



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108250301 A

(43)申请公布日 2018.07.06

(21)申请号 201611246563.4

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2016.12.29

A61K 35/17(2015.01)

A61P 35/00(2006.01)

(71)申请人 天津天锐生物科技有限公司

地址 300300 天津市滨海新区自贸区(空港经济区)环河北路76号空港商务园西区19号楼2层201

(72)发明人 王磊 高斌 吴亚松 司远 吕丹 魏卿

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51)Int. Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 5/078(2010.01)

权利要求书4页 说明书14页  
序列表37页 附图4页

(54)发明名称

一种多靶点嵌合抗原受体

(57)摘要

本发明公开了一种多靶点嵌合抗原受体。本发明提供了多靶点嵌合抗原受体,由主肽链和辅肽链组成;所述主肽链包括抗原结合域A、辅肽链连接域B、跨膜结构域C和胞内信号传导结构域D;所述辅肽链包括主肽链连接域F;所述抗原结合域A为具有结合抗原功能的多肽;所述辅肽链连接域B和所述主肽链连接域F相互结合;所述跨膜结构域C为任意膜结合蛋白的跨膜域或跨膜蛋白的跨膜域;所述胞内信号传导结构域D包括初级信号传导区。本发明的多靶点嵌合抗原受体可通过其两个抗原结合域与不同的抗原结合,介导特异性的细胞杀伤;并且本发明的多靶点嵌合抗原受体中引入了细胞因子与细胞因子受体复合物,它们可以发挥细胞因子的功能。

1. 一种多靶点嵌合抗原受体,由主肽链和辅肽链组成;  
所述主肽链包括抗原结合域A、辅肽链连接域B、跨膜结构域C和胞内信号传导结构域D;  
所述辅肽链包括主肽链连接域F;  
所述抗原结合域A为具有结合抗原功能的多肽;  
所述辅肽链连接域B和所述主肽链连接域F相互结合;  
所述辅肽链连接域B和所述主肽链连接域F为细胞因子及对应的细胞因子受体的全长多肽或细胞因子及对应的细胞因子受体中能相互结合的部分片段;  
所述跨膜结构域C为任意膜结合蛋白的跨膜区或跨膜蛋白的跨膜区;  
所述胞内信号传导结构域D包括初级信号传导区。
2. 根据权利要求1所述的多靶点嵌合抗原受体,其特征在于:  
所述辅肽链还包括抗原结合域E;  
所述抗原结合域E为具有结合抗原功能的多肽;  
所述抗原结合域E和所述抗原结合域A为相同或不相同。
3. 根据权利要求1或2所述的多靶点嵌合抗原受体,其特征在于:  
所述胞内信号传导结构域D还包括共刺激信号传导区。
4. 根据权利要求2或3所述的多靶点嵌合抗原受体,其特征在于:  
所述具有与抗原结合功能的多肽为:能结合抗原的抗体、能结合抗原的配体或能结合抗原的受体。
5. 根据权利要求4所述的多靶点嵌合抗原受体,其特征在于:  
所述能结合所述抗原的抗体为完整的抗体、抗体的Fab、抗体的Fc、scFv、VHH、抗体的VH、抗体的VL的全长多肽或抗体的VL的部分片段;  
所述能结合抗原的配体或所述能结合抗原的受体为所述配体或受体的全长多肽、部分片段。
6. 根据权利要求2-5中任一所述的多靶点嵌合抗原受体,其特征在于:所述抗原结合域A和所述抗原结合域E能结合的抗原均为细胞表面抗原或MHC分子与多肽复合物。
7. 根据权利要求6所述的多靶点嵌合抗原受体,其特征在于:  
所述抗原为癌症相关抗原;  
或所述抗原为脑癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、肝癌、肾脏癌、淋巴瘤、白血病、肺癌、黑色素瘤、转移性黑色素瘤、间皮瘤、神经母细胞瘤、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、肾癌、皮肤癌、胸腺瘤、肉瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、子宫癌相关抗原或其任何组合。
8. 根据权利要求2-7中任一所述的多靶点嵌合抗原受体,其特征在于:  
所述抗原结合域A和所述抗原结合域E的能结合的抗原为如下:CD123,CD19、CD20、CD22、CD37、ROR1、间皮素、CD33/IL3Ra、c-Met、BCMA、PSMA、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1、MAGEA3、 $\beta$ -人绒毛膜促性腺素、AFP、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶反转录酶、RU1、RU2(AS)、hsp70-2、M-CSF、PSA、PAP、LAGE-1a、p53、Prostein、PSMA、Her2/neu、端粒酶、PCTA-1、MAGE、ELF2M、IGF-I、IGF-II、IGF-I受体、BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、GP100、Mart1、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 $\beta$ -联蛋白、CDK4、Mum-1、p15、p16、43-9F、5T4、791Tgp72、 $\beta$ -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3\CA 27.29\BCAA、CA 195、CA 242、CA-

50、WT1、CD68、FGF-5、G250、EpCAM、MA-50、MG7-Ag、MOV 18、NB/70K、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TAG72、TLP、p53、Ras、TPS、Epstein Barr病毒抗原EBVA和人乳头瘤病毒(HPV)抗原E6和E7或其任意组合；

或所述抗原结合域A和所述抗原结合域E的能结合的抗原为MHC与所述抗原的短肽的复合物。

9. 根据权利要求8所述的多靶点嵌合抗原受体,其特征在于:

所述抗原结合域A和所述抗原结合域E的能结合的抗原为CD19、CD20、BCMA、CD22、CD33/IL3Ra、Her2、PDL1、NY-ESO-1、GP100、Mart1、WT1或其任意组合；

或所述抗原结合域A和所述抗原结合域E的能结合的抗原为MHC与上述抗原短肽的复合物。

10. 根据权利要求1-9中任一所述的多靶点嵌合抗原受体,其特征在于:所述细胞因子及对应的细胞因子受体为 $\gamma$ c细胞因子家族中的细胞因子及对应的细胞因子受体。

11. 根据权利要求10所述的多靶点嵌合抗原受体,其特征在于:所述 $\gamma$ c细胞因子家族中的细胞因子及对应的细胞因子受体为IL15与IL15R $\alpha$ 、IL4与IL4R $\alpha$ 或IL2与IL2R $\alpha$ ;

或所述 $\gamma$ c细胞因子家族中的细胞因子及对应的细胞因子受体为IL15与IL15R $\alpha$ 、IL4与IL4R $\alpha$ 、IL2或IL2R $\alpha$ 具有75%以上同源性的多肽。

12. 根据权利要求1-11中任一所述的多靶点嵌合抗原受体,其特征在于:

所述初级信号传导区为CD3- $\zeta$ 、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的一种蛋白或多种蛋白的任意组合的信号传导区;

或所述初级信号传导区为氨基酸序列为序列6的CD3- $\zeta$ 信号传导区或与所述CD3- $\zeta$ 信号传导区具有75%以上同源性的多肽。

13. 根据权利要求3-12中任一所述的多靶点嵌合抗原受体,其特征在于:

所述共刺激信号传导区为CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和与CD83特异性结合配体的信号传导区的一种或多种的任意组合;

或所述共刺激信号传导区具体为氨基酸序列为序列7的CD28信号传导区或氨基酸序列为序列8的4-1BB信号传导区中的一种或两种的组合;

或所述共刺激信号传导区为与CD28信号传导区、4-1BB信号传导区具有75%以上同源性的多肽的一种或两种的组合。

14. 根据权利要求2-13中任一所述的多靶点嵌合抗原受体,其特征在于:

所述多靶点嵌合抗原受体中,所述抗原结合域A或E均为AntiCD19-ScFv、AntiMHC/GP100-VHH、AntiMHC/WT1-VH、AntiCD20-ScFv、AntiCD22-ScFv或PD1胞外区中的一种或两种的组合。

所述辅肽链连接域为IL15R $\alpha$ sushi、IL4R $\alpha$ -N-FN3、IL15或IL4;

所述跨膜结构域为CD8的跨膜区或CD28的跨膜区;

所述胞内信号传导结构域为CD3 $\zeta$ 信号传导区、由CD3 $\zeta$ 信号传导区与4-1BB信号传导区融合得到的多肽或由CD3 $\zeta$ 信号传导区与CD28信号传导区融合得到的多肽;

所述主肽链连接域为IL15、IL4、IL15R $\alpha$ sushi或IL4R $\alpha$ -N-FN3;

或,所述多靶点嵌合抗原受体中,所述抗原结合域A为antiCD19-ScFv;

所述辅肽链连接域为IL15R $\alpha$ sushi；

所述跨膜结构域为CD8的跨膜区；

所述胞内信号传导结构域为由CD3 $\zeta$ 信号传导区与4-1BB (CD137) 信号传导区融合得到的多肽；

所述抗原结合域E为PD1的胞外区；

所述主肽链连接域为IL15。

15. 根据权利要求14所述的多靶点嵌合抗原受体,其特征在于:

所述AntiCD19-ScFv的氨基酸序列为序列1；

所述AntiMHC/GP100-VHH的氨基酸序列为序列15；

所述AntiMHC/Mart1-VHH的氨基酸序列为序列16；

所述AntiCD20-ScFv的氨基酸序列为序列17；

所述AntiCD22-ScFv的氨基酸序列为序列18；

所述AntiMHC/WT1-VH的氨基酸序列为序列19；所述PD1胞外区序列为序列2；

所述IL15R $\alpha$ sushi的氨基酸序列为序列4；

所述IL4R $\alpha$ -N-FN3的氨基酸序列为序列20；

所述CD8的跨膜区的氨基酸序列为序列5；

所述CD28的跨膜区的氨基酸序列为序列22；

所述CD3 $\zeta$ 信号传导区的氨基酸序列为序列6；

所述4-1BB信号传导区的氨基酸序列为序列8；

所述CD28信号的氨基酸序列为序列7；

所述IL15的氨基酸序列为序列3；

所述IL4的氨基酸序列为序列21。

16. 根据权利要求1-15中任一所述的多靶点嵌合抗原受体,其特征在于:

所述多靶点嵌合抗原受体的主肽链的氨基酸序列为序列9、序列23、序列24、序列25、序列26、序列27、序列28或序列29中的任意一种；

所述受体的辅肽链的氨基酸序列为序列3、序列4、序列10、序列30、序列31、序列32、序列33或序列34中的任意一种。

17. 权利要求1-16中任一所述的多靶点嵌合抗原受体的编码核酸分子,为由编码所述主肽链的核酸分子或编码所述辅肽链的核酸分子组成。

18. 含有权利要求17所述的核酸分子的重组载体、表达盒、重组菌、细胞或重组病毒。

19. 根据权利要求18所述的细胞,其特征在于:所述细胞为原核细胞、酵母细胞或哺乳动物细胞；

或,所述哺乳动物细胞具体为人类细胞；

或,所述人类细胞具体为免疫细胞，

或,所述免疫细胞具体为T细胞或NK细胞。

20. 权利要求1-16中任一所述的多靶点嵌合抗原受体、权利要求17所述的核酸分子或权利要求18所述的重组载体、表达盒、重组菌、细胞或重组病毒在免疫治疗中的应用；

或,权利要求1-16中任一所述的多靶点嵌合抗原受体、权利要求17所述的核酸分子或权利要求18所述的重组载体、表达盒、重组菌、细胞或重组病毒在制备免疫治疗产品中的应

用。

21. 权利要求1-16中任一所述的多靶点嵌合抗原受体、权利要求17所述的核酸分子或权利要求18所述的重组载体、表达盒、重组菌、细胞或重组病毒在免疫细胞培养与增殖中的应用；

或权利要求1-16中任一所述的多靶点嵌合抗原受体、权利要求17所述的核酸分子或权利要求18所述的重组载体、表达盒、重组菌、细胞或重组病毒在制备免疫细胞培养与增殖产品中的应用。

22. 权利要求1-16中任一所述的多靶点嵌合抗原受体、权利要求17所述的核酸分子或权利要求18所述的重组载体、表达盒、重组菌、细胞或重组病毒在免疫检测中的应用；

或权利要求1-16中任一所述的多靶点嵌合抗原受体、权利要求17所述的核酸分子或权利要求18所述的重组载体、表达盒、重组菌、细胞或重组病毒在制备免疫检测产品中的应用；

23. 权利要求1-16中任一所述的多靶点嵌合抗原受体、权利要求17所述的核酸分子或权利要求18所述的重组载体、表达盒、重组菌、转基因细胞或重组病毒在抑制或杀伤表达所述抗原的靶细胞中的应用。

或权利要求1-16中任一所述的多靶点嵌合抗原受体、权利要求17所述的核酸分子或权利要求18所述的重组载体、表达盒、重组菌、转基因细胞或重组病毒在制备抑制或杀伤表达所述抗原的靶细胞产品中的应用。

24. 一种试剂盒,其包括权利要求1-16中任一所述的多靶点嵌合抗原受体、权利要求17所述的核酸分子或权利要求18所述的重组载体、表达盒、重组菌、细胞或重组病毒。

25. 权利要求24所述试剂盒在抑制或杀伤表达所述抗原的靶细胞、免疫治疗、免疫细胞培养与增殖或免疫检测中的应用；

或权利要求24所述试剂盒在制备抑制或杀伤表达所述抗原的靶细胞产品、制备免疫治疗产品、制备免疫细胞培养与增殖产品或制备免疫检测产品中的应用。

## 一种多靶点嵌合抗原受体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种多靶点嵌合抗原受体。

### 背景技术

[0002] 嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)通常是一种主要由抗原结合域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域三部分组成的跨膜融合蛋白(专利CN 105392888A),当免疫细胞(例如T细胞或NK细胞)表达嵌合抗原受体后便被赋予抗原靶向特异性。

[0003] CAR分子的抗原结合域决定了免疫细胞特异的靶向性,最典型的CAR常选用单链可变区抗体(single-chain variable fragment,scFv)作为其抗原结合域,它是由抗体的重链可变区和轻链可变区通过一段连接肽(linker)连接而成,因其结构简单,只有一条肽链,很适合作为融合蛋白的一部分整合至CAR分子中去。当肿瘤抗原本身为受体时,CAR的抗原结合域也可选用它的配体使其对受体具有特异性。

[0004] CAR分子的第二个单元结构是跨膜结构域(transmembrane, TM),它使CAR分子可以跨膜表达于细胞表面,通常CAR分子都是武装在T细胞上进行肿瘤治疗,因此很多CAR的跨膜结构域都选用T细胞表达蛋白的跨膜区,例如CD3 $\zeta$ ,CD4,CD8或CD28,有文献报道,相比选用CD3 $\zeta$ 的跨膜区,选用CD28跨膜区的CAR表达水平更高。另外,在一些CAR分子结构中,在抗原结构域和跨膜结构域之间还可以插入一段间隔/铰链区(spacer/hinge),它可以降低抗原结构与靶向抗原的空间位阻碍,常使用IgG1,IgG4,IgD和CD8的部分肽段。

[0005] 胞内信号传导区是CAR分子中最为重要的一部分,它负责传递胞内信号,使免疫细胞活化增殖,早期设计胞内信号传导结构域仅有一个CD3 $\zeta$ 的刺激信号,又称第1代CAR。与CD3 $\zeta$ 分子相比,只有3个ITAM,且缺乏共刺激分子传导的第2信号,因此第1代CAR只有较弱的抗肿瘤作用,由于缺乏T细胞增殖的第2信号,T细胞在结合肿瘤抗原后很难进一步增殖,因此在临床应用中效果较差。在此基础上,人们将CAR进行了改造,将传递第2信号的CD28分子的活性域整合到CAR中,即第2代CAR。在CAR-T细胞中加入共刺激信号可增强CAR-T细胞在体内的存活时间并使细胞在杀死肿瘤细胞的同时,还能完成自身的扩增,提高了CAR-T细胞抗肿瘤的能力,因此,第2代CAR在临床应用中表现出了良好的抗肿瘤作用,例如,Alvarez-Vallina和Hawkins等人将共刺激分子CD28信号片段插入至CAR分子中,证明可通过相应抗原刺激T细胞产生CD28介导的共刺激信号(Alvarezvallina L,Hawkins R E.European Journal of Immunology,1996,26(10):2304-2309.)。因此,第2代CAR在临床应用中表现出了良好的抗肿瘤作用。然而在缺乏外源性共刺激分子的情况下所有2代CAR均不能产生足够的IL-2促进T细胞增殖,当给予外源性B7共刺激分子时这些转基因CAR-T细胞则可产生IL-2促进其增殖。基于此产生了第3代CAR,其胞内信号区除CD28分子外还有另一共刺激分子,通常为OX40或4-1BB(Till BG,Jensen MC,Wang J,et al.Blood,2012,119(17):3940-3950.),与2代CAR相比,3代CAR具有相当的细胞溶解作用,但其体内扩增能力及产生细胞因子能力更强(Pule MA,Straathof KC,Dotti G,et al.Mol Ther,2005,12(5):933-941.)。但最近研究表明CAR-T细胞的功能活性除与其胞内的信号序列有关外,还与靶细胞提供的

内源性受体有关,3代CARs是否优于第2代CARs有待于临床验证。

[0006] 在B细胞源性肿瘤中嵌合抗原受体T细胞治疗取得了较好的疗效,鼠源CART19(即“CTL019”)的临床结果已经表现出有希望在罹患CLL的患者和儿童ALL中建立完全缓解(Kalos et al.,*Sci Transl Med* 3:95ra73(2011),Porter et al.,*NEJM*365:725-733(2011),Grupp et al.,*NEJM* 368:1509-1518(2013)),开辟了过继治疗癌症的新纪元。

[0007] 作为嵌合抗原受体-免疫细胞疗法T细胞或NK细胞的体外扩增都依赖IL-2的刺激,因此T细胞和NK细胞的培养基中都必须添加一定量的IL-2(Bodnar et al.,2008;Grund et al.,2005).为了简化NK细胞培养,并且鉴于IL-2在临床应用上的毒副作用,有研究者对IL-2依赖的NK-92细胞做基因改造,使之稳定表达IL-2,发现可以免除培养基中IL-2的添加(Shigeki Nagashima,1998;Y.K.TAM,1999)。IL-15与IL-2功能类似,而且共用相同的 $\beta\gamma$ 受体,研究表明IL-2或IL-15对于NK细胞和CD8+T细胞的存活和增殖是必须的(Boyman et al.,2007)。于是研究者构建表达IL-15的NK细胞系,发现表达IL-15的NK-92细胞可以很大程度的减少培养基中IL-2的添加(JIAN ZHANG,2004;Jiang et al.,2008)(专利号:03152968.2)。IL-15与IL-2虽然共用相同的 $\beta\gamma$ 受体,但各自又有特异的 $\alpha$ 受体,研究发现IL-15 $\alpha$ -sushi(IL-15受体 $\alpha$ 的sushi结构域)是IL-15的超级激动剂,可以极大的提高IL-15的功能(Han et al.,2011;Mortier et al.,2006)(专利申请号:201280037114.2,201510358540.1),IL-15与IL-15 $\alpha$ -sushi的复合体可以完全替代IL-2在T/NK细胞中的作用(Peter S.Kiml,2016;Rosario et al.,2016),激活NK/CD8+T细胞并提高其杀伤肿瘤的细胞毒性。因此在CAR分子中融合IL-15与IL-15 $\alpha$ -sushi的复合体或其他有功能的细胞因子与受体复合物是提高细胞免疫治疗疗效的一大方向。

[0008] 同时,通过单一靶点治疗肿瘤,肿瘤细胞会通过下调这种靶点的表达水平,进行免疫逃逸,而通过两种靶点治疗肿瘤可以很大程度上缓解这个问题。另外,如果使嵌合抗原受体中的一个靶点为免疫检查点(Immune checkpoint)相关位点,通过阻断免疫检查点传递的负信号,可以大大提高免疫细胞的活性。例如PD-1(programmed death1)和它的受体PD-L1,PD-L2是T细胞活性的重要调节因子(Okazaki and Honjo,2007)。T细胞表面的PD-1与其他细胞表面的PD-L1/2的结合造成T细胞的抑制,这在人体避免自体免疫病和产生免疫耐受的过程中起到重要作用,但一些病原微生物和癌细胞也能通过上调自身PD-L1/2或T细胞PD-1表达来逃避T细胞的监视,进而造成疾病(Freeman et al.,2000;Keir et al.,2008;Parry et al.,2005)。因此研究者探索用PD-1或PD-L1的抗体去结合抗原,以阻断这一信号通路,结果显示此方法能够显著提高T细胞活性,增强机体对病原微生物和癌症的抵抗能力(Topalian et al.,2012;Yanan Guo1,2016),Liu X等人构建一种所谓的嵌合抗原受体开关系统,通过将PD1分子与CD28共刺激信号,使来自肿瘤细胞及肿瘤微环境中针对PD1的抑制信号转为刺激信号,从而提高修饰T细胞治疗实体瘤的效率(liu X et: *CancerRestriction*76:1578,2016)。已有多项临床试验证明了PD-1/PD-L1抗体对于黑色素瘤(Cho et al.,2016;Hamid et al.,2013)、多发性骨髓瘤(Badros et al.,2015)、白血病(Porkka et al.,2014)等癌症都有很好的治疗效果(专利申请号:200380109929.8,201310258289.2,201180019629.5)。因此通过对CAR分子进行修饰改造,使CAR分子可以识别多个靶点,对细胞免疫治疗具有重要的意义。

## 发明内容

- [0009] 本发明一个目的是提供一种多靶点嵌合抗原受体(图1)。
- [0010] 本发明提供的多靶点嵌合抗原受体,由主肽链和辅肽链组成;
- [0011] 所述主肽链包括抗原结合域A、辅肽链连接域B、跨膜结构域C和胞内信号传导结构域D;
- [0012] 所述辅肽链包括主肽链连接域F;
- [0013] 所述抗原结合域A为具有结合抗原功能的多肽;
- [0014] 所述辅肽链连接域B和所述主肽链连接域F相互结合;
- [0015] 所述辅肽链连接域B和所述主肽链连接域F为细胞因子及对应的细胞因子受体的全长多肽或细胞因子及对应的细胞因子受体中能相互结合的部分片段;
- [0016] 所述跨膜结构域C为任意膜结合蛋白的跨膜区或跨膜蛋白的跨膜区;
- [0017] 所述胞内信号传导结构域D包括初级信号传导区。
- [0018] 上述多靶点嵌合抗原受体中,
- [0019] 所述辅肽链还包括抗原结合域E;
- [0020] 所述抗原结合域E为具有结合抗原功能的多肽;
- [0021] 所述抗原结合域E和所述抗原结合域A为相同或不相同。
- [0022] 上述多靶点嵌合抗原受体中,
- [0023] 所述胞内信号传导结构域D还包括共刺激信号传导区。
- [0024] 上述多靶点嵌合抗原受体中,
- [0025] 所述具有与抗原结合功能的多肽为:能结合抗原的抗体、能结合抗原的配体或能结合抗原的受体。
- [0026] 上述多靶点嵌合抗原受体中,
- [0027] 所述能结合所述抗原的抗体为完整的抗体、抗体的Fab、抗体的Fc、scFv、VHH、抗体的VH、抗体的VL的全长多肽或部分片段;
- [0028] 所述能结合抗原的配体或所述能结合抗原的受体为所述配体或受体的全长多肽、部分片段。
- [0029] 上述多靶点嵌合抗原受体中,
- [0030] 所述抗原结合域A和所述抗原结合域E能结合的抗原均为细胞表面抗原或MHC分子与多肽复合物。
- [0031] 上述多靶点嵌合抗原受体中,
- [0032] 所述抗原为癌症相关抗原;
- [0033] 或在一个实施方式中,所述抗原为脑癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、肝癌、肾脏癌、淋巴瘤、白血病、肺癌、黑色素瘤、转移性黑色素瘤、间皮瘤、神经母细胞瘤、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、肾癌、皮肤癌、胸腺瘤、肉瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、子宫癌相关抗原或其任何组合。
- [0034] 上述多靶点嵌合抗原受体中,
- [0035] 所述抗原结合域A和所述抗原结合域E的能结合的抗原为如下:CD123,CD19、CD20、CD22、CD37、ROR1、间皮素、CD33/IL3Ra、c-Met、BCMA、PSMA、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1、

MAGEA3、 $\beta$ -人绒毛膜促性腺素、AFP、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶反转录酶、RU1、RU2 (AS)、hsp70-2、M-CSF、PSA、PAP、LAGE-1a、p53、Prostein、PSMA、Her2/neu、端粒酶、PCTA-1、MAGE、ELF2M、IGF-I、IGF-II、IGF-I受体、BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、1GH-IGK、MYL-RAR、GP100、Mart1、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 $\beta$ -联蛋白、CDK4、Mum-1、p15、p16、43-9F、5T4、791Tgp72、 $\beta$ -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3、CA 27.29、BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、WT1、CD68、FGF-5、G250、EpCAM、MA-50、MG7-Ag、MOV 18、NB/70K、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TAG72、TLP、p53、Ras、TPS、Epstein Barr病毒抗原EBVA和人乳头瘤病毒 (HPV) 抗原E6和E7或其任意组合。

[0036] 或所述抗原结合域A和所述抗原结合域E的能结合的抗原为MHC与上述抗原的短肽的复合物，其中，上述抗原为所述抗原结合域A和所述抗原结合域E的能结合的抗原。

[0037] 上述多靶点嵌合抗原受体中，

[0038] 所述抗原结合域A和所述抗原结合域E的能结合的抗原为CD19、CD20、BCMA、CD22、CD33/IL3Ra、Her2、PDL1、NY-ESO-1、GP100、Mart1、WT1或其任意组合；

[0039] 或所述抗原结合域A和所述抗原结合域E的能结合的抗原为MHC与上述抗原短肽的复合物。

[0040] 上述多靶点嵌合抗原受体中，

[0041] 所述细胞因子及对应的细胞因子受体为 $\gamma$ c细胞因子家族中的细胞因子及对应的细胞因子受体。

[0042] 上述多靶点嵌合抗原受体中，

[0043] 所述 $\gamma$ c细胞因子家族中的细胞因子及对应的细胞因子受体为IL15与IL15Ra、IL4与IL4Ra或IL2与IL2Ra；

[0044] 或，所述 $\gamma$ c细胞因子家族中的细胞因子及对应的细胞因子受体为IL15与IL15Ra、IL4与IL4Ra、IL2或IL2Ra具有75%以上同源性的多肽。

[0045] 上述多靶点嵌合抗原受体中，

[0046] 所述初级信号传导区为CD3- $\zeta$ 、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的一种蛋白或多种蛋白的任意组合的信号传导区；

[0047] 或所述初级信号传导区为氨基酸序列为序列6的CD3- $\zeta$ 信号传导区或与所述CD3- $\zeta$ 信号传导区具有75%以上同源性的多肽。

[0048] 上述多靶点嵌合抗原受体中，

[0049] 所述共刺激信号传导区为CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和与CD83特异性结合配体的一种或多种的任意组合的信号传导区；

[0050] 或所述共刺激信号传导区具体为CD28信号传导区与4-1BB信号传导区中的一种或两种的组合；

[0051] 或所述共刺激信号传导区为与CD28信号传导区、4-1BB信号传导区具有75%以上同源性的多肽的一种或两种的组合。

[0052] 上述多靶点嵌合抗原受体中，

[0053] 所述多靶点嵌合抗原受体中，所述抗原结合域A或E均为AntiCD19-ScFv、AntiMHC/

GP100-VHH、AntiMHC/WT1-VH、AntiCD20-ScFv、AntiCD22-ScFv或PD1胞外区中的一种或两种的组合。

[0054] 所述辅肽链连接域为IL15R $\alpha$ sushi、IL4R $\alpha$ -N-FN3、IL15或IL4；

[0055] 所述跨膜结构域为CD8的跨膜区或CD28的跨膜区；

[0056] 所述胞内信号传导结构域为由CD3 $\zeta$ 信号传导区与4-1BB信号传导区融合得到的多肽或CD3 $\zeta$ 信号传导区与CD28信号传导区融合得到的多肽；

[0057] 所述主肽链连接域为IL15、IL4、IL15R $\alpha$ sushi或IL4R $\alpha$ -N-FN3；

[0058] 或,所述多靶点嵌合抗原受体中,所述抗原结合域A为antiCD19-ScFv；

[0059] 所述辅肽链连接域为IL15R $\alpha$ sushi；

[0060] 所述跨膜结构域为CD8的跨膜区；

[0061] 所述胞内信号传导结构域为由CD3 $\zeta$ 信号传导区与4-1BB (CD137) 信号传导区融合得到的多肽；

[0062] 所述抗原结合域E为PD1的胞外区；

[0063] 所述主肽链连接域为IL15。

[0064] 辅肽链连接域和主肽链连接域其中最优选的为IL15与IL15R $\alpha$ sushi,当使用IL15与IL15R $\alpha$ sushi作为辅肽链连接域(B)和主肽链连接域(F)时,它们会刺激NK细胞或T细胞增殖,使表达这种多靶向嵌合受体的NK细胞或T细胞

[0065] 共刺激信号传导区特别优选自下述蛋白的信号传导区:CD28与4-1BB (CD137) 中的一种或两种的组合。

[0066] 上述多靶点嵌合抗原受体中,

[0067] 所述AntiCD19-ScFv的氨基酸序列为序列1；

[0068] 所述AntiMHC/GP100-VHH的氨基酸序列为序列15；

[0069] 所述AntiMHC/Mart1-VHH的氨基酸序列为序列16；

[0070] 所述AntiCD20-ScFv的氨基酸序列为序列17；

[0071] 所述AntiCD22-ScFv的氨基酸序列为序列18；

[0072] 所述AntiMHC/WT1-VH的氨基酸序列为序列19；

[0073] 所述PD1胞外区序列为序列为序列2；所述IL15R $\alpha$ sushi的氨基酸序列为序列4；

[0074] 所述IL4R $\alpha$ -N-FN3的氨基酸序列为序列20；

[0075] 所述CD8的跨膜区的氨基酸序列为序列5；

[0076] 所述CD28的跨膜区的氨基酸序列为序列22；

[0077] 所述CD3 $\zeta$ 信号传导区的氨基酸序列为序列6；

[0078] 所述4-1BB信号传导区的氨基酸序列为序列8；

[0079] 所述CD28信号的氨基酸序列为序列7；

[0080] 所述IL15的氨基酸序列为序列3；

[0081] 所述IL4的氨基酸序列为序列21。

[0082] 上述多靶点嵌合抗原受体中,

[0083] 所述多靶点嵌合抗原受体的主肽链的氨基酸序列为序列9、序列23、序列24、序列25、序列26、序列27、序列28或序列29中的任意一种；

[0084] 所述受体的辅肽链的氨基酸序列为序列3、序列4、序列10、序列30、序列31、序列

32、序列33或序列34中的任意一种。

[0085] 本发明另一个目的是提供上述多靶点嵌合抗原受体的编码核酸分子。

[0086] 本发明提供的上述多靶点嵌合抗原受体的编码核酸分子,为由编码所述主肽链的核酸分子或编码所述辅肽链的核酸分子组成。

[0087] 编码受体分子的核酸序列可利用在本领域中已知的重组方法获得,诸如,例如通过从表达基因的细胞中筛选文库,通过从已知包括该基因的载体中得到该基因,或通过利用标准的技术,从包含该基因的细胞和组织中直接分离,或者通过人工合成的方式合成多核苷酸。

[0088] 含有上述的核酸分子的重组载体、表达盒、重组菌、细胞或重组病毒也是本发明保护的范畴。

[0089] 上述重组载体包含上述核酸序列或组合。在一个实施方式中,可连接编码主肽链(X)或辅肽链(Y)的核酸至启动子,并将构建体并入表达载体,实现编码主肽链(X)或辅肽链(Y)的表达。典型的克隆载体包含可用于调节期望核酸序列表达的转录和翻译终止子、初始序列和启动子。例如慢病毒载体是实现基因长期稳定遗传的适宜工具,因为它们可以将基因长期、稳定的整合并且其在子细胞中增殖。慢病毒载体具有超过源自致癌反转录病毒诸如鼠科白血病病毒的载体的额外优点,因为它们可转导非增殖的细胞,诸如肝细胞。它们也具有低免疫原性的额外优点。本发明提供的提供的嵌合抗原受体包含两条肽链,可通过公知的方式使其表达于同一细胞中,包括但不限于共转染分别编码主肽链(X)和辅肽链(Y)的两种表达载体,或将编码主肽链(X)和辅肽链(Y)的核酸序列克隆至含有两套表达框架的的表达载体中,或者将编码主肽链(X)和辅肽链(Y)的核酸序列串联克隆至一个表达框架中,通过在主肽链(X)和辅肽链(Y)的核酸序列中间插入核糖体结合位点,2A信号肽实现两种肽链的共表达。

[0090] 上述细胞中,所述细胞为原核细胞、酵母细胞或哺乳动物细胞;

[0091] 或,所述哺乳动物细胞具体为人类细胞;

[0092] 或,所述人类细胞具体为免疫细胞,

[0093] 或,所述免疫细胞具体为T细胞或NK细胞。

[0094] 上述的多靶点嵌合抗原受体、上述的核酸分子或上述的重组载体、表达盒、重组菌、细胞或重组病毒在免疫治疗中的应用也是本发明保护的范畴;

[0095] 或,上述的多靶点嵌合抗原受体、上述的核酸分子或上述的重组载体、表达盒、重组菌、细胞或重组病毒在制备免疫治疗产品中的应用也是本发明保护的范畴。

[0096] 上述的多靶点嵌合抗原受体、上述的核酸分子或上述的重组载体、表达盒、重组菌、细胞或重组病毒在免疫细胞培养与增殖中的应用也是本发明保护的范畴;

[0097] 或上述的多靶点嵌合抗原受体、上述的核酸分子或上述的重组载体、表达盒、重组菌、细胞或重组病毒在制备免疫细胞培养与增殖产品中的应用也是本发明保护的范畴。

[0098] 上述的多靶点嵌合抗原受体、上述的核酸分子或上述的重组载体、表达盒、重组菌、细胞或重组病毒在免疫检测中的应用也是本发明保护的范畴;

[0099] 或上述的多靶点嵌合抗原受体、上述的核酸分子或上述的重组载体、表达盒、重组菌、细胞或重组病毒在制备免疫检测产品中的应用也是本发明保护的范畴;

[0100] 上述的多靶点嵌合抗原受体、上述的核酸分子或上述的重组载体、表达盒、重组

菌、细胞或重组病毒在抑制或杀伤表达所述抗原的靶细胞中的应用也是本发明保护的范

围；  
[0101] 或上述的多靶点嵌合抗原受体、上述的核酸分子或上述的重组载体、表达盒、重组菌、转基因细胞或重组病毒在制备抑制或杀伤表达所述抗原的靶细胞产品中的应用也是本发明保护的范

围。  
[0102] 上述表达所述抗原的靶细胞中的抗原为多靶点嵌合抗原受体结合的抗原。

[0103] 本发明第三个目的是提供一种试剂盒。

[0104] 本发明提供的试剂盒,其包括上述的多靶点嵌合抗原受体、上述的核酸分子或上述的重组载体、表达盒、重组菌、细胞或重组病毒。

[0105] 上述试剂盒在免疫治疗、免疫细胞培养与增殖或免疫检测中的应用也是本发明保护的范

围；  
[0106] 或上述试剂盒在制备免疫治疗产品、制备免疫细胞培养与增殖产品或免疫检测产

品中的应用也是本发明保护的范

围。  
[0107] 本发明中所述IL15R $\alpha$ sushi为IL15受体的 $\alpha$ 链的sushi片段,简称IL15R $\alpha$ sushi,具有结合IL15的功能。

[0108] 本发明中所述IL4R $\alpha$ -N-FN3为IL4受体 $\alpha$ 链中的片段,具有结合IL4的功能。

[0109] 本发明的主肽链的抗原结合域(A)和辅肽链连接域(E)具有结合抗原的功能。其抗原结合域所结合的抗原是由引起免疫应答特别是T-细胞介导的免疫应答的肿瘤细胞产生的蛋白质。本发明的抗原结合结构域的选择将取决于待治疗疾病的具体类型。肿瘤抗原在本领域中是公知的:

[0110] 在一个实施方式中,本发明提及的肿瘤抗原包括例如神经胶质瘤相关的抗原、癌胚抗原(CEA)、 $\beta$ -人绒毛膜促性腺素、 $\alpha$ -胎蛋白(AFP)、凝集素-反应的AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶反转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧酸酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶、前列腺-特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、prostein、PSMA、Her2/neu、存活素和端粒酶、前列腺-癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、MAGE、ELF2M、中性白细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF)-I、IGF-II、IGF-I受体和间皮素。

[0111] 在一个实施方式中,肿瘤抗原包括与恶性肿瘤相关的一个或多个抗原癌症表位。恶性肿瘤表达可用作免疫攻击的靶抗原的许多蛋白。这些分子包括但不限于组织-特异性抗原诸如MART-1、黑素瘤中的酪氨酸酶和GP 100、和前列腺癌中的前列腺酸性磷酸酶(PAP)和前列腺-特异性抗原(PSA)。其他靶分子属于转化相关分子诸如致癌基因HER-2/Neu/ErbB-2的组。而另一组的靶抗原为胎性癌抗原诸如癌胚抗原(CEA)。在B-细胞淋巴瘤中,肿瘤-特异性个体基因型免疫球蛋白构成对个体肿瘤唯一的真正的肿瘤-特异性免疫球蛋白抗原。B-细胞分化抗原诸如CD19、CD20和CD37是B-细胞淋巴瘤中靶抗原的其他候选物。这些抗原中的一些(CEA、HER-2、CD19、CD20、个体基因型)已经有限成功地用作利用单克隆抗体的被动免疫疗法的靶标。

[0112] 在一个实施方式中本发明中提及的肿瘤抗原也可为肿瘤-特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)。TSA为对肿瘤细胞唯一的,并不发生在身体的其他细胞上。TAA相关的抗原不是对肿瘤细胞唯一的,并且相反,其在不能诱导对抗原的免疫耐受状态的病症下,也在正常细胞上进行表达。肿瘤上的抗原表达可在使免疫系统能够响应抗原的病症下发生。TAA

可为在胚胎发育期间,当免疫系统不成熟并且不能响应时,在正常细胞上表达的抗原,或它们可为在正常细胞上以极低的水平正常存在的抗原,但其在肿瘤细胞上以更高的水平进行表达。

[0113] TSA或TAA抗原的非限制性例子包括以下:分化抗原诸如MART-1/MelanA (MART-1)、gp100 (Pmel 17)、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2和肿瘤-特异性多谱系抗原诸如MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15;过表达的胚胎抗原诸如CEA;过表达的致癌基因和突变的肿瘤-抑制基因诸如p53、Ras、HER-2/neu;由染色体易位产生的独特的肿瘤抗原诸如BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR;和病毒抗原,诸如Epstein Barr病毒抗原EBVA和人乳头瘤病毒 (HPV) 抗原E6和E7。其他大的、基于蛋白的抗原包括TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 $\beta$ -联蛋白、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、 $\alpha$ -胎蛋白、 $\beta$ -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3\CA 27.29\BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68\P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733\EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV 18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90\Mac-2结合蛋白\亲环蛋白C相关蛋白、TAAL6、TAG72、TLP和TPS。

[0114] 在一个实施方式中本发明中提及的肿瘤抗原可以是MHC与上述抗原肽段的复合物。包括但不限于HLA-GP100复合物,HLA-Mart1复合物,HLA-WT1复合物。

[0115] 在一个实施方式中,其中所述主肽链中的抗原结合域(A)或辅肽链中的抗原结合域(E)是可以与抗原结合的抗体、配体、受体、具有抗原结合能力的多肽或其任意组合。

[0116] 抗体可以是Ig,Fab,scFv的完整肽链或部分肽段或其任意组合。配体或受体可以是其完整肽链、部分肽段或其任意组合。

[0117] 其中所述辅肽链连接域(B)和主肽链连接域(F)是一对具有相互结合功能的肽段。其中具有相互结合功能的肽段可以是一对可以相互结合的受体与配体或是一对可以相互结合的抗体与抗原。相互结合的受体与配体包括但不限于IL15与IL15R $\alpha$ ,IL4与IL4R,IL2与IL2R $\alpha$ ,CD16与IgG FC,CD32与IgG FC,CD64a与IgG Fc。

[0118] 其中所述跨膜结构域(C)可来源于任何膜结合蛋白或跨膜蛋白的跨膜区。对于跨膜结构域,在一些例子中,可选择跨膜结构域,或通过氨基酸置换进行修饰,以避免将这样的结构域结合至相同或不同的表面膜蛋白的跨膜结构域,从而减小空间位阻。跨膜结构域可源于天然来源或合成来源。在天然来源中,该结构域可源于任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。具体用于本发明的跨膜区可源于包括但不限于T-细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链、CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、ICOS。

[0119] 其中胞内信号传导结构域(D)包含信号传导区,还可以包含共刺激信号传导区或其组合。胞内信号传导结构域指的是转导效应子功能信号并指导细胞实施专有功能的蛋白部分。例如,T细胞的效应子功能可为包括细胞因子分泌的细胞溶解活性或辅助活性。可使用整个细胞内信号传导结构域,但在很多例子中,不必使用整个链。使用细胞内信号传导结构域的截短部分可代替完整的链,只要它具备转导效应子功能信号。

[0120] 初级胞浆信号传导序列以刺激方式或以抑制方式调节免疫细胞的初级活化。以刺激方式起作用的初级胞浆信号传导序列可包含信号传导基序,其已知为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM。

[0121] 包含在本发明中具有具体用途的初级胞浆信号传导序列的ITAM的例子包括源于TCR $\zeta$ 、Fc $\epsilon$ RI  $\gamma$ 、FcR  $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d或其组合。特别优选地,本发明的CAR中的胞浆信号传导分子包括源于CD3 $\zeta$ 的胞浆信号传导序列。

[0122] 共刺激信号传导区指的是包括共刺激分子的细胞内结构域部分。共刺激分子是淋巴细胞对抗原的有效应答所需的细胞表面分子,而不是抗原受体或它们的配体。这种分子的例子包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和与CD83特异性结合的配体等等。因此,尽管本发明主要以4-1BB和CD28作为共刺激信号传导元件示例,但其他共刺激元件也位于本发明的范围内。

[0123] 本发明的多靶点嵌合抗原受体的胞浆信号传导部分内的胞浆信号传导序列可以随机或以规定的顺序相互连接。

[0124] 在一个实施方式中,胞内信号传导结构域包括CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域。在另一个实施方式中,胞内信号传导结构域包括CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域和4-1BB的信号传导结构域。在另一个实施方式中,胞内信号传导结构域是包括CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域和CD28的信号传导结构域。

[0125] 本发明的多靶点嵌合抗原受体中的各个模块之间可以使用短的寡肽或多肽作为连接肽,这并不会影响多靶点嵌合抗原受体的功能,连接肽优选长度在2和10个氨基酸之间,连接肽的氨基酸优选为甘氨酸与丝氨酸。

[0126] 本发明的实验证明,本发明的多靶点嵌合抗原受体可通过其两个抗原结合域与不同的抗原结合,介导特异性的细胞杀伤,可以提高治疗靶向的精确性,并可以缓解因单一靶点表达下调而造成的疾病复发问题;本发明的多靶点嵌合抗原受体可通过其两个抗原结合域与不同的抗原结合,若其中一个抗原结合域所结合的抗原为免疫筛查点相关抗原,可以将阻断免疫抑制信号,提高杀伤肿瘤的能力;本发明的多靶点嵌合抗原受体中引入了细胞因子与细胞因子受体复合物,它们可以发挥细胞因子的功能,例如引入IL-15与IL-15 $\alpha$ -sushi的复合体可刺激T与NK细胞增殖,使其免除对细胞因子的依赖而活化。

## 附图说明

[0127] 图1为多靶点嵌合抗原受体示意图。多靶点嵌合抗原受体由主肽链和辅肽链组成;主肽链包括抗原结合域A、辅肽链连接域B、跨膜结构域C和胞内信号传导结构域D;辅肽链包括主肽链连接域F,还可以包括抗原结合域E。

[0128] 图2为RaceCar-1表达盒示意图。RaceCar-1表达盒由启动子和RaceCar-1的编码基因组成。

[0129] 图3为其他RaceCar表达盒示意图。其他RaceCar表达盒由启动子和RaceCar的编码基因组成。

[0130] 图4为流式细胞仪验证RaceCar-1功能。其中图4a与图4b分别为未转染293T阴性对照与转染pFUGW-RaceCar-1的293T实验组,横坐标代表antiCD19水平,图4c与图4d分别为未转染293T阴性对照与转染pFUGW-RaceCar-1的293T实验组,横坐标代表PD1水平。从图中可见转染pFUGW-RaceCar-1的293T表面可检测到anti-CD19-ScFv和PD1的表达,证明RaceCar-1在293T细胞表面表达,并且其中的anti-CD19-ScFv和PD1都具有免疫学活性。

[0131] 图5为Western blot验证RaceCar-1表达。第一泳道为实验组转染pFUGW-RaceCar-1的293T细胞,第二泳道为阴性对照,即没有转染的293T细胞,下图条带为 $\beta$ -actin内参,可见上图第一泳道相比第二泳道多出一条特异性条带,证明PD1表达,表明RaceCar-1表达。

[0132] 图6为RaceCar-1-NK92细胞靶向杀伤能力验证。图中横坐标为效应细胞与靶细胞比例,纵坐标为杀伤效率。图中显示RaceCar-1-NK-92可以杀伤3m-CD19-luc细胞,证明靶向CD19和PD-L1的多靶点嵌合抗原受体RaceCar-1在NK-92细胞中表达,并具有生物功能。RaceCar-1-NK-92的杀伤能力高于NK-92。加入CD19抗体的实验组,RaceCar-1-NK-92杀伤能力下降,这是因为CD19抗体与靶细胞结合阻断了效应细胞与靶细胞的结合,从而抑制了RaceCar-1-NK-92对靶细胞的杀伤能力,证明RaceCar-1-NK-92对3m-CD19-luc细胞的杀伤具有CD19特异性。

[0133] 图7为RaceCar-1-T细胞与Car-1-T细胞杀伤靶细胞能力比较。图中横坐标为效应细胞与靶细胞比例,纵坐标为杀伤效率。图中显示RaceCar-1-T细胞可以杀伤k562-cd19-luc细胞,证明RaceCar-1在T细胞中表达,并具有生物功能;并且RaceCar-1-T细胞的杀伤能力高于普通的Car-1-T。

## 具体实施方式

[0134] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0135] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0136] 实施例1、多靶点嵌合抗原受体结构与表达载体构建

[0137] 1、多靶点嵌合抗原受体 (RaceCar) 是由主肽链X和辅肽链Y聚合得到蛋白;

[0138] 主肽链(X)包括抗原结合域(A)、辅肽链连接域(B)、跨膜结构域(C)和胞内信号传导结构域(D),辅肽链(Y)包括抗原结合域(E)和主肽链连接域(F);辅肽链连接域(B)和主肽链连接域(F)互补结合使主肽链X和辅肽链Y聚合形成多靶点嵌合抗原受体(RaceCar)。

[0139] 靶向CD19与PD-L1阳性细胞的多靶点嵌合抗原受体(RaceCar-1)由主肽链X1和辅肽链Y1聚合得到蛋白;

[0140] RaceCar-1中,主肽链X1的抗原结合域(A)选用抗CD19的ScFv(序列1)、辅肽链连接域(B)选用IL15R $\alpha$ sushi(序列4)、跨膜结构域(C)选用CD8的跨膜区(序列5)和胞内信号传导结构域(D)选用41BB信号传导区(序列8)与CD3 $\zeta$ 信号传导区(序列6)串联,辅肽链Y1的抗原结合域(E)选用PDL1的受体PD1的胞外区(序列2),主肽链连接域(F)选用IL15(序列3),最终的到主肽链X1(氨基酸序列为序列9)和辅肽链Y1(氨基酸序列为序列10)。

[0141] 2、在主肽链X1氨基酸序列N端前添加分泌信号肽(氨基酸序列为:序列11),人工合成其编码核酸DNA-X1(序列13);在辅肽链Y1氨基酸序列N端前N添加2A信号肽(氨基酸序列为:序列12),人工合成其编码核酸DNA-X2(序列14)。

[0142] 3、在DNA-X1序列5'端添加BamHI位点,3'端添加HindIII位点,使用BamHI和HindIII切割DNA-X1,得到其核酸片段;在DNA-X2序列5'端添加HindIII位点,3'端添加EcoRI位点,使用HindIII和EcoRI切割DNA-X2,得到其核酸片段。

[0143] 4、使用BamHI和EcoRI切割载体pFUGW(addgene产品)将3中得到的两个核酸片段连接至载体中,转化大肠杆菌,挑取单克隆进行PCR鉴定,最后得到重组载体pFUGW-RaceCar-1,重组载体pFUGW-RaceCar-1为表达RaceCar1的编码核酸(该编码核酸由序列13、AAGCTT和

序列14组成,且序列13的最后一位核苷酸和AAGCTT的第一个碱基相邻,序列14第一位核苷酸与AAGCTT的最后一个碱基相邻,AAGCTT为HindIII酶切位点)替换pFUGW载体的BamHI和EcoRI酶切位点间片段,得到的重组载体,RaceCar-1的编码核酸与pFUGW载体中BamHI前的启动子共同组成了RaceCar-1表达盒(图2)。

[0144] 5、用相同方式设计其他多靶点嵌合抗原受体如表1中所示:

[0145] 表1为多靶向嵌合抗原受体(Racecar)组成结构

[0146]

结构名称	抗原结合域 A	辅肽链结合域 B	跨膜结构域 C	胞内信号传导域 D	抗原结合域 E	主肽链结合域 F
RaceCar-1	AntiCD19-ScFv	IL15R $\alpha$ sushi	CD8 跨膜区	4:BB+CD3 $\zeta$	PD1 胞外区	IL15
RaceCar-2	AntiMHC/GP100-VHH	IL15R $\alpha$ sushi	CD8 跨膜区	4:BB+CD3 $\zeta$	PD1 胞外区	IL15
RaceCar-3	AntiMHC/GP100-VHH	IL15R $\alpha$ sushi	CD8 跨膜区	4:BB+CD3 $\zeta$	AntiMHC/Mart1-VHH	IL15
RaceCar-4	AntiCD19-ScFv	IL15R $\alpha$ sushi	CD8 跨膜区	4:BB+CD3 $\zeta$	AntiCD20-ScFv	IL15
RaceCar-5	AntiCD19-ScFv	IL15R $\alpha$ sushi	CD8 跨膜区	4:BB+CD3 $\zeta$	AntiCD22-ScFv	IL15
RaceCar-6	AntiMHC/WT1-VH	IL15R $\alpha$ sushi	CD8 跨膜区	4:BB+CD3 $\zeta$	PD1 胞外区	IL15
RaceCar-7	AntiMHC/WT1-VH	IL15R $\alpha$ sushi	CD8 跨膜区	CD28+CD3 $\zeta$	PD1 胞外区	IL15
RaceCar-8	AntiMHC/WT1-VH	IL4R $\alpha$ -N-FN3	CD8 跨膜区	4:BB+CD3 $\zeta$	PD1 胞外区	IL4
RaceCar-9	AntiMHC/WT1-VH	IL15R $\alpha$ sushi	CD28 跨膜区	4:BB+CD3 $\zeta$	PD1 胞外区	IL15
RaceCar-10	PD1 胞外区	IL15R $\alpha$ sushi	CD8 跨膜区	4:BB+CD3 $\zeta$	AntiMHC/WT1-VH	IL15
RaceCar-11	AntiMHC/WT1-VH	IL15R $\alpha$ sushi	CD8 跨膜区	4:BB+CD3 $\zeta$	—	IL15
RaceCar-12	AntiMHC/WT1-VH	IL15	CD8 跨膜区	4:BB+CD3 $\zeta$	—	IL15R $\alpha$ sushi
RaceCar-13	AntiMHC/WT1-VH	IL15	CD8 跨膜区	4:BB+CD3 $\zeta$	PD1 胞外区	IL15R $\alpha$ sushi
RaceCar-14	AntiMHC/WT1-VH	IL15R $\alpha$ sushi	CD8 跨膜区	4:BB+CD3 $\zeta$	AntiMHC/WT1-VH	IL15

[0147] 表中,AntiMHC/GP100-VHH氨基酸序列为序列15,AntiMHC/Mart1-VH氨基酸序列为序列16,AntiCD20-ScFv氨基酸序列为序列17,AntiCD22-ScFv氨基酸序列为序列18,AntiMHC/WT1-VH氨基酸序列为序列19,IL4R $\alpha$ -N-FN3序列为序列20,IL4序列为序列21,CD28跨膜区序列为序列22。

[0148] 由它们组成了主肽链X2(序列23),X3(序列24),X4(序列25),X5(序列26),X6(序列27),X7(序列28),X8(序列29),辅肽链Y2(序列30),Y3(序列31),Y4(序列32),Y5(序列33),Y6(为IL15,序列3),Y7(为IL15R $\alpha$ sushi,序列4),Y8(为序列34),Y9(为序列39)。

[0149] 其中:

[0150] RaceCar-2由X2和Y1组成;

[0151] RaceCar-3由X2和Y2组成;

[0152] RaceCar-4由X1和Y3组成;

[0153] RaceCar-5由X1和Y4组成;

[0154] RaceCar-6由X3和Y1组成;

[0155] RaceCar-7由X4和Y1组成;

[0156] RaceCar-8由X5和Y9成;

[0157] RaceCar-9由X6和Y1组成;

[0158] RaceCar-10由X7和Y5组成;

[0159] RaceCar-11由X3和Y6组成;

[0160] RaceCar-12由X8和Y7组成;

[0161] RaceCar-13由X8和Y8组成;

[0162] RaceCar-14由X3和Y5组成。

[0163] 用相同方式获得了其他多靶向嵌合抗原受体的编码核酸,并构建了重组载体,重组载体中含有其他多靶点嵌合抗原受体RaceCar的表达盒(图3)。

[0164] 实施例2、RaceCar的293T细胞表达流式验证

[0165] 1、将Lenti-X-293T细胞(Clontech,货号:632180,下简称293T)  $1.2 \times 10^6$ 铺中于6孔板内,37°C,5%CO<sub>2</sub>过夜培养。

[0166] 2、将实施例1中构建的载体pFUGW-RaceCar-1使用lipofectamine3000转染于上述1得到的细胞中,37°C,5%CO<sub>2</sub>培养48h。

[0167] 3、将转染pFUGW-RaceCar-1的293T细胞使用胰蛋白酶消化后重悬于PBS中,控制细胞密度为在  $1 \times 10^6$ /mL。

[0168] 4、向分别向200uL3处理后的细胞中加入1.5uL APC Mouse anti-Human CD279 (BD,货号558694)和FITC标记的CD19-FC融合蛋白(CD19-FC融合蛋白核酸序列为序列35),使用FITC冰浴30min后脱盐进行标记,293F表达),冰上孵浴30min。离心去上清,使用等量PBS重悬细胞。

[0169] 5、进行流式分析(见图4),图4a与图4b分别为未转染293T阴性对照与转染pFUGW-RaceCar-1的293T实验组,横坐标代表antiCD19水平,图4c与图4d分别为未转染293T阴性对照与转染pFUGW-RaceCar-1的293T实验组,横坐标代表PD1水平。从图中可见转染pFUGW-RaceCar-1的293T表面可检测到anti-CD19-ScFv和PD1的表达,证明RaceCar-1在293T细胞表面表达,并且其中的anti-CD19-ScFv和PD1都具有免疫学活性。

[0170] 6、使用相同的方法,选用不同的检测抗体或检测蛋白,检测其他的RaceCar,其他的RaceCar均可用流式证明其表达。

[0171] 实施例3、RaceCar在293T中表达的Western blot验证

[0172] 1、取  $5 \times 10^6$  实施例2中转染pFUGW-RaceCar-1的293T细胞,1500R,10min离心弃上清。

[0173] 2、加入200uL Ripa细胞裂解液(碧云天,货号:P0013B)冰上静止30min。8000g,5min离心取上清20uL,加入5X蛋白电泳buffer,95°C金属浴5min,制备蛋白电泳样品。

[0174] 3、进行SDS-PAGE,电泳完成后,切去浓缩胶部分,100V,200mA,1h进行转膜。

[0175] 4、将转移好蛋白的PVDF膜放置于5%的脱脂乳/PBS溶液中,过夜封闭。PBST脱色摇床清洗3次,每次15min。

[0176] 5、将PVDF膜放置入1uL抗体/mL1%脱脂乳/PBS溶液,其中抗体为PD1/PDCD1/CD279抗体(义翘神州,货号:10377-T48-50),脱色摇床孵育1h,PBST脱色摇床清洗3次,每次15min。

[0177] 6、将PVDF膜放置入1uL抗体/mL1%脱脂乳/PBS溶液,其中抗体为Goat anti-rat IgG (H+L)-HRP(三箭生物,货号:LK2009),脱色摇床孵育1h,PBST脱色摇床清洗3次,每次15min。

[0178] 7、使用W-TMB试剂盒(上海生工,货号:C510025-0005)显色,结果见图5,第一泳道为实验组转染pFUGW-RaceCar-1的293T细胞,第二泳道为阴性对照,即没有转染的293T细胞,下图条带为β-actin内参,可见上图第一泳道相比第二泳道多出一条特异性条带,证明PD1表达,表明RaceCar-1表达。

[0179] 8、用相同的方法,使用对应的抗体通过Western blot检测到了其他RaceCar在293T中的表达。

[0180] 实施例4、pFUGW-RaceCar-1载体慢病毒包装与细胞感染

[0181] 1、293T过夜培养至70%-80%密度,用于转染;将pCMV-VSV-G、pCMV- $\Delta$ R 8.91 (pCMV-VSV-G与pCMV- $\Delta$ R 8.91为addgene产品,用于提供病毒外壳蛋白。)和实施例1制备的pFUGW-RaceCar-1按照各质粒质量比pCMV-VSV-G:pCMV- $\Delta$ R 8.91:实施例1制备的pFUGW-RaceCar-1)=1:3:4,共同混合得到共转染质粒40ug;

[0182] 2、取两个15ml离心管分别标记管1、管2,管1加入上述1的共转染质粒并补充无血清DMEM至1.5ml,管2加入1mg/mL的PEI水溶液(PEI为sigma产品货号GF70215825)120ul并补充无血清DMEM至1.5ml,分别充分混匀后将管1漩涡振荡,同时将管2中PEI逐滴加入管1中,得到质粒-PEI混合液,将质粒-PEI混合液在室温静置30min;加入用于转染的293T中,切勿将细胞悬起,将转染后的细胞置于37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub>孵箱中过夜培养24h。之后将细胞培养液弃去,重新加入20ml含10%FBS DMEM,并加入丁酸钠至终浓度10mM,37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub>孵箱过夜培养48小时。

[0183] 3、收集上述2得到的细胞培养上清,4000g/min,离心15min,0.45um滤器过滤上清,得到病毒原液 $1 \times 10^6$ TU/mL。病毒原液添加1/3体积的质量百分含量为40%PEG水溶液,混匀后4 $^{\circ}$ C放置过夜。第二天离心,4 $^{\circ}$ C,1800g,45分钟,弃上清后用病毒原液1/10体积的培养基(后期感染T细胞使用X-vivo15,感染NK-92细胞使用MEM-Alpha)重悬病毒沉淀,得到10倍浓缩的病毒悬液。

[0184] 4、将取 $3 \times 10^5$ NK-92(ATCC,CRL-2407)和 $1 \times 10^6$ 的T细胞(T细胞为从健康献血者抽取的外周血中梯度离心分离出T细胞后,培养而来)分别用 $1 \times 10^7$ 的病毒重悬感染并添加8ug/ml polybrane(Sigma,H9268-5G),转移到24孔板一个孔中,32 $^{\circ}$ C,1500R离心45分钟后转移到二氧化碳培养箱培养,3小时后离心去上清,换添加100U/ml IL-2的培养基于CO<sub>2</sub>培养箱中培养,用于实验,得到RaceCar-1-NK-92和RaceCar-1-T。

[0185] 5、用相同的方法获得了其他RaceCar-NK92细胞与RaceCar-T细胞。

[0186] 实施例5、RaceCar在NK-92中的表达及RaceCar-NK-92靶向杀伤能力验证

[0187] 1、使用细胞系3m-CD19-luc(向Malme-3m细胞系(ATCC,HTB-64)基因组中整合编码表达CD19抗原(序列36)和luciferase的核酸(序列37),使其表达CD19抗原和luciferase,得到细胞系3m-CD19-luc)做靶细胞,分为如下3个实验组:第一组使用实施例4制备的RaceCar-1-NK-92作为效应细胞,第二组使用普通的NK92作为效应细胞,第三组使用RaceCar-1-NK-92作为效应细胞,并在体系中加入CD19抗体(mouse anti-Human CD19Biotin标记抗体,北京博奥龙免疫技术有限公司,货号:BDLS-1968-100)。阴性对照为不添加效应细胞的体系,进行细胞杀伤。

[0188] 2、效应细胞分别以个数比为10:1,5:1,1:1的比例与 $1 \times 10^4$ 靶细胞在96孔板100ul体系中混合,37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱孵育24h后向细胞中加入50ul 1% Triton裂解液+1ul底物(300ug/mL Luc水溶液与2mg/mL ATP水溶液按照体积比为3:1混和),裂解5min,检测luciferase荧光值,计算杀伤效率={ (阴性对照荧光值-实验组荧光值)/阴性对照荧光值} \*100%。

[0189] 3、结果如图6所示,显示RaceCar-1-NK-92可以杀伤3m-CD19-luc细胞,证明靶向CD19和PD-L1的多靶点嵌合抗原受体RaceCar-1在NK-92细胞中表达,并具有生物功能。RaceCar-1-NK-92的杀伤能力高于NK-92。加入CD19抗体的实验组,RaceCar-1-NK-92杀伤能力下降,这是因为CD19抗体与靶细胞结合阻断了效应细胞与靶细胞的结合,从而抑制了

RaceCar-1-NK-92对靶细胞的杀伤能力,证明RaceCar-1-NK-92对3m-CD19-luc细胞的杀伤具有CD19特异性。

[0190] 实施例6、RaceCar在T细胞中的表达及RaceCar-T与Car-T靶向杀伤能力的比较

[0191] 1、使用细胞系k562-cd19-luc(向k562细胞系(ATCC产品)基因组中整合编码表达CD19抗原(序列36)和luciferase的核酸(序列37),使其表达CD19抗原和luciferase,得到细胞系3m-CD19-luc)作为靶细胞。一组效应细胞使用实施例4中得到的RaceCar-1-T,另一组效应细胞使用Car-1-T细胞(将antiCD19ScFv-CD8TM-41BB-CD3 $\zeta$ 嵌合抗原受体(氨基酸序列为序列38)按照上述病毒转染的方式转入T细胞中得到的细胞,表达普通的antiCD19ScFv-CD8TM-41BB-CD3 $\zeta$ 嵌合抗原受体),以不加入效应细胞为阴性对照,进行细胞杀伤实验。

[0192] 2、k562-cd19-luc细胞铺板 $1 \times 10^4$ 个/孔,同时按照效应细胞与靶细胞个数比为5:1、10:1、20:1比例分别加入RaceCar-1-T细胞和Car-1-T。24h后向细胞中加入50 $\mu$ l 1% Triton裂解液+1 $\mu$ l底物(300ug/mL Luc水溶液与2mg/mL ATP水溶液按照体积比为3:1混和),裂解5min,利用酶标仪检测luciferase发光,计算杀伤效率 = {(阴性对照荧光值-实验组荧光值)/阴性对照荧光值} \* 100%。

[0193] 结果如图7所示,图中横坐标为效应细胞与靶细胞比例,纵坐标为杀伤效率,可以看到RaceCar-1-T细胞可以杀伤k562-cd19-luc细胞,证明RaceCar-1在T细胞中表达,并具有生物功能;并且RaceCar-1-T细胞的杀伤能力高于普通的Car-1-T。

[0194] 实施例7、其他RaceCar-T/NK的细胞杀伤

[0195] 用与实施例4或5相同的方式,选择表达对应抗原的细胞作为靶细胞,证明其他RaceCar-T/NK也具有杀伤对应靶细胞的能力;加入对应的阻断剂(可以是对应抗原的抗体,也可以是对应抗原的天然配体或受体)后,RaceCar-T/NK的杀伤能力有所下降,证明RaceCar-T/NK的杀伤能力具有靶向性;RaceCar-T/NK相比对应的Car-T/NK杀伤细胞的能力要高。

[0196] 实施例8、RaceCar对免疫细胞增殖的影响

[0197] 1、将转染RaceCar基因的T细胞或转染RaceCar基因的NK92细胞,与未处理的T细胞或NK92细胞在不含细胞因子的条件下进行培养。

[0198] 2、结果表明转染RaceCar基因的T细胞或NK92细胞存活时间要长于未处理的T细胞或NK92细胞,有些甚至可以不依赖外源细胞因子长期存活。

## 序列表

&lt;110&gt;天津天锐生物科技有限公司

&lt;120&gt; 一种多靶点嵌合抗原受体

&lt;160&gt; 39

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 245

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt;人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 1

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

Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr  
 210 215 220  
 Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
 225 230 235 240  
 Val Thr Val Ser Ser  
 245

<210> 2

<211> 150

<212> PRT

<220>

<223>

<400> 2

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

<210> 3

<211> 114

<212> PRT

<220>

<223>

<400> 3

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile

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

Thr Ser

<210> 4

<211> 72

<212> PRT

<220>

<223>

<400> 4

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

<210> 5

<211> 69

<212> PRT

<220>

<223>

<400> 5

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

	20		25		30
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile					
	35		40		45
Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val					
	50		55		60
Ile Thr Leu Tyr Cys					
65					
<210> 6					
<211> 112					
<212> PRT					
<220>					
<223>					
<400> 6					
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly					
1	5		10		15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr					
	20		25		30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys					
	35		40		45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys					
	50		55		60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg					
65	70		75		80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala					
	85		90		95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg					
	100		105		110
<210> 7					
<211> 41					
<212> PRT					
<220>					
<223>					
<400> 7					
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr					
1	5		10		15
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro					
	20		25		30
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser					
	35		40		



	165		170		175
Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu					
	180		185		190
Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn					
	195		200		205
Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr					
	210		215		220
Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser					
225		230		235	240
Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro					
	245		250		255
Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr					
	260		265		270
Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly					
	275		280		285
Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala					
	290		295		300
His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp Pro Ala Leu Val					
305		310		315	320
His Gln Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr					
	325		330		335
Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala					
	340		345		350
Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile					
	355		360		365
Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser					
	370		375		380
Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr					
385		390		395	400
Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu					
	405		410		415
Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu					
	420		425		430
Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln					
	435		440		445
Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu					
	450		455		460
Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly					
465		470		475	480



	180		185		190
Thr	Ala Met Lys Cys Phe Leu	Leu	Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu	Glu	
	195		200		205
Ser	Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu				
	210		215		220
Ala	Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys				
225		230		235	240
Lys	Glu Cys Glu Glu Leu Glu Lys Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln				
		245		250	255
Ser	Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser				
	260		265		

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<220>

<223>

<400> 11

Met	Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu
1	5 10 15
His	Ala Ala Arg Pro
	20

<210> 12

<211> 22

<212> PRT

<220>

<223>

<400> 12

Gly	Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
1	5 10 15
Glu	Glu Asn Pro Gly Pro
	20

<210> 13

<211> 1698

<212> DNA

<220>

<223>

<400> 13

atggccttac cagtgaccgc cttgetcctg ccgetggcct tgctgctcca cgccgccagg 60  
ccggatatcc agatgacaca gactacatcc tcctgtctg cctctctggg agacagagtc 120

accatcagtt gcagggcaag tcaggacatt agtaaatatt taaattgta tcagcagaaa 180  
 ccagatggaa ctgttaaact cctgatctac catacatcaa gattacactc aggagtccca 240  
 tcaaggttca gtggcagtgg gtctggaaca gattattctc tcaccattag caacctggag 300  
 caagaagata ttgccactta cttttgccaa cagggttaata cgcttccgta cacgttcgga 360  
 ggggggacca agctggagat cacaggctcc acctctggct ccggcaagcc cggatctggc 420  
 gagggctcca ccaagggcga ggtgaaactg caggagtcag gacctggcct gttggcgccc 480  
 tcacagagcc tgtccgtcac atgcaactgtc tcaggggtct cattaccgga ctatgggtga 540  
 agctggattc gccagcctcc acgaaagggt ctggagtggc tgggagtaat atggggtagt 600  
 gaaaccacat actataatte agctctcaaa tccagactga ccatcatcaa ggacaactcc 660  
 aagagccaag ttttcttaaa aatgaacagt ctgcaaaactg atgacacagc catttactac 720  
 tgtgccaaac attattacta cggtggttagc tatgctatgg actactgggg ccaaggaacc 780  
 tcagtcaccg tgagctcagg cggcggcgga tetateactg gccctcccc catgtccgtg 840  
 gaacacgcag acatctgggt caagagctac agcttgtact ccaggagcg gtacatttgt 900  
 aactctggtt tcaagcgtaa agccggcacg tccagcctga cggagtgcgt gttgaacaag 960  
 gccacgaatg tcgcccactg gacaaccccc agtctcaaat gcattagaga cctgcctctg 1020  
 gttcaccaaa ccacgacgcc agcgccgcga ccaccaacac cggcgccac catcgcgtcg 1080  
 cagcccctgt cctgcgccc agaggcgtgc cggccagcgg cggggggcgc agtgcacagc 1140  
 agggggctgg acttcgcctg tgacatctac atctgggcgc ccttgcccg gacttgtggg 1200  
 gtccttctcc tgtcactggt taccaccctt tactgcaaac ggggcagaaa gaaactctg 1260  
 tatatattca aacaaccatt tatgagacca gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt 1320  
 agctgccgat ttccagaaga agaagaagga ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg 1380  
 agcgcagacg cccccgcta caagcagggc cagaaccagc tctataacga actcaatcta 1440  
 ggacgaagag aggagtacga tgttttgac aagagacgtg gccgggacc tgagatgggg 1500  
 ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggctgtaca atgaactgca gaaagataag 1560  
 atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc ggcgaggagg caaggggcac 1620  
 gatggccttt accagggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc cttcacatg 1680  
 caggccctgc cccctcgc 1698

<210> 14

<211> 879

<212> DNA

<220>

<223>

<400> 14

ggaagcggcg ccaccaactt ctccctgctg aagcaagctg gcgacgtgga agagaacccc 60  
 ggccccccag gatggttctt agaactccca gacaggeect ggaaccccc caccttctcc 120  
 ccagccctgc tcgtggtgac cgaaggggac aacgccacct teacctgag cttctccaac 180  
 acatcggaga gcttcgtgct aaactggtac cgcattgagc ccagcaacca gacggacaag 240  
 ctggccgect tccccgagga ccgcagccag cccggccagg actgccgctt ccgtgtcaca 300  
 caactgcca acgggcgtga cttccacatg agcgtggtca gggccccggc caatgacagc 360

ggcacctacc tctgtggggc catctccctg gcccccaagg cgcagatcaa agagagcctg 420  
 cgggcagagc tcagggtgac agagagaagg gcagaagtgc ccacagccca ccccagcccc 480  
 tcaccacaggc cagccggcca gttccaaacc ctgggtgggcg gaggaggctc caactgggtg 540  
 aacgtcatct ccgacctcaa gaagatcgag gacctgatcc agagcatgca catcgacgcc 600  
 accctgtata ccgagagcga cgtgcacccc tctgttaaag tgaccgccat gaagtgtctc 660  
 ctgctgggagc tgcaggtgat cagcctggag agcggcgacg ccagcatcca tgacaccgtg 720  
 gagaacctga tcatcctggc caataacagc ctgagctcca acggcaacgt gaccgagagc 780  
 ggctgcaagg aatgcgagga gctggagaag aagaacatta aggagtctct gcagagcttc 840  
 gtccacatcg tgcagatggt cattaacacc tectaatag 879

<210> 15

<211> 125

<212> PRT

<220>

<223>

<400> 15

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

<210> 16

<211> 117

<212> PRT

<220>

<223>

<400> 16

Asp	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Asp
1			5						10					15	

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Ile Met Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Trp Ser Thr Asp Asp Tyr Gly Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 17  
 <211> 243  
 <212> PRT  
 <220>  
 <223>  
 <400> 17  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser  
 130 135 140  
 Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys



	165		170		175
Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala					
	180		185		190
Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Arg Gly					
	195		200		205
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp					
	210		215		220
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln Thr Phe					
225		230		235	240
Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
	245				

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 19

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

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 182

&lt;212&gt; PRT

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 20

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

<210> 21

<211> 129

<212> PRT

<220>

<223>

<400> 21

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



115	120	125
Gly Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile		
130	135	140
Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn		
145	150	155
Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val		
165	170	175
Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys		
180	185	190
Cys Ile Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Thr Thr Thr Pro Ala Pro		
195	200	205
Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu		
210	215	220
Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg		
225	230	235
Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly		
245	250	255
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys		
260	265	270
Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg		
275	280	285
Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro		
290	295	300
Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser		
305	310	315
Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu		
325	330	335
Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg		
340	345	350
Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln		
355	360	365
Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr		
370	375	380
Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp		
385	390	395
Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala		
405	410	415
Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
420	425	

<210> 24  
 <211> 418  
 <212> PRT  
 <220>  
 <223>  
 <400> 24  
 Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu  
 1                   5                   10                   15  
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Arg Ile Ser Ser Asp Asp Met  
                   20                   25                   30  
 Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Thr  
                   35                   40                   45  
 Ile Tyr Glu Thr Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly  
                   50                   55                   60  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 65                   70                   75                   80  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
                   85                   90                   95  
 Ala Asn Phe Tyr Ser Glu Gln Pro Phe Gln Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                   105                   110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Thr Cys Pro Pro  
                   115                   120                   125  
 Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu  
                   130                   135                   140  
 Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val  
                   165                   170                   175  
 Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp Pro Ala Leu  
                   180                   185                   190  
 Val His Gln Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro  
                   195                   200                   205  
 Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro  
                   210                   215                   220  
 Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp  
 225                   230                   235                   240  
 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu  
                   245                   250                   255  
 Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu

260	265	270
Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu		
275	280	285
Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys		
290	295	300
Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys		
305	310	315
Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu		
325	330	335
Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly		
340	345	350
Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu		
355	360	365
Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly		
370	375	380
Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser		
385	390	395
Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro		
405	410	415
Pro Arg		
<210> 25		
<211> 376		
<212> PRT		
<220>		
<223>		
<400> 25		
Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu		
1	5	10
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Arg Ile Ser Ser Asp Asp Met		
20	25	30
Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Thr		
35	40	45
Ile Tyr Glu Thr Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly		
50	55	60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln		
65	70	75
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg		
85	90	95
Ala Asn Phe Tyr Ser Glu Gln Pro Phe Gln Phe Trp Gly Gln Gly Thr		

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

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 528

&lt;212&gt; PRT

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 26

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

290	295	300
Cys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile		
305	310	315
Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala		
	325	330
Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr		
	340	345
Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu		
	355	360
Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile		
370	375	380
Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp		
385	390	395
Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu		
	405	410
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly		
	420	425
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr		
	435	440
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys		
450	455	460
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys		
465	470	475
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		
	485	490
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala		
	500	505
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
	515	520
		525
<210> 27		
<211> 417		
<212> PRT		
<220>		
<223>		
<400> 27		
Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu		
1	5	10
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Arg Ile Ser Ser Asp Asp Met		
	20	25
		30

Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Thr																			
	35						40						45						
Ile Tyr Glu Thr Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly																			
	50						55						60						
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln																			
	65						70						75						80
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg																			
							85						90						95
Ala Asn Phe Tyr Ser Glu Gln Pro Phe Gln Phe Trp Gly Gln Gly Thr																			
							100						105						110
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Thr Cys Pro Pro																			
							115						120						125
Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu																			
							130						135						140
Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala																			
							145						150						155
Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val																			
							165						170						175
Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp Pro Ala Leu																			
							180						185						190
Val His Gln Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro																			
							195						200						205
Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro																			
							210						215						220
Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp																			
							225						230						235
Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu																			
							245						250						255
Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu																			
							260						265						270
His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg																			
							275						280						285
Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg																			
							290						295						300
Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln																			
							305						310						315
Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu																			
							325						330						335
Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly																			

340	345	350
Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln		
355	360	365
Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu		
370	375	380
Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr		
385	390	395
Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro		
405	410	415
Arg		
<210> 28		
<211> 450		
<212> PRT		
<220>		
<223>		
<400> 28		
Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr		
1	5	10
Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe		
20	25	30
Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr		
35	40	45
Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu		
50	55	60
Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu		
65	70	75
Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn		
85	90	95
Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala		
100	105	110
Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg		
115	120	125
Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly		
130	135	140
Gln Phe Gln Thr Leu Val Gly Gly Gly Gly Ser Ile Thr Cys Pro Pro		
145	150	155
Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu		
165	170	175
Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala		

	180		185		190														
	Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Cys	Val	Leu	Asn	Lys	Ala	Thr	Asn	Val			
			195						200				205						
	Ala	His	Trp	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys	Cys	Ile	Arg	Asp	Pro	Ala	Leu			
			210						215				220						
	Val	His	Gln	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro			
	225						230					235				240			
	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro			
					245					250				255					
	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp			
			260						265				270						
	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu			
			275						280				285						
	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu			
			290						295				300						
	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu			
					310							315				320			
	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys			
					325							330			335				
	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys			
					340							345			350				
	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu			
			355						360				365						
	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly			
			370						375				380						
	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu			
			385						390				395			400			
	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly			
					405								410			415			
	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser			
					420								425			430			
	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro			
					435								440			445			
	Pro	Arg																	
			450																
	<210>	29																	
	<211>	460																	
	<212>	PRT																	
	<220>																		

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 29

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

290	295	300
Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro		
305	310	315
Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys		
	325	330
Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe		
	340	345
Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu		
	355	360
Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp		
370	375	380
Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys		
385	390	395
Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala		
	405	410
Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys		
	420	425
Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr		
435	440	445
Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
450	455	460
<210> 30		
<211> 236		
<212> PRT		
<220>		
<223>		
<400> 30		
Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr		
	20	25
Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val		
	35	40
Ala Ala Ile Met Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
	50	55
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys		
	85	90
		95

Trp Ser Thr Asp Asp Tyr Gly Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile  
 115 120 125  
 Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp  
 130 135 140  
 Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr  
 145 150 155 160  
 Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser  
 165 170 175  
 Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala  
 180 185 190  
 Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys  
 195 200 205  
 Glu Cys Glu Glu Leu Glu Lys Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser  
 210 215 220  
 Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser  
 225 230 235  
 <210> 31  
 <211> 363  
 <212> PRT  
 <220>  
 <223>  
 <400> 31  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115	120	125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser		
130	135	140
Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys		
145	150	155
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys		
165	170	175
Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala		
180	185	190
Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe		
195	200	205
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr		
210	215	220
Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg		
225	230	235
Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser		
245	250	255
Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala		
260	265	270
Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala		
275	280	285
Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly		
290	295	300
Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn		
305	310	315
Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu		
325	330	335
Cys Glu Glu Leu Glu Lys Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe		
340	345	350
Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser		
355	360	
<210> 32		
<211> 368		
<212> PRT		
<220>		
<223>		
<400> 32		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln		
1	5	10
		15

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

	325		330		335
Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Lys Lys Asn Ile Lys Glu					
	340		345		350
Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser					
	355		360		365
<210> 33					
<211> 237					
<212> PRT					
<220>					
<223>					
<400> 33					
Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu					
1	5		10		15
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Arg Ile Ser Ser Asp Asp Met					
	20		25		30
Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Thr					
	35		40		45
Ile Tyr Glu Thr Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly					
	50		55		60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln					
65	70		75		80
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg					
	85		90		95
Ala Asn Phe Tyr Ser Glu Gln Pro Phe Gln Phe Trp Gly Gln Gly Thr					
	100		105		110
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp Val Asn Val					
	115		120		125
Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile					
	130		135		140
Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val					
145	150		155		160
Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu					
	165		170		175
Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu					
	180		185		190
Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys					
	195		200		205
Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Lys Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln					
	210		215		220



<211> 1575

<212> DNA

<220>

<223>

<400> 35

```

atgccacctc ctcgcctcct cttcttcctc ctcttctca ccccatgga agtcaggccc 60
gaggaacctc tagtggtgaa ggtggaagag ggagataacg ctgtgctgca gtgcctcaag 120
gggacctcag atggccccac tcagcagctg acctggtctc gggagtcccc gcttaaacc 180
ttcttaaaac tcagcctggg gctgccaggc ctgggaatcc acatgaggcc cctggccatc 240
tggtttttca tcttcaacgt ctctcaacag atggggggct tctacctgtg ccagccgggg 300
ccccctctg agaaggcctg gcagcctggc tggacagtca atgtggaggg cagcggggag 360
ctgttccggg ggaatgttcc ggacctaggt ggctgggct gtggcctgaa gaacaggctc 420
tcagagggcc ccagctcccc ttccgggaag ctcatgagcc ccaagctgta tgtgtgggcc 480
aaagaccgcc ctgagatctg ggaggagag cctccgtgtc tcccaccgag ggacagcctg 540
aaccagagcc tcagccagga cctcaccatg gcccttggt ccacactctg gctgtcctgt 600
ggggtacccc ctgactctgt gtccaggggc cccctctct ggacctatgt gcacccaag 660
gggcctaagt cattgctgag cctagagctg aaggacgac gcccgccag agatatgtgg 720
gtaatggaga cgggtctgtt gttgccccgg gccacagctc aagacgctgg aaagtattat 780
tgtcaccgtg gcaacctgac catgtcattc cacctggaga tcaactgctg gccagtacta 840
tggcactggc tgctgaggac tggtggtctg aagggatccg agcccaaate ttgtgagaag 900
accacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtgttctc 960
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg 1020
gtggtggacg tgagccacga ggacctgag gtcaagtcca actggtactg ggacggcgtg 1080
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 1140
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 1200
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaagc caaaggcag 1260
ccccgagaac cacagggtga caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1320
gtcagcctga cttgcctggt caaaggttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1380
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accagcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1440
tccttcttcc tctactcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtg 1500
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggetctg cacaaccact acagcagaa gagcctctcc 1560
ctgtctccgg gtaaaa

```

1575

<210> 36

<211> 1671

<212> DNA

<220>

<223>

<400> 36

```

atgccacctc ctcgcctcct cttcttcctc ctcttctca ccccatgga agtcaggccc 60

```

gaggaacctc tagtggtgaa ggtggaagag ggagataacg ctgtgctgca gtgcctcaag 120  
 gggacctcag atggccccac tcagcagctg acctggtctc gggagtcccc gcttaaacc 180  
 ttcttaaaac tcagcctggg gctgccaggc ctgggaatcc acatgaggcc cctggccatc 240  
 tggcttttca tcttcaacgt ctctcaacag atggggggct tctacctgtg ccagccgggg 300  
 cccccctctg agaaggcctg gcagcctggc tggacagtca atgtggaggg cagcggggag 360  
 ctgttccggt ggaatgtttc ggacctaggt ggctgggct gtggcctgaa gaacaggtcc 420  
 tcagagggcc ccagctcccc ttccgggaag ctcatgagcc ccaagctgta tgtgtgggcc 480  
 aaagaccgcc ctgagatctg ggagggagag cctccgtgtc tcccaccgag ggacagcctg 540  
 aaccagagcc tcagccagga cctcaccatg gccctggct ccacactctg gctgtcctgt 600  
 ggggtacccc ctgactctgt gtccaggggc cccctctct ggacctatgt gcacccaag 660  
 gggcctaagt cattgctgag cctagagctg aaggacgac gcccgccag agatatgtgg 720  
 gtaatggaga cgggtctgtt gttgccccgg gccacagctc aagacgtgg aaagtattat 780  
 tgtcaccgtg gcaacctgac catgtcattc cacctggaga tctactgctg gccagtacta 840  
 tggcaactggc tgctgaggac tggtggetgg aaggtctcag ctgtgacttt ggcttatctg 900  
 atcttctgcc tgtgttccct tgtgggeatt ctteatctc aaagagccct ggtcctgagg 960  
 aggaaaagaa agcgaatgac tgaccccacc aggagattct tcaaagtgac gcctcccca 1020  
 ggaagcgggc cccagaacca gtacgggaac gtgctgtctc tccccacacc cacctcaggc 1080  
 ctcgacgcg cccagcgttg ggccgcaggc ctggggggca ctgccccgtc ttatggaaac 1140  
 ccgagcagcg acgtccaggc ggatggagcc ttgggggtccc ggagccccgc gggagtgggc 1200  
 ccagaagaag aggaagggga gggctatgag gaacctgaca gtgaggagga ctccgagttc 1260  
 tatgagaacg actccaacct tgggcaggac cagctctccc aggatggcag cggctacgag 1320  
 aacctgagg atgagcccct ggtcctgag gatgaagact ccttctcaa cgctgagtct 1380  
 tatgagaacg aggatgaaga gctgaccag ccggtcgcca ggacaatgga cttcctgagc 1440  
 cctcatgggt cagcctggga cccagccgg gaagcaacct cctggggtc ccagtcctat 1500  
 gaggatatga gaggaatcct gtatgcagcc cccagctcc gctccattcg gggccagcct 1560  
 ggacccaatc atgaggaaga tgcagactct tatgagaaca tggataatcc cgatgggcca 1620  
 gaccagcct ggggaggagg gggccgcatg ggcacctgga gcaccaggtg a 1671

<210> 37

<211> 1773

<212> DNA

<220>

<223>

<400> 37

atggaagatg ccaaaaacat taagaagggc ccagcgcct tctaccact cgaagacggg 60  
 accgccggcg agcagctgca caaagccatg aagcgtacg ccctggtgcc cggcaccatc 120  
 gcctttaccg acgcacatat cgaggtggac attacctacg ccgagtactt cgagatgagc 180  
 gttcggctgg cagaagctat gaagcgtat gggctgaata caaacctcg gatcgtggtg 240  
 tgcagcgaga atagcttgea gttcttcatg cccgtgttgg gtgccctgtt catcgggtgtg 300  
 gctgtggccc cagctaacga catctacaac gagcgcgagc tgctgaacag catgggcatc 360

agccagccca ccgtcgtatt cgtgagcaag aaagggtgc aaaagatcct caacgtgcaa 420  
 aagaagctac cgatcataca aaagatcatc atcatggata gcaagaccga ctaccagggc 480  
 ttccaaagca tgtacacctt cgtgacttcc catttgccac ccggcttcaa cgagtacgac 540  
 ttcgtgcccg agagcttcga ccgggacaaa accatcgccc tgatcatgaa cagtagtggc 600  
 agtaccggat tgcccaaggg cgtagcccta ccgcaccgca ccgcttgtgt ccgattcagt 660  
 catgcccgcg accccatctt cggcaaccag atcatccccg acaccgctat cctcagcgtg 720  
 gtgccatttc accacggctt cggcatgttc accacgctgg gctacttgat ctgcggcttt 780  
 cgggtcgtgc tcatgtaccg cttcaggag gagctattct tgcgcagctt gcaagactat 840  
 aagattcaat ctgccctgct ggtgcccaaca ctatttagct tcttcgctaa gagcactctc 900  
 atcgacaagt acgacctaaag caacttgcaac gagatcgcca gcggcggggc gccgctcagc 960  
 aaggaggtag gtgaggccgt ggccaaacgc ttccacctac caggcatccg ccagggttac 1020  
 ggcttgacag aaacaaccag cgccattctg atcccccg aaggggacga caagcctggc 1080  
 gcagtaggca aggtggtgcc cttcttcgag getaaggtgg tggacttga caccggtaa 1140  
 aactgggtg tgaaccagcg cggcgagctg tgcgtccgtg gccccatgat catgagcggc 1200  
 tacgttaaca accccgagge tacaacgct ctcacgaca aggacggctg gctgcacagc 1260  
 ggcgacatcg cctactggga cgaggacgag cacttctca tcgtggaccg gctgaagagc 1320  
 ctgatcaaat acaagggcta ccaggtagcc ccagccgaac tggagagcat cctgctgcaa 1380  
 caccacaaca tcttcgacgc cggggtcgcc ggctgcccg acgacgatgc cggcgagctg 1440  
 cccgccgag tcgtcgtgct ggaacacggt aaaaccatga ccgagaagga gatcgtggac 1500  
 tatgtggcca gccaggttac aaccgccaag aagctgcgcg gtggtgttgt gttcgtggac 1560  
 gaggtgccta aaggactgac cggcaagttg gacgcccga agatccgca gattctcatt 1620  
 aaggccaaga agggcggcaa gatcgccgtg aattctcac gcttcctcc cgaggtggag 1680  
 gagcaggccg ccggcacct gccatgagc tgcgccagg agagcggcat ggatagacac 1740  
 cctgctgctt gcgccagcgc caggatcaac gtc 1773

<210> 38

<211> 470

<212> PRT

<220>

<223>

<400> 38

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

65	70	75	80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly			
	100	105	110
Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys			
	115	120	125
Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser			
	130	135	140
Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser			
145	150	155	160
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile			
	165	170	175
Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu			
	180	185	190
Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn			
	195	200	205
Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr			
	210	215	220
Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser			
225	230	235	240
Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro			
	245	250	255
Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys			
	260	265	270
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala			
	275	280	285
Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu			
	290	295	300
Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys			
305	310	315	320
Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr			
	325	330	335
Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly			
	340	345	350
Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala			
	355	360	365
Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg			
370	375	380	



	165		170		175										
Thr	Leu	Cys	Thr	Glu	Leu	Thr	Val	Thr	Asp	Ile	Phe	Ala	Ala	Ser	Lys
	180		185		190										
Asn	Thr	Thr	Glu	Lys	Glu	Thr	Phe	Cys	Arg	Ala	Ala	Thr	Val	Leu	Arg
	195		200		205										
Gln	Phe	Tyr	Ser	His	His	Glu	Lys	Asp	Thr	Arg	Cys	Leu	Gly	Ala	Thr
	210		215		220										
Ala	Gln	Gln	Phe	His	Arg	His	Lys	Gln	Leu	Ile	Arg	Leu	Leu	Lys	Arg
225			230		235		240								
Leu	Asp	Arg	Asn	Leu	Trp	Gly	Leu	Ala	Gly	Leu	Asn	Ser	Cys	Pro	Val
	245		250		255										
Lys	Glu	Ala	Asn	Gln	Ser	Thr	Leu	Glu	Asn	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Lys
	260		265		270										
Thr	Ile	Met	Arg	Glu	Lys	Tyr	Ser	Lys	Cys	Ser	Ser				
	275		280												

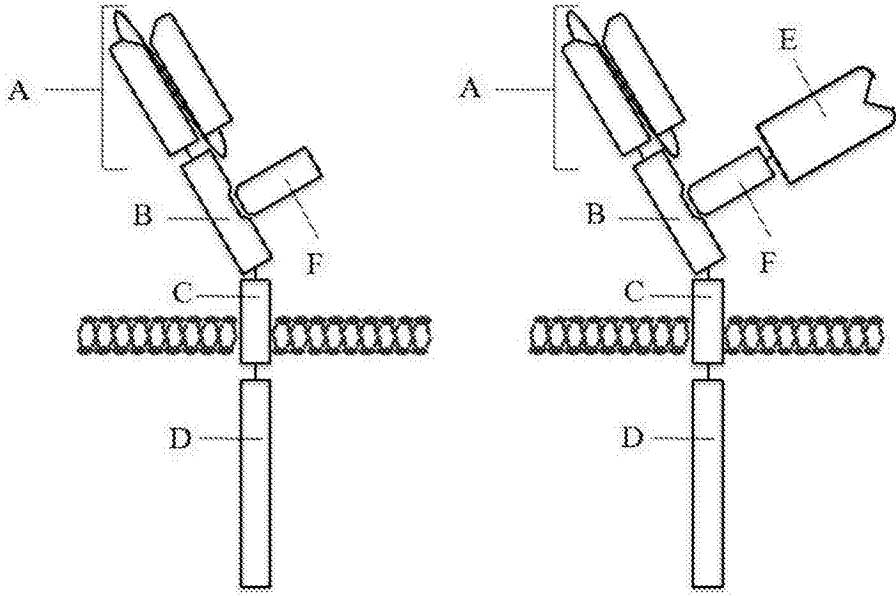


图1

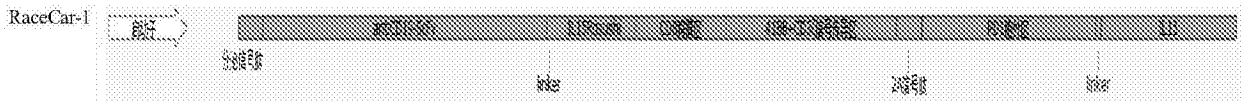


图2

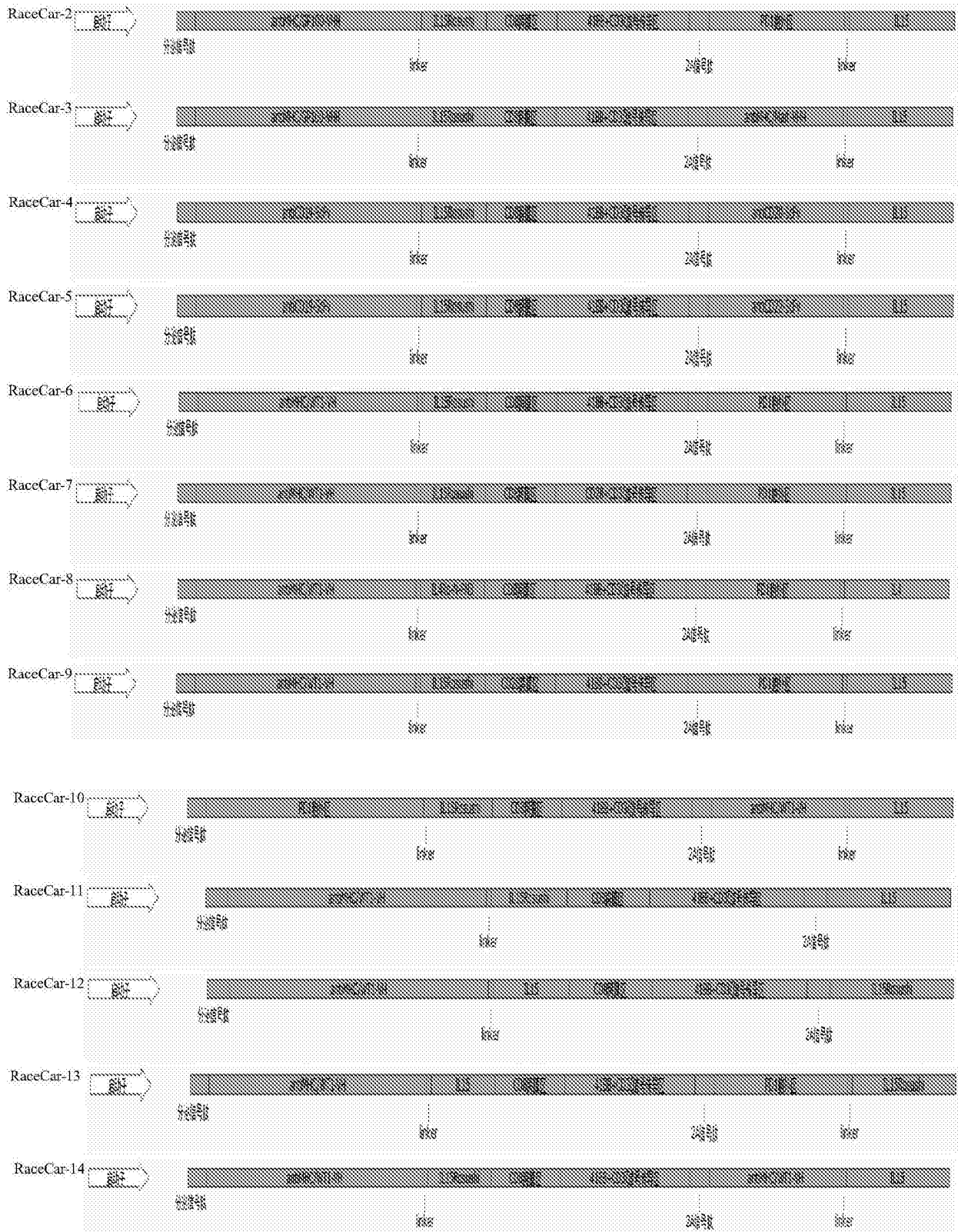


图3

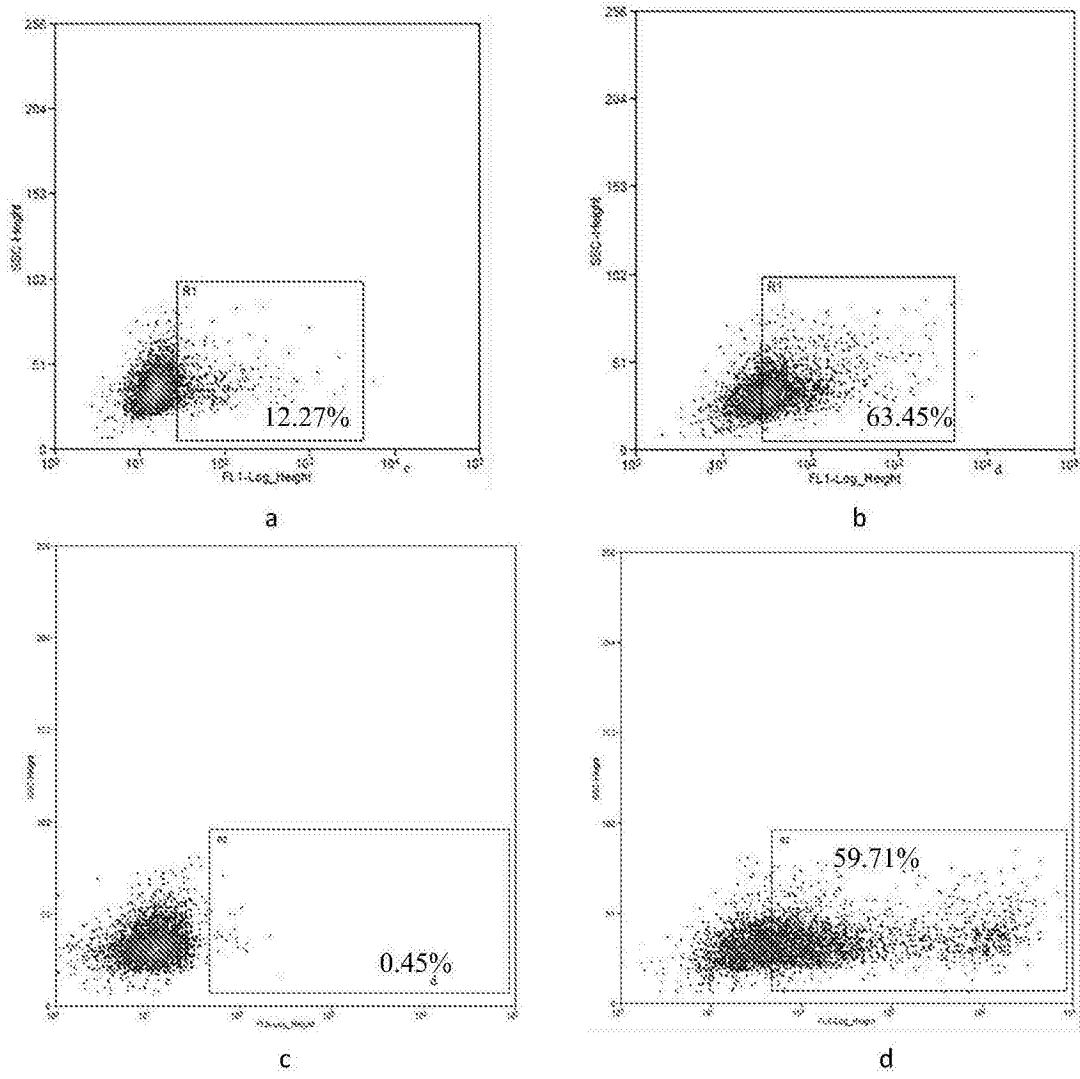


图4

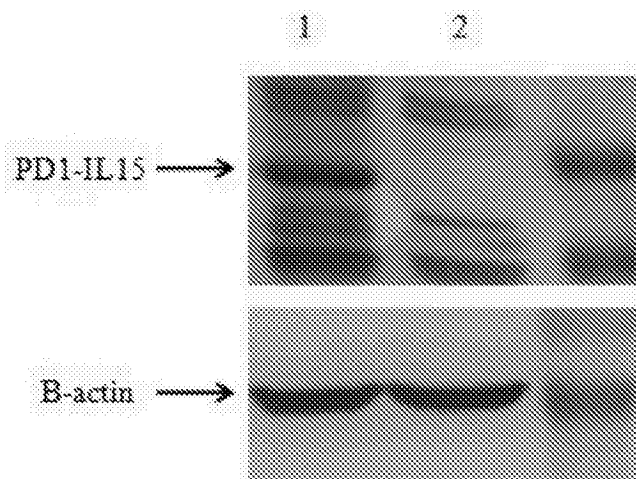


图5

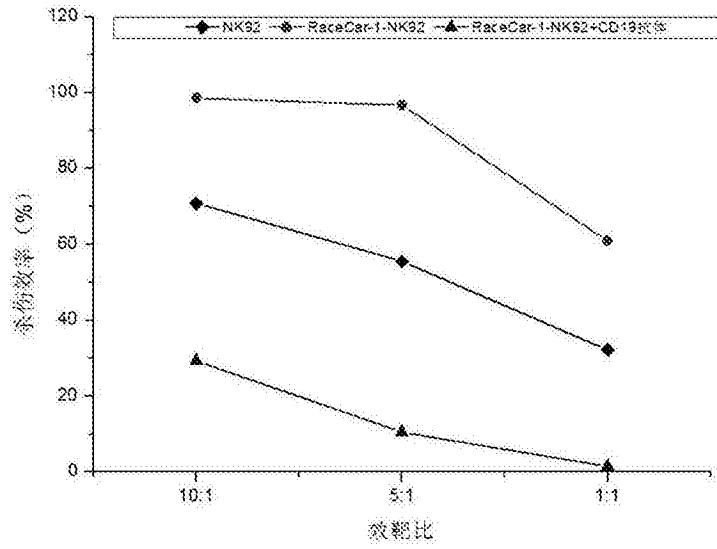


图6

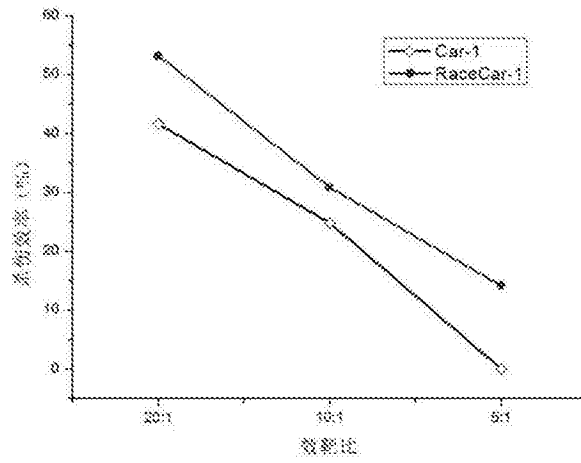


图7