



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108779161 A

(43)申请公布日 2018. 11. 09

(21)申请号 201680066602.4

M • C • 麦隆

(22)申请日 2016.09.22

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

(30)优先权数据

62/222,132 2015.09.22 US

62/253,790 2015.11.11 US

代理人 张全信 赵蓉民

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.15

(51)Int.Cl.

C07K 14/705(2006.01)

C07K 14/725(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/053097 2016.09.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/053556 EN 2017.03.30

(71)申请人 宾夕法尼亚大学董事会
地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 J • L • 瑞利 R • 雷曼
A • S • 佩妮 C • T • 艾利布雷特

权利要求书3页 说明书47页
序列表82页 附图52页

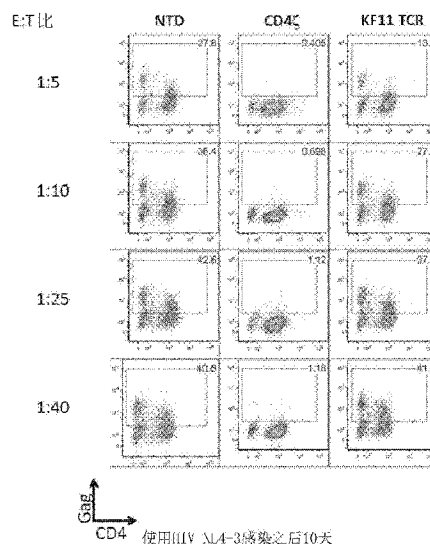
(54)发明名称

重定向T细胞以治疗HIV感染的方法

(57)摘要

本发明涉及使用CD4膜结合嵌合受体或HIV特异性scFv CAR治疗感染HIV的哺乳动物的组合和方法。一方面包括用于过继性细胞疗法和治疗与HIV感染相关联的疾病或病症的修饰的T细胞和包括该修饰的细胞的药物组合物。

CD4膜结合嵌合受体比TCR更好地控制HIV复制



1. 分离的核酸序列,其编码包括CD4细胞外结构域、跨膜结构域、和信号传导结构域的膜结合嵌合受体,其中所述CD4细胞外结构域能够识别和结合感染HIV的细胞。

2. 权利要求1所述的分离的核酸序列,其中所述CD4细胞外结构域由包括SEQ ID NO:3或64的核酸序列编码。

3. 权利要求1所述的分离的核酸序列,其中所述跨膜结构域包括由核酸序列SEQ ID NO:4或65编码的CD8 α 较链,并且跨膜结构域包括由如下核酸序列编码的至少一种结构域,所述核酸序列包括选自SEQ ID NO:5和8的一种。

4. 权利要求1所述的分离的核酸序列,其中所述信号传导结构域包括由包括SEQ ID NO:6或68的核酸序列编码的CD3 ζ 信号传导结构域。

5. 权利要求1所述的分离的核酸序列,进一步包括共刺激信号传导区。

6. 权利要求5所述的分离的核酸序列,其中所述共刺激信号传导区包括选自TCR ζ 的 α 、 β 或 ζ 链,FcR γ ,FcR β ,CD3 γ ,CD3 δ ,CD3 ϵ ,CD5,CD22,CD79a,CD79b,或CD66d的共刺激分子的细胞内结构域,来自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、DAP12、OX9、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性地结合的配体的共刺激信号传导区,和其任意组合。

7. 权利要求6所述的分离的核酸序列,其中所述共刺激信号传导区是CD28并且由包括SEQ ID NO:9或67的核酸序列编码。

8. 权利要求1所述的分离的核酸序列,其中所述CD4细胞外结构域特异性地结合至HIV包膜 (Env) 糖蛋白。

9. 载体,其包括权利要求1所述的分离的核酸序列。

10. 权利要求9所述的载体,其中所述核酸序列包括选自SEQ ID NO:1、7、62和63的至少一种。

11. 分离的氨基酸序列,其编码包括CD4细胞外结构域、跨膜结构域、和信号传导结构域的膜结合嵌合受体,其中所述CD4细胞外结构域能够识别和结合感染HIV的细胞。

12. 权利要求11所述的分离的氨基酸序列,其中所述CD4细胞外结构域包括氨基酸序列SEQ ID NO:46。

13. 权利要求11所述的分离的氨基酸序列,其中所述跨膜结构域包括SEQ ID NO:47的CD8 α 较链,并且跨膜结构域包括选自SEQ ID NO:48和49的至少一种氨基酸序列。

14. 权利要求11所述的分离的氨基酸序列,其中所述信号传导结构域包括包含SEQ ID NO:51的CD3 ζ 信号传导结构域。

15. 权利要求11所述的分离的氨基酸序列,进一步包括共刺激信号传导区。

16. 权利要求15所述的分离的氨基酸序列,其中所述共刺激信号传导区包括选自TCR ζ 的 α 、 β 或 ζ 链,FcR γ ,FcR β ,CD3 γ ,CD3 δ ,CD3 ϵ ,CD5,CD22,CD79a,CD79b,或CD66d的共刺激分子的细胞内结构域,来自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、DAP12、OX9、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性地结合的配体的共刺激信号传导区,和其任意组合。

17. 权利要求16所述的分离的氨基酸序列,其中所述共刺激信号传导区是CD28并且包括SEQ ID NO:49。

18. 权利要求11所述的分离的氨基酸序列,其中所述CD4细胞外结构域特异性地结合至

所述HIV包膜 (Env) 糖蛋白。

19. 载体, 其包括膜结合嵌合受体, 所述膜结合嵌合受体包括CD4细胞外结构域、跨膜结构域、和信号传导结构域, 其中所述CD4细胞外结构域能够识别和结合感染HIV的细胞, 其中所述载体包括选自SEQ ID NO: 44和45的至少一种氨基酸序列。

20. 权利要求19所述的载体, 其中所述载体包括EF α 启动子。

21. 分离的核酸序列, 其编码包括HIV特异性结合结构域、跨膜结构域、共刺激信号传导区、和信号传导结构域的嵌合抗原受体 (CAR), 其中所述HIV结合结构域包括抗-HIV抗体或其片段。

22. 权利要求21所述的分离的核酸序列, 其中所述HIV特异性结合结构域包括重和轻链。

23. 权利要求21所述的分离的核酸序列, 其中所述HIV特异性结合结构域是人抗体、人源化抗体、和其片段。

24. 权利要求21所述的分离的核酸序列, 其中所述抗体或其片段选自Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、和单链Fv (scFv)。

25. 权利要求24所述的分离的核酸序列, 其中所述scFv包括选自SEQ ID NO: 13、17、21、25、29、57-60和61的氨基酸序列。

26. 权利要求24所述的分离的核酸序列, 其中所述scFv由选自SEQ ID NO: 12、16、20、24、28、75-78和79的核酸序列编码。

27. 权利要求21所述的分离的核酸序列, 其中所述HIV特异性结合结构域特异性地结合至感染HIV的细胞的表面或HIV病毒粒子。

28. 权利要求21所述的分离的核酸序列, 其中所述共刺激信号传导区包括选自TCR、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD86、普通的FcR γ 、FcR β (Fc ϵ R1b)、CD79a、CD79b、Fc γ RIIa、DAP10、DAP12、T细胞受体 (TCR)、CD8、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX9、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、KIR家族蛋白、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性地结合的配体、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、To11样受体1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、和其任意组合的共刺激分子的细胞内结构域。

29. 权利要求21所述的分离的核酸序列, 其中所述信号传导结构域包括由核酸序列SEQ ID NO: 6或68编码的CD3 ζ 信号传导结构域。

30. 权利要求21所述的分离的核酸序列, 其中所述CAR由选自SEQ ID NO: 10、14、18、22、26、34、70-73、和74的核酸序列编码。

31. 权利要求21所述的分离的核酸序列, 其中所述CAR具有选自SEQ ID NO: 11、15、19、23、27、35、52-55、和56的氨基酸序列。

32. 修饰的细胞,其包括权利要求1或权利要求21所述的分离的核酸序列。
33. 权利要求32所述的修饰的细胞,其中所述细胞选自T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、和调节性T细胞。
34. 权利要求33所述的修饰的细胞,其中所述核酸序列选自DNA和mRNA。
35. 权利要求33所述的修饰的细胞,其中所述核酸序列通过选自电穿孔、使用慢病毒、使用逆转录病毒和基于化学的转染的至少一种程序被引入所述细胞。
36. 组合物,其包括权利要求33所述的修饰的细胞。
37. 权利要求33所述的细胞在制造用于治疗需要其的对象中HIV感染的药物的用途。
38. 药物组合物,其包括权利要求33所述的修饰的细胞和药学上可接受的运载体。
39. 用于刺激感染HIV的哺乳动物中细胞免疫应答的方法,所述方法包括给所述哺乳动物施用有效量的权利要求33所述的修饰的细胞。
40. 治疗感染HIV的哺乳动物的方法,所述方法包括给所述哺乳动物施用权利要求33所述的修饰的细胞。
41. 权利要求40所述的方法,其中所述修饰的细胞对所述哺乳动物是自体的。
42. 权利要求41所述的方法,进一步包括给所述哺乳动物施用抗逆转录病毒疗法(HAART)。
43. 权利要求41所述的方法,其中所述修饰的细胞和所述HAART被共施用至所述哺乳动物。

重定向T细胞以治疗HIV感染的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请以35 U.S.C. §119 (e) 要求2015年9月22日提交的美国临时专利申请号62/222,132和2015年11月11日提交的美国临时专利申请号62/253,790的优先权,其通过引用以其全部并入本文。

[0003] 关于联邦资助的研究或研发的声明

[0004] 本发明在美国国立卫生研究给予的批准号AI104280、AI117950、和AR064220下使用政府支持完成。政府具有本发明中的某些权利。

背景技术

[0005] 不管抗逆转录病毒疗法最小化人免疫缺陷病毒类型 (HIV) 复制并且增加患者寿命和生活质量的能力如何,与终身治疗方案相关联的健康结果和经济负担致使彻底治愈是极具吸引力的。虽然T细胞在控制病毒复制中发挥重要作用,但是它们自身是HIV介导的破坏的靶标。

[0006] CD4T细胞活性的恢复,不论通过免疫强化或通过防止缺失,是在不存在高活性抗逆转录病毒疗法 (HAART) 的情况下使得能够长期控制HIV复制的关键因素。将T细胞制造为治疗剂以治疗HIV的尝试已经进行了超过二十年。T细胞可以被改造以表达称为嵌合抗原受体 (CAR) 的合成免疫受体,其由细胞外靶向抗体和细胞内信号传导结构域组成。此新的研究领域,称为过继性T细胞疗法,最近已经经历了许多技术进步。重要地,T-细胞疗法途径具有保护辅助性CD4T细胞和使它们装备直接抗病毒功能的潜力,其对在不存在抗逆转录病毒疗法的情况下改进HIV特异性细胞毒性和取得HIV复制的控制可以是至关重要的。虽然在用于过继性疗法的T细胞工程领域中已经取得重大进步,包括展现安全性和可行性,但是没有临床试验在不存在HAART的情况下导致对HIV-复制的持久性和一致性控制。

[0007] 与疫苗途径——其依赖于患者自己体内HIV特异性淋巴细胞的产生和引发——形成对比,过继性T-细胞疗法提供了在施用之前定制治疗性T细胞的机会。因而,不管使用T细胞的直接基因操纵的不成功的治疗性尝试如何,清楚的是过继性细胞疗法可以通过生成HIV-抗性细胞、重定向HIV特异性免疫应答、或两种策略的组合有助于功能性治愈。然而,目前,不清楚如何最好地改造T细胞,使得可以在不存在抗逆转录病毒疗法的情况下取得对HIV复制的持续控制。

[0008] 本领域对抑制HIV复制和提供基因疗法介导的功能性治愈的更有效的T-细胞基因-工程和基因-编辑策略存在极大需要。本发明解决此需要。

发明内容

[0009] 如本文描述的,本发明涉及使用CD4膜结合嵌合受体或HIV特异性单链可变片段 (scFv) CAR治疗感染HIV的哺乳动物的组合物和方法。

[0010] 在一方面,本发明包括编码膜结合嵌合受体的分离的核酸序列。分离的核酸序列包括CD4细胞外结构域、跨膜结构域、和信号传导结构域,其中CD4细胞外结构域能够识别和

结合感染HIV的细胞。

[0011] 在另一方面,本发明包括编码膜结合嵌合受体的分离的氨基酸序列。分离的氨基酸序列包括CD4细胞外结构域、跨膜结构域、和信号传导结构域,其中CD4细胞外结构域能够识别和结合感染HIV的细胞。

[0012] 在一些实施方式中,CD4细胞外结构域由包括SEQ ID NO:3或64的核酸序列编码。在一些实施方式中,CD4细胞外结构域包括氨基酸序列SEQ ID NO:46。在一些其它实施方式中,CD4细胞外结构域特异性地结合至HIV包膜 (Env) 糖蛋白。

[0013] 在一些实施方式中,跨膜结构域包括由核酸序列SEQ ID NO:4或65编码的CD8 α 较链并且跨膜结构域包括由如下核酸序列编码的至少一种结构域:其包括选自SEQ ID NO:5和8的一种。在其它实施方式中,跨膜结构域包括SEQ ID NO:47的CD8 α 较链,并且跨膜结构域包括选自SEQ ID NO:48和49的至少一种氨基酸序列。

[0014] 在其它实施方式中,信号传导结构域包括由包括SEQ ID NO:6或68的核酸序列编码的CD3 ζ 信号传导结构域。在其它实施方式中,信号传导结构域包括包含SEQ ID NO:51的CD3 ζ 信号传导结构域。

[0015] 在又其它实施方式中,本发明的分离的核酸或氨基酸序列进一步包括共刺激信号传导区。

[0016] 在本文描绘的发明的上面的方面或任何其它方面的多种实施方式中,共刺激信号传导区包括选自TCR ζ 的 α 、 β 或 ζ 链,FcR γ ,FcR β ,CD3 γ ,CD3 δ ,CD3 ϵ ,CD5,CD22,CD79a,CD79b,或CD66d的共刺激分子的细胞内结构域,来自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、DAP12、OX9、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性地结合的配体的共刺激信号传导区,和其任意组合。在一些实施方式中,共刺激信号传导区是CD28并且由包括SEQ ID NO:9或67的核酸序列编码。在其它实施方式中,共刺激信号传导区是CD28并且包括SEQ ID NO:49。

[0017] 在一方面,本发明包括载体,其包括编码膜结合嵌合受体的分离的核酸序列。载体的分离的核酸序列包括CD4细胞外结构域、跨膜结构域、和信号传导结构域,其中CD4细胞外结构域能够识别和结合感染HIV的细胞。在一些实施方式中,载体的核酸序列包括选自SEQ ID NO:1、7、62和63的至少一种。

[0018] 在另一方面,本发明包括载体,其包括膜结合嵌合受体。载体的膜结合嵌合受体包括CD4细胞外结构域、跨膜结构域、和信号传导结构域,其中CD4细胞外结构域能够识别和结合感染HIV的细胞,其中载体包括选自SEQ ID NO:44和45的至少一种氨基酸序列。在一些实施方式中,载体包括EF α 启动子。

[0019] 在又另一个方面,本发明包括编码嵌合抗原受体 (CAR) 的分离的核酸序列。编码本发明的CAR的分离的核酸序列包括HIV特异性结合结构域、跨膜结构域、共刺激信号传导区、和信号传导结构域,其中HIV结合结构域包括抗-HIV抗体或其片段。

[0020] 在一些实施方式中,HIV特异性结合结构域包括重和轻链。在其它实施方式中,HIV特异性结合结构域是人抗体、人源化抗体、和其片段。在其它实施方式中,抗体或其片段选自Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段、和单链Fv (scFv)。在又其它实施方式中,scFv包括选自SEQ ID NO:13、17、21、25、29、57-60和61的氨基酸序列。在进一步的实施方式中,scFv由选自SEQ ID NO:12、16、20、24、28、75-78和79的核酸序列编码。在还进一步的实施方式中,HIV

特异性结合结构域特异性地结合至感染HIV的细胞的表面,或HIV病毒粒子。

[0021] 在一些实施方式中,本发明的CAR的共刺激信号传导区包括选自TCR、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD86、普通的FcR γ 、FcR β (Fc ϵ R1b)、CD79a、CD79b、Fc γ RIIa、DAP10、DAP12、T细胞受体 (TCR)、CD8、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX9、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、KIR家族蛋白、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性地结合的配体、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、Toll样受体1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、和其任意组合的共刺激分子的细胞内结构域。

[0022] 在一些实施方式中,本发明的CAR的信号传导结构域包括由核酸序列SEQ ID NO:6或68编码的CD3 ζ 信号传导结构域。

[0023] 在一些实施方式中,CAR由选自SEQ ID NO:10、14、18、22、26、34、70-73、和74的核酸序列编码。在其它实施方式中,CAR具有选自SEQ ID NO:11、15、19、23、27、35、52-55、和56的氨基酸序列。

[0024] 在一方面,本发明包括修饰的细胞,其包括分离的核酸序列,该分离的核酸序列包括CD4细胞外结构域、跨膜结构域、和信号传导结构域,其中CD4细胞外结构域能够识别和结合感染HIV的细胞;或分离的核酸序列,该分离的核酸序列编码包括HIV特异性结合结构域、跨膜结构域、共刺激信号传导区、和信号传导结构域的CAR,其中HIV结合结构域包括抗-HIV抗体或其片段。

[0025] 在一些实施方式中,本发明细胞的修饰的细胞选自T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、和调节性T细胞。在其它实施方式中,修饰的细胞的核酸序列选自DNA和mRNA。在又其它实施方式中,核酸序列通过选自电穿孔、使用慢病毒、使用逆转录病毒和基于化学的转染的至少一种程序被引入细胞。

[0026] 在另一方面,本发明包括组合物,其包括如本文上面列出的本发明的修饰的细胞。

[0027] 在另一方面,本发明包括本发明的修饰的细胞在制造用于治疗需要其的对象中HIV感染的药物中的用途。

[0028] 在又另一个方面,本发明包括药物组合物,其包括本发明的修饰的细胞和药学上可接受的运载体。

[0029] 在进一步的方面,本发明包括用于刺激感染HIV的哺乳动物中细胞免疫应答的方法。方法包括给哺乳动物施用有效量的如本文上面列出的本发明的修饰的细胞。

[0030] 在又进一步的方面,本发明包括治疗感染HIV的哺乳动物的方法。方法包括给哺乳动物施用如本文上面列出的本发明的修饰的细胞。在一些实施方式中,修饰的细胞对哺乳动物是自体的。在其它实施方式中,本发明的方法进一步包括给哺乳动物施用抗逆转录病毒疗法(HAART)。在又其它实施方式中,修饰的细胞和HAART被共同施用至哺乳动物。

附图说明

[0031] 当连同附图阅读时,将更好地理解本发明的优选实施方式的下列详细描述。出于说明本发明的目的,在附图中显示了当前优选的实施方式。然而,应当理解本发明不限于在附图中显示的实施方式的精确的布置和工具。

[0032] 图1A-1B是展现CD4CAR在体外比HIV特异性精英控制者(elite controller) TCR强力超过100-倍的系列图。图1A:CD4和CD8T细胞获得自HLA-B57+正常供体。以HIV Ba1感染CD4T细胞,并且24小时之后,未转导的CD8T细胞(NTD)、表达特异于KAFSPEVIPMF-B57-KF11(KF11)的HLA-B57局限的TCR的CD8T细胞、或表达EF1 α -CD8 α TM CD4CAR构建体(CD4z)的CD8T细胞,后二者均在EF1 α 启动子下表达,以指示的效应物/靶标比混合。转导效率在共培养之前被归一化至40%。在6天的共培养后,针对CD8阴性T细胞显示Gag p24和CD4染色。CD4膜结合嵌合受体(还称为CD4 ζ 或CD4 ζ 构建体)比HLA-B*57局限的KF11精英控制者TCR更好地控制NL4-3HIV-1复制。KF11TCR与患者中对HIV-1复制的较好控制相关联并且是针对HIV-1的最强力的患者源TCR之一。这代表使用基于TCR的策略可以取得的对HIV-1的最佳控制。与KF11TCR形成对比,CD4 ζ 能够在显示的所有效应细胞/靶标细胞(E:T)比下完全地控制HIV-1复制。图1B:在CD8阴性细胞上门控的以一式三份进行的单个实验的汇总数据。误差棒指示平均值的标准误差(SEM)。这些数据代表3个独立实验。

[0033] 图2A-2G是描绘启动子和跨膜改变改进CD4膜结合嵌合受体功效和增加对HIV-1的控制的系列示意图和图。图2A:与包含PGK启动子和CD4 TM结构域的进入临床试验的构建体(底)比较,具有CD8 α 跨膜(TM)和EF1 α 启动子的新的、改进的CD4膜结合嵌合受体构建体(顶)的示意图。图2B:转导的CD8中CD4 ζ 的表面表达。与进入临床试验的基于逆转录病毒载体的构建体(最右)比较,当使用慢病毒载体时,以更高的水平表达相同的构建体(左二)。当EF1 α 启动子被置入慢病毒载体时,此表达被进一步增加(左二)。图2C:以演示显示的所有数据的实验时间线。使用 α CD3/CD28涂覆的珠和100-300IU/ml IL-2刺激健康供体CD4和CD8T淋巴细胞。在24小时后,使用慢病毒转导CD8,或在第3和5天使用逆转录病毒进行转导。在5天后,去除珠,并且在48小时之后感染CD4T细胞。在感染CD4T细胞后24小时,以不同的E:T比共培养CD8。培养物每隔一天进料培养基和IL-2并且进行CD4、CD8、和细胞内p24染色直到HIV-1复制在NTD孔中达到最大复制能力(通常在第10-12天左右)。图2D-2E:以HIV-1Ba1感染CD4T细胞之后8天的细胞内p24染色。图2D,在CD4T细胞上门控,和图2E,在CD8T细胞上门控。具有慢病毒载体、EF1 α 启动子、和CD8 α 跨膜结构域的新的、改进的CD4 ζ 构建体在比具有PGK启动子和CD4跨膜结构域的构建体(在1:5和1:10下失控)低得多的E:T比下(直到大概1:100)控制HIV-1。虽然当与逆转录病毒PGK CD4 TM构建体比较时观察到更高表达的慢病毒PGK CD4 TM构建体,但是在HIV-1复制的控制方面可见小益处。重要地,较高表达的EF1 α CD8 TM构建体不促进较高的感染速率,这是因为CD8保持未感染直到大约1:100比率,而PGK CD4 TM⁺CD8在较低E:T比下变得感染。图2F:在CD8阴性细胞上门控的以一式三份进行的单个实验的汇总数据。误差棒指示平均值的标准误差(SEM)。图2G:CD8阴性T细胞中的细胞内p24在实验的时间过程内的测量水平。每个图代表不同的E:T比。这些数据代表三个独立实验。

[0034] 图3A-3E是系列示意图和图,其描绘EF1 α 启动子和CD8 α 跨膜改变是改进CAR表达

和HIV-1的控制的至关重要的修饰。图3A:四种慢病毒载体嵌合受体构建体——其被生成以比较改变启动子和跨膜组分每个如何各自地影响对HIV-1复制的控制——的示意图。顶部构建体指的是什么被用于临床试验但是现在被插入慢病毒载体。图3B:活化后8天CD8T细胞上的CD4CAR表达。原代人CD8T细胞使用 α CD3/ α CD28涂覆的珠被活化并且保持未转导的(NTD)或转导指示的慢病毒载体。在8天的培养后,通过CD4染色测量CAR表达。在每个图上指示每个构建体的中值荧光强度(MFI)。图3C:以HIV-1Ba1感染CD4T细胞之后8天的细胞内p24染色。左柱集在CD4T细胞上门控和右柱集在CD8T细胞上门控。如先前可见的,EF1 α CD8TM构建体在最低E:T比下控制HIV-1。具有EF1 α 启动子(中柱)的CD4 TM的单纯增加的表达改进了对HIV-1复制的控制,但是EF1 α 启动子和CD8 α 跨膜置换的增加的表达的组合产生对HIV-1的最佳控制。CD8 α TM似乎减少以嵌合受体改造的CD8T细胞的感染(右柱集),特别是在1:50比率(EF1 α 构建体)和1:25比率(PGK构建体)下。图3D:在CD8阴性细胞上门控的以一式三份进行的单个实验的汇总数据。误差棒指示平均值的标准误差(SEM)。图3E:CD8阴性T细胞中的细胞内p24在实验的时间过程内的水平。每个图代表不同的E:T比。这些数据代表三个独立实验。

[0035] 图4A-4C是展现基于单链可变片段(scFv)广泛中和抗体(bnAb)的CAR和CD4膜结合嵌合受体二者可以控制HIV-1感染的系列表格和图。图4A:在假设这些强力和广泛中和的HIV特异性抗体将提供靶向感染HIV的细胞的替代手段下生成由HIV-1特异性bnAb改装的一组单链可变片段(scFv)CAR。以它们的HIV-1结合宽度和中和效力排列的一组scFv(参见图4A中的表格)被克隆入相同的EF1 α -CD8 α TM- ζ 构建体骨架作为CD4膜结合嵌合受体,并且评估它们控制HIV-1复制的能力。在活化之后两周,这些T细胞与Cr51标记的K562靶标细胞——其在指示的效应物/靶标比下表达HIV-1YU2GP160——混合。标绘靶标的特异性裂解。标绘的数据显示三个独立实验的平均数。来自4小时共培养的Cr51释放杀伤试验显示了CD8T细胞表达scFv CAR或CD4膜结合嵌合受体中任一种,而非未转导的(NTD)T细胞、裂解的表达Env的靶标细胞。这指示scFv CAR以适当的折叠/构象表达并且能够结合Env。图4B:原代人CD8T细胞使用 α CD3/ α CD28涂覆的珠被活化并且保持未转导的(NTD)或转导EF1 α -CD8 α TM慢病毒载体——其编码源自VRC01、3BNC60、PG9、PGT128、或PGDM1400抗体的HIV特异性CAR,或CD4CAR。活化之后两周,CD8T细胞在1:1比率下与表达HIV-1YU2GP160的K562细胞共培养6小时,并且测量细胞内IFN γ 和MIP-1 β 产生。转导效率在共培养之前被归一化至60%。图4C:使用在图2C中概述的实验设计,测试HIV特异性CAR在原代人CD4T细胞中控制HIV-1复制的能力。转导效率在共培养之前被归一化至70%。在以HIV-1Ba1感染CD4T细胞之后9天进行细胞内Gag p24和CD4染色,显示CD4T细胞。CD4膜结合嵌合受体和scFv CAR二者展现了相对于NTD对照高至1:50-1:200的E:T比的Env靶标细胞,其优于在图1A中显示的KF11TCR的活性,该KF11TCR展现了高至1:25E:T比的功效。误差棒指示平均值的标准误差(SEM)。数据代表三个独立实验。

[0036] 图5A-5B是系列图,其显示CD28共刺激促进对HIV-1Ba1的控制并且CD28和4-1BB共刺激对体外HIV-1复制的控制具有相反作用。图5A:在以HIV-1Ba1感染CD4T细胞之后10天进行细胞内p24染色,显示CD4T细胞。已经用于普通CAR设计的一组共刺激结构域被克隆入CD4膜结合嵌合受体骨架以测定共刺激对HIV-1体外控制的作用。与CD4 ζ 构建体同样地或更好地一致控制HIV-1的唯一的膜结合嵌合受体是CD4CD28 ζ 构建体。相比之下,4-1BB、ICOS、和

CD27的添加损害对HIV-1的控制,并且OX40和CD28-4-1BB ζ 组合似乎具有极小作用。图5B:在CD8阴性T细胞上启动的以一式三份进行的单个实验的汇总数据。误差棒指示平均值的标准误差(SEM)。数据代表三个独立实验。

[0037] 图6是CD4膜结合嵌合受体的核苷酸序列(CD4 ζ 构建体;SEQ ID NO:1)。此序列已经以红色注释与EF1 α 启动子相关的部分(SEQ ID NO:2),以黄色注释CD4细胞外结构域(SEQ ID NO:3),以绿色注释CD8 α 细胞外铰链(SEQ ID NO:4),以蓝绿色注释CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:5)和以粉色注释CD3 ζ (SEQ ID NO:6)。

[0038] 图7是CD4CD28膜结合嵌合受体的核苷酸序列(CD4CD28 ζ 构建体;SEQ ID NO:7)。此序列已经以红色注释与EF1 α 启动子相关的部分,以黄色注释CD4细胞外结构域,以绿色注释CD8 α 细胞外铰链,以蓝绿色注释CD28跨膜结构域(SEQ ID NO:8),以蓝色注释CD28共刺激结构域(SEQ ID NO:9)和以粉色注释CD3 ζ 。

[0039] 图8是基于五种抗体的CAR构建体的核苷酸和氨基酸(aa)序列表:PGDM1400杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)核苷酸和aa序列(分别地SEQ ID NO:10和11)、PGDM1400scFv核苷酸和aa序列(分别地SEQ ID NO:12和13)、PGT128KIR核苷酸和aa序列(分别地SEQ ID NO:14和15)、PGT128scFv核苷酸和aa序列(分别地SEQ ID NO:16和17)、VRC01KIR核苷酸和aa序列(分别地SEQ ID NO:18和19)、VRC01scFv核苷酸和aa序列(分别地SEQ ID NO:20和21)、3BNC60-KIR核苷酸和aa序列(分别地SEQ ID NO:22和23)、3BNC60scFv核苷酸和aa序列(分别地SEQ ID NO:24和25)、VRC01c-mut-KIR核苷酸和aa序列(分别地SEQ ID NO:26和27)、VRC01c-mut scFv核苷酸和aa序列(分别地SEQ ID NO:28和29)、CD4Dap12-KIRS2核苷酸和aa序列(分别地SEQ ID NO:30和31)、CD4-KIR核苷酸和aa序列(分别地SEQ ID NO:32和33)、和VRC01IgG4bbz核苷酸和aa序列(分别地SEQ ID NO:34和35)。

[0040] 图9A-9C是一系列图和直方图,其展现了基于scFv的CAR(scFv-CAR)的细胞毒性是特异性的和强力的。VRC01CAR针对表达HIV YU-2毒株的靶标细胞(图9A)而非表达CD19的细胞(图9B)显示了特异性细胞毒性;通过使用杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)细胞质结构域(图9A)可以增加细胞毒性。杀伤功效与通过CAR T细胞的干扰素 γ (IFN γ)释放相关联(图9C)。⁵¹Cr释放试验的持续时间是4小时。KIR构建体由DAP12和连接至KIRS2跨膜结构域的scFv构成。G4-bbz构建体由连接至IgG4铰链、CD8跨膜结构域和4-1BB的scFv以及CD3 ζ 细胞内尾的构成。bn01=VRC01;NTD=未转导的对照T细胞。

[0041] 图10A-10C是一系列图和直方图,其描绘了scFv-CAR的细胞特异性细胞毒性的另一个例子。3BNC60和VRC01c-CAR显示了表达HIV-1包膜gp120/41的K562细胞(YU-2分离株)的特异性裂解(图10A),而非表达CD19的K562细胞(图10B)。如图9C中先前显示的,通过CAR T细胞的特异性IFN γ 产生与杀伤功效相关联(图10C)。3BNC60涉及另一个CD4结合位点广泛中和抗体。VRC01-c是VRC01的衍生物,其在HCDR3和HCDR1之间缺少二硫键并且可以因此与原始的VRC01scFv——其包含另外的、非典型的二硫键——比较显示更大百分比的正确折叠的scFv。对于3BNC60和VRC01-c,在KIR和IgG4-bbz(也称为G4)构建体之间,在杀伤方面不存在可检测的差异。

[0042] 图11A-11C是展现CD4CAR特异性地应答于Env+细胞而非II类MHC+细胞的系列图。图11A:原代人CD8T细胞使用 α CD3/ α CD28涂覆的珠被活化并且保持未转导的(NTD)或转导EF1 α -CD8 α TM慢病毒载体——其编码单独表达CD3- ζ 信号传导结构域,或与CD28或4-1BB共

刺激结构域组合表达CD3- ζ 信号传导结构域的CD4CAR。活化之后两周,CD8T细胞在1:1比率下与未修饰的K562细胞、表达高水平的HLA-DR的K562细胞(参见图14)、或表达HIV-1YU2GP160的K562细胞共培养6小时。在左侧上显示细胞内IFN γ 和MIP-1 β 表达,和在右侧上显示细胞内IL-2表达和CD107a表面动员。图11B:设计共培养试验以展现CD4CAR+CD8T细胞不杀伤表达II类MHC的靶标细胞。简略地,来自图6A的NTD或转导CD4 28z CAR的CD8T细胞与表达HLA-A2和GFP的K562细胞以及表达HLA-DR*0401和mCherry的K562在1:1:1比率下共培养。在混合(0hr)和在3天的共培养(72hr)后立刻进行测量GFP和mCherry表达的流式细胞术。图11C:以一式三份进行的单个实验的汇总数据,其测量表达HLA-A2/GFP的细胞与表达HLA-DR*0401/mCherry的细胞在24、48、和72小时的培养后的比率。误差棒指示平均值的标准误差(SEM)。数据代表三个独立实验。

[0043] 图12A-12F是描绘表达优化的CD4CAR的T细胞控制HIV-1复制并且体内扩展至比原始CD4CAR大得多的水平的系列图。使用8百万个CD4T细胞和2百万个CD8T细胞输注7只NSG(NOD-scid IL2Rgnull)小鼠的组群。CD8T细胞保持未转导的(NTD),转导优化的(EF1 α -CD8 α TM,慢病毒载体)CD4- ζ CAR——其包含4-1BB或CD28细胞内共刺激结构域,或转导临床试验(基于MLLV的,PGK-CD4TM)CD4CAR,其分别表示为NTD、BBz、28z、和CD4z。CD8T细胞转导效率在注入小鼠之前被归一化至50%。在注射之后三周,测量移植物以测定(图12A)基线外周CD4T细胞计数和(图12C)CAR+CD8T细胞计数。两天之后,经由尾静脉注射以HIV-1Ba1感染小鼠。感染之后22天,(图12B)获得终点外周CD4T细胞计数和(图12D)CAR+CD8T细胞计数。感染之后(图12E)七天和(图12F)十八天,测量血浆HIV RNA的拷贝。秩和检验被用于测定统计学显著性(p值:ns>0.05,*<0.05,**<0.01,***<0.0001)。

[0044] 图13A-13C是显示体内富集CCR5-ZFN修饰的CD4CAR CD8T细胞的系列图。在图7中描述的NSG小鼠实验设计中,添加四个另外的组群,其中CD8T细胞在活化和CD4CAR转导前48小时电穿孔有CCR5ZFN RNA,或保持未转导的(NTD)。图13A:在22天的HIV感染后,脾CD8T细胞从感染HIV的小鼠被分离并且分析CCR5破坏频率。图13B:通过人CD4和CD8染色和对在HIV或模拟对照感染之后22天分离的外周血进行流式细胞术来测定表达CD4CAR的CD8T细胞与未转导的CD8T细胞的比率。流式细胞术图显示在图15中。图13C:感染之后十八天,在感染HIV的小鼠中测量血浆HIV RNA的拷贝,如图12F中,但是具有并入的四个ZFN处理组。使用秩和检验检测显著性(p值:ns>0.05,*<0.05,**<0.01,***<0.0001)。

[0045] 图14是描绘转导HLA-DR的K562细胞上高水平的II类MHC表达的图。为了确认转导HLA-DR*0401的K562细胞上II类MHC的高表达,通过流式细胞术测量HLA-DR表达。作为门控对照,已经转导HLA-A2的K562细胞被染色,以及表达高的II类MHC的Raji B细胞。描绘了覆盖三种细胞群的直方图。

[0046] 图15是一系列图,其描绘了4-1BB共刺激结构域在不存在抗原的情况下导致较大的T细胞持续性。在22天的模拟对照感染后,来自转导BBz或28z的、ZFN处理的小鼠组群的外周血细胞或脾细胞使用 α CD4和 α CD8抗体进行CAR表达染色。顶图组显示了外周血和底图组显示了脾细胞。在来自感染HIV的小鼠的所有情况中显示了一个代表性流式图(flow plot)。

[0047] 图16A-16B是展现CCR5ZFN处理不改进CD4CAR CD8T细胞体内保护CD4T细胞或扩展CAR⁺CD8T细胞计数的能力的系列图。图16A:在HIV感染之后22天收集终点外周血CD4T细胞

计数,如图12B中显示的,但是现在还包括来自接受CCR5ZFN修饰的CD8T细胞的小鼠的数据。(B) 在所有组群中,在感染之后22天枚举终点外周血CAR⁺CD8T细胞计数。使用秩和检验检测显著性(p值:ns>0.05,*<0.05,**<0.01,***<0.0001)。

[0048] 图17A-17D是概述本发明中对原始临床试验载体做出的改进的系列表格和图。图17A:描绘探索以改进原始临床试验MMLV基构建体的修饰的完整列表的表格和示意图。图17B:使用在图2C中概述的实验设计,原代人CD8T细胞使用 α CD3/ α CD28涂覆的珠被活化并且保持为未转导的(NTD),转导由PGK启动子驱动的基于原始MMLV的CD4基CAR(临床试验CAR),或转导放置在HIV基慢病毒载体中的优化的EF1 α -CD8 α TM CAR。转导效率在共培养之前被归一化至60%。在7天的与感染HIV Ba1的CD4T细胞的共培养后,通过流式细胞术——在CD8阴性T细胞上门控——测量表面CD4和细胞内Gag p24的表达。图17C:显示在CD8阳性细胞上门控。图17D:在CD8阴性细胞上门控的以一式三份进行的单个实验的汇总数据。误差棒指示平均值的标准误差(SEM)。此数据代表3个独立实验。

[0049] 图18是本发明的优化的HIV CD4CAR和基于HIV抗体的CAR中的一些的注释的氨基酸序列(SEQ ID NO:44-61)的列表。

[0050] 图19是本发明的优化的HIV CD4CAR和基于HIV抗体的CAR中的一些的注释的核酸序列(SEQ ID NO:63-79)的列表。

具体实施方式

[0051] 定义

[0052] 除非另外定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解的相同含义。虽然与本文描述的那些类似或等价的任何方法和材料可以在实践中被用于测试本发明,但是本文描述了优选的材料和方法。在描述和要求保护本发明中,将使用下列术语。

[0053] 还理解本文使用的术语仅出于描述特定实施方式的目的,并且不意图是限制性的。

[0054] 本文使用冠词“一个”和“一种”,指的是一个或多个(即,至少一个)该冠词的语法对象。举例而言,“一个要素”意思是一个要素或多个要素。

[0055] 如本文使用的“大约”,当指的是可测量的值比如量、时间期间等时,意思是涵盖从规定值的 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 、更优选地 $\pm 5\%$ 、甚至更优选地 $\pm 1\%$ 、和还更优选地 $\pm 0.1\%$ 的变化,只要这样的变化适于进行公开的方法。

[0056] 如本文使用的“活化”指的是已经被充分地刺激以诱导可检测的细胞增殖的T细胞的状态。活化也可以与诱导的细胞因子产生,和可检测的效应物功能相关联。术语“活化的T细胞”指的是经历细胞分裂的T细胞,等等。

[0057] 如本文使用的,术语“衔接分子”指的是具有如下序列的多肽:其允许与两个或更多个分子相互作用,并且在某些实施方式中,促进细胞毒性细胞的活化或失活。

[0058] 如本文使用的术语“抗体”指的是与抗原特异性地结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是自然来源或从重组来源获得的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫反应性部分。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚体。本发明中的抗体可以以多种形式存在,包括,例如,多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab和F(ab)₂,以及单链抗体(scFv)和人源化抗体

(Harlow等1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow等1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston等1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; Bird等1988, Science 242: 423-426)。

[0059] 术语“抗体片段”指的是部分完整抗体,并且指的是完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段,线性抗体,scFv抗体,和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0060] 如本文使用的“抗体重链”指的是以它们自然存在的构象存在于所有抗体分子中的两种类型的多肽链中较大的链。

[0061] 如本文使用的“抗体轻链”指的是以它们自然存在的构象存在于所有抗体分子中的两种类型的多肽链中较小的链。 α 和 β 轻链指的是两种主要的抗体轻链同种型。

[0062] 如本文使用的术语“合成抗体”的意思是使用重组DNA技术生成的抗体,比如,例如,如本文描述的由噬菌体表达的抗体。术语也应当解释为意思是已经由DNA分子——其编码抗体并且该DNA分子表达抗体蛋白——或规定抗体的氨基酸序列的合成生成的抗体,其中DNA或氨基酸序列已经使用本领域可获得和熟知的合成DNA或氨基酸序列技术获得。

[0063] 如本文使用的术语“抗原”或“Ag”被定义为激发免疫应答的分子。此免疫应答可以涉及抗体产生,或特异性免疫活性细胞的活化,或二者。技术人员将理解任何大分子——实际上包括所有蛋白质或肽——可以充当抗原。另外,抗原可以源自重组或基因组DNA。技术人员将理解任何DNA——其包括编码引起免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列——因此编码如本文使用的该术语“抗原”。另外,本领域技术人员将理解抗原不必单独地由基因的全长核苷酸序列编码。容易显而易见的是本发明包括但不限于多于一个基因的部分核苷酸序列的用途,并且这些核苷酸序列以不同的组合布置以引起期望的免疫应答。而且,技术人员将理解抗原完全不必由“基因”编码。容易显而易见的是抗原可以被生成、合成或可以源自生物学样品。这样的生物学样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物流体。

[0064] 如本文使用的术语“抗肿瘤效应”指的是生物学效应,其可以由肿瘤体积的减小、肿瘤细胞数目的减少、转移数目的减少、预期寿命的增加、或与癌性病症相关联的多种生理学症状的改善显现。“抗肿瘤效应”也可以由本发明的肽、多核苷酸、细胞和抗体在预防肿瘤在第一位置的发生的能力显现。

[0065] 根据本发明,术语“自身抗原”意思是由免疫系统识别为异物(foreign)的任何自体抗原。自身抗原包括但不限于细胞蛋白、磷蛋白、细胞表面蛋白、细胞脂质、核酸、糖蛋白,包括细胞表面受体。

[0066] 如本文使用的,术语“自身免疫疾病”被定义为由自身免疫反应导致的障碍。自身免疫疾病是对自体抗原的不适当和过度应答的结果。自身免疫疾病的实例包括但不限于阿狄森氏病、斑秃、强直性脊柱炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性腮腺炎、克罗恩病、糖尿病(I型)、附睾炎、肾小球性肾炎、格雷夫斯氏病、格-巴二氏综合征、桥本氏病、溶血性贫血、系统性红斑狼疮、多发性硬化、重症肌无力、寻常天疱疮、牛皮癣、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、斯耶格伦氏综合征、脊椎关节病、甲状腺炎、血管炎、白斑病、粘液性水肿、恶性贫血、溃疡性结肠炎等。

[0067] 如本文使用的,术语“自体的”意思是指源自相同个体的任何物质,其随后被再引入该个体。

[0068] “同种异体的”指的是源自相同物种的不同动物的移植物。

[0069] “异种的”指的是源自不同物种的动物的移植物。

[0070] 术语“广泛中和抗体(bnAb)”指的是通过中和其效应防护细胞免于特定病毒的多种毒株的抗体。在一些实施方式中,广泛中和HIV-1抗体(bnAb)是中和多种HIV-1病毒株的中和抗体。

[0071] 如本文使用的术语“癌症”被定义为以畸变细胞的快速和失控生长为特征的疾病。癌细胞可以局部地扩散或通过血流和淋巴系统扩散至身体的其它部分。多种癌症的实例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。

[0072] 如本文使用的术语“CD4”意思是规定来自任何来源的CD4的任何氨基酸序列,包括已经通过密码子优化编码CD4的核酸序列生成的CD4的氨基酸序列。可以使用设计以优化氨基酸序列中的密码子的任何可用的技术和算法完成密码子优化。

[0073] 如本文使用的术语“嵌合抗原受体”或“CAR”指的是被工程化以在免疫效应细胞上表达和特异性地结合抗原的人工T细胞受体。CAR可以被用作使用过继性细胞转移的疗法。T细胞从患者去除并且被修饰,使得它们表达特异于特定形式的抗原的受体。例如,在一些实施方式中,已经以对肿瘤相关抗原的特异性表达CAR。CAR还可以包括细胞内活化结构域、跨膜结构域和细胞外结构域,该细胞外结构域包括肿瘤相关抗原结合区。在一些方面,CAR包括融合单链可变片段(scFv)衍生的单克隆抗体,其被融合至跨膜和细胞内结构域。CAR设计的特异性可以源自受体的配体(例如,肽)。在一些实施方式中,通过重定向表达特异于HIV相关抗原的CAR的T细胞的特异性,CAR可以靶向感染HIV的细胞。

[0074] 术语“嵌合细胞内信号传导分子”指的是重组受体,其包括一个或多个共刺激分子的一个或多个细胞内结构域。嵌合细胞内信号传导分子基本上缺少细胞外结构域。在一些实施方式中,嵌合细胞内信号传导分子包括额外的结构域,比如跨膜结构域、可检测的标签、和间隔结构域。

[0075] 如本文使用的,术语“保守序列修饰”意图指的是氨基酸修饰,其不显著地影响或改变包含该氨基酸序列的抗体的结合特性。这样的保守修饰包括氨基酸置换、添加和缺失。修饰可以通过本领域已知的标准技术引入本发明的抗体,比如定点诱变和PCR介导的诱变。保守氨基酸置换是其中氨基酸残基被替换为具有类似侧链的氨基酸残基的置换。本领域已经定义了具有类似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β -支化侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因而,抗体的CDR区内的一种或多种氨基酸残基可以被替换为来自相同侧链家族的其它氨基酸残基,并且可以使用本文描述的功能性试验测试改变的抗体结合抗原的能力。

[0076] 如本文使用的术语“共刺激配体”包括特异性地结合T细胞上的关联共刺激分子的抗原呈递细胞(例如,aAPC、树突细胞、B细胞等)上的分子,从而除通过例如将TCR/CD3复合

体与使用肽负载的MHC分子结合提供的初级信号之外,还提供了介导T细胞应答的信号,该T细胞应答包括但不限于增殖、活化、分化等。共刺激配体可以包括但不限于CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、可诱导的共刺激配体 (ICOS-L)、细胞间粘附分子 (ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素 β 受体、3/ TR6、ILT3、ILT4、HVEM、结合To11配体受体的激动剂或抗体和与B7-H3特异性地结合的配体。共刺激配体也涵盖,特别是与存在于T细胞上的共刺激分子特异性地结合的抗体,比如,但不限于CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、和与CD83特异性地结合的配体。

[0077] “共刺激分子”指的是与共刺激配体特异性地结合的T细胞上的关联结合配偶体,从而介导通过T细胞的共刺激应答,比如,但不限于增殖。共刺激分子包括但不限于TCR, CD3 ζ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD86, 普通的FcR γ , FcR β (Fc ϵ R1b), CD79a, CD79b, Fc γ RIIa, DAP10, DAP12, T细胞受体 (TCR), CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 与CD83特异性地结合的配体, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD127, CD160, CD19, CD4, CD8 α , CD8 β , IL2R β , IL2R γ , IL7R α , ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244、2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A、Ly108), SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, 本文描述的其它共刺激分子, 其任何衍生物、变体、或片段, 具有相同功能能力的共刺激分子的任何合成序列, 和其任意组合。

[0078] 如本文使用的“共刺激信号”指的是与初级信号组合, 比如TCR/CD3连接, 导致T细胞增殖和/或关键分子的上调或下调的信号。

[0079] 术语“细胞毒的”或“细胞毒性”指的是杀伤或损害细胞。在一个实施方式中, 修饰的细胞的细胞毒性被改进, 例如增加的T细胞的细胞溶解活性。

[0080] “疾病”是动物的健康状态, 其中动物不能维持稳态, 并且其中如果不改善疾病, 则动物的健康继续恶化。相比之下, 动物中的“障碍”是健康状态, 其中动物能够维持稳态, 但是其中动物的健康状态与它没有处于该障碍时相比不太有利。保持不治疗, 障碍不必然引起动物健康状态的进一步降低。

[0081] “有效量”或“治疗有效量”在本文可交换地使用, 并且指的是对实现具体的生物学结果或提供治疗或预防益处有效的如本文描述的化合物、制剂、材料、或组合物的量。这样的结果可以包括但不限于抗肿瘤活性, 如通过本领域适合的任何手段测定的。

[0082] “编码”指的是多核苷酸比如基因、cDNA、或mRNA中的核苷酸的特异性序列充当模板来合成生物学过程中的其它多聚体和大分子的固有性质, 该多聚体和大分子具有核苷酸 (即, rRNA、tRNA和mRNA) 的限定序列或氨基酸的限定序列中的任一种和由其产生的生物学性质。因而, 如果对应于基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物学系统中产生蛋白质, 则该基因编码蛋白质。其核苷酸序列同一于mRNA序列并且通常在序列表中提供的编码链, 和用作基因或cDNA转录的模板的非编码链二者, 可以被称为编码该基因或cDNA的蛋白质或

其它产物。

[0083] 如本文使用的“内源的”指的是来自生物体、细胞、组织或系统或在生物体、细胞、组织或系统内产生的任何物质。

[0084] 如本文使用的，术语“外源的”指的是从生物体、细胞、组织或系统引入或在生物体、细胞、组织或系统外产生的任何物质。

[0085] 如本文使用的术语“扩展”指的是数目的增加，如T细胞数目的增加。在一个实施方式中，离体扩展的T细胞的数目相对于培养物中原始存在的数目增加。在另一个实施方式中，离体扩展的T细胞的数目相对于培养物中的其它细胞类型的数目增加。如本文使用的术语“离体”指的是已经从活的生物体（例如，人）去除，并且在生物体外（例如，在培养皿、试管、或生物反应器中）繁殖的细胞。

[0086] 如本文使用的术语“表达”被定义为由它的启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0087] “表达载体”指的是包括重组多核苷酸的载体，该重组多核苷酸包括可操作地连接至待表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包括足够的用于表达的顺式作用元件；用于表达的其它元件可以由宿主细胞供应或在体外表达系统中供应。表达载体包括所有本领域已知的那些，比如并入重组多核苷酸的粘粒、质粒（例如，裸露的或包含在脂质体中）和病毒（例如，慢病毒、逆转录病毒、腺病毒、和腺伴随病毒）。

[0088] 如本文使用的术语“人免疫缺陷病毒”或“HIV”意思是本领域已知或迄今未知的任何HIV毒株或变体，非限制性地包括HIV-1和HIV-2。

[0089] 如本文使用的“同源的”指的是两个聚合物分子之间，例如，两个核酸分子——比如，两个DNA分子或两个RNA分子——之间，或两个多肽分子之间的亚单元序列同一性。当两个分子二者中的亚单元位置被相同的单体亚单元占据时；例如，如果两个DNA分子的每个中的位置被腺嘌呤占据，则它们在该位置处是同源的。两个序列之间的同源性是匹配或同源位置的数目的直接函数；例如，如果两个序列中的一半位置（例如，长度为十个亚单位的聚合物中的五个位置）是同源的，则两个序列是50%同源的；如果90%的位置（例如，10个中的9个）是匹配的或同源的，则两个序列是90%同源的。如适用于核酸或蛋白质，如本文使用的“同源的”指的是具有大约50%序列同一性的序列。更优选地，同源序列具有大约75%序列同一性，甚至更优选地，具有至少大约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性。

[0090] 非人（例如，鼠）抗体的“人源化”形式的是嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段（比如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其它抗原-结合子序列），其包含源自非人免疫球蛋白的最小序列。就大部分而言，人源化抗体是人免疫球蛋白（受体抗体），其中来自受体的互补决定区（CDR）的残基被替换为来自非人物种（供体抗体）比如小鼠、大鼠或兔的CDR的残基，其具有期望的特异性、亲和力和能力。在一些情况下，人免疫球蛋白的Fv框架区（FR）残基被替换为对应的非人残基。另外，人源化抗体可以包括既没有在受体抗体中也没有在输入的CDR或框架序列中发现的残基。做出这些修饰以进一步改进和优化抗体性能。一般而言，人源化抗体将包括基本上所有至少一种和通常两种可变结构域，其中所有或基本上所有CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些并且所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体最佳地还将包括至少部分免疫球蛋白恒定区（Fc），通常是人免疫球蛋白

的。进一步的细节参见Jones等Nature, 321:522-525, 1986; Reichmann等Nature, 332:323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596, 1992。

[0091] “全人 (fully human)”指的是免疫球蛋白, 比如抗体, 其中完整分子具有人起源或由同一于人形式的抗体的氨基酸序列构成。

[0092] 如本文使用的“同一性”指的是两个聚合物分子之间, 特别是两个氨基酸分子之间, 比如, 两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个氨基酸序列在相同的位置处具有相同的残基时; 例如, 如果两个多肽分子中的每个中的位置均被精氨酸占据, 则它们在该位置处是同一的。在比对中, 两个氨基酸序列在相同的位置处具有相同残基的同一性或程度经常表达为百分数。两个氨基酸序列之间的同一性是匹配或同一位置的数目的直接函数; 例如, 如果两个序列中的一半位置 (例如, 十个氨基酸长度的聚合物中的五个位置) 是同一的, 则两个序列是50%同一的; 如果90%的位置 (例如, 10个中的9个) 是匹配的或同一的, 则两个氨基酸序列是90%同一的。

[0093] “基本上同一的”的意思是展现与参考氨基酸序列 (例如, 本文描述的氨基酸序列中的任一种) 或核酸序列 (例如, 本文描述的核酸序列中的任一种) 至少50%同一性的多肽或核酸分子。优选地, 在氨基酸水平或核酸下, 这样的序列至少60%, 更优选地80%或85%, 和更优选地90%、95%、或甚至99%同一于用于比较的序列。

[0094] 引导核酸序列可以与双链DNA靶标位点的一条链 (核苷酸序列) 互补。引导核酸序列和靶标序列之间的互补百分数可以是至少50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、63%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。引导核酸序列的长度可以是至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35或更多个核苷酸。在一些实施方式中, 引导核酸序列包括10至40个核苷酸的连续区段。可变靶向结构域 (variable targeting domain) 可以由DNA序列、RNA序列、修饰的DNA序列、修饰的RNA序列 (参见例如本文描述的修饰)、或其任意组合组成。

[0095] 通常使用序列分析软件 (例如, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705 威斯康星大学生物技术中心遗传学计算机组的序列分析软件程序包、BLAST、BESTFIT、GAP、或 PILEUP/PRETTYBOX 程序) 测量序列同一性。这样的软件通过向多种置换、缺失、和/或其它修饰分配同源性程度来匹配同一的或相似的序列。保守性置换通常包括在下列组内的置换: 甘氨酸, 丙氨酸; 缬氨酸, 异亮氨酸, 亮氨酸; 天冬氨酸, 谷氨酸, 天冬酰胺, 谷氨酰胺; 丝氨酸, 苏氨酸; 赖氨酸, 精氨酸; 和苯丙氨酸, 酪氨酸。在测定同一性程度的示例性方法中, 可以使用BLAST程序, 其中 e^{-3} 和 e^{-100} 之间的可能性分数指示密切相关的序列。

[0096] 如本文使用的术语“免疫球蛋白”或“Ig”被定义为起抗体作用的一类蛋白质。由B细胞表达的抗体有时被称为BCR (B细胞受体) 或抗原受体。包括在此类蛋白质中的五个成员是IgA、IgG、IgM、IgD、和IgE。IgA是存在于身体分泌物比如唾液、泪液、母乳、胃肠分泌物和呼吸道与泌尿生殖道的粘液分泌物中的初次抗体。IgG是最常见的循环抗体。IgM是在大多数对象中的初次免疫应答中产生的主要免疫球蛋白。它在凝集、补体结合、和其它抗体应答中是最有效的免疫球蛋白, 并且在抵御细菌和病毒方面是重要的。IgD是不具有已知抗体功

能的免疫球蛋白,但是可以充当抗原受体。IgE是在暴露于过敏原之后,通过引起从肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放介体,介导速发过敏性的免疫球蛋白。

[0097] 如本文使用的术语“免疫应答”被定义为当淋巴细胞将抗原分子识别为异物和诱发形成抗体和/或活化淋巴细胞以去除抗原时发生的对抗原的细胞应答。

[0098] 如本文使用的,“指导材料”包括出版物、记录、图表、或任何其它可以用于传达本发明的组合物和方法的有用性的表达媒介。本发明的试剂盒的指导材料可以例如被附加至包含本发明的核酸、肽、和/或组合物的容器,或与包含核酸、肽、和/或组合物的容器一起运送。可选地,指导材料可以与容器分开地运送,目的是指导材料和化合物由接受者配合使用。

[0099] “分离的”意思是从自然状态改变或去除。例如,天然存在于活动物中的核酸或肽不是“分离的”,但是部分或完全与它的自然状态的共存物质分离的相同的核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在,或可以存在于非自然环境,比如,例如,宿主细胞。

[0100] “KIR”意思是杀伤细胞免疫球蛋白样受体,KIR已经在人和非人灵长类中被表征,并且是在淋巴细胞——包括NK细胞和一些T细胞——的某些亚单位上存在的多态性1型跨膜分子。KIR通过与I类MHC分子的 $\alpha 1$ 和2结构域中的决定簇相互作用调控NK细胞的杀伤功能。此相互作用允许它们检测感染病毒的细胞或肿瘤细胞。大多数KIR是抑制性的,意思是它们的MHC识别阻抑表达它们的NK细胞的细胞毒活性。仅有限数目的KIR具有活化细胞的能力。KIR基因家族具有在位于19号染色体上的白细胞受体复合体(LRC)(19q13.4)的100-200Kb区内编码的至少15个基因座(KIR2DL1、KIR2DL2/L3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DL1/S1、KIR3DL2、KIR3DL3)和两个假基因(KIR2DP1和KIR3DP1)。LRC构成快速进化免疫基因的大的(1Mb)和致密的簇,其包含编码具有不同的Ig样细胞外结构域或其它细胞表面分子的基因。此外,延长的LRC包含编码跨膜衔接分子DAP10和DAP12的基因。

[0101] 如本文使用的“慢病毒”指的是逆转录病毒科家族的属。在逆转录病毒中慢病毒是唯一能够感染非分裂细胞的;它们可以递送显著量的遗传信息进入宿主细胞的DNA,以便它们是基因递送载体的最有效的方法之一。HIV、SIV、和FIV是慢病毒的所有实例。源自慢病毒的载体提供了实现显著水平的基因体内转移的工具。

[0102] 如本文使用的术语“修饰的”意思是本发明的分子或细胞的改变的状态或结构。分子可以以许多方式被修饰,包括化学地、结构地和功能地。细胞可以通过引入核酸被修饰。

[0103] 如本文使用的术语“调节”意思是与不存在治疗或化合物的对象中的应答水平比较,和/或与以其它方式相同但未治疗的对象中的应答水平比较,介导对象中的应答水平中的可检测的增加或减少。术语涵盖扰乱和/或影响天然信号或应答,从而介导对象(优选地,人)中的有益的治疗性应答。

[0104] 在本发明的背景下,使用常见核酸碱基的下列缩写。“A”指的是腺苷,“C”指的是胞嘧啶,“G”指的是鸟苷,“T”指的是胸苷,和“U”指的是尿苷。

[0105] 除非另外规定,“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括是彼此的简并译本并且编码相同的氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列还可以包括内含子,其程度为编码该蛋白质的核苷酸序列可以在一些译本中包含内含子(一个或多个)。

[0106] 术语“可操作地连接”指的是调控序列和异源核酸序列之间的功能连接,其导致后者的表达。例如,当第一核酸序列处于与第二核酸序列的功能关系中时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则启动子被可操作地连接至编码序列。通常,可操作地连接的DNA序列是连续的,并且其中在相同的阅读框中必须接合两个蛋白质编码区。

[0107] 术语“过表达的”肿瘤抗原或肿瘤抗原的“过表达”意图指示相对于来自组织或器官的正常细胞的表达水平,来自疾病区域如患者的特定组织或器官内的实体瘤的细胞中的肿瘤抗原的异常表达水平。患有以肿瘤抗原的过表达为特征的实体瘤或血液学恶性肿瘤的患者可以由本领域已知的标准试验确定。

[0108] 免疫原性组合物的“肠胃外”施用包括,例如,皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)、或胸骨内注射,或输注技术。

[0109] 如本文使用的术语“多核苷酸”被定义为核苷酸链。另外,核酸是核苷酸的聚合物。因而,如本文使用的核酸和多核苷酸是可交换的。本领域技术人员具有核酸是可以被水解为单体“核苷酸”的多核苷酸的一般知识。单体核苷酸可以被水解为核苷。如本文使用的多核苷酸包括但不限于通过本领域可获得的任何手段——非限制性地包括重组手段,即,使用普通克隆技术和PCRTM等从重组文库或细胞基因组克隆核酸序列——和通过合成手段获得的所有核酸序列。

[0110] 如本文使用的,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可交换地使用,并且指的是由肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸,并且对可以包括蛋白质或肽的序列的氨基酸的最大数目没有限制。多肽包括任何肽或蛋白质,该肽或蛋白质包括通过肽键相互接合的两个或更多个氨基酸。如本文使用的,术语指的是短链,其在本领域中也通常被称为例如肽、寡肽和寡聚物;和较长链二者,其在本领域中通常被称为蛋白质,其具有许多类型。“多肽”包括例如生物学活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽的变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽、或其组合。

[0111] 如本文使用的术语“启动子”被定义为起始多核苷酸序列的特异性转录需要的,由细胞的合成机器识别,或引导合成机器的DNA序列。

[0112] 如本文使用的,术语“启动子/调控序列”意思是可操作地连接至启动子/调控序列的基因产物的表达需要的核酸序列。在一些情况下,此序列可以是核心启动子序列,并且在其它情况下,此序列还可以包括基因产物的表达需要的增强子序列和其它调控元件。例如,启动子/调控序列可以是以组织特异性方式表达基因产物的序列。

[0113] “组成型”启动子是如下核苷酸序列,当其与编码或规定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,引起在细胞的大多数或所有生理学条件下在细胞中产生基因产物。

[0114] “诱导型”启动子是如下核苷酸序列,当其与编码或规定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,引起在基本上仅当对应于启动子的诱导物存在于细胞中时,在细胞中产生基因产物。

[0115] “组织-特异性”启动子是如下核苷酸序列,当其与编码基因或由基因规定的多核苷酸可操作地连接时,引起基本上只要细胞是对应于相应于启动子的组织类型的细胞,则在细胞中产生基因产物。

[0116] 术语“对免疫抑制的抗性”指的是缺少阻抑或降低的免疫系统活性或活化的阻抑。

[0117] “信号转导途径”指的是各种信号转导分子——其在传递来自细胞的一部分的信号至细胞的另一部分中发挥作用——之间的生物化学关系。短语“细胞表面受体”包括分子和分子的复合体,其能够接收信号和跨越细胞的质膜传递信号。

[0118] “单链抗体”指的是通过重组DNA技术形成的抗体,其中免疫球蛋白重链和轻链片段经由工程化跨度的氨基酸连接至Fv区。生成单链抗体的多种方法是已知的,包括在美国专利号4,694,778;Bird(1988) *Science* 242:423-442;Huston等(1988) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:5879-5883;Ward等(1989) *Nature* 334:54454;Skerra等(1988) *Science* 242:1038-1041中描述的那些。

[0119] 如本文使用的关于抗体的术语“特异性地结合”意思是识别特异性抗原但是基本上不识别或结合样品中的其它分子的抗体。例如,特异性地结合至来自一个物种的抗原的抗体也可以结合至来自一个或多个物种的该抗原。但是,这样的跨物种反应性本身不将抗体的类别改变为特异性的。在另一个实例中,特异性地结合至抗原的抗体也可以结合至抗原的不同等位基因形式。然而,这样的交叉反应性本身不将抗体的类别改变为特异性的。在一些情况下,术语“特异性结合”或“特异性地结合”可以关于抗体、蛋白质、或肽与第二化学种类的相互作用使用,意思是相互作用依赖化学种类上特定结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体识别和结合至特异性蛋白质结构,而不是一般地识别和结合至蛋白质。如果抗体特异于表位“A”,则在包含标示的“A”和抗体的反应中存在包含表位A(或游离的、未标示的A)的分子,将降低结合至抗体的标示的A的量。

[0120] 术语“刺激”意思是通过结合刺激分子(例如,TCR/CD3复合体)与其关联配体,从而介导信号转导事件——比如,但不限于经由TCR/CD3复合体的信号转导——诱导的初次应答。刺激可以介导某些分子的改变的表达,比如TGF- β 的下调、和/或细胞骨架结构的重组等。

[0121] “刺激分子”,作为本文使用的术语,意思是与存在于抗原呈递细胞上的关联刺激配体特异性地结合的T细胞上的分子。

[0122] 如本文使用的“刺激配体”意思是如下配体:其当存在于抗原呈递细胞(例如,aAPC、树突细胞、B细胞等)上时,可以与T细胞上的关联结合配偶体(在本文称为“刺激分子”)特异性地结合,从而介导T细胞的初次应答,包括但不限于活化、免疫应答的起始、增殖等。刺激配体在本领域是熟知的,并且涵盖,特别是使用肽、抗CD3抗体、超激动剂抗CD28抗体、和超激动剂抗CD2抗体负载的I类MHC分子。

[0123] 术语“对象”意图包括其中可以引发免疫应答的活的生物体(例如,哺乳动物)。如其中使用的“对象”或“患者”可以是人或非人哺乳动物。非人哺乳动物包括,例如,家畜和宠物,比如羊、牛、猪、狗、猫和鼠哺乳动物。优选地,对象是人。

[0124] 如本文使用的,术语“基本上缺少细胞外结构域”指的是基本上不含细胞外突出(extrude)的结构域分子。在一个实施方式中,嵌合细胞内信号传导分子缺少通过细胞外结构域执行的任何功能,比如抗原结合。在另一个实施方式中,嵌合细胞内信号传导分子包括跨膜结构域但是缺少功能性细胞外结构域。

[0125] 如本文使用的,“基本上纯化的”细胞是基本上不含其它细胞类型的细胞。基本上纯化的细胞也指的是已经与其它细胞类型——在其天然存在状态中与该其它细胞类型正

常地相关联——分离的细胞。在一些情况下,基本上纯化的细胞群指的是均质细胞群。在其它情况下,此术语简单地指的是已经与如下细胞分离的细胞:在其天然状态中与该细胞正常地相关联。在一些实施方式中,在体外培养细胞。在其它实施方式中,不在体外培养细胞。

[0126] “靶标位点”或“靶标序列”指的是基因组核酸序列,其限定了在足以发生结合的条件下结合分子可以特异性地结合至其的部分核酸。

[0127] 如本文使用的,术语“T细胞受体”或“TCR”指的是响应于抗原的呈递参与T细胞的活化的膜蛋白的复合体。TCR负责识别结合至主要组织相容性复合体分子的抗原。TCR由 α 和 β 链的异二聚体组成,但是在一些细胞中,TCR由 γ 和 δ (γ/δ)链构成。TCR可以以 α/β 和 γ/δ 形式存在,其是结构上相似的,但是具有不同的解剖学位置和功能。每条链由两个细胞外结构域——可变和恒定结构域——组成。在一些实施方式中,TCR可以在包括TCR的任何细胞上被修饰,包括,例如,辅助性T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节性T细胞、自然杀伤T细胞、和 $\gamma\delta$ T细胞。

[0128] 如本文使用的术语“治疗性的”意思是治疗和/或预防。治疗性效果通过疾病状态的阻抑、缓解、或根除获得。

[0129] 如本文使用的术语“转染的”或“转化的”或“转导的”指的是如下过程:通过该过程外源性核酸被转移或引入宿主细胞。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经被转染、转化或转导外源性核酸的细胞。细胞包括原代对象细胞和其子代。

[0130] “治疗”疾病,作为本文使用的术语,意思是降低对象经历的疾病或障碍的至少一种迹象或症状的频率或严重程度。

[0131] 如本文使用的术语“肿瘤”指的是异常生长的组织,其可以是良性的、癌前的、恶性的、或转移的。

[0132] 如本文使用的短语“在转录控制下”或“可操作地连接的”意思是启动子处于与多核苷酸有关的正确的位置和取向,以控制通过RNA聚合酶的转录的起始和多核苷酸的表达。

[0133] “载体”是物质组合物,其包括分离的核酸,并且其可以被用于递送分离的核酸至细胞内部。众多载体在本领域是已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲性化合物相关联的多核苷酸、质粒、和病毒。因而,术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。术语也应当解释为包括便于将核酸转移入细胞的非质粒和非病毒化合物,比如,例如,聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体等。

[0134] 范围:遍及本公开内容,本发明的多个方面可以以范围格式呈现。应当理解范围格式的描述仅仅出于方便和简洁,并且不应当解释为对本发明的范围的僵硬限制。因此,范围的描述应当被认为已经具体地公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如,比如1至6的范围的描述应当被认为已经具体地公开了子范围比如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的单个数字,例如,1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。不管范围的宽度,这均适用。

[0135] 描述

[0136] 本发明包括使用CD4膜结合嵌合受体或HIV特异性scFV嵌合抗原受体(CAR)治疗HIV感染的组合物和方法。根据本发明,通过表达能够特异性地识别和结合感染HIV的细胞的CD4或scFV的片段,T细胞被修饰用于过继性T细胞疗法。本发明的修饰的T细胞特异于感

染HIV的细胞并且针对HIV感染具有改进的细胞毒性和功效。

[0137] HIV特异性CD4膜结合嵌合受体

[0138] 本发明包括膜结合嵌合受体,其包括CD4结构域,具体地特异性地结合至HIV病毒粒子或感染HIV的细胞的CD4细胞外结构域。在某些实施方式中,本发明的CD4膜结合嵌合受体包括特定的结构特征,比如本文公开的特定的氨基酸序列或肽。本发明还包括制造这样的受体的方法。本发明的膜结合嵌合受体可以被并入药物组合物,用于治疗对象,例如用作免疫疗法。因此,本发明提供了用于治疗HIV感染或HIV相关疾病的组合物和方法。

[0139] 在一方面,本发明包括分离的核酸序列,其编码包括CD4细胞外结构域、跨膜结构域、和信号传导结构域的膜结合嵌合受体,其中CD4细胞外结构域能够识别和结合感染HIV的细胞。在另一方面,本发明包括分离的氨基酸序列,其编码包括CD4细胞外结构域、跨膜结构域、和信号传导结构域的膜结合嵌合受体,其中CD4细胞外结构域能够识别和结合感染HIV的细胞。

[0140] 在一个实施方式中,CD4细胞外结构域包括SEQ ID NO:3、46或64,跨膜结构域包括CD8 α 铰链(SEQ ID NO:4、47或65)和跨膜结构域包括选自CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:5、48或66)和CD28跨膜结构域(SEQ ID NO:8、49或67)的至少一种结构域。在另一个实施方式中,信号传导结构域包括CD3 ζ 信号传导结构域(SEQ ID NO:6、51或68)。在又一个实施方式中,共刺激信号传导区包括选自CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性地结合的配体、和其任意组合的共刺激分子的细胞内结构域。在又一个实施方式中,共刺激信号传导区CD28(SEQ ID NO:9、49或67)存在于构建体中。在进一步的实施方式中,CD4细胞外结构域特异性地结合至HIV包膜(Env)糖蛋白。

[0141] 在一方面,本发明包括载体,其包括真核延伸因子(EF1 α)启动子、CD4细胞外结构域、CD8 α 铰链、CD8 α 跨膜结构域和CD3 ζ 信号传导结构域(SEQ ID NO:1)。在另一方面,本发明包括载体,其包括EF1 α 启动子、CD4细胞外结构域、CD8 α 铰链、CD28跨膜结构域、CD28共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域(SEQ ID NO:7)。在又一个方面,本发明包括载体,其包括膜结合嵌合受体,该膜结合嵌合受体包括CD4细胞外结构域、跨膜结构域、和信号传导结构域,其中CD4细胞外结构域能够识别和结合感染HIV的细胞,其中载体包括选自SEQ ID NO:44、45、62和63的至少一种氨基酸序列。

[0142] 在一个实施方式中,膜结合嵌合受体由SEQ ID NO:30、32或64的核酸序列编码。在另一个实施方式中,膜结合嵌合受体具有SEQ ID NO:31、33或46的氨基酸序列。

[0143] CD4细胞外结构域

[0144] CD4是免疫球蛋白超家族的成员并且包括四个细胞外免疫球蛋白结构域(D1至D4)。D1和D3类似于免疫球蛋白可变结构域并且D2和D4类似于免疫球蛋白恒定结构域。D1包括与主要组织相容性复合体II类分子的 β 2-微球蛋白相互作用的CD4的区。

[0145] 在一个实施方式中,膜结合嵌合受体包括CD4的细胞外结构域或其片段。在另一个实施方式中,膜结合嵌合受体包括CD4的至少一个免疫球蛋白结构域。在另一个实施方式中,CD4细胞外结构域包括SEQ ID NO:3或64。

[0146] 本文描述的CD4细胞外结构域,比如CD4的至少一个免疫球蛋白结构域或包括SEQ ID NO:3或64的CD4细胞外结构域,可以与本文描述的任何跨膜结构域、本文描述的任何信

号传导结构域、或本文描述的可以包括在膜结合嵌合受体中的任何其它结构域组合。

[0147] 跨膜结构域

[0148] 在一个实施方式中,跨膜结构域与CD4嵌合抗原受体构建体中的一个结构域缔合。在一些情况下,可以选择跨膜结构域或通过氨基酸置换修饰跨膜结构域,以避免将这样的结构域结合至相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域,从而最小化与受体复合体的其它成员的相互作用。

[0149] 跨膜结构域可以源自天然来源或合成来源。当来源是天然的时,结构域可以源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。特定用途的跨膜区可以源自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 (即至少包括上述中的跨膜区 (一个或多个))。在一些情况下,也可以采用各种人铰链,包括人Ig (免疫球蛋白) 铰链。在一个实施方式中,跨膜结构域包括CD8 α 铰链和跨膜结构域。

[0150] 在一个实施方式中,跨膜结构域包括CD8 α 跨膜结构域 (SEQ ID NO:5或66)。在另一个实施方式中,跨膜结构域包括CD28跨膜结构域 (SEQ ID NO:8或67)。在又一个实施方式中,跨膜结构域包括铰链结构域,比如CD8 α 铰链 (SEQ ID NO:4或65)。跨膜结构域可以与任何铰链结构域组合和/或可以包括本文描述的一种或多种跨膜结构域。

[0151] 本文描述的跨膜结构域,比如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, 或CD154的至少跨膜区 (一种或多种),可以与本文描述的任何CD4细胞外结构域、本文描述的任何信号传导结构域、或可以包括在膜结合嵌合受体中的本文描述的任何其它结构域组合。

[0152] 在另一个实施方式中,跨膜结构域可以是合成的,在该情况下,它包括占主导的疏水残基比如亮氨酸和缬氨酸。优选地,苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体存在于合成跨膜结构域的每端处。任选地,短的寡肽或多肽连接体,长度优选地在2和10个氨基酸之间可以在跨膜结构域和细胞质信号传导结构域之间形成连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供了特别合适的连接体。

[0153] 信号传导结构域

[0154] 信号传导结构域或细胞内信号传导结构域负责活化其中表达CD4嵌合抗原受体构建体的免疫细胞的正常效应物功能中的至少一种。术语“效应物功能”指的是特定的细胞功能。T细胞的效应物功能,例如,可以是细胞溶解活性或辅助性活性,包括分泌细胞因子。因而术语“细胞内信号传导结构域”或“信号传导结构域”指的是转导效应物功能信号和指导细胞执行特定功能的部分蛋白质。虽然通常可以采用整个信号传导结构域,但是在许多情况下,没有必要使用整个分子。就使用信号传导结构域的截短部分而言,可以替代完整的链使用这样的截短部分,只要它转导效应物功能信号。术语信号传导结构域因而意思是包括足以传导效应物功能信号的信号传导结构域的任何截短部分。

[0155] 用于本发明的信号传导结构域的实例包括T细胞受体 (TCR) 和一致作用以在抗原受体衔接之后引发信号转导的共受体的细胞质序列,以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同功能能力的任何合成序列。

[0156] 已知通过单独的TCR生成的信号不足以用于T细胞的完全活化并且还需要次要或共刺激信号。因而,T细胞活化可以据说由两种不同种类的细胞质信号传导序列介导:通过

TCR起始抗原依赖性主要活化的那些(主要细胞质信号传导序列)和以抗原独立性方式作用以提供次要或共刺激信号的那些(次要细胞质信号传导序列)。

[0157] 主要细胞质信号传导序列以刺激性方式或以抑制性方式调控TCR复合体的主要活化。以刺激性方式作用的主要细胞质信号传导序列可以包含信号传导基序,其称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM。

[0158] 在本发明中具有特别用途的包含主要细胞质信号传导序列的ITAM的实例包括源自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、和CD66d的那些。特别优选的是本发明的免疫受体中的细胞质信号传导分子包括源自CD3- ζ 的细胞质信号传导序列。

[0159] 在优选的实施方式中,CD4嵌合抗原受体构建体的信号传导结构域可以被设计以包括单独的CD3- ζ 信号传导结构域或连同在免疫受体的背景下有用的任何其它期望的信号传导结构域(一个或多个)。例如,免疫受体的信号传导结构域可以包括CD3 ζ 链部分和共刺激信号传导区。共刺激信号传导区指的是包括共刺激分子的细胞内结构域的部分免疫受体。共刺激分子是除抗原受体或其配体以外的细胞表面分子,其是淋巴细胞对抗原的高效应答所需的。这样的分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB(CD137)、DAP12、OX9、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、和与CD83特异性地结合的配体等。因而,虽然本发明主要将CD28示例为共刺激信号传导元件,但是其它共刺激元件也在本发明的范围内。

[0160] 在一个实施方式中,信号传导结构域包括CD3 ζ 信号传导结构域(SEQ ID NO:6、51或68)。在另一个实施方式中,信号传导结构域包括CD4CD28 ζ (SEQ ID NO:7或62)。在另一个实施方式中,信号传导结构域包括CD28共刺激结构域(SEQ ID NO:9或67)。在又另一个实施方式中,信号传导结构域包括CD44-1BB共刺激结构域(SEQ ID NO:63)。在又另一个实施方式中,信号传导结构域包括4-1BB(CD137)共刺激结构域(SEQ ID NO:69)。信号传导结构域可以包括本文描述的一种或多种信号传导结构域。

[0161] 本文描述的信号传导结构域,比如TCR ζ 的 α 、 β 或 ζ 链,FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、或CD66d的细胞质信号传导序列或来自CD27、CD28、4-1BB(CD137)、DAP12、OX9、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、或与CD83特异性地结合的配体的共刺激信号传导区,可以与本文描述的任何CD4细胞外结构域、本文描述的任何跨膜结构域、或可以包括在膜结合嵌合受体中的本文描述的任何其它结构域组合。

[0162] 嵌合抗原受体(CAR)

[0163] 不希望受限于理论,应理解,使用靶向HIV的CAR——其中CAR包括抗-HIV scFv——将有益于治疗具有感染HIV的细胞的储存群体(reservoir population)的对象。本发明因此在本发明的一方面包括用于这样的用途的这样的CAR。

[0164] 因而,在本发明的一方面,通过在其中表达CAR来生成T细胞。因而,本发明涵盖CAR和编码CAR的核酸构建体,其中CAR包括抗原结合结构域(例如,编码抗-HIV抗体的scFv)、跨膜结构域和细胞内结构域。

[0165] 在一方面,本发明包括修饰的细胞,其包括嵌合抗原受体(CAR),其中CAR包括抗原结合结构域、跨膜结构域和共刺激分子的细胞内结构域,并且其中细胞是具备靶向的效应物活性的T细胞。在另一方面,本发明包括修饰的细胞,其包括编码嵌合抗原受体(CAR)的核

酸序列,其中核酸序列包括编码抗原结合结构域的核酸序列、编码跨膜结构域的核酸序列和编码共刺激分子的细胞内结构域的核酸序列,并且其中细胞是表达CAR并且具备靶向的效应物活性(例如靶向的细胞细胞毒性和抗原呈递)的T细胞。在一个实施方式中,靶向的效应物活性针对特异性地结合CAR的抗原结合结构域的靶标细胞上的抗原。在一方面,靶标抗原是HIV特异性抗原和CAR包括HIV特异性结合结构域,其包括抗-HIV抗体或其片段。

[0166] 在一个实施方式中,CAR由选自SEQ ID NO:10、14、18、22、26、34、70-73和74的核酸序列编码。在另一个实施方式中,CAR具有SEQ ID NO:11、15、19、23、27、35、52-55、或56的氨基酸序列。

[0167] 抗原结合结构域

[0168] 在一个实施方式中,本发明的抗原结合结构域包括结合至HIV病毒粒子比如HIV包膜糖蛋白(Env)(例如Igp120)和/或感染HIV的细胞的HIV特异性结合结构域。可以充当抗原的其它细胞表面标志物的实例包括与病毒、细菌和寄生虫感染、自身免疫性疾病、和癌细胞相关联的那些。在另一个实施方式中,本发明的抗原结合结构域包括结合至HIV蛋白的抗体或其片段,比如scFv抗体。优选地,抗原结合结构域是结合至HIV蛋白例如HIV Env的scFv抗体。有用的具体scFvs是在图4A、图8、图18和图19中显示的那些(SEQ ID NO:11、12、16、17、20、21、24、25、28、29、57-61、75-78、或79)。

[0169] 抗原结合结构域的选择取决于在靶标细胞的表面上存在的抗原的类型和数目。例如,可以选择抗原结合结构域以识别充当与具体疾病状态相关联的靶标细胞上的细胞表面标志物的抗原。

[0170] 抗原结合结构域可以包括结合至抗原的任何结构域并且可以包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、合成抗体、人抗体、人源化抗体、非人抗体、和其任意片段。因而,在一个实施方式中,抗原结合结构域部分包括哺乳动物抗体或其片段。在另一个实施方式中,CAR的抗原结合结构域选自抗-HIV抗体和其片段。

[0171] 在一些情况下,抗原结合结构域源自CAR将最终用于其中的相同的物种是有利的。例如,对于用于人,可能有利的是,CAR的抗原结合结构域包括如本文其它地方描述的人抗体、或其片段。

[0172] 还有利的是,抗原结合结构域被可操作地连接至CAR的另一个结构域,比如跨膜结构域或细胞内结构域,其均在本文其它地方描述,用于在细胞中表达。在一个实施方式中,编码抗原结合结构域的核酸被可操作地连接至编码跨膜结构域的核酸和编码细胞内结构域的核酸。

[0173] 本文描述的抗原结合结构域,比如结合至HIV蛋白的抗体或其片段,可以与本文描述的任何跨膜结构域、本文描述的任何细胞内结构域或细胞质结构域,或可以包括在CAR中的本文描述的任何其它结构域组合。

[0174] 跨膜结构域

[0175] 关于跨膜结构域,CAR(或膜结合嵌合受体构建体)可以被设计以包括将CAR的抗原结合结构域连接至细胞内结构域的跨膜结构域。在一个实施方式中,跨膜结构域天然地与CAR中的结构域中的一个或多个缔合。在一些情况下,可以选择跨膜结构域或通过氨基酸置换修饰跨膜结构域,以避免将这样的结构域结合至相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域,从而最小化与受体复合体的其它成员的相互作用。

[0176] 跨膜结构域可以源自天然来源或合成来源。当来源是天然的时,结构域可以源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。具体用于本发明的跨膜区可以源自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,To11样受体1(TLR1),TLR2,TLR3,TLR4,TLR5,TLR6,TLR7,TLR8,和TLR9(即至少包括上述中的跨膜区(一个或多个))。在一些情况下,也可以采用各种人铰链,包括Ig(免疫球蛋白)铰链。

[0177] 在一个实施方式中,跨膜结构域包括CD8 α 跨膜结构域(SEQ ID NO:5、48、66)。在另一个实施方式中,跨膜结构域包括CD28跨膜结构域(SEQ ID NO:8、49和67)。在又一个实施方式中,跨膜结构域包括铰链结构域,比如CD8 α 铰链(SEQ ID NO:4、47和65)。跨膜结构域可以与任何铰链结构域组合和/或可以包括本文描述的一种或多种跨膜结构域。

[0178] 本文描述的跨膜结构域,比如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,To11样受体1(TLR1),TLR2,TLR3,TLR4,TLR5,TLR6,TLR7,TLR8,和TLR9的跨膜区,可以与本文描述的任何抗原结合结构域、本文描述的任何细胞内结构域或细胞质结构域、或可以包括在CAR中的本文描述的任何其它结构域组合。

[0179] 在一个实施方式中,跨膜结构域可以是合成的,在该情况下,它将包括占主导的疏水残基比如亮氨酸和缬氨酸。优选地,将在合成跨膜结构域的每端处发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。

[0180] 细胞内结构域

[0181] CAR(或膜结合嵌合受体构建体)的细胞内结构域或另外的细胞质结构域包括与在本文其它地方描述的嵌合细胞内信号传导分子类似或相同的细胞内结构域,并且负责活化其中表达CAR的细胞。

[0182] 在一个实施方式中,CAR的细胞内结构域包括负责信号活化和/或转导的结构域。

[0183] 用于本发明的细胞内结构域的实例包括但不限于表面受体的细胞质部分、共刺激分子、和一致作用以在T细胞中起始信号转导的任何分子,以及这些元件的任何衍生物或变体和具有相同功能能力的任何合成序列。

[0184] 细胞内结构域的实例包括来自一种或多种分子或受体的片段或结构域,该分子或受体包括但不限于TCR,CD3 ζ ,CD3 γ ,CD3 δ ,CD3 ϵ ,CD86,普通的FcR γ ,FcR β (Fc ϵ R1b),CD79a,CD79b,Fc γ RIIa,DAP10,DAP12,T细胞受体(TCR),CD8,CD27,CD28,4-1BB(CD137),OX9,OX40,CD30,CD40,PD-1,ICOS,KIR家族蛋白,淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1),CD2,CD7,LIGHT,NKG2C,B7-H3,与CD83特异性地结合的配体,CDS,ICAM-1,GITR,BAFFR,HVEM(LIGHTR),SLAMF7,NKp80(KLRF1),CD127,CD160,CD19,CD4,CD8 α ,CD8 β ,IL2R β ,IL2R γ ,IL7R α ,ITGA4,VLA1,CD49a,ITGA4,IA4,CD49D,ITGA6,VLA-6,CD49f,ITGAD,CD11d,ITGAE,CD103,ITGAL,CD11a,LFA-1,ITGAM,CD11b,ITGAX,CD11c,ITGB1,CD29,ITGB2,CD18,LFA-1,ITGB7,TNFR2,TRANCE/RANKL,DNAM1(CD226),SLAMF4(CD244、2B4),CD84,CD96(Tactile),CEACAM1,CRTAM,Ly9(CD229),CD160(BY55),PSGL1,CD100(SEMA4D),CD69,SLAMF6(NTB-A、Ly108),SLAM(SLAMF1,CD150,IP0-3),BLAME(SLAMF8),SELPLG(CD162),LTBR,LAT,GADS,SLP-76,PAG/Cbp,NKp44,NKp30,NKp46,NKG2D,To11样受体1(TLR1),TLR2,TLR3,TLR4,TLR5,TLR6,TLR7,TLR8,TLR9,本文描述的其它共刺激分子,其任何衍生物、变体、或片段,具有相同功能

能力的共刺激分子的任何合成序列,和其任意组合。

[0185] 在一个实施方式中,CAR的细胞内结构域包括一种或多种共刺激分子的任何部分,比如至少一个信号传导结构域,其来自CD3、CD8、CD27、CD28、ICOS、4-1BB、PD-1、其任何衍生物或变体、具有相同功能能力的其任何合成序列、和其任意组合。

[0186] 在一个实施方式中,细胞内结构域包括CD3 ζ 信号传导结构域(SEQ ID NO:6、51或68)。在另一个实施方式中,细胞内结构域包括CD4CD28 ζ (SEQ ID NO:7或62)。在另一个实施方式中,细胞内结构域包括CD28共刺激结构域(SEQ ID NO:9或67)。在又一个实施方式中,信号传导结构域包括CD44-1BB共刺激结构域(SEQ ID NO:63)。在还另一个实施方式中,信号传导结构域包括4-1BB(CD137)共刺激结构域(SEQ ID NO:69)。在另一个实施方式中,细胞内结构域包括DAP12结构域。在又一个实施方式中,细胞内结构域包括KIR结构域。细胞内结构域可以包括本文描述的一种或多种细胞内结构域。

[0187] 本文描述的细胞内结构域,比如来自TCR、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD86、普通的Fc γ 、Fc β (Fc ϵ R1b)、CD79a、CD79b、Fc γ RIIa、DAP10、DAP12、T细胞受体(TCR)、CD8、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX9、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、KIR家族蛋白、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性地结合的配体、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、To11样受体1(TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、或其它共刺激分子的片段或结构域,可以与本文描述的任何抗原结合结构域、本文描述的任何跨膜结构域、或可以包括在CAR中的本文描述的任何其它结构域组合。

[0188] 在CAR的抗原结合结构域和跨膜结构域之间,或在CAR的细胞内结构域和跨膜结构域之间,可以并入间隔结构域。如本文使用的,术语“间隔结构域”通常意思是起将跨膜结构域连接至多肽链中的抗原结合结构域或细胞内结构域作用任何寡肽或多肽。在一个实施方式中,间隔结构域可以包括多至300个氨基酸,优选地10至100个氨基酸和最优选地25至50个氨基酸。在另一个实施方式中,短的寡肽或多肽连接体,优选地长度在2和10个氨基酸之间,可以在CAR的跨膜结构域和细胞内结构域之间形成连接。连接体的实例包括甘氨酸-丝氨酸双联体。

[0189] 人抗体

[0190] 当使用CAR的抗原结合结构域时,可以优选地使用人抗体或其片段。完全人抗体对于人对象的治疗性处理是特别期望的。可以通过各种本领域已知的方法制造人抗体,该方法包括使用源自人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法,其包括对这些技术的改进。还参见美国专利号4,444,887和4,716,111;和PCT公布号W0 98/46645、W098/50433、W0 98/24893、W0 98/16654、W0 96/34096、W0 96/33735、和W091/10741;其每个通过引用以其全部并入本文。

[0191] 还可以使用不能表达功能性内源免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠来产生人抗体。例如,人重链和轻链免疫球蛋白基因复合体可以被随机地或通过同源重组引入小鼠胚胎干细胞。可选地,除人重链和轻链基因之外,人可变区、恒定区、和多变区也可以被引入小鼠胚胎干细胞。通过同源重组,可以与引入人免疫球蛋白基因座分开地或同时地,使小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因非功能性。例如,已经描述了在嵌合和种系突变小鼠中纯合缺失抗体重链J区(JH)基因导致内源性抗体产生的完全抑制。修饰的胚胎干细胞被扩展并且显微注射入胚泡以产生嵌合小鼠。然后繁殖嵌合小鼠以产生表达人抗体的纯合后代。转基因小鼠以正常的方式使用选择的抗原——例如,本发明的多肽的全部或部分——进行免疫。针对选择的靶标的抗体可以使用常规的杂交瘤技术从免疫的转基因小鼠获得。由转基因小鼠聚藏(harbor)的人免疫球蛋白转基因在B细胞分化期间重排,并且随后经历类别转换和体细胞突变。因而,使用这样的技术可能产生治疗上有用的IgG、IgA、IgM和IgE抗体,包括但不限于IgG1(γ 1)和IgG3。对于此技术用于产生人抗体的综述,参见Lonberg和Huszar(Int.Rev.Immunol.,13:65-93(1995))。对于此技术用于产生人抗体和人单克隆抗体以及用于生产这样的抗体的方案的详细讨论,参见,例如,PCT公布号W0 98/24893、W0 96/34096、和W0 96/33735;和美国专利号5,413,923;5,625,126;5,633,425;5,569,825;5,661,016;5,545,806;5,814,318;和5,939,598,其每个通过引用以其全部并入本文。此外,可以与公司比如Abgenix,Inc.(Freemont,Calif.)和Genpharm(San Jose,Calif.)签订合同以使用与上面描述的类似的技术提供针对选择的抗原的人抗体。对于在种系突变小鼠中转移人类种系免疫球蛋白基因阵列在抗原攻击之后将导致产生人抗体的具体讨论,参见,例如,Jakobovits等Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551(1993);Jakobovits等Nature,362:255-258(1993);Bruggermann等Year in Immunol.,7:33(1993);和Duchosal等Nature,355:258(1992)。

[0192] 人抗体也可以源自噬菌体展示文库(Hoogenboom等J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等J.Mol.Biol.,222:581-597(1991);Vaughan等Nature Biotech.,14:309(1996))。噬菌体展示技术(McCafferty等Nature,348:552-553(1990))可以被用于从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因所有组成成分在体外产生人抗体和抗体片段。根据此技术,将抗体V结构域基因符合读框地克隆入丝状噬菌体比如M13或fd的主要或次要外壳蛋白基因,并且在噬菌体颗粒的表面上作为功能性抗体片段展示。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝,所以基于抗体的功能性质的选择也导致选择编码展示那些性质的抗体的基因。因而,噬菌体模拟了B细胞的一些性质。噬菌体展示可以以各种形式进行;对于其综述,参见,例如,Johnson,Kevin S和Chiswell,David J.,Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)。数种来源的V基因区段可以被用于噬菌体展示。Clackson等Nature,352:624-628(1991)从源自未免疫小鼠脾脏的V基因的小的随机组合文库分离了抗唑酮抗体的多样化阵列。可以构建来自未免疫人供体的V基因所有组成成分,并且抗原(包括自体抗原)的多样化阵列的抗体可以基本上遵循下列描述的技术进行分离: Marks等J.Mol.Biol.,222:581-597(1991),或者Griffith等EMBO J.,12:725-734(1993)。还参见美国专利号5,565,332和5,573,905,其每个通过引用以其全部并入本文。

[0193] 人抗体也可以通过体外活化的B细胞生成(参见,美国专利号5,567,610和5,229,275,其每个通过引用以其全部并入本文)。人抗体也可以使用杂交瘤技术体外生成,比如,

但不限于由Roder等(Methods Enzymol., 121:140-167 (1986))描述的。

[0194] 人源化抗体

[0195] 可选地,在一些实施方式中,非人抗体可以是人源化的,其中抗体的特异性序列或区域被修饰以增加与人中天然产生的抗体的相似性。例如,在本发明中,抗体或其片段可以包括非人哺乳动物scFv。在一个实施方式中,抗原结合结构域部分是人源化的。

[0196] 可以使用本领域已知的各种技术产生人源化抗体,该技术包括但不限于CDR-移植(参见,例如,欧洲专利号EP 239,400;国际公布号W0 91/09967;和美国专利号5,225,539、5,530,101、和5,585,089,其每个通过引用以其全部并入本文)、贴面(veneering)或表面重建(resurfacing)(参见,例如,欧洲专利号EP 592,106和EP 519,596;Padlan,1991, Molecular Immunology, 28 (4/5):489-498;Studnicka等1994, Protein Engineering, 7 (6):805-814;和Roguska等1994, PNAS, 91:969-973,其每个通过引用以其全部并入本文)、链改组(参见,例如,美国专利号5,565,332,其通过引用以其全部并入本文)、和在如下中公开的技术,例如,美国专利申请公布号US2005/0042664、美国专利申请公布号US2005/0048617、美国专利号6,407,213、美国专利号5,766,886、国际公布号W0 9317105、Tan等J. Immunol., 169:1119-25 (2002)、Caldas等Protein Eng., 13 (5):353-60 (2000)、Morea等Methods, 20 (3):267-79 (2000)、Baca等J. Biol. Chem., 272 (16):10678-84 (1997)、Roguska等Protein Eng., 9 (10):895-904 (1996)、Couto等Cancer Res., 55 (23Supp):5973s-5977s (1995)、Couto等Cancer Res., 55 (8):1717-22 (1995)、Sandhu J S, Gene, 150 (2):409-10 (1994)、和Pedersen等J. Mol. Biol., 235 (3):959-73 (1994),其每个通过引用以其全部并入本文。通常,框架区中的框架残基将被置换为来自CDR供体抗体的相应残基以改变,优选地改进,抗原结合。这些框架置换通过本领域熟知的方法鉴定,例如,通过建模CDR和框架残基的相互作用以鉴定对抗原结合重要的框架残基和通过序列比较鉴定特定位置处的不常见的框架残基(参见,例如,Queen等,美国专利号5,585,089;和Riechmann等1988, Nature, 332:323,其通过引用以其全部并入本文)。

[0197] 人源化抗体具有从非人来源引入其的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,其通常取自“输入”可变结构域。因而,人源化抗体包括来自非人免疫球蛋白分子的一个或多个CDR和来自人的框架区。抗体的人源化是本领域熟知的,并且可以基本上遵循Winter与合作者的方法进行(Jones等Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等Science, 239:1534-1536 (1988)),其通过将啮齿动物CDR或CDR序列置换为相应的人抗体序列,即CDR-移植(EP 239,400;PCT公布号W0 91/09967;和美国专利号4,816,567;6,331,415;5,225,539;5,530,101;5,585,089;6,548,640,其内容通过引用以其全部并入本文)。在这样的人源化嵌合抗体中,实质上小于完整人可变结构域已经被来自非人物种的相应的序列置换。实际上,人源化抗体通常是其中一些CDR残基和可能的一些框架(FR)残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基置换的人抗体。抗体的人源化也可以通过贴面或表面重建(EP 592,106;EP 519,596; Padlan,1991, Molecular Immunology, 28 (4/5):489-498;Studnicka等Protein Engineering, 7 (6):805-814 (1994);和Roguska等PNAS, 91:969-973 (1994))或链改组(美国专利号5,565,332)实现,其内容通过引用以其全部并入本文。

[0198] 用于制造人源化抗体的人可变结构域——轻和重二者——的选择是为了降低抗

原性。根据所谓的“最佳拟合”方法，啮齿动物抗体的可变结构域的序列针对已知的人可变结构域序列的整个文库进行筛选。最接近于啮齿动物的人序列然后被接受为用于人源化抗体的人框架 (FR) (Sims等J.Immunol.,151:2296 (1993);Chothia等J.Mol.Biol.,196:901 (1987),其内容通过引用以其全部并入本文)。另一种方法使用源自特定的轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列的特定框架。相同的框架可以被用于数种不同的人源化抗体 (Carter等Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285 (1992);Presta等J.Immunol.,151:2623 (1993),其内容通过引用以其全部并入本文)。

[0199] 抗体可以被人源化,并且保留对靶抗原的高亲和力和其它有利的生物学性质。根据本发明的一个方面,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和多种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是一般可获得的并且是本领域技术人员熟悉的。图解和展示选择的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序是可获得的。检查这些展示允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即,分析影响候选免疫球蛋白结合靶抗原的能力的残基。以此方式,FR残基可以从接受者和输入序列选择并组合,使得实现期望的抗体特性,比如对靶抗原的增加的亲和力。一般而言,CDR残基直接地和最实质性地参与影响抗原结合。

[0200] 人源化抗体保留与原始抗体相似的抗原特异性。然而,使用人源化的某些方法,可以使用“定向进化”的方法增加抗体对靶抗原的结合亲和力和/或特异性,如由Wu等J.Mol.Biol.,294:151 (1999)描述的,其内容通过引用以其全部并入本文。

[0201] 载体

[0202] 载体可以被用于将嵌合细胞内信号传导分子或CAR引入如本文其它地方描述的T细胞。在一方面,本发明包括载体,其包括编码嵌合细胞内信号传导的核酸序列。在另一方面,本发明包括载体,其包括编码CAR的核酸序列。在一个实施方式中,载体包括质粒载体、病毒载体、逆转录转座子(例如背负式(piggyback)、睡美人式(sleeping beauty))、定点插入载体(例如CRISPR、锌指核酸酶、TALEN)、或自杀表达载体、或本领域其它已知的载体。

[0203] 上面提及的所有构建体能够与第3代慢病毒载体质粒、其它病毒载体、或批准用于人细胞的RNA一起使用。在一个实施方式中,载体是病毒载体,比如慢病毒载体。在另一个实施方式中,载体是RNA载体。

[0204] 可以通过测序验证本文描述的任何分子的产生。可以使用免疫印迹、免疫组织化学、流式细胞术或本领域熟知和可利用的其它技术验证全长蛋白质的表达。

[0205] 本发明也提供了其中插入本发明的DNA的载体。载体,包括源于逆转录病毒比如慢病毒的那些,是实现长期基因转移的合适工具,这是由于它们允许转基因的长期、稳定整合并且其在子细胞中增殖。慢病毒载体具有超过源自致癌逆转录病毒比如鼠白血病病毒的载体的额外优点,因为它们可转导非增殖的细胞,比如肝细胞。它们也具有在将其引入的对象中导致低免疫原性的额外优点。

[0206] 通常通过可操作地连接核酸或其部分至启动子,并且将构建体并入表达载体来实现天然或合成核酸的表达。载体是通常能够在哺乳动物细胞中复制和/或还能够整合入哺乳动物的细胞基因组的载体。典型的载体包含对调节期望的核酸序列的表达有用的转录和翻译终止子、初始序列、和启动子。

[0207] 核酸可以被克隆入任何数目的不同类型的载体。例如,核酸可以被克隆入如下载

体：其包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒、和粘粒。特别感兴趣的载体包括表达载体、复制载体、探针生成载体、和测序载体。

[0208] 表达载体可以以病毒载体的形式被提供给细胞。病毒载体技术是本领域熟知的并且例如在Sambrook等2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY和其它病毒学和分子生物学手册中描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒、和慢病毒。一般而言, 合适的载体包含在至少一种生物体中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制酶位点、和一个或多个可选择的标志物(例如, WO 01/96584; WO 01/29058; 和美国专利号6,326,193)。

[0209] 额外的启动子元件, 例如增强子, 调控转录起始的频率。通常, 这些位于起始位点上游30-110bp的区域, 但是最近已经显示许多启动子也包含起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔经常是柔性的, 使得当元件相对于另一个被倒置或移动时保持启动子功能。在胸苷激酶(tk)启动子中, 启动子元件之间的间隔可被增加隔开50bp, 然后活性才开始下降。取决于启动子, 显示出单个元件可以合作地或独立地起作用以启动转录。

[0210] 启动子的实例是即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。此启动子序列是能够驱动可操作地连接至其的任何多核苷酸序列的高水平表达的强的组成型启动子序列。然而, 也可以使用其它组成型启动子序列, 包括但不限于猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳癌病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、鸟类白血病病毒启动子、EB病毒即时早期启动子、鲁斯氏肉瘤病毒启动子、EF-1 α 启动子, 以及人基因启动子, 比如, 但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红素启动子、和肌酸激酶启动子。进一步, 本发明应当不限于使用组成型启动子。诱导型启动子也被考虑作为本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关, 其能够当期望这样的表达时, 开启可操作地连接诱导型启动子的多核苷酸序列的表达, 或当不期望表达时关闭表达。诱导型启动子的例子包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子、和四环素启动子。

[0211] 为了评估多肽或其部分的表达, 引入细胞的表达载体也可以包含可选择的标记物基因或报道基因中的任一种或二者, 以促进从通过病毒载体寻求被转染或感染的细胞群鉴定和选择表达细胞。在其它方面, 可选择的标志物可以被携带在DNA的单独段上并且用于共转染程序。可选择的标志物和报道基因二者均可以侧接适当的调控序列, 以使得能够在宿主细胞中表达。有用的可选择的标志物包括例如抗生素抗性基因, 比如Neo等。

[0212] 报道基因被用于鉴定潜在转染的细胞并且用于评价调控序列的功能性。一般而言, 报道基因是如下基因: 其不存在于受体生物体或组织中或由受体生物体或组织表达, 并且编码多肽, 该多肽的表达由一些可容易检测的性质例如酶促活性显现。在DNA已经被引入受体细胞后, 在合适的时间评估报道基因的表达。合适的报道基因可以包括编码萤光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶的基因, 或绿色荧光蛋白基因(例如, Ui-Tei等2000FEBS Letters 479:79-82)。合适的表达系统是熟知的并且可以使用已知的技术制备或商购。一般而言, 显示最高水平的报道基因表达的具有最小5'侧翼区的构建体被鉴定为启动子。这样的启动子区可以被连接至报道基因并且被用于评价试剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0213] 引入核酸

[0214] 将基因——比如嵌合细胞内信号传导分子或CAR——引入细胞和表达该基因的方

法是本领域已知的。在表达载体的上下文中,可以通过本领域的任何方法将载体容易地引入宿主细胞,例如,哺乳动物、细菌、酵母、或昆虫细胞。例如,表达载体可以通过物理、化学、或生物学手段被转移入宿主细胞。

[0215] 用于将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。用于产生包括载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域熟知的。参见,例如,Sambrook等2012,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,volumes 1-4,Cold Spring Harbor Press,NY。可以使用商业上可获得的方法将核酸引入靶标细胞,该方法包括电穿孔(Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems,Cologne,Germany))、ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments,Boston,Mass.)或Gene Pulser II (BioRad,Denver,Colo.)、Multiporator (Eppendorf,Hamburg Germany)。还可以通过如下将核酸引入细胞:使用阳离子脂质体介导的转染、使用脂质转染、使用聚合物封装、使用肽介导的转染、或使用生物射弹粒子递送系统比如“基因枪”(参见,例如,Nishikawa等Hum Gene Ther.,12(8):861-70 (2001))。

[0216] 用于将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。RNA载体包括具有RNA启动子和/或用于产生RNA转录物的其它相关结构域的载体。病毒载体,并且尤其是逆转录病毒载体,已经成为最广泛使用的将基因插入哺乳动物例如人细胞的方法。其它病毒载体可以源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒、腺病毒和腺伴随病毒等。参见,例如,美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0217] 用于将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统,比如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠和基于脂质的系统,包括水包油乳液、胶团、混合胶团、和脂质体。用作体外和体内递送媒介的示例性胶体系统是脂质体(例如,人工膜囊)。

[0218] 在利用非病毒递送系统的情况下,示例性递送媒介是脂质体。考虑将脂质制剂用于将核酸引入宿主细胞(体外、离体或体内)。在另一方面,核酸可以与脂质缔合。与脂质缔合的核酸可以被封装在脂质体的水性内部中,散布在脂质体的脂双层内,经由与脂质体和寡核苷酸二者均缔合的连接分子附加至脂质体,包埋在脂质体中,与脂质体复合,分散在包含脂质的溶液中,与脂质混合,与脂质组合,作为悬浮液包含在脂质中,包含在胶团中或与胶团复合,或以其它方式与脂质缔合。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体缔合的组合物不限于溶液中的任何具体结构。例如,它们可以存在于双分子层结构中,作为胶团,或具有“坍塌的(collapsed)”结构。它们也可简单地被散布在溶液中,可能形成大小或形状不均一的聚集体。脂质是脂肪物质,其可以是天然存在的或合成的脂质。例如,脂质包括脂肪液滴——其在细胞质中天然存在——以及包含长链脂肪族烃和它们的衍生物比如脂肪酸、醇类、胺类、氨基醇类、和醛类的化合物类别。

[0219] 适于使用的脂质可以从商业来源获得。例如,二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(“DMPC”)可以从Sigma,St.Louis,MO获得;磷酸二鲸蜡酯(“DCP”)可以从K&K Laboratories (Plainview,NY)获得;胆固醇(“Choi”)可以从Calbiochem-Behring获得;二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(“DMPG”)和其它脂质可以从Avanti Polar Lipids,Inc. (Birmingham,AL.)获得。氯仿或氯仿/甲醇中的脂质原液可以被储存在大约-20℃下。氯仿被用作唯一的溶剂,这是由于它比甲醇更容易蒸发。“脂质体”是通用术语,其涵盖通过生成封闭的脂双层或聚集体而形成的各种单一和多层脂质媒介。脂质体可以被表征为具有含有磷脂双层膜和内部水性介

质的囊泡结构。多层脂质体具有由水性介质分隔的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水性溶液中时,它们自发地形成。在形成封闭结构和在脂双层之间包埋水和溶解的溶质前,脂质组分经历自我重排 (Ghosh等1991Glycobiology 5:505-10)。然而,也涵盖与正常的囊泡结构相比在溶液中具有不同结构的组合物。例如,脂质可以呈现胶团结构或仅作为脂质分子的非均一聚集体存在。同样考虑脂质转染胺-核酸复合物。

[0220] 不管用于将外源核酸引入宿主细胞或以其它方式将细胞暴露于本文描述的分子的方法,为了确认宿主细胞中核酸的存在,可以进行各种试验。这样的试验包括例如本领域技术人员熟知的“分子生物学”试验,比如DNA印迹和RNA印迹、RT-PCR和PCR;“生物化学”试验,比如例如通过免疫学手段 (ELISA和蛋白质印迹) 或通过本文描述的鉴定落入本发明范围内的试剂的试验来检测特定肽的存在或不存在。

[0221] 在一个实施方式中,通过选自如下的方法引入在本文其它地方描述的核酸序列中的一种或多种:转导细胞群、转染细胞群、和电穿孔细胞群。在一个实施方式中,细胞群包括本文描述的核酸序列中的一种或多种。

[0222] 在一个实施方式中,引入细胞的核酸是RNA。在另一个实施方式中,RNA是包括体外转录的RNA或合成RNA的mRNA。使用聚合酶链式反应 (PCR) 生成的模板通过体外转录产生RNA。来自任何来源的感兴趣的DNA可以通过PCR直接转化为使用适当的引物和RNA聚合酶的体外mRNA合成的模板。DNA的来源可以是,例如,基因组DNA、质粒DNA、噬菌体DNA、cDNA、合成DNA序列或任何其它适当的DNA来源。期望的体外转录模板是嵌合细胞内信号传导分子。

[0223] PCR可以被用于生成体外转录mRNA——其随后被引入细胞——的模板。用于进行PCR的方法是本领域熟知的。用于PCR的引物被设计为具有与待用作PCR模板的DNA的区域基本上互补的区域。如本文使用的“基本上互补的”指的是如此核苷酸的序列:其中引物序列中的大部分或所有碱基是互补的,或一个或多个碱基是非互补的或错配的。基本上互补的序列能够与目标DNA靶标在用于PCR的退火条件下退火或杂交。引物可以被设计为与DNA模板的任何部分基本上互补。例如,引物可以被设计为扩增在细胞中正常转录的部分基因 (开放阅读框),包括5'和3'UTR。引物还可以被设计为扩增编码感兴趣的特定结构域的部分基因。在一个实施方式中,引物被设计为扩增包括所有或部分5'和3'UTR的人cDNA的编码区。通过本领域熟知的合成方法生成对PCR有用的引物。“正向引物”是包含与待扩增的DNA序列上游的DNA模板上的核苷酸基本上互补的核苷酸区域的引物。本文使用的“上游”指的是待扩增的DNA序列相对于编码链的5'位置。“反向引物”是包含与待扩增的DNA序列下游的双链DNA模板基本上互补的核苷酸区域的引物。本文使用的“下游”指的是待扩增的DNA序列相对于编码链的3'位置。

[0224] 还可以使用具有促进RNA的稳定性和/或翻译效率的能力的化学结构。RNA优选地具有5'和3'UTR。在一个实施方式中,5'UTR的长度在零和3000个核苷酸之间。待添加至编码区的5'和3'UTR序列的长度可以通过不同的方法改变,包括但不限于设计用于PCR的引物,其退火至UTR的不同区域。使用此方法,本领域普通技术人员可以修改实现转染转录的RNA之后最佳翻译效率所需要的5'和3'UTR长度。

[0225] 5'和3'UTR可以是感兴趣的基因的天然存在的内源性5'和3'UTR。可选地,可以通过将UTR序列并入正向和反向引物或通过模板的任何其它修饰添加对感兴趣的基因非内源性的UTR序列。使用对感兴趣的基因非内源性的UTR序列对修改RNA的稳定性和/或翻译效率

可以是有用的。例如,已知3'UTR序列中的富AU元件可以降低mRNA的稳定性。因此,3'UTR可以被选择或设计以基于本领域熟知的UTR的性质增加转录的RNA的稳定性。

[0226] 在一个实施方式中,5'UTR可以包含内源基因的Kozak序列。可选地,当正在通过如上面描述的PCR添加对感兴趣的基因非内源性的5'UTR时,可以通过添加5'UTR序列重新设计共有的Kozak序列。Kozak序列可以增加一些RNA转录物的翻译效率,但是似乎不是所有RNA能够高效翻译所需要的。许多mRNA的Kozak序列的要求是本领域已知的。在其它实施方式中,5'UTR可以源自其RNA基因组在细胞中稳定的RNA病毒。在其它实施方式中,多种核苷酸类似物可以被用于3'或5'UTR以阻碍mRNA的核酸外切酶降解。

[0227] 为了使得能够从DNA模板合成RNA而不需要基因克隆,转录的启动子应当被附加至待转录的序列上游的DNA模板。当作为RNA聚合酶的启动子起作用的序列被添加至正向引物的5'端时,RNA聚合酶启动子并入待转录的开放阅读框上游的PCR产物。在一个实施方式中,启动子是T7聚合酶启动子,如本文其它地方描述的。其它有用的启动子包括但不限于T3和SP6RNA聚合酶启动子。T7、T3和SP6启动子的共有的核苷酸序列是本领域已知的。

[0228] 在一个实施方式中,mRNA具有5'端上的帽和3'聚腺苷酸尾二者,其决定核糖体结合、翻译起始和mRNA在细胞中的稳定性。在环状DNA模板例如质粒DNA上,RNA聚合酶产生不适于在真核细胞中表达的长的多联体产物(concatameric product)。在3'UTR的端处线性化的质粒DNA的转录产生正常大小的mRNA,其在真核转染中无效,即使其在转录后被聚腺苷酸化。

[0229] 在线性DNA模板上,噬菌体T7RNA聚合酶可以使转录物的3'端延伸超过模板的最后一个碱基(Schenborn和Mierendorf,Nuc Acids Res.,13:6223-36(1985);Nacheva和Berzal-Herranz,Eur.J.Biochem.,270:1485-65(2003))。

[0230] 将聚A/T区段整合入DNA模板的常规方法是分子克隆。然而,整合入质粒DNA的聚A/T序列可能引起质粒不稳定,这就是为什么从细菌细胞获得的质粒DNA模板经常被缺失和其它畸变高度污染。这使得克隆程序不仅费力而且耗时,并且经常不可靠。这就是为什么允许构建具有聚A/T 3'区段的DNA模板而没有克隆的方法是高度期望的。

[0231] 转录的DNA模板的聚A/T区段可以在PCR期间通过使用包含聚T尾——比如100个T尾(大小可以是50-5000个T)——的反向引物产生,或在PCR后通过任何其它方法产生,该方法包括但不限于DNA连接或体外重组。聚腺苷酸尾还给RNA提供稳定性并且减少它们的降解。通常,聚腺苷酸尾的长度与转录的RNA的稳定性正相关。在一个实施方式中,聚腺苷酸尾在100和5000个腺苷之间。

[0232] 可以在体外转录之后使用聚腺苷酸聚合酶——比如大肠杆菌聚腺苷酸聚合酶(E-PAP)——进一步延伸RNA的聚腺苷酸尾。在一个实施方式中,使聚腺苷酸尾的长度从100个核苷酸增加至300和400之间个核苷酸导致RNA的翻译效率增加大约两倍。另外,不同的化学基团附加至3'端可以增加mRNA稳定性。这样的附加可以包含修饰的/人工的核苷酸、适配体和其它化合物。例如,ATP类似物可以使用聚腺苷酸聚合酶并入聚腺苷酸尾。ATP类似物可以进一步增加RNA的稳定性。

[0233] 5'帽也给RNA分子提供稳定性。在优选的实施方式中,通过本文公开的方法产生的RNA包括5'帽。使用本领域已知的和本文描述的技术提供5'帽(Cougot等Trends in Biochem.Sci.,29:436-444(2001);Stepinski等RNA,7:1468-95(2001);Elango等

Biochim.Biophys.Res.Commun.,330:958-966 (2005))。

[0234] 通过本文公开的方法产生的RNA还可以包含内部核糖体进入位点(IRES)序列。IRES序列可以是起始帽-独立性核糖体结合至mRNA并且促进翻译起始的任何病毒序列、染色体序列或人工设计的序列。可以包括适于细胞电穿孔的任何溶质,其可以包含促进细胞通透性和生存力的因子,比如糖、肽、脂质、蛋白质、抗氧化剂、和表面活性剂。

[0235] 一些体外转录的RNA (IVT-RNA) 载体是文献中已知的,其以标准化方式被用作体外转录的模板并且已经以如此方式被基因修饰:该方式产生稳定的RNA转录物。用于本领域的目前的方案基于具有下列结构的质粒载体:使得能够RNA转录的5' RNA聚合酶启动子,接着是由非翻译区域(UTR)在3'和/或5'侧接的感兴趣的基因,和包含50-70个A核苷酸的3'聚腺嘌呤基盒。在体外转录之前,环状质粒在聚腺嘌呤基盒下游通过II型限制酶(识别序列对应于切割位点)线性化。聚腺嘌呤基盒因而对应于转录物中的后面的聚腺苷酸序列。作为此程序的结果,一些核苷酸在线性化后仍作为部分酶切割位点保留并且延伸或掩盖3'端处的聚腺苷酸序列。尚不清楚此非生理学突出部分是否影响从这样的构建体细胞内产生的蛋白质的量。

[0236] 在一方面, RNA构建体通过电穿孔被递送入细胞。参见,例如,如在US 2004/0014645、US 2005/0052630A1、US 2005/0070841A1、US 2004/0059285A1、US 2004/0092907A1中教导的将核酸构建体电穿孔入哺乳动物细胞的制剂和方法。包括电穿孔任何已知的细胞类型所需要的电场强度的多个参数在相关的研究文献以及领域的众多专利和申请中通常是已知的。参见例如,美国专利号6,678,556、美国专利号7,171,264、和美国专利号7,173,116。用于电穿孔的治疗性应用的设备是商业上可获得的,例如,MedPulser™DNA电穿孔治疗系统(Inovio/Genetronics, San Diego, Calif.),并且在专利比如美国专利号6,567,694;美国专利号6,516,223、美国专利号5,993,434、美国专利号6,181,964、美国专利号6,241,701、和美国专利号6,233,482中描述;电穿孔也可以被用于细胞体外转染,例如,如在US20070128708A1中描述的。电穿孔也可以被用于将核酸体外递送入细胞。因此,利用本领域技术人员已知的许多可用的装置和电穿孔系统中的任一种将包括核酸的表达构建体电穿孔介导的施用入细胞提供了令人激动的将感兴趣的RNA递送至靶标细胞的新手段。

[0237] 可选地,在另一方面,本发明包括用于生成修饰的T细胞的方法,其包括使用编码嵌合细胞内信号传导分子的核酸序列电穿孔T细胞群,其中核酸序列包括共刺激分子的细胞内结构域的核酸序列并且基本上缺少细胞外结构域。在一个实施方式中,编码嵌合细胞内信号传导分子的核酸序列被电穿孔入细胞。在又一个实施方式中,编码CAR或膜结合嵌合受体的核酸序列被进一步电穿孔入细胞。

[0238] T细胞的来源

[0239] 修饰的T细胞可以由任何来源的T细胞生成。在一个实施方式中,T细胞的来源从对象获得。对象的非限制性实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠、和其转基因物种。优选地,对象是人。T细胞可以从许多来源获得,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脾脏组织、脐带、和肿瘤。在某些实施方式中,可以使用本领域中可利用的任意数目的T细胞系。在某些实施方式中,可以使用技术人员已知的任意数目的技术比如Ficoll分离从由对象收集的单位血液获得T细胞。在一个实施方式中,通过单采血液成分术或白细胞提取法获得来自个体的循

环血液的细胞。单采血液成分术产物通常包含淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它成核的白细胞、红细胞、和血小板。可以洗涤通过单采血液成分术收集的细胞以去除血浆部分并且将细胞放置在适当的缓冲液或介质中,用于后续处理步骤,该缓冲液或介质比如磷酸盐缓冲盐水(PBS)或洗涤液,其缺少钙并且可能缺少镁或可能缺少很多——如果不是全部的话——二价阳离子。在洗涤后,细胞可以被重悬在各种生物相容性缓冲液中,比如,例如,无Ca、无Mg PBS。可选地,可以去除单采血液成分术样品的非期望组分,并且将细胞直接重悬在培养基中。

[0240] 在另一个实施方式中,通过溶解红细胞和耗尽单核细胞从外周血分离T细胞,例如,通过经由PERCOLL™梯度的离心。可选地,可以从脐带分离T细胞。无论如何,可以通过正或负选择技术进一步分离T细胞的特定亚群。

[0241] 如此分离的脐带血单核细胞可以被耗尽表达某些抗原——包括但不限于CD34、CD8、CD14、CD19和CD56——的细胞。可以使用分离的抗体、包括抗体的生物学样品比如腹水、结合至物理支持体(support)的抗体、和细胞结合的抗体完成这些细胞的耗尽。

[0242] 可以使用针对对负选择的细胞独特的表面标志物的抗体的组合完成通过负选择富集T细胞群。优选的方法是细胞分选和/或选择,其经由负磁性免疫粘附或使用针对在负选择的细胞上存在的细胞表面标志物的单克隆抗体的混合物的流式细胞术。例如,为了通过负选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、和CD8的抗体。

[0243] 对于通过正或负选择分离期望的细胞群,可以改变细胞和表面(例如,颗粒比如珠)的浓度。在某些实施方式中,可能期望的是,显著地降低珠和细胞被混合在一起的体积(即,增加细胞的浓度),以确保细胞和珠的最大接触。例如,在一个实施方式中,使用20亿个细胞/ml的浓度。在一个实施方式中,使用10亿个细胞/ml的浓度。在进一步的实施方式中,使用大于1亿个细胞/ml。在进一步的实施方式中,使用10、15、20、25、30、35、40、45、或50×10⁶个细胞/ml的细胞浓度。在又一个实施方式中,使用75、80、85、90、95、或100×10⁶个细胞/ml的细胞浓度。在进一步的实施方式中,可以使用125或150×10⁶个细胞/ml的浓度。使用高浓度可以产生增加的细胞产率、细胞活化、和细胞扩展。

[0244] 在洗涤步骤后,还可以冷冻T细胞,其不需要单核细胞-去除步骤。虽然不希望被理论束缚,但是通过去除细胞群中的粒细胞和一定程度的单核细胞,冷冻和后续的解冻步骤提供了更均一的产物。在去除血浆和血小板的洗涤步骤后,细胞可以被悬浮在冷冻液中。虽然许多冷冻液和参数是本领域已知的并且将在此背景下是有用的,但是在非限制性实例中,一种方法涉及使用包含20%DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或其它合适的细胞冷冻介质,细胞然后以1°/分钟的速率被冷冻至-80℃,并且储存在液氮储罐的蒸汽相中。可以使用受控冷冻的其它方法以及在-20℃下或在液氮中不受控的即刻冷冻。

[0245] 在一个实施方式中,细胞群包括本发明的T细胞。细胞群的实例包括但不限于外周血单核细胞、脐带血细胞、纯化的T细胞群、和T细胞系。在另一个实施方式中,外周血单核细胞包括T细胞群。在又一个实施方式中,纯化的T细胞包括T细胞群。

[0246] T细胞的扩展

[0247] 可以离体扩展通过本文描述的任何方法生成的T细胞。在一个实施方式中,培养T细胞或包括T细胞的细胞群进行扩展。通常,T细胞通过与表面接触被扩展,该表面具有附加

至其的刺激CD3/TCR复合体相关信号的试剂和刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体。

[0248] 本文描述了用于扩展T细胞的方法,例如,T细胞可以被扩展大约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍、或更大,和其间的任何和所有全部或部分整数。在一个实施方式中,T细胞以大约20倍至大约50倍的范围扩展。

[0249] 在将细胞传代至另一个培养设备前,T细胞可以在培养设备中的细胞培养基中培育一段时间或直到细胞达到进行最佳传代的汇合或高细胞密度。培养设备可以具有一般用于体外培养细胞的任何培养设备。优选地,在将细胞传代至另一个培养设备前,汇合水平是70%或更大。更优选地,汇合水平是90%或更大。一段时间可以是适于细胞体外培养的任何时间。可以在T细胞培养的任何时间替换T细胞培养基。优选地,大约每2至3天替换T细胞培养基。然后从培养设备采集T细胞,于是T细胞可以被立即使用或冷藏储存以备后用。在一个实施方式中,本发明包括冷藏扩展的T细胞。在将在本文其它地方描述的分子中的一种或多种引入T细胞之前解冻冷藏的T细胞。

[0250] 如本文描述的培养步骤(与如本文描述的试剂接触)可以非常短,例如小于24小时比如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、或23小时。如本文进一步描述的培养步骤(与如本文描述的试剂接触)可以较长,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或更多天。

[0251] 在一个实施方式中,T细胞可以被培养数小时(大约3小时)至大约14天或其间的任何小时的整数值。适于T细胞培养的条件包括适当的培养基(例如,最小必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 15, (Lonza)),其可以包含增殖和生存力必需的因子,包括血清(例如,胎牛血清或人血清)、白细胞介素-2 (IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF- β 、和TNF- α 、或技术人员已知的用于细胞生长的任何其它添加剂。用于细胞生长的其它添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白粉(plasmanate)、和还原剂比如N-乙酰-半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可以包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15、和X-Vivo 20、优化物(Optimizer)(具有添加的氨基酸、丙酮酸钠、和维生素)、无血清或补充有适当量的血清(或血浆)或限定的激素组、和/或足够T细胞的生长和扩展的量的细胞因子(一种或多种)。抗生素,例如,青霉素和链霉素,仅包括在实验培养物中,而不在被注入对象的细胞培养物中。靶标细胞被维持在支持生长必需的条件下,例如,适当的温度(例如,37 $^{\circ}$ C)和气氛(例如,空气加5%CO₂)。

[0252] T细胞培养基可以包括可以共刺激T细胞的试剂。例如,可以刺激CD3的试剂是CD3的抗体,并且可以刺激CD28的试剂是CD28的抗体。这是因为,如由本文公开的数据展现的,通过本文公开的方法分离的细胞可以被扩展大约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍、或更大。在一个实施方式中,通过培养电穿孔的群体以大约20倍至大约50倍或更多的范围扩展T细胞。

[0253] 疗法

[0254] 在一方面,本发明包括治疗对象中与HIV感染相关联的疾病或病症的方法,其包括

给对象施用治疗有效量的包括本文描述的修饰的T细胞的药物组合物。

[0255] 如本文描述的修饰的T细胞可以被施用至动物,优选地哺乳动物,甚至更优选地人,以治疗HIV感染。此外,本发明的修饰的T细胞可以被用于任何病症的治疗,其中减弱的或另外抑制的免疫应答,尤其是细胞介导的免疫应答,期望地治疗或减轻疾病。

[0256] 本发明的修饰的T细胞的施用可以以本领域技术人员已知的任何常规方式实施。本发明的修饰的T细胞可以通过雾化吸入、注射、吞咽、输注、植入或移植被施用至对象。本文描述的组合物可以经动脉、皮下、皮内、瘤内、结内、髓内、肌肉内、通过静脉内(i.v.)注射、或腹膜内施用至患者。在其它情况下,本发明的修饰的T细胞被直接注入对象中的炎症部位、对象中的局部疾病部位、淋巴结、器官、肿瘤等。

[0257] 药物组合物

[0258] 本发明的药物组合物可以包括如本文描述的修饰的T细胞,其与一种或多种药学上或生理学上可接受运载体、稀释剂或赋形剂组合。这样的组合物可以包括缓冲液比如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物比如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸比如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂比如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。本发明的组合物优选地配制用于静脉内施用。

[0259] 本发明的药物组合物可以以适于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用数量和频率将通过如下因素确定,比如患者的状况以及患者疾病的类型和严重程度,但是可以通过临床试验确定适当的剂量。

[0260] 当指示“免疫有效量”、“抗免疫应答有效量”、“免疫应答-抑制有效量”、或“治疗量”时,可以由医师考虑个体年龄、重量、免疫应答、和患者(对象)的状况的差异确定待施用的本发明的组合物的精确量。通常可以规定可以以 10^4 至 10^9 个细胞/kg体重,优选地 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重的剂量——包括那些范围内的所有整数值——施用包括本文描述的T细胞的药物组合物。也可以以这些剂量多次施用T细胞组合物。可以通过使用免疫疗法中公知的输注技术(参见,例如,Rosenberg等New Eng.J.of Med.319:1676,1988)施用细胞。特定患者的最佳剂量和治疗方案可以通过监测患者的疾病迹象和因此调节治疗由医学领域技术人员容易地确定。

[0261] 在某些实施方式中,可以期望给对象施用修饰的T细胞,并且随后重新抽取(redraw)血液(或进行单采血液成分术),根据本发明在代谢上增强来自其的T细胞,并且使用这些修饰的T细胞再输注患者。此过程可以每几周实施多次。在某些实施方式中,可以从大约10ml至大约400ml的血液抽取物获得T细胞。在某些实施方式中,从大约20ml、30ml、40ml、50ml、60ml、70ml、80ml、90ml、或100ml的血液抽取物获得修饰的T细胞。不被理论束缚,使用此多重血液抽取/多重再输注方案,可以选择出某些T细胞群。

[0262] 在本发明的某些实施方式中,使用本文描述的方法修饰T细胞,并且使用本文描述的方法或本领域已知的其它方法刺激、活化或扩展T细胞,其中T细胞被扩展至治疗水平,其连同任意数目的相关治疗模态(例如,之前、同时或之后)被施用至患者,该治疗模态包括但不限于任何可用的抗-HIV疗法。

[0263] 施用给患者的上面的治疗的剂量将随着正在治疗的病症的精确性质和治疗的接受者变化。应当理解在本发明中有用的方法和组合物不限于在实施例中陈述的具体制剂。下列实施例被提出以便于为本领域普通技术人员提供如何制造和使用本发明的细胞、扩展

和培养方法以及治疗方法的完整的公开内容和描述,并且不意图限制本发明人视为其发明的范围。

[0264] 除非另外指示,本发明的实践采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,其非常在技术人员的见识内。这样的技术在如下文献中充分地说明,比如,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,fourth edition (Sambrook,2012);“Oligonucleotide Synthesis”(Gait,1984);“Culture of Animal Cells”(Freshney,2010);“Methods in Enzymology”“Handbook of Experimental Immunology”(Weir,1997);“Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells”(Miller和Calos,1987);“Short Protocols in Molecular Biology”(Ausubel,2002);“Polymerase Chain Reaction:Principles,Applications and Troubleshooting”,(Babar,2011);“Current Protocols in Immunology”(Coligan,2002)。这些技术适用于产生本发明的多核苷酸和多肽,并且正因如此,可以考虑用于完成和实践本发明。将在下列部分中讨论具体实施方式的特别有用的技术。

[0265] 实验实施例

[0266] 通过参考下列实验实施例进一步详细地描述本发明。除非另外规定,这些实施例仅出于说明目的提供,并且不意图是限制性的。因而,本发明决不当解释为限于下列实施例,而是应当解释为涵盖由于本文提供的教导而变得明显的任何和所有的变型。

[0267] 在没有进一步描述的情况下,认为使用在先的描述和下列说明性实施例,本领域普通技术人员可以制造和利用本发明的化合物,并且实践要求保护的方法。因此,下列工作实施例具体地指出本发明的优选的实施方式,并且不解释为以任何方式限制本公开内容的其余部分。

[0268] 现在描述在这些实验中采用的材料和方法。

[0269] 基于单链可变片段(scFv)的CAR构建体:

[0270] scFv使用CD137和CD3 ζ 信号传导结构域合成为第2代CAR中的单个转录物或借助KIRS2连同DAP12合成为人工NK细胞受体。所有构建体遵循专利权密码子改装指数(Geneart,Life Techn.)被密码子优化,用于在人中表达为一个转录物。

[0271] 已经在本发明中产生和测试了下列构建体:

[0272] 靶向V1/V2聚糖的“PGDM1400”(SEQ ID NO:10-13),靶向V3/V4聚糖的“PGT128”(SEQ ID NO:14-17),靶向CD4结合位点的“VRC01”(SEQ ID NO:18-21和34-35),靶向CD4结合位点的“VRC01c-mut”(HCDR1和HCDR3之间非典型的二硫键的突变)(SEQ ID NO:26-29),靶向CD4结合位点的“3BNC60”(SEQ ID NO:22-25),和CD4Dap12-KIRS2(SEQ ID NO:30-31)。

[0273] 载体构建:

[0274] 获得原始临床试验载体的骨架pRT43.2GFP(Liu和Eiden.Retrovirology 9,51(2012))并且限制位点连接体被插入PstI和SalI位点,去除CMV启动子区。在PGK启动子下表达的CD4 ζ 序列由质粒pRRL.PGK.F3——其具有寡核苷酸

[0275] 5' GTATCGATCAGAGACTAGC(SEQ ID NO:40)和

[0276] 5' TTAAACCGGTGTCTGGCCTTTGAGTGGTGA(SEQ ID NO:41)——扩增并且被插入pRT43.2内的连接体中的XhoI和AgeI位点。通过扩增产生pTRPE CD4 ζ 。使用下列引物通过PCR由pRRL.PGK.F3逆转录病毒骨架——其包含原始临床试验CD4-CD3 ζ 构建体——扩增CD4

细胞外结构域:

[0277] 引物-1有义 (SEQ ID NO:36):

[0278] 5'-TTAATGGGATCCATGAACCGGGGAGTCCCTTT-3'

[0279] 引物-2反义 (SEQ ID NO:37):

[0280] 5'-AAGGACTTCCGGATGGCTGCACCGGGGTGGACCATG-3'

[0281] PCR产物然后被插入pELNS慢病毒骨架——其包含CD8 α 细胞外铰链和跨膜结构域以及4-1BB和CD3 ζ 细胞内共刺激结构域 (ICD) ——中的BamHI和BspEI限制位点。获得包含CD8 α 铰链-CD8 α TM-CD3 ζ 或包含CD8 α 铰链-CD28TM-CD28-CD3 ζ ICD的pELNS慢病毒载体并且被用作模板以使用下列引物PCR扩增铰链-TM-和ICD区:

[0282] 引物-3有义 (SEQ ID NO:38):

[0283] 5'-GGGACACTCCGGAACACGACGCCAGCGCCGCG-3'

[0284] 引物-4反义 (SEQ ID NO:39):

[0285] 5'-GGGACACGTCGACTTAGCGAGGGGGCA-3'

[0286] 此PCR模板然后被插入最近生成的pELNS CD4 4-1BB ζ 构建体中的BspEI和SalI位点以替换包含CD8 α 铰链-4-1BB-CD3 ζ 区的区。质粒然后被电穿孔入大肠杆菌的Top10菌株并且在其中繁殖。

[0287] 通过合成TCR α 和TCR β 基因序列 (IDT) 生成表达能够识别HIV p24Gag表位KAFSPEVIPMF (SEQ ID NO:42, pTRPE B57-KF11) 的B57局限的TCR的慢病毒载体。如先前描述的, TCR α 和TCR β 基因序列被T2A分隔, 其允许两种TCR基因的协调表达 (Varela-Rohena等 Nature medicine 14, 1390-1395 (2008))。VRC01、3BNC60、PGT128、和PGDM1400scFv CAR由公开的亲本抗体序列以轻链-连接体-重链构型生成。连接体序列如下: GGSSRSSSSGGGGSGGGG (SEQ ID NO:43)。氨基酸序列被密码子优化 (Geneart) 并且被合成为双链DNA片段 (IDT或Geneart), 侧接合适的限制位点并且然后被克隆入具有BamHI和BspEI限制位点的pTRPE表达质粒。PG9scFv被克隆入具有BamHI和BspEI限制位点的pTRPE表达质粒。用于此研究的优化的HIV CAR的序列中的一些在图18 (SEQ ID NO:44-61, 氨基酸) 和图19 (SEQ ID NO:62-79, 核酸) 中列出。

[0288] 基于VRC01、VRC01c-、和3BNC60scFv的KIR和IgG4-41BB- ζ CAR的构建。

[0289] 在使用BamHI和NheI消化后, VRC01、VRC01c-、3BNC60scFv在EF1 α 启动子的控制下被克隆入第3代慢病毒表达载体, 使得scFv符合读框, 其具有后接KIRS2跨膜和信号传导结构域的9个氨基酸GS-连接体。DAP-12位于scFv前导序列的5', 它由此处被T2A核糖体跳跃位点 (ribosomal skipping site) 分隔。应用类似的策略以将scFv编码序列克隆入载体, 其允许符合读框地表达scFv, 其具有IgG4铰链, 接着是CD8跨膜结构域以及41BB共刺激和CD3 ζ 信号传导结构域。

[0290] 基于VRC01、3BNC60、PGT128、PGDM1400和PG9scFv的CD3 ζ CAR的构建。

[0291] 使用编码5'侧翼BamHI和3'侧翼BspEI位点的引物PCR扩增VRC01、3BNC60、PGT128、PGDM1400和PG9scFv编码序列, 其允许消化和在前导序列和CD8 α 铰链之间克隆入前述的pELNS CD8 α 铰链-CD8 α TM-CD3 ζ 。测序验证所有构建体。

[0292] 表1: 序列表

[0293]

SEQ ID No.	描述	
1	CD4 ζ	核酸
2	EF1 α 启动子	核酸
3	CD4 细胞外结构域	核酸
4	CD8 α 细胞外铰链	核酸
5	CD8 α 跨膜结构域	核酸
6	CD3 ζ	核酸
7	CD4 CD28 ζ	核酸
8	CD28 跨膜结构域	核酸
9	CD28 共刺激结构域	核酸
10	PGDM1400-KIR	核酸
11	PGDM1400-KIR	氨基酸
12	PGDM1400 scFv	核酸

[0294]

13	PGDM1400 scFv	氨基酸
14	PGT128-KIR	核酸
15	PGT128-KIR	氨基酸
16	PGT128 scFv	核酸
17	PGT128 scFv	氨基酸
18	VRC01-KIR	核酸
19	VRC01-KIR	氨基酸
20	VRC01 scFv	核酸
21	VRC01 scFv	氨基酸
22	3BNC60-KIR	核酸
23	3BNC60-KIR	氨基酸
24	3BNC60 scFv	核酸
25	3BNC60 scFv	氨基酸
26	VRC01c-KIR	核酸
27	VRC01c-KIR	氨基酸
28	VRC01-c scFv	核酸
29	VRC01-c scFv	氨基酸
30	CD4 Dap12-KIRS2	核酸
31	CD4 Dap12-KIRS2	氨基酸
32	CD4KIR	核酸
33	CD4KIR	氨基酸
34	VRC01 IgG4 bbz	核酸
35	VRC01 IgG4 bbz	氨基酸
44	优化的 CD4-CD28 ζ	氨基酸
45	优化的 CD4 4-1BB ζ	氨基酸
46	优化的 CD4 细胞外结构域	氨基酸
47	优化的 CD8 α 细胞外铰链	氨基酸
48	优化的 CD8 α TM	氨基酸
49	优化的 CD28 TM 和 ICD	氨基酸
50	优化的 4-1BB	氨基酸

[0295]

51	优化的 CD3 ζ	氨基酸
52	优化的 PG9 CD3 ζ	氨基酸
53	优化的 PGT128 CD3 ζ	氨基酸
54	优化的 VRC01 CD3 ζ	氨基酸
55	优化的 3BNC60 CD3 ζ	氨基酸
56	优化的 PGDM1400 CD3 ζ	氨基酸
57	优化的 PG9	氨基酸
58	优化的 PGT128	氨基酸
59	优化的 VRC01	氨基酸
60	优化的 3BNC60	氨基酸
61	优化的 PGDM1400	氨基酸
62	优化的 CD4-CD28 ζ	核酸
63	优化的 CD4 4-1BB ζ	核酸
64	优化的 CD4 细胞外结构域	核酸
65	优化的 CD8 α 细胞外铰链	核酸
66	优化的 CD8 α TM	核酸
67	优化的 CD28 TM 和 ICD	核酸
68	优化的 4-1BB	核酸
69	优化的 CD3 ζ	核酸
70	优化的 PG9 CD3 ζ	核酸
71	优化的 PGT128 CD3 ζ	核酸
72	优化的 VRC01 CD3 ζ	核酸
73	优化的 3BNC60 CD3 ζ	核酸
74	优化的 PGDM1400 CD3 ζ	核酸
75	优化的 PG9	核酸
76	优化的 PGT128	核酸
77	优化的 VRC01	核酸
78	优化的 3BNC60	核酸
79	优化的 PGDM1400	核酸

[0296] 慢病毒采集、浓缩、和原代CD8T细胞的转导：

[0297] 质粒制剂与表达VSV糖蛋白、HIV-1Gag与Pol、和Rev的商购的慢病毒包装质粒 (pRSV.REV、pMDLg/p.RRE、pVSV-G) 组合，并且使用Lipofectamine2000转染试剂

(Invitrogen, Life Technologies) 以 pTRPE 转移载体转染至 HEK293T 细胞上。使用 RD114 Env 和 MMLV gag/pol 质粒 (pMSCV RD114 和 pNGLV3g/p) 完成相同的过程以生成逆转录病毒。在 24 和 48 小时时间点收集上清液的 30ml 等分试样并且通过在 4℃ 下以 8,500RPM 超速离心过夜进行浓缩。吸取上清液并且细胞沉淀物被重悬在 1.2ml 总体积中, 在干冰上急速冰冻, 并且转移至 -80℃ 进行储存。

[0298] 细胞培养-实验方案:

[0299] 获得健康供体 CD8 和 CD4T 淋巴细胞并且使用磁珠—— α CD3/ α CD28 涂覆的 T-expander 珠——进行活化。根据制造商的方案 (StemCell Technologies), 使用 RosetteSep 人 CD4+ 或 CD8+T 细胞富集混合物通过阴性选择纯化 T 细胞。在补充 (ThermoFisher Scientific) 有 10% 胎牛血清 (Seradigm)、1% Penn Strep (Life Technologies)、2mM GlutaMax (Life Technologies) 和 25mM HEPES 缓冲液 (Life Technologies) 的 RPMI 1640 (Life Technologies) 中以 1×10^6 个/mL 培养 T 细胞。使用 3:1 珠/细胞比下的抗-CD3/CD28 涂覆的磁珠 (Life Technologies) 和 100-300 国际单位/毫升的重组人白细胞介素 2 刺激 T 细胞 5 天并且然后去除珠。在刺激后 1 天, 200 μ l 的慢病毒上清液被添加至 0.5×10^6 个细胞。根据制造商的说明, 在第 3 和 5 天进行 MMLV 载体转导, 其中 1ml 病毒上清液添加至 Retrofectin (Takara) 涂覆的 24 孔板并且离心感染细胞 (spinoculated)。培养基在第 3 天加倍并且在第 5 天完全更换, 并且然后在整个细胞培养过程中每隔一天添加, 或基于细胞计数根据需要添加。

[0300] HIV-1 感染。

[0301] 在去除抗-CD3/CD28 珠后两天, 使用 CCR5 嗜性 HIV 毒株 Ba1 感染 CD4T 细胞, 并且 24 小时之后以不同的效应物/靶标 (E:T) 比与 CAR+CD8T 细胞共培养。通过从抗 CD3/CD28 活化的 CD4T 细胞采集无细胞上清液来制备 CCR5 嗜性 HIV-1 Ba1 病毒原液 (280ng/ml p24)。在去除珠后 2-3 天, 通过添加大约 1ml 的上清液/2 千万个细胞来感染活化的 CD4T 细胞。接下来的一天, 以不同的 E:T 比共培养 CD4 和 CD8T 细胞, 并且通过细胞内 p24 染色监测 HIV 传播, 根据制造商的说明, 使用 KC57 抗-Gag-RD1 抗体 (Beckman Coulter) 和 Invitrogen Fix and Perm 缓冲液检测该细胞内 p24 染色。

[0302] 体外细胞毒性和细胞因子试验

[0303] 使用 ^{51}Cr -释放试验测试表达 HIV-1 gp120/41 包膜 (YU-2) 的 K562 细胞的体外杀伤。 5×10^5 个靶标细胞装载有 50 μ Ci 的 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Perkin Elmer) 持续 90-120 分钟, 洗涤两次并且重悬在具有 5% FBS 的无酚红培养基中。转导 CAR 或模拟对照的 T 细胞 (在初始活化后 8-10 天) 与装载的靶标细胞以多种效应物: 靶标 (E:T) 比共培养 4 小时, 并且使用 Micro B 2 平板计数器 (Perkin Elmer) 测量释放入上清液的铬。在以 1:1 E:T 比共培养 5×10^5 个转导 NTD、CD4CAR、或 scFv CAR 的 T 细胞与亲本 K562、转导 HLA-DR*0401 的 K562、或转导 HIV YU2Env 的 K562 持续 6 小时后测量细胞内细胞因子产生。如先前描述的检测细胞因子产生 (86), 其使用大鼠抗人 IL-2 APC (BD biosciences), 小鼠抗人 MIP-1 β PerCP Cy5.5 (BD biosciences), 小鼠抗人 IFN- γ FITC (BD biosciences), 和小鼠抗人 CD107a PE (BD biosciences), 连同 Invitrogen Fix and Perm 缓冲液。在相同的体积中分析通过靶标细胞 (没有效应细胞) 的自发释放, 并且通过使用 5% 最终浓度的 SDS 处理靶标细胞来评估最大释放。百分比特异性裂解 = $[(\text{实验释放} - \text{自发释放}) / (\text{最大释放} - \text{自发释放})] \times 100$ 。以至少 3 个重复进行所有实

验,并且其中原代人T细胞来自3个不同的供体。在400 μ l中共培养 3×10^5 个效应细胞和 10^5 个靶标细胞持续24h后,根据制造商的推荐,在一式两份的培养上清液中通过ELISA (R&D) 定量干扰素 γ 产生。

[0304] CCR5 ZFN破坏。

[0305] 先前描述的CCR5特异性ZFN被克隆入RNA表达载体(Beatty等Cancer immunology research 2,112-120 (2014))。mMessage mMachine T7转录试剂盒(Ambion,Thermo Fisher Scientific)被用于生成加帽的、体外转录的RNA,其随后使用RNeasy Mini Kit(Qiagen)纯化并且在1mg/ml下的无RNase水中洗脱。在电穿孔之前,使用OPTI-MEM培养基洗涤正常供体CD8T细胞三次并且以 1×10^8 个/ml的最终浓度重悬。0.1ml中的 10^6 个T细胞与30 μ g的编码每种ZFN的RNA混合,使用ECM830Electro Square Wave Porator(Harvard Apparatus BTX)在2mm杯皿(Harvard Apparatus BTX)中电穿孔,并且在使用 α CD3/ α CD28涂覆的磁珠(Life Technologies)活化之前,在30 $^{\circ}$ C下培育48小时。

[0306] 为了测量通过CCR5ZFN的基因组修饰效率,基因组DNA由T细胞纯化并且被用于制备Illumina深度测序的样品(Wang等Nucleic Acids Res 44,e30 (2016))。简略地,使用巢式PCR方法以下列2种CCR5特异性引物对扩增CCR5靶标区和添加MiSeq接头。CCR5Out-Out1引物:

[0307] CTGTGCTTCAAGGTCCTTGTCTGC (SEQ ID NO:80) 和

[0308] CTCTGTCTCCTTCTACAGCCAAGC (SEQ ID NO:81); CCR5MiSeq接头引物: ACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNGCCAGGTTGAGCAGGTAGATG (SEQ ID NO:82) 和

[0309] GACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTCTACTCACTGGTGTTCATCTTT (SEQ ID NO:83)。然后使用条形码引物对在后续PCR反应中添加序列条形码。对于分析基因修饰水平,自定义编写的计算机脚本被用于合并双末端150bp序列,并且经由SeqPrep截短接头(John St.John, <https://github.com/jstjohn/SeqPrep>)。测序数据(read)与野生型模板序列比对。使用下列标准过滤合并的测序数据:5'和3'末端(23bp)必须精确地匹配预期的扩增子,测序数据必须不定位至靶标基因组中的不同基因座,如由Bowtie2(Yu等Journal of virology 81, 1619-1631 (2007))使用默认设定测定的,并且缺失必须<70%的扩增子大小或<70bp长。如先前描述的定义比对序列中的插入缺失事件(Gabriel等Nat Biotech 29,816-823 (2011)),除长度为1bp的插入缺失以外,其也被认为是真实的插入缺失以避免少算实际事件,并且真实的插入缺失必须包括横跨每个伴侣ZFN的结合位点的倒数第二个碱基(邻近缺口)之间的序列内出现的缺失。

[0310] 人源化小鼠模型。

[0311] 6周龄NSG(NOD-scid IL2Rnull)小鼠获得自The Jackson Laboratory(JAX)并且在7周时使用与PBS 1:1混合的30mg/kg白消安进行处理。24小时之后,使用PBS中100 μ l 0.5%人血清白蛋白中的 10×10^6 个人淋巴细胞经由尾静脉注射小鼠。三周之后,使用与PBS 1:1混合的15ng的CCR5嗜性Ba1 HIV毒株经由尾静脉注射感染小鼠。通过眼眶后出血获得外周血,并且如先前描述的,使用BD裂解缓冲液和BD TruCount管枚举人CD4和CAR+CD8淋巴细胞计数(Richardson等Molecular therapy:the journal of the American Society of Gene Therapy 22,1084-1095 (2014)),使用小鼠抗人CD45PerCp Cy5.5(BD Biosciences)、小鼠抗人CD4BV421(Biolegend)、和小鼠抗人CD8 α BV711(Biolegend)进行染色。

[0312] HIV病毒载量试验。

[0313] 使用如(Cillo等J Clin Microbiol 52,3944-3951 (2014))中描述的方法,取决于利用度从10-30 μ l的血浆提取RNA,并且在15 μ l的最终体积中重构。在提取之前,均一数量的有复制能力的禽肉瘤(Replication Competent Avian Sarcoma) (RCAS) 病毒穿刺入每个血浆样品并且单独地扩增以验证病毒/RNA恢复和PCR抑制的缺乏(Palmer等J Clin Microbiol 41,4531-4536 (2003))。使用随机六聚体逆转录RNA,并且使用体外转录的RNA标准品以LightCycler 480Probes Master (Roche;Indianapolis,IN) 在ABI 7500FAST实时热循环仪上通过Q-PCR进行定量。对于每种样品,对5 μ l RNA以一式两份运行Q-RT-PCR反应;使用2.5 μ l RNA对一个孔/样品运行非逆转录酶反应和RCAS扩增。如(Cillo等J Clin Microbiol 52,3944-3951 (2014))中描述的,HIV-1引物/探针靶向pol基因和检测所有M分支,并且RCAS扩增使用如(Palmer等J Clin Microbiol 41,4531-4536 (2003))中描述的引物/探针。HIV-1定量被归一化至等价体积的初始血浆。

[0314] 现在描述实验的结果。

[0315] 实施例1:慢病毒骨架强化CD4CAR表达和对HIV复制的控制。

[0316] 测试在先前的临床试验中使用的CD4CAR的临床前研究显示,表达此构建体的T细胞具有与自然生成的HIV特异性T细胞等价的抗病毒活性。这些临床试验展现持久性临床应答失败的假设是在这些临床试验中使用的T细胞不比内源性HIV特异性T细胞应答更强力。本发明以步进方式优化了CAR的每个组分以强化T细胞控制HIV复制的效力。

[0317] 使用原始鼠逆转录病毒载体(MMLV) 临床试验构建体和类似的第三代慢病毒载体构建体——其也使用PGK启动子以驱动CD4CAR表达——转导原代人CD8T细胞。与鼠逆转录病毒比较,原代人CD8T细胞的慢病毒转导一致地导致~10-倍更高的CAR表达的中值荧光强度(MFI)。

[0318] 具有慢病毒载体、EF1 α 启动子、和CD8 α 跨膜结构域的当前新的、改进的CD4膜结合嵌合受体(CD4 ζ 构建体)在比具有PGK启动子和CD4跨膜结构域的构建体(在1:5和1:10下失控)低得多的E:T比下(直到大概1:100)控制HIV-1。甚至鉴于与逆转录病毒PGK CD4 TM CAR比较更高表达的慢病毒PGK CD4TM CAR,在对HIV-1复制的控制方面可见小益处。重要地,较高表达的EF1 α CD8 TM构建体不促进较高的感染速率,这是因为CD8保持未感染直到大约1:100比率,而PGK CD4 TM改造的CD8细胞在较低的E:T比下变得感染(图2A-2D)。在将转导CD4CAR的CD8T细胞稀释至较低的E:T比之后,与转导逆转录病毒载体的T细胞比较,转导慢病毒载体的T细胞在控制HIV复制上更优越(图2F-2G)。最后,转导的CD8T细胞群在1:50E:T比下均不能控制HIV传播。因而,本发明启动子和跨膜改变改进CD4膜结合嵌合受体功效和提供对HIV-1感染的增加的控制。

[0319] 与转导CD4CAR的CD8T细胞易受无细胞病毒感染(Liu等Journal of virology 89, 6685-6694 (2015); Zhen等Molecular therapy:the journal of the American Society of Gene Therapy 23,1358-1367 (2015))的最近报道形成对比,本结果仅显示在使用感染HIV的CD4T细胞稀释至低E:T比后检测CAR CD8T细胞中的细胞内gag(图2E)。相对于未转导的CD8T细胞,高水平的细胞内gag被显示存在于转导CAR的CD8T细胞中,其指示CD4CAR致使这些细胞易受感染(图2E)。重要地,较高表达的转导慢病毒的CD8T细胞上的CD4不促进这些细胞的较高感染水平或较高E:T比下的感染。此数据证明慢病毒载体是引入将T细胞重定向

至靶标HIV的构建体的优选方法。

[0320] 实施例2:EF1 α 启动子和CD8 α 跨膜结构域改进CAR表达和对HIV-1的控制。

[0321] EF1 α CD8TM构建体被显示在最低E:T比下控制HIV-1复制。具有EF1 α 启动子(图3A-3B,中柱)的CD4 TM的单纯增加的表达改进了对HIV-1复制的控制,但是EF1 α 启动子和CD8 α 跨膜置换的增加的表达的组合产生对HIV-1的最佳控制。另外,CD8 α TM似乎减少CD4膜结合嵌合受体CD8细胞的感染(图3A-3B右柱集),特别是在1:50比率(EF1 α 构建体)和1:25比率(PGK构建体)下。

[0322] CD8 α TM结构域的置换降低CAR+CD8T细胞的感染,而不管在1:25和1:50E:T比下使用的启动子(图3B)。然而,如图2A-2G中可见,CAR+CD8T细胞可以被稀释至它们不再可以控制HIV感染和使其屈服于感染的点。因而,相对于临床试验逆转录病毒,改变病毒载体、启动子、和跨膜结构域给予50-倍效力增加,其导致在1:50E:T比下对HIV复制的体外完全控制(图3C-3D)。

[0323] 因而,CD8 α 跨膜改变是改进HIV-1复制控制的至关重要的修饰。

[0324] 实施例3:基于广泛中和抗体的CAR可以控制HIV-1

[0325] 如图4A-4B中可见,基于单链可变片段(scFv)广泛中和抗体(bnAb)的CAR和CD4膜结合嵌合受体二者可以控制HIV-1感染。以它们的HIV-1结合宽度和中和效力排列的一组scFv(参见图4A中的表格)被克隆入相同的EF1 α -CD8 α TM- ζ 构建体骨架作为CD4膜结合嵌合受体,并且评估它们控制HIV-1复制的能力。来自4小时共培养的Cr51释放杀伤试验显示了表达scFv CAR或CD4膜结合嵌合受体中任一种的CD8T细胞,而非未转导的(NTD)T细胞、裂解的表达Env的靶标细胞。这指示scFv CAR以适当的折叠/构象表达并且能够结合Env(图4B)。scFv CAR中的许多响应于表达Env的靶标一致地产生高水平的细胞内细胞因子。CD4膜结合嵌合受体和scFv CAR二者展现了相对于NTD对照高至1:50-1:200的E:T比的Env靶标细胞的裂解(图4C),其优于在图1中显示的KF11TCR的活性,该KF11TCR展现了高至1:25E:T比的功效。

[0326] 不希望受限于理论,理解使用靶向HIV的CAR,其中CAR包括抗-HIV scFv将有益于治疗具有感染HIV的细胞的储存群体的对象。本发明因此在本发明的一方面包括用于这样的用途的这样的CAR。

[0327] 实施例4:CD4CAR在体外比HIV特异性精英控制者TCR强力超过100-倍。

[0328] 精英控制者(EC)是在不存在ART的情况下能够控制HIV复制的罕见个体。某些HLA等位基因,比如HLA-B57,在精英控制者组群中超出比例,这表明T细胞应答在控制这些个体中的HIV复制中发挥关键作用(Walker等Nature reviews.Immunology 13,487-498 (2013))。由EC分离的HIV特异性T细胞比由HIV进展者分离的HIV特异性T细胞具有更高的细胞溶解潜力(Migueles等PNAS 97,2709-2714(2000);Saez-Cirion等PNAS 104,6776-6781 (2007))。因此,为了确定表达CD4CAR的T细胞是否能够比由精英控制者——其与患者中对HIV复制较好的控制相关联——分离的表达HLA-B57局限的TCR的T细胞更好地控制HIV复制,表达HLA-B57的原代人CD8T细胞转导特异于KF11(HIV p24Gag表位KAFSPEVIPMF,SEQ ID NO:42)的TCR——其也在EF1 α 启动子下表达,并且使用来自相同供体的CD4T细胞测定它们限制HIV传播的能力。KF11TCR在本领域已知与患者中对HIV复制较好的控制相关联并且是针对HIV-1的最强力的患者源TCR之一。虽然转导KF11TCR的CD8T细胞低至1:25E:T比降低

HIV复制,但是从没有取得对HIV复制的完全控制(图1A-1B和图3A-3D)。相比之下,本发明的CD4CAR低至1:100E:T比几乎完全控制HIV。这些结果揭示了CD4 ζ CAR比HLA-B*57局限的KF11精英控制者TCR更好地控制NL4-3HIV-1复制。

[0329] 这些数据指示本发明的CD4CAR比内源性HIV T细胞应答具有大得多的效力并且表明表达优化的CD4CAR的T细胞在ART去除后在通过过继性T细胞疗法能够取得的效应物/靶标比下将能够控制HIV复制。

[0330] 另外,图5A-5B揭示了CD28共刺激促进对HIV-1Ba1的控制。与CD4 ζ 构建体同样地或更好地一致控制HIV-1的另一种膜结合嵌合受体构建体是CD4CD28 ζ 构建体。

[0331] 实施例5:CD28和4-1BB共刺激对体外HIV-1复制的控制具有相反作用。

[0332] T细胞需要增殖、效应物功能、和长期存活的共刺激信号。另外的共刺激结构域,比如CD28和4-1BB,已经被并入最近的CAR设计,其已经证明对体外诱导持久性CAR T细胞应答是必需的(Van der Stegen等Nature reviews. Drug discovery 14,499-509(2015))。生成包含各种共刺激结构域的一组CD4CAR,连同CD3- ζ 结构域,包括CD28、4-1BB、CD28+4-1BB、OX40、ICOS、或CD27,并且测试它们体外控制HIV感染的能力。表达CAR——其包含4-1BB、CD27、或ICOS共刺激结构域——的CD8T细胞不如表达CAR——其仅包含CD3- ζ 信号传导结构域——的T细胞一样有效地控制HIV,这表明这些共刺激途径干扰HIV复制的T细胞控制(图5A-5B)。包含OX40或CD28和4-1BB的组别的CAR以与仅包含CD3- ζ 的CAR的类似水平控制HIV。相比之下,CD28改进体外控制,其指示CD28共刺激在HIV特异性CAR中可能是有利的。

[0333] 实施例5:CD4CAR特异性地应答于Env+细胞而非II类MHC+细胞。

[0334] 临床前数据展现了表达临床试验CD4CAR的T细胞不杀伤Raji细胞,其表达高水平的II类MHC——CD4的低亲和力配体(Romeo等Cell 64,1037-1046(1991))。然而,患者中CD4CAR T细胞的长半衰期被推测是由于与II类MHC的低亲和力相互作用或可能由于在病毒信号(viral blip)期间释放Env(Scholler等,Science translational medicine 4,132ra153(2012))。为了确定先前描述的载体修饰是否有助于对II类MHC的脱靶反应性,针对稳定表达高水平的HLA-DR*0401等位基因的K562细胞系测量CD4CAR+CD8T细胞应答(参见图14)。CD8T细胞转导优化的CD4CAR——其包含CD3- ζ 、4-1BB-CD3- ζ 、或CD28-CD3- ζ 共刺激结构域——并且与未修饰的K562靶标细胞、HLA-DR*0401+K562细胞、或HIV YU2Env+K562细胞一起培养。转导CAR的CD8T细胞响应于HIV Env+靶标而不响应于HLA-DR+或亲本K562产生IL-2、CD107a、IFN- γ 、和MIP-1 β ,其中最稳健的产生在包含CD28的CAR T细胞中(图11A)。当与亲本或表达HLA-DR的靶标混合时,对于所有CAR观察到少量的MIP-1 β 信号,其在未转导的对照中没有观察到,这可能是由于在表达CAR的T细胞中观察到的一些组成型、非抗原特异性信号传导。然而,与单独或与亲本K562一起培养的CAR T细胞比较,响应于表达II类MHC的细胞没有检测到另外的细胞因子或CD107a产生。

[0335] 进行共培养试验以确定CAR+CD8T细胞是否可以杀伤II类MHC靶标,而不管缺乏细胞因子产生。包含CD28-CD3- ζ 共刺激结构域的CD4CAR被添加至HLA-A*02+/GFP+K562和HLA-DR*0401+/mCherry+K562的1:1混合物,并且随着时间测量两种K562细胞类型的比率。72小时内延长的培养不导致HLA-DR*0401+K562的比例减小(图11B-11C)。这些结果表明使用再改造的CD4CAR将和原始CD4CAR载体一样安全地用于人。

[0336] 实施例6:与第一代CD4CAR相比,表达优化的CD4CAR的T细胞在体内控制HIV-1复制

并且扩展至大得多的水平。

[0337] 与包含4-1BB和CD3- ζ 信号传导结构域的那些相比,包含CD28和CD3- ζ 信号传导结构域的CD19特异性CAR具有更优越的体外活性,但是包含4-1BB的CAR证明在human小鼠模型和最终在患有B细胞白血病的患者中更优越((Porter等*Science translational medicine* 7,303ra139 (2015);Milone等*Molecular therapy:the journal of the American Society of Gene Therapy* 17,1453-1464 (2009);Brentjens等*Blood* 118,4817-4828 (2011))。为了确定这对靶向HIV的CAR是否符合,以及本发明的优化的CD4CAR是否可以比原始CD4CAR构建体——其先前在临床中测试——更好地体内控制HIV,小鼠的组群输注有1千万个人T细胞,包括8百万个CD4T细胞和2百万个CD8T细胞。四组小鼠与不同的CD8效应细胞群比较:未转导的(NTD),转导包含CD28(28z)或4-1BB共刺激结构域(BBz)的最佳慢病毒载体,或转导临床试验MMLV基载体(CD4z)。

[0338] 感染前基线CD4T细胞计数在NTD、BBz、或28z组之间不显著不同,并且CD4z处理的小鼠显著更高(图12A)。然后以CCR5嗜性HIV毒株Ba1感染小鼠,并且在22天的感染后枚举终点外周CD4T细胞计数。输注表达BBz或28z构建体的T细胞的小鼠分别显示了人CD4T细胞数目的17-倍和177-倍扩展(图12B)。相比之下,外周CD4计数在使用未转导的CD8T细胞或CD4z T细胞处理的小鼠中保持非常低,这大概是由于HIV介导的耗尽(图12B)。不同小鼠组群中CD4CAR+CD8T细胞数目的检查分别揭示了BBz、28z、和CD4z T细胞的389-倍,587-倍、和2-倍扩展(图12C-12D)。还在此模型中检查CD4CAR T细胞控制病毒载量的能力。在HIV感染之后七天,BBz CAR T细胞展示了对病毒复制的最大控制,以及最不可检测到的病毒载量,而来自NTD、28z、和CD4z处理的动物的血浆包含大约1个拷贝的HIV RNA/ μ l(图12E)。感染之后18天,与使用NTD T细胞处理的小鼠比较,HIV RNA的中值拷贝数在BBz和28z处理的动物中降低超过10倍(图12F)。然而,与NTD处理的小鼠比较,CD4z处理的小鼠不在统计学上减少HIV RNA。虽然任一种优化的CD4CAR比临床试验CAR更好地控制HIV,但是这些结果指示不同的共刺激结构域在HIV感染中具有各异的保护作用,其中CD28以最大程度保护CD4T细胞和4-1BB促进对HIV复制的早期控制。

[0339] 实施例7:体内富集CCR5-ZFN修饰的CD4CAR CD8T细胞。

[0340] 不管对HIV复制增加的体外和体内控制,体外数据表明使CD8T细胞转导HIV特异性CAR致使它们易受感染。为了确定这些CAR T细胞是否在体内变得感染,在存在HIV的情况下体内测试CAR T细胞抵抗感染富集。先前已经在原代人CD4T细胞中证明了通过使用锌指核酸酶(ZFN)基因编辑CCR5HIV共受体给予的存活益处(Perez等*Nat Biotechnol* 26,808-816 (2008);Tebas等*Nature reviews.Immunology* 13,693-701 (2013))。然而,还没有探究在存在HIV感染的情况下对CD4CAR+CD8T细胞的类似的富集分析。为了确定共受体编辑是否促进更好的CAR+CD8T细胞富集,作为确定CD4CAR CD8T细胞在体内易受感染的手段,四个额外的组被包括在图12A-12F中描述的实验中,其中CD8T细胞使用CCR5ZFN进行处理并且随后转导CD4CAR构建体中的每种。

[0341] 相对于未转导的CD8T细胞,在使用CD4CAR T细胞处理和感染HIV的小鼠中富集CCR5破坏的等位基因(图13A)。植入有未转导的CD8T细胞的感染HIV的小鼠具有0.4%的中值破坏频率。由于这些CD8T细胞不是转导CD4CAR的,它们不预期在存在HIV的情况下富集。使用BBz、28z、或CD4z T细胞处理的小鼠分别具有14.4%、29.6%、和9.5%的中值破坏频

率,其指示HIV-抗性、表达CD4CAR的CD8T细胞在存在HIV感染的情况下富集。CCR5破坏富集受CAR+CD8T细胞在存在HIV的情况下扩展的能力影响,如图13B和图15中显示的,并且因而28z CAR T细胞的较大的抗原特异性扩展可以负责图8A中可见的较大的CCR5富集。此数据还显示BBz改造的T细胞在不存在抗原的情况下能够比28z改造的T细胞更好地持续,其与使用肿瘤特异性CAR的发现一致(Milone等Molecular therapy:the journal of the American Society of Gene Therapy 17,1453-1464(2009);Carpenito等PNAS 106,3360-3365(2009))。总之,此数据表明发生HIV特异性CAR T细胞的HIV感染,并且防护这些细胞免于HIV感染的策略将可能对确保HIV感染的持久性控制是必需的。

[0342] 还检查了致使CD4CAR CD8T细胞抵抗HIV感染是否增强它们控制HIV-1感染的能力。在22天的感染后,一般而言,在感染的小鼠给出的ZFN处理的细胞或非ZFN处理的细胞中,在外周血CD4T细胞计数或CAR+CD8T细胞的扩展中不存在显著差异,除与非ZFN处理的比较使用ZFN处理的28z小鼠中更低的终点CD4T细胞计数以外(图16A-16B)。然而,在ZFN处理的CD4z小鼠中存在较大的CD4和CAR+CD8T细胞扩展的趋势(图16A-16B)。在28z或BBz小鼠中,其在不存在ZFN处理的情况下具有低病毒载量,没有ZFN处理造成的病毒RNA的进一步减少(图13C)。另一方面,在给予ZFN处理的CD4z T细胞的小鼠中可见血浆病毒RNA的显著减少,到了血浆病毒不再显著高于给予BBz或28z CAR的小鼠的地步。由于与不具有ZFN的BBz或28z处理的小鼠比较,病毒载量在不具有ZFN的CD4z逆转录病毒处理的小鼠中是大约log-倍更高,在由ZFN处理造成的差控制的病毒复制的背景下,较容易检测到病毒载量的显著降低。而且,短的实验持续时间可以已经排除可见ZFN处理对CAR T细胞的完整益处,包括可检测的转导的CD8T细胞的富集,特别是在CD4z处理的小鼠中,其中它们产生最大抗病毒益处。总之,在不存在ZFN处理的情况下,优化的CAR在体内优于临床试验CD4z;然而,如果表达原始CAR构建体的T细胞可以由CCR5破坏保护,则可以在此相对短的体内试验内取得对HIV复制的控制。

[0343] 总之,本文公开的改进的HIV复制控制是印象深刻的(图17A-17C)。本发明包括对先前公开的CD4膜结合嵌合受体的数种改进,其导致杀伤感染HIV-1的细胞的能力的50-倍增加。此增加的功效,与第1代CD4膜结合嵌合受体不同,滴定至在体外试验中生理学相关的效应物:靶标(E:T)比,这表明这些改进的CD4膜结合嵌合受体构建体将可能在降低患者中的病毒载量中更有效。

[0344] 长期控制HIV感染的主要挑战之一是一些病毒突变体的免疫逃逸。本发明的基于scFv的CAR(scFv-CAR)解决此挑战并且被显示有利于治疗具有感染HIV的细胞的储存群体的对象。添加表达基于scFv的CAR的T细胞可以进一步强化改造的T细胞在不存在ART的情况下提供持久性HIV复制控制的能力。如图9A和图10A中可见,VRC01、VRC01c和3BNC60-CAR显示了表达HIV-1包膜gp120/41(YU-2分离株)的K562细胞而非表达CD19的K562细胞的特异性裂解,其确认scFv-CAR细胞毒性是强力的和特异性的二者。而且,由scFv-CAR T细胞释放的干扰素 γ (IFN γ)与细胞的杀伤功效紧密关联(图9C和图10C)。另外,通过使用杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)细胞质结构域进一步增加scFv-CAR细胞毒性。

[0345] 本发明提供了改进的HIV疗法的众多潜力。由HIV患者分离的T细胞可以转导scFv-CAR和/或CD4膜结合嵌合受体,离体扩展和再输入对象。转导的T细胞识别表达gp120的细胞并且成为活化的,其导致杀伤带有HIV的细胞。此途径可以被应用于任何病毒介导的疾

病,其中靶标抗原可以转移或漂移,并且因此逃逸通过正常抗体(例如甲型流感的血凝素)的免疫监督。此疗法可以与其它已知的抗体疗法HAART组合,或可以在CAR疗法期间或之前与病毒诱导物组合。

[0346] 本发明的预防性应用在高风险群体中也是可能的,由于T细胞应当杀伤感染的CD4细胞,其防止建立HIV所有组成成分。

[0347] 其它实施方式

[0348] 本文对变量的任何定义中要素列表的叙述包括该变量作为任何单个要素或列出的要素的组合(或子组合)的定义。本文对实施方式的叙述包括作为任何单个实施方式或与其它实施方式或其部分组合的该实施方式。

[0349] 本文引用的每个和每种专利、专利申请、和出版物的公开内容由此通过引用以其全部并入本文。虽然已经参照具体的实施方式公开了本发明,但是明显的是,本领域技术人员可以设计本发明的其它实施方式和变型而不背离本发明的真实精神和范围。所附权利要求意图解释为包括所有这样的实施方式和等价变型。

<110> 宾夕法尼亚大学董事会

J·瑞利

R·雷曼

A·佩妮

C·T·艾利布雷特

M·C·麦隆

<120> 重定向 T 细胞以治疗 HIV 感染的方法

<130> 046483-7096WO1(01193)

<150> US 62/222,132

<151> 2015-09-22

<150> US 62/253,790

<151> 2015-11-11

<160> 83

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

[0001]

<211> 3011

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 1

```
cgtgaggctc cgggtgccct cagtgggcag agegcacatc gccacagtc cccgagaagt 60
tggggggagg ggctggcaat tgaaccgtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaacagg 120
aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttccgaggg tgggggagaa ccgtatataa 180
gtgcagtagt cggcgtgaac gttcttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 240
gtgccgtgtg tggttccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggcct tgcgtgcctt 300
gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttctgatcc cgagcttcgg gttggaagt 360
gggtgggagag ttcgaggcct tgcgttaag gagcccttc gcctcgtgt ttagttgagg 420
cctggcctgg gcgctggggc cggcgcgtgc gaatctggtg gcacctcgc gcctgtctcg 480
ctgtttcga taagtcteta gccattaaa attttgatg acctgtgcg acgtttttt 540
tcggcaaga tagtcttga aatgcgggcc aagatctgca cactggtatt tcggttttg 600
gggccgcggg cggcgacggg gcccgtcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc 660
```

tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgcctcgg 720
tgcttgccct cgcgcccgcg tgatcgccc cgcctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780
caccagtgc gtgagcggaa agatggccgc ttccggccc tgctgcaggg agctcaaat 840
ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct 900
ttccgtcctc agcgcgcgt tcatgtgact cactgagta ccgggcggcg tccaggcacc 960
tcgattagt ctcgtgctt tgagtagct cgtcttagg ttggggggag gggtttatg 1020
cgatggagt tcccacact gagggggg agactgaagt taggcagct tggcactga 1080
tgtaattc cttggaatt gcccttttg agttggatc ttggttcat ctcaagcctc 1140
agacagtgg tcaagtttt ttcttccat ttacgggtgc gtgagctagc tctagagcca 1200
ccatggcctt accagtacc gccttgctc tgcgctggtc ctgtctgct caegccgcca 1260
ggccgggac catgaaccg ggagtcctt ttaggcactt gcttctggtg ctgcaactgg 1320
cgctccccc agcagccact cagggaaga aagtgggtc gggcaaaaa ggggatacag 1380
tggaactgac ctgtacagct tccagaaga agagcaca attccactgg aaaaactcca 1440
accagataa gattctggga aatcagggt ccttctaac taaaggcca tccaagctga 1500
atgatcgcg tactcaaga agaagcctt ggaccaagg aaactcccc ctgatcata 1560
agaattcaa gatagaagac tcagatact acatctgtga agtggaggac cagaaggagg 1620
[0002] aggtgcaatt gctagtgtc ggattgact ccaactctga caccacctg ctccaggggc 1680
agagcctgac cctgacctg gagagcccc ctggtagtag cccctcagt caatgtagga 1740
gtccaagggg taaaacata caggggggga agacctctc cgtgtctcag ctggagctc 1800
aggatagtgg cacctggaca tgcactgtc tcagaacca gaagaagggt gattcaaaa 1860
tagacatct ggtgctagt ttccagaagg cctccagcat agtctataag aaagaggggg 1920
aacagggtga gtctcctc cactcgcct ttacagtga aaagctgacg ggcagtggtg 1980
agctgtggtg gcagggggag agggcttct cctcaagtc ttggatcac ttgacctga 2040
agaacaagga agtgtctga aaacgggtta cccaggacce taagctccag atgggcaaga 2100
agctccgct ccactcacc ctgcccagg ccttgctca gtagctggtc tetggaaacc 2160
tcacctggc cctgaagcg aaaacaggaa agttgcatc ggaagtgaac ctggtggtga 2220
tgagagccac tcagctccag aaaaattga cctgtgaggt gtgggggacc acctcccta 2280
agctgatgct gagcttgaat ctggagaaca aggaggcaaa ggtctcgaag cgggagaagg 2340
cgtgtgggt gctgaacct gaggcgggga tgtggcagt tctgtgagt gactcgggac 2400
aggctctgt ggaatccaac atcaaggct tgcacatg gtccacccg gtgcagccat 2460
ccggaaccac gacgccagc ccgcgaccac caacaccggc gccaccatc gcgtcgcagc 2520
ccctgtcct gcgccagag gcgtgccggc cagcggcggg gggcgagtg cacacgaggg 2580
ggctggactt cgcctgtat atctacatc gggcgcctt ggccgggact tgtgggtcc 2640
ttctctgtc actggtatc acctttact gcagagtga gttcagcagg agcgagacg 2700

cccccgcgta ccagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag 2760
aggagtacga tgttttgac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccga 2820
gaaggaagaa ccctcaggaa ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcggagg 2880
cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt 2940
accaggggtct cagtacagcc accaaggaca cctacagcgc ccttcacatg caggccctgc 3000
ccctcgtcta a 3011

<210> 2

<211> 1184

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 2

[0003]

cgtgaggctc cgggtcccgt cagtgggcag agcgcacatc gcccacagtc cccgagaagt 60
tggggggagg ggctggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaactggg 120
aaagtgaigt cgtgtactgg ctccgccttt ticcagaggg tgggggagaa ccgtatataa 180
gtgcagtagt cgccgtgaac gttcttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 240
gtgcggtgtg tggttccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300
gaattacttc cacctggctg cagtacgtga tcttgatcc cgagcttcgg gtgggaagtg 360
gggtgggagag ttgaggcct tgcgcttaag gagccccctc gccctgtgct tgagttgagg 420
cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480
ctgctttcga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgtctcg acgtttttt 540
tctggcaaga tagtcttga aatgcgggcc aagatctgca cactggtatt tgggttttg 600
gggcccgggg cggcgacggg gccctgtcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc 660
tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgtcttgg 720
tgcttgccct cgcgcccgcg tctatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780
caccagttgc gtgagcggaa agatggcgc ticcggccc tctgcaggg agtcaaaat 840
ggaggacgcg gcgctcggga gaggggcggt gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggccct 900
ttccgtcttc agcgtctgct tcatgtgact cactgagta ccgggcgcgg tccaggcacc 960
tcgattagt ctcgtgcttt tggagtacgt cgtcttagg ttggggggag gggttttatg 1020
cgatggagtt tcccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080
tgtaattctc ctggaattt gcccttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagctc 1140
agacagtgtg tcaaagtgtt ttcttccat ttcagggtgc gtga 1184

<210> 3

<211> 1188

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 3

atgaaccggg gagtccttt taggcacttg ctcttggtgc tgcaactggc gctcctccca 60
gcagccactc agggaaagaa agtggtgctg ggcaaaaag gggatacagt ggaactgacc 120
tgtacagctt ccagaagaa gagcatacaa ttccactgga aaaactccaa ccagataaag 180
attctgggaa atcagggtc ctcttaact aaaggtccat ccaagctgaa tgatcgct 240
gactcaagaa gaagccttg ggaccaagga aactcccc tgatcatcaa gaatcttaag 300
atagaagact cagatactta catctgtgaa gtggaggacc agaaggagga ggtgcaattg 360
ctagtgtcg gattgactgc caactctgac acccactgc ttacggggca gagcctgacc 420
ctgaccttg agagcccc ttgtagtagc cctcagtc aatgtaggag tccaaggggt 480
aaaaacatac agggggggaa gacctctc gtgtctcagc tggagctca ggatagtggc 540
acctggacat gcactgtct gcagaaccag aagaagggtg agtcaaaat agacatcgtg 600
gtgtagctt tccagaagge ctccagcata gtctataaga aagaggggga acaggtggag 660
ttctcttcc cactcgctt tacagtgaa aagctgacgg gcagtggcga gctgtggtg 720
caggcggaga gggcttctc ctccaagtct tggatcact ttgacctgaa gaacaaggaa 780
gtgtctgtaa aacgggttac ccaggacct aagctccaga tgggcaagaa gctcccgtc 840
cacctaccc tccccagge ctgctcag tatgtggt ctggaaacct caccctggc 900
ctgaagcga aaacaggaaa gttgcatcag gaagtgaacc tggtggtgat gagagccact 960
cagctccaga aaaatttgac ctgtgaggtg tggggacca cctcccctaa gctgatgctg 1020
agcttgaac tggagaacaa ggaggcaaag gtctgaagc gggagaaggc ggtgtgggtg 1080
ctgaacctg aggcggggat gtggcagtg ctgtgagt acfcgggaca ggtctgctg 1140
gaatccaaca tcaaggttct gccacatgg tccacccgg tgcagcca 1188

<210> 4

<211> 135

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 4

accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgctc gcagccctg 60

[0004]

tccttcgccc cagagcgctg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120
gacttcgctt gtgat 135

<210> 5

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 5

atclacatct gggcgccctt ggccgggact tgggggtcc ttctctgtc acgggtatc 60
acctttact gc 72

<210> 6

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0005] <223> 人工合成的

<400> 6

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttctggaca gagacgtggc 120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctccaggaagg cctgtacaat 180
gaactgcaga aagataagat ggccggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
tacgacgccc ttacatgca ggccctgccc cctcgttaa 339

<210> 7

<211> 3149

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 7

cgtaggctc cggtgcccg cagtgggcag agcgcacatc gccacagtc cccgagaagt 60
tggggggagg ggtcggcaat tgaaccgtg cctagagaag gtggcgcggg gtaactggg 120

[0006]

aaagtgaigt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccgaggg tgggggagaa ccgtatataa 180
gtgcagtagt cgccgtgaac gttcttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 240
gtgccgtgtg tggttccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300
gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttctgtacc cgagcttcgg gttggaagtg 360
gggtggagag ttcgaggcct tgcgtttaag gagccccctt gcctcgtgct tgagttgagg 420
cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatcgggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480
ctgtttcga taagtctca gccattaaa attttgaig acctgtcgc acgtttttt 540
tctggcaaga tagtcttga aatgcgggccc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg 600
gggccgcggg cggcgacggg gcccgctgct ccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc 660
tgcgagcgcg gccaccgaga atcggaacggg ggtagtctca agctggcccg cctgtcttgg 720
tgccctggcct cgcgcccgcg tgtatcgccc cgcctggggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780
caccagtgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccgcccc tgctgcaggg agctcaaaat 840
ggaggacgcg gcgctcggga gagcggggcg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct 900
ttccgtctc agcgtcgtct tcatgtgact ccactgagta ccgggcgcgcg tccaggcacc 960
tcgattagtt ctcgtgcttt tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg 1020
cgatggagtt tccccacact gactgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080
tgtaattctc ctggaattt gcccttttg agtttgatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140
agacagtgg tcaagtttt ttcttccat ttacagtgct gtgagctagc tctagagcca 1200
ccatggcctt accagtgacc gccctgtctc tgcgctggc ctgtgtctc cacgcgcga 1260
ggccgggac catgaaccgg ggagtcctt ttaggcactt gcttctgggt ctgcaactgg 1320
cgtctctccc agcagccact cagggaaaga aagtgtgtct gggcaaaaaa ggggalacag 1380
tggaactgac ctgtacagct tccagaaga agagcataca attccactgg aaaaactcca 1440
accagataaa gattctggga aatcagggt ccttctaac taaaggtcca tccaagtga 1500
atgategcgc tgactcaaga agaagcctt gggaccaagg aaacttccc ctgatcatca 1560
agaatcttaa gatagaagac tcagatactt acatctgtga agtggaggac cagaaggagg 1620
aggtgcaatt gctagtgtc ggattgaetg ccaactctga caccacctg ctcaggggc 1680
agagcctgac cctgacctt gagagcccc ctggtagtag ccctcagtg caatgtagga 1740
gtccaagggg taaaacata caggggggga agacctctc cgtgtctcag ctggagctcc 1800
aggatagtgg cacctggaca tgcactgtct tcgagaacca gaagaagggt gagttcaaaa 1860
tagacatcgt ggtgctagct ttccagaagg cctccagcat agtctataag aaagaggggg 1920
aacagggtga gtctctctt ccactgcct ttacagtga aaagctgacg ggcagtggcg 1980
agctgtgggt gcaggcggag agggcttct cctccaagtc ttggatcacc ttgacctga 2040
agaacaagga agtgtctga aaacgggtt ccaggaccc taagctccag atgggcaaga 2100
agctcccgt ccacctcacc ctgccccagg ccttgccca gtatgtgtgc tctggaaacc 2160

tcacctggc cctgaagcg aaaacaggaa agttgcatca ggaagtgaac ctggtggtga 2220
tgagagccac tcagctccag aaaaatttga cctgtgaggt gtggggaccc acctccccta 2280
agctgatgct gagcttgaaa ctggagaaca aggaggcaaa ggtctcgaag cgggagaagg 2340
cggctgtgggt gctgaacct gaggcgggga tgtggcagt tctgctgagt gactcgggac 2400
aggctctgct ggaatccaac atcaaggttc tgecccatg gtccaccccg gtgcagccat 2460
ccggaaccac gacgccagcg ccgcgaccac caacaccggc gccaccatc gcgtcgcagc 2520
ccctgtccct gcgcccagag gcgtgccggc cagcggcggg gggcgccagt cacacgaggg 2580
ggctggactt cgctgtgat tttgggtgc tgggtggtg tgggtggagtc ctggttgc 2640
atagcttgc agtaacagt gcccttatta tttctgggt gaggagtaag aggagcaggc 2700
tcctgcacag tgaactatg aacatgact cccgccccc cgggccacc cgcaagcatt 2760
accagcccta tgecccacca cgcgacttc cagcctatc ctccatcat agagtgaagt 2820
tcagcaggag cgcagacgcc ccgcgtacc agcagggcc gaaccagctc tataacgagc 2880
tcaatctagg acgaagagag gactacgat tttggacaa gagacgtggc cgggacctg 2940
agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctacaggaagg cctgtacaat gaactgcaga 3000
aagataagat ggccgagccc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca 3060
aggggcacga tggcctttac caggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgcc 3120
ttcacatgca ggccctgccc cctcgctaa 3149

[0007]

<210> 8

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 8

tttgggtgc tgggtggtg tgggtggagtc ctggttgc atagcttgc agtaacagt 60
gcccttatta tttctgggt g 81

<210> 9

<211> 123

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 9

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccccc 60

gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120
tcc 123

<210> 10

<211> 1557

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 10

[0008] atggggggac ttgaaccctg cagcagggtc ctgctcctgc ctctcctgct ggctgtaagt 60
ggtctccgic ctgtccaggt ccaggcccag agcgattgca gttgctctac ggtgagcccg 120
ggcgtgctgg cagggatcgt gatgggagac ctggtgctga cagtgtctat tggcctggcc 180
gtgtacttcc tgggcccggc ggtccctcgg gggcgagggg ctgcggagggc agcgaccggc 240
aaacagcgta tctactgagac cgagtcgctt tctcaggagc tccagggtca gaggtcggat 300
gtctacagcg acctcaacac acagagggcg tattacaaag tcgagggcgg cgagaggggc 360
agaggaagtc ttctaactg cggtgacgtg gaggagaatc ccggccctag gatggctctg 420
cctgtgacag ctctgtctgt gccctctggc ctgctgctgc atgtgccag acctggatcc 480
gacttcgtgc tgaccagag ccttcacagc ctgagcgtga cacctggcga gaggccagc 540
atcagctgca agagcagcca ctccctgac caccggcacc ggaacaacta cctggcttgg 600
tactgtcaga agcccggcag atccccccag ctgtgtatct acctggccag cagcagagcc 660
agcggcgtgc ccgatagatt ttctggcagc ggcagcgaca aggacttcac cctgaagatc 720
agccgggttg aaaccgagga cgtgggcacc tactactgta tgcagggcag agagagcccc 780
tggaccttgg gccagggcac caaggtggac atcaagggcg gcagctccag aagcagctct 840
agcggaggcg gaggatctgg cggcggagga caggctcagc tggtcagtc tggaccgaa 900
gtgcggaagc ctggcaccag cgtgaagggt tctgttaaag cccctggcaa caccctgaaa 960
acctacgacc tgcactgggt gcgcagcgtg ccaggacagg gactgcagtg gatgggctgg 1020
atcagccacg agggcgacaa gaaagtgatc gtggaacggt tcaaggccaa agtgaccatc 1080
gactgggaca gaagcaccaa caccgcctac ctgcagctga gcggcctgac ctctggcgat 1140
accgccgtgt actactgctc caagggcagc aagcaccggc tgagagacta cggcctgtac 1200
gacgatgacg gcgcccgtga ctgggccgtg gatgtggact acctgagcaa cctggaattc 1260
tggggccagg gaaccgccgt gaccgtgta tctgtagcg gcggaggggg atctggaggt 1320
gggggttctt caccactga accaagctcc aaaaccggta acccagaca cctgcatgtt 1380
ctgattggga cctcagtggt caaatccct ttaccatcc tctcttctt tctcttctat 1440
cgtgtgtgct ccaacaaaaa aaatgtctgt gtaatggacc aagagcctgc agggacaga 1500

acagtgaaca gcgaggattc tgatgaacaa gaccatcagg aggtgtcata cgcataa 1557

<210> 11

<211> 519

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 11

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Phe Leu Leu Leu Pro Leu Leu

1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Val Gln Ala Gln Ser Asp

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu

50 55 60

[0009]

Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg

65 70 75 80

Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly

85 90 95

Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr

100 105 110

Lys Val Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly

115 120 125

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala

130 135 140

Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gly Ser

145 150 155 160

Asp Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro His Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

165 170 175

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser His Ser Leu Ile His Gly

180 185 190

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

195 200 205

[0010]

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro
210 215 220

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Asp Lys Asp Phe Thr Leu Lys Ile
225 230 235 240

Ser Arg Val Glu Thr Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
245 250 255

Arg Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
260 265 270

Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
275 280 285

Gly Gly Gln Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Arg Lys Pro
290 295 300

Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Pro Gly Asn Thr Leu Lys
305 310 315 320

Thr Tyr Asp Leu His Trp Val Arg Ser Val Pro Gly Gln Gly Leu Gln
325 330 335

Trp Met Gly Trp Ile Ser His Glu Gly Asp Lys Lys Val Ile Val Glu
340 345 350

Arg Phe Lys Ala Lys Val Thr Ile Asp Trp Asp Arg Ser Thr Asn Thr
355 360 365

Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr
370 375 380

Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Lys His Arg Leu Arg Asp Tyr Ala Leu Tyr
385 390 395 400

Asp Asp Asp Gly Ala Leu Asn Trp Ala Val Asp Val Asp Tyr Leu Ser
405 410 415

Asn Leu Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser Ala
420 425 430

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Pro Thr Glu Pro
435 440 445

Ser Ser Lys Thr Gly Asn Pro Arg His Leu His Val Leu Ile Gly Thr
450 455 460

Ser Val Val Lys Ile Pro Phe Thr Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His
465 470 475 480

Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro
485 490 495

Ala Gly Asn Arg Thr Val Asn Ser Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp His
500 505 510

Gln Glu Val Ser Tyr Ala Glx
515

<210> 12

<211> 882

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 12

[0011]

atggctctgc ctgtgacagc tctgtctgtg cctctggccc tgctgtgca tgctgccaga 60
cctggatccg acttctgtct gaccagagc cctcagacc tgagcgtgac acctggcgag 120
agcgccagca tcagctgcaa gacgagccac tccctgatcc acggcgaccg gaacaactac 180
ctggcttggc acgtgcagaa gcccggcaga tccccccagc tgctgatcta cctggccagc 240
agcagagcca gggcgctgcc cgatagattt tctggcagcg gcagcgacaa ggacttcacc 300
ctgaagatca gccgggtgga aaccgaggac gtgggcacct actactgtat gcagggcaga 360
gagagccctt ggaccttgg ccagggcacc aaggtggaca tcaagggcgg cagctccaga 420
agcagctcta gcggaggcgg aggatctggc ggcggaggac aggtcagct ggtgcagtct 480
ggaccgaag tgcggaagcc tggcaccagc gtgaaggtgt cctgtaaagc ccctggcaac 540
acctgaaaa cctacacct gcactgggtg cgcagcgtgc caggacaggg actgcagtgg 600
atgggctgga tcagccacga gggcgacaag aaagtatcg tggacgggt caaggccaaa 660
gtgaccatcg actgggacag aagcaccac accgcctacc tgcagctgag cggcctgacc 720
tctggcgata ccgccgtgta ctactgcgc aagggcagca agcaccggct gagagactac 780
gccctgtacg acgatgacgg cggcctgaac tgggcccgtgg atgtggacta cctgagcaac 840
ctggaattct ggggccaggg aaccgcgtg accgtgcat ct 882

<210> 13

<211> 294

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 13

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Asp Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro His

20 25 30

Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser

35 40 45

Ser His Ser Leu Ile His Gly Asp Arg Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Gly Arg Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln

115 120 125

[0012]

Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser

130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Ala Gln Leu Val Gln Ser

145 150 155 160

Gly Pro Glu Val Arg Lys Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys

165 170 175

Ala Pro Gly Asn Thr Leu Lys Thr Tyr Asp Leu His Trp Val Arg Ser

180 185 190

Val Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met Gly Trp Ile Ser His Glu Gly

195 200 205

Asp Lys Lys Val Ile Val Glu Arg Phe Lys Ala Lys Val Thr Ile Asp

210 215 220

Trp Asp Arg Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Gly Leu Thr

225 230 235 240

Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Lys His Arg

245 250 255

Leu Arg Asp Tyr Ala Leu Tyr Asp Asp Asp Gly Ala Leu Asn Trp Ala

260 265 270

Val Asp Val Asp Tyr Leu Ser Asn Leu Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr

275 280 285

Ala Val Thr Val Ser Ser

290

<210> 14

<211> 1509

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 14

[0013]

atggggggac ttgaacctg cagcagggtc ctgctcctgc ctctcctgct ggctgtaagt 60
 ggtctccgct ctgtccaggf ccaggcccag agcgattgca gttgctctac ggtgagcccg 120
 ggcgtgctgg cagggatcgt gatgggagac ctggtgctga cagtgtcat tgccttgccc 180
 gtgtacttcc tgggccggct ggtccctcgg gggcgagggg ctgcggaggc agcgaccgg 240
 aaacagcgta tcactgagac cgagtgcct tatcaggagc tccagggtca gaggtcggat 300
 gtctacagcg acctcaacac acagaggccg tattacaaag tcgaggggcg cggagagggc 360
 agaggaagtc ttctaactg cgtgacgtg gaggagaatc cggccctag gatggctctg 420
 cctgtgacag ctctctgct gcccttgcc ctgctgctgc atgctgccag acctggatcc 480
 cagtctgccc tgactcagcc tccctccgct tccgggtctc ctggacagtc aatcaccalc 540
 tctgcactg gaaccagcaa taactttgtc tctggtacc agcaacacgc aggcaaggcc 600
 cccaagctcg tcaattatga cgtaataag cgccctcag gtgtccctga tegtctct 660
 ggctccaagt ctggcaacac ggctccctg accgtctctg gactccagac tgacgatgag 720
 gctgtctatt actgcggctc actgttaggc aactgggatg tgatttcgg cggagggacc 780
 aagttgaccg tcttagggcg aagcagcaga agcagcteta gcggcggagg cggatctggc 840
 ggagggggac agatgcagtt acaggagtcg ggccecgac tggtaagcc ttcggaaacc 900
 ctgtccctca cgtgcagtg gtctgggtgc tccalaagt acagtlactg gagctggatc 960
 cggcggtccc caggggaagg acttgagtgg attgggtatg tccacaaaag cggcgacaca 1020
 aattacagcc cctccctcaa gactcgagtc aactgtctgt tagacacgtc caaaaatcag 1080
 gtgtccctga gccctgtggc cgcgaccgt gcggactcgg gcaaatatta ttgcgcgaga 1140
 acactgcacg ggaggagaat ttatggaatc gttgccttca atgagtgggt cacctacttc 1200
 tacatggacg tctggggcaa tgggactcag gtcaccgtct cctcagctag cggcgaggag 1260
 ggatctggag gtgggggttc ctacccact gaaccaagct ccaaaaccgg taaccccgaga 1320

cacctgcatg ttctgattgg gacctcagtg gtcaaaatcc ctttcacat cctctcttc 1380
tttctcttc atcgctggcg ctccaacaaa aaaaatgctg ctgtaatgga ccaagagcct 1440
gcagggaaca gaacagtga cagcgaggat tctgatgaac aagaccatca ggaggtgtca 1500
tagcataa 1509

<210> 15

<211> 503

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 15

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Phe Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Val Gln Ala Gln Ser Asp
20 25 30

Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met
35 40 45

[0014]

Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu
50 55 60

Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg
65 70 75 80

Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly
85 90 95

Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr
100 105 110

Lys Val Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly
115 120 125

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala
130 135 140

Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gly Ser
145 150 155 160

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
165 170 175

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asn Phe Val Ser Trp

[0015]

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

450 455 460

Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Pro

465 470 475 480

Ala Gly Asn Arg Thr Val Asn Ser Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp His

485 490 495

Gln Glu Val Ser Tyr Ala Glx

500

<210> 16

<211> 834

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 16

[0016]

atggctctgc ctgtgacagc tctgtctctg cctctggccc tgctgtctga tgetgccaga 60
cctggatccc agtctgccct gactcagcct cctccgcgt ccgggtctcc tggacagtca 120
atcaccatct cctgcactgg aaccagcaat aactttgtct cctggtaacca gcaacacgca 180
ggcaaggccc ccaagctcgt catttatgac gtcaataagc gccctcagg tgctcctgat 240
cgtttctctg gtccaagtc tggcaaacg gccctcctga ccgtctctgg actccagact 300
gacgatgagg ctgtctatta ctgcggctca ctgtaggca actgggatgt gattttcgcc 360
ggagggacca agttgaccgt cctaggcgga agcagcagaa gcagctctag cggcggaggc 420
ggatctggcg gagggggaca gatgcagta caggagtcgg gcccggact ggtgaagcct 480
tcggaaacce tgctcctcac gtgcagtgtg tctggtgcct ccataagtga cagttactgg 540
agctggatcc ggcgggtccc agggaaggga ctgagtgga ttgggtatgt ccacaaaagc 600
ggcgacacaa attacagccc ctccctcaag agtcgagta acttgctgtt agacacgtcc 660
aaaaatcagg tgctcctgag ccttgtggcc gcgaccgctg cggactcggg caaatattat 720
tgcgcgagaa cactgcacgg gaggagaatt tatggaatcg ttgccttcaa tgagtggltc 780
acctacttct acatggacgt ctggggcaat gggactcagg tcaccgtctc ctca 834

<210> 17

<211> 278

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 17

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser
20 25 30

Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr
35 40 45

Ser Asn Asn Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Ala Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Val Ile Tyr Asp Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser
85 90 95

Gly Leu Gln Thr Asp Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ser Leu Val
100 105 110

Gly Asn Trp Asp Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
115 120 125

[0017]

Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Gln Met Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
145 150 155 160

Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser
165 170 175

Asp Ser Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Arg Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
180 185 190

Trp Ile Gly Tyr Val His Lys Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Pro Ser
195 200 205

Leu Lys Ser Arg Val Asn Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Val Ala Ala Thr Ala Ala Asp Ser Gly Lys Tyr Tyr
225 230 235 240

Cys Ala Arg Thr Leu His Gly Arg Arg Ile Tyr Gly Ile Val Ala Phe
245 250 255

Asn Glu Trp Phe Thr Tyr Phe Tyr Met Asp Val Trp Gly Asn Gly Thr

260 265 270

Gln Val Thr Val Ser Ser

275

<210> 18

<211> 1473

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 18

[0018]

atgggggggac ttgaacctg cagcagggtc ctgcctctgc ctctcctgct ggctgtaagt 60
ggctctcgtc ctgtccaggt ccaggcccag agcgattgca gttgctctac ggtgagcccg 120
ggcgtgctgg cagggatcgt gatgggagac ctggtgctga cagtgtcat tgccttgcc 180
gtgtacttcc tgggcccgtt ggtccctcgg gggcgagggg ctgcggaggc agcgaccgg 240
aaacagcgta tcactgagac cgagtcgcct tatcaggagc tccagggtca gaggtcggat 300
gtctacagcg acctcaacac acagaggccg tattacaaag tcgagggcgg cggagagggc 360
agaggaagtc ttctaactg cggtgacgtg gaggagaatc ccggccctag gatggctctg 420
cctgtgacag ctctgtctgt gctctggcc ctgctgctgc atgctgccag acctggatcc 480
gagatcgtgc tgacacagag ccttgccacc ctgagcctgt ctccaggcga gacagccatc 540
atcagctgcc ggacaagcca glacggcagc ctggccctgg atcagcagag gcctggacag 600
gccccagac tcgtgatcta cagcggcagc acaagagccg ccggaatccc cgatagattc 660
agcggctcta gatggggccc tgactacaac ctgacatca gcaacctgga aagcggcgac 720
ttcggcgtgt actactgcca gcagtcagag ttcttcggcc agggcaccaa ggtgcaggtg 780
gacatcaaga gagcggcgag ctccagaagc tccagctctg gcggcggagg atctggcggg 840
ggcggacagg tgcagctggt gcagctcggc ggccagatga agaaacccgg cgagagcatg 900
cggatcagct gcagagcctc cggctacgag ttcacgact gcacctgaa ctggattcgg 960
ctggcccttg gcaaaagacc cgagtggatg ggctggctga agcccagagg cggagccgtg 1020
aatlacgcca gacctctgca gggcagagtg accatgacc gggacgtgta cagcgatacc 1080
gccttcctgg aactgcccag cctgaccgtg gatgataccg ccgtgtactt ctgcaccgg 1140
ggcaagaact gcgactacaa ctgggacttc gagcactggg gcagaggcac ccctgtgac 1200
gtgtctagcg ctacggcgag agggggatct ggaggtgggg gtctctacc cactgaacca 1260
agctccaaaa ccggtaaccc cagacacctg catgttctga ttgggacctc agtgggtcaa 1320
atcccttca ccatcctct ctctctctc ctctctctc ggtgtccaa caaaaaaat 1380
gtgtgtgtaa tggaccaaga gctgcaggg aacagaacag tgaacagcga ggattctgat 1440

gaacaagacc atcaggaggt gtcatacgca taa 1473

<210> 19

<211> 491

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 19

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Phe Leu Leu Leu Pro Leu Leu

1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Val Gln Ala Gln Ser Asp

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu

50 55 60

[0019] Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg

65 70 75 80

Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly

85 90 95

Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr

100 105 110

Lys Val Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly

115 120 125

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala

130 135 140

Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gly Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala

180 185 190

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

195 200 205

Gly Ser Thr Arg Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg
210 215 220

Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser Gly Asp
225 230 235 240

Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Phe Phe Gly Gln Gly Thr
245 250 255

Lys Val Gln Val Asp Ile Lys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser
260 265 270

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln
275 280 285

Ser Gly Gly Gln Met Lys Lys Pro Gly Glu Ser Met Arg Ile Ser Cys
290 295 300

Arg Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ile Asp Cys Thr Leu Asn Trp Ile Arg
305 310 315 320

Leu Ala Pro Gly Lys Arg Pro Glu Trp Met Gly Trp Leu Lys Pro Arg
325 330 335

[0020] Gly Gly Ala Val Asn Tyr Ala Arg Pro Leu Gln Gly Arg Val Thr Met
340 345 350

Thr Arg Asp Val Tyr Ser Asp Thr Ala Phe Leu Glu Leu Arg Ser Leu
355 360 365

Thr Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Gly Lys Asn Cys
370 375 380

Asp Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Ile
385 390 395 400

Val Ser Ser Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
405 410 415

Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly Asn Pro Arg His Leu His Val
420 425 430

Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Lys Ile Pro Phe Thr Ile Leu Leu Phe
435 440 445

Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met
450 455 460

Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg Thr Val Asn Ser Glu Asp Ser Asp
465 470 475 480

Glu Gln Asp His Gln Glu Val Ser Tyr Ala Glx

485 490

<210> 20

<211> 798

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 20

atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tctgtctgca cggcctaga 60
cctggatccg agatcgtgct gacacagagc cctggcaccg tgagcctgtc tccaggcgag 120
acagccatca tcagctgccg gacaagccag tacggcagcc tggcctggta tcagcagagg 180
cctggacagg cccccagact cgtgatctac agcggcagca caagagccgc cggaatcccc 240
gatagattca gcggctctag atggggccct gactacaacc tgaccatcag caacctggaa 300
agcggcgact tcggcgtgta ctactgccag cagtacgagt tcttcggcca gggcaccaag 360
gtgcaggtgg acatcaagag aggcggcagc tccagaagct ccagctctgg cggcggagga 420
[0021] tctggcggag gcggacaggt gcagctgggt cagtctggcg gccagatgaa gaaacccggc 480
gagagcatgc ggaicagctg cagagcctcc ggctacgagt tcacgactg caccctgaac 540
tggattcggc tggccctgg caaaagacc gagtgatgg gctggctgaa gcccagaggc 600
ggagccgtga attacgccag acctctgcag ggcagagtga ccatgaccgc ggacgtgtac 660
agcgataccg ccttcctgga actgcggagc ctgacctgg atgataccgc cgtgtacttc 720
tgcaccgggg gcaagaactg cgactacaac tgggacttcg agcactgggg cagaggcacc 780
cctgtgatcg tctctagc 798

<210> 21

<211> 266

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys Arg Thr
35 40 45
Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala
50 55 60
Pro Arg Leu Val Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Ala Ala Gly Ile Pro
65 70 75 80
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Asn Leu Glu Ser Gly Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110
Glu Phe Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Val Asp Ile Lys Arg Gly
115 120 125
Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gln Met Lys Lys Pro Gly
145 150 155 160
[0022] Glu Ser Met Arg Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ile Asp
165 170 175
Cys Thr Leu Asn Trp Ile Arg Leu Ala Pro Gly Lys Arg Pro Glu Trp
180 185 190
Met Gly Trp Leu Lys Pro Arg Gly Gly Ala Val Asn Tyr Ala Arg Pro
195 200 205
Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Val Tyr Ser Asp Thr Ala
210 215 220
Phe Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe
225 230 235 240
Cys Thr Arg Gly Lys Asn Cys Asp Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His Trp
245 250 255
Gly Arg Gly Thr Pro Val Ile Val Ser Ser
260 265
<210> 22
<211> 1464
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 22

atggggggac ttgaacctg cagcagggtc ctgctcctgc ctctcctgct ggetgtaagt 60
ggtctccgtc ctgtccaggt ccaggcccag agcgattgca gttgctctac ggtgagcccg 120
ggcgtgctgg cagggatcgt gatgggagac ctggtgctga cagtgtcat tgccttgcc 180
gtgtacttcc tgggccggct ggtccctcgg gggcgagggg ctgcggaggc agcgaccg 240
aaacagcgta tcatgagac cgagtcgcct tatcaggagc tccagggtca gaggtcggat 300
gtctacagcg acctcaacac acagaggccg tattacaaag tcgagggcgg cgagaggggc 360
agagggaagtc tttaacatg cggtgacgtg gaggagaatc ccggccctag gatggctctg 420
cctgtgacag ctctgtctgt gcctctggcc ctgctgtctc atgtgccag acctggatcc 480
gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgtctgcca gaggggcg caccgtgacc 540
atcacctgtc aggccaacgg ctacctgaac tggatcagc agcgagagg caaggcccc 600
aagctgctga tctacgacgg cagcaagctg gaaagaggcg tgcgcccg altcagcggc 660
agaagatggg gccaggagta caacctgacc atcaacaacc tgcagcccga ggacgtggcc 720
acatactttt gccagggtga cgagttcatc gtgcccgga cccggctgga tctgaagggc 780
ggaagcagca gaagcagctc tagcggcgga ggcggatctg gcggaggggg acaggtgac 840
ctgagtcagt ctggcgccgc tgtgacaaag ccaggcgctt ctgtcggggt gtctgtgaa 900
gccagcggtt acaagatcag cgaccacttc atccactggt ggcggcaggc tccaggacag 960
ggactgcagt ggggtggatg gatcaacccc aagaccggcc agcccaacaa cccagacag 1020
ttccaggga gagtgtccct gaccagacag gccagctggg acttcgacac ctacagcttc 1080
lactggacc tgaaggccgt gcggagcgac gacaccgcca tctacttttg cgccagacag 1140
agaagcgact tctgggattt cgacgtgtgg ggcagcgga cccaagtac cgtgtcatct 1200
gctagcgcg gagggggatc tggaggtggg ggttcctcac cactgaacc aagctccaaa 1260
accgtaacc ccagacacct gcatgtctg atgggacct cagtggtaa aatcccttc 1320
accatectcc tctttttt ccttcacgc tgggtctcca aaaaaaaaaa tctgtctgta 1380
atggaccaag agcctgcagg gaacagaaca gtgaacagcg aggattctga tgaacaagac 1440
catcaggagg tgtcatagc ataa 1464

[0023]

<210> 23

<211> 488

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 23

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Phe Leu Leu Leu Pro Leu Leu

1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Val Gln Ala Gln Ser Asp

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu

50 55 60

Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg

65 70 75 80

Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly

85 90 95

Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr

100 105 110

Lys Val Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly

115 120 125

[0024]

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala

130 135 140

Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gly Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Asn Gly Tyr Leu Asn Trp Tyr

180 185 190

Gln Gln Arg Arg Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Ser

195 200 205

Lys Leu Glu Arg Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Arg Trp Gly

210 215 220

Gln Glu Tyr Asn Leu Thr Ile Asn Asn Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala

225 230 235 240

Thr Tyr Phe Cys Gln Val Tyr Glu Phe Ile Val Pro Gly Thr Arg Leu

245 250 255

Asp Leu Lys Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly

260 265 270

Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val His Leu Ser Gln Ser Gly Ala Ala Val

275 280 285

Thr Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr

290 295 300

Lys Ile Ser Asp His Phe Ile His Trp Trp Arg Gln Ala Pro Gly Gln

305 310 315 320

Gly Leu Gln Trp Val Gly Trp Ile Asn Pro Lys Thr Gly Gln Pro Asn

325 330 335

Asn Pro Arg Gln Phe Gln Gly Arg Val Ser Leu Thr Arg Gln Ala Ser

340 345 350

Trp Asp Phe Asp Thr Tyr Ser Phe Tyr Met Asp Leu Lys Ala Val Arg

355 360 365

Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Arg Ser Asp Phe

370 375 380

Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Ser Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

385 390 395 400

[0025]

Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Pro Thr Glu

405 410 415

Pro Ser Ser Lys Thr Gly Asn Pro Arg His Leu His Val Leu Ile Gly

420 425 430

Thr Ser Val Val Lys Ile Pro Phe Thr Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu

435 440 445

His Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu

450 455 460

Pro Ala Gly Asn Arg Thr Val Asn Ser Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp

465 470 475 480

His Gln Glu Val Ser Tyr Ala Glx

485

<210> 24

<211> 720

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 24

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgtctgcc gagtgggcca caccgtgacc 60
atcacctgtc aggccaacgg ctacctgaac tggatcagc agcggagagg caaggcccc 120
aagctgctga tctacgacgg cagcaagctg gaaagaggcg tccccgccag attcagcggc 180
agaagatggg gccaggagta caacctgacc atcaacaacc tgcagcccca ggacgtggcc 240
acatactttt gccaggtgta cgagttcacc gtgcccggca cccggctgga tctgaagggc 300
ggaagcagca gaagcagctc tagcggcgga ggcggatctg gcggaggggg acaggtgcac 360
ctgagtcagt ctggcgccgc tctgacaaag ccaggcgctt ctgtgcgggt gtcctgtgaa 420
gccagcggct acaagatcag cgaccacttc atccactggt ggcggcaggc tccaggacag 480
ggactgcagt ggggtgggat gatcaacccc aagaccggcc agcccaacaa cccagacag 540
ttccaggcca gagtgtccct gaccagacag gccagctggg acttcgacac ctacagcttc 600
tacatggacc tgaaggccgt gcggagcgac gacaccgcca tctacttttg cgccagacag 660
agaagcgact tctgggattt cgacgtgtgg ggcagcggca cccaagtac cgtgtcatct 720

<210> 25

<211> 263

<212> PRT

[0026]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 25

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

100 105 110

Ile Val Pro Gly Thr Arg Leu Asp Leu Lys Gly Gly Ser Ser Arg Ser

115 120 125

Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val His Leu

130 135 140

Ser Gln Ser Gly Ala Ala Val Thr Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Val

145 150 155 160

Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Lys Ile Ser Asp His Phe Ile His Trp

165 170 175

Trp Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Val Gly Trp Ile Asn

180 185 190

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

195 200 205

Ser Leu Thr Arg Gln Ala Ser Trp Asp Phe Asp Thr Tyr Ser Phe Tyr

210 215 220

Met Asp Leu Lys Ala Val Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys

225 230 235 240

[0027]

Ala Arg Gln Arg Ser Asp Phe Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Ser Gly

245 250 255

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

260

<210> 26

<211> 1473

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 26

atggggggac ttgaacctg cagcagggtc ctgctcctgc ctctcctgct ggctgtaagt 60

ggctctcgtc ctgtccaggt ccaggcccag agcgattgca gttgctctac ggtgagcccg 120

ggcgtgctgg cagggatcgt gatgggagac ctggtgctga cagtgtcat tgccctggcc 180

gtgtacttec tgggccggtt ggtccctcgg gggcgagggg ctgcggaggc agcgaccgg 240

aaacagcgta tcactgagac cgagtcgctt tatcaggagc tccagggtca gaggtcggat 300

gtctacagcg acctcaaac acagaggcgg tattacaaag tcgaggggcg cggagagggc 360

agaggaagtc tttaacatg cggtagctg gaggagaatc ccggccctag gatggctctg 420
 cctgtgacag ctctgtctgt gcctctggcc ctgtctctgc atgtgccag acctggatcc 480
 gagatcgtgc tgacacagag ccctggcacc ctgagcctgt ctccaggcga gacagccatc 540
 atcagctgcc ggacaagcca gtacggcagc ctggcctggt atcagcagag gcctggacag 600
 gccccagac tctgtacta cagcggcagc acaagagccg ccggaatccc cgatagatc 660
 agcggctcta gatggggccc tgactacaac ctgacctca gcaacctgga aagcggcgac 720
 ttccgctgt actactcca gcagtacgag ttctcggcc agggcaccaa ggtgcagggt 780
 gacatcaaga gaggtgggtc ctctagatct tctctctctg gtggcgggtg ctggggcgt 840
 ggtgggcagg tgacgtggt gcagtctggc ggccagatga agaaaccgg cgagagcatg 900
 cggatcagct cgagagccctc cggctacgag ttcacgacg ccacctgaa ctggatcgg 960
 ctggccctg gcaaaagacc cgagtggatg ggctggctga agcccagagg cggagccgtg 1020
 aattaccca gacctctga gggcagagt accatgacc gggacgtga cagcgatacc 1080
 gccctctgg aactcggag cctgacctg gatgatacc ccgtgtact ctgcaccgg 1140
 ggcaagaaca gcactacaa ctgggacttc gagcactgg gcagaggcac ccctgtgac 1200
 gtgtctagc ctacggcgg agggggatct ggaggtgggg gtctctacc cactgaacca 1260
 agtccaaaa ccgtaaccc cagacacctg catgttctga ttgggacctc agtggtaaaa 1320
 atcccttca ccactctct ctctctctc ctctctctc ggtgtccaa caaaaaaat 1380
 [0028] gctgtgtaa tggaccaaga gcctgcagg aacagaacag tgaacagca ggattctgat 1440
 gaacaagacc atcaggaggt gtcatacga taa 1473
 <210> 27
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工合成的
 <400> 27
 Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Phe Leu Leu Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Val Gln Ala Gln Ser Asp
 20 25 30
 Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met
 35 40 45
 Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu
 50 55 60

[0029]

Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg
65 70 75 80

Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly
85 90 95

Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr
100 105 110

Lys Val Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly
115 120 125

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala
130 135 140

Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gly Ser
145 150 155 160

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
165 170 175

Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala
180 185 190

Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile Tyr Ser
195 200 205

Gly Ser Thr Arg Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg
210 215 220

Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser Gly Asp
225 230 235 240

Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Phe Phe Gly Gln Gly Thr
245 250 255

Lys Val Gln Val Asp Ile Lys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser
260 265 270

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln
275 280 285

Ser Gly Gly Gln Met Lys Lys Pro Gly Glu Ser Met Arg Ile Ser Cys
290 295 300

Arg Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ile Asp Ala Thr Leu Asn Trp Ile Arg
305 310 315 320

Leu Ala Pro Gly Lys Arg Pro Glu Trp Met Gly Trp Leu Lys Pro Arg
325 330 335

Gly Gly Ala Val Asn Tyr Ala Arg Pro Leu Gln Gly Arg Val Thr Met
340 345 350

Thr Arg Asp Val Tyr Ser Asp Thr Ala Phe Leu Glu Leu Arg Ser Leu
355 360 365

Thr Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Gly Lys Asn Ser
370 375 380

Asp Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Ile
385 390 395 400

Val Ser Ser Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
405 410 415

Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly Asn Pro Arg His Leu His Val
420 425 430

Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Lys Ile Pro Phe Thr Ile Leu Leu Phe
435 440 445

Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met
450 455 460

[0030]

Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg Thr Val Asn Ser Glu Asp Ser Asp
465 470 475 480

Glu Gln Asp His Gln Glu Val Ser Tyr Ala Glx
485 490

<210> 28

<211> 729

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 28

gagatcgtgc tgacacagag ccctggcacc ctgagcctgt ctccaggcga gacagccatc 60
atcagctgcc ggacaagcca gtacggcagc ctggcctggt atcagcagag gcctggacag 120
gccccagac tcgtgatcta cagcggcagc acaagagccg ccggaatccc cgatagattc 180
agcggctcta gatggggccc tgactacaac ctgacatca gcaacctgga aagcggcgac 240
ttcggcgtgt actactgcca gcagtacgag ttcttcggcc agggcaccaa ggtgcaggtg 300
gacatcaaga gagcggcgag ctccagaage tccagctctg gcggcggagg atctggcgga 360
ggcggacagg tgcagctggt gcagtctggc ggccagatga agaaacccgg cgagagcatg 420

cggatcagct gcagagcctc cggetacgag ttcacgaca gcacctgaa ctggattcgg 480
ctggcccctg gcaaaagacc cgagtggatg ggctggctga agcccagagg cggagccgtg 540
aattacgcca gacctctgca gggcagagtg accatgaccc gggacgtgta cagcgatacc 600
gccttcctgg aactcggag cctgaccgtg gatgatacgg cegtgtactt ctgcacccgg 660
ggcaagaacg ccgactacaa ctgggacttc gagcactggg gcagaggcac cctgtgatc 720
gtgtctagc 729

<210> 29

<211> 266

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 29

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 Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly
20 25 30

[0031]

Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys Arg Thr
35 40 45

Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Val Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Ala Ala Gly Ile Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Ser Gly Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Glu Phe Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Val Asp Ile Lys Arg Gly
115 120 125

Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gln Met Lys Lys Pro Gly
145 150 155 160

Glu Ser Met Arg Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ile Asp

165 170 175

Ser Thr Leu Asn Trp Ile Arg Leu Ala Pro Gly Lys Arg Pro Glu Trp

180 185 190

Met Gly Trp Leu Lys Pro Arg Gly Gly Ala Val Asn Tyr Ala Arg Pro

195 200 205

Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Val Tyr Ser Asp Thr Ala

210 215 220

Phe Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe

225 230 235 240

Cys Thr Arg Gly Lys Asn Ala Asp Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His Trp

245 250 255

Gly Arg Gly Thr Pro Val Ile Val Ser Ser

260 265

<210> 30

<211> 1857

<212> DNA

<213> 人工序列

[0032]

<220>

<223> 人工合成的

<400> 30

atggggggac ttgaacctg cagcaggffc ctgctcctgc ctctcctgct ggctgtaagt 60
 ggtctccgtc ctgtccaggt ccaggcccag agegattgca gttgctctac ggtgagcccg 120
 ggcgtgctgg cagggatcgt gatgggagac ctggtgctga cagtgtcat tgcctggcc 180
 gtgtacttcc tgggccggtt ggtccctcgg gggcgagggg ctgcggagggc agcgaccgg 240
 aaacagcgta tcactgagac cgagtcgcct taccaggagc tccagggtca gaggtcggat 300
 gtctacageg acctcaacac acagagggcg tattacaaag tcgagggcgg cggagagggc 360
 agaggaagtc tttaacatg cggtgacgtg gaggagaatc ccggccctag gatggctctg 420
 cctgtgacag ctctgtctgt gcctctggcc ctgctgtctc atgtgccag acctggatcc 480
 aagaaagtgg tgcttggaac gaaggcgac accgtggaac tgacctgac cgccagccag 540
 aagaagtcca tccagttcca ctggaagaac agcaaccaga tcaagatcct gggcaaccag 600
 ggcagcttcc tgaccaaggg cccagcaag ctgaacgaca gagccgactc tcggcggagc 660
 ctgtgggacc agggcaattt cccactgac atcaagaacc tgaagatcga ggacagcgac 720
 acctacatct gcaggtgga agatcagaaa gaagaggtgc agctgttgtt gtteggcctg 780
 accgccaact ccgacacca tctgtgcag ggccagagcc tgacctgac actggaagc 840

cctccaggca gcagcccgag cgtgcagtgt agaagcccca gaggcaagaa catccagggc 900
 ggcaagacce tgagcgtgtc ccagcttgaa ctgcaggata gcggcacctg gacctgtacc 960
 gtgctgcaga accagaagaa agtggaattc aagatcgaca tcgtcgtgct cgccttcag 1020
 aaagccagct ccatcgtgta caagaaggag ggcgaaacagg tggaaatttc cttccccctg 1080
 gccttcactg tggaaaagct gaccggcagc ggcgagctgt ggtggcaggc tgaaagagcc 1140
 agctccagca agtcttgat caccctcgac ctgaagaaca aagaggtgtc cgtgaagaga 1200
 gtgaccagg accccaagct gcagatgggc aagaagctgc cctgcatct gacactgcc 1260
 caggcccttc cacagtatgc cggtctggc aatctcactc ttgctctga agccaagacc 1320
 ggcaagctgc accaggaagt gaacctggtc gtgatgcggg ccaccagct gcagaagaat 1380
 ctgacctgeg aagtgtgggg ccclaccagc cclaagctga tgcctgagcc gaagctggaa 1440
 aacaaagaag ccaaggtgtc caagcgcgag aaggccgtgt ggggtgctgaa tctgaggcc 1500
 ggcatgtggc agtgtctgt gagegattct ggccaggtgc tgcgcgaaag caacatcaag 1560
 gtgctgccc cctggctcac tccagtgcag cctgctagcg gcggaggggg atctggaggt 1620
 gggggttcct caccactga accaagctcc aaaaccggta accccagaca cctgcatgtt 1680
 ctgattggga cctcagtggg caaaatccct ttaccatcc tctcttctt tctcttcat 1740
 cgtggtgtct ccaacaaaaa aaatgtgtct gtaatggacc aagagcctgc agggaacaga 1800
 acagtgaaca gcgaggattc tgatgaacaa gaccatcagg aggtgtcata cgcataa 1857

[0033]

<210> 31

<211> 619

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 31

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Phe Leu Leu Leu Pro Leu Leu

1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Val Gln Ala Gln Ser Asp

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu

50 55 60

Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg

65 70 75 80

[0034]

Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly
85 90 95

Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr
100 105 110

Lys Val Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly
115 120 125

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala
130 135 140

Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gly Ser
145 150 155 160

Lys Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys
165 170 175

Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn
180 185 190

Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro
195 200 205

Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln
210 215 220

Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp
225 230 235 240

Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu
245 250 255

Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln
260 265 270

Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val
275 280 285

Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu
290 295 300

Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr
305 310 315 320

Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val
325 330 335

Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu
340 345 350

Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr
355 360 365

Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys
370 375 380

Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg
385 390 395 400

Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His
405 410 415

Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu
420 425 430

Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn
435 440 445

Leu Val Val Met Arg Ala Thr Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu
450 455 460

Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu
465 470 475 480

[0035] Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val Leu
485 490 495

Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln
500 505 510

Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro
515 520 525

Val Gln Pro Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
530 535 540

Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly Asn Pro Arg His Leu His Val
545 550 555 560

Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Lys Ile Pro Phe Thr Ile Leu Leu Phe
565 570 575

Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met
580 585 590

Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg Thr Val Asn Ser Glu Asp Ser Asp
595 600 605

Glu Gln Asp His Gln Glu Val Ser Tyr Ala Glx
610 615

<210> 32

<211> 1857

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 32

atggggggac ttgaacctg cagcagggtc ctgctcctgc ctctcctgct ggctgtaagt 60
ggctccgtc ctgtccaggt ccaggcccag agcgattgca gttgctctac ggtgagcccg 120
ggcgtgctgg cagggatcgt gatgggagac ctgggtgctga cagtgtcat tgccctggcc 180
gtgtacttcc tgggccgggt ggtccctcgg gggcgagggg ctgcggaggc agcgaccgg 240
aaacagcgta tcaclgagac cgagtcgcct lalcaggagc tccagggtca gaggtcggat 300
gtctacagcg acctcaacac acagaggccg tattacaaag tcgagggcgg cggagagggc 360
agagggaagtc tttaacatg cggtgacgtg gaggagaatc ccggccctag gatggctctg 420
cctgtgacag ctctgtctgt gcctctggcc ctgctgctgc atgtgccag acctggatcc 480
aagaaagtgg tgcttggcaa gaaggcgac accgtggaac tgacctgac cgccagccag 540
aagaagtcca tccagttcca ctggaagaac agcaaccaga tcaagatcct gggcaaccag 600
ggcagcttcc tgaccaaggg ccccagcaag ctgaacgaca gageccgactc tcggcggagc 660
ctgtgggacc agggcaattt cccactgac atcaagaacc tgaagatcga ggacagcgac 720
acctacatct gcgagggtga agatcagaaa gaagaggtgc agctgttgtt gtccggcctg 780
accgccaact ccgacacca tctgtgcag ggccagagcc tgacctgac actggaaagc 840
cctccaggca gcagcccag cgtgcagtg agaagcccca gaggcaagaa catccagggc 900
ggcaagaccc tgagcgtgc ccagcttgaa ctgcaggata gcggcacctg gacctgtacc 960
gtgtgcaga accagaagaa agtggaattc aagatcgaca tcgtctgtct cgccttcag 1020
aaagccagct ccatctgtga caagaaggag ggccaacagg tggaatttc ctccccctg 1080
gccttcactg tggaaaagct gaccggcagc ggcgagctgt ggtggcaggc tgaaagagcc 1140
agctccagca agtcttgat caccctcgac ctgaagaaca aagaggtgtc cgtgaagaga 1200
gtgaccagc accccaagct gcagatgggc aagaagctgc cctgcatct gacactgcca 1260
caggcccttc cacagtatgc cggctctggc aatctcactc ttgctcttga agccaagacc 1320
ggcaagctgc accaggaagt gaacctggtc gtgatgcggg ccaccagct gcagaagaat 1380
ctgacctgag aagtgtgggg cctaccagc cctaagctga tctgagcct gaagctggaa 1440
aacaagaag ccaaggtgtc caagcgcgag aagggcgtgt ggggtgctgaa tctgagggc 1500
ggcatgtggc agtgtctgt gacgattct ggccaggtgc tctcgaaag caacatcaag 1560
gtgtgcccc cctggccac tccagtgcag cctctagcg gcggaggggg atctggaggt 1620

[0036]

gggggttct caccactga accaagetcc aaaaccggta accccagaca cctgcatgtt 1680
ctgattggga cctcagtggt caaaatccct ttcaccatcc tctcttctt tctcttcat 1740
cgctggtgct ccaacaaaaa aaatgctgct gtaatggacc aagagcctgc aggggaacaga 1800
acagtgaaca gcgaggatc tgatgaacaa gaccatcagg aggtgtcata cgcataa 1857

<210> 33

<211> 619

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 33

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Phe Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Val Gln Ala Gln Ser Asp
20 25 30

Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met
35 40 45

[0037]

Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu
50 55 60

Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg
65 70 75 80

Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly
85 90 95

Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr
100 105 110

Lys Val Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly
115 120 125

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala
130 135 140

Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gly Ser
145 150 155 160

Lys Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys
165 170 175

Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn

[0038]

180 185 190

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

195 200 205

Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln

210 215 220

Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp

225 230 235 240

Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu

245 250 255

Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln

260 265 270

Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val

275 280 285

Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu

290 295 300

Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr

305 310 315 320

Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val

325 330 335

Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu

340 345 350

Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr

355 360 365

Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys

370 375 380

Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg

385 390 395 400

Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His

405 410 415

Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu

420 425 430

Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn

435 440 445

Leu Val Val Met Arg Ala Thr Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu

450 455 460

Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu

465 470 475 480

Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val Leu

485 490 495

Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln

500 505 510

Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro

515 520 525

Val Gln Pro Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser

530 535 540

Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly Asn Pro Arg His Leu His Val

545 550 555 560

Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Lys Ile Pro Phe Thr Ile Leu Leu Phe

565 570 575

Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met

580 585 590

[0039]

Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg Thr Val Asn Ser Glu Asp Ser Asp

595 600 605

Glu Gln Asp His Gln Glu Val Ser Tyr Ala Glx

610 615

<210> 34

<211> 1923

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 34

atggetctgc ctgtgacagc tctgtgtctg cctctggccc tgctgtgca tgctgccaga 60

cctggatccg agatgtgtct gacacagagc cctggcaccg tgagcctgtc tccaggcgag 120

acagccatca tcagctgccg gacaagccag tacggcagcc tggccttgta tcagcagagg 180

cctggacagg cccccagact cgtgatctac agcggcagca caagagccgc cggaatcccc 240

gatagatfca gcggtcttag atggggccct gactacaacc tgaccatcag caacctggaa 300

agcggcgact tggcgtgta ctactgccag cagtacgagt tcttcggcca gggcaccaag 360

gtgcagggtgg acatcaagag aggcggcagc tccagaagct ccagctctgg cggcggagga 420
 tctggcggag gcggacaggt gcagctggtg cagtctggcg gccagatgaa gaaacccggc 480
 gagagcatgc ggaacagctg cagagccccc ggctacgagt tcatcgactg caccctgaac 540
 tggatcggc tggccctgg caaaagaccc gagtggatgg gctggctgaa gccagaggc 600
 ggagccgtga attacgccag acctctgcag ggacagatga ccatgaccgg ggacgtgtac 660
 agcgataccg ccttcttga actgcggagc ctgaccgtgg atgataccgc cgtgtacttc 720
 tgcacccggg gcaagaactg cgactacaac tgggacttcg agcactgggg cagaggcacc 780
 cctgtgatcg tctctagcgc tagcgagagc aagtacggcc ctccctgccc ccttgcct 840
 gcccccgagt tcttggggcg acccagcgtg ttctgttcc ccccaagcc caaggacacc 900
 ctgatgatca gccggacccc cgaggtgacc tgtgtggggg tggacgtgtc ccaggaggac 960
 cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac ggctgtggagg tgcacaacgc caagaccaag 1020
 cccggggagg agcagttcaa tagcacctac cgggtggtgt cgtgtctgac cgtgtctgac 1080
 caggactggc tgaacggcaa ggaatacaag tgtaagggtg ccaacaaggg cctgcccagc 1140
 agcatcgaga aaacctcag caaggccaag ggccagcctc gggagcccca ggtgtacacc 1200
 ctgcccccta gccaaagaga gatgaccaag aaccagggtg ccttgacctg cctgtgtaag 1260
 ggcttctacc ccagcgacat cgcctggag tgggagagca acggccagcc cgagaacaac 1320
 tacaagacca cccccctgt gctggacagc gacggcagct tcttctgta cagccggctg 1380
 accgtggaca agagccggtg gcaggagggc aacgtctta gctgtccgt gatgcacgag 1440
 gccctgcaca accactacac ccagaagagc ctgagcctgt ccttgggcaa gatgtccgga 1500
 atctacatct gggcgcctt ggccgggact tgtggggctc ttctctgtc actggttacc 1560
 acccttact gcaaacgggg cagaaagaaa ctctgtata tatcaaaac accatttatg 1620
 agaccagtac aaactactca agaggaagat ggctgtagct gccgatttc agaagaagaa 1680
 gaaggaggat gtgaactcgc tggccgggac cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag 1740
 aaccctcagg aaggcctgta caatgaactg cagaaagata agatggcgga ggcctacagt 1800
 gagattggga tgaaggcga gcgccggagg ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt 1860
 ctcatgacag ccaccaagga cacctacgac gcccttcaca tgcaggccct gcccctcgc 1920
 taa 1923
 <210> 35
 <211> 679
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工合成的
 <400> 35

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 Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly
20 25 30
Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys Arg Thr
35 40 45
Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala
50 55 60
Pro Arg Leu Val Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Ala Ala Gly Ile Pro
65 70 75 80
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Asn Leu Glu Ser Gly Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110
Glu Phe Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Val Asp Ile Lys Arg Gly
115 120 125
[0041] Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gln Met Lys Lys Pro Gly
145 150 155 160
Glu Ser Met Arg Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ile Asp
165 170 175
Cys Thr Leu Asn Trp Ile Arg Leu Ala Pro Gly Lys Arg Pro Glu Trp
180 185 190
Met Gly Trp Leu Lys Pro Arg Gly Gly Ala Val Asn Tyr Ala Arg Pro
195 200 205
Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Val Tyr Ser Asp Thr Ala
210 215 220
Phe Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe
225 230 235 240
Cys Thr Arg Gly Lys Asn Cys Asp Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His Trp
245 250 255
Gly Arg Gly Thr Pro Val Ile Val Ser Ser Ala Ser Glu Ser Lys Tyr
260 265 270

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
275 280 285

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
290 295 300

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
305 310 315 320

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
325 330 335

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
340 345 350

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
355 360 365

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
370 375 380

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
385 390 395 400

[0042] Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
405 410 415

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
420 425 430

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
435 440 445

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
450 455 460

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
465 470 475 480

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
485 490 495

Lys Met Ser Gly Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
500 505 510

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
515 520 525

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
530 535 540

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
545 550 555 560

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
565 570 575

Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
580 585 590

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
595 600 605

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
610 615 620

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
625 630 635 640

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
645 650 655

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
660 665 670

Gln Ala Leu Pro Pro Arg Glx
675

[0043]

<210> 36

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 36

Thr Thr Ala Ala Thr Gly Gly Gly Ala Thr Cys Cys Ala Thr Gly Ala
1 5 10 15

Ala Cys Cys Gly Gly Gly Gly Ala Gly Thr Cys Cys Cys Thr Thr Thr
20 25 30

<210> 37

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 37

aaggacttcc ggatggctgc accggggtgg accatg 36

<210> 38

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 38

gggacactcc ggaaccacga cgccagcgcc gcg 33

<210> 39

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0044] <223> 人工合成的

<400> 39

gggacacgtc gacttagcga gggggca 27

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 40

gtatcgatca cgagactagc 20

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 41

ttaaaccggt gtctggcctt tgagtgggtga 30

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 42

Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe

1 5 10

<210> 43

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0045] <223> 人工合成的

<400> 43

Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly

<210> 44

<211> 625

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 44

Met Asn Arg Gly Val Pro Phe Arg His Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu

1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Ala Ala Thr Gln Gly Lys Lys Val Val Leu Gly Lys

20 25 30

Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser

35 40 45

Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn

50 55 60

Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala

65 70 75 80

Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile

85 90 95

Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu

100 105 110

Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn

115 120 125

Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu

130 135 140

Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

[0046]

Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys

180 185 190

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

195 200 205

Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro

210 215 220

Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp

225 230 235 240

Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu

245 250 255

Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu

260 265 270

Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu

275 280 285

Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys

290 295 300

Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Arg Ala Thr

305 310 315 320

Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro

325 330 335

Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser

340 345 350

Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val Leu Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp

355 360 365

Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile

370 375 380

Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val Gln Pro Ser Gly Thr Thr

385 390 395 400

Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln

405 410 415

Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala

420 425 430

Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val

435 440 445

[0047]

Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala

450 455 460

Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser

465 470 475 480

Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His

485 490 495

Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Ile

500 505 510

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

515 520 525

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu

530 535 540

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly

545 550 555 560

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln

565 570 575

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu

580 585 590

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr

595 600 605

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro

610 615 620

Arg

625

<210> 45

<211> 621

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 45

Met Asn Arg Gly Val Pro Phe Arg His Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu

1 5 10 15

[0048]

Ala Leu Leu Pro Ala Ala Thr Gln Gly Lys Lys Val Val Leu Gly Lys

20 25 30

Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser

35 40 45

Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn

50 55 60

Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala

65 70 75 80

Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile

85 90 95

Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu

100 105 110

Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn

115 120 125

Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu

130 135 140

Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly

145 150 155 160

[0049]

Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu
165 170 175

Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys
180 185 190

Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser
195 200 205

Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro
210 215 220

Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp
225 230 235 240

Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu
245 250 255

Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu
260 265 270

Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu
275 280 285

Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys
290 295 300

Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Arg Ala Thr
305 310 315 320

Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro
325 330 335

Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser
340 345 350

Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val Leu Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp
355 360 365

Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile
370 375 380

Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val Gln Pro Ser Gly Thr Thr
385 390 395 400

Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln
405 410 415

Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
420 425 430

[0050]

Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala
435 440 445

Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
450 455 460

Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
465 470 475 480

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
485 490 495

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
500 505 510

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
515 520 525

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
530 535 540

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
545 550 555 560

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
565 570 575

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
580 585 590

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
595 600 605

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
610 615 620

<210> 46

<211> 396

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 46

Met Asn Arg Gly Val Pro Phe Arg His Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu
1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Ala Ala Thr Gln Gly Lys Lys Val Val Leu Gly Lys

[0051]

20 25 30

Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser

35 40 45

Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn

50 55 60

Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala

65 70 75 80

Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile

85 90 95

Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu

100 105 110

Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn

115 120 125

Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu

130 135 140

Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys

180 185 190

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

195 200 205

Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro

210 215 220

Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp

225 230 235 240

Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu

245 250 255

Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu

260 265 270

Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu

275 280 285

Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys

290 295 300

Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Arg Ala Thr

305 310 315 320

Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro

325 330 335

Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser

340 345 350

Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val Leu Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp

355 360 365

Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile

370 375 380

Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val Gln Pro

385 390 395

<210> 47

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列

[0052]

<220>

<223> 人工合成的

<400> 47

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> 48

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 48

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> 49
<211> 68
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 49
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
20 25 30
Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
35 40 45
[0053] Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
50 55 60
Ala Tyr Arg Ser
65
<210> 50
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 50
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> 51

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 51

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

[0054]

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> 52

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 52

Gln Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Ser Ser

1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Gln Gly

20 25 30

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Ala

35 40 45

Phe Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr His Ala Asp Ser Val Trp

50 55 60
Gly Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val
85 90 95
Arg Glu Ala Gly Gly Pro Asp Tyr Arg Asn Gly Tyr Asn Tyr Tyr Asp
100 105 110
Phe Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys
115 120 125
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser
145 150 155 160
Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Asn Gly Thr
165 170 175
Ser Asn Asp Val Gly Gly Tyr Glu Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln His
180 185 190
[0055] Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro
195 200 205
Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala
210 215 220
Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr
225 230 235 240
Cys Lys Ser Leu Thr Ser Thr Arg Arg Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr
245 250 255
Lys Leu Thr Val Leu Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
260 265 270
Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
275 280 285
Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
290 295 300
Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
305 310 315 320
Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Val Lys Phe

325 330 335

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu

340 345 350

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp

355 360 365

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys

370 375 380

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala

385 390 395 400

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys

405 410 415

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr

420 425 430

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

435 440

<210> 53

<211> 442

[0056]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 53

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asn Phe Val Ser Trp

20 25 30

Tyr Gln Gln His Ala Gly Lys Ala Pro Lys Leu Val Ile Tyr Asp Val

35 40 45

Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser

50 55 60

Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu Gln Thr Asp Asp Glu

65 70 75 80

Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ser Leu Val Gly Asn Trp Asp Val Ile Phe

85 90 95

[0057]

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser
100 105 110

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Pro Gln Leu Gln
115 120 125

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Glu Ala Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr
130 135 140

Cys Ala Val Ser Gly Asp Ser Thr Ala Ala Cys Asn Ser Phe Trp Gly
145 150 155 160

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Ser Leu
165 170 175

Ser His Cys Ala Ser Tyr Trp Asn Arg Gly Trp Thr Tyr His Asn Pro
180 185 190

Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Leu Ala Leu Asp Thr Pro Lys Asn Leu
195 200 205

Val Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
210 215 220

Tyr Cys Ala Arg Phe Gly Gly Glu Val Leu Arg Tyr Thr Asp Trp Pro
225 230 235 240

Lys Pro Ala Trp Val Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val
245 250 255

Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
260 265 270

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
275 280 285

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
290 295 300

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
305 310 315 320

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
325 330 335

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
340 345 350

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
355 360 365

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
370 375 380

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
385 390 395 400

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
405 410 415

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
420 425 430

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg
435 440

<210> 54

<211> 426

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 54

[0058]

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

Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala
20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile Tyr Ser
35 40 45

Gly Ser Thr Arg Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg
50 55 60

Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser Gly Asp
65 70 75 80

Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Phe Phe Gly Gln Gly Thr
85 90 95

Lys Val Gln Val Asp Ile Lys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln
115 120 125

Ser Gly Gly Gln Met Lys Lys Pro Gly Glu Ser Met Arg Ile Ser Cys

[0059]

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

405 410 415
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
420 425
<210> 55
<211> 423
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 55
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Arg Val Gly
1 5 10 15
Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Asn Gly Tyr Leu Asn Trp Tyr
20 25 30
Gln Gln Arg Arg Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Ser
35 40 45
[0060] Lys Leu Glu Arg Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Arg Trp Gly
50 55 60
Gln Glu Tyr Asn Leu Thr Ile Asn Asn Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala
65 70 75 80
Thr Tyr Phe Cys Gln Val Tyr Glu Phe Ile Val Pro Gly Thr Arg Leu
85 90 95
Asp Leu Lys Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly
100 105 110
Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val His Leu Ser Gln Ser Gly Ala Ala Val
115 120 125
Thr Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr
130 135 140
Lys Ile Ser Asp His Phe Ile His Trp Trp Arg Gln Ala Pro Gly Gln
145 150 155 160
Gly Leu Gln Trp Val Gly Trp Ile Asn Pro Lys Thr Gly Gln Pro Asn
165 170 175
Asn Pro Arg Gln Phe Gln Gly Arg Val Ser Leu Thr Arg Gln Ala Ser
180 185 190

Trp Asp Phe Asp Thr Tyr Ser Phe Tyr Met Asp Leu Lys Ala Val Arg
195 200 205

Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Arg Ser Asp Phe
210 215 220

Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Ser Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
245 250 255

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
260 265 270

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
275 280 285

Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
290 295 300

Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
305 310 315 320

[0061]

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
325 330 335

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
340 345 350

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
355 360 365

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
370 375 380

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
385 390 395 400

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
405 410 415

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
420

<210> 56

<211> 454

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 56

Asp Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro His Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser His Ser Leu Ile His Gly
20 25 30

Asp Arg Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Val Gln Lys Pro Gly Arg Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Thr Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Arg Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

[0062]

Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Gln Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Arg Lys Pro
130 135 140

Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Pro Gly Asn Thr Leu Lys
145 150 155 160

Thr Tyr Asp Leu His Trp Val Arg Ser Val Pro Gly Gln Gly Leu Gln
165 170 175

Trp Met Gly Trp Ile Ser His Glu Gly Asp Lys Lys Val Ile Val Glu
180 185 190

Arg Phe Lys Ala Lys Val Thr Ile Asp Trp Asp Arg Ser Thr Asn Thr
195 200 205

Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr
210 215 220

Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Lys His Arg Leu Arg Asp Tyr Ala Leu Tyr
225 230 235 240

Asp Asp Asp Gly Ala Leu Asn Trp Ala Val Asp Val Asp Tyr Leu Ser

245 250 255

Asn Leu Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser Ser

260 265 270

Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile

275 280 285

Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala

290 295 300

Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu

355 360 365

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp

370 375 380

[0063]

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu

385 390 395 400

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile

405 410 415

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr

420 425 430

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met

435 440 445

Gln Ala Leu Pro Pro Arg

450

<210> 57

<211> 261

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 57

[0064]

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

<210> 58

<211> 258

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 58

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asn Phe Val Ser Trp

20 25 30

Tyr Gln Gln His Ala Gly Lys Ala Pro Lys Leu Val Ile Tyr Asp Val

35 40 45

Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser

50 55 60

Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu Gln Thr Asp Asp Glu

65 70 75 80

[0065]

Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ser Leu Val Gly Asn Trp Asp Val Ile Phe

85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser

100 105 110

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

115 120 125

Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Glu Ala Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr

130 135 140

Cys Ala Val Ser Gly Asp Ser Thr Ala Ala Cys Asn Ser Phe Trp Gly

145 150 155 160

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Ser Leu

165 170 175

Ser His Cys Ala Ser Tyr Trp Asn Arg Gly Trp Thr Tyr His Asn Pro

180 185 190

Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Leu Ala Leu Asp Thr Pro Lys Asn Leu

195 200 205

Val Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr

210 215 220

Tyr Cys Ala Arg Phe Gly Gly Glu Val Leu Arg Tyr Thr Asp Trp Pro

225 230 235 240

Lys Pro Ala Trp Val Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val

245 250 255

Ser Ser

<210> 59

<211> 243

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 59

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

1 5 10 15

Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser Leu Ala

20 25 30

[0066]

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

35 40 45

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

50 55 60

Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser Gly Asp

65 70 75 80

Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Phe Phe Gly Gln Gly Thr

85 90 95

Lys Val Gln Val Asp Ile Lys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser

100 105 110

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

115 120 125

Ser Gly Gly Gln Met Lys Lys Pro Gly Glu Ser Met Arg Ile Ser Cys

130 135 140

Arg Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ile Asp Cys Thr Leu Asn Trp Ile Arg

145 150 155 160

Leu Ala Pro Gly Lys Arg Pro Glu Trp Met Gly Trp Leu Lys Pro Arg

165 170 175

Gly Gly Ala Val Asn Tyr Ala Arg Pro Leu Gln Gly Arg Val Thr Met

180 185 190

Thr Arg Asp Val Tyr Ser Asp Thr Ala Phe Leu Glu Leu Arg Ser Leu

195 200 205

Thr Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Gly Lys Asn Cys

210 215 220

Asp Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Ile

225 230 235 240

Val Ser Ser

<210> 60

<211> 240

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 60

[0067]

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

1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Asn Gly Tyr Leu Asn Trp Tyr

20 25 30

Gln Gln Arg Arg Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Ser

35 40 45

Lys Leu Glu Arg Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Arg Trp Gly

50 55 60

Gln Glu Tyr Asn Leu Thr Ile Asn Asn Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala

65 70 75 80

Thr Tyr Phe Cys Gln Val Tyr Glu Phe Ile Val Pro Gly Thr Arg Leu

85 90 95

Asp Leu Lys Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly

100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val His Leu Ser Gln Ser Gly Ala Ala Val

115 120 125

Thr Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr

[0068]

130 135 140

Lys Ile Ser Asp His Phe Ile His Trp Trp Arg Gln Ala Pro Gly Gln

145 150 155 160

Gly Leu Gln Trp Val Gly Trp Ile Asn Pro Lys Thr Gly Gln Pro Asn

165 170 175

Asn Pro Arg Gln Phe Gln Gly Arg Val Ser Leu Thr Arg Gln Ala Ser

180 185 190

Trp Asp Phe Asp Thr Tyr Ser Phe Tyr Met Asp Leu Lys Ala Val Arg

195 200 205

Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Arg Ser Asp Phe

210 215 220

Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Ser Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

225 230 235 240

<210> 61

<211> 271

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 61

Asp Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro His Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser His Ser Leu Ile His Gly

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Thr Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Gly

85 90 95

Arg Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105 110

Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Gln Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Arg Lys Pro
130 135 140

Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Pro Gly Asn Thr Leu Lys
145 150 155 160

Thr Tyr Asp Leu His Trp Val Arg Ser Val Pro Gly Gln Gly Leu Gln
165 170 175

Trp Met Gly Trp Ile Ser His Glu Gly Asp Lys Lys Val Ile Val Glu
180 185 190

Arg Phe Lys Ala Lys Val Thr Ile Asp Trp Asp Arg Ser Thr Asn Thr
195 200 205

Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr
210 215 220

Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Lys His Arg Leu Arg Asp Tyr Ala Leu Tyr
225 230 235 240

[0069]

Asp Asp Asp Gly Ala Leu Asn Trp Ala Val Asp Val Asp Tyr Leu Ser
245 250 255

Asn Leu Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
260 265 270

<210> 62

<211> 1863

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 62

atgaaccggg gagtcccttt taggeacttg cttctggtgc tgcaactgge gctctccca 60
gcagccactc agggaaagaa agtgggtgctg ggcaaaaaag gggatacagt ggaactgacc 120
tgtacagctt ccagaagaa gagcatacaa ttccactgga aaaactccaa ccagataaag 180
attctgggaa atcagggctc cttcttaact aaaggccat ccaagctgaa tgatgcgct 240
gactcaagaa gaagcctttg ggaccaagga aactcccc tgatcatcaa gaatcttaag 300
atagaagact cagatactta catctgtgaa gtggaggacc agaaggagga ggtgcaattg 360
ctagtgttcg gattgactgc caactctgac acccactgc ttcaggggca gagcctgacc 420

ctgaccttgg agagccccc ttgtagtgc ccctcagtgc aatgtaggag tccaaggggt 480
 aaaaacatac agggggggaa gacctctcc gtgtctcagc tggagctcca ggatagtggc 540
 acctggacat gcactgtctt gcagaaccag aagaagggtg agttcaaat agacatcgtg 600
 gtgctagctt tccagaaggc ctccagcata gtctataaga aagaggggga acaggtggag 660
 ttctecttcc cactcgcctt tacagttaa aagctgacgg gcagtggcga gctgtggtg 720
 caggcggaga gggcttctc ctccaagtct tggatcacct ttgacctgaa gaacaaggaa 780
 gtgtctgtaa aacgggttac ccaggacct aagctccaga tgggcaagaa gctcccgtc 840
 cacctacccc tccccaggc ctgcctcag tatgtggct ctggaaacct caccctggcc 900
 ctggaagcga aaacaggaaa gtgcatcag gaagtgaacc tgggtgtgat gagagccact 960
 cagctccaga aaaatttgac ctgtgaggtg tggggacca cctcccctaa gctgatgctg 1020
 agcttgaac tggagaacaa ggaggcaaag gtctcgaagc gggagaaggc ggtgtgggtg 1080
 ctgaacctg aggcggggat gtggcagtg ctgctgagtg actcgggaca ggtcctgctg 1140
 gaatccaaca tcaaggttct gccacatgg tcaccccg tgcagccaac cagcagcca 1200
 ggcgcgcgac caaccaacac ggcgccacc atcgcgtcgc agccctgtc cctgcgcca 1260
 gaggcgtgcc ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggtgga ctctgcctgt 1320
 gattttggg tgcgtggtgt ggttggtgga gtcttggtt gctatagctt gctagtaaca 1380
 gtggccttta ttatttctg ggtgaggagt aagaggagca ggctctgca cagtactac 1440
 [0070] atgaacatga cccccgcg ccccgggccc acccgcaagc attaccagcc ctatgcccc 1500
 ccacgcgact tgcagccta tgcctccaga gtgaagtca gcaggagcgc agacgcccc 1560
 ggcctaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca atctaggacg aagagaggag 1620
 tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gacctgaga tggggggaaa gccgagaagg 1680
 aagaacctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac 1740
 agtgagattg ggatgaaagg cgagcgcgg aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag 1800
 ggtctcagta cagccacca ggacacctac gacgccctt acatgcaggc cctgccccct 1860
 cgc 1863
 <210> 63
 <211> 1857
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工合成的
 <400> 63
 atgaaccggg gattccctt taggcaattg ctctggtgc tgaactggc gctctccca 60
 gcagccactc agggaaagaa agtgggtctg ggcaaaaaag ggatacagt ggaactgacc 120

tgtacagctt cccagaagaa gagcatacaa ttccactgga aaaactccaa ccagataaag 180
 attctgggaa atcagggtct ctcttlaact aaaggltccat ccaagctgaa tgatcgcgct 240
 gactcaagaa gaagcctttg ggaccaagga aacttcccc tgatcatcaa gaatcttaag 300
 atagaagact cagatactta catctgtgaa gtggaggacc agaaggagga ggtgcaattg 360
 ctagtgttcg gattgactgc caactctgac acccacttgc ttcaggggca gagcctgacc 420
 ctgaccttg agagcccccc tggtagtagc cctcagtgc aatgtaggag tccaaggggg 480
 aaaaacatac aggggggggaa gacctctcc gtgtctcagc tggagctcca ggatagtggc 540
 acctggacat gcaactgtct gcagaaccag aagaagggtg agttcaaaat agacatcgtg 600
 gtgctagctt tccagaaggc ctccagcata gtctataaga aagaggggga acaggtggag 660
 ttctcttcc cactcgctt tacagttaa aagctgacgg gcagtggcga gctgtgggtg 720
 caggcggaga gggtctctc ctccaagtct tggatcacct ttgacctgaa gaacaaggaa 780
 gtgtctgtaa aacgggttac ccaggacct aagctccaga tgggcaagaa gctcccgtc 840
 cactcaccc tgcctcaggc ctgctcag tatgtggt ctggaaacct caccctggcc 900
 ctgaagcga aaacaggaaa gtgcatcag gaagtgaacc tgggtgtgat gagagccact 960
 cagctccaga aaaatttgac ctgtgaggtg tggggacca cctcccctaa gctgatgctg 1020
 agcttgaac tggagaacaa ggaggcaaag gtctcgaagc gggagaaggc ggtgtgggtg 1080
 ctgaacctg aggcggggat gtggcagttg ctgctgagtg actcgggaca ggtctgctg 1140
 gaatccaaca tcaagggtt gccacatgg tccacccgg tgcagccaac cagcagcca 1200
 gcgccgcgac caccaacacc ggcgccacc atcgctcgc agccctgtc cctgcgcca 1260
 gagcggtgcc ggccagcggc ggggggcgca gtgcacacga gggggtgga ctgcctgt 1320
 galatetaca tctgggcgcc ctggccggg acttgtggg tcttctct gtcactggt 1380
 atcaccttt actgcaaacg ggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccatt 1440
 atgagaccag taaaactac tcaagaggaa gatggtgta gctccgatt tccagaagaa 1500
 gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac 1560
 cagcagggcc agaaccagt ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat 1620
 gttttggaca agagacgtg cggggacct gagatgggg gaaagccgag aaggaagaac 1680
 cctcaggaag gcctgfaca tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag 1740
 attgggatga aaggcgagcg cggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 1800
 agtacagcca ccaaggacac ctacgacgc ctccacatgc aggcctgcc cctcgc 1857
 <210> 64
 <211> 1188
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 人工合成的

<400> 64

atgaaccggg gagtcccttt taggcacttg ctcttggtgc tgcaactggc gctcctccca 60
gcagccactc agggaaagaa agtgggtgctg ggcaaaaaag gggatacagt ggaactgacc 120
tgtacagctt ccagaagaa gaggatacaa ttccactgga aaaactccaa ccagataaag 180
attctgggaa atcagggctc ctcttaact aaaggtccat ccaagctgaa tgatcgct 240
gaactaagaa gaagcctttg ggaccaagga aacttcccc tgatcatcaa gaacttaag 300
atagaagact cagatactta catctgtgaa gtggaggacc agaaggagga ggtgcaattg 360
ctagtgttcg gattgactgc caactctgac accacctgc ttcaagggca gacctgacc 420
ctgaccttg agagcccccc ttgtagtagc cctcagtgc aatgtaggag tccaaggggt 480
aaaaacatac agggggggaa gacctctcc gtgtctcagc tggagctcca ggatagtggc 540
acctggacat gcactgtctt gcagaaccag aagaagggtg agttcaaaat agacatctg 600
gtgctagctt tccagaaggc ctccagcata gtctataaga aagaggggga acaggtggag 660
ttctcttcc cactgcctt tacagtgaa aagctgacgg gcaglggca gctgtgttg 720
caggcggaga gggcttctc ctccaagtct tggatcacct ttgacctgaa gaacaaggaa 780
gtgtctgtaa aacgggttac ccaggacct aagctccaga tgggcaagaa gctcccgtc 840
caccicacc tgcctcaggc ctgcctcag tatgtggct ctggaaacct cacctggcc 900
cttgaagcga aaacaggaaa gttgcatcag gaagtgaacc tgggtgtgat gagagccact 960
cagctccaga aaaattgac ctgtgaggtg tggggacca cctcccctaa gctgatgtg 1020
agcttgaac tggagaacaa ggaggcaaag gtctcgaagc gggagaaggc ggtgtgggtg 1080
ctgaacctg aggcggggat gtggcagtgt ctgctgagtg actcgggaca ggtcctgtg 1140
gaatccaaca tcaagggtct gccacatgg tccaccccg tgcagcca 1188

[0072]

<210> 65

<211> 135

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 65

accacgaacg cagcgccgag accaccaaca ccggcgccca ccatcgctc gcagcccctg 60
tccctgcgcc cagagcggtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120
gaattgcct gtgat 135

<210> 66

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 66

atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggctc ttctctgtc actggtatc 60
acccttact gc 72

<210> 67

<211> 204

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 67

ttttgggtgc tgggtggtgt tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagt 60
gcccttatta tttctgggt gaggagtaag aggagcaggc tctgcacag tgactacatg 120

[0073] aacatgaact cccgcgcgcc cgggcccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca 180
cgggacttgc cagcctatcg ctcc 204

<210> 68

<211> 126

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 68

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttcag aagaagaaga aggaggatgt 120
gaactg 126

<210> 69

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 69

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
lataacgagc tcaatclagg acgaagagag gactacgatg ttllggaaa gagacgtggc 120
cgggaccttg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctgaggaagg cctgtacaat 180
gaactgcaga aagataagat ggccggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
tacgacgccc ttacatgca ggccctgccc cctcgc 336

<210> 70

<211> 1325

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 70

[0074]

cagagactgg tggaaagcgg tggaggcgtg gtgcagcctg gcagcagcct gagactgagc 60
tgcgccgctt ccgcttcga cttcagccgg caggcatgc attgggtgcg ccaggtcca 120
ggacagggac tggatgggt ggccctcacc aagtacgacg gcagcgagaa gtaccacgcc 180
gacagcgtgt ggggttagct gtctatcagc cgggacaaca gcaaggacac cctgtacctg 240
cagatgaaca gcctgcgggt ggaggacacc gccacatacl ttgcgtgcg ggaggctggt 300
ggacctgact accggaacgg ctacaactac tacgactct acgacggcta ctacaactac 360
cactacatgg atgtgtgggg caagggcacc accgtgaccg tgtctagcgg aggcggagga 420
tgtggggcgg gaggaagtgg aggcggcgga agccagtctg cctgaccca gctgctct 480
gtgtctgga gccctggcca gagcaccacc atcagctgca acggcaccag caacgacgtg 540
ggcggctacg agagcgtgtc ctggtatcag cagcaccgcg gcaaggcccc caaggtggtg 600
atctacgacg tctcaagag gccagcggc gtgagcaacc ggttcagcgg cagcaagagc 660
ggcaataacc ccagcctgac catctctggg ctgcaggccg aggacgagg cgactactac 720
tgcaagagcc tgaccagcac caggcggaga gtgttcggca ccggcaccaa gctgaccgtg 780
ctgaccacga cggcagcgc gcgaccacca acaccggcgc ccaccatgc gtgcagccc 840
ctgtccctgc gccagaggc gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtgca cagaggggg 900
ctggacttcg cctgtgatat ctacatctgg gcgccttgg ccgggacttg tgggtcctt 960
ctctgtac tggttatcac ccttactgc gactgaagt cagcaggagc gcagacgccc 1020
ccgcgtacaa gcaggccag aaccagctct ataagagct caatctagga cgaagagagg 1080
agtacgatgt ttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga aagccgagaa 1140

ggaagaacc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg gcggaggcct 1200
 acagtgaatg tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat ggcctttacc 1260
 agggctcag tacagccacc aaggacacct acgacgcctt tcacatgcag gccctgcccc 1320
 ctgc 1325

<210> 71

<211> 1328

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 71

[0075]

ggateccaga gcgccctgac acagcctct agcgcctctg gatctcccg ccagagcacc 60
 accatcagct gtaccggcac cagaacaac ttctgtctt ggtatcagca gcacgccggc 120
 aagccccca agctcgtgat ctacgacgtg aacaagcggc ccagcggcgt gccgataga 180
 ttacagcgga gcaagagcgg caacaccgcc agcctgacag tctctggcct gcagaccgat 240
 gacgagggcg tglactactg cggcagcctc ggggcaact gggacgtgat clttggcgga 300
 ggcaccaagc tgaccgtgct gggcggaagc agcagaagct ctagtcttg cggcgaggga 360
 agcggaggcg gaggacagcc tcagctgcag gaactggcc ccacactggt ggaagccagc 420
 gagacactga gccctgacctg tgcctgttc ggcgattcta ccgcgcctg caatagcttc 480
 tggggctggg tgcgccagcc tcttgaaaag ggactggaat ggggggaag cctgagccac 540
 tgcgccagct attggaaccg gggctggacc taccacaacc ccagcctgaa gtccagactg 600
 accctggccc tggacacccc caagaacctg gtgttctga agctgaacag cgtgacagcc 660
 gccgacaccg ccacctacta ctgtgccaga ttggcgggc aggtgtgctg gtacaccgac 720
 tggcctaaac ctgcctgggt ggacctgtgg ggcagaggaa cactcgtgac cgtgtctagc 780
 tccggaacca cgacgccagc gccgcgacca ccaacaccgg cgcaccat cgcgtgcag 840
 cccctgtccc tgcgccaga ggcgtgccgg ccagcggcgg gggggcagc gcacacgagg 900
 gggctggact tgcctgtga tatctacac tgggcgcct tggccgggac ttgtggggtc 960
 ctctctgt cactgggtat caccctttac tgcagtgaa gttcagcagg agcgcagacg 1020
 cccccgta caagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag 1080
 aggagtacga tgttttgac aagagacgtg gccgggacct tgagatgggg ggaaagccga 1140
 gaaggaagaa cctcaggaa ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcgagg 1200
 cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggcctt 1260
 accaggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc cttcacatg caggccctgc 1320
 cccctgc 1328

<210> 72

<211> 1283

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 72

ggatccgaga tcgtgctgac acagagccct ggcaccctga gcctgtctcc aggcgagaca 60
gccatcatca gctgccggac aagccagiac ggcagcctgg cctggtatca gcagagccct 120
ggacaggccc ccagacictgt gatctacage ggcagcaca gagccgccc aatccccgat 180
agattcagcg gctctagatg gggccctgac tacaacctga ccatcagcaa cctggaaage 240
ggcgacttcg gcgtgtacta ctgccagcag tacgagttct tcggccaggg caccaaggtg 300
caggtggaca tcaagagagg cggcagctcc agaagctcca gctctggcgg cggaggatct 360
ggcggaggcg gacaggtgca gctggtgcag tctggcgccc agatgaagaa acccggcgag 420
agcatgcgga tcagctgcag agcctccggc tacgagttca tcgactgcac cctgaactgg 480
attcggctgg cccctggcaa aagaccgag tggatgggct ggctgaagcc cagaggcggg 540
gccgtgaatt acgccagacc tctgcaggcg agagtacca tgaccgggga cgtgtacage 600
gataccgctt tcttgaact gcggagcctg accgtggatg ataccgccgt gtacttctgc 660
accgggggca agaactgca ctacaactgg gacttcgagc actggggcag aggcaccct 720
gtgactgtgt ctagctccgg aaccacgacg ccagcggcgc gaccaccaac accggcgccc 780
accatcgcgt cgcagccctt gtccctgcgc ccagaggcgt gccggccagc ggcggggggc 840
gcagtgcaca cgagggggct ggacttcgcc tgtgatatct acatctgggc gcccttggcc 900
gggacttgtg gggctcttct cctgtcactg gttatcacc ttacttgcga gtgaagtca 960
gcaggagcgc agacgcccc gcgtacaagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca 1020
atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gacctgaga 1080
tggggggaaa gccgagaagg aagaacctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag 1140
ataagatggc ggaggcctac agtgagattg gcatgaaagg cgagcgccgg aggggcaagg 1200
ggcacgatgg ccttlaccag ggtctcagta cagccacca ggacacctac gacgccctc 1260
acatgcaggc cctgccccct cgc 1283

<210> 73

<211> 1262

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0076]

<223> 人工合成的

<400> 73

gacatccaga tgacccagag cccacagcage ctgtctgcca gagtgggcca caccgtgacc 60
atcacctgtc aggccaaagg clacctgaac lgglatcage ageggagagg caaggccccc 120
aagctgtctga tctacgacgg cagcaagctg gaaagaggcg tgcccggcag attcagcggc 180
agaagatggg gccaggagta caacctgacc atcaacaacc tgcagcccca ggacgtggcc 240
acatacttt gccaggtgta cgagttcacc gtgcccggca cccggctgga tctgaagggc 300
ggaagcagca gaagcagctc tagcggcgga ggcggatctg gcggaggggg acaggtgcac 360
ctgagtcagt ctggcgccgc tgtgacaaag ccaggcgctt ctgtcggggt gtctgtgaa 420
gccagcggt acaagatcag cgaccacttc atccactggt ggcggcaggc tccaggacag 480
ggactgcagt ggggtgggatg gatcaacccc aagaccggcc ageccaacaa cccagacag 540
ttccaggga gagtgtccct gaccagacag gccagctggg acttcgacac ctacagcttc 600
tacctggacc tgaaggccgt ggcgagcgac gacaccgcca tctactttg cggcagacag 660
agaagcgact tctgggattt cgacgtgtgg ggcagcggca cccaagtac cgtgtcatct 720
accacgacgc cagcgcccg accaccaaca ccggcgccca ccatcgctc gcagccctg 780
tccctgcgc cagaggcggt cgggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 840
gacttcgct gtgatatcta catctggcg ccttgggcg ggacttggt ggtecttctc 900
ctgtcactgg ttatcacctt ttactcgag tgaagtcag caggagcgca gacgccccg 960
cgtacaagca gggccagaac cagctctata acgagctcaa tctaggacga agagaggagt 1020
acgatgttt ggacaagaga cgtggccggg acctgagat ggggggaaag ccgagaagga 1080
agaacctca ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg gaggcctaca 1140
gtgagattgg gatgaaaggc gagcgccgga ggggcaaggg gcacgatggc ctttaccagg 1200
gtctcagtac agccaccaag gacacctacg acgcccctca catgcaggcc ctgccccctc 1260
gc 1262

[0077]

<210> 74

<211> 1355

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 74

gacttcgtgc tgacccagag ccttcacage ctgagcgtga cacctggcga gagcgccage 60
atcagctgca agagcagcca ctccctgac cagggcgacc ggaacaacta cctggcttgg 120
tacgtgcaga agcccggcag atccccccag ctctgatct acctggccag cagcagagcc 180

agcggcgtgc ccgatagatt ttctggcagc ggcagcgaca aggacttcac cctgaagatc 240
 agccgggtgg aaaccgagga cgtgggcacc tactactgta tgcagggcag agagagcccc 300
 tggacctttg gccagggcac caaggtggac atcaagggcg gcagctccag aagcagctct 360
 agcggaggcg gaggatctgg cggcggagga caggtcagc tggtcagtc tggacccgaa 420
 gtgcggaagc ctggcaccag cgtgaagggt tcctgtaaag cccctggcaa cacctgaaa 480
 acctacgacc tgcactgggt gcgcagcgtg ccaggacagg gactgcagtc gatgggctgg 540
 atcagccacg agggcgacaa gaaagtatc gtggaacgt tcaaggccaa agtgaccatc 600
 gactgggaca gaagcaccaa caccgcctac ctgcagctga gcggcctgac ctctggcgat 660
 accgccgtgt actactgcgc caagggcagc aagcaccggc tgagagacta cggcctgtac 720
 gacgatgacg gcgccctgaa ctgggcccgtg gatgtggact acctgagcaa cctggaattc 780
 lggggccagg gaaccgccgt gaccgtgca lclaccacga cggcagcgcc gcgaccacca 840
 acaccggcgc ccaccatgc gtgcagccc ctgtccctgc gccagaggc gtgcccggca 900
 gcggcggggg gcgcagtgca cagcggggg ctggacttcg cctgtgatat ctacatctgg 960
 gcgcccttgg ccgggacttg tgggttcctt ctctgtcac tggttatcac cctttactgc 1020
 gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgccc ccgcgtacaa gcagggccag aaccagctct 1080
 ataacgagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt ttggacaag agacgtggcc 1140
 gggaccctga gatgggggga aagccgagaa ggaagaacc tcagggaaggc ctgtacaatg 1200
 [0078] aactgcagaa agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc 1260
 ggagggggcaa ggggcacgat ggcctttacc aggggtctag tacagccacc aaggacacct 1320
 acgacgccct tcacatgcag gccctgcccc ctgc 1355
 <210> 75
 <211> 783
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工合成的
 <400> 75
 cagagactgg tggaaagcgg tggaggcgtg gtgcagcctg gcagcagcct gagactgagc 60
 tgcgccgctt ccggtctga ctacagccgg cagggcatgc attgggtgcg ccaggctcca 120
 ggacagggac tggaatgggt gcccttcac aagtacgacg gcagcgagaa gtaccacgcc 180
 gacagcgtgt ggggtagact gtctatcagc cgggacaaca gcaaggacac cctgtacctg 240
 cagatgaaca gcctgcgggt ggaggacacc gccacatact ttgcgtgcg ggaggctggt 300
 ggacctgact accggaacgg ctacaactac tacgacttct acgacggcta ctacaactac 360
 cactacatgg atgtgtgggg caagggcacc accgtgaccg tgtctagcgg aggcggagga 420

lctggcgggcg gaggaagtgg aggcggcgga agccagtcg ccctgacceca gccctgectct 480
gtgtctggca gccctggcca gagcatcacc atcagctgca acggcaccag caacgacgtg 540
ggcggtacg agagcgtgtc ctggtatcag cagcaccocg gcaaggcccc caaggtggtg 600
atctacgacg tgccaagag gccagcggc gtgagcaacc ggctcagcgg cagcaagagc 660
ggcaataccg ccagcctgac catctctggg ctgcaggccg aggacgaggg cgactactac 720
tgcaagagcc tgaccagcac caggcggaga gtgttcggca ccggcaccaa gctgaccgtg 780
ctg 783

<210> 76

<211> 786

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 76

[0079]

ggatcccaga ggccttgac acagcctct agcgcctctg gatctcccg ccagagcacc 60
accatcagct glaccggcac cagcaacaac ttctgtctct ggtatcagca gcacgcggcg 120
aaggccccca agctcgtgat ctacgacgtg aacaagcggc ccagcggcgt gccgataga 180
ttcagcggca gcaagagcgg caacaccgcc agcctgacag tgtctggcct gcagaccgat 240
gacgagggcg tgtactactg cggcagcctc gtgggcaact gggacgtgat ctttggcgga 300
ggcaccaage tgaccgtgct gggcggaagc agcagaagct ctagtctgg cggcgaggga 360
agcggaggcg gaggacagcc tcagctgcag gaatctggcc ccacactggt ggaagccagc 420
gagacactga gcctgacctg tgccgtgtcc ggcgattcta ccgcgcctg caatagcttc 480
tggggctggg tgcgccagcc tcttggaag ggactggaat gggcgggaag cctgagccac 540
tgcgccagct attggaaccg gggtggacc taccacaacc ccagcctgaa gtccagactg 600
accctggccc tggacacccc caagaacctg gtgttctga agctgaacag cgtgacagcc 660
gccgacaccg ccacctacta ctgtgccaga ttggcgggc aggtgtctcg gtacaccgac 720
tggcctaaac ctgcctgggt ggacctgtgg ggcagaggaa cactcgtgac cgtgtctagc 780
tccgga 786

<210> 77

<211> 741

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 77

ggatccgaga tcgtgctgac acagagccct ggcacccctga gcctgtctcc aggcgagaca 60
gccatcatca gctgccggac aagccagtac ggcagcctgg cctggtatca gcagaggcct 120
ggacaggccc ccagactcgt gatctacagc ggcagcaca gagccgccgg aatccccgat 180
agattcagcg gctctagatg gggccctgac tacaacctga ccacagcaa cctggaaage 240
ggcgacttcg gcgtgtacta ctgccagcag tacgagttct tcggccaggg caccaagggtg 300
caggtggaca tcaagagagg cggcagctcc agaagctcca gctctggcgg cggaggatct 360
ggcggaggcg gacagggtca gctggtgcag tctggcggcc agatgaagaa acccggcgag 420
agcatgcgga tcagctgcag agcctccggc tacgagttca tcgactgcac cctgaactgg 480
attcggctgg cccctggcaa aagacccgag tggatgggct ggctgaagcc cagaggcgga 540
gccgtgaatt acgccagacc tctgcagggc agagtgacca tgacccggga cgtgtacagc 600
galaccgctt tcttggaaat gcggagcctg accgtggatg ataccgccgt gtacttctgc 660
accgggggca agaactgcga ctacaactgg gacttcagc actggggcag aggcaccct 720
gtgatcgtgt ctagctccgg a 741

<210> 78

<211> 720

<212> DNA

[0080]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 78

gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgtctgcca gagtgggcca caccgtgacc 60
atcacctgtc aggccaacgg ctacctgaac tggatcagc agcggagagg caaggcccc 120
aagctgtga tctacagcg cagcaagctg gaaagaggcg tgcccgcag attcagcggc 180
agaagalggg gccaggagta caacctgacc atcaacaacc tgcagcccga ggacgtggcc 240
acatactttt gccaggtgta cgagttcctc gtgcccgga cccggctgga tctgaaggcg 300
ggaagcagca gaagcagctc tagcggcgga ggcggatctg gcggaggggg acagggtcac 360
ctgagtcagt ctggcgccgc tctgacaaag ccaggcgctt ctgtcgggt gtcctgtgaa 420
gccagcggct acaagatcag cgaccacttc atccactggt ggcggcagcg tccaggacag 480
ggactgcagt ggggtgggatg gatcaacccc aagaccggcc agcccaacaa cccagacag 540
ttccagggca gagtgtccct gaccagacag gccagctggg acttcgacac ctacagcttc 600
tacatggacc tgaaggccgt gcggagcgac gacaccgcca tctacttttg cgcagacag 660
agaagcgact tctgggattt cgacgtgtgg ggcagcggca cccaagtac cgtgtcatct 720
<210> 79

<211> 813

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 79

gacttcgtgc tgaccagag cctcacagc ctgagcgtga cacctggcga gagcgccage 60
atcagctgca agagcagcca ctccctgac cagggcgacc ggaacaacta cctggcttgg 120
tacgtgcaga agcecggcag atccccccag ctgtgatct acctggccag cagcagagcc 180
agcggcgtgc ccgatagatt ttctggcagc ggcagcgaca aggacttcac cctgaagatc 240
agcegggttg aaaccgagga cgtgggcacc tactactgta tgcagggcag agagagcccc 300
tggaccttg gccagggcac caaggtggac atcaagggcg gcagctccag aagcagctct 360
agcggaggcg gaggatctgg cggcggagga caggctcagc tggtcagtc tggaccgaa 420
gtgcggaagc ctgcaccag cgtgaagggt tctgttaaag cccctggcaa caccctgaaa 480
acctacgacc tgcactgggt gcgcagcgtg ccaggacagg gactgcagtg gatgggctgg 540
atcagccacg agggcgacaa gaaagtgatc gtggaacggt tcaaggccaa agtgaccatc 600
[0081] gactgggaca gaagcacaa caccgcctac ctgcagctga gcggcctgac ctctggcgat 660
accgccgtgt actactgcgc caagggcagc aagcaccggc tgagagacta cggcctgtac 720
gacgatgacg gcgccctgaa ctgggccgtg gatgtggact acctgagcaa cctggaattc 780
tggggccagg gaaccgccgt gaccgtgtca tct 813

<210> 80

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的

<400> 80

ctgtgttca aggtccttgt ctgc 24

<210> 81

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的
<400> 81
ctctgtctcc ttctacagcc aagc 24
<210> 82
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<220>
<221> 不能用任何其它的特征关键词表述的具有生物学意义的区域;新的或少见的特征
[0082] <222> (21)..(25)
<223> n 是 a、c、g、或 t
<400> 82
acacgacgct ctccgatct nnnnngccag gttgagcagg tagatg 46
<210> 83
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工合成的
<400> 83
gacgtgtgct ctccgatct gctctactca ctggtgttca tcttt 45

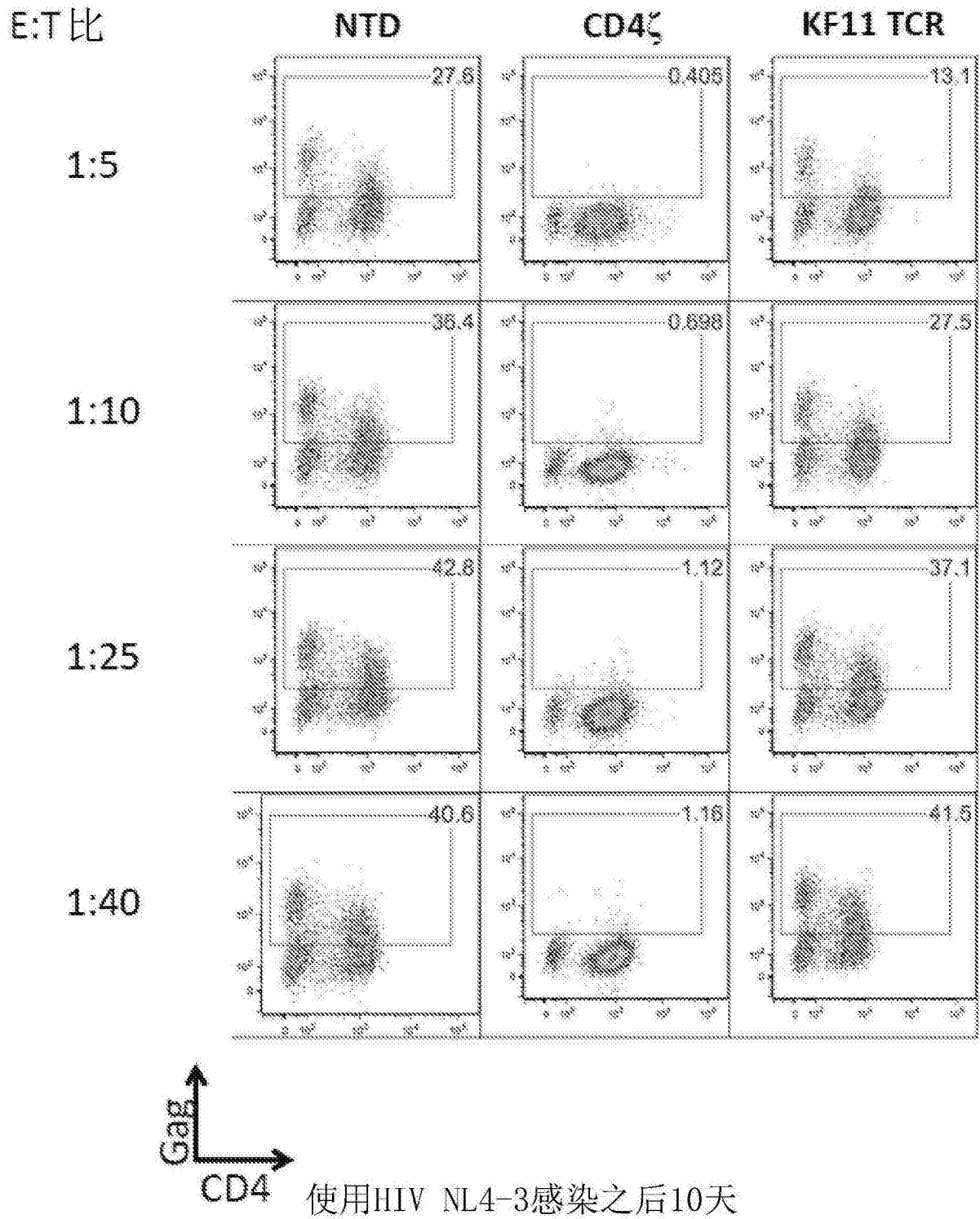
CD4膜结合嵌合受体比TCR更好地控制HIV复制

图1A

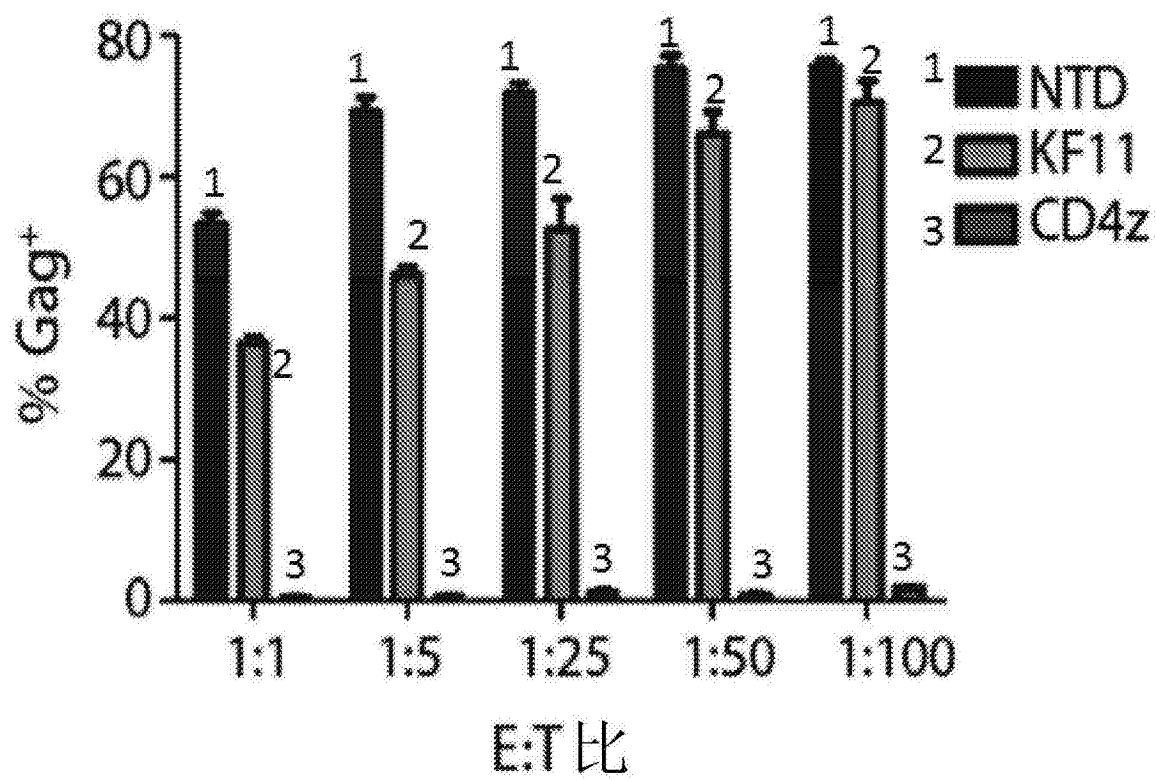


图1B

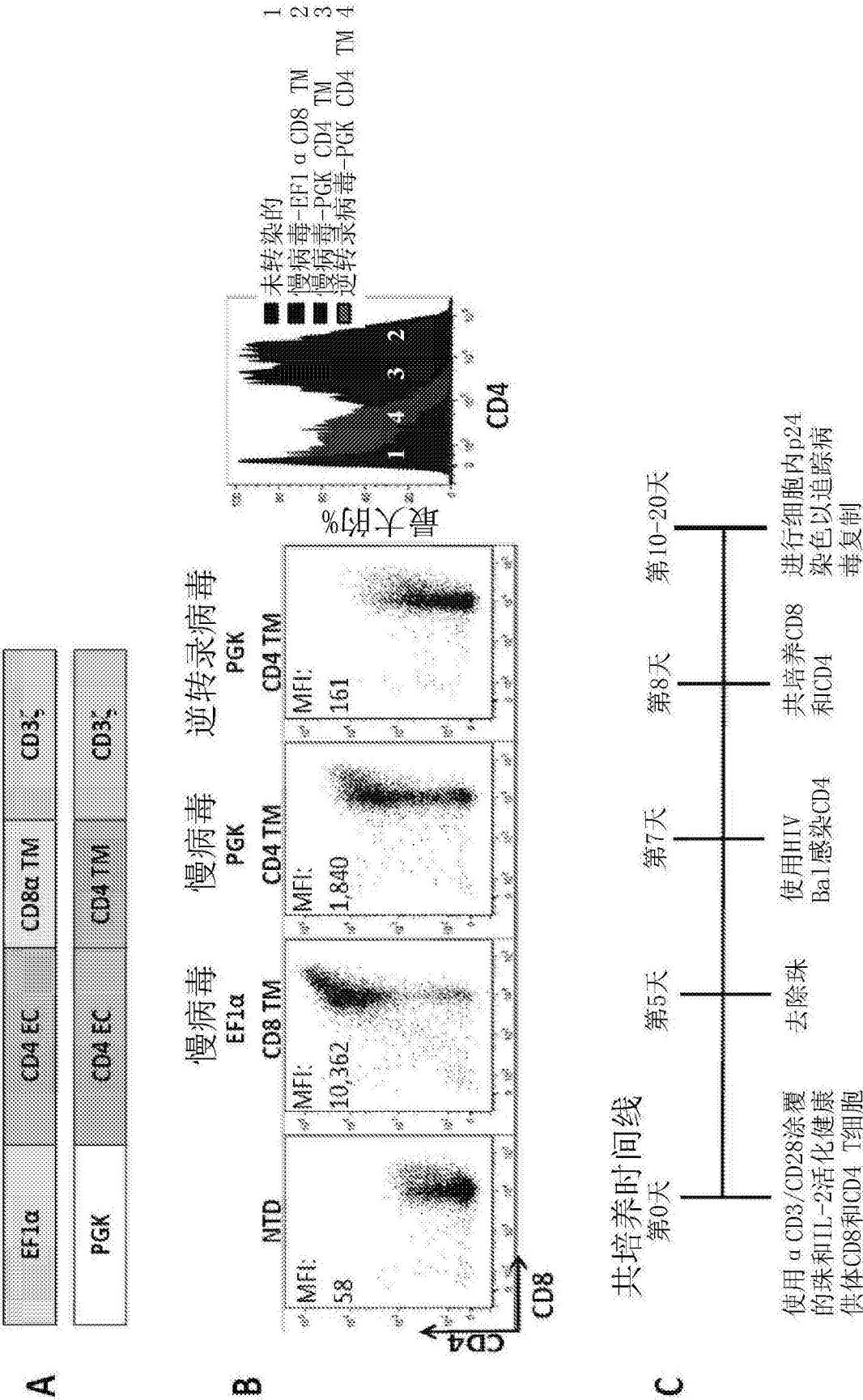


图2A-2C

具有改进的活性的载体构建

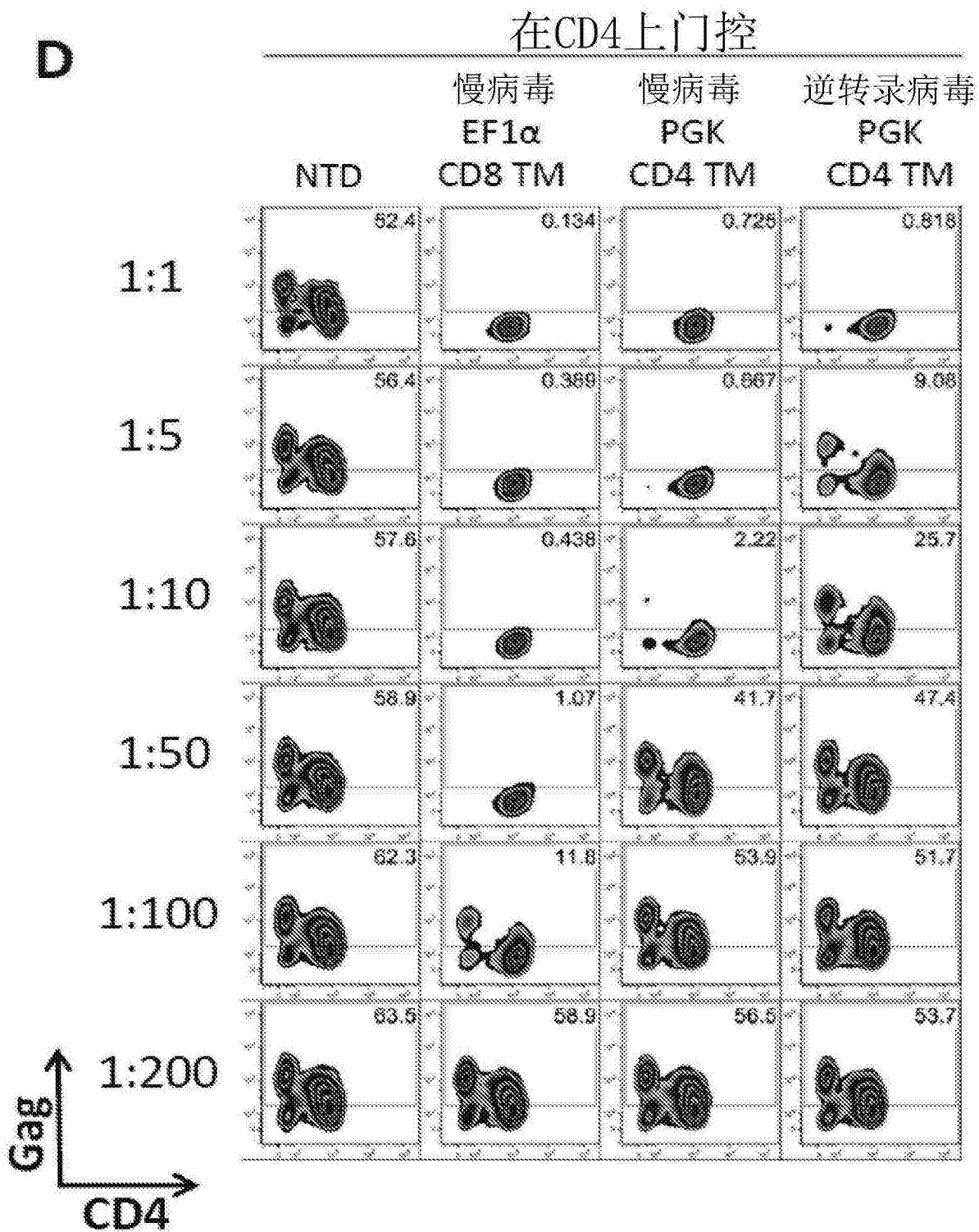
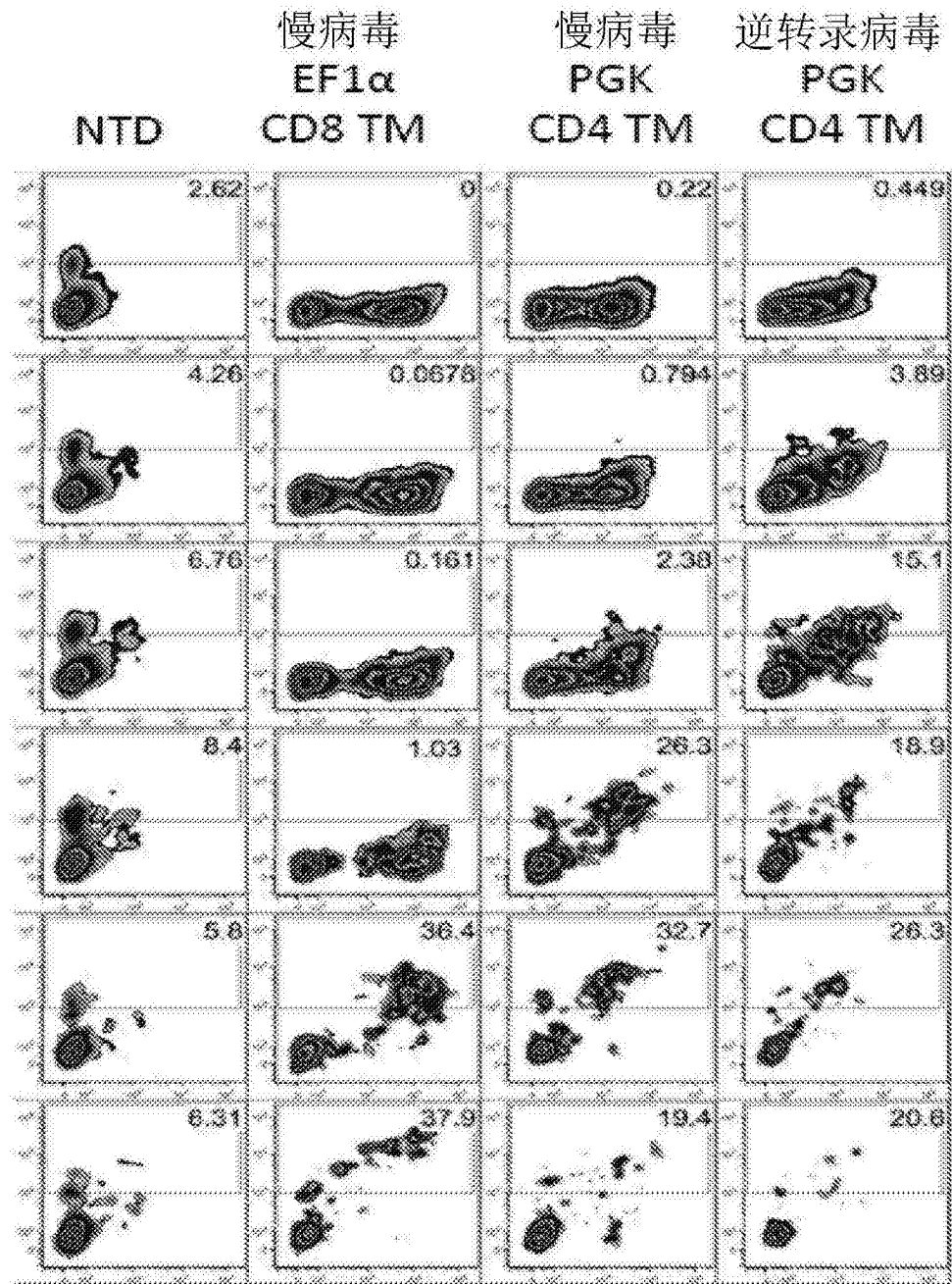


图2D

E

在CD8上门控



Gag
CD4

图2E

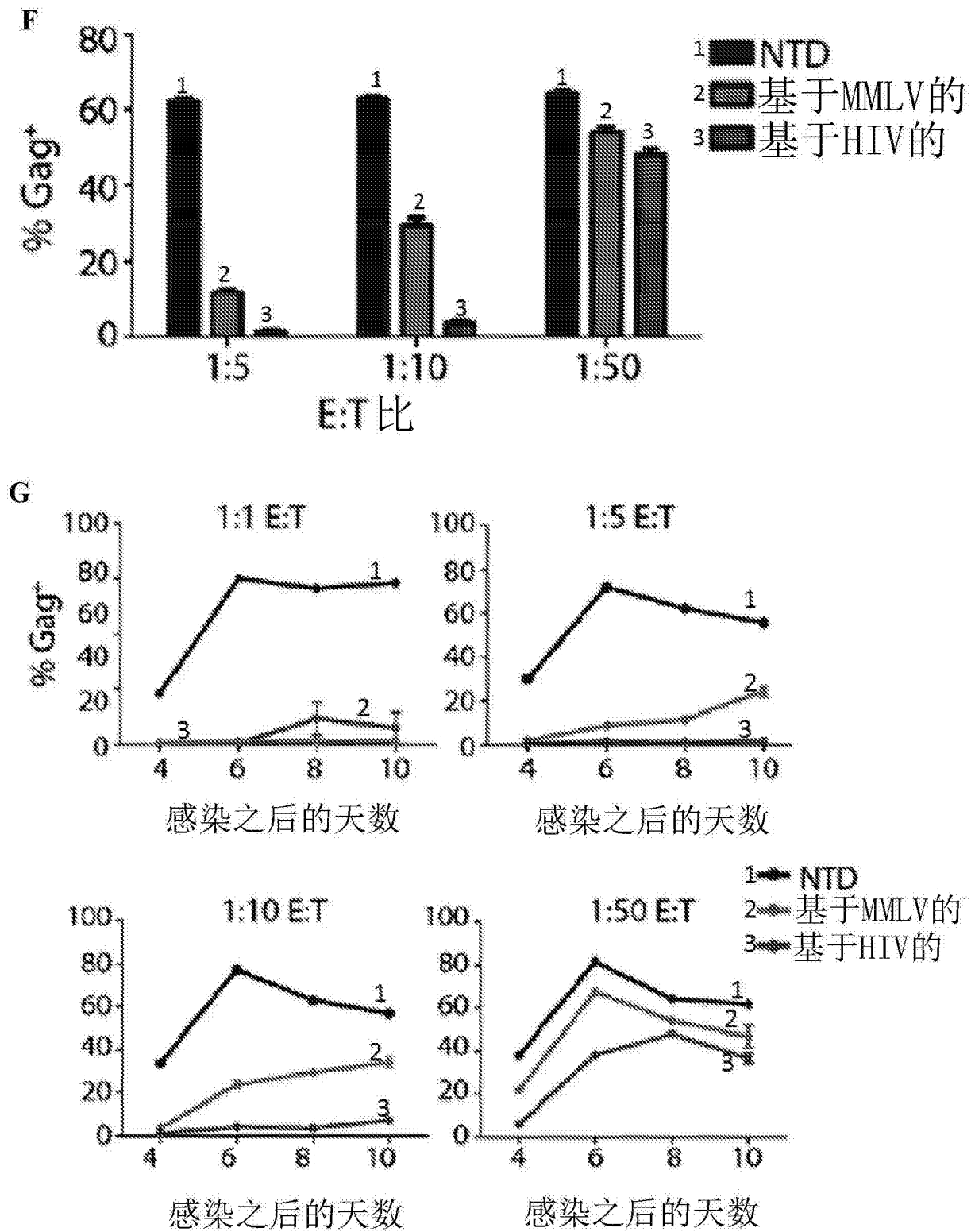


图2F-2G

EF1 α 启动子和CD8 α TM改进对HIV的控制**A**

PGK	CD4 EC	CD4 TM	CD3 ζ
PGK	CD4 EC	CD8 α TM	CD3 ζ
EF1 α	CD4 EC	CD4 TM	CD3 ζ
EF1 α	CD4 EC	CD8 α TM	CD3 ζ

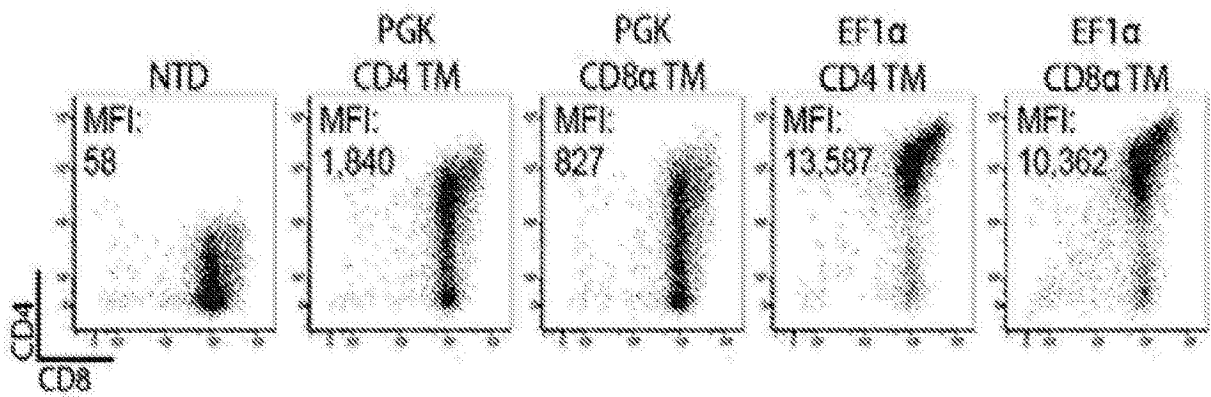
B

图3A-3B

EF1 α 启动子和CD8 α TM改进对HIV的控制并且减少使用膜结合嵌合受体改造的T细胞的感染

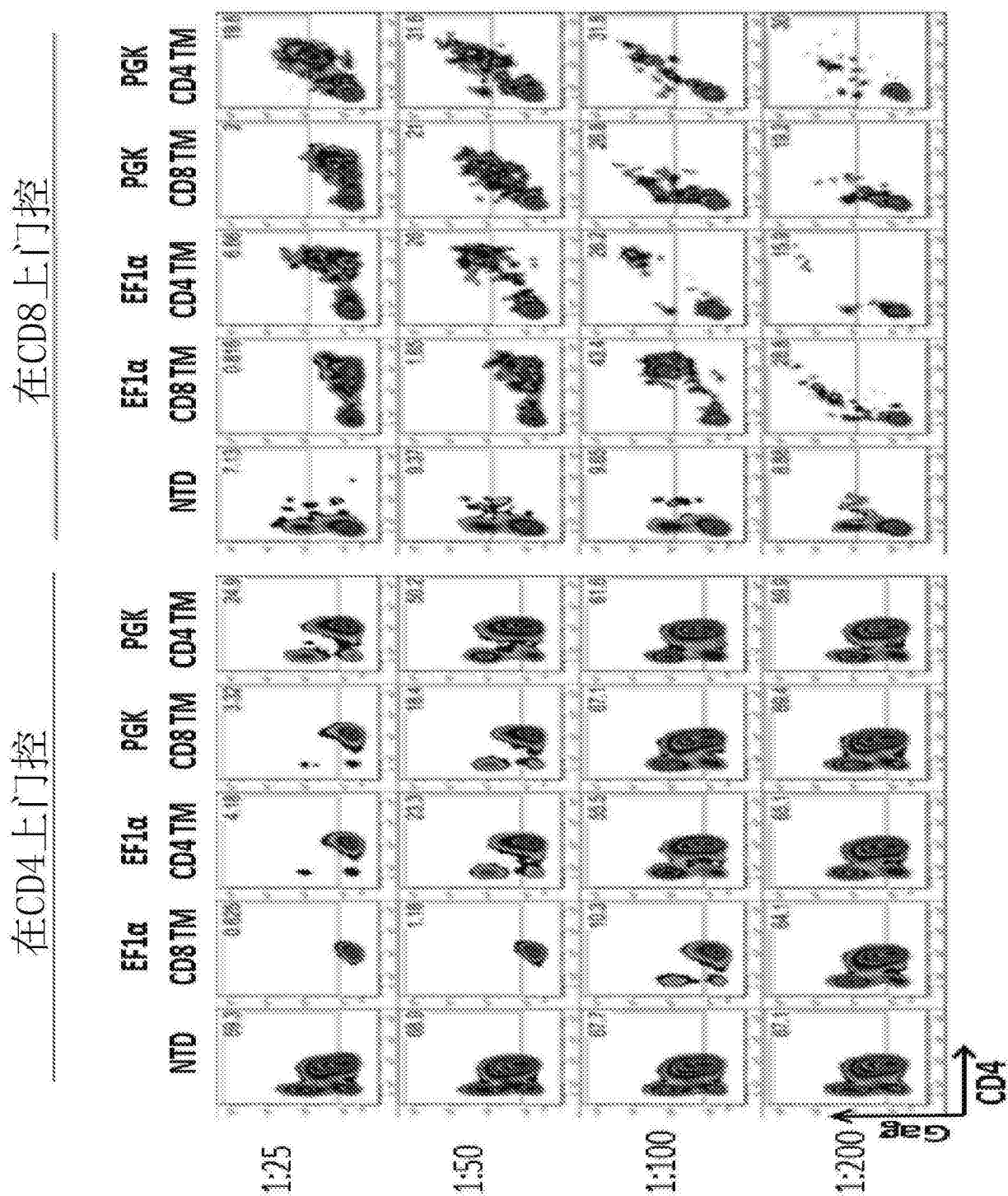


图3C

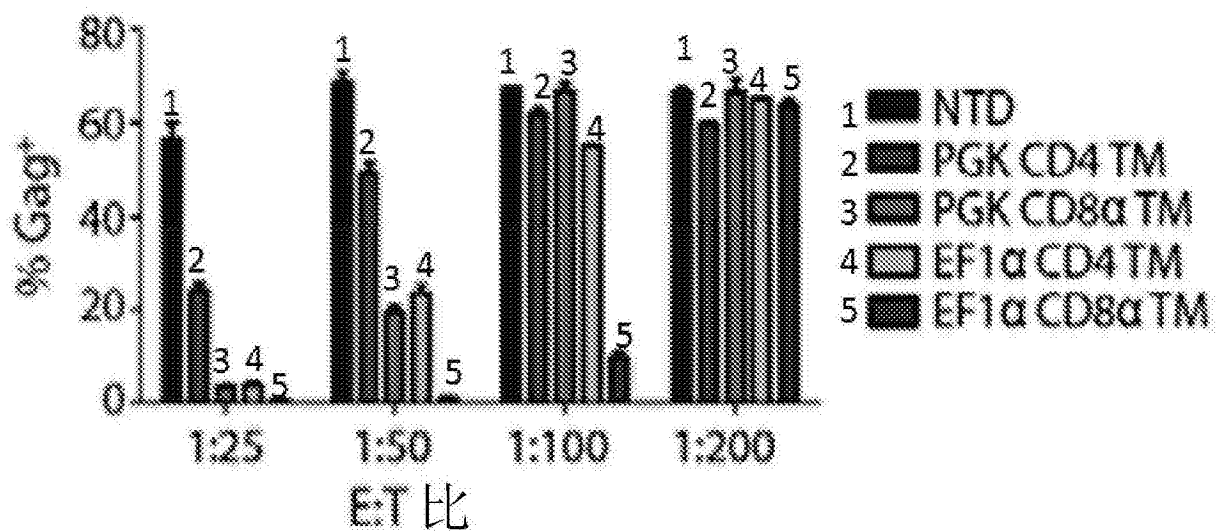
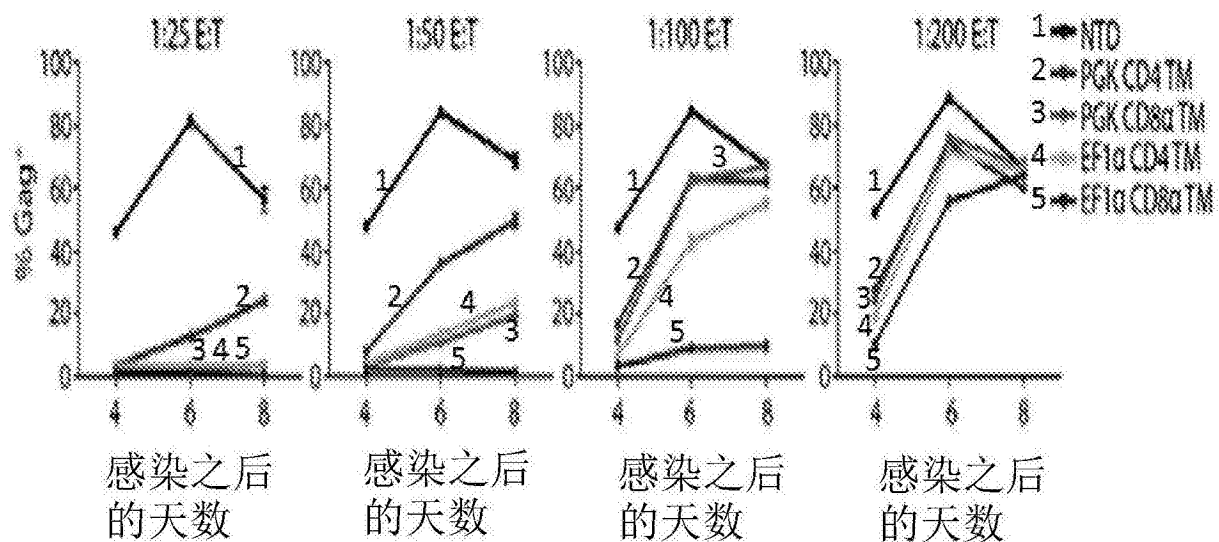
D**E**

图3D-3E

scFv可以阻止改造的T细胞对HIV-1的易感性

ScFv	表位
VRC01	CD4结合位点
PG9	V1/V2茎
3BNC60	CD4bs (VRC01衍生物)
PGT128	N332聚糖 -V3环
PDGM1400	V1/V2中的三聚体顶端N160聚糖

scFv CAR杀伤Env靶标以及CD4膜结合嵌合受体

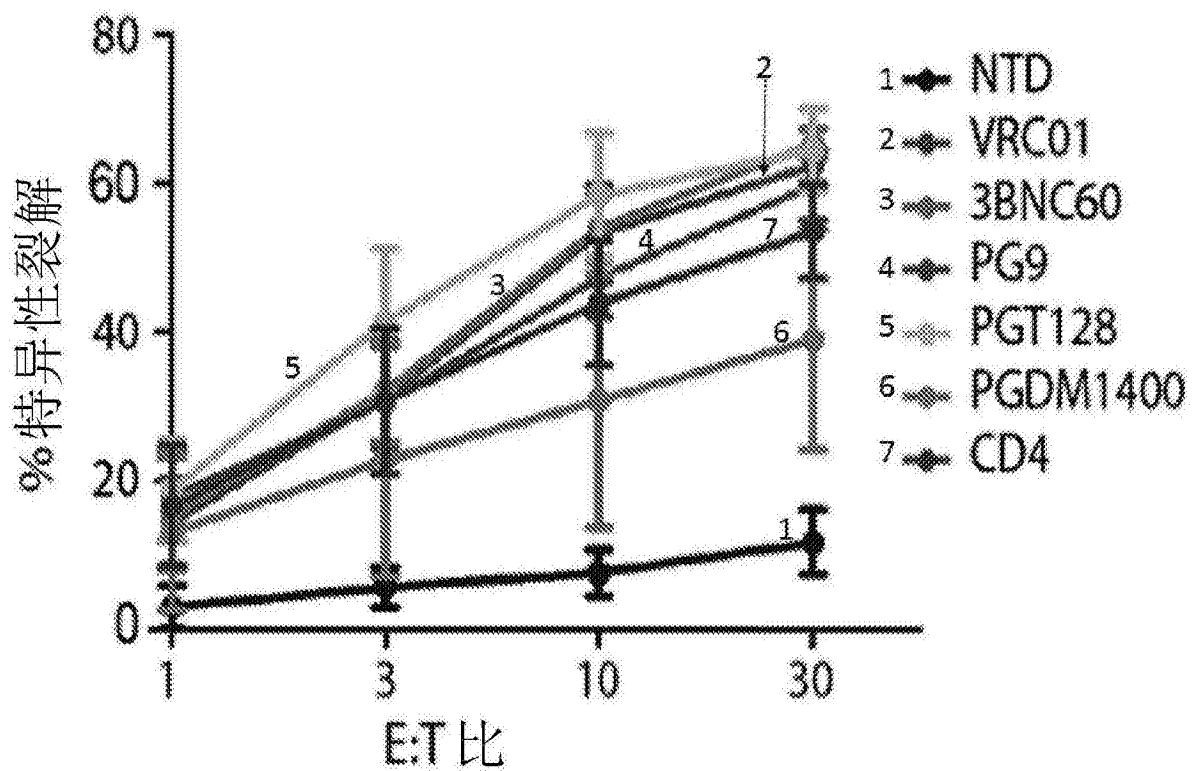


图4A

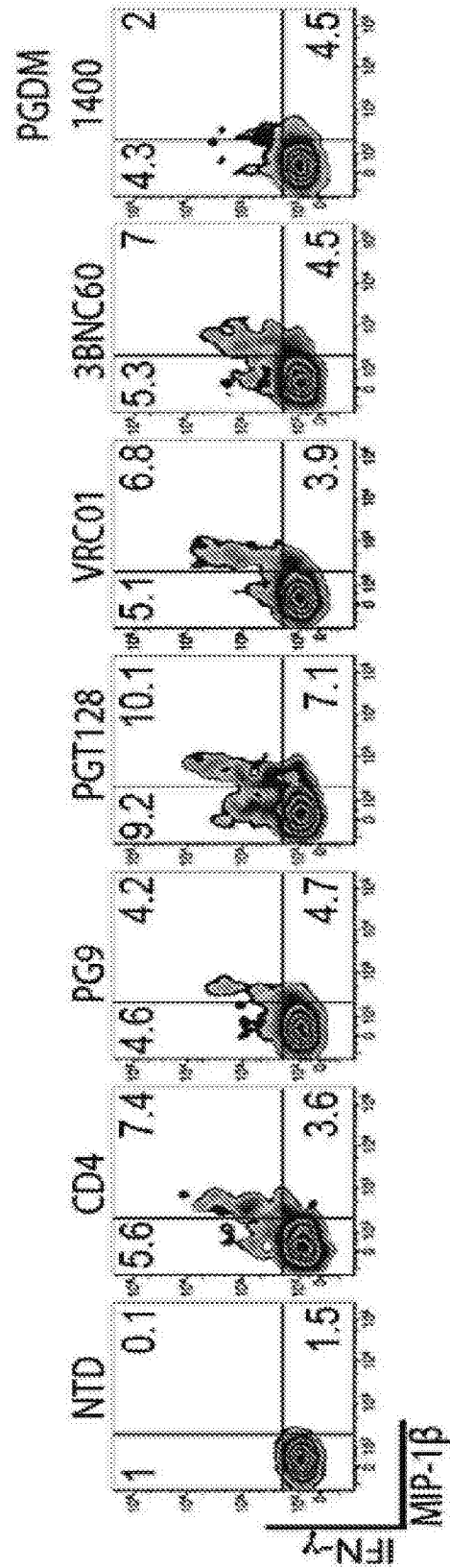


图4B

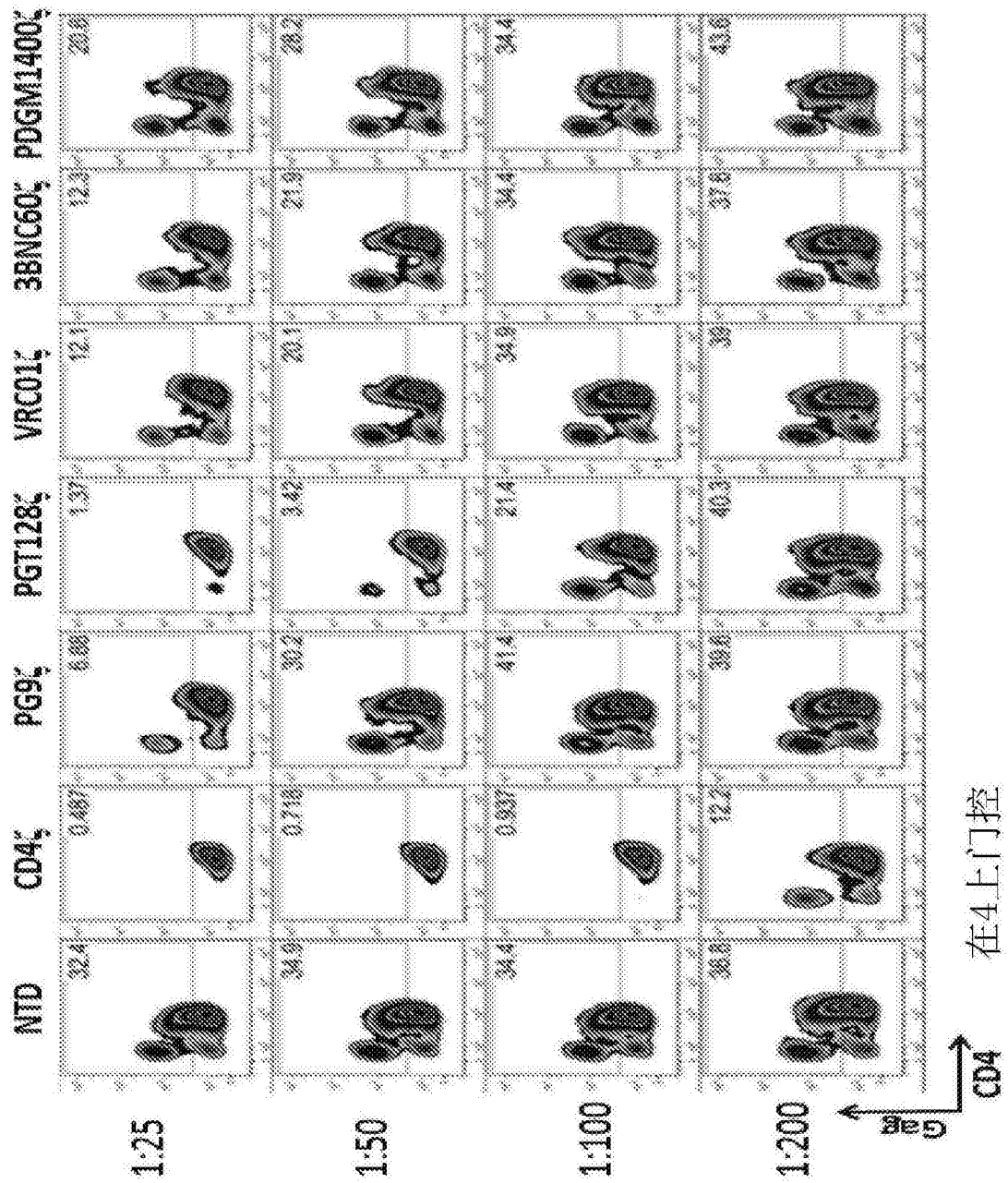


图4C

CD28共刺激辅助控制HIV-1复制

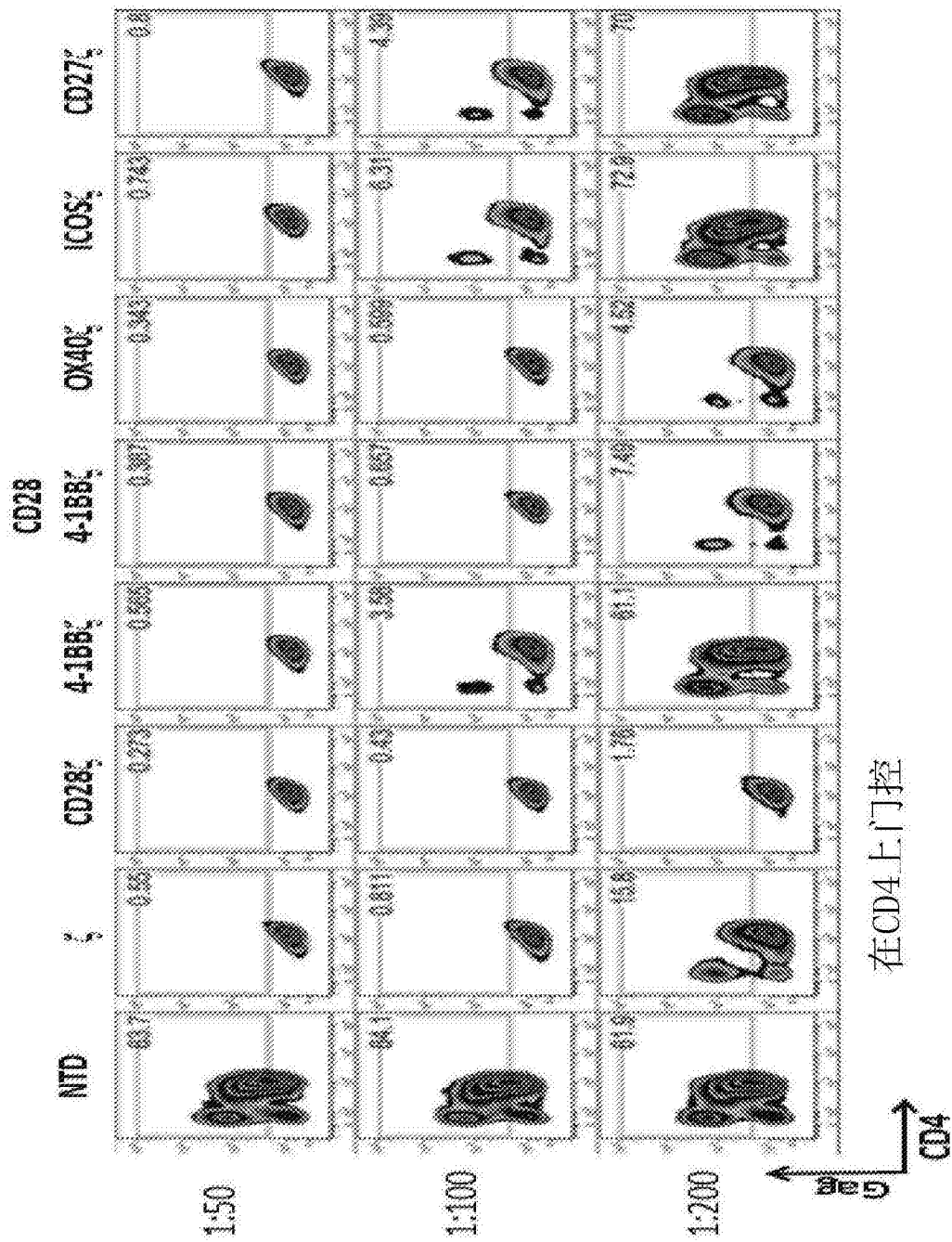


图5A

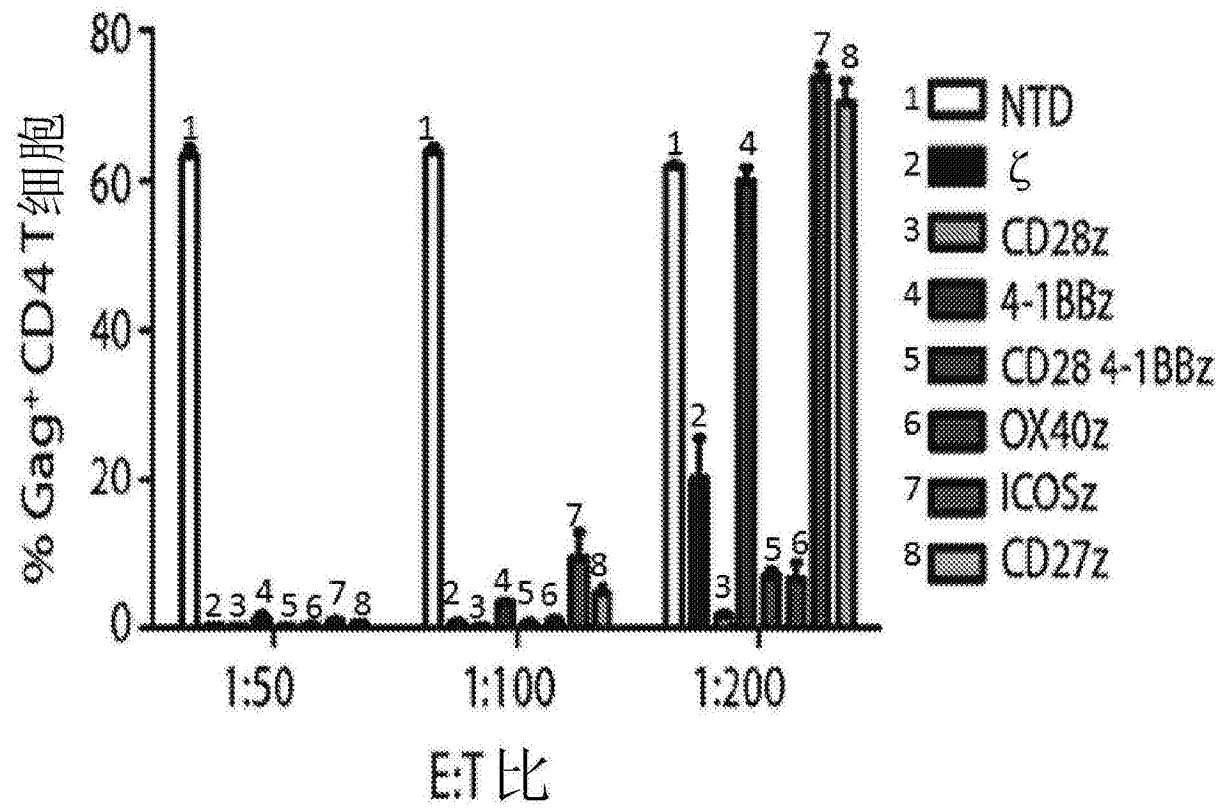


图5B

CD4 ζ 注释的序列 (全载体SEQ ID NO:1)下划线 = EF1 α 启动子

浅灰色 = CD4 细胞外结构域

深灰色 = CD8 α 细胞外链粗体 = CD8 α 跨膜结构域虚线 = CD3 ζ

CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGCGCAATT
 GAACCGGTGCTTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCTTTTCCCGAGGGTGG
 GGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCG
 TGTGTGGTTCGCGCGGGCTGGCCTCTTACGGGTATGGCCCTGCGTGCCTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGA
 TTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGCTTGA
 GTTGAGGCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCTGTCTCGTGCTTTCGATAAGTC
 TCTAGCCATTTAAATTTTATGATGACCTGCTGCGACGCTTTTCTGGAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCAC
 ACTGGTATTTTCGTTTTTGGGGCCGCGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCAGGCGGGGCTGC
 GAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGGTGAT
 CGCCCCGCTGGGCGCAAGGCTGGCCGGTGGCACCAGTTGCGTGAGCGAAAGATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTGCA
 GGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCC
 TCAGCCGTGCTTATGTGACTCCACTGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGTGCTTTTGGAGTACGTG
 TCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGC
 ACTTGATGTAATTTCTCTTGAATTTGCCCTTTTGGATTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT
 TTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGAGTAGCTCTAGAGCCACCATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCTGCCGCTGGCCTGCT
 TGCTCCACGCCGCCAGGCCGGGATCCATGAACCGGGAGTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCGCTCTCC
 CAGCAGCCACTCAGGGAAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAAAAGGGGATACAGTGGAAGTGAAGTGTACAGCTTCCAGAGA
 AGAGCATACAATTCAGTGGAAAACTCCAACAGATAAAGATTCTGGGAAATCAGGGCTCCTTCTTAAGTAAAGGTCCATCCA
 AGCTGAATGATCGCGTGACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAACTTCCCTCTGATCATCAAGAATCTTAAGATAGAA
 GACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGAGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAATTGCTAGTGTTCGGATTGACTGCCAACTCTG
 ACACCCACCTGCTTCAGGGGCGAGGCTGACCTGACCTTGGAGAGCCCCCTGGTAGTAGCCCTCAGTGCAATGTAGGAGT
 CCAAGGGGTAAAAACATACAGGGGGGAAGACCTCTCCGTGCTCAGCTGGAGCTCCAGGATAGTGGCACCTGGACATGCA
 CTGCTTGCAGAACCAAGAAGGTGGAGTTCAAAATAGACATCGTGGTGCTAGCTTCCAGAAGGCCCTCCAGCATAGTCTAT
 AAGAAAGAGGGGGAACAGGTGGAGTTCTCTTCCACTCGCTTTACAGTTGAAAAGCTGACGGGCAGTGGCGAGCTGTGGT
 GGCAGGCGGAGAGGGCTTCTCTCAAGTCTTGGATCACCTTGACCTGAAGAACAAGGAAGTGTCTGTAAAACGGGTACC
 CAGGACCCTAAGCTCCAGATGGGCAAGAAGTCCCCGCTCCACCTCACCTGCCCCAGGCCTTGCTCAGTATGCTGGCTCTGGA
 AACCTCACCTGGCCCTTGAAGCGAAAACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAACCTGGTGGTGATGAGAGCCACTCAGCTCC
 AGAAAAATTTGACCTGTGAGGTGTGGGACCCACCTCCCTAAGCTGATGCTGAGCTTGAACTGGAGAACAAGGAGGCAAA
 GGTCTCGAAGCGGGAGAAGGCGGTGTGGGTGCTGAACCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAGTGACTCGGGACA
 GGTCTGCTGGAATCCAACATCAAGTTCTGCCACATGGTCCACCCGGTGCAGCCATCCGGAACCAAGGCTCAGCGCGG
 GACCAACAAACCGCGCTCACCCTGCTGCGAGCCCTGCTCTGCGCTCAGAGGCTGCGCGGCAAGCGGGGGGGGGGG
 AGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGTCTTCTCTGT
 CACTGGTTATCACCTTTACTGCAGAGTGAAGTTAGCAGGAGCGCAGACSCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACAGCT
 CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGG
 AAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCTTACAGTGAGAT
 TGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
 CGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

图6 (部分1/2)

EF1 α 启动子 (SEQ ID NO: 2)

CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGGCAATT
GAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGG
GGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGGCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCG
TGTGTGGTTCGCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGA
TTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTGAGGCTTGGCGTTAAGGAGCCCCCTCGCCTCGTCTTGA
GTTGAGGCTGGCCTGGGCGCTGGGCGCGCGCTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTC
TCTAGCCATTTAAAAATTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCAC
ACTGGTATTTTGGTTTTTGGGGCGCGGGCGCGCAGCGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTGCGCGAGGCGGGGCTGC
GAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGCTGTAT
CGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCA
GGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCC
TCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCAAGTACCAGGCGCGCTCCAGGACCTCGATTAGTTCTCGTCTTTCGAGTACGTG
TCTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGC
ACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTGGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTT
TTCTTCCATTTAGGTGTCGTGA

CD4 细胞外结构域 (SEQ ID NO: 3)

ATGAACCGGGGAGTCCCTTTAGGCACCTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCGCTCCTCCAGCAGCCACTCAGGGAAAGAAAGT
GGTGTGGGCAAAAAGGGGATACAGTGGAAGTACCTGTACAGCTTCCAGAAAGAGCATACAATTCCTGGAAGAAAC
TCCAACAGATAAAGATTCTGGGAAATCAGGGCTCCTCTTAAGTAAAGGTCCATCCAAGCTGAATGATCGCGCTGACTCAAG
AAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAAACTTCCCCCTGATCATCAAGAATCTTAAGATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGT
GGAGGACCAAGAAGGAGGAGGTGCAATTGCTAGTGTTGCGATTGACTGCCAAGTCTGACACCCACCTGCTTCAGGGGCAGAGC
CTGACCTGACCTTGGAGAGCCCCCTGGTAGTACCCCTCAGTGCAATGTAGGAGTCCAAGGGGTAAAAACATACAGGGGG
GGAAGACCTCTCCGTGTCTCAGCTGGAGCTCCAGGATAGTGGCACCTGGACATGCACTGTCTTGCAAGCAGAAAGAGGT
GGAGTTCAAAATAGACATCGTGGTGCTAGCTTTCCAGAAGCCTCCAGCATAGTCTATAAGAAAAGAGGGGGAAACAGGTGGAG
TTCTCTTCCCACTCGCCTTTACAGTTGAAAAGCTGACGGGCAGTGGCGAGCTGTGGTGGCAGGCGGAGAGGGCTTCTCTCTC
CAAGTCTTGATCACCTTTGACCTGAAGAACAAGGAAGTGCTGTAAACGGGTACCCAGGACCTAAGCTCCAGATGGGCA
AGAAGTCCCGCTCCACCTCACCTGCCCCAGGCCTTGCCTCAGTATGCTGGCTCTGGAACCTCACCTGGCCCTGAAGCGA
AAACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAACCTGGTGGTGATGAGAGCCACTCAGCTCCAGAAAAATTTGACCTGTGAGGTGTG
GGGACCCACCTCCCTAAGCTGATGCTGAGCTTGAACTGGAGAACAAGGAGGCAAGGTCTCGAAGCGGGAGAAGGCGGT
GTGGTGCTGAACCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAGTGACTCGGGACAGGTCTGCTGGAATCCAACATCAAG
GTTCTGCCACATGGTCCACCCCGGTGCAGCCA

CD8 α 细胞外铰链 (SEQ ID NO: 4)

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCG
GCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGACACAGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGAT

CD8 α 跨膜结构域 (SEQ ID NO: 5)

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGC

CD3 ζ (SEQ ID NO: 6)

AGAGTGAAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGAC
GAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCT
CAGGAAGGCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG
AGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGCTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC
TGCCCCCTCGCTAA

图6 (部分2/2)

CD4 CD28 ζ 注释的序列 (全载体SEQ ID NO:7)下划线 = EF1 α 启动子

浅灰色 = CD4 细胞外结构域

深灰色 = CD8 α 细胞外结构域粗体 = CD8 α 跨膜结构域

波浪线 = DC28 共刺激结构域

虚线 = CD3 ζ

CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGCGCAATT
GAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCTTTTCCCGAGGGTGG
GGGAGAACCGTATATAAGTGACAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCG
TGTGTGGTTCGCGCGGGCTGGCCTCTTACGGGTATGGCCCTTGCCTGCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGA
TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGA
GTTGAGGCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGTGCTTTCGATAAGTC
TCTAGCCATTTAAAATTTTATGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCAC
ACTGGTATTTTCGTTTTTGGGGCCGCGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGC
GAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCGCTGTAT
CGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCTGTAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCA
GGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCGCTCC
TCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACTGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTCTCGTGCTTTTGGAGTACGTCG
TCTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGC
ACTTGATGTAATTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTGAAGTTGGATCTGGTTCAATCTCAAGCCTCAGACAGTGTTCAAAGTTTT
TTCTTCCATTTAGGTGTCGTGAGCTAGCTCTAGAGCCACCATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCTGCCGCTGGCCTTGC
TGCTCCACGCCGCCAGGCCGGGATCCATGAACCGGGGAGTCCCTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCGCTCTCC
CAGCAGCCACTCAGGGAAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAAAAGGGGATACAGTGGAACTGACCTGTACAGCTTCCAGAAAG
AGAGCATACAATTCCTGGAAGAACTCCAACAGATAAAGATTCTGGGAAATCAGGGCTCCTTCTAACTAAAGGTCCATCCA
AGCTGAATGATCGCGCTGACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAACTTCCCCTGATCATCAAGAATCTAAGATAGAA
GACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGAGGACCAGAAAGGAGGAGGTGCAATTGCTAGTGTTTCGGATTGACTGCCAACTCTG
ACACCCACCTGCTTCAGGGGCGAGAGCTGACCTGACCTTGGAGAGCCCCCTGGTAGTAGCCCTCAGTGCAATGTAGGAGT
CCAAGGGGTAAAAACATACAGGGGGGGAAGACCCTCTCCGTGTCTCAGCTGGAGCTCCAGGATAGTGGCACCTGGACATGCA
CTGCTTGCAGAACCAAGAAGGTGGAGTTCAAAATAGACATCGTGGTGCTAGCTTTCAGAAAGCCTCCAGCATAGTCTAT
AAGAAAGAGGGGGAACAGGTGGAGTTCTCTTCCCACTCGCCTTACAGTTGAAAAGCTGACGGGCAGTGGCGAGCTGTGGT
GGCAGGCGGAGAGGGCTTCTCTCCAAGCTTGGATCACTTTGACCTGAAGAACAAGGAAGTGTCTGTAAACGGGTACC
CAGGACCCTAAGCTCCAGATGGGCAAGAAGTCCCGCTCCACCTCACCTGCCCCAGGCCCTGCCTCAGTATGCTGGCTCTGGA
AACCTCACCTGGCCCTTGAAGCGAAAACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAACCTGGTGGTGATGAGAGCCACTCAGCTCC
AGAAAAATTTGACCTGTGAGGTGTGGGACCCACCTCCCTAAGCTGATGCTGAGCTTGAACTGGAGAACAAAGGAGGCAAA
GGTCTCGAAGCGGGGAGAAGGCGGTGTGGGTGCTGAACCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAGTGACTCGGGACA
GGTCTGCTGGAATCCAACATCAAGTTCTGCCACATGGTCCACCCCGGTGCAGCCATCCGGAACCAAGACCCAGCGCGG
GACCAACCAACCGGCGCCACCATCGCTGCGAGCCCTGTCTCTGCGCCAGAGGCGTGCCGCGCAGCGCGGGGGGCGG
AGTGACACGAGGGGGGCTGGACTTCGCTGTGAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGTATAGCTTG
CTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCC
CCGCCGCCCCGGGCCCCACCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCATCGATAGAGT
GAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGA
GAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGA
AGGCTGTACAATGAATGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGG
GCAAGGGGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCC
CCTCGCTAA

图7 (部分1/2)

CD28 跨膜结构域**(SEQ ID NO: 8)**

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTCTG
GGTG

CD28 共刺激结构域**(SEQ ID NO: 9)**

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAG
CATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC

图7 (部分2/2)

ScFv CAR 序列**PGDM1400 KIR 核苷酸序列****(SEQ ID NO: 10)**

ATGGGGGGGACTTGAACCTGCAGCAGGTTCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCTGTCCAGGTCCAG
GCCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCCGGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTG
CTCATTGCCCTGGCCGTGTACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAACAGC
GTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCC
GTATTACAAAGTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAG
GATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCATGCTGCCAGACCTGGATCCGACTTCGTGCTGAC
CCAGAGCCCTCACAGCCTGAGCGTGACACCTGGCGAGAGCGCCAGCATCAGCTGCAAGAGCAGCCACTCCCTGATCCACGGC
GACCGGAACAACCTACCTGGCTTGGTACGTGCAGAAGCCCCGGCAGATCCCCCAGCTGCTGATCTACCTGGCCAGCAGCAGAG
CCAGCGGCGTGCCGATAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGACAAGGACTTCACCCTGAAGATCAGCCGGGTGGAAACCGAGGA
CGTGGGCACCTACTACTGTATGCAGGGCAGAGAGAGCCCCCTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGACATCAAGGGCGG
CAGCTCCAGAAGCAGCTTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGACAGGCTCAGCTGGTGCACTCTGGACCCGAAGT
GCGGAAGCCTGGCACCAGCGTGAAGGTGTCTGTAAAGCCCCCTGGCAACACCCTGAAAACCTACGACCTGCACTGGGTGCGC
AGCGTGCCAGGACAGGGACTGCAGTGGATGGGCTGGATCAGCCACGAGGGCGACAAGAAAGTGATCGTGGAACGGTTCAA
GGCCAAAGTGACCATCGACTGGGACAGAAGCACCACCCGCTACCTGCAGCTGAGCGGCCTGACCTCTGGCGATACCGCC
GTGTACTACTGCGCCAAGGGCAGCAAGCACCAGGCTGAGAGACTACGCCCTGTACGACGATGACGGCGCCCTGAAGTGGGCCG
TGGATGTGGACTACCTGAGCAACCTGGAATTCTGGGGCCAGGGAACCGCCGTGACCGTGTCTGCTAGCGGCGGAGGGG
GATCTGGAGGTGGGGTTTCTACCCACTGAACCAAGCTCCAAAACCGGTAACCCAGACACCTGCATGTTCTGATTGGGACC
TCAGTGGTCAAATCCCTTTCACCATCCTCCTTCTTCTCCTTCATCGCTGGTGTCCAAACAAAAAATGCTGCTGTAATGGA
CCAAGAGCCTGCAGGGAACAGAACAGTGAACAGCGAGGATTCTGATGAACAAGACCATCAGGAGGTGCATACGCATAA

PGDM1400KIR aa 序列**(SEQ ID NO: 11)**

MGGLEPCSRFLLPLLLAVSGLRPVQVQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETES
PYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYKVEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMALPVTALLPLALLHAARPGSDFVLTSPLSLSVTPG
ESASISCKSSHLIHGDRNNYLAWYVQKPGRSPQLLIYLASSRASGVPDRFSGSGSDKDFTLKISRVEDVDVGYTCMQGRESPWTFG
QGTVKVDIKGSSRSSSSGGGGSGGGGQAQLVQSGPEVRKPGTSVKVSKAPGNTLKTYDLHWVRSVPQGQLQWMGWISHEGDK
KVIVERFKAKVTIDWDRSTNTAYLQLSGLTSGDTAVYYCAKGSKHLRDLALYDDDGALNWAVDVYLSNLEFWGQGTAVTVSSAS
GGGGSGGGSSPTEPSSKTGNPRHLHLVIGTSVVKIPFTILLFLLHRWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSYAZ

图8 (部分1/9)

PGDM1400 scFv核苷酸序列**(SEQ ID NO: 12):**

ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCATGCTGCCAGACCTGGATCCGACTTCGTGCTGACC
CAGAGCCCTCACAGCTGAGCGTGACACCTGGCGAGAGCGCCAGCATCAGCTGCAAGAGCAGCCACTCCCTGATCCACGGCG
ACCGGAACAACCTACCTGGCTTGGTACGTGCAGAAGCCCGGCAGATCCCCCAGCTGCTGATCTACCTGGCCAGCAGCAGAGCC
AGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGACAAGGACTTCACCTGAAGATCAGCCGGGTGGAAACCGAGGAC
GTGGGCACCTACTACTGTATGCAGGGCAGAGAGAGCCCTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGACATCAAGGGCGGC
AGCTCCAGAAGCAGCTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGACAGGCTCAGCTGGTGCAGTCTGGACCCGAAGTG
CGGAAGCCTGGCACCAGCGTGAAAGGTGTCTGTAAAGCCCTGGCAACACCTGAAAACCTACGACCTGCACTGGGTGCGCA
GCGTGCCAGGACAGGGACTGCAGTGGATGGGCTGGATCAGCCACGAGGGCGACAAGAAAGTGATCGTGGAACGGTTCAAG
GCCAAAGTGACCATCGACTGGGACAGAAGCACCAACACCGCCTACCTGCAGCTGAGCGGCTGACCTCTGGCGATACCGCCG
TGTAATACTGCGCCAAGGGCAGCAAGCACCGGCTGAGAGACTACGCCCTGTACGACGATGACGGCGCCCTGAACTGGGCGCT
GGATGTGGACTACCTGAGCAACCTGGAATTCTGGGGCCAGGGAACCGCCGTGACCGTGTCTATCT

PGDM1400 scFv氨基酸**(aa)序列****(SEQ ID NO: 13):**

MALPVTALLPLALLHAARPGSDFVLTQSPHLSVTPGESASISCKSSSHLIHGDRNNYLAWYVQKPGRSPQLLIYLASSRASGVDPDR
FSGSGSDKDFTLKISRVEDVGTYYCMQGRESPTWFQGGTKVDIKGGSSRSSSSSGGGSGGGGQAQLVQSGPEVRKPGTSVKVS
CKAPGNTLKYDLHWVRSVPQGQLQWMGWISHEGDKKVIVERFKAKVTIDWDRSTNTAYLQLSLTSGDTAVVYCAKGSKHLRL
DYALYDDDGALNWAVDVDYLSNLEFWGQGTAVTVSS

PGT128-KIR核苷酸序列**(SEQ ID NO: 14)**

ATGGGGGGGACTTGAACCTGCAGCAGGTTCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCTGTCCAGGTCCAG
GCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCCGGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTG
CTCATTGCCCTGGCCGTGTACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAAACAGC
GTATCACTGAGACCGAGTCGCCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCC
GTATTACAAAGTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAG
GATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCATGCTGCCAGACCTGGATCCCAGTCTGCCCTGAC
TCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGTCTCCTGGACAGTCAATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAATAACTTTGTCTCCTGGTAC
CAGCAACACGCAGGCAAGGCCCCCAAGCTCGTCATTTATGACGTCAATAAGCGCCCTCAGGTGTCCCTGATCGTTTCTCTGGC
TCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCGTCTCTGGACTCCAGACTGACGATGAGGCTGTCTATTACTGCGGCTCACTTGTA
GGCAACTGGGATGTGATTTTCGGCGGAGGGACCAAGTTGACCGTCTAGGCGGAAGCAGCAGAAGCAGCTCTAGCGGCGGA
GGCGGATCTGGCGGAGGGGGACAGATGCAGTTACAGGAGTCGGGCCCGGACTGGTGAAGCCTTCGGAAACCTGTCCCTC
ACGTGCAGTGTGTCTGGTGCCTCCATAAGTGACAGTACTGGAGCTGGATCCGCGGGTCCCCAGGGAAGGGACTTGAGTGGA
TTGGGTATGTCCACAAAAGCGGCGACACAAATTACAGCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCAACTTGTCGTTAGACACGTCCAAA
AATCAGGTGTCCCTGAGCCTTGTTGGCCGCGACCGCTGCGGACTCGGGCAAATATTATTGCGCGAGAACTGCACGGGAGGA
GAATTTATGGAATCGTTGCCCTCAATGAGTGGTTACCTACTTCTACATGGACGTCTGGGGCAATGGGACTCAGGTACCGTCT
CCTCAGCTAGCGGCGGAGGGGGATCTGGAGGTGGGGGTTCTCACCCTGAAACCAAGCTCCAAAACCGGTAACCCAGACA
CCTGCATGTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTCAAAATCCCTTACCATCCTCCTCTTCTCTTCTCATCGCTGGTGCTCCAACA
AAAAAATGCTGCTGTAATGGACCAAGAGCCTGCAGGGAACAGAACAGTGAACAGCGAGGATTCTGATGAACAAGACCATCA
GGAGGTGTCATACGCATAA

图8 (部分2/9)

PGT128-KIR aa序列 (SEQ ID NO: 15)

MGGLEPCSRFLLPLLLAVSGLRPVQVQAQSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAEEAATRKQRITETES
PYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYKVEGGGEGRGSLTTCGDVEENPGPRMALPVTALLPLALLHAARPGSQSALTQPPSASGSPG
QSITISCTGTSNNFVSWYQQHAGKAPKLVYDVNKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQTDDEAVYYCGSLVGNWDVIFGGGK
LTVLGGSSRSSSSGGGGSGGGGQMLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVSGASISDSYWSWIRRS PGKLEWIGYVHKSGDTNYSPLKS
RVNLSLDTSKNQVSLSLVAATAADSGKYCARTLHGRRYGVAFNEWFTYFYMDVWNGTQVTVSSASGGGGSGGGSSPTEPS
SKTGNPRHLHVLI GTSVVKIPFTILLFLLHRWC SNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSYAZ

PGT128 scFv核苷酸序列 (SEQ ID NO: 16) :

ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCATGCTGCCAGACCTGGATCCCAGTCTGCCCTGACT
CAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAATCACCATCTCCTGCACTGGAACAGCAATAACTTTGTCTCCTGGTACC
AGCAACACGCAGGCAAGGCCCAAGCTCGTCATTTATGACGTCAATAAGCGCCCCCTCAGGTGTCCCTGATCGTTTCTCTGGCT
CCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCGTCTCTGGACTCCAGACTGACGATGAGGCTGTCTATTACTGCGGCTCACTTGATG
GCAACTGGGATGTGATTTTCGGCGGAGGGACCAAGTTGACCGTCTAGCGCGGAAGCAGCAGAAGCAGCTCTAGCGGCGGAG
GCGGATCTGGCGGAGGGGGACAGATGCAGTTACAGGAGTCGGGCCCGGACTGGTGAAGCCTTCGGAAACCTGTCCCTCAC
GTGCAGTGTGTCTGGTGCCTCCATAAGTGACAGTTACTGGAGCTGGATCCGGCGGTCCCCAGGGAAGGGACTTGAGTGGATT
GGGTATGTCCACAAAAGCGGCGACACAAATTACAGCCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCAACTTGTCTGTTAGACACGTCCAAAAA
TCAGGTGTCCCTGAGCCTTGTGGCCGCGACCGCTGCGGACTCGGGCAAATATTATTGCGCGAGAACTGCACGGGAGGAGA
ATTTATGGAATCGTTGCCTCAATGAGTGGTTCACCTACTTCTACATGGACGTCTGGGGCAATGGGACTCAGGTCACCGTCTCC
TCA

PGT128 scFv aa序列 (SEQ ID NO: 17) :

MALPVTALLPLALLHAARPGSQSALTQPPSASGSPGQSITISCTGTSNNFVSWYQQHAGKAPKLVYDVNKRPSGVPDRFSGSKSG
NTASLTVSGLQTDDEAVYYCGSLVGNWDVIFGGGKLTVLGGSSRSSSSGGGGSGGGGQMLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVSGAS
ISDSYWSWIRRS PGKLEWIGYVHKSGDTNYSPLKSRVNLSLDTSKNQVSLSLVAATAADSGKYCARTLHGRRYGVAFNEWFTY
FYMDVWNGTQVTVSS

图8 (部分3/9)

VRC01-KIR核苷酸序列**(SEQ ID NO: 18)**

ATGGGGGGGACTTGAACCTGCAGCAGGTTCTGCTCCTGCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCCTGTCCAGGTCCAG
GCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCCGGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTG
CTCATTGCCCTGGCCGTGTACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAACAGC
GTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCC
GTATTACAAAGTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTAAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAG
GATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCATGCTGCCAGACCTGGATCCGAGATCGTGCTGAC
ACAGAGCCCTGGCACCCTGAGCCTGTCTCCAGGCGAGACAGCCATCATCAGCTGCCGGAACAAGCCAGTACGGCAGCCTGGCC
TGGTATCAGCAGAGGCCCTGGACAGGCCCCAGACTCGTGATCTACAGCGGCAGCACAAAGAGCCGCCGGAATCCCGATAGAT
TCAGCGGCTCTAGATGGGGCCCTGACTACAACCTGACCATCAGCAACCTGGAAAGCGGCGACTTCGGCGTGTAATACTGCCAG
CAGTACGAGTTCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGCAGGTGGACATCAAGAGAGGGCGGCAGCTCCAGAAGCTCCAGCTCTGGCG
GCGGAGGATCTGGCGGAGGGCGGACAGGTGCAGCTGGTGAGTCTGGCGGCCAGATGAAGAAACCCGCGGAGAGCATGCGG
ATCAGCTGCAGAGCCTCCGGCTACGAGTTCATCGACTGCACCCCTGAAGTGGATTGGCTGGCCCTGGCAAAAGACCCGAGTG
GATGGGCTGGCTGAAGCCCAGAGGCGGAGCCGTGAATTACGCCAGACCTTCAGAGGCAGAGTGACCATGACCCGGGACGT
GTACAGCGATACCGCCTTCTGGAAGTGCAGGAGCCTGACCGTGATGATACCGCGTGACTTCTGCACCCGGGGCAAGAAGT
GCGACTACAAGTGGGACTTCGAGCACTGGGGCAGAGGCACCCCTGTGATCGTGTCTAGCGTACGCGGAGGGGGGACTG
GAGGTGGGGGTTCTCACCCTGAACCAAGCTCCTCAAAACCGGTAACCCAGACCTGCATGTTCTGATTGGGACCTCAGTG
GTCAAAATCCCTTTCACCATCTCTCTTCTTCTCTCTCATCGCTGGTGCTCCAACAAAAAATGCTGCTGTAATGGACCAAG
AGCCTGCAGGGAACAGAACAGTGAACAGCGAGGATTCTGATGAACAAGACCATCAGGAGGTGTCATACGCATAA

VRC01 aa序列**(SEQ ID NO: 19)**

MGGLEPCSRFLLPLLLAVSGLRPVQVQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAEEATRKRQITETES
PYQELQGQRSDVYDLNTRPYKVEGGGEGRGSLTCDVEENPGPRMALPVTALLPLALLHAARPGSEIVLTQSPGTLSLSPGE
TAIISCRTSQYGLAWYQRPQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRWGPDPYNLTISNLESGDFGVYQCQYEFFGQGTQVQVDIKR
GGSSRSSSSGGGGSGGGGQVQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLAPGKRPEWMGWLKPRGGAVNYARPLQ
GRVTMTROVYSDTAFLRLSLTVDDTAVYFCTRGKNCNDYNWDFEHWGRGTPVIVSSASGGGGSGGGSSPTEPSSKTGNPRHLHV
LIGTSVVKIPFTILLFLLHRWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSYAZ

VRC01 scFv核苷酸序列**(SEQ ID NO: 20):**

ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCCGCTAGACCTGGATCCGAGATCGTGCTGACA
CAGAGCCCTGGCACCCTGAGCCTGTCTCCAGGCGAGACAGCCATCATCAGCTGCCGGAACAAGCCAGTACGGCAGCCTGGCCT
GGTATCAGCAGAGGCCTGGACAGGCCCCAGACTCGTGATCTACAGCGGCAGCACAAAGAGCCGCCGGAATCCCGATAGATT
CAGCGGCTCTAGATGGGGCCCTGACTACAACCTGACCATCAGCAACCTGGAAAGCGGCGACTTCGGCGTGTAATACTGCCAGC
AGTACGAGTTCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGCAGGTGGACATCAAGAGAGGGCGGCAGCTCCAGAAGCTCCAGCTCTGGCG
GCGGAGGATCTGGCGGAGGGCGGACAGGTGCAGCTGGTGAGTCTGGCGGCCAGATGAAGAAACCCGCGGAGAGCATGCGG
ATCAGCTGCAGAGCCTCCGGCTACGAGTTCATCGACTGCACCCCTGAAGTGGATTGGCTGGCCCTGGCAAAAGACCCGAGTG
GATGGGCTGGCTGAAGCCCAGAGGCGGAGCCGTGAATTACGCCAGACCTTCAGAGGCAGAGTGACCATGACCCGGGACGT
GTACAGCGATACCGCCTTCTGGAAGTGCAGGAGCCTGACCGTGATGATACCGCGTGACTTCTGCACCCGGGGCAAGAAGT
GCGACTACAAGTGGGACTTCGAGCACTGGGGCAGAGGCACCCCTGTGATCGTGTCTAGC

图8 (部分4/9)

(SEQ ID NO: 21):

MALPVTALLPLALLHAARPGSEIVLTQSPGTLSPGETAIISCRTSQYGS LAWYQQRPQGAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRWG
PDYNLTISNLESGDFGVYCYQQYEFGGQTKVQVDIKRGGSSRSSSSGGGGSGGGGQVLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFI
DCTLNWIRLAPGKRPEWMGWLKPRGGAVNYARPLQGRVTMTDRVYSDTAFLRLSLTVDDTAVYFCTRGKNC DYNWDFEHWG
RGTPVIVSS

(SEQ ID NO: 22)

ATGCGGGGACTTGAACCTGCAGCAGGTTCTCTGCTCTGCCTCTCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGCTCTGCCAGGTCGAG
GCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTG
CTCATTGCCCTGGCCGTGTACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAAACAGC
GTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCC
GTATTACAAAGTCGAGGGCGGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAG
GATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCATGCTGCCAGACCTGGATCCGACATCCAGATGAC
CCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGAGTGGGCGACACCGTGACCATCACCTGTCAGGCCAACGGGTACCTGAACTGGTATC
AGCAGCGGAGAGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGGCAGCAAGCTGGAAAGAGGCGTGCCCGCCAGATTACGCG
GCAGAAGATGGGGCCAGGAGTACAACCTGACCATCAACAACCTGCAGCCCGAGGACGTGGCCACATACTTTTGCAGGTGTA
CGAGTTCATCGTGCCCGGCACCCGGCTGGATCTGAAGGGCGGAAGCAGCAGAAGCAGCTCTAGCGGCGGAGGCGGATCTGG
CGGAGGGGGACAGGTGCACCTGAGTCAGTCTGGCGCCGCTGTGACAAAGCCAGGCGCTTCTGTGCGGGTGCTCTGTGAAGCC
AGCGGCTACAAGATCAGCGACCACTTCATCCACTGGTGGCGGCAGGCTCCAGGACAGGGACTGCAGTGGGTGGGATGGATC
AACCCCAAGACCGGCCAGGCCAACCAACCCAGACAGTTCCAGGGCAGAGTGTCCTTGACCAGACAGGCCAGCTGGGACTTCG
ACACCTACAGCTTCTACATGGACCTGAAGGCCGTGCGGAGCGACGACACCGCCATCTACTTTTGCGCCAGACAGAGAAGCGAC
TTCTGGGATTTTCAGCTGTGGGGCAGCGGCACCCAAGTGACCGTGTCTGCTAGCGGCGGAGGGGGATCTGGAGGTGGG
GGTTCCTCACCCACTGAACCAAGCTCCAAAACCGGTAACCCAGACACCTGCATGTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTCAAAATC
CCTTTCACCATCCTCCTCTTTCTCTTCATCGCTGGTGCTCCAACAAAAAATGCTGCTGTAATGGACCAAGAGCCTGCAG
GGAACAGAACAGTGAACAGCGAGGATTCTGATGAACAAGACCATCAGGAGGTGTCATACGCATAA

(SEQ ID NO: 23)

MGGLEPCSRFLLPLLLAVSGLRPVQVQAQSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAEEAATRKQRTITES
PYQELQQRSDVYSDLNTQRPYYKVEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMALPVTALLPLALLLHAARPGSDIQMTQSPSSLSARV
GDTVITITCQANGYLNWYQRRGKAPKLLIYDGSKLGRGVPARFSGRRWGQEYNLTINNLPEDVATYFCQVYEFIVPTRLDLKGK
SSRSSSSGGGGSGGGGQVHLSQSGAAVTKPGASVRVSCASGYKIDHFIHWWRQAPGQGLQWVGWINPKTGQPNPNRQFQG
RVSLTRQASWDFDTSFYMDLKAVRSDDAIYFCARQRSDFWDFDVWGSQTQVTVSSASGGGGSGGGSSPTEPSSKTGNPRHL
HVLIGTSVVKIPFTILLFLLHRWCNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSYAZ

(SEQ ID NO: 24):

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGAGTGGGCGACACCGTGACCATCACCTGTCTAGGCCAACGGCT
ACCTGAAGTGGTATCAGCAGCGGAGAGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGGCAGCAAGCTGGAAAGAGGCGTGC
CCGCCAGATTACGCGGCAGAAGATGGGGCCAGGAGTACAACCTGACCATCAACAACCTGCAGCCCAGGACGTGGCCACATA
CTTTTGCCAGGTGTACGAGTTCATCTGTCCCGGCACCCGGCTGGATCTGAAGGGCGGAAGCAGCAGAAGCAGCTCTAGCGGC
GGAGGCGGATCTGGCGGAGGGGGACAGGTGCACCTGAGTCAGTCTGGCGCCGCTGTGACAAAGCCAGGCGCTTCTGTGCGG
GTGTCCTGTGAAGCCAGCGGCTACAAGATCAGCGACCACTTCATCCACTGGTGCGGCGAGGCTCCAGGACAGGGACTGCAGT
GGGTGGATGGATCAACCCCAAGACCGGCCAGCCCAACAACCCAGACAGTTCAGGGCAGAGTGTCCCTGACCAGACAGGC
CAGCTGGGACTTCGACACCTACAGCTTCTACATGGACCTGAAGGCCGTGCGGAGCGACGACACCGCCATCTACTTTGCGCCA
GACAGAGAAGCGACTTCTGGGATTCGACGTGTGGGGCAGCGGCACCCAAGTGACCGTGTCTATCT

图8 (部分5/9)

3BNC60 scFv aa序列**(SEQ ID NO: 25):**

MALPVTALLPLALLHAARPGSDIQMTQSPSSLSARVGDVTITCQANGYLNWYQRRGKAPKLLIYDGSKLERGVPARFSGRRW
GQEYNLTINNLPEDVATYFCQVYEFIVPGTRLDLKGGSSRSSSSSGGGSGGGGQVHLSQSGAAVTKPGASVRVSCASGYKISDHF
IHWWRQAPGQGLQWVGWINPKTGQPNNPQFQGRVSLTRQASWDFDYSFYMDLKAVRSDDTAIFYCARQSRDFWDFDVW
GSGTQVTVSS

VRC01c-KIR核苷酸序列**(SEQ ID NO: 26)**

ATGGGGGGGACTTGAACCTGCAGCAGGTTCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCCTGTCCAGGTCCAG
GCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCCGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTG
CTCATTGCCCTGGCCGTGTACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAACAGC
GTATCACTGAGACCGAGTCGCCCTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCC
GTATTACAAAGTCGAGGGCGGCGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAG
GATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCATGCTGCCAGACCTGGATCCGAGATCGTGCTGAC
ACAGAGCCCTGGCACCCTGAGCCTGTCTCCAGGCGAGACAGCCATCATCAGCTGCCGGAACAAGCCAGTACGGCAGCCTGGCC
TGGTATCAGCAGAGGCCCTGGACAGGCCCCCAGACTCGTGATCTACAGCGGCAGCACAAAGAGCCGCCGGAATCCCGGATAGAT
TCAGCGGCTCTAGATGGGGCCCTGACTACAACCTGACCATCAGCAACCTGGAAAGCGGCGACTTCGGCGTGTAATACTGCCAG
CAGTACGAGTTCTTCGGCCAGGGCACCAGGTGCAGGTGGACATCAAGAGAGGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGG
CGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGGCCAGATGAAGAAACCCGGCGAGAGCATGCGGA
TCAGCTGCAGAGCCTCCGGCTACGAGTTCATCGACGCCACCCTGAACCTGGATTGGCTGGCCCTGGCAAAAGACCCGAGTGG
ATGGGCTGGCTGAAGCCAGAGGCGGAGCCGTGAATTACGCCAGACCTCTGCAGGGCAGAGTGACCATGACCCGGGACGTG
TACAGCGATAACCGCTTCCTGGAAGTGCAGGAGCCTGACCGTGGATGATACCGCGTGTACTTCTGCACCCGGGGCAAGAACAG
CGACTACAAGTGGGACTTCGAGCACTGGGGCAGAGGCCACCCCTGTGATCGTGTCTAGCGCTAGCGGCGGAGGGGGATCTGG
AGGTGGGGGTTCTACCCACTGAACCAAGCTCCAAAACCGGTAACCCAGACACCTGCATGTTCTGATTGGGACCTCAGTGG
TCAAAATCCCTTTCACCATCTCCTCTTCTCTCTTCATCGCTGGTGTCTCAACAAAAAATGCTGCTGTAATGGACCAAGA
GCCTGCAGGGAACAGAACAGTGAACAGCGAGGATTCTGATGAACAAGACCATCAGGAGGTGTCATACGCATAA

VRC01c-KIR aa序列**(SEQ ID NO: 27)**

MGGLEPCSRFLLPLLLAVSGLRPVQVQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETES
PYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYKVEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMALPVTALLPLALLHAARPGSEIVLTQSPGTLSPGE
TAIISCRTSQYGLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRWGPDYNLTISNLESGDFGVYYCQQYEFFGQGTKVQVDIKR
GGSSRSSSSGGGGSGGGGQVQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFIDATLNWIRLAPGKRPEWMGWLKPGRGAVNYARPLQ
GRVTMTRDVYSDTAFLELRSLTVDDTAVYFCTRGNKSDYNWDFEHWGRGTPVIVSSASGGGGSGGGSSPTEPSSKTGNPRHLHV
LIGTSVVKIPFTILLFLLHRWCNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSYAZ

图8 (部分6/9)

VRC01 c-scFv 核苷酸序列**(SEQ ID NO: 28):**

GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGCACCCCTGAGCCTGTCTCCAGGCGAGACAGCCATCATCAGCTGCCGGACAAGCCAGT
ACGGCAGCCTGGCCTGGTATCAGCAGAGGCGCTGGACAGGCCCCCAGACTCGTGATCTACAGCGGCAGCACAAGAGCCGCCGG
AATCCCCGATAGATTACAGCGGCTCTAGATGGGGCCCTGACTACAACTGACCATCAGCAACCTGGAAAGCGGCGACTTCGGCG
TGTAATACTGCCAGCAGTACGAGTTCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGCAGGTGGACATCAAGAGAGGCGGCAGCTCCAGAAG
CTCCAGCTCTGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGACAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGGCCAGATGAAGAAACCCGG
CGAGAGCATGCGGATCAGCTGCAGAGCCTCCGGCTACGAGTTTCATGCAGACACCCTGAACTGGATTCTGGCTGGCCCCCTGGC
AAAAGACCCGAGTGGATGGGCTGGCTGAAGCCCAGAGGCGGAGCCGTGAATTACGCCAGACCTCTGCAGGGCAGAGTGACC
ATGACCCGGGACGTGTACAGCGATACCGCCTTCTGGAAGTGCAGGAGCCTGACCGTGGATGATACCGCCGTGTACTTCTGCAC
CCGGGGCAAGAACGCCGACTACAACCTGGGACTTCGAGCACTGGGGCAGAGGCACCCCTGTGATCGTGTCTAGC

VRC01 c-scFv aa 序列**(SEQ ID NO: 29):**

MALPVTALLPLALLHAARPGSEIVLTQSPGTLSPGETAIISCRTSQYGLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRWG
PDYNTISNLESGDFGVYQCQYEFFGQGTKVQVDIKRGGSSRSSSSGGGGSGGGGQVQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFI
DSTLNWIRLAPGKRPEWMGWLKPGRGAVNYARPLQGRVTMTRDVYSDTAFLELRSLTVDDTAVYFCTRGKNADYNWDFEHWG
RGPVIVSS

CD4 Dap12-KIRS2 核苷酸序列**(SEQ ID NO: 30):**

ATGGGGGGGACTTGAACCTGCAGCAGGTTCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCTGTCCAGGTCCAG
GCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCCGGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTG
CTCATTGCCCTGGCCGTGTACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAAACAGC
GTATCACTGAGACCGAGTCGCCCTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAGAGGCC
GTATTACAAAGTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAG
GATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCATGCTGCCAGACCTGGATCCAAGAAAGTGGTGC
TTGGCAAGAAGGGCGACACCGTGGAAGTGAAGTGCACCGCCAGCCAGAAGAAGTCCATCCAGTTCCTGGAAGAAGCAGCAA
CCAGATCAAGATCTGGGCAACAGGGCAGCTTCTGACCAAGGGCCCCAGCAAGCTGAACGACAGAGCCGACTCTCGGCGG
AGCCTGTGGGACCAGGGCAATTTCCACTGATCATCAAGAACCTGAAGATCGAGGACAGCGACACCTACATCTGCGAGGTGG
AAGATCAGAAAGAAGAGGTGCAGCTGCTGGTGTTCGGCTGACCGCCAACTCCGACACCCATCTGCTGCAGGGCCAGAGCCT
GACCCTGACACTGGAAGCCCTCCAGGCAGCAGCCGAGCGTGCAGTGTAGAAGCCCCAGAGGCAAGAACATCCAGGGCGG
CAAGACCCTGAGCGTGTCCAGCTTGAAGTGCAGGATAGCGGCACCTGGACCTGTACCGTGTGCGAACCAGAAGAAAGTG
GAATTCAGATCGACATCGTCTGCTCGCCTTCCAGAAAGCCAGCTCCATCGTGTACAAGAAGGAGGGCGAACAGGTGGAAT
TTTCTTCCCCCTGGCCTTCACTGTGGAAGCTGACCGGCAGCGCGAGCTGTGGTGGCAGGCTGAAAGAGCCAGCTCCAGC
AAGTCTGGATCACCTTCGACCTGAAGAACAAGAGGTGTCCGTGAAGAGAGTGACCCAGGACCCCAAGCTGCAGATGGGCA
AGAAGCTGCCCCCTGCATCTGACACTGCCACAGGCCCTCCACAGTATGCCGGCTCTGGCAATCTCACTCTTGCTCTTGAAGCCA
AGACCGGCAAGCTGCACAGGAAGTGAACCTGGTCTGTATGCGGGCCACCCAGCTGCAGAAGAATCTGACCTGCGAAGTGTG
GGGCCCTACCAGCCCTAAGCTGATGCTGAGCCTGAAGCTGGAAGCAAGCAAGGTTGCAAGCGCGAGAAGGCCGT
GTGGGTGCTGAATCCTGAGGCCGGCATGTGGCAGTGTCTGCTGAGCGATTCTGGCCAGGTGCTGCTCGAAAGCAACATCAAG
GTGCTGCCACCTGGTCCACTCCAGTGACGCTGTAGCGGCGAGGGGGATCTGGAGGTGGGGGTTCTCACCCTGAAC
CAAGTCCAAAACCGGTAACCCAGACACCTGCATGTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTCAAAATCCCTTTCACCATCCTCCTCTT
CTTCTCCTTCATCGTGGTGTCTCAACAAAAAATGCTGCTGTAATGGACCAAGAGCCTGCAGGGAACAGAACAGTGAACA
GCGAGGATTCTGATGAACAAGACCATCAGGAGGTGTCATACGCATAA

图8 (部分7/9)

VRC01 – IgG4 铰链 -bbz 核苷酸序列 (SEQ ID NO:34)

ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCATGCTGCCAGACCTGGATCCGAGATCG
 TGCTGACACAGAGCCCTGGCACCTGAGCCTGTCTCCAGGCGAGACAGCCATCATCAGCTGCCGGACAAGCCAGT
 ACGGCAGCCTGGCCTGGTATCAGCAGAGGCCTGGACAGGCCCCAGACTCGTGATCTACAGCGGCAGCACAGA
 GCCGCCGAATCCCCGATAGATTACGCGGCTCTAGATGGGGCCCTGACTACAACCTGACCATCAGCAACCTGGAA
 AGCGGGGACTTCGGCGTGTACTACTGCCAGCAGTACGAGTTCTTCGGCCAGGGGCACCAAGGTGCAGGTGGACATC
 AAGAGAGGCGGGCAGCTCCAGAAGCTCCAGCTCTGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGACAGGTGCAGCTG
 GTGCAGTCTGGCGGCCAGATGAAGAAACCCGGCGAGAGCATGCCGATCAGCTGCAGAGCCTCCGGCTACGAGTT
 CATCGACTGCACCTGAAGTGGATTCCGCTGGCCCTGGCAAAAGACCCGAGTGGATGGGCTGGCTGAAGCCAG
 AGGCGGAGCCGTGAATTACGCCAGACCTCTGCAGGGCAGAGTGACCATGACCCGGGACGTGTACAGCGATACCG
 CCTTCTGGAACTGCGGAGCCTGACCGTGGATGATACCGCCGTGTACTTCTGCACCCGGGGCAAGAACTGCGACT
 ACAACTGGGACTTCGAGCACTGGGGCAGAGGCCACCCCTGTGATCGTGTCTAGCGCTAGCGAGAGCAAGTACGGC
 CCTCCCTGCCCCCTTGCCTGCCCCGAGTTCTGGGCGGACCCAGCGTGTCTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGA
 CACCTGATGATCAGCCGGACCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCC
 AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGC
 ACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAAGT
 GTCCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGG
 TGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCT
 ACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTGTG
 CTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGT
 CTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAA
 GATGTCCGGAATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCTGTCACTGGTTATCACCTTT
 ACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGA
 GGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGTGGCCGGGACCTGAGA
 TGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGA
 GGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCA
 GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

VRC01 – IgG4 铰链 -bbz aa 序列 (SEQ ID NO:35)

MALPVTALLPLALLHAARPGSEIVLTQSPGTLSPGETAIISCRTSQYGS LAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDR
 FSGSRWGPDPYNTISNLES GDFGVYYCQYEFFGQGT KVQVDIKRGGSSRSSSSSGGGGSGGGGQVQLVQSGGOMKY
 PGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLAPGKRPEWMGWLKP RGGAVNYARPLOGRVTMT RDVYSDTAFLRLSLTVDD
 TAVYFCTRGKNC DYNWDFEHWGRGTPVIVSSASESKYGP PCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
 NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKMSGIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTEED
 GCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
 QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRZ

下划线 = CD8 信号肽

浅灰色 = V 轻链

深灰色 = V 重链

粗体 = V 轻链和 V 重链之间的 GS-连接体

虚线 = IgG4 铰链 (CH2/CH3)

斜体 = CD8 跨膜结构域和

4-1BB/CD3z 细胞内结构域

图8 (部分9/9)

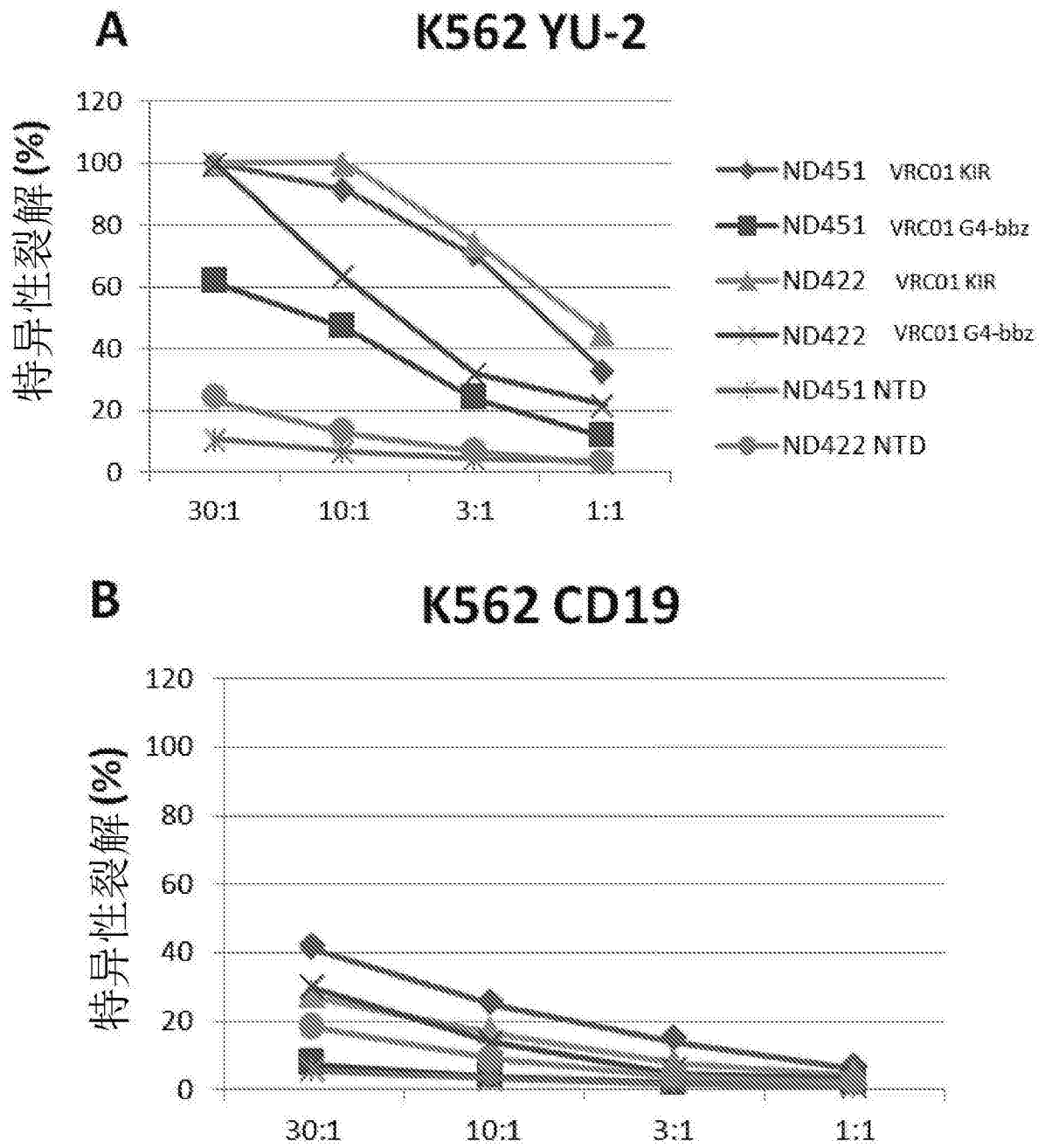


图9A-9B

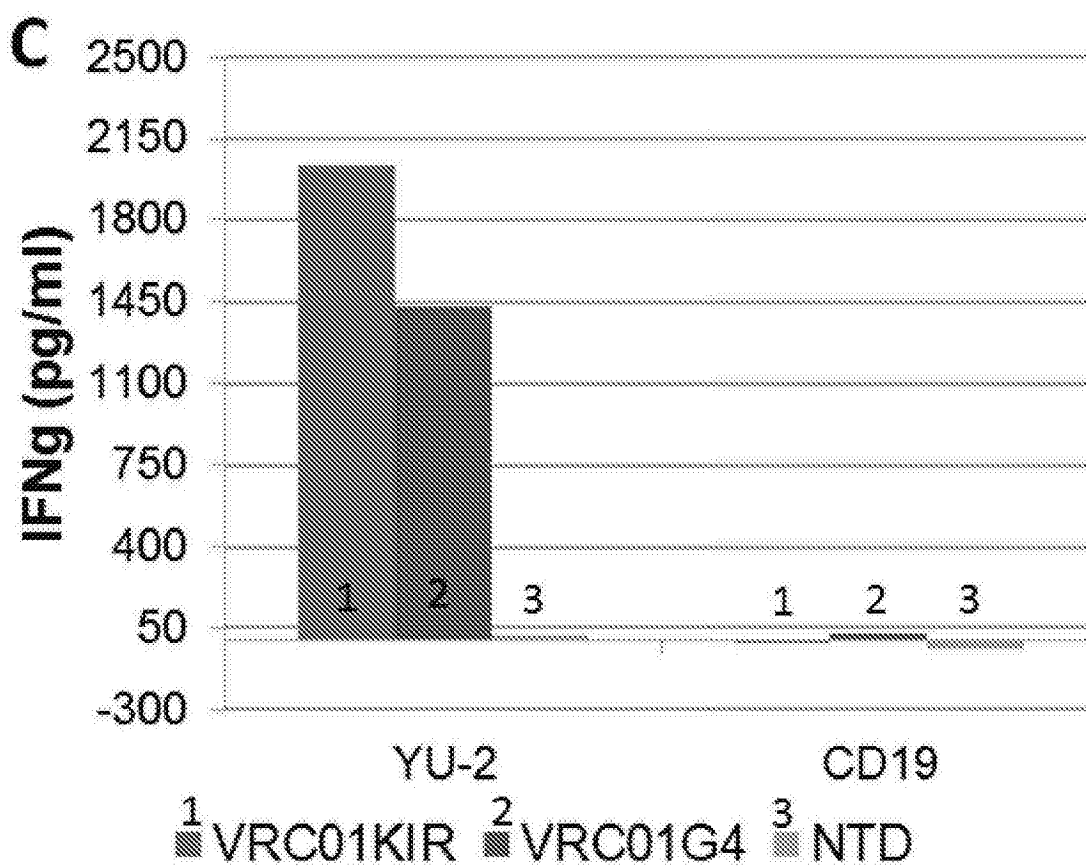


图9C

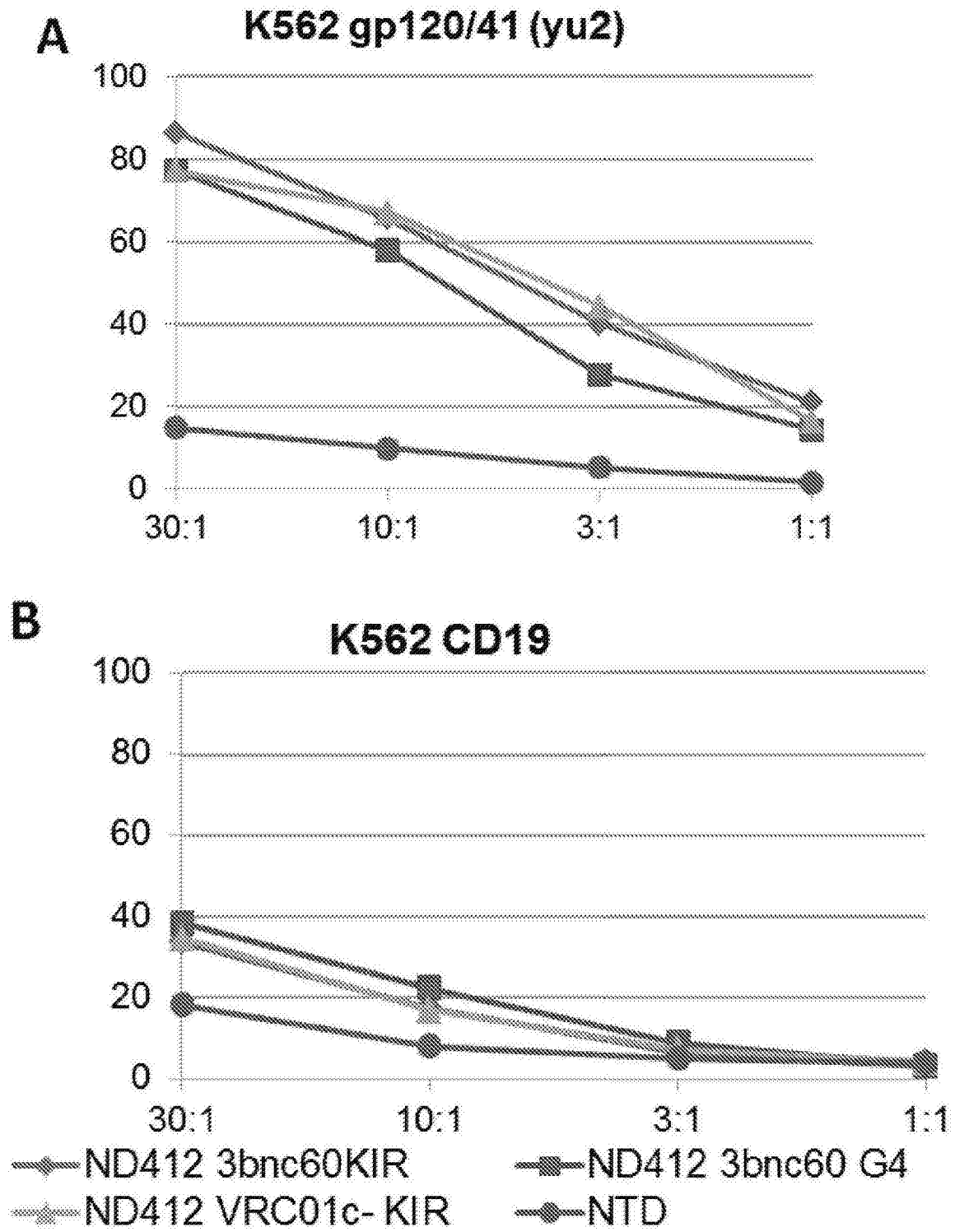


图10A-10B

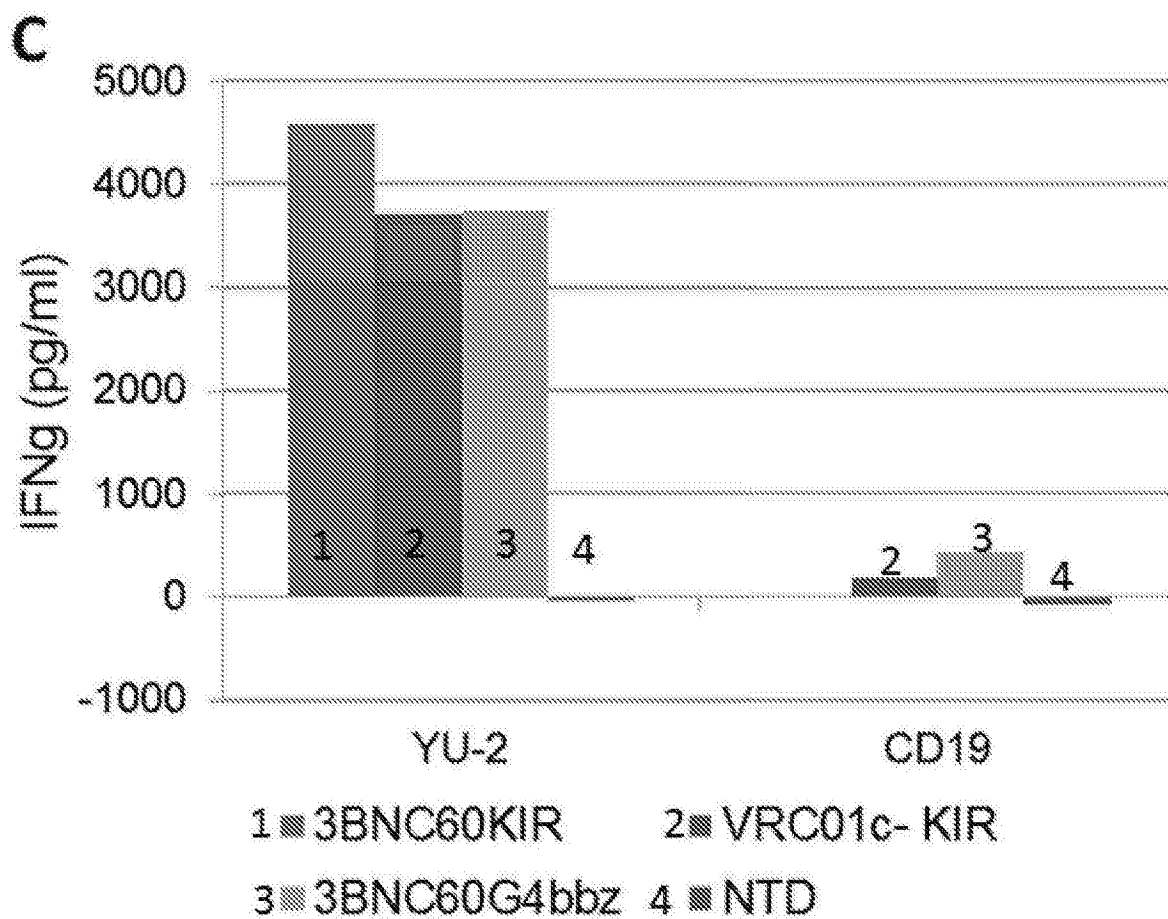


图10C

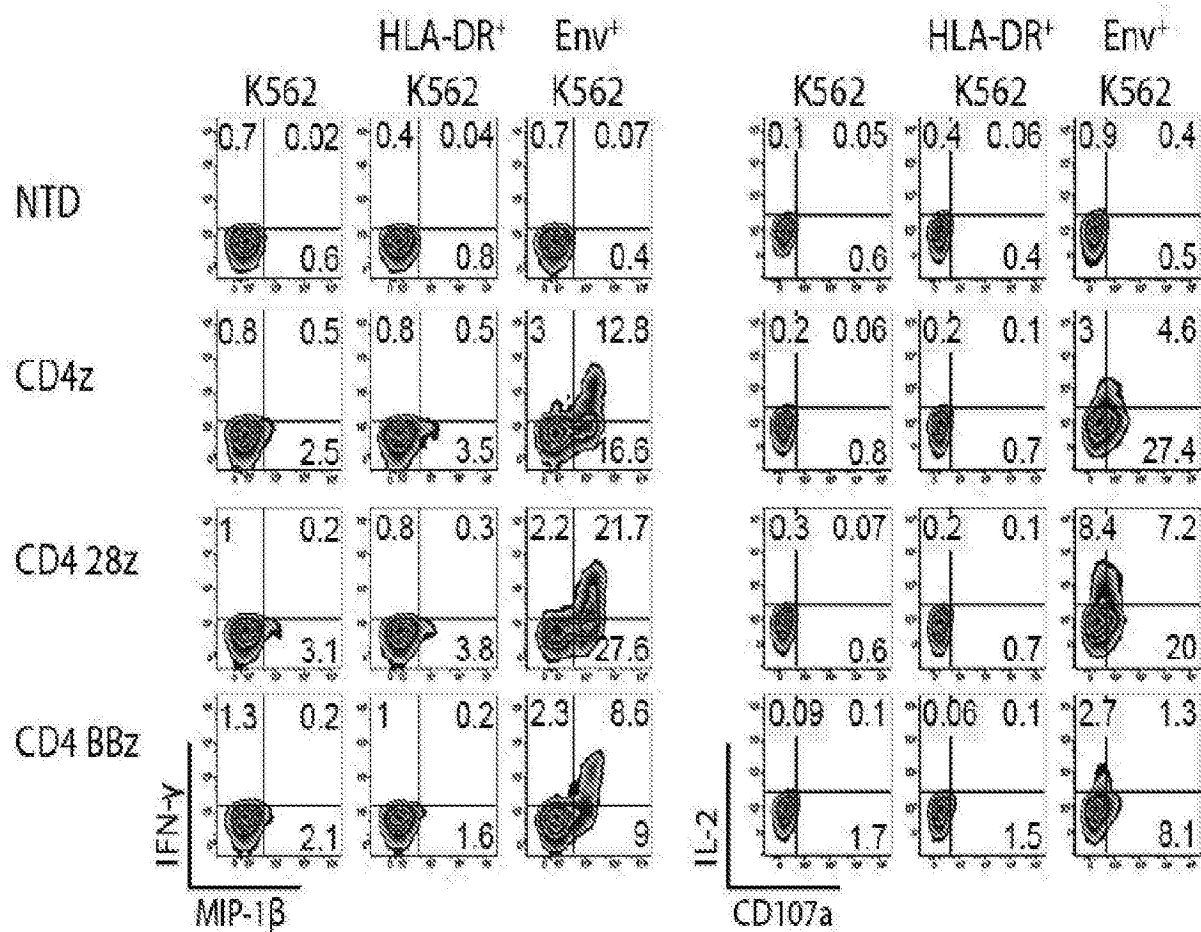


图11A

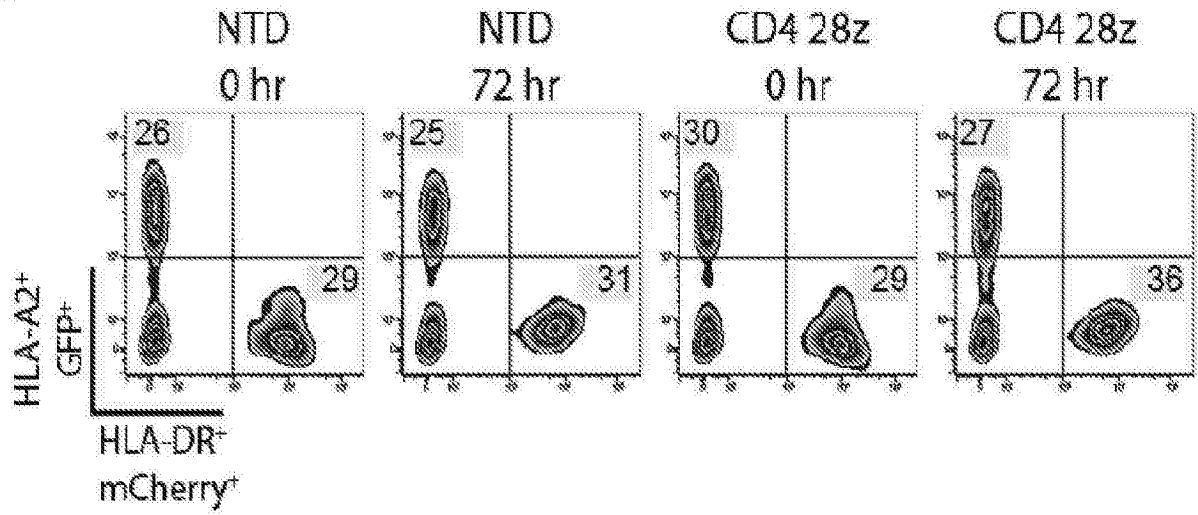
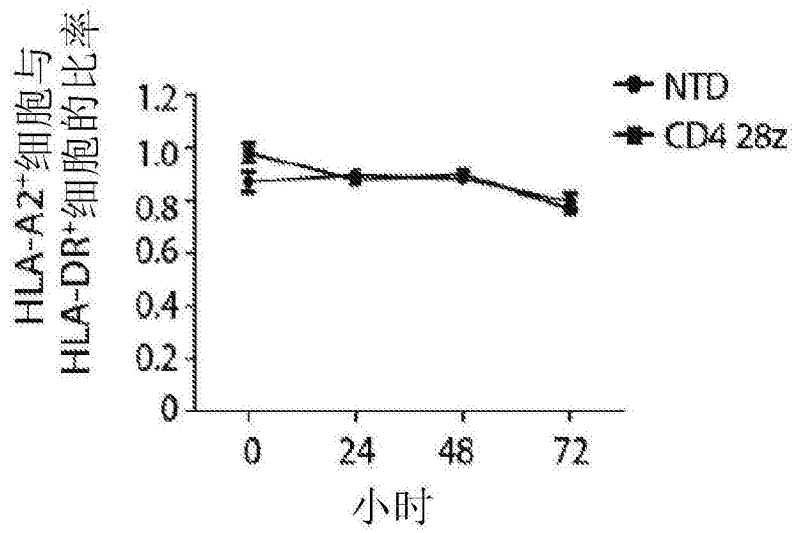
B**C**

图11B-11C

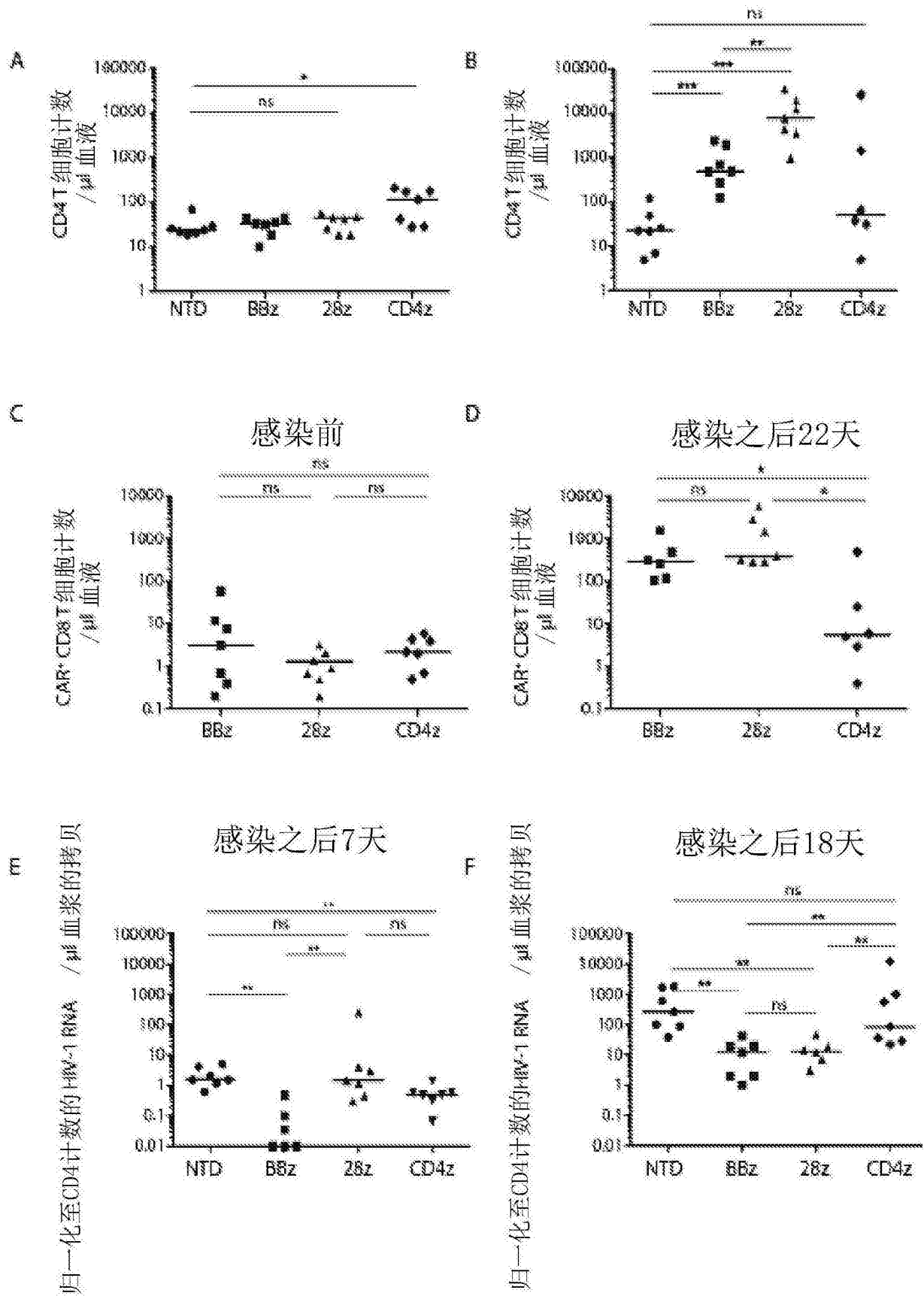


图12A-12F

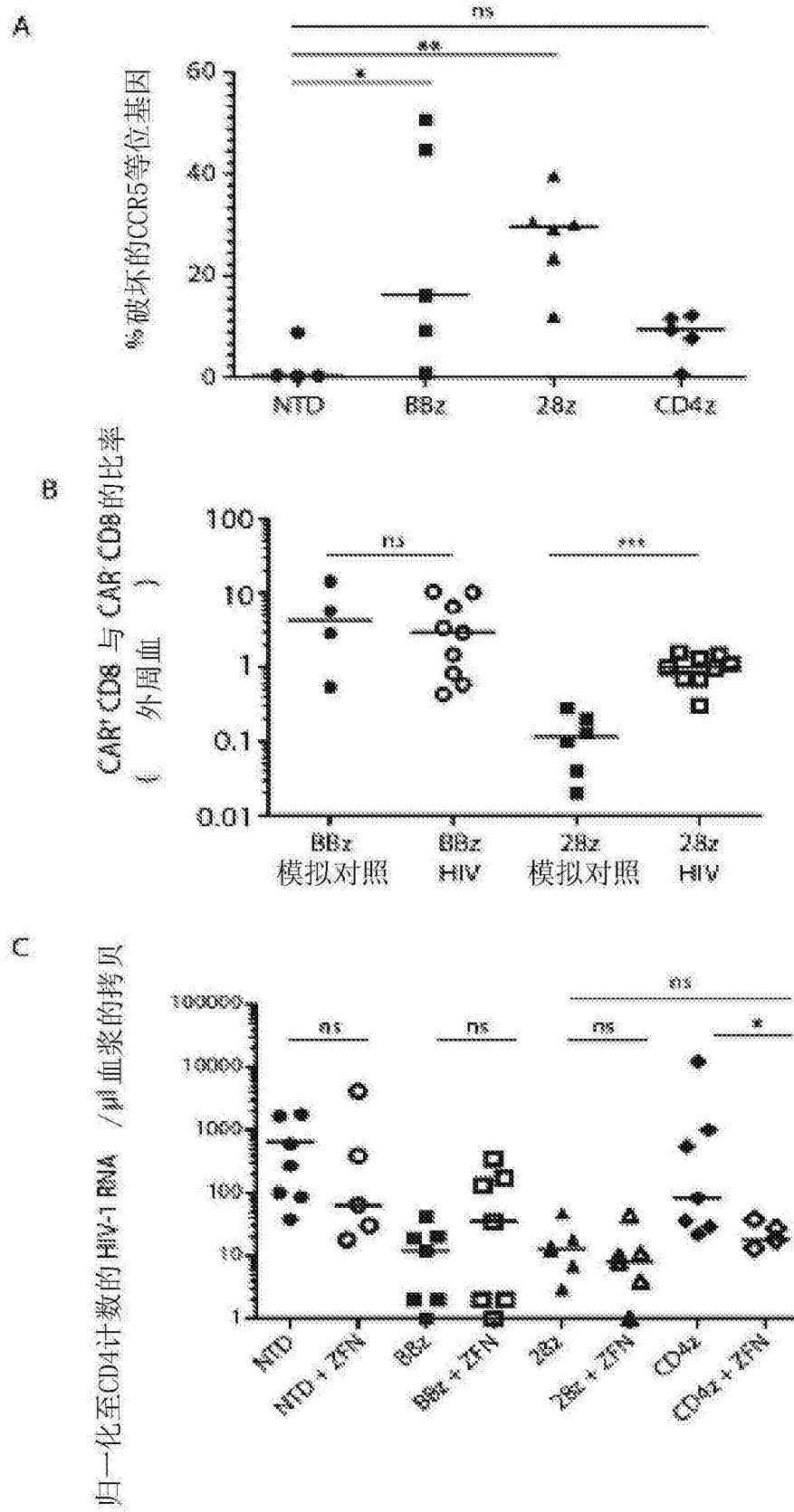


图13A-13C

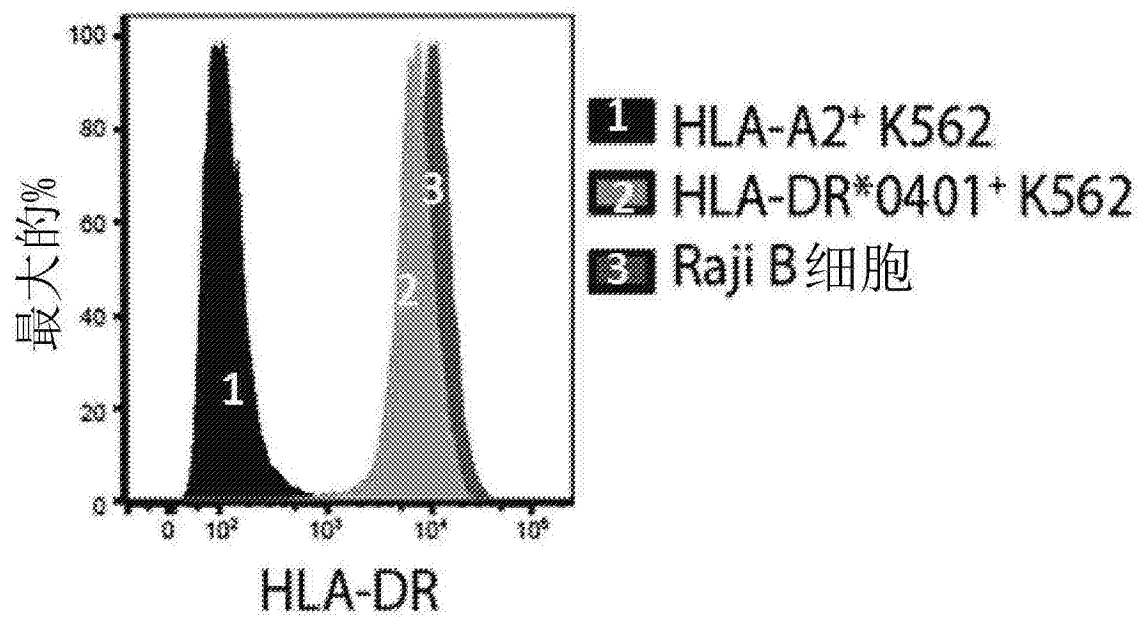
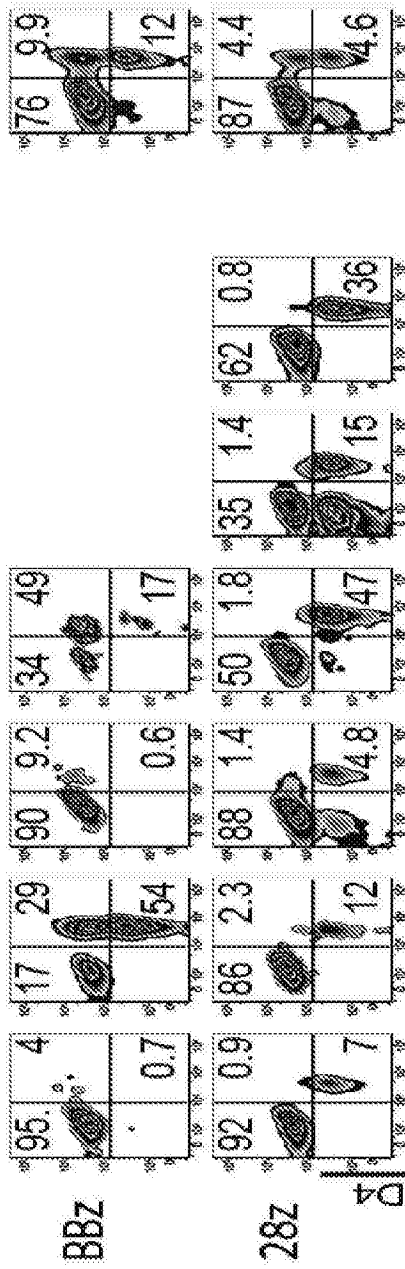


图14

感染的小鼠

未感染的小鼠样品

外周血



脾

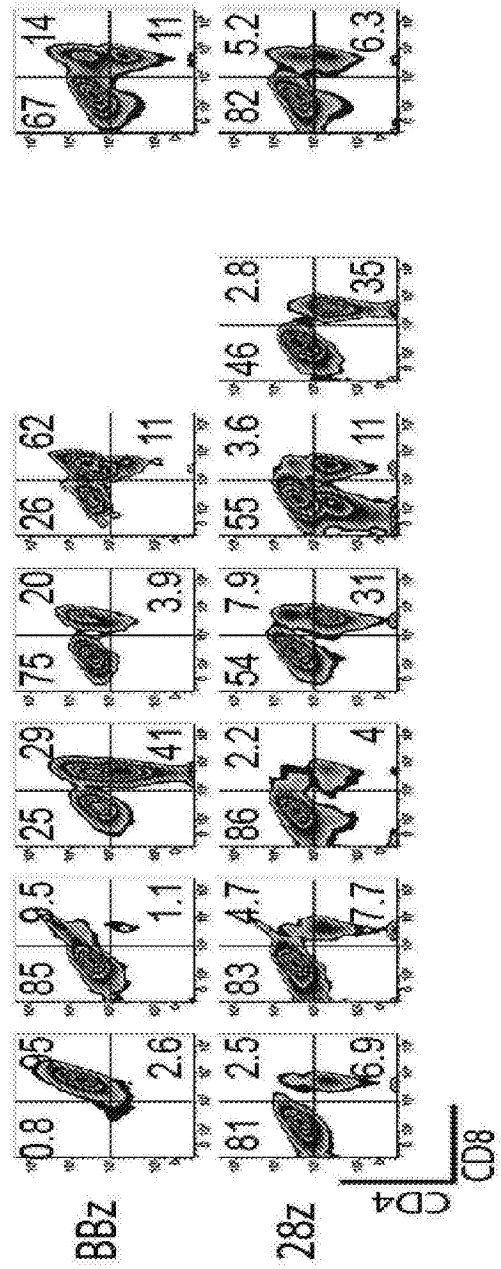


图15

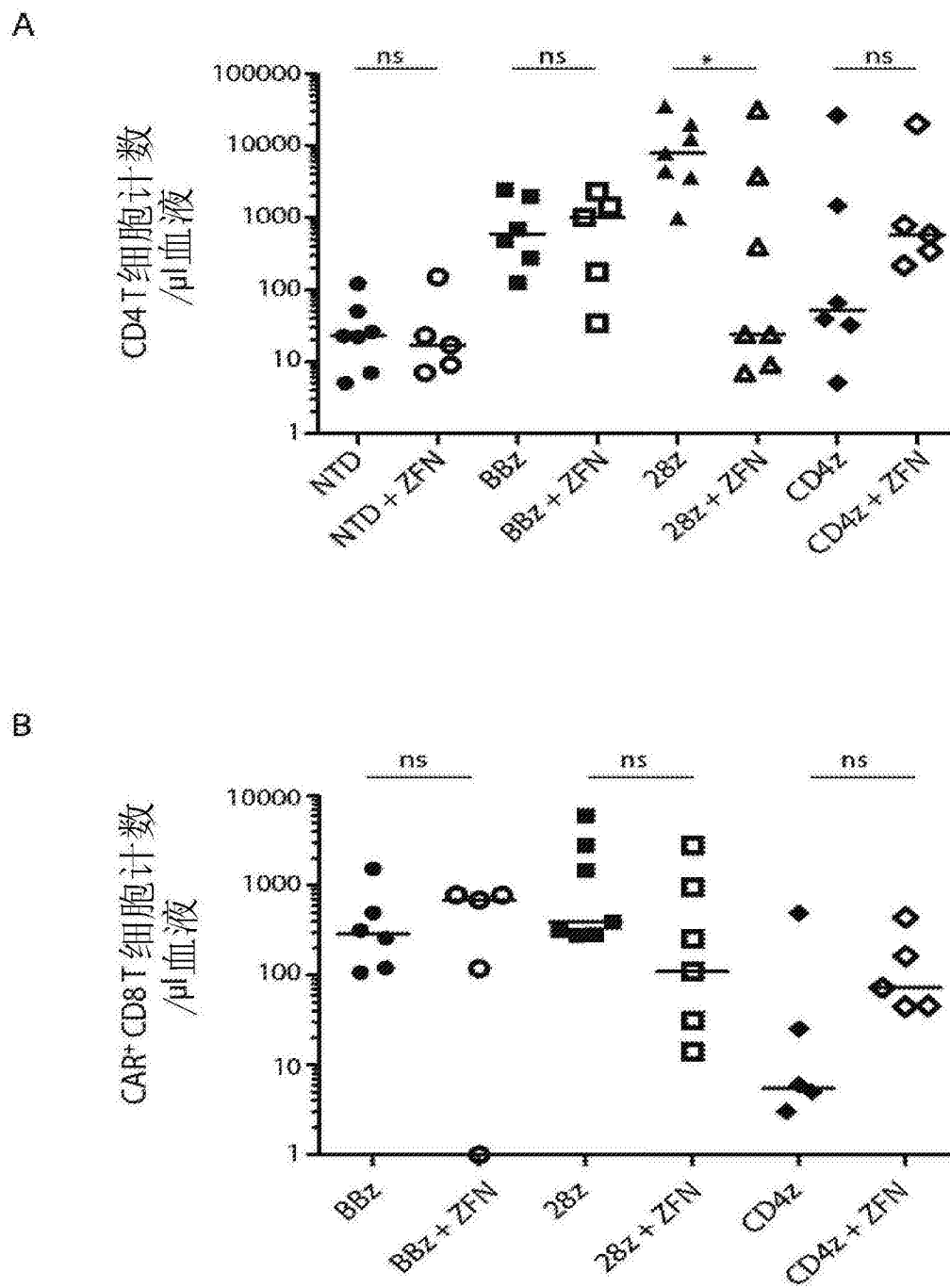


图16A-16B

组分	临床试验构建体	优化的构建体	功能影响
病毒载体	鼠 γ 逆转录病毒 (基于MMLV的)	慢病毒 (基于HIV的)	安全性、持续表达、转导效率
启动子	PGK	EF1 α	持续表达、较高表达(MFI)
铰链	无	CD8 α	灵活性
跨膜结构域	CD4	CD8 α 或CD28	防止感染、阻断降解、二聚化
共刺激结构域	CD3 ζ	CD28-CD3 ζ 4-1BB-CD3 ζ	存活、增殖、和效应功能
细胞外结构域	CD4	CD4或ScFv	靶向的表位、防止感染

PGK	CD4 EC	CD4 TM	CD3- ζ
-----	--------	--------	--------------

临床试验 CAR

EF1 α	CD4 EC	CD8 α TM	CD3- ζ
--------------	--------	-----------------	--------------

优化的 CAR

图17A

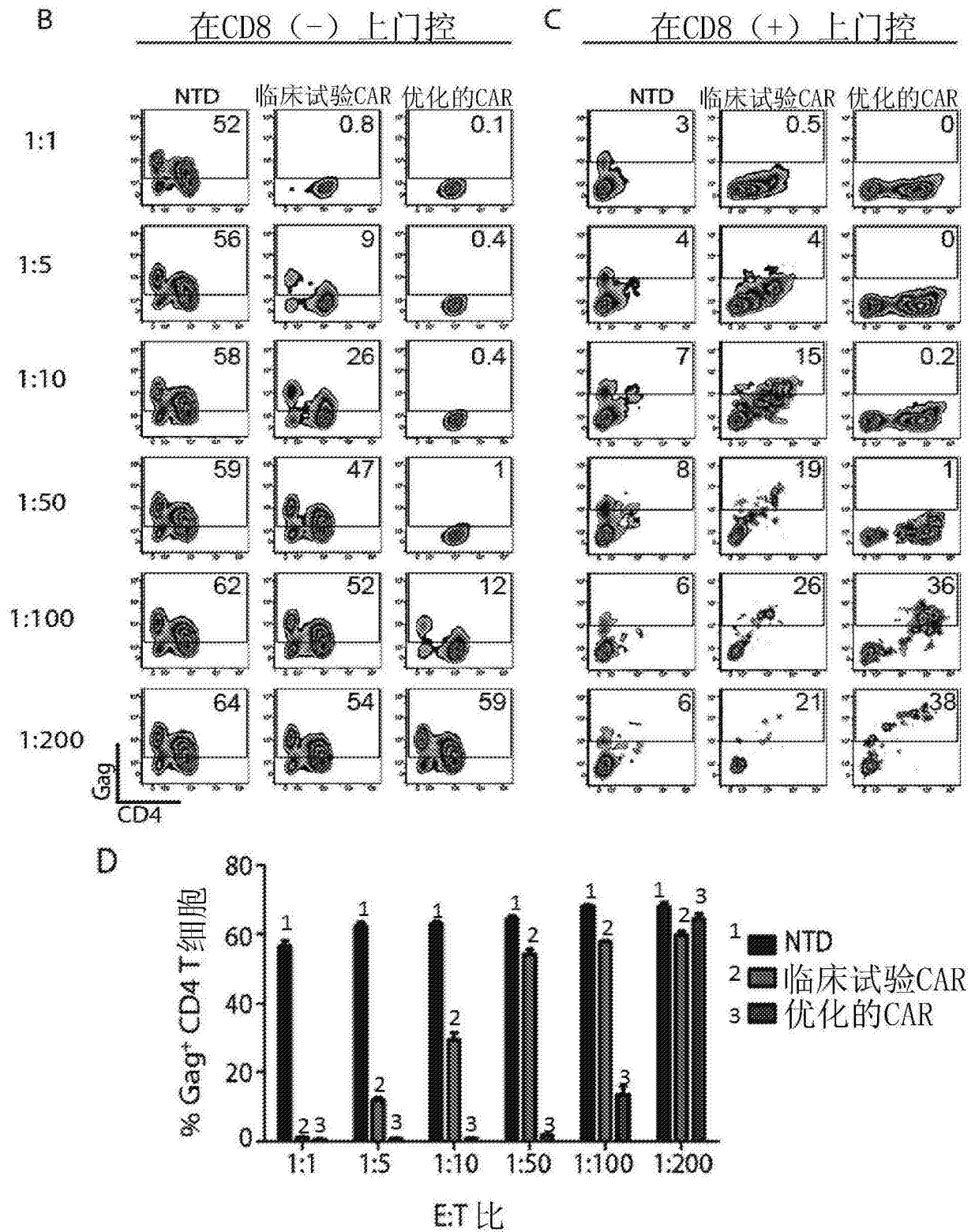


图17B-17D

优化的CD4 CAR的氨基酸序列：

1) CD4 CD28 CD3- ζ 序列 (SEQ ID NO: 44):

MNRGV^{浅灰色}PFRHLLLV^{浅灰色}LQLALLPAATOGKKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQ
IKILGNQGSFLTKGPSKLNDRA^{深灰色}DSRRSLWDQGNFPLIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQ
LLVFGLTANS^{深灰色}DTHLLOGQSLTLTLESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGK^{粗体}TL^{粗体}SVSOLELQDS
GTWTC^{粗体}TVLQ^{粗体}NQKKVEFKIDIVVLA^{粗体}FQKASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGEL
WWQAERASSSKSWITFDLKNKEVSVKRV^{粗体}TQDPKLQMGKKLPLHLTL^{粗体}PQALPOYAGSG
NLTLALEAKTGK^{粗体}LHQEVNLVVMRATQ^{粗体}LQKNLTCEVWGPTSPKLM^{粗体}SLKLENKEAKVS
KREKAVWVLNPEAGMWQCLLSDSGQVLL^{粗体}ESNIKVLPTWSTPVQPSG^{粗体}TTTPAPRPPTPAP
T^{粗体}IASOPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD^{粗体}FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIHFW
VRSKRSRL^{粗体}LHSDYMNMT^{粗体}PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSIDRVKFSRSADAPA
YQQGONQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP^{粗体}EMGGKPRRKNPQEGLYNELOKDKMA
EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

浅灰色 = CD4细胞外结构域

深灰色 = CD8 α 细胞外结构域

粗体 = CD28跨膜结构域和细胞内结构域

虚线 = CD3- ζ

2) CD4 4-1BB CD3- ζ 序列 (SEQ ID NO: 45):

MNRGV^{浅灰色}PFRHLLLV^{浅灰色}LQLALLPAATOGKKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQ
IKILGNQGSFLTKGPSKLNDRA^{深灰色}DSRRSLWDQGNFPLIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQ
LLVFGLTANS^{深灰色}DTHLLOGQSLTLTLESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGK^{粗体}TL^{粗体}SVSOLELQDS
GTWTC^{粗体}TVLQ^{粗体}NQKKVEFKIDIVVLA^{粗体}FQKASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGEL
WWQAERASSSKSWITFDLKNKEVSVKRV^{粗体}TQDPKLQMGKKLPLHLTL^{粗体}PQALPOYAGSG
NLTLALEAKTGK^{粗体}LHQEVNLVVMRATQ^{粗体}LQKNLTCEVWGPTSPKLM^{粗体}SLKLENKEAKVS
KREKAVWVLNPEAGMWQCLLSDSGQVLL^{粗体}ESNIKVLPTWSTPVQPSG^{粗体}TTTPAPRPPTPAP
T^{粗体}IASOPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD^{粗体}IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRG
RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGONQL
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP^{粗体}EMGGKPRRKNPQEGLYNELOKDKMAEAYSEIGMK
GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

浅灰色 = CD4细胞外结构域

深灰色 = CD8 α 细胞外结构域

粗体 = CD8 α 跨膜结构域

波浪线 = 4-1BB共刺激结构域

虚线 = CD3- ζ

图18 (部分1/5)

3) CD4细胞外结构域 (SEQ ID NO: 46):

MNRGVPPFRHLLLVLQLALLPAATQGKKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQ
IKILGNQGSFLT KGPSKLNDRADSRRLWDQGNFPLIHKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQ
LLVFGLTANS DTHLLQGQSLTLTLESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTL SVSQLELQDS
GTWTCTVLQNQKKVEFKIDIVVLA FQKASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGEL
WWQAERASSSKSWITFDLKNKEVSVKRVTQDPKLQMGGKLLPLHLTLPQALPQYAGSG
NLTLALEAKTGKLGHEVNLVVMRATQLQKNLTCEVWGPTSPKLM LSLKLENKEAKVS
KREKAVWVLNPEAGMWQCLLSDSGQVLLESNIKVLPTWSTPVQP

4) CD8 α 细胞外铰链 (SEQ ID NO: 47):

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

6) CD8 α 跨膜结构域 (SEQ ID NO: 48):

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

5) CD28跨膜结构域和细胞内结构域 (SEQ ID NO: 49):

FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYA
PPRDFAA YRS

7) 4-1BB共刺激结构域 (SEQ ID NO: 50):

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

8) CD3 ζ (SEQ ID NO: 51):

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

图18 (部分2/5)

优化的基于抗体的CAR的氨基酸序列

1) PG9 CD3- ζ 序列 (SEQ ID NO: 52):

QRLVESGGGVVQPGSSRLSCAASGFDFSROGMHWVRQAPGQGLEWVAFIKYDGSEK
 YHADSVWGRLSISRDNKDTLYLQMNSLRVEDTATYFCVREAGGPDYRNGYNYYDFY
 DGYNYHYMDVWVGKGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITIS
 CNGTSNDVGGYESVSWYQQHPGKAPKVVIYDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGL
 QAEDEGDYCYCKSLTSTRRRVFGTGKLTVLSGITTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRF
 AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRVKFSRSADAPAYQOGQ
 NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI
 GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

2) PGT128 CD3- ζ 序列 (SEQ ID NO: 53):

QSALTQPPSASGSPGQSITISCTGTSNNFVSWYQQHAGKAPKLVITYDVNKRPSGVDPDRFS
 GSKSGNTASLTVSGLQTDDEAVYYCGSLVGNWDVIFGGGKLTVLGGSSRSSSSSGGGGS
 GGGGQPQLQESGPTLVEASETSLTCAVSGDSTAACNSFWGWVRQPPGKGLEWVGSL
 HCASYWNRGWTYHNPSLKSRLTLALDTPKNLVFLKLSVTAADTATYYCARFGGEVLR
 YTDWPKPAWVDLWGRGTLVTVSSSGITTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA
 VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRVKFSRSADAPAYQOGQNQLYN
 ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
 RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

3) VRC01 CD3- ζ 序列 (SEQ ID NO: 54):

EIVLTQSPGTLSSLSPGETAHSRSTSYGSLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSG
 SRWGPDYNTISNLESGDFGVYYCQQYEFFGQGTKVQVDIKRGGSSRSSSSSGGGSGGG
 GQVQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLAPGKRPEWMGWLKPGRG
 AVNYARPLQGRVTMTRDVYSDTAFLELRSLTVDDTAVYFCTRGNCDYNWDFEHWG
 RGTPVIVSSSGITTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
 PLAGTCGVLLLSLVITLYCRVKFSRSADAPAYQOGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
 RGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST
 ATKDTYDALHMQALPPR

浅灰色 = ScFv 细胞外结构域

深灰色 = CD8 α 细胞外段链粗体 = CD8 α 跨膜结构域.....虚线 = CD3 ζ

图18 (部分3/5)

4) 3BNC60 CD3-ζ 序列 (SEQ ID NO: 55):

DIQMTQSPSSLSARVGD TVTITCQANGYLNWYQQRRGKAPKLLIYDGSKLERGVPARFS
 GRRWGQEQYNLTINNLPEDVATYFCQVYEFIVPGTRLDLKGGSSRSSSSSGGGGSGGGGO
 VHLSQSGAAVTKPGASVRVSCEASGYKISDHFIHWWRQAPGQGLQWVGWINPKTGQP
 NNPROFQGRVSLTRQASWDFDTSFYMDLKAVRSDDTAIYFCARQSRDFWDFDVWGS
 GTQVTVSSSGTTTPAPRPPTPAPTIASOPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
PLAGTCGVLLLSLVITLYCRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPOEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST
ATKDTYDALHMQALPPR

5) PGDM1400 CD3-ζ 序列 (SEQ ID NO: 56):

DFVLTQSPHSLSVTPGESASISCKSSHSLIHGDRNNYLAWYVQKPGRSPQLLIYLASSRAS
 GVPDRFSGSGSDKDFTLKISRVEDVGTYYCMQGRESPTFGQGTKVDIKGGSSRSSS
 SGGGGSGGGGQAQLVQSGPEVRKPGTSVKVSKAPGNTLKTLDLHWVRSVPGQGLQW
 MGWISHEGDKKVIVERFKAKVTIDWDRSTNTAYLQLSLTSGDTAVYYCAKGSKHRLR
 DYALYDDD GALNWAVD VDYLSNLEFWGQGTAVTVSSSGTTTPAPRPPTPAPTIASOPLS
LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA**PLAGTCGVLLLSLVITLYCRVKFSRSADA**
PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPOEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

浅灰色 = ScFv 细胞外结构域

深灰色 = CD8α 细胞外链

粗体 = CD8α 跨膜结构域

虚线 = CD3 ζ

图18 (部分4/5)

6) PG9 CD3- ζ ScFv 细胞外结构域序列 (SEQ ID NO: 57):

QRLVESGGGVVQPGSSRLRLSCAASGFDFSRQGMHWVRQAPGQGLEWVAFIKYDGSEK
YHADSVWGRLSISRDN SKDTLYLQMNSLRVEDTATYFCVREAGGPDYRNGYNYYDFY
DGYNYHYMDVWGKGTTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSQSALTQPASVSGSPGQSITIS
CNGTSNDVGGYESVSWYQQHPGKAPKVVIYDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGL
QAEDEGDYYCKSLTSTRRRVFGTGKLTVL

7) PGT128 CD3- ζ ScFv 细胞外结构域序列 (SEQ ID NO: 58):

QSALTQPPSASGSPGQSITISCTGTSNNFVSWYQQHAGKAPKLVIYDVNKRPSGVPDRFS
GSKSGNTASLTVSGLQTDDEAVYYCGSLVGNWDVIFGGGKLTVLGGSSRSSSSSGGGGS
GGGGQPQLQESGPTLVEASETLSTCAVSGDSTAACNSFWGWVRQPPGKGLEWVGSLS
HCASYWNRGWTYHNPSLKSRLTLALDTPKNLVFLKLSVTAADTATYYCARFGGEVLR
YTDWPKPAWVDLWGRGTLTVSS

8) VRC01 CD3- ζ ScFv 细胞外结构域序列 (SEQ ID NO: 59):

EIVLTQSPGTLSPGETAIISCRTSQYGLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSG
SRWGPDYNLTISNLESGDFGVYYCQQYEFFGQGTKVQVDIKRGGSSRSSSSSGGGGSGGG
GQVQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLAPGKRPEWMGWLKPGRG
AVNYARPLQGRVTMTRDVYSDTAFLELRSLTVDDTAVYFCTRGNCDYNWDFEHWG
RGTPVIVSS

9) 3BNC60 CD3- ζ 序列 (SEQ ID NO: 60):

DIQMTQSPSSLSARVGDVTITCQANGYLNWYQQRGKAPKLLIYDGSKLERGVPARFS
GRRWGQEYNLTINNLPEDVATYFCQVYEFIVPGTRLDLKGSSRSSSSSGGGGSGGGGQ
VHLSQSGAAVTKPGASVRVSCEASGYKISDHFHWWRQAPGQGLQWVGWINPKTGQP
NNPRQFQGRVSLTRQASWDFDYSFYMDLKAVRSDDTAIYFCARQRSDFWDFDVWGS
GTQVTVSS

10) PGDM1400 CD3- ζ 序列 (SEQ ID NO: 61):

DFVLTQSPHSLSVTPGESASISCKSSSHLIHGDRNNYLAWYVQKPGRSPQLLIYLASSRAS
GVPDRFSGSGDKDFTLKISRVEDVGTYYCMQGRESPWTFGQGKVDIKGGSSRSSS
SGGGGSGGGGQAQLVQSGPEVRKPGTSVKVSCKAPGNTLKYDLHWVRSVPGQGLQW
MGWISHEGDKKVIVERFKAKVTIDWDRSTNTAYLQLSGLTSGDTAVYYCAKGSKHRLR
DYALYDDD GALNWAVDVDYLSNLEFWGQGTAVTVSS

图18 (部分5/5)

优化的CD4 CAR的核酸序列

1) CD4 CD28 CD3- ζ 序列 (SEQ ID NO: 62):

ATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGGCCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCGCTCCCTCCAGCAGCCACT
 CAGGGAAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAAAAAGGGGATACAGTGGAAC TGACCTGTACAGCTTCCCAGA
 AGAAGAGCATACAATTCCACTGGAAAAACTCCAACCAGATAAAGATTCTGGGAAATCAGGGCTCCTTC
 TTAACATAAAGGTCCATCCAAGCTGAATGATCGCGCTGACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAA
 ACTTCCCCCTGATCATCAAGAATCTTAAGATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGAGGAC
 CAGAAGGAGGAGGTGCAATTGCTAGTGTTCGGATTGACTGCCAACTCTGACACCCACCTGCTTCAGGG
 GCAGAGCCTGACCTTGACCTTGGAGAGCCCCCTGGTAGTAGCCCTCAGTGCAATGTAGGAGTCCAA
 GGGGTAAAAACATACAGGGGGGGGAAGACCTCTCCGTGTCTCAGCTGGAGCTCCAGGATAGTGGCAC
 CTGGACATGCACTGTCTTGCAGAACCAGAAGAAGGTGGAGTTCAAAAATAGACATCGTGGTGCTAGCTT
 TCCAGAAGGCCTCCAGCATAGTCTATAAGAAAGAGGGGGGAACAGGTGGAGTTCTCTTCCCCTCGCC
 TTTACAGTTGAAAAGCTGACGGGCAGTGGCGAGCTGTGGTGGCAGGCGGAGAGGGCTTCTCTCCAA
 GTCTTGGATCACCTTTGACCTGAAGAACAAGGAAGTGTCTGTAAAACGGGTTACCCAGGACCCTAAGC
 TCCAGATGGGCAAGAAGCTCCCGCTCCACCTCACCTGCCCCAGGCCTTGCTCAGTATGCTGGCTCTG
 GAAACCTCACCTGGCCCTTGAAGCGAAAACAGGAAGTTGCATCAGGAAGTGAACCTGGTGGTGAT
 GAGAGCCACTCAGCTCCAGAAAAATTTGACCTGTGAGGTGTGGGGACCCACCTCCCCCTAAGCTGATGC
 TGAGCTTGAAACTGGAGAACAAGGAGGCAAGGTCTCGAAGCGGGAGAAGGCGGTGTGGGTGCTGAA
 CCCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAGTGACTCGGGACAGGTCTTGCTGGAATCCAACATCA
 AGGTTCTGCCCACATGGTCCACCCCGGTGCAGCCAACACGACGCCAGCGCCGCCACCACCAACACCG
 GCGCCCAACATCGCGTGGCAGCCCCCTGTCTCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGGCCAGCGGCCGGGGGGCGC
 AGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCCTGTGATTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCT
 GGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTCTTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGC
 AGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGGCCACCCGCAAGCATT
 ACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCGAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGC
 GCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAG
 AGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
 AGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGAT
 TGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCC
 ACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

浅灰色 = CD4 细胞外结构域

深灰色 = CD8 α 细胞外结构域

粗体 = CD28 跨膜结构域和细胞内结构域

虚线 = CD3 ζ

图19 (部分1/8)

2) CD4 4-1BB CD3-ζ 序列 (SEQ ID NO: 63):

ATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGGCACCTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCGCTCCTCCCAGCAGCCACT
 CAGGGAAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAAAAGGGGATACAGTGGAAGTACAGCTTCCCAGA
 AGAAGAGCATACAATTCCACTGGAAAACTCCAACCAGATAAAGATTCTGGGAAATCAGGGCTCCTTC
 TTAACATAAAGGTCCATCCAAGCTGAATGATCGCGCTGACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAA
 ACTTCCCCCTGATCATCAAGAATCTTAAGATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGAGGAC
 CAGAAGGAGGAGGTGCAATTGCTAGTGTTCGGATTGACTGCCAAGTCTGACACCCACCTGCTTCAGGG
 GCAGAGCCTGACCTTGACCTTGGAGAGCCCCCTGGTAGTAGCCCCCTCAGTGCAATGTAGGAGTCCAA
 GGGGTAAAAACATACAGGGGGGGGAAGACCTCTCCGTGTCTCAGCTGGAGCTCCAGGATAGTGGCAC
 CTGGACATGCACTGTCTTGCAGAACCAAGAAGGTGGAGTTCAAAATAGACATCGTGGTGCTAGCTT
 TCCAGAAGGCCTCCAGCATAGTCTATAAGAAAGAGGGGGGAACAGGTGGAGTTCTCCTTCCCACCTCGCC
 TTTACAGTTGAAAAGCTGACGGGCAGTGGCGAGCTGTGGTGGCAGGCGGAGAGGGGCTTCTCTCCAA
 GTCTTGATCACCTTTGACCTGAAGAACAAGGAAGTGTCTGTAAAACGGGTACCCAGGACCCTAAGC
 TCCAGATGGGCAAGAAGCTCCCGCTCCACCTCACCTGCCCCAGGCCTTGCCCTCAGTATGCTGGCTCTG
 GAAACCTCACCTTGCCCTTGAAGCGAAAAACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAACCTGGTGGTGAT
 GAGAGCCACTCAGCTCCAGAAAAATTTGACCTGTGAGGTGTGGGGACCCACCTCCCTAAGCTGATGC
 TGAGCTTGAAACTGGAGAACAAGGAGGCAAAGGTCTCGAAGCGGGAGAAGGCGGTGTGGGTGCTGAA
 CCCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGTGAGTGACTCGGGACAGGTCTTGCTGGAATCCAACATCA
 AGGTTCGCCCCACATGGTCCACCCCGGTGCAGCCAACACGACGCGCAGCGCCGCGACCAACACCCG
 GCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCGTCTCTGCGCCCAAGAGGCGTCCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGC
 AGTGCAACAGGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTG
 TGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTA
 TATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGAT
 TTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC
 GTACCAGCAGGGCCAGAACCAAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT
 TTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAA
 GGCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCG
 AGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
 CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

浅灰色 = CD4 细胞外结构域

深灰色 = CD8α 细胞外链

粗体 = CD8α 跨膜结构域

波浪线 = 4-1BB 共刺激结构域

虚线 = CD3-ζ

图19 (部分2/8)

3) CD4细胞外结构域 (SEQ ID NO: 64):

ATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAGGCACTTGCTTCTGGTGCTGCAACTGGCGCTCCTCCCAGCAGCCACT
CAGGGAAAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAAAAAGGGGATACAGTGGAAGTGACCTGTACAGCTTCCCAGA
AGAAGAGCATACAATTCCACTGGAAAACTCCAACCAGATAAAGATTCTGGGAAATCAGGGCTCCTTC
TTAACTAAAGGTCCATCCAAGCTGAATGATCGCGCTGACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAA
ACTTCCCCCTGATCATCAAGAATCTTAAGATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGGAGGAC
CAGAAGGAGGAGGTGCAATTGCTAGTGTTCCGATTGACTGCCAACTCTGACACCCACCTGCTTCAGGG
GCAGAGCCTGACCCTGACCTTGGAGAGCCCCCTGGTAGTAGCCCCTCAGTGCAATGTAGGAGTCCAA
GGGGTAAAAACATACAGGGGGGGGAAGACCCTCTCCGTGTCTCAGCTGGAGCTCCAGGATAGTGGCAC
CTGGACATGCACTGTCTTGCAGAACCAGAAGAAGGTGGAGTTCAAAATAGACATCGTGGTGCTAGCTT
TCCAGAAGGCCTCCAGCATAGTCTATAAGAAAGAGGGGGGAACAGGTGGAGTTCCTTCCCCTCGCC
TTTACAGTTGAAAAGCTGACGGGCAGTGGCGAGCTGTGGTGGCAGGCGGAGAGGGCTTCCTCTCCAA
GTCTTGGATCACCTTTGACCTGAAGAACAAGGAAGTGTCTGTAAAACGGGTACCCAGGACCCTAAGC
TCCAGATGGGCAAGAAGCTCCCGCTCCACCTCACCTGCCCCAGGCCTTGCCTCAGTATGCTGGCTCTG
GAAACCTCACCTTGCCCTTGAAGCGAAAACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAACCTGGTGGTGAT
GAGAGCCACTCAGCTCCAGAAAAATTTGACCTGTGAGGTGTGGGGACCCACCTCCCCTAAGCTGATGC
TGAGCTTGAACTGGAGAACAAGGAGGCAAAGGTCTCGAAGCGGGAGAAGGCGGTGTGGGTGCTGAA
CCCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAGTACTCGGGACAGGTCCTGCTGGAATCCAACATCA
AGGTTCTGCCACATGGTCCACCCCGGTGCAGCCA

4) CD8 α 细胞外铰链 (SEQ ID NO: 65):

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCG
CCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCAACAGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT

6) CD8 α 跨膜结构域 (SEQ ID NO: 66):

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACT
GC

5) CD28跨膜结构域和细胞内结构域 (SEQ ID NO: 67):

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATT
ATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCG
CCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC

7) 4-1BB共刺激结构域 (SEQ ID NO: 68):

AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCA
AGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

8) CD3 ζ (SEQ ID NO: 69):

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACG
AGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGAT
GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT
GGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTT
TACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCG
C

图19 (部分3/8)

优化的基于抗体的CAR的核酸序列

1) PG9 CD3- ζ 序列 (SEQ ID NO: 70):

CAGAGACTGGTGGAAAGCGGTGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGCAGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCG
CTTCCGGCTTCGACTTCAGCCGGCAGGGCATGCATTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGACAGGGACTGGAA
TGGGTGGCCCTTCATCAAGTACGACGGCAGCGAGAAGTACCACGCCGACAGCGTGTGGGGTAGACTGT
CTATCAGCCGGGACAACAGCAAGGACACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGTGGAGGACAC
CGCCACATACTTTTGGGTGCGGGAGGCTGGTGGACCTGACTACCGGAACGGCTACAACCTACTACGACT
TCTACGACGGCTACTACAACCTACCCTACATGGATGTGTGGGGCAAGGGCACCCCGTGACCGTGTCT
AGCGGAGGCGGAGGATCTGGCGGGGAGGAAGTGGAGGCGGCGGAAGCCAGTCTGCCCTGACCCAGC
CTGCCCTGTGTCTGGCAGCCCTGGCCAGAGCATCACCATCAGCTGCAACGGCACCCAGCAACGACGTG
GGCGGCTACGAGAGCGTGTCTGGTATCAGCAGCACCCCGGCAAGGCCCCCAAGGTGGTGTATCTACG
ACGTGTCCAAGAGGCCAGCGGCGTGAGCAACCGGTTACGCGGCAGCAAGAGCGGCAATACCGCCAG
CCTGACCATCTCTGGGCTGCAGGCCGAGGACGAGGGCGACTACTACTGCAAGAGCCTGACCAGCACC
AGGCGGAGAGTGTTCGGCACCGGCCACCAAGCTGACCGTGTCTGACCACGACGCCAGCGCCGCGACCA
CAACACCGGGCGCCACCATCGCGTCGCGAGCCCTGTCCCTGCGGCCAGAGGCGTGCCTGGCCAGCGGG
GGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCC
GGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCGAGTGAAGTTTCAGCAGG
AGCGCAGACGCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAA
GAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAA
GGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGA
GATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA
GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

2) PGT128 CD3- ζ 序列 (SEQ ID NO: 71):

GGATCCCAGAGCGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGATCTCCCGGCCAGAGCATCACCATCAG
CTGTACCGGCACCAGCAACAACCTTCGTGTCTTGGTATCAGCAGCACGCCGGCAAGGCCCCCAAGCTCG
TGATCTACGACGTGAACAAGCGGCCAGCGGCGTGCCCGATAGATTACGCGGCAGCAAGAGCGGCAA
CACCGCCAGCCTGACAGTGTCTGGCTGCAGACCGATGACGAGGCCGTGTACTACTGCGGCAGCCTCG
TGGGCAACTGGGACGTGATCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGTCTGGGCGGAAGCAGCAGAAG
CTCTAGTCTGGCGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAGGACAGCCTCAGCTGCAGGAATCTGGCCCCACA
CTGGTGGAAAGCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTCCGGCGATTCTACCGCCGCTGCAA
TAGCTTCTGGGGCTGGGTGCGCCAGCCTCCTGGAAAGGGACTGGGAATGGGTGGGAAGCCTGAGCCACT
GCGCCAGCTATTGGAACCGGGGCTGGACCTACCACAACCCAGCCTGAAGTCCAGACTGACCTTGGCC
CTGGACACCCCCAAGAACCTGGTGTTCCTGAAGCTGAACAGCGTGACAGCCGCGGACACCGCCACCTA
CTACTGTGCCAGATTTGGCGGCGAGGTGCTGCGGTACACCGACTGGCCTAAACCTGCCTGGGTGGACC
TGTGGGGCAGAGGAACACTCGTGACCGTGTCTAGCTCCGGAACACGACGCCAGCGCCGCGGACCAAC
AACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCGAGCCCTGTCCCTGCGGCCAGAGGCGTGCCTGGCCAGCGGCGG
GGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCG
GGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCGAGTGAAGTTTCAGCAGGA
GCGCAGACGCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAG
AGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAG
GAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAG
ATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAG
CCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

图19 (部分4/8)

3) VRC01 CD3- ζ 序列 (SEQ ID NO: 72):

GGATCCGAGATCGTGTGACACAGAGCCCTGGCACCCCTGAGCCTGTCTCCAGGCGAGACAGCCATCAT
CAGCTGCCGACAAAGCCAGTACGGCAGCCTGGCCTGGTATCAGCAGAGGCCTGGACAGGCCCCCAGA
CTCGTGATCTACAGCGGCAGCACAAAGAGCCGCCGGAATCCCCGATAGATTACAGCGGCTCTAGATGGGG
CCCTGACTACAACCTGACCATCAGCAACCTGGAAAGCGGCGACTTCGGCGTGTACTACTGCCAGCAGT
ACGAGTTCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGCAGGTGGACATCAAGAGAGGGCGGCAGCTCCAGAAGCTC
CAGCTCTGGCGGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGACAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGGCCAGATG
AAGAAACCCGGCGAGAGCATGCGGATCAGCTGCAGAGCCTCCGGCTACGAGTTCATCGACTGCACCCCT
GAACTGGATTTCGGCTGGCCCCCTGGCAAAAGACCCGAGTGGATGGGCTGGCTGAAGCCAGAGGCGGA
GCCGTGAATTACGCCAGACCTCTGCAGGGCAGAGTGACCATGACCCGGGACGTGTACAGCGATACCG
CCTTCCTGGAACCTGCGGAGCCTGACCGTGGATGATACCGCCGTGTACTTCTGCACCCGGGGCAAGAAC
TGCGACTACAACCTGGGACTTCGAGCACTGGGGCAGAGGCAACCCCTGTGATCGTGTCTAGCTCCGGAA
CAGGACGCCAGCGCCCGGACCAACCAACACCGGGCGCCACCATCGCGTCCGAGCCCTGTCTCTGCGCC
CAGAGGCGTGCCTGGCCAGCGGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGAATTCGCTGTGATAT
CTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTT
ACTGCGAGTGAAGTTACAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACAAAGCAGGGCCAGAACCAGCTTAT
AACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCTG
AGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATA
AGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATG
GCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCC
CCTCGC

4) 3BNC60 CD3- ζ 序列 (SEQ ID NO: 73):

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGAGTGGGCGACACCGTGACCATCACCTG
TCAGGCCAACGGCTACCTGAACCTGGTATCAGCAGCGGAGAGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTAC
GACGGCAGCAAGCTGGAAAGAGGCGTGCCCGCCAGATTACGCGGCAGAAGATGGGGCCAGGAGTAC
AACCTGACCATCAACAACCTGCAGCCCCAGGACGTGGCCACATACTTTGCCAGGTGTACGAGTTCAT
CGTGCCCGGCACCCGGCTGGATCTGAAGGGCGGAAGCAGCAGAAGCAGCTCTAGCGGCGGAGGCGGA
TCTGGCGGAGGGGGACAGGTGCACCTGAGTCACTGTGGCGCCGCTGTGACAAAGCCAGGCGCTTCTGT
GCGGGTGTCTGTGAAGCCAGCGGCTACAAGATCAGCGACCACTTCATCCACTGGTGGCGGCAGGCTC
CAGGACAGGGACTGCAGTGGGTGGGATGGATCAACCCCAAGACCGGCCAGCCCAACAACCCCAAGACA
GTTCCAGGGCAGAGTGTCCCTGACCAGACAGGCCAGCTGGGACTTCGACACCTACAGCTTCTACATGG
ACCTGAAGGCCGCTGCGGAGCGACGACACCGCCATCTACTTTGCGCCAGACAGAGAAGCGACTTCTGG
GATTTGACGCTGTGGGGCAGCGGCACCCAAGTGACCGTGTCTATCTACACGACGCGCAGCGCCGCGACC
ACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCCGACGCTTGTCTCTGCGCCAGAGGCGTGCCTGGCCAGCGG
CGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGG
CCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCGAGTGAAGTTCAGCA
GGAGCGCAGACGCCCCCGCTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACG
AAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAG
AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGT
GAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGACACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTA
CAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

图19 (部分5/8)

5) PGDM1400 CD3- ζ 序列 (SEQ ID NO: 74):

GACTTCGTGCTGACCCAGAGCCCTCACAGCCTGAGCGTGACACCTGGCGAGAGCGCCAGCATCAGCTG
 CAAGAGCAGCCACTCCCTGATCCACGGCGACCGGAACAACCTACCTGGCTTGGTACGTGCAGAAGCCCG
 GCAGATCCCCCAGCTGCTGATCTACCTGGCCAGCAGCAGAGCCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCT
 GGCAGCGGCAGCGACAAGGACTTCACCCTGAAGATCAGCCGGGTGGAAACCGAGGACGTGGGCACCT
 ACTACTGTATGCAGGGCAGAGAGAGCCCTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGACATCAAGGG
 CGGCAGCTCCAGAAGCAGCTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGACAGGCTCAGCTGGTG
 CAGTCTGGACCCGAAGTGCGGAAGCCTGGCACAGCGTGGAAGGTGTCCTGTAAAGCCCTGGCAACA
 CCCTGAAAACCTACGACCTGCACCTGGGTGCGCAGCGTGCCAGGACAGGGACTGCAGTGGATGGGCTG
 GATCAGCCACGAGGGCGACAAGAAAGTGATCGTGGAACGGTTCAAGGCCAAAGTGACCATCGACTGG
 GACAGAAGCACCAACACCGCCTACCTGCAGCTGAGCGGCCTGACCTCTGGCGATACCGCCGTGTACTA
 CTGCGCCAAGGGCAGCAAGCACCGGCTGAGAGACTACGCCCTGTACGACGATGACGGCGCCCTGAAC
 TGGGCGGTGGATGTGGACTACCTGAGCAACCTGGAATTCTGGGGCCAGGGAACCGCCGTGACCGTGTG
 ATCTACCAAGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCCAACATCGCGTCGACGCCCTGTCCC
 TGGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTG
 TGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCA
 CCCTTTACTGCGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCA
 GCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGG
 GACCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAG
 AAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGG
 CACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGC
 CCTGCCCCCTCGC

浅灰色 = ScFv EC结构域

深灰色 = CD8 α 细胞外结构域粗体 = CD8 α 跨膜结构域.....虚线 = CD3 ζ

图19 (部分6/8)

6) PG9 CD3- ζ ScFv 细胞外结构域序列**(SEQ ID NO: 75):**

CAGAGACTGGTGGAAAGCGGTGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGCAGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCG
CTTCCGGCTTCGACTTCAGCCGGCAGGGCATGCATTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGACAGGGACTGGAA
TGGGTGGCCTTCATCAAGTACGACGGCAGCGAGAAGTACCACGCCGACAGCGTGTGGGGTAGACTGT
CTATCAGCCGGGACAACAGCAAGGACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGTGGAGGACAC
CGCCACATACTTTTTCGTGCGGGAGGCTGGTGGACCTGACTACCGGAACGGCTACAACCTACTACGACT
TCTACGACGGCTACTACAACCTACCACTACATGGATGTGTGGGGCAAGGGCACCACCGTGACCGTGTCT
AGCGGAGGCGGAGGATCTGGCGGGCGGAGGAAGTGGAGGCGGCGGAAGCCAGTCTGCCCTGACCCAGC
CTGCCTCTGTGTCTGGCAGCCCTGGCCAGAGCATCACCATCAGCTGCAACGGCACCAGCAACGACGTG
GGCGGCTACGAGAGCGTGTCTTGGTATCAGCAGCACCCCGGCAAGGCCCCCAAGGTGGTGATCTACG
ACGTGTCCAAGAGGCCAGCGGCGTGAGCAACCGGTTTCAGCGGCAGCAAGAGCGGCAATACCGCCAG
CCTGACCATCTCTGGGCTGCAGGCCGAGGACGAGGGCGACTACTACTGCAAGAGCCTGACCAGCACC
AGGCGGAGAGTGTTTCGGCACCGGCACCAAGCTGACCGTGCTG

7) PGT128 CD3- ζ ScFv 细胞外结构域序列**(SEQ ID NO: 76):**

GGATCCCAGAGCGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGATCTCCCGGCCAGAGCATCACCATCAG
CTGTACCGGCACCAGCAACAACCTCGTGTCTGGTATCAGCAGCACGCCGGCAAGGCCCCCAAGCTCG
TGATCTACGACGTGAACAAGCGGCCAGCGGCGTGCCGATAGATTACGCGGCAGCAAGAGCGGCAA
CACCGCCAGCCTGACAGTGTCTGGCCTGCAGACCGATGACGAGGCCGTGTACTACTGCGGCAGCCTCG
TGGGCAACTGGGACGTGATCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGCGGAAGCAGCAGAAG
CTCTAGTTCTGGCGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAGGACAGCCTCAGCTGCAGGAATCTGGCCCCACA
CTGGTGGAAGCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGTGCCGTGTCCGGCGATTCTACCGCCGCCTGCAA
TAGCTTCTGGGGCTGGGTGCGCCAGCCTCCTGGAAGGGACTGGAATGGGTGGGAAGCCTGAGCCACT
GCGCCAGCTATTGGAACCGGGGCTGGACCTACCACAACCCAGCCTGAAGTCCAGACTGACCTGGCC
CTGGACACCCCAAGAACCTGGTGTTCTGAAGCTGAACAGCGTGACAGCCGCCGACACCGCCACCTA
CTACTGTGCCAGATTTGGCGGCGAGGTGCTGCGGTACACCGACTGGCCTAAACCTGCCTGGGTGGACC
TGTGGGGCAGAGGAACACTCGTGACCGTGTCTAGCTCCGGA

8) VRC01 CD3- ζ ScFv 细胞外结构域序列**(SEQ ID NO: 77):**

GGATCCGAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGCACCCCTGAGCCTGTCTCCAGGCGAGACAGCCATCAT
CAGCTGCCGGACAAGCCAGTACGGCAGCCTGGCCTGGTATCAGCAGAGGCCTGGACAGGCCCCCAAG
CTCGTGATCTACAGCGGCAGCACAAAGAGCCGCCGAATCCCCGATAGATTACGCGGCTCTAGATGGGG
CCCTGACTACAACTGACCATCAGCAACCTGGAAAGCGGCGACTTCGGCGTGTACTACTGCCAGCAGT
ACGAGTTCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGCAGGTGGACATCAAGAGAGGCGGCAGCTCCAGAAGCTC
CAGCTCTGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGACAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGGCCAGATG
AAGAAACCCGGCGAGAGCATGCGGATCAGCTGCAGAGCCTCCGGCTACGAGTTCATCGACTGCACCCT
GAACTGGATTTCGGCTGGCCCCTGGCAAAGACCCGAGTGGATGGGCTGGCTGAAGCCAGAGGCGGA
GCCGTGAATTACGCCAGACCTCTGCAGGGCAGAGTGACCATGACCCGGGACGTGTACAGCGATACCG
CCTTCCTGGAAGTGGGAGCCTGACCGTGGATGATACCGCGTGTACTTCTGCACCCGGGGCAAGAAC
TGCGACTACAACTGGGACTTCGAGCACTGGGGCAGAGGCACCCCTGTGATCGTGTCTAGCTCCGGA

图19 (部分7/8)

9) 3BNC60 CD3- ζ 序列 (SEQ ID NO: 78):

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGAGTGGGCGACACCGTGACCATCACCTG
TCAGGCCAACGGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGCGGAGAGGCAAGGCCCCAAGCTGCTGATCTAC
GACGGCAGCAAGCTGGAAAGAGGGCTGCCCCGCCAGATTTCAGCGGCAGAAGATGGGGCCAGGAGTAC
AACCTGACCATCAACAACCTGCAGCCCCGAGGACGTGGCCACATACTTTGCCAGGTGTACGAGTTCAT
CGTGCCCCGGCACCCGGCTGGATCTGAAGGGCGGAAGCAGCAGAAGCAGCTCTAGCGGCGGAGGCGGA
TCTGGCGGAGGGGGACAGGTGCACCTGAGTCAGTCTGGCGCCGCTGTGACAAAGCCAGGCGCTTCTGT
GCGGGTGTCTGTGAAGCCAGCGGCTACAAGATCAGCGACCACTTCATCCACTGGTGGCGGCAGGCTC
CAGGACAGGGACTGCAGTGGGTGGGATGGATCAACCCCAAGACCGGCCAGCCCCAACAACCCCAAGACA
GTTCCAGGGCAGAGTGTCCCTGACCAGACAGGCCAGCTGGGACTTCGACACCTACAGCTTCTACATGG
ACCTGAAGGCCGTGCGGAGCGACGACACCGCCATCTACTTTTGCGCCAGACAGAGAAGCGACTTCTGG
GATTTTCGACGTGTGGGGCAGCGGCACCCAAGTGACCGTGTCTATCT

10) PGDM1400 CD3- ζ 序列 (SEQ ID NO: 79):

GACTTCGTGCTGACCCAGAGCCCTCACAGCCTGAGCGTGACACCTGGCGAGAGCGCCAGCATCAGCTG
CAAGAGCAGCCACTCCCTGATCCACGGCGACCGGAACAACCTACCTGGCTTGGTACGTGCAGAAGCCCG
GCAGATCCCCCAGCTGCTGATCTACCTGGCCAGCAGCAGAGCCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCT
GGCAGCGGCAGCGACAAGGACTTCACCCTGAAGATCAGCCGGGTGGAAACCGAGGACGTGGGCACCT
ACTACTGTATGCAGGGCAGAGAGAGCCCCCTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGACATCAAGGG
CGGCAGCTCCAGAAGCAGCTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGACAGGCTCAGCTGGTG
CAGTCTGGACCCGAAGTGCGGAAGCCTGGCACCAGCGTGAAGGTGTCCTGTAAAGCCCCTGGCAACA
CCCTGAAAACCTACGACCTGCACTGGGTGCGCAGCGTGCCAGGACAGGGACTGCAGTGGATGGGCTG
GATCAGCCACGAGGGCGACAAGAAAGTGATCGTGGAACGGTTCAAGGCCAAAGTGACCATCGACTGG
GACAGAAGCACCAACACCGCCTACCTGCAGCTGAGCGGCCTGACCTCTGGCGATACCGCCGTGTACTA
CTGCGCCAAGGGCAGCAAGCACCGGCTGAGAGACTACGCCCTGTACGACGATGACGGCGCCCTGAAC
TGGGCCGTGGATGTGGACTACCTGAGCAACCTGGAATTCTGGGGCCAGGGAACCGCCGTGACCGTGTCT
ATCT

图19 (部分8/8)