



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111850014 B

(45) 授权公告日 2021.07.06

(21) 申请号 201910555128.7

C12N 5/10 (2006.01)

(22) 申请日 2019.06.25

C12N 15/867 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 35/17 (2015.01)

申请公布号 CN 111850014 A

A61P 35/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.10.30

(56) 对比文件

(73) 专利权人 浙江康佰裕生物科技有限公司

CN 109320615 A, 2019.02.12

地址 310000 浙江省杭州市滨江区长河街

CN 108018299 A, 2018.05.11

道滨安路688号5幢20层2006-2008室

Gray Kueberuwa等. CD19 CAR T Cells

(72) 发明人 朱建高 杨文君

Expressing IL-12 Eradicate Lymphoma in

Fully Lymphoreplete Mice through

(74) 专利代理机构 杭州杭诚专利事务所有限公

Induction of Host Immunity.《Molecular

司 33109

Therapy: Oncolytics》.2018,第8卷第41-51页.

代理人 尉伟敏 何俊

审查员 朱晓乐

(51) Int. Cl.

C12N 15/62 (2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

C07K 19/00 (2006.01)

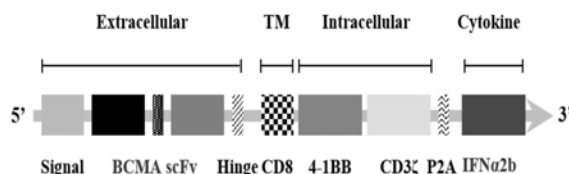
序列表11页 附图3页

(54) 发明名称

一种细胞因子增效的嵌合抗原受体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及嵌合抗原受体领域,公开了一种细胞因子增效的嵌合抗原受体及其应用,具体地,本发明公开了一种多核苷酸序列,选自:(1):含有依次连接的抗BCMA单链抗体的编码序列、人CD8铰链跨膜区的编码序列、人4-1BB胞内区的编码序列、人CD3ζ胞内区的编码序列、人P2A肽的编码序列和人IFN全长序列;和(2):(1)中多核苷酸序列的互补序列。本发明还公开了相关的融合蛋白、核酸构建物、逆转录病毒和基因修饰的T细胞,以及上述物质在制备治疗BCMA介导的疾病的药物中的用途。



1. 一种融合蛋白,其特征在于:氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。
2. 一种编码权利要求1所述融合蛋白的多核苷酸。
3. 如权利要求2所述的多核苷酸,其特征在于:核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。
4. 一种核酸构建物,其特征在于:含有可编码权利要求1中所述融合蛋白的多核苷酸。
5. 如权利要求4所述的核酸构建物,其特征在于:所述多核苷酸为权利要求2或3所述的多核苷酸。
6. 如权利要求4所述的核酸构建物,其特征在于:所述核酸构建物为载体。
7. 如权利要求6所述的核酸构建物,其特征在于:所述核酸构建物为逆转录病毒载体,含有复制起始位点,3' LTR,5' LTR,权利要求2或3所述的多核苷酸,以及标记。
8. 一种逆转录病毒,其特征在于:含有权利要求4-7之一所述的核酸构建物。
9. 一种逆转录病毒的转导方法,其特征在于:所述转导方法包括小规模包装如权利要求8所述的逆转录病毒的方法、筛选和建立产毒细胞株的方法。
10. 一种基因修饰的T细胞,其特征在于:所述T细胞含有如权利要求2或3所述的多核苷酸,或含有权利要求4-7之一所述的核酸构建物,或感染了如权利要求8所述的逆转录病毒,或稳定表达如权利要求1所述的融合蛋白。
11. 如权利要求10所述基因修饰的T细胞在制备治疗BCMA介导的多发性骨髓瘤疾病的药物中的用途。

一种细胞因子增效的嵌合抗原受体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及嵌合抗原受体领域,尤其涉及一种包含BCMA-CAR并且分泌细胞因子的嵌合抗原受体及其用途。

背景技术

[0002] 多发性骨髓瘤(MM)是一种恶性浆细胞疾病,表现为骨髓浆细胞恶性克隆性增生,分泌单克隆免疫球蛋白或其片段(M蛋白),导致骨骼、肾脏等相关靶器官或组织损伤,常见临床表现为骨痛、贫血、肾功能不全、感染等。多发性骨髓瘤为血液系统第二大恶性肿瘤,占血液系统恶性肿瘤的10%,多发病于男性,其发病率随着年龄的增长逐年增高,近几年更是有年轻化的趋势。目前,多发性骨髓瘤的常见治疗类似于其他癌症的疗法,诸如化学疗法或放射疗法、干细胞移植或骨髓移植、靶向疗法或生物疗法。虽然目前的多发性骨髓瘤疗法通常会产生缓解,但是几乎所有患者最终都会复发。需要用于治疗多发性骨髓瘤的有效免疫治疗剂。

[0003] 随着T淋巴细胞肿瘤免疫应答机制的研究日益受到重视,嵌合抗原受体T(CAR-T)细胞治疗正在成为肿瘤免疫治疗领域的一个新的免疫治疗策略。由于T细胞对靶细胞的识别特异性依赖于T淋巴细胞受体(T Cell Receptor, TCR),因此将针对肿瘤细胞相关抗原的单链抗体片段(scFv)与T淋巴细胞受体的CD3 ζ 或Fc ϵ RI γ 等胞内信号激活基序融合成嵌合抗原受体(Chimeric antigen receptor, CAR),并将其通过如逆转录病毒感染等方式基因修饰在T淋巴细胞表面,这种CAR-T淋巴细胞能够以主要组织相容性复合物(Major Histocompatibility Complex, MHC)非限制性方式选择性地将T淋巴细胞定向到肿瘤细胞并特异性地杀伤肿瘤。

[0004] B细胞成熟抗原(B-cell maturation antigen, BCMA)是一种表达于成熟B细胞和浆细胞表面的特征性分子。研究表明,BCMA在维持浆细胞的存活中起了重要的作用,同时也对骨髓瘤细胞的恶性增生起了重要的促进作用。BCMA普遍表达于多发性骨髓瘤细胞系,而在成熟B细胞、浆细胞之外的正常人体组织无表达,且在CD34⁺造血细胞中无表达。

[0005] 由于BCMA表达特征与CD19的高度相似性,以及抗CD19 CAR-T细胞治疗的成功进展,提示我们BCMA可以作为CAR-T细胞的靶点之一用于多发性骨髓瘤的细胞免疫治疗。目前,以BCMA作为靶点的CAR-T细胞治疗临床研究在世界各地陆续开展,部分取得了较为积极的治疗效果。但是在现有的技术水平下,包括靶向BCMA在内的很多在研的CAR-T疗法,其安全性仍有待提高。另外,CAR-T细胞在体内的增殖能力较差,对肿瘤细胞的杀伤效率较低也会客观上加大CAR-T细胞的使用剂量,容易造成较强的毒副作用,如炎症因子风暴和中枢神经系统毒性。因此,仍然迫切需要对CAR的设计进行改造,进一步提高CAR-T疗法的安全性和有效性。

[0006] 在抗原存在情况下,T细胞需要按照一定顺序依次接受三种信号才能完全激活,并且正常的增殖和分化。这三种信号分别是:第一信号,抗原结合的T细胞受体(TCR),和CD3胞内免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)转导信号(CD3 ζ);第二信号,协同刺激信号,包括CD28、

CD137、CD134等表面受体；第三信号，细胞因子，例如I型干扰素、白介素12(IL-12)等。CAR-T设计考虑到了T细胞激活的免疫学特性，CAR的结构包含胞外结合区，跨膜区和胞内信号区。通常胞外区包含能够识别肿瘤相关抗原的scFv，跨膜区采用CD8、CD28等分子的跨膜区，胞内信号区采用免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM) CD3 ζ 及共刺激信号分子 CD28、CD137、CD134等的胞内信号区。目前市场主流的CAR设计为第二代CAR，即在CAR的胞内信号区提供T细胞激活所必须的第一信号(ITAM结构域)和第二信号(B7/CD28或 4-1BB/CD137胞内结构域)，能够引起T淋巴细胞的持续增殖，提高T细胞的细胞毒性、增殖活性等。

[0007] 免疫抑制性微环境是限制CAR-T细胞对肿瘤有效杀伤的主要原因之一。最新一代CAR-T技术(第四代CAR-T)更加注重对肿瘤免疫微环境调节，通过在CAR设计中加入细胞因子或共刺激配体等，为CAR-T提供额外的第三信号，可有效克服免疫抑制微环境，进一步延长CAR-T细胞应答时间和提高CAR-T细胞的应答水平。例如有些四代CAR可以产生IL-12，增加T细胞的激活，同时激活固有免疫细胞使其发挥作用来清除靶抗原阴性的癌细胞，从而进一步提高杀伤效果。

[0008] 干扰素在机体免疫系统抵抗外界病原和清除体内肿瘤细胞的过程中发挥重要调控作用。近年来研究表明，干扰素通过多种途径调节肿瘤发生，进展和转移等过程。一方面，干扰素通过激活JAK1/TYK2和STAT1/2信号通路，能直接调控肿瘤细胞的增殖、凋亡和迁移；另一方面，干扰素能调控包括T细胞在内的所有类型免疫细胞的生物学功能。

[0009] 干扰素根据蛋白质结构和功能的不同，分为三个类型。I型干扰素包括14种IFN α 亚型以及其他亚型(IFN β , ϵ , κ , ω 等)，II型干扰素主要指IFN γ ，III型干扰素主要指IFN λ 。I型干扰素可作为抗癌药物，除了抑制肿瘤细胞生长和抗血管生成，还能促进抗原递呈细胞(树突状细胞)成熟和交叉致敏的能力、促进T细胞的增殖和细胞毒性、提高NK细胞的杀伤能力和增加B细胞免疫球蛋白类型转换等。I型干扰素中的多种亚型，例如IFN α 2a, IFN α 2b和IFN β 等，已广泛应用于抗肿瘤和抗病毒治疗。对于恶性血液肿瘤，例如慢性髓细胞白血病(CML)，IFN α 2b重组蛋白注射联合化疗或靶向治疗可以有效提高患者生存期。而IFN α 2a重组蛋白一度被用来治疗丙型肝炎和乙型肝炎。IFN β 可用于缓解多发性硬化的症状；在部分临床研究中，IFN β 联合内分泌治疗可显著改善乳腺癌患者的预后。然而，无论选用哪种类型的干扰素，直接注射干扰素重组蛋白进行治疗的方法存在药物半衰期短，毒副作用大以及易产生耐药等诸多弊端，因而限制了此类药物在临床治疗中的应用。有些研究者尝试将干扰素与PEG等聚合物混合，以提高干扰素在体内的半衰期，但是大规模临床试验证明，此方法治疗黑色素瘤的疗效一般。

发明内容

[0010] 为了进一步提高CAR-T对多发性骨髓瘤细胞的杀伤效果，本发明提供了一种包含BCMA-CAR-IFN序列的嵌合抗原受体及其用途。本发明在靶向BCMA的CAR设计基础上进行改进，在BCMA-CAR的C末端增加基因优化的人全长干扰素(IFN)片段。与仅表达BCMA-CAR的CAR-T细胞相比，表达BCMA-CAR-IFN的CAR-T细胞具有更强的肿瘤杀伤能力。

[0011] 要提高CAR-T的抗肿瘤效果，一种思路是在肿瘤部位增加细胞因子的表达。细胞因子可以调节肿瘤组织周围的免疫微环境，同时作为第三信号，进一步提高CAR-T细胞的应答水平。细胞因子包括白细胞介素、干扰素、肿瘤坏死因子超家族、集落刺激因子、趋化因子、

生长因子等,种类多达数百种。而选择I型干扰素作为第三信号,是基于已有的研究成果和申请人的大量前期研究工作。首先I型干扰素是目前研究最早的干扰素类型,对其生理功能和潜在副作用已有较深入和全面的认识;其次,I型干扰素具有多重调节作用,一方面可以直接诱导肿瘤细胞凋亡,另一方面也能调控T细胞活性;最后,人工制备的I型干扰素重组蛋白,例如IFN α 2a, IFN α 2b和IFN β 等,在临床上已应用于包括血液肿瘤在内的多种类型肿瘤治疗,但是由于直接注射的干扰素重组蛋白在体内半衰期短,且不易到达病灶部位,因此,I型干扰素与CAR-T细胞疗法联合使用有利于在正确的时间和地点最大限度发挥IFN α 2b的生物学功能。

[0012] 申请人在大量的前期研究中发现,在CAR的C末端串联表达人IFN全长基因,可以显著提高CAR-T细胞的应答水平。人IFN基因序列可以是人IFN α 2a、人IFN α 2b和人IFN β 三者之中任一基因的全长序列。该设计的精妙之处在于,CAR基因和IFN基因之间用P2A肽分隔,因此可以同时表达CAR和分泌型的IFN蛋白。在CAR-T细胞到达肿瘤病灶并激活CAR基因的同时,P2A肽在细胞内的蛋白酶的作用下水解,释放游离的IFN,分泌到胞外发挥免疫激活功能。IFN的表达受到CAR基因的调控,因此可以在病灶部位释放IFN活性,起到精准增效的作用。

[0013] 本发明的具体技术方案为:

[0014] 第一,本发明公开了一种多核苷酸序列,所述多核苷酸序列选自:

[0015] (1):含有依次连接的抗BCMA单链抗体的编码序列,人CD8铰链跨膜区的编码序列,人4-1BB胞内区的编码序列,人CD3 ζ 胞内区的编码序列、人P2A肽的编码序列和人IFN全长序列,和

[0016] (2):(1)中多核苷酸序列的互补序列。

[0017] 作为优选,所述人IFN全长序列为人IFN α 2a、人IFN α 2b和人IFN β 三者之中任一基因的全长序列。进一步优选地,人IFN α 2a、人IFN α 2b或人IFN β 基因的全长序列为经过基因优化的人IFN α 2a、人IFN α 2b或人IFN β 的全长cDNA序列,分别称为oIFN α 2a、oIFN α 2b和oIFN β 。进一步优选地,所述oIFN α 2b的编码序列如SEQ ID NO:1 第1555-2118位多核苷酸所示。进一步优选地,所述oIFN α 2a的编码序列如SEQ ID NO:2 第1555-2118位多核苷酸所示。进一步优选地,所述oIFN β 的编码序列如SEQ ID NO:3 第1555-2115位多核苷酸所示。

[0018] 作为优选,所述多核苷酸序列在所述抗BCMA单链抗体的编码序列前还含有信号肽的编码序列,进一步优选地,所述信号肽的编码多核苷酸序列如SEQ ID NO:1第1-63位多核苷酸所示。

[0019] 作为优选,所述抗BCMA单链抗体的编码序列如SEQ ID NO:1第64-792位多核苷酸所示。

[0020] 作为优选,所述人CD8铰链跨膜区的编码序列如SEQ ID NO:1 第793-999位多核苷酸所示。

[0021] 作为优选,所述人4-1BB胞内区的编码序列如SEQ ID NO:1 第1000-1140位多核苷酸所示。

[0022] 作为优选,所述人CD3 ζ 胞内区的编码序列如SEQ ID NO:1 第1141-1476位多核苷酸所示。

[0023] 作为优选,所述人P2A肽的编码序列如SEQ ID NO:1第1477-1554位核苷酸序列所

示。

[0024] 第二,本发明公开了一种融合蛋白,所述融合蛋白选自:

[0025] (1):含有依次连接的抗BCMA单链抗体、人CD8铰链跨膜区、人4-1BB胞内区、人CD3 ζ 胞内区、人P2A肽和人IFN的融合蛋白;和

[0026] (2):在(1)限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且相似或相近生物学活性的由(1)衍生的融合蛋白。

[0027] 作为优选,所述人IFN为人IFN α 2a、人IFN α 2b和人IFN β 三者之中任一蛋白。进一步优选地,人IFN α 2b的氨基酸序列如SEQ ID NO:4 第519-706位氨基酸所示或与其具有相似或相近生物学活性的氨基酸序列。进一步优选地,人IFN α 2a的氨基酸序列如SEQ ID NO:5 第519-706位氨基酸所示或与其具有相似或相近生物学活性的氨基酸序列。进一步优选地,人IFN β 的氨基酸序列如SEQ ID NO:6 第519-705位氨基酸所示或与其具有相似或相近生物学活性的氨基酸序列。

[0028] 作为优选,所述融合蛋白在所述抗BCMA单链抗体的编码序列N端还含有信号肽。进一步优选,所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:4第1-21位氨基酸所示或与其具有相似或相近生物学活性的氨基酸序列。

[0029] 作为优选,所述抗BCMA单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:4第22-264位氨基酸所示或与其具有相似或相近生物学活性的氨基酸序列。

[0030] 作为优选,所述人CD8铰链跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4 第265-333位氨基酸所示或与其具有相似或相近生物学活性的氨基酸序列。

[0031] 作为优选,所述人4-1BB胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4 第334-380位氨基酸所示或与其具有相似或相近生物学活性的氨基酸序列。

[0032] 作为优选,所述人CD3 ζ 胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4 第381-492位氨基酸所示或与其具有相似或相近生物学活性的氨基酸序列。

[0033] 作为优选,所述人P2A肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:4第493-518位核苷酸序列所示或与其具有相似或相近生物学活性的氨基酸序列。

[0034] 第三,本发明公开了一种核酸构建物,所述核酸构建物含有前文所述的多核苷酸序列,或其他能够编码前文所述融合蛋白的多核苷酸序列。作为优选,所述核酸构建物为载体。进一步优选地,所述核酸构建物为逆转录病毒载体,含有复制起始位点,3' LTR,5' LTR,前文所述的多核苷酸序列,以及任意的可选择的标记。

[0035] 第四,本发明公开了一种逆转录病毒,所述逆转录病毒含有前文所述的核酸构建物,优选含有所述载体,更优选含有所述逆转录病毒载体。

[0036] 第五,本发明公开了一种逆转录病毒的转导方法,所述转导方法包括小规模包装前文所述的逆转录病毒的方法、筛选和建立产毒细胞株的方法,以及用产毒细胞株上清大规模转导T细胞的方法。

[0037] 第六,本发明公开了一种基因修饰的T细胞,所述细胞含有前文所述的多核苷酸序列,或含有本文所述的核酸构建物,或感染了本文所述的逆转录病毒,或稳定表达前文所述的融合蛋白。

[0038] 第七,本发明公开了前文所述的基因修饰的T细胞在制备治疗BCMA介导的疾病的药物中的用途。

[0039] 作为优选,所述BCMA介导的疾病为多发性骨髓瘤。

[0040] 与现有技术对比,本发明的有益效果是:

[0041] 本发明采用抗BCMA单链抗体的基因序列,并从NCBI GenBank数据库中搜索到人的CD8铰链跨膜区、人的4-1BB胞内区、人的CD3 ζ 胞内区、P2A肽和人IFN基因cDNA全长序列(包括人IFN α 2a、人IFN α 2b和人IFN β 基因的cDNA全长序列)信息。所述人IFN基因的cDNA全长序列分别经过基因优化得到各自在人T细胞中表达效率最高的IFN全长序列(oIFN,包括oIFN α 2a、oIFN α 2b和oIFN β)。

[0042] 本发明通过全基因合成嵌合抗原受体抗BCMA scFv-CD8铰链跨膜区-4-1BB-CD3 ζ -oIFN的基因片段,插入到逆转录病毒载体中。重组质粒在EC0细胞中包装病毒,感染T细胞,使T细胞表达该嵌合抗原受体。本发明用嵌合抗原受体基因修饰T淋巴细胞的转导方法是基于逆转录病毒转导方法。该方法具有转导效率高,外源基因能够稳定表达,批次稳定性高且可以缩短体外培养T淋巴细胞到达临床级数量的时间等优点。转导的核酸通过转录、翻译表达在CAR-T细胞表面。用流式细胞术,通过检测与抗BCMA单链抗体 κ 链结合的protein L的含量,可以计算出逆转录病毒感染的T淋巴细胞的比例和细胞表面CAR的表达情况。本发明通过逆转录病毒转导T淋巴细胞,得到CAR阳性T淋巴细胞的比例高达80%。体外通过酶联免疫反应(ELISA)检测发现,CAR-T细胞能分泌大量的IFN至培养基上清,说明逆转录病毒成功转导至T细胞并表达分泌型的IFN。CAR-T细胞对特异性肿瘤细胞的杀伤功能可以通过乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测实验进行检测。本发明制备的CAR-T细胞对BCMA阳性的肿瘤细胞具强烈的杀伤功能,在效靶比是3比1的情况下,杀伤效率超过80%。

[0043] 本发明首次在CAR的C末端增加人IFN全长基因,获得同时表达CAR和释放分泌型人IFN蛋白的CAR-T细胞。动物体内的研究结果证明,BCMA-CAR-IFN的设计可显著提高CAR-T细胞的肿瘤杀伤效率。因此,本发明增强了CAR-T细胞在BCMA介导的疾病中的应用效果。

附图说明

[0044] 图1为BCMA-CAR-IFN α 2b全长序列示意图;ScFv:单链抗体可变区;Hinge:CD8铰链区;TM:CD8跨膜区。

[0045] 图2为流式细胞术分析显示逆转录病毒感染T细胞3天后CD4⁺亚群和CD8⁺亚群的BCMA&IFN α 2b T细胞表面Protein L的阳性率,即BCMA-CAR的表达效率。

[0046] 图3为酶联免疫反应(ELISA)检测逆转录病毒感染后,BCMA&IFN α 2b T,BCMA T和Control T细胞培养基上清中IFN α 2b的含量。BCMA T细胞为表达BCMA-CAR的T细胞,Control T细胞为未转导CAR的T细胞。

[0047] 图4为使用CAR-T细胞和靶细胞按照不同效靶比共培养后,用LDH法检测靶细胞裂解率。

[0048] 图5为肿瘤移植模型中,尾静脉注射CAR-T细胞后,D-luciferin钠盐成像,观察小鼠体内的肿瘤细胞残留情况。A,主要实验流程;B,统计不同时间点各组别小鼠体内的荧光素强度;C,图片显示各组别小鼠钠盐成像结果。

具体实施方式

[0049] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述。

[0050] 本发明提供一种包含靶向BCMA的嵌合抗原受体(CAR)的融合蛋白。该融合蛋白含有依次连接的抗BCMA单链抗体、人CD8铰链跨膜区、人4-1BB胞内区、人CD3 ζ 胞内区、P2A肽和人IFN全长的片段。

[0051] 本发明包括编码本发明融合蛋白的多核苷酸序列。本发明的多核苷酸序列可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。

[0052] 适用于本发明的人IFN全长片段的编码序列为经过基因优化的人IFN基因cDNA全长序列。应理解,基因优化又称为密码子优化,是指在不改变蛋白质氨基酸序列的情况下,通过替换编码某种蛋白质的多核苷酸序列中的一个或多个核苷酸,达到提高蛋白质在特定种属细胞中的表达水平和表达效率的目的。基因优化包括但不限于密码子偏好性优化、RNA高级结构优化、酶切位点优化和GC含量调整等方法。本发明包括运用上述基因优化方法得到的各种编码人IFN的多核苷酸序列(oIFN)。这些多核苷酸序列的共同特征是采用不同的核苷酸密码子,但是编码的氨基酸序列与野生型人IFN全长cDNA序列相同。可采用例如NCBI的BLAST和BLASTp计算两条比对的多核苷酸序列之间和氨基酸序列之间的序列相同性。作为示范性例子,本发明中oIFN α 2b的编码序列如SEQ ID NO:1第1555-2118位多核苷酸所示。

[0053] 适用于本发明的抗BCMA单链抗体可衍生自本领域周知的各种抗BCMA单克隆抗体。单链抗体的基本结构包含轻链可变区,接头序列和重链可变区。优选地,轻链可变区为 κ 链类型。作为示范性例子,本发明中抗BCMA单链抗体轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4第22-132位氨基酸所示。作为示范性例子,本发明中抗BCMA单链抗体重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4第148-264位氨基酸所示。单链抗体的轻链可变区和重链可变区之间由接头序列连接。接头序列可以是本领域周知的适用于抗体的接头序列,例如含G和S的接头序列。通常,接头含有一个或多个前后重复的基序。优选地,基序可以是GGGS、GGGGS、SSSSG、GSGSA和GGSGG,接头包含1~5个重复基序,相邻重复基序之间没有插入氨基酸残基。作为示范性例子,本发明抗BCMA单链抗体的轻链可变区和重链可变区之间由(GGGGS)₃连接,接头序列的氨基酸序列如SEQ ID NO:4第133-147位氨基酸所示。

[0054] 适用于本发明的人CD8铰链跨膜区可以是本领域常用于CAR的各种人CD8铰链跨膜区序列。作为示范性例子,本发明中人CD8 α 铰链跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4第265-333位氨基酸所示。

[0055] 适用于本发明的人4-1BB胞内区可以是本领域已知的各种用于CAR的人4-1BB胞内区。作为示范性例子,本发明使用的人4-1BB胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4第334-380位所示。

[0056] 适用于本发明的人CD3 ζ 胞内区可以是本领域常规用于CAR的各种人CD3 ζ 胞内区。作为示范性例子,所述人CD3 ζ 胞内区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4第381-492位氨基酸所示。

[0057] 适用于本发明的P2A肽可以是本领域常规用于CAR的各种自剪切序列。作为示范性例子,所述P2A肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:4第493-518位氨基酸所示。

[0058] 本发明也包括SEQ ID NO:4第22-492位氨基酸序列所示的CAR、SEQ ID NO:4第22-706位氨基酸序列所示的CAR、SEQ ID NO:5第22-706位氨基酸序列所示的CAR、SEQ ID NO:6第22-705位氨基酸序列所示的CAR、SEQ ID NO:4第1-492位氨基酸序列所示的CAR或SEQ ID

NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6所示的CAR的突变体。这些突变体包括：与该CAR具有至少80%，优选至少85%，优选至少90%，优选至少95%，优选至少97%的序列相同性并保留该CAR的生物学活性（如活化T细胞）的氨基酸序列。可采用例如NCBI的BLASTp计算两条比对的序列之间的序列相同性。

[0059] 突变体还包括：在SEQ ID NO:4第22-492位所示的氨基酸序列、SEQ ID NO:4第22-706位所示的氨基酸序列、SEQ ID NO:5第22-706位所示的氨基酸序列、SEQ ID NO:6第22-705位所示的氨基酸序列、SEQ ID NO:4第1-492位所示的氨基酸序列或SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列中具有一个或数个突变（插入、缺失或取代）、同时仍保留该CAR的生物学活性的氨基酸序列。所述数个突变通常指1—10个以内，例如1—8个、1—5个或1—3个。取代优选是保守性取代。例如，在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸进行保守性取代时，通常不会改变蛋白质或多肽的功能。“性能相近或相似的氨基酸”包括例如，具有相似侧链的氨基酸残基的家族，这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸（例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、具有酸性侧链的氨基酸（例如天冬氨酸、谷氨酸）、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸（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）、具有非极性侧链的氨基酸（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、色氨酸）、具有β-分支侧链的氨基酸（例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和具有芳香侧链的氨基酸（例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。因此，在本发明多肽中用来自同一侧链类的另一氨基酸残基替换一个或几个位点，将不会在实质上影响其活性。

[0060] 本发明采用抗BCMA单链抗体（具体是衍生自克隆号C11D5.3的scFv）的基因序列，并从NCBI GenBank数据库中搜索到人的CD8铰链跨膜区、人的4-1BB胞内区、人的CD3ζ胞内区、P2A肽和人IFN基因cDNA全长序列（包括人IFNα2a、人IFNα2b和人IFNβ基因的cDNA全长序列）信息。所述人IFN基因的cDNA全长序列分别经过基因优化得到各自在人T细胞中表达效率最高的IFN全长序列（oIFN，包括oIFNα2a、oIFNα2b和oIFNβ）。

[0061] 本发明通过全基因合成嵌合抗原受体抗BCMA scFv-CD8铰链跨膜区-4-1BB-CD3ζ-oIFN的基因片段，插入到逆转录病毒载体中。重组质粒在ECO细胞中包装病毒，感染T细胞，使T细胞表达该嵌合抗原受体。本发明用嵌合抗原受体基因修饰T淋巴细胞的转导方法是基于逆转录病毒转导方法。该方法具有转导效率高，外源基因能够稳定表达，批次稳定性高且可以缩短体外培养T淋巴细胞到达临床级数量的时间等优点。转导的核酸通过转录、翻译表达在CAR-T细胞表面。用流式细胞术，通过检测与抗BCMA单链抗体κ链结合的protein L的含量，可以计算出逆转录病毒感染的T淋巴细胞的比例和细胞表面CAR的表达情况。本发明通过逆转录病毒转导T淋巴细胞，得到CAR阳性T淋巴细胞的比例高达80%。体外通过酶联免疫反应（ELISA）检测发现，CAR-T细胞能分泌大量的IFN蛋白至培养基上清，说明逆转录病毒成功转导至T细胞并表达分泌型的IFN蛋白。CAR-T细胞对特异性肿瘤细胞的杀伤功能可以通过乳酸脱氢酶（LDH）细胞毒性检测实验进行检测。本发明制备的CAR-T细胞对BCMA阳性的肿瘤细胞具强烈的杀伤功能，在效靶比是3比1的情况下，杀伤效率超过80%。

[0062] 本发明通过在BCMA-CAR多核苷酸序列的C末端增加基因优化的人IFN全长编码序列，得到BCMA-CAR-IFN多核苷酸序列。其中IFN基因序列可以是人IFNα2a、人IFNα2b和人IFNβ三者之中任一基因的全长序列。人IFNα2a和人IFNα2b的氨基酸序列高度相似，仅在第23位氨基酸不同（人IFNα2a第23位氨基酸是K，人IFNα2b第23位氨基酸是R，属于保守性取代）。而

人IFN β 同样属于I型干扰素,与上述二者相比生物学功能相近,均具有诱导肿瘤细胞凋亡和调节免疫细胞活性的作用。临床研究中常常将IFN α 2和IFN β 互相替代使用。动物实验表明,在BCMA-CAR的C末端增加人IFN α 2b基因全长片段后,较BCMA-CAR序列相比,表达BCMA-CAR-IFN α 2b的CAR-T细胞在动物体内具有更强的肿瘤杀伤能力。因此申请人认为上述三种基因的任一种均能起到对CAR-T细胞的增效作用。

[0063] 以下以BCMA-CAR-IFN α 2b设计为例,通过一系列实验实施例,对本发明进行进一步详细描述。这些实施例仅出于说明性的目的提供,并不意欲为限制性的,除非另有规定。因此,本发明决不应被解释为限于以下实施例,而是应被解释为包括由于本文提供的教导变得显而易见的任何和全部的变化。实施例中所用的方法和试剂,除非另有说明,否则为本领域常规的方法和试剂。

[0064] 实施例1:BCMA-CAR-IFN α 2b基因序列的确定和逆转录病毒载体的构建

[0065] 从NCBI网站数据库搜索到人CD8铰链跨膜区、人4-1BB胞内区、人CD3 ζ 胞内区和人IFN α 2b全长cDNA序列信息。野生型人IFN α 2b基因cDNA全长序列称为nIFN α 2b。将nIFN α 2b序列在网站<http://sg.idtdna.com/site>上进行密码子优化得到oIFN α 2b,保证在编码氨基酸序列不变的情况下更适合人类细胞表达。

[0066] 按照BCMA scFv、人CD8铰链跨膜区、人4-1BB胞内区、人CD3 ζ 胞内区、P2A肽、oIFN α 2b的顺序得到BCMA-CAR-IFN α 2b全长多核苷酸序列。同时构建仅包含BCMA scFv、人CD8铰链跨膜区、人4-1BB胞内区、人CD3 ζ 胞内区的BCMA-CAR全长多核苷酸序列。BCMA-CAR-IFN α 2b全长多核苷酸序列和氨基酸序列信息见核苷酸序列表(SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.4)。BCMA-CAR全长多核苷酸序列如SEQ ID NO:1第1-1476位多核苷酸所示。以上全部多核苷酸在擎科生物科技有限公司合成,克隆在pUC57载体上,并再次测序确定。

[0067] 用NotI (NEB) 和EcoRI (NEB) 双酶切CAR-IFN α 2b的核苷酸序列,经T4连接酶(NEB)连接后,插入逆转录病毒(MP71)的NotI-EcoRI位点,转化到感受态大肠杆菌(DH5 α)。

[0068] 使用Qiagen公司的质粒纯化试剂盒提取并纯化质粒,得到的BCMA-CAR-IFN α 2b质粒可进行逆转录病毒包装实验。

[0069] 按照上述同样方法将BCMA-CAR序列插入逆转录病毒载体,构建得到包含BCMA-CAR序列的逆转录病毒载体。提取质粒进行逆转录病毒包装。

[0070] 本实施例所构建得到的质粒图谱如图1所示。

[0071] 实施例2:逆转录病毒包装和产毒株的建立

[0072] 使用实施例1制备得到的包含BCMA-CAR-IFN α 2b和BCMA-CAR的逆转录病毒载体,按照以下方法分别包装两种逆转录病毒:

[0073] 1. 第1天:Phoenix Ecotropic (ECO) 细胞应是小于20代,不过分长满的。以 0.6×10^6 /ml细胞密度铺板,10cm皿添加10ml的DMEM培养基,充分混匀细胞,37 $^{\circ}$ C培养过夜;

[0074] 2. 第2天:ECO细胞融合度达到90%左右进行转染(通常是铺板14-18h左右);准备质粒MP71-目的基因12.5 μ g,1.25M CaCl $_2$ 250 μ l,H $_2$ O 1ml,总体积为1.25ml;在另一个管里添加跟质粒复合物等体积的2 \times HBS,边加质粒复合物边涡旋震荡20s。温柔地将混合物沿着边加入到ECO皿中,37 $^{\circ}$ C培养4h,去除培养基,PBS洗一遍,重新加入预热的新鲜培养基。

[0075] 3. 第4天:转染48h后收集上清并用0.45 μ m滤器过滤后,即得到逆转录病毒溶液,分装保存于-80 $^{\circ}$ C。

[0076] 4. 产毒株的建立:从上得到的逆转录病毒再感染HY268细胞,感染两天后进行流式细胞分选,筛选分泌逆病毒滴度最高的单细胞来源的细胞株并长期保存。利用此细胞株可以大规模制备逆转录病毒上清用于基因转导制备CAR-T细胞。

[0077] 实施例3:逆转录病毒感染人的T细胞

[0078] 1. 复苏冻存的健康人外周血PBMC,用含10% FBS的RPMI-1640完全培养基调整细胞密度为 $1-2 \times 10^6$ /ml。

[0079] 2. Ficol1分离液(天津灏洋)收集PBMC,磁珠法分离获得较纯的 $CD3^+$ T细胞,按磁珠: $CD3^+$ 细胞比为3:1加入临床级Dynabeads Human T Expander $CD3/CD28$ 磁珠(Invitrogen)活化T细胞。

[0080] 3. T细胞活化后第二天,用PBS稀释至终浓度为 $15\mu\text{g}/\text{ml}$ 的Retronectin (Takara)包被非组织处理培养板,6孔板每孔1.2 ml。避光, 4°C 过夜备用。

[0081] 4. T细胞活化培养两天后,取出包被好的6孔板,吸弃包被液,加入PBS洗板一次。

[0082] 5. 实施例2制备的逆转录病毒液加入孔内,每孔加5-6ml, 32°C , $2000 \times g$,离心2 h。每孔加入含hIL-2($500 \text{ U}/\text{ml}$)的新鲜完全培养基3 ml,继续培养1天。

[0083] 6. 细胞感染后,每天观察细胞的密度,适时补加含IL-2 $100 \text{ U}/\text{ml}$ 的T细胞培养液,使T细胞的密度维持在 5×10^5 /ml左右,便于细胞扩增。

[0084] 7. 由此获得分别感染了实施例2制备的两种逆转录病毒的CAR-T细胞,分别命名为B&IFN α 2b T细胞(表达实施例1的BCMA-CAR-IFN α 2b)和BCMA T细胞(表达实施例1的BCMA-CAR)。

[0085] 8. 设置不感染病毒的对照组,用等体积PBS溶液替代逆转录病毒液,按照上述同样的方法得到Control T细胞。

[0086] 实施例4:流式细胞仪检测感染后T淋巴细胞的比例及表面CAR蛋白和IFN α 2b蛋白的表达

[0087] 由于抗BCMA单链抗体的轻链是 κ 链能结合Protein L,因此我们用FACS方法通过检测与CAR-T细胞结合的生物素标记的Protein L来说明CAR阳性T淋巴细胞的比例和CAR蛋白的表达。

[0088] 分别离心收集感染后72小时的实施例3制备得到的两种CAR-T细胞和Control T细胞(对照组),1%BSA-PBS洗涤1次后弃上清,加入生物素(biotin)标记的protein L抗体避光30min后1%BSA-PBS洗涤3次,重悬;再加入PE标记的亲合素(Streptavidin),避光10min后1%BSA-PBS洗涤,重悬;最后流式细胞仪检测PE的荧光强度。

[0089] 图2显示,使用实施例3制备得到的逆转录病毒感染T细胞3天后, $CD4^+$ T细胞和 $CD8^+$ T细胞中Protein L(CAR)的阳性率均达到80%。

[0090] 分别离心收集感染后72小时的实施例3制备得到的两种CAR-T细胞和Control T细胞(对照组),收集培养后的上清液。ELISA检测上清中IFN α 2b的含量。

[0091] 图3显示ELISA的检测结果,B&IFN α 2b T细胞上清中的IFN α 2b含量显著高于Control T和BCMA T细胞。该结果确证B&IFN α 2b T细胞可以表达分泌型的IFN α 2b。

[0092] 实施例5:乳酸脱氢酶(LDH)法检测肿瘤特异性细胞杀伤作用

[0093] 1. 调整靶细胞(RPMI-8226)浓度为 4×10^5 个/ml,取靶细胞和效应细胞(效靶比分别为3:1, 1:1, 1:3)各50 μ l,加入U型96孔培养板中。效应细胞分别是Control T细胞,BCMA

T细胞和B&IFN α 2b T细胞。另外,设置靶细胞自然释放孔、效应细胞自然释放孔和靶细胞最大释放孔,加靶细胞和培养液各50 μ l。上述各项均设三个复孔。

[0094] 2. 上述细胞在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养4 h。

[0095] 3. 终止细胞培养前45 min, 靶细胞最大释放孔加裂解液10 μ l。

[0096] 4. 96孔板以1500 rpm/min离心5 min,每孔吸取上清50 μ l置平底96孔培养板中,同时加入LDH底物50 μ l,室温避光反应30 min。

[0097] 5. 每孔加入50 μ l 1mol/L的醋酸溶液终止,在酶标仪490nm处测定光密度值(A490),使用630 nm波长作为参考波长进行双波长测定。

[0098] % 细胞毒性率=(实验组-效应细胞自放组-靶细胞自放组) \times 100/(靶细胞最大释放组-靶细胞自放组)

[0099] 图4显示,使用B&IFN α 2b T细胞和靶细胞RPMI-8226按照不同效靶比3:1, 1:1, 1:3共培养后,用LDH法检测靶细胞裂解率。结果表明,在效靶比3比1时,细胞裂解率达到80%以上;效靶比1比3时,细胞裂解率仍有20%左右。

[0100] 实施例6:肿瘤移植模型检测CAR-T细胞在动物体内的肿瘤杀伤作用

[0101] 1. B-NDG重度联合免疫缺陷小鼠(百奥赛图)的尾静脉接种带有荧光素标记的人淋巴瘤细胞Daudi-Luc。接种量为 $2 \times 10^6/0.3$ ml。随机分为4个实验组,分别是无CAR-T细胞对照组,非靶向BCMA的CAR-T对照组(Exb T),BCMA T细胞对照组,和B&IFN α 2b T细胞组,每组各6只小鼠。

[0102] 2. 接种肿瘤细胞5天后,在小鼠尾静脉分别注射不同类型的CAR-T细胞(无CAR-T细胞对照组注射生理盐水),注射的CAR-T细胞量为 5×10^6 CAR⁺T/0.2 ml。

[0103] 3. 分别在注射CAR-T细胞7天、14天和21天后,在小鼠腹腔注射3mg的D-luciferin进行钠盐成像。观察小鼠体内残留肿瘤细胞的数量,统计荧光素强度(光子密度)。

[0104] 图5显示,与BCMA T对照组相比,注射B& IFN α 2b T的小鼠体内的人淋巴瘤细胞残留明显减少。说明B& IFN α 2b T细胞杀伤肿瘤的效果更好。

[0105] 本发明中所用原料、设备,若无特别说明,均为本领域的常用原料、设备;本发明中所用方法,若无特别说明,均为本领域的常规方法。

[0106] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例,并非对本发明作任何限制,凡是根据本发明技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、变更以及等效变换,均仍属于本发明技术方案的保护范围。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 浙江康佰裕生物科技有限公司	
[0003]	<120> 一种细胞因子增效的嵌合抗原受体及其应用	
[0004]	<130> 2019	
[0005]	<160> 6	
[0006]	<170> SIPOSequenceListing 1.0	
[0007]	<210> 1	
[0008]	<211> 2121	
[0009]	<212> DNA	
[0010]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0011]	<400> 1	
[0012]	atggctctgc ctgtgaccgc cctgctgctg cctctggtct tgctgctgca cgccgctcgg	60
[0013]	cctgacatcg ttttgacaca atctctctgcg tcattggcca tgagtctcgg gaagcgcgca	120
[0014]	acaatatcct gtcgcgccag tgaatctgtg tctgtgatag gagcgcactt gatccattgg	180
[0015]	tatcagcaga aacctggaca acctcccaag ctgctcatct acctgccag taaccttgaa	240
[0016]	acaggagtac ctgctcgggtt ttcaggttcc gggtcaggga cggatttcac tttgactatc	300
[0017]	gaccagttg aggaagacga cgtagccata tatagctgcc tgcagtctcg gatcttcccg	360
[0018]	cgcacgttcg ggggaggaac taagctggag attaagggcg gcgggggttc tgggtggcggc	420
[0019]	ggcagcggcg gtggaggatc acaaatccaa ctggttcagt ccggtccaga actgaaaaag	480
[0020]	ccgggggaga cggtgaaaat ctcttgtaag gcctcaggtt ataccttcac cgattacagc	540
[0021]	atcaattggg taaagcgggc tccagggaaa ggtctgaaat ggatgggttg gatcaacaca	600
[0022]	gaaaccgag aaccagccta tgcttacgac tttcgagtc gattcgcttt ttccttgga	660
[0023]	acttccgcaa gcacagccta tctgcaaatc acaatctca agtacgaaga tacggccacg	720
[0024]	tatTTTTgtg ccctggatta cagctatgca atggattact ggggtcaggg gacgtctgtt	780
[0025]	acagtttcta gtactacaac tccagcacc agaccctca cacctgctcc aactatcgca	840
[0026]	agtcagcccc tgtcactgcg ccctgaagcc tgtcgccctg ctgccggggg agctgtgcat	900
[0027]	actcggggac tggactttgc ctgtgatatc tacatctggg cgcccttggc cgggacttgt	960
[0028]	gggtccttc tctgtcact ggttatcacc ctttactgca ggttcagtgt cgtgaagaga	1020
[0029]	ggccggaaga agctgctgta catcttcaag cagccttca tgaggcccggt gcagactacc	1080
[0030]	caggaggaag atggatgcag ctgtagattc cctgaagagg aggaaggagg ctgtgagctg	1140
[0031]	agagtgaagt tctcccgaag cgcagatgcc ccagcctatc agcagggaca gaatcagctg	1200
[0032]	tacaacgagc tgaacctggg aagacgggag gaatacgatg tgctggacaa aaggcggggc	1260
[0033]	agagatctg agatgggcgg caaaccaaga cggaagaacc cccaggaagg tctgtataat	1320
[0034]	gagctgcaga aagacaagat ggctgaggcc tactcagaaa tcgggatgaa gggcgaaaga	1380
[0035]	aggagaggaa aaggccacga cggactgtac caggggctga gtacagcaac aaaagacacc	1440
[0036]	tatgacgctc tgcacatgca ggctctgcca ccaagacgag ctaaagcagg ctgaggcgcg	1500
[0037]	acgaacttta gtttctgaa gcaagctggg gatgtagagg aaaatccggg tcccatggcc	1560
[0038]	ctgaccttcg ccctgctggt ggccctgctg gtctctgagct gcaagagctc ctgcagcgtg	1620

[0039]	gggtgcgacc tgccccagac ccacagcctg ggctccagaa gaaccctgat gctgctggcc	1680
[0040]	cagatgagaa gaatcagtct gttcagctgc ctgaaagaca gacacgactt tggcttcct	1740
[0041]	caggaggaat ttggaaacca gttccagaag gccgaaacca tccccgtgct gcacgagatg	1800
[0042]	atccagcaga tcttcaacct gttctccacc aaagatagca gcgcagcctg ggacgaaacc	1860
[0043]	ctgctggaca agttctacac cgagctgtac cagcagctga acgacctgga ggctgctg	1920
[0044]	atccagggcg tgggagtgc cgagacacca ctgatgaaag aggatagcat tctggccgtg	1980
[0045]	aggaaatact tccagagaat caccctgtac ctgaaagaga aaaagtacag tccctgcgcc	2040
[0046]	tgggaggtgg tgagagccga gatcatgaga agcttcagcc tgagcaccaa tctgcaggaa	2100
[0047]	agcctgagaa gcaaggagtg a	2121
[0048]	<210> 2	
[0049]	<211> 2121	
[0050]	<212> DNA	
[0051]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0052]	<400> 2	
[0053]	atggctctgc ctgtgaccgc cctgctgctg cctctgctc tgctgctgca cgccgctcgg	60
[0054]	cctgacatcg ttttgacaca atctctctgcg tcattggcca tgagtctcgg gaagcgcgca	120
[0055]	acaatatcct gtcgcgccag tgaatctgtg tctgtgatag gagcgcactt gatccattgg	180
[0056]	tatcagcaga aacctggaca acctcccaag ctgctcatct acctgccag taaccttgaa	240
[0057]	acaggagtac ctgctcgggtt ttcaggttcc gggtcaggga cggatttcac tttgactatc	300
[0058]	gaccagttg aggaagacga cgtagccata tatagctgcc tgcagtctcg gatcttcccg	360
[0059]	cgcacgttcg ggggaggaac taagctggag attaaggcg gcgggggttc tgggtggcggc	420
[0060]	ggcagcggcg gtggaggatc acaaatcaa ctggttcagt ccggtccaga actgaaaaag	480
[0061]	ccgggggaga cggtgaaat ctctgtgtaag gcctcaggtt ataccttcac cgattacagc	540
[0062]	atcaattggg taaagcgggc tccagggaaa ggtctgaaat ggatgggttg gatcaacaca	600
[0063]	gaaaccgag aaccagccta tgcttacgac tttcaggtc gattcgttt ttccttgaa	660
[0064]	acttccgcaa gcacagccta tctgcaaatc acaatctca agtacgaaga tacggccacg	720
[0065]	tatttttgtg ccctggatta cagctatgca atggattact ggggtcaggg gacgtctgtt	780
[0066]	acagtttcta gtactacaac tccagcacc agaccctca cacctgctcc aactatcgca	840
[0067]	agtcagcccc tgcactgcg ccctgaagcc tgcgcctg ctgccgggg agctgtgcat	900
[0068]	actcggggac tggactttgc ctgtgatatc tacatctggg cgcccttggc cgggacttgt	960
[0069]	gggtccttc tctgtcact gggtatcacc ctttactgca ggttcagtgt cgtgaagaga	1020
[0070]	ggccggaaga agctgctgta catcttcaag cagccttca tgaggccgt gcagactacc	1080
[0071]	caggaggaag atggatgcag ctgtagattc cctgaagagg aggaaggagg ctgtgagctg	1140
[0072]	agagtgaagt tctcccgaag cgcagatgcc ccagcctatc agcagggaca gaatcagctg	1200
[0073]	tacaacgagc tgaacctggg aagacgggag gaatacgatg tgctggacaa aaggcggggc	1260
[0074]	agagatctg agatggcgcg caaaccaaga cggaagaacc cccaggaagg tctgtataat	1320
[0075]	gagctgcaga aagacaagat ggctgaggcc tactcagaaa tcgggatgaa gggcgaaaga	1380
[0076]	aggagaggaa aaggccacga cggactgtac caggggctga gtacagcaac aaaagacacc	1440
[0077]	tatgacgctc tgcacatgca ggctctgcca ccaagacgag ctaaacgagg ctcaggcgcg	1500

[0078]	acgaacttta gtttgctgaa gcaagctggg gatgtagagg aaaatccggg tcccatggcc	1560
[0079]	ctgaccttcg cctgctggt ggccctgctg gtctgagct gcaagagctc ctgcagcgtg	1620
[0080]	gggtgcgacc tgccccagac ccacagcctg ggctccagaa gaaccctgat gctgctggcc	1680
[0081]	cagatgagaa aaatcagtct gttcagctgc ctgaaagaca gacacgactt tggcttcct	1740
[0082]	caggaggaat ttgaaacca gttccagaag gccgaaacca tccccgtgct gcacgagatg	1800
[0083]	atccagcaga tcttcaacct gttctccacc aaagatagca gcgcagcctg ggacgaaacc	1860
[0084]	ctgctggaca agttctacac cgagctgtac cagcagctga acgacctgga ggctgctg	1920
[0085]	atccagggcg tgggagtgc cgagacacca ctgatgaaag aggatagcat tctggccgtg	1980
[0086]	aggaaatact tccagagaat caccctgtac ctgaaagaga aaaagtacag tccctgcgcc	2040
[0087]	tgggaggtgg tgagagccga gatcatgaga agcttcagcc tgagcaccaa tctgcaggaa	2100
[0088]	agcctgagaa gcaaggagtg a	2121
[0089]	<210> 3	
[0090]	<211> 2118	
[0091]	<212> DNA	
[0092]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0093]	<400> 3	
[0094]	atggctctgc ctgtgaccgc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca cgccgctcgg	60
[0095]	cctgacatcg ttttgacaca atctctctgcg tcattggcca tgagtctcgg gaagcgcgca	120
[0096]	acaatatcct gtcgcgccag tgaatctgtg tctgtgatag gagcgcactt gatccattgg	180
[0097]	tatcagcaga aacctggaca acctcccaag ctgctcatct acctcgccag taaccttgaa	240
[0098]	acaggagtac ctgctcgggtt ttcaggttcc gggtcagga cggatttcac tttgactatc	300
[0099]	gaccagttg aggaagacga cgtagccata tatagctgcc tgcagtctcg gatcttccc	360
[0100]	cgcacgttcg ggggaggaac taagctggag attaaggcg gcggggggtc tgggtggcggc	420
[0101]	ggcagcggcg gtggaggatc acaaatcaa ctggttcagt ccgggtccaga actgaaaaag	480
[0102]	ccgggggaga cggtgaaaat ctctgtgtaag gcctcaggtt ataccttcac cgattacagc	540
[0103]	atcaattggg taaagcgggc tccagggaaa ggtctgaaat ggatgggttg gatcaacaca	600
[0104]	gaaaccgag aaccagccta tgcttacgac ttcgaggtc gattcgttt ttccttgaa	660
[0105]	acttccgcaa gcacagccta tctgcaaadc acaatctca agtacgaaga tacggccacg	720
[0106]	tatttttgtg ccctggatta cagctatgca atggattact ggggtcaggg gacgtctgtt	780
[0107]	acagtttcta gtactacaac tccagcacc agaccctca cacctgctcc aactatcgca	840
[0108]	agtcagcccc tgcactgcg ccctgaagcc tgctgcctg ctgccggggg agctgtgcat	900
[0109]	actcggggac tggactttgc ctgtgatata tacatctggg cgcccttggc cgggacttgt	960
[0110]	ggggtccttc tctgtcact gggtatcacc ctttactgca ggttcagtgt cgtgaagaga	1020
[0111]	ggccggaaga agctgctgta catcttcaag cagccttca tgaggccgt gcagactacc	1080
[0112]	caggaggaag atggatgcag ctgtagattc cctgaagagg aggaaggagg ctgtgagctg	1140
[0113]	agagtgaagt tctcccgaag cgcagatgcc ccagcctatc agcagggaca gaatcagctg	1200
[0114]	tacaacgagc tgaacctggg aagacgggag gaatacgat tgctggacaa aaggcggggc	1260
[0115]	agagatctg agatgggcgg caaaccaaga cggaagaacc cccaggaagg tctgtataat	1320
[0116]	gagctgcaga aagacaagat ggctgaggcc tactcagaaa tcgggatgaa gggcgaaaga	1380

[0117] aggagaggaa aaggccacga cggactgtac caggggctga gtacagcaac aaaagacacc 1440
 [0118] tatgacgctc tgcacatgca ggctctgccca ccaagacgag ctaaacgagg ctgaggcgcg 1500
 [0119] acgaacttta gtttctgtaa gcaagctggg gatgtagagg aaaatccggg tcccatgact 1560
 [0120] aataaatgcc tgcttcagat cgccttgctg ctttgttca gcacaactgc actgtcaatg 1620
 [0121] tcttataacc tgctcgggtt tctccagaga agctccaatt ttcagtgtca gaaactgctt 1680
 [0122] tggcagctga acggccgctt ggaatactgc ctgaaagaca gaatgaactt cgatatcccg 1740
 [0123] gaagagataa aacagctgca gcaatttcag aaggaggatg cggccttgac catttacgag 1800
 [0124] atgcttcaaa acatatttgc aatcttccgg caggactctt cctcaaccgg gtggaatgaa 1860
 [0125] accatcgctg aaaatctcct cgcgaatgct taccaccaga tcaaccatct taagaccgctt 1920
 [0126] ttggaggaga agcttgagaa ggaggacttc acccgcgga aacttatgct ttcactgcac 1980
 [0127] ttgaagcgt actacgctc gattctccat tacctgaaag ccaaggagta ctcccactgc 2040
 [0128] gcctggacaa tcgtccgggt ggagatcctg aggaacttct acttcattaa tcgctgact 2100
 [0129] gggatatctga ggaactga 2118
 [0130] <210> 4
 [0131] <211> 706
 [0132] <212> PRT
 [0133] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0134] <400> 4
 [0135] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 [0136] 1 5 10 15
 [0137] His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
 [0138] 20 25 30
 [0139] Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
 [0140] 35 40 45
 [0141] Ser Val Ser Val Ile Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
 [0142] 50 55 60
 [0143] Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu
 [0144] 65 70 75 80
 [0145] Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 [0146] 85 90 95
 [0147] Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Ile Tyr Ser
 [0148] 100 105 110
 [0149] Cys Leu Gln Ser Arg Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 [0150] 115 120 125
 [0151] Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 [0152] 130 135 140
 [0153] Gly Gly Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
 [0154] 145 150 155 160
 [0155] Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

[0195]	Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Ala Lys Arg
[0196]	485 490 495
[0197]	Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
[0198]	500 505 510
[0199]	Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala
[0200]	515 520 525
[0201]	Leu Leu Val Leu Ser Cys Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu
[0202]	530 535 540
[0203]	Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala
[0204]	545 550 555 560
[0205]	Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp
[0206]	565 570 575
[0207]	Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu
[0208]	580 585 590
[0209]	Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe
[0210]	595 600 605
[0211]	Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys
[0212]	610 615 620
[0213]	Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val
[0214]	625 630 635 640
[0215]	Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser
[0216]	645 650 655
[0217]	Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys
[0218]	660 665 670
[0219]	Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile
[0220]	675 680 685
[0221]	Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser
[0222]	690 695 700
[0223]	Lys Glu
[0224]	705
[0225]	<210> 5
[0226]	<211> 706
[0227]	<212> PRT
[0228]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0229]	<400> 5
[0230]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0231]	1 5 10 15
[0232]	His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
[0233]	20 25 30

[0234]	Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
[0235]	35 40 45
[0236]	Ser Val Ser Val Ile Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
[0237]	50 55 60
[0238]	Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu
[0239]	65 70 75 80
[0240]	Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[0241]	85 90 95
[0242]	Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Ile Tyr Ser
[0243]	100 105 110
[0244]	Cys Leu Gln Ser Arg Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
[0245]	115 120 125
[0246]	Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[0247]	130 135 140
[0248]	Gly Gly Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
[0249]	145 150 155 160
[0250]	Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
[0251]	165 170 175
[0252]	Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu
[0253]	180 185 190
[0254]	Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala
[0255]	195 200 205
[0256]	Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
[0257]	210 215 220
[0258]	Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp Thr Ala Thr
[0259]	225 230 235 240
[0260]	Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[0261]	245 250 255
[0262]	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
[0263]	260 265 270
[0264]	Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
[0265]	275 280 285
[0266]	Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
[0267]	290 295 300
[0268]	Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
[0269]	305 310 315 320
[0270]	Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Phe Ser
[0271]	325 330 335
[0272]	Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro

[0273]		340		345		350													
[0274]	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys			
[0275]			355						360							365			
[0276]	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe			
[0277]		370							375							380			
[0278]	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu			
[0279]	385					390						395				400			
[0280]	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp			
[0281]					405							410				415			
[0282]	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys			
[0283]				420								425				430			
[0284]	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala			
[0285]			435									440				445			
[0286]	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys			
[0287]		450										455				460			
[0288]	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr			
[0289]	465					470						475				480			
[0290]	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Lys	Arg			
[0291]					485							490				495			
[0292]	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val			
[0293]				500								505				510			
[0294]	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Ala	Leu	Thr	Phe	Ala	Leu	Leu	Val	Ala			
[0295]			515									520				525			
[0296]	Leu	Leu	Val	Leu	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Cys	Ser	Val	Gly	Cys	Asp	Leu			
[0297]		530														540			
[0298]	Pro	Gln	Thr	His	Ser	Leu	Gly	Ser	Arg	Arg	Thr	Leu	Met	Leu	Leu	Ala			
[0299]	545					550						555				560			
[0300]	Gln	Met	Arg	Lys	Ile	Ser	Leu	Phe	Ser	Cys	Leu	Lys	Asp	Arg	His	Asp			
[0301]					565							570				575			
[0302]	Phe	Gly	Phe	Pro	Gln	Glu	Glu	Phe	Gly	Asn	Gln	Phe	Gln	Lys	Ala	Glu			
[0303]				580								585				590			
[0304]	Thr	Ile	Pro	Val	Leu	His	Glu	Met	Ile	Gln	Gln	Ile	Phe	Asn	Leu	Phe			
[0305]			595									600				605			
[0306]	Ser	Thr	Lys	Asp	Ser	Ser	Ala	Ala	Trp	Asp	Glu	Thr	Leu	Leu	Asp	Lys			
[0307]		610										615				620			
[0308]	Phe	Tyr	Thr	Glu	Leu	Tyr	Gln	Gln	Leu	Asn	Asp	Leu	Glu	Ala	Cys	Val			
[0309]	625					630						635				640			
[0310]	Ile	Gln	Gly	Val	Gly	Val	Thr	Glu	Thr	Pro	Leu	Met	Lys	Glu	Asp	Ser			
[0311]				645								650				655			

[0312]	Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys
[0313]	660 665 670
[0314]	Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile
[0315]	675 680 685
[0316]	Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser
[0317]	690 695 700
[0318]	Lys Glu
[0319]	705
[0320]	<210> 6
[0321]	<211> 705
[0322]	<212> PRT
[0323]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0324]	<400> 6
[0325]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0326]	1 5 10 15
[0327]	His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
[0328]	20 25 30
[0329]	Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
[0330]	35 40 45
[0331]	Ser Val Ser Val Ile Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
[0332]	50 55 60
[0333]	Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu
[0334]	65 70 75 80
[0335]	Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[0336]	85 90 95
[0337]	Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Ile Tyr Ser
[0338]	100 105 110
[0339]	Cys Leu Gln Ser Arg Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
[0340]	115 120 125
[0341]	Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[0342]	130 135 140
[0343]	Gly Gly Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
[0344]	145 150 155 160
[0345]	Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
[0346]	165 170 175
[0347]	Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu
[0348]	180 185 190
[0349]	Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala
[0350]	195 200 205

[0351]	Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
[0352]	210 215 220
[0353]	Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp Thr Ala Thr
[0354]	225 230 235 240
[0355]	Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[0356]	245 250 255
[0357]	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro
[0358]	260 265 270
[0359]	Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro
[0360]	275 280 285
[0361]	Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu
[0362]	290 295 300
[0363]	Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys
[0364]	305 310 315 320
[0365]	Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Phe Ser
[0366]	325 330 335
[0367]	Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro
[0368]	340 345 350
[0369]	Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys
[0370]	355 360 365
[0371]	Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe
[0372]	370 375 380
[0373]	Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu
[0374]	385 390 395 400
[0375]	Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
[0376]	405 410 415
[0377]	Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
[0378]	420 425 430
[0379]	Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
[0380]	435 440 445
[0381]	Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
[0382]	450 455 460
[0383]	Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
[0384]	465 470 475 480
[0385]	Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Ala Lys Arg
[0386]	485 490 495
[0387]	Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
[0388]	500 505 510
[0389]	Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala

[0390]	515	520	525
[0391]	Leu Leu Leu Cys Phe Ser Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu		
[0392]	530	535	540
[0393]	Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu		
[0394]	545	550	555
[0395]	Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn		
[0396]	565	570	575
[0397]	Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu		
[0398]	580	585	590
[0399]	Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile		
[0400]	595	600	605
[0401]	Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu		
[0402]	610	615	620
[0403]	Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val		
[0404]	625	630	635
[0405]	Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met		
[0406]	645	650	655
[0407]	Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu		
[0408]	660	665	670
[0409]	Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu		
[0410]	675	680	685
[0411]	Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg		
[0412]	690	695	700
[0413]	Asn		
[0414]	705		

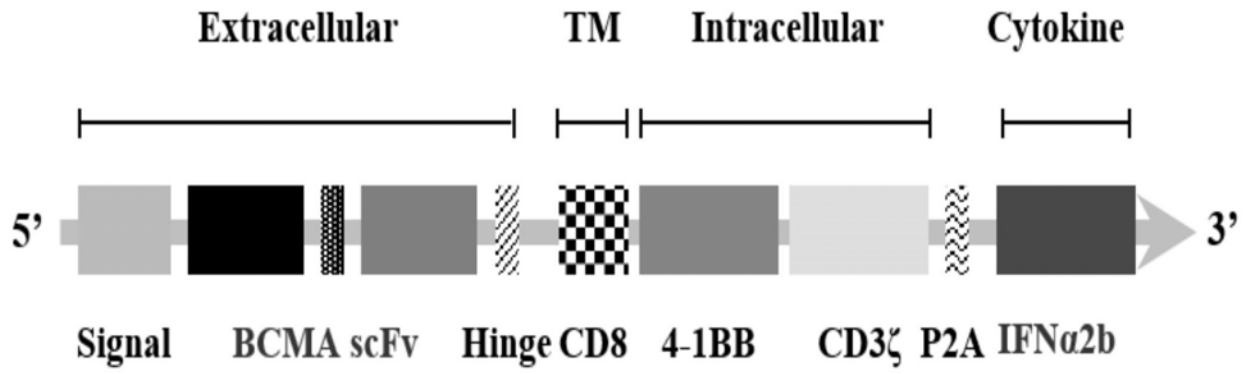


图1

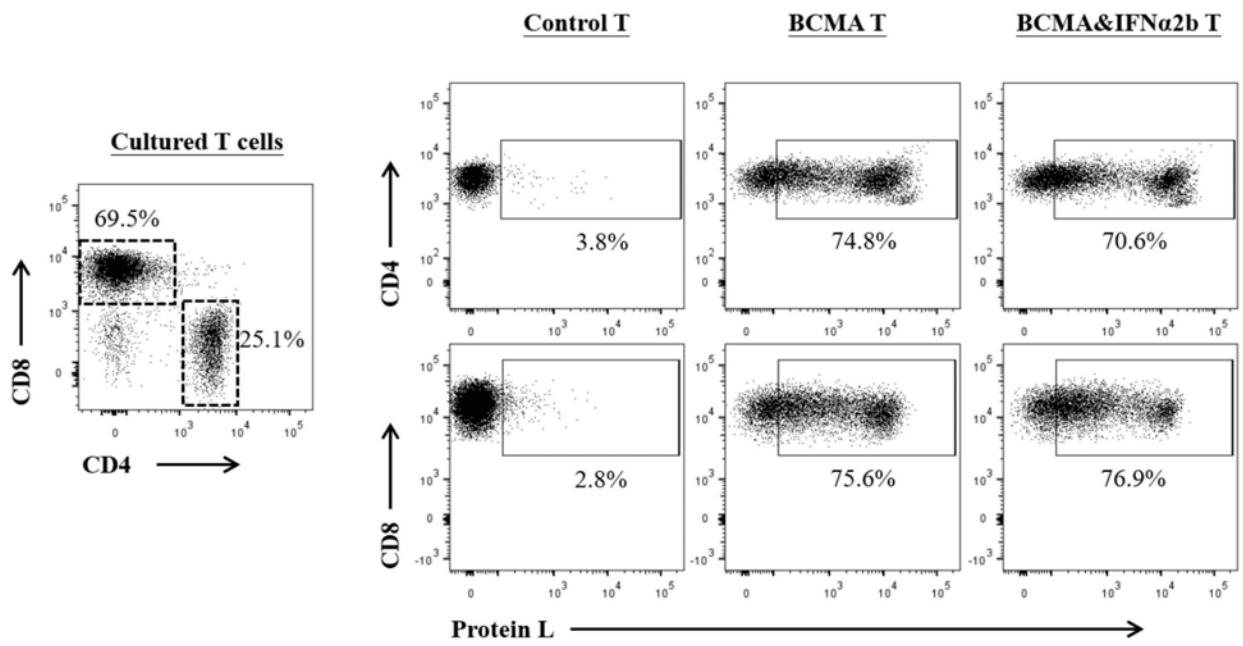


图2

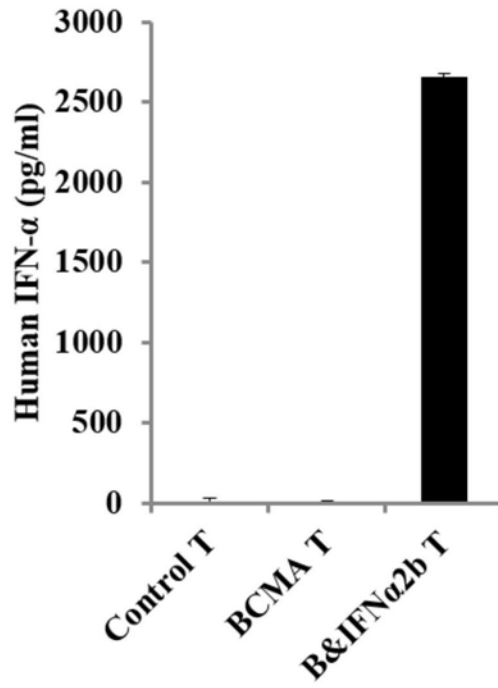


图3

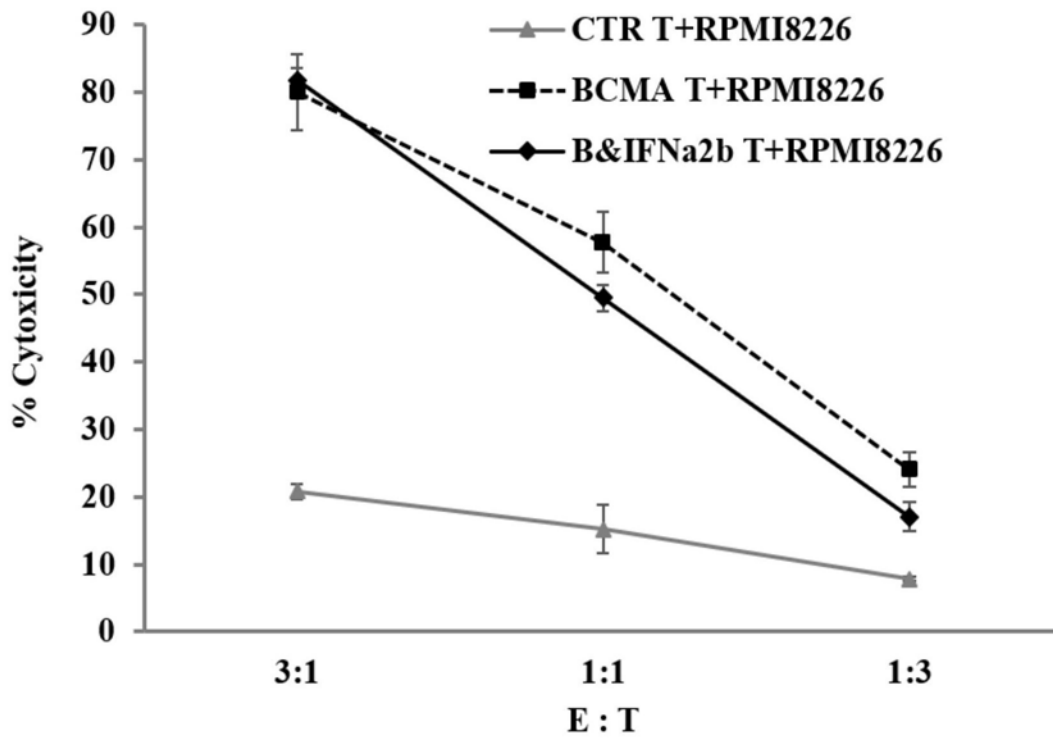


图4

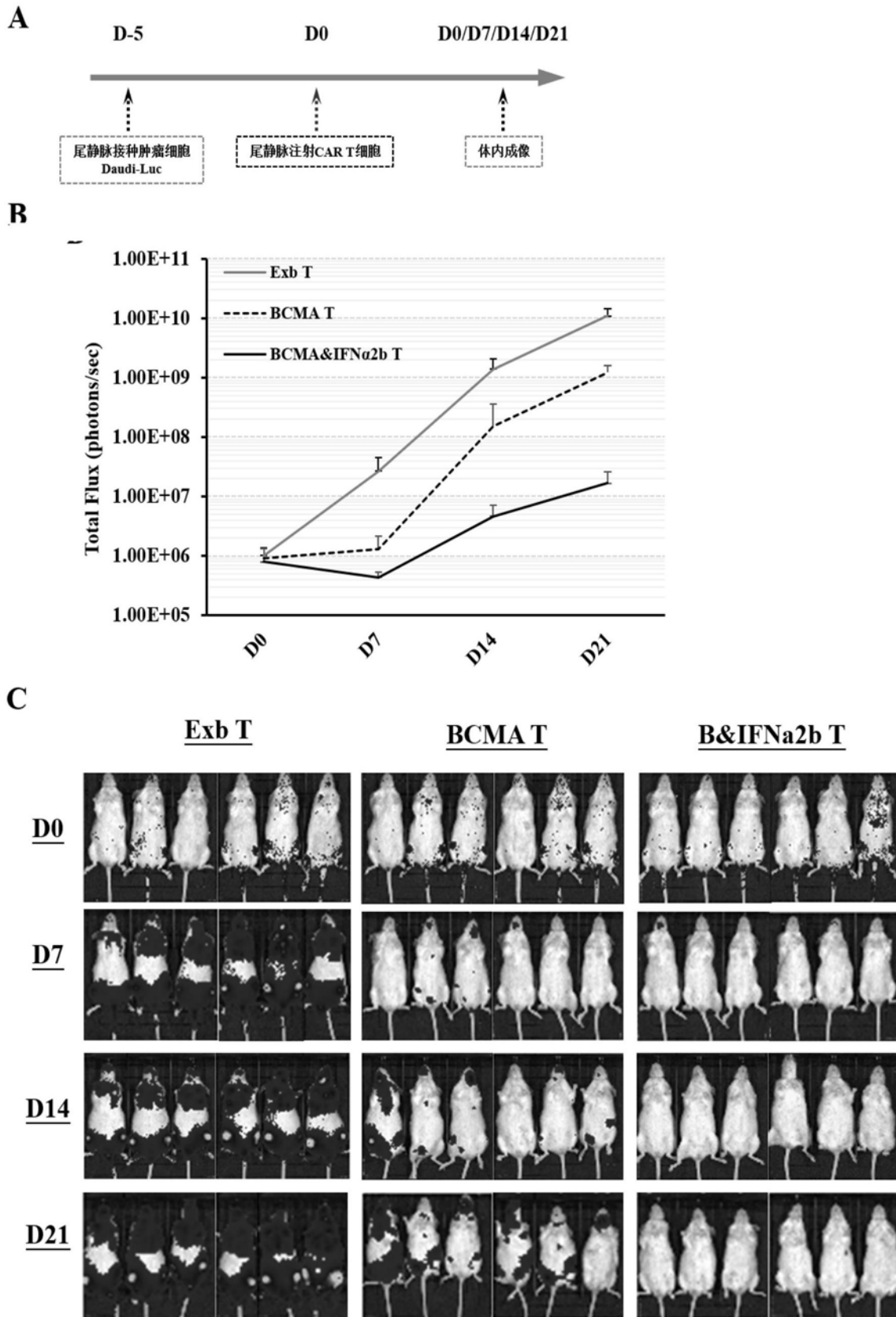


图5