



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117157329 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 01

(21) 申请号 202280027642.3

(22) 申请日 2022.04.15

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2021/087475 2021.04.15 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.10.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2022/087016 2022.04.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/218402 EN 2022.10.20

(71) 申请人 南京传奇生物科技有限公司

地址 211100 江苏省南京市江宁区龙眠大道568号南京生命科技小镇6号楼

(72) 发明人 范晓虎 王骏 毛杰 张二少

魏青 马莲

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 杨琴

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书5页 说明书122页
序列表94页 附图17页

(54) 发明名称

融合蛋白及其用途

(57) 摘要

本申请提供了具有两个多肽的融合蛋白,每个多肽具有细胞外结构域和细胞内结构域,并且两个细胞外结构域形成TGF β 的结合位点并且两个细胞内结构域形成IL-23受体复合物的细胞内结构域。本申请还提供了编码所述融合蛋白的核酸、包含所述核酸的载体和表达所述融合蛋白的经工程改造细胞。还提供了产生所述经工程改造细胞的方法和涉及施用经工程改造细胞的治疗方法。

1. 一种融合蛋白,所述融合蛋白包含:

a) 第一多肽,所述第一多肽包含 i) 包含TGF β R1或TGF β R2中的一者的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii) 第一跨膜结构域,和iii) 包含IL-12R β 1或IL-23R中的一者的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及

b) 第二多肽,所述第二多肽包含 i) 包含TGF β R1或TGF β R2中的另一者的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii) 第二跨膜结构域,和iii) 包含IL-12R β 1或IL-23R中的另一者的细胞内结构域的第二细胞内结构域。

2. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中所述第一跨膜结构域和所述第二跨膜结构域各自包含TGF β R1、TGF β R2、IL-12R β 1和IL-23R中的一者的跨膜结构域。

3. 如权利要求2所述的融合蛋白,其中所述第一跨膜结构域和所述第二跨膜结构域各自包含IL-12R β 1或IL-23R中的一者的跨膜结构域。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的融合蛋白,其中:

a) 所述第一细胞外结构域包含TGF β R1的细胞外结构域,所述第一跨膜结构域包含TGF β R1的跨膜结构域,所述第一细胞内结构域包含IL-23R的细胞内结构域,所述第二细胞外结构域包含TGF β R2的细胞外结构域,所述第二跨膜结构域包含TGF β R2的跨膜结构域,并且所述第二细胞内结构域包含IL-12R β 1的细胞内结构域;

b) 所述第一细胞外结构域包含TGF β R2的细胞外结构域,所述第一跨膜结构域包含TGF β R2的跨膜结构域,所述第一细胞内结构域包含IL-23R的细胞内结构域,所述第二细胞外结构域包含TGF β R1的细胞外结构域,所述第二跨膜结构域包含TGF β R1的跨膜结构域,并且所述第二细胞内结构域包含IL-12R β 1的细胞内结构域;

c) 所述第一细胞外结构域包含TGF β R1的细胞外结构域,所述第一跨膜结构域包含IL-23R的跨膜结构域,所述第一细胞内结构域包含IL-23R的细胞内结构域,所述第二细胞外结构域包含TGF β R2的细胞外结构域,所述第二跨膜结构域包含IL-12R β 1的跨膜结构域,并且所述第二细胞内结构域包含IL-12R β 1的细胞内结构域;或

d) 所述第一细胞外结构域包含TGF β R2的细胞外结构域,所述第一跨膜结构域包含IL-23R的跨膜结构域,所述第一细胞内结构域包含IL-23R的细胞内结构域,所述第二细胞外结构域包含TGF β R1的细胞外结构域,所述第二跨膜结构域包含IL-12R β 1的跨膜结构域,并且所述第二细胞内结构域包含IL-12R β 1的细胞内结构域。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一细胞外结构域包含TGF β R2的细胞外结构域,所述第一跨膜结构域包含IL-23R的跨膜结构域,所述第一细胞内结构域包含IL-23R的细胞内结构域,所述第二细胞外结构域包含TGF β R1的细胞外结构域,所述第二跨膜结构域包含IL-12R β 1的跨膜结构域,并且所述第二细胞内结构域包含IL-12R β 1的细胞内结构域。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一多肽和/或所述第二多肽还包含在所述多肽的N末端的信号肽。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一多肽和所述第二多肽在单一多肽中,并且其中所述第一多肽和所述第二多肽被多顺反子元件隔开。

8. 如权利要求7所述的融合蛋白,其中所述多顺反子元件包含选自由T2A、P2A、E2A或F2A组成的组的2A自裂解肽。

9. 如权利要求7或权利要求8所述的融合蛋白,其中所述第一多肽在所述第二多肽的N末端。

10. 如权利要求7或权利要求8所述的融合蛋白,其中所述第一多肽在所述第二多肽的C末端。

11. 如权利要求7-9中任一项所述的融合蛋白,其中所述单一多肽从N末端至C末端包含:

a) 包含TGF β R1的细胞外结构域的所述第一细胞外结构域、包含TGF β R1的跨膜结构域的所述第一跨膜结构域、包含IL-23R的细胞内结构域的所述第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含TGF β R2的细胞外结构域的所述第二细胞外结构域、包含TGF β R2的跨膜结构域的所述第二跨膜结构域和包含IL-12R β 1的细胞内结构域的所述第二细胞内结构域;

b) 包含TGF β R2的细胞外结构域的所述第一细胞外结构域、包含TGF β R2的跨膜结构域的所述第一跨膜结构域、包含IL-23R的细胞内结构域的所述第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含TGF β R1的细胞外结构域的所述第二细胞外结构域、包含TGF β R1的跨膜结构域的所述第二跨膜结构域和包含IL-12R β 1的细胞内结构域的所述第二细胞内结构域;

c) 包含TGF β R1的细胞外结构域的所述第一细胞外结构域、包含TGF β R1的跨膜结构域的所述第一跨膜结构域、包含IL-12R β 1的细胞内结构域的所述第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含TGF β R2的细胞外结构域的所述第二细胞外结构域、包含TGF β R2的跨膜结构域的所述第二跨膜结构域和包含IL-23R的细胞内结构域的所述第二细胞内结构域;

d) 包含TGF β R1的细胞外结构域的所述第一细胞外结构域、包含IL-23R的跨膜结构域的所述第一跨膜结构域、包含IL-23R的细胞内结构域的所述第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含TGF β R2的细胞外结构域的所述第二细胞外结构域、包含IL-12R β 1的跨膜结构域的所述第二跨膜结构域和包含IL-12R β 1的细胞内结构域的所述第二细胞内结构域;

e) 包含TGF β R2的细胞外结构域的所述第一细胞外结构域、包含IL-23R的跨膜结构域的所述第一跨膜结构域、包含IL-23R的细胞内结构域的所述第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含TGF β R1的细胞外结构域的所述第二细胞外结构域、包含IL-12R β 1的跨膜结构域的所述第二跨膜结构域和包含IL-12R β 1的细胞内结构域的所述第二细胞内结构域;或

f) 包含TGF β R1的细胞外结构域的所述第一细胞外结构域、包含IL-12R β 1的跨膜结构域的所述第一跨膜结构域、包含IL-12R β 1的细胞内结构域的所述第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含TGF β R2的细胞外结构域的所述第二细胞外结构域、包含IL-23R的跨膜结构域的所述第二跨膜结构域和包含IL-23R的细胞内结构域的所述第二细胞内结构域。

12. 如权利要求1-6中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一细胞外结构域和所述第二细胞外结构域形成TGF β 的结合位点,其中所述第一细胞内结构域和所述第二细胞内结构域形成IL-23受体复合物,并且其中在所述融合蛋白与TGF β 结合后,传递通过所述IL-23受体复合物进行的信号传导。

13. 如权利要求2-12中任一项所述的融合蛋白,其中:

a) IL-23R的所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或具有至少约90%序列同一性的功能变体;

b) IL-12R β 1的所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或具有至少约90%序列同一性的功能变体;

c) TGF β R1的所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或具有至少约90%序列同一性的功能变体;和/或

d) TGF β R2的所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列或具有至少约90%序列同一性的功能变体。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的融合蛋白,其中:

a) TGF β R1的所述细胞外结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或具有至少约90%序列同一性的功能变体;

b) TGF β R2的所述细胞外结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或具有至少约90%序列同一性的功能变体;

c) IL-23R的所述细胞内结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或具有至少约90%序列同一性的功能变体;和/或

d) IL-12R β 1的所述细胞内结构域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或具有至少约90%序列同一性的功能变体。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的融合蛋白,其中:

1) 所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的第一跨膜结构域,iii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:16的第二细胞内结构域;

2) 所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的第二细胞内结构域;

3) 所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的第二细胞内结构域;或

4) 所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的第二细胞内结构域。

16. 如权利要求1-15中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一多肽和/或所述第二多肽还包含在两个结构域之间的接头,其中所述两个结构域中的一个所述跨膜结构域,并且所述另一结构域是所述细胞外结构域或所述细胞内结构域。

17. 如权利要求16所述的融合蛋白,其中所述接头包含近膜序列,其中所述近膜序列和所述跨膜结构域源自同一分子。

18. 如权利要求17所述的融合蛋白,其中所述近膜区域包含SEQ ID NO:9-12中任一一个所示的氨基酸序列。

19. 如权利要求1-18中任一项所述的融合蛋白,其中:

a) 所述第一多肽包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列;

b) 所述第一多肽包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列;

c) 所述第一多肽包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列;

d) 所述第一多肽包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列;

e) 所述第一多肽包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列;或者

f) 所述第一多肽包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO:20-25中任一一个所示的氨基酸序列。

21. 一种核酸,所述核酸包含一个或多个编码如权利要求1-18中任一项所述的融合蛋白或其一部分的核酸序列。

22. 一种核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:28-33中任一一个所示的核酸序列。

23. 如权利要求21或权利要求22所述的核酸,其中所述核酸还包含编码功能性外源性受体的第二核酸序列,其中所述功能性外源性受体包含细胞外配体结合结构域和任选的细胞内信号传导结构域。

24. 如权利要求23所述的核酸,其中所述功能性外源性受体选自由以下组成的组:经工程改造T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体(CAR)、T细胞抗原偶联物(TAC)或其一部分。

25. 如权利要求23或权利要求24所述的核酸,其中所述功能性外源性受体特异性识别肿瘤抗原。

26. 如权利要求23-25中任一项所述的核酸,其中所述功能性外源性受体包含特异性识别肿瘤抗原的嵌合抗原受体(CAR)。

27. 如权利要求26所述的核酸,其中所述CAR特异性识别CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、BCMA、CS1、CD138、CD123/IL3R α 、c-Met、gp100、MUC1、IGF-I受体、EpCAM、EGFR/EGFRvIII、HER2、IGF1R、间皮素、PSMA、WT1、ROR1、CEA、GD-2、NY-ESO-1、MAGE A3、GPC3、密封蛋白18.2、糖脂F77、PD-L1和/或PD-L2。

28. 如权利要求27所述的核酸,其中所述CAR包含SEQ ID NO:58或89中所示的氨基酸序列或具有至少约90%序列同一性的功能变体。

29. 如权利要求23-28中任一项所述的核酸,其中编码所述功能性外源性受体的所述核酸序列在编码所述融合蛋白的所述一个或多个核酸序列(“融合蛋白核酸序列”)中的至少一个的上游或下游,并且任选地其中所述功能性外源性受体核酸序列和所述融合蛋白核酸序列被编码第二多顺反子元件的第三核酸序列隔开。

30. 一种载体,所述载体包含如权利要求21-29中任一项所述的核酸。
31. 一种经工程改造细胞,所述经工程改造细胞包含如权利要求1-20中任一项所述的融合蛋白、如权利要求21或22所述的核酸和/或如权利要求30所述的载体。
32. 如权利要求31所述的经工程改造细胞,所述经工程改造细胞还包含功能性外源性受体,其中所述功能性外源性受体包含细胞外配体结合结构域和任选的细胞内信号传导结构域。
33. 如权利要求32所述的经工程改造细胞,其中所述功能性外源性受体选自由以下组成的组:经工程改造T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体(CAR)、T细胞抗原偶联物(TAC)或其一部分。
34. 如权利要求33所述的经工程改造细胞,其中所述功能性外源性受体特异性识别肿瘤抗原。
35. 一种经工程改造细胞,所述经工程改造细胞包含如权利要求23-29中任一项所述的核酸。
36. 如权利要求31-35中任一项所述的经工程改造细胞,其中所述经工程改造细胞是免疫细胞。
37. 如权利要求36所述的经工程改造细胞,其中所述经工程改造细胞选自由以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。
38. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求31-37中任一项所述的经工程改造细胞。
39. 一种治疗个体的疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述个体施用如权利要求38所述的药物组合物。
40. 如权利要求39所述的方法,其中所述疾病或疾患与免疫抑制相关。
41. 一种减少个体的患病组织中的免疫抑制信号的方法,所述方法包括向所述个体施用如权利要求38所述的药物组合物。
42. 如权利要求41所述的方法,其中所述减少所述免疫抑制信号包括减少通过TGF β R进行的信号传导。
43. 如权利要求39-42中任一项所述的方法,其中与没有所述疾病或疾患的个体中的相应组织相比,所述患病组织具有更高的TGF β 表达水平。
44. 如权利要求39-43中任一项所述的方法,其中所述疾病或疾患是癌症。
45. 如权利要求44所述的方法,其中所述癌症是实体瘤或液体瘤。
46. 如权利要求39-43中任一项所述的方法,其中所述疾病或疾患是感染性疾病或与感染相关的疾患。
47. 如权利要求39-46中任一项所述的方法,其中所述药物组合物中的所述经工程改造细胞对所述个体而言是同种异体的。
48. 如权利要求39-46中任一项所述的方法,其中所述药物组合物中的所述经工程改造细胞对所述个体而言是自体的。
49. 如权利要求39-48中任一项所述的方法,其中所述方法还包括第二疗法或施用第二种剂。

融合蛋白及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年4月15日提交的国际申请第PCT/CN2021/087475号的优先权,所述申请的内容出于所有目的通过引用以其整体并入。

[0003] 采用ASCII文本文件的序列列表提交

[0004] 采用ASCII文本文件的以下提交的内容通过引用以其整体并入本文:序列列表的计算机可读形式(CRF)(文件名称:761422003340SEQLIST.TXT,记录日期:2022年4月14日,大小:205,318字节)。

技术领域

[0005] 本申请涉及与TGF β 结合并且能够介导促炎信号的融合蛋白。

背景技术

[0006] 转化生长因子 β (TGF β)是一种多效性细胞因子,在肿瘤微环境中一直被认为是免疫抑制信号传导分子。TGF β 结合至TGF β R1和TGF β R2丝氨酸/苏氨酸激酶受体复合物,导致受体介导的下游转录因子Smad2和Smad3的磷酸化。许多肿瘤通过获得TGF β 受体和/或下游Smad信号传导蛋白的突变来逃避TGF β 的细胞生长抑制和抗增殖作用。TGF β 在体外抑制参与T细胞效应和细胞溶解活性的关键分子,包括IFN γ 分泌。

[0007] 本文提及的所有出版物、专利、专利申请和公布的专利申请的公开内容都据此通过引用以它们整体并入本文。

发明内容

[0008] 本申请在方面提供了一种融合蛋白,所述融合蛋白包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R1或TGF β R2中的一者的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)第一跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1或IL-23R中的一者的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R1或TGF β R2中的另一者的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1或IL-23R中的另一者的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,第一跨膜结构域和第二跨膜结构域各自包含TGF β R1、TGF β R2、IL-12R β 1和IL-23R中的一者的跨膜结构域。在一些实施方案中,第一跨膜结构域和第二跨膜结构域各自包含IL-12R β 1或IL-23R中的一者的跨膜结构域。

[0009] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,所述融合蛋白包含:

[0010] a)第一细胞外结构域包含TGF β R1的细胞外结构域,第一跨膜结构域包含TGF β R1的跨膜结构域,第一细胞内结构域包含IL-23R的细胞内结构域,第二细胞外结构域包含TGF β R2的细胞外结构域,第二跨膜结构域包含TGF β R2的跨膜结构域,并且第二细胞内结构域包含IL-12R β 1的细胞内结构域;

[0011] b)第一细胞外结构域包含TGF β R2的细胞外结构域,第一跨膜结构域包含TGF β R2的跨膜结构域,第一细胞内结构域包含IL-23R的细胞内结构域,第二细胞外结构域包含TGF β

R1的细胞外结构域,第二跨膜结构域包含TGF β R1的跨膜结构域,并且第二细胞内结构域包含IL-12R β 1的细胞内结构域;

[0012] c) 第一细胞外结构域包含TGF β R1的细胞外结构域,第一跨膜结构域包含IL-23R的跨膜结构域,第一细胞内结构域包含IL-23R的细胞内结构域,第二细胞外结构域包含TGF β R2的细胞外结构域,第二跨膜结构域包含IL-12R β 1的跨膜结构域,并且第二细胞内结构域包含IL-12R β 1的细胞内结构域;或

[0013] d) 第一细胞外结构域包含TGF β R2的细胞外结构域,第一跨膜结构域包含IL-23R的跨膜结构域,第一细胞内结构域包含IL-23R的细胞内结构域,第二细胞外结构域包含TGF β R1的细胞外结构域,第二跨膜结构域包含IL-12R β 1的跨膜结构域,并且第二细胞内结构域包含IL-12R β 1的细胞内结构域。

[0014] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,第一多肽和/或第二多肽还包含在所述多肽的N末端的信号肽。

[0015] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,第一多肽和第二多肽在单一多肽中,并且第一多肽和第二多肽被多顺反子元件隔开。在一些实施方案中,多顺反子元件包含选自T2A、P2A、E2A或F2A组成的组的2A自裂解肽。在一些实施方案中,第一多肽在第二多肽的N末端。在一些实施方案中,第一多肽在第二多肽的C末端。在一些实施方案中,单一多肽从N末端至C末端包含:

[0016] a) 包含TGF β R1的细胞外结构域的第一细胞外结构域、包含TGF β R1的跨膜结构域的第一跨膜结构域、包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含TGF β R2的细胞外结构域的第二细胞外结构域、包含TGF β R2的跨膜结构域的第二跨膜结构域和包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域;

[0017] b) 包含TGF β R2的细胞外结构域的第一细胞外结构域、包含TGF β R2的跨膜结构域的第一跨膜结构域、包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含TGF β R1的细胞外结构域的第二细胞外结构域、包含TGF β R1的跨膜结构域的第二跨膜结构域和包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域;

[0018] c) 包含TGF β R1的细胞外结构域的第一细胞外结构域、包含TGF β R1的跨膜结构域的第一跨膜结构域、包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含TGF β R2的细胞外结构域的第二细胞外结构域、包含TGF β R2的跨膜结构域的第二跨膜结构域和包含IL-23R的细胞内结构域的第二细胞内结构域;

[0019] d) 包含TGF β R1的细胞外结构域的第一细胞外结构域、包含IL-23R的跨膜结构域的第一跨膜结构域、包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含TGF β R2的细胞外结构域的第二细胞外结构域、包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域和包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域;

[0020] e) 包含TGF β R2的细胞外结构域的第一细胞外结构域、包含IL-23R的跨膜结构域的第一跨膜结构域、包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含TGF β R1的细胞外结构域的第二细胞外结构域、包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域和包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域;或

[0021] f) 包含TGF β R1的细胞外结构域的第一细胞外结构域、包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第一跨膜结构域、包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含

TGF β R2的细胞外结构域的第二细胞外结构域、包含IL-23R的跨膜结构域的第二跨膜结构域和包含IL-23R的细胞内结构域的第二细胞内结构域。

[0022] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,第一细胞外结构域和第二细胞外结构域形成TGF β 的结合位点,其中第一细胞内结构域和第二细胞内结构域形成IL-23受体复合物的细胞内结构域,并且其中在所述融合蛋白与TGF β 结合后,传递通过所述IL-23受体复合物进行的信号传导。

[0023] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,TGF β R1的跨膜结构域包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,或具有至少约90%序列同一性的功能变体;和/或TGF β R2的跨膜结构域包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,或具有至少约90%序列同一性的功能变体。

[0024] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,IL-23R的跨膜结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,或具有至少约90%序列同一性的功能变体;和/或IL-12R β 1的跨膜结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或具有至少约90%序列同一性的功能变体。

[0025] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,TGF β R1的细胞外结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,或具有至少约90%序列同一性的功能变体。

[0026] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,TGF β R2的细胞外结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或具有至少约90%序列同一性的功能变体。

[0027] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,IL-23R的细胞内结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,或具有至少约90%序列同一性的功能变体。

[0028] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,IL-12R β 1的细胞内结构域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,或具有至少约90%序列同一性的功能变体。

[0029] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的第一跨膜结构域,iii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:16的第二细胞内结构域。

[0030] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的第二细胞内结构域。

[0031] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的第二细胞内结构域。

[0032] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第

一多肽包含i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iii)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iii)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的第二细胞内结构域。

[0033] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,第一多肽和/或第二多肽还包含在两个结构域之间的接头,其中所述两个结构域中的一个为跨膜结构域,并且另一结构域为细胞外结构域或细胞内结构域。在一些实施方案中,接头包含近膜序列,其中近膜序列和跨膜结构域源自同一分子。在一些实施方案中,近膜区域包含SEQ ID NO:9-12中任一个所示的氨基酸序列。

[0034] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,第一多肽包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列,并且第二多肽包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

[0035] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,第一多肽包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列,并且第二多肽包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。

[0036] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,第一多肽包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,并且第二多肽包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列。

[0037] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,第一多肽包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列,并且第二多肽包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列。

[0038] 在根据任何上述融合蛋白的一些实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:20-25中任一个所示的氨基酸序列。

[0039] 本申请在另一个方面提供了一种核酸,所述核酸包含编码任何上述融合蛋白或其一部分的一个或多个核酸序列。

[0040] 本申请在另一个方面提供了一种核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:28-33中任一个所示的核酸序列。

[0041] 在根据任何上述核酸的一些实施方案中,所述核酸还包含编码功能性外源性受体的第二核酸序列,其中所述功能性外源性受体包含细胞外配体结合结构域和任选的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,功能性外源性受体选自由以下组成的组:经工程改造T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体(CAR)、T细胞抗原偶联物(TAC)或其一部分。在一些实施方案中,功能性外源性受体特异性识别肿瘤抗原。在一些实施方案中,编码功能性外源性受体的核酸序列在编码融合蛋白的一个或多个核酸序列(“融合蛋白核酸序列”)中的至少一个的上游,并且任选地其中功能性外源性受体核酸序列和融合蛋白核酸序列被编码第二多顺反子元件的第三核酸序列隔开。在一些实施方案中,第二多顺反子元件包含选自T2A、P2A、E2A或F2A组成的组的2A自裂解肽。在一些实施方案中,编码融合蛋白的核酸序列和编码功能性外源性受体的核酸序列被第二多顺反子元件隔开。

[0042] 本申请在另一个方面提供了一种载体,所述载体包含任何上述核酸。

[0043] 本申请在另一个方面提供了一种经工程改造细胞,所述经工程改造细胞包含上述融合蛋白、核酸或载体中的任一者。在一些实施方案中,经工程改造细胞还包含功能性外源性受体,其中所述功能性外源性受体包含细胞外配体结合结构域和任选的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,功能性外源性受体选自由以下组成的组:经工程改造T细胞受

体 (TCR)、嵌合抗原受体 (CAR)、T 细胞抗原偶联物 (TAC) 或其一部分。在一些实施方案中, 功能性外源性受体特异性识别肿瘤抗原。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中, 经工程改造细胞选自以下组成的组: T 细胞、NK 细胞、外周血单核细胞 (PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。

[0044] 本申请在另一个方面提供了一种药物组合物, 所述药物组合物包含任何上述经工程改造细胞。

[0045] 本申请在另一个方面提供了一种治疗个体的疾病或疾患的方法, 所述方法包括向所述个体施用本文所述的任何融合蛋白或药物组合物。在一些实施方案中, 疾病或疾患与免疫抑制相关。在一些实施方案中, 与没有疾病或疾患的个体中的相应组织相比, 患病组织具有更高的 TGF β 表达水平。在一些实施方案中, 疾病或疾患是癌症。在一些实施方案中, 癌症是实体瘤。在一些实施方案中, 疾病或疾患是感染性疾病或与感染相关的疾患。在一些实施方案中, 药物组合物中的经工程改造细胞对个体而言是同种异体的。在一些实施方案中, 药物组合物中的经工程改造细胞对个体而言是自体的。在一些实施方案中, 所述方法还包括第二疗法或施用第二种剂。

[0046] 本申请在另一个方面提供了一种减少个体的患病组织中的免疫抑制信号的方法, 所述方法包括向所述个体施用本文所述的任何融合蛋白或药物组合物。在一些实施方案中, 减少免疫抑制信号包括减少通过 TGF β R 进行的信号传导。在一些实施方案中, 与没有疾病或疾患的个体中的相应组织相比, 患病组织具有更高的 TGF β 表达水平。在一些实施方案中, 疾病或疾患是癌症。在一些实施方案中, 癌症是实体瘤。在一些实施方案中, 疾病或疾患是感染性疾病或与感染相关的疾患。在一些实施方案中, 药物组合物中的经工程改造细胞对个体而言是同种异体的。在一些实施方案中, 药物组合物中的经工程改造细胞对个体而言是自体的。在一些实施方案中, 所述方法还包括第二疗法或施用第二种剂。

附图说明

[0047] 图1A-1B示出TGB23融合蛋白(图1A)和编码TGB23融合蛋白的多肽(图1B)的卡通结构。SP是指信号肽。TM是指跨膜结构域。

[0048] 图2示出融合蛋白TGB23-1、TGB23-2、TGB23-3、TGB23-4、TGB23-5、TGB23-6、wtTGF β R、TGB23-14和TGB23-15的表达水平。UnT是指未用任何融合蛋白转导的T细胞, 并且wtTGF β R是指野生型TGF β 受体。

[0049] 图3A-3B示出用20ng/mL TGF β 1处理的表达TGB23-1、TGB23-2、TGB23-3、TGB23-4、TGB23-5、TGB23-6、wtTGF β R、TGB23-14或TGB23-15的T细胞的细胞活力(图3A)和细胞数量(图3B)。UnT是指未用任何融合蛋白转导的T细胞。

[0050] 图4示出UnT、huLIC19309b CAR-T细胞和huLIC19309bT CAR-T细胞的CAR阳性细胞中的抗GPC3 CAR表达水平和TGF β R2表达水平。UnT是指未用CAR转导的T细胞。

[0051] 图5示出用或不用20ng/mL TGF β 1处理4小时的UnT、huLIC19309b CAR-T细胞和huLIC19309bT CAR-T细胞中pSmad2的表达水平。UnT是指未用CAR转导的T细胞。

[0052] 图6A-6B示出用或不用20ng/mL TGF β 1处理4小时的UnT、huLIC19309b CAR-T细胞和huLIC19309bT CAR-T细胞中pStat3(图6A)和pStat4(图6B)的表达水平。UnT是指未用CAR转导的T细胞。

[0053] 图7A-7B示出用20ng/mL TGFβ1处理的UnT、huLIC19309b CAR-T细胞和huLIC19309bT CAR-T细胞的细胞活力(图7A)和细胞数量(图7B)。UnT是指未用CAR转导的T细胞。

[0054] 图8A-8B示出在再激发测定中与PLCPRF5和5ng/mL TGFβ1共培养之后,两个处理组(huLIC19309b CAR-T组和huLIC19309bT CAR-T组)的CD4+CAR+ T细胞(图8A)和CD8+CAR+ T细胞(图8B)中PD1的表达水平。

[0055] 图9A-9D示出在再激发测定中与PLCPRF5共培养之后的CAR阳性率(图9A和图9B)和细胞数量(图9C和图9D)。

[0056] 图10A-10B示出在再激发测定中,使用1:1的E/T比率,huLIC19309b CAR-T细胞和huLIC19309bT CAR-T细胞针对PLCPRF5(图10A)和Hep3B2.1-7细胞(图10B)的体外细胞毒性。E/T是指效应细胞与靶细胞的比率。

[0057] 图11示出在体外使用1:20的E/T比率,huLIC19309b CAR-T细胞和huLIC19309bT CAR-T细胞针对Hep3B2.1-7细胞的实时细胞毒性。E/T是指效应细胞与靶细胞的比率。

[0058] 图12A-12C示出CAR-T细胞在NCG小鼠异种移植物模型中的抗肿瘤作用。将NCG小鼠皮下接种Hep3B2.1-7细胞,并用0.3M剂量和0.8M剂量的CAR-T细胞处理(静脉内)。评估小鼠体重(图12A)、肿瘤体积(图12B)和外周血中人CD3+ T细胞的百分比(图12C)。

[0059] 图13A-13C示出通过流式细胞术,UnT、LCAR-UL186S T细胞和LCAR-UL186S+TGB23-6 T细胞的TCRαβ(图13A)、CD20 CAR(图13B)和TGB23-6(图13C)的表达。未转导的T细胞(UnT)用作阴性对照。

[0060] 图14示出使用不同的效应物-靶标比率,LCAR-UL186S T细胞和LCAR-UL186S+TGB23-6 T细胞针对Raji细胞的体外细胞毒性。E/T是指效应细胞与靶细胞的比率。

[0061] 图15示出在多轮Raji刺激后,LCAR-UL186S T细胞和LCAR-UL186S+TGB23-6 T细胞的增殖。在第0天、第4天、第7天、第11天收获细胞并通过流式细胞术检测CD5的表达。

具体实施方式

[0062] 本申请提供了融合蛋白:a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGFβR1或TGFβR2中的一者的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)第一跨膜结构域,和iii)包含IL-12Rβ1或IL-23R中的一者的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGFβR1或TGFβR2中的另一者的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12Rβ1或IL-23R中的另一者的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,第一细胞外结构域和第二细胞外结构域形成TGFβ的结合位点,其中第一细胞内结构域和第二细胞内结构域形成IL-23受体复合物,并且其中在所述融合蛋白与TGFβ结合后,传递通过所述IL-23受体复合物进行的信号传导。本申请还提供包含这种融合蛋白的经工程改造细胞,或编码这种融合蛋白的核酸,任选地所述经工程改造细胞还包含功能性外源性受体(例如,CAR或经工程改造TCR)。还提供了生产或使用此类经工程改造细胞的方法。

[0063] 本申请提供,包含本文所述的融合蛋白的经工程改造细胞能够将TGFβ信号转化为IL-23R介导的信号。如实施例更详细地显示,具有这种融合蛋白的经工程改造T细胞在暴露于TGFβ时表现出与没有融合蛋白的相应T细胞相比更高的活力和增殖。此外,表达融合蛋

白和靶向肿瘤抗原的CAR两者的经工程改造T细胞在体外和动物肿瘤模型两者中均表现出更高的针对肿瘤细胞的细胞毒性。还表明,经工程改造T细胞的增殖和细胞毒性增加在持续超过总计300小时的连续暴露于TGF β 的整个过程中涉及。这些结果提供强有力的证据,表明融合蛋白和包含这些融合蛋白的经工程改造细胞可有效治疗与免疫抑制相关的疾病或疾患(诸如癌症)。鉴于目前对癌症生物学中IL-23信号传导的理解有限且相互矛盾,这些高度有利的影响尤其引人注目。

[0064] I. 定义

[0065] 术语“抗体”包括单克隆抗体(包括全长4链抗体或具有免疫球蛋白Fc区的全长仅有重链的抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、多特异性抗体(例如,双特异性抗体、双功能抗体和单链分子)以及抗体片段(例如,Fab、F(ab')₂和Fv)。术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文中可与“抗体”互换使用。本文涵盖的抗体包括单结构域抗体,诸如仅有重链的抗体。

[0066] 术语“单结构域抗体”或“sdAb”是指具有三个互补决定区(CDR)的单一抗原结合多肽。单独sdAb能够在不与相应含CDR多肽配对下结合至抗原。在一些情况下,单结构域抗体从骆驼科动物HCAb加以工程改造,并且它们的重链可变结构域在本文中被称为“V_H”。术语“仅有重链的抗体”或“HCAb”是指包含重链、但缺乏通常见于4链抗体中的轻链的功能性抗体。已知骆驼科动物(诸如骆驼、美洲驼或羊驼)产生HCAb。一些V_H还可被称为纳米抗体。骆驼科动物sdAb是最小已知抗原结合抗体片段之一(参见例如,Hamers-Casterman等人,Nature 363:446-8(1993);Greenberg等人,Nature 374:168-73(1995);Hassanzadeh-Ghassabeh等人,Nanomedicine(Lond),8:1013-26(2013))。基本V_H从N末端至C末端具有以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1至FR4分别是指框架区1至4,并且其中CDR1至CDR3是指互补决定区1至3。

[0067] 抗体的“可变区”或“可变结构域”是指所述抗体的重链或轻链的氨基末端结构域。重链和轻链的可变结构域可分别被称为“V_H”和“V_L”。这些结构域通常是抗体的最可变部分(相对于相同类别的其他抗体),并且含有抗原结合位点。来自骆驼科动物物种的仅有重链的抗体具有被称为“V_HH”的单一重链可变区。

[0068] 术语“可变”是指以下事实:在抗体之间,可变结构域的某些区段在序列方面广泛不同。V结构域介导抗原结合,并且限定特定抗体对它的特定抗原的特异性。然而,跨越可变结构域的整个间距,可变性并非均匀分布。而是在轻链可变结构域与重链可变结构域两者中,它均集中在三个称为高变区(HVR)的区段中。可变结构域的更高度保守部分被称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个主要采用 β 片层构型,由三个HVR连接的FR区,所述HVR形成连接 β 片层结构,并且在一些情况下形成 β 片层结构的一部分的环。每个链中的HVR通过FR区紧密邻近固持在一起,并且与来自另一链的HVR一起有助于形成抗体的抗原结合位点(参见Kabat等人,Sequences of Immunological Interest,第五版,National Institute of Health,Bethesda,Md.(1991))。恒定结构域不直接涉及于抗体与抗原的结合中,但展现各种效应功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性。

[0069] “Fv”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。这个片段由处于紧密非共价缔合的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。由这两个结构域的折叠,发散出贡献用于抗原结合的氨基酸残基,并且对抗体赋予抗原结合特异性的六个高变环(来自H链和L链各3个环)。然而,即使单一可变结构域(或仅包含三个对抗原具有特

异性的HVR的半个Fv)也能够识别和结合抗原,但亲和力低于整个结合位点。

[0070] “单链Fv”,也缩写为“sFv”或“scFv”,是包含连接成单一多肽链的V_H抗体结构域和V_L抗体结构域的抗体片段。优选地,sFv多肽还包含在V_H结构域与V_L结构域之间的使得sFv能够形成抗原结合所需的结构的肽接头。

[0071] 如本文所用,术语“特异性结合”、“特异性识别”或“对……具有特异性”是指可测量和可重现相互作用,诸如靶标与抗原结合蛋白(诸如抗原结合结构域、配体、经工程改造TCR、CAR或嵌合受体)之间的结合,所述结合确定在包括生物分子的分子的异质群体存在下存在所述靶标。举例来说,特异性结合靶标(其可为表位)的抗原结合蛋白是相比于它结合其他靶标,以更大亲和力、亲合力、更易于和/或以更久持续时间结合这个靶标的抗原结合蛋白。在一些实施方案中,如例如通过放射免疫测定(RIA)所测量,抗原结合蛋白与无关靶标的结合程度小于所述抗原结合蛋白与靶标的结合的约10%。在一些实施方案中,特异性结合靶标的抗原结合蛋白具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 的解离常数(K_d)。在一些实施方案中,抗原结合蛋白特异性结合蛋白质上在来自不同物种的所述蛋白质之间保守的表位。在一些实施方案中,特异性结合可包括但不要求排他性结合。

[0072] 术语“特异性”是指抗原结合蛋白(诸如CAR或抗体)对抗原的特定表位的选择性识别。天然抗体例如具有单特异性。如本文所用的术语“多特异性”表示抗原结合蛋白(诸如CAR或抗体)具有两个或更多个抗原结合位点,其中至少两个结合不同抗原。如本文所用的“双特异性”表示抗原结合蛋白(诸如CAR或抗体)具有两种不同抗原结合特异性。如本文所用的术语“单特异性”表示具有一个或多个结合位点,其中每个结合位点结合相同抗原的抗原结合蛋白(诸如CAR或抗体)。

[0073] 如本文所用的术语“价”表示在抗原结合蛋白(诸如CAR或抗体)中存在指定数目的结合位点。例如天然抗体或全长抗体具有两个结合位点,并且是二价的。因此,术语“三价”、“四价”、“五价”和“六价”分别表示在抗原结合蛋白(诸如CAR或抗体)中存在两个结合位点、三个结合位点、四个结合位点、五个结合位点和六个结合位点。

[0074] 术语“细胞外结构域”是指在细胞外的膜受体的片段或部分。细胞外结构域是或包括配体结合或识别结构域(例如,本申请中的TGF β R1和TGF β R2的TGF β 结合结构域)。

[0075] 术语“细胞内结构域”是指转导效应子功能信号并指导细胞执行专用功能的蛋白质的部分。虽然通常可采用整个细胞内结构域,但在一些情况下没有必要使用整个结构域。就使用细胞内结构域的截短部分而言,这种截短的部分可用来代替整个结构域,只要其转导效应子功能信号。术语细胞内结构域意味着包括足以传导效应子功能信号的细胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0076] 术语“跨膜结构域”或“TM结构域”是将多肽锚定至细胞的质膜的结构域。TM结构域可源自天然、合成、半合成或重组来源。跨膜结构域可来自细胞外结构域或细胞内结构域的相同受体分子。

[0077] 本文的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区域,包括天然序列Fc区和变异Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能变化,但人IgG重链Fc区通常被定义为从在位置Cys226处的氨基酸残基或从Pro230伸展至其羧基末端。Fc区的C末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)可例如在抗体的产生或纯化期间,或通过重组工程改造编码抗体的重链的核酸来移除。因此,完整抗体的组合物可包含所有K447残基都被移除的抗体群体、无

K447残基被移除的抗体群体以及具有含K447残基的抗体和不含K447残基的抗体的混合物的抗体群体。适用于本文所述的抗体中的天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2 (IgG2A、IgG2B)、IgG3和IgG4。

[0078] “结合亲和力”通常是指分子(例如抗体、CAR)的单一结合位点与它的结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗体和抗原,或CAR和抗原)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对它的配偶体Y的亲和力可通常由解离常数(Kd)表示。亲和力可通过本领域中已知的常用方法包括本文所述的那些来测量。低亲和力抗体通常缓慢结合抗原并倾向于容易解离,而高亲和力抗体通常更快结合抗原并倾向于更久保持结合。测量结合亲和力的多种方法在本领域中是已知的,其中任一者都可出于本申请的目的加以使用。在下文中描述用于测量结合亲和力的具体说明性和示例性实施方案。

[0079] 关于肽、多肽或核酸的“序列同一性百分比(%)”和“同源性”定义为在将序列对准以及必要时引入空位以实现最大序列同一性百分比,并且不将任何保守性取代考虑为序列同一性的一部分之后,候选序列中与特定肽、多肽或核酸序列中的氨基酸残基或核苷酸同一的氨基酸残基或核苷酸的百分比。出于确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以属于本领域中的技能的各种方式实现,例如使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™ (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可确定适用于测量比对的参数,包括为历经所比较序列的全长实现最大对准所需的任何算法。

[0080] 如本文所用的“嵌合抗原受体”或“CAR”是指可用于将一种或多种抗原特异性移植至免疫效应细胞诸如T细胞上的经遗传工程改造的受体。一些CAR也被称为“人工T细胞受体”、“嵌合T细胞受体”或“嵌合免疫受体”。在一些实施方案中,CAR包含对一种或多种抗原(诸如肿瘤抗原)具有特异性的细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域以及T细胞和/或其他受体的细胞内信号传导结构域。“CAR-T”是指表达CAR的T细胞。“GPC3 CAR”是指具有对GPC3具有特异性的细胞外结合结构域的CAR。“双表位CAR”是指具有对两种不同表位具有特异性的细胞外结合结构域的CAR。

[0081] 本文所述的“经分离”核酸分子(例如,编码融合蛋白、CAR或经工程改造TCR)是脱离至少一种它在它被产生所处的环境中通常与其相伴的污染物核酸分子加以鉴定和分离的核酸分子。优选地,经分离核酸不与和产生环境相关的所有组分相伴。编码本文多肽和抗体的经分离核酸分子呈除它见于自然界中所采用的形式或配置以外的形式。因此,经分离核酸分子不同于细胞中天然存在的编码本文多肽和抗体的核酸。

[0082] 当核酸被放置与另一核酸序列处于功能性关系时,所述核酸是“可操作地连接的”。举例来说,如果前序列或分泌前导物的DNA被表达为参与多肽的分泌的前蛋白质,那么所述DNA可操作地连接至所述多肽的DNA;如果启动子或增强子影响编码序列的转录,那么所述启动子或增强子可操作地连接至所述编码序列;或如果核糖体结合位点被定位以有助于翻译,那么所述核糖体结合位点可操作地连接至编码序列。通常,“可操作地连接”意指所连接的DNA序列是邻近的,并且在分泌前导物的情况下,是邻近的并且处于阅读相中。然而,增强子不必是邻近的。连接通过在适宜限制位点处进行连接来实现。如果所述位点不存在,那么根据常规规范使用合成寡核苷酸衔接头或接头。

[0083] 除非另外规定,否则“编码氨基酸序列的核酸序列”包括是彼此的简并形式,并且

编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列还可在编码所述蛋白质的核苷酸序列可在某一形式中含有一个或多个内含子的程度上包括内含子。

[0084] 如本文所用的术语“载体”是指能够使它与其连接的另一核酸繁殖的核酸分子。所述术语包括呈自我复制性核酸结构形式的载体以及并入至它已被引入至其中的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导它们所操作性地连接的核酸的表达。这类载体在本文中被称为“表达载体”。

[0085] 如本文所用的术语“转染”或“转化”或“转导”是指外源性核酸被转移或引入至宿主细胞中所采用的过程。“经转染”或“经转化”或“经转导”细胞是已用外源性核酸转染、转化或转导的细胞。细胞包括原代主题细胞和它的子代。

[0086] 如本文所用,“治疗(treatment/treating)”是用于获得包括临床结果的有益或所需结果的方法。出于本发明的目的,有益或所需临床结果包括但不限于以下中的一者或多者:减轻一种或多种由疾病所致的症状,减弱疾病的程度,使疾病稳定(例如预防或延迟疾病的恶化),预防或延迟疾病的扩散(例如转移),预防或延迟疾病的复发,延迟或减缓疾病的进展,改善疾病状态,提供疾病的缓解(部分或完全),降低一种或多种其他药物的为治疗疾病所需的剂量,延迟疾病的进展,增加生活品质和/或延长存活期。“治疗”还涵盖减轻癌症的病理学后果。本申请的方法涵盖这些治疗方面中的任何一者或多者。

[0087] 如本文所用,“个体”或“受试者”是指哺乳动物,包括但不限于人、牛、马、猫、犬、啮齿动物或灵长类动物。在一些实施方案中,个体是人。

[0088] 本文所用的术语“有效量”是指剂诸如本文所述的经工程改造T细胞或其药物组合物的足以治疗指定病症、疾患或疾病,诸如改善、缓和、减弱和/或延迟它的一种或多种症状(例如癌症或感染性疾病)的量。关于癌症,有效量包括足以导致肿瘤收缩和/或使肿瘤的生长速率降低(诸如抑制肿瘤生长)或预防或延迟其他非所要细胞增殖的量。在一些实施方案中,有效量是足以使发展延迟的量。在一些实施方案中,有效量是足以预防或延迟复发的量。有效量可以一次或多次施用来施用。有效量的剂(例如经工程改造T细胞)或组合物可:(i)降低癌细胞的数目;(ii)降低肿瘤尺寸;(iii)抑制、延缓、在一定程度上减缓,并且优选终止癌细胞浸润至外周器官中;(iv)抑制(即在一定程度上减缓,并且优选终止)肿瘤转移;(v)抑制肿瘤生长;(vi)预防或延迟肿瘤的发生和/或复发;和/或(vii)在一定程度上减轻一种或多种与癌症相关的症状。在感染性疾病诸如病毒性感染的情况下,治疗有效量的本文所述的经工程改造T细胞或其组合物可降低由病原体感染的细胞的数目;降低病原体源性抗原的产生或释放;抑制(即在一定程度上减缓,并且优选终止)病原体扩散至未感染细胞;和/或在一定程度上减轻一种或多种与感染相关的症状。在一些实施方案中,治疗有效量是使患者的存活期延长的量

[0089] 如本文所用,“延迟”疾病的发展意指推迟、阻碍、减缓、延缓、稳定和/或延后所述疾病(例如癌症或感染性疾病)的发展。视病史和/或所治疗的个体而定,这个延迟可具有不同时长。如为本领域技术人员所显而易见,充分或显著延迟可实际上涵盖预防,因为个体不显现疾病。“延迟”癌症的发展的方法是以下方法:当相较于不使用所述方法时,所述方法在给定时间范围内使疾病发展的概率降低和/或在给定时间范围内使疾病的程度降低。这类比较通常基于使用统计显著个体数目进行的临床研究。癌症发展可为可使用标准方法进行检测的,所述标准方法包括但不限于计算机轴向断层摄影术(CAT扫描)、磁共振成像(MRI)、

腹部超声、凝结测试、动脉造影术或活检。发展还可指在初始时可为不可检测的癌症进展，并且包括发生、复发和发作。

[0090] 如本文所用，术语“自体”意指任何物质源于它稍后将被再引入至其中的同一个体。

[0091] “同种异体”是指移植物源于相同物种的不同个体。“同种异体T细胞”是指来自具有与接受者匹配的组织人白细胞抗原 (HLA) 类型的供者的T细胞。通常，基于在HLA基因的三个或更多个基因座处的变异性进行匹配，并且在这些基因座处的完全匹配是优选的。在一些情况下，同种异体移植供者可为相关的 (通常是密切HLA匹配的兄弟姐妹)，同种同基因的 (患者的单卵“全等”双胞胎) 或无关的 (供者是不相关的，并且被发现具有极其密切的HLA匹配度)。HLA基因分为两个种类 (I型和II型)。一般来说，I型基因 (即HLA-A、HLA-B或HLA-C) 的不匹配使移植物排斥的风险增加。II型HLA基因 (即HLA-DR或HLA-DQB1) 的不匹配使移植物抗宿主疾病 (GvHD) 的风险增加。

[0092] 如本文所用的“患者”包括受疾病 (例如癌症、病毒性感染) 折磨的任何人。术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文中可互换使用。术语“供给受试者”或“供者”在本文中是指其细胞正被获得用于进一步体外工程改造的受试者。供给受试者可为待用通过本文所述的方法来产生的细胞群体治疗的患者 (即自体供者)，或可为捐献血液样品 (例如淋巴细胞样品) 的个体 (即同种异体供者)，在产生通过本文所述的方法来产生的细胞群体后，所述血液样品将用于治疗不同个体或患者。接受通过本发明方法制备的细胞的那些受试者可被称为“接受者”或“接受受试者”。

[0093] 术语“T细胞受体”或“TCR”是指由在T细胞的表面上配对的 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ 链组成的异二聚受体。每个 α 、 β 、 γ 和 δ 链由两个Ig样结构域组成：通过互补决定区 (CDR) 来赋予抗原识别的可变结构域 (V)，继之以通过连接肽和跨膜 (TM) 区来锚定于细胞膜的恒定结构域 (C)。TM区与CD3信号传导装置的不变亚基缔合。每个V结构域具有三个CDR。这些CDR与抗原肽和所述抗原肽所结合的由主要组织相容性复合物编码的蛋白质之间的复合物 (pMHC) 相互作用 (Davis和Bjorkman (1988) *Nature*, 334, 395-402; Davis等人 (1998) *Annu Rev Immunol*, 16, 523-544; Murphy (2012), xix, 868页)。

[0094] 如本文所用的术语“刺激”是指由细胞表面部分的连接所诱导的初级应答。举例来说，在受体的情形下，这种刺激必然伴有受体的连接以及后续信号转导事件。关于对T细胞的刺激，这种刺激是指T细胞表面部分的连接，在一个实施方案中，所述连接随后诱导信号转导事件，诸如结合TCR/CD3复合物。此外，刺激事件可使细胞活化，并且将分子的表达或分泌上调或下调，诸如将TGF- β 下调。因此，即使在不存在直接信号转导事件下，细胞表面部分的连接也可导致细胞骨架结构的重新组织，或细胞表面部分的聚结，所述情况中的每一者都可用于增强、改进或改变后续细胞应答。

[0095] 如本文所用的术语“活化”是指细胞在进行充分细胞表面部分连接以诱导可觉察的生物化学或形态变化之后的状态。在T细胞的情形内，这种活化是指已被充分刺激以诱导细胞增殖的T细胞的状态。T细胞的活化还可诱导细胞因子产生以及调控性或细胞溶解性效应功能的执行。在其他细胞的情形内，这个术语暗示特定物理化学过程的上调或下调。术语“活化的T细胞”指示当前正经受细胞分裂、细胞因子产生、调控性或细胞溶解性效应功能的执行，和/或新近已经受“活化”的过程的T细胞。

[0096] 如本文所用的术语“功能性外源性受体”是指在引入至本文所述的T细胞或融合蛋白表达性T细胞中之后保留它的生物活性的外源性受体(例如,CAR、经工程改造受体、经工程改造TCR或抗体偶联TCR(ACTR))。生物活性包括但不限于外源性受体在特异性结合分子(例如癌症抗原或ACTR的抗体),适当地转导下游信号,诸如诱导细胞增殖、细胞因子产生和/或调控性或细胞溶解性效应功能的执行的方面的能力。

[0097] 应了解本文所述的本申请的实施方案包括“由……组成”和/或“基本上由……组成”实施方案。

[0098] 在本文中提及“约”某一值或参数包括(并且描述)涉及那个值或参数本身的变化形式。举例来说,涉及“约X”的描述包括对“X”的描述。

[0099] 如本文所用,提及“非”某一值或参数通常意指并且描述“不同于”某一值或参数。举例来说,方法不用于治疗X类型的癌症意指方法用于治疗不同于X的类型的癌症。

[0100] 本文所用的术语“约X-Y”具有与“约X至约Y”相同的含义。

[0101] 除非上下文另外明确规定,否则如本文以及随附权利要求中所用,单数形式“一个(种)”、“或”和“这个(种)”包括复数个(种)指示物。

[0102] II. 本发明的融合蛋白

[0103] 本申请在一个方面提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R1或TGF β R2中的一者的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)第一跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1或IL-23R中的一者的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R1或TGF β R2中的另一者的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1或IL-23R中的另一者的细胞内结构域的第二细胞内结构域。

[0104] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R1的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)包含TGF β R1的跨膜结构域的第一跨膜结构域,iii)包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R2的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)包含TGF β R2的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,TGF β R1的细胞外结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,TGF β R2的细胞外结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,IL-23R的细胞内结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,IL-12R β 1的细胞内结构域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或具有至少约80%序列同一性(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)的功能变体。在一些实施方案中,TGF β R1的跨膜结构域包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,TGF β R2的跨膜结构域包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体。在一

些实施方案中, TGF β R1或TGF β R2的细胞外结构域是TGF β R1或TGF β R2的突变或截短的细胞外结构域。在一些实施方案中, IL-12R β 1或IL-23R的细胞内结构域是IL-12R β 1或IL-23R的突变或截短的细胞内结构域。在一些实施方案中, IL-23R的突变或截短的细胞内结构域具有SEQ ID NO:17或18的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。在一些实施方案中, IL-12R β 1的截短的细胞内结构域具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。在一些实施方案中, 第一多肽和/或第二多肽还包含在所述多肽的N末端的信号肽。在一些实施方案中, 信号肽是来自TGF β R1或TGF β R2的信号肽, 任选地多肽中的信号肽和细胞外结构域源自同一分子。在一些实施方案中, 信号肽具有SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列。在一些实施方案中, 第一细胞外结构域和第二细胞外结构域形成TGF β 的结合位点, 其中第一细胞内结构域和第二细胞内结构域形成IL-23受体复合物, 并且其中在所述融合蛋白与TGF β 结合后, 传递通过所述IL-23受体复合物进行的信号传导。在一些实施方案中, 第一多肽和/或第二多肽还包含在跨膜结构域与细胞内结构域之间的近膜肽。在一些实施方案中, 近膜肽具有约3至约40个氨基酸的长度。在一些实施方案中, 近膜肽源自TGF β R1、TGF β R2、IL-23R或IL-12R β 1的近膜区域。在一些实施方案中, 近膜肽包含SEQ ID NO:9-12中任一个所示的氨基酸序列。在一些实施方案中, 经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0105] 在一些实施方案中, 提供了融合蛋白, 所述融合蛋白包含a) 第一多肽, 所述第一多肽包含i) 包含TGF β R2的细胞外结构域的第一细胞外结构域, ii) 包含TGF β R2的跨膜结构域的第一跨膜结构域, 和iii) 包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域; 以及b) 第二多肽, 所述第二多肽包含i) 包含TGF β R1的细胞外结构域的第二细胞外结构域, ii) 包含TGF β R1的跨膜结构域的第二跨膜结构域, 和iii) 包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中, TGF β R1的细胞外结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体。在一些实施方案中, TGF β R2的细胞外结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体。在一些实施方案中, IL-23R的细胞内结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体。在一些实施方案中, IL-12R β 1的细胞内结构域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或具有至少约80%序列同一性 (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 的功能变体。在一些实施方案中, TGF β R1的跨膜结构域包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体。在一些实施方案中, TGF β R2的跨膜结构域包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体。在一些实施方案中, TGF β R1或TGF β R2的细胞外结构域是TGF β R1或TGF β R2的突变或截短的细胞外结构域。在一些实施方案中, IL-12R β 1或IL-23R的细胞内结构域是IL-12R β 1或IL-23R的突变或截短的细胞内结构域。在一些实施方案中, IL-23R的突变或截短的细胞内结构域具有

SEQ ID NO:17或18的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。在一些实施方案中,IL-12R β 1的截短的细胞内结构域具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。在一些实施方案中,第一多肽和/或第二多肽还包含在所述多肽的N末端的信号肽。在一些实施方案中,信号肽是来自TGF β R1或TGF β R2的信号肽,任选地多肽中的信号肽和细胞外结构域源自同一分子。在一些实施方案中,信号肽具有SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一细胞外结构域和第二细胞外结构域形成TGF β 的结合位点,其中第一细胞内结构域和第二细胞内结构域形成IL-23受体复合物,并且其中在所述融合蛋白与TGF β 结合后,传递通过所述IL-23受体复合物进行的信号传导。在一些实施方案中,第一多肽和/或第二多肽还包含在跨膜结构域与细胞内结构域之间的近膜肽。在一些实施方案中,近膜肽具有约3至约40个氨基酸的长度。在一些实施方案中,近膜肽源自TGF β R1、TGF β R2、IL-23R或IL-12R β 1的近膜区域。在一些实施方案中,近膜肽包含SEQ ID NO:9-12中任一个所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0106] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含TGF β R1的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii) 包含IL-23R的跨膜结构域的第一跨膜结构域,和iii) 包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含TGF β R2的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii) 包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii) 包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,TGF β R1的细胞外结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,TGF β R2的细胞外结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,IL-23R的细胞内结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,IL-12R β 1的细胞内结构域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或具有至少约80%序列同一性 (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 的功能变体。在一些实施方案中,IL-23R的跨膜结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,IL-12R β 1的跨膜结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,TGF β R1或TGF β R2的细胞外结构域是TGF β R1或TGF β R2的突变或截短的细胞外结构域。在一些实施方案中,IL-12R β 1或IL-23R的细胞内结构域是IL-12R β 1或IL-23R的突变或截短的细胞内结构域。在一些实施方案中,IL-23R的突变或截短的细胞内结构域具有SEQ ID NO:17或18的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。在一些实施方案中,IL-12R β 1的截短的细胞内结构域具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约

80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体。在一些实施方案中,第一多肽和/或第二多肽还包含在所述多肽的N末端的信号肽。在一些实施方案中,信号肽是来自TGF β R1或TGF β R2的信号肽,任选地多肽中的信号肽和细胞外结构域源自同一分子。在一些实施方案中,信号肽具有SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一细胞外结构域和第二细胞外结构域形成TGF β 的结合位点,其中第一细胞内结构域和第二细胞内结构域形成IL-23受体复合物,并且其中在所述融合蛋白与TGF β 结合后,传递通过所述IL-23受体复合物进行的信号传导。在一些实施方案中,第一多肽和/或第二多肽还包含在细胞外结构域与跨膜结构域之间的近膜肽。在一些实施方案中,近膜肽具有约3至约40个氨基酸的长度。在一些实施方案中,近膜肽源自TGF β R1、TGF β R2、IL-23R或IL-12R β 1的近膜区域。在一些实施方案中,近膜肽包含SEQ ID NO:9-12中任一个所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0107] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R2的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)包含IL-23R的跨膜结构域的第一跨膜结构域,和iii)包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R1的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,TGF β R1的细胞外结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,TGF β R2的细胞外结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,IL-23R的细胞内结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,IL-12R β 1的细胞内结构域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或具有至少约80%序列同一性 (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)的功能变体。在一些实施方案中,IL-23R的跨膜结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,IL-12R β 1的跨膜结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,TGF β R1或TGF β R2的细胞外结构域是TGF β R1或TGF β R2的突变或截短的细胞外结构域。在一些实施方案中,IL-12R β 1或IL-23R的细胞内结构域是IL-12R β 1或IL-23R的突变或截短的细胞内结构域。在一些实施方案中,IL-23R的突变或截短的细胞内结构域具有SEQ ID NO:17或18的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体。在一些实施方案中,IL-12R β 1的截短的细胞内结构域具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体。在一些实施方案中,第一多肽和/或第二多肽还包含在所述多肽的N末端的信号肽。在一些实施方案中,信号肽是来自TGF β R1或TGF β R2的信号肽,任选地多肽中的信号肽和细胞外结构域源自

同一分子。在一些实施方案中,信号肽具有SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一细胞外结构域和第二细胞外结构域形成TGF β 的结合位点,其中第一细胞内结构域和第二细胞内结构域形成IL-23受体复合物,并且其中在所述融合蛋白与TGF β 结合后,传递通过所述IL-23受体复合物进行的信号传导。在一些实施方案中,第一多肽还包含在第一细胞外结构域与第一跨膜结构域之间的第一近膜序列。在一些实施方案中,第二多肽还包含在第二细胞外结构域与第二跨膜结构域之间的第二近膜序列。近膜序列可充当两个功能结构域之间的过渡,以提供柔性和/或促进融合蛋白的寿命或信号转导。在一些实施方案中,第一和/或第二多肽中的第一或第二近膜结构域和第一或第二跨膜结构域源自同一分子。在一些实施方案中,第一和/或第二近膜肽源自TGF β R1、TGF β R2、IL-23R或IL-12R β 1的近膜区域。在一些实施方案中,第一和/或第二近膜结构域具有约3至约40个氨基酸的长度。在一些实施方案中,近膜肽包含SEQ ID NO:9-12中任一个所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一近膜肽源自IL-23R(例如,SEQ ID NO:11),和/或第二近膜肽源自IL-12R β 1(例如,SEQ ID NO:12)。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0108] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体的第一细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体的第一跨膜结构域,iii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体的第二细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体的第二跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:16或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,第一多肽还包含在第一跨膜结构域与第一细胞内结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体。在一些实施方案中,第二多肽还包含在第二跨膜结构域与第二细胞内结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0109] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体的第一细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、

96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体的第一跨膜结构域,和iii)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体的第二细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体的第二跨膜结构域,和iii)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,第一多肽还包含在第一跨膜结构域与第一细胞内结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体。在一些实施方案中,第二多肽还包含在第二跨膜结构域与第二细胞内结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0110] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体的第一细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体的第一跨膜结构域,和iii)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体的第二细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体的第二跨膜结构域,和iii)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,第一多肽还包含在第一细胞外结构域与第一跨膜结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体。在一些实施方案中,第二多肽还包含在第二细胞外结构域与第二跨膜结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0111] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多

肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第一细胞外结构域, ii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体的第一跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第二细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体的第二跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,第一多肽还包含在第一细胞外结构域与第一跨膜结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。在一些实施方案中,第二多肽还包含在第二细胞外结构域与第二跨膜结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGFβ结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0112] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第一细胞外结构域, ii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体的第一跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第二细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体的第二跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,第一多肽还包含在第一细胞外结构域与第一跨膜结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。在一些实施方案中,第二多肽还包含在第二细胞外结构域与第二跨膜结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。

[0113] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第一细胞外结构域, ii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体的第一跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第二细胞外结构域, ii) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体的第二跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,第一多肽还包含在第一细胞外结构域与第一跨膜结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。在一些实施方案中,第二多肽还包含在第二细胞外结构域与第二跨膜结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。

[0114] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽从N末端至C末端包含,i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第一细胞外结构域, ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的第一跨膜结构域, iii) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的第一接头,和iv) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N末端至C末端包含,i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第二细胞外结构域, ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的第二跨膜结构域, iii) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的第二接头,和iv) 包含SEQ ID NO:16的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0115] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽从N末端至C末端包含,i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第一细胞外结构域, ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的第一跨膜结构域, iii) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的第一接头,和iv) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N末端至C末端包含,i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第二细胞外结构域, ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的第二跨膜结构域, iii) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的第二接头,和iv) 包含SEQ ID NO:16的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0116] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽从N末端至C末端包含,i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第一细胞外结构域, ii) 包含

SEQ ID NO:11的氨基酸序列的第一接头,iii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N末端至C末端包含,i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的第二接头,ii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iv)包含SEQ ID NO:16的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0117] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽从N末端至C末端包含,i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的第一接头,iii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N末端至C末端包含,i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的第二接头,ii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iv)包含SEQ ID NO:16的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0118] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽从N末端至C末端包含,i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的第一接头,iii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iv)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N末端至C末端包含,i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的第二接头,ii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iv)包含SEQ ID NO:16的第二细胞内结构域。

[0119] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽从N末端至C末端包含,i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的第一接头,iii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iv)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N末端至C末端包含,i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的第二接头,ii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iv)包含SEQ ID NO:19的第二细胞内结构域。

[0120] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a)包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体的第一多肽,和b)包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体的第二多肽。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0121] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a)包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的功能变体的第一多肽,和b)包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列或

具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第二多肽。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0122] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第一多肽,和b) 包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第二多肽。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0123] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第一多肽,和b) 包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第二多肽。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0124] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第一多肽,和b) 包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第二多肽。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0125] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第一多肽,和b) 包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体的第二多肽。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0126] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含SEQ ID NO:20-27 (例如, SEQ ID NO:20-25) 中任一个所示的氨基酸序列,或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体。

[0127] 在一些实施方案中,第一多肽和/或第二多肽还包含在所述多肽的N末端的信号肽。在一些实施方案中,信号肽是来自TGF β R1或TGF β R2的信号肽,任选地多肽中的信号肽和细胞外结构域源自同一分子。在一些实施方案中,信号肽具有SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一细胞外结构域和第二细胞外结构域形成TGF β 的结合位点,其中第一细胞内结构域和第二细胞内结构域形成IL-23受体复合物,并且其中在所述融合蛋白与TGF β 结合后,传递通过所述IL-23受体复合物进行的信号传导。

[0128] 在一些实施方案中,第一多肽和第二多肽在单一多肽中,并且其中第一多肽和第二多肽被多顺反子元件隔开。在一些实施方案中,多顺反子元件包含选自T2A、P2A、E2A或F2A组成的组的2A自裂解肽。在一些实施方案中,第一多肽在第二多肽的N末端。在一些实施

方案中,第一多肽在第二多肽的C末端。

[0129] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含单一多肽,所述单一多肽从N末端至C末端包含:包含TGF β R1的细胞外结构域的第一细胞外结构域、包含TGF β R1的跨膜结构域的第一跨膜结构域、包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含TGF β R2的细胞外结构域的第二细胞外结构域、包含TGF β R2的跨膜结构域的第二跨膜结构域和包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0130] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含单一多肽,所述单一多肽从N末端至C末端包含:包含TGF β R2的细胞外结构域的第一细胞外结构域、包含TGF β R2的跨膜结构域的第一跨膜结构域、包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含TGF β R1的细胞外结构域的第二细胞外结构域、包含TGF β R1的跨膜结构域的第二跨膜结构域和包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0131] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含单一多肽,所述单一多肽从N末端至C末端包含:包含TGF β R1的细胞外结构域的第一细胞外结构域、包含TGF β R1的跨膜结构域的第一跨膜结构域、包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含TGF β R2的细胞外结构域的第二细胞外结构域、包含TGF β R2的跨膜结构域的第二跨膜结构域和包含IL-23R的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0132] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含单一多肽,所述单一多肽从N末端至C末端包含:包含TGF β R1的细胞外结构域的第一细胞外结构域、包含IL-23R的跨膜结构域的第一跨膜结构域、包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含TGF β R2的细胞外结构域的第二细胞外结构域、包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域和包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0133] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含单一多肽,所述单一多肽从N末端至C末端包含:包含TGF β R2的细胞外结构域的第一细胞外结构域、包含IL-23R的跨膜结构域的第一跨膜结构域、包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域、2A自裂解肽、包含TGF β R1的细胞外结构域的第二细胞外结构域、包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域和包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0134] 在一些实施方案中,提供了融合蛋白,所述融合蛋白包含单一多肽,所述单一多肽从N末端至C末端包含:包含TGF β R1的细胞外结构域的第一细胞外结构域、包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第一跨膜结构域、包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第一细胞内结构域、2A自

裂解肽、包含TGF β R2的细胞外结构域的第二细胞外结构域、包含IL-23R的跨膜结构域的第二跨膜结构域和包含IL-23R的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0135] 在一些实施方案中,提供了由核酸编码的融合蛋白,所述核酸包含SEQ ID NO:28-35(例如,SEQ ID NO:28-33)中任一个所示的核酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体。

[0136] TGF β 信号传导、TGF β R1和TGF β R2

[0137] 包含三种同种型的TGF- β 是一种强效的多效性细胞因子,其调控哺乳动物几乎所有细胞类型和组织的发育、分化和稳态。三种TGF- β 同种型TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3中的每一种最初合成为75-kDa同二聚体,称为原TGF- β 。然后原TGF- β 在高尔基体中被裂解以形成成熟TGF- β 同二聚体。这些25-kDa同二聚体与潜伏期相关蛋白相互作用,形成小的潜在复合物。在内质网中,单个潜在TGF- β 结合蛋白与TGF- β 同二聚体形成二硫键以形成大的潜在复合物,从而允许靶向输出至细胞外基质。输出后,大的潜在复合物与细胞膜上的纤连蛋白原纤蛋白和硫酸肝素蛋白聚糖相互作用。最终,大的潜在复合物定位于细胞外基质中富含原纤蛋白的微原纤维,并储存在那里直到其活化。在那里,潜在TGF- β 被储存,其中在其活化之前,其在生物学上仍然是不可用的。潜在TGF- β 由多种因素活化,包括蛋白酶、血小板反应蛋白1、活性氧类和整联蛋白。这些因子通过将成熟TGF- β 从微原纤维结合的大潜在复合物中释放出来而释放所述成熟TGF- β 。这通过从潜伏期相关蛋白释放、潜在TGF- β 结合蛋白的降解或潜在复杂构象的修饰而发生。

[0138] 一旦配体被活化,TGF- β 信号传导就通过SMAD和非SMAD途径介导,以调控转录、翻译、微小RNA生物发生、蛋白质合成和翻译后修饰。尽管TGF- β 的下游效应在很大程度上依赖于背景,但它的信号传导在许多细胞类型中是至少部分保守的。在经典途径中,TGF- β 配体与募集1型TGF- β 受体(TGF β R1)的2型TGF- β 受体(TGF β R2)结合。这些受体使丝氨酸/苏氨酸残基二聚化并自磷酸化,从而允许TGF β R1对SMAD2和SMAD3的磷酸化。现在活化的SMAD蛋白与SMAD受体活化锚(SARA)蛋白分离,与SMAD4异源寡聚化,并易位至细胞核,从而与无数转录共调控因子和其他因子相互作用以介导靶基因表达或阻抑。

[0139] 已知人TGF β R1或TGF β R2蛋白的多种天然同种型。本文描述的TGF β R1或TGF β R2的结构域或区域(诸如TGF β R1或TGF β R2的细胞外结构域、跨膜结构域或近膜区域)涵盖源自TGF β R1或TGF β R2的天然同种型的相应结构域或区域。在一些实施方案中,源自TGF β R1或TGF β R2的天然同种型的相应结构域或区域具有与TGB23-1、TGB23-2、TGB23-3、TGB23-4、TGB23-5和TGB23-6中的任一者相当的预期效应。对于示例性TGF β R1天然同种型序列,参见NCBI登录号P36897.1(SEQ ID NO:66)、CAF02096.2(SEQ ID NO:67)、CAF02097.1(SEQ ID NO:68)和AAH71181.1(SEQ ID NO:69)。对于示例性TGF β R2天然同种型序列,参见NCBI登录号P37173.2(SEQ ID NO:70)、Q62312.1(SEQ ID NO:71)、SEQ ID NO:72的氨基酸序列和ABK42378.1(SEQ ID NO:88)。

[0140] 在一些实施方案中,本文所述的TGF β R1包含SEQ ID NO:66-69中任一个所示的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体(例如,功能变体)。

[0141] 在一些实施方案中,本文所述的TGFβR2包含SEQ ID NO:70-72和88中任一个所示的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体(例如,功能变体)。

[0142] 本文涵盖的还包括TGFβR1或TGFβR2的变体或其一部分(例如,结构域,例如细胞外结构域或跨膜结构域)。在一些实施方案中,TGFβR1和/或TGFβR2在细胞外结构域和/或跨膜结构域中具有任何一个或多个(例如,2个、3个、4个、5个或更多个)修饰(例如,取代、截短、缺失、添加,诸如本文所述的任何修饰)。在一些实施方案中,变体或经修饰的TGFβR1和/或TGFβR2以与TGFβR1和/或TGFβR2的天然同种型(例如,TGFβR1和/或TGFβR2的规范序列,例如,SEQ ID NO:66或70)相比等效或增加的方式结合至TGFβ。在一些实施方案中,变体或经修饰的TGFβR1和/或TGFβR2以与TGFβR1和/或TGFβR2的天然同种型(例如,TGFβR1和/或TGFβR2的规范序列,例如,SEQ ID NO:66或70)相比等效或增加的方式传递TGFβ信号传导。

[0143] 在一些实施方案中,TGFβR1在根据SEQ ID NO:66中所示的编号的位置24-26处具有氨基酸缺失。在一些实施方案中,TGFβR1在根据SEQ ID NO:66中所示的编号的位置26处具有丙氨酸插入。在一些实施方案中,TGFβR1具有根据SEQ ID NO:66中所示的编号的I139V取代。在一些实施方案中,TGFβR1具有根据SEQ ID NO:66中所示的编号的V153I取代。

[0144] 在一些实施方案中,TGFβR2具有根据SEQ ID NO:70中所示的编号的M36V取代。在一些实施方案中,TGFβR2具有根据SEQ ID NO:70中所示的编号的C61R取代。在一些实施方案中,TGFβR2具有根据SEQ ID NO:70中所示的编号的I73V取代。在一些实施方案中,TGFβR2具有根据SEQ ID NO:70中所示的编号的R190H取代。在一些实施方案中,TGFβR2具有根据SEQ ID NO:70中所示的编号的V191I取代。

[0145] IL-23信号传导、IL23R和IL-12Rβ1

[0146] 白细胞介素23(IL-23)是与由特定细胞外病原体引起的感染的消退有关的促炎细胞因子。此外,一些报告已经在实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)、银屑病和炎症性肠病的小鼠模型中建立了过量IL-23产生与炎症性疾病的发展之间的牢固联系。参见例如,Cua等人Nature.2003;421:744-748。此外,在来自克罗恩病、溃疡性结肠炎和银屑病患者活检物中发现IL-23的水平升高。

[0147] IL-23在肿瘤生物学中的作用仍然令人费解。参见例如,Yan等人,Cold Spring Harb Perspect Biol.2018年7月2日;10(7):a028530。一方面,各种研究似乎表明IL-23促进肿瘤生长和转移。Langowski等人的开创性论文(Nature 442:461-465,2006)首次证明缺乏IL-23p19的小鼠对DMBA/TPA诱发的皮肤乳头状瘤具有抗性,并且这种抗性与浸润皮肤的CD8⁺ T细胞的显著增加以及IL-17A、基质金属蛋白酶9(MMP9)、CD31、粒细胞(Gr-1⁺)和巨噬细胞(CD11b⁺、F4/80⁺)的减少相关。Teng等人的一项研究(Proc Natl Acad Sci 107:8328-8333,2010)进一步证实了这些小鼠对DMBA/TPA诱发的皮肤乳头状瘤的抗性表型,并且还强调了它们对MCA诱发的纤维肉瘤的抗性。此外,这项研究还表明,IL-23不仅抑制Langowski等人首次发现的T细胞的抗肿瘤功能,而且还抑制了NK细胞的抗转移功能(Teng等人2010)。在另外两个结肠癌发生的从头小鼠模型(CPC-APC,ApcMin⁺)中,IL-23和IL-17A两者均具有促肿瘤效应,因为IL-23/IL-23R/IL-17R或IL-23R/IL-17A阻断的损失导致肿瘤负荷降低(Wu等人Nat Med 15:1016-1022,2009;Grivennikov等人,Nature 491:254-258,2012)。另一方面,也有研究表明,IL-23在不同肿瘤细胞系中过表达并植入小鼠体内后可具有肿瘤抑

制效应(例如,Ngiow等人,Trends Immunol 34:548-555,2013)。

[0148] IL-23由称为p40的亚基(白细胞介素12亚基 β ,Uniprot ID:P29460)和称为p19的亚基(白细胞介素23亚基 α ,Uniprot ID Q9NPF7)组成(Oppmann等人Immunity 13:715-725 (2000))。亚基p40是与白细胞介素12(即IL-12)共有的共同亚基。已经提出IL-12和IL-23在癌症中起着相互矛盾的作用。参见例如,Yan等人,Cold Spring Harb Perspect Biol.2018年7月2日;10(7):a028530。尽管IL-12的抗肿瘤和抗转移活性被认为是由IFN- γ 的STAT4活化介导的,但IL-23的作用机制尚未完全阐明。

[0149] IL-23结合至由IL-12R β 1和IL-23R(Uniprot ID:Q5VWK5)亚基组成的其异二聚体受体复合物(即,IL-23受体)并通过其发出信号。而IL-12R β 1也是IL-12受体(其是由IL-12R β 1(Uniprot ID:P42701)和IL-12R β 2(Uniprot ID:Q99665)形成的异二聚体受体)的一部分,IL-23R是IL-23受体复合物所特有的。IL-23R与IL-12R β 1配对以赋予表达两种亚基的细胞IL-23反应性。IL-12R β 1或IL-23R的抑制将导致表达两种受体链的细胞的IL-23反应的阻断(Parham,C.等人J Immunol 168:5699-5708(2002))。

[0150] IL-23R与JAK2相关,并且以配体依赖性方式与STAT3相关。IL-12R β 1直接与Tyk2相互作用。IL-23与IL-23受体的结合导致以下JAK-STAT信号传导分子的磷酸化和活化:JAK2、Tyk2和STAT1、STAT3、STAT4、STAT5。由IL-23诱发的最显著的STAT是STAT3。IL-23诱发的STAT3活化导致磷酸化STAT3与IL-17和IL-17F启动子的直接结合。STAT3还上调ROR- γ 的表达,ROR- γ 是一种Th17特异性转录调控因子,对白细胞介素-17家族的两个成员IL-17和IL-17F的表达至关重要。IL-23诱发的JAK2活化触发PI3K cat IA类/AKT(PKB)和NF-kB p50/p65途径,所述途径是IL-17产生所必需的。AKT(PKB)可活化NF-kB p50/p65(IKK- α /IKK(cat)/I-kB途径)和STAT3(经由未确定的机制)。

[0151] 已知人IL-23R或IL-12R β 1蛋白的多种天然同种型。本文描述的IL-23R或IL-12R β 1的结构域或区域(诸如IL-23R或IL-12R β 1的跨膜结构域、近膜区域或细胞内结构域)涵盖源自IL-23R或IL-12R β 1的各种天然同种型的相应结构域或区域。在一些实施方案中,源自IL-23R或IL-12R β 1的天然同种型的相应结构域或区域具有与TGB23-1、TGB23-2、TGB23-3、TGB23-4、TGB23-5和TGB23-6中的任一者相当的预期效应。对于示例性IL-23R天然同种型序列,参见NCBI登录号AAM44229.1(SEQ ID NO:73)、AAY18347.1(SEQ ID NO:74)、AAY18349.1(SEQ ID NO:75)以及SEQ ID NO:76和77中所示的氨基酸序列。对于示例性IL-12R β 1天然同种型序,参见NCBI登录号CAC10446.1(SEQ ID NO:78)和UniProt P42701-2(SEQ ID NO:79)。

[0152] 在一些实施方案中,本文所述的IL-23R包含SEQ ID NO:73-77中任一个所示的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体(例如,功能变体)。

[0153] 在一些实施方案中,本文所述的IL-12R β 1包含SEQ ID NO:78-79中任一个所示的氨基酸序列或具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体(例如,功能变体)。

[0154] 本文涵盖的还包括IL-23R或IL-12R β 1的变体或其一部分(例如,结构域,例如跨膜结构域或细胞内结构域)。在一些实施方案中,IL-23R和/或IL-12R β 1在跨膜结构域和/或细胞内结构域中具有任何一个或多个(例如,2个、3个、4个、5个或更多个)修饰(例如,取代、截

短、缺失、添加,诸如本文所述的任何修饰)。在一些实施方案中,变体或修饰的IL-23R和/或IL-12R β 1以与IL-23R和/或IL-12R β 1的天然同种型(例如,IL-23R和/或IL-12R β 1的规范序列,例如,SEQ ID NO:73或78)相比等效或增加的方式传递经由IL-23R/IL-12R β 1的信号传导。

[0155] 在一些实施方案中,IL-23R具有选自由根据SEQ ID NO:73中所示的编号的R381Q、V475A、N481D和S581R取代组成的组的任何一个或多个取代。

[0156] 在一些实施方案中,编码IL-23R的核苷酸在IL-23R基因的3'-非翻译区具有修饰,如Zwiers等人所述。参见例如,Zwiers等人,The Journal of Immunology.2012;188:1573-1577中论述的rs10889677变体。

[0157] 跨膜结构域

[0158] 在一些实施方案中,第一跨膜结构域和第二跨膜结构域各自包含TGF β R1、TGF β R2、IL-12R β 1和IL-23R中的一者的跨膜结构域。在一些实施方案中,其中第一跨膜结构域和第二跨膜各自包含IL-12R β 1或IL-23R中的一者的跨膜结构域。在一些实施方案中,第一和/或第二多肽中的跨膜结构域和细胞外结构域源自同一分子。在一些实施方案中,第一和/或第二多肽中的跨膜结构域和细胞内结构域源自同一分子。

[0159] 在一些实施方案中,TGF β R1的跨膜结构域包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,TGF β R2的跨膜结构域包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,IL-23R的跨膜结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体。在一些实施方案中,IL-12R β 1的跨膜结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的功能变体。

[0160] 接头(例如,近膜序列)

[0161] 在一些实施方案中,第一多肽或第二多肽还包含在两个结构域之间的接头(例如,近膜序列),其中结构域中的一个跨膜结构域,并且另一结构域是细胞外结构域或细胞内结构域。不受理论束缚,接头(例如,近膜序列)可充当两个功能结构域之间的过渡,以提供柔性和/或促进融合蛋白的寿命或信号转导。在一些实施方案中,接头(例如,近膜序列)在细胞外结构域与跨膜结构域之间。在一些实施方案中,接头(例如,近膜序列)在跨膜结构域与细胞内结构域之间。

[0162] 示例性近膜序列

[0163] 在一些实施方案中,接头是源自跨膜分子的近膜区域近膜序列。在一些实施方案中,近膜序列和跨膜结构域源自同一分子。

[0164] 在一些实施方案中,在细胞外结构域与跨膜结构域之间的近膜序列是细胞外结构域的截短的C末端序列,所述细胞外结构域源自跨膜结构域所源自的同一分子。在一些实施方案中,在跨膜结构域与细胞内结构域之间的近膜序列是细胞内结构域的截短的N末端序列,所述细胞内结构域源自跨膜结构域所源自的同一分子。在一些实施方案中,近膜序列具有约2个氨基酸至约50个氨基酸(诸如约3个氨基酸至约40个氨基酸)的长度。在一些实施方

案中,近膜序列包含SEQ ID NO:9-12中任一个所示的氨基酸序列。“靠近膜的IL-23R细胞外结构域的序列”、“靠近膜的IL-12R β 1细胞外结构域的序列”、“靠近膜的TGF β R1细胞内结构域的序列”和“靠近膜的TGF β R2细胞内结构域的序列”是指示例性实施方案中使用的不同近膜序列。

[0165] 示例性接头

[0166] 示例性接头还包括下文描述的任何肽或非肽接头。在一些实施方案中,接头(诸如肽接头)包含柔性残基(诸如甘氨酸和丝氨酸),以使得相邻结构域相对于彼此自由移动。

[0167] 示例性接头还包括下文描述的任何肽或非肽接头。在一些实施方案中,接头(诸如肽接头)包含柔性残基(诸如甘氨酸和丝氨酸),以使得相邻结构域相对于彼此自由移动。

[0168] 肽接头

[0169] 在一些实施方案中,接头是肽接头。在一些实施方案中,肽接头具有约一个至约五十个、约二个至约第四个、约三个至约三十个或约四个至约二十个氨基酸的长度。在一些实施方案中,接头是GS接头。

[0170] 这种肽接头的基本技术特征是所述肽接头不包括任何聚合活性。包括不存在二级结构的促进的肽接头的特征是本领域已知的并且例如描述于Dall'Acqua等人(Biochem.(1998) 37,9266-9273);Cheadle等人(Mol Immunol (1992) 29,21-30)以及Raag和Whitlow(FASEB(1995) 9(1),73-80)。在“肽接头”的上下文中特别优选的氨基酸是Gly。此外,优选也不促进任何二级结构的肽接头。结构域与彼此的键联可通过例如遗传工程改造提供。用于制备融合和可操作连接的双特异性单链构建体并在哺乳动物细胞或细菌中表达它们的方法是本领域众所周知的(例如WO 99/54440;Ausubel,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates and Wiley Interscience,N.Y.1989and 1994;或Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,2001)。

[0171] 肽接头可以是稳定接头,其不可被蛋白酶裂解,尤其是基质金属蛋白酶(MMP)。

[0172] 接头还可以是柔性接头。示例性柔性接头包括甘氨酸聚合物(G)_n(SEQ ID NO:61)、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如,(GS)_n(SEQ ID NO:62)、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:63)、(GGGGS)_n(SEQ ID NO:64)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:65)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其他柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,并且因此可能能够充当组分之间的中性系链。甘氨酸甚至比丙氨酸获得显著更多的phi-psi空间,并且比具有更长侧链的残基限制少的多(参见Scheraga,Rev.Computational Chem.11173-142(1992))。普通技术人员将认识到,融合蛋白的设计可包括全部或部分柔性的接头,以使得接头可包括柔性接头以及赋予较少柔性结构以提供所需的融合蛋白结构的一个或多个部分。在一些实施方案中,接头是GS接头。

[0173] 在一些实施方案中,肽接头包含SEQ ID NO:57中所示的氨基酸序列。

[0174] 在一些实施方案中,肽接头包含IgG的铰链区,诸如人IgG1的铰链区。在一些实施方案中,肽接头包含IgG的铰链区,诸如人IgG1的铰链区。在一些实施方案中,肽接头包含源自IgG的铰链区,诸如人IgG1的铰链区的经修饰序列。

[0175] III.核酸和载体

[0176] 本申请还提供了编码本文所述的任何融合蛋白或其一部分的核酸。

[0177] 在一些实施方案中,核酸包含SEQ ID NO:28-35中的任一个中所示的核酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。在一些实施方案中,核酸包含SEQ ID NO:28-33中的任一个中所示的核酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。

[0178] 在一些实施方案中,核酸还包含编码功能性外源性受体 (诸如“功能性外源性受体”部分中描述的任何功能性外源性受体) 的第二核酸序列。在一些实施方案中,功能性外源性受体包含细胞外配体结合结构域和任选的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,功能性外源性受体选自由以下组成的组:经工程改造T细胞受体 (TCR)、嵌合抗原受体 (CAR)、T细胞抗原偶联物 (TAC) 或其一部分。在一些实施方案中,功能性外源性受体特异性识别肿瘤抗原。在一些实施方案中,功能性外源性受体包含CAR。在一些实施方案中,CAR包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。在一些实施方案中,CAR包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。

[0179] 在一些实施方案中,核酸编码多肽,所述多肽包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。

[0180] 在一些实施方案中,核酸包含SEQ ID NO:38中所示的核酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。

[0181] 在一些实施方案中,核酸编码多肽,所述多肽包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个) 序列同一性的变体。

[0182] 在一些实施方案中,编码功能性外源性受体的核酸序列在编码融合蛋白的一个或多个核酸序列 (“融合蛋白核酸序列”) 中的至少一个的上游,并且任选地其中功能性外源性受体核酸序列和融合蛋白核酸序列被编码第二多顺反子元件的第三核酸序列隔开。

[0183] 在一些实施方案中,编码功能性外源性受体的核酸序列在编码融合蛋白的一个或多个核酸序列 (“融合蛋白核酸序列”) 中的至少一个的下游,并且任选地其中功能性外源性受体核酸序列和融合蛋白核酸序列被编码第二多顺反子元件的第三核酸序列隔开。

[0184] 在一些实施方案中,第二多顺反子元件包含选自由T2A、P2A、E2A或F2A组成的组的2A自裂解肽。

[0185] 载体

[0186] 本申请提供了用于克隆和表达本文所述的融合蛋白和/或功能性外源性受体 (例如,经工程改造TCR或CAR) 中的任一者的载体。在一些实施方案中,载体适合用于在真核细胞,诸如哺乳动物细胞中复制和整合。在一些实施方案中,载体是病毒载体。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、单纯疱疹病毒载体以及其衍生物。在一些实施方案中,载体是慢病毒载体。参见例如,实施例2。病毒载体技术在本领域中是熟知的,并且例如描述于Sambrook等人 (2001, Molecular Cloning: A

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) 中, 以及其他病毒学和分子生物学手册中。

[0187] 已开发许多基于病毒的系统用于将基因转移至哺乳动物细胞中。举例来说, 逆转录病毒提供适宜用于基因递送系统的平台。异源性核酸可使用本领域中已知的技术来插入载体中, 并且包装在逆转录病毒粒子中。重组病毒可接着被分离, 并且在体外或离体递送至经工程改造哺乳动物细胞。许多逆转录病毒系统在本领域中是已知的。在一些实施方案中, 使用腺病毒载体。许多腺病毒载体在本领域中是已知的。在一些实施方案中, 使用慢病毒载体。在一些实施方案中, 使用自失活性慢病毒载体。举例来说, 携带融合蛋白编码序列的自失活性慢病毒载体和/或携带外源性受体 (例如经工程改造 TCR、CAR) 的自失活性慢病毒载体可用本领域中已知的方案加以包装。所得慢病毒载体可用于使用本领域中已知的方法来转导哺乳动物细胞 (诸如原代人 T 细胞)。源于逆转录病毒诸如慢病毒的载体是适于实现长期基因转移的工具, 因为它们允许转基因的长期稳定整合以及它在子代细胞中的繁殖。慢病毒载体还具有低免疫原性, 并且可转导非增殖细胞。

[0188] 在一些实施方案中, 载体是非病毒载体。在一些实施方案中, 载体是转座子, 诸如睡美人 (SB) 转座子系统或 PiggyBac 转座子系统。在一些实施方案中, 载体是基于聚合物的非病毒载体, 包括例如聚 (乳酸-共-乙醇酸) (PLGA) 和聚乳酸 (PLA)、聚 (乙烯亚胺) (PEI) 和树状体。在一些实施方案中, 载体是基于阳离子脂质的非病毒载体, 诸如阳离子脂质体、脂质纳米乳液和固体脂质纳米粒子 (SLN)。在一些实施方案中, 载体是基于肽的基因非病毒载体, 诸如聚 L-赖氨酸。适合于基因组编辑的任何已知非病毒载体都可用于将融合蛋白编码核酸和/或外源性受体 (例如, 经工程改造 TCR、CAR) 编码核酸引入至经工程改造免疫效应细胞 (例如, T 细胞)。参见例如, Yin H. 等人 Nature Rev. Genetics (2014) 15:521-555; Aronovich EL 等人 "The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy." Hum. Mol. Genet. (2011) R1:R14-20; 和 Zhao S. 等人 "PiggyBac transposon vectors: the tools of the human gene editing." Transl. Lung Cancer Res. (2016) 5 (1):120-125, 所述文献通过引用并入本文。在一些实施方案中, 通过物理方法来将任何一种或多种编码本文所述的融合蛋白和/或外源性受体 (例如, 经工程改造 TCR、CAR) 的核酸引入至经工程改造免疫效应细胞 (例如, T 细胞), 所述物理方法包括但不限于电穿孔、声致穿孔、光致穿孔、磁性转染、流体动力穿孔。

[0189] 在一些实施方案中, 载体 (例如, 病毒载体, 诸如慢病毒载体) 包含任一编码本文所述的融合蛋白和/或外源性受体 (例如, 经工程改造 TCR、CAR) 的核酸。核酸可使用本领域中的任何已知分子克隆方法 (包括例如使用限制核酸内切酶位点和一种或多种可选择标记) 来克隆至载体中。在一些实施方案中, 核酸可操作地连接至启动子。已探究用于在哺乳动物细胞中的基因表达的各种启动子, 并且本领域中已知的任何启动子都可用于本发明中。启动子可大致分类为组成型启动子或调控型启动子, 诸如诱导型启动子。

[0190] 启动子

[0191] 在一些实施方案中, 编码本文所述的融合蛋白和/或外源性受体 (例如, 经工程改造 TCR、CAR) 的核酸可操作地连接至组成型启动子。组成型启动子允许异源性基因 (也被称为转基因) 在宿主细胞中组成性表达。本文涵盖的示例性启动子包括但不限于巨细胞病毒立即早期启动子 (CMV)、人延伸因子-1 α (hEF1 α) 启动子、泛素 C 启动子 (UbiC)、磷酸甘油激酶

启动子 (PGK)、猿猴病毒40早期启动子 (SV40)、与CMV早期增强子偶联的鸡 β -肌动蛋白启动子 (CAGG)、劳斯肉瘤病毒 (RSV) 启动子、多瘤病毒增强子/单纯疱疹病毒胸苷激酶 (MC1) 启动子、 β -肌动蛋白 (β -ACT) 启动子、“骨髓增生性肉瘤病毒增强子, 负性控制区域经缺失, 经d1587rev引物结合位点取代 (MND)”启动子。已在庞大数目的研究中广泛比较这类组成型启动子驱动转基因表达的效率。举例来说, Michael C. Milone等人比较了CMV、hEF1 α 、UbiC和PGK在原代人T细胞中驱动CAR表达的效率, 并且推断hEF1 α 启动子不仅诱导最高水平的转基因表达, 而且还在CD4和CD8人T细胞中得以最优维持 (Molecular Therapy, 17 (8): 1453-1464 (2009))。在一些实施方案中, 编码本文所述的融合蛋白和/或外源性受体 (例如, 经工程改造TCR、CAR) 的核酸可操作地连接至hEF1 α 启动子或PGK启动子。

[0192] 在一些实施方案中, 启动子选自由以下组成的组: EF-1启动子、CMV IE基因启动子、EF-1 α 启动子、泛素C启动子、磷酸甘油酸激酶 (PGK) 启动子、劳斯肉瘤病毒 (RSV) 启动子、猿猴病毒40 (SV40) 启动子、巨细胞病毒立即早期基因启动子 (CMV)、延伸因子1 α 启动子 (EF1- α)、磷酸甘油酸激酶-1启动子 (PGK)、泛素-C启动子 (UBQ-C)、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白启动子 (CAG)、多瘤病毒增强子/单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子 (MC1)、 β -肌动蛋白启动子 (β -ACT)、猿猴病毒40启动子 (SV40) 以及骨髓增生性肉瘤病毒增强子, 负性控制区域经缺失, 经d1587rev引物结合位点取代 (MND) 启动子、NFAT启动子、TETON[®]启动子和NF κ B启动子。

[0193] 在一些实施方案中, 编码本文所述的融合蛋白和/或外源性受体 (例如, 经工程改造TCR、CAR) 的核酸可操作地连接至诱导型启动子。诱导型启动子属于调控型启动子的种类。诱导型启动子可通过一种或多种条件来诱导, 所述条件诸如是物理条件、经工程改造免疫效应细胞 (例如T细胞) 的微环境或经工程改造免疫效应细胞的生理状态、诱导物 (即诱导剂) 或它们的组合。在一些实施方案中, 诱导条件不诱导经工程改造哺乳动物细胞中和/或接受药物组合物的受试者中内源性基因的表达。在一些实施方案中, 诱导条件选自由以下组成的组: 诱导物、照射 (诸如电离辐射、光)、温度 (诸如热)、氧化还原状态、肿瘤环境以及经工程改造哺乳动物细胞的活化状态。在一些实施方案中, 诱导型启动子可为NFAT启动子、TETON[®]启动子或NF κ B启动子。

[0194] 在一些实施方案中, 载体还含有可选择标记基因或报告基因以从通过载体 (例如慢病毒载体) 来转染的宿主细胞的群体选择表达本文所述的融合蛋白和/或外源性受体 (例如, 经工程改造TCR、CAR) 的细胞。可选择标记与报告基因两者均可由适当调控序列侧接以使得能够在宿主细胞中进行表达。举例来说, 载体可含有可用于调控核酸序列的表达的转录和翻译终止子、起始序列和启动子。

[0195] 多顺反子元件

[0196] 在一些实施方案中, 载体包含超过一个编码本文所述的融合蛋白和/或外源性受体 (例如, 经工程改造TCR、CAR) 的核酸。在一些实施方案中, 载体 (例如, 病毒载体, 诸如慢病毒载体) 包含编码融合蛋白的第一核酸, 以及编码包含细胞外配体结合结构域和任选的细胞内信号传导结构域的功能性外源性受体 (例如, 经工程改造TCR、CAR) 的第二核酸, 其中所述第一核酸通过编码多顺反子元件的第三核酸来可操作地连接至所述第二核酸。在一些实施方案中, 编码多顺反子元件的第三核酸是内部核糖体进入位点 (IRES)。IRES是允许以帽非依赖性方式达成翻译起始的RNA元件。在一些实施方案中, 多顺反子元件包含 (例如是) 自

裂解2A肽,诸如P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A。在一些实施方案中,多顺反子元件是包含SEQ ID NO:48或60的氨基酸序列的P2A肽。在一些实施方案中,多顺反子元件包含如在“II.融合蛋白”下的以上“肽接头”章节中所述的肽接头,诸如柔性接头。在一些实施方案中,柔性连接序列选自由 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ 、 $(GGGS)_n$ 和 $(GGGGS)_n$ 组成的组,其中n是至少1的整数)。在一些实施方案中,第三核酸序列编码可选择标记,诸如LNGFR。在一些实施方案中,编码多顺反子元件的第三核酸包含本文所述的一种或多种类型的连接序列,诸如自裂解2A肽(例如,P2A),继之以Gly-Ser柔性接头(例如, $(GGGS)_3$),或自裂解2A肽(例如,P2A),继之以可选择标记(例如,LNGFR)。

[0197] 因此,在一些实施方案中,提供了包含编码融合蛋白(诸如本文所述的任何融合蛋白)的第一核酸的载体(例如,病毒载体,诸如慢病毒载体)。在一些实施方案中,融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R2的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)包含IL-23R的跨膜结构域的第一跨膜结构域,和iii)包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R1的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。

[0198] 在一些实施方案中,载体(例如,病毒载体,诸如慢病毒载体)还包含编码功能性外源性受体的第二核酸,所述功能性外源性受体包含细胞外配体结合结构域和任选的细胞内信号传导结构域(例如,经工程改造TCR、CAR)。在一些实施方案中,第一核酸和第二核酸与同一启动子可操作地连接。在一些实施方案中,第一核酸和第二核酸与不同启动子可操作地连接。

[0199] 在一些实施方案中,提供了包含编码融合蛋白(诸如本文所述的任何融合蛋白)的第一核酸和编码功能性外源性受体的第二核酸的载体(例如,病毒载体,诸如慢病毒载体),所述功能性外源性受体包含细胞外配体结合结构域和细胞内信号传导结构域(例如,经工程改造TCR、CAR),其中所述第一核酸和所述第二核酸可操作地连接至不同的启动子(例如,EF1- α 和不同于EF1- α 的启动子)。在一些实施方案中,第一核酸在第二核酸的上游。在一些实施方案中,第一核酸在第二核酸的下游。

[0200] 在一些实施方案中,提供了载体(例如病毒载体,诸如慢病毒载体),所述载体从上游至下游为:启动子(例如,EF1- α)、编码包含细胞外配体结合结构域和细胞内信号传导结构域的功能性外源性受体(例如,经工程改造TCR、CAR)的第一核酸、任选的第二启动子和编码融合蛋白的第二核酸。在一些实施方案中,融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R2的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)包含IL-23R的跨膜结构域的第一跨膜结构域,和iii)包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R1的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。

[0201] 功能性外源性受体

[0202] 本文所述的示例性功能外源性受体可包含细胞外配体结合结构域和任选的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,功能性外源性受体是经工程改造TCR(例如,特异性识别肿瘤抗原的经工程改造TCR)。在一些实施方案中,功能性外源性受体是非TCR受体。

在一些实施方案中,非TCR受体是嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体包含:(a)包含一个或多个(诸如1个、2个、3个、4个、5个、6个或更多个中的任一者)特异性识别抗原(例如,肿瘤抗原)的结合部分的细胞外配体结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR的细胞外配体结合结构域包含一个或多个(诸如1个、2个、3个、4个、5个、6个或更多个中的任一者)结合部分,所述结合部分包含抗原结合片段(下文称为“抗抗原CAR”),诸如sdAb(例如,靶向肿瘤抗原的sdAb)。在一些实施方案中,CAR的细胞外配体结合结构域包含一个或多个结合部分,所述结合部分包含至少一个源自配体或受体的细胞外结构域的结构域(下文还称为“配体/受体CAR”),其中所述配体或受体是细胞表面抗原。在一些实施方案中,受体源自Fc结合结构域,诸如Fc受体(例如,Fc γ R)的细胞外结构域。包含细胞外配体结合结构域的CAR在下文中也称为“抗体偶联T细胞受体(ACR)”,所述细胞外配体结合结构域包含一个或多个包含Fc结合结构域的结合部分。在一些实施方案中,当将含Fc蛋白施用于ACR-T细胞或在其中共表达时,含Fc蛋白赋予表达ACR的T细胞对本文所述的抗原的结合特异性。在一些实施方案中,含Fc蛋白是含Fc抗体(例如,全长抗体)或Fc-融合蛋白,诸如抗原结合片段-Fc融合蛋白、Fc-受体/配体融合蛋白、包含与免疫球蛋白G(IgG)的Fc区融合的TCR的可变区的Fc-融合蛋白(“TCR-Fc融合蛋白”)。含ACR/Fc蛋白系统在下文中被称为“抗抗原ACR”。

[0203] 抗原

[0204] 本文所述的功能性外源性受体的细胞外配体结合结构域可特异性识别靶细胞上的任何抗原。在一些实施方案中,抗原是细胞表面分子。在一些实施方案中,抗原充当靶细胞上与特殊疾病状态相关的细胞表面标志物。在一些实施方案中,抗原是肿瘤抗原。在一些实施方案中,细胞外配体结合结构域特异性识别单一肿瘤抗原。在一些实施方案中,细胞外配体结合结构域特异性识别单一肿瘤抗原的一个或多个表位。在一些实施方案中,细胞外配体结合结构域特异性识别两种或更多种肿瘤抗原。肿瘤表达可充当免疫应答,特别是T细胞介导的免疫应答的靶抗原的许多蛋白质。由细胞外配体结合结构域特异性识别的抗原可为在单一患病细胞上的抗原,或在各自促进疾病的不同细胞上表达的抗原。由细胞外配体结合结构域特异性识别的抗原可直接或间接涉及于疾病中。

[0205] 肿瘤抗原是由肿瘤细胞产生的可引发免疫应答,特别是T细胞介导的免疫应答的蛋白质。对本发明的所靶向抗原的选择将取决于待治疗的特定癌症类型。示例性肿瘤抗原包括例如神经胶质瘤相关抗原、BCMA(B细胞成熟抗原)、癌胚抗原(CEA)、 β -人绒毛膜促性腺激素、 α 胎蛋白(AFP)、凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白(thyroglobulin)、RAGE-1、MN-CAIX、人端粒酶逆转录酶、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)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)、密封蛋白18.2、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、前列腺特异性蛋白、PSMA、HER2/neu、存活素和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜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。

[0206] 在一些实施方案中,肿瘤抗原包含一个或多个与恶性肿瘤相关的抗原性癌症表位。恶性肿瘤表达可充当免疫攻击的靶抗原的许多蛋白质。这些分子包括但不限于黑素瘤中的组织特异性抗原诸如MART-1、酪氨酸酶和gp100,以及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)。其他靶标分子属于转化相关分子的群组,诸如致癌基因

HER2/Neu/ErbB-2。另一组靶抗原是致癌胎儿抗原诸如癌胚抗原(CEA)。在B细胞淋巴瘤中,肿瘤特异性独特型免疫球蛋白构成为单个肿瘤所特有的真正肿瘤特异性的免疫球蛋白抗原。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。

[0207] 在一些实施方案中,肿瘤抗原是肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)。TSA为肿瘤细胞所特有,并且不存在于身体中的其他细胞上。TAA相关抗原不为肿瘤细胞所特有,而是也在未能诱导对抗原的免疫耐受性的状态的条件下在正常细胞上表达。抗原在肿瘤上的表达可发生在使得免疫系统能够对抗原起应答的条件下。TAA可为在胎儿发育期间在正常细胞上表达的抗原,此时免疫系统是不成熟的并且不能起应答,或它们可为通常在极低水平下存在于正常细胞上,但在高得多的水平下在肿瘤细胞上表达的抗原。

[0208] TSA或TAA抗原的非限制性实例包括以下:分化抗原诸如MART-1/MelanA(MART-I)、gp 100(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;过度表达的胚胎抗原诸如CEA;过度表达的致癌基因和突变肿瘤抑制基因诸如p53、Ras、HER2/neu;由染色体易位产生的独特肿瘤抗原;诸如BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR;以及病毒抗原,诸如艾伯斯坦巴尔病毒(Epstein Barr virus)抗原EBVA和人乳头状瘤病毒(HPV)抗原E6和E7。其他大型基于蛋白质的抗原包括TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23HI、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 β -连环蛋白(beta-Catenin)、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、甲胎蛋白、 β -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3、CA 27.29、BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68、P1、C0-029、FGF-5、G250、Ga733、EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、Mac-2结合蛋白、亲环蛋白C相关蛋白(cyclophilin C-associated protein)、TAAL6、TAG72、TLP和TPS。

[0209] 在一些实施方案中,肿瘤抗原选自由以下组成的组:CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、BCMA、CS1、CD138、CD123/IL3 α 、c-Met、gp100、MUC1、IGF-I受体、EpCAM、EGFR/EGFRvIII、HER2、IGF1R、间皮素、PSMA、WT1、ROR1、CEA、GD-2、NY-ESO-1、MAGE A3、GPC3、密封蛋白18.2、糖脂F77、PD-L1、PD-L2以及它们的任何组合。在一些实施方案中,抗原是GPC3。在一些实施方案中,抗原是CD20。

[0210] 在一些实施方案中,抗原是病原体抗原,诸如真菌、病毒或细菌抗原。在一些实施方案中,真菌抗原来自曲霉属(*Aspergillus*)或念珠菌属(*Candida*)。在一些实施方案中,病毒抗原来自单纯疱疹病毒(HSV)、呼吸道合胞病毒(RSV)、偏肺病毒(hMPV)、鼻病毒、副流感病毒(PIV)、艾伯斯坦-巴尔病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)、JC病毒(约翰坎宁安病毒(*John Cunningham virus*))、BK病毒、HIV、寨卡病毒(*Zika virus*)、人冠状病毒、诺如病毒(*norovirus*)、脑炎病毒或埃博拉(*Ebola*)病毒。

[0211] 在一些实施方案中,细胞表面抗原是配体或受体。在一些实施方案中,细胞外配体结合结构域包含一个或多个包含至少一个源于配体或受体的细胞外结构域的结构域的结合部分,其中所述配体或受体是本文所述的细胞表面抗原。在一些实施方案中,配体或受体源于选自由NKG2A、NKG2C、NKG2F、NKG2D、BCMA、APRIL、BAFF、IL-3、IL-13、LLT1、AICL、DNAM-1和NKp80组成的组的分子。在一些实施方案中,配体源于可结合BCMA的APRIL或BAFF。在一些实施方案中,受体源于Fc结合结构域,诸如Fc受体的细胞外结构域。在一些实施方案中,Fc

受体是Fc γ 受体 (Fc γ R)。在一些实施方案中,Fc γ R选自由CD16A (Fc γ RIIIa)、CD16B (Fc γ RIIIb)、CD64A、CD64B、CD64C、CD32A和CD32B组成的组。

[0212] 嵌合抗原受体 (CAR)

[0213] 在一些实施方案中,功能性外源性受体是CAR,所述CAR包含:(a) 细胞外配体结合结构域,所述细胞外配体结合结构域包含一个或多个(诸如1个、2个、3个、4个、5个、6个或更多个中的任一者)特异性识别抗原(诸如上文所述的任何抗原,例如GPC3)的结合部分;(b) 跨膜结构域;以及(c) 细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,一个或多个结合部分是抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,一个或多个结合部分源于一种或多种抗体(例如全长抗体)。在一些实施方案中,一个或多个结合部分源于骆驼科动物抗体。在一些实施方案中,一个或多个结合部分源于人抗体。在一些实施方案中,一个或多个结合部分选自由以下组成的组:骆驼Ig、Ig NAR、Fab片段、Fab'片段、F(ab)'2片段、F(ab)'3片段、Fv、单链Fv抗体(scFv)、双scFv、(scFv)₂、微型抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、二硫键稳定化Fv蛋白(dsFv)和单结构域抗体(sdAb、纳米抗体)。在一些实施方案中,一个或多个结合部分是sdAb(例如抗GPC3 sdAb、抗BCMA sdAb)。在一些实施方案中,细胞外配体结合结构域包含两个或更多个连接在一起的sdAb。在一些实施方案中,一个或多个结合部分是非抗体结合蛋白,诸如结合抗原的多肽配体或经工程改造蛋白质。在一些实施方案中,一个或多个结合部分包含至少一个源于配体或受体的细胞外结构域的结构域,其中所述配体或受体是细胞表面抗原。在一些实施方案中,配体或受体源于选自由NKG2A、NKG2C、NKG2F、NKG2D、BCMA、APRIL、BAFF、IL-3、IL-13、LLT1、AICL、DNAM-1和NKP80组成的组的分子。在一些实施方案中,配体源于可结合BCMA的APRIL或BAFF。在一些实施方案中,受体源于Fc结合结构域,诸如Fc受体的细胞外结构域。在一些实施方案中,Fc受体是Fc γ 受体 (Fc γ R)。在一些实施方案中,Fc γ R选自由CD16A (Fc γ RIIIa)、CD16B (Fc γ RIIIb)、CD64A、CD64B、CD64C、CD32A和CD32B组成的组。在一些实施方案中,CAR是单价的和单特异性的。在一些实施方案中,CAR是多价的(例如双特异性的)和单特异性的。在一些实施方案中,CAR是多价的(例如二价的)和多特异性的(例如双特异性的)。在一些实施方案中,抗原选自由以下组成的组:CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、BCMA、CS1、CD138、CD123/IL3 α 、c-Met、gp100、MUC1、IGF-I受体、EpCAM、EGFR/EGFRvIII、HER2、IGF1R、间皮素、PSMA、WT1、ROR1、CEA、GD-2、NY-ESO-1、MAGE A3、GPC3、密封蛋白18.2、糖脂F77、PD-L1、PD-L2以及它们的任何组合。在一些实施方案中,抗原是GPC3。在一些实施方案中,跨膜结构域源于选自由以下组成的组的分子:T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链,CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 (4-1BB)、CD152、CD154和PD-1。在一些实施方案中,跨膜结构域源于CD8 α 。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,初级细胞内信号传导结构域源于CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 、CD3 δ 、FcR γ (FCER1G)、FcR β (Fc ϵ RIb)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、Fc γ RIIa、DAP10和DAP12。在一些实施方案中,初级细胞内信号传导结构域源于CD3 ζ 。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含共刺激性信号传导结构域。在一些实施方案中,共刺激性信号传导结构域源于选自由以下组成的组的共刺激性分子:CD2 (LFA-2)、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM-1)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD162 (SELPLG)、CD258 (LIGHT)、CD270 (HVEM、LIGHTR)、CD276 (B7-H3)、CD278 (ICOS)、CD279 (PD-1)、CD319 (SLAMF7)、LFA-1 (淋巴细胞功能

相关抗原-1)、NKG2C、CDS、GITR、BAFFR、NKp80 (KLRF1)、CD160、CD19、CD4、IPO-3、BLAME (SLAMF8)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、CD83、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA-4)、CD223 (LAG3)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、DAP10、TRIM、ZAP70、与CD83特异性结合的配体以及它们的任何组合。在一些实施方案中,共刺激性信号传导结构域包含CD137的细胞质结构域。在一些实施方案中,本文所述的CAR还包含位于细胞外配体结合结构域的C末端与跨膜结构域的N末端之间的铰链结构域。在一些实施方案中,铰链结构域源于CD8 α 。在一些实施方案中,CAR还包含位于多肽的N末端处的信号肽。在一些实施方案中,信号肽源于CD8 α 。在一些实施方案中,CAR包含从N末端至C末端包含以下的多肽:CD8 α 信号肽、细胞外配体结合结构域(例如一个或多个特异性识别肿瘤抗原的sdAb)、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、源于CD137的共刺激性信号传导结构域以及源于CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。

[0214] 在一些实施方案中,CAR包含从N末端至C末端包含以下的多肽:CD8 α 信号肽、包含一个或多个靶向肿瘤抗原(例如,抗GPC3 svFv或抗CD20 scFv)的结合部分的细胞外配体结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、源于CD137的共刺激性信号传导结构域以及源于CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR包含从N末端至C末端包含以下的多肽:CD8 α 信号肽、包含靶向肿瘤抗原(例如,抗GPC3 scFv或抗CD20 scFv)的scFv的细胞外配体结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、源于CD137的共刺激性信号传导结构域以及源于CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。

[0215] 在一些实施方案中,本申请的CAR是“BCMA-配体CAR”。在一些实施方案中,CAR包含从N末端至C末端包含以下的多肽:CD8 α 信号肽、包含一个或多个包含至少一个源于APRIL或BAFF的结构域的结合部分的细胞外配体结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、源于CD137的共刺激性信号传导结构域以及源于CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞外配体结合结构域包含APRIL结构域。在一些实施方案中,细胞外配体结合结构域包含BAFF结构域。在一些实施方案中,细胞外配体结合结构域包含APRIL结构域和BAFF结构域。

[0216] 在一些实施方案中,本申请的CAR是ACTR。携带ACTR的经工程改造T细胞可结合含有Fc的蛋白质(诸如单克隆抗体,例如抗BCMA抗体),所述含有Fc的蛋白质接着充当到达肿瘤细胞的桥梁。在一些实施方案中,CAR包含从N末端至C末端包含以下的多肽:CD8 α 信号肽、包含一个或多个包含Fc结合结构域(诸如Fc受体,例如Fc γ R)的结合部分的细胞外配体结合结构域、CD8 α 铰链结构域、CD8 α 跨膜结构域、源于CD137的共刺激性信号传导结构域以及源于CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,Fc γ R选自由CD16A (Fc γ RIIIa)、CD16B (Fc γ RIIIb)、CD64A、CD64B、CD64C、CD32A和CD32B组成的组。

[0217] 在一些实施方案中,CAR包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。

[0218] 在一些实施方案中,CAR包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列。

[0219] 本领域中已知或由本发明者开发的任何CAR,包括PCT/CN2020/112181、PCT/CN2020/112182、PCT/CN2017/096938和PCT/CN2016/094408(其内容通过引用以它们整体并入本文)中所述的CAR,都可用于构建本文所述的CAR。CAR的示例性结构显示于PCT/CN2017/096938的图15A至图15D中。

[0220] 多价和/或多特异性CAR

[0221] 在一些实施方案中,本文所述的CAR是多价CAR,所述多价CAR包含:(a)细胞外配体结合结构域,所述细胞外配体结合结构域包含两个或更多个(诸如2个、3个、4个、5个、6个或更多个中的任一者)特异性识别抗原(例如本文所述的任何抗原)的结合部分;(b)跨膜结构域;以及(c)细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,结合部分中的一者或多者是抗原结合片段。在一些实施方案中,结合部分中的一者或多者包含单结构域抗体(例如抗GPC3 sdAb)。在一些实施方案中,结合部分中的一者或多者源于骆驼科动物抗体。在一些实施方案中,结合部分中的一者或多者源于四链抗体。在一些实施方案中,结合部分中的一者或多者是scFv。在一些实施方案中,结合部分中的一者或多者源于人抗体。在一些实施方案中,结合部分中的一者或多者是特异性结合抗原的多肽配体或其他非抗体多肽。在一些实施方案中,多价CAR是单特异性的,即多价CAR靶向单一抗原,并且包含两个或更多个针对所述单一抗原的结合位点。在一些实施方案中,多价CAR是多特异性的,即多价CAR靶向超过一种抗原,并且多价CAR包含两个或更多个针对至少一种抗原的结合位点。对相同抗原具有特异性的结合部分可结合抗原的相同表位(即“单表位CAR”),或结合抗原的不同表位(即“多表位CAR”诸如双表位CAR或三表位CAR)。对相同抗原具有特异性的结合位点可包含相同或不同sdAb。在一些实施方案中,抗原选自由以下组成的组:CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、BCMA、CS1、CD138、CD123/IL3R α 、c-Met、gp100、MUC1、IGF-I受体、EpCAM、EGFR/EGFRvIII、HER2、IGF1R、间皮素、PSMA、WT1、ROR1、CEA、GD-2、NY-ESO-1、MAGE A3、GPC3、密封蛋白18.2、糖脂F77、PD-L1、PD-L2以及它们的任何组合。在一些实施方案中,抗原是GPC3。

[0222] 在一些实施方案中,本文所述的CAR是多价(诸如二价、三价或更高价数)CAR,所述多价CAR包含:(a)细胞外配体结合结构域,所述细胞外配体结合结构域包含多个(诸如至少约2个、3个、4个、5个、6个或更多个中的任一者)特异性结合抗原(诸如肿瘤抗原,例如GPC3、CD20)的结合部分;(b)跨膜结构域;以及(c)细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,本文所述的CAR是多价(诸如二价、三价或更高价数)CAR,所述多价CAR包含:(a)细胞外配体结合结构域,所述细胞外配体结合结构域包含多个(诸如至少约2个、3个、4个、5个、6个或更多个中的任一者)特异性结合抗原(诸如肿瘤抗原,例如GPC3、CD20)的sdAb;(b)跨膜结构域;以及(c)细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,本文所述的CAR是多价(诸如二价、三价或更高价数)CAR,所述多价CAR包含:(a)细胞外配体结合结构域,所述细胞外配体结合结构域包含特异性结合抗原(诸如肿瘤抗原,例如GPC3、CD20)的第一表位的第一结合部分以及特异性结合所述抗原的第二表位的第二结合部分;(b)跨膜结构域;以及(c)细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,第一表位和第二表位是不同的。在一些实施方案中,第一表位和第二表位是相同的。在一些实施方案中,第一结合部分是sdAb,并且第二结合部分源于人抗体(例如scFv)。在一些实施方案中,多价CAR特异性结合抗原上的两个不同表位。在一些实施方案中,多价CAR特异性结合抗原上的三个或更多个不同表位。在一些实施方案中,本文所述的CAR是多价(诸如二价、三价或更高价数)CAR,所述多价CAR包含:(a)细胞外配体结合结构域,所述细胞外配体结合结构域包含特异性结合抗原(诸如肿瘤抗原,例如GPC3、CD20)的第一表位的第一sdAb以及特异性结合所述抗原的第二表位的第二sdAb;(b)跨膜结构域;以及(c)细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,第一表位和第二表位是不同的。在一些实施方案中,第一表位和第二表位是相同的。在一些实施方案中,本文所述的CAR是多价(诸如二价、三价或更高价数)CAR,所述多价CAR包含:(a)细胞外配体结合结构

域,所述细胞外配体结合结构域包含特异性结合第一抗原(诸如肿瘤抗原,例如GPC3、CD20)的第一sdAb以及特异性结合第二抗原的第二sdAb;(b)跨膜结构域;以及(c)细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,第一抗原和第二抗原是不同的。在一些实施方案中,第一抗原和第二抗原是相同的。在一些实施方案中,抗原选自由以下组成的组:CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、BCMA、CS1、CD138、CD123/IL3R α 、c-Met、gp100、MUC1、IGF-I受体、EpCAM、EGFR/EGFRvIII、HER2、IGF1R、间皮素、PSMA、WT1、ROR1、CEA、GD-2、NY-ESO-1、MAGE A3、GPC3、密封蛋白18.2、糖脂F77、PD-L1、PD-L2以及它们的任何组合。在一些实施方案中,抗原是GPC3。在一些实施方案中,抗原是CD20。

[0223] 在一些实施方案中,本文所述的CAR是多价(诸如二价、三价或更高价数)CAR,所述多价CAR包含:(a)细胞外配体结合结构域,所述细胞外配体结合结构域包含特异性结合GPC3的第一表位的第一sdAb(“抗GPC3 sdAb1”或“抗GPC3 V_HH1”)以及特异性结合GPC3的第二表位的第二sdAb(“抗GPC3 sdAb2”或“抗GPC3 V_HH2”);(b)跨膜结构域;以及(c)细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抗GPC3 sdAb1和抗GPC3 sdAb2是相同的。在一些实施方案中,抗GPC3sdAb1和抗GPC3 sdAb2是不同的。

[0224] 细胞外配体结合结构域

[0225] 本文所述的CAR的细胞外配体结合结构域包含一个或多个(诸如1个、2个、3个、4个、5个、6个或更多个中的任一者)结合部分,诸如sdAb。在一些实施方案中,一个或多个结合部分是抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,一个或多个结合部分源于四链抗体。在一些实施方案中,一个或多个结合部分源于骆驼科动物抗体。在一些实施方案中,一个或多个结合部分源于人抗体。在一些实施方案中,一个或多个结合部分选自由以下组成的组:骆驼Ig、Ig NAR、Fab片段、Fab'片段、F(ab)'2片段、F(ab)'3片段、Fv、单链Fv抗体(scFv)、双scFv、(scFv)₂、微型抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、二硫键稳定化Fv蛋白(dsFv)和单结构域抗体(sdAb、纳米抗体)。在一些实施方案中,一个或多个结合部分是sdAb(例如,抗BCMA sdAb)。在一些实施方案中,一个或多个结合部分是非抗体结合蛋白,诸如结合抗原的多肽配体或经工程改造蛋白质。在一些实施方案中,一个或多个结合部分包含至少一个源于配体或受体的细胞外结构域的结构域,其中所述配体或受体是细胞表面抗原。在一些实施方案中,配体或受体源于选自由NKG2A、NKG2C、NKG2F、NKG2D、BCMA、APRIL、BAFF、IL-3、IL-13、LLT1、AICL、DNAM-1和NKP80组成的组的分子。在一些实施方案中,配体源于可结合BCMA的APRIL或BAFF。在一些实施方案中,受体源于Fc结合结构域,诸如Fc受体的细胞外结构域。在一些实施方案中,Fc受体是Fc γ 受体(Fc γ R)。在一些实施方案中,Fc γ R选自由CD16A(Fc γ RIIIa)、CD16B(Fc γ RIIIb)、CD64A、CD64B、CD64C、CD32A和CD32B组成的组。结合部分可通过肽键直接彼此融合,或通过肽接头来彼此融合。

[0226] 在一些实施方案中,CAR的细胞外配体结合结构域是靶向肿瘤抗原的scFv。在一些实施方案中,CAR的细胞外配体结合结构域是抗GPC3 scFv。在一些实施方案中,抗GPC3 scFv包含a)包含VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3的重链可变区(V_H),所述VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别包含具有SEQ ID NO:80中任一个所示的序列的V_H链区内的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列;以及b)包含VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3的轻链可变区(V_L),所述VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3分别包含具有SEQ ID NO:81中任一个所示的序列的V_L链区内的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗GPC3 scFv包含a)重链可变区(V_H),所述重链

可变区包含含有SEQ ID NO:82中所示的氨基酸序列的VH-CDR1、含有SEQ ID NO:83中所示的氨基酸序列组的VH-CDR2和含有SEQ ID NO:84中所示的氨基酸序列的VH-CDR3;以及b)轻链可变区(V_L),所述轻链可变区包含含有SEQ ID NO:85中所示的氨基酸序列的VL-CDR1、包含SEQ ID NO:86中所示的氨基酸序列的VL-CDR2和包含SEQ ID NO:87中所示的氨基酸序列的VL-CDR3。在一些实施方案中,抗GPC3 scFv包含重链可变区(V_H),所述重链可变区包含SEQ ID NO:80中所示的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体;和/或轻链可变区(V_L),所述轻链可变区包含SEQ ID NO:81中所示的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体。

[0227] 在一些实施方案中,抗GPC3 scFv包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列或具有至少约80% (诸如至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)序列同一性的变体。在一些实施方案中,抗GPC3 scFv包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列。

[0228] 单结构域抗体(sdAb)

[0229] 在一些实施方案中,CAR包含含有一个或多个sdAb的细胞外配体结合结构域。sdAb可具有相同或不同来源,并且具有相同或不同大小。示例性sdAb包括但不限于来自仅有重链的抗体的重链可变结构域(例如, V_{H_H} 或 V_{NAR})、天然地缺乏轻链的结合分子、源于常规4链抗体的单结构域(诸如 V_H 或 V_L)、人源化的仅有重链的抗体、由表达人重链区段的转基因小鼠或大鼠产生的人sdAb以及经工程改造结构域和除源于抗体的单结构域骨架以外的单结构域骨架。本领域中已知或由本发明者开发的任何sdAb,包括PCT/CN2017/096938和PCT/CN2016/094408(其内容通过引用以它们整体并入本文)中所述的sdAb,都可用于构建本文所述的CAR。CAR的示例性结构显示于PCT/CN2017/096938的图15A至图15D中。sdAb可源于任何物种,包括但不限于小鼠、大鼠、人、骆驼、美洲驼、七鳃鳗、鱼、鲨鱼、山羊、兔和牛。本文涵盖的单结构域抗体还包括来自除骆驼科(Camelidae)和鲨鱼以外的物种的天然存在的sdAb分子。

[0230] 在一些实施方案中,sdAb源于被称为缺乏轻链的重链抗体(在本文中也称为“仅有重链的抗体”)的天然存在的单结构域抗原结合分子。这类单结构域分子例如公开于W094/04678以及Hamers-Casterman,C.等人(1993)Nature 363:446-448中。为明晰起见,源于天然地缺乏轻链的重链分子的可变结构域在本文中被称作 V_{H_H} 以将它与四链免疫球蛋白的常规 V_H 进行区分。这种 V_{H_H} 分子可源于在骆驼科物种例如骆驼、美洲驼、小羊驼、单峰驼、羊驼和原驼中产生的抗体。除骆驼科之外,其他物种也可产生天然地缺乏轻链的重链分子,并且这类 V_{H_H} 在本申请的范围内。

[0231] 来自骆驼科动物的 V_{H_H} 分子是IgG分子的约十分之一小。它们是单一多肽,并且可为极其稳定的,抵抗极端pH和温度条件。此外,它们可对蛋白酶的作用具有抗性,常规4链抗体并非这样。此外, V_{H_H} 的体外表达会产生高产率的经适当折叠的功能性 V_{H_H} 。此外,在骆驼科动物中产生的抗体可识别除由在体外通过使用抗体文库或通过使除骆驼科动物以外的哺乳动物免疫来产生的抗体识别的那些表位以外的表位(参见例如W09749805)。因此,相比于包含源于常规4链抗体的抗原结合片段的多特异性或多价CAR,包含一个或多个 V_{H_H} 结构域的多特异性或多价CAR可与靶标更高效地相互作用。因为已知的是 V_{H_H} 会结合至‘不常见’表位诸如空腔或沟槽中,所以相比于常规多特异性多肽,包含这类 V_{H_H} 的CAR的亲和力可更适

于治疗性治疗。

[0232] 在一些实施方案中,sdAb源于见于软骨鱼中的免疫球蛋白的可变区。举例来说,sdAb可源于见于鲨鱼的血清中的被称为新型抗原受体(NAR)的免疫球蛋白同种型。产生源于NAR(“IgNAR”)的可变区的单结构域分子的方法描述于WO 03/014161以及Streltsov (2005)Protein Sci.14:2901-2909中。

[0233] 在一些实施方案中,sdAb是重组的、CDR移植的、人源化的、骆驼源化的、去免疫化的和/或体外产生的(例如通过噬菌体展示来选择)。在一些实施方案中,框架区的氨基酸序列可通过使框架区中的特定氨基酸残基“骆驼源化”来改变。骆驼源化是指用一个或多个存在于重链抗体的V_H结构域中的一个或多个相应位置处的氨基酸残基置换或取代一个或多个在来自常规4链抗体的(天然存在的)V_H结构域的氨基酸序列中的氨基酸残基。这可例如基于本文进一步描述,以对熟练人士来说将是明确的本身已知的方式进行。所述“骆驼源化”取代优选插入在形成V_H-V_L界面和/或存在于所述界面处的氨基酸位置处,以及/或者在如本文定义的所谓骆驼科标志残基处(参见例如WO 94/04678;Davies和Riechmann FEBS Letters 339:285-290,1994;Davies和Riechmann Protein Engineering 9(6):531-537,1996;Riechmann J.Mol.Biol.259:957-969,1996;以及Riechmann和Muyldermans J.Immunol.Meth.231:25-38,1999)。

[0234] 在一些实施方案中,sdAb是由表达人重链区段的转基因小鼠或大鼠产生的人sdAb。参见例如US20090307787A1、美国专利第8,754,287号、US20150289489A1、US20100122358A1和WO2004049794。在一些实施方案中,sdAb是亲和力成熟的。

[0235] 在一些实施方案中,针对特定抗原或靶标的天然存在的V_H结构域可从骆驼科动物V_H序列的(原初或免疫)文库获得。这类方法可或不涉及利用一种或多种本身已知的筛选技术,使用所述抗原或靶标或其至少一个部分、片段、抗原决定簇或表位来筛选这种文库。这类文库和技术例如描述于WO 99/37681、WO 01/90190、WO 03/025020和WO 03/035694中。或者,可使用源于(原初或免疫)V_H文库的改进合成或半合成文库,诸如通过诸如随机诱变和/或CDR改组的技术来从(原初或免疫)V_H文库获得的V_H文库,如例如在WO 00/43507中所述。

[0236] 在一些实施方案中,sdAb从常规四链抗体产生。参见例如EP 0 368 684;Ward等人(Nature 1989年10月12日;341(6242):544-6);Holt等人,Trends Biotechnol.,2003,21(11):484-490;WO 06/030220;以及WO 06/003388。

[0237] 本文所述的多特异性或多价CAR中的各种结合部分(诸如sdAb、配体/受体结构域)可通过肽接头(诸如在章节II中描述的任何肽接头)来彼此融合。在一些实施方案中,结合部分(诸如sdAb、配体/受体结构域)在无任何肽接头下直接彼此融合。连接不同结合部分(诸如sdAb、配体/受体结构域)的肽接头可为相同的或不同的。CAR的不同结构域也可通过肽接头来彼此融合。

[0238] 视sdAb和/或各种结构域(例如配体/受体结构域)的结构性和/或功能性特征而定,CAR中的每个肽接头可具有相同或不同长度和/或序列。每个肽接头可独立选择和优化。CAR中使用的一个或多个肽接头的长度、柔性程度和/或其他性质可对包括但不限于对一种或多种特定抗原或表位的亲和力、特异性或亲合力的性质具有一定影响。举例来说,可选择较长肽接头以确保两个邻近结构域不在空间上彼此干扰。举例来说,在包含针对多聚抗原

的sdAb的本文所述的多价或多特异性CAR中,肽接头的长度和柔性优选使得它允许多价CAR中的每个sdAb结合多聚体的每个亚基上的抗原决定簇。在一些实施方案中,短肽接头可安置在CAR的跨膜结构域与细胞内信号传导结构域之间。在某一实施方案中,肽接头包含柔性残基(诸如甘氨酸和丝氨酸),以使邻近结构域相对于彼此自由移动。举例来说,甘氨酸-丝氨酸双联体可为适合肽接头。

[0239] 肽接头可具有任何适合长度。在一些实施方案中,肽接头的长度是至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100个或更多个氨基酸中的任一者。在一些实施方案中,肽接头的长度是不超过约100、75、50、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5个或更少个氨基酸中的任一者。在一些实施方案中,肽接头的长度是约1个氨基酸至约10个氨基酸、约1个氨基酸至约20个氨基酸、约1个氨基酸至约30个氨基酸、约5个氨基酸至约15个氨基酸、约10个氨基酸至约25个氨基酸、约5个氨基酸至约30个氨基酸、约10个氨基酸至约30个氨基酸长、约30个氨基酸至约50个氨基酸、约50个氨基酸至约100个氨基酸或约1个氨基酸至约100个氨基酸中的任一者。在一些实施方案中,肽接头包含SEQ ID NO:57和61-65中任一个的氨基酸序列。

[0240] 肽接头可具有天然存在的序列或非天然存在的序列。举例来说,源于仅有重链的抗体的铰链区的序列可被用作接头。参见例如W01996/34103。

[0241] 跨膜结构域

[0242] 本申请的CAR包含可直接或间接融合至细胞外配体结合结构域的跨膜结构域。跨膜结构域可源于天然来源或合成来源。如本文所用,“跨膜结构域”是指在细胞膜,优选是真核细胞膜中在热力学上是稳定的任何蛋白质结构。就在本文所述的CAR中使用来说是可相容的跨膜结构域可从天然存在的蛋白质获得。或者,它可为合成的非天然存在的蛋白质区段,例如在细胞膜中在热力学上稳定的疏水性蛋白质区段。

[0243] 跨膜结构域基于跨膜结构域的三维结构加以分类。举例来说,跨膜结构域可形成 α 螺旋、超过一个 α 螺旋的复合物、 β 桶或能够跨越细胞的磷脂双层的任何其他稳定结构。此外,跨膜结构域还可或替代地基于跨膜结构域拓扑结构加以分类,所述拓扑结构包括跨膜结构域跨越膜的穿过次数以及蛋白质的取向。举例来说,单次穿过膜蛋白穿过细胞膜一次,并且多次穿过膜蛋白穿过细胞膜至少两次(例如2、3、4、5、6、7次或更多次)。视它们的末端和一个或多个穿膜区段相对于细胞的内部和外部的拓扑结构而定,膜蛋白可被定义为I型、II型或III型。I型膜蛋白具有单一跨膜区域,并且被取向以致蛋白质的N末端存在于细胞的脂质双层的细胞外侧上,并且蛋白质的C末端存在于细胞质侧上。II型膜蛋白也具有单一跨膜区域,但被取向以致蛋白质的C末端存在于细胞的脂质双层的细胞外侧上,并且蛋白质的N末端存在于细胞质侧上。III型膜蛋白具有多个跨膜区段,并且可基于跨膜区段的数目以及N末端和C末端的位置加以进一步再分类。

[0244] 在一些实施方案中,本文所述的CAR的跨膜结构域源于I型单次穿过膜蛋白。在一些实施方案中,来自多次穿过膜蛋白的跨膜结构域就在本文所述的CAR中使用来说也可为可相容的。多次穿过膜蛋白可包含复合(至少2、3、4、5、6、7个或更多个) α 螺旋或 β 片层结构。优选地,多次穿过膜蛋白的N末端和C末端存在于脂质双层的相对侧上,例如蛋白质的N末端存在于脂质双层的细胞质侧上,并且蛋白质的C末端存在于细胞外侧上。

[0245] 在一些实施方案中,CAR的跨膜结构域包含选自以下各者的跨膜结构域的跨膜结

构域:T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链,CD28,CD3 ϵ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137,CD154,KIRDS2,OX40,CD2,CD27,LFA-1(CDIIa,CD18),ICOS(CD278),4-1BB(CD137),GITR,CD40,BAFFR,HVEM(LIGHTR),SLAMF7,NKp80(KLRF1),CD160,CD19,IL-2R β ,IL-2R γ ,IL-7R α ,ITGA1,VLA1,CD49a,ITGA4,IA4,CD49D,ITGA6,VLA-6,CD49f,ITGAD,CD11d,ITGAE,CD103,ITGAL,CDIIa,LFA-1,ITGAM,CD11b,ITGAX,CD11c,ITGB1,CD29,ITGB2,CD18,LFA-1,ITGB7,TNFR2,DNAM1(CD226),SLAMF4(CD244,2B4),CD84,CD96(Tactile),CEACAM1,CRTAM,Ly9(CD229),CD160(BY55),PSGL1,CDI00(SEMA4D),SLAMF6(NTB-A,Ly108),SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3),BLAME(SLAMF8),SELPLG(CD162),LTBR,PAG/Cbp,NKp44,NKp30,NKp46,NKG2D和/或NKG2C。在一些实施方案中,跨膜结构域源于选自以下组成的组的分子:T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链,CD3 ζ ,CD3 ϵ ,CD4,CD5,CD8 α ,CD9,CD16,CD22,CD27,CD28,CD33,CD37,CD45,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137(4-1BB),CD152,CD154和PD-1。在一些实施方案中,跨膜结构域源于CD8 α 。在一些实施方案中,跨膜结构域源自CD28。

[0246] 用于本文所述的CAR中的跨膜结构域还可包含合成的非天然存在的蛋白质区段的至少一部分。在一些实施方案中,跨膜结构域是合成的非天然存在的 α 螺旋或 β 片层。在一些实施方案中,蛋白质区段是至少约20个氨基酸,例如至少18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个氨基酸。合成跨膜结构域的实例在本领域中是已知的,例如在美国专利第7,052,906B1号和PCT公布第WO 2000/032776 A2号中,所述专利的相关公开内容通过引用并入本文。

[0247] 跨膜结构域可包含跨膜区域和位于跨膜结构域的C末端侧的细胞质区域。跨膜结构域的细胞质区域可包含三个或更多个氨基酸,并且在一些实施方案中,有助于使跨膜结构域在脂质双层中取向。在一些实施方案中,一个或多个半胱氨酸残基存在于跨膜结构域的跨膜区域中。在一些实施方案中,一个或多个半胱氨酸残基存在于跨膜结构域的细胞质区域中。在一些实施方案中,跨膜结构域的细胞质区域包含带正电荷氨基酸。在一些实施方案中,跨膜结构域的细胞质区域包含氨基酸精氨酸、丝氨酸和赖氨酸。

[0248] 在一些实施方案中,跨膜结构域的跨膜区域包含疏水性氨基酸残基。在一些实施方案中,CAR的跨膜结构域包含人工疏水性序列。举例来说,苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体可存在于跨膜结构域的C末端处。在一些实施方案中,跨膜区域主要包含疏水性氨基酸残基,诸如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或缬氨酸。在一些实施方案中,跨膜区域是疏水性的。在一些实施方案中,跨膜区域包含多聚亮氨酸-丙氨酸序列。蛋白质或蛋白质区段的疏/亲水性(hydrophathy)或疏水性或亲水性特征可通过本领域中已知的任何方法例如凯特(Kyte)和杜利特尔(Doolittle)疏/亲水性分析来评估。

[0249] 细胞内信号传导结构域

[0250] 本申请的CAR包含细胞内信号传导结构域。细胞内信号传导结构域负责使表达CAR的免疫效应细胞的至少一种正常效应功能活化。术语“效应功能”是指细胞的专化功能。T细胞的效应功能例如可为细胞溶解活性或辅助活性,包括分泌细胞因子。因此,术语“细胞质信号传导结构域”是指蛋白质的转导效应功能信号,并且引导细胞执行专化功能的部分。尽管通常可采用整个细胞质信号传导结构域,但在许多情况下不必使用整个链。就使用细胞质信号传导结构域的截短部分而言,这种截短部分可替代完整链使用,只要它转导效应功

能信号即可。因此,术语细胞质信号传导结构域意图包括细胞质信号传导结构域的足以转导效应功能信号的任何截短部分。

[0251] 在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含免疫效应细胞的初级细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR包含基本上由免疫效应细胞的初级细胞内信号传导结构域组成的细胞内信号传导结构域。“初级细胞内信号传导结构域”是指以刺激性方式起诱导免疫效应功能的作用的细胞质信号传导序列。在一些实施方案中,初级细胞内信号传导结构域含有被称为免疫受体酪氨酸基活化基序或ITAM的信号传导基序。如本文所用的“ITAM”是通常存在于在许多免疫细胞中表达的信号传导分子的尾部部分中的保守蛋白质基序。所述基序可包含氨基酸序列YxxL/I的由6-8个氨基酸分隔的两个重复,其中每个x独立地是任何氨基酸,从而产生保守基序YxxL/Ix(6-8)YxxL/I。在信号传导分子内的ITAM对于细胞内的信号转导是重要的,所述信号转导至少部分地通过在信号传导分子的活化之后,ITAM中酪氨酸残基的磷酸化来介导。ITAM还可充当信号传导路径中涉及的其他蛋白质的对接位点。示例性的含有ITAM的初级细胞质信号传导序列包括源于CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 ϵ 、CD3 δ 、Fc γ R γ (FCER1G)、Fc ϵ R β (Fc ϵ RIb)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、Fc γ RIIa、DAP10和DAP12的那些。

[0252] 在一些实施方案中,初级细胞内信号传导结构域源于CD3 ζ 。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域由CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域组成。在一些实施方案中,初级细胞内信号传导结构域是野生型CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域。

[0253] 共刺激性信号传导结构域

[0254] 除抗原特异性信号的刺激之外,许多免疫效应细胞(例如T细胞)还需要共刺激,以促进细胞增殖、分化和存活,以及以使细胞的效应功能活化。在一些实施方案中,CAR包含至少一个共刺激性信号传导结构域。如本文所用的术语“共刺激性信号传导结构域”是指介导细胞内的信号转导以诱导免疫应答诸如效应功能的蛋白质的至少一部分。本文所述的嵌合受体的共刺激性信号传导结构域可为来自对信号进行转导,并且调节由免疫细胞诸如T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜中性白细胞或嗜酸性粒细胞介导的应答的共刺激性蛋白质的细胞质信号传导结构域。“共刺激性信号传导结构域”可为共刺激性分子的细胞质部分。术语“共刺激性分子”是指免疫细胞(诸如T细胞)上特异性结合共刺激性配体,由此介导由免疫细胞达成的共刺激性应答诸如但不限于增殖和存活的同源结合配偶体。

[0255] 在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含单一共刺激性信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含两个或更多个(诸如约2个、3个、4个或更多个中的任一者)共刺激性信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含两个或更多个相同共刺激性信号传导结构域,例如CD28或CD137(4-1BB)的共刺激性信号传导结构域的两个拷贝。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含两个或更多个来自不同共刺激性蛋白质诸如本文所述的任何两种或更多种共刺激性蛋白质的共刺激性信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含初级细胞内信号传导结构域(诸如CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域)和一个或多个共刺激性信号传导结构域(例如4-1BB)。在一些实施方案中,一个或多个共刺激性信号传导结构域和初级细胞内信号传导结构域(诸如CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域)通过任选的肽接头来彼此融合。初级细胞内信号传导结构域和一个或多个共刺激性信号传导结构域可以任何适合顺序排列。在一些实施方

案中,一个或多个共刺激性信号传导结构域位于跨膜结构域与初级细胞内信号传导结构域(诸如CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域)之间。多个共刺激性信号传导结构域可提供累加或协同刺激作用。

[0256] 宿主细胞(例如免疫细胞)中共刺激性信号传导结构域的活化可诱导细胞使细胞因子的产生和分泌、吞噬性质、增殖、分化、存活和/或细胞毒性增加或降低。任何共刺激性分子的共刺激性信号传导结构域就在本文所述的CAR中使用来说都可为可相容的。共刺激性信号传导结构域的一种或多种类型基于诸如其中将表达效应分子的免疫效应细胞的类型(例如T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜中性白细胞或嗜酸性粒细胞)以及所需免疫效应功能(例如ADCC效应)的因素加以选择。用于CAR中的共刺激性信号传导结构域的实例可为共刺激性蛋白质的细胞质信号传导结构域,所述共刺激性蛋白质包括但不限于B7/CD28家族的成员(例如B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BTLA/CD272、CD28、CTLA-4、GITR/VISTA/B7-H5、ICOS/CD278、PD-1、PD-L2/B7-DC和PDCD6);TNF超家族的成员(例如4-1BB/TNFSF9/CD137、4-1BB配体/TNFSF9、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BAFF R/TNFSF13C、CD27/TNFSF7、CD27配体/TNFSF7、CD30/TNFSF8、CD30配体/TNFSF8、CD40/TNFSF5、CD40/TNFSF5、CD40配体/TNFSF5、DR3/TNFSF25、GITR/TNFSF18、GITR配体/TNFSF18、HVEM/TNFSF14、LIGHT/TNFSF14、淋巴毒素- α /TNF- β 、OX40/TNFSF4、OX40配体/TNFSF4、RELt/TNFSF19L、TACI/TNFSF13B、TL1A/TNFSF15、TNF- α 和TNF RII/TNFSF1B);SLAM家族的成员(例如2B4/CD244/SLAMF4、BLAME/SLAMF8、CD2、CD2F-10/SLAMF9、CD48/SLAMF2、CD58/LFA-3、CD84/SLAMF5、CD229/SLAMF3、CRACC/SLAMF7、NTB-A/SLAMF6和SLAM/CD150);以及任何其他共刺激性分子,诸如CD2、CD7、CD53、CD82/Kai-1、CD90/Thy1、CD96、CD160、CD200、CD300a/LMIR1、I类HLA、HLA-DR、Ikaros、整合素 α 4/CD49d、整合素 α 4 β 1、整合素 α 4 β 7/LPAM-1、LAG-3、TCL1A、TCL1B、CRTAM、DAP12、树突细胞相关C型凝集素-1(Dectin-1)/CLEC7A、DPPIV/CD26、EphB6、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TSLP、TSLP R、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)和NKG2C。

[0257] 在一些实施方案中,一个或多个共刺激性信号传导结构域源于选自由以下组成的组的共刺激性分子:CD11、CD2(LFA-2)、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM-1)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD162(SELPLG)、CD258(LIGHT)、CD270(HVEM、LIGHTR)、CD276(B7-H3)、CD278(ICOS)、CD279(PD-1)、CD319(SLAMF7)、LFA-1(淋巴细胞功能相关抗原-1)、NKG2C、CDS、GITR、BAFFR、NKp80(KLRF1)、CD160、CD19、CD4、IP0-3、BLAME(SLAMF8)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、CD83、CD150(SLAMF1)、CD152(CTLA-4)、CD223(LAG3)、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、DAP10、TRIM、ZAP70、与CD83特异性结合的配体以及它们的任何组合。在一些实施方案中,一个或多个共刺激性信号传导结构域源于选自由以下组成的组的共刺激性分子:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、CD3、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和特异性结合CD83的配体。

[0258] 在一些实施方案中,本申请的CAR中的细胞内信号传导结构域包含源于4-1BB(CD137)的共刺激性信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域和4-1BB的共刺激性信号传导结构域。

[0259] 在一些实施方案中,本申请的CAR中的细胞内信号传导结构域包含源于CD28的共刺激性信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的细胞质信

号传导结构域和CD28的共刺激性信号传导结构域。

[0260] 在一些实施方案中,本申请的CAR中的细胞内信号传导结构域包含CD28的共刺激性信号传导结构域和CD137的共刺激性信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域、CD28的共刺激性信号传导结构域以及CD137的共刺激性信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含从N末端至C末端包含以下的多肽:CD28的共刺激性信号传导结构域、CD137的共刺激性信号传导结构域以及CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域。

[0261] 还在本公开的范围内的的是本文所述的任何共刺激性信号传导结构域的变体,以致共刺激性信号传导结构域能够调节免疫细胞的免疫应答。在一些实施方案中,相较于野生型对应物,共刺激性信号传导结构域包含多达10个氨基酸残基变异(例如1个、2个、3个、4个、5个或8个)。包含一个或多个氨基酸变异的这类共刺激性信号传导结构域可被称为变体。相对于不包含突变的共刺激性信号传导结构域,共刺激性信号传导结构域的氨基酸残基的突变可导致信号转导增加以及对免疫应答的刺激增强。相对于不包含突变的共刺激性信号传导结构域,共刺激性信号传导结构域的氨基酸残基的突变可导致信号转导降低以及对免疫应答的刺激降低。

[0262] 铰链

[0263] 本申请的CAR可包含位于细胞外配体结合结构域的C末端与跨膜结构域的N末端之间的铰链结构域。铰链结构域是通常见于蛋白质的两个结构域之间,并且可允许达成所述蛋白质的柔性以及所述结构域中的一者或两者相对于彼此的移动的氨基酸区段。可使用提供效应分子的这种柔性以及细胞外抗原结合结构域相对于跨膜结构域的移动的任何氨基酸序列。

[0264] 铰链结构域可含有约10-100个氨基酸,例如约15-75个氨基酸、20-50个氨基酸或30-60个氨基酸中的任一者。在一些实施方案中,铰链结构域在长度方面可为至少约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70或75个氨基酸中的任一者。

[0265] 在一些实施方案中,铰链结构域是天然存在的蛋白质的铰链结构域。本领域中已知包含铰链结构域的任何蛋白质的铰链结构域就在本文所述的CAR中使用来说都是可相容的。在一些实施方案中,铰链结构域是天然存在的蛋白质的铰链结构域的至少一部分,并且对嵌合受体赋予柔性。在一些实施方案中,铰链结构域源于CD8 α 。在一些实施方案中,铰链结构域是CD8 α 的铰链结构域的一部分,例如含有CD8 α 的铰链结构域的至少15(例如20、25、30、35或40)个连续氨基酸的片段。

[0266] 抗体诸如IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体的铰链结构域就在本文所述的pH依赖性嵌合受体系统中使用来说也是可相容的。在一些实施方案中,铰链结构域是使抗体的恒定结构域CH1和CH2接合的铰链结构域。在一些实施方案中,铰链结构域来自抗体,并且包含所述抗体的铰链结构域以及所述抗体的一个或多个恒定区。在一些实施方案中,铰链结构域包含抗体的铰链结构域和所述抗体的CH3恒定区。在一些实施方案中,铰链结构域包含抗体的铰链结构域以及所述抗体的CH2和CH3恒定区。在一些实施方案中,抗体是IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体。在一些实施方案中,抗体是IgG抗体。在一些实施方案中,抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在一些实施方案中,铰链区包含IgG1抗体的铰链区以及CH2和CH3恒定区。

在一些实施方案中,铰链区包含IgG1抗体的铰链区和CH3恒定区。

[0267] 非天然存在的肽也可作为铰链结构域用于本文所述的嵌合受体。在一些实施方案中,在Fc受体的细胞外配体结合结构域的C末端与跨膜结构域的N末端之间的铰链结构域是肽接头,诸如 $(G \times S)_n$ 接头,其中x和n独立地可为在3与12之间的整数,包括3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,或更大。

[0268] 信号肽

[0269] 本申请的CAR可在多肽的N末端处包含信号肽(也被称为信号序列)。一般来说,信号肽是使多肽靶向细胞中的所需位置的肽序列。在一些实施方案中,信号肽使效应分子靶向细胞的分泌路径,并且将允许效应分子整合和锚定至脂质双层中。就在本文所述的CAR中使用来说是可相容的包括天然存在的蛋白质的信号序列或合成的非天然存在的信号序列的信号肽将为本领域技术人员所显而易见。在一些实施方案中,信号肽源于选自CD8 α 、GM-CSF受体 α 和IgG1重链组成的组的分子。在一些实施方案中,信号肽源于CD8 α 。

[0270] ACTR是将Fc受体(CD16)与信号转导结构域(4-1BB/CD3 ζ)组合的嵌合蛋白。携带ACTR的经工程改造T细胞可结合单克隆抗体,所述单克隆抗体接着充当到达肿瘤细胞的桥梁。

[0271] 在一些实施方案中,功能性外源性受体是嵌合受体,所述嵌合受体包含(a)细胞外配体结合结构域,所述细胞外配体结合结构域包含至少一个源于配体或受体的细胞外结构域的结构域,其中所述配体或受体是细胞表面抗原(例如NKG2D、BCMA、IL-3、IL-13);(b)跨膜结构域;以及(c)细胞内信号传导结构域。

[0272] 在一些实施方案中,细胞外配体结合结构域包含至少一个源于BCMA的配体例如APRIL或BAFF的结构域。在一些实施方案中,细胞外配体结合结构域包含特异性识别BCMA的一个或多个表位的抗原结合片段(例如sdAb)。

[0273] 经工程改造TCR

[0274] 在一些实施方案中,功能性外源性受体是经工程改造TCR(例如特异性识别肿瘤抗原或肿瘤抗原-MHC复合物的经工程改造TCR),所述经工程改造TCR包含细胞外配体结合结构域,所述细胞外配体结合结构域包含源于野生型TCR的共同特异性识别抗原(诸如本文所述的任何抗原,例如肿瘤抗原)的V α 和V β ,其中相对于所述野生型TCR,所述V α 、所述V β 或两者在一个或多个CDR中包含突变。在一些实施方案中,突变导致氨基酸取代,诸如保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,经工程改造TCR结合由野生型TCR结合的相同同源肽-MHC。在一些实施方案中,相较于由野生型TCR达成的结合,经工程改造TCR以更高亲和力结合相同同源肽-MHC。在一些实施方案中,相较于由野生型TCR达成的结合,经工程改造TCR以更低亲和力结合相同同源肽-MHC。在一些实施方案中,经工程改造TCR结合不由野生型TCR结合的非同源肽-MHC。在一些实施方案中,经工程改造TCR是单链TCR(scTCR)。在一些实施方案中,经工程改造TCR是二聚TCR(dTCR)。在一些实施方案中,野生型TCR结合HLA-A2。在一些实施方案中,经工程改造TCR还包含细胞内信号传导结构域,诸如源于CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。

[0275] 在一些实施方案中,经工程改造TCR包含细胞外配体结合结构域,所述细胞外配体结合结构域包含源于野生型TCR的共同特异性识别肿瘤抗原或肿瘤抗原-MHC复合物的V α 和V β ,其中相对于所述野生型TCR,所述V α 、所述V β 或两者在一个或多个CDR中包含突变。在一

些实施方案中,相比于野生型抗肿瘤抗原TCR,经工程改造抗肿瘤抗原TCR对肿瘤抗原具有更高结合亲和力。在一些实施方案中,经工程改造TCR还包含细胞内信号传导结构域,诸如源于CD3 ζ 的初级细胞内信号传导结构域。

[0276] IV. 经工程改造细胞

[0277] 本申请提供经工程改造细胞,所述经工程改造细胞包含本文所述的任何融合蛋白、任何核酸和/或任何载体。

[0278] 在一些实施方案中,经工程改造细胞包含a) 融合蛋白(诸如本文所述的任何融合蛋白),和b) 功能性外源性受体(诸如本文所述的任何功能性外源性受体)。在一些实施方案中,融合蛋白和功能性外源性受体两者均在经工程改造细胞的表面上表达。

[0279] 在一些实施方案中,提供了包含(或表达)融合蛋白的经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺ T细胞),所述融合蛋白包含:a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含TGF β 1或TGF β 2中的一者的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii) 第一跨膜结构域,和iii) 包含IL-12R β 1或IL-23R中的一者的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含TGF β 1或TGF β 2中的另一者的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii) 第二跨膜结构域,和iii) 包含IL-12R β 1或IL-23R中的另一者的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0280] 在一些实施方案中,经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺ T细胞)包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含TGF β 1的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii) 包含TGF β 1的跨膜结构域的第一跨膜结构域,iii) 包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含TGF β 2的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii) 包含TGF β 2的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii) 包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞选自以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD4⁺ T细胞。

[0281] 在一些实施方案中,经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺ T细胞)包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含TGF β 2的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii) 包含TGF β 2的跨膜结构域的第一跨膜结构域,和iii) 包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含TGF β 1的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii) 包含TGF β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii) 包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。

胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞选自自由以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD4⁺ T细胞。

[0282] 在一些实施方案中,经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺ T细胞)包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R1的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)包含IL-23R的跨膜结构域的第一跨膜结构域,和iii)包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R2的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞选自自由以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0283] 在一些实施方案中,经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺ T细胞)包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R2的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)包含IL-23R的跨膜结构域的第一跨膜结构域,和iii)包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R1的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞选自自由以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0284] 在一些实施方案中,经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺ T细胞)包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的第一跨

膜结构域,iii)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iii)包含SEQ ID NO:16的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,第一多肽还包含在第一跨膜结构域与第一细胞内结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二多肽还包含在第二跨膜结构域与第二细胞内结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞选自自由以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD4⁺T细胞。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0285] 在一些实施方案中,经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺T细胞)包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iii)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iii)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,第一多肽还包含在第一跨膜结构域与第一细胞内结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二多肽还包含在第二跨膜结构域与第二细胞内结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞选自自由以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD4⁺T细胞。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0286] 在一些实施方案中,经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺T细胞)包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iii)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,

所述第二多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,第一多肽还包含在第一细胞外结构域与第一跨膜结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二多肽还包含在第二细胞外结构域与第二跨膜结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞选自以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0287] 在一些实施方案中,经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺ T细胞)包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,第一多肽还包含在第一细胞外结构域与第一跨膜结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二多肽还包含在第二细胞外结构域与第二跨膜结构域之间的接头(例如,近膜序列),任选地所述接头包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞选自以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0288] 在一些实施方案中,经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺ T细胞)包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽从N末端至C末端包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的第一接头,iii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iv) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N末端至C

末端包含,i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的第二接头,ii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iv)包含SEQ ID NO:16的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞选自自由以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0289] 在一些实施方案中,经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺ T细胞)包含(或表达)1)融合蛋白,所述融合蛋白包含:a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R1或TGF β R2中的一者的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)第一跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1或IL-23R中的一者的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R1或TGF β R2中的另一者的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1或IL-23R中的另一者的细胞内结构域的第二细胞内结构域;以及2)功能性外源性受体,所述功能性外源性受体包含细胞外配体结合结构域和任选的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,功能性外源性受体选自自由以下组成的组:经工程改造T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体(CAR)、T细胞抗原偶联物(TAC)或其一部分。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞选自自由以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0290] 在一些实施方案中,经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺ T细胞)包含(或表达)1)融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R2的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)包含IL-23R的跨膜结构域的第一跨膜结构域,和iii)包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R1的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域;2)功能性外源性受体,所述功能性外源性受体包含嵌合抗原受体(例如,识别肿瘤抗原的嵌合抗原受体,例如抗GPC3 CAR,例如抗CD20 CAR)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自

体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞选自自由以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0291] 在一些实施方案中,经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺ T细胞)包含(或表达)1)融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R2的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)包含IL-23R的跨膜结构域的第一跨膜结构域,和iii)包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R1的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域;2)功能性外源性受体,所述功能性外源性受体包含经工程改造TCR(例如,识别肿瘤抗原的经工程改造TCR)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞选自自由以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0292] 在一些实施方案中,经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺ T细胞)包含(或表达)1)融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R2的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)包含IL-23R的跨膜结构域的第一跨膜结构域,和iii)包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R1的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域;2)功能性外源性受体,所述功能性外源性受体包含T细胞抗原偶联物(TAC)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞选自自由以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造

细胞是CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGFβ结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0293] 在一些实施方案中,经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺ T细胞)包含(或表达)1)融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽从N末端至C末端包含i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的第一接头,iii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N末端至C末端包含,i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的第二接头,ii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iv)包含SEQ ID NO:16的第二细胞内结构域;以及2)功能性外源性受体,所述功能性外源性受体包含嵌合抗原受体(例如,识别肿瘤抗原的嵌合抗原受体,例如抗GPC3 CAR,例如抗CD20 CAR)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是γδT细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞选自由以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是γδT细胞。在一些实施方案中,T细胞是αβT细胞。在一些实施方案中,T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGFβ结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0294] 在一些实施方案中,经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺ T细胞)包含(或表达)1)融合蛋白,所述融合蛋白从N末端至C末端包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的第一接头,iii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N末端至C末端包含,i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的第二接头,ii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iv)包含SEQ ID NO:16的第二细胞内结构域;以及2)功能性外源性受体,所述功能性外源性受体包含经工程改造TCR(例如,识别肿瘤抗原的经工程改造TCR)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是γδT细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞选自由以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是γδT细胞。在一些实施方案中,T细胞是αβT细胞。在一些实施方案中,T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGFβ结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0295] 在一些实施方案中,经工程改造细胞(例如,免疫细胞,例如T细胞,例如CD8⁺ T细

胞) 包含 (或表达) 1) 融合蛋白, 所述融合蛋白从N末端至C末端包含a) 第一多肽, 所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第一细胞外结构域, ii) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的第一接头, iii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域, 和iv) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域; 以及b) 第二多肽, 所述第二多肽从N末端至C末端包含, i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第二细胞外结构域, ii) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的第二接头, iii) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二跨膜结构域, 和iv) 包含SEQ ID NO:16的第二细胞内结构域; 以及2) 功能性外源性受体, 所述功能性外源性受体包含T细胞抗原偶联物 (TAC)。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是同种异体细胞 (例如, 同种异体T细胞)。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是自体细胞 (例如, 自体T细胞)。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中, 经工程改造细胞选自自由以下组成的组: T细胞、NK细胞、外周血单核细胞 (PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中, T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中, T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中, T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中, 经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0296] 在一些实施方案中, 经工程改造细胞 (例如, 免疫细胞, 例如T细胞, 例如CD8 T细胞) 包含核酸 (或包含所述核酸的载体), 所述核酸包含在SEQ ID NO:28-33 (例如, SEQ ID NO:31-33, 例如SEQ ID NO:33) 中任一个所示的核酸序列。在一些实施方案中, 经工程改造细胞还包含功能性外源性受体 (例如CAR, 例如经工程改造TCR) 或编码所述功能性外源性受体的核酸序列。在一些实施方案中, 包含SEQ ID NO:28-33中任一个所示的核酸序列的核酸还包含编码功能性外源性受体 (例如CAR, 例如经工程改造TCR) 的核酸序列。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是同种异体细胞 (例如, 同种异体T细胞)。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是自体细胞 (例如, 自体T细胞)。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中, 经工程改造细胞选自自由以下组成的组: T细胞、NK细胞、外周血单核细胞 (PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中, T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中, T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中, T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中, 经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0297] 在一些实施方案中, 经工程改造细胞 (例如免疫细胞, 例如T细胞, 例如CD8 T细胞) 包含核酸, 所述核酸包含1) SEQ ID NO:33中所示的核酸序列, 以及2) 编码识别肿瘤抗原的CAR (例如抗GPC3CAR, 例如抗CD20 CAR, 例如包含SEQ ID NO:36或89的氨基酸序列的CAR) 的核酸序列。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是同种异体细胞 (例如, 同种异体T细胞)。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是自体细胞 (例如, 自体T细胞)。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中, 经工程改造细胞是免疫细胞。在一些实施方案中, 经工程改造细胞选自自由以下组成的组: T细胞、NK细胞、外周血单核细胞 (PBMC)、造血干

细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是内源性TCR缺陷性T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞是CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,经由IL-23受体复合物细胞内结构域介导的信号在TGF β 结合时从融合蛋白的细胞外结构域传递至细胞内结构域。

[0298] V.产生经工程改造细胞的方法。

[0299] 本发明的一个方面提供产生任何上述经工程改造T细胞的方法。所述方法通常涉及将包含编码本文所述的任何融合蛋白的核酸序列的核酸引入细胞(例如,T细胞,本文称为“前体细胞”)中。在一些实施方案中,核酸还包含编码功能性外源性受体(诸如本文所述的经工程改造TCR、CAR或ACTR)的第二核酸序列。在一些实施方案中,所述方法还包括将包含编码功能性外源性受体(诸如本文所述的经工程改造TCR、CAR或ACTR)的第二核酸序列的第二核酸引入前体细胞中。在一些实施方案中,前体细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,前体细胞选自由以下组成的组:T细胞、NK细胞、外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞以及其组合。

[0300] 在一些实施方案中,前体细胞(例如,前体T细胞)源于源于血液、骨髓、淋巴液或淋巴器官,是免疫系统的细胞,诸如先天性或适应性免疫细胞。在一些方面,细胞是人细胞。

[0301] 在一些实施方案中,前体(例如,前体T细胞)源于细胞系,例如T细胞系。在一些实施方案中,细胞从异种异体来源,例如从小鼠、大鼠、非人灵长类动物和猪获得。

[0302] 在一些实施方案中,前体T细胞是CD4⁺/CD8⁻、CD4⁻/CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD4⁻/CD8⁻或它们的组合。在一些实施方案中,T细胞是天然杀伤T(NKT)细胞。在一些实施方案中,前体T细胞是经工程改造T细胞,诸如本文所述的任何功能性外源性受体(例如,经工程改造TCR或CAR)。在一些实施方案中,在表达本文所述的功能性外源性受体(例如,经工程改造TCR、CAR)以及结合靶细胞,诸如表达肿瘤抗原(例如GPC3)的肿瘤细胞后,前体T细胞产生IL-2、TFN和/或TNF。在一些实施方案中,在表达本文所述的功能性外源性受体(例如,经工程改造TCR、CAR)以及结合靶细胞后,CD8⁺ T细胞使抗原特异性靶细胞溶解。

[0303] 在一些实施方案中,前体细胞(例如,前体T细胞)从干细胞,诸如造血干细胞、多能干细胞、iPS或胚胎干细胞分化。

[0304] 在一些实施方案中,融合蛋白和/或功能性外源性受体(例如,经工程改造TCR、CAR)通过用本文所述的任一核酸或任一载体(例如,非病毒载体和病毒载体,诸如慢病毒载体)转染来引入至前体细胞(例如,前体T细胞)。在一些实施方案中,功能性外源性受体(例如,经工程改造TCR、CAR)通过在使细胞穿过微流体系统诸如CELL SQUEEZE[®]时将蛋白质插入至细胞膜中来引入至前体细胞(例如,前体T细胞)(参见例如,美国专利申请公布第20140287509号)。

[0305] 将载体(例如病毒载体)或经分离核酸引入至哺乳动物细胞中的方法在本领域中是已知的。本文所述的载体可通过物理、化学或生物学方法来转移至细胞(例如T细胞)中。

[0306] 用于将载体(例如病毒载体)引入至细胞(例如T细胞)中的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质体转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。用于产生包含载体和/或外源性核酸的细胞的方法在本领域中是熟知的。参见例如,Sambrook等人(2001)Molecular Cloning:A

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York。在一些实施方案中,载体(例如病毒载体)通过电穿孔来引入至细胞中。

[0307] 用于将载体引入至细胞(例如T细胞)中的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体已成为用于将基因插入至哺乳动物例如人细胞中的最广泛使用方法。

[0308] 用于将载体(例如病毒载体)引入至细胞(例如T细胞)中的化学手段包括胶体分散系统,诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球体、珠粒以及基于脂质的系统(包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体)。在体外用作递送媒介物的示例性胶体系统是脂质体(例如人工膜囊泡)。

[0309] 在一些实施方案中,编码本文所述的任何融合蛋白和/或功能性外源性受体(例如,经工程改造TCR、CAR)的RNA分子可通过常规方法(例如体外转录)来制备,接着通过已知方法诸如mRNA电穿孔来引入至细胞(例如T细胞)中。参见例如,Rabinovich等人,Human Gene Therapy 17:1027-1035。

[0310] 在一些实施方案中,在引入载体或经分离核酸之后,以离体方式使经转导或经转染细胞增殖。在一些实施方案中,培养经转导或经转染细胞以持续至少约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天或14天中的任一者进行增殖。在一些实施方案中,进一步评估或筛选经转导或经转染细胞以选择经工程改造哺乳动物细胞。

[0311] 报告基因可用于鉴定潜在经转染细胞以及评估调控序列的功能性。一般来说,报告基因是不存在于接受生物体或组织中或不由接受生物体或组织表达,并且编码其表达通过某一可易于检测的性质例如酶活性来显现的多肽的基因。在DNA已被引入至接受细胞中之后,在某一适合时间测定报告基因的表达。适合报告基因可包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰基转移酶、分泌碱性磷酸酶的基因,或绿色荧光蛋白基因(例如Ui-Tei等人FEBS Letters 479:79-82(2000))。适合表达系统是熟知的,并且可使用已知技术制备或商购获得。

[0312] 用以确认在经工程改造细胞(例如,经工程改造T细胞)中存在编码本文所述的任何融合蛋白和/或功能性外源性受体(例如,经工程改造TCR、CAR)的核酸的其他方法包括例如为本领域技术人员所熟知的分子生物学测定,诸如DNA印迹和RNA印迹、RT-PCR和PCR;生化测定,诸如检测特定肽的存在或不存在,例如通过免疫方法(诸如ELISA和蛋白质印迹)、荧光激活的细胞分选(FACS)或磁激活的细胞分选(MACS)(也参见实施例章节)。

[0313] 因此,在一些实施方案中,提供了一种产生经工程改造细胞(例如经工程改造T细胞、同种异体T细胞或内源性TCR缺陷性T细胞)的方法,所述方法包括:向前体细胞中引入包含编码本文所述的融合蛋白的核酸序列的核酸。在一些实施方案中,核酸还包含编码包含细胞外配体结合结构域以及任选的细胞内信号传导结构域的任何功能性外源性受体(例如,经工程改造TCR、CAR)的第二核酸序列。在一些实施方案中,前体细胞包含第二核酸,所述第二核酸编码包含细胞外配体结合结构域和细胞内信号传导结构域的功能性外源性受体(例如,经工程改造TCR、CAR)。在一些实施方案中,所述方法还包括向前体T细胞中引入第二核酸,所述第二核酸编码包含细胞外配体结合结构域和细胞内信号传导结构域的功能性外源性受体。在一些实施方案中,第一核酸和第二核酸被依序引入至T细胞中。因此,在一些实施方案中,提供了一种产生经工程改造细胞(例如,T细胞、同种异体T细胞或内源性TCR缺陷性T细胞)的方法,所述方法包括:向前体细胞中引入编码a)融合蛋白(诸如本文所述的任

何融合蛋白)和b)功能性外源性受体(诸如本文所述的任何功能性外源性受体)的核酸。在一些实施方案中,提供了一种产生经工程改造细胞(例如,T细胞、同种异体T细胞或内源性TCR缺陷性T细胞)的方法,所述方法包括:向前体细胞中引入编码融合蛋白的第一核酸,接着向所述前体细胞中引入编码功能性外源性受体的第二核酸,所述功能性外源性受体包含细胞外配体结合结构域和细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,第一核酸和第二核酸被同时引入至T细胞中。在一些实施方案中,第一核酸和第二核酸在单独的载体上。在一些实施方案中,第一核酸和第二核酸在同一载体上。在一些实施方案中,第一核酸和第二核酸与不同启动子可操作地连接。在一些实施方案中,第一核酸在第二核酸的上游。在一些实施方案中,第一核酸在第二核酸的下游。

[0314] 在一些实施方案中,提供了一种产生经工程改造细胞(例如,经工程改造T细胞、经工程改造同种异体T细胞或经工程改造内源性TCR缺陷性T细胞)的方法,所述方法包括向前体细胞中引入载体(例如,病毒载体,诸如慢病毒载体),所述载体从上游至下游为:启动子(例如,EF1- α)、编码功能性外源性受体(例如,经工程改造TCR或CAR)的第一核酸以及编码如本文所述的融合蛋白的第二核酸。在一些实施方案中,第一核酸和第二核酸被编码多顺反子元件(例如,选自由T2A、P2A、E2A或F2A组成的组的2A自裂解肽)的第三核酸隔开。

[0315] 在一些实施方案中,提供了一种产生经工程改造细胞(例如,经工程改造T细胞、经工程改造同种异体T细胞或经工程改造内源性TCR缺陷性T细胞)的方法,所述方法包括向前体细胞中引入载体(例如,病毒载体,诸如慢病毒载体),所述载体从上游至下游为:启动子(例如,EF1- α)、编码融合蛋白(诸如本文所述的任何融合蛋白)的第一核酸和编码功能性外源性受体(例如,经工程改造TCR或CAR)的第二核酸。在一些实施方案中,第一核酸和第二核酸被编码多顺反子元件(例如,选自由T2A、P2A、E2A或F2A组成的组的2A自裂解肽)的第三核酸隔开。

[0316] 在一些实施方案中,经工程改造细胞是T细胞,并且T细胞中的内源性TCR基因座被CRISPR-Cas系统修饰,从而产生内源性TCR缺陷性T细胞。参见例如,WO 2020/020359。

[0317] 在一些实施方案中,本文所述的方法还包括去除 $\alpha\beta$ T细胞或富集 $\gamma\delta$ T细胞。

[0318] 在一些实施方案中,启动子选自由以下组成的组:劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子、巨细胞病毒立即早期基因启动子(CMV IE)、延伸因子1 α 启动子(EF1- α)、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、泛素-C(UBQ-C)启动子、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白(CAG)启动子、多瘤病毒增强子/单纯疱疹病毒胸苷激酶(MC1)启动子、 β 肌动蛋白(β -ACT)启动子、“骨髓增生性肉瘤病毒增强子,负性控制区域经缺失,经d1587rev引物结合位点取代(MND)”启动子、NFAT启动子、TETON[®]启动子和NF κ B启动子。在一些实施方案中,启动子是EF1- α 。

[0319] 在一些实施方案中,多顺反子元件包含P2A、T2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、BmIFV 2A、IRES、(GS)_n、(GSGGS)_n、(GGGS)_n、(GGGGS)_n或其组合,其中n是至少1的整数。

[0320] 在一些实施方案中,载体是病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体选自由腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、痘苗病毒载体、慢病毒载体、单纯疱疹病毒载体以及它们的衍生物组成的组。在一些实施方案中,载体是非病毒载体,诸如游离型表达载体、增强的游离型载体(EEV)、PiggyBac转座酶载体或睡美人(SB)转座子系统。在一些实施方案中,功能性外源性受体是经工程改造TCR。在一些实施方案中,功能性外源性受体是非TCR受

体,诸如CAR(例如抗抗原CAR、配体/受体CAR、ACTR)。

[0321] 在一些实施方案中,所述方法还包括用至少一种药学上可接受的载体配制表达融合蛋白的经工程改造细胞。在一些实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的表达融合蛋白的经工程改造细胞,或有效量的包含表达融合蛋白的经工程改造细胞(例如,T细胞)和至少一种药学上可接受的载体的药物制剂。在一些实施方案中,个体患有癌症。在一些实施方案中,个体是人。

[0322] 细胞的来源、细胞制备和培养

[0323] 在扩增和遗传修饰细胞(例如T细胞)之前,从个体获得T细胞的来源。例如,免疫细胞(例如T细胞)可从许多来源获得,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在一些实施方案中,可使用可在本领域中的具有所需细胞(例如T细胞)的许多细胞系。在一些实施方案中,细胞(例如T细胞)可从使用为熟练技术人员所知的许多技术诸如FICOLL™分离从受试者收集的某一单位的血液获得。在一些实施方案中,来自个体的循环血液的细胞通过单独采集获得。单独采集产物通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白血细胞、红血细胞和血小板。在一些实施方案中,通过单独采集来收集的细胞可加以洗涤以移除血浆级分,以及将细胞放置在适当缓冲液或培养基中以进行后续处理步骤。在一些实施方案中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在一些实施方案中,洗涤溶液缺乏钙,并且可缺乏镁,或可缺乏许多(若非全部)二价阳离子。此外,惊人的是,在不存在钙下的初始活化步骤导致放大的活化。如本领域普通技术人员将易于了解,洗涤步骤可通过为本领域中的人士所知的方法来实现,诸如通过根据制造商说明书使用半自动化“流穿”离心机(例如Cobe 2991细胞处理器、Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5)。在洗涤之后,可将细胞再悬浮于多种生物可相容缓冲液诸如像无Ca²⁺无Mg²⁺PBS、血浆电解质A或具有或不具有缓冲剂的其他盐水溶液中。或者,可移除单独采集样品的不合需要组分,并且将细胞直接再悬浮于培养基中。

[0324] 在一些实施方案中,细胞(T细胞)由脐带血库、外周血库提供,或源于诱导多能干细胞(iPSC)、专能和多能干细胞或人胚胎干细胞。在一些实施方案中,细胞(例如T细胞)源于细胞系。在一些实施方案中,细胞(例如T细胞)从异种异体来源,例如从小鼠、大鼠、非人灵长类动物和猪获得。在一些实施方案中,细胞(例如T细胞)是人细胞。在一些方面,细胞(例如T细胞)是原代细胞,诸如直接从受试者分离和/或从受试者分离并加以冷冻的那些。在一些实施方案中,细胞包括一个或多个T细胞子组,诸如全T细胞群体、CD4+细胞、CD8+细胞以及它们的子群体,诸如根据功能、活化状态、成熟度、分化潜力、扩增、再循环、定位和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体的类型、在特定器官或区室中的存在、标志物或细胞因子分泌概况、和/或分化程度加以定义的那些。关于待治疗的受试者,细胞可为同种异体的和/或自体的。在一些情况下,细胞(例如T细胞)关于一个或多个预定接受者是同种异体的。

[0325] 在T细胞和/或CD4+和/或CD8+ T细胞的亚型和子群体之中的是原初T(T_N)细胞、效应T细胞(T_{EFF})、记忆T细胞及其亚型诸如干细胞记忆T(TSC_M)、中枢性记忆T(TC_M)、效应记忆T(T_{EM})或终末分化的效应记忆T细胞,肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、不成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关恒定T(MAIT)细胞、天然存在的以及适应性调控性T(Treg)细胞、辅助T细胞诸如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤

泡性辅助T细胞, α/β T细胞以及 δ/γ T细胞。

[0326] 在一些实施方案中,通过使红血细胞溶解以及使单核细胞消减,例如通过PERCOLL™梯度离心或通过逆流离心淘析,从外周血液淋巴细胞分离T细胞。T细胞的特定子群体诸如CD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和CD45RO⁺ T细胞可通过正性或负性选择技术来进一步分离。举例来说,在一些实施方案中,T细胞通过与CD3抗体/CD28抗体(即3×28)缀合珠粒一起孵育一段足以对所需T细胞进行正性选择的时期来分离,所述珠粒诸如是DYNABEADS®M-450CD3/CD28 T。在一些实施方案中,时期是约30分钟。在另一实施方案中,时期在30分钟至36小时的范围内或更久时间以及介于之间的所有整数值。在另一实施方案中,时期是至少1、2、3、4、5或6小时。在一些实施方案中,时期是10至24小时。在一些实施方案中,孵育时期是24小时。较久孵育时间可用于在其中相较于其他细胞类型存在少许T细胞的任何情况下分离T细胞,诸如在从肿瘤组织或从免疫损害个体分离肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)时。此外,使用较久孵育时间可使对CD8⁺ T细胞的捕集的效率增加。因此,通过简单地缩短或延长允许T细胞结合CD3/CD28珠粒的时间,以及/或者通过增加或降低珠粒与T细胞的比率(如本文进一步所述),可在培养起始时或在过程期间的其他时间点优先选择或不选择T细胞的子群体。另外,通过增加或降低珠粒或其他表面上的抗CD3抗体和/或抗CD28抗体的比率,可在培养起始时或在其他所需时间点优先选择或不选择T细胞的子群体。熟练技术人员将认识到还可使用多轮选择。在一些实施方案中,可合乎需要的是进行选择程序,并且在活化和扩增过程中使用“未经选择”细胞。还可使“未经选择”细胞经受其他各轮选择。

[0327] 通过负性选择来富集T细胞群体可用针对为负性选择细胞所特有的表面标志物的抗体的组合来实现。一种方法是通过使用针对存在于负性选择细胞上的细胞表面标志物的单克隆抗体的混合物的负性磁性免疫粘附或流式细胞计量术进行细胞分选和/或选择。举例来说,为通过负性选择来富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些实施方案中,可合乎需要的是富集或正性选择通常表达CD4⁺、CD25⁺、CD62Lhi、GITR⁺和FoxP3⁺的调控性T细胞。或者,在某些实施方案中,T调控性细胞通过CD25抗体缀合珠粒或其他类似选择方法来消减。

[0328] 对于通过正性或负性选择来分离所需细胞群体,可改变细胞和表面(例如粒子诸如珠粒)的浓度。在某些实施方案中,可合乎需要的是显著降低珠粒和细胞混合在一起所处的体积(即增加细胞的浓度),以确保细胞和珠粒的最大接触。举例来说,在一个实施方案中,使用20亿个细胞/ml的浓度。在一个实施方案中,使用10亿个细胞/ml的浓度。在另一实施方案中,使用大于10000万个细胞/ml。在另一实施方案中,使用1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在另一实施方案中,使用7500、8000、8500、9000、9500或10000万个细胞/ml的细胞浓度。在其他实施方案中,可使用12500或15000万个细胞/ml的浓度。使用高浓度可导致增加的细胞产率、细胞活化和细胞扩增。此外,使用高细胞浓度允许更高效捕集可微弱表达目标靶抗原的细胞诸如CD28阴性T细胞,或来自其中有许多肿瘤细胞存在的样品(即白血病性血液、肿瘤组织等)的细胞。这类细胞群体可具有治疗价值,并且将需要获得。举例来说,使用高浓度的细胞允许更高效选择通常具有较微弱CD28表达的CD8⁺ T细胞。

[0329] 在一些实施方案中,可合乎需要的是使用较低浓度的细胞。通过显著稀释细胞混

合物(例如T细胞)和表面(例如粒子诸如珠粒)的混合物,粒子与细胞之间的相互作用得以最小化。这会选择表达待结合于粒子的高量所需抗原的细胞。例如,CD4⁺ T细胞表达更高水平的CD28,并且在稀释浓度下比CD8⁺ T细胞更高效地被捕获。在一些实施方案中,所使用的细胞浓度为 5×10^6 /mL。在一些实施方案中,所用浓度可为约 1×10^5 /mL至 1×10^6 /mL,以及介于之间的任何整数值。

[0330] 在一些实施方案中,细胞可在2-10℃下或在室温下在旋转器上在不同速度下孵育不同时长。

[0331] 用于刺激的T细胞还可在洗涤步骤之后加以冷冻。在不希望受理论束缚下,冷冻和后续解冻步骤通过移除细胞群体中的粒细胞以及在一定程度上移除单核细胞而提供更均一产物。在移除血浆和血小板的洗涤步骤之后,可将细胞悬浮于冷冻溶液中。尽管许多冷冻溶液和参数在本领域中是已知的,并且将可用于这个情形下,但一种方法涉及使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或含有10%右旋糖酐40和5%右旋糖、20%人血清白蛋白和7.5% DMSO的培养基,或含有31.25%血浆电解质-A、31.25%右旋糖5%、0.45% NaCl、10%右旋糖酐40和5%右旋糖、20%人血清白蛋白和7.5% DMSO的培养基,或含有例如羟乙基淀粉(Hespan)和血浆电解质A的其他适合细胞冷冻介质,接着将细胞在每分钟1°的速率下冷冻至-80℃,并且储存在液氮储槽的蒸气相中。可使用其他控制冷冻方法,以及在-20℃下或在液氮中进行的非控制立刻冷冻。

[0332] 在一些实施方案中,低温保存细胞如本文所述加以解冻和洗涤,并且使其在室温下静息一小时,随后进行活化。

[0333] 本申请中还涵盖在可能需要如本文所述的经扩增细胞所处的时间之前在某一时期从受试者收集血液样品或单独采集产物。因此,待扩增的细胞的来源可在必要的任何时间点收集,并且分离和冷冻所需细胞诸如T细胞以稍后在针对将受益于T细胞疗法的许多疾病或疾患诸如本文所述的那些的T细胞疗法中使用。在一个实施方案中,血液样品或单独采集物取自大体上健康的受试者。在某些实施方案中,血液样品或单独采集物取自处于显现疾病的风险下,但尚未显现疾病的大体上健康的受试者,并且分离和冷冻目标细胞以供稍后使用。在某些实施方案中,可扩增、冷冻T细胞,并且在稍后时间使用。在某些实施方案中,在诊断如本文所述的特定疾病之后不久但在任何治疗之前从患者收集样品。在另一实施方案中,在许多相关治疗模态之前从来自受试者的血液样品或单独采集物分离细胞,所述治疗模态包括但不限于用诸如以下的剂治疗:那他珠单抗(natalizumab)、依法珠单抗(efalizumab)、抗病毒剂、化学疗法、放射、免疫抑制剂诸如环孢菌素(cyclosporin)、硫唑嘌呤(azathioprine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、霉酚酸酯(mycophenolate)和FK506,抗体或其他免疫净化剂诸如坎帕斯(CAMPATH)、抗CD3抗体、癌得星(cytosan)、氟达拉滨(fludarabine)、环孢菌素(cyclosporin)、FK506、雷帕霉素(rapamycin)、霉酚酸(mycophenolic acid)、类固醇、FR901228和照射。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶钙调神经磷酸酶(calcineurin)(环孢灵(cyclosporine)和FK506),或抑制对于生长因子诱导的信号传导是重要的p70S6激酶(雷帕霉素)(Liu等人,Cell 66:807-815,1991;Henderson等人,Immun73:316-321,1991;Bierer等人,Curr.Opin.Immun.5:763-773,1993)。在另一实施方案中,分离用于患者的细胞,并且冷冻以稍后与骨髓或干细胞移植、使用诸如氟达拉滨、外部射束放射疗法(XRT)、环磷酰胺的化学治疗剂或诸如OKT3或坎帕斯的抗体的T细胞净化疗

法联合使用(例如在之前、同时或在之后)。在另一实施方案中,在B细胞净化疗法诸如与CD20反应的剂例如利妥星(Rituxan)之前分离细胞,并且可加以冷冻以稍后在所述B细胞净化疗法之后用于治疗。

[0334] 在一些实施方案中,在治疗之后立即从患者获得T细胞。就此而言,已观察到在某些癌症治疗特别是用损害免疫系统的药物治疗之后,在治疗之后不久在患者将通常从治疗恢复所处的时期期间,所得T细胞的就它们离体扩增的能力来说的品质可为最优的或改进的。同样,在使用本文所述的方法进行离体操控之后,这些细胞就达成增强的移入和体内扩增来说可处于优选状态。因此,在本发明的情形内,预期在这个恢复期期间收集血细胞,包括T细胞、树突细胞或造血谱系的其他细胞。此外,在某些实施方案中,动员(例如用GM-CSF动员)和调节方案可用于在受试者中创建有利于特定细胞类型的再群体化、再循环、再生和/或扩增所处的条件,尤其是在疗法之后确定时间窗口期间。说明性细胞类型包括T细胞、B细胞、树突细胞和免疫系统的其他细胞。

[0335] T细胞的活化和扩增

[0336] 在一些实施方案中,在遗传工程改造之前或与遗传工程改造关联来孵育和/或培养细胞。孵育步骤可包括培养、培育、刺激、活化和/或增殖。在一些实施方案中,在刺激条件或刺激剂存在下孵育组合物或细胞。这类条件包括被设计来诱导群体中细胞的增殖、扩增、活化和/或存活,模拟抗原暴露,和/或对细胞进行致敏以用于遗传工程改造,诸如用于引入经遗传工程改造的抗原受体的那些。条件可包括以下中的一者或多者:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、剂,例如营养物、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子诸如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体以及被设计来使细胞活化的任何其他剂。

[0337] 无论在用本文所述的融合蛋白或外源性受体(例如经工程改造TCR、CAR)对T细胞进行遗传修饰之前还是之后,T细胞都可通常使用如例如美国专利第6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041号;以及美国专利申请公布第20060121005号中所述的方法来活化和扩增。

[0338] 通常,T细胞可通过与具有与其连接的刺激CD3/TCR复合物相关信号的剂和刺激T细胞的表面上的共刺激性分子的配体的表面接触来扩增。特别地,T细胞群体可如本文所述加以刺激,诸如通过与固定在表面上的抗CD3抗体或其抗原结合片段或抗CD2抗体接触,或通过与和钙离子载体联合的蛋白质激酶C活化剂(例如苔藓抑素(bryostatin))接触。对于共刺激T细胞的表面上的辅助分子,使用结合所述辅助分子的配体。举例来说,可使T细胞群体与抗CD3抗体和抗CD28抗体在适于刺激T细胞的增殖的条件下接触。为刺激CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞的增殖,抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone,Besancon,France),其可如同本领域中通常已知的其他方法一样加以使用(Berg等人,Transplant Proc.30(8):3975-3977,1998;Haanen等人,J.Exp.Med.190(9):13191328,1999;Garland等人,J.Immunol Meth.227(1-2):53-63,1999)。

[0339] 在一些实施方案中,T细胞通过添加至使培养起始的组合饲养细胞诸如非分裂外周血单核细胞(PBMC),(例如以致在待扩增的初始群体中,对于每个T淋巴细胞,所得细胞群体含有至少约5、10、20或40个或更多个PBMC饲养细胞);以及孵育培养物(例如持续足以使T

细胞的数目扩增的时间)来扩增。在一些方面,非分裂饲养细胞可包括经 γ 射线照射的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,PBMC用在约3000至3600拉德(rad)的范围内的 γ 射线照射以防止细胞分裂。在一些方面,饲养细胞在添加T细胞群体之前添加至培养基中。

[0340] 在一些实施方案中,针对T细胞的初级刺激信号和共刺激信号可通过不同方案来提供。举例来说,提供每种信号的剂可在溶液中,或偶联于表面。当偶联于表面时,剂可偶联于同一表面(即呈“顺式”构造),或偶联于单独表面(即呈“反式”构造)。或者,一种剂可偶联于表面,而另一剂在溶液中。在一个实施方案中,提供共刺激信号的剂结合于细胞表面,而提供初级活化信号的剂在溶液中或偶联于表面。在某些实施方案中,两种剂均可在溶液中。在另一实施方案中,剂可呈可溶形式,接着交联于表面,诸如表达将与剂结合的Fc受体或抗体或其他结合剂的细胞。就此而言,对于预期在本发明中用于使T细胞活化和扩增的人工抗原递呈细胞(aAPC),参见例如美国专利申请公布第20040101519和20060034810号。

[0341] 在一些实施方案中,使T细胞与经剂包被的珠粒组合,随后将珠粒和细胞分离,接着对细胞进行培养。在一替代性实施方案中,在培养之前,不将经剂包被的珠粒和细胞分离,而是一起培养。在另一实施方案中,珠粒和细胞首先通过施加诸如磁力的力来浓缩,从而导致细胞表面标志物的连接增加,由此诱导细胞刺激。

[0342] 举例来说,细胞表面蛋白可通过使CD3抗体和CD28抗体与其连接的顺磁性珠粒(3×28 珠粒)接触T细胞来连接。在一个实施方案中,将细胞(例如 10^4 至 10^9 个T细胞)和珠粒(例如DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T顺磁性珠粒,在1:1的比率下)在缓冲液,优选是PBS(不具有二价阳离子诸如钙和镁)中组合。此外,本领域普通技术人员可易于了解,可使用任何细胞浓度。举例来说,靶细胞在样品中可为极其稀少的,并且仅占样品的0.01%,或整个样品(即100%)可包含目标靶细胞。因此,任何细胞数目都在本发明的情形内。在某些实施方案中,可合乎需要的是显著降低粒子和细胞混合在一起所处的体积(即增加细胞的浓度),以确保细胞和粒子的最大接触。举例来说,在一个实施方案中,使用约20亿个细胞/mL的浓度。在另一实施方案中,使用大于10000万个细胞/mL。在另一实施方案中,使用1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或5000万个细胞/mL的细胞浓度。在另一实施方案中,使用7500、8000、8500、9000、9500或10000万个细胞/mL的细胞浓度。在其他实施方案中,可使用12500或15000万个细胞/mL的浓度。使用高浓度可导致增加的细胞产率、细胞活化和细胞扩增。此外,使用高细胞浓度允许更高效捕集可微弱表达目标靶抗原的细胞,诸如CD28阴性T细胞。在某些实施方案中,这类细胞群体可具有治疗价值,并且将需要获得。举例来说,使用高浓度的细胞允许更高效选择通常具有较微弱CD28表达的CD8⁺ T细胞。

[0343] 在一些实施方案中,可培养混合物数小时(约3小时)至约14天或介于之间的任何以小时计的整数值。在另一实施方案中,可培养混合物21天。在本发明的一个实施方案中,将珠粒和T细胞一起培养约八天。在另一实施方案中,将珠粒和T细胞一起培养2-3天。若干个刺激循环也可需要的,以致T细胞的培养时间可为60天或更久。适合于T细胞培养的条件包括适当培养基(例如最低必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 15(Lonza)),所述培养基可含有为增殖和活力所必需的因子,包括血清(例如胎牛或人血清)、白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 和TNF- α 或为熟练技术人员所知的用于细胞生长的任何其他添加剂。用于细胞生长的其他添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白制剂以及还原剂诸如N-乙酰基-半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可包括RPMI

1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo15和X-Vivo 20、Optimizer,添加有氨基酸、丙酮酸钠和维生素,无血清或补充以适量血清(或血浆)或一组确定激素和/或一定量的一种或多种足以达成T细胞的生长和扩增的细胞因子。抗生素例如青霉素和链霉素仅包括在实验性培养中,而非待输注至受试者中的细胞的培养中。在为支持生长所必需的条件下维持靶细胞,所述条件例如是适当温度(例如37℃)和氛围(例如空气加5% CO₂)。已暴露了不同刺激时间的T细胞可展现不同特征。举例来说,典型血液或单独采集外周血单核细胞产物具有大于细胞毒性或抑制T细胞群体(TC,CD8)的辅助T细胞群体(TH,CD4+)。通过刺激CD3和CD28受体来离体扩增T细胞会产生以下T细胞群体:所述T细胞群体在约第8-9天之前主要由TH细胞组成,而在约第8-9天之后,所述T细胞群体包含日益更大的TC细胞群体。因此,视治疗目的而定,用主要包含TH细胞的T细胞群体对受试者进行输注可为有利的。类似地,如果已分离抗原特异性TC细胞子组,那么可有益的是在更大程度上扩增这个子组。

[0344] 此外,除CD4和CD8标志物之外,其他表型标志物在细胞扩增过程期间也显著地但在很大程度上可重现地变化。因此,这种可重现性使得能够调适活化的T细胞产物以达成特定目的。

[0345] 在一些实施方案中,方法包括评估经修饰细胞或待工程改造细胞的表面上的一种或多种标志物的表达。在一个实施方案中,方法包括例如通过基于亲和力的检测方法诸如通过流式细胞计量术来评估TCR或CD3 ϵ 的表面表达。在一些方面,当方法揭示抗原或其他标志物的表面表达时,例如使用本文所述的方法来破坏编码抗原或其他标志物的基因,或以其他方式阻遏表达。

[0346] VI. 药物组合物

[0347] 本申请还提供了药物组合物,所述药物组合物包含任一表达本文所述的融合蛋白和/或功能性外源性受体(例如,经工程改造TCR、CAR诸如抗BCMACAR)的经工程改造细胞(例如,经工程改造T细胞),以及药学上可接受的载体。药物组合物可通过使多个经工程改造细胞与任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A. 编(1980))混合,以冻干制剂或水溶液形式制备。

[0348] 可接受的载体、赋形剂或稳定剂在采用的剂量和浓度下应对接受者无毒,并且包括缓冲剂、抗氧化剂,包括抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素E、焦亚硫酸钠;防腐剂、等张调节剂、稳定剂、金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);螯合剂诸如EDTA和/或非离子表面活性剂。

[0349] 缓冲剂用于将pH控制在使治疗有效性最优化的范围内,尤其是如果稳定性依赖于pH。缓冲剂优选在约50mM至约250mM的范围内的浓度下存在。适于与本发明一起使用的缓冲剂包括有机酸与无机酸两者以及它们的盐。举例来说,柠檬酸盐、磷酸盐、丁二酸盐、酒石酸盐、反丁烯二酸盐、葡萄糖酸盐、草酸盐、乳酸盐、乙酸盐。另外,缓冲剂可包括组氨酸和三胺盐诸如Tris。

[0350] 防腐剂被添加来延缓微生物生长,并且通常在0.2%-1.0% (w/v) 的范围内存在。适于与本发明一起使用的防腐剂包括十八烷基二甲基苯甲基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎卤铵(例如苯扎氯铵、苯扎溴铵、苯扎碘铵)、苄索氯铵;硫柳汞、苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇、3-戊醇和间甲酚。

[0351] 存在张力剂,有时称为“稳定剂”,以调整或维持组合物中的液体张力。当与大型带

电荷生物分子诸如蛋白质和抗体一起使用时,它们常常被称为“稳定剂”,因为它们可与氨基酸侧链的带电荷基团相互作用,由此使分子间和分子内相互作用的潜力减小。在考虑其他成分的相对量的情况下,以重量计,张力剂可以在0.1%至25%,优选是1%至5%之间的任何量存在。优选张力剂包括多羟基糖醇,优选是三羟基或更高级糖醇,诸如甘油、赤藓糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇。

[0352] 额外赋形剂包括可充当以下中的一者或多者的剂:(1)增积剂,(2)溶解增强剂,(3)稳定剂以及(4)防止变性或粘附于容器壁的剂。这类赋形剂包括:多羟基糖醇(以上列举);氨基酸,诸如丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等;有机糖或糖醇,诸如蔗糖、乳糖、乳糖醇、海藻糖、水苏糖、甘露糖、山梨糖、木糖、核糖、核糖醇、肌糖、肌糖醇、半乳糖、半乳糖醇、甘油、环醇(例如肌醇)、聚乙二醇;含硫还原剂,诸如脲、谷胱甘肽、硫辛酸、硫代乙酸钠、硫代甘油、 α -单硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量蛋白质,诸如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或其他免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;单糖(例如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖);二糖(例如乳糖、麦芽糖、蔗糖);三糖,诸如棉子糖;以及多糖,诸如糊精或右旋糖酐。

[0353] 存在非离子表面活性剂或清洁剂(也被称为“湿润剂”)以帮助溶解治疗剂以及保护治疗性蛋白质对抗搅拌诱导的聚集,此还容许制剂暴露于剪切表面应力而不导致活性治疗性蛋白质或抗体的变性。非离子表面活性剂在约0.05mg/mL至约1.0mg/mL,优选是约0.07mg/mL至约0.2mg/mL的范围内存在。

[0354] 适合非离子表面活性剂包括聚山梨醇酯(20、40、60、65、80等)、泊洛沙姆(184、188等)、PLURONIC®多聚醇、TRITON®、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单醚(TWEEN®-20、TWEEN®-80等)、聚桂醇400、聚氧乙烯40硬脂酸酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油10、50和60,甘油单硬脂酸酯、蔗糖脂肪酸酯、甲基纤维素和羧甲基纤维素。可使用的阴离子清洁剂包括月桂基硫酸钠、丁二酸二辛酯磺酸钠和磺酸钠二辛酯。阳离子清洁剂包括苯扎氯铵或苄索氯铵。

[0355] 为使药物组合物用于体内施用,它们必须是无菌的。可通过经无菌过滤膜过滤来致使药物组合物无菌。通常将本文药物组合物放置至具有无菌接入口的容器中,所述容器例如是静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶。

[0356] 施用途径根据已知和接受的方法,诸如通过以适合方式进行单次或多次团注或历经长久时期输注,例如通过皮下、静脉内、腹膜内、肌内、动脉内、病变内或关节内途径来注射或输注;经表面施用、吸入或采用持续释放或延长释放手段。

[0357] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的适合实例包括含有拮抗剂的固体疏水性聚合物半渗透性基质,所述基质呈成形物品例如薄膜或微胶囊形式。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)或聚(乙烯醇))、聚丙交酯(美国专利第3,773,919号)、L-谷氨酸和L-谷氨酸乙酯的共聚物、非可降解乙烯-乙酸乙烯酯、可降解乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)组成的可注射微球体)以及聚D-(-)-3-羟基丁酸。

[0358] 本文所述的药物组合物还可含有超过一种如为所治疗的特定适应症所必需的活性化合物或活性剂,优选是不不利地影响彼此的具有补充活性的那些。或者或此外,组合物可包含细胞毒性剂、化学治疗剂、细胞因子、免疫抑制剂或生长抑制剂。这类分子适合地以

有效达成预定目的的量存在于组合中。

[0359] 活性成分还可被包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊,例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊中,胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中,或巨乳液中。这类技术公开于 Remington's Pharmaceutical Sciences第18版中。

[0360] VII. 治疗方法

[0361] 本申请还提供了治疗个体的疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述个体施用包含有效量的本文所述的经工程改造细胞的药物组合物。在一些实施方案中,疾病或疾患与免疫抑制相关。在一些实施方案中,与没有疾病或疾患的个体中的相应组织相比,患病组织具有更高的TGF β 表达水平(例如,更高的TGF β mRNA或TGF β 蛋白表达)。在一些实施方案中,与没有疾病或疾患的个体中的相应组织相比,患病组织具有更高的TGF β R表达水平(例如,更高的TGF β R1/TGF β R2mRNA或TGF β R1/TGF β R2蛋白表达)。在一些实施方案中,疾病或疾患是癌症。在一些实施方案中,癌症是实体瘤。在一些实施方案中,疾病或疾患是感染性疾病或与感染相关的疾患。

[0362] 本申请还提供了减少个体的患病组织中的免疫抑制信号的方法,所述方法包括向所述个体施用包含有效量的本文所述的经工程改造细胞的药物组合物。在一些实施方案中,减少免疫抑制信号包括减少通过TGF β R进行的信号传导。在一些实施方案中,与没有疾病或疾患的个体中的相应组织相比,患病组织具有更高的TGF β 表达水平(例如,更高的TGF β mRNA或TGF β 蛋白表达)。在一些实施方案中,与没有疾病或疾患的个体中的相应组织相比,患病组织具有更高的TGF β R表达水平(例如,更高的TGF β R1/TGF β R2 mRNA或TGF β R1/TGF β R2蛋白表达)。在一些实施方案中,疾病或疾患是癌症。在一些实施方案中,癌症是实体瘤。在一些实施方案中,疾病或疾患是感染性疾病或与感染相关的疾患。

[0363] 在一些实施方案中,所述方法还包括在治疗之前评估患病组织中TGF β 或TGF β 受体(例如,TGF β R1和/或TGF β R2)的水平。在一些实施方案中,所述方法还包括基于患病组织中TGF β 或TGF β 受体(例如,TGF β R1和/或TGF β R2)的水平选择个体进行治疗。在一些实施方案中,当患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β 水平(例如,平均TGF β 水平)时,选择个体进行治疗。在一些实施方案中,当患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β R水平(例如,平均TGF β R1和/或平均TGF β R2水平)时,选择个体进行治疗。

[0364] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体的疾病或疾患(例如癌症、实体瘤、血液癌症或感染性疾病)的方法,所述方法包括施用包含有效量的经工程改造细胞(例如免疫细胞,例如T细胞)的组合物(例如药物组合物),所述经工程改造细胞包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R1的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)包含TGF β R1的跨膜结构域的第一跨膜结构域,iii)包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R2的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)包含TGF β R2的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例

如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞还包含功能性外源性受体(例如CAR,例如经工程改造TCR)或编码所述功能性外源性受体的核酸序列。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β 水平(例如,平均TGF β 水平)。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β R水平(例如,平均TGF β R1和/或平均TGF β R2水平)。在一些实施方案中,经工程改造细胞被肠胃外(例如,静脉内)施用于个体。在一些实施方案中,个体是人。

[0365] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体的疾病或疾患(例如癌症、实体瘤、血液癌症或感染性疾病)的方法,所述方法包括施用包含有效量的经工程改造细胞(例如免疫细胞,例如T细胞)的组合物(例如药物组合物),所述经工程改造细胞包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R2的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)包含TGF β R2的跨膜结构域的第一跨膜结构域,和iii)包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R1的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)包含TGF β R1的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞还包含功能性外源性受体(例如CAR,例如经工程改造TCR)或编码所述功能性外源性受体的核酸序列。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β 水平(例如,平均TGF β 水平)。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β R水平(例如,平均TGF β R1和/或平均TGF β R2水平)。在一些实施方案中,经工程改造细胞被肠胃外(例如,静脉内)施用于个体。在一些实施方案中,个体是人。

[0366] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体的疾病或疾患(例如癌症、实体瘤、血液癌症或感染性疾病)的方法,所述方法包括施用包含有效量的经工程改造细胞(例如免疫细胞,例如T细胞)的组合物(例如药物组合物),所述经工程改造细胞包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R1的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)包含IL-23R的跨膜结构域的第一跨膜结构域,和iii)包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R2的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞还包含功能性外源性受体(例如CAR,例如经工程改造TCR)或编码所述功能性外源性受体的核酸序列。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β 水平(例如,平均TGF β 水平)。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中

的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β R水平(例如,平均TGF β R1和/或平均TGF β R2水平)。在一些实施方案中,经工程改造细胞被肠胃外(例如,静脉内)施用于个体。在一些实施方案中,个体是人。

[0367] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体的疾病或疾患(例如癌症、实体瘤、血液癌症或感染性疾病)的方法,所述方法包括施用包含有效量的经工程改造细胞(例如免疫细胞,例如T细胞)的组合物(例如药物组合物),所述经工程改造细胞包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R2的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)包含IL-23R的跨膜结构域的第一跨膜结构域,和iii)包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R1的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞还包含功能性外源性受体(例如CAR,例如经工程改造TCR)或编码所述功能性外源性受体的核酸序列。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β 水平(例如,平均TGF β 水平)。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β R水平(例如,平均TGF β R1和/或平均TGF β R2水平)。在一些实施方案中,经工程改造细胞被肠胃外(例如,静脉内)施用于个体。在一些实施方案中,个体是人。

[0368] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体的疾病或疾患(例如癌症、实体瘤、血液癌症或感染性疾病)的方法,所述方法包括施用包含有效量的经工程改造细胞(例如免疫细胞,例如T细胞)的组合物(例如药物组合物),所述经工程改造细胞包含(或表达)1)融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含TGF β R2的细胞外结构域的第一细胞外结构域,ii)包含IL-23R的跨膜结构域的第一跨膜结构域,和iii)包含IL-23R的细胞内结构域的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含TGF β R1的细胞外结构域的第二细胞外结构域,ii)包含IL-12R β 1的跨膜结构域的第二跨膜结构域,和iii)包含IL-12R β 1的细胞内结构域的第二细胞内结构域;以及2)靶向肿瘤抗原(例如,GPC3或BCMA)的CAR。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β 水平(例如,平均TGF β 水平)。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β R水平(例如,平均TGF β R1和/或平均TGF β R2水平)。在一些实施方案中,经工程改造细胞被肠胃外(例如,静脉内)施用于个体。在一些实施方案中,个体是人。

[0369] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体的疾病或疾患(例如,癌症、实体瘤、血液癌症或感染性疾病)的方法,所述方法包括施用包含有效量的经工程改造细胞(例如免疫细胞,例如T细胞)的组合物(例如药物组合物),所述经工程改造细胞包含(或表达)融合蛋白,

所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的第一跨膜结构域,iii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:16的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞还包含功能性外源性受体(例如CAR,例如经工程改造TCR)或编码所述功能性外源性受体的核酸序列。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β 水平(例如,平均TGF β 水平)。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β R水平(例如,平均TGF β R1和/或平均TGF β R2水平)。在一些实施方案中,经工程改造细胞被肠胃外(例如,静脉内)施用于个体。在一些实施方案中,个体是人。

[0370] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体的疾病或疾患(例如,癌症、实体瘤、血液癌症或感染性疾病)的方法,所述方法包括施用包含有效量的经工程改造细胞(例如免疫细胞,例如T细胞)的组合物(例如药物组合物),所述经工程改造细胞包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞还包含功能性外源性受体(例如CAR,例如经工程改造TCR)或编码所述功能性外源性受体的核酸序列。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β 水平(例如,平均TGF β 水平)。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β R水平(例如,平均TGF β R1和/或平均TGF β R2水平)。在一些实施方案中,经工程改造细胞被肠胃外(例如,静脉内)施用于个体。在一些实施方案中,个体是人。

[0371] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体的疾病或疾患(例如,癌症、实体瘤、血液癌症或感染性疾病)的方法,所述方法包括施用包含有效量的经工程改造细胞(例如免疫细胞,例如T细胞)的组合物(例如药物组合物),所述经工程改造细胞包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a) 第一多肽,所述第一多肽包含i) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b) 第二多肽,所述第二多肽包含i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第

二跨膜结构域,和iii)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞还包含功能性外源性受体(例如CAR,例如经工程改造TCR)或编码所述功能性外源性受体的核酸序列。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β 水平(例如,平均TGF β 水平)。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β R水平(例如,平均TGF β R1和/或平均TGF β R2水平)。在一些实施方案中,经工程改造细胞被肠胃外(例如,静脉内)施用于个体。在一些实施方案中,个体是人。

[0372] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体的疾病或疾患(例如,癌症、实体瘤、血液癌症或感染性疾病)的方法,所述方法包括施用包含有效量的经工程改造细胞(例如免疫细胞,例如T细胞)的组合物(例如药物组合物),所述经工程改造细胞包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽包含i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iii)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽包含i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iii)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞还包含功能性外源性受体(例如CAR,例如经工程改造TCR)或编码所述功能性外源性受体的核酸序列。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β 水平(例如,平均TGF β 水平)。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β R水平(例如,平均TGF β R1和/或平均TGF β R2水平)。在一些实施方案中,经工程改造细胞被肠胃外(例如,静脉内)施用于个体。在一些实施方案中,个体是人。

[0373] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体的疾病或疾患(例如,癌症、实体瘤、血液癌症或感染性疾病)的方法,所述方法包括施用包含有效量的经工程改造细胞(例如免疫细胞,例如T细胞)的组合物(例如药物组合物),所述经工程改造细胞包含(或表达)融合蛋白,所述融合蛋白包含a)第一多肽,所述第一多肽从N末端至C末端包含i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第一细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的第一接头,iii)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一跨膜结构域,和iv)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一细胞内结构域;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N末端至C末端包含,i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的第二细胞外结构域,ii)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的第二接头,ii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二跨膜结构域,和iv)包含SEQ ID NO:16的第二细胞内结构域。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。

在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞还包含功能性外源性受体(例如CAR,例如经工程改造TCR)或编码所述功能性外源性受体的核酸序列。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β 水平(例如,平均TGF β 水平)。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β R水平(例如,平均TGF β R1和/或平均TGF β R2水平)。在一些实施方案中,经工程改造细胞被肠胃外(例如,静脉内)施用于个体。在一些实施方案中,个体是人。

[0374] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体的疾病或疾患(例如,癌症、实体瘤、血液癌症或感染性疾病)的方法,所述方法包括施用包含有效量的经工程改造细胞(例如免疫细胞,例如T细胞)的组合物(例如药物组合物),所述经工程改造细胞包含核酸,所述核酸包含SEQ ID NO:28-33(例如,SEQ ID NO:31-33,例如SEQ ID NO:33)中任一个所示的核酸序列。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,经工程改造细胞还包含功能性外源性受体(例如CAR,例如经工程改造TCR)或编码所述功能性外源性受体的核酸序列。在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:28-33中任一个所示的核酸序列的核酸还包含编码功能性外源性受体(例如CAR,例如经工程改造TCR)的核酸序列。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β 水平(例如,平均TGF β 水平)。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β R水平(例如,平均TGF β R1和/或平均TGF β R2水平)。在一些实施方案中,经工程改造细胞被肠胃外(例如,静脉内)施用于个体。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β 水平(例如,平均TGF β 水平)。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β R水平(例如,平均TGF β R1和/或平均TGF β R2水平)。在一些实施方案中,经工程改造细胞被肠胃外(例如,静脉内)施用于个体。在一些实施方案中,个体是人。

[0375] 在一些实施方案中,提供了一种治疗个体的疾病或疾患(例如,癌症、实体瘤、血液癌症或感染性疾病)的方法,所述方法包括施用包含有效量的经工程改造细胞(例如免疫细胞,例如T细胞)的组合物(例如药物组合物),所述经工程改造细胞包含核酸,所述核酸包含1) SEQ ID NO:33中所示的核酸序列,以及2) 编码识别肿瘤抗原的CAR(例如,抗GPC3 CAR,,例如抗CD20 CAR,例如包含SEQ ID NO:36或89的氨基酸序列的CAR)的核酸序列。在一些实施方案中,经工程改造细胞是同种异体细胞(例如,同种异体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是自体细胞(例如,自体T细胞)。在一些实施方案中,经工程改造细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β 水平(例如,平均TGF β 水

平)。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β R水平(例如,平均TGF β R1和/或平均TGF β R2水平)。在一些实施方案中,经工程改造细胞被肠胃外(例如,静脉内)施用于个体。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β 水平(例如,平均TGF β 水平)。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β R水平(例如,平均TGF β R1和/或平均TGF β R2水平)。在一些实施方案中,经工程改造细胞被肠胃外(例如,静脉内)施用于个体。在一些实施方案中,个体是人。

[0376] 在一些实施方案中,经工程改造细胞对于个体而言是自体的。

[0377] 在一些实施方案中,经工程改造细胞对于个体而言是同种异体的。

[0378] 在一些实施方案中,个体是哺乳动物(例如,人、非人灵长类动物、大鼠、小鼠、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫等)。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,个体是临床患者、临床试验志愿者、实验动物等。在一些实施方案中,个体小于约60岁(包括例如小于约50、40、30、25、20、15或10岁)。在一些实施方案中,个体大于约60岁(包括例如大于约70、80、90或100岁中的任一个)。

[0379] 在一些实施方案中,患病组织表现出高水平的免疫抑制。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β 水平(例如,平均TGF β 水平)。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的TGF β R水平(例如,平均TGF β R1和/或平均TGF β R2水平)。在一些实施方案中,患病组织具有与参考组织(例如,健康个体中的相应组织)中相比高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的PD-1或PD-L1水平(例如,平均PD-1或PD-L1水平)。

[0380] 药物组合物的施用可以任何适宜方式进行,包括通过注射、摄取、输液、植入或移植。可将组合物经动脉、皮下、皮内、瘤内、结内、髓内、肌内、静脉内或腹膜内向患者施用。在一些实施方案中,全身性施用药物组合物。在一些实施方案中,通过输注诸如静脉内输注向个体施用药物组合物。用于免疫疗法的输注技术是本领域已知的(参见例如,Rosenberg等人,New Eng. J. of Med. 319:1676(1988))。在一些实施方案中,通过皮内或皮下注向个体施用药物组合物。在一些实施方案中,通过静脉内注射施用组合物。在一些实施方案中,将组合物直接注射到肿瘤或淋巴结中。在一些实施方案中,将药物组合物局部施用至肿瘤部位,诸如直接施用至肿瘤细胞中,或施用至具有肿瘤细胞的组织。

[0381] 本发明的药物组合物的剂量和所需药物浓度可根据预想的特定用途而变化。确定合适的剂量或施用途径完全在普通技术人员的技能范围内。动物实验为确定用于人体治疗的有效剂量提供了可靠的指导。有效剂量的种间缩放可以按照由Mordenti, J. 和Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi等人,编辑, Pergamon Press, New York 1989, 第42-46页中规定的原则进行。在本申请的范围内,不同的制剂将有效用于不同的治疗和不同的病症,并且旨在治疗特定器官或组织的施用可能需要以与用于另一器官或组织的方式不同的方式递送。

[0382] 在其中药物组合物包含任一种表达本文所述的融合蛋白和/或功能性外源性受体(例如,经工程改造TCR,CAR诸如抗GPC3 CAR)的经工程改造细胞(例如,经工程改造T细胞)的一些实施方案中,药物组合物以至少约 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 或 10^9 个细胞/kg个体体重中的任一者的剂量施用。在一些实施方案中,药物组合物以约 10^4 至约 10^5 、约 10^5 至约 10^6 、约 10^6 至约 10^7 、约 10^7 至约 10^8 、约 10^8 至约 10^9 、约 10^4 至约 10^9 、约 10^4 至约 10^6 、约 10^6 至约 10^8 或约 10^5 至约 10^7 个细胞/kg个体体重中的任一者的剂量施用。在一些实施方案中,药物组合物以至少约 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 个细胞/kg或更多中的任一者的剂量施用。在一些实施方案中,以约 3×10^5 至约 7×10^6 个细胞/kg或约 3×10^6 个细胞/kg的剂量施用所述药物组合物。

[0383] 在一些实施方案中,药物组合物被施用一次。在一些实施方案中,药物组合物被施用多次(诸如2次、3次、4次、5次、6次或更多次中的任一次)。在一些实施方案中,每周一次、每2周一次、每3周一次、每4周一次、每月一次、每2个月一次、每3个月一次、每4个月一次、每5个月一次、每6个月一次、每7个月一次、每8个月一次、每9个月一次或每年一次施用药物组合物。在一些实施方案中,施用之间的间隔为约1周至2周、2周至1个月、2周至2个月、1个月至2个月、1个月至3个月、3个月至6个月或6个月至一年中的任一个。医学领域的技术人员可以通过监测患者的疾病体征并相应地调整治疗来容易地确定特定患者的最佳剂量和治疗方案。

[0384] 此外,剂量可通过一次或多次单独施用或通过连续输注来施用。在一些实施方案中,药物组合物以分次剂量施用,诸如约2、3、4、5剂或更多剂中的任一者。在一些实施方案中,历经约1周施用分次剂量。在一些实施方案中,剂量是相等拆分的。在一些实施方案中,分次剂量是总剂量的约20%、约30%或约50%。在一些实施方案中,连续分次剂量之间的间隔是约1天、2天、3天或更久。对于历经数天或更久的重复施用,视情况而定,持续治疗直至发生对疾病症状的所需抑制。然而,其他剂量方案可为有用的。通过常规技术和测定,易于监测这个疗法的进展。

[0385] 在一些实施方案中,疾病或疾患是癌症。在一些实施方案中,疾病或疾患是实体瘤。可通过本文所述的方法治疗的癌症的实例包括,但不限于,肾上腺皮质癌、不明原性骨髓组织异生、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤(例如,小脑和大脑)、基底细胞癌、胆管癌(例如,肝外)、膀胱癌、骨癌(骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤)、脑瘤(例如,神经胶质瘤、脑干神经胶质瘤、小脑或大脑星形细胞瘤(例如,毛细胞性星形细胞瘤、弥漫性星形细胞瘤、间变性(恶性)星形细胞瘤)、恶性神经胶质瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、颅咽管瘤、成血管细胞瘤、成神经管细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、视觉通路和下丘脑神经胶质瘤和成胶质细胞瘤)、乳腺癌、支气管腺瘤/类癌、类癌肿瘤(例如,胃肠类癌瘤)、未知原发性癌、宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌、慢性骨髓增生性病症、子宫内膜癌(例如,子宫癌)、室管膜瘤、食管癌、尤因氏肿瘤家族、眼癌(例如,眼内黑素瘤和视网膜母细胞瘤)、胆囊癌、胃(胃)癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠间质肿瘤(GIST)、生殖细胞肿瘤(例如,颅外、性腺外、卵巢)、妊娠滋养细胞肿瘤、头颈癌、肝细胞癌(肝)癌(例如,肝癌(hepatic carcinoma)和肝细胞瘤(heptoma))、下咽癌、胰岛细胞癌(内分泌胰腺)、喉癌、喉癌、唇和口腔癌、口腔癌、肝癌、肺癌(例如,小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌)、成神经细胞瘤、黑素瘤、间皮瘤、转移性鳞状颈

癌、口腔癌、多发性内分泌瘤形成综合征、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、鼻腔和鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、神经内分泌癌、口咽癌、卵巢癌(例如,卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞瘤、卵巢低恶性潜在肿瘤)、胰腺癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、腹膜癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、松果体母细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体瘤、胸膜肺母细胞瘤、肺淋巴管平滑肌瘤病、直肠癌、肾癌、肾盂和输尿管癌(移行细胞癌)、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、皮肤癌(例如,非黑素瘤(例如,在一些实施方案中,所述癌症包括恶性肿瘤(例如,鳞状细胞癌)、黑素瘤和梅克尔细胞癌)、小肠癌、鳞状细胞癌、睾丸癌、喉癌、甲状腺癌、结节性硬化症、尿道癌、阴道癌、外阴癌、维尔姆斯肿瘤、与斑痣性错构瘤病相关的异常血管增殖、水肿(诸如与脑肿瘤相关的水肿)和梅格斯氏综合征(Meigs' syndrome)。

[0386] 在一些实施方案中,如与暴露于TGFβ后没有融合蛋白的相应细胞相比,经工程改造细胞表现出TGFβ下游途径信号传导(例如,Smad2的磷酸化)降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一些实施方案中,如与暴露于TGFβ后没有融合蛋白的相应细胞相比,经工程改造细胞表现出IL-23R下游信号传导(例如,Stat3和/或Stat4的磷酸化)增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。

[0387] 在一些实施方案中,如与暴露于TGFβ后没有融合蛋白的相应细胞相比,经工程改造细胞表现出细胞活力增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一些实施方案中,与暴露于TGFβ后(例如,重复或连续暴露于TGFβ,例如超过100小时、200小时或300小时暴露于TGFβ)没有融合蛋白的相应细胞相比,经工程改造细胞表现出更低PD-1表达(例如,低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)。在一些实施方案中,与暴露于TGFβ后(例如,重复或连续暴露于TGFβ,例如超过100小时、200小时或300小时暴露于TGFβ)没有融合蛋白的相应细胞相比,经工程改造细胞表现出增加的增殖(例如,增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)。在一些实施方案中,与暴露于TGFβ后(例如,重复或连续暴露于TGFβ,例如超过100小时、200小时或300小时暴露于TGFβ)没有融合蛋白的相应细胞相比,经工程改造细胞表现出增加的细胞毒性(例如,增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)。

[0388] 在一些实施方案中,经工程改造细胞在体内表现出更好的抗肿瘤作用。在一些实施方案中,与暴露于TGFβ后没有融合蛋白的相应细胞相比,经工程改造细胞表现出多至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的肿瘤体积减小。

[0389] 在一些实施方案中,治疗效果包括在个体中引起客观临床反应。在一些实施方案中,在个体中获得严格临床应答(sCR)。在一些实施方案中,治疗效果包括引起个体的疾病缓解(部分或完全)。在一些情况下,在个体接受药物组合物后不超过约6个月、5个月、4个月、3个月、2个月、1个月或更短时间中的任一个后获得临床缓解。在一些实施方案中,治疗效果包括防止个体中癌症的复发或疾病进展。在一些实施方案中,预防复发或疾病进展至少约6个月、1年、2年、3年、4年、5年或更长时间。在一些实施方案中,治疗效果包括延长个体的存活期(诸如无疾病存活期)。在一些实施方案中,治疗效果包括改善个体的生活质量。在一些实施方案中,治疗效果包括抑制实体瘤或淋巴瘤的生长或减小其大小。

[0390] 在一些实施方案中,实体瘤或淋巴管瘤的大小减小至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个)。在一些实施方案中,提供了抑制个体实体瘤或淋巴瘤的生长或减小其大小的方法。在一些实施方案中,治疗效果包括

抑制个体中的肿瘤转移。在一些实施方案中,至少约10% (包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一个)的转移受到抑制。转移可以通过本领域的任何已知方法来评估,诸如通过血液测试、骨扫描、X射线扫描、CT扫描、PET扫描和活组织检查来评估。

[0391] 在一些实施方案中,本发明的经工程改造细胞组合物与第二种、第三种或第四种剂(包括例如抗肿瘤剂、生长抑制剂、细胞毒性剂或化学治疗剂)组合施用以治疗疾病或病症(例如癌症,例如实体瘤)。在一些实施方案中,本文所述的治疗感染性疾病的方法还包括向个体施用抗感染性疾病剂。在一些实施方案中,第二抗感染剂与经工程改造细胞同时施用。在一些实施方案中,第二抗感染剂与经工程改造细胞的施用相继施用(例如,之前或之后)。

[0392] VIII. 药盒和制品

[0393] 还提供了包括任一表达本文所述的融合蛋白和/或功能性外源性受体(例如,经工程改造TCR或CAR,例如抗GPC3 CAR,例如抗CD20 CAR)的经工程改造细胞(例如经工程改造T细胞)的药盒、单位剂量和制品。在一些实施方案中,提供了一种药盒,所述药盒含有本文所述的任一药物组合物,并且优选提供关于它的使用的说明书。

[0394] 本申请的药盒处于适合包装中。适合包装包括但不限于小瓶、瓶、罐、柔性包装(例如密封聚酯薄膜(Mylar)或塑料袋)等。药盒可任选地提供额外组分诸如缓冲剂和解释信息。因此,本申请还提供了制品,所述制品包括小瓶(诸如密封小瓶)、瓶、罐、柔性包装等。

[0395] 制品可包括容器和在所述容器上或与所述容器相伴的标签或包装插页。适合容器包括例如瓶、小瓶、注射器等。容器可由多种材料诸如玻璃或塑料形成。通常,容器容纳有效治疗如本文所述的疾病或病症(诸如与免疫抑制相关的疾病或疾患),或减少个体的患病组织中的免疫抑制信号的组合物,并且可具有无菌接入口(例如容器可为静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。标签或包装插页指示组合物用于治疗个体中的特定疾患。标签或包装插页将还包含关于将组合物施用至个体的说明书。标签可指示关于复原和/或使用的指导。容纳药物组合物的容器可为多次使用小瓶,所述小瓶允许重复施用(例如2-6次施用)复原制剂。包装插页是指惯常包括在治疗性产品的商业包装中的说明书,所述说明书含有关于适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或涉及使用这类治疗性产品的警告的信息。另外,制品可还包括第二容器,所述第二容器包含药学上可接受的缓冲液,诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)和右旋糖溶液。它可还包括从商业和使用者观点来看可合乎需要的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针和注射器。药盒或制品可包括多个单位剂量的药物组合物和使用说明书,以足以在药房例如医院药房和混配药房中储存和使用的数量加以包装。

[0396] 实施例

[0397] 本文所述的实施例不意图表示以下实验是进行的全部或仅有的实验。虽然已尽力确保关于所用数字(例如量、温度等)的准确性,但仍应考虑一些实验误差和偏差。除非另外指出,否则份数是重量份,分子量是重均分子量,温度是摄氏度并且压力是大气压或接近大气压。

[0398] 实施例1. 表达TGF β 受体和IL-23受体融合蛋白(TGB23)的T细胞的产生

[0399] 示例性TGF β 受体和IL-23受体融合蛋白(下文命名为TGB23)的结构在图1A和图1B

中示出。为了在暴露于TGF β 后将TGF β 受体(TGF β R)信号转化为诱导IL-23受体(IL-23R)信号,将TGF β 受体1(TGF β R1)和TGF β 受体2(TGF β R2)的细胞内结构域分别用IL-23R细胞内结构域或IL-12R β 1细胞内结构域替代。还产生了具有TGF β R1(SEQ ID NO:66)和TGF β R2(SEQ ID NO:70)的人天然同种型的野生型TGF β R(wtTGF β R)。

[0400] 1. 含有TGB23融合蛋白的慢病毒表达载体的制备

[0401] 将TGB23融合蛋白的核苷酸序列在克隆位点5'-EcoRI和3'-XbaI克隆至慢病毒表达载体中。将含有pMDLg.pRRE、pRSV-REV和pMD2.G的慢病毒包装质粒混合物以预先优化的比率与含聚醚酰亚胺的表达图1所示的TGB23构建体的载体预混合,然后在25℃下孵育5分钟。将HEK293T细胞添加至转导混合物中。之后,将细胞在细胞孵育箱中在5% CO₂下在37℃下孵育过夜。在4℃和3000g下离心15分钟后收集上清液,通过超离心依序浓缩。弃去上清液并用RPMI 1640培养基冲洗病毒团块。将病毒适当地液化,并存储在-80℃下。经由转导中国仓鼠卵巢细胞系,通过滴定法测定病毒滴度。

[0402] 2. T细胞纯化和激活

[0403] 使用全T细胞分离试剂盒(Miltenyi#130-096-535),根据如下所述的制造商的方案,从PBMC(TPCS#A19K470047)中分离人T细胞。测定细胞数量,并将细胞悬浮液以300g离心10分钟,然后将细胞团块重悬于含有总计10⁷个细胞的40 μ L缓冲液中。每10⁷个总细胞添加10 μ L的全T细胞生物素-抗体混合液,充分混合并在4℃下孵育5分钟。然后每10⁷个细胞添加30 μ L缓冲液和20 μ L的全T细胞微珠混合液,充分混合并在4℃下孵育10分钟。磁分离至少需要500 μ L。对于磁分离,将LS柱置于合适的MACS分离器的磁场中。通过用3mL缓冲液冲洗来准备柱。然后将细胞悬浮液施加到柱上,并收集含有未标记细胞的流出物,这代表了富集T细胞级分。然后用3mL缓冲液清洗柱,以收集通过的未标记细胞。将这些未标记的细胞与来自前一步的流出物合并。将合并的富集T细胞离心并重悬于含10% FBS和20ng/mL TGF- β 1(R&D#240-B-010)的RPMI 1640培养基中。

[0404] 随后根据制造商的方案用T细胞激活/扩增试剂盒(Miltenyi#130-091-441)预激活纯化的T细胞48小时,其中抗CD2/CD3/CD28 MACSiBead颗粒以1:2的珠粒:细胞比率添加。

[0405] 3. T细胞转导和TGF- β 受体检测

[0406] 将预激活的T细胞以1 $\times$ 10⁶个细胞/mL重悬于24孔板中,然后用表达TGB23构建体的慢病毒载体转导(感染复数=10)并孵育过夜。第二天,将含有10%FBS和20ng/mL TGF β 1的1.5mL RPMI 1640培养基添加至经转导细胞中。

[0407] TGB23构建体的表达通过FACS进行测量。用含有TGF- β RII抗体(Miltenyi Biotec#130-115-024)的100 μ L DPBS重悬细胞,并在4℃下孵育30分钟。未转导的T细胞(UnT)用作阴性对照。如图2所示,TGB23-1、TGB23-2、TGB23-3、TGB23-4、TGB23-5、TGB23-6、wtTGF β R(野生型TGF β R)、TGB23-14和TGB23-15的阳性率分别为8.06%、3.16%、6.30%、5.01%、9.47%、46.5%、6.78%、4.37%和2.76%。结果表明,与其他构建体相比,TGB23-6融合蛋白/构建体具有最佳的表达效力。

[0408] 4. 表达TGB23的T细胞的细胞活力

[0409] 转导后,将表达TGB23的0.5 $\times$ 10⁶个T细胞与含有10% FBS和20ng/mL TGF β 1的RPMI 1640培养基一起培养。将TGB23 T细胞重悬,并且取得20 μ L细胞悬浮液进行台盼蓝染色。在转导后第3天、第4天、第5天记录细胞活力并通过T4(Nexcelom)细胞计数器计数细胞

数量。

[0410] UnT和TGB23 T细胞的细胞活力和细胞数量在图3A-3B中示出。转导后五天,TGF β 1处理导致UnT(从51.8%至33.6%)和wtTGF β R T细胞(从51.8%至32.4%)的细胞活力分别降低。TGB23 T细胞具有不同程度的抵消TGF β 1功能的能力。其中,TGB23-2、TGB23-4、TGB23-5、TGB23-6和TGB23-14在第5天的活力高于第0天的活力。在TGF β 1存在下转导并培养5天后,T细胞增殖也受到抑制(图3B)。UnT和wtTGF β R T细胞的总数略有增加。尽管TGB23-14(具有无功能的IL-23R细胞内结构域的突变体,SEQ ID NO:26)和TGB23-15(具有均无功能的截短的IL-23R和截短的IL-12R β 1细胞内结构域,SEQ ID NO:27)构建体理论上可在不同程度上抵消TGF β 1的功能,细胞内信号传导结构域功能的缺失对T细胞增殖几乎没有帮助,这可从转导后5天与UnT和wtTGF β R T细胞相似的细胞数量观察到。从第0天至第5天,用TGB23-2、TGB23-3、TGB23-4、TGB23-5和TGB23-6转导的T细胞增加4倍以上。这些结果表明这些TGB23 T细胞与TGF β 结合,并且通过细胞内IL23受体进行的信号传导为T细胞提供促增殖信号。其中,TGB23-5和TGB23-6在TGF β 1存在下促进T细胞增殖的效力最强。

[0411] 实施例2.表达TGB-23融合蛋白的CAR-T细胞的产生

[0412] 为了验证TGB23构建体在TGF β 存在下提供CAR-T细胞针对靶细胞的益处,产生了共表达TGB23-6融合蛋白的GPC3 CAR-T细胞。

[0413] 1.含有嵌合抗原受体(CAR)和TGB23-6的慢病毒表达载体的制备

[0414] 化学合成了包含多肽的CAR骨架并在下游克隆至预先修饰的慢病毒载体(pLSINK-BBzBB)中并且可操作地连接至组成型hEF1 α 启动子以进行体外转录,所述多肽从N末端至C末端为:CD8 α 铰链结构域(SEQ ID NO:40)、CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:41)、CD137共刺激性信号传导结构域(SEQ ID NO:42)和CD3 ζ 细胞内信号传导结构域(SEQ ID NO:43)。为了表达抗GPC3 scFv,载体中的多克隆位点(MCS)允许包含科扎克序列(Kozak sequence)(SEQ ID NO:59)的核酸序列插入到CAR骨架载体中,在上游并且可操作地连接至CAR骨架序列,所述科扎克序列可操作地连接至与抗GPC3 scFv片段的N末端融合的编码CD8 α 信号肽(SEQ ID NO:39)的核酸序列。化学合成了编码CD8 α 信号肽和抗GPC3 scFv片段的核酸序列并通过EcoRI(5'-GAATTC-3',SEQ ID NO:44)和SpeI(5'-ACTAGT-3',SEQ ID NO:45)限制位点通过本领域中已知的分子克隆技术克隆至pLSINK-BBzBB CAR骨架中。为了共表达TGB23-6蛋白,还化学合成了TGB23-6序列并在克隆位点HpaI(5'-GTTAAC-3',SEQ ID NO:46)和MluI(5'-ACGCGT-3',SEQ ID NO:47)连接至CD3 ζ 细胞内信号传导结构域的C末端,所述克隆位点由肽2A接头(例如,P2A接头,SEQ ID NO:48或60)隔开。上述抗GPC3 CAR(命名为huLIC19309b CAR)的氨基酸序列显示为SEQ ID NO:36。包含抗GPC3 CAR和TGB23-6的融合多肽(命名为huLIC19309bT CAR)的表达序列显示为SEQ ID NO:37(氨基酸序列)和SEQ ID NO:38(核酸序列)。

[0415] 制备了表达huLIC19309b CAR和huLIC19309bT CAR的慢病毒表达载体。将含有pMDLg.pRRE、pRSV-REV和pMD2.G的慢病毒包装质粒混合物以预先优化的比率与含聚醚酰亚胺的表达CAR构建体的载体预混合,然后按照实施例1中描述的标准方案。

[0416] 2.T细胞纯化和激活

[0417] 使用全T细胞分离试剂盒(Miltenyi#130-096-535),按照制造商的方案从PBMC(TPCS#A19Z284097)中分离人T细胞,参见实施例1。获得合并的富集T细胞并重悬于含

300IU/mL IL-2的TexMACS™GMP培养基中。

[0418] 随后根据制造商的方案用MACS GMP T细胞TransAct™试剂盒(Miltenyi#170-076-156)预激活纯化的T细胞48小时,其中抗CD3/CD28 MACSiBead颗粒以40μL/百万的珠粒:细胞比率添加。

[0419] 3.CAR-T制备

[0420] 将预激活的T细胞以 1×10^6 个细胞重悬于24孔板中,然后用表达CAR的慢病毒转导(感染复数=5)过夜。然后将转导的T细胞以300g离心10分钟,并与RPMI 1640培养基、10% FBS和300IU/mL IL-2一起培养。未转导的T细胞(UnT)用作阴性对照。

[0421] 通过FACS测量GPC3 CAR和TGFβRII的细胞表面表达。CAR阳性细胞中GPC3 CAR和TGFβRII的门控分别以细胞群和TGFβRII同种型对照为界。将CAR-T细胞或UnT细胞用含有GPC3蛋白-His标签(Acrobiosystems#GP3-H52H4)的100μL DPBS重悬,并在4℃下孵育40分钟。然后用DPBS洗涤细胞并用含有FITC-抗His标签(Genscript#A01620)和PE-抗TGFβRII抗体(Miltenyi#130-115-024)的100μL DPBS重悬细胞,并在4℃下孵育30分钟。如图4所示,huLIC19309b CAR-T细胞和huLIC19309bT CAR-T细胞的CAR阳性率分别为66.69%和64.91%。TGFβRII在UnT、huLIC19309b CAR-T细胞和huLIC19309bT CAR-T细胞的CAR阳性细胞中的表达水平分别为0.07%、2.61%和92.20%。

[0422] 实施例3.用TGFβ1处理的表达TGB23的CAR-T细胞中pSmad2、pStat3和pStat4的表达水平

[0423] TGFβ1与含有两个单位的TGFβR1和TGFβR2的四聚体复合物的连接诱导Smad2磷酸化,以将免疫抑制信号传播至细胞核(W02018094244A1)。因此,磷酸-Smad2(pSmad2)表达用于询问TGFβ信号传导途径激活。对IL-23的细胞应答通过Stat3和Stat4的受体二聚化和磷酸化启动。因此,pStat3和pStat4表达用于评估IL-23受体信号传导途径激活,参考Robinson RT.IL12Rβ1:the cytokine receptor that we used to know.Cytokine.2015年2月;71(2):348-59。

[0424] 将CAR-T细胞和UnT细胞用20ng/mL重组人TGFβ1(R&D#240-B-002)处理4小时,然后通过FACS测量细胞的pSmad2。将CAR-T细胞或UnT细胞用多聚甲醛固定并用Tween-20透化10分钟。在4℃下将细胞用含有GPC3蛋白-His标签和pSmad2抗体(Cell signaling technology#18338)的100μL DPBS重悬40分钟。用DPBS洗涤细胞,并在4℃下用含有PE-抗His标签抗体(Biolegend#362603)和抗兔IgG-Alexa Fluor 488抗体(Thermo Fisher#A11034)的100μL DPBS重悬30分钟,然后通过FACS检测。如图5所示,在用20ng/mL TGFβ1处理后,与huLIC19309bT CAR-T细胞中相比,UnT或huLIC19309b CAR-T细胞中Smad2的磷酸化明显增加。在用20ng/mL TGFβ1处理的UnT、huLIC19309b CAR-T细胞和huLIC19309bT CAR-T细胞中,pSmad2的中值荧光强度(MFI)分别为41565、30972和18142。数据表明TGB23构建体的表达使CAR-T细胞对TGFβ免疫抑制信号传导不敏感。

[0425] 在用20ng/mL TGFβ1处理4小时后,使用pStat3抗体(Biolegend#651004)和pStat4抗体(Thermo Fisher#17-9044-42)通过FACS测量细胞。如图6A和图6B所示,与UnT和huLIC19309b CAR-T细胞相比,在用20ng/mL TGFβ1处理后,huLIC19309bT CAR-T细胞细胞中Stat3和Stat4的磷酸化明显增加。用20ng/mL TGFβ1处理的UnT、huLIC19309b CAR-T细胞和huLIC19309bT CAR-T细胞中pStat3的MFI分别为854、858和1543(图6A)。用20ng/mL TGFβ

1处理的UnT、huLIC19309b CAR-T细胞和huLIC19309bT CAR-T细胞中pStat4的MFI分别为267、271和370(图6B)。数据证实,转化的TGF β 信号可在表达TGB23构建体的CAR-T细胞中诱导IL-23受体信号传导。

[0426] 这些结果表明,表达抗GPC3 CAR和TGB23融合蛋白的huLIC19309bT CAR-T细胞在TGF β 1刺激下可抑制Smad2的磷酸化并促进Stat3和Stat4的磷酸化,这表明huLIC19309bT CAR-T细胞可将TGF β 信号传导转化为细胞内IL-23信号传导并在下游引起应答。总而言之,以上结果明确表明,TGB23-6构建体在CAR-T细胞中将TGF β 介导的抑制信号转化为IL23介导的促增殖信号,其在TGF β 存在下赋予CAR-T细胞更强的杀伤靶细胞(例如,肿瘤细胞)的效力。

[0427] 实施例4.在用TGF β 1处理后表达TGB23-6的CAR-T细胞的细胞活力

[0428] 转导后7天,将350万个CAR阳性细胞在含有RPMI 1640培养基、10% FBS和20ng/mL TGF β 1的6孔板中培养。每两天通过细胞计数器和FACS检测细胞活力和CAR阳性细胞。

[0429] 如图7A和图7B所示,与huLAb19309bT CAR-T组相比,UnT组和huLIC19309b CAR-T组的细胞活力和CAR阳性细胞的数量明显下降。UnT、huLIC19309b CAR-T细胞和huLIC19309bT CAR-T细胞的细胞活力在第13天分别为23.6%、36.4%和48.2%(图7A)。huLIC19309b CAR-T组的CAR阳性细胞数量呈下降趋势,而huLIC19309bT CAR-T组的细胞数量保持(图7B)。这些结果表明,仅在TGF β 1存在的情况下,与表达抗GPC3 CAR的huLIC19309b CAR-T细胞相比,表达抗GPC3 CAR和TGB23-6结构的huLIC19309bT CAR-T细胞可更好存活。

[0430] 实施例5.表达TGB-23的CAR-T细胞的再激发模型

[0431] 1.再激发模型准备

[0432] 为评估CAR-T细胞在体外的持久性和耗竭,建立了CAR-T细胞重复激发模型(“再激发模型”)。将CAR-T细胞不断通过GPC3阳性肿瘤细胞刺激数轮以获得CAR-T细胞的耗竭表型。再激发测定中存在两组处理:huLIC19309b CAR-T组(初始CAR-T细胞为huLIC19309b CAR-T细胞)和huLIC19309bT CAR-T组(初始CAR-T细胞为huLIC19309bT CAR-T细胞)。作为第一轮(第1轮),在5ng/mL TGF β 1存在下将CAR-T细胞与表达GPC3的PLCPRF5细胞(ATCC#CRL-8024)以1:1的效应物:靶标(E/T)比率共培养过夜。通过FACS检测CD4+CAR+细胞和CD8+CAR+细胞的PD1的表达。在以300g离心10分钟并再培养两天后,将细胞重悬于新鲜培养基(RPMI 1640培养基、10% FBS、5ng/mL TGF β 1和300IU/mL IL2)中。分析细胞的活力、计数、CAR阳性比率和杀伤效力。然后将细胞重复用于与第1轮相同的处理,总共进行另外四轮。未经TGF β 1处理的CAR-T细胞用作对照。根据每轮靶细胞刺激后的CAR-T细胞数量,在每轮调整PLCPRF5细胞数量。

[0433] 2.再激发模型中的PD1表达

[0434] 通过FACS检测与PLCPRF5细胞共培养过夜后CAR-T细胞中的PD1表达。将从每轮刺激中收集的细胞用含有GPC3蛋白-His标签(Acrobiosystems#GP3-H52H4)的100 μ L DPBS重悬,并在4℃下孵育40分钟。然后用DPBS洗涤细胞并用含有FITC-抗His标签抗体(Genscript#A01620)、CD4抗体(Biolegend#357410)、CD8抗体(Biolegend#344710)和PD1抗体(Mitenyi#130-117-694)的100 μ L DPBS重悬,并在4℃孵育下30分钟。

[0435] huLIC19309b CAR-T组的CAR阳性亚群中表达的PD1的水平在5轮实验中从3.9%显著增加至73.7%、72.1%、61.1%和58.5%(CD4+CAR+ T细胞),并且从1.4%显著增加至

50.0%、35.4%、23.0%和20.4% (CD8+CAR+ T细胞) (图8)。相比之下, huLIC19309bT CAR-T组的CAR阳性亚群中的PD1表达在第5轮增加至27.5% (CD4+CAR+ T细胞) 和增加至10.7% (CD8+CAR+ T细胞) (图8A和8B)。在再激发模型中, huLIC19309bT CAR-T细胞的PD1表达低于 huLIC19309b CAR-T细胞, 表明与未用TGB23转导的CAR-T细胞相比, 较少TGB23 CAR-T细胞被耗竭。

[0436] 3. 再激发模式中CAR阳性T细胞的百分比

[0437] 在每轮刺激结束时通过FACS检测与PLCPRF5细胞共培养后的CAR阳性T细胞的百分比。结果在图9A和9B中示出。在5ng/mL TGFβ1存在下, 在再激发模型测定期间 huLIC19309b CAR-T组的CAR阳性T细胞的百分比从21.6%增加至36.8%。相比之下, huLIC19309bT CAR-T组的CAR阳性T细胞的百分比从25.9%增加至99.3%。在没有TGFβ1的情况下, CAR阳性T细胞的百分比在两组之间增加几乎相似, 具体来说, 分别从21.6%至90.7% (huLIC19309b CAR-T组) 和从25.9%至99.8% (huLIC19309bT CAR-T组)。这些结果表明, TGFβ阻碍了CAR-T对杀伤靶细胞的增殖效力, 而在CAR-T细胞中共表达TGB23-6构建体有助于CAR-T细胞克服TGFβ的抑制功能并促进在杀死靶细胞的同时扩增CAR-T。

[0438] 与PLCPRF5细胞共培养后的CAR-T细胞的计数在每轮结束时用台盼蓝染色通过T4细胞计数仪进行检测。将20μL细胞悬浮液与20μL台盼蓝混合, 移液至一次性计数室中, 并通过Cellometer T4进行分析。CAR-T细胞的扩增倍数根据T细胞总数和CAR阳性细胞的百分比计算。

[0439] 如图9C和图9D所示, huLIC19309b CAR-T细胞的扩增倍数在5ng/mL TGFβ1存在下从1倍增加至5.8倍, 并且在不存在TGFβ1的情况下从1倍增加至23倍。相反, huLIC19309bT CAR-T细胞的扩增倍数在5ng/mL TGFβ1存在下从1倍增加至1177倍, 并且在不存在TGFβ1的情况下从1倍增加至586倍。这些结果表明, TGB23-6在CAR-T细胞中的共表达不仅克服了TGFβ的抑制作用, 而且在TGFβ存在和抗原的连续刺激下进一步促进了CAR-T细胞的增殖。

[0440] 4. 再激发模型中的细胞毒性测定

[0441] 通过One-glo发光荧光素酶测定以1:1的总T细胞:靶细胞比率在CAR-T再激发测定中在每轮结束时评估CAR-T细胞的细胞毒性。GPC3阳性人肝细胞癌 (HCC) 细胞系Hep3B2.1-7.Luc (ATCC#HB-8064) 和PLCPRF5-Luc (ATCC#CRL-8024) 用作靶细胞。将靶细胞 (各自 2×10^3 个/孔) 接种在384孔板中, 然后与每轮结束时收集的细胞以指定的E/T比率孵育24小时。然后将One-glo发光荧光素酶测定试剂 (Promega#E6110) 添加至每个孔中, 并用酶标仪检测剩余的发光。由于荧光素酶仅在肿瘤细胞中表达, 因此剩余的发光与孔中活靶细胞的数量直接相关。分别通过添加UnT细胞和培养基获得最大和最小荧光素酶活性。特异性细胞毒性通过以下公式进行计算: 特异性细胞毒性% = $100\% \times (1 - (\text{RLU样品} - \text{RLUmin}) / (\text{RLUmax} - \text{RLUmin}))$ 。

[0442] 如图10A所示, 在再激发模型中在没有TGFβ1的情况下处理的 huLIC19309b CAR-T组在1:1比率下显示出对PLCPRF5-Luc的细胞毒性降低 (从 $88.1\% \pm 2.4\%$ 至 $60.4\% \pm 3.1\%$), 而在5ng/mL TGFβ1存在下, 细胞毒性效力进一步降低, 从 $56.6\% \pm 3.3\%$ 至 $41.5\% \pm 2.6\%$ 。相比之下, huLIC19309bT CAR-T组对PLCPRF5.Luc细胞的细胞毒性在实验过程中超过80%, 与TGFβ1无关。从第1轮至第5轮 huLIC19309bT CAR-T组对PLCPRF5.Luc细胞也表现出更高的细胞毒性 (在没有TGFβ1的情况下从 $92.8\% \pm 0.5\%$ 至 $94.0\% \pm 0.7\%$ 并且在有

TGFβ1的情况下从91.2%±2.1%至99.4%±1.2%)。使用另一种靶细胞(Hep3B2.1-7-Luc细胞,图10B)重复了类似的趋势。这些结果表明共表达TGB23-6构建体的CAR-T细胞(huLIC19309bT)不仅获得了针对TGFβ1介导的抑制性信号传导的抗性,而且针对刺激诱导的衰老具有更好的持久性。

[0443] 实施例6.表达TGB23-6的CAR-T细胞中的实时细胞分析(RTCA)测定

[0444] 通过RTCA测定测量与Hep3B2.1-7细胞共培养的CAR-T细胞中的实时细胞毒性效力。将Hep3B2.1-7细胞(4×10^3 个/孔)接种于96孔板中并通过RTCA分析仪过夜检测。然后将靶细胞与CAR-T或UnT细胞以1:20的E/T比率一起孵育,在此期间实时检测T细胞的细胞毒性效力。细胞指数表示靶细胞的活性、粘附和数量。

[0445] 如图11所示,与UnT细胞共培养的Hep3B2.1-7细胞的细胞指数随时间推移显著增加,并且在实验结束时细胞指数为13.8。随着时间延长,CAR-T细胞(huLIC19309b CAR-T细胞和huLIC19309bT CAR-T细胞)对Hep3B2.1-7细胞表现出不同程度的细胞毒性。与huLIC19309b CAR-T细胞和huLIC19309bT CAR-T细胞共培养的Hep3B2.1-7细胞在结束时的细胞指数分别为8.3和2.1。这些结果表明,与单独表达CAR相比,共表达TGB23-6构建体的huLIC19309bT CAR-T细胞更有效地抑制了Hep3B2.1-7细胞增殖,尤其是在后期共培养阶段期间。结果证明,用TGB23-6转导的CAR-T细胞针对靶细胞表现出持久的细胞毒性。

[0446] 实施例7.表达TGB-23的CAR-T细胞在体内的抗肿瘤作用

[0447] 在NCG小鼠异种移植物模型中评估了CAR-T细胞的体内抗肿瘤功效。对于皮下异种移植物模型,在6-7周龄的NCG小鼠的右下背部皮下接种Hep3B2.1-7细胞(3.7×10^6 个细胞/小鼠)。当平均肿瘤体积接近150mm³时(异种移植物接种后6天),将小鼠随机分为5组并通过尾静脉注射分别用huLIC19309b CAR-T细胞(0.3M或0.8M细胞/小鼠)、huLIC19309bT CAR-T细胞(0.3M或0.8M细胞/小鼠)和UnT细胞(0.8M细胞/小鼠)进行处理。每周两次用数字卡尺测量肿瘤大小。当肿瘤体积达到2000mm³以上时,提前处死小鼠。根据以下公式计算肿瘤体积:
$$\text{肿瘤体积} = \frac{(\text{长度}) \times (\text{宽度})^2}{2}$$
。分别在过继转移后第7天、第14天、第21天和第28天,还

通过FACS检测小鼠血液中T细胞的扩增。

[0448] 如图12A所示,每周两次测量这些小鼠的体重,并且在此实验期间无论是0.3M剂量还是0.8M剂量,除UnT组外,所有组中均未观察到小鼠体重减轻。由于沉重的肿瘤负荷,UnT组的体重在第34天下降了12.2%(第34天18.0g对比第0天20.5g)。

[0449] 如图12B所示,在30万(M)/小鼠的剂量下,与UnT组相比,huLAb19309b CAR-T组显示肿瘤大小的27%肿瘤减小(911.4mm³对比1248.5mm³),而施用huLAb19309bT CAR-T细胞的小鼠在第19天表现出约97%的肿瘤大小减小(29.0mm³对比1248.5mm³)。在第19天后,用huLIC19309bT CAR-T细胞处理的小鼠几乎没有肿瘤,这表明huLIC19309bT CAR-T细胞在较低剂量(0.3M/小鼠)下比huLIC19309b CAR-T细胞具有更好的治疗潜力。当剂量增加至0.8M/小鼠时,施用huLIC19309bT CAR-T细胞的小鼠对肿瘤生长表现出明显的抑制作用,在第15天与UnT相比生长抑制率为81.4%(156.6mm³对比843.8mm³),并且在huLIC19309b CAR-T细胞处理组中观察到类似的肿瘤消退(244.1mm³对比843.8mm³)。用huLIC19309bT CAR-T细胞和huLIC19309b CAR-T细胞处理的小鼠分别在第19天和第22天几乎没有肿瘤。

[0450] 在过继转移后第7天、第14天、第21天和第28天,还通过FACS检测小鼠血液中T细胞

的扩增。将小鼠血液以500g离心10分钟以分离血浆和血细胞,然后将血细胞与红细胞裂解缓冲液一起孵育10分钟。裂解后,用DPBS洗涤细胞并用CD3抗体(Biolegend#300316)染色。如图12C所示,huLIC19309bT CAR-T细胞组中小鼠的T细胞在第14天表现出显著扩增(57.4% CD3阳性细胞),并且随后在0.3M剂量下减少,而在用huLIC19309b CAR-T细胞(8.1% CD3阳性细胞)和UnT(5.1% CD3阳性细胞)处理的小鼠中在第14天无明显扩增。此外,huLIC19309b CAR-T细胞和huLIC19309bT CAR-T细胞在0.8M剂量下表现出相似的抗肿瘤效力,但在第14天huLIC19309bT CAR-T细胞表现出比huLIC19309b CAR-T细胞更好的扩增(85.5% CD3阳性细胞对比29.7% CD3阳性细胞)。

[0451] 实施例8.表达TGB23的LCAR-UL186S T细胞的产生

[0452] 1.LCAR-UL186S和TGB23-6表达载体的构建

[0453] 将购自Clontech的pLVX-Puro载体用ClaI和EcoRI限制性酶消化,并且将原始CMV启动子用人EF1 α 启动子(GenBank:J04617.1)替代,得到pLVX-hEF1 α 载体。将PCT专利申请第PCT/CN2020/112181和PCT/CN2020/112182号中公开的LCAR-UL186S基因(SIV Nef_M116-IRES-CD8 α SP-CD20 scFv(Leu16)-CD8 α 铰链-CD8 α TM-4-1BB-ITAM010,SEQ ID NO:90)克隆到pLVX-hEF1 α 中,以形成重组CD20 CAR(SEQ ID NO:89)表达质粒,命名为M1439。将TGB 23-6基因克隆到pLVX-hEF1 α 中以形成重组TGB23-6表达质粒,命名为M1647。将重组表达载体M1439和M1647分别与psPAX2和pMD2.G辅助质粒按一定比例混合,并且共转染到HEK 293T细胞中。转染后60小时,收集含有病毒载体的细胞培养上清液,并在4℃和3000g下离心5分钟。在将上清液通过0.45 μ m过滤器过滤后,采用500KD中空纤维膜柱切向流技术来进一步浓缩以制备慢病毒浓缩物,将其储存在-80℃以供稍后使用。

[0454] 2.LCAR-UL186S T细胞和LCAR-UL186S+TGB23-6 T细胞的制备

[0455] 使用全T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotech)从购自TPCS公司的外周血单核细胞(PBMC)中纯化T淋巴细胞。将纯化的T细胞通过CD3/CD28磁珠激活,然后再37℃、5% CO₂孵育箱中培养24小时。随后,用上述病毒载体转导T细胞以产生LCAR-UL186S T细胞(用M1439载体转导)或LCAR-UL186S+TGB23-6 T细胞(用M1439和M1647载体转导)。扩增数天后,使用TCR $\alpha\beta$ 分选试剂盒(TCR α/β -生物素,CliniMACS,6190221004;抗生物素试剂,CliniMACS,6190312010)富集TCR $\alpha\beta$ 阴性LCAR-UL186S T细胞和LCAR-UL186S+TGB23-6 T细胞。从最终产物中各自吸出5 $\times$ 10⁵个细胞悬浮液,在室温下离心以弃去上清液,然后重悬于DPBS中。将1 μ L抗人CD5-PE-CY7(Biolegend,目录号364008)、1 μ L Alex Fluor 488抗CAR(LUCAR)-20S(由Genscript生产的针对CD20 CAR的抗体,订单号LGBUADAb-1)、1 μ L APC抗人TCR α/β 抗体(Biolegend,目录号:B259839)和1 μ L PE抗人TGF- β RII抗体(Miltenyi Biotech,目录号:130115024)添加至细胞中,并在4℃下孵育30分钟。将细胞用1mL DPBS重悬2次,在室温下离心以弃去上清液,且最后将细胞重悬于DPBS中用于进行流式细胞术来检测CD20 CAR、TCR $\alpha\beta$ 、TGB23-6的阳性率。

[0456] 如图13A-13C所示,在分选和富集后LCAR-UL186S T细胞和LCAR-UL186S+TGB23-6 T细胞的TCR $\alpha\beta$ 阴性率分别为96.81%和97.37%。LCAR-UL186S T细胞的TCR $\alpha\beta$ 阴性比率和CD20 CAR阳性比率均为97.61%,并且LCAR-UL186S+TGB23-6 T细胞的TCR $\alpha\beta$ 阴性比率和CD20 CAR阳性比率均为98.25%。LCAR-UL186S T细胞的TCR $\alpha\beta$ 阴性比率和TGB23-6阳性比率均为1.54%,并且LCAR-UL186S+TGB23-6 T细胞的TCR $\alpha\beta$ 阴性比率和TGB23-6阳性比率均为

72.29%，指示TGB23-6的成功表达。未转导的T细胞(UnT)用作阴性对照。

[0457] 实施例9.表达TGB23的LCAR-UL186S T细胞的特异性杀伤活性

[0458] 为了进一步研究LCAR-UL186S T细胞和LCAR-UL186S+TGB23-6T细胞对CD20阳性细胞(淋巴瘤细胞Raji)的特异性杀伤能力。在Corning 384孔板中将LCAR-UL186S T细胞和LCAR-UL186S+TGB 23-6T细胞分别与Raji细胞以20:1、10:1或5:1的效应物-靶标比率混合，并且孵育12小时至18小时。每孔添加25 μ L One-Glo试剂(T AKARA, 目录号B6120)，然后通过酶标仪(TECAN, spark 10M)检测荧光素酶的荧光值。通过以下公式计算各组中T淋巴细胞针对靶细胞的细胞毒性作用：杀伤效率=1-[(检测样品值-最小值)/最大值]。

[0459] 如图14所示，在20:1、10:1和5:1的效应物-靶标比率下，与UnT细胞相比，LCAR-UL186S T细胞和LCAR-UL186S+TGB23-6 T细胞能够有效杀伤靶细胞Raji ($P<0.05$)。LCAR-UL186S T组与LCAR-UL186S+TGB23-6 T组之间的细胞毒性无显著差异 ($P>0.05$)，表明在体外TGB23-6不影响LCAR-UL186S对靶细胞的特异性。

[0460] 实施例10.多轮靶细胞刺激后表达TGB23的LCAR-UL186S T细胞的增殖

[0461] 如上所述，产生了LCAR-UL186S T细胞和LCAR-UL186S+TGB23-6 T细胞。将Raji的细胞密度调整为 1×10^6 个细胞/mL。在37℃下将Raji细胞用20 μ g/mL丝裂霉素处理3小时，用10mL DPBS洗涤3次，并且重悬于培养基中。将经处理的Raji细胞与LCAR-UL 186S T细胞或LCAR-UL186S+TGB23-6 T细胞以1:1的比率混合并共培养。将LCAR-UL186S T细胞和LCAR-UL186S+TGB23-6 T细胞在第一次刺激后第4天和第7天用Raji以1:1的E/T比率反复刺激。在第0天、第4天、第7天和第11天收获细胞。用K2自动细胞计数仪计数对细胞数量进行计数，并且通过流式细胞术检测CD5的表达。通过将总细胞数量乘以CD5的阳性率来计算T淋巴细胞计数，并且绘制基于第0天的CD5+细胞数量的倍数变化的增殖曲线。

[0462] 如图15所示，在体外刺激Raji细胞三轮后，LCAR-UL186S T细胞扩增约12倍，而LCAR-UL186S+TGB23-6 T细胞扩增约56倍。与LCAR-UL186S T细胞相比，LCAR-UL186S+TGB23-6 T细胞扩增4倍以上 ($P<0.05$)，表明TGB23-6能够在体外显著提高LCAR-UL186S T细胞的增殖能力。

序列表

SEQ ID NO: 1. TGF β R1 的信号肽

MEAAVAAPRPRLLLVLAAAAAAAAAALLPGATA

SEQ ID NO: 2. TGF β R2 的信号肽

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIAS

[0463]

SEQ ID NO: 3. TGF β R1 的细胞外结构域

LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEID
LIPRDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLG
PVEL

SEQ ID NO: 4. TGF β R2 的细胞外结构域

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQ

KSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYH
DFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTS
NPDLLLVIQ

SEQ ID NO: 5. TGFβR1 的跨膜结构域

AAVIAGPVCFCISLMLMVYI

SEQ ID NO: 6. TGFβR2 的跨膜结构域

VTGISLLPPLGVAISVIIIIFY

SEQ ID NO: 7. IL-23R 的跨膜结构域

LLGMIVFAVMLSILSLIGIF

SEQ ID NO: 8. IL-12Rβ1 的跨膜结构域

[0464]

WLIFFASLGSFLSILLVGVLGYLGL

SEQ ID NO: 9. 靠近膜的 TGFβR1 细胞内结构域的序列

CHNRTV

SEQ ID NO: 10. 靠近膜的 TGFβR2 细胞内结构域的序列

CYRVNRQ

SEQ ID NO: 11. 靠近膜的 IL-23R 细胞外结构域的序列

VPQVTSKAFQHDTWNSGLTVASISTGHLTSDNRGDIG

SEQ ID NO: 12. 靠近膜的 IL-12Rβ1 细胞外结构域的序列

VSD

SEQ ID NO: 13. TGF β R1 的细胞内结构域

CHNRTVIHHRVPNEEDPSLDRPFISEGTTLKDLIYDMTTSGSG
SGLPLLQRTIARTIVLQESIGKGRFGEVWRGKWRGEEVAVKIFSS
REERSWFREAIEYQTVMLRHENILGFIAADNKDNGTWTQLWLVS
DYHEHGSLFDYLNRYTVTVEGMIKLALSTASGLAHLHMEIVGTQ
GKPAIAHRDLKSKNILVKKNGTCCCIADLGLAVRHDSATDTIDIAPN
HRVGTKRYMAPEVLDD SINMKHFESFKRADIYAMGLVFWEIARR
CSIGGIHEDYQLPYYDLVPSDPSVEEMRKVVCEQKLRPNIPNRWQ
SCEALRVMAKIMRECWYANGAARLTALRIKKTLSQLSQQEGIKM

SEQ ID NO: 14. TGF β R2 的细胞内结构域

[0465] CYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLMFSEHCAIILED RSDISST
CANNINHNTPELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAV
KIFPYEEYASWKTEKDIFSDINLKHENILQFLTAEERKTEL GKQYW
LITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARGIAHLHSDHTPC
GRPKMPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLA
NSGQVGTARYMAPEVLES RMNLENVESFKQTDVYSMALVLWEM
TSRCNAVGEVKDYEPFGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPS
FWLNHQGIQMCETLTECWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHL DRL
SGRSCSEEKIPEDGSLN TTK

SEQ ID NO: 15. IL-23R 的细胞内结构域

NRSFRTGIKRRILLIPKWLYEDIPNMKNSNVVKMLQENSEL
MNNNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYP
QNSLFDNTTVVYIPDLNTGYKPKQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTKP
PVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELSLILNQGEC
SSPDIQNSVEEETTMLLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSCLGIVNEELP
SINTYFPQNILESHFN RISLLEK

SEQ ID NO: 16. IL-12R β 1 的细胞内结构域

NRAARHLCPPPLTPCASSAIEFPGGKETWQWINPVDFQEEASL
QEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGAPELALDTELSLEDGDRC
KAKM

SEQ ID NO: 17. IL-23R 细胞内结构域的突变体

NRSFRTGIKRRILLIPKWLFEIPNMKNSNVVKMLQENSELM
NNNSSEQVLFVDPMITEIKEIFIPEHKPTDFKKENTGPLETRDFPQN
SLFDNTTVVFIPDLNTGFKPQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVD
SLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELSLILNQGECSSP
DIQNSVEEETTMLLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSCLGIVNEELPSIN
TFFPQNILESHFNRLLEK

SEQ ID NO: 18. 截短的 IL-23R 细胞内结构域

[0466]

NRSFRTGIKRR

SEQ ID NO: 19. 截短的 IL-12R β 1 细胞内结构域

NRAAR

SEQ ID NO: 20. TGB23-1 氨基酸

MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCT
KDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVCAP
SSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELAAVIAGPV
CFVCISLMLMVYICHNRTVNRSFRTGIKRRILLIPKWLYEDIPNMK
NSNVVKMLQENSELMNNNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDY
KKENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDLNTGYKPQISNFLPEGS
HLSNNNEITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSN
TIFLGELSLILNQGECSSPDIQNSVEEETTMLLENDSPSETIPEQTLL

PDEFVSCLGIVNEELPSINTYFPQNILESHFNRLSLEKATNFSLLKQ
AGDVEENPGPMGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNND
MIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQ
EVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEK
KKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLIVIFQVTGISLLP
PLGVAISVIIIIFYCYRVNRQNRARHLCPPPLTPCASSAIEFPGGKET
WQWINPVDFQEEASLQEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGAP
ELALDTELSLEDGDRCKAKM

SEQ ID NO: 21. TGB23-2 氨基酸

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNN
GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVAV
WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGET
FFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLIVIFQVTGISLLPPLGVAIS
[0467] VIIIIFYCYRVNRQNRSFRTGIKRRILLIPKWLYEDIPNMKNSNVVK
MLQENSELMNNNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTG
PLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDLNTGYKPQISNFLPEGSHLSNNN
EITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELS
LILNQGECSPIQNSVEEETTMLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSC
LGIVNEELPSINTYFPQNILESHFNRLSLEKATNFSLLKQAGDVEEN
PGPMEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCT
KDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCA
SSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELAAVIAGPV
CFVCISLMLMVYICHNRTVNRAARHLCPPPLTPCASSAIEFPGGKE
TWQWINPVDFQEEASLQEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGA
PELALDTELSLEDGDRCKAKM

SEQ ID NO: 22. TGB23-3 氨基酸

MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCT

KDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVCAP
SSKTGSVTTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELAAVIAGPV
CFVCISLMLMVYICHNRVTNRAARHLCPPPLTPCASSAIEFPGGKE
TWQWINPVDFQEEASLQEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGA
PELALDTELSLEDGDRCKAKMATNFSLLKQAGDVEENPGPMGRG
LLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQ
LCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDEN
ITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSS
DECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQVGTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCYR
VNRQNRSFRTGIKRRILLIPKWLYEDIPNMKNSNVVKMLQENSEL
MNNNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYP
QNSLFDNTTVVYIPDLNTGYKPQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKP
PVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELSLILNQGEC
SSPDIQNSVEEETTMLLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSCLGIVNEELP
SINTYFPQNILESHFNRLSLEK

[0468]

SEQ ID NO: 23. TGB23-4 氨基酸

MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCT
KDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVCAP
SSKTGSVTTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELVPQVTSKA
FQHDTWNSGLTVASISTGHILTSDNRGDIGLLLGMIVFAVMLSILSLI
GIFNRSFRTGIKRRILLIPKWLYEDIPNMKNSNVVKMLQENSELM
NNNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYPQ
NSLFDNTTVVYIPDLNTGYKPQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPP
VDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELSLILNQGECS
SPDIQNSVEEETTMLLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSCLGIVNEELPS
INTYFPQNILESHFNRLSLEKATNFSLLKQAGDVEENPGPMGRGL
LRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQL
CKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENI
TLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSD

ECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLIVIFQVSDWLIFASLGSFLSILLVGV
LGYLGLNRAARHLCPPPTPCASSAIEFPGGKETWQWINPVDFQEE
ASLQEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGAPELALDTELSLEDG
DRCKAKM

SEQ ID NO: 24. TGB23-5 氨基酸

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNN
GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAV
WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGET
FFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLIVIFQVPQVTSKAFQHDT
WNSGLTVASISTGHLTSDNRGDIGLLLGMIVFAVMLSILSLIGIFNRS
FRTGIKRRILLIPKWLYEDIPNMKNSNVVKMLQENSELMNNNSSE
QVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYPQNSLFDNT
TVVYIPDLNTGYKPQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDSG
[0469] NNPRQLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELSLILNQGECSSPDIQNS
VEEETTMLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSCLGIVNEELPSINTYFPQ
NILESHFNRLSLEKATNFSLLKQAGDVEENPGPMEAABAAPRPL
LLLVLAIAAAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVS
VTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVCAAPSSKTGSVTTTYCCNQ
DHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELVSDWLIFASLGSFLSILLVGVLG
YLGLNRAARHLCPPPTPCASSAIEFPGGKETWQWINPVDFQEEA
SLQEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGAPELALDTELSLEDGD
RCKAKM

SEQ ID NO: 25. TGB23-6 氨基酸

MEAABAAPRPRLLLLLVLAIAAAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCT
KDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVCA
SSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELVSDWLIF
ASLGSFLSILLVGVLGYLGLNRAARHLCPPPTPCASSAIEFPGGKE

TWQWINPVDFQEEASLQEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGA
PELALDTELSLEDGDRCKAKMATNFSLLKQAGDVEENPGPMGRG
LLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQ
LCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDEN
ITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSS
DECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQVVPQVTSKAFQHDTWNSGLTV
ASISTGHLTSDNRGDIGLLLGMIVFAVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKR
RILLIPKWLYEDIPNMKNSNVVKMLQENSELMNNNSSEQVLYVD
PMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVVYIP
DLNTGYKPQISNFLPEGSHLSNNNEITSITLKPPVDSLDSGNNPRL
QKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELSLILNQGECCSPDIQNSVEEETT
MLLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSCLGIVNEELPSINTYFPQNILESH
FNRISLLEK

SEQ ID NO: 26. TGB23-14 氨基酸

[0470]

MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAAAALLPGATALQCFCCHLCT
KDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVCAP
SSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELVPQVTSKA
FQHDTWNSGLTVASISTGHLTSDNRGDIGLLLGMIVFAVMLSILSLI
GIFNRSFRTGIKRRILLIPKWLFEIPNMKNSNVVKMLQENSELM
NNNSSEQVLFVDPMITEIKEIFIPEHKPTDFKKENTGPLETRDFPQN
SLFDNTTVVFIPDLNTGFKPQISNFLPEGSHLSNNNEITSITLKPPVD
SLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELSLILNQGECCSP
DIQNSVEEETTMLLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSCLGIVNEELPSIN
TFFPQNILESHFNRISLLEKATNFSLLKQAGDVEENPGPMGRGLLR
GLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCK
FCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITL
TVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDEC
NDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQVSDWLIFASLGSFLSILLVGVLYG
LGLNRAARHLCPPPTPCASSAIEFPGGKETWQWINPVDFQEEASL

QEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGAPELALDTELSLEDGDRC
KAKM

SEQ ID NO: 27. TGB23-15 氨基酸

MEAAVAAPRPRLLLVLAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCT
KDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVCAP
SSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELVPQVTSKA
FQHDTWNSGLTVASISTGHLTSDNRGDIGLLLGMIVFAVMLSILSLI
GIFNRSFRTGIKRRATNFSLLKQAGDVEENPGPMGRGLLRGLWPL
HIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVR
FSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHD
PKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFS
EEYNTSNPDLLLVIQVSDWLIFASLGSFLSILLVGVVLGYLGLNRA
AR

[0471]

SEQ ID NO: 28. TGB23-1 核酸

ATGGAAGCCGCCGTGGCCGCTCCCAGACCTCGACTGCTGC
TGCTGGTGCTGGCCGCTGCCGCCGCTGCCGCCGCTGCTCTGCTG
CCTGGCGCCACAGCCCTGCAGTGCTTCTGTACCTGTGCACCA
AGGACAACCTTTACATGCGTGACCGATGGCCTGTGCTTCGTGTCC
GTGACAGAGACAACAGACAAGGTGATCCACAATTCTATGTGCA
TCGCCGAGATCGACCTGATCCCAAGGGATCGCCCCTTCGTGTGC
GCACCAAGCTCCAAGACCGGAAGCGTGACCACAACCTACTGCT
GTAACCAGGATCACTGCAATAAGATCGAGCTGCCAACAACCGT
GAAGTCTAGCCCTGGCCTGGGACCAGTGGAGCTGGCAGCCGTG
ATCGCCGGCCCCGTGTGCTTCGTGTGCATCAGCCTGATGCTGAT
GGTGTACATCTGTCAACAACAGGACAGTGAATCGGTCCTTCAGA
ACCGGCATCAAGCGGAGAATCCTGCTGCTGATCCCAAAGTGGC
TGTATGAGGACATCCCCAACATGAAGAACTCTAATGTGGTGAAG

[0472]

ATGCTGCAGGAGAATAGCGAGCTGATGAACAATAACTCCTCTGA
GCAGGTGCTGTATGTGGACCCAATGATCACAGAGATCAAGGAG
ATCTTTATCCCCGAGCACAAGCCTACCGATTACAAGAAGGAGAA
CACAGGCCCCCTGGAGACACGGGACTATCCCCAGAACAGCCTG
TTTGATAATAACAACCGTGGTGTACATCCCCGATCTGAACACCGG
CTATAAGCCTCAGATCTCCAATTTCTGCCAGAGGGCAGCCACC
TGTCCAATAACAATGAGATCACATCTCTGACCCTGAAGCCCCCT
GTGGACTCTCTGGATAGCGGCAACAATCCCAGACTGCAGAAGC
ACCCTAATTTTCGCCTTTTCCGTGAGCTCCGTGAACTCTCTGAGC
AATACCATCTTCCTGGGCGAGCTGTCTCTGATCCTGAACCAGGG
CGAGTGCTCTAGCCCTGACATCCAGAATAGCGTGGAGGAGGAG
ACAACCATGCTGCTGGAGAACGACTCCCCTTCTGAGACAATCC
CAGAGCAGACCCTGCTGCCAGATGAGTTCGTGAGCTGTCTGGG
CATCGTGAATGAGGAGCTGCCCAGCATCAACACATACTTTCTC
AGAATATCCTGGAGTCTCACTTCAACAGGATCAGCCTGCTGGAG
AAGGCCACCAATTTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCAGGAGATGTGG
AGGAGAACCCAGGACCAATGGGAAGGGGCCTGCTGAGGGGCC
TGTGGCCTCTGCACATCGTGCTGTGGACACGCATCGCCAGCACC
ATCCCACCCACGTGCAGAAGTCCGTGAACAATGACATGATCGT
GACCGATAACAATGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTGTGCAAG
TTCTGTGACGTGCGGTTTTCCACATGCGATAACCAGAAGTCCTG
CATGTCTAATTGTAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCTCAGG
AGGTGTGCGTGGCCGTGTGGAGAAAGAACGACGAGAATATCAC
CCTGGAGACAGTGTGCCACGATCCCAAGCTGCCTTACCACGAC
TTCATCCTGGAGGATGCCGCCAGCCCTAAGTGTATCATGAAGGA
GAAGAAGAAGCCAGGCGAGACATTCTTCATGTGCTCCTGTTCC
TCTGACGAGTGCAACGATAATATCATCTTTTCCGAGGAGTATAAC
ACATCTAATCCTGACCTGCTGCTGGTGTCTTCCAGGTGACCGG
AATCTCCCTGCTGCCTCCACTGGGAGTGGCCATCTCTGTGATCA
TCATCTTCTACTGTTATAGGGTGAACCGCCAGAATAGGGCAGCA

AGACACCTGTGCCCACCTCTGCCTACACCATGTGCAAGCTCCGC
CATCGAGTTTCCAGGAGGAAAGGAGACATGGCAGTGGATCAAC
CCTGTGGACTTCCAGGAGGAGGCCAGCCTGCAGGAGGCCCTGG
TGGTGGAGATGTCCTGGGATAAGGGCGAGAGAACAGAGCCACT
GGAGAAGACCGAGCTGCCAGAGGGCGCCCCCGAACTGGCACT
GGATACTGAACTGAGCCTGGAGGACGGGGATAGATGTAAAGCA
AAAATG

SEQ ID NO: 29. TGB23-2 核酸

[0473] ATGGGAAGAGGACTGCTGAGAGGACTGTGGCCCCTGCATA
TCGTGCTGTGGACTCGCATCGCTAGTACAATCCCCCCCCCATGTG
CAGAAGTCCGTGAACAATGACATGATCGTGACCGATAACAATG
GCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTGTGCAAGTTCTGTGACGTGCG
GTTTTCTACATGCGATAACCAGAAGAGCTGCATGTCCAATTGTT
CTATCACCAGCATCTGCGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGC
CGTGTGGAGAAAGAACGACGAGAATATCACCTGGAGACAGTG
TGCCACGATCCCAAGCTGCCTTACCACGACTTCATCCTGGAGGA
TGCCGCCTCTCCTAAGTGTATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCA
GGCGAGACATTCTTCATGTGCAGCTGTAGCTCCGACGAGTGCA
ACGATAACATCATCTTTTCTGAGGAGTACAACACAAGCAATCCC
GACCTGCTGCTGGTGATCTTCCAGGTGACCGGAATCAGCCTGCT
GCCACCTCTGGGAGTGGCCATCTCCGTGATCATCATCTTTTACTG
TTATAGGGTGAACCGCCAGAATCGGAGCTTCAGAACCGGCATC
AAGCGGAGAATCCTGCTGCTGATCCCAAAGTGGCTGTACGAGG
ATATCCCCAACATGAAGAACTCTAATGTGGTGAAGATGCTGCAG
GAGAATAGCGAGCTGATGAACAATAACTCTAGCGAGCAGGTGC
TGTATGTGGACCCAATGATCACAGAGATCAAGGAGATCTTTATC
CCAGAGCACAAGCCCACCGATTACAAGAAGGAGAACACAGGC
CCCCTGGAGACACGGGACTATCCCCAGAACAGCCTGTTTGATAA
TACCACAGTGGTGTACATCCCCGACCTGAACACAGGCTATAAGC

[0474]

CTCAGATCAGCAATTTCTGCCAGAGGGCTCCCACCTGTCTAAT
AACAATGAGATCACATCCCTGACCCTGAAGCCACCCGTGGACA
GCCTGGATTCCGGCAACAATCCCAGGCTGCAGAAGCACCCCTAA
TTTCGCCTTTTCCGTGTCTCTGTGAACTCTCTGAGCAATACCAT
CTTCCTGGGCGAGCTGTCCCTGATCCTGAACCAGGGCGAGTGC
AGCTCCCCTGACATCCAGAACAGCGTGGAGGAGGAGACAACA
ATGCTGCTGGAGAACGACTCCCCTTCTGAGACAATCCCAGAGC
AGACCCTGCTGCCAGATGAGTTTGTGAGCTGTCTGGGCATCGTG
AATGAGGAGCTGCCCTCCATCAACACATACTTCCCTCAGAATAT
CCTGGAGTCCCCTTTAACCGGATCTCTCTGCTGGAGAAGGCC
ACCAATTTCTCCCTGCTGAAGCAGGCAGGAGATGTGGAGGAGA
ACCCAGGACCTATGGAGGCCGCCGTGGCCGCCCCAAGGCCCCG
CCTGCTGCTGCTGGTGCTGGCAGCCGCCGCAGCAGCAGCAGCC
GCCCTGCTGCCTGGCGCCACAGCCCTGCAGTGCTTCTGTACCT
GTGCACCAAGGACAACCTTTACATGCGTGACCGATGGCCTGTGC
TTCGTGTCTGTGACAGAGACAACAGACAAGGTGATCCACAATA
GCATGTGCATCGCCGAGATCGACCTGATCCCTCGGGATAGACCC
TTCGTGTGCGCCCCATCTAGCAAGACCGGCAGCGTGACCACAA
CCTACTGCTGTAACCAGGATCACTGCAATAAGATCGAGCTGCCA
ACAACCGTGAAGTCCTCTCCAGGCCTGGGACCTGTGGAGCTGG
CAGCAGTGATCGCCGGCCCCGTGTGCTTCGTGTGCATCTCCCTG
ATGCTGATGGTGTATATCTGTCACAACAGGACAGTGAATAGGGC
AGCAAGGCACCTGTGCCCTCCACTGCCTACCCCATGTGCAAGC
TCCGCCATCGAGTTTCCAGGAGGAAAGGAGACATGGCAGTGGA
TCAACCCTGTGGACTTCCAGGAGGAGGCCTCCCTGCAGGAGGC
CCTGGTGGTGGAGATGTCTTGGGATAAGGGCGAGCGCACAGAG
CCTCTGGAGAAGACCGAGCTGCCAGAGGGCGCCCCCGAACTG
GCACTGGATACTGAACTGTCCCTGGAAGACGGAGATAGATGTA
AAGCAAAAATG

SEQ ID NO: 30. TGB23-3 核酸

ATGGAAGCTGCTGTCGCCGCTCCCCGACCTAGACTGCTGCT
GCTGGTGCTGGCCGCCGCCGCTGCTGCCGCCGCCGCTCTGCTG
CCCGGCGCCACAGCCCTGCAGTGCTTCTGTACCTGTGCACCA
AGGACAACCTTTACATGCGTGACCGATGGCCTGTGCTTCGTGTCT
GTGACAGAGACAACAGACAAGGTGATCCACAATAGCATGTGCA
TCGCCGAGATCGACCTGATCCCAAGGGATCGCCCCTTCGTGTGC
GCACCAAGCTCCAAGACCGGAAGCGTGACCACAACCTACTGCT
GTAACCAGGATCACTGCAATAAGATCGAGCTGCCAACAACCGT
GAAGTCTAGCCCTGGCCTGGGACCAGTGGAGCTGGCAGCCGTG
ATCGCCGGCCCCGTGTGCTTCGTGTGCATCTCCCTGATGCTGAT
GGTGTATATCTGTCAACAACAGGACAGTGAATAGGGCAGCAAGA
CACCTGTGCCCACCTCTGCCAACCCCATGTGCATCCTCTGCCAT
CGAGTTTCCTGGCGGCAAGGAGACATGGCAGTGGATCAACCCA
[0475] GTGGACTTCCAGGAGGAGGCCAGCCTGCAGGAGGCCCTGGTG
GTGGAGATGTCCTGGGATAAGGGCGAGCGGACAGAGCCACTGG
AGAAGACCGAGCTGCCAGAGGGAGCACCTGAGCTGGCCCTGG
ACACAGAGCTGTCCCTGGAGGACGGCGATAGATGCAAGGCCAA
GATGGCCACCAACTTTTCTCTGCTGAAGCAGGCCGGCGATGTG
GAGGAGAATCCTGGCCCAATGGGAAGGGGCCTGCTGAGGGGC
CTGTGGCCCCTGCACATCGTGCTGTGGACAAGAATCGCCTCCAC
CATCCCACCCACGTGCAGAAGTCTGTGAACAATGACATGATCG
TGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAGTTCCCTCAGCTGTGCAA
GTTCTGTGACGTGAGGTTTAGCACATGCGATAACCAGAAGAGC
TGCATGTCCAATTGTTCTATCACCAGCATCTGCGAGAAGCCACA
GGAGGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGCAAGAACGACGAGAATATC
ACCCTGGAGACAGTGTGCCACGATCCCAAGCTGCCTTACCACG
ACTTTATCCTGGAGGATGCCGCCTCCCCAAAGTGTATCATGAAG
GAGAAGAAGAAGCCCGGCGAGACATTCTTCATGTGCTCTTGTA

[0476]

GCTCCGACGAGTGCAACGATAACATCATCTTTTCTGAGGAGTAC
AACACAAGCAATCCTGACCTGCTGCTGGTGATCTTCCAGGTGA
CCGGCATCTCTCTGCTGCCTCCACTGGGCGTGGCCATCAGCGTG
ATCATCATCTTTTACTGTTATAGGGTGAACCGCCAGAATCGGTCC
TTCAGAACCGGCATCAAGCGGAGAATCCTGCTGCTGATCCCCA
AGTGGCTGTACGAGGATATCCCTAACATGAAGAACTCCAATGTG
GTGAAGATGCTGCAGGAGAACAGCGAGCTGATGAACAATAACT
CTAGCGAGCAGGTGCTGTATGTGGACCCCATGATCACAGAGATC
AAGGAGATCTTCATCCCAGAGCACAAAGCCCACCGATTACAAGA
AGGAGAACACAGGCCCCCTGGAGACACGGGACTATCCCCAGA
ACAGCCTGTTTGATAATACAACCGTGGTGTACATCCCTGACCTG
AACACAGGCTATAAGCCTCAGATCTCTAATTTCTGCCAGAGGG
CTCCCACCTGTCTAATAACAATGAGATCACAAAGCCTGACCCTGA
AGCCCCCTGTGGACAGCCTGGATTCCGGCAACAATCCCAGACT
GCAGAAGCACCCCTAACTTCGCCTTTTCCGTGTCCTCTGTGAACT
CTCTGAGCAATACCATCTTTCTGGGCGAGCTGAGCCTGATCCTG
AACCAGGGCGAGTGCAGCTCCCCCGACATCCAGAACAGCGTGG
AGGAGGAGACAACCATGCTGCTGGAGAATGACTCCCCTTCTGA
GACAATCCCAGAGCAGACCCTGCTGCCCCGATGAGTTCGTGAGC
TGTCTGGGCATCGTGAACGAGGAGCTGCCTTCCATCAATACATA
CTTCCCACAGAACATCCTGGAGTCCCCTTCAACAGAATCTCAC
TGCTGGAAAAG

SEQ ID NO: 31. TGB23-4 核酸

ATGGAAGCTGCCGTCGCTGCTCCCCGCCCTCGCCTGCTGCT
GCTGGTCCTGGCTGCCGCCGCTGCTGCCGCTGCTGCCCTGCTGC
CCGGCGCCACAGCCCTGCAGTGCTTCTGTACCTGTGCACCAA
GGACAACCTTTACATGCGTGACCGATGGCCTGTGCTTCGTGTCTG
TGACAGAGACAACAGACAAGGTGATCCACAATAGCATGTGCAT
CGCCGAGATCGACCTGATCCCAAGGGATCGCCCCCTTCGTGTGCG

[0477]

CACCAAGCTCCAAGACCGGATCCGTGACCACAACCTACTGCTG
TAACCAGGACCACTGTAATAAGATCGAGCTGCCCACAACCGTG
AAGTCTAGCCCAGGCCTGGGACCAGTGGAGCTGGTGCCTCAGG
TGACCAGCAAGGCCTTTCAGCACGATACATGGAACCTCCGGCCT
GACCGTGGCCTCTATCAGCACAGGCCACCTGACCTCCGACAAT
CGGGGCGATATCGGCCTGCTGCTGGGCATGATCGTGTTTCGCCGT
GATGCTGTCTATCCTGAGCCTGATCGGCATCTTCAACCGGAGCT
TTAGAACCGGCATCAAGCGGAGAATCCTGCTGCTGATCCCCAA
GTGGCTGTACGAGGACATCCCTAACATGAAGAACTCTAATGTGG
TGAAGATGCTGCAGGAGAATAGCGAGCTGATGAACAATAACTC
CTCTGAGCAGGTGCTGTATGTGGACCCCATGATCACAGAGATCA
AGGAGATCTTTATCCCTGAGCACAAGCCAACCGATTACAAGAA
GGAGAACACAGGCCCCCTGGAGACACGGGACTATCCTCAGAAC
TCCCTGTTTGATAATAACAACCGTGGTGTACATCCCTGATCTGAAC
ACCGGCTATAAGCCACAGATCAGCAATTTCTGCCCCGAGGGCTC
CCACCTGTCTAATAACAATGAGATCACATCCCTGACCCTGAAGC
CCCCTGTGGACAGCCTGGATTCCGGCAACAATCCTCGCCTGCA
GAAGCACCCAAATTTTCGCCTTTAGCGTGAGCTCCGTGAACTCCC
TGTCTAATACCATCTTCCTGGGCGAGCTGTCCCTGATCCTGAAC
CAGGGCGAGTGCTCTAGCCCAGACATCCAGAACAGCGTGGAGG
AGGAGACAACCATGCTGCTGGAGAACGACAGCCCATCCGAGAC
AATCCCCGAGCAGACCCTGCTGCCCGATGAGTTTGTGAGCTGTC
TGGGCATCGTGAATGAGGAGCTGCCTTCCATCAACACATACTTT
CCACAGAATATCCTGGAGAGCCACTTCAACCGGATCTCCCTGCT
GGAGAAGGCCACCAATTTCTCCCTGCTGAAGCAGGCAGGAGAT
GTGGAGGAGAACCCAGGACCTATGGGAAGGGGCCTGCTGAGA
GGCCTGTGGCCCCCTGCACATCGTGCTGTGGACAAGAATCGCCT
CCACCATCCCACCCACGTGCAGAAGTCTGTGAACAATGACAT
GATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAGTTCCCTCAGCTGT
GCAAGTTCTGTGACGTGAGGTTTAGCACATGCGATAACCAGAA

[0478]

GTCTTGCAATGAGCAATTGTTCCATCACCTCTATCTGCGAGAAGC
CACAGGAGGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGCAAGAACGACGAGA
ATATCACCTGGAGACAGTGTGCCACGATCCTAAGCTGCCATAT
CACGACTTTATCCTGGAGGATGCCGCCTCTCCAAAGTGTATCAT
GAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGCGAGACATTCTTTATGTGCAGC
TGTTCTCTGACGAGTGCAACGATAATATCATCTTCTCTGAGGA
GTACAACACCAGCAATCCAGACCTGCTGCTGGTGATCTTTCAGG
TGAGCGATTGGCTGATCTTCTTTGCCAGCCTGGGCTCCTTCCTG
TCTATCCTGCTGGTGGGCGTGCTGGGATATCTGGGCCTGAACAG
GGCAGCAAGGCACCTGTGCCCTCCACTGCCAACACCCTGTGCC
AGCTCCGCCATCGAGTTTCCTGGCGGCAAGGAGACATGGCAGT
GGATCAATCCAGTGGACTTCCAGGAGGAGGCCTCCCTGCAGGA
GGCCCTGGTGGTGGAGATGTCTTGGGATAAGGGCGAGAGGACA
GAGCCTCTGGAGAAGACCGAGCTGCCCCGAGGGCGCCCCTGAA
CTGGCACTGGATACTGAACTGAGCCTGGAGGATGGAGATAGAT
GTAAAGCAAAGATG

SEQ ID NO: 32. TGB23-5 核酸

ATGGGCAGGGGGCTGCTGCGGGGGCTGTGGCCTCTGCATA
TTGTGCTGTGGACTCGGATTGCTTCAACTATTCCTCCTCATGTCC
AGAAGTCTGTGAACAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGG
CGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTGTGCAAGTTCTGTGACGTGAGG
TTAGCACATGCGATAACCAGAAGTCTTGCATGAGCAATTGTTC
CATCACCTCTATCTGCGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCC
GTGTGGCGCAAGAACGACGAGAATATCACCTGGAGACAGTGT
GCCACGATCCTAAGCTGCCATAACCACGACTTTATCCTGGAGGAT
GCCGCCAGCCCAAAGTGTATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCC
GGCGAGACATTCTTCATGTGCTCCTGTAGCTCCGACGAGTGCAA
CGATAATATCATCTTCAGCGAGGAGTATAACACATCCAATCCTGA
CCTGCTGCTGGTGATCTTTCAGGTGCCACAGGTGACCTCCAAG

[0479]

GCCTTCCAGCACGATACATGGA ACTCTGGCCTGACCGTGGCCTC
TATCAGCACAGGCCACCTGACCTCCGACAATCGGGGCGATATCG
GCCTGCTGCTGGGCATGATCGTGTTTGCCGTGATGCTGAGCATC
CTGTCCCTGATCGGCATCTTCAACAGGAGCTTTCGCACCGGCAT
CAAGCGGAGAATCCTGCTGCTGATCCCCAAGTGGCTGTACGAG
GACATCCCTAACATGAAGAACAGCAATGTGGTGAAGATGCTGC
AGGAGAACAGCGAGCTGATGAACAATAACTCTAGCGAGCAGGT
GCTGTATGTGGACCCAATGATCACAGAGATCAAGGAGATCTTCA
TCCCCGAGCACAAAGCCTACCGATTACAAGAAGGAGAACACAGG
CCCCCTGGAGACACGGGACTATCCTCAGAACTCCCTGTTTGATA
ATACCACAGTGGTGTACATCCCTGATCTGAACACAGGCTATAAG
CCACAGATCTCCAATTTCTGCCCCGAGGGCTCTCACCTGAGCAA
TAACAATGAGATCACATCTCTGACCCTGAAGCCCCCTGTGGACT
CCCTGGATTCTGGCAACAATCCTAGACTGCAGAAGCACCCAAA
TTTCGCCTTTAGCGTGTCCTCTGTGAACTCCCTGTCTAATACCAT
CTTCCTGGGCGAGCTGTCTCTGATCCTGAACCAGGGCGAGTGC
AGCTCCCCTGACATCCAGAATAGCGTGGAGGAGGAGACAACAA
TGCTGCTGGAGAACGACAGCCCATCCGAGACAATCCCCGAGCA
GACCCTGCTGCCAGATGAGTTCGTGAGCTGTCTGGGCATCGTG
AATGAGGAGCTGCCTTCTATCAACACATACTTCCCACAGAATAT
CCTGGAGTCTCACTTTAACAGGATCAGCCTGCTGGAGAAGGCC
ACCAATTTAGCCTGCTGAAGCAGGCAGGAGACGTGGAGGAG
AACCCTGGACCAATGGAGGCCGCCGTGGCCGCCCCCAGGCCTC
GCCTGCTGCTGCTGGTGCTGGCAGCCGCCGCAGCAGCAGCAGC
CGCCCTGCTGCCAGGAGCAACAGCCCTGCAGTGCTTCTGTAC
CTGTGCACCAAGGACAACCTTTACATGCGTGACCGATGGCCTGT
GCTTCGTGAGCGTGACAGAGACAACAGATAAGGTGATCCACAA
TTCCATGTGCATCGCCGAGATCGACCTGATCCCACGGGATAGAC
CCTTCGTGTGCGCCCCATCTAGCAAGACCGGCTCCGTGACCAC
AACCTACTGCTGTAACCAGGACCACTGTAATAAGATCGAGCTGC

CCACAACCGTGAAGTCCTCTCCTGGCCTGGGACCAGTGGAGCT
GGTGAGCGATTGGCTGATCTTCTTTGCCAGCCTGGGCTCCTTCC
TGTCTATCCTGCTGGTGGGCGTGCTGGGATATCTGGGCCTGAAC
AGGGCAGCAAGACACCTGTGCCCACCACTGCCAACACCATGTG
CAAGCTCCGCCATCGAGTTTCCAGGAGGAAAGGAGACATGGCA
GTGGATCAATCCTGTGGACTTCCAGGAGGAGGCCTCTCTGCAG
GAGGCCCTGGTGGTGGAGATGAGCTGGGATAAGGGCGAGCGC
ACAGAGCCCCTGGAGAAGACCGAGCTGCCCCGAGGGCGCCCCCT
GAACTGGCACTGGATACTGAACTGAGCCTGGAAGATGGCGATA
GGTGTAAGCAAAAATG

SEQ ID NO: 33. TGB23-6 核酸

[0480]

ATGGAAGCCGCTGTGGCCGCTCCCCGACCTCGACTGCTGC
TGCTGGTGCTGGCTGCCGCTGCTGCTGCCGCTGCCGCTCTGCTG
CCTGGCGCCACAGCCCTGCAGTGCTTCTGTACCTGTGCACCA
AGGACAACCTTTACATGCGTGACCGATGGCCTGTGCTTCGTGAGC
GTGACAGAGACAACAGACAAGGTGATCCACAATTCCATGTGCA
TCGCCGAGATCGACCTGATCCCAAGGGATCGCCCCCTTCGTGTGC
GCACCAAGCTCCAAGACCGGCTCCGTGACCACAACCTACTGCT
GTAACCAGGACCACTGTAATAAGATCGAGCTGCCCACAACCGT
GAAGTCTAGCCCAGGCCTGGGACCAGTGGAGCTGGTGAGCGAT
TGGCTGATCTTCTTTGCCTCTCTGGGCAGCTTCCTGTCCATCCTG
CTGGTGGGCGTGCTGGGATATCTGGGCCTGAACAGGGCAGCAA
GACACCTGTGCCCACCTCTGCCCACACCTTGTGCCTCCTCTGCC
ATCGAGTTTCCTGGCGGCAAGGAGACATGGCAGTGGATCAATC
CAGTGGACTTCCAGGAGGAGGCCTCCCTGCAGGAGGCCCTGGT
GGTGGAGATGTCTTGGGATAAGGGCGAGAGGACAGAGCCACTG
GAGAAGACCGAGCTGCCTGAGGGAGCACCAGAGCTGGCCCTG
GACACAGAGCTGTCTCTGGAGGACGGCGATCGCTGCAAGGCCA
AGATGGCCACCAACTTTAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGATGT

[0481]

GGAGGAGAATCCTGGACCAATGGGAAGGGGCCTGCTGAGAGG
CCTGTGGCCTCTGCACATCGTGCTGTGGACACGGATCGCCTCTA
CCATCCCACCCACGTGCAGAAGAGCGTGAACAATGACATGAT
CGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAGTTCCCTCAGCTGTGC
AAGTTCTGTGACGTGCGGTTTAGCACATGCGATAACCAGAAGTC
TTGCATGAGCAATTGTTCCATCACCTCTATCTGCGAGAAGCCAC
AGGAGGTGTGCGTGGCCGTGTGGAGAAAGAACGACGAGAATA
TCACCCTGGAGACAGTGTGCCACGATCCTAAGCTGCCATACCAC
GACTTTATCCTGGAGGATGCCGCCTCTCCCAAGTGTATCATGAA
GGAGAAGAAGAAGCCTGGCGAGACATTCTTCATGTGCAGCTGT
AGCTCCGACGAGTGTAACGATAATATCATCTTCAGCGAGGAGTA
TAACACATCCAATCCAGACCTGCTGCTGGTGATCTTTCAGGTGC
CCCAGGTGACCAGCAAGGCCTTCCAGCACGATACATGGAATC
CGGCCTGACCGTGGCCTCTATCAGCACAGGCCACCTGACCTCC
GACAATAGGGGCGATATCGGCCTGCTGCTGGGCATGATCGTGTT
TGCCGTGATGCTGAGCATCCTGTCCCTGATCGGCATCTTCAACA
GGAGCTTTCGCACCGGCATCAAGCGGAGAATCCTGCTGCTGAT
CCCTAAGTGGCTGTACGAGGACATCCCAAACATGAAGAACTCT
AATGTGGTGAAGATGCTGCAGGAGAATAGCGAGCTGATGAACA
ATAACTCTAGCGAGCAGGTGCTGTATGTGGACCCCATGATCACA
GAGATCAAGGAGATCTTCATCCCCGAGCACAAGCCTACCGATTA
CAAGAAGGAGAACACAGGCCCCCTGGAGACACGGGACTATCC
TCAGAACTCCCTGTTTGATAATAACAACCGTGGTGTACATCCCTG
ATCTGAACACCGGCTATAAGCCACAGATCAGCAATTTCCCTGCCC
GAGGGCTCTCACCTGAGCAATAACAATGAGATCACATCCCTGAC
CCTGAAGCCTCCAGTGGACTCCCTGGATTCTGGCAACAATCCTC
GCCTGCAGAAGCACCCAACTTCGCCTTTAGCGTGTCTCTGTG
AACTCCCTGTCTAATACCATCTTTCTGGGCGAGCTGTCCCTGATC
CTGAACCAGGGCGAGTGCAGCTCCCCCGACATCCAGAACAGCG
TGGAGGAGGAGACAACCATGCTGCTGGAGAATGACAGCCCATC

CGAGACAATCCCCGAGCAGACCCTGCTGCCCCGATGAGTTCGTG
TCCTGTCTGGGCATCGTGAACGAGGAGCTGCCTTCTATCAATAC
ATACTTCCCTCAGAACATCCTGGAGAGCCACTTCAATAGAATTA
GCCTGCTGGAGAAA

SEQ ID NO: 34. TGB23-14 核酸

[0482] ATGGAAGCTGCCGTGGCTGCTCCAAGACCTAGACTGCTGC
TGCTGGTGCTGGCCGCCGCCGCCGCCGCTGCCGCTGCCCTGCT
GCCCCGGCGCCACAGCCCTGCAGTGCTTCTGTACCTGTGCACC
AAGGACAACCTTTACATGCGTGACCGATGGCCTGTGCTTCGTGTC
TGTGACAGAGACAACAGACAAGGTGATCCACAATAGCATGTGC
ATCGCCGAGATCGACCTGATCCCAAGGGATCGCCCCTTCGTGTG
CGCACCAAGCTCCAAGACCGGCTCCGTGACCACAACCTACTGC
TGTAACCAGGACCACTGTAATAAGATCGAGCTGCCCACAACCG
TGAAGTCTAGCCCAGGCCTGGGACCAGTGGAGCTGGTGCCTCA
GGTGACCAGCAAGGCCTTTTCAGCACGATACATGGAACCTCCGGC
CTGACCGTGGCCTCTATCAGCACAGGCCACCTGACCTCCGACA
ATCGGGGCGATATCGGCCTGCTGCTGGGCATGATCGTGTTCCGCC
GTGATGCTGTCTATCCTGAGCCTGATCGGCATCTTCAACCGGAG
CTTTAGAACCGGCATCAAGCGGAGAATCCTGCTGCTGATCCCCA
AGTGGCTGTTTGAGGACATCCCTAACATGAAGAACTCTAATGTG
GTGAAGATGCTGCAGGAGAATAGCGAGCTGATGAACAATAACT
CCTCTGAGCAGGTGCTGTTTCGTGGACCCCATGATCACAGAGATC
AAGGAGATCTTTATCCCTGAGCACAAGCCAACCGATTTCAGA
AGGAGAACACAGGCCCCCTGGAGACACGGGACTTCCCTCAGA
ACTCCCTGTTTGATAATAACAACCGTGGTGTTCATCCCTGATCTGA
ACACCGGCTTCAAGCCACAGATCAGCAATTTTCTGCCCGAGGG
CTCCACCTGTCTAATAACAATGAGATCACATCCCTGACCCTGA
AGCCCCCTGTGGACAGCCTGGATTCCGGCAACAATCCTCGCCT
GCAGAAGCACCCAAATTTTCGCCTTTAGCGTGAGCTCCGTGAAC

[0483]

TCCCTGTCTAATACCATCTTTCTGGGCGAGCTGTCCCTGATCCTG
AACCAGGGGCGAGTGCTCTAGCCCAGACATCCAGAACAGCGTGG
AGGAGGAGACAACCATGCTGCTGGAGAACGACAGCCCATCCG
AGACAATCCCCGAGCAGACCCTGCTGCCCCGATGAGTTCGTGAG
CTGTCTGGGCATCGTGAATGAGGAGCTGCCTTCCATCAACACAT
TCTTTCCACAGAATATCCTGGAGAGCCACTTTAACCGGATCTCC
CTGCTGGAGAAGGCCACCAATTTCTCCCTGCTGAAGCAGGCAG
GAGATGTGGAGGAGAACCCAGGACCTATGGGAAGGGGCCTGCT
GAGAGGCCTGTGGCCCCCTGCACATCGTGCTGTGGACAAGAATC
GCCTCCACCATCCCACCCCACGTGCAGAAGTCTGTGAACAATG
ACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAGTTCCTCAG
CTGTGCAAGTTCTGTGACGTGAGGTTTAGCACATGCGATAACCA
GAAGTCTTGCATGAGCAATTGTTCCATCACCTCTATCTGCGAGA
AGCCACAGGAGGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGCAAGAACGACG
AGAATATCACCCTGGAGACAGTGTGCCACGATCCTAAGCTGCCA
TATCACGACTTTATCCTGGAGGATGCCGCCTCTCCAAAGTGTATC
ATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGCGAGACATTCTTTATGTGCA
GCTGTTCTCTGACGAGTGCAACGATAATATCATCTTCTCTGAG
GAGTACAACACCAGCAATCCAGACCTGCTGCTGGTGATCTTTCA
GGTGAGCGATTGGCTGATCTTCTTTGCCAGCCTGGGCTCCTTCC
TGTCTATCCTGCTGGTGGGCGTGCTGGGATATCTGGGCCTGAAC
AGGGCAGCAAGGCACCTGTGCCCTCCACTGCCAACACCCTGTG
CCAGCTCCGCCATCGAGTTTCTGCGGCAAGGAGACATGGCA
GTGGATCAATCCAGTGGACTTCCAGGAGGAGGCCTCCCTGCAG
GAGGCCCTGGTGGTGGAGATGTCTTGGGATAAGGGCGAGAGGA
CAGAGCCTCTGGAGAAGACCGAGCTGCCCCGAGGGCGCCCCCTG
AGCTGGCACTGGACACCGAACTGAGTCTGGAGGATGGCGACCG
CTGTAAGGCTAAAATG

SEQ ID NO: 35. TGB23-15 核酸

[0484]

ATGGAAGCCGCCGTCGCCGCTCCCCGCCCAAGACTGCTGC
TGCTGGTCCTGGCCGCTGCCGCTGCTGCCGCCGCCGCACTGCT
GCCCCGGCGCCACAGCCCTGCAGTGCTTCTGTACCTGTGCACC
AAGGACAACCTTCACCTGCGTGACCGATGGCCTGTGCTTCGTGT
CCGTGACAGAGACAACAGACAAGGTGATCCACAACCTCTATGTG
CATCGCCGAGATCGACCTGATCCCAAGGGATCGCCCCTTCGTGT
GCGCACCTAGCTCCAAGACCGGCTCCGTGACCACAACCTACTG
CTGTAACCAGGACCACTGTAATAAGATCGAGCTGCCCACAACC
GTGAAGTCTAGCCCAGGCCTGGGACCAGTGGAGCTGGTGCCTC
AGGTGACCTCTAAGGCCTTCCAGCACGATACATGGAATAGCGGC
CTGACCGTGGCCAGCATCTCCACAGGCCACCTGACCTCTGACA
ACAGGGGGCGATATCGGCCTGCTGCTGGGCATGATCGTGTTTGCC
GTGATGCTGTCTATCCTGAGCCTGATCGGCATCTTCAACCGGAG
CTTTAGAACAGGCATCAAGCGGAGAGCCACCAATTTCTCCCTG
CTGAAGCAGGCAGGAGATGTGGAGGAGAACCCTGGACCAATG
GGAAGGGGGCCTGCTGAGGGGGCCTGTGGCCACTGCACATCGTGC
TGTGGACACGGATCGCCAGCACCATCCCCCCTCACGTGCAGAA
GTCCGTGAACAATGACATGATCGTGACCGATAACAATGGCGCCG
TGAAGTTTCCACAGCTGTGCAAGTTCTGTGACGTGCGGTTTAGC
ACATGCGATAACCAGAAGTCCTGCATGTCTAATTGTAGCATCAC
CTCCATCTGCGAGAAGCCACAGGAGGTGTGCGTGGCCGTGTGG
AGAAAGAACGACGAGAATATCACCTGGAGACAGTGTGCCACG
ATCCTAAGCTGCCATAACCACGACTTTATCCTGGAGGATGCCGCC
TCTCCTAAGTGTATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCAGGCGAGA
CATTCTTTATGTGCAGCTGTTCCCTCTGACGAGTGCAACGATAATA
TCATCTTCTCCGAGGAGTATAACACCTCTAATCCCGACCTGCTG
CTGGTGATCTTTCAGGTGTCCGATTGGCTGATCTTCTTTGCCTCT
CTGGGCAGCTTCCTGTCCATCCTGCTGGTGGGGGTCCTGGGCTA
CCTGGGGCTGAATCGGGCTGCTCGG

SEQ ID NO: 36. huLIC19309b CAR 氨基酸

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVMTQSPLSLPVTGPGEASISC
RSSQTIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGGGTKLEIKG
STSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY
TFTDYEMHWVRQATGQGLEWMGGIDPETGNTAYSQKFKGRVTM
TRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYYSFAYWGQGLTVTSST
STTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ
EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL
GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 37. huLIC19309bT CAR 氨基酸

[0485]

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVMTQSPLSLPVTGPGEASISC
RSSQTIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGGGTKLEIKG
STSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY
TFTDYEMHWVRQATGQGLEWMGGIDPETGNTAYSQKFKGRVTM
TRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYYSFAYWGQGLTVTSST
STTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ
EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL
GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRV
NGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMEA AAVAAPRRLLLVLAAAA
AAAAALLPGATALQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVI
HNSMCIAEIDLIPRDRPFVCA PSSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPT
TVKSSPGLGPVELVSDWLIFASLGSFLSILLVGVGLGLNRAAR

HLCPLPTPCASSAIEFPGGKETWQWINPVDFQEEASLQEALVVE
MSWDKGERTEPLEKTELPEGAPELALDTELSLEDGDRCKAKMAT
NFSLLKQAGDVEENPGPMGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHV
QKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS
ITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAS
PKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVI
QVPQVTSKAFQHDTWNSGLTVASISTGHLTSDNRGDIGLLLGMIVF
AVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKRRILLIPKWLYEDIPNMKNSNVVK
MLQENSELMNNNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTG
PLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDLNTGYKPQISNFLPEGSHLSNNN
EITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELS
LILNQGECCSPDIQNSVEEETTMLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSCL
GIVNEELPSINTYFPQNILESHFNRLSLEK

SEQ ID NO: 38. huLIC19309bT CAR 核酸

[0486]

atggccctgctgtgaccgctctgctgctgctctggctctgctgctgcacgctgcccgcctgac
attgtgatgaccagctctcccctgtccctgccagtgaccctggagagccagcctccatctctgcagga
gctcccagaccatcgtgcacagcaacggcaatacacctggagtggatctgcagaagcccgccag
tcccctcagctgctgatctacaaggtgtctaacagggtcagcggagtgccagaccgcttagcggtatccg
gatctggcaccgatttcacactgaagatctctagagtggaggccgaggacgtgggcgtgtactattgctt
ccaggtgagccacgtgccatataccttggcgccggcacaagctggagatcaagggcagcacctcc
ggatctggcaagccaggatccggagagggatctacaaaggacaggtgcagctggtgcagagcgga
gcagaggtgaagaagcctggagccagcgtgaaggtgtcctgtaaggcctctggctacaccttcacaga
ctatgagatgcactgggtgcggcaggcaaccggacagggcctggagtggatgggaggaatcgaccc
agagacaggcaacacagcctactcccagaagttaaggcgccgggtgaccatgacaagaaataccagc
atctccacagcctatatggagctgtctagcctgagatctgaggatacagccgtgtactattgtgctcgtac
tattccttgcctactggggacaggggacactggtcaccgtctcatcaactagtaccacgacgccagcgc
cgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgctgcagccccctgtccctgcgcccagaggcggtgcc
ggccagcggcgggggcgagtgacacagagggggctggacttcgctgtgatattacatctgggc
gcccttggccgggactgtggggctcttctctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcgaa

[0487]

agaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgt
agctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcag
acgcccccgctaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagagga
gtacgatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaa
ccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattggga
tgaaaggcgagcgccggagggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccacca
aggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgcgttaacggcagcggagctacaaac
ttcagtcttctaaaacaggctggtgacgtggaggagaatcccgccctatggaggccgcctggcggt
cctcgccccgcctcctcctgctggtgctggccgcagctgctgccgcggcgtgccttctgctgcctggc
gccaccgcgctgcagtgcctttgtcacctatgcactaaggacaacttcacctgcgtgaccgacggcctgt
gcttcgtgtccgtaacagagactaccgataaagtgattcacaactccatgtgcatcgccgagattgacctg
atcccgcgcgaccgcccccttctgtgtgctccctcatccaagaccggcagcgtcaccacaacttactgct
gcaaccaggaccactgtaacaagatcgagctgccacaacagtcaaatectctcctggattgggaccgg
tgagctggtgagtgactggtgatcttcttgcgagcctaggctccttcttaagcatccttcttggggcgt
cctgggttacctgggactgaaccgcgctgcgcgccacctgtgcccgcctctgccaacccccgcgcctc
ctcgcccatcgagttccccggggggaaggagacctggcaatggatcaatccagtagactttcaggagg
aggcatcgctgcaggaggctctggtggtggagatgagttgggacaagggtgaacggaccgaaccact
cgagaaaaccgagctgccagaagggtgcgccggagctggccctggatactgagctttactggaggac
ggcgacaggtgtaaggccaaaatggccaccaactttagcctgctgaaacaggccggtgatgtggagga
gaatccggggcccaatggggcgccctctacgtggactgtggcccttgacatcgctttggaccgg
catcgcttctaccatcccacctcatgtgcagaagagcgttaataacgacatgatcgactgataacaacg
ggcggtgaagttccctcagctgtgcaagttctgtgatgtacgttctctacttgcgacaaccagaagagt
tgtatgtctaactgctctattacttctatctgcgagaagccccaggaggtctgcgtggccgttggaggaag
aatgacgagaacatcactctggagacagtatgccatgatccgaagctgccctatcatgacttcacctgg
aggatgccgcaagccctaagtgcacatgaaggagaagaagaagccgggggagaccttctcatgtgc
tctgctcttccgatgagtgaacgacaacatcatctttccgaggagtacaacacttccaaccccgatctg
ctgttggtgattttccaggtgccgcaggtcacctccaaggcgttcagcatgacacctggaacagcgga
ctaaccgtggctagcatcagcaccggccacttgacctccgacaaccgcggggacatcggcctgctact
cggaatgatcggttcgcggtgatgctctccatcctctctctcatcggcacttcaaccgcagcttccgcac
cggtattaagaggagaattctgcttctcatcccaaatggttatacgaggacatcccaacatgaaaaaca

gcaacgtggtcaagatgctgcaggagaattcggagctgatgaacaataactcatcggagcaggttctgt
acgtggacccgatgatcacggaaataaaggagatcttcatccctgagcacaagcctaccgactacaaga
aagagaataaccggcccgcttgagactcgtgactatcctcagaactctctgttcgacaacacgacggtggt
gtacattccccgacttgaacacgggctacaaaccccaaattccaacttctgacctgagggcagtcacctgt
ccaacaacaacgaaatcacctccctgacctgaagccaccggctgactccttgacagcggcaacaac
ccccgactccagaagcaccccaattttgcttttccgtgtcctccgtaactcccttcaaataccatcttct
cggcgagctctccctgatcctgaatcagggcgaatgttcgtccccggacatccagaactctgtggagga
ggagaccacgatgcttctggagaacgacagcccgtagaccatccccgagcagacgcttctgccc
gacgagttcgtgagttgcctgggcattgtgaacgaggaactgccttctattaacacctacttccctcagaa
catactggagagccactttaaccgtatctcgtattggagaag

SEQ ID NO: 39. CD8 α 信号肽

MALPVTALLPLALLHAARP

[0488]

SEQ ID NO: 40. CD8 α 铰链

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC
D

SEQ ID NO: 41. CD8 α 跨膜结构域

IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC

SEQ ID NO: 42. 4-1BB (CD137)共刺激信号传导结构域

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

SEQ ID NO: 43. CD3 ζ (CD3z)细胞内信号传导结构域

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR
DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 44. EcoRI 限制位点

GAATTC

SEQ ID NO: 45. SpeI 限制位点

ACTAGT

SEQ ID NO: 46. HpaI 限制位点

GTTAAC

SEQ ID NO: 47. MluI 限制位点

ACGCGT

SEQ ID NO: 48. P2A

[0489]

ATNFSLLKQAGDVEENPGP

SEQ ID NO: 49. TGF β R1EC-TGF β R1TM-IL23RIC

MEAAVAAPRPRLLLVLAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCT
KDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCAP
SSKTGSVTTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELAAVIAGPV
CFVCISLMLMVYICHNRTVNRSFRTGIKRRILLIPKWLYEDIPNMK
NSNVVKMLQENSELMNNNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDY
KKENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDLNTGYKPQISNFLPEGS
HLSNNNEITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSN
TIFLGELSLILNQGECSSPDIQNSVEEETTMLENDSPTSETIPEQTLL
PDEFVSCLGIVNEELPSINTYFPQNILESHFNRLSLEK

SEQ ID NO: 50. TGF β R2EC-TGF β R2TM-IL12R β 1IC

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNN

GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAV
WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGET
FFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQVTGISLLPPLGVAIS
VIIIIFYCYRVNRQNRAARHLCPPPTPCASSAIEFPGGKETWQWINP
VDFQEEASLQEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGAPELALDTE
LSLEDGDRCKAKM

SEQ ID NO: 51. TGFβR1EC-TGFβR1TM-IL12Rβ1IC

MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAAAALLPGATALQCFCCHLCT
KDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVCAP
SSKTGSVTTTCCNQHCKNIELPTTVKSSPGLGPVELAAVIAGPV
CFVCISLMLMVYICHNRTVNRAARHLCPPPTPCASSAIEFPGGKE
TWQWINPVDFQEEASLQEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGA
PELALDTELSLEDGDRCKAKM

[0490]

SEQ ID NO: 52. TGFβR2EC-TGFβR2TM-IL23RIC

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNN
GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAV
WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGET
FFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQVTGISLLPPLGVAIS
VIIIIFYCYRVNRQNSFRGTGKRRILLIPKWLYEDIPNMKNSNVVK
MLQENSELMNNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTG
PLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDLNTGYKPQISNFLPEGSHLSNNN
EITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELS
LILNQGECSPPDIQNSVEEETTMLENDSPTSETIPEQTLLPDEFVSCL
GIVNEELPSINTYFPQNILESHFNRLSLEK

SEQ ID NO: 53. TGFβR1EC-IL23RTM-IL23RIC

MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAAAALLPGATALQCFCCHLCT

KDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVCAP
SSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELVPQVTSKA
FQHDTWNSGLTVASISTGHLTSDNRGDIIGLLGMIVFAVMLSILSLI
GIFNRSFRTGIKRRILLIPKWLYEDIPNMKNSNVVKMLQENSELM
NNNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYPQ
NSLFDNTTVVYIPDLNTGYKPQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPP
VDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELSLILNQGECS
SPDIQNSVEEETTMLLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSCLGIVNEELPS
INTYFPQNILESHFNRLSLEK

SEQ ID NO: 54. TGFβR2EC-IL12Rβ1TM- IL12Rβ1IC

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNN
GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAV
WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKKPGET
[0491] FFMCS CSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQVSDWLIFASLG
LSILLVGVGLGYNRAARHLCPPLTPCASSAIEFPGGKETWQWI
NPVDFQEEASLQEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGAPELALD
TELSLEDGDRCKAKM

SEQ ID NO: 55. TGFβR2EC-IL23RTM-IL23RIC

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNN
GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAV
WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKKPGET
FFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQVVPQVTSKAFQHDT
WNSGLTVASISTGHLTSDNRGDIIGLLGMIVFAVMLSILSLIGIFNRS
FRTGIKRRILLIPKWLYEDIPNMKNSNVVKMLQENSELMNNNSSE
QVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYPQNSLFDNT
TVVYIPDLNTGYKPQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDSG
NNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELSLILNQGECS SPDIQNS

VEEETTMLLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSLGIVNEELPSINTYFPQ
NILESHFNRLSLEK

SEQ ID NO: 56. TGFβR1EC-IL12Rβ1TM- IL12Rβ1IC

MEAAVAAPRPRLLLVLAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCT
KDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCAP
SSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELVSDWLIF
ASLGSFLSILLVGVLGYLGLNRAARHLCPPLPTPCASSAIEFPGGKE
TWQWINPVDFQEEASLQEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGA
PELALDTELSLEDGDRCKAKM

SEQ ID NO: 57. 接头

SGSGKPGSGEGSTKG

[0492]

SEQ ID NO: 58. 抗 GPC3 scFv

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQTIVHSNGNTYLEWYLQ
KPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCFQVSHVPYTFGGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQL
VQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQATGQGLEW
MGGIDPETGNTAYSQKFKGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAV
YYCARYYSFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 59. Kozak 序列

GCCGCCACC

SEQ ID NO: 60. P2A

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP

SEQ ID NO: 61. 接头

(G)_n (其中 n 是至少 1 的整数)

SEQ ID NO: 62 接头

(GS)_n (其中 n 是至少 1 的整数)

SEQ ID NO: 63 接头

(GSGGS)_n (其中 n 是至少 1 的整数)

SEQ ID NO: 64 接头

(GGGS)_n (其中 n 是至少 1 的整数)

SEQ ID NO: 65 接头

(GGGS)_n (其中 n 是至少 1 的整数)

[0493]

SEQ ID NO: 66 TGFβR1 同种型-1

MEAAVAAPRPRLLLVLAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCT
KDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCAP
SSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELAAVIAGPV
CFVCISLMLMVYICHNRTVIHHRVPNEEDPSLDRPFISEGTTLKDLI
YDMTTSGSGSGLPLLQRTIARTIVLQESIGKGRFGEVWRGKWRG
EEVAVKIFSSREERSWFREAEIYQTVMLRHENILGFIAADNKDNGT
WTQLWLVSDYHEHGSLFDYLNRYTVTVEGMIKLALSTASGLAHL
HMEIVGTQGKPAIAHRDLKSKNILVKKNGTCCCIADLGLAVRHDSA
TDTIDIAPNHRVGTKRYMAPEVLDD SINMKHFESFKRADIYAMGL
VFWEIARRCSIGGIHEDYQLPYYDLVPSDPSVEEMRKVVCEQKLR
PNIPNRWQSCEALRVMAKIMRECWYANGAARLTALRIKKTLSQLS
QQEGIKM

SEQ ID NO: 67 TGFβR1 同种型-2

MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCT
KDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCAP
SSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTGPFVKSSPGLGPVELAAVI
AGPVCFCISLMLMVYICHNRTVIHHRVPNEEDPSLDRPFISEGTTL
KDLIYDMTTSGSGSGLPLLQRTIARTIVLQESIGKGRFGEVWRGK
WRGEEVAVKIFSSREERSWFREAEIYQTVMLRHENILGFIAADNKD
NGTWTQLWLVS DYHEHGS LFDYLNRYTVTVEGMIKLALSTASGL
AHLHMEIVGTQGKPAIAHRDLKSKNILVKKNGTCCIALGLAVRH
DSATDTIDIAPNHRVGTKRYMAPEVLDD SINMKHFESFKRADIYA
MGLVFW EIARRCSIGGIHEDYQLPYYDLVPSDPSVEEMRKVVCEQ
KL RPNIPNRWQSCEALRVMAKIMREC WYANGAARLTALRIKKTLS
QLSQQEGIKM

SEQ ID NO: 68 TGFβR1 同种型-3

[0494] TTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCNQ
DHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELAAVIAGPVCFCISLMLMVYICH
NRTVIH

SEQ ID NO: 69 TGFβR1 同种型-4

MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCT
KDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCAP
SSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTGLPLLQRTIARTIVLQESIG
KGRFGEVWRGKWRGEEVAVKIFSSREERSWFREAEIYQTVMLRH
ENILGFIAADNKDNGTWTQLWLVS DYHEHGS LFDYLNRYTVTV
EGMIKLALSTASGLAHLHMEIVGTQGKPAIAHRDLKSKNILVKKNG
TCCIALGLAVRHDSATDTIDIAPNHRVGTKRYMAPEVLDD SINM
KHFESFKRADIYAMGLVFW EIARRCSIGGIHEDYQLPYYDLVPSD
PSVEEMRKVVCEQKL RPNIPNRWQSCEALRVMAKIMREC WYANG
AARLTALRIKKTLSQLSQQEGIKM

SEQ ID NO: 70 TGF β R2 同种型-1

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNN
GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAV
WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGET
FFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQVGTGISLLPPLGVAIS
VIIIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLMFSEHCAIILED RSDIS
STCANNINHNTPELLDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETV
AVKIFPYEEYASWKTEKDIFSDINLKHENILQFLTAERKTEL GKQY
WLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARGIAHLHSDHT
PCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDD
LANSGQVGTARYMAPEVLES RMNLENVESFKQTDVYSMALVLW
EMTSRCNAVGEVKDYEPFSGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPE
IPFVLNHNHQQIQMVCETLTECWDHDPPEARLTAQCVAERFSELEHL
DRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK

[0495]

SEQ ID NO: 71 TGF β R2 同种型-2

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVPKSDVEMEAQKDAS
IHLSCNRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCD
NQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLT
YHGFTLEDAAPKCVMEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEE
YTTSSPDLLLVIQVGTGVSLPPLGIAIAVIIIFYCYRVHRQQKLSPSW
ESSKPRKLMDFS DNCAIILED RSDISSTCANNINHNTPELLDTL
VGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYSSWKTEKDIFS
DINLKHENILQFLTAERKTEL GKQYWLITAFHAKGNLQEYLTRH
VISWEDLRKLGSSLARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNIL
VKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSQVGTARYMAPEVL
ESRMNLENVESFKQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPF
GSKVREHPCVESMKDSVLRDRGRPEIPFVLNHNHQQIQVCETLTEC
WDHDPPEARLTAQCVAERFSELEHPERLSGRSCSQEKIPEDGSLNTT

K

SEQ ID NO: 72 TGF β R2 同种型-3

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSDVEMEAQKDEII
CPSCNRTAHPLRHINNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN
QKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVVRKNDENITLETVCHDPKLPY
HDFILEDAAAPK CIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNT
SNPDLLLVIQVVTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCYRVNRQQKLSSTWET
GKTRKLMEFSEHCAIILED RSDISSTCANNINHNTPELLDTLV
GKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFS
DINLKHENILQFLTAEERKTEL GKQYWLITAFHAKGNLQEYLTRH
VISWEDLRKLGSSLARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNIL
VKNDLTCCLCDFGLSRLDPTLSVDDLANSQGQVGTARYMAPEVL
ESRMNLENVESFKQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFF
[0496] GSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSWL NHQGIQMV CETLTE
CWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNT
TK

SEQ ID NO: 73 IL-23R 同种型-1

MNQVTIQWDAVIALYILFSWCHGGITNINCSGHIWVEPATIFK
MGMNISIYCQAAIKNCQPRKLHFYKNGIKERFQITRINKTTARLWY
KNFLEPHASMYCTAECPKHFQETLICGKDISSGYPPDIPDEVTCVIY
EYSGNMTCTWNAGKLTYIDTKYVVHVKSLETEEEQQYLTSSYINI
STD SLQGGKKYLVWVQAANALGMEESKQLQIHLDDIVIPSAAVIS
RAETINATVPKTIIYWDSQTTIEKVSCEMRYKATTNQTWNVKEFD
TNFTYVQQSEFYLEPNIKYVFQVRCQETGKRYWQPWSSPFFHKTP
ETVPQVTSKAFQHDTWNSGLTVASISTGHLTSDNRGDIGLLLGMIV
FAVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKRRILLIPKWLYEDIPNMKNSNVVK
MLQENSELMNNNSSEQVLYVDP MITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTG

PLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDLNTGYKPQISNFLPEGSHLSNNN
EITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELS
LILNQGECCSPDIQNSVEEETTMLLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSC
LIVNEELPSINTYFPQNILESHFNRLSLEK

SEQ ID NO: 74 IL-23R 同种型-2

MRYKATTNQTWNVKEFDNTFTYVQQSEFYLEPNIKYVFQVR
CQETGKRYWQPWSSPFFHKTPETVPQVTSKAFQHDTWNSGLTVA
SISTGHILTSDNRGDIGLLLGMIVFAVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKRRI
LLIPKWLYEDIPNMKNSNVVKMLQENSELMNNNSSEQVLYVDP
MITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVAYIPD
LDTGYKPQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQ
KHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELSLILNQGECCSPDIQNSVEEETT
MLLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSCLGIVNEELPSINTYFPQNILESH
FNRLSLEK

[0497]

SEQ ID NO: 75 IL-23R 同种型-3

MEFWANSCFHLYRAPYFWIKRRILLIPKWLYEDIPNMKNSN
VVKMLQENSELMNNNSSEQVLYVDP
MITEIKEIFIPEHKPTDYKKE
NTGPLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDLNTGYKPQISNFLPEGSHLS
NNNEITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFL
GELSLILNQGECCSPDIQNSVEEETTMLLENDSPRETIPEQTLLPDEF
VSCLGIVNEELPSINTYFPQNILESHFNRLSLEK

SEQ ID NO: 76 IL-23R 同种型-4

MILRPYQPCGTVKEFDNTFTYVQQSEFYLEPNIKYVFQVRCQ
ETGKRYWQPWSSLFFHKTPETVPQVTSKAFQHDTWNSGLTVASIS
TGHLTSDNRGDIGLLLGMIVFAVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKRRI
LLIPKWLYEDIPNMKNSNVVKMLQENSELMNNNSSEQVLYVDPMI

TEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDLN
TGYKPQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQKHP
NFAFSVSSVNSLSNTIFLGELSLILNQGECSPPDIQNSVEEETTMLLE
NDSPSETIPEQTLLPDEFVSCLGIVNEELPSINTYFPQNILESHFNRI
LLEK

SEQ ID NO: 77 IL-23R 同种型-5

MKNSNVVKMLQENSELMNNNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPE
HKPTDYKKENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDLNTGYKPQIS
NFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSS
VNSLSNTIFLGELSLILNQGECSPPDIQNSVEEETTMLLENDSPSETI
PEQTLLPDEFVSCLGIVNEELPSINTYFPQNILESHFNRI
LLEK

SEQ ID NO: 78 IL-12R β 1 同种型-1

[0498]

MEPLVTWVPLLFLFLLSRQGAACRTSECCFQDPPYPDADSG
SASGPRDLRCYRISSDRYECWQYEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCC
YFAAGSATRLQFSDQAGVSVLYTVTLWVESWARNQTEKSPEVT
QLYNSVKYEPPLGDIKVSKLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHR
TPSSPWKLGDGCPQDDDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGS
SWSKWSSPVCVPPENPPQPQVRFSVEQLGQDGRRLTLKEQPTQL
ELPEGCQGLAPGTEVTYRLQLHMLSCPKAKATRTHLGKMPYL
SGAAYNVAVISSNQFGPGLNQTWHIPADTHTEPVALNISVGTNGTT
MYWPARAQSMTYCIEWQPVGQDGGLATCSLTAPQDPDPAGMATY
SWSRESGAMGQEKCYITIFASAHPEKLTWSTVLSTYHFGGNAS
AAGTPHHVSVKNHSLDSVSVDWAPSLSTCPGVLKEYVVRCD
DSKQVSEHPVQPTETQVTLGLRAGVAYTVQVRADTAWLRGVWS
QPQRFSIEVQVSDWLIFASLGSFLSILLVGVGLGLNRAARHLCP
PLPTPCASSAIEFPGGKETWQWINPVDFQEEASLQEALVVEMSWD
KGERTEPLEKTELPEGAPELALDTELSLEDGDRCKAKM

SEQ ID NO: 79 IL-12R β 1 同种型-2

MEPLVTWVVPLLFLFLLSRQGAACRTSECCFQDPPYPDADSG
SASGPRDLRCYRISSDRYECSWQYEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCC
YFAAGSATRLQFSDQAGVSVLYTVTLWVESWARNQTEKSPEVTL
QLYNSVKYEPPLGDIKVSKLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHR
TPSSPWKLGDGCPQDDDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGS
SWSKWSSPVCVPPENPPQPQVRFSVEQLGQDGRRLTLKEQPTQL
ELPEGCQGLAPGTEVTYRLQLHMLSCPKAKATRTLHLGKMPYL
SGAAYNVAVISSNQFGPGLNQTWHPADTHTEPVALNISVGTNGTT
MYWPARAQSMTYCIEWQPVGQDGGSLATCSLTAPQDPDPAGMATY
SWSRESGAMGQEKCYITIFASAHPEKLTWSTVLSTYHFGGNAS
AAGTPHHVSVKNHSLDSVSVDWAPSLSTCPGVLKEYVVRRCRDE
DSKQVSEHPVQPTETQVTLSGLRAGVAYTVQVRADTAWLRGVWS
[0499] QPQRFSEVQVSDWLIFFASLGSFLSILLVGVGLYNRAARHLCP
PLPTPCASSAIEFPGGKETWQWINPVDFQEEASLQEALVEMSWD
KGERTEPLEKTELPEGAPELALDTELSLEDGDRCRDR

SEQ ID NO: 80 抗 GPC3 VH (每个 Kabat 定义的 CDR 序列加粗)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**DYEMHWVRQA**
TGQGLEWMGG**IDPETGNTAYSQKFKGRVT**MTNRNTSISTAYMELS
SLRSEDTAVYYCARYY**SFAYWGQ**GLTVTVSS

SEQ ID NO: 81 抗 GPC3 VL (每个 Kabat 定义的 CDR 序列加粗)

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QTIVHS**NGNTYLEWYLQ
KPGQSPQLLIY**KVSNR**FSGV**PDR**FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCF**QVSHV**PYTFGGG**TKLEIK**

SEQ ID NO: 82 抗 GPC3 VH-CDR1

DYEMH

SEQ ID NO: 83 抗 GPC3 VH-CDR2

GIDPETGNTAYSQKFKG

SEQ ID NO: 84 抗 GPC3 VH-CDR3

YYSFAY

SEQ ID NO: 85 抗 GPC3 VL-CDR1

RSSQTIVHSNGNTYLE

SEQ ID NO: 86 抗 GPC3 VL-CDR2

[0500]

KVSNRFS

SEQ ID NO: 87 抗 GPC3 VL-CDR3

FQVSHVPYT

SEQ ID NO: 88 TGFβR2 同种型-4

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVPKSVNSDVMASDNG
GAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAV
WRKNDKNITLETVCHDPKLTYHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGE
TFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDLLLVIQVTGVSLPLPLGIA
IAVIIIFYCYRVHRQQKLSPSWESSKPRKLMDFSDNCAIILED RSDI
SSTCANNINHNTPELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFET
VAVKIFPYEEYSSWKTEKDIFSDINLKHENILQFLTAERKTEL GKQ
YWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARGIAHLHSDH
TPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVD

DLANSQVGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVYSMALVL
WEMTSRCNAVGEVKDYEPFGSKVREHPCVESMKDSVLRDRGRP
EIPSWLHNHQGIQIVCETLTECWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHP
ERLSGRSCSQEKIPEDGSLNTTK

SEQ ID NO: 89 CD20 CAR 氨基酸

MALPVTALLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKM
SCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF
KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFF
DVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGE
KVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARF
SGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKT
STTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ
[0501] EEDGCSCRFPEEEEGGCELGENLYFQSGGDTQALLRNDQVYQPLR
DRDDAQYSHLGGNGGSGERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQR
GGSGDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNGGSGRKQRITE
TESPYQELQGQRSDVYSDLNTQGGSG

SEQ ID NO: 90 LCAR-UL186S 核酸

ATGGGCTCCAGCAACTCCAAGAGGCAGCAACAGGGCTTGC
TCAAGCTCTGGCGAGGGCTGCGAGGGAAGCCTGGGGCAGACT
GGGTGCTATTGTCCGATCCGCTTATCGGGCAGTCATCAACAGTC
CAAGAAGAGTGCGGCAAGGCCTTGAAAAAGTCCTGGGGTAAA
GGTAAAATGACTCCAGACGGCCGCCGCTGCAAGAAGGAGAC
ACCTTTGATGAGTGGGATGATGATGAAGAAGAAGTAGGCTTCC
CTGTGCAACCTCGAGTCCCCTTAAGACAGATGACCTATAAATTA
GCAGTGGACTTTTCCCACTTTTAAAATCAAAGGGGGGACTGG
ATGGGATATATTACTCTGAAAGAAGAGAAAAGATCCTGAATTTG

[0502]

TATGCCTTGAACGAGTGGGGAATAATAGATGATTGGCAAGCTTA
CTCACCAGGCCCCGGGGATAAGGTACCCGAGAGTCTTTGGCTTCT
GCTTTAAGCTAGTCCCAGTGGACCTGCATGAGGAGGCACGCAA
CTGTGAGAGACACTGTGCTGCACATCCAGCACAGATGGGGGAA
GATCCTGATGGAATAGATCATGGAGAAGTCTTGGTCTGGAAGTT
TGACCCGAAGTTGGCGGTGGAGTACCGCCCGGACATGTTTAAG
GACATGCACGAACATGCAAAGCGCTGAACGCGTGCCCCCTCTCC
CTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAG
GCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTC
TTTTGGCAATGTGAGGGCCCCGGAACCTGGCCCTGTCTTCTTGA
CGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAA
GGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTT
CTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCG
GAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCA
CGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCC
ACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTC
CTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTA
CCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTT
ACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGA
ACCACGGGGACGTGGTTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATAT
GGCCACAGGATCCGCCGCCACCATGGCCCTGCCAGTGACCGCC
TTGCTCCTTCCCCTGGCTCTTCTGCTGCACGCTGCTAGACCTGA
GGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCTGAGCTGGTGAAGCCTGG
CGCTAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTC
ACCAGCTATAACATGCACTGGGTGAAGCAGACCCCTGGACAGG
GACTGGAGTGGATCGGAGCTATCTACCCTGGAAACGGAGACAC
CTCATACAACCAGAAGTTCAAGGGAAAGGCTACCCTGACCGCT
GACAAGAGCAGCAGCACCGCTTACATGCAGCTGAGCTCACTGA
CCAGCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCCAGAAGCAACTA
CTACGGAAGCAGCTACTGGTTCTTCGACGTGTGGGGAGCTGGA

[0503]

ACCACCGTGACCGTGTCAAGCGGCGGCGGAGGCTCCGGAGGC
GGAGGATCTGGCGGCGGCGGCAGCGACATCGTGCTGACCCAGA
GCCCTGCTATCCTGTCTGCCAGCCCTGGAGAGAAGGTGACCAT
GACCTGCAGAGCTAGCAGCAGCGTGAACCTACATGGACTGGTAT
CAGAAAAAGCCCCGGCAGCTCACCTAAGCCTTGGATCTACGCTA
CCAGCAACTTAGCCAGCGGCGTGCCTGCTAGATTCTCCGGAAG
CGGCTCTGGAACCAGCTACTCCCTTACCATCAGCAGAGTGGAG
GCTGAGGACGCTGCTACCTACTACTGCCAGCAGTGGAGCTTCA
ACCCTCCTACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCAAGAC
TAGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCC
ACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCC
GGCCAGCGGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTGGACT
TCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGT
GGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAACG
GGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGA
GACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCG
ATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGGGTGAAAAT
TTGTATTTTCAATCTGGTGGTGACACACAAGCTCTGTTGAGGAA
TGACCAGGTCTATCAGCCCCCTCCGAGATCGAGATGATGCTCAGT
ACAGCCACCTTGGAGGAAACGGTGGTTCTGGTGAGAGGCCACC
ACCTGTTCCCAACCCAGACTATGAGCCCATCCGGAAAGGCCAG
CGGGACCTGTATTCTGGCCTGAATCAGAGAGGTGGTTCTGGTG
ACAAGCAGACTCTGTTGCCCAATGACCAGCTCTACCAGCCCCT
CAAGGATCGAGAAGATGACCAGTACAGCCACCTTCAAGGAAAC
GGTGGTTCTGGTCGGAAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGC
CTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGA
CCTCAACACACAGGGTGGTTCTGGTTAA

序列表

<110> 南京传奇生物科技有限公司(Nanjing Legend Biotech Co., Ltd.)

<120> 融合蛋白及其用途

<130> P11128-PCT

<140> 尚未分配

<141> 同时随同提交

<150> PCT/CN2021/087475

<151> 2021-04-15

<160> 90

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 1

Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val

1 5 10 15

Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr

20 25 30

Ala

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 2

Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu

1 5 10 15

Trp Thr Arg Ile Ala Ser

20

<210> 3

<211> 93

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 3

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

<210> 4

<211> 144

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 4

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

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 5

Ala Ala Val Ile Ala Gly Pro Val Cys Phe Val Cys Ile Ser Leu Met

1 5 10 15

Leu Met Val Tyr Ile

20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 6

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

1 5 10 15

Ile Ile Ile Phe Tyr

20

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 7

Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser Ile Leu Ser

1 5 10 15

Leu Ile Gly Ile Phe

20

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 8

Trp Leu Ile Phe Phe Ala Ser Leu Gly Ser Phe Leu Ser Ile Leu Leu

1 5 10 15

Val Gly Val Leu Gly Tyr Leu Gly Leu

20 25

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 9

Cys His Asn Arg Thr Val

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 10

Cys Tyr Arg Val Asn Arg Gln

1 5

<210> 11

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 11

Val Pro Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser

1 5 10 15

Gly Leu Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn

20 25 30

Arg Gly Asp Ile Gly

35

<210> 12

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 12

Val Ser Asp

1

<210> 13

<211> 356

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 13

Cys His Asn Arg Thr Val Ile His His Arg Val Pro Asn Glu Glu Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ile Tyr Asp Met Thr Thr Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Leu

35 40 45

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

50 55 60

Gly Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Trp Arg Gly Lys Trp Arg Gly Glu

65 70 75 80

Glu Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Glu Glu Arg Ser Trp Phe

85 90 95

Arg Glu Ala Glu Ile Tyr Gln Thr Val Met Leu Arg His Glu Asn Ile

100 105 110

Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Asn Lys Asp Asn Gly Thr Trp Thr Gln

115 120 125

Leu Trp Leu Val Ser Asp Tyr His Glu His Gly Ser Leu Phe Asp Tyr

130 135 140

Leu Asn Arg Tyr Thr Val Thr Val Glu Gly Met Ile Lys Leu Ala Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys Asn Ile

180 185 190

Leu Val Lys Lys Asn Gly Thr Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala

195 200 205

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

<210> 14

<211> 380

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 14

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

$\langle 210 \rangle$	15
$\langle 211 \rangle$	253
$\langle 212 \rangle$	PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 15

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

<210> 16

<211> 92

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 16

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

<210> 17

<211> 253

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 17

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

Thr Ser Leu Thr Leu Lys Pro Pro Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn		
130	135	140
Asn Pro Arg Leu Gln Lys His Pro Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser		
145	150	155
Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr Ile Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile		
	165	170
Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser Ser Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu		
	180	185
Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu Glu Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile		
	195	200
Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro Asp Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile		
	210	215
Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser Ile Asn Thr Phe Phe Pro Gln Asn Ile		
225	230	235
Leu Glu Ser His Phe Asn Arg Ile Ser Leu Leu Glu Lys		
	245	250

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 18

Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile Lys Arg Arg

1 5 10

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 19

Asn Arg Ala Ala Arg

1 5

<210> 20

<211> 711

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 20

```

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

```

290	295	300
Pro Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr		
305	310	315
Ile Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser		320
	325	330
Ser Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu		335
	340	345
Glu Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro		350
	355	360
Asp Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser		365
370	375	380
Ile Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn Arg		
385	390	395
Ile Ser Leu Leu Glu Lys Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala		400
	405	410
Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg		415
	420	425
Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr		430
435	440	445
Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr		
450	455	460
Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp		
465	470	475
Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys		480
	485	490
Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val		495
	500	505
Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp		510
	515	520
Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro		525
	530	535
Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met		540
545	550	555
Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu		560
	565	570
Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu Leu Leu Val Ile Phe Gln Val		575
	580	585
Thr Gly Ile Ser Leu Leu Pro Pro Leu Gly Val Ala Ile Ser Val Ile		590
595	600	605

Ile	Ile	Phe	Tyr	Cys	Tyr	Arg	Val	Asn	Arg	Gln	Asn	Arg	Ala	Ala	Arg
610						615					620				
His	Leu	Cys	Pro	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Cys	Ala	Ser	Ser	Ala	Ile	Glu
625					630					635					640
Phe	Pro	Gly	Gly	Lys	Glu	Thr	Trp	Gln	Trp	Ile	Asn	Pro	Val	Asp	Phe
				645					650					655	
Gln	Glu	Glu	Ala	Ser	Leu	Gln	Glu	Ala	Leu	Val	Val	Glu	Met	Ser	Trp
			660					665					670		
Asp	Lys	Gly	Glu	Arg	Thr	Glu	Pro	Leu	Glu	Lys	Thr	Glu	Leu	Pro	Glu
		675					680					685			
Gly	Ala	Pro	Glu	Leu	Ala	Leu	Asp	Thr	Glu	Leu	Ser	Leu	Glu	Asp	Gly
	690					695					700				
Asp	Arg	Cys	Lys	Ala	Lys	Met									
705					710										
<210> 21															
<211> 711															
<212> PRT															
<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
<220>															
<223> 合成构建体															
<400> 21															
Met	Gly	Arg	Gly	Leu	Leu	Arg	Gly	Leu	Trp	Pro	Leu	His	Ile	Val	Leu
1			5					10				15			
Trp	Thr	Arg	Ile	Ala	Ser	Thr	Ile	Pro	Pro	His	Val	Gln	Lys	Ser	Val
		20					25				30				
Asn	Asn	Asp	Met	Ile	Val	Thr	Asp	Asn	Asn	Gly	Ala	Val	Lys	Phe	Pro
		35					40				45				
Gln	Leu	Cys	Lys	Phe	Cys	Asp	Val	Arg	Phe	Ser	Thr	Cys	Asp	Asn	Gln
	50					55				60					
Lys	Ser	Cys	Met	Ser	Asn	Cys	Ser	Ile	Thr	Ser	Ile	Cys	Glu	Lys	Pro
65				70					75				80		
Gln	Glu	Val	Cys	Val	Ala	Val	Trp	Arg	Lys	Asn	Asp	Glu	Asn	Ile	Thr
			85					90				95			
Leu	Glu	Thr	Val	Cys	His	Asp	Pro	Lys	Leu	Pro	Tyr	His	Asp	Phe	Ile
		100						105				110			
Leu	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Pro	Lys	Cys	Ile	Met	Lys	Glu	Lys	Lys	Lys
		115					120				125				
Pro	Gly	Glu	Thr	Phe	Phe	Met	Cys	Ser	Cys	Ser	Ser	Asp	Glu	Cys	Asn
	130					135					140				

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

450	455	460
Gly Pro Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu Leu		
465	470	475
Leu Val Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly		
485	490	495
Ala Thr Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe		
500	505	510
Thr Cys Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr		
515	520	525
Asp Lys Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile		
530	535	540
Pro Arg Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser		
545	550	555
Val Thr Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu		
565	570	575
Leu Pro Thr Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu Leu		
580	585	590
Ala Ala Val Ile Ala Gly Pro Val Cys Phe Val Cys Ile Ser Leu Met		
595	600	605
Leu Met Val Tyr Ile Cys His Asn Arg Thr Val Asn Arg Ala Ala Arg		
610	615	620
His Leu Cys Pro Pro Leu Pro Thr Pro Cys Ala Ser Ser Ala Ile Glu		
625	630	635
Phe Pro Gly Gly Lys Glu Thr Trp Gln Trp Ile Asn Pro Val Asp Phe		
645	650	655
Gln Glu Glu Ala Ser Leu Gln Glu Ala Leu Val Val Glu Met Ser Trp		
660	665	670
Asp Lys Gly Glu Arg Thr Glu Pro Leu Glu Lys Thr Glu Leu Pro Glu		
675	680	685
Gly Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp Thr Glu Leu Ser Leu Glu Asp Gly		
690	695	700
Asp Arg Cys Lys Ala Lys Met		
705	710	

<210> 22

<211> 711

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 22

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

Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val			
305	310	315	320
Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser			
	325	330	335
Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp			
	340	345	350
Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro			
	355	360	365
Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys			
	370	375	380
Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys			
385	390	395	400
Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu			
	405	410	415
Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu Leu Leu Val Ile Phe Gln Val Thr			
	420	425	430
Gly Ile Ser Leu Leu Pro Pro Leu Gly Val Ala Ile Ser Val Ile Ile			
	435	440	445
Ile Phe Tyr Cys Tyr Arg Val Asn Arg Gln Asn Arg Ser Phe Arg Thr			
	450	455	460
Gly Ile Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu			
465	470	475	480
Asp Ile Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Glu			
	485	490	495
Asn Ser Glu Leu Met Asn Asn Asn Ser Ser Glu Gln Val Leu Tyr Val			
	500	505	510
Asp Pro Met Ile Thr Glu Ile Lys Glu Ile Phe Ile Pro Glu His Lys			
	515	520	525
Pro Thr Asp Tyr Lys Lys Glu Asn Thr Gly Pro Leu Glu Thr Arg Asp			
	530	535	540
Tyr Pro Gln Asn Ser Leu Phe Asp Asn Thr Thr Val Val Tyr Ile Pro			
545	550	555	560
Asp Leu Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile Ser Asn Phe Leu Pro Glu			
	565	570	575
Gly Ser His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Leu Lys			
	580	585	590
Pro Pro Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn Asn Pro Arg Leu Gln Lys			
	595	600	605
His Pro Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser Asn			

610	615	620
Thr Ile Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys		
625	630	635
Ser Ser Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu		
645	650	655
Leu Glu Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu		
660	665	670
Pro Asp Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro		
675	680	685
Ser Ile Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn		
690	695	700
Arg Ile Ser Leu Leu Glu Lys		
705	710	
<210> 23		
<211> 742		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成构建体		
<400> 23		
Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val		
1	5	10
Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr		
20	25	30
Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys		
35	40	45
Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys		
50	55	60
Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg		
65	70	75
Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr		
85	90	95
Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro		
100	105	110
Thr Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu Leu Val Pro		
115	120	125
Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu		
130	135	140
Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly		

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

Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile			
465	470	475	480
Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp			
	485	490	495
Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val			
	500	505	510
Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser			
	515	520	525
Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp			
	530	535	540
Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro			
545	550	555	560
Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys			
	565	570	575
Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys			
	580	585	590
Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu			
	595	600	605
Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu Leu Leu Val Ile Phe Gln Val Ser			
	610	615	620
Asp Trp Leu Ile Phe Phe Ala Ser Leu Gly Ser Phe Leu Ser Ile Leu			
625	630	635	640
Leu Val Gly Val Leu Gly Tyr Leu Gly Leu Asn Arg Ala Ala Arg His			
	645	650	655
Leu Cys Pro Pro Leu Pro Thr Pro Cys Ala Ser Ser Ala Ile Glu Phe			
	660	665	670
Pro Gly Gly Lys Glu Thr Trp Gln Trp Ile Asn Pro Val Asp Phe Gln			
	675	680	685
Glu Glu Ala Ser Leu Gln Glu Ala Leu Val Val Glu Met Ser Trp Asp			
	690	695	700
Lys Gly Glu Arg Thr Glu Pro Leu Glu Lys Thr Glu Leu Pro Glu Gly			
705	710	715	720
Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp Thr Glu Leu Ser Leu Glu Asp Gly Asp			
	725	730	735
Arg Cys Lys Ala Lys Met			
	740		

<210> 24

<211> 742

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 24

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

275	280	285
Phe Ile Pro Glu His Lys	Pro Thr Asp Tyr Lys	Lys Glu Asn Thr Gly
290	295	300
Pro Leu Glu Thr Arg Asp	Tyr Pro Gln Asn Ser	Leu Phe Asp Asn Thr
305	310	315
Thr Val Val Tyr Ile Pro	Asp Leu Asn Thr Gly	Tyr Lys Pro Gln Ile
325	330	335
Ser Asn Phe Leu Pro Glu	Gly Ser His Leu Ser	Asn Asn Asn Glu Ile
340	345	350
Thr Ser Leu Thr Leu Lys	Pro Pro Val Asp Ser	Leu Asp Ser Gly Asn
355	360	365
Asn Pro Arg Leu Gln Lys	His Pro Asn Phe Ala	Phe Ser Val Ser Ser
370	375	380
Val Asn Ser Leu Ser Asn	Thr Ile Phe Leu Gly	Glu Leu Ser Leu Ile
385	390	395
Leu Asn Gln Gly Glu Cys	Ser Ser Pro Asp Ile	Gln Asn Ser Val Glu
405	410	415
Glu Glu Thr Thr Met Leu	Leu Glu Asn Asp Ser	Pro Ser Glu Thr Ile
420	425	430
Pro Glu Gln Thr Leu Leu	Pro Asp Glu Phe Val	Ser Cys Leu Gly Ile
435	440	445
Val Asn Glu Glu Leu Pro	Ser Ile Asn Thr Tyr	Phe Pro Gln Asn Ile
450	455	460
Leu Glu Ser His Phe Asn	Arg Ile Ser Leu Leu	Glu Lys Ala Thr Asn
465	470	475
Phe Ser Leu Leu Lys Gln	Ala Gly Asp Val Glu	Glu Asn Pro Gly Pro
485	490	495
Met Glu Ala Ala Val Ala	Ala Pro Arg Pro Arg	Leu Leu Leu Leu Val
500	505	510
Leu Ala Ala Ala Ala Ala	Ala Ala Ala Leu Leu	Pro Gly Ala Thr
515	520	525
Ala Leu Gln Cys Phe Cys	His Leu Cys Thr Lys	Asp Asn Phe Thr Cys
530	535	540
Val Thr Asp Gly Leu Cys	Phe Val Ser Val Thr	Glu Thr Thr Asp Lys
545	550	555
Val Ile His Asn Ser Met	Cys Ile Ala Glu Ile	Asp Leu Ile Pro Arg
565	570	575
Asp Arg Pro Phe Val Cys	Ala Pro Ser Ser Lys	Thr Gly Ser Val Thr
580	585	590

Thr	Thr	Tyr	Cys	Cys	Asn	Gln	Asp	His	Cys	Asn	Lys	Ile	Glu	Leu	Pro
595				600				605							
Thr	Thr	Val	Lys	Ser	Ser	Pro	Gly	Leu	Gly	Pro	Val	Glu	Leu	Val	Ser
610				615				620							
Asp	Trp	Leu	Ile	Phe	Phe	Ala	Ser	Leu	Gly	Ser	Phe	Leu	Ser	Ile	Leu
625				630				635				640			
Leu	Val	Gly	Val	Leu	Gly	Tyr	Leu	Gly	Leu	Asn	Arg	Ala	Ala	Arg	His
				645				650				655			
Leu	Cys	Pro	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Cys	Ala	Ser	Ser	Ala	Ile	Glu	Phe
				660				665				670			
Pro	Gly	Gly	Lys	Glu	Thr	Trp	Gln	Trp	Ile	Asn	Pro	Val	Asp	Phe	Gln
				675				680				685			
Glu	Glu	Ala	Ser	Leu	Gln	Glu	Ala	Leu	Val	Val	Glu	Met	Ser	Trp	Asp
690				695				700							
Lys	Gly	Glu	Arg	Thr	Glu	Pro	Leu	Glu	Lys	Thr	Glu	Leu	Pro	Glu	Gly
705				710				715				720			
Ala	Pro	Glu	Leu	Ala	Leu	Asp	Thr	Glu	Leu	Ser	Leu	Glu	Asp	Gly	Asp
				725				730				735			
Arg	Cys	Lys	Ala	Lys	Met										
740															

<210> 25

<211> 742

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 25

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

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

				405					410					415			
Glu	Tyr	Asn	Thr	Ser	Asn	Pro	Asp	Leu	Leu	Leu	Val	Ile	Phe	Gln	Val		
				420					425					430			
Pro	Gln	Val	Thr	Ser	Lys	Ala	Phe	Gln	His	Asp	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly		
				435					440					445			
Leu	Thr	Val	Ala	Ser	Ile	Ser	Thr	Gly	His	Leu	Thr	Ser	Asp	Asn	Arg		
				450					455					460			
Gly	Asp	Ile	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Met	Ile	Val	Phe	Ala	Val	Met	Leu		
465									470					475			480
Ser	Ile	Leu	Ser	Leu	Ile	Gly	Ile	Phe	Asn	Arg	Ser	Phe	Arg	Thr	Gly		
									485					490			495
Ile	Lys	Arg	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Ile	Pro	Lys	Trp	Leu	Tyr	Glu	Asp		
				500					505					510			
Ile	Pro	Asn	Met	Lys	Asn	Ser	Asn	Val	Val	Lys	Met	Leu	Gln	Glu	Asn		
				515					520					525			
Ser	Glu	Leu	Met	Asn	Asn	Asn	Ser	Ser	Glu	Gln	Val	Leu	Tyr	Val	Asp		
				530					535					540			
Pro	Met	Ile	Thr	Glu	Ile	Lys	Glu	Ile	Phe	Ile	Pro	Glu	His	Lys	Pro		
545									550					555			560
Thr	Asp	Tyr	Lys	Lys	Glu	Asn	Thr	Gly	Pro	Leu	Glu	Thr	Arg	Asp	Tyr		
									565					570			575
Pro	Gln	Asn	Ser	Leu	Phe	Asp	Asn	Thr	Thr	Val	Val	Tyr	Ile	Pro	Asp		
				580					585					590			
Leu	Asn	Thr	Gly	Tyr	Lys	Pro	Gln	Ile	Ser	Asn	Phe	Leu	Pro	Glu	Gly		
				595					600					605			
Ser	His	Leu	Ser	Asn	Asn	Asn	Glu	Ile	Thr	Ser	Leu	Thr	Leu	Lys	Pro		
				610					615					620			
Pro	Val	Asp	Ser	Leu	Asp	Ser	Gly	Asn	Asn	Pro	Arg	Leu	Gln	Lys	His		
625									630					635			640
Pro	Asn	Phe	Ala	Phe	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Asn	Ser	Leu	Ser	Asn	Thr		
									645					650			655
Ile	Phe	Leu	Gly	Glu	Leu	Ser	Leu	Ile	Leu	Asn	Gln	Gly	Glu	Cys	Ser		
				660					665					670			
Ser	Pro	Asp	Ile	Gln	Asn	Ser	Val	Glu	Glu	Glu	Thr	Thr	Met	Leu	Leu		
				675					680					685			
Glu	Asn	Asp	Ser	Pro	Ser	Glu	Thr	Ile	Pro	Glu	Gln	Thr	Leu	Leu	Pro		
				690					695					700			
Asp	Glu	Phe	Val	Ser	Cys	Leu	Gly	Ile	Val	Asn	Glu	Glu	Leu	Pro	Ser		
705									710					715			720

Ile Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn Arg
 725 730 735
 Ile Ser Leu Leu Glu Lys
 740
 <210> 26
 <211> 742
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 26
 Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr
 20 25 30
 Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys
 35 40 45
 Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys
 50 55 60
 Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg
 65 70 75 80
 Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr
 85 90 95
 Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro
 100 105 110
 Thr Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu Leu Val Pro
 115 120 125
 Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu
 130 135 140
 Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly
 145 150 155 160
 Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser
 165 170 175
 Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile
 180 185 190
 Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Phe Glu Asp Ile
 195 200 205
 Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Glu Asn Ser
 210 215 220

Glu	Leu	Met	Asn	Asn	Asn	Ser	Ser	Glu	Gln	Val	Leu	Phe	Val	Asp	Pro
225						230				235					240
Met	Ile	Thr	Glu	Ile	Lys	Glu	Ile	Phe	Ile	Pro	Glu	His	Lys	Pro	Thr
				245						250					255
Asp	Phe	Lys	Lys	Glu	Asn	Thr	Gly	Pro	Leu	Glu	Thr	Arg	Asp	Phe	Pro
				260						265					270
Gln	Asn	Ser	Leu	Phe	Asp	Asn	Thr	Thr	Val	Val	Phe	Ile	Pro	Asp	Leu
				275											285
Asn	Thr	Gly	Phe	Lys	Pro	Gln	Ile	Ser	Asn	Phe	Leu	Pro	Glu	Gly	Ser
				290											300
His	Leu	Ser	Asn	Asn	Asn	Glu	Ile	Thr	Ser	Leu	Thr	Leu	Lys	Pro	Pro
305						310									320
Val	Asp	Ser	Leu	Asp	Ser	Gly	Asn	Asn	Pro	Arg	Leu	Gln	Lys	His	Pro
						325									335
Asn	Phe	Ala	Phe	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Asn	Ser	Leu	Ser	Asn	Thr	Ile
						340									350
Phe	Leu	Gly	Glu	Leu	Ser	Leu	Ile	Leu	Asn	Gln	Gly	Glu	Cys	Ser	Ser
						355									365
Pro	Asp	Ile	Gln	Asn	Ser	Val	Glu	Glu	Glu	Thr	Thr	Met	Leu	Leu	Glu
						370									380
Asn	Asp	Ser	Pro	Ser	Glu	Thr	Ile	Pro	Glu	Gln	Thr	Leu	Leu	Pro	Asp
385						390									400
Glu	Phe	Val	Ser	Cys	Leu	Gly	Ile	Val	Asn	Glu	Glu	Leu	Pro	Ser	Ile
						405									415
Asn	Thr	Phe	Phe	Pro	Gln	Asn	Ile	Leu	Glu	Ser	His	Phe	Asn	Arg	Ile
						420									430
Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly
						435									445
Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Arg	Gly	Leu	Leu	Arg	Gly
						450									460
Leu	Trp	Pro	Leu	His	Ile	Val	Leu	Trp	Thr	Arg	Ile	Ala	Ser	Thr	Ile
465						470									480
Pro	Pro	His	Val	Gln	Lys	Ser	Val	Asn	Asn	Asp	Met	Ile	Val	Thr	Asp
						485									495
Asn	Asn	Gly	Ala	Val	Lys	Phe	Pro	Gln	Leu	Cys	Lys	Phe	Cys	Asp	Val
						500									510
Arg	Phe	Ser	Thr	Cys	Asp	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Met	Ser	Asn	Cys	Ser
						515									525
Ile	Thr	Ser	Ile	Cys	Glu	Lys	Pro	Gln	Glu	Val	Cys	Val	Ala	Val	Trp

530					535					540						
Arg	Lys	Asn	Asp	Glu	Asn	Ile	Thr	Leu	Glu	Thr	Val	Cys	His	Asp	Pro	
545					550					555					560	
Lys	Leu	Pro	Tyr	His	Asp	Phe	Ile	Leu	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Pro	Lys	
565					570					575						
Cys	Ile	Met	Lys	Glu	Lys	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Phe	Phe	Met	Cys	
580					585					590						
Ser	Cys	Ser	Ser	Asp	Glu	Cys	Asn	Asp	Asn	Ile	Ile	Phe	Ser	Glu	Glu	
595					600					605						
Tyr	Asn	Thr	Ser	Asn	Pro	Asp	Leu	Leu	Leu	Val	Ile	Phe	Gln	Val	Ser	
610					615					620						
Asp	Trp	Leu	Ile	Phe	Phe	Ala	Ser	Leu	Gly	Ser	Phe	Leu	Ser	Ile	Leu	
625					630					635					640	
Leu	Val	Gly	Val	Leu	Gly	Tyr	Leu	Gly	Leu	Asn	Arg	Ala	Ala	Arg	His	
645					650					655						
Leu	Cys	Pro	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Cys	Ala	Ser	Ser	Ala	Ile	Glu	Phe	
660					665					670						
Pro	Gly	Gly	Lys	Glu	Thr	Trp	Gln	Trp	Ile	Asn	Pro	Val	Asp	Phe	Gln	
675					680					685						
Glu	Glu	Ala	Ser	Leu	Gln	Glu	Ala	Leu	Val	Val	Glu	Met	Ser	Trp	Asp	
690					695					700						
Lys	Gly	Glu	Arg	Thr	Glu	Pro	Leu	Glu	Lys	Thr	Glu	Leu	Pro	Glu	Gly	
705					710					715					720	
Ala	Pro	Glu	Leu	Ala	Leu	Asp	Thr	Glu	Leu	Ser	Leu	Glu	Asp	Gly	Asp	
725					730					735						
Arg	Cys	Lys	Ala	Lys	Met											
740																

<210> 27

413

<212> PRT

〈213〉 人工序列 (Artificial Sequence)

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 合成构建体

<400> 27

Met	Glu	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Pro	Arg	Leu	Leu	Leu	Leu	Val
1				5				10						15	
Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Leu	Pro	Gly	Ala	Thr
			20					25					30		
Ala	Leu	Gln	Cys	Phe	Cys	His	Leu	Cys	Thr	Lys	Asp	Asn	Phe	Thr	Cys

35							40				45					
Val	Thr	Asp	Gly	Leu	Cys	Phe	Val	Ser	Val	Thr	Glu	Thr	Thr	Asp	Lys	
50							55				60					
Val	Ile	His	Asn	Ser	Met	Cys	Ile	Ala	Glu	Ile	Asp	Leu	Ile	Pro	Arg	
65						70			75					80		
Asp	Arg	Pro	Phe	Val	Cys	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Thr	Gly	Ser	Val	Thr	
					85			90					95			
Thr	Thr	Tyr	Cys	Cys	Asn	Gln	Asp	His	Cys	Asn	Lys	Ile	Glu	Leu	Pro	
					100			105					110			
Thr	Thr	Val	Lys	Ser	Ser	Pro	Gly	Leu	Gly	Pro	Val	Glu	Leu	Val	Pro	
					115			120					125			
Gln	Val	Thr	Ser	Lys	Ala	Phe	Gln	His	Asp	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Leu	
					130			135					140			
Thr	Val	Ala	Ser	Ile	Ser	Thr	Gly	His	Leu	Thr	Ser	Asp	Asn	Arg	Gly	
145						150			155					160		
Asp	Ile	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Met	Ile	Val	Phe	Ala	Val	Met	Leu	Ser	
					165			170					175			
Ile	Leu	Ser	Leu	Ile	Gly	Ile	Phe	Asn	Arg	Ser	Phe	Arg	Thr	Gly	Ile	
					180			185					190			
Lys	Arg	Arg	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	
					195			200					205			
Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Arg	Gly	Leu	Leu	Arg	Gly	Leu	Trp	
					210			215					220			
Pro	Leu	His	Ile	Val	Leu	Trp	Thr	Arg	Ile	Ala	Ser	Thr	Ile	Pro	Pro	
225						230			235					240		
His	Val	Gln	Lys	Ser	Val	Asn	Asn	Asp	Met	Ile	Val	Thr	Asp	Asn	Asn	
					245			250					255			
Gly	Ala	Val	Lys	Phe	Pro	Gln	Leu	Cys	Lys	Phe	Cys	Asp	Val	Arg	Phe	
					260			265					270			
Ser	Thr	Cys	Asp	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Met	Ser	Asn	Cys	Ser	Ile	Thr	
					275			280					285			
Ser	Ile	Cys	Glu	Lys	Pro	Gln	Glu	Val	Cys	Val	Ala	Val	Trp	Arg	Lys	
					290			295					300			
Asn	Asp	Glu	Asn	Ile	Thr	Leu	Glu	Thr	Val	Cys	His	Asp	Pro	Lys	Leu	
305						310			315					320		
Pro	Tyr	His	Asp	Phe	Ile	Leu	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Pro	Lys	Cys	Ile	
					325			330					335			
Met	Lys	Glu	Lys	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Phe	Phe	Met	Cys	Ser	Cys	
					340			345					350			

Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn
 355 360 365
 Thr Ser Asn Pro Asp Leu Leu Leu Val Ile Phe Gln Val Ser Asp Trp
 370 375 380
 Leu Ile Phe Phe Ala Ser Leu Gly Ser Phe Leu Ser Ile Leu Leu Val
 385 390 395 400
 Gly Val Leu Gly Tyr Leu Gly Leu Asn Arg Ala Ala Arg
 405 410

<210> 28

<211> 2133

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 28

```
atggaagccg ccgtggccgc tcccagacct cgactgctgc tgctggtgct ggccgctgcc 60
gccgctgccg ccgtgctctt gctgcctggc gccacagccc tgcagtgttt ctgtcacctg 120
tgcaccaagg acaactttac atgcgtgacc gatggcctgt gcttcgtgtc cgtgacagag 180
acaacagaca aggtgatcca caattctatg tgcacgccc agatcgacct gatcccaagg 240
gatcggccct tcgtgtgctc accaagctcc aagaccggaa gcgtgaccac aacctactgc 300
tgtaaccagg atcactgcaa taagatcgag ctgccaacaa ccgtgaagtc tagccctggc 360
ctgggaccag tggagctggc agccgtgatc gccggccccg tgtgcttcgt gtgcatcagc 420
ctgatgctga tgggtgtacat ctgtcacaac aggacagtga atcggtcctt cagaaccggc 480
atcaagcgga gaatcctgct gctgatccca aagtggctgt atgaggacat cccaacatg 540
aagaactcta atgtggtgaa gatgctgcag gagaatagcg agctgatgaa caataactcc 600
tctgagcagg tgctgtatgt ggacccaatg atcacagaga tcaaggagat ctttatcccc 660
gagcacaagc ctaccgatta caagaaggag aacacaggcc ccctggagac acgggactat 720
ccccagaaca gcctgtttga taatacaacc gtggtgtaca tccccgatct gaacaccggc 780
tataagcctc agatctccaa tttcctgcca gagggcagcc acctgtccaa taacaatgag 840
atcacatctc tgaccctgaa gccccctgtg gactctctgg atagcggcaa caatcccaga 900
ctgcagaagc accctaattt cgctttttcc gtgagctccg tgaactctct gagcaatacc 960
atcttcctgg gcgagctgtc tctgatcctg aaccagggcg agtgctctag ccctgacatc 1020
cagaatagcg tggaggagga gacaaccatg ctgctggaga acgactcccc ttctgagaca 1080
atcccagagc agaccctgct gccagatgag ttcgtgagct gtctgggcat cgtgaatgag 1140
gagctgcccc gcatcaacac ataactttct cagaatatcc tggagtctca cttcaacagg 1200
atcagcctgc tggagaaggc caccaatttc agcctgtgta agcaggcagg agatgtggag 1260
gagaaccagg gaccaatggg aaggggcctg ctgaggggcc tgtggcctct gcacatcgtg 1320
ctgtggacac gcatcgccag caccatccca cccacgtgc agaagtcctg gaacaatgac 1380
atgatcgtga ccgataacaa tggcgccgtg aagtttcccc agctgtgcaa gttctgtgac 1440
```

```

gtgcggtttt ccacatgcga taaccagaag tcctgcatgt ctaattgtag catcacctcc 1500
atctgcgaga agcctcagga ggtgtgcgtg gccgtgtgga gaaagaacga cgagaatatc 1560
accctggaga cagtgtgcca cgatcccaag ctgccttacc acgacttcat cctggaggat 1620
gccgccagcc ctaagtgtat catgaaggag aagaagaagc caggcgagac attcttcatg 1680
tgctcctgtt cctctgacga gtgcaacgat aatatcatct tttccgagga gtataacaca 1740
tctaatacctg acctgctgct ggtgatcttc caggtgaccg gaatctccct gctgcctcca 1800
ctgggagtg ccatctctgt gatcatcatc ttctactgtt atagggtgaa ccgccagaat 1860
agggcagcaa gacacctgtg cccacctctg cctacaccat gtgcaagctc cgccatcgag 1920
tttccaggag gaaaggagac atggcagtg atcaacctg tggacttcca ggaggaggcc 1980
agcctgcagg aggccctggt ggtggagatg tcctgggata agggcgagag aacagagcca 2040
ctggagaaga ccgagctgcc agagggcgcc cccgaactgg cactggatac tgaactgagc 2100
ctggaggacg gggatagatg taaagcaaaa atg 2133

```

<210> 29

<211> 2133

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 29

```

atgggaagag gactgctgag aggactgtgg cccctgcata tcgtgctgtg gactcgcac 60
gctagtacaa tccccccca tgtgcagaag tccgtgaaca atgacatgat cgtgaccgat 120
aacaatggcg ccgtgaagtt tcccagctg tgcaagttct gtgacgtgcg gttttctaca 180
tgcgataacc agaagagctg catgtccaat tgttctatca ccagcatctg cgagaagcct 240
caggaggtgt gcgtggccgt gtggagaaag aacgacgaga atatcacct ggagacagt 300
tgccacgata ccaagctgcc ttaccacgac ttcatcctgg aggatgccgc ctctcctaag 360
tgtatcatga aggagaagaa gaagccaggc gagacattct tcatgtgcag ctgtagctcc 420
gacgagtgc aacgataacat catcttttct gaggagtaca acacaagcaa tcccgacctg 480
ctgctgggtg tcttccaggt gaccggaatc agcctgctgc cacctctggg agtggccatc 540
tccgtgatca tcatctttta ctgttatagg gtgaaccgcc agaatcggag cttcagaacc 600
ggcatcaagc ggagaatcct gctgctgata ccaaagtggc tgtacgagga tatccccaac 660
atgaagaact ctaatgtggt gaagatgctg caggagaata gcgagctgat gaacaataac 720
tctagcgagc aggtgctgta tgtggacca atgatcacag agatcaagga gatctttatc 780
ccagagcaca agcccaccga ttacaagaag gagaacacag gccccctgga gacacgggac 840
tatccccaga acagcctgtt tgataatacc acagtgtgt acatccccga cctgaacaca 900
ggctataagc ctcatgacag caatttcctg ccagagggt cccacctgtc taataacaat 960
gagatcacat ccctgaccct gaagccacc gtggacagcc tggattccgg caacaatccc 1020
aggctgcaga agcaccctaa tttcgcttt tccgtgtcct ctgtgaactc tctgagcaat 1080
accatcttcc tgggcgagct gtccctgatc ctgaaccagg gcgagtgcag ctcccctgac 1140
atccagaaca gcgtggagga ggagacaaca atgctgctgg agaacgactc cccttctgag 1200

```

```

acaatcccag agcagaccct gctgccagat gagtttgtga gctgtctggg catcgtgaat 1260
gaggagctgc cctccatcaa cacatacttc ctcagaata tcctggagtc ccactttaac 1320
cggatctctc tgctggagaa ggccaccaat ttctccctgc tgaagcaggc aggagatgtg 1380
gaggagaacc caggacctat ggaggccgcc gtggccgccc caaggccccg cctgctgctg 1440
ctggtgctgg cagccgccgc agcagcagca gccgccctgc tgcctggcgc cacagccctg 1500
cagtgtttct gtcacctgtg caccaaggac aactttacat gcgtgaccga tggcctgtgc 1560
ttcgtgtctg tgacagagac aacagacaag gtgatccaca atagcatgtg catcgccgag 1620
atcgacctga tccctcgga tagaccttc gtgtgcgccc catctagcaa gaccggcagc 1680
gtgaccacaa cctactgtg taaccaggat cactgcaata agatcgagct gccacaacc 1740
gtgaagtcct ctccaggcct gggacctgtg gagctggcag cagtgatcgc cggccccgtg 1800
tgcttcgtgt gcatctccct gatgtgtatg gtgtatatct gtcacaacag gacagtgaat 1860
agggcagcaa ggcacctgtg ccctccactg cctaccccat gtgcaagctc cgccatcgag 1920
tttccaggag gaaaggagac atggcagtgg atcaacctg tggacttcca ggaggaggcc 1980
tccctgcagg aggccctggt ggtggagatg tcttgggata agggcgagcg cacagagcct 2040
ctggagaaga ccgagctgcc agagggcgcc cccgaactgg cactggatac tgaactgtcc 2100
ctggaagacg gagatagatg taaagcaaaa atg 2133

```

<210> 30

<211> 2133

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 30

```

atggaagctg ctgtcgccgc tccccgacct agactgctgc tgctggtgct ggccgcccgc 60
gctgctgccg ccgccgtct gctgcccggc gccacagccc tgcagtgtt ctgtcacctg 120
tgcaccaagg acaactttac atgcgtgacc gatggcctgt gcttcgtgtc tgtgacagag 180
acaacagaca aggtgatcca caatagcatg tgcacgccc agatcgacct gatcccaagg 240
gatcgccccct tcgtgtgcgc accaagctcc aagaccggaa gcgtgaccac aacctactgc 300
tgtaaccagg atcactgcaa taagatcgag ctgccaacaa ccgtgaagtc tagccctggc 360
ctgggaccag tggagctggc agccgtgatc gccggccccg tgtgcttcgt gtgcatctcc 420
ctgatgctga tgggtgtatat ctgtcacaac aggacagtga atagggcagc aagacacctg 480
tgcccacctc tgccaacccc atgtgcatcc tctgcatcg agtttctctg cggcaaggag 540
acatggcagt ggatcaaccc agtggacttc caggaggagg ccagcctgca ggaggccctg 600
gtggtggaga tgtcctggga taagggcgag cggacagagc cactggagaa gaccgagctg 660
ccagagggag cacctgagct ggccctggac acagagctgt ccctggagga cgccgataga 720
tgcaaggcca agatggccac caacttttct ctgctgaagc aggccggcga tgtggaggag 780
aatcctggcc caatgggaag gggcctgctg aggggcctgt ggcccctgca catcgtgctg 840
tggaacaaga tcgcctccac catcccacc cactgcaga agtctgtgaa caatgacatg 900
atcgtgaccg ataacaatgg cgccgtgaag ttccctcagc tgtgcaagtt ctgtgacgtg 960

```

```

aggttttagca catgcgataa ccagaagagc tgcattgtcca attgtttctat caccagcatc 1020
tgccgagaagc cacaggaggt gtgcgtggcc gtgtggcgca agaacgacga gaatatcacc 1080
ctggagacag tgtgccacga tcccaagctg ccttaccacg actttatcct ggaggatgcc 1140
gcctccccaag agtgtatcat gaaggagaag aagaagcccc gcgagacatt cttcatgtgc 1200
tcttgttagct ccgacgagtg caacgataac atcatctttt ctgaggagta caacacaagc 1260
aatcctgacc tgctgctggt gatcttccag gtgaccggca tctctctgct gcctccactg 1320
ggcgtggcca tcagcgtgat catcatcttt tactgttata gggatgaaccg ccagaatcgg 1380
tccttcagaa ccggcatcaa gcggagaatc ctgctgctga tccccaagtg gctgtacgag 1440
gatatcccta acatgaagaa ctccaatgtg gtgaagatgc tgcaggagaa cagcgagctg 1500
atgaacaata actctagcga gcaggtgctg tatgtggacc ccatgatcac agagatcaag 1560
gagatcttca tcccagagca caagcccacc gattacaaga aggagaacac agggcccctg 1620
gagacacggg actatcccca gaacagcctg ttgataata caaccgtggt gtacatccct 1680
gacctgaaca caggctataa gcctcagatc tctaatttcc tgccagaggg ctcccacctg 1740
tctaataaca atgagatcac aagcctgacc ctgaagcccc ctgtggacag cctggattcc 1800
ggcaacaatc ccagactgca gaagcaccct aacttcgctt tttccgtgtc ctctgtgaac 1860
tctctgagca ataccatctt tctgggcgag ctgagcctga tcctgaacca gggcgagtgc 1920
agctcccccg acatccagaa cagcgtggag gaggagacaa ccatgctgct ggagaatgac 1980
tccccttctg agacaatccc agagcagacc ctgctgcccc atgagttcgt gagctgtctg 2040
ggcatcgtga acgaggagct gccttccatc aatacatact tcccacagaa catcctggag 2100
tcccacttca acagaatctc actgctggaa aag                                     2133

```

<210> 31

<211> 2226

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 31

```

atggaagctg ccgtcgtgc tccccgccct cgctgctgc tgctggctct ggctgccgcc 60
gctgctgccg ctgctgccct gctgcccggc gccacagccc tgcagtgtct ctgtcacctg 120
tgcaccaagg acaactttac atgcgtgacc gatggcctgt gcttcgtgtc tgtgacagag 180
acaacagaca aggtgatcca caatagcatg tgcacgccc agatcgacct gatcccaagg 240
gatcgcccct tcgtgtgcgc accaagctcc aagaccggat ccgtgaccac aacctactgc 300
tgtaaccagg accactgtaa taagatcgag ctgcccacaa ccgtgaagtc tagcccaggc 360
ctgggaccag tggagctggt gcctcaggtg accagcaagg cctttcagca cgatacatgg 420
aactccggcc tgaccgtggc ctctatcagc acaggccacc tgacctccga caatcggggc 480
gatatcggcc tgctgctggg catgatcgtg ttccgctgta tgctgtctat cctgagcctg 540
atcggcatct tcaaccggag ctttagaacc ggcatcaagc ggagaatcct gctgctgac 600
cccaagtggc tgtacgagga catccctaac atgaagaact ctaatgtggt gaagatgctg 660
caggagaata gcgagctgat gaacaataac tcctctgagc aggtgctgta tgtggacccc 720

```

```

atgatcacag agatcaagga gatctttatc cctgagcaca agccaaccga ttacaagaag 780
gagaacacag gccccctgga gacacgggac tatcctcaga actccctgtt tgataatata 840
accgtgggtgt acatccctga tctgaacacc ggctataagc cacagatcag caatttcctg 900
cccgagggct cccacctgtc taataacaat gagatcacat ccctgaccct gaagccccct 960
gtggacagcc tggattccgg caacaatcct cgcctgcaga agcacccaaa tttcgccctt 1020
agcgtgagct ccgtgaactc cctgtctaata accatcttcc tgggcgagct gtccctgata 1080
ctgaaccagg gcgagtgtc tagcccagac atccagaaca gcgtggagga ggagacaacc 1140
atgctgctgg agaacgacag cccatccgag acaatccccg agcagaccct gctgcccgat 1200
gagtttgtga gctgtctggg catcgtgaat gaggagctgc cttccatcaa cacatacttt 1260
ccacagaata tcctggagag ccacttcaac cggatctccc tgctggagaa ggccaccaat 1320
ttctccctgc tgaagcaggc aggagatgtg gaggagaacc caggacctat gggaaggggc 1380
ctgctgagag gcctgtggcc cctgcacatc gtgctgtgga caagaatcgc ctccaccatc 1440
ccacccacg tgcagaagtc tgtgaacaat gacatgatcg tgaccgataa caatggcgcc 1500
gtgaagttcc ctcagctgtg caagttctgt gacgtgaggt ttagcacatg cgataaccag 1560
aagtcttgca tgagcaattg ttccatcacc tctatctgcg agaagccaca ggaggtgtgc 1620
gtggccgtgt ggcgcaagaa cgacgagaat atcacctgg agacagtgtg ccacgatcct 1680
aagctgccat atcacgactt tatcctggag gatgccgcct ctccaaagtg tatcatgaag 1740
gagaagaaga agcccgcgga gacattcttt atgtgcagct gttcctctga cgagtgaac 1800
gataatatca tcttctctga ggagtacaac accagcaatc cagacctgct gctggtgata 1860
tttcaggtga gcgattggct gatcttcttt gccagcctgg gctccttcct gtctatcctg 1920
ctggtgggcg tgctgggata tctgggcctg aacagggcag caaggcacct gtgccctcca 1980
ctgccaacac cctgtgccag ctccgccatc gagtttcctg gcggcaagga gacatggcag 2040
tggatcaatc cagtggactt ccaggaggag gcctccctgc aggaggccct ggtggtggag 2100
atgtcttggg ataagggcga gaggacagag cctctggaga agaccgagct gcccaggggc 2160
gcccctgaac tggcactgga tactgaactg agcctggagg atggagatag atgtaaagca 2220
aagatg 2226

```

<210> 32

<211> 2226

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 32

```

atgggcaggg ggctgctgcg ggggctgtgg cctctgcata ttgtgctgtg gactcggatt 60
gcttcaacta ttctcctca tgtccagaag tctgtgaaca atgacatgat cgtgaccgat 120
aacaatggcg ccgtgaagtt tccccagctg tgcaagttct gtgacgtgag gtttagcaca 180
tgcgataacc agaagtcttg catgagcaat tgttccatca cctctatctg cgagaagcct 240
caggaggtgt gcgtggccgt gtggcgcaag aacgacgaga atatcacctt ggagacagtg 300
tgccacgata ctaagctgcc ataccacgac tttatcctgg aggatgccgc cagcccaaag 360

```

```

tgtatcatga aggagaagaa gaagcccggc gagacattct tcatgtgctc ctgtagctcc 420
gacgagtgcac acgataatat catcttcagc gaggagtata acacatccaa tcctgacctg 480
ctgctgggtga tctttcaggt gccacaggtg acctccaagg ccttccagca cgatacatgg 540
aactctggcc tgacctggc ctctatcagc acaggccacc tgacctccga caatcggggc 600
gatatcggcc tgctgctggg catgatcgtg tttgccgtga tgctgagcat cctgtccctg 660
atcggcacatc tcaacaggag ctttcgcacc ggcataaagc ggagaatcct gctgctgac 720
cccaagtggc tgtacgagga catccctaac atgaagaaca gcaatgtggt gaagatgctg 780
caggagaaca gcgagctgat gaacaataac tctagcgagc aggtgctgta tgtggacca 840
atgatcacag agatcaagga gatcttcac cccgagcaca agcctaccga ttacaagaag 900
gagaacacag gccccctgga gacacgggac tatectcaga actccctgtt tgataatacc 960
acagtgggtg acatccctga tctgaacaca ggctataagc cacagatctc caatttctctg 1020
cccgagggtc ctcacctgag caataacaat gagatcacat ctctgacct gaagccccct 1080
gtggactccc tggattctgg caacaatcct agactgcaga agcaccacaa tttcgccctt 1140
agcgtgtcct ctgtgaactc cctgtctaata accatcttcc tgggcgagct gtctctgac 1200
ctgaaccagg gcgagtgcag ctcccctgac atccagaata gcgtggagga ggagacaaca 1260
atgctgctgg agaacgacag cccatccgag acaatccccg agcagacct gctgccagat 1320
gagttcgtga gctgtctggg catcgtgaat gaggagctgc cttctatcaa cacatacttc 1380
ccacagaata tcctggagtc tcactttaac aggatcagcc tgctggagaa ggccaccaat 1440
ttcagcctgc tgaagcaggc aggagacgtg gaggagaacc ctggaccaat ggaggccgcc 1500
gtggccgccc ccaggcctcg cctgtgctg ctggtgctgg cagccgccgc agcagcagca 1560
gccgccctgc tgccaggagc aacagccctg cagtgtctt gtcacctgtg caccaaggac 1620
aactttacat gcgtgaccga tggcctgtgc ttcgtgagcg tgacagagac aacagataag 1680
gtgatccaca attccatgtg catcgccgag atcgacctga tcccacggga tagacccttc 1740
gtgtgcgccc catctagcaa gaccggctcc gtgaccacaa cctactgctg taaccaggac 1800
cactgtaata agatcgagct gccacaacc gtgaagtct ctcctggcct gggaccagt 1860
gagctgggtga gcgattggct gatcttctt gccagcctgg gctccttcct gtctatcctg 1920
ctggtgggcg tgctgggata tctgggcctg aacagggcag caagacacct gtgcccacca 1980
ctgccaacac catgtgcaag ctccgccatc gagtttccag gaggaaagga gacatggcag 2040
tggtatcaatc ctgtggactt ccaggaggag gcctctctgc aggaggccct ggtggtggag 2100
atgagctggg ataaggcgga gcgcacagag ccctggaga agaccgagct gcccgagggc 2160
gcccctgaac tggcactgga tactgaactg agcctggaag atggcgatag gtgtaaagca 2220
aaaatg 2226

```

<210> 33

<211> 2226

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 33

```

atggaagccg ctgtggccgc tccccgacct cgactgctgc tgctggtgct ggctgccgct 60
gctgctgccg ctgccgtctt gctgcctggc gccacagccc tgcagtgtt ctgtcacctg 120
tgcaccaagg acaactttac atgcgtgacc gatggcctgt gcttcgtgag cgtgacagag 180
acaacagaca aggtgatcca caattccatg tgcacgccc agatcgacct gatcccaagg 240
gatcgccccct tcgtgtgcgc accaagctcc aagaccggct ccgtgaccac aacctactgc 300
tgtaaccagg accactgtaa taagatcgag ctgcccacaa ccgtgaagtc tagcccaggc 360
ctgggaccag tggagctggt gagcgattgg ctgatcttct ttgcctctct gggcagcttc 420
ctgtccatcc tgctggtggg cgtgctggga tatctgggcc tgaacagggc agcaagacac 480
ctgtgcccac ctctgcccac acctgtgccc tcctctgcca tcgagtttcc tggcggcaag 540
gagacatggc agtggatcaa tccagtggac ttccaggagg aggcctccct gcaggaggcc 600
ctggtggtgg agatgtcttg ggataagggc gagaggacag agccactgga gaagaccgag 660
ctgcctgagg gagcaccaga gctggccctg gacacagagc tgtctctgga ggacggcgat 720
cgctgcaagg ccaagatggc caccaacttt agcctgctga agcaggccgg cgatgtggag 780
gagaatcctg gaccaatggg aaggggcctg ctgagaggcc tgtggcctct gcacatcgtg 840
ctgtggacac ggatcgccct taccatccca cccacgtgc agaagagcgt gaacaatgac 900
atgatcgtga ccgataacaa tggcgccgtg aagttccctc agctgtgcaa gttctgtgac 960
gtgcggttta gcacatgca taaccagaag tcttgcatga gcaattgttc catcacctct 1020
atctgcgaga agccacagga ggtgtgcgtg gccgtgtgga gaaagaacga cgagaatata 1080
accctggaga cagtgtgcca cgatcctaag ctgccatacc acgactttat cctggaggat 1140
gccgcctctc ccaagtgtat catgaaggag aagaagaagc ctggcgagac attcttcatg 1200
tgcagctgta gctccgacga gtgtaacgat aatatcatct tcagcgagga gtataacaca 1260
tccaatccag acctgctgct ggtgatcttt caggtgcccc aggtgaccag caaggccttc 1320
cagcacgata catggaactc cggcctgacc gtggcctcta tcagcacagg ccacctgacc 1380
tccgacaata ggggcgatat cggcctgctg ctgggcatga tcgtgtttgc cgtgatgctg 1440
agcatcctgt ccctgatcgg catcttcaac aggagcttcc gcaccggcat caagcggaga 1500
atcctgctgc tgatccctaa gtggctgtac gaggacatcc caaacatgaa gaactctaata 1560
gtggtgaaga tgctgcagga gaatagcgag ctgatgaaca ataactctag cgagcagggtg 1620
ctgtatgtgg accccatgat cacagagatc aaggagatct tcatccccga gcacaagcct 1680
accgattaca agaaggagaa cacaggcccc ctggagacac gggactatcc tcagaactcc 1740
ctgtttgata atacaaccgt ggtgtacatc cctgatctga acaccggcta taagccacag 1800
atcagcaatt tcctgcccga gggctctcac ctgagcaata acaatgagat cacatccctg 1860
accctgaagc ctccagtgga ctccctggat tctggcaaca atcctcgcct gcagaagcac 1920
ccaaacttcg cttttagcgt gtcctctgtg aactccctgt ctaataccat ctttctgggc 1980
gagctgtccc tgatcctgaa ccagggcgag tgcagctccc ccgacatcca gaacagcgtg 2040
gaggaggaga caaccatgct gctggagaat gacagcccat ccgagacaat ccccgagcag 2100
accctgctgc ccgatgagtt cgtgtcctgt ctgggcatcg tgaacgagga gctgccttct 2160
atcaatacat acttccctca gaacatcctg gagagccact tcaatagaat tagcctgctg 2220
gagaaa 2226

```

<210> 34

<211> 2226

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 34

```

atggaagctg ccgtggctgc tccaagacct agactgctgc tgctgggtgct ggccgccgcc 60
gccgccgctg ccgtgccct gctgcccggc gccacagccc tgcagtgtt ctgtcacctg 120
tgcaccaagg acaactttac atgcgtgacc gatggcctgt gcttcgtgtc tgtgacagag 180
acaacagaca aggtgatcca caatagcatg tgcacgccc agatcgacct gatcccaagg 240
gatcgcccct tcgtgtgcgc accaagctcc aagaccggt ccgtgaccac aacctactgc 300
tgtaaccagg accactgtaa taagatcgag ctgccacaa ccgtgaagtc tagcccaggc 360
ctgggaccag tggagctggt gcctcaggtg accagcaagg ctttcagca cgatacatgg 420
aactccggcc tgaccgtggc ctctatcagc acaggccacc tgacctcca caatcggggc 480
gatatcggcc tgctgctggg catgatcgtg ttccgctga tgctgtctat cctgagcctg 540
atcggcatct tcaaccggag ctttagaacc ggcatcaagc ggagaatcct gctgctgac 600
cccaagtggc tgtttgagga catccctaac atgaagaact ctaatgtggt gaagatgctg 660
caggagaata gcgagctgat gaacaataac tcctctgagc aggtgctgtt cgtggacccc 720
atgatcacag agatcaagga gatctttatc cctgagcaca agccaaccga tttcaagaag 780
gagaacacag gccccctgga gacacgggac ttccctcaga actccctgtt tgataataca 840
accgtggtgt tcatccctga tctgaacacc ggcttcaagc cacagatcag caattttctg 900
cccgagggct cccacctgtc taataacaat gagatcacat ccctgaccct gaagccccct 960
gtggacagcc tggattccgg caacaatcct cgctgcaga agcacccaaa tttcgcttt 1020
agcgtgagct ccgtgaactc cctgtctaata accatctttc tgggcgagct gtccctgac 1080
ctgaaccagg gcgagtgtc tagcccagac atccagaaca gcgtggagga ggagacaacc 1140
atgctgctgg agaacgacag cccatccgag acaatccccg agcagaccct gctgcccgat 1200
gagttcgtga gctgtctggg catcgtgaat gaggagctgc cttccatcaa cacattcttt 1260
ccacagaata tcctggagag ccactttaac cggatctccc tgctggagaa ggccaccaat 1320
ttctccctgc tgaagcaggc aggagatgtg gaggagaacc caggacctat gggaaggggc 1380
ctgctgagag gcctgtggcc cctgcacatc gtgctgtgga caagaatcgc ctccaccatc 1440
ccaccccacg tgcagaagtc tgtgaacaat gacatgatcg tgaccgataa caatggcgcc 1500
gtgaagtcc ctcagctgtg caagttctgt gacgtgaggt ttagcacatg cgataaccag 1560
aagtcttgca tgagcaattg ttccatcacc tctatctgcg agaagccaca ggaggtgtgc 1620
gtggccgtgt ggcgcaagaa cgacgagaat atcacctgg agacagtgtg ccacgatcct 1680
aagctgccat atcacgactt tatcctggag gatgccgct ctccaaagtg tatcatgaag 1740
gagaagaaga agccggcgga gacattcttt atgtgcagct gttcctctga cgagtgaac 1800
gataatatca tcttctctga ggagtacaac accagcaatc cagacctgct gctggtgatc 1860
tttcaggtag gcgattggct gatcttcttt gccagcctgg gctccttct gtctatcctg 1920
ctggtgggag tgctgggata tctgggcctg aacagggcag caaggcacct gtgccctcca 1980

```

ctgccaacac cctgtgccag ctccgccatc gagtttcctg gcggcaagga gacatggcag 2040
 tggatcaatc cagtggactt ccaggaggag gcctccctgc aggaggccct ggtggtggag 2100
 atgtcttggg ataagggcga gaggacagag cctctggaga agaccgagct gcccaggggc 2160
 gcccctgagc tggcactgga caccgaactg agtctggagg atggcgaccg ctgtaaggct 2220
 aaaatg 2226

<210> 35

<211> 1239

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 35

atggaagccg ccgtcgccgc tccccgccca agactgctgc tgctggctcct ggccgctgcc 60
 gctgctgccg ccgccgcact gctgccccgc gccacagccc tgcagtgtt ctgtcacctg 120
 tgcaccaagg acaacttcac ctgcgtgacc gatggcctgt gcttcgtgtc cgtgacagag 180
 acaacagaca aggtgatcca caactctatg tgcacgccc agatcgacct gatcccaagg 240
 gatcgccccct tcgtgtgcgc acctagctcc aagaccggct ccgtgaccac aacctactgc 300
 tgtaaccagg accactgtaa taagatcgag ctgcccacaa ccgtgaagtc tagcccaggc 360
 ctgggaccag tggagctggt gcctcaggtg acctctaagg ccttcagca cgatacatgg 420
 aatagcggcc tgaccgtggc cagcatctcc acaggccacc tgacctctga caacaggggc 480
 gatatcggcc tgctgctggg catgatcgtg tttgccgtga tgctgtctat cctgagcctg 540
 atcggcatct tcaaccggag ctttagaaca ggcatcaagc ggagagccac caatttctcc 600
 ctgctgaagc aggcaggaga tgtggaggag aaccctggac caatgggaag gggcctgctg 660
 aggggcctgt ggccactgca catcgtgctg tggacacgga tcgccagcac catccccct 720
 cacgtgcaga agtccgtgaa caatgacatg atcgtgaccg ataacaatgg cgccgtgaag 780
 tttccacagc tgtgcaagtt ctgtgacgtg cggtttagca catgcgataa ccagaagtcc 840
 tgcattgtcta attgtagcat cacctccatc tgcgagaagc cacaggaggt gtgcgtggcc 900
 gtgtggagaa agaacgacga gaatatcacc ctggagacag tgtgccacga tcctaagctg 960
 ccataccacg actttatcct ggaggatgcc gcctctccta agtgtatcat gaaggagaag 1020
 aagaagccag gcgagacatt ctttatgtgc agctgttctt ctgacgagtg caacgataat 1080
 atcatcttct ccgaggagta taacacctct aatcccgacc tgctgctggt gatctttcag 1140
 gtgtccgatt ggctgatctt ctttgccctt ctgggcagct tcctgtccat cctgctggtg 1200
 ggggtcctgg gctacctggg gctgaatcgg gctgctcgg 1239

<210> 36

<211> 491

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 36

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

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu			
305	310	315	320
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr			
	325	330	335
Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe			
	340	345	350
Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg			
	355	360	365
Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser			
370	375	380	
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr			
385	390	395	400
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys			
	405	410	415
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn			
	420	425	430
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu			
	435	440	445
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly			
450	455	460	
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr			
465	470	475	480
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	485	490	

<210> 37

<211> 1257

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 37

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

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

370	375	380
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
385	390	395
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		400
405	410	415
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn		
420	425	430
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu		
435	440	445
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly		
450	455	460
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr		
465	470	475
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Val Asn Gly Ser Gly		480
485	490	495
Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn		
500	505	510
Pro Gly Pro Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu		
515	520	525
Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro		
530	535	540
Gly Ala Thr Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn		
545	550	555
Phe Thr Cys Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr		
565	570	575
Thr Asp Lys Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu		
580	585	590
Ile Pro Arg Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly		
595	600	605
Ser Val Thr Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile		
610	615	620
Glu Leu Pro Thr Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu		
625	630	635
Leu Val Ser Asp Trp Leu Ile Phe Phe Ala Ser Leu Gly Ser Phe Leu		
645	650	655
Ser Ile Leu Leu Val Gly Val Leu Gly Tyr Leu Gly Leu Asn Arg Ala		
660	665	670
Ala Arg His Leu Cys Pro Pro Leu Pro Thr Pro Cys Ala Ser Ser Ala		
675	680	685

Ile Glu Phe Pro Gly Gly Lys Glu Thr Trp Gln Trp Ile Asn Pro Val		
690	695	700
Asp Phe Gln Glu Glu Ala Ser Leu Gln Glu Ala Leu Val Val Glu Met		
705	710	715 720
Ser Trp Asp Lys Gly Glu Arg Thr Glu Pro Leu Glu Lys Thr Glu Leu		
	725	730 735
Pro Glu Gly Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp Thr Glu Leu Ser Leu Glu		
	740	745 750
Asp Gly Asp Arg Cys Lys Ala Lys Met Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu		
	755	760 765
Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Arg Gly		
	770	775 780
Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu Trp Thr Arg Ile		
785	790	795 800
Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met		
	805	810 815
Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys		
	820	825 830
Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met		
	835	840 845
Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys		
850	855	860
Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val		
865	870	875 880
Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala		
	885	890 895
Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr		
	900	905 910
Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile		
	915	920 925
Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu Leu Leu Val Ile		
	930	935 940
Phe Gln Val Pro Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp		
945	950	955 960
Asn Ser Gly Leu Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser		
	965	970 975
Asp Asn Arg Gly Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala		
	980	985 990
Val Met Leu Ser Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe		

995	1000	1005
Arg Thr Gly Ile Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu		
1010	1015	1020
Tyr Glu Asp Ile Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu		
1025	1030	1035
Gln Glu Asn Ser Glu Leu Met Asn Asn Asn Ser Ser Glu Gln Val Leu		1040
	1045	1050
Tyr Val Asp Pro Met Ile Thr Glu Ile Lys Glu Ile Phe Ile Pro Glu		1055
	1060	1065
His Lys Pro Thr Asp Tyr Lys Lys Glu Asn Thr Gly Pro Leu Glu Thr		1070
	1075	1080
Arg Asp Tyr Pro Gln Asn Ser Leu Phe Asp Asn Thr Thr Val Val Tyr		1085
	1090	1095
Ile Pro Asp Leu Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile Ser Asn Phe Leu		1100
	1105	1110
Pro Glu Gly Ser His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr		1115
	1125	1130
Leu Lys Pro Pro Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn Asn Pro Arg Leu		1135
	1140	1145
Gln Lys His Pro Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu		1150
	1155	1160
Ser Asn Thr Ile Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly		1165
	1170	1175
Glu Cys Ser Ser Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr		1180
	1185	1190
Met Leu Leu Glu Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr		1195
	1205	1210
Leu Leu Pro Asp Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu		1215
	1220	1225
Leu Pro Ser Ile Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His		1230
	1235	1240
Phe Asn Arg Ile Ser Leu Leu Glu Lys		1245
	1250	1255

<210> 38

<211> 3771

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 38

```

atggccctgc ctgtgaccgc tctgtctgtg cctctggctc tgctgtgca cgctgcccgc 60
cctgacattg tgatgacca gtctcccctg tccctgccag tgaccctgg agagccagcc 120
tccatctctt gcaggagctc ccagaccatc gtgcacagca acggcaatac atacctggag 180
tggtatctgc agaagcccgg ccagtcccct cagctgtga tctacaaggt gtctaacagg 240
ttcagcggag tgccagaccg ctttagcgga tccggatctg gcaccgattt cactactgaag 300
atctctagag tggaggccga ggacgtgggc gtgtactatt gcttccaggt gagccacgtg 360
ccatatacct ttggcggcgg cacaagctg gagatcaagg gcagcacctc cggatctggc 420
aagccaggat ccggagaggg atctacaaag ggacaggtgc agctggtgca gagcggagca 480
gaggtgaaga agcctggagc cagcgtgaag gtgtcctgta aggcctctgg ctacaccttc 540
acagactatg agatgcactg ggtgcggcag gcaaccggac agggcctgga gtggatggga 600
ggaatcgacc cagagacagg caacacagcc tactcccaga agtttaaggg ccgggtgacc 660
atgacaagaa ataccagcat ctccacagcc tatatggagc tgtctagcct gagatctgag 720
gatacagccg tgtactattg tgctcgtac tattcctttg cctactgggg acaggggaca 780
ctggtcaccg tctcatcaac tagtaccag acgccagcg cgcgaccacc aacaccggcg 840
cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg 900
ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc gcctgtgata tctacatctg ggcgcccttg 960
gccgggactt gtggggtcct tctcctgtca ctggttatca ccctttactg caaacggggc 1020
agaaagaaac tcctgtatat attcaaaca ccatttatga gaccagtaca aactactcaa 1080
gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga 1140
gtgaagttca gcaggagcgc agacgcccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat 1200
aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg 1260
gaccctgaga tggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa 1320
ctgcagaaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg 1380
aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 1440
gacgcccttc acatgcaggc cctgccccct cgcgttaacg gcagcggagc taaaaacttc 1500
agtcttctaa aacaggctgg tgacgtggag gagaatcccc gccctatgga ggccgccgtg 1560
gcggctcctc ggccccgcct cctcctgtg gtgtggccg cagctgtgctc cgccgcggct 1620
gccttgctgc ctggcgccac cgcgtgcag tgcttttgct acctatgcac taaggacaac 1680
ttcacctgcg tgaccgacgg cctgtgcttc gtgtccgtaa cagagactac cgataaagtg 1740
attcacaact ccatgtgcat cgccgagatt gacctgatcc cgcgcgaccg ccccttcgtc 1800
tgtgtccct catccaagac cggcagcgtc accacaactt actgctgcaa ccaggaccac 1860
tgtaacaaga tcgagctgcc cacaacagtc aaatcctctc ctggattggg acccgtggag 1920
ctggtgagtg actggttgat cttctttgct agcctaggt ccttcttaag catccttctt 1980
gtgggcgtcc tgggttacct gggactgaac cgcgtgcgc gccacctgtg ccgcctctg 2040
ccaaccccc ctgcctcctc ggccatcgag ttccccggg ggaaggagac ctggcaatgg 2100
atcaatccag tagactttca ggaggaggca tcgctgcagg aggtcttggt ggtggagatg 2160
agttgggaca aggtgaacg gaccgaacca ctcgagaaaa ccgagctgcc agaaggtgcg 2220
ccggagctgg ccctggatac tgagctttca ctggaggacg gcgacaggtg taaggccaaa 2280

```

```

atggccacca actttagcct gctgaaacag gccggtgatg tggaggagaa tccgggcccc 2340
atgggcccgcg gcctcctacg tggactgtgg cccttgacac tctgtctttg gacccgcac 2400
gcttctacca tcccacctca tgtgcagaag agcgtaata acgacatgat cgtcactgat 2460
aacaacgggg cggtgaagtt ccctcagctg tgcaagttct gtgatgtacg cttctctact 2520
tgcgacaacc agaagagttg tatgtctaac tgctctatta cttctatctg cgagaagccc 2580
caggaggtct gcgtggccgt ttggaggaag aatgacgaga acatcactct ggagacagta 2640
tgccatgata cgaagctgcc ctatcatgac ttcacctcgg aggatgccgc aagccctaag 2700
tgcacatga agagaagaa gaagccgggg gagaccttct tcatgtgctc ctgctcttcc 2760
gatgagtga acgacaacat catcttttcc gaggagtaca acacttccaa ccccgatctg 2820
ctgttggtga ttttccaggt gccgcaggtc acctccaagg cgttccagca tgacacctgg 2880
aacagcggac taaccgtggc tagcatcagc accggccact tgacctccga caaccgagg 2940
gacatcggcc tgctactcgg aatgatcgtg ttccggtga tgctctccat cctctctctc 3000
atcggcatct tcaaccgcag cttccgcacc ggtattaaga ggagaattct gcttctcacc 3060
cccaaattgt tatacgagga catccccaac atgaaaaaca gcaacgtggt caagatgctg 3120
caggagaatt cggagctgat gaacaataac tcatcggagc aggttctgta cgtggaccgc 3180
atgatcacgg aaataaagga gatcttcac cctgagcaca agcctaccga ctacaagaaa 3240
gagaataaccg gcccgttga gactcgtgac tatcctcaga actctctgtt cgacaacacg 3300
acggtggtgt acattcccga cttgaacacg ggctacaaac ccaaatttc caacttcctg 3360
cctgagggca gtcacctgtc caacaacaac gaaatcacct ccctgacct gaagccaccg 3420
gtcgactcct tggacagcgg caacaacccc cgactccaga agcaccctaa ttttgctttt 3480
tccgtgtcct ccgtcaactc cctctcaaat accatcttcc tcggcgagct ctccctgac 3540
ctgaatcagg gcgaatgttc gtccccggac atccagaact ctgtggagga ggagaccacg 3600
atgcttctgg agaacgacag cccgtccgag accatccccg agcagacgct tctgcccacg 3660
gagttcgtga gttgcctggg cattgtgaac gaggaactgc cttctattaa cacctacttc 3720
cctcagaaca tactggagag ccactttaac cgtatctcgc tattggagaa g 3771

```

<210> 39

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 39

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> 40

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 40

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

35 40 45

<210> 41

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 41

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 42

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 42

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 43

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 43

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln 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> 44

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 44

gaattc 6

<210> 45

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 45

actagt 6

<210> 46

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 46

gttaac	6
<210> 47	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成构建体	
<400> 47	
acgcgt	6
<210> 48	
<211> 19	
<212> PRT	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成构建体	
<400> 48	
Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn	
1 5 10 15	
Pro Gly Pro	
<210> 49	
<211> 406	
<212> PRT	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成构建体	
<400> 49	
Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val	
1 5 10 15	
Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr	
20 25 30	
Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys	
35 40 45	
Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys	
50 55 60	
Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg	
65 70 75 80	
Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr	
85 90 95	
Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro	

			100				105				110				
Thr	Thr	Val	Lys	Ser	Ser	Pro	Gly	Leu	Gly	Pro	Val	Glu	Leu	Ala	Ala
			115				120				125				
Val	Ile	Ala	Gly	Pro	Val	Cys	Phe	Val	Cys	Ile	Ser	Leu	Met	Leu	Met
			130				135				140				
Val	Tyr	Ile	Cys	His	Asn	Arg	Thr	Val	Asn	Arg	Ser	Phe	Arg	Thr	Gly
145			150				155				160				
Ile	Lys	Arg	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Ile	Pro	Lys	Trp	Leu	Tyr	Glu	Asp
			165				170				175				
Ile	Pro	Asn	Met	Lys	Asn	Ser	Asn	Val	Val	Lys	Met	Leu	Gln	Glu	Asn
			180				185				190				
Ser	Glu	Leu	Met	Asn	Asn	Asn	Ser	Ser	Glu	Gln	Val	Leu	Tyr	Val	Asp
			195				200				205				
Pro	Met	Ile	Thr	Glu	Ile	Lys	Glu	Ile	Phe	Ile	Pro	Glu	His	Lys	Pro
210			215				220								
Thr	Asp	Tyr	Lys	Lys	Glu	Asn	Thr	Gly	Pro	Leu	Glu	Thr	Arg	Asp	Tyr
225			230				235				240				
Pro	Gln	Asn	Ser	Leu	Phe	Asp	Asn	Thr	Thr	Val	Val	Tyr	Ile	Pro	Asp
			245				250				255				
Leu	Asn	Thr	Gly	Tyr	Lys	Pro	Gln	Ile	Ser	Asn	Phe	Leu	Pro	Glu	Gly
			260				265				270				
Ser	His	Leu	Ser	Asn	Asn	Asn	Glu	Ile	Thr	Ser	Leu	Thr	Leu	Lys	Pro
275			280				285								
Pro	Val	Asp	Ser	Leu	Asp	Ser	Gly	Asn	Asn	Pro	Arg	Leu	Gln	Lys	His
290			295				300								
Pro	Asn	Phe	Ala	Phe	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Asn	Ser	Leu	Ser	Asn	Thr
305			310				315				320				
Ile	Phe	Leu	Gly	Glu	Leu	Ser	Leu	Ile	Leu	Asn	Gln	Gly	Glu	Cys	Ser
			325				330				335				
Ser	Pro	Asp	Ile	Gln	Asn	Ser	Val	Glu	Glu	Glu	Thr	Thr	Met	Leu	Leu
			340				345				350				
Glu	Asn	Asp	Ser	Pro	Ser	Glu	Thr	Ile	Pro	Glu	Gln	Thr	Leu	Leu	Pro
			355				360				365				
Asp	Glu	Phe	Val	Ser	Cys	Leu	Gly	Ile	Val	Asn	Glu	Glu	Leu	Pro	Ser
370			375				380								
Ile	Asn	Thr	Tyr	Phe	Pro	Gln	Asn	Ile	Leu	Glu	Ser	His	Phe	Asn	Arg
385			390				395				400				
Ile	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys										
405															

<210> 50

<211> 286

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 50

```

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

```

Glu Lys Thr Glu Leu Pro Glu Gly Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp Thr
 260 265 270
 Glu Leu Ser Leu Glu Asp Gly Asp Arg Cys Lys Ala Lys Met
 275 280 285
 <210> 51
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 51
 Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr
 20 25 30
 Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys
 35 40 45
 Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys
 50 55 60
 Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg
 65 70 75 80
 Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr
 85 90 95
 Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro
 100 105 110
 Thr Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu Leu Ala Ala
 115 120 125
 Val Ile Ala Gly Pro Val Cys Phe Val Cys Ile Ser Leu Met Leu Met
 130 135 140
 Val Tyr Ile Cys His Asn Arg Thr Val Asn Arg Ala Ala Arg His Leu
 145 150 155 160
 Cys Pro Pro Leu Pro Thr Pro Cys Ala Ser Ser Ala Ile Glu Phe Pro
 165 170 175
 Gly Gly Lys Glu Thr Trp Gln Trp Ile Asn Pro Val Asp Phe Gln Glu
 180 185 190
 Glu Ala Ser Leu Gln Glu Ala Leu Val Val Glu Met Ser Trp Asp Lys
 195 200 205
 Gly Glu Arg Thr Glu Pro Leu Glu Lys Thr Glu Leu Pro Glu Gly Ala
 210 215 220

Pro Glu Leu Ala Leu Asp Thr Glu Leu Ser Leu Glu Asp Gly Asp Arg
 225 230 235 240
 Cys Lys Ala Lys Met
 245
 <210> 52
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 52
 Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu
 1 5 10 15
 Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val
 20 25 30
 Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
 35 40 45
 Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln
 50 55 60
 Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro
 65 70 75 80
 Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr
 85 90 95
 Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile
 100 105 110
 Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys
 115 120 125
 Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn
 130 135 140
 Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu
 145 150 155 160
 Leu Leu Val Ile Phe Gln Val Thr Gly Ile Ser Leu Leu Pro Pro Leu
 165 170 175
 Gly Val Ala Ile Ser Val Ile Ile Ile Phe Tyr Cys Tyr Arg Val Asn
 180 185 190
 Arg Gln Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile Lys Arg Arg Ile Leu Leu
 195 200 205
 Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile Pro Asn Met Lys Asn Ser
 210 215 220

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

<210> 53

<211> 437

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 53

Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val			
1	5	10	15
Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr			
	20	25	30

Ala	Leu	Gln	Cys	Phe	Cys	His	Leu	Cys	Thr	Lys	Asp	Asn	Phe	Thr	Cys
35							40					45			
Val	Thr	Asp	Gly	Leu	Cys	Phe	Val	Ser	Val	Thr	Glu	Thr	Thr	Asp	Lys
50							55					60			
Val	Ile	His	Asn	Ser	Met	Cys	Ile	Ala	Glu	Ile	Asp	Leu	Ile	Pro	Arg
65						70					75				80
Asp	Arg	Pro	Phe	Val	Cys	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Thr	Gly	Ser	Val	Thr
				85						90				95	
Thr	Thr	Tyr	Cys	Cys	Asn	Gln	Asp	His	Cys	Asn	Lys	Ile	Glu	Leu	Pro
			100							105				110	
Thr	Thr	Val	Lys	Ser	Ser	Pro	Gly	Leu	Gly	Pro	Val	Glu	Leu	Val	Pro
			115							120				125	
Gln	Val	Thr	Ser	Lys	Ala	Phe	Gln	His	Asp	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Leu
						135								140	
Thr	Val	Ala	Ser	Ile	Ser	Thr	Gly	His	Leu	Thr	Ser	Asp	Asn	Arg	Gly
145						150					155				160
Asp	Ile	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Met	Ile	Val	Phe	Ala	Val	Met	Leu	Ser
						165					170				175
Ile	Leu	Ser	Leu	Ile	Gly	Ile	Phe	Asn	Arg	Ser	Phe	Arg	Thr	Gly	Ile
						180								190	
Lys	Arg	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Ile	Pro	Lys	Trp	Leu	Tyr	Glu	Asp	Ile
								200						205	
Pro	Asn	Met	Lys	Asn	Ser	Asn	Val	Val	Lys	Met	Leu	Gln	Glu	Asn	Ser
						215								220	
Glu	Leu	Met	Asn	Asn	Asn	Ser	Ser	Glu	Gln	Val	Leu	Tyr	Val	Asp	Pro
225						230					235				240
Met	Ile	Thr	Glu	Ile	Lys	Glu	Ile	Phe	Ile	Pro	Glu	His	Lys	Pro	Thr
						245					250				255
Asp	Tyr	Lys	Lys	Glu	Asn	Thr	Gly	Pro	Leu	Glu	Thr	Arg	Asp	Tyr	Pro
						260					265			270	
Gln	Asn	Ser	Leu	Phe	Asp	Asn	Thr	Thr	Val	Val	Tyr	Ile	Pro	Asp	Leu
						275								285	
Asn	Thr	Gly	Tyr	Lys	Pro	Gln	Ile	Ser	Asn	Phe	Leu	Pro	Glu	Gly	Ser
						295								300	
His	Leu	Ser	Asn	Asn	Asn	Glu	Ile	Thr	Ser	Leu	Thr	Leu	Lys	Pro	Pro
305						310					315				320
Val	Asp	Ser	Leu	Asp	Ser	Gly	Asn	Asn	Pro	Arg	Leu	Gln	Lys	His	Pro
						325					330				335
Asn	Phe	Ala	Phe	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Asn	Ser	Leu	Ser	Asn	Thr	Ile

340	345	350
Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser Ser		
355	360	365
Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu Glu		
370	375	380
Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro Asp		
385	390	395
Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser Ile		
405	410	415
Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn Arg Ile		
420	425	430
Ser Leu Leu Glu Lys		
435		
<210> 54		
<211> 286		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成构建体		
<400> 54		
Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu		
1	5	10
Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val		
20	25	30
Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro		
35	40	45
Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln		
50	55	60
Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro		
65	70	75
Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr		
85	90	95
Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile		
100	105	110
Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys		
115	120	125
Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn		
130	135	140
Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu		

145	150	155	160
Leu Leu Val Ile Phe Gln Val Ser Asp Trp Leu Ile Phe Phe Ala Ser			
	165	170	175
Leu Gly Ser Phe Leu Ser Ile Leu Leu Val Gly Val Leu Gly Tyr Leu			
	180	185	190
Gly Leu Asn Arg Ala Ala Arg His Leu Cys Pro Pro Leu Pro Thr Pro			
	195	200	205
Cys Ala Ser Ser Ala Ile Glu Phe Pro Gly Gly Lys Glu Thr Trp Gln			
	210	215	220
Trp Ile Asn Pro Val Asp Phe Gln Glu Glu Ala Ser Leu Gln Glu Ala			
225	230	235	240
Leu Val Val Glu Met Ser Trp Asp Lys Gly Glu Arg Thr Glu Pro Leu			
	245	250	255
Glu Lys Thr Glu Leu Pro Glu Gly Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp Thr			
	260	265	270
Glu Leu Ser Leu Glu Asp Gly Asp Arg Cys Lys Ala Lys Met			
	275	280	285
<210> 55			
<211> 477			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 55			
Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu			
1	5	10	15
Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val			
	20	25	30
Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro			
	35	40	45
Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln			
	50	55	60
Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro			
65	70	75	80
Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr			
	85	90	95
Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile			
	100	105	110
Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys			

115	120	125
Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn		
130	135	140
Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu		
145	150	155
Leu Leu Val Ile Phe Gln Val Pro Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln		
165	170	175
His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly		
180	185	190
His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met		
195	200	205
Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe		
210	215	220
Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile		
225	230	235
Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val		
245	250	255
Val Lys Met Leu Gln Glu Asn Ser Glu Leu Met Asn Asn Asn Ser Ser		
260	265	270
Glu Gln Val Leu Tyr Val Asp Pro Met Ile Thr Glu Ile Lys Glu Ile		
275	280	285
Phe Ile Pro Glu His Lys Pro Thr Asp Tyr Lys Lys Glu Asn Thr Gly		
290	295	300
Pro Leu Glu Thr Arg Asp Tyr Pro Gln Asn Ser Leu Phe Asp Asn Thr		
305	310	315
Thr Val Val Tyr Ile Pro Asp Leu Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile		
325	330	335
Ser Asn Phe Leu Pro Glu Gly Ser His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile		
340	345	350
Thr Ser Leu Thr Leu Lys Pro Pro Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn		
355	360	365
Asn Pro Arg Leu Gln Lys His Pro Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser		
370	375	380
Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr Ile Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile		
385	390	395
Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser Ser Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu		
405	410	415
Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu Glu Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile		
420	425	430

Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro Asp Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile
 435 440 445
 Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser Ile Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile
 450 455 460
 Leu Glu Ser His Phe Asn Arg Ile Ser Leu Leu Glu Lys
 465 470 475
 <210> 56
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 56
 Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr
 20 25 30
 Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys
 35 40 45
 Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys
 50 55 60
 Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg
 65 70 75 80
 Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr
 85 90 95
 Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro
 100 105 110
 Thr Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu Leu Val Ser
 115 120 125
 Asp Trp Leu Ile Phe Phe Ala Ser Leu Gly Ser Phe Leu Ser Ile Leu
 130 135 140
 Leu Val Gly Val Leu Gly Tyr Leu Gly Leu Asn Arg Ala Ala Arg His
 145 150 155 160
 Leu Cys Pro Pro Leu Pro Thr Pro Cys Ala Ser Ser Ala Ile Glu Phe
 165 170 175
 Pro Gly Gly Lys Glu Thr Trp Gln Trp Ile Asn Pro Val Asp Phe Gln
 180 185 190
 Glu Glu Ala Ser Leu Gln Glu Ala Leu Val Val Glu Met Ser Trp Asp
 195 200 205

Lys Gly Glu Arg Thr Glu Pro Leu Glu Lys Thr Glu Leu Pro Glu Gly
 210 215 220
 Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp Thr Glu Leu Ser Leu Glu Asp Gly Asp
 225 230 235 240
 Arg Cys Lys Ala Lys Met
 245

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 57

Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 58

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 58

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Val
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 115 120 125

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

130	135	140
Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr		
145	150	155
Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu		
	165	170
Trp Met Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln		
	180	185
Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr		
	195	200
Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
210	215	220
Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
225	230	235
Val Thr Val Ser Ser		
	245	

<210> 59

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 59

gccgccacc

9

<210> 60

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 60

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> 61

<211> 1

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> 1
<223> 可以任何整数的重复序列存在
<400> 61
Gly
1
<210> 62
<211> 2
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (2)
<223> 可以任何整数的重复序列存在
<400> 62
Gly Ser
1
<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (5)
<223> 可以任何整数的重复序列存在
<400> 63
Gly Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 64
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (5)

<223> 可以任何整数的重复序列存在

<400> 64

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 65

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (4)

<223> 可以任何整数的重复序列存在

<400> 65

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 66

<211> 503

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 66

Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val

1 5 10 15

Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr

20 25 30

Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys

35 40 45

Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys

50 55 60

Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg

65 70 75 80

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

85							90						95			
Thr	Thr	Tyr	Cys	Cys	Asn	Gln	Asp	His	Cys	Asn	Lys	Ile	Glu	Leu	Pro	
100							105						110			
Thr	Thr	Val	Lys	Ser	Ser	Pro	Gly	Leu	Gly	Pro	Val	Glu	Leu	Ala	Ala	
115							120						125			
Val	Ile	Ala	Gly	Pro	Val	Cys	Phe	Val	Cys	Ile	Ser	Leu	Met	Leu	Met	
130							135						140			
Val	Tyr	Ile	Cys	His	Asn	Arg	Thr	Val	Ile	His	His	Arg	Val	Pro	Asn	
145							150						155			
Glu	Glu	Asp	Pro	Ser	Leu	Asp	Arg	Pro	Phe	Ile	Ser	Glu	Gly	Thr	Thr	
165							170						175			
Leu	Lys	Asp	Leu	Ile	Tyr	Asp	Met	Thr	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	
180							185						190			
Leu	Pro	Leu	Leu	Val	Gln	Arg	Thr	Ile	Ala	Arg	Thr	Ile	Val	Leu	Gln	
195							200						205			
Glu	Ser	Ile	Gly	Lys	Gly	Arg	Phe	Gly	Glu	Val	Trp	Arg	Gly	Lys	Trp	
210							215						220			
Arg	Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Val	Lys	Ile	Phe	Ser	Ser	Arg	Glu	Glu	Arg	
225							230						235			
Ser	Trp	Phe	Arg	Glu	Ala	Glu	Ile	Tyr	Gln	Thr	Val	Met	Leu	Arg	His	
245							250						255			
Glu	Asn	Ile	Leu	Gly	Phe	Ile	Ala	Ala	Asp	Asn	Lys	Asp	Asn	Gly	Thr	
260							265						270			
Trp	Thr	Gln	Leu	Trp	Leu	Val	Ser	Asp	Tyr	His	Glu	His	Gly	Ser	Leu	
275							280						285			
Phe	Asp	Tyr	Leu	Asn	Arg	Tyr	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Gly	Met	Ile	Lys	
290							295						300			
Leu	Ala	Leu	Ser	Thr	Ala	Ser	Gly	Leu	Ala	His	Leu	His	Met	Glu	Ile	
305							310						315			
Val	Gly	Thr	Gln	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Ala	His	Arg	Asp	Leu	Lys	Ser	
325							330						335			
Lys	Asn	Ile	Leu	Val	Lys	Lys	Asn	Gly	Thr	Cys	Cys	Ile	Ala	Asp	Leu	
340							345						350			
Gly	Leu	Ala	Val	Arg	His	Asp	Ser	Ala	Thr	Asp	Thr	Ile	Asp	Ile	Ala	
355							360						365			
Pro	Asn	His	Arg	Val	Gly	Thr	Lys	Arg	Tyr	Met	Ala	Pro	Glu	Val	Leu	
370							375						380			
Asp	Asp	Ser	Ile	Asn	Met	Lys	His	Phe	Glu	Ser	Phe	Lys	Arg	Ala	Asp	
385							390						395			
													400			

Ile Tyr Ala Met Gly Leu Val Phe Trp Glu Ile Ala Arg Arg Cys Ser
 405 410 415
 Ile Gly Gly Ile His Glu Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Val
 420 425 430
 Pro Ser Asp Pro Ser Val Glu Glu Met Arg Lys Val Val Cys Glu Gln
 435 440 445
 Lys Leu Arg Pro Asn Ile Pro Asn Arg Trp Gln Ser Cys Glu Ala Leu
 450 455 460
 Arg Val Met Ala Lys Ile Met Arg Glu Cys Trp Tyr Ala Asn Gly Ala
 465 470 475 480
 Ala Arg Leu Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ser Gln Leu Ser
 485 490 495
 Gln Gln Glu Gly Ile Lys Met
 500

<210> 67

<211> 507

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 67

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

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

450	455	460
Cys Glu Ala Leu Arg Val Met Ala Lys Ile Met Arg Glu Cys Trp Tyr		
465	470	475
Ala Asn Gly Ala Ala Arg Leu Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu		
485	490	495
Ser Gln Leu Ser Gln Gln Glu Gly Ile Lys Met		
500	505	
<210> 68		
<211> 95		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成构建体		
<400> 68		
Thr Thr Asp Lys Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp		
1	5	10
Leu Ile Pro Arg Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr		
20	25	30
Gly Ser Val Thr Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys		
35	40	45
Ile Glu Leu Pro Thr Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val		
50	55	60
Glu Leu Ala Ala Val Ile Ala Gly Pro Val Cys Phe Val Cys Ile Ser		
65	70	75
Leu Met Leu Met Val Tyr Ile Cys His Asn Arg Thr Val Ile His		
85	90	95
<210> 69		
<211> 426		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成构建体		
<400> 69		
Met Glu Ala Ala Val Ala Ala Pro Arg Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val		
1	5	10
Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr		
20	25	30
Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys		
35	40	45

Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys		
50	55	60
Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg		
65	70	75 80
Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr		
	85	90 95
Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro		
	100	105 110
Thr Thr Gly Leu Pro Leu Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Arg Thr Ile		
	115	120 125
Val Leu Gln Glu Ser Ile Gly Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Trp Arg		
	130	135 140
Gly Lys Trp Arg Gly Glu Glu Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg		
145	150	155 160
Glu Glu Arg Ser Trp Phe Arg Glu Ala Glu Ile Tyr Gln Thr Val Met		
	165	170 175
Leu Arg His Glu Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Asn Lys Asp		
	180	185 190
Asn Gly Thr Trp Thr Gln Leu Trp Leu Val Ser Asp Tyr His Glu His		
	195	200 205
Gly Ser Leu Phe Asp Tyr Leu Asn Arg Tyr Thr Val Thr Val Glu Gly		
	210	215 220
Met Ile Lys Leu Ala Leu Ser Thr Ala Ser Gly Leu Ala His Leu His		
225	230	235 240
Met Glu Ile Val Gly Thr Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp		
	245	250 255
Leu Lys Ser Lys Asn Ile Leu Val Lys Lys Asn Gly Thr Cys Cys Ile		
	260	265 270
Ala Asp Leu Gly Leu Ala Val Arg His Asp Ser Ala Thr Asp Thr Ile		
	275	280 285
Asp Ile Ala Pro Asn His Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro		
	290	295 300
Glu Val Leu Asp Asp Ser Ile Asn Met Lys His Phe Glu Ser Phe Lys		
305	310	315 320
Arg Ala Asp Ile Tyr Ala Met Gly Leu Val Phe Trp Glu Ile Ala Arg		
	325	330 335
Arg Cys Ser Ile Gly Gly Ile His Glu Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr		
	340	345 350
Asp Leu Val Pro Ser Asp Pro Ser Val Glu Glu Met Arg Lys Val Val		

355	360	365
Cys Glu Gln Lys Leu Arg Pro Asn Ile Pro Asn Arg Trp Gln Ser Cys		
370	375	380
Glu Ala Leu Arg Val Met Ala Lys Ile Met Arg Glu Cys Trp Tyr Ala		
385	390	395
Asn Gly Ala Ala Arg Leu Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ser		400
	405	410
Gln Leu Ser Gln Gln Glu Gly Ile Lys Met		415
420	425	
<210> 70		
<211> 567		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成构建体		
<400> 70		
Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu		
1	5	10
Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val		15
	20	25
Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro		30
	35	40
Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln		45
	50	55
Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro		60
65	70	75
Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr		80
	85	90
Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile		95
	100	105
Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys		110
	115	120
Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn		125
	130	135
Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu		140
145	150	155
Leu Leu Val Ile Phe Gln Val Thr Gly Ile Ser Leu Leu Pro Pro Leu		160
	165	170
Gly Val Ala Ile Ser Val Ile Ile Ile Phe Tyr Cys Tyr Arg Val Asn		175

180	185	190
Arg Gln Gln Lys Leu Ser Ser Thr Trp Glu Thr Gly Lys Thr Arg Lys		
195	200	205
Leu Met Glu Phe Ser Glu His Cys Ala Ile Ile Leu Glu Asp Asp Arg		
210	215	220
Ser Asp Ile Ser Ser Thr Cys Ala Asn Asn Ile Asn His Asn Thr Glu		
225	230	235
240		
Leu Leu Pro Ile Glu Leu Asp Thr Leu Val Gly Lys Gly Arg Phe Ala		
245	250	255
Glu Val Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln Asn Thr Ser Glu Gln Phe Glu		
260	265	270
Thr Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Tyr Glu Glu Tyr Ala Ser Trp Lys		
275	280	285
Thr Glu Lys Asp Ile Phe Ser Asp Ile Asn Leu Lys His Glu Asn Ile		
290	295	300
Leu Gln Phe Leu Thr Ala Glu Glu Arg Lys Thr Glu Leu Gly Lys Gln		
305	310	315
320		
Tyr Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Ala Lys Gly Asn Leu Gln Glu Tyr		
325	330	335
Leu Thr Arg His Val Ile Ser Trp Glu Asp Leu Arg Lys Leu Gly Ser		
340	345	350
Ser Leu Ala Arg Gly Ile Ala His Leu His Ser Asp His Thr Pro Cys		
355	360	365
Gly Arg Pro Lys Met Pro Ile Val His Arg Asp Leu Lys Ser Ser Asn		
370	375	380
Ile Leu Val Lys Asn Asp Leu Thr Cys Cys Leu Cys Asp Phe Gly Leu		
385	390	395
400		
Ser Leu Arg Leu Asp Pro Thr Leu Ser Val Asp Asp Leu Ala Asn Ser		
405	410	415
Gly Gln Val Gly Thr Ala Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Glu Ser		
420	425	430
Arg Met Asn Leu Glu Asn Val Glu Ser Phe Lys Gln Thr Asp Val Tyr		
435	440	445
Ser Met Ala Leu Val Leu Trp Glu Met Thr Ser Arg Cys Asn Ala Val		
450	455	460
Gly Glu Val Lys Asp Tyr Glu Pro Pro Phe Gly Ser Lys Val Arg Glu		
465	470	475
480		
His Pro Cys Val Glu Ser Met Lys Asp Asn Val Leu Arg Asp Arg Gly		
485	490	495

Arg Pro Glu Ile Pro Ser Phe Trp Leu Asn His Gln Gly Ile Gln Met
 500 505 510
 Val Cys Glu Thr Leu Thr Glu Cys Trp Asp His Asp Pro Glu Ala Arg
 515 520 525
 Leu Thr Ala Gln Cys Val Ala Glu Arg Phe Ser Glu Leu Glu His Leu
 530 535 540
 Asp Arg Leu Ser Gly Arg Ser Cys Ser Glu Glu Lys Ile Pro Glu Asp
 545 550 555 560
 Gly Ser Leu Asn Thr Thr Lys
 565

<210> 71

<211> 592

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 71

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

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

201

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

Glu	Ser	Phe	Lys	Gln	Thr	Asp	Val	Tyr	Ser	Met	Ala	Leu	Val	Leu	Trp
465					470					475					480
Glu	Met	Thr	Ser	Arg	Cys	Asn	Ala	Val	Gly	Glu	Val	Lys	Asp	Tyr	Glu
				485					490					495	
Pro	Pro	Phe	Gly	Ser	Lys	Val	Arg	Glu	His	Pro	Cys	Val	Glu	Ser	Met
			500					505					510		
Lys	Asp	Asn	Val	Leu	Arg	Asp	Arg	Gly	Arg	Pro	Glu	Ile	Pro	Ser	Phe
		515					520					525			
Trp	Leu	Asn	His	Gln	Gly	Ile	Gln	Met	Val	Cys	Glu	Thr	Leu	Thr	Glu
	530					535					540				
Cys	Trp	Asp	His	Asp	Pro	Glu	Ala	Arg	Leu	Thr	Ala	Gln	Cys	Val	Ala
545					550					555					560
Glu	Arg	Phe	Ser	Glu	Leu	Glu	His	Leu	Asp	Arg	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser
				565					570					575	
Cys	Ser	Glu	Glu	Lys	Ile	Pro	Glu	Asp	Gly	Ser	Leu	Asn	Thr	Thr	Lys
			580					585					590		

<210> 73

<211> 629

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 73

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

Asp	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Ile	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Gly	Asn	Met	Thr	Cys
130						135					140				
Thr	Trp	Asn	Ala	Gly	Lys	Leu	Thr	Tyr	Ile	Asp	Thr	Lys	Tyr	Val	Val
145					150					155					160
His	Val	Lys	Ser	Leu	Glu	Thr	Glu	Glu	Glu	Gln	Gln	Tyr	Leu	Thr	Ser
				165						170				175	
Ser	Tyr	Ile	Asn	Ile	Ser	Thr	Asp	Ser	Leu	Gln	Gly	Gly	Lys	Lys	Tyr
			180						185				190		
Leu	Val	Trp	Val	Gln	Ala	Ala	Asn	Ala	Leu	Gly	Met	Glu	Glu	Ser	Lys
			195				200					205			
Gln	Leu	Gln	Ile	His	Leu	Asp	Asp	Ile	Val	Ile	Pro	Ser	Ala	Ala	Val
			210				215				220				
Ile	Ser	Arg	Ala	Glu	Thr	Ile	Asn	Ala	Thr	Val	Pro	Lys	Thr	Ile	Ile
225					230					235					240
Tyr	Trp	Asp	Ser	Gln	Thr	Thr	Ile	Glu	Lys	Val	Ser	Cys	Glu	Met	Arg
				245						250				255	
Tyr	Lys	Ala	Thr	Thr	Asn	Gln	Thr	Trp	Asn	Val	Lys	Glu	Phe	Asp	Thr
			260						265				270		
Asn	Phe	Thr	Tyr	Val	Gln	Gln	Ser	Glu	Phe	Tyr	Leu	Glu	Pro	Asn	Ile
			275				280					285			
Lys	Tyr	Val	Phe	Gln	Val	Arg	Cys	Gln	Glu	Thr	Gly	Lys	Arg	Tyr	Trp
			290				295				300				
Gln	Pro	Trp	Ser	Ser	Pro	Phe	Phe	His	Lys	Thr	Pro	Glu	Thr	Val	Pro
305					310					315					320
Gln	Val	Thr	Ser	Lys	Ala	Phe	Gln	His	Asp	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Leu
				325						330				335	
Thr	Val	Ala	Ser	Ile	Ser	Thr	Gly	His	Leu	Thr	Ser	Asp	Asn	Arg	Gly
			340						345				350		
Asp	Ile	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Met	Ile	Val	Phe	Ala	Val	Met	Leu	Ser
			355				360					365			
Ile	Leu	Ser	Leu	Ile	Gly	Ile	Phe	Asn	Arg	Ser	Phe	Arg	Thr	Gly	Ile
			370				375					380			
Lys	Arg	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Ile	Pro	Lys	Trp	Leu	Tyr	Glu	Asp	Ile
385					390					395					400
Pro	Asn	Met	Lys	Asn	Ser	Asn	Val	Val	Lys	Met	Leu	Gln	Glu	Asn	Ser
				405						410				415	
Glu	Leu	Met	Asn	Asn	Asn	Ser	Ser	Glu	Gln	Val	Leu	Tyr	Val	Asp	Pro
			420						425				430		
Met	Ile	Thr	Glu	Ile	Lys	Glu	Ile	Phe	Ile	Pro	Glu	His	Lys	Pro	Thr

435	440	445
Asp Tyr Lys Lys Glu Asn Thr Gly Pro Leu Glu Thr Arg Asp Tyr Pro		
450	455	460
Gln Asn Ser Leu Phe Asp Asn Thr Thr Val Val Tyr Ile Pro Asp Leu		
465	470	475
Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile Ser Asn Phe Leu Pro Glu Gly Ser		
485	490	495
His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Leu Lys Pro Pro		
500	505	510
Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn Asn Pro Arg Leu Gln Lys His Pro		
515	520	525
Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr Ile		
530	535	540
Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser Ser		
545	550	555
Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu Glu		
565	570	575
Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro Asp		
580	585	590
Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser Ile		
595	600	605
Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn Arg Ile		
610	615	620
Ser Leu Leu Glu Lys		
625		
<210> 74		
<211> 375		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成构建体		
<400> 74		
Met Arg Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe		
1	5	10
Asp Thr Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro		
20	25	30
Asn Ile Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg		
35	40	45
Tyr Trp Gln Pro Trp Ser Ser Pro Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr		

50	55	60
Val Pro Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser		
65	70	75
Gly Leu Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn		
85	90	95
Arg Gly Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met		
100	105	110
Leu Ser Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe Arg Thr		
115	120	125
Gly Ile Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu		
130	135	140
Asp Ile Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Glu		
145	150	155
Asn Ser Glu Leu Met Asn Asn Asn Ser Ser Glu Gln Val Leu Tyr Val		
165	170	175
Asp Pro Met Ile Thr Glu Ile Lys Glu Ile Phe Ile Pro Glu His Lys		
180	185	190
Pro Thr Asp Tyr Lys Lys Glu Asn Thr Gly Pro Leu Glu Thr Arg Asp		
195	200	205
Tyr Pro Gln Asn Ser Leu Phe Asp Asn Thr Thr Val Ala Tyr Ile Pro		
210	215	220
Asp Leu Asp Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile Ser Asn Phe Leu Pro Glu		
225	230	235
Gly Ser His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Leu Lys		
245	250	255
Pro Pro Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn Asn Pro Arg Leu Gln Lys		
260	265	270
His Pro Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser Asn		
275	280	285
Thr Ile Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys		
290	295	300
Ser Ser Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu		
305	310	315
Leu Glu Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu		
325	330	335
Pro Asp Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro		
340	345	350
Ser Ile Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn		
355	360	365

Arg Ile Ser Leu Leu Glu Lys

370

375

<210> 75

<211> 264

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 75

Met Glu Phe Trp Ala Asn Ser Cys Phe His Leu Tyr Arg Ala Pro Tyr

1

5

10

15

Phe Trp Ile Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr

20

25

30

Glu Asp Ile Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln

35

40

45

Glu Asn Ser Glu Leu Met Asn Asn Asn Ser Ser Glu Gln Val Leu Tyr

50

55

60

Val Asp Pro Met Ile Thr Glu Ile Lys Glu Ile Phe Ile Pro Glu His

65

70

75

80

Lys Pro Thr Asp Tyr Lys Lys Glu Asn Thr Gly Pro Leu Glu Thr Arg

85

90

95

Asp Tyr Pro Gln Asn Ser Leu Phe Asp Asn Thr Thr Val Val Tyr Ile

100

105

110

Pro Asp Leu Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile Ser Asn Phe Leu Pro

115

120

125

Glu Gly Ser His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Leu

130

135

140

Lys Pro Pro Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn Asn Pro Arg Leu Gln

145

150

155

160

Lys His Pro Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser

165

170

175

Asn Thr Ile Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu

180

185

190

Cys Ser Ser Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met

195

200

205

Leu Leu Glu Asn Asp Ser Pro Arg Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu

210

215

220

Leu Pro Asp Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu

225

230

235

240

Pro Ser Ile Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe
 245 250 255
 Asn Arg Ile Ser Leu Leu Glu Lys
 260
 <210> 76
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 76
 Met Ile Leu Arg Pro Tyr Gln Pro Cys Gly Thr Val Lys Glu Phe Asp
 1 5 10 15
 Thr Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn
 20 25 30
 Ile Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr
 35 40 45
 Trp Gln Pro Trp Ser Ser Leu Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val
 50 55 60
 Pro Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly
 65 70 75 80
 Leu Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg
 85 90 95
 Gly Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu
 100 105 110
 Ser Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly
 115 120 125
 Ile Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp
 130 135 140
 Ile Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Glu Asn
 145 150 155 160
 Ser Glu Leu Met Asn Asn Asn Ser Ser Glu Gln Val Leu Tyr Val Asp
 165 170 175
 Pro Met Ile Thr Glu Ile Lys Glu Ile Phe Ile Pro Glu His Lys Pro
 180 185 190
 Thr Asp Tyr Lys Lys Glu Asn Thr Gly Pro Leu Glu Thr Arg Asp Tyr
 195 200 205
 Pro Gln Asn Ser Leu Phe Asp Asn Thr Thr Val Val Tyr Ile Pro Asp
 210 215 220

Leu Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile Ser Asn Phe Leu Pro Glu Gly
 225 230 235 240
 Ser His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Leu Lys Pro
 245 250 255
 Pro Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn Asn Pro Arg Leu Gln Lys His
 260 265 270
 Pro Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr
 275 280 285
 Ile Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser
 290 295 300
 Ser Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu
 305 310 315 320
 Glu Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro
 325 330 335
 Asp Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser
 340 345 350
 Ile Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn Arg
 355 360 365
 Ile Ser Leu Leu Glu Lys
 370
 <210> 77
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 77
 Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Glu Asn Ser Glu Leu
 1 5 10 15
 Met Asn Asn Asn Ser Ser Glu Gln Val Leu Tyr Val Asp Pro Met Ile
 20 25 30
 Thr Glu Ile Lys Glu Ile Phe Ile Pro Glu His Lys Pro Thr Asp Tyr
 35 40 45
 Lys Lys Glu Asn Thr Gly Pro Leu Glu Thr Arg Asp Tyr Pro Gln Asn
 50 55 60
 Ser Leu Phe Asp Asn Thr Thr Val Val Tyr Ile Pro Asp Leu Asn Thr
 65 70 75 80
 Gly Tyr Lys Pro Gln Ile Ser Asn Phe Leu Pro Glu Gly Ser His Leu
 85 90 95

Ser Asn Asn Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Leu Lys Pro Pro Val Asp
 100 105 110
 Ser Leu Asp Ser Gly Asn Asn Pro Arg Leu Gln Lys His Pro Asn Phe
 115 120 125
 Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr Ile Phe Leu
 130 135 140
 Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser Ser Pro Asp
 145 150 155 160
 Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu Glu Asn Asp
 165 170 175
 Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro Asp Glu Phe
 180 185 190
 Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser Ile Asn Thr
 195 200 205
 Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn Arg Ile Ser Leu
 210 215 220
 Leu Glu Lys
 225
 <210> 78
 <211> 662
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 78
 Met Glu Pro Leu Val Thr Trp Val Val Pro Leu Leu Phe Leu Phe Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Arg Gln Gly Ala Ala Cys Arg Thr Ser Glu Cys Cys Phe Gln
 20 25 30
 Asp Pro Pro Tyr Pro Asp Ala Asp Ser Gly Ser Ala Ser Gly Pro Arg
 35 40 45
 Asp Leu Arg Cys Tyr Arg Ile Ser Ser Asp Arg Tyr Glu Cys Ser Trp
 50 55 60
 Gln Tyr Glu Gly Pro Thr Ala Gly Val Ser His Phe Leu Arg Cys Cys
 65 70 75 80
 Leu Ser Ser Gly Arg Cys Cys Tyr Phe Ala Ala Gly Ser Ala Thr Arg
 85 90 95
 Leu Gln Phe Ser Asp Gln Ala Gly Val Ser Val Leu Tyr Thr Val Thr
 100 105 110

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

420	425	430
Val Leu Ser Thr Tyr His Phe Gly	Gly Asn Ala Ser Ala Ala Gly Thr	
435	440	445
Pro His His Val Ser Val Lys Asn His Ser Leu Asp Ser Val Ser Val		
450	455	460
Asp Trp Ala Pro Ser Leu Leu Ser Thr Cys Pro Gly Val Leu Lys Glu		
465	470	475
480		
Tyr Val Val Arg Cys Arg Asp Glu Asp Ser Lys Gln Val Ser Glu His		
485	490	495
Pro Val Gln Pro Thr Glu Thr Gln Val Thr Leu Ser Gly Leu Arg Ala		
500	505	510
Gly Val Ala Tyr Thr Val Gln Val Arg Ala Asp Thr Ala Trp Leu Arg		
515	520	525
Gly Val Trp Ser Gln Pro Gln Arg Phe Ser Ile Glu Val Gln Val Ser		
530	535	540
Asp Trp Leu Ile Phe Phe Ala Ser Leu Gly Ser Phe Leu Ser Ile Leu		
545	550	555
560		
Leu Val Gly Val Leu Gly Tyr Leu Gly Leu Asn Arg Ala Ala Arg His		
565	570	575
Leu Cys Pro Pro Leu Pro Thr Pro Cys Ala Ser Ser Ala Ile Glu Phe		
580	585	590
Pro Gly Gly Lys Glu Thr Trp Gln Trp Ile Asn Pro Val Asp Phe Gln		
595	600	605
Glu Glu Ala Ser Leu Gln Glu Ala Leu Val Val Glu Met Ser Trp Asp		
610	615	620
Lys Gly Glu Arg Thr Glu Pro Leu Glu Lys Thr Glu Leu Pro Glu Gly		
625	630	635
640		
Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp Thr Glu Leu Ser Leu Glu Asp Gly Asp		
645	650	655
Arg Cys Lys Ala Lys Met		
660		
<210> 79		
<211> 660		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成构建体		
<400> 79		
Met Glu Pro Leu Val Thr Trp Val Val Pro Leu Leu Phe Leu Phe Leu		

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

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

Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
35				40				45							
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
50				55				60							
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65				70				75				80			
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Val
				85				90				95			
Ser	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
100				105				110							

<210> 82

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 82

Asp Tyr Glu Met His

1 5

<210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 83

Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asn Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 84

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 84

Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr

1 5

<210> 85

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 85

Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 86

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 87

Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 88

<211> 567

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 88

Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu

1 5 10 15

Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Pro Lys Ser Val

20 25 30

Asn Ser Asp Val Met Ala Ser Asp Asn Gly Gly Ala Val Lys Leu Pro

35 40 45

Gln	Leu	Cys	Lys	Phe	Cys	Asp	Val	Arg	Leu	Ser	Thr	Cys	Asp	Asn	Gln
50						55					60				
Lys	Ser	Cys	Met	Ser	Asn	Cys	Ser	Ile	Thr	Ala	Ile	Cys	Glu	Lys	Pro
65					70				75						80
His	Glu	Val	Cys	Val	Ala	Val	Trp	Arg	Lys	Asn	Asp	Lys	Asn	Ile	Thr
				85					90					95	
Leu	Glu	Thr	Val	Cys	His	Asp	Pro	Lys	Leu	Thr	Tyr	His	Gly	Phe	Thr
			100					105					110		
Leu	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Pro	Lys	Cys	Val	Met	Lys	Glu	Lys	Lys	Arg
		115					120					125			
Ala	Gly	Glu	Thr	Phe	Phe	Met	Cys	Ala	Cys	Asn	Met	Glu	Glu	Cys	Asn
		130				135					140				
Asp	Tyr	Ile	Ile	Phe	Ser	Glu	Glu	Tyr	Thr	Thr	Ser	Ser	Pro	Asp	Leu
145					150					155					160
Leu	Leu	Val	Ile	Ile	Gln	Val	Thr	Gly	Val	Ser	Leu	Leu	Pro	Pro	Leu
				165					170					175	
Gly	Ile	Ala	Ile	Ala	Val	Ile	Ile	Ile	Phe	Tyr	Cys	Tyr	Arg	Val	His
			180					185					190		
Arg	Gln	Gln	Lys	Leu	Ser	Pro	Ser	Trp	Glu	Ser	Ser	Lys	Pro	Arg	Lys
		195					200					205			
Leu	Met	Asp	Phe	Ser	Asp	Asn	Cys	Ala	Ile	Ile	Leu	Glu	Asp	Asp	Arg
	210					215					220				
Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Cys	Ala	Asn	Asn	Ile	Asn	His	Asn	Thr	Glu
225					230					235					240
Leu	Leu	Pro	Ile	Glu	Leu	Asp	Thr	Leu	Val	Gly	Lys	Gly	Arg	Phe	Ala
				245					250					255	
Glu	Val	Tyr	Lys	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	Asn	Thr	Ser	Glu	Gln	Phe	Glu
			260					265					270		
Thr	Val	Ala	Val	Lys	Ile	Phe	Pro	Tyr	Glu	Glu	Tyr	Ser	Ser	Trp	Lys
		275					280						285		
Thr	Glu	Lys	Asp	Ile	Phe	Ser	Asp	Ile	Asn	Leu	Lys	His	Glu	Asn	Ile
		290				295					300				
Leu	Gln	Phe	Leu	Thr	Ala	Glu	Glu	Arg	Lys	Thr	Glu	Leu	Gly	Lys	Gln
305					310					315					320
Tyr	Trp	Leu	Ile	Thr	Ala	Phe	His	Ala	Lys	Gly	Asn	Leu	Gln	Glu	Tyr
				325					330					335	
Leu	Thr	Arg	His	Val	Ile	Ser	Trp	Glu	Asp	Leu	Arg	Lys	Leu	Gly	Ser
			340					345					350		
Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Ile	Ala	His	Leu	His	Ser	Asp	His	Thr	Pro	Cys

35	40	45
Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln		
50	55	60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser		
65	70	75
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser		
85	90	95
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser		
100	105	110
Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp		
115	120	125
Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly		
130	135	140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile		
145	150	155
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys		
165	170	175
Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp		
180	185	190
Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr		
195	200	205
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser		
210	215	220
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala		
225	230	235
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly		
245	250	255
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro		
260	265	270
Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu		
275	280	285
Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg		
290	295	300
Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly		
305	310	315
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys		
325	330	335
Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg		
340	345	350

Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
 355 360 365
 Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
 370 375 380
 Ser Gly Gly Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln
 385 390 395 400
 Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn
 405 410 415
 Gly Gly Ser Gly Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu
 420 425 430
 Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg
 435 440 445
 Gly Gly Ser Gly Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
 450 455 460
 Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
 465 470 475 480
 Asn Gly Gly Ser Gly Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro
 485 490 495
 Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn
 500 505 510
 Thr Gln Gly Gly Ser Gly
 515

<210> 90

<211> 2835

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 90

atgggctcca gcaactccaa gaggcagcaa cagggttgc tcaagctctg gcgagggctg 60
 cgagggaagc ctggggcaga ctgggtgcta ttgtccgac cgcttatcgg gcagtcacatca 120
 acagtccaag aagagtgcgg caaggccttg aaaaagtcc tgggtaaagg taaaatgact 180
 ccagacggcc gccgcctgca agaaggagac acctttgatg agtgggatga tgatgaagaa 240
 gaagtaggct tccctgtgca acctcgagtc cccttaagac agatgaccta taaattagca 300
 gtggactttt cccacttttt aaaatcaaag gggggactgg atgggatata ttactctgaa 360
 agaagagaaa agatcctgaa tttgtatgcc ttgaacgagt ggggaataat agatgattgg 420
 caagcttact caccaggccc ggggataagg taccgcagag tcttttgctt ctgctttaag 480
 ctagtcccag tggacctgca tgaggaggca cgcaactgtg agagacactg tgctgcacat 540
 ccagcacaga tgggggaaga tcctgatgga atagatcatg gagaagtctt ggtctggaag 600

```

tttgacccga agttggcggg ggagtaccgc ccggacatgt ttaaggacat gcacgaacat 660
gcaaagcgct gaacgcgtgc ccctctccct ccccccccc taacgttact ggccgaagcc 720
gcttgggaata aggccgggtgt gcgtttgtct atatgttatt ttccaccata ttgccgtctt 780
ttggcaatgt gagggccccg aaacctggcc ctgtcttctt gacgagcatt cctaggggtc 840
tttccccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt cgtgaaggaa gcagttcctc 900
tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct ttgcaggcag cggaaccccc 960
cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt ataagataca cctgcaaagg 1020
cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt ggaaagagtc aaatggctct 1080
cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgccagaa ggtaccccat tgtatgggat 1140
ctgatctggg gcctcggtgc acatgcttta catgtgttta gtcgaggtta aaaaaacgtc 1200
taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt tcctttgaaa aacacgatga taatatggcc 1260
acaggatccg ccgccaccat ggccctgcca gtgaccgctt tgctccttcc cctggctctt 1320
ctgctgcacg ctgctagacc tgaggtgcag ctgcagcaga gcggagctga gctggtgaag 1380
cctggcgcta gcgtgaagat gagctgcaag gccagcggct acaccttcac cagctataac 1440
atgcaactggg tgaagcagac ccctggacag ggactggagt ggatcggagc tatctacct 1500
ggaaacggag acacctcata caaccagaag ttcaaggaa aggctaccct gaccgctgac 1560
aagagcagca gcaccgctta catgcagctg agctactga ccagcgagga ctccgccgac 1620
tactactgcg ccagaagcaa ctactacgga agcagctact ggttcttcga cgtgtgggga 1680
gctggaacca ccgtgaccgt gtcaagcggc ggcgagggt cccgaggcgg aggatctggc 1740
ggcggcggca gcgacatcgt gctgaccag agccctgcta tcctgtctgc cagccctgga 1800
gagaaggtga ccatgacctg cagagctagc agcagcgtga actacatgga ctggtatcag 1860
aaaaagcccc gcagctcacc taagccttgg atctacgcta ccagcaactt agccagcggc 1920
gtgcctgcta gattctccgg aagcggctct ggaaccagct actcccttac catcagcaga 1980
gtggaggctg aggacgctgc tactactac tgccagcagt ggagcttcaa ccctcctacc 2040
ttcgaggagg gaaccaagct ggagatcaag actagtacca cgacgccagc gccgcgacca 2100
ccaacaccgg cgcccaccat cgcgtcgcag ccctgtccc tgcgccaga ggcgtgccgg 2160
ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg gggtggact tcgcctgtga tatctacatc 2220
tgggcgccct tggccgggac ttgtggggtc cttctcctgt cactggttat caccctttac 2280
tgcaaacggg gcagaaaaga actcctgtat atattcaaac aaccatttat gagaccagta 2340
caaactactc aagaggaaga tggtgtgtagc tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga 2400
tgtgaactgg gtgaaaattt gtattttcaa tctggtggtg acacacaagc tctgttgagg 2460
aatgaccagg tctatcagcc cctccgagat cgagatgatg ctcagtacag ccaccttgga 2520
ggaaacggtg gttctggtga gaggccacca cctgttccca acccagacta tgagcccatc 2580
cggaaggcc agcgggacct gtattctggc ctgaatcaga gaggtggttc tggtgacaag 2640
cagactctgt tgcccaatga ccagctctac cagccctca aggatcgaga agatgaccag 2700
tacagccacc ttcaaggaaa cgggtggttct ggtcgaaac agcgtatcac tgagaccgag 2760
tcgccttatc aggagctcca gggtcagagg tcggatgtct acagcgacct caacacacag 2820
ggtggttctg gttaa
2835

```

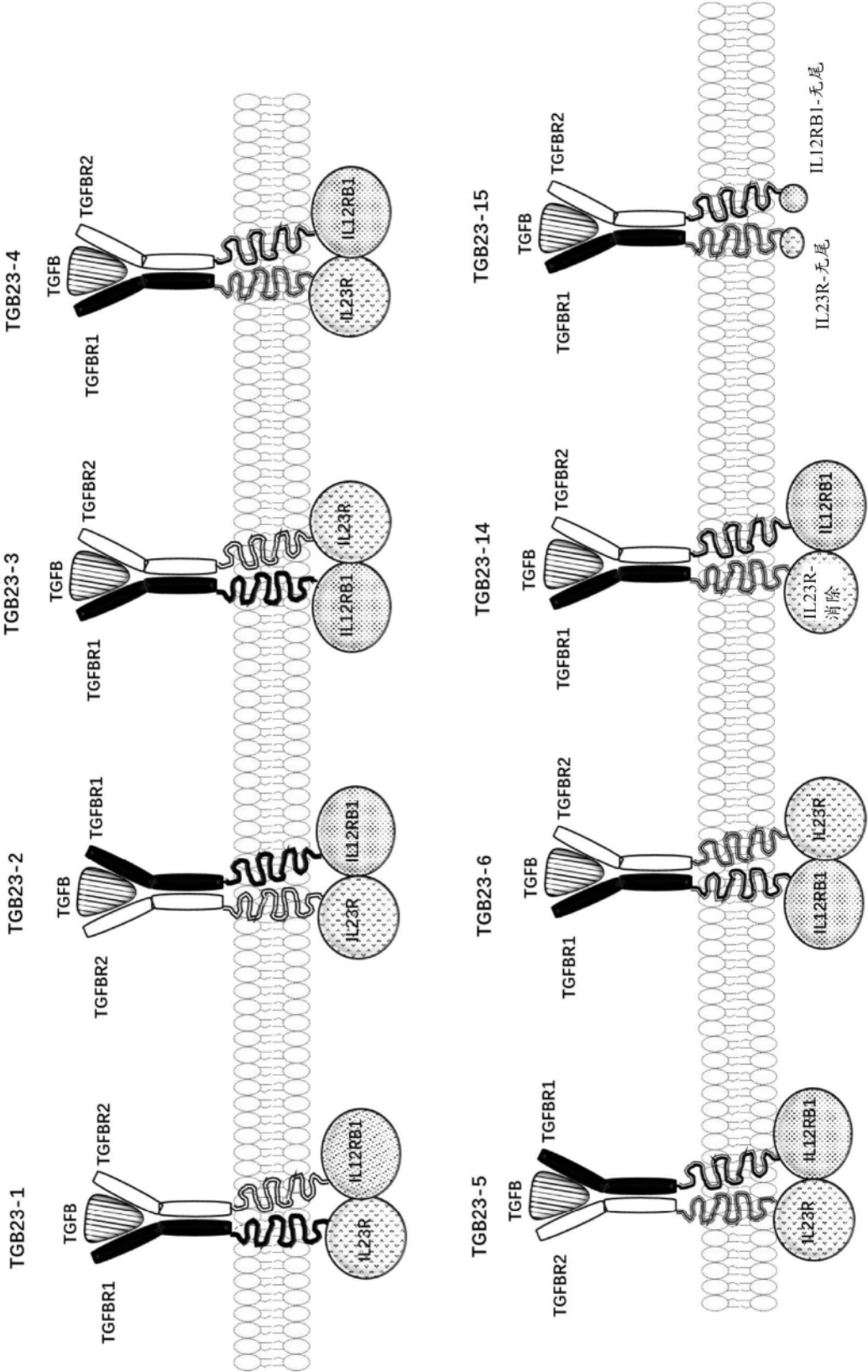


图1A

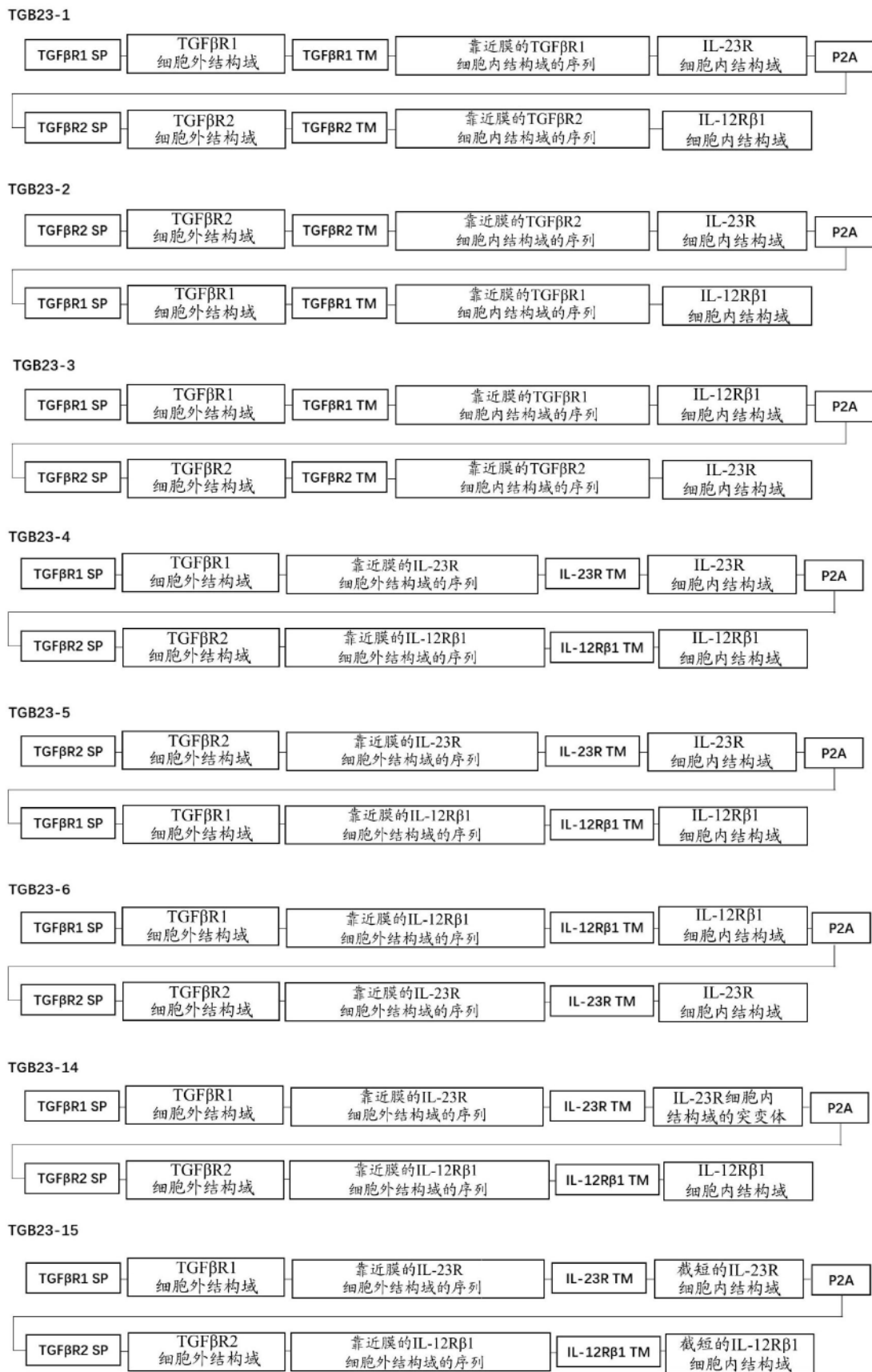


图1B

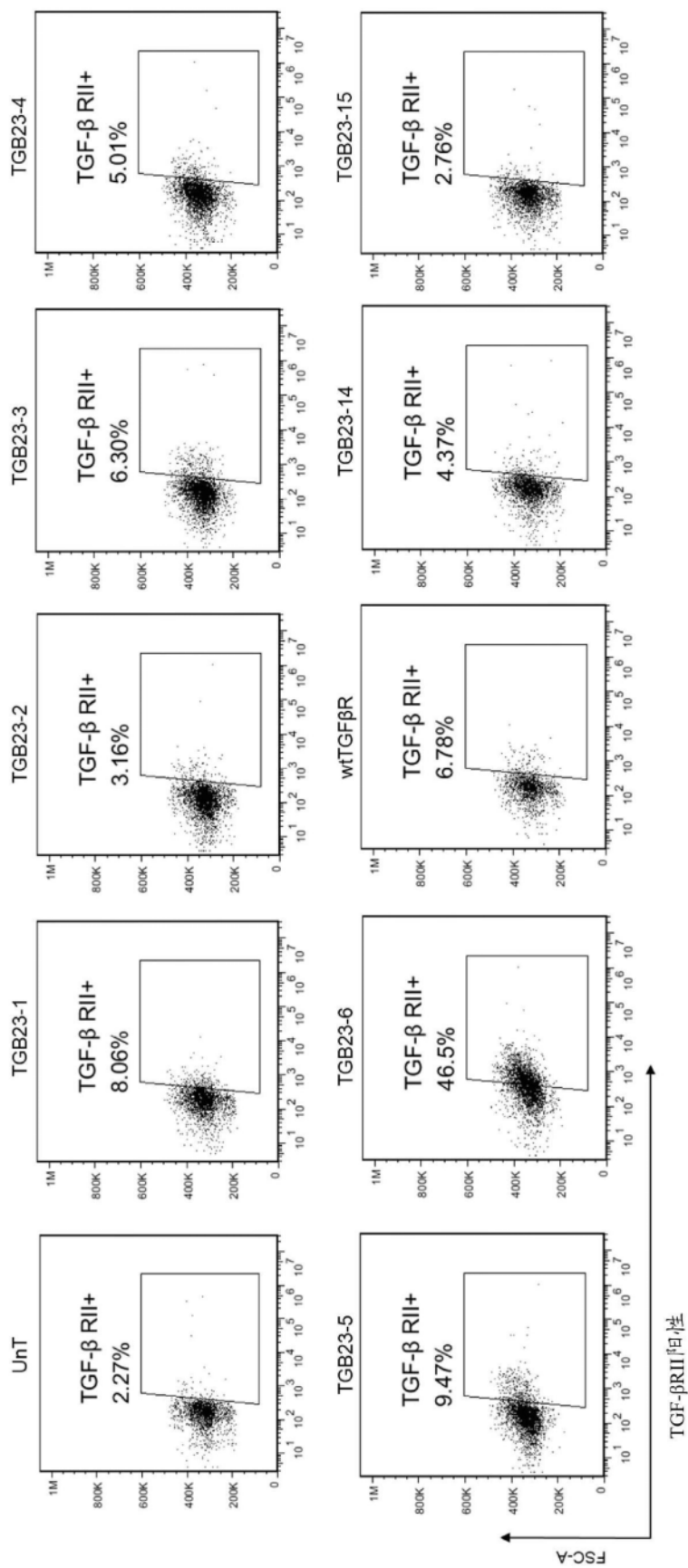


图2

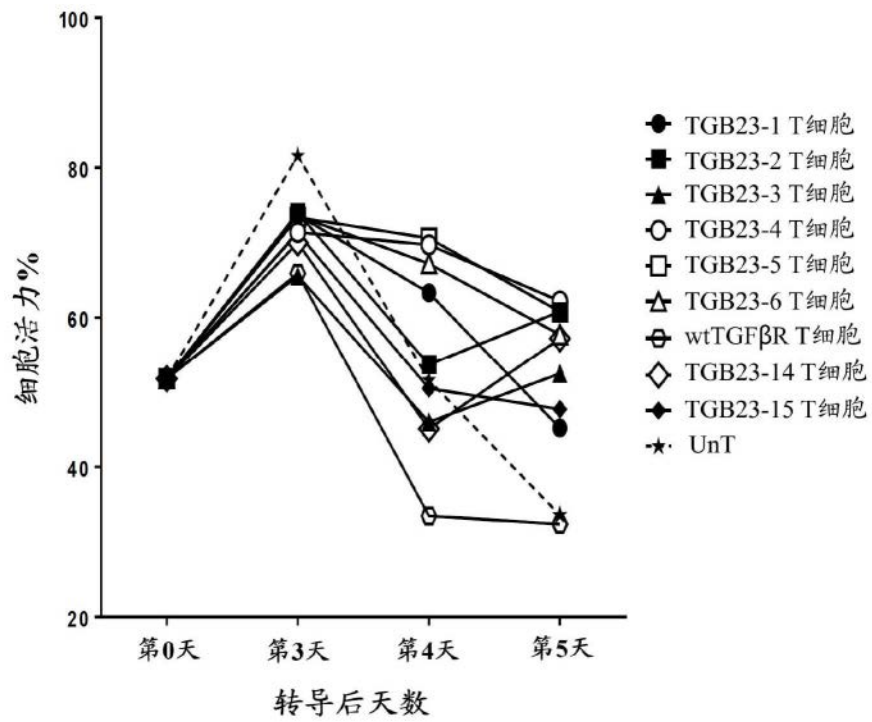


图3A

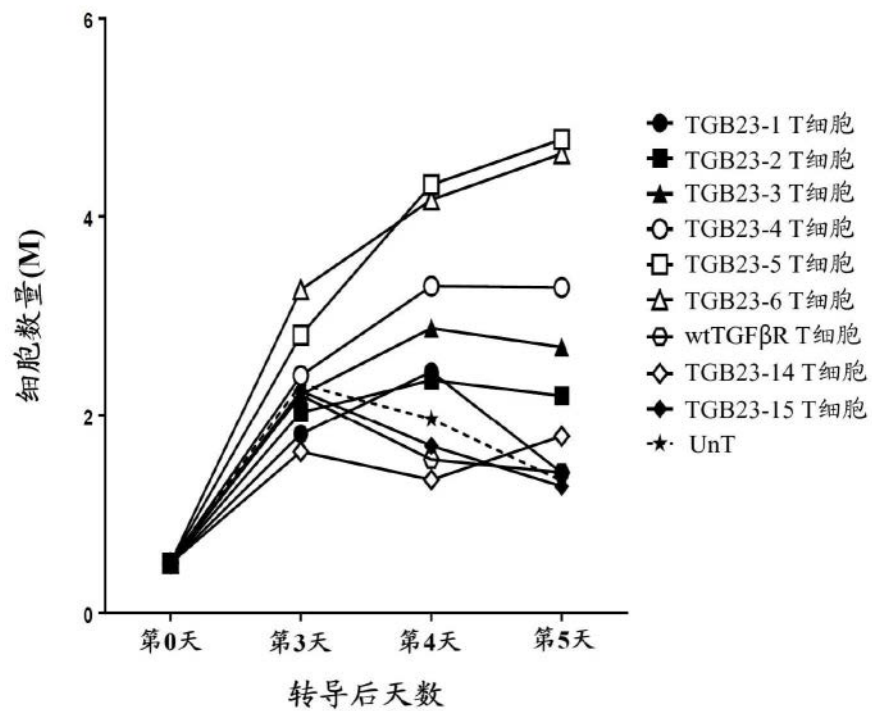


图3B

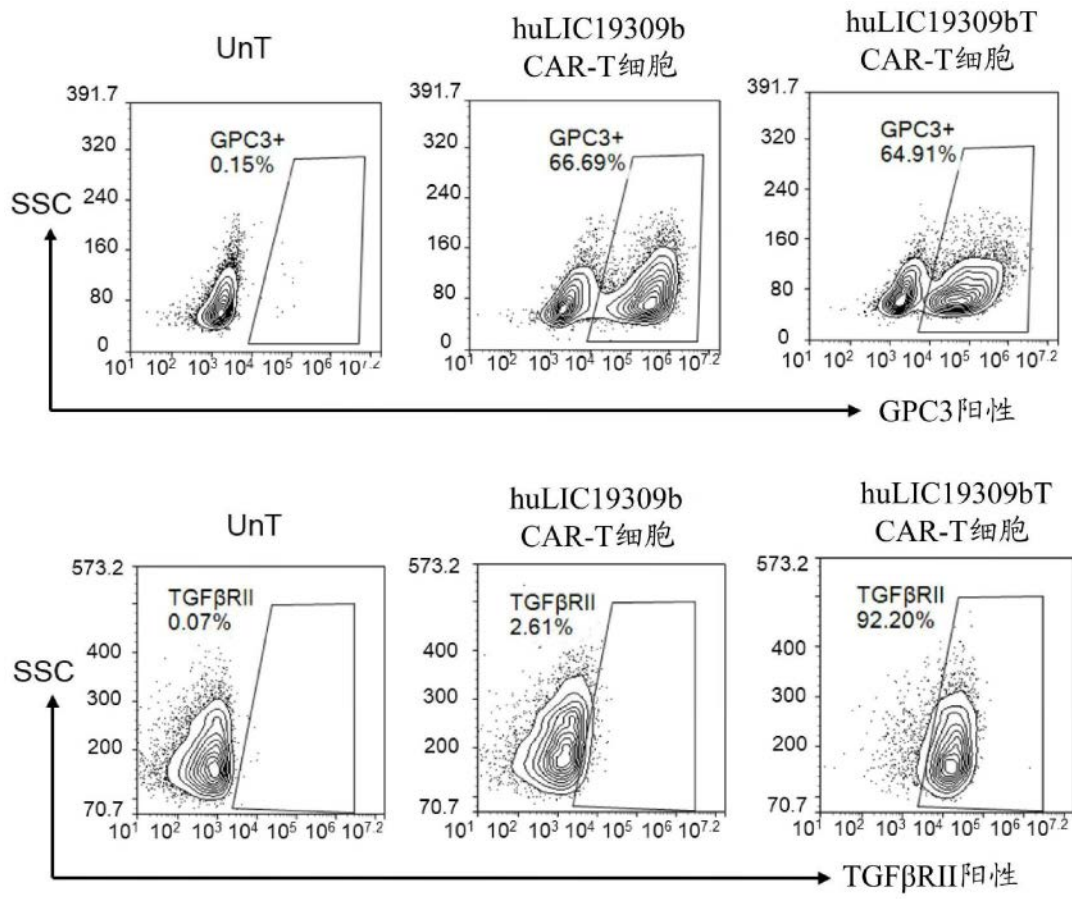


图4

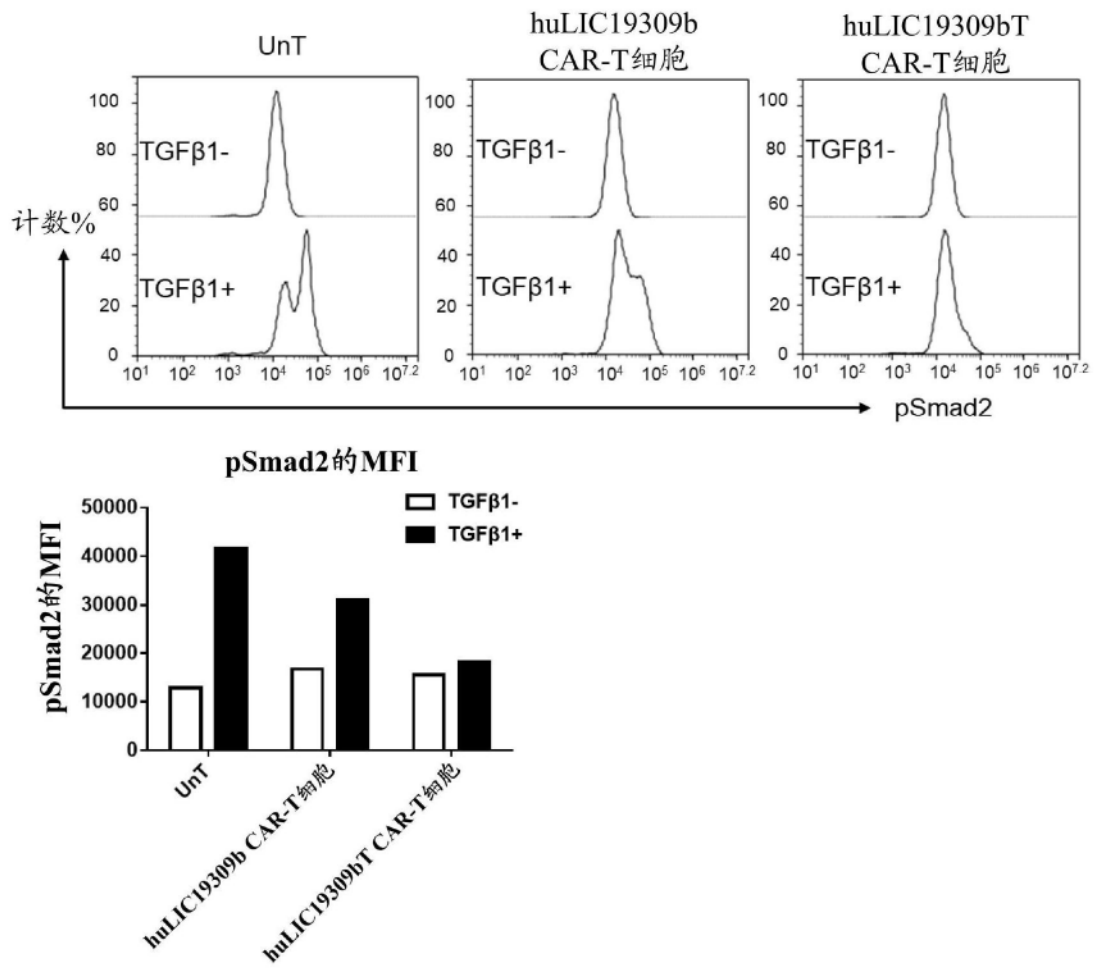


图5

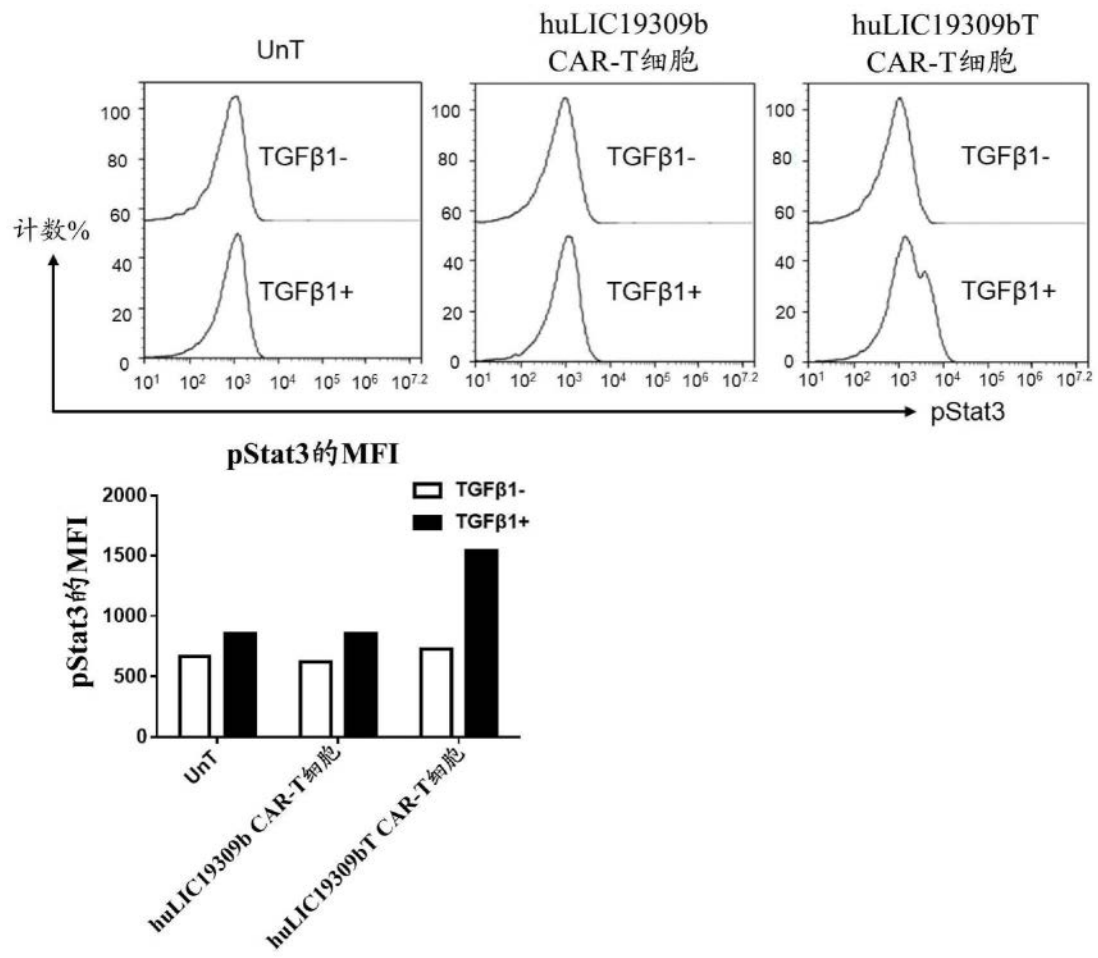


图6A

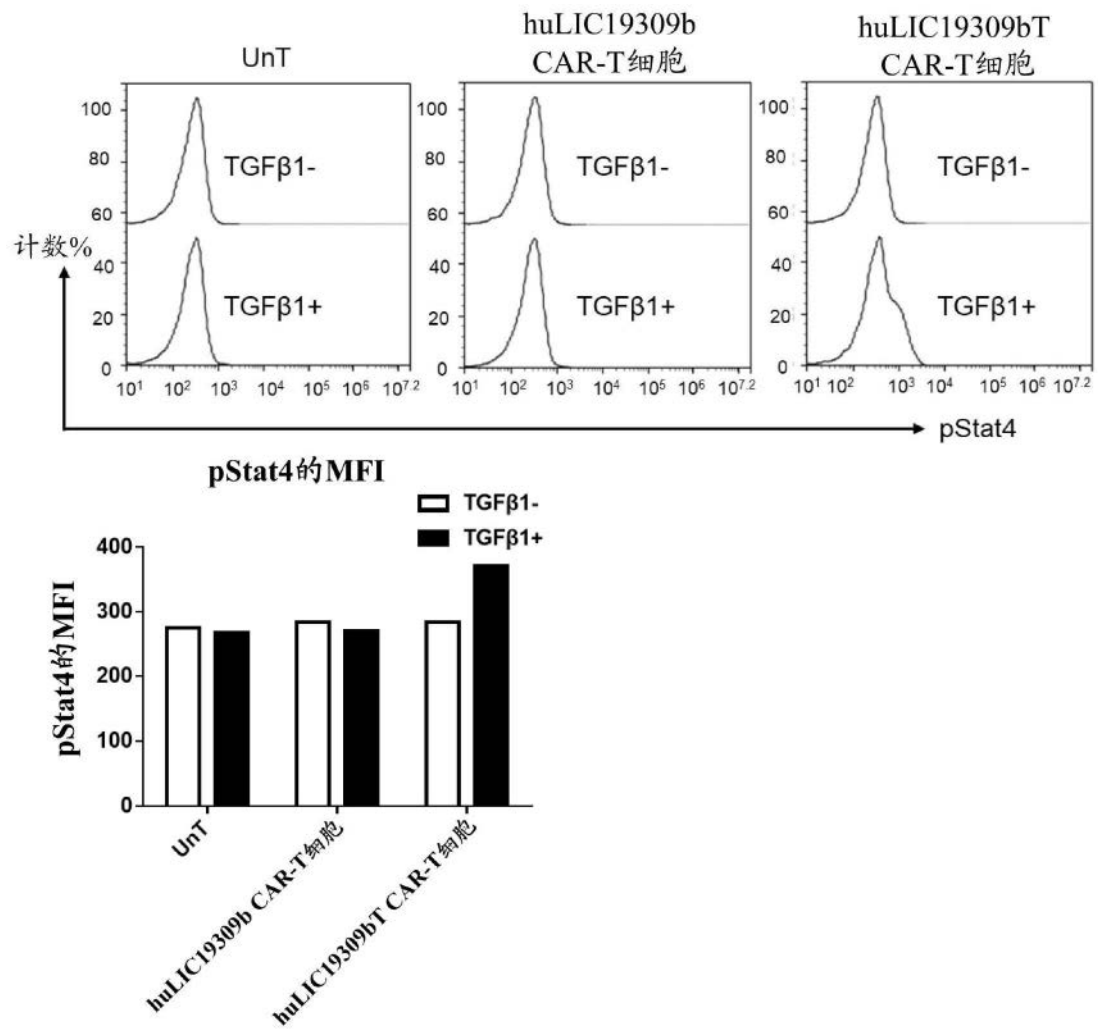


图6B

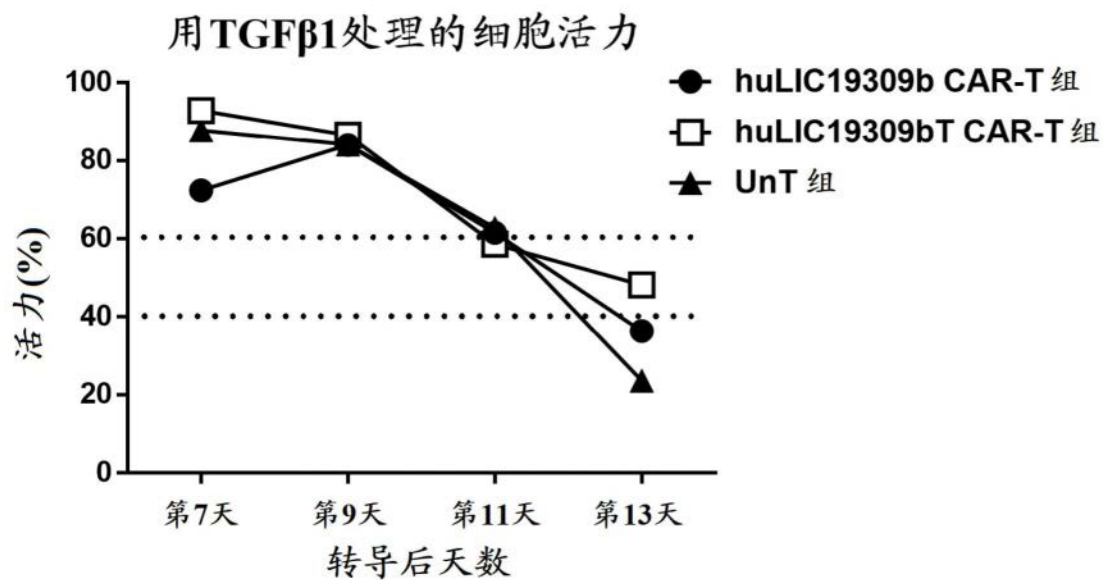


图7A

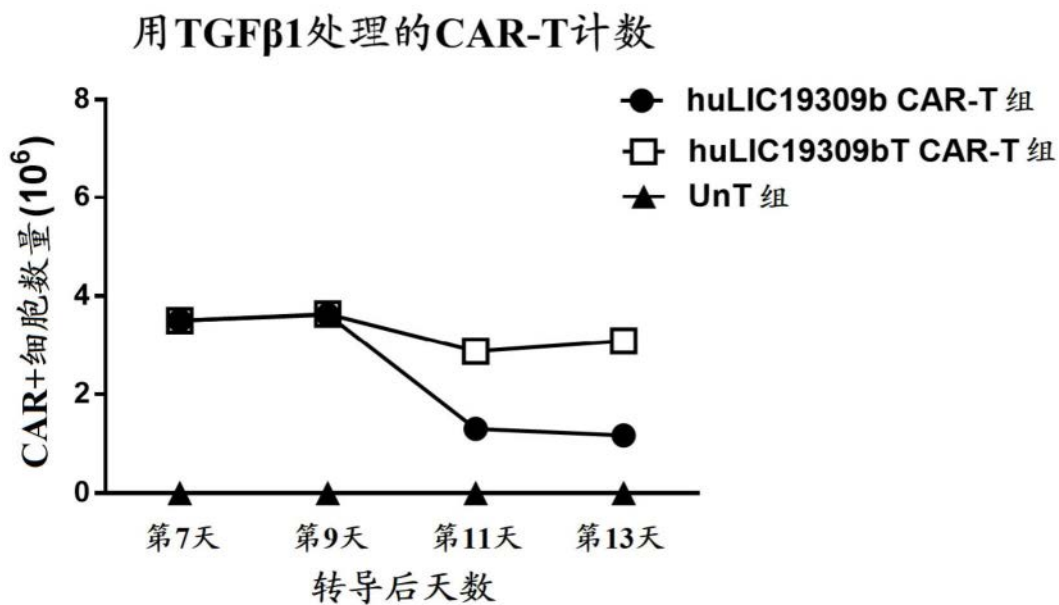


图7B

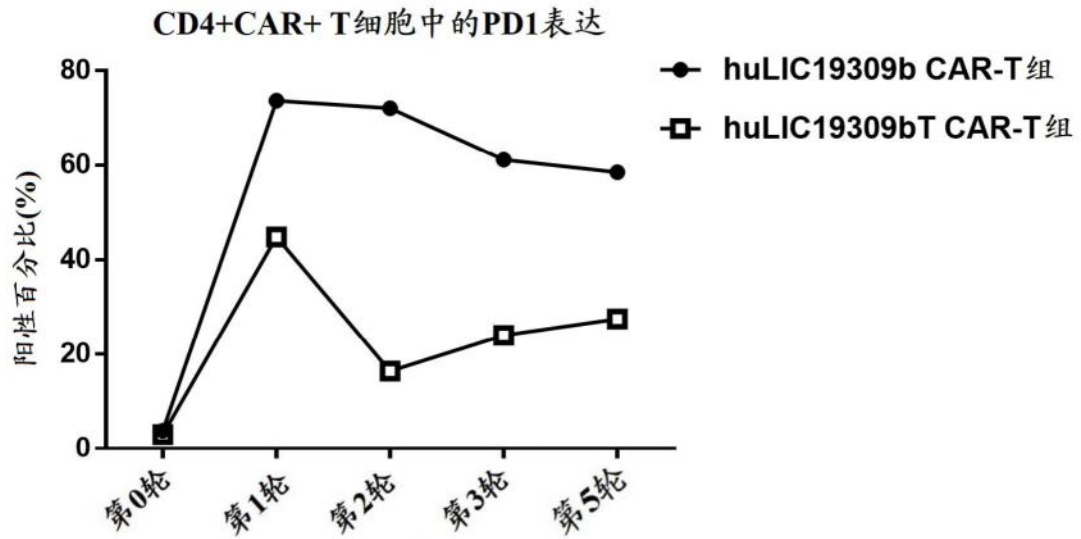


图8A

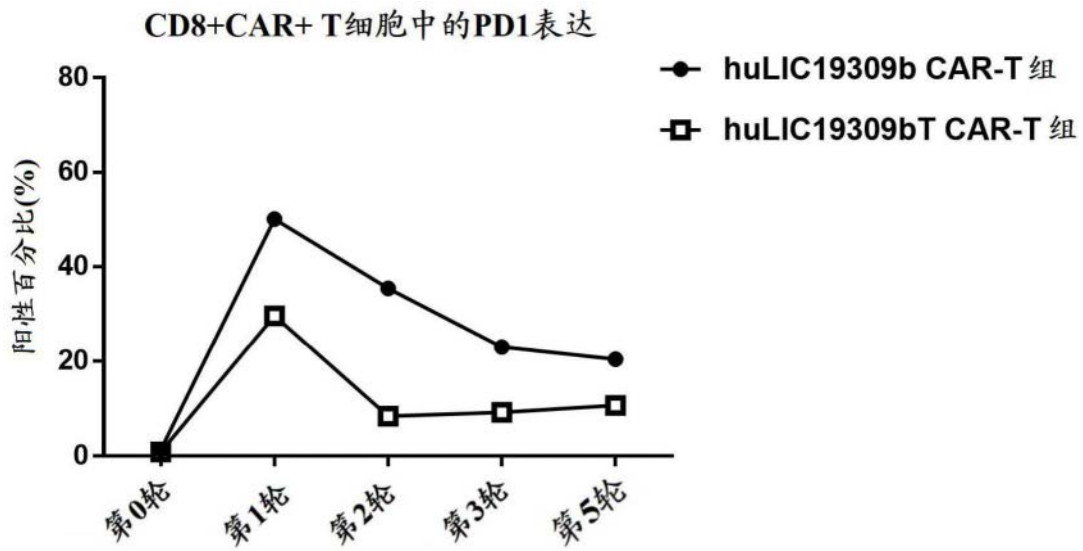


图8B

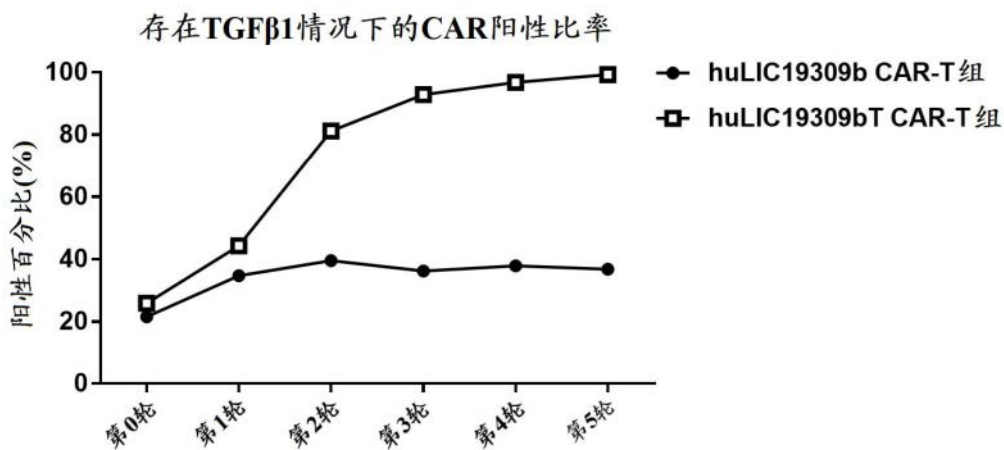


图9A

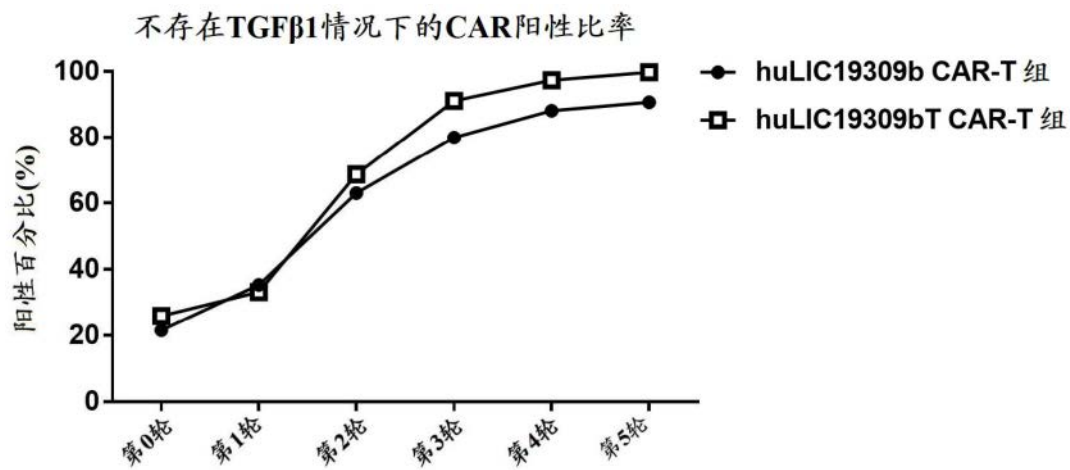


图9B

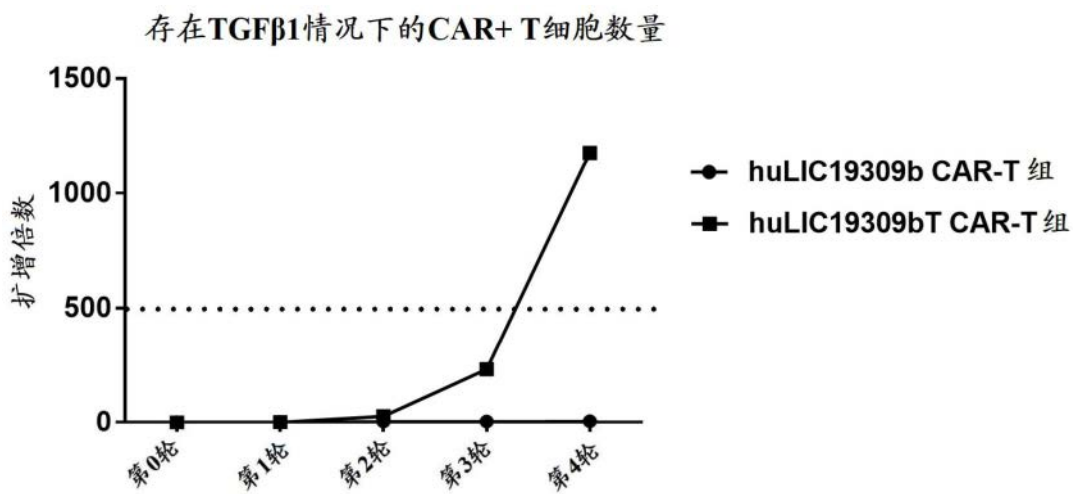


图9C

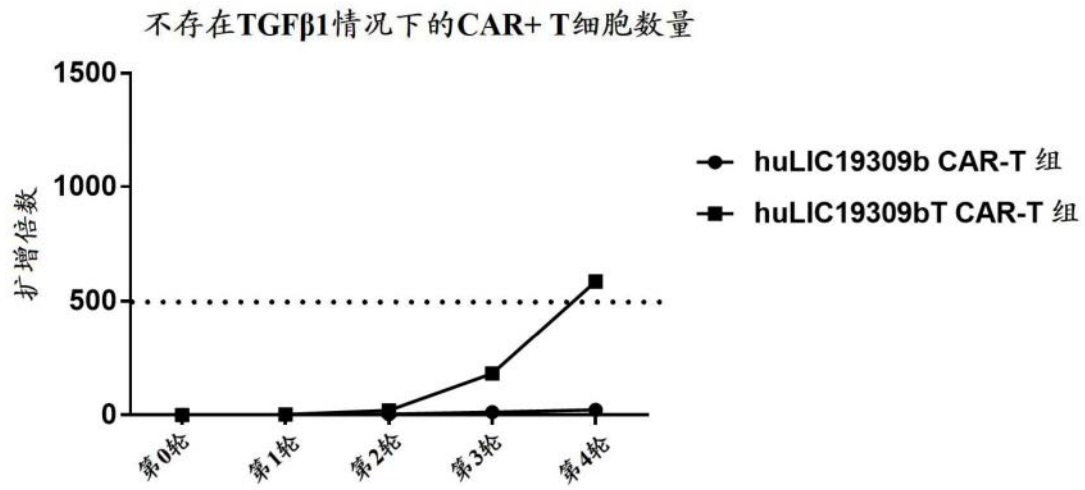


图9D

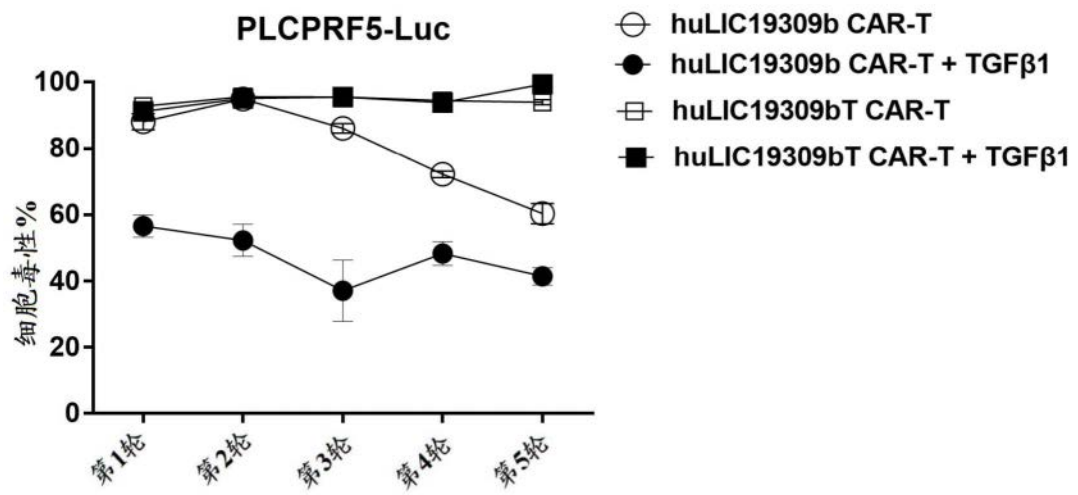


图10A

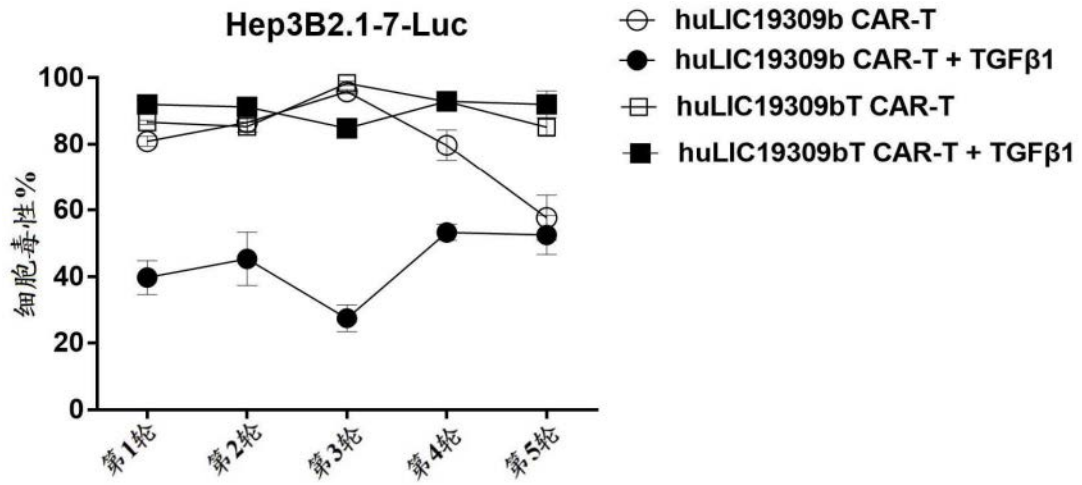


图10B

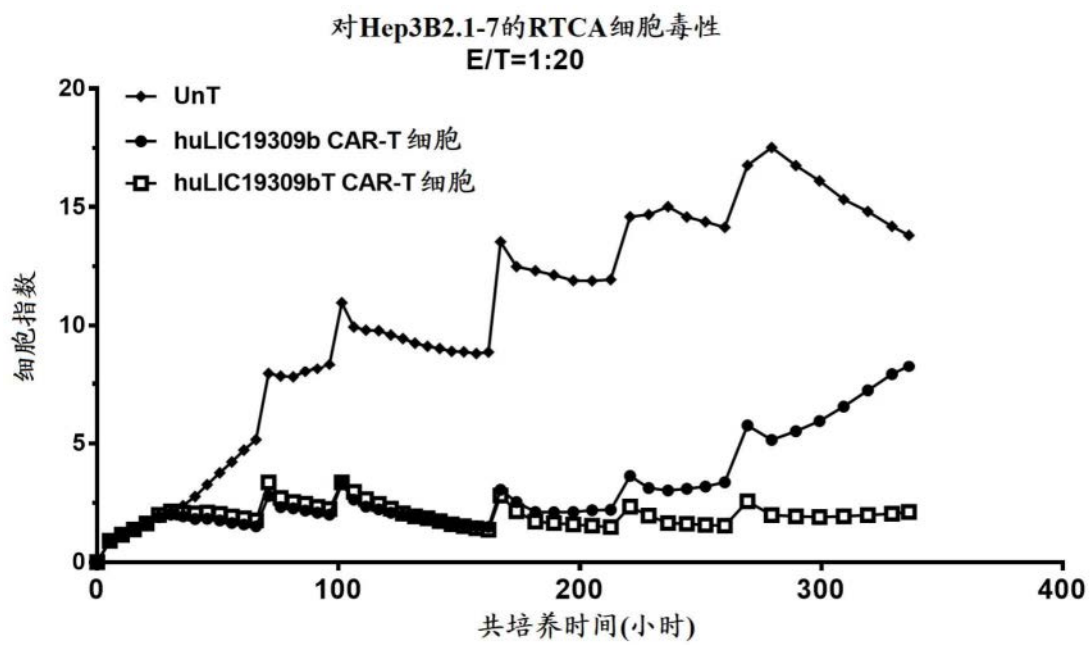


图11

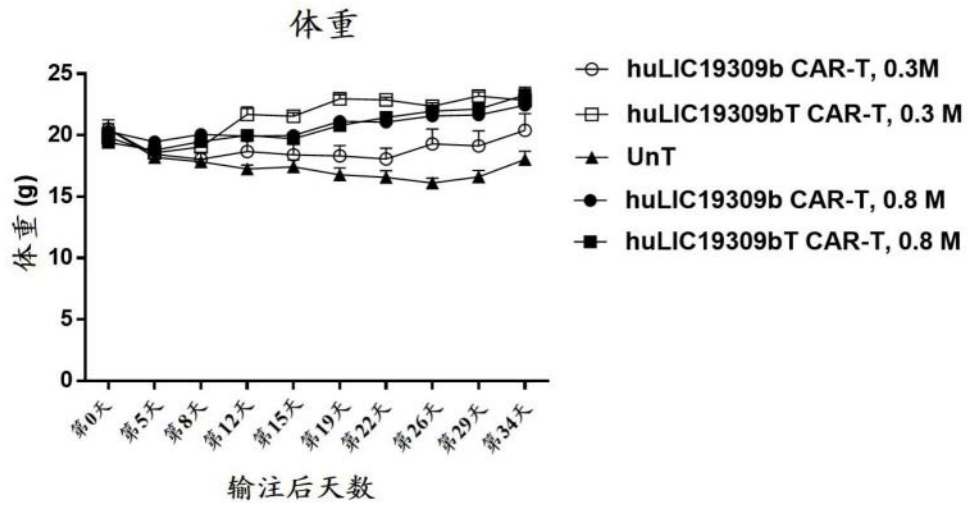


图12A

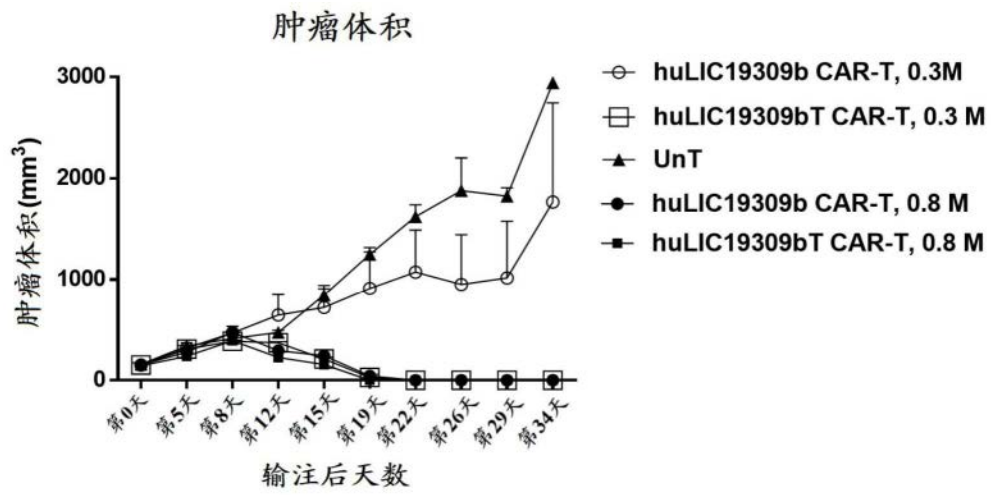


图12B

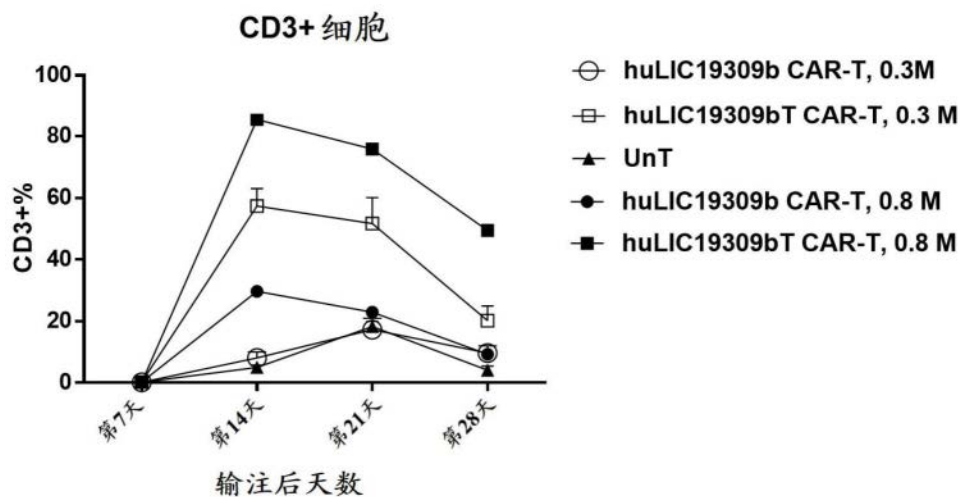


图12C

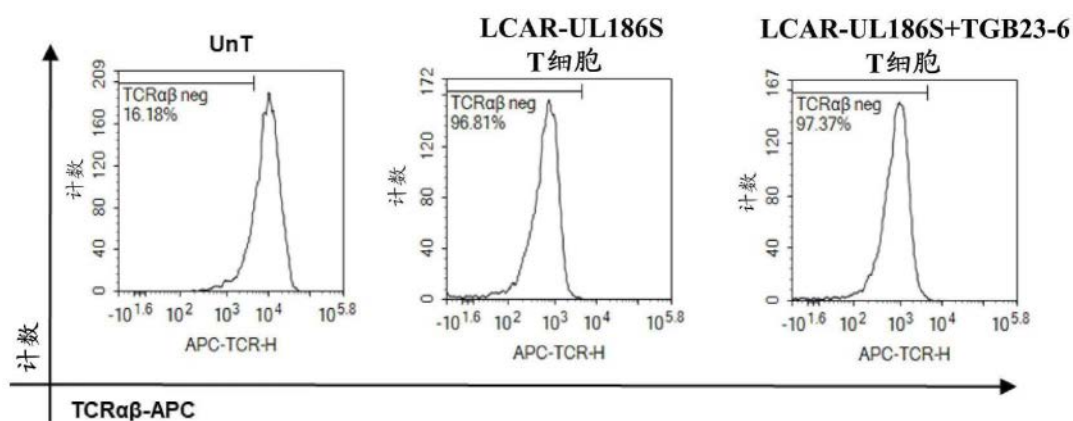


图13A

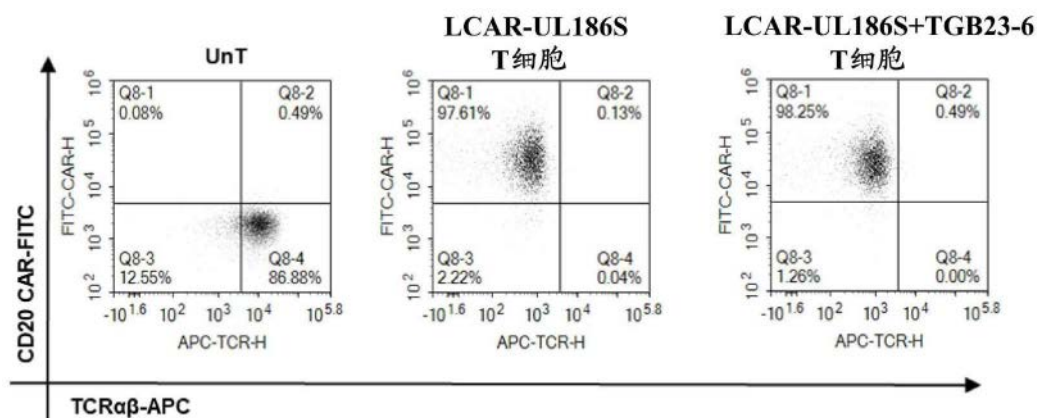


图13B

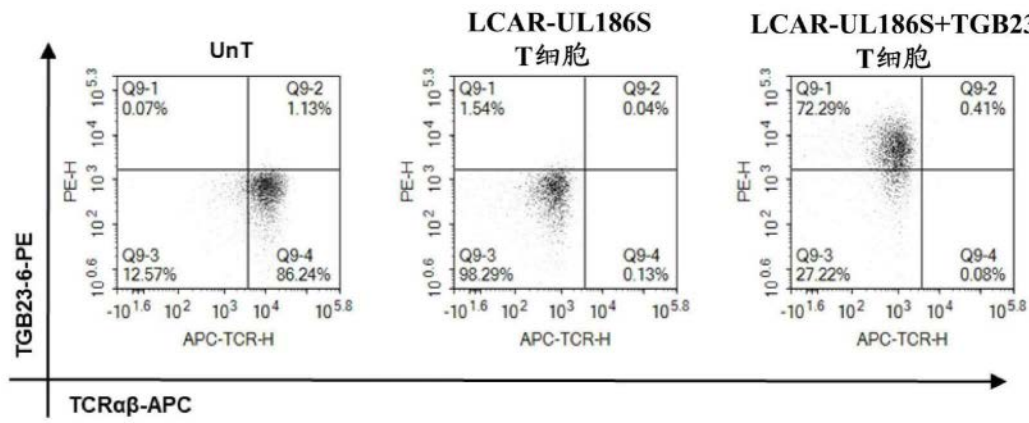


图13C

对Raji细胞的特异性细胞毒性

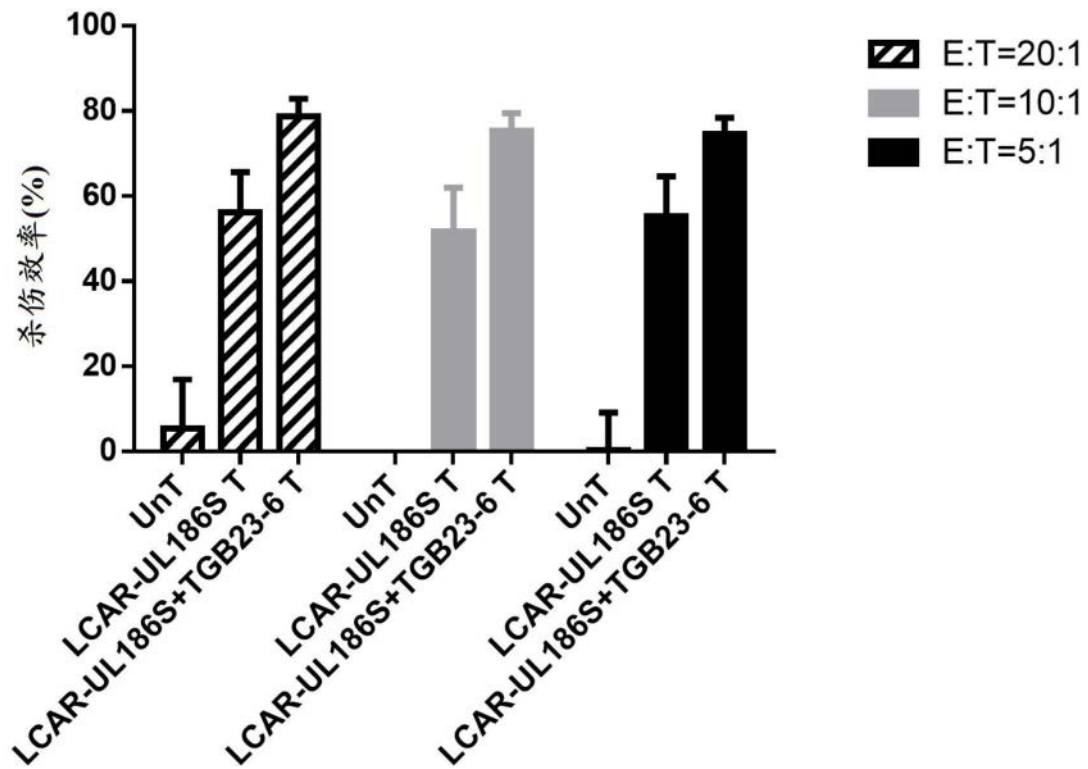


图14

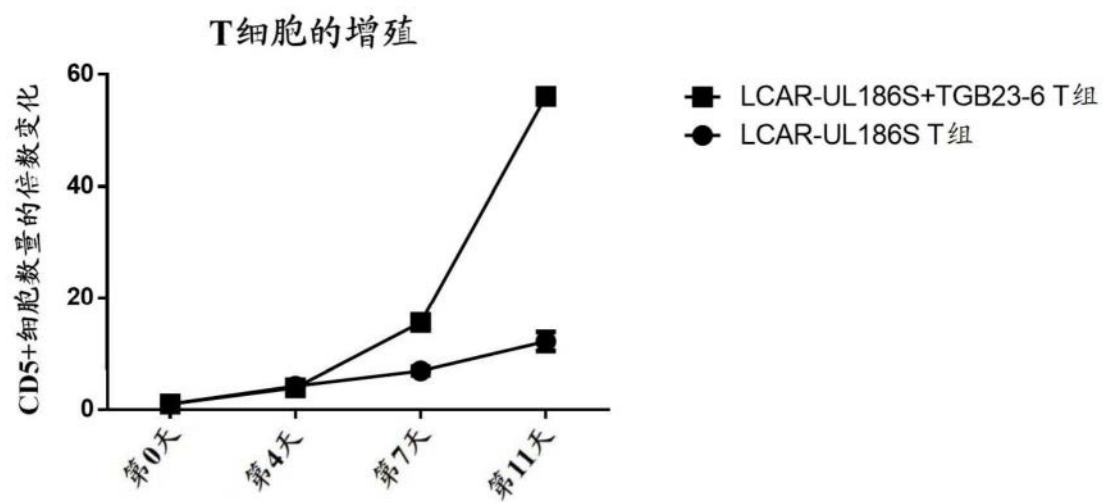


图15