



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117295753 A

(43) 申请公布日 2023.12.26

(21) 申请号 202180092799.X

S·昆图

(22) 申请日 2021.12.06

(74) 专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300

(30) 优先权数据

63/121,782 2020.12.04 US

63/156,070 2021.03.03 US

专利代理师 杜娟

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.08.02

(51) Int.Cl.

C07H 21/04 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/062015 2021.12.06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/120276 EN 2022.06.09

(71) 申请人 基那奥生物公司

地址 美国纽约州

申请人 耶鲁大学

权利要求书4页 说明书72页

序列表74页 附图53页

(72) 发明人 E·奎加诺 P·格莱泽 B·特纳

(54) 发明名称

用于将核酸递送到细胞的组合物和方法

(57) 摘要

提供了用于将核酸货物递送到细胞中的组合物和其使用方法。所述组合物通常包含：(a) 3E10单克隆抗体或其抗原结合、细胞穿透片段；单价、二价或多价单链可变片段(scFv)；或双功能抗体；或其人源化形式或变体；以及(b)核酸货物，所述核酸货物包含例如编码多肽的核酸、功能性核酸、编码功能性核酸的核酸或其组合。元件(a)和(b)通常非共价连接以形成复合物。

1. 一种组合物,其包括(a) 3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与(b) 治疗性多核苷酸的非共价复合物,其中所述组合物包括的(i) 3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与(ii) 治疗性多核苷酸的摩尔比为至少2:1。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包括的(i) 3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与(ii) 治疗性多核苷酸的摩尔比为至少5:1。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包括的(i) 3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与(ii) 治疗性多核苷酸的摩尔比为至少20:1。

4. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包括的(i) 3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与(ii) 治疗性多核苷酸的摩尔比为至少50:1。

5. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包括的(i) 3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与(ii) 治疗性多核苷酸的摩尔比为至少100:1。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的组合物,其中所述组合物包括的(i) 3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与(ii) 治疗性多核苷酸的摩尔比不超过200:1。

7. 根据权利要求1至5中任一项所述的组合物,其中所述组合物包括的(i) 3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与(ii) 治疗性多核苷酸的摩尔比不超过100:1。

8. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包括的(i) 3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与(ii) 治疗性多核苷酸的摩尔比为2:1至200:1。

9. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包括的(i) 3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与(ii) 治疗性多核苷酸的摩尔比为5:1至200:1。

10. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包括的(i) 3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与(ii) 治疗性多核苷酸的摩尔比为2:1至50:1,其中所述治疗性多核苷酸的长度不超过2000个核苷酸。

11. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包括的(i) 3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与(ii) 治疗性多核苷酸的摩尔比为2:1至30:1,其中所述治疗性多核苷酸的长度不超过1000个核苷酸。

12. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包括的(i) 3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与(ii) 治疗性多核苷酸的摩尔比为20:1至200:1,其中所述治疗性多核苷酸的长度为至少2000个核苷酸。

13. 一种组合物,其包括以下或由以下组成:

(a) 3E10单克隆抗体、其细胞穿透片段;单价、二价或多价单链可变片段(scFv);或双功能抗体;或其人源化形式或变体;以及

(b) 核酸货物,所述核酸货物包括编码多肽的核酸、功能性核酸、编码功能性核酸的核酸或其组合。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的组合物,其中(a) 包括:

(i) SEQ ID NO:1-6、12、13、46-48或50-52中的任一者的CDR与SEQ ID NO:7-11、14或53-58中的任一者的CDR的组合;

(ii) 选自SEQ ID NO:15-23、42或43中的任一者的第一重链CDR、第二重链CDR和第三重链CDR与选自SEQ ID NO:24-30、44或45中的任一者的第一轻链CDR、第二轻链CDR和第三轻链CDR的组合;

(iii) (i) 或 (ii) 的人源化形式;

(iv) 包括与SEQ ID NO:1或2中的任一者包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的重链与包括与SEQ ID NO:7或8包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的轻链的组合;

(v) 人源化形式或 (iv); 或

(vi) 包括与SEQ ID NO:3-6、46-48或50-52中的任一者包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的重链与包括与SEQ ID NO:9-11或53-58包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的轻链的组合。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的组合物, 其中 (a) 包括与由ATCC登录号PTA2439杂交瘤产生的单克隆抗体3E10相同或不同的表位特异性。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的组合物, 其中 (a) 是具有单克隆抗体3E10的互补位的重组抗体。

17. 一种组合物, 其包括:

(a) 结合蛋白, 所述结合蛋白包括:

(i) SEQ ID NO:1-6、12、13、46-48或50-52中的任一者的CDR与SEQ ID NO:7-11、14或53-58中的任一者的CDR的组合;

(ii) 选自SEQ ID NO:15-23、42或43的第一重链CDR、第二重链CDR和第三重链CDR与选自SEQ ID NO:24-30、44或45的第一轻链CDR、第二轻链CDR和第三轻链CDR的组合;

(iii) (i) 或 (ii) 的人源化形式;

(iv) 包括与SEQ ID NO:1或2中的任一者包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的重链与包括与SEQ ID NO:7或8包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的轻链的组合;

(v) 人源化形式或 (iv); 或

(vi) 包括与SEQ ID NO:3-6、46-48或50-52中的任一者包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的重链与包括与SEQ ID NO:9-11或53-58包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的轻链的组合; 以及

(b) 核酸货物, 所述核酸货物包括编码多肽的核酸、功能性核酸、编码功能性核酸的核酸或其组合。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的组合物, 其中 (a) 是双特异性的。

19. 根据权利要求18所述的组合物, 其中 (a) 靶向所关注的细胞类型。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的组合物, 其中 (a) 和 (b) 是非共价连接的。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的组合物, 其中 (a) 和 (b) 处于复合物中。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的组合物, 其中 (b) 包括DNA、RNA、PNA或其它经修饰的核酸、或核酸类似物或其组合。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的组合物, 其中 (b) 包括mRNA。

24. 根据权利要求1至23中任一项所述的组合物, 其中 (b) 包括载体。

25. 根据权利要求24所述的组合物, 其中所述载体包括编码与表达控制序列可操作地连接的所关注的多肽的核酸序列。

26. 根据权利要求25所述的组合物, 其中所述载体是质粒。

27. 根据权利要求1至26中任一项所述的组合物, 其中 (b) 包括编码Cas核酸内切酶、gRNA或其组合的核酸。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的组合物,其中(b)包括编码嵌合抗原受体多肽的核酸。

29. 根据权利要求1至28中任一项所述的组合物,其中(b)包括功能性核酸。

30. 根据权利要求1至29中任一项所述的组合物,其中(b)包括编码功能性核酸的核酸。

31. 根据权利要求29或30所述的组合物,其中所述功能性核酸是反义分子、siRNA、miRNA、适体、核酶、RNAi或外部向导序列。

32. 根据权利要求1至31中任一项所述的组合物,其中(b)包括多个单一核酸分子。

33. 根据权利要求1至31中任一项所述的组合物,其中(b)包括多个2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个不同的核酸分子。

34. 根据权利要求1至33中任一项所述的组合物,其中(b)包括长度介于约1与25,000个核碱基之间的核酸分子或由其组成。

35. 根据权利要求1至34中任一项所述的组合物,其中(b)包括单链核酸、双链核酸或其组合或由其组成。

36. 根据权利要求1至35中任一项所述的组合物,其进一步包括载体DNA。

37. 根据权利要求36所述的组合物,其中所述载体DNA是非编码DNA。

38. 根据权利要求36或37所述的组合物,其中(b)由RNA构成。

39. 一种药物组合物,其包括根据权利要求1至26中任一项所述的组合物以及药学上可接受的赋形剂。

40. 根据权利要求39所述的组合物,其进一步包括包封(a)和(b)的复合物的聚合纳米颗粒。

41. 根据权利要求40所述的组合物,其中靶向部分、细胞穿透肽或其组合与所述纳米颗粒缔合、连接、缀合或以其它方式直接或间接附接。

42. 一种将核酸货物递送到细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与有效量的根据权利要求1至29中任一项所述的组合物接触。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中所述接触离体发生。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述细胞是造血干细胞或T细胞。

45. 根据权利要求42至44中任一项所述的方法,其进一步包括向有需要的受试者施用所述细胞。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中以有效量向所述受试者施用所述细胞以治疗疾病或病症的一种或多种症状。

47. 根据权利要求42所述的方法,其中在向有需要的受试者施用之后,所述接触在体内发生。

48. 根据权利要求45至47中任一项所述的方法,其中所述受试者患有疾病或病症。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述疾病或病症是遗传病症、癌症或感染或感染性疾病。

50. 根据权利要求48或49所述的方法,其中(b)以有效量递送到所述受试者的细胞中,以减少所述受试者的所述疾病或病症的一种或多种症状。

51. 一种制备根据权利要求1至41中任一项所述的组合物的方法,所述方法包括在与细胞接触之前,将(a)和(b)在合适的温度下一起温育和/或混合持续有效时间量以形成(a)和

(b)的复合物。

52.一种制备根据权利要求1至41中任一项所述的组合物的方法,所述方法包括任选地在室温下或37摄氏度下将(a)和(b)一起温育和/或混合持续约1分钟至约30分钟、约10分钟至约20分钟或约15分钟。

53.根据权利要求1至52中任一项所述的组合物或方法,其中3E10单克隆抗体、其细胞穿透片段;单价、二价或多价单链可变片段(scFv);或双功能抗体;或其人源化形式或变体包括SEQ ID NO:92或93的核酸结合袋,或其具有相同或改善的与核酸结合的能力的变体。

54.根据权利要求1至53中任一项所述的组合物或方法,其中与重链氨基酸序列或其CDR的D31或N31对应的氨基酸残基被R取代。

55.根据权利要求1至54中任一项所述的组合物或方法,其中与重链氨基酸序列或其CDR的D31或N31对应的氨基酸残基被L取代。

56.一种结合蛋白,其包括:

(i) SEQ ID NO:1-6、12、13、46-48或50-52中的任一者的CDR与SEQ ID NO:7-11、14或53-58中的任一者的CDR的组合的变体;

(ii) 第一重链CDR与选自SEQ ID NO:15-23、42或43的第二重链CDR和第三重链CDR的组合与选自SEQ ID NO:24-30、44或45的第一轻链CDR、第二轻链CDR和第三轻链CDR的组合的变体;

(iii) (i)或(ii)的人源化形式;

(iv) 包括与SEQ ID NO:1或2中的任一者包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的重链与包括与SEQ ID NO:7或8包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的轻链的组合;

(v) 人源化形式或(iv);或

(vi) 包括与SEQ ID NO:3-6、46-48或50-52中的任一者包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的重链与包括与SEQ ID NO:9-11或53-58包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的轻链的组合,

其中与D31或N31对应的氨基酸残基被R或L取代。

57.根据权利要求56所述的结合蛋白,其包括SEQ ID NO:92或93的核酸结合袋,或其具有相同或改善的与核酸结合的能力的变体。

## 用于将核酸递送到细胞的组合物和方法

[0001] 相关申请交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年12月4日提交的美国临时专利申请第63/121,782号以及于2021年3月3日提交的美国临时专利申请第63/156,070号的优先权,所述美国临时专利申请的内容出于所有目的通过引用整体并入本文。关于联邦政府资助的研究的声明

[0003] 本发明是根据国立卫生研究院授予的CA197574在政府支持下完成的。政府享有本发明中的某些权利。

[0004] 序列表的引用

[0005] 创建于2021年12月5日并且大小为154,915字节的以命名为“127689-5004-W003\_ST.25”的文本文件提交的序列表根据37C.F.R. §1.52(e) (5) 通过引用特此并入。

### 背景技术

[0006] 基因疗法包含从基因置换和遗传疾病或后天性疾病如癌症的敲低到疫苗接种的一系列应用。病毒载体和合成脂质体已成为当今许多应用的首选媒介,但两者均具有包含生产的复杂性、有限的包装能力和不利的免疫学特征的局限性和风险,这限制了基因疗法应用,并且抑制了预防性基因疗法的潜力 (Seow和Wood,《分子疗法 (Mol Ther.)》17 (5) : 767-777 (2009))。

[0007] 已经观察到细胞和组织中的多核苷酸的体内摄取和分布 (Huang等人,《FEBS快报 (FEBS Lett.)》,558 (1-3) : 69-73 (2004))。此外,尽管例如,Nyce等人已示出,吸入时反义寡脱氧核苷酸 (ODN) 与内源性表面活性剂 (由肺细胞产生的脂质) 结合,并且被肺细胞摄取,而无需另外的载体脂质 (Nyce等人,《自然 (Nature)》,385:721-725 (1997)), 将小核酸摄取到T24膀胱癌组织培养细胞中 (Ma等人,《反义核酸药物开发 (Antisense Nucleic Acid Drug Dev.)》,8:415-426 (1998)), 仍然需要改进的核酸转染技术,尤其用于体内应用。AAV9,仍然是在2003年发现的人们通常使用的病毒载体 (Robbins,“基因疗法先锋说该领域落后——并且递送技术令人尴尬 (Gene therapy pioneer says the field is behind-and that delivery technology is embarrassing),”《统计 (Stat)》,2019年11月)。

[0008] 因此,本公开的目的是提供用于改善将核酸递送到细胞中的组合物和其使用方法。

### 发明内容

[0009] 提供了用于将核酸货物递送到细胞中的组合物和其使用方法。所述组合物通常包含: (a) 3E10单克隆抗体或其细胞穿透片段;单价、二价或多价单链可变片段 (scFv);或双功能抗体;或其人源化形式或变体;以及 (b) 核酸货物,所述核酸货物包含例如编码多肽的核酸、功能性核酸、编码功能性核酸的核酸或其组合。元件 (a) 和 (b) 通常非共价缔合以形成复合物。各个实施例中的核酸包括DNA (单链或双链)、RNA、寡核苷酸、PNA和其它核酸。

[0010] 示例性3E10抗体及其片段和融合蛋白包含具有以下的那些: (i) SEQ ID NO:1-6、12、13、46-48或50-52中的任一者的CDR与SEQ ID NO:7-11、14或53-58中的任一者的CDR的

组合；(ii)选自SEQ ID NO:15-23、42或43的第一重链CDR、第二重链CDR和第三重链CDR与选自SEQ ID NO:24-30、44或45的第一轻链CDR、第二轻链CDR和第三轻链CDR的组合；(iii) (i)或(ii)的人源化形式；(iv)包括与SEQ ID NO:1或2中的任一者包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的重链与包括与SEQ ID NO:7或8包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的轻链的组合；(v)人源化形式或(iv)；或(vi)包括与SEQ ID NO:3-6、46-48或50-52中的任一者包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的重链与包括与SEQ ID NO:9-11或53-58包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的轻链的组合。

[0011] 在一些实施例中，抗体及其片段和融合蛋白是具有与3E10重链氨基酸序列的D31或N31对应的氨基酸残基的CDR1重链变体或其被精氨酸(R)或赖氨酸(K)取代的CDR。

[0012] 在一些实施例中，抗体及其片段和融合蛋白包含SEQ ID NO:92或93的核酸结合袋，或其具有相同或改善的与核酸，如DNA、RNA或其组合结合的能力的变体。

[0013] 还提供了包含具有与3E10重链氨基酸序列的D31或N31对应的氨基酸残基的CDR1重链变体或其被精氨酸(R)或赖氨酸(K)取代的CDR1的3E10结合蛋白本身，以及具有SEQ ID NO:92或93的核酸结合袋，或其具有相同或改善的与核酸，如DNA、RNA或其组合结合的能力的变体的结合蛋白本身。

[0014] 在一些实施例中，抗体或片段或融合蛋白可以是双特异性的，并且可以例如包含靶向细胞类型、组织或所关注的器官的结合序列。

[0015] 核酸货物可以由DNA、RNA、经修饰的核酸构成，包含但不限于PNA或其组合。核酸货物通常是功能性货物，如功能性核酸(例如，抑制性RNA，如siRNA)、mRNA、反义寡核苷酸、miRNA或载体，例如表达载体。包含载体的核酸货物可以包含编码与表达控制序列可操作地连接的所关注的多肽的核酸序列，如启动子。载体可以是例如质粒。通常，货物不是例如随机剪切的或片段化的基因组DNA。

[0016] 在一些实施例中，货物包含编码Cas核酸内切酶、gRNA或其组合的核酸或由其组成。在一些实施例中，货物包含编码嵌合抗原受体多肽的核酸或T细胞受体或由其组成。在一些实施例中，货物是功能性核酸，如反义分子、siRNA、微RNA(miRNA)、适体、核酶、RNAi或外部向导序列，或编码其的核酸构建体。

[0017] 货物可以包含多个单核苷酸分子或多个2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个不同核酸分子或由其组成。在一些实施例中，货物的核酸分子包含长度介于约1与约25,000个核碱基之间的核酸分子或由其组成。货物可以是单链核酸、双链核酸或其组合。

[0018] 还提供了包含复合物和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施例中，复合物被包封在聚合纳米颗粒中。靶向部分、细胞穿透肽或其组合可以与所述纳米颗粒缔合、连接、缀合或以其它方式直接或间接附接。在一些实施例中，复合物不包封在脂质纳米颗粒中，并且使得包封技术不必要。

[0019] 还提供了通过使细胞与有效量的单独的复合物接触或将所述细胞包封在纳米颗粒中而将核酸货物递送到细胞中的方法。所述接触可以在体外、离体或体内发生。在一些实施例中，向有需要的受试者施用有效量的经离体处理的细胞，例如以有效量用于治疗疾病或病症的一种或多种症状。

[0020] 在一些实施例中，在向有需要的受试者施用之后，所述接触在体内发生。受试者可

以患有疾病或病症,如遗传病症或癌症。可以向受试者例如通过注射或输注施用有效量的组合物,以减少受试者的所述疾病或病症的一种或多种症状。

[0021] 还提供了组合物和方法的应用,并且包含但不限于基因疗法和T细胞或CAR T细胞制造/形成/疗法。

### 附图说明

[0022] 图1A-1C是示出对照(1A)和PNA在单独(1B)和与3E10混合持续1小时(1C)时的摄取的散点图。图1D是定量图1A-1C中的数据的柱状图。

[0023] 图2A-2C是示出对照(2A)和PNA在单独(2B)和与3E10混合持续24小时(2C)时的摄取的散点图。图2D是定量图2A-2C中的数据的柱状图。

[0024] 图3A-3C是示出对照(3A)和siRNA在单独(3B)和与3E10混合持续24小时(3C)时的摄取的散点图。图3D是定量图3A-3C中的数据的柱状图。

[0025] 图4A-4H是示出对照(4A)和mRNA在单独(4B)和在不同浓度下与3E10混合持续24小时(4C-4H)时的摄取的散点图。图4I是定量图4A-4H中的数据的柱状图。

[0026] 图5A-5H是示出对照(5A)和mRNA在单独(5B)和在不同浓度下与3E10混合持续1小时(5C-5H)时的摄取的散点图。图5I是定量图5A-5H中的数据的柱状图。

[0027] 图6是示出在与3E10混合72小时后和与细胞一起温育24小时后GFP报告质粒DNA的细胞表达的一系列图像。

[0028] 图7A是示出在小鼠全身注射之前在室温下与增加剂量的3E10(0.25,0.5和1mg)混合持续15分钟的经荧光标记的siRNA在肿瘤中累积的柱状图。图7B是示出在小鼠全身注射之前在室温下与1mg 3E10或0.1mg D31N变体3E10混合持续15分钟的荧光标记的siRNA在肿瘤中累积的柱状图。在注射后24小时分析所有肿瘤。

[0029] 图8是示出随着时间的推移(IM注射后数天)将3E10介导的mRNA(生物发光体(光子/秒))递送到小鼠肌肉(IM)的线图。

[0030] 图9A和9B是示出在注射后24小时由IVIS(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))成像的将3E10-D31N IV注射到肌肉的对照(图9A)和分布(图9B)的图像。图9C是定量IVIS图像中的荧光的柱状图。

[0031] 图10是将100 $\mu$ g或200 $\mu$ g标记为VivoTag680的3E10-D31N静脉内注射到小鼠(珀金埃尔默公司)体内后24小时,定量3E10-D31N对组织的剂量依赖性生物分布的IVIS图像中的荧光的柱状图。

[0032] 图11A和11B是示出在注射后24小时由IVIS(珀金埃尔默公司)成像的将3E10-D31N IV注射到同基因结肠肿瘤(CT26)(图11B)的对照(图11A)和分布的图像。图11C是定量IVIS图像中的荧光的柱状图。

[0033] 图12A、12B和12C是示出在注射后24小时由IVIS(珀金埃尔默公司)成像的IV注射裸单链DNA(ssDNA)(图12B)和3E10-D31N+ssDNA(图12C)同基因结肠肿瘤(CT26)的对照(图12A)和分布的图像。图12D是定量IVIS图像中的荧光的柱状图。

[0034] 图13是示出3E10介导的RIG-I的递送和刺激的柱状图。

[0035] 图14A是3E10、其推定核酸结合袋(NAB1)以及其中的氨基酸突变诱导的预测结构变化的分子建模的图解。图14B是3E10-scFv(Pymol)的分子建模的图解,其中NAB1氨基酸残

基由点状圆点突出显示。图14C示出了3E10的推定核酸结合袋的氨基酸序列图谱。

[0036] 图15A和15B是示出如通过ELISA测量的3E10与单链(15A)和双链DNA(15B)的结合的条形图。

[0037] 图16是示出3E10-D31N与含有单核苷酸重复序列的DNA序列的结合的条形图。

[0038] 图17A-17D是示出3E10变体与含有单核苷酸重复序列(腺嘌呤(17A)、胸腺嘧啶(17B)、鸟嘌呤(17C)或胞嘧啶(17D))的DNA序列的结合的条形图。

[0039] 图18A和18B是示出3E10-WT(18A)和3E10-D31N(18B)与RNA(聚腺嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤或肌苷核苷酸)的结合的条形图。

[0040] 图19A、19B和19C示出了如实例9所描述的使用在3E10与720核苷酸mRNA分子之间形成的复合物进行的mRNA保护测定的凝胶电泳。

[0041] 图20A和20B是示出野生型(20A)或D31N 3E10(20B)+Poly(I:C)在黑色素瘤细胞活力中的影响的柱状图。

[0042] 图21示出了如实例20所描述的使用以1:1、2:1、5:1、10:1和100:1(3E10:mRNA)摩尔比制备的3E10与14kb mRNA分子之间形成的复合物进行的mRNA保护测定的凝胶电泳分析。

## 具体实施方式

[0043] 定义。

[0044] 如本文所使用的,术语“单链Fv”或“scFv”意指单链可变片段,所述单链可变片段包含由接头连接的单个多肽链中的轻链可变区(VL)和重链可变区(VH),所述接头使scFv能够形成抗原结合的所期望的结构(即,单个多肽链的VH和VL相互缔合以形成Fv)。

[0045] 如本文所使用的,术语“可变区”旨在区分免疫球蛋白的此类结构域与抗体广泛共享的结构域(如抗体Fc结构域)。可变区包含“高变区”,所述高变区的残基对抗原结合负责。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(即,通常在大约轻链可变结构域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)处以及在大约重链可变结构域中的残基27-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)处;Kabat等人,《具有免疫学意义的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,第5版,马里兰州贝塞斯达国立卫生研究院的公共卫生署(Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.) (1991))和/或来自“高变环”的那些残基(即,轻链可变结构域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)以及重链可变结构域中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3); Chothia和Lesk,1987,《分子生物学杂志(J. Mol Biol.)》196:901-917)。

[0046] 如本文所使用的,如本文中所定义的,术语“框架区”或“FR”残基是除了高变区残基以外的那些可变结构域残基。

[0047] 如本文所使用的,术语“抗体”是指结合靶抗原的天然或合成抗体。所述术语包含多克隆抗体和单克隆抗体。除了完整的免疫球蛋白分子之外,术语“抗体”中还包含那些免疫球蛋白分子的结合蛋白、片段和聚合物以及结合靶抗原的人或人源化免疫球蛋白分子版本。

[0048] 如本文所使用的,术语“细胞穿透抗体”是指被转运到活的哺乳动物细胞的细胞质和/或细胞核中的免疫球蛋白、其片段、变体或基于其的融合蛋白。在一些实施例中,抗体在

不借助于载体或缀合物的情况下被转运到细胞的细胞质中。在一些实施例中,细胞穿透抗体在使用或不使用载体或缀合物的情况下转运在细胞核中。

[0049] 如本文所使用的,术语“变体”是指不同于参考多肽或多核苷酸但保留了基本性质的多肽或多核苷酸。多肽的典型变体在氨基酸序列上不同于另一种参考多肽。通常,差异是有限的,使得参考多肽和变体的序列总体上非常类似并且在许多区完全相同。变体和参考多肽在氨基酸序列上的不同之处可以在于一个或多个修饰(例如,取代、添加和/或缺失)。经取代的或插入的氨基酸残基可以是或者可能不是由遗传密码编码的残基。多肽的变体可以是天然存在的,如等位基因变体,或者可以是已知并非天然地存在的变体。

[0050] 在进行氨基酸修饰时,可以考虑氨基酸的亲水指数。本领域中通常理解亲水氨基酸指数在向多肽赋予相互作用生物官能方面的重要性。根据其疏水性和电荷特性,已经为每个氨基酸指定了亲水指数。这些指数是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);蛋氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。

[0051] 据信,氨基酸的相对亲水特性确定了所得多肽的二级结构,这进而限定了多肽与其它分子。在此类改变中,优选亲水指数在 $\pm 2$ 以内的氨基酸的取代,特别优选亲水指数在 $\pm 1$ 以内的氨基酸的取代,并且甚至更加特别优选亲水指数在 $\pm 0.5$ 以内的氨基酸的取代。

[0052] 也可以在亲水性的基础上进行相似氨基酸的取代,特别是在由此产生的生物学功能等效多肽或肽旨在用于免疫学实施例的情况下。已经为氨基酸残基指定了以下亲水性值:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0 $\pm 1$ );谷氨酸(+3.0 $\pm 1$ );丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);脯氨酸(-0.5 $\pm 1$ );苏氨酸(-0.4);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。在此类改变时,优选亲水性值在 $\pm 2$ 以内的氨基酸的取代,特别优选亲水性值在 $\pm 1$ 以内的氨基酸的取代,并且更特别优选亲水性值在 $\pm 0.5$ 以内的氨基酸的取代。

[0053] 如上文所概述的,氨基酸取代通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如其疏水性、亲水性、电荷、大小等。考虑到各种前述特征的示例性取代是本领域技术人员众所周知的并且包含(原始残基:示例性取代):(Ala:Gly,Ser),(Arg:Lys),(Asn:Gln,His),(Asp:Glu,Cys,Ser),(Gln:Asn),(Glu:Asp),(Gly:Ala),(His:Asn,Gln),(Ile:Leu,Val),(Leu:Ile,Val),(Lys:Arg),(Met:Leu,Tyr),(Ser:Thr),(Thr:Ser),(Tyr:Trp,Phe),以及(Val:Ile,Leu)。因此,本公开的实施例考虑了如上所示的多肽的功能或生物学等效物。具体地,多肽的实施例可以包含与所关注的多肽具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的变体。

[0054] 如本文所使用的,术语“序列同一性百分比(%)”被定义为在必要时比对序列并引入空位以获得最大序列同一性百分比之后,候选序列中与参考核酸序列中的核苷酸或氨基酸相同的核苷酸或氨基酸的百分比。可以用本领域技术内的多种方式来实现出于测定序列同一性百分比的目的进行的比对,例如使用可公开获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign(DNASTAR)软件。用于测量比对的适当参数(包含在被比较的序

列的全长内实现最大比对所需的任何算法)可以通过已知方法确定。

[0055] 如本文所使用的,术语“特异性地结合”是指抗体与其同源抗原(例如,DNA或RNA)结合,而未与其它抗原显著结合。在此类条件下抗体与靶标的特异性结合需要针对其对靶标的特异性来选择抗体。可以使用多种免疫测定格式来选择与特定抗原发生特异性免疫反应的抗体。例如,常规使用固相ELISA免疫测定来选择与抗原发生特异性免疫反应的单克隆抗体。参见例如Harlow和Lane(1988)《抗体实验室手册(Antibodies, A Laboratory Manual)》,纽约的冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Publications, New York),了解可以用于测定特异性免疫反应性的免疫测定格式和条件的描述。优选地,抗体“特异性地结合”具有与第二分子的亲和力常数( $K_a$ )大于约 $10^5 \text{mol}^{-1}$ (例如, $10^6 \text{mol}^{-1}$ 、 $10^7 \text{mol}^{-1}$ 、 $10^8 \text{mol}^{-1}$ 、 $10^9 \text{mol}^{-1}$ 、 $10^{10} \text{mol}^{-1}$ 、 $10^{11} \text{mol}^{-1}$ 和 $10^{12} \text{mol}^{-1}$ 或更高)的抗原。

[0056] 如本文所使用的,术语“单克隆抗体”或“MAb”是指从基本上均质的抗体群体获得的抗体,即,除了抗体分子的小子集中可能存在的可能天然存在的突变外,群体内的各个抗体完全相同。

[0057] 如本文所使用的,术语“受试者”意指作为施用靶标的任何个体。受试者可以是脊椎动物,例如哺乳动物。因此,受试者可以是人。所述术语不指示特定的年龄或性别。

[0058] 如本文所使用的,术语“有效量”意指所使用的组合物的量是足以改善疾病或病症的一种或多种原因或症状的量。此类改善仅需要减少或改变,并不一定需要消除。精确剂量可以根据多种因素而变化,所述因素如受试者依赖性变量(例如,年龄、免疫系统健康状况等)、所治疗疾病或病症以及施用途径和所施用药剂的药代动力学。

[0059] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的”是指不是生物学上或在其它方面不期望的材料,即,所述材料可以向受试者施用,而不会引起大量不期望的生物学效应或以任何有害的方式与含有所述材料的药物组合物中的其它组分相互作用。

[0060] 如本文所使用的,术语“载体”或“赋形剂”是指调配物中的有机或无机成分、天然或合成的非活性成分,其中一种或多种活性成分与其组合。如本领域技术人员众所周知的,载体或赋形剂将被自然地选择来最小化活性成分的任何降解并且最小化受试者中的任何不良副作用。

[0061] 如本文所使用的,术语“治疗”是指患者的医疗管理,其中有意治愈、改善、稳定或预防疾病、病理学病状或病症。此术语包含积极治疗,即特别针对疾病、病理学病状或病症的改善的治疗,并且还包含病因治疗,即针对相关疾病、病理学病状或病症的病因的去除的治疗。另外,此术语包含姑息性治疗,即设计用于缓解症状而非治愈疾病、病理学病状或病症的治疗;预防性治疗,即旨在最小化或部分或完全抑制相关疾病、病理学病状或病症的发展的治疗;以及支持性治疗,即用于补充针对相关疾病、病理学病状或病症的改善的另一种特异性疗法的治疗。

[0062] 如本文所使用的,“靶向部分”是可以将颗粒、分子或复合物引导至所选细胞或组织类型上的受体位点的物质。如本文所使用的,“直接”是指使分子或复合物优先与所选细胞或组织类型衔接。如下文所讨论的,这可以用于引导复合物。

[0063] 如本文所使用的,术语“抑制”或“降低”意指减小活性、应答、病状、疾病或其它生物参数。这可以包含但不限于活性、应答、病状或疾病的完全消融。这还可以包含例如与天然或对照水平相比,活性、应答、病状或疾病统计上显著减少。

[0064] 如本文所使用的,“融合蛋白”是指通过将两个或更多个多肽通过在一个多肽的氨基末端与另一个多肽的羧基末端之间形成的肽键进行连接而形成的多肽。融合蛋白可以通过构成的多肽的化学偶联形成,或者可以从编码单个连续融合蛋白的核酸序列表达为单个多肽。单链融合蛋白是具有单个连续多肽主链的融合蛋白。可以使用分子生物学中的常规技术来制备融合蛋白,以将使用相同读框的这两个基因连接成单个核酸序列,并且然后在产生融合蛋白的条件下在适合的宿主细胞中表达核酸。

[0065] 除非本文中另外指明,否则对本文中值范围的叙述仅旨在充当单独地提及落入所述范围的每个单独值的速记方法,并且每个单独值并入本说明书中,如同在本文中单独地叙述一样。

[0066] 除非上下文另有要求,否则术语“约”的使用旨在描述在大约 $\pm 10\%$ 的范围内高于或低于所述值的值。

[0067] 除非另外指明或明显与上下文相矛盾,否则本文所描述的所有方法均可以按任何适合的顺序执行。除非另外要求,否则本文中提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“如”)的使用仅旨在更好地阐明实施例,而不构成对实施例的范围的限制。说明书中的任何语言都不应被解释为指示任何未要求保护的要素为实践本发明所必需的。

[0068] 组合物

[0069] 已发现3E10抗体帮助跨质膜递送核酸,并进入到细胞质和细胞核中。因此,提供了用于使用3E10来增强核酸构建体的递送的组合物和方法。通常使有效量的3E10抗体与核酸接触,所述核酸期望递送到细胞中。通常,接触发生足够的时间量,以使3E10和核酸货物形成复合物。使复合物与细胞接触足够的时间量,以便将核酸货物递送到细胞中。与在不存在抗体的情况下使细胞与核酸货物接触相比,货物可以以更大的数量、更大的质量(例如,更完整、功能性等)或更快的速率或其组合累积。因为抗体充当递送手段,所以递送系统通常是非病毒的。

[0070] A. 3E10抗体

[0071] 尽管在本文中通常被称为“3E10”或“3E10抗体”,但是应当理解,片段和结合蛋白(包含抗原结合片段、变体和融合蛋白,如scFv、二-scFv、三-scFv和其它单链可变片段)以及本文所公开的其它细胞穿透、核酸转运分子也被明确提供用于本文所公开的组合物和方法的短语所涵盖。因此,抗体和其它结合蛋白在本文中也被称为细胞穿透。

[0072] 在优选的实施例中,3E10抗体在不借助于载体或缀合物的情况下被转运到细胞的细胞质和/或细胞核中。例如,授予Richard Weisbart的美国专利第4,812,397号和第7,189,396号公开了在体内转运到哺乳动物细胞的细胞核而没有细胞毒性作用的单克隆抗体3E10和其活性片段。

[0073] 在一些实施例中,抗体可以结合和/或抑制Rad51。参见例如在Turchick等人,《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》,45(20):11782-11799(2017)、W02020/047344和W0 2020/047353中描述的抗体,所述文献中的每一个均通过引用整体并入本文。

[0074] 组合物和方法中可以使用的抗体包含任何类别的整个免疫球蛋白(即完整抗体)、其片段以及至少含有抗体的抗原结合可变结构域的合成蛋白质。抗原结合活性通常集中在轻链可变结构域和重链可变结构域两者中的被称为互补决定区(CDR)或高变区的三个区段中。可变结构域的更高保守性部分称为框架(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包括:

主要采用通过三个CDR连接的 $\beta$ -片层构型的四个FR区,所述三个CDR形成连接 $\beta$ -片层结构的环并且在一些情况下形成 $\beta$ -片层结构的一部分。每条链中的CDR通过FR区紧密保持在一起并与来自另一条链的CDR一起促进抗体的抗原结合位点的形成。因此,抗体通常至少含有维持核酸结合所必需的CDR。

[0075] 3E10抗体通常是单克隆3E10,或其结合与3E10相同或不同的表位的变体、衍生物、片段、融合物或人源化形式。

[0076] 根据布达佩斯条约的条款,于2000年9月6日接收了产生单克隆抗体3E10的杂交瘤细胞系的寄存,并且被美国维吉尼亚州马纳萨斯市20110-2209大学大道10801号的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA)接受,并且给出的专利保藏号为PTA-2439。

[0077] 因此,抗体可以具有与由ATCC号PTA2439杂交瘤产生的单克隆抗体3E10相同或不同的表位特异性。抗体可以具有单克隆抗体3E10的互补位。抗体可以是3E10的单链可变片段或变体,例如其保守性变体。例如,抗体可以是3E10的单链可变片段(3E10 Fv)或其变体。

[0078] 1. 3E10序列

[0079] 单克隆抗体3E10的氨基酸序列是本领域已知的。例如,下文提供了3E10重链和轻链的序列,其中单下划线表示根据Kabat系统鉴定的CDR区,而在SEQ ID NO:12-14中,斜体表示可变区并且双下划线表示信号肽。还提供了根据IMGT系统的CDR。

[0080] a. 3E10重链

[0081] 在一些实施例中,3E10的重链可变区为:

EVQLVESGGGLV<sup>K</sup>PGGSRKLS<sup>CAASGFTFSD</sup>YGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSG

[0082] SSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARRGLLLLDYWGQ

GTTLTVSS (SEQ ID NO:1; Zack等人,《免疫与细胞生物学 (Immunology and Cell Biology)》,72:513-520 (1994); GenBank:L16981.1-小鼠Ig重排L链基因,部分cds;以及GenBank:AAA65679.1-免疫球蛋白重链,部分[小家鼠])。

[0083] 在一些实施例中,3E10重链表达为

MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLV<sup>K</sup>PGGSRKLS<sup>CAASGFTFSD</sup>Y

GMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQ

MTSLRSEDTAMYYCARRGLLLLDYWGQTTLTVSAASTKGPSVFPLAPSS

KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<sup>GVHTFPAVLQSSGLYSLS</sup>

[0084] SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE

LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE

VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI

EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES

NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL

HNHYTQKSLSLSPGK (3E10WT重链; SEQ ID NO:12)。

[0085] 将突变并入到野生型序列中的3E10抗体的变体在本领域中也是已知的,如例如在Zack等人,《免疫学杂志 (J. Immunol.)》,157 (5) :2082-8 (1996)中所公开的。例如,已测定

3E10的重链可变区的氨基酸位置31对抗体和其片段穿透核并与DNA结合的能力有影响(在SEQ ID NO:1、2和13中以粗体表示)。CDR1中的D31N突变(在SEQ ID NO:2和13中以粗体表示)穿透细胞核并结合DNA,其效率比原始抗体高得多(Zack等人,《免疫学和细胞生物学(Immunology and Cell Biology)》,72:513-520(1994),Weisbart等人,《自体免疫力杂志(J.Autoimmun.)》,11,539-546(1998);Weisbart,《国际肿瘤学杂志(Int.J.Oncol.)》,25,1867-1873(2004))。在一些实施例中,抗体具有D31N取代。

[0086] 在一些实施例中,3E10的重链可变区的优选变体的氨基酸序列是:

[0087] EVQLVESGGGLVKPGGSRKLSCAASGFTFS**NYGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSG**  
SSTIYYADTVKGRFTISRDNANTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARRGLLLLDYWGQ  
GTTTLTVSS (SEQ ID NO:2)。

[0088] 在一些实施例中,3E10重链表达为

[0089] MGWSCIIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVKPGGSRKLSCAASGFTFS**NY**  
GMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNANTLFLQ  
MTSLRSEDTAMYYCARRGLLLDYWGQGTTTLTVSAASTKGPSVFPLAPSS  
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLS  
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE  
[0090] LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES  
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEAL  
HNHYTQKSLSLSPGK (3E10D31N变体重链;SEQ ID NO:13)。

[0091] 在一些实施例中,在3E10重链可变区中,SEQ ID NO:1或2的C端丝氨酸不存在或被例如丙氨酸取代。

[0092] 由Kabat鉴定的互补决定区(CDR)上方用下划线示出,并且包含CDR H1.1(原始序列):DYGMH(SEQ ID NO:15);CDR H1.2(具有D31N突变):NYGMH(SEQ ID NO:16);CDR H2.1:YISSGSSTIYYADTVKG(SEQ ID NO:17);CDR H3.1:RGLLLDY(SEQ ID NO:18)。

[0093] Kabat CDR H2.1的变体包含YISSGSSTIYYADSVKG(SEQ ID NO:19)和YISSSSSTIYYADSVKG(SEQ ID NO:42)。

[0094] 另外地或可替代地,可以根据IMGT系统定义重链互补决定区(CDR)。由IMGT系统鉴定的互补决定区(CDR)包含CDR H1.3(原始序列):GFTFSDYG(SEQ ID NO:20);CDR H1.4(具有D31N突变):GFTFSNYG(SEQ ID NO:21);CDR H2.2:ISSGSSTI(SEQ ID NO:22)和变体ISSSSSTI(SEQ ID NO:43);CDR H3.2:ARRGLLLDY(SEQ ID NO:23)。

[0095] b. 3E10轻链

[0096] 在一些实施例中,3E10的轻链可变区为:

[0097] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESGVPARFSG  
SGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPWFGGGKLEIK(SEQ ID NO:7)。

[0098] 3E10的轻链可变区的氨基酸序列也可以是:

[0099] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESGVPARFSGSGSGTDFHLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLELK (SEQ ID NO:8)。

[0100] 在一些实施例中,3E10轻链表达为

[0101] MGWSCIILFLVATATGVHSDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSSY  
SYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESGVPARFSGSGSGTDFHLNIHPVEE  
EDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS  
VVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLT  
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (3E10WT轻链;SEQ  
ID NO:14)

[0102] 其它3E10轻链序列是本领域已知的。参见例如,Zack等人,《免疫学杂志》,15;154 (4):1987-94 (1995);GenBank:L16981.1-小鼠Ig重排L链基因,部分cds;GenBank:AAA65681.1-免疫球蛋白轻链,部分[小家鼠]。

[0103] 如由Kabat鉴定的互补决定区(CDR)用下划线示出,包含CDR L1.1:RASKSVSTSSYSYMH (SEQ ID NO:24);CDR L2.1:YASYLES (SEQ ID NO:25);CDR L3.1:QHSREFPWT (SEQ ID NO:26)。

[0104] Kabat CDR L1.1的变体包含RASKSVSTSSYSYLA (SEQ ID NO:27)和RASKTVSTSSYSYMH (SEQ ID NO:44)。

[0105] Kabat CDR L2.1的变体是YASYLQS (SEQ ID NO:28)。

[0106] 另外地或可替代地,可以根据IMGT系统定义重链互补决定区(CDR)。由IMGT系统鉴定的互补决定区(CDR)包含CDR L1.2 KSVSTSSYSY (SEQ ID NO:29)和变体KTVSTSSYSY (SEQ ID NO:45);CDR L2.2:YAS (SEQ ID NO:30);CDR L3.2:QHSREFPWT (SEQ ID NO:26)。

[0107] 在一些实施例中,SEQ ID NO:7或8的序列的C端进一步包含3E10轻链可变区中的精氨酸。

[0108] 2.人源化3E10

[0109] 在一些实施例中,抗体是人源化抗体。用于人源化非人抗体的方法是本领域众所周知的。通常,人源化抗体具有从非人的来源引入到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(import)”残基,所述输入残基通常取自“输入”可变结构域。抗体人源化技术通常涉及使用重组DNA技术来操纵编码抗体分子的一条或多条多肽链的DNA序列。

[0110] 在WO 2015/106290、WO 2016/033324、WO 2019/018426和WO/2019/018428中讨论并在下文提供了示例性3E10人源化序列。

[0111] a.人源化3E10重链可变区

[0112] 在一些实施例中,人源化3E10重链可变结构域包含

[0113] EVQLVQSGGGLIHPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRF  
TISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGTTLTVSS (hVH1,SEQ ID NO:3)、或

[0114] EVQLVESGGGLIHPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRF  
TISRDNKNTLYLQMTLSRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGTTLTVSS (hVH2,SEQ ID NO:4)、或

[0115] EVQLQESGGGVVHPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRF

- TISRDNKNTLYLQMNSLRSED TAVYYCARRGLLLDYWGQGLTVTVSS (hVH3, SEQ ID NO:5)、或
- [0116] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSTIYYADTVKGRF  
TISRDNKNTLYLQMNSSLRAEDTAVYYCVKRGLLLDYWGQGLTVTVSS (hVH4, SEQ ID NO:6)、或
- [0117] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRF  
TISRDNKNTLYLQMNSSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGLTVTVSS (变体2、6和10, SEQ ID NO:46)、或
- [0118] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRF  
TISRDNKNTLYLQMNSSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGLTVTVSS (变体3、7和11, SEQ ID NO:47)、或
- [0119] EVQLVESGGGDVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRF  
TISRDNKNTLYLQMNSSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGLTVTVSS (变体4、8和12, SEQ ID NO:48)、或
- [0120] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRF  
TISRDNKNTLYLQMNSSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGLTVTVSS (变体13、16和19, SEQ ID NO:50)、  
或
- [0121] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRF  
TISRDNKNTLYLQMNSSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGLTVTVSS (变体14和17, SEQ ID NO:51)、或
- [0122] EVQLVESGGGDVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRF  
TISRDNKNTLYLQMNSSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGLTVTVSS (变体15和18, SEQ ID NO:52)。
- [0123] b. 人源化3E10轻链可变区
- [0124] 在一些实施例中,人源化3E10轻链可变结构域包含DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVSTSSSYLAWYQQKPEKAPKLLIKYASYLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGAGTKLELK (hVL1, SEQ ID NO:9)、或
- [0125] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVSTSSSYLAWYQQKPEKAPKLLIKYASYLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQHSREFPWTFGAGTKLELK (hVL2, SEQ ID NO:10)、或
- [0126] DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSSSYLAWYQQKPGQPPKLLIYASYLESVGPARGFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYCQHSREFPWTFGQGTKVEIK (hVL3, SEQ ID NO:11)、
- [0127] DIQMTQSPSSLSASLGDRTITCRASKSVSTSSSYLAWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESVGPARGFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKVEIK (变体2、3和4, SEQ ID NO:53)、或
- [0128] DIQMTQSPSSLSASLGDRTITCRASKSVSTSSSYLAWYQQKPGQAPKLLIKYASYLESVGPARGFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIK (变体6、7和8, SEQ ID NO:54)、或
- [0129] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVSTSSSYLAWYQQKPGKAPKLLIKYASYLESVGPARGFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIK (变体10、11和12, SEQ ID NO:55)、或
- [0130] DIQMTQSPSSLSASLGDRTITCRASKTVSTSSSYLAWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESVGPARGFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKVEIK (变体13、14和15, SEQ ID NO:56)、或
- [0131] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKTVSTSSSYLAWYQQKPGKAPKLLIKYASYLESVGPARGFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIK (变体16、17和18, SEQ ID NO:57)、或
- [0132] DIQMTQSPSSLSASLGDRTITCRASKTVSTSSSYLAWYQQKPGQAPKLLIKYASYLESVGPARGFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIK (变体19, SEQ ID NO:58)。
- [0133] c. 细胞穿透和核定位
- [0134] 所公开的组合物和方法通常利用维持穿透细胞的能力的抗体,并且任选地利用核。

[0135] 通过自身抗体的细胞内化机制是多样化的。一些通过静电相互作用或FcR介导的内吞作用进入到细胞中,而另一些则利用基于与细胞表面肌球蛋白或钙网蛋白缔合的机制,随后为内吞作用(Ying-Chyi等人,《欧洲免疫学杂志(Eur J Immunol)》38,3178-3190(2008),Yanase等人,《临床研究杂志(J Clin Invest)》100,25-31(1997))。3E10在Fc非依赖性机制中穿透细胞(如通过缺乏Fc的3E10片段穿透细胞的能力所证明的),但涉及核苷转运蛋白ENT2的存在(Weisbart等人,《科技报告(Sci Rep)》5:12022.doi:10.1038/srep12022.(2015),Zack等人,《免疫学杂志》157,2082-2088(1996),Hansen等人,《生物化学杂志(J Biol Chem)》282,20790-20793(2007))。因此,在一些实施例,所公开的组合物和方法中利用的抗体是在Fc非依赖性机制中穿透细胞但涉及核苷转运蛋白ENT2的存在的抗体。

[0136] 3E10中干扰其结合核酸的能力的突变可能使抗体不能进行核穿透。因此,通常所公开的抗体的变体和人源化形式维持结合核酸的能力。另外,先前已经示出了3E10 scFv能够以ENT2依赖性方式穿透到活细胞和核酸中,其中ENT2缺陷细胞中的摄取效率受损(Hansen等人,《生物化学杂志》282,20790-20793(2007))。因此,在一些实施例,所公开的抗体的变体和人源化形式维持以ENT依赖性,优选地ENT2依赖性方式穿透到细胞核中的能力。

[0137] 如在WO 2019/152806和WO 2019/152808中所讨论的,发现一些人源化3E10变体比原始鼠类3E10(D31N)二-scFv更有效地穿透细胞核,而发现其它已丧失穿透核的能力。具体地,与鼠类抗体相比,变体10和13能很好地穿透核。

[0138] 人源化3E10 VL中的潜在双核定位信号(NLS)已经鉴定,并且可以包含以下序列中的部分或全部序列:

[0139] **RASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKY** (SEQ ID NO:88);

**RASKTVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKY** (SEQ ID NO:89);或RVTITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGKAPKL (SEQ ID NO:90)。

[0140] 示例性共有序列NLS可以是或包含(X)RASKTVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLL(X)KY(其中(X)=任何残基,但优先地为与SEQ ID NO:53具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的碱性残基(R或K)(SEQ ID NO:91)或其变体。

[0141] 因此,在一些实施例,特别是在核输入很重要的情况下,所公开的抗体可以包含SEQ ID NO:88-91中的任一者的序列,或其可以易位到细胞核中的片段和变体(例如,与SEQ ID NO:88-91中的任一者的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性)。

[0142] NLS的存在指示3E10可以通过核输入途径跨核包膜。在一些实施例, NLS通过与输入途径的一个或多个成员相互作用来改善输入。因此,在一些实施例, NLS可以与输入蛋白-β、输入蛋白-β/输入蛋白-α异二聚体或其组合结合。

[0143] 3. 核酸结合

[0144] 所公开的组合物和方法通常利用维持结合核酸如DNA、RNA或其组合的能力的抗体。

[0145] 以下实例展示了3E10和另外的3E10变体的分子建模。3E10 (Pymol) 的分子建模揭示了推定核酸结合袋 (NAB1) (参见例如,图14A和14B),并用下划线展示以下序列。

[0146] WT重链scFv序列

[0147] E VQLVESGGGL VKPGGSRKLSCAASGFTFSD YGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGSSTIYYA  
DTVKGRFTIS RDNAKNTLFL QMTSLRSEDTAMYCARRGL LLDYWGQGT LTVS (SEQ ID NO:92)

[0148] 轻链scFv序列

[0149] DIVLTQSPASL AVSLGQRATI SCRASKSVST SSYSYMHWYQ QKPGQPPKLLIKYASYLESG  
VPAFSGSGS GTDFTLNIHP VEEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIKRADAAPGGGG SGGGSGGGGS  
(SEQ ID NO:93)

[0150] 在一些实施例中,所公开的抗体包含一些或全部带下划线的NAB1序列。在一些实施例中,抗体包含具有结合核酸的变化的能力的变体序列。在一些实施例中,NAB1中的突变(例如,取代、插入和/或缺失)改善抗体与核酸如DNA、RNA或其组合的结合。在一些实施例中,突变是保守性取代。在一些实施例中,突变增加了NAB1袋的阳离子电荷。

[0151] 如本文所讨论和例示的,在CDR1的残基31处的天冬氨酸向天冬酰胺的突变增加了此残基的阳离子电荷并增强了核酸在体内的结合和递送(3E10-D31N)。

[0152] 另外的示例性变体包含在CDR1的残基31处的天冬氨酸向精氨酸(3E10-D31R)的突变,所述建模指示扩增阳离子电荷,或赖氨酸(3E10-D31K),所述建模指示改变电荷朝向。因此,在一些实施例中,3E10结合蛋白包含D31R或D31K取代。

[0153] 另外的示例性变体包含精氨酸(R)96突变为天冬酰胺(N),和/或丝氨酸(S)30突变为天冬氨酸(D),单独或与D31N、D31R或D31K组合。

[0154] 本文所公开的具有对应于3E10 D31或N31的残基的序列中的所有序列明确公开了具有D31R或D31K或N31R或N31K取代。

[0155] 3E10(Pymol)的分子建模揭示了推定核酸结合袋(NAB1)(图14A-14B)。在CDR1的残基31处的天冬氨酸向天冬酰胺的突变增加了此残基的阳离子电荷并增强了核酸在体内的结合和递送(3E10-D31N)。

[0156] 在CDR1的残基31处的天冬氨酸向精氨酸(3E10-D31R)的突变进一步扩增了阳离子电荷,而向赖氨酸(3E10-D31K)的突变改变了电荷朝向(图14A)。

[0157] 从分子建模预测的NAB1氨基酸已在上文重链和轻链序列中加了下划线。图14B是示出具有有用点状圆点展示的NAB1氨基酸残基的3E10-scFv(Pymol)的分子建模的图解。

[0158] 本文所公开的具有对应于R96的残基的序列中的所有序列明确公开了具有R96N取代。

[0159] 本文所公开的具有对应于S30的残基的序列中的所有序列明确公开了具有S30D。

[0160] 取代中的任何取代可以包含在任何组合中。因此,明确提供了在残基31、30和96的任何组合处具有两个或三个取代的序列。

[0161] 在特定实施例中,序列具有31N、31K或31R单独或与30D组合,并且不具有R96N取代。因此,在一些实施例中,与96相对应的残基不是N,并且在更具体的实施例中保持R。

[0162] 4. 片段、变体和融合蛋白

[0163] 抗核酸抗体可以由抗体片段或融合蛋白构成,所述抗体片段或融合蛋白包含可变重链和/或可变轻链的氨基酸序列,所述氨基酸序列与3E10或其人源化形式的可变重链和/

或轻链(例如,SEQ ID NO:1-11或46-58中的任一者,或SEQ ID NO:12-14中的任一者的重链和/或轻链)的氨基酸序列至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%相同。

[0164] 抗核酸抗体可以由抗体片段或融合蛋白构成,所述抗体片段或融合蛋白包含与3E10或其变体或人源化形式的CDR(例如,SEQ ID NO:1-11或46-58,或SEQ ID NO:12-14或SEQ ID NO:15-30或42-45中的任一者的CDR)的氨基酸序列至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的一个或多个CDR。可以通过BLAST蛋白比较来测定两个氨基酸序列的同一性百分比。在一些实施例中,抗体包含上述优选的可变结构域的CDR中的一个、两个、三个、四个、五个或全部六个CDR。

[0165] 优选地,抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3中的每一个中的一个与轻链CDR1、CDR2和CDR3中的每一个中的一个的组合。

[0166] 上文提供了3E10的轻链可变序列的预测的互补决定区(CDR)。还参见GenBank:AAA65681.1-免疫球蛋白轻链,部分[小家鼠]以及GenBank:L34051.1-小鼠Ig重排κ链mRNA V区。上文提供了3E10的重链可变序列的预测的互补决定区(CDR)。参见例如Zack等人,《免疫学和细胞生物学》,72:513-520(1994),GenBank登录号AAA65679.1。Zach等人,《免疫学杂志》154(4),1987-1994(1995)以及GenBank:L16982.1-小鼠Ig重排H链基因,部分cDs。

[0167] 因此,在一些实施例中,细胞穿透抗体含有SEQ ID NO:1或2的CDR或整个重链和轻链可变区或SEQ ID NO:12或13的重链区;或其与SEQ ID NO:7或8的组合的人源化形式,或SEQ ID NO:14的轻链区;或其人源化形式。在一些实施例中,细胞穿透抗体含有与SEQ ID NO:9、10或11组合的SEQ ID NO:3、4、5或6的CDR或整个重链和轻链可变区。在一些实施例中,细胞穿透抗体含有SEQ ID NO:46-48或50-52中任一者与SEQ ID NO:53-58中的任一者的组合的CDR或整个重链和轻链可变区。

[0168] 本文所公开的具有对应于3E10 D31或N31的残基的序列中的所有序列明确公开了其中具有D31R或D31K或N31R或N31K取代。因此,在一些实施例中,3E10结合蛋白是前述或以下序列中任何序列的变体,其中对应于3E10重链的残基31的氨基酸残基被精氨酸(R)或赖氨酸(K)取代。

[0169] 还包含具有核酸递送活性的抗体片段。无论是否与其它序列附接,片段都包含特定区或特异性氨基酸残基的插入、缺失、取代或其它所选修饰,条件是片段的活性与未经修饰的抗体或抗体片段相比未显著改变或受损。

[0170] 还可以采用用于生产对本公开的核酸具有特异性的单链抗体的技术。用于产生单链抗体的方法是本领域技术人员众所周知的。可以通过使用短肽接头将重链和轻链的可变结构域融合在一起来创建单链抗体,由此在单个分子上重构抗原结合位点。在未显著破坏抗原结合或结合特异性的情况下,已经开发出单链抗体可变片段(scFv),其中一个可变结构域的C端通过具有15至25个氨基酸的肽或接头与另一个可变结构域的N端栓连。选择接头以允许重链和轻链以其合适的构象朝向结合在一起。

[0171] 可以修饰抗核酸抗体以改进其核酸递送潜力。例如,在一些实施例中,将细胞穿透抗核酸抗体与对靶细胞的细胞质和/或细胞核中的治疗性靶标具有特异性的另一种抗体缀合。例如,细胞穿透抗核酸抗体可以是含有3E10Fv和特异性地结合治疗性靶标的单克隆抗

体的单链可变片段的融合蛋白。在其它实施例中,细胞穿透抗核酸抗体是双特异性抗体,所述双特异性抗体具有来自3E10的第一重链和第一轻链以及来自特异性地结合治疗性靶标的单克隆抗体的第二重链和第二轻链。

[0172] 双特异性抗体和其它结合蛋白具有来自3E10的第一重链和第一轻链以及来自特异性地结合靶标的单克隆抗体的第二重链和第二轻链,其在Weisbart等人,《分子癌症治疗(Mol.Cancer Ther.)》,11(10):2169-73(2012)和Weisbart等人,《国际肿瘤学杂志》,25:1113-8(2004),以及美国专利申请第2013/0266570号中有所讨论,所述文献其以全文引用的方式具体并入。在一些实施例中,靶标对靶细胞类型、组织、器官等具有特异性。因此,第二重链和第二轻链可以充当靶向复合物至靶细胞类型、组织、器官的靶向部分。在一些实施例中,第二重链和第二轻链靶、造血干细胞、CD34<sup>+</sup>细胞、T细胞或任何另外优选的细胞类型,例如通过靶向在优选细胞类型上表达的受体或配体。在一些实施例中,第二重链和第二轻链靶向胸腺、脾或癌细胞。

[0173] 在一些实施例中,特别是用于在体内靶向T细胞,例如用于在体内产生抗原特异性T细胞、CAR T细胞的那些,可以靶向免疫细胞或T细胞标志物,如CD3、CD7或CD8。例如,抗CD8抗体和抗CD3 Fab片段两者均已用于在体内靶向T细胞(Pfeiffer等人,《EMBO分子医学(EMBO Mol Med.)》,10(11)(2018).pii:e9158.doi:10.15252/emmm.201809158,Smith等人,《自然纳米技术(Nat Nanotechnol.)》,12(8):813-820(2017).Doi:10.1038/nnano.2017.57)。因此,在一些实施例中,3E10抗体或抗原结合片段或融合蛋白是可以与CD3、CD7、CD8或另一免疫细胞(例如T细胞)标志物,或特异性组织,如胸腺、脾或肝的标志物特异地结合的双特异性抗体部分。

[0174] 二价单链可变片段(二-scFv)可以通过连接两个scFv来工程化。这可以通过产生具有两个VH区和两个VL区的单肽链来完成,从而产生串联的scFv。scFv还可以设计为具有接头肽,所述接头肽对于这两个可变区来说短得无法折叠在一起(约五个氨基酸),从而迫使scFv二聚化。这种类型被称为双功能抗体。已证明,双功能抗体的解离常数是相对应scFv的解离常数的至少1/40,这意味着双功能抗体对其靶标具有更高的亲和力。仍更短的接头(一个或两个氨基酸)导致三聚体(三功能抗体或三体)形成。四抗体也已经产生。其对靶标表现出的亲和力比双功能抗体高得多。在一些实施例中,抗核酸抗体可以含有3E10的两个或更多个连接的单链可变片段(例如,3E10二-scFv、3E10三-scFv)或其保守性变体。在一些实施例中,抗核酸抗体是双功能抗体或三功能抗体(例如,3E10双功能抗体、3E10三功能抗体)。在WO 2017/218825和WO 2016/033321中提供了3E10的单个和两个或更多个连接的单链可变片段的序列。

[0175] 抗体的功能可以通过将抗体或其片段与治疗剂偶联来增强。抗体或片段与治疗剂的此类偶联可以通过制备免疫缀合物或通过制备融合蛋白或通过将抗体或片段与包括抗体或抗体片段和治疗剂的如DNA或RNA(例如,siRNA)等核酸连接来实现。

[0176] 在一些实施例中,对细胞穿透抗体进行修饰以改变其半衰期。在一些实施例中,期望增加抗体的半衰期,使得所述抗体在循环中或治疗位点处存在更长时间段。例如,可以期望在循环中或待治疗位置处维持抗体的滴度延长的时间段。在其它实施例中,减小抗核酸抗体的半衰期以减少潜在的副作用。抗体片段,如3E10Fv的半衰期可能比全尺寸抗体的半衰期短。改变半衰期的其它方法是已知的,并且可以在所描述的方法中使用。例如,抗体可

以被工程化为具有延长半衰期的Fc变体,例如使用Xtend™抗体半衰期延长技术(加利福尼亚州蒙罗维亚的Xencor公司(Xencor, Monrovia, CA))。

[0177] a. 接头

[0178] 如本文所使用的,术语“接头”包含但不限于肽接头。肽接头可以是任何大小,只要其不干扰通过可变区与表位的结合即可。在一些实施例中,接头包含一个或多个甘氨酸和/或丝氨酸氨基酸残基。单价单链抗体可变片段(scFv),其中一个可变结构域的C端通常通过15到25个氨基酸肽或接头与另一个可变结构域的N端栓连。选择接头以允许重链和轻链以其合适的构象朝向结合在一起。如上文所讨论的,双功能抗体、三功能抗体等中的接头通常包含比单价scFv的接头短的接头。二价、三价和其它多价scFv通常包含三个或更多个接头。接头的长度和/或氨基酸组成可以相同或不同。因此,如本领域中已知的,可以基于scFv的所期望化合价来测定接头的数量、接头的组成和接头的长度。接头可以允许或驱动二价、三价和其它多价scFv的形成。

[0179] 例如,接头可以包含4-8个氨基酸。在一特定实施例中,接头包含氨基酸序列GQSSRSS (SEQ ID NO:31)。在另一个实施例中,接头包含15-20个氨基酸,例如18个氨基酸。在一特定实施例中,接头包含氨基酸序列GQSSRSSGGGSSGGGGS (SEQ ID NO:32)。其它柔性接头包含但不限于氨基酸序列Gly-Ser、Gly-Ser-Gly-Ser (SEQ ID NO:33)、Ala-Ser、Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:34)、(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:35)和(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:36)以及(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:37)。

[0180] 其它示例性接头包含例如,RADAAPGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:59)和ASTKGPSVFPLAPLESSGS (SEQ ID NO:60)。

[0181] b. 示例性抗核酸scFv序列

[0182] 在WO 2016/033321、WO 2017/218825、WO 2019/018426和WO/2019/018428中公开并在下文提供了示例性鼠类3E10 scFv序列,包含单-scFv、二-scFv和三-scFv。用于所公开的组合物和方法中的细胞穿透抗体包含示例性scFv和其片段和变体。

[0183] scFv 3E10 (D31N)的氨基酸序列为:

[0184] AGIHDI VLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESQVPA  
RFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIKRADAAPGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESG  
GGLVKPGGSRKLSAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNTLFLQMT  
SLRSEDTAMYYCARRGLLLDYWGQGTTLTVSSLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH (SEQ ID NO:38)。

[0185] 参考SEQ ID NO: 38注释scFv蛋白结构域

[0186] ●AGIH序列增加溶解度 (SEQ ID NO:38的氨基酸1-4)

[0187] ●Vk可变区 (SEQ ID NO:38的氨基酸5-115)

[0188] ●轻链CH1 (SEQ ID NO:38的氨基酸116-121)的初始 (6aa)

[0189] ●(GGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:37) 接头 (SEQ ID NO:38的氨基酸122-136)

[0190] ●VH可变区 (SEQ ID NO:38的氨基酸137-252)

[0191] ●Myc标签 (氨基酸253-268SEQ ID NO:38)

[0192] ●His 6标签 (SEQ ID NO:38的氨基酸269-274)

[0193] 3E10二-scFv (D31N)的氨基酸序列

[0194] 二-scFv 3E10 (D31N)是双单链可变片段,所述双单链可变片段包含3E10的2X重链

和轻链可变区,并且其中重链的位置31处的天冬氨酸突变为天冬酰胺。二-scFv 3E10 (D31N)的氨基酸序列为:

[0195] AGIHDIIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESQVPA  
RFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIKRADAAPGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESG  
GGLVKPGGSRKLSAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNTLFLQMT  
SLRSEDAMYYCARRGLLLDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCR  
ASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESQVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPWT  
FGGGTKLEIKRADAAPGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSRKLSAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGL  
EWVAYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCARRGLLLDYWGQGTTLTVSSLEQKL  
ISEEDLN SAVDHHHHHH (SEQ ID NO:39)。

[0196] 参考SEQ ID NO:39注释二-scFv蛋白结构域

[0197] ●AGIH序列增加溶解度 (SEQ ID NO:39的氨基酸1-4)

[0198] ●Vk可变区 (SEQ ID NO:39的氨基酸5-115)

[0199] ●轻链CH1 (SEQ ID NO:39的氨基酸116-121)的初始 (6aa)

[0200] ●(GGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:37)接头 (SEQ ID NO:39的氨基酸122-136)

[0201] ●VH可变区 (SEQ ID NO:39的氨基酸137-252)

[0202] ●由人IgG CH1初始13个氨基酸组成的Fv片段之间的接头 (SEQ ID NO:39的氨基酸253-265)

[0203] ●旋转序列 (SEQ ID NO:39的氨基酸266-271)

[0204] ●Vk可变区 (SEQ ID NO:39的氨基酸272-382)

[0205] ●轻链CH1 (SEQ ID NO:39的氨基酸383-388)的初始 (6aa)

[0206] ●(GGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:37)接头 (SEQ ID NO:39的氨基酸389-403)

[0207] ●VH可变区 (SEQ ID NO:39的氨基酸404-519)

[0208] ●Myc标签 (SEQ ID NO:39的氨基酸520-535)

[0209] ●His 6标签 (SEQ ID NO:39的氨基酸536-541)

[0210] 三-scFv的氨基酸序列

[0211] 三-scFv 3E10 (D31N)是三单链可变片段,所述三单链可变片段包含310E的3X重链和轻链可变区,并且其中重链的位置31处的天冬氨酸突变为天冬酰胺。三-scFv 3E10 (D31N)的氨基酸序列为:

[0212] AGIHDIIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESQVPA  
RFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIKRADAAPGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG  
LVKPGGSRKLSAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLR  
SEDAMYYCARRGLLLDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSV  
STSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESQVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGT  
KLEIKRADAAPGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSRKLSAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVAYI  
SSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCARRGLLLDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLA  
PLESSGSDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESQVPARFSGSG  
SGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIKRADAAPGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPG  
GSRKLSAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSL

- [0213] RSEDTAMYYCARRGLLLLDYWGQGTTLTVSSLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH (SEQ ID NO:40)。
- [0214] 参考SEQ ID NO:40注释三-scFv蛋白结构域
- [0215] ●AGIH序列增加溶解度 (SEQ ID NO:40的氨基酸1-4)
- [0216] ●Vk可变区 (SEQ ID NO:40的氨基酸5-115)
- [0217] ●轻链CH1 (SEQ ID NO:40的氨基酸116-121) 的初始 (6aa)
- [0218] ●(GGGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:37) 接头 (SEQ ID NO:40的氨基酸122-136)
- [0219] ●VH可变区 (SEQ ID NO:40的氨基酸137-252)
- [0220] ●由人IgG CH1初始13个氨基酸组成的Fv片段之间的接头 (SEQ ID NO:40的氨基酸253-265)
- [0221] ●旋转序列 (SEQ ID NO:40的氨基酸266-271)
- [0222] ●Vk可变区 (SEQ ID NO:40的氨基酸272-382)
- [0223] ●轻链CH1 (SEQ ID NO:40的氨基酸383-388) 的初始 (6aa)
- [0224] ●(GGGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:37) 接头 (SEQ ID NO:40的氨基酸389-403)
- [0225] ●VH可变区 (SEQ ID NO:40的氨基酸404-519)
- [0226] ●由人IgG C<sub>H1</sub>初始13个氨基酸组成的Fv片段之间的接头 (SEQ ID NO:40的氨基酸520-532)
- [0227] ●旋转序列 (SEQ ID NO:40的氨基酸533-538)
- [0228] ●Vk可变区 (SEQ ID NO:40的氨基酸539-649)
- [0229] ●轻链CH1 (SEQ ID NO:40的氨基酸650-655) 的初始 (6aa)
- [0230] ●(GGGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:37) 接头 (SEQ ID NO:40的氨基酸656-670)
- [0231] ●VH可变区 (SEQ ID NO:40的氨基酸671-786)
- [0232] ●Myc标签 (SEQ ID NO:40的氨基酸787-802)
- [0233] ●His 6标签 (SEQ ID NO:40的氨基酸803-808)
- [0234] WO 2016/033321和Noble等人,《癌症研究 (Cancer Research)》,75 (11):2285-2291 (2015) 示出与其单价对应物相比,二-scFv和三-scFv具有一些改善的和另外的活性。上文还提供了与示例性融合蛋白中的每个示例性融合蛋白的不同结构域相对应的子序列。本领域技术人员应当理解,示例性融合蛋白或其结构域可以用于构建上文更详细讨论的融合蛋白。例如,在一些实施例中,二-scFv包含第一scFv,所述第一scFv包含Vk可变区 (例如,SEQ ID NO:39的氨基酸5-115或其功能变体或片段),所述Vk可变区与VH可变结构域 (例如,SEQ ID NO:39的氨基酸137-252或其功能变体或片段) 连接、与包含Vk可变区 (例如,SEQ ID NO:39的氨基酸272-382或其功能变体或片段) 的第二scFv连接、与VH可变结构域 (例如,SEQ ID NO:39的氨基酸404-519或其功能变体或片段) 连接。在一些实施例中,三-scFv包含与第三scFv结构域连接的二-scFv,所述第三scFv结构域包含与VH可变结构域 (例如,SEQ ID NO:40的氨基酸671-786或其功能变体或片段) 连接的Vk可变区 (例如,SEQ ID NO:40的氨基酸539-649或其功能变体或片段)。
- [0235] Vk可变区可以单独地或与轻链CH1 (SEQ ID NO:39的氨基酸116-121) 的 (6aa) 组合通过例如接头 (例如,(GGGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:37)) 与VH可变结构域连接。上文讨论了其它合适的接头,并且其是本领域已知的。scFv可以单独地或与旋转序列 (例如,SEQ ID NO:39的氨基酸266-271) 组合通过接头 (例如,SEQ ID NO:39的人IgG CH1初始13个氨基酸 (253-

265))连接。上文讨论了其它合适的接头,并且其是本领域已知的。

[0236] 因此,二-scFv可以包含SEQ ID NO:39的氨基酸5-519。三-scFv可以包含SEQ ID NO:40的氨基酸5-786。在一些实施例中,融合蛋白包含另外的结构域。例如,在一些实施例中,融合蛋白包含增强溶解度的序列(例如,SEQ ID NO:39的氨基酸1-4)。因此,在一些实施例中,二-scFv可以包含SEQ ID NO:39的氨基酸1-519。三-scFv可以包含SEQ ID NO:40的氨基酸1-786。在一些实施例中,融合蛋白包含增强融合蛋白的纯化、分离、捕获、鉴定、分离等的一个或多个结构域。示例性结构域包含例如Myc标签(例如,SEQ ID NO:39的氨基酸520-535)和/或His标签(SEQ ID NO:39的氨基酸536-541)。因此,在一些实施例中,二-scFv可以包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。三-scFv可以包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。上文更详细地讨论了其它可取代的结构域和另外的结构域。

[0237] 在WO 2016/033324中讨论了示例性3E10人源化Fv序列:DIVLTQSPASLAVSPGQRATI TCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYYASYLESVGPARGSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSRE FPWTFGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASGFTFSNYGMHWVRQAPGKLEY VSYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCVKRGLLLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:41)。

[0238] 在WO 2019/018426和WO/2019/018428中讨论了示例性3E10人源化二-scFv序列,并且包含:

[0239] DIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESVPSRFSG SSGSGTDFTLTISSLQPEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKVEIKRADAAPGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARRGLLDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKSV STSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDAATYYCQHSREFPWTFGGG TKVEIKRADAAPGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKLEWVS YISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLDYWGQTTVTVSS (变体2, SEQ ID NO:61)、

[0240] DIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESVPSRFSG SSGSGTDFTLTISSLQPEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKVEIKRADAAPGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVV QPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARRGLLDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKSV STSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDAATYYCQHSREFPWTFGGG TKVEIKRADAAPGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKLEWVS YISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLDYWGQTTVTVSS (变体3, SEQ ID NO:62)、

[0241] DIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESVPSRFSG SSGSGTDFTLTISSLQPEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKVEIKRADAAPGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGDV KPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARRGLLDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKSV STSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDAATYYCQHSREFPWTFGGG TKVEIKRADAAPGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGDVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKLEWVS

YISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TVTVSS (变体4, SEQ ID NO:63) 、

[0242] DIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQAPKLLIKYASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIKRADAAPGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQAPKLLIKYASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIKRADAAPGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TVTVSS (变体6, SEQ ID NO:64) 、

[0243] DIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQAPKLLIKYASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIKRADAAPGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQAPKLLIKYASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIKRADAAPGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TVTVSS (变体7, SEQ ID NO:65) 、

[0244] DIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQAPKLLIKYASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIKRADAAPGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGDV KPGGSLRLS CAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQAPKLLIKYASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIKRADAAPGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGDV KPGGSLRLS CAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TVTVSS (变体8, SEQ ID NO:66) 、

[0245] DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGKAPKLLIKYASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIKRADAAPGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGKAPKLLIKYASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIKRADAAPGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TVTVSS (变体10, SEQ ID NO:67) 、

[0246] DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGKAPKLLIKYASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIKRADAAPGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGKAPKLLIKYASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIKRADAAPGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TVTVSS (变体11, SEQ ID NO:68) 、

TKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVS  
YISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TTVTVSS (变体11,  
SEQ ID NO:68)、

[0247] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPKAPKLLIKYASYLESVPSRFSG  
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGDV  
KPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA  
EDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSV  
STSSYSYMHWYQQKPKAPKLLIKYASYLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQ  
TKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGDVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVS  
YISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TTVTVSS (变体12,  
SEQ ID NO:69)、

[0248] DIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKTVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESVPSRFSG  
SGSGTDFTLTISLQPEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV  
QPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA  
EDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKTV  
STSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYCQHSREFPWTFGGG  
TKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKLEWVS  
YISSGSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TTVTVSS (变体13,  
SEQ ID NO:70)、

[0249] DIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKTVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESVPSRFSG  
SGSGTDFTLTISLQPEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGVV  
QPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA  
EDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKTV  
STSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYCQHSREFPWTFGGG  
TKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKLEWVS  
YISSGSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TTVTVSS (变体14,  
SEQ ID NO:71)、

[0250] DIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKTVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESVPSRFSG  
SGSGTDFTLTISLQPEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGDV  
KPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA  
EDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKTV  
STSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYCQHSREFPWTFGGG  
TKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGDVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKLEWVS  
YISSGSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TTVTVSS (变体15,  
SEQ ID NO:72)、

[0251] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKTVSTSSYSYMHWYQQKPKAPKLLIKYASYLESVPSRFSG  
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV  
QPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA  
EDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKTV

STSSYSYMHWYQQKPGKAPKLLIKYASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQG  
TKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVS  
YISSGSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGTITVTVSS (变体16,  
SEQ ID NO:73)、

[0252] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKTVSTSSYSYMHWYQQKPGKAPKLLIKYASYLESGVPSRFSG  
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVV  
QPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRA  
EDTAVYYCARRGLLLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKTV  
STSSYSYMHWYQQKPGKAPKLLIKYASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQG  
TKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVS  
YISSGSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGTITVTVSS (变体17,  
SEQ ID NO:74)、

[0253] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKTVSTSSYSYMHWYQQKPGKAPKLLIKYASYLESGVPSRFSG  
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGDV  
KPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRA  
EDTAVYYCARRGLLLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKTV  
STSSYSYMHWYQQKPGKAPKLLIKYASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQG  
TKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGDVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVS  
YISSGSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGTITVTVSS (变体18,  
SEQ ID NO:75) 和

[0254] DIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKTVSTSSYSYMHWYQQKPGQAPKLLIKYASYLESGVPSRFSG  
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV  
QPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRA  
EDTAVYYCARRGLLLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKTV  
STSSYSYMHWYQQKPGQAPKLLIKYASYLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGQG  
TKVEIKRADAAPGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVS  
YISSGSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGTITVTVSS (变体19,  
SEQ ID NO:76)。

[0255] c. 另外的序列

[0256] 可以用于构建抗核酸抗原结合蛋白、抗体、片段和融合蛋白的另外的序列包含但  
不限于

[0257] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRF  
TISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD  
KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(IgG1 L2345A/L235A重链全长序列, SEQ ID NO:77)、

[0258] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV (IgG1恒定重区1, SEQ ID NO:78)、

[0259] EPKSCDKTHTCP (IgG1铰链区, SEQ ID NO:79)、

[0260] PCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (IgG1 L2345A/L235A恒定重区2, SEQ  
ID NO:80)、

[0261] GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (IgG1恒定重区3, SEQ ID NO:81)、

[0262] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRF  
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD  
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYD  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(IgG1 N297D重链全长序列, SEQ ID NO:82)、

[0263] PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (IgG1 N297D恒定重区2, SEQ ID NO:  
83)、

[0264] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSTIYYADSVKGRF  
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD  
KTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYD  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(IgG1 L2345A/L235A/N297D重链全长序列, SEQ ID NO:84)、

[0265] PCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (IgG1 L2345A/L235A/N297D恒定重区  
2, SEQ ID NO:85)、

[0266] PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID NO:86, 未修饰的恒定重区2)  
以及

[0267] DIQMTQSPSSLSASLGDRATITCRASKTVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESVPSRFSG  
SGSGTDFLTITSSLPEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFY  
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (轻  
链全长序列, SEQ ID NO:87)。

[0268] B. 货物

[0269] 如本文提供的方法和组合物中所使用的, 3E10通常与具有核酸货物的复合物中的  
细胞接触。抗体或结合蛋白与核酸货物之间的相互作用是非共价的。

[0270] 核酸货物可以是单链的或双链的。核酸货物可以是或包含DNA、RNA、核酸类似物或  
其组合。如下文更详细地讨论的, 核酸类似物可以在碱基部分、糖部分或磷酸主链处进行修

饰。此类修饰可以改善例如核酸的稳定性、杂交或溶解度。

[0271] 核酸货物通常是具有功能性意义的,即是或编码一旦被递送到细胞中就具有生物活性的试剂。下文更详细地讨论了示例性货物,但包含例如编码所关注的多肽的mRNA或DNA,包含例如表达构建体和载体、抑制性核酸如siRNA,或编码抑制性核酸的核酸,包含例如表达构建体和载体。

[0272] 所公开的组合物可以包含多个单一核酸货物分子。在一些实施例中,所述组合物包含多种(例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个)不同的核酸分子。

[0273] 在一些实施例中,货物分子的长度为约0.001、约0.01、约1、10、100、1,000、10,000、和/或100,000千碱基。

[0274] 在一些实施例中,例如,货物介于0.001kb与100kb之间、或介于0.001kb与50kb之间、或介于0.001kb与25kb之间、或介于0.001kb与12.5kb之间、或介于0.001kb与10kb之间、或介于0.001kb与8kb之间、或0.001kb与5kb之间、或介于0.001kb与2.5kb之间、或介于0.001kb与1kb之间、或介于0.01kb与100kb之间、或介于0.01kb与50kb之间、或介于0.01kb与25kb之间、或介于0.01kb与12.5kb之间、或介于0.01kb与10kb之间、或介于0.01kb与8kb之间、或0.01kb与5kb之间、或介于0.01kb与2.5kb之间、或介于0.01kb与1kb之间、或介于0.1kb与100kb之间、或介于0.1kb与50kb之间、或介于0.1kb与25kb之间、或介于0.1kb与12.5kb之间、或介于0.1kb与10kb之间、或介于0.1kb与8kb之间、或0.1kb与5kb之间、或介于0.1kb与2.5kb之间、或介于0.1kb与1kb之间、或介于1kb与100kb之间、或介于1kb与50kb之间、或介于1kb与25kb之间、或介于1kb与12.5kb之间、或介于1kb与10kb之间、或介于1kb与8kb之间、或1kb与5kb之间、或介于1kb与2.5kb之间,各自包含端值。

[0275] 在一些实施例中,例如,货物介于约0.001kb与约100kb之间、或介于约0.001kb与约50kb之间、或介于约0.001kb与约25kb之间、或介于约0.001kb与约12.5kb之间、或介于约0.001kb与约10kb之间、或介于约0.001kb与约8kb之间、或约0.001kb与约5kb之间、或介于约0.001kb与约2.5kb之间、或介于约0.001kb与约1kb之间、或介于约0.01kb与约100kb之间、或介于约0.01kb与约50kb之间、或介于约0.01kb与约25kb之间、或介于约0.01kb与约12.5kb之间、或介于约0.01kb与约10kb之间、或介于约0.01kb与约8kb之间、或约0.01kb与约5kb之间、或介于约0.01kb与约2.5kb之间、或介于约0.01kb与约1kb之间、或介于约0.1kb与约100kb之间、或介于约0.1kb与约50kb之间、或介于约0.1kb与约25kb之间、或介于约0.1kb与约12.5kb之间、或介于约0.1kb与约10kb之间、或介于约0.1kb与约8kb之间、或介于约0.1kb与约5kb之间、或介于约0.1kb与约2.5kb之间、或介于约0.1kb与约1kb之间、或介于约1kb与约100kb之间、或介于约1kb与约50kb之间、或介于约1kb与约25kb之间、或介于约1kb与约12.5kb之间、或介于约1kb与约10kb之间、或介于约1kb与约8kb之间、或介于约1kb与约5kb之间、或介于约1kb与约2.5kb之间,各自包含端值。

[0276] 在一些实施例中,例如,货物介于0.2kb与10kb之间、或介于0.2kb与5kb之间、或介于0.2kb与2.5kb之间、或介于0.2kb与1kb之间、或介于0.2kb与0.5kb之间、或介于0.2kb与0.25kb之间、或介于0.5kb与10kb之间、或介于0.5kb与5kb之间、或介于1kb与5kb之间、或介于1kb与3kb之间、或介于2kb与10kb之间、或介于3kb与5kb之间。

[0277] 在一些实施例中,例如,货物介于约0.2kb与约10kb之间、或介于约0.2kb与约5kb之间、或介于约0.2kb与约2.5kb之间、或介于约0.2kb与约1kb之间、或介于约0.2kb与约

0.5kb之间、或介于约0.2kb与约0.25kb之间、或介于约0.5kb与约10kb之间、或介于约0.5kb与约5kb之间、或介于约1kb与约5kb之间、或介于约1kb与约3kb之间、或介于约2kb与约10kb之间、或介于约3kb与约5kb之间。

[0278] 应当理解,对于具体应用,核酸货物可以是例如落在前述范围(包含前述范围中的一个)内的一个或多个离散长度,明确公开每个离散长度的具体值。例如,大小可以如单核苷酸或核碱基小。在示例性应用中,货物是环状二核苷酸,像cGAMP,其是STING激动剂。在其它实施例中,货物是短寡聚物。例如,短至8聚体的寡聚物可以用于反义或剪接开关。略微更长的寡聚物(例如,18聚体至20聚体)可以用于基因编辑。

[0279] 1. 货物的形式

[0280] 核酸货物是核酸,并且可以是分离的核酸组合物。如本文所使用的,“分离的核酸”是指与存在于哺乳动物基因组中的其它核酸分子分离的核酸,包含通常侧接哺乳动物基因组中的核酸的一侧或两侧的核酸。如本文所使用的,关于核酸的术语“分离的”还包含与任何非天然存在的核酸序列的组合,因为此类非天然存在的序列在自然界中并未发现,并且在天然存在的基因组中不立即具有连续序列。

[0281] 分离的核酸可以是例如DNA分子,并且在一些实施例中,在天然存在的基因组中正常发现的紧邻侧接所述DNA分子的核酸序列之一被去除或缺失。因此,分离的核酸包含但不限于作为独立于其它序列(例如,化学合成的核酸,或通过PCR或限制性核酸内切酶处理产生的cDNA或基因组DNA片段)的单独分子存在的DNA分子,以及掺入到载体中的重组DNA、自主复制的质粒、病毒(例如,逆转录病毒、慢病毒、腺病毒或疱疹病毒),或进入到原核生物或真核生物中的基因组DNA。另外,分离的核酸可以包含工程化核酸,如作为杂交体或融合核酸的一部分的重组DNA分子。在一些实施例中,分离的核酸不是存在于例如cDNA文库或基因组文库内的数百个至数百万个其它核酸中的核酸,或者不是基因组DNA限制性消化物。

[0282] 编码多肽的核酸序列包含基因组序列。在一些实施例中,分离的核酸是mRNA或cDNA序列,其中一个或多个(或所有)外显子已缺失。在各个实施例中,核酸编码多肽。编码多肽的核酸可以被优化以在所选择的表达宿主或细胞中表达。密码子可以被编码相同氨基酸的替代密码子取代,以考虑核酸序列所来源于的生物体或细胞与表达宿主或细胞之间的密码子使用的差异。以此方式,可以使用优选的表达宿主密码子合成核酸。

[0283] 核酸可以是有义朝向或反义朝向,或者可以例如与编码多肽的参考序列互补。

[0284] a. 载体

[0285] 货物可以是核酸载体,例如编码多肽和/或功能性核酸的载体。如上文所没描述的核酸可以插入到载体中以便在细胞中表达。如本文所使用的,“载体”是可以引导其内所含核酸的复制或表达的核酸,如质粒、粘粒或类似的核酸载体,其中可以插入另一个DNA片段,以实现插入片段的复制。载体可以是表达载体。“表达载体”是包含一个或多个表达控制序列(例如,启动子)的载体,并且“表达控制序列”是控制并调节另一个DNA序列的转录和/或翻译的DNA序列。

[0286] 载体中的核酸可以与一个或多个表达控制序列可操作地连接。例如,可以将控制序列掺入到基因构建体中,以便表达控制序列有效地控制所关注的编码序列的表达。表达控制序列的实例包含启动子、增强子和转录终止区。启动子是通常在转录起始点上游的100个核苷酸内(通常接近RNA聚合酶II的起始位点)的由DNA分子的区构成的表达控制序列。为

了使编码序列处于启动子的控制下,有必要将多肽的翻译阅读框的翻译起始位点定位在启动子下游的一个核苷酸与约五十个核苷酸之间。增强子在时间、位置和水平方面提供表达特异性。与启动子不同,增强子可以在位于距转录位点的不同距离处时发挥作用。增强子还可以位于转录起始位点的下游。当RNA聚合酶能够将编码序列转录到mRNA中时,编码序列在细胞中“可操作地连接”和“控制”表达控制序列,所述mRNA然后可以被翻译成由编码序列编码的蛋白质。

[0287] 在一些实施例中,货物被递送到细胞中并保持在染色体外。在一些实施例中,货物被引入到宿主细胞中,并且被整合到宿主细胞的基因组中。如下文更详细地讨论的,组合物可用于基因疗法的方法中。基因疗法的方法可以包含将改变细胞的基因型的多核苷酸引入到细胞中。多核苷酸的引入可以通过基因重组校正、替换或以其它方式改变内源性基因。方法可以包含引入缺陷基因、异源基因或小核酸分子如寡核苷酸的完整替换拷贝。例如,可以将校正基因引入到宿主基因组内的非特异性位置中。

[0288] 在一些实施例中,货物是核酸载体。用于构建含有基因序列和适当的转录和翻译控制元件的表达载体的方法是本领域众所周知的。这些方法包含体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。表达载体通常含有用于插入的编码序列的翻译和/或转录的调控序列和必要元件,所述编码序列可以是例如所关注的多核苷酸。编码序列可以与启动子和/或增强子可操作地连接以帮助控制所期望的基因产物的表达。在生物技术中使用的启动子根据基因表达的控制的预期类型而具有不同类型。这些启动子通常可以分成组成型启动子、组织特异性启动子或发育阶段特异性启动子、诱导型启动子和合成启动子。

[0289] 用于哺乳动物细胞中的表达载体可以包含复制起点(根据需要或期望)、位于待表达基因前面的启动子以及任何必要的核糖体结合位点、RNA剪接位点(如果需要或期望)、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。可以通过构建载体来提供复制起点以包含如可以源自SV40或其它病毒(例如,多瘤病毒、腺病毒、VSV、BPV),或者可以由宿主细胞染色体复制机构提供的外源起点。如果载体被整合到宿主细胞染色体中,则后者通常就足够了。

[0290] 启动子可以源自哺乳动物细胞(例如,金属硫蛋白启动子)的基因组或源自哺乳动物病毒(例如,腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)。进一步地,还可能并且可能期望利用通常与所期望的基因序列相关联的启动子或控制序列,条件是此类控制序列与宿主细胞系统相容。

[0291] 可以利用许多基于病毒的表达系统,例如,常用的启动子源自多瘤、腺病毒2、巨细胞病毒和猿猴病毒40(SV40)。SV40病毒的早期和晚期启动子是有用的,因为两者都很容易地从病毒中作为片段获得,所述片段还含有SV40病毒复制起点。可以使用更小或更大的SV40片段,条件是包含从HindIII位点朝向位于病毒复制起点的Bg1I位点延伸的大约250bp序列。

[0292] 对于所公开的组合物的有效翻译,还可能需要特异性起始信号。这些信号包含ATG起始密码子和相邻序列。另外地可能需要提供包含ATG起始密码子的外源翻译控制信号。本领域的普通技术人员将容易地能够确定此需求并提供必要的信号。众所周知,起始密码子必须与所期望的编码序列的阅读框使用相同读框(或同相),以确保整个插入物的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以是天然和合成两者的多种起源。可以通过包含适当的转录增强子元件或转录终止子来增强表达效率。

[0293] 在真核表达中,如果原始克隆区段内未含有适当的聚腺苷酸化位点,则通常还期望将适当的聚腺苷酸化位点掺入到转录单元中。通常,在转录终止之前,将poly A添加位点置于蛋白质的终止位点的约30至2000个核苷酸“下游”的位置。

[0294] b.mRNA

[0295] 货物可以是mRNA。

[0296] 还可以使用具有促进稳定性和/或翻译效率的能力的化学结构。例如, RNA可以具有5'和/或3'UTR。3'UTR的长度可以例如超过100个核苷酸。在一些实施例中,3'UTR序列介于约100至约5000个核苷酸之间,如约100至约500个核苷酸。在一些实施例中,5'UTR的长度为零至约3000个核苷酸,如约10至约100个核苷酸。

[0297] 5'和3'UTR可以是所关注的基因的天然存在的内源性5'和3'UTR。可替代地,可以通过将UTR序列掺入到正向引物和反向引物中或通过模板的任何其它修饰来添加对于所关注的基因来说不是内源性的UTR序列。使用对于所关注的基因来说不是内源性的UTR序列可以用于改变RNA的稳定性和/或翻译效率。例如,众所周知,3'UTR序列中富含AU的元件可以降低mRNA的稳定性。因此,基于本领域众所周知的UTR的特性,可以选择或设计3'UTR以增加转录的RNA的稳定性。

[0298] 在一些实施例中,5'UTR含有Kozak序列,其在一些实施例中为内源性基因的Kozak序列。Kozak序列可以提高一些RNA转录物的翻译效率,但似乎并不是所有RNA都需要实现高效翻译。在其它实施例中,5'UTR可以源自RNA基因组在细胞中稳定的RNA病毒。在其它实施例中,可以在3'或5'UTR中使用各种核苷酸类似物以阻止mRNA的核酸外切酶降解。

[0299] 在一些实施例中,mRNA在确定核糖体结合、翻译起始和mRNA在细胞中的稳定性的5'端、3'poly(A)尾或其组合上具有帽。

[0300] 5'帽提供RNA分子的稳定性。5'帽可以例如是 $m^7G(5')ppp(5')G$ 、 $m^7G(5')ppp(5')A$ 、 $G(5')ppp(5')G$ 或 $G(5')ppp(5')A$ 帽类似物,其全部可商购获得。5'帽还可以是抗逆帽类似物(ARCA)(Stepinski等人,《RNA》,7:1468-95(2001))或任何其它合适的类似物。5'帽可以使用本领域已知的技术掺入(Cougot等人,《生物化学科学趋势(Trends in Biochem.Sci.)》,29:436-444(2001);Stepinski等人,《RNA》,7:1468-95(2001);Elango等人,《生物化学和生物物理研究通讯(Biochim.Biophys.Res.Commun.)》,330:958-966(2005))。

[0301] RNA还可以含有内部核糖体进入位点(IRES)序列。IRES序列可以是任何病毒、染色体或人工设计的序列,其起始与mRNA的帽非依赖性核糖体结合并且促进翻译的起始。

[0302] 通常,poly(A)尾的长度与转录的RNA的稳定性正相关。在一个实施例中,poly(A)尾介于100至5000个腺苷之间(例如,约50至约300个腺苷)。

[0303] 另外地,不同化学基团与3'端的附接可以增加mRNA稳定性。此类附接可以含有经修饰的/人工核苷酸、适体和其它化合物。例如,可以使用poly(A)聚合酶将ATP类似物掺入到poly(A)尾中。ATP类似物可以进一步增加RNA的稳定性。合适的ATP类似物包含但不限于虫草素(cordycepin)和8-氮杂腺苷。

[0304] 在一些实施例中,mRNA包括一个或多个经修饰的碱基,如US 8,691,966中所以描述的经修饰的碱基,所述文献通过引用整体并入本文。在一些实施例中,mRNA包括经修饰的尿苷和/或经修饰的胞嘧啶。例如,至少约50%或所有尿苷可以是经修饰的尿苷,如假尿苷

或N1-甲基-假尿苷,和/或5-甲氧基-尿苷。在一些实施例中,基本上所有尿苷被假尿苷或N1-甲基-假尿苷替代。与mRNA一起使用的其它经修饰的碱基包含5-甲基胞苷和N6-甲基腺苷。

[0305] 2. 货物的序列

[0306] a. 所关注的多肽

[0307] 货物可以编码一种或多种蛋白质。货物可以是单顺反子或多顺反子的多核苷酸。在一些实施例中,多核苷酸是多基因的。多核苷酸可以是例如mRNA或表达构建体,如载体。

[0308] 货物可以编码一种或多种所关注的多肽。多肽可以是任何多肽。例如,由多核苷酸编码的多肽可以是向生物体提供治疗或预防作用或者可以用于诊断生物体中的疾病或病症的多肽。例如,为了治疗癌症、自身免疫性疾病、寄生虫、病毒、细菌、真菌或其它感染,待表达的多核苷酸可以编码充当免疫系统细胞的配体或受体的多肽,或者可以起到刺激或抑制生物体的免疫系统的作用。

[0309] 在一些实施例中,多核苷酸补充或替换生物体中有缺陷的多核苷酸。

[0310] 在特定实施例中,多核苷酸编码肌营养不良蛋白、肌营养相关蛋白或其组合。此类组合物可以以有效量施用以治疗来自营养不良,特别是肌肉营养不良,例如杜氏肌肉营养不良(Duchenne's muscular dystrophy)的受试者。

[0311] 在另一个特定实施例中,多核苷酸编码抗原,例如可以用于疫苗调配物和相关方法的抗原。在一特定实施例中,多核苷酸编码病毒抗原,例如SARS-CoV-2抗原。因此,提供了其用于预防和治疗包含COVID19在内的SARS-CoV-2病毒和病毒感染和其相关疾病的组合物和使用方法。在一些实施例中,核酸编码流感抗原。

[0312] 在一些实施例中,多核苷酸包含可选择标志物,例如在真核细胞中有效的可选择标志物,如抗药性选择标志物。此可选择标志物基因可以编码在选择性培养基中生长的经转化的宿主细胞的存活或生长所必需的因子。典型的选择基因编码赋予对抗生素或其它毒素的抗性的蛋白质,所述其它毒素例如氨苄青霉素(ampicillin)、新霉素(neomycin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、卡那霉素(kanamycin)、庆大霉素(gentamycin)、吉欧霉素(Zeocin)或四环素(tetracycline)、补体营养缺陷或供应从介质中保留的关键营养素。

[0313] 在一些实施例中,多核苷酸包含报告基因。报告基因通常是在宿主细胞中不存在或表达的基因。报告基因通常编码提供一些表型变化或酶特性的蛋白质。此类基因的实例在Weising等人,《遗传学年鉴(Ann.Rev.Genetics)》,22,421(1988)中有所提供。优选的报告基因包含葡萄糖醛酸酶(GUS)基因和GFP基因。

[0314] b. 功能性核酸

[0315] 货物可以是或编码功能性核酸。功能性核酸是具有特异性功能的核酸分子,如结合靶分子或催化特异性反应。如下文更详细地讨论的,功能性核酸分子可以分为以下非限制性类别:反义分子、siRNA、miRNA、适体、核酶、RNAi和外部向导序列,以及环状二核苷酸。功能性核酸分子可以充当具有靶分子所拥有的特异性活性的效应子、抑制剂、调节剂和刺激剂,或者功能性核酸分子可以拥有独立于任何其它分子的从头活性。

[0316] 功能性核酸分子可以与如DNA、RNA、多肽或碳水化合物链的任何大分子相互作用。基于靶分子与功能性核酸分子之间的序列同源性,通常将功能性核酸设计为与其它核酸相

互作用。在其它情况下,功能性核酸分子与靶分子之间的特异性识别并非基于功能性核酸分子与靶分子之间的序列同源性,而是基于三级结构的形成,所述三级结构允许发生特异性识别。

[0317] 因此,组合物可以包含被设计成减少基因或其基因产物的表达或丰度的一种或多种功能性核酸。例如,功能性核酸或多肽可以被设计成靶向和减少或抑制mRNA的表达或翻译;或减少或抑制表达、减少活性或增加蛋白质的降解。在一些实施例中,组合物包含适合于功能性核酸的体内表达的载体。

[0318] i. 反义

[0319] 功能性核酸可以是或编码反义分子。反义分子被设计成通过经典或非经典碱基配对与靶核酸分子相互作用。在一些实施例中,反义分子与靶分子的相互作用被设计成通过例如RNA酶H介导的RNA-DNA杂合降解来促进对靶分子的破坏。可替代地,反义分子被设计成中断通常会在靶分子上发生的加工功能,如转录、剪接、翻译或复制。可以基于靶分子的序列来设计反义分子。存在许多用于通过找到靶分子的最易接近的区来优化反义效率的方法。优选的是反义分子以小于或等于 $10^{-6}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-10}$ 或 $10^{-12}$ 的解离常数( $K_d$ )结合靶分子。

[0320] ii. RNA干扰

[0321] 在一些实施例中,功能性核酸通过RNA干扰诱导基因沉默。还可以通过RNA干扰(RNAi)以高度特异性的方式有效地沉默基因表达。最初通过添加双链RNA(dsRNA)观察到此沉默(Fire等人,(1998)《自然》,391:806-11;Napoli等人,(1990)《植物细胞(Plant Cell)》2:279-89;Hannon,(2002)《自然》,418:244-51)。一旦dsRNA进入细胞,就会被RNA酶III样酶,Dicer切割成双链小干扰RNA(siRNA),其长度为21-23个核苷酸并且在3'端含有2个核苷酸突出端(Elbashir等人,(2001)《基因和发展(Genes Dev.)》,15:188-200;Bernstein等人,(2001)《自然》,409:363-6;Hammond等人,(2000)《自然》,404:293-6)。在ATP依赖性步骤中,siRNA整合到将siRNA引导至靶RNA序列的通常被称为RNAi诱导的沉默复合物(RISC)的多亚基蛋白复合物中(Nykanen等人,(2001)《细胞(Cell)》,107:309-21)。在一些点处,siRNA双链体解开,并且反义链看起来保持与RISC结合,并且通过核酸内切酶和核酸外切酶的组合指导互补mRNA序列的降解(Martinez等人,(2002)《细胞》,110:563-74)。然而,siRNA或siRNA的作用或其用途不限于任何类型的机制。

[0322] 短干扰RNA(siRNA)包括可以诱导序列特异性转录后基因沉默的双链RNA,由此减少或甚至抑制基因表达。在一个实例中,siRNA触发同源RNA分子,如mRNA的特异性降解。例如,WO 02/44321公开了当与3'突出端碱基配对时能够对靶mRNA进行序列特异性降解的siRNA,通过引用并入本文。

[0323] 序列特异性基因沉默可以在哺乳动物细胞中使用模仿由酶dicer产生的siRNA的合成的短双链RNA来实现(Elbashir等人,(2001)《自然》,411:494-498)(Ui-Tei等人,(2000)《FEBS快报》479:79-82)。siRNA可以化学或体外合成或者可以在细胞内被加工成siRNA的短双链发夹样RNA(shRNA)的结果。通常使用算法和常规DNA/RNA合成仪来设计合成siRNA。供应商包含Ambion公司(Ambion)(得克萨斯奥斯汀(Austin,Texas))、ChemGenes公司(ChemGenes)(马萨诸塞州亚什兰(Ashland,Massachusetts))、Dharmacon公司(Dharmacon)(科罗拉多州拉斐特(Lafayette,Colorado))、格伦研究公司(Glen Research)(弗吉尼亚州斯特林(Sterling, Virginia))、MWB生物技术公司(MWB Biotech)(德国埃斯伯

斯贝格 (Esbersberg, Germany)、Proligo公司 (Proligo) (科罗拉多州博尔德 (Boulder, Colorado)) 和凯杰公司 (Qiagen) (荷兰温托 (Vento, The Netherlands))。siRNA还可以使用如Ambion公司的SILENCER® siRNA构建试剂盒等试剂盒在体外合成。

[0324] 由载体产生siRNA更常见的是通过转录短发夹RNA酶 (shRNA) 完成的。可获得用于生产具有shRNA的载体的试剂盒, 如例如, Imgenex公司 (Imgenex) 的GENESUPPRESSOR™构建试剂盒和英杰公司 (Invitrogen) 的BLOCK-IT™诱导型RNAi质粒和慢病毒载体。

[0325] 在一些实施例中, 功能性核酸是siRNA、shRNA、miRNA。在一些实施例中, 组合物包含表达功能性核酸的载体。

[0326] iii. 适体

[0327] 功能性核酸可以是或编码适体。适体是优选地以特异性方式与靶分子相互作用的分子。适体通常是长度范围为约15至约50个碱基的小核酸, 所述小核酸折叠成限定的二级结构和三级结构, 如茎环或G-四联体。适体可以结合如ATP和茶碱等小分子以及如逆转录酶和凝血酶等大分子。适体可以与 $K_d$ 小于 $10^{-12}$ M的靶分子非常紧密地结合。优选的是, 适体与 $K_d$ 小于 $10^{-6}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-10}$ 或 $10^{-12}$ 的靶分子结合。

[0328] 适体可以以非常高的特异性程度结合靶分子。例如, 已经分离出在分子上仅在单个位置处不同的靶分子与另一个分子之间的结合亲和力差异大于10,000倍的适体。优选的是, 适体与靶分子的 $K_d$ 低于与本底结合分子的 $K_d$ 至少10、100、1000、10,000或100,000倍。优选的是, 当比较如多肽等分子时, 本底分子是不同的多肽。

[0329] iv. 核酶

[0330] 功能性核酸可以是或编码核酶。核酶是能够在分子内或分子间催化化学反应的核酸分子。优选的是核酶催化分子间反应。存在许多不同类型的核酶催化核酸酶或核酸聚合酶类型反应, 其基于天然系统中发现的核酶, 如锤头型核酶。还存在许多核酶在天然系统中并未发现, 但所述核酶已经被工程化成从头催化特异性反应。优选的核酶切割RNA或DNA底物并且更优选地切割RNA底物。核酶通常通过识别靶底物和将靶底物与随后的切割结合来切割核酸底物。这种识别经常主要基于典型或非典型的碱基对相互作用。这种特性使核酶成为用于靶向核酸的特异性切割的特别好的候选物, 因为对靶底物的识别是基于靶底物序列。

[0331] v. 外部向导序列

[0332] 功能性核酸可以是或编码外部向导序列。外部向导序列 (EGS) 是结合形成复合物的靶核酸分子的分子, 所述复合物通过然后切割靶分子的RNA酶P识别。可以将EGS设计成特异性地靶向所选择的RNA分子。RNA酶P辅助加工细胞内的转移RNA (tRNA)。可以招募细菌RNA酶P, 以通过使用使靶RNA:EGS复合物模仿天然tRNA底物的EGS来切割几乎任何RNA序列。类似地, 可以利用RNA的真核EGS/RNA酶P定向切割来切割真核细胞内的所期望的靶标。如何制备和使用EGS分子以便于切割各种不同的靶分子的代表性实例是本领域已知的。

[0333] 制备和使用供功能性核酸在体内表达的载体的方法是本领域已知的, 所述功能性核酸如反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、miRNA、EGS、核酶和适体。

[0334] vi. 环状二核苷酸

[0335] 功能性核酸可以是或编码环状二核苷酸。环状二核苷酸直接与STING衔接子蛋白结合, 从而导致IFN- $\beta$ 的产生 (Zhang等人, 《分子细胞 (Mol Cell.)》, 51 (2) : 226-35 (2013))

.doi:10.1016/j.molcel.2013.05.022.)。若干经典和非经典二核苷酸是本领域已知的,并且包含但不限于2'3'-cGAMP、2'3'-cGAMP、3'3'-cGAMP、c-二-AMP、c-二-GMP、cAIMP (CL592)、cAIMP二氟 (CL614)、cAIM (PS) 2二氟 (Rp/Sp) (CL656)、2'2'-cGAMP、2'3'-cGAM (PS) 2 (Rp/Sp)、3'3'-cGAMP氟化、c-二-AMP氟化、2'3'-c-二-AMP、2'3'-c-二-AM (PS) 2 (Rp, Rp)、2'3'-c-二-AM (PS) 2 (Rp, Rp)、c-二-GMP氟化、2'3'-c-二-GMP、c-二-IMP、DMXAA。

[0336] vii. 免疫刺激寡核苷酸

[0337] 在一些实施例中,功能性核酸可以是或编码寡核苷酸配体。实例包含但不限于模式识别受体 (PRR) 配体。

[0338] PRR的实例包含在先天性免疫应答的起始中发挥作用,并且还影响稍后的和更进一步的抗原特异性适应性免疫应答的信号传导分子的Toll样家族。因此,寡核苷酸可以充当Toll样家族信号传导分子,如Toll样受体9 (TLR9) 的配体。

[0339] 例如,可以通过人的浆细胞样树突状细胞和B细胞上的TLR9检测未甲基化的CpG位点 (Zaida等人,《感染与免疫 (Infection and Immunity)》,76 (5):2123-2129, (2008))。因此,寡核苷酸的序列可以包含一个或多个未甲基化的胞嘧啶-鸟嘌呤 (CG或CpG,可互换使用) 二核苷酸基序。“p”是指DNA的磷酸二酯主链,然而,在一些实施例中,包含CG的寡核苷酸可以具有经修饰的主链,例如硫代磷酸酯 (PS) 主链。

[0340] 在一些实施例中,寡核苷酸可以含有连续布置或由中间核苷酸分离的多于一个CG二核苷酸。CpG基序可以处于寡核苷酸序列的内部。许多核苷酸序列刺激TLR9,其中CG二核苷酸的数量和位置以及侧接CG二聚体的精确碱基序列变化。

[0341] 通常,基于其序列、二级结构和对人外周血单核细胞 (PBMC) 的作用对CG ODN进行分类。五个类别是类别A (D型)、类别B (K型)、类别C、类别P和类别S (Vollmer, J&Krieg, AM, 《先进药物递送综述 (Advanced drug delivery reviews)》61 (3):195-204 (2009),所述文献通过引用并入本文)。CG ODN可以刺激I型干扰素 (例如IFN $\alpha$ ) 的产生,并且诱导树突状细胞 (DC) 的成熟。一些类别的ODN还是通过间接细胞因子信号传导的自然杀伤 (NK) 细胞的强激活剂。一些类别是人B细胞和单核细胞成熟的强刺激物 (Weiner, GL, 《美国国家科学院院刊 (PNAS USA)》94 (20):10833-7 (1997); Dalpke, AH, 《免疫学 (Immunology)》106 (1):102-12 (2002); Hartmann, G, 《免疫学杂志》164 (3):1617-2 (2000),所述文献中的每个文献通过引用并入本文)。

[0342] 其它PRR Toll样受体包含可以分别识别双链RNA、单链和短双链RNA的TLR3和TLR7,以及为最众所周知的胞质溶胶中的RNA感测受体的维甲酸诱导型基因I (RIG-I) 样受体,即RIG-I和黑色素瘤分化相关基因5 (MDA5)。

[0343] RIG-I (维甲酸诱导蛋白1,也称为Ddx58) 和MDA-5 (黑色素瘤分化相关基因5,也称为Ifih1或Helicard) 是属于RIG-I样受体 (RLR) 家族并且对于宿主抗病毒应答至关重要的细胞质RNA解旋酶。

[0344] RIG-I和MDA-5感测双链RNA (dsRNA)、RNA病毒的复制中间体,以及通过线粒体抗病毒信号传导蛋白MAVS (也称为IPS-1、VISA或Cardif) 的信号,从而导致I型干扰素 (IFN- $\alpha$ 和IFN- $\beta$ ) 的产生。

[0345] RIG-I检测表现出未加帽的5'-二/三磷酸端和短平端双链部分的病毒RNA,这两个基本特征有助于与自身RNA区分。MDA-5生理配体的特征尚未完全表征。然而,承认RIG-I和

MDA-5对dsRNA的长度表现出不同的依赖性:RIG-I选择性地结合短dsRNA,而MDA-5选择性地结合长dsRNA。与此一致,RIG-I和MDA-5以不同的长度偏好结合Poly(I:C),即合成dsRNA类似物。

[0346] 在一些情况下,RIG-I还可以间接感测dsDNA。病毒dsDNA可以通过RNA聚合酶III转录成具有5'-三磷酸部分的dsRNA。Poly(dA:dT),即B型DNA的合成类似物,因此构成另一种RIG-I配体。

[0347] 示例性RIG-I配体包含但不限于5' ppp-dsRNA,即RIG-I的特异性激动剂;3p-hpRNA,即RIG-I的特异性激动剂;取决于poly(I:C)的大小被RIG-I和/或MDA-5识别的Poly(I:C)/LyoVec复合物;被RIG-I间接识别的Poly(dA:dT)/LyoVec复合物。

[0348] 在一些实施例中,寡核苷酸含有用于TLR3、TLR7、TLR8、TLR9或RIG-I样受体的功能性配体或其组合。

[0349] 免疫刺激寡核苷酸的实例及其制备方法在本领域中是已知的并且可商购获得,参见例如Bodera, P.《炎症和过敏药物发现的最新专利(Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.)》5(1):87-93(2011),所述文献通过引用并入本文。

[0350] 以下实例显示3E10-D31N+Poly(I:C)增强黑色素瘤细胞死亡。因此是一些实施例,使用免疫刺激寡核苷酸,如Poly(I:C)来治疗癌症,如黑色素瘤。

[0351] 3. 货物的组成

[0352] 所公开的核酸货物可以是或包含DNA或RNA核苷酸,其通常包含杂环碱基(核酸碱基)、与杂环碱基附接的糖部分和使糖部分的羟基官能团酯化的磷酸部分。主要的天然存在的主要核苷酸包含作为杂环碱基的尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤以及由磷酸二酯键连接的核酸糖或脱氧核糖。

[0353] 在一些实施例中,货物包含已经化学修饰的以相对于DNA或RNA配对物改善靶受体的稳定性、半衰期或特异性或亲和力的核苷酸类似物或由所述核苷酸类似物构成。化学修饰包含核碱基、糖部分、核苷酸键或其组合的化学修饰。如本文所使用的,“经修饰的核苷酸”或“经化学修饰的核苷酸”限定了化学修饰杂环碱基、糖部分或磷酸部分成分中的一个或多个的核苷酸。在一些实施例中,与相同核碱基序列的DNA或RNA相比,经修饰的核苷酸的电荷减少。例如,寡核苷酸可以具有低负电荷、无电荷或正电荷。

[0354] 通常,核苷类似物支持能够通过Watson-Crick碱基配对与标准多核苷酸碱基进行氢键合的碱基,其中类似物主链以允许在寡核苷酸类似物分子与标准多核苷酸(例如,单链RNA或单链DNA)碱基之间以序列特异性方式进行此类氢键合的方式呈递碱基。在一些实施例中,类似物具有基本上不带电荷的含磷主链。

[0355] a. 杂环碱基

[0356] 主要的天然存在的核苷酸包含作为杂环碱基的尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤。货物可以包含对其核碱基成分的化学修饰。杂环碱基或杂环碱基类似物的化学修饰可以有效地增加结合靶序列的结合亲和力或稳定性。经化学修饰的杂环碱基包含但不限于肌苷、5-(1-丙炔基)尿嘧啶(pU)、5-(1-丙炔基)胞嘧啶(pC)、5-甲基胞嘧啶、8-氧代-腺嘌呤、假胞嘧啶、假异胞嘧啶、5和2-氨基-5-(2'-脱氧-β-D-呋喃核糖基)吡啶(2-氨基吡啶)以及各种吡咯并-和吡唑并嘧啶衍生物。

[0357] b. 糖修饰

[0358] 货物还可以含有具有经修饰的糖部分或糖部分类似物的核苷酸。糖部分修饰包含但不限于2'-O-氨基乙氧基、2'-O-氨基乙基(2'-OAE)、2'-O-甲氧基、2'-O-甲基、2-胍基乙基(2'-OGE)、2'-O、4'-C-亚甲基(LNA)、2'-O-(甲氧基乙基)(2'-OME)和2'-O-(N-(甲基)乙酰胺基)(2'-OMA)。2'-O-氨基乙基糖部分取代是特别优选的,因为其中性pH下质子化并且因此抑制TF0与靶双链体之间的电荷排斥。这种修饰使核酸糖或脱氧核糖的C3'-内构象稳定,并且还与双链体的嘌呤链中的i-1磷酸酯形成桥。

[0359] 在一些实施例中,核酸是吗啉代寡核苷酸。吗啉代寡核苷酸通常由含有嘌呤或嘧啶碱基配对部分的两个以上吗啉代单体构成,所述嘌呤或嘧啶碱基配对部分通过碱基特异性氢键合与多核苷酸中的碱基有效结合,其通过一至三个原子长的含磷键连接在一起,从而将一个单体的吗啉代氮与相邻单体的5'环外碳连接。嘌呤或嘧啶碱基配对部分通常是腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶或胸腺嘧啶。吗啉代寡聚物的合成、结构和结合特性在美国专利第5,698,685号、第5,217,866号、第5,142,047号、第5,034,506号、第5,166,315号、第5,521,063号和第5,506,337中有所描述。

[0360] 基于吗啉代的亚基的重要特性通常包含:通过稳定的不带电荷的主链键以寡聚形式连接的能力;支持核苷酸碱基(例如腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸苷、尿嘧啶或肌苷)的能力,使得形成的聚合物可以与具有高 $T_m$ 的互补碱基靶核酸(包含靶RNA)杂交,甚至与短至10-14个碱基的寡聚物杂交;寡聚物主动转运到哺乳动物细胞中的能力;以及寡聚物:RNA异源双链体抵抗RNA酶降解的能力。

[0361] 在一些实施例中,如上文所描述的,寡核苷酸采用通过不带电荷的键连接的携带碱基配对部分的基于吗啉代的亚基。

#### [0362] c. 核苷酸间键

[0363] 寡核苷酸通过核苷酸间键连接,所述核苷酸间键是指两个核苷部分之间的化学键。对DNA或RNA寡核苷酸的磷酸主链的修饰可以增加结合亲和力或稳定性寡核苷酸,或降低寡核苷酸核酸酶消化的易感性。阳离子修饰包含但不限于二乙基-亚乙基二酰胺(DEED)或二甲基-氨基丙胺(DMAP),其可能由于降低寡核苷酸与靶标之间的静电排斥而特别有用。磷酸主链的修饰还可以包含硫原子取代磷酸二酯键中的非桥氧之一。此取代产生硫代磷酸酯核苷间键来代替磷酸二酯键。含有硫代磷酸酯核苷间键的寡核苷酸已示出在体内更稳定。

[0364] 如上文所讨论的,具有减少的电荷的经修饰的核苷酸的实例包含经修饰的核苷酸间键,如具有非手性和不带电荷的亚基间键的磷酸类似物(例如,Sterchak, E.P. 等人,《有机化学(Organic.Chem.)》,52:4202, (1987)),以及具有非手性亚基间键的不带电荷的基于吗啉代的聚合物(参见例如,美国专利第5,034,506号)。一些核苷酸间键类似物包含吗啉代、乙缩醛和聚酰胺连接的杂环。

[0365] 在另一个实施例中,货物由锁核酸构成。锁核酸(LNA)是经修饰的RNA核苷酸(参见例如,Braasch等人,《化学与生物学(Chem.Biol.)》,8(1):1-7(2001))。LNA与DNA形成杂交体,这些杂交体比DNA/DNA杂交体更稳定,性质类似于肽核酸(PNA)/DNA杂交体的性质。因此,可以像使用PNA分子一样使用LNA。在一些实施例中,可以通过向其添加正电荷来提高LNA结合效率。商业核酸合成仪和标准亚磷酰胺化学反应可以用于制备LNA。

[0366] 在一些实施例中,货物由肽核酸构成。肽核酸(PNA)是合成DNA模拟物,寡核苷酸的

磷酸主链通过重复N-(2-氨基乙基)-甘氨酸单元而被整体替换,并且磷酸二酯键通常被肽键替换。各种杂环碱基通过亚甲基羰基键与主链连接。PNA维持杂环碱基的与常规DNA寡核苷酸类似的间隔,但是为非手性和中性电荷的分子。肽核酸由肽核酸单体构成。

[0367] 其它主链修饰包含肽和氨基酸变型和修饰。因此,寡核苷酸如PNA的主链成分可以是肽键,或者可替代地其可以是非肽肽键。实例包含乙酰基帽、如8-氨基-3,6-二氧杂辛酸等氨基间隔子(在本文中被称为0-接头),如果正电荷是PNA等中所期望的,则如赖氨酸等氨基酸是特别有用的。用于化学组装PNA的方法是众所周知的。参见例如美国专利第5,539,082号、第5,527,675号、第5,623,049号、第5,714,331号、第5,736,336号、第5,773,571号和第5,786,571号。

[0368] 货物任选地包含在任一或两个末端处的一个或多个末端残基或修饰,以增加寡核苷酸对其靶标的稳定性和/或亲和力。常用的带正电荷的部分包含氨基酸赖氨酸和精氨酸,尽管其它带正电荷的部分也可以是有用的。可以使用丙胺基团进一步修饰货物以封端,从而防止降解。用于3'或5'加帽寡核苷酸的程序在本领域是众所周知的。

[0369] 在一些实施例中,核酸可以是单链的或双链的。

[0370] d. 微调结合

[0371] 下面的实例显示,各种3E10结合蛋白可以显示出与一些核苷酸的增强结合,最具体地,与由胸腺嘧啶或鸟嘌呤组成的序列的结合存在显著增加,并且与腺苷的结合通常减少。参见例如,图17A-17D和18A-18B。

[0372] 因此,可以修饰货物的序列以考虑这些特性,并微调货物与3E10结合蛋白之间的结合强度。

[0373] 例如,所公开的货物中的任何货物可以包含polyA、polyT、polyG、polyT、polyU或腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)、尿嘧啶(U)、鸟嘌呤(G)或肌苷(I)中的2、3、4或更多者的组合或由其组成。此类序列可以是添加到货物中的合成、非编码序列,例如,增加或减少与3E10结合蛋白的结合。此类序列并且可以但不一定在核酸货物的5'或3'端处。货物可以是单链或双链DNA或RNA。

[0374] 在一些实施例中,添加多核苷酸序列以增加3E10结合蛋白的结合。在一些实例中,添加的序列由polyG、polyT、polyU或polyI或胸腺嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶和/或肌苷中的两者或更多者的组合组成。

[0375] 在一些实施例中,添加多核苷酸序列以减少结合。在一些实施例中,添加的序列由polyA或腺嘌呤另一种核苷酸,例如胞嘧啶的组合组成。

[0376] 另外地或可替代地,在合理设计货物的核酸序列时,可以使用优先增加结合(例如,优选胸腺嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶和/或肌苷)或减少结合(例如,优选腺嘌呤和/或胞嘧啶)的密码子优化来考虑这些结合性质。

[0377] C. 药物组合物

[0378] 组合物可以与药学上可接受的载体组合治疗地使用。

[0379] 包含与3E10抗体复合的核酸货物的组合物优选地与合适的药物载体组合用于治疗性用途。此类组合物包含有效量的组合物以及药学上可接受的载体或赋形剂。

[0380] 组合物可以是用于在合适的药物载体中局部、局部性地或全身地施用的调配物。E.W.Martin的《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第15版(马克

出版公司(Mark Publishing Company),1975)公开了典型的载体和制备方法。复合物还可以被包封在由可生物降解或不可生物降解的聚合物或蛋白质或脂质体形成的合适的生物相容性颗粒中,以靶向细胞。此类系统是本领域技术人员众所周知的。在一些实施例中,复合物被包封在纳米颗粒中。在一些实施例中,本文所公开的用于递送的复合物不包封在脂质体或其它聚合颗粒或脂质颗粒中。

[0381] 用于注射的调配物可以以单位剂型存在,例如在安瓿或在多剂量容器中,任选地添加有防腐剂。组合物可以采取如无菌水溶液或非水溶液、悬浮液和乳液等形式,在某些实施例中,这些组合物可以与受试者的血液等渗。非水溶剂的实例是聚丙二醇;聚乙二醇;植物油,如橄榄油、芝麻油、椰子油、花生油、落花生油、矿物油;可注射的有机酯,如油酸乙酯;或固定油,包含合成的甘油单酯或甘油二酯。水性载体包含水、醇溶液/水溶液、乳液或悬浮液,包含盐水和缓冲介质。肠胃外媒剂包含氯化钠溶液、1,3-丁二醇、林格氏右旋糖(Ringer's dextrose)、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏油或固定油。静脉内媒剂包含流体和营养补充剂以及电解质补充剂(如基于林格氏右旋糖的那些)。材料可以在溶液、乳液或悬浮液中(例如,并入到颗粒、脂质体或细胞中)。通常,在调配物中使用适当量的药学上可接受的盐以使得调配物是等渗的。通常1-5%的量的海藻糖可以被添加到药物组合物中。溶液的pH优选地为约5至约8,并且更优选地约7至约7.5。

[0382] 药物组合物可以包含载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂和表面活性剂。可以在《雷明顿药物科学》,宾夕法尼亚州伊斯顿的麦克出版公司(Mack Publishing Co.,Easton, Pa.)中找到载体调配物。本领域技术人员可以容易地测定用于制备和调配组合物的各种参数,而无需过度实验。

[0383] 单独或与其它合适的组分组合的组合物也可以制成气溶胶调配物(即,所述组合物可以被“雾化”)以通过吸入施用。气溶胶调配物可以被放置到加压的可接受的推进剂,如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气和空气中。为了通过吸入进行施用,使用合适的推进剂,从加压包或喷雾器以气溶胶喷雾呈现的形式递送化合物。

[0384] 在一些实施例中,包含具有调配物成分,如盐、载体、缓冲剂、乳化剂、稀释剂、赋形剂、螯合剂、防腐剂、增溶剂或稳定剂的药学上可接受的载体。

[0385] 可以使用侵入性装置,如血管或导尿管并且使用介入装置,如具有药物传递能力并被配置为扩张装置或支架移植物的支架以实现组织特异性摄取药剂和/或核苷酸递送系统的方式递送组合物。

[0386] 可以使用可生物降解的植入物通过扩散或通过聚合物基质的降解来递送调配物。在某些实施例中,调配物的施用可以被设计成在某个时间段,例如,数小时、数天、数周、数月或数年内连续暴露组合物。这可以通过例如重复施用调配物或通过持续或控制释放递送系统来完成,在所述递送系统中,在不重复施用的情况下在延长的时间段内递送组合物。

[0387] 复合物包含核酸货物和抗体,并且其组合物可以调配用于肺或粘膜施用。施用可以包含将组合物递送到肺、鼻、口腔(舌下、颊)、阴道或直肠粘膜。如本文所使用的,术语气溶胶是指颗粒的细水雾的任何制剂,所述制剂可以呈溶液或悬浮液,不论其是否使用推进剂来产生。可以使用标准技术,如超声处理或高压处理产生气溶胶。

[0388] 为了通过上呼吸道施用,可以将调配物调配成溶液,例如,水或等渗盐水、缓冲的或非缓冲的或作为悬浮液,以便以滴剂或喷雾剂的形式鼻内施用。优选地,此类溶液或悬浮

液相对于鼻分泌物是等渗的并且具有约相同的pH,例如在约pH 4.0到约pH 7.4或pH 6.0到pH 7.0的范围内。缓冲液应该是生理相容的,并且仅通过实例的方式包含磷酸盐缓冲液。

[0389] 在一些实施例中,特别是用于在体内靶向T细胞,例如用于在体内产生CAR T细胞或抗原特异性T细胞的那些,可以靶向免疫细胞或T细胞标志物,如CD3、CD7或CD8,或靶组织如肝的标志物。例如,抗CD8抗体和抗CD3 Fab片段两者均已用于在体内靶向T细胞(Pfeiffer等人,《EMBO分子医学》,10(11)(2018). pii:e9158. doi:10.15252/emmm.201809158., Smith等人,《自然纳米技术》,12(8):813-820(2017). Doi:10.1038/nnano.2017.57)。因此,在一些实施例中,颗粒或其它递送媒介剂包含对CD3、CD7、CD8具有特异性的靶向部分,或另一免疫细胞(例如T细胞)标志物,或特异性组织如胸腺、脾或肝的标志物。结合部分可以是例如抗体或其抗原结合片段。

[0390] 靶向部分可以与复合物或其其它递送媒介剂直接或间接缔合、连接、缀合或以其它方式附接。靶向分子可以是与靶向细胞的表面上的受体或其它分子结合的蛋白质、肽、核酸分子、糖或多糖。可以通过选择靶向分子来调节与移植物结合的特异性程度和亲合力。

[0391] 部分的实例包含例如靶向部分,所述靶向部分提供分子到特异性细胞的递送,例如针对造血干细胞、CD34<sup>+</sup>细胞、T细胞或任何其它优选细胞类型的抗体以及在优选的细胞类型上表达的受体和配体。优选地,这些部分靶向造血干细胞。靶向细胞外基质(“ECM”)的分子的实例包含糖胺聚糖(“GAG”)和胶原蛋白。

[0392] 直接或间接附接到复合物的其它有用的配体包含病原体相关分子模式(PAMP)。PAMP靶向细胞或组织的表面上的Toll样受体(TLR),或在内部向细胞或组织发出信号,由此潜在地增加摄取。与颗粒表面缀合或共包封的PAMP可以包含:未甲基化的CpG DNA(细菌)、双链RNA(病毒)、脂多糖(细菌)、肽聚糖(细菌)、脂阿拉伯甘露聚糖(细菌)、酵母聚糖(酵母)、支原体脂蛋白如MALP-2(细菌)、鞭毛蛋白(细菌)、聚(肌苷-胞苷)酸(细菌)、脂磷壁酸(细菌)或咪唑并喹啉(合成的)。

[0393] 凝集素可以直接或间接共价附接到复合物以使其对粘蛋白和粘膜细胞层具有靶特异性。

[0394] 靶向部分的选择将取决于纳米颗粒组合物和要靶向的细胞或组织的施用方法。靶向分子通常可以增加颗粒对细胞或组织的结合亲和力,或者可以将纳米颗粒靶向到器官中的特定组织或组织中的特定细胞类型。在一些实施例中,靶向部分靶向胸腺、脾或癌细胞。

[0395] III. 使用方法

[0396] 提供了用于使用3E10来增强核酸的递送的组合物和方法。通常,首先使有效量的3E10抗体与核酸货物接触,所述核酸货物期望被递送到细胞中。例如,核酸货物和抗体可以在溶液中混合持续足够的时间,以使核酸货物和抗体形成复合物。接下来,使混合物与细胞接触。在其它实施例中,将货物和抗体添加到含有或以其它方式浴洗细胞的溶液中,并且在细胞存在的情况下形成复合物。可以使复合物与细胞在体外、离体或在体内(例如,通过将复合物递送至生物体)接触。因此,在一些实施例中,将复合物的溶液添加到培养的细胞中或注射到待处理的动物中。

[0397] 据信,抗体帮助将核酸递送到细胞中,并且在一些实施例中,递送到细胞核中。处理可以是例如通过简单的肠胃外施用,如IV或皮下或肌肉内施用将抗体和核酸货物的混合物向有需要的受试者施用。

[0398] 组合物和方法可以包含由RNA、DNA、PNA或其它经修饰的核酸或其组合形成的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个不同的核酸构建体。

[0399] 有效量或治疗有效量的组合物可以是足以治疗、抑制或减轻疾病或病症的一种或多种症状或以其它方式提供所期望的药理学和/或生理学效应,例如,降低、抑制或逆转以疾病或病症为基础的病理生理学机制中的一种或多种病理生理学机制的剂量。

[0400] 有效量还可以是相对于在不存在抗体的情况下施用货物而有效增加核酸货物的递送速率、数量和/或质量的量。组合物的调配物制备为适合施用的模式。药学上可接受的载体部分地由所施用的特定组合物以及通过用于施用组合物的特定方法来测定。因此,存在含有复合物的药物组合物的多种合适的调配物。精确剂量将根据各种因素,如受试者依赖性变量(例如,年龄、免疫系统健康状况、临床症状等)而变化。

[0401] 在一些实施例中,在施用之前,特别是对于体内施用,将抗体和核酸在室温下混合持续一段时间。在一些实施例中,复合化的时间在例如1分钟至30分钟或10分钟至20分钟的范围,各自包含端值,优选地复合化的时间为约15分钟。抗体剂量可以在0.0001mg至1mg的范围内,各自包含端值,优选的剂量为约0.1mg。核酸剂量可以在0.001 $\mu$ g至100 $\mu$ g的范围内,包括端值,优选的剂量为10 $\mu$ g。使用0.1mg 3E10、10 $\mu$ g的mRNA产生下面的体内数据(例如,图6B),并复合持续15分钟。在仍其它实施例中,在施用之前,以干燥或冻干形式提供抗体/核酸货物用于重构。

[0402] 下面的实例可以指示DNA货物可以更普遍地被递送到多个组织,并且不限于肿瘤,而RNA递送可以对肿瘤组织更具选择性。因此,在一些实施例中,RNA货物(例如单独的)可以选择性递送到癌细胞或其它肿瘤组织。在一些实施例中,当期望RNA货物的更广泛的分布时,可以将RNA与DNA(例如载体DNA)混合,以促进递送到非癌症/肿瘤组织。载体DNA可以是来自例如鲑鱼精子的质粒DNA或低分子量。在一些实施例中,载体DNA是非编码DNA。载体DNA可以是单链的或双链的或其组合。在一些实施例中,载体DNA由长度为1-10、1-100、1-1,000或1-10,000个核苷酸,或其任何子范围或整数,或其组合的核酸构成。通常载体DNA不与抗体缀合或以其它方式共价附接。通常载体DNA与货物核酸(例如RNA)和抗体共温育,并且作为其复合物共递送。在一些实施例中,载体DNA是非编码DNA。

[0403] A. 体外和离体方法

[0404] 对于体外和离体方法,细胞通常在培养物中与组合物接触。对于离体方法,可以从受试者中分离细胞,并与组合物离体接触,以产生含有货物核酸的细胞。在一优选的实施例中,从待治疗的受试者或同基因宿主中分离细胞。在与组合物接触之前,可以从受试者去除靶细胞。

[0405] B. 体内方法

[0406] 在一些实施例中,将核酸货物体内递送到细胞用于基因编辑和/或治疗受试者的疾病或病症。通常包含抗体-核酸货物的组合物可以直接向受试者施用,用于体内疗法。

[0407] 组合物可以通过多种途径,包含肠胃外途径施用,所述多种途径包含但不限于静脉内、腹膜内、羊膜内、肌内、皮下或局部(舌下、直肠、鼻内、肺、直肠粘膜和阴道)和口服(舌下、口腔或肠内)。

[0408] 在一些实施例中,组合物被调配成用于肺递送,如鼻内施用或口服吸入。调配物的施用可以通过允许复合物达到其靶标的任何可接受的方法来完成。取决于所治疗的病状,

施用可以是局部的(即,到特定区、生理系统、组织、器官或细胞类型)或全身的。在WO 2017/143042中还讨论了用于体内递送的组合物和方法。

[0409] 所述方法还可以包含在体内向胚胎或胎儿或其怀孕母亲施用有效量的抗体-核酸复合物组合物。在一些方法中,通过将组合物注射和/或输注到静脉或动脉(如卵黄静脉或脐静脉)中或注射和/或输注到胚胎或胎儿的羊膜囊中在子宫内递送组合物。参见例如,Ricciardi等人,《自然通讯(Nat Commun.)》2018年6月26日;9(1):2481.doi:10.1038/s41467-018-04894-2和WO 2018/187493。

#### [0410] C.应用

[0411] 可以使用3E10抗体将编码所关注的多肽或功能性核酸的核酸货物,例如mRNA、功能性核酸、DNA表达构建体、载体等递送到细胞中,以在细胞中表达或抑制多肽。组合物和方法可以在一系列不同应用中使用。非限制性实例包含CRISPR和gRNA表达载体+/-编辑DNA、大型DNA(质粒和表达载体)的递送、基因置换和基因疗法、DNA和/或RNA的递送,以例如在体内或离体产生CAR-T细胞或T细胞受体,并简化在体内或离体的CAR-T细胞产生、siRNA的递送、mRNA的递送等。下文讨论了与基因疗法/基因编辑和免疫调节,特别是嵌合抗原受体T细胞产生相关的示例性应用。

#### [0412] 1.基因疗法和编辑

[0413] 在一些实施例中,组合物用于基因编辑。例如,所述方法尤其可以用于治疗由单个基因突变引起的基因缺陷、病症和疾病例如以校正由点突变引起的基因缺陷、病症和疾病。如果靶基因含有导致遗传病症的突变,则可以使用所述方法进行诱变修复,所述诱变修复可以将靶基因的DNA序列恢复到常态。靶序列可以在基因的编码DNA序列内或内含子内。靶序列也可以在调节靶基因表达的DNA序列(包含启动子或增强子序列)内。

[0414] 在本文的方法中,已经与复合物接触的细胞可以向受试者施用。受试者可能患有疾病或病症,如血友病、肌肉营养不良、球蛋白病、囊性纤维化、着色性干皮病或溶酶体贮积病。在此类实施例中,基因修饰、基因置换、基因添加或其组合可以以有效量发生,以减轻受试者的该疾病或病症的一种或多种症状。

[0415] 在一些实施例中,DNA货物包含编码核酸酶的核酸、供体寡核苷酸或编码供体寡核苷酸的核酸或其组合。

#### [0416] a.基因编辑核酸酶

[0417] 核酸货物包含编码在靶细胞基因组中诱导单链断裂或双链断裂的一个或多个元件的那些,并且任选地,但优选组合其它元件,如供体寡核苷酸和/或尤其在CRISPR/Cas的情况下,系统的其它元件,如gRNA。组合物可以用于例如减少或以其它方式修饰靶基因的表达。

#### [0418] i.链断裂诱导元件CRISPR/Cas

[0419] 在一些实施例中,核酸货物包含CRISPR/Cas介导的基因组编辑组合物的一种或多种元件、编码CRISPR/Cas介导的基因组编辑组合物的一种或多种元件的核酸或其组合。如本文所使用的,CRISPR/Cas介导的基因组编辑组合物是指在哺乳动物受试者中进行CRISPR/Cas介导的基因组编辑所需的CRISPR系统的元件。如下文更详细地讨论的,CRISPR/Cas介导的基因组编辑组合物通常包含编码crRNA、tracrRNA(或其嵌合体,其还被称为向导RNA或单向导RNA)和Cas酶,如Cas9的一种或多种核酸。CRISPR/Cas介导的基因组编辑组合

物可以任选地包含供体多核苷酸,所述供体多核苷酸可以在靶位点处或邻近靶位点(例如,Cas9诱导的单链断裂或双链断裂的位点)处重组到靶细胞的基因组中。

[0420] CRISPR/Cas系统已适用于用作在真核生物中使用的基因编辑(沉默、增强或改变特异性基因)(参见例如,Cong,《科学(Science)》,15:339(6121):819-823(2013)和Jinek等人,《科学》,337(6096):816-21(2012))。通过用包含cas基因和具体设计的CRISPR的所需元件转染细胞,可以在任何所期望的位置处切割和修饰生物体的基因组。在WO 2013/176772和WO 2014/018423中详细描述了使用CRISPR/Cas系统制备用于基因组编辑的组合物的方法,所述文献以全文引用的方式具体地并入本文。

[0421] 本文所公开的递送方法适用于CRISPR/Cas系统上的多种变化。

[0422] 一般而言,“CRISPR系统”统称为CRISPR相关(“Cas”)基因的表达或引导Cas基因的活性所涉及的转录物和其它元件,包含编码Cas基因的序列、tracr(反式激活CRISPR)序列(例如,tracrRNA或活化部分tracrRNA)、tracr配对序列(在内源性CRISPR系统的上下文中涵盖“直接重复序列”和tracrRNA处理的部分直接重复序列)、向导序列(在内源性CRISPR系统的背景下也称为“间隔子”)或其它序列和来自CRISPR基因座的转录物。与向导序列可操作地连接的一个或多个tracr配对序列(例如,直接重复序列-间隔子-直接重复序列)也可以被称为在被核酸酶加工前的pre-crRNA(pre-CRISPR RNA)或在被核酸酶加工后的crRNA。

[0423] 如下文更详细地讨论的,在一些实施例中,tracrRNA和crRNA连接并形成嵌合crRNA-tracrRNA杂合体,其中成熟的crRNA通过合成茎环与部分tracrRNA融合以模拟天然的crRNA:tracrRNA双链体,如在Cong,《科学》,15:339(6121):819-823(2013)和Jinek等人,《科学》,337(6096):816-21(2012)中所描述的。单个融合的crRNA-tracrRNA构建体在本文中还被称为向导RNA或gRNA(或单向导RNA(sgRNA))。在sgRNA内,crRNA部分可以被鉴定为“靶序列”,并且tracrRNA通常被称为“支架”。

[0424] 在一些实施例中,CRISPR系统的一个或多个元件源自I型、II型或III型CRISPR系统。在一些实施例中,CRISPR系统的一个或多个元件源自包含内源性CRISPR系统的特定生物体,如化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)。

[0425] 一般而言,CRISPR系统以促进靶序列的位点处的CRISPR复合物的形成的元件(在内源性CRISPR系统的背景下也被称为原间隔子)为表征。在CRISPR复合物的形成的背景下,“靶序列”是指向导序列被设计成具有互补性的序列,其中靶序列与向导序列之间的杂交促进CRISPR复合物的形成。靶序列可以是任何多核苷酸,如DNA或RNA多核苷酸。在一些实施例中,靶序列位于细胞的核或细胞质中。

[0426] 在靶核酸中,每个原间隔子与识别对单独的CRISPR系统具有特异性的原间隔子相邻基序(PAM)相关联。在化脓性链球菌CRISPR/Cas系统中,PAM是核苷酸序列NGG。在嗜热链球菌(*Streptococcus thermophiles*)CRISPR/Cas系统中,PAM是核苷酸序列,所述核苷酸序列是NNAGAAW。tracrRNA双链体通过crRNA的间隔子区和原间隔子DNA之间的异源双链体形成将Cas引导至由原间隔子和所需PAM组成的DNA靶标。

[0427] 通常,在内源性CRISPR系统的背景下,CRISPR复合物的形成(包含与靶序列杂交并且与一种或多种Cas蛋白复合的向导序列)导致靶序列中或附近的(例如,在来自所述靶序列的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、20个、50个或更多个碱基对内)的一条或两条链的切割。如通过和与向导序列可操作地连接的tracr配对序列的全部或一部分杂

交, tracr序列的全部或一部分也可以形成CRISPR复合物的一部分。

[0428] 一旦鉴定了所期望的DNA靶序列,许多资源就可用于帮助从业者测定合适的靶位点。例如,可利用大量公共资源(包含以生物信息学方式产生的靶向超过40%的人外显子的约190,000种潜在sgRNA的清单)以帮助从业者选择靶位点并设计相关的sgRNA,以便影响位点处的切口或双链断裂。还参见, [crispr.u-psud.fr/](http://crispr.u-psud.fr/),即被设计成帮助科学家在广泛的物种中找到靶向CRISPR的位点并产生适当的crRNA序列的工具。

[0429] 在一些实施例中,将驱动CRISPR系统的一种或多种元件的表达的一种或多种载体引入到靶细胞中,使得CRISPR系统的元件的表达直接在一个或多个靶位点处形成CRISPR复合物。例如,Cas酶、与tracr配对序列连接的向导序列和tracr序列可以各自与单独载体上的单独的调节元件可操作地连接。可替代地,由相同或不同的调节元件表达的两个或更多个元件可以组合在单个载体中,其中一个或多个另外的载体提供第一载体中未包含的CRISPR系统的任何组分。组合在单个载体中的CRISPR系统元件可以布置在任何合适的朝向上,如相对于第二元件的(“上游”)为5’或相对于第二元件的(“下游”)为3’的一个元件。一个元件的编码序列可以位于第二元件的编码序列的相同或相反链上,并且以相同或相反的方向定向。在一些实施例中,单个启动子驱动编码CRISPR酶的转录物和向导序列、tracr配对序列(任选地与向导序列可操作地连接)和嵌入一个或多个内含子序列(例如,各自在不同的内含子中、两个或多个在至少一个内含子中、或全部在单个内含子中)内的tracr序列中的一个或多个序列的表达。在一些实施例中,CRISPR酶、向导序列、tracr配对序列和tracr序列与相同的启动子可操作地连接并且从所述相同的启动子表达。

[0430] 在一些实施例中,载体包含一个或多个插入位点,如限制性核酸内切酶识别序列(也称为“克隆位点”)。在一些实施例中,一个或多个插入位点(例如,约或多于约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个插入位点)位于一种或多种载体的一个或多个序列元件的上游和/或下游。在一些实施例中,载体包含tracr配对序列上游的插入位点,并且任选地包含与tracr配对序列可操作地连接的调节元件下游的插入位点,使得在将向导序列插入到插入位点之后并且在表达时,向导序列引导CRISPR复合物与真核细胞中的靶序列的序列特异性结合。在一些实施例中,载体包含两个或更多个插入位点,每个插入位点位于两个tracr配对序列之间,以便允许在每个位点处插入向导序列。在此类布置中,两个或更多个向导序列可以包含单个向导序列的两个或更多个拷贝、两个或更多个不同的向导序列或这些的组合。当使用多个不同的向导序列时,单个表达构建体可以用于将CRISPR活性靶向细胞内的多个不同的对应靶序列。例如,单个载体可以包含约或多于约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个向导序列。在一些实施例中,可以提供约或多于约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个此类含有向导序列的载体,并且任选地递送到细胞。

[0431] 在一些实施例中,载体包含与编码CRISPR酶的酶编码序列可操作地连接的调节元件,如Cas蛋白。Cas蛋白的非限制性实例包含Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也被称为Csn1和Csx12)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csl17、Csl14、Csl10、Csl16、CsaX、Csx3、Csl1、Csl15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、其同源物或其经修饰的版本。在一些实施例中,未经修饰的CRISPR酶具有DNA切割活性,如Cas9。在一些实

施例中,CRISPR酶引导一条或两条链在靶序列的位置处(如在靶序列内和/或在靶序列的补体内)的切割。在一些实施例中,CRISPR酶引导从靶序列的第一个或最后一个核苷酸切割约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个、25个、50个、100个、200个、500或更多个碱基对内的一条或两条链。

[0432] 在一些实施例中,载体编码CRISPR酶,其相对于对应的野生型酶突变,使得突变的CRISPR酶缺乏切割含有靶序列的靶多核苷酸的一条或两条链的能力。例如,来自酿脓链球菌(*S. pyogenes*)的Cas9的RuvC I催化结构域中的天冬氨酸到丙氨酸取代(D10A)将Cas9从切割两条链的核酸酶转化为切口酶(切割单链)。使Cas9成为切口酶的突变的其它实例包含但不限于H840A、N854A和N863A。作为另外的实例,Cas9的两个或更多个催化结构域(RuvC I、RuvC II和RuvC III)可以突变以产生基本上缺乏所有DNA切割活性的突变Cas9。在一些实施例中,D10A突变与H840A、N854A或N863A突变中的一种或多种突变组合以产生基本上缺乏所有DNA切割活性的Cas9酶。在一些实施例中,当突变的酶的DNA切割活性相对于其非突变的形式小于约25%、10%、5%、1%、0.1%、0.01%或更低时,CRISPR酶被认为基本上缺乏所有DNA切割活性。

[0433] 在一些实施例中,编码CRISPR酶的酶编码序列是针对特定细胞如真核细胞中的表达而优化的密码子。真核细胞可以是源自特定生物体,如哺乳动物的那些细胞,所述哺乳动物包含但不限于人、小鼠、大鼠、兔、犬或非人灵长类动物。一般而言,密码子优化是指在维持天然氨基酸序列的情况下通过以下方式修饰核酸序列来增强在所关注的宿主细胞中的表达的方法:通过用所述宿主细胞的基因中更频繁使用或最频繁使用的密码子替换天然序列的至少一个密码子(例如,约或多于约1个、2个、3个、4个、5个、10个、15个、20个、25个、50个或更多个密码子)。各种物种对特定氨基酸的某些密码子表现出特定的偏好。密码子偏倚(生物体之间密码子使用的差异)通常与信使RNA(mRNA)的翻译效率相关,所述信使RNA的翻译效率又被认为取决于被翻译的密码子的特性和特定转移RNA(tRNA)分子的可用性。

[0434] 所选tRNA在细胞中的优势大体上反映了在肽合成中最常使用的密码子。因此,能够基于密码子优化来定制基因以使给定生物体中的基因表达最优。密码子使用表例如在“密码子使用数据库”中很容易获得,并且这些表可以通过多种方式进行调整。参见Nakamura, Y.等人,《核酸研究》,28:292(2000)。用于密码子优化特定序列以在特定宿主细胞中表达的计算机算法,例如基因制造(Gene Forge)(宾夕法尼亚州雅各布斯的Aptagen公司(Aptagen; Jacobus, PA))也是可得的。在一些实施例中,编码CRISPR酶的序列中的一个或多个密码子(例如,1个、2个、3个、4个、5个、10个、15个、20个、25个、50个或所有密码子)对应于特定氨基酸的最常用的密码子。

[0435] 在一些实施例中,载体编码包含一个或多个核定位序列(NLS)的CRISPR酶。当存在多于一个NLS时,每个NLS可独立于其它NLS选择,使得单个NLS可以以多于一个拷贝存在和/或与存在于一个或多个拷贝中的一个或多个其它NLS组合存在。在一些实施例中,当NLS的最近氨基酸沿着来自N端或C端的多肽链在约1个、2个、3个、4个、5个、10个、15个、20个、25个、30个、40个、50个或更多个氨基酸内时,NLS被视为接近N端或C端。

[0436] 一般而言,一个或多个NLS具有足够的强度以驱动在真核细胞的核中以可检测的量累积CRISPR酶。一般而言,核定位活性的强度可以源自CRISPR酶中的NLS的数目、所使用的特定NLS或这些因素的组合。

[0437] 可以通过任何合适的技术来执行核中的累积的检测。例如,可检测标志物可以与CRISPR酶融合,使得细胞内的位置可以被可视化,如与用于检测核的位置的装置(例如,对核具有特异性的染色,如DAPI)的组合。细胞核还可以从细胞分离,然后可以通过用于检测蛋白质的任何合适的方法,如免疫组织化学、蛋白质印迹或酶活性测定来分析其内容物。与未暴露于CRISPR酶或复合物的对照相比,或与暴露于缺乏一个或多个NLS的CRISPR酶的对照相比,还可以如通过针对CRISPR复合物形成的效应的测定(例如,针对在靶序列处的DNA切割或突变的测定,或针对受CRISPR复合物形成和/或CRISPR酶活性影响的改变的基因表达活性的测定)间接地确定核中的累积。

[0438] 在一些实施例中,CRISPR系统的一个或多个元件在诱导型启动子的控制下,所述诱导型启动子可以包含诱导型Cas,如Cas9。

[0439] Cong,《科学》,15:339(6121):819-823(2013)报道了Cas9、tracrRNA、pre-crRNA(或Cas9和sgRNA)的异源表达可以实现哺乳动物染色体的靶向切割。因此,在本文所公开的方法中利用的CRISPR系统,并且因此货物核酸是载体系统,所述载体系统可以包含编码CRISPR系统的元件的一种或多种载体,所述CRISPR系统的元件可以包含与CRISPR/Cas系统嵌合RNA(chiRNA)多核苷酸序列可操作地连接的第一调节元件,以及与编码可以任选地包含至少一个或多个核定位序列的CRISPR酶的酶编码序列可操作地连接的第二调节元件,其中所述多核苷酸序列包含(a)能够与真核细胞中的靶序列杂交的向导序列;(b) tracr配对序列;以及(c) tracr序列。元件(a)、(b)和(c)可以以5'至3'朝向布置,其中组分I和II位于系统的相同或不同的载体上,其中当转录时, tracr配对序列与 tracr序列杂交,并且向导序列引导CRISPR复合物与靶序列的序列特异性结合,并且其中CRISPR复合物可以包含与以下复合的CRISPR酶:(1)与靶序列杂交的向导序列复合;以及(2)与 tracr序列杂交的 tracr配对序列,其中编码所述CRISPR酶的酶编码序列进一步编码异源功能结构域。在一些实施例中,载体中的一种或多种载体还编码合适的Cas酶,如Cas9。不同的遗传元件可以在相同或不同启动子的控制下。

[0440] 尽管可以改变不同的工程化的CRISPR系统中的具体细节,但总体方法是类似的。有兴趣使用CRISPR技术靶向DNA序列(使用许多可用的在线工具之一鉴定)的从业者可以将含有靶序列的短DNA片段插入到向导RNA表达质粒中。sgRNA表达质粒含有靶序列(约20个核苷酸)、tracrRNA序列的形式(支架)以及合适的启动子和在真核细胞中适当加工的必要元件。此类载体是可商购获得的(参见例如,阿德基因(Addgene))。许多系统依赖于被退火以形成双链DNA并且然后克隆到sgRNA表达质粒中的定制的互补寡聚物。sgRNA和适当的Cas酶从转染细胞中的相同或单独的质粒共表达会在所期望的靶位点处产生单链断裂或双链断裂(取决于Cas酶的活性)。

[0441] ii. 锌指核酸酶

[0442] 在一些实施例中,诱导靶细胞的基因组中的单链断裂或双链断裂的元件是核酸构建体或编码锌指核酸酶(ZFN)的构建体。因此,核酸货物可以编码ZFN。

[0443] ZFN通常是包含源自与切割结构域连接的锌指蛋白的DNA结合结构域的融合蛋白。最常见的切割结构域是IIS型酶FokI。FokI催化DNA的双链切割,一条链上距其识别位点9个核苷酸,而另一条链上距其识别位点13个核苷酸。参见例如,美国专利第5,356,802号;第5,436,150号和第5,487,994号;以及Li等人,《美国国家科学院院刊》89(1992):4275-4279;Li

等人,《美国国家科学院院刊》,90:2764-2768(1993);Kim等人,《美国国家科学院院刊》91:883-887(1994a);Kim等人,《生物化学杂志》269:31,978-31,982(1994b)。这些酶(或其酶功能片段)中的一种或多种酶可以用作切割结构域的来源。

[0444] 原则上可以被设计成靶向任何所关注的基因组位置的DNA结合结构域可以是Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>锌指的串联阵列,所述锌指中的每个锌指通常识别靶DNA序列中的三至四个核苷酸。Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>结构域具有一般结构:Phe(有时为Tyr)-Cys-(2到4个氨基酸)-Cys-(3个氨基酸)-Phe(有时为Tyr)-(5个氨基酸)-Leu-(2个氨基酸)-His-(3个氨基酸)-His。通过将多个指连接在一起(数量不同:在已发表的研究中,每个单体使用了三至六个指),ZFN对可以被设计成与18至36个核苷酸长的基因组序列结合。

[0445] 工程化方法包含但不限于合理设计和各种类型的经验选择方法。合理的设计包含例如使用包含三链体(或四链体)核苷酸序列和单独的锌指氨基酸序列的数据库,其中每个三链体或四链体核苷酸序列与结合特定三链体或四链体序列的锌指的一个或多个氨基酸序列缔合。参见例如,美国专利第6,140,081号;第6,453,242号;第6,534,261号;第6,610,512号;第6,746,838号;第6,866,997号;第7,067,617号;美国公开申请第2002/0165356号;第2004/0197892号;第2007/0154989号;和第2007/0213269号以及国际专利申请公开第W0 98/53059号和第W0 2003/016496号。

[0446] iii. 转录激活因子样效应子核酸酶

[0447] 在一些实施例中,诱导靶细胞的基因组中的单链或双链断裂的元件是核酸构建体或编码转录激活因子样效应子核酸酶(TALEN)的构建体。因此,核酸货物可以编码TALEN。

[0448] TALEN的总体架构与ZFN的总体架构类似,其中主要不同在于DNA结合结构域来自TAL效应蛋白,而转录因子来自植物病原菌。TALEN的DNA结合结构域是氨基酸重复序列的串联阵列,每个氨基酸重复序列长约34个残基。重复序列彼此非常相似;通常所述重复序列主要在两个位置不同(氨基酸12和13,被称为重复可变二残基或RVD)。每个RVD指定与四个可能的核苷酸之一的优先结合,这意味着每个TALEN重复序列都与单个碱基对结合,尽管已知NN RVD除了结合鸟嘌呤外还结合腺嘌呤。TAL效应子DNA结合机械地不如锌指蛋白的DNA结合容易理解,但是其看似更简单的代码对于工程化的核酸酶设计可能是非常有益的。TALEN也切割为二聚体,具有相对长的靶序列(迄今为止报道的最短序列,每个单体结合13个核苷酸),并且对于结合位点之间的间隔子的长度要求似乎不如ZFN严格。单体和二聚体TALEN可以包含多于10个、多于14个、多于20个或多于24个重复序列。

[0449] 将工程化TAL以与特异性核酸结合的方法在Cermak等人,《核酸研究》1-11(2011)中进行了描述。美国公开申请第2011/0145940号公开了TAL效应子和使用其修饰DNA的方法。Miller等人,《自然生物技术(Nature Biotechnol)》29:143(2011)报道了通过将TAL截短变体与FokI核酸酶的催化结构域连接来制备用于位点特异性核酸酶架构的TALEN。示出了所得TALEN在永生生化人细胞中诱导基因修饰。可以在例如W0 2011/072246中找到TALE结合结构域的一般设计原理。

[0450] b. 供体多核苷酸

[0451] 本文所描述的基因组编辑系统的核酸酶活性切割靶DNA以在靶DNA中产生单链断裂或双链断裂。双链断裂可以通过细胞以两种方式之一进行修复:非同源末端连接和同源定向修复。在非同源末端连接(NHEJ)中,通过将断裂末端彼此直接连接来修复双链断裂。

如此,没有新的核酸材料插入到位点中,但是一些核酸材料可能丢失,从而导致缺失。在同源性定向修复(HDR)中,将与切割的靶DNA序列具有同源性的供体多核苷酸用作用于修复切割的靶DNA序列的模板,从而导致将基因信息从供体多核苷酸转移到靶DNA。如此,新的核酸材料可以插入/复制到位点中。

[0452] 因此,在一些实施例中,核酸货物是或包含供体多核苷酸。由于NHEJ和/或同源性定向修复引起的靶DNA的修饰可以用于诱导基因校正、基因置换、基因标记、转基因插入、核苷酸缺失、基因破坏、基因突变等。

[0453] 因此,通过基因组编辑组合物切割DNA可以用于通过切割靶DNA序列并且允许细胞在不存在外源提供的供体多核苷酸的情况下修复序列来从靶DNA序列中缺失核酸材料。可替代地,如果基因组编辑组合物包含供体多核苷酸序列,所述供体多核苷酸序列至少包含与靶DNA序列具有同源性的区段,所述方法可以用于将核酸材料添加(即插入或替换)到靶DNA序列(例如,以“敲入”编码蛋白质、siRNA、miRNA等的核酸),添加标签(例如,6xHis、荧光蛋白(例如,绿色荧光蛋白;黄色荧光蛋白等)、血凝素(HA)、FLAG等),将调节序列添加到基因(例如,启动子、聚腺苷酸化信号、内部核糖体进入序列(IRES)、2A肽、起始密码子、终止密码子、剪接信号、定位信号等)以修饰核酸序列(例如,引入突变)等。如此,组合物可以用于以位点特异性,即“靶向”的方式,例如在基因疗法中所使用的,例如基因敲除、基因敲入、基因编辑、基因标记等修饰DNA。

[0454] 在期望将多核苷酸序列插入到靶DNA序列的应用中,还向细胞提供包含待插入的供体序列的多核苷酸。“供体序列”或“供体多核苷酸”或“供体寡核苷酸”意指在切割位点处待插入的核酸序列。供体多核苷酸通常在切割位点处与基因组序列含有足够的同源性,例如与侧接切割位点(例如,在切割位点的约50个碱基或更少以内,例如在约30个碱基内、在约15个碱基内、在约10个碱基内、在约5个碱基内,或紧侧接切割位点)的核苷酸序列具有70%、80%、85%、90%、95%或100%的同源性,以支持其与和其具有同源性的基因组序列之间的同源性定向修复。所述供体序列通常与其替换的基因组序列不同。相反,所述供体序列可以含有相对于基因组序列的至少一个或多个单碱基改变、插入、缺失、倒置或重排,只要存在足够的同源性以支持同源性定向修复即可。在一些实施例中,供体序列包含由两个同源区侧接的非同源序列,使得靶DNA区与两个侧接序列之间的同源定向修复导致非同源序列在靶区处的插入。

[0455] 2. 免疫调节

[0456] a. CAR T细胞

[0457] 所公开的组合物和方法在制备表达免疫受体,特别是嵌合免疫受体(CIR)如嵌合抗原受体(CAR)的淋巴细胞的背景下特别有用。人工免疫受体(在本文中也已知并称为嵌合T细胞受体、嵌合免疫受体、嵌合抗原受体(CAR)和嵌合免疫受体(CIR))是将所选特异性移植到细胞上的工程化受体。根据所讨论的方法修饰的细胞可以如下文更详细地所讨论的,用于多种免疫疗法以用于治疗癌症、感染、炎症和自身免疫性疾病。

[0458] 在特别优选的实施例中,编码嵌合抗原受体货物的mRNA或DNA被递送到免疫细胞,如淋巴细胞。

[0459] 货物可以递送到体内、离体或体外免疫细胞。在优选的实施例中,货物是mRNA,其可以允许降低成本、容易制造、减少副作用(例如,细胞因子风暴、神经毒性、移植物对宿主

疾病等)中的一种或多种。在一特定实施例中,从需要CAR T细胞疗法的受试者收获免疫细胞(例如,T细胞),本文所公开的组合物和方法用于将编码一种或多种CAR T细胞构建体的mRNA递送到收获的细胞中,并且将所述细胞返回到所述受试者。在一些实施例中,从最初收获细胞到将其返回到受试者的过程需要1周或更短的时间,例如1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天。在特定实施例中,从最初收获细胞到将其返回到受试者的过程在1天或2天内,或在少于1天内,例如1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时或23小时内进行。

[0460] 嵌合抗原受体的设计和开发的策略在Dotti等人,《免疫学评论 (Immunol Rev.)》2014年1月;257(1):.doi:10.1111/imr.12131(35页)中综述,所述文献通过引用整体并入本文,以及Dotti,《分子疗法》,22(5):899-890(2014),Karlsson等人,《癌症基因疗法 (Cancer Gene Therapy)》,20:386-93(2013),Charo等人,《癌症研究》,65(5):2001-8(2005),Jensen等人,《免疫学评论》,257(1):127-144(2014),Eaton等人,《基因疗法 (Gene Therapy)》,9:527-35(2002),Barrett等人,《医学年鉴 (Annu Rev Med.)》,65:333-347(2014),Cartellieri等人,《生物医学与生物技术杂志 (Journal of Biomedicine and Biotechnology)》,第2010卷,文章ID 956304,13页doi:10.1155/2010/956304;以及美国公开申请第2015/0017120号、第2015/0283178号、第2015/0290244号、第2014/0050709号以及第2013/0071414号。

[0461] CAR将单克隆抗体的抗原结合特性与T细胞的溶解能力和自身更新组合,并且与常规T细胞相比具有若干优点(Ramos和Dotti,《生物疗法专家意见 (Expert Opin Biol Ther.)》,11:855-873(2011),Curran等人,《基因医学杂志 (J Gene Med.)》,14:405-415(2012),Maher,《ISRN肿瘤学 (ISRN Oncol.)》2012:278093(2012))。CAR-T细胞独立于主要组织相容性复合物(MHC)识别并杀死癌细胞。因此,靶细胞识别不受一些机制的影响,通过所述机制,肿瘤逃避MHC限制性T细胞识别,例如人白细胞抗原(HLA) I类分子的下调和有缺陷的抗原处理。

[0462] 嵌合免疫受体最初最初开发于20世纪80年代,并且最初包含单克隆抗体的可变(抗原结合)区和T细胞受体(TCR)  $\alpha$ 链和 $\beta$ 链的恒定区(Kuwana等人,《生物化学与生物物理研究通讯 (Biochem Biophys Res Commun.)》,149:960-968(1987))。在1993年,这种设计被修改为包含来自单克隆抗体的重链和轻链两者的抗原结合区的单链可变片段(scFv)的胞外结构域、跨膜结构域和具有源自CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域的胞内结构域。之后的CAR通常遵循具有共刺激信号传导胞内结构域的结构设计。因此,本文中的方法中所利用的CAR构建体可以包含抗原结合结构域或胞外结构域、铰链结构域、跨膜结构域、胞内结构域和其组合。

[0463] 在一些实施例中,胞外结构域是scFv。scFv的亲合力预测CAR功能(Hudecek等人,《临床癌症研究 (Clin Cancer Res.)》,19(12):3153-64(2013),Chmielewski等人,《免疫学杂志》,173:7647-7653(2004))。抗原结合和随后的激活还可以通过在CAR中添加柔性接头序列来进行修饰,这允许表达可以识别两种不同的抗原的两种不同的scFv(Grada等人,《分子疗法-核酸 (Mol Ther Nucleic Acids)》,2:e105(2013)) (称为串联CAR (TanCAR))。串联CARS可以更有效地单独杀死表达低水平的每种抗原的癌症,并且还可以降低由单个抗原丢

失变体引起的肿瘤免疫逃逸的风险。其它胞外结构域包含IL13R $\alpha$ 2 (Kahlon等人,《癌症研究》,64:9160-9166 (2004),Brown等人,《临床癌症研究》,18(8):2199-209 (2012),Kong等人,《临床癌症研究》,18:5949-5960 (2012),NKG2D配体和CD70受体,肽配体(例如,T1E肽配体),以及所谓的“通用胞外结构域”(例如,亲和素胞外结构域,其被设计成识别已与生物素化单克隆抗体接触的靶标,或FITC特异性scFv,其被设计成识别已与FITC标记的单克隆抗体接触的靶标(Zhang等人,《血液(Blood)》,106:1544-1551 (2005),Barber等人,《实验血液学(Exp Hematol.)》36:1318-1328 (2008),Shaffer等人,《血液》,117:4304-4314 (2011),Davies等人,《分子医学(Mol Med.)》,18:565-576 (2012),Urbanska等人,《癌症研究》,72:1844-1852 (2012),Tamada等人,《临床癌症研究》,18:6436-6445 (2012))。

[0464] 在一些实施例中,CAR包含铰链区。虽然胞外结构域对于CAR特异性很重要,但将胞外结构域与跨膜结构域(铰链区)连接的序列还可以通过产生CAR的长度和柔性的差异来影响CAR-T细胞功能。铰链可以包含例如源自免疫球蛋白如IgG1的CH2CH3铰链或其片段。例如,Hudecek等人(Hudecek等人,《临床癌症研究》19(12):3153-64 (2013))比较了CH2-CH3铰链[229个氨基酸(AA)]、CH3铰链(119AA)和短铰链(12AA)对表达第3代ROR1特异性CAR的T细胞的效应子功能的影响,并且发现表达‘短铰链’CAR的T细胞具有优异的抗肿瘤活性,而其它研究者发现CH2-CH3铰链会损害第1代CD30特异性CAR的表位识别(Hombach等人,《基因疗法》7:1067-1075 (2000))。

[0465] 铰链(或如果没有铰链结构域,则为胞外结构域)与信号传导胞内结构域之间通常存在最典型地源自CD3- $\zeta$ 、CD4、CD8或CD28分子的跨膜结构域。与铰链一样,跨膜结构域还可以影响CAR-T细胞效应子功能。

[0466] 在抗原识别后,CAR胞内结构域将激活和共刺激信号传输到T细胞。T细胞激活依赖于存在于细胞质结构域中的基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)到TCR复合物的细胞质CD3- $\zeta$ 结构域的磷酸化作用(Irving等人,《细胞》,64:891-901 (1991))。尽管大多数CAR胞内结构域含有源自CD3- $\zeta$ 的激活结构域,但其它CAR胞内结构域可以包含含有ITAM的结构域,如IgE- $\gamma$ 结构域的Fc受体(Haynes等人,《免疫学杂志》,166:182-187 (2001))。

[0467] 表达CAR的细胞的靶特异性通过由抗体/胞外结构域识别的抗原确定。所公开的组合物和方法可以用于产生靶向任何抗原的构建体和表达所述构建体的细胞。在免疫疗法,特别是在癌症免疫疗法的背景下,许多抗原和用于靶向其的合适的胞外结构域是众所周知的。与天然TCR不同,大多数基于scFv的CAR识别在细胞表面上表达的靶抗原,而不是识别由细胞的MHC处理和呈递的内部抗原,然而,CAR相对于经典TCR具有能够识别除蛋白质表位以外的结构,包含碳水化合物和糖脂的优点,Dotti等人,《免疫学评论》2014年1月;257(1):.doi:10.1111/imr.12131 (35页),从而增加了潜在靶抗原的池。优选的靶标包含仅在癌细胞或其周围基质上表达的抗原(Cheever等人,《临床癌症研究》,15:5323-5337 (2009)),如对神经胶质瘤细胞具有特异性的EGFR剪接变体(EGFRvIII)(Sampson等人,《免疫学研讨文集(Semin Immunol.)》,20(5):267-75 (2008))。然而,人抗原满足此要求,并且大多数靶抗原以低水平在正常细胞(例如GD2、CAIX、HER2)上和/或以谱系限制方式(例如,CD19,CD20)表达。

[0468] 优选的靶标和靶向其的CAR是本领域已知的(参见例如,Dotti等人,《免疫学评论》2014年1月;257(1):.doi:10.1111/imr.12131 (35页))。例如,用于血液恶性肿瘤的CAR靶标

包含但不限于CD 19(例如,B细胞)(Savoldo等人,《临床研究杂志》,121:1822-1826(2011), Cooper等人,《血液》,105:1622-1631(2005);Jensen等人,《血液与骨髓移植生物学(Biol Blood Marrow Transplant)》(2010),Kochenderfer等人,《血液》,119:2709-2720(2012), Brentjens等人,《分子疗法》,17:S157(2009),Brentjens等人,《自然医学(Nat Med.)》,9:279-286(2003),Brentjens等人,《血液》,118:4817-4828(2011),Porter等人,《新英格兰医学杂志(N Engl J Med.)》,365:725-733(2011),Kalos等人,《科学转化医学(Sci Transl Med.)》,3:95ra73(2011),Brentjens等人,《科学转化医学》,5:177ra38(2013),Grupp等人,《新英格兰医学杂志》(2013));CD20(例如,B细胞)(Jensen等人,《血液与骨髓移植生物学》(2010),Till等人,《血液》,112:2261-2271(2008),Wang等人,《人类基因疗法(Hum Gene Ther.)》,18:712-725(2007),Wang等人,《分子疗法》,9:577-586(2004),Jensen等人,《血液与骨髓移植生物学》,4:75-83(1998));CD22(例如,B细胞)(Haso等人,《血液》,121:1165-1174(2013));CD30(例如,B细胞)(Di Stasi等人,《血液》,113:6392-6402(2009),Savoldo等人,《血液》,110:2620-2630(2007),Hombach等人,《癌症研究》,58:1116-1119(1998));CD33(例如,骨髓)(Finney等人,《免疫学杂志》,161:2791-2797(1998));CD70(例如,B细胞/T细胞)(Shaffer等人,《血液》,117:4304-4314(2011));CD123(例如,骨髓)(Tettamanti等人,《英国血液学杂志(Br J Haematol.)》,161:389-401(2013));Kappa(例如,B细胞)(Vera等人,《血液》,108:3890-3897(2006));Lewis Y(例如,骨髓)(Peinert等人,《基因疗法》,17:678-686(2010),Ritchie等人,《分子疗法》(2013));NKG2D配体(例如,骨髓)(Barber等人,《实验血液学》,36:1318-1328(2008),Lehner等人,《美国科学公共图书馆(PLoS One.)》,7:e31210(2012),Song等人,《人类基因疗法》,24:295-305(2013),Spear等人,《免疫学杂志》188:6389-6398(2012));ROR1(例如,B细胞/T细胞)(Hudecek等人,《临床癌症研究》(2013))。

[0469] 用于实体瘤的CAR靶标包含但不限于B7H3(例如,肉瘤,神经胶质瘤)(Cheung等人,《杂交瘤和杂交组学(Hybrid Hybridomics)》,22:209-218(2003));CAIX(例如,肾)(Lamers等人,《临床肿瘤学杂志(J Clin Oncol.)》,24:e20-e22.(2006)),Weijtens等人,《国际癌症杂志(Int J Cancer)》,77:181-187(1998));CD44 v6/v7(例如,颈)(Hekele等人,《国际癌症杂志》,68:232-238(1996)),Dall等人,《癌症免疫学与免疫疗法(Cancer Immunol Immunother)》,54:51-60(2005);CD171(例如,成神经细胞瘤)(Park等人,《分子疗法》,15:825-833(2007));CEA(例如,结肠)(Nolan等人,《临床癌症研究》,5:3928-3941(1999));EGFRvIII(例如,神经胶质瘤)(Bullain等人,《神经肿瘤学杂志(J Neurooncol.)》(2009),Morgan等人,《人类基因疗法》,23:1043-1053(2012));EGP2(例如,癌)(Meier等人,《医学磁共振(Magn Reson Med.)》,65:756-763(2011),Ren-Heidenreich等人,《癌症免疫学和免疫疗法(Cancer Immunol Immunother.)》,51:417-423(2002));EGP40(例如,结肠)(Daly等人,《癌症基因疗法》,7:284-291(2000));EphA2(例如,神经胶质瘤,肺)(Chow等人,《分子疗法》,21:629-637(2013));ErbB2(HER2)(例如,乳腺、肺、前列腺、神经胶质瘤)(Zhao等人,《免疫学杂志》,183:5563-5574(2009),Morgan等人,《分子疗法》,18:843-851(2010),Pinthus等人,114:1774-1781(2004),Teng等人,《人类基因疗法》,15:699-708(2004),Stancovski等人,《免疫学杂志》,151:6577-6582(1993),Ahmed等人,《分子疗法》,17:1779-1787(2009),Ahmed等人,《临床癌症研究》,16:474-485(2010),Moritz等人,《美国国家科学

院院刊》,91:4318-4322(1994));ErbB受体家族(例如,乳腺、肺、前列腺、神经胶质瘤)(Davies等人,《分子医学》,18:565-576(2012));ErbB3/4(例如,乳腺、卵巢)(Muniappan等人,《癌症基因疗法》,7:128-134(2000),Altenschmidt等人,《临床癌症研究》,2:1001-1008(1996));HLA-A1/MAGE1(例如,黑色素瘤)(Willemsen等人,《基因疗法》,8:1601-1608(2001),Willemsen等人,《免疫学杂志》,174:7853-7858(2005));HLA-A2/NY-ES0-1(例如,肉瘤,黑色素瘤)(Schubert等人,《基因疗法》,20:386-395(2013));FR- $\alpha$ (例如,卵巢)(Hwu等人,《实验医学杂志(J Exp Med.)》,178:361-366(1993),Kershaw等人,《自然生物技术》,20:1221-1227(2002),Kershaw等人,《临床癌症研究》,12:6106-6115(2006),Hwu等人,《癌症研究》,55:3369-3373(1995));FAP(例如,癌症相关成纤维细胞)(Kakarla等人,《分子疗法》(2013));FAR(例如,横纹肌肉瘤)(Gattenlohner等人,《癌症研究》,66:24-28(2006));GD2(例如,成神经细胞瘤、肉瘤、黑色素瘤)(Pule等人,《自然医学》,14:1264-1270(2008),Louis等人,《血液》,118:6050-6056(2011),Rossig等人,《国际癌症杂志》,94:228-236(2001));GD3(例如,黑色素瘤,肺癌)(Yun等人,《瘤形成(Neoplasia.)》,2:449-459(2000));HMW-MAA(例如,黑色素瘤)(Burns等人,《癌症研究》,70:3027-3033(2010));IL11R $\alpha$ (例如,骨肉瘤)(Huang等人,《癌症研究》,72:271-281(2012));IL13Ra2(例如,神经胶质瘤)(Kahlon等人,《癌症研究》,64:9160-9166(2004),Brown等人,《临床癌症研究》(2012),Kong等人,《临床癌症研究》,18:5949-5960(2012),Yaghoubi等人,《自然临床实践肿瘤学(Nat Clin Pract Oncol.)》,6:53-58(2009));Lewis Y(例如,乳腺/卵巢/胰腺)(Peinert等人,《基因疗法》,17:678-686(2010),Westwood等人,《美国国家科学院院刊》,102:19051-19056(2005),Mezzanzanica等人,《癌症基因疗法》,5:401-407(1998));间皮素(例如,间皮瘤、乳腺、胰腺)(Lanitis等人,《分子疗法》,20:633-643(2012),Moon等人,《临床癌症研究》,17:4719-4730(2011));Mue1(例如,卵巢、乳腺、前列腺)(Wilkie等人,《免疫学杂志》,180:4901-4909(2008));NCAM(例如,成神经细胞瘤,结直肠)(Gilham等人,《免疫疗法杂志(J Immunother.)》,25:139-151(2002));NKG2D配体(例如,卵巢,sacoma)(Barber等人,《实验血液学》,36:1318-1328(2008),Lehner等人,《美国科学公共图书馆》,7:e31210(2012),Song等人,《基因疗法》,24:295-305(2013),Spear等人,《免疫学杂志》,188:6389-6398(2012));PSCA(例如,前列腺,胰腺)(Morgenroth等人,《前列腺(Prostate)》,67:1121-1131(2007),Katari等人,《HPB》,13:643-650(2011));PSMA(例如,前列腺)(Maher等人,《自然生物技术》,20:70-75(2002),Gong等人,《瘤形成》,1:123-127(1999));TAG72(例如,结肠)(Hombach等人,《肠胃病学(Gastroenterology)》,113:1163-1170(1997),McGuinness等人,《人类基因疗法》,10:165-173(1999));VEGFR-2(例如,肿瘤血管)(《临床研究杂志》,120:3953-3968(2010),Niederman等人,《美国国家科学院院刊》,99:7009-7014(2002))。

#### [0470] b. 代谢稳定性

[0471] 在一些实施例中,细胞(例如CAR细胞)的代谢稳定性通过使其具有产生限制体内、生长因子的能力而得到改善。在一些实施例中,编码抗凋亡因子如BCL-XL的核酸货物被瞬时递送到细胞。超大型B细胞淋巴瘤(Bcl-XL,或BCL2样1同种型1)是线粒体中的跨膜蛋白。其是Bcl-2蛋白家族的成员,并且通过防止线粒体内容物如细胞色素c的释放而充当内在凋亡途径中的促存活蛋白,这会导致胱天蛋白酶激活。编码BCL-XL的氨基酸和核酸序列两者都是本领域已知的,并且包含例如UniProtKB-Q07817(B2CL1\_人)、同种型Bcl-X(L)(标识

符:Q07817-1) (氨基酸序列); ENA|U72398|U72398.1人Bcl-x $\beta$  (bcl-x) 基因,完整的cds (基因组核酸序列); ENA|Z23115|Z23115.1智人 (H.sapiens) bcl-XL mRNA (mRNA/cDNA核酸序列)。

[0472] 在一些实施例中,核酸货物编码增殖诱导因子,如IL-2。编码IL-2的氨基酸和核酸序列两者都是本领域已知的,并且包含例如UniProtKB-P60568 (IL2\_人) (氨基酸序列); ENA|X00695|X00695.1人白介素-2 (IL-2) 基因和5'-侧接区 (基因核酸序列); 以及ENA|V00564|V00564.1编码白介素-2 (IL-2) 的人mRNA (mRNA/cDNA核酸序列)。

[0473] 然而,分泌的IL-2的产生可以具有也刺激淋巴瘤和Treg细胞的增殖,并且损害记忆T细胞的形成的不希望的作用 (Zhang等人,《自然医学》,11:1238-1243 (2005))。另外,在用肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 治疗的患者中使用IL-2导致增加的毒性 (Heemskerk等人,《人类基因疗法》,19:496-510 (2008))。为了避免这种潜在性,除IL-2之外或作为IL-2的替代方案,核酸货物可以编码嵌合 $\gamma$ c细胞因子受体 (C $\gamma$ CR), 如由与IL-7 $\alpha$ /CD127栓连的白介素-7 (IL-7) 构成的受体,其赋予外源性细胞因子非依赖性、细胞固有的STAT5细胞因子信号 (Hunter等人,《分子免疫学 (Molecular Immunology)》,56:1-11 (2013))。设计是模块化的,因为IL-2R $\beta$ /CD122细胞质链可以与IL-7 $\alpha$ /CD127的细胞质链交换,以增强Shc活性。构建体模拟人CD8+T细胞中的野生型IL-2信号传导 (Hunter等人,《分子免疫学》,56:1-11 (2013)), 因此应该与IL-2mRNA类似地起作用,而没有不希望的作用。

[0474] 另外地和可替代地,其它抗凋亡分子和细胞因子可以用于保持天然状态下的细胞活力。示例性因素包含但不限于:

[0475] ●骨髓细胞白血病1 (MCL-1) (例如,UniProtKB-Q07820 (MCL1\_人) (氨基酸序列); ENA|AF147742|AF147742.1智人骨髓细胞分化蛋白 (MCL1) 基因、启动子和完整的cds (基因组核酸序列); ENA|AF118124|AF118124.1智人骨髓细胞白血病序列1 (MCL1) mRNA,完整的cds。(mRNA/cDNA核酸序列)), 其是一种抗凋亡因子;

[0476] ●IL-7 (例如,UniProtKB-P13232 (IL7\_人) (氨基酸序列); ENA|EF064721|EF064721.1智人白介素7 (IL7) 基因,完整的cds。(基因组核酸序列); ENA|J04156|J04156.1人白介素7 (IL-7) mRNA,完整的cds。(mRNA/cDNA核酸序列), 其对T细胞存活和发育是重要的,以及

[0477] ●IL-15 (例如,UniProtKB-P40933 (IL15\_人) (氨基酸序列); ENA|X91233|X91233.1智人IL15基因 (基因组核酸序列); ENA|U14407|U14407.1人白介素15 (IL15) mRNA,完整的cds。(mRNA/cDNA核酸序列)), 其促进T和NK细胞存活 (Opferman等人,《自然》,426:671-676 (2003); Meazza等人,《生物医学与生物技术杂志》,861920,doi:10.1155/2011/861920 (2011); Michaud等人,《免疫疗法杂志》,33:382-390 (2010))。这些细胞因子mRNA可以独立地使用或与BCL-XL、IL-2和/或C $\gamma$ CR mRNA组合使用。因此,在一些实施例中,编码MCL-1、IL-7、IL-15或其组合的mRNA被递送到细胞。

[0478] c. 抑制性CAR (iCAR)

[0479] 在一些实施例中,T细胞疗法被递送到已被证明对一些癌症的治疗具有长期功效和治愈潜力的CAR细胞,然而,其的使用受到在供体淋巴细胞输注后令人联想起移植物抗宿主疾病的非癌组织的损害的限制。所公开的组合物和方法中的任一种组合物和方法可以与非特异性免疫抑制 (例如,对T细胞施加细胞抑制或细胞毒性作用的高剂量皮质类固醇疗

法,以抑制免疫应答)、不可逆的T细胞消除(例如,所谓的自杀基因工程化策略)或其组合组合使用。然而,在一些优选的实施例中,通过将编码抑制性嵌合抗原受体(iCAR)的构建体引入CAR细胞中来减少脱靶效应。对肿瘤和脱靶组织两者具有特异性的T细胞仅可以通过使用引入到T细胞中的抗原特异性iCAR来保护脱靶组织而被限制于肿瘤(Fedorov等人,《科学转化医学》,5:215ra172(2013))。iCAR可以包含与强大的急性抑制性信号传导结构域组合的表面抗原识别结构域,以限制T细胞响应性,尽管同时接合了激活受体(例如,CAR)。在优选的实施例中,iCAR包含通过在抗原识别时特异性地抑制T细胞功能的跨膜区对与免疫抑制受体(例如,CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4(CD244)、BTLA(CD272)、KIR、TIM-3、TGF $\beta$ 受体显性阴性类似物等)的信号传导结构域融合的抑制性抗原具有特异性的单链可变片段(scFv)。一旦CAR细胞遇到不表达抑制性抗原的细胞(例如癌细胞),iCAR转导的T细胞就可以针对CAR的靶抗原产生CAR诱导的应答。使用对具有CTLA-4或PD-1的抑制性信号传导结构域的PSMA具有特异性的scFv的DNAiCAR讨论于(Fedorov等人,《科学转化医学》,5:215ra172(2013))。

[0480] 设计考虑包含观察到PD-1是比CTLA-4更强的抑制剂,除非使用Y165G突变体,否则CTLA-4表现出细胞质定位,并且iCAR表达水平很重要。

[0481] 可以针对细胞类型特异性表面分子设计iCAR。在一些实施例中,iCAR被设计成防止T细胞、NK细胞或其它免疫细胞对某些组织或细胞类型的反应性。

[0482] d.减少内源性抑制性信号传导

[0483] 在一些实施例中,使细胞与核酸货物接触,所述核酸货物对细胞进行重编程以防止一种或多种抗原的表达。例如,在一些实施例中,核酸货物是或编码防止编码抗原如CTLA-4或PD-1的mRNA的表达的干扰RNA。所述方法可以用于制备通用供体细胞。用于改变同种异体抗原的表达的RNA可以单独使用或与导致靶细胞的去分化的RNA组合使用。

[0484] 尽管上述区段提供了利用抑制性信号传导结构域,例如来自人工iCAR中的CTLA-4或PD-1来限制中靶/脱靶肿瘤细胞毒性的组合物和方法,但是另外地或可替代地,可以通过减少CAR细胞中的内源性抑制性信号传导的表达来增加总体CAR细胞在靶肿瘤效应子效率,以便CAR细胞对有害肿瘤微环境的抑制性信号具有抗性。

[0485] CTLA-4和PD-1在激活和功能的不同阶段抑制T细胞。CTLA-4调节对自身抗原的T细胞应答,因为敲除小鼠由于高活性、组织浸润性T细胞而自发地发展器官损伤,而无特异性抗原暴露(Tivol等人,《免疫学Immunity》,3:541-547(1995);Waterhouse等人,《科学》,270:985-988(1995))。有趣的是,Treg细胞中CTLA-4的条件性敲除重新概括了指示其在Treg内正常发挥作用的全局敲除,(Wing等人,《科学》,322:271-275(2008))。相比之下,PD-L1敲除小鼠是自身免疫易感的,但不会自发地形成正常器官的大规模炎性细胞浸润,从而指示其主要生理功能是以诱导方式介导对持续组织炎症的负反馈控制(Dong等人,《免疫学》,20:327-336(2004))。实际上,根据“适应性抗性”假设,大多数肿瘤响应于IFN $\gamma$ 上调PD-L1;由包含CART细胞的效应T细胞释放的关键细胞因子(Greenwald等人,《免疫学年度综述(Annu Rev Immunol)》23:515-548(2005);Carreno等人,《免疫学年度综述》,20:29-53(2002);Chen等人,《临床研究杂志》,125:3384-3391(2015);Keir等人,《免疫学年度综述》,26:677-704(2008);Pentcheva-Hoang等人,《免疫学评论》,229:67-87(2009))。然后,PD-L1向T细胞递送抑制性信号,从而降低其增殖,以及细胞因子和穿孔蛋白产生(Butte等人,《免疫学》,27:111-122(2007);Chen等人,《免疫学》,4:336-347(2004);Park等人,《血液》,116:

1291-1298 (2010); Wherry等人,《自然免疫学 (Nat Immunol)》,12:492-499 (2011); Zou等人,《免疫学》,8:467-477 (2008)。另外,来自T细胞的通过B7-H1对癌细胞的反向信号传导诱导对抗Fas-L信号传导的抗凋亡效应 (Azuma等人,《血液》,111:3635-3643 (2008))。Azuma等人,《血液》,111:3635-3643 (2008)。

[0486] 鉴于癌细胞对B7-H1的上调以及其表达与癌症进展和不良临床结果的关联 (Flies等人,《免疫疗法杂志》,30:251-260 (2007); Nishimura等人,《免疫学》,11:141-151 (1999); Wang等人,《微生物学和免疫学的最新课题 (Curr Top Microbiol Immunol)》,344:245-267 (2011)), 拮抗PD-1和CTLA-4途径的抗体在实体瘤,特别是在黑色素瘤中示出了显著的功效,其中两者的组合示出了甚至更高的活性。抗CTLA-4抗体,伊匹单抗 (ipilimumab), 主要通过抑制Treg细胞,改善了转移性黑色素瘤中T细胞向肿瘤中的浸润增加和肿瘤内CD8+:Treg比率增加的总体存活率 (Hamid等人,《转化医学杂志 (JTransl Med)》,9:204 (2011); Ribas等人,《临床癌症研究:美国癌症研究协会的官方期刊 (Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research)》,15:6267-6276 (2009); Twyman-Saint等人,《自然》,520:373-377 (2015))。抗PD-1抗体,纳武利尤单抗 (nivolumab) 在转移性黑色素瘤中示出了30-40%的总体应答率 (Robert等人,《新英格兰医学杂志》,372:320-330 (2015); Topalian等人,《临床肿瘤学杂志》,32:1020-1030 (2014)), 在包含转移性肾癌、非小细胞肺癌和复发性霍奇金淋巴瘤 (relapsed Hodgkin's Lymphoma) 的其它实体瘤的早期临床试验中具有类似的发现 (Ansell等人,《新英格兰医学杂志》,372:311-319 (2015); Brahmer等人,《临床肿瘤学杂志》,28:3167-3175 (2010); Topalian等人,《新英格兰医学杂志》,366:2443-2454 (2012))。由于在小鼠黑色素瘤模型中对抗CTLA-4抗体的抗性归因于PD-L1的上调,因此伊匹单抗和纳武利尤单抗两者的组合在小鼠模型和人类患者两者中证明了另外的功效 (Larkin等人,《新英格兰医学杂志》,373:23-34 (2015); Spranger等人,《癌症免疫疗法杂志 (J Immunother Cancer)》,2,3, doi:10.1186/2051-1426-2-3 (2014); Yu等人,《临床癌症研究:美国癌症研究协会的官方期刊》,16:6019-6028 (2010))。鉴于检查点抑制途径的重要性,据信PD-1/CTLA-4抑制将释放制动,而嵌合抗原受体将推动油门踏板。重要的是,可以利用瞬时递送仅瞬时释放制动,使得这些细胞不会导致未来的自身免疫性疾病。

[0487] i. CRISPRi

[0488] 为了避免PD-1和CTLA-4等抑制性信号的永久基因组修饰和失活,可以利用dCAS9 CRISPRi系统 (Larson等人,《自然实验室指南 (Nat Protoc)》,8:2180-2196 (2013))。编码无酶活性的dCAS9-KRAB抑制结构域、融合蛋白和抑制性信号传导蛋白的sgRNA (例如,CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4 (CD244)、BTLA (CD272)、KIR、TIM-3、TGF $\beta$ 受体显性阴性类似物等)的核酸可以被共递送到CAR细胞中。可以利用一个或多个sgRNA。sgRNA可以被设计成靶向近端启动子区和编码区 (非模板链)。替代方法利用单组分Cpf1 CRISPR系统,其是用于电穿孔和表达的较小的RNA (Zetsche等人,《细胞》,doi:10.1016/j.cell.2015.09.038 (2015))。上述RNA组分中的任一种组分还可以由DNA表达构建体,如载体,例如质粒编码。因此,RNA、DNA或其组合可以充当核酸货物。

[0489] 尽管用伊匹单抗广泛抑制CTLA-4会导致自身免疫后遗症,但据信这些副作用将通过限制CAR细胞的损失和mRNA递送的瞬时性能而减少。抑制性功能将及时恢复。

[0490] ii. 抑制性RNA

[0491] 可以递送到细胞的核酸货物可以是或编码功能性核酸或多肽,所述功能性核酸或多肽被设计成靶向和减少或抑制抑制性信号传导分子mRNA的表达或翻译;或减少或抑制抑制性信号传导分子蛋白的表达,降低其活性或增加其降解。合适的技术包含但不限于反义分子、siRNA、miRNA、适体、核酶、三重形成分子、RNAi等。在一些实施例中,mRNA编码减少抑制性信号传导的拮抗剂多肽。

[0492] 在一些实施例中,可以单独或组合将适于减少或沉默CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4 (CD244)、BTLA (CD272)、KIR、TIM-3、TGF $\beta$ 受体显性阴性类似物等的功能性RNA的货物或编码所述功能性RNA的货物递送到细胞。

[0493] 在一些实施例中,货物是编码降低生物利用度或充当CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4 (CD244)、BTLA (CD272)、KIR、TIM-3、TGF $\beta$ 受体显性阴性类似物或免疫抑制性途径中的另一种蛋白质的拮抗剂或其它负调节剂或抑制剂的多肽的RNA或DNA。蛋白质可以是旁分泌、内分泌或自分泌的。其可以在细胞内调节细胞。其可以分泌并调节表达细胞和/或其它(例如,相邻)细胞。其可以是调节表达细胞和/或其它细胞的跨膜蛋白。蛋白质可以是融合蛋白,例如Ig融合蛋白。

[0494] e. 促凋亡因子

[0495] 还提供了用于激活和再激活凋亡途径的组合物和方法。在一些实施例中,核酸是或编码激活、再激活或以其它方式增强或增加内在凋亡途径的因子或试剂。优选地,所述因子激活、再激活或以其它方式增强癌症(例如,肿瘤)细胞中的内在凋亡途径,并且更优选地对癌细胞具有特异性或靶向癌细胞。

[0496] 在一些实施例中,在递送抗凋亡因子或促增殖因子(如上文所讨论或本领域已知的那些)之后,细胞对诱导的凋亡比未经处理的细胞更具抗性或不敏感。促凋亡因子可以诱导或增加例如未经处理的细胞相对于经处理的T细胞的凋亡,并且优选地对癌细胞具有选择性。方案导致对癌细胞的双重攻击,一种是细胞攻击,另一种是分子攻击。

[0497] 内在凋亡途径可以通过靶向BCL-2家族成员来激活、再激活或以其它方式增强。BCL-2家族成员基于功能和Bcl-2同源性(BH)结构域被分类成三个亚组:多结构域抗凋亡(例如,BCL-2或BCL-XL)、多结构域促凋亡(例如,BAX和BAK)和仅BH3促凋亡(例如,BIM)蛋白。仅BH3亚组的成员,如BIM,充当位于整个细胞中的死亡哨兵,准备好将细胞损伤的各种生理和病理信号传输到位于线粒体处的核心凋亡机制(Danial等人,《细胞》,116:205-219 (2004))。

[0498] 在一些实施例中,促凋亡因子是促凋亡BH3模拟物。各种促凋亡BH3模拟物可以模拟BIM的天然促凋亡活性,并且提供操纵凋亡途径的多个点的能力。例如,BIM SAHB (BCL-2结构域的稳定 $\alpha$ 螺旋)、ABT-737和ABT-199是促凋亡的BH3模拟物,其通过对促凋亡的仅BH3螺旋结构域与由抗凋亡蛋白的BH1、BH2和BH3结构域汇合形成的疏水沟之间相互作用的结构研究而设计(Oltersdorf等人,《自然》,435:677-681 (2005))。

[0499] D. 靶细胞

[0500] 在一些实施例中,一种或多种特定细胞类型或组织是所公开的复合物的靶标。靶细胞可以在体外、离体或在受试者(即,体内)中。本文所讨论的应用可以在体外、离体或体内进行。对于离体应用,可以收集或分离细胞并在培养物中进行处理。经离体处理的细胞可

以以治疗有效量向有需要的受试者施用。对于体内应用,可以将货物例如基于组合物的循环、局部递送等被动地递送到靶细胞,或者可以例如用另外的细胞、组织、器官特异性靶向部分主动地靶向。因此,在一些实施例中,货物被递送到靶细胞以排除其它细胞。在一些实施例中,货物被递送到靶细胞和非靶细胞。

[0501] 靶细胞可以由从业者基于所期望的处理和疗法以及核酸货物的预期效应来选择。例如,当核酸货物预期诱导细胞死亡时,靶细胞可以是癌细胞;当核酸货物预期诱导基因组改变时,靶细胞可以是干细胞;当核酸货物编码嵌合抗原受体时,靶细胞可以是免疫细胞。

[0502] 3E10 scFv先前已被证明能够以ENT2依赖性方式渗透到细胞核中,而在ENT2缺陷细胞中核摄取的效率大大受损(Hansen等人,《生物化学杂志》282,20790-20793(2007))。ENT2(SLC29A2)是一种钠非依赖性转运蛋白,其参与嘌呤和嘧啶核苷和核碱基的转运,并且对硝基苄基巯基嘌呤核苷(NBMPR)的敏感性低于ENT1。

[0503] 在一些实施例中,靶细胞在其血浆成员、其核膜或两者上表达ENT2。ENT2的表达相对普遍,但在组织和细胞类型中的丰度不同。已在脑、心脏、胎盘、胸腺、胰腺、前列腺和肾中得到证实(Griffiths等人,《生物化学杂志》,1997.328(Pt 3):第739-43页,Crawford等人,《生物化学杂志》,1998.273(9):第5288-93页)。相对于其它转运蛋白,ENT2具有骨骼肌中最高的mRNA表达之一(Baldwin等人,《弗鲁格档案(Pflugers Arch)》,2004.447(5):第735-43页,Govindarajan等人,《美国生理学杂志-调节、综合和比较生理学(Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol)》,2007.293(5):第R1809-22页)。因此,在一些实施例中,靶细胞是脑、心脏、胎盘、胸腺、胰腺、前列腺、肾或骨骼肌。由于骨骼肌对ENT2的高表达,所公开的组合物和方法可以特别有效地将核酸货物递送到这些细胞,和/或与表达较低水平ENT2的其它细胞相比,较高水平的货物可以被递送到这些细胞。

[0504] 下文讨论了另外的非限制性示例性靶细胞。

[0505] 1. 祖细胞和干细胞

[0506] 细胞可以是造血祖细胞或干细胞。在一些实施例中,特别是与基因编辑和基因疗法相关的那些靶细胞是CD34<sup>+</sup>造血干细胞。造血干细胞(HSC)(如CD34<sup>+</sup>细胞)是产生包含红细胞的所有血细胞类型的多能干细胞。

[0507] 可以由本领域技术人员分离和富集干细胞。用于CD34<sup>+</sup>和其它细胞的此类分离和富集的方法是本领域已知的,并且例如公开在美国专利第4,965,204号;第4,714,680号;第5,061,620号;第5,643,741号;第5,677,136号;第5,716,827号;第5,750,397号和第5,759,793号。如本文在富集造血祖细胞和干细胞的组合物的背景下所使用的,“富集”表示期望的元件(例如,造血祖细胞和干细胞)的比例高于在细胞天然来源中发现的比例。细胞的组成可以在细胞的天然来源上富集至少一个数量级,优选地两个或三个数量级,并且更优选地10个、100个、200个或1000个数量级。

[0508] 在人中,在通过以足以使造血干细胞从骨髓空间移动到周围循环中的量向供体皮下或静脉内注射造血生长因子(如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干细胞因子(SCF))引起的细胞因子动员后,从脐带血、骨髓或从血液中回收CD34<sup>+</sup>细胞。最初,可以从任何合适的骨髓来源,例如,胫骨、股骨、脊柱和其它骨腔获得骨髓细胞。为了分离骨髓,可以使用适当的溶液冲洗骨髓,所述溶液将是方便地补充有胎牛血清或其它天然存在的因子与通常在约5至25mM的低浓度下的可接受的缓冲液结合的平衡的

盐溶液。便的缓冲溶液包含Hepes、磷酸盐缓冲液、乳酸盐缓冲液等。

[0509] 可以通过正负选择技术来选择细胞。使用本领域技术人员已知的方法,可以使用与造血祖细胞或干细胞表面抗原,例如,CD34结合的可商购获得的抗体来选择细胞。例如,可以将抗体与磁珠缀合,并利用免疫原性程序来回收所期望的细胞类型。其它技术涉及使用荧光激活细胞分选(FACS)。在非白血病个体的造血系统内的祖细胞中发现的CD34抗原在单克隆抗体My-10识别的细胞群体上表达(即,表达CD34抗原),并且可以用于分离用于骨髓移植的干细胞。存入美国典型培养物保藏中心(马里兰州罗克维尔(Rockville, Md.))作为HB-8483的My-10可作为抗HPCA1商购获得。另外地,可以利用来自人骨髓的分化的且“专用的”细胞的阴性选择来针对基本上任何所期望的细胞标志物进行选择。例如,祖细胞或干细胞,最优选地CD34<sup>+</sup>细胞,可以表征为CD3<sup>-</sup>、CD7<sup>-</sup>、CD8<sup>-</sup>、CD10<sup>-</sup>、CD14<sup>-</sup>、CD15<sup>-</sup>、CD19<sup>-</sup>、CD20<sup>-</sup>、CD33<sup>-</sup>、II类HLA<sup>+</sup>和Thy-1<sup>+</sup>中的任一种。

[0510] 一旦分离出祖细胞或干细胞,就可以通过在任何合适的培养基中生长来繁殖这些细胞。例如,祖细胞或干细胞可以在来自基质细胞(如可以从与因子分泌相关的骨髓或肝脏中获得的那些基质细胞)的条件培养基中生长或在包含支持干细胞增殖的细胞表面因子的培养基中生长。可以采用适当的单克隆抗体去除不期望的细胞来使基质细胞脱离造血细胞。

[0511] 使分离的细胞与抗体和核酸货物复合物离体接触。货物被运送到的细胞可以被称为经修饰的细胞。复合物的溶液可以被简单地添加到培养物中的细胞中。可能期望以S相同步细胞。用于例如通过双胸苷阻断使培养的细胞同步的方法是本领域已知的(Zielke等人,《细胞生物学方法(Methods Cell Biol.)》,8:107-121(1974))。

[0512] 经修饰的细胞可以在向受试者施用之前在培养物中维持或扩增。取决于细胞类型,培养条件是本领域通常已知的。具体地,已经很好地研究了用于维持CD34<sup>+</sup>的条件,并且若干种合适的方法是可用的。用于离体全能造血细胞扩增的常用方法是在存在早期作用的细胞因子,如白介素-3的情况下培养经纯化的祖细胞或干细胞。还示出在用于离体维持造血祖细胞的营养培养基中,包含血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)和f1t3配体(F1t-3L;即f1t3基因产物的配体)的组合可用于在体外扩增原始(即,相对未分化的)人造造血祖细胞,并且这些细胞能够移植到SCID-hu小鼠中(Luens等人,1998,《血液》91:1206-1215)。在其它已知方法中,可以将细胞离体维持在营养培养基中(例如,持续数分钟、数小时或3天、6天、9天、13天或更多天),所述营养培养基包含鼠类催乳素样蛋白E(mPLP-E)或鼠类催乳素样蛋白F(mPIP-F;共同为mPLP-E/IF)(美国专利第6,261,841号)。应当理解,也可以使用其它合适的细胞培养和扩增方法。如美国专利第5,945,337号中所描述的,细胞也可以在无血清培养基中生长。

[0513] 在另一个实施例中,在使用本领域众所周知的方法向受试者施用之前,使用白介素和生长因子的特异性组合将经修饰的造血干细胞离体分化成CD4<sup>+</sup>细胞培养物。与分离的造血干细胞的原始群体相比,细胞可以大量离体扩增,优选地至少5倍,更优选地至少10倍并且甚至更优选地至少20倍。

[0514] 在另一个实施例中,细胞可以是去分化的体细胞。体细胞可以被重新编程成为可以被诱导成为造血祖细胞的多能干细胞样细胞。然后可以用如上文关于CD34<sup>+</sup>所描述的组合物处理造血祖细胞。可以重新编程的代表性体细胞包含但不限于成纤维细胞、脂肪细胞

和肌肉细胞。来自诱导型干细胞样细胞的造血祖细胞已在小鼠中成功开发(Hanna等人,《科学》,318:1920-1923(2007))。

[0515] 为了由诱导型干细胞样细胞产生造血祖细胞,从宿主中采收细胞。在一优选的实施例中,体细胞是自体成纤维细胞。用编码Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc转录因子的载体培养和转导细胞。培养经转导的细胞并筛选胚胎干细胞(ES)形态和ES细胞标志物,包括但不限于AP、SSEA1和Nanog。培养并诱导经转导的ES细胞以产生诱导型干细胞样细胞。然后筛选细胞的CD41和c-kit标志物(早期造血祖细胞标志物)以及用于骨髓和红系分化的标志物。

[0516] 然后,将经修饰的造血干细胞或包含例如诱导型造血祖细胞的经修饰的细胞引入到受试者中。可以使用各种方法来影响细胞的递送,并且最优选地包含通过输注以及直接储库注射到骨髓、骨髓和/或皮下位点中的静脉内施用。

[0517] 可以对接受经修饰的细胞的受试者进行骨髓调节治疗以增强细胞的移植。在施用细胞之前,可以使用放射或化学疗法治疗来治疗受体以增强移植。施用后,细胞通常将需要一段时间移植。实现造血干细胞或祖细胞的显著移植通常花费数周到数月。

[0518] 高百分比的经修饰的造血干细胞的移植对于实现显著的预防或治疗效果可能不是必需的。据信,移植后经移植的细胞将随着时间的推移而扩增,以增加经修饰细胞的百分比。据信,在一些情况下,仅需要移植少量或小百分比的经修饰的造血干细胞来提供预防或治疗作用。

[0519] 在优选的实施例中,要向受试者施用的细胞将是自体的,例如源自受试者或同基因的。

## [0520] 2. 胚胎

[0521] 在一些实施例中,组合物和方法可以用于在体外将货物递送到胚胎细胞。所述方法通常包含使胚胎与有效量的抗体-货物DNA在体外接触,以改善货物转导到胚胎中。胚胎可以是单细胞受精卵,然而还提供了在受精之前和受精期间对雄配子和雌配子的处理以及具有2个、4个、8个或16个细胞并且不仅包含受精卵而且还包含桑椹胚和胚细胞的胚胎。在一些实施例中,在体外受精期间或之后,在培养第0-6天使胚胎与组合物接触。

[0522] 接触可以将组合物添加到沐浴胚胎的液体培养基中。例如,可以将组合物直接移液到胚胎培养基中,然后被胚胎摄取。

## [0523] 3. 免疫细胞

[0524] 在一些实施例中,靶细胞是一种或多种类型的免疫细胞。例如,不同类型的细胞可以用于或以其它方式靶向用于免疫调节和基于CAR的疗法。优选的靶向/工程化T细胞可以根据肿瘤和过继性疗法的目标而变化。效应T细胞通常是优选的,因为其分泌高水平的效应细胞因子并且在体外是肿瘤靶标的熟练扼杀剂(Barrett等人,《医学年鉴》,65:333-347(2014))。具有强CAR介导的细胞毒性的两个互补淋巴细胞群是CD3-CD56+NK细胞和CD3+CD8+T细胞。CD8+T细胞与CD4+辅助T细胞的使用导致抑制性T-reg细胞的存在增加,并抑制了CD8+T细胞的细胞毒性。由于重新编程的CD8+T细胞是预激活的,以便其直接作用于肿瘤细胞,而不需要在淋巴结中激活,CD4+T细胞支持不是必需的。

[0525] 另外地,有证据表明,输注原初T细胞(Rosenberg等人,《癌症研究进展(Adv.Cancer Res.)》,25:323-388(1977))、中央记忆T细胞( $T_{CM}$ 细胞)(Berger等人,《临床研究杂志(J.Clin.Invest.)》,118:294-305(2008))、Th17细胞(Paulos等人,《科学转化医

学》,2:55-78(2010))以及T干记忆细胞(Gattinoni等人,《自然医学》,17:1290-1297(2012))在某些应用中都可能例如由于其高复制能力而具有某些优点。肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)由于其抗原特异性也具有某些优点,并且可以用于本文所公开的递送策略中。

[0526] 尽管有时称为CAR细胞,CAR免疫细胞,和CART细胞(或CAR T细胞),但是应当理解,本文所公开的CAR和其它递送策略也可以在其它细胞类型中执行,特别是在不同类型的免疫细胞中执行,所述不同类型的免疫细胞包含本文所讨论的那些(例如,淋巴细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞、B细胞、抗原呈递细胞、巨噬细胞等)和其它地方所描述的那些(参见例如,Barrett等人,《医学年鉴》,65:333-347(2014))。

[0527] 4. 癌细胞和肿瘤

[0528] 在一些实施例中,靶细胞是癌细胞。在此类实施例中,提供了在癌症的背景下可能有用的治疗方法,包含肿瘤疗法。下面的实例可以指示DNA货物可以更普遍地被递送到多个组织,并且不限于肿瘤,而RNA递送可以对肿瘤组织更具选择性。因此,在一些实施例中,当癌细胞是靶细胞时,货物可以由RNA(例如,单独的RNA)构成。

[0529] 可以递送到癌细胞的货物包含但不限于用于表达一种或多种促凋亡因子、免疫原性因子或肿瘤抑制因子的构建体;基因编辑组合物,靶向致癌基因的抑制性核酸;以及本文和其它地方所讨论的其它策略。在一些实施例中,货物是编码促凋亡因子或增加细胞的免疫应答的免疫原性因子的mRNA。在其它实施例中,货物是siRNA,其减少致癌基因或其它引起癌症的转录物的表达。

[0530] 在成熟的动物中,在大多数器官和组织中的细胞再生与细胞死亡之间通常维持平衡。体内各种类型的成熟细胞均具有给定的寿命;随着这些细胞死亡,各种类型的干细胞的增殖和分化会产生新的细胞。在正常情况下,新细胞的产生如此调控,以致于任何特定类型的细胞的数量都保持恒定。然而,偶尔会出现不再对正常生长控制机制作出应答的细胞。这些细胞产生的细胞克隆可以扩展到相当大的尺寸,从而产生肿瘤或赘生物。不能无限生长并且不会广泛侵袭周围健康组织的肿瘤是良性的。持续生长并逐渐具有侵袭性的肿瘤是恶性的。术语癌症具体地指代恶性肿瘤。除了不受控制的生长外,恶性肿瘤还表现出转移。在此过程中,一小簇癌细胞从肿瘤中脱落,侵袭血管或淋巴管,并被携带到其它组织,在所述其它组织中继续增殖。以此方式,一个部位处的原发性肿瘤可能在另一个部位处产生继发性肿瘤。

[0531] 本文所描述的组合物和方法可以用于通过延迟或抑制受试者的肿瘤的生长、减少肿瘤的生长或大小、抑制或减少肿瘤的转移和/或抑制或减少与肿瘤发展或生长相关的症状来治疗患有良性或恶性肿瘤的受试者。

[0532] 可以治疗的恶性肿瘤在本文中根据肿瘤源自的组织的胚胎起源进行分类。癌是由内胚层或外胚层组织(如皮肤或内脏器官和腺体的上皮层)产生的肿瘤。所公开的组合物在治疗癌中特别有效。发生频率较低的肉瘤源自于中胚层结缔组织,如骨骼、脂肪和软骨。白血病和淋巴瘤是骨髓造血细胞的恶性肿瘤。白血病以单细胞形式增殖,而淋巴瘤则倾向于以肿瘤块的形式生长。恶性肿瘤可能会出现在身体的许多器官或组织处,从而形成癌症。

[0533] 可以用所提供的组合物和方法治疗的癌症类型包含但不限于癌症,如血管癌,如多发性骨髓瘤、腺癌和肉瘤,以及骨癌、膀胱癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、食道癌、肾癌、肝癌、肺癌、鼻咽癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌和子宫癌。在一些实施例中,所公开

的组合用于同时治疗多种癌症类型。所述组合还可以用于治疗多个位置处的转移或肿瘤。

[0534] 3E10/3E10变体治疗性多核苷酸组合物

[0535] 一方面,本公开提供了药物组合物,其包含在例如,如上文所描述的治疗性多核苷酸与如本文所描述的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段之间形成的复合物。

[0536] 在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少2:1。如实例18和20中所报道,在本文所描述的组合物中使用3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比保护治疗性多核苷酸免于降解。

[0537] 进一步地,如图19A和19C中所展示的,尽管亲本3E10抗体以2:1和20:1的摩尔比保护mRNA免受RNA酶A介导的RNA降解,但通过20:1的摩尔比提供的保护超过以2:1提供的保护。因此,在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约2:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约5:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约7.5:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约10:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约15:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约20:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约25:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约30:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约40:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约50:1。

[0538] 进一步地,如图21所示,使用更高的化学计量比更好地保护较长的多核苷酸不被降解。因此,在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约50:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约75:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约100:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约125:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约150:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约200:1。在一些实施例中,较长的多核苷酸的长度为至少1000个核苷酸,例如,对于单链多核苷酸为1000个核苷酸,或者对于双链多核苷酸为1000个碱基对。在一些实施例中,较长的多核苷酸的长度为至少1500个核苷酸。在一些实施例中,较长的多核苷酸的长度为至少2000个核苷酸。在一些实施例中,

较长的多核苷酸的长度为至少2500个核苷酸。在一些实施例中,较长的多核苷酸的长度为至少3000个核苷酸。在一些实施例中,较长的多核苷酸的长度为至少4000个核苷酸。在一些实施例中,较长的多核苷酸的长度为至少5000个核苷酸。在一些实施例中,较长的多核苷酸的长度为至少7500个核苷酸。在一些实施例中,较长的多核苷酸的长度为至少10,000个核苷酸。

[0539] 在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少约3:1、至少约4:1、至少约5:1、至少约6:1、至少约7:1、至少约8:1、至少约9:1、至少约10:1、至少约11:1、至少约12:1、至少约13:1、至少约14:1、至少约15:1、至少约16:1、至少约17:1、至少约18:1、至少约19:1、至少约20:1、至少约21:1、至少约22:1、至少约23:1、至少约24:1、至少约25:1、至少约26:1、至少约27:1、至少约28:1、至少约29:1、至少约30:1、至少约31:1、至少约32:1、至少约33:1、至少约34:1、至少约35:1、至少约36:1、至少约37:1、至少约38:1、至少约39:1、至少约40:1、至少约41:1、至少约42:1、至少约43:1、至少约44:1、至少约45:1、至少约50:1、至少约55:1、至少约60:1、至少约70:1、至少约75:1、至少约80:1、至少约85:1、至少约90:1、至少约95:1、至少约100:1、至少约110:1、至少约120:1、至少约125:1、至少约130:1、至少约140:1、至少约150:1、至少约160:1、至少约170:1、至少约175:1、至少约180:1、至少约190:1、至少约200:1或更大。

[0540] 在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少2:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少5:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少7.5:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少10:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少15:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少20:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少25:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少30:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少40:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少50:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少75:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少100:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少125:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少150:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少200:1。

[0541] 在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合

片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为至少3:1、至少4:1、至少5:1、至少6:1、至少7:1、至少8:1、至少9:1、至少10:1、至少11:1、至少12:1、至少13:1、至少14:1、至少15:1、至少16:1、至少17:1、至少18:1、至少19:1、至少20:1、至少21:1、至少22:1、至少23:1、至少24:1、至少25:1、至少26:1、至少27:1、至少28:1、至少29:1、至少30:1、至少31:1、至少32:1、至少33:1、至少34:1、至少35:1、至少36:1、至少37:1、至少38:1、至少39:1、至少40:1、至少41:1、至少42:1、至少43:1、至少44:1、至少45:1、至少50:1、至少55:1、至少60:1、至少70:1、至少75:1、至少80:1、至少85:1、至少90:1、至少95:1、至少100:1、至少110:1、至少120:1、至少125:1、至少130:1、至少140:1、至少150:1、至少160:1、至少170:1、至少175:1、至少180:1、至少190:1、至少200:1或更大。

[0542] 在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、26:1、27:1、28:1、29:1、30:1、31:1、32:1、33:1、34:1、35:1、36:1、37:1、38:1、39:1、40:1、41:1、42:1、43:1、44:1、45:1、50:1、55:1、60:1、70:1、75:1、80:1、85:1、90:1、95:1、100:1、110:1、120:1、125:1、130:1、140:1、150:1、160:1、170:1、175:1、180:1、190:1、200:1或更大。

[0543] 在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比不超过约200:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比不超过约150:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比不超过约100:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比不超过约50:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比不超过约40:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比不超过约30:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比不超过约25:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比不超过约20:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比不超过约15:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比不超过约10:1。

[0544] 在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比不超过约200:1、不超过约175:1、不超过约150:1、不超过约125:1、不超过约100:1、不超过约75:1、不超过约50:1、不超过约45:1、不超过约40:1、不超过约35:1、不超过约30:1、不超过约35:1、不超过约30:1、不超过约25:1、不超过约20:1或更少。

[0545] 在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比不超过200:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比不超过150:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多









体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为25:1至75:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为25:1至50:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为25:1至40:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为25:1至30:1。

[0555] 在又其它实施例中,设想了落在约2:1至约200:1的范围内的其它范围。

[0556] 在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为约1:1至约200:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为约1:1至约175:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为约1:1至约150:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为约1:1至约125:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为约1:1至约100:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为约1:1至约75:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为约1:1至约50:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为约1:1至约30:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为约1:1至约20:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为约1:1至约10:1。在一些实施例中,本文所描述的药物组合物的3E10抗体或其变体、或其抗原结合片段与治疗性多核苷酸的摩尔比为约1:1至约5:1。

[0557] 所公开的组合物和方法可以通过以下编号段落进一步理解。

[0558] 1.一种组合物,其包括以下或由以下组成:

[0559] (a) 3E10单克隆抗体、其细胞穿透片段;单价、二价或多价单链可变片段(scFv);或双功能抗体;或其人源化形式或变体;以及

[0560] (b) 核酸货物,所述核酸货物包括编码多肽的核酸、功能性核酸、编码功能性核酸的核酸或其组合。

[0561] 2.根据段落1所述的组合物,其中(a)包括:

[0562] (i) SEQ ID NO:1-6、12、13、46-48或50-52中的任一者的CDR与SEQ ID NO:7-11、14或53-58中的任一者的CDR的组合;

[0563] (ii) 选自SEQ ID NO:15-23、42或43中的任一者的第一重链CDR、第二重链CDR和第三重链CDR与选自SEQ ID NO:24-30、44或45中的任一者的第一轻链CDR、第二轻链CDR和第三轻链CDR的组合;

[0564] (iii) (i) 或(ii)的人源化形式;

[0565] (iv) 包括与SEQ ID NO:1或2中的任一者包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的重链与包括与SEQ ID NO:7或8包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的轻链的组合;

[0566] (v) 人源化形式或(iv);或

[0567] (vi) 包括与SEQ ID NO:3-6、46-48或50-52中的任一者包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的重链与包括与SEQ ID NO:9-11或53-58包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的轻链的组合。

[0568] 3. 根据段落1或2所述的组合物,其中(a)包括与由ATCC登录号PTA 2439杂交瘤产生的单克隆抗体3E10相同或不同的表位特异性。

[0569] 4. 根据段落1至3中任一项所述的组合物,其中(a)是具有单克隆抗体3E10的互补位的重组抗体。

[0570] 5. 一种组合物,其包括:

[0571] (a) 结合蛋白,所述结合蛋白包括:

[0572] (i) SEQ ID NO:1-6、12、13、46-48或50-52中的任一者的CDR与SEQ ID NO:7-11、14或53-58中的任一者的CDR的组合;

[0573] (ii) 选自SEQ ID NO:15-23、42或43的第一重链CDR、第二重链CDR和第三重链CDR与选自SEQ ID NO:24-30、44或45的第一轻链CDR、第二轻链CDR和第三轻链CDR的组合;

[0574] (iii) (i) 或(ii)的人源化形式;

[0575] (iv) 包括与SEQ ID NO:1或2中的任一者包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的重链与包括与SEQ ID NO:7或8包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的轻链的组合;

[0576] (v) 人源化形式或(iv);或

[0577] (vi) 包括与SEQ ID NO:3-6、46-48或50-52中的任一者包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的重链与包括与SEQ ID NO:9-11或53-58包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的轻链的组合;以及

[0578] (b) 核酸货物,所述核酸货物包括编码多肽的核酸、功能性核酸、编码功能性核酸的核酸或其组合。

[0579] 6. 根据段落1至5中任一项所述的组合物,其中(a)是双特异性的。

[0580] 7. 根据段落6所述的组合物,其中(a)靶向所关注的细胞类型。

[0581] 8. 根据段落1至7中任一项所述的组合物,其中(a)和(b)是非共价连接的。

[0582] 9. 根据段落1至8中任一项所述的组合物,其中(a)和(b)处于复合物中。

[0583] 10. 根据段落1至9中任一项所述的组合物,其中(b)包括DNA、RNA、PNA或其它经修饰的核酸、或核酸类似物或其组合。

[0584] 11. 根据段落1至10中任一项所述的组合物,其中(b)包括mRNA。

[0585] 12. 根据段落1至11中任一项所述的组合物,其中(b)包括载体。

[0586] 13. 根据段落12所述的组合物,其中所述载体包括与表达控制序列可操作地连接的编码所关注的多肽的核酸序列。

[0587] 14. 根据段落13所述的组合物,其中所述载体是质粒。

[0588] 15. 根据段落1至14中任一项所述的组合物,其中(b)包括编码Cas核酸内切酶、gRNA或其组合的核酸。

[0589] 16. 根据段落1至15中任一项所述的组合物,其中(b)包括编码嵌合抗原受体多肽的核酸。

[0590] 17. 根据段落1至16中任一项所述的组合物,其中(b)包括功能性核酸。

[0591] 18. 根据段落1至17中任一项所述的组合物,其中(b)包括编码功能性核酸的核酸。

- [0592] 19. 根据段落17或18所述的组合物,其中所述功能性核酸是反义分子、siRNA、miRNA、适体、核酶、RNAi或外部向导序列。
- [0593] 20. 根据段落1至19中任一项所述的组合物,其中(b)包括多个单一核酸分子。
- [0594] 21. 根据段落1至19中任一项所述的组合物,其中(b)包括多个2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个不同的核酸分子。
- [0595] 22. 根据段落1至21中任一项所述的组合物,其中(b)包括长度介于约1与25,000个核碱基之间的核酸分子或由其组成。
- [0596] 23. 根据段落1至22中任一项所述的组合物,其中(b)包括单链核酸、双链核酸或其组合或由其组成。
- [0597] 24. 根据段落1至23中任一项所述的组合物,其进一步包括载体DNA。
- [0598] 25. 根据段落24所述的组合物,其中所述载体DNA是非编码DNA。
- [0599] 26. 根据段落24或25所述的组合物,其中(b)由RNA构成。
- [0600] 27. 一种药物组合物,其包括根据段落1至26中任一项所述的组合物以及药学上可接受的赋形剂。
- [0601] 28. 根据段落27所述的组合物,其进一步包括包封(a)和(b)的复合物的聚合纳米颗粒。
- [0602] 29. 根据段落28所述的组合物,其中靶向部分、细胞穿透肽或其组合与所述纳米颗粒缔合、连接、缀合或以其它方式直接或间接附接。
- [0603] 30. 一种将核酸货物递送到细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与有效量的根据段落1至29中任一项所述的组合物接触。
- [0604] 31. 根据段落30所述的方法,其中所述接触离体发生。
- [0605] 32. 根据段落31所述的方法,其中所述细胞是造血干细胞或T细胞。
- [0606] 33. 根据段落30至32中任一项所述的方法,其进一步包括向有需要的受试者施用所述细胞。
- [0607] 34. 根据段落33所述的方法,其中以有效量向所述受试者施用所述细胞以治疗疾病或病症的一种或多种症状。
- [0608] 35. 根据段落30所述的方法,其中在向有需要的受试者施用之后,所述接触在体内发生。
- [0609] 36. 根据段落33至35中任一项所述的方法,其中所述受试者患有疾病或病症。
- [0610] 37. 根据段落36所述的方法,其中所述疾病或病症是遗传病症、癌症或感染或感染性疾病。
- [0611] 38. 根据段落36或37所述的方法,其中(b)以有效量递送到所述受试者的细胞中,以减少所述受试者的所述疾病或病症的一种或多种症状。
- [0612] 39. 一种制备根据段落1至29中任一项所述的组合物的方法,所述方法包括在与细胞接触之前,将(a)和(b)在合适的温度下一起温育和/或混合持续有效时间量以形成(a)和(b)的复合物。
- [0613] 40. 一种制备根据段落1至29中任一项所述的组合物的方法,所述方法包括任选地在室温下或37摄氏度下将(a)和(b)一起温育和/或混合持续约1分钟至约30分钟、约10分钟至约20分钟或约15分钟。

[0614] 41. 根据段落1至40中任一项所述的组合物或方法,其中3E10单克隆抗体、其细胞穿透片段;单价、二价或多价单链可变片段(scFv);或双功能抗体;或其人源化形式或变体包括SEQ ID NO:92或93的核酸结合袋,或其具有相同或改善的与核酸结合的能力的变体。

[0615] 42. 根据段落1至41中任一项所述的组合物或方法,其中与重链氨基酸序列或其CDR的D31或N31对应的氨基酸残基被R取代。

[0616] 43. 根据段落1至42中任一项所述的组合物或方法,其中与重链氨基酸序列或其CDR的D31或N31对应的氨基酸残基被L取代。

[0617] 44. 一种结合蛋白,其包括:

[0618] (i) SEQ ID NO:1-6、12、13、46-48或50-52中的任一者的CDR与SEQ ID NO:7-11、14或53-58中的任一者的CDR的组合的变体;

[0619] (ii) 第一重链CDR与选自SEQ ID NO:15-23、42或43的第二重链CDR和第三重链CDR的组合与选自SEQ ID NO:24-30、44或45的第一轻链CDR、第二轻链CDR和第三轻链CDR的组合的变体;

[0620] (iii) (i) 或(ii)的人源化形式;

[0621] (iv) 包括与SEQ ID NO:1或2中的任一者包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的重链与包括与SEQ ID NO:7或8包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的轻链的组合;

[0622] (v) 人源化形式或(iv);或

[0623] (vi) 包括与SEQ ID NO:3-6、46-48或50-52中的任一者包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的重链与包括与SEQ ID NO:9-11或53-58包括至少85%序列同一性的氨基酸序列的轻链的组合,

[0624] 其中与D31或N31对应的氨基酸残基被R或L取代。

[0625] 45. 根据段落44所述的结合蛋白,其包括SEQ ID NO:92或93的核酸结合袋,或其具有相同或改善的与核酸结合的能力的变体。

[0626] 实例

[0627] 关于下面的实验,使用标准的3E10序列,除了其中注明为D31N变体(例如,实例4)之外。标准的3E10和D31N变体两者都被用作全长抗体。

[0628] 实例1:3E10在1小时后增加PNA的细胞摄取。

[0629] 材料和方法

[0630] 将单独的PNA(1nmole)(MW=9984.39;长度为29个核苷酸)或与3E10复合的PNA(0.75mg)在室温下混合持续5分钟。然后将200,000个K562细胞添加到3E10或单独的PNA在无血清培养基中的悬浮液中。添加另外的无血清培养基至最终体积为500u1。在37°C下与细胞一起温育持续1小时后,在通过流式细胞术进行分析之前,将细胞离心并用PBS洗涤三次。PNA通过与荧光染料,四甲基罗丹明(TAMRA)附接来标记。

[0631] 结果

[0632] 结果在流式细胞术点状图(图1A-1C)中展示。定量了摄取%(图1D)。结果示出,当与3E10混合时PNA的摄取增加。

[0633] 实例2:3E10在24小时后增加PNA的细胞摄取。

[0634] 材料和方法

[0635] 将单独的PNA(1nmole)(MW=9984.39;长度为29个核苷酸)或与3E10复合的PNA

(0.75mg) 在室温下混合持续5分钟。然后将200,000个K562细胞添加到3E10或单独的PNA在无血清培养基中的悬浮液中。添加另外的无血清培养基至最终体积为500ul。在37°C下与细胞一起温育持续24小时后,在通过流式细胞术进行分析之前,将细胞离心并用PBS洗涤三次。

[0636] 将20,000个U2OS细胞接种在8孔室载玻片中,并使其粘附持续24小时。随后用单独的PNA(1nmole)或与3E10(10uM)复合的PNA处理细胞。在37°C下一起温育持续24小时后,在固定和核染色之前,用PBS洗涤PNA或与3E10混合的PNA。随后通过流式细胞术定量PNA摄取,并使用荧光显微镜成像。PNA通过与荧光染料,四甲基罗丹明(TAMRA)附接来标记。

[0637] 结果

[0638] 结果在流式细胞术点状图(图2A-2C)中展示。定量了摄取%(图2D)。结果示出,当与3E10混合时PNA的摄取增加。

[0639] 荧光显微镜示出了核DNA(呈蓝色的DAPI)和PNA(呈红色的Tamra)的共定位,其通过产生不同的粉红色色调显而易见。

[0640] 实例3:3E10在24小时后增加siRNA的细胞摄取。

[0641] 材料和方法

[0642] 将经标记的siRNA(通过与荧光素脒,FAM附接)(1nmole)或与3E10复合的siRNA(0.75mg)在室温下混合持续5分钟。然后将200,000个K562细胞添加到3E10或单独的siRNA在无血清培养基中的悬浮液中。添加另外的无血清培养基至最终体积为500ul。在37°C下与细胞一起温育持续24小时后,在通过流式细胞术进行分析之前,将细胞离心并用PBS洗涤三次。

[0643] 结果

[0644] 结果在流式细胞术点状图(图3A-3C)中展示。定量了摄取%(图3D)。结果示出,当与3E10混合时siRNA的细胞摄取增加。

[0645] 实例4:3E10在24小时后增加mRNA的细胞摄取。

[0646] 材料和方法

[0647] 将单独的经标记的mRNA(通过与花青5、Cy5附接)(2ug)或与3E10复合的经标记的mRNA(2.5,5和10uM)在室温下混合持续5分钟。将3E10加mRNA,或单独的mRNA的悬浮液添加到无血清培养基中的200,000个K562细胞中。添加另外的无血清培养基至最终体积为500ul。在37°C下与细胞一起温育持续24小时后,在通过流式细胞术进行分析之前,将细胞离心并用PBS洗涤三次。

[0648] 结果

[0649] 结果在流式细胞术点状图(图4A-4H)中展示。定量了摄取%(图4I)。结果示出,当与3E10混合时mRNA的摄取增加。注意,通过3E10的D31N变体递送mRNA导致最高水平的mRNA细胞摄取。

[0650] 荧光显微镜示出了在翻译相同的编码绿色荧光蛋白(GFP)报告基因的经Cy5标记的mRNA后,U2OS细胞中的功能性GFP表达。

[0651] 实例5:3E10在1小时后增加mRNA的细胞摄取。

[0652] 材料和方法

[0653] 将经标记的mRNA(Cy5)(2ug)或与3E10的D31N变体复合的经标记的mRNA(0.1-

10uM) 在室温下混合持续5分钟。将3E10加mRNA,或单独的mRNA的悬浮液添加到无血清培养基中的200,000个K562细胞中。添加另外的无血清培养基至最终体积为500u1。在37°C下与细胞一起温育持续1小时后,在通过流式细胞术进行分析之前,将细胞离心并用PBS洗涤三次。

[0654] 结果

[0655] 结果在流式细胞术点状图(图5A-5H)中展示。定量了摄取%(图5I)。

[0656] 实例6:3E10增加质粒DNA的细胞摄取

[0657] 材料和方法

[0658] 将GFP报告质粒DNA(250ug)与3E10(10uM)在室温下复合持续5分钟。将3E10加质粒DNA,或单独的质粒DNA的悬浮液添加到无血清培养基中的200,000个K562细胞中。添加另外的无血清培养基至最终体积为500u1。在37°C下与细胞一起温育持续24小时后,将细胞离心并用PBS洗涤三次。在初始处理后72小时,对细胞进行成像并分析GFP表达。

[0659] 结果

[0660] 如通过绿色荧光所测量的,结果指示当3E10与质粒DNA组合时,GFP质粒被细胞稳健地摄取,从而指示GFP构建体的摄取和功能性表达。当使用单独的质粒DNA时,未看到摄取或绿色荧光。(图6)。

[0661] 实例7:3E10介导体内mRNA递送

[0662] 材料和方法

[0663] 将编码GFP的10ug的mRNA与0.1mg的3E10在室温下混合持续15分钟。将与3E10复合的mRNA全身注射到携带测量为100mm<sup>3</sup>的EMT6肺腹肿瘤的BALB/c小鼠。处理后20小时,收获肿瘤并使用IVIS成像分析mRNA表达(GFP)。

[0664] 结果

[0665] 与不产生肿瘤中的任何GFP表达的自由注射的mRNA相比,3E10介导的mRNA的递送导致肿瘤中的显著更高水平的GFP表达。在用任一种处理检查的包含肝、脾、心脏和肾的正常组织中的任何正常组织中,均不存在GFP的可检测表达。结果表明mRNA被稳健地递送到肿瘤中,具有功能性翻译和表达。

[0666] 实例8:3E10介导体内siRNA递送

[0667] 材料和方法

[0668] 将40ug的经荧光标记的siRNA与增加剂量的3E10(0.25,0.5和1mg)在室温下混合持续15分钟。将与3E10复合的siRNA全身注射到携带测量为100mm<sup>3</sup>的EMT6肺腹肿瘤的BALB/c小鼠。处理后20小时,收获肿瘤并使用IVIS成像分析siRNA递送。

[0669] 将40ug的经荧光标记的siRNA与1mg 3E10或0.1mg的3E10的D31N变体在室温下混合持续15分钟。将与3E10复合的siRNA全身注射到携带测量为100mm<sup>3</sup>的EMT6肺腹肿瘤的BALB/c小鼠。处理后20小时,收获肿瘤并使用IVIS成像分析siRNA递送。

[0670] 结果

[0671] 如在图7A中所示出的,增加3E10的剂量会导致siRNA在肿瘤中的更高的累积。如在图7B中所示出的,降低十倍剂量的D31N 3E10会导致与3E10相似的siRNA递送水平。

[0672] 实例9:载体DNA增强非肿瘤组织的mRNA

[0673] 材料和方法

[0674] 将2ug的经荧光标记的mRNA与20ug的具有或不具有载体DNA (5ug) 的3E10-D31N在室温下混合持续15分钟。在E15.5处将与3E10复合的mRNA注射到胎儿。处理后24-48小时,收获胎儿并使用IVIS成像分析mRNA递送。

[0675] 结果

[0676] 在没有载体DNA的情况下,在第24小时时,将与mRNA复合的3E10-D31N迅速从胎儿中清除。然而,在第48小时时,载体DNA的添加在胎儿的多个组织中产生可检测的mRNA信号。

[0677] 以上实例可以指示DNA货物可以更普遍地被递送到多个组织并且不限于肿瘤,而RNA递送可以对肿瘤组织更具选择性。

[0678] 实例10:与mRNA和载体DNA复合3E10 (D31N) 导致持续水平的蛋白质表达

[0679] 材料和方法

[0680] 将10ug的荧光素酶mRNA和10ug的单链载体DNA (60nt) 与100ug的3E10 (WT) 或3E10 (D31N) 在室温下混合持续15分钟。将与3E10复合的mRNA肌肉注射 (IM) 到每只小鼠的右股四头肌。在6天内监测荧光素酶表达。

[0681] 结果

[0682] 如在图8中所看到的,施用与mRNA和载体DNA复合的3E10 (D31N) 会导致持续水平的荧光素酶表达,而与mRNA和载体DNA复合的3E10 (WT) 未能产生高于背景的任何可感知的信号。

[0683] 实例11:IV注射的3E10在体内的分布。

[0684] 研究了将3E10 IV注射到肌肉的分布。向小鼠静脉内注射200 $\mu$ g的标记为VivoTag680 (珀金埃尔默公司) 的3E10-WT或D31N。在注射后四小时,收获肌肉并通过IVIS (珀金埃尔默公司) 成像 (图9A和9B)。IVIS图像的定量证明了当与3E10-WT相比时,3E10-D31N实现了更高的肌肉分布 (图9C)。

[0685] 研究了3E10-D31N对组织的剂量依赖性生物分布。向小鼠静脉内注射100 $\mu$ g或200 $\mu$ g的标记为VivoTag680 (珀金埃尔默公司) 的3E10-D31N。在注射后24小时,收获组织并通过IVIS (珀金埃尔默公司) 成像。组织分布的定量证明了肌肉累积中的剂量依赖性增加了两倍,而包含肝在内的多个组织中没有相应的增加 (图10)。

[0686] 3E10对肿瘤的分布。向携带胁腹同基因结肠肿瘤 (CT26) 的小鼠静脉内注射200 $\mu$ g的标记为VivoTag680 (珀金埃尔默公司) 的3E10-WT或D31N。在注射后24小时,收获肿瘤并通过IVIS (珀金埃尔默公司) 成像 (图11A-11B)。肿瘤分布的定量证明了当与3E10-WT相比时,3E10-D31N在肿瘤中具有更高的累积 (图11C)。

[0687] 研究了与3E10非共价相关的ssDNA的分布。向携带胁腹同基因结肠肿瘤 (CT26) 的小鼠静脉内注射200ug的3E10-WT或D31N,并与40ug的经标记的ssDNA (IR680) 混合。在注射后24小时,收获肿瘤并通过IVIS (珀金埃尔默公司) 成像 (图12A-12C)。组织分布的定量证明了当与3E10-WT相比时,通过3E10-D31N递送ssDNA导致更高的肿瘤累积 (图12D)。

[0688] 实例12:3E10介导RIG-I配体的递送和RIG-I活性的刺激。

[0689] 材料和方法

[0690] RIG-I报告细胞 (HEK-Lucia RIG-I, 英杰公司 (Invivogen)) 以50,000个细胞/孔接种,并用RIG-I配体 (1ug) 或与3E10-D31N复合的配体 (20ug) 处理。此项测定使用了具有荧光素酶报告基因的细胞系,当干扰素诱导时,所述细胞系被激活。

[0691] 结果

[0692] 在所有情况下,单独的RIG-I配体不刺激IFN分泌。然而,用3E10-D31N递送RIG配体刺激了高于对照的IFN分泌,其中在低分子量和高分子量(LMW和HMW)两者中,观察到poly(I:C)的最高分泌量。

[0693] 实例13:3E10和其工程化变体的分子建模。

[0694] WT重链scFv序列

[0695] E VQLVESGGGL VKPGGSRKLSCAASGFTFSD YGMHWVRQAP EKGLEWVAYISSGSSTIYYA  
DTVKGRFTIS RDNANKTLFL QMTSLRSEDT AMYCARRGL LLDYWGQGTT LTVS (SEQ ID NO:92)

[0696] 轻链scFv序列

[0697] DIVLTQSPASL AVSLGQRATI SCRASKSVST SSYSYMHWYQ QKPGQPPKLL IKYASYLESG  
VPARFSGSGS GTDFTLNIHP VEEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIK RADAAPGGGG SGGGGSGGGGS  
(SEQ ID NO:93)

[0698] 3E10(Pymo1)的分子建模揭示了推定核酸结合袋(NAB1)(图14A-14B)。在CDR1的残基31处的天冬氨酸向天冬酰胺的突变增加了此残基的阳离子电荷并增强了核酸在体内的结合和递送(3E10-D31N)。

[0699] 在CDR1的残基31处的天冬氨酸向精氨酸(3E10-D31R)的突变进一步扩增了阳离子电荷,而向赖氨酸(3E10-D31K)的突变改变了电荷朝向(图14A)。

[0700] 从分子建模预测的NAB1氨基酸已在上文重链和轻链序列中加了下划线。图14B是示出具有用点状圆点展示的NAB1氨基酸残基的3E10-scFv(Pymo1)的分子建模的图解。

[0701] 实例14:3E10与单链和双链DNA结合

[0702] 通过ELISA测量3E10-WT和3E10-D31N与单链(ssDNA)或双链DNA(dsDNA)的结合。抗体与DNA直接相互作用。3E10-WT和3E10-D31N两者都显示出与ssDNA或dsDNA的剂量依赖性相互作用。在所有情况下,3E10-D31N显示出相对于3E10-WT的优越结合(图15A和15B)。

[0703] 实例15:3E10-D31N优先与含有胸腺嘧啶和鸟嘌呤核苷酸的DNA序列结合

[0704] 通过ELISA测量3E10-WT和3E10-D31N与完全由胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶或腺嘌呤组成的单链DNA的结合。在所有情况下,3E10-D31N显示出增强的结合,其中与由胸腺嘧啶或鸟嘌呤组成的序列的结合显著增加(图16)。

[0705] 实例16:3E10的变体显示出与单链DNA结合

[0706] 通过ELISA测量3E10变体与完全由胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶或腺嘌呤组成的单链DNA的结合。在所有情况下,除了完全由腺嘌呤组成的ssDNA之外,变体3E10-D31K显示出相对于3E10-D31N的优越结合。从左至右,每个变体的剂量为100nM、200nM和400nM的3E10或3E10变体抗体(图17A-17D)。

[0707] 实例17:3E10-WT和3E10-D31N与RNA结合

[0708] 通过ELISA测量3E10-WT和3E10-D31N与完全由腺嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤或肌苷核苷酸组成的单链RNA的结合。在所有情况下,3E10-D31N显示出相对于3E10-WT的优越结合(图18A-18B)。

[0709] 实例18:3E10-D31N保护mRNA免于降解

[0710] 接下来研究使mRNA与3E10(D31N)复合是否能保护mRNA免于降解。简而言之,通过将3E10(D31N)与mRNA以20:1的摩尔比混合形成3E10(D31N)与长度为720个核苷酸的编码绿

色荧光蛋白的mRNA的复合物。然后将游离mRNA和3E10-mRNA复合物与1%血清、10%血清或16 $\mu$ g/mL RNA酶A一起温育。对反应进行凝胶电泳分析(图13A)。如图19A所示,通过与1%血清、10%血清和RNA酶A中的每一种一起温育来降解游离mRNA。然而,当复合的mRNA与1%血清、10%血清或RNA酶A中的任一者一起温育时,未观察到明显的RNA降解,这表明3E10(D31N)保护mRNA免于降解。

[0711] 相比之下, RNA酶A快速降解裸mRNA或与同种型抗体对照混合的mRNA(图19B)。

[0712] 接下来,研究了以较低摩尔比复合的mRNA是否也得到保护免于RNA降解。简而言之,通过将3E10(D31N)与mRNA以2:1的摩尔比混合形成3E10(D31N)与编码绿色荧光蛋白的720nt mRNA的复合物(GFP\_mRNA)。然后在上述条件下,将游离mRNA和3E10-mRNA复合物与RNA酶A一起温育。进行对反应的凝胶电泳分析(图19C)。如图19C所示,通过与RNA酶A一起温育,使游离mRNA完全降解。然而,将mRNA与3E10(D31N)以2:1的摩尔比复合引起mRNA对降解的一些保护,如孔中存在RNA信号所指示,这指示存在完整的3E10(D31N)-mRNA复合物。当以20:1摩尔比复合时,以2:1摩尔比提供的保护看起来小于对mRNA提供的保护。

[0713] 实例19:3E10-D31N+Poly(I:C)介导黑色素瘤细胞死亡

[0714] 用缓冲液对照、poly(I:C)、3E10(WT或D31N)或与3E10(WT或D31N)复合的poly(I:C)处理小鼠黑色素瘤细胞(B16)。处理后24小时,通过CellTiter-Glo测量细胞活力。在所有情况下,相对于对照,poly(I:C)与3E10(WT或D31N)的复合降低了细胞活力(图20A-20B)。

[0715] 实例20:3E10(D31N)以大小依赖性方式保护mRNA免受RNA降解。

[0716] 研究了3E10-D31N在复合时是否还将保护较大的mRNA分子免于酶降解,以及是否需要较大化学计量的3E10-D31N。简而言之,通过以1:1、2:1、5:1、10:1、20:1和100:1摩尔比将3E10-D31N与mRNA混合,形成编码大蛋白的3E10-D31N与14kb mRNA(HMW mRNA)的复合物。然后将游离mRNA与3E10-mRNA复合物在37 $^{\circ}$ C下与另外的蛋白酶K一起用6 $\mu$ g/mL RNA酶A温育10分钟,以促进蛋白质降解。图21示出了保护测定的琼脂糖凝胶电泳分析。如图21所示,游离HMW mRNA以及以1:1、2:1、5:1和10:1摩尔比(3E10:mRNA)复合的HMW mRNA通过与RNA酶A一起温育而完全降解。然而,如图21所示,以20:1和100:1的摩尔比将HMW mRNA与3E10复合,增加对mRNA免于被RNA酶A降解的保护,如凝胶上未降解的mRNA以类似距离迁移的条带所指示。这些结果与实例18的结果结合,表明3E10以大小依赖性方式保护多核苷酸。

[0717] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术术语和科学术语都具有与所公开的本发明所属领域的技术人员通常所理解的含义相同的含义。本文所引用的出版物和其所引用的材料通过引用具体并入。

[0718] 本领域的技术人员将认识到或者使用仅常规实验能够确定,本文所描述的本发明的具体实施例的许多等效形式。此类等效形式旨在被以下附权利要求书涵盖。



<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 2

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

<210> 3

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 3

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



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

<210> 6

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 6

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

<210> 7

<211> 111



	100	105	110
<210> 9			
<211> 111			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多肽			
<400> 9			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser			
	20	25	30
Ser Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro			
	35	40	45
Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser			
	50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
65	70	75	80
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg			
	85	90	95
Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys			
	100	105	110

<210> 10			
<211> 111			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多肽			
<400> 10			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser			
	20	25	30
Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro			
	35	40	45
Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser			
	50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
65	70	75	80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 85 90 95  
 Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110

<210> 11

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 11

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

<210> 12

<211> 465

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 12

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

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 370 375 380  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 385 390 395 400  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 405 410 415  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 420 425 430  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 435 440 445  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 450 455 460  
 Lys  
 465  
 <210> 13  
 <211> 465  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <400> 13  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys  
 20 25 30  
 Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45  
 Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala  
 65 70 75 80  
 Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
 85 90 95  
 Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 115 120 125  
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 130 135 140

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



225	230	235
<210> 15		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 15		
Asp Tyr Gly Met His		
1	5	
<210> 16		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 16		
Asn Tyr Gly Met His		
1	5	
<210> 17		
<211> 17		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 17		
Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys		
1	5	10 15
Gly		
<210> 18		
<211> 7		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 18		
Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr		
1	5	
<210> 19		

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 19

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly

1

5

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 21

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly

1

5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 22

Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile

1

5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT



<400> 27

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Leu Ala  
1                   5                   10                   15

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 28

Tyr Ala Ser Tyr Leu Gln Ser  
1                   5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 29

Lys Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr  
1                   5                   10

<210> 30

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 30

Tyr Ala Ser

1

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 31

Gly Gln Ser Ser Arg Ser Ser  
1                   5

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 32

Gly Gln Ser Ser Arg Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly

1

5

10

15

Gly Ser

<210> 33

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 33

Gly Ser Gly Ser

1

<210> 34

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 34

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 35

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

<210> 36

<211> 20



Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly  
 130 135 140  
 Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala  
 165 170 175  
 Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser  
 180 185 190  
 Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg  
 195 200 205  
 Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser  
 210 215 220  
 Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp  
 225 230 235 240  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Glu Gln Lys  
 245 250 255  
 Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His  
 260 265 270

His His

<210> 39

<211> 541

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 39

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

	85	90	95
Gln His Ser Arg	Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu		
	100	105	110
Glu Ile Lys Arg	Ala Asp Ala Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
	115	120	125
Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly		
	130	135	140
Gly Gly Leu Val	Lys Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala		
145	150	155	160
Ser Gly Phe Thr	Phe Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala		
	165	170	175
Pro Glu Lys Gly	Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser		
	180	185	190
Thr Ile Tyr Tyr	Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg		
	195	200	205
Asp Asn Ala Lys	Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser		
	210	215	220
Glu Asp Thr Ala	Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp		
225	230	235	240
Tyr Trp Gly Gln	Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
	245	250	255
Gly Pro Ser Val	Phe Pro Leu Ala Pro Leu Glu Ser Ser Gly Ser Asp		
	260	265	270
Ile Val Leu Thr	Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln		
	275	280	285
Arg Ala Thr Ile	Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Ser		
	290	295	300
Tyr Ser Tyr Met	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys		
305	310	315	320
Leu Leu Ile Lys	Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg		
	325	330	335
Phe Ser Gly Ser	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro		
	340	345	350
Val Glu Glu Glu	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Glu		
	355	360	365
Phe Pro Trp Thr	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala		
	370	375	380
Asp Ala Ala Pro	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
385	390	395	400

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys  
 405 410 415  
 Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 420 425 430  
 Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu  
 435 440 445  
 Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala  
 450 455 460  
 Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
 465 470 475 480  
 Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met  
 485 490 495  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 500 505 510  
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu  
 515 520 525  
 Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His  
 530 535 540  
 <210> 40  
 <211> 808  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <400> 40  
 Ala Gly Ile His Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser  
 20 25 30  
 Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 35 40 45  
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser  
 50 55 60  
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 100 105 110

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

	420		425		430										
Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu
	435		440		445										
Glu	Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala
	450		455		460										
Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn
465			470		475				480						
Thr	Leu	Phe	Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met
	485		490		495										
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Gly	Leu	Leu	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
	500		505		510										
Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
	515		520		525										
Pro	Leu	Ala	Pro	Leu	Glu	Ser	Ser	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln
	530		535		540										
Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser
545			550		555				560						
Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ser	Tyr	Met	His
	565		570		575										
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr
	580		585		590										
Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly
	595		600		605										
Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp
	610		615		620										
Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Arg	Glu	Phe	Pro	Trp	Thr	Phe
625			630		635				640						
Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Gly
	645		650		655										
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val
	660		665		670										
Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser	Arg
	675		680		685										
Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr	Gly	Met
	690		695		700										
His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Tyr
705			710		715				720						
Ile	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val	Lys	Gly
	725		730		735										

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln  
 740 745 750  
 Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 755 760 765  
 Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
 770 775 780  
 Ser Ser Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala  
 785 790 795 800  
 Val Asp His His His His His His  
 805

<210> 41

<211> 242

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 41

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

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

Ser Ser

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 42

Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 43

Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile

1 5

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 44

Arg Ala Ser Lys Thr Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met His  
 1 5 10 15

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 45

Lys Thr Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr

1 5 10

<210> 46

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 46

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 47

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 47

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

1 5 10 15

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

<210> 48

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 48

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

<210> 49

<400> 49





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

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成多肽

&lt;400&gt; 54

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

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 合成多肽

<400> 55

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

<210> 56

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 56

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

<210> 57

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 57

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

<210> 58

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 58

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

	100	105	110
<210>	59		
<211>	21		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		
<400>	59		
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
1	5	10	15
Gly Gly Gly Gly Ser			
	20		
<210>	60		
<211>	19		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		
<400>	60		
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Leu Glu Ser			
1	5	10	15
Ser Gly Ser			
<210>	61		
<211>	515		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		
<400>	61		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser			
	20	25	30
Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
	35	40	45
Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser			
	50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
65	70	75	80

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

385	390	395	400
Val Gln Leu	Val Glu Ser Gly Gly Gly	Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser	
	405	410	415
Leu Arg Leu	Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly		
	420	425	430
Met His Trp	Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser		
	435	440	445
Tyr Ile Ser	Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
	450	455	460
Gly Arg Phe	Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu		
465	470	475	480
Gln Met Asn	Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
	485	490	495
Arg Arg Gly	Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr		
	500	505	510
Val Ser Ser			
	515		
<210>	62		
<211>	515		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		
<400>	62		
Asp Ile Gln	Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly		
1	5	10	15
Asp Arg Ala	Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser		
	20	25	30
Ser Tyr Ser	Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
	35	40	45
Lys Leu Leu	Ile Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser		
	50	55	60
Arg Phe Ser	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65	70	75	80
Ser Leu Gln	Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg		
	85	90	95
Glu Phe Pro	Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		
	100	105	110
Ala Asp Ala	Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		

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

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 435 440 445  
 Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 450 455 460  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 465 470 475 480  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 485 490 495  
 Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 500 505 510  
 Val Ser Ser  
 515  
 <210> 63  
 <211> 515  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <400> 63  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 85 90 95  
 Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110  
 Ala Asp Ala Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Asp Val  
 130 135 140  
 Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
 145 150 155 160

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



195	200	205
Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met	Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala	
210	215	220
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln		
225	230	235
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
245	250	255
Phe Pro Leu Ala Pro Leu Glu Ser Ser Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr		
260	265	270
Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Ala Thr Ile		
275	280	285
Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met		
290	295	300
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Lys		
305	310	315
Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser		
325	330	335
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu		
340	345	350
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Trp Thr		
355	360	365
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro		
370	375	380
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu		
385	390	395
Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser		
405	410	415
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly		
420	425	430
Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser		
435	440	445
Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
450	455	460
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu		
465	470	475
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
485	490	495
Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr		
500	505	510

Val Ser Ser  
           515  
 <210> 65  
 <211> 515  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <400> 65  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1                  5                  10                  15  
 Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
                   20                  25                  30  
 Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
                   35                  40                  45  
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser  
                   50                  55                  60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65                  70                  75                  80  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
                   85                  90                  95  
 Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
                   100                  105                  110  
 Ala Asp Ala Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
                   115                  120                  125  
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val  
                   130                  135                  140  
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
 145                  150                  155                  160  
 Phe Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly  
                   165                  170                  175  
 Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr  
                   180                  185                  190  
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys  
                   195                  200                  205  
 Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala  
                   210                  215                  220  
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
 225                  230                  235                  240

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 245 250 255  
 Phe Pro Leu Ala Pro Leu Glu Ser Ser Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr  
 260 265 270  
 Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Ala Thr Ile  
 275 280 285  
 Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met  
 290 295 300  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Lys  
 305 310 315 320  
 Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 325 330 335  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 340 345 350  
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Trp Thr  
 355 360 365  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro  
 370 375 380  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
 385 390 395 400  
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 405 410 415  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly  
 420 425 430  
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 435 440 445  
 Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 450 455 460  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 465 470 475 480  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 485 490 495  
 Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 500 505 510  
 Val Ser Ser  
 515  
 <210> 66  
 <211> 515  
 <212> PRT



275	280	285
Thr Cys Arg Ala Ser Lys	Ser Val Ser Thr Ser Ser	Tyr Ser Tyr Met
290	295	300
His Trp Tyr Gln Gln Lys	Pro Gly Gln Ala Pro Lys	Leu Leu Ile Lys
305	310	315
Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu	Ser Gly Val Pro Ser Arg	Phe Ser Gly Ser
325	330	335
Gly Ser Gly Thr Asp Phe	Thr Leu Thr Ile Ser Ser	Leu Gln Pro Glu
340	345	350
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr	Cys Gln His Ser Arg Glu	Phe Pro Trp Thr
355	360	365
Phe Gly Gln Gly Thr Lys	Val Glu Ile Lys Arg Ala	Asp Ala Ala Pro
370	375	380
Gly Gly Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Gly Ser Glu
385	390	395
Val Gln Leu Val Glu Ser	Gly Gly Gly Asp Val Lys	Pro Gly Gly Ser
405	410	415
Leu Arg Leu Ser Cys Ala	Ala Ser Gly Phe Thr Phe	Ser Asn Tyr Gly
420	425	430
Met His Trp Val Arg Gln	Ala Pro Glu Lys Gly Leu	Glu Trp Val Ser
435	440	445
Tyr Ile Ser Ser Ser Ser	Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala	Asp Ser Val Lys
450	455	460
Gly Arg Phe Thr Ile Ser	Arg Asp Asn Ser Lys Asn	Thr Leu Tyr Leu
465	470	475
Gln Met Asn Ser Leu Arg	Ala Glu Asp Thr Ala Val	Tyr Tyr Cys Ala
485	490	495
Arg Arg Gly Leu Leu Leu	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	Thr Thr Val Thr
500	505	510
Val Ser Ser		
515		
<210> 67		
<211> 515		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 67		
Asp Ile Gln Met Thr Gln	Ser Pro Ser Ser Leu Ser	Ala Ser Val Gly

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

Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 325 330 335  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 340 345 350  
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Trp Thr  
 355 360 365  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro  
 370 375 380  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
 385 390 395 400  
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 405 410 415  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly  
 420 425 430  
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 435 440 445  
 Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 450 455 460  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu  
 465 470 475 480  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 485 490 495  
 Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 500 505 510  
 Val Ser Ser  
 515  
 <210> 68  
 <211> 515  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <400> 68  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 35 40 45

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

355	360	365
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val	Glu Ile Lys Arg Ala Asp	Ala Ala Pro
370	375	380
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu		
385	390	395
Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser		
405	410	415
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly		
420	425	430
Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser		
435	440	445
Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
450	455	460
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu		
465	470	475
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
485	490	495
Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr		
500	505	510
Val Ser Ser		
515		
<210> 69		
<211> 515		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 69		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser		
20	25	30
Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro		
35	40	45
Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser		
50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65	70	75
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg		

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

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Asp Val Lys Pro Gly Gly Ser  
 405 410 415  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly  
 420 425 430  
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 435 440 445  
 Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 450 455 460  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 465 470 475 480  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 485 490 495  
 Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 500 505 510  
 Val Ser Ser  
 515  
 <210> 70  
 <211> 515  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <400> 70  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Thr Val Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 85 90 95  
 Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110  
 Ala Asp Ala Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 115 120 125

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

435 440 445  
 Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 450 455 460  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu  
 465 470 475 480  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 485 490 495  
 Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 500 505 510  
 Val Ser Ser  
 515  
 <210> 71  
 <211> 515  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <400> 71  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Thr Val Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
 85 90 95  
 Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110  
 Ala Asp Ala Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val  
 130 135 140  
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
 145 150 155 160  
 Phe Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly

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



Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala  
 210 215 220  
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
 225 230 235 240  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 245 250 255  
 Phe Pro Leu Ala Pro Leu Glu Ser Ser Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr  
 260 265 270  
 Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Ala Thr Ile  
 275 280 285  
 Thr Cys Arg Ala Ser Lys Thr Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met  
 290 295 300  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Lys  
 305 310 315 320  
 Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 325 330 335  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 340 345 350  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Trp Thr  
 355 360 365  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro  
 370 375 380  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
 385 390 395 400  
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Asp Val Lys Pro Gly Gly Ser  
 405 410 415  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly  
 420 425 430  
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 435 440 445  
 Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 450 455 460  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 465 470 475 480  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 485 490 495  
 Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 500 505 510  
 Val Ser Ser





&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成多肽

&lt;400&gt; 74

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

Thr Cys Arg Ala Ser Lys Thr Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met  
 290 295 300  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Lys  
 305 310 315 320  
 Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 325 330 335  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 340 345 350  
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Trp Thr  
 355 360 365  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro  
 370 375 380  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
 385 390 395 400  
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 405 410 415  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly  
 420 425 430  
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 435 440 445  
 Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 450 455 460  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 465 470 475 480  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 485 490 495  
 Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 500 505 510  
 Val Ser Ser  
 515  
 <210> 75  
 <211> 515  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <400> 75  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

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

	325		330		335
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu					
	340		345		350
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Trp Thr					
	355		360		365
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro					
	370		375		380
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu					
385		390		395	400
Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Asp Val Lys Pro Gly Gly Ser					
	405		410		415
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly					
	420		425		430
Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser					
	435		440		445
Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys					
	450		455		460
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu					
465		470		475	480
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala					
	485		490		495
Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr					
	500		505		510
Val Ser Ser					
	515				
<210> 76					
<211> 515					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 合成多肽					
<400> 76					
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly					
1	5		10		15
Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Thr Val Ser Thr Ser					
	20		25		30
Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro					
	35		40		45
Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser					

50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65	70	75
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg		
	85	90
Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		
	100	105
Ala Asp Ala Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
	115	120
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val		
	130	140
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr		
	145	155
Phe Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly		
	165	170
Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr		
	180	185
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys		
	195	200
Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala		
	210	220
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln		
	225	235
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
	245	250
Phe Pro Leu Ala Pro Leu Glu Ser Ser Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr		
	260	265
Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Ala Thr Ile		
	275	280
Thr Cys Arg Ala Ser Lys Thr Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met		
	290	295
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Lys		
	305	310
Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser		
	325	330
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu		
	340	345
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Trp Thr		
	355	360
		365

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro  
 370 375 380  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
 385 390 395 400  
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 405 410 415  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly  
 420 425 430  
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 435 440 445  
 Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 450 455 460  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu  
 465 470 475 480  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 485 490 495  
 Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 500 505 510  
 Val Ser Ser  
 515  
 <210> 77  
 <211> 446  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <400> 77  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95





<223> 合成多肽

<400> 80

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

Lys

<210> 81

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 81

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

<210> 82

<211> 446  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <400> 82

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

260	265	270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asp Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
340	345	350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
355	360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
405	410	415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
420	425	430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445
<210> 83		
<211> 113		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 83		
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
1	5	10
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
20	25	30
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
35	40	45
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
50	55	60
Arg Glu Glu Gln Tyr Asp Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		

65	70	75	80
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val			
	85	90	95
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala			
	100	105	110
Lys			
<210> 84			
<211> 446			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多肽			
<400> 84			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr			
	20	25	30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Arg Gly Leu Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val			
	100	105	110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala			
	115	120	125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu			
	130	135	140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly			
145	150	155	160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
	165	170	175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
	180	185	190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
	195	200	205



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

Lys

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成多肽

&lt;400&gt; 86

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

Lys

&lt;210&gt; 87

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列



1	5	10	15
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr			
	20	25	30

<210> 89

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 89

Arg Ala Ser Lys Thr Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp			
1	5	10	15
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr			
	20	25	30

<210> 90

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 90

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Ser			
1	5	10	15
Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys			
	20	25	30

Leu

<210> 91

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> X = 任何氨基酸,但优选地为碱性残基(R或K)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (30) .. (30)



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

130

&lt;210&gt; 94

&lt;211&gt; 89

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成多核苷酸

&lt;400&gt; 94

ggagcaaaag cagggugaca aagacauaau ggaucacaac acugugucua gcuucaggu 60  
 agauugcuuu cuuuggcaug uccgcaaac 89

未经处理的

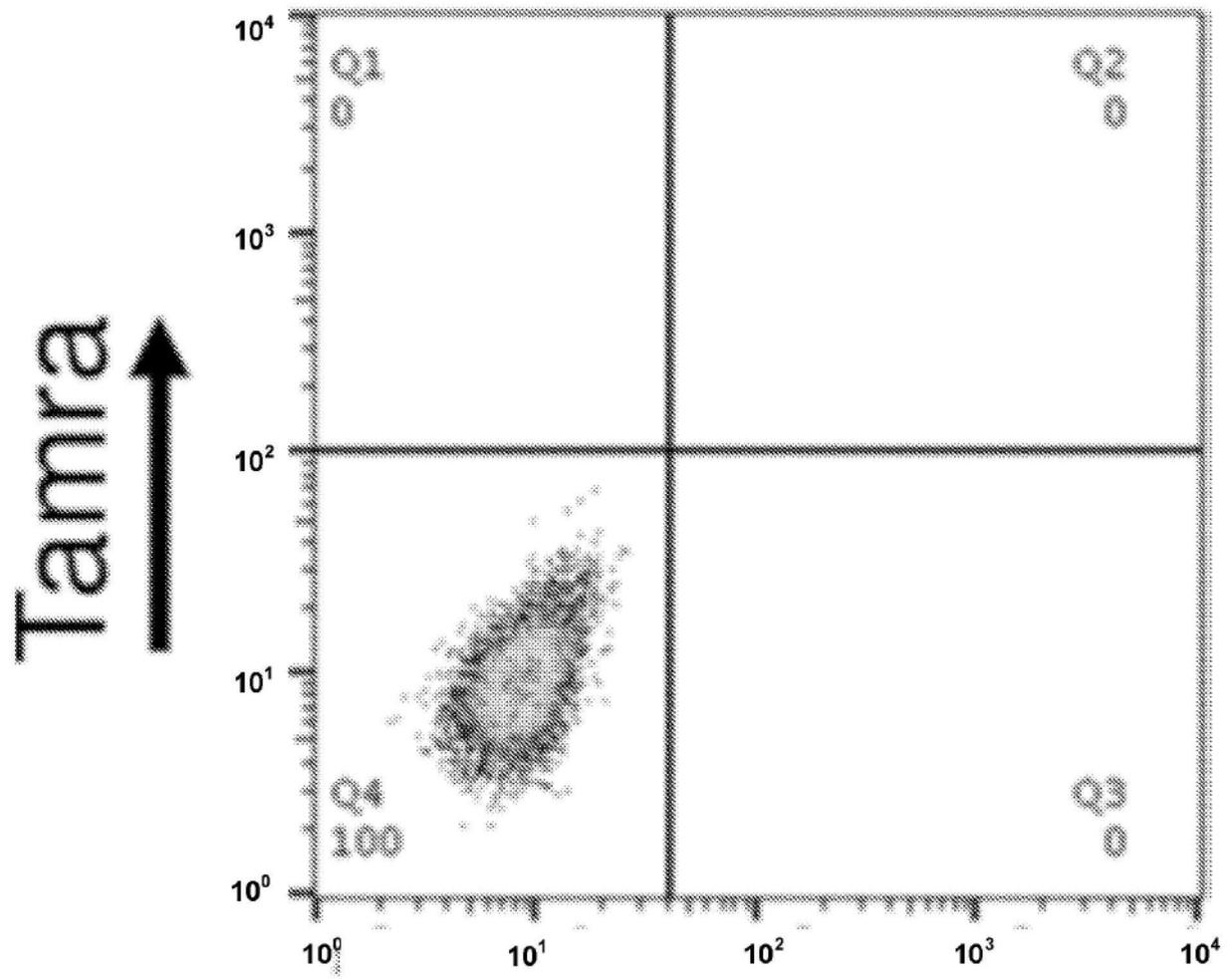


图1A

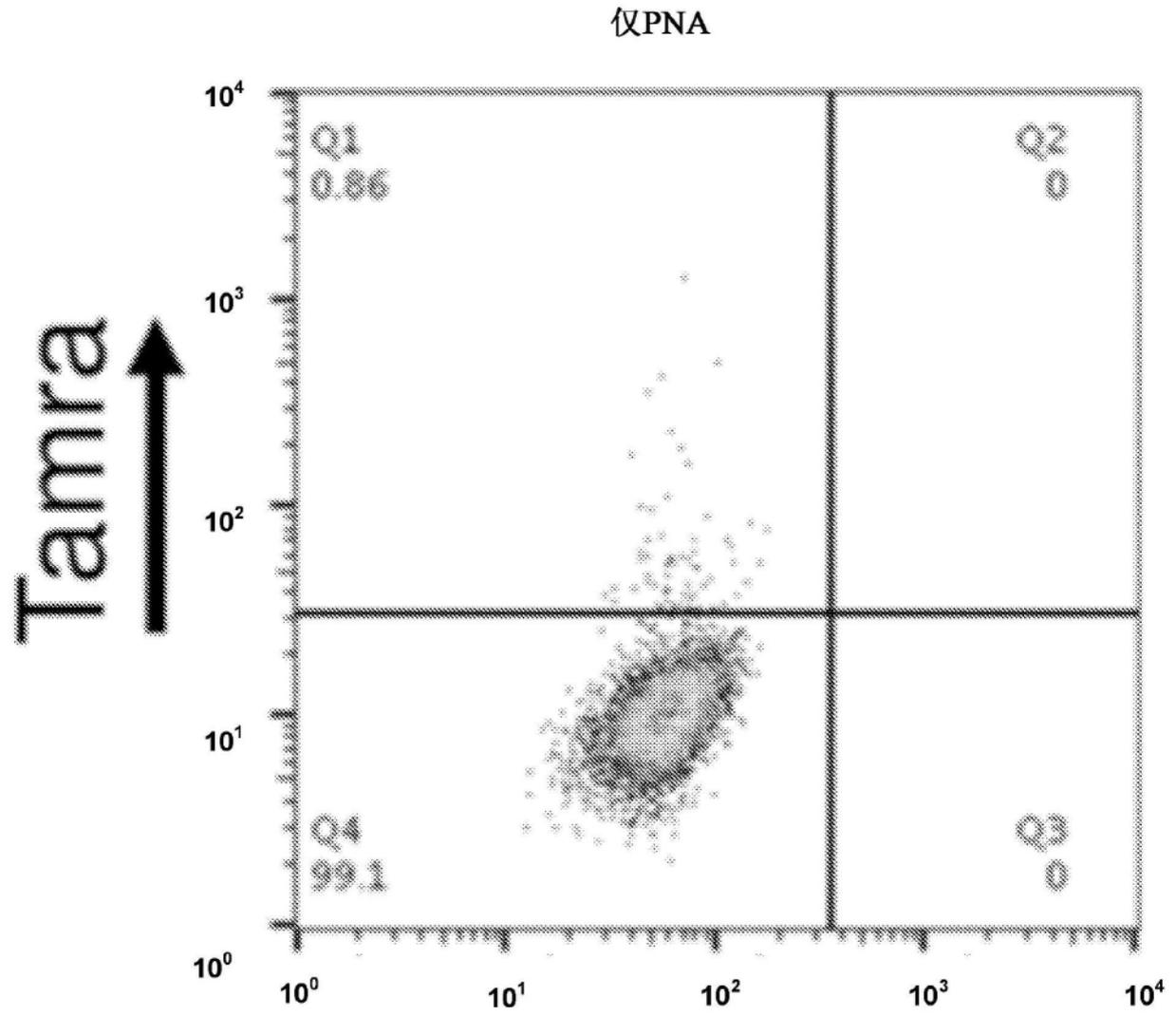


图1B

# PNA + 3E10

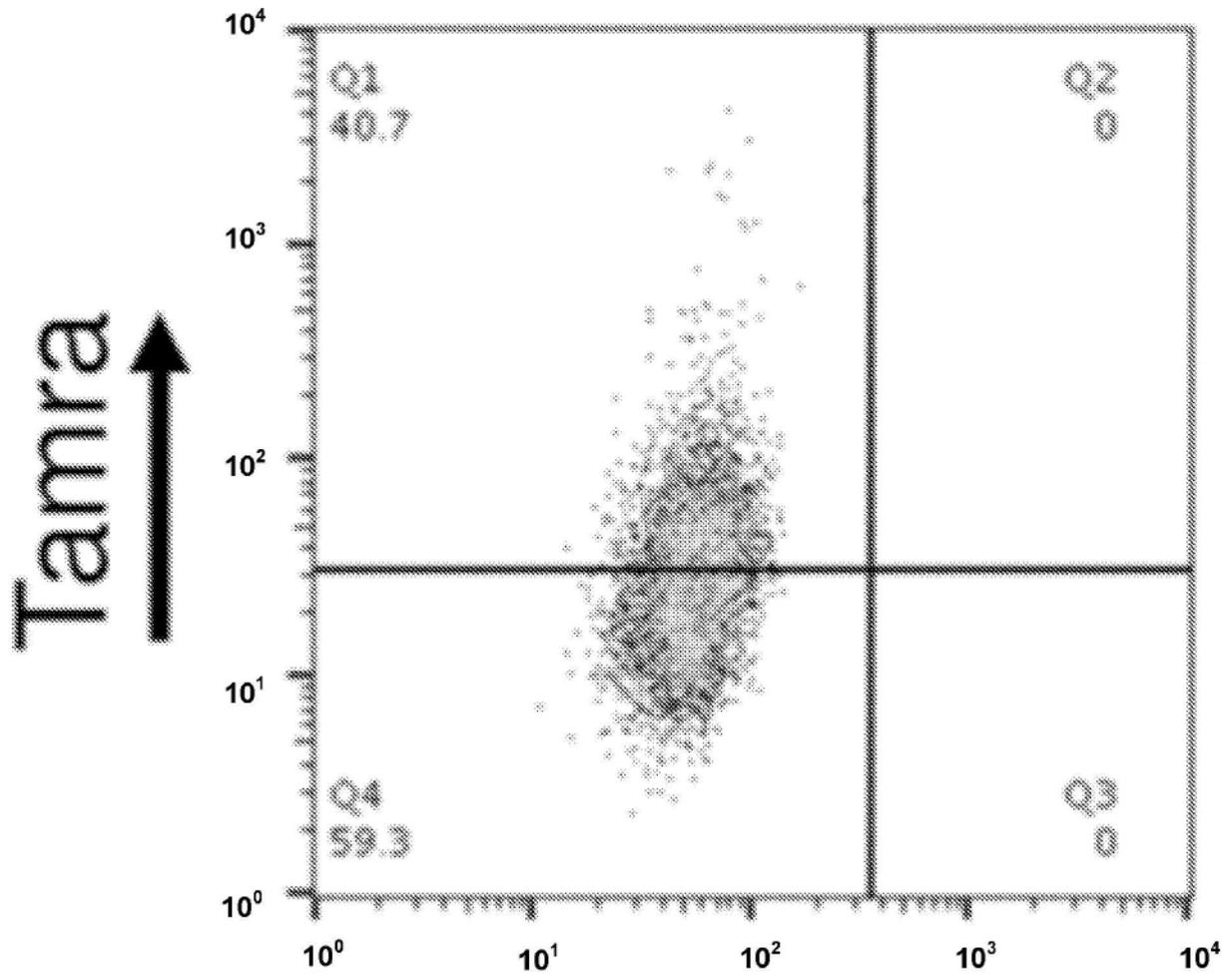


图1C

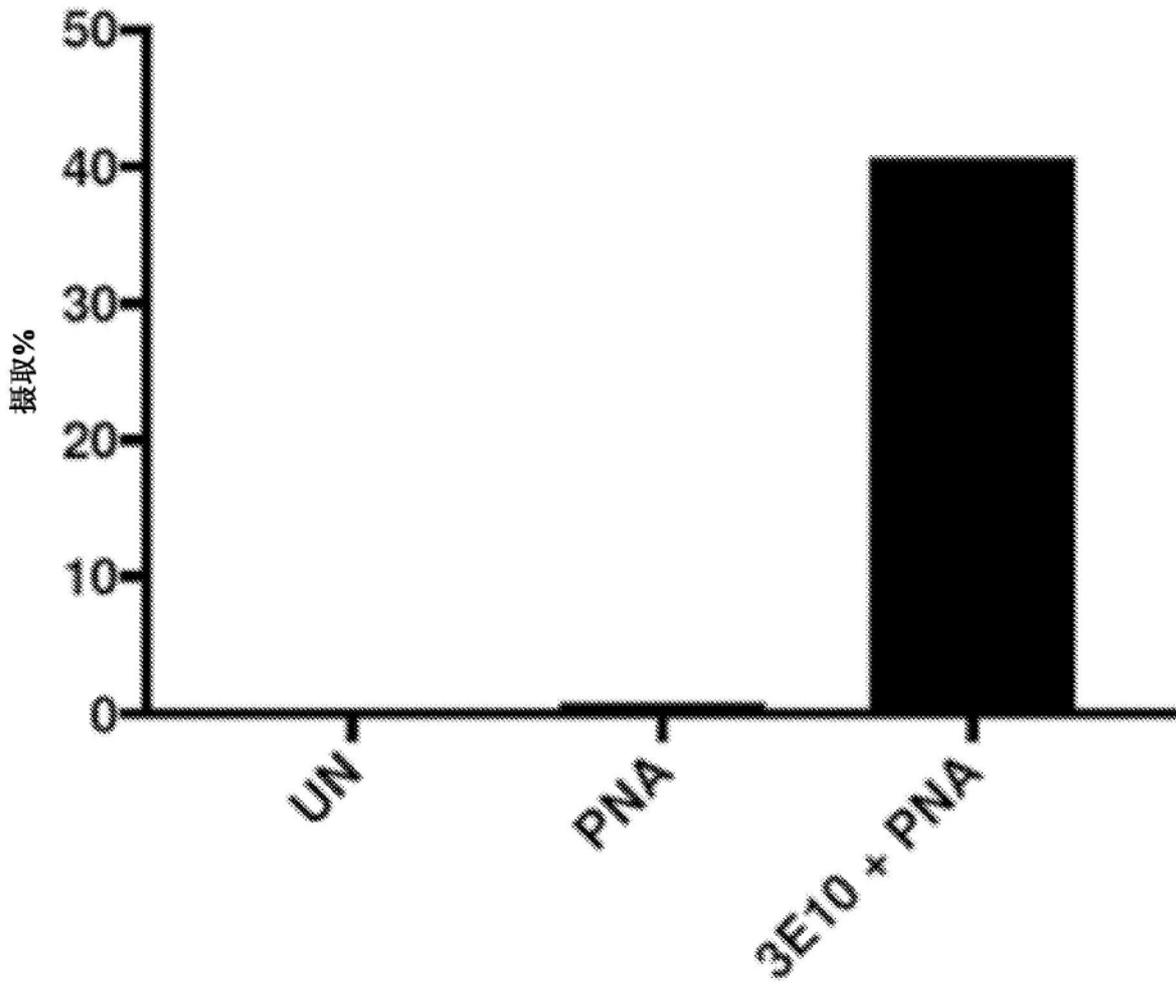


图1D

未经处理的

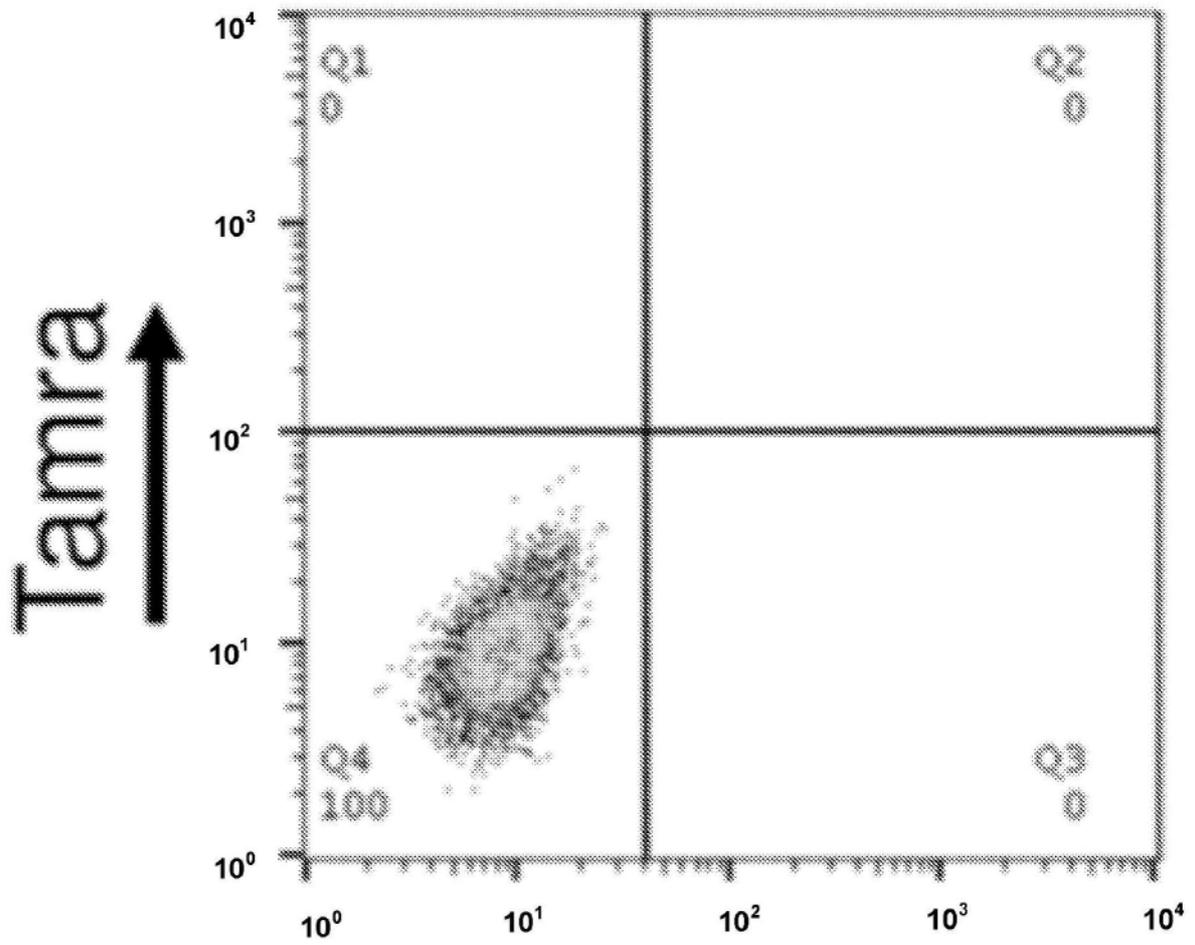


图2A

仅PNA

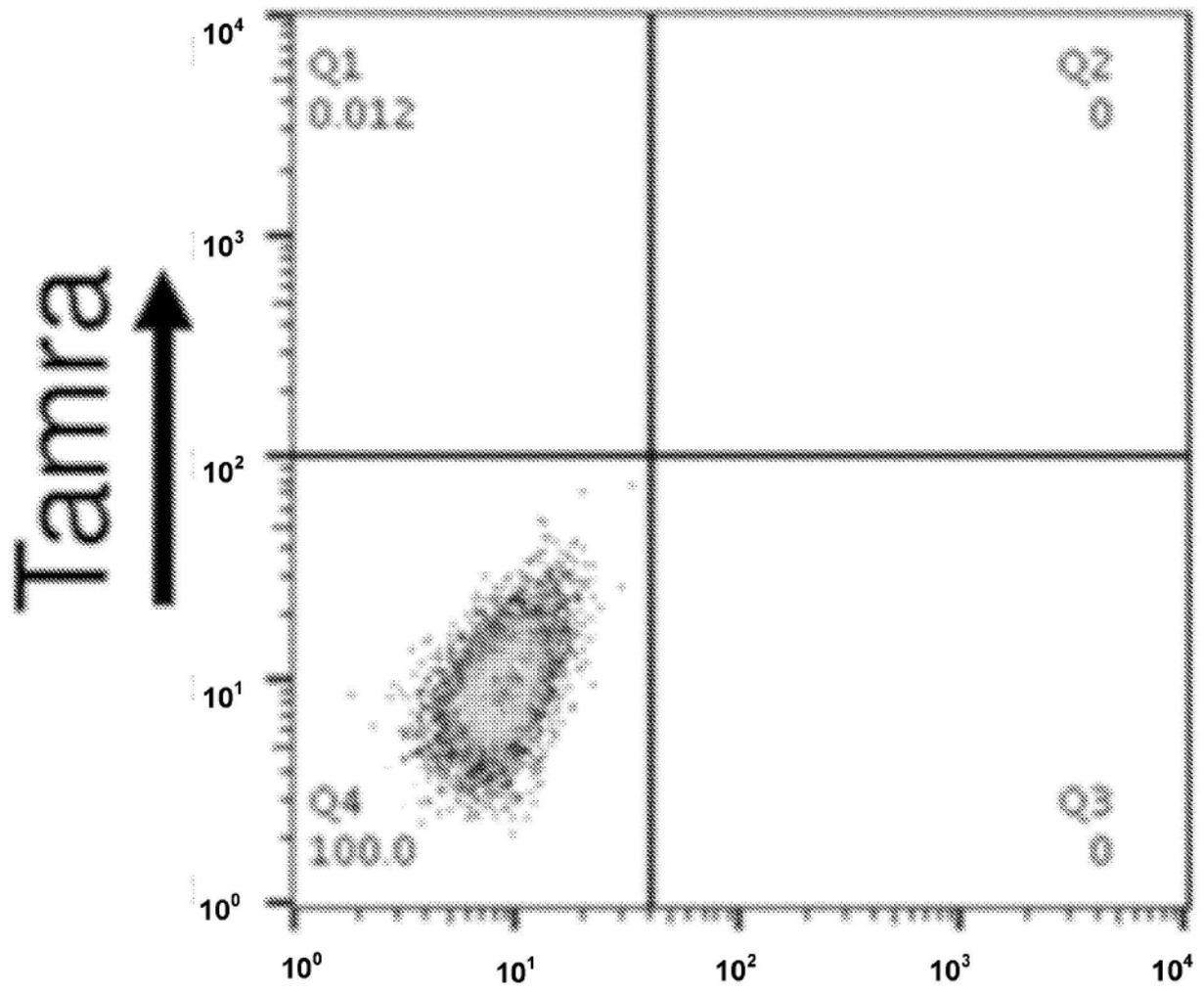


图2B

# PNA + 3E10

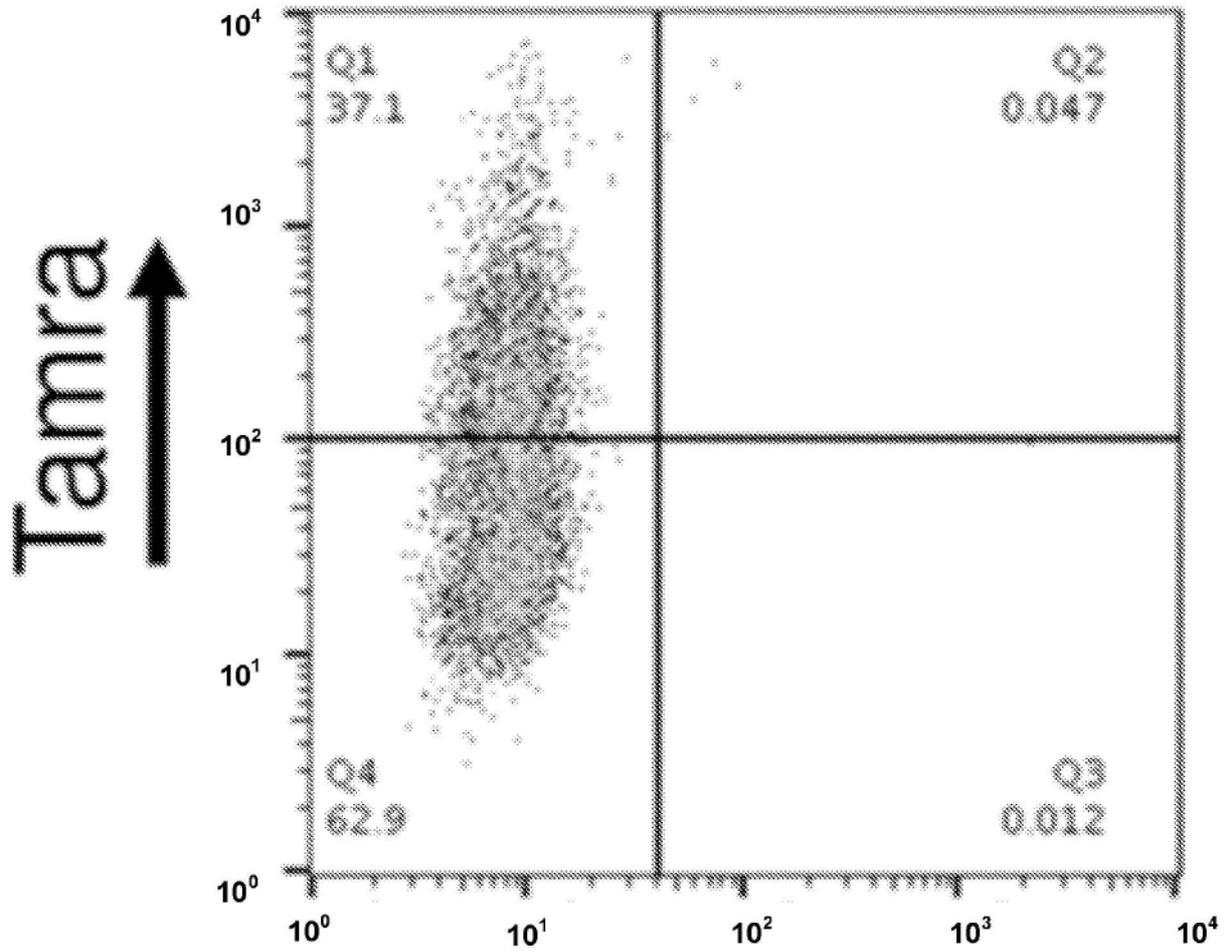


图2C

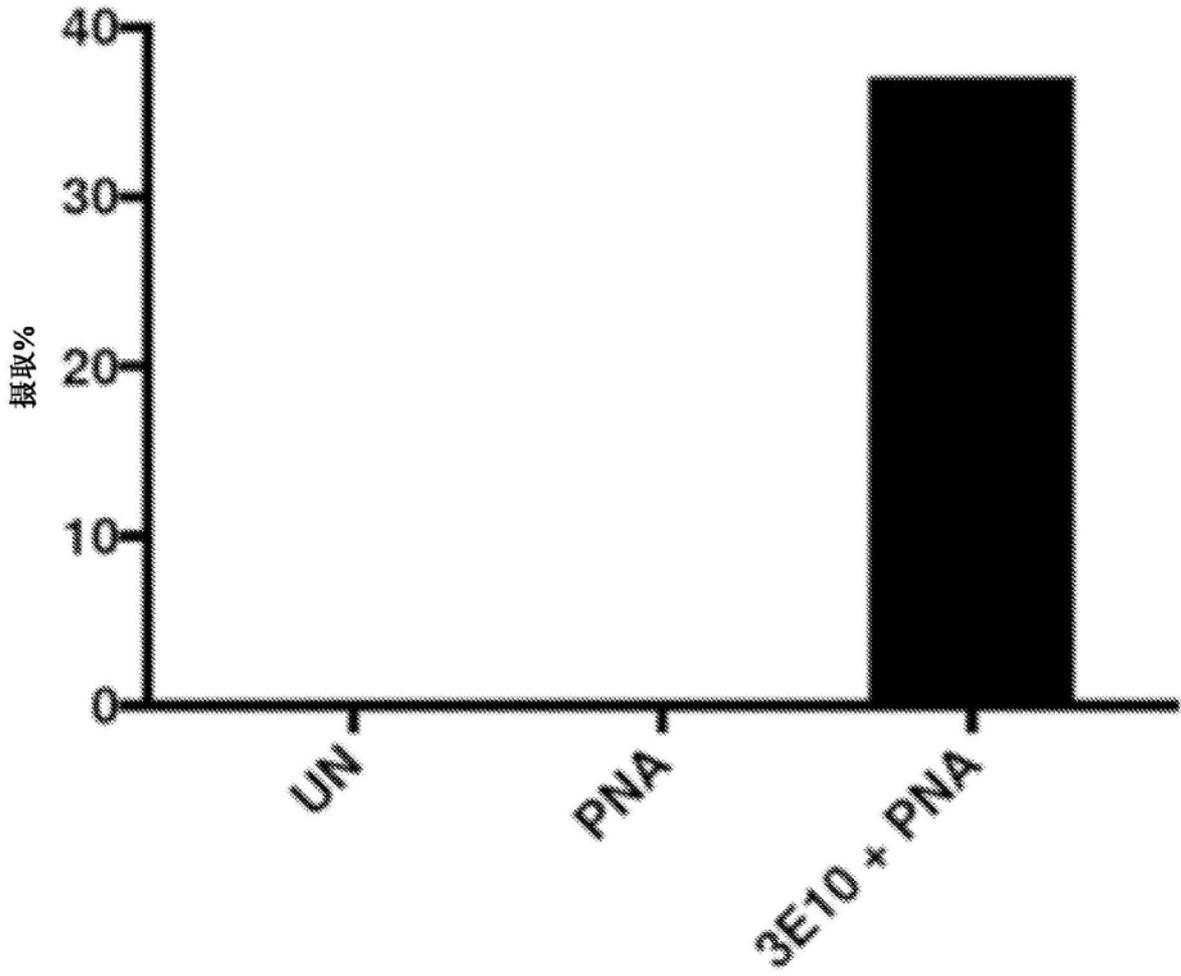


图2D

未经处理的

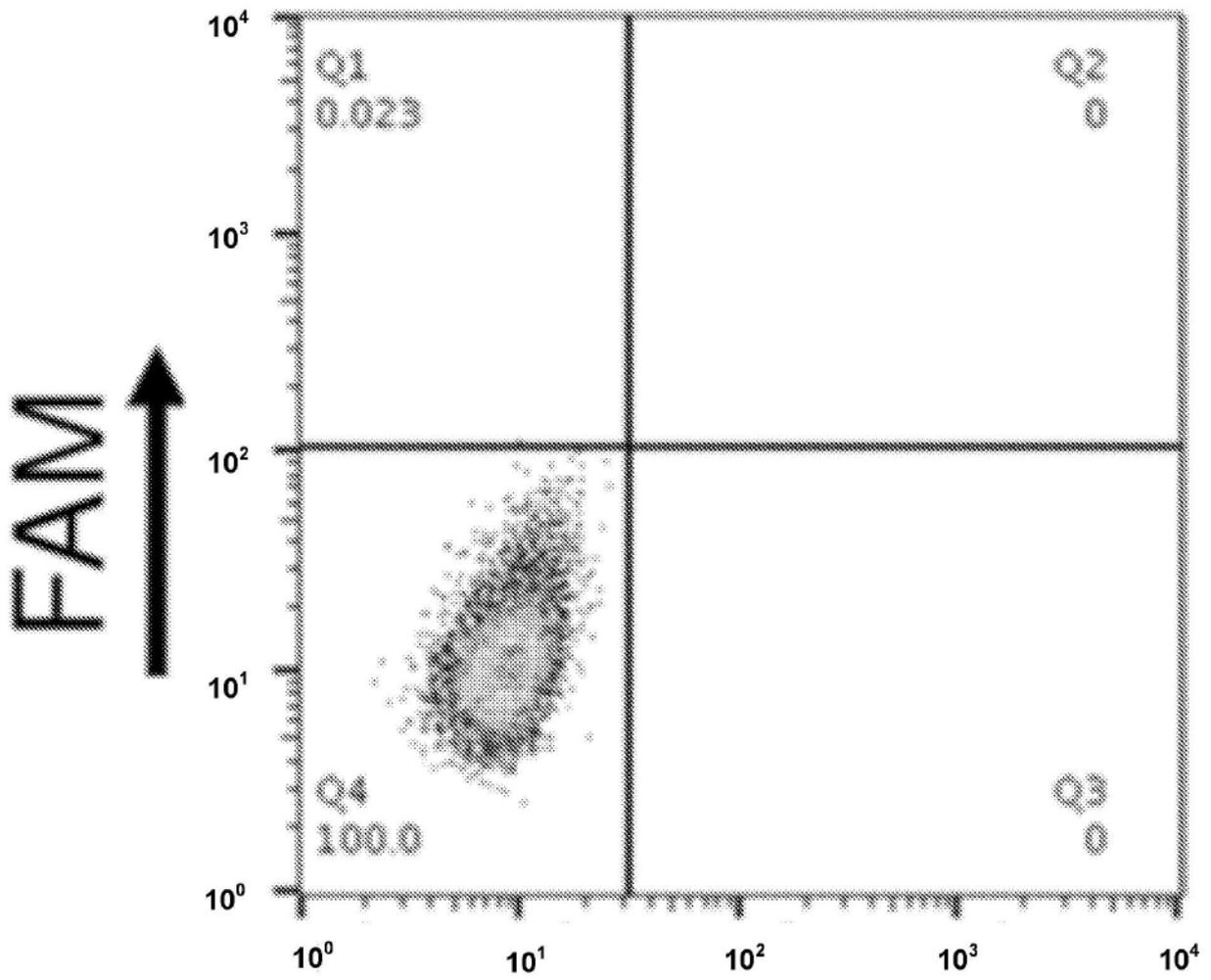


图3A

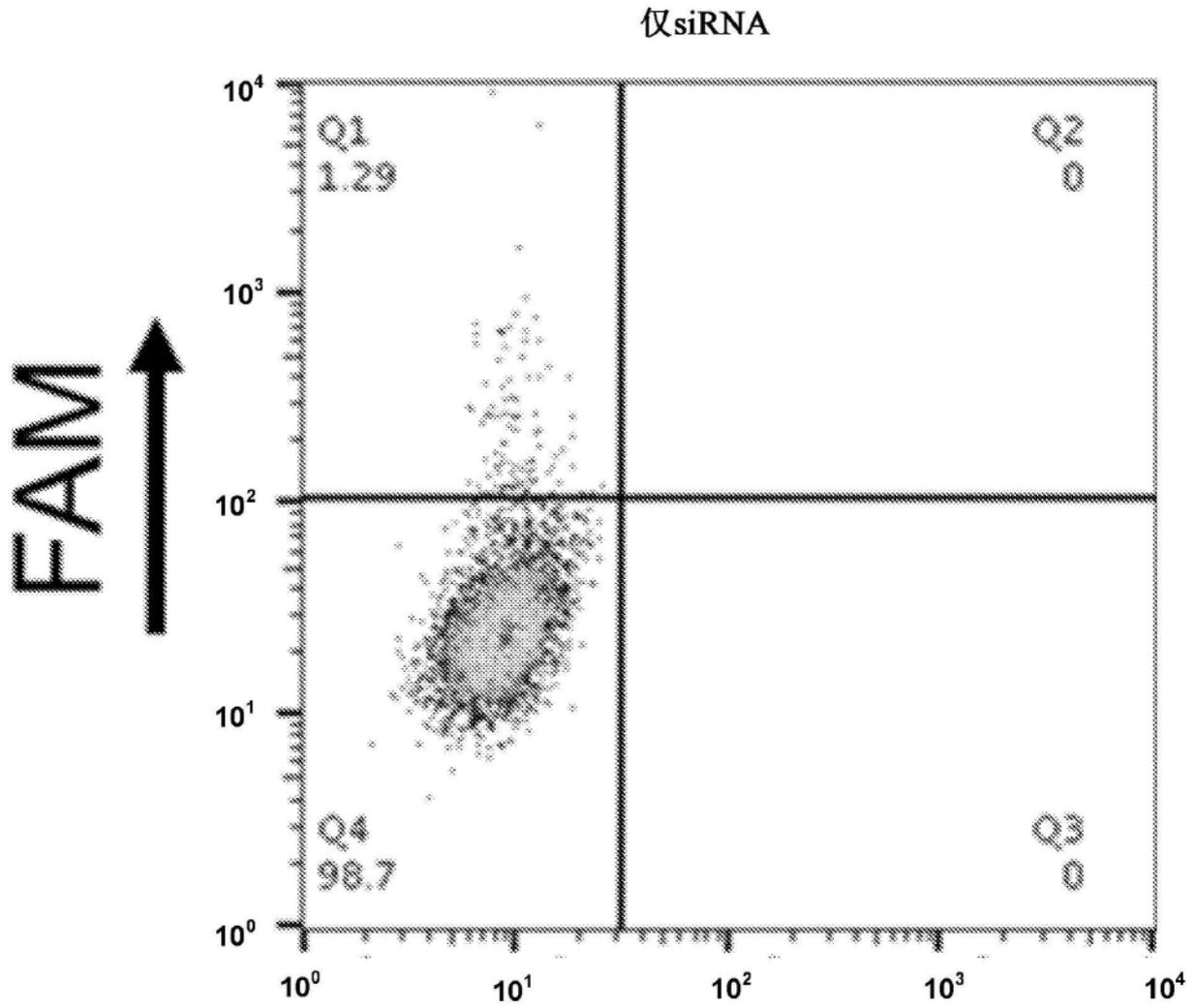


图3B

# siRNA + 3E10

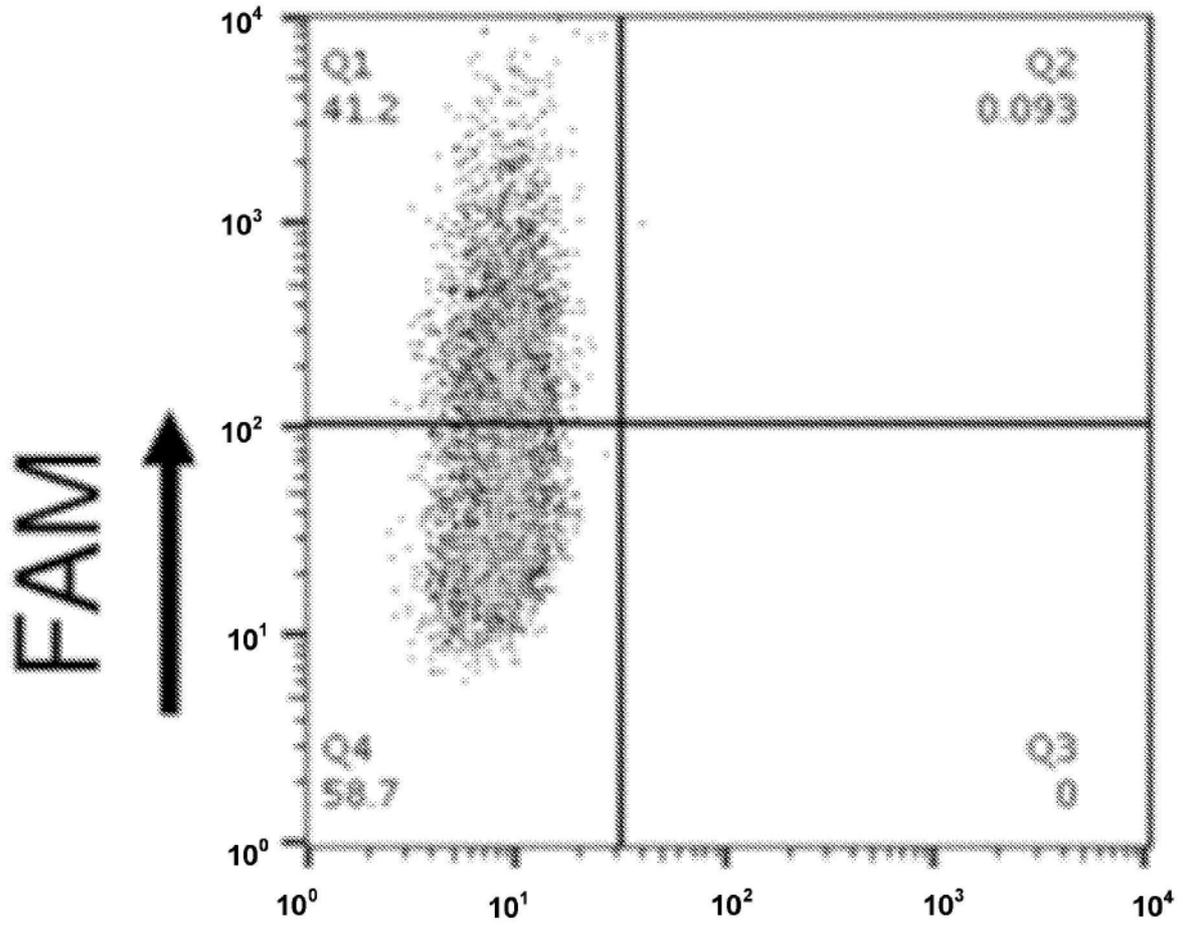


图3C

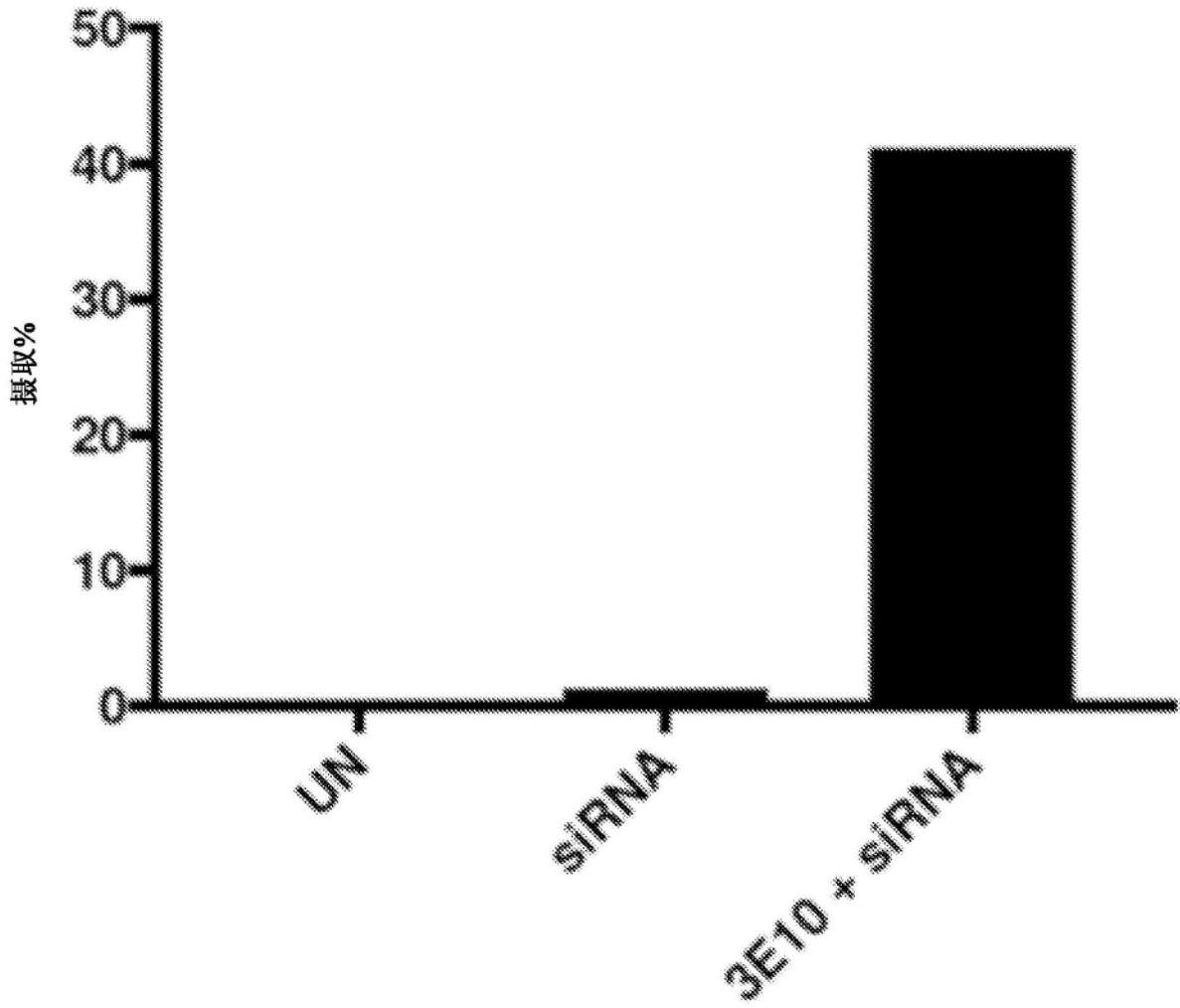


图3D

未经处理的

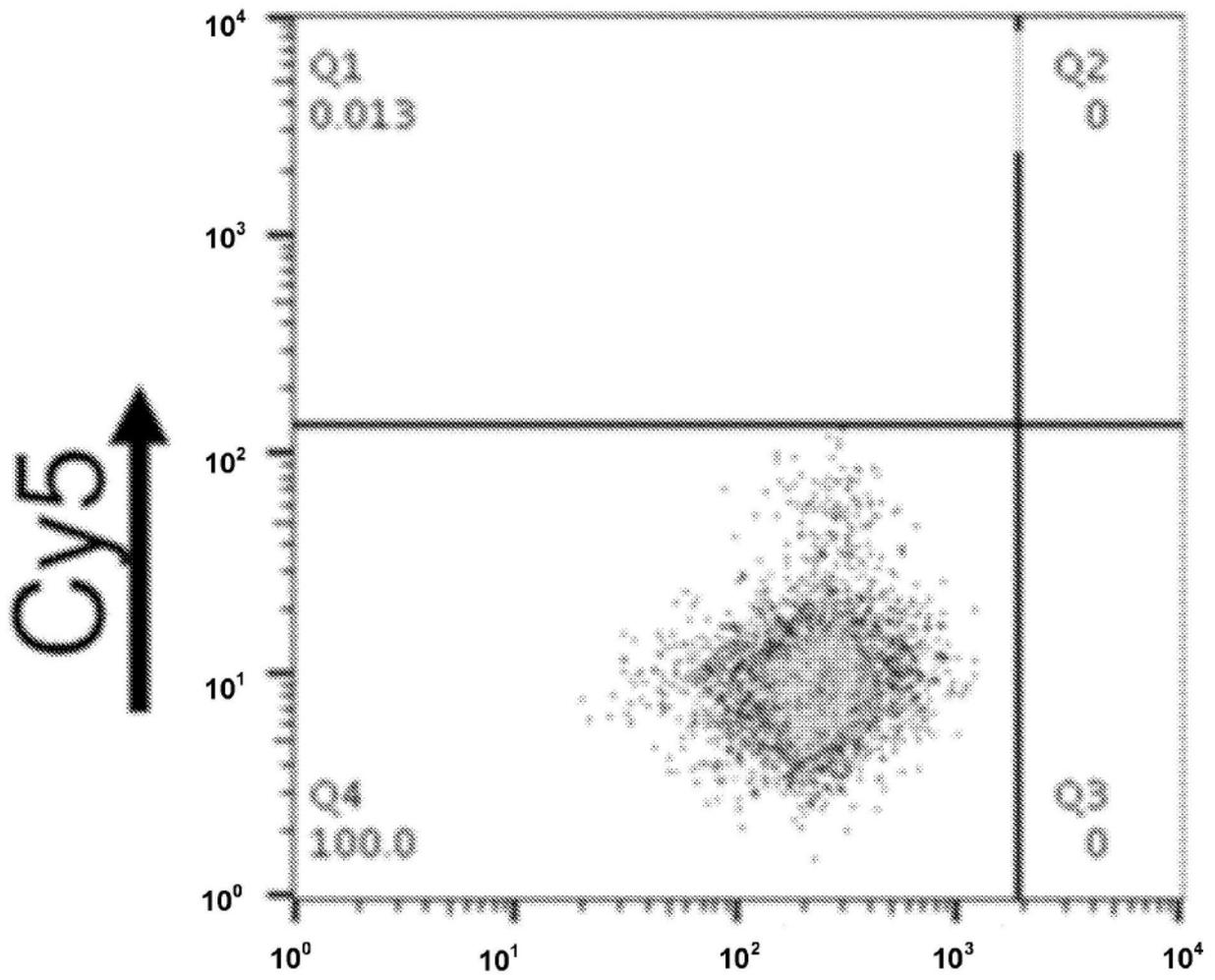


图4A

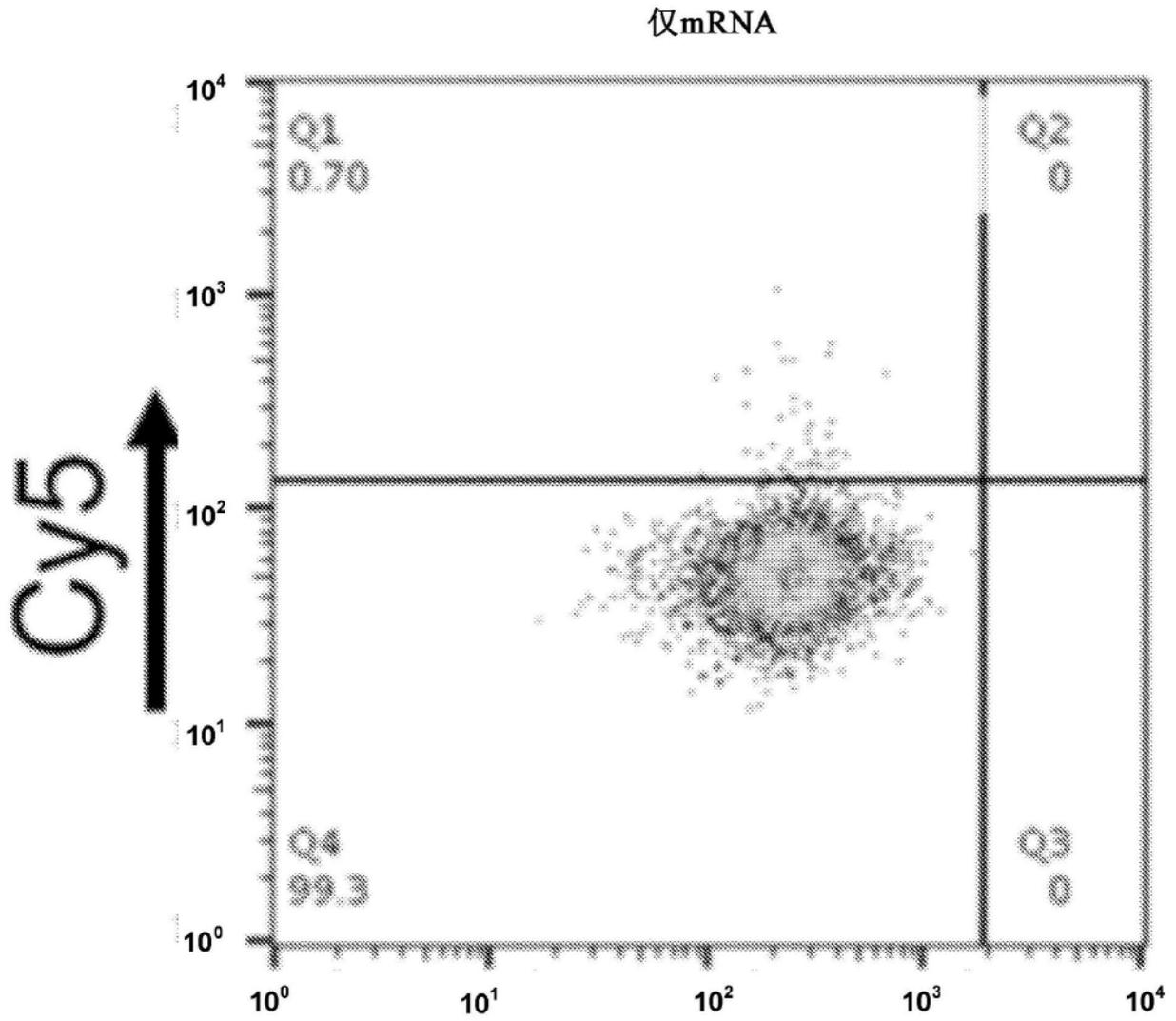


图4B

# mRNA + 3E10 (2.5 uM)

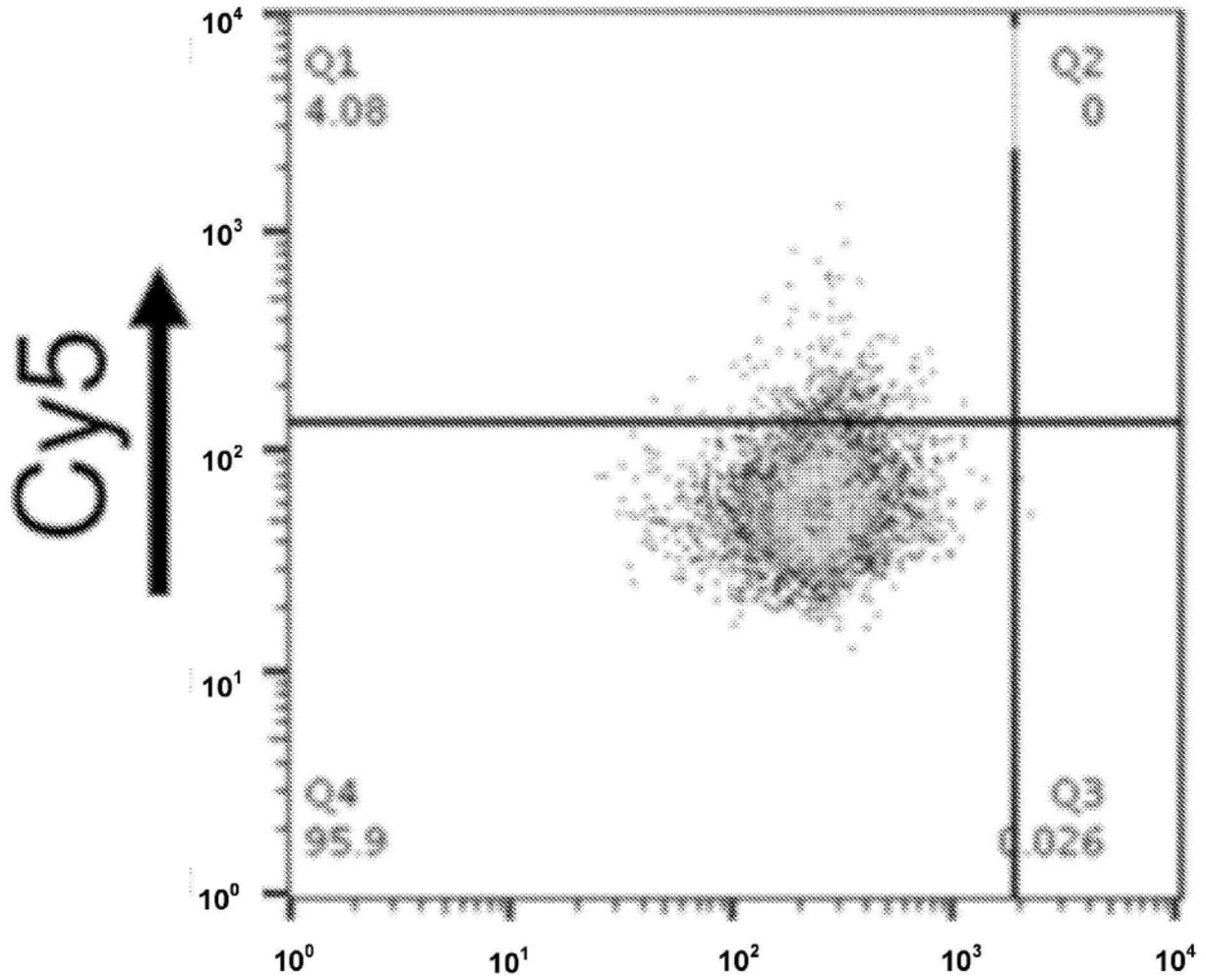


图4C

# mRNA + 3E10 (5 uM)

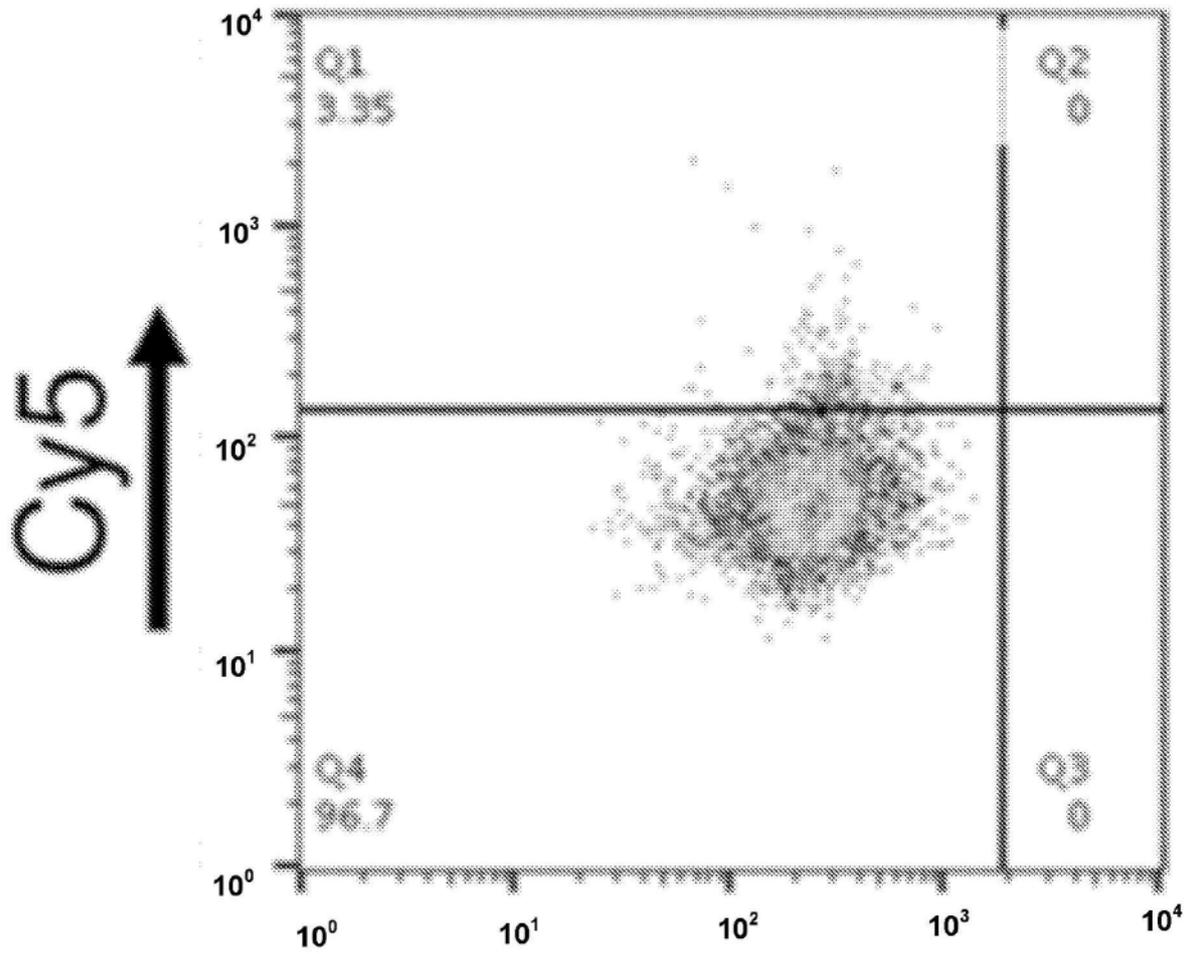


图4D

# mRNA + 3E10 (10 uM)

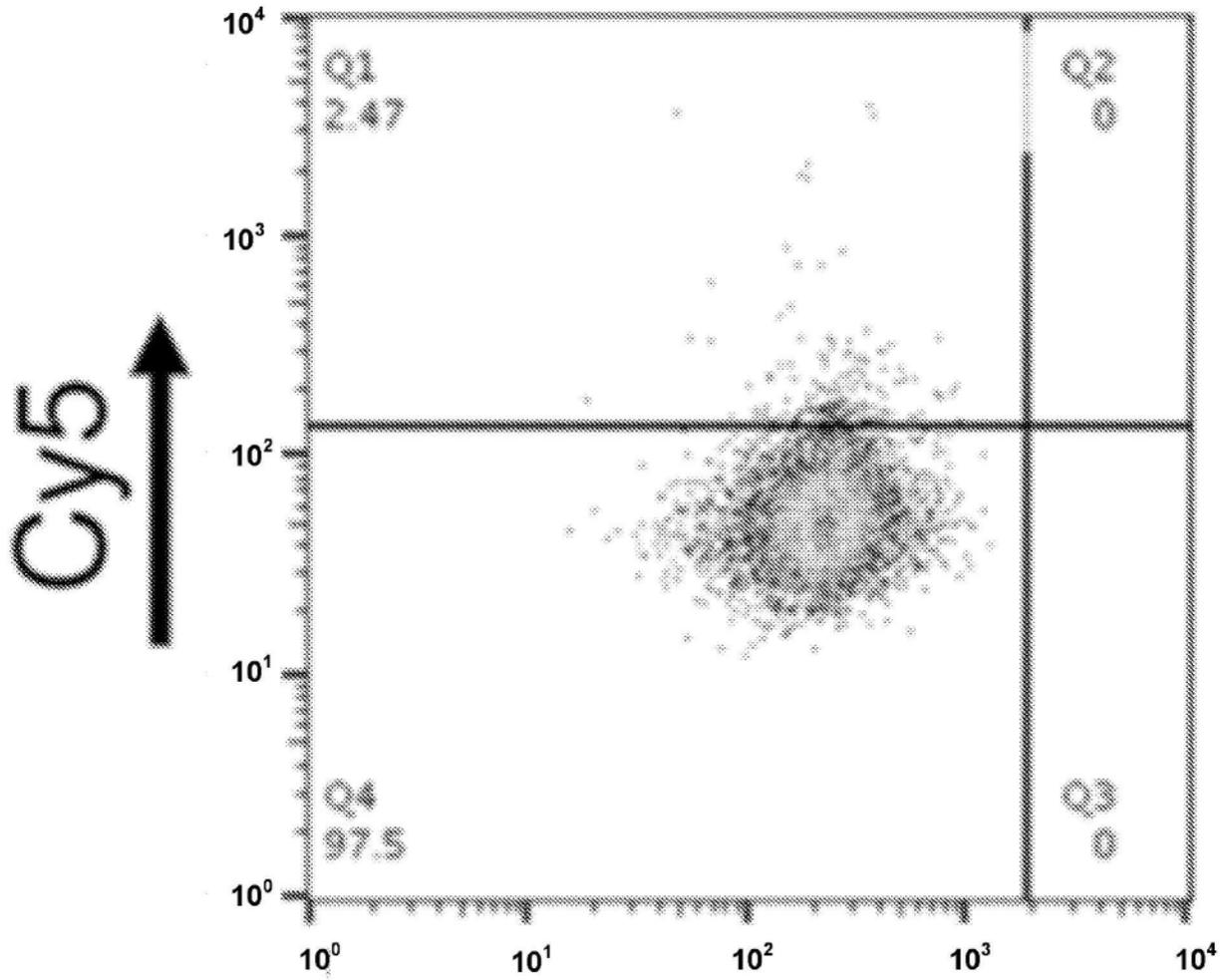


图4E

# mRNA + 3E10 D31N (2.5 $\mu$ M)

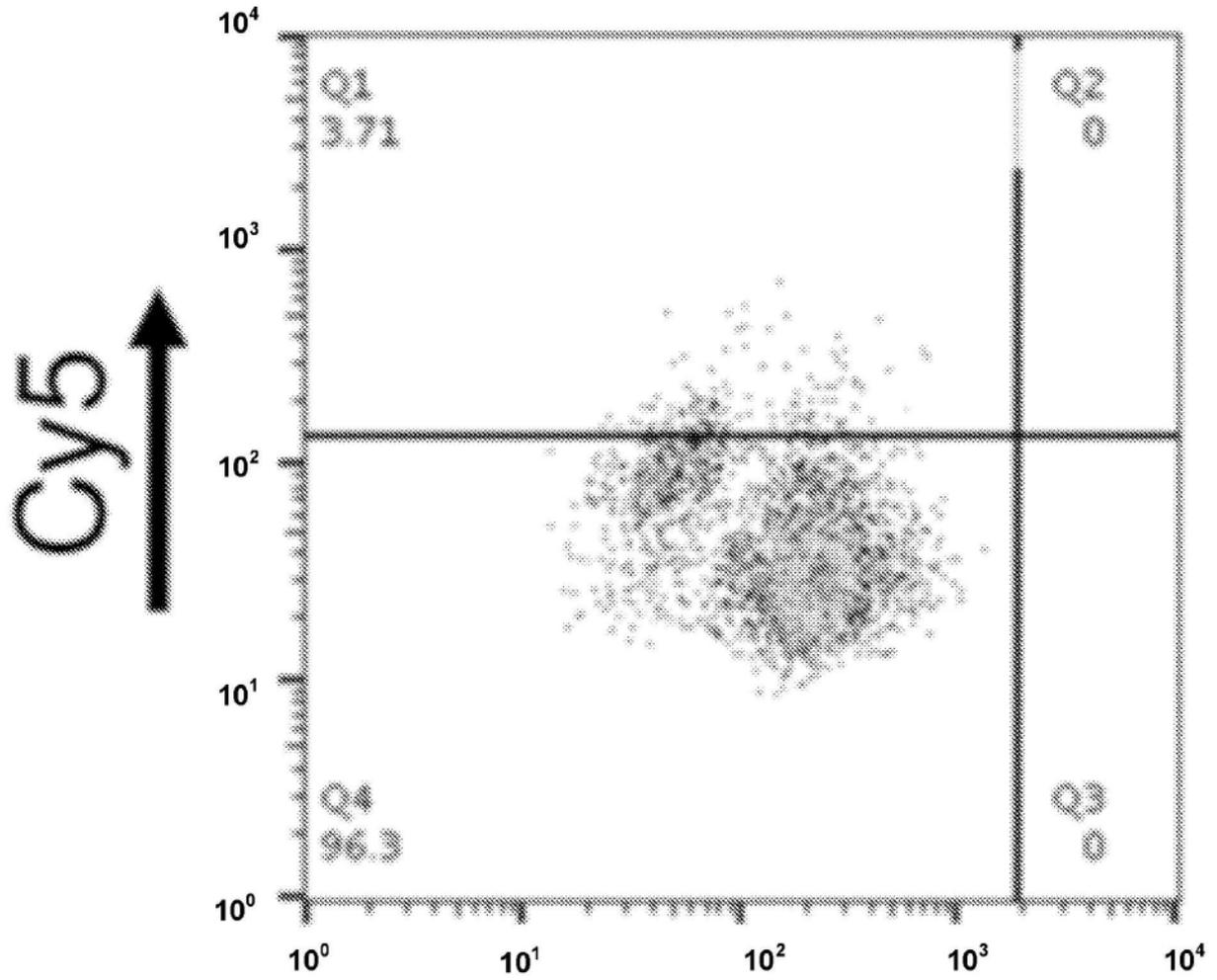


图4F

# mRNA + 3E10 D31N (5 uM)

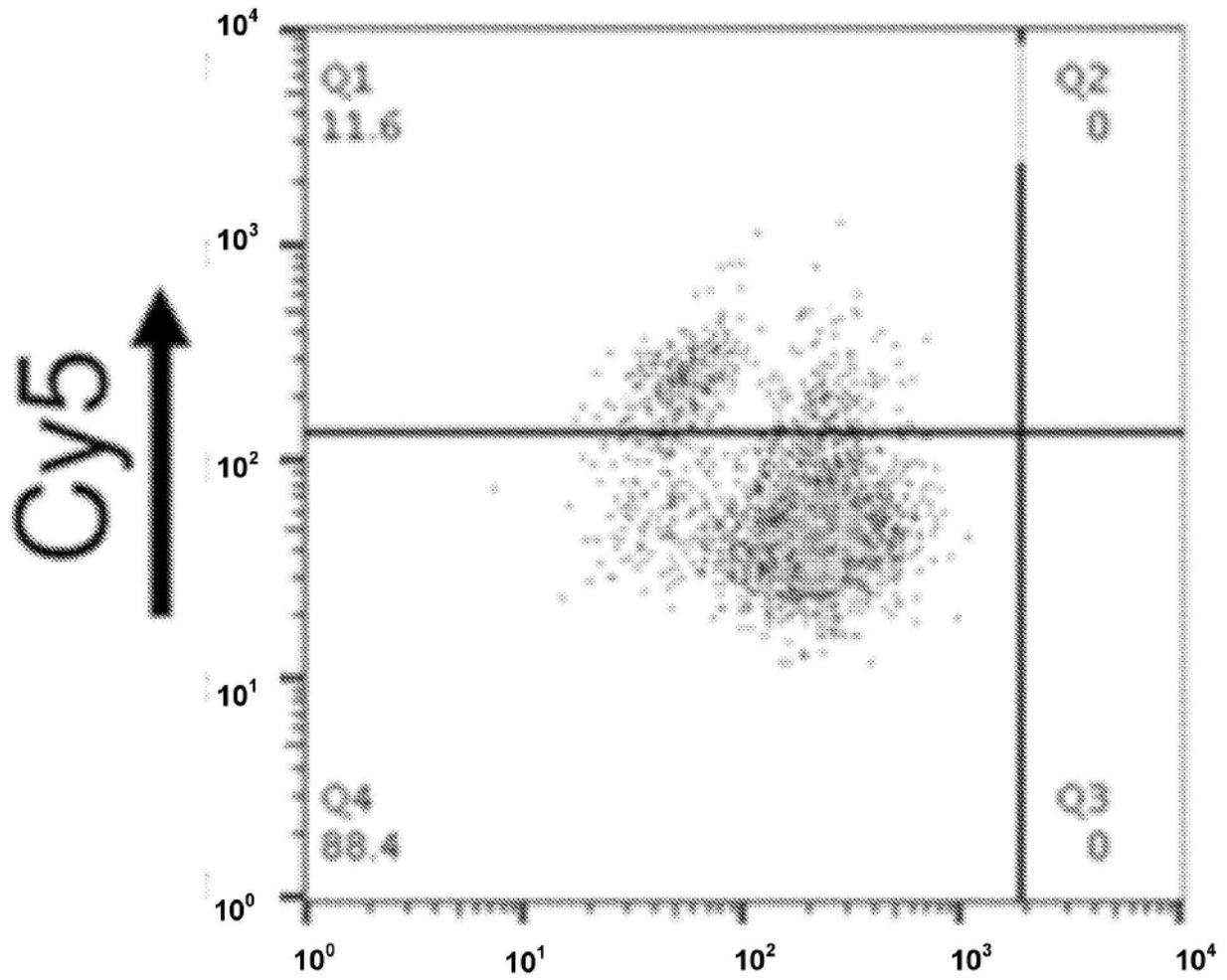


图4G

# mRNA + 3E10 D31N (10 uM)

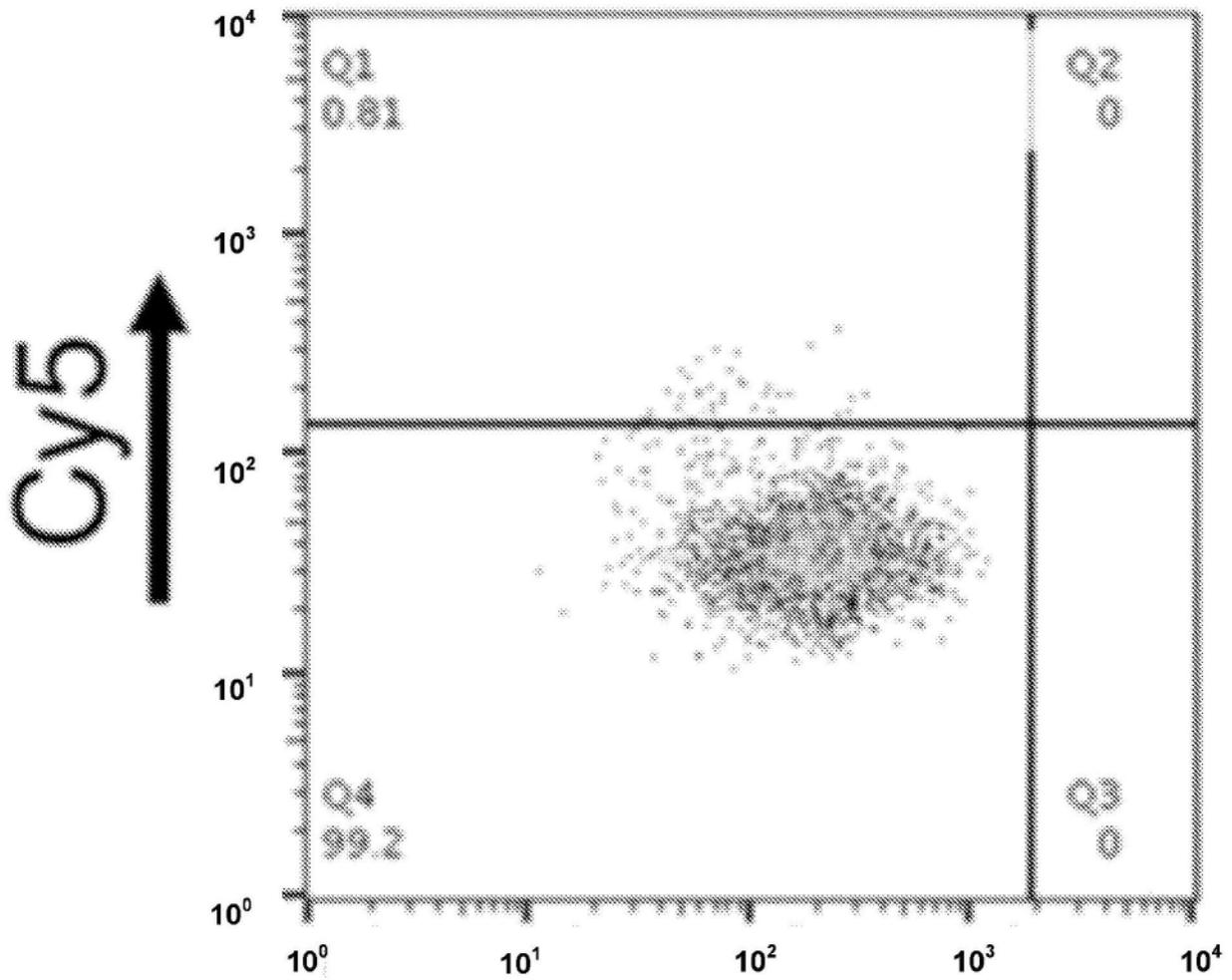


图4H

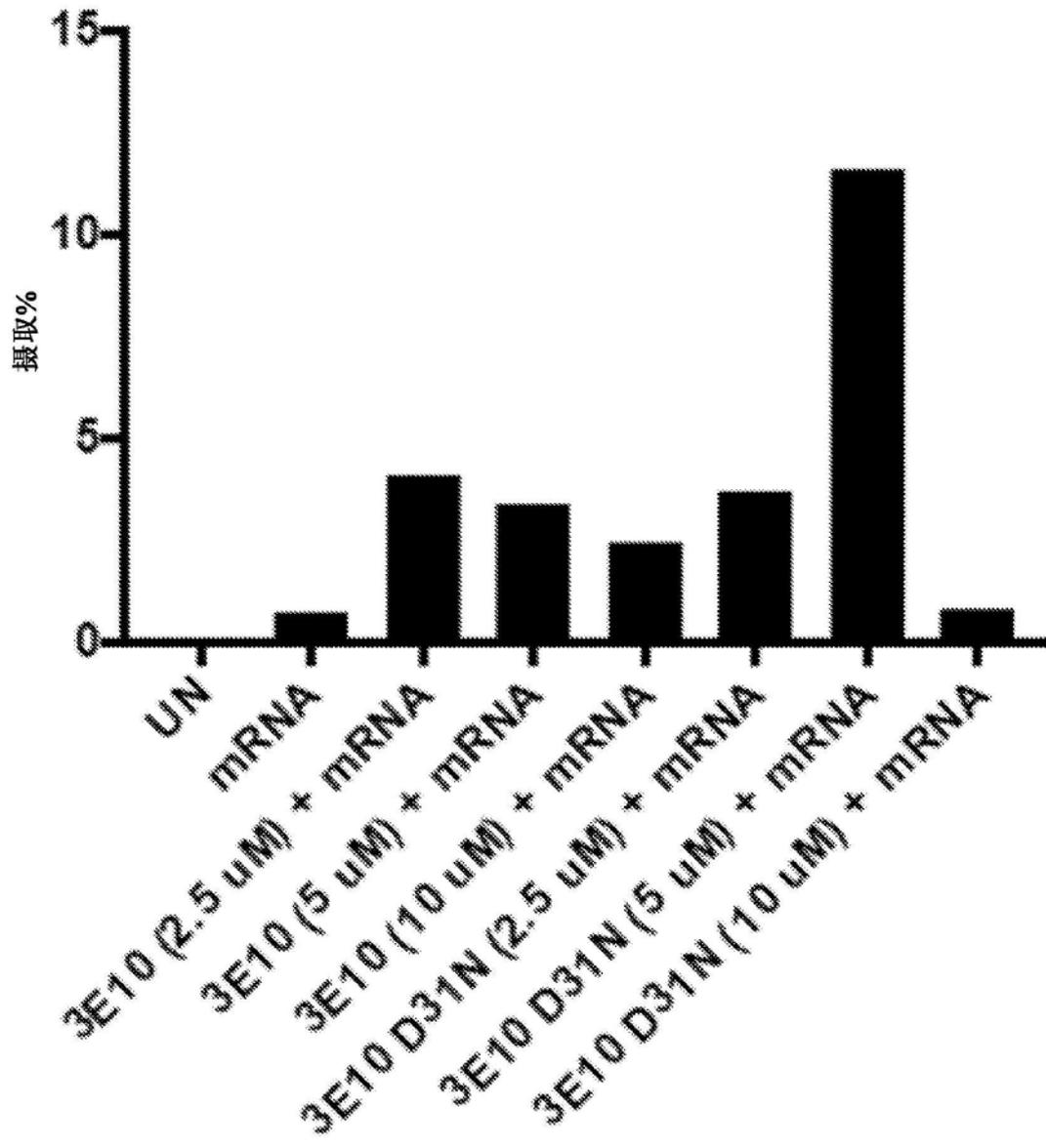


图4I

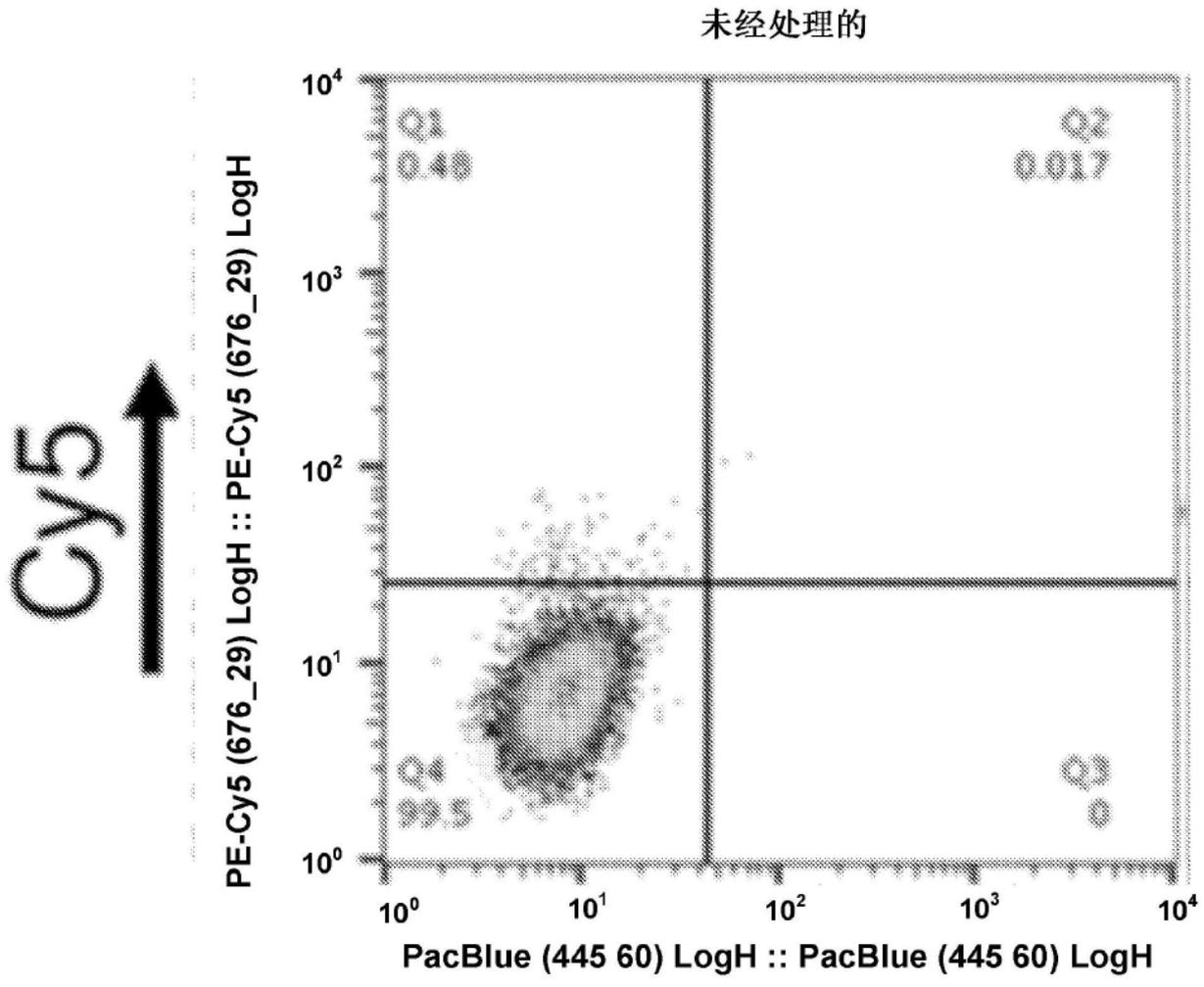


图5A

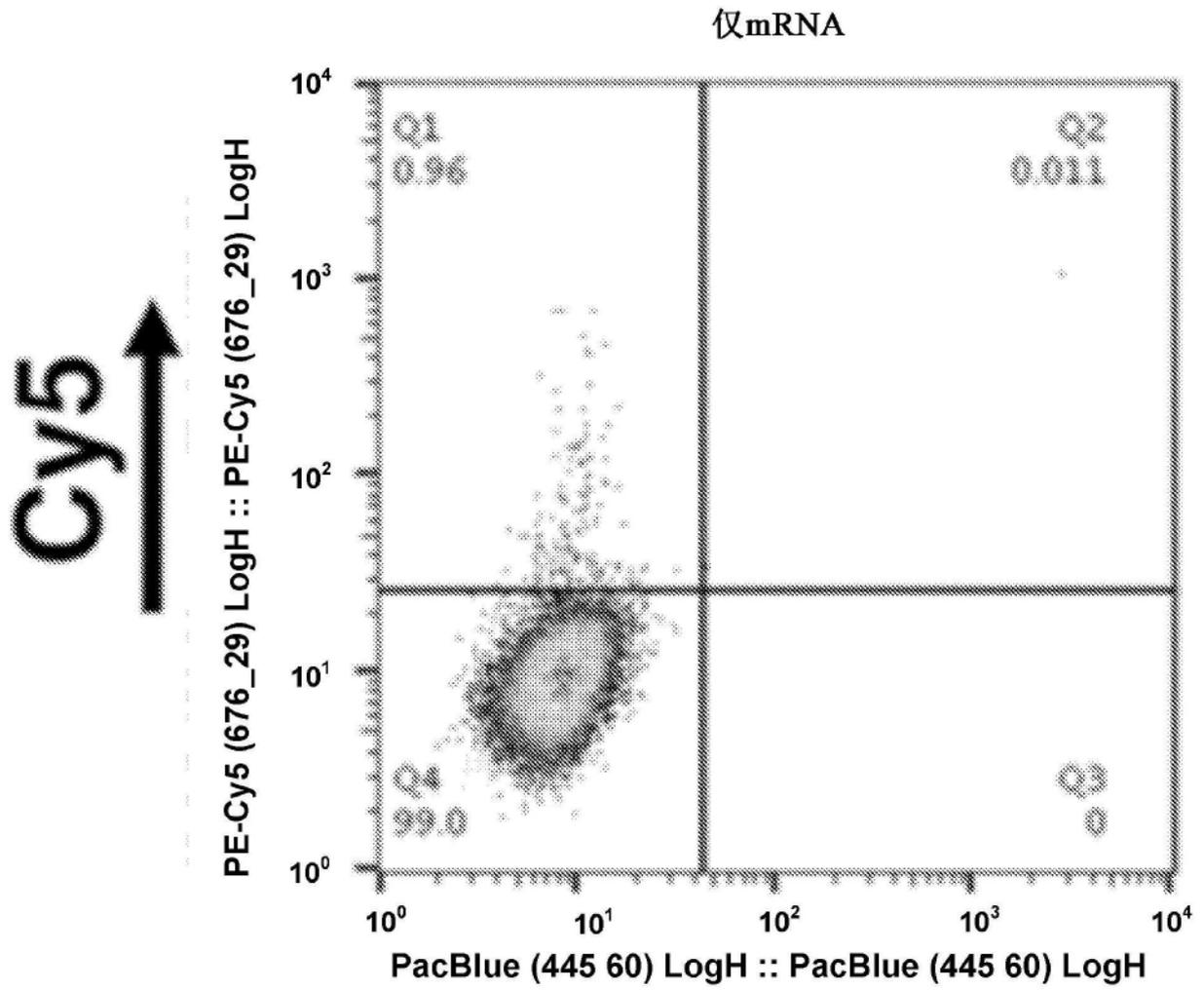


图5B

# mRNA + 3E10 D31N (0.1 uM)

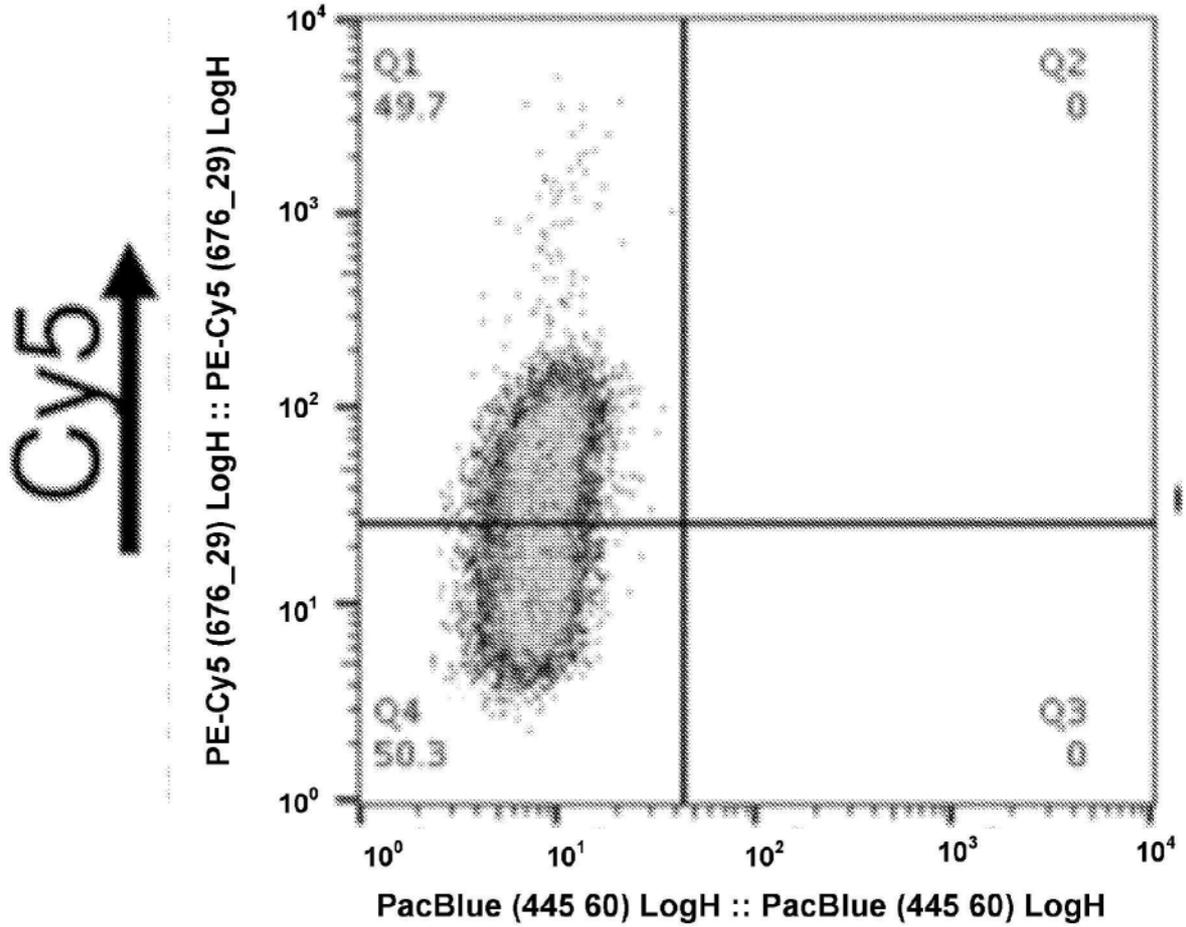


图5C

# mRNA + 3E10 D31N (0.25 $\mu$ M)

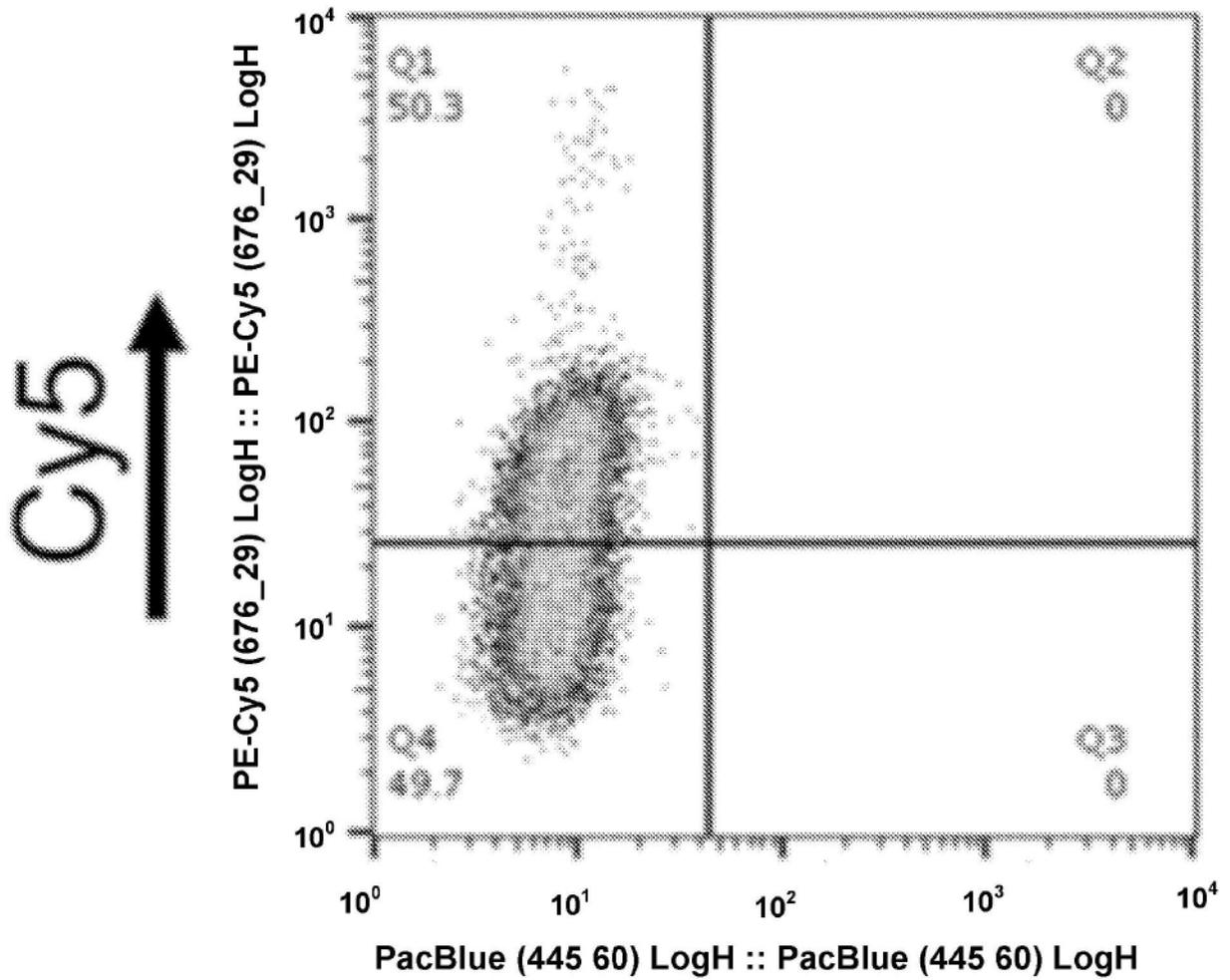


图5D

# mRNA + 3E10 D31N (0.5 uM)

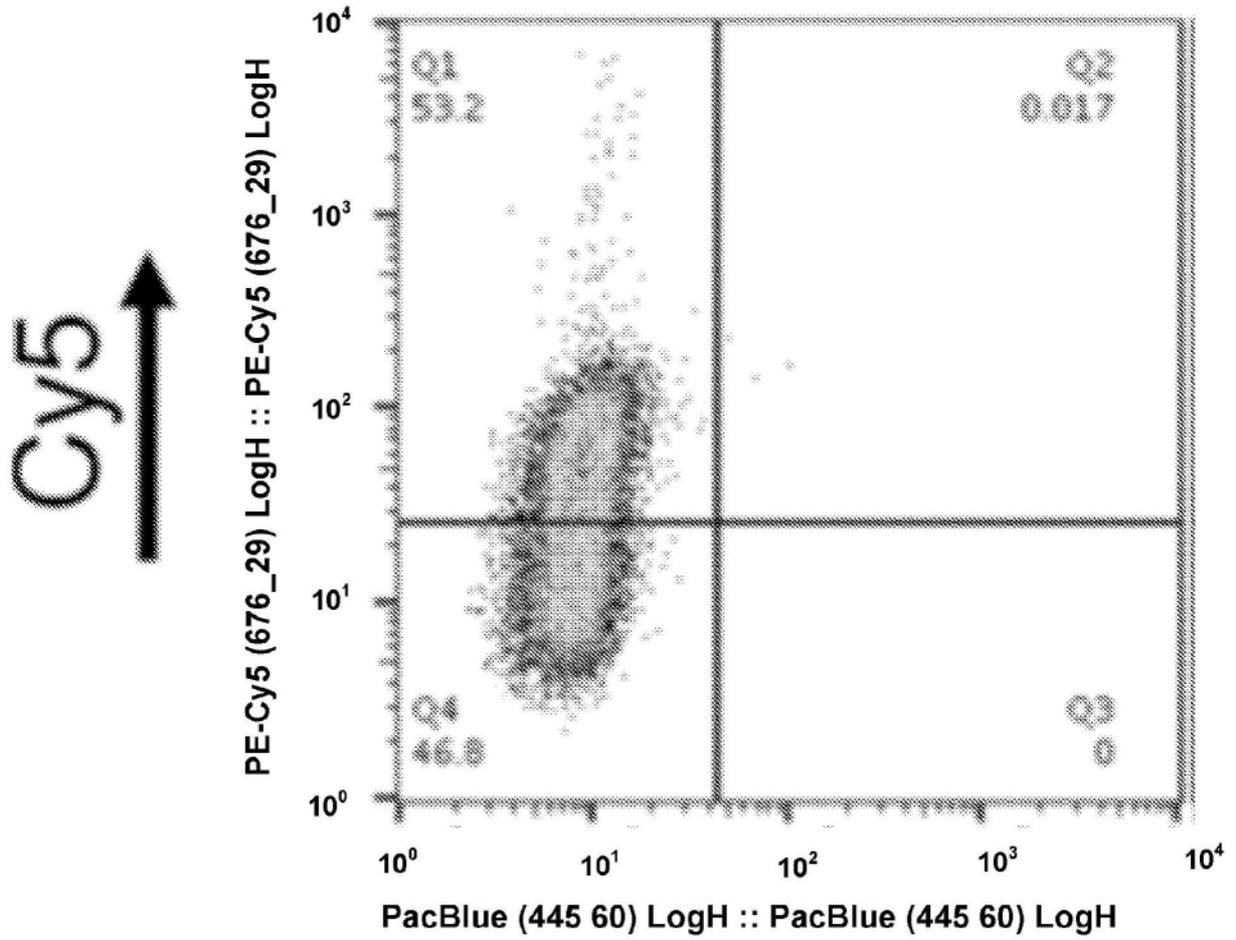


图5E

# mRNA + 3E10 D31N (1 uM)

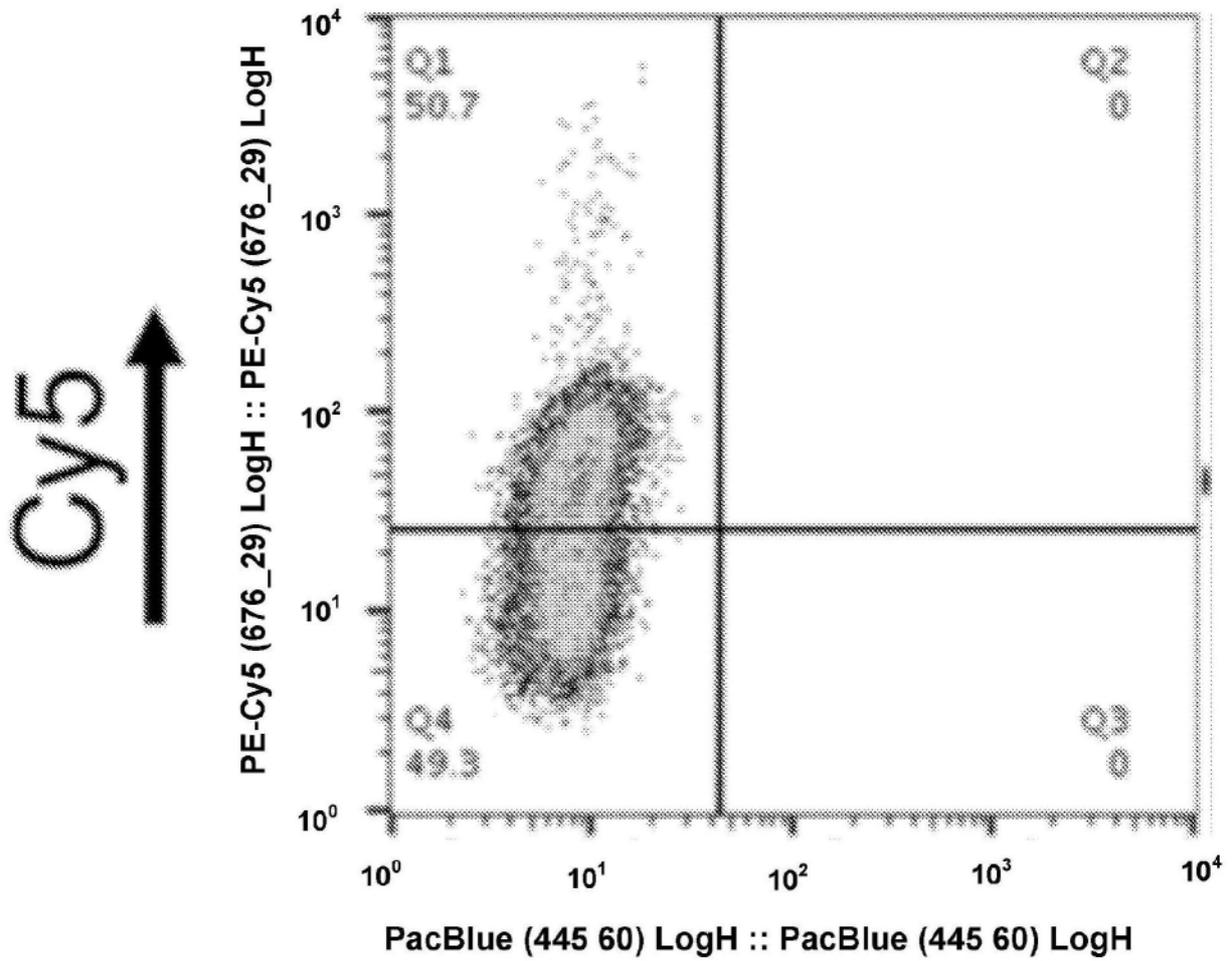


图5F

# mRNA + 3E10 D31N (5 uM)

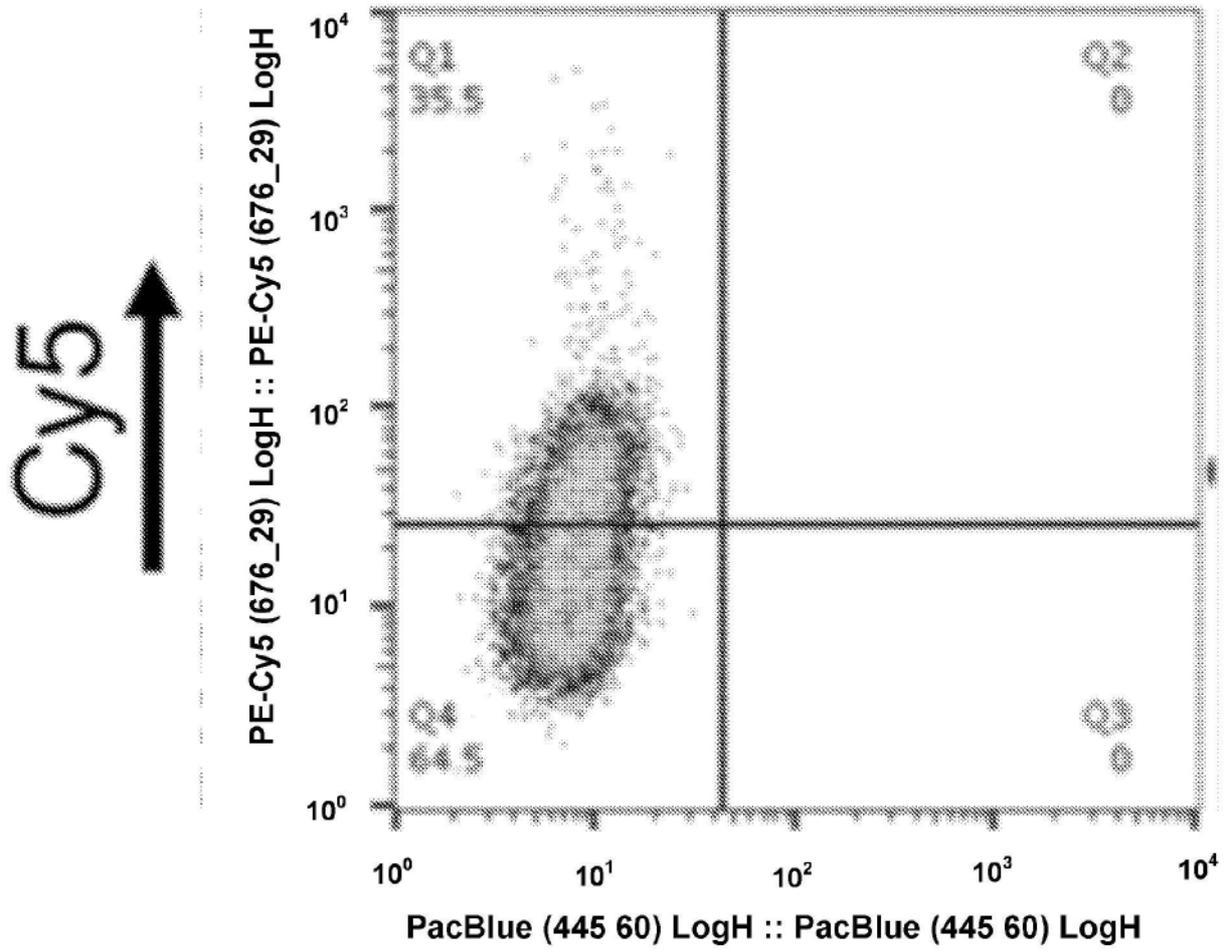


图5G

# mRNA + 3E10 D31N (10 $\mu$ M)

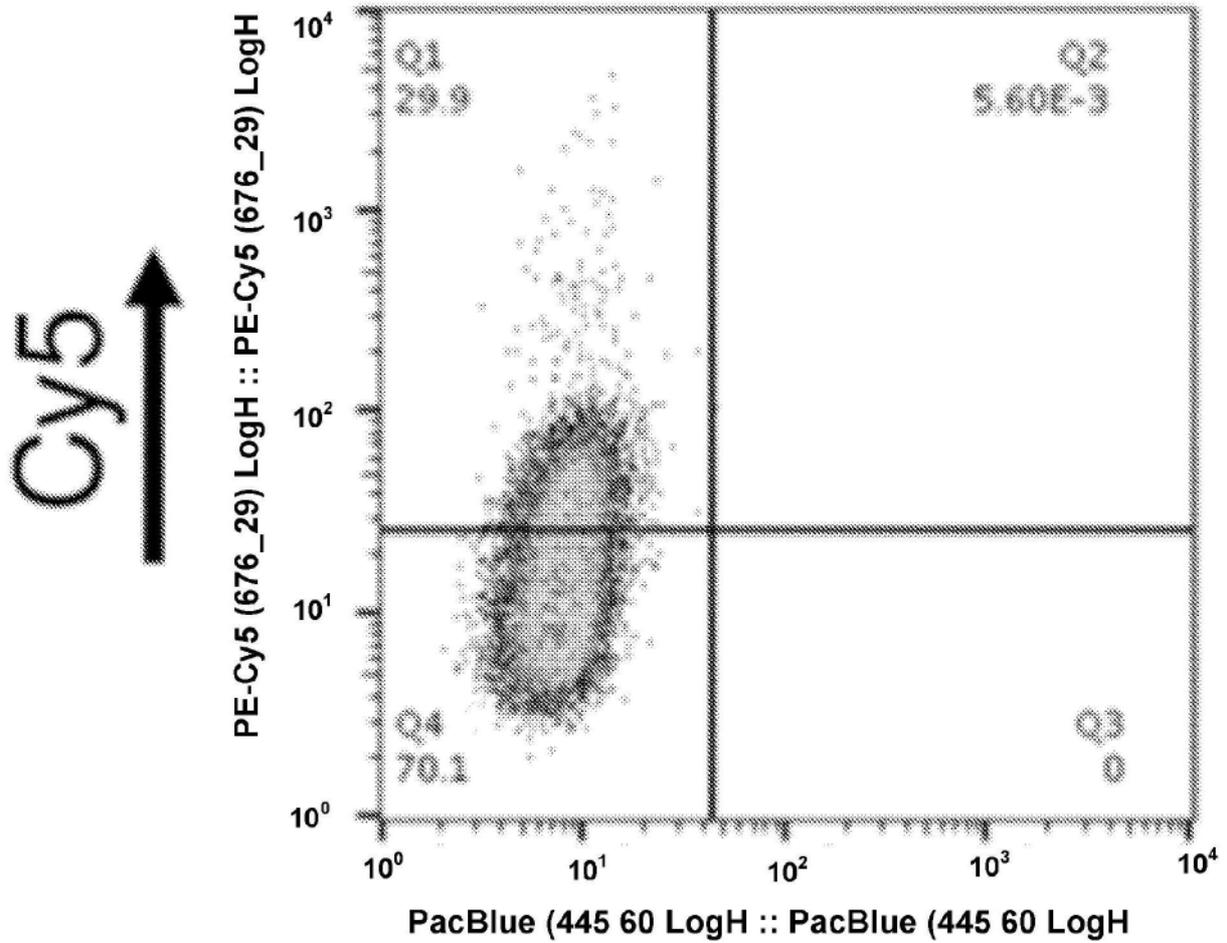


图5H

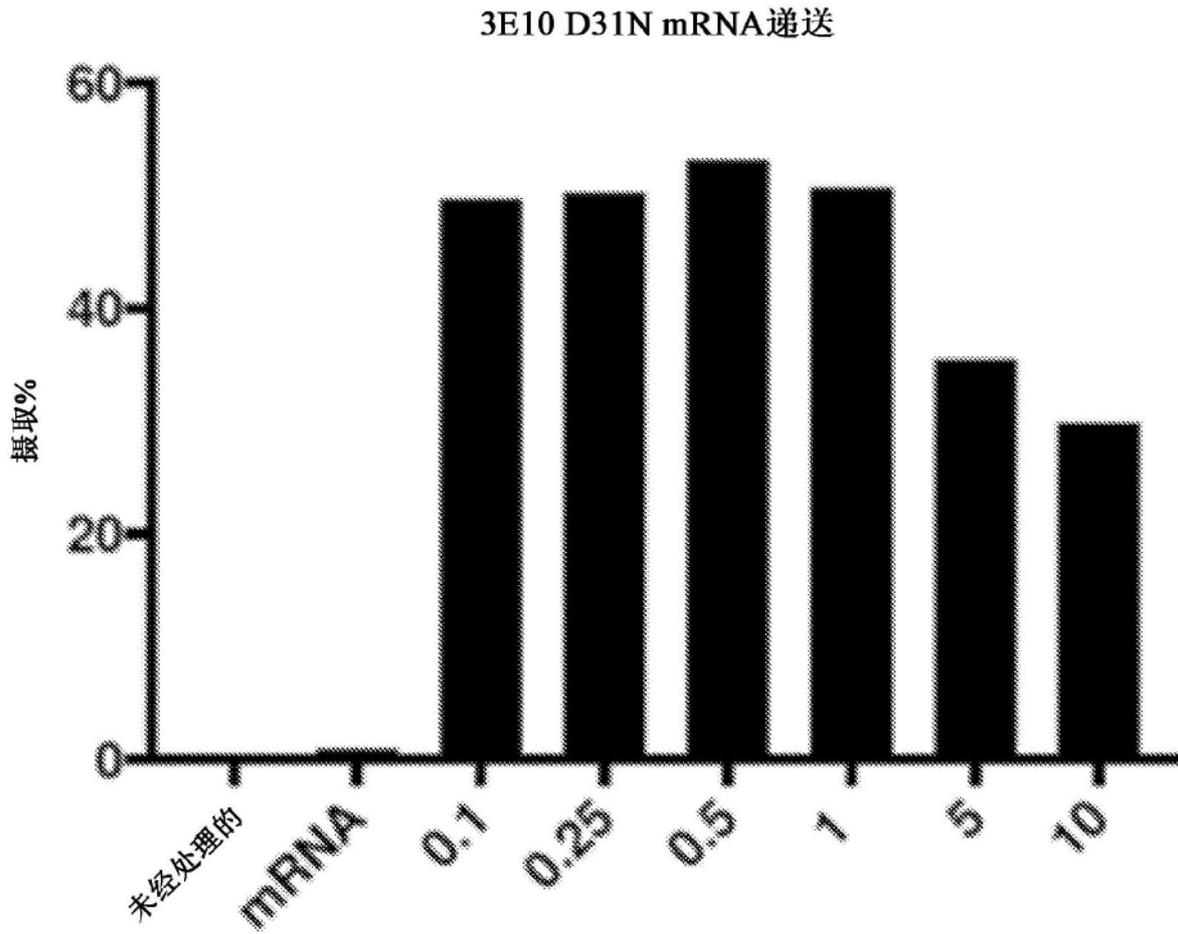


图5I

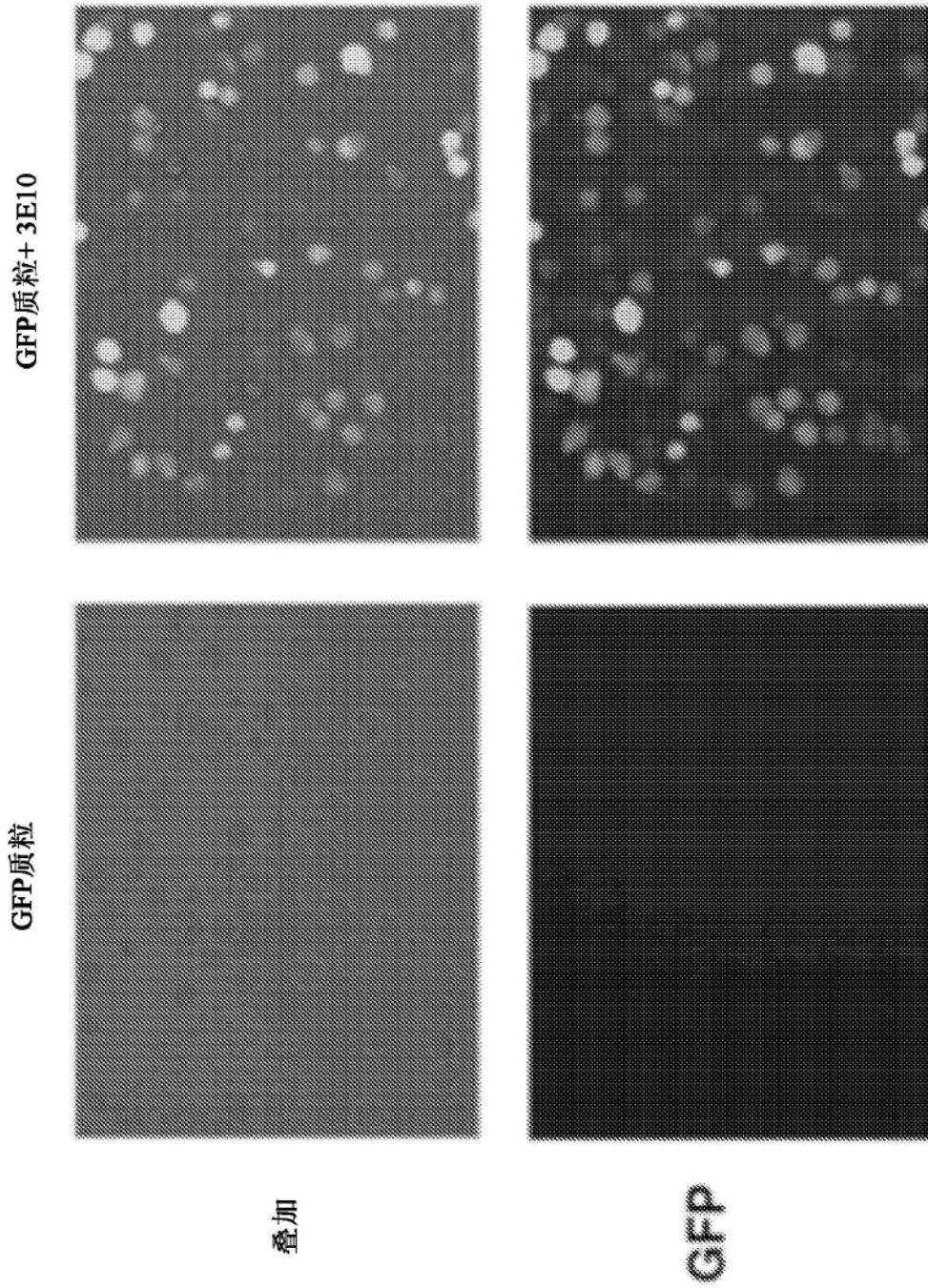


图6

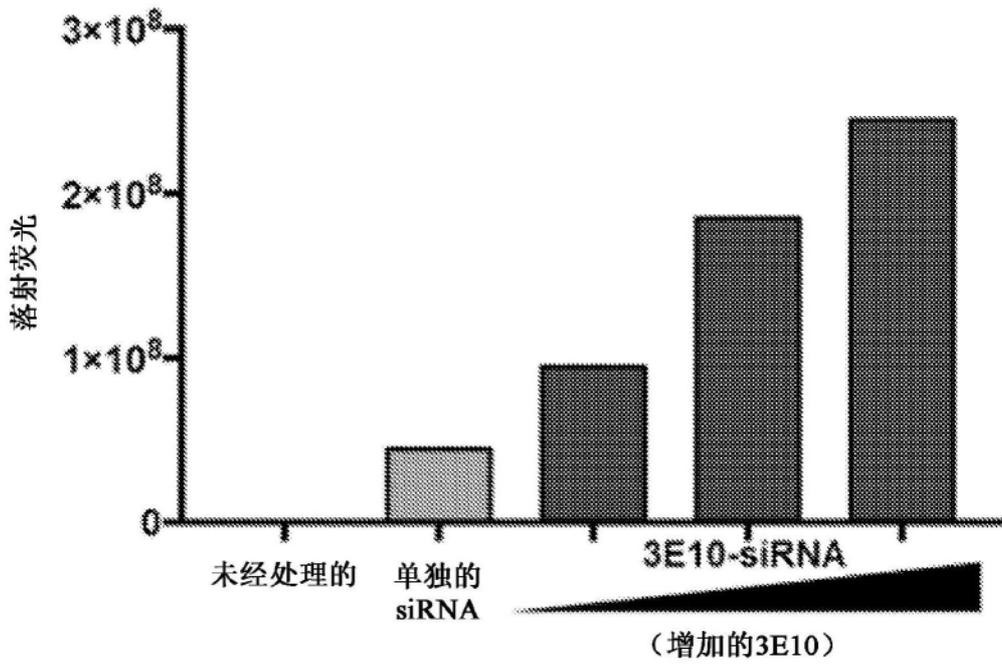


图7A

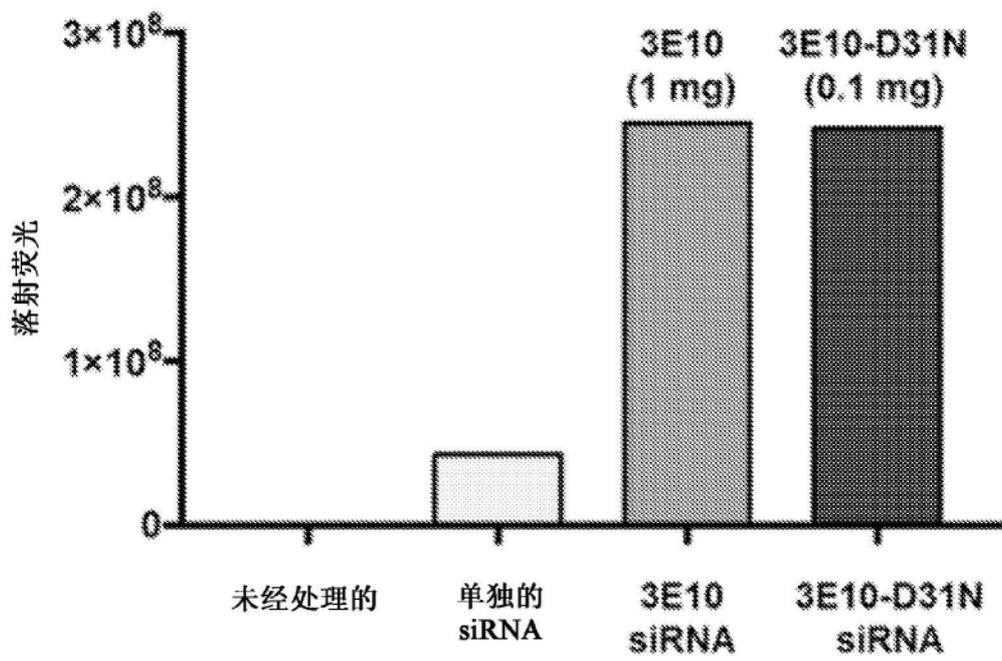


图7B

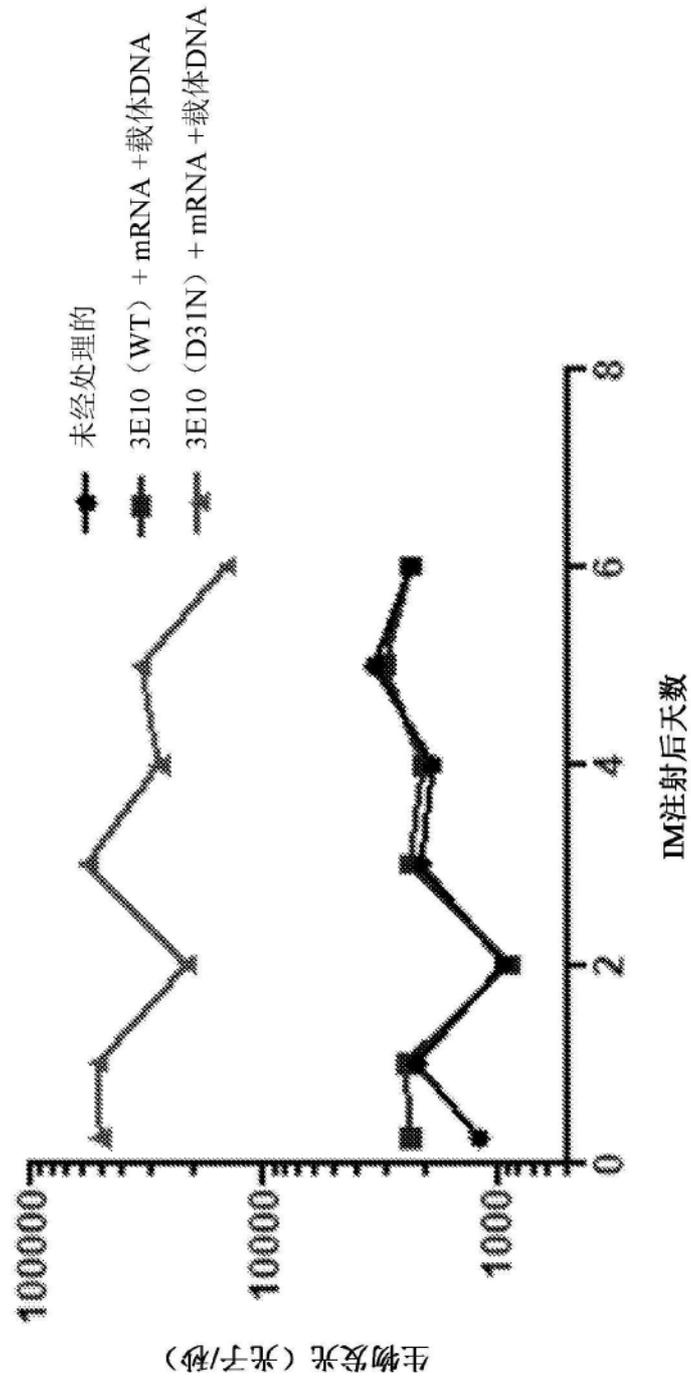
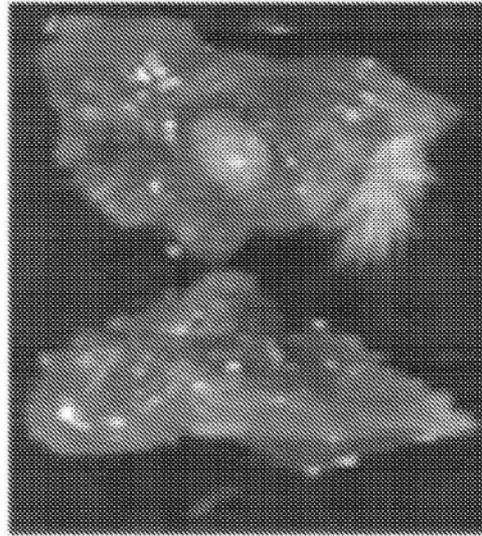


图8

未经处理的对照



小鼠肌肉

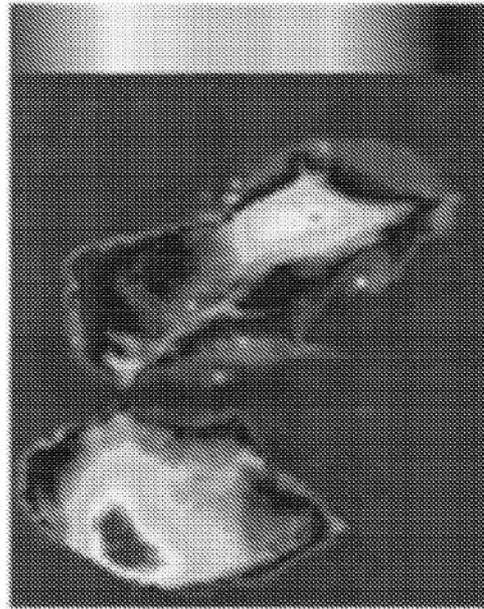
图9A

3E10-D31N

高3E10-D31N

抗体是  
荧光标记的

低3E10-D31N



小鼠肌肉

图9B

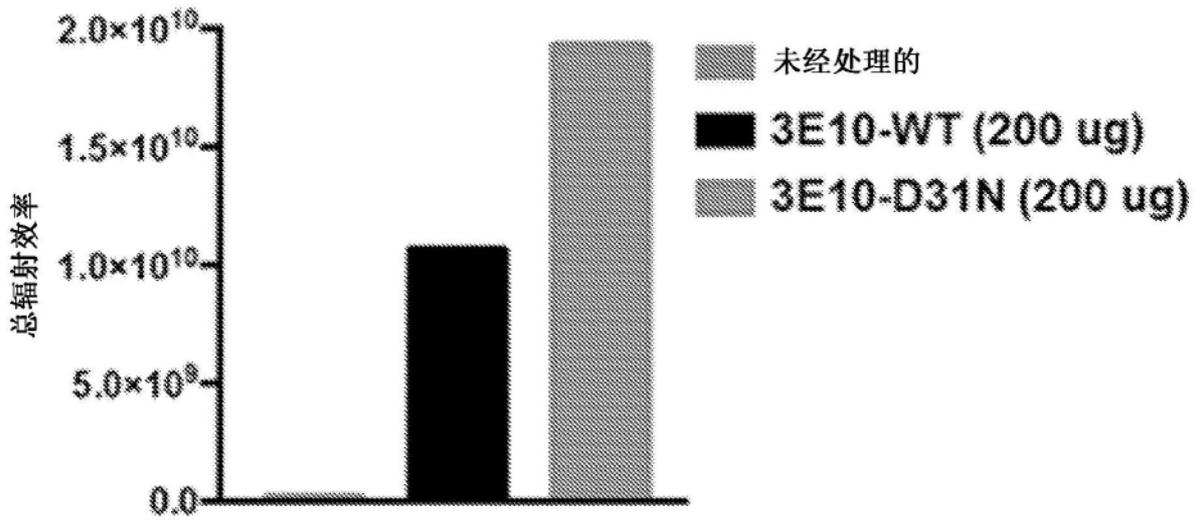


图9C

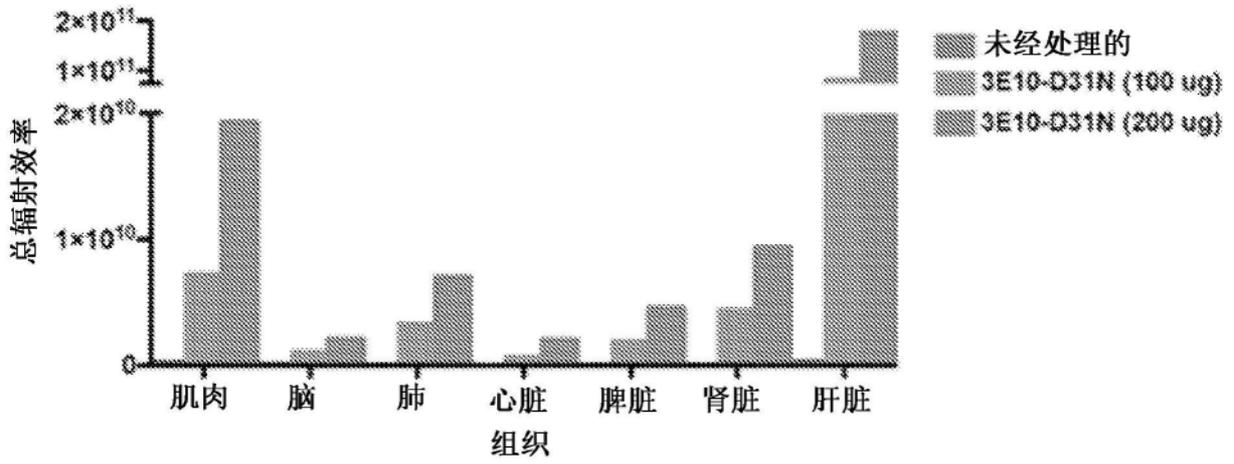
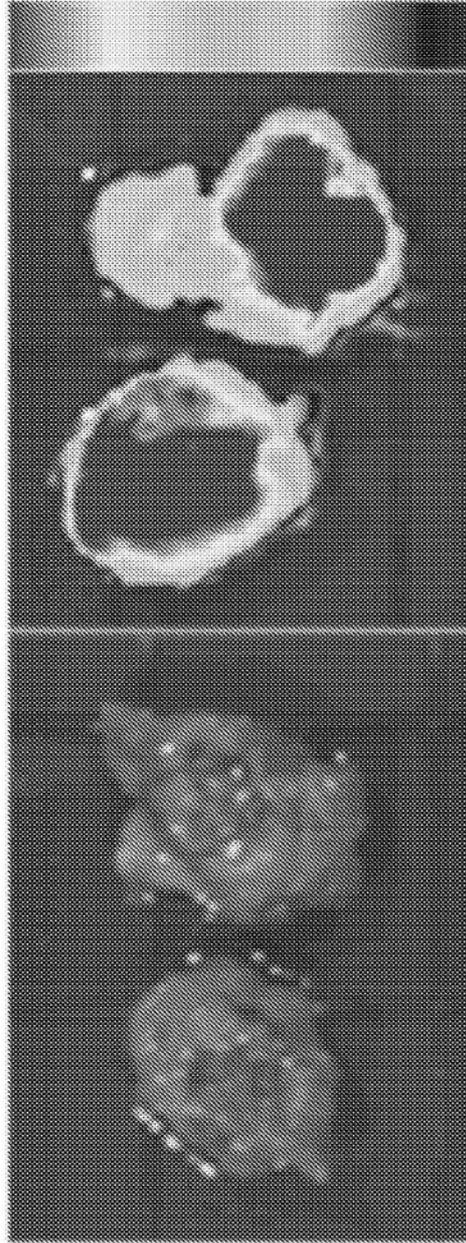


图10

3E10-D31N

未经处理的对照



肿瘤

肿瘤

图11A

图11B

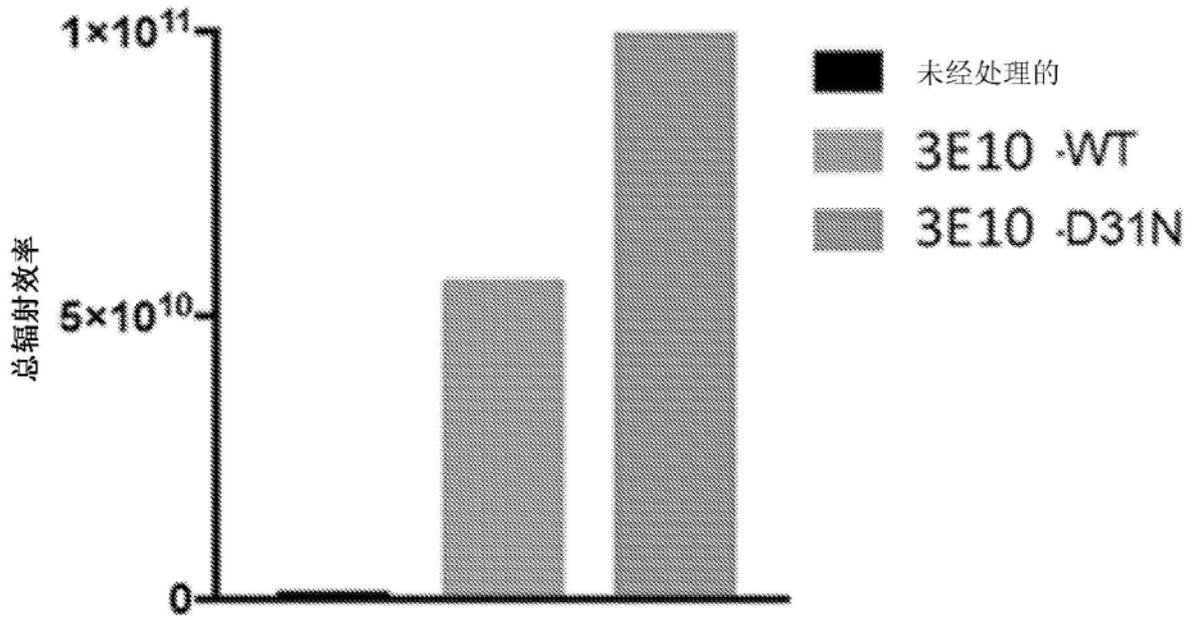


图11C

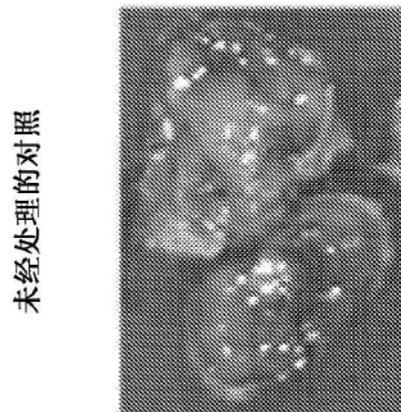


图12A

裸ssDNA

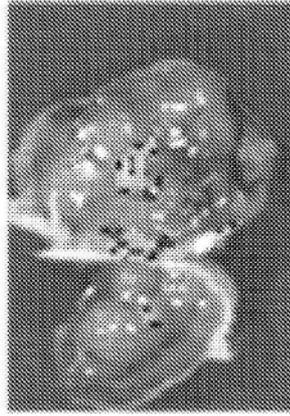


图12B

3E10-D31N/  
ssDNA

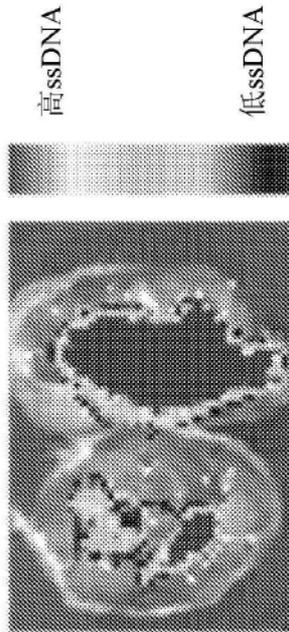


图12C

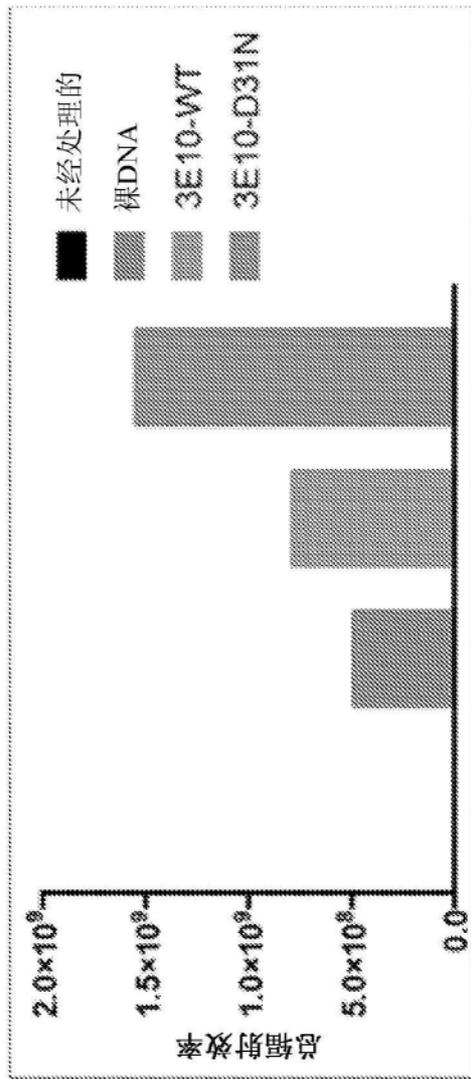


图12D

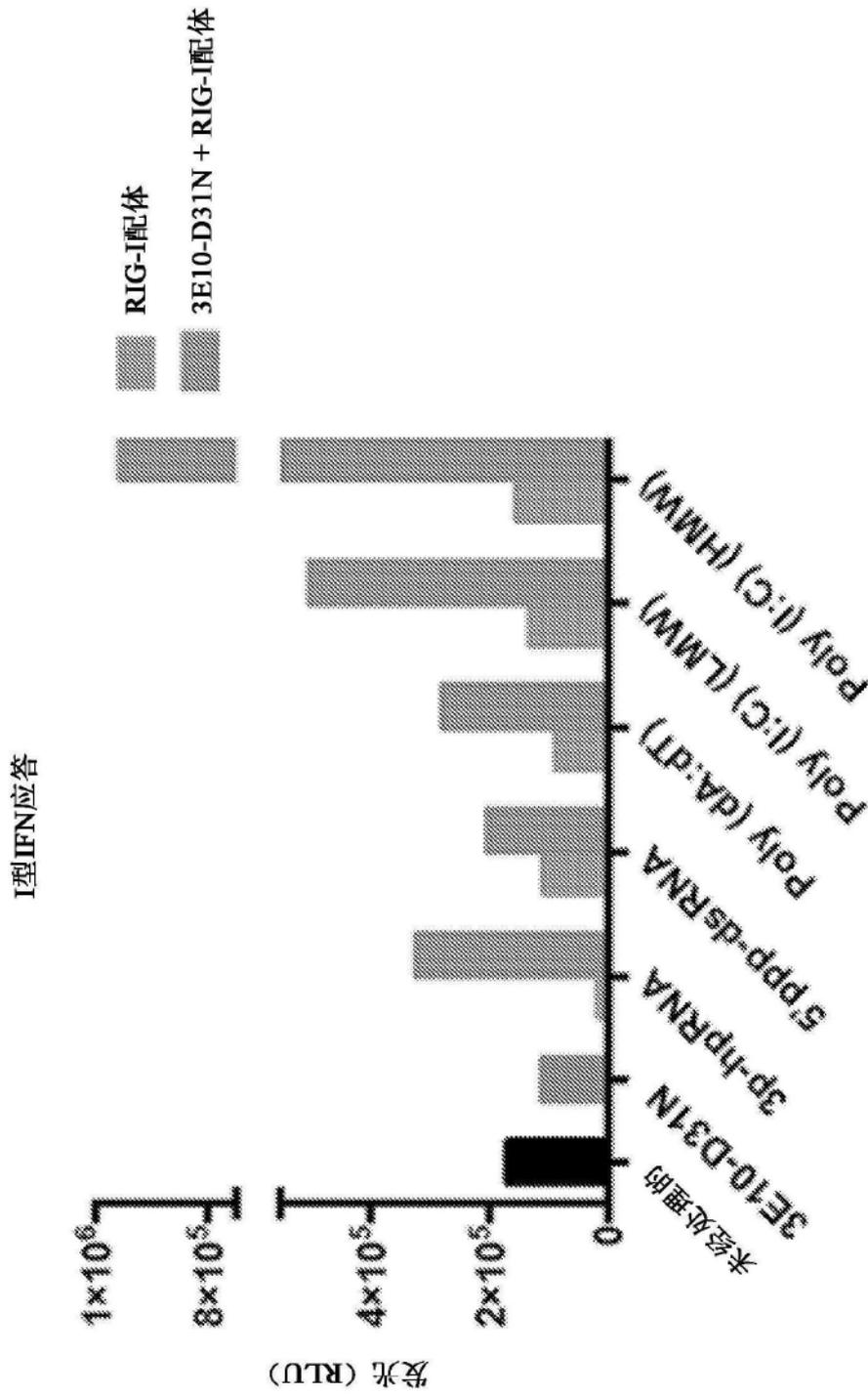


图13

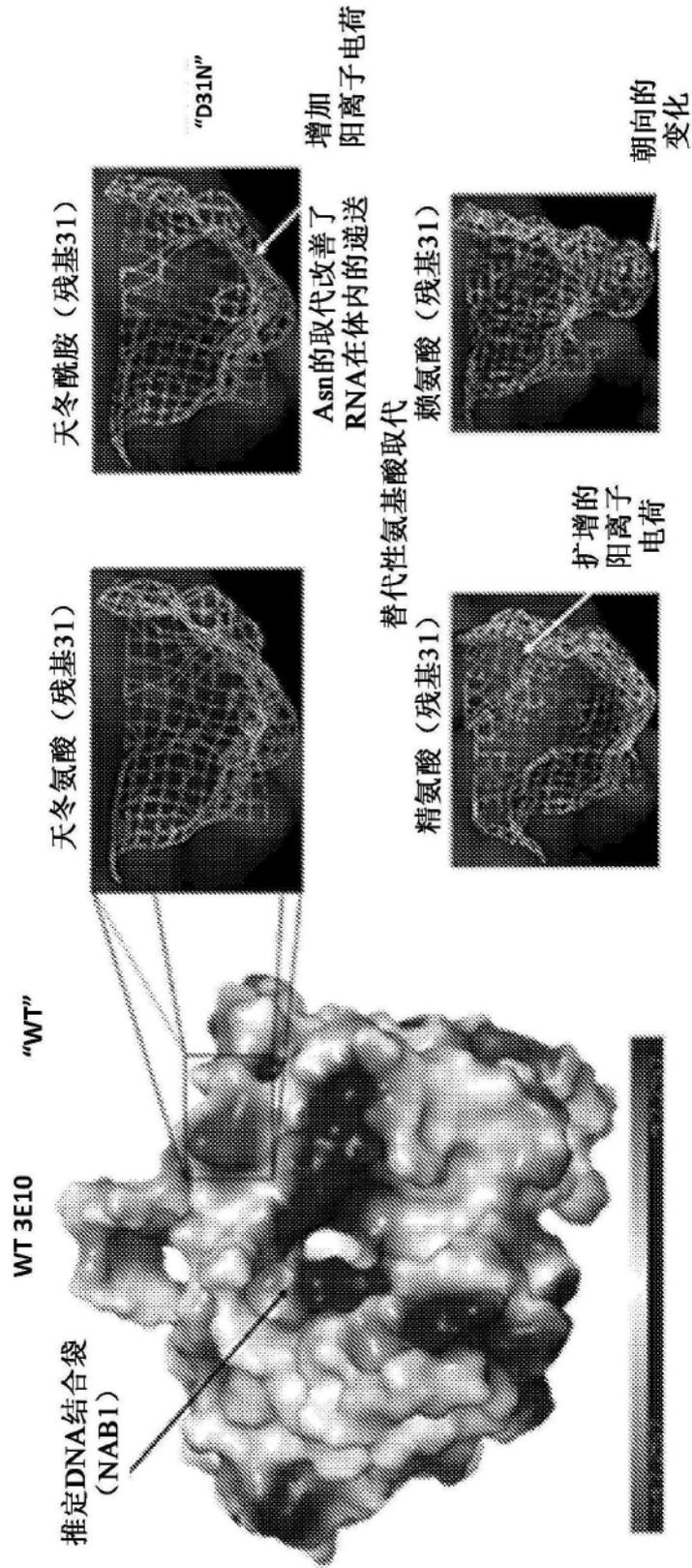


图14A

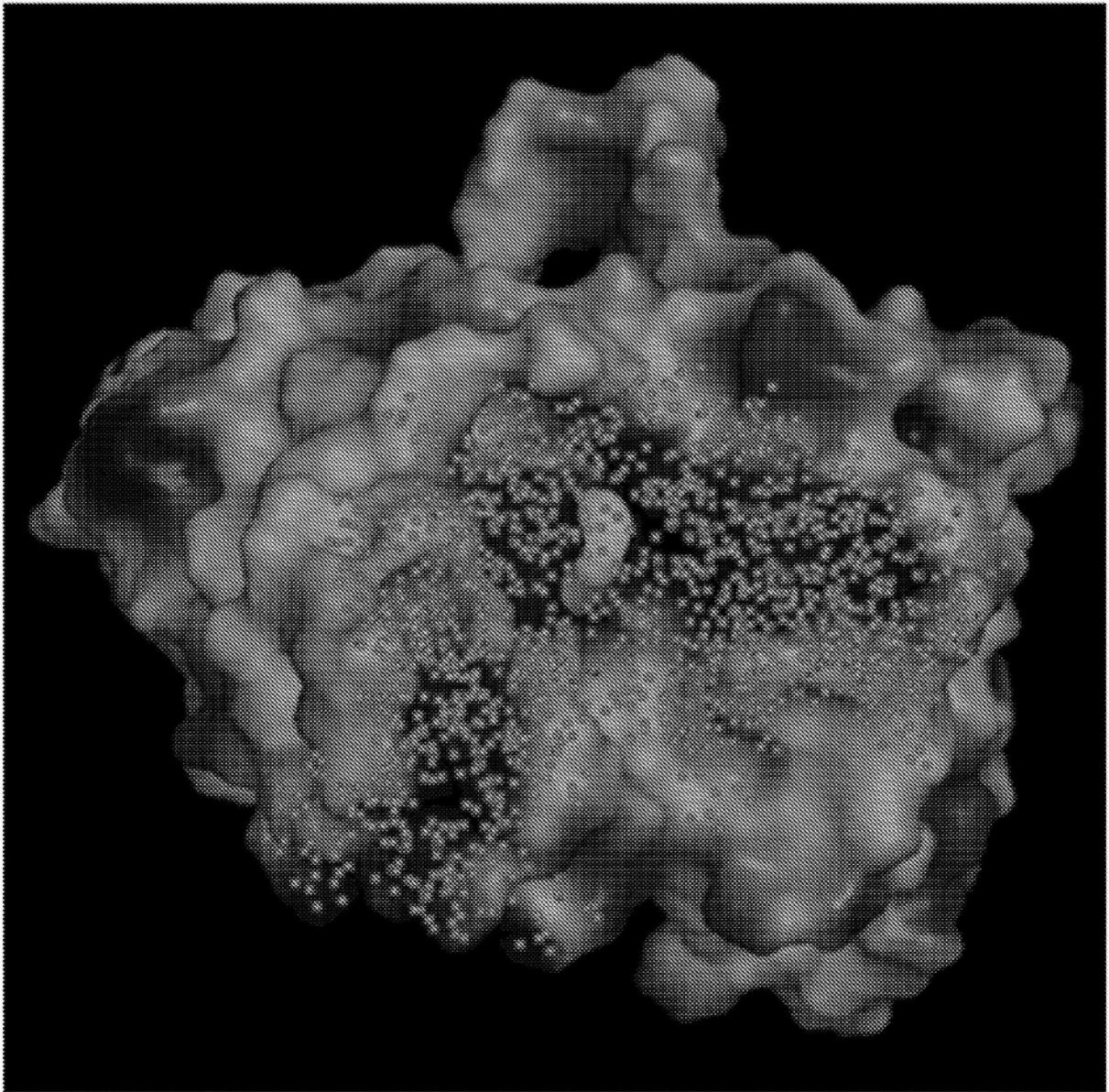


图14B

推定核酸结合袋的映射

>3E10-HC

*EVQLVESGGGLV<sup>K</sup>PGGSRKLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNAK  
 NTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARRGLLLDYWGQTTLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP  
 VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC  
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
 ESNQGPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID  
 NO: XX)*

>3E10-LC

*DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQOKPGQPPKLLIKYASYLESGVPARFSGSGSDFT  
 LNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNRFYPREAKVQW  
 KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID  
 NO: XX)*

图14C

3E10与ssDNA的结合

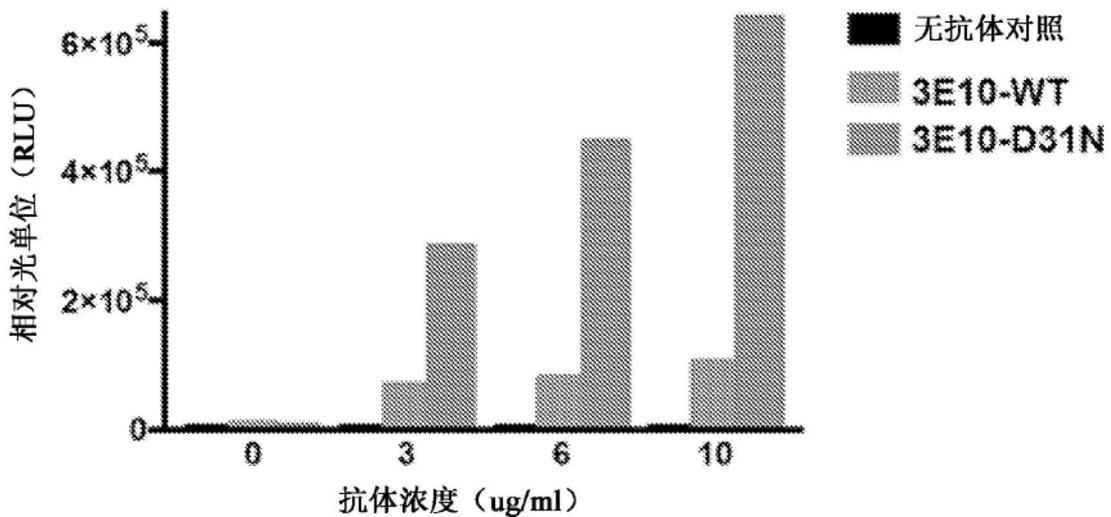


图15A

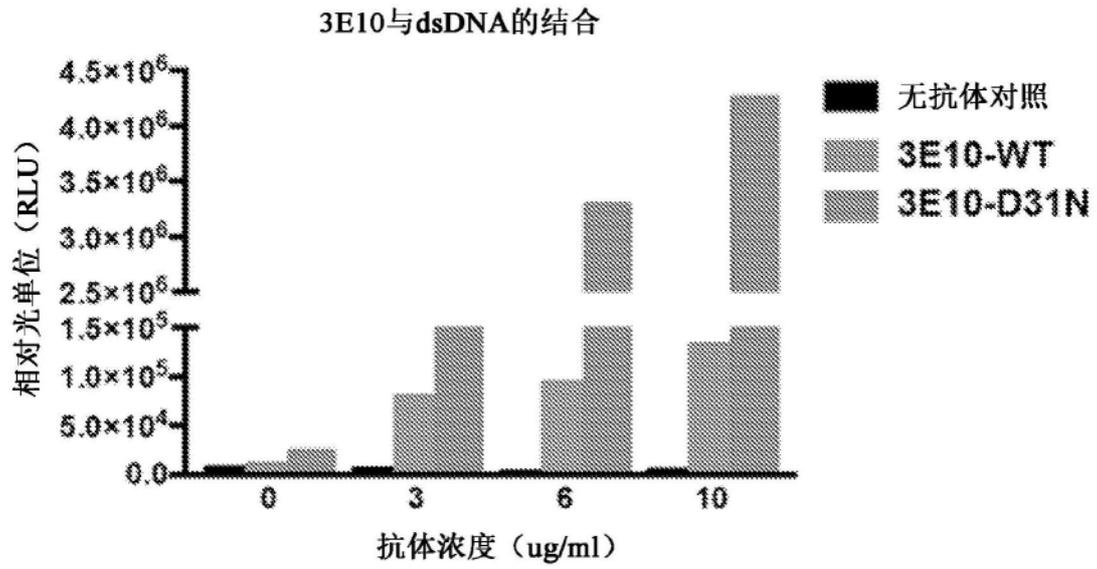


图15B

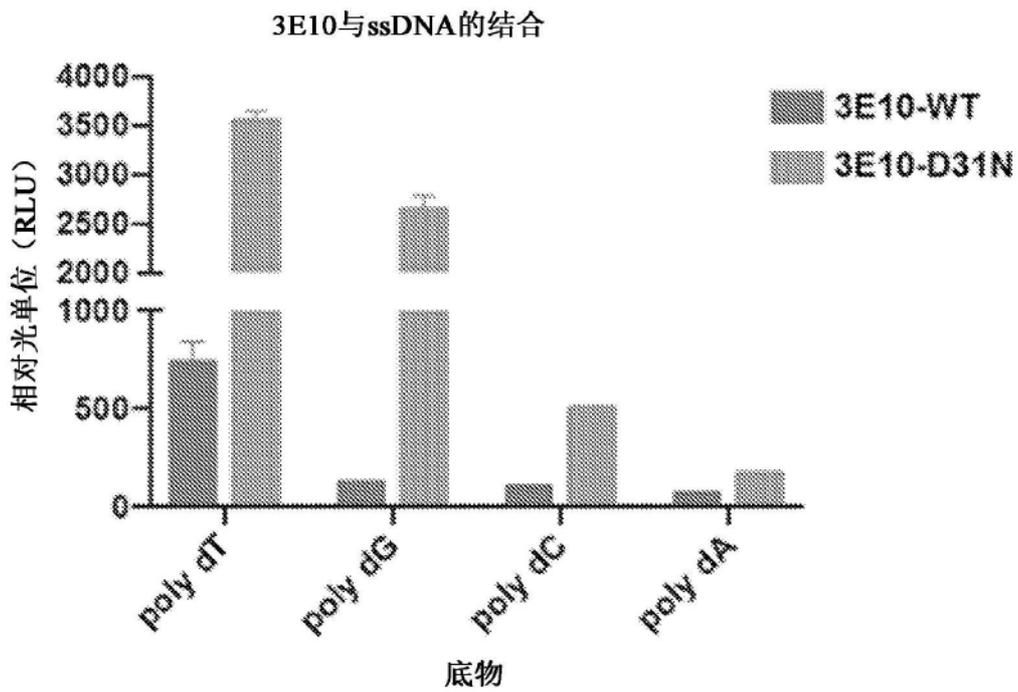


图16

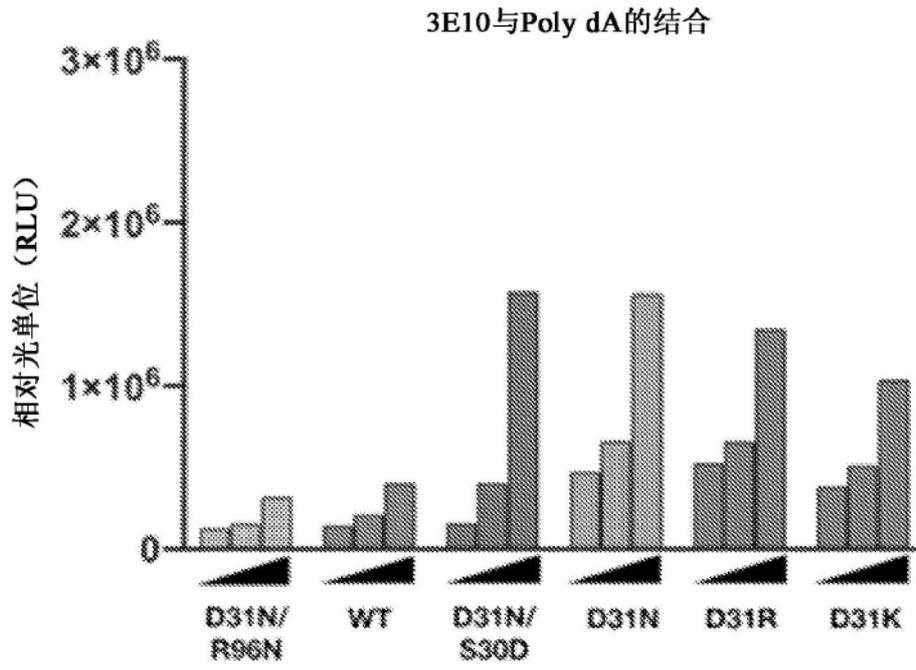


图17A

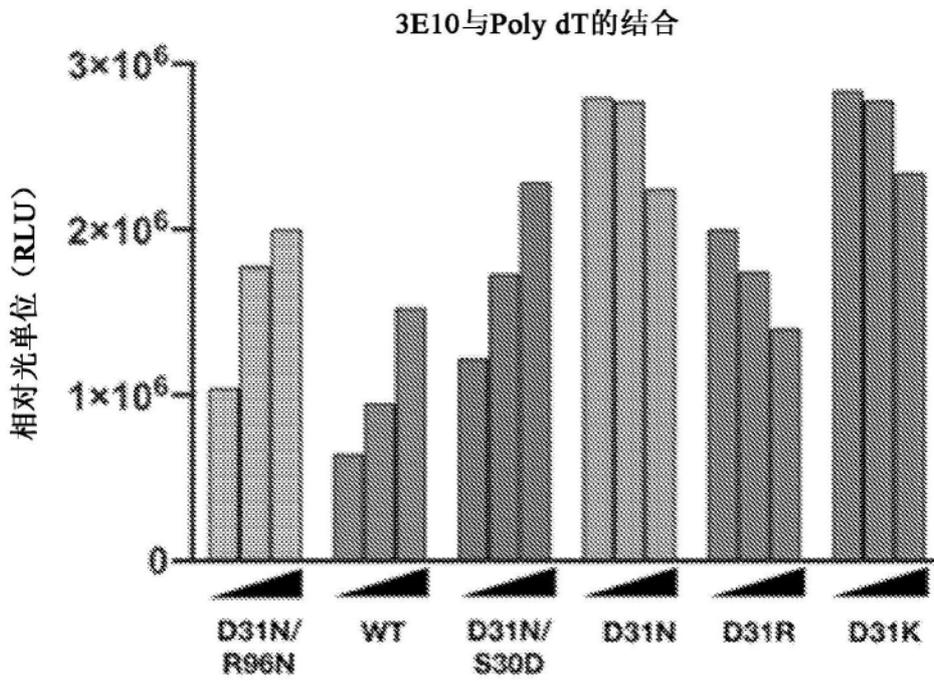


图17B

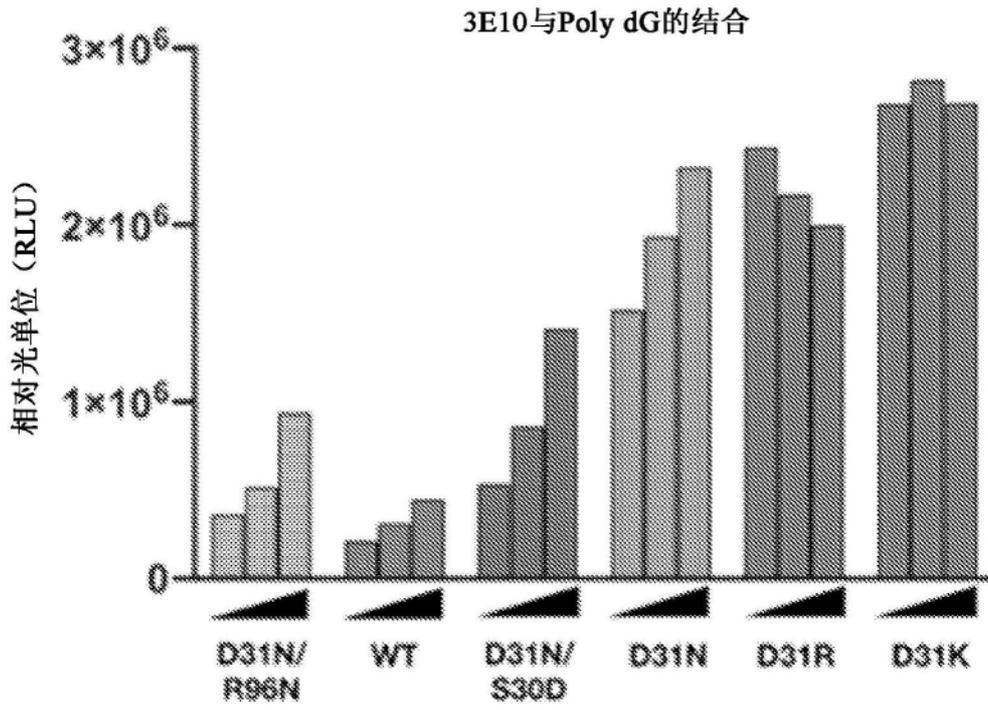


图17C

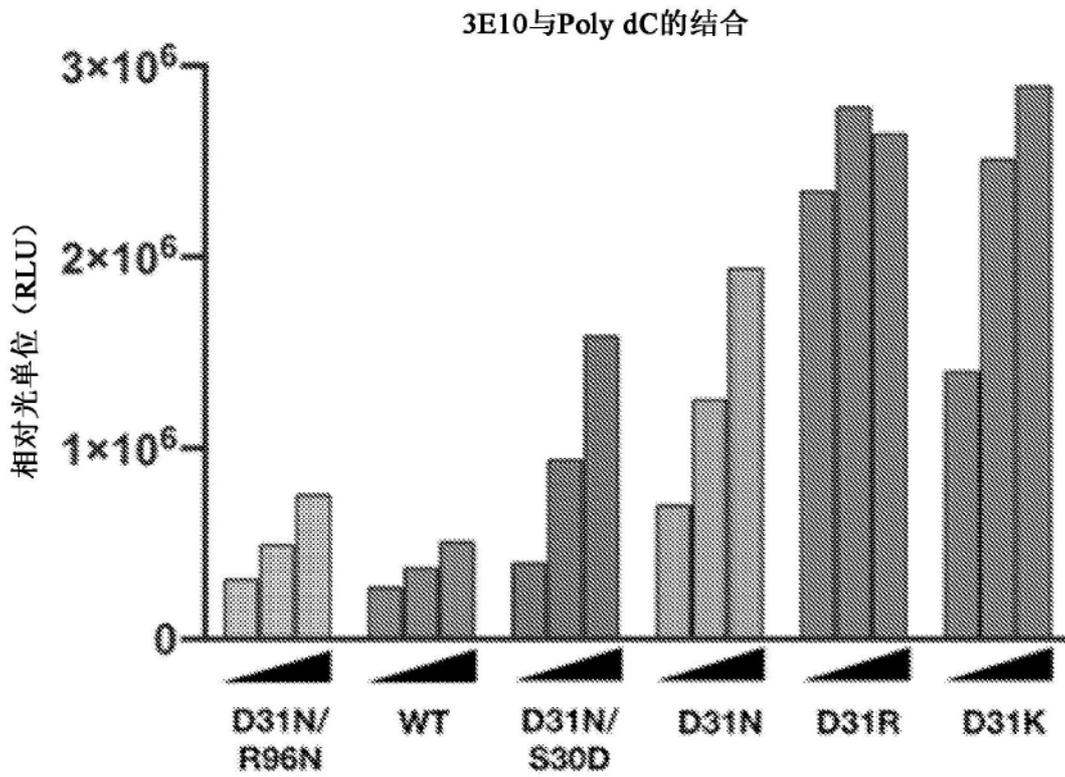


图17D

3E10-WT与RNA的结合

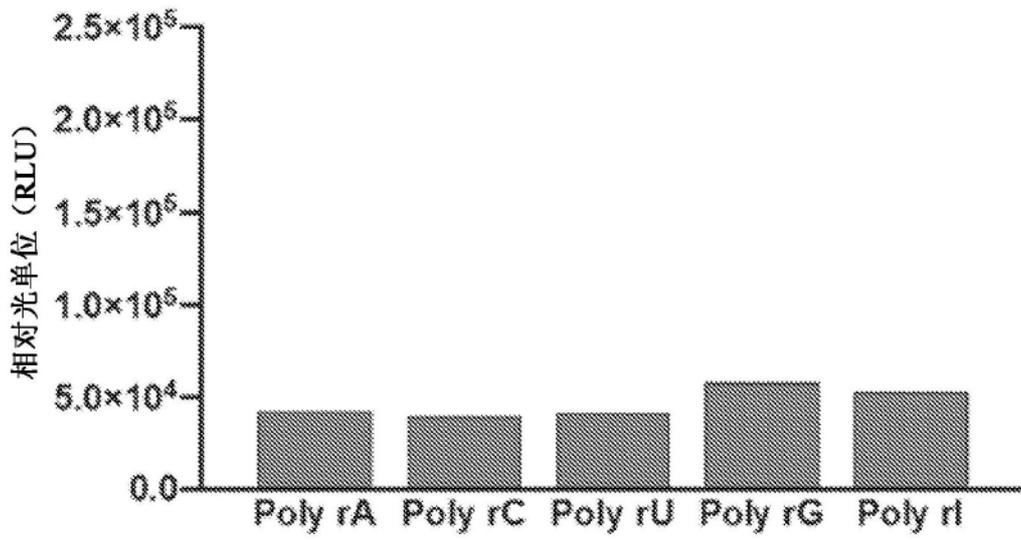


图18A

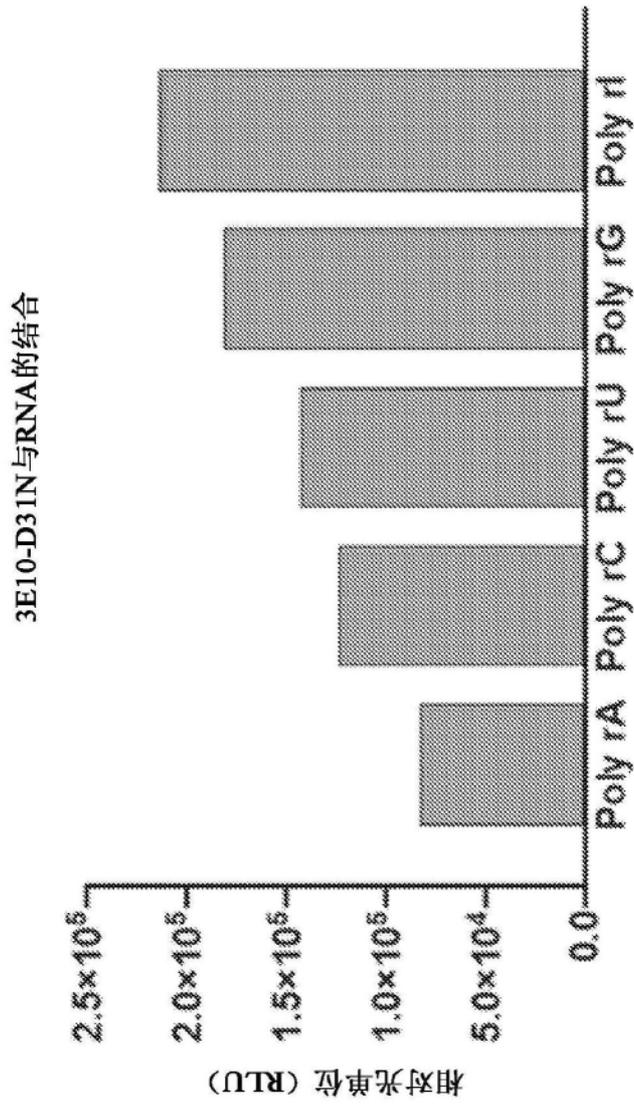


图18B

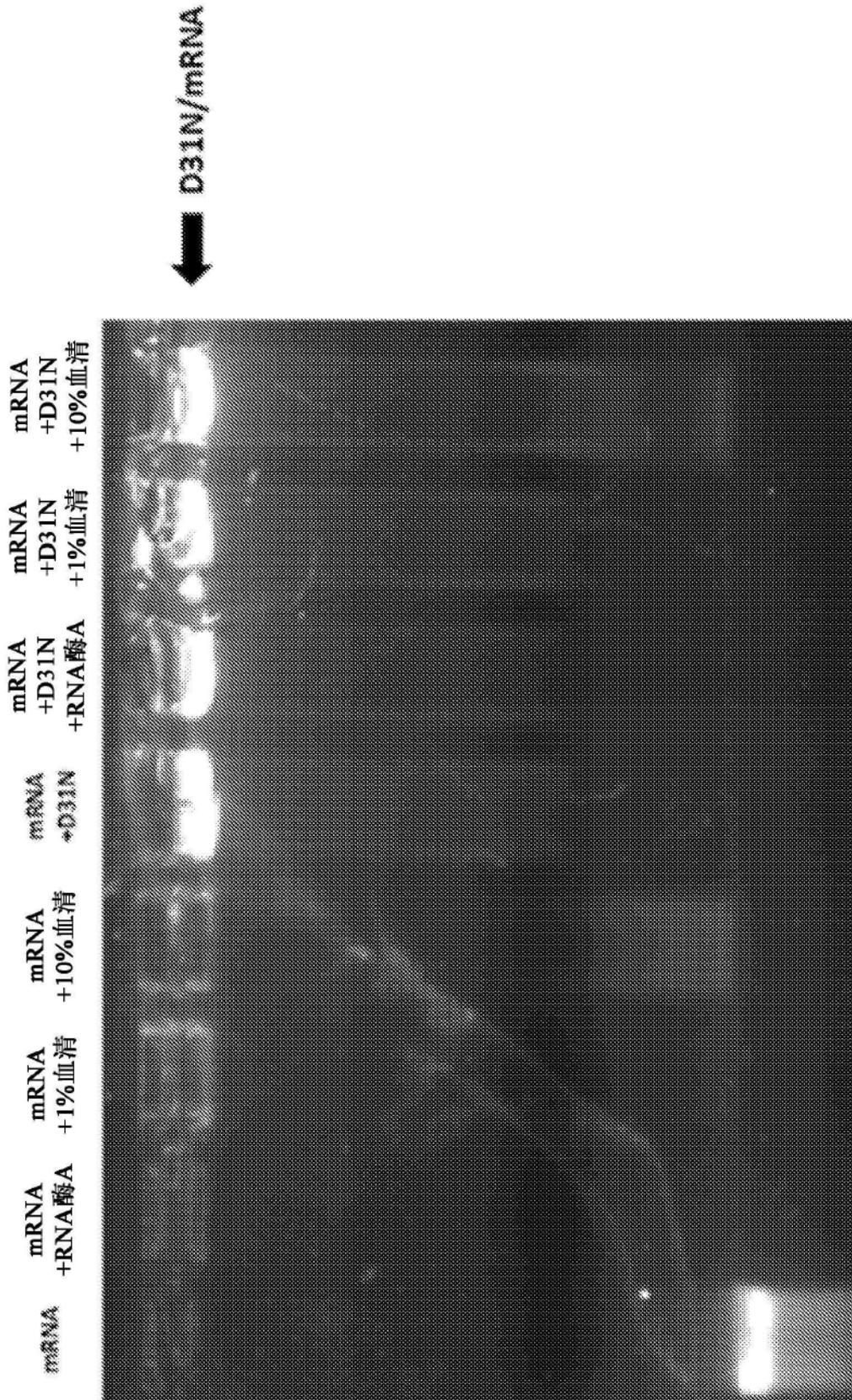


图19A

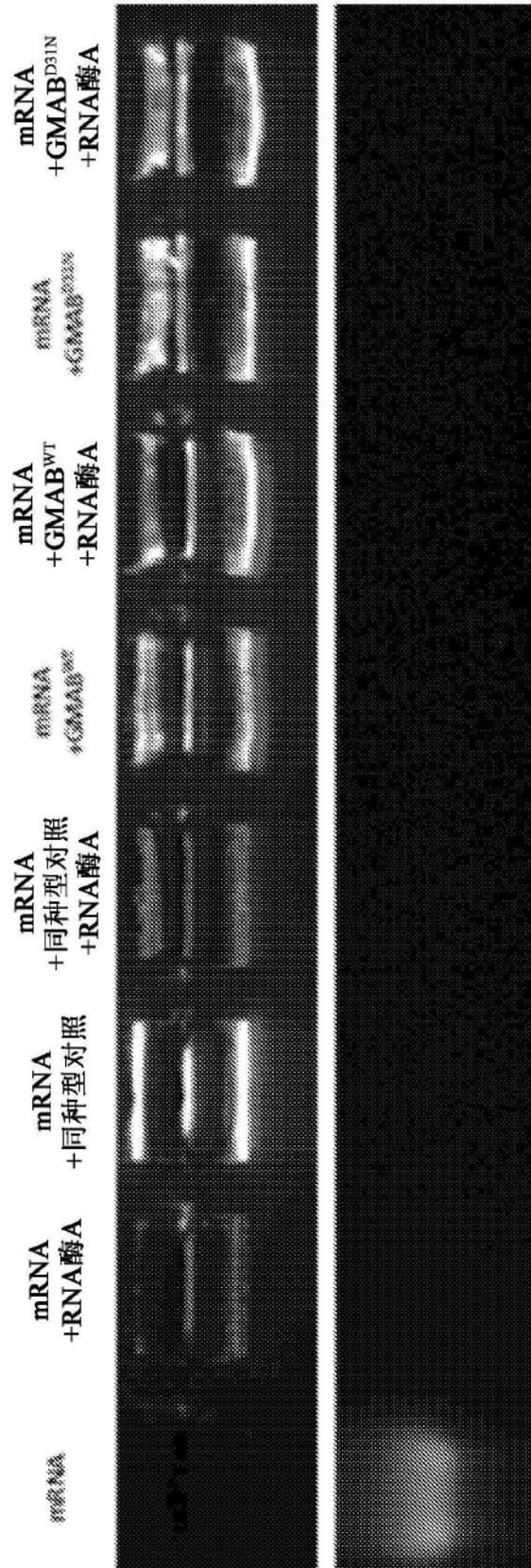


图19B

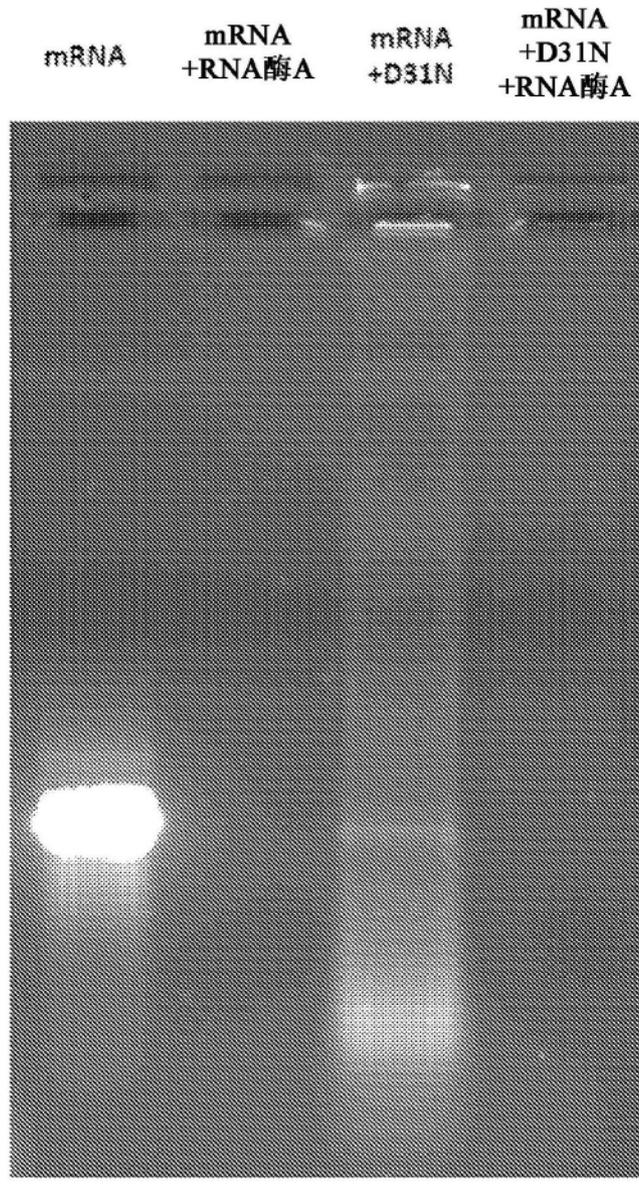


图19C

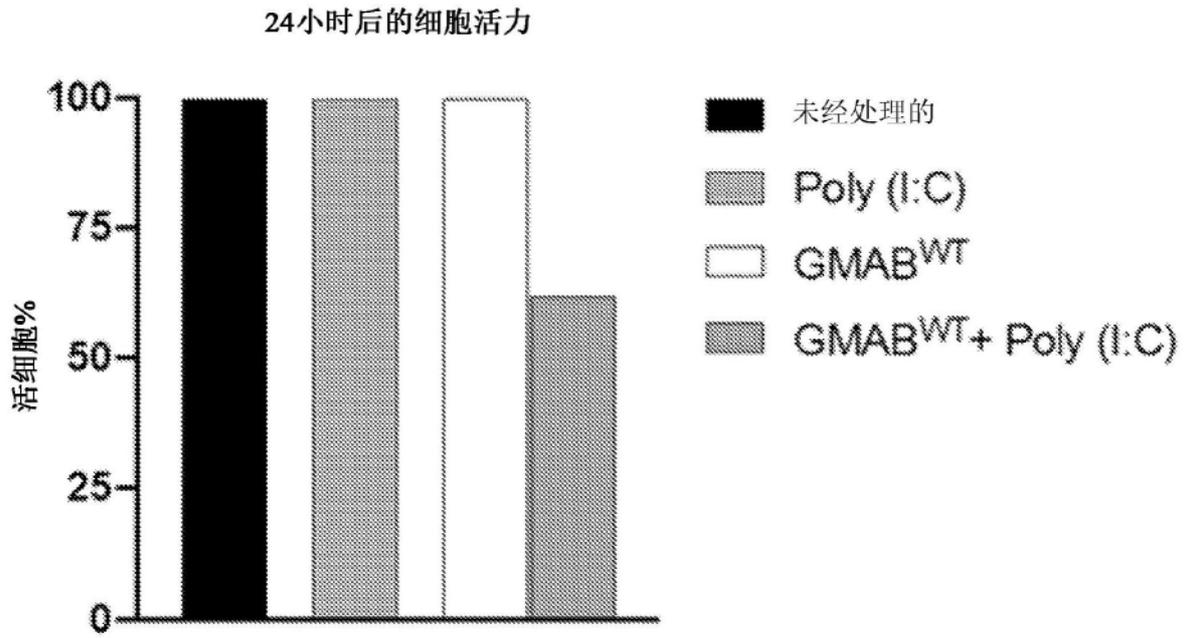


图20A

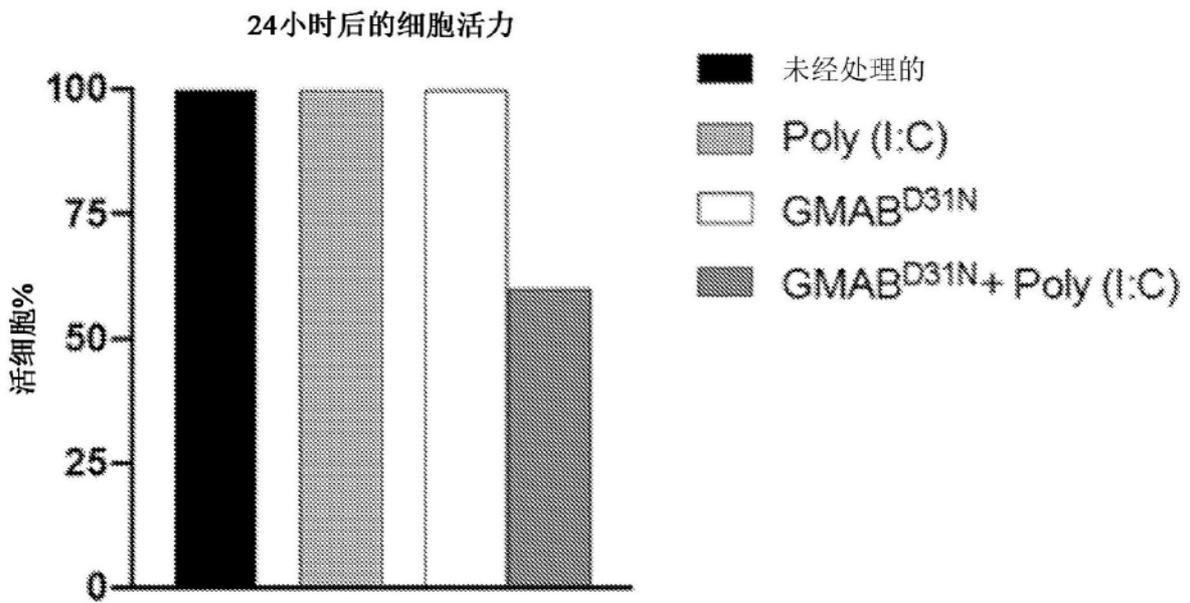


图20B

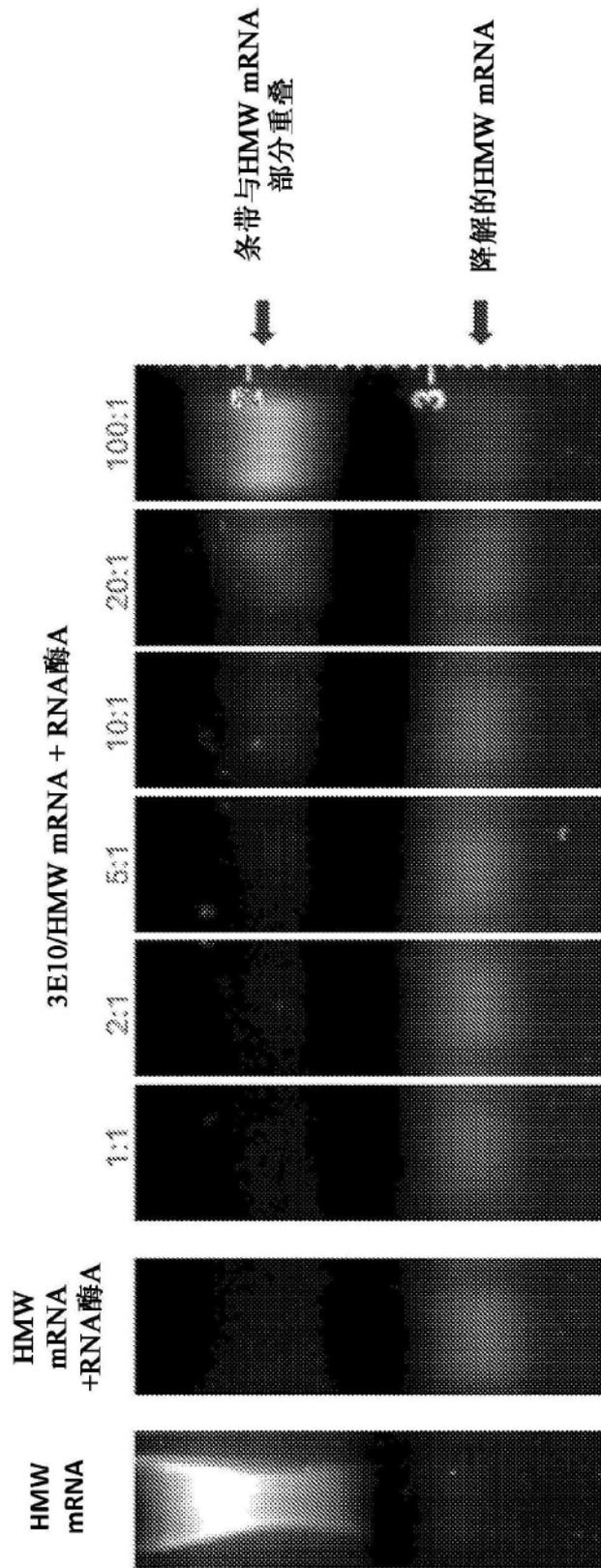


图21