bd1和Bd2是第一双特异性T细胞衔接器中的结合结构域的名义标记。就所述第一双特异性T细胞衔接器内的结合结构域的朝向位置而言,其不是参考或限制。

[0223] 如本文所采用的Bd3和Bd4是第二双特异性T细胞衔接器中的结合结构域的名义标记。就所述第二双特异性T细胞衔接器内的结合结构域的朝向位置而言,其不是参考或限制。

[0224] 如本文所使用的术语抗体是指能够通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点(本文也称为结合位点)特异性结合靶抗原,如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽、肽等的免疫球蛋白分子。除非上下文另有指示,否则所述术语延伸到全长抗体和包括全长抗体的多特异性抗体分子。

[0225] 如本文所使用的,“抗体分子”包含抗体及其结合片段和任何一种的多特异性形式。

[0226] 如本文所采用的抗原结合位点是指分子的一部分,其包括一对可变区,具体的说与靶抗原特异性相互作用的同源对。

[0227] 具体地,如本文所采用的,旨在表示仅识别其特异性抗原的结合位点或与对抗原具有显著更高的结合亲和力的结合位点,与对其非特异性的抗原的亲和力相比具有特异性,例如结合亲和力高5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍。

[0228] 如本文所采用的结合片段或抗体结合片段是指抗体结合片段和多特异性抗体分子,其包括抗体结合片段,包含但不限于Fab、修饰Fab、Fab’、修饰Fab’、$F(ab')_2$、Fv、单结构域抗体、scFv、二价抗体、三价抗体或四价抗体、Bis-scFv、双抗体、三抗体、四抗体和上文任一种的表位结合片段(参见例如Holliger和Hudson,2005,《自然生物技术(Nature Biotech.)》23(9):1126-1136;Adair和Lawson,2005,《药物设计综述-在线(Drug Design Reviews-Online)》2(3),209-217)。用于产生和制备这些抗体片段的方法在所属领域中众所周知(参见例如Verma等人,1998,《免疫法期刊(Journal of Immunological Methods)》,216:165-181)。用于本公开的其它抗体片段包含国际专利申请WO05/003169、WO05/003170和WO05/003171中所描述的Fab和Fab’片段。多价抗体可以包括多种特异性,例如双特异性或者可以是单特异性的(参见例如WO92/22853和WO05/113605)。

[0229] 在一个实施例中,腺病毒包括多特异性抗体分子。

[0230] 如本文所采用的多特异性抗体分子是指具有两个或更多个抗原结合结构域的抗体分子,例如两个(双特异性)或三个(三特异性)或四个(四特异性)结合结构域。

[0231] 本公开的多特异性抗体分子可以由各种抗体片段构建,如上文描述的抗体片段。例如,双抗体是由ScFv片段的非共价二聚体构成的双特异性抗体分子,而$F(ab')_2$是由通过铰链区连接的2个Fab片段构成的双特异性抗体分子。因此,技术人员将意识到,可以以各种组合布置不同的抗体片段,以产生双特异性或多特异性抗体分子。

[0232] 三特异性或四特异性抗体形式的实例包含但不限于Fab_3、三抗体、四抗体、三体、DVD-Ig、IgG-scFv、$ScFv_2$-Fc、tandAb和DNL-Fab3。

[0233] 如本文所采用的双特异性抗体分子是指具有两个抗原结合结构域的分子,其可以结合相同或不同的抗原。双特异性T细胞衔接器是双特异性抗体分子的亚类。

[0234] 结构域可以结合不同的抗原。

[0235] 可替代地,结构域可以全部结合相同的抗原,包含结合抗原上的相同表位或结合相同抗原上的不同表位。

[0236] 双特异性抗体形式的实例包含但不限于双特异性T细胞衔接器、$F(ab')_2$、F(ab')-ScFv2、di-scFv、双抗体、微抗体、scFv-Fc、DART、TandAb、ScDiabody、ScDiabody-CH3、双抗体-CH3、三体、微型抗体、微抗体、TriBi微抗体、ScFv-CH3KIH(杵臼)、Fab-ScFv、SCFv-CH-CL-scFv、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、scDiabody-Fc、双抗体-Fc、胞内抗体、对接和锁定抗体、ImmTAC、HSAbody、ScDiabody-HAS、人体和串联ScFv-毒性(参见例如Christoph Spiess等人,《分子免疫学(Molecular Immunology)》,67(2015),第95到106页)。

[0237] 本公开的腺病毒包括双特异性T细胞衔接器,其对感兴趣的T细胞上的至少表面抗原具有特异性。T细胞表面抗原的实例包含但不限于:CD3、CD2、VLA-1、CD8、CD4、CCR6、CXCR5、CD25、CD31、CD45RO、CD197、CD127、CD38、CD27、CD196、CD277和CXCR3,具体的说CD2、CD3、CD31和CD277。

[0238] 如本文所使用的双特异性T细胞衔接器是指一类人工双特异性单克隆抗体,其包括2个scFv的不同抗体或来自约55KDa的单个肽链上的4个不同基因的氨基酸序列。其中一种scFv对免疫细胞具有特异性,如在T细胞表面表达的T细胞抗原,如CD3受体。另一种scFv通常通过肿瘤特异性分子与肿瘤细胞结合。因此,双特异性T细胞衔接器能够通过其对T细胞上的抗原和肿瘤细胞上的抗原的特异性在T细胞与肿瘤细胞之间形成连接。这导致T细胞的活化并且触发T细胞对肿瘤细胞发挥其细胞毒性作用,而与MHC I或共刺激分子无关。目前批准或正在进行临床试验的基于双特异性T细胞衔接器的疗法的实例包含例如靶向CD19的Blinatumomab(Blyncyto®),并且其用于治疗非霍奇金淋巴瘤和急性淋巴细胞白血病和Solitomab,所述Solitomab靶向EpCAM并且用于治疗胃肠癌和肺癌。

[0239] 在一个实施例中,免疫细胞衔接器(如T细胞衔接器)被布置为VL1-连接子1-VH1-连接子2-VH2-连接子3-VL2的形式,例如采用独立地选自本文公开的连接子序列的连接子。

[0240] 在一个实施例中,根据本公开的双特异性T细胞衔接器中的连接子独立地选自SEQ ID NO:10、14、23、124到162和166到297。

[0241] 在一个实施例中,连接子1和连接子3具有相同的序列,例如SEQ ID NO:10、14、23、124到162和166到296,具体的说10、14和23中任一个所示的序列。

[0242] 在一个实施例中,连接子1和连接子3具有不同的氨基酸序列,例如独立地选自SEQ ID NO:10、14、23、124到162和166到296,具体的说10、14和23。

[0243] 在一个实施例中,连接子1是SEQ ID NO:10。

[0244] 在一个实施例中,连接子1是SEQ ID NO:14。

[0245] 在一个实施例中,连接子3是SEQ ID NO:10。

[0246] 在一个实施例中,连接子3是SEQ ID NO:14。

[0247] 在一个实施例中,连接子1和连接子3是SEQ ID NO:10。

[0248] 在一个实施例中,连接子1和连接子3是SEQ ID NO:14。

[0249] 在一个实施例中,连接子1是SEQ ID NO:10,并且连接子3是SEQ ID NO:14。

[0250] 在一个实施例中,连接子1是SEQ ID NO:14,并且连接子3是SEQ ID NO:10。

[0251] 在一个实施例中,连接子2与连接子1和连接子3都不同。

[0252] 在一个实施例中,连接子2选自SEQ ID NO:10、14、23、124到162和166到297中的任一个,如SEQ ID NO:297。

[0253] 在一个实施例中,连接子1的长度范围为10个到30个氨基酸,如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个或30个。

[0254] 在一个实施例中,连接子3的长度范围为10个到30个氨基酸,如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个或30个。

[0255] 在一个实施例中,连接子2的长度范围为2个到10个氨基酸,如2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个。

[0256] 在一个实施例中,VH1和VL1对根据本公开的T细胞抗原具有特异性,如CD3。

[0257] 在一个实施例中,VH2和VL2对根据本公开的如T细胞抗原等免疫细胞抗原具有特异性,如CD3。

[0258] 在一个实施例中,VH1和VL1对抗原或感兴趣的如癌抗原或基质抗原等具有特异性。

[0259] 在一个实施例中,VH2和VL2对抗原或感兴趣的如癌抗原或基质抗原等具有特异性。

[0260] 如本文所采用的基质或基质抗原是指基质中的抗原治疗靶,包含在基质基质的分子结构中表达,如结缔组织分子或与此基质相关的分子或与基质的细胞组分相关的抗原,例如已经渗入基质的成纤维细胞、肿瘤相关巨噬细胞、树突细胞、NK细胞和/或T细胞上表达。基质抗原的实例包含但不限于FAP、TGFβ、TREM1、IGFBP7、FSP-1、成纤维细胞相关的抗原、NG2、内皮唾液酸蛋白(CD248)、血小板源性生长因子α受体(PDGFR-α)、血小板源性生长因子-β受体(PDGFR-β)和波形蛋白。

[0261] 成纤维细胞可以通过采用抗原成纤维细胞活化蛋白(FAP),具体的说不结合CD26的FAP特异性抗体来靶向(参见US2012/0258119,通过引用并入本文)。

[0262] FAP最初被鉴定为反应性基质成纤维细胞上的丝氨酸蛋白酶。随后的分子克隆显示FAP与seprase相同,seprase是由黑素瘤细胞系表达的170kDa膜相关明胶酶。全长cDNA编码760个氨基酸(aa)的H型跨膜蛋白酶,其与二肽基肽酶IV(DPPIV)高度同源,在整个序列上具有52%的同一性,并且在催化结构域中具有几乎70%的同一性。通过引用并入本文的US5,587,299描述了编码FAP的核酸分子及其应用。

[0263] FAP和DPPIV具有相似的基因大小,并且在2q24处彼此染色体相邻,表明基因复制事件(Genebank登录号U09278)。两种蛋白质均是脯氨酰肽酶家族的成员。这类酶是可诱导的,在细胞表面或细胞外液中有活性,并且独特地能够在倒数第二位置从具有脯氨酸或丙氨酸的多肽切割N-末端二肽。DPPIV,也称为CD26,由几种细胞类型结构性表达,包含成纤维细胞、内皮细胞和上皮细胞、白细胞亚群如NK细胞、T淋巴细胞和巨噬细胞。一小部分DPPIV

在血液中作为可溶性蛋白质循环。与DPPIV相反,FAP通常不在正常成人组织中表达,并且其蛋白水解活性可溶形式被称为α2-抗纤溶酶裂解酶(APCE)。标记的FAP表达发生在与活化的基质相关的病症中,包含伤口愈合、上皮癌、骨关节炎、类风湿性关节炎、肝硬化和肺纤维化。

[0264] FAP结构已经解决(PDB ID 1Z68)并且与DPPIV的结构非常相似。FAP通过约20个氨基酸的未裂解信号序列锚定在质膜中,并且具有六个氨基酸的短氨基末端细胞质结构域。包含催化结构域的蛋白质的主要部分暴露于细胞外环境。FAP糖蛋白是由两个相同的97-kDa亚基组成的同型二聚体。每个FAP-单体亚基由两个结构域组成,αβ水解酶结构域(aa 27到53和493到760)和八叶β螺旋桨结构域(aa 54到492)包围大腔。在两个区界面处的此腔内的小口袋含有催化三联体(Ser624、Asp702和His734)。FAP在亚基同源二聚化后获得其酶活性,并且除了其二肽基肽酶活性外,FAP还具有I型胶原特异性明胶酶和内肽酶活性。β螺旋桨充当蛋白质-蛋白质相互作用的支架并且确定底物和细胞外基质(ECM)结合。此外,β螺旋桨参与形成FAP与其它脯氨酰肽酶或与其它膜结合分子的超分子复合物。发现FAP和DPPIV的异聚体或四聚体复合物的形成与胶原底物上的迁移细胞的伪足有关。I型胶原蛋白诱导FAP与β1整联蛋白的紧密结合,由此在伪足的形成和粘附中起主要的组织作用。虽然没有详细了解所涉及的机制,但是在细胞侵袭前沿处形成这种富含蛋白酶的膜结构域有助于定向的细胞外ECM降解。这指示FAP和ECM相互作用可能通过整合素途径影响细胞粘附、迁移、增殖和凋亡,并且支持FAP在疾病发病机制和进展中的作用,从而与侵袭性细胞行为密切相关。总之,FAP被认为是一种多功能蛋白质,所述多功能蛋白质通过其蛋白酶活性和其与其它细胞表面分子形成复合物的能力的组合,以细胞依赖性方式执行其生物学功能。上皮细胞和成纤维细胞系中FAP的过度表达促进恶性行为,指向临床情况,其中FAP的细胞表达水平与更差的临床结果相关。

[0265] 通过旁分泌信号分子、癌细胞活化基质成纤维细胞并且诱导FAP的表达,这进而影响癌细胞的增殖、侵袭和迁移。最近的研究已经证明TGF-β是促进FAP蛋白表达的主要因素(Chen、H等人,(2009),《实验与分子病理学(Exp and Molec Pathology)》,doi:10.1016/j.yexmp。2009.09.001)。FAP在90％的人上皮癌中的反应性基质成纤维细胞中大量表达,包含乳腺癌、肺癌、结肠癌和卵巢癌(Garin-Chesa、P等人,(1990),《美国科学院院报(PNAS USA)》,87:7236-7239)。Chen等人最近表明FAPα影响HO-8910PM卵巢癌细胞的侵袭、增殖和迁移(Chen、H等人,(2009),《实验与分子病理学》,doi:10.1016/j.yexmp。2009.09.001)。

[0266] FAP可以通过结合所述抗原并且在空间上阻断其与生物相关分子的相互作用来靶向。可替代地或另外地,采用如双特异性抗体分子等多特异性抗体分子可以实现FAP分子与另一种FAP分子或不同分子的交联,例如癌细胞表面上的抗原。这种交联提高了携带抗原的细胞对免疫系统的可见性,然后所述免疫系统可以被活化到中性或破坏免疫系统。

[0267] 肿瘤相关巨噬细胞(TAM)被认为表达TREM1、CD204、CD68(单独或与CD163或CD206组合)。这些标记可以用于靶向TAM。

[0268] 本公开的腺病毒具有感染肿瘤细胞的能力,并且具体的说选择优先感染肿瘤细胞。溶瘤病毒感染引起癌细胞的死亡和溶解,释放新生成的病毒颗粒。编码抗体、双特异性T细胞衔接器和其它“有效载荷”的掺入转基因是新合成的并且在它们死亡之前由肿瘤细胞主动分泌,并且一些分子还将在细胞溶解时释放。

[0269] 具有短半衰期的抗体分子可能特别适合用于本公开内容,因为这使脱靶效应最小化,因为如果分子变得全身可用,则身体会快速清除所述分子。

[0270] NKT细胞具有靶向和破坏肿瘤相关巨噬细胞的能力。然而,它们的活性似乎受到肿瘤缺氧环境的抑制。通过向NKT细胞提供例如在本公开的病毒中编码的IL-2和/或IL-15,可以恢复此活性。

[0271] 因此,在一个实施例中,根据本公开的病毒进一步编码细胞因子以活化NKT细胞,例如选自IL-2、IL-15和其组合。编码细胞因子的基因可以与编码抗体分子的基因位于相同的位置或不同的位置,例如独立地选自E1、E3、E4、B_X和B_Y。

[0272] 因此,根据本公开的腺病毒具有至少两种或三种攻击肿瘤的机制,包含破坏肿瘤基质的间接机制。

[0273] 如本文所采用的转基因是指已经插入基因组序列的基因,所述基因组序列是对病毒不自然的基因(外源的)或通常不在病毒的特定位置发现的基因。转基因的实例如下。如本文所采用的转基因还包含基因的功能片段,所述基因的功能片段是基因的一部分,其在插入时适合于执行全长基因的功能或大部分功能。

[0274] 除非上下文另有指示,否则转基因和编码序列在插入病毒基因组的上下文中可互换使用。如本文所采用的编码序列意指例如编码功能性RNA、肽、多肽或蛋白质的DNA序列。通常,编码序列是用于编码目的功能性RNA、肽、多肽或蛋白质的转基因的cDNA。功能性RNA、肽、多肽和感兴趣的蛋白质描述如下。

[0275] 显然,病毒基因组含有DNA的编码序列。在本说明书的上下文中,病毒的基因组序列中的内源(天然存在的基因)不被认为是转基因,除非之后通过重组技术修饰,如它们在非天然位置或在非天然环境中。

[0276] 在一个实施例中,如本文所采用的,转基因是指含有基因或cDNA序列的DNA区段,所述基因或cDNA序列已经从一种生物体中分离并且被引入不同的生物体,即本公开的病毒。在一个实施例中,此非天然DNA区段可以保留产生功能性RNA、肽、多肽或蛋白质的能力。

[0277] 因此,在一个实施例中,插入的转基因编码人类或人源化蛋白质、多肽或肽。

[0278] 在一个实施例中,插入的转基因编码非人类蛋白质、多肽或肽(如非人类哺乳动物蛋白、多肽或肽)或RNA分子,例如来自小鼠、大鼠、兔、骆驼、美洲驼或类似物。有利地,本公开的病毒允许转基因在癌细胞内转运。因此,通过这种细胞内递送可以使由人类患者对非人类序列(如蛋白质)生成的应答最小化。

[0279] DNA序列可以包括一种以上的转基因,例如1个、2个、3个或4个转基因,如1种或2种。

[0280] 转基因盒可以包括一种以上的转基因,例如1个、2个、3个或4个转基因,如1种或2种。

[0281] 在一个或多个实施例中,所述盒如图中或实例中的一个或多个所示布置。

[0282] 如本文所采用的转基因盒是指编码以一个或多个编码序列和一个或多个调控元件形式的一个或多个转基因的DNA序列。

[0283] 转基因盒可以编码一个或多个单顺反子和/或多顺反子mRNA序列。

[0284] 在一个实施例中,转基因或转基因盒编码单顺反子或多顺反子mRNA,并且例如所述盒适于在内源启动子或外源启动子或其组合的控制下的位置处插入腺病毒基因组。

[0285] 如本文所采用的单顺反子mRNA是指编码单一功能性RNA、肽、多肽或蛋白质的mRNA分子。

[0286] 在一个实施例中,转基因盒编码单顺反子mRNA。

[0287] 在一个实施例中,在编码单顺反子mRNA的盒的上下文中,转基因盒意指任选地含有外源启动子的DNA区段(其是将确定转基因何时何地处于活跃状态的调节序列)或剪接位点(其是调节序列确定mRNA分子何时将被剪接体裂解)编码序列(即转基因),通常衍生自感兴趣的蛋白质的cDNA,任选地含有polyA信号序列和终止子序列。

[0288] 在一个实施例中,转基因盒可以编码一个或多个多顺反子mRNA序列。

[0289] 如本文所采用的多顺反子mRNA是指编码两种或更多种功能性RNA、肽或蛋白质或其组合的mRNA分子。在一个实施例中,转基因盒编码多顺反子mRNA。

[0290] 在一个实施例中,在编码多顺反子mRNA的盒的上下文中,转基因盒包含任选地含有外源启动子的DNA区段(其是将确定转基因何时何地处于活跃状态的调节序列)或剪接位点(其是调节序列确定mRNA分子何时将被剪接体裂解)两个或多个编码序列(即转基因),通常衍生自感兴趣的蛋白质或肽的cDNA,例如其中每个编码序列被IRES或2A肽分开。在待转录的最后编码序列之后,所述盒可以任选地含有polyA序列和终止子序列。

[0291] 在一个实施例中,转基因盒编码单顺反子mRNA,然后编码多顺反子mRNA。在另一个实施例中,转基因盒编码多顺反子mRNA,然后是单顺反子mRNA。

[0292] 在一个实施例中,腺病毒是人类腺病毒。如本文所采用的“腺病毒”、“血清型”或“腺病毒血清型”是指任何可以指定为50多种目前已知的腺病毒血清型中的任何一种的腺病毒,其被分类为亚组A到F,并且进一步延伸到任何尚未鉴定或尚未分类的腺病毒血清型。参见例如Strauss,“腺病毒在人体内的感染(Adenovirus infections in humans)”,载于《腺病毒》,Ginsberg,ea.,美国纽约州纽约普莱南出版社,第451到596页,(1984)以及Shenk,“腺病毒科:病毒及其复制(Adenoviridae:The Viruses and Their Replication)”,载于《病毒学领域》第2卷第四期,Knipe,35ea.,Lippincott Williams和Wilkins,第2265到2267页,(2001),如表1所示。

[0293] 表1

[0294]

亚组	腺病毒血清型
A	12、18、31
B	3、7、11、14、16、21、34、35、51。
C	1、2、5、6
D	8 到 10、13、15、17、19、20、22 到 30、32、33、36 到 39、42 到 49、50
E	4
F	40、41

[0295] 本公开的腺病毒是亚组B病毒,即Ad11,具体的说Ad11p(Slobitski菌株)及其衍生物,如EnAd。

[0296] 腺病毒被指定为基于衣壳的其组/血清型,如六邻体和/或纤维。

[0297] 本公开的腺病毒不是A组、C组、D组、E组或F组病毒。本公开的病毒不包括腺病毒死亡蛋白。

[0298] 在一个实施例中,本公开的腺病毒是嵌合的。当腺病毒是嵌合的时,则将采用外衣壳的特性来确定血清型。如本文所采用的嵌合体是指包括来自至少两种不同病毒血清型的DNA的病毒,包含同一组内的不同血清型。

[0299] 在一个实施例中,溶瘤病毒具有来自相同血清型的纤维、六邻体和五邻体蛋白,例如Ad11,具体的说Ad11p,例如在后者的基因组序列的30812到31789、18254到21100和13682到15367位置发现,其中核苷酸位置是相对于genbank ID 217307399(登录号:GC689208)。

[0300] 在一个实施例中,腺病毒是enadenotucirev(也称为EnAd,并且以前称为EnAd)。如本文所采用的Enadenotucirev是指SEQ ID NO:38的嵌合腺病毒。它是具有复制能力的溶瘤性嵌合腺病毒,其与野生型腺病毒相比具有增强的治疗性质(参见WO2005/118825)。EnAd具有嵌合E2B区,其具有来自Ad11p和Ad3的DNA,以及E3/E4中的缺失。enadenotucirev的结构变化导致基因组比Ad11p小约3.5kb,由此为转基因的插入提供了额外的“空间”。

[0301] Enadenotucirev(EnAd)是嵌合的溶瘤腺病毒,以前称为EnAd(WO2005/118825),具有来自Ad11p的纤维、五邻体和六邻体,因此它是亚组B病毒。它具有嵌合的E2B区,其包括来自Ad11p和Ad3的DNA。在EnAd中几乎所有E3区和E4区的一部分都缺失。因此,它在基因组中具有显著的空间以容纳额外的遗传物质,同时保持活力。此外,因为EnAd是亚组B腺病毒,所以人类预先存在的免疫力不如例如Ad5那么常见。具有Ad11纤维、五邻体和六邻体的嵌合溶瘤病毒的其它实例包含OvAd1和OvAd2(参见WO2006/060314)。

[0302] EnAd似乎优先感染肿瘤细胞,在这些细胞中快速复制并且导致细胞溶解。反过来,这可以生成炎症性免疫应答,由此刺激身体也来对抗癌症。EnAd的部分成功被假设与体内病毒的快速复制有关。

[0303] 虽然EnAd选择性地溶解肿瘤细胞,但是可以引入另外的有益性质,例如通过用转基因携带它来增加病毒的治疗活性或减少病毒的副作用,如编码细胞信号蛋白或抗体的转基因或编码刺激一个或多个细胞信号蛋白的实体的转基因。

[0304] 有利地,利用可以在癌细胞内表达的编码如双特异性T细胞衔接器等某些蛋白质的DNA来携带病毒,可以使身体自身的防御能够更有效地用于对抗肿瘤细胞,例如通过使细胞对于免疫系统更加可见或通过优先向靶肿瘤细胞递送治疗基因/蛋白质。

[0305] 此外,将作为报告基因的转基因插入基因组的能力可以有助于临床或临床前研究。

[0306] 重要的是转基因的表达不会不利地影响病毒的复制或其它有利性质。因此,必须将一个或多个基因插入不损害病毒的复制能力和其它有利性质的位置。另外,腺病毒的基因组是紧密堆积的,并且因此很难找到合适的位置来插入转基因。这也限制了可以容纳的转基因的大小。

[0307] OvAd1和OvAd2也是与enadenotucirev相似的嵌合腺病毒,其在基因组中还具有额外的“空间”(参见WO2008/080003)。因此,在一个实施例中,腺病毒是OvAd1或OvAd2。

[0308] 在一个实施例中,腺病毒是溶瘤的。如本文所采用的溶瘤腺病毒意指与非癌细胞相比优先杀死癌细胞的腺病毒。

[0309] 在一个实施例中,溶瘤病毒是凋亡的。也就是说,其加速了程序性细胞死亡。

[0310] 在一个实施例中,溶瘤病毒是溶细胞的。本公开的溶瘤腺病毒的溶细胞活性可以在代表性肿瘤细胞系中确定,并且数据转换为效力的测量,例如用如Ad5等属于亚组C的腺

病毒来用作标准物(即,效力为1)。用于确定细胞溶解活性的合适方法是MTS测定(参见WO2005/118825的实例4,图2,其通过引用并入本文)。

[0311] 在一个实施例中,溶瘤病毒是坏死性的。也就是说,其引起或加速细胞坏死或免疫原性细胞死亡。在一个实施例中,坏死性细胞死亡是有利的,因为其触发、诱导患者(宿主)免疫应答。

[0312] 除非上下文另有指示,否则本文所采用的腺病毒是指能够进行复制的病毒(如具有复制能力的(复制型,replication competent)病毒)以及复制缺陷型病毒载体。

[0313] 如本文所采用的能够进行复制是指具有复制能力的病毒或这样的病毒:其复制依赖于癌细胞中的因子,例如上调因子,如p53或类似物。

[0314] 在一个实施例中,病毒是具有复制能力的。在本说明书的上下文中的具有复制能力是指具有在体外和体内的细胞中复制的所有必需机制的病毒,即没有包装细胞系的辅助。例如在E1区缺失、能够在互补包装细胞系中复制的病毒载体在本文上下文中不是具有复制能力的病毒。

[0315] 病毒载体是复制缺陷的,并且需要包装细胞提供互补基因以允许复制。

[0316] 如本文所采用的腺病毒基因组意指编码与腺病毒的功能/生命周期相关的结构蛋白和元件的DNA序列。

[0317] 迄今为止检查的所有人类腺病毒基因组具有相同的一般组织,即编码特定功能的基因位于病毒基因组中的相同位置(在本文中称为结构元件)。病毒基因组的每个末端都具有称为反向末端重复序列(或ITR)的短序列,这是病毒复制所必需的。病毒基因组含有五个早期转录单位(E1A、E1B、E2、E3和E4)、三个延迟早期单位(IX、IVa2和E2晚期)以及被处理以生成五个晚期mRNA家族(L1到L5)的一个晚期单位(主要晚期)。由早期基因编码的蛋白质主要参与宿主细胞对感染的应答的复制和调节,而晚期基因编码病毒结构蛋白。早期基因以字母E为前缀,并且晚期基因以字母L为前缀。

[0318] 腺病毒的基因组紧密堆积,也就是说几乎不存在非编码序列,并且因此很难找到合适的位置来插入转基因。诸位发明人已经鉴定了两个耐受转基因的DNA区,具体的说鉴定的位点适合于容纳复杂的转基因,如编码抗体的转基因。也就是说,表达转基因而不会不利地影响病毒的活力、如溶瘤性质或复制等天然性质。

[0319] 在一个实施例中,根据本公开的溶瘤病毒或部分溶瘤病毒可以是E4和/或E3区中的缺失的结果,例如在E4区的一部分中缺失或在E3区中完全缺失,或者可替代地在E4区的一部分(如E4或f4)中缺失并且在E3区中完全缺失,例如在本文公开的序列中举例说明。

[0320] 在一个实施例中,本公开的溶瘤病毒是嵌合的。如本文所采用的嵌合体是指包括来自两种或更多种不同血清型的DNA并且具有溶瘤病毒性质的病毒。

[0321] 在一个实施例中,溶瘤病毒是EnAd或其活性衍生物,其保留病毒的基本有益性质。EnAd在WO2005/118825中公开(通过引用并入本文)并且本文提供了病毒的完整序列SEQ ID NO:38。嵌合E2B区在本文中公开为SEQ ID NO:71。

[0322] 可替代的溶瘤病毒包含OvAd1和OvAd2,它们分别在WO2008/080003中作为SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3公开,并且通过引用并入本文。

[0323] 有利地,本公开的腺病毒在体外感染多种不同的结肠癌细胞系后展现出与EnAd相似的病毒活性,例如复制和/或感染性。

[0324] 腺病毒的结构元素

[0325] 本公开还涉及本文公开的病毒或病毒组分/构建体的新序列,如质粒。

[0326] 在一个实施例中,腺病毒包括由式(I)序列构成的基因组

[0327] 5'ITR-B_1-B_A-B_2-B_X-B_B-B_Y-B_3-3'ITR (I)

[0328] 其中:B_1包括E1A、E1B或E1A-E1B;B_A包括E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;B_2是键或包括E3;B_X是包括限制性位点、一个或多个转基因(具体的说编码至少一个根据本公开的双特异性T细胞衔接器的转基因,例如在外源启动子控制下)或两者的键或DNA序列;B_B包括L5;B_Y是键或包括以下的DNA序列:限制性位点、一个或多个转基因(具体的说编码至少一个根据本公开的双特异性T细胞衔接器的转基因,例如在如MPL等内源启动子的控制下或在如CMV启动子等外源启动子的控制下)或两者;B_3是键或包括E4;其中B_X和B_Y中的至少一个不是键并且包括转基因或限制性位点或两者;并且编码包括至少两个结合结构域的多特异性抗原分子,并且所述结构域中的至少一个对感兴趣的T细胞上的表面抗原具有特异性。在一个实施例中,腺病毒包括由式(I)的序列构成的基因组,其中B_1 B_X是键。

[0329] 在一个实施例中,腺病毒包括由式(I)序列构成的基因组,其中:B_Y是键。

[0330] 在一个实施例中,腺病毒包括由式(Ia)序列构成的基因组:

[0331] 5'ITR-B_A-B_2-B_X-B_B-B_Y-B_3-3'ITR (Ia)

[0332] 其中:B_A包括E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;B_2是键或包括E3;B_X是包括限制性位点、一个或多个转基因(具体的说编码至少一个根据本公开的双特异性T细胞衔接器的转基因,例如在外源启动子的控制下)或两者的键或DNA序列;B_B包括L5;B_Y是键或包括以下的DNA序列:限制性位点、一个或多个转基因(具体的说编码至少一个根据本公开的双特异性T细胞衔接器的转基因,例如在如MPL等内源启动子的控制下或在如CMV启动子等外源启动子的控制下)或两者;B_3是键或包括E4;其中B_X和B_Y中的至少一个不是键,并且至少一个包括转基因或限制性位点,如转基因。

[0333] 在一个实施例中,腺病毒包括由式(Ia)的序列构成的基因组,其中B_X是键。

[0334] 在一个实施例中,腺病毒包括由式(Ia)的序列构成的基因组,其中B_Y是键。

[0335] 在一个实施例中,腺病毒包括由式(Ib)序列构成的基因组:

[0336] 5'ITR-B_A-B_X-B_B-B_Y-B_3-3'ITR (Ib)

[0337] 其中:B_A包括E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;B_X是包括限制性位点、一个或多个转基因(具体的说编码至少一个根据本公开的双特异性T细胞衔接器的转基因,例如在外源启动子的控制下)或两者的键或DNA序列;B_B包括L5;B_Y是键或包括以下的DNA序列:限制性位点、一个或多个转基因(具体的说编码至少一个根据本公开的双特异性T细胞衔接器的转基因,例如在如MPL等内源启动子的控制下或在如CMV启动子等外源启动子的控制下)或两者;B_3是键或包括E4;其中B_X和B_Y中的至少一个不是键并且包括转基因或限制性位点或两者,如转基因。

[0338] 在一个实施例中,腺病毒包括由式(Ib)的序列构成的基因组,其中B_X是键。

[0339] 在一个实施例中,腺病毒包括由式(Ib)的序列构成的基因组,其中B_Y是键。

[0340] 在一个实施例中,腺病毒包括由式(Ic)序列构成的基因组:

[0341] 5'ITR-B_A-B_2-B_X-B_B-B_Y-3'ITR (Ic)

[0342] 其中:B_A包括E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;B_2是E3;B_X是包括限制性位点、一个或多个转

基因(具体的说编码至少一个根据本公开的双特异性T细胞衔接器的转基因,例如在外源启动子的控制下)或两者的键或DNA序列;B_B包括L5;B_Y是键或包括以下的DNA序列:限制性位点、一个或多个转基因(具体的说编码至少一个根据本公开的双特异性T细胞衔接器的转基因,例如在如MPL等内源启动子的控制下或在如CMV启动子等外源启动子的控制下)或两者;其中B_X和B_Y中的至少一个不是键并且包括转基因或限制性位点或两者,如转基因。

[0343] 在一个实施例中,腺病毒包括由式(Ic)的序列构成的基因组,其中B_X是键。

[0344] 在一个实施例中,腺病毒包括由式(Ic)的序列构成的基因组,其中B_Y是键。

[0345] 在一个实施例中,腺病毒包括由式(Id)序列构成的基因组:

[0346] 5'ITR-B_1-B_A-B_X-B_B-B_Y-B_3-3'ITR (Id)

[0347] 其中:B_1包括E1A、E1B或E1A-E1B;B_A包括E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;B_X是包括限制性位点、一个或多个转基因(具体的说编码至少一个根据本公开的双特异性T细胞衔接器的转基因,例如在外源启动子的控制下)或两者的键或DNA序列;B_B包括L5;B_Y是键或包括以下的DNA序列:限制性位点、一个或多个转基因(具体的说编码至少一个根据本公开的双特异性T细胞衔接器的转基因,例如在如MPL等内源启动子的控制下或在如CMV启动子等外源启动子的控制下)或两者;B_3是键或包括E4;其中B_X和B_Y中的至少一个不是键并且包括转基因、限制性位点或两者。

[0348] 在一个实施例中,腺病毒包括由式(Id)的序列构成的基因组,其中B_X是键。

[0349] 在一个实施例中,腺病毒包括由式(Id)的序列构成的基因组,其中B_Y是键。

[0350] 在一个实施例中,腺病毒包括由式(Ie)序列构成的基因组:

[0351] 5'ITR-B_1-B_A-B_2-B_B-B_Y-3'ITR (Ie)

[0352] 其中:B_1包括E1A、E1B或E1A-E1B;B_A包括E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;B_2包括E3;B_B包括L5;B_Y是键或包括以下的DNA序列:根据本公开的一个或多个转基因编码至少一个双特异性T细胞衔接器(例如在如MPL等内源启动子的控制下或在如CMV启动子等外源启动子的控制下);其中B_X和B_Y中的至少一个不是键并且包括转基因、限制性位点或两者。

[0353] 在一个实施例中,提供了式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)、(Id)或(Ie)的化合物,其中B_X和B_Y不是键并且包括转基因限制性位点或两者,如B_X和B_Y均是转基因。

[0354] 在式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)或(Id)的一个实施例中,仅B_X编码一个或两个双特异性T细胞衔接器,例如一个双特异性T细胞衔接器(并且B_Y不编码双特异性T细胞衔接器),具体的说所述一个或多个双特异性T细胞衔接器在如CMV启动子等外源启动子的控制下。在式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)或(Id)的一个实施例中,仅B_Y编码一个或两个双特异性T细胞衔接器,例如一个双特异性T细胞衔接器(并且B_X不编码双特异性T细胞衔接器),具体的说所述一个或多个双特异性T细胞衔接器在如MPL等内源启动子的控制下或在如CMV启动子等外源启动子的控制下。在式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)或(Id)的一个实施例中,B_X编码双特异性T细胞衔接器(例如在如CMV启动子等外源启动子的控制下)并且B_Y编码双特异性T细胞衔接器(例如在如MPL等内源启动子的控制下或在如CMV启动子等外源启动子的控制下)。

[0355] 键是指将一个DNA序列连接到另一个DNA序列的共价键,例如将病毒基因组的一个区段连接到另一个区段。因此,当本文的式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)、(Id)或(Ie)中的变量表示键时,由键表示的特征或元素不存在,即缺失。

[0356] 由于腺病毒的结构通常类似于下文的元素是根据结构要素和参考的常用术语来

讨论的,这些是本领域技术人员已知的。当在本文中提及元件时,我们指的是编码所述元件的DNA序列或编码腺病毒中所述元件的相同结构蛋白的DNA序列。因为DNA代码的冗余,所以后者是相关的。可能需要考虑病毒对密码子使用的偏好以获得优化结果。

[0357] 来自本公开的病毒中采用的腺病毒的任何结构元件可以包括天然序列或由天然序列组成,或者可以在给定长度上具有至少95%的相似性,如96%、97%、98%、99%或100%。可以修改原始序列以省略遗传物质的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。技术人员知道,当进行改变时,必须不破坏病毒的阅读框,以便破坏结构蛋白的表达。

[0358] 在一个实施例中,给定元件是全长序列,即全长基因。

[0359] 在一个实施例中,给定元素小于全长并且保持与全长序列相同或对应的功能。

[0360] 在一个实施例中,对于在本公开的构建体中任选的给定元件,DNA序列可以小于全长并且不具有功能性。

[0361] 编码腺病毒的结构或功能蛋白的结构基因通常通过DNA的非编码区连接。因此,为了将转基因插入本公开的病毒中,在哪里“切割”感兴趣的结构元件的基因组序列(尤其是其非编码区)存在一些灵活性。因此,出于本说明书的目的,所述元件将被认为是参考的结构元件,其程度适合于目的并且不编码外来材料。因此,如果合适,所述基因将与合适的非编码区相关联,例如在病毒的天然结构中发现的。

[0362] 因此,在一个实施例中,将插入物(如编码限制性位点和/或转基因的DNA)插入基因组病毒DNA的非编码区,如内含子或基因间序列。已经说过,腺病毒的一些非编码区可能具有功能,例如在可替代的剪接、转录调节或转译调节中,并且可能需要考虑这一点。

[0363] 本文鉴定的与L5区相关的位点(例如L5与E4区之间)适合于容纳编码复杂实体的各种DNA序列,如RNAi、细胞因子、单链或多聚体蛋白质,如抗体,如双特异性T细胞衔接器。

[0364] 本文所采用的基因是指编码和与其相关的任何非编码序列,例如内含子和相关的外显子。在一个实施例中,基因包括必需的结构组分或仅由必需的结构组分组成,例如编码区。

[0365] 下文是关于腺病毒的特定结构元素的讨论。

[0366] 反向末端重复(ITR)序列对于所有已知的腺病毒是共同的,并且由于其对称性而如此命名,并且是病毒染色体复制起点。这些序列的另一个性质是其形成发夹的能力。

[0367] 如本文所采用的5'ITR是指来自腺病毒5'末端的部分或全部ITR,其在合适位置掺入腺病毒时保留ITR的功能。在一个实施例中,5'ITR包括SEQ ID No:38的约1bp到138bp的序列或沿整个长度的序列90%、95%、96%、97%、98或99%相同的序列或由其组成,具体的说由SEQ ID No:38的约1bp到138bp组成的序列。

[0368] 如本文所采用的3'ITR是指腺病毒3'末端的部分或全部ITR,其在合适位置掺入腺病毒时保留ITR的功能。在一个实施例中,3'ITR包括SEQ ID No:38的约32189bp到32326bp的序列或沿整个长度的序列90%、95%、96%、97%、98或99%相同的序列或由其组成,具体的说由SEQ ID No:38的约32189bp到32326bp组成的序列。

[0369] 如本文所采用的B_1是指DNA序列编码:腺病毒的E1A的部分或全部、腺病毒的E1B区的部分或全部以及独立地腺病毒的E1A区和E1B区的部分或全部。

[0370] 当B_1是键时,则E1A和E1B序列将从病毒中省略。在一个实施例中,B_1是键,并且因此病毒是载体。

[0371] 在一个实施例中,B_1进一步包括转基因。本领域已知E1区可以容纳转基因,所述转基因可以以破坏性的方式插入E1区(即在序列的“中间”)或者可以缺失部分或全部E1区以提供更多的空间以容纳遗传物质。

[0372] 如本文所采用的E1A是指编码部分或全部腺病毒E1A区的DNA序列。后者在本文中是指多肽/蛋白质E1A。其可以被突变使得由E1A基因编码的蛋白质具有保守或非保守的氨基酸变化,使得其具有:与野生型相同的功能(即对应的非突变蛋白质);与野生型蛋白质相比功能增加;功能下降,如与野生型蛋白质相比无功能;或者与野生型蛋白质或其适当组合相比具有新功能。

[0373] 如本文所采用的E1B是指编码部分或全部腺病毒E1B区(即多肽或蛋白质)的DNA序列,其可以被突变,使得由E1B基因/区编码的蛋白质具有保守或非保守的氨基酸变化,使得其具有:与野生型相同的功能(即对应的非突变蛋白质);与野生型蛋白质相比功能增加;功能下降,如与野生型蛋白质相比无功能;或者与野生型蛋白质或其适当组合相比具有新功能。

[0374] 因此,相对于如野生型E1A和/或E1B等野生型E1区,B_1可以被修饰或未修饰。技术人员可以容易地识别E1A和/或E1B是否存在或(部分)缺失或突变。

[0375] 如本文所采用的野生型是指已知的腺病毒。已知的腺病毒是已经鉴定和命名的腺病毒,无论所述序列是否可用。

[0376] 在一个实施例中,B_1具有SEQ ID No:38的139bp到3932bp的序列。

[0377] 如本文所采用的,B_A是指编码E2B-L1-L2-L3-E2A-L4区的DNA序列,包含任何非编码序列,视情况而定。通常,此序列将不包括转基因。在一个实施例中,所述序列与来自已知腺病毒的连续序列基本相似或相同,例如表1中所示的血清型,具体的说B组病毒,例如Ad3、Ad7、Ad11、Ad14、Ad16、Ad21、Ad34、Ad35、Ad51或其组合,如Ad3、Ad11或其组合。在一个实施例中,E2B-L1-L2-L3-E2A-L4是指包括这些元件和与所述区相关的其它结构元件,例如B_A将通常包含编码蛋白质IV2a的序列,例如如下:IV2AIV2a-E2B-L1-L2-L3-E2A-L4

[0378] 在一个实施例中,E2B区是嵌合的。也就是说,包括来自两种或更多种不同腺病毒血清型的DNA序列,例如来自Ad3和Ad11,如Ad11p。在一个实施例中,E2B区在整个长度上具有SEQ ID NO:38的5068bp到10355bp的序列或与其95%、96%、97%、98%或99%相同的序列。

[0379] 在一个实施例中,组分B_A中的E2B包括SEQ ID NO:71中所示的序列(其对应于WO2005/118825中公开的SEQ ID NO:3)。

[0380] 在一个实施例中,B_A具有SEQ ID No:38的3933bp到27184bp的序列。

[0381] 如本文所采用的E3是指编码部分或全部腺病毒E3区(即蛋白质/多肽)的DNA序列,其可以被突变,使得由E3基因编码的蛋白质具有保守或非保守的氨基酸变化,使得其具有与野生型相同的功能(对应的未突变蛋白);与野生型蛋白质相比功能增加;功能降低,如与野生型蛋白质相比无功能或者与野生型蛋白质或其组合相比具有新功能,视情况而定。

[0382] 在一个实施例中,E3区形成表1中给出的腺病毒血清型或其组合,具体的说B组血清型,例如Ad3、Ad7、Ad11(具体的说Ad11p)、Ad14、Ad16、Ad21、Ad34、Ad35、Ad51或其组合,如Ad3、Ad11(具体的说Ad11p)或其组合。

[0383] 在一个实施例中,E3区被部分缺失,例如95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、

60％、55％、50％、45％、40％、35％、30％、25％、20％、15％、10％、5％缺失。

[0384] 在一个实施例中，B_2是键，其中不存在编码E3区的DNA。

[0385] 在一个实施例中，编码E3区的DNA可以被转基因代替或中断。如本文所采用的，用如本文所采用的转基因代替的E3区包含部分或全部E3区被转基因代替。

[0386] 在一个实施例中，B_2区包括SEQ ID NO:38的27185bp到28165bp的序列。

[0387] 在一个实施例中，B_2由SEQ ID NO:38的27185bp到28165bp的序列组成。

[0388] 如本文所采用的B_X是指B_B中L5基因的5'末端附近的DNA序列。在如本文所采用的L5基因的5'末端附近或近端是指:邻近(邻接)L5基因的5'末端或与其固有相关的非编码区，即与L5基因的5'主要末端紧靠或邻接或与其固有相关的非编码区。可替代地，在附近或近端可以指闭合L5基因，使得在B_X区与L5基因的5'末端之间不存在编码序列。

[0389] 因此，在一个实施例中，B_X直接连接到L5的碱基，其代表例如L5基因的编码序列的起始。

[0390] 因此，在一个实施例中，B_X直接连接到L5的碱基，其代表例如非编码序列的起点，或直接连接到与L5天然相关的非编码区。如本文所采用的，天然关联L5的非编码区是指所有非编码区的一部分，所述非编码区是L5基因的一部分或与其邻接但不是另一基因的一部分。

[0391] 在一个实施例中，B_X包括SEQ ID NO:39的序列。此序列是人工非编码序列，其中可以插入DNA序列，例如包括转基因(或转基因盒)、限制性位点或其组合。此序列是有利的，因为其充当缓冲液，由于允许转基因的确切位置具有一定的灵活性，同时最小化对病毒稳定性和活力的破坏性影响。

[0392] 一个或多个插入物可以在SEQ ID NO:39中从5'末端、3'末端或在bp 1到bp 201之间的任何点处发生，例如在碱基对1/2、2/3、3/4、4/5、5/6、6/7、7/8、8/9、9/10、10/11、11/12、12/13、13/14、14/15、15/16、16/17、17/18、18/19、19/20、20/21、21/22、22/23、23/24、24/25、25/26、26/27、27/28、28/29、29/30、30/31、31/32、32/33、33/34、34/35、35/36、36/37、37/38、38/39、39/40、40/41、41/42、42/43、43/44、44/45、45/46、46/47、47/48、48/49、49/50、50/51、51/52、52/53、53/54、54/55、55/56、56/57、57/58、58/59、59/60、60/61、61/62、62/63、63/64、64/65、65/66、66/67、67/68、68/69、69/70、70/71、71/72、72/73、73/74、74/75、75/76、76/77、77/78、78/79、79/80、80/81、81/82、82/83、83/84、84/85、85/86、86/87、87/88、88/89、89/90、90/91、91/92、92/93、93/94、94/95、95/96、96/97、97/98、98/99、99/100、100/101、101/102、102/103、103/104、104/105、105/106、106/107、107/108、108/109、109/110、110/111、111/112、112/113、113/114、114/115、115/116、116/117、117/118、118/119、119/120、120/121、121/122、122/123、123/124、124/125、125/126、126/127、127/128、128/129、129/130、130/131、131/132、132/133、133/134、134/135、135/136、136/137、137/138、138/139、139/140、140/141、141/142、142/143、143/144、144/145、145/146、146/147、147/148、148/149、150/151、151/152、152/153、153/154、154/155、155/156、156/157、157/158、158/159、159/160、160/161、161/162、162/163、163/164、164/165、165/166、166/167、167/168、168/169、169/170、170/171、171/172、172/173、173/174、174/175、175/176、176/177、177/178、178/179、179/180、180/181、181/182、182/183、183/184、184/185、185/186、186/187、187/188、189/190、190/191、191/192、192/193、193/194、194/195、195/196、

196/197、197/198、198/199、199/200或200/201之间。

[0393] 在一个实施例中，B_X包括SEQ ID NO:39，其中DNA序列插入bp27与bp28之间或对应于SEQ ID NO:38的28192bp与28193bp位置之间的位置。

[0394] 在一个实施例中，插入物是限制性位点插入物。在一个实施例中，限制性位点插入物包括一个或两个限制性位点。在一个实施例中，限制性位点是包括2个限制性位点的19bp限制性位点插入物。在一个实施例中，限制性位点插入物是包括1个限制性位点的9bp限制性位点插入物。在一个实施例中，限制性位点插入物包括一个或两个限制性位点和至少一个转基因，例如一个或两个转基因。在一个实施例中，限制性位点是19bp限制性位点插入物，其包括2个限制性位点和至少一个转基因，例如一个或两个转基因。在一个实施例中，限制性位点插入物是9bp限制性位点插入物，其包括1个限制性位点和至少一个转基因，例如一个、两个或三个转基因，如一个或两个。在一个实施例中，两个限制性位点夹在一个或多个，如两个转基因中(例如在转基因盒中)。在一个实施例中，当B_X包括两个限制性位点时，所述限制性位点彼此不同。在一个实施例中，B_X中的所述一个或多个限制性位点在其已经插入的特定腺病毒基因组中是非天然发生的。在一个实施例中，B_X中的所述一个或多个限制性位点不同于位于腺病毒基因组中其它位置的其它限制性位点，例如不同于引入基因组其它部分的天然发生的限制性位点和/或限制性位点，如引入B_Y的限制性位点。因此，在一个实施例中，一个或多个限制性位点允许区段中的DNA被特异性切割。

[0395] 有利地，使用“独特的”限制性位点可简单地通过使用适当的限制酶来提供对病毒基因组切割位置的选择性和控制。

[0396] 具体地，如本文所采用的，切割是指使用对限制性位点特异的酶仅在期望的位置(通常是一个位置)切割病毒，尽管偶尔其可以是一对位置。如本文所采用的一对位置是指彼此接近的两个限制位点，其被设计为由相同的酶切割(即，不能彼此区分)。

[0397] 在一个实施例中，限制性位点插入物是SEQ ID NO:50。

[0398] 在一个实施例中，B_X具有SEQ ID No:38的28166bp到28366bp的序列。

[0399] 在一个实施例中，B_X是键。

[0400] 在一个实施例中，B_X包括限制性位点，例如1个、2个、3个或4个限制性位点，如1个或2个。在一个实施例中，B_X包括至少一个转基因，例如1个或2个转基因。在一个实施例中，B_X包括至少一个转基因，例如1个或2个转基因和一个或多个限制性位点，例如2个或3个限制性位点，具体的说其中限制性位点夹杂基因或包括基因的DNA序列以允许它/它们被特异性地从基因组中切除和/或被代替。可替代地，限制性位点可以将每个基因夹在中间，例如当存在两个转基因时，需要三个不同的限制性位点以确保可以选择性地切除和/或代替的基因。在一个实施例中，一个或多个，例如所有转基因都是转基因盒的形式。在一个实施例中，B_X包括SEQ ID NO:39。在一个实施例中，SEQ ID NO:39被例如转基因中断。在实施例中，SEQ ID NO:39是不间断的。在一个实施例中，B_X不包括限制性位点。在一个实施例中，B_X是键。在一个实施例中，B_x包括一个或多个转基因或由其组成。

[0401] 在一个实施例中，B_Y包括限制性位点，例如1个、2个、3个或4个限制性位点，如1个或2个。在一个实施例中，B_Y包括至少一个转基因，例如1个或2个转基因。在一个实施例中，B_Y包括至少一个转基因，例如1个或2个转基因和一个或多个限制性位点，例如2个或3个限制性位点，具体的说其中限制性位点夹杂基因或包括基因的DNA序列以允许它/它们被特异性

地从基因组中切除和/或被代替。可替代地,限制性位点可以将每个基因夹在中间,例如当存在两个转基因时,需要三个不同的限制性位点以确保可以选择性地切除和/或代替的基因。在一个实施例中,一个或多个,例如所有转基因都是转基因盒的形式。在一个实施例中,B_Y包括SEQ ID NO:40。在一个实施例中,SEQ ID NO:40被例如转基因中断。在实施例中,SEQ ID NO:40是不间断的。在一个实施例中,B_Y不包括限制性位点。在一个实施例中,B_Y是键。在一个实施例中,B_Y包括一个或多个转基因或由其组成。

[0402] 在一个实施例中,B_X和B_Y各自包括限制性位点,例如1个、2个、3个或4个限制性位点,如1个或2个。在一个实施例中,B_X和B_Y各自包括至少一个转基因,例如1个或2个转基因。在一个实施例中,B_X和B_Y各自包括至少一个转基因,例如1个或2个转基因和一个或多个限制性位点,例如2个或3个限制性位点,具体的说其中限制性位点夹杂基因或包括基因的DNA序列以允许其被特异性地从基因组中切除和/或被代替。可替代地,限制性位点可以将每个基因夹在中间,例如当存在两个转基因时,需要三个不同的限制性位点以确保可以选择性地切除和/或代替的基因。在一个实施例中,一个或多个,例如所有转基因都是转基因盒的形式。在一个实施例中,B_X和B_Y分别包括SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40。在一个实施例中,B_X和B_Y不包括限制性位点。在一个实施例中,B_X是键并且B_Y不是键。在一个实施例中,B_Y是键并且B_X不是键。

[0403] 如本文所采用的,B_B是指编码L5区的DNA序列。如本文所采用的,L5区是指含有编码纤维多肽/蛋白质的基因的DNA序列,在上下文中视情况而定。纤维基因/区编码纤维蛋白,所述纤维蛋白是腺病毒的主要衣壳组分。纤维在受体识别中起作用,并且有助于腺病毒选择性结合和感染细胞的能力。

[0404] 在本公开的病毒中,纤维可以来自任何血清型11的腺病毒株,如Ad11p。

[0405] 在一个实施例中,B_B具有SEQ ID No:38的28367bp到29344bp的序列。

[0406] 与如本文所采用的B_Y相关的DNA序列是指B_B的L5基因的3'末端附近的DNA序列。在如本文所采用的L5基因的3'末端附近或近端是指:邻近(邻接)L5基因的3'末端或与其固有相关的非编码区,即与L5基因的3'主要末端紧靠或邻接或与其固有相关的非编码区(即L5内源的非编码序列的全部或部分)。可替代地,在附近或近端可以指闭合L5基因,使得在B_Y区与L5基因的3'末端之间不存在编码序列。

[0407] 因此,在一个实施例中,B_Y直接连接到L5的碱基,其代表编码序列的"末端"。

[0408] 因此,在一个实施例中,B_Y直接连接到L5的碱基,其代表非编码序列的"末端",或直接连接到与L5天然相关的非编码区。

[0409] 本文中可固有地和自然地互换使用。在一个实施例中,B_Y包括SEQ ID NO:40的序列。此序列是非编码序列,其中可以插入DNA序列,例如包括转基因(或转基因盒)、限制性位点或其组合。此序列是有利的,因为其起缓冲液的作用,由于允许转基因的确切位置具有一定的灵活性,同时最小化对病毒稳定性和活力的破坏性影响。

[0410] 一个或多个插入物可以在SEQ ID NO:40中从5'末端、3'末端或在bp 1到bp 35之间的任何点发生,例如在碱基对1/2、2/3、3/4、4/5、5/6、6/7、7/8、8/9、9/10、10/11、11/12、12/13、13/14、14/15、15/16、16/17、17/18、18/19、19/20、20/21、21/22、22/23、23/24、24/25、25/26、26/27、27/28、28/29、29/30、30/31、31/32、32/33、33/34或34/35之间。

[0411] 在一个实施例中,B_Y包括SEQ ID NO:40,其中DNA序列插入位置bp 12与bp 13之

间,或者对应于SEQ ID NO:38中29356bp和29357bp的位置。在一个实施例中,插入物是限制性位点插入物。在一个实施例中,限制性位点插入物包括一个或两个限制性位点。在一个实施例中,限制性位点是包括2个限制性位点的19bp限制性位点插入物。在一个实施例中,限制性位点插入物是包括1个限制性位点的9bp限制性位点插入物。在一个实施例中,限制性位点插入物包括一个或两个限制性位点和至少一个转基因,例如一个或两个或三个转基因,如一个或两个转基因。在一个实施例中,限制性位点是19bp限制性位点插入物,其包括2个限制性位点和至少一个转基因,例如一个或两个转基因。在一个实施例中,限制性位点插入物是9bp限制性位点插入物,其包括1个限制性位点和至少一个转基因,例如一个或两个转基因。在一个实施例中,两个限制性位点夹在一个或多个,如两个转基因中(例如在转基因盒中)。在一个实施例中,当B_Y包括两个限制性位点时,所述限制性位点彼此不同。在一个实施例中,B_Y中的所述一个或多个限制性位点在其已经插入的特定腺病毒基因组中是非天然发生(如罕有的)的。在一个实施例中,B_Y中的所述一个或多个限制性位点不同于位于腺病毒基因组中其它位置的其它限制性位点,例如不同于引入基因组其它部分的天然发生的限制性位点或限制性位点,如B_X。因此,在一个实施例中,一个或多个限制性位点允许区段中的DNA被特异性切割。

[0412] 在一个实施例中,限制性位点插入物是SEQ ID NO:51。

[0413] 在一个实施例中,B_Y具有SEQ ID No:38的29345bp到29379bp的序列。

[0414] 在一个实施例中,B_Y是键。

[0415] 在一个实施例中,插入物在SEQ ID No:40中的bp 12之后。

[0416] 在一个实施例中,插入物位于SEQ ID NO:38的约29356bp的位置。

[0417] 在一个实施例中,插入物是包括一个或多个转基因的转基因盒,例如1个、2个或3个,如1个或2个。

[0418] 如本文所采用的,E4是指编码部分或全部腺病毒E4区(即多肽/蛋白质区)的DNA序列,其可以被突变,使得由E4基因编码的蛋白质具有保守或非保守的氨基酸变化,和具有与野生型相同的功能(对应的非突变蛋白);与野生型蛋白质相比功能增加;功能降低,如与野生型蛋白质相比无功能或者与野生型蛋白质或其组合相比具有新功能,视情况而定。在一个实施例中,E4区缺失E4或f4。

[0419] 在一个实施例中,E4区被部分缺失,例如95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%缺失。在一个实施例中,E4区具有SEQ ID NO:38的32188bp到29380bp的序列。

[0420] 在一个实施例中,B_3是键,即其中不存在E4。

[0421] 在一个实施例中,B_3具有由SEQ ID NO:38的32188bp到29380bp组成的序列。

[0422] 如本文所采用的,数字范围包括端点。

[0423] 技术人员将理解,本文式中的元素,如式(I)、(Ia),(Ib)、(Ic)、(Id)和(Ie)是连续的,并且可以包含非编码DNA序列以及本文提及的基因和编码DNA序列(结构特征)。在一个或多个实施例中,本公开的式试图描述腺病毒基因组中的天然发生的序列。在此上下文中,技术人员将清楚所述配方是指表征基因组相关区段的主要元件,并且并不旨在是DNA的基因组延伸的详尽描述。

[0424] 如本文所采用的,E1A、E1B、E3和E4各自独立地指野生型及其等同物,如本文所描

述的每个区的突变或部分缺失形式,具体的说来自已知腺病毒的野生型序列。

[0425] 如本文所采用的,“插入”是指在5’末端、3’末端或在给定DNA序列参考片段内掺入的DNA序列,使得其中断参考序列。后者是用作相对于插入物所在的参考点的参考序列。在本公开的上下文中,插入物通常出现在SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中。插入物可以是限制性位点插入物、转基因盒或两者。当序列被中断时,病毒仍将包括原始序列,但通常其将两个片段夹在插入物中。

[0426] 在一个实施例中,转基因或转基因盒不包括非偏向插入转座子,如TN7转座子或其部分。如本文所采用的,Tn7转座子是指如WO2008/080003中所描述的非偏向插入转座子。

[0427] 在一个实施例中,B_X和B_Y中的一个或多个限制性位点独立地选自对本文所描述的酶具有特异性的限制性位点,例如NotI、FseI、AsiSI、SgfI和SbfI,具体的说插入的限制性位点都是不同的,如NotI特异性位点和位于B_X中的FseI特异性位点和位于B_Y中的SgfI和SbfI。

[0428] 如上文在一个实施例中所讨论的,区B_X和/或B_Y不包括限制性位点。有利地,可以在不具有限制性位点的情况下制备本公开的病毒和构建体,例如使用合成技术。这些技术在创建病毒和构建体时具有很大的灵活性。此外,诸位发明人已经确定,当通过合成技术制备病毒和构建体时,其性质不会降低。

[0429] 启动子

[0430] 如本文所采用的,启动子是指启动一个或多个特定基因的转录的DNA区。启动子通常位于其在相同链上和DNA上游(即5’)转录的基因的近端。如在此上下文中所采用的近端意指足够接近作为启动子的功能。在一个实施例中,启动子在转录起始位点的100bp内。因此,如本文所采用的,内源启动子是指在插入转基因的腺病毒(或构建体)中天然发生(即天然存在的)的启动子。在一个或多个实施例中,所采用的内源启动子是病毒基因组中其原始位置的病毒中天然发生的启动子,具体的说这是一个或多个转基因表达中采用的主要或唯一的启动子。在一个实施例中,用于促进转译和任选地转基因转录的内源启动子是一种常驻启动子,即整合在腺病毒基因组中并且之前未通过重组技术引入的内源启动子。

[0431] 如本文所采用的受内源启动子的控制是指转基因/转基因盒以适当的朝向插入以受所述内源启动子的控制。也就是说,当启动子通常在反义链上时将盒插入,例如以反义朝向插入。

[0432] 话虽如此,基因可以用两种朝向之一表达。然而,对于给定的(特定)转基因,通常一个朝向提供比另一个朝向更高的表达水平。

[0433] 在一个实施例中,盒处于有义朝向。也就是说,以5’到3’的方向转录。在一个实施例中,盒处于反义朝向。也就是说,以3’到5’朝向转录。

[0434] 例如,可以通过采用编码转基因和剪接受体序列的基因来利用病毒中的内源启动子。因此,在一个实施例中,当受内源启动子的控制时,盒将包括剪接受体序列。因此,在一个实施例中,编码序列,例如编码抗体或抗体结合片段的序列进一步包括剪接受体序列。

[0435] 在一个实施例中,一个或多个转基因、或转基因盒受E4启动子或主要晚期启动子,如主要晚期启动子(ML启动子)的控制。

[0436] 如本文所采用的受控制意指当特定启动子指示时,转基因被活化,即转录。

[0437] 如本文所采用的,主要晚期启动子(ML启动子或MLP)是指控制如L5基因等“晚期表

达”基因表达的腺病毒启动子。MLP是“有义链”启动子。也就是说,启动子影响5’到3’朝向上启动子下游的基因。如本文所采用的,主要晚期启动子是指位于病毒基因组中的原始主要晚期启动子。

[0438] 如本文所采用的,E4启动子是指E4区的腺病毒启动子。E4区是反义区;因此启动子是反义启动子。也就是说,启动子在3’到5’方向上位于E4区的上游。因此,受E4启动子控制的任何转基因盒可能需要适当地定向。在一个实施例中,受E4启动子控制的盒处于反义朝向。在一个实施例中,盒在有义朝向上受E4启动子的控制。如本文所采用的,E4启动子是指位于病毒基因组中的原始E4启动子。

[0439] 因此,在一个实施例中,提供了具有复制能力的溶瘤性腺病毒血清型11(如Ad11p)或其病毒衍生物,其中纤维、六邻体和衣壳是血清型11(如Ad11p),其中病毒基因组包括编码治疗性抗体或抗体结合片段的DNA序列(如双特异性T细胞衔接器),其中所述DNA序列受腺病毒内源性启动子控制,选自E4和主要晚期启动子(即E4启动子或主要晚期启动子),使得转基因不会干扰病毒复制,例如与L5区相关(即在所述区之前或之后),如位于病毒基因组中的L5之后,具体的说位于L5区与E4区之间。

[0440] 在一个实施例中,通过重组技术将内源启动子在所需位置处引入病毒基因组中,例如引入转基因盒中。然而,在本说明书的上下文中,此布置通常称为外源启动子。

[0441] 在一个实施例中,转基因盒包括外源启动子。如本文所采用的,外源启动子是指将转基因插入的腺病毒中并非天然发生的启动子。通常,外源启动子来自其它病毒或是哺乳动物启动子。如本文所采用的,外源启动子是指通常位于感兴趣的基因上游的DNA元件,其调节基因的转录。

[0442] 在一个实施例中,基因表达的调节是外源启动子,例如CMV(巨细胞病毒启动子)、CBA(鸡β-肌动蛋白启动子)或PGK(磷酸甘油酸激酶1个启动子),如CMV启动子。

[0443] 在一个实施例中,所采用的CMV外源启动子具有SEQ ID NO:52的核苷酸序列。在一个实施例中,所采用的PGK外源启动子具有SEQ ID NO:53的核苷酸序列。在一个实施例中,所采用的CBA外源启动子具有SEQ ID NO:54的核苷酸序列。

[0444] 在一个实施例中,提供了具有复制能力的溶瘤性腺病毒血清型11(如Ad11p)或其病毒衍生物,其中纤维、六邻体和衣壳是血清型11(如Ad11p),其中病毒基因组包括编码治疗性抗体或抗体结合片段(如根据本公开的双特异性T细胞衔接器)的DNA序列,其位于病毒基因组的一部分中,其在病毒复制周期的晚期表达并且使得转基因不会干扰病毒复制,其中所述DNA序列受腺病毒外源的启动子的控制(例如CMV启动子)。在一个实施例中,编码抗体或片段(如根据本公开的双特异性T细胞衔接器)的DNA序列与L5区相关,如本文其它地方所描述的,具体的说位于L5区与E4区之间。

[0445] 在一个实施例中,外源启动子是抗原呈递细胞启动子。如本文所采用的,抗原呈递细胞启动子是指由抗原呈递细胞选择性表达的基因的启动子,如树突细胞或巨噬细胞。这些基因包含但不限于:FLT-3、FLT-3配体、TLRs、CD1a、CD1c、CD11b、CD11c、CD80、CD83、CD86、CD123、CD172a、CD205、CD207、CD209、CD273、CD281、CD283、CD286、CD289、CD287、CXCR4、GITR配体、IFN-α2、IL-12、IL-23、ILT1、ILT2、ILT3、ILT4、ILT5、ILT7、TSLP受体、CD141、CD303、CADM1、CLEC9a、XCR1或CD304;如CTIIA或GILT等抗原加工和呈递介质。因此,在一个实施例中,外源启动子适合于在所述抗原呈递细胞中选择性表达转基因。

[0446] 其它调节序列

[0447] 如本文所采用的,“基因表达调节因子”(或调节/调节元件)是指遗传特征,如通常通过启动或增强转录或转译而在基因表达中起作用的启动子、增强子或剪接受体序列。

[0448] 如本文所采用的,“剪接受体序列”、“剪接受体”或“剪接位点”是指确定何时mRNA分子将被剪接体复合物的小核核糖核蛋白识别的调节序列。一旦组装后,剪接体催化mRNA分子的剪接受体位点与上游剪接供体位点之间的剪接,从而产生可以被转译成产生单个多肽或蛋白质的成熟mRNA分子。

[0449] 在本发明中可以采用不同大小的剪接受体序列,并且这些可以描述为短剪接受体(小)、剪接受体(中等)和分支剪接受体(大)。

[0450] 如本文所采用的,SSA意指短剪接受体,通常仅包括剪接位点,例如4个碱基对。如本文所采用的,SA意指剪接受体,通常包括短剪接受体和多聚嘧啶束,例如16bp。如本文所采用的,bSA意指支链剪接受体,通常包括短剪接受体,多聚嘧啶束和分支点,例如26个碱基对。

[0451] 在一个实施例中,在本公开的构建体中采用的剪接受体显示在SEQ ID NO:55到SEQ ID NO:57中。在一个实施例中,SSA具有SEQ ID NO:55的核苷酸序列。在一个实施例中,SA具有SEQ ID NO:56的核苷酸序列。在一个实施例中,bSA具有SEQ ID NO:57的核苷酸序列。在一个实施例中,剪接受体序列独立地选自包括以下的组:TGCTAATCTT CCTTTCTCTC TTCAGG(SEQ ID NO:57)、CCTTTCTCTCTT CAGG(SEQ ID NO:56)和CAGG(SEQ ID NO:55)。

[0452] 在一个实施例中,剪接位点立即由包括CCACC的共有Kozak序列进行(即,在5’到3’方向上进行)。在一个实施例中,剪接位点和Kozak序列散布多达100个或更少的碱基对。在一个实施例中,Kozak序列具有SEQ ID NO:58的核苷酸序列。

[0453] 通常,当受内源或外源启动子(如内源启动子)的控制时,编码序列将立即由Kozak序列进行。编码区的起始是由起始密码子(AUG)指示的,例如在序列(gcc)gccRccAUGg[SEQ ID NO:59]的上下文中,编码序列的“开始”的开始由粗体的碱基指示。小写字母表示此位置的共同碱基(不过其可以变化)并且大写字母指示高度保守的碱基,即“AUGG”序列是恒定的或很少(如果有的话)变化;“R”指示通常在此位置观察到嘌呤(腺嘌呤或鸟嘌呤),并且括号内的序列(gcc)具有不确定的意义。因此,在一个实施例中,将起始密码子AUG掺入Kozak序列中。

[0454] 如本文所采用的,内部核糖体进入DNA序列是指编码内部核糖体进入序列(IRES)的DNA序列。如本文所采用的,IRES意指允许启动信使RNA(mRNA)序列转译的核苷酸序列,包含在mRNA序列内起始的开始。当盒编码多顺反子mRNA时,这是特别有用的。使用IRES产生多顺反子mRNA,其被转译成多个单独的蛋白质或肽。在一个实施例中,内部核糖体进入DNA序列具有SEQ ID NO:60的核苷酸序列。在一个实施例中,特定的IRES仅在基因组中使用一次。这可能对基因组的稳定性有益。

[0455] 如本文所采用的,“高自切割效率2A肽”或“2A肽”是指在转译后有效切割的肽。合适的2A肽包含P2A、F2A、E2A和T2A。诸位发明人已经注意到,一旦使用编码给定2A肽的特异性DNA序列一次,就可能不能再次使用相同的特异性DNA序列。然而,DNA代码中的冗余可以用于生成转译成相同2A肽的DNA序列。当盒编码多顺反子mRNA时,使用2A肽特别有用。使用2A肽导致转译的单个多肽链在转译后被修饰以生成多个单独的蛋白质或肽。

[0456] 在一个实施例中,所采用的经编码P2A肽具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列。在一个实施例中,所采用的经编码F2A肽具有SEQ ID NO:62的氨基酸序列。在一个实施例中,所采用的经编码E2A肽具有SEQ ID NO:63的氨基酸序列。在一个实施例中,所采用的经编码T2A肽具有SEQ ID NO:64的氨基酸序列。

[0457] 在一个实施例中,由一个或多个转基因编码的mRNA或每种mRNA包括多腺苷酸化信号序列,如通常在mRNA序列的末端处,例如如SEQ ID NO:65所示。因此,转基因或转基因盒的一个实施例包括至少一个编码多腺苷酸化信号序列的序列。

[0458] 如本文所采用的,“PolyA”、“多聚腺苷酸化信号”或“多聚腺苷酸化序列”意指通常含有AATAAA位点的DNA序列,其一旦转录就可以被多蛋白复合物识别,所述多蛋白复合物裂解并且多聚腺苷酸化新生的mRNA分子。

[0459] 在一个实施例中,多腺苷酸化序列具有SEQ ID NO:65的核苷酸序列。

[0460] 在一个实施例中,构建体不包含多腺苷酸化序列。在一个实施例中,基因表达的调节子是剪接受体序列。

[0461] 在一个实施例中,编码蛋白质/多肽/肽的序列,如抗体或抗体片段(如根据本公开的双特异性T细胞衔接器)进一步包括多腺苷酸化信号。

[0462] 由转基因编码的分子

[0463] 如本文所描述的,病毒中的至少一个转基因编码双特异性T细胞衔接器,其中一种结合结构域对T细胞表面抗原具有特异性。第二结合结构域可以靶向合适的抗原,例如病原体抗原、癌抗原、基质抗原。

[0464] 癌抗原(也称为肿瘤抗原)是特别感兴趣的一类,并且包含例如选自CEA、MUC-1、EpCAM、HER受体HER1、HER2、HER3、HER4、PEM、A33、G250、碳水化合物抗原Le^y、Le^x、Le^b、PSMA、TAG-72、STEAP1、CD166、CD24、CD44、E-cadherin、SPARC、ErbB2、ErbB3、WT1、MUC1、LMP2、独特型、HPV E6和E7、EGFRvIII、HER-2/neu、MAGE A3、p53非突变、p53突变体、NY-ESO-1、GD2、PSMA、PCSA、PSA、MelanA/MART1、Ras突变体、蛋白酶3(PR1)、bcr-abl、酪氨酸酶、存活蛋白、PSA、hTERT,具体的说WT1、MUC1、HER-2/neu、NY-ESO-1、存活蛋白和hTERT。

[0465] 基质抗原包含成纤维细胞抗原,例如本文所描述的那些,如FAP、肿瘤相关巨噬细胞抗原和髓源性抑制细胞抗原,例如包含CD163、CD206、CD68、CD11c、CD11b、CD14、CSF1受体、CD15、CD33和CD66b。

[0466] 如果合适,下文的靶列表可以根据本公开在双特异性T细胞衔接器中编码,或者可替代地可以作为另外的治疗性转基因或两者提供。

[0467] 在一个实施例中,一个或多个转基因独立地编码蛋白质、肽、RNA分子,如RNA分子。有利地,转基因可以在细胞内递送,并且随后可以转录并且如果合适的话可以转译。由转基因编码的遗传物质的实例包含例如抗体或其结合片段、趋化因子、细胞因子、免疫调节因子、酶(例如能够转化活性剂中的前药)和RNAi分子。

[0468] 如本文所采用的,肽是指2个到50个残基的氨基酸序列,例如5个到20个残基。如本文所采用的,多肽是指不含三级结构的多于50个残基的氨基酸序列,具体的说不具有二级结构和三级结构。蛋白质是指超过50个残基的氨基酸序列,具有二级和/或三级结构,具体的说具有二级结构和三级结构。

[0469] 在一个实施例中,编码序列编码治疗性RNA、治疗性肽、治疗性多肽或治疗性蛋白

质(即,治疗性基因)。

[0470] 如本文所采用的,免疫调节基因或转基因意指编码肽或蛋白质分子的基因,其可以定性或定量地修饰免疫系统细胞的一个或多个活性。

[0471] 如本文所采用的,治疗性基因意指编码可以用于治疗、改善或预防疾病的实体的基因,例如所述基因表达治疗性蛋白质、多肽、肽或RNA,其至少减缓、停止或逆转如癌症等疾病的进展。

[0472] 在一个实施例中,当在如癌细胞等细胞中转录或转译时由转基因编码的实体增加由细胞产生的危险信号。如本文所采用的,"危险信号"是指由经历损伤、应激或非凋亡性死亡的细胞产生的各种分子,其作为警报信号,例如通过刺激先天免疫系统的细胞直接响应以及用于增强活化适应性免疫系统的细胞。

[0473] 众所周知,肿瘤的微环境经常发生变化,使得天然的人体免疫应答受到下调。因此,从肿瘤内部重新启动免疫应答的能力在癌症治疗中可能是非常有趣的。

[0474] 在一个实施例中,经编码治疗性肽或蛋白质被设计为分泌到细胞外环境中。在一个实施例中,功能性RNA、肽、多肽或蛋白质(如抗体)被释放到细胞的外部微环境中,例如释放到培养上清液中,或体内:组织、基质、循环、血液和/或淋巴系统。

[0475] 在一个实施例中,由转基因编码的肽、多肽或蛋白质(包含根据本公开的双特异性T细胞衔接器)包括信号序列。如本文所采用的,信号肽是指位于蛋白质N-末端的短的13个到36个残基肽序列,其有助于蛋白质进入分泌途径以进行分泌或膜表达。在一个实施例中,前导序列(信号肽)具有SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67的氨基酸序列。

[0476] 在另一个实施例中,如抗体等经编码治疗性肽或蛋白质被设计为在细胞的表面膜中表达为膜锚定形式,例如通过包含在蛋白质中编码跨膜结构域或用于附着脂质膜锚的位点。通常,本公开的一个或多个双特异性T细胞衔接器不表达为细胞表面锚定形式。

[0477] 在一个实施例中,如抗体等功能性RNA、肽、多肽或蛋白质从腺病毒感染的细胞中释放,例如通过活性分泌或作为细胞溶解的结果。因此,在一个实施例中,腺病毒溶解细胞,由此释放如抗体等功能性RNA、肽、多肽或蛋白质。

[0478] 在另一个实施例中,经编码的另外的如抗体等治疗性肽或蛋白质被设计为保留在完整细胞内。

[0479] 有利地,如由本公开的腺病毒表达的抗体等功能性RNA、肽、多肽或蛋白质可以作为mRNA和抗体蛋白在体内的组织中检测。此外,如抗体等表达的功能性RNA、肽或蛋白质可以在ELISA中结合其配体。又另外地,如抗体等功能性RNA、肽、多肽或蛋白质可以早期检测到(例如在感染后3天内)并且表达持续数周。

[0480] 在一个实施例中,本公开的腺病毒如在感染的约3天或更长时间内表达如抗体等功能性RNA、肽、多肽或蛋白质,如在约36小时、48小时、60小时或72小时内或如2天、3天、4天、5天或6天。

[0481] 在一个实施例中,本公开的腺病毒表达如抗体等功能性RNA、肽、多肽或蛋白质数周,如约1周、2周、3周、4周、5周或6周。如7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天、32天、33天、34天、35天、36天、37天、38天、39天、40天、41或42天。

[0482] 有利地,如抗体表达等功能性RNA、肽或蛋白质表达足以能够检测如血液中的抗体

等功能性RNA、肽、多肽或蛋白质。

[0483] 在一个实施例中,如由本公开的腺病毒表达的抗体等功能性RNA、肽或蛋白质进入血流和/或淋巴系统。

[0484] 在一个实施例中,本公开的腺病毒是溶瘤病毒,所述溶瘤病毒具有增强的癌细胞治疗指数。

[0485] 在一个实施例中,编码序列进一步编码功能性RNA,例如治疗性RNA。

[0486] 如本文所采用的,功能性RNA是指具有除编码蛋白质或肽之外的功能的RNA,并且包含例如包含适于抑制或降低基因活性的RNA构建体,包含如shRNA和miRNA等RNAi。如本文所采用的,shRNA是指短发夹RNA,所述短发夹RNA是产生紧密发夹转向的RNA序列,其可以用于通过RNA干扰(RNAi)沉默靶基因表达。如本文所采用的,miRNA(微RNA)是指小非编码RNA分子(含有约22个核苷酸),其通过碱基配对与mRNA分子内的互补序列起作用,以调节转录或转录后水平的基因表达。由miRNA结合的mRNA链被沉默因为它们不再能被核糖体转译成蛋白质,并且这种复合物通常被细胞主动分解。

[0487] 在一个实施例中,转基因编码蛋白质。如本文所采用的,蛋白质包含蛋白质配体、蛋白质受体或抗体分子。

[0488] 如本文所采用的,蛋白质配体是指与细胞受体结合或以其它方式与细胞受体结合以影响细胞功能的细胞表面膜或分泌蛋白质的结合片段,例如通过刺激细胞内信号传导和调整细胞内的基因转录。在一个实施例中,表达的蛋白质被工程化以在细胞表面上表达和/或从细胞分泌。

[0489] 在一个实施例中,经编码蛋白质是如双特异性T细胞衔接器等双特异性抗体。

[0490] 在一个实施例中,转基因进一步编码酶,例如有助于降解肿瘤的细胞外基质的酶,例如DNAse、胶原酶、基质金属蛋白酶(如MMP2或14)或类似物。

[0491] 合适的抗体和抗体片段可以是激动的或拮抗的,并且包含具有抗癌活性的抗体和抗体片段以及修饰宿主细胞对癌症应答的抗体和抗体片段,例如:激动剂或拮抗性抗体或抗体片段可以减少血管形成或使肿瘤的血管形成正常化。在一个实施例中,激动性抗体或其它经编码蛋白质可以使宿主细胞对宿主的先天性和适应性免疫应答更加可见,例如通过表达抗原、危险信号、细胞因子或趋化因子来吸引和活化宿主细胞,或通过结合共刺激或检查点途径分子来增强适应性免疫应答。

[0492] 如本文所采用的,治疗性抗体或抗体结合片段是指在被插入溶瘤病毒时对患者的病理学,例如对待治疗的癌症具有有益的影响的抗体或抗体结合片段。

[0493] 如本文所采用的,有益的影响是指体内表达的抗体的理想和/或有利效果。

[0494] 治疗性抗体和抗体结合片段的类别包含:抗EGF抗体、抗VEGF抗体、抗PDGF抗体、抗CTLA抗体、抗PD1抗体、抗PDL1抗体和抗FGF抗体。

[0495] 适合掺入本公开病毒的注册治疗性抗体包含:阿昔单抗、阿达木单抗、阿仑单抗、巴利昔单抗、贝利木单抗、贝伐单抗、本妥昔单抗、康纳单抗、西妥昔单抗、塞妥珠单抗、达利珠单抗、地诺单抗、依库珠单抗、依法利珠单抗(efalixumab)、吉妥珠单抗、戈利木单抗、替伊莫单抗、英利昔单抗、伊匹单抗、莫罗单抗-CD3、奥法木单抗、帕利珠单抗、帕尼单抗、兰尼单抗、利妥昔单抗、托珠单抗、托西莫单抗和曲妥珠单抗。

[0496] 在一个实施例中,所采用的抗体或抗体片段的抗体可变区序列与贝伐单抗(也称

为Avastin®)的可变区95％到100％相似或相同,如96％、97％、98％或99％相似或相同。

[0497] 适合掺入本公开的病毒的还有那些被批准用于癌症适应症的抗体及其结合片段的编码序列,例如曲妥珠单抗、托西莫单抗、利妥昔单抗、帕尼单抗、奥法木单抗、伊匹单抗、替伊莫单抗、吉妥珠单抗、地诺单抗、西妥昔单抗、本妥昔单抗、贝伐单抗、阿达木单抗。

[0498] 在一个实施例中,所采用的抗体或抗体片段的抗体可变区序列与已知抗体或本文公开的抗体的可变区95％到100％相似或相同。

[0499] 如本文所使用的,“抗体分子”包含抗体及其结合片段。

[0500] 如本文所采用的,抗体通常是指全长抗体和包括全长抗体的双特异性或多特异性形式。

[0501] 抗体结合片段包含能够靶向抗原的抗体片段,其具有与其衍生的原始“抗体”相同、相似或更好的特异性。抗体片段包含:Fab、修饰Fab、Fab’、修饰Fab’、$F(ab')_2$、Fv、单结构域抗体(例如VH或VL或VHH)、scFv、二价抗体、三价抗体或四价抗体、双scFv、双抗体、三抗体、四抗体和上述任一种的表位结合片段(参见例如Holliger和Hudson,2005,《自然生物技术》,23(9):1126-1136;Adair和Lawson,2005,《药物设计综述-在线》2(3),209-217)。用于产生和制备这些抗体片段的方法在所属领域中众所周知(参见例如Verma等人,1998,《免疫法期刊(Journal of Immunological Methods)》,216,165-181)。用于本发明的其它抗体片段包含国际专利申请WO2005/003169、WO2005/003170和WO2005/003171中所描述的Fab和Fab’片段。多价抗体可以包括多种特异性,例如双特异性或者可以是单特异性的(参见例如WO 92/22853、WO05/113605、WO2009/040562和WO2010/035012)。

[0502] 如本文所采用的,特异性是指仅识别其特异性抗原的抗体或片段,或者对抗原具有显著更高的结合亲和力的抗体或片段,与对其不具有特异性的抗原的结合亲和力相比是具有特异性的,例如结合亲和力高5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍。

[0503] 可以采用已知的抗体或抗体结合片段来生成具有相同CDR或相同可变区的可替代的抗体形式,例如可以容易地将全长抗体转化为Fab、Fab’或scFv片段。

[0504] 可以在本公开的构建体中采用多种不同形式的抗体,包含来自非人类动物的抗体分子、人类抗体分子、人源化抗体分子和嵌合抗体分子。

[0505] 在一个实施例中,抗体或结合片段是单克隆的。单克隆抗体可通过本领域已知的任何方法制备,如杂交瘤技术(Kohler&Milstein,1975,《自然(Nature)》,256:495-497);三体瘤技术、人类B细胞杂交瘤技术(Kozbor等人,1983,《今日免疫学(Immunology Today)》,4:72)和EBV-杂交瘤技术(Cole等人,《单克隆抗体与癌症治疗(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)》,第77到96页,Alan R Liss,Inc.,1985)。

[0506] 在一个实施例中,抗体或结合片段是非人类的,即完全来自非人类来源。这是可能的,因为抗体和片段可以通过病毒在癌细胞内递送。

[0507] 在一个实施例中,抗体是嵌合的,例如具有一个或多个人类恒定区和非人类可变区。

[0508] 在一个实施例中,抗体或结合片段是人类的,即来自完全人源的。

[0509] 在一个实施例中,抗体或结合片段是人源化的。人源化抗体(其包含CDR嫁接的抗体)是具有来自非人类物种的一个或多个互补决定区(CDR)和来自人类免疫球蛋白分子的框架区的抗体分子(参见例如US 5,585,089;WO91/09967)。应当理解,可能仅需要转移CDR

的特异性决定残基而不是整个CDR(参见例如,Kashmiri等人,2005,《方法(Methods)》,36,25-34)。人源化抗体可以任选地进一步包括一个或多个衍生自非人类物种的框架残基,例如CDR就是从这些残基中衍生的。

[0510] 在一个实施例中,编码序列编码抗体重链、抗体轻链或抗体片段。如本文所采用的,重链(HC)是指抗体的大多肽亚基。如本文所采用的,轻链(LC)是指抗体的小多肽亚基。在一个实施例中,抗体轻链包括CL结构域、κ或λ。

[0511] 可以使用本领域已知的任何合适的方法获得用于本公开的抗体。抗原多肽/蛋白质包含融合蛋白,包含表达多肽(如活化的T细胞)的细胞(重组或天然)可以用于产生特异性识别抗原的抗体。多肽可以是“成熟”多肽或其生物活性片段或衍生物。

[0512] 可以使用测定以测量与抗原的结合和/或测定以测量拮抗受体的能力来执行抗体的筛选。结合测定的实例是ELISA,具体的说使用融合蛋白(任选地包括报道分子),其固定在平板上,并且采用缀合的第二抗体来检测与融合蛋白结合的抗原抗体。

[0513] 如果存在,本发明的抗体分子的恒定区结构域可以考虑所提出的抗体分子的功能,并且具体的说可能需要的效应子功能来选择。例如,恒定区结构域可以是人类IgA、IgD、IgE、IgG或IgM结构域。特别地,当抗体分子用于治疗用途并且需要抗体效应子功能时,可以使用人类IgG恒定区结构域,尤其是IgG1和IgG3同种型。可替代地,当抗体分子旨在用于治疗目的并且不需要抗体效应子功能时,可以使用IgG2和IgG4同种型,例如用于简单的激动活性或用于靶中和。应当理解,还可以使用这些恒定区结构域的序列变体。例如,可以使用IgG4分子,其中241位的丝氨酸已经如Angal等人,《分子免疫学》,1993,30(1),105-108中所描述的变为脯氨酸。

[0514] 对于某些抗体功能,例如用于向如免疫系统的细胞等携带抗体靶分子的细胞递送活化信号,使用膜锚定形式的抗体使得抗体将在表达细胞的表面上表达可能是有利的。这种细胞表面表达的结合分子能够在另一个细胞表面上的靶信号分子之间实现有效的多聚体相互作用,这增强了从靶分子向受体细胞的活化信号的递送。

[0515] 有利地,本公开的腺病毒可以表达全长抗体、如scFv等抗体片段、多特异性抗体,具体的说如本文所描述的双特异性T细胞衔接器等双特异性抗体。

[0516] 在一个实施例中,编码抗体或抗体片段的序列(如根据本公开的双特异性T细胞衔接器)包括或进一步包括内部核糖体进入序列。如本文所采用的,内部核糖体进入序列(IRES)意指允许在信使RNA(mRNA)序列的中间开始转译的核苷酸序列。

[0517] 在一个实施例中,经编码治疗性蛋白质或肽是靶特异性蛋白质、多肽或肽。

[0518] 如本文所采用的,靶特异性蛋白质或肽是指靶蛋白质本身,或直接结合(例如对靶特异)或以其它方式修饰靶蛋白质或肽的水平的不同蛋白质或肽。前者的实例是细胞因子,而后者的实例是针对所述细胞因子的抗体。

[0519] 感兴趣的靶通常涉及与疾病相关的,具体的说癌症的特定细胞、细胞产物、抗原或信号传导途径。取决于上下文,靶还涉及从编码蛋白质或多肽的基因转录的mRNA或类似物,其例如可以通过RNAi型技术抑制。因此,在如RNAi技术等RNA的上下文中,靶是由靶基因编码的mRNA。

[0520] 感兴趣的靶的实例包含但不限于:刺激性T细胞共受体及其配体、检查点抑制性T细胞共受体分子及其配体、由调节性T细胞表达的受体及其配体、髓源性抑制细胞和免疫抑

制性免疫细胞、树突细胞和抗原呈递细胞受体及其配体、抗原加工和呈递介质、细胞因子和细胞因子受体、趋化因子和趋化因子受体、转录因子和转录调节因子、细胞内运输分子和细胞功能调节因子、肿瘤细胞和肿瘤微环境受体和产物、如IDO等细胞内肿瘤细胞酶、用于由免疫细胞识别的抗原。

[0521] 因此,在一个实施例中,如本文所采用的,靶是指可以例如在适当时被例如抗体或其中的结合片段抑制、中和或活化的蛋白质或多肽。在细胞因子的上下文中,靶是指细胞因子本身或对细胞因子特异的抗体或其结合片段。因此,病毒可以编码和表达细胞因子本身,因为其释放可以刺激“宿主”免疫应答。在配体的上下文中,配体的突变形式可以由病毒编码,所述病毒与天然配体竞争以结合受体。突变的配体可以具有增加的对受体的结合亲和力,例如使得其具有缓慢的解离速率,由此占据受体并且增加或减少其信号传导。可替代地,与野生型配体相比,突变配体的活性可以降低,由此降低通过天然配体的受体的结合和总体活性。

[0522] 在一个实施例中,根据本公开的病毒或构建体编码前药、免疫调节因子和/或酶。

[0523] 如本文所采用的,前药意指作为无活性(或少于完全活性)衍生物施用的分子,其随后通常通过正常代谢过程转化为体内活性药理学试剂。前药作为预期药物的一种前体。前药转化酶作为将前药转化为其药理活性形式的酶。

[0524] 如本文所采用的,免疫调节因子意指免疫应答的调节因子。免疫调节因子在将免疫应答调节到所需水平方面起作用,如免疫增强、免疫抑制或免疫耐受的诱导。

[0525] T细胞需要两个信号才能完全活化。通过T细胞受体提供抗原特异性的第一信号,其与抗原呈递细胞(APC)膜上的肽-MHC分子相互作用。第二信号即共刺激信号是抗原非特异性的,并且由APC膜上表达的共刺激分子与T细胞之间的相互作用提供。因此,如本文所采用的,共刺激分子意指为T细胞活化、增殖和存活所需的抗原特异性信号提供互补信号的分子。共刺激分子的实例包含但不限于CD28、CD80、CD86、CD83和4-1BB。

[0526] 如本文所采用的,酶意指在活生物体中起催化剂作用的物质调节化学反应进行的速率,而在所述过程中本身不会改变。

[0527] 以下是示例性靶肽/多肽和蛋白质的非详尽讨论。

[0528] 在一个实施例中,靶是检查点蛋白,如免疫检查点或细胞周期检查点蛋白。检查点蛋白的实例包含但不限于:CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、VISTA、B7-H3、B7-H4、HVEM、ILT-2、ILT-3、ILT-4、TIM-3、LAG-3、BTLA、LIGHT或CD160,例如CTLA-4、PD-1、PD-L1和PD-L2。在一个实施例中,提供了对其中之一具有特异性的抗体或其结合片段。因此,在一个实施例中,转基因或转基因盒编码对CTLA-4、PD-1、PD-L1或PD-L2具有特异性的抗体或抗体片段。在一个实施例中,腺病毒表达对CTLA-4、PD-1、PD-L1或PD-L2具有特异性的抗体或抗体片段。

[0529] 在一个实施例中,抗体是检查点抑制剂抗体,例如抗PD-L1。在一个实施例中,腺病毒表达全长抗人类PD-L1抗体。在一个实施例中,全长抗人类PD-L1抗体的表达受如主要晚期启动子(MLP)等内源启动子的控制,具体的说在位置B_Y。在一个实施例中,腺病毒表达scFv形式的抗人类PD-L1抗体。在一个实施例中,scFv形式的抗人类PD-L1抗体的表达受如主要晚期启动子等内源启动子的控制,具体的说在位置B_Y。

[0530] 在一个实施例中,提供了根据本公开的编码抗体或其结合片段的病毒或构建体,用于例如本文示例的对CTLA-4具有特异性的全长抗体或scFv。

[0531] 在一个实施例中,靶是一个或多个独立地选自包括以下的组:CD16、CD25、CD33、CD332、CD127、CD31、CD43、CD44、CD162、CD301a、CD301b和半乳糖凝集素-3。在一个实施例中,提供了对其具有特异性的抗体或其结合片段,例如全长抗体或scFv。

[0532] 在一个实施例中,例如可以被抗体或结合片段进行靶向的靶是一个或多个独立地选自包括以下的组:FLT-3、FLT-3配体、TLRs、TLR配体、CCR7、CD1a、CD1c、CD11b、CD11c、CD80、CD83、CD86、CD123、CD172a、CD205、CD207、CD209、CD273、CD281、CD283、CD286、CD289、CD287、CXCR4、GITR配体、IFN-α2、IL-12、IL-23、ILT1、ILT2、ILT3、ILT4、ILT5、ILT7、TSLP受体、CD141、CD303、CADM1、CLEC9a、XCR1和CD304。

[0533] 在一个实施例中,本公开中采用的双特异性T细胞衔接器的靶是肿瘤细胞抗原。

[0534] 在一个实施例中,靶是一个或多个独立地选自包括以下的组:CEA、MUC-1、EpCAM、HER受体HER1、HER2、HER3、HER4、PEM、A33、G250、碳水化合物抗原Le^y、Le^x、Le^b、PSMA、TAG-72、STEAP1、CD166、CD24、CD44、E-钙粘蛋白、SPARC、ErbB2、ErbB3。

[0535] 在一个实施例中,本公开中采用的双特异性T细胞衔接器的靶是肿瘤基质抗原。

[0536] 在一个实施例中,本公开中采用的双特异性T细胞衔接器的靶是一个或多个独立地选自包括以下的组:FAP、TREM1、IGFBP7、FSP-1、血小板源性生长因子-α受体(PDGFR-α)、血小板源性生长因子-β受体(PDGFR-β)和波形蛋白。

[0537] 在一个实施例中,例如可以被抗体或结合片段(如双特异性T细胞衔接器)靶向的靶是癌症靶。

[0538] 在一个实施例中,靶是一个或多个独立地选自包括以下的组:OX40、OX40配体、CD27、CD28、CD30、CD40、CD40配体、TL1A、CD70、CD137、GITR、4-1BB、ICOS或ICOS配体,例如CD40和CD40配体。

[0539] 在一个实施例中,转基因盒编码包括CD40或CD40配体的配体,或靶向CD40或CD40配体的抗体、抗体片段或shRNA。在一个实施例中,腺病毒表达包括CD40或CD40配体的配体,或靶向(特异于)CD40或CD40配体的抗体、抗体片段或shRNA。

[0540] 在一个实施例中,靶是一个或多个独立地选自包括以下的组的细胞因子:IL-1α、IL-1β、IL-6、IL-9、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-33、IL-35。白细胞介素-2(IL-2)、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、IL-25、IL-1RA、IFNα、IFNβ、IFNγ、TNFα、TGFβ、淋巴毒素α(LTA)和GM-CSF。

[0541] 在一个实施例中,转基因盒编码对IL-12、IL-18、IL-22、IL-7、IL-15、IL-21、IFNα、IFNγ、TNFα、TGFβ或淋巴毒素α(LTA)。具有特异性的抗体或抗体片段,在一个实施例中,腺病毒表达IL-12、IL-18、IL-22、IL-7、IL-15、IL-21、IFNα、IFNγ、TNFα、TGFβ或淋巴毒素α(LTA)。

[0542] 在一个实施例中,IFN的氨基酸序列γ是SEQ ID NO:68。在一个实施例中,IFNα的氨基酸序列是SEQ ID NO:69。在一个实施例中,TNFα的氨基酸序列是SEQ ID NO:70。

[0543] 在一个实施例中,靶是例如一个或多个独立地选自包括以下的组的趋化因子:IL-8、CCL3、CCL5、CCL17、CCL20、CCL22、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL13、CXCL12、CCL2、CCL19、CCL21、CXCR2、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CXCR3、CXCR4、CXCR5和CRTH2。

[0544] 在一个实施例中,转基因盒编码对CCL5、CXCL9、CXCL12、CCL2、CCL19、CCL21、CXCR2、CCR2、CCR4或CXCR4具有特异性的抗体或抗体片段。在趋化因子的上下文中,靶包含

病毒编码和表达趋化因子的位置,例如诱导或增强宿主对癌症的免疫应答。

[0545] 在一个实施例中,腺病毒表达对CCL5、CXCL9、CXCL12、CCL2、CCL19、CCL21、CXCR2、CCR2、CCR4或CXCR4具有特异性的抗体或抗体片段。

[0546] 在一个实施例中,靶是一个或多个独立地选自包括以下的组:STAT3,STAT1,STAT4,STAT6,CTIIA,MyD88和NFκB家族成员,例如蛋白质被抑制剂,例如抗体或其结合片段靶向或从相关基因转录的mRNA被如RNAi等机制抑制。

[0547] 在一个实施例中,靶是HSp70或如存活蛋白等细胞存活和死亡的调节因子,例如蛋白质被抑制剂,例如抗体或其结合片段靶向或从相关基因转录的mRNA被如RNAi等机制抑制。

[0548] 在一个实施例中,靶是一个或多个独立地选自包括以下的组:双调蛋白、BTC、NRG1a、NRG1b、NRG3、TGFα、LRIG1、LRIG3、EGF、EGF-L6、上皮细胞有丝分裂蛋白抗体、HB-EGF、EGFR、Her2、Her3和Her4,例如蛋白质被抑制剂,例如抗体或其结合片段靶向或从相关基因转录的mRNA被如RNAi等机制抑制。

[0549] 在一个实施例中,靶是用于一个或多个独立地选自包括以下的组的配体或受体:hedgehog、FGF、IGF、Wnt、VEGF、TNF、TGFβ、PDGF和Notch。

[0550] 在一个实施例中,腺病毒表达对VEGF具有特异性的抗体或抗体片段。在一个实施例中,抗体是抗VEGF抗体。例如,如具有抗体贝伐单抗的氨基酸序列的抗体或其等同物。在一个实施例中,腺病毒表达全长抗人类VEGF抗体。在一个实施例中,全长抗人类VEGF抗体的表达受如主要晚期启动子(MLP)等内源启动子的控制,具体的说在位置B_Y。在一个实施例中,腺病毒表达scFv形式的抗人类VEGF抗体。在一个实施例中,scFv形式的抗人类VEGF抗体的表达受如主要晚期启动子等内源启动子的控制,具体的说在位置B_Y。

[0551] 在一个实施例中,靶是IDO。

[0552] 在一个实施例中,靶是用于免疫细胞识别的抗原(如由双特异性T细胞衔接器参与的T细胞)是一个或多个独立地选自包括以下的组的蛋白质或肽:来自感染性生物的免疫原性蛋白,如巨细胞病毒抗原、流感抗原、乙型肝炎表面和核心抗原、白喉类毒素、Crm197、破伤风类毒素;衍生自这些抗原的肽是已知的T细胞或抗体表位,或基因工程复合物或这些抗原的多聚体;肿瘤来源的蛋白质作为抗原;衍生自这些抗原的肽,所述抗原是已知的T细胞或抗体表位;以及基因工程化的合成物或这些抗原的多聚体,例如WT1、MUC1、LMP2、独特型、HPV E6和E7、EGFRvIII、HER-2/neu、MAGE A3、p53非突变体、p53突变体、NY-ESO-1、GD2、PSMA、PCSA、PSA、gp100、CEA、MelanA/MART1、Ras突变体、蛋白酶3(PR1)、bcr-abl、酪氨酸酶、存活蛋白、PSA、hTERT,具体的说WT1、MUC1、HER-2/neu、NY-ESO-1、存活蛋白或hTERT。

[0553] 技术人员将理解,由于密码子冗余,编码给定氨基酸序列的核酸序列存在许多可能性,所述沉默核酸碱基对突变是可耐受的,并且编码如SEQ ID NO中任一所限定的给定氨基酸序列的所有核酸序列是本公开所设想的。

[0554] 在一个实施例中,由转基因编码的肽、多肽或蛋白质是模拟表位。如本文所采用的,模拟表位是分子,通常是肽,所述分子模拟表位的结构。后一种性质引起类似于表位引发的抗体应答。用于给定表位抗原的抗体将识别模拟所述表位的模拟表位。模拟表位通常通过生物淘选从噬菌体展示文库获得。正在开发利用模拟表位的疫苗。因此,已知特异性的抗体可以用于筛选文库(例如噬菌体展示中的肽文库-例如Ab序列文库或非抗体肽文库,具

体的说那些优化用于产生具有更稳定3D构象的肽的文库)-模拟表位的生成被充分描述在艺术领域(参见Tribbick G、Rodda S.用于发现与抗体样分子结合的肽配体的组合方法。《分子识别期刊(J Mol Recognit.)》2002 15(5):306-10;Masuko T、Ohno Y、Masuko K、Yagi H、Uejima S、Takechi M、Hashimoto Y.通过使用表达与绿色荧光蛋白融合的靶分子的转染子免疫的大鼠的强有力策略,朝向膜癌蛋白的治疗性抗体。《癌症科学(Cancer Sci.)》2011 102(1):25-35)。

[0555] 在一个实施例中,模拟表位或其它设计的疫苗抗原由转基因编码并且表达以在受体患者中诱导抗体应答,其中诱导的抗体具有所期望的治疗效果。在一个实施例中,具有来自所期望的人类配体的肽序列的GFP-肽融合蛋白用于诱导抗自身靶抗体应答,例如已知对于结合靶分子PD-1重要的PD-L1的肽区可以与GFP或其它高免疫原性外来载剂蛋白质基因连锁,使得对肽的免疫抗体应答包含与天然PDL1分子交叉反应的抗体,并且因此以与直接编码抗PDL1抗体相同的方式阻断PD-L1:PD-1相互作用。本领域充分描述了用于诱导抗自身治疗性抗体应答的疫苗的概念(参见Spohn G、Bachmann MF.治疗性疫苗接种以阻断受体-配体相互作用。《关于药物疗法的专家意见(Expert Opin Biol Ther.)》2003 3(3):469-76;Link A、Bachmann MF.免疫药物:用治疗性抗细胞因子疫苗破坏B-但不破坏T细胞耐受性。《免疫疗法(Immunotherapy)》2010 2(4):561-74;Delavallée L、Assier E、Semerano L、Bessis N、Boissier MC.抗细胞因子疫苗的新兴应用。《疫苗专家评论(Expert Rev Vaccines)》,2008 7(10):1507-17)。

[0556] 在一个或多个实施例中,所采用的转基因编码SEQ ID NO:2、4、7、11或16中任一个所示的序列。

[0557] 在另一个实施例中,所采用的转基因编码在C-末端处排除deca-His亲和标记的序列,例如SEQ ID NO:72到78中任一个所阐述的病毒所示。

[0558] 有利地,本公开的腺病毒表达并且释放抗体形式(如双特异性T细胞衔接器)和如细胞因子等其它蛋白质由其中的转基因编码到体外培养上清液中或到体内肿瘤组织基质中。前导序列可以帮助经编码蛋白质/多肽或肽离开癌细胞。因此,在一个实施例中,经编码“蛋白质”包括前导序列。如本文所采用的,前导序列是指位于启动子序列与编码区之间的多核苷酸序列,其可以在转录或转译水平上调节基因表达。

[0559] 在一个实施例中,编码序列编码肽。如本文所采用的,肽是指不是完整功能蛋白的氨基酸链。通常,保留蛋白质的一些或全部功能的片段,其是免疫系统的片段,或者可以被免疫系统识别,例如可以被T细胞识别的8个或更多个氨基酸的肽。

[0560] 在一个实施例中,转基因是报告基因,所述报告基因编码例如包含生物发光的成像剂、荧光成像剂(包含可活化的荧光成像剂),如荧光素酶、GFP或eGFP或红色荧光蛋白。

[0561] 如本文所采用的,报告基因或报告序列意指产生在真核细胞中容易检测的产物的基因或DNA序列,并且可以用作标记物以确定与其DNA紧密连接或组合的另一种基因的活性。报告基因赋予易于鉴定和测量的表达它们的细胞或生物体的特性或者是可选择的标记。报告基因通常用作指示某种基因是否已经被细胞或生物群体吸收或表达。常见报告基因的实例包含但不限于:LacZ、荧光素酶、GFP、eGFP、新霉素磷酸转移酶、氯霉素乙酰转移酶、碘化钠同向转运体(NIS)、硝基还原酶(例如NfsA、NfsB)细胞内金属蛋白、HSV1-tk或雌激素受体。

[0562] 在一个实施例中,遗传物质(具体的说转基因)不编码或表达如显像剂、荧光素酶、GFP或eGFP等报告基因。

[0563] 通过检查一组肿瘤细胞中的溶解潜力,可以研究根据本公开的病毒对特异性肿瘤类型的偏好,例如结肠肿瘤细胞系包含HT-29、DLD-1、LS174T、LS1034、SW403、HCT116、SW48和Colo320DM。任何可用的结肠肿瘤细胞系对于这种评估同样有用。

[0564] 前列腺细胞系包含DU145和PC-3细胞。胰腺细胞系包含Panc-1细胞。乳腺肿瘤细胞系包含MDA231细胞系,并且卵巢细胞系包含OVCAR-3细胞系。造血细胞系包含但不限于:Raji和Daudi B淋巴细胞、K562成红细胞样细胞、U937骨髓细胞和HSB2 T淋巴细胞。其它可用的肿瘤细胞系同样有用。

[0565] 本公开还延伸到本公开的新序列。在一个实施例中,病毒以本文公开的任一个序列显示,例如SEQ ID NO:34到37中的任一个或与其至少95%相同的序列,例如如SEQ ID NO:79到82中任一个所阐述。

[0566] 配制品

[0567] 本公开还涉及如本文所描述的病毒的药物配制品。

[0568] 在一个实施例中,提供了液体胃肠外配制品,例如对于根据本公开的输注或注射能够溶瘤的复制物,其中所述配制品提供的剂量范围为每体积剂量1×10^{10}到1×10^{14}个病毒颗粒。

[0569] 肠胃外配制品意指设计为不通过胃肠道递送的配制品。典型的肠胃外递送途径包含注射、植入或输注。在一个实施例中,配制品以推注递送的形式提供。

[0570] 在一个实施例中,肠胃外配制品是以注射的形式。注射包含静脉内、皮下、肿瘤内或肌内注射。如本文所采用的,注射意指通过注射器将液体注入体内。在一个实施例中,本公开的方法不涉及肿瘤内注射。

[0571] 在一个实施例中,肠胃外配制品是以输注形式。

[0572] 如本文所采用的,输注意指通过滴注、输注泵、注射器驱动器或等效装置以较慢的速率施用流体。在一个实施例中,输注在1.5分钟到120分钟的范围内施用,如约3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟、25分钟、30分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟、60分钟、65分钟、70分钟、65分钟、80分钟、85分钟、90分钟、95分钟、100分钟、105分钟、110分钟或115分钟。

[0573] 在一个实施例中,一剂量的配制品小于100ml,例如30ml,如通过注射器驱动器施用。在一个实施例中,一剂量的配制品小于10ml,例如9ml、8ml、7ml、6ml、5ml、4ml、3ml、2ml或1ml。在一个实施例中,一剂量的配制品小于1ml,如0.9ml、0.8ml、0.7ml、0.6ml、0.5ml、0.4ml、0.3ml、0.2ml或0.1ml。

[0574] 在一个实施例中,注射以缓慢注射施用,例如在1.5分钟到30分钟的时间内施用。

[0575] 在一个实施例中,所述配制品用于静脉内(i.v.)施用。此途径对溶瘤病毒的传递特别有效,因为其可以快速进入大多数器官和组织,并且是特别适用于转移瘤的治疗,例如已建立的转移灶,尤其是位于如肝脏和肺部等高度血管化区的转移灶。

[0576] 治疗配制品通常在制造和储存条件下是无菌和稳定的。所述组合物可以被配制成适合于施用于人类的溶液、微乳液、脂质体或其它肠胃外配制品,并且可以被配制成如注射

器或小瓶等预填充装置,具体的说作为单剂量。

[0577] 配制品通常包括药学上可接受的稀释剂或载剂,例如与病毒相容的无毒等渗载剂,并且其中病毒在所需的一段时间内是稳定的。

[0578] 载剂可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。例如,通过使用分散剂或表面活性剂,如卵磷脂或如聚山梨醇酯80或40等非离子表面活性剂,可以保持适当的流动性。在分散体中,可以通过表面活性剂的存在来辅助维持所需的粒度。等渗剂的实例包含组合物中的糖、如甘露醇等多元醇、山梨糖醇或氯化钠。

[0579] 在一个实施例中,所采用的肠胃外配制品可以包括例如下列缓冲液中的一个或多个:4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸、磷酸盐缓冲液和/或Tris缓冲液、糖,例如右旋糖、甘露糖、蔗糖或类似物、如氯化钠等盐、氯化镁或氯化钾、洗涤剂,如briji、PS-80、PS-40或类似物等非离子表面活性剂。配制品还可以包括如EDTA或乙醇或EDTA和乙醇的组合等防腐剂,所述防腐剂被认为可以防止一个或多个可能的降解途径。

[0580] 在一个实施例中,配制品将包括根据本公开的纯化的溶瘤病毒,例如每剂量1×10^{10}个到1×10^{14}个病毒颗粒,如每剂量1×10^{10}个到1×10^{12}个病毒颗粒。在一个实施例中,配制品中病毒的浓度范围为2×10^{8}vp/mL到2×10^{14}vp/mL,如2×10^{12}vp/ml。

[0581] 在一个实施例中,肠胃外配制品包括甘油。

[0582] 在一个实施例中,配制品包括如本文所描述的溶瘤腺病毒、HEPES(N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸)、甘油和缓冲液。

[0583] 在一个实施例中,肠胃外配制品由本公开的病毒、例如5mM HEPES、例如5%到20%(v/v)甘油、盐酸组成,例如将pH调节到7到8的范围并且水用于注射。

[0584] 在一个实施例中,将浓度为2×10^{12}vp/mL的0.7mL的本公开的病毒配制在5mM HEPES、20%甘油中,最终pH为7.8。

[0585] 在《雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》(Mack Publishing Company(马克出版公司),新泽西州,1991)中可获得药学上可接受的载剂的详尽讨论。

[0586] 在一个实施例中,配制品作为包含吸入的局部施用的配制品提供。

[0587] 合适的可吸入制剂包含可吸入粉末、含有推进剂气体的计量气溶胶或不含推进剂气体的可吸入溶液。根据本公开的可吸入粉末通常含有如本文所描述的病毒和生理学上可接受的赋形剂。

[0588] 这些可吸入粉末可以包含单糖(例如葡萄糖或阿拉伯糖)、二糖(例如乳糖、蔗糖、麦芽糖)、低聚糖和多糖(例如葡聚糖)、多元醇(例如山梨糖醇、甘露醇、木糖醇)、盐(例如氯化钠、碳酸钙)或其彼此的混合物。适合使用单糖或二糖,使用乳糖或葡萄糖,具体的说但不限于其水合物形式。

[0589] 用于在肺中沉积的颗粒需要小于10微米的粒度,如1微米到9微米,例如0.1μm到5μm,具体的说1μm到5μm。携带病毒的粒度是最重要的,并且因此在一个实施例中,根据本公开的病毒可以被吸附或吸收到颗粒上,如给定大小的乳糖颗粒。

[0590] 可以用于制备可吸入气溶胶的推进剂气体在本领域中是已知的。合适的推进剂气体选自烃类,如正丙烷、正丁烷或异丁烷以及卤代烃,如甲烷、乙烷、丙烷、丁烷、环丙烷或环

丁烷的氯化和/或氟化衍生物。上述推进剂气体可以单独使用或以其混合物使用。

[0591] 特别合适的推进剂气体是选自TG 11、TG 12、TG 134a和TG227的卤代烷烃衍生物。在上述卤代烃中,TG134a(1,1,1,2-四氟乙烷)和TG227(1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷)及其混合物是特别合适的。

[0592] 含有推进剂气体的可吸入气溶胶还可以含有其它成分,如助溶剂、稳定剂、表面活化剂(表面活性剂)、抗氧化剂、润滑剂和调节pH的方法。所有这些成分在本领域中是已知的。

[0593] 根据本发明的含有推进剂气体的可吸入气溶胶可以含有最多5%重量的活性物质。根据本发明的气溶胶含有例如0.002重量%到5重量%、0.01重量%到3重量%、0.015重量%到2重量%、0.1重量%到2重量%、0.5重量%到2重量%或0.5重量%到1重量%的活性成分。

[0594] 可替代地,肺部的局部施用还可以通过施用液体溶液或悬浮液配制品,例如采用如喷雾器等装置,例如,连接到压缩机的喷雾器(例如,连接到由弗吉尼亚州里士满的帕里呼吸设备公司(Pari Respiratory Equipment,Inc.)制造的Pari Master(R)压缩机的Pari LC-Jet Plus(R)喷雾器)。

[0595] 本发明的病毒可以分散在溶剂中递送,例如以溶液或悬浮液的形式递送,例如如上文所描述的用于肠胃外配制品。其可以悬浮在合适的生理溶液中,例如盐水或其它药理学上可接受的溶剂或缓冲溶液。本领域已知的缓冲溶液可以含有0.05mg到0.15mg的乙二胺四乙酸二钠、8.0mg到9.0mg氯化钠、0.15mg到0.25mg聚山梨醇酯、0.25mg到0.30mg无水柠檬酸和0.45mg到0.55mg柠檬酸钠/1ml水,以便达到约4.0到5.0的pH。

[0596] 治疗性悬浮液或溶液配制品还可以含有一个或多个赋形剂。赋形剂在本领域中是众所周知的并且包含缓冲液(例如,柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液和碳酸氢盐缓冲液)、氨基酸、尿素、醇、抗坏血酸、磷脂、蛋白质(例如血清白蛋白)、EDTA、氯化钠、脂质体、甘露醇、山梨糖醇和甘油。溶液或悬浮液可以包封在脂质体或可生物降解的微球中。配制品通常采用无菌制造方法以基本上无菌的形式提供。

[0597] 这可以包含通过过滤用于配制品的缓冲溶剂/溶液的生产和灭菌、抗体在无菌缓冲溶剂溶液中的无菌悬浮以及通过本领域普通技术人员熟悉的方法将配制品分配到无菌容器中。

[0598] 根据本公开的可雾化配制品可以例如作为包装在箔包封中的单剂量单位(例如,密封的塑料容器或小瓶)提供。每个小瓶含有体积中的单位剂量,例如2mL溶剂/溶液缓冲液。

[0599] 治疗

[0600] 在另外的方面,本公开涉及如本文所描述的用于治疗的病毒或其配制品,具体的说用于治疗癌症。

[0601] 在一个实施例中,治疗方法用于治疗肿瘤,具体的说实体瘤。

[0602] 如本文所采用的,肿瘤是指由过度细胞分裂引起的异常组织块,其是不受控制的和渐进的,也称为肿瘤。肿瘤可以是良性的(非癌性的)或恶性的。肿瘤涵盖所有形式的癌症和转移。

[0603] 在一个实施例中,肿瘤是实体瘤。实体瘤可以定位或转移。

[0604] 在一个实施例中,肿瘤是上皮来源的。

[0605] 在一个实施例中,肿瘤是恶性肿瘤,如结肠直肠癌、肝癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、甲状腺癌、肾癌、膀胱癌、头颈癌或肺癌。

[0606] 在一个实施例中,肿瘤是结肠直肠恶性肿瘤。

[0607] 如本文所采用的,恶性肿瘤意指癌细胞。

[0608] 在一个实施例中,溶瘤腺病毒用于治疗或预防转移。

[0609] 在一个实施例中,本文的方法或配制品用于治疗耐药性癌症。

[0610] 在一个实施例中,病毒与进一步的癌症治疗或疗法的施用组合施用。

[0611] 在一个实施例中,提供了根据本公开的用来制造用于治疗癌症,例如上文所描述的癌症的药物的病毒或配制品。

[0612] 在另外的方面,提供了一种治疗癌症的方法,其包括将治疗有效量的根据本公开的病毒或配制品施用给有需要的患者,例如人类患者。

[0613] 在一个实施例中,本文的溶瘤病毒或配制品与另一种疗法组合施用。

[0614] 如本文所采用的,“组合”旨在涵盖在癌症治疗或疗法之前,同时和/或之后施用溶瘤病毒的位置。

[0615] 癌症疗法包含手术、放射疗法、靶向疗法和/或化学疗法。

[0616] 如本文所采用的,癌症治疗是指用治疗化合物或生物制剂治疗,例如旨在治疗癌症和/或其维持疗法的抗体。

[0617] 在一个实施例中,癌症治疗选自任何其它抗癌疗法,包含化学治疗剂、靶向抗癌剂、放射疗法、放射性同位素疗法或其任何组合。

[0618] 在一个实施例中,本公开的如溶瘤腺病毒等病毒可以用作对于如手术(新辅助疗法)等疗法的预治疗,以缩小肿瘤、治疗转移和/或预防转移或进一步转移。可以在如手术(辅助疗法)等疗法后使用溶瘤腺病毒以治疗转移和/或预防转移或进一步转移。

[0619] 如本文所采用的,同时地是与溶瘤腺病毒配制品同时或大致同时施用另外的癌症治疗。治疗可以包含在相同的配制品中或作为单独的配制品施用。

[0620] 在一个实施例中,病毒与化学治疗剂的施用组合施用。

[0621] 如本文所采用的,化学治疗剂是指特异性的抗肿瘤化学试剂或选择性破坏恶性细胞和组织的药物。例如,烷化剂、抗代谢物、蒽环霉素、植物生物碱、拓扑异构酶抑制剂以及其它抗肿瘤剂。化学疗法的其它实例包含多柔比星、5-氟尿嘧啶(5-FU)、紫杉醇、卡培他滨、伊立替康以及如顺铂和奥沙利铂等铂。优选的剂量可以由医师根据所治疗的癌症的性质来选择。

[0622] 在一个实施例中,治疗剂是更昔洛韦,其可以帮助控制免疫应答和/或肿瘤血管形成。

[0623] 在一个实施例中,本文方法中采用的一个或多个疗法是节拍法,即使用低剂量抗癌药物的连续或频繁治疗,通常伴随其它治疗方法。

[0624] 亚组B溶瘤腺病毒,具体的说Ad11和由其衍生的如EnAd等腺病毒可以与化学治疗剂特别协同,因为所述腺病毒似乎具有很大程度上不依赖于细胞凋亡的作用机制,从而通过主要的坏死性机制杀死癌细胞。而且,化学疗法期间发生的免疫抑制可以使溶瘤病毒更有效地发挥作用。

[0625] 如本文所采用的,治疗剂量是指当在合适的治疗方案中采用时适合于实现预期治疗效果的如溶瘤腺病毒等病毒的量,所述合适的治疗方案例如改善疾病的症状或病症。当病毒颗粒的数量足以导致以下情况时,剂量可以被视为治疗癌症或转移的治疗剂量:肿瘤或转移性生长减慢或停止、或肿瘤或转移的大小缩小和/或延长患者的寿命。合适的治疗剂量通常是治疗效果与可耐受毒性之间的平衡,例如考虑到治疗所获得的益处,副作用和毒性是可耐受的。

[0626] 在一个实施例中,每周施用根据本公开的病毒或治疗构建体(包含由其构成的配制品),例如一周1剂量在第1天、第3天、第5天施用,然后每个后续一周施用一剂量。

[0627] 在一个实施例中,根据本公开的病毒或治疗构建体(包含由其构成的配制品)每两周或每三周施用,例如在第1周的第1天、第3天和第5天施用,并且在第2周或第3周也在第1天、第3天和第5天施用。此给药方案可以适当地重复多次。

[0628] 在一个实施例中,每月施用根据本公开的病毒或治疗构建体(包含由其构成的配制品)。

[0629] 在一个实施例中,通过重组技术制备本公开的病毒和构建体。技术人员将理解,携带腺病毒基因组可以通过其它技术手段制造,包含完全合成基因组或包括所有基因组的一部分的质粒。技术人员将理解,在合成基因组的情况下,插入区可以不包括限制性位点核苷酸,因为后者是使用克隆方法插入基因后的假象。

[0630] 在一个实施例中,携带腺病毒基因组完全合成制造,例如按照SEQ ID NO:34到37。

[0631] 本公开进一步扩展到通过插入转基因或转基因盒获得或可获得的式(I)的腺病毒或其子公式。

[0632] 如本文所采用的,“是”意指包括。

[0633] 在本说明书的上下文中,“包括”应解释为“包含”。

[0634] 包括某些特征/元件的本发明的实施例还旨在扩展到相关元件/特征的“由……组成”或“基本上由……组成”的可替代的实施例。

[0635] 在技术上适当时,可以组合本发明的实施例。

[0636] 如专利和申请等技术参考文献以引用的方式并入本文中。

[0637] 本文具体和明确地叙述的任何实施例可以单独或与一个或多个另外的实施例组合形成免责声明的基础。

[0638] 本申请要求GB1614607.8、GB1700663.6、GB1706219.1和GB1713765.4的优先权,其通过引用并入本文。这些文件可以用于纠正本说明书中的错误,具体的说序列表中的错误。

[0639] 仅通过以下实例进一步描述本发明,所述实例参考附图,在附图中:

附图说明

[0640] 图1(A)是根据本公开的包括或缺少任选的十八组氨酸(decahistidine)亲和标签的双特异性T细胞衔接器抗体的示意图。Ig SP:信号肽;10His:十八组氨酸亲和标签;L:GS连接子;V_L:可变轻结构域;V_H可变重结构域。(B)pSF-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器的质粒图谱。(C)pSF-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器的质粒图谱。(D)pSF-CMV-对照双特异性T细胞衔接器的质粒图谱。

[0641] 图2(A)斑点印迹示出了重组双特异性T细胞衔接器定量。(B)示出了显示FAP的

ELISA结果的图。(C)显示EpCAM的ELISA结果的图。

[0642] 图3示出了在FAP双特异性T细胞衔接器和对照双特异性T细胞衔接器存在下使用流式细胞术测量的单独或与NHDF细胞共培养的T细胞的CD69(A)和CD25(B)的表达水平的图。

[0643] 图4(A)示出了在FAP双特异性T细胞衔接器存在下单独或与NHDF细胞共培养的T细胞和通过细胞内细胞因子染色测量的对照双特异性T细胞衔接器的IFNγ表达水平的图。图(B)和图(C)示出了在EpCAM双特异性T细胞衔接器存在下单独或与DLD细胞共培养的T细胞的CD69和CD25的表达水平,并且使用流式细胞术测量了对照双特异性T细胞衔接器。

[0644] 图5(A)示出了在EpCAM双特异性T细胞衔接器存在下与DLD细胞共培养的T细胞和通过细胞内细胞因子染色测量的对照双特异性T细胞衔接器的IFNγ表达水平的图。图(B)和图(C)示出了在EpCAM双特异性T细胞衔接器存在下与DLD细胞共培养的PBMC的CD69和CD25的水平,并且使用流式细胞术测量了对照双特异性T细胞衔接器。

[0645] 图6(A)示出了显示已经与T细胞和FAP双特异性T细胞衔接器或对照双特异性T细胞衔接器共培养的NHDF细胞的细胞毒性的LDH测定的结果的图。(B)示出了显示已经与T细胞和FAP双特异性T细胞衔接器或对照双特异性T细胞衔接器共培养的BTC100细胞的细胞毒性的LDH测定结果的图。(C)与T细胞和FAP双特异性T细胞衔接器与对照双特异性T细胞衔接器共培养后的NHDF细胞的图。

[0646] 图7(A)示出了多个患者衍生细胞中的FAP表达的散点图。(B)示出了跨多个细胞和细胞系表达EpCAM和FAP的细胞百分比的图。

[0647] 图8(A)示出了随着双特异性T细胞衔接器浓度增加,FAP双特异性T细胞衔接器的NHDF剂量应答的图。图(B)和图(C)示出了显示已经与T细胞和EpCAM双特异性T细胞衔接器或对照双特异性T细胞衔接器共培养的DLD细胞的细胞毒性的LDH测定的结果。

[0648] 图9(A)示出了显示已经与T细胞和EpCAM双特异性T细胞衔接器或对照双特异性T细胞衔接器共培养的SKOV细胞的细胞毒性的LDH测定的结果的图。(B)示出了显示已经与T细胞和EpCAM双特异性T细胞衔接器或对照双特异性T细胞衔接器共培养的MCF7细胞的细胞毒性的LDH测定结果的图。

[0649] 图10示出了显示随着双特异性T细胞衔接器浓度增加,EpCAM双特异性T细胞衔接器的NHDF剂量应答的图。

[0650] 图11(A)示出了通过FAP或同位素对照抗体确定并且通过流式细胞术分析的CHO细胞中的FAP表达的图。(B)示出了显示已经与T细胞和FAP双特异性T细胞衔接器或对照双特异性T细胞衔接器共培养的CHO或CHO-FAP细胞的细胞毒性的LDH测定结果的图。

[0651] 图12示出了使用流式细胞术分析CHO对CHO-FAP细胞的T细胞活化(基于CD69和CD25表达水平)的图。

[0652] 图13(A)示出了通过用EpCAM的或同位素对照抗体染色确定,并且使用流式细胞术分析的亲本细胞系对稳定转染变体的EpCAM表达的图。(B)示出了显示已经与T细胞和EpCAM双特异性T细胞衔接器或对照双特异性T细胞衔接器共培养的CHO或CHO-EpCAM细胞的细胞毒性的LDH测定结果的图。

[0653] 图14示出了使用流式细胞术分析CHO对CHO-EpCAM细胞的T细胞活化(基于CD69和CD25表达水平)的图。

[0654] 图15(A)示出了FAP双特异性T细胞衔接器活化使用流式细胞术分析的CD4+或CD8+T细胞(基于CD69和CD25表达水平)的能力的图。(B)示出了显示已经与CD4+或CD8+T细胞和FAP双特异性T细胞衔接器或对照双特异性T细胞衔接器共培养的NHDF细胞的细胞毒性的LDH测定结果的图。

[0655] 图16(A)示出了在EpCAM存在下通过DLD细胞的CD4+和CD8+T细胞活化(基于CD69和CD25表达水平)或使用流式细胞术分析对照双特异性T细胞衔接器的图。(B)示出了显示已经与CD4+或CD8+T细胞和EpCAM双特异性T细胞衔接器或对照双特异性T细胞衔接器共培养的DLD细胞的细胞毒性的LDH测定结果的图。

[0656] 图17(A)示出了用对照或FAP双特异性T细胞衔接器培养的腹水中CD3+T细胞的数量的图。(B)示出了用对照或FAP双特异性T细胞衔接器培养的腹水中T细胞的CD25表达水平的图。(C)示出了用对照或FAP双特异性T细胞衔接器培养的腹水的FAP+细胞数量的图。

[0657] 图18(A)本公开的腺病毒的基因组的示意性表示。(B)比较CMV对SA启动子驱动的表达的动力学的图。

[0658] 图19(A)示出了NG-601、NG-602、NG-603、NG-604、NG-605、NG-606和EnAd的每个细胞检测到的病毒基因组数量的定量的图。(B)示出了通过感染A549细胞评估的NG-601、NG-602、NG-603、NG-604、NG-605、NG-606或EnAd的溶瘤活性的图。

[0659] 图20(A)示出了使用流式细胞术分析,通过NG-601、NG-602、NG-605和NG-606在与CHO-FAP共培养时T细胞活化(基于CD69和CD25表达水平)的图。(B)示出了使用流式细胞术分析,通过NG-601、NG-602、NG-605和NG-606在与CHO-EpCAM共培养时T细胞活化(基于CD69和CD25表达水平)的图。

[0660] 图21示出了显示确定从NG-605和NG-606产生的FAP双特异性T细胞衔接器的量的实验结果的图。

[0661] 图22示出了显示确定从NG-601和NG-602产生的EpCAM双特异性T细胞衔接器的量的实验结果的图。

[0662] 图23示出了用NG-607、NG-608、NG-609和NG-610感染的Ad293细胞的显微镜图像。

[0663] 图24(A)指示使用XCELLigence进行分析,用EnAd感染的DLD细胞的细胞毒性的图。(B)指示使用XCELLigence进行分析,用EnAd感染的SKOV细胞的细胞毒性的图。(C)指示使用XCELLigence进行分析,用EnAd感染的NHDF细胞的细胞毒性的图。

[0664] 图25(A)指示使用XCELLigence进行分析,NG-603、NG-604、NG-605、NG-606和EnAd杀死NHDF细胞的能力的图。(B)指示使用LDH测定法进行分析,NG-603、NG-604、NG-605、NG-606和EnAd杀死NHDF细胞的能力的图。

[0665] 图26示出了显示使用流式细胞术分析,通过NG-603、NG-604、NG-605、NG-606与NHDF细胞、SKOV和T细胞共培养的T细胞活化(基于CD69和CD25表达水平)的图。

[0666] 图27(A)示出了使用流式细胞术分析,通过NG-603、NG-604、NG-605、NG-606与NHDF和多个SKOV细胞对单个SKOV共培养的T细胞活化(基于CD69和CD25表达水平)的图。(B)指示使用LDH测定法分析,用NG-605和NG-606感染的NHDF细胞的细胞毒性的图。

[0667] 图28示出了通过重组FAP双特异性T细胞衔接器、EnAd、NG-603或NG-605,来自NHDF细胞溶解的间隔拍摄视频的静止帧图像。

[0668] 图29示出了通过NG-607、NG-608、NG-609或NG-610,来自NHDF细胞溶解的间隔拍摄

视频的静止帧图像。

[0669] 图30示出了指示使用XCELLigence进行分析,在存在T细胞或不存在T细胞的情况下,用EnAd、NG-601、NG-602、NG-603和NG-604感染的DLD细胞的细胞毒性的图。

[0670] 图31示出了指示使用LDH测定法进行分析,在存在T细胞或不存在T细胞的情况下,用EnAd、NG-601、NG-602、NG-603和NG-604感染的DLD细胞的细胞毒性的图。

[0671] 图32示出了使用流式细胞术分析,通过EnAd、NG-601、NG-602、NG-603和NG-604显示T细胞活化(基于CD69和CD25表达水平)的图。

[0672] 图33示出了使用xCELLigence评估在存在或不存在$CD3^+$T细胞时,确定NG-601在不同感染复数(MOI)下杀死DLD肿瘤细胞的能力的实验结果。

[0673] 图34示出了指示使用xCELLigence评估在存在或不存在$CD3^+$T细胞时,EnAd和NG-601、NG-602、NG-603和NG-604杀死SKOV肿瘤细胞的能力的图。

[0674] 图35示出了指示使用LDH测定法评估在存在或不存在$CD3^+$T细胞时,EnAd和NG-601、NG-602、NG-603和NG-604杀死SKOV肿瘤细胞的能力的图。

[0675] 图36示出了显示使用流式细胞术分析,通过与SKOV肿瘤细胞共培养的EnAd、NG-601、NG-602、NG-603和NG-604的T细胞活化(基于CD69和CD25表达水平)的图。

[0676] 图37示出了显示使用流式细胞术分析,通过与腹水细胞共培养的EnAd、NG-601、NG-602、NG-603和NG-604的T细胞活化(基于CD69和CD25表达水平)的图。

[0677] 图38示出了通过EpCAM双特异性T细胞衔接器、EnAd、NG-601或NG-603,来自NHDF细胞溶解的间隔拍摄视频的静止帧图像。

[0678] 图39示出了从患者获得的腹水细胞的显微镜图像,所述腹水细胞被本公开的病毒感染并且用EnAd-CMV-GFP和EnAd-SA-GFP作为报道基因染色以确定感染和晚期病毒基因表达。

[0679] 图40(A)指示在用本公开的病毒感染的腹水样品中CD3+T细胞上CD25的表达水平的图。(B)指示用本公开的病毒感染的腹水样品中FAP+细胞的数量的图。

[0680] 图41示出了从癌症患者获得的腹水细胞的显微镜图像,所述腹水细胞被本公开的病毒感染并且用EnAd-CMV-GFP和EnAd-SA-GFP作为报道基因染色以确定感染和晚期病毒基因表达。

[0681] 图42示出了指示从癌症患者获得并且用本公开的病毒感染的腹水样品中CD3+T细胞的数量的图。

[0682] 图43示出了指示从癌症患者获得并且用本公开的病毒感染的腹水样品中CD3+T细胞上的CD25表达水平的图。

[0683] 图44示出了指示从癌症患者获得并且用本公开的病毒感染的腹水样品中的FAP+细胞数量的图。

[0684] 图45EpCAM双特异性T细胞衔接器的表征及其对PBMC衍生T细胞的影响

[0685] (A)靶向EpCAM的双特异性T细胞衔接器和非特异性对照双特异性T细胞衔接器的结构示意图。VL和VH结构域与富含丝氨酸和甘氨酸的柔性肽连接子(L)连接,以获得灵活性和溶解性。Ig SP,轻链免疫球蛋白信号肽;10His,decahistidine亲和标签。(B)在含有双特异性T细胞衔接器的上清液存在下,单独培养或与DLD细胞(5:1)一起培养的CD3纯化的PBMC上活化标记物CD69和(C)CD25的诱导。在共培养24小时后通过流式细胞术测量CD69和CD25。

评估显著性对IgG同种型(D)在与DLD细胞(5:1)和含有双特异性T细胞衔接器的上清液共培养6小时后IFNγ阳性T细胞的百分比。(E)与DLD细胞(5:1)和含有双特异性T细胞衔接器的上清液共培养的CFSE染色的T细胞的分部指数和进入增殖的亲本T细胞群的百分比所代表的增殖。共培养后5天通过流式细胞术测量荧光。分部指数使用FlowJo增殖工具建模。(F)通过CD107a外化测量的T细胞脱粒,与DLD细胞(5:1)和含有双特异性T细胞衔接器的上清液共培养。通过与CD107a特异性抗体共培养6小时评估外化,然后进行流式细胞术分析。(G)在含有双特异性T细胞衔接器的上清液存在下,使用来自T细胞与DLD细胞(5:1)的共培养物的上清液,通过LEGENDplex人类Th细胞因子组测量细胞因子水平48小时。每种条件以生物学一式三份测量,并且数据表示为平均值±SD。除非另有说明,使用Tukey的Post Hoc分析的单向ANOVA测试评估显著性对未治疗的显著性,*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

[0686] 图46重组EpCAM双特异性T细胞衔接器的表征

[0687] (A)斑点印迹以估计由转染的HEK293A细胞产生的EpCAM双特异性T细胞衔接器的量。(B)通过对照或重组EpCAM或非特异性双特异性T细胞衔接器测量EpCAM结合水平的ELISA。通过使用Tukey的Post Hoc分析的单向ANOVA检验与空载体对照样品比较评估显著性,***p<0.001

[0688] 图47EpCAM双特异性T细胞衔接器介导的T细胞细胞毒性的抗原特异性评估

[0689] (A)在与CHO或CHO-EpCAM细胞(5:1)和含有双特异性T细胞衔接器的上清液共培养的CD3+T细胞上诱导活化标记物CD25,在共培养24小时后通过FACS分析测量。(B)单独或与T细胞共培养的含有双特异性T细胞衔接器的上清液培养的CHO或CHO-EpCAM细胞的细胞毒性。通过在孵育24小时后将LDH释放到培养上清液中来评估细胞毒性。(C)与T细胞(1:5)和含有双特异性T细胞衔接器的上清液共培养24小时后多种EpCAM阳性癌细胞的细胞毒性。在共培养24小时后通过MTS测定法测量活力。(D)与通过使用同种型对照抗体测量的背景荧光相比,通过(C)中的EpCAM阳性细胞系的FACS分析评估的EpCAM表达水平(N=1)。(AC)每种条件以生物学一式三份测量,并且表示为平均值±SD。使用Tukey的Post Hoc分析的单向ANOVA测试评估显著性对未治疗或仅T细胞对照的显著性,*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

[0690] 图48表达EnAd的EpCAM双特异性T细胞衔接器在SKOV3细胞中的细胞毒性

[0691] 在不存在(A)或存在(B)T细胞的情况下,将SKOV3细胞与EnAd或重组病毒一起孵育,并且通过在指定时间点的LDH释放来测量细胞毒性。通过使用Tukey的Post Hoc分析的单向ANOVA检验与未感染的对照孔进行比较来评估显著性,***p<0.001

[0692] 图49识别哪些T细胞负责双特异性T细胞衔接器介导的细胞毒性

[0693] (A)在CD3 T细胞与DLD细胞(5:1)和含有双特异性T细胞衔接器的上清液共培养后24小时后,双特异性T细胞衔接器介导的CD4和CD8细胞的T细胞活化。通过CD69和CD25的表面表达评估活化,并且通过流式细胞术测量。(B)CFSE染色的CD4和CD8 T细胞与DLD细胞共培养并且与含有双特异性T细胞衔接器的上清液一起孵育的增殖应答。孵育5天后,通过FACS分析测量荧光。(C)与DLD细胞和含有双特异性T细胞衔接器的上清液共培养6小时后CD4和CD8细胞的脱粒。在共培养期间将CD107a特异性抗体添加到培养基中,并且通过流式细胞术评估脱粒。(D)通过将DLD细胞与CD4或CD8纯化的T细胞(1:5)和含有双特异性T细胞衔接器的上清液孵育24小时后,通过LDH释放到上清液中来评估CD4或CD8 T细胞亚群的细胞毒性。每种条件以生物学一式三份测量,并且表示为平均值±SD。除非另有说明,否则将

EpCAM双特异性T细胞衔接器治疗与对照双特异性T细胞衔接器进行比较,并且使用Tukey的Post Hoc分析的单向ANOVA测试评估显著性,*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

[0694] 图50在DLD细胞中通过表达EnAd的EpCAM双特异性T细胞衔接器的细胞毒性和T细胞活化

[0695] 在不存在(A)或存在T细胞(B)的情况下感染的DLD细胞的细胞毒性。感染DLD细胞并且与T细胞共培养,并且在特定时间点通过LDH释放测量细胞毒性。(C-D)采集来自(B)的T细胞并且染色活化标记物CD69(C)或CD25(D),并且通过流式细胞术分析。(E-F)从用重组病毒感染的DLD细胞产生的EpCAM双特异性T细胞衔接器的定量。DLD在与CD3+细胞和不同已知量的重组EpCAM双特异性T细胞衔接器(E)共培养中释放(Ab)的LDH标准曲线。平行地,将共培养物与来自3天感染的DLD细胞(F)的稀释上清液(10,000倍)一起孵育。对于EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器和EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器,标准曲线分别允许大约确定在165μg和50μg/百万DLD细胞中产生的EpCAM双特异性T细胞衔接器。通过使用Tukey的Post Hoc分析的单向ANOVA检验与未感染的对照孔进行比较来评估显著性,***p<0.001

[0696] 图51使用细胞系和PBMC衍生的T细胞表征表达EpCAM双特异性T细胞衔接器的溶瘤病毒EnAd

[0697] (A)用亲本EnAd或重组病毒(100vp/细胞)感染DLD细胞,并且在24小时或72小时采集孔。通过使用针对病毒六邻体的qPCR测量基因组来评估复制。(B)随着病毒浓度的增加,用EnAd或重组病毒感染的DLD细胞的细胞毒性。感染5天后通过MTS测定法测量细胞毒性。(C)通过免疫印迹分析评估来自第3天未感染或感染病毒的HEK293A细胞的上清液的转基因表达,并且用抗His抗体探测。(D)用CHO或CHO-EpCAM(E:T 5:1)培养的CD3阳性T细胞和来自(D)的稀释HEK293A上清液的活化标记物CD25的诱导。通过流式细胞术通过CD25的表面表达来测量活化。(E)与来自(D)的HEK293A上清液一起孵育或与CD3纯化的PBMC(E:T 5:1)共培养的CHO或CHO-EpCAM细胞的细胞毒性将HEK293A上清液稀释300倍。通过在孵育24小时后释放到上清液中的LDH评估细胞毒性。每种条件以生物学一式三份测量,并且表示为平均值±SD。每种情况与未治疗的情况相比,使用Tukey的Post Hoc分析的单向ANOVA测试评估显著性,*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

[0698] 图52恶性渗出物的细胞组合物

[0699] (A)代表性图像(胸腔积液样品,来自图57的患者3)证明通过流式细胞术评估的腹水液和渗出液的细胞组成的筛选。(B)表中记录了每种细胞类型的绝对数量(10,000个细胞样品量)。

[0700] 图53表达EpCAM双特异性T细胞衔接器的EnAd在部分EnAd抗性癌细胞系中的优越效力

[0701] (A-B)通过基于xCELLigence的细胞毒性测定,在160小时内实时监测SKOV3细胞的活力。接种SKOV3细胞并且在0小时用EnAd或双特异性T细胞衔接器携带的EnAd病毒感染,未感染的细胞用作阴性对照。在(B)中,感染后2小时添加CD3纯化的PBMC(5:1),并且以15分钟的间隔测量阻抗。(C-D)将CD3纯化的PBMC与用亲本EnAd或重组携带病毒感染的SKOV3细胞(5:1)一起培养。在每个时间点,采集T细胞并且通过流式细胞术分析CD69(C)或CD25(D)的表面表达。(E)延时序列,显示用EnAd、EnAd-CMVEpCAM双特异性T细胞衔接器或未感染的SKOV3癌细胞(未染色)、NHDF成纤维细胞(红色)和CD3纯化的PBMC(蓝色)的共培养物。使用

CellEvent半胱天冬酶3/7检测试剂(绿色)显现细胞凋亡。在Nikon TE 2000-E Eclipse倒置显微镜上以15分钟的间隔拍摄图像,持续96小时。在显示的时间记录代表性图像;原始放大倍数×10;比例尺100μm。(A-D)每种条件以生物学一式三份测量,并且表示为平均值±SD。通过使用Tukey的Post Hoc分析的单向ANOVA测试与未感染对照进行比较来评估显著性,*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

[0702] 图54PD1的表达和PD1抗体对双特异性T细胞衔接器介导的T细胞活化的影响

[0703] (A)通过流式细胞术评估在初始分离胸腔积液后通过内源性T细胞的PD1表达。(B-D)在游离双特异性T细胞衔接器、EnAd或重组病毒的存在下,将来自胸腔积液(来自三个不同患者)的未纯化的总细胞在来自相同胸膜渗出物的100%液体中孵育。5天后,采集总细胞群,并且定量(B)CD3+T细胞数量和(C)CD25+细胞数量。(D)使用流式细胞术测量EpCAM+细胞的数量。通过使用Tukey的Post Hoc分析的单向ANOVA检验与未处理的对照孔进行比较来评估显著性,***p<0.001

[0704] 图55表达EpCAM双特异性T细胞衔接器的EnAd可以选择性地杀死来自化疗预处理的患者的原代人类肿瘤细胞

[0705] (A)EpCAM+细胞或(B)FAP+成纤维细胞的细胞毒性,首先从三个患者的腹水中分离并且离体扩增,然后与重组双特异性T细胞衔接器一起孵育或用EnAd或重组病毒感染。5天后通过流式细胞术测量细胞毒性。(C)用来自(A+B)的腹水衍生的EpCAM+和FAP+细胞培养的CD3阳性T细胞上的活化标记物CD25的诱导。每种条件以生物学一式三份测量,并且表示为平均值±SD。通过使用Tukey的Post Hoc分析的单向ANOVA测试与未处理的进行比较来评估显著性,*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

[0706] 图56EpCAM双特异性T细胞衔接器可以克服腹水液的免疫抑制作用并且活化内源性T细胞

[0707] (A-B)PBMC衍生的T细胞与RPMI培养基中的抗CD3抗体或来自五个卵巢癌患者的100%腹膜腹水液的存在下一起孵育。(A)在24小时分析T细胞活化标记物CD69和CD25的诱导,并且(B)使用流式细胞术通过CD107a外化测量T细胞的脱粒。(C)通过基于xCELLigence的细胞毒性测定,在60小时内实时监测MCF7细胞的活力。接种MCF7细胞,并且在RPMI培养基或100%腹水液#1或#2存在下于25小时与对照或EpCAM双特异性T细胞衔接器一起孵育。未处理的细胞用作阴性对照。同时添加CD3纯化的PBMC(5:1),并且以15分钟的间隔测量阻抗。(D)在游离EpCAM或对照双特异性T细胞衔接器存在下,将来自腹膜腹水的内源性未纯化的总细胞在100%腹水液中孵育。24小时后,采集总细胞群,并且通过流式细胞术测量CD3+/CD69+and CD3+/CD25+细胞的数量。每种条件以生物学一式三份测量,并且表示为平均值±SD。通过使用Tukey的Post Hoc分析的单向ANOVA测试与RPMI(A+B)、未处理(D)或对照双特异性T细胞衔接器(E)进行比较来评估显著性,*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

[0708] 图57表达EpCAM双特异性T细胞衔接器的EnAd可以活化内源性T细胞以杀死恶性胸膜渗出物中的内源性肿瘤细胞

[0709] 在游离双特异性T细胞衔接器、EnAd或重组病毒的存在下,将来自胸腔积液(来自四个不同患者)的未纯化的总细胞在来自相同胸膜渗出物的100%液体中孵育。5天后,采集总细胞群,并且定量(A)CD3+T细胞数量和(B)CD25+细胞数量。(C)使用流式细胞术测量EpCAM+细胞的数量。(D)用EnAd或EnAd-CMVEpCAM双特异性T细胞衔接器治疗后患者3(癌细

胞和淋巴细胞)的胸腔积液细胞的代表性图像(放大倍数×10;比例尺100μm)和流式细胞术分析。(E)在第5天,在与游离重组双特异性T细胞衔接器孵育或用EnAd或重组病毒感染后,使用胸腔积液培养物,通过LEGENDplex人类Th细胞因子组测量细胞因子水平。每种条件以生物学一式三份测量,并且表示为平均值±SD。通过对照样品使用Tukey的Post Hoc分析的单向ANOVA测试与未处理的对照样品进行比较来评估显著性,*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

[0710] 图58示出了使用人类IL-10ELISA MAX试剂盒(Biolegend,430604)在正常血清(NS)或患者恶性渗出液(A:腹膜腹水,P:胸腔积液)中测量的IL-10的量。

[0711] 图59示出了通过流式细胞术测量的患者液体中CD3/28珠介导的PBMC T细胞活化(基于CD69/CD25水平)与正常血清的比较。A:患者渗出液,P:胸腔积液。

[0712] 图60示出了患者体液中CD3/28珠介导的PBMC T细胞脱粒(基于CD107a表达)。A:腹水,P:胸腔积液。

[0713] 图61示出了患者体液中IL-10水平与CD3/CD28珠介导的T细胞脱粒之间的相关性。

[0714] 图62示出了患者体液中EpCAM双特异性T细胞衔接器珠介导的PBMC T细胞活化(基于CD69/CD25表达)。A:腹水,P:胸腔积液。

[0715] 图63示出了患者体液中EpCAM双特异性T细胞衔接器珠介导的PBMC T细胞脱粒(基于CD107a表达)。A:腹水,P:胸腔积液。

[0716] 图64示出了患者体液中EpCAM双特异性T细胞衔接器珠介导的SKOV3的细胞毒性。A:腹水,P:胸腔积液。

[0717] 图65示出了RPMI培养基中EpCAM双特异性T细胞衔接器介导的T细胞活化(基于CD25/CD69表达)与腹水液的关系。

[0718] 图66示出了EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器和EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器在RPMI培养基中诱导T细胞介导的靶细胞溶解与腹水液的关系。((A)CD3+的数量。(B)T细胞的CD25表达。(C)通过流式细胞术确定的EpCAM+细胞数量。

[0719] 图67示出了EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器和EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器在腹水液中诱导T细胞介导的靶细胞溶解的能力(7个患者样品)。

[0720] (A)CD3+的数量。(B)T细胞的CD25表达。(C)通过流式细胞术确定的EpCAM+细胞数量。图例请参见图67A。

[0721] 图68示出了在人类成纤维细胞存在下通过重组FAP双特异性T细胞衔接器蛋白活化T细胞细胞因子产生和用抗CD3/CD28珠进行多克隆活化的比较。(A)通过ELISA测量的IFNγ水平。(B)通过细胞因子珠阵列测量的细胞因子水平。

[0722] 图69FAP靶向双特异性T细胞衔接器诱导T细胞脱粒和FAP+细胞的特异性细胞毒性

[0723] (A)用NHDF细胞(5:1)和(B)含有双特异性T细胞衔接器的上清液对培养物中的T细胞进行脱粒。通过用CD107a特异性抗体培养6小时后CD107a的外化来评估脱粒,并且通过流式细胞术测量。CD3/CD28磁珠用作阳性对照。(C)与T细胞(1:5)和10倍连续稀释的含有双特异性T细胞衔接器的上清液共培养24小时后NHDF细胞的细胞毒性。通过将LDH释放到培养上清液中来评估细胞毒性。(D)在与来自六个健康供体和含有双特异性T细胞衔接器的上清液的PBMC衍生的T细胞(1:5)共培养24小时后,评估LDH释放(左)和T细胞上CD25诱导(右)对NHDF的溶解。

[0724] 图70表达FAP双特异性T细胞衔接器的EnAd选择性杀死FAP+成纤维细胞,并且降低腹膜腹水样品中的TGFb

[0725] (A,B)用PBMC衍生的T细胞和EnAd或重组病毒培养72小时后FAP+成纤维细胞(A)和EpCAM+肿瘤细胞(B)的数目。首先从三名患者腹水中分离腹水细胞并且离体扩增。通过流式细胞术在感染后72小时测量细胞数量。(C)在感染后72小时测量来自(A)的PBMC衍生的CD3细胞上的活化标记物CD25的诱导。(D)使用从(A)采集的上清液通过ELISA测量TGFb的水平。

[0726] 图71示出了FAP双特异性T细胞衔接器蛋白和EnAd-FAP双特异性T细胞衔接器病毒对患者恶性腹水活检样品中内源性肿瘤相关T细胞的活化和相关的FAP+细胞杀伤。(A)通过CD25表达测量的T细胞活化。(B)通过流式细胞术测量的残留数量的FAP+细胞。

[0727] 图72PD-L1阻断抗体对患者样品中双特异性T细胞衔接器介导的T细胞活化的影响

[0728] (A)通过流式细胞术评估在从腹膜腹水初始分离后FAP+细胞上内源性T细胞和PD-L1对PD1的表达。(B)在存在游离双特异性T细胞衔接器、EnAd或重组病毒的情况下,在存在或不存在抗PD-L1阻断抗体的情况下,将来自腹膜腹水的未纯化的总细胞在来自相同渗出物的50％液体中孵育。2天后,采集总细胞群,并且通过流式细胞术定量CD25+T细胞的数量。(C)通过ELISA测量的来自(B,D)的培养上清液中的干扰素γ的量。(D)使用流式细胞术测量(B)中残留的FAP+细胞的数量。

[0729] 图73表达双特异性T细胞衔接器的EnAd活化并且重定向来自患者活组织检查样品的T细胞以溶解NHDF成纤维细胞

[0730] (A)从健康供体或恶性渗出癌活组织检查样品中分离后内源性T细胞的PD-1表达。通过流式细胞术测量PD-1表达。(B)通过流式细胞术测量的PBMC和癌症活组织检查样品的未纯化细胞群中CD3+细胞的比例。(C)在处理后120小时从(B)采集的培养上清液中通过ELISA测量的干扰素γ水平。(D)通过与PBMC或总癌症活检细胞(1:5)和含有双特异性T细胞衔接器的上清液共培养的xCELLigence细胞毒性测定,在130小时内实时监测NHDF成纤维细胞的活力。

[0731] 图74示出了免疫抑制性腹水液样品对FAP双特异性T细胞衔接器介导的和抗CD3/CD28珠介导的PBMC T细胞活化的影响。(A)用抗CD3/Cd28磁珠活化的PBMC T细胞。(B)在NHDF细胞存在下用对照或FAP双特异性T细胞衔接器活化的PBMC T细胞。NS:正常血清,A:腹膜腹水。

[0732] 图75表达EnAd的FAP双特异性T细胞衔接器使患者腹水中的CD11b+巨噬细胞极化为更炎性的表型

[0733] (A)在存在游离双特异性T细胞衔接器或表达病毒的双特异性T细胞衔接器的情况下,将来自腹水样品的未纯化的总细胞在50％腹水液中孵育。干扰素γ治疗用作阳性对照。3天后,采集总细胞群并且通过流式细胞术测量CD3+细胞上活化标记物CD25的诱导。(B)通过ELISA测量来自(A)的培养上清液中的干扰素γ的水平。(C)在第3天,通过流式细胞术测量来自(A)的CD11b+细胞上的CD68、CD86、CD206和CD163的表达水平。来自一式三份的代表性流式细胞术光谱与完整数据集一起显示。

[0734] 图76实体前列腺肿瘤的结构和细胞组成的表征

[0735] (A)EpCAM染色,(B)CD8染色,(C)FAP染色。(D)用表达病毒的双特异性T细胞衔接器处理后前列腺肿瘤切片内CD25诱导的代表性免疫组织化学图像。用Leica振动切片机将肿

瘤核切成300μM厚度,培养并且在插入物中感染,并且在处理7天后采集。(E)通过ELISA测量的组织切片培养基中IFNg的水平。在指定的时间点从恶性和良性组织的切片培养物中采集上清液。(F)通过ELISA测量的恶性和良性组织的组织培养基中IL-2的水平。

[0736] 图77A到图77C示出了实例33中使用的转基因盒的示意图。

[0737] 图77D示出了指示NG-611、NG-612和NG-617处理的肿瘤细胞中经每个细胞检测病毒基因组的数目的图。

[0738] 图78示出了与NG-612、enadenotucirev或未处理的对照上清液相比,在用NG-611病毒颗粒处理后24小时、48小时或72小时与表达SKOV细胞的EpCam和从A549细胞采集的上清液共培养后表达CD69(a)、CD25(b)、HLA-DR(c)、CD40L(d)或细胞表面CD107a(e)的T细胞的百分比。

[0739] 图79示出了与NG-611、enadenotucirev或未处理的对照上清液相比,在用NG-612病毒颗粒处理后24小时、48小时或72小时与表达MRC-5细胞的FAP和从A549细胞采集的上清液共培养后表达CD69(a)、CD25(b)、HLA-DR(c)、CD40L(d)或细胞表面CD107a(e)的T细胞的百分比。

[0740] 图80示出了表达EpCAM和FAP的MRC-5细胞的百分比

[0741] 图81示出了在用NG-611、NG-612或enadenotucirev病毒颗粒或未处理的对照上清液处理后24小时、48小时或72小时与SKOV细胞(A)或MRC-5细胞(B)的T细胞共培养物的上清液中的IFNγ表达,其与从A549细胞采集的上清液一起孵育。

[0742] 图82示出了体内表达病毒的双特异性T细胞衔接器的抗肿瘤功效和免疫活化。(a)用盐水、enadenotucirev或NG-611治疗的小鼠的肿瘤体积。(b)与enadenotucirev治疗或未治疗的对照相比,NG-611治疗的肿瘤中CD8与CD4 T细胞的比例。

[0743] 图83示出了转基因盒的示意图。(a)NG-615,(b)NG-640,(c)NG-641。

[0744] 图84示出了指示NG-612和NG-615处理的肿瘤细胞中经每个细胞检测病毒基因组的数目的图。

[0745] 图85示出了IFNα、MIP1α和Flt3 L在NG-615的细胞上清液中与enadenotucirev与未处理的对照肿瘤细胞的上清液的表达。

[0746] 图86示出了与NG-612、enadenotucirev或未处理的对照上清液相比,在用NG-615病毒颗粒处理后24小时、48小时或72小时与表达MRC-5细胞的FAP和从A549细胞采集的上清液共培养后表达CD69(a)、CD25(b)、HLA-DR(c)、CD40L(d)或细胞表面CD107a(e)的T细胞的数量。

[0747] 图87示出了在用NG-612、NG-615或enadenotucirev病毒颗粒或未处理的对照上清液处理后24小时、48小时或72小时与MRC-5细胞的T细胞共培养物的上清液中的IFNγ表达,其与从A549细胞采集的上清液一起孵育。

[0748] 图88示出了NG-618转基因盒的示意图

[0749] 图89示出了在用NG-611、NG-612、NG-615或enadenotucirev病毒颗粒处理后72小时与从A549细胞采集的上清液孵育后,MRC-5细胞上表面FAP表达(a)或SKOV细胞上的EpCam表达(b)的检测。

[0750] 图90示出了与Enadenotucirev或未处理的对照相比,在用NG-618病毒颗粒处理后72小时与表达MRC-5细胞的FAP和从A549细胞采集的上清液共培养后表达CD24(a)、CD40L

(b)或细胞表面CD107a(c)的T细胞的百分比。

[0751] 图91示出了与Enadenotucirev或未处理的对照相比,在用NG-618病毒颗粒处理后72小时与表达SKOV细胞的EpCam和从A549细胞采集的上清液共培养后表达CD24(a)、CD40L(b)或细胞表面CD107a(c)的T细胞的百分比。

[0752] 图92示出了与enadenotucirev或未处理的对照相比,在用NG-618病毒颗粒处理后72小时与T细胞和从A549细胞采集的上清液共培养后死亡的MRC-5(a)或SKOV(b)细胞的百分比。

[0753] 序列

[0754] SEQ ID NO:1抗EpCAM双特异性T细胞衔接器DNA编码序列,具有N-末端信号序列和C-末端deca-His亲和标签

[0755] SEQ ID NO:2抗EpCAM双特异性T细胞衔接器蛋白质序列,具有N-末端信号序列和C-末端deca-His亲和标签

[0756] SEQ ID NO:3抗FAP双特异性T细胞衔接器DNA编码序列,具有N末端信号序列和C末端deca-His亲和标签

[0757] SEQ ID NO:4抗FAP双特异性T细胞衔接器氨基酸序列,具有N末端信号序列和C末端deca-His亲和标签

[0758] SEQ ID NO:5:对照(抗FHA)双特异性T细胞衔接器DNA编码序列,具有N末端信号序列和C末端deca-His亲和标签

[0759] SEQ ID NO:6:对照(抗FHA)双特异性T细胞衔接器氨基酸序列,具有N末端信号序列和C末端deca-His亲和标签

[0760] SEQ ID NO:7:抗CD3 ScFv氨基酸序列

[0761] SEQ ID NO:8:抗CD3 VH

[0762] SEQ ID NO:9:抗CD3 VL

[0763] SEQ ID NO:10:抗CD3 ScFv连接子序列

[0764] SEQ ID NO:11:抗FAP ScFv

[0765] SEQ ID NO:12:抗FAP VL结构域

[0766] SEQ ID NO:13:抗FAP VH结构域

[0767] SEQ ID NO:14:抗FAP和抗EpCAM连接子序列

[0768] SEQ ID NO:15:双特异性T细胞衔接器前导序列

[0769] SEQ ID NO:16:抗EpCAM ScFv

[0770] SEQ ID NO:17:抗EpCAM VL

[0771] SEQ ID NO:18:抗EpCAM VH

[0772] SEQ ID NO:19:对照双特异性T细胞衔接器(抗FHA)

[0773] SEQ ID NO:20:对照(抗FHA)ScFv

[0774] SEQ ID NO:21:对照(抗FHA)VL

[0775] SEQ ID NO:22:对照(抗FHA)VH

[0776] SEQ ID NO:23:对照(抗FHA)ScFv连接子序列

[0777] SEQ ID NO:24:Deca-His标签序列

[0778] SEQ ID NO:25:FAP双特异性T细胞衔接器-P2A-RFP(ITALICS＝前导,BOLD＝弗林

蛋白酶切割位点,UNDERLINE＝P2A序列,小写＝RFP)

[0779] SEQ ID NO:26:对照(抗FHA)双特异性T细胞衔接器-P2A-RFP(ITALICS＝前导,BOLD＝弗林蛋白酶切割位点,UNDERLINE＝P2A序列,小写＝RFP)

[0780] SEQ ID NO:27:人类EpCAM DNA编码序列

[0781] SEQ ID NO:28:人类EpCAM氨基酸序列

[0782] SEQ ID NO:29:人类FAP DNA编码序列

[0783] SEQ ID NO:30:人类FAP氨基酸序列

[0784] SEQ ID NO:31:CMV启动子序列

[0785] SEQ ID NO:32:SV40晚期多腺苷酸化序列

[0786] SEQ ID NO:33:零序列

[0787] SEQ ID NO:34:零序列

[0788] SEQ ID NO:35:零序列

[0789] SEQ ID NO:36:零序列

[0790] SEQ ID NO:37:零序列

[0791] SEQ ID NO:38EnAd基因组

[0792] SEQ ID NO:39B_X DNA序列对应于并且包含EnAd基因组的bp28166到bp 28366

[0793] SEQ ID NO:40B_Y DNA序列对应于并且包含EnAd基因组的bp29345到bp 29379

[0794] SEQ ID NO:41HIS-Tag

[0795] SEQ ID NO:42剪接受体序列。

[0796] SEQ ID NO:43SV40多腺苷酸化序列

[0797] SEQ ID NO:44EpCam双特异性T细胞衔接器核酸序列(OKT3)

[0798] SEQ ID NO:45FAP双特异性T细胞衔接器核酸序列(OKT3)

[0799] SEQ ID NO:46FAP双特异性T细胞衔接器核酸序列(aCD3)

[0800] SEQ ID NO:47NG-611转基因盒

[0801] SEQ ID NO:48NG-612转基因盒

[0802] SEQ ID NO:49NG-613转基因盒

[0803] SEQ ID NO:50限制性位点插入(B_X)

[0804] SEQ ID NO:51限制性位点插入(B_Y)

[0805] SEQ ID NO:52CMV启动子序列

[0806] SEQ ID NO:53PGK启动子序列

[0807] SEQ ID NO:54CBA启动子序列

[0808] SEQ ID NO:55短剪接受体(SSA)DNA序列

[0809] SEQ ID NO:56剪接受体(SA)DNA序列

[0810] SEQ ID NO:57分支剪接受体(bSA)DNA序列

[0811] SEQ ID NO:58Kozak序列(零序列)

[0812] SEQ ID NO:59起始密码子的实例

[0813] SEQ ID NO:60内部核糖体进入序列(IRES)

[0814] SEQ ID NO:61P2A肽

[0815] SEQ ID NO:62F2A肽

[0816] SEQ ID NO:63E2A肽

[0817] SEQ ID NO:64T2A肽

[0818] SEQ ID NO:65多聚腺苷酸化(polyA)序列

[0819] SEQ ID NO:66前导序列

[0820] SEQ ID NO:67前导序列

[0821] SEQ ID NO:68IFNΓ氨基酸序列

[0822] SEQ ID NO:69IFNα氨基酸序列

[0823] SEQ ID NO:70TNFα氨基酸序列

[0824] SEQ ID NO:71对应于EnAd基因组的E2B区的DNA序列(bp 10355到bp 5068)

[0825] SEQ ID NO:72:抗EpCAM双特异性T细胞衔接器DNA编码序列,具有N末端信号序列和C末端deca-His亲和标签

[0826] SEQ ID NO:73:抗EpCAM双特异性T细胞衔接器蛋白质序列,具有N末端信号序列,不具有C末端deca-His亲和标签

[0827] SEQ ID NO:74:抗FAP双特异性T细胞衔接器DNA编码序列,具有N末端信号序列,不具有C末端deca-His亲和标签

[0828] SEQ ID NO:75:抗FAP双特异性T细胞衔接器氨基酸序列,具有N末端信号序列,不具有C末端deca-His亲和标签

[0829] SEQ ID NO:76:对照(抗FHA)双特异性T细胞衔接器DNA编码序列,具有N末端信号序列,不具有C末端deca-His亲和标签

[0830] SEQ ID NO:77:对照(抗FHA)双特异性T细胞衔接器氨基酸序列,具有N末端信号序列,不具有C末端deca-His亲和标签

[0831] SEQ ID NO:78:对照双特异性T细胞衔接器(抗FHA),不具有C末端deca-His亲和标签的

[0832] SEQ ID NO:79:零序列

[0833] SEQ ID NO:80:零序列

[0834] SEQ ID NO:81:零序列

[0835] SEQ ID NO:82:零序列

[0836] SEQ ID NO:83:EpCam双特异性T细胞衔接器核酸序列(OKT3)

[0837] SEQ ID NO:84:零序列

[0838] SEQ ID NO:85:FAP双特异性T细胞衔接器核酸序列(OKT3)

[0839] SEQ ID NO:86:零序列

[0840] SEQ ID NO:87:FAP双特异性T细胞衔接器核酸序列(aCD3)

[0841] SEQ ID NO:88:NG-611转基因盒

[0842] SEQ ID NO:89:NG-612转基因盒

[0843] SEQ ID NO:90:NG-613转基因盒

[0844] SEQ ID NO:91:NG-614转基因盒

[0845] SEQ ID NO:92:NG-617转基因盒

[0846] SEQ ID NO:93:EpCam双特异性T细胞衔接器氨基酸序列(OKT3)

[0847] SEQ ID NO:94:FAP双特异性T细胞衔接器氨基酸序列(OKT3)

[0848] SEQ ID NO:95:FAP双特异性T细胞衔接器氨基酸序列(aCD3)

[0849] SEQ ID NO:96:零序列

[0850] SEQ ID NO:97:零序列

[0851] SEQ ID NO:98:零序列

[0852] SEQ ID NO:99:零序列

[0853] SEQ ID NO:100:零序列

[0854] SEQ ID NO:101:零序列

[0855] SEQ ID NO:102:零序列

[0856] SEQ ID NO:103:零序列

[0857] SEQ ID NO:104:零序列

[0858] SEQ ID NO:105:Flt3L核酸序列

[0859] SEQ ID NO:106:零序列

[0860] SEQ ID NO:107:MIP1α核酸序列

[0861] SEQ ID NO:108:柔性连接子序列

[0862] SEQ ID NO:109:IFNα核酸序列

[0863] SEQ ID NO:110:CXCL10核酸序列

[0864] SEQ ID NO:111:CXCL9核酸序列

[0865] SEQ ID NO:112:NG-615转基因盒

[0866] SEQ ID NO:113:NG-640转基因盒

[0867] SEQ ID NO:114:NG-641转基因盒

[0868] SEQ ID NO:115:FLT3L氨基酸序列

[0869] SEQ ID NO:116:MIP1α氨基酸序列

[0870] SEQ ID NO:117::IFNα氨基酸序列

[0871] SEQ ID NO:118:CXCL9氨基酸序列

[0872] SEQ ID NO:119:CXCL10氨基酸序列

[0873] SEQ ID NO:120:NG-618基因组

[0874] SEQ ID NO:121:NG-618EpCam双特异性T细胞衔接器核酸序列

[0875] SEQ ID NO:122:NG-618FAP双特异性T细胞衔接器核酸序列

[0876] SEQ ID NO:123:NG-618转基因盒

[0877] SEQ ID No:124到297是连接子序列

[0878] 实例

[0879] NG-601腺病毒在CMV启动子的控制下将EpCam双特异性T细胞衔接器编码在位置B_Y中

[0880] NG-602腺病毒将EpCam双特异性T细胞衔接器和剪接受体编码在位置B_Y中

[0881] NG-605腺病毒在CMV启动子的控制下将FAP双特异性T细胞衔接器编码在位置B_Y中

[0882] NG-606腺病毒将FAP双特异性T细胞衔接器和剪接受体编码在位置B_Y中

[0883] NG-611腺病毒将EpCam双特异性T细胞衔接器和SSA编码在位置B_Y中

[0884] NG-612腺病毒将FAP双特异性T细胞衔接器和SSA编码在位置B_Y中

[0885] NG-613腺病毒将FAP双特异性T细胞衔接器和SA编码在位置B_Y中NG-614腺病毒将

FAP双特异性T细胞衔接器和SA编码在位置B_Y中(对NG-613具有不同的CD3特异性)

[0886] NG-615腺病毒将FAP双特异性T细胞衔接器、FLt3配体、干扰素α、MIPα和SSA编码在位置B_Y中。

[0887] NG-616腺病毒将FAP双特异性T细胞衔接器、FLt3配体、干扰素α、MIPα和SA编码在位置B_Y中。

[0888] NG-617腺病毒将FAP双特异性T细胞衔接器和SSA编码在位置B_Y中

[0889] NG-640腺病毒将FAP双特异性T细胞衔接器、CXCL10、CXCL9和SSA编码在位置B_Y中。

[0890] NG-641腺病毒将FAP双特异性T细胞衔接器、CXCL10、CXCL9和干扰素α编码在位置B_Y中。

[0891] 实例1

[0892] 设计重组双特异性T细胞衔接器并且如本实例中所描述制备蛋白质。

[0893] 双特异性T细胞衔接器工程化

[0894] 通过将具有不同特异性的两个单链抗体片段(ScFv)与柔性Gly_4Ser连接子连接来生成双特异性T细胞衔接器。ScFv是通过连接子从亲本单克隆抗体连接V_H和V_L结构域而创建的。每个双特异性T细胞衔接器设计有用于哺乳动物分泌的N-末端信号序列和用于检测和纯化的C-末端十八组氨酸亲和标签。通过标准DNA克隆技术工程化双特异性T细胞衔接器并且将其插入蛋白质表达载体中(图1)。抗EpCAM双特异性T细胞衔接器是来自专利WO 2005040220(其中SEQ ID NO:63)的抗EpCAM双特异性T细胞衔接器,其中添加了信号序列和亲和标签。使用来自专利WO2010037835A2的抗FAP ScFv和来自专利WO 2005040220(其中的SEQ ID 63)的抗CD3 ScFv从头创建抗FAP双特异性T细胞衔接器,其中添加了信号序列和亲和标签。对照双特异性T细胞衔接器使用来自Hussein等人,2007的抗FHA(来自百日咳博德特氏菌的丝状血细胞凝集素)ScFv(Hussein AH等人(2007)“针对百日咳博德特氏菌表面粘附素丝状血凝素和百日咳杆菌素的单链可变片段抗体的构建和表征”。感染免疫75,5476-5482),以及来自专利WO 2005040220(其中SEQ ID NO:63)的抗CD3 ScFv,其中添加了信号序列和亲和标签。这些双特异性T细胞衔接器的DNA编码和氨基酸序列是SEQ ID NO:1到6。

[0895] 重组双特异性T细胞衔接器生产

[0896] 通过使用CMV启动子(SEQ ID NO:31)将各序列克隆到pSF-CMV载体中以驱动蛋白质表达来产生重组双特异性T细胞衔接器蛋白质(图1)。通过NanoDrop测量质粒、pSF-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器、pSF-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器和pSF-CMV-对照双特异性T细胞衔接器(表2)的质粒DNA浓度。包含空pSF-CMV载体作为阴性对照。用4mL OptiMEM稀释各54.7μg。将109.2ug PEI(线性,MW 25000,美国Polysciences公司)在4mL OptiMEM培养基中稀释,并且与4ml稀释的DNA混合以生成DNA-PEI复合物(DNA:PEI比为1:2(w/w))。在室温下孵育20分钟后,用OptiMEM将复合物混合物补足到18mL,并且将此转染混合物添加到含有90％汇合的Ad293细胞的T175烧瓶中。将细胞与转染混合物在37℃、5％Co2孵育4小时后,将30mL细胞培养基(补充有谷氨酰胺的DMEM高葡萄糖,无酚红)添加到细胞中,并且将烧瓶在37℃、5％ CO_2下孵育48小时。将另一个细胞烧瓶与pSF-CMV-GFP平行转染以确保有效的转染效率。为了采集分泌的蛋白质,收集转染细胞的上清液,并且在4℃下以350g离心5分钟以去除细胞组分(Allegra X-15R,贝克曼库尔特有限公司(Beckman Coulter))。将上清液转移到10kMWCO Amicon Ultra-15离心过滤装置(密理博公司(Millipore))中。在4750rpm和4

℃下旋转后,用流过物调节渗余物的体积以获得高50倍的浓度。将等分的浓缩蛋白质储存在-80℃。

[0897] 表2

[0898] 在命名构建体中用作前缀的“p”指示构建体是质粒。

[0899]

质粒 ID	编码序列 SEQ ID NO:	[质粒 DNA] ng/ml
pSF-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器	SEQ ID NO：1	3717
pSF-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器	SEQ ID NO：3	6700
pSF-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器	SEQ ID NO：5	5300
pSF-Lenti-EpCAM	SEQ ID NO：27	2529.3
pSF-Lenti-FAP	SEQ ID NO：29	659.6

[0900] 重组双特异性T细胞衔接器检测

[0901] 为了检测双特异性T细胞衔接器,可以使用蛋白质印迹技术用抗His抗体探测C-末端的十八组氨酸亲和标签。用溶解缓冲液调节蛋白质样品到终体积15μL,包含含有β-巯基乙醇和SDS的2.5μL 6x Laemmli SDS样品缓冲液。将样品在95℃孵育5分钟以使蛋白质变性并且加载到15孔10％预制聚丙烯酰胺凝胶(Mini-PROTEAN TGX预制凝胶,英国生命科学公司(BioRad))上。在Mini-PROTEAN Tetra系统(英国生命科学公司)内的1x运行缓冲液中,凝胶在180V下运行45分钟。将来自SDS凝胶的蛋白质通过在300mA和4℃下90分钟内在微型反式印迹细胞(Mini Trans-Blot Cell)(英国生命科学公司)内的1x转移缓冲液中湿电印迹转移到硝酸纤维素膜上。在冰袋存在下执行转移以限制热量。然后将硝酸纤维素膜用PBS-T中的5％牛奶在摇床上在室温下封闭1小时,并且用抗His(C-末端)抗体(小鼠α-6xHis,克隆3D5,英国英杰公司(Invitrogen),#46-0693)探测,在PBS/5％牛奶中1:5000稀释。在摇床上于4℃孵育过夜后,洗涤膜并且用HRP标记的多克隆次级α-小鼠免疫球蛋白抗体(在PBS/5％牛奶中1:10.000,Dako公司,#P0161)在室温下探测1小时。为了可视化,按照制造商的说明应用SuperSignal West Dura延长持续时间基板(英国赛默飞世尔科技公司)并且暴露于X射线胶片并在自动胶片处理器中显影。结果证明了用双特异性T细胞衔接器表达质粒转染的Ad293细胞中双特异性T细胞衔接器蛋白的表达和分泌,但不是亲本载体。

[0902] 重组双特异性T细胞衔接器定量

[0903] 为了测量重组双特异性T细胞衔接器蛋白的量,使用斑点印迹技术将双特异性T细胞衔接器信号与His标记的(C-末端10His)蛋白标准品(10x His标记的人类组织蛋白酶D,Biolegend公司,#556704)进行比较。制备两倍系列稀释的双特异性T细胞衔接器样品和蛋白质标准品,并且将1.5μL各自直接施加到硝酸纤维素膜上并且空气干燥20分钟。然后执行上文所描述的用于蛋白质印迹的阻断和染色方案。调节蛋白质标准品的摩尔浓度以表示双特异性T细胞衔接器浓度为250μg/mL。结果(图2A)证明了用双特异性T细胞衔接器表达质粒转染的Ad293细胞中双特异性T细胞衔接器蛋白的表达和分泌。

[0904] FAP结合ELISA

[0905] 通过酶联免疫吸附测定(ELISA)评估从用pSF-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器或pSF-CMV-对照双特异性T细胞衔接器转染的细胞分泌的FAP双特异性T细胞衔接器和对照

(抗FHA)双特异性T细胞衔接器(SEQ ID NO:4和6)的FAP结合活性。包含空pSF-CMV载体上清液作为阴性对照。通过在4℃下用PBS缓冲液中的人类FAP/seprase蛋白(100ng/孔,义翘神州科技有限公司(Sino Biological Inc),10464-H07H-10)涂覆过夜来制备ELISA板(Nunc Immuno MaxiSorp 96孔微孔板)。用PBS 0.05%吐温20在所有后续结合步骤之间洗涤板。将板在室温下用5%BSA的PBS 0.05%吐温20封闭1小时。将等分的双特异性T细胞衔接器蛋白或从空pSF-CMV载体转染的孔采集的蛋白质稀释10倍到PBS/5%BSA/0.05%吐温20中。将所有样品添加到FAP涂覆的板中并且在室温下孵育2小时。将检测抗体,抗His(C末端)抗体(小鼠抗6xHis,克隆3D5,英杰公司,英国,#46-0693)以1:1000稀释,并且在室温下施加1小时。然后在室温下施加HRP缀合的抗小鼠Fc(在PBS/5%牛奶中1:1000,Dako公司)1小时,接着用HRP底物溶液3.3.5.5'-四甲基乙二胺(TMB,赛默飞世尔科技公司)执行HRP检测。使用终止溶液终止反应,并且在读板器上在450nm处测量显色。针对FAP双特异性T细胞衔接器、对照双特异性T细胞衔接器和空载体上清液绘制450nm处的吸光度,证明FAP双特异性T细胞衔接器与FAP蛋白的特异性结合。结果(图2B)示出了FAP双特异性T细胞衔接器而非对照双特异性T细胞衔接器与重组FAP蛋白的特异性结合。

[0906] EpCAM结合ELISA

[0907] 通过酶联免疫吸附测定(ELISA)评估从用pSF-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器或pSF-CMV-对照双特异性T细胞衔接器转染的细胞分泌的EpCAM双特异性T细胞衔接器和对照双特异性T细胞衔接器(SEQ ID NO:2和6)的EpCAM结合活性。包含空pSF-CMV载体上清液作为阴性对照。通过在4℃下用PBS缓冲液中的人类EpCAM/TROP-1蛋白(50ng/孔,义翘神州科技有限公司(Sino Biological Inc),#10694-H02H-50)涂覆过夜来制备ELISA板(Nunc Immuno MaxiSorp 96孔微孔板)。用PBS 0.05%吐温20在所有后续结合步骤之间洗涤板。将板在室温下用5%BSA的PBS 0.05%吐温20封闭1小时。将等分的双特异性T细胞衔接器蛋白或从空pSF-CMV载体转染的孔采集的蛋白质稀释10倍到PBS/5%BSA/0.05%吐温20中。将所有样品添加到EpCAM涂覆的板中并且在室温下孵育2小时。将检测抗体,抗His(C末端)抗体(小鼠抗6xHis,克隆3D5,英杰公司,英国,#46-0693)以1:5000稀释,并且在室温下施加1小时。然后在室温下施加HRP缀合的抗小鼠Fc(在PBS/5%牛奶中1:1000,Dako公司)1小时,接着用HRP底物溶液3.3.5.5'-四甲基乙二胺(TMB,赛默飞世尔科技公司)执行HRP检测。使用终止溶液终止反应,并且在读板器上在450nm处测量显色。针对EpCAM双特异性T细胞衔接器、对照双特异性T细胞衔接器和空载体上清液绘制450nm处的吸光度证明EpCAM双特异性T细胞衔接器与重组EpCAM的特异性结合。结果(图2C)示出了EpCAM双特异性T细胞衔接器而非对照双特异性T细胞衔接器与重组EpCAM蛋白的特异性结合。

[0908] 实例2

[0909] 在构建携带双特异性T细胞衔接器转基因的EnAd病毒之前,在许多不同的测定中评估重组双特异性T细胞衔接器蛋白的功能活性。

[0910] 人类外周血单个核细胞(PBMC)的分离

[0911] 通过密度梯度离心从健康供体的新鲜人类血液样品或从牛津的英国国家医疗服务系统血液与移植管理处(NHS Blood和Transplant UK)获得的全血白细胞锥体分离人类PBMC。在任一种情况下,将样品用PBS1:2稀释,并且将25mL此混合物在50mL离心管中分层到13mL Ficoll(1.079g/mL,淋巴细胞分离液(Ficoll-Paque Plus),GE Healthcare公司)上。

将样品在22℃下以1600rpm离心30分钟(Allegra X-15R,Beckman Coulter),用最低减速设置以保持相分离。离心后,可以观察到4层,其中包含在顶端的等离子体层,下面是含有PBMC的界面,底部是一个Ficoll层和一层红细胞和粒细胞。使用巴斯德吸管收集PBMC,并且用PBS(1200rpm,室温下10分钟)洗涤两次,并且重悬于补充有10% FBS的RPMI培养基中。

[0912] 分离CD3阳性T细胞

[0913] 根据制造商的方案,使用Pan T细胞分离试剂盒(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec),#130-096-535)通过耗尽非CD3细胞从PBMC中提取CD3阳性($CD3^+$)T细胞。

[0914] 处理原发性腹水样品

[0915] 从丘吉尔医院(牛津大学医院)的肿瘤病房接收来自多种适应症的患者的原发性人类腹水样品,包含但不限于卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌和胃癌。在收到样品后,将细胞和流体部分分离,将等分试样的流体冷冻在-20℃下以便储存和将来的分析。按照制造商的说明,用红细胞溶解缓冲液(罗氏公司(Roche),#11814389001)处理细胞级分以去除红细胞。通过对EpCAM、EGFR、FAP、CD45、CD11b、CD56、CD3、CD4、CD8、PD1和CTLA4的染色确定每个样品中存在的细胞类型,并且通过流式细胞术分析。然后将新鲜细胞用于离体T细胞活化和靶细胞溶解实验。在一些情况下,将细胞在补充有10% FBS的DMEM中传代以用于后续实验。

[0916] 细胞系维护

[0917] 将所有细胞系维持在表3中指定的DMEM(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich),英国)或RPMI培养基(西格玛奥德里奇公司,英国)中,在潮湿的培养箱(MCO-17AIC,三洋公司(Sanyo))中于37℃和5% CO_2下补充有10%(v/v)胎牛血清(FBS,Gibco™)和1%(v/v)青霉素/链霉素(10mg/mL,西格玛奥德里奇公司,英国),除非另有说明。通过用胰蛋白酶/EDTA(0.05%胰蛋白酶0.02%EDTA,西格玛奥德里奇公司,英国)酶促解离,每2天到3天将细胞分开,然后达到汇合。在此过程中,抽吸培养基,并且用15ml PBS洗涤细胞,并且随后用2mL胰蛋白酶/EDTA在37℃处理细胞2分钟到10分钟。用10mL含有10% FBS的DMEM中和胰蛋白酶,并且将一部分细胞转移到含有新鲜培养基的新烧瓶中。对于常规细胞培养,培养基补充有10% FBS,用于2%FBS的感染和病毒质粒转染以及用于没有FBS补充的重组双特异性T细胞衔接器质粒转染。

[0918] 表3

[0919]

细胞系	细胞的起源	培养培养基	资源

[0920]

腹水来源的细胞系	人类原发性腹水	DMEM	英国国家医疗服务系统血液与移植管理处
BTC100	人类原发性肺癌相关成纤维细胞（CAF）	DMEM	牛津大学
CHO-K1	中国仓鼠卵巢，贴壁	RPMI	ATCC
CHO-K1 稳定细胞系	中国仓鼠卵巢，贴壁	RPMI	-
DLD1	人类结肠直肠腺癌	RPMI	ATCC
HEK 293A	人类胚肾，贴壁	DMEM	ATCC
HEK 293A 稳定细胞系	人类胚肾，贴壁	DMEM	-
HEK 293T	人类胚肾，贴壁	DMEM	ATCC
MCF-7	人类，乳腺，乳房，贴壁	DMEM	ATCC
正常人类真皮成纤维细胞（NHDF）	正常成人人类原发真皮成纤维细胞	DMEM	ATCC
SKOV3	人类卵巢腺癌	DMEM	ATCC

[0921] 统计

[0922] 在比较两个条件的情况下,使用t检验执行统计分析。在所有其它情况下,通过使用单向ANOVA执行统计分析。

[0923] 通过重组FAP双特异性T细胞衔接器表征人类T细胞活化

[0924] 比较了FAP双特异性T细胞衔接器在存在或不存在正常人类皮肤成纤维细胞(NHDF)细胞的情况下诱导T细胞活化的能力。在单独的培养基或300ng/mL FAP或对照双特异性T细胞衔接器的存在下,将人类$CD3^+$T细胞(96孔U-底板中每孔70,000个细胞)单独或与NHDF细胞(10:1T:NHDF)共培养。将细胞在37℃共培养24小时,并且随后用无酶细胞解离缓冲液(赛默飞世尔科技公司,#13151014)采集。然后通过抗体染色和流式细胞术分析$CD45^+$T细胞上CD69(图3A)和CD25(图3B)的表达水平,并且表示为几何平均荧光(gMFI)值。将板固定的抗CD3抗体(7.5μg/mL)用作T细胞活化的阳性对照。FAP双特异性T细胞衔接器选择性诱导T细胞上活化标记物CD69和CD25的表达,指示其能够活化T细胞。

[0925] 在第二个类似的实验中,在与NHDF细胞(200,000个$CD3^+$细胞加上96孔板的孔中的40,000个NHDF)和300ng/mL FAP或对照双特异性T细胞衔接器共培养6小时后,通过细胞内细胞因子染色评估T细胞。对$CD45^+$T细胞进行细胞内染色以进行IFNγ表达,在采集前5小时将布雷菲德菌素A添加到培养基中。作为阳性对照,用可溶性PMA(10ng/mL)和离子霉素(1μg/mL)刺激T细胞。图4A中示出的结果指示,与对照双特异性T细胞衔接器相比,在NHDF存在下的FAP双特异性T细胞衔接器导致显著更高数量的表达IFNγ的T细胞。

[0926] 实例3

[0927] 进行与实例2中相似的一组实验以表征重组EpCAM双特异性T细胞衔接器蛋白。

[0928] 通过重组EpCAM双特异性T细胞衔接器表征人类T细胞活化

[0929] 比较了在存在或不存在EpCAM阳性DLD细胞系的情况下EpCAM双特异性T细胞衔接器诱导T细胞活化的能力。在单独的培养基或600ng/mL EpCAM或对照双特异性T细胞衔接器的存在下,将人类$CD3^+$T细胞(96孔U-底板中每孔70,000个细胞)单独或与DLD细胞(10:1T:DLD)共培养。将细胞在37℃共培养24小时,并且随后用无酶细胞解离缓冲液采集。然后通过抗体染色和流式细胞术分析$CD45^+$T细胞上CD69和CD25的表达水平,并且将数据表示为几何

平均荧光(gMFI)值。将板固定的抗CD3抗体(7.5μg/mL)用作T细胞活化的阳性对照。EpCAM双特异性T细胞衔接器选择性诱导T细胞上活化标记物CD69和CD25的表达,指示其能够活化T细胞(图4B和图C)。

[0930] 在类似的实验中,在与DLD细胞(200,000个$CD3^+$T细胞加上96孔板的每孔40,000个DLD细胞)和300ng/mL EpCAM或对照双特异性T细胞衔接器共培养6小时后,通过细胞内细胞因子染色评估T细胞。对$CD45^+$T细胞进行细胞内染色以进行IFNγ表达,在采集前5小时将布雷菲德菌素A添加到培养基中。作为阳性对照,用可溶性PMA(10ng/mL)和离子霉素(1μg/mL)刺激T细胞。结果示出了与对照双特异性T细胞衔接器相比,在DLD存在下的EpCAM双特异性T细胞衔接器导致显著更高数量的表达IFNγ的T细胞(图5A)。

[0931] 在另一个类似的实验中,来自8个不同献血者的PBMC用于评估双特异性T细胞衔接器介导的T细胞活化中的供体依赖性变异。在单独培养基或300ng/mL对照或EpCAM双特异性T细胞衔接器存在下,将DLD(7,000个细胞)与100,000个PBMC在U形底96孔板中共培养。将细胞在37℃共培养24小时,并且随后采集。然后通过抗体染色和流式细胞术分析$CD45^+$T细胞上CD69和CD25的表达水平,并且将数据表示为几何平均荧光(gMFI)值。结果示出了EpCAM双特异性T细胞衔接器诱导来自所有8个供体的$CD3^+$T细胞中活化标记物CD69和CD25的表达(图5B和图C)。

[0932] 实例4

[0933] 在此实例中,评估了重组FAP双特异性T细胞衔接器活化的T细胞诱导成纤维细胞靶细胞死亡的能力。

[0934] FAP双特异性T细胞衔接器诱导T细胞介导的FAP阳性细胞系和原发细胞的溶解

[0935] 在单独培养基或300ng/mL对照或FAP双特异性T细胞衔接器存在下,将NHDF(7,000个细胞)与70,000个T细胞在U形底96孔板的孔中共培养。共培养24小时后,采集上清液,并且按照制造商的说明通过LDH测定法确定细胞毒性。图6A中的结果示出了FAP双特异性T细胞衔接器显著增加NHDF细胞的溶解。

[0936] 在类似的实验中,在具有或不具有300ng/mL对照或FAP双特异性T细胞衔接器下,将7,000个原代肺成纤维细胞(BTC100)与70,000个$CD3^+$T细胞共培养。共培养24小时后,采集上清液,并且通过LDH测定法确定细胞毒性。图6B和图C中的结果示出了FAP双特异性T细胞衔接器显著增加原发性人类癌症相关成纤维细胞(CAF)细胞的溶解。这些和其它患者来源的细胞系的FAP表达如图7所示。

[0937] 通过将8,000个NHDF细胞与40,000个T细胞共培养并且双特异性T细胞衔接器浓度范围为2×10^3到2×10^{-2}ng/mL来评估FAP双特异性T细胞衔接器介导的细胞溶解的剂量-应答关系。在37℃共培养24小时后,对上清液执行LDH测定以确定靶细胞的细胞毒性。使用集成到GraphPad Prism中的四参数非线性拟合模型拟合剂量应答曲线,从而生成FAP双特异性T细胞衔接器的EC50值为3.2ng/mL。结果(图8A)示出了通过LDH测定法测量的FAP双特异性T细胞衔接器浓度与细胞毒性之间的剂量依赖性关系(显示为Abs_{490})。

[0938] 实例5

[0939] 使用与实例4中类似的研究来证明重组EpCAM双特异性T细胞衔接器活化的T细胞诱导靶肿瘤细胞死亡的能力。

[0940] EpCAM双特异性T细胞衔接器诱导T细胞介导的EpCAM阳性细胞系的溶解

[0941] 在单独培养基或300ng/mL对照或EpCAM双特异性T细胞衔接器存在下,将DLD肿瘤细胞(7,000个细胞)与70,000个T细胞在U形底96孔板的孔中共培养。共培养24小时后,采集上清液,并且通过LDH测定法确定细胞毒性。图8B中的结果示出了EpCAM双特异性T细胞衔接器显著增加DLD细胞的溶解(在图8C中示出了DLD细胞上的EpCAM表达)。

[0942] 在类似的实验中,在具有或不具有300ng/mL对照或EpCAM双特异性T细胞衔接器下,将4,000个SKOV细胞与40,000个$CD3^+$T细胞共培养。共培养24小时后,采集上清液,并且通过LDH测定法确定细胞毒性。图9A中的结果示出了EpCAM双特异性T细胞衔接器显著增加SKOV细胞的溶解。

[0943] 在另一个类似的实验中,在具有或不具有300ng/mL对照或EpCAM双特异性T细胞衔接器下,将5,000个MCF7细胞与50,000个$CD3^+$T细胞共培养。共培养24小时后,采集上清液,并且通过LDH测定法确定细胞毒性。图9B中的结果示出了EpCAM双特异性T细胞衔接器还显著增加MCF7细胞的溶解。

[0944] 通过将8,000个DLD与40,000个T细胞共培养并且EpCAM或对照双特异性T细胞衔接器浓度范围为2×10^3到2×10^{-2}ng/mL来评估EpCAM双特异性T细胞衔接器介导的细胞溶解的剂量-应答关系。在37℃共培养24小时后,对上清液执行LDH测定以确定靶细胞的细胞毒性。使用集成到GraphPad Prism中的四参数非线性拟合模型拟合剂量应答曲线,从而生成EpCAM双特异性T细胞衔接器的EC50值为7.4ng/mL。图10中的结果示出了EpCAM双特异性T细胞衔接器浓度与细胞毒性之间的剂量依赖关系。

[0945] 总之,此实例的结果证明EpCAM双特异性T细胞衔接器能够诱导T细胞介导的多种EpCAM阳性肿瘤细胞系的溶解。

[0946] 实例6

[0947] 生成稳定的表达FAP的CHO和Ad293细胞系,作为通过与亲本未转染细胞比较证明FAP双特异性T细胞衔接器的FAP抗原特异性的手段。

[0948] 表达FAP的稳定转染的细胞系的生成

[0949] 从NCBI数据库(SEQ ID 30)获得FAP基因的蛋白质序列,逆转录以生成由牛津遗传学有限公司(Oxford Genetics Ltd)(英国牛津)合成的DNA编码序列。通过标准克隆技术将FAP基因克隆到pSF-Lenti载体中,产生pSF-Lenti-FAP载体。用慢病毒FAP表达载体与pSF-CMV-HIV-Gag-Pol、pSF-CMV-VSV-G、pSF-CMV-HIV-Rev一起转染HEK293T细胞。脂质体2000用作转染试剂,并且以DNA:脂质体比例为1:2添加到载体DNA中,并且与细胞在37℃下孵育。48小时后采集含有慢病毒的上清液并且与聚凝胺混合(终浓度,8μg/mL)。将慢病毒/聚凝胺混合物添加到接种的Ad293或CHO细胞中并且在37℃下孵育。在第4天,将上清液更换为含有嘌呤霉素的培养基(Ad293为2μg/mL,并且CHO为7.5μg/mL)。然后克隆选择稳定的变体,并且通过用FAP或同位素对照抗体染色确定亲本细胞系或稳定转染的变体的FAP表达,并且通过流式细胞术分析(图11A)。

[0950] FAP双特异性T细胞衔接器介导的靶细胞溶解对表达FAP的细胞是特异性的

[0951] 在单独培养基或2μg/mL对照或FAP双特异性T细胞衔接器存在于U形底96孔板的孔中,单独或与人类T细胞(70,000个)共培养CHO或CHO-FAP细胞(7,000个细胞)。孵育24小时后,采集上清液,并且如实例4中所描述的通过LDH细胞毒性测定法测量靶细胞细胞毒性(图11B)。还通过流式细胞术分析CD69和CD25的表达水平来确定T细胞活化(图12)。仅当CHO-

FAP细胞与T细胞和FAP双特异性T细胞衔接器一起培养时才观察到细胞毒性。这指示FAP双特异性T细胞衔接器介导的T细胞活化和靶细胞溶解是高度特异性的并且限于FAP表达细胞,而不是FAP阴性亲本细胞系。

[0952] 实例7

[0953] 生成稳定的表达EpCAM的CHO和Ad293细胞系,作为通过与亲本未转染细胞比较证明EpCAM双特异性T细胞衔接器的EpCAM抗原特异性的手段。

[0954] 表达EpCAM的稳定转染的细胞系的生成

[0955] 从NCBI数据库(SEQ ID 28)获得EpCAM基因的蛋白质序列,逆转录以生成由牛津遗传学有限公司(Oxford Genetics Ltd)(英国牛津)合成的DNA编码序列。通过标准克隆技术将EpCAM基因克隆到pSF-Lenti载体中,产生pSF-Lenti-EpCAM载体。用慢病毒EpCAM表达载体与pSF-CMV-HIV-Gag-Pol、pSF-CMV-VSV-G、pSF-CMV-HIV-Rev一起转染HEK293T细胞。脂质体2000用作转染试剂,并且以DNA:脂质体比例为1:2添加到载体DNA中,并且与细胞在37℃下孵育。48小时后采集含有慢病毒的上清液并且与聚凝胺混合(终浓度,8μg/mL)。将慢病毒/聚凝胺混合物添加到接种的Ad293或CHO细胞中并且在37℃下孵育。在第4天,将上清液更换为含有嘌呤霉素的培养基(Ad293为2μg/mL,并且CHO为7.5μg/mL)。然后克隆选择稳定的变体,并且通过用EpCAM或同位素对照抗体染色确定亲本细胞系或稳定转染的变体的EpCAM表达,并且通过流式细胞术分析(图13A)。

[0956] EpCAM双特异性T细胞衔接器介导的靶细胞溶解对表达EpCAM的细胞是特异性的

[0957] 在单独培养基或2μg/mL对照或EpCAM双特异性T细胞衔接器存在于U形底96孔板的孔中,单独或与人类T细胞(70,000个)共培养CHO或CHO-EpCAM细胞(7,000个细胞)。孵育24小时后,采集上清液,并且通过LDH细胞毒性测定法测量靶细胞细胞毒性(图13B)。还通过流式细胞术分析CD69和CD25的表达水平来确定T细胞活化(图14)。仅当CHO-EpCAM细胞与T细胞和EpCAM双特异性T细胞衔接器一起培养时才观察到细胞毒性。这指示EpCAM双特异性T细胞衔接器介导的T细胞活化和靶细胞溶解是高度特异性的并且限于EpCAM表达细胞,而不是EpCAM阴性亲本细胞系。

[0958] 实例8

[0959] 在进一步的实验中,评估了重组FAP双特异性T细胞衔接器蛋白活化CD4或CD8 T细胞的能力以及这些T细胞亚群中的每一种溶解NHDF细胞的能力。在300ng/mL对照或FAP双特异性T细胞衔接器存在下,在U形底96孔板的孔中将$CD3^+$T细胞(35,000个)与7,000个NHDF细胞共培养,并且在37℃下孵育24小时。采集细胞并且用针对CD4或CD8和CD69和CD25的抗体染色,并且通过流式细胞术分析。结果(图15A)证明FAP双特异性T细胞衔接器诱导$CD4^+$和$CD8^+$T细胞中活化标记物CD69和CD25的增加。

[0960] 在类似的实验中,评估了每个T细胞亚群(CD4和CD8)杀死靶细胞的能力。根据制造商的方案,通过使用CD4 T细胞分离试剂盒(美天旎生物技术公司,#130-045-101)的阳性选择从CD3纯化的细胞中提取$CD4^+$T细胞,其中CD8细胞在非分离的流过物中。在U形底96孔板的孔中,将7,000个NHDF与35,000个$CD4^+$或$CD8^+$T细胞一起与300ng/mL对照或FAP双特异性T细胞衔接器共培养,并且在37℃孵育。24小时后,采集上清液,并且通过LDH细胞毒性测定法测量靶细胞细胞毒性。结果(图15B)示出了FAP双特异性T细胞衔接器诱导$CD4^+$和$CD8^+$T细胞以杀死NHDF细胞。

[0961] 实例9

[0962] 评估了EpCAM双特异性T细胞衔接器活化$CD4^+$或$CD8^+$T细胞的能力以及每个亚群溶解DLD肿瘤细胞的能力。在300ng/mL对照或EpCAM双特异性T细胞衔接器存在下,在U形底96孔板的孔中将$CD3^+$T细胞(35,000个)与7,000个DLD细胞共培养,并且在37℃下孵育24小时。采集细胞并且用针对CD4或CD8和CD69和CD25的抗体染色,并且通过流式细胞术分析。结果(图16A)证明EpCAM双特异性T细胞衔接器诱导$CD4^+$和$CD8^+$T细胞中活化标记物CD69和CD25的增加。

[0963] 在类似的实验中,评估了每个T细胞亚群(CD4和CD8)杀死靶细胞的能力。根据制造商的方案,通过使用CD4 T细胞分离试剂盒的阳性选择从CD3纯化的细胞中提取$CD4^+$T细胞,其中CD8细胞在未选择的流过物中。在U形底96孔板的孔中,将7,000个DLD与35,000个$CD4^+$或$CD8^+$T细胞与300ng/mL对照或EpCAM双特异性T细胞衔接器共培养,并且在37℃孵育。24小时后,采集上清液,并且通过LDH细胞毒性测定法测量靶细胞细胞毒性(图16B)。结果示出了EpCAM双特异性T细胞衔接器诱导$CD4^+$和$CD8^+$T细胞以杀死DLD细胞。

[0964] 实例10

[0965] 表征FAP双特异性T细胞衔接器介导的原发性恶性腹水自体肿瘤相关淋巴细胞的活化

[0966] 为了使用癌症患者衍生细胞评估双特异性T细胞衔接器蛋白的活性,获得含有$CD3^+$T细胞和FAP^+细胞的原发性恶性腹水液样品用于测试。在500ng/mL对照或FAP双特异性T细胞衔接器存在下,在100%腹水液或补充有1%人类血清的培养基中,将未纯化的腹水细胞(因此从接收时保持不变)以每孔250,000个细胞接种于U形底96孔板中。未处理的孔用作阴性对照。在37℃孵育5天后,采集总细胞群并且确定$CD3^+$T细胞的数量(图17A)和$CD3^+$T细胞上CD25的表达水平(图17B)。使用精密计数珠确定每孔的总细胞数。结果证明,FAP双特异性T细胞衔接器导致癌症患者的肿瘤相关T细胞的T细胞活化显著增加。

[0967] 作为上述实验的延伸,采集重复孔并且通过流式细胞术确定FAP^+细胞的数量(图17C)。使用精密计数珠确定每孔的总细胞数。结果示出了FAP双特异性T细胞衔接器导致腹水样品中自体FAP表达细胞数量的显著减少。

[0968] 实例11

[0969] 使用下文所描述的方法工程化、产生和纯化表达重组双特异性T细胞衔接器的EnAd病毒。

[0970] 表达双特异性T细胞衔接器的Enadenotucirev的生成

[0971] EnAd是具有复制能力的嵌合B组腺病毒,在E2B区含有Ad3的频繁非同源核苷酸取代Ad11p,几乎完整的E3缺失和较小的E4缺失定位于E4或f4(Kuhn等人,定向进化生成用于治疗结肠癌的新型溶瘤病毒,《公共科学图书馆期刊(PLoS One)》,2008年6月18日;3(6):e2409)。本研究中使用的腺病毒基因组的示意图显示在图18A中。

[0972] 通过直接插入编码EpCAM双特异性T细胞衔接器(SEQ ID NO:1)、FAP双特异性T细胞衔接器(SEQ ID NO:3)或对照双特异性T细胞衔接器(SEQ ID NO:5)的盒,质粒pEnAd2.4用于生成质粒pEnAd2.4-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器、pEnAd2.4-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器、pEnAd2.4-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器、pEnAd2.4-SA-FAP双特异性T细胞衔接器、pEnAd2.4-CMV-对照双特异性T细胞衔接器、pEnAd2.4-SA-对照双特异性T细胞衔接器

(表4)。转基因盒含有5'短剪接受体序列(SEQ ID NO:33)或外源CMV启动子(SEQ ID NO:31)、EpCAM、FAP或对照双特异性T细胞衔接器cDNA序列和3'多聚腺苷酸化序列(SEQ ID NO:32)。通过DNA测序确认质粒的构建。外源CMV启动子具有组成型活性,并且因此导致转基因的早期表达。剪接受体序列在病毒主要晚期启动子的控制下驱动表达,并且在病毒基因组复制开始后导致后来的转基因表达。此启动子驱动的表达的动力学可以在图18B中观察到,其中GFP用作转基因。

[0973] 表4

[0974]

质粒 ID	[质粒 DNA] ng/ml
pEnAd2.4-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器	205.3
pEnAd2.4-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器	325.2
pEnAd2.4-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器	1322.8
pEnAd2.4-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器	3918.3
pEnAd2.4-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器	189.1
pEnAd2.4-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器	236.2
pEnAd2.4-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器-RFP	1599
pEnAd2.4-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器-RFP	1872
pEnAd2.4-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器-RFP	1294
pEnAd2.4-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器-RFP	2082

[0975] 病毒生产和表征

[0976] 质粒EnAd2.4-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器、pEnAd2.4-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器、pEnAd2.4-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器、pEnAd2.4-SA-FAP双特异性T细胞衔接器、pEnAd2.4-CMV-对照双特异性T细胞衔接器、pEnAd2.4-SA-对照双特异性T细胞衔接器为通过用酶AscI限制性消化来线性化以产生线性病毒基因组。通过异丙醇提取纯化消化的DNA,并且在300μl>95%分子生物级乙醇和10μl 3M乙酸钠中于-20℃沉淀16小时。通过在14000rpm离心5分钟沉淀析出的DNA,并且在500μl 70%乙醇中洗涤,然后再次以14000rpm离心5分钟。将干净的DNA沉淀空气干燥并且重悬于100μL水中。将6.25μg DNA与15.6μL脂质体转染试剂在OptiMEM中混合,并且在室温下孵育20分钟。然后将转染混合物添加到含有生长到80%汇合的Ad293细胞的T-25烧瓶中。将细胞与转染混合物在37℃孵育4小时后,向细胞中添加5% CO_2 4ml的细胞培养基(DMEM高葡萄糖和谷氨酰胺补充有10% FBS),并且将烧瓶在37℃,5% CO_2孵育。每24小时监测转染的Ad293细胞,并且每48小时到72小时补充额外的培养基。通过观察细胞单层中的显著细胞病变效应(CPE)来监测病毒的产生。一旦观察

到广泛的CPE,通过三次冻融循环从Ad293细胞采集病毒。通过连续稀释采集的溶解物并且重新感染Ad293细胞,并且采集含有单个噬菌斑的孔来选择单个病毒克隆。一旦感染达到完全CPE,就进行Ad293细胞的连续感染,以便扩增病毒原种。通过观察细胞单层中的显著CPE证实扩增期间活病毒的产生。

[0977] 病毒纯化

[0978] 一旦扩增有效的病毒原种,通过双氯化铯密度梯度离心(条带化)纯化病毒以产生NG-601、NG-602、NG-603、NG-604、NG-605和NG-606病毒原种。按照制造商的说明,通过micoBCA测定(生命技术公司(Life Technologies))滴定这些原种(表5)。

[0979] 表5

[0980]

EnAd ID	NG ID NO:	病毒基因组 SEQ ID	vp/mL	TCID50/mL
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器	NG-601	SEQ ID NO: 34	2.2494×10^{12}	1.26×10^{11}

[0981]

EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器	NG-602	SEQ ID NO: 35	4.21746×10^{12}	1.58×10^{11}
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器	NG-603		1.42607×10^{12}	5.01×10^{10}
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器	NG-604		3.31073×10^{12}	2.00×10^{11}
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器	NG-605	SEQ ID NO: 36	1.64653×10^{12}	1.58×10^{11}
EnAd-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器	NG-606	SEQ ID NO: 37	1.28148×10^{12}	3.98×10^{10}
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器-P2A-RFP	NG-607		5.963×10^{12}	1.26×10^{9}
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器-P2A-RFP	NG-608		1.51848×10^{12}	6.31×10^{9}
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器-P2A-RFP	NG-609		1.57517×10^{12}	7.94×10^{9}
EnAd-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器-P2A-RFP	NG-610		7.74881×10^{11}	5.01×10^{10}

[0982] 实例12

[0983] 使用下文所描述的方法表征NG-601、NG-602、NG-603、NG-604、NG-605和NG-606病毒的活性。

[0984] 在癌细胞系中与EnAd相比编码EnAd活性的双特异性T细胞衔接器的表征

[0985] 通过感染A549肺癌细胞分析NG-601、NG-602、NG-603、NG-604、NG-605、NG-606或EnAd复制的能力,并且通过qPCR评估。将A549细胞以2×10^5个细胞/孔的细胞密度接种在24孔板的孔中。将板在37℃、5% CO_2下孵育18小时,然后将细胞用每个细胞100个病毒颗粒(ppc)感染或保持未感染。感染后24小时、48小时或72小时采集孔,并且使用PureLink基因组DNA微型试剂盒(英杰公司)根据制造商的方案纯化DNA。使用表6中详述的反应混合物中的EnAd六邻体基因特异性引物-探针组,通过qPCR对每种提取的样品或标准物定量总病毒基因组。按照表7中的程序执行qPCR。

[0986] 表6

[0987]

试剂	体积/孔(μl)
2×qPCRBIO探针混合物(PCRBiosystems)	10
EnAd正向引物	0.08
EnAd反向引物	0.08
EnAd探针	0.8
NFW	4.04
样品	5
孔体积	20

[0988] 表7

[0989]

编号周期	温度（℃）	持续时间（秒）
1	95	120
40	95 60-65	5 20-30

[0990] 对每个细胞检测到的病毒基因组数量的定量证明NG-601、NG-602、NG-603、NG-604、NG-605、NG-606和EnAd病毒复制在A549细胞系中具有可比性(图19A)。

[0991] 通过感染A549评估NG-601、NG-602、NG-603、NG-604、NG-605、NG-606或EnAd的溶瘤活性(图19B)。将A549细胞以1.5×10^4个细胞/孔的细胞密度接种在96孔板中。将板在37℃、5% CO_2下孵育18小时,然后用增加的ppc病毒(5倍连续稀释,4.1×10^{-7}到5000病毒ppc)感染细胞或者保持未感染。在第5天通过CellTiter96®AQueous单溶液细胞增殖测定试剂盒(CellTiter96®AQueous One Solution Cell Proliferation Assay)(MTS)(普洛麦格公司(Promega),#G3582)测量A549细胞毒性。使用集成到GraphPad Prism中的四参数非线性拟合模型拟合剂量应答曲线。为每种病毒生成的IC 50值证明NG-601、NG-602、NG-603、NG-604、NG-605、NG-606和EnAd的溶瘤活性对于每种病毒具有可比性。

[0992] 从NG-601、NG-602、NG-603、NG-604、NG-605、NG-606确认功能性双特异性T细胞衔接器转基因表达

[0993] 为了确定病毒NG-601、NG-602、NG-605、NG-606是否产生功能性双特异性T细胞衔接器,使用CHO、CHO-EpCAM和CHO-FAP细胞系作为靶细胞执行T细胞活化测定。将10,000个靶细胞与50,000个$CD3^+$T细胞在U-底96孔板的孔中共培养,其中Ad293病毒上清液在培养基中稀释100倍并且在37℃、5% CO_2下孵育24小时。采集T细胞并且用对CD25和CD69具有特异性的抗体染色,并且通过流式细胞术分析。结果(图20A和图20B)指示病毒NG-601和NG-602表达功能性双特异性T细胞衔接器转基因,当与CHO-EpCAM细胞共培养时,所述功能性双特异性T细胞衔接器转基因活化T细胞,并且NG-605和NG-606表达功能性双特异性T细胞衔接器转基因,当与CHO-FAP细胞共培养时活化T细胞,但与CHO细胞共培养时不活化T细胞。

[0994] 结肠癌细胞系中双特异性T细胞衔接器表达的定量

[0995] 评估了NG-601、NG-602、NG-605、NG-606感染人类结肠癌细胞系DLD的双特异性T细胞衔接器表达的量。将DLD细胞以每孔1.2×10^6个细胞的密度接种在6孔培养板中。接种后18小时,用100ppc的EnAd、NG-601、NG-602、NG-603、NG-604、NG-605、NG-606感染DLD细胞。将细胞培养72小时,然后从孔中收集上清液并且以1200rpm离心5分钟以去除细胞碎片。然后

将澄清的上清液用于杀伤测定,与用已知浓度的重组双特异性T细胞衔接器生成的标准曲线相比具有细胞毒性,从而能够确定病毒上清液中双特异性T细胞衔接器的量。

[0996] 为了确定从NG-605和NG-606产生的FAP双特异性T细胞衔接器的量,执行了细胞毒性测定法,其中8,000个NHDF与40,000个$CD3^+$T细胞共培养,并且DLD病毒上清液以$1/10^3$、$1/10^4$和$1/10^5$稀释。通过将NHDF和$CD3^+$T细胞与FAP或对照双特异性T细胞衔接器以10倍连续稀释度从3333到$3.33x10^{-4}$ng/μL孵育来生成标准曲线。处理后24小时采集上清液,并且通过LDH测定法测量细胞毒性。通过比较病毒上清液的细胞毒性与重组双特异性T细胞衔接器标准曲线的细胞毒性来确定表达的双特异性T细胞衔接器的量。结果(图21)指示病毒NG-605和NG-606分别产生每百万DLD细胞9.8μg和49.2μg FAP双特异性T细胞衔接器。

[0997] 为了确定从NG-601和NG-602产生的EpCAM双特异性T细胞衔接器的量,执行了细胞毒性测定法,其中8,000个DLD细胞与40,000个$CD3^+$T细胞共小室培养,并且DLD病毒上清液以$1/10^3$、$1/10^4$和$1/10^5$稀释。通过将DLD和$CD3^+$T细胞与EpCAM或对照双特异性T细胞衔接器以10倍连续稀释度从3333到$3.33x10^{-4}$ ng/μL孵育来生成标准曲线。处理后24小时采集上清液,并且通过LDH测定法测量细胞毒性(图22)。通过比较病毒上清液的细胞毒性与重组双特异性T细胞衔接器标准曲线的细胞毒性来确定表达的双特异性T细胞衔接器的量。结果指示病毒NG-601和NG-602分别产生每百万DLD细胞165μg和50.3μg EpCAM双特异性T细胞衔接器。

[0998] 实例13

[0999] 除编码FAP或对照双特异性T细胞衔接器外,NG-607、NG-608、NG-609、NG-610病毒还携带用于使用荧光显微镜方法观察感染细胞(SEQ ID NO:25和26,表4)的红色荧光蛋白(RFP)转基因。使用下文所描述的方法表征这些病毒的功能活性。

[1000] 确认来自NG-607、NG-608、NG-609、NG-610的转基因表达

[1001] 通过感染Ad293细胞评估病毒NG-607、NG-608、NG-609和NG-610产生其双特异性T细胞衔接器转基因的能力。将Ad293细胞以1×10^6个细胞/孔接种在6孔板中。将板在37℃、5% CO_2下孵育24小时,然后将细胞用100ppc的病毒感染或保持未感染。在感染后48小时,用荧光汞灯照射噬菌斑并且拍照(图23)。结果表明病毒NG-607、NG-608、NG-609和NG-610表达RFP转基因。

[1002] 实例14

[1003] 在接下来的一系列实验中,评估了EnAd和FAP或对照双特异性T细胞衔接器病毒NG-603、NG-604、NG-605、NG-606、NG-607、NG-608、NG-609、NG-610杀死包含肿瘤细胞和成纤维细胞的靶细胞的能力。

[1004] 在第一项研究中,使用xCELLigence技术评估EnAd杀死DLD细胞的能力。将DLD细胞以1.2×10^4个细胞/孔接种在48孔E-板中,并且在37℃、5% CO_2下孵育18小时,然后用100EnAd ppc感染细胞或保持未感染。XCELLigence用于在8天的孵育期间每15分钟测量靶细胞的细胞毒性。结果(图24A)表明EnAd能够在所述时间段内有效杀死DLD细胞。

[1005] 在类似的实验中,使用xCELLigence技术评估EnAd杀死SKOV细胞的能力。将SKOV细胞以1×10^4个细胞/孔接种在48孔E-板中,并且在37℃、5% CO_2下孵育18小时,然后用100EnAd ppc感染细胞或保持未感染。xCELLigence用于在8天的期间每15分钟测量靶细胞的细胞毒性。结果(图24B)表明SKOV细胞在此时间范围内对EnAd介导的细胞毒性具有抗性。

[1006] 在类似的实验中,使用xCELLigence技术乙酰酒石酸铝还评估了EnAd杀死NHDF细胞的能力。将NHDF细胞以4×10^3个细胞/孔接种在48孔E-板中,并且在37℃、5% CO_2下孵育18小时,然后用100EnAd ppc感染细胞或保持未感染。xCELLigence用于在与A549和SKOV细胞相同的时间段内每15分钟测量靶细胞的细胞毒性。结果(图24C)表明EnAd在观察到的时间段内不能杀死NHDF细胞。

[1007] 在类似的实验中,使用xCELLigence在与SKOV肿瘤细胞和$CD3^+$T细胞的共培养中评估NG-603、NG-604、NG-605、NG-606和EnAd杀死NHDF细胞的能力。将NHDF细胞和SKOV细胞分别以4×10^3和1×10^3个细胞/孔接种在48孔E板中。将板在37℃、5% Co2下孵育18小时,然后用100ppc的NG-603、NG-604、NG-605或NG-606的EnAd感染细胞或保持未感染。孵育2小时后,向每个孔中添加37,500个$CD3^+$T细胞。xCELLigence用于每15分钟测量靶细胞的细胞毒性。结果(图25A)证明表达FAP双特异性T细胞衔接器的病毒NG-605和NG606,但不是EnAd或表达对照双特异性T细胞衔接器的病毒NG-603和NG-604,能够诱导NHDF细胞的溶解,其中动力学依赖于用于双特异性T细胞衔接器表达的启动子(CMV启动子更快)。

[1008] 在类似的实验中,使用LDH细胞毒性测定法在与SKOV和$CD3^+$T细胞的共培养中评估NG-603、NG-604、NG-605、NG-606和EnAd杀死NHDF细胞的能力。将NHDF细胞和SKOV细胞分别以8×10^3和2×10^3个细胞/孔接种于96孔U形底板中,并且用100ppc的NG-603、NG-604、NG-605或NG-606的EnAd感染细胞或保持未感染。孵育2小时后,向每个孔中添加75,000个$CD3^+$T细胞,并且将板在37℃、5% CO_2下孵育。在处理后0小时、24小时、48小时和96小时采集上清液,并且通过LDH细胞毒性测定法测量细胞毒性。结果(图25B)证明表达FAP双特异性T细胞衔接器的病毒NG-605和NG606,但不是EnAd或表达对照双特异性T细胞衔接器的病毒NG-603和NG-604,能够诱导NHDF细胞的溶解,其中动力学依赖于用于双特异性T细胞衔接器表达的启动子。

[1009] 作为上述LDH实验的延伸,还在处理后0小时、24小时、48小时和96小时采集细胞,用CD45、CD69和CD25的抗体染色并且通过流式细胞术分析。结果(图26)证明表达FAP双特异性T细胞衔接器的病毒NG-605和NG-606,但不是EnAd或表达对照双特异性T细胞衔接器的病毒NG-603和NG-604,能够诱导T细胞活化,其中动力学依赖于用于双特异性T细胞衔接器表达的启动子。

[1010] 在类似的实验中,评估了对FAP诱导FAP双特异性T细胞衔接器介导的T细胞活化的依赖性。在96孔U型底的板中,SKOV细胞以2×10^3个细胞/孔单独地或与NHDF细胞组合在8×10^3个细胞/孔接种。将病毒颗粒以100ppc添加到每个孔中,并且将板在37℃、5% CO_2下孵育。两小时后,添加75,000个$CD3^+$T细胞,并且进一步孵育板。在感染后96小时,采集细胞并且染色CD45和CD25并且通过流式细胞术分析(图27A)。结果证明,表达FAP双特异性T细胞衔接器的病毒NG-605和NG-606仅在FAP阳性NHDF细胞存在下诱导T细胞活化。

[1011] 在类似的实验中,进一步研究了NG-605和NG-606中启动子(CMV或病毒MLP/SA)驱动的双特异性T细胞衔接器表达的特异性。在96孔U形底板中,以4×10^3个细胞/孔接种NHDF细胞。每孔添加100个病毒颗粒,并且将板在37℃、5% CO_2下孵育。两小时后,添加40,000个CD3细胞并且进一步孵育板。在感染后72小时,采集上清液并且通过LDH细胞毒性测定法测量细胞毒性。结果(图27B)证明CMV驱动的病毒NG-605,但不是SA驱动的NG-606,能够在单独感染NHDF细胞时介导NHDF细胞的杀伤。

[1012] 结果指示NG-605和NG-606均能够诱导T细胞活化和靶细胞溶解,尽管动力学特征根据所使用的启动子略有不同。

[1013] 获得间隔拍摄视频以通过重组FAP双特异性T细胞衔接器、EnAd、NG-603或NG-605观察病毒或T细胞介导的靶细胞溶解。用CellTracker Orange CMTMR Dye(生命技术公司,#C2927)染色NHDF细胞,并且按照制造商的方案用CellTrace紫细胞增殖试剂盒(CellTrace Violet Cell Proliferation Kit)(生命技术公司,#C34557)染色$CD3^+$T细胞。将染色的NHDF以7.5×10^3个细胞/孔接种在24孔板中,与1.35×10^4DLD或SKOV肿瘤细胞共培养。将板在37℃、5%CO_2下孵育18小时。然后用300ng/mL FAP双特异性T细胞衔接器处理细胞或用100ppc的EnAd、NG-603和NG-605感染细胞或保持不处理。孵育两小时后,除了1.5μM CellEvent半胱天冬酶3-7试剂(生命技术公司,#C10423)之外,将100,000个染色的$CD3^+$T细胞添加到必要的孔中。在Nikon TE 2000-EEclipse倒置显微镜上获得视频,每15分钟捕获图像,持续96小时。在图28中示出了视频中的帧。结果示出了重组FAP双特异性T细胞衔接器和NG-605,但不是EnAd或NG-603,能够诱导NHDF细胞的快速溶解。

[1014] 在类似的实验中,用CellTracker Green CMFDA Dye(生命技术公司,#C2925)染色NHDF细胞,并且按照制造商的方案用CellTrace紫细胞增殖试剂盒(CellTrace Violet Cell Proliferation Kit)(生命技术公司,#C34557)染色$CD3^+$T细胞。将染色的NHDF以7.5×10^3个细胞/孔接种在24孔板中,与1.35×10^4DLD或SKOV肿瘤细胞共培养。将板在37℃、5%CO_2下孵育18小时。然后用100ppc的NG-607、NG-608、NG-609或NG-610感染细胞或保持未感染。孵育两小时后,将100,000个染色的$CD3^+$T细胞添加到必要的孔中。在Nikon TE 2000-E Eclipse倒置显微镜上获得视频,每15分钟捕获图像,持续96小时。在图29中示出了视频中的帧。结果示出了所有病毒都导致肿瘤细胞感染(RFP,红色荧光,阳性),但只有NG-609和NG-610能够诱导共培养的NHDF细胞快速溶解。

[1015] 实例15

[1016] 在此系列实验中,评估了EnAd和EpCAM或对照双特异性T细胞衔接器病毒NG-601、NG-602、NG-603和NG-604杀死包含肿瘤细胞和成纤维细胞的靶细胞的能力。

[1017] 通过EnAd、NG-601、NG-602、NG-603和NG-604对人类T细胞活化和EpCAM阳性靶细胞溶解的表征

[1018] 使用xCELLigence技术评估EnAd和NG-601、NG-602、NG-603和NG-604在存在或不存在$CD3^+$T细胞的情况下杀死DLD肿瘤细胞的能力。将DLD细胞以1.2×10^4个细胞/孔接种在48孔E板中。将板在37℃、5% CO_2下孵育18小时,然后将细胞用100ppc的EnAd感染或保持未感染。感染后两小时,将75,000个$CD3^+$T细胞添加到必要的孔中。XCELLigence用于每15分钟测量靶细胞的细胞毒性。结果(图30)证明NG-601和NG-602以T细胞依赖性方式导致显著更快的DLD细胞毒性。

[1019] 在类似的实验中,使用LDH细胞毒性测定法评估EnAd和NG-601、NG-602、NG-603和NG-604在存在或不存在$CD3^+$T细胞的情况下杀死DLD肿瘤细胞的能力。将DLD细胞以2×10^4个细胞/孔接种在96孔U形底板中,并且用100ppc EnAd感染细胞或保持未感染。感染后两小时,将150,000个$CD3^+$T细胞添加到必要的孔中。将板在37℃、5% CO_2下孵育并且采集上清液,并且在感染后0小时、24小时、48小时和72小时通过LDH细胞毒性测定法进行分析。结果(图31)证明NG-601和NG-602以T细胞依赖性方式导致更快的DLD细胞毒性。

[1020] 作为上述LDH实验的延伸,还在处理后0小时、24小时、48小时和96小时采集细胞,用CD45、CD69和CD25的抗体染色并且通过流式细胞术分析以确定$CD3^+$T细胞的活化状态。结果(图32)证明表达EpCAM双特异性T细胞衔接器的病毒NG-601和NG-602,但不是EnAd或表达对照双特异性T细胞衔接器的病毒NG-603和NG-604,能够诱导T细胞活化,其中动力学依赖于用于双特异性T细胞衔接器表达的启动子。

[1021] 在另一个实验中,使用xCELLigence技术评估NG-601在存在或不存在$CD3^+$T细胞的情况下以不同的感染复数(MOI)杀死DLD肿瘤细胞的能力。将DLD细胞以2×10^4个细胞/孔接种在48孔E板中。将板在37℃、5% CO_2下孵育18小时,然后用MOI(ppc)的NG-601感染细胞,其变化范围为0.001到10或保持未感染。感染后两小时,将150,000个$CD3^+$T细胞添加到必要的孔中。xCELLigence用于每15分钟测量靶细胞的细胞毒性。结果(图33)证明,在MOI低至0.001时,NG-601以T细胞依赖性方式导致更快的DLD细胞毒性。

[1022] 在类似的实验中,使用xCELLigence技术评估EnAd和NG-601、NG-602、NG-603和NG-604在存在或不存在$CD3^+$T细胞的情况下杀死SKOV肿瘤细胞的能力。将SKOV细胞以1×10^4个细胞/孔接种在48孔E板中。将板在37℃、5%CO_2下孵育18小时,然后用EnAd(100ppc)感染细胞或保持未感染。感染后两小时,将50,000个$CD3^+$T细胞添加到必要的孔中。xCELLigence用于每15分钟测量靶细胞的细胞毒性。结果(图34)表明SKOV细胞在本研究的时间范围内对EnAd介导的细胞毒性具有抗性,然而NG-601和NG-602能够在$CD3^+$T细胞存在下诱导SKOV细胞的快速溶解。

[1023] 在类似的实验中,使用LDH细胞毒性测定法评估EnAd和NG-601、NG-602、NG-603和NG-604在存在或不存在$CD3^+$T细胞的情况下杀死SKOV细胞的能力。将SKOV细胞以2×10^4个细胞/孔接种在96孔U形底板中,并且用EnAd(100ppc)感染细胞或保持未感染。感染后两小时,将150,000个$CD3^+$T细胞添加到必要的孔中。将板在37℃、5% CO_2下孵育并且采集上清液,并且在感染后0小时、24小时、48小时和72小时通过LDH细胞毒性测定法进行分析。结果(图35)与先前的数据一致并且表明SKOV细胞在此时间范围内对EnAd介导的细胞毒性具有抗性,然而NG-601和NG-602能够在$CD3^+$T细胞存在下诱导SKOV细胞的快速溶解。

[1024] 作为上述LDH实验的延伸,还在处理后0小时、24小时、48小时和96小时采集细胞,用CD45、CD69和CD25的抗体染色并且通过流式细胞术分析以确定$CD3^+$T细胞的活化状态(图36)。结果证明表达EpCAM双特异性T细胞衔接器的病毒NG-601和NG-602,但不是EnAd或表达对照双特异性T细胞衔接器的病毒NG-603和NG-604,能够诱导T细胞活化,其中动力学依赖于用于双特异性T细胞衔接器表达的启动子。

[1025] 在类似的实验中,评估了EnAd和NG-601、NG-602、NG-603和NG-604从$CD3^+$EpCAM阴性的原发性腹水样品中活化癌症患者来源的$CD3^+$T细胞的能力。将EpCAM阳性DLD细胞以每孔1×10^4个细胞接种在96孔U形底板中,并且与100,000个腹水细胞共培养(在接收时保持不变)。细胞用100ppc的病毒颗粒感染或保持未感染。在37℃下孵育48小时后,采集总细胞群并且通过流式细胞术确定$CD3^+$T细胞上CD25的表达水平。结果(图37)证明表达EpCAM双特异性T细胞衔接器的病毒NG-601和NG-602,但不是EnAd或表达对照双特异性T细胞衔接器的病毒NG-603和NG-604,能够诱导患者来源的$CD3^+$T细胞的T细胞活化。

[1026] 结果指示,EpCAM双特异性T细胞衔接器病毒NG-601和NG-602均能够诱导T细胞活化和靶细胞溶解,尽管动力学特征根据所使用的启动子略有不同。

[1027] 获得间隔拍摄视频以通过重组EpCAM双特异性T细胞衔接器、EnAd、NG-601或NG-603观察病毒或T细胞介导的靶细胞溶解。用CellTracker Orange CMTMR Dye(生命技术公司,#C2927)染色NHDF细胞,并且按照制造商的方案用CellTrace紫细胞增殖试剂盒(CellTrace Violet Cell Proliferation Kit)(生命技术公司,#C34557)染色$CD3^+$T细胞。将染色的NHDF以7.5×10^3个细胞/孔接种在24孔板中,与1.35×10^4DLD或SKOV肿瘤细胞共培养。将板在37℃、5% CO_2下孵育18小时。然后用300ng/mL EpCAM双特异性T细胞衔接器处理细胞或用100ppc的EnAd、NG-601或NG-603感染细胞或保持不处理。孵育两小时后,除了1.5μM CellEvent半胱天冬酶3-7试剂(生命技术公司,#C10423)之外,将100,000个染色的$CD3^+$T细胞添加到必要的孔中。在Nikon TE 2000-E Eclipse倒置显微镜上获得视频,每15分钟捕获图像,持续96小时。在图38中示出了视频中的帧。结果示出了重组EpCAM双特异性T细胞衔接器和NG-605导致DLD和SKOV靶细胞的快速溶解,但NHDF保持不受影响。

[1028] 实例16

[1029] 在此实例中,评估了EnAd、NG-603、NG-604、NG-605和NG-606对来自癌症患者的FAP^+原发性恶性腹水的自体肿瘤相关淋巴细胞的活化。被认为适合进一步分析的患者样品是含有$CD3^+$T细胞和FAP^+细胞的样品。

[1030] 在第一个实验中,将来自患者的未纯化(因此从接收时保持不变)腹水细胞以每孔250,000个细胞接种于100%腹水液中的U形底96孔板中。用100ppc的病毒感染细胞,未处理的孔用作阴性对照。EnAd-CMV-GFP和EnAd-SA-GFP还作为报道基因包含在实验中,并且分别用于确定感染和晚期病毒基因表达,显微照片如图39所示。在37℃孵育5天后,采集总细胞群并且确定$CD3^+$T细胞上CD25的表达水平(图40A)。使用精密计数珠确定每孔的总细胞数。结果证明FAP双特异性T细胞衔接器病毒NG-605和NG-606导致肿瘤相关淋巴细胞的T细胞活化显著增加。

[1031] 作为上述实验的延伸,采集重复孔并且通过流式细胞术确定内源性FAP^+细胞的数量。使用精密计数珠确定每孔的总细胞数。结果(图40B)示出了NG-605和NG-606导致腹水样品中表达自体FAP细胞数量的显著减少,表明一些FAP^+细胞已经被活化的T细胞杀死。

[1032] 在第二个实验中,在100%腹水液或补充有1%人类血清的培养基中,将来自癌症患者的未纯化(因此从接收时保持不变)腹水细胞以每孔250,000个细胞接种于U形底96孔板中。用100ppc的病毒感染细胞,未处理的孔用作阴性对照。还包含EnAd-CMV-GFP和EnAd-SA-GFP作为报道基因以分别用于确定感染和晚期病毒基因表达,显微照片如图41所示。在37℃下孵育5天后,采集总细胞群并且确定$CD3^+$T细胞的数量(图42)和$CD3^+$T细胞上CD25的表达水平(图43)。使用精密计数珠确定每孔的总细胞数。结果证明,对于此患者,重组FAP双特异性T细胞衔接器和NG-605而非NG-606导致培养基中肿瘤相关淋巴细胞的T细胞活化显著增加。这两种病毒都没有导致腹水液中的活化。

[1033] 作为上述实验的延伸,采集重复孔并且通过流式细胞术确定FAP^+细胞的数量(图44)。使用精密计数珠确定每孔的总细胞数。结果证明,重组FAP双特异性T细胞衔接器和NG-605而非NG-606导致培养基中表达自体FAP细胞数量的显著减少。两种病毒均未导致腹水液中FAP^+细胞减少。

[1034] 实例17-材料和方法

[1035] 细胞系

[1036] HEK293A、DLD、SKOV3、MCF7、A431、A549和PC3细胞(ATCC)在杜氏改良的伊格尔氏培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)(DMEM,西格玛奥德里奇公司,英国)和在洛斯维·帕克纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute)(RPMI-1640,西格玛奥德里奇公司,英国)的CHO细胞(ATCC)中培养。生长培养基补充有10％(v/v)胎牛血清(FBS,Gibco公司,英国)和1％(v/v)青霉素/链霉素(10mg/mL,西格玛奥德里奇公司),并且细胞维持在37℃和5％ CO_2的潮湿气氛中。对于病毒感染和病毒质粒转染,将细胞维持在补充有2％FBS的DMEM中。对于重组双特异性T细胞衔接器质粒转染,将细胞维持在不含FBS的DMEM中。通过流式细胞术确定靶细胞系的EpCAM表达。

[1037] 表达EpCAM的稳定的细胞系的生成

[1038] 从NCBI数据库和DNA获得EpCAM基因的蛋白质序列(ID:4072)

[1039] 由牛津遗传学有限公司(英国牛津)合成。通过标准克隆技术将EpCAM基因克隆到pSF-Lenti载体中,产生pSF-Lenti-EpCAM载体。使用Lipofectamine2000与慢病毒EpCAM表达载体以及pSF-CMVHIV-Gag-Pol、pSF-CMV-VSV-G、pSF-CMV-HIV-Rev(牛津遗传学有限公司)一起转染HEK293T细胞。48小时后采集含有慢病毒的上清液并且与聚凝胺(8μg/mL)混合。将慢病毒/聚凝胺混合物添加到CHO细胞中并且在37℃下孵育。在第4天,将上清液更换为含有7.5μg/mL嘌呤霉素的培养基。然后克隆选择稳定的变体,并且通过用EpCAM或同位素对照抗体的抗体染色确定亲本细胞系或稳定转染的变体的EpCAM表达,并且通过流式细胞术分析。扩增阳性克隆并且用于进一步的实验。

[1040] 外周血单个核细胞(PBMC)的制备和T细胞分离

[1041] 通过密度梯度离心(Boyum公司,1968)从获得自英国国家医疗服务系统血液与移植管理处(英国牛津)的全血白细胞锥体中分离PBMC。用PBS将血液1:2稀释并且分层到Ficoll(1,079g/mL,淋巴细胞分离液,GE Healthcare公司)上,然后在22℃以低减速度以400g离心30分钟。离心后,收集PBMC并且用PBS洗涤两次(300g,室温下10分钟),并且重悬于补充有10％ FBS的RPMI-1640培养基中。为了从PBMC中提取CD3阳性T细胞,根据制造商的方案,使用Pan T细胞分离试剂盒(美天旎生物技术公司,#130-096-535)去除非CD3细胞。为了进一步分离CD4-阳性T细胞和CD8-阳性T细胞,使用CD4+微珠(美天旎生物技术公司,#130-045-101)对CD3 T细胞进行另一轮纯化。

[1042] 处理原发性腹水和胸腔积液

[1043] 在患有多种晚期癌症适应症的患者(包括但不限于卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌和肺癌)的知情同意下,从牛津大学医院(英国牛津)丘吉尔医院接收到原发性人类恶性腹水和胸腔积液样品。这项工作得到了牛津组织病理学研究中心研究伦理委员会的批准。收到后,分离细胞和液体部分,并且立即使用液体或将等分试样储存在-20℃下以备将来的分析。按照制造商的说明,用红细胞溶解缓冲液(罗氏公司,英国)处理细胞级分。通过台盼蓝染色确定细胞数和活力。通过对EpCAM、EGFR、FAP、CD45、CD11b、CD56、CD3、CD4、CD8、PD1和CTLA4的抗体染色确定每个样品中存在的细胞类型,并且通过流式细胞术分析。对于离体T细胞活化和靶细胞溶解实验,使用新鲜细胞和液体。在一些情况下,将贴壁细胞在补充有10％ FBS的DMEM中传代并且扩增以备后用。

[1044] 双特异性T细胞衔接器工程化和生产

[1045] 通过将两个具有不同特异性的scFv与灵活的GS连接子连接来生成双特异性T细胞

衔接器。通过连接子从亲本单克隆抗体连接VH和VL结构域来创建每个scFv。每个双特异性T细胞衔接器具有用于哺乳动物分泌的免疫球蛋白轻链(Ig)N-末端信号序列和用于检测和纯化的C-末端十八组氨酸亲和标签。通过标准DNA克隆技术工程化双特异性T细胞衔接器并且将其插入蛋白质表达载体(pSFCMV-Amp)中,用于巨细胞病毒(CMV)启动子驱动的组成型蛋白质表达和分泌。使用聚乙烯亚胺(PEI,线性,MW 25000,美国Polysciences公司)在以下条件下将pSF-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器或pSF-CMV-对照双特异性T细胞衔接器质粒DNA转染到HEK293A细胞中,55μg质粒DNA:110μg PEI(DNA:PEI比例为1:2(w/w))添加到细胞中,在37℃下孵育4小时,然后用新鲜的无血清DMEM替换,并且进一步在37℃、5% CO_2下孵育48小时。将细胞与pSF-CMV-GFP平行转染以确保转染效率。为了采集分泌的蛋白质,收集转染细胞的上清液并且在350g、4℃下离心5分钟以去除细胞组分。将上清液转移到10,000MWCO Amicon Ultra-15离心过滤装置(密理博公司(Millipore))中。在4750g和4℃下离心后,用流过物调节渗余物的体积以获得高50倍的浓度。将等分的浓缩蛋白质储存在-80℃。

[1046] 表达双特异性T细胞衔接器的EnAdenotucirev的生成

[1047] 通过使用Gibson组装技术将编码EpCAM双特异性T细胞衔接器或对照双特异性T细胞衔接器的转基因盒直接插入碱性EnAd质粒pEnAd2.4中,生成质粒pEnAd2.4-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器、pEnAd2.4-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器、pEnAd2.4-CMV-对照双特异性T细胞衔接器、pEnAd2.4-SA-对照双特异性T细胞衔接器。转基因盒含有5'短剪接受体序列或外源CMV启动子,随后是EpCAM或对照双特异性T细胞衔接器cDNA序列和3'多腺苷酸化序列。在图18中示出了插入的转基因盒的示意图。通过DNA测序确认质粒的正确构建。在转染HEK293A细胞之前,通过用酶AscI进行限制性消化来线性化质粒EnAd2.4-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器、pEnAd2.4-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器、pEnAd2.4-CMV-对照双特异性T细胞衔接器和pEnAd2.4-SA-对照双特异性T细胞衔接器。通过观察细胞单层中的细胞病变效应(CPE)来监测病毒的产生。一旦观察到广泛的CPE,通过三次冻融循环从HEK293A细胞采集病毒。通过连续稀释采集的溶解物并且重新感染HEK293A细胞,并且采集含有单个噬菌斑的孔来选择单个病毒克隆。一旦感染达到完全CPE,就进行HEK293A细胞的连续感染,以便扩增病毒原种。一旦扩增有效的病毒原种,通过双氯化铯条带纯化病毒以产生EnAd-CMVEpCAM双特异性T细胞衔接器、EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器、EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器、EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器病毒原种。根据制造商的说明,通过TCID50和picogreen测定(生命技术公司)滴定这些原种。

[1048] 上清液的制备

[1049] 为了评估双特异性T细胞衔接器介导的细胞因子释放,将DLD细胞(20,000)在单独的96孔平底板或2ng/μL EpCAM或对照双特异性T细胞衔接器中接种100,000个CD3+T细胞。在37℃和5% CO_2下孵育48小时后,收集上清液,通过离心去除细胞组分,并且将等分试样储存在-20℃。为了评估来自重组病毒的双特异性T细胞衔接器转基因表达,用EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器、EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器、EnAd-CMV对照双特异性T细胞衔接器、EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器或EnAd以100vp/细胞感染HEK293A(1e6)或DLD细胞(1.2e6)。将细胞培养72小时,此时推进细胞病变效应(CPE)。收集上清液并且以300g离心5分钟,以去除细胞碎片并且储存在-20℃下用于将来的分析。

[1050] 免疫印迹

[1051] 斑点印迹用于测量由质粒转染产生的重组双特异性T细胞衔接器的浓度。制备每个双特异性T细胞衔接器和蛋白质标准品(10×His标记的(Cterminus)人类组织蛋白酶D,Biolegend公司,#556704)的两倍系列稀释液。调节蛋白质标准品的摩尔浓度以表示双特异性T细胞衔接器浓度为100μg/mL。将两μL每种样品和蛋白质标准物直接施加到硝酸纤维素膜上。将膜空气干燥、封闭并且用α-6xHis(C-末端)抗体(1:5000,克隆3D5,英杰公司,英国,#46-0693)探测以检测C-末端His-标记的蛋白质,然后洗涤和用抗小鼠第二抗体(1:10000,Dako公司,#P0161)孵育,并且根据制造商的说明书通过应用SuperSignal West Dura持久底物(赛默飞世尔科技公司,#34075)进行检测。通过蛋白质印迹分析病毒感染的HEK293A细胞的上清液的双特异性T细胞衔接器表达。通过SDS-PAGE分离上清液,并且根据制造商的方案(Bio-Rad公司)转移到硝酸纤维素膜上。将膜进一步与上文斑点印迹方案进行相同地处理。

[1052] 酶联免疫吸附测定(ELISA)

[1053] 为了评估EpCAM结合,通过在4℃下用人类EpCAM/TROP-1蛋白(50ng/孔,义翘神州科技有限公司,#10694-H02H-50)涂覆过夜来制备ELISA板。将板在环境温度下用5%BSA封闭1小时,然后与稀释的EpCAM双特异性T细胞衔接器转染的HEK293A上清液、对照双特异性T细胞衔接器转染的HEK293A上清液和空的pSF-CMV载体转染的HEK293A上清液(2小时,室温)一起孵育。将板用PBS-T洗涤三次,并且随后在每个将来的结合步骤后洗涤。将板与抗His(C-末端)抗体(1:5000,克隆3D5,#46-0693,英杰公司,英国)在室温下孵育1小时,然后在室温下与HRP缀合的抗小鼠-Fc(在PBS/5%牛奶中1:1000,Dako公司)孵育1小时。使用3.3.5.5'-四甲基乙二胺(TMB,赛默飞世尔科技公司)执行HRP检测,并且使用终止溶液终止反应。在Wallac1420读板器(珀金埃尔默股份有限公司(Perkin Elmer))上测量450nm处的吸光度。

[1054] 流式细胞术

[1055] 在FACSCalibur流式细胞术(BD生物科学)上执行流式细胞术分析,并且用FlowJov10.0.7r2软件(TreeStar公司,美国)处理数据。对于不同细胞群的分类,使用对CD45(HI30,Biolegend公司)、CD11b(ICRF44,Biolegend公司)、EpCAM(9C4,Biolegend公司)和FAP(427819,R&D Systems公司)具有特异性的抗体。为了分析T细胞群,使用以下与不同荧光团偶联的抗体克隆:CD69(FN50,Biolegend公司)、CD25(BC96,Biolegend公司)、IFNγ(4S.B3,Biolegend公司)、αCD107a抗体(H4A3,Biolegend公司)、CD3(HIT3a,Biolegend公司)、CD4(OKT4,Biolegend公司)、CD8a(HIT8a,Biolegend公司)、PD1(H4A3,Biolegend公司)。在每种情况下,使用适当的同种型对照抗体。

[1056] 表征人类T细胞活化

[1057] CD69和CD25表达水平

[1058] 通过CD69和CD25的表面表达评估重组EpCAM双特异性T细胞衔接器或EpCAM双特异性T细胞衔接器病毒诱导T细胞活化的能力。来自PBMC或腹水样品的人类CD3细胞(在96孔平底板中75,000个细胞/孔)在单独培养基、EpCAM或对照双特异性T细胞衔接器蛋白(2ng/μL)或重组病毒(100vp/细胞)的存在下单独或与DLD、SKOV、CHO、CHOEpCAM或腹水靶细胞(15,000)一起培养。在一些情况下,添加抗PD1(Invivogen公司,#hpd1ni-mab7)抗体,终浓度为

2.5μg/mL。将CD3细胞与CD3/CD28磁珠(Dynabeads)(赛默飞世尔科技公司,#11131D)一起孵育,作为T细胞活化的阳性对照。除非另有说明,否则将细胞在37℃下培养24小时,并且随后用无酶细胞解离缓冲液(Gibco公司,#13151014)采集。用CD69、CD25、CD3、CD4或CD8表面表达抗体对总细胞进行染色,并且通过流式细胞术分析。通过与RPMI-1640中的板固定的CD3抗体(7.5μg/mL,HIT3a,Biolegend公司,#300313)或从恶性腹水样品中分离的液体一起孵育,通过多克隆活化CD3纯化的PBMC(100,000)来研究腹水液对T细胞活化(CD69、CD25)的影响。

[1059] IFNγ表达

[1060] 通过IFNγ表达,通过将T细胞与DLD细胞共培养6小时来评估EpCAM双特异性T细胞衔接器诱导T细胞活性的能力(在平底96孔板中,200,000个CD3细胞/孔、40,000个DLD细胞/孔)和2ng/μL重组EpCAM或对照双特异性T细胞衔接器。作为阳性对照,用可溶性PMA/离子霉素细胞活化混合物(Biolegend公司,#423301)刺激T细胞。在采集前5小时将布雷菲德菌素A(GolgiPlug,BD生物科学)添加到培养基中,此时采集CD3+T细胞并且细胞内染色IFNγ表达并且通过流式细胞术分析。

[1061] T细胞增殖

[1062] 为了研究T细胞增殖,将100,000CFSE标记的(CellTrace CFSE试剂盒,英杰公司,#C34554)CD3+T细胞与具有2ng/μL EpCAM或对照双特异性T细胞衔接器的96孔板形式的20,000个DLD细胞

[1063] 一起孵育。共培养后五天,对细胞进行CD3,CD4或CD8染色,并且通过流式细胞术测量活CD3+T细胞的CFSE荧光,使用精确计数珠标准化总细胞数(5000/孔,Biolegend公司,#424902)。使用FlowJo v7.6.5软件的增殖功能分析和建模荧光数据。数据表示为进入增殖周期的原始细胞的百分比(%除以)或原始种群中的细胞经历的平均细胞分裂数(分裂指数)。

[1064] CD107a脱粒

[1065] 在单独培养基或2ng/μL对照或EpCAM双特异性T细胞衔接器存在下,将DLD细胞(15,000细胞/孔)与平底96孔板中的75,000个CD3+T细胞共培养。将αCD107a或同种型对照抗体直接添加到培养基中。在37℃和5% CO_2下孵育1小时后添加莫能菌素(GolgiStop,BD生物科学),然后进一步孵育5小时。随后采集细胞,染色CD3、CD4或CD8并且通过流式细胞术分析。

[1066] 细胞因子释放

[1067] 按照制造商的说明使用LEGENDplex人类T辅助细胞因子面板(LEGENDplex Human T Helper Cytokine panel)(Biolegend公司,#740001)和流式细胞术定量从DLD/PBMC或胸腔积液细胞培养物中采集的上清液中的细胞因子。分析中包含的细胞因子是IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13、IL-17A、IL-17F、IL-21、IL-22、IFNγ和TNFα。

[1068] 体外靶细胞细胞毒性测定

[1069] 通过LDH释放或MTS测定评估由重组双特异性T细胞衔接器或病毒介导的靶细胞细胞毒性。在单独培养基、稀释的上清液或病毒(100vp/细胞)存在下,将靶细胞(DLD、SKOV、HT-29、A431、A549、PC3、CHO、CHO-EpCAM)与CD3、CD4或CD8 T细胞(E:T 5:1)在平底96孔板中共培养。共培养24小时后(除非另有说明),采集上清液和细胞,并且按照制造商的说明通过

LDH测定法(CytoTox 96非放射性细胞毒性测定,普洛麦格公司,#G1780)或MTS活力测定法(CellTiter 96细胞增殖测定,普洛麦格公司,#G3580)确定细胞毒性。通过比较稀释的病毒上清液诱导的细胞毒性与使用重组双特异性T细胞衔接器生成的标准曲线的细胞毒性来确定由病毒感染的DLD细胞产生的双特异性T细胞衔接器的量。

[1070] 为了评估病毒的溶瘤活性,将DLD细胞在37℃和5% CO_2下接种于96孔板(25,000个细胞/孔)中18小时,然后用增加的vp/细胞(5倍连续稀释,100到5.12e-5vp/细胞)感染或保持未感染。在第5天通过MTS活力测定法测量DLD细胞毒性。拟合剂量应答曲线并且使用集成到Prism 7软件(GraphPad软件)中的四参数非线性拟合模型确定IC 50。使用xCELLigence RTCA DP技术(艾森生物公司(Acea Biosciences))实时监测细胞活力。将DLD、SKOV3或MCF7细胞以12,000个细胞/孔接种在48孔E-板中。将板在37℃、5% CO_2下孵育18小时,然后用双特异性T细胞衔接器(2ng/μL)处理细胞或用病毒(100vp/细胞)感染细胞或保持不处理。感染后两小时,将75,000个CD3+细胞添加到必要的孔中。每15分钟测量细胞阻抗,持续时间长达160小时。对于离体细胞毒性测定,将来自腹水或胸腔积液样品的未纯化细胞重新悬浮于腹水液中并且在平底96孔板中铺板(1.5e5/孔)。在37℃、5% CO_2下孵育所述持续时间后,通过LDH测定分析上清液或通过细胞解离缓冲液采集总细胞,染色CD3、CD25和EpCAM,并且通过流式细胞术分析。对于PD1阻断实验,包含抗PD1抗体(2.5μg/mL,Invivogen公司,#hpd1ni-mab7)抗体。

[1071] 病毒基因组复制和qPCR

[1072] 通过在用100vp/细胞感染之前在24孔板(150,000细胞/孔)中在37℃、5%CO_2下接种DLD细胞18小时来分析EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器、EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器、EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器、EnAd-SA对照双特异性T细胞衔接器或EnAd复制其基因组的能力。感染后24小时和72小时采集孔,并且根据制造商的方案使用PureLink基因组DNA微型试剂盒(英杰公司,#K182001)纯化DNA。使用特异性引物-探针组(引物:TACATGCACATCGCCGGA/CGGGCGAACTGCACCA,探针:CCGGACTCAGGTACTCCGAAGCATCCT),通过针对EnAd六邻体的qPCR定量总病毒基因组。

[1073] 显微镜

[1074] 在Zeiss Axiovert 25显微镜上捕获明场和荧光图像。获得时间推移视频以通过EnAd或EnAd-CMVEpCAM双特异性T细胞衔接器观察病毒或T细胞介导的靶细胞溶解。未感染的细胞用作阴性对照。用CellTracker Orange CMTMR Dye(生命技术公司,#C2927)染色NHDF细胞,并且按照制造商的方案用CellTrace紫细胞增殖试剂盒(CellTrace Violet Cell Proliferation Kit)(生命技术公司,#C34557)染色CD3+细胞。将染色的NHDF以7,500个细胞/孔接种在24孔板中,以13,500个细胞/孔接种在共培养SKOV3中。将板在37℃、5% CO_2下孵育18小时。然后用300ng/mL EpCAM双特异性T细胞衔接器处理细胞或用100vp/细胞的EnAd或EnAd2.4-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器感染细胞或保持不处理。孵育2小时后,除了1.5μM CellEvent半胱天冬酶3-7试剂(生命技术公司,#C10423)之外,将100,000个染色的CD3+添加到必要的孔中。在Nikon TE 2000-E Eclipse倒置显微镜(10倍光学物镜)上以15分钟的间隔捕获图像,覆盖96小时的期间。使用ImageJ软件生成延时视频(12帧/秒)。

[1075] 统计

[1076] 在比较两个以上实验条件的所有情况下,使用Tukey的Post Hoc分析的单向ANOVA

测试执行统计分析。所有数据都以平均值±SD表示。使用的显著水平是P＝0.01-0.05(*)、0.001-0.01(**)、0.0001-0.001(***)。除非另有说明,否则所有体外实验一式三份执行。

[1077] 实例18-靶向EpCAM的双特异性T细胞衔接器的生成和产生

[1078] 通过将对CD3ε和EpCAM具有特异性的两种scFv与柔性甘氨酸-丝氨酸(GS)连接子连接来工程化靶向EpCAM的双特异性T细胞衔接器。还产生了识别CD3ε和无关抗原(百日咳博德特氏菌的丝状血细胞凝集素粘附素(FHA))的对照双特异性T细胞衔接器。将两个双特异性T细胞衔接器工程化成含有用于哺乳动物分泌的N-末端信号序列和用于检测和纯化的C-末端十八组氨酸亲和标记(图45A)。为了表征重组双特异性T细胞衔接器的功能,将其克隆到CMV立即早期启动子(分别为pSF-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器和pSF-CMV-对照双特异性T细胞衔接器)的转录控制下的表达载体中。

[1079] 用表达载体转染贴壁HEK293细胞(HEK293A),并且采集上清液并且浓缩50倍用于进一步分析。为了估计产生的双特异性T细胞衔接器的量,使用抗His,在斑点印迹中使用十八组氨酸标记的组织蛋白酶D作为标准连续稀释和评价样品。通过这种方式,在转染后48小时,可以估计产生于上清液中的双特异性T细胞衔接器水平约为20μg/mL(1.8e7 HEK293A细胞的)

[1080] (图46A)。通过ELISA证明EpCAM双特异性T细胞衔接器而非对照双特异性T细胞衔接器与重组EpCAM蛋白的特异性结合(图46B)。

[1081] 实例19-通过重组EpCAM双特异性T细胞衔接器表征人类T细胞活化

[1082] 通过将未刺激的人类原代CD3+细胞添加到人类DLD结肠直肠癌细胞的培养物中来评估重组EpCAM双特异性T细胞衔接器蛋白活化PBMC衍生的T细胞的能力,已知其在其表面上表达EpCAM(Karlsson等人,2008)。添加2.5ng/ml EpCAM双特异性T细胞衔接器(作为来自转导的HEK293A细胞的上清液)导致T细胞活化标记物CD69和CD25的显著增加(图45B和图45C),而对照双特异性T细胞衔接器没有效果。

[1083] 在不存在肿瘤细胞的情况下将CD3细胞暴露于EpCAM双特异性T细胞衔接器产生CD69和CD25的非常适度的增加,并且这指示抗体介导的CD3聚集对于通过此抗CD3结合的完全活化是必需的。在肿瘤细胞存在下由EpCAM双特异性T细胞衔接器刺激的T细胞还示出了γ干扰素(图45D)和细胞增殖(图45E)的产生显著增加,而对照双特异性T细胞衔接器没有效果。T细胞活化的目的是引起脱粒介导的细胞毒性,并且表面CD107a/LAMP1的表达(指示脱粒,Aktas等人)被EpCAM双特异性T细胞衔接器强烈上调,但不受对照的强烈上调(图45F)。

[1084] 通过使用细胞因子珠阵列的流式细胞术表征在DLD细胞存在下EpCAM双特异性T细胞衔接器介导的PBMC衍生的T细胞活化后细胞因子的释放。如前所述,对照双特异性T细胞衔接器示出了很少的活性,尽管EpCAM双特异性T细胞衔接器触发了几种细胞因子的释放,包含高水平的IL-2、IL-6、IL-10、IL-13、γ干扰素和TNF(图45G)。IL-2、γ干扰素和TNF的产生通常与Th1应答相关,而IL-6和IL-10通常与Th2应答相关(Mosmann&Sad,1996)。

[1085] 实例20-重组EpCAM双特异性T细胞衔接器的特异性

[1086] 大多数人类上皮细胞表达EpCAM,因此为了评估EpCAM双特异性T细胞衔接器的作用是否具有

[1087] 抗原特异性,使用慢病毒载体工程化中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)以在其表面上

表达人类EpCAM。在存在EpCAM双特异性T细胞衔接器和CHO-EpCAM细胞的情况下,外源添加的PBMC衍生的T细胞示出了强烈的活化(通过CD25表达评估,参见图47A)和用亲本CHO对照细胞或对照双特异性T细胞衔接器未见的相关细胞毒性(图47B)。这指示EpCAM双特异性T细胞衔接器的细胞毒性是抗原特异性的。

[1088] 然后,我们评估了EpCAM双特异性T细胞衔接器是否会杀死一系列肿瘤细胞,以及观察到的EpCAM双特异性T细胞衔接器介导的细胞毒性水平是否依赖于EpCAM表达的密度。在六种不同的癌细胞系中测量在EpCAM双特异性T细胞衔接器存在下T细胞的细胞毒性,在DLD和A431中观察到最大的细胞毒性,在A549和PC3中观察到最少的细胞毒性(图47C)。这示出了与EpCAM的表面水平(通过流式细胞术确定)松散相关,其中A549和PC3细胞示出了最低水平并且DLD示出了最高水平(图47D)。这表明EpCAM表达的存在和水平确实影响细胞毒性的程度,尽管其它因素(可能是细胞对颗粒酶介导的细胞凋亡的内在抗性)还在确定细胞杀伤的总体水平中起作用。

[1089] 实例21-双特异性T细胞衔接器介导的CD4+和CD8+T细胞亚群的活化

[1090] 为了确定哪些T细胞类型被EpCAM双特异性T细胞衔接器活化,将PBMC衍生的T细胞与DLD细胞一起孵育并且在流动分析之前使用双特异性T细胞衔接器活化。CD4+和CD8+细胞均示出高水平的CD69和CD25表达(图49A),尽管活化的CD4细胞的百分比通常略高。使用CFSE染色评估EpCAM双特异性T细胞衔接器介导的T细胞增殖(图49B),并且通过CD197a/LAMP1的表达进行脱粒(图49C),并且对于CD4+和CD8+细胞均观察到类似的活化水平。最后,使用EpCAM双特异性T细胞衔接器比较实现的肿瘤细胞细胞毒性水平以活化纯化的CD4+和CD8+亚群。所有T细胞制剂示出相似的细胞毒性(图49D),指示CD4+和CD8+细胞均可以促成观察到的双特异性T细胞衔接器介导的细胞毒性。

[1091] 实例22-来自溶瘤腺病毒EnAdenotucirev的EpCAM双特异性T细胞衔接器的表达

[1092] EnAdenotucirev(EnAd)是溶瘤腺病毒,B组11型和3型腺病毒的嵌合体,具有镶嵌的E2B区,几乎完整的E3缺失和映射到E4或f4的较小的E4缺失(Kuhn,2008)。目前正在进行几项治疗癌症的早期临床试验,所述病毒将良好的全身药代动力学和有前景的临床活性与编码和表达转基因的可能性相结合(Calvo 2014,Boni 2014)。使用通过Gibson组装插入病毒骨架的穿梭载体,EpCAM双特异性T细胞衔接器在紧邻纤维基因下游的EnAd内编码(图18)。将双特异性T细胞衔接器置于CMV立即早期启动子(EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器)的转录控制下,或置于腺病毒主要晚期启动子(MLP;EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器)的剪接受体位点的下游。在前一种配置中,只要病毒成功感染细胞就应表达双特异性T细胞衔接器,而MLP剪接受体位点的表达只有在MLP在允许病毒复制的细胞中被活化时才会发生。还引入了对照双特异性T细胞衔接器(识别CD3和FHA)以创建两种对应的对照病毒。

[1093] 克隆病毒,在HEK293A细胞中获救,并且在超滤液中制备大批的病毒,并且通过氯化铯条带纯化两次。用亲本EnAd和重组双特异性T细胞衔接器病毒感染DLD在所有测试时间点产生相似量的病毒基因组(通过qPCR测量),指示双特异性T细胞衔接器转基因不干扰病毒复制动力学(图51A)。接下来,我们研究了在没有人类T细胞的情况下病毒的复制和溶瘤性质。用增加的病毒颗粒(vp)/细胞的病毒批次感染DLD细胞,并且在第5天通过MTS测定法测量细胞毒性。由CMV启动子或剪接受体调节的所有重组病毒,包含具有EpCAM和对照双特异性T细胞衔接器的重组病毒,示出了与亲代病毒无法区分的细胞毒活性,显示遗传修饰未

改变病毒的内在溶瘤活性(图51B)。

[1094] 为了评估双特异性T细胞衔接器表达和分泌,使用表达双特异性T细胞衔接器的EnAd病毒感染HEK293A细胞,并且使用抗His抗体通过蛋白质印迹检查72小时上清液。如图51C所示,所有四种病毒(两种表达对照双特异性T细胞衔接器和两种表达EpCAM双特异性T细胞衔接器)示出了分泌到上清液中的相似水平的双特异性T细胞衔接器。

[1095] 实例23-通过病毒产生的EpCAM双特异性T细胞衔接器选择性杀死EpCAM阳性细胞

[1096] 将来自EnAd-EpCAM双特异性T细胞衔接器感染的HEK293A细胞的上清液添加到具有或不具有PBMC衍生的T细胞的CHO和CHO-EpCAM细胞培养物中;24小时后测量T细胞活化和对CHO/CHO-EpCAM细胞的细胞毒性。在CHO细胞的情况下,CD25的T细胞表达没有增加(图51D),也没有任何处理观察到的任何细胞毒性(图51E)。然而,使用来自已经用EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器或EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器病毒感染的HEK293A细胞的上清液,与CHO-EpCAM细胞一起孵育的T细胞示出了CD25表达显著增加(图51D)。正如预期的那样,只有在已经用EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器或EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器病毒感染的293A细胞的上清液存在下添加T细胞时,这才转化为对CHO-EpCAM细胞的选择性细胞毒性(图51E)。至关重要的是,在没有T细胞的情况下没有细胞毒性,或者当使用来自HEK293A的上清液时细胞已经用表达对照双特异性T细胞衔接器的EnAd感染。

[1097] 实例24-表达EnAd的EpCAM双特异性T细胞衔接器的优异细胞毒性

[1098] EnAd通过直接溶瘤作用快速杀死大多数癌细胞(Kuhn,2008),尽管一些细胞-具体的说SKOV3卵巢癌细胞-部分抗性并且杀死更慢。因此,我们推断,携带End分泌EpCAM双特异性T细胞衔接器,从而导致T细胞的细胞毒活化可能在SKOV3细胞中特别明显。因此,细胞在接种后24小时暴露于病毒(100vp/细胞),并且通过xCELLigence系统监测细胞死亡。2小时后,将PBMC衍生的T细胞添加(或不添加)到SKOV3细胞培养物中。在不存在T细胞的情况下,肿瘤细胞生长约72小时(由图53A中的细胞指数信号增加表明),但细胞生长然后达到平台并且在不受病毒感染的情况下保持稳定,直至至少160小时。所有测试的病毒,包含亲本EnAd,在测量的时间内均未诱导可观察到的靶细胞细胞毒性。然而,当与PBMC衍生的T细胞共培养时,CMV和SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器携带的病毒均诱导快速SKOV3溶解,CMV驱动的诱导溶解在16小时内,并且SA在添加T细胞后44小时内(图53B)。重要的是,即使添加T细胞,亲本EnAd或非特异性双特异性T细胞衔接器对照病毒在此时间范围内也未显示靶细胞溶解。此结果通过LDH测定证实,其中建立了与上述相同的共培养物,在感染后24小时、48小时和96小时测量细胞毒性(图48)。DLD细胞中的类似发现进一步支持了这些结果,其中表达EpCAM双特异性T细胞衔接器的病毒以比对照双特异性T细胞衔接器病毒显著更快的速率诱导细胞毒性(图50A+图50B)。

[1099] 为了证实靶细胞的细胞毒性是通过T细胞活化介导的,在每个时间点采集CD3细胞,并且通过CD69和CD25表达确定活化状态,从而证明了与细胞毒性观察到的相似的表达动力学(图53C和图53D,图50C和图50D)。通过比较由感染的DLD上清液诱导的细胞毒性(Abs490)与由已知量的重组双特异性T细胞衔接器诱导的细胞毒性(即创建标准曲线(Abs490))来确定由感染的DLD细胞产生的EpCAM双特异性T细胞衔接器的近似量。将与CD3纯化的PBMC(1:5)共培养的DLD与重组双特异性T细胞衔接器(图50E)或感染的DLD上清液(图50F)一起孵育,并且在24小时测量LDH释放,这使我们能够确定EpCAM双特异性T细胞衔

接器是对于EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器和EnAd-SAEpCAM双特异性T细胞衔接器，分别以165μg和50μg/百万DLD产生。EpCAM双特异性T细胞衔接器的EC50为7.4ng/ml(图50E和图50F)，并且因此EpCAM双特异性T细胞衔接器由重组病毒以可能达到治疗剂量的水平产生。

[1100] 通过时间推移视频显微镜观察表达EpCAM双特异性T细胞衔接器的EnAd的细胞毒性。在半胱天冬酶染色剂存在下(当胱天蛋白酶被活化时，CellEvent半胱天冬酶3-7试剂产生绿色染色)，将SKOV3肿瘤细胞(未标记的)与正常人类成纤维细胞(EpCAM阴性，标记为红色，用作非靶对照细胞)和PBMC衍生的T细胞(标记为蓝色)共孵育。表达EpCAM双特异性T细胞衔接器的EnAd与外源T细胞的组合再次对SKOV3肿瘤细胞产生显著的细胞毒性，当用EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器而不是亲本EnAd感染时，其显示出强烈的细胞凋亡诱导。重要的是，共培养中的EpCAM阴性NHDF始终存在。在图53E中示出了来自SKOV3视频的不同时间点的代表性荧光图像。还示出了显示与NHDF共培养的DLD细胞(其本质上对病毒更敏感)的等效时间推移视频。

[1101] 实例25-EpCAM双特异性T细胞衔接器可以克服免疫抑制，活化内源性T细胞并且杀死恶性腹膜腹水内的内源性肿瘤细胞

[1102] 将含有EpCAM阳性肿瘤细胞和原代成纤维细胞(作为对照，非表达EpCAM的细胞)的恶性腹膜腹水样品的三个临床样品离体扩增，并且将混合的原代细胞群与PBMC衍生的T细胞一起孵育，并且在培养基中用游离双特异性T细胞衔接器或100vp/细胞EnAd-EpCAM双特异性T细胞衔接器处理。72小时后，通过流式细胞术测量EpCAM阳性靶细胞(图55A)或非靶成纤维细胞活化蛋白(FAP)阳性成纤维细胞(图55B)的水平。通过测量CD25表达分析T细胞的活化(图55C)。游离EpCAM双特异性T细胞衔接器和表达EpCAM双特异性T细胞衔接器的病毒诱导T细胞活化，导致EpCAM阳性肿瘤细胞消耗，原发性FAP阳性(EpCAM阴性)成纤维细胞数量未显示出变化。这在所有患者的样品中都观察得到，并且没有其它治疗示出任何显著效果。这证明EpCAM双特异性T细胞衔接器(或编码它的溶瘤病毒)可以介导PBMC衍生的T细胞对人类卵巢腹水肿瘤细胞的活化和选择性细胞毒性。

[1103] 恶性渗出物可能代表具有潜在免疫耐受性的环境，其具有通常在晚期转移性癌症患者中观察到的抑制的免疫应答。为了验证这一假设，我们用培养基中的抗CD3抗体或来自五名腹膜恶性肿瘤患者的100％腹水液进行多克隆刺激的PBMC衍生的T细胞。在RPMI培养基中，抗CD3抗体为CD25和CD69提供了约50％的T细胞阳性，如通过降低的抗体介导的CD69/CD25表达升高所确定的，腹水液的存在似乎减弱了T细胞的活化，并且这对于患者流体#2尤其明显(图56A)。这支持了我们的观点，即腹水液的成分可能发挥免疫抑制或耐受作用。然而，活化标记物增加的这种减弱与T细胞脱粒的抑制无关，其中腹水液中的CD107a外化与培养基中的类似(图56B)。由此可见，双特异性T细胞衔接器可能能够绕过肿瘤微环境相关的T细胞免疫抑制机制(Nakamura&Smyth，2016)。

[1104] 因此，我们研究了PBMC衍生的T细胞和EpCAM双特异性T细胞衔接器在免疫抑制性腹水液存在下介导靶细胞细胞毒性的能力。与腹水液1和2一起孵育的T细胞在RPMI培养基中(使用xCELLigence测量)诱导与人类乳腺癌MCF7细胞系相似的溶解，尽管在患者腹水液#2存在下细胞毒性显示延迟约8小时(图56C)。除了存在的免疫抑制液和肿瘤细胞外，腹水还含有肿瘤相关的淋巴细胞和肿瘤基质的支持细胞，从而提供了独特的肿瘤样模型系统来测

试双特异性T细胞衔接器介导的内源性患者来源T细胞的活化。在用游离重组双特异性T细胞衔接器孵育总内源细胞和腹水液24小时后,评估患者T细胞的活化(图56D)。在这种高度临床相关的环境中,EpCAM双特异性T细胞衔接器(但不是对照组)诱导CD69和CD25表达,尽管当实验在100%腹水中执行时CD25处于较低水平而不是在简单培养基中。这些数据表明,EpCAM双特异性T细胞衔接器可以克服腹膜腹水液中至少一些免疫抑制作用来活化内源性T细胞。通过测量LDH的释放来评估细胞毒性,并且当在培养基中以及在100%腹水液中进行实验时,双特异性T细胞衔接器引起显著的上升。这指示一些腹水细胞已被双特异性T细胞衔接器介导的细胞毒性杀死,尽管鉴于原发性腹水中存在多种细胞类型,但不可能限定杀死肿瘤细胞的比例。

[1105] 实例26-表达EpCAM双特异性T细胞衔接器的EnAd可以活化内源性T细胞以杀死恶性胸膜渗出物中的内源性肿瘤细胞

[1106] 为了研究表达EpCAM双特异性T细胞衔接器的病毒在另一个临床相关环境中的作用,我们从一系列恶性肿瘤患者中获得了几个胸膜渗出物样品。在初始筛选时(图52中示出了一个实例),被认为适合进一步分析的样品是含有CD3和EpCAM阳性细胞的样品。我们还评估了初始分离后内源性T细胞PD1的表达,而只有10%的PBMC衍生的T细胞表达PD1,所有恶性胸腔积液样品T细胞至少40%为PD1阳性并且有时达到高为100%(图54)。在500ng/mL游离EpCAM双特异性T细胞衔接器或100vp/细胞病毒编码双特异性T细胞衔接器的存在下,将未纯化的总细胞(通过离心和重悬浮分离)在100%胸腔积液中以固定浓度孵育。5天后,采集总细胞群,并且测量CD3+细胞的总数(图57A)。

[1107] 与未处理的对照相比,仅接受游离EpCAM双特异性T细胞衔接器或编码EpCAM双特异性T细胞衔接器的EnAd的样品示出了T细胞增殖。这证实了EpCAM双特异性T细胞衔接器与EpCAM靶结合并且交联CD3以刺激内源性T细胞。还确定了CD3细胞上CD25的表达水平(图57B)。游离EpCAM双特异性T细胞衔接器诱导所有患者样品中肿瘤相关淋巴细胞的显著T细胞活化(通过CD25表达评估),甚至在胸腔积液的可能的免疫耐受环境中也是如此。在这种情况下,添加抗PD1阻断抗体对EpCAM双特异性T细胞衔接器介导的T细胞活化没有影响(图54B和图54C)。患者之间存在显著差异(尽管来自同一患者的样品之间几乎没有变化),依赖于供体的活化范围为50%到90%。类似地,用表达EpCAM双特异性T细胞衔接器的EnAd处理的样品在一些患者中示出了高活化(对于EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器和EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器,范围从10%到20%直到80%)。

[1108] 有趣的是,显示出最低双特异性T细胞衔接器介导的活化的患者还示出了最低水平的背景T细胞活化。亲本EnAd或表达对照双特异性T细胞衔接器的EnAd或游离对照双特异性T细胞衔接器在背景上没有引起刺激。

[1109] 我们通过在五天孵育结束时通过流式细胞术测量EpCAM阳性细胞的残留水平来评估表达双特异性T细胞衔接器的病毒介导EpCAM靶向细胞毒性的能力(图57C)。游离的EpCAM双特异性T细胞衔接器和编码EpCAM双特异性T细胞衔接器的两种病毒在每种情况下都引起自体EpCAM表达细胞的显著消耗,而其它处理对EpCAM阳性细胞的水平几乎没有或没有影响。在样品#1的情况下,与未处理的对照相比,所有基于EnAd的病毒的存活率略微降低,并且这可能代表直接病毒溶瘤作用的影响。与PD1阻断抗体对T细胞活化缺乏影响相结合,其对EpCAM双特异性T细胞衔接器介导的靶细胞杀伤没有影响,在不存在PD1阻断剂的情况下

EpCAM+细胞(患者2、3和4)具有几乎完全细胞毒性

[1110] (图54D)。

[1111] 亲本EnAd和EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器的不同作用通过图57D中的显微镜显示,其中双特异性T细胞衔接器的表达降低肿瘤细胞的存在并且扩增T细胞群。相关的流式细胞术图证实了用表达EpCAM双特异性T细胞衔接器的病毒处理后T细胞的显著扩增和活化。

[1112] 最后,通过测量使用LEGENDplex蛋白质阵列产生的关键细胞因子的水平来表征各种处理的效果(图57E)。到目前为止,最大倍数增加的是γ干扰素,在用游离的EpCAM双特异性T细胞衔接器或编码EpCAM双特异性T细胞衔接器的EnAd处理后,其增加了近1000倍。这两种治疗还使IL-5、IL-13、肿瘤坏死因子(TNF)、IL17A和IL17F的表达增加约10倍,这是活化T细胞的特征。单独的EnAd(或表达对照双特异性T细胞衔接器)还引起γ干扰素的10倍升高,但是在其它方面没有治疗引起细胞因子表达的任何明显变化。

[1113] 实例27-讨论

[1114] 溶瘤病毒提供了一种有趣的新策略,将多种治疗方式结合在一个有针对性的自我放大剂中(Keller&Bell,2016;Seymour&Fisher,2016)。由于它们在癌细胞内选择性复制并且在细胞间传播,因此一些溶瘤病毒被认为通过非凋亡性死亡途径介导细胞死亡(Ingemarsdotter等人,2010;Li等人,2013),这是允许病毒颗粒从垂死细胞中逃逸的过程的一部分。特别地,EnAd通过称为肿瘤或缺血性细胞死亡的促炎过程杀死细胞(Dyer,2017)。这种非凋亡性死亡机制导致几种促炎细胞组分的释放,如ATP、HMGB1和钙网蛋白的暴露(称为损伤相关分子模式,

[1115] DAMP)(Weerasinghe和Buja,2012),并且可能是病毒促进有效抗癌免疫应答的能力的关键。然而,除了直接溶解的后果之外,病毒还提供编码和表达其它抗癌生物制剂的潜力,从而避免了递送挑战并且确保生物制剂在肿瘤微环境中达到其最高浓度。Imlygic编码GM-CSF,然而携带病毒的可能性实际上是无限的,并且提供了许多令人兴奋的机会来设计具有添加的或协同的抗癌作用的多模式治疗策略(de Gruijl等人,2015;Hermiston&Kuhn,2002)。

[1116] 在溶瘤病毒中编码双特异性T细胞衔接器提供了活化肿瘤浸润淋巴细胞变成细胞毒性和溶解抗原阳性靶细胞的有力手段,从而提供了与直接病毒溶解的效果完全分开的治疗方式。在此研究中,我们已经示出了

[1117] 双特异性T细胞衔接器靶向的细胞毒性是完全抗原特异性的,可以由CD4和CD8T细胞介导

[1118] (Brischwein等人,2006),并且可以掺入溶瘤腺病毒中并且仅在允许病毒复制的细胞中表达。此外,目前的研究首次示出了液体癌活组织检查中的内源性T细胞可以被双特异性T细胞衔接器和病毒编码的双特异性T细胞衔接器活化,并且可以杀死内源性肿瘤细胞而无需任何额外的刺激或逆转免疫抑制。重要的是,这甚至可以在包括腹膜腹水或胸腔积液的微环境的初级流体中发生,作为实体瘤的免疫抑制微环境的替代物。

[1119] 携带溶瘤病毒以表达双特异性T细胞衔接器结合了两种截然不同的治疗机制,前者提供允许病毒感染的肿瘤细胞的溶解性死亡,并且后者通过特异性的选择的抗原靶向T细胞细胞毒性。这在治疗方法的设计中提供了相当大的灵活性,可能使用双特异性T细胞衔

接器向肿瘤相关细胞递送细胞毒性,所述细胞对病毒的直接杀伤具有相对抗性。例如,虽然我们已经使用识别癌相关抗原(EpCAM)的双特异性T细胞衔接器示例了这里的技术,但也可以使用双特异性T细胞衔接器方法靶向肿瘤相关成纤维细胞或其它基质细胞的细胞毒性。实际上,即使当双特异性T细胞衔接器识别的靶不限于在肿瘤微环境中表达时,通过将双特异性T细胞衔接器产生与病毒复制相关联,允许双特异性T细胞衔接器的表达在空间上限于肿瘤,从而使全身毒性最小化。这很重要,因为静脉内施用的双特异性T细胞衔接器示出了相对短的循环动力学(Klinger等人,2012),并且通常与相当大的靶向肿瘤外毒性相关(Teachey等人,2013)。

[1120] 先前已经使用具有靶向Ephrin A2的双特异性T细胞衔接器的溶瘤痘苗病毒探索了在溶瘤病毒内编码双特异性T细胞衔接器的可能性。此试剂示出了Ephrin双特异性T细胞衔接器可以在体外和体内介导PBMC的活化和抗原靶向的肿瘤细胞杀伤。有趣的是,虽然双特异性T细胞衔接器可以活化T细胞,但是如果不添加外源性IL-2,其就不会导致T细胞增殖,而目前研究中使用的双特异性T细胞衔接器导致体外PBMC的广泛增殖和使用离体临床活检样品的肿瘤相关淋巴细胞的广泛增殖。

[1121] 我们认为观察到的差异可能反映了不同的双特异性T细胞衔接器设计,所使用的不同溶瘤病毒或可能取决于抗原密度,从而在T细胞上产生足够的CD3交联。

[1122] 溶瘤病毒治疗的一个中心目标是创建识别患者特异性新抗原以及“公共”肿瘤相关抗原的抗癌T细胞应答。溶解病毒可以通过在DAMP背景下溶解肿瘤细胞以及病毒相关病原体相关分子模式(PAMP)来刺激改善的抗原呈递来实现这一点。在静脉内递送EnAd后,切除的结肠肿瘤的免疫组织化学染色表明所述病毒促进CD8+T细胞大量流入肿瘤组织(Garcia-Carbonero,2017)。然而,尽管这可能是非常有效的方法,但是适应性T细胞应答最终依赖于肿瘤细胞对MHC I类抗原的表达,以允许靶向杀伤。MHC表达缺失是充分证明的肿瘤免疫逃避策略(Garrido等人,2016)。

[1123] 值得注意的是,由双特异性T细胞衔接器携带的溶瘤病毒立即参与的细胞毒性策略由肿瘤细胞独立于MHC I类来发挥作用,并且因此即使当肿瘤细胞丧失MHC表达时也可以用于杀死癌细胞。

[1124] 因此,本研究证明在EnAd内编码双特异性T细胞衔接器提供了一种特别有前景的策略,以在扩散的肿瘤中实现靶向表达,利用已知的血液稳定性和病毒的全身生物利用度,这现已经在几个早期临床试验中进行了研究。值得注意的是,在一项在原发性结肠癌切除前几天静脉注射病毒的研究中,随后对肿瘤切片的免疫组织学评估示出了病毒已经通过肿瘤到达区,并且产生强烈的核内六邻体信号,从而指示感染成功并且病毒在肿瘤细胞中选择性复制。这证实了临床前数据(Di等人,2014;Illingworth,2017),所述数据指示此病毒在100%人类血液中是稳定的,并且应该能够对人类患者的播散性和转移性恶性肿瘤进行肿瘤靶向感染。

[1125] 双特异性T细胞衔接器可以由EnAd编码而没有任何溶瘤毒力的损失(图51B),反映了病毒的相当大的转基因包装能力。转基因的存在不会影响病毒颗粒的物理化学性质,因此经修饰的病毒应该展现出与亲本试剂完全相同的临床药代动力学,并且应该能够在整个身体的肿瘤内选择性地表达经编码双特异性T细胞衔接器。这为系统靶向的癌症免疫疗法提供了一种令人兴奋且可能非常有效的新方法,所述癌症免疫疗法现在应优先用于临床评

估。

[1126] 实例28

[1127] 患者恶性渗出液对人类T细胞活化和靶细胞细胞毒性的免疫抑制

[1128] 恶性渗出物代表具有潜在免疫耐受性的环境,其具有通常在晚期转移性癌症患者中观察到的抑制的免疫应答。使用人类IL-10ELISA MAX试剂盒(Biolegend,430604)在正常血清或患者恶性渗出液(A,腹膜腹水;P,胸腔积液)中测量被认为是抗炎细胞因子的IL-10的量。渗出液中的IL-10水平(88.1pg/mL到633.4pg/mL)远远超过在正常血清中测量的水平(7.2pg/mL到10pg/mL)。参见图58。

[1129] 研究了CD3/CD28珠(Gibco,11161D)在正常血清、腹水或胸膜液存在下活化PBMC T细胞的能力。在正常血清或患者渗出液(50%)中用CD3/CD28珠(遵循制造商说明书)处理人类PBMC T细胞(96孔板中每孔100,000个细胞)。在每种液体中不处理的T细胞作为阴性对照。培养24小时后,采集细胞并且然后通过抗体染色分析CD3+T细胞上CD69和CD25的表达水平,并且将流式细胞术表示为双阳性(CD69+CD25+细胞)的百分比(图59)。在正常血清中,抗CD3/CD28珠产生CD25和CD69双重阳性的约60%的T细胞,而腹水液的存在减弱了6/12液体中的T细胞活化。

[1130] 在类似的实验中,在正常血清、腹水或胸膜液(50%)存在下用CD3/CD28珠处理100,000个T细胞。将抗CD107a或同种型对照抗体直接添加到培养基中。1小时后,根据制造商的说明添加莫能菌素(BD Golgistop,BD Biosciences)。再过5小时后,采集细胞并且通过流式细胞术分析以确定脱粒(图60)。在正常血清中,抗CD3/CD28珠产生约22.5%的T细胞脱粒,而腹水液的存在减弱了10/12液体中的T细胞活化。脱粒水平与每种液体中IL-10的量显著相关(Pearson系数,r=-0.7645;p=0.0038)(图61)。

[1131] 在类似的实验中,在正常血清、腹水或胸膜液(50%)存在下,将75,000个T细胞与15,000个SKOV3和EpCAM共培养。用每种液体中的对照双特异性T细胞衔接器处理的T细胞作为阴性对照。培养24小时后,采集细胞并且然后通过抗体染色分析CD3+T细胞上CD69和CD25的表达水平,并且将流式细胞术表示为双阳性(CD69+CD25+细胞)的百分比(图62)。在正常血清中,EpCAM双特异性T细胞衔接器给予约67.6%的CD25和CD69双重阳性的T细胞,而腹水液的存在减弱了0/12液体中的T细胞活化,并且在4/10液体中略微诱导活化。

[1132] 在类似的实验中,在正常血清、腹水或胸膜液(50%)存在下,将75,000个T细胞与15,000个SKOV3和EpCAM共培养。用每种液体中的对照双特异性T细胞衔接器处理的T细胞作为阴性对照。将抗CD107a或同种型对照抗体直接添加到培养基中。1小时后,根据制造商的说明添加莫能菌素(BD Golgistop,BD Biosciences)。再过5小时后,采集细胞并且通过流式细胞术分析以确定脱粒(图63)。在正常血清中,EpCAM双特异性T细胞衔接器珠给予约41.4%的T细胞脱粒,而腹水液的存在减弱了2/12液体中的T细胞活化。

[1133] 使用xCELLigence技术评估EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器和EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器诱导恶性渗出液中T细胞介导的靶细胞溶解的能力。将SKOV细胞分别以1e4细胞/孔接种在48孔E板中。将板在37℃、5%CO_2下孵育18小时,然后将细胞用每个细胞100个病毒颗粒(ppc)感染或保持未感染。两小时后,添加正常血清或患者渗出液(最终,50%)中的PBMC T细胞(5:1)。xCELLigence用于每10分钟测量靶细胞的细胞毒性(图64)。结果表明,T细胞的双特异性T细胞衔接器介导的SKOV3溶解与所使用的液体无关。

[1134] 将未纯化的腹水细胞(因此从接收时保持不变)以每孔100,000个细胞接种于RPMI培养基或腹水液中的平底96孔板中。用EpCAM或对照双特异性T细胞衔接器处理细胞,未处理的孔用作阴性对照。在37℃孵育24小时后,采集细胞并且确定CD3细胞上CD25和CD69的表达水平(图65)。结果证明EpCAM双特异性T细胞衔接器导致肿瘤相关淋巴细胞的T细胞活化(CD69/CD25双阳性)显著增加,腹水液略微增加。

[1135] 在类似的实验中,将未纯化的腹水细胞(因此从接收时保持不变)以每孔100,000个细胞接种在RPMI培养基或腹水液中的平底96孔板中。用EpCAM、对照双特异性T细胞衔接器或重组双特异性T细胞衔接器病毒(100vp/细胞)处理细胞,未处理的孔用作阴性对照(图66)。在37℃孵育5天后,采集总细胞群,并且确定CD3+细胞的数量(图66A)和CD3细胞上CD25的表达水平(图66B)和通过流式细胞术确定的内源性EpCaM+细胞的数量(图66C)。使用精密计数珠确定每孔的总细胞数。结果证明EpCAM双特异性T细胞衔接器和EnAd表达EpCAM双特异性T细胞衔接器导致肿瘤相关淋巴细胞的T细胞活化(CD3数,CD25)和RPMI培养基和腹水液中EpCAM+细胞的细胞毒性显著增加。

[1136] 作为上述实验的延伸,在腹水液中相同地处理另外六个患者的渗出物样品(总共7个)(图67),并且通过流式细胞术确定CD3+的数量(图67A)、T细胞的CD25表达(图67B)和EpCAM+细胞的数量(图67C)。结果示出了EpCAM双特异性T细胞衔接器和表达EpCAM双特异性T细胞衔接器的EnAd导致肿瘤相关淋巴细胞的T细胞活化(CD3数,CD25)和EpCAM+细胞的细胞毒性在一系列渗出活检样品中可重复地显著增加。

[1137] 实例29

[1138] FAP双特异性T细胞衔接器通过不同的供体T细胞介导T细胞的活化和FAP+细胞的杀伤

[1139] 在其它实验中,与使用抗CD3/CD28磁珠的对照双特异性T细胞衔接器和多克隆T细胞活化相比较,使用实例2中描述的方法进一步评估在NHDF和T细胞的共培养物中测试的重组FAP双特异性T细胞衔接器蛋白的T细胞活化性质。

[1140] 培养24小时后取出的上清液通过ELISA测试IFNγ(图68A),并且通过细胞因子珠阵列(LEGENDplex人类T辅助细胞因子组,BioLegend#74001)测试一组细胞因子(图68B)。对照双特异性T细胞衔接器诱导任何细胞因子没有显著变化,然而,FAP-双特异性T细胞衔接器导致γ干扰素、IL-2、TNFα、IL-17和IL-10的强烈增加,与刺激的T细胞的不同亚群一致,并且IFNγ的产生远远大于由抗CD3/CD28引发的。

[1141] 在存在NHDF细胞的情况下用FAP双特异性T细胞衔接器但不用对照双特异性T细胞衔接器刺激还诱导T细胞(CD4+和CD8+亚群)的快速脱粒(在6小时内),如通过T细胞表面上CD107a/LAMP1的外化(通过流式细胞术评估)所确定的,这与它们杀死靶细胞的能力密切相关(图69A和图69B)。通过FAP双特异性T细胞衔接器进行的此脱粒诱导转化为有效的成纤维细胞溶解(图69C),通过与PBMC T细胞(EC_{50}为约2.5ng/mL)共培养24小时后的LDH释放所测量的,其中使用6/6供体T细胞观察到诱导的T细胞活化和细胞毒性(图69D)。对照双特异性T细胞衔接器没有诱导细胞毒性,与保持在灭活状态的T细胞一致。

[1142] 实例30

[1143] FAP双特异性T细胞衔接器和EnAd-FAP双特异性T细胞衔接器病毒对不同癌症患者原发性恶性腹水样品细胞的影响

[1144] 作为实例16中所描述的研究的后续,获得来自另外的癌症患者的新鲜原发性恶性腹膜腹水用于研究EnAd FAP双特异性T细胞衔接器病毒活性。将含有$EpCAM^+$肿瘤细胞和FAP^+成纤维细胞的三个患者样品离体扩增,并且将混合(贴壁)细胞群与PBMC衍生的T细胞和未修饰的或表达双特异性T细胞衔接器的EnAd病毒一起培养。72小时后,采集总细胞并且通过流式细胞术确定FAP^+(图70A)和$EpCAM^+$细胞(图70B)的数量。另外,测量T细胞的活化状态(通过CD25表达)(图70C)。用EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器和EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器感染诱导所有患者样品中的T细胞活化和FAP^+细胞消耗,而$EpCAM^+$肿瘤细胞的水平没有显著变化。亲本EnAd或对照病毒均未诱导可观察到的T细胞活化,FAP^+细胞数量与未感染对照相似。

[1145] 重要的是,FAP^+成纤维细胞的这种消耗一致地导致在上清液中检测到的免疫抑制细胞因子TGFβ水平的强烈降低(图70D)。

[1146] 在第二系列实验中,评估来自五个患者活组织检查样品的总(和未纯化)细胞以评估样品中内源性肿瘤相关T细胞的活性。将细胞接种在50%腹水液中,并且用重组对照或FAP双特异性T细胞衔接器蛋白或100vp/细胞的EnAd或EnAd-双特异性T细胞衔接器病毒处理。孵育5天后,通过流式细胞术测量T细胞活化(通过CD25表达)和残留数量的FAP^+细胞(图71A和图71B)。在所有3个患者样品中,重组FAP-双特异性T细胞衔接器和EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器诱导强烈的T细胞活化,高达约80%的患者来源的T细胞被活化,这导致FAP^+成纤维细胞显著消耗。有趣的是,EnAd-SA-FAP-双特异性T细胞衔接器在2/3样品中诱导CD25表达,在患者1中没有可观察到的活化或FAP^+细胞消耗。这可能是由于病毒感染的肿瘤细胞不足以及双特异性T细胞衔接器蛋白的产生(通过流式细胞术在此样品中未检测到$EpCAM^+$肿瘤细胞),这与肿瘤细胞对MLP(SA)驱动的转基因表达的需求一致(这还可能解释了EnAd-SA-FAP-双特异性T细胞衔接器病毒缺乏T细胞活化和FAP^+细胞消耗,患者腹水样品如图42到图44所示)。总的来说,数据示出了在肿瘤细胞感染后,表达FAP-双特异性T细胞衔接器的EnAd可重复地导致肿瘤相关T细胞的活化以杀死内源性成纤维细胞。

[1147] 另一项实验研究了是否可以通过使用患者活组织检查样品阻断PD-1检查点来改善FAP-双特异性T细胞衔接器活性,其中T细胞为73.6%PD-1阳性并且FAP^+细胞为62.9%PDL1阳性(图72A)。在存在或不存在针对人类PDL1的纯化的阻断小鼠IgG2b抗体(BioLegend,克隆29E.2A3)的情况下建立与上文所描述的那些类似的共培养物,终浓度为2.5μg/mL。培养2天后,采集总细胞并且测量残留的FAP+细胞和T细胞活化。包含阻断性抗PDL1抗体导致CD25诱导适度增加(图72B)和IFNγ产生高两倍(图72C),而在第2天在任一情况下均没有改变FAP+细胞的消耗,几乎完全溶解(图72D)。

[1148] 据报道,从卵巢癌患者腹水中分离的肿瘤相关淋巴细胞(TAL)富集了PD-1的表达并且影响了效应子功能-包含细胞毒性和IFNg产生。与此一致,来自六个癌症患者腹水活组织检查的$CD3^+$细胞的PD-1表达比来自三个健康供体的外周血单核细胞(PBMC)的所述表达高2倍(图73A)。为了评估这些癌症活组织检查样品中T细胞的功能,将NHDF细胞和未纯化的PBMC或腹水细胞(在图73B中示出了样品中的每一个的%CD3+细胞)与对照或含有FAP双特异性T细胞衔接器的上清液共培养,并且5天后采集上清液,并且通过ELISA测试IFNγ(图73C)。对照双特异性T细胞衔接器未诱导IFNγ。三个腹水细胞样品以与PBMC样品相似的水平产生IFNγ,而其它三个样品对FAP双特异性T细胞衔接器具有减弱的应答。我们接下来研

究这些T细胞诱导双特异性T细胞衔接器介导的NHDF细胞溶解的能力。将NHDF铺板,并且将PBMC或腹水细胞与含有双特异性T细胞衔接器的上清液一起添加,并且使用xCELLigence细胞毒性测定系统实时监测培养物中细胞的活力。尽管IFNγ产生的可变性,当添加FAP双特异性T细胞衔接器时,所有腹水样品都诱导NHDF细胞的完全细胞毒性,总体相似的双特异性T细胞衔接器介导的NHDF溶解速率与PBMC受影响时的速率相似(图73D)。

[1149] 为了研究FAP双特异性T细胞衔接器是否可以在存在患者恶性渗出物样品(全部为50%)的情况下介导T细胞活化,在NHDF细胞存在下用对照或FAP双特异性T细胞衔接器活化PBMC T细胞,或用50%正常人类血清(NS)或不同(无细胞)恶性渗出物样品中的抗CD3/CD28磁珠活化。然而在正常血清中,74%的T细胞在用抗CD3/CD28珠刺激后24小时被活化(CD25和CD69均为双阳性),与NS中的应答相比,3/5测试的腹水液显著减弱了T细胞活化(图74A)。然而,当PBMC与NHDF一起培养并且用FAP双特异性T细胞衔接器刺激时,在任何渗出液存在下都没有观察到T细胞活化的抑制(图74B),这证明FAP双特异性T细胞衔接器可以克服免疫抑制机制以活化T细胞。

[1150] 实例31

[1151] EnAd-FAP双特异性T细胞衔接器介导的溶瘤和T细胞刺激将患者腹水中的CD11b+TAM极化为更活化的表型

[1152] 调查是否通过FAP双特异性T细胞衔接器介导的T细胞活化产生Th1细胞因子,包含IFNγ、TNFα和IL-2,以及随后消除FAP^+成纤维细胞(以及相关的TGFβ1减少与肿瘤的其它变化相关)从免疫抑制和促致癌基因到抗肿瘤活性的微环境评估了未分离的腹水细胞样品中对肿瘤相关巨噬细胞(TAM)的作用。将未纯化的患者腹水细胞全部置于50%腹水液中,用游离对照或FAP双特异性T细胞衔接器处理或用EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器或EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器病毒(100vp/细胞)感染。平行地,用IFNγ处理一些细胞以诱导活化的CD11b骨髓细胞表型。孵育3天后,首先测量T细胞的活化状态;通过流式细胞术测量CD25+细胞并且通过ELISA测量IFNγ分泌。

[1153] 用FAP双特异性T细胞衔接器和EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器处理导致约60%的$CD3^+$T细胞变为CD25+(图75A)和培养上清液中的大量IFNγ(图75B)。对于CD25表达或IFNγ,未观察到对照双特异性T细胞衔接器或对照病毒增加超过背景。为了评估TAM极化,通过流式细胞术在CD11b+细胞上测量CD64和CD86(M1或"活化的"巨噬细胞标记物)和CD206和CD163(M2或TAM标记物)的表达水平(图75C)。用游离FAP双特异性T细胞衔接器或表达FAP双特异性T细胞衔接器的EnAd处理诱导更活化的表型,表现为CD64表达的显著增加,以及CD206和CD163的强烈降低-类似于将IFNγ掺入培养物中时观察到的。

[1154] 虽然在此实验中用游离FAP双特异性T细胞衔接器或对照病毒处理在背景上没有引起CD86的明显变化,但是表达FAP双特异性T细胞衔接器的EnAd诱导CD86表达的大量增加,指示EnAd病毒感染和FAP双特异性T细胞衔接器活性可以协同活化如此处测试的恶性腹水样品等抑制性肿瘤微环境中的原发性骨髓细胞。在此研究中,IFNγ处理诱导CD86的适度降低,指示由EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器观察到的CD86的强烈增加可能是通过IFNγ非依赖性机制。

[1155] 实例32

[1156] EnAd-FAP双特异性T细胞衔接器活化肿瘤浸润淋巴细胞并且在离体固体前列腺肿

瘤活检中诱导细胞毒性

[1157] 组织切片培养提供了各种组织、器官和肿瘤的最现实的临床前模型之一。为了评估在这种高度临床相关的环境中表达FAP双特异性T细胞衔接器的病毒的活性,研究了来自切除的人类前列腺的恶性和良性前列腺组织的几个成对穿孔活组织检查。在初始筛选时,前体组织可再现地显示具有散布在含有分散的CD8 T细胞(图76B)的基质的大区之间的EpCAM+肿瘤细胞的环状环(图76A)。在邻近肿瘤区的成纤维细胞上发现FAP染色(图76C)。

[1158] 通过振动切片机将核心切成300μm厚度,并且在病毒存在下(1.5e9 vp/切片)建立切片培养物或保持未感染。7天后,固定切片、石蜡包埋、切片并且通过免疫组织化学(IHC)通过染色CD25表达评估T细胞活化状态(图76D)。仅接受EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器或EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器的样品示出了肿瘤浸润性T细胞的活化,通过强CD25染色显示。未经处理或对照病毒处理均未检测到CD25阳性细胞。通过ELISA测试感染后第4天和第7天从这些切片培养物中取出的上清液的IFNγ和IL-2,在用EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器病毒培养物中检测到的用FAP双特异性T细胞衔接器病毒(图76E)和IL-2感染的恶性但非良性的前列腺切片培养物中检测到IFNγ的增加(图76F)。与CMV驱动的FAP双特异性T细胞衔接器病毒相比,EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器诱导更高量的IFNγ,其可以更早检测到。

[1159] 实例33-表达EpCAM或FAP双特异性T细胞衔接器的EnAd病毒

[1160] 生成编码单个双特异性T细胞衔接器的五种病毒(NG-611、NG-612、NG-613、NG-614、NG-617)(表8)。

[1161] 表8

[1162]

病毒ID	转基因盒
NG-611(SEQ ID NO:96)	SSA^1-EpCam双特异性T细胞衔接器^2-His^3-PA^4
NG-612(SEQ ID NO:97)	SSA^1-FAP双特异性T细胞衔接器^5-His^3-PA^4
NG-613(SEQ ID NO:98)	SA^6-FAP双特异性T细胞衔接器^5-His^3-PA^4
NG-614(SEQ ID NO:99)	SA^6-FAP双特异性T细胞衔接器^7-His^3-PA^4
NG-617(SEQ ID NO:100)	SSA^1-FAP双特异性T细胞衔接器^5-PA^4

[1163] ^{1}SEQ ID NO.55;^{2}SEQ ID NO.83;^{3}SEQ ID NO.84;^{4}SEQ ID NO.65;^{5}SEQ ID NO.85;^{6}SEQ ID NO.86;^{7}SEQ ID NO.87;

[1164] 在每个转基因盒中,编码双特异性T细胞衔接器的cDNA在5'末端处侧接短剪接受体序列(SSA,SEQUENCE ID NO:55)或更长的剪接受体序列(SA,SEQUENCE ID NO:86)。在双特异性T细胞衔接器的3'末端处,编码SV40晚期poly(A)序列(PA,SEQUENCE ID NO:65),之后是组氨酸标签(HIS,SEQ ID NO.41)或没有标签。在病毒NG-611、NG-612、NG-613和NG-617中,双特异性T细胞衔接器分子的抗CD3部分使用小鼠抗人类CD3ε单克隆抗体OKT3的单链变体。

[1165] 病毒生产

[1166] 质粒pEnAd2.4用于通过直接插入合成的转基因盒(分别为SEQ ID NO:88到92)使质粒pNG-611、pNG-612、pNG-613、pNG-614和pNG-617生成。pNG-611转基因盒编码靶向双特异性T细胞衔接器的EpCam(SEQ ID NO.93),pNG-612、pNG-613和pNG-617转基因盒编码靶向SEQ ID NO.94的双特异性T细胞衔接器的FAP,并且pNG-614转基因盒编码靶向SEQ ID

NO.95的双特异性T细胞衔接器的FAP。在图77A到图77C中示出了转基因盒的示意图。通过限制性分析和DNA测序确认质粒DNA的构建。

[1167] 质粒、pNG-611、pNG-612、pNG-613、pNG-614和pNG-617通过用酶AscI限制性消化进行线性化以产生病毒基因组。根据下文给出的方法扩增和纯化病毒。

[1168] 通过苯酚/氯仿提取纯化消化的DNA,并且在300μl>95%分子生物级乙醇和10μl 3M乙酸钠中于-20℃沉淀16小时。通过在14000rpm离心5分钟沉淀析出的DNA,并且在500μl 70%乙醇中洗涤,然后再次以14000rpm离心5分钟。将干净的DNA团粒空气干燥,重悬浮于含有15μl脂质体转染试剂的500μlOptiMEM中,并且在室温下孵育30分钟。然后将转染混合物逐滴添加到含有生长到70%汇合的293细胞的T-25烧瓶中。将细胞与转染混合物在37℃孵育2小时后,向细胞中添加5% CO_2 4ml的细胞培养基(DMEM高葡萄糖和谷氨酰胺补充有2% FBS),并且将烧瓶在37℃,5% CO_2孵育。

[1169] 每24小时监测转染的293细胞,并且每48小时到72小时补充额外的培养基。通过观察细胞单层中的显著细胞病变效应(CPE)来监测病毒的产生。一旦观察到广泛的CPE,通过三次冻融循环从293细胞采集病毒。采集的病毒用于再感染293细胞以便扩增病毒原种。通过观察细胞单层中的显著CPE证实扩增期间活病毒的产生。一旦观察到CPE,通过三次冻融循环从293细胞采集病毒。在通过双氯化铯条带纯化病毒以产生纯化的病毒原种之前,将扩增的病毒原种用于进一步扩增。

[1170] 通过qPCR评估病毒活性

[1171] 用1ppc NG-611、NG-612、NG-617、enadenotucirev或保持未感染的A549细胞感染72小时,用于通过qPCR定量病毒DNA。收集细胞上清液并且通过以1200rpm离心5分钟来澄清。根据制造商的方案,使用Qiagen Dneasy试剂盒从45μL上清液中提取DNA。还使用DNeasy试剂盒制备并且提取使用enadenotucirev病毒颗粒(2.5e10到2.5e5vp)的标准曲线。使用针对早期基因E3的病毒基因特异性引物-探针,通过qPCR分析每个提取的样品或标准品。

[1172] 每个细胞检测到的病毒基因组数量的定量证明NG-611、NG-612和NG-617在A549细胞系中示出了显著的基因组复制(图77D)。对于包含亲本病毒enadenotucirev的所有测试的病毒,这是类似的,指示包含双特异性T细胞衔接器转基因不影响病毒复制活性。在未感染的细胞中未检测到病毒基因组(数据未显示)。

[1173] 由表达双特异性T细胞衔接器的病毒介导的T细胞活化和脱粒。

[1174] 癌细胞感染

[1175] 将A549细胞以2.5e5细胞/孔的密度接种到24孔板中。将板在37℃、5% Co2下孵育4小时,然后用1ppc的NG-611、NG-612、enadenotucirev感染细胞或保持未感染。在感染后24小时、48小时或72小时,从细胞中采集上清液,通过以1200rpm离心5分钟来澄清并且快速冷冻。

[1176] T细胞测定

[1177] 将表达肺成纤维细胞系MRC-5或表达EpCam的卵巢癌细胞SKOV3的FAP分别以5.7e4细胞/孔和1.2e5细胞/孔的密度接种到48孔板中。将板在37℃、5%CO_2下孵育4小时,然后用150μL/孔从A549板采集的解冻上清液替换培养基。然后还将从人类PBMC供体分离的纯化的CD3 T细胞添加到板中,得到T细胞与MRC-5或SKOV3的比例为2比1。将共培养物在37℃、5%CO_2下孵育16小时,然后收集细胞上清液用于ELISA分析,并且采集T细胞用于流式细胞术分

析。从共培养孔中去除含有非贴壁细胞的培养基并且离心(300xg)。小心去除上清液,用PBS 5%BSA稀释1倍,并且储存用于ELISA分析。用PBS洗涤贴壁细胞单层一次,并且然后用胰蛋白酶分离。使用10% FBS RPMI培养基灭活胰蛋白酶,并且将细胞添加到已经从培养上清液中收集的细胞团粒中。将细胞离心(300xg),弃去上清液,并且将细胞团粒在200μL的PBS中洗涤。将细胞再次离心,然后在室温下重悬于50μL含有Live/Dead Aqua(生命技术公司)的PBS中15分钟。将细胞在FAC缓冲液中洗涤一次,然后用直接缀合的抗体组进行染色:与AF700缀合的抗CD3;与BV421缀合的抗CD25;与PE/CY5缀合的抗HLA-DR;与BV605缀合的抗CD40L;与PE缀合的抗CD69和与FITC缀合的抗CD107a。来自每种共培养条件的细胞样品也用相关的同种型对照抗体染色。所有染色都在FAC缓冲液中以50μL/孔的总体积在4℃下进行15分钟。然后用FAC缓冲液(200μL)洗涤细胞两次,然后再悬浮于200μL的FAC缓冲液中并且通过流式细胞术(Attune)分析。

[1178] 上调T细胞活化标记物

[1179] 通过在活的单细胞上表达T细胞活化标记物CD25、CD69、HLA-DR和CD40L或T细胞脱粒标记物CD107a来评估T细胞活化的流式细胞术分析。这些数据示出了当与$EpCam^{+}$SKOV3细胞共培养时,与NG-612、enadenotucirev或未处理的对照上清液相比,当向细胞中添加NG-611上清液时,表达CD25、CD69、HLA-DR、CD40L或细胞表面CD107a的T细胞的数量显著增加(图78)。对于所有这些标记物,来自感染24小时的A549细胞的上清液刺激很少的T细胞活化,然而,在感染后48小时,上清液刺激所有标记物上的显著T细胞活化。在感染后72小时也是这种情况。

[1180] 当与FAP^{+}MRC-5细胞共培养时,与NG-611、enadenotucirev或未处理的对照上清液相比,当向细胞中添加NG-612上清液时,表达CD25、CD69、HLA-DR、CD40L或细胞表面CD107a的T细胞的数量显著增加(图79)。使用NG-611病毒还可以观察到一些T细胞活化,这可能是由于与由NG-611病毒表达的EpCam双特异性T细胞衔接器接合的MRC-5细胞系中EpCam(约5%)的低表达但可检测到的表达(图80)。对于所有这些标记物,来自感染24小时的A549细胞的上清液刺激很少的T细胞活化,然而,在感染后48小时,上清液刺激所有标记物上的显著T细胞活化。在与感染后72小时采集的上清液孵育后,CD25和CD69标记物也被上调,然而,在感染后72小时和感染后48小时采集上清液,检测到较低水平的活化标记物HLA-DR、CD40L和CD107a。这可能是由于在感染的后期存在高水平的双特异性T细胞衔接器导致快速和有效的T细胞活化,这意味着效应子功能需要在早于产生上清液的16小时的时间点测量。

[1181] 为了检测IFNγ表达,将共培养上清液稀释到5%BSA/PBS测定缓冲液(范围为1:10到1:1000)中,并且使用人类IFNγQingtikine ELISA试剂盒(R&Dsystems)根据制造商的方案进行ELISA。通过从标准曲线内插确定分泌的IFNγ的浓度。IFNγ的表达只能在使用SKOV3细胞(图81A)上的NG-611或MRC-5细胞(图81B)上的NG-611、NG-612的共培养物的上清液中检测到。

[1182] 实例34:体内表达双特异性T细胞衔接器的病毒的免疫活化和抗肿瘤功效

[1183] 在移植后18周,将NSG小鼠人源化CD34+造血干细胞(来自杰克森实验室(Jackson Labs))在两侧腹侧皮下植入HCT116肿瘤细胞。一旦肿瘤达到80mm^3到400mm^3,将小鼠分组,使得每个治疗组具有相等的肿瘤体积分布,每组7只小鼠。用盐水、enadenotucirev或NG-611瘤内注射小鼠,每次注射5×10^9个颗粒,每个肿瘤注射2次。对两侧的肿瘤进行治疗。每周测

量3到4次肿瘤体积并且证明与enadenotucirev或未治疗的对照相比,NG-611治疗在给药后20天导致显著的抗肿瘤应答(图82a)。在给药后20天后,处理来自每组中4只小鼠的一个肿瘤用于流式细胞术,同时将剩余的肿瘤在干冰上冷冻。

[1184] 流式细胞术

[1185] 在小体积的RPMI培养基中切除后立即对肿瘤样品进行机械解聚。然后使解聚的肿瘤通过70μm细胞滤网并且以300g离心10分钟。将细胞团粒重悬于100μL含有Live/Dead Aqua(生命技术公司)的PBS中,在冰上保持15分钟。将细胞在FAC缓冲液(5%BSA PBS)中洗涤一次,然后用一组直接缀合的抗体染色:抗CD8(RPA-T8,AF700);抗CD4(RPA-T4,PE);抗CD45(2D1,APC-Fire 750);抗CD3(OKT3,PerCP-Cy5.5);抗CD25(M-A251,PE-Dazzle594);抗CD69(FN50,APC);抗HLA-DR(L243,BV605);抗CD107a(H4A3,FITC)。还用相关的同种型对照抗体染色肿瘤细胞悬浮液库。所有染色都在FAC缓冲液中以50μL/孔的总体积在4℃下进行20分钟。用FAC缓冲液(200μL)洗涤细胞三次,然后再悬浮于200μL的FAC缓冲液中并且通过流式细胞术(Attune)分析。FAC分析证明与enadenotucirev处理或未处理的对照相比,在NG-611处理的肿瘤中肿瘤中CD8与CD4 T细胞的比例显著增加(图82b)。

[1186] 实例35-EnAd病毒共表达FAP双特异性T细胞衔接器和免疫调节细胞因子和趋化因子

[1187] 生成编码FAP双特异性T细胞衔接器和免疫调节蛋白的三种病毒(NG-615、NG-640和NG-641)(表9)。

[1188] 表9

[1189]

病毒 ID	转基因盒
NG-615 (SEQ ID NO: 101)	SSA[1]-FAP 双特异性 T 细胞衔接器 [2]-E2A[3]-Flt3L[4]-P2A[5]-MIP1α[6]-T2A[7]-IFNα[8]-PA[9]
NG-640 (SEQ ID NO: 102)	SSA[1]-FAP 双特异性 T 细胞衔接器 [2]-P2A[5]-CXCL10[10]-T2A[7]-CXCL9[11]-PA[6]
NG-641 (SEQ ID NO: 103)	SSA[1]-FAP 双特异性 T 细胞衔接器 [5]-P2A[5]-CXCL10[10]-T2A[7]-CXCL9[11]-E2A[3]-IFNα[8]-PA[6]
NG-615 (SEQ ID NO: 298)	SA[12]-FAP 双特异性 T 细胞衔接器 [2]-E2A[3]-Flt3L[4]-P2A[5]-MIP1α[6]-T2A[7]-IFNα[8]-PA[9]

[1190] [1]SEQ ID NO.55;[2]SEQ ID NO.87;[3]SEQ ID NO.63;[4]SEQ ID NO.105;[5]SEQ ID NO.61;[6]SEQ ID NO.107;[7]SEQ ID NO.64;[8]SEQ ID NO.109;[9]SEQ ID NO.65;[10]SEQ ID NO.110;[11]SEQ ID NO.111;[12]SEQ ID NO.86

[1191] 病毒生产

[1192] 质粒pEnAd2.4用于通过直接插入合成的转基因盒(分别为SEQ ID NO:112到114)使质粒pNG-615、pNG-616、pNG-640和pNG-641生成。NG-615和NG-616含有四种编码FAP靶向双特异性T细胞衔接器(SEQ ID NO:94)、Flt3L(SEQ ID NO.115)、MIP1α(SEQ ID NO.116)和IFNα(SEQ ID NO.117)的转基因。NG-640和NG-641编码靶向双特异性T细胞衔接器的FAP(SEQ ID NO.94)、CXCL9(SEQ ID NO.118)和CXCL10(SEQ ID NO.119),NG-641还含有编码IFNα的第四转基因(SEQ ID NO.117),在图83A到图83C中示出了转基因盒的示意图。通过限制性分析和DNA测序确认质粒DNA的构建。

[1193] 质粒、pNG-615、pNG-616、pNG-640和pNG-641通过用酶AscI限制性消化进行线性化以产生病毒基因组。根据实例33中详述的方法扩增和纯化病毒。

[1194] 通过qPCR和转基因ELISA评估病毒活性

[1195] 癌细胞感染

[1196] 用1ppc NG-615、enadenotucirev或保持未感染的A549细胞感染72小时,用于通过qPCR定量病毒DNA并且通过ELISA分析转基因表达。收集细胞上清液并且通过以1200rpm离心5分钟来澄清。将45μL上清液用于DNA分析,并且剩余的上清液用于ELISA。

[1197] qPCR

[1198] 根据制造商的方案,使用Qiagen DNeasy试剂盒从上清液样品中提取DNA。还使用DNeasy试剂盒制备并且提取使用enadenotucirev病毒颗粒(2.5e10到2.5e5vp)的标准曲线。使用针对早期基因E3的病毒基因特异性引物-探针,通过qPCR分析每个提取的样品或标准品。对每个细胞检测到的病毒基因组数量的定量证明,NG-615在A549细胞系中示出了与亲本病毒enadenotucirev相似水平的显著基因组复制(图84)。这些数据指示包含双特异性T细胞衔接器和三种免疫调节转基因不会显著影响病毒复制活性。在未感染的细胞中未检测到病毒基因组。

[1199] ELISA

[1200] 使用Verikine人类IFNα试剂盒(Pbl assay science)进行IFNαELISA,使用人类CCL3 Quantikine ELISA试剂盒(R&D systems)进行MIP1αELISA并且使用Flt3L人类ELISA试剂盒(Abcam)进行Flt3L ELISA。所有测定均根据制造商的方案进行。

[1201] 通过从标准曲线内插确定分泌的IFNα、MIPα或FLt3L的浓度。IFNα、MIP1α和Flt3 L表达可以在NG-615的细胞上清液中检测到,但不能在enadenotucirev或未处理的对照细胞中检测到(图85)。

[1202] 由表达双特异性T细胞衔接器的病毒介导的T细胞活化和脱粒。

[1203] 癌细胞感染

[1204] 将A549细胞以2.5e5细胞/孔的密度接种到24孔板中。将板在37℃、5% Co2下孵育4小时,然后用1ppc的NG-612、NG-615、enadenotucirev感染细胞或保持未感染。在感染后24小时、48小时或72小时,从细胞中采集上清液,通过以1200rpm离心5分钟来澄清并且快速冷冻。

[1205] T细胞测定

[1206] 将表达肺成纤维细胞系MRC-5的FAP以5.7e4细胞/孔的密度接种到48孔板中。将板在37℃、5% CO_2下孵育4小时,然后用150μL/孔从A549板采集的解冻上清液替换培养基。然后还将从人类PBMC供体分离的纯化的CD3 T细胞添加到板中,得到T细胞与MRC-5的比例为2比1。将共培养物在37℃、5%CO_2下孵育16小时,然后收集细胞上清液用于ELISA分析,并且根据实例29中详述的方法采集T细胞用于流式细胞术分析。

[1207] 上调T细胞活化标记物

[1208] 通过在活的$CD3^+$单细胞上表达T细胞活化标记物CD25、CD69、HLA-DR和CD40L或T细胞脱粒标记物CD107a来评估T细胞活化的流式细胞术分析。这些数据示出了当与FAP^+MRC-5细胞共培养时,与enadenotucirev或未处理的对照上清液相比,当向细胞中添加NG-615或612上清液时,表达CD25、CD69、HLA-DR、CD40L或CD107a的T细胞的数量显著增加(图86)。

[1209] 分泌刺激性细胞因子IFNγ

[1210] 为了检测IFNγ表达,将共培养上清液稀释到5%BSA/PBS测定缓冲液(范围为1:10

到1:1000)中,并且使用人类IFNγQingtikine试剂盒(RandD Systems)根据制造商的方案进行。通过从标准曲线内插确定分泌的IFNγ的浓度。IFNγ的表达只能在使用NG-612或NG-615感染的A549上清液的共培养物的上清液中检测到(图87)。

[1211] 实例36-EnAd病毒共表达靶向FAP的双特异性T细胞衔接器和靶向EpCam的双特异性T细胞衔接器

[1212] 生成编码两个双特异性T细胞衔接器分子的病毒NG-618,一种靶向EpCam(EpCam双特异性T细胞衔接器),并且一种靶向FAP(FAP双特异性T细胞衔接器)(表10)。

[1213] 表10

[1214]

病毒ID	转基因盒
NG-618(SEQ ID NO:120)	SSA[1]-EpCAM双特异性T细胞衔接器[2]-P2A[3]-FAP双特异性T细胞衔接器[4]-PA[5]

[1215] [1]SEQ ID NO.55;[2]SEQ ID NO.121;[3]SEQ ID NO.106;[4]SEQ ID NO.122;[5]SEQ ID NO.65;

[1216] 病毒生产

[1217] 质粒pEnAd2.4用于通过直接插入合成的转基因盒(SEQ ID NO.123)生成质粒pNG-618。NG-618病毒含有两种编码靶向双特异性T细胞衔接器的EpCam(SEQ ID NO.93)和靶向双特异性T细胞衔接器的FAP(SEQ ID NO.95)的转基因。在图88中示出了转基因盒的示意图。通过限制性分析和DNA测序确认质粒DNA的构建。

[1218] 通过用酶AscI限制性消化使质粒pNG-618线性化以产生病毒基因组。根据实例33中详述的方法扩增和纯化病毒

[1219] 由表达双特异性T细胞衔接器的病毒介导的T细胞活化和脱粒。

[1220] 癌细胞感染

[1221] 将A549细胞以1.2e6细胞/孔的密度接种到6孔板中。将板在37℃、5% Co2下孵育4小时,然后用NG-611、NG-612、NG-618、enadenotucirev感染细胞或保持未感染。在感染后72小时,从细胞中采集上清液,并且通过以1200rpm离心5分钟来澄清。

[1222] T细胞测定

[1223] 将表达肺成纤维细胞系MRC-5的FAP和表达A549细胞的EpCam以1.5e5细胞/孔的密度接种到24孔板中。还将MRC-5和A549细胞以1比1的比例混合,并且以1.5e5细胞/孔的总细胞密度接种到24个平板中。将板在37℃、5% CO_2下孵育4小时,然后用300μL/孔从A549板采集的解冻上清液替换培养基。然后还将从人类PBMC供体分离的纯化的CD3 T细胞添加到板中,得到T细胞与MRC-5或SKOV3细胞的比例为2比1。将共培养物在37℃、5% CO_2下孵育16小时,然后收集细胞上清液用于ELISA分析,并且采集T、MRC-5和A549细胞用于流式细胞术分析。

[1224] 检测MRC-5或SKOV细胞上的FAP和EpCam

[1225] 通过在FAC缓冲液中洗涤细胞一次,然后用直接缀合的抗体组染色来分别评估MRC-5或SKOV细胞表面上可检测的FAP或EpCam的流式细胞术分析:与AF647缀合的抗FAP;与PE缀合的抗EpCam。分析示出了在与用表达FAP-双特异性T细胞衔接器的病毒NG-618感染的细胞的上清液一起孵育的MRC-5细胞上不再能检测到FAP表达,但是在用来自用EnAd或未处理细胞处理的细胞的上清液孵育的>80%的细胞上检测到FAP表达(图89A)。这些数据指示

由NG-618病毒产生的FAP-双特异性T细胞衔接器与其阻断抗FAP抗体结合的MRC-5细胞上的FAP靶结合。评估活的、大的单细胞SKOV细胞的可检测的EpCam表达。在与表达EpCam-双特异性T细胞衔接器的病毒NG-618(17％的细胞)感染的细胞的上清液一起孵育的SKOV细胞中，只检测到较低水平的EpCam表达，但是在用EnAd或未处理细胞处理的细胞的上清液孵育的>40％细胞中检测到EpCam表达(图89B)。总的来说，这些数据指示NG-618产生与EpCam和FAP靶蛋白结合的双特异性T细胞衔接器分子。

[1226] 上调T细胞活化标记物

[1227] 通过在活的$CD3^+$单细胞上表达T细胞活化标记物CD25、CD69、HLA-DR和CD40L或T细胞脱粒标记物CD107a来评估T细胞活化的流式细胞术分析。这些数据示出了当与FAP^+MRC-5细胞共培养时，与enadenotucirev或未处理的对照上清液相比，当向细胞中添加NG-618上清液时，表达CD25、CD40L或CD107a的T细胞的数量显著增加(图90)。与enadenotucirev或未处理的对照上清液相比，当将NG-618上清液添加到$EpCam^+$SKOV3细胞时，表达CD25、CD40L或CD107a的T细胞的数量也显著增加(图91)。这些数据证明NG-618病毒表达的两个双特异性T细胞衔接器分子在诱导T细胞活化方面都是有功能的。

[1228] 分析T细胞介导的靶(MRC-5和SKOV)细胞杀伤

[1229] 通过在室温下将含有Live/Dead Aqua(生命技术公司)的50μL的PBS中的细胞染色15分钟来评估MRC-5和SKOV细胞活力的流式细胞术分析。将细胞在FAC缓冲液中洗涤一次，然后用直接缀合的抗体组进行染色:与AF647缀合的抗FAP;与PE缀合的抗EpCam。与NG-618上清液样品一起孵育后，MRC-5和SKOV细胞活力显著降低，而在enadenotucirev或未处理的对照上清液中未检测到显著的细胞死亡(图92)。这些数据证明了NG-618共表达的FAP和靶向双特异性T细胞衔接器的EpCam诱导T细胞介导的靶细胞杀伤的功能性的能力。

[1230] 序列

[1231] SEQ ID NO:25:FAP双特异性T细胞衔接器-P2A-RFP(ITALICS＝前导，BOLD＝弗林蛋白酶切割位点，UNDERLINE＝P2A序列，小写＝RFP)

*MGWSCIILFLVATATGVHS*DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQK

[1232] NYLAWYQQKPGQPPKLLIFWASTRESGVPDRFSGSGFGTDFTLTISSLQAEDV

AVYYCQQYFSYPLTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVK

KPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWIGGINPNNGIPNYNQKF
KGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRRIAYGYDEGHAMDYWG
QGTLVTVSSGGGGSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHW
VRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSE
DTATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGEGTSTGSGGSGGSGGADDI

[1233] VLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVA
SGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIKH
HHHHHHHHHH**RRKRGSG**ATNFSLLKQAGDVEENPGPmselikenmhmklymegtvn
nhhfkctsegegkpyegtqtmkikvveggplpfafdilatsfmygskafinhtqgipdffkqsfpegftwerittyed
ggvltatqdtsfqngciiynvkingvnfpsngpvmqkktrgweantemlypadgglrghsqmalklvgggylhcs
fkttyrskkpaknlkmpgfhfvdhrlerikeadketyveqhemavakycdlpsklghr

[1234] SEQ ID NO:26:对照(抗FHA)双特异性T细胞衔接器-P2A-RFP(ITALICS＝前导,BOLD＝弗林蛋白酶切割位点,UNDERLINE＝P2A序列,小写＝RFP)

*MGWSCIILFLVATATGVHS*ELDIVMTQAPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSSGY
NYLHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEED
AATYYCQHSREFPLTFGAGTKLEIKSSGGGGSGGGGGGSSRSSLEVQLQQSG
PELVKPGASVKISCKTSGYTFTGYTMHWVRQSHGKSLEWIGGINPKNGGIIY
NQKFQGKATLTVDKSSSTASMELRSLTSDDSAVYYCARRVYDDYPYYYAMD
YWGQGTSVTVSSAKTTPPSVTSGGGGSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK
ASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDK

[1235] STSTAYMELSSLRSEDTATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGEGTST
GSGGSGGSGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPG
KAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSS
NPLTFGGGTKVEIKHHHHHHHHHHH**RRKRGSG**ATNFSLLKQAGDVEENPGP
mselikenmhmklymegtvnnhhfkctsegegkpyegtqtmkikvveggplpfafdilatsfmygskafinhtq
gipdffkqsfpegftwerittyedggvltatqdtsfqngciiynvkingvnfpsngpvmqkktrgweantemlypad
gglrghsqmalklvgggylhcsfkttyrskkpaknlkmpgfhfvdhrlerikeadketyveqhemavakycdlpsk
lghr

[1236] SEQ ID NO:33:剪接受体序列

[1237] CAGG

[1238] SEQ ID NO:55短剪接受体(SSA)DNA序列(零序列)

[1239] CAGG

[1240] SEQ ID NO:58Kozak序列(零序列)

[1241] CCACC

[0001] 序列表

[0002] <110> 阿卡米斯生物公司

[0003] <120> 携带双特异性T细胞衔接器的腺病毒

[0004] <130> P000192_WO2

[0005] <150> GB1614607.8

[0006] <151> 2016-08-29

[0007] <160> 297

[0008] <170> PatentIn版本3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 1578

[0011] <212> DNA

[0012] <213> 人工序列

[0013] <220>

[0014] <223> 抗EpCAM双特异性T细胞衔接器DNA编码序列,具有N末端信号序列和C末端deca-His亲和标签

[0015] <400> 1

[0016] atgggatgga gctgcatcat cctattcctc gtggcgacgg ccactggagt gcatagcgaa 60

[0017] ctggtgatga ctcagtcccc gtcatccctg acggtgaccg ccggcgagaa ggtcaccatg 120

[0018] tcgtgcaagt cctcgcaaag cctgcttaac agcggcaacc agaaaaacta cctcacgtgg 180

[0019] tatcagcaaa agccaggtca acccccaaaa ctgctcatct actgggcgag cacccgcgag 240

[0020] tcgggggtgc cagaccggtt caccggctcc gggtcaggaa ctgatttcac cctaaccatc 300

[0021] agctcggtgc aagcggagga cctggccgtg tactactgcc aaaatgatta ctcgtaccct 360

[0022] ctgacctttg gagcgggcac caagctcgaa atcaagggcg gtggaggaag cggcgggga 420

[0023] ggctcaggtg ggggaggatc agaagtccaa ctgctggagc agtcaggagc cgaactggtc 480

[0024] cgcccgggaa cctccgtcaa gatttcctgt aaggcttccg gctacgcttt taccaattac 540

[0025] tggctgggct gggtcaagca aagaccgggg catggcctgg agtggatcgg cgacatcttc 600

[0026] ccagggagcg gcaacatcca ctacaacgag aagttcaagg ggaaagcgac tctgactgcc 660

[0027] gacaaatcat ccagcaccgc ctacatgcag ctgtcgtcgc tcactttcga agacagcgcg 720

[0028] gtgtactttt gtgctcggct ccggaactgg gatgaaccaa tggactactg gggacaagga 780

[0029] actaccgtga ccgtctcctc cggcggcggt ggaagcgatg tgcaactcgt gcagtccggt 840

[0030] gcggaagtga aaaagccggg cgcgagcgtc aaagtgtcat gcaaggcgtc aggatatacg 900

[0031] tttactagat acactatgca ctgggtgcgc caggcacctg gtcagggcct tgaatggatc 960

[0032] ggctacatca atccgtcgag aggctacact aattacgcgg actcagtcaa agggcgcttc 1020

[0033] acgattacga ccgacaagtc cacctcgact gcatacatgg aactgtcctc gctgagaagc 1080

[0034] gaggacaccg ctacttacta ctgcgctaga tactacgatg atcactactg cctcgattac 1140

[0035] tggggccagg gaaccactgt cacggtgtca tcgggagagg gcacctcaac cggatcaggg 1200

[0036] ggatcgggag gctcgggcgg cgcagacgac atcgtcctga cccagtcgcc cgccaccttg 1260

[0037] tcgctgtccc caggagaaag agcgaccctg tcatgccggg cgtcgcaaag cgtgagctat 1320

[0038] atgaattggt atcagcagaa gccaggaaag gcgccgaaga gatggatcta cgacacctcc 1380

[0039] aaggtcgctt caggtgtccc ggctagattc tcaggatcgg gatcaggaac ggactactcc 1440

[0040] ctgaccatca attcactgga agcagaagat gcggccacct actactgtca gcagtggtcc 1500

[0041] tccaacccgc tgactttcgg aggcggaact aaggtcgaga tcaagcatca ccatcaccat 1560

[0042] caccaccatc accattag 1578

[0043] <210> 2

[0044] <211> 525

[0045] <212> PRT

[0046] <213> 人工序列

[0047] <220>

[0048] <223> 抗EpCAM双特异性T细胞衔接器蛋白质序列,具有N末端信号序列和C末端deca-His亲和标签

[0049] <400> 2

[0050] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

[0051] 1 5 10 15

[0052] Val His Ser Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val

[0053] 20 25 30

[0054] Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu

[0055] 35 40 45

[0056] Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys

[0057] 50 55 60

[0058] Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu

[0059] 65 70 75 80

[0060] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

[0061] 85 90 95

[0062] Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr

[0063] 100 105 110

[0064] Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys

[0065] 115 120 125

[0066] Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

[0067] 130 135 140

[0068] Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val

[0069] 145 150 155 160

[0070] Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala

[0071] 165 170 175

[0072] Phe Thr Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly

[0073] 180 185 190

[0074] Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr

[0075] 195 200 205

[0076] Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser

[0077] 210 215 220

[0078] Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala

[0079] 225 230 235 240

[0080] Val Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp Tyr

[0081] 245 250 255

[0082] Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0083] 260 265 270
[0084] Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0085] 275 280 285
[0086] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
[0087] 290 295 300
[0088] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0089] 305 310 315 320
[0090] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
[0091] 325 330 335
[0092] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0093] 340 345 350
[0094] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
[0095] 355 360 365
[0096] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[0097] 370 375 380
[0098] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly
[0099] 385 390 395 400
[0100] Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser
[0101] 405 410 415
[0102] Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
[0103] 420 425 430
[0104] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
[0105] 435 440 445
[0106] Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
[0107] 450 455 460
[0108] Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser
[0109] 465 470 475 480
[0110] Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
[0111] 485 490 495
[0112] Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
[0113] 500 505 510
[0114] Glu Ile Lys His His His His His His His His His His His
[0115] 515 520 525
[0116] <210> 3
[0117] <211> 1590
[0118] <212> DNA
[0119] <213> 人工序列
[0120] <220>
[0121] <223> 抗FAP双特异性T细胞衔接器DNA编码序列,具有N末端信号序列和C末端deca-His亲和标签
[0122] <400> 3

[0123] atgggctgga gctgcatcat cttgttcctg gtcgcaactg ctaccggagt ccattcggac 60

[0124] atcgtcatga cccaaagccc tgactcgctc gctgtgtcac tgggagagcg ggcgactatc 120

[0125] aactgcaaat catcccagag cctgctgtat tcacgcaatc agaaaaacta cctggcctgg 180

[0126] tatcagcaga agccgggcca gcctcccaag ctgctgatct tctgggcctc cacccgcgaa 240

[0127] agcggcgtgc cggaccgctt cagcggaagc ggattcggaa ctgactttac tctgaccatt 300

[0128] agctccttgc aggcggagga cgtggccgtc tactactgcc agcagtattt ctcctatccg 360

[0129] ctcacctttg ggcaaggcac caaggtggag attaagggag ggggcggcag cgggggaggc 420

[0130] ggcagcggcg gcgggggatc gcaggtccag ctcgtccaat ccggagccga agtcaagaag 480

[0131] ccgggagcgt cggtcaaggt cagctgcaaa acttcgcgct acaccttcac tgagtacacg 540

[0132] atccactggg tccgccaggc gcccggccag cggctggagt ggatcggcgg gatcaaccca 600

[0133] aacaacggaa tcccaaatta caatcagaaa tttaaagggc gggtgactat caccgtggat 660

[0134] acctcggcct ccacggcgta catggagctc tcatcactca gatcggagga caccgcggtc 720

[0135] tattactgcg cccgccgccg gatcgcttat ggatacgatg aaggacatgc gatggattac 780

[0136] tggggccagg gcaccctcgt cacggtgtcg tcaggaggcg gcggttcaga tgtgcaactc 840

[0137] gtgcagtccg gtgcggaagt gaaaaagccg ggcgcgagcg tcaaagtgtc atgcaaggcg 900

[0138] tcaggatata cgtttactag atacactatg cactgggtgc gccaggcacc tggtcagggc 960

[0139] cttgaatgga tcggctacat caatccgtcg agaggctaca ctaattacgc ggactcagtc 1020

[0140] aaagggcgct tcacgattac gaccgacaag tccacctcga ctgcatacat ggaactgtcc 1080

[0141] tcgctgagaa gcgaggacac cgctacttac tactgcgcta gatactacga tgatcactac 1140

[0142] tgcctcgatt actggggcca gggaaccact gtcacggtgt catcgggaga gggcacctca 1200

[0143] accggatcag ggggatcggg aggctcgggc ggcgcagacg acatcgtcct gacccagtcg 1260

[0144] cccgccacct tgtcgctgtc cccaggagaa agagcgaccc tgtcatgccg ggcgtcgcaa 1320

[0145] agcgtgagct atatgaattg gtatcagcag aagccaggaa aggcgccgaa gagatggatc 1380

[0146] tacgacacct ccaaggtcgc ttcaggtgtc ccggctagat tctcaggatc gggatcagga 1440

[0147] acggactact ccctgaccat caattcactg gaagcagaag atgcggccac ctactactgt 1500

[0148] cagcagtggt cctccaaccc gctgactttc ggaggcggaa ctaaggtcga gatcaagcat 1560

[0149] caccatcacc atcaccacca tcaccattag 1590

[0150] <210> 4

[0151] <211> 529

[0152] <212> PRT

[0153] <213> 人工序列

[0154] <220>

[0155] <223> 抗FAP双特异性T细胞衔接器氨基酸序列,具有N末端信号序列和C末端deca-His亲和标签

[0156] <400> 4

[0157] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

[0158] 1 5 10 15

[0159] Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val

[0160] 20 25 30

[0161] Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu

[0162] 35 40 45

[0163] Leu Tyr Ser Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

[0164] 50 55 60

[0165] Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu

[0166] 65 70 75 80

[0167] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe

[0168] 85 90 95

[0169] Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr

[0170] 100 105 110

[0171] Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys

[0172] 115 120 125

[0173] Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

[0174] 130 135 140

[0175] Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

[0176] 145 150 155 160

[0177] Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe

[0178] 165 170 175

[0179] Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu

[0180] 180 185 190

[0181] Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn

[0182] 195 200 205

[0183] Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser

[0184] 210 215 220

[0185] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

[0186] 225 230 235 240

[0187] Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His

[0188] 245 250 255

[0189] Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly

[0190] 260 265 270

[0191] Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys

[0192] 275 280 285

[0193] Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr

[0194] 290 295 300

[0195] Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly

[0196] 305 310 315 320

[0197] Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr

[0198] 325 330 335

[0199] Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr

[0200] 340 345 350

[0201] Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala

[0202] 355 360 365

[0203] Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr

[0204] 370 375 380

[0205] Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser

[0206] 385 390 395 400

[0207] Thr Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val

[0208] 405 410 415

[0209] Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala

[0210] 420 425 430

[0211] Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr

[0212] 435 440 445

[0213] Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser

[0214] 450 455 460

[0215] Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

[0216] 465 470 475 480

[0217] Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala

[0218] 485 490 495

[0219] Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly

[0220] 500 505 510

[0221] Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys His His His His His His His His His

[0222] 515 520 525

[0223] His

[0224] <210> 5

[0225] <211> 1629

[0226] <212> DNA

[0227] <213> 人工序列

[0228] <220>

[0229] <223> 对照(抗FHA)双特异性T细胞衔接器 DNA编码序列,具有N末端信号序列和C末端deca-His亲和标签

[0230] <400> 5

[0231] atgggttggt catgcatcat cctgtttctc gtcgcaactg cgaccggcgt gcattcggaa 60

[0232] ctggacatcg tgatgaccca ggcacctgca tcactggcag tgagcctggg acagagagcc 120

[0233] accatttcat gccgggccag caagagcgtg tcgtcatccg gatacaatta tctgcactgg 180

[0234] tatcagcaga aaccaggaca acctccaaag ctactcatct acctggcgtc gaacctcgaa 240

[0235] tcgggcgtcc cagctagatt ctcagggagc ggttcgggaa ccgatttcac cctgaacatc 300

[0236] caccctgtgg aggaggaaga cgcggcaacg tactattgcc agcattcccg cgagttccct 360

[0237] ctcactttcg gtgcgggaac taagctggag atcaagtcca gcggcggcgg aggtagcggt 420

[0238] ggaggtggcg gaggaagctc ccggtcgtcg ctggaggtgc agctgcaaca atccggcccg 480

[0239] gaactggtca agccaggcgc atccgtcaag atttcatgca agacctcggg gtacaccttc 540

[0240] accgggtaca cgatgcattg ggtcaggcag agccacggca agtccctgga atggatcgga 600

[0241] ggaatcaacc ccaaaaacgg cggcatcatc tacaaccaaa agttccaggg aaaagccact 660

[0242] ctgaccgtgg acaagtcgtc gagcacggcc agcatggagc tgcggtccct cacttccgac 720

[0243] gactcagccg tgtattactg cgcgagacgg gtctacgatg actacccata ctactacgct 780

[0244] atggactact ggggacaagg aaccagcgtg accgtctcat cggcgaaaac tactccgccg 840

[0245] tcggtgacgt cgggaggtgg tggaagcgac gtgcagctcg tccagtcggg tgccgaggtg 900

[0246] aagaagccag gagcctccgt gaaggtctcg tgcaaagcca gcggctacac ttttactagg 960

[0247] tacactatgc actgggtgcg gcaagcgccg ggacaaggtc tggagtggat cggatacatc 1020

[0248] aatccgtcgc ggggatacac taattacgcg gactccgtca agggacggtt tactatcact 1080

[0249] acggataagt ccactagcac cgcctacatg gaactgtcct cgctgcggtc ggaagacact 1140

[0250] gcgacctact actgcgctag atattacgat gaccactact gcctcgacta ttgggggcag 1200

[0251] ggcactacgg tcaccgtctc gtcgggagaa ggaacctcaa ctggatcggg cggatcggga 1260

[0252] ggctccggag gagccgacga catcgtgctt acccagtcgc ctgcgaccct gtccctgtcc 1320

[0253] ccaggagaga gagcgactct ttcatgcagg gcttcccaat cagtctccta catgaattgg 1380

[0254] tatcaacaaa aacccggcaa ggccccgaaa cgctggatct acgatacttc aaaggtggcc 1440

[0255] agcggtgtgc ctgcccgctt ctccgggtcg gggtccggca ccgattactc gttgactatc 1500

[0256] aatagcctgg aggccgagga cgctgcaact tactactgcc agcagtggtc ctccaaccct 1560

[0257] ctcaccttcg gaggcgggac caaggtggaa atcaaacatc accatcacca tcaccaccat 1620

[0258] caccattag 1629

[0259] <210> 6

[0260] <211> 542

[0261] <212> PRT

[0262] <213> 人工序列

[0263] <220>

[0264] <223> 对照(抗FHA)双特异性T细胞衔接器氨基酸序列,具有N末端信号序列和C末端deca-His亲和标签

[0265] <400> 6

[0266] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

[0267] 1 5 10 15

[0268] Val His Ser Glu Leu Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Pro Ala Ser Leu

[0269] 20 25 30

[0270] Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys

[0271] 35 40 45

[0272] Ser Val Ser Ser Ser Gly Tyr Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys

[0273] 50 55 60

[0274] Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu

[0275] 65 70 75 80

[0276] Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

[0277] 85 90 95

[0278] Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr

[0279] 100 105 110

[0280] Cys Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys

[0281] 115 120 125

[0282] Leu Glu Ile Lys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly

[0283] 130 135 140

[0284] Gly Ser Ser Arg Ser Ser Leu Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro

[0285] 145 150 155 160

[0286] Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser

[0287] 165 170 175

[0288] Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser His
[0289] 180 185 190
[0290] Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Lys Asn Gly Gly
[0291] 195 200 205
[0292] Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp
[0293] 210 215 220
[0294] Lys Ser Ser Ser Thr Ala Ser Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp
[0295] 225 230 235 240
[0296] Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Val Tyr Asp Asp Tyr Pro
[0297] 245 250 255
[0298] Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
[0299] 260 265 270
[0300] Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Ser Gly Gly Gly Gly
[0301] 275 280 285
[0302] Ser Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
[0303] 290 295 300
[0304] Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg
[0305] 305 310 315 320
[0306] Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
[0307] 325 330 335
[0308] Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser
[0309] 340 345 350
[0310] Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala
[0311] 355 360 365
[0312] Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
[0313] 370 375 380
[0314] Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
[0315] 385 390 395 400
[0316] Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser
[0317] 405 410 415
[0318] Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln
[0319] 420 425 430
[0320] Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
[0321] 435 440 445
[0322] Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
[0323] 450 455 460
[0324] Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala
[0325] 465 470 475 480
[0326] Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
[0327] 485 490 495
[0328] Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
[0329] 500 505 510

[0330] Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
[0331] 515 520 525
[0332] Val Glu Ile Lys His His His His His His His His His His
[0333] 530 535 540
[0334] <210> 7
[0335] <211> 243
[0336] <212> PRT
[0337] <213> 人工序列
[0338] <220>
[0339] <223> 抗CD3 ScFv氨基酸序列
[0340] <400> 7
[0341] Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0342] 1 5 10 15
[0343] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
[0344] 20 25 30
[0345] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0346] 35 40 45
[0347] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
[0348] 50 55 60
[0349] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0350] 65 70 75 80
[0351] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
[0352] 85 90 95
[0353] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[0354] 100 105 110
[0355] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly
[0356] 115 120 125
[0357] Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser
[0358] 130 135 140
[0359] Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
[0360] 145 150 155 160
[0361] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
[0362] 165 170 175
[0363] Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
[0364] 180 185 190
[0365] Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser
[0366] 195 200 205
[0367] Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
[0368] 210 215 220
[0369] Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
[0370] 225 230 235 240
[0371] Glu Ile Lys

[0372] <210> 8
[0373] <211> 119
[0374] <212> PRT
[0375] <213> 人工序列
[0376] <220>
[0377] <223> 抗CD3 VH
[0378] <400> 8
[0379] Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0380] 1 5 10 15
[0381] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
[0382] 20 25 30
[0383] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0384] 35 40 45
[0385] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
[0386] 50 55 60
[0387] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0388] 65 70 75 80
[0389] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
[0390] 85 90 95
[0391] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[0392] 100 105 110
[0393] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0394] 115
[0395] <210> 9
[0396] <211> 106
[0397] <212> PRT
[0398] <213> 人工序列
[0399] <220>
[0400] <223> 抗CD3 VL
[0401] <400> 9
[0402] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0403] 1 5 10 15
[0404] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met
[0405] 20 25 30
[0406] Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
[0407] 35 40 45
[0408] Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
[0409] 50 55 60
[0410] Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu
[0411] 65 70 75 80
[0412] Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
[0413] 85 90 95

[0414] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0415] 100 105
[0416] <210> 10
[0417] <211> 18
[0418] <212> PRT
[0419] <213> 人工序列
[0420] <220>
[0421] <223> 抗CD3 ScFv连接子序列
[0422] <400> 10
[0423] Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
[0424] 1 5 10 15
[0425] Ala Asp
[0426] <210> 11
[0427] <211> 252
[0428] <212> PRT
[0429] <213> 人工序列
[0430] <220>
[0431] <223> 抗FAP ScFv
[0432] <400> 11
[0433] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0434] 1 5 10 15
[0435] Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
[0436] 20 25 30
[0437] Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0438] 35 40 45
[0439] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0440] 50 55 60
[0441] Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0442] 65 70 75 80
[0443] Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
[0444] 85 90 95
[0445] Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
[0446] 100 105 110
[0447] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0448] 115 120 125
[0449] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0450] 130 135 140
[0451] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
[0452] 145 150 155 160
[0453] Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
[0454] 165 170 175
[0455] Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

[0456] 180 185 190

[0457] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

[0458] 195 200 205

[0459] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0460] 210 215 220

[0461] Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His Ala Met Asp

[0462] 225 230 235 240

[0463] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0464] 245 250

[0465] <210> 12

[0466] <211> 113

[0467] <212> PRT

[0468] <213> 人工序列

[0469] <220>

[0470] <223> 抗FAP VL结构域

[0471] <400> 12

[0472] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

[0473] 1 5 10 15

[0474] Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

[0475] 20 25 30

[0476] Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

[0477] 35 40 45

[0478] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

[0479] 50 55 60

[0480] Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

[0481] 65 70 75 80

[0482] Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

[0483] 85 90 95

[0484] Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

[0485] 100 105 110

[0486] Lys

[0487] <210> 13

[0488] <211> 124

[0489] <212> PRT

[0490] <213> 人工序列

[0491] <220>

[0492] <223> 抗FAP VH结构域

[0493] <400> 13

[0494] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

[0495] 1 5 10 15

[0496] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr

[0497] 20 25 30

[0498] Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
[0499] 35 40 45
[0500] Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
[0501] 50 55 60
[0502] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
[0503] 65 70 75 80
[0504] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0505] 85 90 95
[0506] Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His Ala Met Asp
[0507] 100 105 110
[0508] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0509] 115 120
[0510] <210> 14
[0511] <211> 15
[0512] <212> PRT
[0513] <213> 人工序列
[0514] <220>
[0515] <223> 抗FAP和抗EpCAM连接子序列
[0516] <400> 14
[0517] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0518] 1 5 10 15
[0519] <210> 15
[0520] <211> 19
[0521] <212> PRT
[0522] <213> 人工序列
[0523] <220>
[0524] <223> 双特异性T细胞衔接器前导序列
[0525] <400> 15
[0526] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
[0527] 1 5 10 15
[0528] Val His Ser
[0529] <210> 16
[0530] <211> 248
[0531] <212> PRT
[0532] <213> 人工序列
[0533] <220>
[0534] <223> 抗EpCAM ScFv
[0535] <400> 16
[0536] Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
[0537] 1 5 10 15
[0538] Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[0539] 20 25 30

[0540] Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0541] 35 40 45
[0542] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0543] 50 55 60
[0544] Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0545] 65 70 75 80
[0546] Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
[0547] 85 90 95
[0548] Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[0549] 100 105 110
[0550] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0551] 115 120 125
[0552] Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
[0553] 130 135 140
[0554] Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn
[0555] 145 150 155 160
[0556] Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp
[0557] 165 170 175
[0558] Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr Asn Glu Lys
[0559] 180 185 190
[0560] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
[0561] 195 200 205
[0562] Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
[0563] 210 215 220
[0564] Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[0565] 225 230 235 240
[0566] Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0567] 245
[0568] <210> 17
[0569] <211> 113
[0570] <212> PRT
[0571] <213> 人工序列
[0572] <220>
[0573] <223> 抗EpCAM VL
[0574] <400> 17
[0575] Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
[0576] 1 5 10 15
[0577] Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[0578] 20 25 30
[0579] Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0580] 35 40 45
[0581] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

[0582] 50 55 60

[0583] Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

[0584] 65 70 75 80

[0585] Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

[0586] 85 90 95

[0587] Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile

[0588] 100 105 110

[0589] Lys

[0590] <210> 18

[0591] <211> 120

[0592] <212> PRT

[0593] <213> 人工序列

[0594] <220>

[0595] <223> 抗EpCAM VH

[0596] <400> 18

[0597] Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly

[0598] 1 5 10 15

[0599] Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn

[0600] 20 25 30

[0601] Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp

[0602] 35 40 45

[0603] Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr Asn Glu Lys

[0604] 50 55 60

[0605] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

[0606] 65 70 75 80

[0607] Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe

[0608] 85 90 95

[0609] Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

[0610] 100 105 110

[0611] Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

[0612] 115 120

[0613] <210> 19

[0614] <211> 542

[0615] <212> PRT

[0616] <213> 人工序列

[0617] <220>

[0618] <223> 对照双特异性T细胞衔接器(抗FHA)

[0619] <400> 19

[0620] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

[0621] 1 5 10 15

[0622] Val His Ser Glu Leu Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Pro Ala Ser Leu

[0623] 20 25 30

[0624] Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys
[0625] 35 40 45
[0626] Ser Val Ser Ser Ser Gly Tyr Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys
[0627] 50 55 60
[0628] Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu
[0629] 65 70 75 80
[0630] Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[0631] 85 90 95
[0632] Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
[0633] 100 105 110
[0634] Cys Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
[0635] 115 120 125
[0636] Leu Glu Ile Lys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
[0637] 130 135 140
[0638] Gly Ser Ser Arg Ser Ser Leu Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro
[0639] 145 150 155 160
[0640] Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser
[0641] 165 170 175
[0642] Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser His
[0643] 180 185 190
[0644] Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Lys Asn Gly Gly
[0645] 195 200 205
[0646] Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp
[0647] 210 215 220
[0648] Lys Ser Ser Ser Thr Ala Ser Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp
[0649] 225 230 235 240
[0650] Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Val Tyr Asp Asp Tyr Pro
[0651] 245 250 255
[0652] Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
[0653] 260 265 270
[0654] Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Ser Gly Gly Gly Gly
[0655] 275 280 285
[0656] Ser Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
[0657] 290 295 300
[0658] Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg
[0659] 305 310 315 320
[0660] Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
[0661] 325 330 335
[0662] Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser
[0663] 340 345 350
[0664] Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala
[0665] 355 360 365

[0666] Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
[0667] 370 375 380
[0668] Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
[0669] 385 390 395 400
[0670] Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser
[0671] 405 410 415
[0672] Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln
[0673] 420 425 430
[0674] Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
[0675] 435 440 445
[0676] Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
[0677] 450 455 460
[0678] Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala
[0679] 465 470 475 480
[0680] Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
[0681] 485 490 495
[0682] Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
[0683] 500 505 510
[0684] Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
[0685] 515 520 525
[0686] Val Glu Ile Lys His His His His His His His His His His
[0687] 530 535 540
[0688] <210> 20
[0689] <211> 265
[0690] <212> PRT
[0691] <213> 人工序列
[0692] <220>
[0693] <223> 对照(抗FHA)ScFv
[0694] <400> 20
[0695] Glu Leu Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser
[0696] 1 5 10 15
[0697] Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser
[0698] 20 25 30
[0699] Ser Ser Gly Tyr Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0700] 35 40 45
[0701] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val
[0702] 50 55 60
[0703] Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn
[0704] 65 70 75 80
[0705] Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His
[0706] 85 90 95
[0707] Ser Arg Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile

[0708] 100 105 110

[0709] Lys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ser

[0710] 115 120 125

[0711] Arg Ser Ser Leu Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val

[0712] 130 135 140

[0713] Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr

[0714] 145 150 155 160

[0715] Phe Thr Gly Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser

[0716] 165 170 175

[0717] Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Lys Asn Gly Gly Ile Ile Tyr

[0718] 180 185 190

[0719] Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser

[0720] 195 200 205

[0721] Ser Thr Ala Ser Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala

[0722] 210 215 220

[0723] Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Val Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr Tyr Tyr

[0724] 225 230 235 240

[0725] Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala

[0726] 245 250 255

[0727] Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Ser

[0728] 260 265

[0729] <210> 21

[0730] <211> 113

[0731] <212> PRT

[0732] <213> 人工序列

[0733] <220>

[0734] <223> 对照(抗FHA)VL

[0735] <400> 21

[0736] Glu Leu Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser

[0737] 1 5 10 15

[0738] Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser

[0739] 20 25 30

[0740] Ser Ser Gly Tyr Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

[0741] 35 40 45

[0742] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val

[0743] 50 55 60

[0744] Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn

[0745] 65 70 75 80

[0746] Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His

[0747] 85 90 95

[0748] Ser Arg Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile

[0749] 100 105 110

[0750] Lys

[0751] <210> 22

[0752] <211> 133

[0753] <212> PRT

[0754] <213> 人工序列

[0755] <220>

[0756] <223> 对照(抗FHA)VH

[0757] <400> 22

[0758] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

[0759] 1 5 10 15

[0760] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

[0761] 20 25 30

[0762] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

[0763] 35 40 45

[0764] Gly Gly Ile Asn Pro Lys Asn Gly Gly Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe

[0765] 50 55 60

[0766] Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Ser

[0767] 65 70 75 80

[0768] Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

[0769] 85 90 95

[0770] Ala Arg Arg Val Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

[0771] 100 105 110

[0772] Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro

[0773] 115 120 125

[0774] Pro Ser Val Thr Ser

[0775] 130

[0776] <210> 23

[0777] <211> 19

[0778] <212> PRT

[0779] <213> 人工序列

[0780] <220>

[0781] <223> 对照(抗FHA)ScFv连接子序列

[0782] <400> 23

[0783] Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg

[0784] 1 5 10 15

[0785] Ser Ser Leu

[0786] <210> 24

[0787] <211> 10

[0788] <212> PRT

[0789] <213> 人工序列

[0790] <220>

[0791] <223> Deca-His标签序列

[0792] <400> 24

[0793] His His His His His His His His His His

[0794] 1 5 10

[0795] <210> 25

[0796] <211> 786

[0797] <212> PRT

[0798] <213> 人工序列

[0799] <220>

[0800] <223> FAP 双特异性T细胞衔接器-P2A-RFP

[0801] <400> 25

[0802] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

[0803] 1 5 10 15

[0804] Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val

[0805] 20 25 30

[0806] Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu

[0807] 35 40 45

[0808] Leu Tyr Ser Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

[0809] 50 55 60

[0810] Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu

[0811] 65 70 75 80

[0812] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe

[0813] 85 90 95

[0814] Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr

[0815] 100 105 110

[0816] Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys

[0817] 115 120 125

[0818] Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

[0819] 130 135 140

[0820] Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

[0821] 145 150 155 160

[0822] Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe

[0823] 165 170 175

[0824] Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu

[0825] 180 185 190

[0826] Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn

[0827] 195 200 205

[0828] Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser

[0829] 210 215 220

[0830] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

[0831] 225 230 235 240

[0832] Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His

[0833] 245 250 255

[0834] Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
[0835] 260 265 270
[0836] Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
[0837] 275 280 285
[0838] Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
[0839] 290 295 300
[0840] Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
[0841] 305 310 315 320
[0842] Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
[0843] 325 330 335
[0844] Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr
[0845] 340 345 350
[0846] Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
[0847] 355 360 365
[0848] Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
[0849] 370 375 380
[0850] Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser
[0851] 385 390 395 400
[0852] Thr Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val
[0853] 405 410 415
[0854] Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
[0855] 420 425 430
[0856] Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
[0857] 435 440 445
[0858] Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
[0859] 450 455 460
[0860] Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
[0861] 465 470 475 480
[0862] Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala
[0863] 485 490 495
[0864] Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly
[0865] 500 505 510
[0866] Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys His His His His His His His His His
[0867] 515 520 525
[0868] His Arg Arg Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys
[0869] 530 535 540
[0870] Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ser Glu Leu Ile
[0871] 545 550 555 560
[0872] Lys Glu Asn Met His Met Lys Leu Tyr Met Glu Gly Thr Val Asn Asn
[0873] 565 570 575
[0874] His His Phe Lys Cys Thr Ser Glu Gly Glu Gly Lys Pro Tyr Glu Gly
[0875] 580 585 590

[0876] Thr Gln Thr Met Lys Ile Lys Val Val Glu Gly Gly Pro Leu Pro Phe
[0877] 595 600 605
[0878] Ala Phe Asp Ile Leu Ala Thr Ser Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Phe
[0879] 610 615 620
[0880] Ile Asn His Thr Gln Gly Ile Pro Asp Phe Phe Lys Gln Ser Phe Pro
[0881] 625 630 635 640
[0882] Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Ile Thr Thr Tyr Glu Asp Gly Gly Val
[0883] 645 650 655
[0884] Leu Thr Ala Thr Gln Asp Thr Ser Phe Gln Asn Gly Cys Ile Ile Tyr
[0885] 660 665 670
[0886] Asn Val Lys Ile Asn Gly Val Asn Phe Pro Ser Asn Gly Pro Val Met
[0887] 675 680 685
[0888] Gln Lys Lys Thr Arg Gly Trp Glu Ala Asn Thr Glu Met Leu Tyr Pro
[0889] 690 695 700
[0890] Ala Asp Gly Gly Leu Arg Gly His Ser Gln Met Ala Leu Lys Leu Val
[0891] 705 710 715 720
[0892] Gly Gly Gly Tyr Leu His Cys Ser Phe Lys Thr Thr Tyr Arg Ser Lys
[0893] 725 730 735
[0894] Lys Pro Ala Lys Asn Leu Lys Met Pro Gly Phe His Phe Val Asp His
[0895] 740 745 750
[0896] Arg Leu Glu Arg Ile Lys Glu Ala Asp Lys Glu Thr Tyr Val Glu Gln
[0897] 755 760 765
[0898] His Glu Met Ala Val Ala Lys Tyr Cys Asp Leu Pro Ser Lys Leu Gly
[0899] 770 775 780
[0900] His Arg
[0901] 785
[0902] <210> 26
[0903] <211> 799
[0904] <212> PRT
[0905] <213> 人工序列
[0906] <220>
[0907] <223> 对照(抗FHA)双特异性T细胞衔接器-P2A-RFP
[0908] <400> 26
[0909] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
[0910] 1 5 10 15
[0911] Val His Ser Glu Leu Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Pro Ala Ser Leu
[0912] 20 25 30
[0913] Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys
[0914] 35 40 45
[0915] Ser Val Ser Ser Ser Gly Tyr Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys
[0916] 50 55 60
[0917] Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu

[0918] 65 70 75 80

[0919] Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

[0920] 85 90 95

[0921] Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr

[0922] 100 105 110

[0923] Cys Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys

[0924] 115 120 125

[0925] Leu Glu Ile Lys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly

[0926] 130 135 140

[0927] Gly Ser Ser Arg Ser Ser Leu Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro

[0928] 145 150 155 160

[0929] Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser

[0930] 165 170 175

[0931] Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser His

[0932] 180 185 190

[0933] Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Lys Asn Gly Gly

[0934] 195 200 205

[0935] Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp

[0936] 210 215 220

[0937] Lys Ser Ser Ser Thr Ala Ser Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp

[0938] 225 230 235 240

[0939] Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Val Tyr Asp Asp Tyr Pro

[0940] 245 250 255

[0941] Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val

[0942] 260 265 270

[0943] Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Ser Gly Gly Gly Gly

[0944] 275 280 285

[0945] Ser Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly

[0946] 290 295 300

[0947] Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg

[0948] 305 310 315 320

[0949] Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

[0950] 325 330 335

[0951] Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser

[0952] 340 345 350

[0953] Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala

[0954] 355 360 365

[0955] Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

[0956] 370 375 380

[0957] Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln

[0958] 385 390 395 400

[0959] Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser

[0960] 405 410 415

[0961] Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln

[0962] 420 425 430

[0963] Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser

[0964] 435 440 445

[0965] Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys

[0966] 450 455 460

[0967] Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala

[0968] 465 470 475 480

[0969] Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr

[0970] 485 490 495

[0971] Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr

[0972] 500 505 510

[0973] Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

[0974] 515 520 525

[0975] Val Glu Ile Lys His His His His His His His His His His Arg Arg

[0976] 530 535 540

[0977] Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly

[0978] 545 550 555 560

[0979] Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ser Glu Leu Ile Lys Glu Asn

[0980] 565 570 575

[0981] Met His Met Lys Leu Tyr Met Glu Gly Thr Val Asn Asn His His Phe

[0982] 580 585 590

[0983] Lys Cys Thr Ser Glu Gly Glu Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr

[0984] 595 600 605

[0985] Met Lys Ile Lys Val Val Glu Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp

[0986] 610 615 620

[0987] Ile Leu Ala Thr Ser Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Phe Ile Asn His

[0988] 625 630 635 640

[0989] Thr Gln Gly Ile Pro Asp Phe Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Phe

[0990] 645 650 655

[0991] Thr Trp Glu Arg Ile Thr Thr Tyr Glu Asp Gly Gly Val Leu Thr Ala

[0992] 660 665 670

[0993] Thr Gln Asp Thr Ser Phe Gln Asn Gly Cys Ile Ile Tyr Asn Val Lys

[0994] 675 680 685

[0995] Ile Asn Gly Val Asn Phe Pro Ser Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys

[0996] 690 695 700

[0997] Thr Arg Gly Trp Glu Ala Asn Thr Glu Met Leu Tyr Pro Ala Asp Gly

[0998] 705 710 715 720

[0999] Gly Leu Arg Gly His Ser Gln Met Ala Leu Lys Leu Val Gly Gly Gly

[1000] 725 730 735

[1001] Tyr Leu His Cys Ser Phe Lys Thr Thr Tyr Arg Ser Lys Lys Pro Ala

[1002] 740 745 750
[1003] Lys Asn Leu Lys Met Pro Gly Phe His Phe Val Asp His Arg Leu Glu
[1004] 755 760 765
[1005] Arg Ile Lys Glu Ala Asp Lys Glu Thr Tyr Val Glu Gln His Glu Met
[1006] 770 775 780
[1007] Ala Val Ala Lys Tyr Cys Asp Leu Pro Ser Lys Leu Gly His Arg
[1008] 785 790 795
[1009] <210> 27
[1010] <211> 945
[1011] <212> DNA
[1012] <213> 人工序列
[1013] <220>
[1014] <223> 人类EpCAM DNA编码序列
[1015] <400> 27
[1016] atggctccgc cgcaagtgct cgcctttgga ctgctcctgg ccgctgctac tgccaccttt 60
[1017] gctgccgctc aggaagaatg cgtgtgcgaa aactacaaac tggcagtgaa ctgcttcgtg 120
[1018] aacaataacc gccaatgcca gtgcaccagc gtgggcgcgc agaacactgt catctgcagc 180
[1019] aagctggccg caaaatgcct ggtcatgaaa gcggagatga acggatcgaa gctgggtcgg 240
[1020] cgcgctaagc cggaaggagc gctacaaaat aacgacgggc tgtacgatcc ggattgcgac 300
[1021] gaaagcggtc tgtttaaggc aaagcagtgt aatgggacca gcatgtgttg gtgcgtgaac 360
[1022] actgccggag tgcgccgcac tgacaaggat accgaaatta cgtgctcgga gcgcgtgaga 420
[1023] acgtattgga tcatcatcga gttgaagcat aaagctagag agaagccgta cgatagcaag 480
[1024] tccctgcgca ccgctctcca aaaagaaatt accactagat accaactcga cccgaaattc 540
[1025] atcacttcaa tcctgtacga aaacaacgtg attacgatcg acctggtgca gaactccagc 600
[1026] caaaagacgc agaacgacgt ggacattgca gacgtggctt actactttga aaaggacgtg 660
[1027] aaggggaat cactatttca ttccaagaaa atggacctga ccgtcaacgg agagcagctc 720
[1028] gacctggacc caggtcagac tctgatctac tacgtggacg agaaggcacc ggagttttcg 780
[1029] atgcagggcc tgaaagccgg agtcatcgcc gtgatcgtgg tggtggtgat tgccgtcgtc 840
[1030] gccgggatcg tggtgctcgt gattagccgc aaaaagagaa tggctaagta tgaaaaggca 900
[1031] gagatcaagg aaatgggaga aatgcaccgc gaactcaacg catag 945
[1032] <210> 28
[1033] <211> 314
[1034] <212> PRT
[1035] <213> 人工序列
[1036] <220>
[1037] <223> 人类EpCAM氨基酸序列
[1038] <400> 28
[1039] Met Ala Pro Pro Gln Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu Ala Ala Ala
[1040] 1 5 10 15
[1041] Thr Ala Thr Phe Ala Ala Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr
[1042] 20 25 30
[1043] Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys

[1044] 35 40 45
[1045] Thr Ser Val Gly Ala Gln Asn Thr Val Ile Cys Ser Lys Leu Ala Ala
[1046] 50 55 60
[1047] Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg
[1048] 65 70 75 80
[1049] Arg Ala Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr Asp
[1050] 85 90 95
[1051] Pro Asp Cys Asp Glu Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly
[1052] 100 105 110
[1053] Thr Ser Met Cys Trp Cys Val Asn Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr Asp
[1054] 115 120 125
[1055] Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile
[1056] 130 135 140
[1057] Ile Ile Glu Leu Lys His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser Lys
[1058] 145 150 155 160
[1059] Ser Leu Arg Thr Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln Leu
[1060] 165 170 175
[1061] Asp Pro Lys Phe Ile Thr Ser Ile Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile Thr
[1062] 180 185 190
[1063] Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp
[1064] 195 200 205
[1065] Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser
[1066] 210 215 220
[1067] Leu Phe His Ser Lys Lys Met Asp Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln Leu
[1068] 225 230 235 240
[1069] Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala
[1070] 245 250 255
[1071] Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly Val Ile Ala Val Ile
[1072] 260 265 270
[1073] Val Val Val Val Ile Ala Val Val Ala Gly Ile Val Val Leu Val Ile
[1074] 275 280 285
[1075] Ser Arg Lys Lys Arg Met Ala Lys Tyr Glu Lys Ala Glu Ile Lys Glu
[1076] 290 295 300
[1077] Met Gly Glu Met His Arg Glu Leu Asn Ala
[1078] 305 310
[1079] <210> 29
[1080] <211> 2283
[1081] <212> DNA
[1082] <213> 人工序列
[1083] <220>
[1084] <223> 人类FAP DNA编码序列
[1085] <400> 29

[1086] atgaagacct gggtgaaaat cgtgtttgga gtcgcaacca gcgccgtgct ggccctgttg 60
[1087] gtgatgtgca tcgtgctgcg cccgtcacgc gtgcataaca gcgaagaaaa caccatgaga 120
[1088] gctctgacgc taaaggacat cctgaatggc actttttcct ataagacttt cttcccgaat 180
[1089] tggattagcg ggcaggagta cctgcaccaa tcggcggata acaatatcgt gctctacaac 240
[1090] atcgaaactg gccagagcta caccatcctg tcgaatagaa ctatgaaatc ggtgaatgcg 300
[1091] tcgaactacg gacttagccc ggaccgccag ttcgtgtacc tagaatcgga ctacagcaag 360
[1092] ctgtggcggt acagctacac tgctacgtac tacatctacg acctgtcgaa tggcgagttc 420
[1093] gtgagaggaa acgaactccc ccgcccgatc caatacctgt gctggagccc tgtgggaagc 480
[1094] aagctggcgt acgtgtatca gaacaacatc tacctcaagc agaggccggg cgacccacct 540
[1095] ttccagatca cttttaacgg tcgggagaac aagattttca atggaatccc ggattgggtg 600
[1096] tacgaagaag agatgctggc gaccaaatat gcgctctggt ggtcgccaaa cggaaaattt 660
[1097] ctagcatacg ccgagttcaa tgacaccgac atccccgtca tcgcctacag ctactacgga 720
[1098] gatgagcaat acccacgcac tattaatatc ccgtacccga aagccggcgc taaaaatccg 780
[1099] gtcgtgcgga tcttcatcat cgacactacc tatccagctt acgtgggacc gcaagaggtc 840
[1100] cctgtgccag ccatgatcgc cagcagcgat tactacttct cctggctgac ttgggtcact 900
[1101] gacgagaggg tgtgcctcca atggctcaag cgcgtgcaga acgtgagcgt gctgtccatc 960
[1102] tgcgacttca gagaagattg gcaaacgtgg gactgtccga aaactcaaga gcatatcgag 1020
[1103] gagagcagaa ccggatgggc agggggttc ttcgtgtcca ccccggtgtt cagctacgat 1080
[1104] gcgatctcgt actacaagat tttctccgat aaggacgggt acaaacatat ccactacatc 1140
[1105] aaggacaccg tggagaatgc gatccaaatc actagcggaa aatgggaagc gattaacatt 1200
[1106] ttccgggtga cgcaagactc attgttctat tcatccaatg aatttgaaga gtaccctggc 1260
[1107] cggaggaaca tctaccgcat ctccatcgga tcatacccac catcaaagaa gtgcgtgacc 1320
[1108] tgccatctcc gcaaggagcg ctgccaatac tacaccgcgt ccttctccga ttacgcgaag 1380
[1109] tactacgccc tggtgtgcta cggcccggga atcccaatct cgaccctaca tgatgggcgc 1440
[1110] accgaccagg agatcaaaat cctggaggaa aacaaggagc tcgaaaatgc tctgaaaaat 1500
[1111] attcaactac cgaaggagga aatcaagaag ctggaggtgg atgaaattac tctgtggtac 1560
[1112] aaaatgatcc tgccgccaca gttcgaccgc tccaagaagt acccgctgct gatccaggtg 1620
[1113] tacggaggac cctgctcaca gtcggtgcgc tcagtgtttg ctgtgaattg gatcagctac 1680
[1114] ctcgcatcaa aggaggggat ggtcatcgcg cttgtggacg gaagaggtac tgcattccag 1740
[1115] ggggacaaac tgctctacgc ggtgtaccgc aagctgggcg tctacgaggt ggaggaccaa 1800
[1116] atcacggcgg tcagaaagtt catcgagatg ggtttcatcg acgagaagag gatcgccatc 1860
[1117] tggggctggt cgtacggagg ttacgtgtcg tcactcgctc tggcgagcgg gactggattg 1920
[1118] ttcaaatgcg gtatcgcagt cgcccccgtg tcgtcatggg aatactacgc ctcggtgtat 1980
[1119] accgaacgct ttatgggact ccctactaaa gacgataacc tagagcacta caaaaactcg 2040
[1120] acggtgatgg cacgcgcaga gtactttcgc aatgtggatt acctcctgat ccacggaacc 2100
[1121] gccgatgata atgtccactt ccagaactca gcccaaatcg cgaaagccct ggtgaacgct 2160
[1122] caagtggact ttcaagcaat gtggtattca gaccagaacc acggactatc cggcctatcg 2220
[1123] actaatcacc tgtacaccca tatgacccat ttccttaaac agtgtttcag cctgtccgat 2280
[1124] tag 2283
[1125] <210> 30
[1126] <211> 760
[1127] <212> PRT

[1128] <213> 人工序列

[1129] <220>

[1130] <223> 人类FAP氨基酸序列

[1131] <400> 30

[1132] Met Lys Thr Trp Val Lys Ile Val Phe Gly Val Ala Thr Ser Ala Val
[1133] 1 5 10 15
[1134] Leu Ala Leu Leu Val Met Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val His
[1135] 20 25 30
[1136] Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu
[1137] 35 40 45
[1138] Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe Pro Asn Trp Ile Ser Gly
[1139] 50 55 60
[1140] Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn Asn Ile Val Leu Tyr Asn
[1141] 65 70 75 80
[1142] Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu Ser Asn Arg Thr Met Lys
[1143] 85 90 95
[1144] Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val
[1145] 100 105 110
[1146] Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala
[1147] 115 120 125
[1148] Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Asn
[1149] 130 135 140
[1150] Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser
[1151] 145 150 155 160
[1152] Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro
[1153] 165 170 175
[1154] Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn Gly Arg Glu Asn Lys Ile
[1155] 180 185 190
[1156] Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr
[1157] 195 200 205
[1158] Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Ala
[1159] 210 215 220
[1160] Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
[1161] 225 230 235 240
[1162] Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly
[1163] 245 250 255
[1164] Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile Ile Asp Thr Thr Tyr Pro
[1165] 260 265 270
[1166] Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val Pro Ala Met Ile Ala Ser
[1167] 275 280 285
[1168] Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Thr Asp Glu Arg Val
[1169] 290 295 300

[1170] Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile
[1171] 305 310 315 320
[1172] Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp Asp Cys Pro Lys Thr Gln
[1173] 325 330 335
[1174] Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
[1175] 340 345 350
[1176] Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
[1177] 355 360 365
[1178] Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
[1179] 370 375 380
[1180] Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Asn Ile
[1181] 385 390 395 400
[1182] Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu
[1183] 405 410 415
[1184] Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Ser Tyr
[1185] 420 425 430
[1186] Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
[1187] 435 440 445
[1188] Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
[1189] 450 455 460
[1190] Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
[1191] 465 470 475 480
[1192] Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
[1193] 485 490 495
[1194] Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu Glu Ile Lys Lys Leu Glu
[1195] 500 505 510
[1196] Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
[1197] 515 520 525
[1198] Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
[1199] 530 535 540
[1200] Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Ser Tyr
[1201] 545 550 555 560
[1202] Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
[1203] 565 570 575
[1204] Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr Ala Val Tyr Arg Lys Leu
[1205] 580 585 590
[1206] Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile
[1207] 595 600 605
[1208] Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser
[1209] 610 615 620
[1210] Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu
[1211] 625 630 635 640

[1212] Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr
[1213] 645 650 655
[1214] Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp
[1215] 660 665 670
[1216] Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
[1217] 675 680 685
[1218] Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
[1219] 690 695 700
[1220] Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
[1221] 705 710 715 720
[1222] Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Leu
[1223] 725 730 735
[1224] Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe Leu
[1225] 740 745 750
[1226] Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
[1227] 755 760
[1228] <210> 31
[1229] <211> 571
[1230] <212> DNA
[1231] <213> 人工序列
[1232] <220>
[1233] <223> CMV启动子序列
[1234] <400> 31
[1235] agtaatcaat tacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac 60
[1236] ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa 120
[1237] tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt 180
[1238] atttacggta aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc 240
[1239] ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat 300
[1240] gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atgctgatgc 360
[1241] ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc 420
[1242] tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa 480
[1243] aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc aaatgggcgg taggcgtgta cggtgggagg 540
[1244] tctatataag cagagctggt ttagtgaacc g 571
[1245] <210> 32
[1246] <211> 192
[1247] <212> DNA
[1248] <213> 人工序列
[1249] <220>
[1250] <223> SV40晚期多腺苷酸化序列
[1251] <400> 32
[1252] cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 60
[1253] aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 120

[1254] ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag ggggaggtgt 180
[1255] gggaggtttt tt 192
[1256] <210> 33
[1257] <400> 33
[1258] 000
[1259] <210> 34
[1260] <400> 34
[1261] 000
[1262] <210> 35
[1263] <400> 35
[1264] 000
[1265] <210> 36
[1266] <400> 36
[1267] 000
[1268] <210> 37
[1269] <400> 37
[1270] 000
[1271] <210> 38
[1272] <211> 32326
[1273] <212> DNA
[1274] <213> 人工序列
[1275] <220>
[1276] <223> EnAd基因组
[1277] <400> 38
[1278] tctatctata taatatacct tatagatgga atggtgccaa tatgtaaatg aggtgatttt 60
[1279] aaaaagtgtg gatcgtgtgg tgattggctg tggggttaac ggctaaaagg ggcggtgcga 120
[1280] ccgtgggaaa atgacgtttt gtgggggtgg agtttttttg caagttgtcg cgggaaatgt 180
[1281] gacgcataaa aaggcttttt tctcacggaa ctacttagtt ttcccacggt atttaacagg 240
[1282] aaatgaggta gttttgaccg gatgcaagtg aaaattgttg attttcgcgc gaaaactgaa 300
[1283] tgaggaagtg tttttctgaa taatgtggta tttatggcag ggtggagtat ttgttcaggg 360
[1284] ccaggtagac tttgacccat tacgtggagg tttcgattac cgtgtttttt acctgaattt 420
[1285] ccgcgtaccg tgtcaaagtc ttctgttttt acgtaggtgt cagctgatcg ctagggtatt 480
[1286] tatacctcag ggtttgtgtc aagaggccac tcttgagtgc cagcgagaag agttttctcc 540
[1287] tctgcgccgg cagtttaata ataaaaaaat gagagatttg cgatttctgc ctcaggaaat 600
[1288] aatctctgct gagactggaa atgaaatatt ggagcttgtg gtgcacgccc tgatgggaga 660
[1289] cgatccggag ccacctgtgc agctttttga gcctcctacg cttcaggaac tgtatgattt 720
[1290] agaggtagag ggatcggagg attctaatga ggaagctgta aatggctttt ttaccgattc 780
[1291] tatgctttta gctgctaatg aagggttaga attagatccg cctttggaca cttttgatac 840
[1292] tccaggggta attgtggaaa gcggtacagg tgtaagaaaa ttacctgatt tgagttccgt 900
[1293] ggactgtgat ttgcactgct atgaagacgg gtttcctccg agtgatgagg aggaccatga 960
[1294] aaaggagcag tccatgcaga ctgcagcggg tgagggagtg aaggctgcca atgttggttt 1020
[1295] tcagttggat tgcccggagc ttcctggaca tggctgtaag tcttgtgaat ttcacaggaa 1080

[1296] aaatactgga gtaaaggaac tgttatgttc gctttgttat atgagaacgc actgccactt 1140
[1297] tatttacagt aagtgtgttt aagttaaaat ttaaaggaat atgctgtttt tcacatgtat 1200
[1298] attgagtgtg agttttgtgc ttcttattat aggtcctgtg tctgatgctg atgaatcacc 1260
[1299] atctcctgat tctactacct cacctcctga gattcaagca cctgttcctg tggacgtgcg 1320
[1300] caagcccatt cctgtgaagc ttaagcctgg gaaacgtcca gcagtggaaa aacttgagga 1380
[1301] cttgttacag ggtggggacg gacctttgga cttgagtaca cggaaacgtc caagacaata 1440
[1302] agtgttccat atccgtgttt acttaaggtg acgtcaatat ttgtgtgaca gtgcaatgta 1500
[1303] ataaaaatat gttaactgtt cactggtttt tattgctttt tgggcgggga ctcaggtata 1560
[1304] taagtagaag cagacctgtg tggttagctc ataggagctg gctttcatcc atggaggttt 1620
[1305] gggccatttt ggaagacctt aggaagacta ggcaactgtt agagaacgct tcggacggag 1680
[1306] tctccggttt ttggagattc tggttcgcta gtgaattagc tagggtagtt tttaggataa 1740
[1307] aacaggacta taaacaagaa tttgaaaagt tgttggtaga ttgcccagga ctttttgaag 1800
[1308] ctcttaattt gggccatcag gttcacttta aagaaaaagt tttatcagtt ttagactttt 1860
[1309] caaccccagg tagaactgct gctgctgtgg cttttcttac ttttatatta gataaatgga 1920
[1310] tcccgcagac tcatttcagc aggggatacg ttttggattt catagccaca gcattgtgga 1980
[1311] gaacatggaa ggttcgcaag atgaggacaa tcttaggtta ctggccagtg cagcctttgg 2040
[1312] gtgtagcggg aatcctgagg catccaccgg tcatgccagc ggttctggag gaggaacagc 2100
[1313] aagaggacaa cccgagagcc ggcctggacc ctccagtgga ggaggcggag tagctgactt 2160
[1314] gtctcctgaa ctgcaacggg tgcttactgg atctacgtcc actggacggg ataggggcgt 2220
[1315] taagagggag agggcatcta gtggtactga tgctagatct gagttggctt taagtttaat 2280
[1316] gagtcgcaga cgtcctgaaa ccatttggtg gcatgaggtt cagaaagagg gaagggatga 2340
[1317] agtttctgta ttgcaggaga aatattcact ggaacaggtg aaaacatgtt ggttggagcc 2400
[1318] tgaggatgat tgggaggtgg ccattaaaaa ttatgccaag atagctttga ggcctgataa 2460
[1319] acagtataag attactagac ggattaatat ccggaatgct tgttacatat ctggaaatgg 2520
[1320] ggctgaggtg gtaatagata ctcaagacaa ggcagttatt agatgctgca tgatggatat 2580
[1321] gtggcctggg gtagtcggta tggaagcagt aacttttgta aatgttaagt ttaggggaga 2640
[1322] tggttataat ggaatagtgt ttatggccaa taccaaactt atattgcatg gttgtagctt 2700
[1323] ttttggtttc aacaatacct gtgtagatgc ctggggacag gttagtgtac ggggatgtag 2760
[1324] tttctatgcg tgttggattg ccacagctgg cagaaccaag agtcaattgt ctctgaagaa 2820
[1325] atgcatattt caaagatgta acctgggcat tctgaatgaa ggcgaagcaa gggtccgcca 2880
[1326] ctgcgcttct acagatactg gatgttttat tttgattaag ggaaatgcca gcgtaaagca 2940
[1327] taacatgatt tgcggtgctt ccgatgagag gccttatcaa atgctcactt gtgctggtgg 3000
[1328] gcattgtaat atgctggcta ctgtgcatat tgtttcccat caacgcaaaa aatggcctgt 3060
[1329] ttttgatcac aatgtgatga cgaagtgtac catgcatgca ggtgggcgta gaggaatgtt 3120
[1330] tatgccttac cagtgtaaca tgaatcatgt gaaagtgttg ttggaaccag atgccttttc 3180
[1331] cagaatgagc ctaacaggaa tttttgacat gaacatgcaa atctggaaga tcctgaggta 3240
[1332] tgatgatacg agatcgaggg tacgcgcatg cgaatgcgga ggcaagcatg ccaggttcca 3300
[1333] gccggtgtgt gtagatgtga ctgaagatct cagaccggat catttggtta ttgcccgcac 3360
[1334] tggagcagag ttcggatcca gtggagaaga aactgactaa ggtgagtatt gggaaaactt 3420
[1335] tggggtggga ttttcagatg gacagattga gtaaaaattt gtttttctg tcttgcagct 3480
[1336] gtcatgagtg gaaacgcttc ttttaagggg ggagtcttca gcccttatct gacagggcgt 3540
[1337] ctcccatcct gggcaggagt tcgtcagaat gttatgggat ctactgtgga tggaagaccc 3600

[1338] gtccaacccg ccaattcttc aacgctgacc tatgctactt taagttcttc acctttggac 3660
[1339] gcagctgcag ctgccgccgc cgcttctgtt gccgctaaca ctgtgcttgg aatgggttac 3720
[1340] tatggaagca tcatggctaa ttccacttcc tctaataacc cttctaccct gactcaggac 3780
[1341] aagttacttg tccttttggc ccagctggag gctttgaccc aacgtctggg tgaactttct 3840
[1342] cagcaggtgg tcgagttgcg agtacaaact gagtctgctg tcggcacggc aaagtctaaa 3900
[1343] taaaaaaatc ccagaatcaa tgaataaata aacaagcttg ttgttgattt aaaatcaagt 3960
[1344] gtttttattt catttttcgc gcacggtatg ccctagacca ccgatctcta tcattgagaa 4020
[1345] ctcggtggat tttttccagg atcctataga ggtgggattg aatgtttaga tacatgggca 4080
[1346] ttaggccgtc tttggggtgg agatagctcc attgaaggga ttcatgctcc ggggtagtgt 4140
[1347] tgtaaatcac ccagtcataa caaggtcgca gtgcatggtg ttgcacaata tcttttagaa 4200
[1348] gtaggctgat tgccacagat aagcccttgg tgtaggtgtt tacaaaccgg ttgagctggg 4260
[1349] atgggtgcat tcggggtgaa attatgtgca ttttggattg gatttttaag ttggcaatat 4320
[1350] tgccgccaag atcccgtctt gggttcatgt tatgaaggac caccaagacg gtgtatccgg 4380
[1351] tacatttagg aaatttatcg tgcagcttgg atggaaaagc gtggaaaaat ttggagacac 4440
[1352] ccttgtgtcc tccaagattt tccatgcact catccatgat aatagcaatg gggccgtggg 4500
[1353] cagcggcgcg ggcaaacacg ttccgtgggt ctgacacatc atagttatgt tcctgagtta 4560
[1354] aatcatcata agccatttta atgaatttgg ggcggagagt accagattgg ggtatgaatg 4620
[1355] ttccttcggg ccccggagca tagttcccct cacagatttg catttcccaa gctttcagtt 4680
[1356] ccgagggtgg aatcatgtcc acctgggggg ctatgaaaaa caccgtttct ggggcggggg 4740
[1357] tgattaattg tgatgatagc aaatttctga gcaattgaga tttgccacat ccggtggggc 4800
[1358] cataaatgat tccgattacg ggttgcaggt ggtagtttag ggaacggcaa ctgccgtctt 4860
[1359] ctcgaagcaa gggggccacc tcgttcatca tttcccttac atgcatattt tcccgcacca 4920
[1360] aatccattag gaggcgctct cctcctagtg atagaagttc ttgtagtgag gaaaagtttt 4980
[1361] tcagcggttt cagaccgtca gccatgggca ttttggagag agtttgctgc aaaagttcta 5040
[1362] gtctgttcca cagttcagtg atgtgttcta tggcatctcg atccagcaga cctcctcgtt 5100
[1363] tcgcgggttt ggacggctcc tggaataggg tatgagacga tgggcgtcca gcgctgccag 5160
[1364] ggttcggtcc ttccagggtc tcagtgttcg agtcagggtt gtttccgtca cagtgaaggg 5220
[1365] gtgtgcgcct gcttgggcgc ttgccagggt gcgcttcaga ctcatcctgc tggtcgaaaa 5280
[1366] cttctgtcgc ttggcgccct gtatgtcggc caagtagcag tttaccatga gttcgtagtt 5340
[1367] gagcgcctcg gctgcgtggc ctttggcgcg gagcttacct ttggaagttt tcttgcatac 5400
[1368] cgggcagtat aggcatttca gcgcatacaa cttgggcgca aggaaaacgg attctgggga 5460
[1369] gtatgcatct gcgccgcagg aggcgcaaac agtttcacat tccaccagcc aggttaaatc 5520
[1370] cggttcattg gggtcaaaaa caagttttcc gccatatttt ttgatgcgtt tcttaccttt 5580
[1371] ggtctccatg agttcgtgtc ctcgttgagt gacaaacagg ctgtccgtgt ccccgtagac 5640
[1372] tgattttaca ggcctcttct ccagtggagt gcctcggtct tcttcgtaca ggaactctga 5700
[1373] ccactctgat acaaaggcgc gcgtccaggc cagcacaaag gaggctatgt gggaggggta 5760
[1374] gcgatcgttg tcaaccaggg ggtccacctt ttccaaagta tgcaaacaca tgtcaccctc 5820
[1375] ttcaacatcc aggaatgtga ttggcttgta ggtgtatttc acgtgacctg gggtccccgc 5880
[1376] tgggggggta taaaaggggg cggttctttg ctcttcctca ctgtcttccg gatcgctgtc 5940
[1377] caggaacgtc agctgttggg gtaggtattc cctctcgaag gcgggcatga cctctgcact 6000
[1378] caggttgtca gtttctaaga acgaggagga tttgatattg acagtgccgg ttgagatgcc 6060
[1379] tttcatgagg ttttcgtcca tctggtcaga aaacacaatt tttttattgt caagtttggt 6120

[1380] ggcaaatgat ccatacaggg cgttggataa aagtttggca atggatcgca tggtttggtt 6180
[1381] cttttccttg tccgcgcgct ctttggcggc gatgttgagt tggacatact cgcgtgccag 6240
[1382] gcacttccat tcggggaaga tagttgttaa ttcatctggc acgattctca cttgccaccc 6300
[1383] tcgattatgc aaggtaatta aatccacact ggtggccacc tcgcctcgaa ggggttcatt 6360
[1384] ggtccaacag agcctacctc ctttcctaga acagaaaggg ggaagtgggt ctagcataag 6420
[1385] ttcatcggga gggtctgcat ccatggtaaa gattcccgga agtaaatcct tatcaaaata 6480
[1386] gctgatggga gtggggtcat ctaaggccat ttgccattct cgagctgcca gtgcgcgctc 6540
[1387] atatgggtta aggggactgc cccatggcat gggatgggtg agtgcagagg catacatgcc 6600
[1388] acagatgtca tagacgtaga tgggatcctc aaagatgcct atgtaggttg gatagcatcg 6660
[1389] ccccccctctg atacttgctc gcacatagtc atatagttca tgtgatggcg ctagcagccc 6720
[1390] cggacccaag ttggtgcgat tgggtttttc tgttctgtag acgatctggc gaaagatggc 6780
[1391] gtgagaattg gaagagatgg tgggtctttg aaaaatgttg aaatgggcat gaggtagacc 6840
[1392] tacagagtct ctgacaaagt gggcataaga ttcttgaagc ttggttacca gttcggcggt 6900
[1393] gacaagtacg tctagggcgc agtagtcaag tgtttcttga atgatgtcat aacctggttg 6960
[1394] gtttttcttt tcccacagtt cgcggttgag aaggtattct tcgcgatcct tccagtactc 7020
[1395] ttctagcgga aacccgtctt tgtctgcacg gtaagatcct agcatgtaga actgattaac 7080
[1396] tgccttgtaa gggcagcagc ccttctctac gggtagagag tatgcttgag cagcttttcg 7140
[1397] tagcgaagcg tgagtaaggg caaaggtgtc tctgaccatg actttgagga attggtattt 7200
[1398] gaagtcgatg tcgtcacagg ctccctgttc ccagagttgg aagtctaccc gtttcttgta 7260
[1399] ggcggggttg ggcaaagcga aagtaacatc attgaagaga atcttgccgg ccctgggcat 7320
[1400] gaaattgcga gtgatgcgaa aaggctgtgg tacttccgct cggttattga taacctgggc 7380
[1401] agctaggacg atctcgtcga aaccgttgat gttgtgtcct acgatgtata attctatgaa 7440
[1402] acgcggcgtg cctctgacgt gaggtagctt actgagctca tcaaaggtta ggtctgtggg 7500
[1403] gtcagataag gcgtagtgtt cgagagccca ttcgtgcagg tgaggattcg ctttaaggaa 7560
[1404] ggaggaccag aggtccactg ccagtgctgt ttgtaactgg tcccggtact gacgaaaatg 7620
[1405] ccgtccgact gccatttttt ctggggtgac gcaatagaag gtttgggggt cctgccgcca 7680
[1406] gcgatcccac ttgagtttta tggcgaggtc ataggcgatg ttgacgagcc gctggtctcc 7740
[1407] agagagtttc atgaccagca tgaaggggat tagctgcttg ccaaaggacc ccatccaggt 7800
[1408] gtaggtttcc acatcgtagg tgagaaagag cctttctgtg cgaggatgag agccaatcgg 7860
[1409] gaagaactgg atctcctgcc accagttgga ggaatggctg ttgatgtgat ggaagtagaa 7920
[1410] ctccctgcga cgcgccgagc attcatgctt gtgcttgtac agacggccgc agtagtcgca 7980
[1411] gcgttgcacg ggttgtatct cgtgaatgag ttgtacctgg cttcccttga cgagaaattt 8040
[1412] cagtgggaag ccgaggcctg gcgattgtat ctcgtgcttt actatgttgt ctgcatcggc 8100
[1413] ctgttcatct tctgtctcga tggtggtcat gctgacgagc cctcgcggga ggcaagtcca 8160
[1414] gacctcggcg cggcaggggc ggagctcgag gacgagagcg cgcaggctgg agctgtccag 8220
[1415] ggtcctgaga cgctgcggac tcaggttagt aggcagtgtc aggagattaa cttgcatgat 8280
[1416] cttttggagg gcgtgcggga ggttcagata gtacttgatc tcaacgggtc cgttggtgga 8340
[1417] gatgtcgatg gcttgcaggg ttccgtgtcc cttgggcgct accaccgtgc ccttgttttt 8400
[1418] cattttggac ggcggtggct ctgttgcttc ttgcatgttt agaagcggtg tcgagggcgc 8460
[1419] gcaccgggcg gcaggggcgg ctcgggaccc ggcggcatgg ctggcagtgg tacgtcggcg 8520
[1420] ccgcgcgcgg gtaggttctg gtactgcgcc ctgagaagac tcgcatgcgc gacgacgcgg 8580
[1421] cggttgacat cctggatctg acgcctctgg gtgaaagcta ccggccccgt gagcttgaac 8640

[1422] ctgaaagaga gttcaacaga atcaatctcg gtatcgttga cggcggcttg cctaaggatt 8700
[1423] tcttgcacgt caccagagtt gtcctggtag gcgatctccg ccatgaactg ctcgatctct 8760
[1424] tcctcttgaa gatctccgcg gcccgctctc tcgacggtgg ccgcgaggtc gttggagatg 8820
[1425] cgcccaatga gttgagagaa tgcattcatg cccgcctcgt tccagacgcg gctgtagacc 8880
[1426] acggccccca cgggatctct cgcgcgcatg accacctggg cgaggttgag ctccacgtgg 8940
[1427] cgggtgaaga ccgcatagtt gcataggcgc tggaaaaggt agttgagtgt ggtggcgatg 9000
[1428] tgctcggtga cgaagaaata catgatccat cgtctcagcg gcatctcgct gacatcgccc 9060
[1429] agagcttcca agcgctccat ggcctcgtag aagtccacgg caaaattaaa aaactgggag 9120
[1430] tttcgcgcgg acacggtcaa ctcctcttcc agaagacgga taagttcggc gatggtggtg 9180
[1431] cgcacctcgc gctcgaaagc ccctgggatt tcttcctcaa tctcttcttc ttccactaac 9240
[1432] atctcttcct cttcaggtgg ggctgcagga ggagggggaa cgcggcgacg ccggcggcgc 9300
[1433] acgggcagac ggtcgatgaa tctttcaatg acctctccgc ggcggcggcg catggtttca 9360
[1434] gtgacggcgc ggccgttctc gcgcggtcgc agagtaaaaa caccgccgcg catctcctta 9420
[1435] aagtggtgac tgggaggttc tccgtttggg agggagaggg cgctgattat acattttatt 9480
[1436] aattggcccg tagggactgc acgcagagat ctgatcgtgt caagatccac gggatctgaa 9540
[1437] aacctttcga cgaaagcgtc taaccagtca cagtcacaag gtaggctgag tacggcttct 9600
[1438] tgtgggcggg ggtggttatg tgttcggtct gggtcttctg tttcttcttc atctcgggaa 9660
[1439] ggtgagacga tgctgctggt gatgaaatta aagtaggcag ttctaagacg gcggatggtg 9720
[1440] gcgaggagca ccaggtcttt gggtccggct tgctggatac gcaggcgatt ggccattccc 9780
[1441] caagcattat cctgacatct agcaagatct ttgtagtagt cttgcatgag ccgttctacg 9840
[1442] ggcacttctt cctcacccgt tctgccatgc atacgtgtga gtccaaatcc gcgcattggt 9900
[1443] tgtaccagtg ccaagtcagc tacgactctt tcggcgagga tggcttgctg tacttgggta 9960
[1444] agggtggctt gaaagtcatc aaaatccaca aagcggtggt aagctcctgt attaatggtg 10020
[1445] taagcacagt tggccatgac tgaccagtta actgtctggt gaccagggcg cacgagctcg 10080
[1446] gtgtatttaa ggcgcgaata ggcgcgggtg tcaaagatgt aatcgttgca ggtgcgcacc 10140
[1447] agatactggt accctataag aaaatgcggc ggtggttggc ggtagagagg ccatcgttct 10200
[1448] gtagctggag cgccaggggc gaggtcttcc aacataaggc ggtgatagcc gtagatgtac 10260
[1449] ctggacatcc aggtgattcc tgcggcggta gtagaagccc gaggaaactc gcgtacgcgg 10320
[1450] ttccaaatgt tgcgtagcgg catgaagtag ttcattgtag gcacggtttg accagtgagg 10380
[1451] cgcgcgcagt cattgatgct ctatagacac ggagaaaatg aaagcgttca gcgactcgac 10440
[1452] tccgtagcct ggaggaacgt gaacgggttg ggtcgcggtg taccccggtt cgagacttgt 10500
[1453] actcgagccg gccggagccg cggctaacgt ggtattggca ctcccgtctc gacccagcct 10560
[1454] acaaaaatcc aggatacgga atcgagtcgt tttgctggtt tccgaatggc agggaagtga 10620
[1455] gtcctatttt tttttttgc cgctcagatg catcccgtgc tgcgacagat gcgcccccaa 10680
[1456] caacagcccc cctcgcagca gcagcagcag caatcacaaa aggctgtccc tgcaactact 10740
[1457] gcaactgccg ccgtgagcgg tgcgggacag cccgcctatg atctggactt ggaagagggc 10800
[1458] gaaggactgg cacgtctagg tgcgccttca cccgagcggc atccgcgagt tcaactgaaa 10860
[1459] aaagattctc gcgaggcgta tgtgccccaa cagaacctat ttagagacag aagcggcgag 10920
[1460] gagccggagg agatgcgagc ttcccgcttt aacgcgggtc gtgagctgcg tcacggtttg 10980
[1461] gaccgaagac gagtgttgcg ggacgaggat ttcgaagttg atgaaatgac agggatcagt 11040
[1462] cctgccaggg cacacgtggc tgcagccaac cttgtatcgg cttacgagca gacagtaaag 11100
[1463] gaagagcgta acttccaaaa gtcttttaat aatcatgtgc gaaccctgat tgcccgcgaa 11160

[1464] gaagttaccc ttggtttgat gcatttgtgg gatttgatgg aagctatcat tcagaaccct 11220
[1465] actagcaaac ctctgaccgc ccagctgttt ctggtggtgc aacacagcag agacaatgag 11280
[1466] gctttcagag aggcgctgct gaacatcacc gaacccgagg ggagatggtt gtatgatctt 11340
[1467] atcaacattc tacagagtat catagtgcag gagcggagcc tgggcctggc cgagaaggtg 11400
[1468] gctgccatca attactcggt tttgagcttg ggaaaatatt acgctcgcaa aatctacaag 11460
[1469] actccatacg ttcccataga caaggaggtg aagatagatg ggttctacat gcgcatgacg 11520
[1470] ctcaaggtct tgaccctgag cgatgatctt ggggtgtatc gcaatgacag aatgcatcgc 11580
[1471] gcggttagcg ccagcaggag gcgcgagtta agcgacaggg aactgatgca cagtttgcaa 11640
[1472] agagctctga ctggagctgg aaccgagggt gagaattact tcgacatggg agctgacttg 11700
[1473] cagtggcagc ctagtcgcag ggctctgagc gccgcgacgg caggatgtga gcttccttac 11760
[1474] atagaagagg cggatgaagg cgaggaggaa gagggcgagt acttggaaga ctgatggcac 11820
[1475] aacccgtgtt ttttgctaga tggaacagca agcaccggat cccgcaatgc gggcggcgct 11880
[1476] gcagagccag ccgtccggca ttaactcctc ggacgattgg acccaggcca tgcaacgtat 11940
[1477] catggcgttg acgactcgca accccgaagc ctttagacag caaccccagg ccaaccgtct 12000
[1478] atcggccatc atggaagctg tagtgccttc ccgctctaat cccactcatg agaaggtcct 12060
[1479] ggccatcgtg aacgcgttgg tggagaacaa agctattcgt ccagatgagg ccggactggt 12120
[1480] atacaacgct ctcttagaac gcgtggctcg ctacaacagt agcaatgtgc aaaccaattt 12180
[1481] ggaccgtatg ataacagatg tacgcgaagc cgtgtctcag cgcgaaaggt tccagcgtga 12240
[1482] tgccaacctg ggttcgctgg tggcgttaaa tgctttcttg agtactcagc ctgctaatgt 12300
[1483] gccgcgtggt caacaggatt atactaactt tttaagtgct ttgagactga tggtatcaga 12360
[1484] agtacctcag agcgaagtgt atcagtccgg tcctgattac ttctttcaga ctagcagaca 12420
[1485] gggcttgcag acggtaaatc tgagccaagc ttttaaaaac cttaaaggtt tgtggggagt 12480
[1486] gcatgccccg gtaggagaaa gagcaaccgt gtctagcttg ttaactccga actcccgcct 12540
[1487] attattactg ttggtagctc ctttcaccga cagcggtagc atcgaccgta attcctattt 12600
[1488] gggttaccta ctaaacctgt atcgcgaagc catagggcaa agtcaggtgg acgagcagac 12660
[1489] ctatcaagaa attacccaag tcagtcgcgc tttgggacag gaagacactg gcagtttgga 12720
[1490] agccactctg aacttcttgc ttaccaatcg gtctcaaaag atccctcctc aatatgctct 12780
[1491] tactgcggag gaggagagga tccttagata tgtgcagcag agcgtgggat tgtttctgat 12840
[1492] gcaagagggg gcaactccga ctgcagcact ggacatgaca gcgcgaaata tggagcccag 12900
[1493] catgtatgcc agtaaccgac ctttcattaa caaactgctg gactacttgc acagagctgc 12960
[1494] cgctatgaac tctgattatt tcaccaatgc catcttaaac ccgcactggc tgcccccacc 13020
[1495] tggtttctac acgggcgaat atgacatgcc cgaccctaat gacggatttc tgtgggacga 13080
[1496] cgtggacagc gatgtttttt cacctctttc tgatcatcgc acgtggaaaa aggaaggcgg 13140
[1497] cgatagaatg cattcttctg catcgctgtc cggggtcatg ggtgctaccg cggctgagcc 13200
[1498] cgagtctgca agtccttttc ctagtctacc cttttctcta cacagtgtac gtagcagcga 13260
[1499] agtgggtaga ataagtcgcc cgagtttaat gggcgaagag gagtatctaa acgattcctt 13320
[1500] gctcagaccg gcaagagaaa aaaatttccc aaacaatgga atagaaagtt tggtggataa 13380
[1501] aatgagtaga tggaagactt atgctcagga tcacagagac gagcctggga tcatggggat 13440
[1502] tacaagtaga gcgagccgta gacgccagcg ccatgacaga cagaggggtc ttgtgtggga 13500
[1503] cgatgaggat tcggccgatg atagcagcgt gctggacttg ggtgggagag gaaggggcaa 13560
[1504] cccgtttgct catttgcgcc ctcgcttggg tggtatgttg taaaaaaaaa taaaaaaaaa 13620
[1505] actcaccaag gccatggcga cgagcgtacg ttcgttcttc tttattatct gtgtctagta 13680

[1506] taatgaggcg agtcgtgcta ggcggagcgg tggtgtatcc ggagggtcct cctccttcgt 13740
[1507] acgagagcgt gatgcagcag cagcaggcga cggcggtgat gcaatcccca ctggaggctc 13800
[1508] cctttgtgcc tccgcgatac ctggcaccta cggagggcag aaacagcatt cgttattcgg 13860
[1509] aactggcacc tcagtacgat accaccaggt tgtatctggt ggacaacaag tcggcggaca 13920
[1510] ttgcttctct gaactatcag aatgaccaca gcaacttctt gaccacggtg gtgcaaaaca 13980
[1511] atgactttac ccctacggaa gccagcaccc agaccattaa ctttgatgaa cgatcgcggt 14040
[1512] ggggcggtca gctaaagacc atcatgcata ctaacatgcc aaacgtgaac gagtatatgt 14100
[1513] ttagtaacaa gttcaaagcg cgtgtgatgg tgtccagaaa acctcccgac ggtgctgcag 14160
[1514] ttggggatac ttatgatcac aagcaggata ttttgaaata tgagtggttc gagtttactt 14220
[1515] tgccagaagg caacttttca gttactatga ctattgattt gatgaacaat gccatcatag 14280
[1516] ataattactt gaaagtgggt agacagaatg gagtgcttga aagtgacatt ggtgttaagt 14340
[1517] tcgacaccag gaacttcaag ctgggatggg atcccgaaac caagttgatc atgcctggag 14400
[1518] tgtatacgta tgaagccttc catcctgaca ttgtcttact gcctggctgc ggagtggatt 14460
[1519] ttaccgagag tcgtttgagc aaccttcttg gtatcagaaa aaaacagcca tttcaagagg 14520
[1520] gttttaagat tttgtatgaa gatttagaag gtggtaatat tccggccctc ttggatgtag 14580
[1521] atgcctatga gaacagtaag aaagaacaaa aagccaaaat agaagctgct acagctgctg 14640
[1522] cagaagctaa ggcaaacata gttgccagcg actctacaag ggttgctaac gctggagagg 14700
[1523] tcagaggaga caattttgcg ccaacacctg ttccgactgc agaatcatta ttggccgatg 14760
[1524] tgtctgaagg aacggacgtg aaactcacta ttcaacctgt agaaaaagat agtaagaata 14820
[1525] gaagctataa tgtgttggaa gacaaaatca acacagccta tcgcagttgg tatctttcgt 14880
[1526] acaattatgg cgatcccgaa aaaggagtgc gttcctggac attgctcacc acctcagatg 14940
[1527] tcacctgcgg agcagagcag gtctactggt cgcttccaga catgatgaag gatcctgtca 15000
[1528] ctttccgctc cactagacaa gtcagtaact accctgtggt gggtgcagag cttatgcccg 15060
[1529] tcttctcaaa gagcttctac aacgaacaag ctgtgtactc ccagcagctc cgccagtcca 15120
[1530] cctcgcttac gcacgtcttc aaccgctttc ctgagaacca gattttaatc cgtccgccgg 15180
[1531] cgcccaccat taccaccgtc agtgaaaacg ttcctgctct cacagatcac gggaccctgc 15240
[1532] cgttgcgcag cagtatccgg ggagtccaac gtgtgaccgt tactgacgcc agacgccgca 15300
[1533] cctgtcccta cgtgtacaag gcactgggca tagtcgcacc gcgcgtcctt tcaagccgca 15360
[1534] ctttctaaaa aaaaaaaaaa tgtccattct tatctcgccc agtaataaca ccggttgggg 15420
[1535] tctgcgcgct ccaagcaaga tgtacggagg cgcacgcaaa cgttctaccc aacatcctgt 15480
[1536] ccgtgttcgc ggacattttc gcgctccatg gggcgccctc aagggccgca ctcgcgttcg 15540
[1537] aaccaccgtc gatgatgtaa tcgatcaggt ggttgccgac gcccgtaatt atactcctac 15600
[1538] tgcgcctaca tctactgtgg atgcagttat tgacagtgta gtggctgacg ctcgcaacta 15660
[1539] tgctcgacgt aagagccggc gaaggcgcat tgccagacgc caccgagcta ccactgccat 15720
[1540] gcgagccgca agagctctgc tacgaagagc tagacgcgtg gggcgaagag ccatgcttag 15780
[1541] ggcggccaga cgtgcagctt cgggcgccag cgccggcagg tcccgcaggc aagcagccgc 15840
[1542] tgtcgcagcg gcgactattg ccgacatggc ccaatcgcga agaggcaatg tatactgggt 15900
[1543] gcgtgacgct gccaccggtc aacgtgtacc cgtgcgcacc cgtccccctc gcacttagaa 15960
[1544] gatactgagc agtctccgat gttgtgtccc agcggcgagg atgtccaagc gcaaatacaa 16020
[1545] ggaagaaatg ctgcaggtta tcgcacctga agtctacggc caaccgttga aggatgaaaa 16080
[1546] aaaaccccgc aaaatcaagc gggttaaaaa ggacaaaaaa gaagaggaag atggcgatga 16140
[1547] tgggctggcg gagtttgtgc gcgagtttgc cccacggcga cgcgtgcaat ggcgtgggcg 16200

[1548] caaagttcga catgtgttga gacctggaac ttcggtggtc tttacacccg gcgagcgttc 16260
[1549] aagcgctact tttaagcgtt cctatgatga ggtgtacggg gatgatgata ttcttgagca 16320
[1550] ggcggctgac cgattaggcg agtttgctta tggcaagcgt agtagaataa cttccaagga 16380
[1551] tgagacagtg tcgataccct tggatcatgg aaatcccacc cctagtctta aaccggtcac 16440
[1552] tttgcagcaa gtgttacccg taactccgcg aacaggtgtt aaacgcgaag gtgaagattt 16500
[1553] gtatcccact atgcaactga tggtacccaa acgccagaag ttggaggacg ttttggagaa 16560
[1554] agtaaaagtg gatccagata ttcaacctga ggttaaagtg agacccatta agcaggtagc 16620
[1555] gcctggtctg ggggtacaaa ctgtagacat taagattccc actgaaagta tggaagtgca 16680
[1556] aactgaaccc gcaaagccta ctgccacctc cactgaagtg caaacggatc catggatgcc 16740
[1557] catgcctatt acaactgacg ccgccggtcc cactcgaaga tcccgacgaa agtacggtcc 16800
[1558] agcaagtctg ttgatgccca attatgttgt acacccatct attattccta ctcctggtta 16860
[1559] ccgaggcact cgctactatc gcagccgaaa cagtacctcc cgccgtcgcc gcaagacacc 16920
[1560] tgcaaatcgc agtcgtcgcc gtagacgcac aagcaaaccg actcccggcg ccctggtgcg 16980
[1561] gcaagtgtac cgcaatggta gtgcggaacc tttgacactg ccgcgtgcgc gttaccatcc 17040
[1562] gagtatcatc acttaatcaa tgttgccgct gcctccttgc agatatggcc ctcacttgtc 17100
[1563] gccttcgcgt tcccatcact ggttaccgag gaagaaactc gcgccgtaga agagggatgt 17160
[1564] tgggacgcgg aatgcgacgc tacaggcgac ggcgtgctat ccgcaagcaa ttgcggggtg 17220
[1565] gtttttttacc agccttaatt ccaattatcg ctgctgcaat tggcgcgata ccaggcatag 17280
[1566] cttccgtggc ggttcaggcc tcgcaacgac attgacattg gaaaaaaacg tataaataaa 17340
[1567] aaaaaaaaaa tacaatggac tctgacactc ctggtcctgt gactatgttt tcttagagat 17400
[1568] ggaagacatc aatttttcat ccttggctcc gcgacacggc acgaagccgt acatgggcac 17460
[1569] ctggagcgac atcggcacga gccaactgaa cgggggcgcc ttcaattgga gcagtatctg 17520
[1570] gagcgggctt aaaaattttg gctcaaccat aaaaacatac gggaacaaag cttggaacag 17580
[1571] cagtacagga caggcgctta gaaataaact taaagaccag aacttccaac aaaaagtagt 17640
[1572] cgatgggata gcttccggca tcaatggagt ggtagatttg gctaaccagg ctgtgcagaa 17700
[1573] aaagataaac agtcgtttgg acccgccgcc agcaacccca ggtgaaatgc aagtggagga 17760
[1574] agaaattcct ccgccagaaa aacgaggcga caagcgtccg cgtcccgatt tggaagagac 17820
[1575] gctggtgacg cgcgtagatg aaccgccttc ttatgaggaa gcaacgaagc ttggaatgcc 17880
[1576] caccactaga ccgatagccc caatggccac cggggtgatg aaaccttctc agttgcatcg 17940
[1577] acccgtcacc ttggatttgc cccctccccc tgctgctact gctgtacccg cttctaagcc 18000
[1578] tgtcgctgcc ccgaaaccag tcgccgtagc caggtcacgt cccgggggcg ctcctcgtcc 18060
[1579] aaatgcgcac tggcaaaata ctctgaacag catcgtgggt ctaggcgtgc aaagtgtaaa 18120
[1580] acgccgtcgc tgcttttaat taaatatgga gtagcgctta acttgcctat ctgtgtatat 18180
[1581] gtgtcattac acgccgtcac agcagcagag gaaaaaagga agaggtcgtg cgtcgacgct 18240
[1582] gagttacttt caagatggcc accccatcga tgctgcccca atgggcatac atgcacatcg 18300
[1583] ccggacagga tgcttcggag tacctgagtc cgggtctggt gcagttcgcc cgcgccacag 18360
[1584] acacctactt caatctggga aataagttta gaaatcccac cgtagcgccg acccacgatg 18420
[1585] tgaccaccga ccgtagccag cggctcatgt tgcgcttcgt gcccgttgac cgggaggaca 18480
[1586] atacatactc ttacaaagtg cggtacaccc tggccgtggg cgacaacaga gtgctggata 18540
[1587] tggccagcac gttctttgac attaggggtg tgttggacag aggtcccagt ttcaaaccct 18600
[1588] attctggtac ggcttacaac tccctggctc ctaaaggcgc tccaaataca tctcagtgga 18660
[1589] ttgcagaagg tgtaaaaaat acaactggtg aggaacacgt aacagaagag gaaaccaata 18720

[1590] ctactactta cacttttggc aatgctcctg taaaagctga agctgaaatt acaaaagaag 18780
[1591] gactcccagt aggtttggaa gtttcagatg aagaaagtaa accgatttat gctgataaaa 18840
[1592] catatcagcc agaacctcag ctgggagatg aaacttggac tgaccttgat ggaaaaaccg 18900
[1593] aaaagtatgg aggcagggct ctcaaacccg atactaagat gaaaccatgc tacgggtcct 18960
[1594] ttgccaaacc tactaatgtg aaaggcggtc aggcaaaaca aaaaacaacg gagcagccaa 19020
[1595] atcagaaagt cgaatatgat atcgacatgg agtttttga tgcggcatcg cagaaaacaa 19080
[1596] acttaagtcc taaaattgtc atgtatgcag aaaatgtaaa tttggaaact ccagacactc 19140
[1597] atgtagtgta caaacctgga acagaagaca caagttccga agctaatttg ggacaacaat 19200
[1598] ctatgcccaa cagacccaac tacattggct tcagagataa ctttattgga cttatgtact 19260
[1599] ataacagtac tggtaacatg ggggtgctgg ctggtcaagc gtctcagtta aatgcagtgg 19320
[1600] ttgacttgca ggacagaaac acagaacttt cttaccaact cttgcttgac tctctgggcg 19380
[1601] acagaaccag atactttagc atgtggaatc aggctgtgga cagttatgat cctgatgtac 19440
[1602] gtgttattga aaatcatggt gtggaagatg aacttcccaa ctactgtttt ccactggacg 19500
[1603] gcataggtgt tccaacaacc agttacaaat caatagttcc aaatggagac aatgcgccta 19560
[1604] attggaagga acctgaagta aatggaacaa gtgagatcgg acagggtaat ttgtttgcca 19620
[1605] tggaaattaa ccttcaagcc aatctatggc gaagtttcct ttattccaat gtggctctat 19680
[1606] atctcccaga ctcgtacaaa tacaccccgt ccaatgtcac tcttccagaa aacaaaaaca 19740
[1607] cctacgacta catgaacggg cgggtggtgc cgccatctct agtagacacc tatgtgaaca 19800
[1608] ttggtgccag gtggtctctg gatgccatgg acaatgtcaa cccattcaac caccaccgta 19860
[1609] acgctggctt gcgttaccga tccatgcttc tgggtaacgg acgttatgtg cctttccaca 19920
[1610] tacaagtgcc tcaaaaattc ttcgctgtta aaaacctgct gcttctccca ggctcctaca 19980
[1611] cttatgagtg gaactttagg aaggatgtga acatggttct acagagttcc ctcggtaacg 20040
[1612] acctgcgggt agatggcgcc agcatcagtt tcacgagcat caacctctat gctacttttt 20100
[1613] tccccatggc tcacaacacc gcttccaccc ttgaagccat gctgcggaat gacaccaatg 20160
[1614] atcagtcatt caacgactac ctatctgcag ctaacatgct ctaccccatt cctgccaatg 20220
[1615] caaccaatat tcccatttcc attccttctc gcaactgggc ggctttcaga ggctggtcat 20280
[1616] ttaccagact gaaaaccaaa gaaactccct ctttggggtc tggatttgac ccctactttg 20340
[1617] tctattctgg ttctattccc tacctggatg gtaccttcta cctgaaccac acttttaaga 20400
[1618] aggtttccat catgtttgac tcttcagtga gctggcctgg aaatgacagg ttactatctc 20460
[1619] ctaacgaatt tgaaataaag cgcactgtgg atggcgaagg ctacaacgta gcccaatgca 20520
[1620] acatgaccaa agactggttc ttggtacaga tgctcgccaa ctacaacatc ggctatcagg 20580
[1621] gcttctacat tccagaagga tacaaagatc gcatgtattc atttttcaga aacttccagc 20640
[1622] ccatgagcag gcaggtggtt gatgaggtca attacaaaga cttcaaggcc gtcgccatac 20700
[1623] cctaccaaca caacaactct ggctttgtgg gttacatggc tccgaccatg cgccaaggtc 20760
[1624] aaccctatcc cgctaactat ccctatccac tcattggaac aactgccgta aatagtgtta 20820
[1625] cgcagaaaaa gttcttgtgt gacagaacca tgtggcgcat accgttctcg agcaacttca 20880
[1626] tgtctatggg ggcccttaca gacttgggac agaatatgct ctatgccaac tcagctcatg 20940
[1627] ctctggacat gacctttgag gtggatccca tggatgagcc caccctgctt tatcttctct 21000
[1628] tcgaagtttt cgacgtggtc agagtgcatc agccacaccg cggcatcatc gaggcagtct 21060
[1629] acctgcgtac accgttctcg gccggtaacg ctaccacgta agaagcttct tgcttcttgc 21120
[1630] aaatagcagc tgcaaccatg gcctgcggat cccaaaacgg ctccagcgag caagagctca 21180
[1631] gagccattgt ccaagacctg ggttgcggac cctatttttt gggaacctac gataagcgct 21240

[1632] tcccggggtt catggccccc gataagctcg cctgtgccat tgtaaatacg gccggacgtg 21300
[1633] agacgggggg agagcactgg ttggctttcg gttggaaccc acgttctaac acctgctacc 21360
[1634] tttttgatcc ttttggattc tcggatgatc gtctcaaaca gatttaccag tttgaatatg 21420
[1635] agggtctcct gcgccgcagc gctcttgcta ccaaggaccg ctgtattacg ctggaaaaat 21480
[1636] ctacccagac cgtgcagggt ccccgttctg ccgcctgcgg acttttctgc tgcatgttcc 21540
[1637] ttcacgcctt tgtgcactgg cctgaccgtc ccatggacgg aaaccccacc atgaaattgc 21600
[1638] taactggagt gccaaacaac atgcttcatt ctcctaaagt ccagcccacc ctgtgtgaca 21660
[1639] atcaaaaagc actctaccat tttcttaata cccattcgcc ttattttcgc tcccatcgta 21720
[1640] cacacatcga aagggccact gcgttcgacc gtatggatgt tcaataatga ctcatgtaaa 21780
[1641] caacgtgttc aataaacatc actttatttt tttacatgta tcaaggctct gcattactta 21840
[1642] tttatttaca agtcgaatgg gttctgacga gaatcagaat gacccgcagg cagtgatacg 21900
[1643] ttgcggaact gatacttggg ttgccacttg aattcgggaa tcaccaactt gggaaccggt 21960
[1644] atatcgggca ggatgtcact ccacagcttt ctggtcagct gcaaagctcc aagcaggtca 22020
[1645] ggagccgaaa tcttgaaatc acaattagga ccagtgcttt gagcgcgaga gttgcggtac 22080
[1646] accggattgc agcactgaaa caccatcagc gacggatgtc tcacgcttgc cagcacggtg 22140
[1647] ggatctgcaa tcatgcccac atccagatct tcagcattgg caatgctgaa cggggtcatc 22200
[1648] ttgcaggtct gcctacccat ggcgggcacc caattaggct tgtggttgca atcgcagtgc 22260
[1649] agggggatca gtatcatctt ggcctgatcc tgtctgattc ctggatacac ggctctcatg 22320
[1650] aaagcatcat attgcttgaa agcctgctgg gctttactac cctcggtata aaacatcccg 22380
[1651] caggacctgc tcgaaaactg gttagctgca cagccggcat cattcacaca gcagcgggcg 22440
[1652] tcattgttag ctatttgcac cacacttctg ccccagcggt tttgggtgat tttggttcgc 22500
[1653] tcgggattct cctttaaggc tcgttgtccg ttctcgctgg ccacatccat ctcgataatc 22560
[1654] tgctccttct gaatcataat attgccatgc aggcacttca gcttgccctc ataatcattg 22620
[1655] cagccatgag gccacaacgc acagcctgta cattcccaat tatggtgggc gatctgagaa 22680
[1656] aaagaatgta tcattccctg cagaaatctt cccatcatcg tgctcagtgt cttgtgacta 22740
[1657] gtgaaagtta actggatgcc tcggtgctcc tcgtttacgt actggtgaca gatgcgcttg 22800
[1658] tattgttcgt gttgctcagg cattagttta aaagaggttc taagttcgtt atccagcctg 22860
[1659] tacttctcca tcagcagaca catcacttcc atgcctttct cccaagcaga caccaggggc 22920
[1660] aagctaatcg gattcttaac agtgcaggca gcagctcctt tagccagagg gtcatcttta 22980
[1661] gcgatcttct caatgcttct tttgccatcc ttctcaacga tgcgcacggg cgggtagctg 23040
[1662] aaacccactg ctacaagttg cgcctcttct ctttcttctt cgctgtcttg actgatgtct 23100
[1663] tgcatgggga tatgtttggt cttccttggc ttctttttgg ggggtatcgg aggaggagga 23160
[1664] ctgtcgctcc gttccggaga cagggaggat tgtgacgttt cgctcaccat taccaactga 23220
[1665] ctgtcggtag aagaacctga ccccacacgg cgacaggtgt ttctcttcgg gggcagaggt 23280
[1666] ggaggcgatt gcgaagggct gcggtccgac ctggaaggcg gatgactggc agaacccctt 23340
[1667] ccgcgttcgg gggtgtgctc cctgtggcgg tcgcttaact gatttccttc gcggctggcc 23400
[1668] attgtgttct cctaggcaga gaaacaacag acatggaaac tcagccattg ctgtcaacat 23460
[1669] cgccacgagt gccatcacat ctcgtcctca gcgacgagga aaaggagcag agcttaagca 23520
[1670] ttccaccgcc cagtcctgcc accacctcta ccctagaaga taaggaggtc gacgcatctc 23580
[1671] atgacatgca gaataaaaaa gcgaaagagt ctgagacaga catcgagcaa gacccgggct 23640
[1672] atgtgacacc ggtggaacac gaggaagagt tgaaacgctt tctagagaga gaggatgaaa 23700
[1673] actgcccaaa acaacgagca gataactatc accaagatgc tggaaatagg gatcagaaca 23760

[1674] ccgactacct catagggctt gacggggaag acgcgctcct taaacatcta gcaagacagt 23820
[1675] cgctcatagt caaggatgca ttattggaca gaactgaagt gcccatcagt gtggaagagc 23880
[1676] tcagccgcgc ctacgagctt aacctctttt cacctcgtac tccccccaaa cgtcagccaa 23940
[1677] acggcacctg cgagccaaat cctcgcttaa acttttatcc agcttttgct gtgccagaag 24000
[1678] tactggctac ctatcacatc ttttttaaaa atcaaaaaat tccagtctcc tgccgcgcta 24060
[1679] atcgcacccg cgccgatgcc ctactcaatc tgggacctgg ttcacgctta cctgatatag 24120
[1680] cttccttgga agaggttcca aagatcttcg agggtctggg caataatgag actcgggccg 24180
[1681] caaatgctct gcaaaaggga gaaaatggca tggatgagca tcacagcgtt ctggtggaat 24240
[1682] tggaaggcga taatgccaga ctcgcagtac tcaagcgaag catcgaggtc acacacttcg 24300
[1683] catatcccgc tgtcaacctg ccccctaaag tcatgacggc ggtcatggac cagttactca 24360
[1684] ttaagcgcgc aagtcccctt tcagaagaca tgcatgaccc agatgcctgt gatgagggta 24420
[1685] aaccagtggt cagtgatgag cagctaaccc gatggctggg caccgactct cccagggatt 24480
[1686] tggaagagcg tcgcaagctt atgatggccg tggtgctggt taccgtagaa ctagagtgtc 24540
[1687] tccgacgttt ctttaccgat tcagaaacct tgcgcaaact cgaagagaat ctgcactaca 24600
[1688] cttttagaca cggctttgtg cggcaggcat gcaagatatc taacgtggaa ctcaccaacc 24660
[1689] tggtttccta catgggtatt ctgcatgaga atcgcctagg acaaagcgtg ctgcacagca 24720
[1690] ccctgaaggg ggaagcccgc cgtgattaca tccgcgattg tgtctatctg tacctgtgcc 24780
[1691] acacgtggca aaccggcatg ggtgtatggc agcaatgttt agaagaacag aacttgaaag 24840
[1692] agcttgacaa gctcttacag aaatctctta aggttctgtg gacagggttc gacgagcgca 24900
[1693] ccgtcgcttc cgacctggca gacctcatct tcccagagcg tctcagggtt actttgcgaa 24960
[1694] acggattgcc tgactttatg agccagagca tgcttaacaa ttttcgctct ttcatcctgg 25020
[1695] aacgctccgg tatcctgccc gccacctgct gcgcactgcc ctccgacttt gtgcctctca 25080
[1696] cctaccgcga gtgccccccg ccgctatgga gtcactgcta cctgttccgt ctggccaact 25140
[1697] atctctccta ccactcggat gtgatcgagg atgtgagcgg agacggcttg ctggagtgtc 25200
[1698] actgccgctg caatctgtgc acgccccacc ggtccctagc ttgcaacccc cagttgatga 25260
[1699] gcgaaaccca gataataggc acctttgaat tgcaaggccc cagcagccaa ggcgatgggt 25320
[1700] cttctcctgg gcaaagttta aaactgaccc cgggactgtg gacctccgcc tacttgcgca 25380
[1701] agtttgctcc ggaagattac cacccctatg aaatcaagtt ctatgaggac caatcacagc 25440
[1702] ctccaaaggc cgaactttcg gcctgcgtca tcacccaggg ggcaattctg gcccaattgc 25500
[1703] aagccatcca aaaatcccgc caagaatttc tactgaaaaa gggtaagggg gtctaccttg 25560
[1704] acccccagac cggcgaggaa ctcaacacaa ggttccctca ggatgtccca acgacgagaa 25620
[1705] aacaagaagt tgaaggtgca gccgccgccc ccagaagata tggaggaaga ttgggacagt 25680
[1706] caggcagagg aggcggagga ggacagtctg gaggacagtc tggaggaaga cagtttggag 25740
[1707] gaggaaaacg aggaggcaga ggaggtggaa gaagtaaccg ccgacaaaca gttatcctcg 25800
[1708] gctgcggaga caagcaacag cgctaccatc tccgctccga gtcgaggaac ccggcggcgt 25860
[1709] cccagcagta gatgggacga gaccggacgc ttcccgaacc caaccagcgc ttccaagacc 25920
[1710] ggtaagaagg atcggcaggg atacaagtcc tggcgggggc ataagaatgc catcatctcc 25980
[1711] tgcttgcatg agtgcggggg caacatatcc ttcacgcggc gctacttgct attccaccat 26040
[1712] ggggtgaact ttccgcgcaa tgttttgcat tactaccgtc acctccacag cccctactat 26100
[1713] agccagcaaa tcccggcagt ctcgacagat aaagacagcg gcggcgacct ccaacagaaa 26160
[1714] accagcagcg gcagttagaa aatacacaac aagtgcagca acaggaggat taaagattac 26220
[1715] agccaacgag ccagcgcaaa cccgagagtt aagaaatcgg atctttccaa ccctgtatgc 26280

[1716] catcttccag cagagtcggg gtcaagagca ggaactgaaa ataaaaaacc gatctctgcg 26340
[1717] ttcgctcacc agaagttgtt tgtatcacaa gagcgaagat caacttcagc gcactctcga 26400
[1718] ggacgccgag gctctcttca acaagtactg cgcgctgact cttaaagagt aggcagcgac 26460
[1719] cgcgcttatt caaaaaaggc gggaattaca tcatcctcga catgagtaaa gaaattccca 26520
[1720] cgccttacat gtggagttat caaccccaaa tgggattggc ggcaggcgcc tcccaggact 26580
[1721] actccacccg catgaattgg ctcagcgccg ggccttctat gatttctcga gttaatgata 26640
[1722] tacgcgccta ccgaaaccaa atacttttgg aacagtcagc tcttaccacc acgccccgcc 26700
[1723] aacaccttaa tcccagaaat tggcccgccg ccctagtgta ccaggaaagt cccgctccca 26760
[1724] ccactgtatt acttcctcga gacgcccagg ccgaagtcca aatgactaat gcaggtgcgc 26820
[1725] agttagctgg cggctccacc ctatgtcgtc acaggcctcg gcataatata aaacgcctga 26880
[1726] tgatcagagg ccgaggtatc cagctcaacg acgagtcggt gagctctccg cttggtctac 26940
[1727] gaccagacgg aatctttcag attgccggct gcgggagatc ttccttcacc cctcgtcagg 27000
[1728] ctgttctgac tttggaaagt tcgtcttcgc aaccccgctc gggcggaatc gggaccgttc 27060
[1729] aatttgtgga ggagtttact ccctctgtct acttcaaccc cttctccgga tctcctgggc 27120
[1730] attacccgga cgagttcata ccgaacttcg acgcgattag cgagtcagtg gacggctacg 27180
[1731] attgatgtct ggtgacgcgg ctgagctatc tcggctgcga catctagacc actgccgccg 27240
[1732] ctttcgctgc tttgcccggg aactcattga gttcatctac ttcgaactcc ccaaggatca 27300
[1733] ccctcaaggt ccggcccacg gagtgcggat ttctatcgaa ggcaaaatag actctcgcct 27360
[1734] gcaacgaatt ttctcccagc ggcccgtgct gatcgagcga gaccagggaa acaccacggt 27420
[1735] ttccatctac tgcatttgta atcaccccgg attgcatgaa agcctttgct gtcttatgtg 27480
[1736] tactgagttt aataaaaact gaattaagac tctcctacgg actgccgctt cttcaacccg 27540
[1737] gattttacaa ccagaagaac gaaacttttc ctgtcgtcca ggactctgtt aacttcacct 27600
[1738] ttcctactca caaactagaa gctcaacgac tacaccgctt ttccagaagc attttcccta 27660
[1739] ctaatactac tttcaaaacc ggaggtgagc tccaaggtct tcctacagaa aacccttggg 27720
[1740] tggaagcggg ccttgtagtg ctaggaattc ttgcgggtgg gcttgtgatt attctttgct 27780
[1741] acctatacac accttgcttc actttcttag tggtgttgtg gtattggttt aaaaaatggg 27840
[1742] gcccatacta gtcttgcttg ttttactttc gcttttggaa ccgggttctg ccaattacga 27900
[1743] tccatgtcta gacttcgacc cagaaaactg cacacttact tttgcacccg acacaagccg 27960
[1744] catctgtgga gttcatcgcc tctcttacga acttggcccc caacgacaaa aatttacctg 28020
[1745] catggtggga atcaacccca tagttatcac ccagcaaagt ggagatacta agggttgcat 28080
[1746] tcactgctcc tgcgattcca tcgagtgcac ctacaccctg ctgaagaccc tatgcggcct 28140
[1747] aagagacctg ctaccaatga attaaaaaat gattaataaa aaatcactta cttgaaatca 28200
[1748] gcaataaggt ctctgttgaa attttctccc agcagcacct cacttccctc ttcccaactc 28260
[1749] tggtattcta aaccccgttc agcggcatac tttctccata ctttaaaggg gatgtcaaat 28320
[1750] tttagctcct ctcctgtacc cacaatcttc atgtctttct tcccagatga ccaagagagt 28380
[1751] ccggctcagt gactccttca accctgtcta cccctatgaa gatgaaagca cctcccaaca 28440
[1752] ccccttttata aacccagggt ttatttcccc aaatggcttc acacaaagcc caaacggagt 28500
[1753] tcttacttta aaatgtttaa ccccactaac aaccacaggc ggatctctac agctaaaagt 28560
[1754] gggaggggga cttacagtgg atgacaccaa cggttttttg aaagaaaaca taagtgccac 28620
[1755] cacaccactc gttaagactg gtcactctat aggtttacca ctaggagccg gattgggaac 28680
[1756] gaatgaaaat aaactttgta tcaaattagg acaaggactt acattcaatt caaacaacat 28740
[1757] ttgcattgat gacaatatta acaccttatg gacaggagtc aaccccaccg aagccaactg 28800

[1758] tcaaatcatg aactccagtg aatctaatga ttgcaaatta attctaacac tagttaaaac 28860
[1759] tggagcacta gtcactgcat ttgtttatgt tataggagta tctaacaatt ttaatatgct 28920
[1760] aactacacac agaaatataa attttactgc agagctgttt ttcgattcta ctggtaattt 28980
[1761] actaactaga ctctcatccc tcaaaactcc acttaatcat aaatcaggac aaaacatggc 29040
[1762] tactggtgcc attactaatg ctaaaggttt catgcccagc acgactgcct atcctttcaa 29100
[1763] tgataattct agagaaaaag aaaactacat ttacggaact tgttactaca cagctagtga 29160
[1764] tcgcactgct tttcccattg acatatctgt catgcttaac cgaagagcaa taaatgacga 29220
[1765] gacatcatat tgtattcgta taacttggtc ctggaacaca ggagatgccc cagaggtgca 29280
[1766] aacctctgct acaaccctag tcacctcccc atttaccttt tactacatca gagaagacga 29340
[1767] ctgacaaata aagtttaact tgtttatttg aaaatcaatt cacaaaatcc gagtagttat 29400
[1768] tttgcctccc ccttcccatt taacagaata caccaatctc tccccacgca cagctttaaa 29460
[1769] catttggata ccattagata tagacatggt tttagattcc acattccaaa cagtttcaga 29520
[1770] gcgagccaat ctggggtcag tgatagataa aaatccatcg ggatagtctt ttaaagcgct 29580
[1771] ttcacagtcc aactgctgcg gatgcgactc cggagtctgg atcacggtca tctggaagaa 29640
[1772] gaacgatggg aatcataatc cgaaaacggt atcggacgat tgtgtctcat caaacccaca 29700
[1773] agcagccgct gtctgcgtcg ctccgtgcga ctgctgttta tgggatcagg gtccacagtg 29760
[1774] tcctgaagca tgattttaat agcccttaac atcaactttc tggtgcgatg cgcgcagcaa 29820
[1775] cgcattctga tttcactcaa atctttgcag taggtacaac acattattac aatattgttt 29880
[1776] aataaaccat aattaaaagc gctccagcca aaactcatat ctgatataat cgcccctgca 29940
[1777] tgaccatcat accaaagttt aatataaatt aaatgacgtt ccctcaaaaa cacactaccc 30000
[1778] acatacatga tctcttttgg catgtgcata ttaacaatct gtctgtacca tggacaacgt 30060
[1779] tggttaatca tgcaacccaa tataaccttc cggaaccaca ctgccaacac cgctccccca 30120
[1780] gccatgcatt gaagtgaacc ctgctgatta caatgacaat gaagaaccca attctctcga 30180
[1781] ccgtgaatca cttgagaatg aaaaatatct atagtggcac aacatagaca taaatgcatg 30240
[1782] catcttctca taatttttaa ctcctcagga tttagaaaca tatcccaggg aataggaagc 30300
[1783] tcttgcagaa cagtaaagct ggcagaacaa ggaagaccac gaacacaact tacactatgc 30360
[1784] atagtcatag tatcacaatc tggcaacagc gggtggtctt cagtcataga agctcgggtt 30420
[1785] tcattttcct cacaacgtgg taactgggct ctggtgtaag ggtgatgtct ggcgcatgat 30480
[1786] gtcgagcgtg cgcgcaacct tgtcataatg gagttgcttc ctgacattct cgtattttgt 30540
[1787] atagcaaaac gcggccctgg cagaacacac tcttcttcgc cttctatcct gccgcttagc 30600
[1788] gtgttccgtg tgatagttca agtacaacca cactcttaag ttggtcaaaa gaatgctggc 30660
[1789] ttcagttgta atcaaaactc catcgcatct aatcgttctg aggaaatcat ccaagcaatg 30720
[1790] caactggatt gtgtttcaag caggagagga gagggaagag acggaagaac catgttaatt 30780
[1791] tttattccaa acgatctcgc agtacttcaa attgtagatc gcgcagatgg catctctcgc 30840
[1792] ccccactgtg ttggtgaaaa agcacagcta gatcaaaaga aatgcgattt tcaaggtgct 30900
[1793] caacggtggc ttccagcaaa gcctccacgc gcacatccaa gaacaaaaga ataccaaaag 30960
[1794] aaggagcatt ttctaactcc tcaatcatca tattacattc ctgcaccatt cccagataat 31020
[1795] tttcagcttt ccagccttga attattcgtg tcagttcttg tggtaaatcc aatccacaca 31080
[1796] ttacaaacag gtcccggagg gcgccctcca ccaccattct taaacacacc ctcataatga 31140
[1797] caaaatatct tgctcctgtg tcacctgtag cgaattgaga atggcaacat caattgacat 31200
[1798] gcccttggct ctaagttctt ctttaagttc tagttgtaaa aactctctca tattatcacc 31260
[1799] aaactgctta gccagaagcc ccccgggaac aagagcaggg gacgctacag tgcagtacaa 31320

[1800] gcgcagacct ccccaattgg ctccagcaaa aacaagattg gaataagcat attgggaacc 31380
[1801] gccagtaata tcatcgaagt tgctggaaat ataatcaggc agagtttctt gtaaaaattg 31440
[1802] aataaaagaa aaatttgcca aaaaaacatt caaaacctct gggatgcaaa tgcaataggt 31500
[1803] taccgcgctg cgctccaaca ttgttagttt tgaattagtc tgcaaaaata aaaaaaaaaa 31560
[1804] caagcgtcat atcatagtag cctgacgaac agatggataa atcagtcttt ccatcacaag 31620
[1805] acaagccaca gggtctccag ctcgaccctc gtaaaacctg tcatcatgat taaacaacag 31680
[1806] caccgaaagt tcctcgcggt gaccagcatg aataattctt gatgaagcat acaatccaga 31740
[1807] catgttagca tcagttaacg agaaaaaaca gccaacatag cctttgggta taattatgct 31800
[1808] taatcgtaag tatagcaaag ccacccctcg cggatacaaa gtaaaaggca caggagaata 31860
[1809] aaaaatataa ttatttctct gctgctgttc aggcaacgtc gcccccggtc cctctaaata 31920
[1810] cacatacaaa gcctcatcag ccatggctta ccagacaaag tacagcgggc acacaaagca 31980
[1811] caagctctaa agtgactctc caacctctcc acaatatata tatacacaag ccctaaactg 32040
[1812] acgtaatggg agtaaagtgt aaaaaatccc gccaaaccca acacacaccc cgaaactgcg 32100
[1813] tcaccaggga aaagtacagt ttcacttccg caatcccaac aggcgtaact tcctctttct 32160
[1814] cacggtacgt gatatcccac taacttgcaa cgtcattttc ccacggtcgc accgcccctt 32220
[1815] ttagccgtta accccacagc caatcaccac acgatccaca ctttttaaaa tcacctcatt 32280
[1816] tacatattgg caccattcca tctataaggt atattatata gataga 32326
[1817] <210> 39
[1818] <211> 201
[1819] <212> DNA
[1820] <213> 人工序列
[1821] <220>
[1822] <223> 对应于并且包含EnAd基因组的bp 28166-28366的Bx DNA序列
[1823] <400> 39
[1824] aaaatgatta ataaaaaatc acttacttga aatcagcaat aaggtctctg ttgaaatttt 60
[1825] ctcccagcag cacctcactt ccctcttccc aactctggta ttctaaaccc cgttcagcgg 120
[1826] catactttct ccatacttta aaggggatgt caaattttag ctcctctcct gtacccacaa 180
[1827] tcttcatgtc tttcttccca g 201
[1828] <210> 40
[1829] <211> 35
[1830] <212> DNA
[1831] <213> 人工序列
[1832] <220>
[1833] <223> 对应于并且包含EnAd基因组的bp 29345-29379的By DNA序列
[1834] <400> 40
[1835] caaataaagt ttaacttgtt tatttgaaaa tcaat 35
[1836] <210> 41
[1837] <211> 6
[1838] <212> PRT
[1839] <213> 人工序列
[1840] <220>
[1841] <223> His标签

[1842] <400> 41
[1843] His His His His His His
[1844] 1 5
[1845] <210> 42
[1846] <211> 14
[1847] <212> DNA
[1848] <213> 人工序列
[1849] <220>
[1850] <223> 剪接受体
[1851] <400> 42
[1852] tttctctctt cagg 14
[1853] <210> 43
[1854] <211> 192
[1855] <212> DNA
[1856] <213> 人工序列
[1857] <220>
[1858] <223> SV40多腺苷酸化序列
[1859] <400> 43
[1860] cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 60
[1861] aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 120
[1862] ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag ggggaggtgt 180
[1863] gggaggtttt tt 192
[1864] <210> 44
[1865] <211> 1539
[1866] <212> DNA
[1867] <213> 人工序列
[1868] <220>
[1869] <223> EpCam 双特异性T细胞衔接器核酸序列(OKT3)
[1870] <400> 44
[1871] atgggatgga gctgcatcat cctattcctc gtggcgacgg ccactggagt gcatagcgaa 60
[1872] ctggtgatga ctcagtcccc gtcatccctg acggtgaccg ccggcgagaa ggtcaccatg 120
[1873] tcgtgcaagt cctcgcaaag cctgcttaac agcggcaacc agaaaaacta cctcacgtgg 180
[1874] tatcagcaaa agccaggtca acccccaaaa ctgctcatct actgggcgag cacccgcgag 240
[1875] tcgggggtgc cagaccggtt caccggctcc gggtcaggaa ctgatttcac cctaaccatc 300
[1876] agctcggtgc aagcggagga cctggccgtg tactactgcc aaaatgatta ctcgtaccct 360
[1877] ctgacctttg gagcgggcac caagctcgaa atcaagggcg gtggaggaag cggcgggga 420
[1878] ggctcaggtg ggggaggatc agaagtccaa ctgctggagc agtcaggagc cgaactggtc 480
[1879] cgcccgggaa cctccgtcaa gatttcctgt aaggcttccg gctacgcttt taccaattac 540
[1880] tggctgggct gggtcaagca aagaccgggg catggcctgg agtggatcgg cgacatcttc 600
[1881] ccagggagcg gcaacatcca ctacaacgag aagttcaagg ggaaagcgac tctgactgcc 660
[1882] gacaaatcat ccagcaccgc ctacatgcag ctgtcgtcgc tcactttcga agacagcgcg 720
[1883] gtgtactttt gtgctcggct ccggaactgg gatgaaccaa tggactactg gggacaagga 780

[1884] actaccgtga ccgtctcctc cggcggcggt ggaagccagg tgcagctgca gcagtctggg 840
[1885] gctgaactgg caagacctgg ggcctcagtg aagatgtcct gcaaggcttc tggctacacc 900
[1886] tttactaggt acacgatgca ctgggtaaaa cagaggcctg gacagggtct ggaatggatt 960
[1887] ggatacatta atcctagccg tggttatact aattacaatc agaagttcaa ggacaaggcc 1020
[1888] acattgacta cagacaaatc ctccagcaca gcctacatgc aactgagcag cctgacatct 1080
[1889] gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga tattatgatg atcattactg ccttgactac 1140
[1890] tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcaggtggcg gtggctcggg cggtggtgga 1200
[1891] tctggtggcg gcggatctga tatcgtgctc actcagtctc cagcaatcat gtctgcatct 1260
[1892] ccaggggaga aggtcaccat gacctgcagt gccagctcaa gtgtaagtta catgaactgg 1320
[1893] taccagcaga agtcaggcac ctcccccaaa agatggattt atgacacatc caaactggct 1380
[1894] tctggagtcc ctgctcactt caggggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 1440
[1895] agcggcatgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag tagtaaccca 1500
[1896] ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaccgg 1539
[1897] <210> 45
[1898] <211> 1551
[1899] <212> DNA
[1900] <213> 人工序列
[1901] <220>
[1902] <223> FAP 双特异性T细胞衔接器核酸序列(OKT3)
[1903] <400> 45
[1904] atgggctgga gctgcatcat cttgttcctg gtcgcaactg ctaccggagt ccattcggac 60
[1905] atcgtcatga cccaaagccc tgactcgctc gctgtgtcac tgggagagcg ggcgactatc 120
[1906] aactgcaaat catcccagag cctgctgtat tcacgcaatc agaaaaacta cctggcctgg 180
[1907] tatcagcaga agccgggcca gcctcccaag ctgctgatct tctgggcctc cacccgcgaa 240
[1908] agcggcgtgc cggaccgctt cagcggaagc ggattcggaa ctgactttac tctgaccatt 300
[1909] agctccttgc aggcggagga cgtggccgtc tactactgcc agcagtattt ctcctatccg 360
[1910] ctcacctttg ggcaaggcac caaggtggag attaagggag ggggcggcag cgggggaggc 420
[1911] ggcagcggcg gcgggggatc gcaggtccag ctcgtccaat ccggagccga agtcaagaag 480
[1912] ccgggagcgt cggtcaaggt cagctgcaaa acttcgcgct acaccttcac tgagtacacg 540
[1913] atccactggg tccgccaggc gcccggccag cggctggagt ggatcggcgg gatcaaccca 600
[1914] aacaacggaa tcccaaatta caatcagaaa tttaaagggc gggtgactat caccgtggat 660
[1915] acctcggcct ccacggcgta catggagctc tcatcactca gatcggagga caccgcggtc 720
[1916] tattactgcg cccgccgccg gatcgcttat ggatacgatg aaggacatgc gatggattac 780
[1917] tggggccagg gcaccctcgt cacggtgtcg tcaggaggcg gcggttcaca ggtgcagctg 840
[1918] cagcagtctg gggctgaact ggcaagacct ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct 900
[1919] tctggctaca cctttactag gtacacgatg cactgggtaa aacagaggcc tggacagggt 960
[1920] ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtggttata ctaattacaa tcagaagttc 1020
[1921] aaggacaagg ccacattgac tacagacaaa tcctccagca cagcctacat gcaactgagc 1080
[1922] agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat tactgtgcaa gatattatga tgatcattac 1140
[1923] tgccttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcaggtgg cggtggctcg 1200
[1924] ggcggtggtg gatctggtgg cggcggatct gatatcgtgc tcactcagtc tccagcaatc 1260
[1925] atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt 1320

[1926] tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc acctccccca aaagatggat ttatgacaca 1380
[1927] tccaaactgg cttctggagt ccctgctcac ttcaggggca gtgggtctgg gacctcttac 1440
[1928] tctctcacaa tcagcggcat ggaggctgaa gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg 1500
[1929] agtagtaacc cattcacgtt cggctcgggg acaaagttgg aaataaaccg g 1551
[1930] <210> 46
[1931] <211> 1557
[1932] <212> DNA
[1933] <213> 人工序列
[1934] <220>
[1935] <223> FAP 双特异性T细胞衔接器核酸序列(aCD3)
[1936] <400> 46
[1937] atgggctgga gctgcatcat cttgttcctg gtcgcaactg ctaccggagt ccattcggac 60
[1938] atcgtcatga cccaaagccc tgactcgctc gctgtgtcac tgggagagcg ggcgactatc 120
[1939] aactgcaaat catcccagag cctgctgtat tcacgcaatc agaaaaacta cctggcctgg 180
[1940] tatcagcaga agccgggcca gcctcccaag ctgctgatct tctgggcctc cacccgcgaa 240
[1941] agcggcgtgc cggaccgctt cagcggaagc ggattcggaa ctgactttac tctgaccatt 300
[1942] agctccttgc aggcggagga cgtggccgtc tactactgcc agcagtattt ctcctatccg 360
[1943] ctcacctttg ggcaaggcac caaggtggag attaagggag ggggcggcag cgggggaggc 420
[1944] ggcagcggcg gcgggggatc gcaggtccag ctcgtccaat ccggagccga agtcaagaag 480
[1945] ccgggagcgt cggtcaaggt cagctgcaaa acttcgcgct acaccttcac tgagtacacg 540
[1946] atccactggg tccgccaggc gcccggccag cggctggagt ggatcggcgg gatcaaccca 600
[1947] aacaacggaa tcccaaatta caatcagaaa tttaaagggc gggtgactat caccgtggat 660
[1948] acctcggcct ccacggcgta catggagctc tcatcactca gatcggagga caccgcggtc 720
[1949] tattactgcg cccgccgccg gatcgcttat ggatacgatg aaggacatgc gatggattac 780
[1950] tggggccagg gcaccctcgt cacggtgtcg tcaggaggcg gcggttcaga tgtgcaactc 840
[1951] gtgcagtccg gtgcggaagt gaaaaagccg ggcgcgagcg tcaaagtgtc atgcaaggcg 900
[1952] tcaggatata cgtttactag atacactatg cactgggtgc gccaggcacc tggtcagggc 960
[1953] cttgaatgga tcggctacat caatccgtcg agaggctaca ctaattacgc ggactcagtc 1020
[1954] aaagggcgct tcacgattac gaccgacaag tccacctcga ctgcatacat ggaactgtcc 1080
[1955] tcgctgagaa gcgaggacac cgctacttac tactgcgcta gatactacga tgatcactac 1140
[1956] tgcctcgatt actggggcca gggaaccact gtcacggtgt catcgggaga gggcacctca 1200
[1957] accggatcag ggggatcggg aggctcgggc ggcgcagacg acatcgtcct gacccagtcg 1260
[1958] cccgccacct tgtcgctgtc cccaggagaa agagcgaccc tgtcatgccg ggcgtcgcaa 1320
[1959] agcgtgagct atatgaattg gtatcagcag aagccaggaa aggcgccgaa gagatggatc 1380
[1960] tacgacacct ccaaggtcgc ttcaggtgtc ccggctagat tctcaggatc gggatcagga 1440
[1961] acggactact ccctgaccat caattcactg gaagcagaag atgcggccac ctactactgt 1500
[1962] cagcagtggt cctccaaccc gctgactttc ggaggcggaa ctaaggtcga gatcaag 1557
[1963] <210> 47
[1964] <211> 1856
[1965] <212> DNA
[1966] <213> 人工序列
[1967] <220>

[1968] <223> NG-611转基因盒

[1969] <400> 47

[1970] caggcccacc atgggatgga gctgcatcat cctattcctc gtggcgacgg ccactggagt 60

[1971] gcatagcgaa ctggtgatga ctcagtcccc gtcatccctg acggtgaccg ccggcgagaa 120

[1972] ggtcaccatg tcgtgcaagt cctcgcaaag cctgcttaac agcggcaacc agaaaaacta 180

[1973] cctcacgtgg tatcagcaaa agccaggtca acccccaaaa ctgctcatct actgggcgag 240

[1974] cacccgcgag tcgggggtgc cagaccggtt caccggctcc gggtcaggaa ctgatttcac 300

[1975] cctaaccatc agctcggtgc aagcggagga cctggccgtg tactactgcc aaaatgatta 360

[1976] ctcgtaccct ctgacctttg gagcgggcac caagctcgaa atcaagggcg gtggaggaag 420

[1977] cggcgggggа ggctcaggtg ggggaggatc agaagtccaa ctgctggagc agtcaggagc 480

[1978] cgaactggtc cgcccgggaa cctccgtcaa gatttcctgt aaggcttccg gctacgcttt 540

[1979] taccaattac tggctgggct gggtcaagca aagaccgggg catggcctgg agtggatcgg 600

[1980] cgacatcttc ccagggagcg gcaacatcca ctacaacgag aagttcaagg ggaaagcgac 660

[1981] tctgactgcc gacaaatcat ccagcaccgc ctacatgcag ctgtcgtcgc tcactttcga 720

[1982] agacagcgcg gtgtactttt gtgctcggct ccggaactgg gatgaaccaa tggactactg 780

[1983] gggacaagga actaccgtga ccgtctcctc cggcggcggt ggaagccagg tgcagctgca 840

[1984] gcagtctggg gctgaactgg caagacctgg ggcctcagtg aagatgtcct gcaaggcttc 900

[1985] tggctacacc tttactaggt acacgatgca ctgggtaaaa cagaggcctg gacagggtct 960

[1986] ggaatggatt ggatacatta atcctagccg tggttatact aattacaatc agaagttcaa 1020

[1987] ggacaaggcc acattgacta cagacaaatc ctccagcaca gcctacatgc aactgagcag 1080

[1988] cctgacatct gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga tattatgatg atcattactg 1140

[1989] ccttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcaggtggcg gtggctcggg 1200

[1990] cggtggtgga tctggtggcg gcggatctga tatcgtgctc actcagtctc cagcaatcat 1260

[1991] gtctgcatct ccaggggaga aggtcaccat gacctgcagt gccagctcaa gtgtaagtta 1320

[1992] catgaactgg taccagcaga agtcaggcac ctcccccaaa agatggattt atgacacatc 1380

[1993] caaactggct tctggagtcc ctgctcactt caggggcagt gggtctggga cctcttactc 1440

[1994] tctcacaatc agcggcatgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag 1500

[1995] tagtaaccca ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaccggc atcaccatca 1560

[1996] ccatcaccac catcaccatt aggctagctt gactgactga gatacagcgt accttcagct 1620

[1997] cacagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa 1680

[1998] aaaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg 1740

[1999] caataaacaa gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggaggt 1800

[2000] gtgggaggtt ttttaaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtagtcgtc agctat 1856

[2001] <210> 48

[2002] <211> 1868

[2003] <212> DNA

[2004] <213> 人工序列

[2005] <220>

[2006] <223> NG-612转基因盒

[2007] <400> 48

[2008] caggcccacc atgggctgga gctgcatcat cttgttcctg gtcgcaactg ctaccggagt 60

[2009] ccattcggac atcgtcatga cccaaagccc tgactcgctc gctgtgtcac tgggagagcg 120

[2010] ggcgactatc aactgcaaat catcccagag cctgctgtat tcacgcaatc agaaaaacta 180
[2011] cctggcctgg tatcagcaga agccgggcca gcctcccaag ctgctgatct tctgggcctc 240
[2012] cacccgcgaa agcggcgtgc cggaccgctt cagcggaagc ggattcggaa ctgactttac 300
[2013] tctgaccatt agctccttgc aggcggagga cgtggccgtc tactactgcc agcagtattt 360
[2014] ctcctatccg ctcacctttg ggcaaggcac caaggtggag attaagggag ggggcggcag 420
[2015] cgggggaggc ggcagcggcg gcgggggatc gcaggtccag ctcgtccaat ccggagccga 480
[2016] agtcaagaag ccgggagcgt cggtcaaggt cagctgcaaa acttcgcgct acaccttcac 540
[2017] tgagtacacg atccactggg tccgccaggc gcccggccag cggctggagt ggatcggcgg 600
[2018] gatcaaccca aacaacggaa tcccaaatta caatcagaaa tttaaagggc gggtgactat 660
[2019] caccgtggat acctcggcct ccacggcgta catggagctc tcatcactca gatcggagga 720
[2020] caccgcggtc tattactgcg cccgccgccg gatcgcttat ggatacgatg aaggacatgc 780
[2021] gatggattac tggggccagg gcaccctcgt cacggtgtcg tcaggaggcg gcggttcaca 840
[2022] ggtgcagctg cagcagtctg gggctgaact ggcaagacct ggggcctcag tgaagatgtc 900
[2023] ctgcaaggct tctggctaca cctttactag gtacacgatg cactgggtaa aacagaggcc 960
[2024] tggacagggt ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtggttata ctaattacaa 1020
[2025] tcagaagttc aaggacaagg ccacattgac tacagacaaa tcctccagca cagcctacat 1080
[2026] gcaactgagc agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat tactgtgcaa gatattatga 1140
[2027] tgatcattac tgccttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcaggtgg 1200
[2028] cggtggctcg ggcggtggtg gatctggtgg cggcggatct gatatcgtgc tcactcagtc 1260
[2029] tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc atgacctgca gtgccagctc 1320
[2030] aagtgtaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc acctccccca aaagatggat 1380
[2031] ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcac ttcaggggca gtgggtctgg 1440
[2032] gacctcttac tctctcacaa tcagcggcat ggaggctgaa gatgctgcca cttattactg 1500
[2033] ccagcagtgg agtagtaacc cattcacgtt cggctcgggg acaaagttgg aaataaaccg 1560
[2034] gcatcaccat caccatcacc accatcacca ttaggctagc ttgactgact gagatacagc 1620
[2035] gtaccttcag ctcacagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag 1680
[2036] aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac 1740
[2037] cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt 1800
[2038] tcaggggggag gtgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat gtggtagtcg 1860
[2039] tcagctat 1868
[2040] <210> 49
[2041] <211> 1878
[2042] <212> DNA
[2043] <213> 人工序列
[2044] <220>
[2045] <223> NG-613转基因盒
[2046] <400> 49
[2047] tttctctctt caggcccacc atgggctgga gctgcatcat cttgttcctg gtcgcaactg 60
[2048] ctaccggagt ccattcggac atcgtcatga cccaaagccc tgactcgctc gctgtgtcac 120
[2049] tgggagagcg ggcgactatc aactgcaaat catcccagag cctgctgtat tcacgcaatc 180
[2050] agaaaaacta cctggcctgg tatcagcaga agccgggcca gcctcccaag ctgctgatct 240
[2051] tctgggcctc cacccgcgaa agcggcgtgc cggaccgctt cagcggaagc ggattcggaa 300

[2052] ctgactttac tctgaccatt agctccttgc aggcggagga cgtggccgtc tactactgcc 360
[2053] agcagtattt ctcctatccg ctcacctttg ggcaaggcac caaggtggag attaagggag 420
[2054] ggggcggcag cgggggaggc ggcagcggcg gcgggggatc gcaggtccag ctcgtccaat 480
[2055] ccggagccga agtcaagaag ccgggagcgt cggtcaaggt cagctgcaaa acttcgcgct 540
[2056] acaccttcac tgagtacacg atccactggg tccgccaggc gcccggccag cggctggagt 600
[2057] ggatcggcgg gatcaaccca aacaacggaa tcccaaatta caatcagaaa tttaaagggc 660
[2058] gggtgactat caccgtggat acctcggcct ccacggcgta catggagctc tcatcactca 720
[2059] gatcggagga caccgcggtc tattactgcg cccgccgccg gatcgcttat ggatacgatg 780
[2060] aaggacatgc gatggattac tggggccagg gcaccctcgt cacggtgtcg tcaggaggcg 840
[2061] gcggttcaca ggtgcagctg cagcagtctg gggctgaact ggcaagacct ggggcctcag 900
[2062] tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca cctttactag gtacacgatg cactgggtaa 960
[2063] aacagaggcc tggacagggt ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtggttata 1020
[2064] ctaattacaa tcagaagttc aaggacaagg ccacattgac tacagacaaa tcctccagca 1080
[2065] cagcctacat gcaactgagc agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat tactgtgcaa 1140
[2066] gatattatga tgatcattac tgccttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct 1200
[2067] cctcaggtgg cggtggctcg ggcggtggtg gatctggtgg cggcggatct gatatcgtgc 1260
[2068] tcactcagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc atgacctgca 1320
[2069] gtgccagctc aagtgtaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc acctccccca 1380
[2070] aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcac ttcaggggca 1440
[2071] gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcagcggcat ggaggctgaa gatgctgcca 1500
[2072] cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cattcacgtt cggctcgggg acaaagttgg 1560
[2073] aaataaaccg gcatcaccat caccatcacc accatcacca ttaggctagc ttgactgact 1620
[2074] gagatacagc gtaccttcag ctcacagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa 1680
[2075] ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt 1740
[2076] tatttgtaac cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta 1800
[2077] tgtttcaggt tcaggggga gtgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat 1860
[2078] gtggtagtcg tcagctat 1878
[2079] <210> 50
[2080] <211> 19
[2081] <212> DNA
[2082] <213> 人工序列
[2083] <220>
[2084] <223> 限制位点插入(Bx)
[2085] <400> 50
[2086] gcggccgcta tggccggcc 19
[2087] <210> 51
[2088] <211> 19
[2089] <212> DNA
[2090] <213> 人工序列
[2091] <220>
[2092] <223> 限制位点插入(By)
[2093] <400> 51

[2094] gcgatcgcta ccctgcagg 19

[2095] <210> 52

[2096] <211> 572

[2097] <212> DNA

[2098] <213> 人工序列

[2099] <220>

[2100] <223> CMV启动子序列

[2101] <400> 52

[2102] agtaatcaat tacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac 60

[2103] ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa 120

[2104] tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt 180

[2105] atttacggta aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc 240

[2106] ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat 300

[2107] gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atgctgatgc 360

[2108] ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc 420

[2109] tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa 480

[2110] aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc aaatgggcgg taggcgtgta cggtgggagg 540

[2111] tctatataag cagagctggt ttagtgaacc gt 572

[2112] <210> 53

[2113] <211> 505

[2114] <212> DNA

[2115] <213> 人工序列

[2116] <220>

[2117] <223> PGK启动子序列

[2118] <400> 53

[2119] ctaccgggta ggggaggcgc ttttcccaag gcagtctgga gcatgcgctt tagcagcccc 60

[2120] gctgggcact tggcgctaca caagtggcct ctggcctcgc acacattcca catccaccgg 120

[2121] taggcgccaa ccggctccgt tctttggtgg ccccttcgcg ccaccttcta cccctcccct 180

[2122] agtcaggaag ttcccccccg ccccgcagct cgcgtcatgc aggacgtgac aaatggaagt 240

[2123] agcacgtctc actagtctcg tgcaaatgga cagcaccgct gagcaatgga agcgggtagg 300

[2124] cccttggggc agcggccaat agcagctttg ctccttcgct ttctgggctc agaggctggg 360

[2125] aaggggtggg tccgggggcg ggctcagggg cgggctcagg ggcggggcgg gcgcccgaag 420

[2126] gtcctccgga ggcccggcat tccgcacgct tcaaaagcgc acgtctgccg cgctgttctc 480

[2127] ttcttcctca tctccgggcc tttcg 505

[2128] <210> 54

[2129] <211> 367

[2130] <212> DNA

[2131] <213> 人工序列

[2132] <220>

[2133] <223> CBA启动子序列

[2134] <400> 54

[2135] gtcgaggtga gccccacgtt ctgcttcact ctccccatct cccccccctc cccaccccca 60

[2136] attttgtatt tatttatttt ttaattattt tatgcagcga tgggggcggg gggggggggg 120
[2137] gcgcgcgcca ggcggggcgg ggcggggcga ggggcggggc ggggcgaggc ggagaggtgc 180
[2138] ggcggcagcc aatcagagcg gcgcgctccg aaagtttcct tttatggcga ggcggcggcg 240
[2139] gcggcggccc tataaaaagc gaagcgcgcg gcgggcggga gtcgctgcgt tgccttcgcc 300
[2140] ccgtgccccg ctccgcgccg cctcgcgccg cccgccccgg ctctgactga ccgcgttact 360
[2141] cccacag 367
[2142] <210> 55
[2143] <400> 55
[2144] 000
[2145] <210> 56
[2146] <211> 16
[2147] <212> DNA
[2148] <213> 人工序列
[2149] <220>
[2150] <223> 剪接受体(SA)DNA序列
[2151] <400> 56
[2152] cctttctctc ttcagg 16
[2153] <210> 57
[2154] <211> 23
[2155] <212> DNA
[2156] <213> 人工序列
[2157] <220>
[2158] <223> 支链剪接受体(bSA)DNA序列
[2159] <400> 57
[2160] tgctaatcct ttctctcttc agg 23
[2161] <210> 58
[2162] <400> 58
[2163] 000
[2164] <210> 59
[2165] <211> 13
[2166] <212> RNA
[2167] <213> 人工序列
[2168] <220>
[2169] <223> 起始密码子的实例
[2170] <220>
[2171] <221> 其它特征
[2172] <222> (11)..(11)
[2173] <223> R是腺嘌呤或鸟嘌呤
[2174] <400> 59
[2175] gccgccrcca ugg 13
[2176] <210> 60
[2177] <211> 551

[2178] <212> DNA
[2179] <213> 人工序列
[2180] <220>
[2181] <223> 内部核糖体进入序列(IRES)
[2182] <400> 60
[2183] cgttactggc cgaagccgct tggaataagg ccggtgtgcg tttgtctata tgttattttc 60
[2184] caccatattg ccgtcttttg gcaatgtgag ggcccggaaa cctggccctg tcttcttgac 120
[2185] gagcattcct aggggtcttt cccctctcgc caaaggaatg caaggtctgt tgaatgtcgt 180
[2186] gaaggaagca gttcctctgg aagcttcttg aagacaaaca acgtctgtag cgacccttg 240
[2187] caggcagcgg aacccccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggccaaaagc cacgtgtata 300
[2188] agatacacct gcaaaggcgg cacaacccca gtgccacgtt gtgagttgga tagttgtgga 360
[2189] aagagtcaaa tggctcccct caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg cccagaaggt 420
[2190] accccattgt atgggatctg atctggggcc tcggtgcaca tgcttttcat gtgtttagtc 480
[2191] gaggttaaaa aacgtctagg cccccccgaac cacggggacg tggttttcct ttgaaaaaca 540
[2192] cgatgataat a 551
[2193] <210> 61
[2194] <211> 22
[2195] <212> PRT
[2196] <213> 人工序列
[2197] <220>
[2198] <223> P2A肽
[2199] <400> 61
[2200] Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
[2201] 1 5 10 15
[2202] Glu Glu Asn Pro Gly Pro
[2203] 20
[2204] <210> 62
[2205] <211> 21
[2206] <212> PRT
[2207] <213> 人工序列
[2208] <220>
[2209] <223> F2A肽
[2210] <400> 62
[2211] Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
[2212] 1 5 10 15
[2213] Glu Asn Pro Gly Pro
[2214] 20
[2215] <210> 63
[2216] <211> 23
[2217] <212> PRT
[2218] <213> 人工序列
[2219] <220>

[2220] <223> E2A肽
[2221] <400> 63
[2222] Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
[2223] 1 5 10 15
[2224] Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[2225] 20
[2226] <210> 64
[2227] <211> 25
[2228] <212> PRT
[2229] <213> 人工序列
[2230] <220>
[2231] <223> T2A肽
[2232] <400> 64
[2233] Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
[2234] 1 5 10 15
[2235] Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[2236] 20 25
[2237] <210> 65
[2238] <211> 192
[2239] <212> DNA
[2240] <213> 人工序列
[2241] <220>
[2242] <223> 多腺苷酸化(polyA)序列
[2243] <400> 65
[2244] cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 60
[2245] aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 120
[2246] ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag ggggaggtgt 180
[2247] gggaggtttt tt 192
[2248] <210> 66
[2249] <211> 19
[2250] <212> PRT
[2251] <213> 人工序列
[2252] <220>
[2253] <223> 前导序列
[2254] <400> 66
[2255] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
[2256] 1 5 10 15
[2257] Val His Ser
[2258] <210> 67
[2259] <211> 19
[2260] <212> PRT
[2261] <213> 人工序列

[2262] <220>
[2263] <223> 前导序列
[2264] <400> 67
[2265] Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
[2266] 1 5 10 15
[2267] Ala His Ser
[2268] <210> 68
[2269] <211> 166
[2270] <212> PRT
[2271] <213> 人工序列
[2272] <220>
[2273] <223> IFNγ氨基酸序列
[2274] <400> 68
[2275] Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
[2276] 1 5 10 15
[2277] Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu
[2278] 20 25 30
[2279] Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn
[2280] 35 40 45
[2281] Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp
[2282] 50 55 60
[2283] Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe
[2284] 65 70 75 80
[2285] Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile
[2286] 85 90 95
[2287] Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg
[2288] 100 105 110
[2289] Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val
[2290] 115 120 125
[2291] Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser
[2292] 130 135 140
[2293] Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg
[2294] 145 150 155 160
[2295] Gly Arg Arg Ala Ser Gln
[2296] 165
[2297] <210> 69
[2298] <211> 188
[2299] <212> PRT
[2300] <213> 人工序列
[2301] <220>
[2302] <223> IFNα氨基酸序列
[2303] <400> 69

[2304] Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
[2305] 1 5 10 15
[2306] Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
[2307] 20 25 30
[2308] Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser
[2309] 35 40 45
[2310] Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
[2311] 50 55 60
[2312] Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His
[2313] 65 70 75 80
[2314] Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser
[2315] 85 90 95
[2316] Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr
[2317] 100 105 110
[2318] Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val
[2319] 115 120 125
[2320] Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys
[2321] 130 135 140
[2322] Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro
[2323] 145 150 155 160
[2324] Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu
[2325] 165 170 175
[2326] Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
[2327] 180 185
[2328] <210> 70
[2329] <211> 233
[2330] <212> PRT
[2331] <213> 人工序列
[2332] <220>
[2333] <223> TNFα氨基酸序列
[2334] <400> 70
[2335] Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
[2336] 1 5 10 15
[2337] Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
[2338] 20 25 30
[2339] Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
[2340] 35 40 45
[2341] Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
[2342] 50 55 60
[2343] Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
[2344] 65 70 75 80
[2345] Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro

[2346] 85 90 95
[2347] Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
[2348] 100 105 110
[2349] Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
[2350] 115 120 125
[2351] Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
[2352] 130 135 140
[2353] Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
[2354] 145 150 155 160
[2355] Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
[2356] 165 170 175
[2357] Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
[2358] 180 185 190
[2359] Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
[2360] 195 200 205
[2361] Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
[2362] 210 215 220
[2363] Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
[2364] 225 230
[2365] <210> 71
[2366] <211> 5288
[2367] <212> DNA
[2368] <213> 人工序列
[2369] <220>
[2370] <223> 对应于EnAd基因组的E2B区的DNA序列(bp 10355-5068)
[2371] <400> 71
[2372] ctatggcatc tcgatccagc agacctcctc gtttcgcggg tttggacggc tcctggaata 60
[2373] gggtatgaga cgatgggcgt ccagcgctgc cagggttcgg tccttccagg gtctcagtgt 120
[2374] tcgagtcagg gttgtttccg tcacagtgaa ggggtgtgcg cctgcttggg cgcttgccag 180
[2375] ggtgcgcttc agactcatcc tgctggtcga aaacttctgt cgcttggcgc cctgtatgtc 240
[2376] ggccaagtag cagtttacca tgagttcgta gttgagcgcc tcggctgcgt ggcctttggc 300
[2377] gcggagctta cctttggaag ttttcttgca taccgggcag tataggcatt tcagcgcata 360
[2378] caacttgggc gcaaggaaaa cggattctgg ggagtatgca tctgcgccgc aggaggcgca 420
[2379] aacagtttca cattccacca gccaggttaa atccggttca ttggggtcaa aaacaagttt 480
[2380] tccgccatat tttttgatgc gtttcttacc tttggtctcc atgagttcgt gtcctcgttg 540
[2381] agtgacaaac aggctgtccg tgtccccgta gactgatttt acaggcctct tctccagtgg 600
[2382] agtgcctcgg tcttcttcgt acaggaactc tgaccactct gatacaaagg cgcgcgtcca 660
[2383] ggccagcaca aaggaggcta tgtgggaggg gtagcgatcg ttgtcaacca gggggtccac 720
[2384] cttttccaaa gtatgcaaac acatgtcacc ctcttcaaca tccaggaatg tgattggctt 780
[2385] gtaggtgtat ttcacgtgac ctggggtccc cgctgggggg gtataaaagg gggcggttct 840
[2386] ttgctcttcc tcactgtctt ccggatcgct gtccaggaac gtcagctgtt ggggtaggta 900
[2387] ttccctctcg aaggcgggca tgacctctgc actcaggttg tcagtttcta agaacgagga 960

[2388] ggatttgata ttgacagtgc cggttgagat gcctttcatg aggttttcgt ccatctggtc 1020
[2389] agaaaacaca attttttttat tgtcaagttt ggtggcaaat gatccataca gggcgttgga 1080
[2390] taaaagtttg gcaatggatc gcatggtttg gttcttttcc ttgtccgcgc gctctttggc 1140
[2391] ggcgatgttg agttggacat actcgcgtgc caggcacttc cattcgggga agatagttgt 1200
[2392] taattcatct ggcacgattc tcacttgcca ccctcgatta tgcaaggtaa ttaaatccac 1260
[2393] actggtggcc acctcgcctc gaaggggttc attggtccaa cagagcctac ctcctttcct 1320
[2394] agaacagaaa gggggaagtg ggtctagcat aagttcatcg ggagggtctg catccatggt 1380
[2395] aaagattccc ggaagtaaat ccttatcaaa atagctgatg ggagtggggt catctaaggc 1440
[2396] catttgccat tctcgagctg ccagtgcgcg ctcatatggg ttaaggggac tgccccatgg 1500
[2397] catgggatgg gtgagtgcag aggcatacat gccacagatg tcatagacgt agatgggatc 1560
[2398] ctcaaagatg cctatgtagg ttggatagca tcgccccccct ctgatacttg ctcgcacata 1620
[2399] gtcatatagt tcatgtgatg gcgctagcag ccccggaccc aagttggtgc gattgggttt 1680
[2400] ttctgttctg tagacgatct ggcgaaagat ggcgtgagaa ttggaagaga tggtgggtct 1740
[2401] ttgaaaaatg ttgaaatggg catgaggtag acctacagag tctctgacaa agtgggcata 1800
[2402] agattcttga agcttggtta ccagttcggc ggtgacaagt acgtctaggg cgcagtagtc 1860
[2403] aagtgtttct tgaatgatgt cataacctgg ttggtttttc ttttcccaca gttcgcggtt 1920
[2404] gagaaggtat tcttcgcgat ccttccagta ctcttctagc ggaaacccgt ctttgtctgc 1980
[2405] acggtaagat cctagcatgt agaactgatt aactgccttg taagggcagc agcccttctc 2040
[2406] tacgggtaga gagtatgctt gagcagcttt tcgtagcgaa gcgtgagtaa gggcaaaggt 2100
[2407] gtctctgacc atgactttga ggaattggta tttgaagtcg atgtcgtcac aggctccctg 2160
[2408] ttcccagagt tggaagtcta cccgtttctt gtaggcgggg ttgggcaaag cgaaagtaac 2220
[2409] atcattgaag agaatcttgc cggccctggg catgaaattg cgagtgatgc gaaaaggctg 2280
[2410] tggtacttcc gctcggttat tgataacctg ggcagctagg acgatctcgt cgaaaccgtt 2340
[2411] gatgttgtgt cctacgatgt ataattctat gaaacgcggc gtgcctctga cgtgaggtag 2400
[2412] cttactgagc tcatcaaagg ttaggtctgt ggggtcagat aaggcgtagt gttcgagagc 2460
[2413] ccattcgtgc aggtgaggat tcgctttaag gaaggaggac cagaggtcca ctgccagtgc 2520
[2414] tgtttgtaac tggtcccggt actgacgaaa atgccgtccg actgccattt tttctggggt 2580
[2415] gacgcaatag aaggtttggg ggtcctgccg ccagcgatcc cacttgagtt ttatggcgag 2640
[2416] gtcataggcg atgttgacga gccgctggtc tccagagagt ttcatgacca gcatgaaggg 2700
[2417] gattagctgc ttgccaaagg accccatcca ggtgtaggtt tccacatcgt aggtgagaaa 2760
[2418] gagcctttct gtgcgaggat gagagccaat cgggaagaac tggatctcct gccaccagtt 2820
[2419] ggaggaatgg ctgttgatgt gatggaagta gaactccctg cgacgcgccg agcattcatg 2880
[2420] cttgtgcttg tacagacggc cgcagtagtc gcagcgttgc acgggttgta tctcgtgaat 2940
[2421] gagttgtacc tggcttccct tgacgagaaa tttcagtggg aagccgaggc ctggcgattg 3000
[2422] tatctcgtgc tttactatgt tgtctgcatc ggcctgttca tcttctgtct cgatggtggt 3060
[2423] catgctgacg agccctcgcg ggaggcaagt ccagacctcg gcgcggcagg ggcggagctc 3120
[2424] gaggacgaga gcgcgcaggc tggagctgtc cagggtcctg agacgctgcg gactcaggtt 3180
[2425] agtaggcagt gtcaggagat taacttgcat gatcttttgg agggcgtgcg ggaggttcag 3240
[2426] atagtacttg atctcaacgg gtccgttggt ggagatgtcg atggcttgca gggttccgtg 3300
[2427] tcccttgggc gctaccaccg tgcccttgtt tttcattttg gacggcggtg gctctgttgc 3360
[2428] ttcttgcatg tttagaagcg gtgtcgaggg cgcgcaccgg gcggcagggg cggctcggga 3420
[2429] cccggcggca tggctggcag tggtacgtcg gcgccgcgcg cgggtaggtt ctggtactgc 3480

[2430] gccctgagaa gactcgcatg cgcgacgacg cggcggttga catcctggat ctgacgcctc 3540
[2431] tgggtgaaag ctaccggccc cgtgagcttg aacctgaaag agagttcaac agaatcaatc 3600
[2432] tcggtatcgt tgacggcggc ttgcctaagg atttcttgca cgtcaccaga gttgtcctgg 3660
[2433] taggcgatct ccgccatgaa ctgctcgatc tcttcctctt gaagatctcc gcggcccgct 3720
[2434] ctctcgacgg tggccgcgag gtcgttggag atgcgcccaa tgagttgaga gaatgcattc 3780
[2435] atgcccgcct cgttccagac gcggctgtag accacggccc ccacgggatc tctcgcgcgc 3840
[2436] atgaccacct gggcgaggtt gagctccacg tggcgggtga agaccgcata gttgcatagg 3900
[2437] cgctggaaaa ggtagttgag tgtggtggcg atgtgctcgg tgacgaagaa atacatgatc 3960
[2438] catcgtctca gcggcatctc gctgacatcg cccagagctt ccaagcgctc catggcctcg 4020
[2439] tagaagtcca cggcaaaatt aaaaaactgg gagtttcgcg cggacacggt caactcctct 4080
[2440] tccagaagac ggataagttc ggcgatggtg gtgcgcacct cgcgctcgaa agcccctggg 4140
[2441] atttcttcct caatctcttc ttcttccact aacatctctt cctcttcagg tggggctgca 4200
[2442] ggaggagggg gaacgcggcg acgccggcgg cgcacgggca gacggtcgat gaatctttca 4260
[2443] atgacctctc cgcggcggcg gcgcatggtt tcagtgacgg cgcggccgtt ctcgcgcggt 4320
[2444] cgcagagtaa aaacaccgcc gcgcatctcc ttaaagtggt gactgggagg ttctccgttt 4380
[2445] gggagggaga gggcgctgat tatacatttt attaattggc ccgtagggac tgcacgcaga 4440
[2446] gatctgatcg tgtcaagatc cacgggatct gaaaaccttt cgacgaaagc gtctaaccag 4500
[2447] tcacagtcac aaggtaggct gagtacggct tcttgtgggc gggggtggtt atgtgttcgg 4560
[2448] tctgggtctt ctgtttcttc ttcatctcgg gaaggtgaga cgatgctgct ggtgatgaaa 4620
[2449] ttaaagtagg cagttctaag acggcggatg gtggcgagga gcaccaggtc tttgggtccg 4680
[2450] gcttgctgga tacgcaggcg attggccatt ccccaagcat tatcctgaca tctagcaaga 4740
[2451] tctttgtagt agtcttgcat gagccgttct acgggcactt cttcctcacc cgttctgcca 4800
[2452] tgcatacgtg tgagtccaaa tccgcgcatt ggttgtacca gtgccaagtc agctacgact 4860
[2453] ctttcggcga ggatggcttg ctgtacttgg gtaagggtgg cttgaaagtc atcaaaatcc 4920
[2454] acaaagcggt ggtaagctcc tgtattaatg gtgtaagcac agttggccat gactgaccag 4980
[2455] ttaactgtct ggtgaccagg gcgcacgagc tcggtgtatt taaggcgcga taggcgcgg 5040
[2456] gtgtcaaaga tgtaatcgtt gcaggtgcgc accagatact ggtaccctat aagaaaatgc 5100
[2457] ggcggtggtt ggcggtagag aggccatcgt tctgtagctg gagcgccagg ggcgaggtct 5160
[2458] tccaacataa ggcggtgata gccgtagatg tacctggaca tccaggtgat tcctgcggcg 5220
[2459] gtagtagaag cccgaggaaa ctcgcgtacg cggttccaaa tgttgcgtag cggcatgaag 5280
[2460] tagttcat 5288
[2461] <210> 72
[2462] <211> 1548
[2463] <212> DNA
[2464] <213> 人工序列
[2465] <220>
[2466] <223> 抗EpCAM双特异性T细胞衔接器DNA编码序列,具有N末端信号序列和C末端deca-His亲和标签
[2467] <400> 72
[2468] atgggatgga gctgcatcat cctattcctc gtggcgacgg ccactggagt gcatagcgaa 60
[2469] ctggtgatga ctcagtcccc gtcatccctg acggtgaccg ccggcgagaa ggtcaccatg 120
[2470] tcgtgcaagt cctcgcaaag cctgcttaac agcggcaacc agaaaaacta cctcacgtgg 180

[2471] tatcagcaaa agccaggtca acccccaaaa ctgctcatct actgggcgag cacccgcgag 240
[2472] tcgggggtgc cagaccggtt caccggctcc gggtcaggaa ctgatttcac cctaaccatc 300
[2473] agctcggtgc aagcggagga cctggccgtg tactactgcc aaaatgatta ctcgtaccct 360
[2474] ctgacctttg gagcgggcac caagctcgaa atcaagggcg gtggaggaag cggcgggga 420
[2475] ggctcaggtg ggggaggatc agaagtccaa ctgctggagc agtcaggagc cgaactggtc 480
[2476] cgcccgggaa cctccgtcaa gatttcctgt aaggcttccg gctacgcttt taccaattac 540
[2477] tggctgggct gggtcaagca aagaccgggg catggcctgg agtggatcgg cgacatcttc 600
[2478] ccagggagcg gcaacatcca ctacaacgag aagttcaagg ggaaagcgac tctgactgcc 660
[2479] gacaaatcat ccagcaccgc ctacatgcag ctgtcgtcgc tcactttcga agacagcgcg 720
[2480] gtgtactttt gtgctcggct ccggaactgg gatgaaccaa tggactactg gggacaagga 780
[2481] actaccgtga ccgtctcctc cggcggcggt ggaagcgatg tgcaactcgt gcagtccggt 840
[2482] gcggaagtga aaaagccggg cgcgagcgtc aaagtgtcat gcaaggcgtc aggatatacg 900
[2483] tttactagat acactatgca ctgggtgcgc caggcacctg gtcagggcct tgaatggatc 960
[2484] ggctacatca atccgtcgag aggctacact aattacgcgg actcagtcaa agggcgcttc 1020
[2485] acgattacga ccgacaagtc cacctcgact gcatacatgg aactgtcctc gctgagaagc 1080
[2486] gaggacaccg ctacttacta ctgcgctaga tactacgatg atcactactg cctcgattac 1140
[2487] tggggccagg gaaccactgt cacggtgtca tcgggagagg gcacctcaac cggatcaggg 1200
[2488] ggatcgggag gctcgggcgg cgcagacgac atcgtcctga cccagtcgcc cgccaccttg 1260
[2489] tcgctgtccc caggagaaag agcgaccctg tcatgccggg cgtcgcaaag cgtgagctat 1320
[2490] atgaattggt atcagcagaa gccaggaaag gcgccgaaga gatggatcta cgacacctcc 1380
[2491] aaggtcgctt caggtgtccc ggctagattc tcaggatcgg gatcaggaac ggactactcc 1440
[2492] ctgaccatca attcactgga agcagaagat gcggccacct actactgtca gcagtggtcc 1500
[2493] tccaacccgc tgactttcgg aggcggaact aaggtcgaga tcaagtag 1548
[2494] <210> 73
[2495] <211> 515
[2496] <212> PRT
[2497] <213> 人工序列
[2498] <220>
[2499] <223> 抗EpCAM 双特异性T细胞衔接器蛋白质序列,具有N末端信号序列,不具有C末端deca-His亲和标签
[2500] <400> 73
[2501] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
[2502] 1 5 10 15
[2503] Val His Ser Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
[2504] 20 25 30
[2505] Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
[2506] 35 40 45
[2507] Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
[2508] 50 55 60
[2509] Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
[2510] 65 70 75 80
[2511] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

[2512] 85 90 95
[2513] Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
[2514] 100 105 110
[2515] Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
[2516] 115 120 125
[2517] Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[2518] 130 135 140
[2519] Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val
[2520] 145 150 155 160
[2521] Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala
[2522] 165 170 175
[2523] Phe Thr Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly
[2524] 180 185 190
[2525] Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr
[2526] 195 200 205
[2527] Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
[2528] 210 215 220
[2529] Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala
[2530] 225 230 235 240
[2531] Val Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp Tyr
[2532] 245 250 255
[2533] Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[2534] 260 265 270
[2535] Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[2536] 275 280 285
[2537] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
[2538] 290 295 300
[2539] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[2540] 305 310 315 320
[2541] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
[2542] 325 330 335
[2543] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[2544] 340 345 350
[2545] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
[2546] 355 360 365
[2547] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[2548] 370 375 380
[2549] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser Gly
[2550] 385 390 395 400
[2551] Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser
[2552] 405 410 415
[2553] Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

[2554] 420 425 430

[2555] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

[2556] 435 440 445

[2557] Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser

[2558] 450 455 460

[2559] Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser

[2560] 465 470 475 480

[2561] Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

[2562] 485 490 495

[2563] Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val

[2564] 500 505 510

[2565] Glu Ile Lys

[2566] 515

[2567] <210> 74

[2568] <211> 1560

[2569] <212> DNA

[2570] <213> 人工序列

[2571] <220>

[2572] <223> 抗FAP双特异性T细胞衔接器DNA编码序列,具有N末端信号序列,不具有C末端deca-His亲和标签

[2573] <400> 74

[2574] atgggctgga gctgcatcat cttgttcctg gtcgcaactg ctaccggagt ccattcggac 60

[2575] atcgtcatga cccaaagccc tgactcgctc gctgtgtcac tgggagagcg ggcgactatc 120

[2576] aactgcaaat catcccagag cctgctgtat tcacgcaatc agaaaaacta cctggcctgg 180

[2577] tatcagcaga agccgggcca gcctcccaag ctgctgatct tctgggcctc cacccgcgaa 240

[2578] agcggcgtgc cggaccgctt cagcggaagc ggattcggaa ctgactttac tctgaccatt 300

[2579] agctccttgc aggcggagga cgtggccgtc tactactgcc agcagtattt ctcctatccg 360

[2580] ctcacctttg ggcaaggcac caaggtggag attaagggag ggggcggcag cgggggaggc 420

[2581] ggcagcggcg gcgggggatc gcaggtccag ctcgtccaat ccggagccga agtcaagaag 480

[2582] ccgggagcgt cggtcaaggt cagctgcaaa acttcgcgct acaccttcac tgagtacacg 540

[2583] atccactggg tccgccaggc gcccggccag cggctggagt ggatcggcgg gatcaaccca 600

[2584] aacaacggaa tcccaaatta caatcagaaa tttaaagggc gggtgactat caccgtggat 660

[2585] acctcggcct ccacggcgta catggagctc tcatcactca gatcggagga caccgcggtc 720

[2586] tattactgcg cccgccgccg gatcgcttat ggatacgatg aaggacatgc gatggattac 780

[2587] tggggccagg gcaccctcgt cacggtgtcg tcaggaggcg gcggttcaga tgtgcaactc 840

[2588] gtgcagtccg gtgcggaagt gaaaaagccg ggcgcgagcg tcaaagtgtc atgcaaggcg 900

[2589] tcaggatata cgtttactag atacactatg cactgggtgc gccaggcacc tggtcagggc 960

[2590] cttgaatgga tcggctacat caatccgtcg agaggctaca ctaattacgc ggactcagtc 1020

[2591] aaagggcgct tcacgattac gaccgacaag tccacctcga ctgcatacat ggaactgtcc 1080

[2592] tcgctgagaa gcgaggacac cgctacttac tactgcgcta gatactacga tgatcactac 1140

[2593] tgcctcgatt actggggcca gggaaccact gtcacggtgt catcgggaga gggcacctca 1200

[2594] accggatcag ggggatcggg aggctcgggc ggcgcagacg acatcgtcct gacccagtcg 1260

[2595] cccgccacct tgtcgctgtc cccaggagaa agagcgaccc tgtcatgccg ggcgtcgcaa 1320
[2596] agcgtgagct atatgaattg gtatcagcag aagccaggaa aggcgccgaa gagatggatc 1380
[2597] tacgacacct ccaaggtcgc ttcaggtgtc ccggctagat tctcaggatc gggatcagga 1440
[2598] acggactact ccctgaccat caattcactg gaagcagaag atgcggccac ctactactgt 1500
[2599] cagcagtggt cctccaaccc gctgactttc ggaggcggaa ctaaggtcga gatcaagtag 1560
[2600] <210> 75
[2601] <211> 519
[2602] <212> PRT
[2603] <213> 人工序列
[2604] <220>
[2605] <223> 抗FAP双特异性T细胞衔接器氨基酸序列,具有N末端信号序列,不具有C末端deca-His亲和标签
[2606] <400> 75
[2607] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
[2608] 1 5 10 15
[2609] Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val
[2610] 20 25 30
[2611] Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
[2612] 35 40 45
[2613] Leu Tyr Ser Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
[2614] 50 55 60
[2615] Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu
[2616] 65 70 75 80
[2617] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe
[2618] 85 90 95
[2619] Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr
[2620] 100 105 110
[2621] Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
[2622] 115 120 125
[2623] Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[2624] 130 135 140
[2625] Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
[2626] 145 150 155 160
[2627] Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe
[2628] 165 170 175
[2629] Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
[2630] 180 185 190
[2631] Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn
[2632] 195 200 205
[2633] Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser
[2634] 210 215 220
[2635] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

[2636] 225 230 235 240
[2637] Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His
[2638] 245 250 255
[2639] Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
[2640] 260 265 270
[2641] Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
[2642] 275 280 285
[2643] Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
[2644] 290 295 300
[2645] Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
[2646] 305 310 315 320
[2647] Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
[2648] 325 330 335
[2649] Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr
[2650] 340 345 350
[2651] Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
[2652] 355 360 365
[2653] Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
[2654] 370 375 380
[2655] Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser
[2656] 385 390 395 400
[2657] Thr Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val
[2658] 405 410 415
[2659] Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
[2660] 420 425 430
[2661] Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
[2662] 435 440 445
[2663] Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
[2664] 450 455 460
[2665] Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
[2666] 465 470 475 480
[2667] Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala
[2668] 485 490 495
[2669] Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly
[2670] 500 505 510
[2671] Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[2672] 515
[2673] <210> 76
[2674] <211> 1599
[2675] <212> DNA
[2676] <213> 人工序列
[2677] <220>

[2678] <223> 对照(抗FHA)双特异性T细胞衔接器 DNA编码序列,具有N末端信号序列,不具有C末端deca-His亲和标签

[2679] <400> 76

[2680] atgggttggt catgcatcat cctgtttctc gtcgcaactg cgaccggcgt gcattcggaa 60

[2681] ctggacatcg tgatgaccca ggcacctgca tcactggcag tgagcctggg acagagagcc 120

[2682] accatttcat gccgggccag caagagcgtg tcgtcatccg gatacaatta tctgcactgg 180

[2683] tatcagcaga aaccaggaca acctccaaag ctactcatct acctggcgtc gaacctcgaa 240

[2684] tcgggcgtcc cagctagatt ctcagggagc ggttcgggaa ccgatttcac cctgaacatc 300

[2685] caccctgtgg aggaggaaga cgcggcaacg tactattgcc agcattcccg cgagttccct 360

[2686] ctcactttcg gtgcgggaac taagctggag atcaagtcca gcggcggcgg aggtagcggt 420

[2687] ggaggtggcg gaggaagctc ccggtcgtcg ctggaggtgc agctgcaaca atccggcccg 480

[2688] gaactggtca agccaggcgc atccgtcaag atttcatgca agacctcggg gtacaccttc 540

[2689] accgggtaca cgatgcattg ggtcaggcag agccacggca agtccctgga atggatcgga 600

[2690] ggaatcaacc ccaaaaacgg cggcatcatc tacaaccaaa agttccaggg aaaagccact 660

[2691] ctgaccgtgg acaagtcgtc gagcacggcc agcatggagc tgcggtccct cacttccgac 720

[2692] gactcagccg tgtattactg cgcgagacgg gtctacgatg actacccata ctactacgct 780

[2693] atggactact ggggacaagg aaccagcgtg accgtctcat cggcgaaaac tactccgccg 840

[2694] tcggtgacgt cgggaggtgg tggaagcgac gtgcagctcg tccagtcggg tgccgaggtg 900

[2695] aagaagccag gagcctccgt gaaggtctcg tgcaaagcca gcggctacac ttttactagg 960

[2696] tacactatgc actgggtgcg gcaagcgccg ggacaaggtc tggagtggat cggatacatc 1020

[2697] aatccgtcgc ggggatacac taattacgcg gactccgtca agggacggtt tactatcact 1080

[2698] acggataagt ccactagcac cgcctacatg gaactgtcct cgctgcggtc ggaagacact 1140

[2699] gcgacctact actgcgctag atattacgat gaccactact gcctcgacta ttgggggcag 1200

[2700] ggcactacgg tcaccgtctc gtcgggagaa ggaacctcaa ctggatcggg cggatcggga 1260

[2701] ggctccggag gagccgacga catcgtgctt acccagtcgc ctgcgaccct gtccctgtcc 1320

[2702] ccaggagaga gagcgactct ttcatgcagg gcttcccaat cagtctccta catgaattgg 1380

[2703] tatcaacaaa aacccggcaa ggccccgaaa cgctggatct acgatacttc aaaggtggcc 1440

[2704] agcggtgtgc ctgcccgctt ctccgggtcg gggtccggca ccgattactc gttgactatc 1500

[2705] aatagcctgg aggccgagga cgctgcaact tactactgcc agcagtggtc ctccaaccct 1560

[2706] ctcaccttcg gaggcgggac caaggtggaa atcaaatag 1599

[2707] <210> 77

[2708] <211> 532

[2709] <212> PRT

[2710] <213> 人工序列

[2711] <220>

[2712] <223> 对照(抗FHA)双特异性T细胞衔接器氨基酸序列,具有N末端信号序列,不具有C-末端deca-His标签

[2713] <400> 77

[2714] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

[2715] 1 5 10 15

[2716] Val His Ser Glu Leu Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Pro Ala Ser Leu

[2717] 20 25 30

[2718] Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys
[2719] 35 40 45
[2720] Ser Val Ser Ser Ser Gly Tyr Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys
[2721] 50 55 60
[2722] Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu
[2723] 65 70 75 80
[2724] Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[2725] 85 90 95
[2726] Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
[2727] 100 105 110
[2728] Cys Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
[2729] 115 120 125
[2730] Leu Glu Ile Lys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
[2731] 130 135 140
[2732] Gly Ser Ser Arg Ser Ser Leu Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro
[2733] 145 150 155 160
[2734] Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser
[2735] 165 170 175
[2736] Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser His
[2737] 180 185 190
[2738] Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Lys Asn Gly Gly
[2739] 195 200 205
[2740] Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp
[2741] 210 215 220
[2742] Lys Ser Ser Ser Thr Ala Ser Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp
[2743] 225 230 235 240
[2744] Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Val Tyr Asp Asp Tyr Pro
[2745] 245 250 255
[2746] Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
[2747] 260 265 270
[2748] Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Ser Gly Gly Gly Gly
[2749] 275 280 285
[2750] Ser Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
[2751] 290 295 300
[2752] Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg
[2753] 305 310 315 320
[2754] Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
[2755] 325 330 335
[2756] Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser
[2757] 340 345 350
[2758] Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala
[2759] 355 360 365

[2760] Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
[2761] 370 375 380
[2762] Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
[2763] 385 390 395 400
[2764] Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser
[2765] 405 410 415
[2766] Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln
[2767] 420 425 430
[2768] Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
[2769] 435 440 445
[2770] Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
[2771] 450 455 460
[2772] Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala
[2773] 465 470 475 480
[2774] Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
[2775] 485 490 495
[2776] Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
[2777] 500 505 510
[2778] Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
[2779] 515 520 525
[2780] Val Glu Ile Lys
[2781] 530
[2782] <210> 78
[2783] <211> 532
[2784] <212> PRT
[2785] <213> 人工序列
[2786] <220>
[2787] <223> 对照双特异性T细胞衔接器(抗FHA),不具有C末端deca-His标签
[2788] <400> 78
[2789] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
[2790] 1 5 10 15
[2791] Val His Ser Glu Leu Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Pro Ala Ser Leu
[2792] 20 25 30
[2793] Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys
[2794] 35 40 45
[2795] Ser Val Ser Ser Ser Gly Tyr Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys
[2796] 50 55 60
[2797] Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu
[2798] 65 70 75 80
[2799] Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[2800] 85 90 95
[2801] Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr

[2802] 100 105 110
[2803] Cys Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
[2804] 115 120 125
[2805] Leu Glu Ile Lys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
[2806] 130 135 140
[2807] Gly Ser Ser Arg Ser Ser Leu Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro
[2808] 145 150 155 160
[2809] Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser
[2810] 165 170 175
[2811] Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser His
[2812] 180 185 190
[2813] Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Lys Asn Gly Gly
[2814] 195 200 205
[2815] Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp
[2816] 210 215 220
[2817] Lys Ser Ser Ser Thr Ala Ser Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp
[2818] 225 230 235 240
[2819] Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Val Tyr Asp Asp Tyr Pro
[2820] 245 250 255
[2821] Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
[2822] 260 265 270
[2823] Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Ser Gly Gly Gly Gly
[2824] 275 280 285
[2825] Ser Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
[2826] 290 295 300
[2827] Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg
[2828] 305 310 315 320
[2829] Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
[2830] 325 330 335
[2831] Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser
[2832] 340 345 350
[2833] Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala
[2834] 355 360 365
[2835] Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
[2836] 370 375 380
[2837] Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
[2838] 385 390 395 400
[2839] Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser
[2840] 405 410 415
[2841] Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln
[2842] 420 425 430
[2843] Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser

[2844] 435 440 445

[2845] Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys

[2846] 450 455 460

[2847] Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala

[2848] 465 470 475 480

[2849] Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr

[2850] 485 490 495

[2851] Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr

[2852] 500 505 510

[2853] Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

[2854] 515 520 525

[2855] Val Glu Ile Lys

[2856] 530

[2857] <210> 79

[2858] <400> 79

[2859] 000

[2860] <210> 80

[2861] <400> 80

[2862] 000

[2863] <210> 81

[2864] <400> 81

[2865] 000

[2866] <210> 82

[2867] <400> 82

[2868] 000

[2869] <210> 83

[2870] <211> 1539

[2871] <212> DNA

[2872] <213> 人工序列

[2873] <220>

[2874] <223> EpCam 双特异性T细胞衔接器核酸序列(OKT3)

[2875] <400> 83

[2876] atgggatgga gctgcatcat cctattcctc gtggcgacgg ccactggagt gcatagcgaa 60

[2877] ctggtgatga ctcagtcccc gtcatccctg acggtgaccg ccggcgagaa ggtcaccatg 120

[2878] tcgtgcaagt cctcgcaaag cctgcttaac agcggcaacc agaaaaacta cctcacgtgg 180

[2879] tatcagcaaa agccaggtca acccccaaaa ctgctcatct actgggcgag cacccgcgag 240

[2880] tcgggggtgc cagaccggtt caccggctcc gggtcaggaa ctgatttcac cctaaccatc 300

[2881] agctcggtgc aagcggagga cctggccgtg tactactgcc aaaatgatta ctcgtaccct 360

[2882] ctgacctttg gagcgggcac caagctcgaa atcaagggcg gtggaggaag cggcgggga 420

[2883] ggctcaggtg ggggaggatc agaagtccaa ctgctggagc agtcaggagc cgaactggtc 480

[2884] cgcccgggaa cctccgtcaa gatttcctgt aaggcttccg gctacgcttt taccaattac 540

[2885] tggctgggct gggtcaagca aagaccgggg catggcctgg agtggatcgg cgacatcttc 600

[2886] ccagggagcg gcaacatcca ctacaacgag aagttcaagg ggaaagcgac tctgactgcc 660
[2887] gacaaatcat ccagcaccgc ctacatgcag ctgtcgtcgc tcactttcga agacagcgcg 720
[2888] gtgtactttt gtgctcggct ccggaactgg gatgaaccaa tggactactg gggacaagga 780
[2889] actaccgtga ccgtctcctc cggcggcggt ggaagccagg tgcagctgca gcagtctggg 840
[2890] gctgaactgg caagacctgg ggcctcagtg aagatgtcct gcaaggcttc tggctacacc 900
[2891] tttactaggt acacgatgca ctgggtaaaa cagaggcctg gacagggtct ggaatggatt 960
[2892] ggatacatta atcctagccg tggttatact aattacaatc agaagttcaa ggacaaggcc 1020
[2893] acattgacta cagacaaatc ctccagcaca gcctacatgc aactgagcag cctgacatct 1080
[2894] gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga tattatgatg atcattactg ccttgactac 1140
[2895] tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcaggtggcg gtggctcggg cggtggtgga 1200
[2896] tctggtggcg gcggatctga tatcgtgctc actcagtctc cagcaatcat gtctgcatct 1260
[2897] ccaggggaga aggtcaccat gacctgcagt gccagctcaa gtgtaagtta catgaactgg 1320
[2898] taccagcaga agtcaggcac ctcccccaaa agatggattt atgacacatc caaactggct 1380
[2899] tctggagtcc ctgctcactt caggggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 1440
[2900] agcggcatgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag tagtaaccca 1500
[2901] ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaccgg 1539
[2902] <210> 84
[2903] <400> 84
[2904] 000
[2905] <210> 85
[2906] <211> 1551
[2907] <212> DNA
[2908] <213> 人工序列
[2909] <220>
[2910] <223> FAP 双特异性T细胞衔接器核酸序列(OKT3)
[2911] <400> 85
[2912] atgggctgga gctgcatcat cttgttcctg gtcgcaactg ctaccggagt ccattcggac 60
[2913] atcgtcatga cccaaagccc tgactcgctc gctgtgtcac tgggagagcg ggcgactatc 120
[2914] aactgcaaat catcccagag cctgctgtat tcacgcaatc agaaaaacta cctggcctgg 180
[2915] tatcagcaga agccgggcca gcctcccaag ctgctgatct tctgggcctc cacccgcgaa 240
[2916] agcggcgtgc cggaccgctt cagcggaagc ggattcggaa ctgactttac tctgaccatt 300
[2917] agctccttgc aggcggagga cgtggccgtc tactactgcc agcagtattt ctcctatccg 360
[2918] ctcacctttg ggcaaggcac caaggtggag attaagggag ggggcggcag cgggggaggc 420
[2919] ggcagcggcg gcgggggatc gcaggtccag ctcgtccaat ccggagccga agtcaagaag 480
[2920] ccgggagcgt cggtcaaggt cagctgcaaa acttcgcgct acaccttcac tgagtacacg 540
[2921] atccactggg tccgccaggc gcccggccag cggctggagt ggatcggcgg gatcaaccca 600
[2922] aacaacggaa tcccaaatta caatcagaaa tttaaagggc gggtgactat caccgtggat 660
[2923] acctcggcct ccacggcgta catggagctc tcatcactca gatcggagga caccgcggtc 720
[2924] tattactgcg cccgccgccg gatcgcttat ggatacgatg aaggacatgc gatggattac 780
[2925] tggggccagg gcaccctcgt cacggtgtcg tcaggaggcg gcggttcaca ggtgcagctg 840
[2926] cagcagtctg gggctgaact ggcaagacct ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct 900
[2927] tctggctaca cctttactag gtacacgatg cactgggtaa aacagaggcc tggacagggt 960

[2928] ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtggttata ctaattacaa tcagaagttc 1020
[2929] aaggacaagg ccacattgac tacagacaaa tcctccagca cagcctacat gcaactgagc 1080
[2930] agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat tactgtgcaa gatattatga tgatcattac 1140
[2931] tgccttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcaggtgg cggtggctcg 1200
[2932] ggcggtggtg gatctggtgg cggcggatct gatatcgtgc tcactcagtc tccagcaatc 1260
[2933] atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt 1320
[2934] tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc acctccccca aaagatggat ttatgacaca 1380
[2935] tccaaactgg cttctggagt ccctgctcac ttcaggggca gtgggtctgg gacctcttac 1440
[2936] tctctcacaa tcagcggcat ggaggctgaa gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg 1500
[2937] agtagtaacc cattcacgtt cggctcgggg acaaagttgg aaataaaccg g 1551
[2938] <210> 86
[2939] <400> 86
[2940] 000
[2941] <210> 87
[2942] <211> 1557
[2943] <212> DNA
[2944] <213> 人工序列
[2945] <220>
[2946] <223> FAP 双特异性T细胞衔接器核酸序列(aCD3)
[2947] <400> 87
[2948] atgggctgga gctgcatcat cttgttcctg gtcgcaactg ctaccggagt ccattcggac 60
[2949] atcgtcatga cccaaagccc tgactcgctc gctgtgtcac tgggagagcg ggcgactatc 120
[2950] aactgcaaat catcccagag cctgctgtat tcacgcaatc agaaaaacta cctggcctgg 180
[2951] tatcagcaga agccgggcca gcctcccaag ctgctgatct tctgggcctc cacccgcgaa 240
[2952] agcggcgtgc cggaccgctt cagcggaagc ggattcggaa ctgactttac tctgaccatt 300
[2953] agctccttgc aggcggagga cgtggccgtc tactactgcc agcagtattt ctcctatccg 360
[2954] ctcacctttg ggcaaggcac caaggtggag attaagggag ggggcggcag cgggggaggc 420
[2955] ggcagcggcg gcgggggatc gcaggtccag ctcgtccaat ccggagccga agtcaagaag 480
[2956] ccgggagcgt cggtcaaggt cagctgcaaa acttcgcgct acaccttcac tgagtacacg 540
[2957] atccactggg tccgccaggc gcccggccag cggctggagt ggatcggcgg gatcaaccca 600
[2958] aacaacggaa tcccaaatta caatcagaaa tttaaagggc gggtgactat caccgtggat 660
[2959] acctcggcct ccacggcgta catggagctc tcatcactca gatcggagga caccgcggtc 720
[2960] tattactgcg cccgccgccg gatcgcttat ggatacgatg aaggacatgc gatggattac 780
[2961] tggggccagg gcaccctcgt cacggtgtcg tcaggaggcg gcggttcaga tgtgcaactc 840
[2962] gtgcagtccg gtgcggaagt gaaaaagccg ggcgcgagcg tcaaagtgtc atgcaaggcg 900
[2963] tcaggatata cgtttactag atacactatg cactgggtgc gccaggcacc tggtcagggc 960
[2964] cttgaatgga tcggctacat caatccgtcg agaggctaca ctaattacgc ggactcagtc 1020
[2965] aaagggcgct tcacgattac gaccgacaag tccacctcga ctgcatacat ggaactgtcc 1080
[2966] tcgctgagaa gcgaggacac cgctacttac tactgcgcta gatactacga tgatcactac 1140
[2967] tgcctcgatt actggggcca gggaaccact gtcacggtgt catcgggaga gggcacctca 1200
[2968] accggatcag ggggatcggg aggctcgggc ggcgcagacg acatcgtcct gacccagtcg 1260
[2969] cccgccacct tgtcgctgtc cccaggagaa agagcgaccc tgtcatgccg ggcgtcgcaa 1320

[2970] agcgtgagct atatgaattg gtatcagcag aagccaggaa aggcgccgaa gagatggatc 1380
[2971] tacgacacct ccaaggtcgc ttcaggtgtc ccggctagat tctcaggatc gggatcagga 1440
[2972] acggactact ccctgaccat caattcactg gaagcagaag atgcggccac ctactactgt 1500
[2973] cagcagtggt cctccaaccc gctgactttc ggaggcggaa ctaaggtcga gatcaag 1557
[2974] <210> 88
[2975] <211> 1856
[2976] <212> DNA
[2977] <213> 人工序列
[2978] <220>
[2979] <223> NG-611转基因盒
[2980] <400> 88
[2981] caggcccacc atgggatgga gctgcatcat cctattcctc gtggcgacgg ccactggagt 60
[2982] gcatagcgaa ctggtgatga ctcagtcccc gtcatccctg acggtgaccg ccggcgagaa 120
[2983] ggtcaccatg tcgtgcaagt cctcgcaaag cctgcttaac agcggcaacc agaaaaacta 180
[2984] cctcacgtgg tatcagcaaa agccaggtca acccccaaaa ctgctcatct actgggcgag 240
[2985] cacccgcgag tcgggggtgc cagaccggtt caccggctcc gggtcaggaa ctgatttcac 300
[2986] cctaaccatc agctcggtgc aagcggagga cctggccgtg tactactgcc aaaatgatta 360
[2987] ctcgtaccct ctgacctttg gagcgggcac caagctcgaa atcaagggcg gtggaggaag 420
[2988] cggcggggga ggctcaggtg ggggaggatc agaagtccaa ctgctggagc agtcaggagc 480
[2989] cgaactggtc cgcccgggaa cctccgtcaa gatttcctgt aaggcttccg gctacgcttt 540
[2990] taccaattac tggctgggct gggtcaagca aagaccgggg catggcctgg agtggatcgg 600
[2991] cgacatcttc ccagggagcg gcaacatcca ctacaacgag aagttcaagg ggaaagcgac 660
[2992] tctgactgcc gacaaatcat ccagcaccgc ctacatgcag ctgtcgtcgc tcactttcga 720
[2993] agacagcgcg gtgtactttt gtgctcggct ccggaactgg gatgaaccaa tggactactg 780
[2994] gggacaagga actaccgtga ccgtctcctc cggcggcggt ggaagccagg tgcagctgca 840
[2995] gcagtctggg gctgaactgg caagacctgg ggcctcagtg aagatgtcct gcaaggcttc 900
[2996] tggctacacc tttactaggt acacgatgca ctgggtaaaa cagaggcctg gacagggtct 960
[2997] ggaatggatt ggatacatta atcctagccg tggttatact aattacaatc agaagttcaa 1020
[2998] ggacaaggcc acattgacta cagacaaatc ctccagcaca gcctacatgc aactgagcag 1080
[2999] cctgacatct gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga tattatgatg atcattactg 1140
[3000] ccttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcaggtggcg gtggctcggg 1200
[3001] cggtggtgga tctggtggcg gcggatctga tatcgtgctc actcagtctc cagcaatcat 1260
[3002] gtctgcatct ccaggggaga aggtcaccat gacctgcagt gccagctcaa gtgtaagtta 1320
[3003] catgaactgg taccagcaga agtcaggcac ctcccccaaa agatggattt atgacacatc 1380
[3004] caaactggct tctggagtcc ctgctcactt caggggcagt gggtctggga cctcttactc 1440
[3005] tctcacaatc agcggcatgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag 1500
[3006] tagtaaccca ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaccggc atcaccatca 1560
[3007] ccatcaccac catcaccatt aggctagctt gactgactga gatacagcgt accttcagct 1620
[3008] cacagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa 1680
[3009] aaaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg 1740
[3010] caataaacaa gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggaggt 1800
[3011] gtgggaggtt ttttaaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtagtcgtc agctat 1856

[3012] <210> 89

[3013] <211> 1868

[3014] <212> DNA

[3015] <213> 人工序列

[3016] <220>

[3017] <223> NG-612转基因盒

[3018] <400> 89

[3019] caggcccacc atgggctgga gctgcatcat cttgttcctg gtcgcaactg ctaccggagt 60

[3020] ccattcggac atcgtcatga cccaaagccc tgactcgctc gctgtgtcac tgggagagcg 120

[3021] ggcgactatc aactgcaaat catcccagag cctgctgtat tcacgcaatc agaaaaacta 180

[3022] cctggcctgg tatcagcaga agccgggcca gcctcccaag ctgctgatct tctgggcctc 240

[3023] cacccgcgaa agcggcgtgc cggaccgctt cagcggaagc ggattcggaa ctgactttac 300

[3024] tctgaccatt agctccttgc aggcggagga cgtggccgtc tactactgcc agcagtattt 360

[3025] ctcctatccg ctcacctttg ggcaaggcac caaggtggag attaagggag ggggcggcag 420

[3026] cgggggaggc ggcagcggcg gcgggggatc gcaggtccag ctcgtccaat ccggagccga 480

[3027] agtcaagaag ccgggagcgt cggtcaaggt cagctgcaaa acttcgcgct acaccttcac 540

[3028] tgagtacacg atccactggg tccgccaggc gcccggccag cggctggagt ggatcggcgg 600

[3029] gatcaaccca aacaacggaa tcccaaatta caatcagaaa tttaaagggc gggtgactat 660

[3030] caccgtggat acctcggcct ccacggcgta catggagctc tcatcactca gatcggagga 720

[3031] caccgcggtc tattactgcg cccgccgccg gatcgcttat ggatacgatg aaggacatgc 780

[3032] gatggattac tggggccagg gcaccctcgt cacggtgtcg tcaggaggcg gcggttcaca 840

[3033] ggtgcagctg cagcagtctg gggctgaact ggcaagacct ggggcctcag tgaagatgtc 900

[3034] ctgcaaggct tctggctaca cctttactag gtacacgatg cactgggtaa aacagaggcc 960

[3035] tggacagggt ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtggttata ctaattacaa 1020

[3036] tcagaagttc aaggacaagg ccacattgac tacagacaaa tcctccagca cagcctacat 1080

[3037] gcaactgagc agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat tactgtgcaa gatattatga 1140

[3038] tgatcattac tgccttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcaggtgg 1200

[3039] cggtggctcg ggcggtggtg gatctggtgg cggcggatct gatatcgtgc tcactcagtc 1260

[3040] tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc atgacctgca gtgccagctc 1320

[3041] aagtgtaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc acctccccca aaagatggat 1380

[3042] ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcac ttcaggggca gtgggtctgg 1440

[3043] gacctcttac tctctcacaa tcagcggcat ggaggctgaa gatgctgcca cttattactg 1500

[3044] ccagcagtgg agtagtaacc cattcacgtt cggctcgggg acaaagttgg aaataaaccg 1560

[3045] gcatcaccat caccatcacc accatcacca ttaggctagc ttgactgact gagatacagc 1620

[3046] gtaccttcag ctcacagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag 1680

[3047] aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac 1740

[3048] cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt 1800

[3049] tcaggggggag gtgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat gtggtagtcg 1860

[3050] tcagctat 1868

[3051] <210> 90

[3052] <211> 1878

[3053] <212> DNA

[3054] <213> 人工序列

[3055] <220>

[3056] <223> NG-613转基因盒

[3057] <400> 90

[3058] tttctctctt caggcccacc atgggctgga gctgcatcat cttgttcctg gtcgcaactg 60

[3059] ctaccggagt ccattcggac atcgtcatga cccaaagccc tgactcgctc gctgtgtcac 120

[3060] tgggagagcg ggcgactatc aactgcaaat catcccagag cctgctgtat tcacgcaatc 180

[3061] agaaaaacta cctggcctgg tatcagcaga agccgggcca gcctcccaag ctgctgatct 240

[3062] tctgggcctc cacccgcgaa agcggcgtgc cggaccgctt cagcggaagc ggattcggaa 300

[3063] ctgactttac tctgaccatt agctccttgc aggcggagga cgtggccgtc tactactgcc 360

[3064] agcagtattt ctcctatccg ctcacctttg ggcaaggcac caaggtggag attaagggag 420

[3065] ggggcggcag cgggggaggc ggcagcggcg gcgggggatc gcaggtccag ctcgtccaat 480

[3066] ccggagccga agtcaagaag ccgggagcgt cggtcaaggt cagctgcaaa acttcgcgct 540

[3067] acaccttcac tgagtacacg atccactggg tccgccaggc gcccggccag cggctggagt 600

[3068] ggatcggcgg gatcaaccca aacaacggaa tcccaaatta caatcagaaa tttaaagggc 660

[3069] gggtgactat caccgtggat acctcggcct ccacggcgta catggagctc tcatcactca 720

[3070] gatcggagga caccgcggtc tattactgcg cccgccgccg gatcgcttat ggatacgatg 780

[3071] aaggacatgc gatggattac tggggccagg gcaccctcgt cacggtgtcg tcaggaggcg 840

[3072] gcggttcaca ggtgcagctg cagcagtctg gggctgaact ggcaagacct ggggcctcag 900

[3073] tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca cctttactag gtacacgatg cactgggtaa 960

[3074] aacagaggcc tggacagggt ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtggttata 1020

[3075] ctaattacaa tcagaagttc aaggacaagg ccacattgac tacagacaaa tcctccagca 1080

[3076] cagcctacat gcaactgagc agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat tactgtgcaa 1140

[3077] gatattatga tgatcattac tgccttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct 1200

[3078] cctcaggtgg cggtggctcg ggcggtggtg gatctggtgg cggcggatct gatatcgtgc 1260

[3079] tcactcagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc atgacctgca 1320

[3080] gtgccagctc aagtgtaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc acctccccca 1380

[3081] aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcac ttcaggggca 1440

[3082] gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcagcggcat ggaggctgaa gatgctgcca 1500

[3083] cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cattcacgtt cggctcgggg acaaagttgg 1560

[3084] aaataaaccg gcatcaccat caccatcacc accatcacca ttaggctagc ttgactgact 1620

[3085] gagatacagc gtaccttcag ctcacagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa 1680

[3086] ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt 1740

[3087] tatttgtaac cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta 1800

[3088] tgtttcaggt tcaggggggag gtgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat 1860

[3089] gtggtagtcg tcagctat 1878

[3090] <210> 91

[3091] <211> 1884

[3092] <212> DNA

[3093] <213> 人工序列

[3094] <220>

[3095] <223> NG-614转基因盒

[3096] <400> 91

[3097] tttctctctt caggcccacc atgggctgga gctgcatcat cttgttcctg gtcgcaactg 60

[3098] ctaccggagt ccattcggac atcgtcatga cccaaagccc tgactcgctc gctgtgtcac 120

[3099] tgggagagcg ggcgactatc aactgcaaat catcccagag cctgctgtat tcacgcaatc 180

[3100] agaaaaacta cctggcctgg tatcagcaga agccgggcca gcctcccaag ctgctgatct 240

[3101] tctgggcctc cacccgcgaa agcggcgtgc cggaccgctt cagcggaagc ggattcggaa 300

[3102] ctgactttac tctgaccatt agctccttgc aggcggagga cgtggccgtc tactactgcc 360

[3103] agcagtattt ctcctatccg ctcacctttg ggcaaggcac caaggtggag attaagggag 420

[3104] ggggcggcag cgggggaggc ggcagcggcg gcgggggatc gcaggtccag ctcgtccaat 480

[3105] ccggagccga agtcaagaag ccgggagcgt cggtcaaggt cagctgcaaa acttcgcgct 540

[3106] acaccttcac tgagtacacg atccactggg tccgccaggc gcccggccag cggctggagt 600

[3107] ggatcggcgg gatcaaccca aacaacggaa tcccaaatta caatcagaaa tttaaagggc 660

[3108] gggtgactat caccgtggat acctcggcct ccacggcgta catggagctc tcatcactca 720

[3109] gatcggagga caccgcggtc tattactgcg cccgccgccg gatcgcttat ggatacgatg 780

[3110] aaggacatgc gatggattac tggggccagg gcaccctcgt cacggtgtcg tcaggaggcg 840

[3111] gcggttcaga tgtgcaactc gtgcagtccg gtgcggaagt gaaaaagccg ggcgcgagcg 900

[3112] tcaaagtgtc atgcaaggcg tcaggatata cgtttactag atacactatg cactgggtgc 960

[3113] gccaggcacc tggtcagggc cttgaatgga tcggctacat caatccgtcg agaggctaca 1020

[3114] ctaattacgc ggactcagtc aaagggcgct tcacgattac gaccgacaag tccacctcga 1080

[3115] ctgcatacat ggaactgtcc tcgctgagaa gcgaggacac cgctacttac tactgcgcta 1140

[3116] gatactacga tgatcactac tgcctcgatt actggggcca gggaaccact gtcacggtgt 1200

[3117] catcgggaga gggcacctca accggatcag ggggatcggg aggctcgggc ggcgcagacg 1260

[3118] acatcgtcct gacccagtcg cccgccacct tgtcgctgtc cccaggagaa agagcgaccc 1320

[3119] tgtcatgccg ggcgtcgcaa agcgtgagct atatgaattg gtatcagcag aagccaggaa 1380

[3120] aggcgccgaa gagatggatc tacgacacct ccaaggtcgc ttcaggtgtc ccggctagat 1440

[3121] tctcaggatc gggatcagga acggactact ccctgaccat caattcactg gaagcagaag 1500

[3122] atgcggccac ctactactgt cagcagtggt cctccaaccc gctgactttc ggaggcggaa 1560

[3123] ctaaggtcga gatcaagcat caccatcacc atcaccacca tcaccattag gctagcttga 1620

[3124] ctgactgaga tacagcgtac cttcagctca cagacatgat aagatacatt gatgagtttg 1680

[3125] gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta 1740

[3126] ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc 1800

[3127] attttatgtt tcaggttcag ggggaggtgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct 1860

[3128] acaaatgtgg tagtcgtcag ctat 1884

[3129] <210> 92

[3130] <211> 1838

[3131] <212> DNA

[3132] <213> 人工序列

[3133] <220>

[3134] <223> NG-617转基因盒

[3135] <400> 92

[3136] caggcccacc atgggctgga gctgcatcat cttgttcctg gtcgcaactg ctaccggagt 60

[3137] ccattcggac atcgtcatga cccaaagccc tgactcgctc gctgtgtcac tgggagagcg 120

[3138] ggcgactatc aactgcaaat catcccagag cctgctgtat tcacgcaatc agaaaaacta 180
[3139] cctggcctgg tatcagcaga agccgggcca gcctcccaag ctgctgatct tctgggcctc 240
[3140] cacccgcgaa agcggcgtgc cggaccgctt cagcggaagc ggattcggaa ctgactttac 300
[3141] tctgaccatt agctccttgc aggcggagga cgtggccgtc tactactgcc agcagtattt 360
[3142] ctcctatccg ctcacctttg ggcaaggcac caaggtggag attaagggag ggggcggcag 420
[3143] cgggggaggc ggcagcggcg gcgggggatc gcaggtccag ctcgtccaat ccggagccga 480
[3144] agtcaagaag ccgggagcgt cggtcaaggt cagctgcaaa acttcgcgct acaccttcac 540
[3145] tgagtacacg atccactggg tccgccaggc gcccggccag cggctggagt ggatcggcgg 600
[3146] gatcaaccca aacaacggaa tcccaaatta caatcagaaa tttaaagggc gggtgactat 660
[3147] caccgtggat acctcggcct ccacggcgta catggagctc tcatcactca gatcggagga 720
[3148] caccgcggtc tattactgcg cccgccgccg gatcgcttat ggatacgatg aaggacatgc 780
[3149] gatggattac tggggccagg gcaccctcgt cacggtgtcg tcaggaggcg gcggttcaca 840
[3150] ggtgcagctg cagcagtctg gggctgaact ggcaagacct ggggcctcag tgaagatgtc 900
[3151] ctgcaaggct tctggctaca cctttactag gtacacgatg cactgggtaa aacagaggcc 960
[3152] tggacagggt ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtggttata ctaattacaa 1020
[3153] tcagaagttc aaggacaagg ccacattgac tacagacaaa tcctccagca cagcctacat 1080
[3154] gcaactgagc agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat tactgtgcaa gatattatga 1140
[3155] tgatcattac tgccttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcaggtgg 1200
[3156] cggtggctcg ggcggtggtg gatctggtgg cggcggatct gatatcgtgc tcactcagtc 1260
[3157] tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc atgacctgca gtgccagctc 1320
[3158] aagtgtaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc acctccccca aaagatggat 1380
[3159] ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcac ttcaggggca gtgggtctgg 1440
[3160] gacctcttac tctctcacaa tcagcggcat ggaggctgaa gatgctgcca cttattactg 1500
[3161] ccagcagtgg agtagtaacc cattcacgtt cggctcgggg acaaagttgg aaataaaccg 1560
[3162] gtaggctagc ttgactgact gagatacagc gtaccttcag ctcacagaca tgataagata 1620
[3163] cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga 1680
[3164] aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac cattataagc tgcaataaac aagttaacaa 1740
[3165] caacaattgc attcatttta tgtttcaggt tcaggggga gtgtgggagg ttttttaaag 1800
[3166] caagtaaaac ctctacaaat gtggtagtcg tcagctat 1838
[3167] <210> 93
[3168] <211> 513
[3169] <212> PRT
[3170] <213> 人工序列
[3171] <220>
[3172] <223> EpCam 双特异性T细胞衔接器氨基酸序列(OKT3)
[3173] <400> 93
[3174] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
[3175] 1 5 10 15
[3176] Val His Ser Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
[3177] 20 25 30
[3178] Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
[3179] 35 40 45

[3180] Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
[3181] 50 55 60
[3182] Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
[3183] 65 70 75 80
[3184] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[3185] 85 90 95
[3186] Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
[3187] 100 105 110
[3188] Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
[3189] 115 120 125
[3190] Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[3191] 130 135 140
[3192] Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val
[3193] 145 150 155 160
[3194] Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala
[3195] 165 170 175
[3196] Phe Thr Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly
[3197] 180 185 190
[3198] Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr
[3199] 195 200 205
[3200] Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
[3201] 210 215 220
[3202] Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala
[3203] 225 230 235 240
[3204] Val Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp Tyr
[3205] 245 250 255
[3206] Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[3207] 260 265 270
[3208] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
[3209] 275 280 285
[3210] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
[3211] 290 295 300
[3212] Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[3213] 305 310 315 320
[3214] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
[3215] 325 330 335
[3216] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[3217] 340 345 350
[3218] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[3219] 355 360 365
[3220] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[3221] 370 375 380

[3222] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
[3223] 385 390 395 400
[3224] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
[3225] 405 410 415
[3226] Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
[3227] 420 425 430
[3228] Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
[3229] 435 440 445
[3230] Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
[3231] 450 455 460
[3232] Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
[3233] 465 470 475 480
[3234] Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
[3235] 485 490 495
[3236] Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
[3237] 500 505 510
[3238] Arg
[3239] <210> 94
[3240] <211> 517
[3241] <212> PRT
[3242] <213> 人工序列
[3243] <220>
[3244] <223> FAP 双特异性T细胞衔接器氨基酸序列(OKT3)
[3245] <400> 94
[3246] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
[3247] 1 5 10 15
[3248] Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val
[3249] 20 25 30
[3250] Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
[3251] 35 40 45
[3252] Leu Tyr Ser Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
[3253] 50 55 60
[3254] Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu
[3255] 65 70 75 80
[3256] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe
[3257] 85 90 95
[3258] Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr
[3259] 100 105 110
[3260] Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
[3261] 115 120 125
[3262] Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[3263] 130 135 140

[3264] Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
[3265] 145 150 155 160
[3266] Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe
[3267] 165 170 175
[3268] Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
[3269] 180 185 190
[3270] Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn
[3271] 195 200 205
[3272] Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser
[3273] 210 215 220
[3274] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
[3275] 225 230 235 240
[3276] Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His
[3277] 245 250 255
[3278] Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
[3279] 260 265 270
[3280] Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala
[3281] 275 280 285
[3282] Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
[3283] 290 295 300
[3284] Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly
[3285] 305 310 315 320
[3286] Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
[3287] 325 330 335
[3288] Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser
[3289] 340 345 350
[3290] Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
[3291] 355 360 365
[3292] Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
[3293] 370 375 380
[3294] Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[3295] 385 390 395 400
[3296] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln
[3297] 405 410 415
[3298] Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr
[3299] 420 425 430
[3300] Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
[3301] 435 440 445
[3302] Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
[3303] 450 455 460
[3304] Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr
[3305] 465 470 475 480

[3306] Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
[3307] 485 490 495
[3308] Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
[3309] 500 505 510
[3310] Leu Glu Ile Asn Arg
[3311] 515
[3312] <210> 95
[3313] <211> 519
[3314] <212> PRT
[3315] <213> 人工序列
[3316] <220>
[3317] <223> FAP 双特异性T细胞衔接器氨基酸序列(aCD3)
[3318] <400> 95
[3319] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
[3320] 1 5 10 15
[3321] Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val
[3322] 20 25 30
[3323] Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
[3324] 35 40 45
[3325] Leu Tyr Ser Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
[3326] 50 55 60
[3327] Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu
[3328] 65 70 75 80
[3329] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe
[3330] 85 90 95
[3331] Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr
[3332] 100 105 110
[3333] Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
[3334] 115 120 125
[3335] Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[3336] 130 135 140
[3337] Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
[3338] 145 150 155 160
[3339] Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe
[3340] 165 170 175
[3341] Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
[3342] 180 185 190
[3343] Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn
[3344] 195 200 205
[3345] Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser
[3346] 210 215 220
[3347] Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

[3348] 225 230 235 240
[3349] Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His
[3350] 245 250 255
[3351] Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
[3352] 260 265 270
[3353] Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
[3354] 275 280 285
[3355] Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
[3356] 290 295 300
[3357] Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
[3358] 305 310 315 320
[3359] Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
[3360] 325 330 335
[3361] Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr
[3362] 340 345 350
[3363] Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
[3364] 355 360 365
[3365] Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
[3366] 370 375 380
[3367] Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser
[3368] 385 390 395 400
[3369] Thr Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val
[3370] 405 410 415
[3371] Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
[3372] 420 425 430
[3373] Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
[3374] 435 440 445
[3375] Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
[3376] 450 455 460
[3377] Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
[3378] 465 470 475 480
[3379] Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala
[3380] 485 490 495
[3381] Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly
[3382] 500 505 510
[3383] Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[3384] 515
[3385] <210> 96
[3386] <400> 96
[3387] 000
[3388] <210> 97
[3389] <400> 97

[3390] 000

[3391] <210> 98

[3392] <400> 98

[3393] 000

[3394] <210> 99

[3395] <400> 99

[3396] 000

[3397] <210> 100

[3398] <400> 100

[3399] 000

[3400] <210> 101

[3401] <400> 101

[3402] 000

[3403] <210> 102

[3404] <400> 102

[3405] 000

[3406] <210> 103

[3407] <400> 103

[3408] 000

[3409] <210> 104

[3410] <400> 104

[3411] 000

[3412] <210> 105

[3413] <211> 537

[3414] <212> DNA

[3415] <213> 人工序列

[3416] <220>

[3417] <223> Flt3L核酸序列

[3418] <400> 105

[3419] atgacagtgc tggcgccagc ctggagccca acaacctatc tcctcctgct gctgctgctg 60

[3420] agctcgggac tcagtgggac ccaggactgc tccttccaac acagccccat ctcctccgac 120

[3421] ttcgctgtca aaatccgtga gctgtctgac tacctgcttc aagattaccc agtcaccgtg 180

[3422] gcctccaacc tccaggacga ggagctctgc gggggcctct ggcggctggt cctggcacag 240

[3423] cgctggatgg agcggctcaa gactgtcgct gggtccaaga tgcaaggctt gctggagcgc 300

[3424] gtgaacacgg agatacactt tgtcaccaaa tgtgcctttc agccccccc cagctgtctt 360

[3425] cgcttcgtcc agaccaacat ctcccgcctc ctacaggaga cctccgagca gctggtggcg 420

[3426] ctgaagccct ggatcactcg ccagaacttc tcccggtgcc tggagctgca gtgtcagccc 480

[3427] gactcctcaa ccctgccacc cccatggagt ccccggcccc tggaggccac agccccg 537

[3428] <210> 106

[3429] <400> 106

[3430] 000

[3431] <210> 107

[3432] <211> 279
[3433] <212> DNA
[3434] <213> 人工序列
[3435] <220>
[3436] <223> MIP1α核酸序列
[3437] <400> 107
[3438] atgcaggtct ccactgctgc ccttgccgtc ctcctctgca ccatggctct ctgcaaccag 60
[3439] gtcctctctg caccacttgc tgctgacacg ccgaccgcct gctgcttcag ctacacctcc 120
[3440] cgacagattc cacagaattt catagctgac tactttgaga cgagcagcca gtgctccaag 180
[3441] cccagtgtca tcttcctaac caagagaggc cggcaggtct gtgctgaccc cagtgaggag 240
[3442] tgggtccaga aatacgtcag tgacctggag ctgagtgcc 279
[3443] <210> 108
[3444] <211> 18
[3445] <212> PRT
[3446] <213> 人工序列
[3447] <220>
[3448] <223> 灵活的连接子序列
[3449] <400> 108
[3450] Ser Pro Gln Tyr Pro Ser Pro Leu Thr Leu Thr Leu Pro Pro His Pro
[3451] 1 5 10 15
[3452] Ser Leu
[3453] <210> 109
[3454] <211> 564
[3455] <212> DNA
[3456] <213> 人工序列
[3457] <220>
[3458] <223> IFNα核酸序列
[3459] <400> 109
[3460] atggccttga cctttgcttt actggtggcc ctcctggtgc tcagctgcaa gtcaagctgc 60
[3461] tctgtgggct gtgatctgcc tcaaacccac agcctgggta gcaggaggac cttgatgctc 120
[3462] ctggcacaga tgaggagaat ctctcttttc tcctgcttga aggacagaca tgactttgga 180
[3463] tttccccagg aggagtttgg caaccagttc caaaaggctg aaaccatccc tgtcctccat 240
[3464] gagatgatcc agcagatctt caatctcttc agcacaaagg actcatctgc tgcttgggat 300
[3465] gagaccctcc tagacaaatt ctacactgaa ctctaccagc agctgaatga cctggaagcc 360
[3466] tgtgtgatac agggggtggg ggtgacagag actcccctga tgaaggagga ctccattctg 420
[3467] gctgtgagga aatacttcca aagaatcact ctctatctga aagagaagaa atacagccct 480
[3468] tgtgcctggg aggttgtcag agcagaaatc atgagatctt tttctttgtc aacaaacttg 540
[3469] caagaaagtt taagaagtaa ggaa 564
[3470] <210> 110
[3471] <211> 294
[3472] <212> DNA
[3473] <213> 人工序列

[3474] <220>
[3475] <223> CXCL10核酸序列
[3476] <400> 110
[3477] atgaatcaaa ctgccattct gatttgctgc cttatctttc tgactctaag tggcattcaa 60
[3478] ggagtacctc tctctagaac tgtacgctgt acctgcatca gcattagtaa tcaacctgtt 120
[3479] aatccaaggt ctttagaaaa acttgaaatt attcctgcaa gccaattttg tccacgtgtt 180
[3480] gagatcattg ctacaatgaa aaagaagggt gagaagagat gtctgaatcc agaatcgaag 240
[3481] gccatcaaga atttactgaa agcagttagc aaggaaaggt ctaaaagatc tcct 294
[3482] <210> 111
[3483] <211> 372
[3484] <212> DNA
[3485] <213> 人工序列
[3486] <220>
[3487] <223> CXCL9核酸序列
[3488] <400> 111
[3489] aagaaaagtg gtgttctttt cctcttgggc atcatcttgc tggttctgat tggagtgcaa 60
[3490] ggaaccccag tagtgagaaa gggtcgctgt tcctgcatca gcaccaacca agggactatc 120
[3491] cacctacaat ccttgaaaga ccttaaacaa tttgccccaa gcccttcctg cgagaaaatt 180
[3492] gaaatcattg ctacactgaa gaatggagtt caaacatgtc taaacccaga ttcagcagat 240
[3493] gtgaaggaac tgattaaaaa gtgggagaaa caggtcagcc aaaagaaaaa gcaaaagaat 300
[3494] gggaaaaaac atcaaaaaaa gaaagttctg aaagttcgaa aatctcaacg ttctcgtcaa 360
[3495] aagaagacta ca 372
[3496] <210> 112
[3497] <211> 3407
[3498] <212> DNA
[3499] <213> 人工序列
[3500] <220>
[3501] <223> NG-615转基因盒
[3502] <400> 112
[3503] caggcccacc atgggctgga gctgcatcat cttgttcctg gtcgcaactg ctaccggagt 60
[3504] ccattcggac atcgtcatga cccaaagccc tgactcgctc gctgtgtcac tgggagagcg 120
[3505] ggcgactatc aactgcaaat catcccagag cctgctgtat tcacgcaatc agaaaaacta 180
[3506] cctggcctgg tatcagcaga agccgggcca gcctcccaag ctgctgatct tctgggcctc 240
[3507] cacccgcgaa agcggcgtgc cggaccgctt cagcggaagc ggattcggaa ctgactttac 300
[3508] tctgaccatt agctccttgc aggcggagga cgtggccgtc tactactgcc agcagtattt 360
[3509] ctcctatccg ctcacctttg ggcaaggcac caaggtggag attaagggag ggggcggcag 420
[3510] cgggggaggc ggcagcggcg gcgggggatc gcaggtccag ctcgtccaat ccggagccga 480
[3511] agtcaagaag ccgggagcgt cggtcaaggt cagctgcaaa acttcgcgct acaccttcac 540
[3512] tgagtacacg atccactggg tccgccaggc gcccggccag cggctggagt ggatcggcgg 600
[3513] gatcaaccca aacaacggaa tcccaaatta caatcagaaa tttaaagggc gggtgactat 660
[3514] caccgtggat acctcggcct ccacggcgta catggagctc tcatcactca gatcggagga 720
[3515] caccgcggtc tattactgcg cccgccgccg gatcgcttat ggatacgatg aaggacatgc 780

[3516] gatggattac tggggccagg gcaccctcgt cacggtgtcg tcaggaggcg gcggttcaca 840
[3517] ggtgcagctg cagcagtctg gggctgaact ggcaagacct ggggcctcag tgaagatgtc 900
[3518] ctgcaaggct tctggctaca cctttactag gtacacgatg cactgggtaa aacagaggcc 960
[3519] tggacagggt ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtggttata ctaattacaa 1020
[3520] tcagaagttc aaggacaagg ccacattgac tacagacaaa tcctccagca cagcctacat 1080
[3521] gcaactgagc agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat tactgtgcaa gatattatga 1140
[3522] tgatcattac tgccttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcaggtgg 1200
[3523] cggtggctcg ggcggtggtg gatctggtgg cggcggatct gatatcgtgc tcactcagtc 1260
[3524] tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc atgacctgca gtgccagctc 1320
[3525] aagtgtaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc acctccccca aaagatggat 1380
[3526] ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcac ttcaggggca gtgggtctgg 1440
[3527] gacctcttac tctctcacaa tcagcggcat ggaggctgaa gatgctgcca cttattactg 1500
[3528] ccagcagtgg agtagtaacc cattcacgtt cggctcgggg acaaagttgg aaataaaccg 1560
[3529] gggaagcgga cagtgtacta attatgctct cttgaaattg gctggagatg ttgagagcaa 1620
[3530] ccctggacct acagtgctgg cgccagcctg gagcccaaca acctatctcc tcctgctgct 1680
[3531] gctgctgagc tcgggactca gtgggaccca ggactgctcc ttccaacaca gccccatctc 1740
[3532] ctccgacttc gctgtcaaaa tccgtgagct gtctgactac ctgcttcaag attacccagt 1800
[3533] caccgtggcc tccaacctcc aggacgagga gctctgcggg ggcctctggc ggctggtcct 1860
[3534] ggcacagcgc tggatggagc ggctcaagac tgtcgctggg tccaagatgc aaggcttgct 1920
[3535] ggagcgcgtg aacacggaga tacactttgt caccaaatgt gcctttcagc ccccccccag 1980
[3536] ctgtcttcgc ttcgtccaga ccaacatctc ccgcctccta caggagacct ccgagcagct 2040
[3537] ggtggcgctg aagccctgga tcactcgcca gaacttctcc cggtgcctgg agctgcagtg 2100
[3538] tcagcccgac tcctcaaccc tgccaccccc atggagtccc cggcccctgg aggccacagc 2160
[3539] cccgggaagc ggagctacta acttcagcct gctgaagcag gctggagacg tggaggagaa 2220
[3540] ccctggacct caggtctcca ctgctgccct tgccgtcctc ctctgcacca tggctctctg 2280
[3541] caaccaggtc ctctctgcac cacttgctgc tgacacgccg accgcctgct gcttcagcta 2340
[3542] cacctcccga cagattccac agaatttcat agctgactac tttgagacga gcagccagtg 2400
[3543] ctccaagccc agtgtcatct tcctaaccaa gagaggccgg caggtctgtg ctgaccccag 2460
[3544] tgaggagtgg gtccagaaat acgtcagtga cctggagctg agtgccggaa gcggagaggg 2520
[3545] cagaggaagt ctgctaacat gcggtgacgt cgaggagaat cctggacctg ccttgacctt 2580
[3546] tgctttactg gtggccctcc tggtgctcag ctgcaagtca agctgctctg tgggctgtga 2640
[3547] tctgcctcaa acccacagcc tgggtagcag gaggaccttg atgctcctgg cacagatgag 2700
[3548] gagaatctct cttttctcct gcttgaagga cagacatgac tttggatttc cccaggagga 2760
[3549] gtttggcaac cagttccaaa aggctgaaac catccctgtc ctccatgaga tgatccagca 2820
[3550] gatcttcaat ctcttcagca caaaggactc atctgctgct tgggatgaga ccctcctaga 2880
[3551] caaattctac actgaactct accagcagct gaatgacctg gaagcctgtg tgatacaggg 2940
[3552] ggtgggggtg acagagactc ccctgatgaa ggaggactcc attctggctg tgaggaaata 3000
[3553] cttccaaaga atcactctct atctgaaaga gaagaaatac agcccttgtg cctgggaggt 3060
[3554] tgtcagagca gaaatcatga gatctttttc tttgtcaaca aacttgcaag aaagtttaag 3120
[3555] aagtaaggaa taagctagct tgactgactg agatacagcg taccttcagc tcacagacat 3180
[3556] gataagatac attgatgagt ttggacaaac cacaactaga atgcagtgaa aaaaatgctt 3240
[3557] tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttgtaacc attataagct gcaataaaca 3300

[3558] agttaacaac aacaattgca ttcattttat gtttcaggtt caggggggagg tgtgggaggt 3360

[3559] tttttaaagc aagtaaaacc tctacaaatg tggtagtcgt cagctat 3407

[3560] <210> 113

[3561] <211> 2630

[3562] <212> DNA

[3563] <213> 人工序列

[3564] <220>

[3565] <223> NG-640转基因盒

[3566] <400> 113

[3567] caggcccacc atgggctgga gctgcatcat cttgttcctg gtcgcaactg ctaccggagt 60

[3568] ccattcggac atcgtcatga cccaaagccc tgactcgctc gctgtgtcac tgggagagcg 120

[3569] ggcgactatc aactgcaaat catcccagag cctgctgtat tcacgcaatc agaaaaacta 180

[3570] cctggcctgg tatcagcaga agccgggcca gcctcccaag ctgctgatct tctgggcctc 240

[3571] cacccgcgaa agcggcgtgc cggaccgctt cagcggaagc ggattcggaa ctgactttac 300

[3572] tctgaccatt agctccttgc aggcggagga cgtggccgtc tactactgcc agcagtattt 360

[3573] ctcctatccg ctcacctttg ggcaaggcac caaggtggag attaagggag ggggcggcag 420

[3574] cgggggaggc ggcagcggcg gcgggggatc gcaggtccag ctcgtccaat ccggagccga 480

[3575] agtcaagaag ccgggagcgt cggtcaaggt cagctgcaaa acttcgcgct acaccttcac 540

[3576] tgagtacacg atccactggg tccgccaggc gcccggccag cggctggagt ggatcggcgg 600

[3577] gatcaaccca aacaacggaa tcccaaatta caatcagaaa tttaaagggc gggtgactat 660

[3578] caccgtggat acctcggcct ccacggcgta catggagctc tcatcactca gatcggagga 720

[3579] caccgcggtc tattactgcg cccgccgccg gatcgcttat ggatacgatg aaggacatgc 780

[3580] gatggattac tggggccagg gcaccctcgt cacggtgtcg tcaggaggcg gcggttcaca 840

[3581] ggtgcagctg cagcagtctg gggctgaact ggcaagacct ggggcctcag tgaagatgtc 900

[3582] ctgcaaggct tctggctaca cctttactag gtacacgatg cactgggtaa aacagaggcc 960

[3583] tggacagggt ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtggttata ctaattacaa 1020

[3584] tcagaagttc aaggacaagg ccacattgac tacagacaaa tcctccagca cagcctacat 1080

[3585] gcaactgagc agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat tactgtgcaa gatattatga 1140

[3586] tgatcattac tgccttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcaggtgg 1200

[3587] cggtggctcg ggcggtggtg gatctggtgg cggcggatct gatatcgtgc tcactcagtc 1260

[3588] tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc atgacctgca gtgccagctc 1320

[3589] aagtgtaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc acctccccca aaagatggat 1380

[3590] ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcac ttcaggggca gtgggtctgg 1440

[3591] gacctcttac tctctcacaa tcagcggcat ggaggctgaa gatgctgcca cttattactg 1500

[3592] ccagcagtgg agtagtaacc cattcacgtt cggctcgggg acaaagttgg aaataaaccg 1560

[3593] gggaagcgga gctactaact tcagcctgct gaagcaggct ggagacgtgg aggagaaccc 1620

[3594] tggacctaat caaactgcca ttctgatttg ctgccttatc tttctgactc taagtggcat 1680

[3595] tcaaggagta cctctctcta gaactgtacg ctgtacctgc atcagcatta gtaatcaacc 1740

[3596] tgttaatcca aggtctttag aaaaacttga aattattcct gcaagccaat tttgtccacg 1800

[3597] tgttgagatc attgctacaa tgaaaaagaa gggtgagaag agatgtctga atccagaatc 1860

[3598] gaaggccatc aagaatttac tgaaagcagt tagcaaggaa aggtctaaaa gatctcctgg 1920

[3599] aagcggagag ggcagaggaa gtctgctaac atgcggtgac gtcgaggaga atcctggacc 1980

[3600] taagaaaagt ggtgttcttt tcctcttggg catcatcttg ctggttctga ttggagtgca 2040
[3601] aggaacccca gtagtgagaa agggtcgctg ttcctgcatc agcaccaacc aagggactat 2100
[3602] ccacctacaa tccttgaaag accttaaaca atttgcccca agcccttcct gcgagaaaat 2160
[3603] tgaaatcatt gctacactga agaatggagt tcaaacatgt ctaaacccag attcagcaga 2220
[3604] tgtgaaggaa ctgattaaaa agtgggagaa acaggtcagc caaaagaaaa agcaaaagaa 2280
[3605] tgggaaaaaa catcaaaaaa agaaagttct gaaagttcga aaatctcaac gttctcgtca 2340
[3606] aaagaagact acataagcta gcttgactga ctgagataca gcgtaccttc agctcacaga 2400
[3607] catgataaga tacattgatg agtttggaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaaatg 2460
[3608] ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttgta accattataa gctgcaataa 2520
[3609] acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg aggtgtggga 2580
[3610] ggttttttaa agcaagtaaa acctctacaa atgtggtagt cgtcagctat 2630
[3611] <210> 114
[3612] <211> 3260
[3613] <212> DNA
[3614] <213> 人工序列
[3615] <220>
[3616] <223> NG-641转基因盒
[3617] <400> 114
[3618] caggcccacc atgggctgga gctgcatcat cttgttcctg gtcgcaactg ctaccggagt 60
[3619] ccattcggac atcgtcatga cccaaagccc tgactcgctc gctgtgtcac tgggagagcg 120
[3620] ggcgactatc aactgcaaat catcccagag cctgctgtat tcacgcaatc agaaaaacta 180
[3621] cctggcctgg tatcagcaga agccgggcca gcctcccaag ctgctgatct tctgggcctc 240
[3622] cacccgcgaa agcggcgtgc cggaccgctt cagcggaagc ggattcggaa ctgactttac 300
[3623] tctgaccatt agctccttgc aggcggagga cgtggccgtc tactactgcc agcagtattt 360
[3624] ctcctatccg ctcacctttg ggcaaggcac caaggtggag attaagggag ggggcggcag 420
[3625] cgggggaggc ggcagcggcg gcgggggatc gcaggtccag ctcgtccaat ccggagccga 480
[3626] agtcaagaag ccgggagcgt cggtcaaggt cagctgcaaa acttcgcgct acaccttcac 540
[3627] tgagtacacg atccactggg tccgccaggc gcccggccag cggctggagt ggatcggcgg 600
[3628] gatcaaccca aacaacggaa tcccaaatta caatcagaaa tttaaagggc gggtgactat 660
[3629] caccgtggat acctcggcct ccacggcgta catggagctc tcatcactca gatcggagga 720
[3630] caccgcggtc tattactgcg cccgccgccg gatcgcttat ggatacgatg aaggacatgc 780
[3631] gatggattac tggggccagg gcaccctcgt cacggtgtcg tcaggaggcg gcggttcaca 840
[3632] ggtgcagctg cagcagtctg gggctgaact ggcaagacct ggggcctcag tgaagatgtc 900
[3633] ctgcaaggct tctggctaca cctttactag gtacacgatg cactgggtaa aacagaggcc 960
[3634] tggacagggt ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtggttata ctaattacaa 1020
[3635] tcagaagttc aaggacaagg ccacattgac tacagacaaa tcctccagca cagcctacat 1080
[3636] gcaactgagc agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat tactgtgcaa gatattatga 1140
[3637] tgatcattac tgccttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcaggtgg 1200
[3638] cggtggctcg ggcggtggtg gatctggtgg cggcggatct gatatcgtgc tcactcagtc 1260
[3639] tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc atgacctgca gtgccagctc 1320
[3640] aagtgtaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc acctccccca aaagatggat 1380
[3641] ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcac ttcaggggca gtgggtctgg 1440

[3642] gacctcttac tctctcacaa tcagcggcat ggaggctgaa gatgctgcca cttattactg 1500
[3643] ccagcagtgg agtagtaacc cattcacgtt cggctcgggg acaaagttgg aaataaaccg 1560
[3644] gggaagcgga gctactaact tcagcctgct gaagcaggct ggagacgtgg aggagaaccc 1620
[3645] tggacctaat caaactgcca ttctgatttg ctgccttatc tttctgactc taagtggcat 1680
[3646] tcaaggagta cctctctcta gaactgtacg ctgtacctgc atcagcatta gtaatcaacc 1740
[3647] tgttaatcca aggtctttag aaaaacttga aattattcct gcaagccaat tttgtccacg 1800
[3648] tgttgagatc attgctacaa tgaaaaagaa gggtgagaag agatgtctga atccagaatc 1860
[3649] gaaggccatc aagaatttac tgaaagcagt tagcaaggaa aggtctaaaa gatctcctgg 1920
[3650] aagcggagag ggcagaggaa gtctgctaac atgcggtgac gtcgaggaga atcctggacc 1980
[3651] taagaaaagt ggtgttcttt tcctcttggg catcatcttg ctggttctga ttggagtgca 2040
[3652] aggaacccca gtagtgagaa agggtcgctg ttcctgcatc agcaccaacc aagggactat 2100
[3653] ccacctacaa tccttgaaag accttaaaca atttgcccca agcccttcct gcgagaaaat 2160
[3654] tgaaatcatt gctacactga agaatggagt tcaaacatgt ctaaacccag attcagcaga 2220
[3655] tgtgaaggaa ctgattaaaa agtgggagaa acaggtcagc caaaagaaaa agcaaaagaa 2280
[3656] tgggaaaaaa catcaaaaaa agaaagttct gaaagttcga aaatctcaac gttctcgtca 2340
[3657] aaagaagact acaggaagcg gacagtgtac taattatgct ctcttgaaat tggctggaga 2400
[3658] tgttgagagc aaccctggac ctgccttgac ctttgcttta ctggtggccc tcctggtgct 2460
[3659] cagctgcaag tcaagctgct ctgtgggctg tgatctgcct caaacccaca gcctgggtag 2520
[3660] caggaggacc ttgatgctcc tggcacagat gaggagaatc tctcttttct cctgcttgaa 2580
[3661] ggacagacat gactttggat ttccccagga ggagtttggc aaccagttcc aaaaggctga 2640
[3662] aaccatccct gtcctccatg agatgatcca gcagatcttc aatctcttca gcacaaagga 2700
[3663] ctcatctgct gcttgggatg agaccctcct agacaaattc tacactgaac tctaccagca 2760
[3664] gctgaatgac ctggaagcct gtgtgataca gggggtgggg gtgacagaga ctcccctgat 2820
[3665] gaaggaggac tccattctgg ctgtgaggaa atacttccaa agaatcactc tctatctgaa 2880
[3666] agagaagaaa tacagccctt gtgcctggga ggttgtcaga gcagaaatca tgagatcttt 2940
[3667] ttctttgtca acaaacttgc aagaaagttt aagaagtaag gaataagcta gcttgactga 3000
[3668] ctgagataca gcgtaccttc agctcacaga catgataaga tacattgatg agtttggaca 3060
[3669] aaccacaact agaatgcagt gaaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc 3120
[3670] tttatttgta accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt 3180
[3671] tatgtttcag gttcaggggg aggtgtggga ggtttttaa agcaagtaaa acctctacaa 3240
[3672] atgtggtagt cgtcagctat 3260
[3673] <210> 115
[3674] <211> 154
[3675] <212> PRT
[3676] <213> 人工序列
[3677] <220>
[3678] <223> FLT3L氨基酸序列
[3679] <400> 115
[3680] Met Thr Gln Asp Cys Ser Phe Gln His Ser Pro Ile Ser Ser Asp Phe
[3681] 1 5 10 15
[3682] Ala Val Lys Ile Arg Glu Leu Ser Asp Tyr Leu Leu Gln Asp Tyr Pro
[3683] 20 25 30

[3684] Val Thr Val Ala Ser Asn Leu Gln Asp Glu Glu Leu Cys Gly Gly Leu
[3685] 35 40 45
[3686] Trp Arg Leu Val Leu Ala Gln Arg Trp Met Glu Arg Leu Lys Thr Val
[3687] 50 55 60
[3688] Ala Gly Ser Lys Met Gln Gly Leu Leu Glu Arg Val Asn Thr Glu Ile
[3689] 65 70 75 80
[3690] His Phe Val Thr Lys Cys Ala Phe Gln Pro Pro Pro Ser Cys Leu Arg
[3691] 85 90 95
[3692] Phe Val Gln Thr Asn Ile Ser Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Glu Gln
[3693] 100 105 110
[3694] Leu Val Ala Leu Lys Pro Trp Ile Thr Arg Gln Asn Phe Ser Arg Cys
[3695] 115 120 125
[3696] Leu Glu Leu Gln Cys Gln Pro Asp Ser Ser Thr Leu Pro Pro Pro Trp
[3697] 130 135 140
[3698] Ser Pro Arg Pro Leu Glu Ala Thr Ala Pro
[3699] 145 150
[3700] <210> 116
[3701] <211> 93
[3702] <212> PRT
[3703] <213> 人工序列
[3704] <220>
[3705] <223> MIP1α氨基酸序列
[3706] <400> 116
[3707] Met Gln Val Ser Thr Ala Ala Leu Ala Val Leu Leu Cys Thr Met Ala
[3708] 1 5 10 15
[3709] Leu Cys Asn Gln Val Leu Ser Ala Pro Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr
[3710] 20 25 30
[3711] Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr Ser Arg Gln Ile Pro Gln Asn Phe Ile
[3712] 35 40 45
[3713] Ala Asp Tyr Phe Glu Thr Ser Ser Gln Cys Ser Lys Pro Ser Val Ile
[3714] 50 55 60
[3715] Phe Leu Thr Lys Arg Gly Arg Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Glu
[3716] 65 70 75 80
[3717] Trp Val Gln Lys Tyr Val Ser Asp Leu Glu Leu Ser Ala
[3718] 85 90
[3719] <210> 117
[3720] <211> 188
[3721] <212> PRT
[3722] <213> 人工序列
[3723] <220>
[3724] <223> IFNα氨基酸序列
[3725] <400> 117

[3726] Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
[3727] 1 5 10 15
[3728] Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
[3729] 20 25 30
[3730] Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser
[3731] 35 40 45
[3732] Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
[3733] 50 55 60
[3734] Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His
[3735] 65 70 75 80
[3736] Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser
[3737] 85 90 95
[3738] Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr
[3739] 100 105 110
[3740] Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val
[3741] 115 120 125
[3742] Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys
[3743] 130 135 140
[3744] Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro
[3745] 145 150 155 160
[3746] Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu
[3747] 165 170 175
[3748] Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
[3749] 180 185
[3750] <210> 118
[3751] <211> 125
[3752] <212> PRT
[3753] <213> 人工序列
[3754] <220>
[3755] <223> CXCL9氨基酸序列
[3756] <400> 118
[3757] Met Lys Lys Ser Gly Val Leu Phe Leu Leu Gly Ile Ile Leu Leu Val
[3758] 1 5 10 15
[3759] Leu Ile Gly Val Gln Gly Thr Pro Val Val Arg Lys Gly Arg Cys Ser
[3760] 20 25 30
[3761] Cys Ile Ser Thr Asn Gln Gly Thr Ile His Leu Gln Ser Leu Lys Asp
[3762] 35 40 45
[3763] Leu Lys Gln Phe Ala Pro Ser Pro Ser Cys Glu Lys Ile Glu Ile Ile
[3764] 50 55 60
[3765] Ala Thr Leu Lys Asn Gly Val Gln Thr Cys Leu Asn Pro Asp Ser Ala
[3766] 65 70 75 80
[3767] Asp Val Lys Glu Leu Ile Lys Lys Trp Glu Lys Gln Val Ser Gln Lys

[3768] 85 90 95
[3769] Lys Lys Gln Lys Asn Gly Lys Lys His Gln Lys Lys Lys Val Leu Lys
[3770] 100 105 110
[3771] Val Arg Lys Ser Gln Arg Ser Arg Gln Lys Lys Thr Thr
[3772] 115 120 125
[3773] <210> 119
[3774] <211> 98
[3775] <212> PRT
[3776] <213> 人工序列
[3777] <220>
[3778] <223> CXCL10氨基酸序列
[3779] <400> 119
[3780] Met Asn Gln Thr Ala Ile Leu Ile Cys Cys Leu Ile Phe Leu Thr Leu
[3781] 1 5 10 15
[3782] Ser Gly Ile Gln Gly Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys
[3783] 20 25 30
[3784] Ile Ser Ile Ser Asn Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu
[3785] 35 40 45
[3786] Glu Ile Ile Pro Ala Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala
[3787] 50 55 60
[3788] Thr Met Lys Lys Lys Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys
[3789] 65 70 75 80
[3790] Ala Ile Lys Asn Leu Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Arg Ser Lys Arg
[3791] 85 90 95
[3792] Ser Pro
[3793] <210> 120
[3794] <211> 35788
[3795] <212> DNA
[3796] <213> 人工序列
[3797] <220>
[3798] <223> NG-618基因组
[3799] <400> 120
[3800] tctatctata taatatacct tatagatgga atggtgccaa tatgtaaatg aggtgatttt 60
[3801] aaaaagtgtg gatcgtgtgg tgattggctg tggggttaac ggctaaaagg ggcggtgcga 120
[3802] ccgtgggaaa atgacgtttt gtgggggtgg agtttttttg caagttgtcg cgggaaatgt 180
[3803] gacgcataaa aaggcttttt tctcacggaa ctacttagtt ttcccacggt atttaacagg 240
[3804] aaatgaggta gttttgaccg gatgcaagtg aaaattgttg attttcgcgc gaaaactgaa 300
[3805] tgaggaagtg tttttctgaa taatgtggta tttatggcag ggtggagtat ttgttcaggg 360
[3806] ccaggtagac tttgacccat tacgtggagg tttcgattac cgtgtttttt acctgaattt 420
[3807] ccgcgtaccg tgtcaaagtc ttctgttttt acgtaggtgt cagctgatcg ctagggtatt 480
[3808] tatacctcag ggtttgtgtc aagaggccac tcttgagtgc cagcgagaag agttttctcc 540
[3809] tctgcgccgg cagtttaata ataaaaaaat gagagatttg cgatttctgc ctcaggaaat 600

[3810] aatctctgct gagactggaa atgaaatatt ggagcttgtg gtgcacgccc tgatgggaga 660
[3811] cgatccggag ccacctgtgc agctttttga gcctcctacg cttcaggaac tgtatgattt 720
[3812] agaggtagag ggatcggagg attctaatga ggaagctgta aatggctttt ttaccgattc 780
[3813] tatgctttta gctgctaatg aagggttaga attagatccg cctttggaca cttttgatac 840
[3814] tccaggggta attgtggaaa gcggtacagg tgtaagaaaa ttacctgatt tgagttccgt 900
[3815] ggactgtgat ttgcactgct atgaagacgg gtttcctccg agtgatgagg aggaccatga 960
[3816] aaaggagcag tccatgcaga ctgcagcggg tgagggagtg aaggctgcca atgttggttt 1020
[3817] tcagttggat tgcccggagc ttcctggaca tggctgtaag tcttgtgaat ttcacaggaa 1080
[3818] aaatactgga gtaaaggaac tgttatgttc gctttgttat atgagaacgc actgccactt 1140
[3819] tatttacagt aagtgtgttt aagttaaaat ttaaaggaat atgctgtttt tcacatgtat 1200
[3820] attgagtgtg agttttgtgc ttcttattat aggtcctgtg tctgatgctg atgaatcacc 1260
[3821] atctcctgat tctactacct cacctcctga gattcaagca cctgttcctg tggacgtgcg 1320
[3822] caagcccatt cctgtgaagc ttaagcctgg gaaacgtcca gcagtggaaa aacttgagga 1380
[3823] cttgttacag ggtggggacg gacctttgga cttgagtaca cggaaacgtc caagacaata 1440
[3824] agtgttccat atccgtgttt acttaaggtg acgtcaatat ttgtgtgaca gtgcaatgta 1500
[3825] ataaaaatat gttaactgtt cactggtttt tattgctttt tgggcgggga ctcaggtata 1560
[3826] taagtagaag cagacctgtg tggttagctc ataggagctg gctttcatcc atggaggttt 1620
[3827] gggccatttt ggaagacctt aggaagacta ggcaactgtt agagaacgct tcggacggag 1680
[3828] tctccggttt ttggagattc tggttcgcta gtgaattagc tagggtagtt tttaggataa 1740
[3829] aacaggacta taaacaagaa tttgaaaagt tgttggtaga ttgcccagga ctttttgaag 1800
[3830] ctcttaattt gggccatcag gttcacttta aagaaaaagt tttatcagtt ttagactttt 1860
[3831] caaccccagg tagaactgct gctgctgtgg cttttcttac ttttatatta gataaatgga 1920
[3832] tcccgcagac tcatttcagc aggggatacg ttttggattt catagccaca gcattgtgga 1980
[3833] gaacatggaa ggttcgcaag atgaggacaa tcttaggtta ctggccagtg cagcctttgg 2040
[3834] gtgtagcggg aatcctgagg catccaccgg tcatgccagc ggttctggag gaggaacagc 2100
[3835] aagaggacaa cccgagagcc ggcctggacc ctccagtgga ggaggcggag tagctgactt 2160
[3836] gtctcctgaa ctgcaacggg tgcttactgg atctacgtcc actggacggg ataggggcgt 2220
[3837] taagagggag agggcatcta gtggtactga tgctagatct gagttggctt taagtttaat 2280
[3838] gagtcgcaga cgtcctgaaa ccatttggtg gcatgaggtt cagaaagagg gaagggatga 2340
[3839] agtttctgta ttgcaggaga aatattcact ggaacaggtg aaaacatgtt ggttggagcc 2400
[3840] tgaggatgat tgggaggtgg ccattaaaaa ttatgccaag atagctttga ggcctgataa 2460
[3841] acagtataag attactagac ggattaatat ccggaatgct tgttacatat ctggaaatgg 2520
[3842] ggctgaggtg gtaatagata ctcaagacaa ggcagttatt agatgctgca tgatggatat 2580
[3843] gtggcctggg gtagtcggta tggaagcagt aacttttgta aatgttaagt ttaggggaga 2640
[3844] tggttataat ggaatagtgt ttatggccaa taccaaactt atattgcatg gttgtagctt 2700
[3845] ttttggtttc aacaatacct gtgtagatgc ctggggacag gttagtgtac ggggatgtag 2760
[3846] tttctatgcg tgttggattg ccacagctgg cagaaccaag agtcaattgt ctctgaagaa 2820
[3847] atgcatattt caaagatgta acctgggcat tctgaatgaa ggcgaagcaa gggtccgcca 2880
[3848] ctgcgcttct acagatactg gatgttttat tttgattaag ggaaatgcca gcgtaaagca 2940
[3849] taacatgatt tgcggtgctt ccgatgagag gccttatcaa atgctcactt gtgctggtgg 3000
[3850] gcattgtaat atgctggcta ctgtgcatat tgtttcccat caacgcaaaa aatggcctgt 3060
[3851] ttttgatcac aatgtgatga cgaagtgtac catgcatgca ggtgggcgta gaggaatgtt 3120

[3852] tatgccttac cagtgtaaca tgaatcatgt gaaagtgttg ttggaaccag atgccttttc 3180
[3853] cagaatgagc ctaacaggaa tttttgacat gaacatgcaa atctggaaga tcctgaggta 3240
[3854] tgatgatacg agatcgaggg tacgcgcatg cgaatgcgga ggcaagcatg ccaggttcca 3300
[3855] gccggtgtgt gtagatgtga ctgaagatct cagaccggat catttggtta ttgcccgcac 3360
[3856] tggagcagag ttcggatcca gtggagaaga aactgactaa ggtgagtatt gggaaaactt 3420
[3857] tggggtggga ttttcagatg gacagattga gtaaaaattt gtttttctg tcttgcagct 3480
[3858] gtcatgagtg gaaacgcttc ttttaagggg ggagtcttca gcccttatct gacagggcgt 3540
[3859] ctcccatcct gggcaggagt tcgtcagaat gttatgggat ctactgtgga tggaagaccc 3600
[3860] gtccaacccg ccaattcttc aacgctgacc tatgctactt taagttcttc acctttggac 3660
[3861] gcagctgcag ctgccgccgc cgcttctgtt gccgctaaca ctgtgcttgg aatgggttac 3720
[3862] tatggaagca tcatggctaa ttccacttcc tctaataacc cttctaccct gactcaggac 3780
[3863] aagttacttg tccttttggc ccagctggag gctttgaccc aacgtctggg tgaactttct 3840
[3864] cagcaggtgg tcgagttgcg agtacaaact gagtctgctg tcggcacggc aaagtctaaa 3900
[3865] taaaaaaatc ccagaatcaa tgaataaata aacaagcttg ttgttgattt aaaatcaagt 3960
[3866] gtttttattt catttttcgc gcacggtatg ccctagacca ccgatctcta tcattgagaa 4020
[3867] ctcggtggat tttttccagg atcctataga ggtgggattg aatgtttaga tacatgggca 4080
[3868] ttaggccgtc tttggggtgg agatagctcc attgaaggga ttcatgctcc ggggtagtgt 4140
[3869] tgtaaatcac ccagtcataa caaggtcgca gtgcatggtg ttgcacaata tcttttagaa 4200
[3870] gtaggctgat tgccacagat aagcccttgg tgtaggtgtt tacaaaccgg ttgagctggg 4260
[3871] atgggtgcat tcggggtgaa attatgtgca ttttggattg gatttttaag ttggcaatat 4320
[3872] tgccgccaag atcccgtctt gggttcatgt tatgaaggac caccaagacg gtgtatccgg 4380
[3873] tacatttagg aaatttatcg tgcagcttgg atggaaaagc gtggaaaaat ttggagacac 4440
[3874] ccttgtgtcc tccaagattt tccatgcact catccatgat aatagcaatg gggccgtggg 4500
[3875] cagcggcgcg ggcaaacacg ttccgtgggt ctgacacatc atagttatgt tcctgagtta 4560
[3876] aatcatcata agccatttta atgaatttgg ggcggagagt accagattgg ggtatgaatg 4620
[3877] ttccttcggg ccccggagca tagttcccct cacagatttg catttcccaa gctttcagtt 4680
[3878] ccgagggtgg aatcatgtcc acctgggggg ctatgaaaaa caccgtttct ggggcggggg 4740
[3879] tgattaattg tgatgatagc aaatttctga gcaattgaga tttgccacat ccggtggggc 4800
[3880] cataaatgat tccgattacg ggttgcaggt ggtagtttag ggaacggcaa ctgccgtctt 4860
[3881] ctcgaagcaa gggggccacc tcgttcatca tttcccttac atgcatattt tcccgcacca 4920
[3882] aatccattag gaggcgctct cctcctagtg atagaagttc ttgtagtgag gaaaagtttt 4980
[3883] tcagcggttt cagaccgtca gccatgggca ttttggagag agtttgctgc aaaagttcta 5040
[3884] gtctgttcca cagttcagtg atgtgttcta tggcatctcg atccagcaga cctcctcgtt 5100
[3885] tcgcgggttt ggacggctcc tggaataggg tatgagacga tgggcgtcca gcgctgccag 5160
[3886] ggttcggtcc ttccagggtc tcagtgttcg agtcagggtt gtttccgtca cagtgaaggg 5220
[3887] gtgtgcgcct gcttgggcgc ttgccagggt gcgcttcaga ctcatcctgc tggtcgaaaa 5280
[3888] cttctgtcgc ttggcgccct gtatgtcggc caagtagcag tttaccatga gttcgtagtt 5340
[3889] gagcgcctcg gctgcgtggc ctttggcgcg gagcttacct ttggaagttt tcttgcatac 5400
[3890] cgggcagtat aggcatttca gcgcatacaa cttgggcgca aggaaaacgg attctgggga 5460
[3891] gtatgcatct gcgccgcagg aggcgcaaac agtttcacat tccaccagcc aggttaaatc 5520
[3892] cggttcattg gggtcaaaaa caagttttcc gccatatttt ttgatgcgtt tcttaccttt 5580
[3893] ggtctccatg agttcgtgtc ctcgttgagt gacaaacagg ctgtccgtgt ccccgtagac 5640

[3894] tgattttaca ggcctcttct ccagtggagt gcctcggtct tcttcgtaca ggaactctga 5700
[3895] ccactctgat acaaaggcgc gcgtccaggc cagcacaaag gaggctatgt gggaggggta 5760
[3896] gcgatcgttg tcaaccaggg ggtccacctt ttccaaagta tgcaaacaca tgtcaccctc 5820
[3897] ttcaacatcc aggaatgtga ttggcttgta ggtgtatttc acgtgacctg gggtccccgc 5880
[3898] tgggggggta taaaaggggg cggttctttg ctcttcctca ctgtcttccg gatcgctgtc 5940
[3899] caggaacgtc agctgttggg gtaggtattc cctctcgaag gcgggcatga cctctgcact 6000
[3900] caggttgtca gtttctaaga acgaggagga tttgatattg acagtgccgg ttgagatgcc 6060
[3901] tttcatgagg ttttcgtcca tctggtcaga aaacacaatt tttttattgt caagtttggt 6120
[3902] ggcaaatgat ccatacaggg cgttggataa aagtttggca atggatcgca tggtttggtt 6180
[3903] cttttccttg tccgcgcgct ctttggcggc gatgttgagt tggacatact cgcgtgccag 6240
[3904] gcacttccat tcggggaaga tagttgttaa ttcatctggc acgattctca cttgccaccc 6300
[3905] tcgattatgc aaggtaatta aatccacact ggtggccacc tcgcctcgaa ggggttcatt 6360
[3906] ggtccaacag agcctacctc ctttcctaga acagaaaggg ggaagtgggt ctagcataag 6420
[3907] ttcatcggga gggtctgcat ccatggtaaa gattcccgga agtaaatcct tatcaaaata 6480
[3908] gctgatggga gtggggtcat ctaaggccat ttgccattct cgagctgcca gtgcgcgctc 6540
[3909] atatgggtta aggggactgc cccatggcat gggatgggtg agtgcagagg catacatgcc 6600
[3910] acagatgtca tagacgtaga tgggatcctc aaagatgcct atgtaggttg gatagcatcg 6660
[3911] ccccccctctg atacttgctc gcacatagtc atatagttca tgtgatggcg ctagcagccc 6720
[3912] cggacccaag ttggtgcgat tgggtttttc tgttctgtag acgatctggc gaaagatggc 6780
[3913] gtgagaattg gaagagatgg tgggtctttg aaaaatgttg aaatgggcat gaggtagacc 6840
[3914] tacagagtct ctgacaaagt gggcataaga ttcttgaagc ttggttacca gttcggcggt 6900
[3915] gacaagtacg tctagggcgc agtagtcaag tgtttcttga atgatgtcat aacctggttg 6960
[3916] gtttttcttt tcccacagtt cgcggttgag aaggtattct tcgcgatcct tccagtactc 7020
[3917] ttctagcgga aacccgtctt tgtctgcacg gtaagatcct agcatgtaga actgattaac 7080
[3918] tgccttgtaa gggcagcagc ccttctctac gggtagagag tatgcttgag cagcttttcg 7140
[3919] tagcgaagcg tgagtaaggg caaaggtgtc tctgaccatg actttgagga attggtattt 7200
[3920] gaagtcgatg tcgtcacagg ctccctgttc ccagagttgg aagtctaccc gtttcttgta 7260
[3921] ggcggggttg ggcaaagcga aagtaacatc attgaagaga atcttgccgg ccctgggcat 7320
[3922] gaaattgcga gtgatgcgaa aaggctgtgg tacttccgct cggttattga taacctgggc 7380
[3923] agctaggacg atctcgtcga aaccgttgat gttgtgtcct acgatgtata attctatgaa 7440
[3924] acgcggcgtg cctctgacgt gaggtagctt actgagctca tcaaaggtta ggtctgtggg 7500
[3925] gtcagataag gcgtagtgtt cgagagccca ttcgtgcagg tgaggattcg ctttaaggaa 7560
[3926] ggaggaccag aggtccactg ccagtgctgt ttgtaactgg tcccggtact gacgaaaatg 7620
[3927] ccgtccgact gccatttttt ctggggtgac gcaatagaag gtttgggggt cctgccgcca 7680
[3928] gcgatcccac ttgagtttta tggcgaggtc ataggcgatg ttgacgagcc gctggtctcc 7740
[3929] agagagtttc atgaccagca tgaaggggat tagctgcttg ccaaaggacc ccatccaggt 7800
[3930] gtaggtttcc acatcgtagg tgagaaagag cctttctgtg cgaggatgag agccaatcgg 7860
[3931] gaagaactgg atctcctgcc accagttgga ggaatggctg ttgatgtgat ggaagtagaa 7920
[3932] ctccctgcga cgcgccgagc attcatgctt gtgcttgtac agacggccgc agtagtcgca 7980
[3933] gcgttgcacg ggttgtatct cgtgaatgag ttgtacctgg cttcccttga cgagaaattt 8040
[3934] cagtgggaag ccgaggcctg gcgattgtat ctcgtgcttt actatgttgt ctgcatcggc 8100
[3935] ctgttcatct tctgtctcga tggtggtcat gctgacgagc cctcgcggga ggcaagtcca 8160

[3936] gacctcggcg cggcaggggc ggagctcgag gacgagagcg cgcaggctgg agctgtccag 8220
[3937] ggtcctgaga cgctgcggac tcaggttagt aggcagtgtc aggagattaa cttgcatgat 8280
[3938] cttttggagg gcgtgcggga ggttcagata gtacttgatc tcaacgggtc cgttggtgga 8340
[3939] gatgtcgatg gcttgcaggg ttccgtgtcc cttgggcgct accaccgtgc ccttgttttt 8400
[3940] cattttggac ggcggtggct ctgttgcttc ttgcatgttt agaagcggtg tcgagggcgc 8460
[3941] gcaccgggcg gcaggggcgg ctcgggaccc ggcggcatgg ctggcagtgg tacgtcggcg 8520
[3942] ccgcgcgcgg gtaggttctg gtactgcgcc ctgagaagac tcgcatgcgc gacgacgcgg 8580
[3943] cggttgacat cctggatctg acgcctctgg gtgaaagcta ccggccccgt gagcttgaac 8640
[3944] ctgaaagaga gttcaacaga atcaatctcg gtatcgttga cggcggcttg cctaaggatt 8700
[3945] tcttgcacgt caccagagtt gtcctggtag gcgatctccg ccatgaactg ctcgatctct 8760
[3946] tcctcttgaa gatctccgcg gcccgctctc tcgacggtgg ccgcgaggtc gttggagatg 8820
[3947] cgcccaatga gttgagagaa tgcattcatg cccgcctcgt tccagacgcg gctgtagacc 8880
[3948] acggccccca cgggatctct cgcgcgcatg accacctggg cgaggttgag ctccacgtgg 8940
[3949] cgggtgaaga ccgcatagtt gcataggcgc tggaaaaggt agttgagtgt ggtggcgatg 9000
[3950] tgctcggtga cgaagaaata catgatccat cgtctcagcg gcatctcgct gacatcgccc 9060
[3951] agagcttcca agcgctccat ggcctcgtag aagtccacgg caaaattaaa aaactgggag 9120
[3952] tttcgcgcgg acacggtcaa ctcctcttcc agaagacgga taagttcggc gatggtggtg 9180
[3953] cgcacctcgc gctcgaaagc ccctgggatt tcttcctcaa tctcttcttc ttccactaac 9240
[3954] atctcttcct cttcaggtgg ggctgcagga ggagggggaa cgcggcgacg ccggcggcgc 9300
[3955] acgggcagac ggtcgatgaa tctttcaatg acctctccgc ggcggcggcg catggtttca 9360
[3956] gtgacggcgc ggccgttctc gcgcggtcgc agagtaaaaa caccgccgcg catctcctta 9420
[3957] aagtggtgac tgggaggttc tccgtttggg agggagaggg cgctgattat acattttatt 9480
[3958] aattggcccg tagggactgc acgcagagat ctgatcgtgt caagatccac gggatctgaa 9540
[3959] aacctttcga cgaaagcgtc taaccagtca cagtcacaag gtaggctgag tacggcttct 9600
[3960] tgtgggcggg ggtggttatg tgttcggtct gggtcttctg tttcttcttc atctcgggaa 9660
[3961] ggtgagacga tgctgctggt gatgaaatta aagtaggcag ttctaagacg gcggatggtg 9720
[3962] gcgaggagca ccaggtcttt gggtccggct tgctggatac gcaggcgatt ggccattccc 9780
[3963] caagcattat cctgacatct agcaagatct ttgtagtagt cttgcatgag ccgttctacg 9840
[3964] ggcacttctt cctcacccgt tctgccatgc atacgtgtga gtccaaatcc gcgcattggt 9900
[3965] tgtaccagtg ccaagtcagc tacgactctt tcggcgagga tggcttgctg tacttgggta 9960
[3966] agggtggctt gaaagtcatc aaaatccaca aagcggtggt aagctcctgt attaatggtg 10020
[3967] taagcacagt tggccatgac tgaccagtta actgtctggt gaccagggcg cacgagctcg 10080
[3968] gtgtatttaa ggcgcgaata ggcgcgggtg tcaaagatgt aatcgttgca ggtgcgcacc 10140
[3969] agatactggt accctataag aaaatgcggc ggtggttggc ggtagagagg ccatcgttct 10200
[3970] gtagctggag cgccaggggc gaggtcttcc aacataaggc ggtgatagcc gtagatgtac 10260
[3971] ctggacatcc aggtgattcc tgcggcggta gtagaagccc gaggaaactc gcgtacgcgg 10320
[3972] ttccaaatgt tgcgtagcgg catgaagtag ttcattgtag gcacggtttg accagtgagg 10380
[3973] cgcgcgcagt cattgatgct ctatagacac ggagaaaatg aaagcgttca gcgactcgac 10440
[3974] tccgtagcct ggaggaacgt gaacgggttg ggtcgcggtg taccccggtt cgagacttgt 10500
[3975] actcgagccg gccggagccg cggctaacgt ggtattggca ctcccgtctc gacccagcct 10560
[3976] acaaaaatcc aggatacgga atcgagtcgt tttgctggtt tccgaatggc agggaagtga 10620
[3977] gtcctatttt tttttttgc cgctcagatg catcccgtgc tgcgacagat gcgcccccaa 10680

[3978] caacagcccc cctcgcagca gcagcagcag caatcacaaa aggctgtccc tgcaactact 10740
[3979] gcaactgccg ccgtgagcgg tgcgggacag cccgcctatg atctggactt ggaagagggc 10800
[3980] gaaggactgg cacgtctagg tgcgccttca cccgagcggc atccgcgagt tcaactgaaa 10860
[3981] aaagattctc gcgaggcgta tgtgccccaa cagaacctat ttagagacag aagcggcgag 10920
[3982] gagccggagg agatgcgagc ttcccgcttt aacgcgggtc gtgagctgcg tcacggtttg 10980
[3983] gaccgaagac gagtgttgcg ggacgaggat ttcgaagttg atgaaatgac agggatcagt 11040
[3984] cctgccaggg cacacgtggc tgcagccaac cttgtatcgg cttacgagca gacagtaaag 11100
[3985] gaagagcgta acttccaaaa gtcttttaat aatcatgtgc gaaccctgat tgcccgcgaa 11160
[3986] gaagttaccc ttggtttgat gcatttgtgg gatttgatgg aagctatcat tcagaaccct 11220
[3987] actagcaaac ctctgaccgc ccagctgttt ctggtggtgc aacacagcag agacaatgag 11280
[3988] gctttcagag aggcgctgct gaacatcacc gaacccgagg ggagatggtt gtatgatctt 11340
[3989] atcaacattc tacagagtat catagtgcag gagcggagcc tgggcctggc cgagaaggtg 11400
[3990] gctgccatca attactcggt tttgagcttg ggaaaatatt acgctcgcaa aatctacaag 11460
[3991] actccatacg ttcccataga caaggaggtg aagatagatg ggttctacat gcgcatgacg 11520
[3992] ctcaaggtct tgaccctgag cgatgatctt ggggtgtatc gcaatgacag aatgcatcgc 11580
[3993] gcggttagcg ccagcaggag gcgcgagtta agcgacaggg aactgatgca cagtttgcaa 11640
[3994] agagctctga ctggagctgg aaccgagggt gagaattact tcgacatggg agctgacttg 11700
[3995] cagtggcagc ctagtcgcag ggctctgagc gccgcgacgg caggatgtga gcttccttac 11760
[3996] atagaagagg cggatgaagg cgaggaggaa gagggcgagt acttggaaga ctgatggcac 11820
[3997] aacccgtgtt ttttgctaga tggaacagca agcaccggat cccgcaatgc gggcggcgct 11880
[3998] gcagagccag ccgtccggca ttaactcctc ggacgattgg acccaggcca tgcaacgtat 11940
[3999] catggcgttg acgactcgca accccgaagc ctttagacag caaccccagg ccaaccgtct 12000
[4000] atcggccatc atggaagctg tagtgccttc ccgctctaat cccactcatg agaaggtcct 12060
[4001] ggccatcgtg aacgcgttgg tggagaacaa agctattcgt ccagatgagg ccggactggt 12120
[4002] atacaacgct ctcttagaac gcgtggctcg ctacaacagt agcaatgtgc aaaccaattt 12180
[4003] ggaccgtatg ataacagatg tacgcgaagc cgtgtctcag cgcgaaaggt tccagcgtga 12240
[4004] tgccaacctg ggttcgctgg tggcgttaaa tgctttcttg agtactcagc ctgctaatgt 12300
[4005] gccgcgtggt caacaggatt atactaactt tttaagtgct ttgagactga tggtatcaga 12360
[4006] agtacctcag agcgaagtgt atcagtccgg tcctgattac ttctttcaga ctagcagaca 12420
[4007] gggcttgcag acggtaaatc tgagccaagc ttttaaaaac cttaaaggtt tgtggggagt 12480
[4008] gcatgccccg gtaggagaaa gagcaaccgt gtctagcttg ttaactccga actcccgcct 12540
[4009] attattactg ttggtagctc ctttcaccga cagcggtagc atcgaccgta attcctattt 12600
[4010] gggttaccta ctaaacctgt atcgcgaagc catagggcaa agtcaggtgg acgagcagac 12660
[4011] ctatcaagaa attacccaag tcagtcgcgc tttgggacag gaagacactg gcagtttgga 12720
[4012] agccactctg aacttcttgc ttaccaatcg gtctcaaaag atccctcctc aatatgctct 12780
[4013] tactgcggag gaggagagga tccttagata tgtgcagcag agcgtgggat tgtttctgat 12840
[4014] gcaagagggg gcaactccga ctgcagcact ggacatgaca gcgcgaaata tggagcccag 12900
[4015] catgtatgcc agtaaccgac ctttcattaa caaactgctg gactacttgc acagagctgc 12960
[4016] cgctatgaac tctgattatt tcaccaatgc catcttaaac ccgcactggc tgcccccacc 13020
[4017] tggtttctac acgggcgaat atgacatgcc cgaccctaat gacggatttc tgtgggacga 13080
[4018] cgtggacagc gatgtttttt cacctctttc tgatcatcgc acgtggaaaa aggaaggcgg 13140
[4019] cgatagaatg cattcttctg catcgctgtc cggggtcatg ggtgctaccg cggctgagcc 13200

[4020] cgagtctgca agtccttttc ctagtctacc cttttctcta cacagtgtac gtagcagcga 13260
[4021] agtgggtaga ataagtcgcc cgagtttaat gggcgaagag gagtatctaa acgattcctt 13320
[4022] gctcagaccg gcaagagaaa aaaatttccc aaacaatgga atagaaagtt tggtggataa 13380
[4023] aatgagtaga tggaagactt atgctcagga tcacagagac gagcctggga tcatggggat 13440
[4024] tacaagtaga gcgagccgta gacgccagcg ccatgacaga cagaggggtc ttgtgtggga 13500
[4025] cgatgaggat tcggccgatg atagcagcgt gctggacttg ggtgggagag gaaggggcaa 13560
[4026] cccgtttgct catttgcgcc ctcgcttggg tggtatgttg taaaaaaaaa taaaaaaaaa 13620
[4027] actcaccaag gccatggcga cgagcgtacg ttcgttcttc tttattatct gtgtctagta 13680
[4028] taatgaggcg agtcgtgcta ggcggagcgg tggtgtatcc ggagggtcct cctccttcgt 13740
[4029] acgagagcgt gatgcagcag cagcaggcga cggcggtgat gcaatcccca ctggaggctc 13800
[4030] cctttgtgcc tccgcgatac ctggcaccta cggagggcag aaacagcatt cgttattcgg 13860
[4031] aactggcacc tcagtacgat accaccaggt tgtatctggt ggacaacaag tcggcggaca 13920
[4032] ttgcttctct gaactatcag aatgaccaca gcaacttctt gaccacggtg gtgcaaaaca 13980
[4033] atgactttac ccctacggaa gccagcaccc agaccattaa ctttgatgaa cgatcgcggt 14040
[4034] ggggcggtca gctaaagacc atcatgcata ctaacatgcc aaacgtgaac gagtatatgt 14100
[4035] ttagtaacaa gttcaaagcg cgtgtgatgg tgtccagaaa acctcccgac ggtgctgcag 14160
[4036] ttggggatac ttatgatcac aagcaggata ttttgaaata tgagtggttc gagtttactt 14220
[4037] tgccagaagg caacttttca gttactatga ctattgattt gatgaacaat gccatcatag 14280
[4038] ataattactt gaaagtgggt agacagaatg gagtgcttga aagtgacatt ggtgttaagt 14340
[4039] tcgacaccag gaacttcaag ctgggatggg atcccgaaac caagttgatc atgcctggag 14400
[4040] tgtatacgta tgaagccttc catcctgaca ttgtcttact gcctggctgc ggagtggatt 14460
[4041] ttaccgagag tcgtttgagc aaccttcttg gtatcagaaa aaaacagcca tttcaagagg 14520
[4042] gttttaagat tttgtatgaa gatttagaag gtggtaatat tccggccctc ttggatgtag 14580
[4043] atgcctatga gaacagtaag aaagaacaaa aagccaaaat agaagctgct acagctgctg 14640
[4044] cagaagctaa ggcaaacata gttgccagcg actctacaag ggttgctaac gctggagagg 14700
[4045] tcagaggaga caattttgcg ccaacacctg ttccgactgc agaatcatta ttggccgatg 14760
[4046] tgtctgaagg aacggacgtg aaactcacta ttcaacctgt agaaaaagat agtaagaata 14820
[4047] gaagctataa tgtgttggaa gacaaaatca acacagccta tcgcagttgg tatctttcgt 14880
[4048] acaattatgg cgatcccgaa aaaggagtgc gttcctggac attgctcacc acctcagatg 14940
[4049] tcacctgcgg agcagagcag gtctactggt cgcttccaga catgatgaag gatcctgtca 15000
[4050] ctttccgctc cactagacaa gtcagtaact accctgtggt gggtgcagag cttatgcccg 15060
[4051] tcttctcaaa gagcttctac aacgaacaag ctgtgtactc ccagcagctc cgccagtcca 15120
[4052] cctcgcttac gcacgtcttc aaccgctttc ctgagaacca gattttaatc cgtccgccgg 15180
[4053] cgcccaccat taccaccgtc agtgaaaacg ttcctgctct cacagatcac gggaccctgc 15240
[4054] cgttgcgcag cagtatccgg ggagtccaac gtgtgaccgt tactgacgcc agacgccgca 15300
[4055] cctgtcccta cgtgtacaag gcactgggca tagtcgcacc gcgcgtcctt tcaagccgca 15360
[4056] ctttctaaaa aaaaaaaaaa tgtccattct tatctcgccc agtaataaca ccggttgggg 15420
[4057] tctgcgcgct ccaagcaaga tgtacggagg cgcacgcaaa cgttctaccc aacatcctgt 15480
[4058] ccgtgttcgc ggacattttc gcgctccatg gggcgccctc aagggccgca ctcgcgttcg 15540
[4059] aaccaccgtc gatgatgtaa tcgatcaggt ggttgccgac gcccgtaatt atactcctac 15600
[4060] tgcgcctaca tctactgtgg atgcagttat tgacagtgta gtggctgacg ctcgcaacta 15660
[4061] tgctcgacgt aagagccggc gaaggcgcat tgccagacgc caccgagcta ccactgccat 15720

[4062] gcgagccgca agagctctgc tacgaagagc tagacgcgtg gggcgaagag ccatgcttag 15780
[4063] ggcggccaga cgtgcagctt cgggcgccag cgccggcagg tcccgcaggc aagcagccgc 15840
[4064] tgtcgcagcg gcgactattg ccgacatggc ccaatcgcga agaggcaatg tatactgggt 15900
[4065] gcgtgacgct gccaccggtc aacgtgtacc cgtgcgcacc cgtccccctc gcacttagaa 15960
[4066] gatactgagc agtctccgat gttgtgtccc agcggcgagg atgtccaagc gcaaatacaa 16020
[4067] ggaagaaatg ctgcaggtta tcgcacctga agtctacggc caaccgttga aggatgaaaa 16080
[4068] aaaaccccgc aaaatcaagc gggttaaaaa ggacaaaaaa gaagaggaag atggcgatga 16140
[4069] tgggctggcg gagtttgtgc gcgagtttgc cccacggcga cgcgtgcaat ggcgtgggcg 16200
[4070] caaagttcga catgtgttga gacctggaac ttcggtggtc tttacacccg gcgagcgttc 16260
[4071] aagcgctact tttaagcgtt cctatgatga ggtgtacggg gatgatgata ttcttgagca 16320
[4072] ggcggctgac cgattaggcg agtttgctta tggcaagcgt agtagaataa cttccaagga 16380
[4073] tgagacagtg tcgataccct tggatcatgg aaatcccacc cctagtctta aaccggtcac 16440
[4074] tttgcagcaa gtgttacccg taactccgcg aacaggtgtt aaacgcgaag gtgaagattt 16500
[4075] gtatcccact atgcaactga tggtacccaa acgccagaag ttggaggacg ttttggagaa 16560
[4076] agtaaaagtg gatccagata ttcaacctga ggttaaagtg agacccatta agcaggtagc 16620
[4077] gcctggtctg ggggtacaaa ctgtagacat taagattccc actgaaagta tggaagtgca 16680
[4078] aactgaaccc gcaaagccta ctgccacctc cactgaagtg caaacggatc catggatgcc 16740
[4079] catgcctatt acaactgacg ccgccggtcc cactcgaaga tcccgacgaa agtacggtcc 16800
[4080] agcaagtctg ttgatgccca attatgttgt acacccatct attattccta ctcctggtta 16860
[4081] ccgaggcact cgctactatc gcagccgaaa cagtacctcc cgccgtcgcc gcaagacacc 16920
[4082] tgcaaatcgc agtcgtcgcc gtagacgcac aagcaaaccg actcccggcg ccctggtgcg 16980
[4083] gcaagtgtac cgcaatggta gtgcggaacc tttgacactg ccgcgtgcgc gttaccatcc 17040
[4084] gagtatcatc acttaatcaa tgttgccgct gcctccttgc agatatggcc ctcacttgtc 17100
[4085] gccttcgcgt tcccatcact ggttaccgag gaagaaactc gcgccgtaga agagggatgt 17160
[4086] tgggacgcgg aatgcgacgc tacaggcgac ggcgtgctat ccgcaagcaa ttgcggggtg 17220
[4087] gtttttacc agccttaatt ccaattatcg ctgctgcaat tggcgcgata ccaggcatag 17280
[4088] cttccgtggc ggttcaggcc tcgcaacgac attgacattg gaaaaaaacg tataaataaa 17340
[4089] aaaaaaaaaa tacaatggac tctgacactc ctggtcctgt gactatgttt tcttagagat 17400
[4090] ggaagacatc aatttttcat ccttggctcc gcgacacggc acgaagccgt acatgggcac 17460
[4091] ctggagcgac atcggcacga gccaactgaa cgggggcgcc ttcaattgga gcagtatctg 17520
[4092] gagcgggctt aaaaattttg gctcaaccat aaaaacatac gggaacaaag cttggaacag 17580
[4093] cagtacagga caggcgctta gaaataaact taaagaccag aacttccaac aaaaagtagt 17640
[4094] cgatgggata gcttccggca tcaatggagt ggtagatttg gctaaccagg ctgtgcagaa 17700
[4095] aaagataaac agtcgtttgg acccgccgcc agcaacccca ggtgaaatgc aagtggagga 17760
[4096] agaaattcct ccgccagaaa aacgaggcga caagcgtccg cgtcccgatt tggaagagac 17820
[4097] gctggtgacg cgcgtagatg aaccgccttc ttatgaggaa gcaacgaagc ttggaatgcc 17880
[4098] caccactaga ccgatagccc caatggccac cggggtgatg aaaccttctc agttgcatcg 17940
[4099] acccgtcacc ttggatttgc cccctccccc tgctgctact gctgtacccg cttctaagcc 18000
[4100] tgtcgctgcc ccgaaaccag tcgccgtagc caggtcacgt cccgggggcg ctcctcgtcc 18060
[4101] aaatgcgcac tggcaaaata ctctgaacag catcgtgggt ctaggcgtgc aaagtgtaaa 18120
[4102] acgccgtcgc tgcttttaat taaatatgga gtagcgctta acttgcctat ctgtgtatat 18180
[4103] gtgtcattac acgccgtcac agcagcagag gaaaaaagga agaggtcgtg cgtcgacgct 18240

[4104] gagttacttt caagatggcc accccatcga tgctgcccca atgggcatac atgcacatcg 18300
[4105] ccggacagga tgcttcggag tacctgagtc cgggtctggt gcagttcgcc cgcgccacag 18360
[4106] acacctactt caatctggga aataagttta gaaatcccac cgtagcgccg acccacgatg 18420
[4107] tgaccaccga ccgtagccag cggctcatgt tgcgcttcgt gcccgttgac cgggaggaca 18480
[4108] atacatactc ttacaaagtg cggtacaccc tggccgtggg cgacaacaga gtgctggata 18540
[4109] tggccagcac gttctttgac attaggggtg tgttggacag aggtcccagt ttcaaaccct 18600
[4110] attctggtac ggcttacaac tccctggctc ctaaaggcgc tccaaataca tctcagtgga 18660
[4111] ttgcagaagg tgtaaaaaat acaactggtg aggaacacgt aacagaagag gaaaccaata 18720
[4112] ctactactta cacttttggc aatgctcctg taaaagctga agctgaaatt acaaaagaag 18780
[4113] gactcccagt aggtttggaa gtttcagatg aagaaagtaa accgatttat gctgataaaa 18840
[4114] catatcagcc agaacctcag ctgggagatg aaacttggac tgaccttgat ggaaaaaccg 18900
[4115] aaaagtatgg aggcagggct ctcaaacccg atactaagat gaaaccatgc tacgggtcct 18960
[4116] ttgccaaacc tactaatgtg aaaggcggtc aggcaaaaca aaaaacaacg gagcagccaa 19020
[4117] atcagaaagt cgaatatgat atcgacatgg agttttttga tgcggcatcg cagaaaacaa 19080
[4118] acttaagtcc taaaattgtc atgtatgcag aaaatgtaaa tttggaaact ccagacactc 19140
[4119] atgtagtgta caaacctgga acagaagaca caagttccga agctaatttg ggacaacaat 19200
[4120] ctatgcccaa cagacccaac tacattggct tcagagataa ctttattgga cttatgtact 19260
[4121] ataacagtac tggtaacatg ggggtgctgg ctggtcaagc gtctcagtta aatgcagtgg 19320
[4122] ttgacttgca ggacagaaac acagaacttt cttaccaact cttgcttgac tctctgggcg 19380
[4123] acagaaccag atactttagc atgtggaatc aggctgtgga cagttatgat cctgatgtac 19440
[4124] gtgttattga aaatcatggt gtggaagatg aacttcccaa ctactgtttt ccactggacg 19500
[4125] gcataggtgt tccaacaacc agttacaaat caatagttcc aaatggagac aatgcgccta 19560
[4126] attggaagga acctgaagta aatggaacaa gtgagatcgg acagggtaat ttgtttgcca 19620
[4127] tggaaattaa ccttcaagcc aatctatggc gaagtttcct ttattccaat gtggctctat 19680
[4128] atctcccaga ctcgtacaaa tacaccccgt ccaatgtcac tcttccagaa aacaaaaaca 19740
[4129] cctacgacta catgaacggg cgggtggtgc cgccatctct agtagacacc tatgtgaaca 19800
[4130] ttggtgccag gtggtctctg gatgccatgg acaatgtcaa cccattcaac caccaccgta 19860
[4131] acgctggctt gcgttaccga tccatgcttc tgggtaacgg acgttatgtg cctttccaca 19920
[4132] tacaagtgcc tcaaaaattc ttcgctgtta aaaacctgct gcttctccca ggctcctaca 19980
[4133] cttatgagtg gaactttagg aaggatgtga acatggttct acagagttcc ctcggtaacg 20040
[4134] acctgcgggt agatggcgcc agcatcagtt tcacgagcat caacctctat gctacttttt 20100
[4135] tccccatggc tcacaacacc gcttccaccc ttgaagccat gctgcggaat gacaccaatg 20160
[4136] atcagtcatt caacgactac ctatctgcag ctaacatgct ctaccccatt cctgccaatg 20220
[4137] caaccaatat tcccatttcc attccttctc gcaactgggc ggctttcaga ggctggtcat 20280
[4138] ttaccagact gaaaaccaaa gaaactccct ctttggggtc tggatttgac ccctactttg 20340
[4139] tctattctgg ttctattccc tacctggatg gtaccttcta cctgaaccac acttttaaga 20400
[4140] aggtttccat catgtttgac tcttcagtga gctggcctgg aaatgacagg ttactatctc 20460
[4141] ctaacgaatt tgaaataaag cgcactgtgg atggcgaagg ctacaacgta gcccaatgca 20520
[4142] acatgaccaa agactggttc ttggtacaga tgctcgccaa ctacaacatc ggctatcagg 20580
[4143] gcttctacat tccagaagga tacaaagatc gcatgtattc atttttcaga aacttccagc 20640
[4144] ccatgagcag gcaggtggtt gatgaggtca attacaaaga cttcaaggcc gtcgccatac 20700
[4145] cctaccaaca caacaactct ggctttgtgg gttacatggc tccgaccatg cgccaaggtc 20760

[4146] aaccctatcc cgctaactat ccctatccac tcattggaac aactgccgta aatagtgtta 20820
[4147] cgcagaaaaa gttcttgtgt gacagaacca tgtggcgcat accgttctcg agcaacttca 20880
[4148] tgtctatggg ggcccttaca gacttgggac agaatatgct ctatgccaac tcagctcatg 20940
[4149] ctctggacat gacctttgag gtggatccca tggatgagcc caccctgctt tatcttctct 21000
[4150] tcgaagtttt cgacgtggtc agagtgcatc agccacaccg cggcatcatc gaggcagtct 21060
[4151] acctgcgtac accgttctcg gccggtaacg ctaccacgta agaagcttct tgcttcttgc 21120
[4152] aaatagcagc tgcaaccatg gcctgcggat cccaaaacgg ctccagcgag caagagctca 21180
[4153] gagccattgt ccaagacctg ggttgcggac cctatttttt gggaacctac gataagcgct 21240
[4154] tcccggggtt catggccccc gataagctcg cctgtgccat tgtaaatacg gccggacgtg 21300
[4155] agacgggggg agagcactgg ttggctttcg gttggaaccc acgttctaac acctgctacc 21360
[4156] tttttgatcc ttttggattc tcggatgatc gtctcaaaca gatttaccag tttgaatatg 21420
[4157] agggtctcct gcgccgcagc gctcttgcta ccaaggaccg ctgtattacg ctggaaaaat 21480
[4158] ctacccagac cgtgcagggt ccccgttctg ccgcctgcgg acttttctgc tgcatgttcc 21540
[4159] ttcacgcctt tgtgcactgg cctgaccgtc ccatggacgg aaaccccacc atgaaattgc 21600
[4160] taactggagt gccaaacaac atgcttcatt ctcctaaagt ccagcccacc ctgtgtgaca 21660
[4161] atcaaaaagc actctaccat tttcttaata cccattcgcc ttattttcgc tcccatcgta 21720
[4162] cacacatcga aagggccact gcgttcgacc gtatggatgt tcaataatga ctcatgtaaa 21780
[4163] caacgtgttc aataaacatc actttatttt tttacatgta tcaaggctct gcattactta 21840
[4164] tttatttaca agtcgaatgg gttctgacga gaatcagaat gacccgcagg cagtgatacg 21900
[4165] ttgcggaact gatacttggg ttgccacttg aattcgggaa tcaccaactt gggaaccggt 21960
[4166] atatcgggca ggatgtcact ccacagcttt ctggtcagct gcaaagctcc aagcaggtca 22020
[4167] ggagccgaaa tcttgaaatc acaattagga ccagtgcttt gagcgcgaga gttgcggtac 22080
[4168] accggattgc agcactgaaa caccatcagc gacggatgtc tcacgcttgc cagcacggtg 22140
[4169] ggatctgcaa tcatgcccac atccagatct tcagcattgg caatgctgaa cggggtcatc 22200
[4170] ttgcaggtct gcctacccat ggcgggcacc caattaggct tgtggttgca atcgcagtgc 22260
[4171] agggggatca gtatcatctt ggcctgatcc tgtctgattc ctggatacac ggctctcatg 22320
[4172] aaagcatcat attgcttgaa agcctgctgg gctttactac cctcggtata aaacatcccg 22380
[4173] caggacctgc tcgaaaactg gttagctgca cagccggcat cattcacaca gcagcgggcg 22440
[4174] tcattgttag ctatttgcac cacacttctg ccccagcggt tttgggtgat tttggttcgc 22500
[4175] tcgggattct cctttaaggc tcgttgtccg ttctcgctgg ccacatccat ctcgataatc 22560
[4176] tgctccttct gaatcataat attgccatgc aggcacttca gcttgccctc ataatcattg 22620
[4177] cagccatgag gccacaacgc acagcctgta cattcccaat tatggtgggc gatctgagaa 22680
[4178] aaagaatgta tcattccctg cagaaatctt cccatcatcg tgctcagtgt cttgtgacta 22740
[4179] gtgaaagtta actggatgcc tcggtgctcc tcgtttacgt actggtgaca gatgcgcttg 22800
[4180] tattgttcgt gttgctcagg cattagttta aaagaggttc taagttcgtt atccagcctg 22860
[4181] tacttctcca tcagcagaca catcacttcc atgcctttct cccaagcaga caccaggggc 22920
[4182] aagctaatcg gattcttaac agtgcaggca gcagctcctt tagccagagg gtcatcttta 22980
[4183] gcgatcttct caatgcttct tttgccatcc ttctcaacga tgcgcacggg cgggtagctg 23040
[4184] aaacccactg ctacaagttg cgcctcttct ctttcttctt cgctgtcttg actgatgtct 23100
[4185] tgcatgggga tatgtttggt cttccttggc ttctttttgg ggggtatcgg aggaggagga 23160
[4186] ctgtcgctcc gttccggaga cagggaggat tgtgacgttt cgctcaccat taccaactga 23220
[4187] ctgtcggtag aagaacctga ccccacacgg cgacaggtgt ttctcttcgg gggcagaggt 23280

[4188] ggaggcgatt gcgaagggct gcggtccgac ctggaaggcg gatgactggc agaacccctt 23340
[4189] ccgcgttcgg gggtgtgctc cctgtggcgg tcgcttaact gatttccttc gcggctggcc 23400
[4190] attgtgttct cctaggcaga gaaacaacag acatggaaac tcagccattg ctgtcaacat 23460
[4191] cgccacgagt gccatcacat ctcgtcctca gcgacgagga aaaggagcag agcttaagca 23520
[4192] ttccaccgcc cagtcctgcc accacctcta ccctagaaga taaggaggtc gacgcatctc 23580
[4193] atgacatgca gaataaaaaa gcgaaagagt ctgagacaga catcgagcaa gacccgggct 23640
[4194] atgtgacacc ggtggaacac gaggaagagt tgaaacgctt tctagagaga gaggatgaaa 23700
[4195] actgcccaaa acaacgagca gataactatc accaagatgc tggaaatagg gatcagaaca 23760
[4196] ccgactacct catagggctt gacggggaag acgcgctcct taaacatcta gcaagacagt 23820
[4197] cgctcatagt caaggatgca ttattggaca gaactgaagt gcccatcagt gtggaagagc 23880
[4198] tcagccgcgc ctacgagctt aacctctttt cacctcgtac tccccccaaa cgtcagccaa 23940
[4199] acggcacctg cgagccaaat cctcgcttaa acttttatcc agcttttgct gtgccagaag 24000
[4200] tactggctac ctatcacatc ttttttaaaa atcaaaaaat tccagtctcc tgccgcgcta 24060
[4201] atcgcacccg cgccgatgcc ctactcaatc tgggacctgg ttcacgctta cctgatatag 24120
[4202] cttccttgga agaggttcca aagatcttcg agggtctggg caataatgag actcgggccg 24180
[4203] caaatgctct gcaaaaggga gaaaatggca tggatgagca tcacagcgtt ctggtggaat 24240
[4204] tggaaggcga taatgccaga ctcgcagtac tcaagcgaag catcgaggtc acacacttcg 24300
[4205] catatcccgc tgtcaacctg ccccctaaag tcatgacggc ggtcatggac cagttactca 24360
[4206] ttaagcgcgc aagtcccctt tcagaagaca tgcatgaccc agatgcctgt gatgagggta 24420
[4207] aaccagtggt cagtgatgag cagctaaccc gatggctggg caccgactct cccagggatt 24480
[4208] tggaagagcg tcgcaagctt atgatggccg tggtgctggt taccgtagaa ctagagtgtc 24540
[4209] tccgacgttt ctttaccgat tcagaaacct tgcgcaaact cgaagagaat ctgcactaca 24600
[4210] cttttagaca cggctttgtg cggcaggcat gcaagatatc taacgtggaa ctcaccaacc 24660
[4211] tggtttccta catgggtatt ctgcatgaga atcgcctagg acaaagcgtg ctgcacagca 24720
[4212] ccctgaaggg ggaagcccgc cgtgattaca tccgcgattg tgtctatctg tacctgtgcc 24780
[4213] acacgtggca aaccggcatg ggtgtatggc agcaatgttt agaagaacag aacttgaaag 24840
[4214] agcttgacaa gctcttacag aaatctctta aggttctgtg gacagggttc gacgagcgca 24900
[4215] ccgtcgcttc cgacctggca gacctcatct tcccagagcg tctcagggtt actttgcgaa 24960
[4216] acggattgcc tgactttatg agccagagca tgcttaacaa ttttcgctct ttcatcctgg 25020
[4217] aacgctccgg tatcctgccc gccacctgct gcgcactgcc ctccgacttt gtgcctctca 25080
[4218] cctaccgcga gtgccccccg ccgctatgga gtcactgcta cctgttccgt ctggccaact 25140
[4219] atctctccta ccactcggat gtgatcgagg atgtgagcgg agacggcttg ctggagtgtc 25200
[4220] actgccgctg caatctgtgc acgccccacc ggtccctagc ttgcaacccc cagttgatga 25260
[4221] gcgaaaccca gataataggc acctttgaat tgcaaggccc cagcagccaa ggcgatgggt 25320
[4222] cttctcctgg gcaaagttta aaactgaccc cgggactgtg gacctccgcc tacttgcgca 25380
[4223] agtttgctcc ggaagattac cacccctatg aaatcaagtt ctatgaggac caatcacagc 25440
[4224] ctccaaaggc cgaactttcg gcctgcgtca tcacccaggg ggcaattctg gcccaattgc 25500
[4225] aagccatcca aaaatcccgc caagaatttc tactgaaaaa gggtaagggg gtctaccttg 25560
[4226] acccccagac cggcgaggaa ctcaacacaa ggttccctca ggatgtccca acgacgagaa 25620
[4227] aacaagaagt tgaaggtgca gccgccgccc ccagaagata tggaggaaga ttgggacagt 25680
[4228] caggcagagg aggcggagga ggacagtctg gaggacagtc tggaggaaga cagtttggag 25740
[4229] gaggaaaacg aggaggcaga ggaggtggaa gaagtaaccg ccgacaaaca gttatcctcg 25800

[4230] gctgcggaga caagcaacag cgctaccatc tccgctccga gtcgaggaac ccggcggcgt 25860
[4231] cccagcagta gatgggacga gaccggacgc ttcccgaacc caaccagcgc ttccaagacc 25920
[4232] ggtaagaagg atcggcaggg atacaagtcc tggcgggggc ataagaatgc catcatctcc 25980
[4233] tgcttgcatg agtgcggggg caacatatcc ttcacgcggc gctacttgct attccaccat 26040
[4234] ggggtgaact ttccgcgcaa tgttttgcat tactaccgtc acctccacag cccctactat 26100
[4235] agccagcaaa tcccggcagt ctcgacagat aaagacagcg gcggcgacct ccaacagaaa 26160
[4236] accagcagcg gcagttagaa aatacacaac aagtgcagca acaggaggat taaagattac 26220
[4237] agccaacgag ccagcgcaaa cccgagagtt aagaaatcgg atctttccaa ccctgtatgc 26280
[4238] catcttccag cagagtcggg gtcaagagca ggaactgaaa ataaaaaacc gatctctgcg 26340
[4239] ttcgctcacc agaagttgtt tgtatcacaa gagcgaagat caacttcagc gcactctcga 26400
[4240] ggacgccgag gctctcttca acaagtactg cgcgctgact cttaaagagt aggcagcgac 26460
[4241] cgcgcttatt caaaaaaggc gggaattaca tcatcctcga catgagtaaa gaaattccca 26520
[4242] cgccttacat gtggagttat caaccccaaa tgggattggc ggcaggcgcc tcccaggact 26580
[4243] actccacccg catgaattgg ctcagcgccg ggccttctat gatttctcga gttaatgata 26640
[4244] tacgcgccta ccgaaaccaa atacttttgg aacagtcagc tcttaccacc acgccccgcc 26700
[4245] aacaccttaa tcccagaaat tggcccgccg ccctagtgta ccaggaaagt cccgctccca 26760
[4246] ccactgtatt acttcctcga gacgcccagg ccgaagtcca aatgactaat gcaggtgcgc 26820
[4247] agttagctgg cggctccacc ctatgtcgtc acaggcctcg gcataatata aaacgcctga 26880
[4248] tgatcagagg ccgaggtatc cagctcaacg acgagtcggt gagctctccg cttggtctac 26940
[4249] gaccagacgg aatctttcag attgccggct gcgggagatc ttccttcacc cctcgtcagg 27000
[4250] ctgttctgac tttggaaagt tcgtcttcgc aaccccgctc gggcggaatc gggaccgttc 27060
[4251] aatttgtgga ggagtttact ccctctgtct acttcaaccc cttctccgga tctcctgggc 27120
[4252] attacccgga cgagttcata ccgaacttcg acgcgattag cgagtcagtg gacggctacg 27180
[4253] attgatgtct ggtgacgcgg ctgagctatc tcggctgcga catctagacc actgccgccg 27240
[4254] ctttcgctgc tttgcccggg aactcattga gttcatctac ttcgaactcc ccaaggatca 27300
[4255] ccctcaaggt ccggcccacg gagtgcggat ttctatcgaa ggcaaaatag actctcgcct 27360
[4256] gcaacgaatt ttctcccagc ggcccgtgct gatcgagcga gaccagggaa acaccacggt 27420
[4257] ttccatctac tgcatttgta atcaccccgg attgcatgaa agcctttgct gtcttatgtg 27480
[4258] tactgagttt aataaaaact gaattaagac tctcctacgg actgccgctt cttcaacccg 27540
[4259] gattttacaa ccagaagaac gaaacttttc ctgtcgtcca ggactctgtt aacttcacct 27600
[4260] ttcctactca caaactagaa gctcaacgac tacaccgctt ttccagaagc attttcccta 27660
[4261] ctaatactac tttcaaaacc ggaggtgagc tccaaggtct tcctacagaa aacccttggg 27720
[4262] tggaagcggg ccttgtagtg ctaggaattc ttgcgggtgg gcttgtgatt attctttgct 27780
[4263] acctatacac accttgcttc actttcttag tggtgttgtg gtattggttt aaaaaatggg 27840
[4264] gcccatacta gtcttgcttg ttttactttc gcttttggaa ccgggttctg ccaattacga 27900
[4265] tccatgtcta gacttcgacc cagaaaactg cacacttact tttgcacccg acacaagccg 27960
[4266] catctgtgga gttcatcgcc tctcttacga acttggcccc caacgacaaa aatttacctg 28020
[4267] catggtggga atcaacccca tagttatcac ccagcaaagt ggagatacta agggttgcat 28080
[4268] tcactgctcc tgcgattcca tcgagtgcac ctacaccctg ctgaagaccc tatgcggcct 28140
[4269] aagagacctg ctaccaatga attaaaaaat gattaataaa aaatcactta cttgaaatca 28200
[4270] gcaataaggt ctctgttgaa attttctccc agcagcacct cacttccctc ttcccaactc 28260
[4271] tggtattcta aaccccgttc agcggcatac tttctccata ctttaaaggg gatgtcaaat 28320

[4272] tttagctcct ctcctgtacc cacaatcttc atgtctttct tcccagatga ccaagagagt 28380
[4273] ccggctcagt gactccttca accctgtcta cccctatgaa gatgaaagca cctcccaaca 28440
[4274] ccccttttata aacccagggt ttatttcccc aaatggcttc acacaaagcc caaacggagt 28500
[4275] tcttacttta aaatgtttaa ccccactaac aaccacaggc ggatctctac agctaaaagt 28560
[4276] gggaggggga cttacagtgg atgacaccaa cggttttttg aaagaaaaca taagtgccac 28620
[4277] cacaccactc gttaagactg gtcactctat aggtttacca ctaggagccg gattgggaac 28680
[4278] gaatgaaaat aaactttgta tcaaattagg acaaggactt acattcaatt caaacaacat 28740
[4279] ttgcattgat gacaatatta acaccttatg gacaggagtc aaccccaccg aagccaactg 28800
[4280] tcaaatcatg aactccagtg aatctaatga ttgcaaatta attctaacac tagttaaaac 28860
[4281] tggagcacta gtcactgcat ttgtttatgt tataggagta tctaacaatt ttaatatgct 28920
[4282] aactacacac agaaatataa attttactgc agagctgttt ttcgattcta ctggtaattt 28980
[4283] actaactaga ctctcatccc tcaaaactcc acttaatcat aaatcaggac aaaacatggc 29040
[4284] tactggtgcc attactaatg ctaaaggttt catgcccagc acgactgcct atcctttcaa 29100
[4285] tgataattct agagaaaaag aaaactacat ttacggaact tgttactaca cagctagtga 29160
[4286] tcgcactgct tttcccattg acatatctgt catgcttaac cgaagagcaa taaatgacga 29220
[4287] gacatcatat tgtattcgta taacttggtc ctggaacaca ggagatgccc cagaggtgca 29280
[4288] aacctctgct acaaccctag tcacctcccc atttaccttt tactacatca gagaagacga 29340
[4289] ctgacaaata aagtttgcga tcgccaggcc caccatgggt tggagctgta ttattctctt 29400
[4290] cctcgtcgcc accgcgaccg gagtgcattc cgagctcgtg atgacccagt caccatcatc 29460
[4291] cttgaccgtg actgcgggcg agaaggtcac gatgtcatgc aagtcgtcac aaagcctgct 29520
[4292] gaactccggc aatcagaaga attacctgac ctggtaccag cagaaaccgg gtcagccgcc 29580
[4293] aaaactgctg atctactggg catccacccg ggaaagcggg gtccctgacc ggttcactgg 29640
[4294] atcaggatca ggaaccgact ttaccctcac gatctcaagc gtccaagccg aggacttggc 29700
[4295] tgtgtactac tgccaaaatg actactcgta ccccctgact ttcggagctg ggaccaagct 29760
[4296] ggagatcaaa ggcggcggag ggtccggagg agggggggtcg ggaggggggg gaagcgaggt 29820
[4297] gcagctgctg gaacagagcg gagccgagct ggtgagacca ggcaccagcg tgaaaatctc 29880
[4298] gtgcaaggcc tcggggtacg ctttcacgaa ctactggttg ggttgggtga agcagcggcc 29940
[4299] gggtcatgga ctggagtgga tcggagacat ctttcccgga agcggaaata tccattacaa 30000
[4300] cgaaaagttt aaaggcaagg ccacccttac tgcggataag tcaagctcca ccgcttacat 30060
[4301] gcaactgtcc tcactgactt ttgaagacag cgctgtgtat ttctgcgctc gcctgcgcaa 30120
[4302] ttgggatgaa cctatggact actggggcca aggaaccacc gtgactgtgt cgtcgggagg 30180
[4303] gggaggctca caagtgcagc tgcagcagtc aggtgcagaa ttggccaggc cgggagccag 30240
[4304] cgtgaagatg tcgtgcaaag cctccggcta caccttcact cgctacacta tgcattgggt 30300
[4305] gaaacagcgg ccgggacaag ggctggagtg gatcggatac atcaatccat caagaggtta 30360
[4306] caccaactac aatcagaagt tcaaggacaa ggctaccctg acgactgata agagctcgtc 30420
[4307] aactgcatac atgcagctgt cgagcctgac cagcgaggat tccgccgtgt actactgcgc 30480
[4308] gagatactat gatgaccact actgcttgga ttactggggc caagggacca ctctgaccgt 30540
[4309] gtcctccggc ggaggggggct cgggcggcgg gggctcgggg ggcggcggca gcgacatcgt 30600
[4310] gctgacgcag agccccgcaa tcatgtcagc ctcccctggc gaaaaagtga cgatgacctg 30660
[4311] ctccgcttcc tcatcagtct cctacatgaa ctggtatcaa cagaagagcg gaacctcgcc 30720
[4312] gaagcgctgg atctacgata cctccaaact ggccagcgga gtgccggcgc attttcgggg 30780
[4313] atcgggcagc ggtacctcct actcgctcac catctcagga atggaagccg aagacgccgc 30840

[4314] cacctactac tgccagcagt ggtcctcaaa cccattcacc ttcggatccg gcactaagct 30900
[4315] ggaaatcaac cgcgggagcg gagcgactaa cttcagcttg ctcaagcaag ccggagatgt 30960
[4316] cgaggagaac ccgggacctg gttggtcgtg catcatccta ttccttgtcg cgaccgcaac 31020
[4317] tggcgtccat tccgacatcg tcatgaccca atccccagat tcgctggcgg tgtcgcttgg 31080
[4318] ggaacgggca accatcaact gcaagagctc gcagtcactg ctatacagcc ggaatcagaa 31140
[4319] aaactacctg gcgtggtacc agcaaaagcc gggtcagcct ccgaagctgc tgattttctg 31200
[4320] ggcctcaacc cgggaatccg gagtccctga cagattcagc gggtccggat tcgggaccga 31260
[4321] cttcactctg actatttcga gcctgcaagc agaagatgtg gcagtgtact attgccaaca 31320
[4322] gtatttttca tacccgctga ccttcggcca gggtacgaag gtggagatca agggtggagg 31380
[4323] gggtagcggc gggggaggca gcggcggggg gggaagccag gtgcagctgg tccaatcagg 31440
[4324] cgccgaggtc aagaaacctg gagcgtcggt caaggtctcc tgcaagacta gccgctacac 31500
[4325] ttttaccgaa tacaccatcc actgggtcag acaggcgccc ggtcagcgcc tggagtggat 31560
[4326] cggcgggatc aacccgaata atggaatccc gaactacaat caaaaattca aaggccgcgt 31620
[4327] gactatcacc gtggatactt cagcctcaac tgcttacatg gaactgtcat cgctgagatc 31680
[4328] agaggacact gcggtctact actgtgcgcg cagaagaatc gcttacggat acgacgaggg 31740
[4329] gcacgcaatg gactactggg gacagggaac cctggtgacc gtgtcgtcag gcggaggagg 31800
[4330] atcggatgtg cagttggtgc agtcgggcgc cgaagtgaaa aaaccggggg cctcagtgaa 31860
[4331] agtgtcctgc aaggcctccg gatacacctt cacccgctac actatgcact gggtcaggca 31920
[4332] ggcgcccggg cagggcctgg agtggatcgg gtatatcaac ccgtcaaggg gatacactaa 31980
[4333] ctacgccgac tccgtgaagg gaagattcac tatcaccact gacaaatcaa cttcgacggc 32040
[4334] gtatatggaa ctgtcatcct tgagatcgga agataccgcg acctactact gtgcgcgcta 32100
[4335] ctacgatgac cattactgcc tcgattactg gggacagggc accacggtga ccgtctcatc 32160
[4336] aggagaagga acttcaactg gttccggagg ctccggcggc tcaggcggcg ctgacgacat 32220
[4337] tgtgctgacc cagagcccgg cgaccctgtc actctcgccg ggggaaaggg ctactctgtc 32280
[4338] atgcagagcg tcacaatcgg tctcatacat gaactggtac cagcagaaac cgggcaaggc 32340
[4339] tccaaagcgg tggatctacg atacttcgaa ggtggcttca ggagtgccgg ctcgcttcag 32400
[4340] cggatccggc tcgggaaccg attacagctt gaccattaac tcgctggagg cggaggatgc 32460
[4341] agcgacctac tactgtcaac aatggtcctc gaacccactc acttttgggg gcgggaccaa 32520
[4342] ggtggagatt aagtaggcta gcttgactga ctgagataca gcgtaccttc agctcacaga 32580
[4343] catgataaga tacattgatg agtttggaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaaatg 32640
[4344] ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttgta accattataa gctgcaataa 32700
[4345] acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg aggtgtggga 32760
[4346] ggttttttaa agcaagtaaa acctctacaa atgtggtagt cgtcagctat cctgcaggaa 32820
[4347] cttgtttatt tgaaaatcaa ttcacaaaat ccgagtagtt attttgcctc ccccttccca 32880
[4348] tttaacagaa tacaccaatc tctccccacg cacagcttta aacatttgga taccattaga 32940
[4349] tatagacatg gttttagatt ccacattcca aacagtttca gagcgagcca atctggggtc 33000
[4350] agtgatagat aaaaatccat cgggatagtc ttttaaagcg ctttcacagt ccaactgctg 33060
[4351] cggatgcgac tccggagtct ggatcacggt catctggaag aagaacgatg ggaatcataa 33120
[4352] tccgaaaacg gtatcggacg attgtgtctc atcaaaccca caagcagccg ctgtctgcgt 33180
[4353] cgctccgtgc gactgctgtt tatgggatca gggtccacag tgtcctgaag catgatttta 33240
[4354] atagccctta acatcaactt tctggtgcga tgcgcgcagc aacgcattct gatttcactc 33300
[4355] aaatctttgc agtaggtaca acacattatt acaatattgt ttaataaacc ataattaaaa 33360

[4356] gcgctccagc caaaactcat atctgatata atcgcccctg catgaccatc ataccaaagt 33420
[4357] ttaatataaa ttaaatgacg ttccctcaaa aacacactac ccacatacat gatctctttt 33480
[4358] ggcatgtgca tattaacaat ctgtctgtac catggacaac gttggttaat catgcaaccc 33540
[4359] aatataacct tccggaacca cactgccaac accgctcccc cagccatgca ttgaagtgaa 33600
[4360] ccctgctgat tacaatgaca atgaagaacc caattctctc gaccgtgaat cacttgagaa 33660
[4361] tgaaaaatat ctatagtggc acaacataga cataaatgca tgcatcttct cataattttt 33720
[4362] aactcctcag gatttagaaa catatcccag ggaataggaa gctcttgcag aacagtaaag 33780
[4363] ctggcagaac aaggaagacc acgaacacaa cttacactat gcatagtcat agtatcacaa 33840
[4364] tctggcaaca gcgggtggtc ttcagtcata gaagctcggg tttcattttc ctcacaacgt 33900
[4365] ggtaactggg ctctggtgta agggtgatgt ctggcgcatg atgtcgagcg tgcgcgcaac 33960
[4366] cttgtcataa tggagttgct tcctgacatt ctcgtatttt gtatagcaaa acgcggccct 34020
[4367] ggcagaacac actcttcttc gccttctatc ctgccgctta gcgtgttccg tgtgatagtt 34080
[4368] caagtacaac cacactctta agttggtcaa aagaatgctg gcttcagttg taatcaaaac 34140
[4369] tccatcgcat ctaatcgttc tgaggaaatc atccaagcaa tgcaactgga ttgtgtttca 34200
[4370] agcaggagag gagagggaag agacggaaga accatgttaa tttttattcc aaacgatctc 34260
[4371] gcagtacttc aaattgtaga tcgcgcagat ggcatctctc gcccccactg tgttggtgaa 34320
[4372] aaagcacagc tagatcaaaa gaaatgcgat tttcaaggtg ctcaacggtg gcttccagca 34380
[4373] aagcctccac gcgcacatcc aagaacaaaa gaataccaaa agaaggagca ttttctaact 34440
[4374] cctcaatcat catattacat tcctgcacca ttcccagata attttcagct ttccagcctt 34500
[4375] gaattattcg tgtcagttct tgtggtaaat ccaatccaca cattacaaac aggtcccgga 34560
[4376] gggcgccctc caccaccatt cttaaacaca ccctcataat gacaaaatat cttgctcctg 34620
[4377] tgtcacctgt agcgaattga gaatggcaac atcaattgac atgcccttgg ctctaagttc 34680
[4378] ttctttaagt tctagttgta aaaactctct catattatca ccaaactgct tagccagaag 34740
[4379] ccccccggga acaagagcag gggacgctac agtgcagtac aagcgcagac ctccccaatt 34800
[4380] ggctccagca aaaacaagat tggaataagc atattgggaa ccgccagtaa tatcatcgaa 34860
[4381] gttgctggaa atataatcag gcagagtttc ttgtaaaaat tgaataaaag aaaaatttgc 34920
[4382] caaaaaaaca ttcaaaacct ctgggatgca aatgcaatag gttaccgcgc tgcgctccaa 34980
[4383] cattgttagt tttgaattag tctgcaaaaa taaaaaaaaa aacaagcgtc atatcatagt 35040
[4384] agcctgacga acagatggat aaatcagtct ttccatcaca agacaagcca cagggtctcc 35100
[4385] agctcgaccc tcgtaaaacc tgtcatcatg attaaacaac agcaccgaaa gttcctcgcg 35160
[4386] gtgaccagca tgaataattc ttgatgaagc atacaatcca gacatgttag catcagttaa 35220
[4387] cgagaaaaaa cagccaacat agcctttggg tataattatg cttaatcgta agtatagcaa 35280
[4388] agccacccct cgcggataca aagtaaaagg cacaggagaa taaaaaatat aattatttct 35340
[4389] ctgctgctgt tcaggcaacg tcgcccccgg tccctctaaa tacacataca aagcctcatc 35400
[4390] agccatggct taccagacaa agtacagcgg gcacacaaag cacaagctct aaagtgactc 35460
[4391] tccaacctct ccacaatata tatatacaca agccctaaac tgacgtaatg ggagtaaagt 35520
[4392] gtaaaaaatc ccgccaaacc caacacacac cccgaaactg cgtcaccagg gaaaagtaca 35580
[4393] gtttcacttc cgcaatccca acaggcgtaa cttcctcttt ctcacggtac gtgatatccc 35640
[4394] actaacttgc aacgtcattt tcccacggtc gcaccgcccc ttttagccgt taaccccaca 35700
[4395] gccaatcacc acacgatcca cacttttaa aatcacctca tttacatatt ggcaccattc 35760
[4396] catctataag gtatattata tagataga 35788
[4397] <210> 121

[4398] <211> 1540
[4399] <212> DNA
[4400] <213> 人工序列
[4401] <220>
[4402] <223> NG-618 EpCam 双特异性T细胞衔接器核酸序列
[4403] <400> 121
[4404] atgggttgga gctgtattat tctcttcctc gtcgccaccg cgaccggagt gcattccgag 60
[4405] ctcgtgatga cccagtcacc atcatccttg accgtgactg cgggcgagaa ggtcacgatg 120
[4406] tcatgcaagt cgtcacaaag cctgctgaac tccggcaatc agaagaatta cctgacctgg 180
[4407] taccagcaga aaccgggtca gccgccaaaa ctgctgatct actgggcatc cacccgggaa 240
[4408] agcggggtcc ctgaccggtt cactggatca ggatcaggaa ccgactttac cctcacgatc 300
[4409] tcaagcgtcc aagccgagga cttggctgtg tactactgcc aaaatgacta ctcgtacccc 360
[4410] ctgactttcg gagctgggac caagctggag atcaaaggcg gcggagggtc cggaggaggg 420
[4411] gggtcgggag gggggggaag cgaggtgcag ctgctggaac agagcggagc cgagctggtg 480
[4412] agaccaggca ccagcgtgaa aatctcgtgc aaggcctcgg ggtacgcttt cacgaactac 540
[4413] tggttgggtt gggtgaagca gcggccgggt catggactgg agtggatcgg agacatcttt 600
[4414] cccggaagcg gaaatatcca ttacaacgaa aagtttaaag gcaaggccac ccttactgcg 660
[4415] gataagtcaa gctccaccgc ttacatgcaa ctgtcctcac tgacttttga agacagcgct 720
[4416] gtgtatttct gcgctcgcct gcgcaattgg gatgaaccta tggactactg gggccaagga 780
[4417] accaccgtga ctgtgtcgtc gggaggggga ggctcacaag tgcagctgca gcagtcaggt 840
[4418] gcagaattgg ccaggccggg agccagcgtg aagatgtcgt gcaaagcctc cggctacacc 900
[4419] ttcactcgct acactatgca ttgggtgaaa cagcggccgg gacaagggct ggagtggatc 960
[4420] ggatacatca atccatcaag aggttacacc aactacaatc agaagttcaa ggacaaggct 1020
[4421] accctgacga ctgataagag ctcgtcaact gcatacatgc agctgtcgag cctgaccagc 1080
[4422] gaggattccg ccgtgtacta ctgcgcgaga tactatgatg accactactg cttggattac 1140
[4423] tggggccaag ggaccactct gaccgtgtcc tccggcggag ggggctcggg cggcgggggc 1200
[4424] tcgggggcg gcggcagcga catcgtgctg acgcagagcc ccgcaatcat gtcagcctcc 1260
[4425] cctggcgaaa aagtgacgat gacctgctcc gcttcctcat cagtctccta catgaactgg 1320
[4426] tatcaacaga agagcggaac ctcgccgaag cgctggatct acgatacctc caaactggcc 1380
[4427] agcggagtgc cggcgcattt tcggggatcg ggcagcggta cctcctactc gctcaccatc 1440
[4428] tcaggaatgg aagccgaaga cgccgccacc tactactgcc agcagtggtc ctcaaaccca 1500
[4429] ttcaccttcg gatccggcac taagctggaa atcaaccgcg 1540
[4430] <210> 122
[4431] <211> 1557
[4432] <212> DNA
[4433] <213> 人工序列
[4434] <220>
[4435] <223> NG-618 FAP 双特异性T细胞衔接器核酸序列
[4436] <400> 122
[4437] atgggttggt cgtgcatcat cctattcctt gtcgcgaccg caactggcgt ccattccgac 60
[4438] atcgtcatga cccaatcccc agattcgctg gcggtgtcgc ttggggaacg ggcaaccatc 120
[4439] aactgcaaga gctcgcagtc actgctatac agccggaatc agaaaaacta cctggcgtgg 180

[4440] taccagcaaa agccgggtca gcctccgaag ctgctgattt tctgggcctc aacccgggaa 240
[4441] tccggagtcc ctgacagatt cagcgggtcc ggattcggga ccgacttcac tctgactatt 300
[4442] tcgagcctgc aagcagaaga tgtggcagtg tactattgcc aacagtattt ttcatacccg 360
[4443] ctgaccttcg gccagggtac gaaggtggag atcaagggtg gaggggtag cggcggggga 420
[4444] ggcagcggcg gggggggaag ccaggtgcag ctggtccaat caggcgccga ggtcaagaaa 480
[4445] cctggagcgt cggtcaaggt ctcctgcaag actagccgct acacttttac cgaatacacc 540
[4446] atccactggg tcagacaggc gcccggtcag cgcctggagt ggatcggcgg gatcaacccg 600
[4447] aataatggaa tcccgaacta caatcaaaaa ttcaaaggcc gcgtgactat caccgtggat 660
[4448] acttcagcct caactgctta catggaactg tcatcgctga gatcagagga cactgcggtc 720
[4449] tactactgtg cgcgcagaag aatcgcttac ggatacgacg aggggcacgc aatggactac 780
[4450] tggggacagg gaaccctggt gaccgtgtcg tcaggcggag gaggatcgga tgtgcagttg 840
[4451] gtgcagtcgg gcgccgaagt gaaaaaaccg ggggcctcag tgaaagtgtc ctgcaaggcc 900
[4452] tccggataca ccttcacccg ctacactatg cactgggtca ggcaggcgcc cgggcagggc 960
[4453] ctggagtgga tcgggtatat caacccgtca aggggataca ctaactacgc cgactccgtg 1020
[4454] aagggaagat tcactatcac cactgacaaa tcaacttcga cggcgtatat ggaactgtca 1080
[4455] tccttgagat cggaagatac cgcgacctac tactgtgcgc gctactacga tgaccattac 1140
[4456] tgcctcgatt actggggaca gggcaccacg gtgaccgtct catcaggaga aggaacttca 1200
[4457] actggttccg gaggctccgg cggctcaggc ggcgctgacg acattgtgct gacccagagc 1260
[4458] ccggcgaccc tgtcactctc gccgggggaa agggctactc tgtcatgcag agcgtcacaa 1320
[4459] tcggtctcat acatgaactg gtaccagcag aaaccgggca aggctccaaa gcggtggatc 1380
[4460] tacgatactt cgaaggtggc ttcaggagtg ccggctcgct tcagcggatc cggctcggga 1440
[4461] accgattaca gcttgaccat taactcgctg gaggcggagg atgcagcgac ctactactgt 1500
[4462] caacaatggt cctcgaaccc actcactttt gggggcggga ccaaggtgga gattaag 1557
[4463] <210> 123
[4464] <211> 3169
[4465] <212> DNA
[4466] <213> 人工序列
[4467] <220>
[4468] <223> NG-618转基因盒
[4469] <400> 123
[4470] caggcccacc atgggttgga gctgtattat tctcttcctc gtcgccaccg cgaccggagt 60
[4471] gcattccgag ctcgtgatga cccagtcacc atcatccttg accgtgactg cgggcgagaa 120
[4472] ggtcacgatg tcatgcaagt cgtcacaaag cctgctgaac tccggcaatc agaagaatta 180
[4473] cctgacctgg taccagcaga aaccgggtca gccgccaaaa ctgctgatct actgggcatc 240
[4474] cacccgggaa agcggggtcc ctgaccggtt cactggatca ggatcaggaa ccgactttac 300
[4475] cctcacgatc tcaagcgtcc aagccgagga cttggctgtg tactactgcc aaaatgacta 360
[4476] ctcgtacccc ctgactttcg gagctgggac caagctggag atcaaaggcg gcggagggtc 420
[4477] cggaggaggg gggtcgggag gggggggaag cgaggtgcag ctgctggaac agagcggagc 480
[4478] cgagctggtg agaccaggca ccagcgtgaa aatctcgtgc aaggcctcgg ggtacgcttt 540
[4479] cacgaactac tggttgggtt gggtgaagca gcggccgggt catggactgg agtggatcgg 600
[4480] agacatcttt cccggaagcg gaaatatcca ttacaacgaa aagtttaaag gcaaggccac 660
[4481] ccttactgcg gataagtcaa gctccaccgc ttacatgcaa ctgtcctcac tgacttttga 720

[4482] agacagcgct gtgtatttct gcgctcgcct gcgcaattgg gatgaaccta tggactactg 780
[4483] gggccaagga accaccgtga ctgtgtcgtc gggaggggga ggctcacaag tgcagctgca 840
[4484] gcagtcaggt gcagaattgg ccaggccggg agccagcgtg aagatgtcgt gcaaagcctc 900
[4485] cggctacacc ttcactcgct acactatgca ttgggtgaaa cagcggccgg gacaagggct 960
[4486] ggagtggatc ggatacatca atccatcaag aggttacacc aactacaatc agaagttcaa 1020
[4487] ggacaaggct accctgacga ctgataagag ctcgtcaact gcatacatgc agctgtcgag 1080
[4488] cctgaccagc gaggattccg ccgtgtacta ctgcgcgaga tactatgatg accactactg 1140
[4489] cttggattac tggggccaag ggaccactct gaccgtgtcc tccggcggag ggggctcggg 1200
[4490] cggcgggggc tcgggggcg gcggcagcga catcgtgctg acgcagagcc ccgcaatcat 1260
[4491] gtcagcctcc cctggcgaaa aagtgacgat gacctgctcc gcttcctcat cagtctccta 1320
[4492] catgaactgg tatcaacaga agagcggaac ctcgccgaag cgctggatct acgatacctc 1380
[4493] caaactggcc agcggagtgc cggcgcattt tcggggatcg ggcagcggta cctcctactc 1440
[4494] gctcaccatc tcaggaatgg aagccgaaga cgccgccacc tactactgcc agcagtggtc 1500
[4495] ctcaaaccca ttcaccttcg gatccggcac taagctggaa atcaaccgcg ggagcggagc 1560
[4496] gactaacttc agcttgctca agcaagccgg agatgtcgag gagaacccgg gacctggttg 1620
[4497] gtcgtgcatc atcctattcc ttgtcgcgac cgcaactggc gtccattccg acatcgtcat 1680
[4498] gacccaatcc ccagattcgc tggcggtgtc gcttggggaa cgggcaacca tcaactgcaa 1740
[4499] gagctcgcag tcactgctat acagccggaa tcagaaaaac tacctggcgt ggtaccagca 1800
[4500] aaagccgggt cagcctccga agctgctgat tttctgggcc tcaacccggg aatccggagt 1860
[4501] ccctgacaga ttcagcgggt ccggattcgg gaccgacttc actctgacta tttcgagcct 1920
[4502] gcaagcagaa gatgtggcag tgtactattg ccaacagtat ttttcatacc cgctgacctt 1980
[4503] cggccagggt acgaaggtgg agatcaaggg tggagggggt agcggcgggg gaggcagcgg 2040
[4504] cgggggggga agccaggtgc agctggtcca atcaggcgcc gaggtcaaga aacctggagc 2100
[4505] gtcggtcaag gtctcctgca agactagccg ctacactttt accgaataca ccatccactg 2160
[4506] ggtcagacag gcgcccggtc agcgcctgga gtggatcggc gggatcaacc cgaataatgg 2220
[4507] aatcccgaac tacaatcaaa aattcaaagg ccgcgtgact atcaccgtgg atacttcagc 2280
[4508] ctcaactgct tacatggaac tgtcatcgct gagatcagag gacactgcgg tctactactg 2340
[4509] tgcgcgcaga agaatcgctt acggatacga cgaggggcac gcaatggact actggggaca 2400
[4510] gggaaccctg gtgaccgtgt cgtcaggcgg aggaggatcg gatgtgcagt tggtgcagtc 2460
[4511] gggcgccgaa gtgaaaaaac cgggggcctc agtgaaagtg tcctgcaagg cctccggata 2520
[4512] caccttcacc cgctacacta tgcactgggt caggcaggcg cccgggcagg gcctggagtg 2580
[4513] gatcgggtat atcaacccgt caaggggata cactaactac gccgactccg tgaagggaag 2640
[4514] attcactatc accactgaca aatcaacttc gacggcgtat atggaactgt catccttgag 2700
[4515] atcggaagat accgcgacct actactgtgc gcgctactac gatgaccatt actgcctcga 2760
[4516] ttactgggga cagggcacca cggtgaccgt ctcatcagga gaaggaactt caactggttc 2820
[4517] cggaggctcc ggcggctcag gcggcgctga cgacattgtg ctgacccaga gcccggcgac 2880
[4518] cctgtcactc tcgccggggg aaagggctac tctgtcatgc agagcgtcac aatcggtctc 2940
[4519] atacatgaac tggtaccagc agaaaccggg caaggctcca aagcggtgga tctacgatac 3000
[4520] ttcgaaggtg gcttcaggag tgccggctcg cttcagcgga tccggctcgg gaaccgatta 3060
[4521] cagcttgacc attaactcgc tggaggcgga ggatgcagcg acctactact gtcaacaatg 3120
[4522] gtcctcgaac ccactcactt ttgggggcgg gaccaaggtg gagattaag 3169
[4523] <210> 124

[4524] <211> 7
[4525] <212> PRT
[4526] <213> 人工序列
[4527] <220>
[4528] <223> 灵活的连接子序列
[4529] <400> 124
[4530] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
[4531] 1 5
[4532] <210> 125
[4533] <211> 6
[4534] <212> PRT
[4535] <213> 人工序列
[4536] <220>
[4537] <223> 灵活的连接子序列
[4538] <400> 125
[4539] Asp Lys Thr His Thr Ser
[4540] 1 5
[4541] <210> 126
[4542] <211> 6
[4543] <212> PRT
[4544] <213> 人工序列
[4545] <220>
[4546] <223> 灵活的连接子序列
[4547] <220>
[4548] <221> 其它特征
[4549] <222> (1)..(1)
[4550] <223> Ser是任选的
[4551] <400> 126
[4552] Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[4553] 1 5
[4554] <210> 127
[4555] <211> 11
[4556] <212> PRT
[4557] <213> 人工序列
[4558] <220>
[4559] <223> 灵活的连接子序列
[4560] <220>
[4561] <221> 其它特征
[4562] <222> (1)..(1)
[4563] <223> Ser是任选的
[4564] <400> 127
[4565] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[4566] 1 5 10

[4567] <210> 128

[4568] <211> 16

[4569] <212> PRT

[4570] <213> 人工序列

[4571] <220>

[4572] <223> 灵活的连接子序列

[4573] <220>

[4574] <221> 其它特征

[4575] <222> (1)..(1)

[4576] <223> Ser是任选的

[4577] <400> 128

[4578] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[4579] 1 5 10 15

[4580] <210> 129

[4581] <211> 21

[4582] <212> PRT

[4583] <213> 人工序列

[4584] <220>

[4585] <223> 灵活的连接子序列

[4586] <220>

[4587] <221> 其它特征

[4588] <222> (1)..(1)

[4589] <223> Ser是任选的

[4590] <400> 129

[4591] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[4592] 1 5 10 15

[4593] Gly Gly Gly Gly Ser

[4594] 20

[4595] <210> 130

[4596] <211> 26

[4597] <212> PRT

[4598] <213> 人工序列

[4599] <220>

[4600] <223> 灵活的连接子序列

[4601] <220>

[4602] <221> 其它特征

[4603] <222> (1)..(1)

[4604] <223> Ser是任选的

[4605] <400> 130

[4606] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[4607] 1 5 10 15

[4608] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[4609] 20 25
[4610] <210> 131
[4611] <211> 11
[4612] <212> PRT
[4613] <213> 人工序列
[4614] <220>
[4615] <223> 灵活的连接子序列
[4616] <400> 131
[4617] Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ser Ala Ser
[4618] 1 5 10
[4619] <210> 132
[4620] <211> 16
[4621] <212> PRT
[4622] <213> 人工序列
[4623] <220>
[4624] <223> 灵活的连接子序列
[4625] <220>
[4626] <221> 其它特征
[4627] <222> (7)..(7)
[4628] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[4629] <400> 132
[4630] Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
[4631] 1 5 10 15
[4632] <210> 133
[4633] <211> 21
[4634] <212> PRT
[4635] <213> 人工序列
[4636] <220>
[4637] <223> 灵活的连接子序列
[4638] <220>
[4639] <221> 其它特征
[4640] <222> (7)..(7)
[4641] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[4642] <220>
[4643] <221> 其它特征
[4644] <222> (12)..(12)
[4645] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[4646] <400> 133
[4647] Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
[4648] 1 5 10 15
[4649] Gly Ala Ser Ala Ser

[4650] 20

[4651] <210> 134

[4652] <211> 26

[4653] <212> PRT

[4654] <213> 人工序列

[4655] <220>

[4656] <223> 灵活的连接子序列

[4657] <220>

[4658] <221> 其它特征

[4659] <222> (7)..(7)

[4660] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[4661] <220>

[4662] <221> 其它特征

[4663] <222> (12)..(12)

[4664] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[4665] <220>

[4666] <221> 其它特征

[4667] <222> (17)..(17)

[4668] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[4669] <400> 134

[4670] Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser

[4671] 1 5 10 15

[4672] Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser

[4673] 20 25

[4674] <210> 135

[4675] <211> 31

[4676] <212> PRT

[4677] <213> 人工序列

[4678] <220>

[4679] <223> 灵活的连接子序列

[4680] <220>

[4681] <221> 其它特征

[4682] <222> (7)..(7)

[4683] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[4684] <220>

[4685] <221> 其它特征

[4686] <222> (12)..(12)

[4687] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[4688] <220>

[4689] <221> 其它特征

[4690] <222> (17)..(17)

[4691] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[4692] <220>
[4693] <221> 其它特征
[4694] <222> (22)..(22)
[4695] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[4696] <400> 135
[4697] Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
[4698] 1 5 10 15
[4699] Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
[4700] 20 25 30
[4701] <210> 136
[4702] <211> 13
[4703] <212> PRT
[4704] <213> 人工序列
[4705] <220>
[4706] <223> 灵活的连接子序列
[4707] <220>
[4708] <221> 其它特征
[4709] <222> (7)..(7)
[4710] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[4711] <400> 136
[4712] Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Ser Gly Ala Ser Ala Ser
[4713] 1 5 10
[4714] <210> 137
[4715] <211> 28
[4716] <212> PRT
[4717] <213> 人工序列
[4718] <220>
[4719] <223> 灵活的连接子序列
[4720] <400> 137
[4721] Pro Gly Gly Asn Arg Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr
[4722] 1 5 10 15
[4723] Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr
[4724] 20 25
[4725] <210> 138
[4726] <211> 11
[4727] <212> PRT
[4728] <213> 人工序列
[4729] <220>
[4730] <223> 灵活的连接子序列
[4731] <400> 138
[4732] Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr
[4733] 1 5 10

[4734] <210> 139
[4735] <211> 6
[4736] <212> PRT
[4737] <213> 人工序列
[4738] <220>
[4739] <223> 灵活的连接子序列
[4740] <400> 139
[4741] Ala Thr Thr Thr Gly Ser
[4742] 1 5
[4743] <210> 140
[4744] <211> 18
[4745] <212> PRT
[4746] <213> 人工序列
[4747] <220>
[4748] <223> 灵活的连接子序列
[4749] <400> 140
[4750] Met Pro Ser Leu Ser Gly Val Leu Gln Val Arg Tyr Leu Ser Pro Pro
[4751] 1 5 10 15
[4752] Asp Leu
[4753] <210> 141
[4754] <211> 21
[4755] <212> PRT
[4756] <213> 人工序列
[4757] <220>
[4758] <223> 灵活的连接子序列
[4759] <400> 141
[4760] Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Ser Pro Pro Ser Lys Glu
[4761] 1 5 10 15
[4762] Ser His Lys Ser Pro
[4763] 20
[4764] <210> 142
[4765] <211> 15
[4766] <212> PRT
[4767] <213> 人工序列
[4768] <220>
[4769] <223> 灵活的连接子序列
[4770] <400> 142
[4771] Gly Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
[4772] 1 5 10 15
[4773] <210> 143
[4774] <211> 15
[4775] <212> PRT

[4776] <213> 人工序列
[4777] <220>
[4778] <223> 灵活的连接子序列
[4779] <400> 143
[4780] Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Ser Met Val Gly Gly Gly Gly Ser
[4781] 1 5 10 15
[4782] <210> 144
[4783] <211> 15
[4784] <212> PRT
[4785] <213> 人工序列
[4786] <220>
[4787] <223> 灵活的连接子序列
[4788] <400> 144
[4789] Gly Gly Gly Gly Lys Val Glu Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser
[4790] 1 5 10 15
[4791] <210> 145
[4792] <211> 15
[4793] <212> PRT
[4794] <213> 人工序列
[4795] <220>
[4796] <223> 灵活的连接子序列
[4797] <400> 145
[4798] Gly Gly Gly Gly Ser Met Lys Ser His Asp Gly Gly Gly Gly Ser
[4799] 1 5 10 15
[4800] <210> 146
[4801] <211> 15
[4802] <212> PRT
[4803] <213> 人工序列
[4804] <220>
[4805] <223> 灵活的连接子序列
[4806] <400> 146
[4807] Gly Gly Gly Gly Asn Leu Ile Thr Ile Val Gly Gly Gly Gly Ser
[4808] 1 5 10 15
[4809] <210> 147
[4810] <211> 15
[4811] <212> PRT
[4812] <213> 人工序列
[4813] <220>
[4814] <223> 灵活的连接子序列
[4815] <400> 147
[4816] Gly Gly Gly Gly Val Val Pro Ser Leu Pro Gly Gly Gly Gly Ser
[4817] 1 5 10 15

[4818] <210> 148
[4819] <211> 12
[4820] <212> PRT
[4821] <213> 人工序列
[4822] <220>
[4823] <223> 灵活的连接子序列
[4824] <400> 148
[4825] Gly Gly Glu Lys Ser Ile Pro Gly Gly Gly Gly Ser
[4826] 1 5 10
[4827] <210> 149
[4828] <211> 18
[4829] <212> PRT
[4830] <213> 人工序列
[4831] <220>
[4832] <223> 灵活的连接子序列
[4833] <400> 149
[4834] Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Pro Pro Phe Pro Phe Gly Phe Pro Ser Val
[4835] 1 5 10 15
[4836] Arg Pro
[4837] <210> 150
[4838] <211> 18
[4839] <212> PRT
[4840] <213> 人工序列
[4841] <220>
[4842] <223> 灵活的连接子序列
[4843] <400> 150
[4844] Tyr Pro Arg Ser Ile Tyr Ile Arg Arg Arg His Pro Ser Pro Ser Leu
[4845] 1 5 10 15
[4846] Thr Thr
[4847] <210> 151
[4848] <211> 18
[4849] <212> PRT
[4850] <213> 人工序列
[4851] <220>
[4852] <223> 灵活的连接子序列
[4853] <400> 151
[4854] Thr Pro Ser His Leu Ser His Ile Leu Pro Ser Phe Gly Leu Pro Thr
[4855] 1 5 10 15
[4856] Phe Asn
[4857] <210> 152
[4858] <211> 18
[4859] <212> PRT

[4860] <213> 人工序列
[4861] <220>
[4862] <223> 灵活的连接子序列
[4863] <400> 152
[4864] Arg Pro Val Ser Pro Phe Thr Phe Pro Arg Leu Ser Asn Ser Trp Leu
[4865] 1 5 10 15
[4866] Pro Ala
[4867] <210> 153
[4868] <211> 18
[4869] <212> PRT
[4870] <213> 人工序列
[4871] <220>
[4872] <223> 灵活的连接子序列
[4873] <400> 153
[4874] Ser Pro Ala Ala His Phe Pro Arg Ser Ile Pro Arg Pro Gly Pro Ile
[4875] 1 5 10 15
[4876] Arg Thr
[4877] <210> 154
[4878] <211> 18
[4879] <212> PRT
[4880] <213> 人工序列
[4881] <220>
[4882] <223> 灵活的连接子序列
[4883] <400> 154
[4884] Ala Pro Gly Pro Ser Ala Pro Ser His Arg Ser Leu Pro Ser Arg Ala
[4885] 1 5 10 15
[4886] Phe Gly
[4887] <210> 155
[4888] <211> 18
[4889] <212> PRT
[4890] <213> 人工序列
[4891] <220>
[4892] <223> 灵活的连接子序列
[4893] <400> 155
[4894] Pro Arg Asn Ser Ile His Phe Leu His Pro Leu Leu Val Ala Pro Leu
[4895] 1 5 10 15
[4896] Gly Ala
[4897] <210> 156
[4898] <211> 18
[4899] <212> PRT
[4900] <213> 人工序列
[4901] <220>

[4902] <223> 灵活的连接子序列
[4903] <400> 156
[4904] Asn Pro Ser Leu Asn Pro Pro Ser Tyr Leu His Arg Ala Pro Ser Arg
[4905] 1 5 10 15
[4906] Ile Ser
[4907] <210> 157
[4908] <211> 17
[4909] <212> PRT
[4910] <213> 人工序列
[4911] <220>
[4912] <223> 灵活的连接子序列
[4913] <400> 157
[4914] Leu Pro Trp Arg Thr Ser Leu Leu Pro Ser Leu Pro Leu Arg Arg Arg
[4915] 1 5 10 15
[4916] Pro
[4917] <210> 158
[4918] <211> 18
[4919] <212> PRT
[4920] <213> 人工序列
[4921] <220>
[4922] <223> 灵活的连接子序列
[4923] <400> 158
[4924] Pro Pro Leu Phe Ala Lys Gly Pro Val Gly Leu Leu Ser Arg Ser Phe
[4925] 1 5 10 15
[4926] Pro Pro
[4927] <210> 159
[4928] <211> 18
[4929] <212> PRT
[4930] <213> 人工序列
[4931] <220>
[4932] <223> 灵活的连接子序列
[4933] <400> 159
[4934] Val Pro Pro Ala Pro Val Val Ser Leu Arg Ser Ala His Ala Arg Pro
[4935] 1 5 10 15
[4936] Pro Tyr
[4937] <210> 160
[4938] <211> 17
[4939] <212> PRT
[4940] <213> 人工序列
[4941] <220>
[4942] <223> 灵活的连接子序列
[4943] <400> 160

[4944] Leu Arg Pro Thr Pro Pro Arg Val Arg Ser Tyr Thr Cys Cys Pro Thr
[4945] 1 5 10 15
[4946] Pro
[4947] <210> 161
[4948] <211> 18
[4949] <212> PRT
[4950] <213> 人工序列
[4951] <220>
[4952] <223> 灵活的连接子序列
[4953] <400> 161
[4954] Pro Asn Val Ala His Val Leu Pro Leu Leu Thr Val Pro Trp Asp Asn
[4955] 1 5 10 15
[4956] Leu Arg
[4957] <210> 162
[4958] <211> 18
[4959] <212> PRT
[4960] <213> 人工序列
[4961] <220>
[4962] <223> 灵活的连接子序列
[4963] <400> 162
[4964] Cys Asn Pro Leu Leu Pro Leu Cys Ala Arg Ser Pro Ala Val Arg Thr
[4965] 1 5 10 15
[4966] Phe Pro
[4967] <210> 163
[4968] <211> 11
[4969] <212> PRT
[4970] <213> 人工序列
[4971] <220>
[4972] <223> 刚性连接子
[4973] <400> 163
[4974] Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala
[4975] 1 5 10
[4976] <210> 164
[4977] <211> 4
[4978] <212> PRT
[4979] <213> 人工序列
[4980] <220>
[4981] <223> 刚性连接子
[4982] <400> 164
[4983] Pro Pro Pro Pro
[4984] 1
[4985] <210> 165

[4986] <400> 165
[4987] 000
[4988] <210> 166
[4989] <211> 8
[4990] <212> PRT
[4991] <213> 人工序列
[4992] <220>
[4993] <223> 连接子序列
[4994] <220>
[4995] <221> 其它特征
[4996] <222> (7)..(7)
[4997] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[4998] <220>
[4999] <221> 其它特征
[5000] <222> (8)..(8)
[5001] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[5002] <400> 166
[5003] Asp Lys Thr His Thr Cys Xaa Xaa
[5004] 1 5
[5005] <210> 167
[5006] <211> 11
[5007] <212> PRT
[5008] <213> 人工序列
[5009] <220>
[5010] <223> 连接子序列
[5011] <400> 167
[5012] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5013] 1 5 10
[5014] <210> 168
[5015] <211> 18
[5016] <212> PRT
[5017] <213> 人工序列
[5018] <220>
[5019] <223> 连接子序列
[5020] <400> 168
[5021] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5022] 1 5 10 15
[5023] Pro Ala
[5024] <210> 169
[5025] <211> 25
[5026] <212> PRT
[5027] <213> 人工序列

[5028] <220>
[5029] <223> 连接子序列
[5030] <400> 169
[5031] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5032] 1 5 10 15
[5033] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5034] 20 25
[5035] <210> 170
[5036] <211> 30
[5037] <212> PRT
[5038] <213> 人工序列
[5039] <220>
[5040] <223> 连接子序列
[5041] <400> 170
[5042] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr Leu
[5043] 1 5 10 15
[5044] Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
[5045] 20 25 30
[5046] <210> 171
[5047] <211> 31
[5048] <212> PRT
[5049] <213> 人工序列
[5050] <220>
[5051] <223> 连接子序列
[5052] <400> 171
[5053] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr His
[5054] 1 5 10 15
[5055] Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr
[5056] 20 25 30
[5057] <210> 172
[5058] <211> 15
[5059] <212> PRT
[5060] <213> 人工序列
[5061] <220>
[5062] <223> 连接子序列
[5063] <400> 172
[5064] Asp Lys Thr His Thr Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5065] 1 5 10 15
[5066] <210> 173
[5067] <211> 26
[5068] <212> PRT
[5069] <213> 人工序列

[5070] <220>
[5071] <223> 连接子序列
[5072] <400> 173
[5073] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
[5074] 1 5 10 15
[5075] Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala
[5076] 20 25
[5077] <210> 174
[5078] <211> 11
[5079] <212> PRT
[5080] <213> 人工序列
[5081] <220>
[5082] <223> 连接子序列
[5083] <400> 174
[5084] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Ser Cys Pro Ala
[5085] 1 5 10
[5086] <210> 175
[5087] <211> 8
[5088] <212> PRT
[5089] <213> 人工序列
[5090] <220>
[5091] <223> 连接子序列
[5092] <220>
[5093] <221> 其它特征
[5094] <222> (7)..(7)
[5095] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[5096] <220>
[5097] <221> 其它特征
[5098] <222> (8)..(8)
[5099] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[5100] <400> 175
[5101] Asp Lys Thr His Thr Ser Xaa Xaa
[5102] 1 5
[5103] <210> 176
[5104] <211> 11
[5105] <212> PRT
[5106] <213> 人工序列
[5107] <220>
[5108] <223> 连接子序列
[5109] <400> 176
[5110] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[5111] 1 5 10

[5112] <210> 177
[5113] <211> 11
[5114] <212> PRT
[5115] <213> 人工序列
[5116] <220>
[5117] <223> 连接子序列
[5118] <400> 177
[5119] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala
[5120] 1 5 10
[5121] <210> 178
[5122] <211> 11
[5123] <212> PRT
[5124] <213> 人工序列
[5125] <220>
[5126] <223> 连接子序列
[5127] <400> 178
[5128] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala
[5129] 1 5 10
[5130] <210> 179
[5131] <211> 18
[5132] <212> PRT
[5133] <213> 人工序列
[5134] <220>
[5135] <223> 连接子序列
[5136] <400> 179
[5137] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser
[5138] 1 5 10 15
[5139] Pro Ala
[5140] <210> 180
[5141] <211> 18
[5142] <212> PRT
[5143] <213> 人工序列
[5144] <220>
[5145] <223> 连接子序列
[5146] <400> 180
[5147] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5148] 1 5 10 15
[5149] Pro Ala
[5150] <210> 181
[5151] <211> 18
[5152] <212> PRT
[5153] <213> 人工序列

[5154] <220>
[5155] <223> 连接子序列
[5156] <400> 181
[5157] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5158] 1 5 10 15
[5159] Pro Ala
[5160] <210> 182
[5161] <211> 18
[5162] <212> PRT
[5163] <213> 人工序列
[5164] <220>
[5165] <223> 连接子序列
[5166] <400> 182
[5167] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5168] 1 5 10 15
[5169] Pro Ala
[5170] <210> 183
[5171] <211> 18
[5172] <212> PRT
[5173] <213> 人工序列
[5174] <220>
[5175] <223> 连接子序列
[5176] <400> 183
[5177] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser
[5178] 1 5 10 15
[5179] Pro Ala
[5180] <210> 184
[5181] <211> 18
[5182] <212> PRT
[5183] <213> 人工序列
[5184] <220>
[5185] <223> 连接子序列
[5186] <400> 184
[5187] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser
[5188] 1 5 10 15
[5189] Pro Ala
[5190] <210> 185
[5191] <211> 18
[5192] <212> PRT
[5193] <213> 人工序列
[5194] <220>
[5195] <223> 连接子序列

[5196] <400> 185
[5197] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser
[5198] 1 5 10 15
[5199] Pro Ala
[5200] <210> 186
[5201] <211> 18
[5202] <212> PRT
[5203] <213> 人工序列
[5204] <220>
[5205] <223> 连接子序列
[5206] <400> 186
[5207] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5208] 1 5 10 15
[5209] Pro Ala
[5210] <210> 187
[5211] <211> 18
[5212] <212> PRT
[5213] <213> 人工序列
[5214] <220>
[5215] <223> 连接子序列
[5216] <400> 187
[5217] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5218] 1 5 10 15
[5219] Pro Ala
[5220] <210> 188
[5221] <211> 18
[5222] <212> PRT
[5223] <213> 人工序列
[5224] <220>
[5225] <223> 连接子序列
[5226] <400> 188
[5227] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5228] 1 5 10 15
[5229] Pro Ala
[5230] <210> 189
[5231] <211> 18
[5232] <212> PRT
[5233] <213> 人工序列
[5234] <220>
[5235] <223> 连接子序列
[5236] <400> 189
[5237] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser

[5238] 1 5 10 15
[5239] Pro Ala
[5240] <210> 190
[5241] <211> 18
[5242] <212> PRT
[5243] <213> 人工序列
[5244] <220>
[5245] <223> 连接子序列
[5246] <400> 190
[5247] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser
[5248] 1 5 10 15
[5249] Pro Ala
[5250] <210> 191
[5251] <211> 18
[5252] <212> PRT
[5253] <213> 人工序列
[5254] <220>
[5255] <223> 连接子序列
[5256] <400> 191
[5257] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser
[5258] 1 5 10 15
[5259] Pro Ala
[5260] <210> 192
[5261] <211> 18
[5262] <212> PRT
[5263] <213> 人工序列
[5264] <220>
[5265] <223> 连接子序列
[5266] <400> 192
[5267] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser
[5268] 1 5 10 15
[5269] Pro Ala
[5270] <210> 193
[5271] <211> 18
[5272] <212> PRT
[5273] <213> 人工序列
[5274] <220>
[5275] <223> 连接子序列
[5276] <400> 193
[5277] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5278] 1 5 10 15
[5279] Pro Ala

[5280] <210> 194
[5281] <211> 25
[5282] <212> PRT
[5283] <213> 人工序列
[5284] <220>
[5285] <223> 连接子序列
[5286] <400> 194
[5287] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5288] 1 5 10 15
[5289] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[5290] 20 25
[5291] <210> 195
[5292] <211> 25
[5293] <212> PRT
[5294] <213> 人工序列
[5295] <220>
[5296] <223> 连接子序列
[5297] <400> 195
[5298] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5299] 1 5 10 15
[5300] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala
[5301] 20 25
[5302] <210> 196
[5303] <211> 25
[5304] <212> PRT
[5305] <213> 人工序列
[5306] <220>
[5307] <223> 连接子序列
[5308] <400> 196
[5309] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser
[5310] 1 5 10 15
[5311] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5312] 20 25
[5313] <210> 197
[5314] <211> 25
[5315] <212> PRT
[5316] <213> 人工序列
[5317] <220>
[5318] <223> 连接子序列
[5319] <400> 197
[5320] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5321] 1 5 10 15

[5322] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5323] 20 25
[5324] <210> 198
[5325] <211> 25
[5326] <212> PRT
[5327] <213> 人工序列
[5328] <220>
[5329] <223> 连接子序列
[5330] <400> 198
[5331] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5332] 1 5 10 15
[5333] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5334] 20 25
[5335] <210> 199
[5336] <211> 25
[5337] <212> PRT
[5338] <213> 人工序列
[5339] <220>
[5340] <223> 连接子序列
[5341] <400> 199
[5342] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5343] 1 5 10 15
[5344] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5345] 20 25
[5346] <210> 200
[5347] <211> 25
[5348] <212> PRT
[5349] <213> 人工序列
[5350] <220>
[5351] <223> 连接子序列
[5352] <400> 200
[5353] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5354] 1 5 10 15
[5355] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala
[5356] 20 25
[5357] <210> 201
[5358] <211> 25
[5359] <212> PRT
[5360] <213> 人工序列
[5361] <220>
[5362] <223> 连接子序列
[5363] <400> 201

[5364] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser
[5365] 1 5 10 15
[5366] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[5367] 20 25
[5368] <210> 202
[5369] <211> 25
[5370] <212> PRT
[5371] <213> 人工序列
[5372] <220>
[5373] <223> 连接子序列
[5374] <400> 202
[5375] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5376] 1 5 10 15
[5377] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[5378] 20 25
[5379] <210> 203
[5380] <211> 25
[5381] <212> PRT
[5382] <213> 人工序列
[5383] <220>
[5384] <223> 连接子序列
[5385] <400> 203
[5386] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5387] 1 5 10 15
[5388] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[5389] 20 25
[5390] <210> 204
[5391] <211> 25
[5392] <212> PRT
[5393] <213> 人工序列
[5394] <220>
[5395] <223> 连接子序列
[5396] <400> 204
[5397] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5398] 1 5 10 15
[5399] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[5400] 20 25
[5401] <210> 205
[5402] <211> 25
[5403] <212> PRT
[5404] <213> 人工序列
[5405] <220>

[5406] <223> 连接子序列
[5407] <400> 205
[5408] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser
[5409] 1 5 10 15
[5410] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala
[5411] 20 25
[5412] <210> 206
[5413] <211> 25
[5414] <212> PRT
[5415] <213> 人工序列
[5416] <220>
[5417] <223> 连接子序列
[5418] <400> 206
[5419] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5420] 1 5 10 15
[5421] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala
[5422] 20 25
[5423] <210> 207
[5424] <211> 25
[5425] <212> PRT
[5426] <213> 人工序列
[5427] <220>
[5428] <223> 连接子序列
[5429] <400> 207
[5430] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5431] 1 5 10 15
[5432] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala
[5433] 20 25
[5434] <210> 208
[5435] <211> 25
[5436] <212> PRT
[5437] <213> 人工序列
[5438] <220>
[5439] <223> 连接子序列
[5440] <400> 208
[5441] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5442] 1 5 10 15
[5443] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala
[5444] 20 25
[5445] <210> 209
[5446] <211> 25
[5447] <212> PRT

[5448] <213> 人工序列
[5449] <220>
[5450] <223> 连接子序列
[5451] <400> 209
[5452] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser
[5453] 1 5 10 15
[5454] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5455] 20 25
[5456] <210> 210
[5457] <211> 25
[5458] <212> PRT
[5459] <213> 人工序列
[5460] <220>
[5461] <223> 连接子序列
[5462] <400> 210
[5463] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser
[5464] 1 5 10 15
[5465] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5466] 20 25
[5467] <210> 211
[5468] <211> 25
[5469] <212> PRT
[5470] <213> 人工序列
[5471] <220>
[5472] <223> 连接子序列
[5473] <400> 211
[5474] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser
[5475] 1 5 10 15
[5476] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5477] 20 25
[5478] <210> 212
[5479] <211> 25
[5480] <212> PRT
[5481] <213> 人工序列
[5482] <220>
[5483] <223> 连接子序列
[5484] <400> 212
[5485] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5486] 1 5 10 15
[5487] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5488] 20 25
[5489] <210> 213

[5490] <211> 25
[5491] <212> PRT
[5492] <213> 人工序列
[5493] <220>
[5494] <223> 连接子序列
[5495] <400> 213
[5496] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5497] 1 5 10 15
[5498] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5499] 20 25
[5500] <210> 214
[5501] <211> 25
[5502] <212> PRT
[5503] <213> 人工序列
[5504] <220>
[5505] <223> 连接子序列
[5506] <400> 214
[5507] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5508] 1 5 10 15
[5509] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5510] 20 25
[5511] <210> 215
[5512] <211> 25
[5513] <212> PRT
[5514] <213> 人工序列
[5515] <220>
[5516] <223> 连接子序列
[5517] <400> 215
[5518] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser
[5519] 1 5 10 15
[5520] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala
[5521] 20 25
[5522] <210> 216
[5523] <211> 25
[5524] <212> PRT
[5525] <213> 人工序列
[5526] <220>
[5527] <223> 连接子序列
[5528] <400> 216
[5529] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5530] 1 5 10 15
[5531] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala

[5532] 20 25

[5533] <210> 217

[5534] <211> 25

[5535] <212> PRT

[5536] <213> 人工序列

[5537] <220>

[5538] <223> 连接子序列

[5539] <400> 217

[5540] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys

[5541] 1 5 10 15

[5542] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala

[5543] 20 25

[5544] <210> 218

[5545] <211> 25

[5546] <212> PRT

[5547] <213> 人工序列

[5548] <220>

[5549] <223> 连接子序列

[5550] <400> 218

[5551] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys

[5552] 1 5 10 15

[5553] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala

[5554] 20 25

[5555] <210> 219

[5556] <211> 25

[5557] <212> PRT

[5558] <213> 人工序列

[5559] <220>

[5560] <223> 连接子序列

[5561] <400> 219

[5562] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser

[5563] 1 5 10 15

[5564] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala

[5565] 20 25

[5566] <210> 220

[5567] <211> 25

[5568] <212> PRT

[5569] <213> 人工序列

[5570] <220>

[5571] <223> 连接子序列

[5572] <400> 220

[5573] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser

[5574] 1 5 10 15
[5575] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[5576] 20 25
[5577] <210> 221
[5578] <211> 25
[5579] <212> PRT
[5580] <213> 人工序列
[5581] <220>
[5582] <223> 连接子序列
[5583] <400> 221
[5584] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser
[5585] 1 5 10 15
[5586] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[5587] 20 25
[5588] <210> 222
[5589] <211> 25
[5590] <212> PRT
[5591] <213> 人工序列
[5592] <220>
[5593] <223> 连接子序列
[5594] <400> 222
[5595] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5596] 1 5 10 15
[5597] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[5598] 20 25
[5599] <210> 223
[5600] <211> 25
[5601] <212> PRT
[5602] <213> 人工序列
[5603] <220>
[5604] <223> 连接子序列
[5605] <400> 223
[5606] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5607] 1 5 10 15
[5608] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[5609] 20 25
[5610] <210> 224
[5611] <211> 25
[5612] <212> PRT
[5613] <213> 人工序列
[5614] <220>
[5615] <223> 连接子序列

[5616] <400> 224
[5617] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5618] 1 5 10 15
[5619] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5620] 20 25
[5621] <210> 225
[5622] <211> 25
[5623] <212> PRT
[5624] <213> 人工序列
[5625] <220>
[5626] <223> 连接子序列
[5627] <400> 225
[5628] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser
[5629] 1 5 10 15
[5630] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5631] 20 25
[5632] <210> 226
[5633] <211> 25
[5634] <212> PRT
[5635] <213> 人工序列
[5636] <220>
[5637] <223> 连接子序列
[5638] <400> 226
[5639] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5640] 1 5 10 15
[5641] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala
[5642] 20 25
[5643] <210> 227
[5644] <211> 25
[5645] <212> PRT
[5646] <213> 人工序列
[5647] <220>
[5648] <223> 连接子序列
[5649] <400> 227
[5650] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
[5651] 1 5 10 15
[5652] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[5653] 20 25
[5654] <210> 228
[5655] <211> 25
[5656] <212> PRT
[5657] <213> 人工序列

[5658] <220>
[5659] <223> 连接子序列
[5660] <400> 228
[5661] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser
[5662] 1 5 10 15
[5663] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5664] 20 25
[5665] <210> 229
[5666] <211> 25
[5667] <212> PRT
[5668] <213> 人工序列
[5669] <220>
[5670] <223> 连接子序列
[5671] <400> 229
[5672] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5673] 1 5 10 15
[5674] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala
[5675] 20 25
[5676] <210> 230
[5677] <211> 25
[5678] <212> PRT
[5679] <213> 人工序列
[5680] <220>
[5681] <223> 连接子序列
[5682] <400> 230
[5683] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser
[5684] 1 5 10 15
[5685] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala
[5686] 20 25
[5687] <210> 231
[5688] <211> 25
[5689] <212> PRT
[5690] <213> 人工序列
[5691] <220>
[5692] <223> 连接子序列
[5693] <400> 231
[5694] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser
[5695] 1 5 10 15
[5696] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[5697] 20 25
[5698] <210> 232
[5699] <211> 25

[5700] <212> PRT
[5701] <213> 人工序列
[5702] <220>
[5703] <223> 连接子序列
[5704] <400> 232
[5705] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5706] 1 5 10 15
[5707] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[5708] 20 25
[5709] <210> 233
[5710] <211> 25
[5711] <212> PRT
[5712] <213> 人工序列
[5713] <220>
[5714] <223> 连接子序列
[5715] <400> 233
[5716] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser
[5717] 1 5 10 15
[5718] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[5719] 20 25
[5720] <210> 234
[5721] <211> 25
[5722] <212> PRT
[5723] <213> 人工序列
[5724] <220>
[5725] <223> 连接子序列
[5726] <400> 234
[5727] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5728] 1 5 10 15
[5729] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala
[5730] 20 25
[5731] <210> 235
[5732] <211> 25
[5733] <212> PRT
[5734] <213> 人工序列
[5735] <220>
[5736] <223> 连接子序列
[5737] <400> 235
[5738] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5739] 1 5 10 15
[5740] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[5741] 20 25

[5742] <210> 236
[5743] <211> 25
[5744] <212> PRT
[5745] <213> 人工序列
[5746] <220>
[5747] <223> 连接子序列
[5748] <400> 236
[5749] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser
[5750] 1 5 10 15
[5751] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala
[5752] 20 25
[5753] <210> 237
[5754] <211> 25
[5755] <212> PRT
[5756] <213> 人工序列
[5757] <220>
[5758] <223> 连接子序列
[5759] <400> 237
[5760] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser
[5761] 1 5 10 15
[5762] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala
[5763] 20 25
[5764] <210> 238
[5765] <211> 25
[5766] <212> PRT
[5767] <213> 人工序列
[5768] <220>
[5769] <223> 连接子序列
[5770] <400> 238
[5771] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser
[5772] 1 5 10 15
[5773] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala
[5774] 20 25
[5775] <210> 239
[5776] <211> 25
[5777] <212> PRT
[5778] <213> 人工序列
[5779] <220>
[5780] <223> 连接子序列
[5781] <400> 239
[5782] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser
[5783] 1 5 10 15

[5784] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala
[5785] 20 25
[5786] <210> 240
[5787] <211> 25
[5788] <212> PRT
[5789] <213> 人工序列
[5790] <220>
[5791] <223> 连接子序列
[5792] <400> 240
[5793] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser
[5794] 1 5 10 15
[5795] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala
[5796] 20 25
[5797] <210> 241
[5798] <211> 25
[5799] <212> PRT
[5800] <213> 人工序列
[5801] <220>
[5802] <223> 连接子序列
[5803] <400> 241
[5804] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Cys
[5805] 1 5 10 15
[5806] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala
[5807] 20 25
[5808] <210> 242
[5809] <211> 25
[5810] <212> PRT
[5811] <213> 人工序列
[5812] <220>
[5813] <223> 连接子序列
[5814] <400> 242
[5815] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser
[5816] 1 5 10 15
[5817] Pro Ala Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[5818] 20 25
[5819] <210> 243
[5820] <211> 25
[5821] <212> PRT
[5822] <213> 人工序列
[5823] <220>
[5824] <223> 连接子序列
[5825] <400> 243

[5826] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser
[5827] 1 5 10 15
[5828] Pro Ala Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala
[5829] 20 25
[5830] <210> 244
[5831] <211> 30
[5832] <212> PRT
[5833] <213> 人工序列
[5834] <220>
[5835] <223> 连接子序列
[5836] <400> 244
[5837] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr Leu
[5838] 1 5 10 15
[5839] Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Ser Tyr
[5840] 20 25 30
[5841] <210> 245
[5842] <211> 30
[5843] <212> PRT
[5844] <213> 人工序列
[5845] <220>
[5846] <223> 连接子序列
[5847] <400> 245
[5848] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Gly Lys Pro Thr Leu
[5849] 1 5 10 15
[5850] Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
[5851] 20 25 30
[5852] <210> 246
[5853] <211> 30
[5854] <212> PRT
[5855] <213> 人工序列
[5856] <220>
[5857] <223> 连接子序列
[5858] <400> 246
[5859] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr Leu
[5860] 1 5 10 15
[5861] Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
[5862] 20 25 30
[5863] <210> 247
[5864] <211> 30
[5865] <212> PRT
[5866] <213> 人工序列
[5867] <220>

[5868] <223> 连接子序列
[5869] <400> 247
[5870] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Gly Lys Pro Thr Leu
[5871] 1 5 10 15
[5872] Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Ser Tyr
[5873] 20 25 30
[5874] <210> 248
[5875] <211> 30
[5876] <212> PRT
[5877] <213> 人工序列
[5878] <220>
[5879] <223> 连接子序列
[5880] <400> 248
[5881] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Gly Lys Pro Thr Leu
[5882] 1 5 10 15
[5883] Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
[5884] 20 25 30
[5885] <210> 249
[5886] <211> 30
[5887] <212> PRT
[5888] <213> 人工序列
[5889] <220>
[5890] <223> 连接子序列
[5891] <400> 249
[5892] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr Leu
[5893] 1 5 10 15
[5894] Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Ser Tyr
[5895] 20 25 30
[5896] <210> 250
[5897] <211> 30
[5898] <212> PRT
[5899] <213> 人工序列
[5900] <220>
[5901] <223> 连接子序列
[5902] <400> 250
[5903] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Gly Lys Pro Thr Leu
[5904] 1 5 10 15
[5905] Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Ser Tyr
[5906] 20 25 30
[5907] <210> 251
[5908] <211> 31
[5909] <212> PRT

[5910] <213> 人工序列
[5911] <220>
[5912] <223> 连接子序列
[5913] <400> 251
[5914] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr His
[5915] 1 5 10 15
[5916] Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Ser Tyr
[5917] 20 25 30
[5918] <210> 252
[5919] <211> 31
[5920] <212> PRT
[5921] <213> 人工序列
[5922] <220>
[5923] <223> 连接子序列
[5924] <400> 252
[5925] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Gly Lys Pro Thr His
[5926] 1 5 10 15
[5927] Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr
[5928] 20 25 30
[5929] <210> 253
[5930] <211> 31
[5931] <212> PRT
[5932] <213> 人工序列
[5933] <220>
[5934] <223> 连接子序列
[5935] <400> 253
[5936] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr His
[5937] 1 5 10 15
[5938] Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr
[5939] 20 25 30
[5940] <210> 254
[5941] <211> 31
[5942] <212> PRT
[5943] <213> 人工序列
[5944] <220>
[5945] <223> 连接子序列
[5946] <400> 254
[5947] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Ser Pro Ala Gly Lys Pro Thr His
[5948] 1 5 10 15
[5949] Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Ser Tyr
[5950] 20 25 30
[5951] <210> 255

[5952] <211> 31
[5953] <212> PRT
[5954] <213> 人工序列
[5955] <220>
[5956] <223> 连接子序列
[5957] <400> 255
[5958] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr His
[5959] 1 5 10 15
[5960] Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Ser Tyr
[5961] 20 25 30
[5962] <210> 256
[5963] <211> 31
[5964] <212> PRT
[5965] <213> 人工序列
[5966] <220>
[5967] <223> 连接子序列
[5968] <400> 256
[5969] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Gly Lys Pro Thr His
[5970] 1 5 10 15
[5971] Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr
[5972] 20 25 30
[5973] <210> 257
[5974] <211> 31
[5975] <212> PRT
[5976] <213> 人工序列
[5977] <220>
[5978] <223> 连接子序列
[5979] <400> 257
[5980] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Gly Lys Pro Thr His
[5981] 1 5 10 15
[5982] Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Ser Tyr
[5983] 20 25 30
[5984] <210> 258
[5985] <211> 15
[5986] <212> PRT
[5987] <213> 人工序列
[5988] <220>
[5989] <223> 连接子序列
[5990] <400> 258
[5991] Asp Lys Thr His Thr Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[5992] 1 5 10 15
[5993] <210> 259

[5994] <211> 15
[5995] <212> PRT
[5996] <213> 人工序列
[5997] <220>
[5998] <223> 连接子序列
[5999] <400> 259
[6000] Asp Lys Thr His Thr Cys Cys Val Glu Ser Pro Pro Cys Pro Ala
[6001] 1 5 10 15
[6002] <210> 260
[6003] <211> 15
[6004] <212> PRT
[6005] <213> 人工序列
[6006] <220>
[6007] <223> 连接子序列
[6008] <400> 260
[6009] Asp Lys Thr His Thr Cys Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[6010] 1 5 10 15
[6011] <210> 261
[6012] <211> 15
[6013] <212> PRT
[6014] <213> 人工序列
[6015] <220>
[6016] <223> 连接子序列
[6017] <400> 261
[6018] Asp Lys Thr His Thr Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[6019] 1 5 10 15
[6020] <210> 262
[6021] <211> 15
[6022] <212> PRT
[6023] <213> 人工序列
[6024] <220>
[6025] <223> 连接子序列
[6026] <400> 262
[6027] Asp Lys Thr His Thr Cys Cys Val Glu Ser Pro Pro Ser Pro Ala
[6028] 1 5 10 15
[6029] <210> 263
[6030] <211> 15
[6031] <212> PRT
[6032] <213> 人工序列
[6033] <220>
[6034] <223> 连接子序列
[6035] <400> 263

[6036] Asp Lys Thr His Thr Cys Ser Val Glu Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[6037] 1 5 10 15
[6038] <210> 264
[6039] <211> 15
[6040] <212> PRT
[6041] <213> 人工序列
[6042] <220>
[6043] <223> 连接子序列
[6044] <400> 264
[6045] Asp Lys Thr His Thr Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[6046] 1 5 10 15
[6047] <210> 265
[6048] <211> 15
[6049] <212> PRT
[6050] <213> 人工序列
[6051] <220>
[6052] <223> 连接子序列
[6053] <400> 265
[6054] Asp Lys Thr His Thr Cys Ser Val Glu Ser Pro Pro Cys Pro Ala
[6055] 1 5 10 15
[6056] <210> 266
[6057] <211> 15
[6058] <212> PRT
[6059] <213> 人工序列
[6060] <220>
[6061] <223> 连接子序列
[6062] <400> 266
[6063] Asp Lys Thr His Thr Ser Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[6064] 1 5 10 15
[6065] <210> 267
[6066] <211> 15
[6067] <212> PRT
[6068] <213> 人工序列
[6069] <220>
[6070] <223> 连接子序列
[6071] <400> 267
[6072] Asp Lys Thr His Thr Cys Ser Val Glu Ser Pro Pro Ser Pro Ala
[6073] 1 5 10 15
[6074] <210> 268
[6075] <211> 15
[6076] <212> PRT
[6077] <213> 人工序列

[6078] <220>
[6079] <223> 连接子序列
[6080] <400> 268
[6081] Asp Lys Thr His Thr Ser Ser Val Glu Cys Pro Pro Ser Pro Ala
[6082] 1 5 10 15
[6083] <210> 269
[6084] <211> 15
[6085] <212> PRT
[6086] <213> 人工序列
[6087] <220>
[6088] <223> 连接子序列
[6089] <400> 269
[6090] Asp Lys Thr His Thr Ser Ser Val Glu Ser Pro Pro Cys Pro Ala
[6091] 1 5 10 15
[6092] <210> 270
[6093] <211> 15
[6094] <212> PRT
[6095] <213> 人工序列
[6096] <220>
[6097] <223> 连接子序列
[6098] <400> 270
[6099] Asp Lys Thr His Thr Ser Ser Val Glu Ser Pro Pro Ser Pro Ala
[6100] 1 5 10 15
[6101] <210> 271
[6102] <211> 26
[6103] <212> PRT
[6104] <213> 人工序列
[6105] <220>
[6106] <223> 连接子序列
[6107] <400> 271
[6108] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
[6109] 1 5 10 15
[6110] Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Ser Pro Ala
[6111] 20 25
[6112] <210> 272
[6113] <211> 26
[6114] <212> PRT
[6115] <213> 人工序列
[6116] <220>
[6117] <223> 连接子序列
[6118] <400> 272
[6119] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp

[6120] 1 5 10 15
[6121] Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Cys Pro Ala
[6122] 20 25
[6123] <210> 273
[6124] <211> 26
[6125] <212> PRT
[6126] <213> 人工序列
[6127] <220>
[6128] <223> 连接子序列
[6129] <400> 273
[6130] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp
[6131] 1 5 10 15
[6132] Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala
[6133] 20 25
[6134] <210> 274
[6135] <211> 26
[6136] <212> PRT
[6137] <213> 人工序列
[6138] <220>
[6139] <223> 连接子序列
[6140] <400> 274
[6141] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Ser Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
[6142] 1 5 10 15
[6143] Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala
[6144] 20 25
[6145] <210> 275
[6146] <211> 26
[6147] <212> PRT
[6148] <213> 人工序列
[6149] <220>
[6150] <223> 连接子序列
[6151] <400> 275
[6152] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
[6153] 1 5 10 15
[6154] Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala
[6155] 20 25
[6156] <210> 276
[6157] <211> 26
[6158] <212> PRT
[6159] <213> 人工序列
[6160] <220>
[6161] <223> 连接子序列

[6162] <400> 276
[6163] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
[6164] 1 5 10 15
[6165] Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Ser Pro Ala
[6166] 20 25
[6167] <210> 277
[6168] <211> 26
[6169] <212> PRT
[6170] <213> 人工序列
[6171] <220>
[6172] <223> 连接子序列
[6173] <400> 277
[6174] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp
[6175] 1 5 10 15
[6176] Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Ser Pro Ala
[6177] 20 25
[6178] <210> 278
[6179] <211> 26
[6180] <212> PRT
[6181] <213> 人工序列
[6182] <220>
[6183] <223> 连接子序列
[6184] <400> 278
[6185] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Ser Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
[6186] 1 5 10 15
[6187] Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Ser Pro Ala
[6188] 20 25
[6189] <210> 279
[6190] <211> 26
[6191] <212> PRT
[6192] <213> 人工序列
[6193] <220>
[6194] <223> 连接子序列
[6195] <400> 279
[6196] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
[6197] 1 5 10 15
[6198] Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Ser Pro Ala
[6199] 20 25
[6200] <210> 280
[6201] <211> 26
[6202] <212> PRT
[6203] <213> 人工序列

[6204] <220>
[6205] <223> 连接子序列
[6206] <400> 280
[6207] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp
[6208] 1 5 10 15
[6209] Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Ser Pro Ala
[6210] 20 25
[6211] <210> 281
[6212] <211> 26
[6213] <212> PRT
[6214] <213> 人工序列
[6215] <220>
[6216] <223> 连接子序列
[6217] <400> 281
[6218] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Ser Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
[6219] 1 5 10 15
[6220] Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Ser Pro Ala
[6221] 20 25
[6222] <210> 282
[6223] <211> 26
[6224] <212> PRT
[6225] <213> 人工序列
[6226] <220>
[6227] <223> 连接子序列
[6228] <400> 282
[6229] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
[6230] 1 5 10 15
[6231] Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Ser Pro Ala
[6232] 20 25
[6233] <210> 283
[6234] <211> 26
[6235] <212> PRT
[6236] <213> 人工序列
[6237] <220>
[6238] <223> 连接子序列
[6239] <400> 283
[6240] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Ser Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp
[6241] 1 5 10 15
[6242] Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Ser Pro Ala
[6243] 20 25
[6244] <210> 284
[6245] <211> 26

[6246] <212> PRT
[6247] <213> 人工序列
[6248] <220>
[6249] <223> 连接子序列
[6250] <400> 284
[6251] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp
[6252] 1 5 10 15
[6253] Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Ser Pro Ala
[6254] 20 25
[6255] <210> 285
[6256] <211> 26
[6257] <212> PRT
[6258] <213> 人工序列
[6259] <220>
[6260] <223> 连接子序列
[6261] <400> 285
[6262] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Arg Ser Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
[6263] 1 5 10 15
[6264] Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Ser Pro Ala
[6265] 20 25
[6266] <210> 286
[6267] <211> 26
[6268] <212> PRT
[6269] <213> 人工序列
[6270] <220>
[6271] <223> 连接子序列
[6272] <400> 286
[6273] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Ser Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp
[6274] 1 5 10 15
[6275] Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Cys Pro Ala
[6276] 20 25
[6277] <210> 287
[6278] <211> 26
[6279] <212> PRT
[6280] <213> 人工序列
[6281] <220>
[6282] <223> 连接子序列
[6283] <400> 287
[6284] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp
[6285] 1 5 10 15
[6286] Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Cys Pro Ala
[6287] 20 25

[6288] <210> 288
[6289] <211> 26
[6290] <212> PRT
[6291] <213> 人工序列
[6292] <220>
[6293] <223> 连接子序列
[6294] <400> 288
[6295] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Arg Ser Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp
[6296] 1 5 10 15
[6297] Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala
[6298] 20 25
[6299] <210> 289
[6300] <211> 26
[6301] <212> PRT
[6302] <213> 人工序列
[6303] <220>
[6304] <223> 连接子序列
[6305] <400> 289
[6306] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Ser Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp
[6307] 1 5 10 15
[6308] Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Ser Pro Ala
[6309] 20 25
[6310] <210> 290
[6311] <211> 26
[6312] <212> PRT
[6313] <213> 人工序列
[6314] <220>
[6315] <223> 连接子序列
[6316] <400> 290
[6317] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Arg Ser Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp
[6318] 1 5 10 15
[6319] Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Ser Pro Ala
[6320] 20 25
[6321] <210> 291
[6322] <211> 26
[6323] <212> PRT
[6324] <213> 人工序列
[6325] <220>
[6326] <223> 连接子序列
[6327] <400> 291
[6328] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Arg Ser Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
[6329] 1 5 10 15

[6330] Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Ser Pro Ala
[6331] 20 25
[6332] <210> 292
[6333] <211> 26
[6334] <212> PRT
[6335] <213> 人工序列
[6336] <220>
[6337] <223> 连接子序列
[6338] <400> 292
[6339] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp
[6340] 1 5 10 15
[6341] Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Ser Pro Ala
[6342] 20 25
[6343] <210> 293
[6344] <211> 26
[6345] <212> PRT
[6346] <213> 人工序列
[6347] <220>
[6348] <223> 连接子序列
[6349] <400> 293
[6350] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Arg Ser Pro Glu Pro Lys Ser Ser Asp
[6351] 1 5 10 15
[6352] Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Ser Pro Ala
[6353] 20 25
[6354] <210> 294
[6355] <211> 11
[6356] <212> PRT
[6357] <213> 人工序列
[6358] <220>
[6359] <223> 连接子序列
[6360] <400> 294
[6361] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Ser Ser Pro Ala
[6362] 1 5 10
[6363] <210> 295
[6364] <211> 11
[6365] <212> PRT
[6366] <213> 人工序列
[6367] <220>
[6368] <223> 连接子序列
[6369] <400> 295
[6370] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Ser Cys Pro Ala
[6371] 1 5 10

[6372] <210> 296
[6373] <211> 11
[6374] <212> PRT
[6375] <213> 人工序列
[6376] <220>
[6377] <223> 连接子序列
[6378] <400> 296
[6379] Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Ser Ser Pro Ala
[6380] 1 5 10
[6381] <210> 297
[6382] <211> 4
[6383] <212> PRT
[6384] <213> 人工序列
[6385] <220>
[6386] <223> 连接子序列
[6387] <400> 297
[6388] Gly Gly Gly Ser
[6389] 1

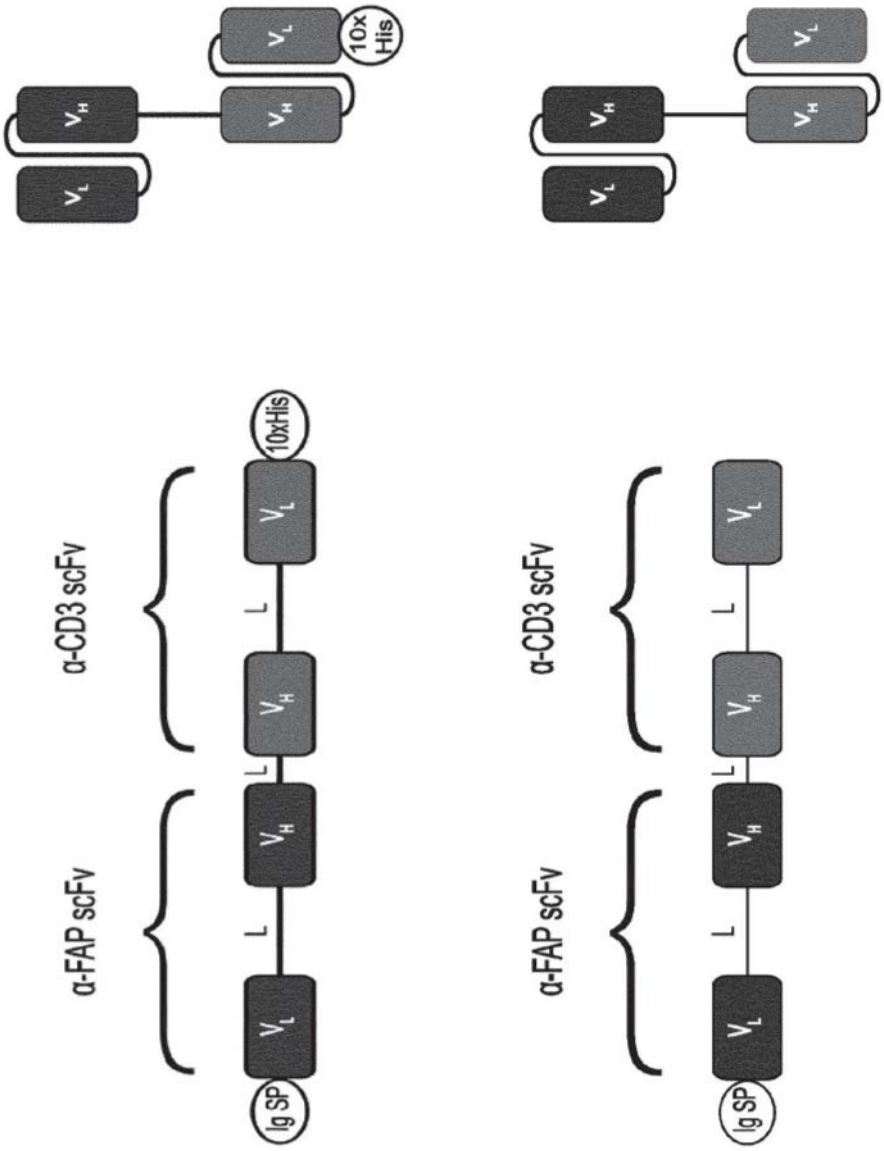


图1A

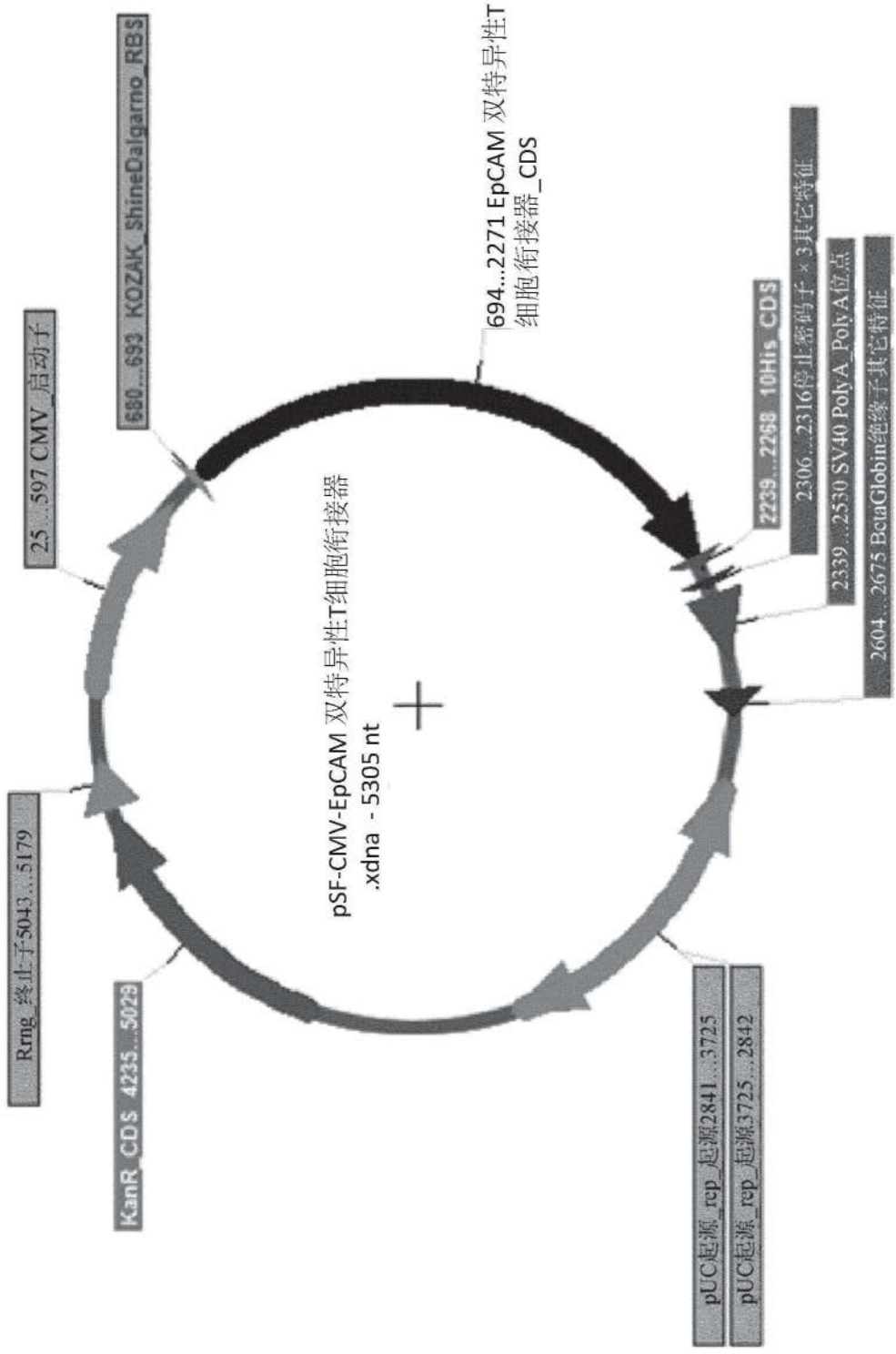

pSF-CMV-EpCAM 双特异性T细胞衔接器
.xdna - 5305 nt
694...2271 EpCAM 双特异性T细胞衔接器_CDS
2239...2268 10His_CDS
2306...2316停止密码子 ×3其它特征
2339...2530 SV40 PolyA_PolyA位点
2604...2675 BetaGlobin绝缘子其它特征
pUC起源_rep_起源2841...3725
pUC起源_rep_起源3725...2842
KanR_CDS 4235...5029
Rmg_终止子5043...5179
25...597 CMV_启动子
680...693 KOZAK_ShineDalgarno_RBS

图1B

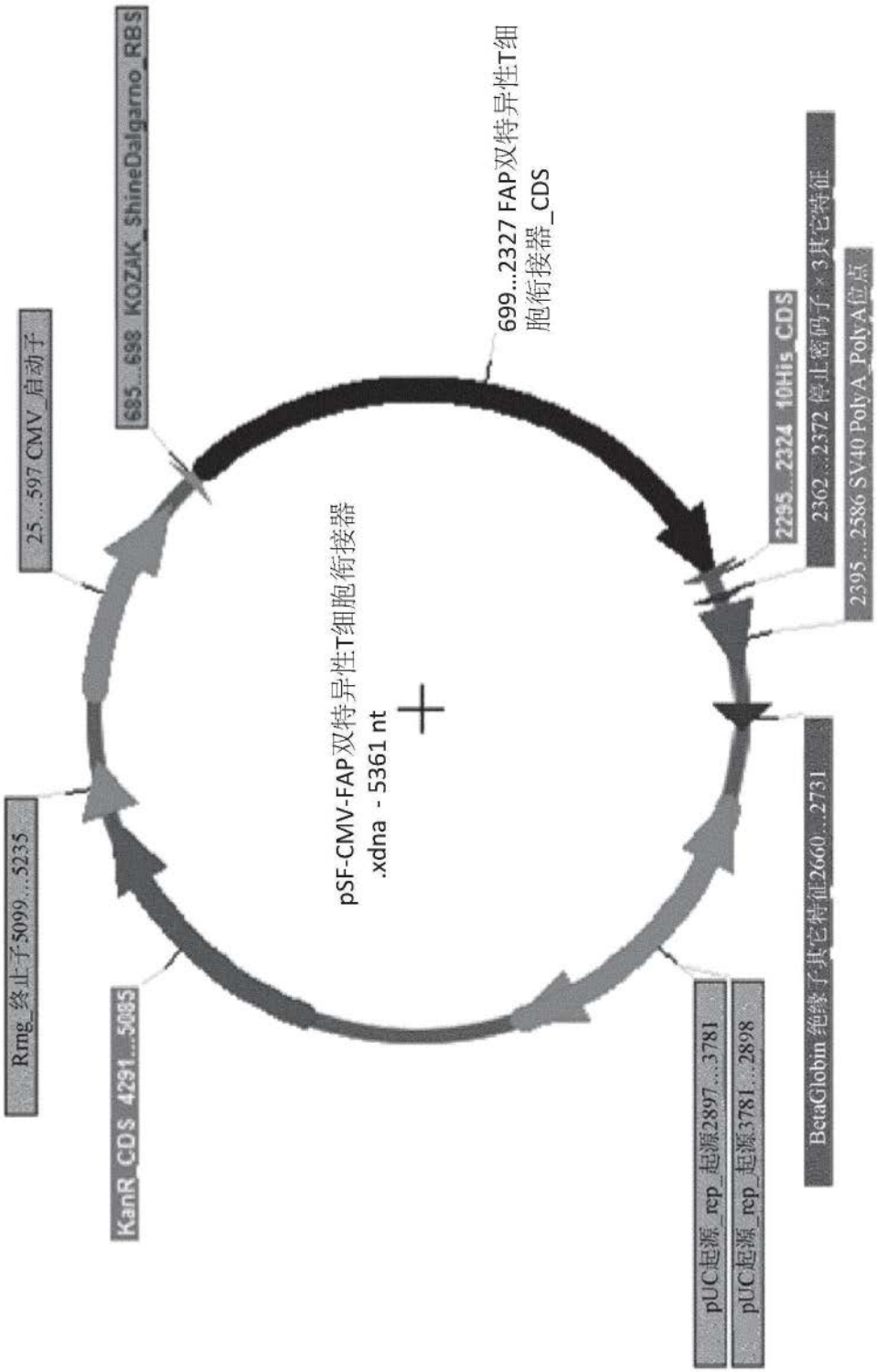

pSF-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器
.xdna - 5361 nt
699...2327 FAP双特异性T细胞衔接器_CDS
685...698 KOZAK_ShineDalgarno_RBS
25...597 CMV_启动子
Rmg_终止子5099...5235
KanR_CDS 4291...5085
pUC起源_rep_起源2897...3781
pUC起源_rep_起源3781...2898
BetaGlobin 绝缘子其它特征2660...2731
2295...2324 10His_CDS
2362...2372 停止密码子 × 3其它特征
2395...2586 SV40 PolyA_PolyA位点

图1C

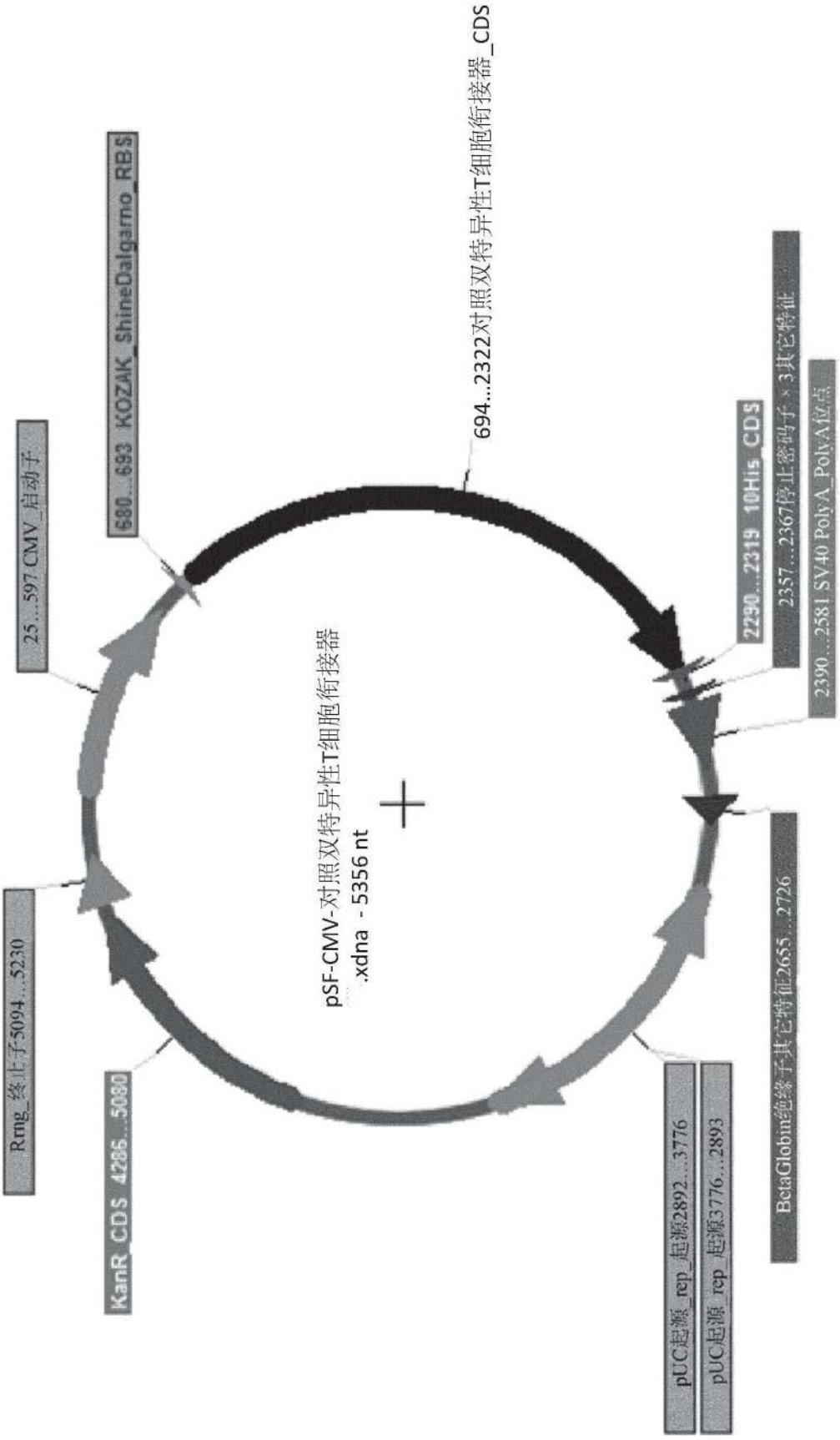
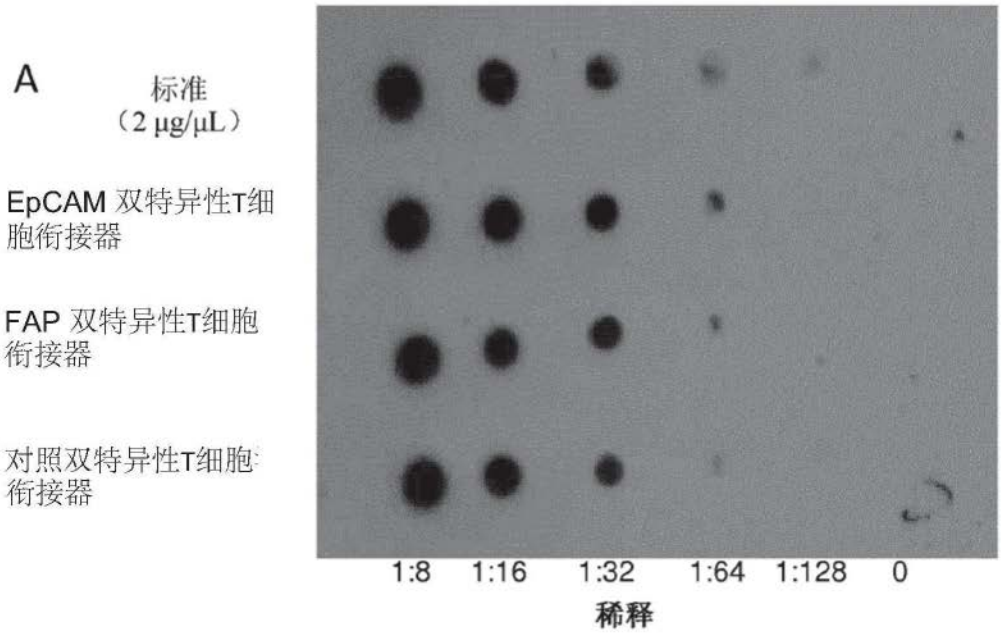

694...2322对照双特异性T细胞衔接器_CDS
680...693 KOZAK_ShineDalgarno_RBS
25...597 CMV_启动子
pSF-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
.xdna - 5356 nt
2290...2319 10His_CDS
2357...2367停止密码子 x 3其它特征
2390...2581 SV40 PolyA_PolyA位点
BetaGlobin绝缘子其它特征2655...2726
pUC起源_rep_起源2892...3776
pUC起源_rep_起源3776...2893
KanR_CDS 4286...5080
Rmg_终止子5094...5230

图1D


A
标准
（2 μg/μL）
EpCAM 双特异性T细胞衔接器
FAP 双特异性T细胞衔接器
对照双特异性T细胞衔接器
1:8
1:16
1:32
1:64
1:128
0
稀释

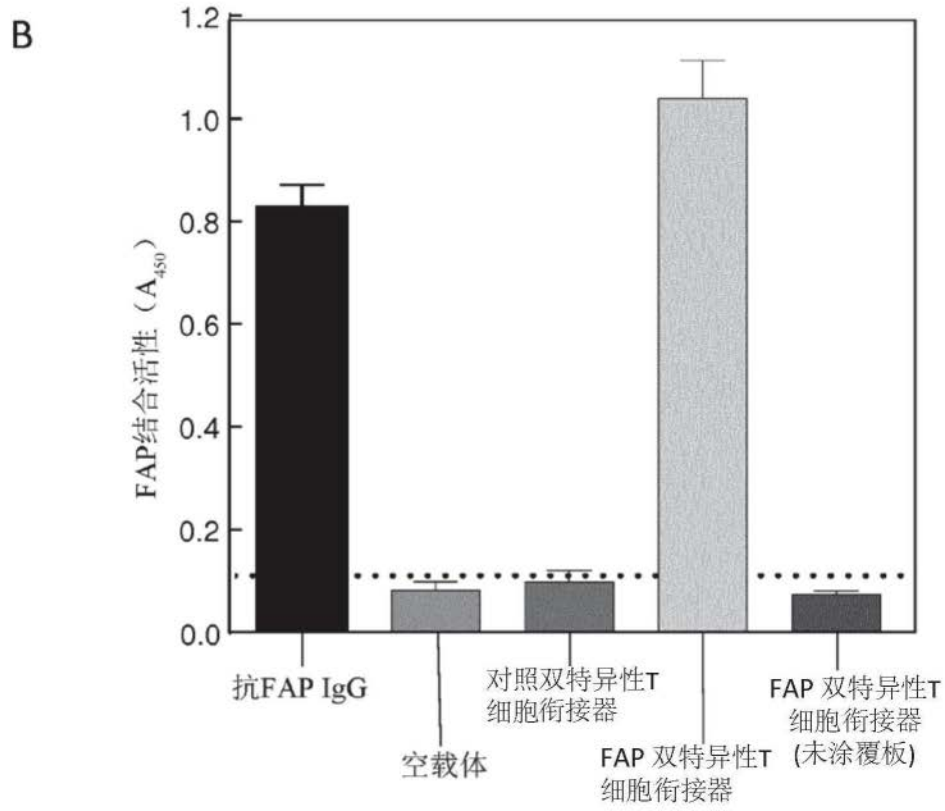

B
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
FAP结合活性（A450）
抗FAP IgG
空载体
对照双特异性T细胞衔接器
FAP 双特异性T细胞衔接器
FAP 双特异性T细胞衔接器（未涂覆板）

图2

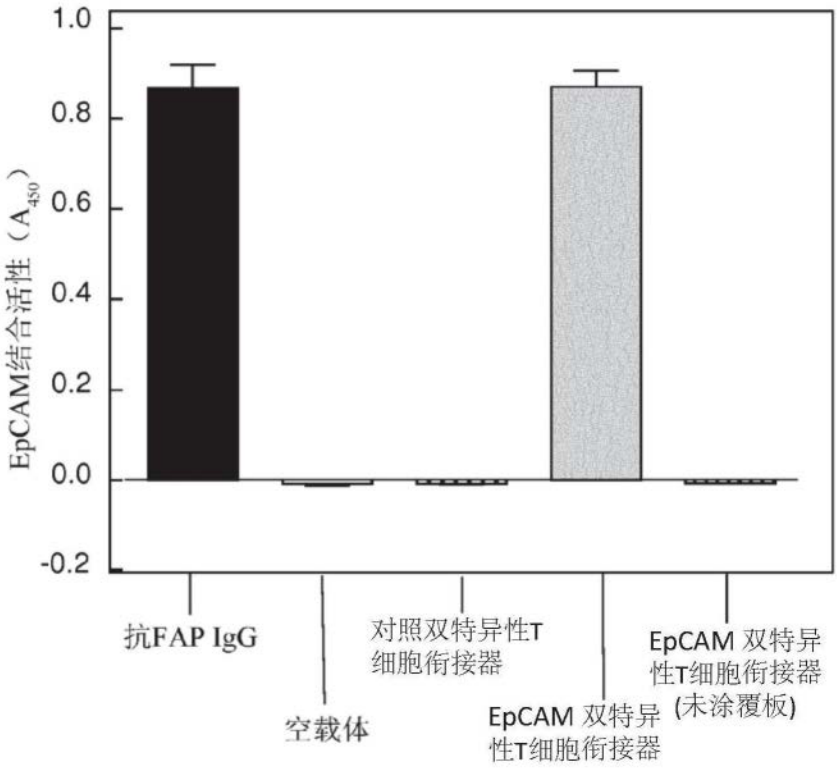
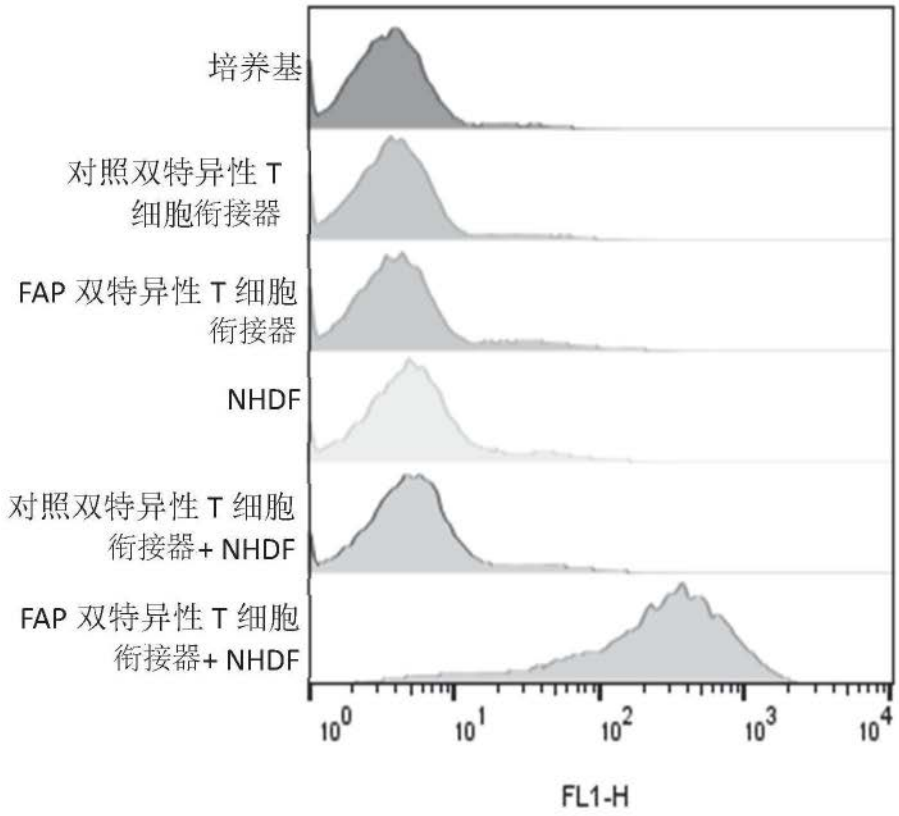

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
EpCAM结合活性（A_{450}）
抗FAP IgG
空载体
对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM 双特异性T细胞衔接器
EpCAM 双特异性T细胞衔接器 (未涂覆板)

图2C


培养基
对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
NHDF
对照双特异性 T 细胞衔接器+ NHDF
FAP 双特异性 T 细胞衔接器+ NHDF
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-H

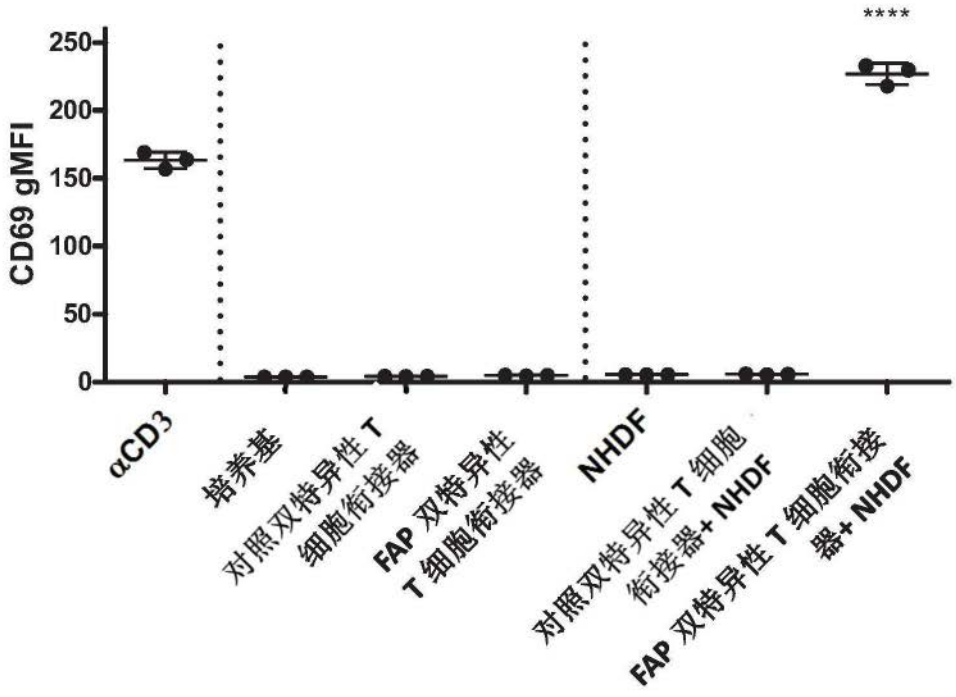
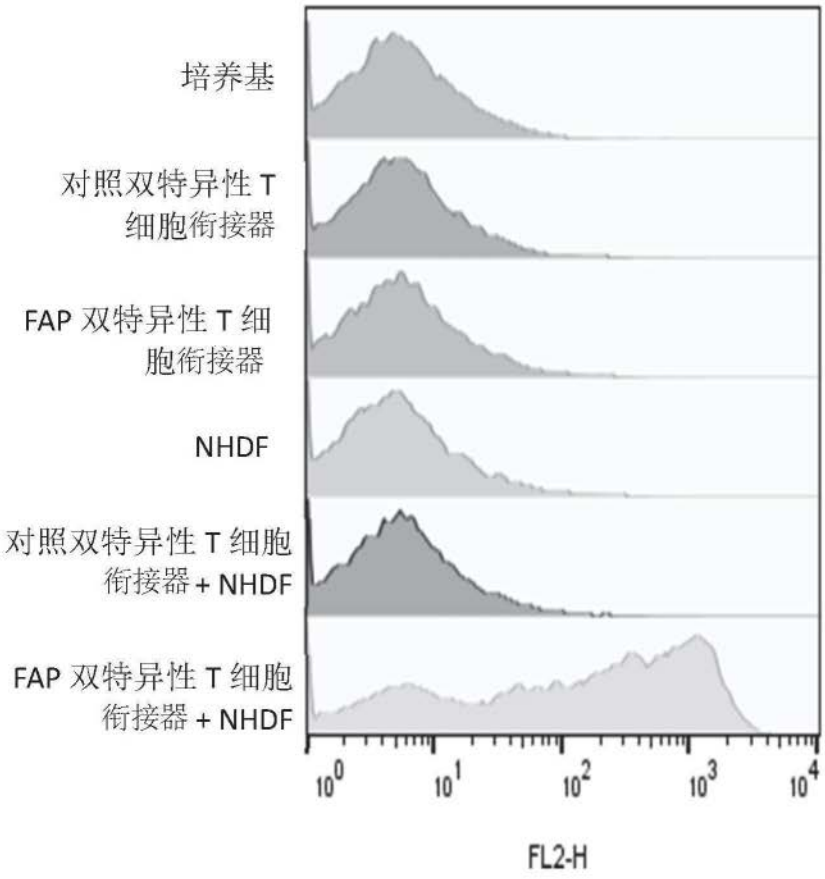

****
CD69 gMFI
250
200
150
100
50
0
αCD3
培养基
对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
NHDF
对照双特异性 T 细胞衔接器+ NHDF
FAP 双特异性 T 细胞衔接器+ NHDF

图3A


培养基
对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
NHDF
对照双特异性 T 细胞衔接器 + NHDF
FAP 双特异性 T 细胞衔接器 + NHDF
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H

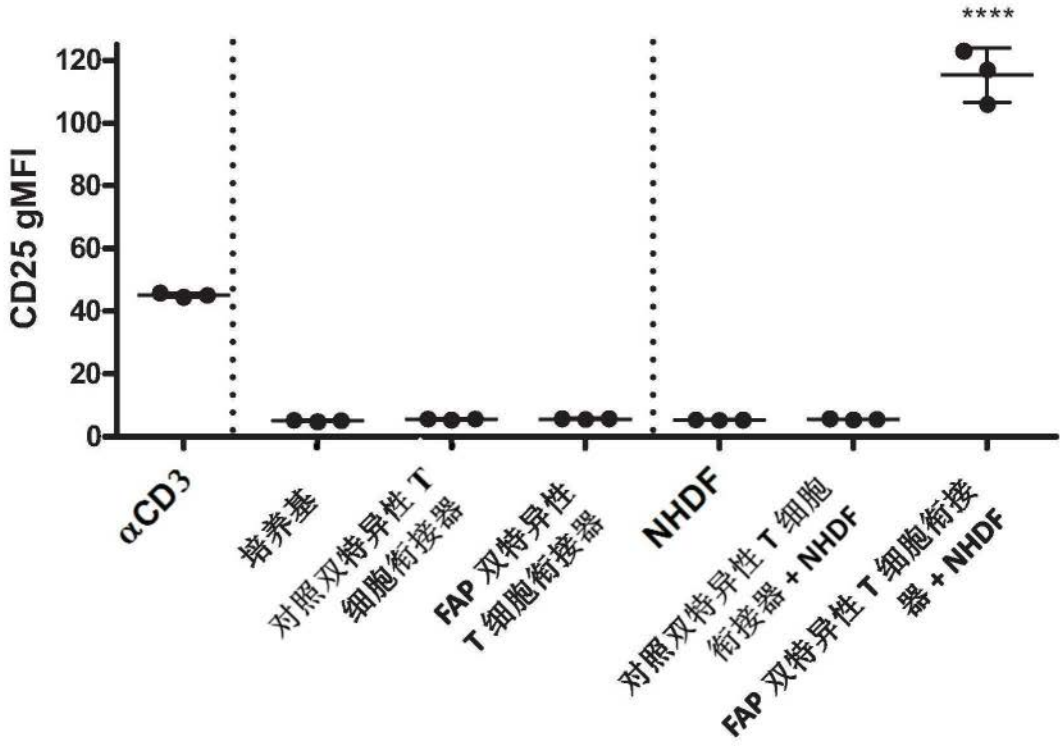

****
120
100
80
60
40
20
0
CD25 gMFI
αCD3
培养基
对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
NHDF
对照双特异性 T 细胞衔接器 + NHDF
FAP 双特异性 T 细胞衔接器 + NHDF

图3B

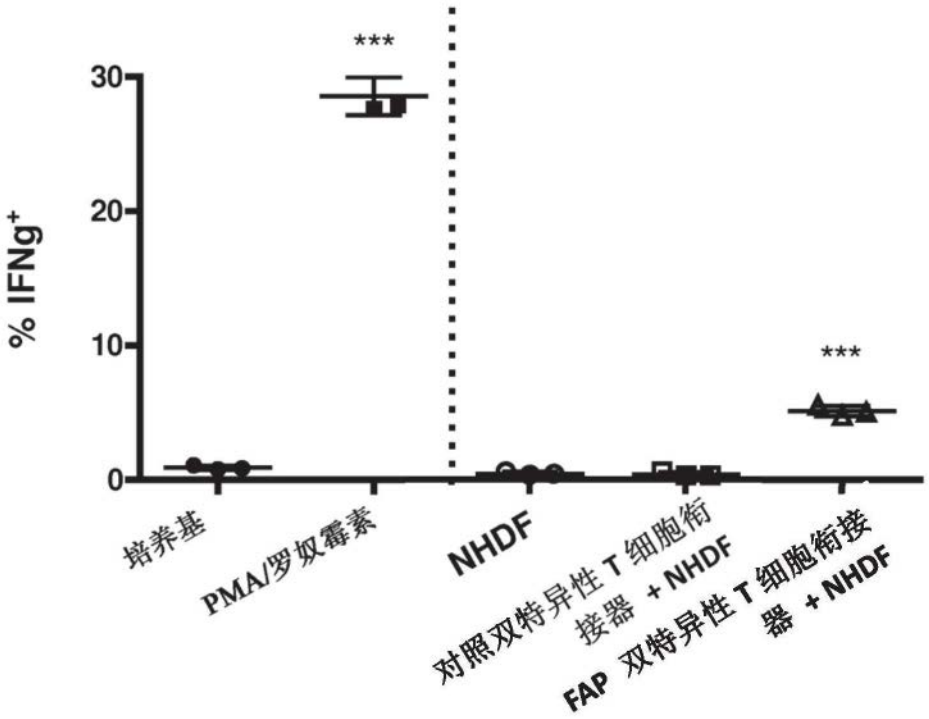

***
30
20
10
0
% IFNg+
***
培养基
PMA/罗奴霉素
NHDF
对照双特异性T细胞衔接器 + NHDF
FAP 双特异性T细胞衔接器 + NHDF

图4A

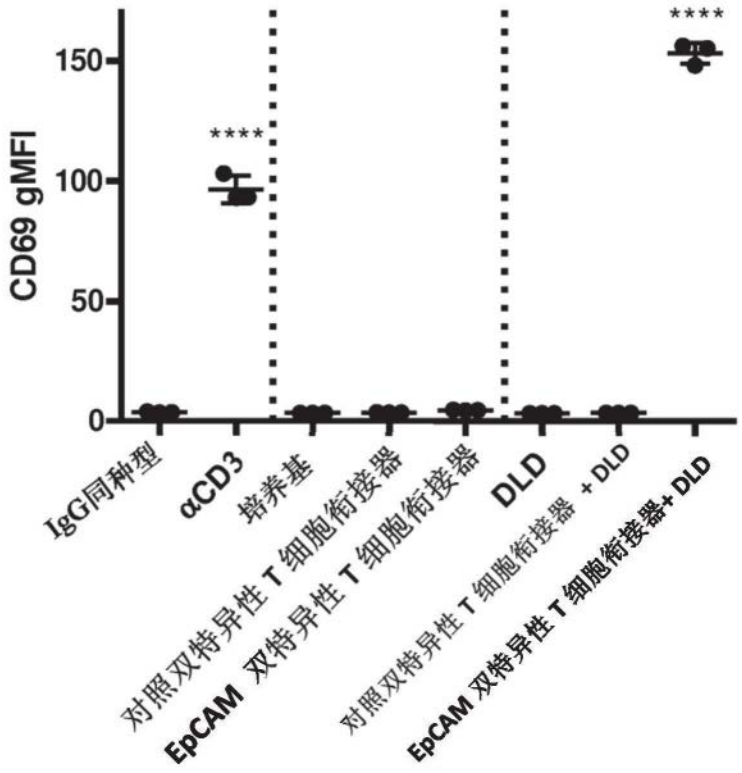

****
****
150
100
50
0
CD69 gMFI
IgG同种型
αCD3
培养基
对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM 双特异性T细胞衔接器
DLD
对照双特异性T细胞衔接器 + DLD
EpCAM 双特异性T细胞衔接器+ DLD

图4B

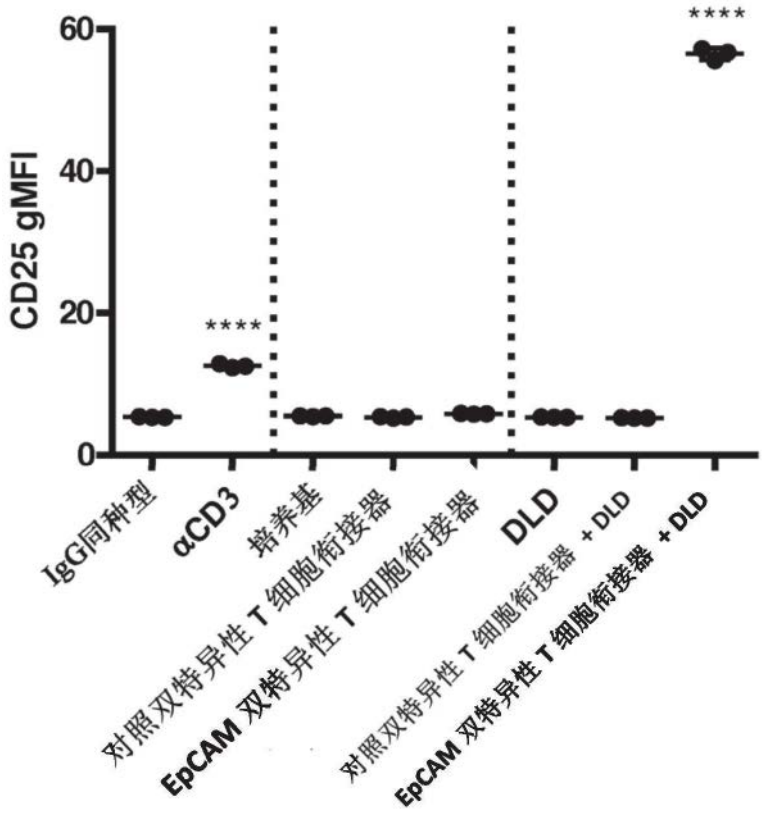

CD25 gMFI
60
40
20
0
****
****
IgG同种型
αCD3
培养基
对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM双特异性T细胞衔接器
DLD
对照双特异性T细胞衔接器 + DLD
EpCAM双特异性T细胞衔接器 + DLD

图4C

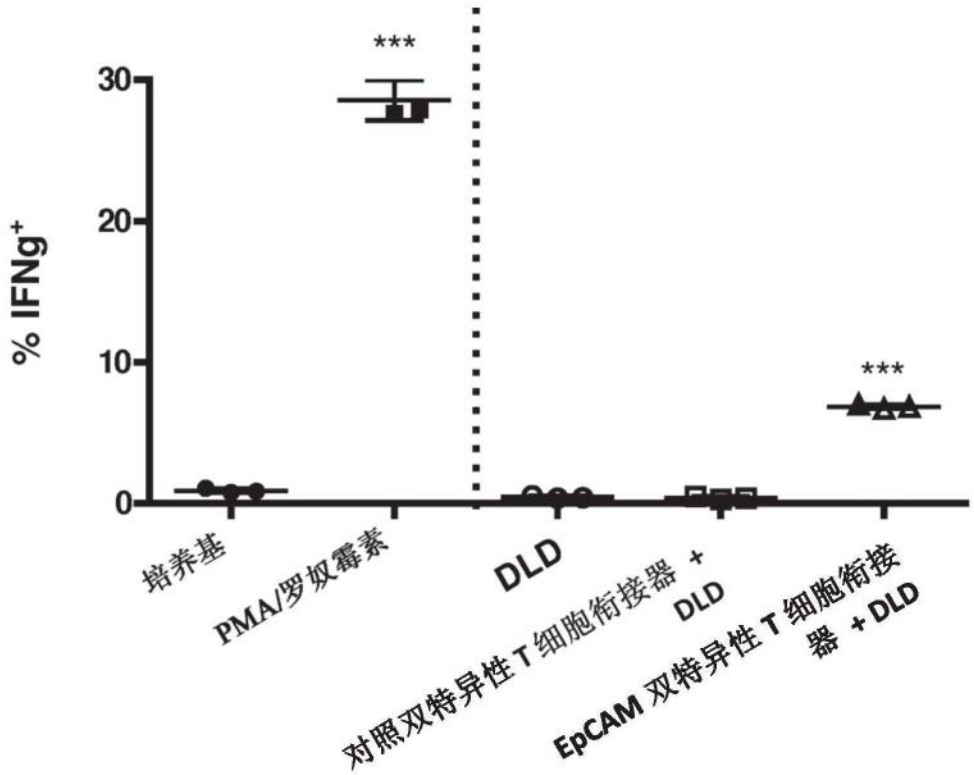

% IFNg+
30
20
10
0
***
***
培养基
PMA/罗奴霉素
DLD
对照双特异性T细胞衔接器 + DLD
EpCAM双特异性T细胞衔接器 + DLD

图5A

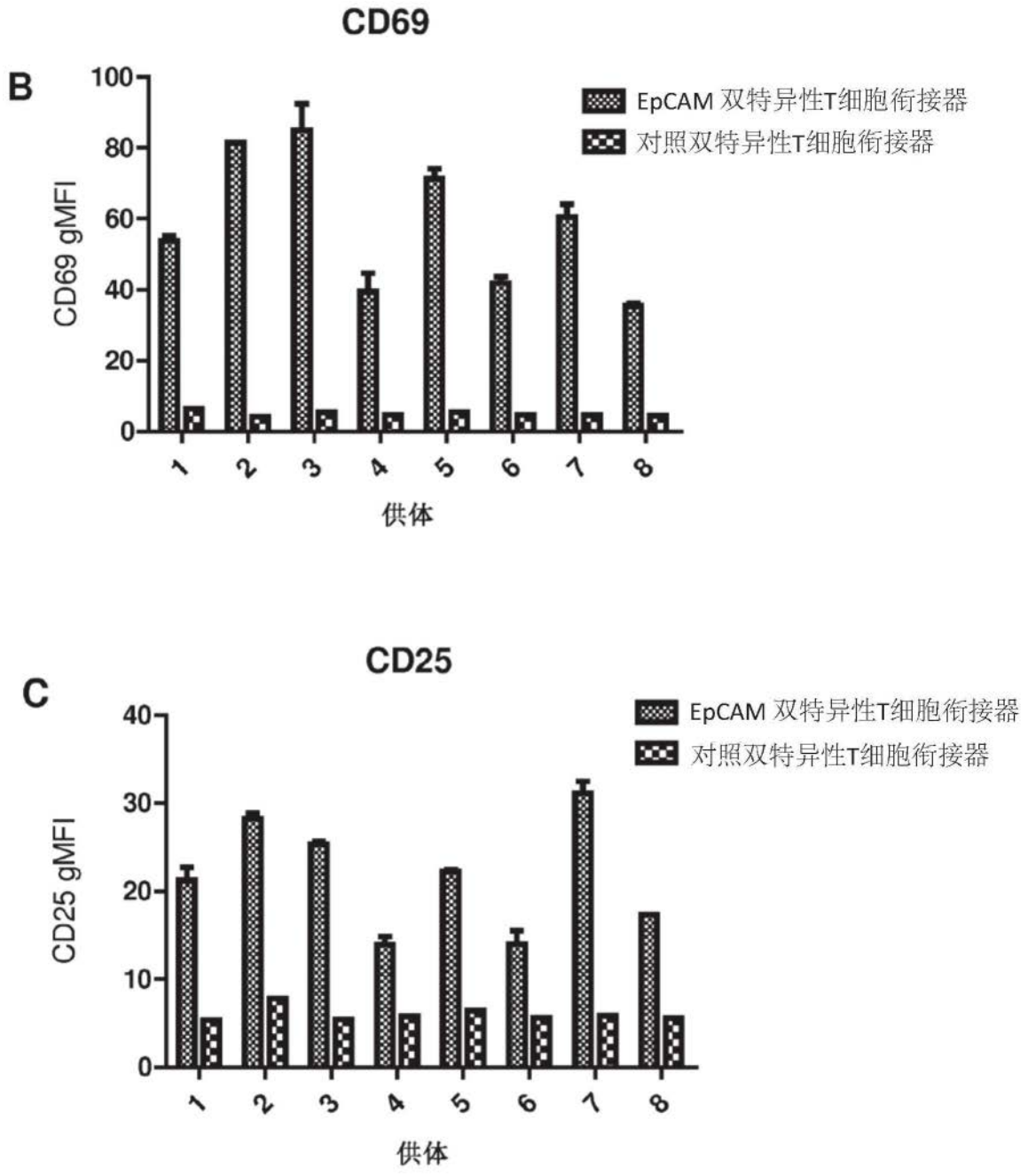

CD69
B
100
80
60
40
20
0
CD69 gMFI
EpCAM 双特异性T细胞衔接器
对照双特异性T细胞衔接器
1
2
3
4
5
6
7
8
供体
CD25
C
40
30
20
10
0
CD25 gMFI
EpCAM 双特异性T细胞衔接器
对照双特异性T细胞衔接器
1
2
3
4
5
6
7
8
供体

图5(续)

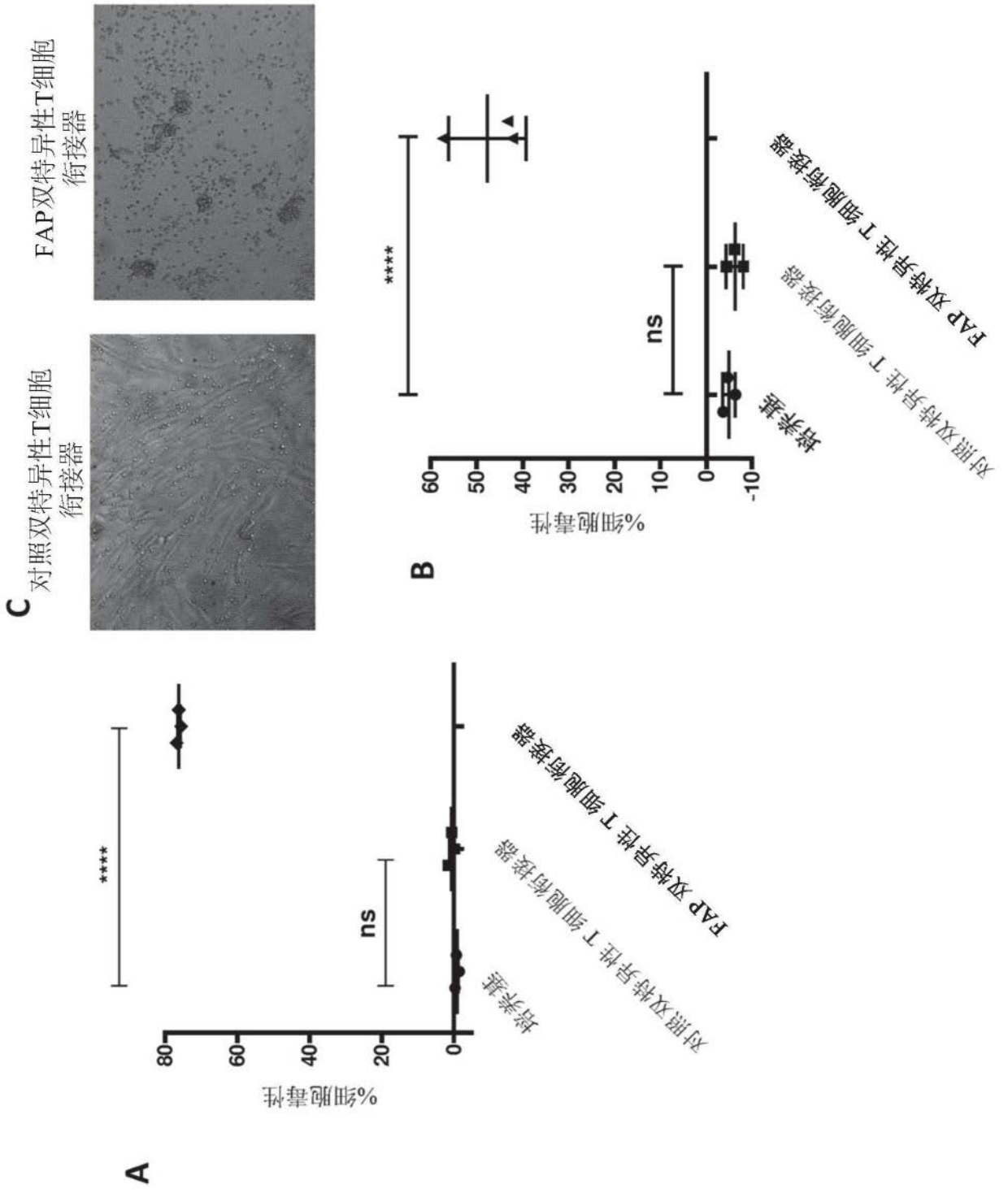
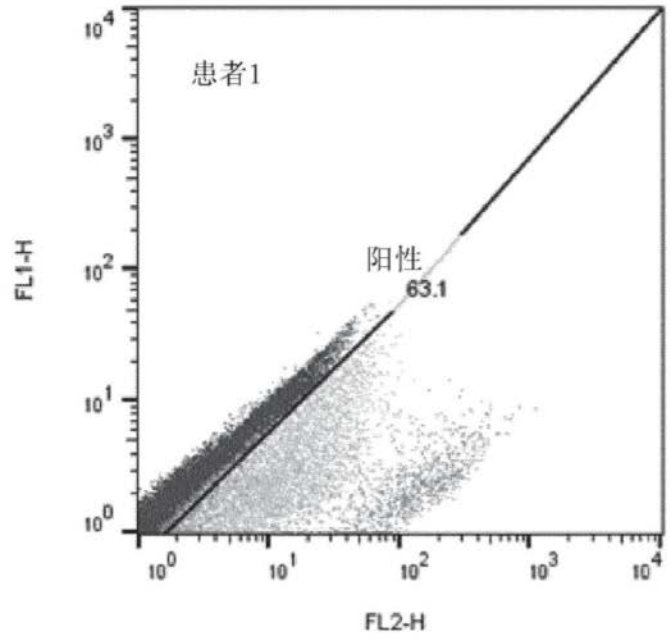
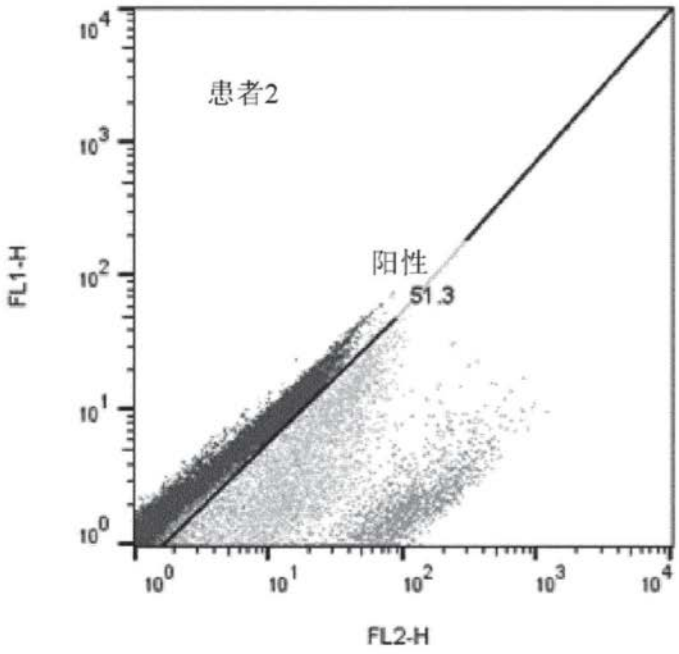

A
%细胞毒性
0
20
40
60
80
ns
****
培养基
对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
B
%细胞毒性
-10
0
10
20
30
40
50
60
ns
****
培养基
对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
C
对照双特异性T细胞
衔接器
FAP双特异性T细胞
衔接器

图6

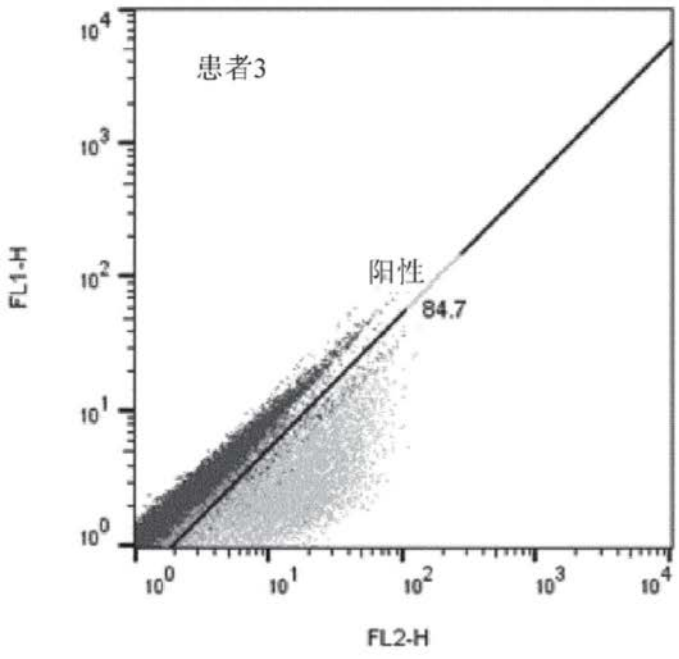


	样品名称	阳性：亲本频率
	未染色的	0.19
	同种型C	0.41
	EpCAM双特异性T细胞衔接器	15.7
	FAP双特异性T细胞衔接器	63.1

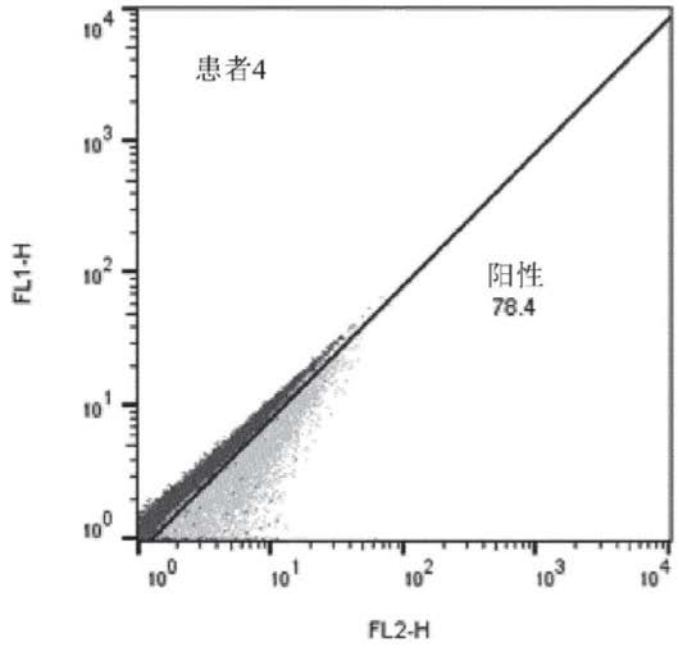


	样品名称	阳性：亲本频率
	未染色的	0.46
	同种型C	0.56
	EpCAM双特异性T细胞衔接器	23.9
	FAP双特异性T细胞衔接器	51.3

图7A



样品名称	阳性：亲本频率
未染色的	1.06
同种型C	1.12
EpCAM双特异性T细胞衔接器	4.48
FAP双特异性T细胞衔接器	84.7



样品名称	阳性：亲本频率
未染色的	0.78
同种型C	0.22
EpCAM双特异性T细胞衔接器	0.37
FAP双特异性T细胞衔接器	78.4

图7A(续)

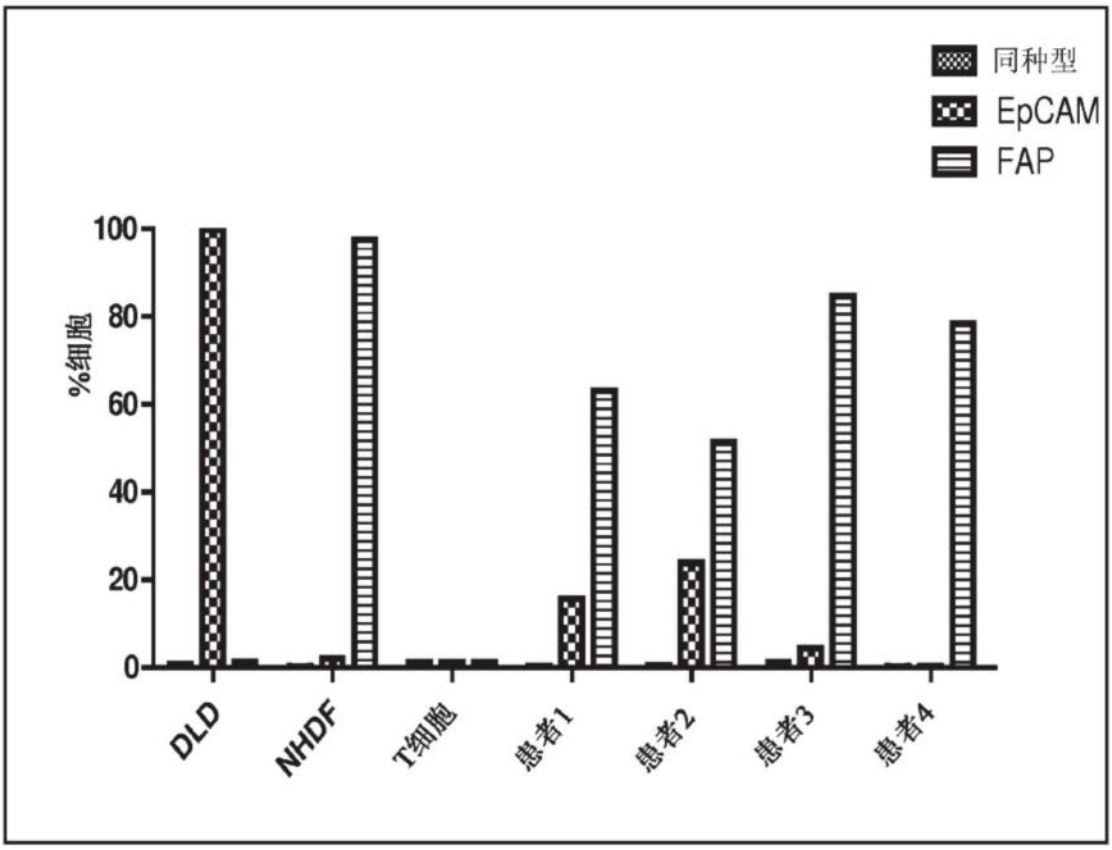

同种型
EpCAM
FAP
%细胞
100
80
60
40
20
0
DLD
NHDF
T细胞
患者1
患者2
患者3
患者4

图7B

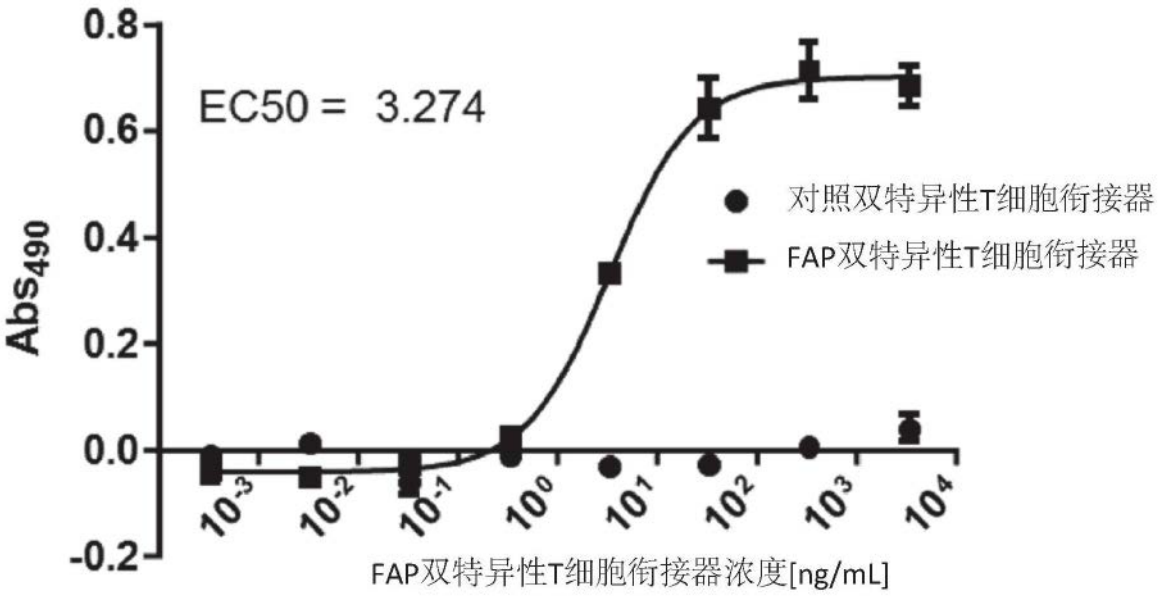

EC50 = 3.274
Abs490
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
对照双特异性T细胞衔接器
FAP双特异性T细胞衔接器
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
104
FAP双特异性T细胞衔接器浓度[ng/mL]

图8A

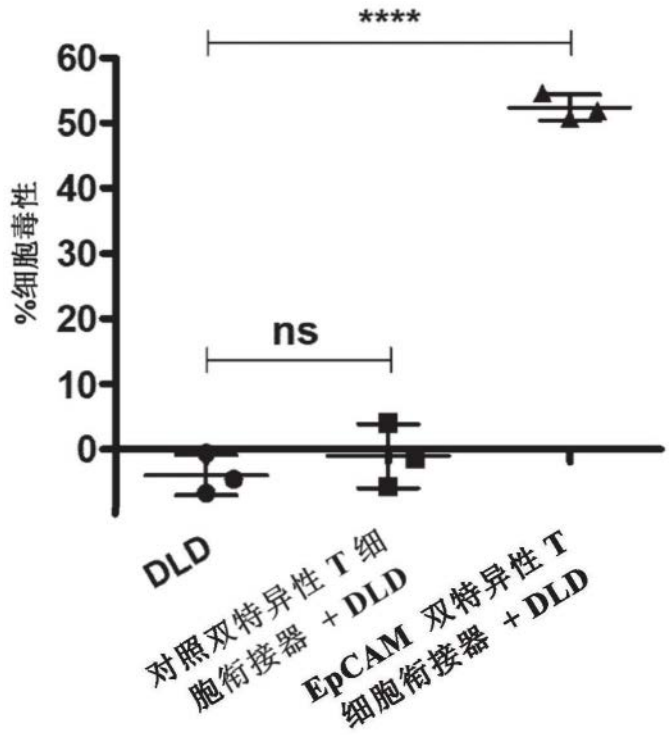
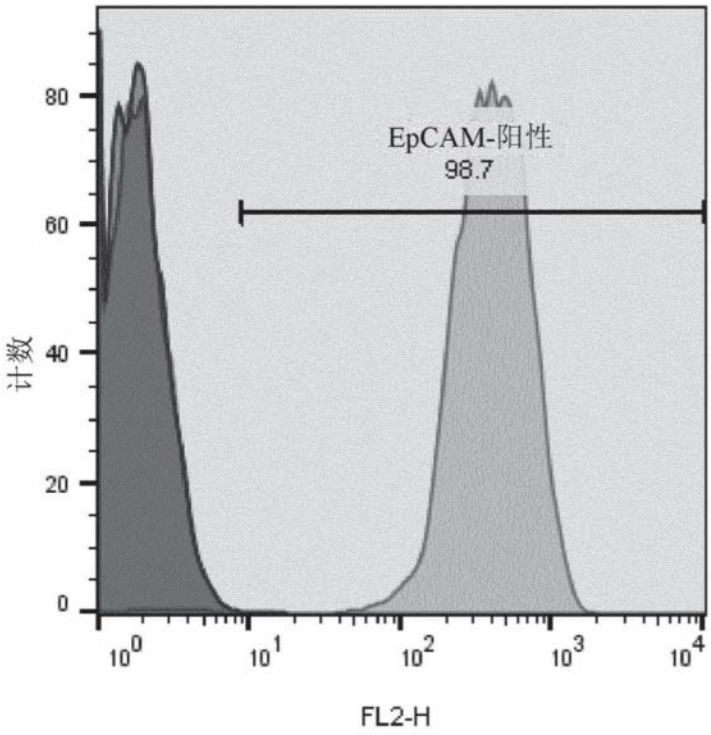
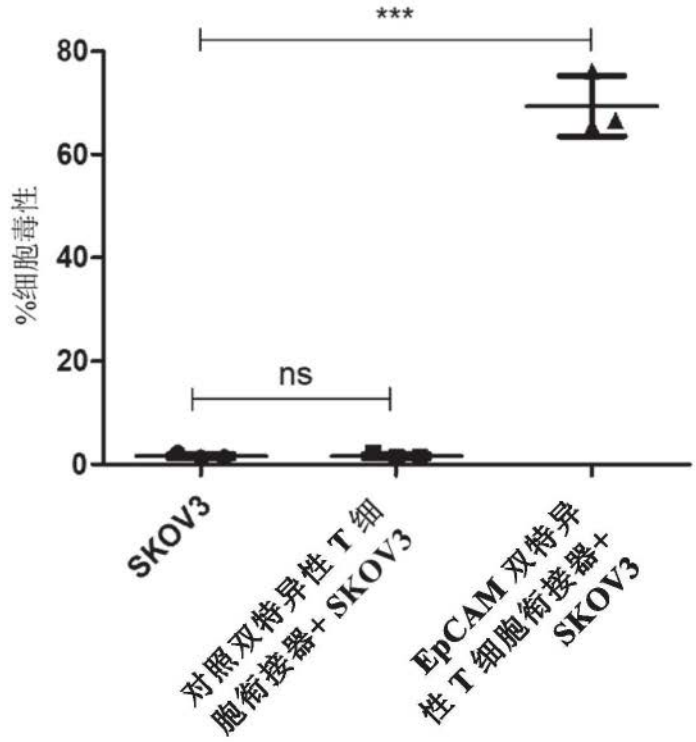

****
60
50
40
30
20
10
0
%细胞毒性
ns
DLD
对照双特异性 T 细胞衔接器 + DLD
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器 + DLD

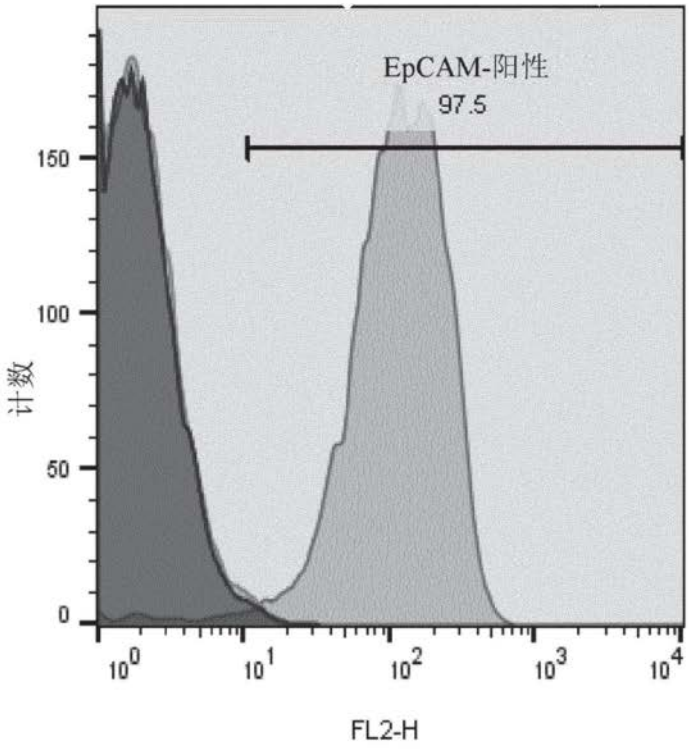
图8B



	样品名称	EpCAM-阳性：亲本频率	几何平均：FL2-H
■	[DLD未染色的.021]	0.40	1.77
■	[DLD iso.022]	0.36	1.81
■	[DLD ep.023]	98.7	361

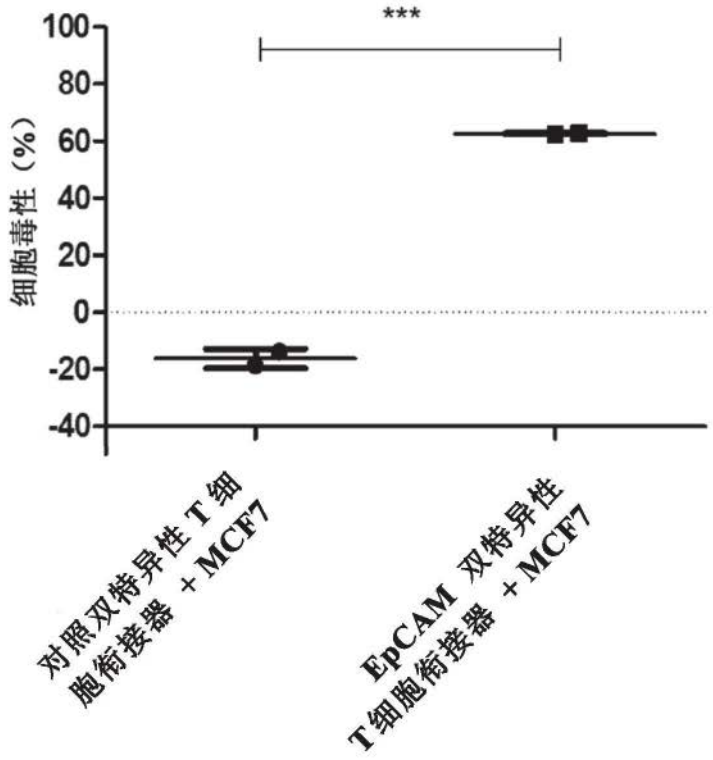
图8C

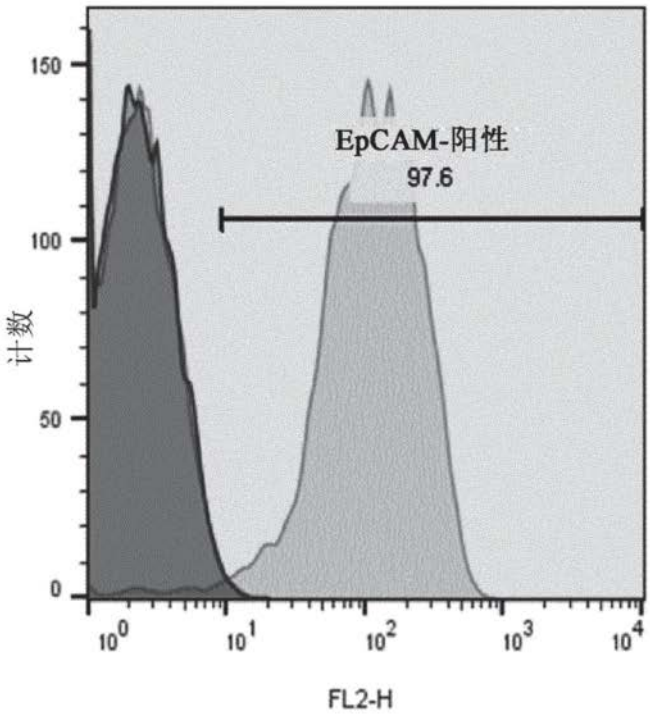




	样品名称	EpCAM-阳性：亲本频率	几何平均：FL2-H
	[Skov未染色的.024]	1.48	1.99
	[Skov iso.025]	1.53	2.00
	[Skov ep.026]	97.5	103

图9A





	样品名称	EpCAM-阳性：亲本频率	几何平均：FL2-H
■	[MCF7未染色的.018]	0.84	2.24
■	[MCF7 iso.019]	0.86	2.21
■	[MCF7 ep.020]	97.6	101

图9B

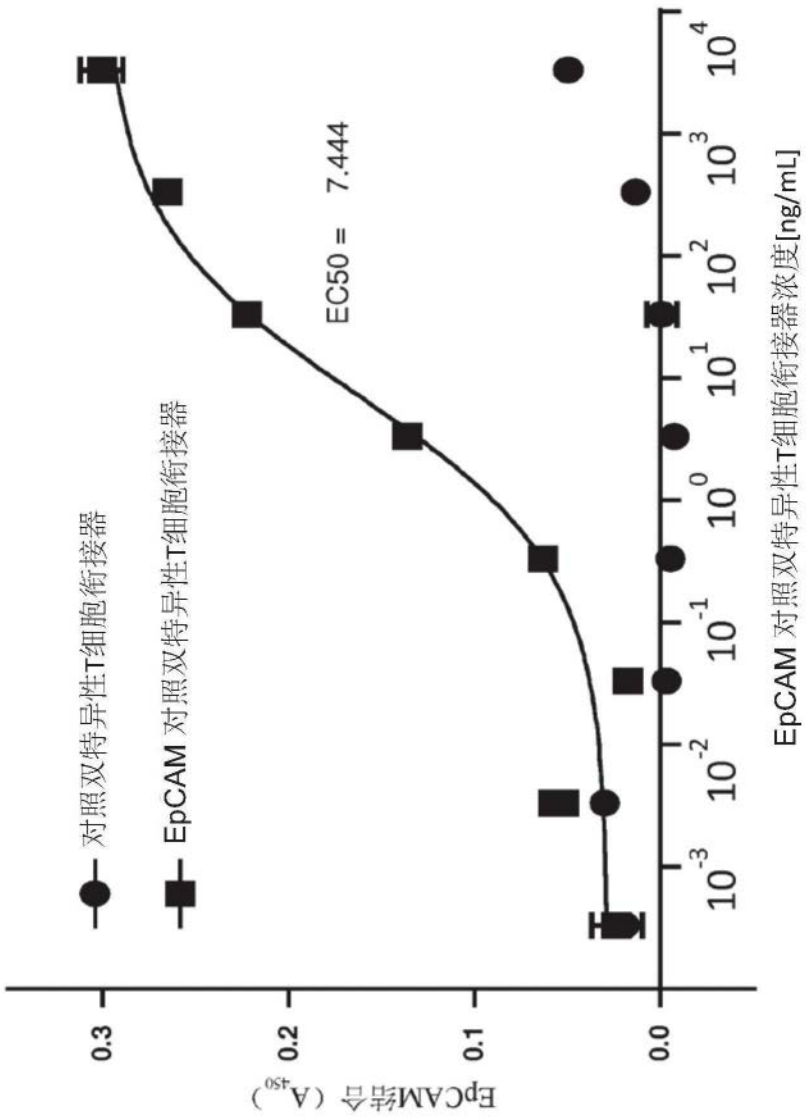

对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM 对照双特异性T细胞衔接器
EC50 = 7.444
EpCAM结合（A_{450}）
0.3
0.2
0.1
0.0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
10^{3}
10^{4}
EpCAM 对照双特异性T细胞衔接器浓度[ng/mL]

图10

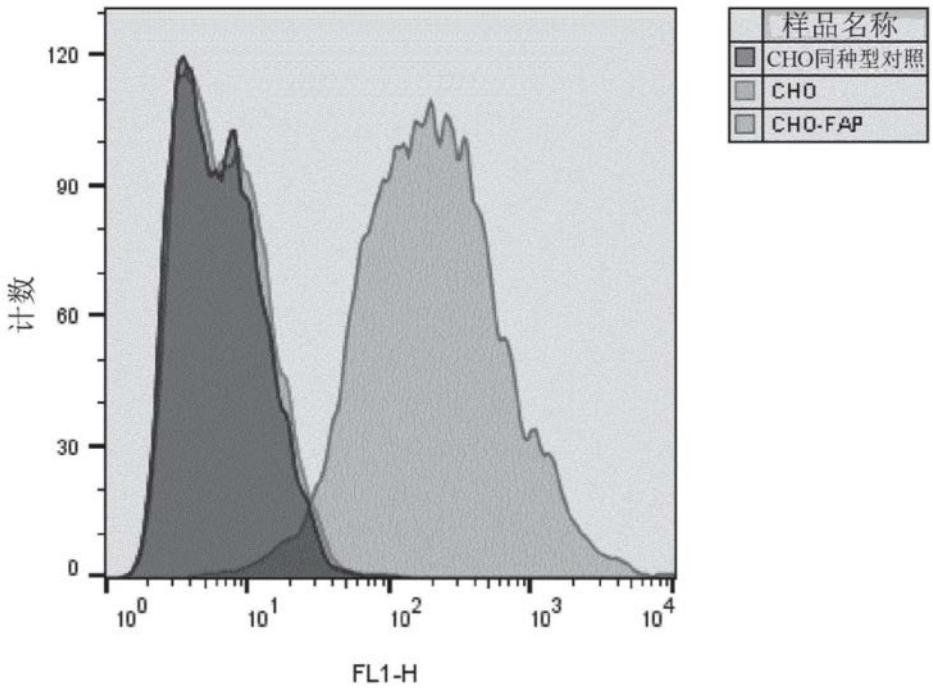

样品名称
CHO同种型对照
CHO
CHO-FAP
计数
120
90
60
30
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-H

图11A

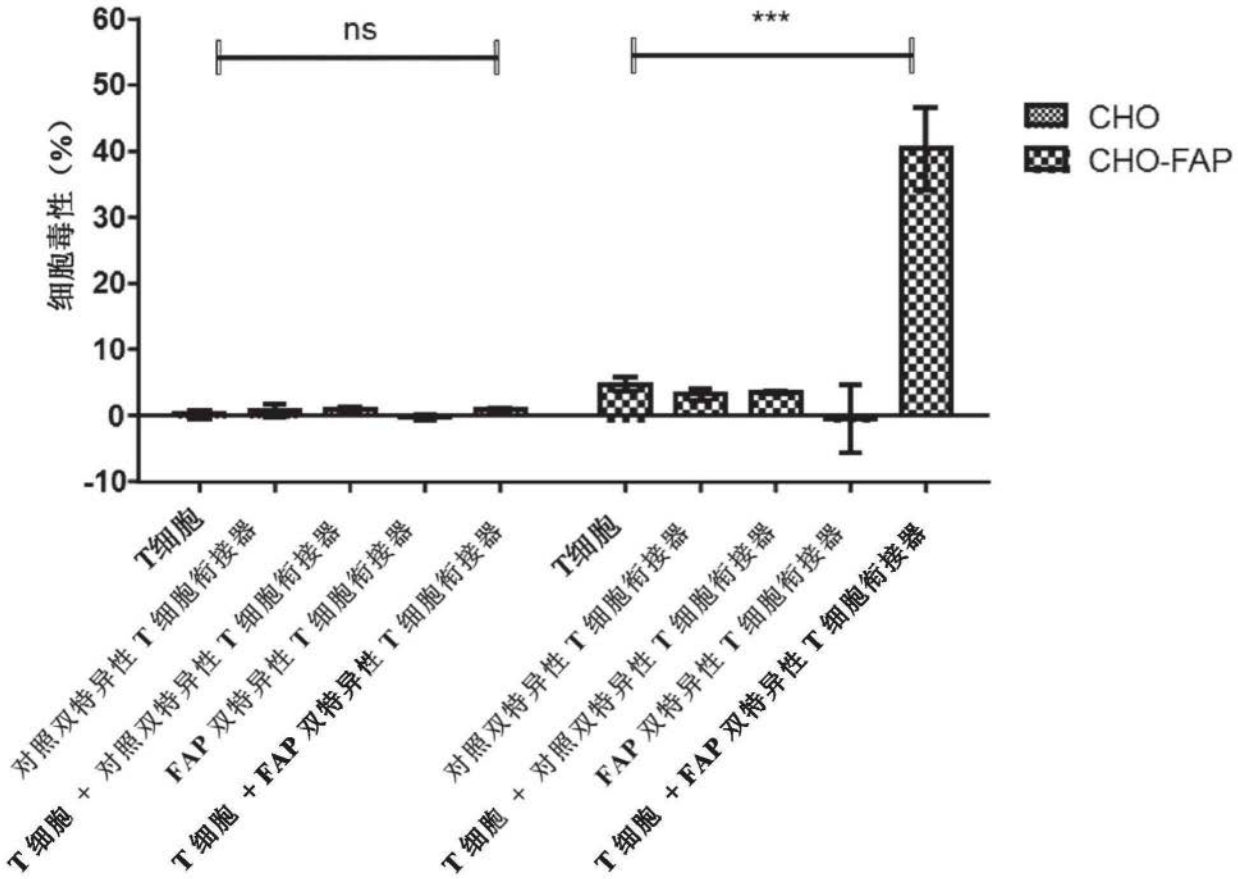

ns
***
细胞毒性（%）
60
50
40
30
20
10
0
-10
CHO
CHO-FAP
T细胞
对照双特异性 T 细胞衔接器
T 细胞 + 对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
T 细胞 + FAP 双特异性 T 细胞衔接器
T细胞
对照双特异性 T 细胞衔接器
T 细胞 + 对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
T 细胞 + FAP 双特异性 T 细胞衔接器

图11B

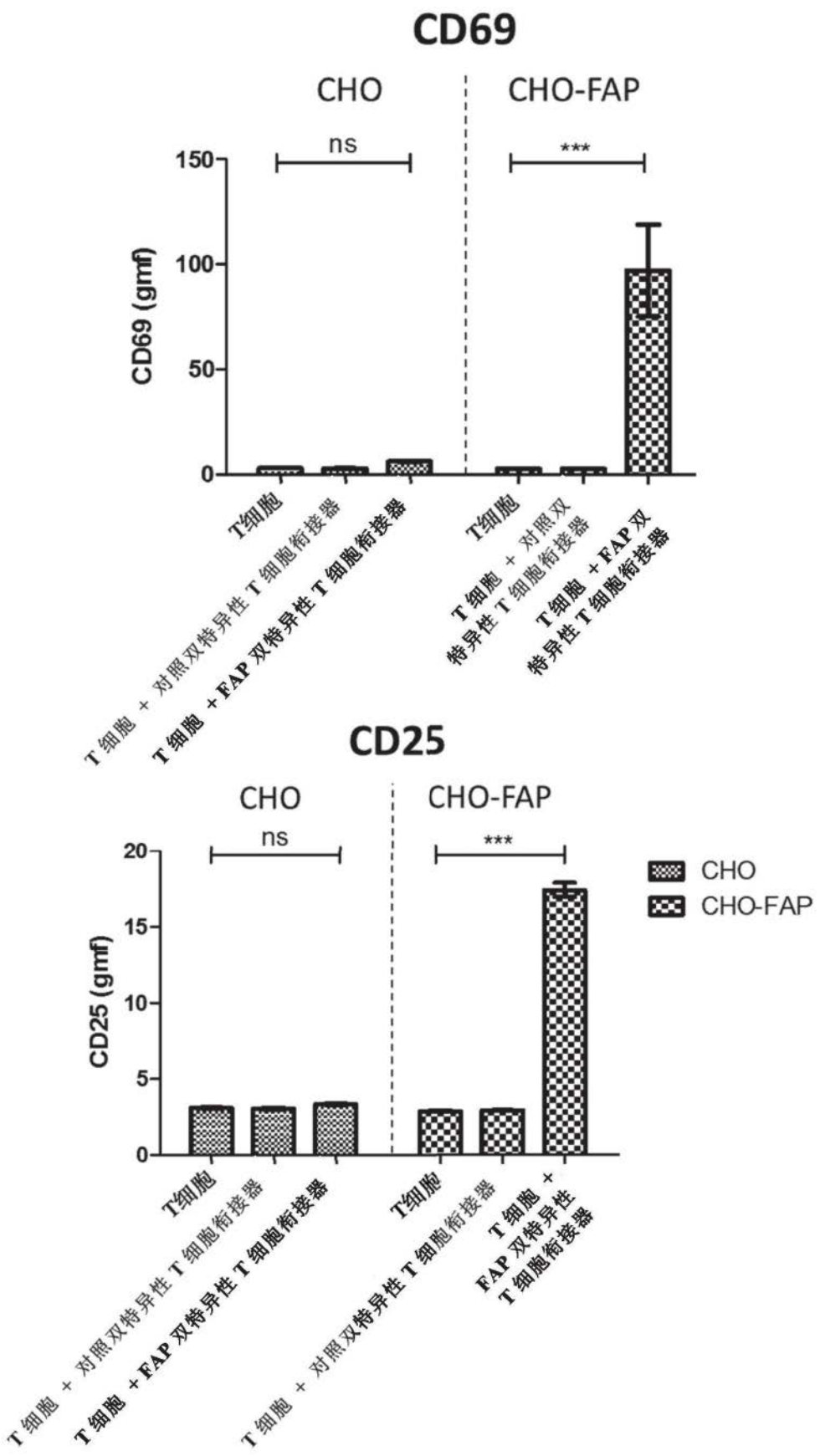
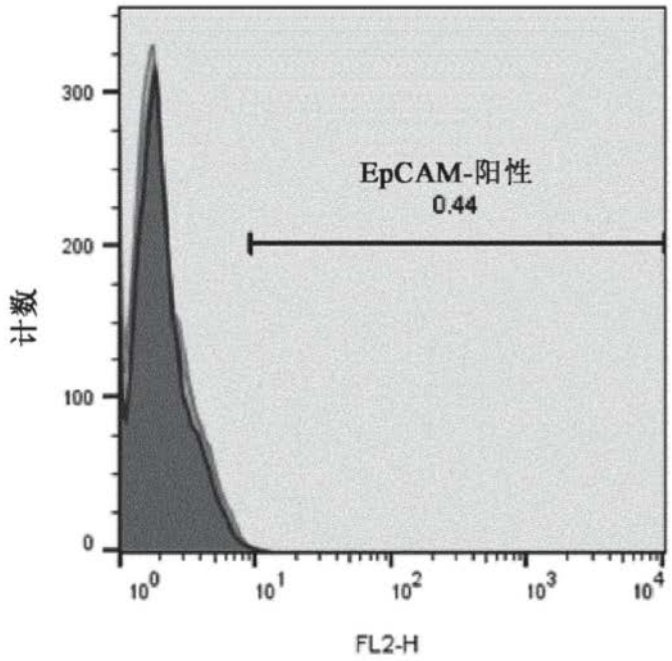
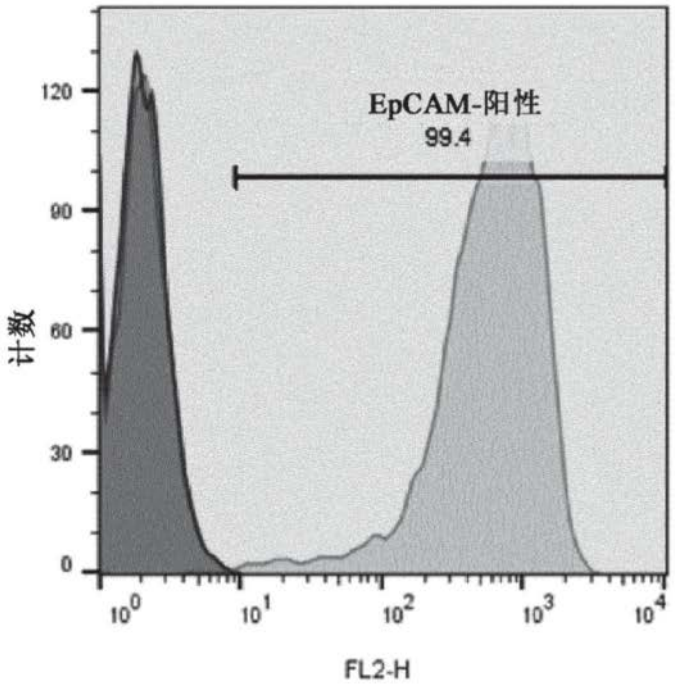

CD69
CHO
CHO-FAP
ns
***
150
100
50
0
CD69 (gmf)
T细胞
T细胞 + 对照双特异性T细胞衔接器
T细胞 + FAP双特异性T细胞衔接器
T细胞 + 对照双特异性T细胞衔接器
T细胞 + FAP双特异性T细胞衔接器
CD25
CHO
CHO-FAP
ns
***
20
15
10
5
0
CD25 (gmf)
CHO
CHO-FAP
T细胞
T细胞 + 对照双特异性T细胞衔接器
T细胞 + FAP双特异性T细胞衔接器
T细胞
T细胞 + 对照双特异性T细胞衔接器
T细胞 + FAP双特异性T细胞衔接器

图12



	样品名称	EpCAM-阳性：亲本频率	几何平均：FL2-H
■	[CHO未染色的.036]	0.38	2.06
□	[CHO iso.037]	0.42	2.08
□	[CHO ep.038]	0.44	2.02



	样品名称	EpCAM-阳性：亲本频率	几何平均：FL2-H
■	[CHO epcam未染色的.039]	0.093	2.03
□	[CHO-epcam iso.040]	0.15	2.05
□	[CHO-epcam ep.041]	99.4	513

图13A

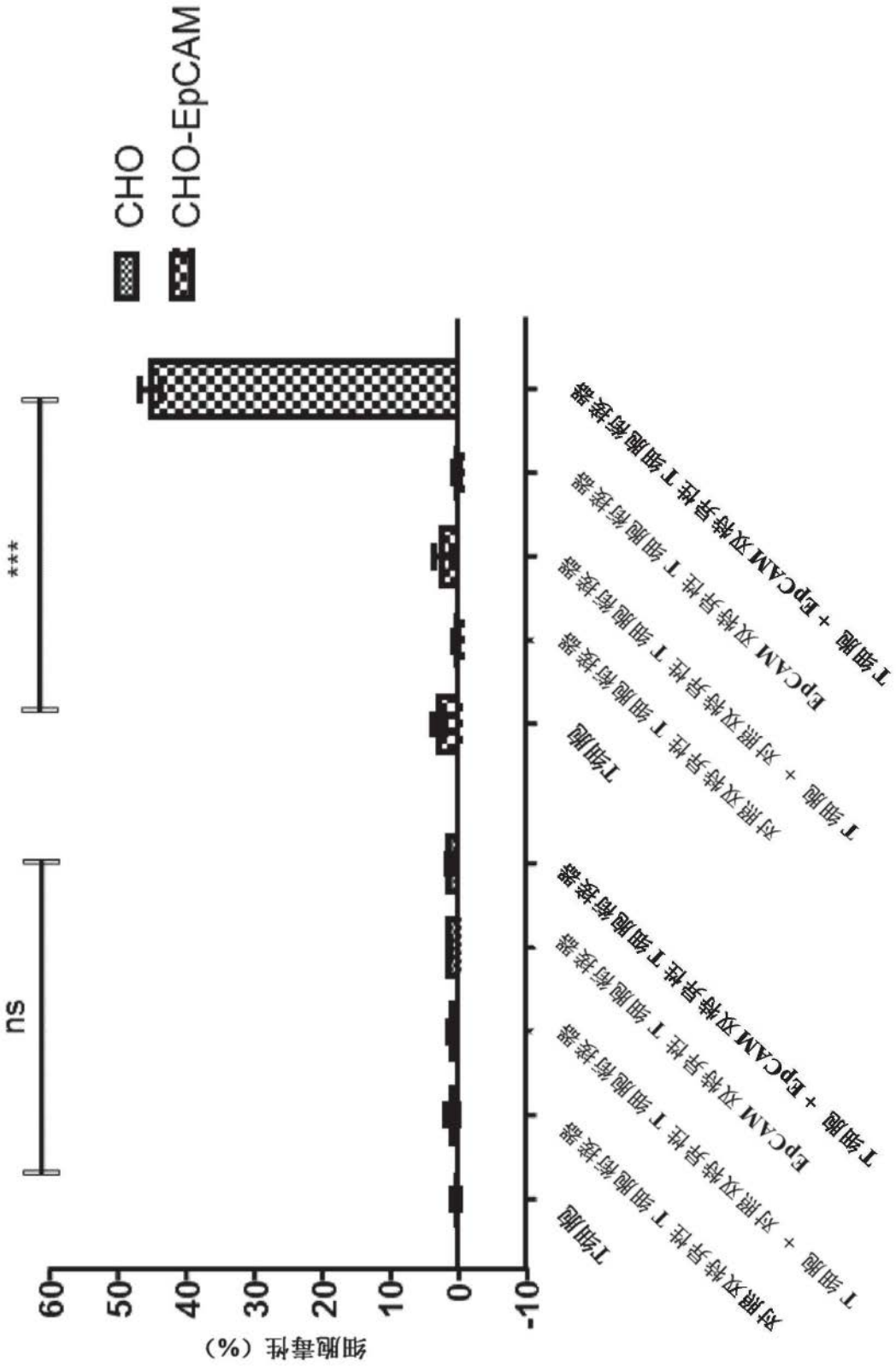

CHO
CHO-EpCAM
细胞毒性（%）
60
50
40
30
20
10
0
-10
***
ns
T细胞
对照双特异性 T 细胞衔接器
T 细胞 + 对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
T 细胞 + EpCAM双特异性 T 细胞衔接器

图13B

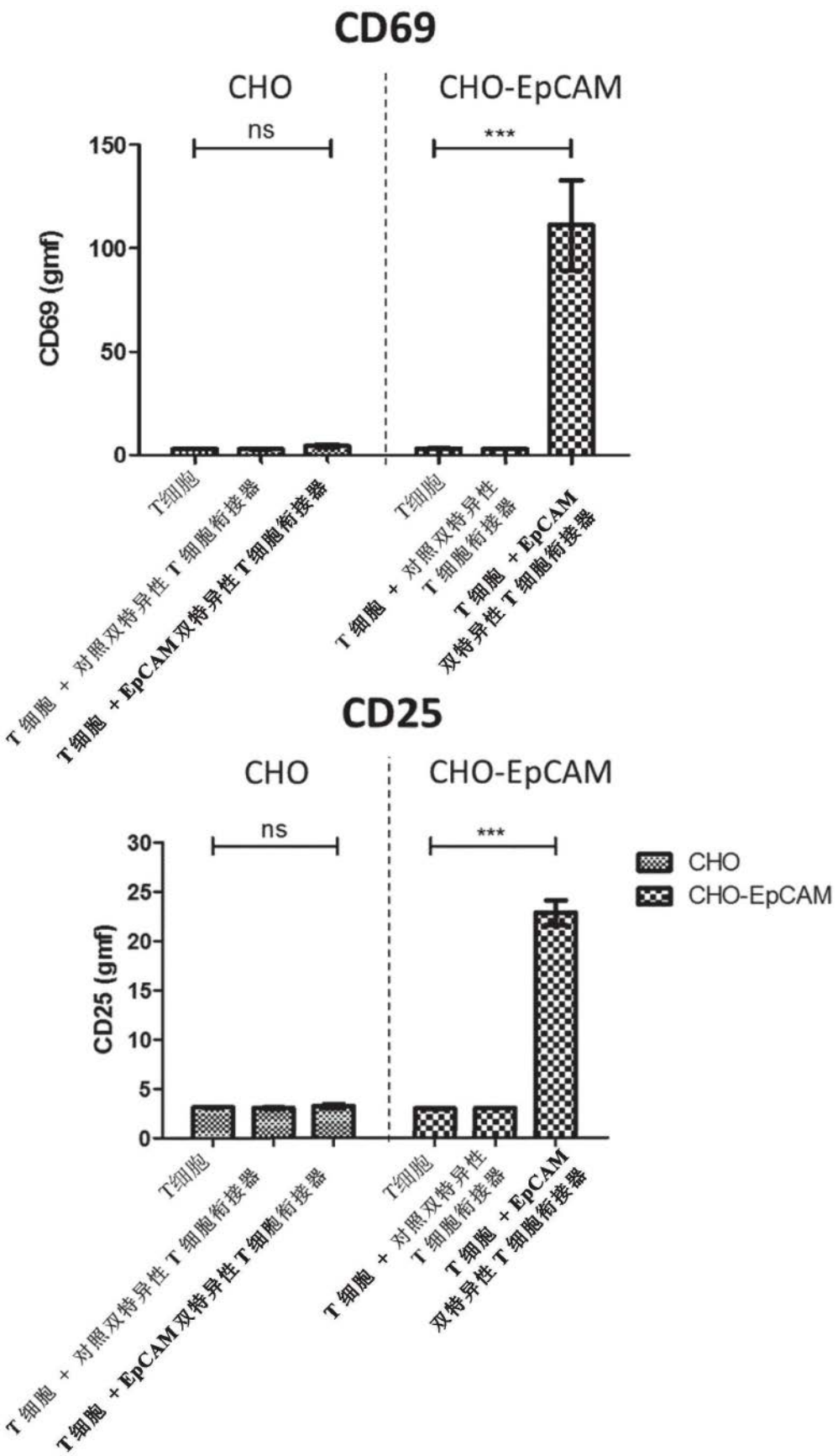

CD69
CHO
CHO-EpCAM
ns
***
150
100
50
0
CD69 (gmf)
T细胞
T细胞 + 对照双特异性T细胞衔接器
T细胞 + EpCAM双特异性T细胞衔接器
CD25
CHO
CHO-EpCAM
ns
***
30
25
20
15
10
5
0
CD25 (gmf)
CHO
CHO-EpCAM

图14

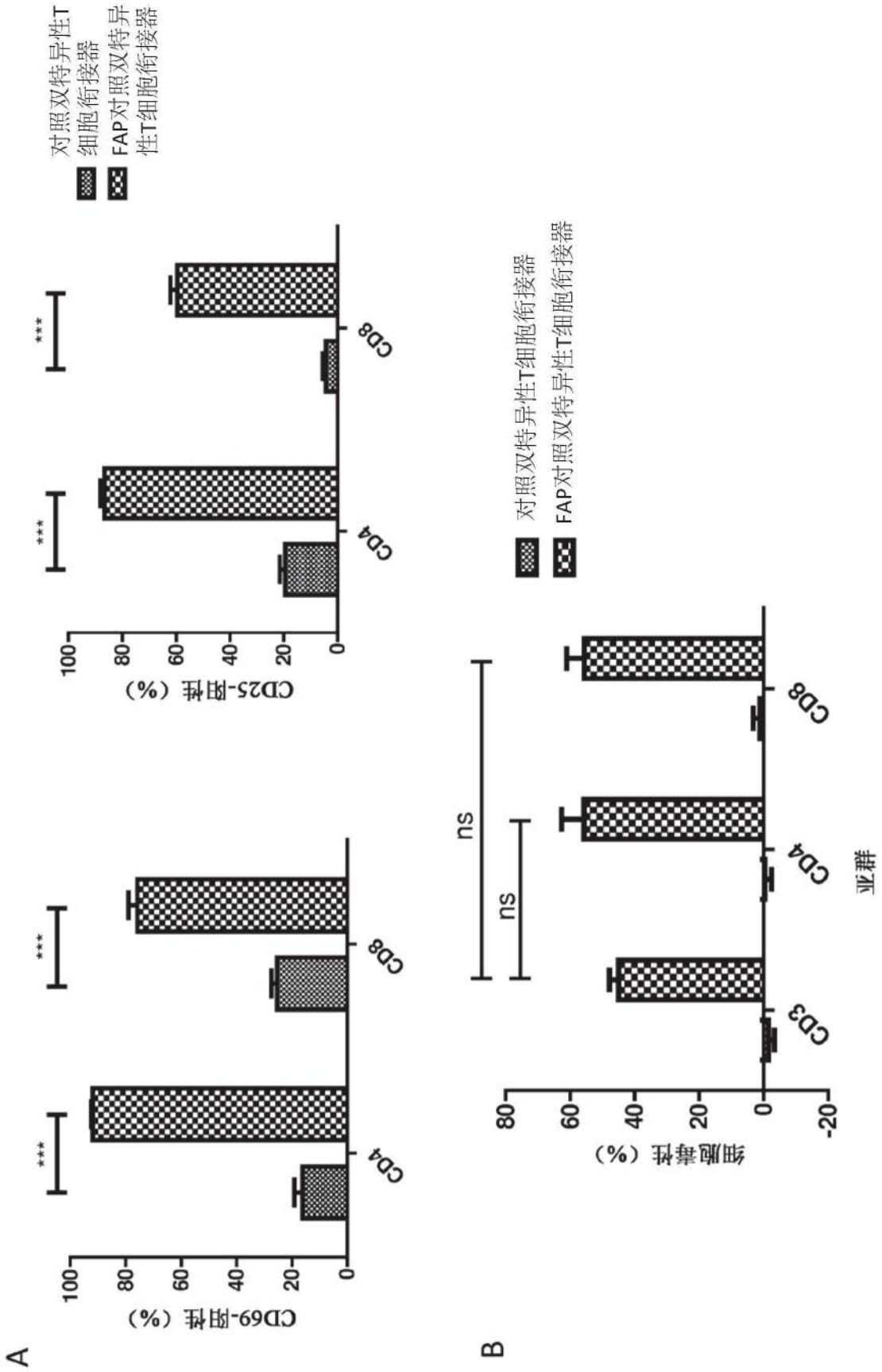

A
CD69-阳性（%）
CD25-阳性（%）
对照双特异性T细胞衔接器
FAP对照双特异性T细胞衔接器
CD4
CD8
***
B
细胞毒性（%）
CD3
CD4
CD8
亚群
ns

图15

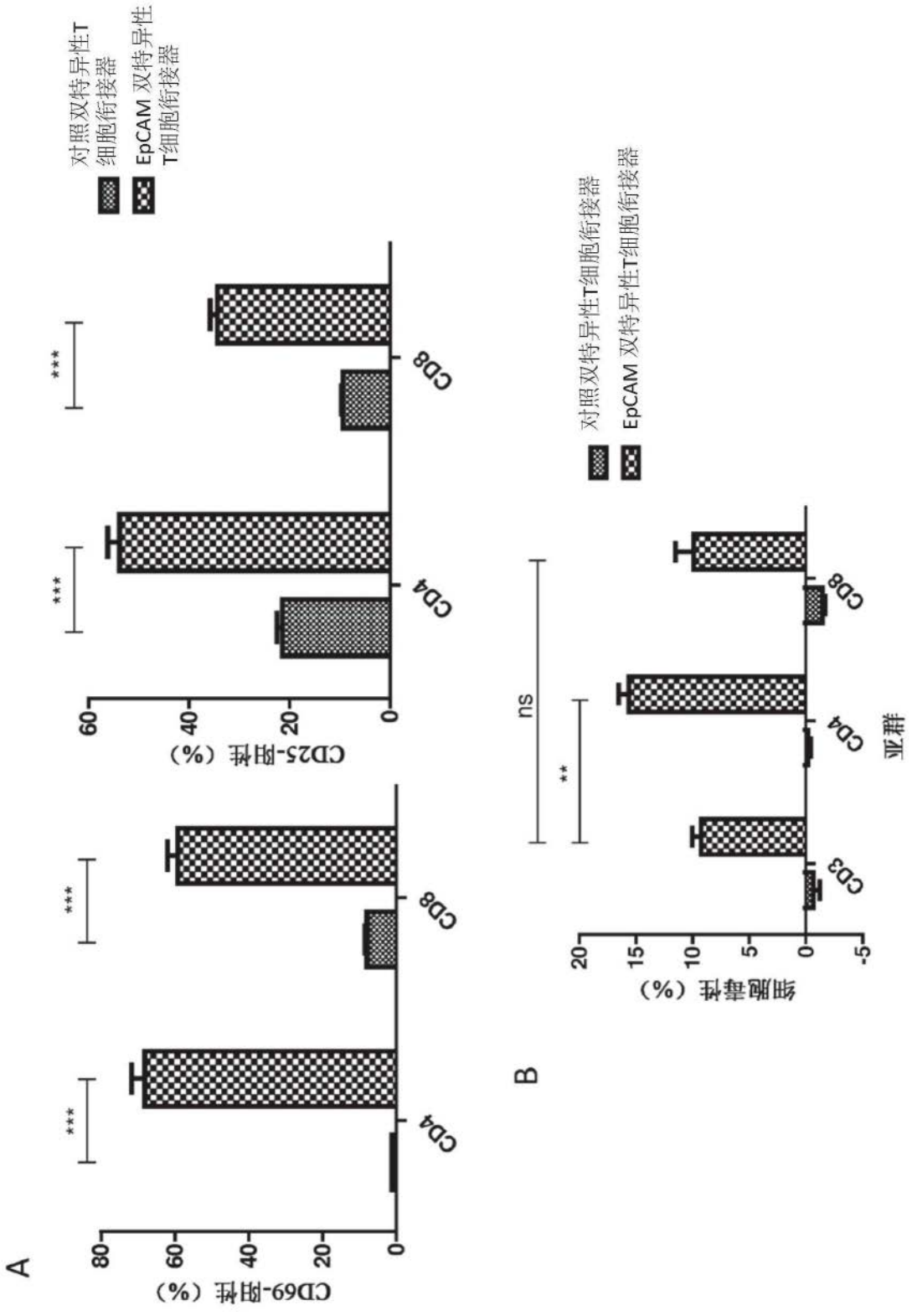

A
CD69-阳性（%）
CD25-阳性（%）
对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM 双特异性T细胞衔接器
CD4
CD8
***
B
细胞毒性（%）
亚群
CD3
ns
**

图16

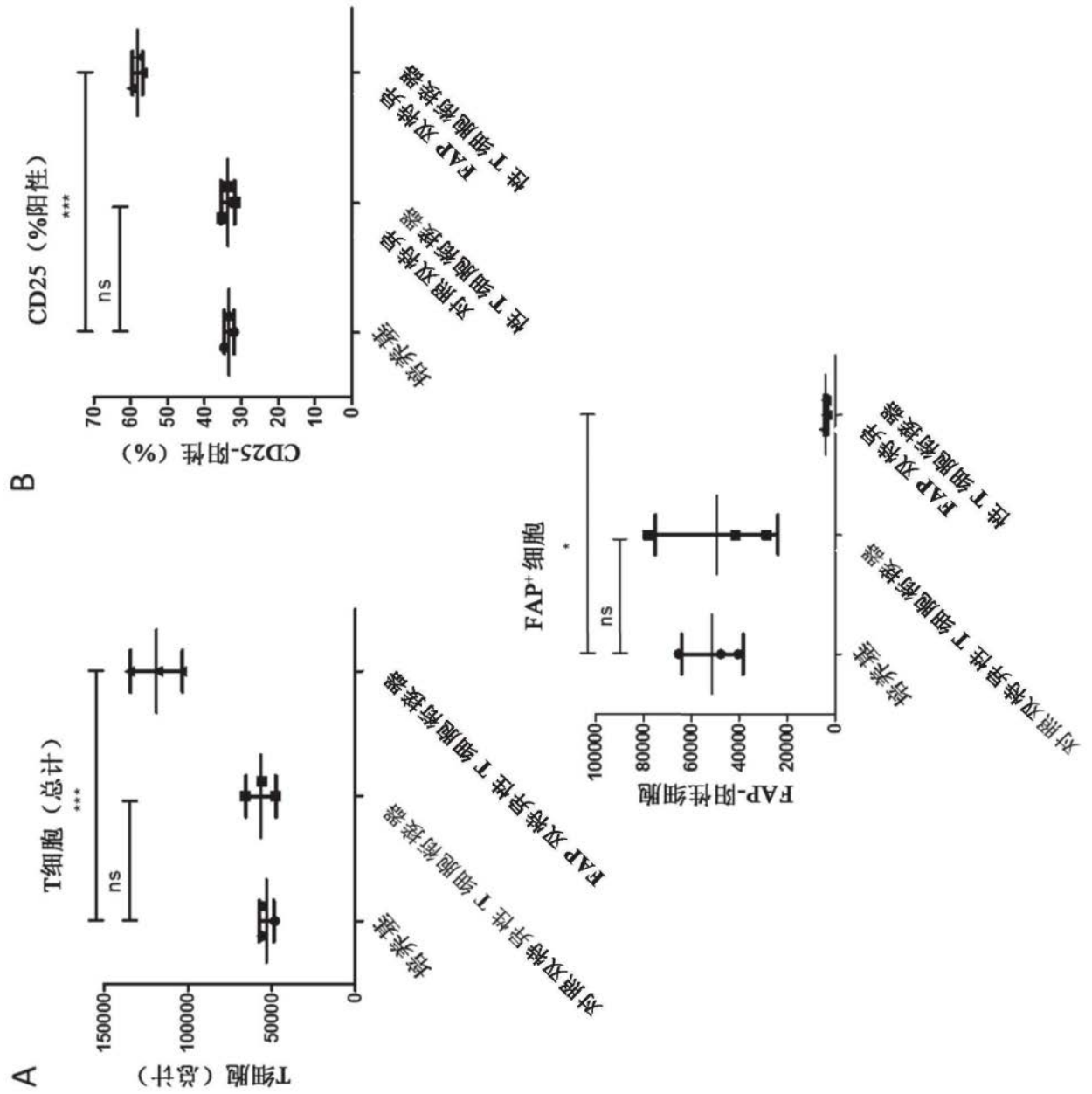

A
T细胞（总计）
150000
100000
50000
0
***
ns
T细胞（总计）
未养基
对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
FAP-阳性细胞
100000
80000
60000
40000
20000
0
*
ns
FAP+细胞
未养基
对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
B
CD25-阳性（%）
70
60
50
40
30
20
10
0
***
ns
CD25（%阳性）
未养基
对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器

图17

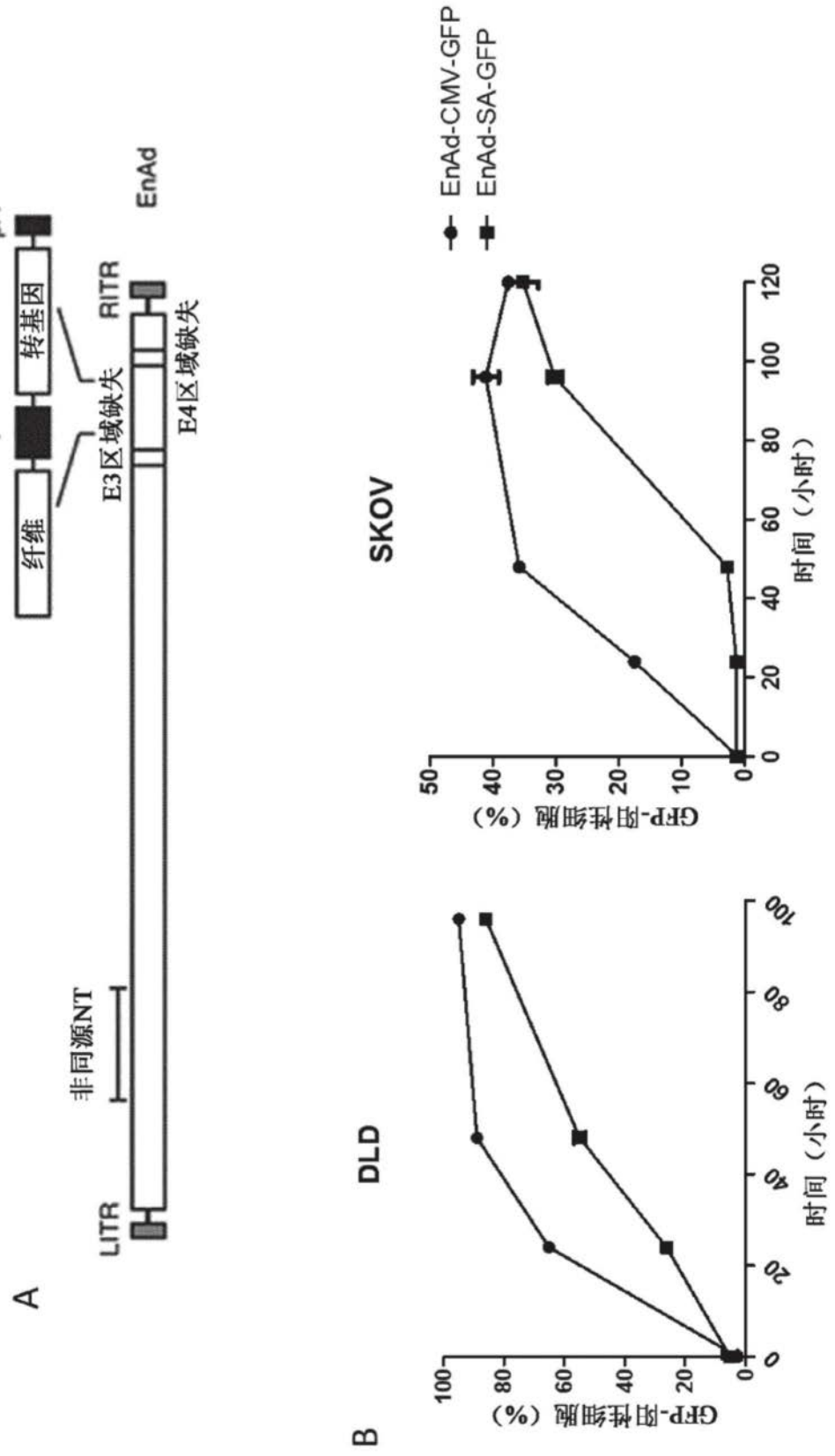

A
pA
转基因
纤维
P
E3区域缺失
RITR
EnAd
E4区域缺失
非同源NT
LITR
B
DLD
GFP-阳性细胞（%）
时间（小时）
SKOV
EnAd-CMV-GFP
EnAd-SA-GFP
GFP-阳性细胞（%）
时间（小时）

图18

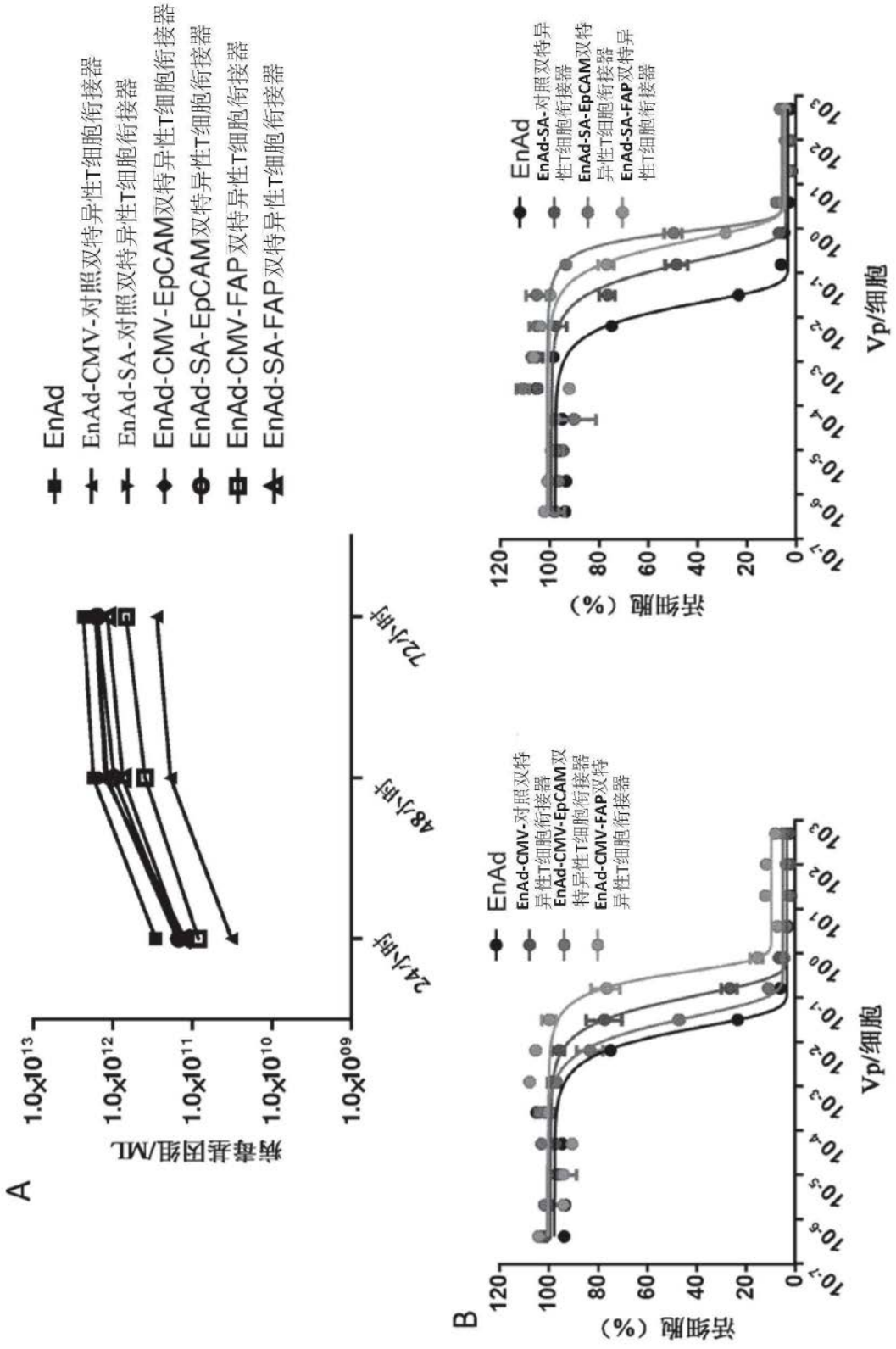

A
病毒基因组/ML
1.0x10^13
1.0x10^12
1.0x10^11
1.0x10^10
1.0x10^09
24小时
48小时
72小时
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器
B
活细胞（%）
Vp/细胞
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器

图19

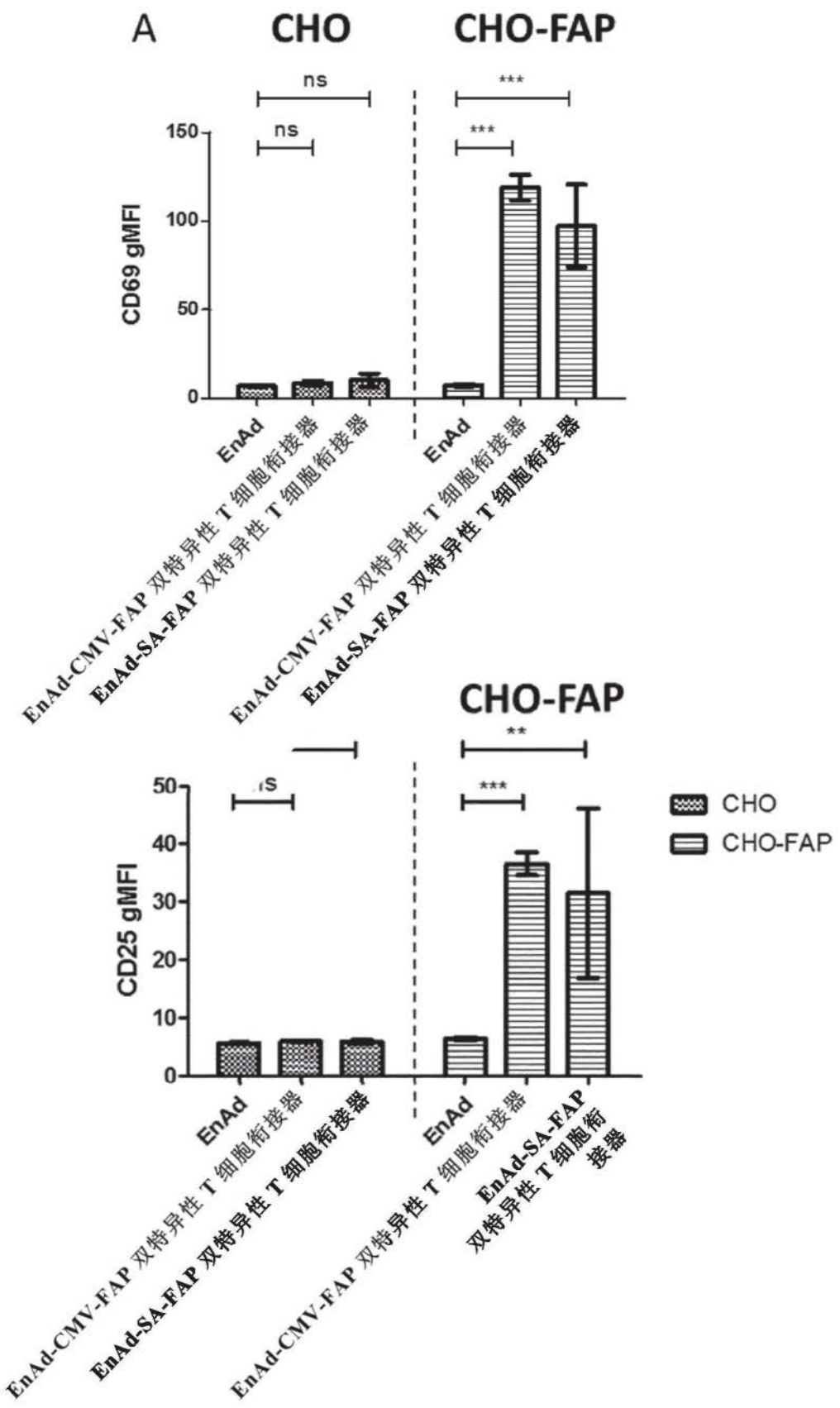

A
CHO
CHO-FAP
ns
ns
***
***
150
100
50
0
CD69 gMFI
EnAd
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
CHO-FAP
**
***
50
40
30
20
10
0
CD25 gMFI
CHO
CHO-FAP

图20A

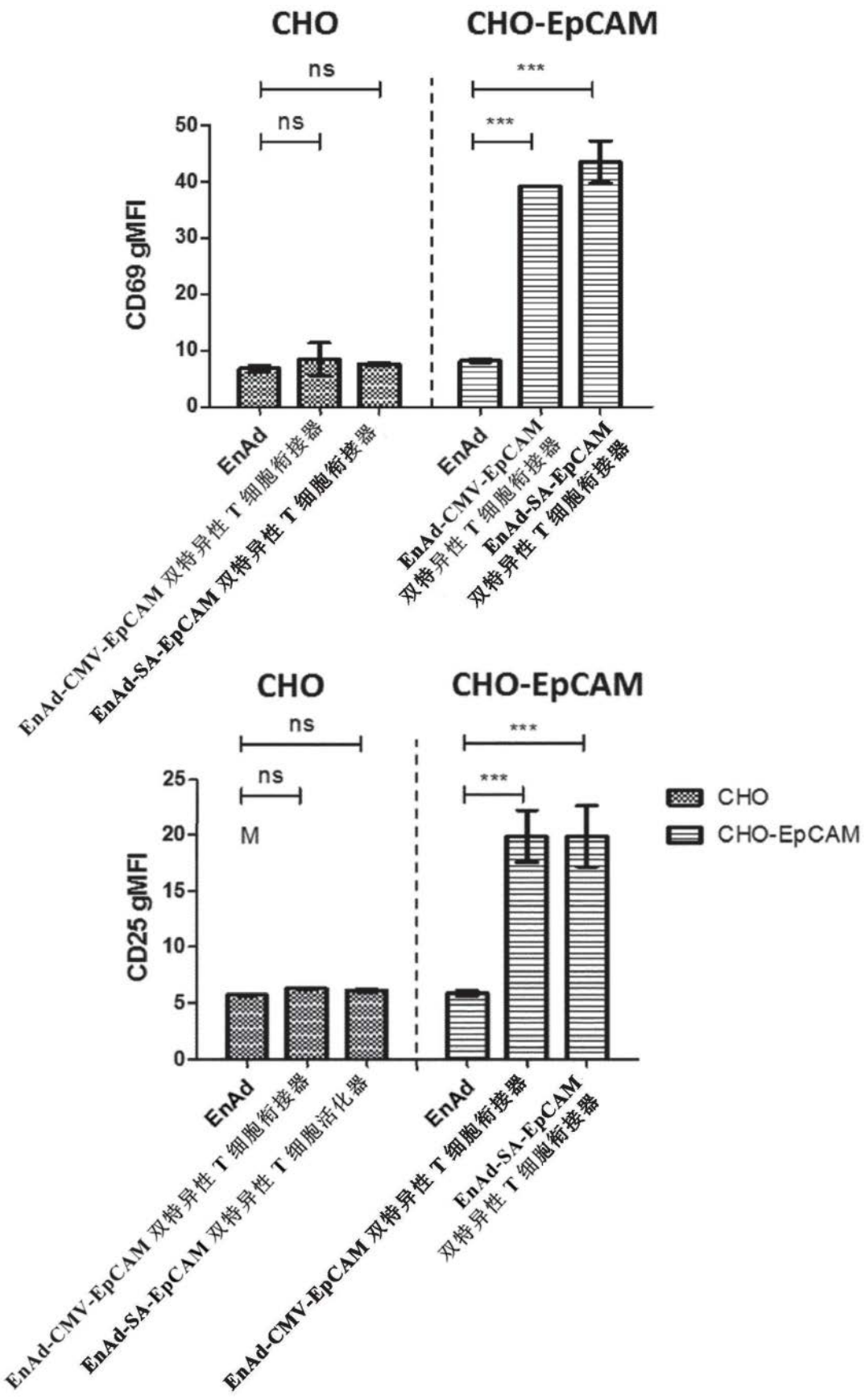
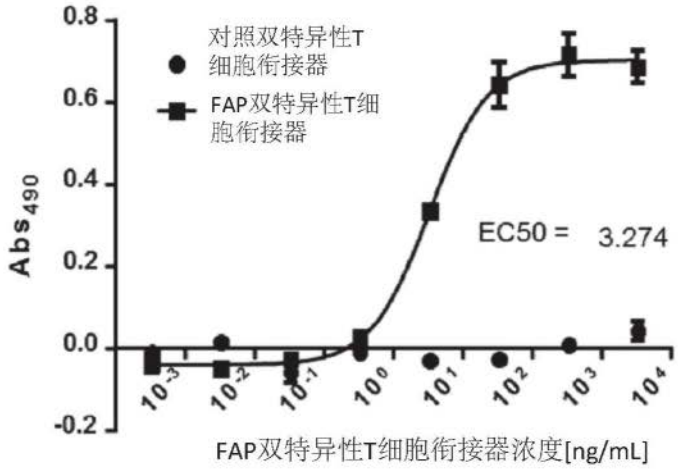
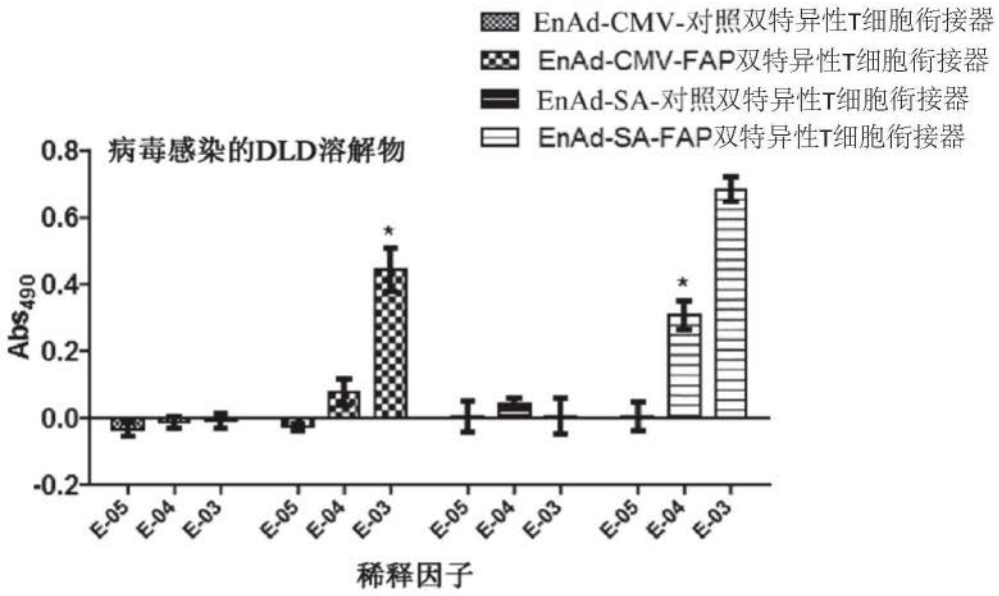

CHO
CHO-EpCAM
ns
ns
***
***
CD69 gMFI
50
40
30
20
10
0
EnAd
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
CHO
CHO-EpCAM
ns
ns
***
***
M
CD25 gMFI
25
20
15
10
5
0
CHO
CHO-EpCAM
EnAd
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞活化器

图20B


对照双特异性T细胞衔接器
FAP双特异性T细胞衔接器
EC50 = 3.274
Abs490
FAP双特异性T细胞衔接器浓度[ng/mL]


EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器
病毒感染的DLD溶解物
Abs490
稀释因子

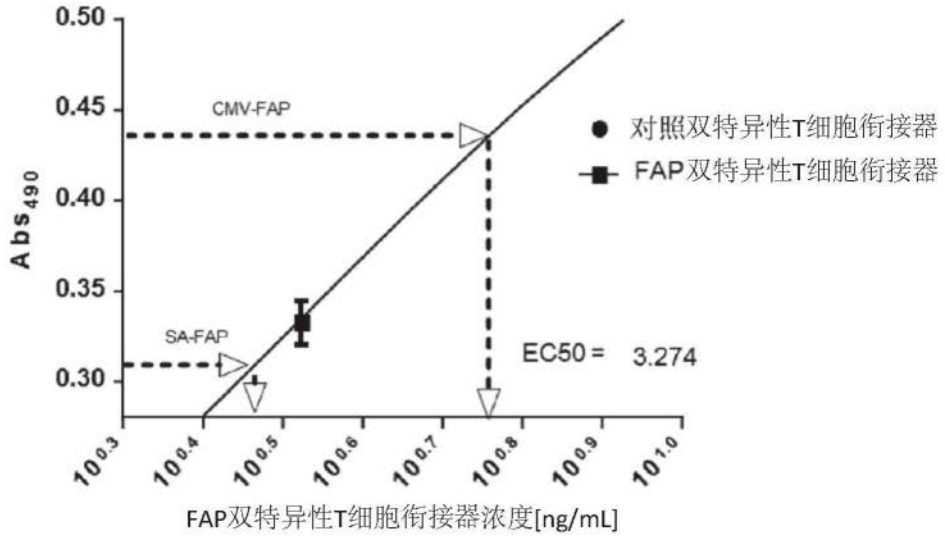
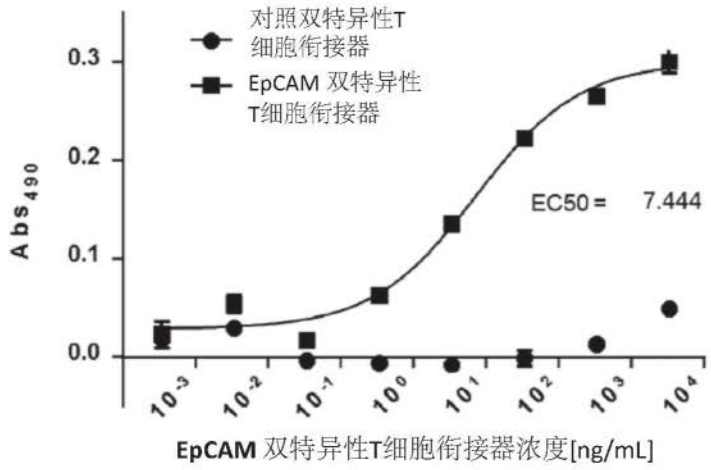
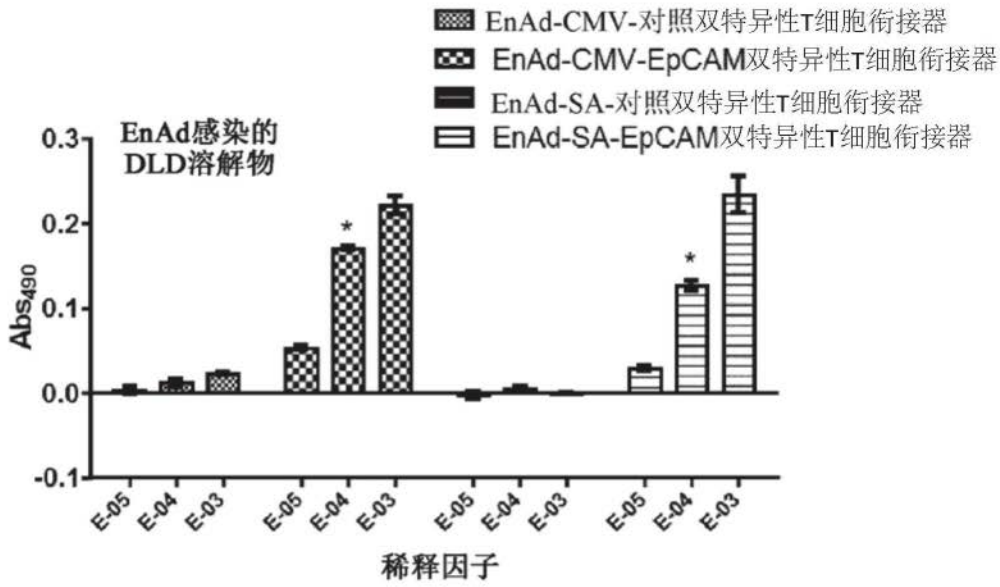

CMV-FAP
SA-FAP
对照双特异性T细胞衔接器
FAP双特异性T细胞衔接器
EC50 = 3.274
Abs490
FAP双特异性T细胞衔接器浓度[ng/mL]

图21


对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM 双特异性T细胞衔接器
Abs490
EC50 = 7.444
EpCAM 双特异性T细胞衔接器浓度[ng/mL]


EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd感染的DLD溶解物
Abs490
稀释因子

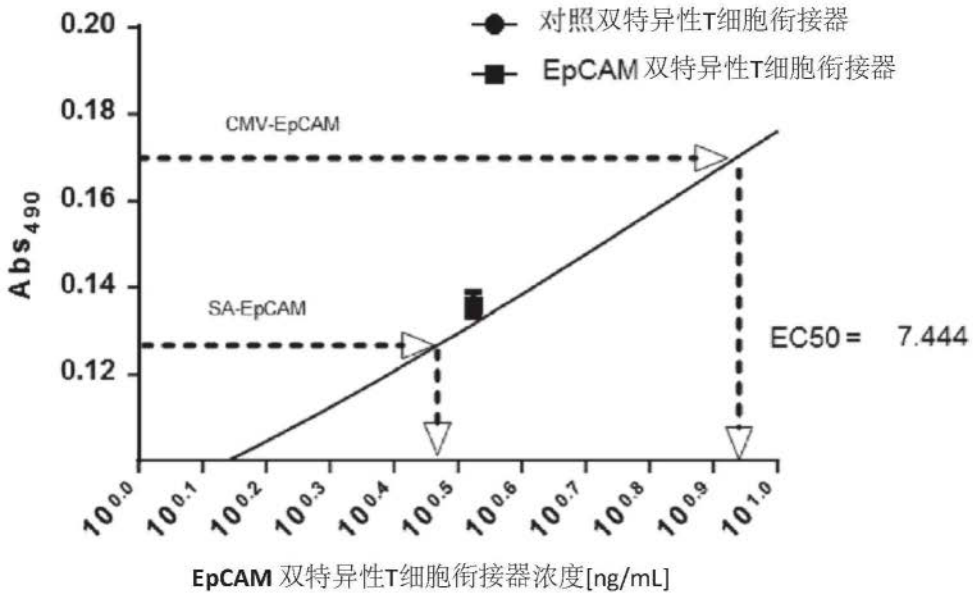

对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM 双特异性T细胞衔接器
CMV-EpCAM
SA-EpCAM
Abs490
EC50 = 7.444
EpCAM 双特异性T细胞衔接器浓度[ng/mL]

图22

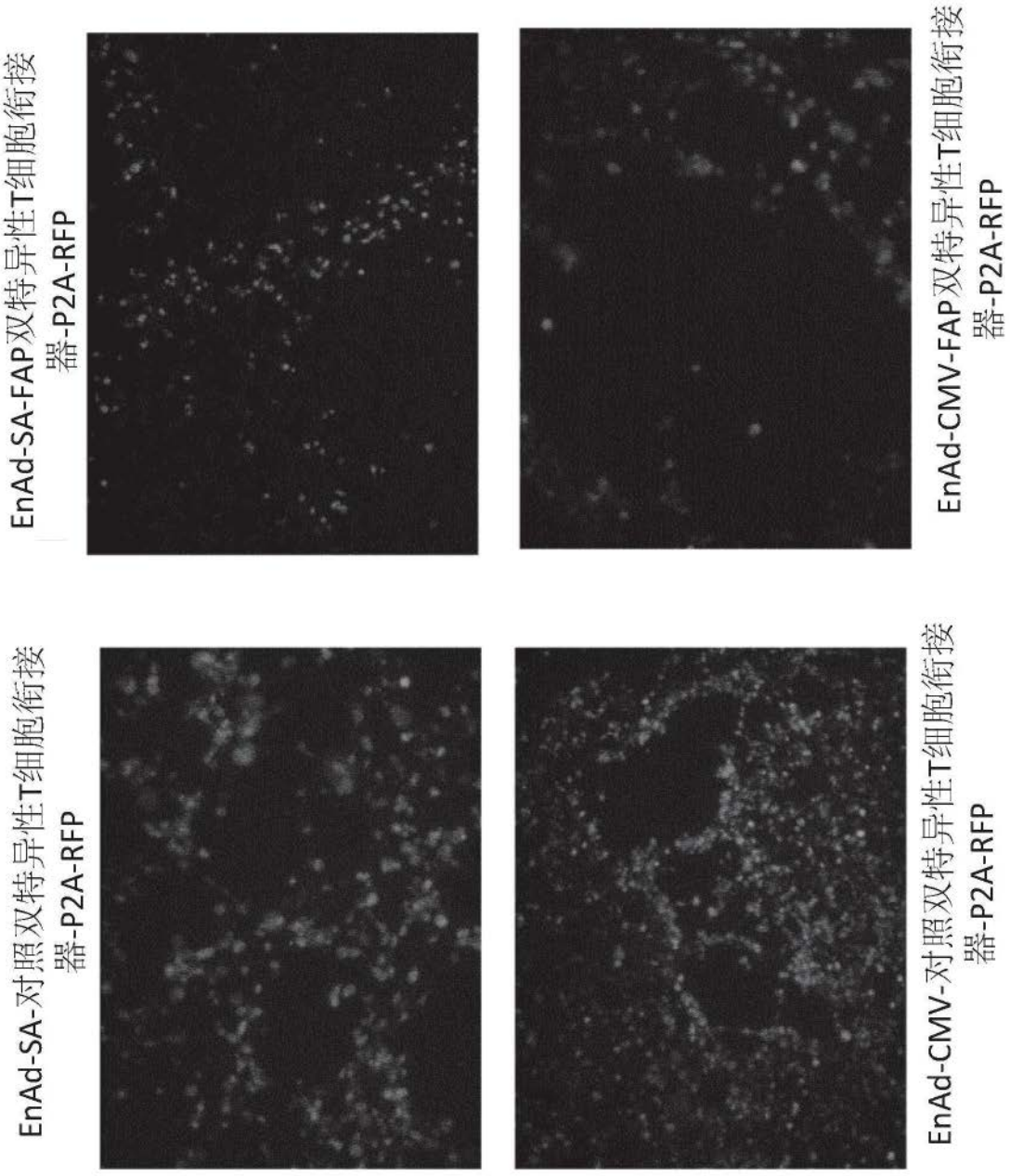

EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器-P2A-RFP
EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器-P2A-RFP
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器-P2A-RFP
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器-P2A-RFP

图23

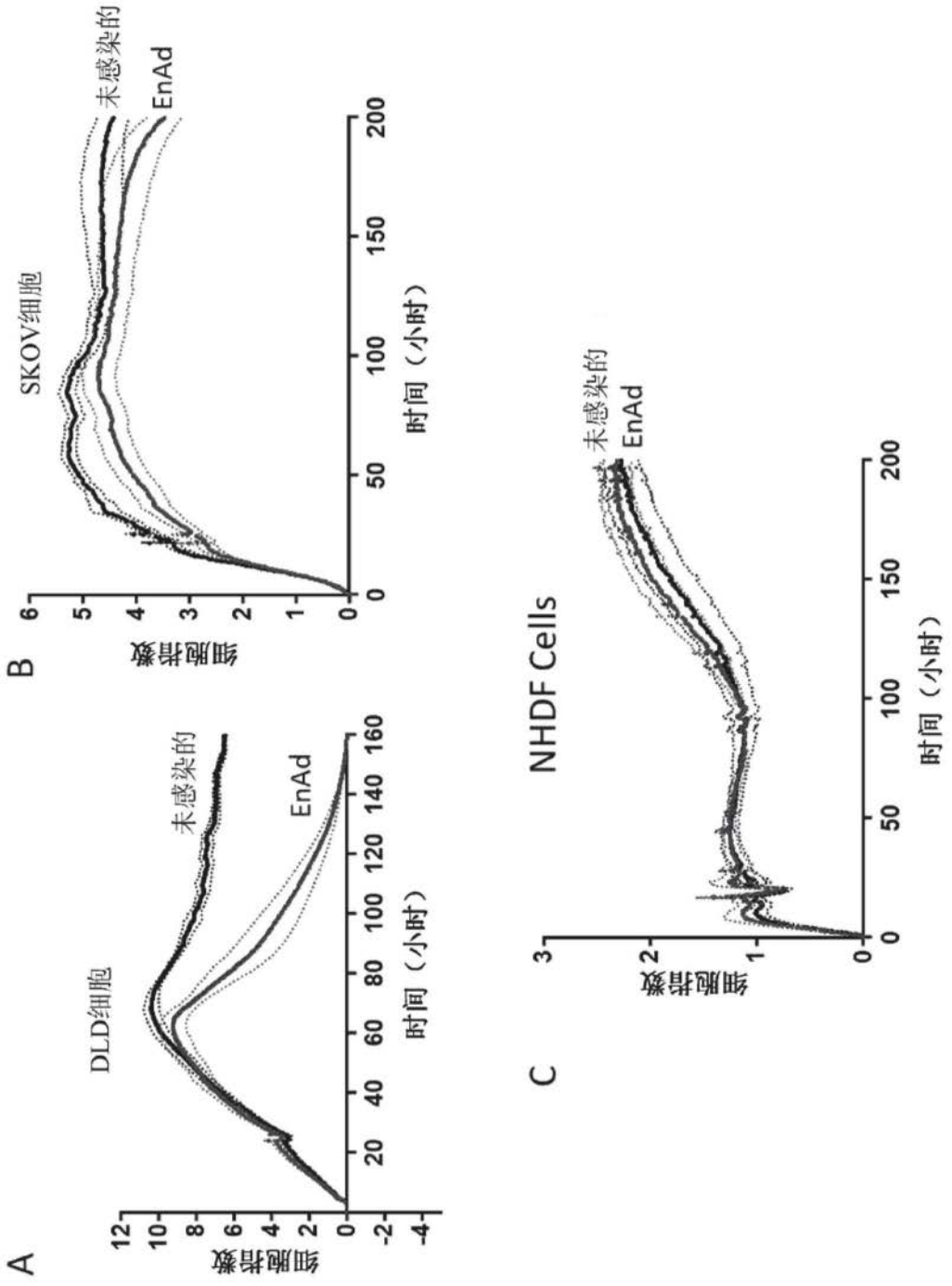

A
DLD细胞
细胞指数
时间（小时）
未感染的
EnAd
B
SKOV细胞
细胞指数
时间（小时）
未感染的
EnAd
C
NHDF Cells
细胞指数
时间（小时）
未感染的
EnAd

图24

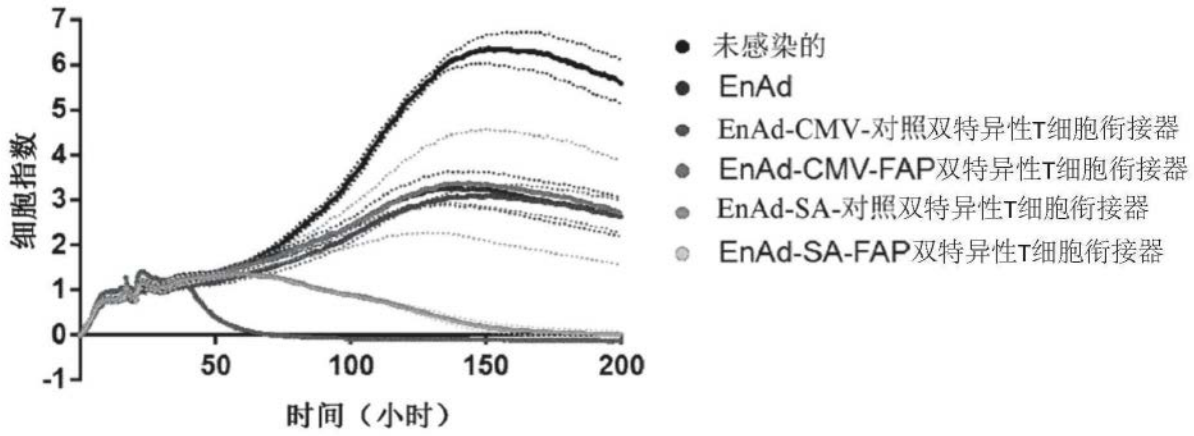

细胞指数
时间（小时）
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器

图25A

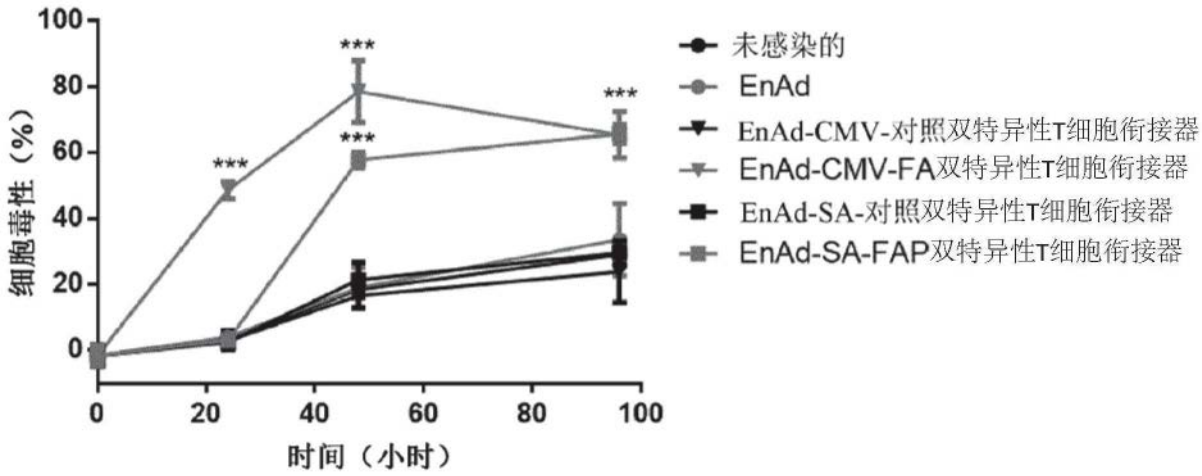

细胞毒性（%）
时间（小时）
***
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-FA双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器

图25B

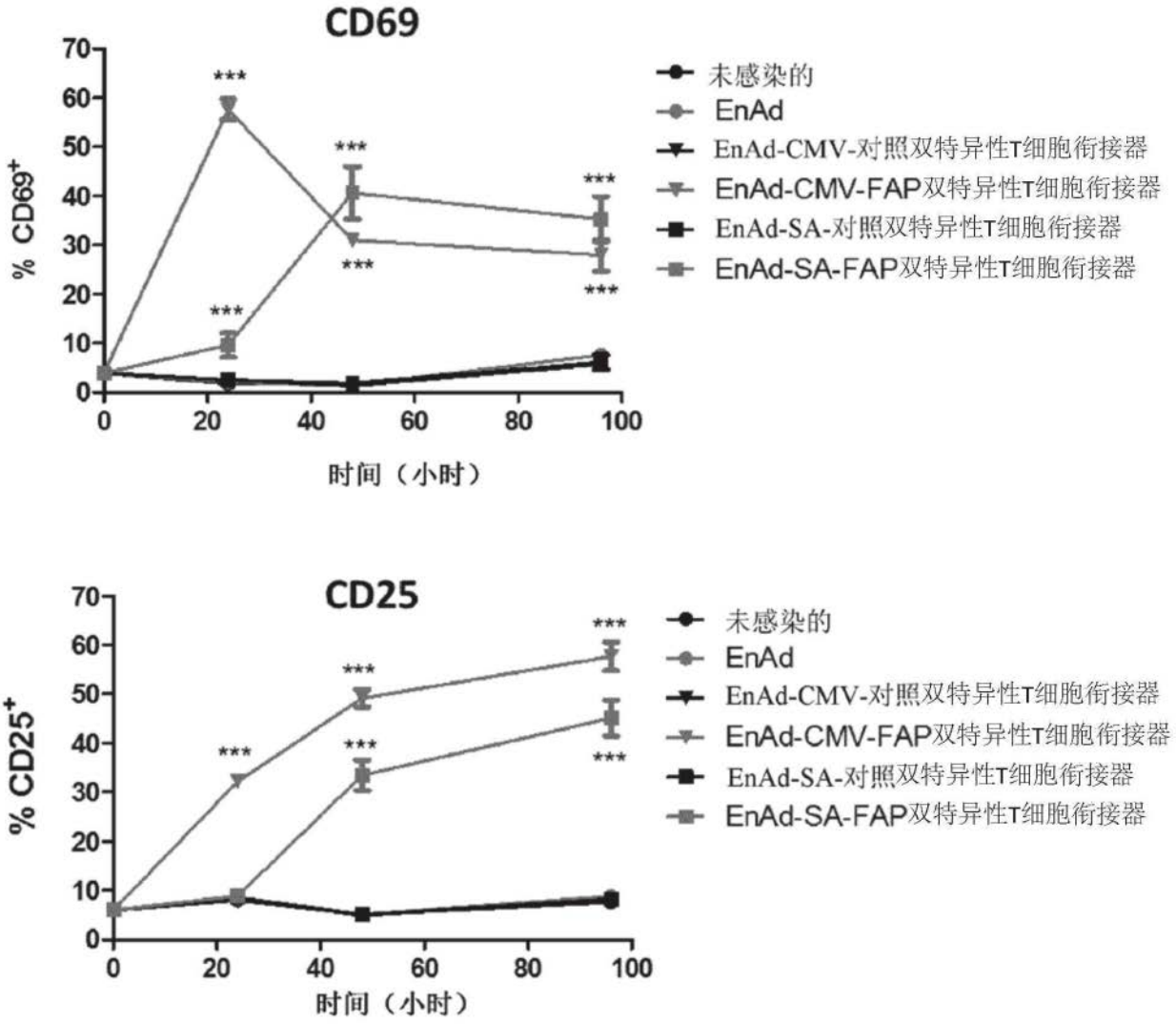

CD69
% CD69+
时间（小时）
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器
CD25
% CD25+
时间（小时）
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器

图26

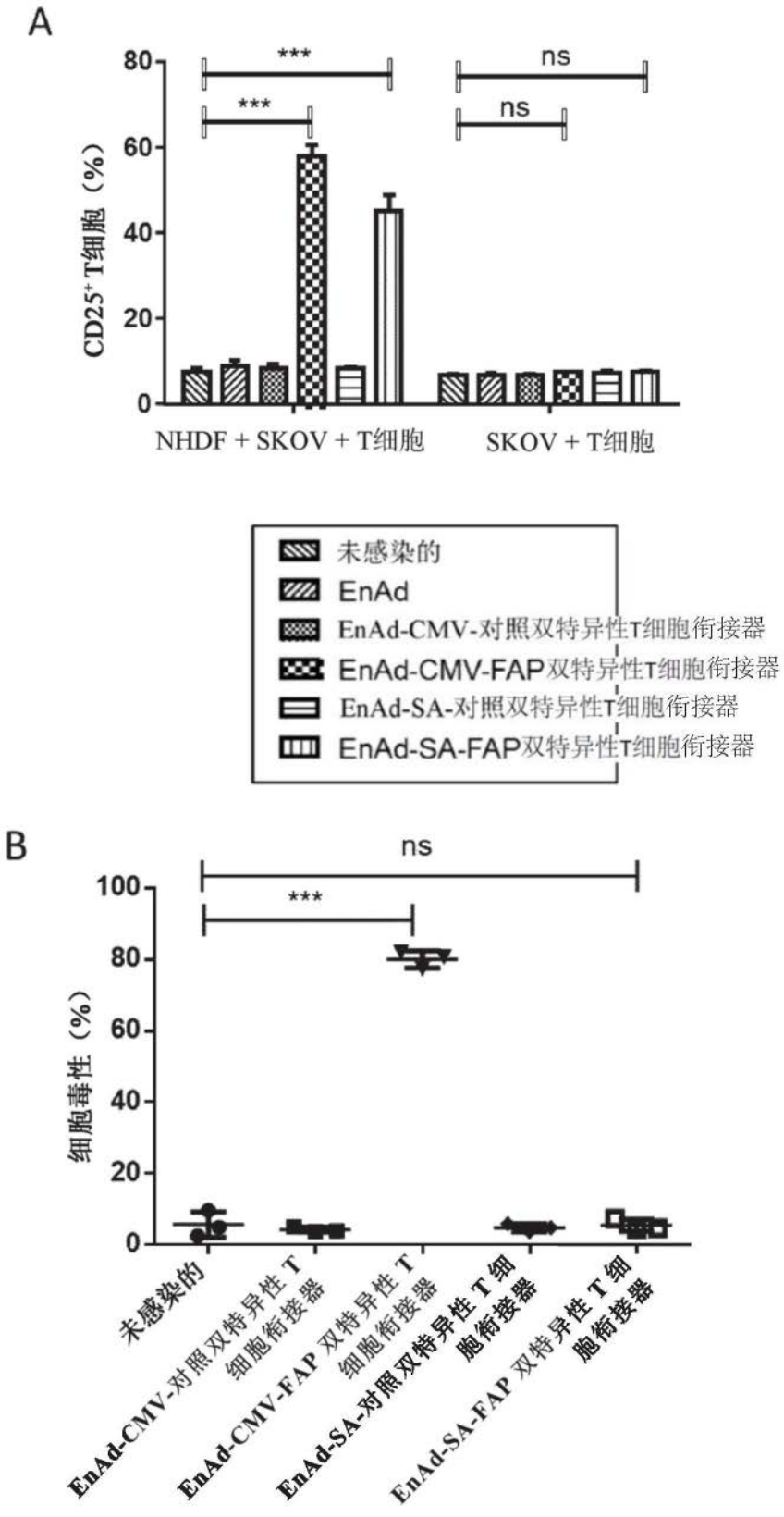

A
CD25+T细胞（%）
80
60
40
20
0
***
***
ns
ns
NHDF + SKOV + T细胞
SKOV + T细胞
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器
B
细胞毒性（%）
100
80
60
40
20
0
ns
***
未感染的
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器

图27

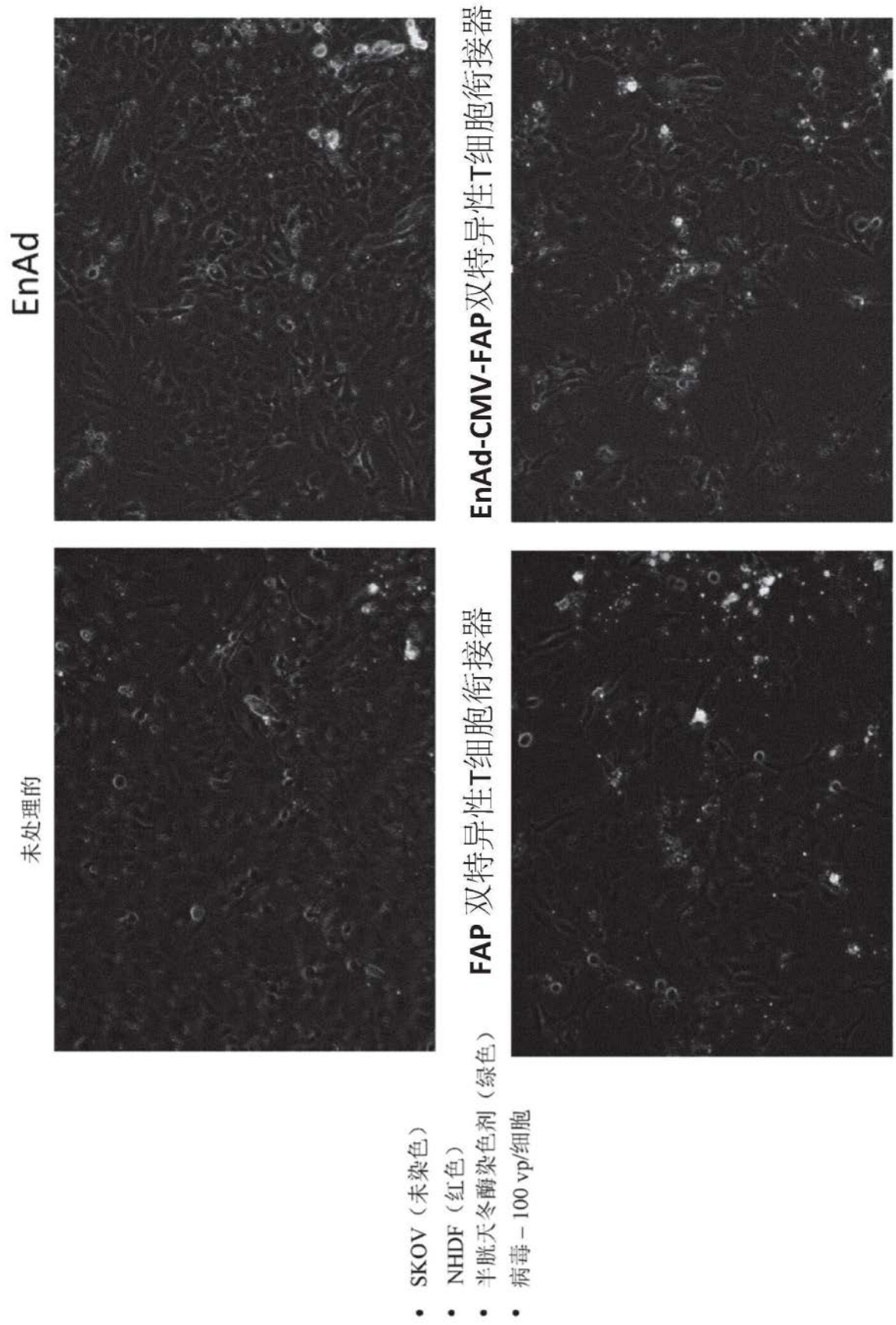

未处理的
EnAd
FAP 双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器
• SKOV（未染色）
• NHDF（红色）
• 半胱天冬酶染色剂（绿色）
• 病毒 – 100 vp/细胞

图28

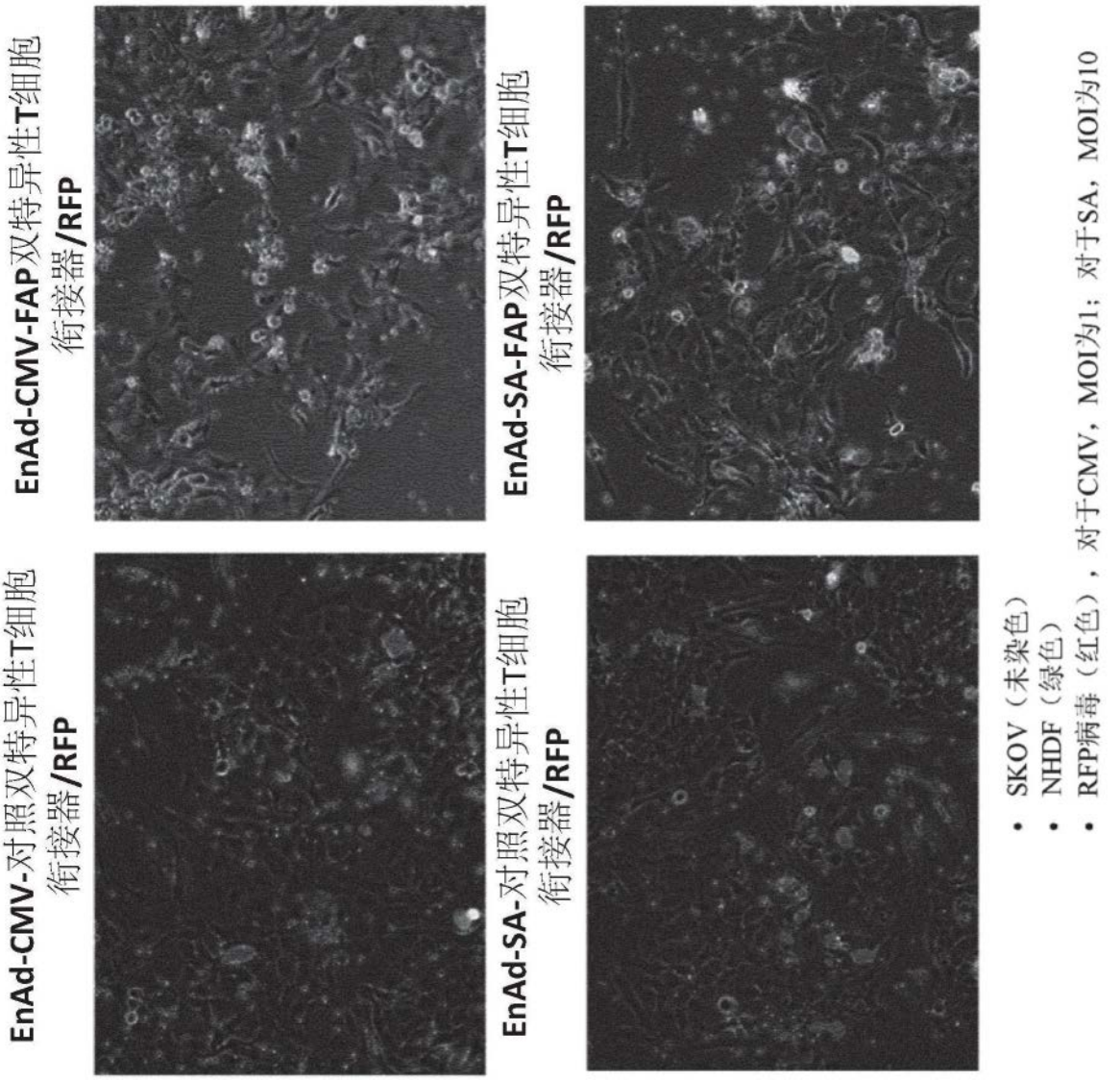

EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器/RFP
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器/RFP
EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器/RFP
EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器/RFP
• SKOV（未染色）
• NHDF（绿色）
• RFP病毒（红色），对于CMV，MOI为1；对于SA，MOI为10

图29

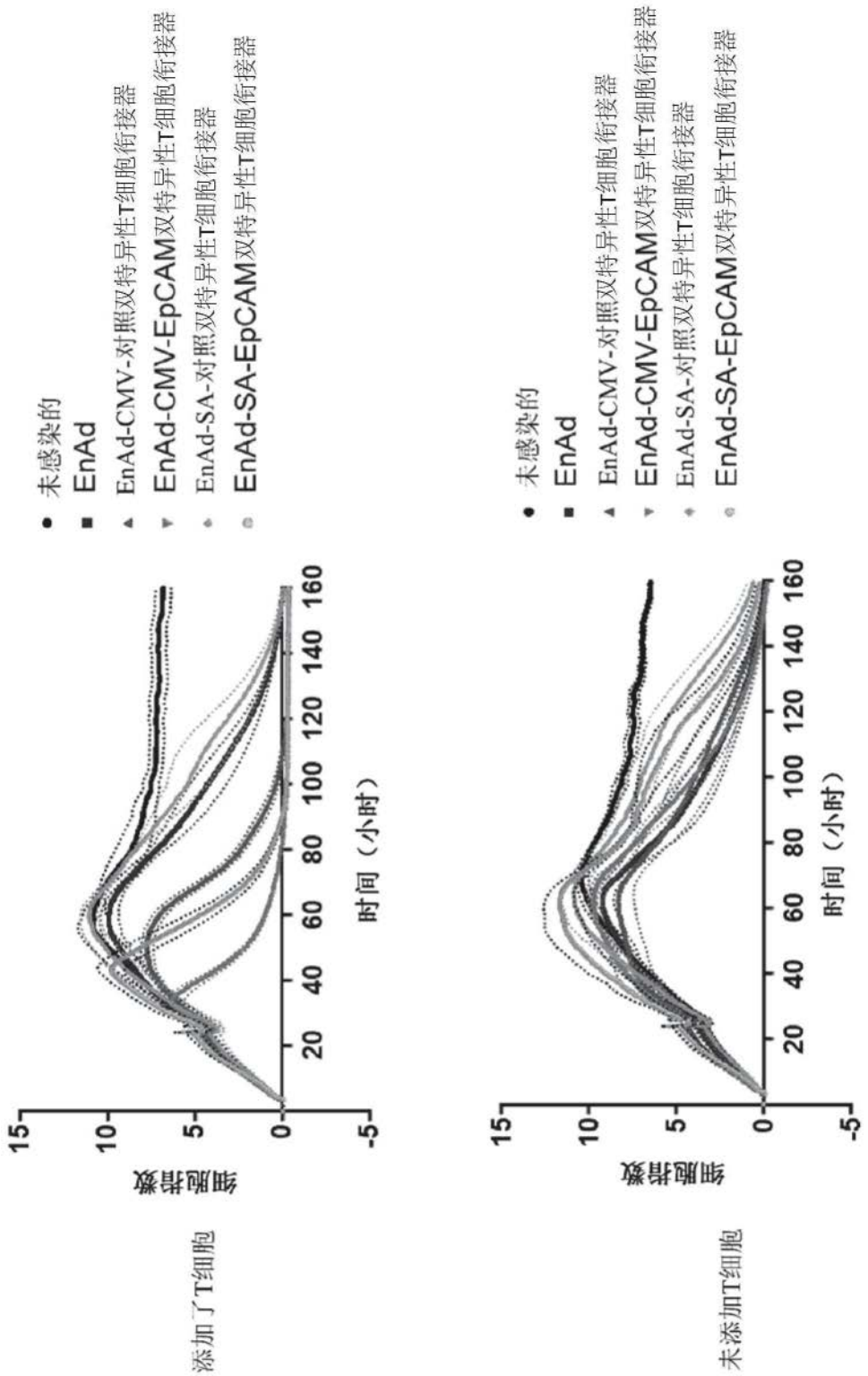

未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器
细胞指数
时间（小时）
添加了T细胞
未添加T细胞

图30

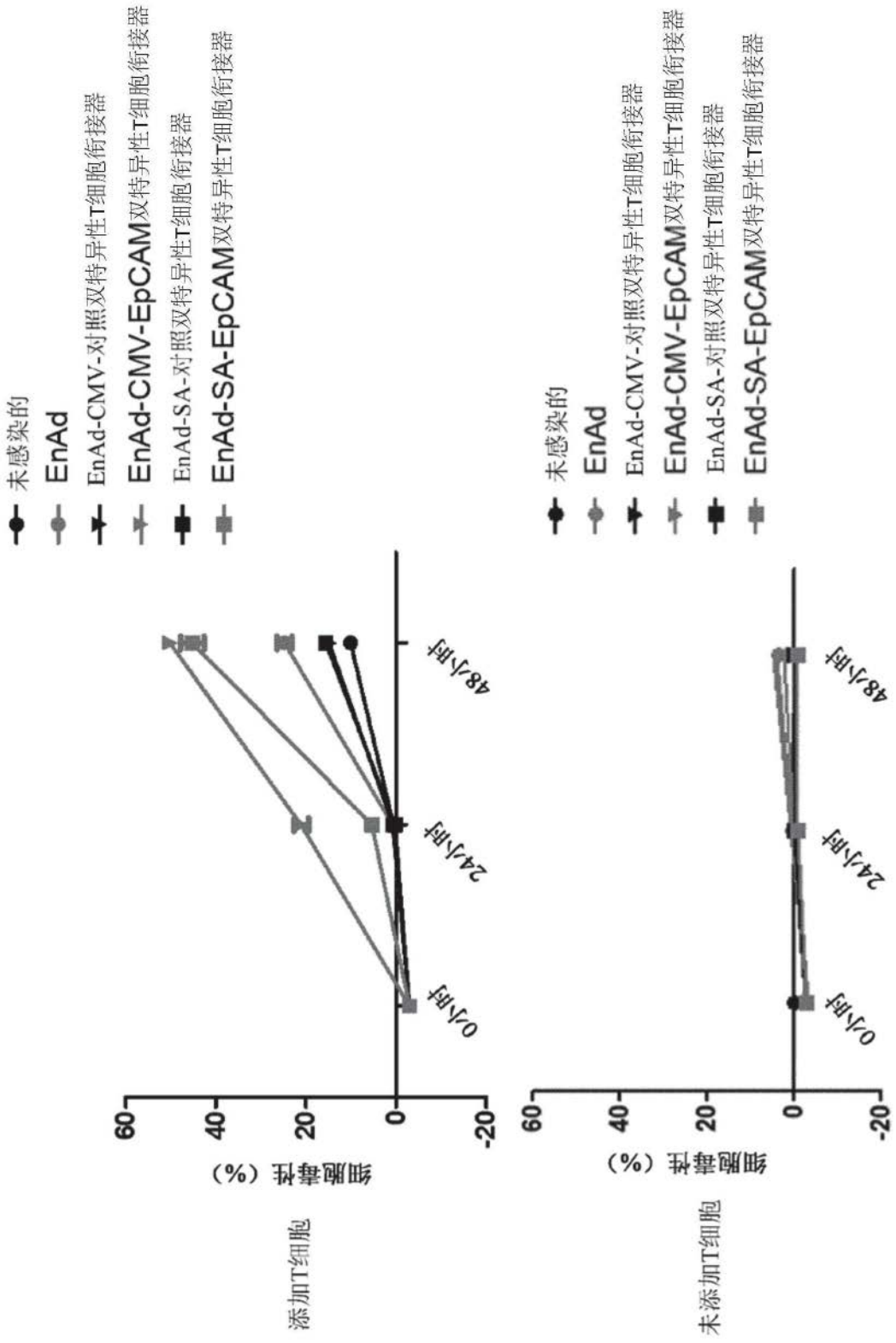

未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器
细胞毒性（%）
60
40
20
0
-20
0小时
24小时
48小时
添加T细胞
未添加T细胞

图31

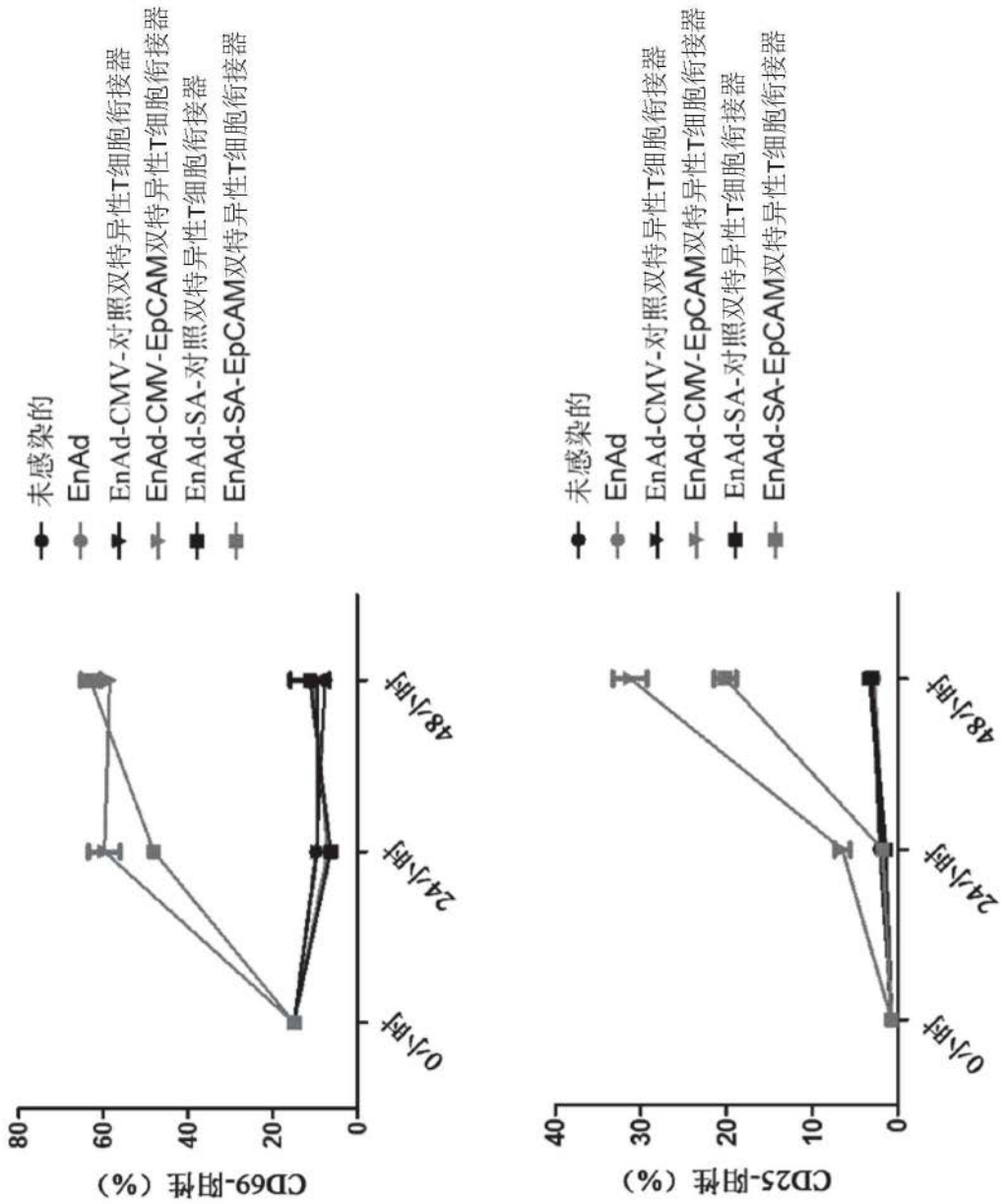

未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器
CD69-阳性（%）
CD25-阳性（%）
0小时
24小时
48小时

图32

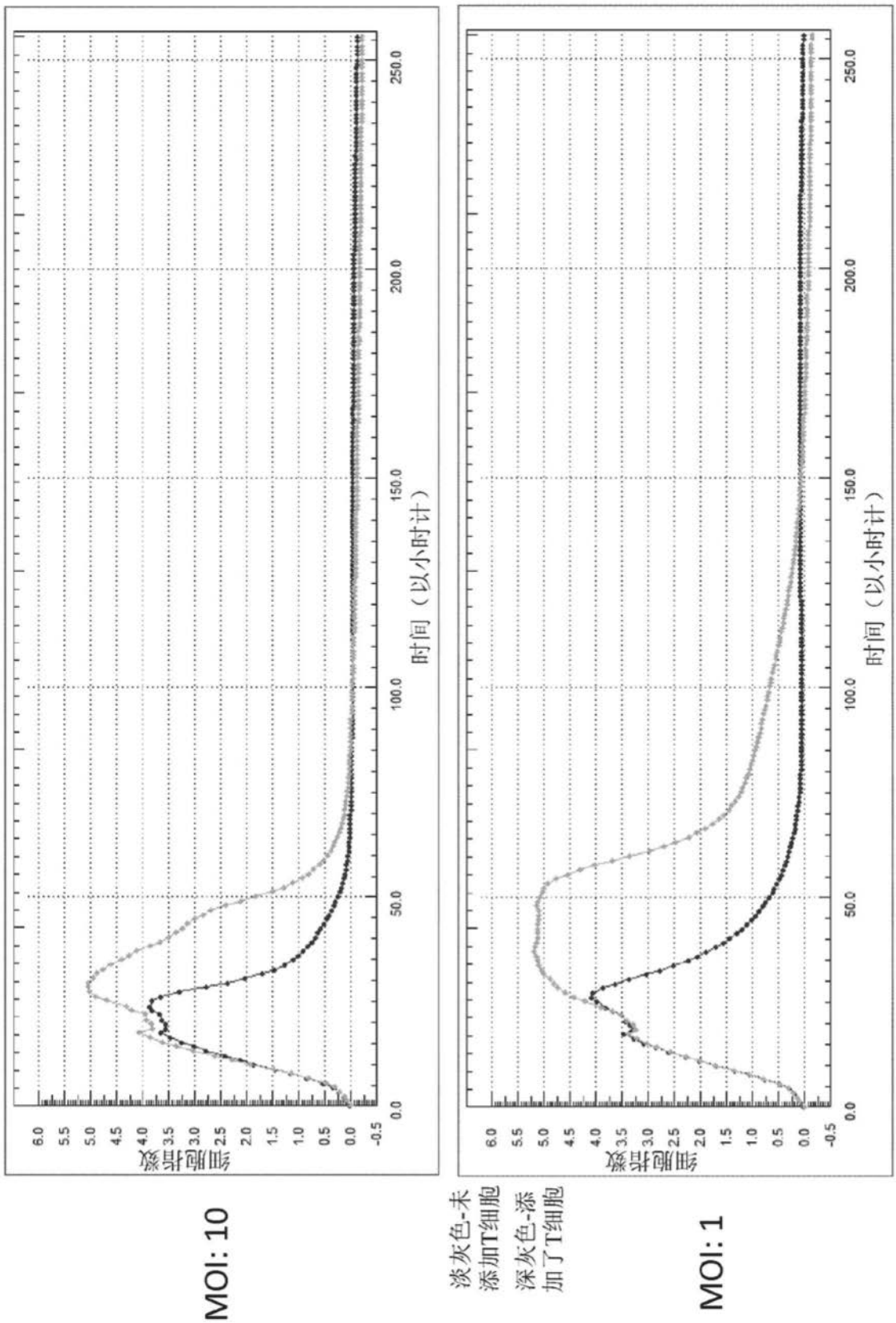


图33

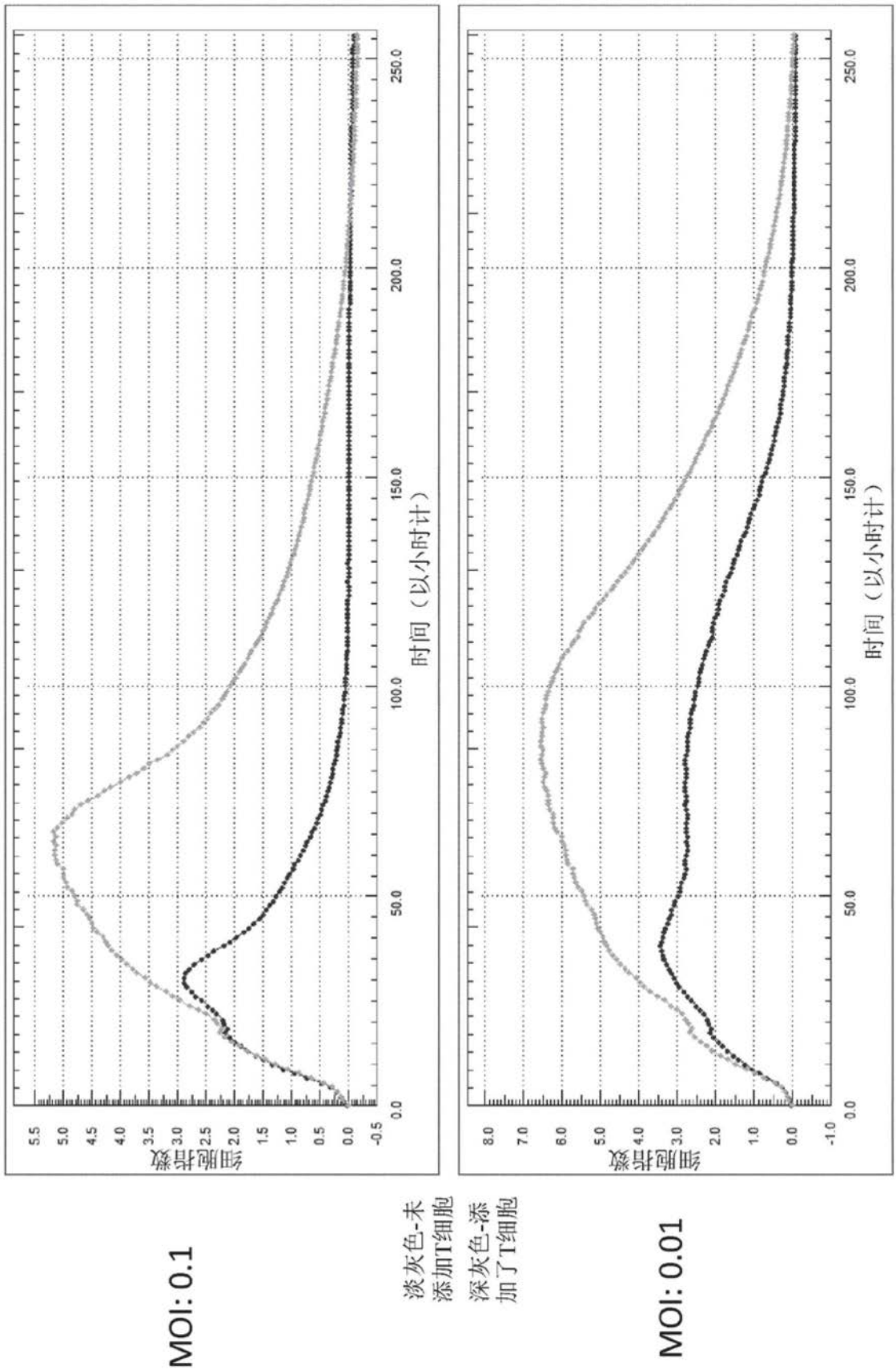


图33(续)

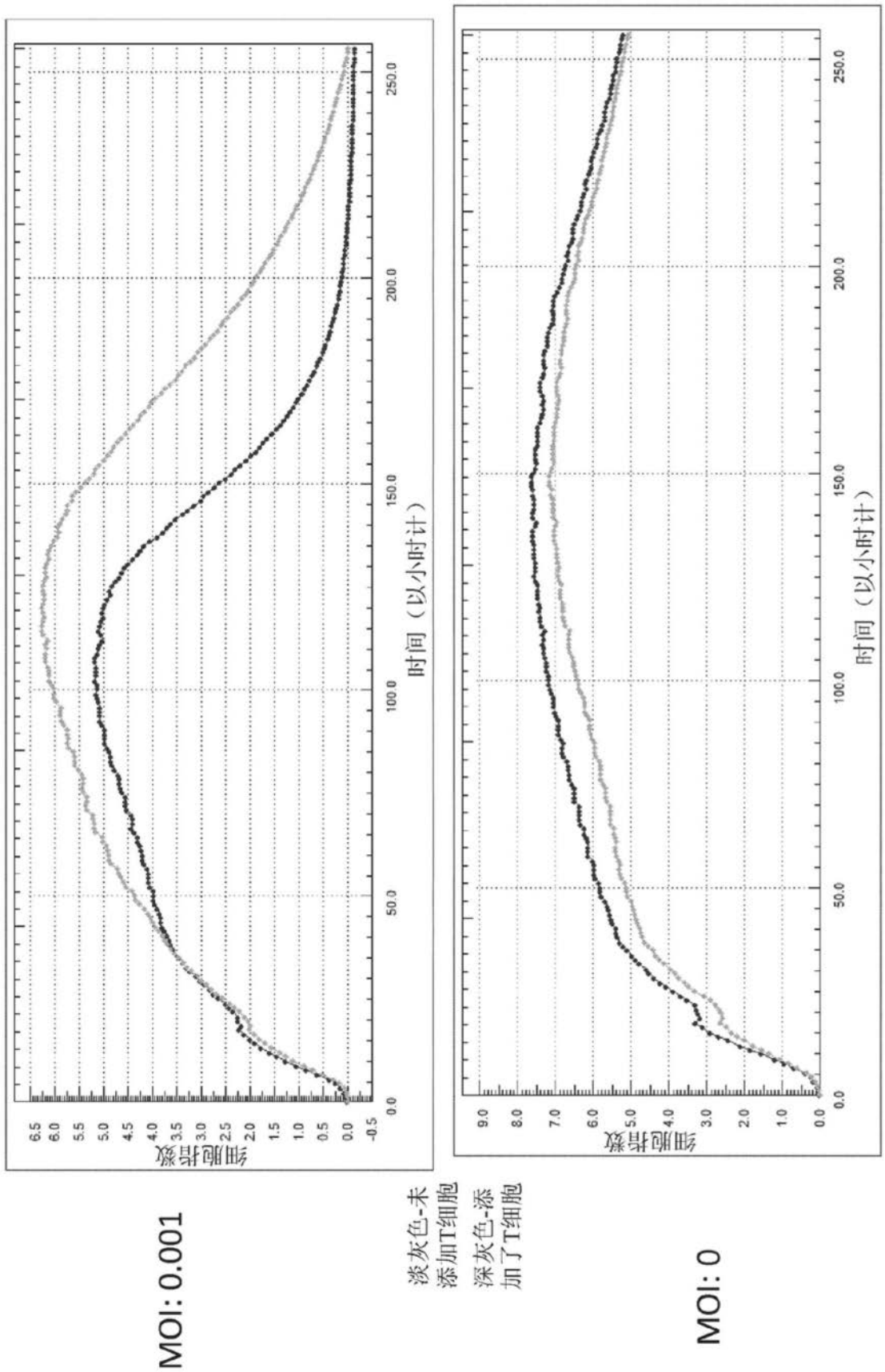

MOI: 0.001
MOI: 0
淡灰色-未添加T细胞
深灰色-添加了T细胞
细胞指数
时间（以小时计）
0.0
50.0
100.0
150.0
200.0
250.0

图33(续)

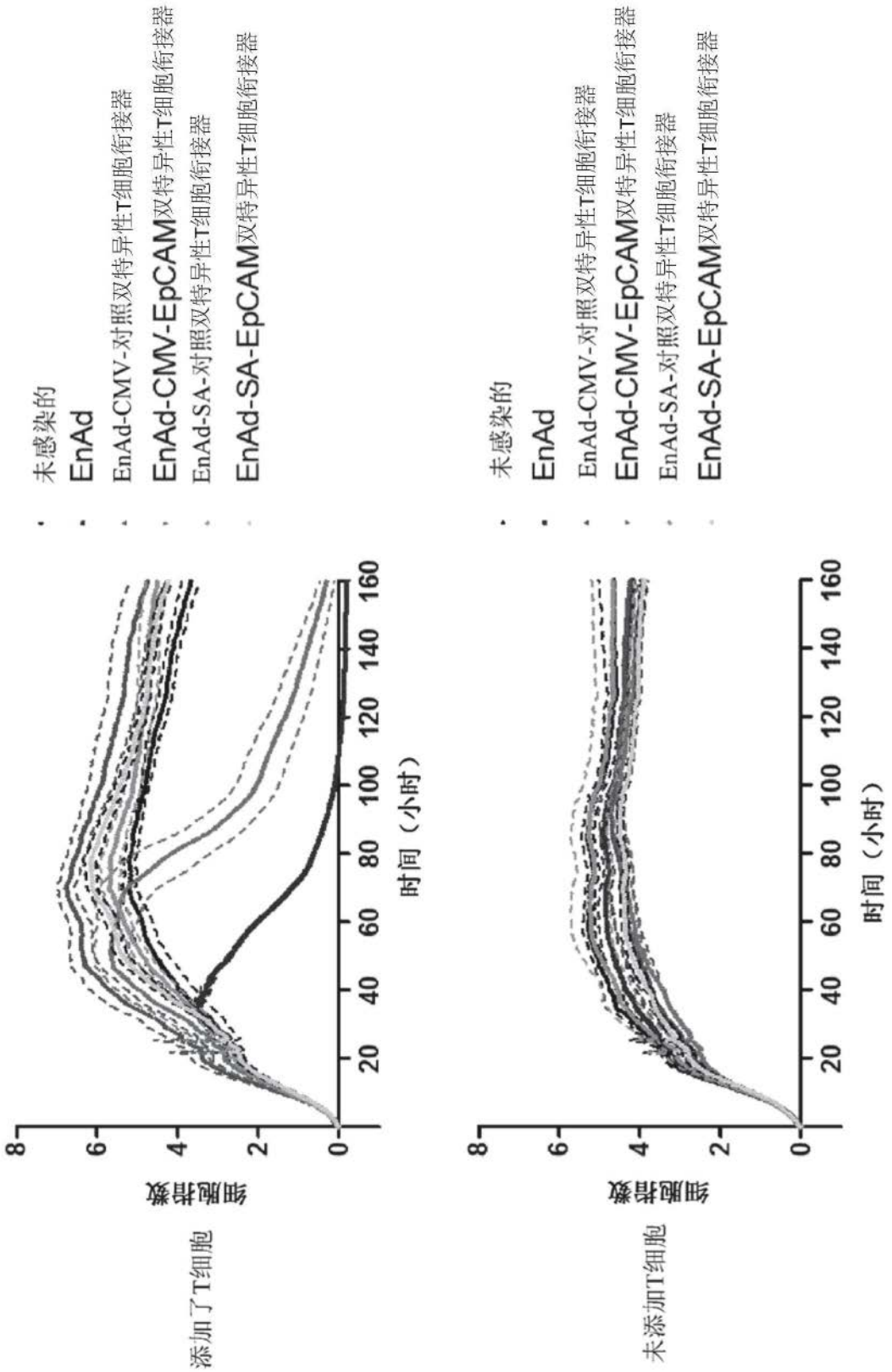

未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器
细胞指数
时间（小时）
添加了T细胞
未添加T细胞

图34

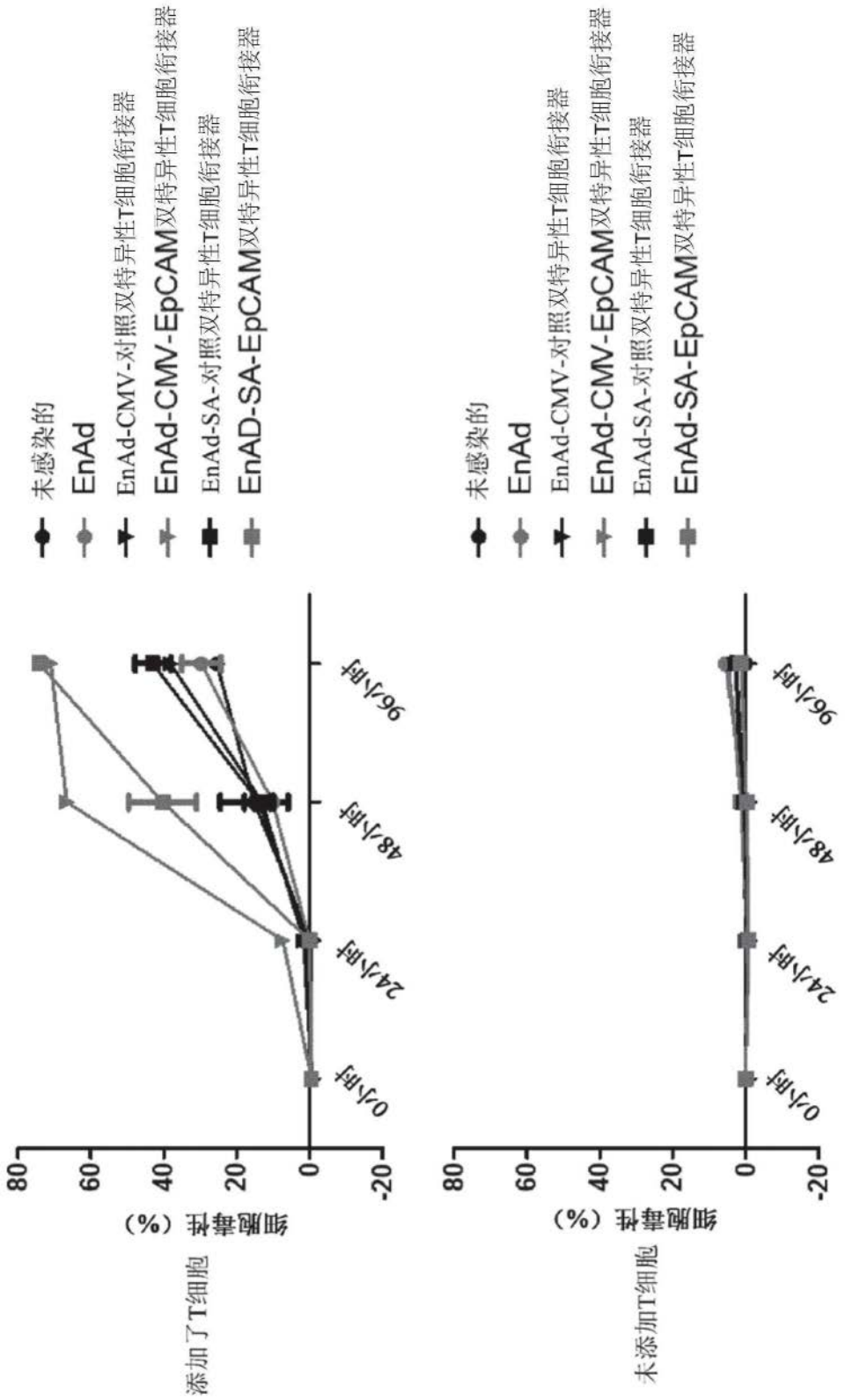

未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAD-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器
细胞毒性（%）
80
60
40
20
0
-20
0小时
24小时
48小时
96小时
添加了T细胞
未添加T细胞

图35

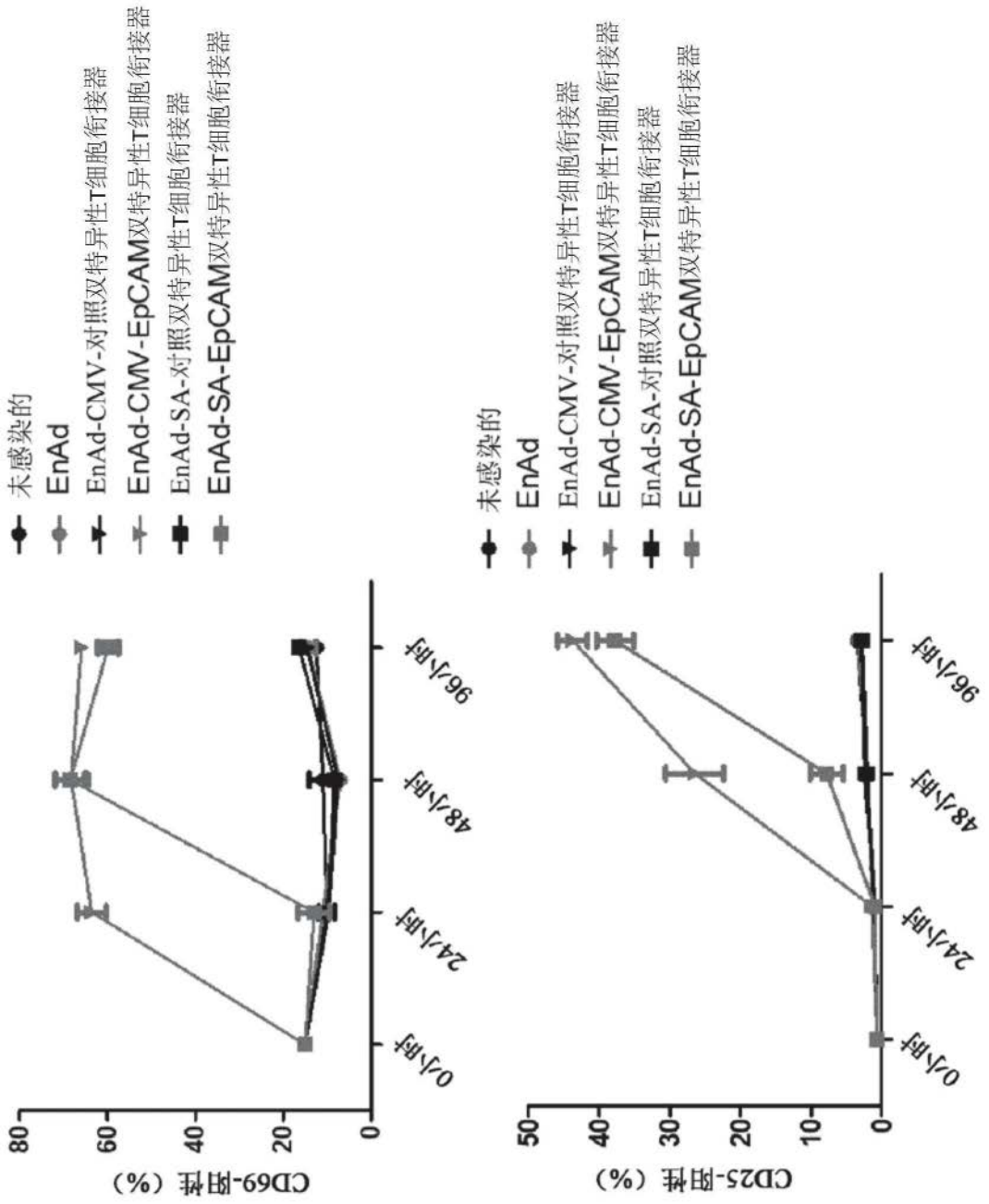

未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器
CD69-阳性（%）
0
20
40
60
80
0小时
24小时
48小时
96小时
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器
CD25-阳性（%）
0
10
20
30
40
50
0小时
24小时
48小时
96小时

图36

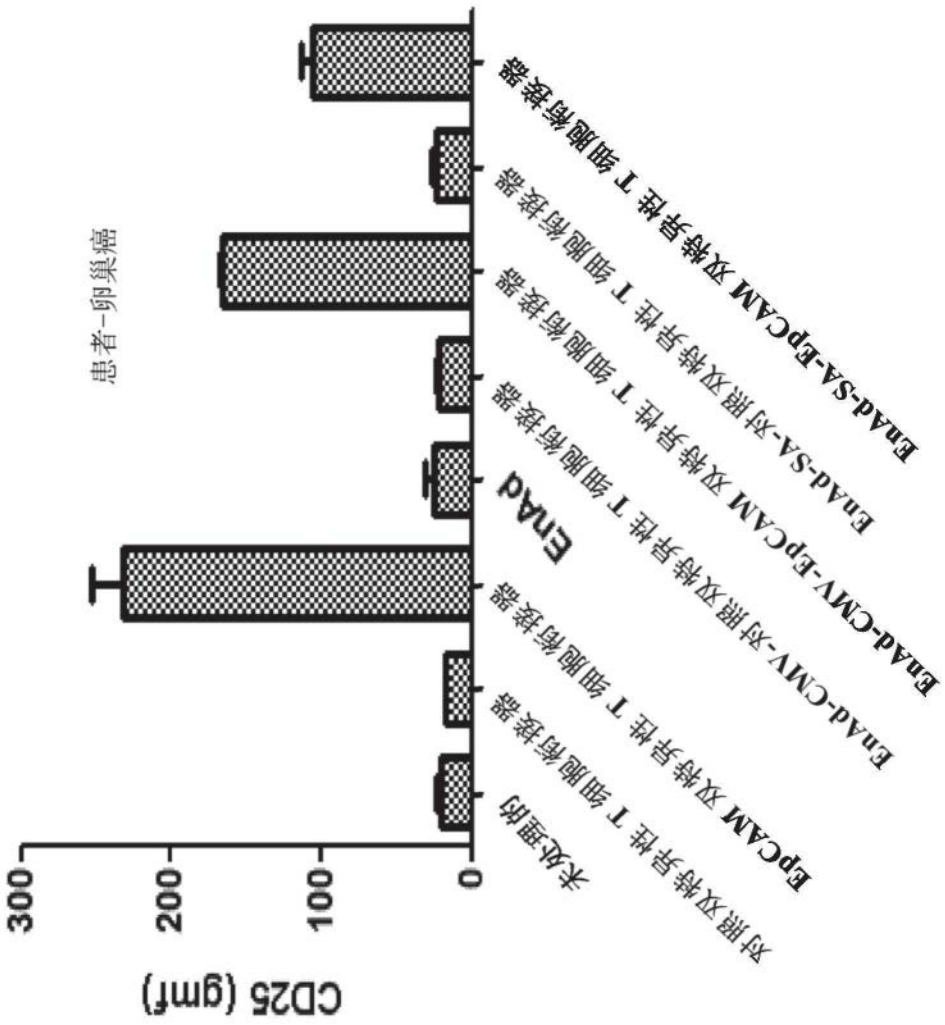

患者-卵巢癌
CD25 (gmf)
300
200
100
0
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器

图37

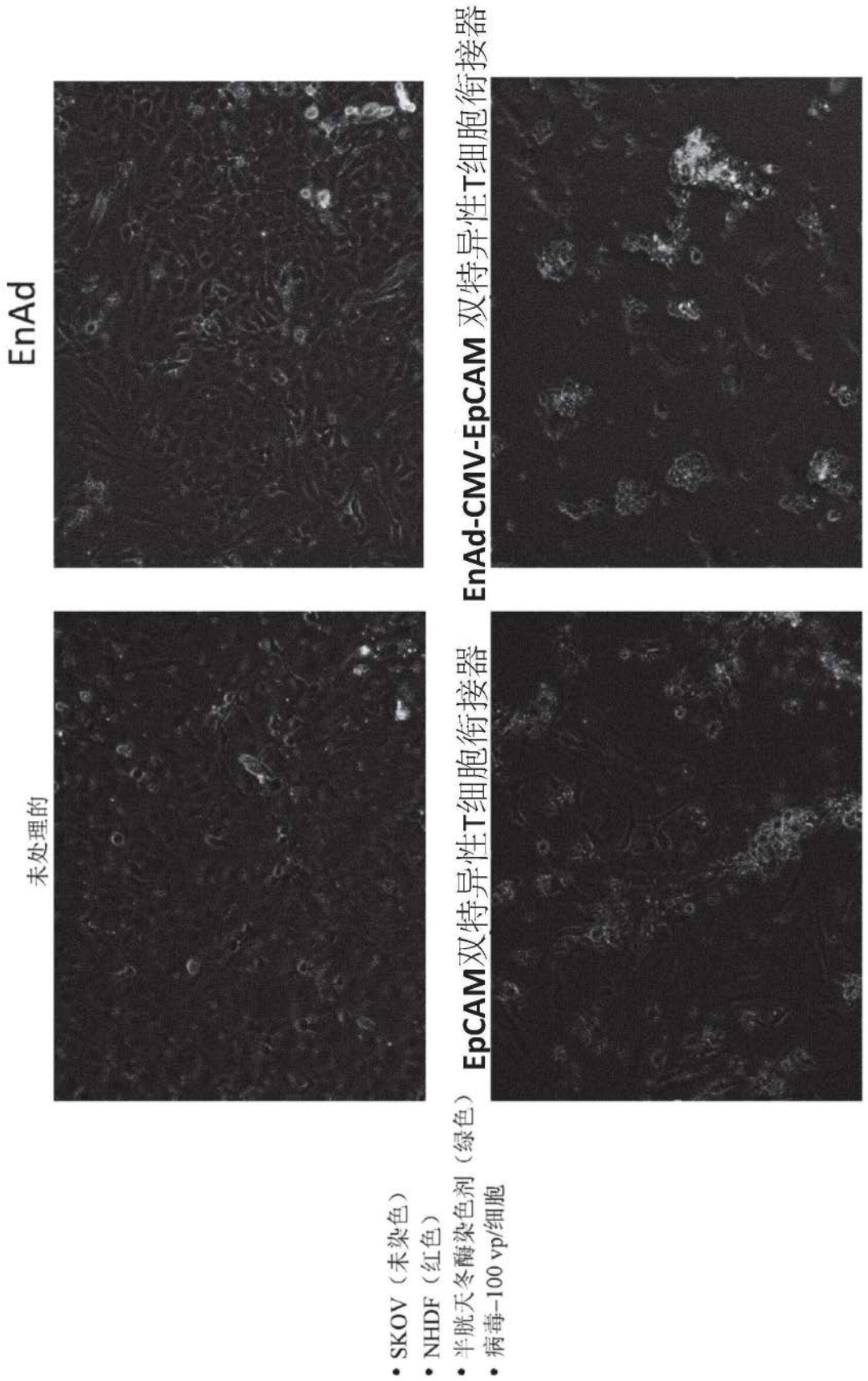

未处理的
EnAd
EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性T细胞衔接器
• SKOV（未染色）
• NHDF（红色）
• 半胱天冬酶染色剂（绿色）
• 病毒–100 vp/细胞

图38

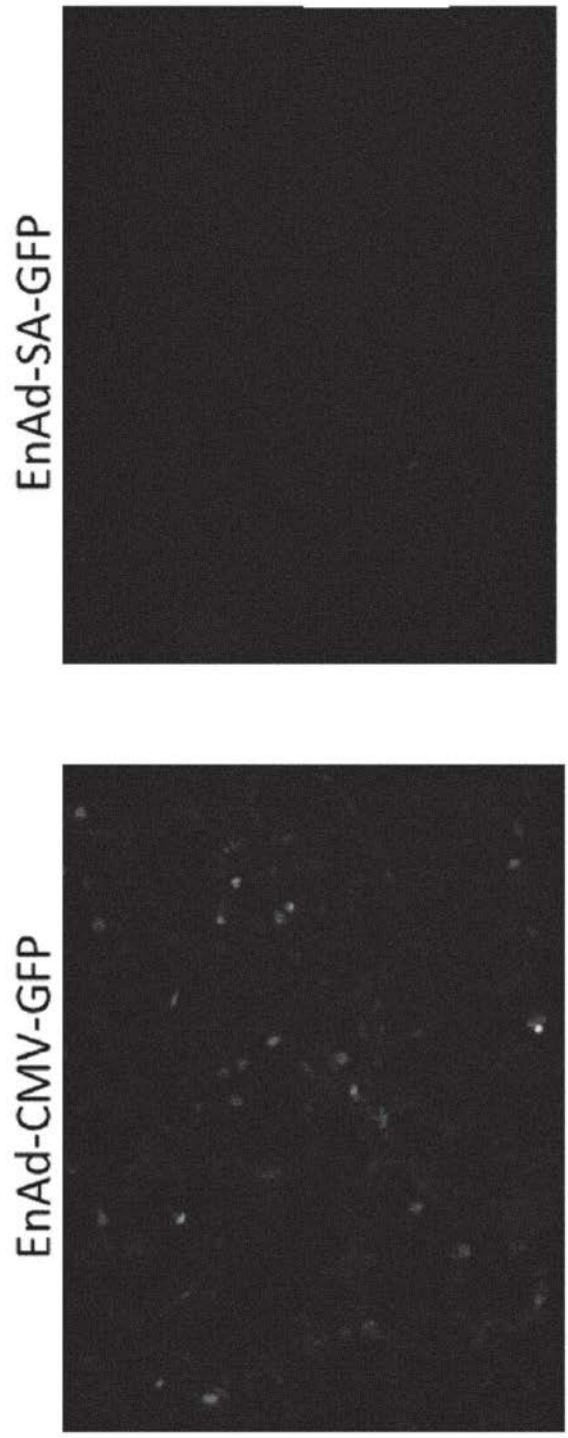


图39

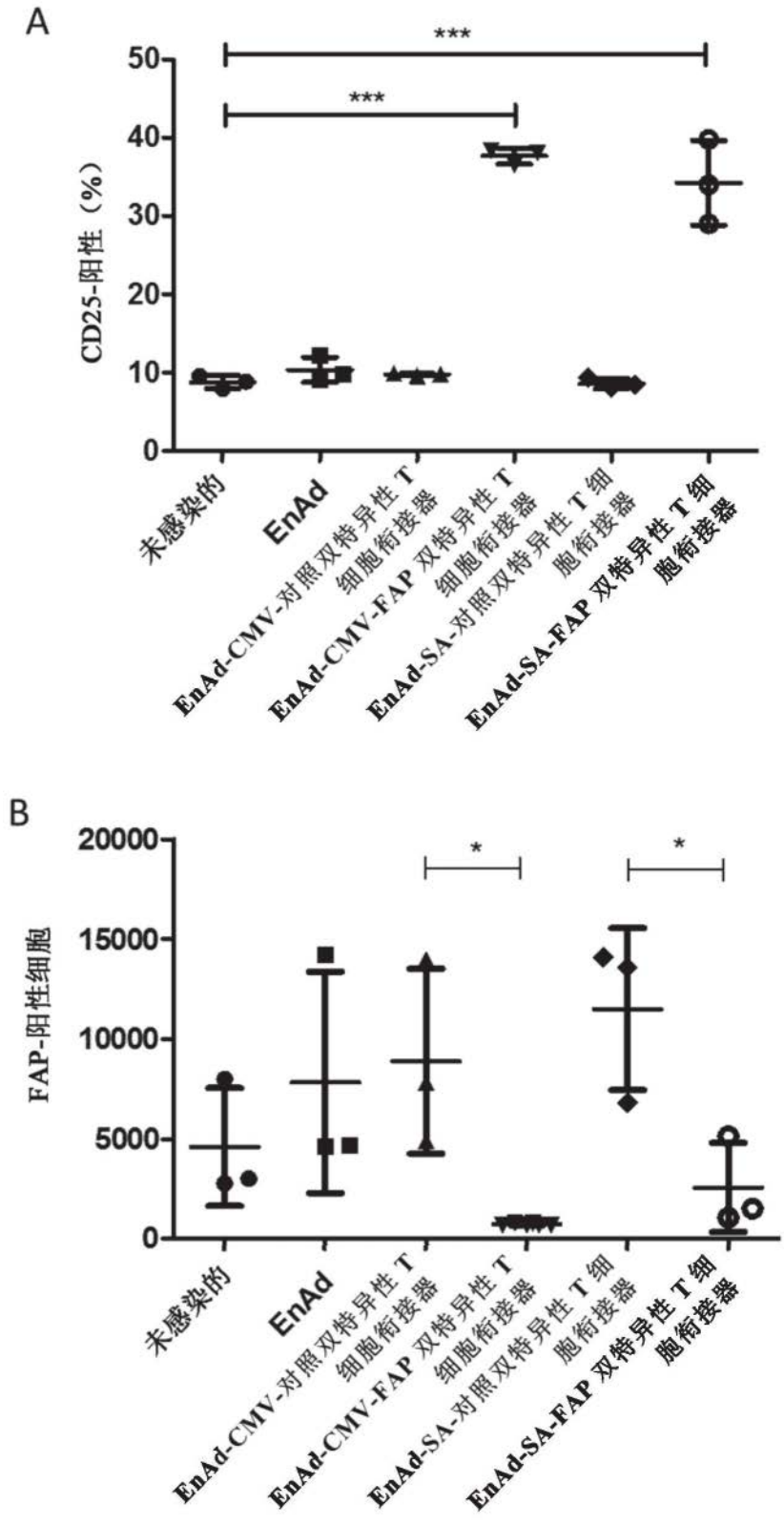

A
CD25-阳性（%）
50
40
30
20
10
0
***
***
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器
B
FAP-阳性细胞
20000
15000
10000
5000
0
*
*
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器

图40

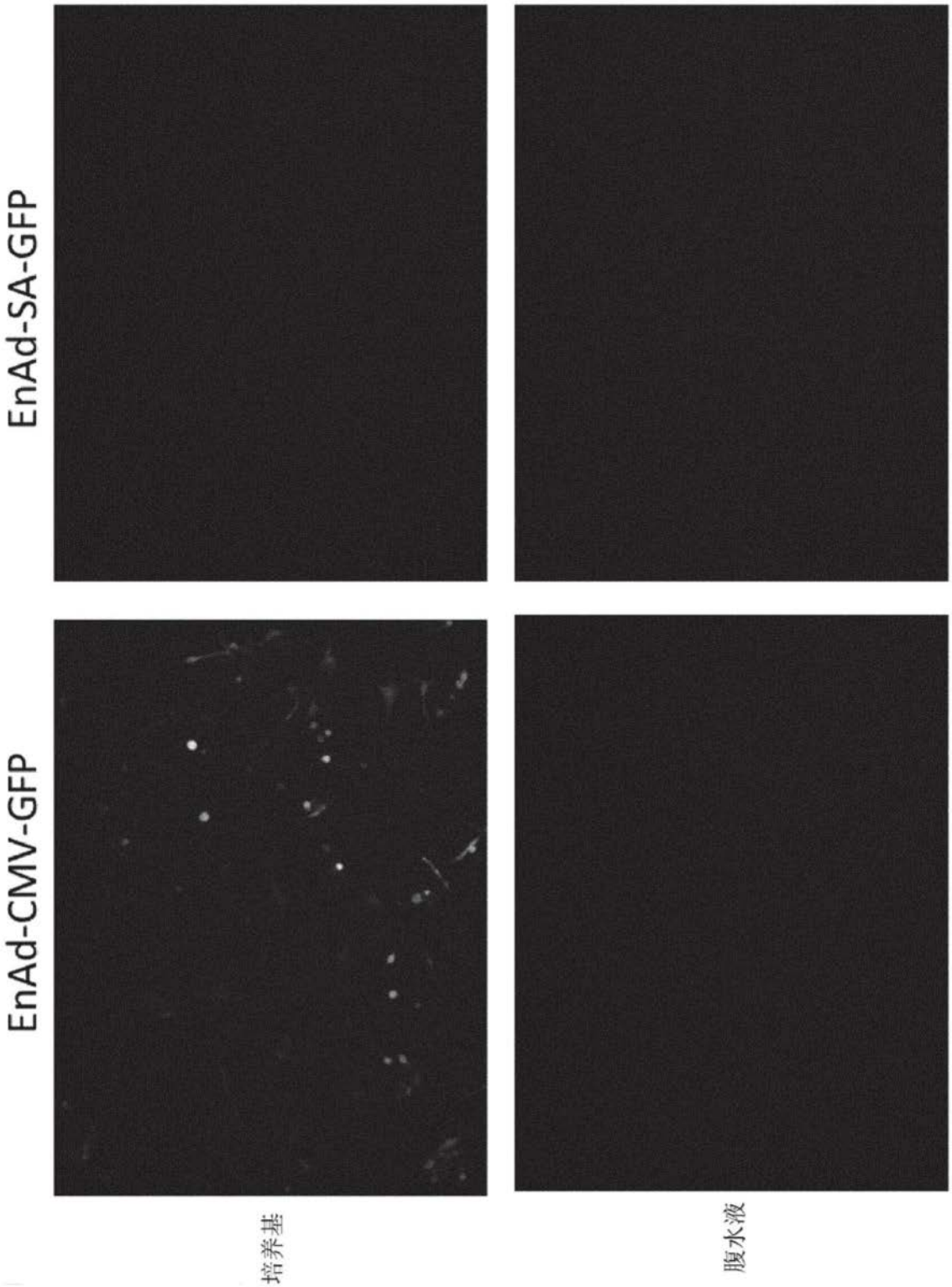


图41

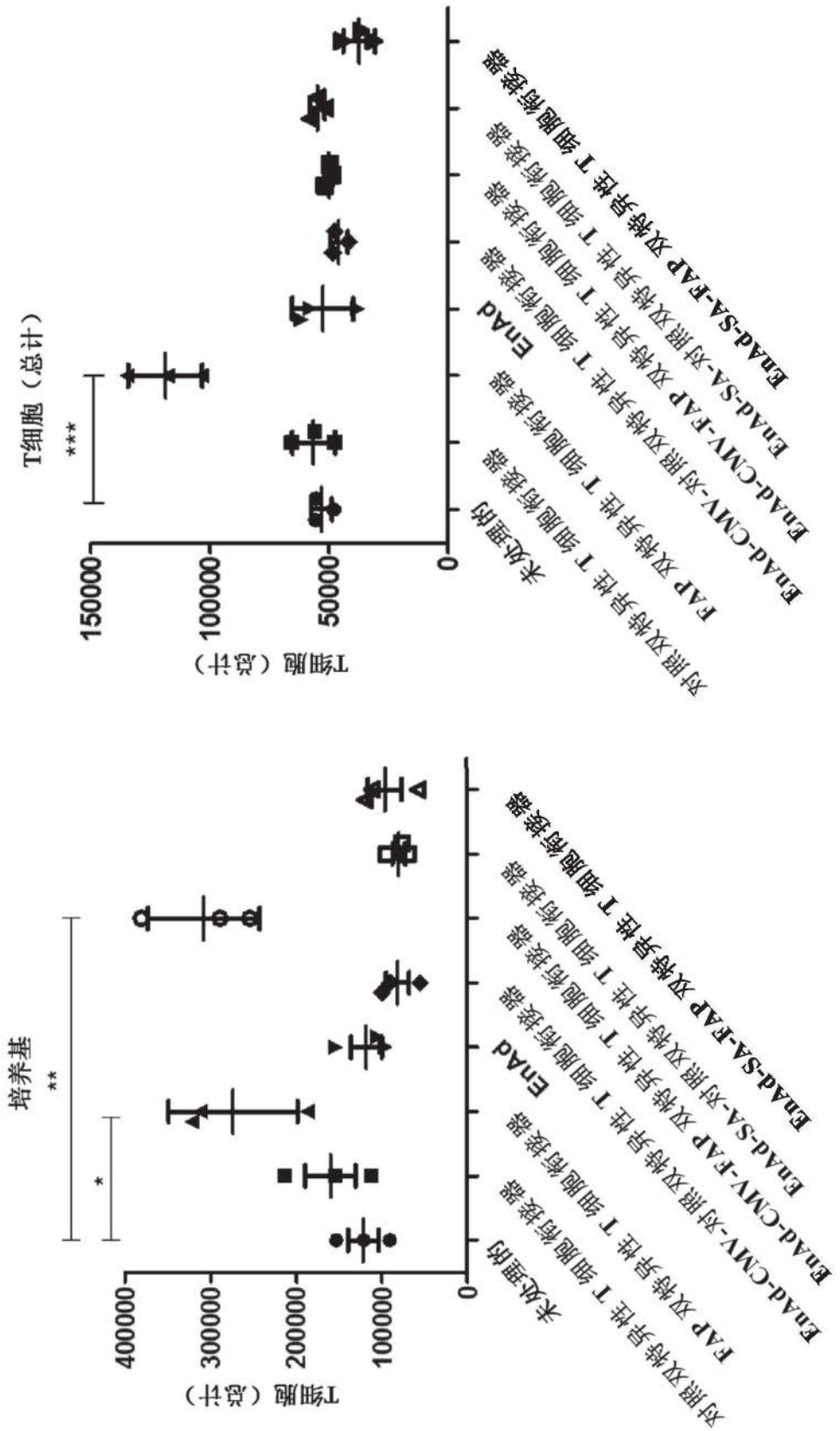

T细胞（总计）
***
150000
100000
50000
0
T细胞（总计）
未处理的
抗PRS双特异性T细胞衔接器
FAP双特异性T细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-抗PRS双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-抗PRS双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器
培养基
**
*
400000
300000
200000
100000
0
T细胞（总计）
未处理的
抗PRS双特异性T细胞衔接器
FAP双特异性T细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-抗PRS双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-抗PRS双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器

图42

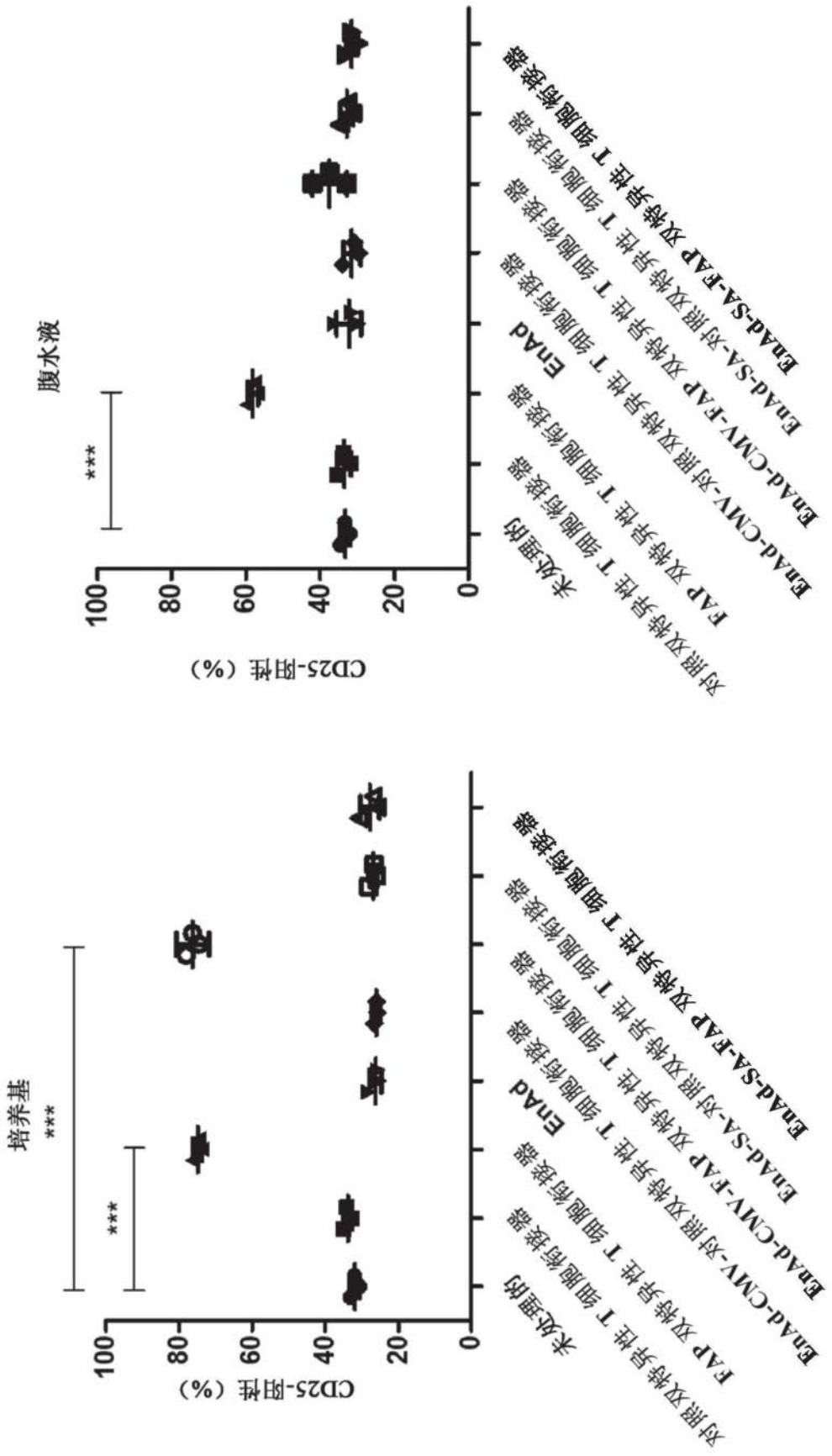

腹水液
***
CD25-阳性（%）
100
80
60
40
20
0
未处理的
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
培养基
***
***
CD25-阳性（%）
100
80
60
40
20
0
未处理的
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器

图43

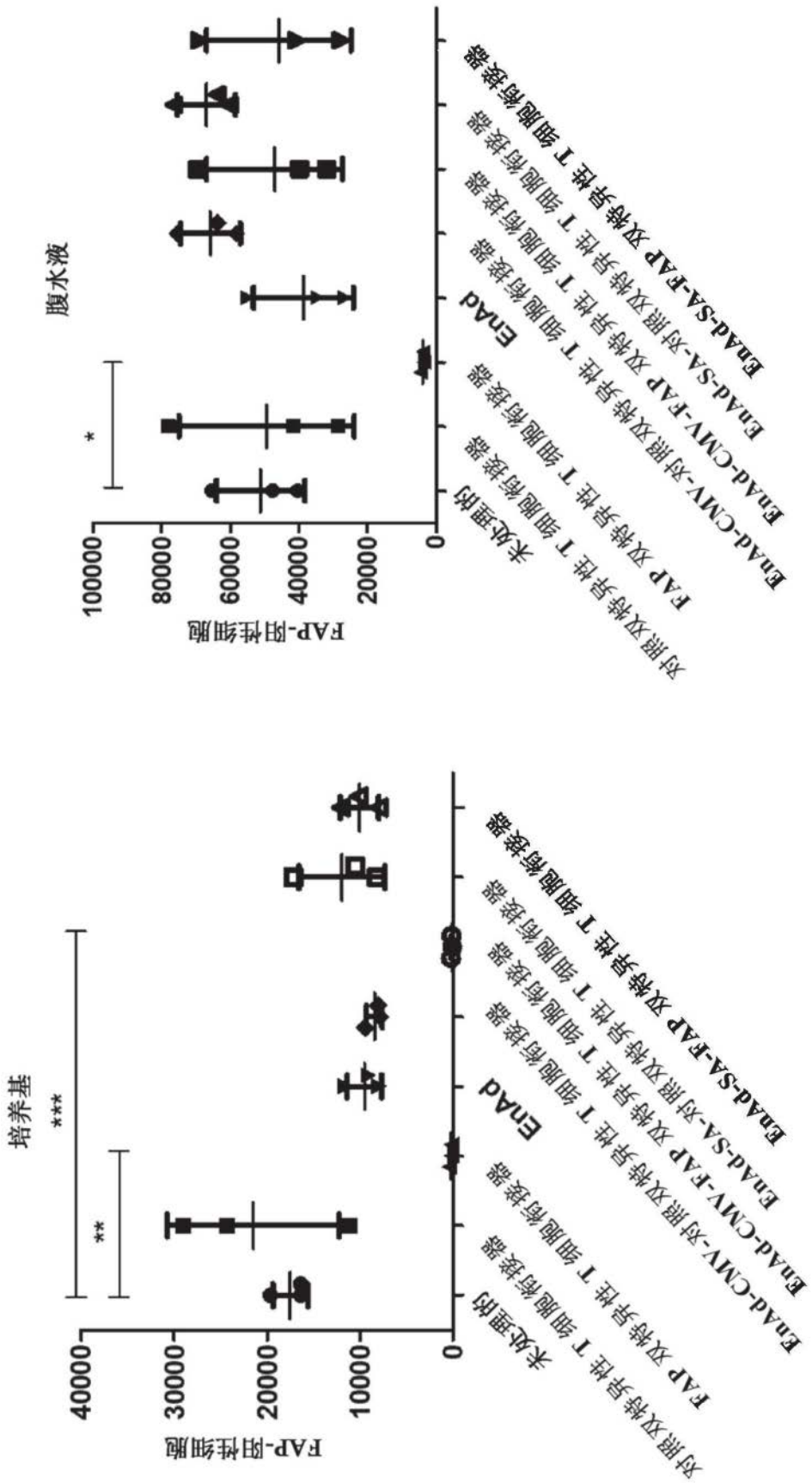

腹水液
FAP-阳性细胞
100000
80000
60000
40000
20000
0
*
未处理的
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
培养基
FAP-阳性细胞
40000
30000
20000
10000
0
**
***
未处理的
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器

图44

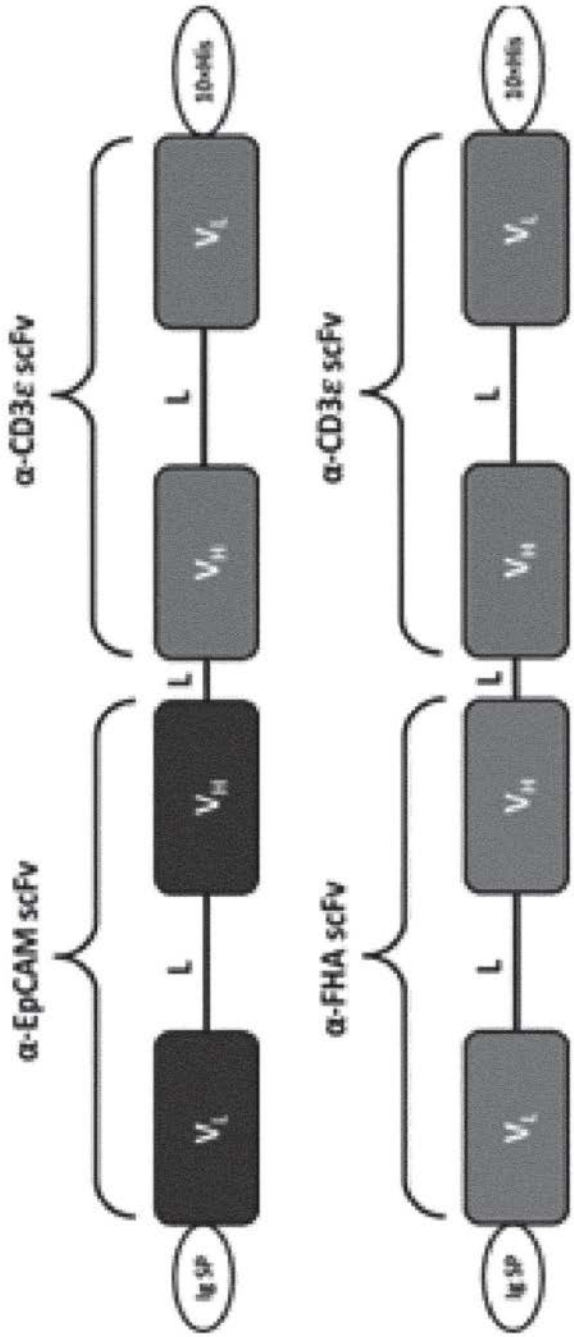

10×His
α-CD3ε scFv
L
L
α-EpCAM scFv
Ig SP
10×His
α-CD3ε scFv
L
L
α-FHA scFv
Ig SP

图45A

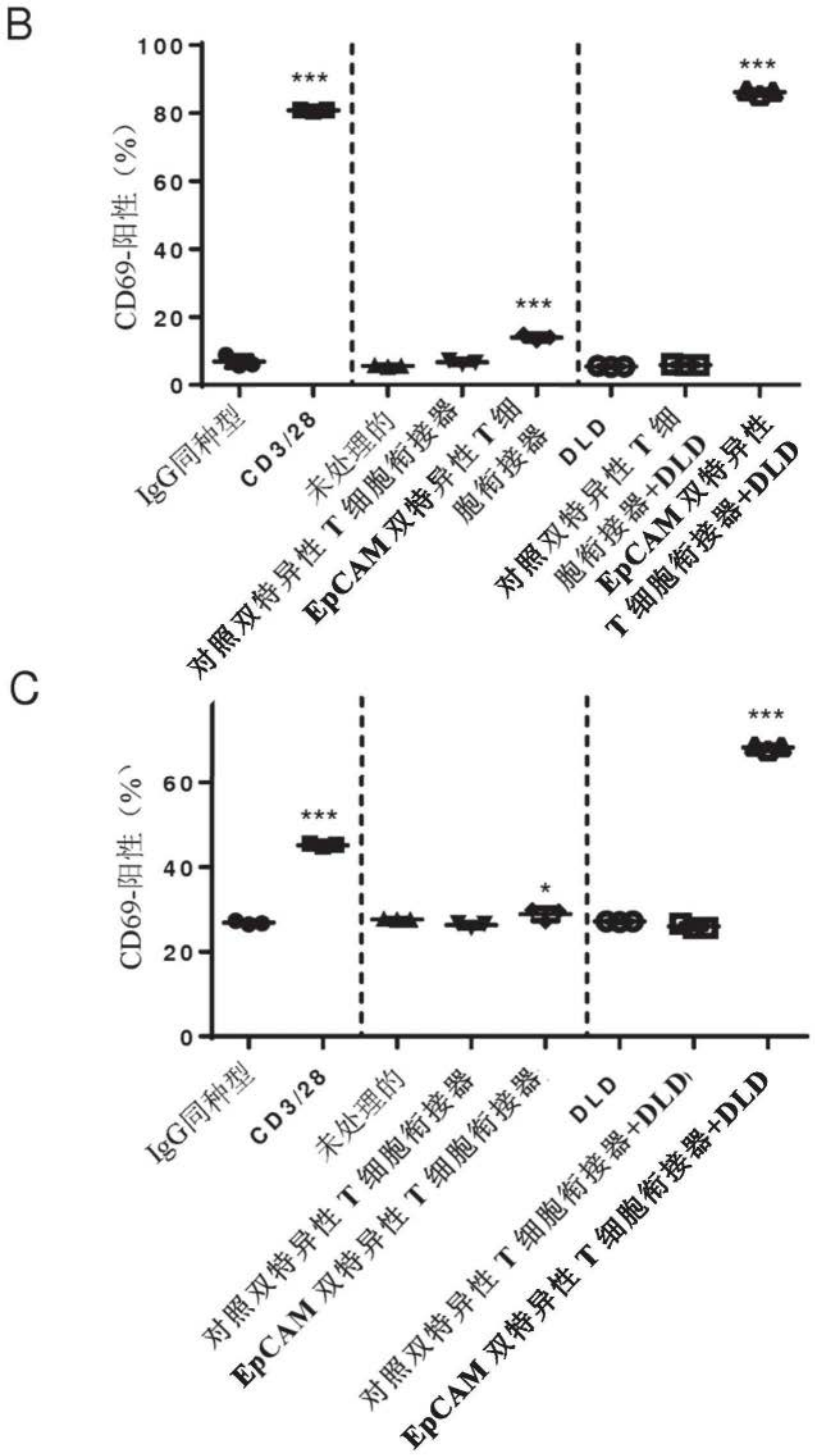
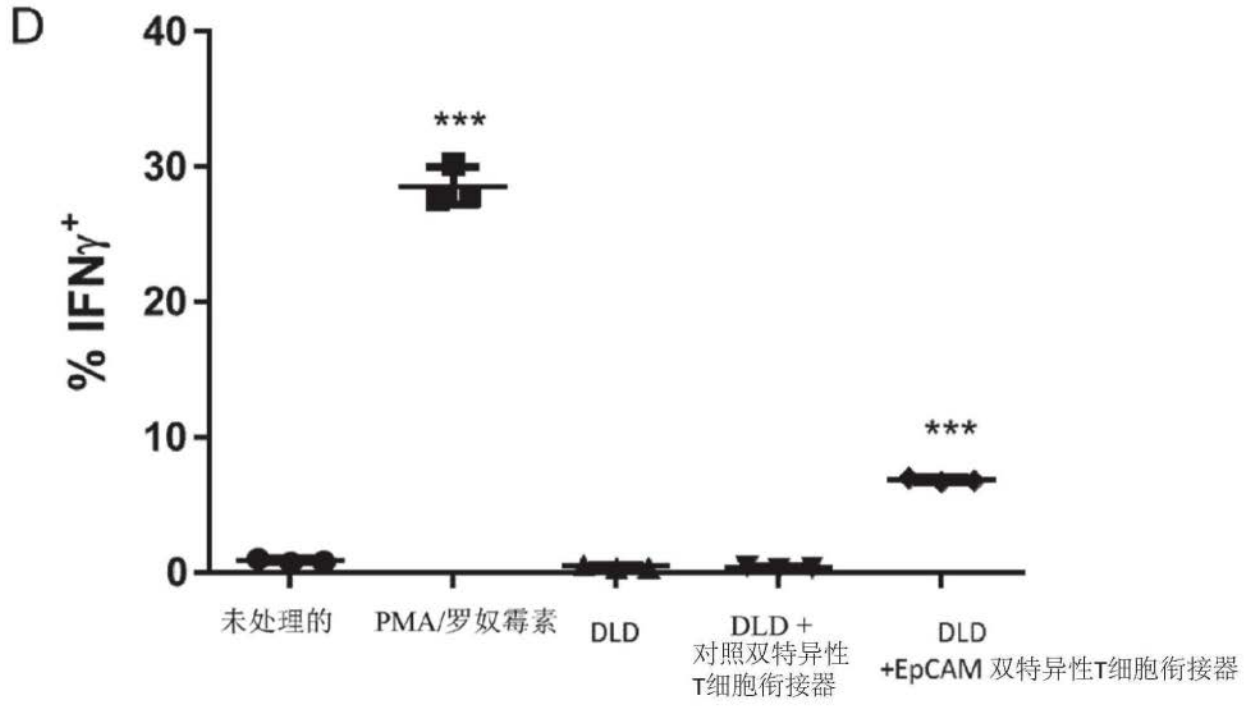

B
CD69-阳性（%）
100
80
60
40
20
0
***
***
***
IgG同种型
CD3/28
未处理的
对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM双特异性T细胞衔接器
DLD
对照双特异性T细胞衔接器+DLD
EpCAM双特异性T细胞衔接器+DLD
C
CD69-阳性（%）
60
40
20
0
***
*
***
IgG同种型
CD3/28
未处理的
对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM双特异性T细胞衔接器
DLD
对照双特异性T细胞衔接器+DLD
EpCAM双特异性T细胞衔接器+DLD

图45(续)


D
40
30
20
10
0
% IFNγ+
***
***
未处理的
PMA/罗奴霉素
DLD
DLD +
对照双特异性
T细胞衔接器
DLD
+EpCAM 双特异性T细胞衔接器

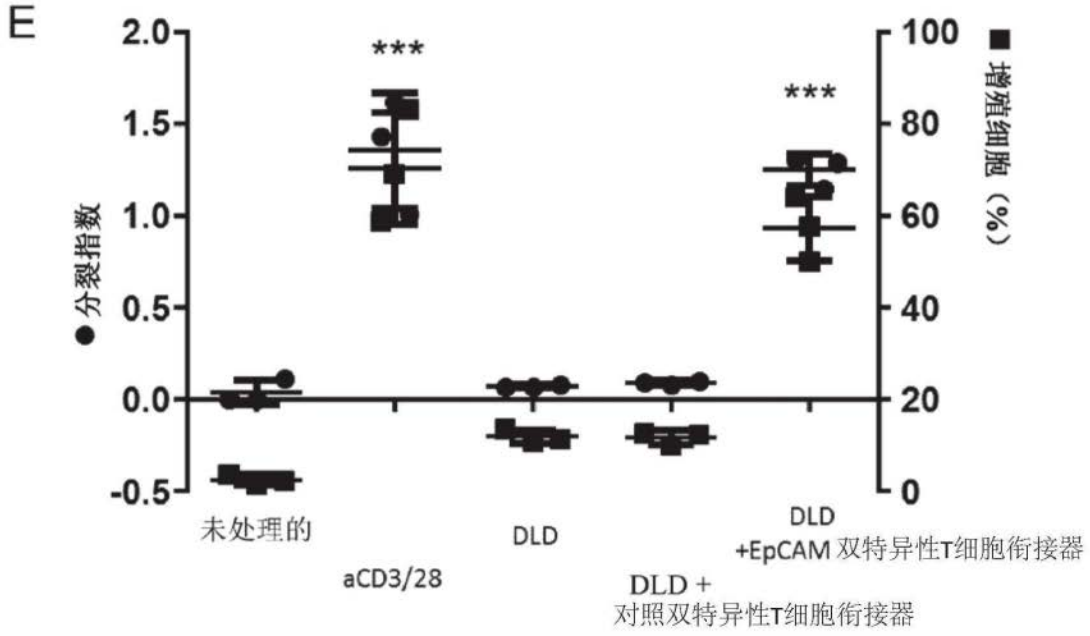

E
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
● 分裂指数
100
80
60
40
20
0
■ 残留细胞（%）
***
***
未处理的
aCD3/28
DLD
DLD +
对照双特异性T细胞衔接器
DLD
+EpCAM 双特异性T细胞衔接器

图45(续)

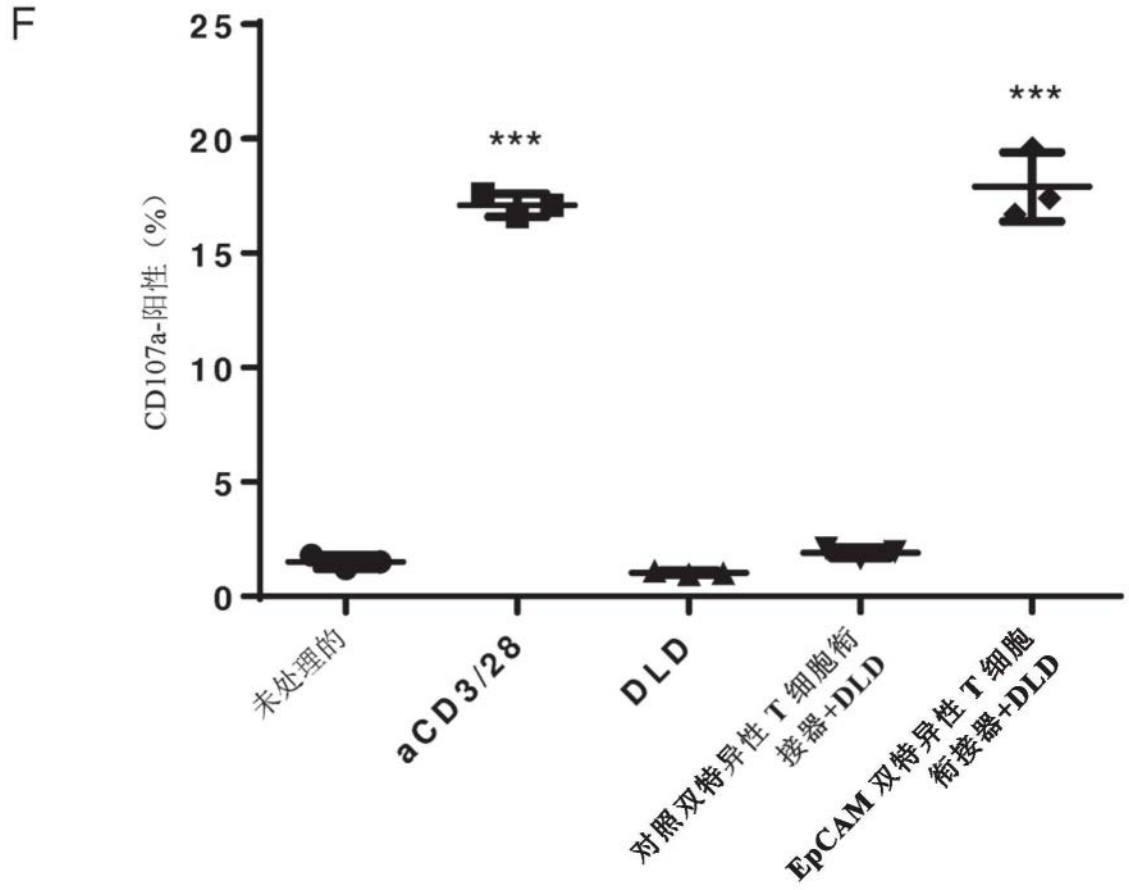

F
CD107a-阳性（%）
25
20
15
10
5
0
***
***
未处理的
aCD3/28
DLD
对照双特异性T细胞衔接器+DLD
EpCAM双特异性T细胞衔接器+DLD

图45(续)

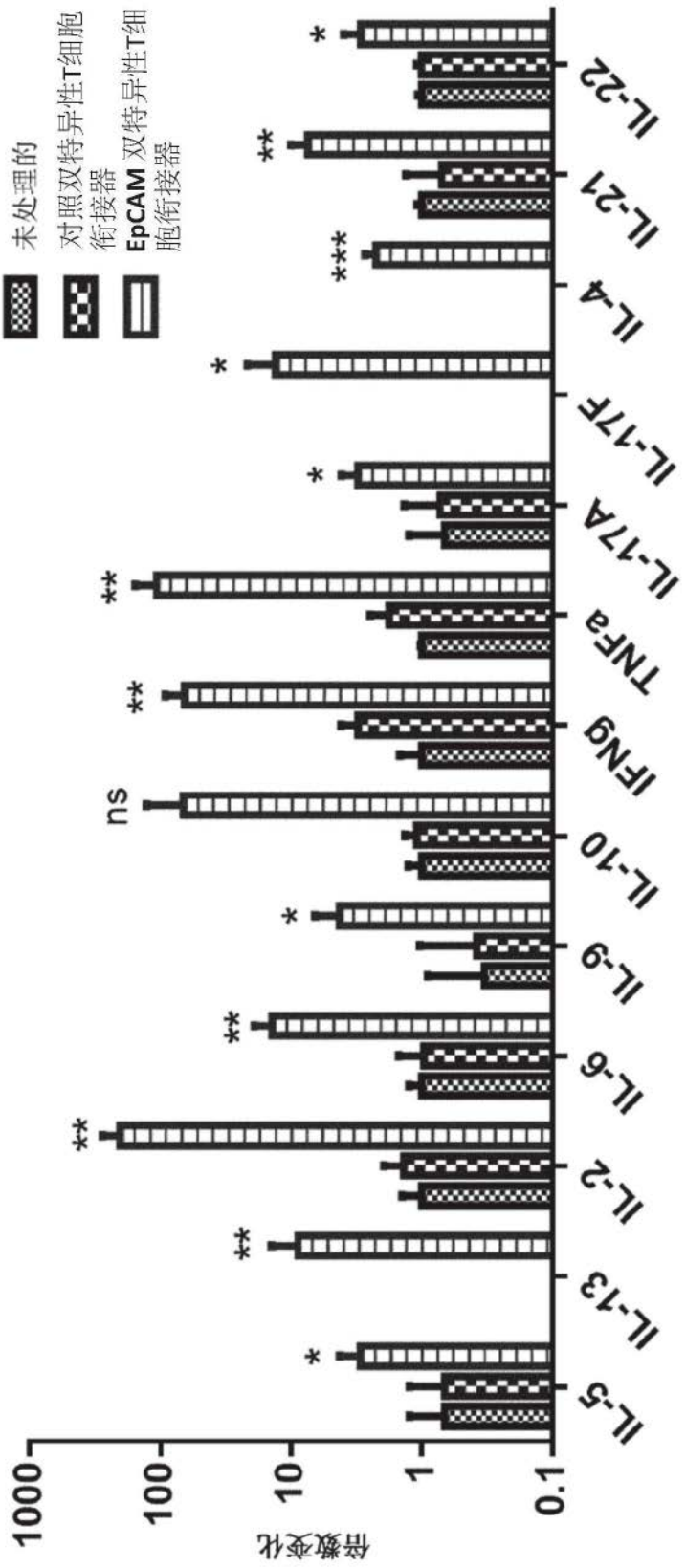

未处理的
对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM 双特异性T细胞衔接器
倍数变化
1000
100
10
1
0.1
IL-5
IL-13
IL-2
IL-6
IL-9
IL-10
IFNg
TNFa
IL-17A
IL-17F
IL-4
IL-21
IL-22
ns
*
**
***

图45G

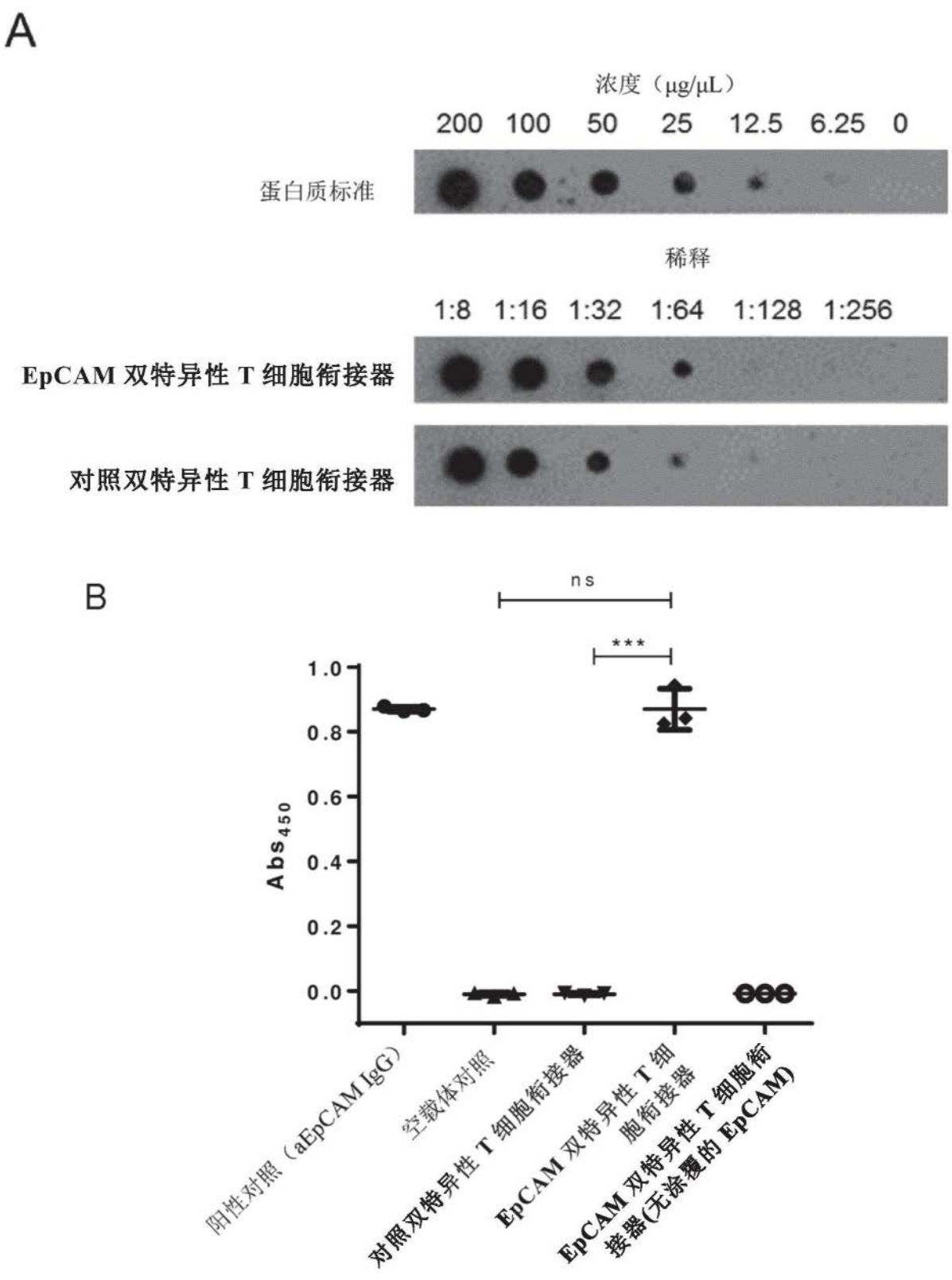

A
浓度（μg/μL）
200 100 50 25 12.5 6.25 0
蛋白质标准
稀释
1:8 1:16 1:32 1:64 1:128 1:256
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
对照双特异性 T 细胞衔接器
B
ns
***
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Abs450
阳性对照（aEpCAM IgG）
空载体对照
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器(无涂覆的 EpCAM)

图46

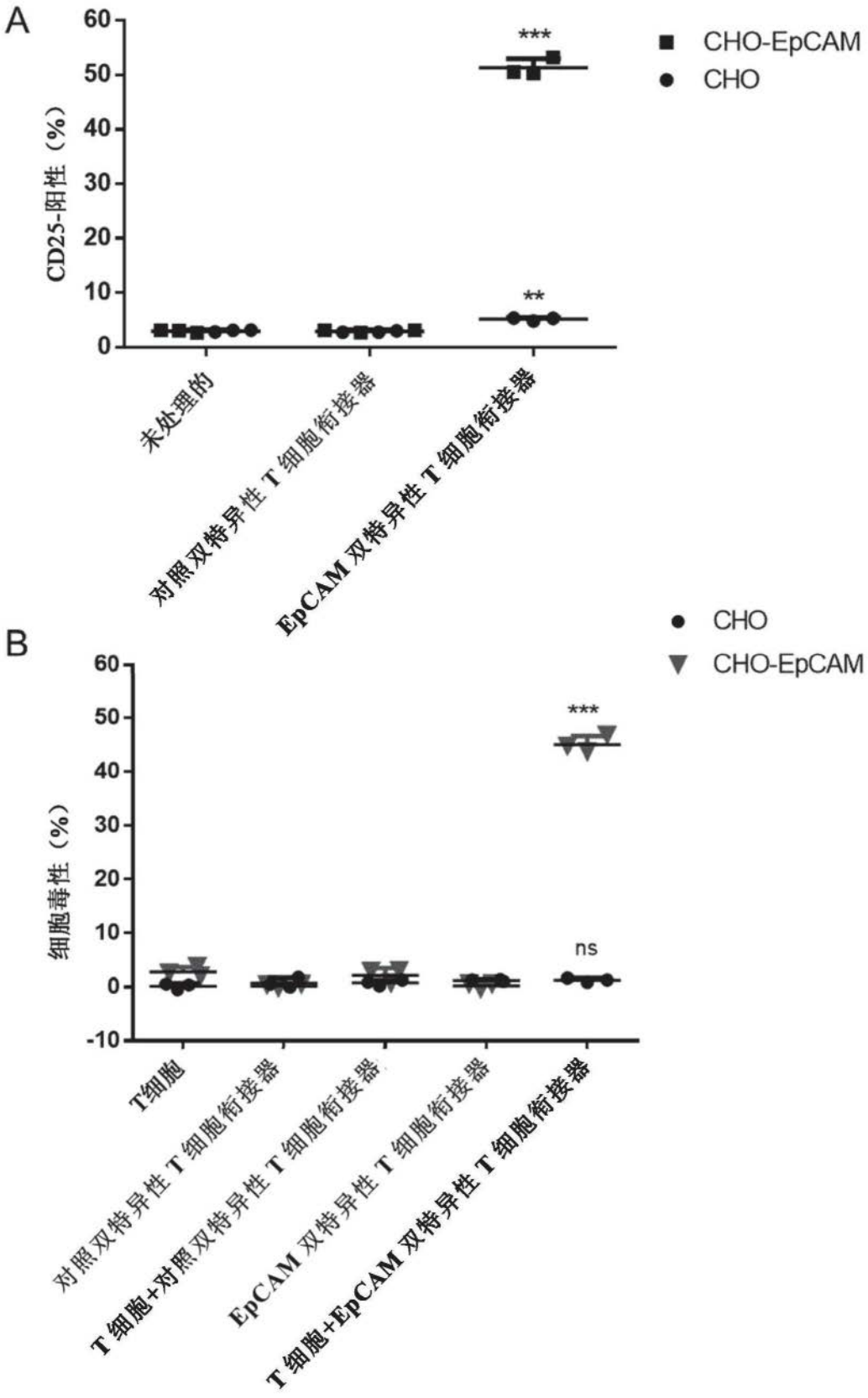

A
CD25-阳性（%）
60
50
40
30
20
10
0
***
**
CHO-EpCAM
CHO
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
B
细胞毒性（%）
60
50
40
30
20
10
0
-10
***
ns
CHO
CHO-EpCAM
T细胞
对照双特异性 T 细胞衔接器
T 细胞+对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
T 细胞+EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器

图47

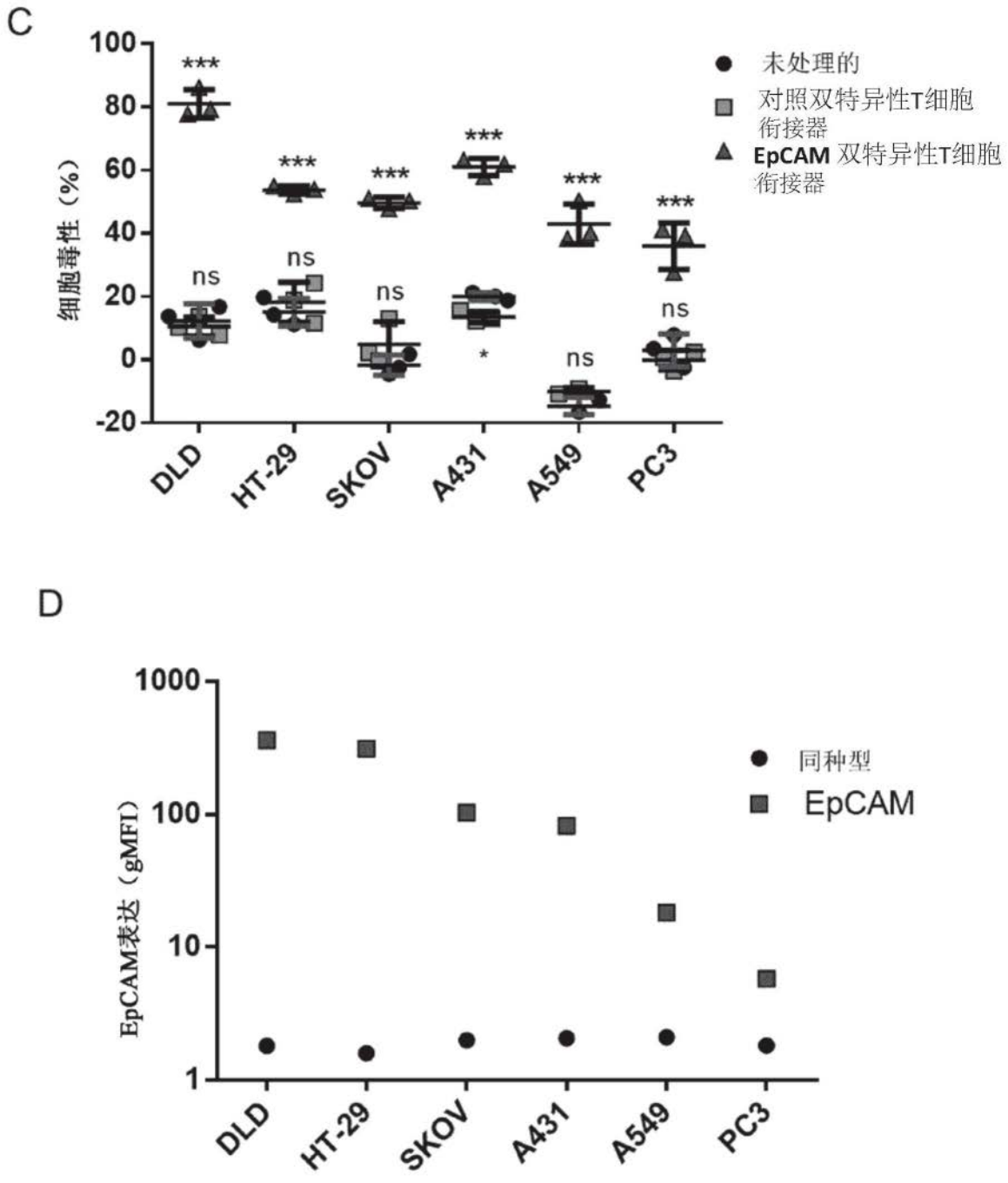

C
100
80
60
40
20
0
-20
细胞毒性（%）
***
ns
*
未处理的
对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM 双特异性T细胞衔接器
DLD
HT-29
SKOV
A431
A549
PC3
D
1000
100
10
1
EpCAM表达（gMFI）
同种型
EpCAM

图47(续)

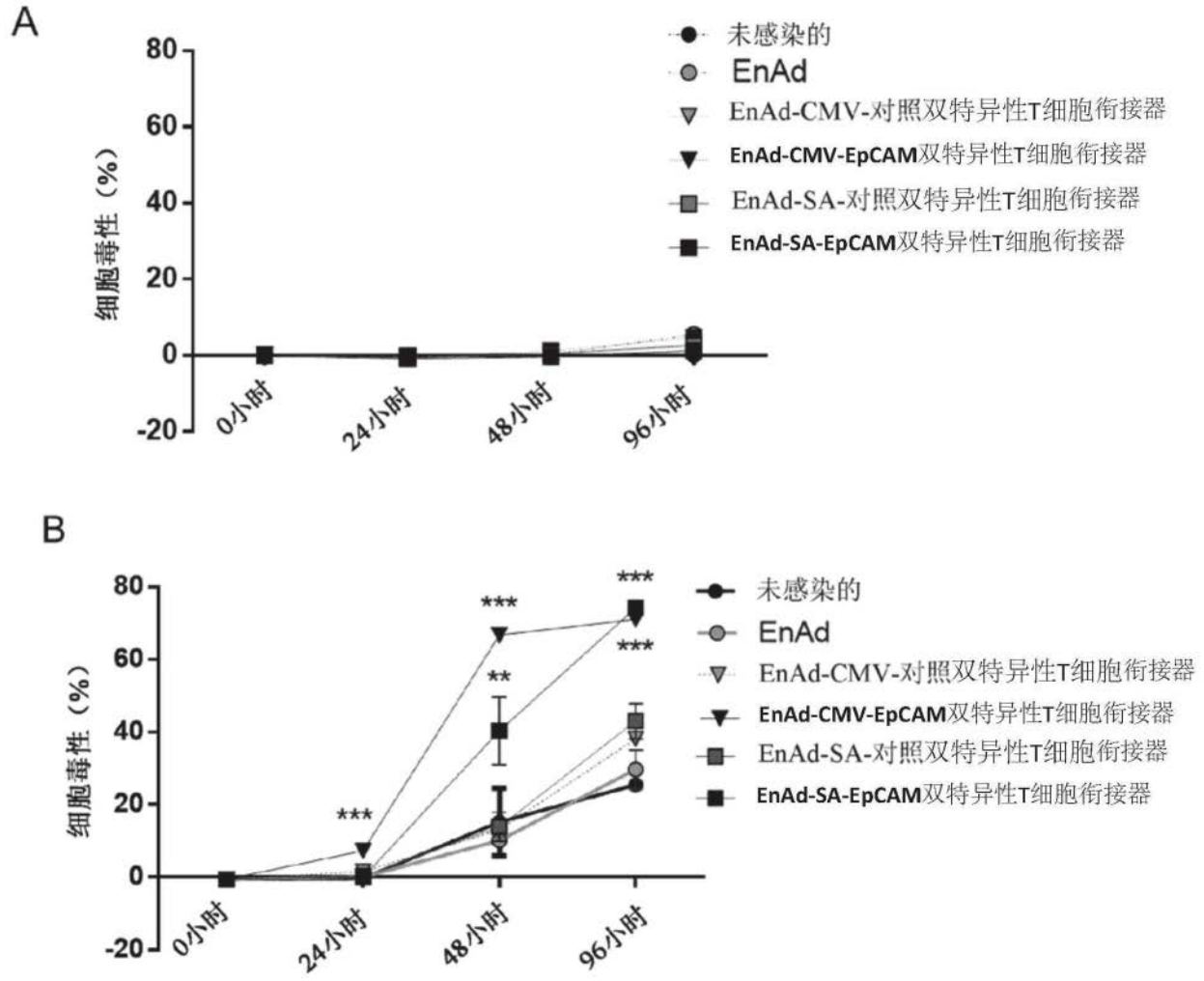

A
80
60
40
20
0
-20
细胞毒性（%）
0小时
24小时
48小时
96小时
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器
B
80
60
40
20
0
-20
细胞毒性（%）
***
**
***
***
0小时
24小时
48小时
96小时
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器

图48

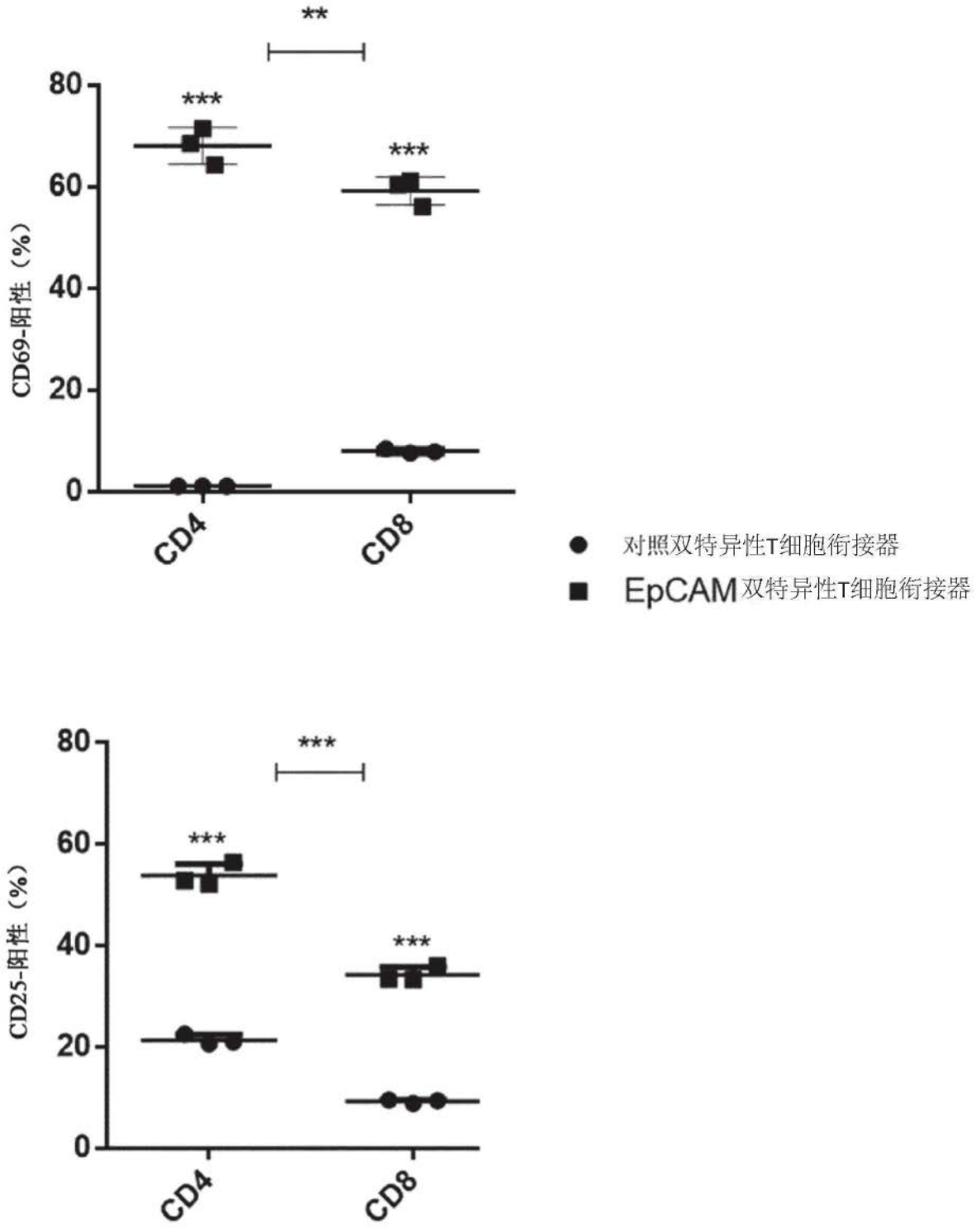
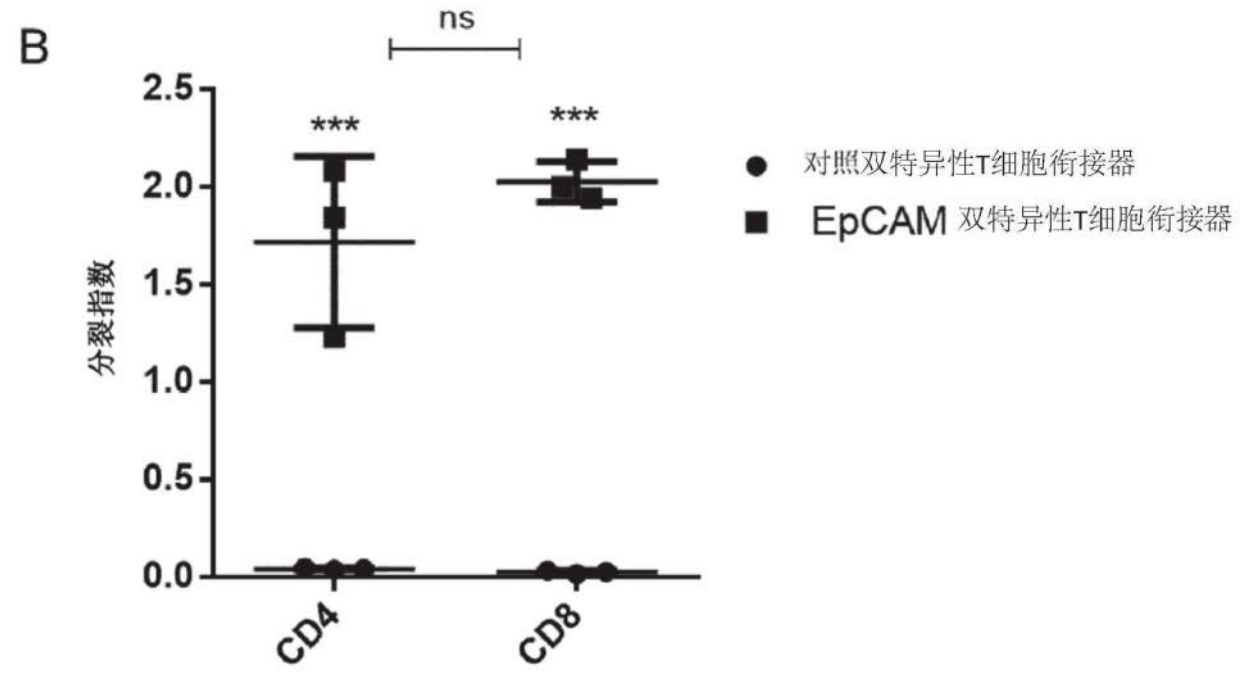

**
***
***
80
60
40
20
0
CD69-阳性（%）
CD4
CD8
对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM双特异性T细胞衔接器
***
***
***
80
60
40
20
0
CD25-阳性（%）
CD4
CD8

图49A


B
ns
***
***
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
分裂指数
CD4
CD8
对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM 双特异性T细胞衔接器

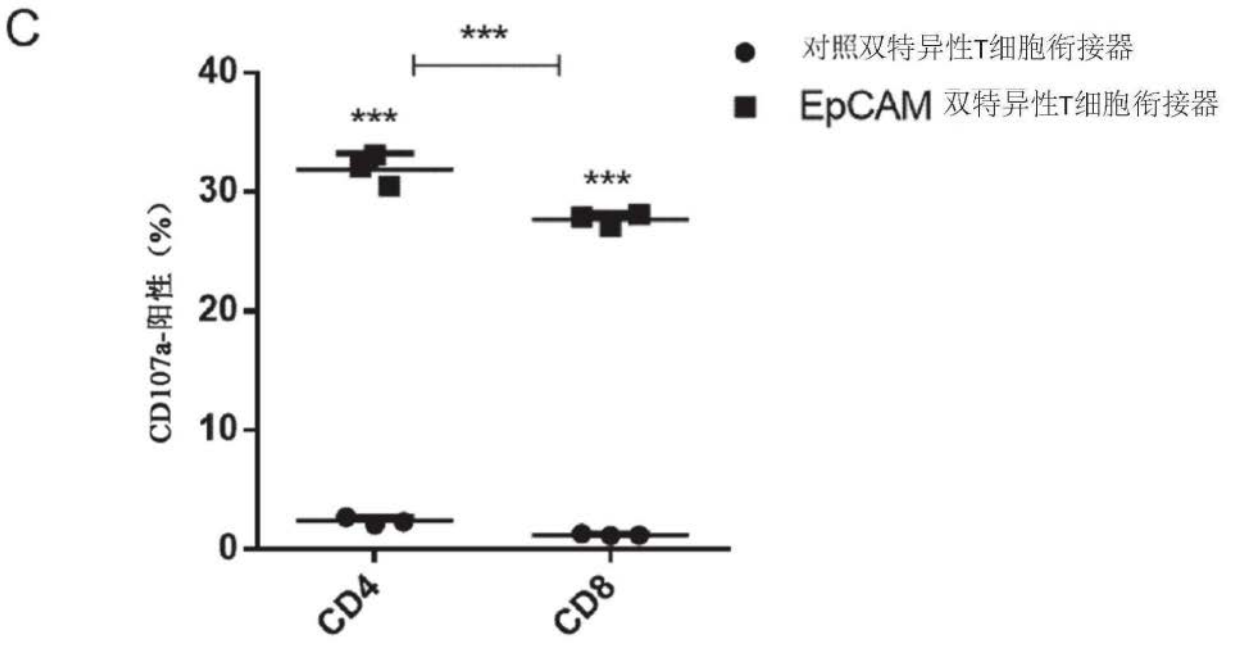

C
***
***
***
40
30
20
10
0
CD107a-阳性（%）
CD4
CD8
对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM 双特异性T细胞衔接器

图49(续)

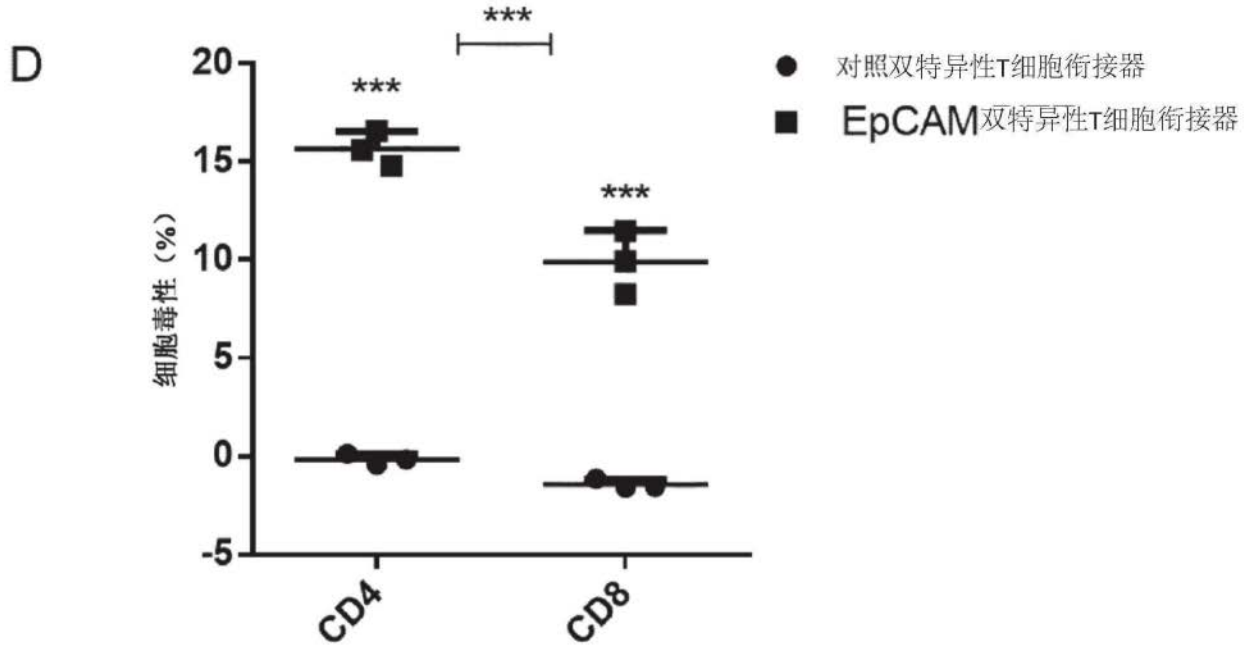


图49(续)

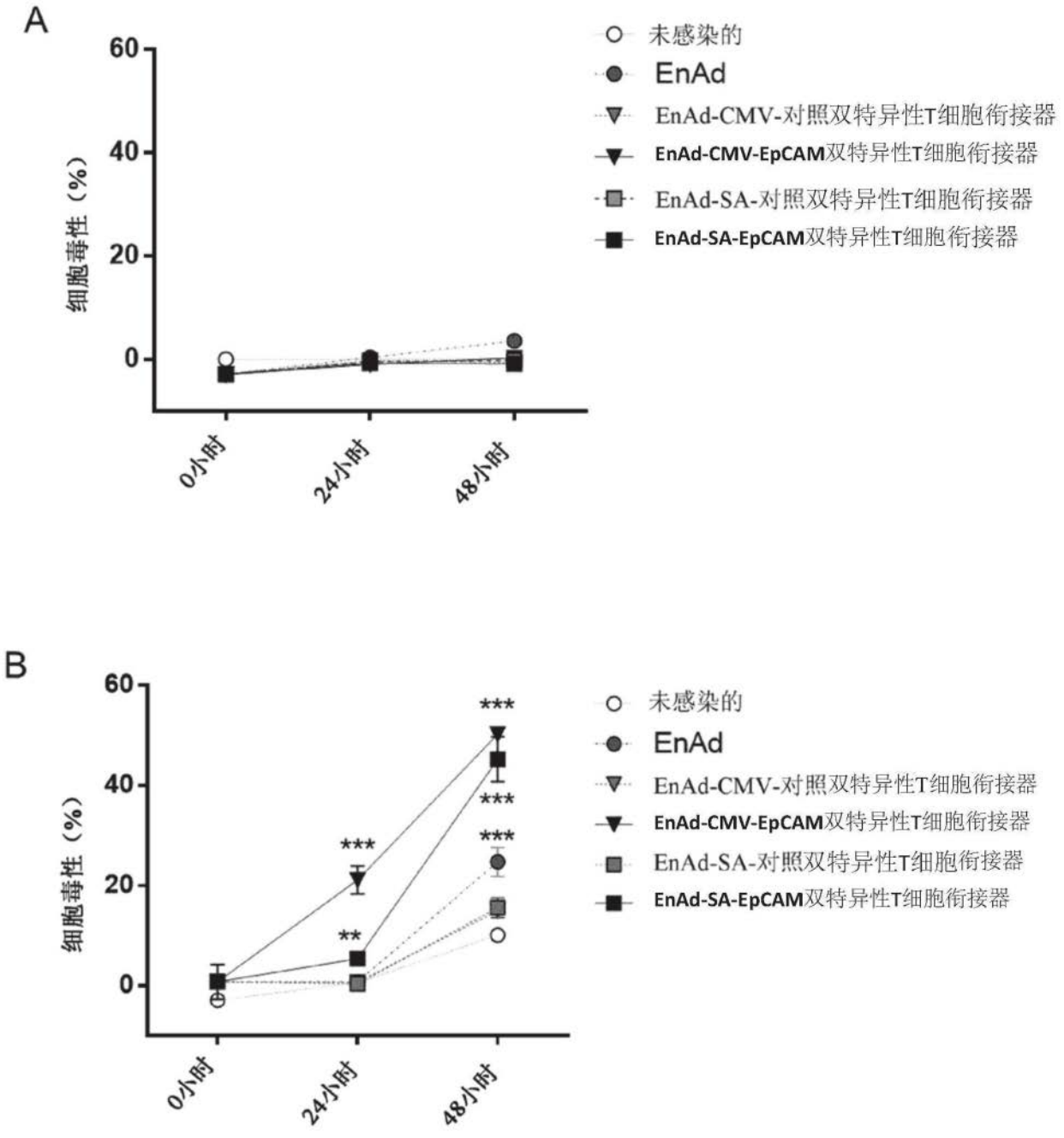

A
60
40
20
0
细胞毒性（%）
0小时
24小时
48小时
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器
B
60
40
20
0
细胞毒性（%）
***
**
***
***
0小时
24小时
48小时
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器

图50

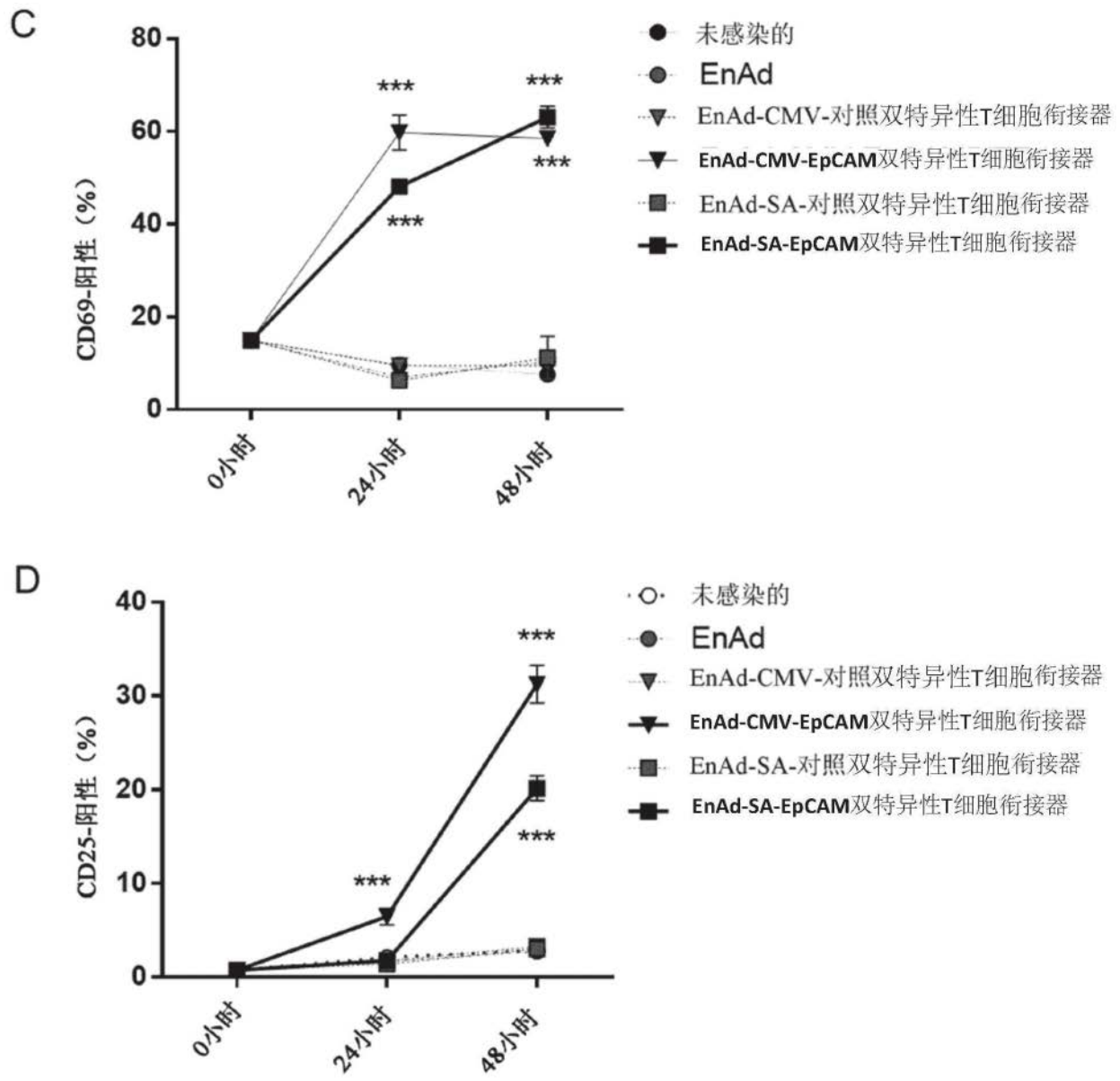
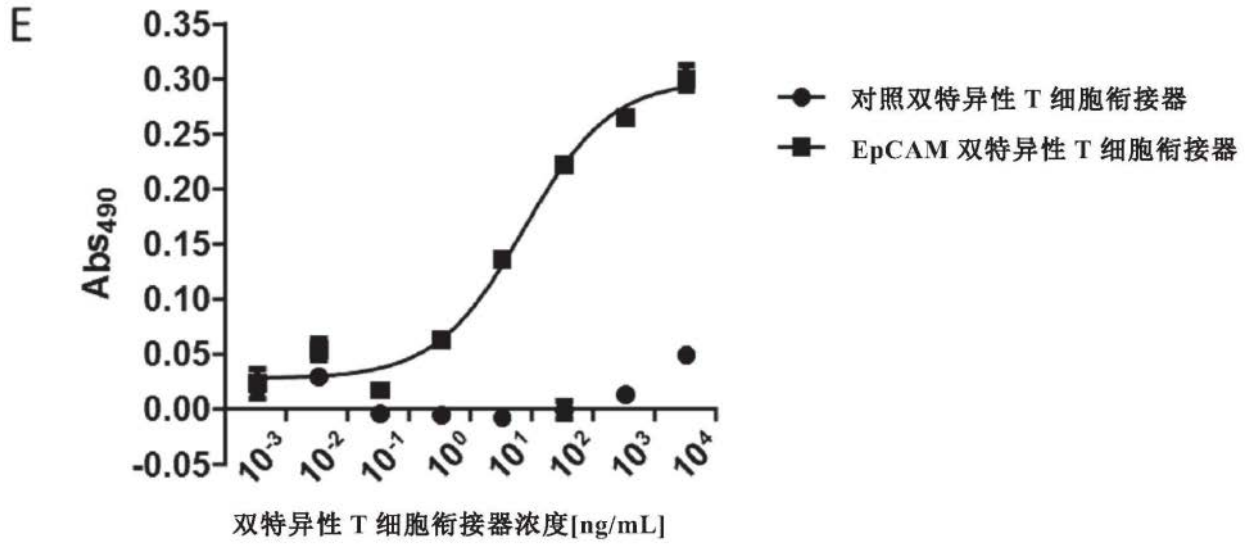

C
CD69-阳性（%）
80
60
40
20
0
***
***
***
***
0小时
24小时
48小时
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器
D
CD25-阳性（%）
40
30
20
10
0
***
***
***
0小时
24小时
48小时
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器

图50(续)


E
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
-0.05
Abs490
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
104
双特异性 T 细胞衔接器浓度[ng/mL]
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EC50 7.444

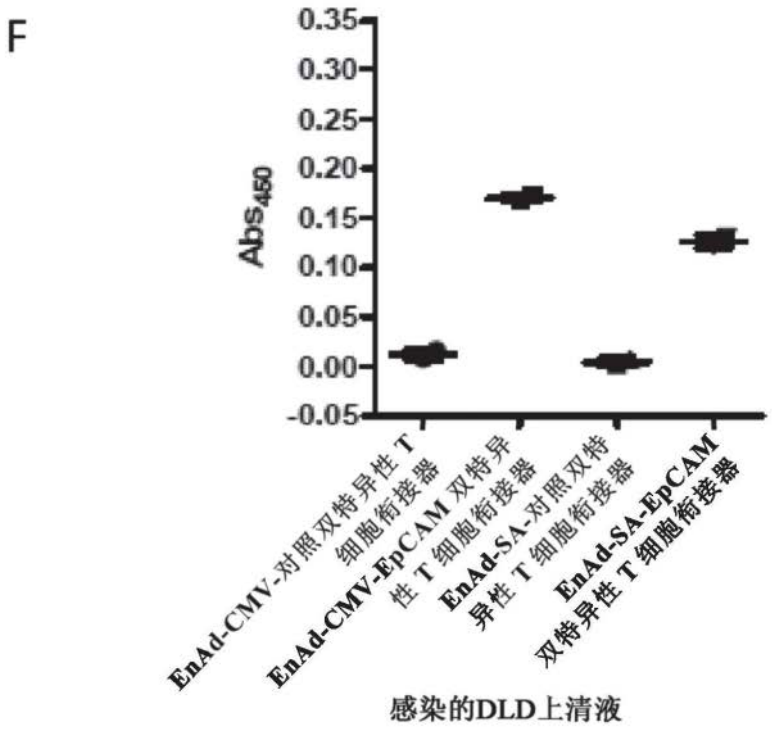

F
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
-0.05
Abs450
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
感染的DLD上清液

图50(续)

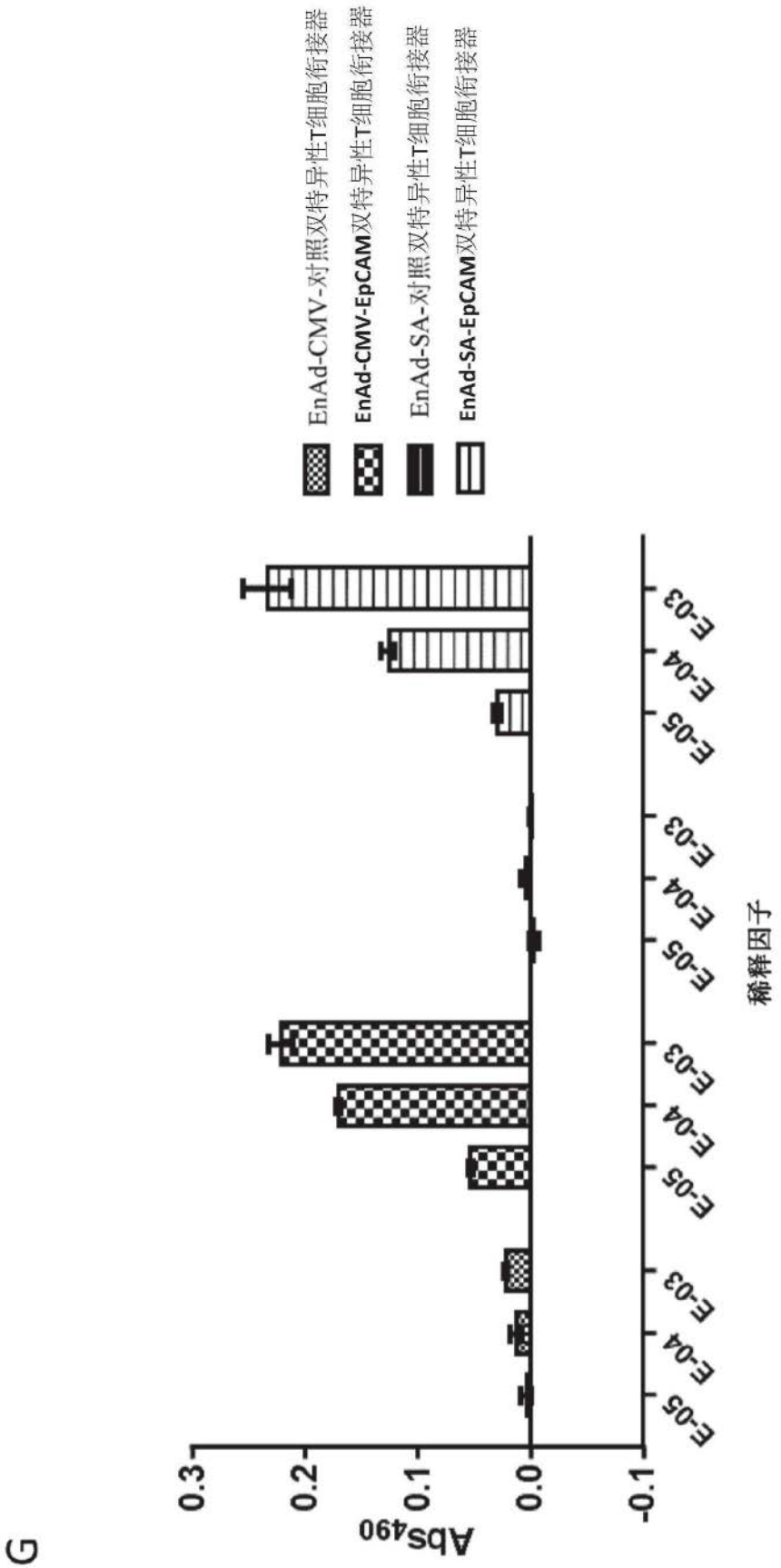

G
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器
Abs490
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
E-03
E-04
E-05
稀释因子

图50(续)

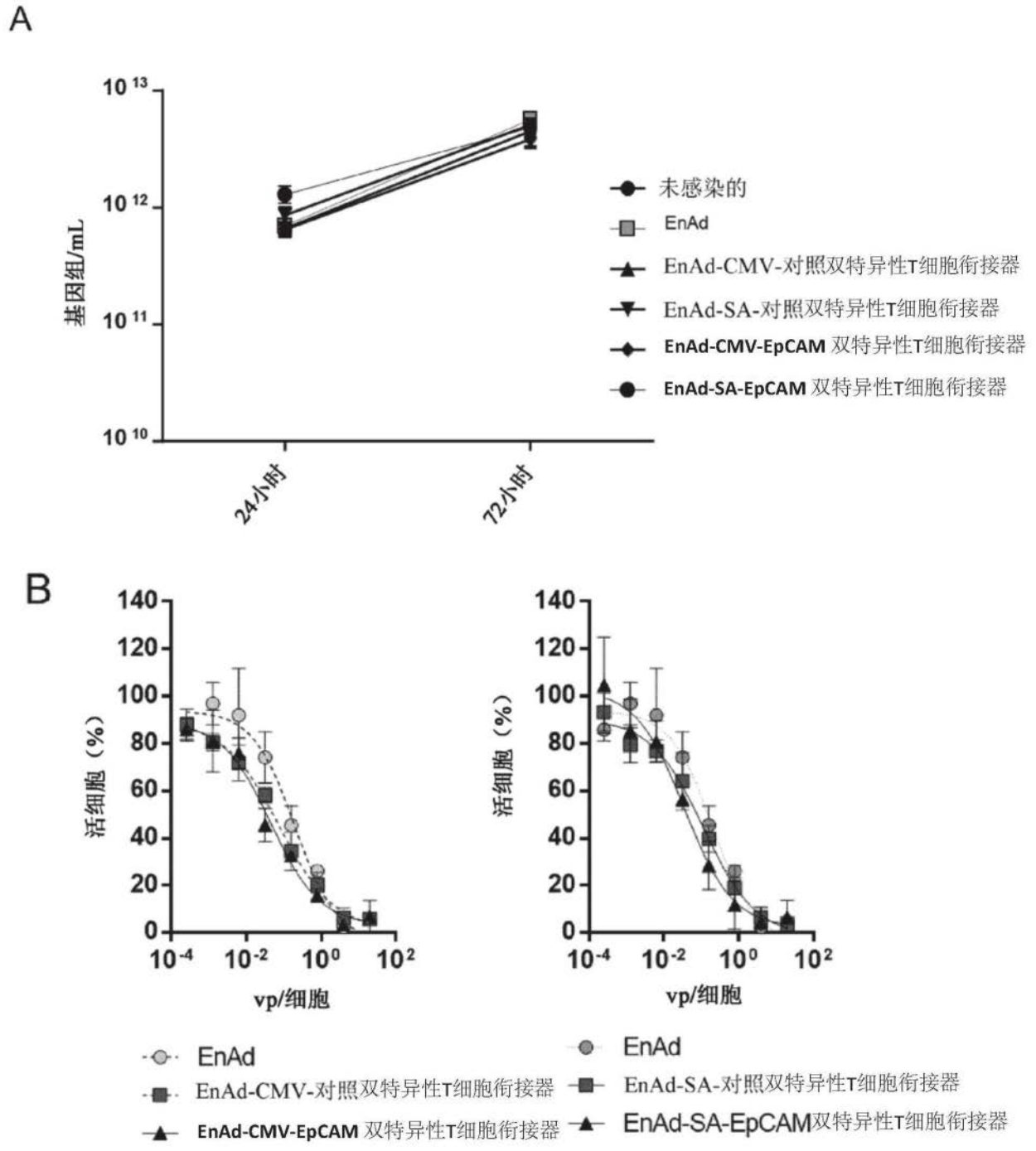

A
基因组/mL
10 13
10 12
10 11
10 10
24小时
72小时
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性T细胞衔接器
B
活细胞（%）
vp/细胞
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器

图51

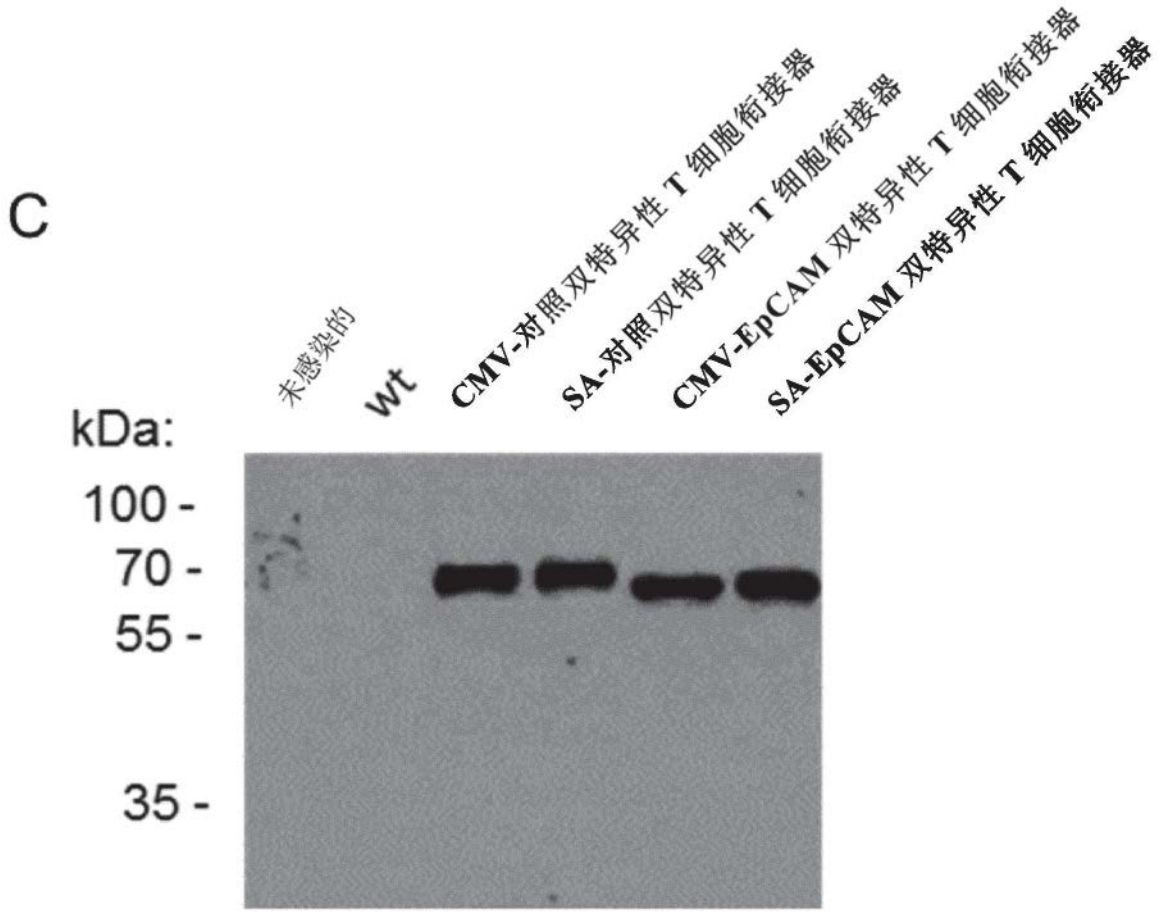

C
未感染的
wt
CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
kDa:
100 -
70 -
55 -
35 -

图51(续)

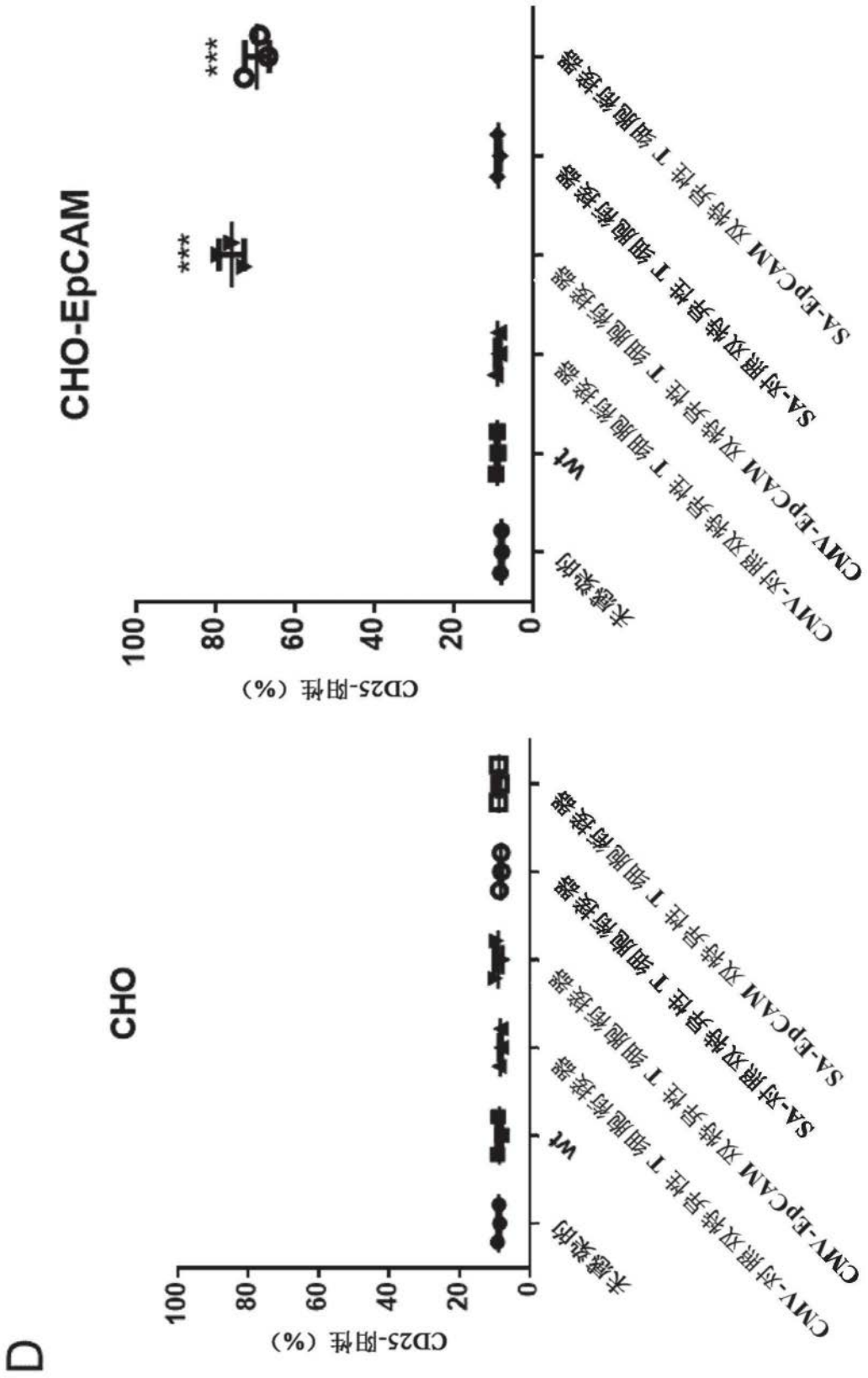

D
CHO
CD25-阳性（%）
0
20
40
60
80
100
未感染的
Wt
CMV-抗照双特异性 T 细胞衔接器
CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
SA-抗照双特异性 T 细胞衔接器
SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
CHO-EpCAM
***
***

图51(续)

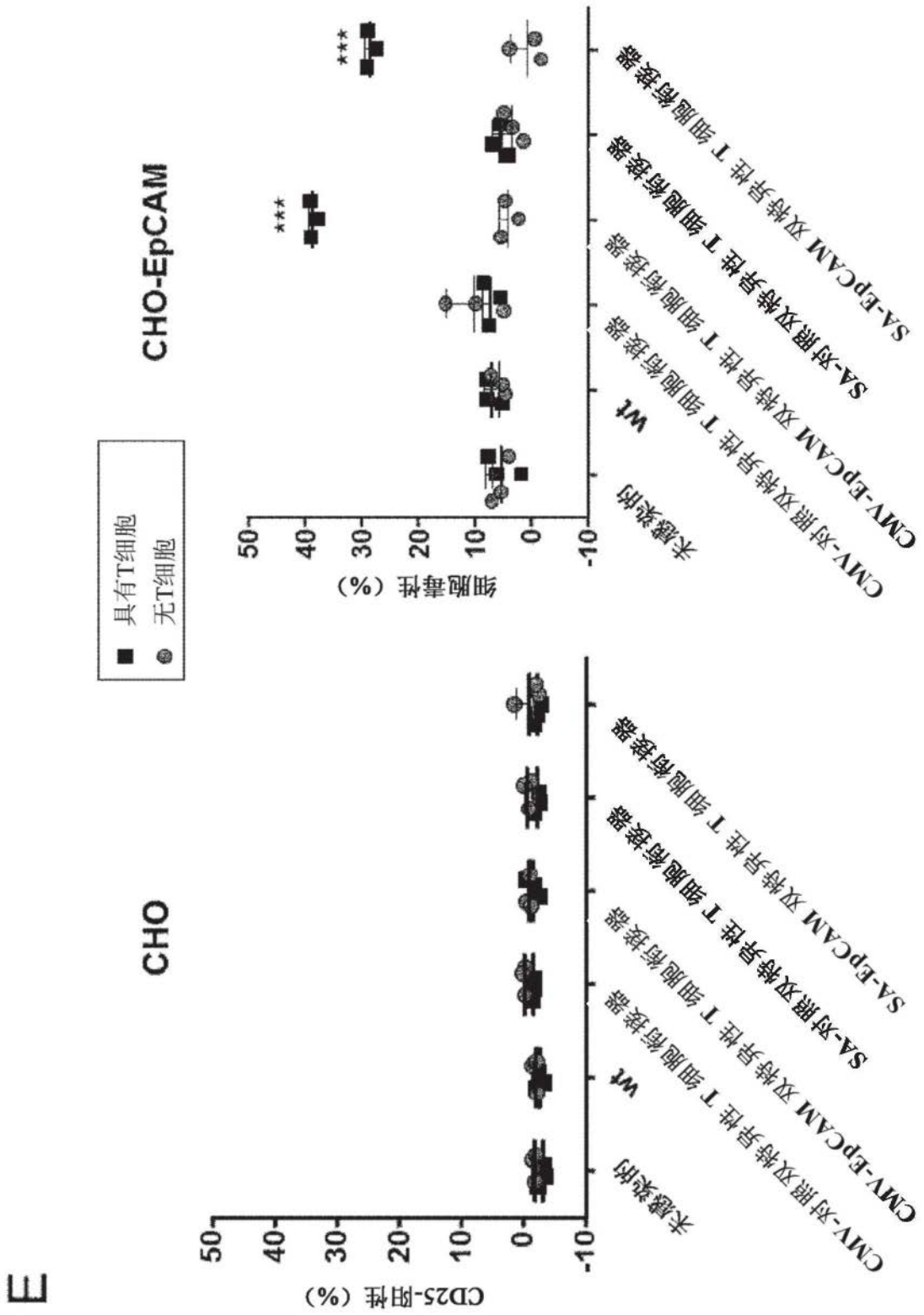
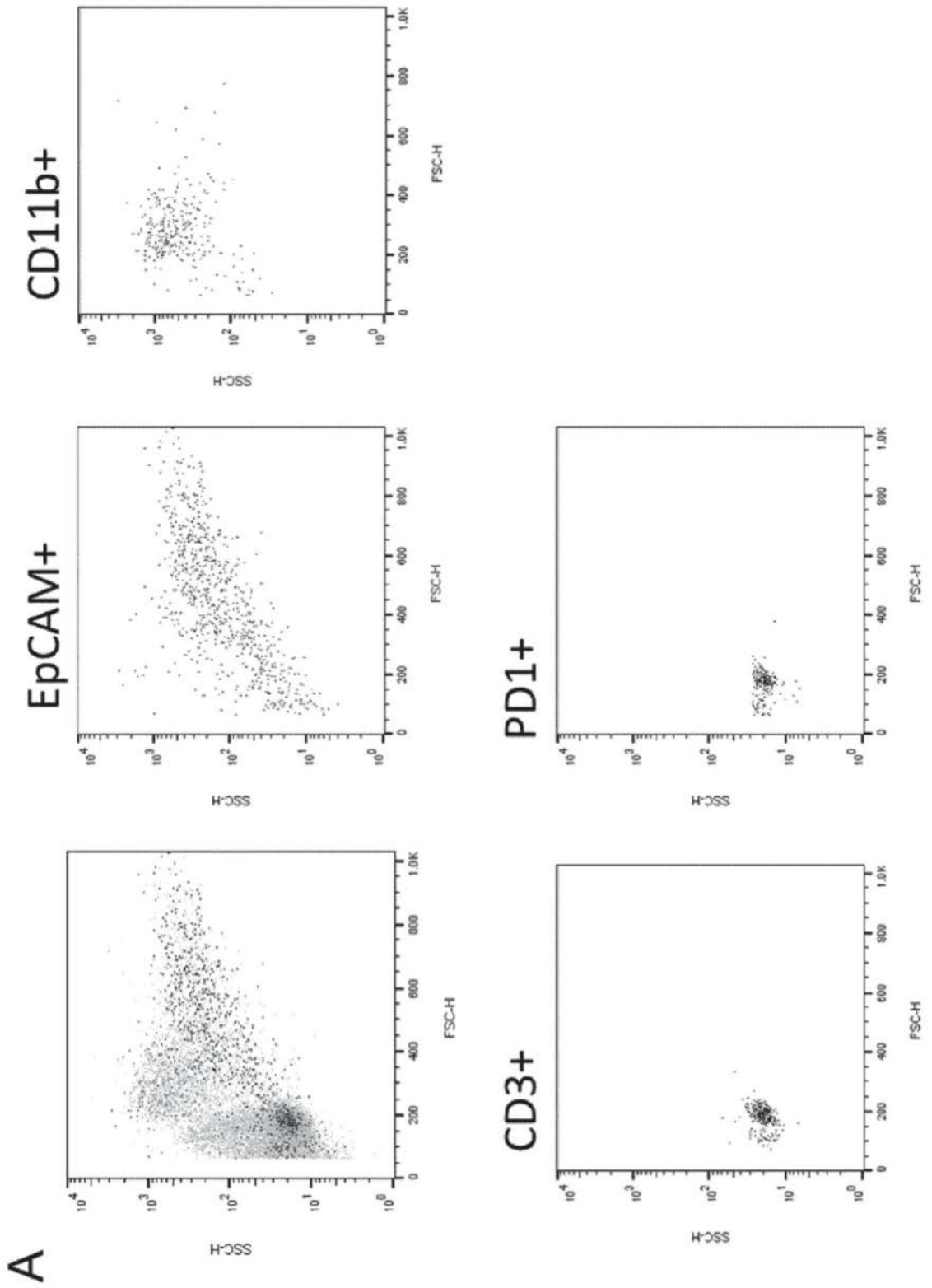

E
CHO
CHO-EpCAM
具有T细胞
无T细胞
CD25-阳性（%）
细胞毒性（%）
50
40
30
20
10
0
-10
***
未感染的
Wt
CMV-对照双特异性T细胞衔接器
CMV-对照双特异性T细胞衔接器
CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
SA-对照双特异性T细胞衔接器
SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器

图51(续)


A
CD11b+
EpCAM+
PD1+
CD3+
SSC-H
FSC-H

B

亚群	计数
EpCAM	749
CD3	289
PD1	206
CD11b	277
总计	10000

图52

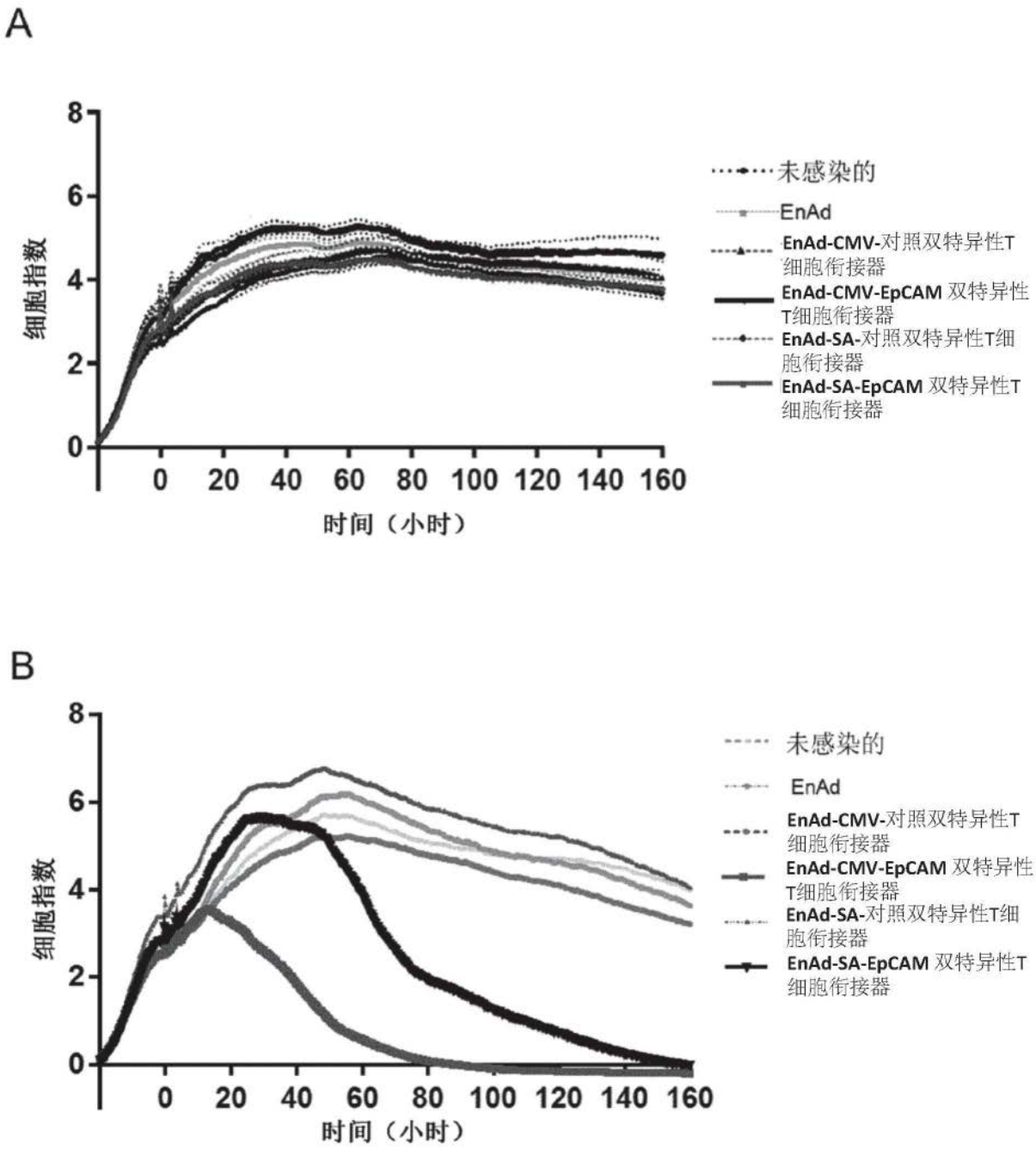

A
细胞指数
时间（小时）
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性T细胞衔接器
B
细胞指数
时间（小时）
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性T细胞衔接器

图53

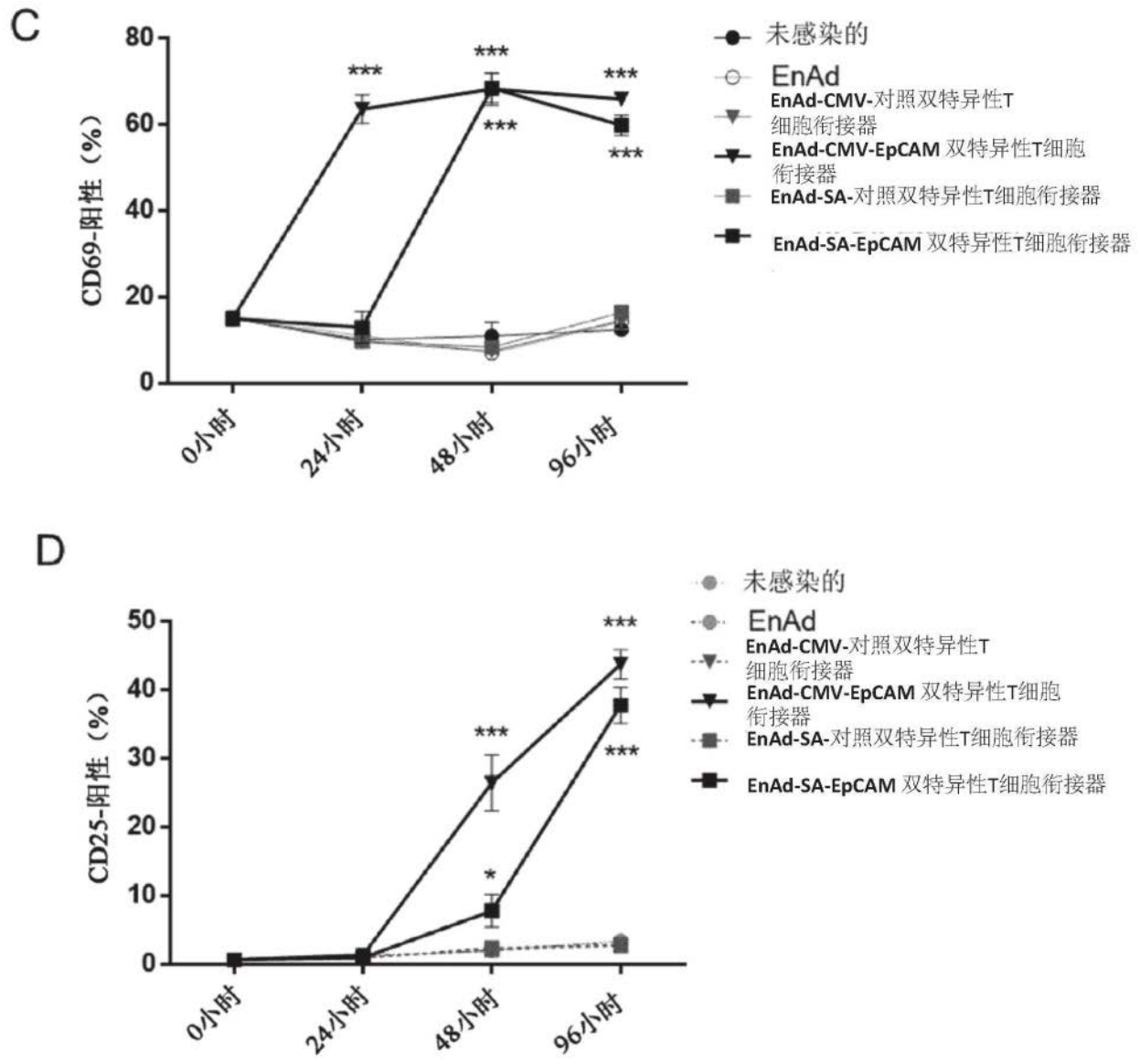

C
CD69-阳性（%）
80
60
40
20
0
***
***
***
***
***
0小时
24小时
48小时
96小时
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性T细胞衔接器
D
CD25-阳性（%）
50
40
30
20
10
0
***
***
*
0小时
24小时
48小时
96小时
未感染的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性T细胞衔接器

图53(续)

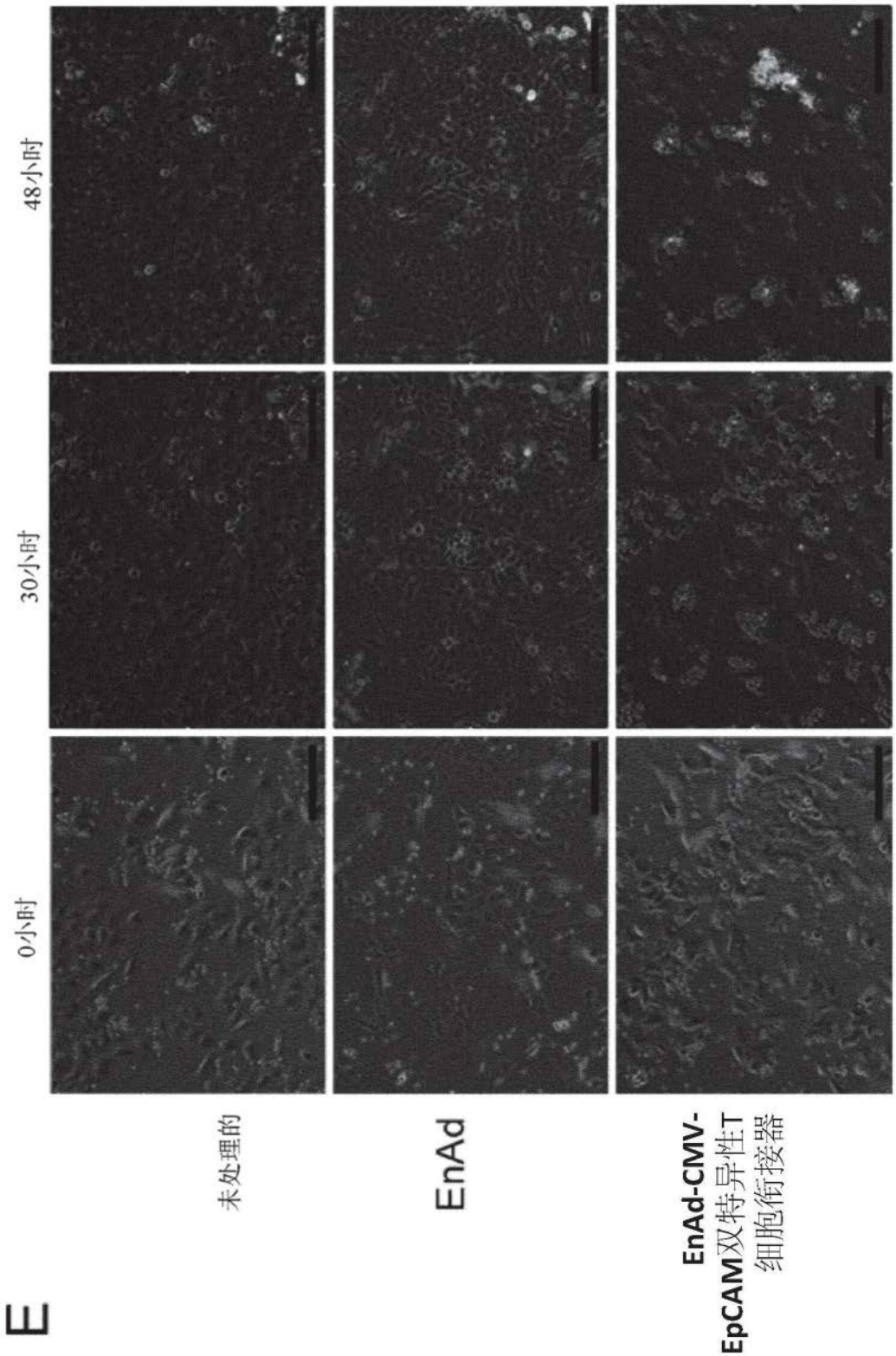


图53(续)

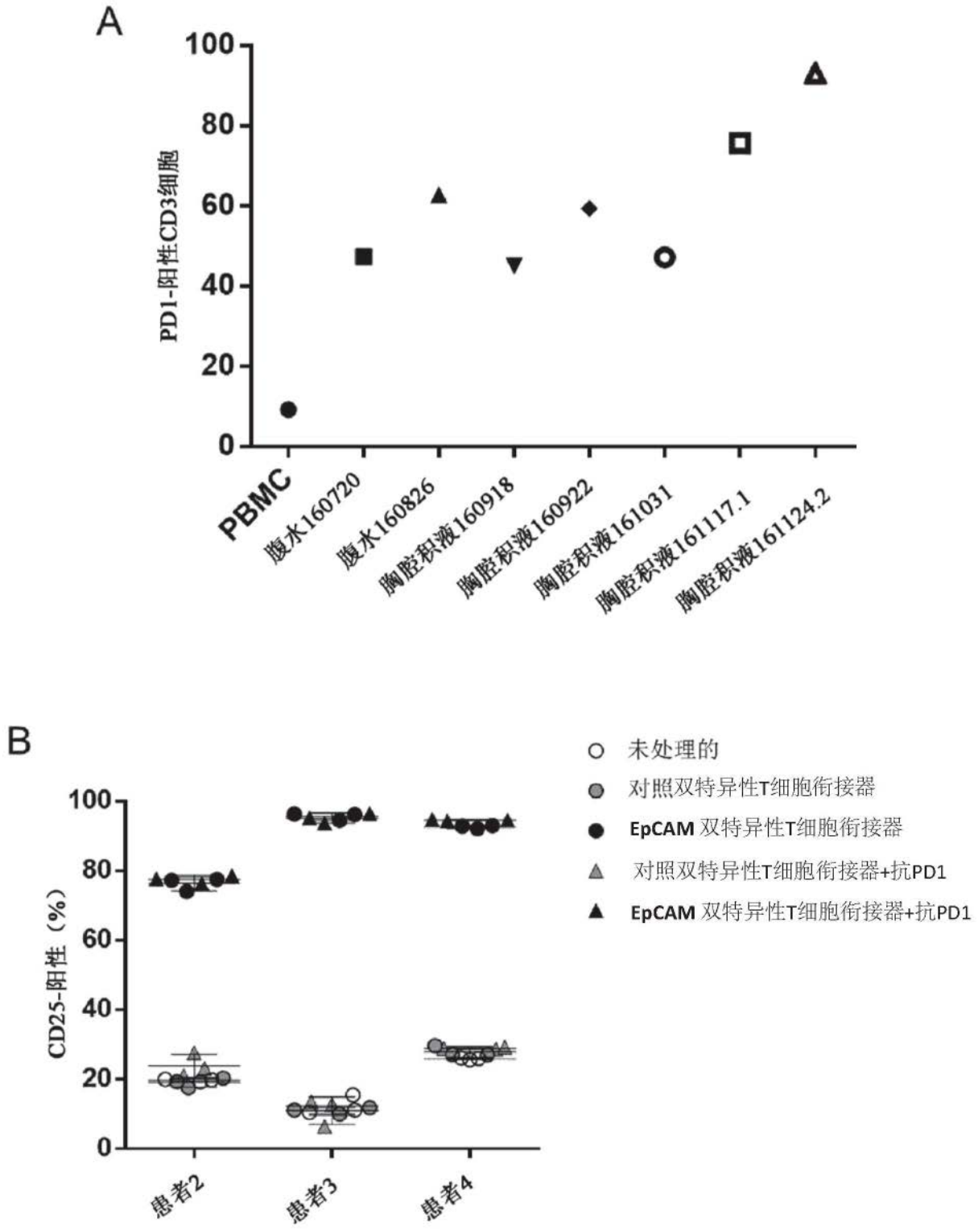
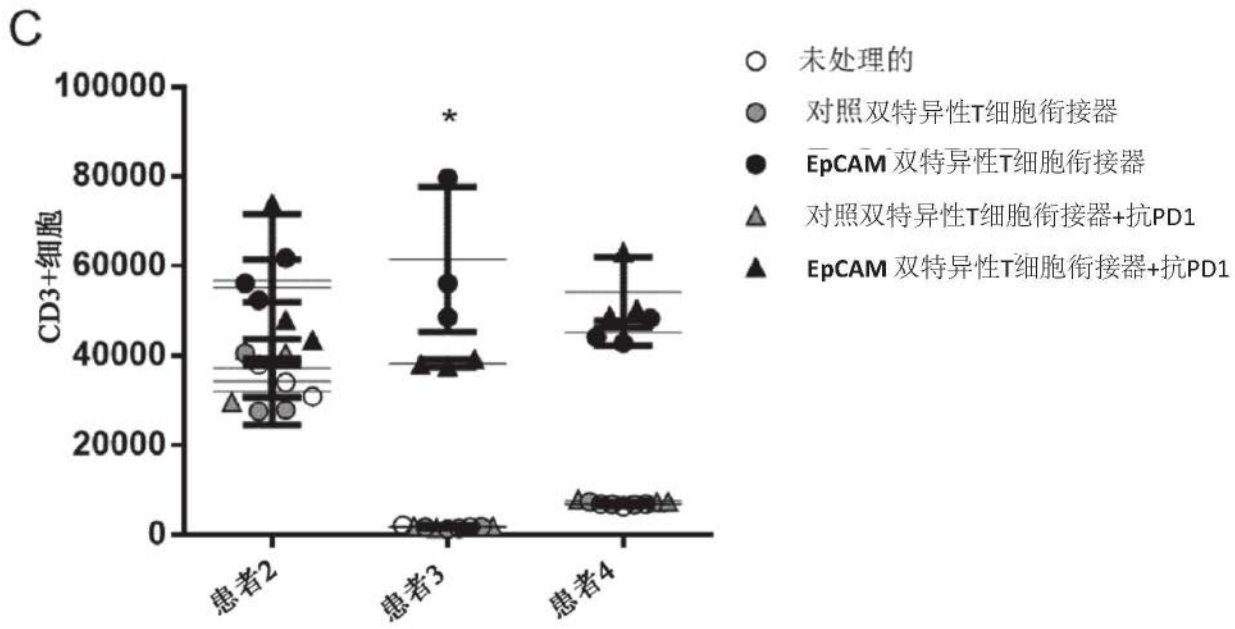

A
PD1-阳性CD3细胞
100
80
60
40
20
0
PBMC
腹水160720
腹水160826
胸腔积液160918
胸腔积液160922
胸腔积液161031
胸腔积液161117.1
胸腔积液161124.2
B
CD25-阳性（%）
100
80
60
40
20
0
患者2
患者3
患者4
未处理的
对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM 双特异性T细胞衔接器
对照双特异性T细胞衔接器+抗PD1
EpCAM 双特异性T细胞衔接器+抗PD1

图54


C
100000
80000
60000
40000
20000
0
CD3+细胞
*
患者2
患者3
患者4
未处理的
对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM 双特异性T细胞衔接器
对照双特异性T细胞衔接器+抗PD1
EpCAM 双特异性T细胞衔接器+抗PD1

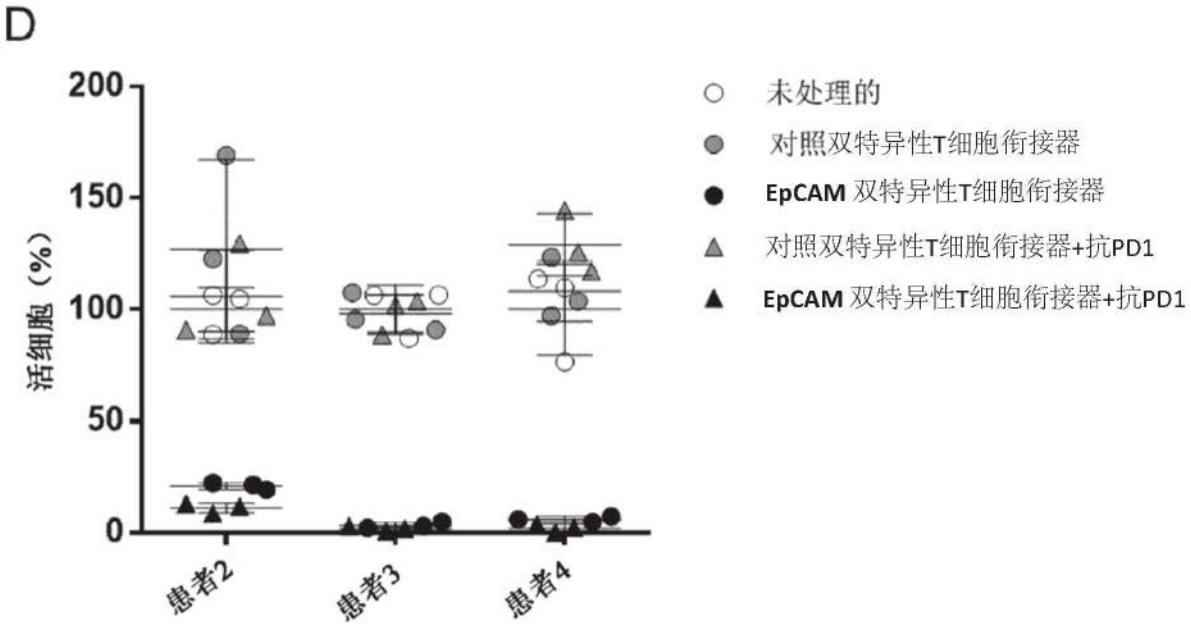

D
200
150
100
50
0
活细胞（%）
患者2
患者3
患者4
未处理的
对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM 双特异性T细胞衔接器
对照双特异性T细胞衔接器+抗PD1
EpCAM 双特异性T细胞衔接器+抗PD1

图54(续)

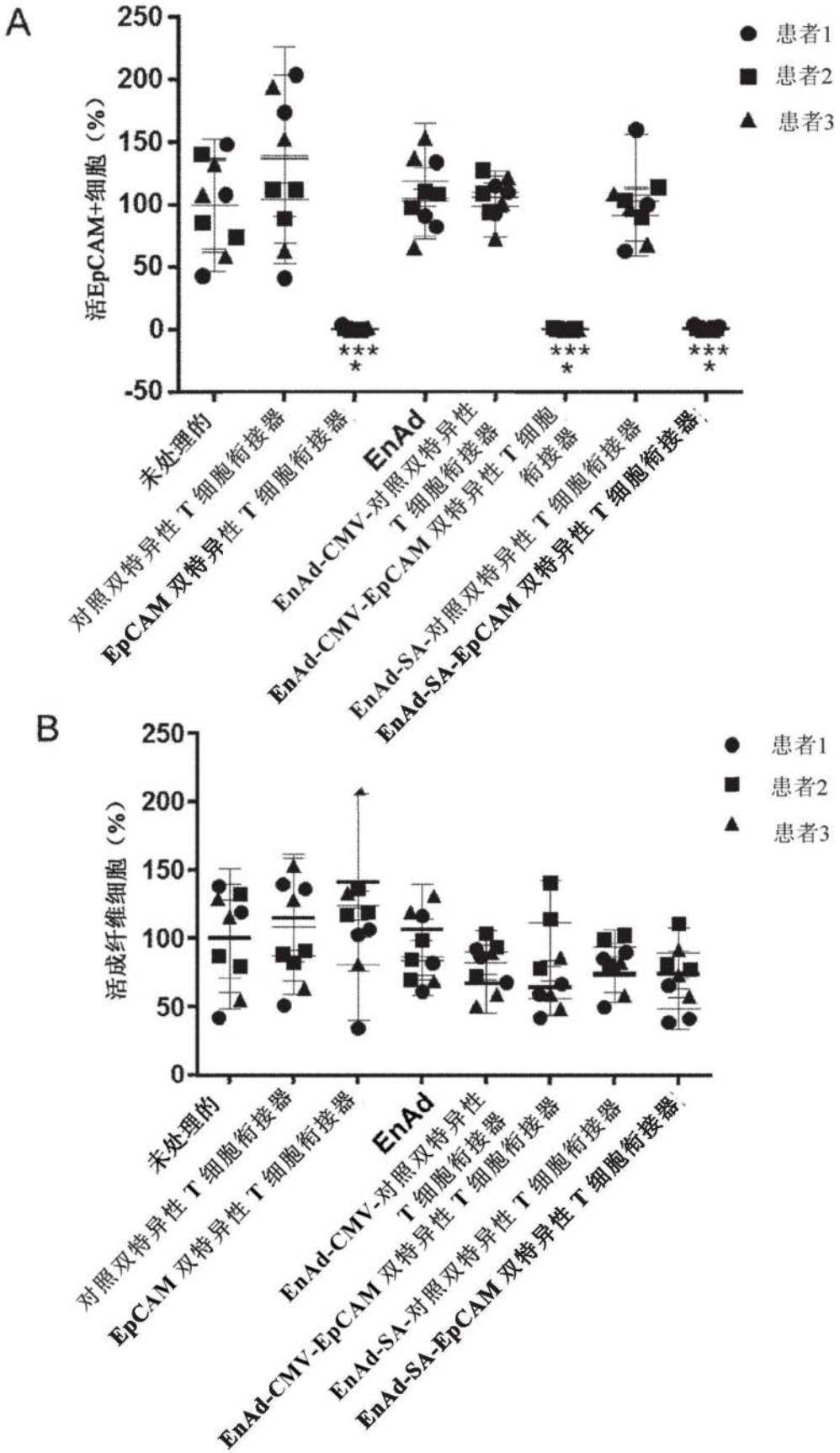

A
活EpCAM+细胞（%）
250
200
150
100
50
0
-50
患者1
患者2
患者3
***
*
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
B
活成纤维细胞（%）
250
200
150
100
50
0
患者1
患者2
患者3
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器

图55

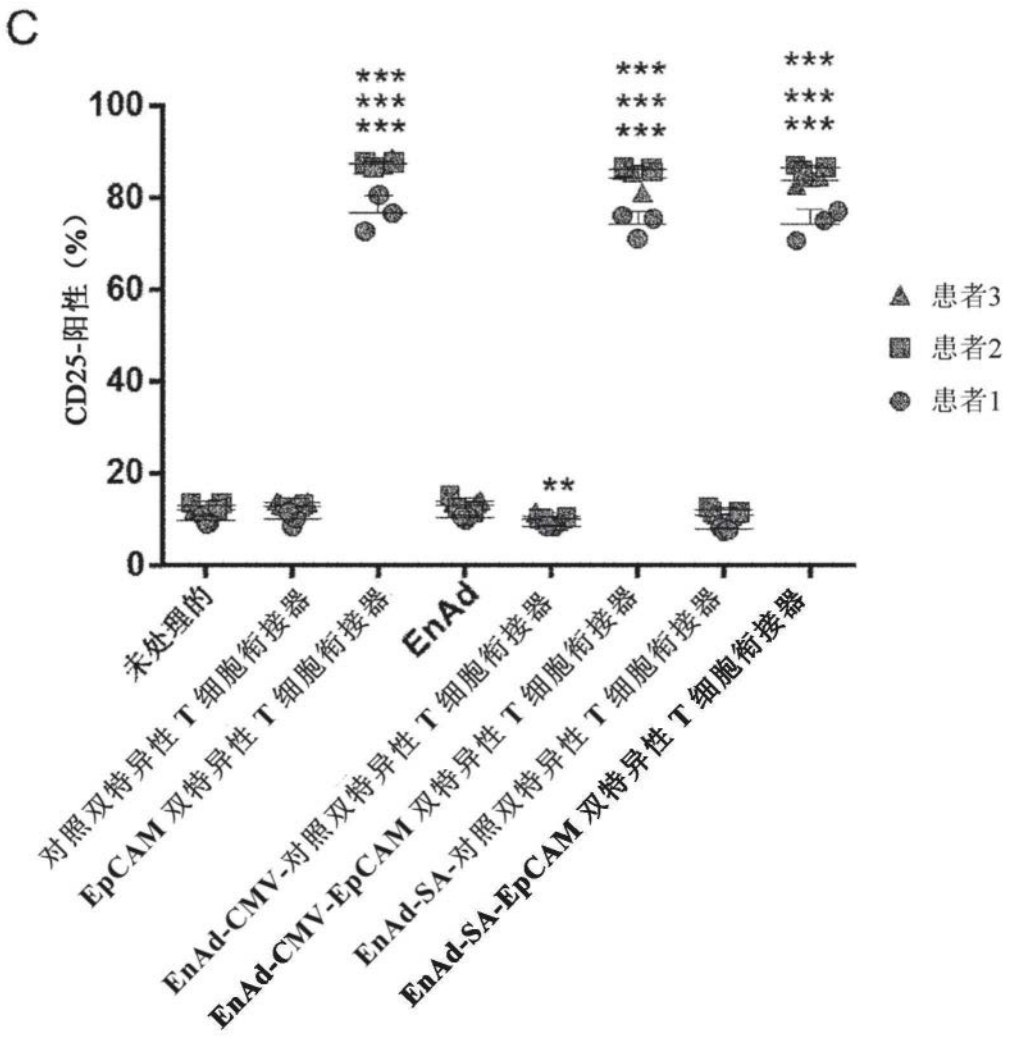

C
CD25-阳性（%）
100
80
60
40
20
0
***
***
***
**
患者3
患者2
患者1
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器

图55(续)

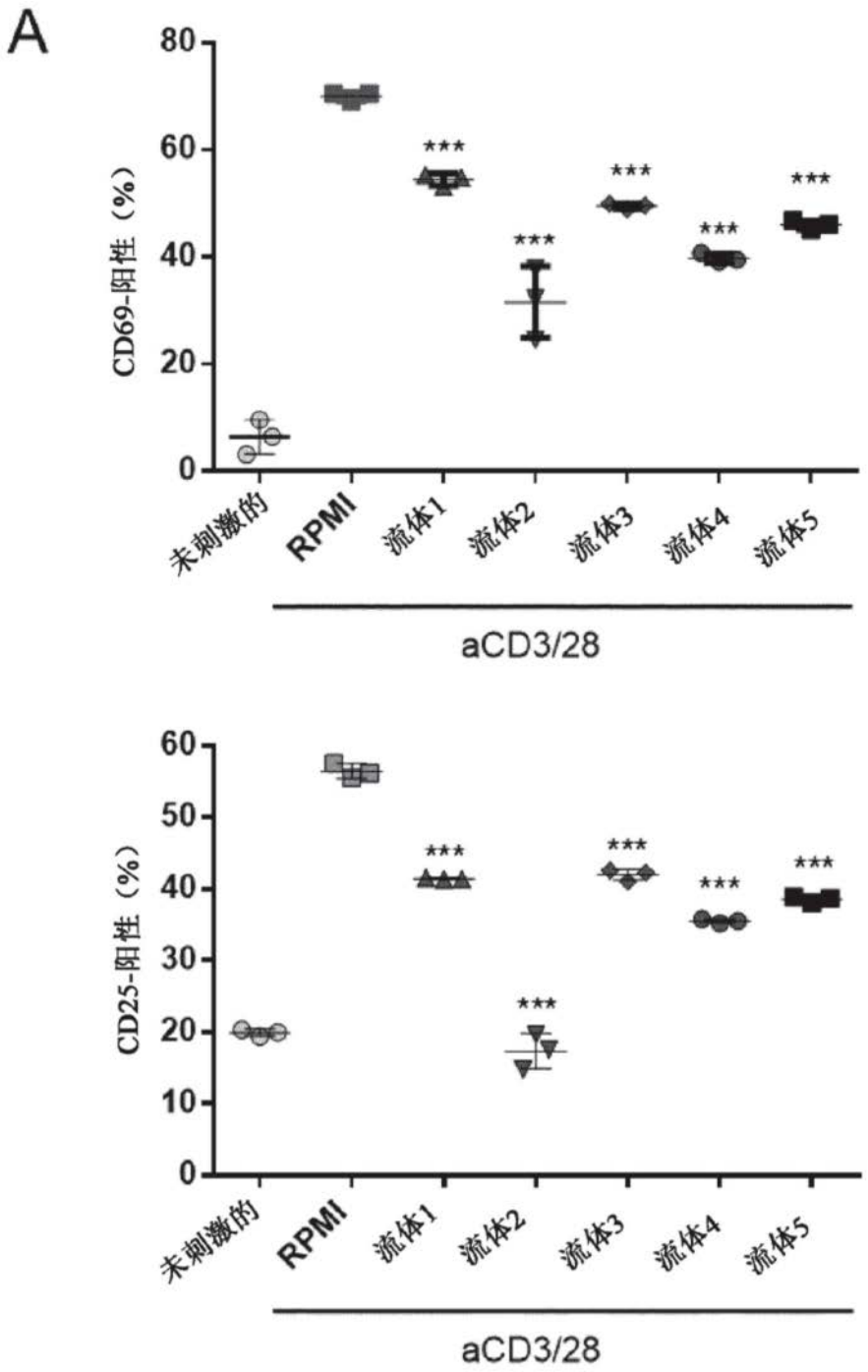

A
CD69-阳性（%）
80
60
40
20
0
***
未刺激的
RPMI
流体1
流体2
流体3
流体4
流体5
aCD3/28
CD25-阳性（%）
60
50
40
30
20
10
0
***
未刺激的
RPMI
流体1
流体2
流体3
流体4
流体5
aCD3/28

图56

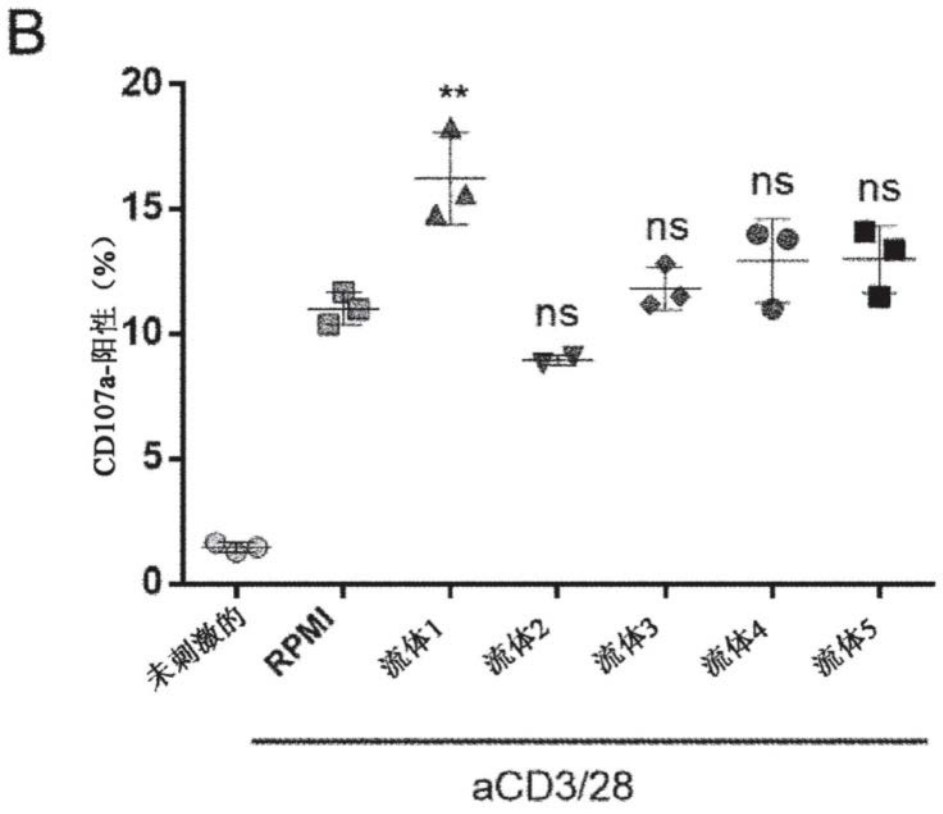

B
20
15
10
5
0
CD107a-阳性（%）
**
ns
ns
ns
未刺激的
RPMI
流体1
流体2
流体3
流体4
流体5
aCD3/28

图56(续)

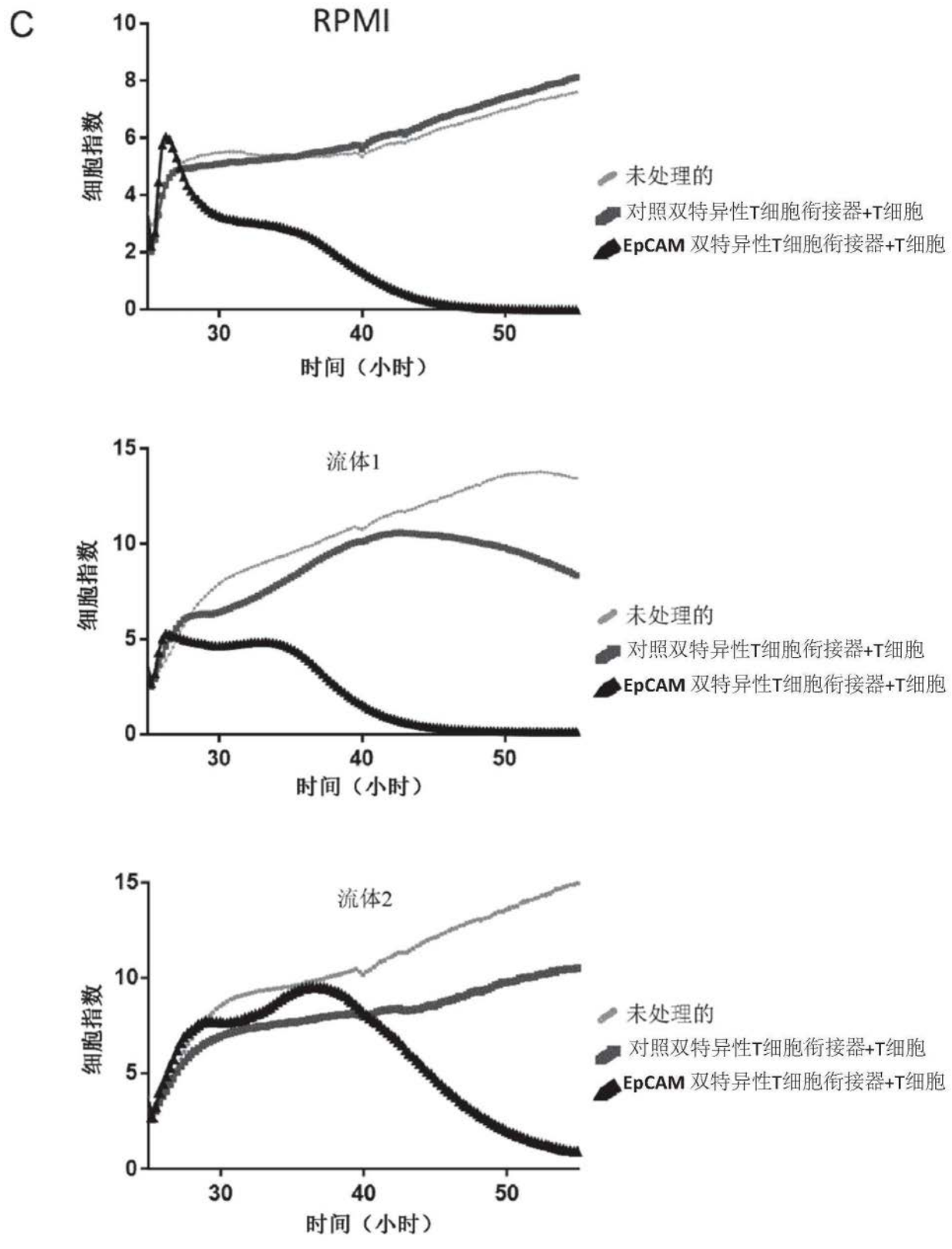

C
RPMI
细胞指数
时间（小时）
未处理的
对照双特异性T细胞衔接器+T细胞
EpCAM 双特异性T细胞衔接器+T细胞
流体1
流体2

图56(续)

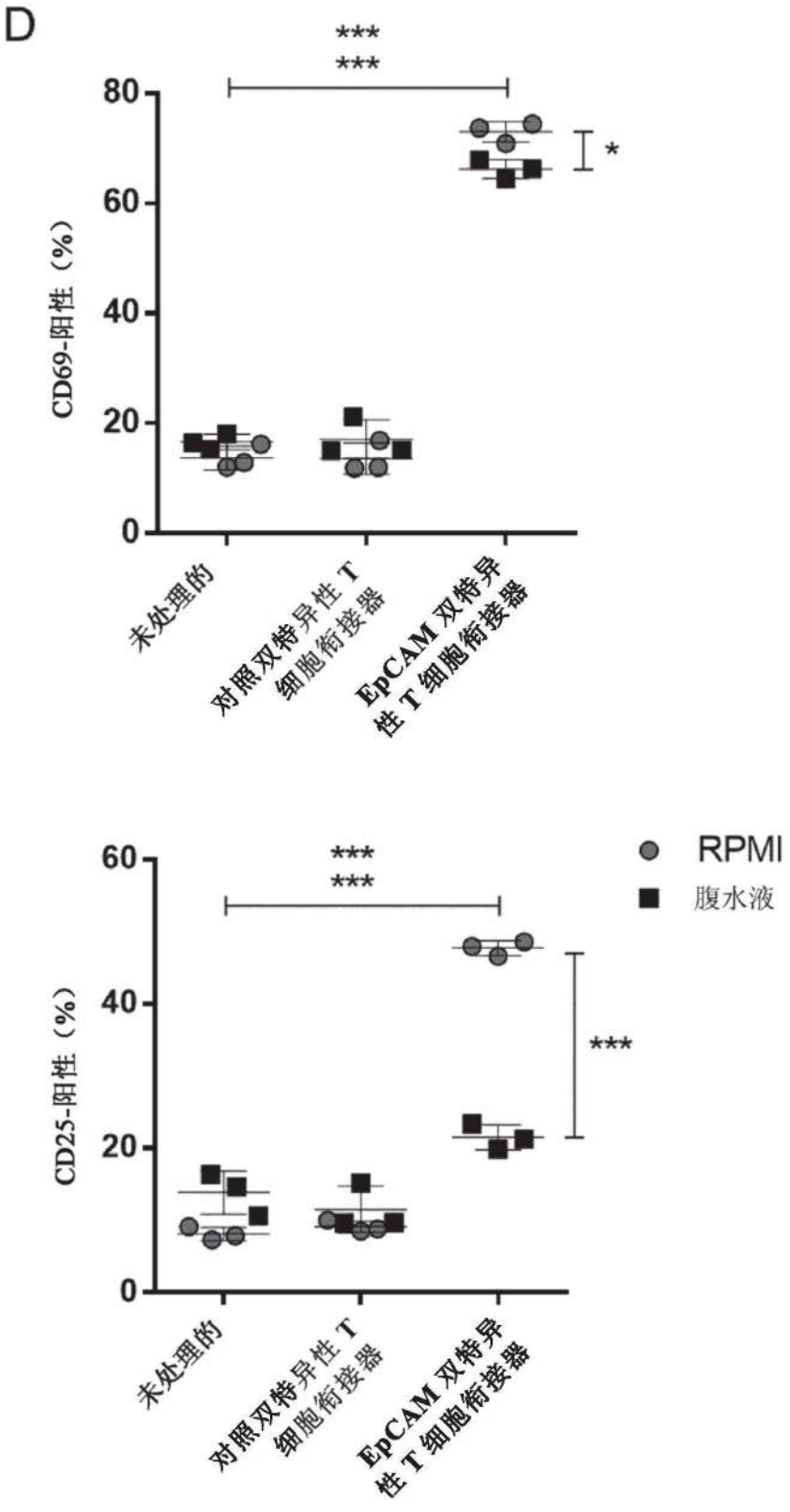

D
***
***
80
60
40
20
0
CD69-阳性（%）
*
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
***
***
60
40
20
0
CD25-阳性（%）
***
RPMI
腹水液
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器

图56(续)

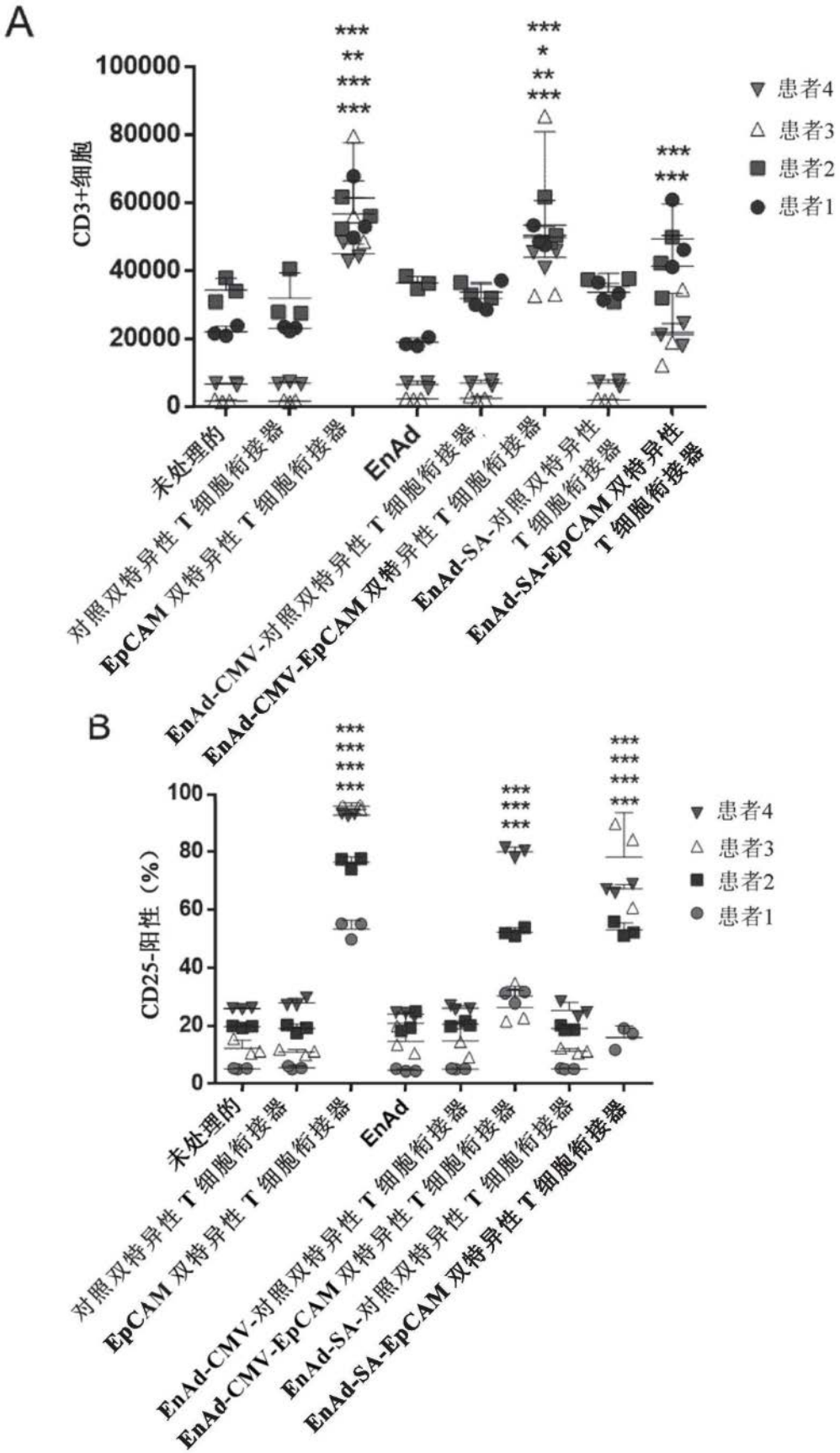

A
CD3+细胞
100000
80000
60000
40000
20000
0
患者4
患者3
患者2
患者1
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
B
CD25-阳性（%）
100
80
60
40
20
0
患者4
患者3
患者2
患者1
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器

图57

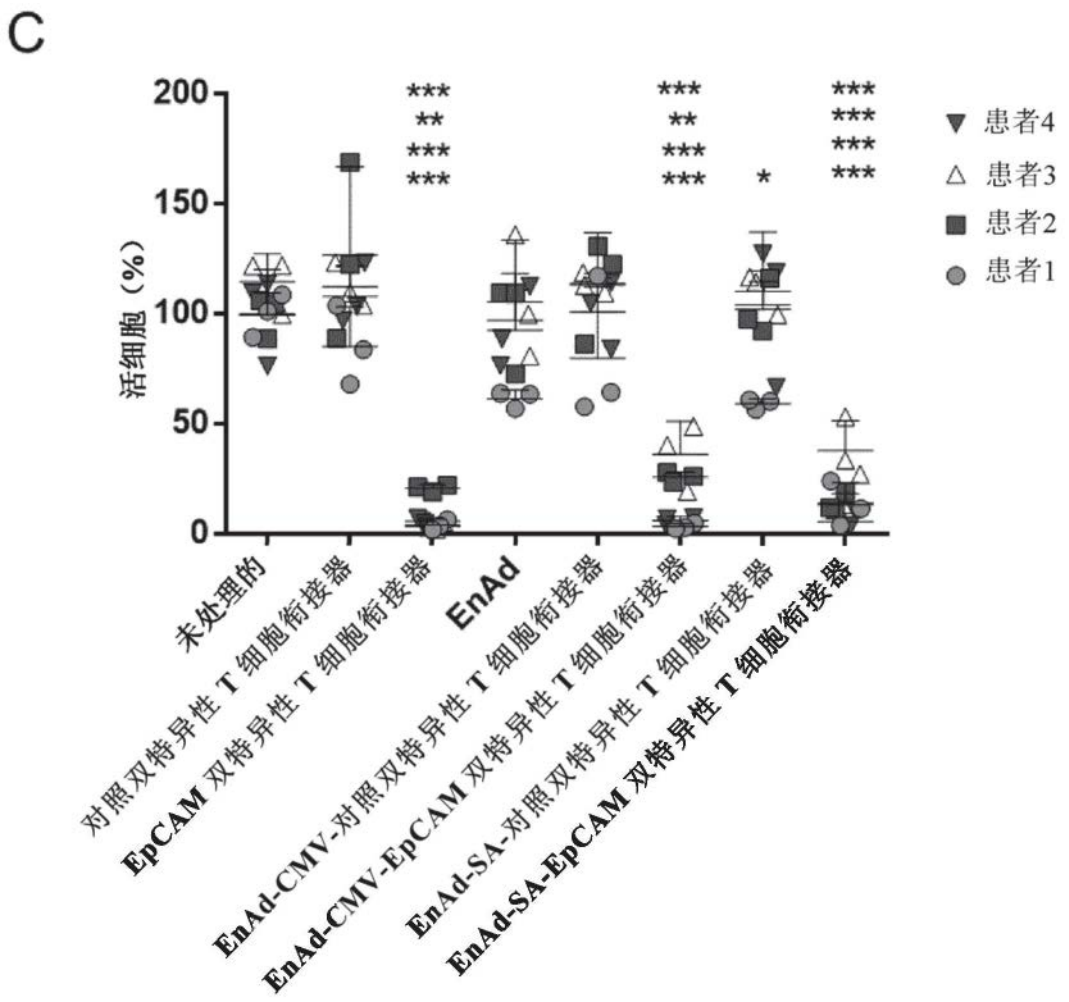

C
200
150
100
50
0
活细胞（%）
***
**
***
***
***
**
***
***
*
***
***
***
患者4
患者3
患者2
患者1
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器

图57(续)

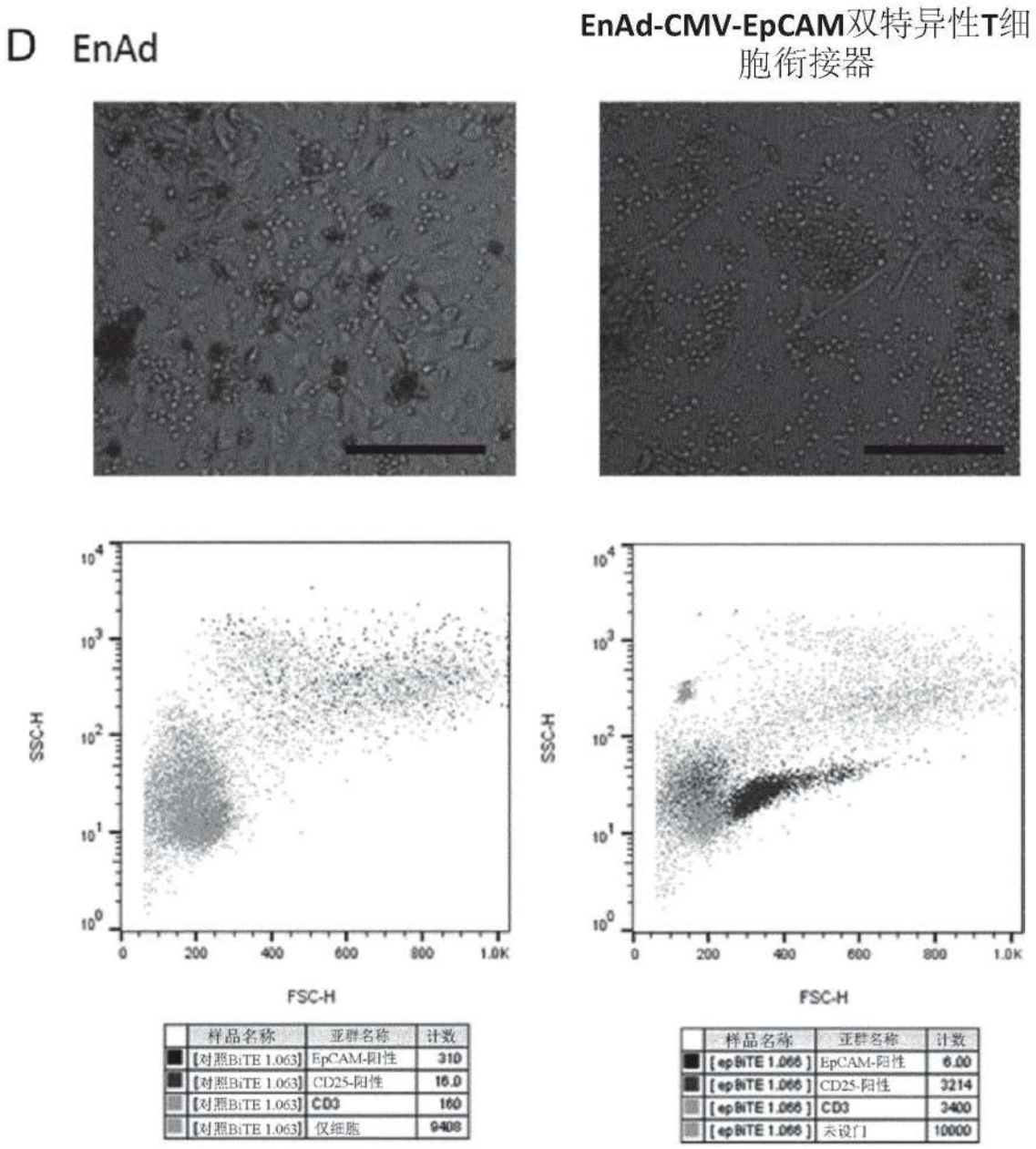

D EnAd
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
SSC-H
FSC-H
样品名称 亚群名称 计数
【对照BiTE 1.063】 EpCAM-阳性 310
【对照BiTE 1.063】 CD25-阳性 16.0
【对照BiTE 1.063】 CD3 160
【对照BiTE 1.063】 仅细胞 9408
样品名称 亚群名称 计数
【epBiTE 1.066】 EpCAM-阳性 6.00
【epBiTE 1.066】 CD25-阳性 3214
【epBiTE 1.066】 CD3 3400
【epBiTE 1.066】 无设门 10000

图57(续)

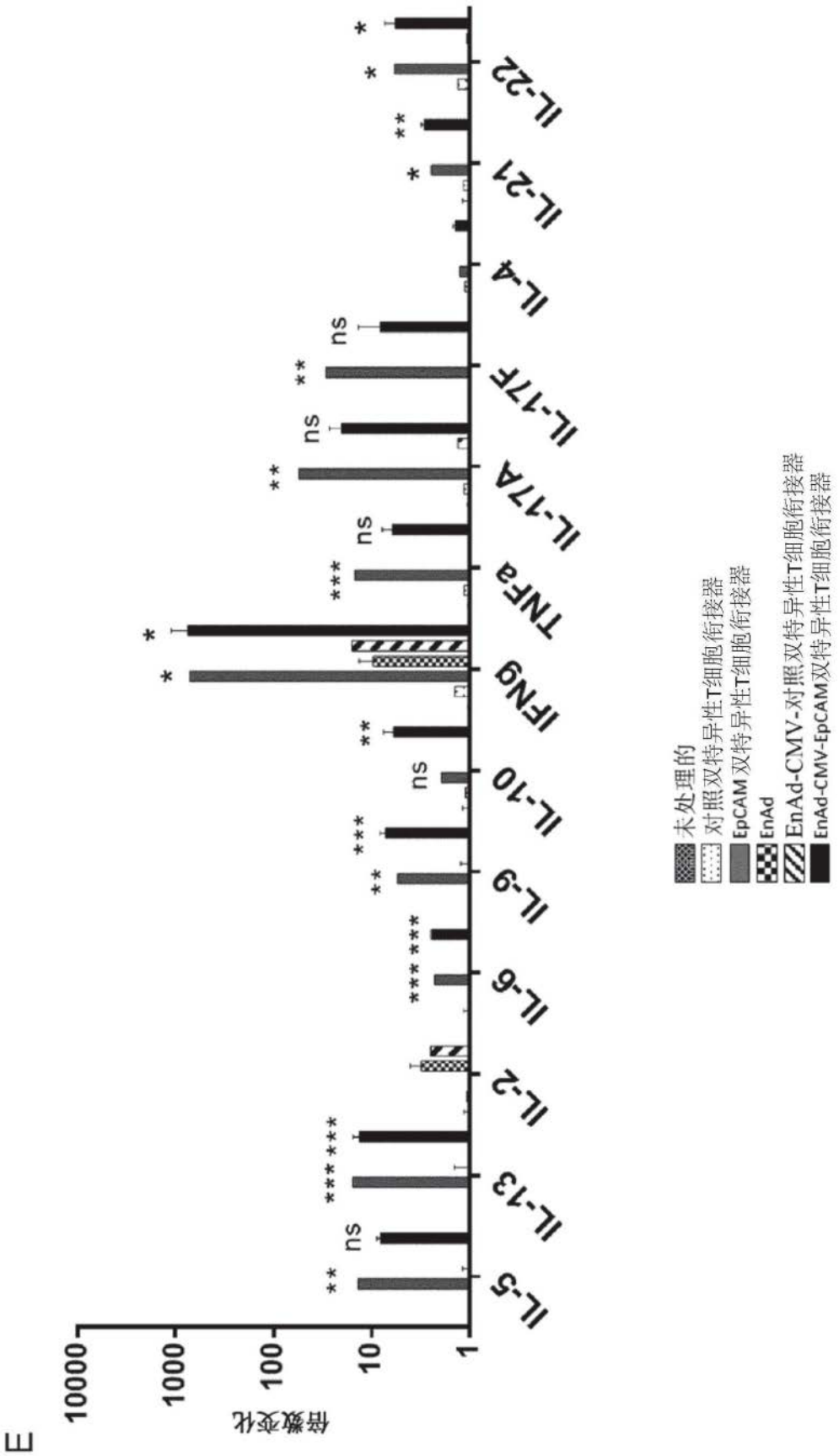

E
倍数变化
10000
1000
100
10
1
IL-5
IL-13
IL-2
IL-6
IL-9
IL-10
IFNg
TNFa
IL-17A
IL-17F
IL-4
IL-21
IL-22
未处理的
对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器

图57(续)

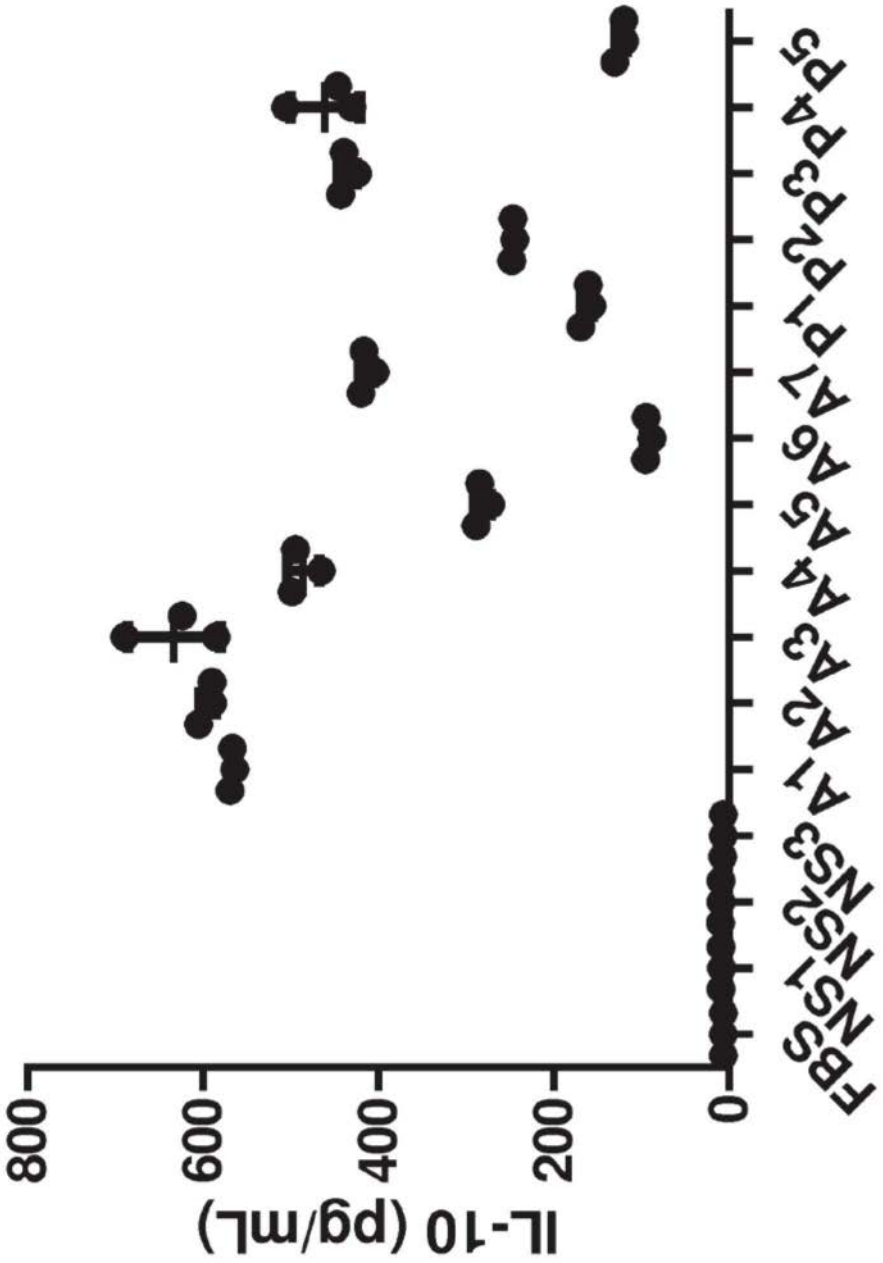

IL-10 (pg/mL)
800
600
400
200
0
FBS
NS1
NS2
NS3
A1
A2
A3
A4
A5
A6
A7
P1
P2
P3
P4
P5

图58


未处理的
CD3/CD28
CD69+CD25+ (%)
80
60
40
20
0
正常血液
A7
A2
A3
A4
A5
A6
A7
P1
P2
P3
P4
P5
*
***
***
***
***

图59

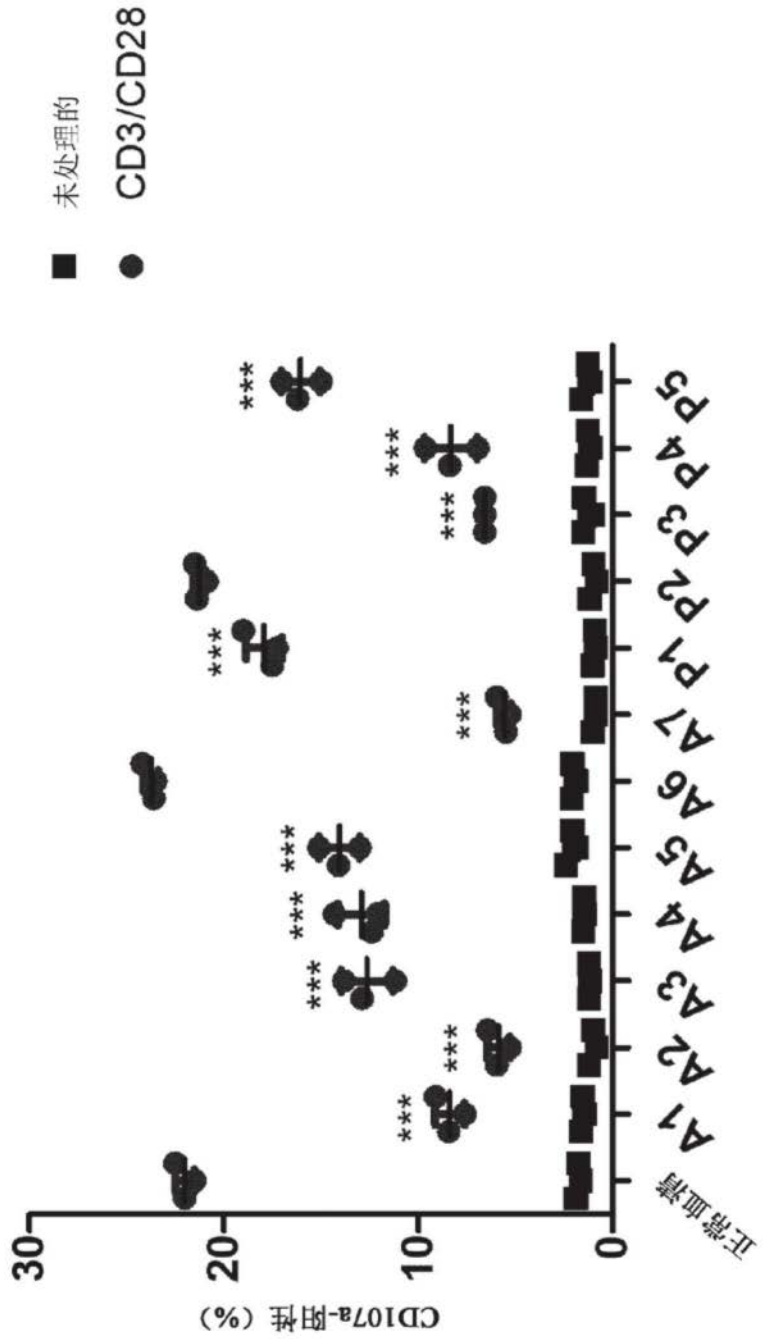

未处理的
CD3/CD28
CD107a-阳性（%）
30
20
10
0
正常血液
A7
A2
A3
A4
A5
A6
A7
P1
P2
P3
P4
P5
***

图60

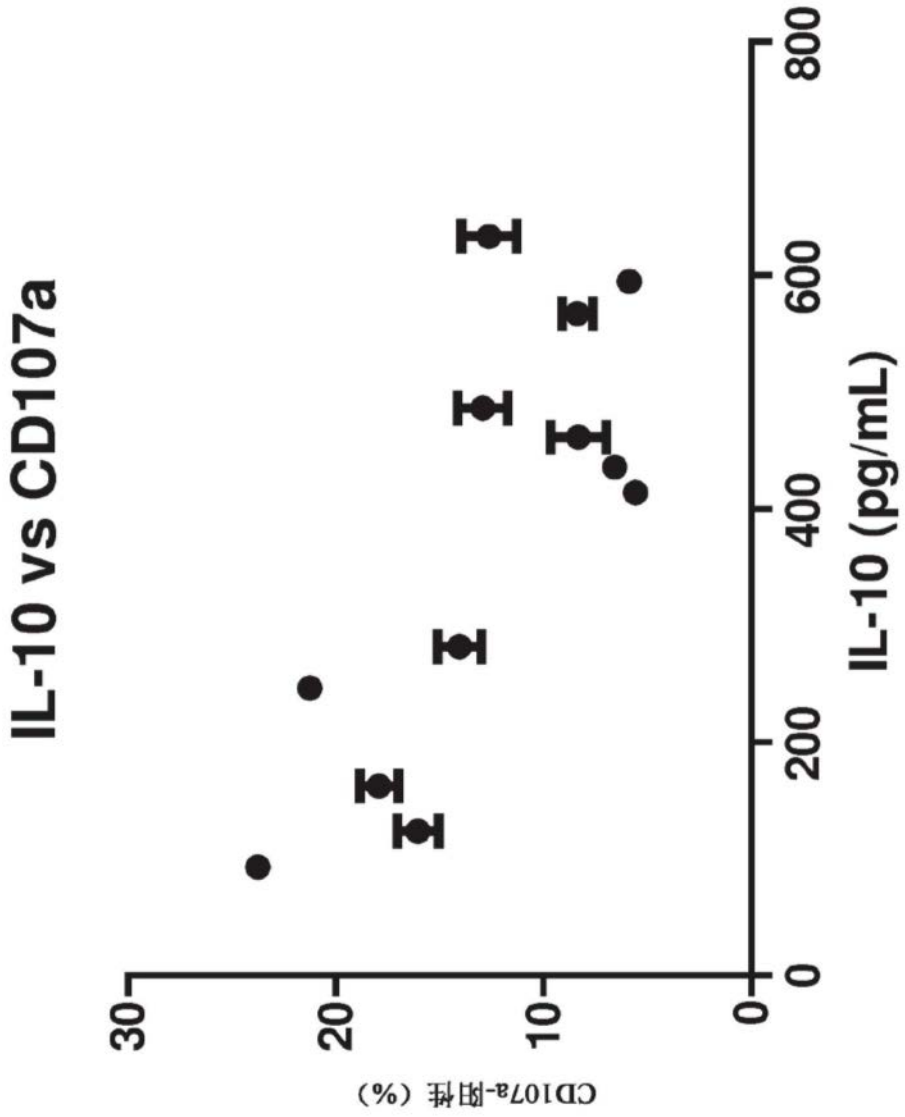


图61

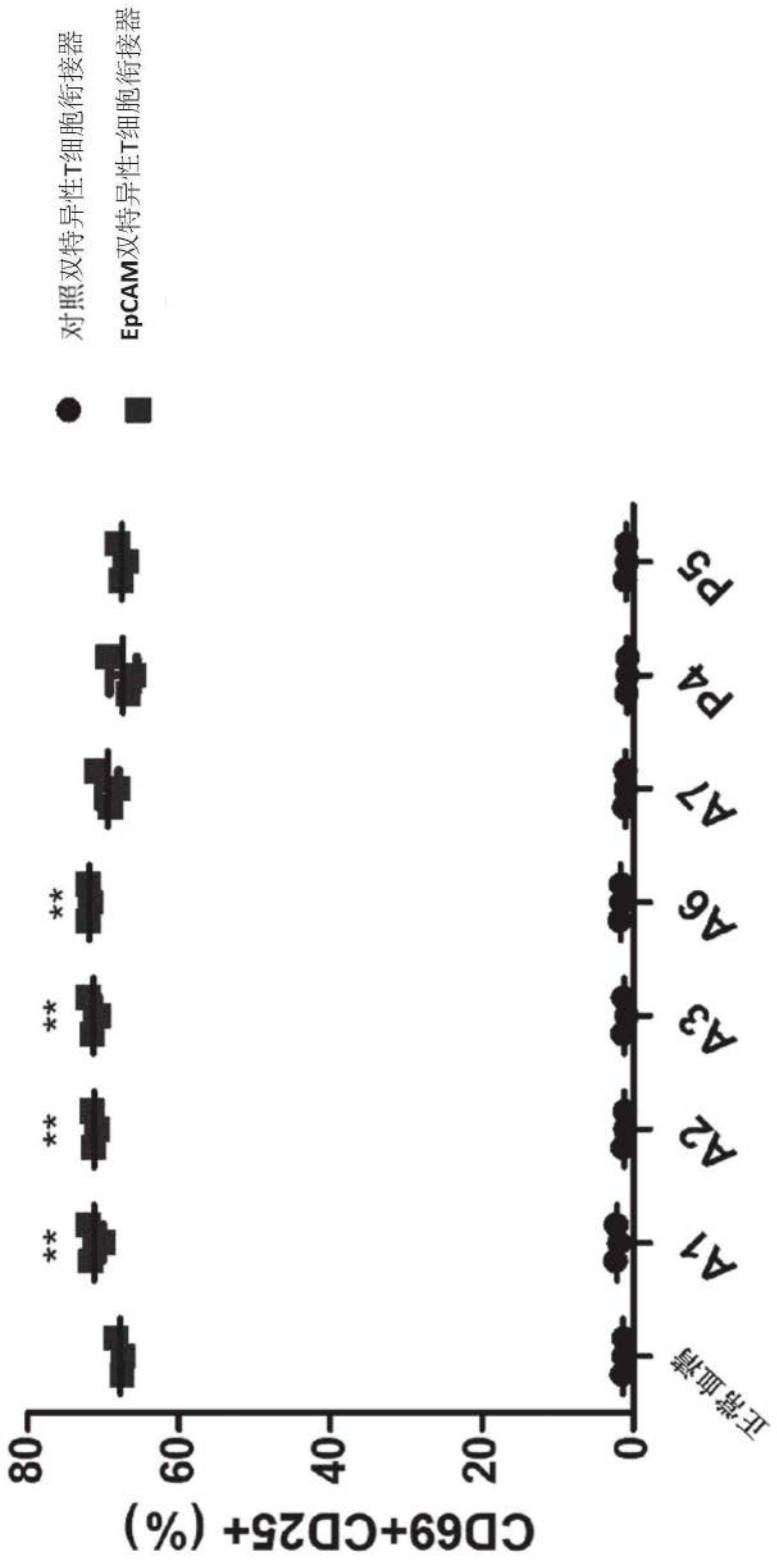

对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM双特异性T细胞衔接器
CD69+CD25+ (%)
80
60
40
20
0
正常血液
A1
A2
A3
A6
A7
P4
P5
**
**
**
**

图62

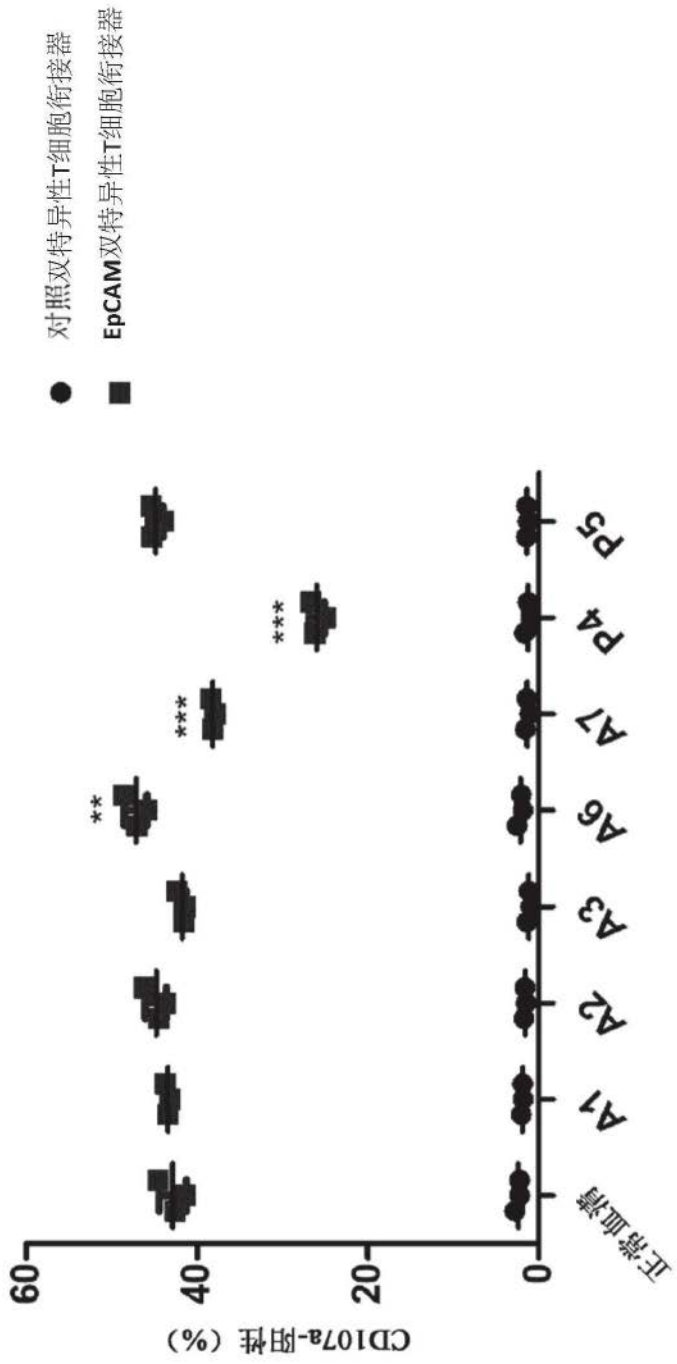

对照双特异性T细胞衔接器
EpCAM双特异性T细胞衔接器
CD107a-阳性（%）
60
40
20
0
正常血清
A7
A2
A3
A6
A7
P4
P5
**
***
***

图63

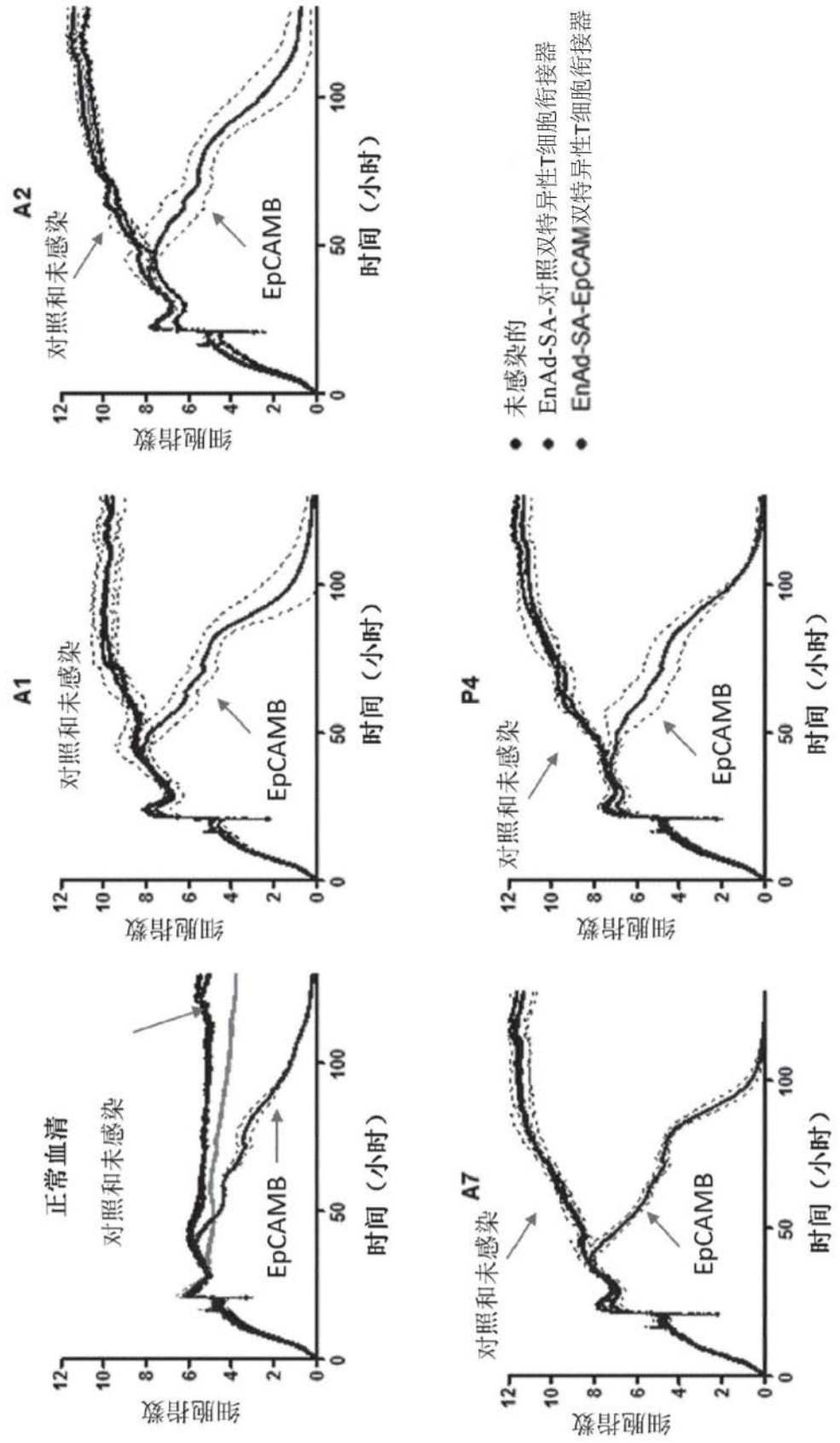

正常血清
对照和未感染
EpCAMB
细胞指数
时间（小时）
A1
对照和未感染
EpCAMB
细胞指数
时间（小时）
A2
对照和未感染
EpCAMB
细胞指数
时间（小时）
A7
对照和未感染
EpCAMB
细胞指数
时间（小时）
P4
对照和未感染
EpCAMB
细胞指数
时间（小时）
未感染的
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器

图64

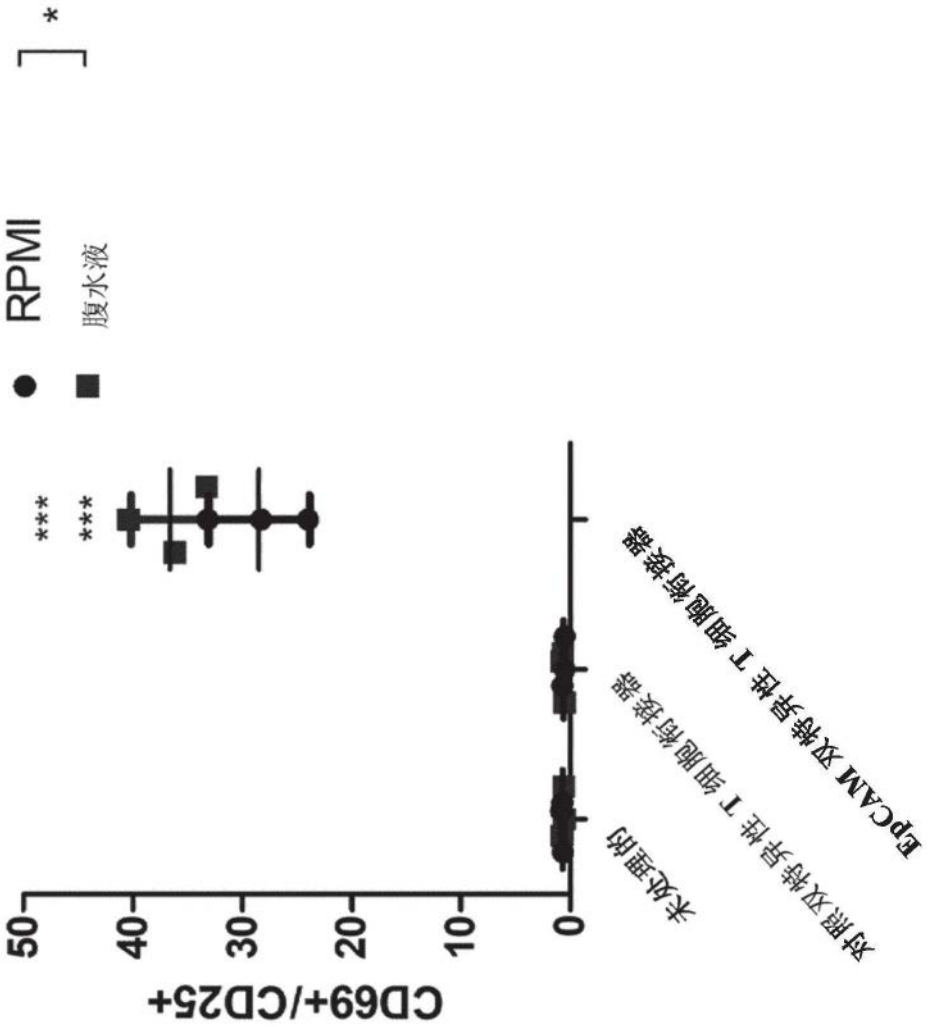

*
RPMI
腹水液
***
***
CD69+/CD25+
50
40
30
20
10
0
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器

图65

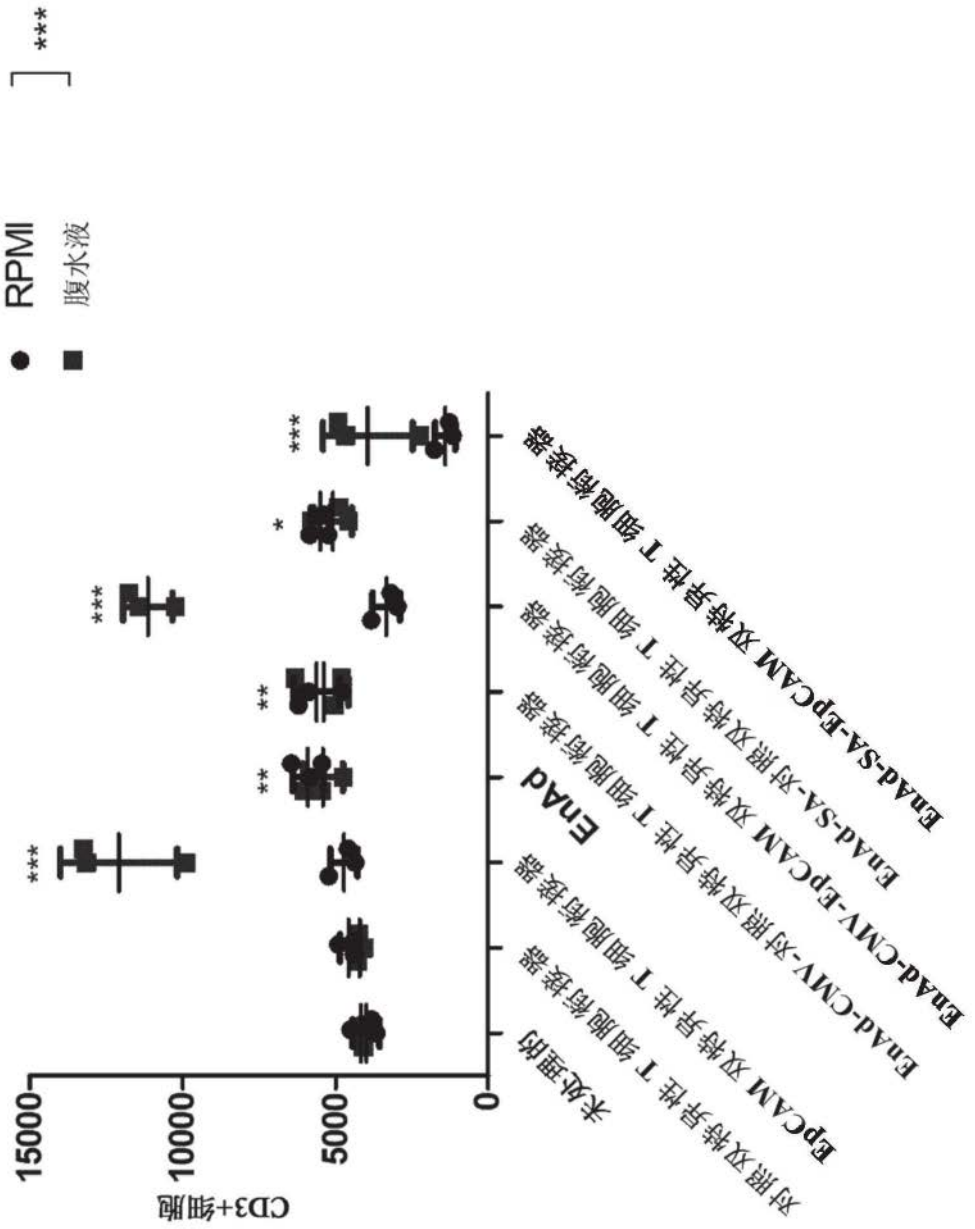

RPMI
腹水液
CD3+细胞
15000
10000
5000
0
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
*
**
**
***
***
***

图66A

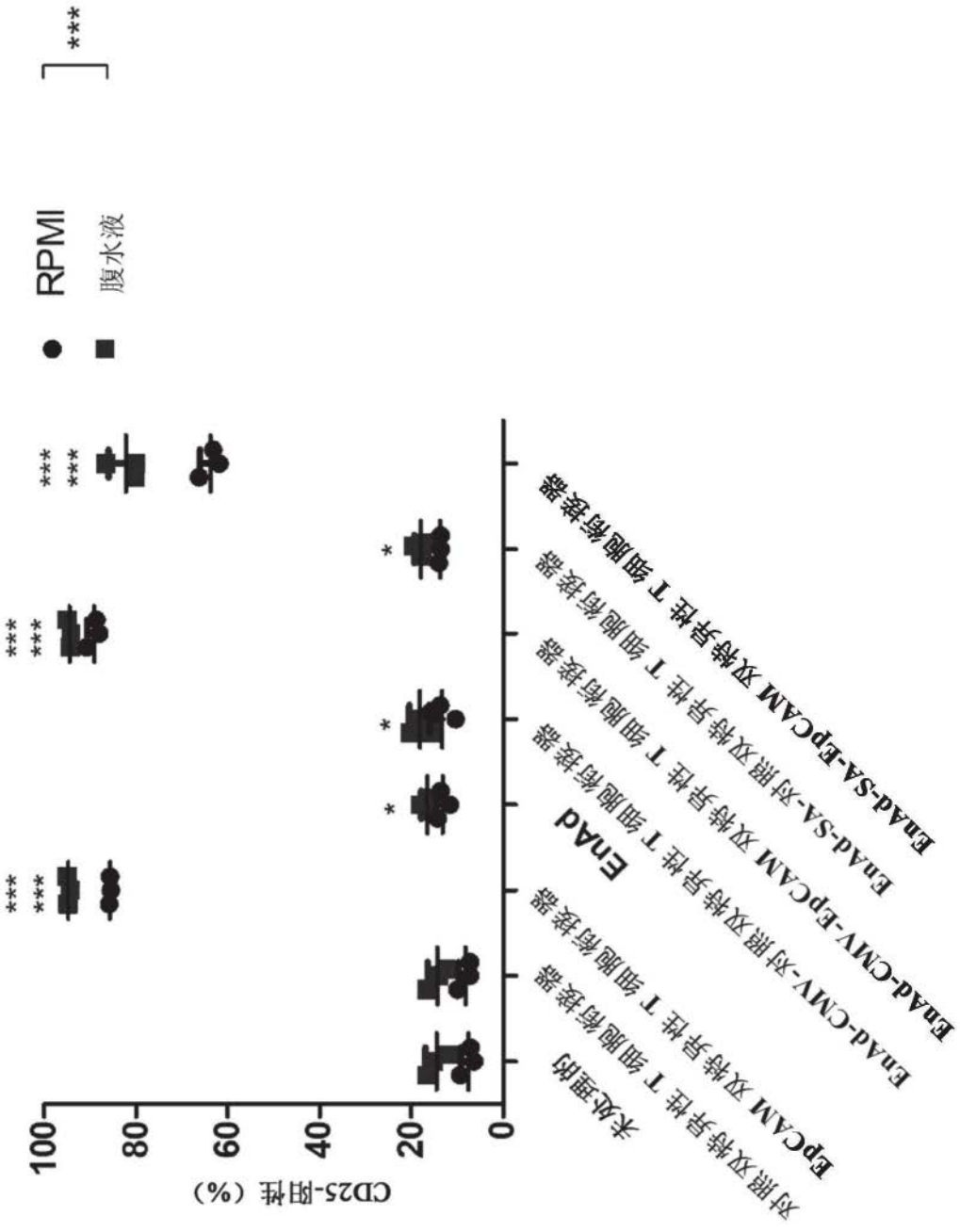

RPMI
腹水液
CD25-阳性（%）
100
80
60
40
20
0
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd

图66B

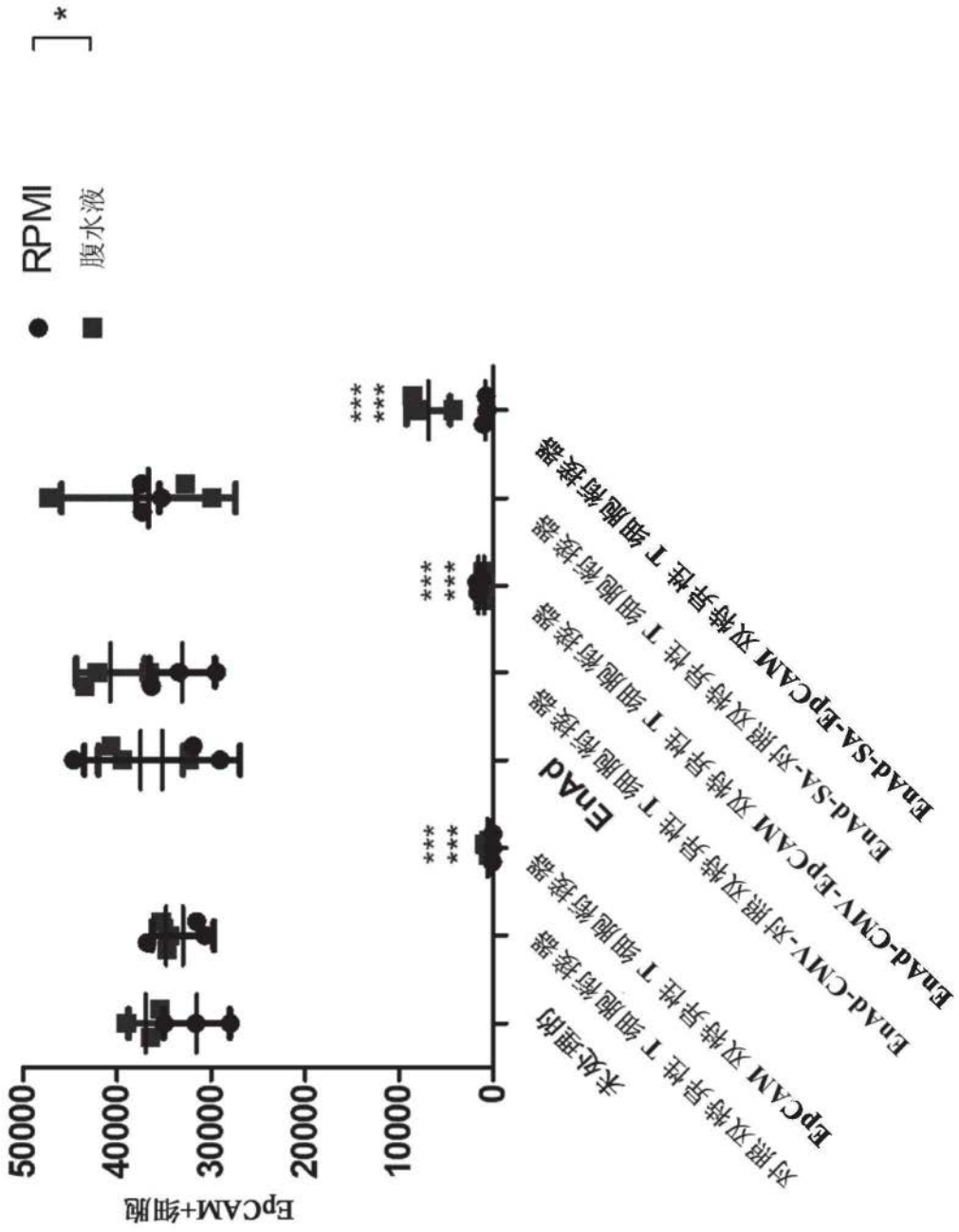

RPMI
腹水液
*
EpCAM+细胞
50000
40000
30000
20000
10000
0
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器

图66C

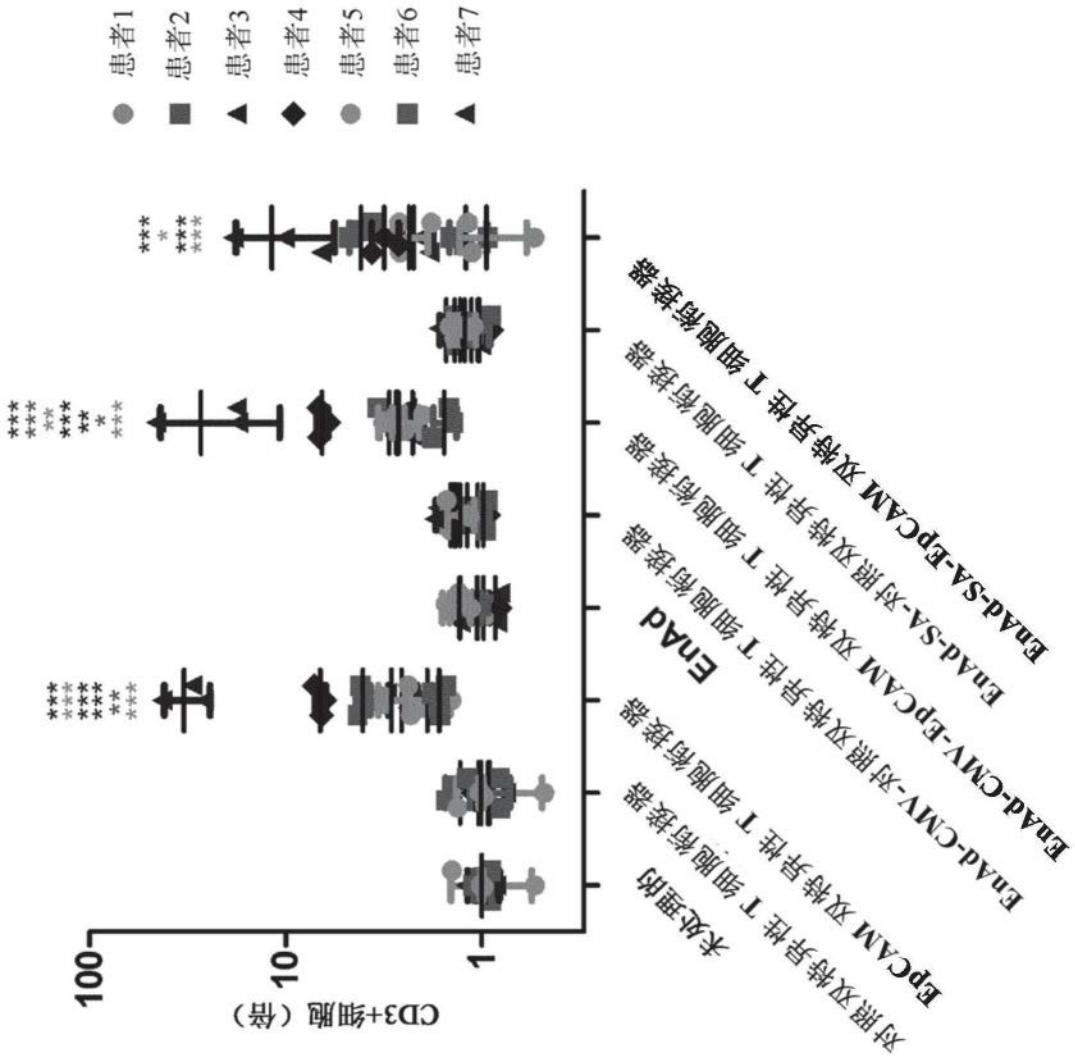

患者1
患者2
患者3
患者4
患者5
患者6
患者7
CD3+细胞（倍）
100
10
1
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器

图67A

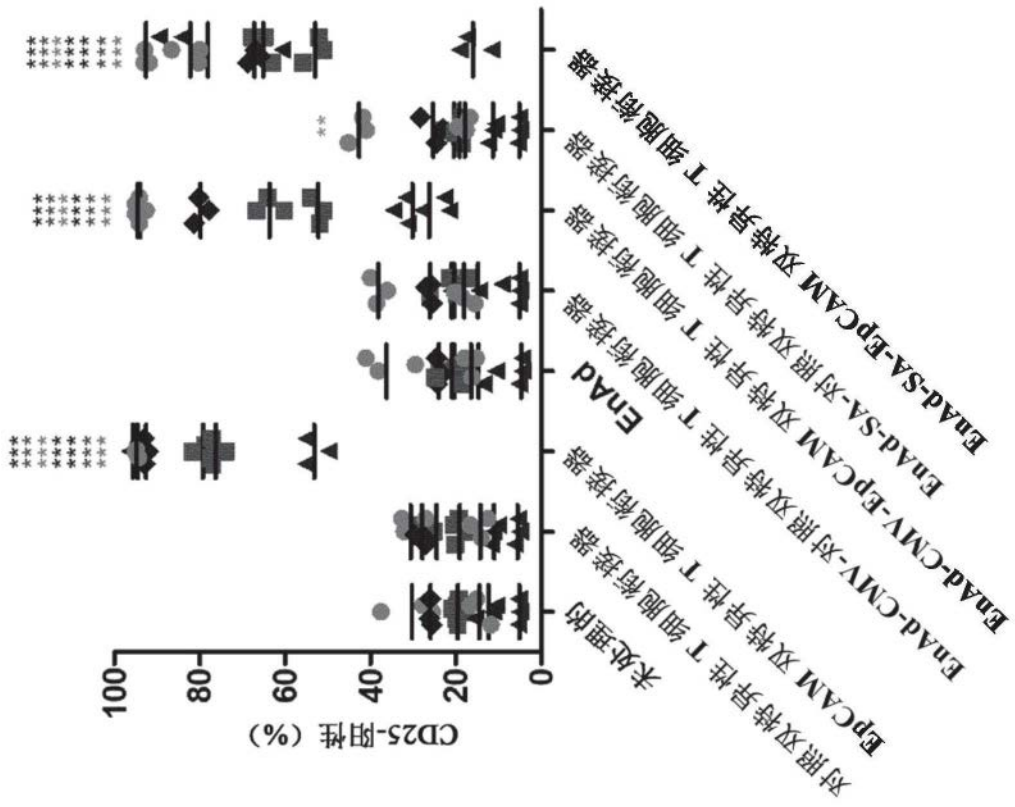

未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
CD25-阳性（%）
0
20
40
60
80
100

图67B

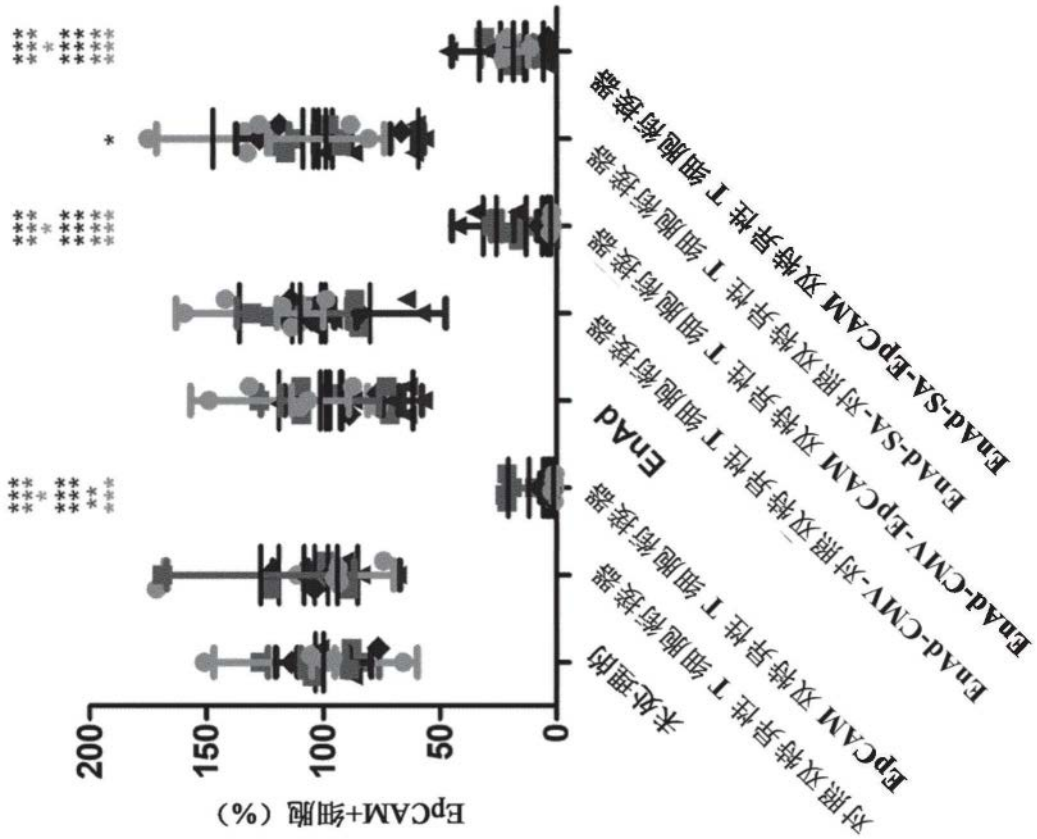

EpCAM+细胞（%）
200
150
100
50
0
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd

图67C

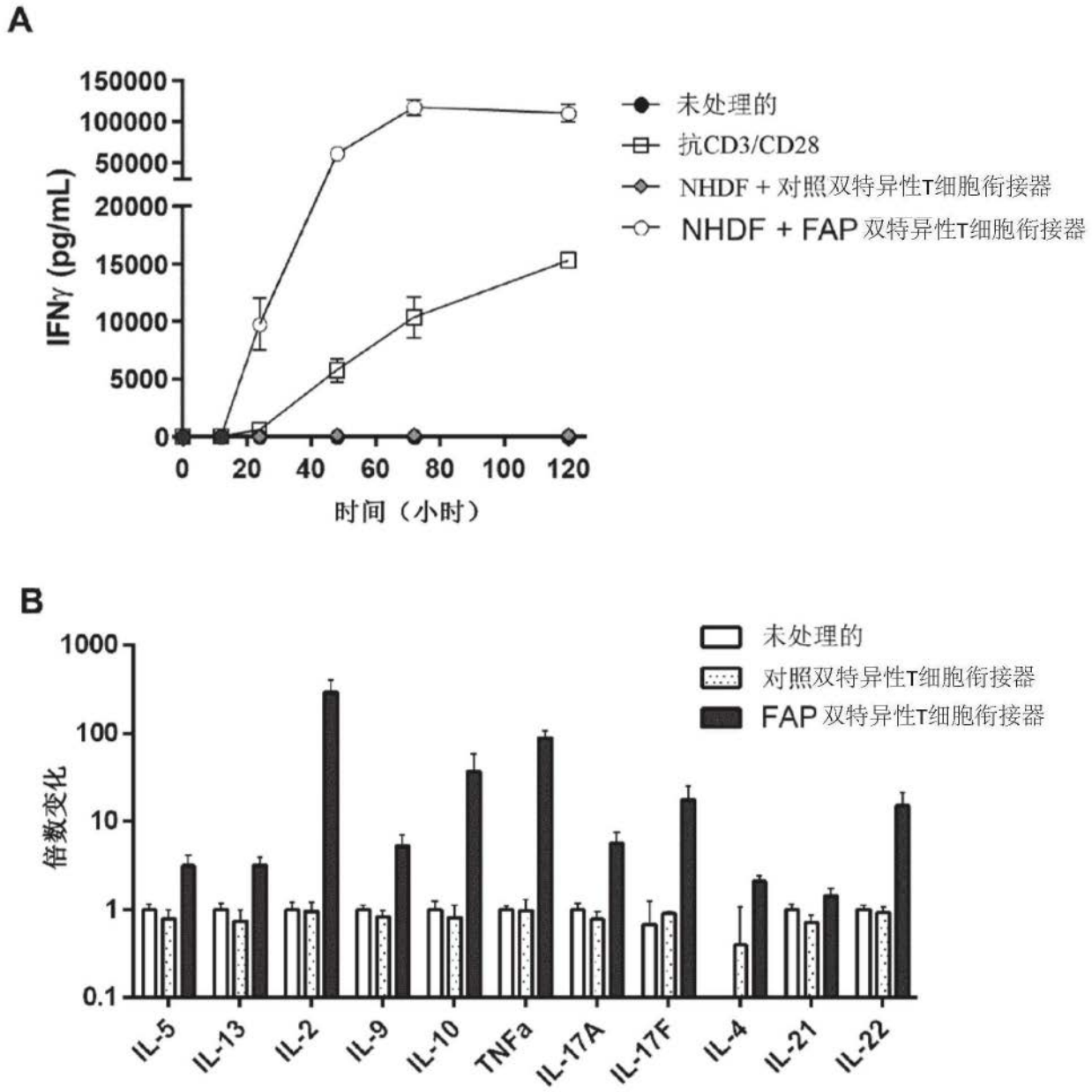
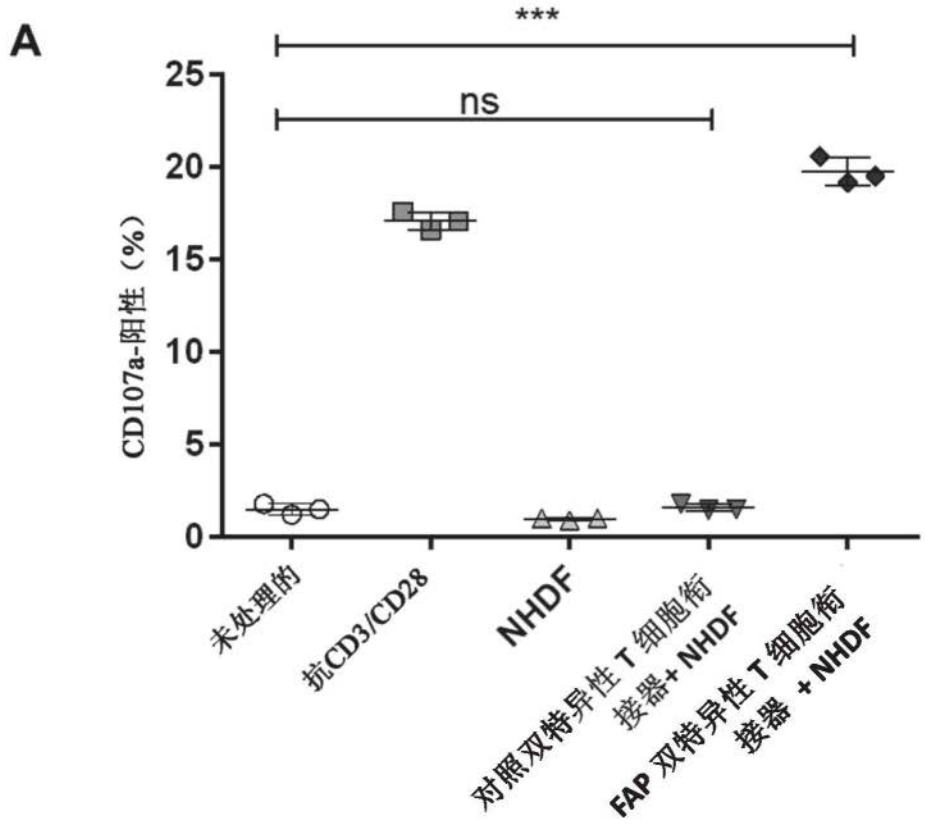
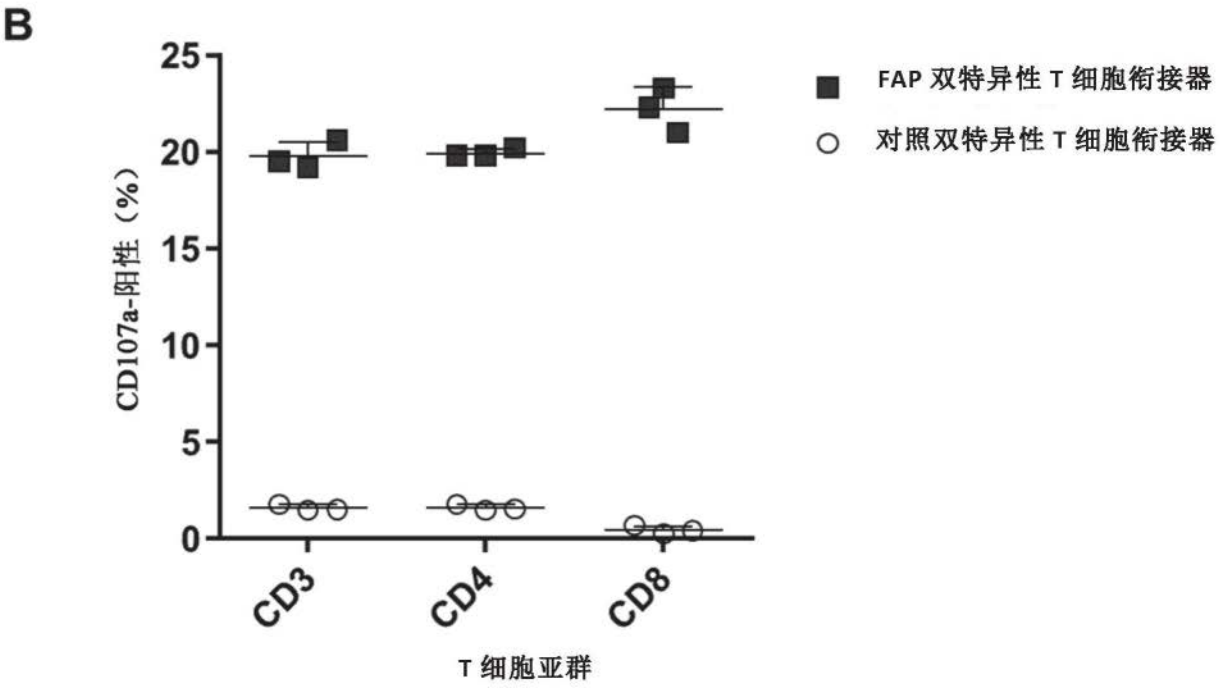

A
150000
100000
50000
20000
15000
10000
5000
0
IFNγ (pg/mL)
0 20 40 60 80 100 120
时间（小时）
未处理的
抗CD3/CD28
NHDF + 对照双特异性T细胞衔接器
NHDF + FAP 双特异性T细胞衔接器
B
1000
100
10
1
0.1
倍数变化
IL-5 IL-13 IL-2 IL-9 IL-10 TNFa IL-17A IL-17F IL-4 IL-21 IL-22
未处理的
对照双特异性T细胞衔接器
FAP 双特异性T细胞衔接器

图68


A
***
ns
25
20
15
10
5
0
CD107a-阳性（%）
未处理的
抗CD3/CD28
NHDF
对照双特异性 T 细胞衔接器+ NHDF
FAP 双特异性 T 细胞衔接器 + NHDF


B
25
20
15
10
5
0
CD107a-阳性（%）
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
对照双特异性 T 细胞衔接器
CD3
CD4
CD8
T 细胞亚群

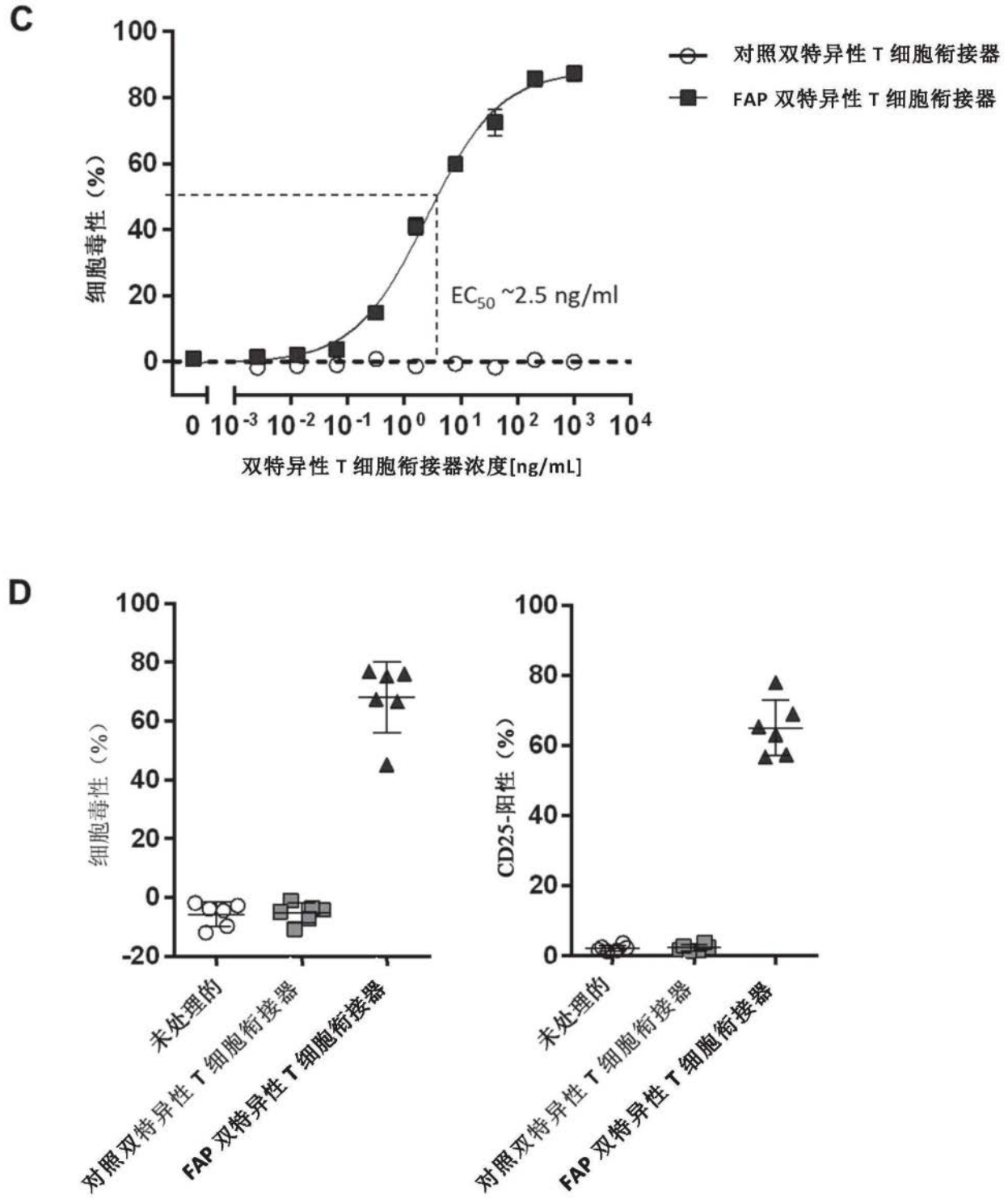
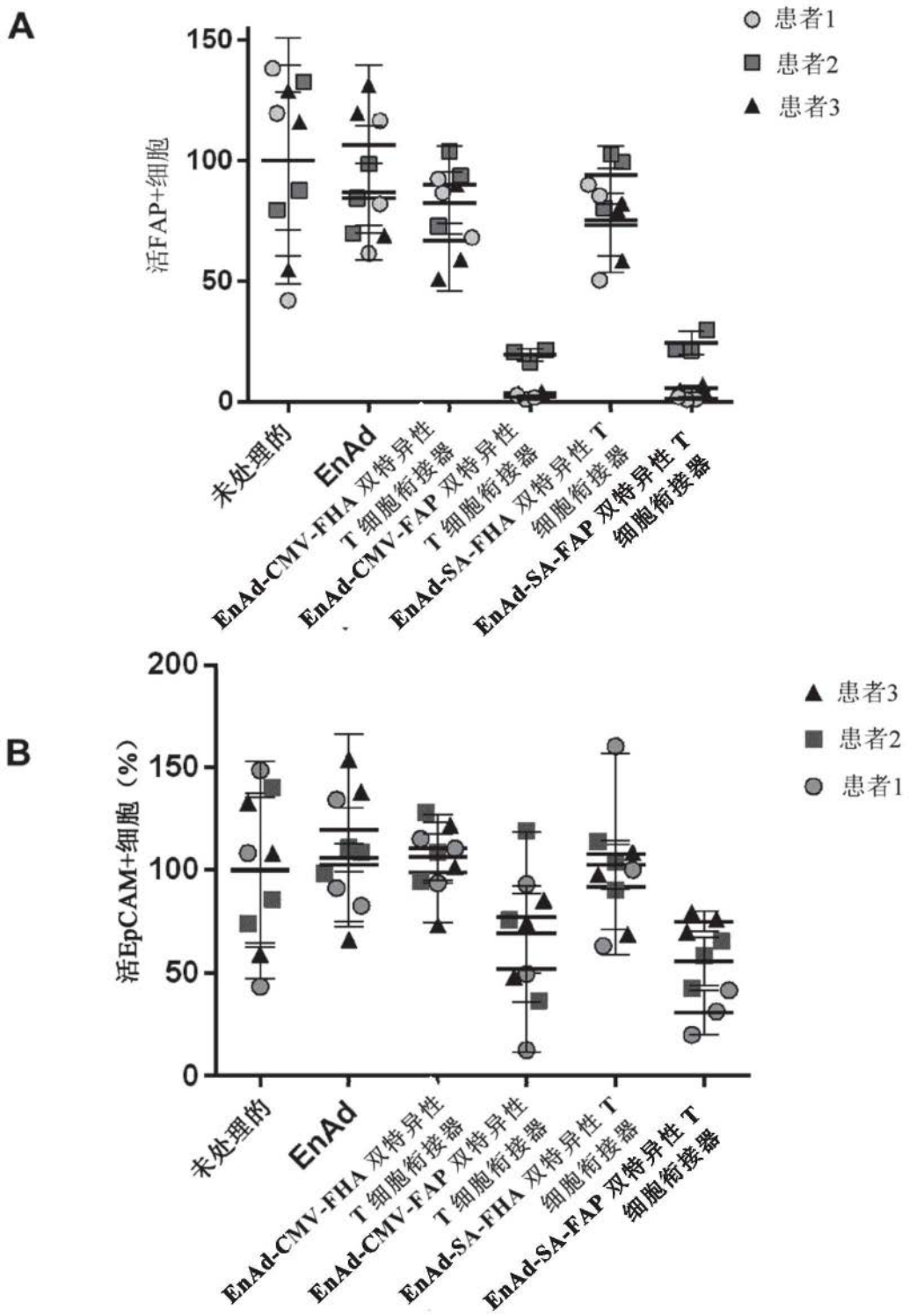

C
100
80
60
40
20
0
细胞毒性（%）
对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EC50 ~2.5 ng/ml
0 10-3 10-2 10-1 100 101 102 103 104
双特异性 T 细胞衔接器浓度[ng/mL]
D
100
80
60
40
20
0
-20
细胞毒性（%）
CD25-阳性（%）
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器

图69


A
患者1
患者2
患者3
活FAP+细胞
150
100
50
0
未处理的
EnAd
EnAd-CMV-FHA 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-FHA 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
B
患者3
患者2
患者1
活EpCAM+细胞（%）
200
150
100
50
0
未处理的
EnAd
EnAd-CMV-FHA 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-FHA 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器

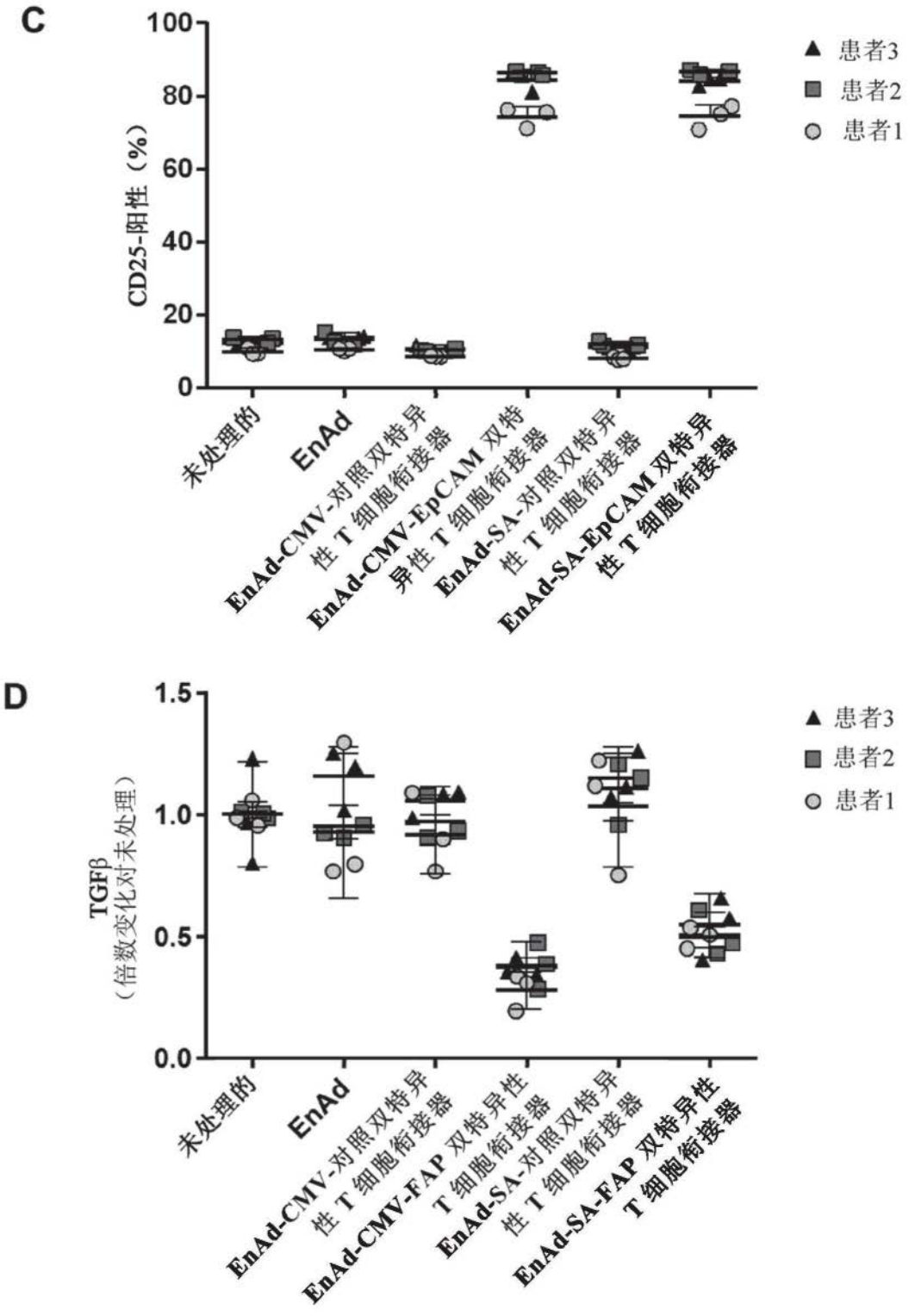

C
CD25-阳性（%）
100
80
60
40
20
0
患者3
患者2
患者1
未处理的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-EpCAM双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-EpCAM双特异性T细胞衔接器
D
TGFβ（倍数变化对未处理）
1.5
1.0
0.5
0.0
患者3
患者2
患者1
未处理的
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器

图70

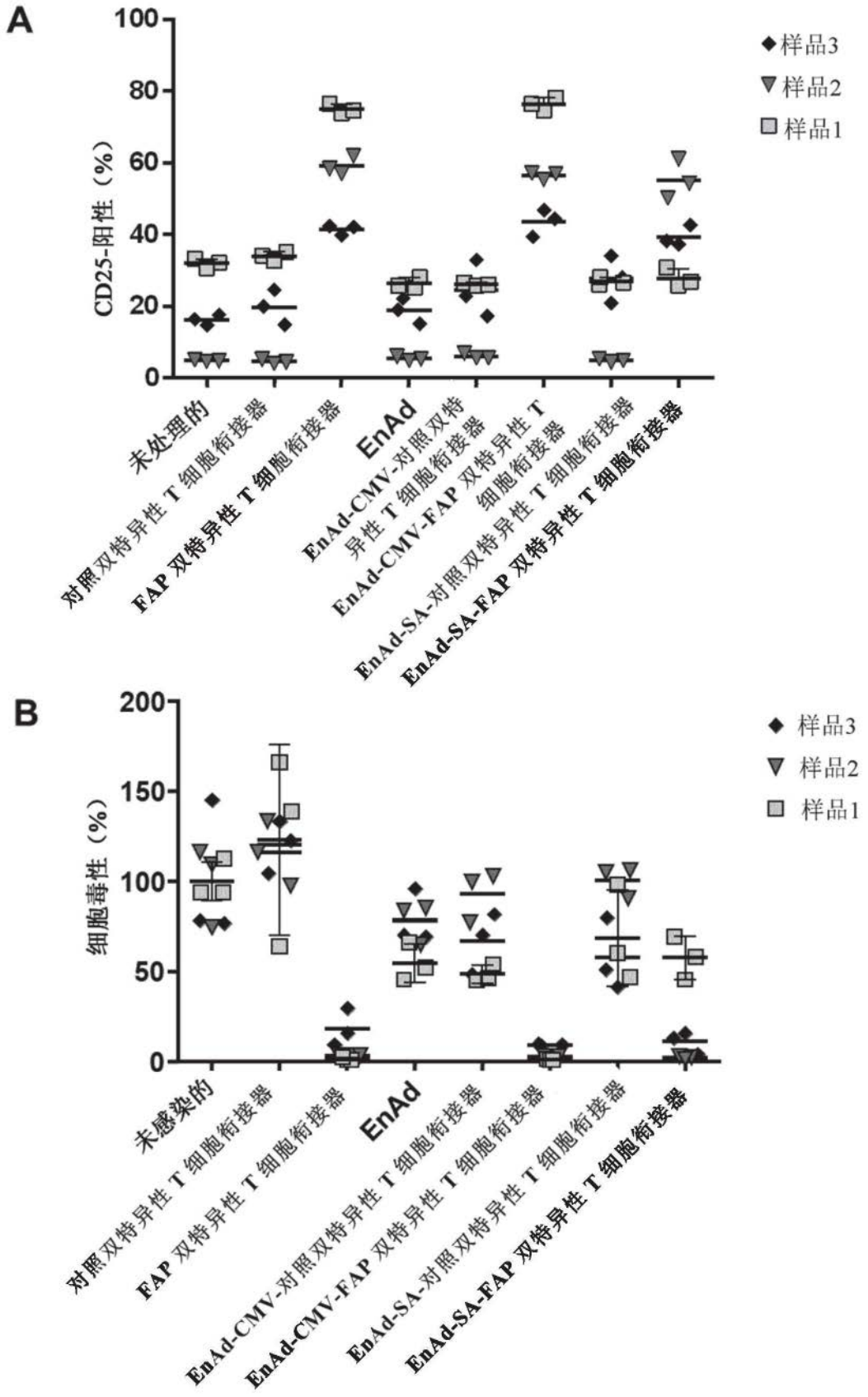
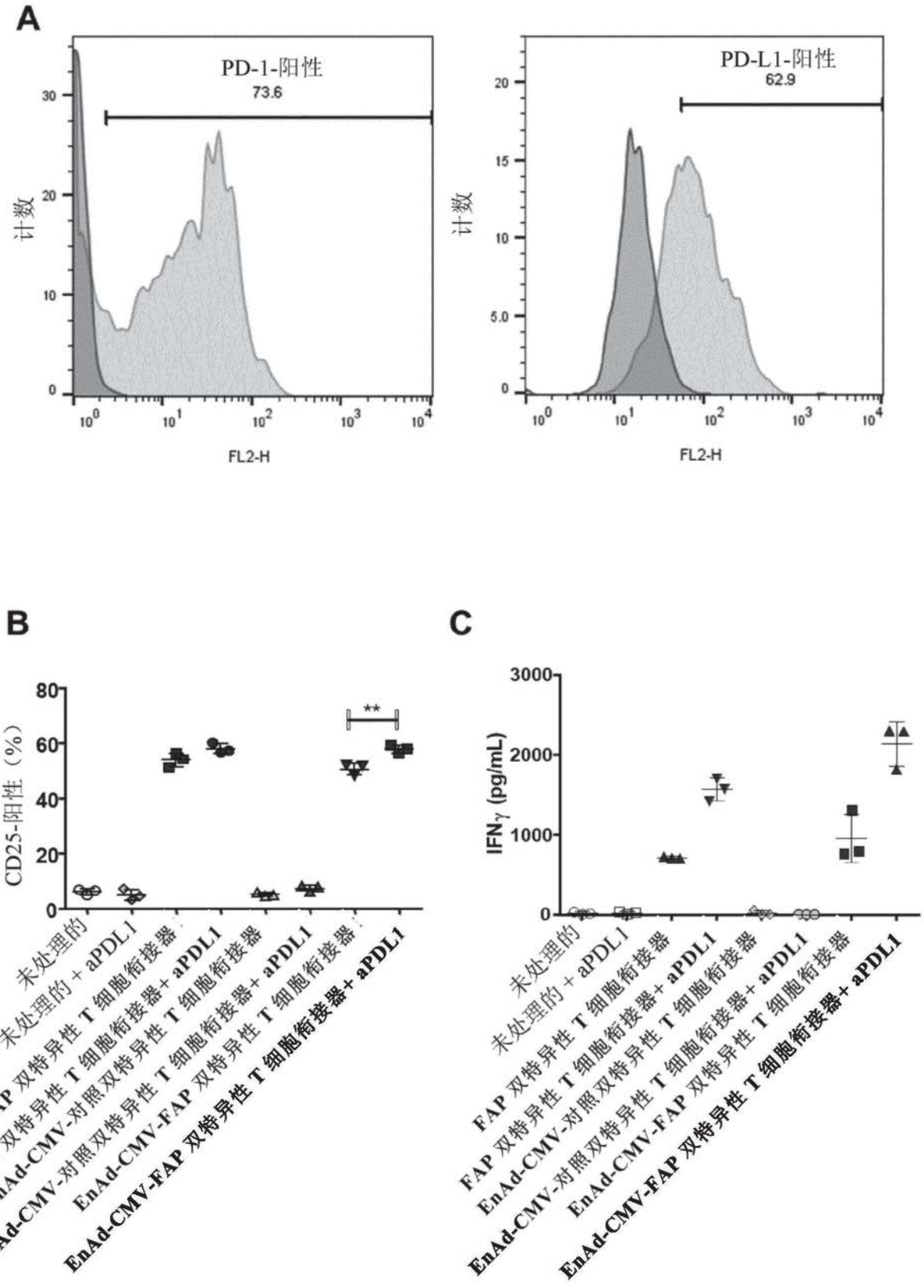

A
CD25-阳性（%）
100
80
60
40
20
0
样品3
样品2
样品1
未处理的
对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
B
细胞毒性（%）
200
150
100
50
0
样品3
样品2
样品1
未感染的
对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器

图71


A
PD-1-阳性
73.6
计数
FL2-H
PD-L1-阳性
62.9
计数
FL2-H
B
CD25-阳性（%）
**
未处理的
未处理的 + aPDL1
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器+ aPDL1
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器+ aPDL1
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器+ aPDL1
C
IFNγ (pg/mL)
未处理的
未处理的 + aPDL1
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器+ aPDL1
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器+ aPDL1
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器+ aPDL1

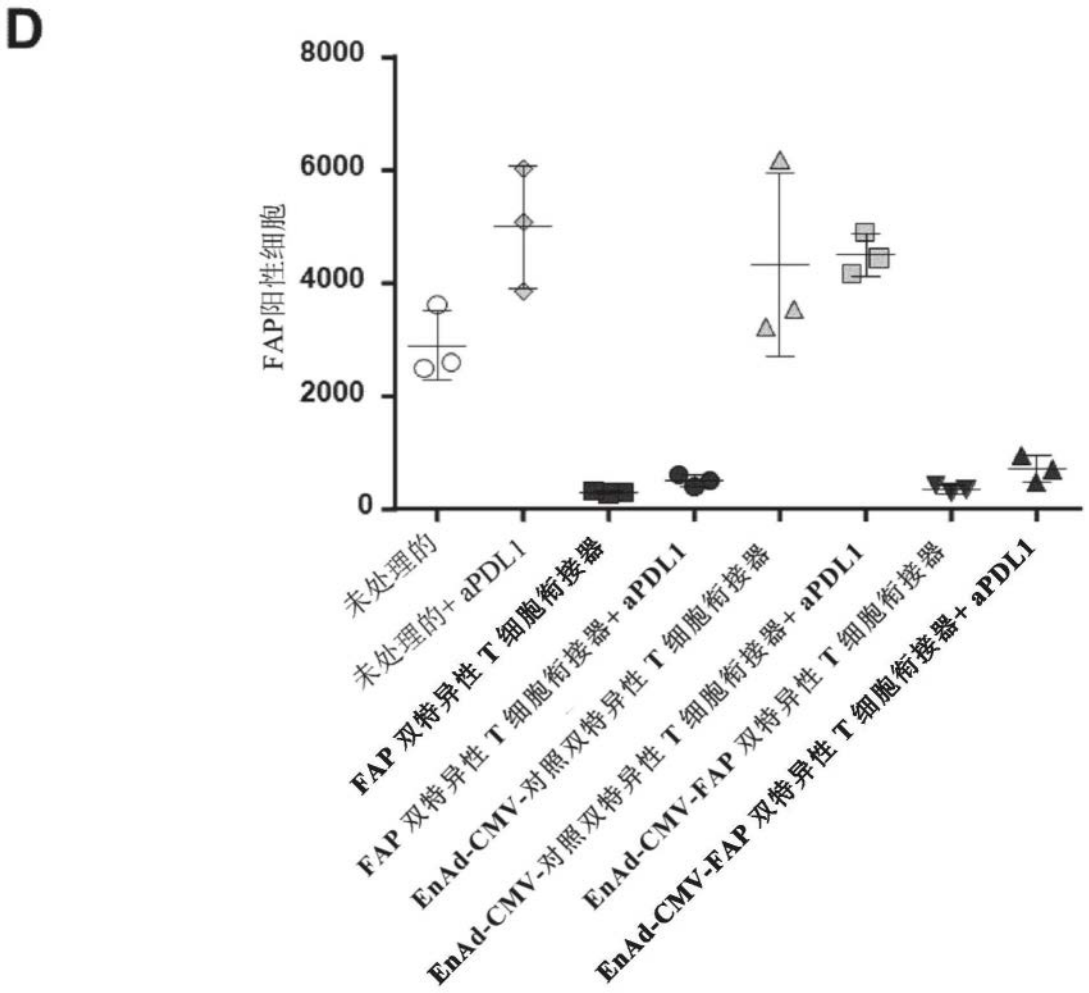
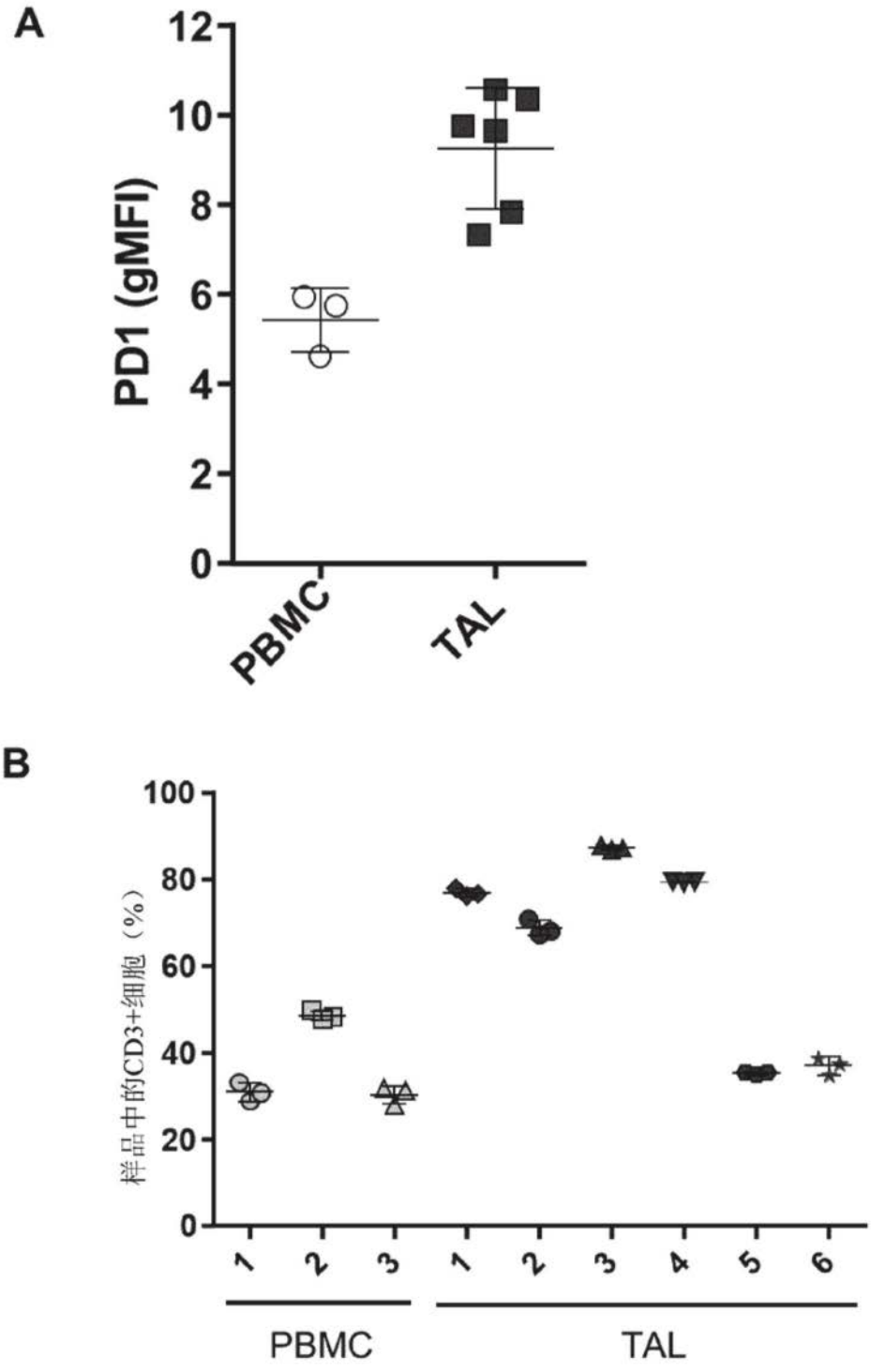

D
8000
6000
4000
2000
0
FAP阳性细胞
未处理的
未处理的+ aPDL1
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器+ aPDL1
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-对照双特异性 T 细胞衔接器+ aPDL1
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP 双特异性 T 细胞衔接器+ aPDL1

图72


A
PD1 (gMFI)
12
10
8
6
4
2
0
PBMC
TAL
B
样品中的CD3+细胞（%）
100
80
60
40
20
0
1
2
3
1
2
3
4
5
6
PBMC
TAL

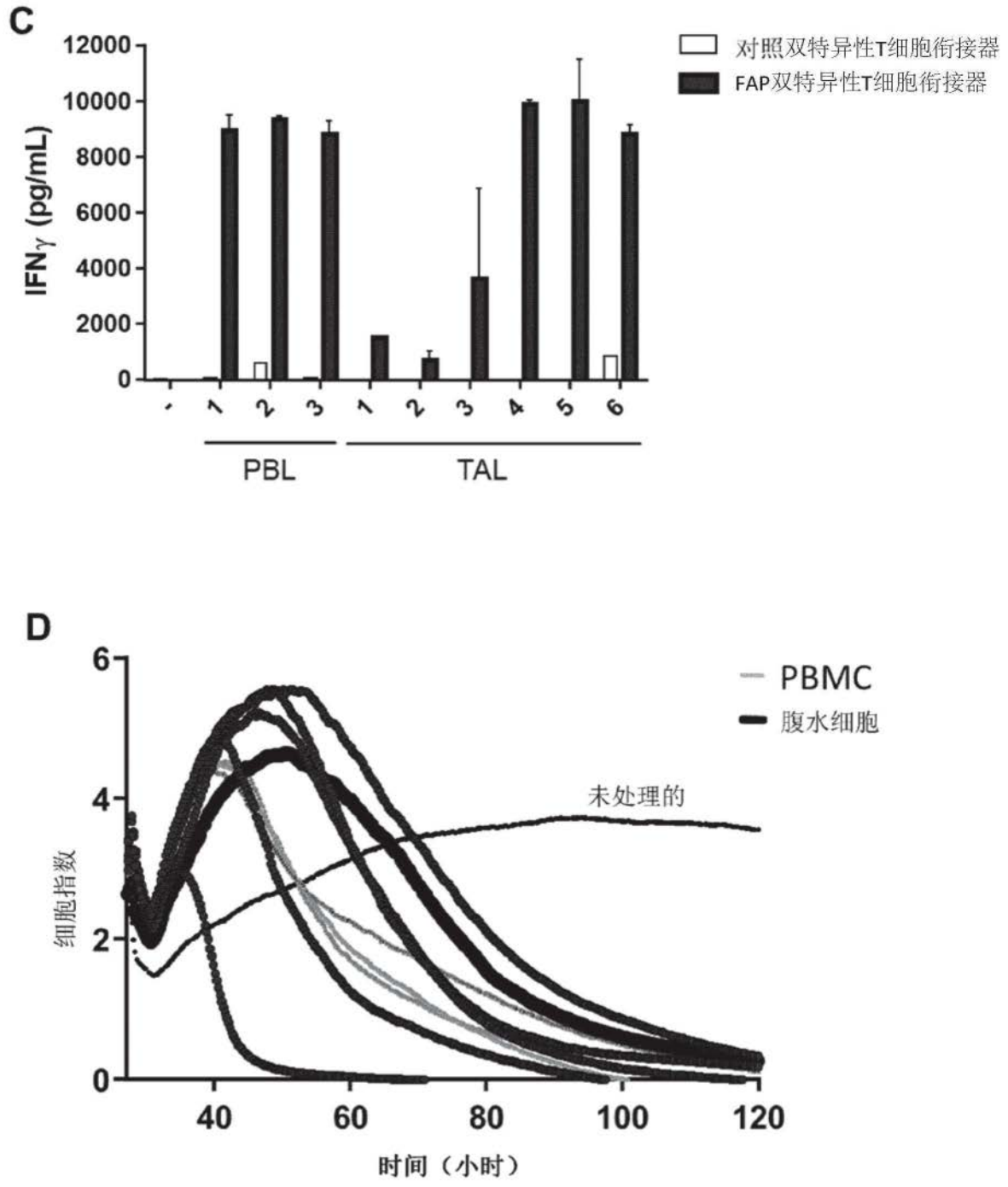

C
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
IFNγ (pg/mL)
对照双特异性T细胞衔接器
FAP双特异性T细胞衔接器
-
1
2
3
1
2
3
4
5
6
PBL
TAL
D
6
4
2
0
细胞指数
PBMC
腹水细胞
未处理的
40
60
80
100
120
时间（小时）

图73

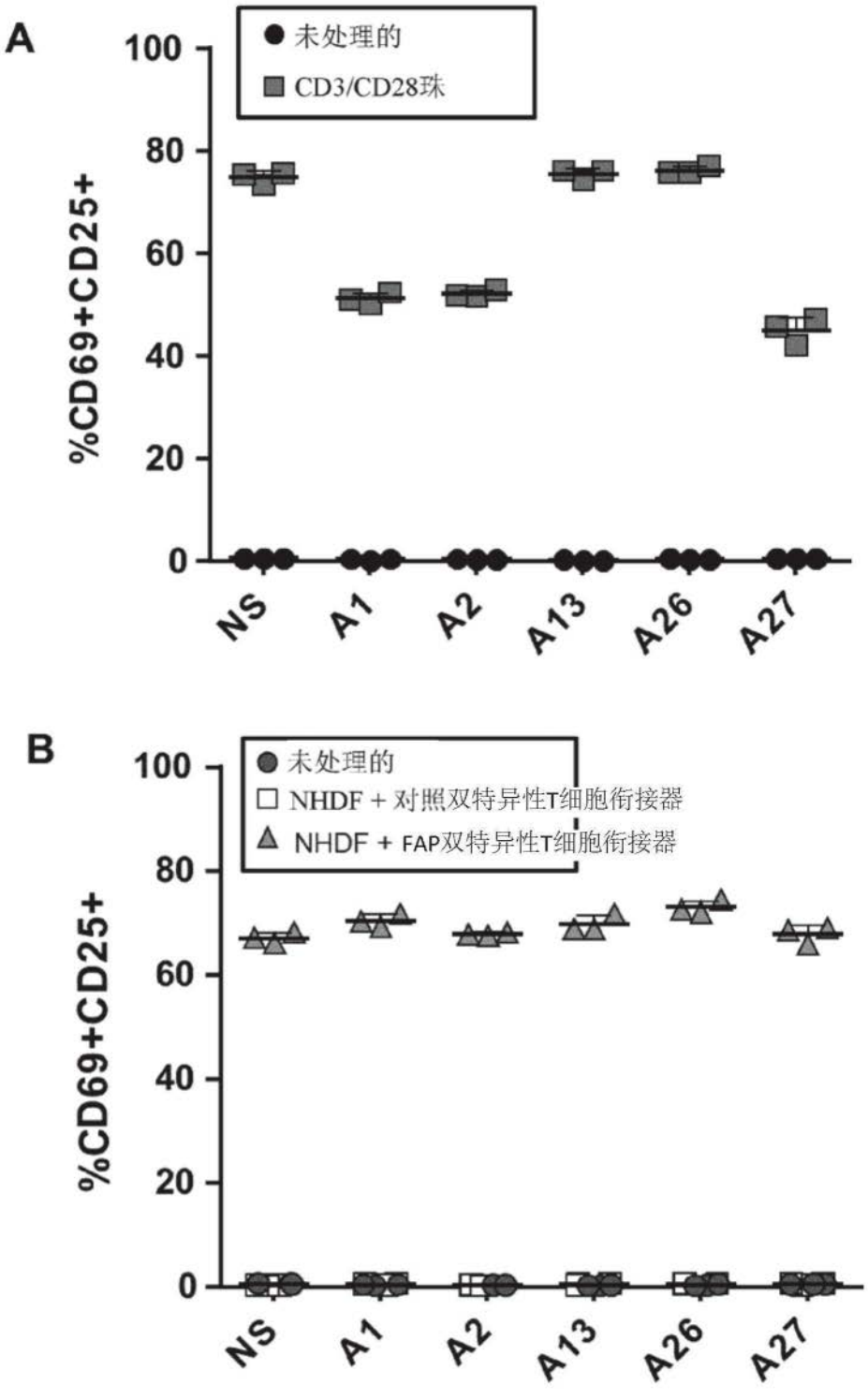
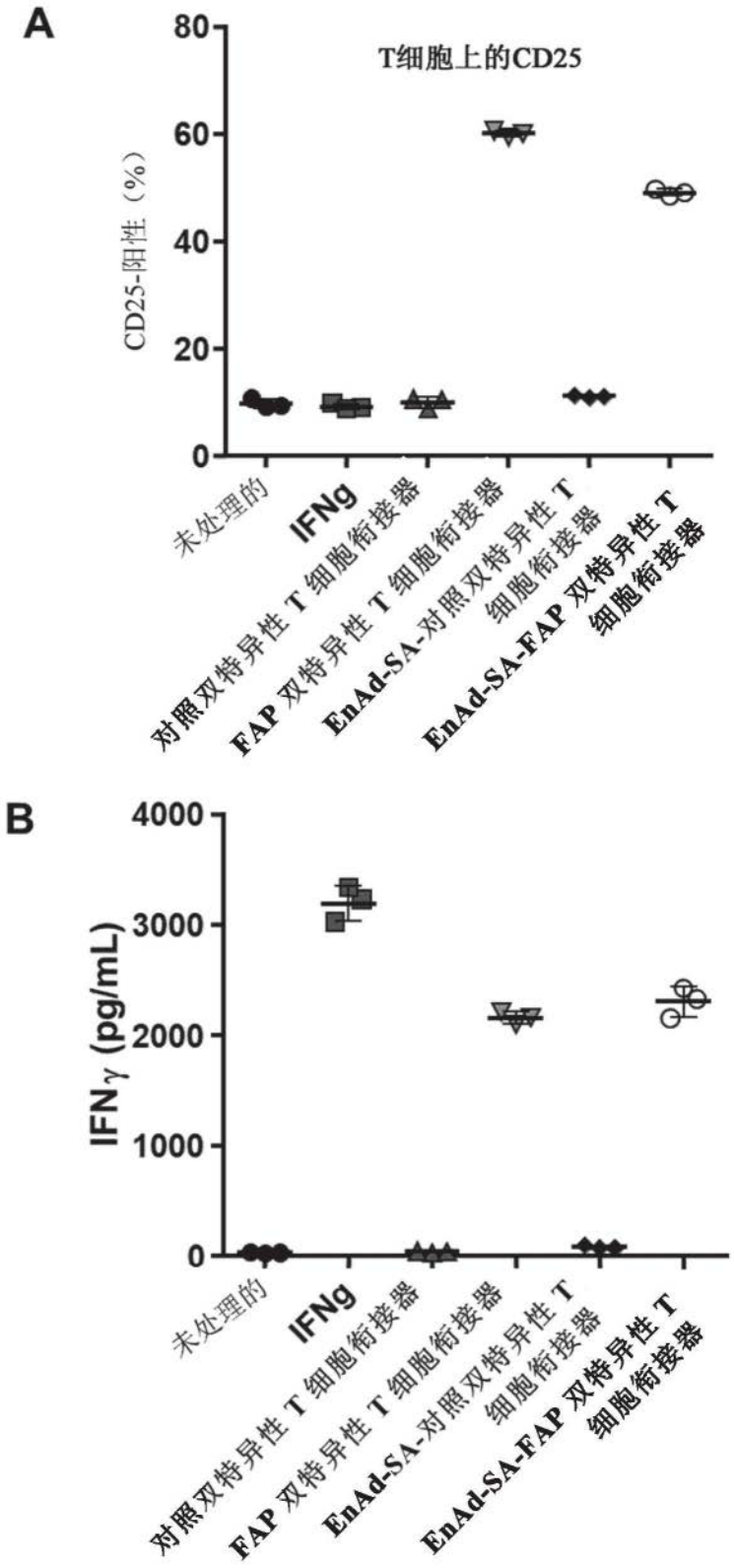

A
未处理的
CD3/CD28珠
%CD69+CD25+
100
80
60
40
20
0
NS
A1
A2
A13
A26
A27
B
未处理的
NHDF + 对照双特异性T细胞衔接器
NHDF + FAP双特异性T细胞衔接器
%CD69+CD25+
100
80
60
40
20
0
NS
A1
A2
A13
A26
A27

图74


A
T细胞上的CD25
CD25-阳性（%）
80
60
40
20
0
未处理的
IFNg
对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器
B
IFNγ (pg/mL)
4000
3000
2000
1000
0
未处理的
IFNg
对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器

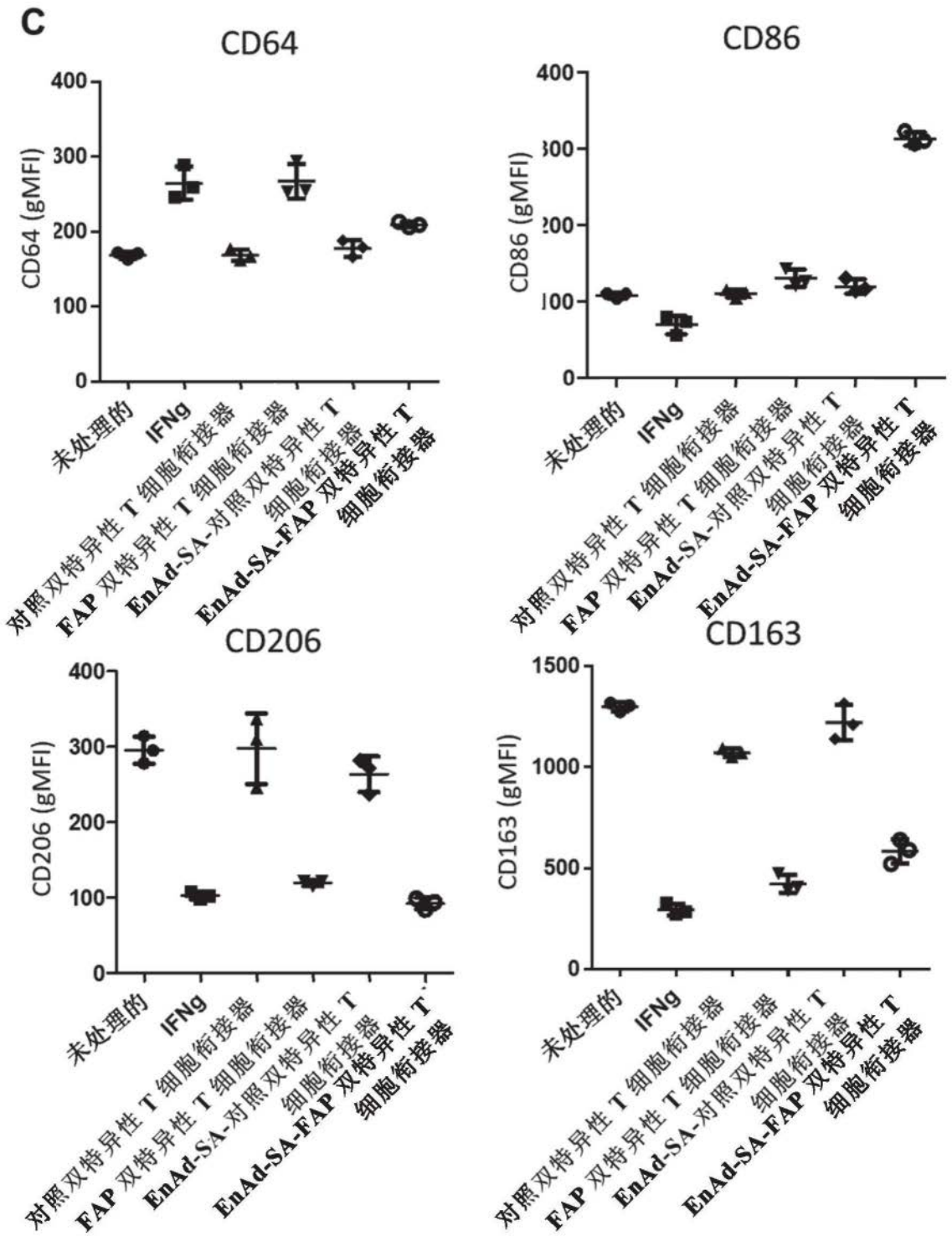
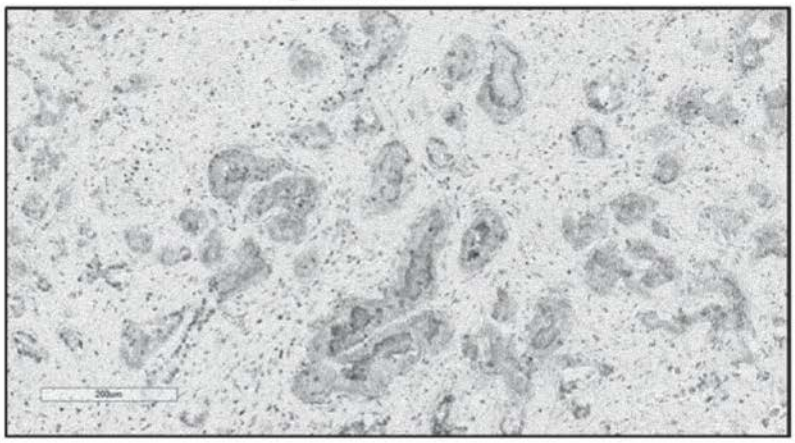

C
CD64
CD64 (gMFI)
400
300
200
100
0
CD86
CD86 (gMFI)
CD206
CD206 (gMFI)
CD163
CD163 (gMFI)
1500
1000
500
未处理的
IFNg
对照双特异性 T 细胞衔接器
FAP 双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-对照双特异性 T 细胞衔接器
EnAd-SA-FAP 双特异性 T 细胞衔接器

图75

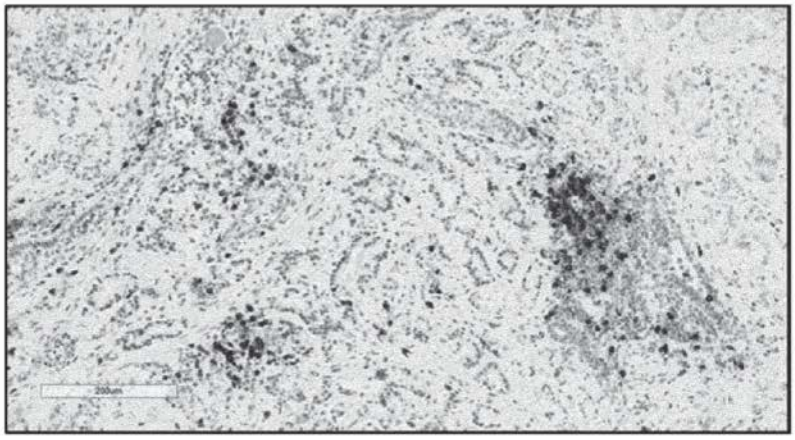
A

EpCAM染色



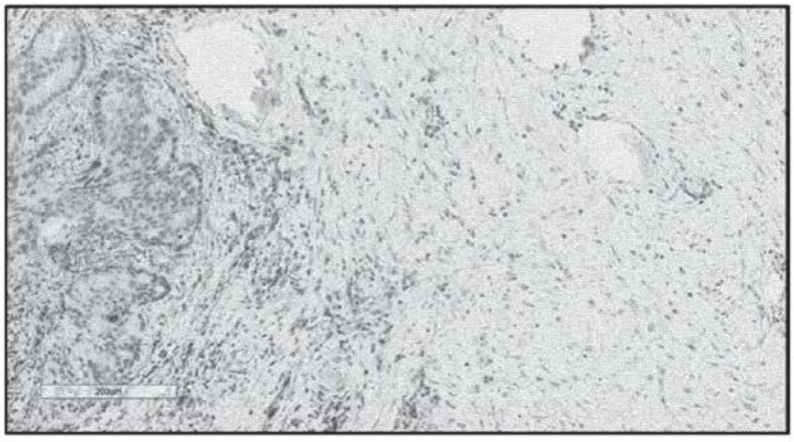
B

CD8染色



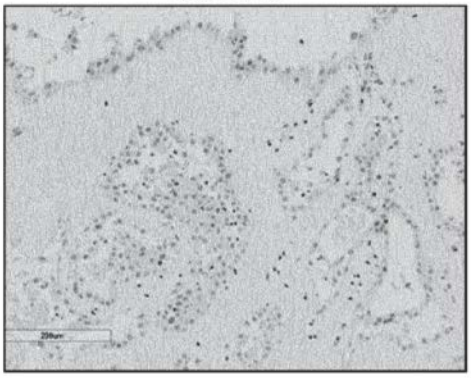
C

FAP染色

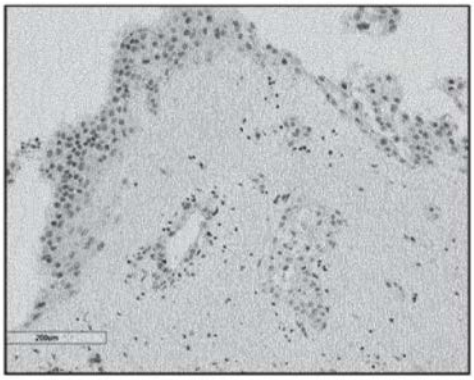


D

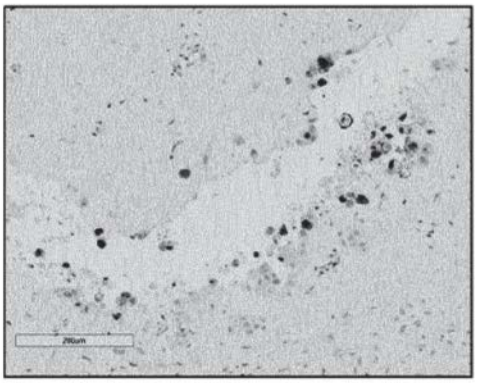
未处理的



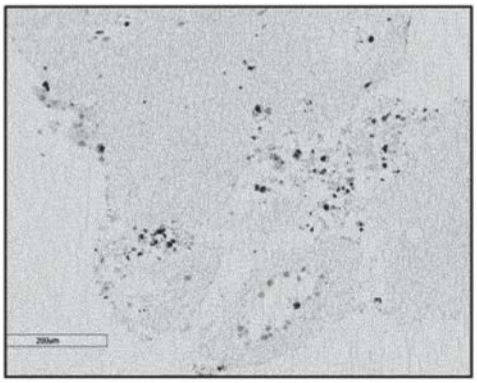
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器



EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器



EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器



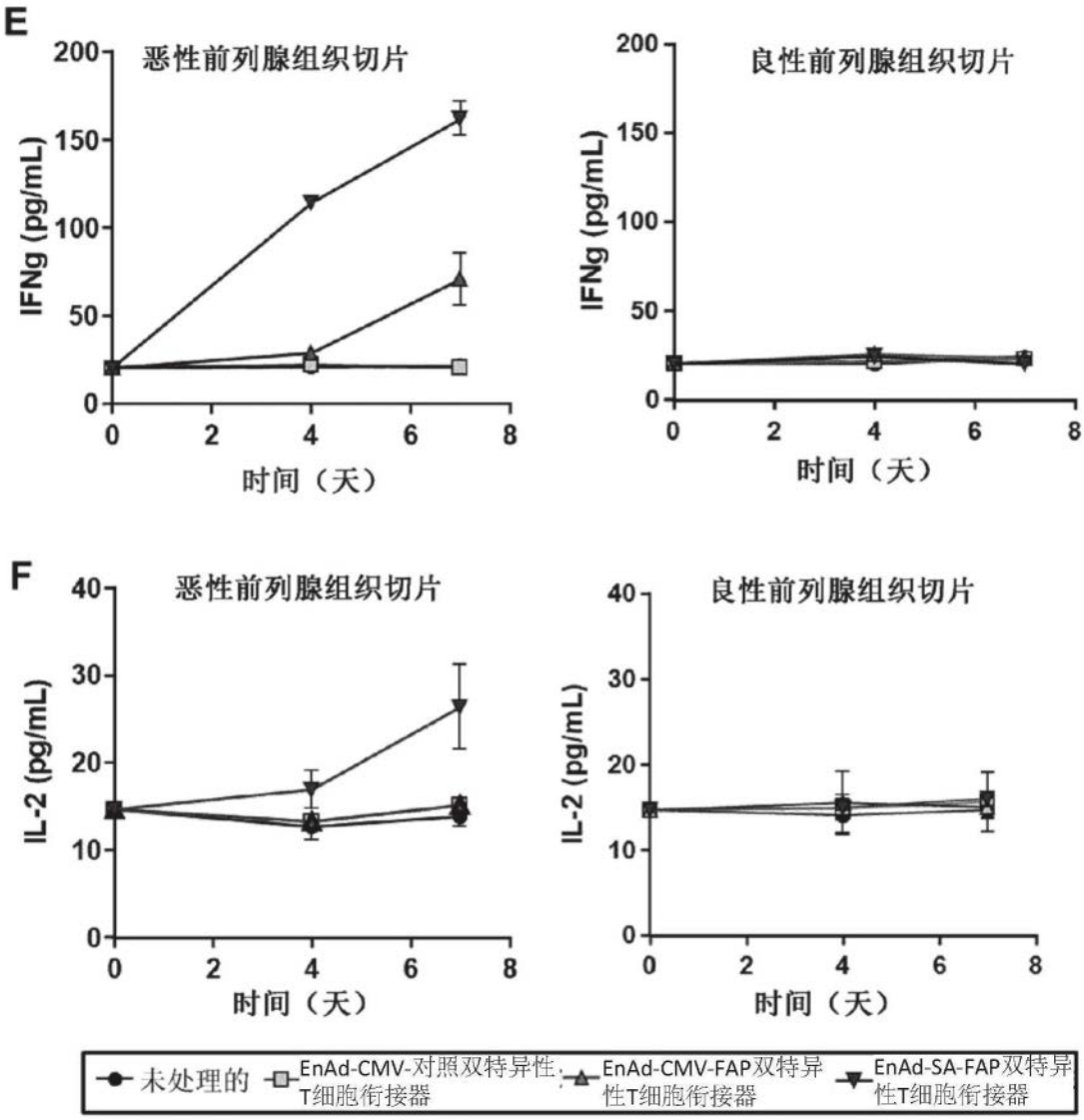

E
恶性前列腺组织切片
良性前列腺组织切片
IFNg (pg/mL)
时间（天）
F
恶性前列腺组织切片
良性前列腺组织切片
IL-2 (pg/mL)
时间（天）
未处理的
EnAd-CMV-对照双特异性T细胞衔接器
EnAd-CMV-FAP双特异性T细胞衔接器
EnAd-SA-FAP双特异性T细胞衔接器

图76

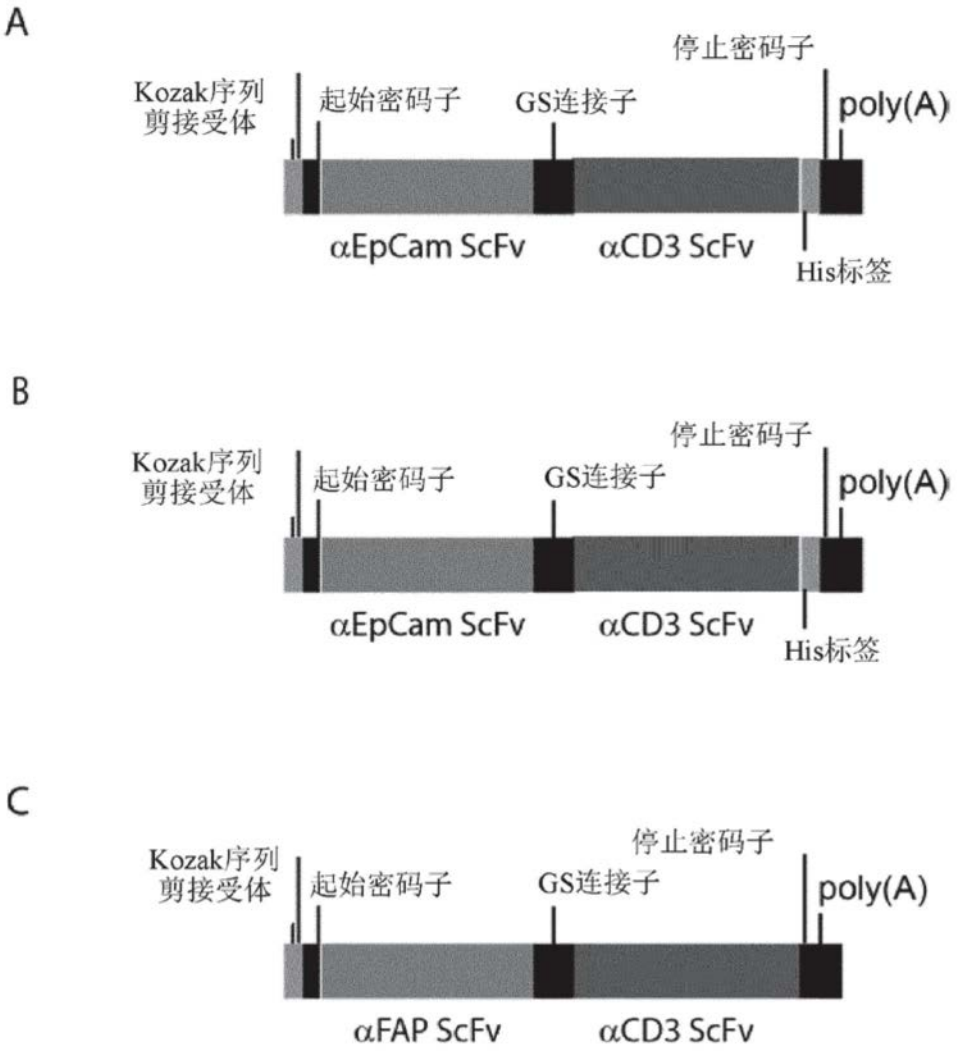

A
停止密码子
Kozak序列
剪接受体
起始密码子
GS连接子
poly(A)
αEpCam ScFv
αCD3 ScFv
His标签
B
停止密码子
Kozak序列
剪接受体
起始密码子
GS连接子
poly(A)
αEpCam ScFv
αCD3 ScFv
His标签
C
停止密码子
Kozak序列
剪接受体
起始密码子
GS连接子
poly(A)
αFAP ScFv
αCD3 ScFv

图77

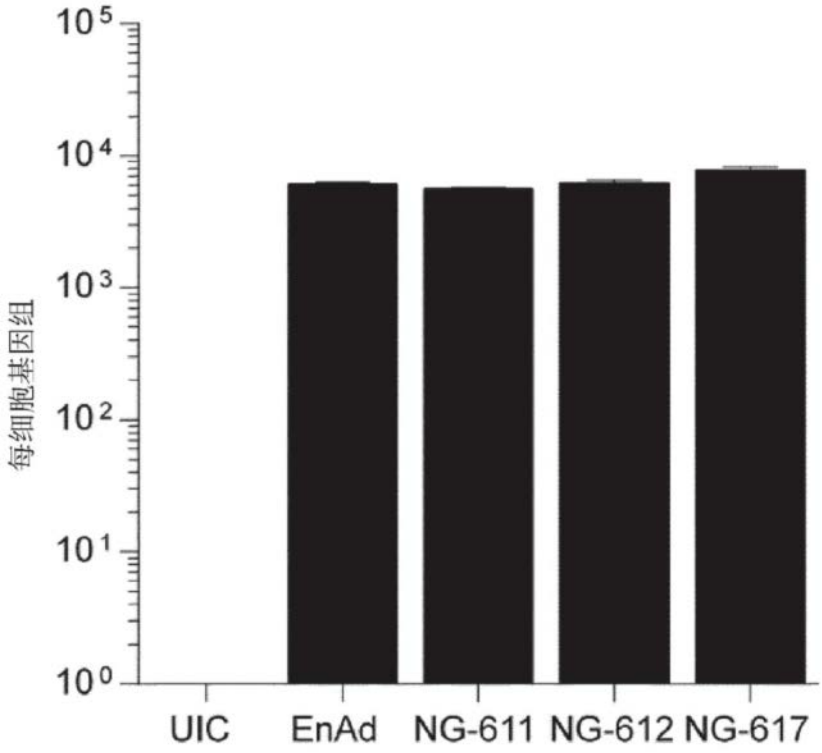


图77D

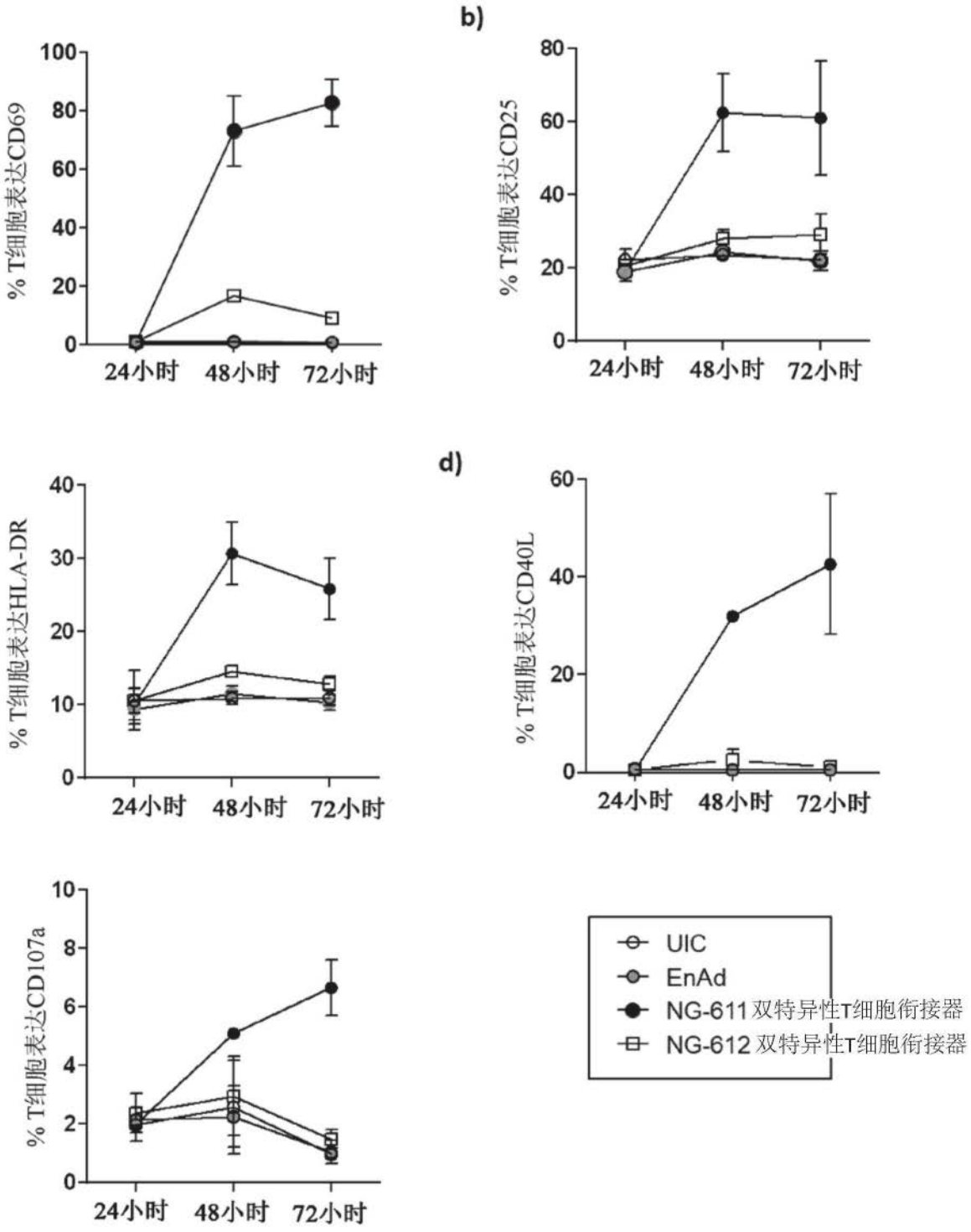

b)
% T细胞表达CD69
% T细胞表达CD25
d)
% T细胞表达HLA-DR
% T细胞表达CD40L
% T细胞表达CD107a
24小时
48小时
72小时
UIC
EnAd
NG-611 双特异性T细胞衔接器
NG-612 双特异性T细胞衔接器

图78

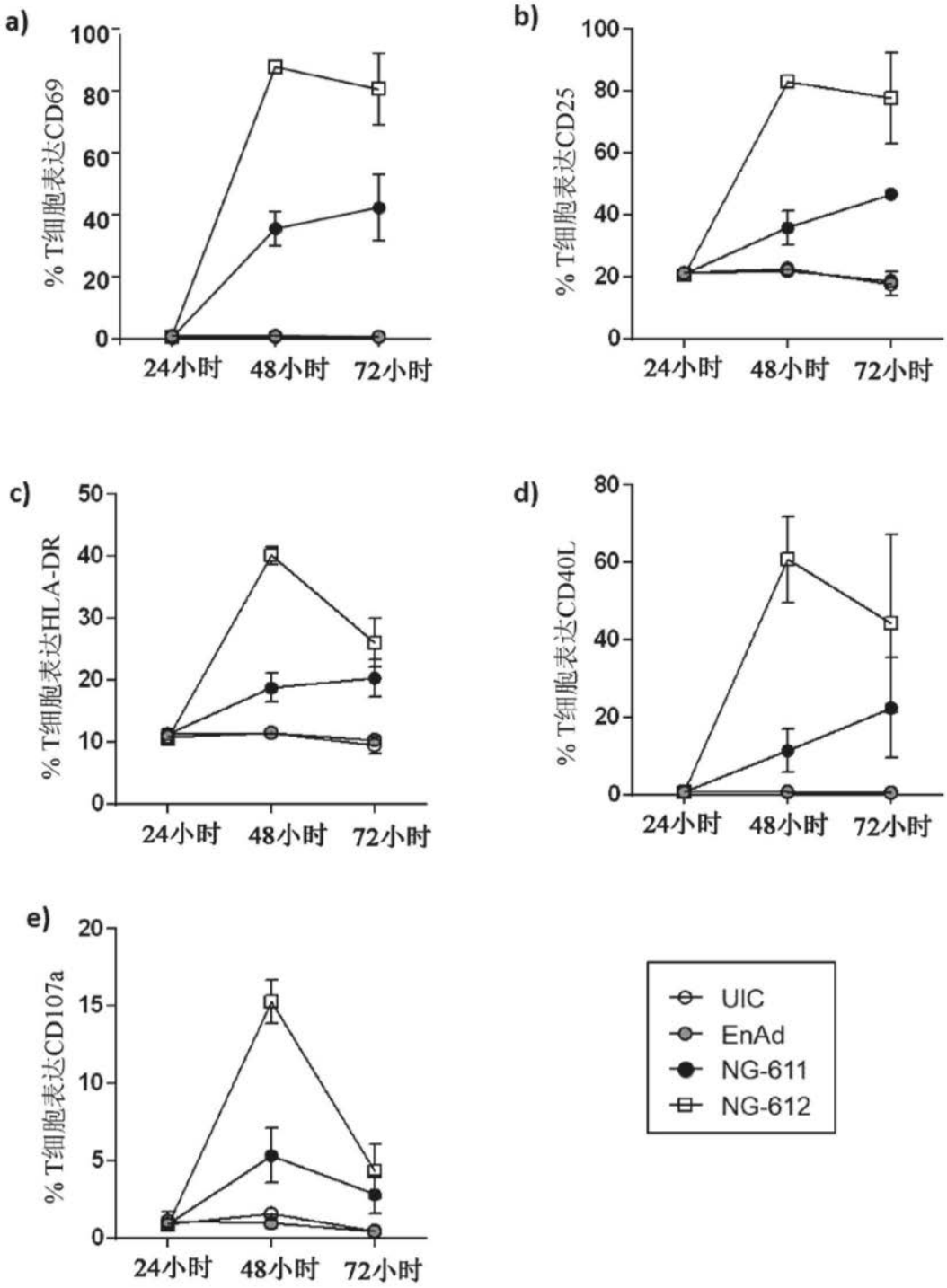

a)
% T细胞表达CD69
100
80
60
40
20
0
24小时
48小时
72小时
b)
% T细胞表达CD25
c)
% T细胞表达HLA-DR
50
40
30
d)
% T细胞表达CD40L
e)
% T细胞表达CD107a
15
10
5
UIC
EnAd
NG-611
NG-612

图79

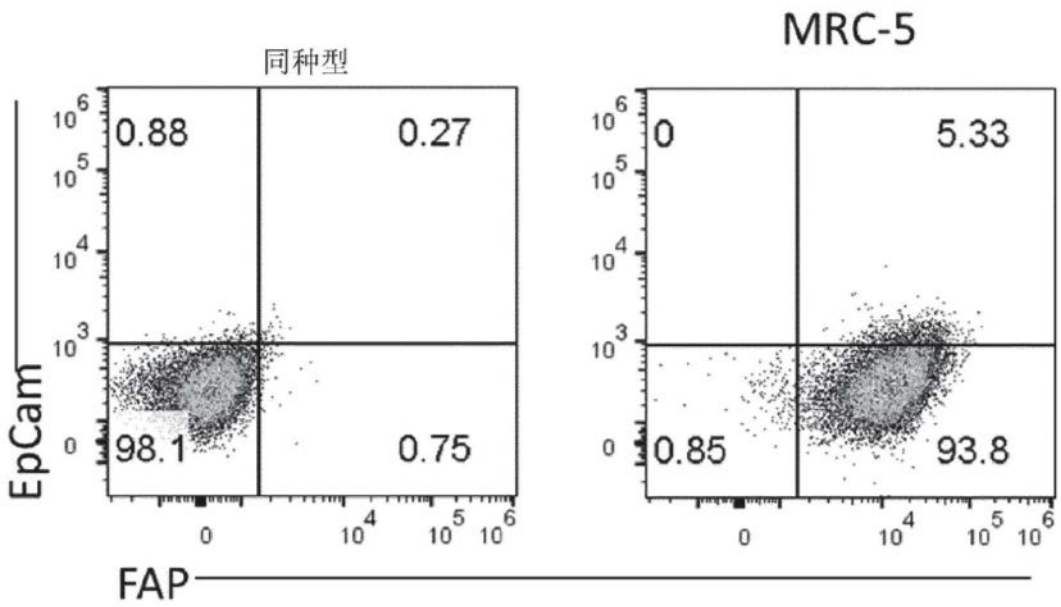


图80

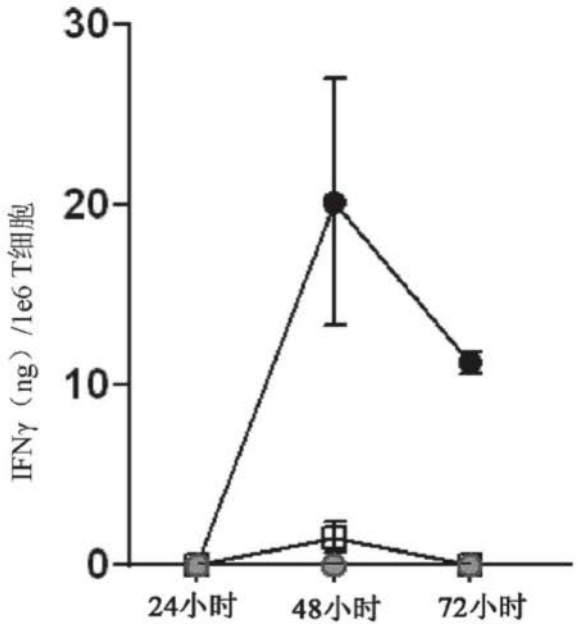

30
20
10
0
IFNγ（ng）/1e6 T细胞
24小时
48小时
72小时

图81A

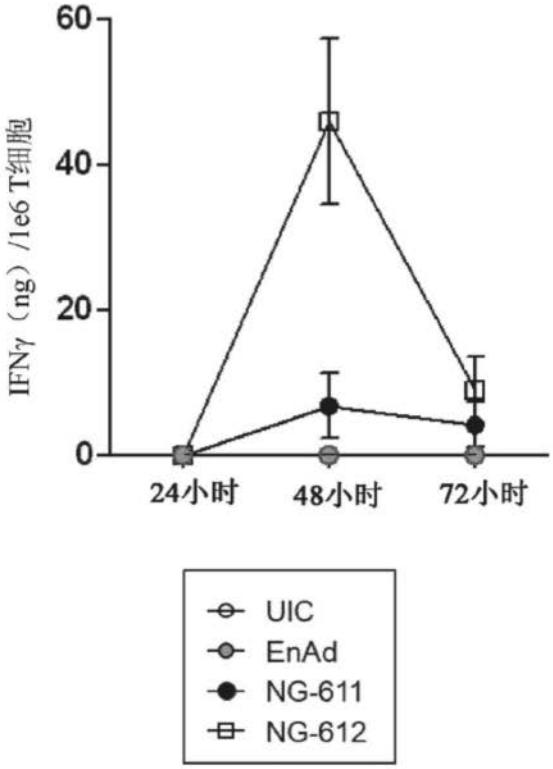

60
40
20
0
IFNγ（ng）/1e6 T细胞
24小时
48小时
72小时
UIC
EnAd
NG-611
NG-612

图81B

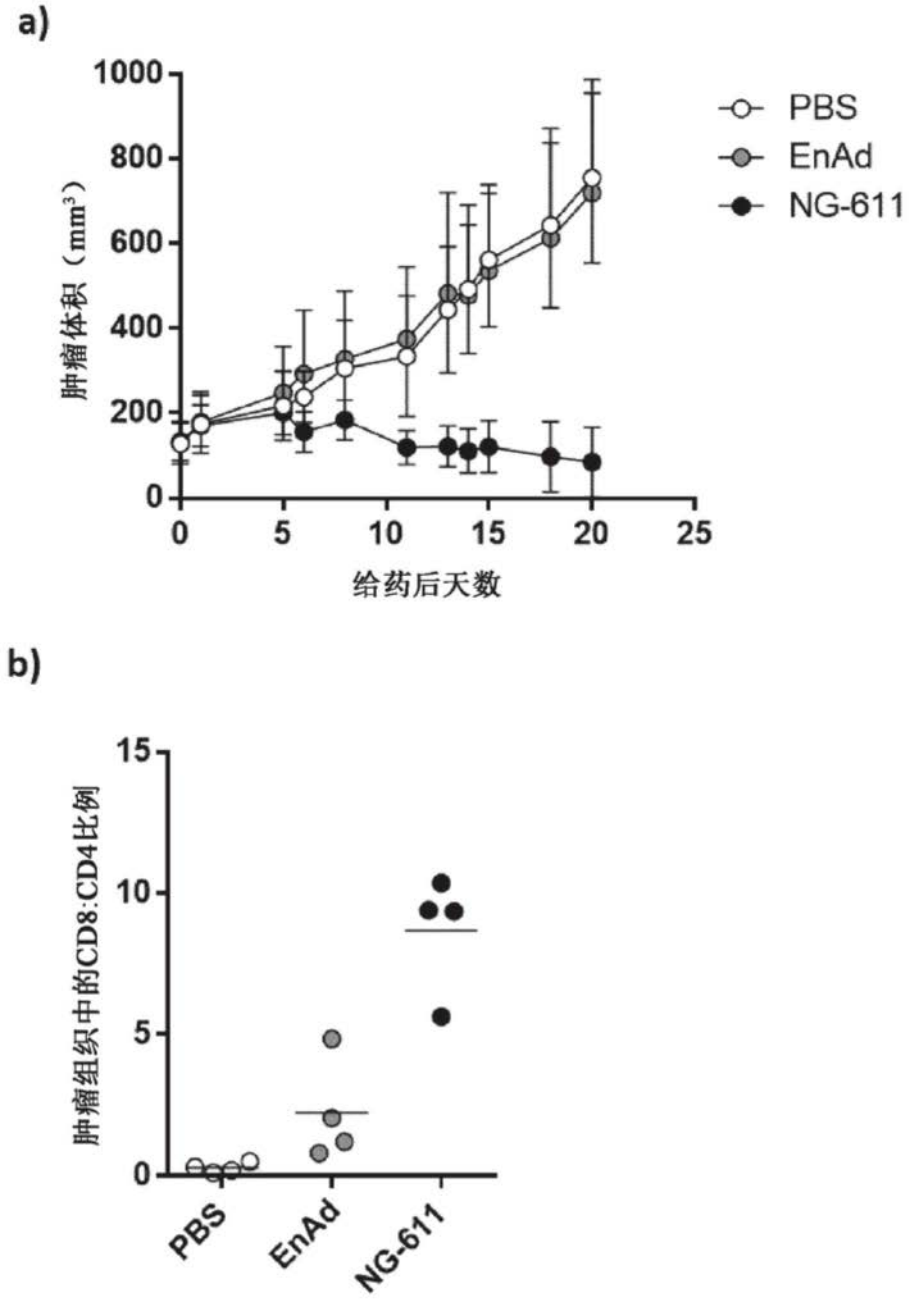

a)
1000
800
600
400
200
0
肿瘤体积（mm³）
0
5
10
15
20
25
给药后天数
PBS
EnAd
NG-611
b)
15
10
5
0
肿瘤组织中的CD8:CD4比例
PBS
EnAd
NG-611

图82

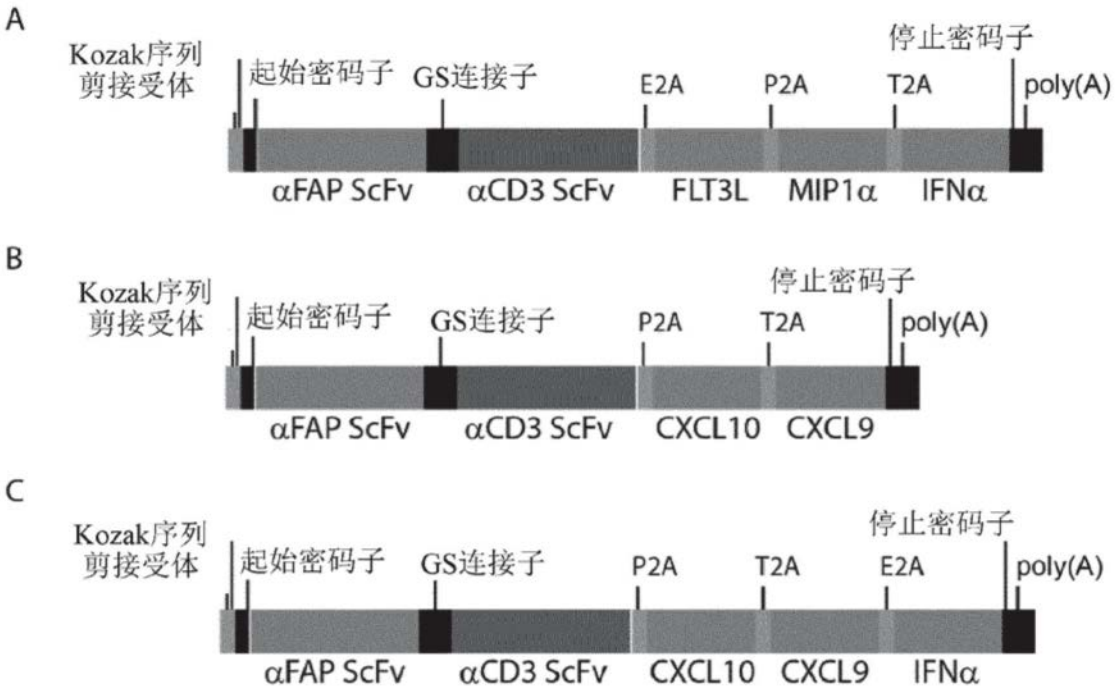

A
Kozak序列
剪接受体
起始密码子
GS连接子
E2A
P2A
T2A
停止密码子
poly(A)
αFAP ScFv
αCD3 ScFv
FLT3L
MIP1α
IFNα
B
Kozak序列
剪接受体
起始密码子
GS连接子
P2A
T2A
停止密码子
poly(A)
αFAP ScFv
αCD3 ScFv
CXCL10
CXCL9
C
Kozak序列
剪接受体
起始密码子
GS连接子
P2A
T2A
E2A
停止密码子
poly(A)
αFAP ScFv
αCD3 ScFv
CXCL10
CXCL9
IFNα

图83

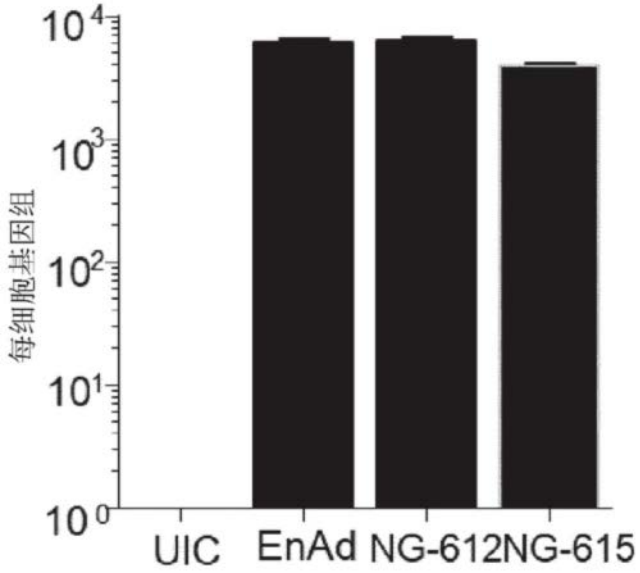

每细胞基因组
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
UIC
EnAd
NG-612
NG-615

图84

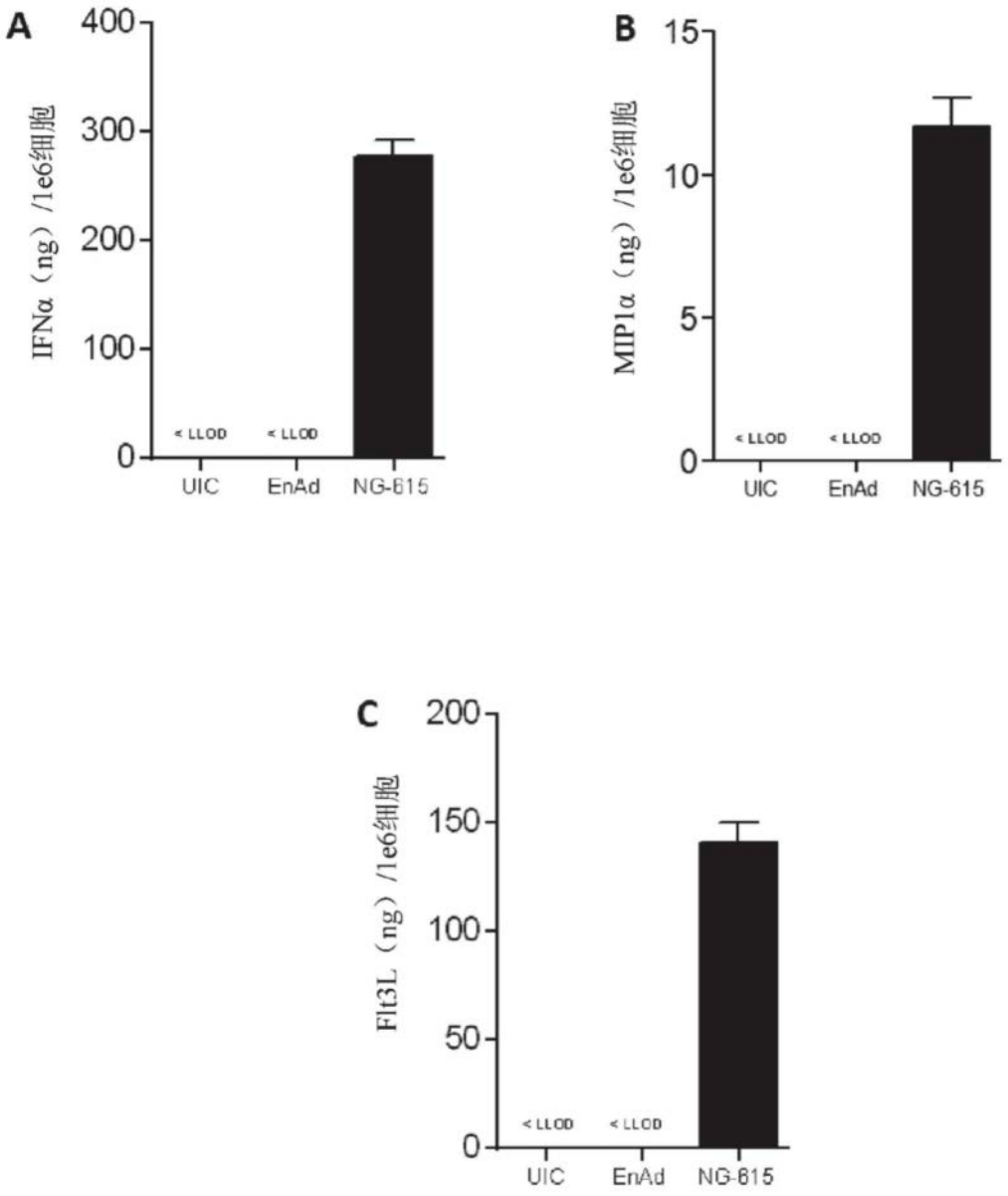

A
IFNα（ng）/1e6细胞
400
300
200
100
0
< LLOD
< LLOD
UIC
EnAd
NG-615
B
MIP1α（ng）/1e6细胞
15
10
5
0
< LLOD
< LLOD
UIC
EnAd
NG-615
C
Flt3L（ng）/1e6细胞
200
150
100
50
0
< LLOD
< LLOD
UIC
EnAd
NG-615

图85

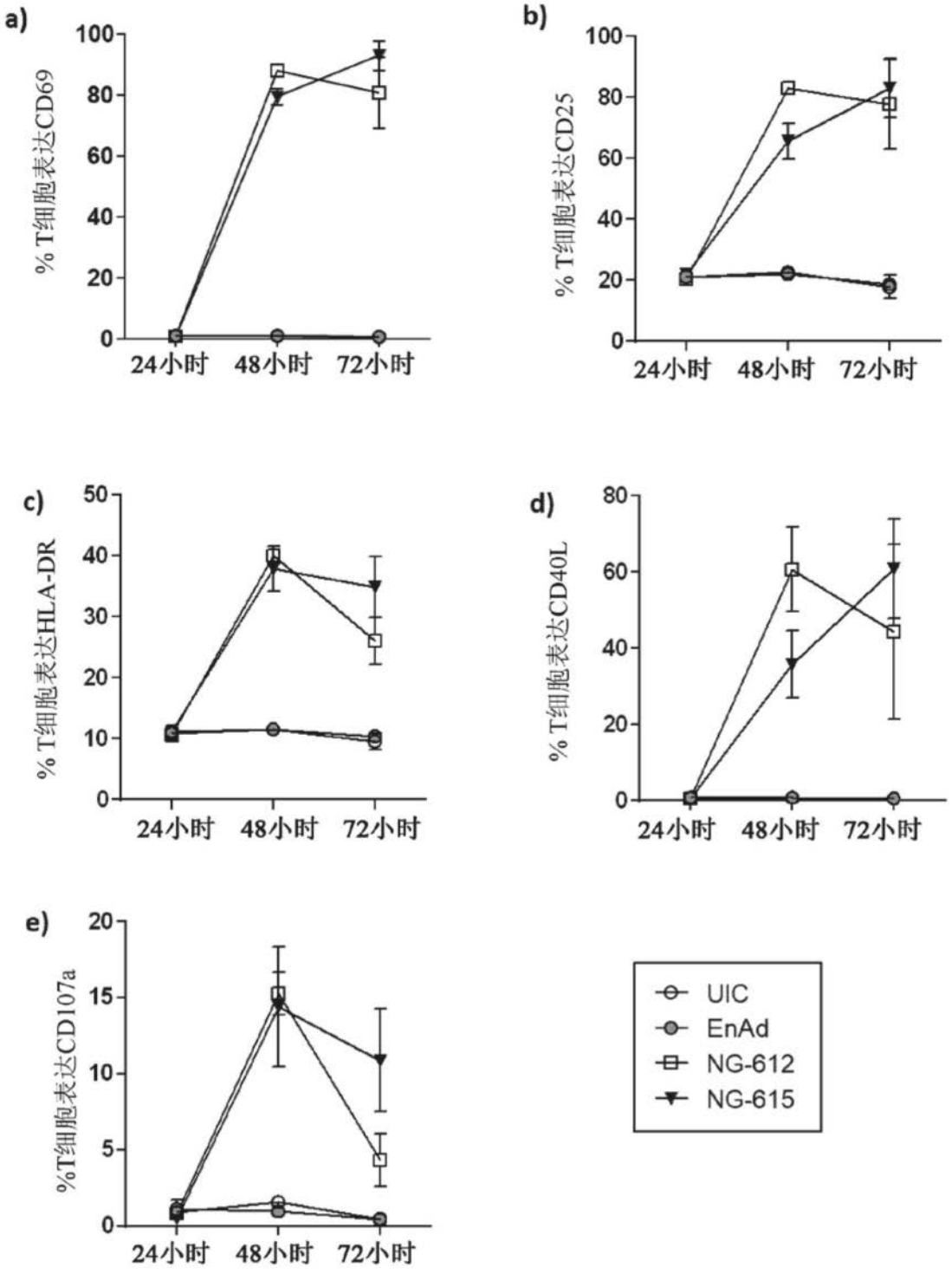

a)
% T细胞表达CD69
100
80
60
40
20
0
24小时
48小时
72小时
b)
% T细胞表达CD25
c)
% T细胞表达HLA-DR
50
40
30
d)
% T细胞表达CD40L
e)
%T细胞表达CD107a
UIC
EnAd
NG-612
NG-615

图86

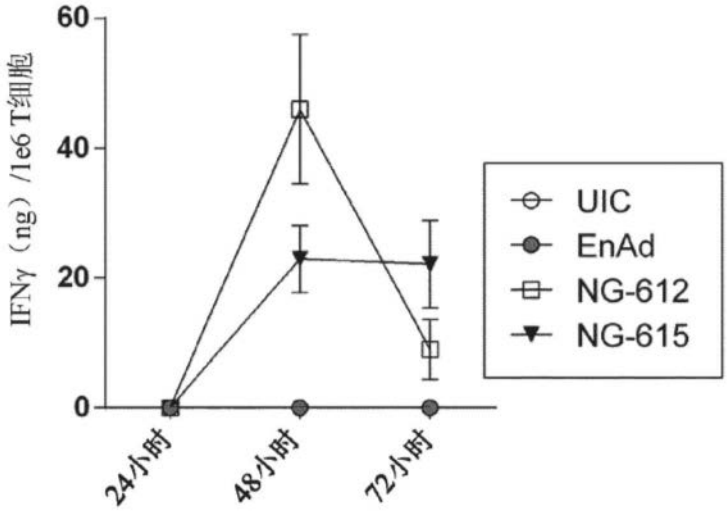

60
40
20
0
IFNγ（ng）/1e6 T细胞
24小时
48小时
72小时
UIC
EnAd
NG-612
NG-615

图87

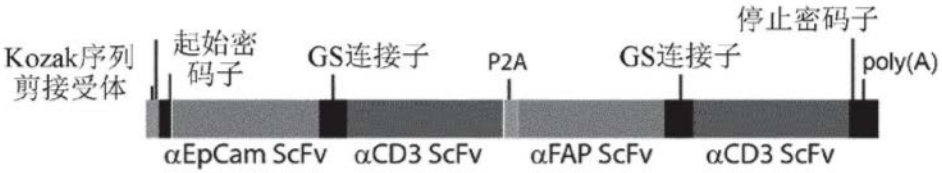

Kozak序列
剪接受体
起始密码子
GS连接子
P2A
GS连接子
停止密码子
poly(A)
αEpCam ScFv
αCD3 ScFv
αFAP ScFv
αCD3 ScFv

图88

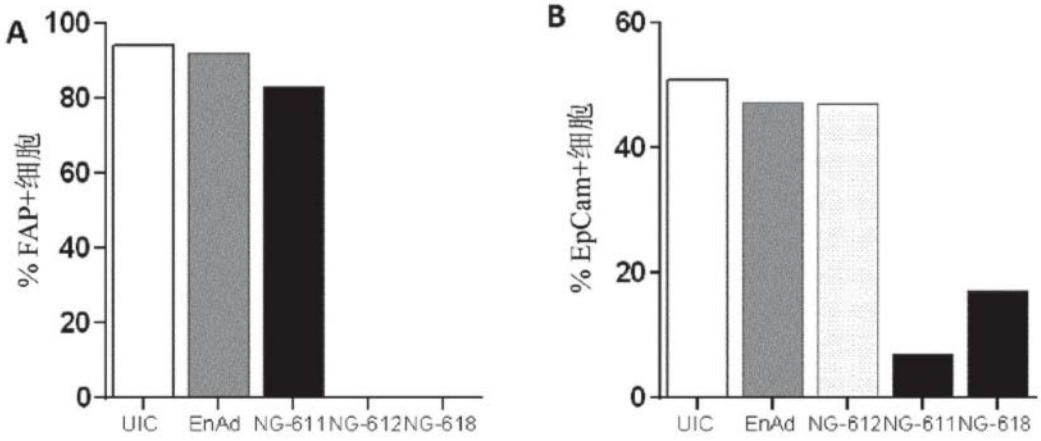

A
100
80
60
40
20
0
% FAP+细胞
UIC
EnAd
NG-611
NG-612
NG-618
B
60
40
20
0
% EpCam+细胞
UIC
EnAd
NG-612
NG-611
NG-618

图89

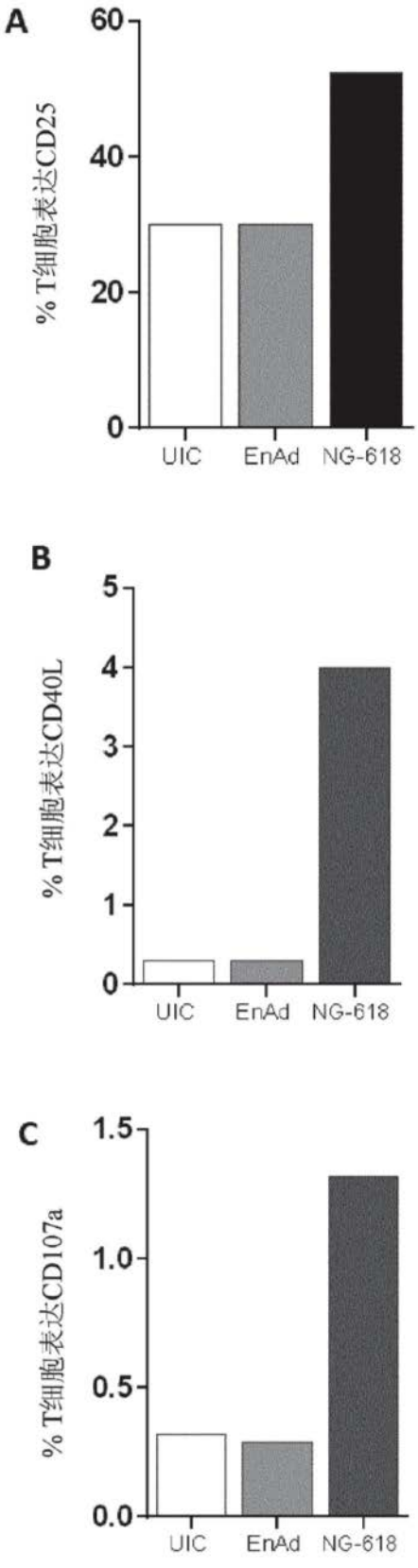

A
60
40
20
0
% T细胞表达CD25
UIC
EnAd
NG-618
B
5
4
3
2
1
0
% T细胞表达CD40L
UIC
EnAd
NG-618
C
1.5
1.0
0.5
0.0
% T细胞表达CD107a
UIC
EnAd
NG-618

图90

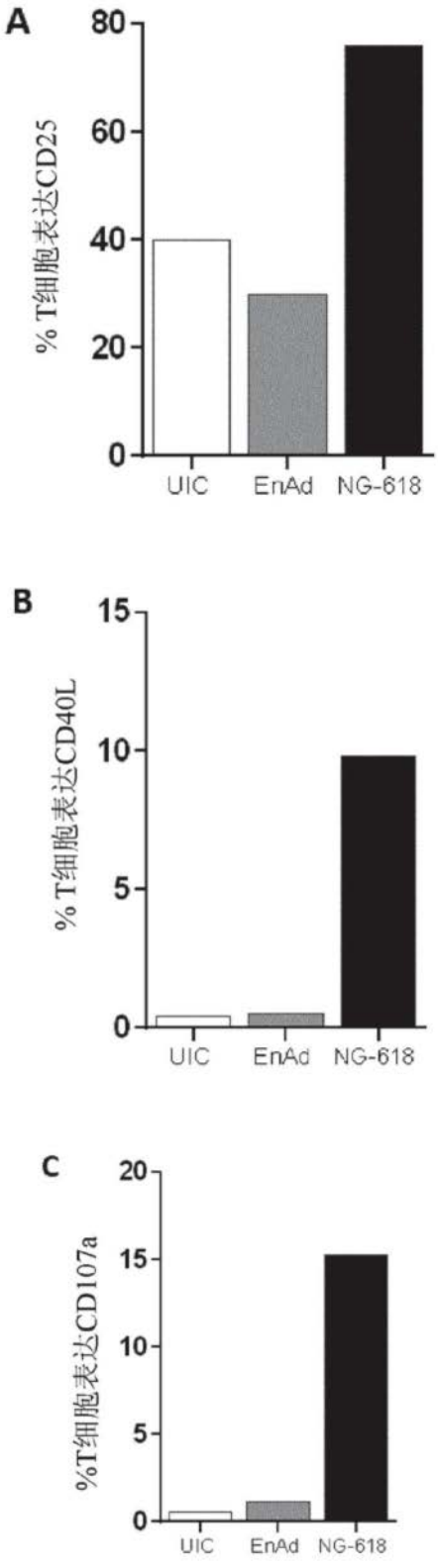

A
% T细胞表达CD25
80
60
40
20
0
UIC
EnAd
NG-618
B
% T细胞表达CD40L
15
10
5
0
UIC
EnAd
NG-618
C
%T细胞表达CD107a
20
15
10
5
0
UIC
EnAd
NG-618

图91

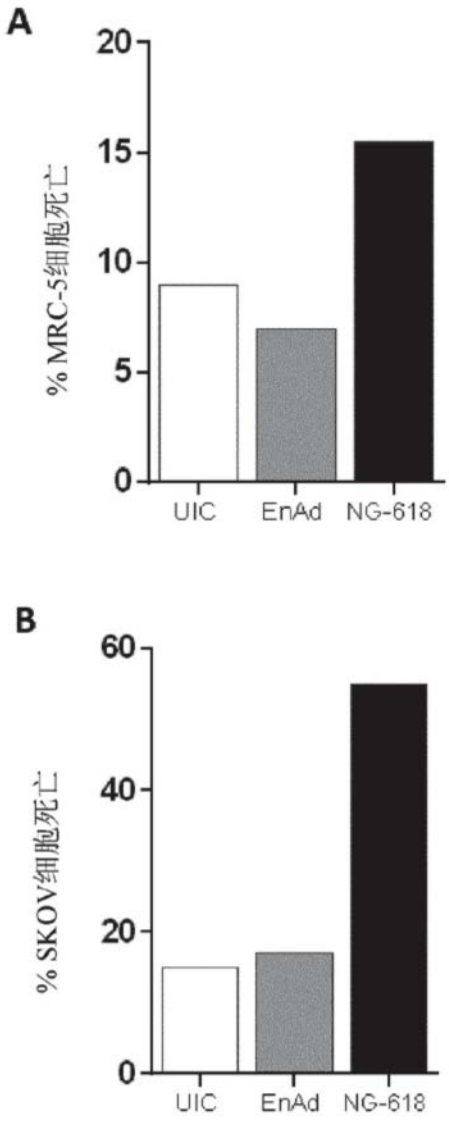

A
20
15
10
5
0
% MRC-5细胞死亡
UIC
EnAd
NG-618
B
60
40
20
0
% SKOV细胞死亡
UIC
EnAd
NG-618

图92