



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112218884 A

(43) 申请公布日 2021.01.12

(21) 申请号 201980031020.6

(22) 申请日 2019.05.03

(30) 优先权数据

2018-000039 2018.05.07 CU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.11.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CU2019/050003 2019.05.03

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2019/214757 ES 2019.11.14

(71) 申请人 免疫分子中心

地址 古巴哈瓦那11600阿塔贝普拉亚

(72) 发明人 泰斯·埃尔恩德斯·加西亚

毛拉·利塞特·瑞巴德·切地克

卡莱特·莱昂·蒙兹

赛斯·梅萨·帕迪略

路易斯·恩里克·费恩德斯·莫利纳

吉赛尔·赫维娅·赫恩德斯

(74) 专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限公司 11228

代理人 关宇辰

(51) Int.Cl.

C07K 14/55 (2006.01)

C07K 14/56 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

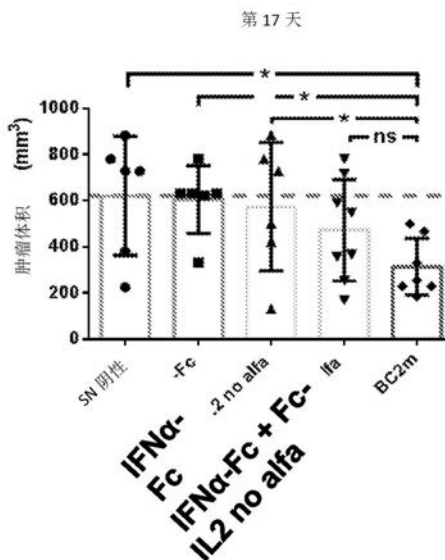
权利要求书1页 说明书7页
序列表15页 附图5页

(54) 发明名称

由白介素-2突变蛋白和I型干扰素构成的融合蛋白

(57) 摘要

本发明描述了基于细胞因子的融合蛋白,称为双细胞因子(BC),具体地通过IL2激动剂突变蛋白与I型干扰素(IFN)的结合而形成,由突变人IgG1的Fc区和连接肽连接。IL2激动剂突变蛋白和I型IFN在双细胞因子结构中的组合为这些分子提供了令人惊讶的免疫调节特性,并且提供了比亲代细胞因子或它们的组合优越的治疗效果,这使它们成为用于治疗癌症的有吸引力的新颖分子。还描述了包含本专利的融合蛋白标的作为活性成分的药物组合物。



1. 一种融合蛋白,所述融合蛋白包含与I型干扰素 (IFN) 连接的IL2激动剂突变蛋白。
2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中所述IL2激动剂突变蛋白通过接头与I型IFN结合。
3. 根据权利要求2所述的融合蛋白,其特征在于所述IL2突变蛋白具有以SEQ ID NO 1示出的序列。
4. 根据权利要求2所述的融合蛋白,其特征在于所述IL2突变蛋白具有以SEQ ID NO 2示出的序列。
5. 根据权利要求2所述的融合蛋白,其特征在于所述I型IFN是人IFN α ,其序列以SEQ ID NO 3示出。
6. 根据权利要求2所述的融合蛋白,其特征在于具有由与连接肽连接的突变人IgG1的Fc区组成的接头。
7. 根据权利要求6所述的融合蛋白,其特征在于具有序列以SEQ ID NO 5示出的接头。
8. 根据权利要求2所述的融合蛋白,其特征在于具有以SEQ ID NO 6示出的序列。
9. 根据权利要求2所述的融合蛋白,其特征在于具有以SEQ ID NO 7示出的序列。
10. 一种核酸分子,所述核酸分子包含编码如权利要求8和9中任一项所述的融合蛋白的核苷酸序列。
11. 根据权利要求10所述的核酸分子,其特征在于具有以SEQ ID NO 10示出的序列。
12. 根据权利要求10所述的核酸分子,其特征在于具有以SEQ ID NO 11示出的序列。
13. 一种mRNA分子,所述mRNA分子编码如权利要求8和9所述的融合蛋白中的任一者。
14. 一种药物组合物,所述药物组合物包含浓度范围为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的如权利要求8和9中任一项所述的融合蛋白作为活性成分,以及药学上可接受的载体。
15. 如权利要求8和9中任一项所述的融合蛋白在癌症治疗中的用途。
16. 如权利要求10和11中任一项所述的核酸分子用于肿瘤内注射的用途。

由白介素-2突变蛋白和I型干扰素构成的融合蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术和免疫肿瘤学领域,尤其涉及基于细胞因子的融合蛋白的开发。特别地,本发明描述了由I型干扰素 (IFN) 与白介素2 (IL2) 激动剂突变蛋白结合而构成的融合蛋白。

背景技术

[0002] 尽管在癌症免疫疗法领域中已进行了数十年与细胞因子使用有关的艰苦工作,但迄今为止所获得的结果仍是微不足道的。这些分子的高毒性和降低的半衰期以及受益患者的低百分比,使得有必要制定创新策略来增强其抗肿瘤特性,从而转化为癌症患者的更高生活质量和更长寿命。破坏细胞因子的治疗功效的机制中包括调节性T细胞的诱导,其抑制肿瘤微环境中细胞毒性CD8⁺ T细胞的应答 (Ovens和Naugler (2012) *Theoretical Biology and Medical Modeling*, 9: 44)。

[0003] 传统上,通过可溶分子的共同施用或融合蛋白(通常称为融合因子(fusokine))的产生,组合一直是旨在优化细胞因子在癌症治疗中的治疗用途的策略之一。与融合蛋白的使用相关的优点不仅包括其生产的可行性,而且还包括在具有不同药理特性的分子之间建立化学计量关系的可能性。另外,已经表明,与独立施用亲代细胞因子相比,甚至当与它们的组合相比时,一些融合因子具有优越的治疗效果 (Stagg J.等(2004) *Cancer Research*, 64: 8795-8799; Acres B. (2005) *Cancer Research*, 65: 9536-9546); US 2011/0150828。最近在融合因子的研究中描述的一种治疗策略是肿瘤内施用编码基于I型IFN和TGFβ受体胞外域的融合蛋白的mRNA,其显示抗肿瘤作用。mRNA的肿瘤内转移技术是一种非常适合临床情况的高度灵活、可重现、简单且适应性强的治疗工具 (Van der Jeught等(2015), *OncoImmunology*, 4: 5)。

[0004] 与抗肿瘤治疗相关的两种细胞因子是I型干扰素IFNα和IL2,它们是癌症治疗中所需的T辅助1应答模式的有效诱导剂。先前已描述了IFNα对恶性细胞的直接抗肿瘤作用。它与细胞生长抑制、抗增殖作用以及细胞外基质蛋白酶水平的降低相关,所述细胞外基质蛋白酶参与侵袭和转移过程并与疾病的预后较差有关。另一方面,该细胞因子促进抗原呈递细胞的成熟和迁移、αCD8树突状细胞中交叉呈递的诱导和淋巴细胞活化 (Chikkala等(1990) *Cancer Research*, 50: 1176-1182)。已描述,由于抗原介导的活化,IFNα保护T细胞免受线粒体依赖性细胞凋亡的影响,从而以受调控的方式促进克隆扩增过程 (Dondi等(2004) *The Journal of Immunology*, 173 (6): 3740-3747)。

[0005] 另一方面,细胞因子IL2是一种自分泌因子,其促进抗原活化的T淋巴细胞的增殖。然而,其与调节性T淋巴细胞结合的亲和力高于与效应细胞结合的亲和力,从而诱导其增殖,因而在抗肿瘤作用中产生负面影响 (Chaput等(2007) *J Immunol*, 179: 4969-4978)。改善该分子的治疗功效的策略之一是基于合理设计开发突变蛋白。在分子免疫学中心 (Center of Molecular Immunology) 产生的IL2激动剂突变蛋白就是这种情况,它不能与调节性T细胞中表达的高亲和力受体结合。IL2激动剂突变蛋白在下文中将被称为no alpha

IL2 (US 9,206,243的SEQ ID NO 6)。由于其相对于野生型IL2的修饰,与调节性T淋巴细胞相比,no alpha IL2优先扩增NK和记忆CD8 T细胞的效应子群体。还描述了该分子与野生型IL2相比对健康组织的较低毒性(Carmenate等(2013). *of Immunology*, 190: 6230-6238)。

[0006] IL2的另一种激动剂变体由体外进化(基因工程)产生。这种称为IL2的超级因子的变体(H9)对IL2受体的 β 链表现出增加的结合亲和力并刺激T淋巴细胞的强大增殖,而与IL2受体的CD25 α 链的表达无关。事实上,已证明,相对于IL2,所述变体能够诱导细胞毒性T淋巴细胞的扩增增加,体内抗肿瘤反应增强,调节性T细胞的有限扩增以及毒性降低(Levin等(2012) *Nature*, 48: 529-535)。下文将该变体称为H9。

[0007] 若干研究表明,IL2和IFN α 的组合施用在癌症治疗中具有协同作用。与独立使用的细胞因子相比,通过使用IFN α 和IL2的组合,可显著提高BR55-2 MAb针对HT29结直肠癌细胞系诱导的刺激抗体依赖性细胞毒性的能力(Flieger等(2000) *Cytokine*, 12: 756-761)。在2010年,Konjevic等证实,从临床IV期转移性黑素瘤患者获取的外周血样本中,IL2和IFN α 都可提高NK细胞的体外活性。IL2和IFN α 这两种细胞因子都能够刺激NK细胞中NKG2D激活受体的表达,甚至在具有CD16高表达的NK细胞亚群中也是如此;两种细胞因子的NKG2D诱导都与NK细胞活性的诱导相关(Konjevic等(2010) *Melanoma Research*, 20: 459-67)。

[0008] 在文献中,有一篇报道描述了融合蛋白的产生,该融合蛋白结合了两种细胞因子,即野生型IL2和人IFN α 2b。在该分子中,IL2直接与IFN α 2b连接,并且其抗肿瘤作用未与亲代细胞因子和它们的组合进行比较(He等(1999) *J Leukoc Biol*, 125: 77-82),因此没有证据表明所述融合蛋白优于这些细胞因子。

[0009] 考虑到上述先决条件,本申请的发明人生成了用于癌症治疗的几种称为双细胞因子(BC)的双功能融合蛋白。获得了两种将I型IFN与IL2激动剂结合的双功能分子,用于治疗癌症。为了获得它们,起点是两个突变蛋白的融合:no alpha IL-2或H9,和IFN α 。所提出的这些BC(下文分别称为BC2和BC3)的设计由两种细胞因子通过免疫球蛋白的Fc区连接组成,所述Fc区与Fc γ 受体的结合有限。能够结合新生儿Fc受体的这种Fc区的存在可延长半衰期。这些组合和设计构成了这类蛋白质的开发中的新要素。所得分子具有免疫调节作用以及令人惊讶的体内抗肿瘤特性,其优于以等摩尔量施用每个亲代细胞因子(与相同的Fc区融合)以及甚至这些亲代细胞因子的组合后所观测到的体内抗肿瘤特性。

发明内容

[0010] 在一个实施方案中,本发明的主题是包含通过接头与I型IFN连接的IL2突变蛋白的融合蛋白。特别地,作为本发明的融合蛋白的一部分的IL2突变蛋白的序列描述于SEQ ID NO 1和2。作为所述融合蛋白的结构的一部分的IFN是IFN α (SEQ ID NO 3)。

[0011] 在一个特定的实施方案中,本发明的融合蛋白的特征在于所述接头由突变人IgG1的Fc区和连接肽组成,并且其序列以SEQ ID NO 5示出。

[0012] 另外,本发明中描述的融合蛋白的序列以SEQ ID NO 6和7示出,并且编码它们的核酸序列分别以SEQ ID NO 10和11示出。

[0013] 在另一个实施方案中,本发明涉及药物组合物,所述药物组合物包含作为活性成分的以SEQ ID NO 6和7描述的融合蛋白以及药学上可接受的载体。

[0014] 在另一个实施方案中,本发明的主题是本文描述的融合蛋白在癌症治疗中的用途;包括编码所述融合蛋白的核酸分子的肿瘤内注射方法。

附图说明

[0015] 图1. 序列:(A) 人IFN α 2b, (B) 接头片段。

[0016] 图2. H9的序列。

[0017] 图3. 通过ELISA评估BC2m和单一对照在HEK293T细胞中的瞬时表达。

[0018] 图4. 通过蛋白质印迹法利用以下对BC2m和单一对照进行免疫识别:(A) 对IFN α 具特异性的抗体, (B) 对IL2具特异性的抗体。

[0019] 图5. (A) BC2m和IFN α -Fc对照的IFN α 样活性,如通过在用转染的HEK293T细胞的上清液处理的MB16F10肿瘤细胞中由MHC I表达的诱导测试所测量, (B) BC2m和单一对照Fc-no alpha IL2的IL2样活性,如通过用转染的HEK293T细胞的上清液处理的原生小鼠脾细胞的培养物中T CD8+淋巴细胞的扩增测试所测量。

[0020] 图6. 通过ELISA检测转导的4T1肿瘤细胞上清液中的BC2m和单一对照:(A) 对Fc区具特异性, (B) 对Fc和IL2区具特异性, (C) 对Fc和IFN α 区具特异性。

[0021] 图7. 在实验的第25天和第27天,通过使用转导的4T1肿瘤细胞来评估BC2m的抗肿瘤作用。

[0022] 图8. 在实验的第17天,在肿瘤内注射BC2m的4T1模型中评估治疗效果。

[0023] 通过以下实施例和附图进一步阐述本发明。然而,这些实施例不应解释为限制本发明的范围。

具体实施方式

[0024] BC的设计

设计本发明的融合蛋白时要考虑到它们预期的病理情况。BC2是通过no alpha IL-2突变蛋白与人IFN α 的融合形成,no alpha IL-2突变蛋白的序列以SEQ ID NO. 1示出(先前公开于US 9,206,243 B2的SEQ ID No. 6),并且人IFN α 的序列示于图1A以及本发明的SEQ ID. NO 3。具有L234A L235A突变的突变人IgG1的Fc区(与参与免疫应答的受体的活化能力有限相关)(Hezareh等(2001) J Virol., 75 (24): 12161-12168)与连接肽(Gly₄Ser)₃形成接头元件。IFN α 分子结合在接头片段的N末端(Nt),并且no alpha IL2分子结合在C末端(Ct)。所述接头的序列描述于图1B以及SEQ ID. NO 5。

[0025] BC3是通过人IFN α 与前述H9突变蛋白的融合而形成,人IFN α 的序列示于图1A以及SEQ ID. NO 3,并且前述H9突变蛋白的序列示于SEQ ID NO. 2以及图2。接头元件由具有突变L234A L235A并且参与免疫应答的受体的激活能力有限的人IgG1的Fc区和接头肽(Gly₄Ser)₃构成。IFN α 分子结合在接头片段的Nt处,并且在Ct处发现为H9分子。所述接头的序列描述于图1B以及SEQ ID. NO 5。

[0026] 药物组合物

可发现本发明的BC标的为活性成分,因此构成适合的不同药物组合物的一部分,以及药学上可接受的载体。所述药物组合物中活性成分的浓度在1 μ g/ml至20 μ g/ml的范围内,优选在5 μ g/ml至10 μ g/ml的范围内。

[0027] 药学上可接受的载体包括但不限于：盐溶液、pH中性的磷酸盐缓冲盐水和类似制剂。适于施用于患者的其它缓冲剂、分散剂和无毒惰性物质可包括在本发明的组合中。所述组合物可以是适于施用的溶液，并且通常是无菌的并且不含不希望的颗粒。

[0028] 治疗用途和治疗方法

BC的新颖格式部分是由于在构成它们的细胞因子的接头元件中存在Fc区。该Fc区使其可通过蛋白A亲和色谱法纯化，从而可通过不同途径（皮下、静脉内、皮内、肌内、腹膜内）以可溶性蛋白的形式施用，并且还可增加这些药剂在循环中的半衰期，并因此提高它们的治疗效用。这允许使用较低的剂量，从而降低毒性。替代的施用途径是肿瘤内，与其它途径相比，肿瘤内施用的毒性较低。同样，与目前临床情况中使用的野生型IL2分子相比，存在no alpha IL2或H9与毒性降低相关。

[0029] 另外，本发明中用于这些BC的施用策略可包括通过基于基因的治疗方法进行产品的肿瘤内注射，例如肿瘤内注射mRNA和编码它们的转导颗粒。对于表达BC2或BC3的肿瘤或浸润性肿瘤细胞的遗传修饰保证了它们在肿瘤微环境中的存在，这使其免疫调节作用以及对肿瘤本身的直接作用成为可能。肿瘤内注射编码治疗剂的核酸的多功能性和高再现性是治疗不同类型肿瘤的合适平台。

[0030] 鉴于这些分子的免疫调节特性，除了以非特异性方式原位增强抗肿瘤反应外，在各种类型的癌症患者中，可考虑与靶向疗法的可能组合支持的特异性抗原免疫反应刺激作为未来的治疗方法。

[0031] 以这种方式，前述BC旨在构成新的治疗前沿，其增强了目前用于癌症治疗的I型IFN和IL2个别细胞因子的药理作用。该作用与细胞毒性T细胞优于调节性T细胞的优先扩增相关，这导致更有效的抗肿瘤免疫应答，因此导致所治疗个体的肿瘤生长延迟和更大存活率。除此之外，与使用野生型细胞因子的疗法相比，所使用的IL2突变蛋白的较低毒性水平增加了成功的可能性。所有这些反应都可以转化为所治疗患者的更高预期寿命和生活质量。

实施例

[0032] 实施例1. 设计和获得BC和细胞因子的单一对照。

[0033] 为了在小鼠中模拟基于I型IFN和IL2激动剂的BC的免疫调节和抗肿瘤作用，产生了以SEQ ID NO 8描述的BC2m。这由通过以SEQ ID NO 12示出的接头片段与no alpha IL2突变蛋白(IL2激动剂的实施例，以SEQ ID NO 1描述)融合的I型IFN(鼠类IFN α 4 (SEQ. ID NO 4))组成，所述接头片段由结合到肽连接子(Gly₄Ser)₃的突变鼠类IgG1的Fc区组成。Fc区中的D265A突变降低了参与免疫应答的受体的激活能力(Becker J.C.等(1996) PNAS, 93: 2702-2707)。no alpha IL2突变蛋白位于接头片段的Ct末端，而IFN α 4位于该同一片段的Nt末端。因此，BC2m是一种二聚且四价的分子。

[0034] 将单一对照设计为包含与突变鼠类IgG1 (D265A)的Fc区融合在每个亲代细胞因子并保持每个细胞因子在BC2m结构中的相对位置的分子。因此，在单个IFN α 对照中，该细胞因子结合至上述Fc区的Nt，而在no alpha IL2的单一对照中，该细胞因子位于上述Fc区的Ct处。因此，IFN α 和no alpha IL2的单一对照是二聚且二价的分子。

[0035] 将BC2m和单一对照IFN α -Fc和Fc-no alpha IL2基因克隆到pLV-CMV-IRES-Neo载

体中,以便在高级细胞中进行瞬时表达测定。所得的遗传构建也用作转移载体,以获得用于肿瘤细胞系的遗传修饰的转导颗粒。通过使用脂质转染胺(lipofectamine)的瞬时转染检查所述基因在HEK293T细胞中的表达。通过对鼠类Fc区特异性的ELISA对上清液中的不同重组分子进行定量。

[0036] BC2和BC3的生成

为了构建BC2和BC3的人BC,使用人IFN α (SEQ ID NO 3和图1A)以及激动剂突变蛋白no alpha IL2和H9 (分别描述于SEQ ID NO. 1和2)。具有L234A L235A突变和参与免疫应答的受体的激活能力有限的突变人IgG1的Fc区和接头肽(Gly₄Ser)₃被用作接头;所述接头示于SEQ ID NO. 5和图1B中。IFN α 分子结合在接头片段的Nt处,并且no alpha IL2或H9结合在接头的Ct处。

[0037] 双功能蛋白BC2和BC3的最终设计分别示于SEQ ID NO. 6和7。将BC2和BC3的基因克隆到转移载体pLV-CMV-IRES-Neo中,以在高级细胞中稳定表达。这些基因的功能性通过在HEK293T细胞中用脂质转染胺进行瞬时表达测定来检查,为此,通过对人Fc区特异性的ELISA来定量重组分子。

[0038] 实施例2. BC2m被表达为完整的功能蛋白。

[0039] 一旦获得了BC2m构建体和单一对照IFN α -Fc和Fc-no alpha IL2,就对HEK293T细胞进行瞬时转染测定,以评估设计这些分子的可行性。培养72小时后,除去上清液并进行对鼠类Fc区特异性的ELISA。为此,用对鼠类IgG分子特异性的抗体包被聚苯乙烯板,并与用含有BC2m基因的每种构建体和单一对照转染的细胞的上清液一起温育。最后,使用缀合至酶过氧化物酶的对鼠类IgG的Fc区特异性的抗体进行检测。通过用鼠类IgG在标准曲线中内插在492nm处的吸光度值,计算重组蛋白的浓度。通过此测试,可检测三种目标蛋白的表达,并检查所设计格式的功能性(图3)。

[0040] 类似地,通过进行对细胞因子IFN α 和IL2特异性的蛋白质印迹测定,检查了其在BC2m结构中的存在(图4A和图4B)。同样,已证实在非还原和还原条件下,BC2m表达为一种蛋白质,其电泳迁移分别对应于二聚体的理论大小120 kDa和单体的理论大小60 kDa。还在相应的单一对照IFN α -Fc和Fc-no alpha IL2中检查了这些细胞因子的鉴定,并且根据设计,检测到的电泳迁移与预期大小相对应(图4A和图4B)。

[0041] 实施例3. BC2m保留了与细胞因子IFN α 和IL2相对应的生物活性。

[0042] 为了确定IFN α 和no alpha IL2突变蛋白的部分在BC2m和单一对照的结构中是否具有活性,对用相应基因构建体转染的HEK293T细胞上清液并使用等摩尔量的分子进行体外实验。未转染的HEK293T细胞的上清液用作阴性对照。在IFN α 样活性的情况下,通过流式细胞术评估在24小时内用所述上清液处理的MB16F10黑素瘤细胞表面上的MHC I表达的增加。与使用阴性对照获得的结果相反,含有BC2m或IFN α -Fc对照的上清液能够刺激MHC I在治疗的肿瘤细胞中的表达,这表明IFN α 的活性功能被保留在BC2的结构中(图5A)。

[0043] 为了确定在BC2m和Fc-no alpha IL2对照中存在的no alpha IL2是否表现出生物活性,用来自原生小鼠的脾细胞培养物进行CD8⁺淋巴细胞增殖刺激测定。用CFSE试剂标记来自C57BL/6小鼠的脾细胞,并在含有BC2m或Fc-no alpha IL2对照的转染HEK293T细胞上清液存在下培养72小时。实验结束时,分析CD8⁺ T淋巴细胞增殖的百分比。作为阴性对照,使用与未转染HEK293T细胞的上清液一起温育的脾细胞,并通过分别将用BC2m或Fc-no

alpha IL2处理的脾细胞的增殖CD8+ T细胞的百分比除以对应于阴性对照的值来计算CD8+ T淋巴细胞的增殖比率 (Pr)。

[0044] 在图5B中,含有BC2和Fc-no alpha IL2的上清液能够诱导脾细胞增殖,分别是阴性对照的4倍和5倍。这些结果证实所述融合蛋白的结构中所含的no alpha IL2部分保留了其生物学特性。

[0045] 实施例4. BC2m由通过慢病毒转导进行基因修饰的4T1肿瘤细胞分泌。

[0046] 为了评估BC2m在体内的抗肿瘤活性,使用4T1乳腺癌作为模型,选择了转导的肿瘤细胞的方法。用编码BC2m和单一对照的慢病毒颗粒转导细胞。作为阴性对照,使用用空pLV-CMV-IRES-Neo载体转导的肿瘤细胞(模拟对照)。将转导的细胞在选择性培养基(含G-418抗生素)中保持10天,并通过ELISA测量上清液中重组分子的浓度,以检测鼠类免疫球蛋白的Fc部分。通过该技术在转导的肿瘤细胞的上清液中检测到BC2m和单一对照(图6A)。

[0047] 另外,通过夹心ELISA确认了BC2m和单一对照中no alpha IL2部分和IFN α 的存在。在其中之一中,将转导细胞的上清液在涂有抗Fc抗体的板上温育,并依次添加对IL2具特异性的兔抗体和与酶过氧化物酶结合的抗兔免疫球蛋白抗体来检测IL2部分。因此,在BC2m和单个Fc-no alpha IL2对照的结构中检测到Fc-IL2部分(图6B)。在另一测定中,将转导细胞的上清液在涂有抗IFN α 抗体的板上温育,并用对小鼠IgG的Fc区具特异性的抗体(与酶过氧化物酶缀合)检测Fc部分。在BC2m和单个IFN α -Fc对照中检测到IFN α -Fc部分(图6C)。

[0048] 实施例5. BC2m的抗肿瘤作用优于单个细胞因子IFN α -Fc和Fc- no alpha IL2或其组合的对照的抗肿瘤作用

为了比较BC2m相对于对照的抗肿瘤作用,评估了来自分泌不同分子的4T1细胞的植入肿瘤的生长。设想了五组待治疗的动物:其中三组接受4T1-模拟、4T1-IFN α -Fc或4T1-Fc-no alpha IL2细胞,并且其余两组接种no alpha 4T1-IFN α -Fc+4T1-FcIL2或4T1-BC2m细胞的组合。皮下施用了总数为100 000个的细胞。考虑到转导的品系表达不同水平的重组蛋白,在某些情况下将它们与模拟细胞混合以确保分泌的蛋白/总细胞比率在所有组中均相等。

[0049] 为了分析结果,在实验的第25天和第27天,通过Fisher精确检验,对不同组中肿瘤体积小于或等于4T1-模拟组中存在的最小体积的动物的频率进行配对比较。

[0050] 如图7中所观察到,在第25天和第27天,与单一对照及其组合相比,在接受4T1-BC2m细胞的组中,肿瘤尺寸小于或等于模拟对照组中观察到的最低值的动物的频率明显更高(Fisher精确检验, $p < 0.05$)。在接受4T1-IFN α -Fc+4T1-Fc no alpha IL2细胞的组合的组中未观察到这种现象,其中所评估的频率与用每种单一疗法治的组相比没有差异(结果未示出,Fisher精确检验, $p > 0.05$)。

[0051] 这些结果指出了BC2m的治疗优势,因为它们表明IFN α 与no alpha IL2的结合导致了定性或定量不同分子和细胞机制的激活,从而发挥了增强的抗肿瘤反应,高于采用细胞因子IFN α -Fc和Fc-no alpha IL2的单一对照的共同施用或这些细胞因子的单独施用所获得的抗肿瘤反应。

[0052] 实施例6. 在4T1模型中肿瘤内注射BC2m具有比单一对照IFN α -Fc和Fc-no alpha IL2更大的抗肿瘤作用。

[0053] 将4T1细胞接种在BALB/c免疫活性小鼠中。10天后,经肿瘤内注射等摩尔量的先前转染的HEK293T细胞的上清液中包含的IFN α -Fc、Fc-no alpha IL2和BC2m。另一组接受了含

有IFN α -Fc和Fc-no alpha IL2的上清液的混合物的注射,从而相对于单一对照和BC2m确保了每种细胞因子的等摩尔性。作为阴性对照,使用未转染的HEK293T细胞的上清液。以每天一次的频率注入上清液,持续四天。如图8所示,在实验的第17天,用BC2m治疗的小鼠中100%小鼠的肿瘤体积低于阴性对照组的平均值,这一结果在任何其它治疗组中均未观察到。在接受BC2m治疗的组中,带有肿瘤尺寸低于阴性对照组平均值的动物的频率高于任何接受个别疗法IFN α -Fc或Fc-no alpha IL2的组(Fisher精确检验; $p<0.05$)。然而,与单一对照IFN α -Fc相比,在用IFN α -Fc和Fc-no alpha IL2对照的组合治疗的组中,肿瘤体积小于阴性对照组的平均肿瘤体积的动物的频率更高。相反,相对于Fc-no alpha IL2对照,该频率没有更高,这表明需要在同一分子中结合IFN α 和no alpha IL2细胞因子以获得更有效的保护作用。这可能是由于与同时刺激两个分子的受体相关的分子和细胞机制的可能激活。总体而言,这些证据支持,相对于亲代细胞因子,在肿瘤中局部施用BC2m具有优越的治疗价值。

序列表

<110> 免疫分子中心(Centro de Inmunologia Molecular)

<120> 由白介素-2突变蛋白和I型干扰素构成的融合蛋白

<130> 592018CU00

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 利用DNA重组技术

<400> 1

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

<210> 2

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 利用DNA重组技术

<400> 2

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

<210> 3

<211> 165

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 利用DNA重组技术

<400> 3

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

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125
 Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140
 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Ser Lys Glu
 165

<210> 4

<211> 162

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 利用DNA重组技术

<400> 4

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

<210> 5

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 利用DNA重组技术

<400> 5

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

<210> 6

<211> 544

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 利用DNA重组技术

<400> 6

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

275	280	285
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
290	295	300
Glu Glu Val Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
305	310	315
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
325	330	335
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
340	345	350
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln		
355	360	365
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
370	375	380
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly		
385	390	395
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser		
405	410	415
Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu		
420	425	430
Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr		
435	440	445
Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu		
450	455	460
Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Ala Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val		
465	470	475
Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu		
485	490	495
Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr		
500	505	510
Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe		
515	520	525
Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr		
530	535	540
<210> 7		
<211> 544		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 利用DNA重组技术		

<400> 7

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

Glu Glu Val Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 305 310 315 320
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 325 330 335
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 340 345 350
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 355 360 365
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 370 375 380
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser
 405 410 415
 Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
 420 425 430
 Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
 435 440 445
 Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
 450 455 460
 Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Phe Asp Pro Arg Asp Val
 485 490 495
 Val Ser Asn Ile Asn Val Phe Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
 500 505 510
 Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
 515 520 525
 Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 530 535 540
 <210> 8
 <211> 536
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 利用DNA重组技术
 <400> 8
 Cys Asp Leu Pro His Thr Tyr Asn Leu Gly Asn Lys Arg Ala Leu Thr
 1 5 10 15

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

	325		330		335										
Pro	Ile	Met	Asp	Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn
	340		345		350										
Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val
	355		360		365										
Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His
	370		375		380										
Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
385			390		395		400								
Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln
	405		410		415										
Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn
	420		425		430										
Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Ala	Met	Leu	Thr	Ala	Lys	Phe	Ala
	435		440		445										
Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu
	450		455		460										
Ala	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn
465			470		475		480								
Phe	His	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val
	485		490		495										
Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp
	500		505		510										
Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser
	515		520		525										
Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr								
	530		535												
<210>	9														
<211>	536														
<212>	PRT														
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
<220>															
<223>	利用DNA重组技术														
<400>	9														
Cys	Asp	Leu	Pro	His	Thr	Tyr	Asn	Leu	Gly	Asn	Lys	Arg	Ala	Leu	Thr
1		5				10			15						
Val	Leu	Glu	Glu	Met	Arg	Arg	Leu	Pro	Pro	Leu	Ser	Cys	Leu	Lys	Asp
	20					25			30						
Arg	Lys	Asp	Phe	Gly	Phe	Pro	Leu	Glu	Lys	Val	Asp	Asn	Gln	Gln	Ile

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

Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
 355 360 365
 Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His
 370 375 380
 Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 405 410 415
 Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn
 420 425 430
 Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr
 435 440 445
 Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu
 450 455 460
 Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn
 465 470 475 480
 Phe His Phe Asp Pro Arg Asp Val Val Ser Asn Ile Asn Val Phe Val
 485 490 495
 Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp
 500 505 510
 Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys
 515 520 525
 Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 530 535

<210> 10

<211> 1563

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 利用DNA重组技术

<400> 10

tgcgatctgc cccacaccta caacctgggc aacaagagag cctgaccgt gctggaggag 60
 atgaggagac tgcctcctct gtctgctg aaggacagga aggacttcgg ctccccctg 120
 gagaaggtgg acaaccagca gatccagaag gccaggcta tctggtgct gagagacctg 180
 acacagcaga tctgaacct gttcacctcc aaggacctgt ctgccacctg gaatgccacc 240
 ctgctggact ccttctgcaa cgacctgcac cagcagctga acgacctgaa ggctgctg 300
 atgcaggagc ctctctgac ccaggaggat tctctgctgg ctgtgctggac ctacttccac 360
 cggatcaccg tgtacctgcg gaagaagaag cactctctgt gcgctggga ggtgatcaga 420
 gccgaagtgt ggagagccct gtctcctct accaacctgc tggccaggct gtctgaggag 480

aaggaggcgg ccgcttctgg ttgtaagcct tgcatatgta cagtcccaga agtatcatct 540
 gtcttcatct tcccccaaa gcccaaggat gtgtcacca ttactctgac tcctaaggtc 600
 acgtgtgttg tggtagccat cagcaaggat gatcccagg tccagttcag ctggtttgta 660
 gatgatgtgg aggtgcacac agctcagacg caaccccggg aggagcagtt caacagcact 720
 ttccgctcag tcagtgaact tcccatcatg caccaggact ggctcaatgg caaggagttc 780
 aaatgcaggg tcaacagtgc agctttccct gccccatcg agaaaacat ctccaaaacc 840
 aaaggcagac cgaaggctcc acaggtgtac accattccac ctccaagga gcagatggcc 900
 aaggataaag tcagtctgac ctgcatgata acagacttct tccctgaaga cattactgtg 960
 gagtggcagt ggaatgggca gccagcggag aactacaaga aactcagcc catcatggac 1020
 acagatggct cttacttcgt ctacagcaag ctcaatgtgc agaagagcaa ctgggaggca 1080
 ggaaataactt tcacctgctc tgtgttacat gagggctgc acaaccacca tactgagaag 1140
 agcctctccc actctcctgg taaagcccc acctccagca gcaccaagaa aactcagctc 1200
 cagctcgaac atctgctgct ggatctgcag atgatctga acggcatcaa caactacaag 1260
 aacccaagc tgaccgcat gctgacagcc aagttcgcca tgccaagaa ggccaccgag 1320
 ctgaagcatc tgcagtgcct ggaagaggcc ctgaagcctc tggaagaggt gctgaacctg 1380
 gccagtcca agaactcca cctgaggccc aggacctga tcagcaacat caacgtgatc 1440
 gtgctggaac tgaagggcag cgagacaacc ttcatgtgcg agtacgccga cgagacagca 1500
 acaatcgtgg agtttctgaa ccggtggatc accttcagcc agagcatcat cagcacctg 1560
 acc 1563

<210> 11

<211> 1632

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 利用DNA重组技术

<400> 11

tgcgatctgc cgcagacca tagcctgggc agccgccga ccctgatgct gctggcgcag 60
 atgcgcaaaa ttagcctggt tagctgctg aaagatgcc atgattttgg ctttccgcag 120
 gaagaatttg gcaaccagtt tcagaaagcg gaaaccattc cgggtgctgca tgaatgatt 180
 cagcagattt ttaacctggt tagcaccaaa gatagcagcg cggcgtggga tgaaccctg 240
 ctggataaat tttataccga actgtatcag cagctgaacg atctggaagc gtgcgtgatt 300
 cagggcgtgg gcgtgaccga aaccccgtg atgaaagaag atagcattct ggcggtgcgc 360
 aaatattttc agcgcattac cctgtatctg aaagaaaaa aatatagcc gtgcgcgtgg 420
 gaagtgggtc gcgcggaaat tatgcgcagc ttagcctga gcaccaacct gcaggaaagc 480
 ctgcgcagca aagaagcggc cgtagcagc aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 540
 cctgaagccg cgggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc 600
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct 660
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 720
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 780

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 840
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 900
ccccatccc gggaggaggt gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 960
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1020
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctatag caagctcacc 1080
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1140
ctgcacaacc actacacgca gaagtcgctc agcctgtccc cgggtaaagg tggaggcggg 1200
tcaggcggag gtggttctgg cgggtggcga tcggcgccga ccagcagcag caccaaaaaa 1260
accagctgc agctggaaca tctgctgctg gatctgcaga tgattctgaa cggcattaac 1320
aactataaaa acccgaaaact gaccgcatg ctgacctta aattttatat gccgaaaaaa 1380
gcgaccgaac tgaaacatct gcagtgcctg gaagaagaac tgaaaccgct ggaagaagtg 1440
ctgaacctgg cgcagagcaa aaactttcat tttgatccgc gcgatgtggt gagcaacatt 1500
aacgtgtttg tgctggaact gaaaggcagc gaaaccacct ttatgtgcga atatgcggat 1560
gaaaccgcga ccattgtgga atttctgaac cgctggatta ccttttgcca gagcattatt 1620
agcaccctga cc 1632

<210> 12

<211> 241

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 利用DNA重组技术

<400> 12

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

130	135	140	
Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp			
145	150	155	160
Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile			
	165	170	175
Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln			
	180	185	190
Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His			
	195	200	205
Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro			
	210	215	220
Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
225	230	235	240
Ser			


```

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAEIIPVL
HEMIQQIFNLFSTKDSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDELEACVIQGVGTETPLMK
EDSILAVRKYFQRITLYLKEWKYSPCANEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

```

图 1A

```

AAASDKTHICPPCPAPEAAGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNARTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIENTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVTSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGKGGGSGGGGSGGGG

```

图 1B

```

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTBMLTFKFYMP
KKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHFDPRDVSNIINVFVL
ELKGSSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

```

图 2

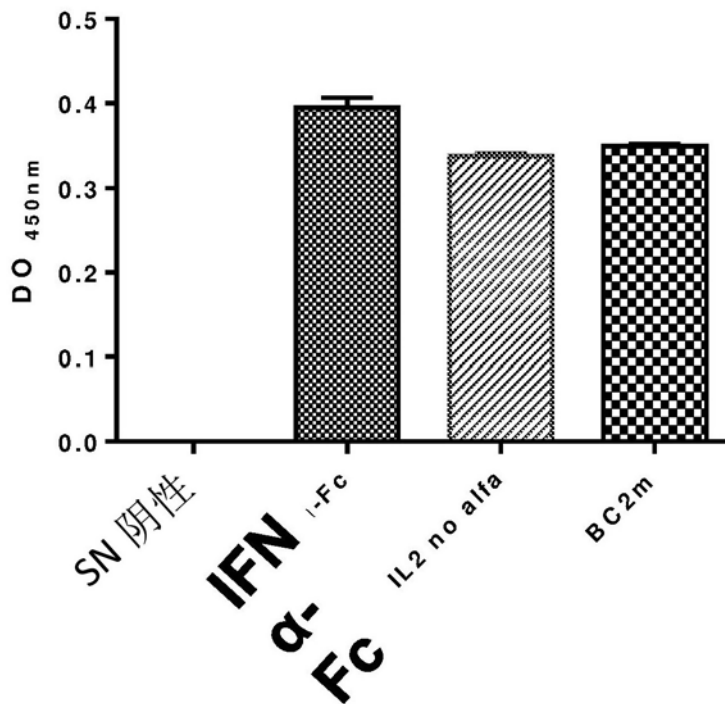


图 3

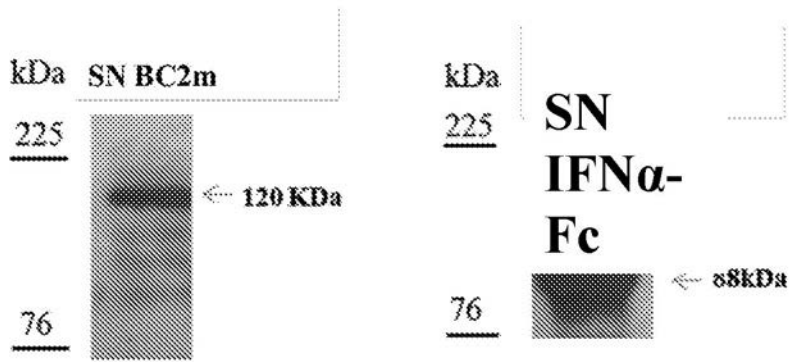


图 4A

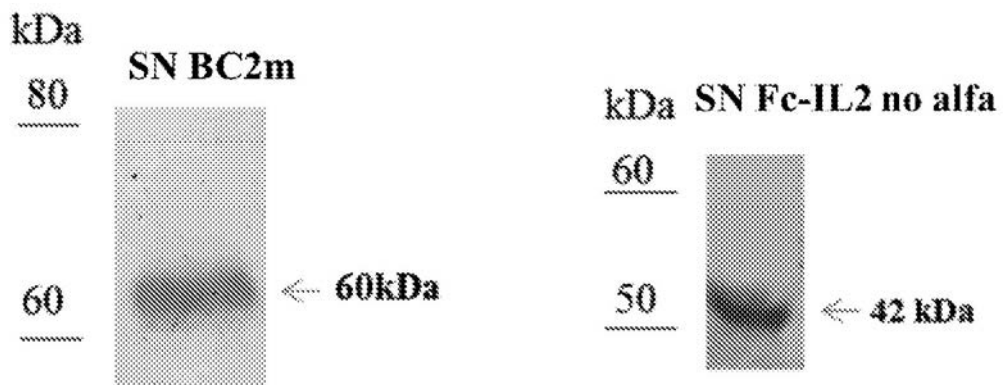


图 4B

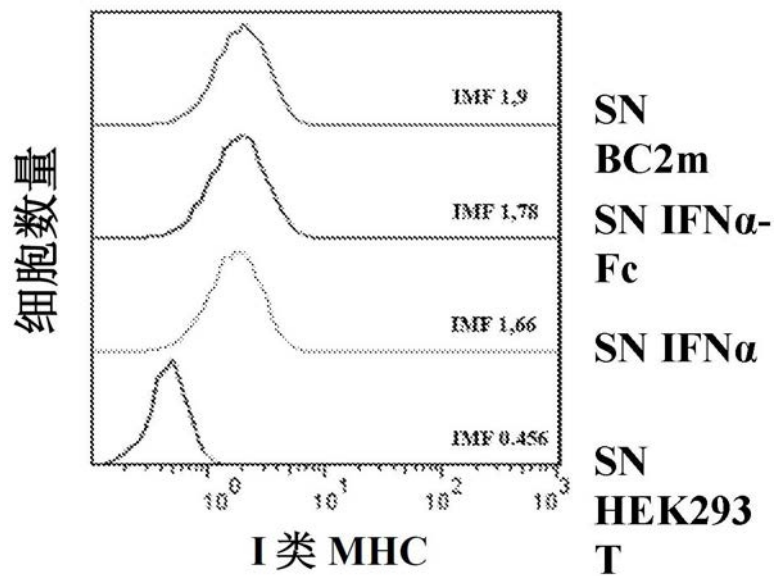


图 5A

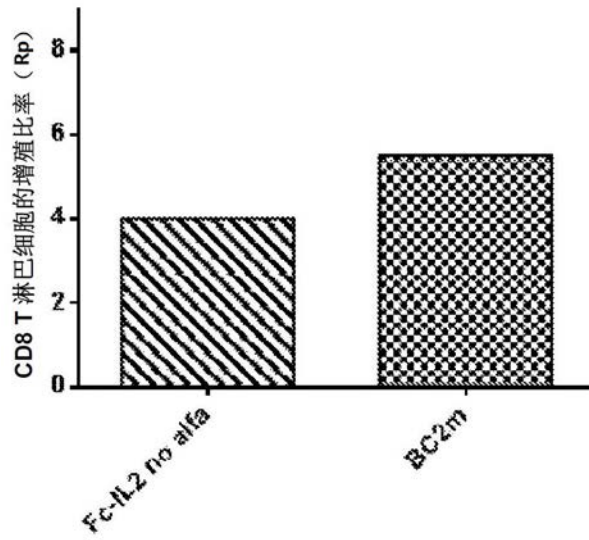


图 5B

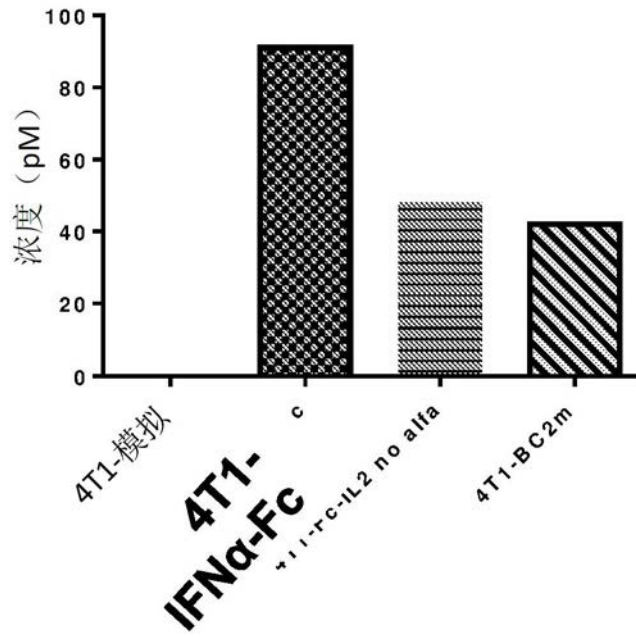


图 6A

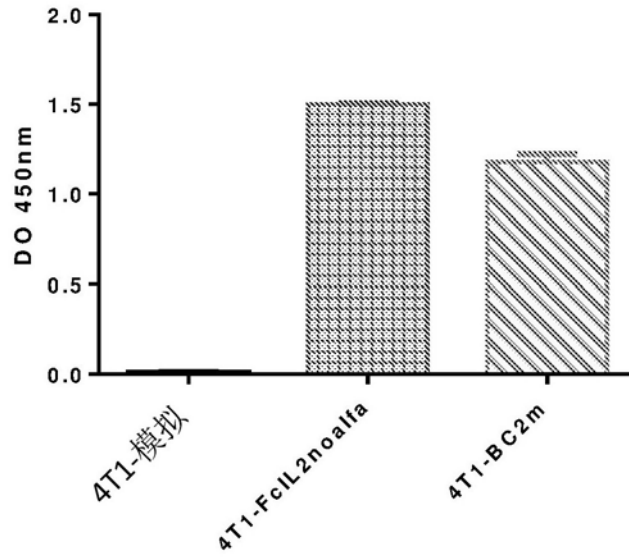


图 6B

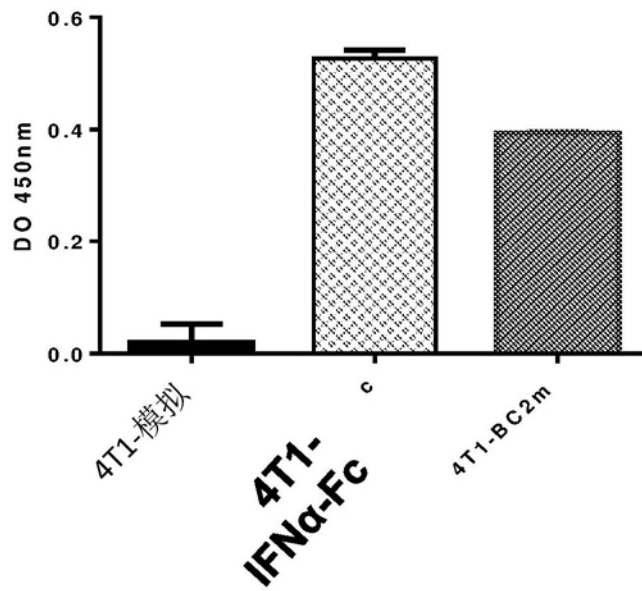


图 6C

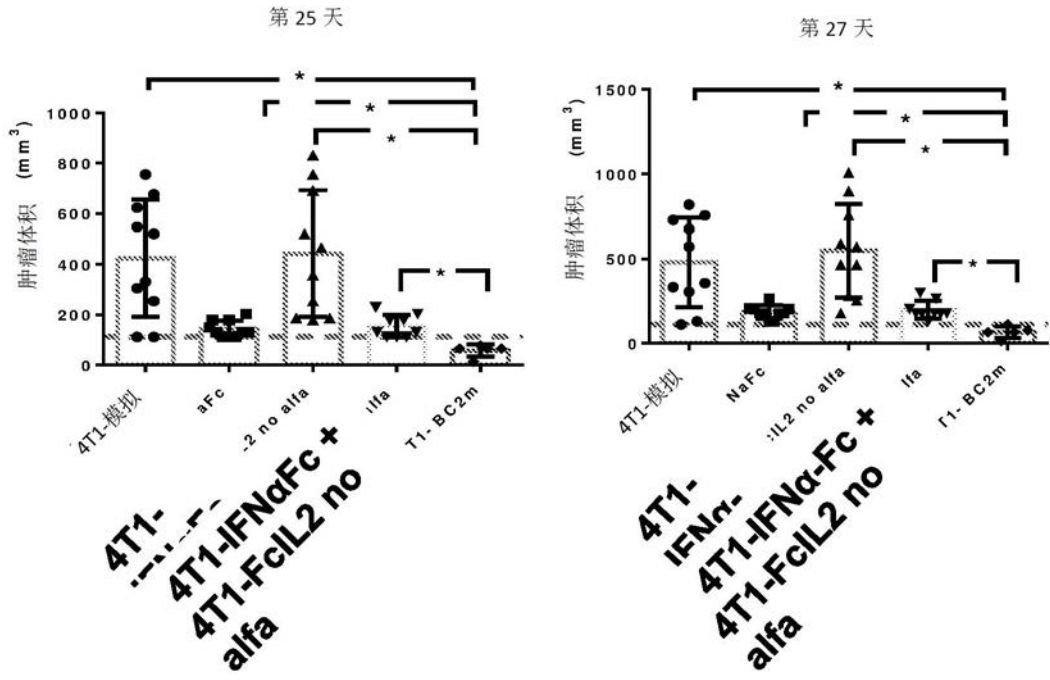


图 7

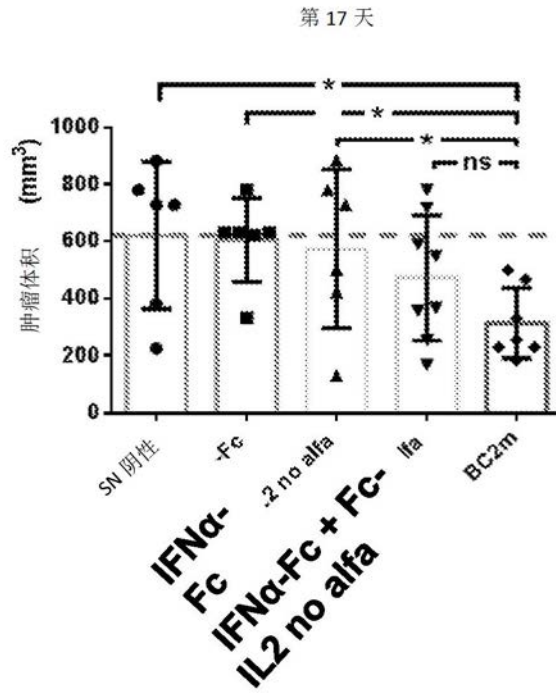


图 8