



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107683289 B

(45) 授权公告日 2021.08.06

(21) 申请号 201680018571.5  
 (22) 申请日 2016.01.26  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 107683289 A  
 (43) 申请公布日 2018.02.09  
 (30) 优先权数据  
 62/107984 2015.01.26 US  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2017.09.26  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/US2016/014984 2016.01.26  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02016/123142 EN 2016.08.04  
 (73) 专利权人 芝加哥大学  
 地址 美国伊利诺伊州  
 (72) 发明人 I.V.巴利亚斯尼科瓦  
 M.S.列斯尼亚克  
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公  
 司 72001  
 代理人 段菊兰 罗文锋  
 (51) Int.Cl.  
 C07K 16/28 (2006.01)  
 C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102241774 A, 2011.11.16  
 WO 2014152361 A1, 2014.09.25  
 Irina V. Balyasnikova, et al.. Characterization and Immunotherapeutic Implications for a Novel Antibody Targeting Interleukin (IL)-13 Receptor  $\alpha 2$ . 《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》. 2012, 第287卷(第36期), 第30215-30227页.  
 Irina V. Balyasnikova, et al.. Characterization and Immunotherapeutic Implications for a Novel Antibody Targeting Interleukin (IL)-13 Receptor  $\alpha 2$ . 《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》. 2012, 第287卷(第36期), 第30215-30227页.  
 PATRICK BÜHLER, et al.. Influence of Structural Variations on Biological Activity of Anti-PSMA scFv and Immunotoxins. 《ANTICANCER RESEARCH》. 2010, 第30卷(第9期), 第3373-3380页.

审查员 高赞

权利要求书3页 说明书71页  
 序列表84页 附图29页

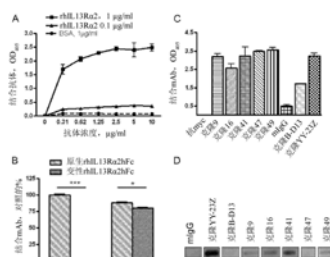
(54) 发明名称

IL13R  $\alpha 2$  结合剂和其在癌症治疗中的用途

(57) 摘要

提供结合到IL13R  $\alpha 2$ 的抗原决定基的特异性结合分子或其片段,所述抗原决定基是优先发现于癌细胞而非健康细胞的表面上的受体多肽。示范性的特异性结合分子是包含IL13R  $\alpha 2$ 结合分子的片段和提供第二功能的肽的双特异性结合分子,所述第二功能提供T细胞信号传导蛋白的信号传导域的信号传导功能、T细胞活化的肽调节物或标记系统的酶组分。还提供编码这类特异性结合分子(例如双特异性结合分子)的聚核

苷酸、载体、宿主细胞、医药组合物,和预防、治疗或改善与癌症疾病如实体肿瘤疾病(例如多形性成胶质细胞瘤)相关的症状的方法。



CN 107683289 B

1. 一种IL13R $\alpha$ 2结合剂,包含以下的氨基酸序列中的每一个:  
NYLMN (SEQ ID NO:1);  
RIDPYDGDIDYNQNFKD (SEQ ID NO:2);  
GYGTAYGVVDY (SEQ ID NO:3);  
RASESVDNYGISFMN (SEQ ID NO:4);  
AASRQGS (SEQ ID NO:5); 和  
QQSKEVPWT (SEQ ID NO:6)。
2. 根据权利要求1所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂,包含SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:8的氨基酸序列中的一个或两个。
3. 根据权利要求2所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂,其中SEQ ID NO:7的所述氨基酸序列经由连接子融合到SEQ ID NO:8的所述氨基酸序列。
4. 根据权利要求3所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂,其中所述连接子包含EEGEFSEAR (SEQ ID NO 10)的氨基酸序列。
5. 根据权利要求4所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂,包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。
6. 根据权利要求1到5中任一项所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂,进一步包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:28至少90%一致的氨基酸序列。
7. 根据权利要求1到5中任一项所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂,进一步包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:30至少90%一致的氨基酸序列。
8. 根据权利要求1到5中任一项所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂,所述IL13R $\alpha$ 2结合剂是抗体或其抗原结合片段,其中所述其抗原结合片段至少包含SEQ ID NO:1-6的氨基酸序列。
9. 根据权利要求8所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂,其中所述结合剂是为单链可变片段(scFv)的抗原结合片段。
10. 根据权利要求9所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂,进一步包含METDTLLLWVLLLWVPGSTGD (SEQ ID NO:9)的Ig $\kappa$ 前导序列。
11. 根据权利要求9或10所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂,进一步包含EEGEFSEAR (SEQ ID NO 10)的连接子序列。
12. 根据权利要求9或10所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂,进一步包含GGPEQKLI SEEDLN (SEQ ID NO:11)的Myc标签序列。
13. 根据权利要求9或10所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂,进一步包含HHHHHH (SEQ ID NO:12)的His标签序列。
14. 根据权利要求9或10所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂,包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。
15. 根据权利要求1到5和9到10中任一项所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂,其结合到人类IL13R $\alpha$ 2但不结合到人类IL13R $\alpha$ 1。
16. 根据权利要求1到5和9到10中任一项所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂,具有不大于 $1.39 \times 10^{-9}$ M的针对人类IL13R $\alpha$ 2的平衡解离常数( $K_D$ )。
17. 一种缀合物,包含共价连接到效应域的根据权利要求1到16中任一项所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂。
18. 根据权利要求17所述的缀合物,其中所述缀合物是融合蛋白或嵌合蛋白。
19. 根据权利要求17或18所述的缀合物,其中所述效应域是细胞毒素、细胞凋亡标签、T

细胞信号传导域或标记物。

20. 根据权利要求19所述的缀合物,其中所述效应域是T细胞信号传导域并且所述缀合物是IL13R $\alpha$ 2特异性嵌合抗原受体(CAR)。

21. 根据权利要求20所述的缀合物,其中所述细胞凋亡标签是TRAIL蛋白或其一部分,任选地,其中所述细胞凋亡标签包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

22. 根据权利要求21所述的缀合物,包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列。

23. 一种核酸,编码根据权利要求1到16中任一项所述的IL13R $\alpha$ 2结合剂,或根据权利要求17到22中任一项所述的缀合物。

24. 根据权利要求23所述的核酸,包含SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:15和16这两者的序列。

25. 一种载体,包含根据权利要求23或24所述的核酸。

26. 根据权利要求25所述的载体,其中所述载体是病毒。

27. 根据权利要求26所述的载体,其中所述病毒是腺病毒。

28. 根据权利要求27所述的载体,其中所述腺病毒是血清5型腺病毒。

29. 一种重组聚核苷酸,包含根据权利要求26到28中任一项所述的载体,或根据权利要求23或24中任一项所述的核酸。

30. 根据权利要求29所述的重组聚核苷酸,其中所述聚核苷酸是Ad5-纤维-纤维蛋白三聚域-scFv47,其中所述Ad5-纤维-纤维蛋白三聚域-scFv47编码包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的scFv47。

31. 一种宿主细胞,包含根据权利要求25所述的载体。

32. 一种医药组合物,包含根据权利要求1到16中任一项所述的结合剂、根据权利要求17到22中任一项所述的缀合物、根据权利要求23或24所述的核酸、根据权利要求25到28中任一项所述的载体、根据权利要求29或30中任一项所述的重组聚核苷酸或根据权利要求31所述的宿主细胞,和药学上可接受的载剂。

33. 根据权利要求1到16中任一项所述的结合剂或根据权利要求17到22中任一项所述的缀合物在制备用于一种治疗个体的癌症的方法的药物中的用途,其中所述方法包括以可有效治疗所述个体的所述癌症的量向所述个体给予根据权利要求1到16中任一项所述的结合剂,或根据权利要求17到22中任一项所述的缀合物。

34. 根据权利要求33所述的用途,其中所述癌症是多形性成胶质细胞瘤或结肠癌。

35. 根据权利要求1到16中任一项所述的结合剂或根据权利要求17到22中任一项所述的缀合物在制备用于一种鉴别IL13R $\alpha$ 2阳性癌细胞的方法的试剂盒中的用途,其中所述方法包括

a. 使生物样品与可检测量的根据权利要求1到16中任一项所述的结合剂或根据权利要求17到22中任一项所述的缀合物接触;和

b. 测量结合到所述生物样品的至少一种细胞的所述结合剂或缀合物的量,由此鉴别IL13R $\alpha$ 2阳性癌细胞。

36. 根据权利要求35所述的用途,其中所述生物样品是个体的身体内的细胞块、组织或器官。

37. 根据权利要求35所述的用途,其中所述IL13R $\alpha$ 2阳性癌细胞是神经胶质瘤细胞。

38. 根据权利要求35所述的用途,其中所述结合剂包含scFv47,其中所述scFv47包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

39. 根据权利要求35所述的用途,其中所述结合剂是根据权利要求17所述的缀合物,并且其中所述效应域是放射性标记物、荧光标记物、催化量热或荧光反应的酶、酶底物、固体基质、生物素或抗生物素蛋白。

## IL13R $\alpha$ 2结合剂和其在癌症治疗中的用途

### [0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请依据35 U.S.C. §119 (e) 要求2015年1月26日提交的美国临时专利申请第62/107,984号的优先权权益,所述申请的公开内容均以全文引用的方式并入本文中。

### [0003] 以引用的方式并入以电子版提交的材料

[0004] 本申请含有呈计算机可读形式的序列列表作为本公开的单独部分,所述序列列表以全文引用的方式并入并且标识如下:文件名:49102A\_Seqlisting.txt;182,500个字节,2016年1月20日生成。

### 技术领域

[0005] 本公开大体上涉及癌症生物学领域并且涉及分子抗体-受体技术。

### 背景技术

[0006] 癌症对人类和非人类动物的健康具有重大威胁,其降低生活品质并且在太多情况下导致死亡。就所需的来源和人力来说,置于国家、区域和地方保健组织上的治疗和预防各种形式癌症的负担相当重。脊椎动物(包括人类)必须对抗疾病的一种主要武器是功能免疫系统。简单考虑治疗或预防癌症的免疫疗法可以让人得出如下结论:由于免疫系统提防外来或非自身物质并且癌细胞起因于内部,即其是自身物质,因此努力后成功的希望极小。然而,在我们的理解中,癌症和免疫学的持续进展正在可见地改善。

[0007] 例如在小鼠中突变体抗原是肿瘤破坏的有力标靶,并且在患者中靶向这些突变的肿瘤-浸润淋巴细胞引起持久的肿瘤消退。然而,对于疫苗方法,非突变体抗原已经被许多科学家推测为是癌症特异性或“相对癌症特异性”并且安全的抗原。然而,过继转移的T细胞可以在数量级上比接种更有效并且更具破坏性。因此,在现在停止的临床试验中用T细胞靶向MAGE-A3、HER-2或CEA已引起死亡或产生严重毒性(8-11)。如在2002年显示,具有极高或极低表达水平的靶抗原的癌细胞仅在免疫应答诱导中不同,而在效应阶段不如此(15)。

[0008] 高亲和力白介素-13受体 $\alpha$ 2(IL13R $\alpha$ 2)由多形性成胶质细胞瘤(GBM)以及若干其它肿瘤类型以高频率选择性地表达。靶向这种肿瘤特异性受体的一种方法利用缀合到细胞毒性分子的同源配位体IL-13。然而,这种方法缺乏特异性,因为针对IL-13、IL13R $\alpha$ 1的较低亲和力受体由正常组织广泛地表达。

[0009] 大多数的人类癌症缺乏可预测地存在并且充当有效标靶以由T细胞根除的特异性抗原。每一癌细胞类型具有产生不同肿瘤特异性抗原的独特的突变集合。尽管技术取得了巨大进展,但仍难以鉴别有效独特的抗原并且分离适当TCR用于自体T细胞的转导而用于过继免疫疗法。使用抗体或T细胞的过继免疫疗法在临床上以及实验上是最有效的免疫疗法,至少当考虑临床相关癌症时如此(22)。然而,使用嵌合抗体受体(CAR)和双特异性T细胞啮合蛋白(BiTE)的过继免疫疗法的显著成功在很大程度上受限于特异的患者中的CD19/CD20根除B细胞恶性病和正常B细胞的那些者,即,造血癌症。因此,需要对大范围实

体肿瘤鉴别共享但具肿瘤特异性的抗原,并且同时需要开发可以 诊断、预防、治疗或改善这些癌症的症状的预防剂和治疗剂,以及用于诊断、预防和治 疗各种癌症的方法。

### 发明内容

[0010] 本公开提供 (i) 特异性靶向人类肿瘤相关抗原IL13R $\alpha$ 2的单克隆抗体的重链(SEQ ID NO:7)和轻链(SEQ ID NO:8)可变区的序列,和(ii)展现由重链和轻链cDNA编 码的呈scFv抗体型式的蛋白质或与其它功能部分的融合体的功能性的数据。重链和轻 链可以按不同型式布置,如单链抗体、双功能抗体、双特异性抗体和三特异性抗体、具 有治疗蛋白和 其它部分的融合体、人类或人源化全抗体以及人类或人源化Fab片段和其 它功能衍生物。单链抗体或由重链和轻链编码的蛋白质的其它布置,例如双特异性结合 分子,可以经过表达并且缀合到治疗载体(例如病毒、细胞、纳米材料)用于将治疗剂 特异性递送到IL13R $\alpha$ 2过表达肿瘤中或用于使肿瘤负荷成像。

[0011] 由肿瘤细胞而非正常细胞表达的蛋白质是用于选择性递送细胞毒性分子的有吸引 力的分子。因此,针对白介素-13(IL-13)的高亲和力受体白介素-13受体 $\alpha$ 2(IL13R $\alpha$ 2)是一种有前景的候选物。IL13R $\alpha$ 2以高频率在称为多形性成胶质细胞瘤(GBM)的侵蚀 性并不可治愈形式的原发性脑肿瘤(1-3)中表达,以及被其它实体肿瘤(4)表达。相 反,除睾丸之外,正常组织表达极少到不表达IL13R $\alpha$ 2(6)。值得注意地,许多组织广 泛表达对IL-13具有低亲和力的一不同受体IL13R $\alpha$ 1(7-9),使其成为肿瘤特异性免疫 治疗应用的选择性靶 向的较差候选物。

[0012] 若干研究已在临床前动物模型和临床试验中所测试的患者中研究出与衍生自假 单 胞菌外毒素A的重组细胞毒素缀合的IL-13融合蛋白(IL-13PE)的治疗特性,所述假 单 胞菌外毒素A在体外诱导IL13R $\alpha$ 2表达神经胶质瘤细胞中的细胞凋亡(17-22)。然而,这类 药剂缺乏与IL13R $\alpha$ 2的相互作用的高特异性,因为其替代性地结合于广泛表达的 IL13R $\alpha$ 1。因此,预期开发针对IL13R $\alpha$ 2表达细胞的特异性可以与效应子(例如T细胞、毒素)组合的高度 选择性抗体片段会产生治疗有益的结果。

[0013] 本公开通过提供特异于IL13R $\alpha$ 2的蛋白质结合伴侣而非模拟IL13自身来获得 IL13R $\alpha$ 2的肿瘤特异性,其将产生展现结合于IL13R $\alpha$ 1和IL13R $\alpha$ 2两者的能力的分子。此外, 本公开提供一种编码这些癌症特异性IL13R $\alpha$ 2结合伴侣中的一种的聚核苷酸,包 括针对特异于这些IL13R $\alpha$ 2结合伴侣中的一种的抗原决定基的结合伴侣包含密码子优化 编码区的 聚核苷酸。明确涵盖融合蛋白或嵌合体,其包含呈连接到肽的可操作连接形式 的如上文所 定义的IL13R $\alpha$ 2结合伴侣,所述肽提供第二功能,如T细胞信号传导蛋白的 信号传导域的信号 传导功能,T细胞活化的肽调节物或标记系统的酶组分。示范性的T 细胞信号传导蛋白包 括4-1BB(CD137)、CD3 $\zeta$ 和融合蛋白,例如CD28-CD3 $\zeta$ 和 4-1BBD3 $\zeta$ 。4-1BB(CD137)和CD28是T 细胞的共刺激分子;CD3 $\zeta$ 是T细胞抗原受 体的信号转导组分。提供第二功能的肽或蛋白质 可以提供T细胞活化的调节物,如IL-15、IL-15R $\alpha$ 、IL-15/IL-15R $\alpha$ 融合体的调节物,或其可 以编码适用于体内或体外监测结合的 程度和/或位置的标记系统的标记物或酶组分。在本 公开的一些实施例中,编码置于T 细胞如自体T细胞情形下的这些预防和治疗活性生物分 子的药剂提供有力的平台用于招 募过继转移的T细胞,以预防或治疗各种癌症。对特异于 癌细胞上发现的抗原决定基的 结合伴侣的编码区的密码子优化提供一种递送本文所公开

的诊断、预防和/或治疗蛋白的有效方法。

[0014] 在一个方面中,本公开提供一种白介素13受体 $\alpha 2$  (IL13R $\alpha 2$ ) 结合伴侣,其包含 SEQ ID NO:1的抗体重链可变片段( $V_H$ ) 互补决定区1(CDR1)、SEQ ID NO:2的 $V_H$  CDR2、SEQ ID NO:3的 $V_H$  CDR3、SEQ ID NO:4的轻链( $V_L$ ) 互补决定区1(CDR1)、SEQ ID NO:5的 $V_L$  CDR2和SEQ ID NO:6的 $V_L$  CDR3,其中IL13R $\alpha 2$ 结合伴侣特异性结合到IL13R $\alpha 2$ 的抗原决定基。在一些实施例中, $V_H$ 序列阐述为SEQ ID NO:7并且在一些相同和一些不同实施例, $V_L$ 序列阐述为SEQ ID NO:8。

[0015] 本公开的一相关方面提供一种双特异性结合分子,其包含结合于IL13R $\alpha 2$ 抗原决定基的本文所描述的IL13R $\alpha 2$ 结合伴侣的片段,所述片段共价连接到提供第二功能的肽以形成双特异性结合分子。在一些实施例中,肽的第二功能选自由以下组成的组:T细胞信号传导蛋白的信号传导域的信号传导功能、T细胞活化的肽调节物和标记系统的酶组分。在一些实施例中,片段是单链可变片段(scFv),其可以含于双特异性T细胞啮合体(BiTE)或嵌合抗原受体(CAR)内。提供一些实施例,其中如本文所描述的双特异性结合分子缀合到治疗载体。

[0016] 本公开的另一方面涉及一种医药组合物,其包含如本文所描述的IL13R $\alpha 2$ 结合伴侣和药学上可接受的载剂、佐剂或稀释剂。

[0017] 一相关方面提供一种试剂盒,其包含本文所描述的医药组合物和用于给予组合物的方案。也相关的是如下一方面:提供编码如本文所描述的IL13R $\alpha 2$ 结合伴侣的聚核苷酸和包含如本文所描述的聚核苷酸的载体。在示范性实施例中,载体是病毒,如腺病毒。在特定实施例中,腺病毒是血清5型腺病毒。本公开的另一方面是包含本文所公开的载体和本文所公开的核酸的重组聚核苷酸。在一些实施例中,重组聚核苷酸是Ad5FFscFv47。另一方面是针对一种宿主细胞,其包含本文所描述的聚核苷酸或本文所描述的载体。

[0018] 本公开的又一方面提供一种预防、治疗或改善癌症疾病的症状的方法,所述方法包含给予治疗有效量的如本文所描述的医药组合物。在一些实施例中,癌症是实体肿瘤,如多形性成胶质细胞瘤(GBM)。在一些实施例中,癌症通过抑制实体肿瘤的生长速率治疗。在一些实施例中,所改善的症状是疼痛。

[0019] 更确切地说,本公开的一个方面涉及一种IL13R $\alpha 2$ 结合剂,其包含以下的氨基酸序列中的每一个:NYLMN(SEQ ID NO:1);RIDPYDGDIDYNQNFKD(SEQ ID NO:2);GYGTAYGVVDY(SEQ ID NO:3);RASESVDNYGISFMN(SEQ ID NO:4);AASRQGS(GSEQ ID NO:5)和QQSKEVPWT(SEQ ID NO:6)。在一些实施例中,本文所公开的IL13R $\alpha 2$ 结合剂包含SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:8的氨基酸序列中的一个或两个。在一些实施例中,SEQ ID NO:7的氨基酸序列经由连接子融合到SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施例中,连接子包含EEGEFSEAR(SEQ ID NO 10)的氨基酸序列。在一些实施例中,本文所公开的IL13R $\alpha 2$ 结合剂包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。在一些实施例中,本文所公开的IL13R $\alpha 2$ 结合剂进一步包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:28至少90%一致的氨基酸序列。在一些实施例中,本文所公开的IL13R $\alpha 2$ 结合剂进一步包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:30至少90%一致的氨基酸序列。在一些实施例中,本文所公开的IL13R $\alpha 2$ 结合剂是抗体或其抗原结合片段,其中其抗原结合片段至少包含SEQ ID NO:1-6的氨基酸序列。在一些实施例中,结合剂是为单链可变片段(scFv)的抗原结合片段。在一些实施例中,本文所公

开的 IL13R $\alpha$ 2 结合剂进一步包含 METDTLLLWVLLLVPGSTGD (SEQ ID NO:9) 的 Ig $\kappa$  前导序列。在一些实施例中,本文所公开的 IL13R $\alpha$ 2 结合剂进一步包含 EEEGFSEAR (SEQ ID NO 10) 的连接子序列。在一些实施例中,本文所公开的 IL13R $\alpha$ 2 结合剂进一步包含 GGPEQKLISEEDLN (SEQ ID NO:11) 的 Myc 标签序列。在一些实施例中,本文所公开的 IL13R $\alpha$ 2 结合剂进一步包含 HHHHHH (SEQ ID NO:12) 的 His 标签序列。在一些实施例中,本文所公开的 IL13R $\alpha$ 2 结合剂包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列。在一些实施例中,本文所公开的 IL13R $\alpha$ 2 结合剂结合到人类 IL13R $\alpha$ 2 但不结合到人类 IL13R $\alpha$ 1。在一些实施例中,本文所公开的 IL13R $\alpha$ 2 结合剂具有不大于约  $1.39 \times 10^{-9}$  M 的针对人类 IL13R $\alpha$ 2 的平衡解离常数 ( $K_D$ )。

[0020] 在一相关方面中,本公开提供一种缀合物,其包含共价连接到效应域的本文所公开的 IL13R $\alpha$ 2 结合剂。在一些实施例中,缀合物是融合蛋白或嵌合蛋白。在一些实施例中,效应域是细胞毒素、细胞凋亡标签、T 细胞信号传导域或标记物。在一些实施例中,效应域是 T 细胞信号传导域并且缀合物是 IL13R $\alpha$ 2 特异性嵌合抗原受体 (CAR)。在一些实施例中,细胞凋亡标签是 TRAIL 蛋白质或其一部分,任选地,其中细胞凋亡标签包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列。在一些实施例中,缀合物包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列。在一些实施例中,标记物是放射性标记物、荧光标记物、催化量热或荧光反应的酶、酶底物、固体基质、生物素或抗生物素蛋白。在一些实施例中,效应域是放射性标记物、荧光标记物、生物素或抗生物素蛋白。

[0021] 在另一方面中,本公开提供一种核酸,其编码本文所公开的 IL13R $\alpha$ 2 结合剂或如本文所公开的任何这类结合剂的缀合物。在一些实施例中,本文所公开的核酸包含 SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:16 或 SEQ ID NO:15 和 16 这两者的序列。

[0022] 在另一方面中,本公开存在一种包含本文所公开的核酸的载体。

[0023] 又一方面涉及一种包含本文所公开的载体的宿主细胞。另一方面是针对一种医药组合物,其包含本文所公开的结合剂、本文所公开的缀合物、本文所公开的核酸、本文所公开的载体或本文所公开的宿主细胞,和药学上可接受的载剂。

[0024] 另一方面是一种治疗个体的癌症的方法,其包含以有效治疗个体的癌症的量向个体给予本文所公开的结合剂或本文所公开的缀合物。在一些实施例中,癌症是结肠癌。

[0025] 又一方面是一种鉴别 IL13R $\alpha$ 2 阳性癌细胞的方法,其包含使生物样品与可检测量的如本文所公开的结合剂或如本文所公开的缀合物接触;和测量结合到生物样品的至少一种细胞的结合剂或缀合物的量,由此鉴别 IL13R $\alpha$ 2 阳性癌细胞。在一些实施例中,生物样品是个体的身体内的细胞块、组织或器官,并且在其它实施例中生物样品是离体细胞块、组织和/或器官。在一些实施例中,IL13R $\alpha$ 2 阳性癌细胞是神经胶质瘤细胞。在一些实施例中,结合剂包含 scFv47。在一些实施例中,结合剂是如本文所公开的缀合物,其中效应域是放射性标记物、荧光标记物、催化量热或荧光反应的酶、酶底物、固体基质、生物素或抗生物素蛋白。在一些实施例中,效应域是放射性标记物、荧光标记物、生物素或抗生物素蛋白。

[0026] 本公开的其他特征和优势将从包括图式的以下详细描述变得显而易见。然而,应理解,虽然详细描述和具体实例指示优选实施例,但仅提供其用于说明,因为对于所属领域的技术人员,本发明的精神和范围内的各种改变和修改将从详细描述变得显而易见。



## 附图说明

[0027] 图1. 杂交瘤克隆的抗原识别和筛选的表征。A: B-D13 mAb与涂布有0.1和1 $\mu$ g/ml的rhIL13R $\alpha$ 2hFc的ELISA板的结合。B: 板结合的ELISA中, IL13R $\alpha$ 2 mAb与原生和变性(在 $\beta$ -巯基乙醇存在下在95 $^{\circ}$ C下) rhIL13R $\alpha$ 2hFc的结合。配对t检验用以评估对照组(n=4)之间的差异。\*: p<0.1; \*\*\*: p<0.001。误差棒表示S.D。这些数据是两个独立实验的代表。C: 板结合的ELISA中, 针对rhIL13R $\alpha$ 2hFc的所选择杂交瘤群体的筛选。D: 使用蛋白质印迹针对rhIL13R $\alpha$ 2hFc的所选择杂交瘤群体的筛选。

[0028] 图2. IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb特异性结合到CHO细胞的细胞表面上表达的 rhIL13R $\alpha$ 2和IL13R $\alpha$ 2。A: 板结合的ELISA中, IL13R $\alpha$ 2(克隆47、83807和B-D13) mAb与rhIL13R $\alpha$ 2的结合。B: IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与CHO细胞表面上表达的人类IL13R $\alpha$ 2的结合。C: IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与hrIL13R $\alpha$ 1的交叉反应性。D: IL13R $\alpha$ 2(克隆47、83807和B-D13)mAb与小鼠rIL13R $\alpha$ 2的交叉反应性。误差条表示S.D。

[0029] 图3. IL13R $\alpha$ 2 mAb与神经胶质瘤细胞的结合A: 结合于神经胶质瘤细胞、正常人类原代星形胶质细胞和转染有IL13R $\alpha$ 2的HEK细胞的表面的IL13R $\alpha$ 2(克隆47、83807和B-D13)mAb的流程图。B: 通过流式细胞测量术分析的IL13R $\alpha$ 2(克隆47、83807和B-D13)mAb之间与各种细胞系的结合的中位荧光强度的数据。对于每一细胞系, 高于条棒的数目表示当与克隆B-D13相比较时克隆47的结合的差值。A和B的颜色键相同。C: 神经胶质瘤细胞以及正常人类原代星形胶质细胞中的IL13R $\alpha$ 2的mRNA表达。D: 图a-c, 展现IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与来自颅内异种移植物(xeno)的带GFP标记的U251神经胶质瘤细胞的特异性结合的流式细胞测量术。具有子图B中的曲线下的有效面积的曲线描绘mAb IL13R $\alpha$ 2(克隆47)与GFP阴性细胞的结合; 具有子图C中的曲线下的有效面积的曲线描绘mAb IL13R $\alpha$ 2(克隆47)与GFP阳性细胞的结合。具有曲线下的灰色面积的子图b和c中的曲线显示当将对照IgG暴露到GFP阴性细胞(子图B)或GFP阳性(子图C)细胞时的结果。neg: 阴性。A: 面积; SSC-A: 侧向散射面积; APC-A: 别藻蓝蛋白面积。

[0030] 图4. IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与rhIL13R $\alpha$ 2之间的亲和力。显示了IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb(A)和可商购mAb克隆83807(B)和B-D13(C)与rhIL13R $\alpha$ 2的相互作用的动力学, 如通过SPR在Biacore 3000中目测。在20 $\mu$ l/min的恒定流速下在固定化抗体上和对照聚葡萄糖表面上以1到100nM范围内的浓度(下部到上部曲线, 所显示的1 nM、2.5nM、5nM、7.5nM、10nM、15nM、20nM、25nM浓度)注射rhIL13R $\alpha$ 2(从信号中减去这些值)。监测缔合和解离阶段300秒, 随后监测以RU给出的SPR信号的变化(彩色曲线)。黑色曲线表示数据与一个位点结合模型的拟合。对于衍生的动力学参数, 参见表1。下面三个图显示一个位点结合模型的残数, 指示极佳的拟合。

[0031] 图5. IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与rhIL-13竞争IL13R $\alpha$ 2的结合位点。A: 使用竞争结合板分析, IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb而非对照mIgG或抗体克隆83807、B-D13和YY-23Z显著消除rhIL-13与吸收到塑料的rhIL13R $\alpha$ 2Fc嵌合体的结合。进行单因素方差分析, 随后进行邓尼特事后检验(Dunnett's post hoc test)。显示单一代表性实验的数据。B: 重组人类IL-13与IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb竞争HEK细胞表面上表达的WT IL13R $\alpha$ 2而非4氨基酸(4aa)突变体IL13R $\alpha$ 2的结合位点。C: IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与rhIL-13竞争WT和4氨基酸突变体形式的IL13R $\alpha$ 2的结合位点。进行配对t检验。数据表示B和C中所示的三个独立实验的汇总。\*: p<

0.05; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ 。误差棒表示S.D。

[0032] 图6. IL13R $\alpha$ 2的Tyr207、Asp271、Tyr315和Asp318残基对结合IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb的贡献。A:产生编码IL13R $\alpha$ 2的突变成Ala的个别突变或组合性4氨基酸突变体(4aamut)的cDNA的变异体。HEK细胞转染有对照载体或编码IL13R $\alpha$ 2变异体的载体。48小时后,通过流式细胞测量术分析IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与经转染细胞的表面的结合。在这一分析中抗IL13R $\alpha$ 2抗体克隆83807和B-D13用作参考抗体。将抗体的结合确定为阳性细胞的百分比。确定每一IL13R $\alpha$ 2突变体的结合克隆的比率并且与野生型受体相比较。进行单因素方差分析,随后进行邓尼特事后检验。数据表示四个独立实验的汇总。误差棒表示S.D。B:流式细胞测量术数据的代表图,其展现克隆47或rhIL-13与HEK细胞表面上表达的IL13R $\alpha$ 2受体的WT和4氨基酸突变变异体的结合。填充曲线:阴性对照,用同型对照IgG+二级抗体染色;开口曲线:用抗IL13R $\alpha$ 2(克隆47)单克隆抗体+二级抗体染色。A:面积;APC-A:别藻蓝蛋白面积;FITC-A:异硫氰酸荧光素面积。

[0033] 图7.N-连接糖基化对IL13R $\alpha$ 2与重组IL13R $\alpha$ 2的结合的影响。A:IL13R $\alpha$ 2与对照和Pngase F处理的rhIL13R $\alpha$ 2的结合。用1 $\mu$ g/ml的hrIL13R $\alpha$ 2涂布板并且在37 $^{\circ}$ C下用天然缓冲液或用天然缓冲液中的1毫单位(milliunit)/孔Pngase F处理3小时。进行相较于抗体克隆B-D13、83807和YY-23Z以及rhIL-13,针对IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb的结合的ELISA,并且显示来自三个独立实验的一个代表性实验的数据。配对t检验用以评估对照组与Pngase F处理组(n=4)之间的差异。\*:  $p < 0.5$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ 。B:蛋白质印迹显示由于从分子中去除N-连接糖基化加合物,因此Pngase F处理的rhIL13R $\alpha$ 2的分子量较低。C:流式细胞测量术显示在37 $^{\circ}$ C下IL13R $\alpha$ 2 mAb与用1毫单位Pngase F处理1小时的IL13R $\alpha$ 2表达U251和HEK293细胞的结合。数据是三个独立实验的代表。配对t检验用以评估对照组与Pngase F处理组之间的差异。\*:  $p < 0.5$ 。MFI:平均荧光强度。误差棒表示S.D。

[0034] 图8. IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb识别GBM组织和人类神经胶质瘤异种移植物中的IL13R $\alpha$ 2。用3 $\mu$ g/ml浓度的IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb或mIgG对来自三个人类GBM样品和U251异种移植物的冷冻组织切片上进行免疫组织化学分析。GBM组织的染色展现样品1中大多数细胞的阳性染色、样品2中仅一部分细胞的阳性反应性和样品3中的阴性染色。在同一实验中对所有三个样品进行染色。也在U251异种移植物组织中检测到阳性染色。箭头指向个别阳性细胞。比例尺=100 $\mu$ m。

[0035] 图9. 在原位人类神经胶质瘤异种移植物模型中,IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb提高小鼠的存活率。A:用U251神经胶质瘤细胞( $2.5 \times 10^4$ 个)单独注射或与对照IgG或IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb组合注射的动物的存活率。B:来自用U251细胞单独注射(图a和b)或与mIgG(图c和d)或mAb IL13R $\alpha$ 2(克隆47)(图e和f)组合注射的小鼠的染色有H&E的10 $\mu$ m厚组织切片的代表性显微照片。箭头指向肿瘤和侵入细胞。比例尺(图a、c和e)=100 $\mu$ m。比例尺(图b、d和f)=100 $\mu$ m。

[0036] 图10. IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与N10神经胶质瘤细胞表面的竞争结合分析。A.在冰上将IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与10 $\times$ 过量rhIL13R $\alpha$ 2一起预培育30分钟。随后将N10细胞与同型对照mIgG或IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb单独或在rhIL13R $\alpha$ 2存在下一起培育并且通过流式细胞测量术分析结合抗体。B.在冰上将N10神经胶质瘤细胞与10 $\times$ 过量rhIL13(左图)或10 $\times$ 过量IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb(右图)一起预培育30分钟。随后将N10细胞与同型对照mIgG、

IL13R $\alpha$ 2 (克隆47) mAb或rhIL13一起培育。用二级抗体检测结合抗体或rhIL13并且通过流式细胞测量术分析。数据呈现为阳性细胞的百分比。

[0037] 图11. 在已确立的人类U251神经胶质瘤下, IL13R $\alpha$ 2 (克隆47) mAb对小鼠的存活率的影响。用 $2.5 \times 10^4$ 个U251神经胶质瘤细胞颅内注射小鼠并且处理三天, 稍后单次注射PBS (n=7) 或10 $\mu$ g IL13R $\alpha$ 2 (克隆47或B-D13) mAb (n=7)。使用对数秩检验分析动物的存活率。相对于分别用B-D13和47IL13R $\alpha$ 2 mAb处理的组的23和35天的中位存活期, PBS组中的中位存活期确定为27天 (p>0.05)。

[0038] 图12. (a) 针对V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>, 使用经过设定的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>特异性引物的对亲本杂交瘤 IL13R $\alpha$ 2细胞mRNA的筛选 (表2)。(b) 板ELISA中IL13R $\alpha$ 2克隆47噬菌体与 IL13R $\alpha$ 2hFc的结合。这些数据证实3轮生物淘选后, 针对IL13R $\alpha$ 2Fc嵌合蛋白, 阳性选择存在scFv IL13R $\alpha$ 2 (克隆47)的噬菌体。左图: 所指示轮次的生物淘选后, scFv IL13R $\alpha$ 2 (克隆47) 与IL13R $\alpha$ 2Fc的结合; 右图: scFv IL13R $\alpha$ 2 (克隆47) 与对照hFc的结合, 对照hFc即为不融合到IL13R $\alpha$ 2的对照IgG抗体的恒定区。对着这两个图, 从左到右移动的每一次轮的条棒顺序反映1:32、1:16、1:8、1:4、1:2和非稀释 (即, 1:1) 的稀释度。

[0039] 图13. 结合scFv IL13R $\alpha$ 2克隆47与IL13R $\alpha$ 2hFc竞争性分析的特异性。这些数据显示存在于噬菌体表面上的scFvIL13R $\alpha$ 2 (克隆47) 与重组IL13R $\alpha$ 2的结合通过亲本单克隆抗体 (克隆47) 而非针对IL13R $\alpha$ 2的其它抗体被完全消除。其指示scFvIL13R $\alpha$ 2 (克隆47) 和亲本单克隆抗体 (克隆47) 共享IL13R $\alpha$ 2分子上的抗原决定基 (即, 识别位点)。

[0040] 图14. 可溶scFv IL13R $\alpha$ 2 (克隆47) 与IL13R $\alpha$ 2hFc嵌合体的结合。这些数据显示在原核表达系统 (大肠杆菌 (E. coli)) 中产生的可溶scFvIL13R $\alpha$ 2 (克隆47) 特异性结合于IL13R $\alpha$ 2Fc重组蛋白。亲本抗体、mAb IL13R $\alpha$ 2 (克隆47) 和对照小鼠IgG分别充当阳性和阴性对照

[0041] 图15. 分泌scFvIL13R $\alpha$ 2 sTRAIL融合蛋白的间叶干细胞对U87-IL13R $\alpha$ 2神经胶质瘤细胞系的影响。这些数据显示在IL13R $\alpha$ 2表达U87神经胶质瘤细胞系中, 经修饰分泌scFvIL13R $\alpha$ 2 (克隆47) 与TRAIL蛋白的基因融合体的间叶干细胞展现治疗作用。所述结果确立将scFv结合到TRAIL细胞因子的功效。癌细胞杀死的量等效于在无scFv下单独使用TRAIL, 但在靶向IL13R $\alpha$ 2的scFv赋予特异性的情况下, 预期scFv-TRAIL 对非癌组织的危害将更小。

[0042] 图16. 编码IL13R $\alpha$ 2特异性scFv CAR的反转录病毒载体的示意性图。CAR由以下组成: 免疫球蛋白重链前导肽、IL13R $\alpha$ 2特异性scFv克隆47 (M47)、短铰链 (SH) 或长铰链 (LH)、衍生自CD28的跨膜域 (TM) 和CD28.  $\zeta$ 胞内域。LTR: 长末端重复序列 (反转录病毒主链)。域被鉴别为嵌段结构。图不按比例绘制。

[0043] 图17. IL13R $\alpha$ 2-scFv CAR T细胞剂: T细胞中相对于CAR剂的 $\alpha$ GAPDH,  $\alpha$ CD3.  $\zeta$  的表达。SH: 短铰链。LH: 长铰链。

[0044] 图18. IL13R $\alpha$ 2-scFv CAR在T细胞表面上表达。IL13R $\alpha$ 2-CAR T细胞由反转录病毒转导产生并且CAR表达通过FACS分析确定。短铰链CAR用特异于鼠类scFv的抗体检测。长铰链CAR用特异于长铰链的抗体检测。同型: 开口曲线; 特异性抗体: 填充曲线。

[0045] 图19. IL13R $\alpha$ 2-CAR T细胞-细胞毒性的功能表征。用Raji (IL13R $\alpha$ 1-/IL13R $\alpha$ 2-), 293T (IL13R $\alpha$ 1+/IL13R $\alpha$ 2-), 经过遗传修饰以表达IL13R $\alpha$ 2的293T细胞 (293T-IL13R $\alpha$ 2;

IL13R $\alpha$ 1+/IL13R $\alpha$ 2+) 或U373 (IL13R $\alpha$ 1+/IL13R $\alpha$ 2+) 细胞作为靶靶进行标准<sup>51</sup>铬细胞毒性分析。使用IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH.CD28. $\zeta$ T细胞、IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH.CD28. $\zeta$ T细胞、IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH. $\Delta$ T细胞或IL13R $\alpha$ 2-CAR.LH. $\Delta$ T细胞作为效应子非转导(NT)T细胞。仅IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH.CD28. $\zeta$ T细胞和IL13R $\alpha$ 2-CAR.LH.CD28. $\zeta$ T细胞杀死IL13R $\alpha$ 2+靶细胞(U373和293T-IL13R $\alpha$ 2;n=4)。表达非功能性CAR(IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH. $\Delta$ 和IL13R $\alpha$ 2-CAR.LH. $\Delta$ )的T细胞不具有溶细胞活性,证实杀死活性取决于功能性IL13R $\alpha$ 2-CAR的表达。NT T细胞不杀死靶靶,进一步确认特异性。

[0046] 图20.IL13R $\alpha$ 2-CAR T细胞-IFN $\gamma$ 和IL2细胞因子分泌的功能表征。A.NT T细胞、IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH.CD28. $\zeta$ T细胞、IL13R $\alpha$ 2-CAR.LH.CD28. $\zeta$ T细胞、IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH. $\Delta$ T细胞或IL13R $\alpha$ 2-CAR.LH. $\Delta$ T细胞与U373细胞共培养24到48小时(n=4)。仅IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH.CD28. $\zeta$ T细胞和IL13R $\alpha$ 2-CAR.LH.CD28. $\zeta$ T细胞分泌IFN $\gamma$ ,证实与IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH. $\Delta$ T细胞、IL13R $\alpha$ 2-CAR.LH. $\Delta$ T细胞或NT T细胞相比,靶细胞的识别。B.NT T细胞、IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH.CD28. $\zeta$ T细胞、IL13R $\alpha$ 2-CAR.LH.CD28. $\zeta$ T细胞、IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH. $\Delta$ T细胞或IL13R $\alpha$ 2-CAR.LH. $\Delta$ T细胞与U373细胞共培养24到48小时(n=4)。仅IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH.CD28. $\zeta$ T细胞分泌IL2,证实相较于IL13R $\alpha$ 2-CAR.LH.CD28. $\zeta$ ,IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH.CD28. $\zeta$ 诱导优异的T细胞活化。IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH. $\Delta$ T细胞、IL13R $\alpha$ 2-CAR.LH. $\Delta$ T细胞或NT T细胞也不诱导IL2产生。

[0047] 图21.IL13R $\alpha$ 2-SH CAR在体内具有抗神经胶质瘤活性。用 $1 \times 10^5$ 个表达萤火虫荧光素酶的U373细胞颅内注射严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠。在第7天,用 $1 \times 10^6$ 个IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH.CD28. $\zeta$ T细胞、IL13R $\alpha$ 2-CAR.LH.CD28. $\zeta$ T细胞、IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH. $\Delta$ T细胞或IL13R $\alpha$ 2-CAR.LH. $\Delta$ T细胞处理小鼠(每组5只小鼠)。通过生物发光成像监测肿瘤生长。仅IL13R $\alpha$ 2-CAR.SH.CD28. $\zeta$ T细胞具有显著的抗神经胶质瘤作用,其中4/5只小鼠具有完全应答。

[0048] 图22.m47 CAR T细胞剂的特性.m47-CAR T细胞识别IL13R $\alpha$ 2<sup>+</sup>而非IL13R $\alpha$ 1<sup>+</sup>靶靶。数据显示就效应功能来说,短铰链CD28z-CAR(SH2)T细胞比CD28z-CAR(SH3)、CD28z-CAR(LH2)、CD28z-CAR(LH3)、CD28z-CAR(SH2 $\Delta$ )或CD28z-CAR(SH3 $\Delta$ )表现得更好。

[0049] 图23.m47 CAR T细胞剂的功能比较。开口曲线:二级抗体;填充曲线:IL13R $\alpha$ 2Fc+二级抗体。

[0050] 图24.m47 CAR T细胞剂在转导后高度表达。开口曲线:二级抗体;填充曲线:IL13R $\alpha$ 2Fc+二级抗体。

[0051] 图25.m47 CAR T细胞产生干扰素 $\gamma$ 和白介素2,但仅在IL13R $\alpha$ 2刺激后产生。

[0052] 图26.IL13R $\alpha$ 2-和IL13R $\alpha$ 1-阳性细胞系是通过HEK 293T细胞的遗传修饰制备。填充曲线:同型抗体对照;开口曲线:特异性抗体。

[0053] 图27.m47 CAR T细胞仅杀死IL13R $\alpha$ 2<sup>+</sup>细胞系。体外实验提供确立如下的数据:m47 CAR T细胞在细胞表面上存在重组CAR蛋白,其除特异性识别IL13R $\alpha$ 2外不识别IL4R、IL13R $\alpha$ 1或任何受体。识别的特异性延伸到仅针对那些表达IL13R $\alpha$ 2的细胞系的特异性。

[0054] 图28.比较裸小鼠中m47 CAR T细胞剂、未处理和NT处理的多形性成胶质细胞瘤异种移植物的作用的体内数据。使用U373多形性成胶质细胞瘤异种移植小鼠模型。在第0天,每只小鼠给予 $1 \times 10^5$ 个GFP-ffluc U373细胞。在第7天,给予 $2 \times 10^6$ 个m47 CAR T细胞或

NT细胞。在第7天未处理样品不接受处理。不给予外源性白介素2并且通过连续生物发光成像记录存活分析的结果。 $n=3$ 。

[0055] 图29.m47 CAR T细胞剂延长具有多形性成胶质细胞瘤的裸小鼠的存活。

[0056] 图30.IL13R $\alpha$ 2-CAR T细胞的表征。(A、B)使用重组蛋白的共培养分析证实以IL14R $\alpha$ 2依赖性方式产生干扰素 $\gamma$ 和白介素2；(C)标准铬释放分析中的溶细胞活性。

[0057] 图31.scFv47与IL13R $\alpha$ 2的结合特征。(a)在板ELISA中确定经过纯化的可溶scFv47与rhIL13R $\alpha$ 2和rhIL13R $\alpha$ 1蛋白的结合。(b)可溶scFv47的蛋白质印迹分析。与所预测分子量一致，scFv47蛋白在还原条件下按30kDa蛋白形式操作。(c)在Biacore 3000中通过SPR目测scFv47与rhIL13R $\alpha$ 2之间的相互作用的动力学。在20 $\mu$ L/min的恒定流速下在固定化rhIL13R $\alpha$ 2上以1到50nM(下部到上部曲线)范围内的浓度注射scFv47。监测缔合阶段30秒，监测解离阶段900秒，随后监测以RU形式给出的SPR信号的变化(彩色曲线)。黑色曲线表示数据与一个位点结合模型的拟合。对于衍生的动力学参数，参见表1。下部图显示一个位点结合模型的残数，指示极佳的拟合。

[0058] 图32.IL13R $\alpha$ 2向性病毒结构和稳定性的设计、产生和确认。(a) Ad5FFscFv47-CMV-GFP的抗IL13R $\alpha$ 2 scFv特异性嵌合体纤维的示意图。Ad5的纤维结(knob)和干(shaft)域经纤维-纤维蛋白(fiber fibritin)三聚域替代，并且抗IL13R $\alpha$ 2 scFv47并入嵌合纤维的C端中。(b)纤维修饰的PCR确认。(c)嵌合纤维结构的验证。当嵌合纤维未煮沸(U:在室温下培育10分钟)时，蛋白质印迹分析检测到稳定的纤维三聚，并且当纤维经过煮沸(B:在95 $^{\circ}$ C下培育10分钟)时检测到变性的单体结构。

[0059] 图33.Ad5FFscFv47-CMV-GFP的向性修饰的确认。(a) Ad5FFscFv47-CMV-GFP病毒的CAR不依赖性感染力。用Ad5CMV-GFP或Ad5FFscFv47-CMV-GFP病毒感染CAR阴性CHO和CAR阳性CHO-hCAR细胞系。感染后72小时通过流式细胞测量术分析细胞的GFP表达。(b)使用mAb IL13R $\alpha$ 2(克隆47)检测的IL13R $\alpha$ 2在CHO-IL13R $\alpha$ 2细胞系表面上的表达。(c)通过CHO-IL13R $\alpha$ 2细胞的有效转导和IL13R $\alpha$ 2阴性CHO细胞的转导缺乏而展现的Ad5FFscFv47-CMV-GFP的IL13R $\alpha$ 2依赖性感染力。(d)在U87MG、U251MG、GBM39和GBM43神经胶质瘤细胞系表面上的IL13R $\alpha$ 2表达。数据呈现为阳性细胞的百分比。(e) Ad5FFscFv47-CMV-GFP而非Ad5CMV-GFP病毒的转导效率强烈地与U87MG、U251MG、GBM39和GBM43神经胶质瘤细胞中的IL13R $\alpha$ 2表达水平相关。感染后72小时通过流式细胞测量术分析所转导的神经胶质瘤细胞的GFP表达。(f)随着MOI增加，Ad5FFscFv47-CMV-GFP的感染力的稳定增加。在100、200和300个病毒粒子/细胞(vp/cell)的MOI下用Ad5FFscFv47-CMV-GFP或Ad5CMV-GFP感染U251MG细胞。感染后72小时，针对细胞中的GFP表达，进行流式细胞分析。在所有图中每一个数据点是3个独立重复的平均值。数据呈现为平均值 $\pm$ SEM。\*\*\* $p < 0.001$ 。

[0060] 图34.Ad5FFscFv47-CMV-GFP的IL13R $\alpha$ 2特异性感染力。(a) U251MG细胞中的IL13R $\alpha$ 2表达的流式细胞测量术分析，其紧接着用对照shRNA(IL13R $\alpha$ 2+U251MG)或IL13R $\alpha$ 2特异性shRNA(IL13R $\alpha$ 2 KDU251MG)的基因敲低(knockdown)，其呈现为阳性细胞的百分比(流程图)和中位荧光强度(MFI)。(b)通过IL13R $\alpha$ 2+U251MG和IL13R $\alpha$ 2.KDU251MG细胞系中的GFP的差异表达而展现的Ad5FFscFv47-CMV-GFP的IL13R $\alpha$ 2依赖性感染力。(c)竞争结合分析。用如本文所描述的抗IL13R $\alpha$ 2 mAb预处理U251MG细胞。随后用Ad5scFv47-CMV-GFP病毒感染对照和处理细胞。72小时后通过流式细胞测量术分析细胞的GFP转基因表达。每一个数

据点是3个独立重复的平均值。绘制平均值 $\pm$ SEM。\*\*\* $p < 0.001$ 。

[0061] 图35. 神经球通过Ad5FFscFv47-CMV-GFP的感染。(a) 对以粘附培养物形式或以神经球形式生长的U87MG细胞中的IL13R $\alpha$ 2表达的比较。(b) 通过RT-PCR分析以粘附培养物形式或以神经球形式生长的U87MG神经胶质瘤细胞中的相对IL13R $\alpha$ 2 mRNA 表达。(c) 针对GFP阳性细胞,通过流式细胞测量术分析确定相对于神经球以粘附培养物形式生长的U87MG神经胶质瘤细胞的Ad5FFscFv47-CMV-GFP感染力。(d) 感染有 Ad5FFscFv47-CMV-GFP的U87MG神经球的显微图像(相差图像-左图)。GFP表达(右图)以绿色荧光形式显示。比例条是100 $\mu$ m。每一个数据点是3个独立重复的平均值。绘制平均值 $\pm$ SEM。\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ 。

[0062] 图36. 神经胶质瘤的异种移植模型中的IL13R $\alpha$ 2特异性感染。将小鼠脑切片并且针对DAPI(蓝色)、GFP(病毒感染)、抗GFP(紫色)和抗人类巢蛋白(红色,肿瘤)进行染色。(a) IL13R $\alpha$ 2.KDU251MG细胞植入的小鼠的免疫组织化学分析。在肿瘤区域中,不可观测到GFP阳性细胞。(b) IL13R $\alpha$ 2+U251MG细胞植入的小鼠的免疫组织化学分析。虽然在肿瘤区域中观测到GFP阳性细胞,但在肿瘤相邻区域中不可观测到经过病毒感染的细胞,指示Ad5FFscFv47-CMV-GFP的感染力对IL13R $\alpha$ 2表达水平具有高度特异性。比例条是10 $\mu$ m。

[0063] 图37. Ad5FFscFv47-CMV-GFP病毒产生的效率。如本文所描述对Ad5-CMV-GFP和Ad5FFscFv47-CMV-GFP两者进行扩展、纯化和滴定。每一个数据点是3个独立重复的平均值。绘制平均值 $\pm$ SEM。

[0064] 图38. 原代GBM细胞通过Ad5FFscFv47-CMV-GFP病毒的感染。A. 通过qRT-PCR分析以粘附或神经球培养物形式生长的源自患者的原代GBM39和GBM43细胞中的相对IL13R $\alpha$ 2 mRNA表达。将IL13R $\alpha$ 2 mRNA表达水平归一化成GAPDH mRNA表达。B. 对在以粘附培养物形式或以神经球形式生长的原代GBM细胞的表面上的IL13R $\alpha$ 2表达的比较。C. 针对GFP阳性细胞,通过流式细胞测量术分析确定以粘附或神经球培养物形式生长的原代GBM细胞的Ad5FFscFv47-CMV-GFP感染力。每一个数据点是3个独立重复的平均值。绘制平均值 $\pm$ SEM。\*\*\* $P < 0.001$ 。

[0065] 图39. 可溶性双特异性scFvIL13R $\alpha$ 2-scFvCD3在大肠杆菌表达系统中的表达。LL-长连接子(Gly<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>;SL-短连接子Gly<sub>4</sub>S。

## 具体实施方式

[0066] 本公开提供特异性地识别白介素13受体 $\alpha$ 2(IL13R $\alpha$ 2)的结合剂或伴侣,以用于诊断、预防、治疗或改善通过存在IL13R $\alpha$ 2的细胞表征的大范围癌症中的任一种的症状。更确切地说,本公开提供(i)特异性靶向人类肿瘤相关抗原、即白介素13受体 $\alpha$ 2(IL13R $\alpha$ 2)的单克隆抗体(m47)的六个互补决定区的序列,和(ii)展现由重链和轻链cDNA编码的呈scFv抗体型式的蛋白质或与其它功能部分的缀合物(例如融合体)的功能性的数据。与免疫技术中的理解一致,m47单克隆抗体的六个互补决定区赋予针对IL13R $\alpha$ 2的结合特异性。在一些实施例中,scFv包含抗体m47的完整重链和轻链可变区或抗体m47的完整重链和轻链。在一些实施例中,重链和轻链片段包含例如m47 CDR或m47可变区,并且这些域可以按不同型式布置,如抗体的单链可变片段(即,scFv)、双功能抗体、双特异性抗体片段、三特异性抗体片段、具有广泛多种治疗蛋白中的任一种和/或其它部分的融合蛋白、人源化抗体片段、Fab片段、Fab'片段、F(ab)2'片段和提供靶向功能和效应功能的双功能肽的任何其它功能

型式。此外,单链抗体或由重链和轻链编码的蛋白质的其它布置可以经过表达并且缀合到治疗载体(例如病毒、细胞、纳米材料)用于将治疗剂特异性递送到IL13R $\alpha$ 2表达肿瘤中。根据本公开的材料也适用于使肿瘤负荷成像。

[0067] 所述技术解决阻碍免疫疗法进展的最严重障碍,即假想不存在所定义的肿瘤特异性抗原,所述抗原可以预测地发现于人类癌症的至少一更大子组上并且可以充当有效靶以用于癌症根除。寻找这类抗原将会使所述领域超出用于治疗CD19/CD20表达B细胞恶性病的方法。

[0068] 当在本公开的情形下视为整体时,除非本文清楚地指出不同含义,否则,在所属领域中给出贯穿本公开所使用的术语的普通和习惯含义。

[0069] 本公开描述对IL13R $\alpha$ 2具有特异性的单克隆抗体(mAb)片段的开发和表征,以用于靶向IL13R $\alpha$ 2表达肿瘤的治疗目的。高亲和力IL13R $\alpha$ 2由多形性成胶质细胞瘤(GBM)以及若干其它肿瘤类型以高频率选择性地表达。靶向这种肿瘤特异性受体的一种方法利用缀合到细胞毒性分子的同源配位体IL-113。然而,这种方法缺乏特异性,因为针对IL-13、IL13R $\alpha$ 1的较低亲和力受体由正常组织广泛地表达。预期对IL13R $\alpha$ 2具有特异性的单克隆抗体(mAb)解决困扰识别两种IL13受体即IL13R $\alpha$ 1以及IL13R $\alpha$ 2的方法的特异性缺乏。这类mAb将治疗性地适用于靶向并且治疗IL13R $\alpha$ 2表达癌症,包括肿瘤。

[0070] 如本文所公开,产生杂交瘤细胞系并且比较其与重组人类IL13R $\alpha$ 2(rhIL13R $\alpha$ 2)的结合亲和力。克隆47展现与IL13R $\alpha$ 2的原生构形的结合并且因此被选择用于进一步研究。克隆47特异性结合到rhIL13R $\alpha$ 2而非rhIL13R $\alpha$ 1或鼠类IL13R $\alpha$ 2并且与rhIL13R $\alpha$ 2具有高亲和力(KD=1.39 $\times$ 10<sup>-9</sup>M)。此外,克隆47特异性识别在CHO和HEK细胞以及若干神经胶质瘤细胞系的表面上表达的野生型IL13R $\alpha$ 2。竞争结合分析揭露克隆47也显著抑制人类可溶IL-13与IL13R $\alpha$ 2受体之间的相互作用。此外,IL13R $\alpha$ 2的N-连接糖基化部分地促进抗体与IL13R $\alpha$ 2的相互作用。在体内,IL13R $\alpha$ 2 mAb提高颅内植入有人类U251神经胶质瘤异种移植物的裸小鼠的存活率。

[0071] 本公开至少部分地基于如下发现:IL13R $\alpha$ 2优先发现于如肿瘤细胞的癌细胞上。这种受体充当已被使用以诱发高亲和力单克隆抗体m47以及所述抗体的抗原结合片段的癌症或肿瘤特异性抗原。m47抗体的VL和VH可变区已被工程改造成单链(sc)可变片段(scFv)以产生缀合物,如嵌合抗原受体(即,CAR),以引入到T细胞中用于过继转移。因此,预期CAR转导的T细胞靶向肿瘤特异性IL13R $\alpha$ 2抗原决定基,根除存在所述受体的癌细胞。相信识别IL13R $\alpha$ 2的CAR转导的T细胞将破坏大实体肿瘤。然而,CAR转导的T细胞仅直接靶向癌细胞并且抗原阴性癌细胞可能会逃脱。所预期的是CAR转导的T细胞也将在经由旁观者效应消除抗原阴性癌细胞中有效。

[0072] 根据本公开的蛋白质缀合物特异于与癌症例如肿瘤相关的IL13R $\alpha$ 2。此外,本公开提供一种编码这些癌症特异性结合伴侣中的一种的聚核苷酸,包括针对特异于IL13R $\alpha$ 2的抗原决定基的结合伴侣包含密码子优化编码区的聚核苷酸。本公开的聚核苷酸编码缀合物或双功能多肽,所述缀合物或双功能多肽适用于诊断、预防、治疗或改善癌症的症状,所述癌症如各种人类癌症、包括形成实体肿瘤的那些癌症中的任一种。也涵盖包含如本文所公开的聚核苷酸的载体、包含这类聚核苷酸和/或如上文所描述的载体的宿主细胞,以及治疗、预防或改善癌症疾病例如实体肿瘤、原发性癌症部位或转移癌症的症状的方法。

[0073] 本公开涵盖所属领域中已知的各种形式的缀合物。这些缀合物提供对癌症以及蛋白质极具特异性的抗体受体,所述受体可以并入提供效应功能的各种骨架中,如下文所提到的双特异性T细胞啮合体(BITE)或嵌合抗原受体(CAR)。本公开的示范性的缀合物包括CAR;融合蛋白,包括包含单链可变(抗体)片段(scFv)多聚体的融合体,或与编码适用于治疗癌症的产物例如IL-15、IL15R $\alpha$ 或IL-15/IL15R $\alpha$ 剂的编码区融合的scFv融合体;双功能抗体;三功能抗体;四功能抗体和双特异性二价scFv,包括双特异性串联二价scFv,也称为双特异性T细胞啮合体或BITE。此外,这些缀合物形式中的任一种可以展现各种相对结构中的任一种,如在所属领域中已知,不同域顺序(例如H<sub>2</sub>N-VH-连接子-VL-CO<sub>2</sub>H和H<sub>2</sub>N-VL-连接子-VH-CO<sub>2</sub>H)与特异性结合相容。也涵盖本文所描述的缀合物的更高级形式,如包含本文所公开的缀合物的至少一种形式的肽体。本公开的缀合物特异性结合到癌症特异性抗原决定基(例如IL13R $\alpha$ 2)并且可以对编码其的聚核苷酸进行密码子优化,以例如用于最大化翻译,用于在所靶向细胞(例如人类或小鼠细胞)中表达。在表达本公开的缀合物如CAR的情形下,为确保蛋白质的产生有效并且足够稳固以适用作治疗剂源,密码子优化至关重要。

[0074] 本公开也涵盖其中靶向部分(抗IL13R $\alpha$ 2抗体或其片段)连接到提供第二功能的肽的缀合物,所述第二功能例如效应功能,如涉及T细胞活化的T细胞信号传导域;影响或调节针对癌细胞的免疫应答的肽;或在缀合物的编码区经过密码子优化用于在靶细胞中表达的情况下,产生由根据本公开的聚核苷酸编码的CAR的标记系统的酶组分。示范性的缀合物包括抗IL13R $\alpha$ 2 scFv,其连接到铰链、跨膜域和效应化合物或域,例如CD28、CD3 $\zeta$ 、CD134(OX40)、CD137(41BB)、ICOS、CD40、CD27或Myd88,由此产生CAR。

[0075] 本公开的聚核苷酸方面包含如下实施例:其中提供较慢生长的更高级真核生物如脊椎动物(例如人类)中关于密码子优化的未预期变化,其聚焦于翻译优化(最大化高保真性翻译率)而非用于这类生物体中的典型的密码子优化,其经设计以适应突变偏移并且由此将突变降到最小。也公开诊断、预防、治疗或改善癌症的症状的方法。示意性地描述,聚核苷酸包含用于抗原受体的密码子优化编码区,所述抗原受体特异性识别连接到以下中的任一个的IL13R $\alpha$ 2抗原决定基:涉及T细胞活化的T细胞信号传导域的编码区;影响或调节针对癌细胞的免疫应答的基因产物,如IL15/IL15R $\alpha$ 融合体;或标记组分,如标记系统的酶组分。连接的编码区产生根据本公开的编码缀合物如BITE或嵌合抗原受体(CAR)的聚核苷酸。

[0076] 在诊断、预防、治疗或改善癌症的症状的方法中,本公开的组合物典型地以缀合物转导的细胞形式给予,所述缀合物转导的细胞如T细胞、NK细胞或不为T细胞的淋巴细胞,但也涵盖对包含本公开的聚核苷酸的载体的给予或对本公开的聚核苷酸的给予,这取决于缀合物的功能性。如贯穿本公开所使用,术语“鉴别(identifying)”和所述术语的其它形式(例如鉴别(identify))可与术语“诊断(diagnosing)”和所述术语的其它形式(例如诊断(diagnose))互换使用。将本公开的聚核苷酸、载体或宿主细胞与生理学上合适的缓冲液、佐剂或稀释剂组合得到根据本公开的医药组合物,并且这些医药组合物适用于给药以诊断、预防、治疗或改善癌症的症状。

[0077] 在本文所描述的实验工作的过程中,产生杂交瘤细胞系并且比较其与重组人类IL13R $\alpha$ 2(rhIL13R $\alpha$ 2)的结合亲和力。克隆47展现与IL13R $\alpha$ 2的原生构形的结合并且因此进



一步被表征。克隆47特异性结合到rhIL13R $\alpha$ 2而非rhIL13R $\alpha$ 1或鼠类IL13R $\alpha$ 2 并且与rhIL13R $\alpha$ 2具有高亲和力(KD  $1.39 \times 10^{-9}$ M)。此外,克隆47特异性识别在CHO 和HEK细胞以及若干神经胶质瘤细胞系的表面上表达的野生型IL13R $\alpha$ 2。竞争结合分析揭露克隆47也显著抑制人类可溶IL-13与IL13R $\alpha$ 2受体之间的相互作用。此外,发现IL13R $\alpha$ 2的N-连接糖基化部分地促进抗体与IL13R $\alpha$ 2的相互作用。在体内,IL13R $\alpha$ 2 单克隆抗体提高颅内植入有人类U251神经胶质瘤异种移植物的裸小鼠的存活率。总的来说,这些数据确立本文所公开的癌症的免疫调节治疗的功效。

[0078] IL13R $\alpha$ 2在多形性成胶质细胞瘤 (GBM) 中而非在正常脑组织中的过表达独特地将这种受体定位为用于靶向肿瘤细胞的候选物。GBM是高度浸润性肿瘤,经常使完全的手术去除变得不可能。此外,GBM高度耐辐射和化学疗法(16),使进一步开发用于治疗患者的新颖并靶向的疗法有必要。

[0079] 已使用噬菌体展示文库方法来选择对人类IL13R $\alpha$ 2具有特异性的小抗体片段,随后在体外和体内对其进行评估(23)。尽管与IL13R $\alpha$ 2的相互作用具高特异性,但当与IL-13PE38的作用相比较时,与毒素的结合不能增加IL13R $\alpha$ 2表达神经胶质瘤和肾细胞癌细胞系中的细胞毒性。所产生的抗体片段的低亲和力是对缺乏成功最合理的解释。已知衍生自噬菌体呈现文库的抗体片段在亲和力和亲合力方面比由常规杂交瘤技术产生的抗体更低(24)。经常需要修饰那些小抗体片段以增强其与所靶向蛋白质的亲和力和亲合力。近年来,单克隆抗体作为靶向抗癌和诊断药剂日益取得成功(25、26),并且需要进一步探索对肿瘤相关抗原具有受限制特异性的高亲和力试剂。设计本文所公开的实验以发现、开发并且表征特异性地识别在癌细胞表面上表达的IL13R $\alpha$ 2的高亲和力抗体。与上述设计一致,本文公开如下实验:确立拥有体内对IL13R $\alpha$ 2表达肿瘤的免疫治疗靶向关键的特性并且潜在地适用于各种其它应用的抗体的产生。

[0080] 单克隆抗体看起来是有价值的研究和诊断工具以及治疗剂。由于具有特异性靶向癌细胞同时避免与未转化组织相互作用的能力,因此特异于肿瘤相关抗原的单克隆抗体具有优于系统性化学疗法的显著优势。因此,对新颖“灵丹妙药(magic bullet)”的探索持续增长,经全球市场确认,截至2010年,治疗抗体值480亿美元。治疗抗体是传统杂交瘤技术或抗体片段的文库筛选和其成为人源化片段或实际大小分子的后续工程改造的产物。在本研究之前,在科学界不可获得分泌对肿瘤特异性抗原IL13R $\alpha$ 2具高亲和力的抗体的杂交瘤细胞系。此处,我们描述对肿瘤特异性抗原IL13R $\alpha$ 2具高亲和力的抗体的产生和表征,并且论述其在不同应用中的可能用途。

[0081] 新发现的抗体与人类IL13R $\alpha$ 2的相互作用的特异性通过ELISA使用rhIL13R $\alpha$ 2hFc融合蛋白、在CHO和HEK细胞的表面上表达的重组人类IL13R $\alpha$ 2和表达各种含量的IL13R $\alpha$ 2的若干神经胶质瘤细胞系通过流式细胞测量术来分析。本文中所鉴别的抗体和使用其结合域的药剂展现与人类IL13R $\alpha$ 2的相互作用的特异性并且不与人类IL13R $\alpha$ 1或小鼠IL13R $\alpha$ 2交叉反应。此外,对于在HEK细胞表面上表达的IL13R $\alpha$ 2的检测,在竞争结合分析中使用rhIL13R $\alpha$ 2hFc融合蛋白通过ELISA或通过流式细胞测量术确认与IL13R $\alpha$ 2的结合的特异性。在这些分析中,IL13R $\alpha$ 2(克隆47) mAb与重组人类IL-13 竞争其抗原决定基并且能够阻断IL-13与IL13R $\alpha$ 2之间约80%的结合。相反,人类重组IL-13能够阻断约50%的与IL13R $\alpha$ 2的抗体结合。类似地,当rhIL13R $\alpha$ 2hFc嵌合体和rhIL-13用作竞争者时,观测到IL13R $\alpha$ 2(克

隆47)mAb与N10神经胶质瘤细胞的结合显著降低。rhIL-13与N10细胞的结合也通过IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb消除。这些数据指示两个分子在其针对IL13R $\alpha$ 2的识别位点中具有显著的重叠。

[0082] IL-13是小10kDa分子(31),然而抗体的分子质量比其大约15倍。rhIL-13与抗体竞争结合位点的能力表明抗体的抑制特性有可能是由于与促进IL-13与同源受体的结合的氨基酸残基的特异性相互作用而非位阻所致,所述位阻也可以防止IL-13与其受体的相互作用。先前,Tyr207、Asp271、Tyr315和Asp318被鉴别成为与IL-13的相互作用所需的IL13R $\alpha$ 2的关键残基(28)。在本文所公开的分析中,当与野生型受体相比较时,IL-13与携带突变成丙氨酸的所有4个氨基酸突变的组合的突变体IL13R $\alpha$ 2的结合被显著消除。然而,IL13R $\alpha$ 2mAb与IL13R $\alpha$ 2的个别形式或4氨基酸突变体形式的结合不受显著影响。这些发现指示Tyr207、Asp271、Tyr315和Asp318残基对于经IL13R $\alpha$ 2 mAb识别IL13R $\alpha$ 2来说不关键。人类IL13R $\alpha$ 2和鼠类IL13R $\alpha$ 2在结构上保守并且共享59%的氨基酸一致性(32)。此外,Tyr207、Asp271、Tyr315和Asp318残基在人类和鼠类IL13R $\alpha$ 2中是保守的。IL13R $\alpha$ 2 mAb与鼠类IL13R $\alpha$ 2hFc融合体的结合的缺乏进一步支持如下预期:这些氨基酸残基有助于IL-13与IL13R $\alpha$ 2的结合并且对于这种抗体与受体的相互作用不关键。

[0083] 为进一步表征IL13R $\alpha$ 2与本文所公开的抗体和抗体药剂的相互作用,测量IL13R $\alpha$ 2 mAb的亲和力并且使用表面等离子体共振法(surface plasmon resonance method)将其与两种可商购抗体的结合特性相比较。经过测定IL13R $\alpha$ 2 mAb的亲和力等于 $1.39 \times 10^{-9}$ M,大大超过可比较的可商购抗体的亲和力,超出达75倍。与亲和力研究一致,在与各种神经胶质瘤细胞表面上表达的IL13R $\alpha$ 2的结合和ELISA方面,IL13R $\alpha$ 2 mAb(克隆47)展现超越两种商业抗体的优越性。尽管应在具体使用之前考虑抗体的许多特性,包括亲和力和亲合力、体内稳定性、清除速率和内化速率、肿瘤渗透和保持力,但已经报导对于免疫治疗肿瘤靶向应用,更高亲和力的抗体更佳(33)。针对表皮生长因子受体变异体III的单链抗体片段(scFv)MR1-1展现比亲本scFvMR1高约15倍的亲和力,并且还显示比scFvMR1的肿瘤吸收高平均244%的肿瘤吸收(34)。有可能本文所公开的IL13R $\alpha$ 2 mAb和其药剂的高亲和力特性将有利于利用靶向表达IL13R $\alpha$ 2的肿瘤细胞的抗体或相关衍生物的应用。

[0084] IL13R $\alpha$ 2的N-连接糖基化已被鉴别为是与IL-13的有效结合的必需要求(30)。考虑到本文所公开的IL13R $\alpha$ 2 mAb抑制约80%的IL-13与同源受体IL13R $\alpha$ 2的结合,合理地期望在IL13R $\alpha$ 2的去糖基化形式下这种抗体或含有其结合域的药剂的结合也会受影响。IL13R $\alpha$ 2分子具有四个可能的N-连接糖基化位点。当与非处理对照相比较时,抗体与rhIL13R $\alpha$ 2或与在用Pngase F处理的HEK或U251细胞的表面上表达的IL13R $\alpha$ 2的结合分别降低35和30%。当与克隆83807和B-D13相比较时,克隆47的结合活性的部分变化表明使用Pngase F从IL13R $\alpha$ 2中去除碳水化合物加合物使得受体的构形发生变化,间接影响IL-13(30)和IL13R $\alpha$ 2 mAb与IL13R $\alpha$ 2的结合。这也支持如下预期:抗体直接结合到IL13R $\alpha$ 2氨基酸主链而非与翻译后添加的碳水化合物部分相互作用。支持这种预期,若干研究先前已证实蛋白质的构形概况和结构刚度取决于N-连接糖基化(22、35-38)。

[0085] 为调查IL13R $\alpha$ 2 mAb和其药剂的治疗特性,进行体内研究,其中将神经胶质瘤细胞和IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb颅内共注射于脑中,或将抗体注射于经确立带有肿瘤的小鼠中。有趣地,IL13R $\alpha$ 2 mAb能够延迟肿瘤发展,并且提高具有颅内U251神经胶质瘤异种移植物的

动物的存活率,在共注射模型中最显著,进而展现提高具有已确立的神经胶质瘤的动物的中位存活期的趋势。尽管对于这种抗肿瘤作用的基础机制仍然不清楚,但所述结果确立这种抗体或其药剂(含有IL13R $\alpha$ 2结合域,所述结合域呈六个CDR区形式,或呈克隆47抗IL13R $\alpha$ 2的两个可变域形式)单独或与药物载剂组合的治疗适用性,由此提供用于治疗IL13R $\alpha$ 2表达神经胶质和其它谱系肿瘤的疗法。已显示若干抗体通过Fc介导的补体活化介导肿瘤中的细胞毒性作用(39)。抗体依赖性细胞介导的细胞毒性诱导的效应细胞活化也可以针对所靶向细胞的抗体的细胞毒性作用做出贡献(40、41)。衍生自用表达人类IL13R $\alpha$ 2的D5黑素瘤细胞攻击的动物的血清的抗IL13R $\alpha$ 2活性证实体外抑制细胞生长的能力(4)。

[0086] 适合于所描述治疗的癌症包括已发现表达IL13R $\alpha$ 2的癌症,包括成胶质细胞瘤;神经管胚细胞瘤;卡波西(Kaposi)肉瘤;和头颈癌、卵巢癌、胰脏癌、肾癌和结肠直肠癌(2、43-47)。尽管IL13R $\alpha$ 2在一些癌症中的作用尚不界定,但最新报导已证实IL13R $\alpha$ 2对卵巢癌、胰脏癌和结肠直肠癌的侵袭性表型有贡献(5、13)。此外,Minn等人(42)已表明IL13R $\alpha$ 2表达与到肺的乳癌转移之间的关系。此外,Fichtner-Feigl等人(11)证实IL-13与IL13R $\alpha$ 2的相互作用上调TGF- $\beta$ 1,介导博莱霉素(bleomycin)诱导的肺纤维化模型中的纤维化。根据这种发现,预期抗IL13R $\alpha$ 2抗体(克隆47)和其结合剂将能够减弱TGF- $\beta$ 1诱导的肺纤维化。

[0087] 如本文所公开,所描述实验产生抗IL13R $\alpha$ 2抗体和其结合剂,其均对人类IL13R $\alpha$ 2具有特异性。抗体和其药剂拥有针对IL13R $\alpha$ 2的高亲和力并且与IL-13竞争IL13R $\alpha$ 2上的结合位点。抗体识别在神经胶质瘤细胞以及其它IL13R $\alpha$ 2表达细胞的细胞表面上表达的抗原,确立体内用于靶向IL13R $\alpha$ 2表达肿瘤细胞的适合性。也预期抗IL13R $\alpha$ 2抗体和其结合剂在诊断成像、抗体放射性核素缀合物的递送、检测IL13R $\alpha$ 2的生物分析中有效并且经济,并且作为治疗剂在不同类型的IL13R $\alpha$ 2过表达肿瘤中的载体。

[0088] 在诊断、预防、治疗或改善癌症的症状的方法中,本公开的组合物典型地以缀合物转导的T细胞形式给予,但也涵盖对包含本公开的聚核苷酸的载体的给予或对本公开的聚核苷酸的给予,这取决于缀合物的功能。将本公开的聚核苷酸、载体或宿主细胞与生理学上合适的缓冲液、佐剂或稀释剂组合得到根据本公开的医药组合物,并且这些医药组合物适用于给药以诊断、预防、治疗或改善癌症的症状。

[0089] 也涵盖根据本公开的缀合物,如由融合到IL15/IL15R $\alpha$ 的针对IL13R $\alpha$ 2抗原决定基的scFv受体构成的融合蛋白。预期融合蛋白将消除临床大小肿瘤或仅初期和微散播的癌细胞。本公开进一步涵盖对人类癌症上的两种独立的IL13R $\alpha$ 2抗原决定基的同时靶向,其可能为防止逃脱治疗(如CAR治疗)所必需。

[0090] 通过CAR的对不同IL13R $\alpha$ 2抗原决定基的同时靶向应降低癌症亚群逃脱的可能性,其提供了鉴别额外IL13R $\alpha$ 2抗体产物和/或抗原决定基的强有力的理由。

[0091] 本公开提供可调适并且可以充当具有可观增长可能性的平台技术的基础的材料和方法。预期IL13R $\alpha$ 2的癌症特异性性质向癌症诊断剂、预防剂和治疗剂提供主要优势优于先前和当前使用的标靶的标靶。

[0092] 与前述的精神一致,以下提供对本文所提供的材料和方法的描述。

[0093] 本文公开IL13R $\alpha$ 2结合剂,其包含以下的氨基酸序列中的每一个:NYLMN(SEQ ID NO:1);RIDPYDGDIDYNQNFKD(SEQ ID NO:2);GYGTAYGVVDY(SEQ ID NO:3);RASESVDNYGISFMN

(SEQ ID NO:4);AASRQGS (SEQ ID NO:5);和QQSKEVPWT (SEQ ID NO:6)。在示范性方面中,除提供构架以支撑结合到IL13R $\alpha$ 2的三维构形的其它序列以外,结合剂包含前述六个氨基酸序列中的每一个。在示范性方面中,IL13R $\alpha$ 2 结合剂包含SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:8的氨基酸序列中的一个或两个。在示范性方面中,IL13R $\alpha$ 2结合剂包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在示范性方面中,IL13R $\alpha$ 2 结合剂包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在示范性方面中,IL13R $\alpha$ 2结合剂包含SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的氨基酸序列两者。在SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的氨基酸序列存在于结合剂中的示范性方面中,SEQ ID NO:7的氨基酸序列经由连接子融合到 SEQ ID NO:8的氨基酸序列。合适的连接子在所属领域中已知。在示范性方面中,连接子包含约5到约25个氨基酸、例如约10到约20个氨基酸的短氨基酸序列。在示范性方面中,连接子包含EEGEFSEAR (SEQ ID NO 10) 的氨基酸序列。在示范性方面中,连接子包含AKTTPPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:80) 的氨基酸序列。在示范性方面中,IL13R $\alpha$ 2结合剂包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0094] 在示范性实施例中,本文所提供的结合剂进一步包含额外氨基酸序列。在示范性方面中,结合剂进一步包含重链的恒定区和/或轻链的恒定区。重链和轻链恒定区的序列是公众可获得的。举例来说,美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 核苷酸数据库提供IgG1  $\kappa$ 轻链的恒定区的序列。参见以引用的方式并入本文中的基因银行 (GenBank) 登录号DQ381549.1。在示范性方面中,结合剂包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。在示范性方面中,结合剂包含SEQ ID NO:28的经过修饰的氨基酸序列。。在示范性方面中,结合剂包含与SEQ ID NO:28至少90%、至少93%、至少95%或至少98%一致的氨基酸序列。同样,举例来说,NCBI核苷酸数据库提供小家鼠 (*Mus musculus*) IgG1的恒定区的序列。参见基因银行登录号DQ381544.1。在示范性方面中,结合剂包含SEQ ID NO:29 的氨基酸序列。在示范性方面中,结合剂包含SEQ ID NO:29的经过修饰的氨基酸序列。。在示范性方面中,结合剂包含与SEQ ID NO:29至少90%、至少93%、至少95%或至少 98%一致的氨基酸序列。

[0095] 在示范性方面中,IL13R $\alpha$ 2结合剂是抗体或其抗原结合片段。在示范性方面中,抗体包含SEQ ID NO:1-6的氨基酸序列中的每一个。在示范性方面中,抗体包含SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在示范性方面中,抗体包含SEQ ID NO:7和 SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在示范性方面中,抗体包含SEQ ID NO:7和SEQ ID NO: 8的氨基酸序列,并且SEQ ID NO:7的氨基酸序列经由连接子融合到SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在示范性方面中,连接子包含约5到约25个氨基酸、例如约10到约20 个氨基酸的短氨基酸序列。在示范性方面中,连接子包含EEGEFSEAR (SEQ ID NO 10) 的氨基酸序列。在示范性方面中,连接子包含AKTTPPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:80) 的氨基酸序列。在示范性方面中,抗体包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0096] 在示范性方面中,抗体可以是所属领域中已知的任何类型的免疫球蛋白。举例来说,抗体可以具有任何同型,例如IgA、IgD、IgE、IgG或IgM。抗体可以是单克隆或多克隆的。抗体可以是天然存在的抗体,即,从哺乳动物例如小鼠、兔、山羊、马、鸡、仓鼠、人类等等中分离和/或纯化的抗体。在这点上,抗体可被认为是哺乳动物抗体,例如小鼠抗体、兔抗体、山羊抗体、马抗体、鸡抗体、仓鼠抗体、人类抗体等等。如本文所用,术语“分离”意指已从其天然环境去除。如本文所用,术语“纯化”涉及分子或化合物 以大体上不含污染物(其通常与分子或化合物在原生或天然环境中缔合)的形式分离,并且意指已因与初始组

合物的其它组分分离而导致纯度增加。应认识到，“纯度”是相对术语，并且不必解释为绝对纯度或绝对富集或绝对选择。在一些方面中，纯度是至少或约50%、至少或约60%、至少或约70%、至少或约80%、或至少或约90%（例如，至少或约91%、至少或约92%、至少或约93%、至少或约94%、至少或约95%、至少或约96%、至少或约97%、至少或约98%、至少或约99%或约100%）。

[0097] 在示范性方面中，抗体包含IgG的恒定区。在示范性方面中，抗体包含IgG<sub>1</sub>的恒定区。在示范性方面中，抗体包含IgGκ轻链的恒定区。举例来说，抗体可以包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。在示范性方面中，抗体包含高度类似于SEQ ID NO:28的氨基酸序列。举例来说，抗体可以包含与SEQ ID NO:28具有至少85%序列一致性的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:28具有至少90%序列一致性的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:28具有至少93%序列一致性的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:28具有至少95%序列一致性的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:28具有至少98%序列一致性的氨基酸序列。

[0098] 在示范性方面中，抗体包含小家鼠IgG<sub>1</sub>的恒定区。举例来说，抗体可以包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。在示范性方面中，抗体包含高度类似于SEQ ID NO:30的氨基酸序列。举例来说，抗体可以包含与SEQ ID NO:30具有至少85%序列一致性的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:30具有至少90%序列一致性的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:30具有至少93%序列一致性的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:30具有至少95%序列一致性的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:30具有至少98%序列一致性的氨基酸序列。

[0099] 本公开的抗IL13Rα2抗体和其片段可以具有针对IL13Rα2的任何水平的亲和力或亲和力。解离常数(K<sub>d</sub>)可以是本文关于结合单元所描述的那些示范性解离常数中的任一项。结合常数，包括解离常数，通过所属领域中已知的方法确定，所述方法包括例如利用表面等离子体共振原理的方法，例如利用Biacore™系统的方法。根据前述，在一些实施例中，抗体呈单体形式，而在其它实施例中，抗体呈聚合物形式。在抗体包含两个或两个以上不同抗原结合区或片段的某些实施例中，抗体视为双特异性、三特异性或多特异性的或二价、三价或多价的，这取决于经结合剂识别并结合的不同抗原决定基的数目。

[0100] 因为本公开的结合剂可以针对与IL13Rα2的结合而与IL13竞争，所以示范性方面中的抗体被视为阻断抗体或中和抗体。在一些方面中，针对IL13Rα2，结合剂的K<sub>d</sub>大约与原生配位体IL13的K<sub>d</sub>相同。在一些方面中，针对IL13Rα2，结合剂的K<sub>d</sub>比IL13的K<sub>d</sub>更低（例如低至少0.5倍、低至少1倍、低至少2倍、低至少5倍、低至少10倍、低至少25倍、低至少50倍、低至少75倍、低至少100倍）。在示范性方面中，K<sub>d</sub>在约0.0001nM与约100nM之间。在一些实施例中，K<sub>d</sub>是至少或约0.0001nM、至少或约0.001nM、至少或约0.01nM、至少或约0.1nM、至少或约1nM、或至少或约10nM。在一些实施例中，K<sub>d</sub>不大于或约100nM、不大于或约75nM、不大于或约50nM、或不大于或约25nM。在示范性方面中，针对人类IL13Rα2，抗体具有不大于约 $1.39 \times 10^{-9}$  M的K<sub>d</sub>。

[0101] 在示范性方面中，结合剂，例如抗体或其抗原结合片段，不结合到人类IL13Rα1。

[0102] 在示范性实施例中，抗体是基因工程改造过的抗体，例如单链抗体、人源化抗体、嵌合抗体、CDR接枝抗体、包括特异于IL13Rα2的CDR序列的部分的抗体（例如包括SEQ ID NO:1-6的CDR序列的抗体）、人改造或人源化抗体、双特异性抗体、三特异性抗体等等，如本文中更详细地定义。基因工程技术还提供制备非人类中的全人类抗体的能力。

[0103] 在一些方面中,抗体是嵌合抗体。术语“嵌合抗体”在本文中用以指如下抗体:含有来自一种物种的恒定域和来自第二物种的可变域,或更通常含有来自至少两种物种的氨基酸序列片段。

[0104] 在一些方面中,抗体是人源化抗体。当相关于抗体使用时,术语“人源化”用以指抗体具有来自非人类源的至少CDR区,经过工程改造而具有相对于初始源抗体更类似于真实人类抗体的结构和免疫功能。举例来说,人源化可以涉及将来自非人类抗体如小鼠抗体的CDR接枝于人类抗体中。如将在所属领域中已知,人源化也可以涉及选择氨基酸取代以制备更类似于人类序列的非人类序列。

[0105] 本文中对术语“嵌合或人源化”的使用不意指为相互排斥的;相反,意指涵盖嵌合抗体、人源化抗体和已进一步经过人源化的嵌合抗体。除非上下文另外指示,否则关于嵌合抗体(嵌合抗体的特性、用途、测试等)的陈述适用于人源化抗体,并且关于人源化抗体的陈述也涉及嵌合抗体。同样,除非上下文规定,否则这类陈述也应理解为适用于抗体和这类抗体的抗原结合片段。

[0106] 在本公开的一些方面中,结合剂是特异性结合到根据本发明的IL13R $\alpha$ 2的抗体的抗原结合片段。抗原结合片段(在本文中也称作“抗原结合部分”)可以是任一种本文所描述抗体的抗原结合片段。抗原结合片段可以是具有至少一个抗原结合位点的抗体的任何一部分,包括但不限于Fab、F(ab')<sub>2</sub>、dsFv、sFv、双功能抗体、三功能抗体、双scFv、通过Fab表达文库表达的片段、域抗体、VhH域、V-NAR域、VH域、VL域等等。然而,本发明的抗体片段不限于这些示范性类型的抗体片段。

[0107] 在示范性方面中,IL13R $\alpha$ 2结合剂是抗原结合片段。在示范性方面中,抗原结合片段包含SEQ ID NO:1-6的氨基酸序列中的每一个。在示范性方面中,抗原结合片段包含SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在示范性方面中,抗原结合片段包含SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在示范性方面中,抗原结合片段包含SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的氨基酸序列,并且SEQ ID NO:7的氨基酸序列经由连接子融合到SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在示范性方面中,连接子包含约5到约25个氨基酸、例如约10到约20个氨基酸的短氨基酸序列。在示范性方面中,连接子包含EEGEFSEAR(SEQ ID NO 10)的氨基酸序列。在示范性方面中,连接子包含AKTTPPKLEEGEFSEARV(SEQ ID NO:80)的氨基酸序列。在示范性方面中,本文所提供的抗原结合片段包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0108] 在示范性方面中,抗原结合片段包含前导序列。任选地,在一些方面中,前导序列位于重链可变区的N端。在示范性方面中,抗原结合片段包含Ig $\kappa$ 前导序列。合适的前导序列在所属领域中已知,并且包括例如METDTLLLWVLLLWVPGSTGD(SEQ ID NO: 9)的Ig $\kappa$ 前导序列。

[0109] 在示范性方面中,抗原结合片段包含一个或多个标签序列。标签序列可以有助于产生并且表征所制造的抗原结合片段。在示范性方面中,抗原结合片段包含一个或多个在轻链可变区的C端的标签序列。合适的标签序列在所属领域中已知并且包括但不限于Myc标签、His标签等等。在示范性方面中,抗原结合片段包含GGPEQKLISEEDLN(SEQ ID NO:11)的Myc标签。在示范性方面中,抗原结合片段包含HHHHHH(SEQ ID NO: 12)的His标签序列。

[0110] 在示范性方面中,本公开的抗原结合片段从N端到C端包含前导序列、重链可变区、连接子序列、轻链可变区、Myc标签(例如SEQ ID NO:11)和His标签(例如SEQ ID NO:12)。在

示范性方面中,本公开的抗原结合片段包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0111] 在示范性方面中,抗原结合片段是域抗体。域抗体包含抗体的功能结合单元,并且可以对应于抗体的重( $V_H$ )或轻( $V_L$ )链的可变区。域抗体可以具有约13kDa,或全抗体的约十分之一重量的分子量。域抗体可以衍生自全抗体,如本文所描述的那些抗体。在一些实施例中,抗原结合片段是单体或聚合的、双特异性或三特异性的并且是二价或三价的。

[0112] 含有抗体分子的抗原结合或独特位(idiotope)的抗体片段共享常见独特型并且由本公开涵盖。这类抗体片段可以由所属领域中已知的技术产生,并且包括但不限于可以通过抗体分子的胃蛋白酶消化产生的 $F(ab')_2$ 片段;可以通过减少 $F(ab')_2$ 片段的二硫桥键产生的Fab'片段;和可以通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子产生的两个Fab'片段。

[0113] 在示范性方面中,本文所提供的结合剂是单链可变区片段(scFv)抗体片段。scFv可以由包含抗体重链的可变(V)域的截短Fab片段组成,所述可变(V)域经由合成肽连接到抗体轻链的V域,并且scFv可以使用常规重组DNA技术产生(参见例如Janeway等人,《免疫生物学(Immunobiology)》,第2版,加兰出版社(Garland出版),纽约(New York), (1996))。类似地,二硫键稳定化可变区片段(dsFv)可以通过重组DNA技术制备(参见例如Reiter等人,《蛋白质工程(Protein Engineering)》,7, 697-704(1994))。

[0114] 在示范性方面中,本文所提供的IL13R $\alpha$ 2结合剂是scFv。在示范性方面中,scFv包含SEQ ID NO:1-6的氨基酸序列中的每一个。在示范性方面中,scFv包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在示范性方面中,scFv包含SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在示范性方面中,scFv包含SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的氨基酸序列,并且SEQ ID NO:7的氨基酸序列经由连接子融合到SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在示范性方面中,连接子包含约5到约25个氨基酸、例如约10到约20个氨基酸的短氨基酸序列。在示范性方面中,连接子包含EEGEFSEAR(SEQ ID NO 10)的氨基酸序列。在示范性方面中,连接子包含AKTTPKLEEGEFSEARV(SEQ ID NO:80)的氨基酸序列。在示范性方面中,本文所提供的scFv包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0115] 重组抗体片段,例如本公开的scFv,也可以经过工程改造以组装于对不同靶抗原具有高结合亲合力和特异性的稳定多聚体寡聚物中。这类双功能抗体(二聚体)、三功能抗体(三聚体)或四功能抗体(四聚体)在所属领域中是众所周知的。参见例如Kortt等人,《生物分子工程(Biomol Eng)》.2001 18:95-108, (2001)和Todorovska等人,《免疫学方法杂志(J Immunol Methods)》.248:47-66, (2001)。

[0116] 在示范性方面中,结合剂是双特异性抗体(bscAb)。双特异性抗体是包含两个单链Fv片段的分子,所述两个单链Fv片段使用重组方法经由甘氨酸-丝氨酸连接子接合。在示范性实施例中,所关注的两个抗体的V轻链( $V_L$ )和V重链( $V_H$ )域使用标准PCR方法分离。随后在两步融合PCR中,获自每一杂交瘤的 $V_L$ 和 $V_H$  cDNA接合以形成单链片段。双特异性融合蛋白以类似方式制备。双特异性单链抗体和双特异性融合蛋白是包括在本发明范围内的抗体物质。示范性的双特异性抗体教导于美国专利申请公开第2005-0282233A1号和国际专利申请公开第W0 2005/087812号中,以上公开的应用均以全文引用的方式并入本文中。

[0117] 在示范性方面中,结合剂是含有两个产生为单一多肽链的scFv的双特异性T细胞啮合抗体(BiTE)。在示范性方面中,结合剂是包含两个scFv的BiTE,其中至少一个scFv包含SEQ ID NO:1-6的氨基酸序列中的每一个或包含SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:8。制备并



且使用BiTE抗体的方法描述于所属领域中。参见例如Cioffi等人,《临床癌症研究 (Clin Cancer Res)》18:465, Brischwein等人,《分子免疫学 (Mol Immunol)》43:1129-43 (2006); Amann M等人,《癌症研究 (Cancer Res)》68:143-51 (2008); Schlereth 等人,《癌症研究》65:2882-2889 (2005); 和Schlereth等人,《癌症免疫与免疫疗法 (Cancer Immunol Immunother)》55:785-796 (2006)。

[0118] 在示范性方面中,结合剂是双重亲和力再靶向抗体(dual affinity re-targeting antibody, DART)。DART产生为通过使链间二硫键稳定而接合的单独多肽。在示范性方面中,结合剂是包含scFv的DART,所述scFv包含SEQ ID NO:1-6的氨基酸序列中的每一个或包含SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:8。制备并且使用DART抗体的方法描述于所属领域中。参见例如Rossi等人,《mAb》6:381-91 (2014); Fournier和 Schirmacher,生物制药《BioDrugs》27:35-53 (2013); Johnson等人,《分子生物学杂志 (J Mol Biol)》399:436-449 (2010); Brien等人,《病毒学杂志 (J Virol)》87:7747-7753 (2013); 和Moore等人,《血液 (Blood)》117:4542 (2011)。

[0119] 在示范性方面中,结合剂是四价串联双功能抗体(TandAb),其中抗体片段产生为呈头到尾布置形式的非共价均二聚体折叠子(folder)。在示范性方面中,结合剂是包含scFv的TandAb,所述scFv包含SEQ ID NO:1-6的氨基酸序列中的每一个或包含SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:8。TandAb在所属领域中已知。参见例如McAleese等人,《未来肿瘤学 (Future Oncol)》8:687-695 (2012); Portner等人,《癌症免疫与免疫疗法 (Cancer Immunol Immunother)》61:1869-1875 (2012); 和Reusch等人,《mAb》6:728 (2014)。

[0120] 在示范性方面中,BiTE、DART或TandAb包含SEQ ID NO:1-6的CDR。在示范性方面中,BiTE、DART或TandAb包含SEQ ID NO:7和8的氨基酸序列。在示范性方面中,BiTE、DART或TandAb包含SEQ ID NO:13。

[0121] 合适的制备抗体的方法在所属领域中已知。举例来说,标准杂交瘤方法描述于例如 Harlow和Lane (编),《抗体:实验室手册 (Antibodies: A Laboratory Manual)》, CSH出版社 (CSH Press) (1988), 和CA. Janeway等人 (编), 免疫生物学, 第5版, 加兰出版社, 纽约, 纽约州 (NY) (2001)。

[0122] 用于本发明中的单克隆抗体可以使用任何技术制备,所述任何技术通过培养物中的传代细胞系提供抗体分子的产生。这些技术包括但不限于最初由Koehler和Milstein (《自然 (Nature)》256:495-497, 1975) 描述的杂交瘤技术; 人类B细胞杂交瘤技术 (Kosbor 等人,《今日免疫学 (Immunol Today)》4:72, 1983; Cote等人,《美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci)》80:2026-2030, 1983); 和EBV杂交瘤技术 (Cole等人,《单克隆抗体和癌症疗法 (Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)》, Alan R Liss Inc, 纽约州纽约, 第77-96页, (1985)。

[0123] 简单来说,多克隆抗体是通过用包含本发明多肽的免疫原免疫动物并且从经过免疫的动物中收集抗血清来制备。大范围动物物种可以用于产生抗血清。在一些方面中,用于产生抗血清的动物是非人类动物,包括兔、小鼠、大鼠、仓鼠、山羊、绵羊、猪或马。因为兔的血量相对大,所以在一些示范性方面中兔是用于产生多克隆抗体的优选选择。在用于产生对所选择IL13R $\alpha$ 2抗原决定基具免疫反应性的多克隆抗血清的一示范性方法中,在弗氏完全佐剂 (Freund's Complete Adjuvant) 中乳化50 $\mu$ g IL13R $\alpha$ 2抗原用于兔的免疫接



种。在例如21天的间隔下,在弗氏不完全佐剂中乳化50 $\mu$ g抗原决定基用于增强。多克隆抗血清可以在抗体产生的允许时间后仅通过使动物出血并且由全血制备血清样品来获得。

[0124] 简单来说,在示范性实施例中,为产生单克隆抗体,用重组IL13R $\alpha$ 2(针对其抗体待升高)(例如10-20 $\mu$ g乳化于弗氏完全佐剂中的IL13R $\alpha$ 2)周期性地注射小鼠。小鼠获得含有允许特异性识别PBS中的淋巴内皮细胞的抗原决定基的IL13R $\alpha$ 2多肽的最终预融合加强,并且四天后处死小鼠并且移出其脾。将脾置于10ml无血清RPMI 1640中,并且通过在两个玻璃显微镜载片的毛端之间研磨脾而形成单细胞悬浮液,所述载片浸没于补充有2mM L谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、100单位/毫升青霉素和100 $\mu$ g/ml链霉素的无血清RPMI 1640中(RPMI)(吉毕科(Gibco),加拿大(Canada))。经由无菌70目Nitex细胞过滤器(贝克顿-迪金森(Becton Dickinson),新泽西州派西派尼市(Parsippany, N.J.))过滤细胞悬浮液,并且通过在200g下离心5分钟而洗涤两次,并且将离心块再悬浮于20ml无血清RPMI中。以类似方式制备获自三只未处理Balb/c小鼠的脾细胞并且将其用作对照。将NS-1骨髓瘤细胞,其在融合之前在具有11%胎牛血清(FBS)(海克隆实验室公司(Hyclone Laboratories, Inc.)),犹他州洛根(Logan, Utah))的RPMI中维持对数期三天,在200g下离心5分钟,并且洗涤离心块两次。

[0125] 将脾细胞( $1 \times 10^8$ )与 $2.0 \times 10^7$ NS-1细胞组合并且离心,并且抽吸上清液。通过轻敲试管移出细胞离心块,并且历经1分钟时程在搅拌下添加1ml的37 $^{\circ}$ C PEG 1500(50%于75mM HEPES中, pH 8.0)(宝灵曼(Boehringer Mannheim)),随后历经7分钟添加7ml无血清RPMI。添加额外8ml RPMI并且在200g下离心细胞10分钟。舍弃上清液后,将离心块再悬浮于200ml含有15%FBS、100 $\mu$ M次黄嘌呤钠、0.4 $\mu$ M氨基嘌呤、16 $\mu$ M胸苷(HAT)(吉毕科)、25单位/毫升IL-6(宝灵曼)和 $1.5 \times 10^6$ 个脾细胞/毫升的RPMI中,并且接种于10个康宁(Corning)底部平坦的96孔组织培养板(康宁, 纽约州康宁)中。

[0126] 在第2、4和6天,在融合后,从融合板的孔中去除100 $\mu$ l培养基并且用新鲜培养基替换。在第8天,通过ELISA筛选融合体,如下测试结合到IL13R $\alpha$ 2的小鼠IgG的存在。在37 $^{\circ}$ C下用100纳克/孔的稀释于25mM pH 7.5 Tris中的IL13R $\alpha$ 2涂布Immulon 4个板(Dynatech(戴雷泰克), 马萨诸塞州剑桥市(Cambridge, Mass.)),持续2小时。抽吸涂布溶液并且添加200 $\mu$ l/孔的阻断溶液(稀释于CMF-PBS中的0.5%鱼皮明胶(西格玛(Sigma)),并且在37 $^{\circ}$ C下培育30分钟。用含有0.05%Tween 20(PBST)的PBS洗涤板三次,并且添加50 $\mu$ l培养物上清液。在37 $^{\circ}$ C下培育30分钟并且如上洗涤后,添加50 $\mu$ l按1:3500稀释于PBST中的辣根过氧化酶缀合的山羊抗小鼠IgG(Fc)(杰克逊免疫研究(Jackson ImmunoResearch), 宾夕法尼亚州西格罗夫(West Grove, Pa.))。如上培育板,用PBST洗涤四次并且添加100 $\mu$ l底物,所述底物由于100mM pH 4.5柠檬酸盐中的1mg/ml邻亚苯基二胺(西格玛)和0.1 $\mu$ l/ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组成。5分钟后停止显色反应,添加50 $\mu$ l 15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。使用板读取器(戴雷泰克)测定A<sub>490</sub>吸光度。

[0127] 通过稀释于96孔板中将所选择融合孔克隆两次,并且5天后对每孔的菌落数进行视觉评分。使用Isostrip系统(宝灵曼, 印第安纳州的印第安纳波利斯(Indianapolis, Ind.))对杂交瘤产生的单克隆抗体进行同型化。

[0128] 当采用杂交瘤技术时,可以使用骨髓瘤细胞系。适合用于产生杂交瘤的融合程序中的这类细胞系优选是非抗体产生的,具有高融合效率和酶不足,所述酶不足使其不能在

仅支持所期望融合细胞(杂交瘤)生长的某种选择性培养基中生长。举例来说,在经过免疫的动物是小鼠时,可以使用P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653、NS1/1.Ag 4 1、Sp210-Ag14、F0、NS0/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG 1.7和S194/15XX0 Bu1;对于大鼠,可以使用R210.RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983F和4B210;并且U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2和UC729-6均适用于与细胞融合体连接。应注意,通过用于产生单克隆抗体的这类技术产生的杂交瘤和细胞系预期是本公开的组合物。

[0129] 取决于宿主物种,可以使用各种佐剂来增加免疫应答。这类佐剂包括但不限于弗氏;矿物凝胶,如氢氧化铝;和表面活性物质,如溶血卵磷脂、普朗尼克多元醇(pluronic polyol)、聚阴离子、肽、油乳液、匙孔螺血氰蛋白和二硝基苯酚。卡介苗((bacilli Calmette-Guerin,BCG)和短小棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)是潜在适用的人类佐剂。

[0130] 或者,可以使用其它方法,如所属领域中已知的EBV杂交瘤方法(Haskard和Archer,《免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)》,74(2),361-67(1984)和Roder等人,《酶学方法(Methods Enzymol.)》,121,140-67(1986));和噬菌体载体表达系统(参见例如Huse等人,《科学(Science)》,246,1275-81(1989))。此外,在非人类动物中产生抗体的方法描述于例如美国专利5,545,806、5,569,825和5,714,352以及美国专利申请公开第2002/0197266 A1)号中。

[0131] 抗体还可以通过诱导淋巴细胞群体的体内产生或通过筛选高度特异性结合试剂的重组免疫球蛋白文库或图来产生,如Orlandi等人(《美国国家科学院院刊》86:3833-3837;1989)以及Winter和Milstein(《自然》349:293-299,1991)中所公开。

[0132] 此外,噬菌体呈现可用以产生本公开的抗体。在这点上,编码抗体的抗原结合可变(V)域的噬菌体文库可以使用标准分子生物学和重组DNA技术产生(参见例如Sambrook等人(编),《分子克隆实验指南(Molecular Cloning,A Laboratory Manual)》,第3版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约(2001))。编码具有所期望特异性的可变区的噬菌体选用于特异性结合到所期望抗原,并且完全或部分抗体经过复原包含所选择的可变域。编码复原抗体的核酸序列被引入到适合的细胞系如用于杂交瘤产生的骨髓瘤细胞中,使得细胞分泌具有单克隆抗体特征的抗体(参见例如Janeway等人,前述;Huse等人,前述和美国专利6,265,150)。相关方法也描述于美国专利第5,403,484号;第5,571,698号;第5,837,500号;和第5,702,892号中。美国专利第5,780,279号、第5,821,047号、第5,824,520号、第5,855,885号、第5,858,657号、第5,871,907号、第5,969,108号、第6,057,098号和第6,225,447号中所描述的技术也预期为适用于制备根据本公开的抗体。

[0133] 抗体可以由特异性重链和轻链免疫球蛋白基因为转基因的转基因小鼠产生。这类方法在所属领域中已知并且描述于例如美国专利第5,545,806号和第5,569,825号以及Janeway等人,前述中。

[0134] 用于产生人源化抗体的方法在所属领域中众所周知并且详细地描述于例如Janeway等人,前述;美国专利第5,225,539号、第5,585,089号和第5,693,761号;欧洲专利第0239400 B1号;和联合王国专利第2188638号中。人源化抗体也可以使用美国专利第5,639,641号和Pedersen等人,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》,235:959-973(1994)中所

描述的抗体表面重修技术来产生。

[0135] 可以使用经过开发用于“嵌合抗体”产生的技术,即将小鼠抗体基因与人类抗体基因 拼接以获得具有适当抗原特异性和生物活性的分子(Morrison等人,《美国国家科学院院刊》81:6851-6855,1984;Neuberger等人,《自然》312:604-608,1984;和Takeda 等人,《自然》314:452-454;1985)。或者,经过描述用于产生单链抗体的技术(美国 专利第4,946,778号)可以适于产生IL13R $\alpha$ 2特异性单链抗体。

[0136] 优选的嵌合或人源化抗体具有人类恒定区,而抗体的可变区或至少一CDR衍生自非人类物种。用于使非人类抗体人源化的方法在所属领域中众所周知。(参见美国专利 第5,585,089号和第5,693,762号)。一般来说,人源化抗体具有一个或多个引入到来自 非人类来源的CDR区和/或其构架区中的氨基酸残基。人源化可以例如使用Jones等人(《自然》321:522-525,1986)、Riechmann等人(《自然》332:323-327,1988)和Verhoeyen 等人(《科学》239:1534-1536,1988)中所描述的方法,通过用啮齿动物互补决定区(CDR) 的至少一部分取代人类抗体的对应区来进行。用于制备工程改造抗体的诸多技术描述于 例如Owens和Young,《免疫学方法杂志(J. Immunol. Meth.)》,168:149-165(1994)中。随后可以将其它变化引入到抗体构架中以调节亲和力或免疫原性。

[0137] 与前述描述一致,包含CDR的组合物可以至少部分地使用所属领域中已知的技术来产生以分离CDR。互补决定区的特征在于六个多肽环,三个环针对重链或轻链可变区 中的每一个。CDR中的氨基酸位置由Kabat等人,《免疫学感兴趣的蛋白质的序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,美国卫生和公众服务部(U.S. Department of Health and Human Services), (1983)界定,所述文献以引用的方式并入本 文中。举例来说,人类抗体的高变区经过粗略地界定发现在重链和轻链可变区的残基28 到35、49-59和残基92-103处[Janeway等人,前述]。发现鼠类CDR也恰在这些氨基酸 残基处。应理解,在所属领域中,CDR区可以发现于具有上文所阐述的适当氨基酸位置 的若干氨基酸内。免疫球蛋白可变区也由围绕CDR的四个“构架”区(FR1-4)组成。不 同轻链或重链的构架区的序列在物种内高度保守,并且也在人类与鼠类序列之间保守。

[0138] 产生包含单克隆抗体的重链可变区或轻链可变区的一个、两个和/或三个CDR的组合物。举例来说,使用包含具有SEQ ID NO:1-6序列的CDR的杂交瘤克隆47的抗体,产生包含这些CDR的多肽组合物。也涵盖包含抗体的一个、二个、三个、四个、五个 和/或六个互补决定区的多肽组合物。使用围绕CDR的保守构架序列,产生与这些共同 构架序列互补的PCR引物,以扩增定位于引物区之间的CDR序列。用于克隆并且表达 核苷酸和多肽序列的技术在所属领域中是公认的[参见例如Sambrook等人,《分子克隆 实验指南》,第2版,冷泉港,纽约(1989)]。所扩增的CDR序列接合于适当质粒中。包 含一个、二个、三个、四个、五个和/或六个克隆CDR的质粒任选地含有编码连接到CDR 的区域的额外多肽。

[0139] 预期产生经过修饰的多肽组合物,其包含具有SEQ ID NO:1-6的重链或轻链的一个、二个、三个、四个、五个或六个CDR,其中CDR经过改变以提供针对靶IL13R $\alpha$ 2 的增加的特异性或亲和力或亲合力。在CDR中的位置处的位点典型地经过连续修饰, 例如通过首先用保守选择取代(例如疏水性氨基酸取代不相同的疏水性氨基酸)并且随 后用更不相似的选择取代(例如疏水性氨基酸取代带电荷氨基酸),并且随后可以在标 靶位点处进行缺失或插入。

[0140] 鼠类抗体的构架区 (FR) 通过取代相容的人类构架区人源化, 所述相容的人类构架区选自人类抗体可变序列的大数据库, 包括超过一千二百个人类 $V_H$ 序列和超过一千个 $V_L$ 序列。用于比较的抗体序列的数据库从Andrew C.R.Martin's KabatMan web page (<http://www.rubic.rdg.ac.uk/abs/>) 下载。用于鉴别CDR的卡巴特 (Kabat) 法提供用于描绘任何人类抗体的近似CDR和构架区并且针对相似性比较鼠类抗体的序列以确定CDR 和FR的手段。最匹配的人类 $V_H$ 和 $V_L$ 序列基于高的整体构架匹配、类似CDR长度以及典型和 $V_H/V_L$ 接触残基的最小错配而选择。最类似于鼠类序列的人类构架区被插入在鼠类CDR之间。或者, 鼠类构架区可以通过对更接近地类似人类抗体构架区的原生构架区的全部或部分进行氨基酸取代来修饰。

[0141] “保守”氨基酸取代基于所涉及残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性性质的相似性来进行。举例来说, 非极性 (疏水性) 氨基酸包括丙氨酸 (Ala, A)、亮氨酸 (Leu, L)、异亮氨酸 (Ile, I)、缬氨酸 (Val, V)、脯氨酸 (Pro, P)、苯丙氨酸 (Phe, F)、色氨酸 (Trp, W) 和甲硫氨酸 (Met, M); 极性中性氨基酸包括甘氨酸 (Gly, G)、丝氨酸 (Ser, S)、苏氨酸 (Thr, T)、半胱氨酸 (Cys, C)、酪氨酸 (Tyr, Y)、天冬酰胺 (Asn, N) 和谷氨酰胺 (Gln, Q); 带正电 (基础) 氨基酸包括精氨酸 (Arg, R)、赖氨酸 (Lys, K) 和组氨酸 (His, H); 并且带负电 (酸性) 氨基酸包括天冬氨酸 (Asp, D) 和谷氨酸 (Glu, E)。“插入”或“缺失”优选在约1到20个氨基酸、更优选1到10个氨基酸范围内。可以通过使用重组DNA技术在多肽分子中系统地进行氨基酸取代并且分析所得重组变异体的活性来引入变化。可以在不同物种在核酸方面不同的位点 (可变位置) 处或在高度保守区 (恒定区) 中进行核酸改变。下文更详细地描述用于表达适用于本发明的多肽组合物的方法。

[0142] 此外, 用于产生用于本公开方法的抗体的另一适用技术可以是使用合理设计型方法的技术。合理设计的目标是制造相互作用的生物活性多肽或化合物的结构类似物 (促效剂、拮抗剂、抑制剂、肽模拟物、结合伴侣等等)。在这种情况下, 活性多肽包含本文所公开的SEQ ID NO:1-6的序列。通过生成这类类似物, 有可能形成比原生或天然分子更具免疫反应性的额外抗体。在一种方法中, 将产生抗体或其抗原决定基结合片段的三维结构。这可以通过x射线结晶学、计算机建模或通过两种方法的组合实现。一种替代方法-“丙氨酸扫描”-涉及残基贯穿具有丙氨酸的分子的随机替代, 并且确定对功能的所得影响。

[0143] 解析特异性抗体的晶体结构也是可能的。原则上, 这种方法得到后续药物设计可以以其为基础的制药核心 (pharmacore)。有可能通过将抗独特型抗体产生为功能性药理学活性抗体而完全绕过蛋白质结晶学。作为镜像的镜像, 预期抗独特型抗体的结合位点是初始抗原的类似物。随后抗独特型抗体用以从以化学或生物学方式产生的肽的库中鉴别并且分离额外抗体。

[0144] 化学合成的双特异性抗体可以通过借助化学物质如异双官能试剂丁二酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)-丙酸酯 (SPDP, Pierce Chemicals, 伊利诺斯州罗克福德 (Rockford, Ill)) 使异源Fab或 $F(ab')_2$ 片段化学交联来制备。Fab和 $F(ab')_2$ 片段可以通过分别用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化完整抗体而获自完整抗体 (Karpovsky等人, 《实验医学杂志 (J. Exp. Med.)》160:1686-701, 1984; Titus等人, 《免疫学杂志 (J. Immunol.)》, 138:4018-22, 1987)。

[0145] 无论抗体怎样产生, 测试抗体结合到IL13R $\alpha$ 2的抗原决定基的能力的方法在所属

领域中已知并且包括任何抗体-抗原结合分析,例如放射免疫分析(RIA)、ELISA、蛋白质印迹、免疫沉淀和竞争抑制分析(参见例如Janeway等人,下文,和美国专利申请公开第2002/0197266 A1号)。

[0146] 出于本文的目的,从抗体群体中选择抗体也包括使用血管内皮细胞“减去”与在这类细胞上的不为IL13R $\alpha$ 2抗原决定基的抗原决定基交叉反应的那些抗体。剩余的抗体群体在优先用于IL13R $\alpha$ 2抗原决定基的抗体中富集。

[0147] 适体

[0148] 组合科学领域中的最新进展已鉴别出对给定标靶具有高的亲和力和特异性的短聚合物序列(例如寡核苷酸或肽分子)。举例来说,已使用SELEX技术来鉴别竞争哺乳动物抗体的具有结合特性的DNA和RNA适体,免疫学领域已产生并且分离结合到大量化合物的抗体或抗体片段,并且已经利用噬菌体呈现来发现具有极有利结合特性的新肽序列。基于这些分子演变技术的成功,确定可以生成结合到任何靶分子的分子。环结构经常涉及如在适体的情况下提供所期望的结合属性,所述适体经常利用产自无互补碱基配对的短区域的发夹环,利用环形高可变区的组合布置的天然衍生的抗体,和利用环肽的新噬菌体呈现文库,所述新噬菌体呈现文库当与线性肽噬菌体呈现结果相比较时已显示提高的结果。因此,已产生足够的证据以指示到高亲和力配位体可以通过组合分子演变技术来生成和鉴别。对于本发明,分子演变技术可以用以分离特异于本文所公开的IL13R $\alpha$ 2的结合剂。关于适体的更多内容,一般参见Gold, L., Singer, B., He, Y. Y., Brody, E., “作为治疗剂和诊断剂的适体(Aptamers As Therapeutic And Diagnostic Agents),”《生物技术杂志(J. Biotechnol.)》74:5-13(2000)。用于产生适体的相关技术见于美国专利第6,699,843号,所述专利以全文引用的方式并入本文中。

[0149] 在一些实施例中,适体通过制备核酸文库、使核酸文库与生长因子接触来产生,其中选择并且扩增对生长因子具有更大结合亲和力(相对于其它文库核酸)的核酸以得到富含针对结合到生长因子具有相对较高的亲和力和特异性的核酸的核酸混合物。可以重复所述过程,并且使所选择的核酸突变并且重新筛选,其中生长因子适体被鉴别。可以筛选核酸以选择结合到多于标靶的分子。结合多于一种标靶可以指同时或竞争性地结合多于一种标靶。在一些实施例中,结合剂包含至少一种适体,其中第一结合单元结合IL13R $\alpha$ 2的第一抗原决定基并且第二结合单元结合IL13R $\alpha$ 2的第二抗原决定基。

[0150] 关于本公开组合物的结合剂,在将结合剂结合到IL13R $\alpha$ 2时IL13R $\alpha$ 2的配位体诱导的活化降低。如本文所使用,术语“降低”以及类似术语例如“抑制”未必暗示100%或完全的降低或抑制。相反,存在降低或抑制的变化程度,其中所属领域的一般技术人员认为具有潜在益处或治疗作用。相应地,在一些实施例中,IL13R $\alpha$ 2的配位体诱导的活化被完全消除。在一些实施例中,当不存在结合剂或其不结合到IL13R $\alpha$ 2时,相较于IL13R $\alpha$ 2的配位体诱导的活化,配位体诱导的活化基本上降低,例如降低约10%(例如约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%)或更多。测量IL13R $\alpha$ 2的配位体诱导的活化的方法在所属领域中已知,并且包括例如下文实例中所描述的分析。

[0151] 缀合物

[0152] 本文公开包含靶向域和效应域的缀合物。在示范性实施例中,缀合物包含本文所公开的结合剂中的任一种作为靶向域以将缀合物定位到表达IL13R $\alpha$ 2的细胞,例如表达

IL13R $\alpha$ 2的肿瘤细胞;和效应域。在示范性方面中,缀合物是融合蛋白。在示范性方面中,缀合物是嵌合蛋白。如本文所使用,术语“嵌合”是指由不同来源的部分构成的分子。总体上嵌合分子是非天然存在的,例如合成或重组的,但包含嵌合分子的部分可以是天然存在的。

[0153] 示范性效应域

[0154] 如本文所使用,术语“效应域”是指影响所期望的生物功能的缀合物的一部分。在示范性方面中,效应域鉴别或定位IL13R $\alpha$ 2表达细胞。举例来说,效应域可以是诊断剂,例如放射性标记、荧光标记、酶(例如催化量热或荧光反应)、底物、固体基质或载体(例如生物素或抗生物素蛋白)。在一些方面中诊断剂是成像剂。许多适当的成像剂在所 属领域中已知,将标记剂附接到本发明肽的方法也一样(参见例如美国专利第4,965,392号;第4,472,509号;第5,021,236号;和第5,037,630号;每一专利以引用的方式并入本文中)。向个体给予在药学上可接受的载剂中的成像剂,并且使其积累于具有淋巴内皮细胞的标靶位点处。随后这种成像剂充当用于标靶位点的X射线、磁共振、正电子发射断层扫描(positron emission tomography)、单光子发射计算机断层扫描(single photon emission computed tomography, SPECT),或超声或闪烁成像的对比试剂。当然,应理解,成像可以在体外进行,其中来自个体的组织经由活检获得,并且淋巴内皮细胞的存在借助于本文所描述的成像剂以及用于制备和固定组织的组织化学技术来确定。适用于本发明的成像剂的顺磁离子包括例如铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钆(III)、钐(III)、镱(III)、钆(III)、钒(II)、铽(III)、镨(III)、钆(III)和铟(III)。适用于X射线成像的离子包括但不限于镧(III)、金(III)、铅(II)并且尤其铋(III)。用于诊断应用的放射性同位素包括例如<sup>211</sup>砷、<sup>14</sup>碳、<sup>51</sup>铬、<sup>36</sup>氯、<sup>57</sup>钴、<sup>67</sup>铜、<sup>152</sup>镧、<sup>67</sup>镱、<sup>3</sup>氢、<sup>123</sup>碘、<sup>125</sup>碘、<sup>111</sup>铟、<sup>59</sup>铁、<sup>32</sup>磷、<sup>186</sup>铼、<sup>75</sup>硒、<sup>35</sup>硫、<sup>99m</sup>锝、<sup>90</sup>钇和<sup>99</sup>锆。

[0155] 效应域可以是改变缀合物的物理-化学特征的一者,例如赋予增加的溶解性和/或稳定性和/或半衰期、抗蛋白水解分裂性、清除率的调节的效应子。在示范性方面中,效应域是聚合物、碳水化合物或脂质。

[0156] 聚合物可以是分枝或未分枝的。聚合物可以具有任何分子量。在一些实施例中,聚合物具有在约2kDa到约100kDa之间的平均分子量(术语“约”指示在制备水溶性聚合物中,一些分子将比所规定的分子量更重,一些分子比所规定的分子量更轻)。在一些方面中,聚合物的平均分子量在约5kDa与约50kDa之间,在约12kDa到约40kDa之间或在约20kDa到约35kDa之间。在一些实施例中,聚合物经过修饰具有单个反应性基团,如针对酰化的活性酯或针对烷基化的醛,使得聚合度可以受到控制。在一些实施例中,聚合物是水溶性的,使得其附接的蛋白质不在水性环境如生理环境中沉淀。在一些实施例中,当例如组合物用于治疗用途时,聚合物是药学上可接受的。此外,在一些方面中,聚合物是聚合物的混合物,例如共聚物、嵌段共聚物。在一些实施例中,聚合物选自以下组成的组:聚酰胺;聚碳酸酯;聚亚烷基和其衍生物,包括聚亚烷二醇、聚烷醚、聚对苯二甲酸亚烷酯;丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的聚合物,包括聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)和聚(丙烯酸十八烷酯);聚乙烯基聚合物,包括聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚乙烯基卤

化物、聚(乙酸乙酯)和聚乙烯吡咯烷酮;聚乙交酯;聚硅氧烷;聚氨基甲酸酯和其共聚物;纤维素,包括烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基丁基甲基纤维素、乙酸纤维素、丙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、邻苯二甲酸乙酸纤维素、羧乙基纤维素、三乙酸纤维素和硫酸纤维素钠盐;聚丙烯;聚乙烯,包括聚(乙二醇)、聚(氧化乙烯)及聚(对苯二甲酸乙二酯);和聚苯乙烯。在一些方面中,聚合物是生物可降解聚合物,包括合成生物可降解聚合物(例如乳酸与乙醇酸的聚合物、聚酸酐、聚(原)酸酯、聚氨基甲酸酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)和聚(丙交酯-共-己内酯)),和天然生物可降解聚合物(例如,海藻酸盐和其它多糖(包括聚葡萄糖和纤维素)、胶原蛋白、其化学衍生物(取代、添加例如烷基、亚烷基的化学基团、羟基化、氧化和所属领域的技术人员通常进行的其它修饰)、白蛋白和其它亲水性蛋白质(例如,玉米蛋白(zein)和其它醇溶谷蛋白(prolamine)和疏水性蛋白质)),以及其任何共聚物或混合物。一般来说,这些材料在体内通过酶水解或暴露于水、通过表面或整体侵蚀而降解。在一些方面中,聚合物是生物粘附聚合物,如生物可侵蚀性水凝胶(由H.S.Sawhney,C.P.Pathak和J.A.Hubbell于《大分子(Macromolecules)》,1993,26,581-587中描述,该文献的教导内容并入本文中)、聚玻尿酸、酪蛋白、明胶、明胶蛋白(glutin)、聚酸酐、聚丙烯酸、海藻酸盐、聚葡萄糖胺糖、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)及聚(丙烯酸十八烷酯)。在一些实施例中,聚合物是水溶性聚合物或亲水性聚合物。合适的水溶性聚合物在所属领域中已知并且包括例如聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基纤维素(HPC;Klucel)、羟丙基甲基纤维素(HPMC;Methocel)、硝基纤维素、羟丙基乙基纤维素、羟丙基丁基纤维素、羟丙基戊基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素(Ethocel)、羟乙基纤维素、各种烷基纤维素和羟烷基纤维素、各种纤维素醚、乙酸纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素钙、乙酸乙酯/丁烯酸共聚物、聚甲基丙烯酸羟烷基酯、甲基丙烯酸羟甲基酯、甲基丙烯酸共聚物、聚甲基丙烯酸、聚甲基丙烯酸甲酯、马来酸酐/甲基乙炔醚共聚物、聚乙烯醇、聚丙烯酸钠和聚丙烯酸钙、聚丙烯酸、酸性羧基聚合物、羧基聚亚甲基、羧基乙烯基聚合物、聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物、聚甲基乙炔醚-共-马来酸酐、羧甲基酰胺、甲基丙烯酸钾二乙烯基苯共聚物、聚氧基乙二醇、聚氧化乙烯,以及其衍生物、其盐和其组合。在一些方面中,水溶性聚合物或其混合物包括但不限于N连接或O连接的碳水化合物、糖、磷酸盐、碳水化合物;糖;磷酸盐;聚乙二醇(PEG)(包括已经用以衍生蛋白质的PEG形式,包括单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇);单甲氧基-聚乙二醇;聚葡萄糖(如,例如约6kD的低分子量聚葡萄糖);纤维素;其它碳水化合物基聚合物;聚-(N-乙烯基吡咯烷酮);聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物;聚氧乙基化多元醇(例如甘油)和聚乙烯醇。本公开也涵盖可以用以制备共价连接的多聚体的双官能交联分子。本文中使用的特别优选的水溶性聚合物是聚乙二醇(PEG)。如本文所使用,聚乙二醇意指涵盖可以用于衍生其它蛋白质的PEG形式中的任一种,如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇。PEG是线性或分枝的中性聚醚,以广泛范围的分子量获得,并且可溶于水 and 大多数有机溶剂中。当存在于水中时,PEG主要经由其高动态链运动性和疏水性在排除其它聚合物或肽方面有效,由此当附接到其它蛋白质或聚合物表面时生成水壳或水合球面。PEG

是无毒性、非免疫原性的,并且由食品和药物管理局(Food and Drug Administration)认可用于内部消耗。蛋白质或酶当缀合到PEG时具有经过证实的生物活性、非抗原特性和当在动物中给予时降低的清除率。F.M.Veronese等人,用于治疗应用的单甲氧基聚(乙二醇)修饰的酶的制备和特性(Preparation and Properties of Monomethoxypoly(ethylene glycol)-modified Enzymes for Therapeutic Applications),于J. M.Harris编,《聚(乙二醇)化学--生物技术和生物医学应用(Poly(Ethylene Glycol) Chemistry--Biotechnical and Biomedical Applications)》,127-36,1992中,所述文献以引用的方式并入本文中。不希望受理论所束缚,这些现象可能归因于PEG在预防通过免疫系统的识别中的排除特性。此外,PEG已广泛地用于表面修饰程序以降低蛋白质吸附并且提高血液相容性。S.W.Kim等人,《纽约科学院年鉴(Ann.N.Y.Acad.Sci.)》516: 116-30 1987;Jacobs等人,《人工器官(Artif.Organs)》12:500-501,1988;Park等人,《聚合物科学杂志,A辑(J.Poly.Sci,Part A)》29:1725-31,1991,每一文献以全文引用的方式并入本文中。疏水性聚合物表面,如聚氨基甲酸酯和聚苯乙烯,可以通过PEG(MW 3,400)的接枝来修饰并且用作非血栓形成性表面(nonthrombogenic surface)。归因于PEG的水合作用,表面特性(接触角)可以与亲水性表面更加一致。更重要地,由PEG的高链运动性、水合球面和蛋白质排除特性所造成,蛋白质(白蛋白和其它血浆蛋白)吸附会大大地降低。在表面固定研究中,PEG(MW 3,400)被确定为理想大小,Park等人,《生物医学材料研究杂志(J.Biomed.Mat.Res.)》26:739-45,1992,而PEG(Mw 5,000)在降低蛋白质抗原性方面是最有益的。F.M.Veronese等人,于J.M.Harris,等人,《聚(乙二醇)化学--生物技术和生物医学应用》,127-36中。用于制备PEG化结合剂多肽的方法可以包含以下步骤(a)使多肽与聚乙二醇(如PEG的反应性酯或醛衍生物)在结合剂多肽附接到一个或多个PEG基团的条件下反应,和(b)获得反应产物。一般来说,酰化反应的理想反应条件将基于已知参数和所期望的结果来确定。举例来说,PEG:蛋白质的比率越大,聚-PEG化产物的百分比越大。在一些实施例中,结合剂将在N端具有单个PEG部分。参见美国专利第8,234,784号,所述专利以引用的方式并入本文中。

[0157] 在一些实施例中,效应域是碳水化合物。在一些实施例中,碳水化合物是单糖(例如葡萄糖、半乳糖、果糖)、双糖(例如蔗糖、乳糖、麦芽糖)、寡糖(例如棉籽糖、水苏糖)、多糖(例如淀粉、淀粉酶、胶淀粉、纤维素、几丁质、愈创聚葡糖(callose)、昆布糖(laminarin)、木聚糖、甘露聚糖、褐藻糖胶或半乳甘露聚糖)。

[0158] 在一些实施例中,效应域是脂质。在一些实施例中,脂质是脂肪酸、类甘烷酸(eicosanoid)、前列腺素、白三烯、血栓素、N-酰基乙醇胺、甘油脂质(例如,单取代甘油、双取代甘油、三取代甘油)、甘油磷脂(例如,磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸)、鞘脂(例如,神经鞘胺醇、神经酰胺)、固醇脂质(例如,类固醇、胆固醇)、异戊烯醇脂质(prenol lipid)、糖脂质、或聚酮化合物(polyketide)、油、蜡、胆固醇、固醇、脂溶性维生素、单酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯或磷脂。

[0159] 致死域

[0160] 在示范性方面中,效应域是赋予致死性的致死域,使得当缀合物定位到表达IL13R $\alpha$ 2的细胞例如表达IL13R $\alpha$ 2的肿瘤细胞时。效应域向缀合物赋予一旦结合剂已发现并且结合到其IL13R $\alpha$ 2靶就杀死IL13R $\alpha$ 2表达细胞的能力。



[0161] 在示范性方面中,效应域是细胞毒素(在本文中也被称作“细胞毒性剂”)。细胞毒性剂是对细胞具有毒性的任何(化学或生物化学)分子。在一些实施例中,细胞毒性剂是化学治疗剂。化学治疗剂在所属领域中已知并且包括但不限于铂配位化合物、拓扑异构酶抑制剂、抗生素、抗有丝分裂生物碱和二氟核苷,如美国专利第6,630,124号中所描述。在一些实施例中,化学治疗剂是铂配位化合物。术语“铂配位化合物”是指提供呈离子形式的铂的任何肿瘤细胞生长抑制铂配位化合物。在一些实施例中,铂配位化合物是顺-二氨二水合铂(II)-离子(cis-diamminediaquoplatinum(II)-ion);氯(二亚乙基三胺)-氯化铂(II)(chloro(diethylenetriamine)-platinum(II)chloride);(乙二胺)-二氯合铂(II)(dichloro(ethylenediamine)-platinum(II))、(1,1-环丁烷二甲酸)二氨合铂(II)(卡铂(carboplatin));螺铂;异丙铂;(2-乙基丙二酸)-二氨合铂(II)(diammine(2-ethylmalonato)-platinum(II));乙二胺丙二酸铂(II);(1,2-二氨基环己烷)-水合硫酸铂(II);(1,2-二氨基环己烷)丙二酸铂(II);(1,2-二氨基环己烷)(4-羧基邻苯二甲酸)铂(II)((4-carboxyphthalato)(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II));(1,2-二氨基环己烷)-(异柠檬酸)铂(II);(1,2-二氨基环己烷)顺(丙酮酸)铂(II);(1,2-二氨基环己烷)草酸铂(II);奥马铂(ormaplatin);或四铂。在一些实施例中,顺铂是本发明的组合物和方法中所采用的铂配位化合物。顺铂可按名称PLATINOL™商购自Bristol Myers-Squibb Corporation,并且可以用于与水、无菌盐水或其它合适的媒剂配制的粉末形式获得。适合于本发明中的其它铂配位化合物是已知的并且可商购和/或可以通过常规技术制备。在各种人类实体恶性肿瘤的治疗中,顺铂或顺-二氯二氨铂II已作为化学治疗剂成功地使用了很多年。近年来,在各种人类实体恶性肿瘤的治疗中,其它二氨基-铂络合物也已显示作为化学治疗剂的功效。这类二氨基-铂络合物包括但不限于螺铂和卡铂。尽管顺铂和其它二氨基-铂络合物已广泛地用作人类的化学治疗剂,但其不得不以会引起毒性问题如肾损害的高剂量水平递送。

[0162] 在一些实施例中,化学治疗剂是拓扑异构酶抑制剂。拓扑异构酶是能够改变真核细胞中的DNA拓扑结构的酶。其对细胞功能和细胞增殖很关键。一般来说,在真核细胞中存在两种类别的拓扑异构酶,I型和II型。拓扑异构酶I是具有约100,000分子量的单体酶。所述酶结合到DNA并且引入短暂的单链断裂,使双螺旋解旋(或允许其展开),并且随后将裂口再封合,之后从DNA链解离。各种拓扑异构酶抑制剂最近已在罹患卵巢癌、食道癌或非小细胞肺癌的人类的治疗中显示临床功效。在一些方面中,拓扑异构酶抑制剂是喜树碱(camptothecin)或喜树碱类似物。喜树碱是水不溶性的细胞毒性生物碱,由中国本土的喜树(Camptotheca acuminate tree)和印度本土的青脆枝树(Nothapodytes foetidatree)产生。喜树碱展现针对许多肿瘤细胞的肿瘤细胞生长抑制活性。喜树碱类似物类别的化合物是DNA拓扑异构酶I的典型的特异性抑制剂。术语“拓扑异构酶的抑制剂”意指结构上与喜树碱相关的任何肿瘤细胞生长抑制化合物。喜树碱类似物类别的化合物包括但不限于拓朴替康(topotecan)、伊立替康(irinotecan)和9-氨基-喜树碱。在额外实施例中,细胞毒性剂是以下中所要求或描述的任何肿瘤细胞生长抑制喜树碱类似物:美国专利第5,004,758号;欧洲专利申请号88311366.4(公开号EP 0 321 122);美国专利第4,604,463号;欧洲专利申请公开号EP 0 137 145;美国专利第4,473,692号;欧洲专利申请公开号EP 0 074 256;美国专利第4,545,880号;欧洲专利申请公开号EP 0 074 256;欧洲

专利申请公开号EP 0 088 642;Wani等人,《药物化学 杂志(J.Med.Chem.)》,29,2358-2363 (1986);和Nitta等人,《会刊(Proc.)》第14 届国际化疗会议(14th International Congr.Chemotherapy),京都(Kyoto),1985,东京 出版社(Tokyo Press),抗癌章节1,第28-30页。确切地说,本公开涵盖称作CPT-11 的化合物。CPT-11是具有4-(哌啶基)-哌啶侧链的喜树碱类似物,所述侧链经由氨甲酸 酯连接在10-羟基-7-乙基喜树碱的C-10处接合。CPT-11目前正经历人类临床试验并且 还被称作伊立替康;Wani等人,《药物化学杂志》,23,554 (1980);Wani等人,《药物 化学杂志》,30,1774 (1987);美国专利第4,342,776号;欧洲专利申请公开号EP 418 099; 美国专利第4,513,138号;欧洲专利申请公开号EP 0 074 770;美国专利第4,399,276号; 欧洲专利申请公开号0 056 692;以上文献中的每一个的全部揭示内容由此以引用的方式 并入。喜树碱类似物类别的所有上文所列举化合物可商购和/或可以通过常规技术(包括 上文所列举文献中所描述的那些技术)来制备。拓扑异构酶抑制剂可以选自由以下组成 的组:拓朴替康、伊立替康和9-氨基喜树碱。

[0163] 喜树碱类似物类别的诸多化合物(包括其药学上可接受的盐、水合物和溶剂合物)的制备,以及包含喜树碱类似物类别的这类化合物和惰性的药学上可接受的载剂或稀释剂的口服和肠胃外医药组合物的制备广泛地描述于美国专利第5,004,758号和欧洲专利申请号88311366.4(公开号EP 0 321 122)中,所述专利中的每一个的教导内容以全文 引用的方式并入本文中。

[0164] 在本发明的再一实施例中,化学治疗剂是抗生素化合物。合适的抗生素包括但不限于 小红莓(doxorubicin)、丝裂霉素(mitomycin)、博莱霉素(bleomycin)、道诺霉素(daunorubicin)和链脲霉素(streptozocin)。在一些实施例中,化学治疗剂是抗有丝分裂生物碱。一般来说,抗有丝分裂生物碱可以从长春花(Cantharanthus roseus)中提取,并且作为抗癌化学治疗剂已显示为有效的。已在化学上和药理学上研究了大量的半合成衍生物(参见O.Van Tellingen等人,《抗癌研究(Anticancer Research)》,12,1699-1716 (1992))。本发明的抗有丝分裂生物碱包括但不限于长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、长春地辛(vindesine)、紫杉醇(Taxol)和长春瑞宾(vinorelbine)。后两种抗有丝分裂生物碱可分别商购自礼来公司(Eli Lilly and Company)和皮耶法柏实验室(Pierre Fabre Laboratories)(参见美国专利第5,620,985号)。在本发明的一个方面中,抗 有丝分裂生物碱是长春瑞宾。

[0165] 在本发明的另一实施例中,化学治疗剂是二氟核苷。2'-脱氧-2',2'-二氟核苷在所属领域 中已知为具有抗病毒活性。这类化合物公开并且教导于美国专利第4,526,988号 和第 4,808,614号中。欧洲专利申请公开184,365公开到这些相同的二氟核苷具有溶瘤活性。在某些特定方面中,本公开的组合物和方法中所使用的2'-脱氧-2',2'-二氟核苷是 2'-脱氧 -2',2'-二氟胞苷盐酸盐,也称为吉西他滨(gemcitabine)盐酸盐。吉西他滨可商 购或可以 按如美国专利第4,526,988号、第4,808,614号和第5,223,608号中所公开的多步 方法合 成,所述专利中的每一个的教导内容以全文引用的方式并入本文中。

[0166] 在示范性方面中,效应域是造成IL13R $\alpha$ 2表达细胞编程性细胞死亡(apoptose)的 细胞凋亡标签。在示范性方面中,细胞凋亡标签是TRAIL蛋白或其一部分。在示范性 方面 中,细胞凋亡标签包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在示范性方面中,缀合物包 含SEQ ID NO:25的氨基酸序列。

[0167] 在示范性实施例中,效应域是IgG或其它免疫球蛋白的Fc域。对于取代基,如人类IgG的Fc区,融合体可以直接融合到结合剂或经由插入序列融合。举例来说,人类IgG铰链、CH2和CH3区可以在结合剂的N端或C端处融合以附接Fc区。所得Fc-融合体药剂使得能够经由蛋白A亲和柱(Pierce,伊利诺斯州罗克福德)纯化。融合到Fc区的肽和蛋白质可以展现体内比未融合对应体基本上更大的半衰期。融合到Fc区的融合体允许融合多肽进行二聚化/多聚化。Fc区可以是天然存在的Fc区,或可以针对优异特征例如治疗质量、循环时间、减少的聚集而经过修饰。如上所指出,在一些实施例中,结合剂缀合(例如融合)到免疫球蛋白或其部分(例如可变区、CDR或Fc区)。已知类型的免疫球蛋白(Ig)包括IgG、IgA、IgE、IgD或IgM。Fc区是Ig重链的C端区,其负责与进行如再循环(其导致半衰期延长)的活动的Fc受体的结合、抗体依赖性细胞介导细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0168] 举例来说,根据一些定义,人类IgG重链Fc区从重链的Cys226延展到C端。“铰链区”一般从人类IgG1的Glu216延伸到Pro230(通过比对半胱氨酸键结中所涉及的半胱氨酸,可以将其它IgG同型物的铰链区与IgG1序列进行比对)。IgG的Fc区包括两个恒定域CH2和CH3。人类IgG Fc区的CH2域通常从氨基酸231延伸到氨基酸341。人类IgG Fc区的CH3域通常从氨基酸342延伸到447。对免疫球蛋白或免疫球蛋白片段或区域的氨基酸编号的参考均基于Kabat等人1991,《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》,美国公共卫生部(U.S.Department of Public Health),马里兰州贝塞斯达(Bethesda,Md.),其以引用的方式并入本文中。在相关实施例中,Fc区可以包含一个或多个不为CH1的来自免疫球蛋白重链的原生或经过修饰的恒定区,例如IgG和IgA的CH2区和CH3区,或IgE的CH3区和CH4区。

[0169] 合适的缀合物部分包括包含FcRn结合位点的免疫球蛋白序列的部分。救助受体FcRn负责再循环免疫球蛋白并且使其返回到血液中的循环。已基于X射线结晶学描述了结合到FcRn受体的IgG Fc部分的区域(Burmeister等人1994,《自然》372:379)。Fc与FcRn的主要接触区域接近CH2域与CH3域的接面。Fc-FcRn接触点均在单一Ig重链内。主要接触位点包括CH2域的氨基酸残基248、250-257、272、285、288、290-291、308-311和314,和CH3域的氨基酸残基385-387、428和433-436。

[0170] 一些缀合物部分可能包括或可能不包括Fc $\gamma$ R结合位点。Fc $\gamma$ R负责抗体依赖性细胞介导细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。与Fc $\gamma$ R直接接触的Fc区内位置的实例是氨基酸234-239(下端铰链区)、氨基酸265-269(B/C环)、氨基酸297-299(C'/E环)和氨基酸327-332(F/G)环(Sondermann等人,《自然》406:267-273,2000)。IgE的下端铰链区也已与FcRI结合有关(Henry等人,《生物化学(Biochemistry)》36, 15568-15578,1997)。涉及IgA受体结合的残基描述于Lewis等人,《免疫学杂志》175:6694-701,2005)中。涉及IgE受体结合的氨基酸残基描述于Sayers等人(《生物化学杂志(J Biol Chem.)》279(34): 35320-5,2004)中。

[0171] 可以对免疫球蛋白的Fc区进行氨基酸修饰。这类变异Fc区在Fc区的CH3域(残基342-447)中包含至少一个氨基酸修饰和/或在Fc区的CH2域(残基231-341)中包含至少一个氨基酸修饰。相信赋予FcRn以增加的亲和力的突变包括T256A、T307A、E380A和N434A(Shields等人2001,《生物化学杂志》276:6591)。其它突变可以降低Fc区与Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIA、Fc $\gamma$ RIIB和/或Fc $\gamma$ RIIIA的结合而不显著降低对FcRn的亲合力。举例来说,用Ala或另一氨基酸取代Fc区的位置297处的Asn去除高度保守的N-糖基化位点并且可以降低Fc区

的免疫原性,同时延长Fc区的半衰期,以及降低与Fc $\gamma$ R的结合(劳特利奇等人1995,《移植(Transplantation)》60:847;Friend等人1999,《移植》68:1632;Shields等人1995,《生物化学杂志》276:6591)。已对IgG1的位置233-236处进行氨基酸修饰以降低与Fc $\gamma$ R的结合(Ward和Ghetie 1995,《治疗免疫学(Therapeutic Immunology)》2:77;和Armour等人1999,《欧洲免疫学杂志(Eur.J.Immunol.)》29:2613)。一些示范性的氨基酸取代描述于美国专利第7,355,008号和第7,381,408号中,所述专利中的每一个以全文引用的方式并入本文中。

[0172] 在一些实施例中,结合剂融合到碱性磷酸酶(AP)。用于制备Fc或AP融合剂的方法提供于WO 02/060950中。

[0173] 嵌合抗原受体(CAR)

[0174] 在示范性方面中,效应域是T细胞信号传导域。在示范性方面中,缀合物是嵌合抗原受体(CAR)。嵌合抗原受体(CAR)是经过工程改造的跨膜蛋白,其将抗原-特异性抗体的特异性与T细胞受体功能组合起来。一般来说,CAR包含胞外域、跨膜域和胞内域。在示范性方面中,CAR的胞外域包含抗原识别区域,其可以是抗原-特异性抗体的scFv。在一些实施例中,胞外域也包含将新生蛋白质引入内质网中的信号肽。在示范性方面中,胞外域包含将抗原识别区连接到跨膜域的间隔区。跨膜(TM)域是穿越细胞膜的CAR的部分。在示范性方面中,TM域包含疏水性 $\alpha$ 螺旋。在示范性方面中,TM域包含CD28的TM域的全部或一部分。在示范性方面中,TM域包含CD8 $\alpha$ 的TM域的全部或一部分。CAR的胞内域包含一个或多个信号传导域。在示范性方面中,胞内域包含CD3的 $\zeta$ 链,其包含免疫受体酪氨酸基活化基元(ITAM)的三个拷贝。ITAM一般包含由来自Leu或Ile的两个氨基酸分隔开的Tyr残基。在免疫细胞受体例如T细胞受体 and B细胞受体的情况下,ITAM多次出现(至少两个)并且每一个ITAM通过6-8个氨基酸与另一ITAM分隔开。CAR的胞内域还可以包含对下游信号转导至关重要的额外信号传导域,例如蛋白质部分。在示范性方面中,胞内域包含来自CD28、41BB或4-1BB(CD137)、ICOS、CD27、CD40、OX40(CD134)或Myd88中的一个或多个的信号传导域。编码这类蛋白质的信号传导域的序列在本文中SEQ ID NO:39-42、68-79、81和83形式提供。制备CAR、在例如T细胞的细胞中表达CAR和在疗法中利用CAR表达T细胞的方法在所属领域中已知。参见例如国际专利申请公开第W02014/208760号、第W02014/190273号、第W02014/186469号、第W02014/184143号、第W02014180306号、第W02014/179759号、第W02014/153270号;美国申请公开第US20140369977号、第US20140322212号、第US20140322275号、第US20140322183号、第US20140301993号、第US20140286973号、第US20140271582号、第US20140271635号、第US20140274909号;欧洲申请公开第2814846号,其中的每一个以全文引用的方式并入。

[0175] 在示范性方面中,本公开的缀合物是IL13R $\alpha$ 2特异性嵌合抗原受体(CAR),其包含本文所描述的结合剂、铰链区和胞内域,所述胞内域包含CD3 $\zeta$ 链的信号传导域和CD28、CD134和/或CD137的信号传导域的。在示范性方面中,CAR包含(A)以下的氨基酸序列中的每一个:NYLMN(SEQ ID NO:1);RIDPYDGDIDYNQNFKD(SEQ ID NO:2);GYGTAYGVVDY(SEQ ID NO:3);RASESVDNYGISFMN(SEQ ID NO:4);AASRQSG(SEQ ID NO:5);和QQSKEVPWT(SEQ ID NO:6);(B)铰链区;和(C)胞内域,所述胞内域包含CD3 $\zeta$ 链的信号传导域和CD28、CD134和/或CD137的信号传导域。在示范性方面中,CD3 $\zeta$ 链信号传导域包含SEQ ID NO:41的氨基酸

序列。在示范性方面中，CAR基于CD28的跨膜(TM)域进一步包含TM域。在示范性方面中，CAR包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列。在示范性方面中，CAR基于CD8 $\alpha$ 的跨膜(TM)域进一步包含TM域。在示范性方面中，CAR包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列。在示范性方面中，铰链区包含SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在示范性方面中，CAR包含SEQ ID NO:49或SEQ ID NO:51的氨基酸序列。在示范性方面中，本公开的CAR的胞内域包含SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:55的氨基酸序列。在示范性方面中，本公开的CAR的胞内域包含SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:89的氨基酸序列。在示范性方面中，本公开的CAR的胞内域包含SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:93或SEQ ID NO:95的氨基酸序列。在示范性方面中，本公开的CAR的胞内域包含SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:99或SEQ ID NO:101的氨基酸序列。

[0176] 在示范性方面中，胞内域进一步包含以下中的一种或多种的信号传导域：CD137、CD134、CD27、CD40、ICOS和Myd88。在示范性方面中，胞内域包含SEQ ID NO:68、70、72、74、76和78的氨基酸序列中的一个或多个，上述氨基酸序列分别提供包含CD27信号传导域的序列、包含CD40信号传导域的序列、包含CD134信号传导域的序列、包含CD137信号传导域的序列、包含ICOS信号传导域的序列和包含Myd88信号传导域的序列。

[0177] 在示范性方面中，CAR包含(A)以下的氨基酸序列中的每一个：NYLMN(SEQ ID NO:1)；RIDPYDGDIDYNQNFKD(SEQ ID NO:2)；GYGTAYGVDY(SEQ ID NO:3)；RASESVDNYGISFMN(SEQ ID NO:4)；AASRQSG(SEQ ID NO:5)；和QQSKEVPWT(SEQ ID NO:6)；(B)铰链区；(C)胞内域，所述胞内域包含CD3 $\zeta$ 链的信号传导域和CD28的信号传导域和至少一个其它信号传导域。在示范性方面中，CAR包含包含41BB的信号传导域(CD137)的胞内域。在示范性方面中，CAR包含包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的胞内域。在示范性方面中，CD137信号传导是CD3 $\zeta$ 链信号传导链的N端。在示范性方面中，胞内域包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列。在示范性方面中，CAR包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列。在示范性方面中，CAR包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列。

[0178] 在示范性方面中，CAR包含包含OX40的信号传导域(CD134)的胞内域。在示范性方面中，CAR包含包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的胞内域。在示范性方面中，CD137信号传导是CD3 $\zeta$ 链信号传导链的N端。在示范性方面中，胞内域包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列。在示范性方面中，CAR包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列。在示范性方面中，CAR包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列。

[0179] 在示范性方面中，CAR包含(A)以下的氨基酸序列中的每一个：NYLMN(SEQ ID NO:1)；RIDPYDGDIDYNQNFKD(SEQ ID NO:2)；GYGTAYGVDY(SEQ ID NO:3)；RASESVDNYGISFMN(SEQ ID NO:4)；AASRQSG(SEQ ID NO:5)；和QQSKEVPWT(SEQ ID NO:6)；(B)铰链区；(C)CD8 $\alpha$ 链的跨膜域；和(D)胞内域，所述胞内域包含CD3 $\zeta$ 链的信号传导域和任选地至少一个其它信号传导域。在示范性方面中，跨膜域包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列。在示范性方面中，CAR进一步包含CD137信号传导域和CD3 $\zeta$ 链信号传导域。在示范性方面中，CAR包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。在示范性方面中，CAR包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列。

[0180] 作为一实例，提供三种额外IL13R $\alpha$ 2特异性CAR的序列。一种CAR含有CD8 $\alpha$ TM域和41BB. $\zeta$ 信号传导域(由SEQ ID NO:94编码的SEQ ID NO:93)。其它两种CAR含有CD28 TM域和CD28.CD134. $\zeta$ (由SEQ ID NO:100编码的SEQ ID NO:99)或CD28.CD137. $\zeta$ (由SEQ ID NO:102编码的SEQ ID NO:101)信号传导域。

[0181] 核酸、载体、宿主细胞

[0182] 本公开进一步提供一种核酸,其包含编码本文所描述的结合剂和缀合物(例如嵌合蛋白、融合蛋白、CAR)中的任一种的核苷酸序列。核酸可以包含编码本文所描述的结合剂和缀合物中的任一种的任何核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:1-6的CDR中的每一个的核苷酸序列。在示范性方面中,本公开的核酸包含编码SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:8的核苷酸序列。在示范性方面中,本公开的核酸包含编码SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的核苷酸序列。在示范性方面中,本文所提供的核酸包含SEQ ID NO:15和/或SEQ ID NO:16的序列。在示范性方面中,核酸包含SEQ ID NO:66或67的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:25的序列的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含SEQ ID NO:26的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:1-6中的每一个并且编码SEQ ID NO:28或30的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:1-6中的每一个并且编码与SEQ ID NO:28或30至少90%一致的氨基酸序列的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:1-6中的每一个并且包含SEQ ID NO:29或31的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:33的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含SEQ ID NO:34的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:1-6中的每一个并且编码SEQ ID NO:35或37的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:1-6中的每一个并且包含SEQ ID NO:36或38的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:1-6中的每一个并且编码SEQ ID NO:39或41的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:1-6中的每一个并且包含SEQ ID NO:40或42的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:1-6中的每一个并且编码SEQ ID NO:47的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:1-6中的每一个并且包含SEQ ID NO:48的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:1-6中的每一个并且编码SEQ ID NO:49或51的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:1-6中的每一个并且包含SEQ ID NO:50或52的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:53或55的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:1-6中的每一个并且包含SEQ ID NO:54或56的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:1-6中的每一个并且编码SEQ ID NO:68、70、72、74、76和78中的一个或多个的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:1-6中的每一个并且包含SEQ ID NO:69、71、73、75、77和79中的一个或多个的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含编码SEQ ID NO:1-6中的每一个并且包含SEQ ID NO:82、84、86、88、90、92、94、96中的一个或多个的核苷酸序列。在示范性方面中,核酸包含包含SEQ ID NO:98、100和102中的一个的核苷酸序列。

[0183] 如本文所用,“核酸”包括“聚核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”,并且一般意指DNA或RNA的聚合物,其可以是单链或双链的,合成的或从天然来源中获得(例如分离和/或纯化),其可以含有天然、非天然或改变的核苷酸,并且其可以含有天然、非天然或改变的核苷酸间连接,如氨基磷酸酯连接或硫代磷酸酯连接,而不是发现于未经修饰的寡核苷酸的核苷酸之间的磷酸二酯。一般优选的是核酸不包含任何插入、缺失、倒置和/或取代。然而,如本文所论述,在一些情况下核酸包含一个或多个插入、缺失、倒置和/或取代可能合适。

[0184] 在示范性方面中,本公开的核酸是重组的。如本文所使用,术语“重组(的)”是指

(i) 通过将天然或合成的核酸片段接合到可以在活细胞中复制的核酸分子而构筑在活细胞外部的分子,或(ii)由上文(i)中所描述的那些分子的复制产生的分子。出于本文的目的,复制可以是体外复制或体内复制。

[0185] 在示范性方面中,核酸基于化学合成和/或酶连接反应使用所属领域中已知的程序构筑。参见例如Sambrook等人,前述,和Ausubel等人,前述。举例来说,核酸可以使用天然存在的核苷酸或各种各样经过修饰的核苷酸以化学方式合成,所述经过修饰的核苷酸经过设计以增加分子的生物稳定性或增加杂交时形成的双螺旋体的物理稳定性(例如硫代磷酸酯衍生物和吡啶取代的核苷酸)。可以用于产生核酸的经过修饰的核苷酸的实例包括但不限于5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰基胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 $\beta$ -D-半乳糖基Q核苷、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N-取代的腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 $\beta$ -D-甘露糖基Q核苷、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、丁氧核苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、Q核苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。或者,本公开的核酸中的一个或多个可以购自如Macromolecular Resources(科罗拉多州柯林斯堡(Fort Collins,CO))和Synthegen(德克萨斯州休斯顿(Houston,TX))的公司。

[0186] 在示范性方面中,本公开的核酸并入重组表达载体中。在这点上,本公开提供包含本公开的核酸中的任一个的重组表达载体。出于本文的目的,术语“重组表达载体”意指基因修饰的寡核苷酸或聚核苷酸构筑体,当构筑体包含编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列,并且载体在足以使mRNA、蛋白质、多肽、或肽在细胞内表达的条件下与细胞接触时,所述构筑体准许由宿主细胞表达mRNA、蛋白质、多肽或肽。本公开的载体总体上不是天然存在的。然而,载体的部分可以是天然存在的。本发明的重组表达载体可以包含任何类型的核苷酸,包括但不限于如下DNA和RNA:其可以是单链或双链的,合成的或部分地从天然来源中获得,并且其可以含有天然、非天然或改变的核苷酸。重组表达载体可以包含天然存在或非天然存在的核苷酸间连接,或这两种类型的连接。在示范性方面中,改变的核苷酸或非天然存在的核苷酸间连接不阻碍载体的转录或复制。

[0187] 本公开的重组表达载体可以是任何合适的重组表达载体,并且可以用于转化或转染任何合适的宿主。合适的载体包括经过设计用于扩展和扩增或用于表达或以上两项的那些载体,如质粒和病毒。载体可以选自由以下组成的组:pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene,加利福尼亚州拉荷亚(LaJolla,CA))、pET系列(Novagen,威斯康星州麦迪逊(Madison,WI))、pGEX系列(Pharmacia Biotech,瑞典乌普萨拉(Uppsala,Sweden))和pEX系列(Clontech,加利福尼亚州帕洛阿尔托(Palo Alto))。也可以使用噬菌体载体,如 $\lambda$ GT10、 $\lambda$ GT11、 $\lambda$ ZapII(Stratagene)、 $\lambda$ EMBL4和 $\lambda$ NM1149。植物表达载体的实例包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的实例包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。优选地,重组表达载体是病毒载体,例如反转录病毒载体。

[0188] 本公开的重组表达载体可以使用描述于例如Sambrook等人,前述和Ausubel等人,前述中的标准重组DNA技术制备。可以制备环形或线性的表达载体构筑体以在原核或真核宿主细胞中含有复制系统功能。复制系统可以衍生自例如CoIE1、2 $\mu$ 质粒、 $\lambda$ 、SV40、牛乳头瘤病毒等等。

[0189] 在示范性方面中,重组表达载体包含调节序列,如转录与翻译起始和终止密码子,其按需要并且考虑载体是否是基于DNA或RNA的而对待引入载体的宿主类型(例如细菌、真菌、植物或动物)具有特异性。

[0190] 重组表达载体可以包括一个或多个允许选择转化或转染的宿主的标记基因。标记基因包括杀生物剂抗性,例如对抗生素、重金属等的抗性,在营养缺陷型宿主中提供原营养的互补性等等。用于本发明表达载体的合适的标记基因包括例如新霉素/G418抗性基因、潮霉素抗性基因、组氨酸(histidinol)抗性基因、四环素抗性基因和安比西林(ampicillin)抗性基因。

[0191] 重组表达载体可以包含原生或正常启动子,所述启动子可操作地连接到编码结合剂或缀合物的核苷酸序列,或与编码结合剂或缀合物的核苷酸序列互补或与其杂交的核苷酸序列。启动子的选择,例如强、弱、诱导型、组织特异性和发育特异性,在从业者的普通技能内。

[0192] 类似地,核苷酸序列与启动子的组合也在从业者的技能内。启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,例如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子和鼠类干细胞病毒的长末端重复序列中所发现的启动子。

[0193] 本发明的重组表达载体可以经过设计用于短暂表达、用于稳定表达或用于两者。同样,重组表达载体可以经过制备用于组成型表达或用于诱导型表达。此外,重组表达载体可以经过制备以包括自杀基因。

[0194] 如本文所使用,术语“自杀基因”是指造成表达自杀基因的细胞死亡的基因。自杀基因可以是如下基因:给表达所述基因的细胞时赋予对药剂例如药物的敏感性,并且当细胞与药剂接触或暴露于药剂时造成细胞死亡。自杀基因在所属领域中已知(参见例如《自杀基因疗法:方法和评论》(Suicide Gene Therapy:Methods and Reviews.)》Springer, Caroline J. (Maycer研究所的Maycer治疗剂的Maycer研究英国中心(Maycer Research UK Centre for Maycer Therapeutics at the Institute of Maycer Research),英国萨里萨顿(Sutton,Surrey)),胡马纳出版社(Humana Press),2004),并且包括例如单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因、胞嘧啶脱氨酶、嘌呤核苷磷酸化酶和硝基还原酶。

[0195] 本公开进一步提供包含本文所描述的核酸或载体中的任一种的宿主细胞。如本文所使用,术语“宿主细胞”是指可以含有本文所描述的核酸或载体的任何类型的细胞。在示范性方面中,宿主细胞是真核细胞,例如植物、动物、真菌或海藻;或可以是原核细胞,例如细菌或原生动物。在示范性方面中,如本文所描述,宿主细胞是起源于或获自个体的细胞。在示范性方面中,宿主细胞来源于或获自哺乳动物。如本文所使用,术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物,包括但不限于啮齿目(order Rodentia)哺乳动物,如小鼠和仓鼠;和兔形目(order Lagomorpha)哺乳动物,如兔。优选地,哺乳动物来自食肉目(order Carnivora),包括猫科动物(猫)和犬科动物(犬)。更优选地,哺乳动物来自偶蹄目(order Artiodactyla),包括牛科动物(牛)和猪科动物(猪),或属于奇蹄目(order



Perssodactyla), 包括马科动物(马)。最优选地, 哺乳动物属于灵长目(order Primate)、新世界猴类(Ceboids)或狐猴类(Simoids)(猴)或属于类人猿亚目(order Anthropoids)(人类和猿)。特别优选的哺乳动物是人类。

[0196] 在示范性方面中, 宿主细胞是培养细胞或原代细胞, 即, 直接从生物体例如人类中分离。在示范性方面中, 宿主细胞是粘附细胞或悬浮细胞, 即, 在悬浮液中生长的细胞。合适的宿主细胞在所属领域中已知并且包括例如DH5 $\alpha$ 大肠杆菌细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、猴VERO细胞、T293细胞、COS细胞、HEK293细胞等等。出于扩增或复制重组表达载体的目的, 宿主细胞优选是原核细胞, 例如DH5 $\alpha$ 细胞。出于产生结合剂或缀合物的目的, 在一些方面中, 宿主细胞是哺乳动物细胞。在示范性方面中, 宿主细胞是人类细胞。虽然宿主细胞可以具有任何细胞类型, 但宿主细胞可以来源于任何类型的组织, 并且可以具有任何发育阶段。在示范性方面中, 宿主细胞是造血干细胞或祖细胞。参见例如Nakamura De Oliveira等人, 《人类基因疗法(Human Gene Therapy)》24:824-839(2013)。在示范性方面中, 宿主细胞是外周血液淋巴细胞(PBL)。在示范性方面中, 宿主细胞是自然杀伤细胞。在示范性方面中, 宿主细胞是T细胞。

[0197] 出于本文的目的, T细胞可以是任何T细胞, 如培养T细胞, 例如原代T细胞, 或来自培养T细胞系的T细胞, 例如Jurkat、SupT1等, 或获自哺乳动物的T细胞。如果获自哺乳动物, 那么T细胞可以获自诸多来源, 包括但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其它组织或流体。T细胞还可以被富集或被化。T细胞可以通过在体外或体内将造血干细胞成熟化成T细胞而获得。在示范性方面中, T细胞是人类T细胞。在示范性方面中, T细胞是从人类中分离的T细胞。T细胞可以是任何类型的T细胞, 包括NKT细胞, 并且可以具有任何发育阶段, 包括但不限于CD4 $^+$ /CD8 $^+$ 双阳性T细胞; CDA $^+$ 辅助T细胞; 例如Th1和Th2细胞, CD8 $^+$ T细胞(例如细胞毒性T细胞); 外周血液单核细胞(PBMC); 外周血液白细胞(PBL); 肿瘤浸润细胞(TIL); 记忆T细胞; 未处理T细胞等等。优选地, T细胞是CD8 $^+$ T细胞或CD4 $^+$ T细胞。

[0198] 本公开还提供包含至少一种本文所描述的宿主细胞的细胞群体。细胞群体可以是异质群体, 除至少一种其它细胞以外, 所述异质群体包含包含任一种所描述重组表达载体的宿主细胞, 所述至少一种其它细胞例如不包含任一种重组表达载体的宿主细胞(例如T细胞), 或不为T细胞的细胞, 例如B细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、红细胞、肝细胞、内皮细胞、上皮细胞、肌肉细胞、脑细胞等。或者, 细胞群体可以是基本上均质的群体, 其中群体主要包含包含重组表达载体(例如基本上由重组表达载体组成)的宿主细胞。群体也可以是细胞克隆群体, 其中群体的所有细胞是包含重组表达载体的单一宿主细胞的克隆, 使得群体的所有细胞包含重组表达载体。在本公开的示范性实施例中, 细胞群体是包含表达本文所描述的核酸或载体的宿主细胞的克隆群体。

[0199] 医药组合物和给药途径

[0200] 在本公开的一些实施例中, 结合剂、缀合物、核酸、载体、宿主细胞或细胞群体与药学上可接受的载剂掺合。相应地, 涵盖医药组合物, 其包含本文所描述的结合剂、缀合物、核酸、载体、宿主细胞或细胞群体中的任一种, 并且包含药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。

[0201] 药学上可接受的载剂是常规使用的那些载剂中的任一种, 并且仅受到物理-化学考虑因素(如溶解性和与活性结合剂的反应性的缺乏)限制, 并且受给药途径限制。本文所

描述的药学上可接受的载剂,例如媒剂、佐剂、赋形剂和稀释剂为所属领域的技术人员所熟知并且公众可容易获得。在一个方面中,药学上可接受的载剂是对医药组合物的活性成分例如第一结合剂和第二结合剂具有化学惰性的载剂,并且是在使用条件下不具有不利的副作用或毒性的载剂。在一些实施例中,当向动物或人类给予时,载体不产生不良、过敏或其它不适当的反应。在一些方面中,医药组合物不含热原质以及会对人类或动物有害的其它杂质。药学上可接受的载剂包括任何和所有溶剂、分散介质、涂料、抗细菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等等;其用途在所属领域中是众所周知。

[0202] 可接受的载剂、赋形剂或稳定剂对接受者无毒性并且优选在所采用的剂量和浓度下是惰性的,并且包括缓冲液,如磷酸盐、柠檬酸盐或其它有机酸;抗氧化剂,如抗坏血酸;低分子量多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖醇,如甘露糖醇或山梨糖醇;盐形成抗衡离子,如钠;和/或非离子表面活性剂,如Tween、Pluronic 或聚乙二醇(PEG)。

[0203] 适用于实施本文所公开的方法的组合物的治疗配制物,如多肽、聚核苷酸或抗体,可以通过以冻干饼或水溶液的形式将具有所期望纯度的所选择组合物与任选的生理学上药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂混合(《雷明顿的药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第18版,A.R.Gennaro编,马克出版公司(Mack Publishing Company)(1990))来制备用于储存。医药组合物可以通过与一种或多种合适的载剂或佐剂掺合来制造,所述载剂或佐剂如水、矿物油、聚乙二醇、淀粉、滑石、乳糖、增稠剂、稳定剂、悬浮剂等等。这类组合物可以呈溶液、悬浮液、片剂、胶囊、乳膏、油膏、软膏的形式或呈其它常规形式。

[0204] 体内给药所用的组合物应为无菌的。这通过在冻干和复原之前或之后经由无菌过滤膜过滤容易地实现。治疗性组合物一般置于具有无菌接入端口的容器中,例如具有可被皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶。适用于可注射用途的医药形式包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。在一些情况下,所述形式应为无菌的,并且应是流体,以达到能够易于注射的程度。其应在制造和储存的条件下稳定并且应被保存以免遭微生物如细菌和真菌的污染作用。用于肠胃外给药的组合物通常将以冻干形式或以溶液形式储存。

[0205] 载剂可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等等)、其合适的混合物和植物油的溶剂或分散介质。适当的流动性可以例如通过使用涂层如卵磷脂、在分散液情况下通过维持所需粒径和通过使用表面活性剂来维持。微生物作用的预防可以通过各种抗细菌剂和/或抗真菌剂例如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等等来实现。在许多情况下,优选的将是包括等张剂,例如糖或氯化钠。可注射组合物的长期吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收剂例如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0206] 载剂的选择将部分地通过医药组合物的结合剂的特定类型以及通过用以给予医药组合物的特定途径来确定。相应地,存在各种合适的医药组合物的配制物。

[0207] 本发明的医药组合物可以包含任何药学上可接受的成份,包括例如酸化剂、添加剂、吸附剂、气雾剂推进剂(aerosol propellant)、空气置换剂、碱化剂、防结块剂、抗凝剂、抗微生物防腐剂、抗氧化剂、抗菌剂(antiseptic)、基质、粘合剂、缓冲剂、螯合剂、涂

布剂、着色剂、干燥剂、清洁剂、稀释剂、消毒剂(disinfectant)、崩解剂、分散剂、溶解增强剂、染料、润肤剂、乳化剂、乳液稳定剂、填充剂、成膜剂、香味增强剂、调味剂、流动增强剂、胶凝剂、粒化剂、保温剂、润滑剂、粘膜粘着剂、软膏基质、软膏、油性媒剂、有机碱、锭剂基质、颜料、增塑剂、抛光剂、防腐剂、多价螯合剂、皮肤渗透剂、增溶剂、溶剂、稳定剂、栓剂基质、表面活性剂(surface active agent)、表面活性剂(surfactant)、悬浮剂、甜味剂、治疗剂、增稠剂、张力剂、毒性剂、增粘剂、吸水剂、水可混溶性共溶剂、水软化剂或湿润剂。

[0208] 医药组合物可以经过配制以获得生理学上相容的pH。在一些实施例中,取决于配制物和给药途径,医药组合物的pH可以是至少5、至少5.5、至少6、至少6.5、至少7、至少7.5、至少8、至少8.5、至少9、至少9.5、至少10或至少10.5到并且包括pH 11。在某些实施例中,医药组合物可以包含缓冲剂以获得生理学上相容的pH。缓冲剂可以包括能够在所期望的pH下缓冲的任何化合物,例如磷酸盐缓冲液(例如PBS)、三乙醇胺、Tris、二甘氨酸、TAPS、麦黄酮、HEPES、TES、MOPS、PIPES、甲次砷酸盐、MES和所属领域中已知的其它化合物。

[0209] 在一些实施例中,包含本文所描述的结合剂的医药组合物经过配制用于肠胃外给药、皮下给药、静脉内给药、肌内给药、动脉内给药、鞘内给药或腹膜内给药。在其它实施例中,医药组合物通过经鼻、喷雾、口服、气雾剂、直肠或阴道给药来给予。组合物可以通过输注、快速注射或通过植入装置来给予。

[0210] 仅提供关于给药途径的以下论述来说明示范性实施例并且不应解释为以任何方式限制所公开主题的范围。

[0211] 适用于口服给药的配制物可以由以下组成:(a)液体溶液,如有效量的本发明组合物溶解于稀释剂如水、盐水或橙汁中;(b)胶囊、药囊、片剂、糖锭和糖衣锭,每一种含有预定量的活性成分,呈固体或颗粒形式;(c)粉末;(d)适当液体中的悬浮液;和(e)合适的乳剂。液体配制物可以包括稀释剂,如水和醇,例如乙醇、苯甲醇和聚乙烯醇,其中添加有或未添加药学上可接受的表面活性剂。胶囊形式可以具有含有例如表面活性剂、润滑剂和惰性填充剂如乳糖、蔗糖、磷酸钙和玉米淀粉的普通硬壳或软壳明胶类型。片剂形式可以包括以下中的一种或多种:乳糖、蔗糖、甘露糖醇、玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸、微晶纤维素、阿拉伯胶、明胶、瓜尔胶、胶态二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸锌、硬脂酸和其它赋形剂、着色剂、稀释剂、缓冲剂、崩解剂、湿润剂、防腐剂、调味剂和其它药理学上相容的赋形剂。糖锭形式可以包含于通常蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍的调味剂中的本公开组合物,以及锭剂包含于如明胶和丙三醇或蔗糖和阿拉伯胶的惰性基质中的本公开组合物,乳液、凝胶等等任选地也含有如所属领域中已知的这类赋形剂。

[0212] 单独或与其它适合组分组合的本发明组合物可以经由肺部给药递送,并且可以制成待经由吸入给予的气雾剂配制物。这些气雾剂配制物可以置于可接受的加压推进剂如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等等中。其也可以被配制为如在喷雾器或雾化器中的非加压制剂的医药。这类喷雾配制物也可以用于喷雾粘膜。在一些实施例中,组合物被配制成粉末掺合物或微米粒子或纳米粒子。合适的肺部配制物在所属领域中已知。参见例如Qian等人,《国际医药学杂志(Int J Pharm)》366:218-220(2009);Adjei和Garren,《医药研究(Pharmaceutical Research)》,7(6):565-569(1990);Kawashima等人,《控制释放杂志(J Controlled Release)》62(1-2):279-287(1999);Liu等人,《医药研究》10(2):228-232(1993);国际专利申请公开第W0 2007/133747号和第W0 2007/141411号。

[0213] 局部配制物为所属领域的技术人员所熟知。这类配制物在本发明的背景下尤其适于施用到皮肤。

[0214] 在一些实施例中,本文所描述的医药组合物经过配制用于肠胃外给药。出于本文的目的,肠胃外给药包括但不限于静脉内、动脉内、肌内、脑内、脑室内、心内、皮下、骨内、皮内、鞘内、腹膜内、眼球后、肺内、膀胱内和阴茎海绵体内注射或输注。也涵盖通过在特定部位处手术植入的给药。

[0215] 适用于肠胃外给药的配制物包括水性和非水性等张无菌注射溶液,其可以含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和使配制物与预期接受者的血液等张的溶解物;以及水性和非水性无菌悬浮液,其可以包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。术语“肠胃外”意指不經由消化道而是通过如皮下、肌内、脊柱内或静脉内的某一其它途径。本发明的组合物可以在医药载剂中与生理学上可接受的稀释剂一起给予,所述医药载剂如无菌液体或液体的混合物,包括水、盐水、右旋糖水溶液和相关糖溶液、醇(如乙醇或十六醇)、二醇(如丙二醇或聚乙二醇)、二甲亚砜、甘油、缩酮(如2,2-二甲基-1,5,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇)、醚、聚(乙二醇)400、油、脂肪酸、脂肪酸酯或甘油酯、或乙酰化脂肪酸甘油酯,其中添加有或未添加药学上可接受的表面活性剂(如皂或清洁剂)、悬浮剂(如果胶)、卡波姆(carbomer)、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素、或乳化剂和其它医药佐剂。

[0216] 可以用于肠胃外配制物中的油包括石油、动物油、植物油或合成油。油的具体实例包括花生油、大豆油、芝麻油、棉籽油、玉米油、橄榄油、石蜡油和矿物油。用于肠胃外配制物中的合适的脂肪酸包括油酸、硬脂酸和异硬脂酸。油酸乙酯和十四烷酸异丙酯是合适脂肪酸酯的实例。

[0217] 在一些实施例中,肠胃外配制物含有防腐剂或缓冲液。为了将注射部位处的刺激降到最小或消除,这类组合物任选地含有一种或多种具有约12到约17的亲水-亲油平衡(HLB)的非离子表面活性剂。这类配制物中的表面活性剂的量典型地在约5重量%到约15重量%范围内。合适的表面活性剂包括聚乙二醇脱水山梨糖醇脂肪酸酯,如脱水山梨糖醇单油酸酯;和氧化乙烯与通过氧化丙烯与丙二醇缩合形成的疏水性基质的高分子量加合物。肠胃外配制物可以存在于单位剂量或多剂量密封容器如安瓿和小瓶中,并且可以储存于冷冻干燥(冻干)条件下,仅需要在即将使用之前添加无菌液体赋形剂,例如注射用水。临时注射溶液和悬浮液可以由先前描述并且在所属领域中已知的种类的无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0218] 可注射配制物是根据本发明。所属领域的普通技术人员熟知用于可注射组合物的有效医药载剂的要求(参见例如《制药学和药学实践(Pharmaceutics and Pharmacy Practice)》,J.B.利平科特公司(J.B.Lippincott Company),宾夕法尼亚州费城(Philadelphia),Banker和Chalmers编,第238-250页(1982);和《可注射药物的ASHP手册(ASHP Handbook on Injectable Drugs)》,Toissel,第4版,第622-630页(1986))。

[0219] 所属领域的技术人员应了解,除上述医药组合物以外,本公开的组合物可以被配制成包合物,如环糊精包合物,或脂质体。

[0220] 剂量

[0221] 出于本文的目的,在合理的时间范围内,所给予的医药组合物的量或剂量在个体或动物中足以发挥作用,例如治疗或预防应答。举例来说,医药组合物的剂量足以自给药

时间起在约12小时、约18小时、约1到4天或更长,例如5天、6天、1周、10天、2周、16到20天或更长时间的周期内治疗或预防疾病或医学病状。在某些实施例中,时间段甚至更长。剂量通过特定医药组合物的功效和动物(例如人类)的条件以及待治疗的动物(例如人类)的体重来确定。

[0222] 用于确定给予剂量的许多分析在所属领域中已知。在一些实施例中,一种分析用以确定待给予到哺乳动物的起始剂量,所述分析包含在一组每一只被给予不同剂量的结合剂的哺乳动物中,向一哺乳动物给予给定剂量时,比较结合剂阻断IL13R $\alpha$ 2介导的细胞生长的程度。在给予某一剂量时结合剂阻断IL13R $\alpha$ 2介导的细胞生长的程度可以通过所属领域中已知的方法分析。

[0223] 也将通过给予特定医药组合物可能伴随产生的任何不良副作用的存在、性质和程度来确定医药组合物的剂量。典型地,主治医生将考虑到各种因素如年龄、体重、一般健康状况、饮食、性别、待给予的医药组合物的结合剂、给药途径和被治疗的病状的严重程度,来决定用于治疗每一个别患者的医药组合物的剂量。

[0224] 通过实例并且不意图限制本发明,本发明结合剂的剂量可以是约0.0001到约1克/被治疗个体的千克体重/天、约0.0001到约0.001克/千克体重/天或约0.01毫克到约1克/千克体重/天。在一些方面中,医药组合物包含浓度是至少A的本发明结合剂,其中A是约0.001mg/ml、约0.01mg/ml、约0.1mg/ml、约0.5mg/ml、约1mg/ml、约2mg/ml、约3mg/ml、约4mg/ml、约5mg/ml、约6mg/ml、约7mg/ml、约8mg/ml、约9mg/ml、约10mg/ml、约11mg/ml、约12mg/ml、约13mg/ml、约14mg/ml、约15mg/ml、约16mg/ml、约17mg/ml、约18mg/ml、约19mg/ml、约20mg/ml、约21mg/ml、约22mg/ml、约23mg/ml、约24mg/ml、约25mg/ml或更高。在一些实施例中,医药组合物包含浓度是至多B的结合剂,其中B是约30mg/ml、约25mg/ml、约24mg/ml、约23mg/ml、约22mg/ml、约21mg/ml、约20mg/ml、约19mg/ml、约18mg/ml、约17mg/ml、约16mg/ml、约15mg/ml、约14mg/ml、约13mg/ml、约12mg/ml、约11mg/ml、约10mg/ml、约9mg/ml、约8mg/ml、约7mg/ml、约6mg/ml、约5mg/ml、约4mg/ml、约3mg/ml、约2mg/ml、约1mg/ml或约0.1mg/ml。在一些实施例中,组合物可以含有浓度范围是A到B mg/ml,例如约0.001到约30.0mg/ml的类似物。

[0225] 额外给药指导可以根据其它抗体治疗剂估量,所述其它抗体治疗剂如贝伐单抗(bevacizumab) (Avastin<sup>TM</sup> Genentech)、西妥昔单抗(西妥昔单抗) (Exbitux<sup>TM</sup> Imclone)、帕尼单抗(Panitumumab) (Vectibix<sup>TM</sup> Amgen) 和曲妥珠单抗(Trastuzumab) (Herceptin<sup>TM</sup> Genentech)。

[0226] 给药时序

[0227] 可以根据任何方案给予所公开的医药配制物,所述方案包括例如每天(每天1次、每天2次、每天3次、每天4次、每天5次、每天6次)、每两天、每三天、每四天、每五天、每六天、每周、每两周、每三周、每月或每两月。类似于给药,时序可以基于剂量反应研究、功效和毒性数据细调,并且最初基于用于其它抗体治疗剂的时序来估量。

[0228] 控制释放配制物

[0229] 在某些方面中,医药组合物被修改成长效制剂形式(depot form),使得医药组合物的活性成分(例如结合剂)释放于给予其的身体中的方式在时间和身体内的位置方面受到控制(参见例如美国专利第4,450,150号)。在各种方面中,长效制剂形式包括例如包含

多孔或无孔材料如聚合物的可植入组合物,其中结合剂通过材料和/或无孔材料的降解来囊封或贯穿材料而扩散。随后长效制剂植入身体内的所期望位置中并且结合剂以预定速率从植入物中释放。

[0230] 相应地,在某些方面中,医药组合物经过修改以具有任何类型的体内释放曲线。在一些方面中,医药组合物是立即释放、控制释放、持续释放、延长释放、延迟释放或两相释放配制物。配制用于控制释放的肽(例如肽结合剂)的方法在所属领域中已知。参见例如 Qian 等人,《医药学杂志(J Pharm)》374:46-52 (2009) 和国际专利申请公开第 WO 2008/130158号、第WO2004/033036号、第WO2000/032218号和第WO 1999/040942 号。持续释放制剂的合适实例包括呈成型制品例如膜或微胶囊形式的半渗透聚合物基质。持续释放基质包括聚酯、水凝胶、聚丙烯交酯(美国专利第3,773,919号、EP 58,481)、L-谷氨酸与 $\gamma$ 乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman等人,《生物聚合物(Biopolymers)》,22: 547-556(1983))、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)(Langer等人,《生物医学材料研究杂志(J.Biomed.Mater.Res.)》,15:167-277(1981)和Langer,《化学技术(Chem.Tech.)》,12: 98-105(1982))、乙烯乙酸乙烯酯(Langer等人,前述)或聚-D(-)-3-羟基丁酸(EP 133,988)。持续释放组合物也可以包括脂质体,其可以通过所属领域中已知的若干方法中的一种制备(例如DE 3,218,121;Epstein等人,《美国国家科学院院刊》,82:3688-3692(1985);Hwang等人,《美国国家科学院院刊》,77:4030-4034(1980);EP 52,322;EP 36,676;EP 88,046;EP 143,949)。

[0231] 组合

[0232] 本公开的组合物可以单独采用或与其它药剂组合采用。在一些实施例中,给予多于一种类型的结合剂。举例来说,所给予的组合物例如医药组合物可以包含抗体以及 scFv。在一些实施例中,本公开的组合物连同另一治疗剂或诊断剂(包括本文所描述的那些药剂中的任一种)一起给予。与单独使用任何一种疗法相比,某些疾病例如癌症或患者可能适于组合药剂的治疗以获得相加效应或甚至协同效应。

[0233] 用途

[0234] 部分地基于本文所提供的数据,结合剂、缀合物、宿主细胞、细胞群体和医药组合物适用于治疗赘瘤、肿瘤或癌症。

[0235] 出于本发明的目的,如本文所使用,术语“治疗”和“预防”以及由其词干提取的词未必暗示100%或完全的治疗(例如治愈)或预防。相反,存在治疗或预防的变化程度,其中所属领域的一般技术人员认为具有潜在益处或治疗作用。在这方面中,本发明的方法可以在患者例如人类中提供癌症的任何量或任何水平的治疗或预防。此外,本文所公开的方法提供的治疗或预防可以包括对疾病例如被治疗或预防的癌症的一种或多种病状或症状的治疗或预防。同样,出于本文的目的,“预防”可以涵盖延迟疾病或其症状或病状的发作。

[0236] 本文所描述的材料和方法特别适用于抑制赘生性细胞生长或扩散;确切地说抑制结合剂所靶向的IL13R $\alpha$ 2起作用的赘生性细胞生长。

[0237] 可通过本公开的结合剂、缀合物、宿主细胞、细胞群体和医药组合物治疗的赘瘤包括实体肿瘤,例如癌瘤和肉瘤。癌瘤包括衍生自上皮细胞的浸润(例如侵袭)周围组织并且引起转移的恶性赘瘤。腺癌是衍生自腺组织或衍生自形成可识别腺结构的组织的癌瘤。另一广泛类别的癌症包括肉瘤和纤维肉瘤,其是细胞嵌入于纤维状或均质物质如胚胎结缔

组织中的肿瘤。本发明也提供治疗骨髓或淋巴系统的癌症的方法,所述癌症包括白血病、淋巴瘤和典型地不作为肿瘤块存在但分布在血管或淋巴网状系统中的其它癌症。进一步涵盖用于治疗以下的方法:成人和小儿肿瘤、实体肿瘤/恶性病的生长、粘液样和圆形细胞癌、局部晚期肿瘤、癌转移,包括淋巴性转移。本文所列举的癌症并不打算为限制性的。年龄(儿童和成人)、性别(男性和女性)、原发性和继发性、转移前和转移后、急性和慢性、良性和恶性、解剖位置癌症实施例和变化形式均是所涵盖的目标。癌症根据胚胎来源(例如癌瘤、淋巴瘤和肉瘤)、根据器官或生理系统并且通过杂项分组来分组。特定癌症可以在其分类中重叠,并且其在一组中的列举不将其从另一组中排除。

[0238] 可以被靶向的癌瘤包括肾上腺皮质癌、腺泡状癌、腺泡细胞癌、腺泡癌、腺囊癌、腺样囊性癌、腺样鳞状细胞癌、癌症腺瘤(cancer adenomatosum)癌、腺鳞癌、附属器癌、肾上腺皮质的癌症、肾上腺皮质癌、醛固酮产生癌、醛固酮分泌癌、肺泡癌、肺泡细胞癌、成釉细胞癌、壶腹癌、甲状腺退行性癌症、大汗腺癌、基底细胞癌、基底细胞癌、肺泡癌、粉刺状基底细胞癌、囊性基底细胞癌、硬斑病样基底细胞癌、多中心基底细胞癌、结节溃疡性基底细胞(nodulo-ulcerative basal cell)癌、有色基底细胞癌、硬化性基底细胞癌、表层基底细胞癌、基底细胞样癌、鳞状基底细胞癌、胆管癌、肝外胆管癌、肝内胆管癌、支气管肺泡癌、细支气管癌、细支气管细胞癌、支气管肺癌、髓样癌、胆管细胞癌、绒毛膜癌、脉络丛癌、透明细胞癌、泄殖腔源性癌、胶质癌、粉刺状癌、体癌、子宫体癌、皮质醇产生癌、筛形癌、圆柱形癌、圆柱形细胞癌、导管癌、腺管癌、前列腺导管癌、导管原位癌(ductal cancer in situ,DCIS)、分泌腺癌、胚胎癌、铠甲状癌(cancer en cuirasse)、子宫内膜癌、子宫内膜的癌症、子宫内膜样癌、表皮样癌、混肿瘤状癌(cancer ex mixed tumor)、多形性腺瘤外癌(cancer ex pleomorphic adenoma)、外生性癌、纤维板型癌、纤维软疣癌(cancer fibrosum)、滤泡性甲状腺癌、胃癌、凝胶样癌、胶状癌、巨大细胞癌、巨大细胞甲状腺癌、巨细胞癌、腺癌、颗粒细胞癌、肝细胞癌、许特尔(Hurthle)细胞癌、肾上腺样癌、婴儿型胚胎癌、胰岛细胞癌、乳房发炎性癌、原位癌、导管内癌、表皮内癌、上皮内癌、幼年型胚胎癌、库利奇茨基(Kulchitsky)细胞癌、大细胞癌、软脑膜癌、小叶癌、浸润性小叶癌、侵袭性小叶癌、小叶原位癌(lobular cancer in situ,LCIS)、淋巴上皮癌、髓样癌、髓质癌、甲状腺髓质癌、髓质甲状腺癌、黑色素癌、脑膜癌、默克(Merkel)细胞癌、变型细胞癌、微乳头状癌、软性癌(cancer molle)、粘液性癌、粘液癌(cancer muciparum)、粘液细胞癌、粘液表皮样癌、粘液癌(cancer mucosum)、黏液癌(mucous carcinoma)、鼻咽癌、神经内分泌皮肤癌(neuroendocrine cancer of the skin)、非浸润性癌、非小细胞癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、燕麦细胞癌、骨化性癌(cancer ossificans)、骨化性癌(osteoid carcinoma)、佩吉特氏(Paget's)骨病或乳房病、乳头状癌、乳头状甲状腺癌、壶腹周围癌、蔓延前癌(preinvasive carcinoma)、棘细胞癌、原发性中央型癌(primary intrasseous carcinoma)、肾细胞癌、疤痕癌、血吸虫性膀胱癌(schistosomal bladder carcinoma)、施奈德癌(Schneiderian carcinoma)、硬癌、皮脂癌、印指环状细胞癌、单工癌(cancer simplex)、小细胞癌、小细胞肺癌(SCLC)、梭形细胞癌、海绵体癌、鳞状癌、鳞状细胞癌、多形性低度恶性癌(terminal duct carcinoma)、退行性甲状腺癌、滤泡甲状腺癌、髓质甲状腺癌、乳头状甲状腺癌、小梁皮肤癌、移行细胞癌、管状癌、甲状腺未分化癌、子宫体癌、疣状癌、绒毛状癌(villous carcinoma)、绒毛状癌(cancer villosum)、卵黄囊癌、鳞状细胞

癌(确切地说头颈部鳞状细胞癌)、食道鳞状细胞癌和口癌。

[0239] 可以被靶向的肉瘤包括脂肪肉瘤、肺泡软部分肉瘤、成釉细胞肉瘤、禽肉瘤、葡萄样肉瘤、葡萄状肉瘤、鸡肉瘤、绿色肉瘤、软骨型肉瘤、肾脏透明细胞肉瘤、胚胎肉瘤、子宫内膜间质肉瘤、上皮状肉瘤、尤文氏(Ewing's)肉瘤、筋膜肉瘤(fascial sarcomas)、成纤维细胞肉瘤、飞禽肉瘤、巨大细胞肉瘤、粒细胞肉瘤、血管内皮细胞肉瘤、霍奇金氏(Hodgkin's)肉瘤、特发性多色出血性肉瘤、成免疫细胞B细胞肉瘤(immunoblastic sarcoma of B cell)、成免疫细胞T细胞肉瘤、詹森氏(Jensen's)肉瘤、卡波西氏(Kaposi's)肉瘤、库普弗(Kupffer)细胞肉瘤、白细胞肉瘤、淋巴肉瘤、黑色素肉瘤、混合细胞肉瘤、多肉瘤、淋巴管肉瘤、特发性出血性肉瘤、多潜能原发性骨肉瘤、成骨细胞肉瘤、成骨性肉瘤、骨膜外肉瘤、多晶型肉瘤、伪卡波西(Kaposi)肉瘤、网状细胞肉瘤、网状细胞脑肉瘤、横纹肌肉瘤、劳斯(Rous)肉瘤、软组织肉瘤、梭形细胞肉瘤、滑膜肉瘤、毛细血管扩张性肉瘤、骨的肉瘤(骨肉瘤(osteosarcoma))/恶性纤维组织细胞瘤和软组织肉瘤。

[0240] 可以被靶向的淋巴瘤包括AIDS相关淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、T细胞白血病/淋巴瘤、非洲淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、B细胞单核球淋巴瘤、牛恶性淋巴瘤、伯基特氏(Burkitt's)淋巴瘤、中央细胞淋巴瘤、皮肤淋巴瘤(lymphoma cutis)、弥漫性淋巴瘤、弥漫性淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、弥漫性淋巴瘤、混合小细胞和大细胞淋巴瘤、弥漫性淋巴瘤、小裂解细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、滤泡性中央细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、混合小裂解细胞和大细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、主要大细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、主要小裂解细胞淋巴瘤、巨大滤泡性淋巴瘤、巨大滤泡性淋巴瘤、肉芽肿性淋巴瘤、组织细胞淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、成免疫细胞淋巴瘤、大裂解细胞淋巴瘤、大非裂解细胞淋巴瘤、伦纳特氏(Lennert's)淋巴瘤、成淋巴细胞淋巴瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、中间性淋巴瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、中度分化性淋巴瘤、浆细胞性淋巴瘤、分化不良的淋巴细胞性淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、分化良好的淋巴细胞性淋巴瘤、牛淋巴瘤、MALT、外膜细胞淋巴瘤、外膜区淋巴瘤、边际区淋巴瘤、地中海(Mediterranean)淋巴瘤混合的淋巴细胞-组织细胞淋巴瘤、节状淋巴瘤、浆细胞性淋巴瘤、多形性淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、小B细胞淋巴瘤、小裂解细胞淋巴瘤、小非裂解细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、卷积T细胞淋巴瘤、皮肤t细胞淋巴瘤、小淋巴细胞性T细胞淋巴瘤、不确定的淋巴瘤、u细胞淋巴瘤、未分化型淋巴瘤、aids相关淋巴瘤、中枢神经系统淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、渗出性(基于体腔的)淋巴瘤、胸腺淋巴瘤和皮肤T细胞淋巴瘤。

[0241] 可以被靶向的白血病和其它血细胞恶性病包括急性成淋巴细胞白血病、急性骨髓白血病、淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、毛状细胞白血病、成淋巴细胞白血病、骨髓白血病、淋巴细胞性白血病、骨髓性白血病、白血病、毛状细胞白血病、T细胞白血病、单核细胞性白血病、成髓细胞性白血病、粒细胞白血病、格罗斯(gross)白血病、手镜细胞白血病(hand mirror-cell leukemia)、嗜碱性白血病、成血细胞白血病(hemoblastic leukemia)、组织细胞白血病、白细胞减少性白血病、淋巴白血病、希林氏(Schilling's)白血病、干细胞白血病、骨髓单核细胞性白血病、前淋巴细胞性白血病、小成髓细胞白血病、成巨核细胞白血病、巨核细胞白血病、瑞登(Rieder)细胞白血病、牛白血病、白细胞不增多性白血病、肥大细胞白血病、骨髓细胞性白血病、浆细胞白血病、亚白血性白血病、多发性骨髓瘤、非淋巴细胞白血病和慢性骨髓细胞白血病。



[0242] 可以被靶向的脑和中枢神经系统 (CNS) 癌症和肿瘤包括星形细胞瘤 (包括小脑和大脑)、神经胶质瘤 (包括恶性神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、脑干神经胶质瘤、视觉路径和下丘脑神经胶质瘤)、脑肿瘤、室管膜瘤、神经管胚细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、颅外生殖细胞肿瘤、骨髓发育不良综合症、少突神经胶质瘤、骨髓发育不良/骨髓增生疾病、骨髓性白血病、骨髓白血病、多发性骨髓瘤、骨髓增生病症、神经母细胞瘤、浆细胞瘤/多发性骨髓瘤、中枢神经系统淋巴瘤、固有脑肿瘤、星形胶质细胞脑肿瘤和中枢神经系统中的转移性肿瘤细胞侵犯。

[0243] 可以被靶向的胃肠道癌症包括肝外胆管癌、结肠癌、结肠和直肠癌、结直肠癌、胆囊癌、胃 (胃部) 癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤、膀胱癌、胰岛细胞瘤 (内分泌胰腺)、胰脏癌、胰岛细胞胰脏癌、前列腺癌、直肠癌、唾液腺癌、小肠癌、结肠癌和与结直肠癌形成相关的息肉。对结直肠癌的论述描述在Barderas等人,《癌症研究》72: 2780-2790 (2012) 中。

[0244] 可以被靶向的骨癌症包括骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤、骨髓癌、骨转移、骨的骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤,和骨瘤和骨肉瘤。可以被靶向的乳癌包括小细胞癌和腺管癌。

[0245] 可以被靶向的肺和呼吸性癌症包括支气管腺瘤/类癌瘤、食道癌食道癌、食道癌、下咽癌、喉癌、下咽癌、肺类癌肿瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌 (small cell lung cancer)、小细胞肺癌 (small cell carcinoma of the lung)、间皮瘤、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、鼻咽癌、口癌、口腔和唇癌、口咽癌、副鼻窦和鼻腔癌,和胸膜肺母细胞瘤。

[0246] 可以被靶向的泌尿道和生殖性癌症包括宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢上皮癌、性腺外生殖细胞肿瘤、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、卵巢生殖细胞肿瘤、妊娠期滋养细胞肿瘤、脾癌、肾癌、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢低恶性潜在肿瘤、阴茎癌、肾细胞癌 (包括癌瘤)、肾细胞癌、肾盂和输尿管 (移行细胞癌)、肾盂和输尿管的移行细胞癌、妊娠期滋养细胞肿瘤、睾丸癌、输尿管和肾盂癌、移行细胞癌、尿道癌、子宫内膜子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、卵巢癌、原发性腹膜上皮癌、宫颈癌、子宫癌和卵巢滤泡中的实体肿瘤、浅表性膀胱肿瘤、侵袭性膀胱移行细胞癌和肌肉侵袭性膀胱癌。

[0247] 可以被靶向的皮肤癌和黑素瘤 (以及非黑素瘤) 包括皮肤T细胞淋巴瘤、眼内黑素瘤、人类皮肤角化细胞的肿瘤进展、基底细胞癌和鳞状细胞癌。可以被靶向的肝癌包括肝外胆管癌和肝细胞癌。可以被靶向的眼癌包括眼内黑素瘤、成视网膜细胞瘤,并且可以被靶向的眼内黑素瘤激素癌包括: 甲状旁腺癌、松果体和幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体肿瘤、胸腺瘤和胸腺癌、胸腺瘤、胸腺癌、甲状腺癌、肾上腺皮质癌和ACTH产生肿瘤。

[0248] 可以被靶向的各种其它癌症包括晚期癌症、AIDS相关癌、肛门癌、肾上腺癌、皮质癌、再生障碍性贫血、苯胺癌、槟榔癌、菱叶性颊癌 (buyo cheek cancer)、髓样癌、烟囱扫除癌 (chimney-sweep cancer)、粘土管癌 (clay pipe cancer)、胶质癌、接触癌、囊性癌、树突状癌、配偶癌 (cancer a deux)、乳腺管癌、染料工人 (dye workers) 癌症、脑样癌、钨甲状腺癌、子宫内膜癌、内皮癌、上皮癌、腺癌、原位癌、康 (kang) 癌、康格里 (kangri) 癌、潜在癌症、髓质癌、黑色素癌、骡-旋转式癌 (mule-spinners' cancer)、非小细胞肺癌、隐性癌症、石蜡癌、沥青工癌 (pitch workers' cancer)、疤痕癌、血吸虫性膀胱癌、硬癌、淋巴结癌、小细胞肺癌、软癌、烟尘癌、梭形细胞癌、沼泽癌 (swamp cancer)、焦油癌和管状癌。

[0249] 可以被靶向的各种其它癌症也包括类癌 (胃肠道和支气管)、卡斯特莱曼氏

(Castleman's)病、慢性骨髓增生病症、腱鞘透明细胞肉瘤、尤文氏肿瘤家族、头颈癌、唇和口腔癌、瓦尔登斯特伦氏(Waldenstrom's)巨球蛋白血症、隐性原发性转移性鳞状颈癌(metastatic squamous neck cancer with occult primary)、多发性内分泌腺瘤综合症、多发性骨髓瘤/浆细胞赘瘤、维尔姆斯(Wilms')瘤、蕈样真菌病、嗜铬细胞瘤、塞扎里(sezary)综合征、幕上原始神经外胚层肿瘤、未知原发部位、腹膜渗出、恶性肋膜积液、滋养细胞赘瘤和血管外皮瘤。

[0250] 在示范性方面中,癌症是前述的中的任一种,其中IL13R $\alpha$ 2在癌细胞上表达。在示范性方面中,癌症是结肠癌。在示范性方面中,癌症是多形性成胶质细胞瘤。在示范性方面中,治疗有需要个体的癌症的方法包含以有效治疗癌症的量向所述个体给予本文所描述的结合剂、缀合物、核酸、载体、宿主细胞、细胞群体或医药组合物中的任一种。在示范性方面中,所述方法包含给予本文所描述的缀合物。在示范性方面中,所述方法包含给予本公开的宿主细胞,并且相关于被治疗的个体,宿主细胞是自体细胞。在示范性方面中,所述方法包含给予本公开的宿主细胞,并且宿主细胞是获自被治疗的个体的细胞。在示范性方面中,细胞是T淋巴细胞。在替代方面中,细胞是自然杀伤细胞。

[0251] 将参照以下实例更完全地理解本公开,所述实例详述本公开的示范性实施例。然而,实例不应解释为限制本公开的范围。

[0252] 实例1

[0253] 材料

[0254] 脂染胺(Lipofectamine)2000和pEF6/Myc-His载体获自英杰公司(Invitrogen)。IL13R $\alpha$ 2的单克隆抗体(克隆YY-23Z和B-D13)和IsoStrip小鼠单克隆抗体同型试剂盒购自圣克鲁斯生物技术(Santa Cruz Biotechnology)(加利福尼亚州圣克鲁斯(Santa Cruz))。IL13R $\alpha$ 2的mAb(克隆83807)和重组型人类和小鼠IL13R $\alpha$ 2hFc和IL13R $\alpha$ 1hFc嵌合体购自R&D Systems(明尼苏达州明尼阿波利斯(Minneapolis,MN))。生物素化马抗小鼠抗体和Elite试剂盒获自载体实验室(Vector Laboratories)(加利福尼亚州伯林盖姆(Burlingame))。3,3'-二氨基联苯胺底物购自达科公司(Dako)(加利福尼亚州卡平特里亚(Carpinteria))。与过氧化酶缀合的山羊抗小鼠抗体购自Chemicon International(加利福尼亚州坦密库拉(Temecula)),并且Pngase F购自新英格兰生物实验室(New England Biolabs)(马萨诸塞州伊普威治(Ipswich,MA)。QuikChange Lightning定点突变诱发试剂盒购自安捷伦科技有限公司(Agilent Technologies,Inc.)(加利福尼亚州圣克拉拉(Santa Clara)),并且RNeasy Plus试剂盒接受自凯杰(Qiagen)(加利福尼亚州巴伦西亚(Valencia))。cDNA iScript试剂盒、7.5%Tris-HCl凝胶和ImmunStar WesternC开发试剂和蛋白质标记物购自伯乐(Bio-Rad)。人类IL-13 ELISA试剂盒购自电子生物科学(eBioscience)(加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego))。GBM12和GBM43由David C.James博士(加州大学旧金山分校(University of California-San Francisco))友情提供,并且编码人类野生型IL13R $\alpha$ 2的cDNA获自Waldemar Debinski博士(维克弗斯特大学(Wake Forest University))。获得编码人类野生型IL13R $\alpha$ 2或大多数其它蛋白质的cDNA涉及使用熟知技术和可容易获得的试剂。

[0255] 免疫接种

[0256] 为获得对原生IL13R $\alpha$ 2具有特异性的单克隆抗体,针对动物的免疫接种并且在所

有筛选分析中使用人类重组IL13R $\alpha$ 2hFc融合体。持续2个月在2周间隔下,用完全弗氏佐剂(Freund's adjuvant)中的10 $\mu$ g rhIL13R $\alpha$ 2hFc蛋白质的腹膜内注射使两只6周龄雌性BALB/c小鼠免疫,随后用在不完全弗氏佐剂中的10 $\mu$ g rhIL13R $\alpha$ 2hFc蛋白质的腹膜内注射免疫。在最后一次腹膜内注射后的两周和融合前的3天,通过组合无弗氏佐剂的10 $\mu$ g抗原的静脉内和腹膜内注射进行加强。通过使用Köhler和Milstein (27) 描述的程序进行小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞系X63.Ag8.653亚克隆P301的融合。针对IL13R $\alpha$ 2抗体的存在,使用酶联免疫吸附分析(ELISA)分析杂交瘤上清液。对所选择群体进行克隆,并且分析上清液以鉴别具有最强结合的克隆。

[0257] 表达人类IL13R $\alpha$ 2的CHO细胞系的产生

[0258] 用以下引物对扩增编码人类野生型IL13R $\alpha$ 2的cDNA:正向5'-GCTTGGTACCGAATGGCTTTCGTTTCTTGGC-3'(SEQ ID NO:17),和反向5'-GTTTTGTTCGAATGTATCACAGAAAAATTCTGG-3'(SEQ ID NO:18)。将纯化的PCR产物用KpnI和BstBI酶限制,琼脂糖凝胶纯化,并且随后在具有Myc和His6标签的阅读框中克隆于pEF6/Myc-His载体中。在80%汇合下接种CHO细胞并且使用脂染胺2000用编码IL13R $\alpha$ 2的质粒转染。第二天,添加4 $\mu$ g/ml杀稻瘟菌素(blasticidin)以选择已稳定并入并且表达IL13R $\alpha$ 2转录物的细胞。将稳定的细胞群体进一步以一个细胞/孔的密度亚克隆于96孔板中。十天后,针对IL13R $\alpha$ 2的细胞表面表达,通过流式细胞测量术使用IL13R $\alpha$ 2的抗体(克隆B-D13)来筛选单克隆。选择并且扩增具有最高水平的IL13R $\alpha$ 2表达的克隆以用于分泌IL13R $\alpha$ 2抗体的杂交瘤的后续筛选。

[0259] ELISA

[0260] 在4°C下用50 $\mu$ l人类或小鼠重组IL13R $\alpha$ 2hFc或IL13R $\alpha$ 1hFc或浓度是1 $\mu$ g/ml的人类对照IgG涂布96孔板,过夜。用TBS-Tween 20缓冲液洗涤并且用1%脱脂奶粉阻断后,将50 $\mu$ l纯化的抗体、血清或杂交瘤上清液(在各种稀释度下)施用到板并且在室温下培育1小时。用缀合到碱性磷酸酶的山羊抗小鼠抗体检测结合抗体,之后用碱性磷酸酶底物显色。在A405下使用UniRead 800板读取器(伯腾(BioTek))读取板。

[0261] 流式细胞测量术

[0262] 用1 $\mu$ g/ml的IL13R $\alpha$ 2(克隆47)单克隆抗体染色表达IL13R $\alpha$ 2的CHO或HEK细胞;神经胶质瘤细胞系A172、N10、U251、U87和U118;源自患者的GBM12和GBM43以及原代人类星形胶质细胞,随后用山羊抗小鼠Alexa Fluor 647(1:500)染色。所有染色程序在冰上进行。使用BD FACSCanto流式细胞仪和FACSDiVa™软件分析样品。

[0263] PCR

[0264] 为测定IL13R $\alpha$ 2在各种神经胶质瘤细胞和星形胶质细胞中的表达,使用RNeasy Plus试剂盒由细胞离心块产生总RNA。随后使用cDNA iScript试剂盒将200ng的总RNA转化成cDNA。针对IL13R $\alpha$ 2和GAPDH,使用IL13R $\alpha$ 2和GAPDH引物通过PCR进一步扩增cDNA 30个循环,并且在1%琼脂糖凝胶上显现。

[0265] 表面等离子体共振

[0266] 用Biacore 3000生物传感器通过表面等离子体共振(SPR)测量IL13R $\alpha$ 2(克隆47)单克隆抗体、可商购的IL13R $\alpha$ 2单克隆抗体(克隆83807和B-D13)与标靶(rhIL13R $\alpha$ 2)之间的相互作用的亲和力和速率。使用氨基偶合试剂盒将单克隆抗体固定(以共价方式)到传感器芯片(CM5)的聚葡萄糖基质。用含有0.2MN-乙基-N'- (3-二乙氨基-丙基)-碳化二亚胺

和0.05MN-羟基丁二酰亚胺的溶液的注射来活化传感器表面上的羧基。通过注射1甲醇胺盐酸盐以阻断剩余酯基完成固定程序。以10 $\mu$ l/min的流速进行固定方法的所有步骤。除了注射操作缓冲液而非单克隆抗体,以类似方式制备对照表面。在25 $^{\circ}$ C下在HBSP缓冲液(20mM HEPES,pH 7.4,150mM NaCl,和0.005% (v/v)表面活性剂 P20)中使用20 $\mu$ l/min的流速进行结合反应。在结合阶段期间在流动中添加各种浓度的标靶(rhIL13R $\alpha$ 2)。通过折射率(由应答单位(RU)表示)的变化监测结合到传感器芯片的蛋白质的量。对仪器进行编程以在同一表面上在标靶的增加的浓度下进行一系列结合测量。对标靶的每一浓度重复注射三次。使用BIAevaluation v4.1分析传感图(表面上RU随时间变化的图)。使用1:1结合模型通过曲线拟合估算亲和常数。

#### [0267] 数据准备和动力学分析

[0268] 通过在固定化mAb上重复注射一系列标靶浓度来估算动力学参数。通过“双参考”方法准备数据。这种方法利用对照聚葡萄糖表面上每一标靶样品的平行注射,以及固定化mAb和对照聚葡萄糖表面两者上的操作缓冲液注射。这些传感图的扣除产生对照;这由实验传感图扣除。使用各种动力学模型分析每一数据组(由增加的标靶浓度在相同水平的固定化mAb上的传感图组成)。随后BIAevaluation v 4.1软件用于数据分析。使用1:1结合模型通过曲线拟合估算亲和常数。局部或总体地拟合传感图缔合和解离曲线。通过以下类型的方程式描述样品注射期间复合物形成的速率: $dR/dt = k_a C (R_{max} - R) - k_d R$ (针对1:1相互作用),其中R是以RU为单位的SPR信号,C是分析物的浓度, $R_{max}$ 是以RU为单位的最大的分析物结合能力,并且 $dR/dt$ 是SPR信号的改变速率。早期结合阶段(300s)用以确定mAb与标靶之间的缔合常数( $k_a$ )。在标靶注射结束时使用引入游离缓冲液时RU的降低速率测量解离阶段(dissociation phase, $k_d$ )。通过软件程序(全局拟合算法)同时拟合数据,并且复合物的解离常数( $K_d$ )以比率 $k_a/k_d$ 形式测定。对于定量分析,每一个样品有三个独立的重复。数据表述为平均值 $\pm$ S.E。

#### [0269] 竞争结合分析

[0270] 针对竞争结合板分析,用pH 9.6的碳酸盐缓冲液中的50 $\mu$ l 1 $\mu$ g/ml的亲纯化的hrIL13R $\alpha$ 2hFc涂布96孔板,并且在4 $^{\circ}$ C下储存过夜。在用含有0.05% Tween 20的PBS洗涤后,在室温下添加IL13R $\alpha$ 2的mAb(10 $\mu$ g/ml)或对照mIgG,持续30分钟。洗涤后,在室温下添加PBS中的50 $\mu$ l纯化rhIL-13和0.1% 10ng/ml的BSA用于1小时培育,并且使用来自人类IL-13ELISA试剂盒的检测试剂分析结合的rhIL-13。单独地,在冰上用2 $\mu$ g/ml的rhIL-13或mAb IL13R $\alpha$ 2(克隆47)预处理表达野生型IL13R $\alpha$ 2或在IL13R $\alpha$ 2序列中的4氨基酸突变体(参见实例10)的HEK细胞30分钟,随后分别与100ng/ml的IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb或rhIL-13一起培育1小时。单独或在竞争对手存在下,用人类IL-13 mAb-FITC检测rhIL-13与IL13R $\alpha$ 2的结合。单独或在竞争对手存在下,用缀合到Alexa Fluor 649的抗小鼠抗体检测IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与rhIL13R $\alpha$ 2的结合,并且通过流式细胞测量术分析。

#### [0271] IL13R $\alpha$ 的突变诱发

[0272] 先前,人类IL13R $\alpha$ 2的Tyr<sup>207</sup>、Asp<sup>271</sup>、Tyr<sup>315</sup>和Asp<sup>318</sup>被鉴别为对与人类IL-13的相互作用关键的残基(28)。为判定那些残基是否对IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与IL13R $\alpha$ 2的结合至关重要,根据制造商的建议,使用QuikChange Lightning定点突变诱发试剂盒,将Tyr<sup>207</sup>、Asp<sup>271</sup>、Tyr<sup>315</sup>和Asp<sup>318</sup>残基单独地或同时突变成Ala(4氨基酸突变体)。使用常规技术测序

所选择的克隆,其确认所选择的突变的存在。使用Lipofectamine Plus 转染试剂,在pEF6 Myc-His载体中用IL13R $\alpha$ 2 cDNA的野生型或突变变异体转染HEK 细胞。在转染后48小时,收集细胞并且经由流式细胞测量术分析与IL13R $\alpha$ 2 (克隆47) mAb的结合。

#### [0273] 蛋白质印迹

[0274] 将rhIL13R $\alpha$ 2以200纳克/泳道施用到7.5%Tris-HCl凝胶(伯乐)并且在还原条件下解析。在将蛋白质转移到PVDF膜(伯乐)并且用2%脱脂奶粉阻断后,所述膜用2 $\mu$ g/ml 的抗IL13R $\alpha$ 2 mAb(克隆YY-23Z和B-D13)或用从杂交瘤克隆收集的上清液(稀释10 倍)染色,随后用与过氧化酶缀合的山羊抗小鼠抗体染色。使用ImmunStar WesternC使 反应显色。使用伯乐ChemiDoc成像系统捕获图像。

#### [0275] 免疫组织化学

[0276] 根据芝加哥大学(University of Chicago)机构审查委员会(Institutional Review Board) 认可的方案收集GBM组织。将快速冷冻的脑肿瘤组织切成10 $\mu$ m厚。用-20 $^{\circ}$ C 甲醇固定 组织切片,并且针对人类IL13R $\alpha$ 2,使用浓度是3 $\mu$ g/ml的小鼠IL13R $\alpha$ 2(克隆47) mAb 或同型对照mIgG1染色。用生物素化马抗小鼠抗体检测结合抗体(1:100)。用3,3'-二氨基联苯胺底物利用Elite试剂盒检测抗原-抗体结合。使用CRI全景扫描全幻灯片扫描器(CRI Panoramic Scan Whole Slide Scanner)和全景查看器(Panoramic Viewer)软件分析 载片。

#### [0277] 动物研究

[0278] 根据机构动物照护与使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)方 案并且根据美国国家卫生研究院(National Institutes of Health)指南维护并照护所有动 物。实验中所使用的动物是6到7周龄雄性无胸腺nu/nu小鼠。用氯胺酮盐酸盐/甲苯噻 嗪(25mg/ml/2.5mg/ml)混合物的腹膜内注射来麻醉小鼠。为确立颅内肿瘤,制备中线 颅骨切口,并且在矢状缝侧2mm和 $\lambda$ 上约2mm放置右侧钻孔。将动物安置在立体定 位框中,并且将汉密尔顿(Hamilton)针插入通过钻孔并前移3mm。紧接着颅内渗透的 是(i)注射 $2.5 \times 10^4$ 个U251神经胶质瘤细胞,所述细胞在与200ng mIgG或IL13R $\alpha$ 2 (克隆47) mAb组合的2.5 $\mu$ l无菌PBS中,或(ii)用如先前所描述的PBS或10 $\mu$ g IL13R $\alpha$ 2 (克隆47或B-D13) mAb对神经胶质瘤细胞进行3天后的颅内注射(29,以引用的方式 并入本文中)。监测所有小鼠的存活。在第17天处死每组的三只动物,并且收集脑并冷 冻用于切片、苏木精和伊红(H&E)染色和显微镜分析。

#### [0279] 统计

[0280] 通过史都登氏(Student's) t检验或使用事后比较杜凯氏(Tukey's) 检验或邓尼特检 验的单因素方差分析评估各组之间的差异。对于体内存活率数据,使用卡普兰-迈耶存 活 率分析,并且使用对数秩检验进行统计分析。 $P < 0.05$ 视为在统计学上显著。

#### [0281] 实例2

#### [0282] 抗原的表征和分泌抗IL13R $\alpha$ 2抗体的杂交瘤克隆的筛选

[0283] 本研究的主要目标是产生适用于靶向在肿瘤细胞表面上表达的IL13R $\alpha$ 2的高亲和 力 单克隆抗体。因此我们将小鼠免疫并且对于针对抗原rhIL13R $\alpha$ 2(呈其原生构形)的 反应性筛选所得杂交瘤克隆。针对rhIL13R $\alpha$ 2的检测,确立利用针对rhIL13R $\alpha$ 2的杂交瘤 克隆 YY-23Z的板结合的ELISA。发现1 $\mu$ g/ml的吸收到塑料的rhIL13R $\alpha$ 2的浓度适用 于检测抗体

结合(图1A)。然后,通过利用一对仅识别原生(发现于细胞表面上)和变性(在还原条件下使用蛋白质印迹法)形式的IL13R $\alpha$ 2的可商购抗体来表征 rhIL13R $\alpha$ 2hFc的“原生性”,并且分别使用抗体克隆B-D13和YY-23Z在ELISA中表征 其与rhIL13R $\alpha$ 2的结合特性。在板结合的ELISA中,克隆B-D13和YY-23Z均能够识别 rhIL13R $\alpha$ 2hFc(图1B)。在 $\beta$ -巯基乙醇存在下在95℃下持续5分钟的抗原变性完全消除 抗体克隆B-D13通过ELISA识别抗原的能力,然而YY-23Z克隆保持结合变性抗原的 能力。因此,吸收到塑料的rhIL13R $\alpha$ 2hFc,含有蛋白质的原生和变性形式的ELISA板。分析来自用rhIL13R $\alpha$ 2和hFc的融合体免疫的动物的血清揭露了针对rhIL13R $\alpha$ 2和人类 Fc片段的抗体的存在。为选择特异于融合体的IL13R $\alpha$ 2部分的抗体,将人类IgG作为 额外阴性对照包括,以用于筛选杂交瘤群体。在39个筛选的原代群体中,仅15个群体 对IL13R $\alpha$ 2具有特异性,并且四个与人类IgG具反应性。最后,进一步扩增并且再克隆 与原生IL13R $\alpha$ 2强烈反应的五个克隆。仅识别变性抗原的两个克隆选自具有 rhIL13R $\alpha$ 2hFc嵌合体的单独免疫接种组。在板结合的ELISA(图1C)中并且通过蛋白质印迹法(图1D)比较所选择克隆的上清液结合hrIL13R $\alpha$ 2的能力。图1C显示在板结合的ELISA中而非通过蛋白质印迹法,克隆47强烈地结合到抗原,指示克隆47识别抗 原的原生构形的能力。因此,选择克隆47用于进一步表征并且用于其它实验。发现克 隆47具有IgG1同型,拥有 $\kappa$ 链。

#### [0284] 实例3

[0285] IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与在细胞表面上表达的重组人类IL13R $\alpha$ 2和IL13R $\alpha$ 2的结合特异性

[0286] 我们研究在板结合的ELISA中,相对于可商购的克隆83807和B-D13,IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与rhIL13R $\alpha$ 2的结合特性。图2A显示当与克隆83807和B-D13相比较时,克隆47与rhIL13R $\alpha$ 2的结合较强并且具特异性。克隆47在0.05 $\mu$ g/ml的低浓度下达到 结合平台。在这些实验中,无抗体显示与用作额外阴性对照的人类IgG的结合。为进一步验证克隆47与人类IL13R $\alpha$ 2的相互作用的特异性,产生表达实际大小野生型人类 IL13R $\alpha$ 2的CHO细胞的克隆系(克隆6)。将抗体与转染有空白载体的对照CHO细胞的 结合与抗体与表达IL13R $\alpha$ 2的CHO细胞的组合相比较。再次,IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb 展现与在细胞表面上表达的IL13R $\alpha$ 2而非与对照CHO细胞的结合较强并且具特异性, 指示这种抗体特异性地识别IL13R $\alpha$ 2的原生构形(图2B)。克隆47在0.25 $\mu$ g/ml的最低测试浓度下展现针对IL13R $\alpha$ 2的最强亲和力。值得注意地,其它所选择的杂交瘤克隆 展现类似的与在CHO细胞的细胞表面上表达的IL13R $\alpha$ 2而非与对照CHO细胞的相互作用的特异性。在板结合的ELISA中获得的数据也揭露到克隆47不与IL-13的低亲和力 受体IL13R $\alpha$ 1(图2C)或小鼠重组IL13R $\alpha$ 2相互作用,进一步验证克隆47与IL13R $\alpha$ 2 之间的相互作用的特异性(图2D)。克隆83807和B-D13并不显示与小鼠rIL13R $\alpha$ 2的结合,这与目前对这些抗体与小鼠IL13R $\alpha$ 2的交叉反应性的理解一致。

[0287] 然后,我们表征克隆47与各种神经胶质瘤细胞系、源自患者的神经胶质瘤系GBM12和GBM43以及正常人类星形胶质细胞的结合能力。在44-47%人类GBM切除的样本(3)中和在多达82%(14/17)的衍生自GBM和正常脑外植体的原代细胞培养物中(2)报导相对于正常脑组织IL13R $\alpha$ 2基因的增加的表达。图3的A和B显示神经胶质瘤细胞、人类星形胶质细胞和在细胞表面上表达重组人类IL13R $\alpha$ 2的HEK细胞与IL13R $\alpha$ 2(克隆47、83807和B-D13)mAb的比较染色的流程图。图3的A和B揭露(i)细胞表面 上IL13R $\alpha$ 2表达的各种水平,和(ii)相对于克隆B-D13(细胞系之间1.2-4.6倍的差异)和83807,克隆47与所分析细胞系的表面的

优异结合。有趣地,我们观测到与表达 IL13R $\alpha$ 2的HEK细胞相比,克隆83807与神经胶质瘤细胞系的结合几乎完全不存在。未检测到克隆47与正常人类星形胶质细胞的结合,确认克隆47与表达IL13R $\alpha$ 2的人类神经胶质瘤细胞的相互作用的特异性。IL13R $\alpha$ 2 mRNA在这些细胞中的表达一般与细胞表面上的IL13R $\alpha$ 2表达水平相关。此外,表达低IL13R $\alpha$ 2 mRNA到不表达IL13R $\alpha$ 2 mRNA的细胞,包括U118和原代人类星形胶质细胞,展现IL13R $\alpha$ 2在细胞表面上低表达到不表达(图3B)。在额外实验中,将N10神经胶质瘤细胞与1 $\mu$ g/ml的IL13R $\alpha$ 2(克隆47) mAb或用10倍过量的rhIL13R $\alpha$ 2预培育的IL13R $\alpha$ 2(克隆47) mAb一起培育(图10),并且通过流式细胞测量术分析。当与单独的克隆47相比较时,发现在10倍过量的 rhIL13R $\alpha$ 2存在下的IL13R $\alpha$ 2(克隆47) mAb之间的相互作用显著去除。类似地,N10细胞与10倍过量的rhIL-13或IL13R $\alpha$ 2(克隆47) mAb的预培育几乎完全阻断抗体或 rhIL-13与N10细胞之间的相互作用(补充图1B),指示在神经胶质瘤细胞表面上表达的IL13R $\alpha$ 2与克隆47之间的识别的特异性(图10)。

[0288] 为验证IL13R $\alpha$ 2(克隆47) mAb拥有原位结合神经胶质瘤细胞表面上的IL13R $\alpha$ 2的能力,在裸小鼠中确立表达绿色荧光蛋白(GFP)的U251细胞的颅内神经胶质瘤异种移植物。三周后,处死动物,并且获得细胞并将其放置于体外培养条件下。48小时后,收集细胞并且用对照mIgG或IL13R $\alpha$ 2(克隆47) mAb染色。所培养的表达GFP的U251细胞充当阳性对照。GFP阳性U251细胞代表全部细胞的约56%(图3C,图a),并且96%的细胞与IL13R $\alpha$ 2(克隆47) mAb具反应性(图3C,图c),然而GFP阴性细胞不与抗体相互作用(图3C,图b)。这些数据进一步确认IL13R $\alpha$ 2(克隆47) mAb特异性地识别表达小鼠异种移植物中的IL13R $\alpha$ 2的神经胶质瘤细胞,并且不与来自小鼠脑的其它细胞具反应性。

[0289] 实例4

[0290] 亲和力研究

[0291] 使用表面等离子体共振来确定IL13R $\alpha$ 2(克隆47) mAb与rhIL13R $\alpha$ 2之间的相互作用的亲和力和速率。相较于针对IL13R $\alpha$ 2的两种商业抗体克隆83807和B-D13,进行所有测量。图4显示每一抗体的传感图。测量结果概述在表1中。

[0292] 表1

[0293] 结合到人类重组IL13R $\alpha$ 2的单克隆抗体的动力学

IL13R $\alpha$ 2的 mAb	$k_a$ 1/MS	$k_d$ 1/S	$K_D$ M	$R_{max}$ RU
[0294] 克隆 47	9.06e4 $\pm$ 322	1.26e-4 $\pm$ 1.07e-6	1.39 $\times$ 10 <sup>-9</sup>	390
克隆 83807	2.23e4 $\pm$ 620	2.31e-3 $\pm$ 1.03e-5	104 $\times$ 10 <sup>-9</sup>	250
克隆 B-D13	1.08e5 $\pm$ 5.71e3	4.99e-3 $\pm$ 1.45e-4	46.1 $\times$ 10 <sup>-9</sup>	8-16

[0295] 如实例1中所描述估算动力学参数。将复合物的解离常数(KD)确定为比率 $k_a/k_d$ 。对于定量分析,每一个样品有三个独立的重复。数据表述为平均值 $\pm$ S.E。这些数据证实IL13R $\alpha$ 2(克隆47) mAb与重组IL13R $\alpha$ 2的亲和力分别超过可商购的mAb克隆83807和B-D13的亲和力75倍和33倍。

[0296] 图4A显示到,克隆47展现与rhIL13R $\alpha$ 2在30分钟时间范围内测量的长期并稳定的缔合,然而克隆83807(图4B)和B-D13(图4C)相对快速地解离。IL13R $\alpha$ 2(克隆47) mAb与rhIL13R $\alpha$ 2的结合亲和力计算为1.39  $\times$  10<sup>-9</sup>M。这个值分别超过可商购的抗体克隆83807和B-D13与rhIL13R $\alpha$ 2的亲和力75倍和33倍。当分别与克隆83807和B-D13的250和8-16RU相比

较时,克隆47在390RU下展现与rhIL13R $\alpha$ 2的最高结合亲和力( $R_{max}$ )。这些数据指示IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb拥有比克隆83807和B-D13优异的特性以及展现针对rhIL13R $\alpha$ 2的更高的亲和力。

#### [0297] 实例5

#### [0298] 单克隆抗体与rhIL-13竞争与IL13R $\alpha$ 2的结合

[0299] 为判定IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb是否拥有抑制特性,进行利用rhIL13R $\alpha$ 2hFc嵌合体 and 短暂表达人类IL13R $\alpha$ 2的HEK细胞的竞争结合分析。以板结合的ELISA型式设定竞争结合分析。吸收到板的rhIL13R $\alpha$ 2hFc充当靶抗原。为判定IL13R $\alpha$ 2 mAb是否特异性抑制IL-13与rhIL13R $\alpha$ 2的结合,将板与100倍过量的mIgG、IL13R $\alpha$ 2(克隆47) mAb或包括83807、YY-23Z和B-D13的其它IL13R $\alpha$ 2 mAb克隆预培育,随后与rhIL13一起培育。图5A显示IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb显著消除rhIL-13与rhIL13R $\alpha$ 2的结合,然而针对人类IL-13的结合,IL13R $\alpha$ 2 mAb克隆B-D13和83807展现显著较小的竞争。

[0300] 为进一步验证IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb的抑制特性,将HEK 293T细胞用编码IL13R $\alpha$ 2 cDNA的野生型或4氨基酸突变体形式的药剂转染,在所述突变体形式中Tyr207、Asp271、Tyr315和Asp318残基被Ala取代。先前,人类IL13R $\alpha$ 2的这些残基被鉴别为与同源配体IL-13的相互作用所需要的氨基酸。所有四种突变在一个分子中的存在已显示使IL-13几乎完全丧失与IL13R $\alpha$ 2的突变体形式的结合(28)。48小时后,将细胞用20倍过量的rhIL-13或IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb预处理,随后分别与IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb或rhIL-13一起培育。图5B显示通过20倍过量的rhIL-13,IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与野生型(WT)IL13R $\alpha$ 2而非IL13R $\alpha$ 2的4氨基酸突变体形式有约50%的结合抑制。当在细胞表面上表达80%时,20倍过量的抗体消除rhIL-13与IL13R $\alpha$ 2的结合,这类似于板ELISA中所观测到的结果。IL-13与IL13R $\alpha$ 2的4氨基酸突变体形式的残余结合进一步通过过量的IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb降低(图5C)。总的来说,这些数据指示IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与rhIL-13特异性竞争IL13R $\alpha$ 2上的结合位点。同样,这些数据指示IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与IL-13在其IL13R $\alpha$ 2分子的识别位点中具有显著重叠。

#### [0301] 实例6

#### [0302] Tyr<sup>207</sup>、Asp<sup>271</sup>、Tyr<sup>315</sup>和Asp<sup>318</sup>残基对IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb结合的作用

[0303] 考虑到IL-13和IL13R $\alpha$ 2(克隆47)单克隆抗体可以彼此显著竞争IL13R $\alpha$ 2的结合,我们判定促进IL-13与IL13R $\alpha$ 2的相互作用(28)的残基Tyr207、Asp271、Tyr315和Asp318是否也对IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与IL13R $\alpha$ 2的结合至关重要。产生如下质粒:其编码针对携带Tyr207、Asp271、Tyr315或Asp318残基到Ala的个别突变或所有四个突变在一个分子中的组合的IL13R $\alpha$ 2的cDNA,并且其在HEK细胞中短暂表达。通过流式细胞测量术分析IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与IL13R $\alpha$ 2的野生型和突变体形式的结合。IL13R $\alpha$ 2 mAb 83807和B-D13用作参考抗体,以排除HEK细胞表面上IL13R $\alpha$ 2的野生型或突变变异体的表达水平变化的可能影响(图6A)。当与抗体克隆83807和B-D13相比较时,将数据计算为IL13R $\alpha$ 2(克隆47)与IL13R $\alpha$ 2的结合的比率。图6A展现当与野生型受体相比较时,IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb的结合不受IL13R $\alpha$ 2的个别突变或4氨基酸突变体形式的显著影响。相反,IL-13与IL13R $\alpha$ 2的4氨基酸突变体形式的结合几乎被消除(图6B)。这些数据指示Tyr207、Asp271、Tyr315和Asp318残基对IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与IL13R $\alpha$ 2的相互作用不关键,但为与IL-13的结合所



必需。

#### [0304] 实例7

[0305] N-连接糖基化影响IL13R $\alpha$ 2 mAb对IL13R $\alpha$ 2的亲合力

[0306] 先前已证实N-连接糖基化对IL-13与同源受体IL13R $\alpha$ 2的有效结合至关重要(30)。考虑到IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与IL-13之间的抗原决定基识别的显著重叠,我们预期 IL13R $\alpha$ 2的N-连接糖基化有助于IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb的结合。为确认这种预期,用Pngase F处理rhIL13R $\alpha$ 2hFc以从蛋白质中去除N-连接糖基化。研究IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与对照和去糖基化靶蛋白的结合。在原生条件下(在不存在SDS下)用Pngase F处理rhIL13R $\alpha$ 2,以避免影响抗体结合的rhIL13R $\alpha$ 2的变性。在分析中包括IL13R $\alpha$ 2的额外mAb(克隆83807、B-D13和YY23Z)和rhIL-13以证实结合的特异性。在板结合的ELISA中,当与未处理蛋白质相比较时,IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与Pngase F处理的IL13R $\alpha$ 2的结合降低35%( $n=4$ ;  $P<0.001$ )。当与未处理蛋白质相比较时,IL13R $\alpha$ 2(克隆83807)的结合降低80%,并且IL13R $\alpha$ 2mAb B-D13和YY-23Z分别完全不存在结合( $n=4$ ;  $P<0.001$ )(图7A)。rhIL-13与Pngase F处理的rhIL13R $\alpha$ 2的结合也显著减弱。为验证Pngase F处理导致蛋白质去糖基化,通过蛋白质印迹解析对照和Pngase F处理的rhIL13R $\alpha$ 2hFc蛋白质。图7B显示Pngase F处理的蛋白质具有更低分子量,确认N-连接聚糖从IL13R $\alpha$ 2分子中去除。当与对照未处理细胞相比较时,IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb与Pngase F处理的U251神经胶质瘤和表达野生型IL13R $\alpha$ 2的HEK 293细胞的结合也降低约30%( $n=3$ ;  $P<0.05$ )(图7C)。

#### [0307] 实例8

[0308] 免疫组织化学

[0309] 在新鲜的冷冻组织中评估IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb检测IL13R $\alpha$ 2的能力。用同型对照mIgG1或IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb染色快速冷冻的人类GBM样品或U251神经胶质瘤侧腹异种移植植物。图8显示两个人类GBM样品中的阳性(褐色)染色,只是在样品以及基于U251神经胶质瘤细胞的神经胶质瘤异种移植植物中的阳性细胞有不同频率。在所分析的三个GBM样品中的两个中检测到阳性染色,这与少于50%的原发性GBM表达IL13R $\alpha$ 2的预期一致(3)。这些数据也与这种抗体识别在细胞表面上和在ELISA应用中表达的IL13R $\alpha$ 2的原生形式的能力一致,以及与这种mAb通过蛋白质印迹法检测变性抗原的折衷能力一致。

#### [0310] 实例9

[0311] IL13R $\alpha$ 2单克隆抗体延长具有颅内神经胶质瘤异种移植物的动物的存活

[0312] 也在人类神经胶质瘤的原位小鼠模型中确定IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb的潜在治疗特性。在对照mIgG存在下或在IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb下,将U251神经胶质瘤细胞单独地颅内注射于裸小鼠的脑中。图9A显示对照PBS( $n=15$ )和mIgG( $n=16$ )组中的动物分别展现27和25天的类似中位存活期。相反,用IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb共注射的动物的存活期( $n=13$ )显著增加到34天的中位数( $p=0.0001$ ; mIgG相对于IL13R $\alpha$ 2 mAb组)。对来自在第17天收集的脑的神经胶质瘤异种移植物的H&E染色的分析揭露了神经胶质瘤细胞分布在对照组的脑中的类似模式。相反,用IL13R $\alpha$ 2 mAb共注射的动物组中的肿瘤块的大小显著降低(图9B)。独立地,在小鼠的脑中接种U251细胞并且3天后经由同一钻孔用如先前所描述的PBS或IL13R $\alpha$ 2(克隆47或B-D13)mAb注射(29)。有趣地,类似于在共注射实验中所发现的(图9A),当与PBS和克隆B-D13组相比较时,用克隆47注射的小鼠展现中位存活期的提高(35天分别相对

于27和23天;n=7; P>0.05) (图11)。然而,所有动物最终因疾病而死亡。这些数据指示在小鼠脑中,IL13R $\alpha$ 2 (克隆47) mAb在促进IL13R $\alpha$ 2表达U251神经胶质瘤细胞的肿瘤排斥中展示前景。这种发现预期并入IL13R $\alpha$ 2 (克隆47) mAb的IL13R $\alpha$ 2结合域的抗体药剂将在治疗通过 IL13R $\alpha$ 2的呈递表征的各种人类和非人类癌症(如IL13R $\alpha$ 2表达神经胶质瘤细胞和其它恶性细胞类型)中有效。

[0313] 参考文献-除非以其它方式特定确认,否则针对实例1-9和贯穿申请的引用

[0314] 1. Debinski, W., Obiri, N. I., Powers, S. K., Pastan, I. 和 Puri, R. K. (1995) 《临床癌症研究》1, 1253-1258.

[0315] 2. Joshi, B. H., Plautz, G. E. 和 Puri, R. K. (2000) 《癌症研究 (Cancer Res.)》60, 1168-1172.

[0316] 3. Jarboe, J. S., Johnson, K. R., Choi, Y., Lonser, R. R. 和 Park, J. K. (2007) 《癌症研究》67, 7983-7986.

[0317] 4. Kawakami, K., Terabe, M., Kawakami, M., Berzofsky, J. A. 和 Puri, R. K. (2006) 《癌症研究》66, 4434-4442.

[0318] 5. Fujisawa, T., Joshi, B., Nakajima, A. 和 Puri, R. K. (2009) 《癌症研究》69, 8678-8685.

[0319] 6. Debinski, W., Slagle, B., Gibo, D. M., Powers, S. K. 和 Gillespie, G. Y. (2000) 《神经肿瘤学杂志 (J. Neurooncol.)》48, 103-111.

[0320] 7. Aman, M. J., Tayebi, N., Obiri, N. I., Puri, R. K., Modi, W. S. 和 Leonard, W. J. (1996) 《生物化学杂志》271, 29265-29270.

[0321] 8. Gauchat, J. F., Schlagenhauf, E., Feng, N. P., Moser, R., Yamage, M., Jeannin, P., Alouani, S., Elson, G., Notarangelo, L. D., Wells, T., Eugster, H. P. 和 Bonnefoy, J. Y. (1997) 《欧洲免疫学杂志》27, 971-978.

[0322] 9. Akaiwa, M., Yu, B., Umeshita-Suyama, R., Terada, N., Suto, H., Koga, T., Arima, K., Matsushita, S., Saito, H., Ogawa, H., Furue, M., Hamasaki, N., Ohshima, K. 和 Izuhara, K. (2001) 《细胞因子 (Cytokine)》13, 75-84.

[0323] 10. Rahaman, S. O., Sharma, P., Harbor, P. C., Aman, M. J., Vogelbaum, M. A. 和 Haque, S. J. (2002) 《癌症研究》62, 1103-1109.

[0324] 11. Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R. K. 和 Kitani, A. (2006) 《自然医学 (Nat. Med.)》12, 99-106.

[0325] 12. Shimamura, T., Fujisawa, T., Husain, S. R., Joshi, B. 和 Puri, R. K. (2010) 《临床癌症研究》16, 577-586.

[0326] 13. Fujisawa, T., Joshi, B. H. 和 Puri, R. K. (2012) 《国际癌症杂志 (Int. J. Cancer)》131, 344-356.

[0327] 14. Murphy, E. V., Zhang, Y., Zhu, W. 和 Biggs, J. (1995) 《基因 (Gene)》159, 131-135.

[0328] 15. Rich, T., Chen, P., Furman, F., Huynh, N. 和 Israel, M. A. (1996) 《基因》180, 125-130.

[0329] 16. Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B.,

Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E. 和 Mirimanoff, R.O. (2005) 《新英格兰医学杂志 (N.Engl.J.Med.)》352, 987-996.

[0330] 17. Kunwar, S., Prados, M.D., Chang, S.M., Berger, M.S., Lang, F.F., Piepmeyer, J.M., Sampson, J.H., Ram, Z., Gutin, P.H., Gibbons, R.D., Aldape, K.D., Croteau, D.J., Sherman, J.W. 和 Puri, R.K. (2007) 《临床肿瘤学杂志 (J.Clin.Oncol.)》25, 837-844.

[0331] 18. Wykosky, J., Gibo, D.M., Stanton, C. 和 Debinski, W. (2008) 《临床癌症研究》14, 199-208.

[0332] 19. Debinski, W., Gibo, D.M., Obiri, N.I., Kealisher, A. 和 Puri, R.K. (1998) 《自然生物技术 (Nat.Biotechnol.)》16, 449-453.

[0333] 20. Kawakami, M., Kawakami, K. 和 Puri, R.K. (2002) 《分子癌症治疗 (Mol.Cancer Ther.)》1, 999-1007.

[0334] 21. Husain, S.R. 和 Puri, R.K. (2000) 《血液》95, 3506-3513.

[0335] 22. Bartolazzi, A., Nocks, A., Aruffo, A., Spring, F. 和 Stamenkovic, I. (1996) 《细胞生物学杂志 (J.Cell Biol.)》132, 1199-1208.

[0336] 23. Kioi, M., Seetharam, S. 和 Puri, R.K. (2008) 《分子癌症治疗》7, 1579-1587.

[0337] 24. Pini, A. 和 Bracci, L. (2000) 《当今蛋白质与肽科学 (Curr. Protein Pept. Sci.)》1, 155-169.

[0338] 25. Ross, J.S., Gray, K., Gray, G.S., Worland, P.J. 和 Rolfe, M. (2003) 《美国临床病理学杂志 (Am.J.Clin.Pathol.)》119, 472-485.

[0339] 26. Souriau, C. 和 Hudson, P.J. (2003) 《生物疗法专家评论 (Expert Opin.Biol.Ther.)》3, 305-318.

[0340] 27. Köhler, G. 和 Milstein, C. (1975) 《自然》256, 495-497.

[0341] 28. Arima, K., Sato, K., Tanaka, G., Kanaji, S., Terada, T., Honjo, E., Kuroki, R., Matsuo, Y. 和 Izuhara, K. (2005) 《生物化学杂志》280, 24915-24922.

[0342] 29. Sampson, J.H., Crotty, L.E., Lee, S., Archer, G.E., Ashley, D.M., Wikstrand, C.J., Hale, L.P., Small, C., Dranoff, G., Friedman, A.H., Friedman, H.S. 和 Bigner, D.D. (2000) 《美国国家科学院院刊 (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.)》97, 7503-7508.

[0343] 30. Kioi, M., Seetharam, S. 和 Puri, R.K. (2006) 《美国实验生物学联合会会刊 (FASEB J.)》20, 2378-2380.

[0344] 31. McKenzie, A.N., Culpepper, J.A., de Waal Malefyt, R., Brière, F., Punnonen, J., Aversa, G., Sato, A., Dang, W., Cocks, B.G. 和 Menon, S. (1993) 《美国国家科学院院刊》90, 3735-3739.

[0345] 32. Donaldson, D.D., Whitters, M.J., Fitz, L.J., Neben, T.Y., Finnerty, H., Henderson, S.L., O'Hara, R.M., Jr, Beier, D.R., Turner, K.J., Wood, C.R. 和 Collins, M. (1998) 《免疫学杂志》161, 2317-2324.

[0346] 33. Hansen, H.J., Goldenberg, D.M., Newman, E.S., Grebenau, R. 和 Sharkey, R.M. (1993) 《癌症 (Cancer)》71, 3478-3485.

- [0347] 34.Kuan,C.T.,Wikstrand,C.J.,Archer,G.,Beers,R.,Pastan,I.,Zalutsky,M.R.和 Bigner,D.D. (2000)《国际癌症杂志》88,962-969.
- [0348] 35.Imperiali,B.和Rickert,K.W. (1995)《美国国家科学院院刊》92,97-101.
- [0349] 36.Sondermann,P.,Huber,R.,Oosthuizen,V.和Jacob,U. (2000)《自然》406,267-273.
- [0350] 37.Krapp,S.,Mimura,Y.,Jefferis,R.,Huber,R.和Sondermann,P. (2003)《分子生物学杂志》325,979-989.
- [0351] 38.Fernandes,H.,Cohen,S.和Bishayee,S. (2001)《生物化学杂志》276,5375-5383.
- [0352] 39.Hsu,Y.F.,Ajona,D.,Corrales,L.,Lopez-Picazo,J.M.,Gurpide,A.,Montuenga,L. M.和Pio,R. (2010)《分子癌症 (Mol.Cancer)》9,139.
- [0353] 40.Cartron,G.,Watier,H.,Golay,J.和Solal-Celigny,P. (2004)《血液》104,2635-2642.
- [0354] 41.de Haij,S.,Jansen,J.H.,Boross,P.,Beurskens,F.J.,Bakema,J.E.,Bos,D.L.,Martens,A.,Verbeek,J.S.,Parren,P.W.,van de Winkel,J.G.和Leusen,J.H. (2010)《癌症 研究》70,3209-3217.
- [0355] 42.Minn,A.J.,Kang,Y.,Serganova,I.,Gupta,G.P.,Giri,D.D.,Dobrovin,M.,Ponomarev,V.,Gerald,W.L.,Blasberg,R.和Massagué,J. (2005)《临床研究杂志 (J.Clin. Investig.)》115,44-55.
- [0356] 43.Kawakami,M.,Kawakami,K.,Kasperbauer,J.L.,Hinkley,L.L.,Tsukuda,M.,Strome,S.E.和Puri,R.K. (2003)《临床癌症研究》9,6381-6388.
- [0357] 44.Husain,S.R.,Obiri,N.I.,Gill,P.,Zheng,T.,Pastan,I.,Debinski,W.和Puri,R.K. (1997)《临床癌症研究》3,151-156.
- [0358] 45.Puri,R.K.,Leland,P.,Obiri,N.I.,Husain,S.R.,Kreitman,R.J.,Haas,G.P.,Pastan,I.和Debinski,W. (1996)《血液》87,4333-4339.
- [0359] 46.Joshi,B.H.,Leland,P.和Puri,R.K. (2003)《克罗地亚医学杂志 (Croat.Med.J.)》44,455-462.
- [0360] 47.Barderas R,Bartolomé RA,Fernandez-AceñeroMJ,Torres S,Casal JI.《癌症研究》2012Jun 1;72(11):2780-90.
- [0361] 实例10
- [0362] 用于选择性靶向IL13R $\alpha$ 2表达脑肿瘤的单链抗体
- [0363] IL13R $\alpha$ 2在大多数高级星形细胞瘤和其它恶性病中过度表达,并且在各种临床前模型中其已被验证为用于治疗应用的标靶。然而,由于与由正常或健康细胞广泛表达的IL13R $\alpha$ 1受体的相互作用,目前基于IL13的治疗剂缺乏特异性。严格地结合到IL13R $\alpha$ 2的靶向剂的产生将显著扩大用于治疗IL13R $\alpha$ 2表达癌症的治疗潜在性。最近,已开发出单克隆抗体47 (mAb47) 并且其被广泛地表征。mAb47排他性地结合到人类IL13R $\alpha$ 2的原生形式。使用mAb47,单链抗体 (scFv) 片段从由亲本杂交瘤细胞系表达的mAb47中工程改造。测试单链抗体 (scFv) 片段作为可溶药剂的靶向特性,并且将具有并有 scFv47作为靶向基元的经修饰纤维的腺病毒 (Ad) 药剂化。

[0364] 利用噬菌体呈现方法来选择来自产生mAb47的所确立杂交瘤细胞的可变重(VH)和轻(VL)链的功能组合。测试呈现scFv47的纯化噬菌体与IL13R $\alpha$ 2hFc重组蛋白-即 IL13R $\alpha$ 2和抗体的Fc区的融合体-的相互作用。利用竞争性ELISA来验证亲本mAb47 和结合到相同抗原决定基的scFv47片段。通过SDS-PAGE分析在大肠杆菌和CHO细胞 中表达的scFv47的可溶形式,并且测试其稳定性和靶向特性。为产生IL13R $\alpha$ 2特异性 Ad,用由在其C端处连接到scFv47的T4纤维蛋白三聚域构成的嵌合纤维基因替代编码绿色荧光蛋白的复制缺陷型Ad5的纤维(AdFFscFv47-CMV-GFP)。为产生病毒粒子,在HEK293F28细胞中拯救编码腺病毒基因组的药剂,扩展并且纯化。IL13R $\alpha$ 2<sup>+</sup>和 IL13R $\alpha$ 2 U251细胞系分别经由用对照或IL13R $\alpha$ 2特异性shRNA(U251-IL13R $\alpha$ 2.KO)稳定转染来确立。在这些U251细胞系中并且在IL13R $\alpha$ 2表达U87细胞中测试 AdFFscFv47-CMV-GFP病毒的靶向特性。

[0365] 在板ELISA中,噬菌体的生物淘选选择库以及若干个个别克隆展现与IL13R $\alpha$ 2hFc蛋白质而非hIgG的特异性结合。scFv47呈现的噬菌体与IL13R $\alpha$ 2的结合由mAb47而非对照IgG或其它所测试的IL13R $\alpha$ 2 mAb完全消除,由此确认如由亲本mAb47所识别,同一IL13R $\alpha$ 2抗原决定基由scFv47识别。类似于噬菌体呈现的scFv47,可溶scFv47显示 与IL13R $\alpha$ 2而非IL13R $\alpha$ 1的特异性结合。相对于U251-IL13R $\alpha$ 2.KO细胞,针对 U251-IL13R $\alpha$ 2<sup>+</sup>细胞中的GFP表达,如通过流式细胞测量术所判断, Ad5FFscFv47-CMV-GFP的相互作用也对IL13R $\alpha$ 2表达U251细胞具有特异性。此外,感染有Ad5FFscFv47-CMV-GFP的细胞中的GFP表达强烈地与IL13R $\alpha$ 2的表面表达水平相关。进一步在U251神经胶质瘤模型中验证病毒感染的特异性。

[0366] 所述数据将scFv47验证为高度选择性的IL13R $\alpha$ 2靶向剂,其提供适用于诊断并且治疗IL13R $\alpha$ 2表达癌症如神经胶质瘤、结肠癌(参见实例12)等的可溶性单链生物制剂。

[0367] 实例11

[0368] IL13R $\alpha$ 2-CAR的产生

[0369] 为产生IL13R $\alpha$ 2特异性T细胞,最初使IL13R $\alpha$ 2特异性嵌合抗原受体(CAR)药剂化。合成密码子优化微基因,其含有免疫球蛋白重链前导肽和由连接子分隔开的 IL13R $\alpha$ 2特异性单链可变片段(scFv)的重链和轻链(scFv衍生自杂交瘤47,Balyasnikova 等人《生物化学杂志》2012;287(36):30215-30277)。将微基因亚克隆于SFG反转录病毒载体中,所述SFG反转录病毒载体含有人类IgG1-CH2CH3域、CD28跨膜域和衍生自CD28和CD3 $\zeta$ -链的共刺激域。用RD114假型化的反转录病毒粒子转导CD3/CD28活化的人类T细胞并且随后使用IL2扩增。功能分析揭露到如通过细胞因子产生(IFN $\gamma$ 和IL2;图19和20)所判断,表达IL13R $\alpha$ 2特异性CAR的T细胞(IL13R $\alpha$ 2-CAR T细胞)识别重组IL13R $\alpha$ 2蛋白,并且在细胞毒性分析中杀死IL13R $\alpha$ 2阳性细胞(图18)。非转导(NT)T细胞不产生细胞因子并且不具有溶细胞活性。

[0370] 实例12

[0371] 将T细胞再引导到IL13R $\alpha$ 2阳性小儿神经胶质瘤

[0372] IL13R $\alpha$ 2在多形性成胶质细胞瘤中异常表达,并且因此是一种用于CAR T细胞免疫疗法的有前景的标靶。CAR的抗原识别域通常由单链可变片段(scFv)组成,但目前的 IL13R $\alpha$ 2特异性CAR使用IL13突变蛋白作为抗原识别域。然而,已显示基于IL13突变蛋白的CAR也识别IL13R $\alpha$ 1,产生重大的安全问题。为解决这种障碍,已将高亲和力 IL13R $\alpha$ 2特异性scFv药剂化。这种scFv用于开发基于scFv的IL13R $\alpha$ 2特异性CAR(IL13R $\alpha$ 2-CAR),其在T细胞中表达时将提供具有细胞毒性效应功能的IL13R $\alpha$ 2-CAR T细胞。

[0373] 将抗原特异性T细胞并入用于扩散型内因性脑桥神经胶质瘤(diffuse intrinsic pontine glioma, DIPG)和成胶质细胞瘤(GBM)的有效免疫疗法中,所述瘤在儿童中是最具侵蚀性的均一致死性的原发性人类脑肿瘤。IL13R $\alpha$ 2在DIPG和GBM两者中而非在正常脑中以高频率表达,使得其成为用于T细胞免疫疗法和融合有提供效应功能的其它构架的scFv融合体的有前景的靶,所述T细胞免疫疗法包括基于scFv的疗法、基于scFv-CAR T细胞的疗法,所述scFv融合体如BITE和scFv-CAR-NK。已使用IL13的突变体形式作为CAR结合域产生IL13结合CAR,但这些CAR也识别IL13R $\alpha$ 1,产生重大的毒性问题。

[0374] 为克服这种限制,产生不识别IL13R $\alpha$ 1的高亲和力IL13R $\alpha$ 2特异性scFv。将一组IL13R $\alpha$ 2-CAR药剂化,其含有作为胞外域的IL13R $\alpha$ 2特异性scFv、短铰链(SH)或长铰链(LH)、CD28跨膜域和胞内域,所述胞内域含有衍生自CD3 $\zeta$ 的信号传导域和共刺激分子(例如CD28. $\zeta$ 、CD137. $\zeta$ 、CD28.CD137. $\zeta$ 、CD28.CD134. $\zeta$ )。IL13R $\alpha$ 2-CAR T细胞通过反转录病毒转导来产生,并且效应功能在体外使用共培养和细胞毒性分析确定,并且在体内使用U373脑异种移植模型确定(图21)。

[0375] 如通过蛋白质印迹分析所判断,所有CAR在T细胞中的表达是类似的。然而,取决于药剂的铰链和胞内域,CAR细胞表面表达是不同的。在细胞毒性分析中,各种IL13R $\alpha$ 2-CAR T细胞仅杀死表达IL13R $\alpha$ 2并且不表达IL13R $\alpha$ 1的靶细胞,确认了特异性(图18)。虽然所有IL13R $\alpha$ 2-CAR T细胞在与IL13R $\alpha$ 2<sup>+</sup>神经胶质瘤细胞系U373的共培养分析中分泌显著含量的IFN $\gamma$ (图19),但仅短铰链CAR T细胞分泌显著量的IL2(图20)。表达具有缺失胞内域的IL13R $\alpha$ 2-CAR(IL13R $\alpha$ 2 $\Delta$ -CAR)的T细胞不分泌细胞因子,确认细胞因子产生取决于功能IL13R $\alpha$ 2-CAR的存在。如通过生物发光成像所判断,体内IL13R $\alpha$ 2.SH.CD28. $\zeta$ -CAR T细胞于带有U373的小鼠中的注射使神经胶质瘤异种移植植物消退(图21)。IL13R $\alpha$ 2.LH.CD28. $\zeta$ -或IL13R $\alpha$ 2. $\Delta$ -CAR T细胞不具有抗肿瘤作用。数据确立到CAR仅识别IL13R $\alpha$ 2并且无IL13R $\alpha$ 1产生,并且CAR优先靶向表达IL13R $\alpha$ 2的肿瘤细胞。对若干IL13R $\alpha$ 2-CAR的比较揭露:如通过IL2产生和体内抗神经胶质瘤活性所判断,具有SH和CD28. $\zeta$ 胞内域的CAR产生显著的T细胞活化。结果显示儿童中原发性人类脑肿瘤例如高级神经胶质瘤的过继性免疫疗法是可行并有前景的。

[0376] 实例13

[0377] 体外和体内靶向细胞标记物

[0378] 在本实例中所公开的研究中,scFv47-靶向IL13R $\alpha$ 2的scFv-经显示拥有结合到IL13R $\alpha$ 2的排它性特异性。同样,scFv47经显示以高亲和力识别与亲本单克隆抗体相同的抗原决定基。此外,作为显示其治疗适用性的原理论证,通过将scFv47并入纤维-纤维蛋白修饰的腺病毒的纤维结域中构筑IL13R $\alpha$ 2靶向腺病毒载体<sup>21-23</sup>。体外和体内,纤维修饰成功地将病毒向性特异性地重新定向到IL13R $\alpha$ 2表达神经胶质瘤细胞。数据验证scFv47代表用于开发对患者的肿瘤表型进行特定调适的个人化治疗剂的价值试剂。

[0379] 材料和方法

[0380] 细胞系和试剂.

[0381] 纯化的抗c-myc抗体(克隆9E10)获自芝加哥大学的Frank W.Fitch单克隆抗体机构(Monoclonal Antibody Facility)。抗M13-HRP抗体获自安发玛西亚生物技术(Amersham Pharmacia Biotech)(瑞典乌普萨拉(Uppsala, Sweden))。山羊抗小鼠碱性磷

酸酶缀合物购自密苏里州圣路易斯的西格玛-奥德里奇 (Sigma-Aldrich St.Louis,MO)。使用人类胚胎肾 (HEK) 293、稳定表达Ad5野生型纤维的HEK 293-F28、中国仓鼠卵巢 (Chinese hamster ovary,CHO) 细胞、稳定表达人类CAR的CHO-hCAR细胞、CHO-IL13R $\alpha$ 219、U87MG和U251MG神经胶质瘤细胞系。为产生IL13R $\alpha$ 2+U251MG 和IL13R $\alpha$ 2.KDU251MG,用编码对照或IL13R $\alpha$ 2 shRNA的慢病毒粒子转导U251细胞 (西格玛-奥德里奇,密苏里州圣路易斯)。所转导的细胞用2 $\mu$ g/ml的嘌呤霉素选择并且 使用抗IL13R $\alpha$ 2单克隆抗体(克隆47)通过流式细胞测量术分析其IL13R $\alpha$ 2表达<sup>19</sup>。在补充有10%热不活化FBS(海克隆(Hyclone); 犹他州洛根)和青霉素-链霉素(美的 泰克公司(Mediatech,Inc.),弗吉尼亚州赫恩登(Herndon,VA))的DMEM培养基(美的 泰克公司,弗吉尼亚州赫恩登)中培养细胞系。对于神经球的形成,如先前所描述<sup>43</sup>,使神经胶质瘤细胞生长于补充有EGF和bFGF(浓度是20ng/ml)以及N10和B27补充剂(西格玛-奥德里奇,密苏里州圣路易斯)的神经基质培养基(生命技术(Life Technologies),俄勒冈州尤金(Eugene,OR))中,持续7天。源自患者的GBM43和GBM39神经胶质瘤细胞获自西北大学费恩伯格医学院(Northwestern University Feinberg School of Medicine)的Charles D.James博士。在裸小鼠的侧腹中经由连续传代繁殖细胞。

[0382] 克隆mAb IL13R $\alpha$ 2(克隆47)的scFv片段

[0383] 使用先前公开<sup>24,25</sup>的免疫球蛋白重链和轻链序列的一组基因特异性引物(表2)克隆针对人类IL13R $\alpha$ 2<sup>19</sup>的单克隆抗体(克隆47)的重链和轻链。如先前所描述<sup>44</sup>,再扩增重链和轻链cDNA以分别引入NcoI和HindIII以及MluI和NotI限制位点,用于后续亚克隆于噬菌粒载体pSEX 81中。通过电穿孔用由噬菌粒载体编码的scFv文库转化XL1 blue细胞,并且如先前所描述<sup>25</sup>产生噬菌体。使用涂布于96孔板上的重组型人类 IL13R $\alpha$ 2hFc融合蛋白(rhIL13R $\alpha$ 2hFc)(R&D Systems)在三轮中选择免疫反应性噬菌体。人类IgG充当阴性对照。针对由全大小scFv和scFv插件的上游和下游的质粒序列组成的适当大小PCR产物的存在,通过PCR筛选用阳性选择的噬菌体感染的细菌克隆的DNA。纯化约1000bp的八种PCR产物用于后续序列分析。将针对人类IL13R $\alpha$ 2的所获得的scFv指定为scFv47。为了产生可溶蛋白,如先前所描述<sup>24,44</sup>,在细菌表达盒中再克隆编码scFv47的cDNA。根据已确立的方案<sup>24</sup>利用XL-1 blue细胞产生可溶蛋白。

[0384] 表2

[0385]

引物	SEQ ID NO	重链	SEQ ID NO	轻 $\kappa$ 链
正向 1	117	5'-GATGTGAAGCTTCAGGAGTC-3'	118	5'-GATGTTTTGATGACCCAAACT-3'
正向 2	119	5'-CAGGTGCAGCTGAAGGAGTC-3'	120	5'-GATATTGTGATGACGCAGGCT-3'
正向 3	121	5'-CAGGTGCAGCTGAAGCAGTC-3'	122	5'-GATATTGTGATAACCCAG-3'
正向 4	123	5'-CAGGTTACTCTGAAAGAGTC-3'	124	5'-GACATTGTGCTGACCCAATCT-3'
正向 5	125	5'-GAGGTCCAGCTGCAACAATCT-3'	126	5'-GACATTGTGATGACCCAGTCT-3'
正向 6	127	5'-GAGGTCCAGCTGCAGCAGTC-3'	128	5'-GATATTGTGCTAACTCAGTCT-3'
正向 7	129	5'-CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCT-3'	130	5'-GATATCCAGATGACACAGACT-3'
正向 8	131	5'-GAGGTGAAGCTGGTGGAGTC-3'	132	5'-GACATCCAGCTGACTCAGTCT-3'
正向 9	133	5'-GAGGTGAAGCTGGTGGAAATC-3'	134	5'-CAAATTGTTCTCACCCAGTCT-3'
正向 10	135	5'-GATGTGAAGCTTGAAGTGTC-3'	136	5'-GACATTCTGATGACCCAGTCT-3'
正向 11	137	5'-GAGGTGCAGCTGGAGGAGTC-3'		n/a
反向	138	5'-GGCCAGTGGATAGTCAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC-3'	139	5'-GGATACAGTTGGTGCAGCATC-3'

### [0386] ELISA

[0387] 针对其与rhIL13R $\alpha$ 2蛋白的结合特异性,使用板ELISA分析来自所有轮次生物淘选的含有噬菌体的上清液。涂布有人类IgG的孔用作阴性对照。具体地说,用2%脱脂奶粉阻断孔30分钟,并且将含有噬菌体的上清液以不同稀释度施用到孔。在震荡下培育30分钟并且在无震荡的情况下再培育1.5小时后,用PBS/0.05%Tween 20洗涤未结合噬菌体,并且添加缀合有过氧化酶的抗M13抗体(安发玛西亚生物技术,瑞典乌普萨拉)(在2%脱脂奶粉中以1/2000稀释)。在用PBS/0.05%Tween 20充分洗涤后,针对ELISA使用1步慢3,3',5,5'-四甲基-联苯胺(TMB)底物使板显色,并且在用3N盐酸停止反应后在OD<sub>450</sub>下读取。

[0388] 对于可溶scFv47与rhIL13R $\alpha$ 2的结合的分析,用编码scFv47基因的用c-myc标记的表达载体转化XL-1 blue大肠杆菌的克隆,并且在补充有100mM葡萄糖和100 $\mu$ g/ml安比西林(LBGA)的LB培养基中将6-His序列生长过夜,如先前所描述<sup>24</sup>。将过夜培养物以1/100稀释并且在震荡(在37°C下250rpm)下于50ml LBGA培养基中生长,直至密度OD<sub>600</sub>=0.8。培育后,在1500g下离心细菌培养物10分钟。将离心块再悬浮于50ml含有0.4M蔗糖和0.1mM IPTG的LBGA培养基中,并且在室温(RT)下生长20小时。根据制造商的建议(赛默科技(Thermo Scientific),伊利诺斯州罗克福德(Rockford, IL))使用Co树脂从培养物上清液中获得纯化的可溶scFv47。在板ELISA中测试纯化的scFv47,并且亲和力如本文所描述研究。用2%脱脂奶粉阻断涂布有1 $\mu$ g/ml rhIL13R $\alpha$ 1或rhIL13R $\alpha$ 2蛋白的96孔板,并且在室温(RT)下施用各种浓度的scFv47,持续2小时。洗涤后,添加1 $\mu$ g/ml的抗c-myc单克隆抗体(克隆9E10)用于1小时培育,洗涤未结合抗体,并且随后用缀合到碱性磷酸酶的抗小鼠抗体(西格玛奥德里奇,密苏里州圣路易斯)显色。随后在分光光度计中在OD<sub>405</sub>下读取反应物。

### [0389] 竞争性分析

[0390] 用浓度是1 $\mu$ g/ml的100 $\mu$ l IL13R $\alpha$ 2hFc涂布易于洗液的96孔板(赛默科技,伊利诺斯州罗克福德),并且在4°C下储存过夜。在用PBS/0.05%Tween 20洗涤后,用2%脱脂奶粉阻断孔并且将其与浓度是2 $\mu$ g/ml的作为阴性对照的PBS或小鼠IgG1或一组抗IL13R $\alpha$ 2 mAb一起培育1小时,所述抗IL13R $\alpha$ 2 mAb与亲本抗IL13R $\alpha$ 2 mAb(克隆47)识别不重叠的抗原决定基<sup>19</sup>。在洗掉未结合抗体后,在第三轮的生物淘选后在室温下将含有噬菌体的上清液施用到所有孔,持续2小时。如本文所描述检测结合噬菌体。

### [0391] 表面等离子体共振和动力学分析

[0392] 如所描述<sup>19</sup>,用Biacore 3000生物传感器经由表面等离子体共振(SPR)测量scFv47与标靶(rhIL13R $\alpha$ 2)之间的相互作用的亲和力和速率。通过在固定化rhIL13R $\alpha$ 2上重复注射一系列标靶浓度来估算动力学参数。使用各种动力学模型分析每一个数据组,所述数据组由增加的scFv47浓度在相同水平的固定化rhIL13R $\alpha$ 2上的传感图组成。BIAevaluation v 4.1软件用于数据分析。使用1:1结合模型通过曲线拟合估算亲和常数。局部或总体地拟合传感图缔合和解离曲线。通过以下类型的方程式描述样品注射期间复合物形成的速率:
$$dR/dt = k_a C (R_{max} - R) - k_d R$$
(针对1:1相互作用)(R=呈RU形式的SPR信号;C=分析物的浓度;R<sub>max</sub>=呈RU形式的最大的分析物结合能力;dR/dt=SPR信号的改变速率)。早期结合阶段(300秒)用以确定mAb与标靶之间的缔合常数(k<sub>a</sub>)。在标靶注射结束时使用引入游离缓冲液时RU的降低速率测量解离阶段(k<sub>d</sub>)。通过软件程序(全局拟合算法)同时拟合数据,并且将复合物的解离常数(K<sub>D</sub>)确定为比率k<sub>a</sub>/k<sub>d</sub>。对于定量分析,对每一个样品进行3次独立的



重复。数据表述为平均值 $\pm$ SEM。

#### [0393] 腺病毒基因修饰和病毒产生

[0394] 为了产生纤维穿梭载体,使用含有纤维-纤维蛋白的基因的pKan 566腺病毒基因组(圣路易斯华盛顿大学(Washington University in Saint Louis)的Curiel博士友情赠送)。通过使用标准分子技术将scFv47的cDNA插入在纤维-纤维蛋白的C末端处,产生pKan-scFv47FF<sup>21,27,45</sup>。使用这种纤维穿梭载体,产生重组HAd5骨架,其含有增强型绿色荧光蛋白(eGFP),处于E1缺失区中的CMV启动子的控制下(不可复制型 Ad5scFv47FF-CMV-GFP)。在HEK293-F28细胞中拯救重组病毒并且随后在HEK293细胞中扩展。通过两轮CsCl梯度超速离心来纯化病毒<sup>27</sup>。

#### [0395] 流式细胞测量术

[0396] 为了分析IL13R $\alpha$ 2在细胞表面上的表达,用2 $\mu$ g/mL的抗IL13R $\alpha$ 2(克隆47)mAb染色U87MG和U251MG神经胶质瘤细胞系,随后用山羊抗小鼠Alexa Fluor 647(1:500)染色。在冰上进行所有染色程序。基于GFP表达来分析使用对照或Ad5FFscFv47病毒的神经胶质瘤细胞的转导。使用BD FACS Canto流式细胞仪和FACS DiVa<sup>TM</sup>软件分析样品。

#### [0397] PCR分析

[0398] 含有Ad5-CMV-GFP和Ad5FFscFv47-CMV-GFP病毒粒子( $10^9$ 个)中的病毒DNA用作模板,使用以下引物组来进行PCR扩增:HA d V 5特异性引物组:正向:5'-CAGCTCCATCTCCTAACTGT-3'(SEQ ID NO:140)和反向:5'-TTCTTGGGCAATGTATGAAA-3'(SEQ ID NO:141),以及scFv47特异性引物组:正向:5'-CAGGTCCAACCTGCAGCA-3'(SEQ ID NO:142)和反向:5'-TTTGATTTCCAGCTTGGT-3'(SEQ ID NO:143)。

#### [0399] 蛋白质印迹

[0400] 在勒姆利(Laemmli)缓冲液中稀释含有scFv47或纯化的腺病毒粒子的XL1-blue大肠杆菌细胞的上清液,在室温(未煮沸样品)下或在95 $^{\circ}$ C(煮沸样品)下培育10min,并且负载于7.5%SDS-聚丙烯酰胺凝胶(伯乐(Bio-Rad),加利福尼亚州埃库莱斯(Hercules))上。电泳分离后,将样品转移于PVDF膜上,并且针对可溶scFv47或抗纤维尾mAb4D2的检测,用1 $\mu$ g/ml的抗myc mAb(9E10)(1:3,000)(赛默科技,伊利诺斯州罗克福德)检测,随后用HRP标记的抗小鼠IgG二级抗体(1:5,000)(圣克鲁斯,美国加利福尼亚州)检测。

#### [0401] 定量实时实时PCR(qRT-PCR)分析

[0402] 通过qRT-PCR来表征以粘附培养物形式或以神经球形式生长的U87MG细胞中的IL13R $\alpha$ 2表达。使用RNeasy plus试剂盒(凯杰,马萨诸塞州波士顿(Boston))从神经胶质瘤细胞中分离RNA,并且使用iScript cDNA转化试剂盒(伯乐(Biorad),美国加利福尼亚州)反向转录。使用SYBR绿色qPCR试剂盒(伯乐,美国加利福尼亚州),用以下引物进行qRT-PCR:GAPDH正向引物:5'-GGTCGGAGTCAACGGATTTGG-3'(SEQ ID NO:144);GAPDH反向引物:5'-CATGGGTGGAATCATATTGGAAC-3'(SEQ ID NO:145);IL13R $\alpha$ 2正向引物:5'-TTGGGACCTATTCCAGCAAGGTGT-3'(SEQ ID NO:146);IL13R $\alpha$ 2反向引物:5'-CACTCCACTCACTCCAAATCCCGT-3'(SEQ ID NO:147)。对于IL13R $\alpha$ 2表达的相对定量,将所有IL13R $\alpha$ 2值归一化成甘油醛3磷酸脱氢酶(GAPDH)表达值。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法<sup>46</sup>进行数据分析。

#### [0403] 病毒感染力分析

[0404] 将细胞( $3 \times 10^5$ 个)接种在24孔板中并且培育过夜。对于单克隆抗IL13R $\alpha$ 2抗体介导的抑制分析,将2 $\mu$ g抗IL13R $\alpha$ 2 mAb(克隆47)添加到细胞中并且在4°C下使其培育1小时。在500 $\mu$ l含有于DMEM中的2%FBS的感染培养基中,将每一个病毒样品稀释到300个病毒粒子(vp)/细胞的感染复数。在37°C下用Ad5FFscFv47-CMV-GFP感染细胞2小时。随后用含有2%FBS的新鲜培养基替代含有病毒的培养基,并且在37°C下在含有5%CO<sub>2</sub>的大气加湿下将细胞保持3天,随后如本文所描述进行流式细胞测量术分析。

#### [0405] 动物实验

[0406] 雄性无胸腺/裸小鼠获自查尔斯河实验室(Charles River Laboratory)(马萨诸塞州威明顿(Wilmington)),并且根据芝加哥大学机构动物照护与使用委员会(University of Chicago Institutional Animal Care and Use Committee)认可的研究特定动物方案照护。对于肿瘤细胞植入,用氯胺酮/甲苯噻嗪混合物(115/17mg/kg)麻醉小鼠。制备钻孔以允许进行使用10 $\mu$ l汉密尔顿注射器(汉密尔顿,内华达州里诺(Reno,NV))进行的立体定位注射。将针安装到小鼠特异性立体定位仪器(哈佛仪器(Harvard Apparatus),马萨诸塞州霍利斯顿(Holliston)),并且随后通过钻孔插入到3mm深的解剖位置。具体地说,小鼠植入有IL13R $\alpha$ 2+U251MG的颅内神经胶质瘤异种移植物或IL13R $\alpha$ 2.KDU251MG细胞( $5.0 \times 10^5$ 个细胞)。肿瘤植入后十天,在与肿瘤细胞相同的座标中用5 $\mu$ l PBS中的10<sup>9</sup>个Ad5FFscFv47-CMV-GFP的病毒粒子(vp)注射小鼠,并且3天后处死。

#### [0407] 共焦显微镜

[0408] 将快速冷冻的脑肿瘤组织切成10 $\mu$ m厚。固定组织切片并且染色人类巢蛋白以使用小鼠mAb(R&D systems,明尼苏达州明尼阿波利斯)观察U251神经胶质瘤细胞。为分析使用Ad5FFscFv47-CMV-GFP的神经胶质瘤细胞的转导,使用生物素化抗GFP抗体(生命技术,俄勒冈州尤金)和抗生物素化链菌素-Alexa Fluor647(杰克逊免疫研究,宾夕法尼亚州西格罗夫)揭露转基因GFP表达。使用DAPI核染色观察细胞核。用3i Marianas Yokogawa型旋转盘共焦显微镜捕获共焦显微图像,所述共焦显微镜具有Evolve EM-CCD相机(Photometrics,亚利桑那州土桑(Tucson,AZ)),运行SlideBook v5.5软件(Intelligent Imaging Innovations,科罗拉多州丹佛(Denver,CO))。

#### [0409] 统计分析

[0410] 使用格拉夫帕德Prism 4(格拉夫帕德软件公司(GraphPad Software Inc.)),加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego))进行所有统计分析。每组的样品大小 $\geq 3$ ,并且数字数据按平均值 $\pm$ SEM报导。史都登氏t检验用于两组之间的比较,并且使用杜凯氏事后检验的ANOVA用于多于两个组之间的比较。所有被报导的p值是双侧的并且在\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001下视为统计学上显著的。

[0411] mAb47的克隆和表征scFv片段。

[0412] 单克隆抗IL13R $\alpha$ 2(克隆47)抗体拥有独特特性,如与IL13R $\alpha$ 2的原生抗原决定基强结合,与IL13R $\alpha$ 2的相互作用的高亲和力,和与IL13竞争其在IL13R $\alpha$ 2上的识别位点的能力<sup>19</sup>。在这个实例中报导scFv47从分泌亲本抗体(克隆47)的杂交瘤细胞系中的工程改造。对来自这个杂交瘤细胞系的mRNA的分析揭露对应于抗IL13R $\alpha$ 2单克隆抗体的重链和轻链,存在多个转录物(图12a)<sup>24,25</sup>。为了获得组装在scFv47中的重链和轻链可变区的功能组合,使用噬菌体呈现方法<sup>24,25</sup>。出于所述原因,产生呈scFv型式的重链和轻链变异体的噬菌体

文库,并且如下文所描述针对重组人类IL13R $\alpha$ 2 (rhIL13R $\alpha$ 2)进行筛选。

[0413] 在产生scFv47后,验证其对rhIL13R $\alpha$ 2的结合特异性。为此目的,产生所有轮次的生物淘选期间的含有噬菌体的上清液,并且通过ELISA分析与rhIL13R $\alpha$ 2的结合特异性。图12b和13显示随着每一后续轮次的生物淘选,噬菌体与rhIL13R $\alpha$ 2蛋白的相互作用的特异性大大增加,然而与阴性对照人类IgG的非特异性结合降低到不可检测的水平。在最后一轮的生物淘选后,产生个别噬菌体克隆。对感染有个别噬菌体克隆的XL1 blue 大肠杆菌的序列分析揭露到所有所选择噬菌体含有相同的scFv47序列。因此,这些数据指示经由三轮的噬菌体生物淘选,成功地产生scFv47。

[0414] 然后,进行竞争性分析以确定新克隆的scFv47和亲本mAb IL13R $\alpha$ 2(克隆47)是否结合到IL13R $\alpha$ 2分子上的同一抗原决定基。图13显示mAb IL13R $\alpha$ 2(克隆47)完全防止scFv47表达噬菌体与固定化rhIL13R $\alpha$ 2蛋白的相互作用。对照mIgG和针对IL13R $\alpha$ 2的三种其它mAb,其识别人类IL13R $\alpha$ 2上的mAb IL13R $\alpha$ 2(克隆47)的不重叠抗原决定基<sup>19</sup>,干扰scFv47与IL13R $\alpha$ 2的结合。这种结果证实scFv47共享与亲本单克隆抗体相同的IL13R $\alpha$ 2上的识别位点。

[0415] 进一步验证可溶scFv47与IL13R $\alpha$ 2的结合的特异性。对此,在XL1 blue大肠杆菌中产生可溶scFv47并且如本文所描述纯化。对板ELISA中可溶scFv47的结合的分析证实缺乏与rhIL13R $\alpha$ 1的相互作用和与rhIL13R $\alpha$ 2的特异性结合(图31a)。图31b显示可溶scFv47蛋白的分子量是约30kDa,这对应于其预测值。此外,等离子共振分析揭露类似于亲本抗体<sup>19</sup>,可溶scFv47以高亲和力( $0.9 \times 10^{-9}$ M)结合到rhIL13R $\alpha$ 2(图31c)。确切地说,发现scFv具有 $k_a(1/\text{Ms}) = 3.08\text{e}3 \pm 16$ 、 $k_d(1/\text{s}) = 2.63\text{e}-6 \pm 1.8\text{e}-8$ 、 $K_D(\text{M}) = 0.9 \times 10^{-9}$ 和 $R_{\text{max}}(\text{RU}) = 496$ 。如本文所描述对结合到人类重组IL13R $\alpha$ 2的scFv47的动力学参数进行估算。复合物的解离常数( $K_D$ )确定为比率 $k_d/k_a$ 。对于定量分析,每一个样品有3个独立的重复。数据表述为平均值 $\pm$ SEM。这些数据证实scFv47与rhIL13R $\alpha$ 2的亲合力类似于亲本抗IL13R $\alpha$ 2 mAb(克隆47)( $1.39 \times 10^{-9}$ )<sup>19</sup>。因此,如通过scFv47表达噬菌体和可溶scFv47与rhIL13R $\alpha$ 2的特异性相互作用所确定,认为所获得的scFv47具有完整的功能。

[0416] IL13R $\alpha$ 2靶向腺病毒载体的产生。

[0417] 为将病毒向性重新定向到IL13R $\alpha$ 2,对腺病毒的病毒纤维干和结域进行遗传修饰<sup>22,26</sup>。首先,用纤维-纤维蛋白(FF)三聚域替代干域以确保结合基元结构的稳定性,并且随后将scFv47并入FF干域的C末端中(图32a)。纯化的Ad5scFv47FF-CMV-GFP病毒效价与Ad5-CMV-GFP的效价相当,指示scFv47并入不影响病毒的产生(图37)。为确认纤维的遗传修饰,使用纤维特异性或scFv47特异性引物组,用纯化的病毒DNA进行PCR分析。图32b证实scFv47成功并入腺病毒(Ad5FFscFv47)的FF域中。此外,野生型和重组病毒的蛋白质印迹分析进一步确认(图32c)新嵌合纤维具有类似于野生型纤维的组成,指示并入scFv47不阻碍纤维三聚或不导致纤维结构不稳定。

[0418] CAR不依赖性感染的论证。

[0419] 人类血清5型腺病毒(Ad5)的主要受体是柯沙奇(coxsackie)和腺病毒受体(CAR)<sup>27-29</sup>。因此,预期Ad5FFscFv47病毒将以CAR不依赖性方式感染细胞。为确认我们的修饰使CAR结合能力丧失,在人类CAR(hCAR)阴性和hCAR阳性(CHO-hCAR)中国仓鼠卵巢细胞系中分析Ad5FFscFv47和野生型病毒Ad5-CMV-GFP的病毒感染力,所述Ad5FFscFv47在CMV启动

子的控制下编码绿色荧光蛋白 (Ad5FFscFv47-CMV-GFP)。图33a证实野生型Ad5-CMV-GFP有效地感染CHO-hCAR 而非hCAR阴性CHO细胞,而Ad5FFscFv47-CMV-GFP在任一细胞系中显示极小的感染力,指示CAR结合能力丧失。

[0420] 体外神经胶质瘤细胞的IL13R $\alpha$ 2特异性感染。

[0421] 为证实Ad5FFscFv47-CMV-GFP病毒所致的IL13R $\alpha$ 2特异性感染力,将病毒暴露于CHO和CHO-IL13R $\alpha$ 2细胞系<sup>19</sup>。如图33b、c中所示,Ad5FFscFv47-CMV-GFP有效地感染CHO-IL13R $\alpha$ 2细胞(80%的IL13R $\alpha$ 2细胞是GFP阳性的)而非IL13R $\alpha$ 2阴性的对照CHO细胞。为进一步验证Ad5FFscFv47-CMV-GFP的IL-13R $\alpha$ 2依赖性感染力,在U87MG和U251MG细胞系中分析病毒转导。也在源自患者的原代GBM43和GBM39神经胶质瘤细胞中评估Ad5FFscFv47-CMV-GFP感染力,所述神经胶质瘤细胞内源地表达不同含量的IL13R $\alpha$ 2(图33d)。流式细胞测量术分析揭露Ad5FFscFv47-CMV-GFP的感染力强烈地与所分析细胞系中的IL13R $\alpha$ 2表达水平相关。分别在约20%U87MG和90%U251MG神经胶质瘤细胞系以及1%和20%的GBM39和GBM43神经胶质瘤细胞中观测GFP表达(图33e)。相反,根据通过神经胶质瘤细胞的充分表征的低水平CAR表达<sup>30,31</sup>,观测到两种神经胶质瘤细胞系的野生型Ad5-CMV-GFP感染处于极低水平下。重要地,Ad5FFscFv47-CMV-GFP在U251MG细胞中的感染力随着分析中所使用的病毒感染复数(MOI)按比例增加(图33f),而不引起任何可观测的细胞毒性。

[0422] 为进一步验证Ad5FFscFv47-CMV-GFP的IL13R $\alpha$ 2依赖性感染力,经由用分别编码对照或IL13R $\alpha$ 2特异性shRNA的慢病毒转导,产生两种细胞系IL13R $\alpha$ 2+U251MG和IL13R $\alpha$ 2.KDU251MG。慢病毒转导后,IL13R $\alpha$ 2+U251MG细胞在其细胞表面上保持极高(高于92%的阳性细胞)的IL13R $\alpha$ 2表达,而IL13R $\alpha$ 2.KDU251MG神经胶质瘤细胞大多数是IL13R $\alpha$ 2阴性的(约12%的IL13R $\alpha$ 2阳性细胞)(图34a)。Ad5FFscFv47-CMV-GFP感染超过90%的IL13R $\alpha$ 2+U251MG细胞和小于5%的IL13R $\alpha$ 2.KDU251MG细胞(图34b)。此外,在竞争性分析中,抗IL13R $\alpha$ 2 mAb有效地抑制通过Ad5FFscFv47-CMV-GFP的U251MG细胞的感染(图34c)。总起来说,这些数据证实类似于scFv47蛋白,Ad5FFscFv47是IL13R $\alpha$ 2特异性病毒药剂。

[0423] 类干细胞癌症神经胶质瘤细胞通过Ad5FFscFv47病毒的感染。

[0424] 由于癌症干细胞已作为潜在靶用于成胶质细胞瘤治疗,因此如本文所描述,体外通过培养呈神经球形式的U87MG细胞模拟癌症类干细胞特性。IL13R $\alpha$ 2表达的分析揭露到与以粘附(例如分化)形式生长的细胞相比,U87MG神经球具有比其高13倍的mRNA表达和高1.7倍的表面蛋白质表达(图35a、b)。相应地,Ad5FFscFv47-CMV-GFP感染力在神经球中比在粘附生长的U87MG细胞中高约1.6倍(图35c、d)。为进一步验证Ad5FFscFv47-CMV-GFP转导衍生自IL13R $\alpha$ 2表达神经胶质瘤细胞的神经球的能力,分析源自患者的原代神经胶质瘤细胞和GBM39和GBM43。虽然在呈神经球形式培养的GBM39和GBM43细胞系两者中观测到IL13R $\alpha$ 2 mRNA的表达略微地增加,但在任一细胞系中,不可检测到IL13R $\alpha$ 2的表面表达或使用Ad5FFscFv47-CMV-GFP的感染力的变化(图38)。在所有所研究的神经胶质瘤细胞系中,Ad5FFscFv47-CMV-GFP感染力与细胞表面上的IL13R $\alpha$ 2表达水平良好相关。

[0425] 因此,我们的数据指示使用scFv47靶向治疗剂,如scFv47工程改造的腺病毒,对IL13R $\alpha$ 2过表达癌症干细胞的靶向是高度可实行的。

[0426] 体内IL13R $\alpha$ 2特异性感染的论证。

[0427] 总起来说,本文所公开和上文所描述的体外分析证实Ad5FFscFv47-CMV-GFP特异

性感染IL13R $\alpha$ 2表达神经胶质瘤细胞。然后,在神经胶质瘤的异种移植物鼠类模型中,使用颅内植入的IL13R $\alpha$ 2+U251MG和IL13R $\alpha$ 2.KDU251MG细胞,体内验证 Ad5FFscFv47-CMV-GFP感染力的特异性。如通过GFP转基因表达的缺乏所判断,在大部分IL13R $\alpha$ 2阴性IL13R $\alpha$ 2.KDU251MG异种移植物组织中或在肿瘤周围的脑组织中,未检测到感染(图36a)。然而,观测到表达IL13R $\alpha$ 2的IL13R $\alpha$ 2+U251MG异种移植物的高感染水平,并且再一次,在邻近于肿瘤的脑组织中不可检测到GFP信号(图36b)。因此,所述数据确认Ad5FFscFv47-CMV-GFP不仅在体外而且在体内能够特异性转导 IL13R $\alpha$ 2表达肿瘤细胞。

[0428] 公开一种scFv,即,scFv47,其经由噬菌体呈现方法由亲本抗IL13R $\alpha$ 2单克隆抗体产生。scFv47经显示以排他性的高亲和力特异性地识别原生IL13R $\alpha$ 2,并且识别与亲本抗IL13R $\alpha$ 2 mAb(克隆47)相同的抗原决定基。此外,scFv47经证实成功地并入腺病毒载体中并且Ad5FFscFv47-CMV-GFP病毒也在体外和体内排他性地感染IL13R $\alpha$ 2表达神经胶质瘤细胞。

[0429] 一系列靶向IL13R $\alpha$ 2的免疫治疗剂已展现临床前的前景<sup>10,11,32,33</sup>,但那些药剂也识别分布广泛的IL13R $\alpha$ 1,指示仍需要特异性靶向剂<sup>10,11,34</sup>。为了提高IL13R $\alpha$ 2靶向特异性,产生排他性地识别IL13R $\alpha$ 2蛋白上的原生抗原决定基的单克隆抗体。然而,工程改造的抗体片段具有优于全抗体的优势,因为其可以易于被遗传操控并且并入治疗剂中。考虑到这些,scFv47单链可变片段被工程改造为各种治疗剂的IL13R $\alpha$ 2特异性靶向部分。

[0430] 本文所公开的数据证实scFv47通过重新定向常用抗癌剂腺病毒的向性(经由修饰其纤维)而具有治疗适用性。尽管已知因scFv自身和纤维三聚的稳定性所致,scFv于腺病毒纤维中的并入较困难<sup>21,23</sup>,但scFv47修饰的纤维展现与野生型腺病毒纤维的稳定性相当的稳定性,并且Ad5FFscFv47-CMV-GFP不再能够识别原生腺病毒受体CAR。取而代之,病毒在体外和体内均排他性地感染IL13R $\alpha$ 2表达细胞。本文所公开的结果验证 scFv47为高度选择性的IL13R $\alpha$ 2靶向剂,并且确认其可以用于将腺病毒向性重新定向到癌症和癌症类干细胞神经胶质瘤细胞。

[0431] 最近,研究聚焦于鉴别可以成功地根除癌症干细胞的治疗剂,所述癌症干细胞对传统的抗癌疗法具有抵抗性并且认为负责治疗性治疗后的癌症复发<sup>35</sup>。基于这些特性,神经胶质瘤干细胞是用于治疗性靶向的高度有吸引力的肿瘤细胞子组。与先前报导<sup>36,37</sup>一致,IL13R $\alpha$ 2的表达在呈神经球生长的源自患者的原代神经胶质瘤细胞中得到维持,这准许通过Ad5FFscFv47-CMV-GFP病毒有效转导这些细胞。最近IL13R $\alpha$ 2表达与增加的恶性病级别和较差患者预后相关<sup>17</sup>。因此,提供一种特异性靶向IL13R $\alpha$ 2表达类干细胞和分化的神经胶质瘤细胞的治疗选择将对患有最具侵蚀性并且最难以治疗的癌症中的一些的患者有益处。

[0432] 先前,已显示几乎50%的GBM患者具有表达IL13R $\alpha$ 2的肿瘤<sup>38</sup>,百分比比其它常用的神经胶质瘤特异性标记物EGFRvIII39更高,这指示这种分子标靶对大多数GBM患者的重要性<sup>38</sup>。此外,神经胶质瘤细胞死亡后,‘抗原决定基扩散(epitope spreading)’的现象可能增强针对肿瘤的免疫应答,并且进一步去除肿瘤,包括去除甚至那些不表达最初靶向抗原的细胞<sup>40</sup>。随着更多的神经胶质瘤特异性药剂被开发,可以给予个人化治疗混合物以获得针对既定患者神经胶质瘤表型的加强特异性和功效。

[0433] 总之,scFv47可以充当IL13R $\alpha$ 2定向治疗剂的特异性靶向剂,所述治疗剂如T和NK

免疫细胞、融合蛋白、纳米载体、病毒和其它药剂。恶性神经胶质瘤的大量分子异 质性可能对有效靶向疗法的缺乏有贡献。目前,存在针对患有神经胶质瘤的患者的个人 疗法所设计的若干活跃和待定的临床试验。最终,随着靶向疗法武器(arsenal)的开发,如特异性靶向并且破坏IL13R $\alpha$ 2表达肿瘤细胞和其它肿瘤相关抗原如EGFRvIII的药剂,个人化治疗方案可以结合传统疾病疗法如手术和辐射来实施,以改善患有GBM的患者 的结果。

[0434] 仅针对实例13的参考文献

[0435] 1.Stupp,R.等人用于成胶质细胞瘤的放射疗法加伴随和佐剂替莫唑胺(Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma).《新英格兰 医学杂志(N Engl J Med)》352,987-996(2005).

[0436] 2.Zheng,S.等人纤维结修饰增强恶性神经胶质瘤中的腺病毒向性和基因转移(Fiber-knob modifications enhance adenoviral tropism and gene transfer in malignant glioma).《基因医学杂志(Thejournal of gene medicine)》9,151-160(2007).

[0437] 3.Van Houdt,W.J.等人人类存活素启动子:用于治疗神经胶质瘤的新颖转录靶向策略(The human survivin promoter:a novel transcriptional targeting strategy for treatment of glioma).《神经外科杂志(J Neurosurg)》104,583-592(2006).

[0438] 4.Ulasov,I.V.等人对用于神经胶质瘤基因疗法的转录靶向的存活素、中期因子和 CXCR4启动子的比较评估(Comparative evaluation of survivin,midkine and CXCR4 promoters for transcriptional targeting of glioma gene therapy).《癌症生物学与疗法 (Cancer biology&therapy)》6,679-685(2007).

[0439] 5.Ulasov,I.V.等人存活素驱动并且纤维修饰的溶瘤腺病毒在所确立的颅内神经胶质瘤中展现有力的抗肿瘤活性(Survivin-driven and fiber-modified oncolytic adenovirus exhibits potent antitumor activity in established intracranial glioma).《人类基因疗法 (Human gene therapy)》18,589-602(2007).

[0440] 6.Ulasov,I.V.等人腺病毒病毒疗法和替莫唑胺化学疗法的组合在体内经由自噬性和凋亡细胞死亡根除恶性神经胶质瘤(Combination of adenoviral virotherapy and temozolomide chemotherapy eradicates malignant glioma through autophagic and apoptotic cell death in vivo).《英国癌症杂志(British journal of cancer)》100,1154-1164(2009).

[0441] 7.Chakravarti,A.等人定量确定的存活素表达水平在人类神经胶质瘤中具有预后价值(Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas).《临床肿瘤学杂志:美国临床肿瘤学学会的官方杂志(Journal of clinical oncology:official journal of the American Society of Clinical Oncology)》20,1063-1068 (2002).

[0442] 8.Uematsu,M.等人神经胶质瘤中存活素的免疫组织化学指数的预后显著性:具有MIB-1指数的比较研究(Prognostic significance of the immunohistochemical index of survivin in glioma:a comparative study with the MIB-1 index).《神经肿瘤学杂志(Journal of neuro-oncology)》72,231-238(2005).

[0443] 9.Choi,B.D.等人靶向EGFRvIII的双特异性抗体的系统性给药成功地治疗脑内神经胶质瘤(Systemic administration of a bispecific antibody targeting EGFRvIII

successfully treats intracerebral glioma).《美利坚合众国国家科学院院刊 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)》110,270-275 (2013) .

[0444] 10.Kong,S.等人使用第二代IL13R特异性嵌合抗原受体修饰的T细胞抑止人类神经胶质瘤异种移植物 (Suppression of human glioma xenografts with second-generation IL13R-specific chimeric antigen receptor-modified T cells).《临床癌症研究:美国癌症研究协会的官方杂志 (Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research)》18,5949-5960 (2012) .

[0445] 11.Krebs,S.等人具有白介素-13突变蛋白-嵌合抗原受体的重新定向到白介素-13R $\alpha$ 2的T细胞具有抗神经胶质瘤活性并且也识别白介素-13R $\alpha$ 1 (T cells redirected to interleukin-13R $\alpha$ 2 with interleukin-13 mutein-chimeric antigen receptors have anti-glioma activity but also recognize interleukin-13R $\alpha$ 1).《细胞疗法 (Cytotherapy)》16,1121-1131 (2014) .

[0446] 12.Riccione,K.等人在成胶质细胞瘤标准护理的情形下用于过继性疗法的CAR T细胞的产生 (Generation of CAR T Cells for Adoptive Therapy in the Context of Glioblastoma Standard of Care).《可视化实验期刊:JoVE (Journal of visualized experiments:JoVE)》,doi:10.3791/52397 (2015) .

[0447] 13.Zitron,I.M.等人用装备有双特异性抗体的活化T细胞靶向并且杀死成胶质细胞瘤 (Targeting and killing of glioblastoma with activated T cells armed with bispecific antibodies).《生物医学中心癌症 (BMC cancer)》13,83 (2013) .

[0448] 14.Debinski,W.,Obiri,N.I.,Powers,S.K.,Pastan,I.&Puri,R.K.人类神经胶质瘤细胞过度表达白介素13和由白介素13和假单胞菌外毒素构成的新颖嵌合蛋白的受体并且对新颖嵌合蛋白极敏感 (Human glioma cells overexpress receptors for interleukin 13 and are extremely sensitive to a novel chimeric protein composed of interleukin 13 and pseudomonas exotoxin).《临床癌症研究:美国癌症研究协会的官方杂志 (Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research)》1, 1253-1258 (1995) .

[0449] 15.Joshi,B.H.,Plautz,G.E.&Puri,R.K.白介素-13受体 $\alpha$ 链:人类恶性神经胶质瘤的原始外植体中的新颖肿瘤相关跨膜蛋白 (interleukin-13 receptor alpha chain:a novel tumor-associated transmembrane protein in primary explants of human malignant gliomas).《癌症研究》60,1168-1172 (2000) .

[0450] 16.Jarboe,J.S.,Johnson,K.R.,Choi,Y.,Lonser,R.R.&Park,J.K.白介素-13受体 $\alpha$ 2在多形性成胶质细胞瘤中的表达:靶向疗法的推论 (Expression of interleukin-13 receptor alpha2 in glioblastoma multiforme:implications for targeted therapies).《癌症研究》67,7983-7986 (2007) .

[0451] 17.Brown,C.E.等人神经胶质瘤IL13R $\alpha$ 2与间叶细胞标签基因表达和不良患者预后相关 (Glioma IL13R $\alpha$ 2 Is Associated with Mesenchymal Signature Gene Expression and Poor Patient Prognosis).《公共科学图书馆期刊 (PLoS One)》8,e77769 (2013) .

- [0452] 18.Ulasov,I.V.,Tyler,M.A.,Han,Y.,Glasgow,J.N.&Lesniak,M.S.靶向白介素-13 受体 $\alpha$ 2链的新颖重组腺病毒载体准许到恶性神经胶质瘤的有效基因转移 (Novel recombinant adenoviral vector that targets the interleukin-13 receptor alpha2 chain permits effective gene transfer to malignant glioma).《人类基因疗法》18, 118-129 (2007) .
- [0453] 19.Balyashikova,I.V.等人靶向白介素 (IL) -13受体 $\alpha$ 2的新颖抗体的表征和免疫治疗推论 (Characterization and immunotherapeutic implications for a novel antibody targeting interleukin (IL) -13 receptor alpha2).《生物化学杂志 (The Journal of biological chemistry)》287,30215-30227 (2012) .
- [0454] 20.Bartolomé,R.A.等人IL13受体 $\alpha$ 2信号传导需要骨架蛋白FAM120A以在结肠癌转移中活化FAK和PI3K路径 (IL13 Receptor  $\alpha$ 2 Signaling Requires a Scaffold Protein, FAM120A,to Activate the FAK and PI3K Pathways in Colon Cancer Metastasis).《癌症研究》75,2434-2444 (2015) .
- [0455] 21.Hedley,S.J.等人具有并入稳定化单链抗体的嵌合纤维的腺病毒载体实现靶向的基因递送 (An adenovirus vector with a chimeric fiber incorporating stabilized single chain antibody achieves targeted gene delivery).《基因疗法 (Gene Ther)》13,88-94 (2006) .
- [0456] 22.Krasnykh,V.,Belousova,N.,Korokhov,N.,Mikheeva,G.&Curiel,D.T.经由用噬菌体T4纤维蛋白替代纤维蛋白质的腺病毒载体的基因靶向 (Genetic targeting of an adenovirus vector via replacement of the fiber protein with the phage T4 fibritin).《病毒学杂志 (Journal of virology)》75,4176-4183 (2001) .
- [0457] 23.Kaliberov,S.A.等人使用遗传并入的骆驼科单可变域的腺病毒靶向 (Adenoviral targeting using genetically incorporated camelid single variable domains).《实验室调查; 技术方法和病变杂志 (Laboratory investigation;a journal of technical methods and pathology)》94,893-905 (2014) .
- [0458] 24.Kipriyanov,S.M.,Kupriyanova,O.A.,Little,M.&Moldenhauer,G.通过流式细胞测量术的针对细胞表面抗原的重组抗体片段的快速检测 (Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry).《免疫方法杂志 (Journal of immunological methods)》196,51-62 (1996) .
- [0459] 25.Toleikis,L.,Broders,O.&Dubel,S.从杂交瘤细胞中克隆单链抗体片段 (scFv) (Cloning single-chain antibody fragments (scFv) from hybridoma cells).《分子药理学方法 (Methods in molecular medicine)》94,447-458 (2004) .
- [0460] 26.Curiel,D.T.使用于靶向递送的腺病毒载体适应的策略 (Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery).《纽约科学院年鉴 (Annals of the New York Academy of Sciences)》886,158-171 (1999) .
- [0461] 27.Kim,J.W.等人具有并入纤维-纤维蛋白嵌合体中的噬菌体呈现衍生的肽的遗传修饰的腺病毒载体延长实验神经胶质瘤的存活 (A Genetically Modified Adenoviral Vector with a Phage Display Derived Peptide Incorporated into Fiber Fibrin Chimera Prolongs Survival in Experimental Glioma).《人类基因疗法》(2015) .



- [0462] 28. Bergelson, J.M. 等人柯沙奇B病毒以及腺病毒2和5的常见受体的分离 (Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5).《科学》(纽约州纽约)275,1320-1323 (1997).
- [0463] 29. Tomko, R.P., Xu, R. & Philipson, L. HCAR和MCAR:用于子组C腺病毒和组B 柯沙奇病毒的人类和小鼠细胞受体 (HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses).《美利坚合众国国家科学院院刊》94,3352-3356 (1997).
- [0464] 30. Fuxe, J. 等人柯沙奇和腺病毒受体在人类星形胶质细胞肿瘤和异种移植植物中的表达 (Expression of the coxsackie and adenovirus receptor in human astrocytic tumors and xenografts. International journal of cancer).《国际癌症杂志 (Journal international du cancer)》103,723-729 (2003).
- [0465] 31. Asaoka, K., Tada, M., Sawamura, Y., Ikeda, J. & Abe, H. 在恶性神经胶质瘤细胞中的有效腺病毒基因递送对柯萨奇病毒和腺病毒受体的表达水平的依赖性 (Dependence of efficient adenoviral gene delivery in malignant glioma cells on the expression levels of the Coxsackievirus and adenovirus receptor).《神经外科杂志》92,1002-1008 (2000).
- [0466] 32. Allen, C. 等人呈现白介素-13的再靶向溶瘤麻疹病毒株在改善的特异性下具有针对神经胶质瘤的显著活性 (Interleukin-13 displaying retargeted oncolytic measles virus strains have significant activity against gliomas with improved specificity).《分子治疗学 (Mol Ther)》16,1556-1564 (2008).
- [0467] 33. Kioi, M., Seetharam, S. & Puri, R.K. 用由单链抗体和突变假单胞菌外毒素构成的新颖重组免疫毒素靶向IL-13R $\alpha$ 2阳性癌症 (Targeting IL-13R $\alpha$ 2-positive cancer with a novel recombinant immunotoxin composed of a single-chain antibody and mutated Pseudomonas exotoxin).《分子癌症治疗 (Mol Cancer Ther)》7,1579-1587 (2008).
- [0468] 34. Kunwar, S. 等人针对复发性成胶质细胞瘤,相较于Gliadel晶片,IL13-PE38QQR的CED的III期随机试验 (Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma).《神经肿瘤学 (Neuro-oncology)》12, 871-881 (2010).
- [0469] 35. Auffnger, B., Spencer, D., Pytel, P., Ahmed, A.U. & Lesniak, M.S. 神经胶质瘤干细胞在抗化学疗法和多形性成胶质细胞瘤复发中的作用 (The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence).《神经治疗学专家评论 (Expert review of neurotherapeutics)》,1-12 (2015).
- [0470] 36. Brown, C.E. 等人从IL13R $\alpha$ 2表达神经胶质瘤中分离的类干细胞肿瘤引发细胞被IL13- $\zeta$ 因子重新定向的T细胞靶向和杀死 (Stem-like tumor-initiating cells isolated from IL 13 R $\alpha$ 2 expressing gliomas are targeted and killed by IL 13-zetakine-redirected T Cells).《临床癌症研究:美国癌症研究协会的官方杂志》18, 2199-2209 (2012).
- [0471] 37. Ogden, A.T. 等人成年人类神经胶质瘤中的A2B5+CD133肿瘤引发细胞的鉴别

(Identification of A2B5+CD133-tumor-initiating cells in adult human gliomas).《神经外科(Neurosurgery)》62,505-514(2008).

[0472] 38.Jarboe,J.S.,Johnson,K.R.,Choi,Y.,Lonser,R.R.&Park,J.K.白介素-13受体 $\alpha$  2在多形性成胶质细胞瘤中的表达:靶向疗法的推论(Expression of Interleukin-13 Receptor $\alpha$ 2 in Glioblastoma Multiforme:Implications for Targeted Therapies).《癌症研究》67,7983-7986(2007).

[0473] 39.Gan,H.K.,Kaye,A.H.&Luwor,R.B.多形性成胶质细胞瘤中的EGFRvIII变异体(The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme).《临床神经科学杂志:澳大拉西亚神经外科学会的官方杂志(Journal of clinical neuroscience:official journal of the Neurosurgical Society of Australasia)》16,748-754(2009).

[0474] 40.Beatty,G.L.等人间皮素特异性嵌合抗原受体mRNA工程改造的T细胞诱导固体恶性病中的抗肿瘤活性(Mesothelin-specific chimcric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies).《癌症免疫学研究(Cancer immunology research)》2,112-120(2014).

[0475] 41.Kane,J.R.等人自成一体:用于治疗成胶质细胞瘤的基因疗法和递送系统(Sui generis:gene therapy and delivery systems for the treatment of glioblastoma).《神经肿瘤学(Neuro-oncology)》17增刊2,ii24-ii36(2015).

[0476] 42.Patel,M.A.,Kim,J.E.,Ruzevick,J.,Li,G.&Lim,M.成胶质细胞瘤疗法的未来:标准护理和免疫疗法的协同效应(The future of glioblastoma therapy:synergism of standard of care and immunotherapy).《癌症(Cancers)》6,1953-1985(2014).

[0477] 43.Yan,K.等人神经胶质瘤干细胞分泌Gremlin1以促进其在肿瘤层次内的维持(Glioma cancer stem cells secrete Gremlin1 to promote their maintenance within the tumor hierarchy).《基因与开发(Genes&development)》28,1085-1100(2014).

[0478] 44.Balyasnikova,I.V.等人适用于肺内皮靶向的ACE的单克隆抗体单链片段的克隆和表征(Cloning and characterization of a single-chain fragment of monoclonal antibody to ACE suitable for lung endothelial targeting).《微血管研究(Microvascular research)》80, 355-364(2010).

[0479] 45.Wilkinson-Ryan,I.等人猪腺病毒4纤维蛋白质的并入增强腺病毒载体对树突状细胞的感染力:免疫介导的癌症疗法的推论(Incorporation of porcine adenovirus 4 fiber protein enhances infectivity of adenovirus vector on dendritic cells: implications for immune-mediated cancer therapy).《公共科学图书馆期刊》10, e0125851(2015).

[0480] 46.Livak,K.J.&Schmittgen,T.D.使用实时定量PCR和 $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ 方法分析相对基因表达数据(Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method).《方法(Methods)》25,402-408(2001).

[0481] 如将从引用的情形中显而易见,本文所引用的每一个参考文献以全文或相关部分引用的方式并入本文中。

[0482] 从本文的公开内容应了解,尽管本文中已出于说明的目的描述了本公开的特定实施例,但可以在不背离本公开的精神和范围的情况下进行各种修改。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> Balyasnikova等人
- [0003] <120> IL13R $\alpha$ 2结合剂和其在癌症治疗中的用途
- [0004] <130> 27373/49102A
- [0005] <150> US 62/107,984
- [0006] <151> 2015-01-26
- [0007] <160> 147
- [0008] <170> PatentIn version 3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 5
- [0011] <212> PRT
- [0012] <213> 人工序列
- [0013] <220>
- [0014] <223> 合成多肽
- [0015] <400> 1
- [0016] Asn Tyr Leu Met Asn
- [0017] 1 5
- [0018] <210> 2
- [0019] <211> 17
- [0020] <212> PRT
- [0021] <213> 人工序列
- [0022] <220>
- [0023] <223> 合成多肽
- [0024] <400> 2
- [0025] Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
- [0026] 1 5 10 15
- [0027] Asp
- [0028] <210> 3
- [0029] <211> 10
- [0030] <212> PRT
- [0031] <213> 人工序列
- [0032] <220>
- [0033] <223> 合成多肽
- [0034] <400> 3
- [0035] Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr
- [0036] 1 5 10
- [0037] <210> 4
- [0038] <211> 15
- [0039] <212> PRT
- [0040] <213> 人工序列
- [0041] <220>

[0042]	<223>	合成多肽
[0043]	<400>	4
[0044]	Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn	
[0045]	1	5 10 15
[0046]	<210>	5
[0047]	<211>	8
[0048]	<212>	PRT
[0049]	<213>	人工序列
[0050]	<220>	
[0051]	<223>	合成多肽
[0052]	<400>	5
[0053]	Ala Ala Ser Arg Gln Gly Ser Gly	
[0054]	1	5
[0055]	<210>	6
[0056]	<211>	9
[0057]	<212>	PRT
[0058]	<213>	人工序列
[0059]	<220>	
[0060]	<223>	合成多肽
[0061]	<400>	6
[0062]	Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr	
[0063]	1	5
[0064]	<210>	7
[0065]	<211>	119
[0066]	<212>	PRT
[0067]	<213>	人工序列
[0068]	<220>	
[0069]	<223>	合成多肽
[0070]	<400>	7
[0071]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala	
[0072]	1	5 10 15
[0073]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr	
[0074]		20 25 30
[0075]	Leu Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Asp Leu Asp Trp Ile	
[0076]		35 40 45
[0077]	Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp Tyr Asn Gln Asn Phe	
[0078]		50 55 60
[0079]	Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
[0080]		65 70 75 80
[0081]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0082]		85 90 95
[0083]	Ala Arg Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	

[0084]	100	105	110
[0085]	Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
[0086]	115		
[0087]	<210> 8		
[0088]	<211> 111		
[0089]	<212> PRT		
[0090]	<213> 人工序列		
[0091]	<220>		
[0092]	<223> 合成多肽		
[0093]	<400> 8		
[0094]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
[0095]	1	5	10 15
[0096]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr		
[0097]	20	25	30
[0098]	Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
[0099]	35	40	45
[0100]	Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Arg Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala		
[0101]	50	55	60
[0102]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His		
[0103]	65	70	75 80
[0104]	Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys		
[0105]	85	90	95
[0106]	Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0107]	100	105	110
[0108]	<210> 9		
[0109]	<211> 21		
[0110]	<212> PRT		
[0111]	<213> 人工序列		
[0112]	<220>		
[0113]	<223> 合成多肽		
[0114]	<400> 9		
[0115]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro		
[0116]	1	5	10 15
[0117]	Gly Ser Thr Gly Asp		
[0118]	20		
[0119]	<210> 10		
[0120]	<211> 9		
[0121]	<212> PRT		
[0122]	<213> 人工序列		
[0123]	<220>		
[0124]	<223> 合成多肽		
[0125]	<400> 10		

[0126]	Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg
[0127]	1 5
[0128]	<210> 11
[0129]	<211> 14
[0130]	<212> PRT
[0131]	<213> 人工序列
[0132]	<220>
[0133]	<223> 合成多肽
[0134]	<400> 11
[0135]	Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
[0136]	1 5 10
[0137]	<210> 12
[0138]	<211> 6
[0139]	<212> PRT
[0140]	<213> 人工序列
[0141]	<220>
[0142]	<223> 合成多肽
[0143]	<400> 12
[0144]	His His His His His His
[0145]	1 5
[0146]	<210> 13
[0147]	<211> 248
[0148]	<212> PRT
[0149]	<213> 人工序列
[0150]	<220>
[0151]	<223> 合成多肽
[0152]	<400> 13
[0153]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
[0154]	1 5 10 15
[0155]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr
[0156]	20 25 30
[0157]	Leu Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Asp Leu Asp Trp Ile
[0158]	35 40 45
[0159]	Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp Tyr Asn Gln Asn Phe
[0160]	50 55 60
[0161]	Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0162]	65 70 75 80
[0163]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0164]	85 90 95
[0165]	Ala Arg Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[0166]	100 105 110
[0167]	Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Lys Leu Glu

[0168]	115	120	125
[0169]	Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser		
[0170]	130	135	140
[0171]	Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys		
[0172]	145	150	155
[0173]	Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp		
[0174]	165	170	175
[0175]	Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala		
[0176]	180	185	190
[0177]	Ser Arg Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser		
[0178]	195	200	205
[0179]	Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr		
[0180]	210	215	220
[0181]	Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly		
[0182]	225	230	235
[0183]	Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0184]	245		
[0185]	<210> 14		
[0186]	<211> 297		
[0187]	<212> PRT		
[0188]	<213> 人工序列		
[0189]	<220>		
[0190]	<223> 合成多肽		
[0191]	<400> 14		
[0192]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro		
[0193]	1	5	10
[0194]	Gly Ser Thr Gly Asp Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu		
[0195]	20	25	30
[0196]	Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr		
[0197]	35	40	45
[0198]	Thr Phe Ser Asn Tyr Leu Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln		
[0199]	50	55	60
[0200]	Asp Leu Asp Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp		
[0201]	65	70	75
[0202]	Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser		
[0203]	85	90	95
[0204]	Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser		
[0205]	100	105	110
[0206]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp		
[0207]	115	120	125
[0208]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr		
[0209]	130	135	140



[0210]	Pro Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Asp Ile	
[0211]	145	150 155 160
[0212]	Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg	
[0213]	165	170 175
[0214]	Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile	
[0215]	180	185 190
[0216]	Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu	
[0217]	195	200 205
[0218]	Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Arg Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe	
[0219]	210	215 220
[0220]	Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Met	
[0221]	225	230 235 240
[0222]	Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val	
[0223]	245	250 255
[0224]	Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ala Ala	
[0225]	260	265 270
[0226]	Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser	
[0227]	275	280 285
[0228]	Ala Val Asp His His His His His His	
[0229]	290	295
[0230]	<210>	15
[0231]	<211>	357
[0232]	<212>	DNA
[0233]	<213>	人工序列
[0234]	<220>	
[0235]	<223>	合成聚核苷酸
[0236]	<400>	15
[0237]	caggccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgagc ctggggcttc agtgaagctg	60
[0238]	tectgcaagg cttctggcta cacgttctcc aactacttga tgaactgggt taagcagagg	120
[0239]	cctgagcaag accttgactg gattggaagg attgatcctt acgatggtga cattgactac	180
[0240]	aatcaaaact tcaaggacaa ggccatattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac	240
[0241]	atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaggttat	300
[0242]	ggcacggcct atggtgtgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctctca	357
[0243]	<210>	16
[0244]	<211>	333
[0245]	<212>	DNA
[0246]	<213>	人工序列
[0247]	<220>	
[0248]	<223>	合成聚核苷酸
[0249]	<400>	16
[0250]	gatattgtgc taactcagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggaca gagggccacc	60
[0251]	atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactggttc	120

[0252]	caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccag gcaaggatcc	180
[0253]	gggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat	240
[0254]	cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtgg	300
[0255]	acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa	333
[0256]	<210>	17
[0257]	<211>	32
[0258]	<212>	DNA
[0259]	<213>	人工序列
[0260]	<220>	
[0261]	<223>	合成聚核苷酸
[0262]	<400>	17
[0263]	gcttggtagc gaatggcttt cgtttgcttg gc	32
[0264]	<210>	18
[0265]	<211>	34
[0266]	<212>	PRT
[0267]	<213>	人工序列
[0268]	<220>	
[0269]	<223>	合成聚核苷酸
[0270]	<400>	18
[0271]	Gly Thr Thr Thr Thr Thr Gly Thr Thr Cys Gly Ala Ala Thr Gly Thr	
[0272]	1 5 10 15	
[0273]	Ala Thr Cys Ala Cys Ala Gly Ala Ala Ala Ala Thr Thr Cys Thr	
[0274]	20 25 30	
[0275]	Gly Gly	
[0276]	<210>	19
[0277]	<211>	146
[0278]	<212>	PRT
[0279]	<213>	智人
[0280]	<220>	
[0281]	<221>	SIGNAL
[0282]	<222>	(1) .. (34)
[0283]	<220>	
[0284]	<221>	mat_peptide
[0285]	<222>	(35) .. (132)
[0286]	<400>	19
[0287]	Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala	
[0288]	-30 -25 -20	
[0289]	Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala	
[0290]	-15 -10 -5	
[0291]	Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu	
[0292]	-1 1 5 10	
[0293]	Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly	

[0294]	15	20	25	30
[0295]	Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala			
[0296]		35	40	45
[0297]	Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr			
[0298]		50	55	60
[0299]	Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln			
[0300]		65	70	75
[0301]	Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe			
[0302]		80	85	90
[0303]	Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Gln			
[0304]	95	100	105	110
[0305]	Phe Asn			
[0306]	<210>	20		
[0307]	<211>	1282		
[0308]	<212>	DNA		
[0309]	<213>	智人		
[0310]	<400>	20		
[0311]	aagccacca gcctatgcat ccgctcctca atcctctcct gttggcactg ggcctcatgg	60		
[0312]	cgcttttggt gaccacggtc attgctctca cttgccttgg cggctttgcc tccccaggcc	120		
[0313]	ctgtgcctcc ctctacagcc ctcagggagc tcattgagga gctgggtcaac atcaccaga	180		
[0314]	accagaaggc tccgctctgc aatggcagca tggatggag catcaacctg acagctggca	240		
[0315]	tgtactgtgc agccctggaa tcctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc atcgagaaga	300		
[0316]	cccagaggat gctgagcggg ttctgcccgc acaaggcttc agctgggcag ttttcagct	360		
[0317]	tgcattgccc agacacaaa atcgagggtg cccagtttgt aaaggacctg ctcttacatt	420		
[0318]	taaagaaact ttttcgagag ggacagttca actgaaactt cgaaagcacc attatttgea	480		
[0319]	gagacaggac ctgactattg aagttgcaga ttcatttttc tttctgatgt caaaaatgtc	540		
[0320]	ttgggtaggc gggaaggagg gttaggagg ggtaaaatc cttagcttag acctcagcct	600		
[0321]	gtgtgccccg tcttcagcct agccgacctc agccttcccc ttgcccaggg ctcagcctgg	660		
[0322]	tgggctcct ctgtccaggg cctgagctc ggtggacca gggatgacat gtccctacac	720		
[0323]	ccctcccctg ccttagagca cactgtagca ttacagtggg tgccccctt gccagacatg	780		
[0324]	tggtagggaca gggaccact tcacacacag gcaactgagg cagacagcag ctcaggcaca	840		
[0325]	cttcttcttg gtcttattta ttattgtgtg ttattttaaag gagtgtgttt gtcaccgttg	900		
[0326]	gggattgggg aagactgtgg ctgctagcac ttggagccaa gggttcagag actcagggcc	960		
[0327]	ccagcactaa agcagtggac accaggagtc cctggtaata agtactgtgt acagaattct	1020		
[0328]	gctacctcac tggggtcctg gggcctcggg gcctcatccg aggcagggtc aggagagggg	1080		
[0329]	cagaacagcc gctcctgtct gccagccagc agccagctct cagccaacga gtaatttatt	1140		
[0330]	gttttctctt gtattttaaatt attaaatag ttagcaaaga gttaatatat agaagggtac	1200		
[0331]	cttgaacact gggggagggg acattgaaca agttgtttca ttgactatca aactgaagcc	1260		
[0332]	agaaataaag ttggtgacag at	1282		
[0333]	<210>	21		
[0334]	<211>	427		
[0335]	<212>	PRT		

[0336] <213> 智人  
 [0337] <220>  
 [0338] <221> SIGNAL  
 [0339] <222> (1) .. (21)  
 [0340] <220>  
 [0341] <221> mat\_peptide  
 [0342] <222> (22) .. (427)  
 [0343] <400> 21  
 [0344] Met Glu Trp Pro Ala Arg Leu Cys Gly Leu Trp Ala Leu Leu Leu Cys  
 [0345] -20 -15 -10  
 [0346] Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro Thr Glu Thr Gln  
 [0347] -5 -1 1 5 10  
 [0348] Pro Pro Val Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Glu Asn Leu Cys Thr Val  
 [0349] 15 20 25  
 [0350] Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu  
 [0351] 30 35 40  
 [0352] Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys Lys Ile Ala Pro  
 [0353] 45 50 55  
 [0354] Glu Thr Arg Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu Arg Ile Cys Leu  
 [0355] 60 65 70 75  
 [0356] Gln Val Gly Ser Gln Cys Ser Thr Asn Glu Ser Glu Lys Pro Ser Ile  
 [0357] 80 85 90  
 [0358] Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp Pro Glu Ser Ala  
 [0359] 95 100 105  
 [0360] Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn Leu Ser Tyr Met Lys Cys  
 [0361] 110 115 120  
 [0362] Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr Asn Tyr Thr Leu  
 [0363] 125 130 135  
 [0364] Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile His Gln Cys Glu Asn Ile  
 [0365] 140 145 150 155  
 [0366] Phe Arg Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp Leu Thr Lys Val  
 [0367] 160 165 170  
 [0368] Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp  
 [0369] 175 180 185  
 [0370] Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser  
 [0371] 190 195 200  
 [0372] Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn  
 [0373] 205 210 215  
 [0374] Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg  
 [0375] 220 225 230 235  
 [0376] Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His  
 [0377] 240 245 250

[0378]	Asn Val Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu	
[0379]	255	260 265
[0380]	Arg Asn Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro	
[0381]	270	275 280
[0382]	Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys	
[0383]	285	290 295
[0384]	Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile	
[0385]	300	305 310 315
[0386]	Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Leu Tyr Ile Thr Met Leu Leu Ile Val	
[0387]	320	325 330
[0388]	Pro Val Ile Val Ala Gly Ala Ile Ile Val Leu Leu Leu Tyr Leu Lys	
[0389]	335	340 345
[0390]	Arg Leu Lys Ile Ile Ile Phe Pro Pro Ile Pro Asp Pro Gly Lys Ile	
[0391]	350	355 360
[0392]	Phe Lys Glu Met Phe Gly Asp Gln Asn Asp Asp Thr Leu His Trp Lys	
[0393]	365	370 375
[0394]	Lys Tyr Asp Ile Tyr Glu Lys Gln Thr Lys Glu Glu Thr Asp Ser Val	
[0395]	380	385 390 395
[0396]	Val Leu Ile Glu Asn Leu Lys Lys Ala Ser Gln	
[0397]	400	405
[0398]	<210> 22	
[0399]	<211> 4006	
[0400]	<212> DNA	
[0401]	<213> 智人	
[0402]	<400> 22	
[0403]	tgccaaggct ccagccggc cgggctccga ggcgagaggc tgcattggagt ggccggcgcg	60
[0404]	gctctgcggg ctgtgggcgc tgctgctctg cgccggcggc gggggcgggg gcgggggcgc	120
[0405]	cgcgcctacg gaaactcagc cacctgtgac aaatttgagt gtctctgttg aaaacctctg	180
[0406]	cacagtaata tggacatgga atccaccga gggagccagc tcaaattgta gtctatggta	240
[0407]	ttttagtcatt tttggcgaca aacaagataa gaaaatagct ccggaaactc gtcgttcaat	300
[0408]	agaagtaccc ctgaatgaga ggatttgtct gcaagtgggg tcccagtgta gcaccaatga	360
[0409]	gagtgagaag cctagcattt tggttgaaa atgcatctca ccccagaag gtgatcctga	420
[0410]	gtctgctgtg actgagcttc aatgcatttg gcacaactg agctacatga agtgttcttg	480
[0411]	gtccctgga aggaatacca gtcccacac taactatact ctctactatt ggcacagaag	540
[0412]	cctggaaaa attcatcaat gtgaaaacat ctttagagaa ggccaatact ttggttgttc	600
[0413]	ctttgatctg accaaagtga aggattccag ttttgaacaa cacagtgtcc aaataatggt	660
[0414]	caaggataat gcaggaaaa ttaaacatc cttcaatata gtgcctttaa cttcccgtgt	720
[0415]	gaaacctgat cctccacata ttaaaaacct ctcttccac aatgatgacc tatatgtgca	780
[0416]	atgggagaat ccacagaatt ttattagcag atgcctattt tatgaagtag aagtcaataa	840
[0417]	cagccaaact gagacacata atgttttcta cgtccaagag gctaaatgtg agaatccaga	900
[0418]	atgttgagaga aatgtggaga atacatcttg tttcatggtc cctggtgttc ttcctgatac	960
[0419]	tttgaacaca gtcagaataa gagtcaaac aaataagtta tgctatgagg atgacaaact	1020

[0420]	ctggagtaat tggagccaag aatgagtat aggtaagaag cgcaattcca cactctacat	1080
[0421]	aaccatgtta ctcatgttc cagtcacgt cgcaggtgca atcatagtac tctgtctta	1140
[0422]	cctaaaaagg ctcaagatta ttatatccc tccaattcct gatcctggca agatTTTTAA	1200
[0423]	agaaatgttt ggagaccaga atgatgatac tctgactgg aagaagtacg acatctatga	1260
[0424]	gaagcaaacc aaggaggaaa ccgactctgt agtgctgata gaaaacctga agaaagcctc	1320
[0425]	tcagtgatgg agataattta tttttacctt cactgtgacc ttgagaagat tcttcccatt	1380
[0426]	ctccatttgt tatctgggaa cttattaaat ggaaactgaa actactgcac catttaaaaa	1440
[0427]	caggcagctc ataagagcca caggtcttta tgttgagtcg cgcaccgaaa aactaaaaat	1500
[0428]	aatgggcgct ttggagaaga gtgtggagtc attctcattg aattataaaa gccagcaggc	1560
[0429]	ttcaactag gggacaagc aaaaagtat gatagtggtg gagttaatct tatcaagagt	1620
[0430]	tgtgacaact tctgaggga tctatacttg ctttgtgttc tttgtgtcaa catgaacaaa	1680
[0431]	ttttatttgt aggggaactc atttggggtg caaatgctaa tgtcaaactt gagtcacaaa	1740
[0432]	gaacatgtag aaaacaaaat ggataaaatc tgatatgtat tgtttgggat cctattgaac	1800
[0433]	catgtttgtg gctattaaaa ctcttttaac agtctgggct gggctccggtg gctcacgcct	1860
[0434]	gtaatcccag caatttggga gtccgaggcg ggccgatcac tcgaggtcag gagttccaga	1920
[0435]	ccagcctgac caaatggtg aaacctctc tctactaaaa ctacaaaaat taactgggtg	1980
[0436]	tggtggcgcg tcctgtaat cccagctact cgggaagctg aggcaggta attgtttgaa	2040
[0437]	cctgggaggt ggaggtgca gtgagcagag atcacaccac tgcactctag cctgggtgac	2100
[0438]	agagcaagac tctgtctaaa aaacaaaaca aaacaaaaca aaacaaaaaa acctcttaat	2160
[0439]	attctggagt catcattccc ttgacagca ttttctctg ctttgaaagc cccagaaatc	2220
[0440]	agtgttgcc atgatgacaa ctacagaaaa accagaggca gcttctttgc caagaccttt	2280
[0441]	caaagccatt ttagctgtt aggggcagtg gaggtagaat gactccttgg gtattagagt	2340
[0442]	ttcaacctag aagtctctaa caatgtattt tcttcacctc tgctactcaa gtagcattta	2400
[0443]	ctgtgtcttt gttttgtgct agggccccgg gtgtgaagca cagacctt ccaggggttt	2460
[0444]	acagtctatt tgagactcct cagttcttgc cacttttttt tttaatctcc accagtcatt	2520
[0445]	ttcagacct tttactcct caattccaac actgatttcc ctttttgcac tctcctctc	2580
[0446]	tccctcctt gtagcctttt gactttcatt ggaaattagg atgtaaatct gctcaggaga	2640
[0447]	cctggaggag cagaggataa ttagcatctc aggttaagtg tgagtaatct gagaaacaat	2700
[0448]	gactaattct tgcatatttt gtaacttcca tgtgagggtt ttcagcattg atatttgtgc	2760
[0449]	atTTTctaaa cagagatgag gtggtatctt cacgtagaac attggtattc gcttgagaaa	2820
[0450]	aaaagaatag ttgaacctat ttctctttct ttacaagatg ggtccaggat tctcttttc	2880
[0451]	tctgccataa atgattaatt aaatagcttt tgtgtcttac attggtagcc agccagccaa	2940
[0452]	ggctctgttt atgcttttgg ggggcataata ttgggttcca ttctcaccta tccacacaac	3000
[0453]	atatccgat atatccccct tactcttact tcccccaat ttaaagaagt atgggaaatg	3060
[0454]	agaggcattt cccccaccc atttctctcc tcacacacag actcatatta ctggtaggaa	3120
[0455]	cttgagaact ttatttccaa gttgttcaaa catttaccac tcatattaat acaatgatgc	3180
[0456]	tatttgcaat tctgtcctc aggggagggg agataagaaa ccctcactct ctacagggtt	3240
[0457]	gggtacaagt ggcaacctgc ttccatggcc gtgtagaagc atggtgccct ggcttctctg	3300
[0458]	aggaagctgg ggttcatgac aatggcagat gtaaagtat tcttgaagtc agattgagge	3360
[0459]	tgggagacag ccgtagtaga tgttctactt tgttctgctg ttctctagaa agaatatttg	3420
[0460]	gttttctgt ataggaatga gattaattcc tttccagta ttttataatt ctgggaagca	3480
[0461]	aaacctatgc ctccccctag ccatttttac tgttatceta ttttagatgac catgaagagg	3540

[0462]	atgctgtgaa attccaaca aacattgatg ctgacagtca tgcagtctgg gagggggaa	3600
[0463]	gtgatctttt gtcccatcc tcttctttta gcagtaaaat agctgaggga aaagggaggg	3660
[0464]	aaaaggaagt tatgggaata cctgtggtgg ttgtgatccc taggtcttgg gagctcttgg	3720
[0465]	aggtgtctgt atcagtggat ttcccatccc ctgtgggaaa ttagtaggct catttactgt	3780
[0466]	tttagtcta gcctatgtgg attttttctt aacataccta agcaaacca gtgtcaggat	3840
[0467]	ggtaattctt attctttcgt tcagttaagt ttttcccttc atctgggcac tgaaggata	3900
[0468]	tgtgaaacaa tgtaacatt tttggtagtc ttcaaccagg gattgtttct gtttaacttc	3960
[0469]	ttatagaaa gcttgagtaa aataaatatt gtctttttgt atgtca	4006
[0470]	<210> 23	
[0471]	<211> 380	
[0472]	<212> PRT	
[0473]	<213> 智人	
[0474]	<220>	
[0475]	<221> SIGNAL	
[0476]	<222> (1) .. (26)	
[0477]	<220>	
[0478]	<221> mat_peptide	
[0479]	<222> (27) .. (380)	
[0480]	<400> 23	
[0481]	Met Ala Phe Val Cys Leu Ala Ile Gly Cys Leu Tyr Thr Phe Leu Ile	
[0482]	-25 -20 -15	
[0483]	Ser Thr Thr Phe Gly Cys Thr Ser Ser Ser Asp Thr Glu Ile Lys Val	
[0484]	-10 -5 -1 1 5	
[0485]	Asn Pro Pro Gln Asp Phe Glu Ile Val Asp Pro Gly Tyr Leu Gly Tyr	
[0486]	10 15 20	
[0487]	Leu Tyr Leu Gln Trp Gln Pro Pro Leu Ser Leu Asp His Phe Lys Glu	
[0488]	25 30 35	
[0489]	Cys Thr Val Glu Tyr Glu Leu Lys Tyr Arg Asn Ile Gly Ser Glu Thr	
[0490]	40 45 50	
[0491]	Trp Lys Thr Ile Ile Thr Lys Asn Leu His Tyr Lys Asp Gly Phe Asp	
[0492]	55 60 65 70	
[0493]	Leu Asn Lys Gly Ile Glu Ala Lys Ile His Thr Leu Leu Pro Trp Gln	
[0494]	75 80 85	
[0495]	Cys Thr Asn Gly Ser Glu Val Gln Ser Ser Trp Ala Glu Thr Thr Tyr	
[0496]	90 95 100	
[0497]	Trp Ile Ser Pro Gln Gly Ile Pro Glu Thr Lys Val Gln Asp Met Asp	
[0498]	105 110 115	
[0499]	Cys Val Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Lys Pro Gly	
[0500]	120 125 130	
[0501]	Ile Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu	
[0502]	135 140 145 150	
[0503]	Gly Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp Tyr Ile Lys Ala Asp Gly	

[0504]		155	160	165
[0505]	Gln Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu Glu Ala Ser Asp Tyr Lys			
[0506]		170	175	180
[0507]	Asp Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser Glu Asn Lys Pro Ile Arg			
[0508]		185	190	195
[0509]	Ser Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn Ile Val Lys Pro Leu Pro			
[0510]		200	205	210
[0511]	Pro Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser Ser Cys Glu Ile Lys Leu			
[0512]		215	220	225
[0513]	Lys Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro Ala Arg Cys Phe Asp Tyr			
[0514]		235	240	245
[0515]	Glu Ile Glu Ile Arg Glu Asp Asp Thr Thr Leu Val Thr Ala Thr Val			
[0516]		250	255	260
[0517]	Glu Asn Glu Thr Tyr Thr Leu Lys Thr Thr Asn Glu Thr Arg Gln Leu			
[0518]		265	270	275
[0519]	Cys Phe Val Val Arg Ser Lys Val Asn Ile Tyr Cys Ser Asp Asp Gly			
[0520]		280	285	290
[0521]	Ile Trp Ser Glu Trp Ser Asp Lys Gln Cys Trp Glu Gly Glu Asp Leu			
[0522]		295	300	305
[0523]	Ser Lys Lys Thr Leu Leu Arg Phe Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu			
[0524]		315	320	325
[0525]	Ile Leu Val Ile Phe Val Thr Gly Leu Leu Leu Arg Lys Pro Asn Thr			
[0526]		330	335	340
[0527]	Tyr Pro Lys Met Ile Pro Glu Phe Phe Cys Asp Thr			
[0528]		345	350	
[0529]	<210> 24			
[0530]	<211> 1376			
[0531]	<212> DNA			
[0532]	<213> 智人			
[0533]	<400> 24			
[0534]	gtaagaacac tctcgtgagt ctaacggtct tccgatgaa ggctatttga agtcgccata 60			
[0535]	acctggtcag aagtgtgcct gtcggcgggg agagaggcaa tatcaaggtt ttaaattctcg 120			
[0536]	gagaaatggc tttcgtttgc ttggetatcg gatgcttata tacctttctg ataagcaaa 180			
[0537]	catttgctg tacttcatct tcagacaccg agataaaagt taacctcct caggattttg 240			
[0538]	agatagtgga tcccggatac ttaggttata tctatttga atggcaacc cactgtctc 300			
[0539]	tggatcattt taaggaatgc acagtggaat atgaactaaa ataccgaaac attggtagt 360			
[0540]	aaacatggaa gaccatcatt actaagaatc tacattacaa agatgggttt gatcttaaca 420			
[0541]	agggcattga agcgaagata cacacgttt taccatggca atgcacaaat ggatcagaag 480			
[0542]	ttcaaagtgc ctgggcagaa actacttatt ggatatcacc acaaggaatt ccagaaacta 540			
[0543]	aagttcagga tatggattgc gtatattaca attggcaata ttactctgt tcttgaaac 600			
[0544]	ctggcatagg tgtacttctt gataccaatt acaactgtt ttactggtat gagggcttgg 660			
[0545]	atcatgcatt acagtgtgtt gattacatca aggctgatgg acaaaatata ggatgcagat 720			



[0546]	ttccctat	ttt ggaggcatca	gactataaag	at	tttctatat	ttgtg	ttaat	ggatcatcag	780							
[0547]	agaacaagcc	tatcagatcc	agttatttca	cttttcagct	tcaaaatata	gttaa	acctt	840								
[0548]	tgccgccagt	ctatcttact	tttactcggg	agagttcatg	tgaattaag	ctgaa	atgga	900								
[0549]	gcataccttt	gggacctatt	ccagcaaggt	gttttgatta	tgaaattgag	atcagagaag	960									
[0550]	atgatactac	cttggtgact	gctacagttg	aaaatgaaac	atacaccttg	aaaaca	acaa	1020								
[0551]	atgaaacccg	acaattatgc	ttttagta	gaagcaaagt	gaatatttat	tgctcagatg	1080									
[0552]	acggaatttg	gagtgagtgg	agtgataaac	aatgctggga	aggatgaagac	ctatcgaaga	1140									
[0553]	aaactttgct	acgtttctgg	ctaccatttg	gtttcatctt	aatattagtt	atatttgtaa	1200									
[0554]	ccggtctgct	tttgcgtaag	ccaacacct	acccaaaaat	gattccagaa	tttttctgtg	1260									
[0555]	atacatgaag	actttccata	tcaagagaca	tggtattgac	tcaacagttt	ccagtcagtg	1320									
[0556]	ccaaatgttc	aatatgagtc	tcaataaact	gaat	ttttct	tgcgatgtt	gaaaaa	1376								
[0557]	<210>	25														
[0558]	<211>	479														
[0559]	<212>	PRT														
[0560]	<213>	人工序列														
[0561]	<220>															
[0562]	<223>	合成多肽														
[0563]	<400>	25														
[0564]	Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro
[0565]	1				5					10					15	
[0566]	Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln
[0567]					20					25					30	
[0568]	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys
[0569]					35					40					45	
[0570]	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr	Leu	Met	Asn	Trp	Val	Lys
[0571]					50					55					60	
[0572]	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln	Asp	Leu	Asp	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Tyr
[0573]	65														70	
[0574]	Asp	Gly	Asp	Ile	Asp	Tyr	Asn	Gln	Asn	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Ile	Leu
[0575]															85	
[0576]	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu
[0577]															90	
[0578]	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Tyr	Gly	Thr
[0579]															100	
[0580]	Ala	Tyr	Gly	Val	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser
[0581]															110	
[0582]	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Lys	Leu	Glu	Glu	Gly	Glu	Phe	Ser	Glu
[0583]	145														150	
[0584]	Ala	Arg	Val	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val
[0585]															165	
[0586]	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val
[0587]															170	
[0588]															185	
[0589]															190	

[0588]	Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly
[0589]	195 200 205
[0590]	Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Arg Gln Gly Ser Gly
[0591]	210 215 220
[0592]	Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu
[0593]	225 230 235 240
[0594]	Asn Ile His Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln
[0595]	245 250 255
[0596]	Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
[0597]	260 265 270
[0598]	Ile Lys Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[0599]	275 280 285
[0600]	Gly Gly Gly Ser Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys
[0601]	290 295 300
[0602]	Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val
[0603]	305 310 315 320
[0604]	Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser
[0605]	325 330 335
[0606]	Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp
[0607]	340 345 350
[0608]	Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg
[0609]	355 360 365
[0610]	Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser
[0611]	370 375 380
[0612]	Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn
[0613]	385 390 395 400
[0614]	Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp
[0615]	405 410 415
[0616]	Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp
[0617]	420 425 430
[0618]	Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu
[0619]	435 440 445
[0620]	Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile
[0621]	450 455 460
[0622]	Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
[0623]	465 470 475
[0624]	<210> 26
[0625]	<211> 1440
[0626]	<212> DNA
[0627]	<213> 人工序列
[0628]	<220>
[0629]	<223> 合成聚核苷酸

[0630] <400> 26

[0631] atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

[0632] gacgcggccc agccggccca ggtccaactg cagcagcctg gggctgagct ggtgaggcct 120

[0633] ggggcttcag tgaagctgtc ctgcaaggct tctggctaca cgttctccaa ctacttgatg 180

[0634] aactgggtta agcagaggcc tgagcaagac cttgactgga ttggaaggat tgatccttac 240

[0635] gatggtgaca ttgactacaa tcaaaacttc aaggacaagg ccatattgac tgtagacaaa 300

[0636] tctccagca cagcctacat gcaactcagc agcctgacat ctgaggactc tgcgggtctat 360

[0637] tactgtgcaa gaggttatgg cacggcctat ggtgtggact actgggggtca aggaacctca 420

[0638] gtcaccgtct cctcagccaa aacgacaccc ccaaagcttg aagaaggatga attttcagaa 480

[0639] gcacgcgtag atattgtgct aactcagtct ccagcttctt tggctgtgtc tctaggacag 540

[0640] agggccacca tctcctgcag agccagcgaa agtgttgata attatggcat tagttttatg 600

[0641] aactggttcc aacagaaacc aggacagcca cccaaactcc tcatctatgc tgcattccagg 660

[0642] caaggatccg gggtcctgc caggtttagt ggcagtggtt ctgggacaga cttcagcctc 720

[0643] aacatccatc ctatggagga ggatgatact gcaatgtatt tctgtcagca aagtaaggag 780

[0644] gttccgtgga cgttcgggtg aggcaccaag ctggaaatca aagcggccgc tggcggaggc 840

[0645] ggttcgggcg gaggtggctc tggcgggtgc ggatcaacct ctgaggaaac catttctaca 900

[0646] gttcaagaaa agcaacaaaa tatttctccc ctagttagag aaagaggatc tcagagagta 960

[0647] gcagctcaca taactgggac cagaggaaga agcaacacat tgtcttctcc aaactccaag 1020

[0648] aatgaaaagg ctctgggccc caaaataaac tctggggaat catcaaggag tgggcattca 1080

[0649] ttctgagca acttgcaactt gaggaatggt gaactggtca tccatgaaaa agggttttac 1140

[0650] tacatctatt cccaaacata ctttcgattt caggaggaaa taaaagaaaa cacaaagaac 1200

[0651] gacaaacaaa tggccaata tatttcaaaa tacacaagtt atcctgacct tatattgttg 1260

[0652] atgaaaagtg ctagaaatag ttgttggtct aaagatgcag aatatggact ctattccatc 1320

[0653] tatcaagggg gaatatttga gcttaaggaa aatgacagaa tttttgttc tgtaacaaat 1380

[0654] gagcaattga tagacatgga ccatgaagcc agttttttcg gggccttttt agttggctaa 1440

[0655] <210> 27

[0656] <211> 187

[0657] <212> PRT

[0658] <213> 人工序列

[0659] <220>

[0660] <223> 合成多肽

[0661] <400> 27

[0662] Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile

[0663] 1 5 10 15

[0664] Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile

[0665] 20 25 30

[0666] Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys

[0667] 35 40 45

[0668] Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg

[0669] 50 55 60

[0670] Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu

[0671] 65 70 75 80

[0672]	Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe
[0673]	85 90 95
[0674]	Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met
[0675]	100 105 110
[0676]	Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu
[0677]	115 120 125
[0678]	Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly
[0679]	130 135 140
[0680]	Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp
[0681]	145 150 155 160
[0682]	Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His
[0683]	165 170 175
[0684]	Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
[0685]	180 185
[0686]	<210> 28
[0687]	<211> 107
[0688]	<212> PRT
[0689]	<213> 人工序列
[0690]	<220>
[0691]	<223> 合成多肽
[0692]	<400> 28
[0693]	Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
[0694]	1 5 10 15
[0695]	Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
[0696]	20 25 30
[0697]	Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
[0698]	35 40 45
[0699]	Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[0700]	50 55 60
[0701]	Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
[0702]	65 70 75 80
[0703]	Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
[0704]	85 90 95
[0705]	Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
[0706]	100 105
[0707]	<210> 29
[0708]	<211> 324
[0709]	<212> DNA
[0710]	<213> 人工序列
[0711]	<220>
[0712]	<223> 合成聚核苷酸
[0713]	<400> 29

[0714]	cgggctgatg ctgcaccaac tgtatccatc ttcccacat ccagttagca gttaacatct	60
[0715]	ggaggtgcct cagtcgtgtg cttcttgaac aacttctacc ccaaagacat caatgtcaag	120
[0716]	tggaagattg atggcagtga acgacaaaat ggcgtcctga acagttggac tgatcaggac	180
[0717]	agcaaagaca gcacctacag catgagcagc accctcacgt tgaccaagga cgagtatgaa	240
[0718]	cgacataaca gctatacctg tgaggccact cacaagacat caacttcacc cattgtcaag	300
[0719]	agcttcaaca ggaatgagtg ttag	324
[0720]	<210>	30
[0721]	<211>	324
[0722]	<212>	PRT
[0723]	<213>	人工序列
[0724]	<220>	
[0725]	<223>	合成多肽
[0726]	<400>	30
[0727]	Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala	
[0728]	1 5 10 15	
[0729]	Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr	
[0730]	20 25 30	
[0731]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser	
[0732]	35 40 45	
[0733]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu	
[0734]	50 55 60	
[0735]	Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val	
[0736]	65 70 75 80	
[0737]	Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys	
[0738]	85 90 95	
[0739]	Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro	
[0740]	100 105 110	
[0741]	Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu	
[0742]	115 120 125	
[0743]	Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser	
[0744]	130 135 140	
[0745]	Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu	
[0746]	145 150 155 160	
[0747]	Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr	
[0748]	165 170 175	
[0749]	Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn	
[0750]	180 185 190	
[0751]	Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro	
[0752]	195 200 205	
[0753]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln	
[0754]	210 215 220	
[0755]	Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val	

[0756]	225	230	235	240
[0757]	Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val			
[0758]		245	250	255
[0759]	Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln			
[0760]		260	265	270
[0761]	Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn			
[0762]		275	280	285
[0763]	Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val			
[0764]		290	295	300
[0765]	Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His			
[0766]	305	310	315	320
[0767]	Ser Pro Gly Lys			
[0768]	<210>	31		
[0769]	<211>	975		
[0770]	<212>	DNA		
[0771]	<213>	人工序列		
[0772]	<220>			
[0773]	<223>	合成聚核苷酸		
[0774]	<400>	31		
[0775]	gccaaaacga cacccecatc tgtctatcca ctggcccctg gatctgctgc ccaaactaac	60		
[0776]	tccatggatg ccctgggatg cctgggtcaag ggctatttcc ctgagccagt gacagtgacc	120		
[0777]	tggaactctg gatccctgtc cagcgggtgtg cacaccttcc cagctgtcct gcagtctgac	180		
[0778]	ctctacactc tgagcagctc agtgactgtc ccctccagca cctggcccag cgagaccgtc	240		
[0779]	acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc accaaggtgg acaagaaaat tgtgcccagg	300		
[0780]	gattgtgggt gtaagccttg catatgtaca gtcccagaag tatcatctgt cttcatcttc	360		
[0781]	ccccaaagc ccaaggatgt gctcaccatt actctgactc ctaaggctac gtgtgtttgtg	420		
[0782]	gtagacatca gcaaggatga tcccagggtc cagttcagct ggttttaga tgatgtggag	480		
[0783]	gtgcacacag ctgagcagca accccgggag gagcagttca acagcacttt ccgctcagtc	540		
[0784]	agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg ctcaatggca aggagttaa atgcagggtc	600		
[0785]	aacagtgcag ctttcctgc ccccatcgag aaaaccatct caaaaccaa aggcagaccg	660		
[0786]	aaggctccac aggtgtacac cattccacct cccaaggagc agatggccaa ggataaagtc	720		
[0787]	agtctgacct gcatgataac agacttcttc cctgaagaca ttactgtgga gtggcagtg	780		
[0788]	aatgggcagc cagcggagaa ctacaagaac actcagccca tcatggacac agatggctct	840		
[0789]	tacttcgtct acagcaagct caatgtgcag aagagcaact gggaggcagg aaatactttc	900		
[0790]	acctgctctg tgttacatga ggcctgcac aaccaccata ctgagaagag cctctccac	960		
[0791]	tctcctggta aatga	975		
[0792]	<210>	32		
[0793]	<211>	19		
[0794]	<212>	PRT		
[0795]	<213>	人工序列		
[0796]	<220>			
[0797]	<223>	合成多肽		

[0798]	<400>	32																	
[0799]	Met	Asp	Trp	Ile	Trp	Arg	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Gly	Ala	Ala	Thr	Gly			
[0800]	1				5					10						15			
[0801]	Ala	His	Ser																
[0802]	<210>	33																	
[0803]	<211>	267																	
[0804]	<212>	PRT																	
[0805]	<213>	人工序列																	
[0806]	<220>																		
[0807]	<223>	合成多肽																	
[0808]	<400>	33																	
[0809]	Met	Asp	Trp	Ile	Trp	Arg	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Gly	Ala	Ala	Thr	Gly			
[0810]	1				5					10						15			
[0811]	Ala	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg			
[0812]				20					25					30					
[0813]	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe			
[0814]		35					40					45							
[0815]	Ser	Asn	Tyr	Leu	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln	Asp	Leu			
[0816]	50						55					60							
[0817]	Asp	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ile	Asp	Tyr	Asn			
[0818]	65					70					75					80			
[0819]	Gln	Asn	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Ile	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser			
[0820]				85						90				95					
[0821]	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val			
[0822]				100						105					110				
[0823]	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Tyr	Gly	Thr	Ala	Tyr	Gly	Val	Asp	Tyr	Trp			
[0824]				115						120				125					
[0825]	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro			
[0826]				130						135				140					
[0827]	Lys	Leu	Glu	Glu	Gly	Glu	Phe	Ser	Glu	Ala	Arg	Val	Asp	Ile	Val	Leu			
[0828]	145						150					155				160			
[0829]	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr			
[0830]				165								170				175			
[0831]	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr	Gly	Ile	Ser	Phe			
[0832]				180								185				190			
[0833]	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile			
[0834]				195								200				205			
[0835]	Tyr	Ala	Ala	Ser	Arg	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly			
[0836]				210									215			220			
[0837]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Ser	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Met	Glu	Glu			
[0838]	225						230						235			240			
[0839]	Asp	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys	Glu	Val	Pro	Trp			

[0840]	245	250	255
[0841]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0842]	260	265	
[0843]	<210> 34		
[0844]	<211> 801		
[0845]	<212> DNA		
[0846]	<213> 人工序列		
[0847]	<220>		
[0848]	<223> 合成聚核苷酸		
[0849]	<400> 34		
[0850]	atggactgga tctggcgcat cctgtttctc gtgggagccg ccacagggcg ccatttctcag	60	
[0851]	gtgcagctgc agcagcctgg cgctgaactc gtgcggccag gcgcttctgt gaagctgagc	120	
[0852]	tgtaaagcca gcggtacac cttcagcaac tacctgatga actgggtcaa gcagcggccc	180	
[0853]	gagcaggacc tggattggat cggcagaatc gaccctacg acggcgacat cgactacaac	240	
[0854]	cagaacttca aggacaagc catcctgacc gtggacaaga gcagcagcac cgcctacatg	300	
[0855]	cagctgtcca gcctgaccag cgaggacagc gccgtgtact actgcgccag aggctacggc	360	
[0856]	acagcctacg gcgtggacta ttggggccag ggcacaagcg tgaccgtgtc cagcgccaag	420	
[0857]	accaccccc ctaagctgga agagggcgag ttctccgagg cccgggtgga cattgtgctg	480	
[0858]	acacagtctc cagccagcct ggccgtgtcc ctgggacaga gagccacat cagctgtagg	540	
[0859]	gccagcgaga gcgtggacaa ctacggcatc agcttcatga attggttcca gcagaagccc	600	
[0860]	ggccagcccc ccaagctgct gatctatgcc gccagcagac agggcagcgg agtgctctgc	660	
[0861]	agattttctg gcagcggtc cggcaccgac ttcagcctga acatccacc tatggaagag	720	
[0862]	gacgacaccg ccatgtactt ttgccagcag agcaaagagg tgccctggac ctttggcgga	780	
[0863]	ggcaccaagc tggaaatcaa g	801	
[0864]	<210> 35		
[0865]	<211> 236		
[0866]	<212> PRT		
[0867]	<213> 人工序列		
[0868]	<220>		
[0869]	<223> 合成多肽		
[0870]	<400> 35		
[0871]	Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro		
[0872]	1 5 10 15		
[0873]	Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro		
[0874]	20 25 30		
[0875]	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
[0876]	35 40 45		
[0877]	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn		
[0878]	50 55 60		
[0879]	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
[0880]	65 70 75 80		
[0881]	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		



[0882]	85	90	95
[0883]	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser		
[0884]	100	105	110
[0885]	Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
[0886]	115	120	125
[0887]	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp		
[0888]	130	135	140
[0889]	Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe		
[0890]	145	150	155
[0891]	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu		
[0892]	165	170	175
[0893]	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe		
[0894]	180	185	190
[0895]	Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly		
[0896]	195	200	205
[0897]	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr		
[0898]	210	215	220
[0899]	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys		
[0900]	225	230	235
[0901]	<210> 36		
[0902]	<211> 708		
[0903]	<212> DNA		
[0904]	<213> 人工序列		
[0905]	<220>		
[0906]	<223> 合成聚核苷酸		
[0907]	<400> 36		
[0908]	gatcccgccg agcccaaate tcctgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct 60		
[0909]	gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc ttcccccaa aaccaagga caccctcatg 120		
[0910]	atctccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 180		
[0911]	gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 240		
[0912]	gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 300		
[0913]	tggtctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 360		
[0914]	gagaaaacca tctccaaagc caaaggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgecc 420		
[0915]	ccatccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggttc 480		
[0916]	tatcccagcg acatgccgt ggagtggag agcaatggc aaccggagaa caactacaag 540		
[0917]	accagcctc ccgtgctgga ctccgacgc tccttcttc tctacagca gtcaccgtg 600		
[0918]	gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 660		
[0919]	cacaaccact acacgcagaa gacctctcc ctgtctccgg gtaaaaaa 708		
[0920]	<210> 37		
[0921]	<211> 17		
[0922]	<212> PRT		
[0923]	<213> 人工序列		

```

[0924] <220>
[0925] <223> 合成多肽
[0926] <400> 37
[0927] Asp Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
[0928] 1             5             10             15
[0929] Pro
[0930] <210> 38
[0931] <211> 51
[0932] <212> DNA
[0933] <213> 人工序列
[0934] <220>
[0935] <223> 合成聚核苷酸
[0936] <400> 38
[0937] gatctcgagc ccaaattcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc g      51
[0938] <210> 39
[0939] <211> 68
[0940] <212> PRT
[0941] <213> 人工序列
[0942] <220>
[0943] <223> 合成多肽
[0944] <400> 39
[0945] Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
[0946] 1             5             10             15
[0947] Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
[0948]             20             25             30
[0949] Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
[0950]             35             40             45
[0951] Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
[0952]             50             55             60
[0953] Ala Tyr Arg Ser
[0954] 65
[0955] <210> 40
[0956] <211> 204
[0957] <212> DNA
[0958] <213> 人工序列
[0959] <220>
[0960] <223> 合成聚核苷酸
[0961] <400> 40
[0962] ttttgggtgc tgggtggtgt tggaggagtc ctggcttgc atagcttgc agtaacagtg 60
[0963] gcctttatta ttttctgggt gaggagtaag aggagcagc tcctgcacag tgactacatg 120
[0964] aacatgactc cccgccgcc cgggccccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca 180
[0965] cgcgacttcg cagcctatcg ctcc      204

```

[0966]	<210>	41	
[0967]	<211>	112	
[0968]	<212>	PRT	
[0969]	<213>	人工序列	
[0970]	<220>		
[0971]	<223>	合成多肽	
[0972]	<400>	41	
[0973]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly		
[0974]	1	5	10 15
[0975]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr		
[0976]		20	25 30
[0977]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys		
[0978]		35	40 45
[0979]	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys		
[0980]		50	55 60
[0981]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		
[0982]		65	70 75 80
[0983]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala		
[0984]		85	90 95
[0985]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[0986]		100	105 110
[0987]	<210>	42	
[0988]	<211>	336	
[0989]	<212>	DNA	
[0990]	<213>	人工序列	
[0991]	<220>		
[0992]	<223>	合成聚核苷酸	
[0993]	<400>	42	
[0994]	agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc		60
[0995]	tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc		120
[0996]	cgggacctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat		180
[0997]	gaactgcaga aagataagat ggcggagccc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc		240
[0998]	cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc		300
[0999]	tagcacgcc ttacatgca ggcctgccc cctcgc		336
[1000]	<210>	43	
[1001]	<211>	17	
[1002]	<212>	PRT	
[1003]	<213>	人工序列	
[1004]	<220>		
[1005]	<223>	合成多肽	
[1006]	<400>	43	
[1007]	Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu		

[1008]	1	5	10	15	
[1009]	Leu				
[1010]	<210>	44			
[1011]	<211>	105			
[1012]	<212>	DNA			
[1013]	<213>	人工序列			
[1014]	<220>				
[1015]	<223>	合成聚核苷酸			
[1016]	<400>	44			
[1017]	ttttgggtgc	tggtggtggt	tggtggagtc	ctggcttgct	atagcttgct agtaacagtg 60
[1018]	gcctttatta	ttttctgggt	gaggagtaag	aggagcaggc	tcctg 105
[1019]	<210>	45			
[1020]	<211>	24			
[1021]	<212>	PRT			
[1022]	<213>	人工序列			
[1023]	<220>				
[1024]	<223>	合成多肽			
[1025]	<400>	45			
[1026]	Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu				
[1027]	1	5	10	15	
[1028]	Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile				
[1029]		20			
[1030]	<210>	46			
[1031]	<211>	105			
[1032]	<212>	DNA			
[1033]	<213>	人工序列			
[1034]	<220>				
[1035]	<223>	合成聚核苷酸			
[1036]	<400>	46			
[1037]	ttttgggtgc	tggtggtggt	tggtggagtc	ctggcttgct	atagcttgct agtaacagtg 60
[1038]	gcctttatta	ttttctgggt	gaggagtaag	aggagcaggc	tcctg 105
[1039]	<210>	47			
[1040]	<211>	180			
[1041]	<212>	PRT			
[1042]	<213>	人工序列			
[1043]	<220>				
[1044]	<223>	合成多肽			
[1045]	<400>	47			
[1046]	Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu				
[1047]	1	5	10	15	
[1048]	Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser				
[1049]		20	25	30	

[1050]	Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
[1051]	35 40 45
[1052]	Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
[1053]	50 55 60
[1054]	Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
[1055]	65 70 75 80
[1056]	Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
[1057]	85 90 95
[1058]	Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
[1059]	100 105 110
[1060]	Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
[1061]	115 120 125
[1062]	Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
[1063]	130 135 140
[1064]	Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
[1065]	145 150 155 160
[1066]	Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
[1067]	165 170 175
[1068]	Leu Pro Pro Arg
[1069]	180
[1070]	<210> 48
[1071]	<211> 540
[1072]	<212> DNA
[1073]	<213> 人工序列
[1074]	<220>
[1075]	<223> 合成聚核苷酸
[1076]	<400> 48
[1077]	ttttgggtgc tgggtggtggt tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 60
[1078]	gcctttatta ttttctgggt gaggagtaag aggagcaggc tctgcacag tgactacatg 120
[1079]	aacatgactc cccgccgcc cgggccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca 180
[1080]	cgcgacttcg cagcctatcg ctccagagtg aagttcagca ggagcgcaga cgccccgcg 240
[1081]	taccagcagg gccagaacca gctctataac gagctcaatc taggacgaag agaggagtac 300
[1082]	gatgttttgg acaagagacg tggccgggac cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag 360
[1083]	aaccctcagg aaggcctgta caatgaactg cagaaagata agatggcgga ggcctacagt 420
[1084]	gagattggga tgaaggcga gcgccggagg ggcaagggc acgatggcct ttaccagggt 480
[1085]	ctcagtacag ccaccaagga cacctacgac gcccttcaca tgcaggcct gccccctgcg 540
[1086]	<210> 49
[1087]	<211> 419
[1088]	<212> PRT
[1089]	<213> 人工序列
[1090]	<220>
[1091]	<223> 合成多肽

[1092] <400> 49  
 [1093] Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
 [1094] 1 5 10 15  
 [1095] Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 [1096] 20 25 30  
 [1097] Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 [1098] 35 40 45  
 [1099] Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
 [1100] 50 55 60  
 [1101] Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 [1102] 65 70 75 80  
 [1103] Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 [1104] 85 90 95  
 [1105] Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 [1106] 100 105 110  
 [1107] Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 [1108] 115 120 125  
 [1109] Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 [1110] 130 135 140  
 [1111] Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 [1112] 145 150 155 160  
 [1113] Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 [1114] 165 170 175  
 [1115] Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 [1116] 180 185 190  
 [1117] Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 [1118] 195 200 205  
 [1119] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 [1120] 210 215 220  
 [1121] Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe  
 [1122] 225 230 235 240  
 [1123] Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu  
 [1124] 245 250 255  
 [1125] Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg  
 [1126] 260 265 270  
 [1127] Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro  
 [1128] 275 280 285  
 [1129] Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala  
 [1130] 290 295 300  
 [1131] Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr  
 [1132] 305 310 315 320  
 [1133] Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg

[1134]		325		330		335	
[1135]	Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met						
[1136]		340		345		350	
[1137]	Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu						
[1138]		355		360		365	
[1139]	Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys						
[1140]		370		375		380	
[1141]	Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu						
[1142]		385		390		395	
[1143]	Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu						
[1144]		405		410		415	
[1145]	Pro Pro Arg						
[1146]	<210> 50						
[1147]	<211> 1257						
[1148]	<212> DNA						
[1149]	<213> 人工序列						
[1150]	<220>						
[1151]	<223> 合成聚核苷酸						
[1152]	<400> 50						
[1153]	gatcccgcg agcccaaate tctgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct 60						
[1154]	gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc ttcccccaa aaccaagga caccctcatg 120						
[1155]	atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 180						
[1156]	gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 240						
[1157]	gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 300						
[1158]	tggetgaatg gcaaggagta caagtcaag gtctccaaca aagcctccc agccccatc 360						
[1159]	gagaaaacca tctccaaagc caaaggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 420						
[1160]	ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 480						
[1161]	tatcccagcg acatgccctg ggagtgggag agcaatgggc aaccggagaa caactacaag 540						
[1162]	accagcctc cegtgtgga ctccgacgc tcttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg 600						
[1163]	gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 660						
[1164]	cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaaaaaga tcccaaattt 720						
[1165]	tgggtgctgg tgggtgttg tggagtctg gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc 780						
[1166]	tttattattt tctgggtgag gagtaagagg agcaggctcc tgcacagtga ctacatgaac 840						
[1167]	atgactcccc gccgccccg gccaccgc aagcattacc agccctatgc cccaccagc 900						
[1168]	gacttcgag cctatcgtc cagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc cccgcgtac 960						
[1169]	cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat 1020						
[1170]	gttttgaca agagacgtgg ccgggacct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 1080						
[1171]	cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggagc ctacagtgag 1140						
[1172]	attgggatga aaggcagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 1200						
[1173]	agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggcctgcc ccctcgc 1257						
[1174]	<210> 51						
[1175]	<211> 200						

[1176]	<212>	PRT
[1177]	<213>	人工序列
[1178]	<220>	
[1179]	<223>	合成多肽
[1180]	<400>	51
[1181]	Asp Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	
[1182]	1	5 10 15
[1183]	Pro Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala	
[1184]		20 25 30
[1185]	Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg	
[1186]		35 40 45
[1187]	Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro	
[1188]		50 55 60
[1189]	Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro	
[1190]	65	70 75 80
[1191]	Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala	
[1192]		85 90 95
[1193]	Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu	
[1194]		100 105 110
[1195]	Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly	
[1196]		115 120 125
[1197]	Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu	
[1198]		130 135 140
[1199]	Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser	
[1200]	145	150 155 160
[1201]	Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly	
[1202]		165 170 175
[1203]	Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu	
[1204]		180 185 190
[1205]	His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg	
[1206]		195 200
[1207]	<210>	52
[1208]	<211>	600
[1209]	<212>	PRT
[1210]	<213>	人工序列
[1211]	<220>	
[1212]	<223>	合成多肽
[1213]	<400>	52
[1214]	Gly Ala Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Cys Cys Cys Ala Ala Ala Thr	
[1215]	1	5 10 15
[1216]	Cys Thr Thr Gly Thr Gly Ala Cys Ala Ala Ala Ala Cys Thr Cys Ala	
[1217]		20 25 30



[1218]	Cys Ala Cys Ala Thr Gly Cys Cys Cys Ala Cys Cys Gly Thr Gly Cys
[1219]	35 40 45
[1220]	Cys Cys Gly Gly Ala Thr Cys Cys Cys Ala Ala Ala Thr Thr Thr Thr
[1221]	50 55 60
[1222]	Gly Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr
[1223]	65 70 75 80
[1224]	Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr Cys Cys Thr Gly Gly Cys Thr
[1225]	85 90 95
[1226]	Thr Gly Cys Thr Ala Thr Ala Gly Cys Thr Thr Gly Cys Thr Ala Gly
[1227]	100 105 110
[1228]	Thr Ala Ala Cys Ala Gly Thr Gly Gly Cys Cys Thr Thr Thr Ala Thr
[1229]	115 120 125
[1230]	Thr Ala Thr Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Gly Thr Gly Ala Gly Gly
[1231]	130 135 140
[1232]	Ala Gly Thr Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys
[1233]	145 150 155 160
[1234]	Thr Cys Cys Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Ala Cys Thr Ala
[1235]	165 170 175
[1236]	Cys Ala Thr Gly Ala Ala Cys Ala Thr Gly Ala Cys Thr Cys Cys Cys
[1237]	180 185 190
[1238]	Cys Gly Cys Cys Gly Cys Cys Cys Cys Gly Gly Gly Cys Cys Cys Ala
[1239]	195 200 205
[1240]	Cys Cys Cys Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala Thr Thr Ala Cys Cys Ala
[1241]	210 215 220
[1242]	Gly Cys Cys Cys Thr Ala Thr Gly Cys Cys Cys Cys Ala Cys Cys Ala
[1243]	225 230 235 240
[1244]	Cys Gly Cys Gly Ala Cys Thr Thr Cys Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr
[1245]	245 250 255
[1246]	Ala Thr Cys Gly Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Thr Gly Ala Ala
[1247]	260 265 270
[1248]	Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Ala Gly Cys Gly Cys Ala
[1249]	275 280 285
[1250]	Gly Ala Cys Gly Cys Cys Cys Cys Cys Gly Cys Gly Thr Ala Cys Cys
[1251]	290 295 300
[1252]	Ala Gly Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Ala
[1253]	305 310 315 320
[1254]	Gly Cys Thr Cys Thr Ala Thr Ala Ala Cys Gly Ala Gly Cys Thr Cys
[1255]	325 330 335
[1256]	Ala Ala Thr Cys Thr Ala Gly Gly Ala Cys Gly Ala Ala Gly Ala Gly
[1257]	340 345 350
[1258]	Ala Gly Gly Ala Gly Thr Ala Cys Gly Ala Thr Gly Thr Thr Thr Thr
[1259]	355 360 365

[1260]	Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly Ala Gly Ala Cys Gly Thr Gly Gly Cys
[1261]	370 375 380
[1262]	Cys Gly Gly Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly Ala Gly Ala Thr Gly Gly
[1263]	385 390 395 400
[1264]	Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Gly Cys Cys Gly Ala Gly Ala Ala Gly
[1265]	405 410 415
[1266]	Gly Ala Ala Gly Ala Ala Cys Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly Ala Ala
[1267]	420 425 430
[1268]	Gly Gly Cys Cys Thr Gly Thr Ala Cys Ala Ala Thr Gly Ala Ala Cys
[1269]	435 440 445
[1270]	Thr Gly Cys Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Thr Ala Ala Gly Ala Thr
[1271]	450 455 460
[1272]	Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Cys Cys Thr Ala Cys Ala Gly Thr
[1273]	465 470 475 480
[1274]	Gly Ala Gly Ala Thr Thr Gly Gly Gly Ala Thr Gly Ala Ala Ala Gly
[1275]	485 490 495
[1276]	Gly Cys Gly Ala Gly Cys Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly
[1277]	500 505 510
[1278]	Cys Ala Ala Gly Gly Gly Gly Cys Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys
[1279]	515 520 525
[1280]	Cys Thr Thr Thr Ala Cys Cys Ala Gly Gly Gly Thr Cys Thr Cys Ala
[1281]	530 535 540
[1282]	Gly Thr Ala Cys Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Ala Gly Gly Ala
[1283]	545 550 555 560
[1284]	Cys Ala Cys Cys Thr Ala Cys Gly Ala Cys Gly Cys Cys Cys Thr Thr
[1285]	565 570 575
[1286]	Cys Ala Cys Ala Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys
[1287]	580 585 590
[1288]	Cys Cys Cys Cys Thr Cys Gly Cys
[1289]	595 600
[1290]	<210> 53
[1291]	<211> 688
[1292]	<212> PRT
[1293]	<213> 人工序列
[1294]	<220>
[1295]	<223> 合成多肽
[1296]	<400> 53
[1297]	Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly
[1298]	1 5 10 15
[1299]	Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
[1300]	20 25 30
[1301]	Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

[1302]	35	40	45
[1303]	Ser Asn Tyr Leu Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Asp Leu		
[1304]	50	55	60
[1305]	Asp Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp Tyr Asn		
[1306]	65	70	75
[1307]	Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser		
[1308]		85	90
[1309]	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val		95
[1310]		100	105
[1311]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr Trp		110
[1312]		115	120
[1313]	Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro		125
[1314]		130	135
[1315]	Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Asp Ile Val Leu		140
[1316]		145	150
[1317]	Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr		155
[1318]		165	170
[1319]	Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe		175
[1320]		180	185
[1321]	Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile		190
[1322]		195	200
[1323]	Tyr Ala Ala Ser Arg Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly		205
[1324]		210	215
[1325]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Met Glu Glu		220
[1326]		225	230
[1327]	Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp		235
[1328]		245	250
[1329]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Glu Asp Pro Ala		255
[1330]		260	265
[1331]	Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		270
[1332]		275	280
[1333]	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		285
[1334]		290	295
[1335]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		300
[1336]		305	310
[1337]	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		315
[1338]		325	330
[1339]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		335
[1340]		340	345
[1341]	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		350
[1342]		355	360
[1343]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		365

[1344]	370	375	380
[1345]	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
[1346]	385	390	395 400
[1347]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr		
[1348]		405	410 415
[1349]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
[1350]		420	425 430
[1351]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
[1352]		435	440 445
[1353]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
[1354]		450	455 460
[1355]	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
[1356]		465	470 475 480
[1357]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
[1358]		485	490 495
[1359]	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu		
[1360]		500	505 510
[1361]	Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val		
[1362]		515	520 525
[1363]	Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His		
[1364]		530	535 540
[1365]	Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys		
[1366]		545	550 555 560
[1367]	His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser		
[1368]		565	570 575
[1369]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly		
[1370]		580	585 590
[1371]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr		
[1372]		595	600 605
[1373]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys		
[1374]		610	615 620
[1375]	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys		
[1376]		625	630 635 640
[1377]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		
[1378]		645	650 655
[1379]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala		
[1380]		660	665 670
[1381]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[1382]		675	680 685
[1383]	<210>	54	
[1384]	<211>	2064	
[1385]	<212>	PRT	

[1386]	<213>	人工序列
[1387]	<220>	
[1388]	<223>	合成聚核苷酸
[1389]	<400>	54
[1390]	Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Cys	
[1391]	1	5 10 15
[1392]	Gly Cys Ala Thr Cys Cys Thr Gly Thr Thr Thr Cys Thr Cys Gly Thr	
[1393]		20 25 30
[1394]	Gly Gly Gly Ala Gly Cys Cys Gly Cys Cys Ala Cys Ala Gly Gly Cys	
[1395]		35 40 45
[1396]	Gly Cys Cys Cys Ala Thr Thr Cys Thr Cys Ala Gly Gly Thr Gly Cys	
[1397]		50 55 60
[1398]	Ala Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly	
[1399]	65	70 75 80
[1400]	Cys Gly Cys Thr Gly Ala Ala Cys Thr Cys Gly Thr Gly Cys Gly Gly	
[1401]		85 90 95
[1402]	Cys Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly Thr Gly Ala	
[1403]		100 105 110
[1404]	Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Thr Ala Ala Ala Gly Cys	
[1405]		115 120 125
[1406]	Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala Cys Cys Thr Thr Cys	
[1407]		130 135 140
[1408]	Ala Gly Cys Ala Ala Cys Thr Ala Cys Cys Thr Gly Ala Thr Gly Ala	
[1409]	145	150 155 160
[1410]	Ala Cys Thr Gly Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Cys Gly	
[1411]		165 170 175
[1412]	Gly Cys Cys Cys Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly Ala Cys Cys Thr Gly	
[1413]		180 185 190
[1414]	Gly Ala Thr Thr Gly Gly Ala Thr Cys Gly Gly Cys Ala Gly Ala Ala	
[1415]		195 200 205
[1416]	Thr Cys Gly Ala Cys Cys Cys Cys Thr Ala Cys Gly Ala Cys Gly Gly	
[1417]		210 215 220
[1418]	Cys Gly Ala Cys Ala Thr Cys Gly Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys	
[1419]	225	230 235 240
[1420]	Cys Ala Gly Ala Ala Cys Thr Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala Cys Ala	
[1421]		245 250 255
[1422]	Ala Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Gly Thr	
[1423]		260 265 270
[1424]	Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys	
[1425]		275 280 285
[1426]	Ala Cys Cys Gly Cys Cys Thr Ala Cys Ala Thr Gly Cys Ala Gly Cys	
[1427]		290 295 300

[1428]	Thr Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Ala Gly
[1429]	305 310 315 320
[1430]	Cys Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Gly Cys Gly Cys Cys Gly Thr Gly
[1431]	325 330 335
[1432]	Thr Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Cys Gly Cys Cys Ala Gly Ala Gly
[1433]	340 345 350
[1434]	Gly Cys Thr Ala Cys Gly Gly Cys Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr Ala
[1435]	355 360 365
[1436]	Cys Gly Gly Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Thr Thr Gly Gly
[1437]	370 375 380
[1438]	Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Cys Ala Ala Gly Cys Gly
[1439]	385 390 395 400
[1440]	Thr Gly Ala Cys Cys Gly Thr Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Cys
[1441]	405 410 415
[1442]	Cys Ala Ala Gly Ala Cys Cys Ala Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Thr
[1443]	420 425 430
[1444]	Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gly Gly Cys Gly
[1445]	435 440 445
[1446]	Ala Gly Thr Thr Cys Thr Cys Cys Gly Ala Gly Gly Cys Cys Cys Gly
[1447]	450 455 460
[1448]	Gly Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Thr Thr Gly Thr Gly Cys Thr Gly
[1449]	465 470 475 480
[1450]	Ala Cys Ala Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala
[1451]	485 490 495
[1452]	Gly Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys Gly Thr Gly Thr Cys Cys Cys Thr
[1453]	500 505 510
[1454]	Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Ala Gly Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys
[1455]	515 520 525
[1456]	Ala Thr Cys Ala Gly Cys Thr Gly Thr Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala
[1457]	530 535 540
[1458]	Gly Cys Gly Ala Gly Ala Gly Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Ala
[1459]	545 550 555 560
[1460]	Cys Thr Ala Cys Gly Gly Cys Ala Thr Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys
[1461]	565 570 575
[1462]	Ala Thr Gly Ala Ala Thr Thr Gly Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly Cys
[1463]	580 585 590
[1464]	Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys Cys Gly Gly Cys Cys Ala Gly Cys Cys
[1465]	595 600 605
[1466]	Cys Cys Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala Thr Cys
[1467]	610 615 620
[1468]	Thr Ala Thr Gly Cys Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Cys
[1469]	625 630 635 640

[1470]	Ala Gly Gly Gly Cys Ala Gly Cys Gly Gly Ala Gly Thr Gly Cys Cys
[1471]	645 650 655
[1472]	Thr Gly Cys Cys Ala Gly Ala Thr Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Cys
[1473]	660 665 670
[1474]	Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Cys Cys Gly Gly Cys Ala Cys Cys Gly
[1475]	675 680 685
[1476]	Ala Cys Thr Thr Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala Cys Ala Thr
[1477]	690 695 700
[1478]	Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly
[1479]	705 710 715 720
[1480]	Gly Ala Cys Gly Ala Cys Ala Cys Cys Gly Cys Cys Ala Thr Gly Thr
[1481]	725 730 735
[1482]	Ala Cys Thr Thr Thr Thr Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Gly
[1483]	740 745 750
[1484]	Cys Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly Thr Gly Cys Cys Cys Thr Gly Gly
[1485]	755 760 765
[1486]	Ala Cys Cys Thr Thr Thr Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala
[1487]	770 775 780
[1488]	Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala
[1489]	785 790 795 800
[1490]	Gly Gly Cys Cys Gly Ala Gly Gly Ala Thr Cys Cys Cys Gly Cys Cys
[1491]	805 810 815
[1492]	Gly Ala Gly Cys Cys Cys Ala Ala Ala Thr Cys Thr Cys Cys Thr Gly
[1493]	820 825 830
[1494]	Ala Cys Ala Ala Ala Ala Cys Thr Cys Ala Cys Ala Cys Ala Thr Gly
[1495]	835 840 845
[1496]	Cys Cys Cys Ala Cys Cys Gly Thr Gly Cys Cys Cys Ala Gly Cys Ala
[1497]	850 855 860
[1498]	Cys Cys Thr Gly Ala Ala Cys Thr Cys Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly
[1499]	865 870 875 880
[1500]	Gly Ala Cys Cys Gly Thr Cys Ala Gly Thr Cys Thr Thr Cys Cys Thr
[1501]	885 890 895
[1502]	Cys Thr Thr Cys Cys Cys Cys Cys Cys Ala Ala Ala Ala Cys Cys Cys
[1503]	900 905 910
[1504]	Ala Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys Ala Thr Gly Ala
[1505]	915 920 925
[1506]	Thr Cys Thr Cys Cys Cys Gly Gly Ala Cys Cys Cys Cys Thr Gly Ala
[1507]	930 935 940
[1508]	Gly Gly Thr Cys Ala Cys Ala Thr Gly Cys Gly Thr Gly Gly Thr Gly
[1509]	945 950 955 960
[1510]	Gly Thr Gly Gly Ala Cys Gly Thr Gly Ala Gly Cys Cys Ala Cys Gly
[1511]	965 970 975

[1512]	Ala Ala Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Thr Cys Ala Ala
[1513]	980 985 990
[1514]	Gly Thr Thr Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys Gly Thr Gly
[1515]	995 1000 1005
[1516]	Gly Ala Cys Gly Gly Cys Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly
[1517]	1010 1015 1020
[1518]	Cys Ala Thr Ala Ala Thr Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Cys Ala
[1519]	1025 1030 1035
[1520]	Ala Ala Gly Cys Cys Gly Cys Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly
[1521]	1040 1045 1050
[1522]	Cys Ala Gly Thr Ala Cys Ala Ala Cys Ala Gly Cys Ala Cys Gly
[1523]	1055 1060 1065
[1524]	Thr Ala Cys Cys Gly Thr Gly Thr Gly Gly Thr Cys Ala Gly Cys
[1525]	1070 1075 1080
[1526]	Gly Thr Cys Cys Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Cys Thr Gly
[1527]	1085 1090 1095
[1528]	Cys Ala Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly
[1529]	1100 1105 1110
[1530]	Ala Ala Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Thr Ala Cys
[1531]	1115 1120 1125
[1532]	Ala Ala Gly Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Thr Cys Thr Cys Cys
[1533]	1130 1135 1140
[1534]	Ala Ala Cys Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys Thr Cys Cys Cys Ala
[1535]	1145 1150 1155
[1536]	Gly Cys Cys Cys Cys Cys Ala Thr Cys Gly Ala Gly Ala Ala Ala
[1537]	1160 1165 1170
[1538]	Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Ala Ala Ala Gly Cys Cys
[1539]	1175 1180 1185
[1540]	Ala Ala Ala Gly Gly Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Cys Gly Ala
[1541]	1190 1195 1200
[1542]	Gly Ala Ala Cys Cys Ala Cys Ala Gly Gly Thr Gly Thr Ala Cys
[1543]	1205 1210 1215
[1544]	Ala Cys Cys Cys Thr Gly Cys Cys Cys Cys Ala Thr Cys Cys
[1545]	1220 1225 1230
[1546]	Cys Gly Gly Gly Ala Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Cys Cys
[1547]	1235 1240 1245
[1548]	Ala Ala Gly Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Thr Cys Ala Gly Cys
[1549]	1250 1255 1260
[1550]	Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys
[1551]	1265 1270 1275
[1552]	Ala Ala Ala Gly Gly Cys Thr Thr Cys Thr Ala Thr Cys Cys Cys
[1553]	1280 1285 1290



[1554]	Ala Gly Cys Gly Ala Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Gly Thr Gly		
[1555]	1295	1300	1305
[1556]	Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Cys Ala Ala Thr		
[1557]	1310	1315	1320
[1558]	Gly Gly Gly Cys Ala Ala Cys Cys Gly Gly Ala Gly Ala Ala Cys		
[1559]	1325	1330	1335
[1560]	Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Gly Ala Cys Cys Ala Cys Gly		
[1561]	1340	1345	1350
[1562]	Cys Cys Thr Cys Cys Cys Gly Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Cys		
[1563]	1355	1360	1365
[1564]	Thr Cys Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys Thr Cys Cys Thr Thr Cys		
[1565]	1370	1375	1380
[1566]	Thr Thr Cys Cys Thr Cys Thr Ala Cys Ala Gly Cys Ala Ala Gly		
[1567]	1385	1390	1395
[1568]	Cys Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly		
[1569]	1400	1405	1410
[1570]	Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly		
[1571]	1415	1420	1425
[1572]	Gly Gly Gly Ala Ala Cys Gly Thr Cys Thr Thr Cys Thr Cys Ala		
[1573]	1430	1435	1440
[1574]	Thr Gly Cys Thr Cys Cys Gly Thr Gly Ala Thr Gly Cys Ala Thr		
[1575]	1445	1450	1455
[1576]	Gly Ala Gly Gly Cys Thr Cys Thr Gly Cys Ala Cys Ala Ala Cys		
[1577]	1460	1465	1470
[1578]	Cys Ala Cys Thr Ala Cys Ala Cys Gly Cys Ala Gly Ala Ala Gly		
[1579]	1475	1480	1485
[1580]	Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly Thr Cys Thr		
[1581]	1490	1495	1500
[1582]	Cys Cys Gly Gly Gly Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Thr		
[1583]	1505	1510	1515
[1584]	Cys Cys Cys Ala Ala Ala Thr Thr Thr Thr Gly Gly Gly Thr Gly		
[1585]	1520	1525	1530
[1586]	Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Thr Gly Gly Thr		
[1587]	1535	1540	1545
[1588]	Gly Gly Ala Gly Thr Cys Cys Thr Gly Gly Cys Thr Thr Gly Cys		
[1589]	1550	1555	1560
[1590]	Thr Ala Thr Ala Gly Cys Thr Thr Gly Cys Thr Ala Gly Thr Ala		
[1591]	1565	1570	1575
[1592]	Ala Cys Ala Gly Thr Gly Gly Cys Cys Thr Thr Thr Ala Thr Thr		
[1593]	1580	1585	1590
[1594]	Ala Thr Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Gly Thr Gly Ala Gly Gly		
[1595]	1595	1600	1605

[1596]	Ala Gly Thr Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly
[1597]	1610 1615 1620
[1598]	Cys Thr Cys Cys Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Ala Cys
[1599]	1625 1630 1635
[1600]	Thr Ala Cys Ala Thr Gly Ala Ala Cys Ala Thr Gly Ala Cys Thr
[1601]	1640 1645 1650
[1602]	Cys Cys Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Cys Cys Cys Gly Gly Gly
[1603]	1655 1660 1665
[1604]	Cys Cys Cys Ala Cys Cys Cys Gly Cys Ala Ala Gly Cys Ala Thr
[1605]	1670 1675 1680
[1606]	Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys Cys Cys Thr Ala Thr Gly Cys Cys
[1607]	1685 1690 1695
[1608]	Cys Cys Ala Cys Cys Ala Cys Gly Cys Gly Ala Cys Thr Thr Cys
[1609]	1700 1705 1710
[1610]	Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Ala Thr Cys Gly Cys Thr Cys Cys
[1611]	1715 1720 1725
[1612]	Ala Gly Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys
[1613]	1730 1735 1740
[1614]	Ala Gly Gly Ala Gly Cys Gly Cys Ala Gly Ala Cys Gly Cys Cys
[1615]	1745 1750 1755
[1616]	Cys Cys Cys Gly Cys Gly Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly
[1617]	1760 1765 1770
[1618]	Gly Gly Cys Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Ala Gly Cys Thr Cys
[1619]	1775 1780 1785
[1620]	Thr Ala Thr Ala Ala Cys Gly Ala Gly Cys Thr Cys Ala Ala Thr
[1621]	1790 1795 1800
[1622]	Cys Thr Ala Gly Gly Ala Cys Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly
[1623]	1805 1810 1815
[1624]	Gly Ala Gly Thr Ala Cys Gly Ala Thr Gly Thr Thr Thr Thr Gly
[1625]	1820 1825 1830
[1626]	Gly Ala Cys Ala Ala Gly Ala Gly Ala Cys Gly Thr Gly Gly Cys
[1627]	1835 1840 1845
[1628]	Cys Gly Gly Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly Ala Gly Ala Thr Gly
[1629]	1850 1855 1860
[1630]	Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Gly Cys Cys Gly Ala Gly Ala
[1631]	1865 1870 1875
[1632]	Ala Gly Gly Ala Ala Gly Ala Ala Cys Cys Cys Thr Cys Ala Gly
[1633]	1880 1885 1890
[1634]	Gly Ala Ala Gly Gly Cys Cys Thr Gly Thr Ala Cys Ala Ala Thr
[1635]	1895 1900 1905
[1636]	Gly Ala Ala Cys Thr Gly Cys Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Thr
[1637]	1910 1915 1920

[1638]	Ala Ala Gly Ala Thr Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Cys Cys
[1639]	1925 1930 1935
[1640]	Thr Ala Cys Ala Gly Thr Gly Ala Gly Ala Thr Thr Gly Gly Gly
[1641]	1940 1945 1950
[1642]	Ala Thr Gly Ala Ala Ala Gly Gly Cys Gly Ala Gly Cys Gly Cys
[1643]	1955 1960 1965
[1644]	Cys Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Gly Gly
[1645]	1970 1975 1980
[1646]	Cys Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys Cys Thr Thr Thr Ala Cys
[1647]	1985 1990 1995
[1648]	Cys Ala Gly Gly Gly Thr Cys Thr Cys Ala Gly Thr Ala Cys Ala
[1649]	2000 2005 2010
[1650]	Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys Cys
[1651]	2015 2020 2025
[1652]	Thr Ala Cys Gly Ala Cys Gly Cys Cys Cys Thr Thr Cys Ala Cys
[1653]	2030 2035 2040
[1654]	Ala Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys Cys Cys
[1655]	2045 2050 2055
[1656]	Cys Cys Thr Cys Gly Cys
[1657]	2060
[1658]	<210> 55
[1659]	<211> 467
[1660]	<212> PRT
[1661]	<213> 人工序列
[1662]	<220>
[1663]	<223> 合成多肽
[1664]	<400> 55
[1665]	Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly
[1666]	1 5 10 15
[1667]	Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
[1668]	20 25 30
[1669]	Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
[1670]	35 40 45
[1671]	Ser Asn Tyr Leu Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Asp Leu
[1672]	50 55 60
[1673]	Asp Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp Tyr Asn
[1674]	65 70 75 80
[1675]	Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
[1676]	85 90 95
[1677]	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
[1678]	100 105 110
[1679]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr Trp

[1680]	115	120	125
[1681]	Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro		
[1682]	130	135	140
[1683]	Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Asp Ile Val Leu		
[1684]	145	150	155
[1685]	Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr		
[1686]		165	170
[1687]	Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe		175
[1688]		180	185
[1689]	Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile		190
[1690]		195	200
[1691]	Tyr Ala Ala Ser Arg Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly		205
[1692]		210	215
[1693]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Met Glu Glu		220
[1694]		225	230
[1695]	Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp		235
[1696]		245	250
[1697]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Leu Glu Pro Lys		255
[1698]		260	265
[1699]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Asp Pro Lys Phe		270
[1700]		275	280
[1701]	Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu		285
[1702]		290	295
[1703]	Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg		300
[1704]		305	310
[1705]	Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro		315
[1706]		325	330
[1707]	Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala		335
[1708]		340	345
[1709]	Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr		350
[1710]		355	360
[1711]	Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg		365
[1712]		370	375
[1713]	Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met		380
[1714]		385	390
[1715]	Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu		395
[1716]		405	410
[1717]	Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys		415
[1718]		420	425
[1719]	Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu		430
[1720]		435	440
[1721]	Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu		445

	450	455	460	
[1722]	450	455	460	
[1723]	Pro Pro Arg			
[1724]	465			
[1725]	<210> 56			
[1726]	<211> 1401			
[1727]	<212> DNA			
[1728]	<213> 人工序列			
[1729]	<220>			
[1730]	<223> 合成聚核苷酸			
[1731]	<400> 56			
[1732]	atggactgga tctggcgcat cctgtttctc gtgggagccg ccacaggcgc ccattctcag	60		
[1733]	gtgcagctgc agcagcctgg cgctgaactc gtgcggccag gcgcttctgt gaagctgagc	120		
[1734]	tgtaaagcca gcggtacac cttcagcaac tacctgatga actgggtcaa gcagcggccc	180		
[1735]	gagcaggacc tggattggat cggcagaatc gaccctacg acggcgacat cgactacaac	240		
[1736]	cagaacttca aggacaaggc catcctgacc gtggacaaga gcagcagcac cgcctacatg	300		
[1737]	cagctgtcca gcctgaccag cgaggacagc gccgtgtact actgcgccag aggctacggc	360		
[1738]	acagcctacg gcgtggacta ttggggccag ggcacaagcg tgaccgtgtc cagcgccaag	420		
[1739]	accaccccc ctaagctgga agagggcgag ttctccgagg cccgggtgga cattgtgctg	480		
[1740]	acacagtctc cagccagcct ggccgtgtcc ctgggacaga gagccacat cagctgtagg	540		
[1741]	gccagcgaga gcgtggacaa ctacggcatc agcttcatga attggttcca gcagaagccc	600		
[1742]	ggccagcccc ccaagctgct gatctatgcc gccagcagac agggcagcgg agtgcctgcc	660		
[1743]	agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcagcctga acatccacc tatggaagag	720		
[1744]	gacgacaccg ccatgtactt ttgccagcag agcaaagagg tgccctggac ctttggcgga	780		
[1745]	ggcaccaagc tggaaatcaa ggatctcgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc	840		
[1746]	ccaccgtgcc cggatcccaa attttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc	900		
[1747]	tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg	960		
[1748]	ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat	1020		
[1749]	taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc	1080		
[1750]	aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat	1140		
[1751]	ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg	1200		
[1752]	gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat	1260		
[1753]	aagatggcgg aggctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgcgggag gggcaagggg	1320		
[1754]	cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgccttcaac	1380		
[1755]	atgcaggccc tgccccctcg c	1401		
[1756]	<210> 57			
[1757]	<211> 257			
[1758]	<212> PRT			
[1759]	<213> 人工序列			
[1760]	<220>			
[1761]	<223> 合成多肽			
[1762]	<400> 57			
[1763]	Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro			

[1764]	1	5	10	15
[1765]	Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro			
[1766]		20	25	30
[1767]	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			
[1768]		35	40	45
[1769]	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn			
[1770]		50	55	60
[1771]	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg			
[1772]		65	70	75
[1773]	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val			
[1774]		85	90	95
[1775]	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser			
[1776]		100	105	110
[1777]	Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys			
[1778]		115	120	125
[1779]	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp			
[1780]		130	135	140
[1781]	Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe			
[1782]		145	150	155
[1783]	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
[1784]		165	170	175
[1785]	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
[1786]		180	185	190
[1787]	Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
[1788]		195	200	205
[1789]	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr			
[1790]		210	215	220
[1791]	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe			
[1792]		225	230	235
[1793]	Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu			
[1794]		245	250	255
[1795]	His			
[1796]	<210> 58			
[1797]	<211> 822			
[1798]	<212> DNA			
[1799]	<213> 人工序列			
[1800]	<220>			
[1801]	<223> 合成聚核苷酸			
[1802]	<400> 58			
[1803]	gatcccgcgcg agcccaaate tcctgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct 60			
[1804]	gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcttc ttcccccaa aaccaagga caccctcatg 120			
[1805]	atctcccgga ccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 180			

- [1806] gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 240  
 [1807] gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 300  
 [1808] tggtgtaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc 360  
 [1809] gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 420  
 [1810] ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 480  
 [1811] tatcccagcg acatgcccggt ggagtgaggag agcaatgggc aaccggagaa caactacaag 540  
 [1812] accacgcctc ccgtgtctga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg 600  
 [1813] gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 660  
 [1814] cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaaaaaga tcccaaattt 720  
 [1815] tgggtgctgg tggtggttgg tggagtctg gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc 780  
 [1816] tttattatit tctgggtgag gagtaagagg agcaggctcc tg 822  
 [1817] <210> 59  
 [1818] <211> 44  
 [1819] <212> PRT  
 [1820] <213> 人工序列  
 [1821] <220>  
 [1822] <223> 合成多肽  
 [1823] <400> 59  
 [1824] Asp Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 [1825] 1 5 10 15  
 [1826] Pro Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala  
 [1827] 20 25 30  
 [1828] Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile  
 [1829] 35 40  
 [1830] <210> 60  
 [1831] <211> 165  
 [1832] <212> DNA  
 [1833] <213> 人工序列  
 [1834] <220>  
 [1835] <223> 合成聚核苷酸  
 [1836] <400> 60  
 [1837] gatctcgagc ccaaactcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc ggatcccaaa 60  
 [1838] ttttgggtgc tggtggtggt tggtggagtc ctggcttct atagcttct agtaacagt 120  
 [1839] gcctttatta tttctgggt gaggagtaag aggagcaggc tcctg 165  
 [1840] <210> 61  
 [1841] <211> 526  
 [1842] <212> PRT  
 [1843] <213> 人工序列  
 [1844] <220>  
 [1845] <223> 合成多肽  
 [1846] <400> 61  
 [1847] Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly

[1848]	1	5	10	15
[1849]	Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg			
[1850]		20	25	30
[1851]	Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe			
[1852]		35	40	45
[1853]	Ser Asn Tyr Leu Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Asp Leu			
[1854]		50	55	60
[1855]	Asp Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp Tyr Asn			
[1856]		65	70	75
[1857]	Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser			
[1858]		85	90	95
[1859]	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val			
[1860]		100	105	110
[1861]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr Trp			
[1862]		115	120	125
[1863]	Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro			
[1864]		130	135	140
[1865]	Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Asp Ile Val Leu			
[1866]		145	150	155
[1867]	Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr			
[1868]		165	170	175
[1869]	Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe			
[1870]		180	185	190
[1871]	Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile			
[1872]		195	200	205
[1873]	Tyr Ala Ala Ser Arg Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
[1874]		210	215	220
[1875]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Met Glu Glu			
[1876]		225	230	235
[1877]	Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp			
[1878]		245	250	255
[1879]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Glu Asp Pro Ala			
[1880]		260	265	270
[1881]	Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
[1882]		275	280	285
[1883]	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
[1884]		290	295	300
[1885]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
[1886]		305	310	315
[1887]	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
[1888]		325	330	335
[1889]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			



[1890]	340	345	350
[1891]	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
[1892]	355	360	365
[1893]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
[1894]	370	375	380
[1895]	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
[1896]	385	390	395
[1897]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr		
[1898]	405	410	415
[1899]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
[1900]	420	425	430
[1901]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
[1902]	435	440	445
[1903]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
[1904]	450	455	460
[1905]	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
[1906]	465	470	475
[1907]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
[1908]	485	490	495
[1909]	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu		
[1910]	500	505	510
[1911]	Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu His		
[1912]	515	520	525
[1913]	<210> 62		
[1914]	<211> 1632		
[1915]	<212> DNA		
[1916]	<213> 人工序列		
[1917]	<220>		
[1918]	<223> 合成聚核苷酸		
[1919]	<400> 62		
[1920]	atggactgga tctggcgcac cctgtttctc gtgggagccg ccacagcgc ccattctcag 60		
[1921]	gtgcagctgc agcagcctgg cgctgaactc gtgcggccag gcgcttctgt gaagctgagc 120		
[1922]	tgtaaagcca gcggtacac cttagcaac tacctgatga actgggtcaa gcagcggccc 180		
[1923]	gagcaggacc tggattggat cggcagaatc gaccctacg acggcgacat cgactacaac 240		
[1924]	cagaacttca aggacaaggc catcctgacc gtggacaaga gcagcagcac cgcctacatg 300		
[1925]	cagctgtcca gcctgaccag cgaggacagc gccgtgtact actgcgccag aggctacggc 360		
[1926]	acagctacg gcgtggacta ttggggccag ggcacaagcg tgaccgtgtc cagcgcceaag 420		
[1927]	accaccccc ctaagctgga agagggcgag ttctccgagg cccgggtgga cattgtgctg 480		
[1928]	acacagtctc cagccagcct ggccgtgtcc ctgggacaga gagccaccat cagctgtagg 540		
[1929]	gccagcgaga gcgtggacaa ctacggcatc agcttcatga attggttcca gcagaagccc 600		
[1930]	ggccagcccc ccaagctgct gatctatgcc gccagcagac agggcagcgg agtgcctgcc 660		
[1931]	agatittctg gcagcggctc cggcaccgac ttagcctga acatccacc tatggaagag 720		

[1932]	gacgacaccg ccatgtactt ttgccagcag agcaaagagg tgccctggac ctttggcgga	780
[1933]	ggcaccaagc tggaaatcaa ggccgaggat cccgccgagc ccaaattctc tgacaaaact	840
[1934]	cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa ctctctgggg gaccgtcagt ctctctcttc	900
[1935]	ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggacc ctgaggtcac atgcgtggtg	960
[1936]	gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag	1020
[1937]	gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc	1080
[1938]	agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc	1140
[1939]	tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc	1200
[1940]	cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc	1260
[1941]	agcctgacct gcctgtgtaa aggtctctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc	1320
[1942]	aatgggcaac cggagaacaa ctacaagacc acgcctccc tgctggactc cgacggctcc	1380
[1943]	ttctctctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc	1440
[1944]	tcatgtccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg	1500
[1945]	tctccgggta aaaaagatcc caaatcttg gtgctgtgg tggttgggtg agtctctggct	1560
[1946]	tgctatagct tgctagtaac agtggccttt attattttct gggtaggag taagaggagc	1620
[1947]	aggetcctga ct	1632
[1948]	<210>	63
[1949]	<211>	312
[1950]	<212>	PRT
[1951]	<213>	人工序列
[1952]	<220>	
[1953]	<223>	合成多肽
[1954]	<400>	63
[1955]	Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly	
[1956]	1 5 10 15	
[1957]	Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg	
[1958]	20 25 30	
[1959]	Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
[1960]	35 40 45	
[1961]	Ser Asn Tyr Leu Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Asp Leu	
[1962]	50 55 60	
[1963]	Asp Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp Tyr Asn	
[1964]	65 70 75 80	
[1965]	Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser	
[1966]	85 90 95	
[1967]	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
[1968]	100 105 110	
[1969]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr Trp	
[1970]	115 120 125	
[1971]	Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro	
[1972]	130 135 140	
[1973]	Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Asp Ile Val Leu	

[1974]	145	150	155	160
[1975]	Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr			
[1976]		165	170	175
[1977]	Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe			
[1978]		180	185	190
[1979]	Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile			
[1980]		195	200	205
[1981]	Tyr Ala Ala Ser Arg Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
[1982]		210	215	220
[1983]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Met Glu Glu			
[1984]	225	230	235	240
[1985]	Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp			
[1986]		245	250	255
[1987]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Leu Glu Pro Lys			
[1988]		260	265	270
[1989]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Asp Pro Lys Phe			
[1990]		275	280	285
[1991]	Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu			
[1992]		290	295	300
[1993]	Val Thr Val Ala Phe Ile Ile His			
[1994]	305	310		
[1995]	<210>	64		
[1996]	<211>	969		
[1997]	<212>	DNA		
[1998]	<213>	人工序列		
[1999]	<220>			
[2000]	<223>	合成聚核苷酸		
[2001]	<400>	64		
[2002]	atggactgga tctggcgcat cctgtttctc gtgggagccg ccacaggcgc ccattctcag	60		
[2003]	gtgcagctgc agcagcctgg cgctgaactc gtgcggccag gcgcttctgt gaagctgagc	120		
[2004]	tgtaaagcca gcggtacac cttagcaac tacctgatga actgggtcaa gcagcggccc	180		
[2005]	gagcaggacc tggattgat cggcagaatc gaccctacg acggcgacat cgactacaac	240		
[2006]	cagaacttca aggacaagc catcctgacc gtggacaaga gcagcagcac cgcctacatg	300		
[2007]	cagctgtcca gcctgaccag cgaggacagc gccgtgtact actgcgccag aggctacggc	360		
[2008]	acagcctacg gcgtggacta ttggggccag ggcacaagcg tgaccgtgtc cagcgccaag	420		
[2009]	accaccccc ctaagctgga agagggcgag ttctccgagg cccgggtgga cattgtgctg	480		
[2010]	acacagtctc cagccagcct ggccgtgtcc ctgggacaga gagccacat cagctgtagg	540		
[2011]	gccagcgaga gcgtggacaa ctacggcatc agcttcatga attggttcca gcagaagccc	600		
[2012]	ggccagcccc ccaagctgct gatctatgcc gccagcagac agggcagcgg agtgcctgcc	660		
[2013]	agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcagcctga acatccacc tatggaagag	720		
[2014]	gacgacaccg ccatgtactt ttgccagcag agcaaagagg tgccctggac ctttggcgga	780		
[2015]	ggcaccaagc tggaaatcaa ggatctcgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc	840		

[2016]	ccaccgtgcc cggatcccaa attttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc	900
[2017]	tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg	960
[2018]	ctcctgact	969
[2019]	<210> 65	
[2020]	<211> 747	
[2021]	<212> DNA	
[2022]	<213> 人工序列	
[2023]	<220>	
[2024]	<223> 合成聚核苷酸	
[2025]	<400> 65	
[2026]	tctcaggtgc agctgcagca gcctggcgt gaactcgtgc ggccaggcgc ttctgtgaag	60
[2027]	ctgagctgta aagccagcgg ctacacctc agcaactacc tgatgaactg ggtcaagcag	120
[2028]	cggcccagc aggacctgga ttgatcggc agaatcgacc cctacgacgg cgacatcgac	180
[2029]	tacaaccaga acttcaagga caaggccatc ctgaccgtgg acaagagcag cagcaccgcc	240
[2030]	tacatgcagc tgtccagcct gaccagcgag gacagcggc tgtactactg cgccagaggc	300
[2031]	tacggcacag cctacggcgt ggactattgg ggccagggca caagcgtgac cgtgtccagc	360
[2032]	gccaagacca cccccctaa gctggaagag ggcgagttct ccgaggccc ggtggacatt	420
[2033]	gtgctgacac agtctccagc cagcctggcc gtgtccctgg gacagagac caccatcagc	480
[2034]	tgtagggcca gcgagagcgt ggacaactac ggcacagct tcatgaattg gttccagcag	540
[2035]	aagcccggcc agcccccaa gctgctgatc tatgcccca gcagacaggc cagcggagtg	600
[2036]	cctgccagat tttctggcag cggctccggc accgacttca gctgaacat ccaccctatg	660
[2037]	gaagaggacg acaccgcat gtacttttgc cagcagagca aagaggtgcc ctggaccttt	720
[2038]	ggcggaggca ccaagctgga aatcaag	747
[2039]	<210> 66	
[2040]	<211> 690	
[2041]	<212> DNA	
[2042]	<213> 人工序列	
[2043]	<220>	
[2044]	<223> 合成聚核苷酸	
[2045]	<400> 66	
[2046]	caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgaagctg	60
[2047]	tcttcaagg cttctggcta cacgttctcc aactacttga tgaactgggt taagcagagg	120
[2048]	cctgagcaag acctgactg gattggaagg attgatcctt acgatggtga cattgactac	180
[2049]	aatcaaaact tcaaggacaa ggccatattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac	240
[2050]	atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaggttat	300
[2051]	ggcacggcct atggtgtgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctcagat	360
[2052]	attgtgctaa ctacgtctcc agcttctttg gctgtgtctc taggacagag ggccaccatc	420
[2053]	tcttgcagag ccagcgaag tgttgataat tatggcatta gttttatgaa ctggttccaa	480
[2054]	cagaaaccag gacagccacc caaactctc atctatgctg catccagca aggatccggg	540
[2055]	gtccctgcca ggtttagtgg cagtgggtct gggacagact tcagcctcaa catccatcct	600
[2056]	atggaggagg atgatactgc aatgtatttc tgtcagcaaa gtaaggaggt tccgtggacg	660
[2057]	ttcgggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa	690

[2058]	<210>	67
[2059]	<211>	1488
[2060]	<212>	PRT
[2061]	<213>	人工序列
[2062]	<220>	
[2063]	<223>	合成聚核苷酸
[2064]	<400>	67
[2065]	Cys Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys	
[2066]	1	5 10 15
[2067]	Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Cys Gly Cys Thr Gly Ala Ala Cys Thr	
[2068]		20 25 30
[2069]	Cys Gly Thr Gly Cys Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr	
[2070]		35 40 45
[2071]	Thr Cys Thr Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr	
[2072]		50 55 60
[2073]	Gly Thr Ala Ala Ala Gly Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Ala	
[2074]		65 70 75 80
[2075]	Cys Ala Cys Cys Thr Thr Cys Ala Gly Cys Ala Ala Cys Thr Ala Cys	
[2076]		85 90 95
[2077]	Cys Thr Gly Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly Gly Gly Thr Cys Ala	
[2078]		100 105 110
[2079]	Ala Gly Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Cys Cys Gly Ala Gly Cys Ala	
[2080]		115 120 125
[2081]	Gly Gly Ala Cys Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Ala Thr Cys	
[2082]		130 135 140
[2083]	Gly Gly Cys Ala Gly Ala Ala Thr Cys Gly Ala Cys Cys Cys Cys Thr	
[2084]		145 150 155 160
[2085]	Ala Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys Gly Ala Cys Ala Thr Cys Gly Ala	
[2086]		165 170 175
[2087]	Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Ala Gly Ala Ala Cys Thr Thr Cys	
[2088]		180 185 190
[2089]	Ala Ala Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Cys	
[2090]		195 200 205
[2091]	Thr Gly Ala Cys Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly Ala Gly	
[2092]		210 215 220
[2093]	Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala Cys Cys Gly Cys Cys Thr Ala Cys	
[2094]		225 230 235 240
[2095]	Ala Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys	
[2096]		245 250 255
[2097]	Thr Gly Ala Cys Cys Ala Gly Cys Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Gly	
[2098]		260 265 270
[2099]	Cys Gly Cys Cys Gly Thr Gly Thr Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Cys	

[2100]	275	280	285
[2101]	Gly Cys Cys Ala Gly Ala Gly Gly Cys Thr Ala Cys Gly Gly Cys Ala		
[2102]	290	295	300
[2103]	Cys Ala Gly Cys Cys Thr Ala Cys Gly Gly Cys Gly Thr Gly Gly Ala		
[2104]	305	310	315
[2105]	Cys Thr Ala Thr Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Cys		
[2106]		325	330
[2107]	Ala Cys Ala Ala Gly Cys Gly Thr Gly Ala Cys Cys Gly Thr Gly Thr		
[2108]		340	345
[2109]	Cys Cys Ala Gly Cys Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Cys Cys Ala Cys		
[2110]		355	360
[2111]	Cys Cys Cys Cys Cys Cys Thr Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala		
[2112]		370	375
[2113]	Gly Ala Gly Gly Gly Cys Gly Ala Gly Thr Thr Cys Thr Cys Cys Gly		
[2114]		385	390
[2115]	Ala Gly Gly Cys Cys Cys Gly Gly Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Thr		
[2116]		405	410
[2117]	Thr Gly Thr Gly Cys Thr Gly Ala Cys Ala Cys Ala Gly Thr Cys Thr		
[2118]		420	425
[2119]	Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys Gly		
[2120]		435	440
[2121]	Thr Gly Thr Cys Cys Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Ala Gly		
[2122]		450	455
[2123]	Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala Gly Cys Thr Gly Thr		
[2124]		465	470
[2125]	Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Cys Gly Ala Gly Ala Gly Cys Gly		
[2126]		485	490
[2127]	Thr Gly Gly Ala Cys Ala Ala Cys Thr Ala Cys Gly Gly Cys Ala Thr		
[2128]		500	505
[2129]	Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys Ala Thr Gly Ala Ala Thr Thr Gly Gly		
[2130]		515	520
[2131]	Thr Thr Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys Cys Gly		
[2132]		530	535
[2133]	Gly Cys Cys Ala Gly Cys Cys Cys Cys Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr		
[2134]		545	550
[2135]	Gly Cys Thr Gly Ala Thr Cys Thr Ala Thr Gly Cys Cys Gly Cys Cys		
[2136]		565	570
[2137]	Ala Gly Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Gly Cys Gly		
[2138]		580	585
[2139]	Gly Ala Gly Thr Gly Cys Cys Thr Gly Cys Cys Ala Gly Ala Thr Thr		
[2140]		595	600
[2141]	Thr Thr Cys Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Cys Cys		

[2142]	610	615	620
[2143]	Gly Gly Cys Ala Cys Cys Gly Ala Cys Thr Thr Cys Ala Gly Cys Cys		
[2144]	625	630	635 640
[2145]	Thr Gly Ala Ala Cys Ala Thr Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr Ala Thr		
[2146]	645	650	655
[2147]	Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Cys Gly Ala Cys Ala Cys Cys		
[2148]	660	665	670
[2149]	Gly Cys Cys Ala Thr Gly Thr Ala Cys Thr Thr Thr Thr Gly Cys Cys		
[2150]	675	680	685
[2151]	Ala Gly Cys Ala Gly Ala Gly Cys Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly Thr		
[2152]	690	695	700
[2153]	Gly Cys Cys Cys Thr Gly Gly Ala Cys Cys Thr Thr Thr Gly Gly Cys		
[2154]	705	710	715 720
[2155]	Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly		
[2156]	725	730	735
[2157]	Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala		
[2158]	740	745	750
[2159]	Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Cys		
[2160]	755	760	765
[2161]	Gly Cys Thr Gly Ala Ala Cys Thr Cys Gly Thr Gly Cys Gly Gly Cys		
[2162]	770	775	780
[2163]	Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly Thr Gly Ala Ala		
[2164]	785	790	795 800
[2165]	Gly Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Thr Ala Ala Ala Gly Cys Cys		
[2166]	805	810	815
[2167]	Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala Cys Cys Thr Thr Cys Ala		
[2168]	820	825	830
[2169]	Gly Cys Ala Ala Cys Thr Ala Cys Cys Thr Gly Ala Thr Gly Ala Ala		
[2170]	835	840	845
[2171]	Cys Thr Gly Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Cys Gly Gly		
[2172]	850	855	860
[2173]	Cys Cys Cys Gly Ala Gly Cys Ala Gly Gly Ala Cys Cys Thr Gly Gly		
[2174]	865	870	875 880
[2175]	Ala Thr Thr Gly Gly Ala Thr Cys Gly Gly Cys Ala Gly Ala Ala Thr		
[2176]	885	890	895
[2177]	Cys Gly Ala Cys Cys Cys Cys Thr Ala Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys		
[2178]	900	905	910
[2179]	Gly Ala Cys Ala Thr Cys Gly Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys		
[2180]	915	920	925
[2181]	Ala Gly Ala Ala Cys Thr Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala Cys Ala Ala		
[2182]	930	935	940
[2183]	Gly Gly Cys Cys Ala Thr Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Gly Thr Gly		

[2184]	945	950	955	960
[2185]	Gly Ala Cys Ala Ala Gly Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala			
[2186]		965	970	975
[2187]	Cys Cys Gly Cys Cys Thr Ala Cys Ala Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr			
[2188]		980	985	990
[2189]	Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Ala Gly Cys			
[2190]		995	1000	1005
[2191]	Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Gly Cys Gly Cys Cys Gly Thr Gly			
[2192]		1010	1015	1020
[2193]	Thr Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Cys Gly Cys Cys Ala Gly Ala			
[2194]		1025	1030	1035
[2195]	Gly Gly Cys Thr Ala Cys Gly Gly Cys Ala Cys Ala Gly Cys Cys			
[2196]		1040	1045	1050
[2197]	Thr Ala Cys Gly Gly Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Thr			
[2198]		1055	1060	1065
[2199]	Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Cys Ala			
[2200]		1070	1075	1080
[2201]	Ala Gly Cys Gly Thr Gly Ala Cys Cys Gly Thr Gly Thr Cys Cys			
[2202]		1085	1090	1095
[2203]	Ala Gly Cys Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Cys Cys Ala Cys Cys			
[2204]		1100	1105	1110
[2205]	Cys Cys Cys Cys Cys Thr Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala			
[2206]		1115	1120	1125
[2207]	Gly Ala Gly Gly Gly Cys Gly Ala Gly Thr Thr Cys Thr Cys Cys			
[2208]		1130	1135	1140
[2209]	Gly Ala Gly Gly Cys Cys Cys Gly Gly Gly Thr Gly Gly Ala Cys			
[2210]		1145	1150	1155
[2211]	Ala Thr Thr Gly Thr Gly Cys Thr Gly Ala Cys Ala Cys Ala Gly			
[2212]		1160	1165	1170
[2213]	Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly			
[2214]		1175	1180	1185
[2215]	Gly Cys Cys Gly Thr Gly Thr Cys Cys Cys Thr Gly Gly Gly Ala			
[2216]		1190	1195	1200
[2217]	Cys Ala Gly Ala Gly Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys			
[2218]		1205	1210	1215
[2219]	Ala Gly Cys Thr Gly Thr Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Cys			
[2220]		1220	1225	1230
[2221]	Gly Ala Gly Ala Gly Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Ala Cys			
[2222]		1235	1240	1245
[2223]	Thr Ala Cys Gly Gly Cys Ala Thr Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys			
[2224]		1250	1255	1260
[2225]	Ala Thr Gly Ala Ala Thr Thr Gly Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly			



[2226]	1265	1270	1275
[2227]	Cys Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys Cys Gly Gly Cys Cys Ala Gly		
[2228]	1280	1285	1290
[2229]	Cys Cys Cys Cys Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly		
[2230]	1295	1300	1305
[2231]	Ala Thr Cys Thr Ala Thr Gly Cys Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys		
[2232]	1310	1315	1320
[2233]	Ala Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Gly Cys Gly Gly Ala		
[2234]	1325	1330	1335
[2235]	Gly Thr Gly Cys Cys Thr Gly Cys Cys Ala Gly Ala Thr Thr Thr		
[2236]	1340	1345	1350
[2237]	Thr Cys Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Thr Cys Cys		
[2238]	1355	1360	1365
[2239]	Gly Gly Cys Ala Cys Cys Gly Ala Cys Thr Thr Cys Ala Gly Cys		
[2240]	1370	1375	1380
[2241]	Cys Thr Gly Ala Ala Cys Ala Thr Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr		
[2242]	1385	1390	1395
[2243]	Ala Thr Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Cys Gly Ala Cys		
[2244]	1400	1405	1410
[2245]	Ala Cys Cys Gly Cys Cys Ala Thr Gly Thr Ala Cys Thr Thr Thr		
[2246]	1415	1420	1425
[2247]	Thr Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Gly Cys Ala Ala Ala		
[2248]	1430	1435	1440
[2249]	Gly Ala Gly Gly Thr Gly Cys Cys Cys Thr Gly Gly Ala Cys Cys		
[2250]	1445	1450	1455
[2251]	Thr Thr Thr Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala Cys Cys		
[2252]	1460	1465	1470
[2253]	Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala Gly		
[2254]	1475	1480	1485
[2255]	<210> 68		
[2256]	<211> 48		
[2257]	<212> PRT		
[2258]	<213> 人工序列		
[2259]	<220>		
[2260]	<223> 合成多肽		
[2261]	<400> 68		
[2262]	Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro		
[2263]	1 5 10 15		
[2264]	Ala Glu Pro Cys His Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr		
[2265]	20 25 30		
[2266]	Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro		
[2267]	35 40 45		

[2268]	<210>	69	
[2269]	<211>	144	
[2270]	<212>	DNA	
[2271]	<213>	人工序列	
[2272]	<220>		
[2273]	<223>	合成聚核苷酸	
[2274]	<400>	69	
[2275]		caacgaagga aatatagatc aaacaaagga gaaagtcctg tggagcctgc agagccttgt	60
[2276]		cgttacagct gccccagga ggaggaggc agcaccatcc ccatccagga ggattaccga	120
[2277]		aaaccggagc ctgcctgctc cccc	144
[2278]	<210>	70	
[2279]	<211>	62	
[2280]	<212>	PRT	
[2281]	<213>	人工序列	
[2282]	<220>		
[2283]	<223>	合成多肽	
[2284]	<400>	70	
[2285]		Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn Lys Ala Pro His Pro Lys Gln	
[2286]		1                    5                    10                    15	
[2287]		Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr	
[2288]		20                    25                    30	
[2289]		Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln	
[2290]		35                    40                    45	
[2291]		Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser Val Gln Glu Arg Gln	
[2292]		50                    55                    60	
[2293]	<210>	71	
[2294]	<211>	186	
[2295]	<212>	DNA	
[2296]	<213>	人工序列	
[2297]	<220>		
[2298]	<223>	合成聚核苷酸	
[2299]	<400>	71	
[2300]		aagaaggtgg ccaagaagcc caccaacaag gccccccacc ctaagcagga accccaggaa	60
[2301]		atcaacttcc cgcagacct gcccggcagc aatactgctg ctcccgtgca ggaaacctg	120
[2302]		cacggctgtc agcctgtgac ccaggaagat ggcaaagaaa gccgatcag cgtgcaggaa	180
[2303]		cggcag	186
[2304]	<210>	72	
[2305]	<211>	36	
[2306]	<212>	PRT	
[2307]	<213>	人工序列	
[2308]	<220>		
[2309]	<223>	合成多肽	

[2310]	<400>	72	
[2311]	Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly		
[2312]	1	5	10 15
[2313]	Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr		
[2314]		20	25 30
[2315]	Leu Ala Lys Ile		
[2316]		35	
[2317]	<210>	73	
[2318]	<211>	108	
[2319]	<212>	DNA	
[2320]	<213>	人工序列	
[2321]	<220>		
[2322]	<223>	合成聚核苷酸	
[2323]	<400>	73	
[2324]	agggaccaga ggctgcccc cgatgcccac aagccccctg ggggaggcag tttccggacc		60
[2325]	cccatccaag aggagcaggc cgacgcccac tccacctgg ccaagatc		108
[2326]	<210>	74	
[2327]	<211>	42	
[2328]	<212>	PRT	
[2329]	<213>	人工序列	
[2330]	<220>		
[2331]	<223>	合成多肽	
[2332]	<400>	74	
[2333]	Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met		
[2334]	1	5	10 15
[2335]	Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe		
[2336]		20	25 30
[2337]	Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu		
[2338]		35	40
[2339]	<210>	75	
[2340]	<211>	126	
[2341]	<212>	DNA	
[2342]	<213>	人工序列	
[2343]	<220>		
[2344]	<223>	合成聚核苷酸	
[2345]	<400>	75	
[2346]	aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaacaac catttatgag accagtacaa		60
[2347]	actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt		120
[2348]	gaactg		126
[2349]	<210>	76	
[2350]	<211>	38	
[2351]	<212>	PRT	

[2352]	<213>	人工序列	
[2353]	<220>		
[2354]	<223>	合成多肽	
[2355]	<400>	76	
[2356]		Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn	
[2357]		1 5 10 15	
[2358]		Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg	
[2359]		20 25 30	
[2360]		Leu Thr Asp Val Thr Leu	
[2361]		35	
[2362]	<210>	77	
[2363]	<211>	114	
[2364]	<212>	DNA	
[2365]	<213>	人工序列	
[2366]	<220>		
[2367]	<223>	合成聚核苷酸	
[2368]	<400>	77	
[2369]		tgctggctga ccaaaaaaaaa atatagcagc agcgtgcatg atccgaacgg cgaatatatg	60
[2370]		tttatgcgcg cggatgaacac cgcgaaaaaaaa agccgcctga ccgatgtgac cctg	114
[2371]	<210>	78	
[2372]	<211>	172	
[2373]	<212>	PRT	
[2374]	<213>	人工序列	
[2375]	<220>		
[2376]	<223>	合成多肽	
[2377]	<400>	78	
[2378]		Met Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser	
[2379]		1 5 10 15	
[2380]		Thr Ser Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Asn Met Arg Val Arg Arg Arg	
[2381]		20 25 30	
[2382]		Leu Ser Leu Phe Leu Asn Val Arg Thr Gln Val Ala Ala Asp Trp Thr	
[2383]		35 40 45	
[2384]		Ala Leu Ala Glu Glu Met Asp Phe Glu Tyr Leu Glu Ile Arg Gln Leu	
[2385]		50 55 60	
[2386]		Glu Thr Gln Ala Asp Pro Thr Gly Arg Leu Leu Asp Ala Trp Gln Gly	
[2387]		65 70 75 80	
[2388]		Arg Pro Gly Ala Ser Val Gly Arg Leu Leu Glu Leu Leu Thr Lys Leu	
[2389]		85 90 95	
[2390]		Gly Arg Asp Asp Val Leu Leu Glu Leu Gly Pro Ser Ile Glu Glu Asp	
[2391]		100 105 110	
[2392]		Cys Gln Lys Tyr Ile Leu Lys Gln Gln Gln Glu Glu Ala Glu Lys Pro	
[2393]		115 120 125	

[2394]	Leu Gln Val Ala Ala Val Asp Ser Ser Val Pro Arg Thr Ala Glu Leu			
[2395]	130	140		
[2396]	Ala Gly Ile Thr Thr Leu Asp Asp Pro Leu Gly His Met Pro Glu Arg			
[2397]	145	150	155	160
[2398]	Phe Asp Ala Phe Ile Cys Tyr Cys Pro Ser Asp Ile			
[2399]	165	170		
[2400]	<210>	79		
[2401]	<211>	516		
[2402]	<212>	DNA		
[2403]	<213>	人工序列		
[2404]	<220>			
[2405]	<223>	合成聚核苷酸		
[2406]	<400>	79		
[2407]	atggctgctg gcggacctgg cgccgatct gctgctctg tgtctagcac aagcagcctg	60		
[2408]	cctctggccg ccctgaacat gagagtgcgg agaaggctga gcctgttctt gaacgtgcgg	120		
[2409]	acacaggtgg ccgccattg gacagccctg gccgaggaaa tggacttcga gtacctggaa	180		
[2410]	atccggcagc tggaaaccca ggccgaccct acaggcagac tgctggatgc ttggcagggc	240		
[2411]	agaccaggcg cttctgtggg aaggctgctg gaactgctga ccaagctggg cagggacgac	300		
[2412]	gtgctgctgg aactggcccc tagcatcga gaggactgcc agaagtacat cctgaagcag	360		
[2413]	cagcaggaag aggccgagaa gcctctgcag gtggcagccg tggatagcag cgtgccaaga	420		
[2414]	acagccgagc tggccggcat caccaccctg gatgatctc tgggccacat gcccgagaga	480		
[2415]	ttcagcct tcattctgcta ctgccccagc gacatc	516		
[2416]	<210>	80		
[2417]	<211>	18		
[2418]	<212>	PRT		
[2419]	<213>	人工序列		
[2420]	<220>			
[2421]	<223>	合成多肽		
[2422]	<400>	80		
[2423]	Ala Lys Thr Thr Pro Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala			
[2424]	1	5	10	15
[2425]	Arg Val			
[2426]	<210>	81		
[2427]	<211>	42		
[2428]	<212>	PRT		
[2429]	<213>	人工序列		
[2430]	<220>			
[2431]	<223>	合成多肽		
[2432]	<400>	81		
[2433]	Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met			
[2434]	1	5	10	15
[2435]	Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe			

[2436]	20	25	30
[2437]	Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu		
[2438]	35	40	
[2439]	<210>	82	
[2440]	<211>	126	
[2441]	<212>	DNA	
[2442]	<213>	人工序列	
[2443]	<220>		
[2444]	<223>	合成聚核苷酸	
[2445]	<400>	82	
[2446]	aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa		60
[2447]	actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttcag aagaagaaga aggaggatgt		120
[2448]	gaactg		126
[2449]	<210>	83	
[2450]	<211>	36	
[2451]	<212>	PRT	
[2452]	<213>	人工序列	
[2453]	<220>		
[2454]	<223>	合成多肽	
[2455]	<400>	83	
[2456]	Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly		
[2457]	1	5	10 15
[2458]	Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr		
[2459]	20	25	30
[2460]	Leu Ala Lys Ile		
[2461]	35		
[2462]	<210>	84	
[2463]	<211>	108	
[2464]	<212>	DNA	
[2465]	<213>	人工序列	
[2466]	<220>		
[2467]	<223>	合成聚核苷酸	
[2468]	<400>	84	
[2469]	agggaccaga ggctgcccc cgatgccac aagccccctg ggggaggcag tttccggacc		60
[2470]	cccatccaag aggagcaggc cgacgccac tccacctg ccaagatc		108
[2471]	<210>	85	
[2472]	<211>	30	
[2473]	<212>	PRT	
[2474]	<213>	人工序列	
[2475]	<220>		
[2476]	<223>	合成多肽	
[2477]	<400>	85	

[2478]	Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu	
[2479]	1 5 10 15	
[2480]	Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn	
[2481]	20 25 30	
[2482]	<210> 86	
[2483]	<211> 90	
[2484]	<212> DNA	
[2485]	<213> 人工序列	
[2486]	<220>	
[2487]	<223> 合成聚核苷酸	
[2488]	<400> 86	
[2489]	tgtgatattct acatctgggc gcccttggcc gggacttgtg gggtccttct cctgtcaactg	60
[2490]	gttatcaccc ttactgcaa ccacaggaac	90
[2491]	<210> 87	
[2492]	<211> 154	
[2493]	<212> PRT	
[2494]	<213> 人工序列	
[2495]	<220>	
[2496]	<223> 合成多肽	
[2497]	<400> 87	
[2498]	Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met	
[2499]	1 5 10 15	
[2500]	Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe	
[2501]	20 25 30	
[2502]	Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg	
[2503]	35 40 45	
[2504]	Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn	
[2505]	50 55 60	
[2506]	Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg	
[2507]	65 70 75 80	
[2508]	Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro	
[2509]	85 90 95	
[2510]	Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala	
[2511]	100 105 110	
[2512]	Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His	
[2513]	115 120 125	
[2514]	Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp	
[2515]	130 135 140	
[2516]	Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg	
[2517]	145 150	
[2518]	<210> 88	
[2519]	<211> 462	

[2520]	<212>	DNA	
[2521]	<213>	人工序列	
[2522]	<220>		
[2523]	<223>	合成聚核苷酸	
[2524]	<400>	88	
[2525]		aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa	60
[2526]		actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt	120
[2527]		gaactgagag tgaagttcag caggagcgca gacgccccg cgtaccagca gggccagaac	180
[2528]		cagctctata acgagctcaa tctaggacga agagaggagt acgatgtttt ggacaagaga	240
[2529]		cgtggccggg accctgagat ggggggaaag ccgagaagga agaaccctca ggaaggcctg	300
[2530]		tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg gaggcctaca gtgagattgg gatgaaaggc	360
[2531]		gagcgccgga ggggcaaggg gcacgatggc ctttaccagg gtctcagtae agccaccaag	420
[2532]		gacacctacg acgccttca catgcaggcc ctgccccctc gc	462
[2533]	<210>	89	
[2534]	<211>	148	
[2535]	<212>	PRT	
[2536]	<213>	人工序列	
[2537]	<220>		
[2538]	<223>	合成多肽	
[2539]	<400>	89	
[2540]		Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly	
[2541]		1 5 10 15	
[2542]		Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr	
[2543]		20 25 30	
[2544]		Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala	
[2545]		35 40 45	
[2546]		Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg	
[2547]		50 55 60	
[2548]		Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu	
[2549]		65 70 75 80	
[2550]		Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn	
[2551]		85 90 95	
[2552]		Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met	
[2553]		100 105 110	
[2554]		Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly	
[2555]		115 120 125	
[2556]		Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala	
[2557]		130 135 140	
[2558]		Leu Pro Pro Arg	
[2559]		145	
[2560]	<210>	90	
[2561]	<211>	444	



[2562]	<212>	DNA	
[2563]	<213>	人工序列	
[2564]	<220>		
[2565]	<223>	合成聚核苷酸	
[2566]	<400>	90	
[2567]		agggaccaga ggctgcccc cgatgcccac aagccccctg ggggaggcag tttccggacc	60
[2568]		cccatccaag aggagcagc cgacgcccac tccacctg ccaagatcag agtgaagttc	120
[2569]		agcaggagcg cagacgcccc cgcgtaccag cagggccaga accagctcta taacgagctc	180
[2570]		aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag	240
[2571]		atggggggaa agccgagaag gaagaacct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa	300
[2572]		gataagatgg cggaggccta cagtgagatt gggatgaaag gcgagcgcg gaggggcaag	360
[2573]		gggcacgatg gcctttacca ggggtctcagt acagccacca aggacaceta cgacgccett	420
[2574]		cacatgcagg ccctgcccc tcgc	444
[2575]	<210>	91	
[2576]	<211>	222	
[2577]	<212>	PRT	
[2578]	<213>	人工序列	
[2579]	<220>		
[2580]	<223>	合成多肽	
[2581]	<400>	91	
[2582]		Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu	
[2583]		1 5 10 15	
[2584]		Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser	
[2585]		20 25 30	
[2586]		Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly	
[2587]		35 40 45	
[2588]		Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala	
[2589]		50 55 60	
[2590]		Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys	
[2591]		65 70 75 80	
[2592]		Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys	
[2593]		85 90 95	
[2594]		Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val	
[2595]		100 105 110	
[2596]		Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn	
[2597]		115 120 125	
[2598]		Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val	
[2599]		130 135 140	
[2600]		Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg	
[2601]		145 150 155 160	
[2602]		Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys	
[2603]		165 170 175	

[2604]	Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg	
[2605]	180	185
[2606]	Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys	
[2607]	195	200
[2608]	Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg	
[2609]	210	215
[2610]	<210>	92
[2611]	<211>	666
[2612]	<212>	DNA
[2613]	<213>	人工序列
[2614]	<220>	
[2615]	<223>	合成聚核苷酸
[2616]	<400>	92
[2617]	ttttgggtgc tgggtgggt tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg	60
[2618]	gcctttatta ttttctgggt gaggagtaag aggagcaggc tcctgcacag tgactacatg	120
[2619]	aacatgactc cccgccgcc cgggccacc cgcaagcatt accagcceta tgccccacca	180
[2620]	cgcgacttcg cagcctatcg ctccaaacgg ggcagaaaga aactcctgta tatattcaaa	240
[2621]	caaccattta tgagaccagt acaactact caagaggaag atggctgtag ctgccgattt	300
[2622]	ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc	360
[2623]	cccgcgtacc agcaggcca gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag	420
[2624]	gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga	480
[2625]	aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc	540
[2626]	tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac	600
[2627]	cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc	660
[2628]	cctcgc	666
[2629]	<210>	93
[2630]	<211>	184
[2631]	<212>	PRT
[2632]	<213>	人工序列
[2633]	<220>	
[2634]	<223>	合成多肽
[2635]	<400>	93
[2636]	Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu	
[2637]	1	5
[2638]	Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Lys Arg	
[2639]	20	25
[2640]	Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro	
[2641]	35	40
[2642]	Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu	
[2643]	50	55
[2644]	Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala	
[2645]	65	70

[2646]	Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu	
[2647]	85	90 95
[2648]	Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly	
[2649]	100	105 110
[2650]	Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu	
[2651]	115	120 125
[2652]	Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser	
[2653]	130	135 140
[2654]	Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly	
[2655]	145	150 155 160
[2656]	Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu	
[2657]	165	170 175
[2658]	His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg	
[2659]	180	
[2660]	<210> 94	
[2661]	<211> 552	
[2662]	<212> DNA	
[2663]	<213> 人工序列	
[2664]	<220>	
[2665]	<223> 合成聚核苷酸	
[2666]	<400> 94	
[2667]	tgtgatatct acatctgggc gcccttggcc gggacttgtg gggtccttct cctgtcactg	60
[2668]	gttatcaccc ttactgcaa ccacaggaac aaacggggca gaaagaaact cctgtatata	120
[2669]	ttcaaacacac catttatgag accagtacaa actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc	180
[2670]	cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt gaactgagag tgaagttcag caggagcgca	240
[2671]	gacgcccccg cgtaccagca gggccagaac cagctctata acgagctcaa tctaggacga	300
[2672]	agagaggagt acgatgtttt ggacaagaga cgtggccggg accctgagat ggggggaaag	360
[2673]	ccgagaagga agaacctca ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg	420
[2674]	gaggctaca gtgagattgg gatgaaagc gagcgccgga ggggcaaggg gcacgatggc	480
[2675]	ctttaccagg gtctcagtac agccaccaag gacacctac acgcccttca catgcaggcc	540
[2676]	ctgccccctc gc	552
[2677]	<210> 95	
[2678]	<211> 216	
[2679]	<212> PRT	
[2680]	<213> 人工序列	
[2681]	<220>	
[2682]	<223> 合成多肽	
[2683]	<400> 95	
[2684]	Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu	
[2685]	1	5 10 15
[2686]	Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser	
[2687]	20	25 30

[2688]	Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly		
[2689]	35	40	45
[2690]	Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala		
[2691]	50	55	60
[2692]	Ala Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro		
[2693]	65	70	75
[2694]	Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp		
[2695]	85	90	95
[2696]	Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala		
[2697]	100	105	110
[2698]	Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu		
[2699]	115	120	125
[2700]	Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly		
[2701]	130	135	140
[2702]	Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu		
[2703]	145	150	155
[2704]	Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser		
[2705]	165	170	175
[2706]	Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly		
[2707]	180	185	190
[2708]	Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu		
[2709]	195	200	205
[2710]	His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[2711]	210	215	
[2712]	<210>	96	
[2713]	<211>	648	
[2714]	<212>	DNA	
[2715]	<213>	人工序列	
[2716]	<220>		
[2717]	<223>	合成聚核苷酸	
[2718]	<400>	96	
[2719]	ttttgggtgc tgggtggtggt tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg	60	
[2720]	gcctttatta ttttctgggt gaggagtaag aggagcaggc tctgcacag tgactacatg	120	
[2721]	aacatgactc cccgccgcc cgggccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca	180	
[2722]	cgcgacttcg cagcctatcg ctccaggac cagaggctgc cccccgatgc ccacaagccc	240	
[2723]	cctgggggag gcagtttccg gacccccatc caagaggagc aggccgacgc ccaactccacc	300	
[2724]	ctggccaaga tcagagtga gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc	360	
[2725]	cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttggac	420	
[2726]	aagagacgtg gccgggacc tgagatgggg gaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa	480	
[2727]	ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattgggatg	540	
[2728]	aaagcgagc gccggagggg caagggcac gatggccttt accagggtct cagtacagcc	600	
[2729]	accaaggaca cctacgacgc cttcacatg caggecctgc ccctcgc	648	

[2730]	<210>	97
[2731]	<211>	509
[2732]	<212>	PRT
[2733]	<213>	人工序列
[2734]	<220>	
[2735]	<223>	合成多肽
[2736]	<400>	97
[2737]	Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly	
[2738]	1	5 10 15
[2739]	Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg	
[2740]		20 25 30
[2741]	Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
[2742]		35 40 45
[2743]	Ser Asn Tyr Leu Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Asp Leu	
[2744]		50 55 60
[2745]	Asp Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp Tyr Asn	
[2746]		65 70 75 80
[2747]	Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser	
[2748]		85 90 95
[2749]	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
[2750]		100 105 110
[2751]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr Trp	
[2752]		115 120 125
[2753]	Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro	
[2754]		130 135 140
[2755]	Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Asp Ile Val Leu	
[2756]		145 150 155 160
[2757]	Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr	
[2758]		165 170 175
[2759]	Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe	
[2760]		180 185 190
[2761]	Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile	
[2762]		195 200 205
[2763]	Tyr Ala Ala Ser Arg Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly	
[2764]		210 215 220
[2765]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Met Glu Glu	
[2766]		225 230 235 240
[2767]	Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp	
[2768]		245 250 255
[2769]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Leu Glu Pro Lys	
[2770]		260 265 270
[2771]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Asp Pro Lys Phe	

[2772]	275	280	285
[2773]	Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu		
[2774]	290	295	300
[2775]	Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg		
[2776]	305	310	315 320
[2777]	Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro		
[2778]		325	330 335
[2779]	Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala		
[2780]		340	345 350
[2781]	Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln		
[2782]		355	360 365
[2783]	Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser		
[2784]		370	375 380
[2785]	Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys		
[2786]		385	390 395 400
[2787]	Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln		
[2788]		405	410 415
[2789]	Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu		
[2790]		420	425 430
[2791]	Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg		
[2792]		435	440 445
[2793]	Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met		
[2794]		450	455 460
[2795]	Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly		
[2796]		465	470 475 480
[2797]	Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp		
[2798]		485	490 495
[2799]	Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[2800]		500	505
[2801]	<210>	98	
[2802]	<211>	1527	
[2803]	<212>	DNA	
[2804]	<213>	人工序列	
[2805]	<220>		
[2806]	<223>	合成聚核苷酸	
[2807]	<400>	98	
[2808]	atggactgga tctggcgcac cctgtttctc gtgggagccg ccacaggcgc ccattctcag	60	
[2809]	gtgcagctgc agcagcctgg cgctgaactc gtgcggccag gcgcttctgt gaagctgagc	120	
[2810]	tgtaaagcca gcggtacac ctccagcaac tacctgatga actgggtcaa gcagcggccc	180	
[2811]	gagcaggacc tggattgat cggcagaatc gaccctacg acggcgacat cgactacaac	240	
[2812]	cagaacttca aggacaaggc catcctgacc gtggacaaga gcagcagcac cgcctacatg	300	
[2813]	cagctgtcca gctgaccag cgaggacagc gccgtgtact actgcgccag aggctacggc	360	

[2814]	acagcctacg gcgtggacta ttggggccag ggcacaagcg tgaccgtgtc cagcgccaag	420
[2815]	accaccccc ctaagctgga agagggcgag ttctccgagg cccgggtgga cattgtgctg	480
[2816]	acacagtctc cagccagcct ggccgtgtcc ctgggacaga gagccacat cagctgtagg	540
[2817]	gccagcgaga gcgtggacaa ctacggcatc agcttcatga attggttcca gcagaagccc	600
[2818]	ggccagcccc ccaagctgct gatctatgcc gccagcagac agggcagcgg agtgcctgcc	660
[2819]	agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcagcctga acatccacc tatggaagag	720
[2820]	gacgacaccg ccatgtactt ttgccagcag agcaaagagg tgccctggac ctttggegga	780
[2821]	ggcaccaagc tggaaatcaa ggatctcgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc	840
[2822]	ccaccgtgcc cggatcccaa attttgggtg ctggtgtgg ttggtggagt cctggcttgc	900
[2823]	tatagcttgc tagtaacagt ggcttttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg	960
[2824]	ctctgcaca gtgactacat gaacatgact ccccgccgcc ccgggccac ccgcaagcat	1020
[2825]	taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccaaacg gggcagaaag	1080
[2826]	aaactcctgt atatatcaa acaaccattt atgagaccag taaaactac tcaagaggaa	1140
[2827]	gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag	1200
[2828]	ttcagcagga gcgacagcgc ccccgctac cagcagggcc agaaccagct ctataacgag	1260
[2829]	ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat gttttggaca agagacgtgg ccgggacct	1320
[2830]	gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag	1380
[2831]	aaagataaga tggcggagc ctacagtgag attgggatga aaggcgagc ccggaggggc	1440
[2832]	aagggcacg atggcttta ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc	1500
[2833]	cttcacatgc aggcctgcc ccctgc	1527
[2834]	<210>	99
[2835]	<211>	503
[2836]	<212>	PRT
[2837]	<213>	人工序列
[2838]	<220>	
[2839]	<223>	合成多肽
[2840]	<400>	99
[2841]	Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly	
[2842]	1 5 10 15	
[2843]	Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg	
[2844]	20 25 30	
[2845]	Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
[2846]	35 40 45	
[2847]	Ser Asn Tyr Leu Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Asp Leu	
[2848]	50 55 60	
[2849]	Asp Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp Tyr Asn	
[2850]	65 70 75 80	
[2851]	Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser	
[2852]	85 90 95	
[2853]	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
[2854]	100 105 110	
[2855]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr Trp	

[2856]	115	120	125
[2857]	Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro		
[2858]	130	135	140
[2859]	Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Asp Ile Val Leu		
[2860]	145	150	155
[2861]	Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr		
[2862]		165	170
[2863]	Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe		175
[2864]		180	185
[2865]	Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile		190
[2866]		195	200
[2867]	Tyr Ala Ala Ser Arg Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly		205
[2868]		210	215
[2869]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Met Glu Glu		220
[2870]		225	230
[2871]	Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp		235
[2872]		245	250
[2873]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Leu Glu Pro Lys		255
[2874]		260	265
[2875]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Asp Pro Lys Phe		270
[2876]		275	280
[2877]	Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu		285
[2878]		290	295
[2879]	Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg		300
[2880]		305	310
[2881]	Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro		315
[2882]		325	330
[2883]	Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala		335
[2884]		340	345
[2885]	Tyr Arg Ser Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro		350
[2886]		355	360
[2887]	Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala		365
[2888]		370	375
[2889]	His Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp		380
[2890]		385	390
[2891]	Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn		395
[2892]		405	410
[2893]	Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg		415
[2894]		420	425
[2895]	Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly		430
[2896]		435	440
[2897]	Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu		445



[2898]	450	455	460	
[2899]	Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu			
[2900]	465	470	475	480
[2901]	Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His			
[2902]		485	490	495
[2903]	Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
[2904]		500		
[2905]	<210>	100		
[2906]	<211>	1509		
[2907]	<212>	DNA		
[2908]	<213>	人工序列		
[2909]	<220>			
[2910]	<223>	合成聚核苷酸		
[2911]	<400>	100		
[2912]	atggactgga tctggcgcac cctgtttctc gtgggagccg ccacaggcgc ccattctcag	60		
[2913]	gtgcagctgc agcagcctgg cgctgaactc gtgcggccag gcgcttctgt gaagctgagc	120		
[2914]	tgtaaagcca gcggctacac cttcagcaac tacctgatga actgggtcaa gcagcggccc	180		
[2915]	gagcaggacc tggattggat cggcagaatc gaccctacg acggcgacat cgactacaac	240		
[2916]	cagaacttca aggacaaggc catcctgacc gtggacaaga gcagcagcac cgcctacatg	300		
[2917]	cagctgtcca gcctgaccag cgaggacagc gccgtgtact actgcgccag aggctacggc	360		
[2918]	acagcctacg gcgtggacta ttggggccag ggcacaagcg tgaccgtgtc cagcgccaag	420		
[2919]	accaccccc ctaagctgga agagggcgag ttctccgagg cccgggtgga cattgtgctg	480		
[2920]	acacagtctc cagccagcct ggccgtgtcc ctgggacaga gagccacat cagctgtagg	540		
[2921]	gccagcgaga gcgtggacaa ctacggcatc agcttcatga attggttcca gcagaagccc	600		
[2922]	ggccagcccc ccaagctgct gatctatgcc gccagcagac agggcagcgg agtgccctgcc	660		
[2923]	agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcagcctga acatccacc tatggaagag	720		
[2924]	gacgacaccg ccatgtactt ttgccagcag agcaaagagg tgccctggac ctttggcgga	780		
[2925]	ggcaccaagc tggaaatcaa ggatctcgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc	840		
[2926]	ccaccgtgcc cggatcccaa attttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc	900		
[2927]	tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg	960		
[2928]	ctctgcaca gtgactacat gaacatgact ccccgccgc ccgggcccac ccgcaagcat	1020		
[2929]	taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccaggga ccagaggctg	1080		
[2930]	ccccccgatg cccacaagcc ccctggggga ggcagtttcc ggacccccat ccaagaggag	1140		
[2931]	caggccgacg cccactccac cctggccaag atcagagtga agttcagcag gagcgcagac	1200		
[2932]	gcccccgct accagcagg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga	1260		
[2933]	gaggagtacg atgttttgg caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg	1320		
[2934]	agaaggaaga accctcagga aggctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag	1380		
[2935]	gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggagg gcaaggggca cgatggcctt	1440		
[2936]	taccagggtc tcagtacag caccaaggac acctacgac cccttccat gcaggccctg	1500		
[2937]	ccccctgc			1509
[2938]	<210>	101		
[2939]	<211>	471		

[2940] <212> PRT  
 [2941] <213> 人工序列  
 [2942] <220>  
 [2943] <223> 合成多肽  
 [2944] <400> 101  
 [2945] Met Asp Trp Ile Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Gly Ala Ala Thr Gly  
 [2946] 1 5 10 15  
 [2947] Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg  
 [2948] 20 25 30  
 [2949] Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 [2950] 35 40 45  
 [2951] Ser Asn Tyr Leu Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Asp Leu  
 [2952] 50 55 60  
 [2953] Asp Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp Tyr Asn  
 [2954] 65 70 75 80  
 [2955] Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
 [2956] 85 90 95  
 [2957] Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 [2958] 100 105 110  
 [2959] Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr Trp  
 [2960] 115 120 125  
 [2961] Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
 [2962] 130 135 140  
 [2963] Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Asp Ile Val Leu  
 [2964] 145 150 155 160  
 [2965] Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr  
 [2966] 165 170 175  
 [2967] Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe  
 [2968] 180 185 190  
 [2969] Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 [2970] 195 200 205  
 [2971] Tyr Ala Ala Ser Arg Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 [2972] 210 215 220  
 [2973] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Met Glu Glu  
 [2974] 225 230 235 240  
 [2975] Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp  
 [2976] 245 250 255  
 [2977] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Leu Glu Pro Lys  
 [2978] 260 265 270  
 [2979] Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Asp Pro Lys Cys  
 [2980] 275 280 285  
 [2981] Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu

[2982]	290	295	300
[2983]	Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Lys Arg Gly		
[2984]	305	310	315 320
[2985]	Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val		
[2986]		325	330 335
[2987]	Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu		
[2988]		340	345 350
[2989]	Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp		
[2990]		355	360 365
[2991]	Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn		
[2992]		370	375 380
[2993]	Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg		
[2994]		385	390 395 400
[2995]	Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly		
[2996]		405	410 415
[2997]	Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu		
[2998]		420	425 430
[2999]	Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu		
[3000]		435	440 445
[3001]	Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His		
[3002]		450	455 460
[3003]	Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[3004]		465	470
[3005]	<210>	102	
[3006]	<211>	1413	
[3007]	<212>	DNA	
[3008]	<213>	人工序列	
[3009]	<220>		
[3010]	<223>	合成聚核苷酸	
[3011]	<400>	102	
[3012]	atggactgga tctggcgcac cctgtttctc gtgggagccg ccacagcgc ccattctcag	60	
[3013]	gtgcagctgc agcagcctgg cgctgaactc gtgcggccag gcgcttctgt gaagctgagc	120	
[3014]	tgtaaagcca gcggtacac cttagcaac tacctgatga actgggtcaa gcagcggccc	180	
[3015]	gagcaggacc tggattgat cggcagaatc gaccctacg acggcgacat cgactacaac	240	
[3016]	cagaacttca aggacaaggc catcctgacc gtggacaaga gcagcagcac cgcctacatg	300	
[3017]	cagctgtcca gcctgaccag cgaggacagc gccgtgtact actgcgccag aggctacggc	360	
[3018]	acagcctacg gcgtggacta ttggggccag ggcacaagcg tgaccgtgtc cagcgcceaag	420	
[3019]	accaccccc ctaagctgga agagggcgag ttctccgagg cccgggtgga cattgtgctg	480	
[3020]	acacagtctc cagccagcct ggccgtgtcc ctgggacaga gagccacat cagctgtagg	540	
[3021]	gccagcgaga gcgtggacaa ctacggcatc agcttcatga attggttcca gcagaagccc	600	
[3022]	ggccagcccc ccaagctgct gatctatgcc gccagcagac agggcagcgg agtgcctgcc	660	
[3023]	agatittctg gcagcggctc cggcaccgac ttagcctga acatccacc tatggaagag	720	

[3024]	gacgacaccg ccatgtactt ttgccagcag agcaaagagg tgccttgac ctttggcggg	780
[3025]	ggcaccaagc tggaaatcaa ggatctcgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc	840
[3026]	ccaccgtgcc cggatcccaa atgtgatatc tacatctggg cgcccttggc cgggacttgt	900
[3027]	ggggtccttc tcctgtcact ggttatcacc ctttactgca accacaggaa caaacggggc	960
[3028]	agaaagaaac tcctgtatat attcaaaaa ccatatga gaccagtaca aactactcaa	1020
[3029]	gaggaagatg gctgtagctg ccgattcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga	1080
[3030]	gtgaagtcca gcaggagcgc agacgcccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat	1140
[3031]	aacgagctca atctaggagc aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg	1200
[3032]	gaccctgaga tgggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa	1260
[3033]	ctgcagaaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg	1320
[3034]	aggggcaagg ggcacgatgg cttttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac	1380
[3035]	gacgccttc acatgcaggc cctgccccct cgc	1413
[3036]	<210>	103
[3037]	<211>	18
[3038]	<212>	PRT
[3039]	<213>	智人
[3040]	<220>	
[3041]	<221>	MISC_FEATURE
[3042]	<223>	hIgG1的铰链区
[3043]	<400>	103
[3044]	Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	
[3045]	1                                    5                                    10                                    15	
[3046]	Glu Leu	
[3047]	<210>	104
[3048]	<211>	291
[3049]	<212>	DNA
[3050]	<213>	人工序列
[3051]	<220>	
[3052]	<223>	合成聚核苷酸
[3053]	<220>	
[3054]	<221>	misc_feature
[3055]	<223>	克隆47重链恒定区1
[3056]	<400>	104
[3057]	gcaaaaacga caccceccatc tgtctatcca ctggccccctg gatctgctgc ccaaactaac	60
[3058]	tccatggtga ccctgggatg cctggtaag ggctatttcc ctgagccagt gacagtgacc	120
[3059]	tggaactctg gatccctgtc cagcgggtg cacacctcc cagctgtcct gcagtctgac	180
[3060]	ctctacactc tgagcagtc agtgactgtc ccctccagca cctggcccag cgagaccgtc	240
[3061]	acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc accaaggtgg acaagaaaat t	291
[3062]	<210>	105
[3063]	<211>	321
[3064]	<212>	DNA
[3065]	<213>	人工序列

[3066] <220>  
 [3067] <223> 合成聚核苷酸  
 [3068] <220>  
 [3069] <221> misc\_feature  
 [3070] <223> 克隆47重链恒定区2  
 [3071] <400> 105  
 [3072] gtcccagaag tatcatctgt cttcatcttc ccccaaaagc ccaaggatgt gctcaccatt 60  
 [3073] actctgactc ctaaggtcac gtgtgtgtg gtagacatca gcaaggatga tcccgaggtc 120  
 [3074] cagttcagct ggtttgtaga tgatgtggag gtgcacacag ctgagacgca accccgggag 180  
 [3075] gagcagttca acagcacttt ccgctcagtc agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg 240  
 [3076] ctcaatggca aggagttaa atgcagggtc aacagtgtag ctttcctgc ccccatcgag 300  
 [3077] aaaaccatct ccaaaaccaa a 321  
 [3078] <210> 106  
 [3079] <211> 287  
 [3080] <212> DNA  
 [3081] <213> 人工序列  
 [3082] <220>  
 [3083] <223> 合成聚核苷酸  
 [3084] <220>  
 [3085] <221> misc\_feature  
 [3086] <223> 克隆47重链恒定区3  
 [3087] <400> 106  
 [3088] ggcagaccga aggctccaca ggtgtacacc attccacctc ccaaggagca gatggccaag 60  
 [3089] gataaagtca gtctgacctg catgataaca gacttcttcc ctgaagacat tactgtggag 120  
 [3090] tggcagtgga atgggcagcc agcggagaac tacaagaaca ctgagcccat catggacaca 180  
 [3091] gatggctctt acttctgcta cagcaagctc aatgtgcaga agagcaactg ggaggcagga 240  
 [3092] aatactttca cctgctctgt gttacatgag ggctgcaca accacca 287  
 [3093] <210> 107  
 [3094] <211> 324  
 [3095] <212> DNA  
 [3096] <213> 人工序列  
 [3097] <220>  
 [3098] <223> 合成聚核苷酸  
 [3099] <220>  
 [3100] <221> misc\_feature  
 [3101] <223> 克隆47轻链恒定区  
 [3102] <400> 107  
 [3103] cgggctgatg ctgcaccaac tgtatccatc ttcccaccat ccagtgagca gttaacatct 60  
 [3104] ggaggtgect cagtcgtgtg cttcttgaac aacttctacc ccaagacat caatgtcaag 120  
 [3105] tggaagattg atggcagtga acgacaaaat ggcgtcctga acagttggac tgatcaggac 180  
 [3106] agcaaagaca gcacctacag catgagcagc accctcacgt tgaccaagga cgagtatgaa 240  
 [3107] cgacataaca gctatacctg tgaggccact cacaagacat caacttcacc cattgtcaag 300

[3108]	agcttcaaca ggaatgagtg ttag	324
[3109]	<210> 108	
[3110]	<211> 39	
[3111]	<212> DNA	
[3112]	<213> 人工序列	
[3113]	<220>	
[3114]	<223> 合成聚核苷酸	
[3115]	<220>	
[3116]	<221> misc_feature	
[3117]	<223> 克隆47铰链区	
[3118]	<400> 108	
[3119]	gtgcccaggg attgtggttg taagccttgc atatgtaca	39
[3120]	<210> 109	
[3121]	<211> 66	
[3122]	<212> DNA	
[3123]	<213> 猪捷申病毒(Porcine teschovirus)	
[3124]	<400> 109	
[3125]	ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct	60
[3126]	ggacct	66
[3127]	<210> 110	
[3128]	<211> 22	
[3129]	<212> PRT	
[3130]	<213> 猪捷申病毒(Porcine teschovirus)	
[3131]	<400> 110	
[3132]	Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val	
[3133]	1                    5                    10                    15	
[3134]	Glu Glu Asn Pro Gly Pro	
[3135]	20	
[3136]	<210> 111	
[3137]	<211> 63	
[3138]	<212> DNA	
[3139]	<213> 明脉扁刺蛾β四体病毒(Thoseaasigna virus)	
[3140]	<400> 111	
[3141]	ggaagcggag agggcagagg aagtctgcta acatgcggtg acgtcgagga gaatcctgga	60
[3142]	cct	63
[3143]	<210> 112	
[3144]	<211> 21	
[3145]	<212> PRT	
[3146]	<213> 明脉扁刺蛾β四体病毒(Thoseaasigna virus)	
[3147]	<400> 112	
[3148]	Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu	
[3149]	1                    5                    10                    15	

[3150]	Glu Asn Pro Gly Pro	
[3151]	20	
[3152]	<210>	113
[3153]	<211>	69
[3154]	<212>	DNA
[3155]	<213>	马鼻炎A病毒(Equine rhinitis A virus)
[3156]	<400>	113
[3157]	ggaagcggac agtgactaa ttatgctctc ttgaaattgg ctggagatgt tgagagcaac	60
[3158]	cctggacct	69
[3159]	<210>	114
[3160]	<211>	23
[3161]	<212>	PRT
[3162]	<213>	马鼻炎A病毒(Equine rhinitis A virus)
[3163]	<400>	114
[3164]	Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp	
[3165]	1 5 10 15	
[3166]	Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro	
[3167]	20	
[3168]	<210>	115
[3169]	<211>	84
[3170]	<212>	DNA
[3171]	<213>	口蹄疫病毒(Foot and Mouth Disease virus,FMDV)
[3172]	<400>	115
[3173]	ggaagcggag tgaaacagac tttgaatttt gaccttctca agggaagcgg agtgaaacag	60
[3174]	actttgaatt ttgaccttct caag	84
[3175]	<210>	116
[3176]	<211>	25
[3177]	<212>	PRT
[3178]	<213>	口蹄疫病毒(Foot and Mouth Disease virus,FMDV)
[3179]	<400>	116
[3180]	Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala	
[3181]	1 5 10 15	
[3182]	Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro	
[3183]	20 25	
[3184]	<210>	117
[3185]	<211>	20
[3186]	<212>	DNA
[3187]	<213>	人工序列
[3188]	<220>	
[3189]	<223>	合成聚核苷酸
[3190]	<220>	
[3191]	<221>	misc_feature

[3192]	<223>	重链正向引物1	
[3193]	<400>	117	
[3194]		gatgtgaagc ttcaggagtc	20
[3195]	<210>	118	
[3196]	<211>	21	
[3197]	<212>	DNA	
[3198]	<213>	人工序列	
[3199]	<220>		
[3200]	<223>	合成聚核苷酸	
[3201]	<220>		
[3202]	<221>	misc_feature	
[3203]	<223>	轻κ链正向引物1	
[3204]	<400>	118	
[3205]		gatgttttga tgacccaaac t	21
[3206]	<210>	119	
[3207]	<211>	20	
[3208]	<212>	DNA	
[3209]	<213>	人工序列	
[3210]	<220>		
[3211]	<223>	合成聚核苷酸	
[3212]	<220>		
[3213]	<221>	misc_feature	
[3214]	<223>	重链正向引物2	
[3215]	<400>	119	
[3216]		caggtgcagc tgaaggagtc	20
[3217]	<210>	120	
[3218]	<211>	21	
[3219]	<212>	DNA	
[3220]	<213>	人工序列	
[3221]	<220>		
[3222]	<223>	合成聚核苷酸	
[3223]	<220>		
[3224]	<221>	misc_feature	
[3225]	<223>	轻κ链正向引物2	
[3226]	<400>	120	
[3227]		gatattgtga tgacgcaggc t	21
[3228]	<210>	121	
[3229]	<211>	20	
[3230]	<212>	DNA	
[3231]	<213>	人工序列	
[3232]	<220>		
[3233]	<223>	合成聚核苷酸	



[3234]	<220>	
[3235]	<221>	misc_feature
[3236]	<223>	重链正向引物3
[3237]	<400>	121
[3238]	caggtgcagc tgaagcagtc	20
[3239]	<210>	122
[3240]	<211>	18
[3241]	<212>	DNA
[3242]	<213>	人工序列
[3243]	<220>	
[3244]	<223>	合成聚核苷酸
[3245]	<220>	
[3246]	<221>	misc_feature
[3247]	<223>	轻κ链正向引物3
[3248]	<400>	122
[3249]	gatattgtga taaccag	18
[3250]	<210>	123
[3251]	<211>	20
[3252]	<212>	DNA
[3253]	<213>	人工序列
[3254]	<220>	
[3255]	<223>	合成聚核苷酸
[3256]	<220>	
[3257]	<221>	misc_feature
[3258]	<223>	重链正向引物4
[3259]	<400>	123
[3260]	caggttactc tgaaagagtc	20
[3261]	<210>	124
[3262]	<211>	21
[3263]	<212>	DNA
[3264]	<213>	人工序列
[3265]	<220>	
[3266]	<223>	合成聚核苷酸
[3267]	<220>	
[3268]	<221>	misc_feature
[3269]	<223>	轻κ链正向引物4
[3270]	<400>	124
[3271]	gacattgtgc tgacceaatc t	21
[3272]	<210>	125
[3273]	<211>	21
[3274]	<212>	DNA
[3275]	<213>	人工序列

[3276]	<220>	
[3277]	<223>	合成聚核苷酸3
[3278]	<220>	
[3279]	<221>	misc_feature
[3280]	<223>	重链正向引物5
[3281]	<400>	125
[3282]		gaggtccagc tgcaacaatc t 21
[3283]	<210>	126
[3284]	<211>	21
[3285]	<212>	DNA
[3286]	<213>	人工序列
[3287]	<220>	
[3288]	<223>	合成聚核苷酸
[3289]	<220>	
[3290]	<221>	misc_feature
[3291]	<223>	轻κ链正向引物5
[3292]	<400>	126
[3293]		gacattgtga tgaccagtc t 21
[3294]	<210>	127
[3295]	<211>	20
[3296]	<212>	DNA
[3297]	<213>	人工序列
[3298]	<220>	
[3299]	<223>	合成聚核苷酸
[3300]	<220>	
[3301]	<221>	misc_feature
[3302]	<223>	重链正向引物6
[3303]	<400>	127
[3304]		gaggtccagc tgcagcagtc 20
[3305]	<210>	128
[3306]	<211>	21
[3307]	<212>	DNA
[3308]	<213>	人工序列
[3309]	<220>	
[3310]	<223>	合成聚核苷酸
[3311]	<220>	
[3312]	<221>	misc_feature
[3313]	<223>	轻κ链正向引物6
[3314]	<400>	128
[3315]		gatattgtgc taactcagtc t 21
[3316]	<210>	129
[3317]	<211>	21

[3318]	<212>	DNA	
[3319]	<213>	人工序列	
[3320]	<220>		
[3321]	<223>	合成聚核苷酸	
[3322]	<220>		
[3323]	<221>	misc_feature	
[3324]	<223>	重链正向引物7	
[3325]	<400>	129	
[3326]		caggtccaac tgcagcagcc t	21
[3327]	<210>	130	
[3328]	<211>	21	
[3329]	<212>	DNA	
[3330]	<213>	人工序列	
[3331]	<220>		
[3332]	<223>	合成聚核苷酸	
[3333]	<220>		
[3334]	<221>	misc_feature	
[3335]	<223>	轻κ链正向引物7	
[3336]	<400>	130	
[3337]		gatatccaga tgacacagac t	21
[3338]	<210>	131	
[3339]	<211>	20	
[3340]	<212>	DNA	
[3341]	<213>	人工序列	
[3342]	<220>		
[3343]	<223>	合成聚核苷酸	
[3344]	<220>		
[3345]	<221>	misc_feature	
[3346]	<223>	重链正向引物8	
[3347]	<400>	131	
[3348]		gaggtgaagc tgggtggagtc	20
[3349]	<210>	132	
[3350]	<211>	21	
[3351]	<212>	DNA	
[3352]	<213>	人工序列	
[3353]	<220>		
[3354]	<223>	合成聚核苷酸	
[3355]	<220>		
[3356]	<221>	misc_feature	
[3357]	<223>	轻κ链正向引物8	
[3358]	<400>	132	
[3359]		gacatccagc tgactcagtc t	21

[3360]	<210>	133	
[3361]	<211>	20	
[3362]	<212>	DNA	
[3363]	<213>	人工序列	
[3364]	<220>		
[3365]	<223>	合成聚核苷酸	
[3366]	<220>		
[3367]	<221>	misc_feature	
[3368]	<223>	重链正向引物9	
[3369]	<400>	133	
[3370]		gaggtgaagc tgggtggaatc	20
[3371]	<210>	134	
[3372]	<211>	21	
[3373]	<212>	DNA	
[3374]	<213>	人工序列	
[3375]	<220>		
[3376]	<223>	合成聚核苷酸	
[3377]	<220>		
[3378]	<221>	misc_feature	
[3379]	<223>	轻κ链正向引物9	
[3380]	<400>	134	
[3381]		caaattgttc tcaccagtc t	21
[3382]	<210>	135	
[3383]	<211>	20	
[3384]	<212>	DNA	
[3385]	<213>	人工序列	
[3386]	<220>		
[3387]	<223>	合成聚核苷酸	
[3388]	<220>		
[3389]	<221>	misc_feature	
[3390]	<223>	重链正向引物10	
[3391]	<400>	135	
[3392]		gatgtgaact tggaagtgtc	20
[3393]	<210>	136	
[3394]	<211>	21	
[3395]	<212>	DNA	
[3396]	<213>	人工序列	
[3397]	<220>		
[3398]	<223>	合成聚核苷酸	
[3399]	<220>		
[3400]	<221>	misc_feature	
[3401]	<223>	轻κ链正向引物10	

[3402]	<400> 136	
[3403]	gacattctga tgaccagtc t	21
[3404]	<210> 137	
[3405]	<211> 20	
[3406]	<212> DNA	
[3407]	<213> 人工序列	
[3408]	<220>	
[3409]	<223> 合成聚核苷酸	
[3410]	<220>	
[3411]	<221> misc_feature	
[3412]	<223> 重链正向引物11	
[3413]	<400> 137	
[3414]	gaggtgcagc tggaggagtc	20
[3415]	<210> 138	
[3416]	<211> 36	
[3417]	<212> DNA	
[3418]	<213> 人工序列	
[3419]	<220>	
[3420]	<223> 合成聚核苷酸	
[3421]	<220>	
[3422]	<221> misc_feature	
[3423]	<223> 重链反向引物	
[3424]	<400> 138	
[3425]	ggccagtgga tagtcagatg ggggtgtcgt tttggc	36
[3426]	<210> 139	
[3427]	<211> 21	
[3428]	<212> DNA	
[3429]	<213> 人工序列	
[3430]	<220>	
[3431]	<223> 合成聚核苷酸	
[3432]	<220>	
[3433]	<221> misc_feature	
[3434]	<223> 轻κ链反向引物	
[3435]	<400> 139	
[3436]	ggatacagtt ggtgcagcat c	21
[3437]	<210> 140	
[3438]	<211> 20	
[3439]	<212> DNA	
[3440]	<213> 人工序列	
[3441]	<220>	
[3442]	<223> 合成聚核苷酸	
[3443]	<220>	

[3444]	<221>	misc_feature	
[3445]	<223>	HAdV5正向引物	
[3446]	<400>	140	
[3447]		cagctccatc tcctaactgt	20
[3448]	<210>	141	
[3449]	<211>	20	
[3450]	<212>	DNA	
[3451]	<213>	人工序列	
[3452]	<220>		
[3453]	<223>	合成聚核苷酸	
[3454]	<220>		
[3455]	<221>	misc_feature	
[3456]	<223>	HAdV5反向引物	
[3457]	<400>	141	
[3458]		ttcttgggca atgtatgaaa	20
[3459]	<210>	142	
[3460]	<211>	17	
[3461]	<212>	DNA	
[3462]	<213>	人工序列	
[3463]	<220>		
[3464]	<223>	合成聚核苷酸	
[3465]	<220>		
[3466]	<221>	misc_feature	
[3467]	<223>	scFv47正向引物	
[3468]	<400>	142	
[3469]		caggtccaac tgcagca	17
[3470]	<210>	143	
[3471]	<211>	18	
[3472]	<212>	DNA	
[3473]	<213>	人工序列	
[3474]	<220>		
[3475]	<223>	合成聚核苷酸	
[3476]	<220>		
[3477]	<221>	misc_feature	
[3478]	<223>	scFv47反向引物	
[3479]	<400>	143	
[3480]		tttgatttcc agcttggg	18
[3481]	<210>	144	
[3482]	<211>	21	
[3483]	<212>	DNA	
[3484]	<213>	人工序列	
[3485]	<220>		

[3486]	<223>	合成聚核苷酸	
[3487]	<220>		
[3488]	<221>	misc_feature	
[3489]	<223>	GAPDH正向引物	
[3490]	<400>	144	
[3491]		ggtcggagtc aacggatttg g	21
[3492]	<210>	145	
[3493]	<211>	23	
[3494]	<212>	DNA	
[3495]	<213>	人工序列	
[3496]	<220>		
[3497]	<223>	合成聚核苷酸	
[3498]	<220>		
[3499]	<221>	misc_feature	
[3500]	<223>	GAPDH反向引物	
[3501]	<400>	145	
[3502]		catgggtgga atcatattgg aac	23
[3503]	<210>	146	
[3504]	<211>	24	
[3505]	<212>	DNA	
[3506]	<213>	人工序列	
[3507]	<220>		
[3508]	<223>	合成聚核苷酸	
[3509]	<220>		
[3510]	<221>	misc_feature	
[3511]	<223>	IL13R $\alpha$ 2正向引物	
[3512]	<400>	146	
[3513]		ttgggacctt ttccagcaag gtgt	24
[3514]	<210>	147	
[3515]	<211>	24	
[3516]	<212>	DNA	
[3517]	<213>	人工序列	
[3518]	<220>		
[3519]	<223>	合成聚核苷酸	
[3520]	<220>		
[3521]	<221>	misc_feature	
[3522]	<223>	IL13R $\alpha$ 2反向引物	
[3523]	<400>	147	
[3524]		cactccactc actccaaatc ccgt	24

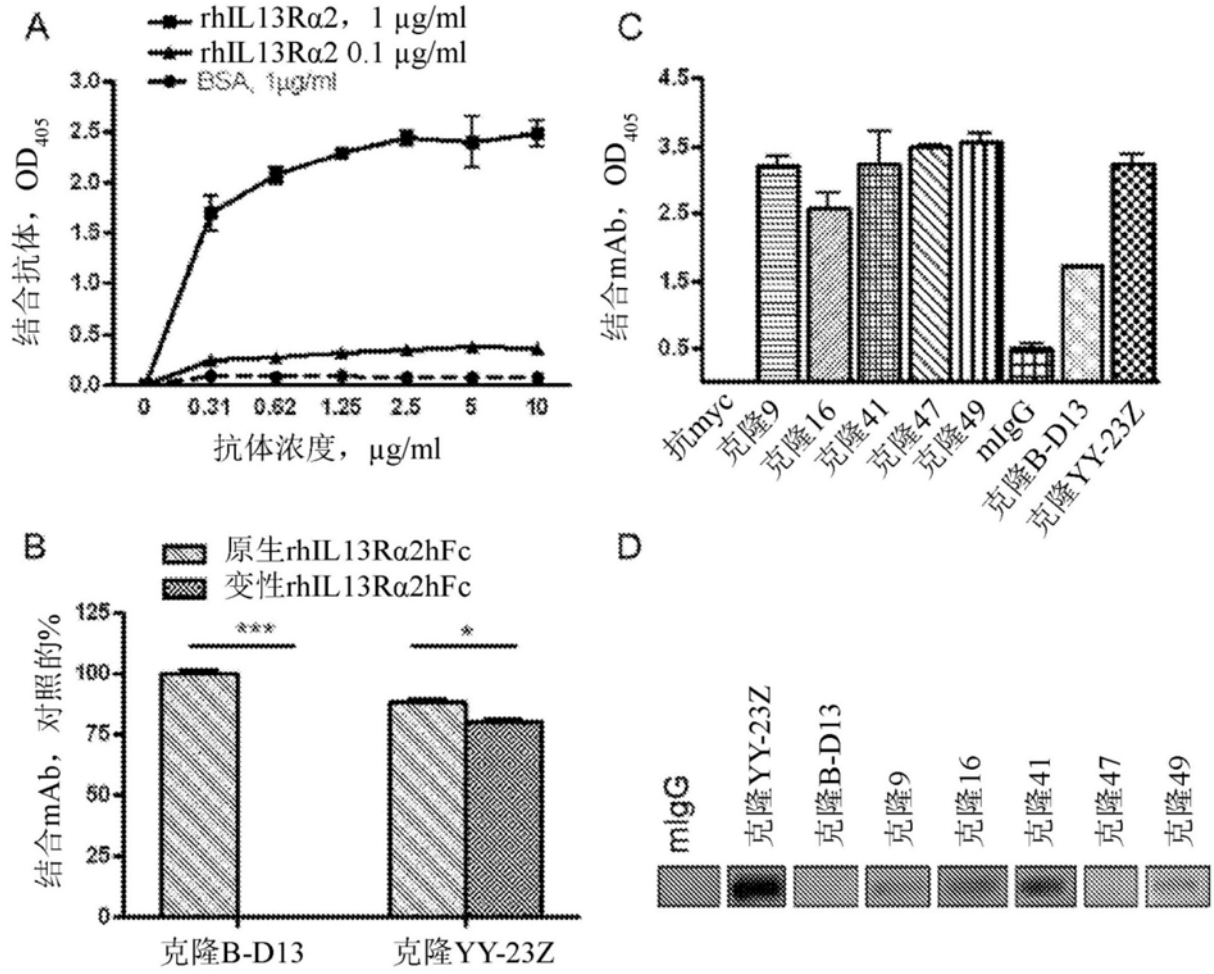


图1



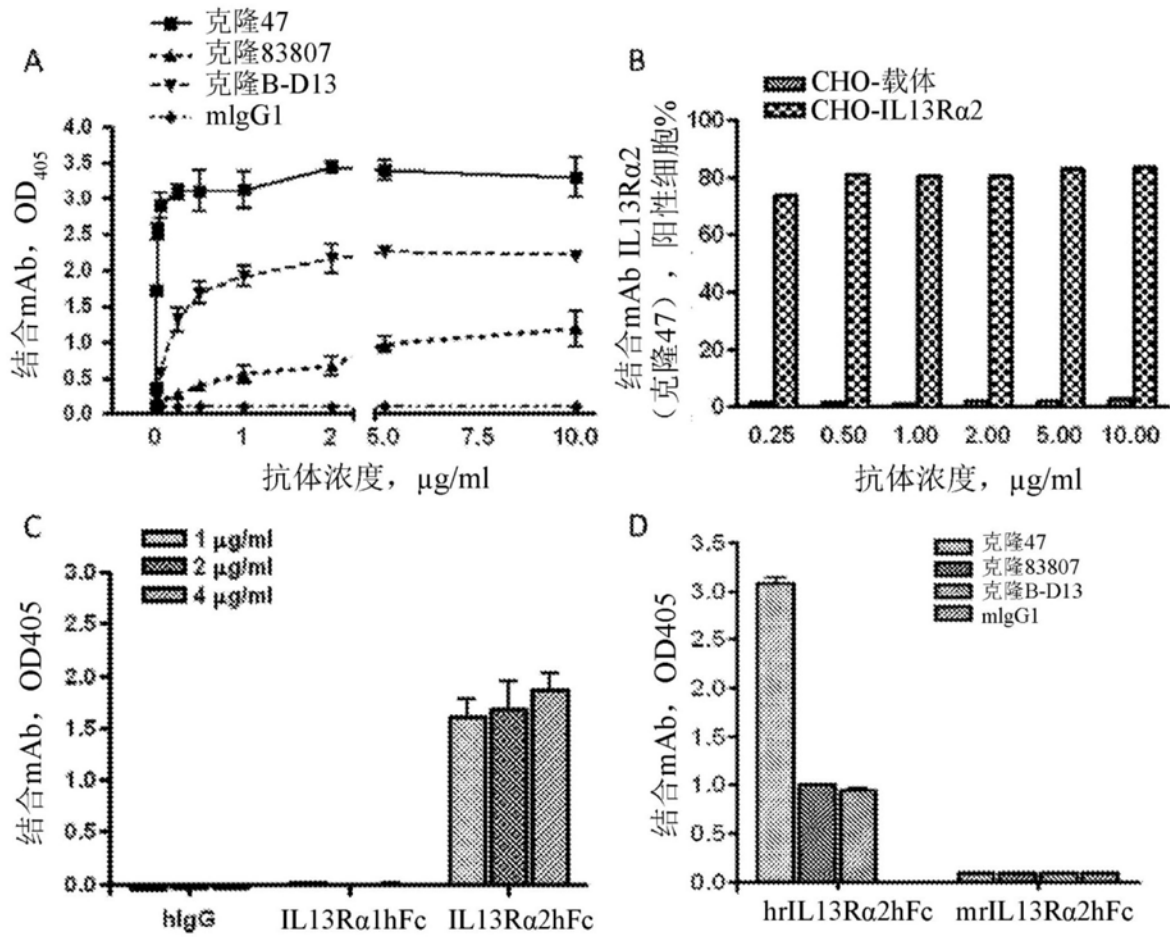


图2

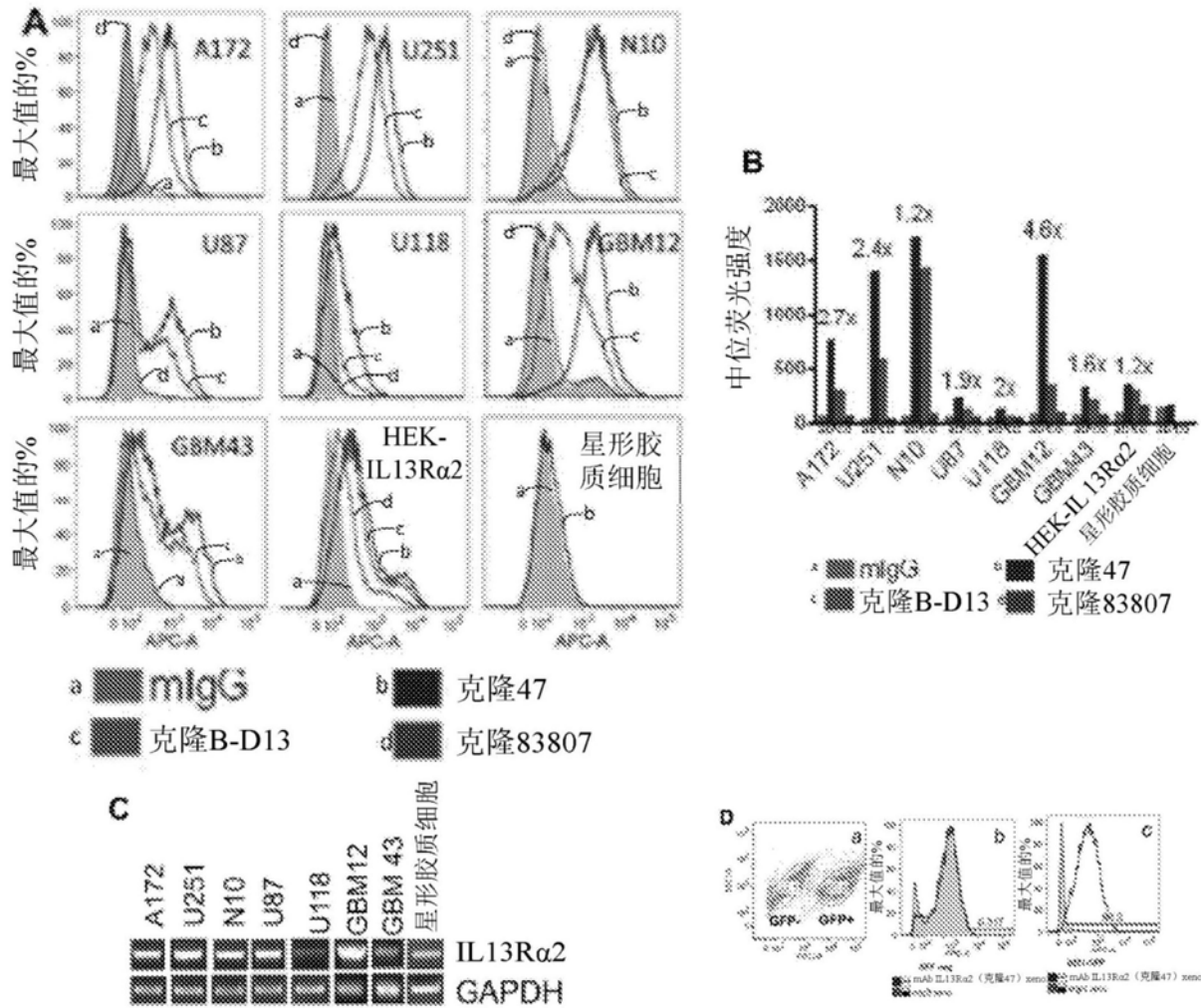


图3

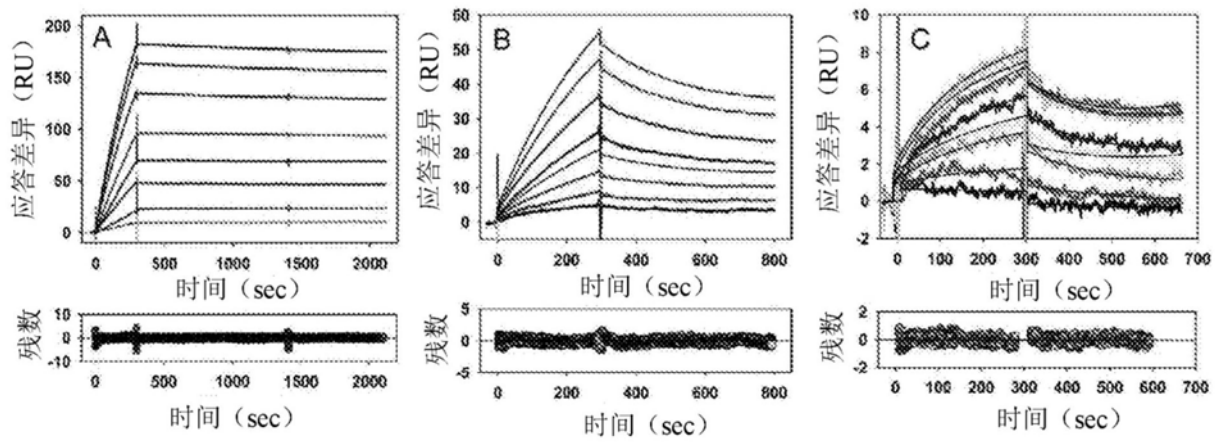


图4

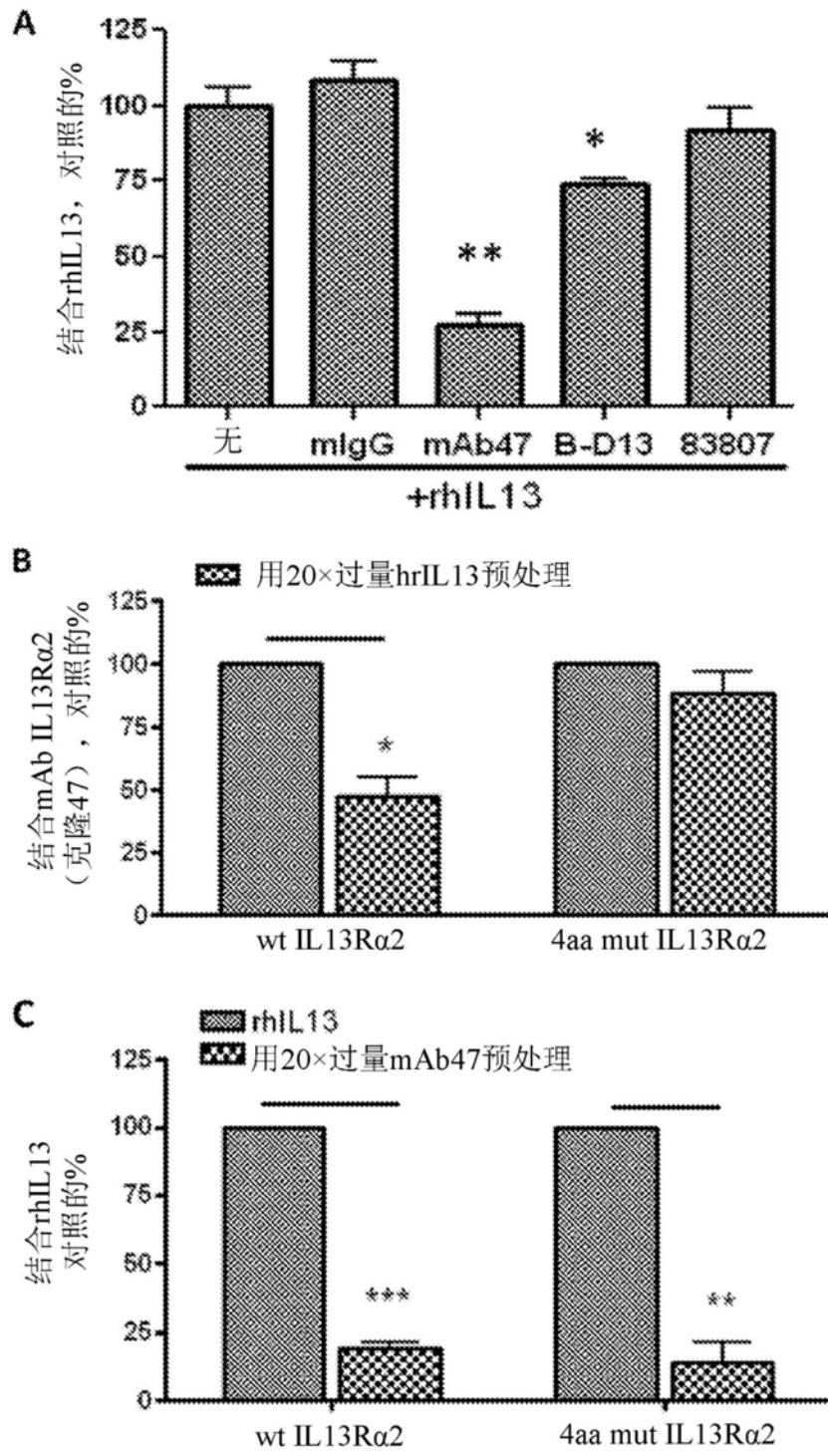


图5

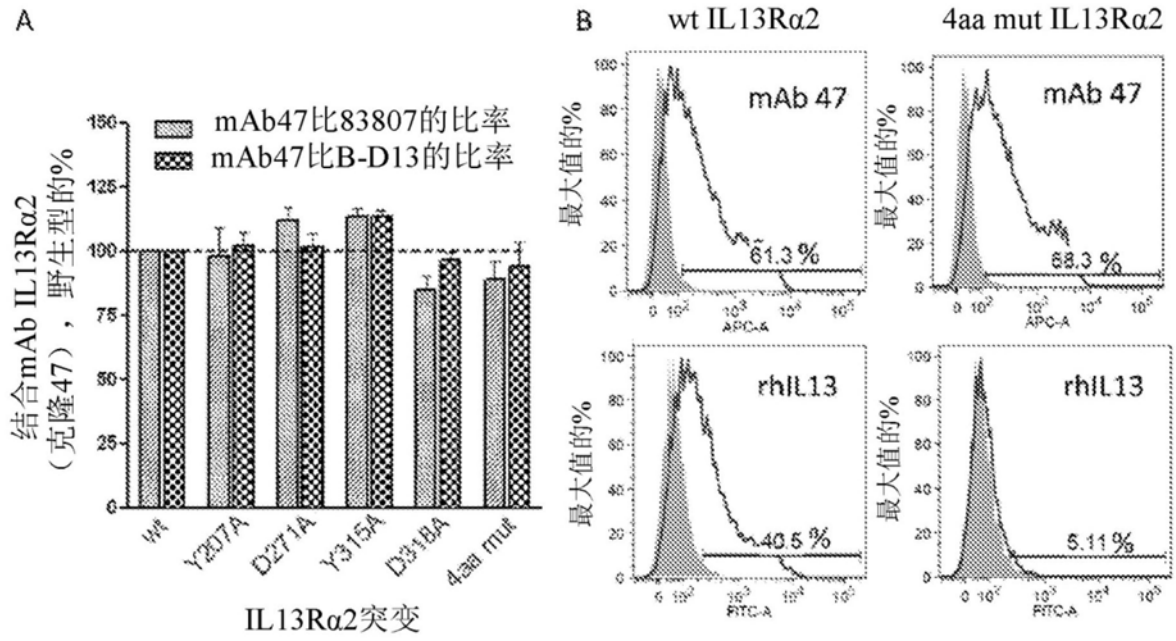


图6

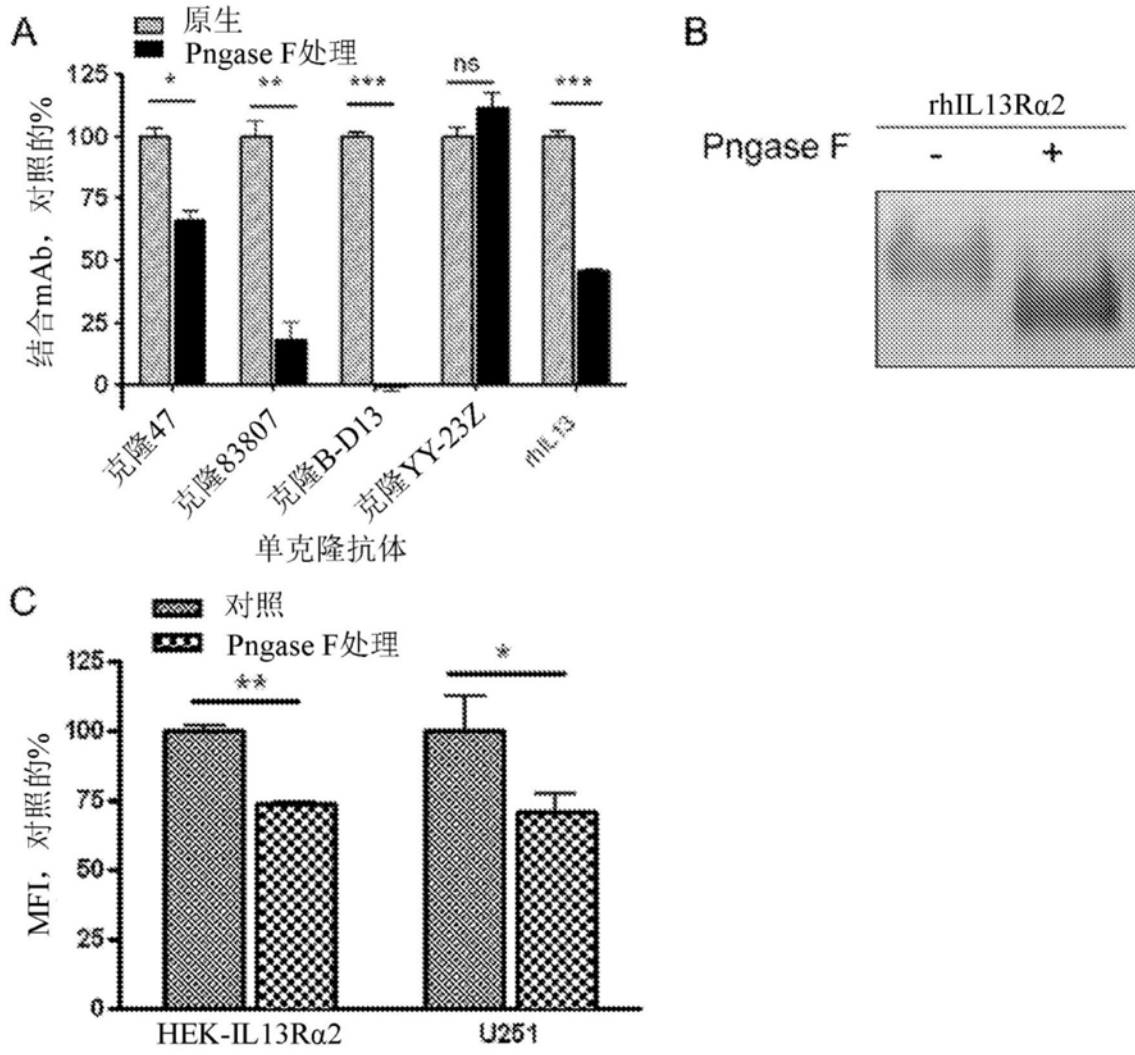


图7

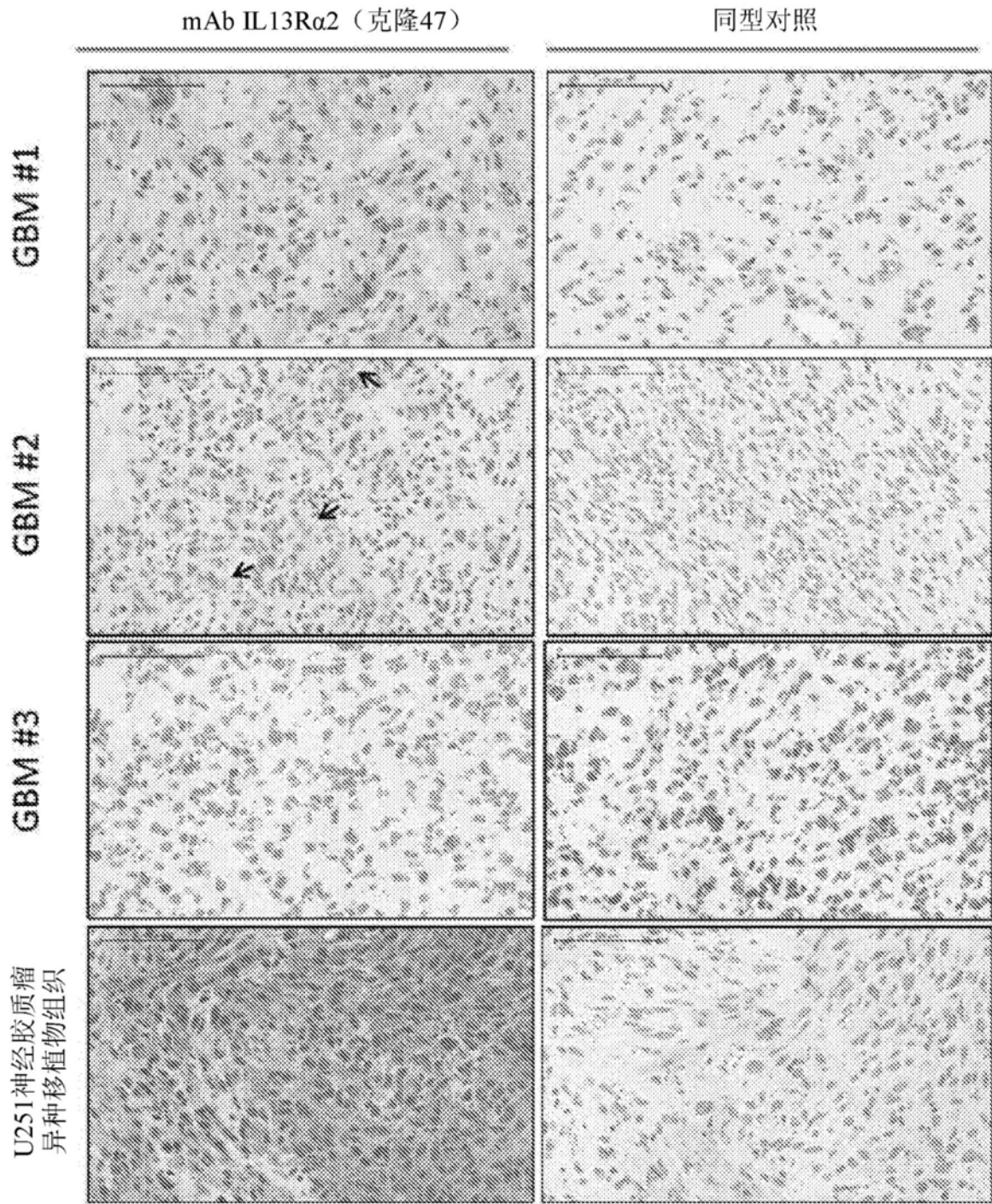


图8

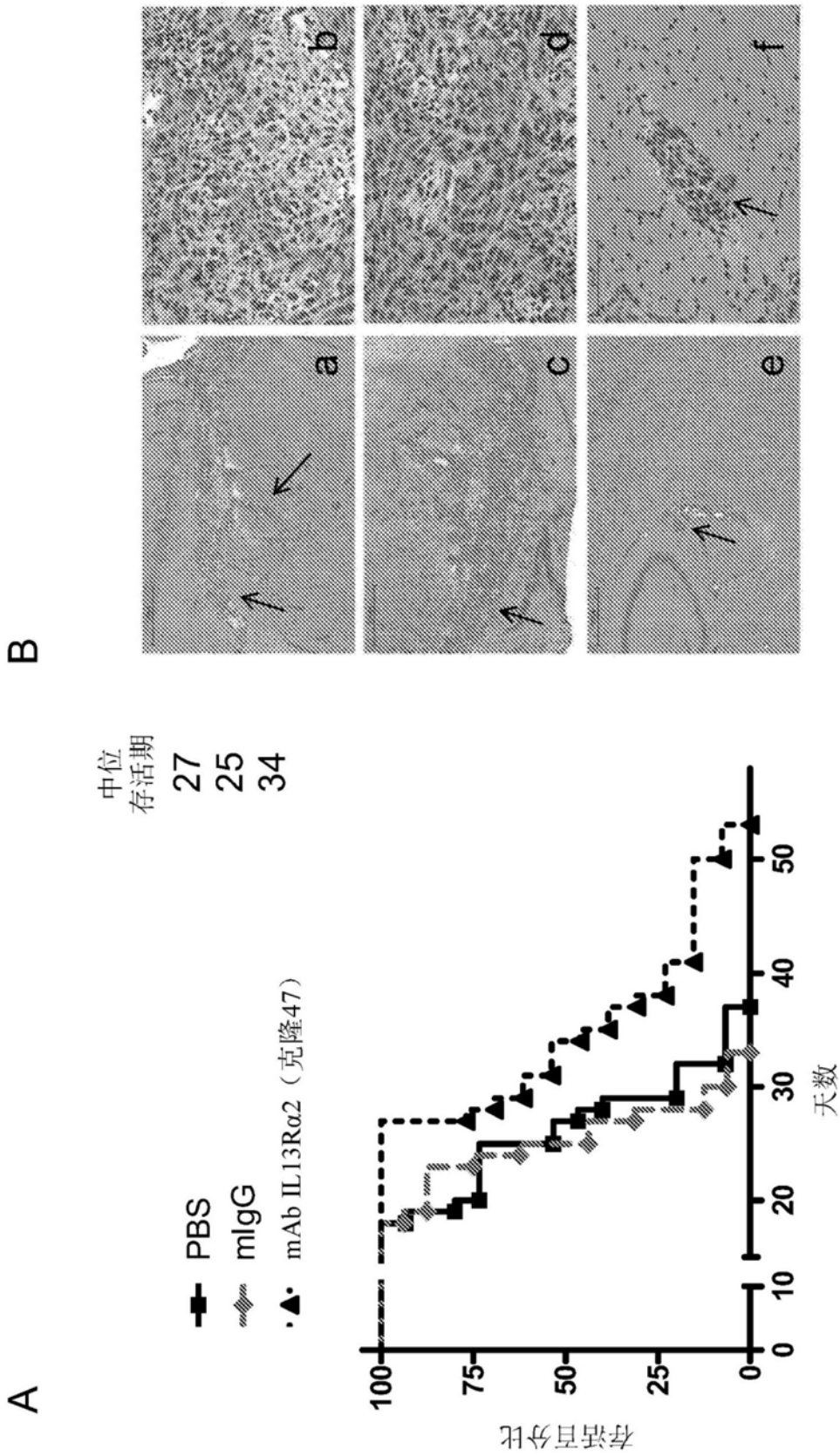


图9



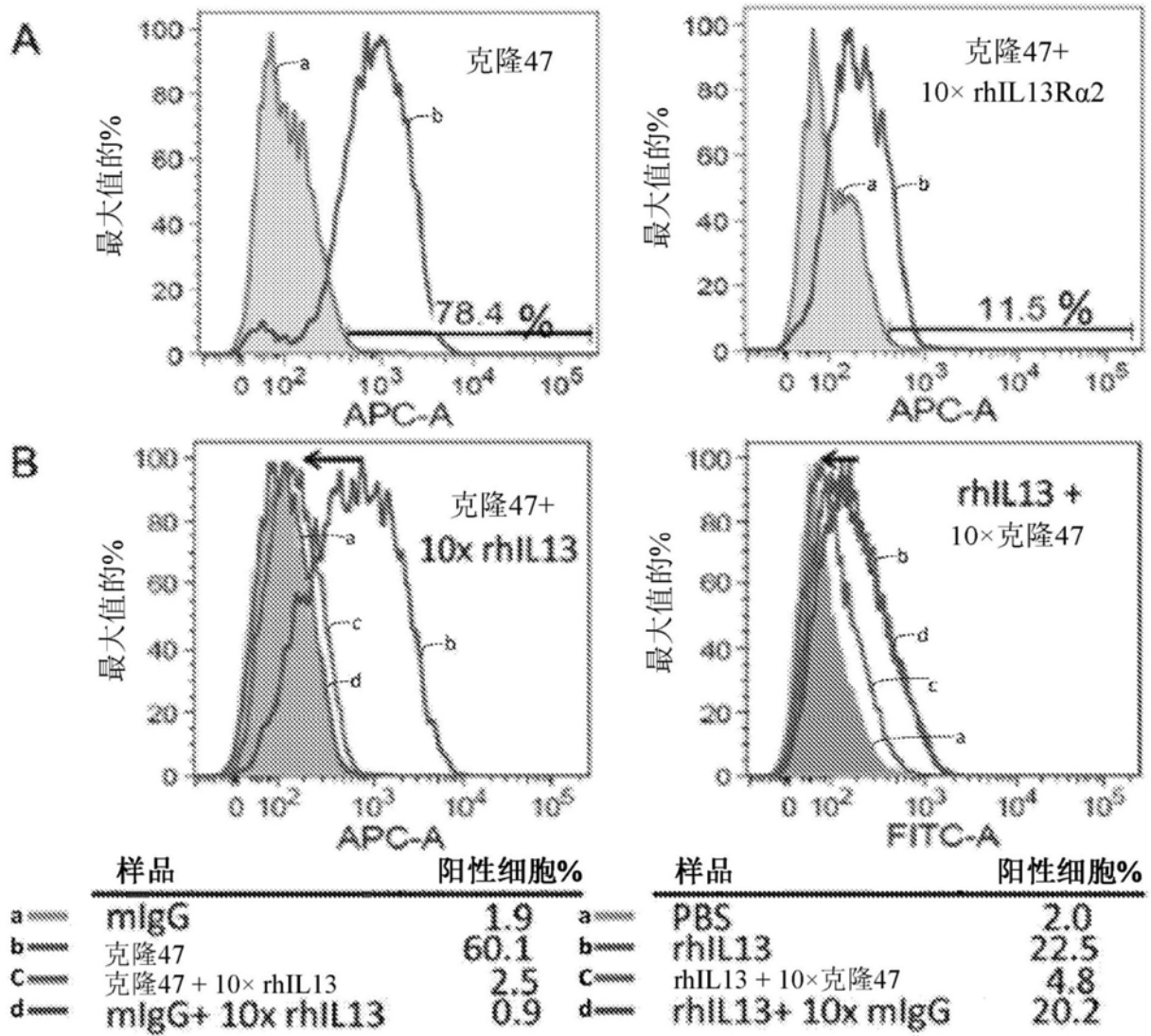


图10



中位  
存活期  
27  
23  
35

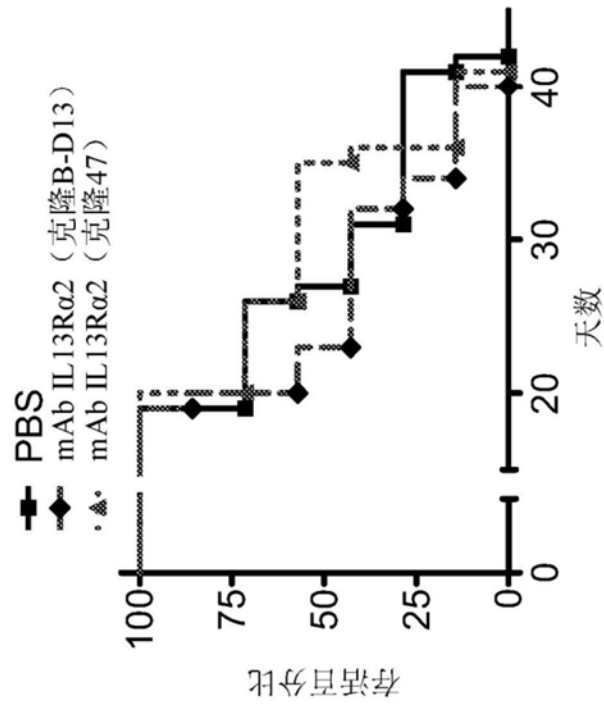


图11

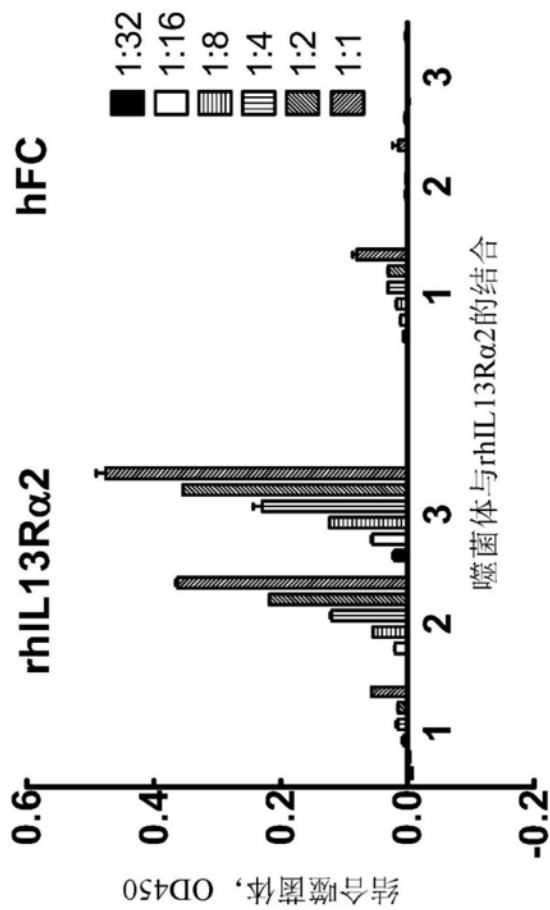


图12

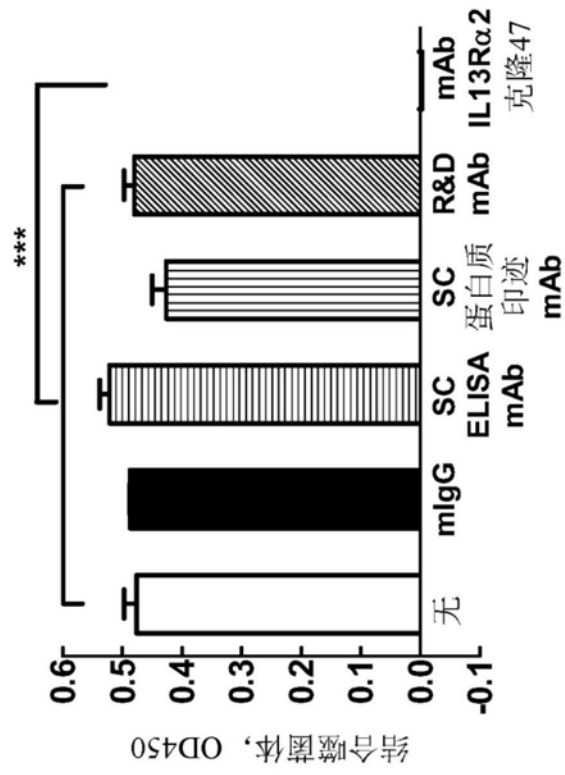


图13

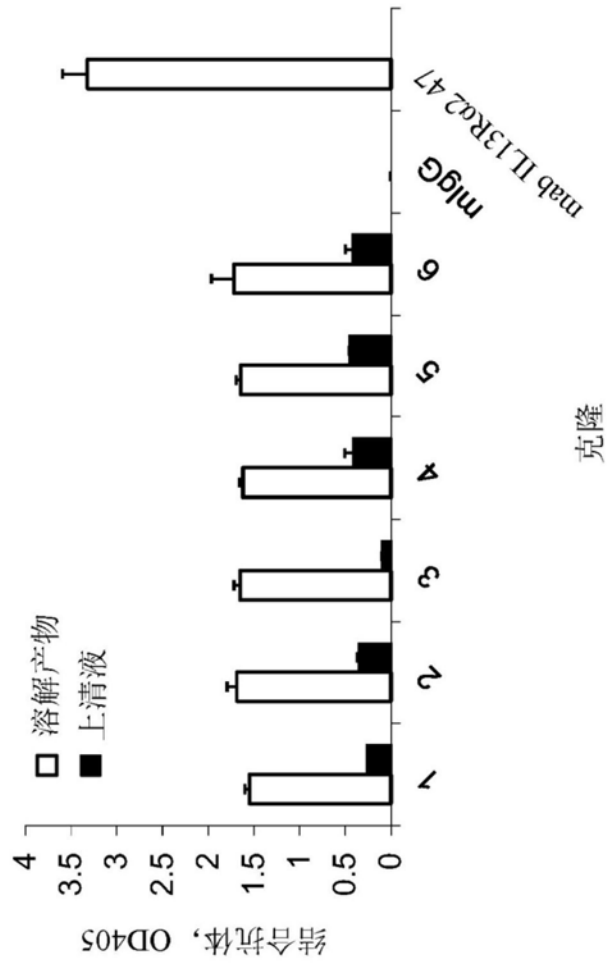


图14

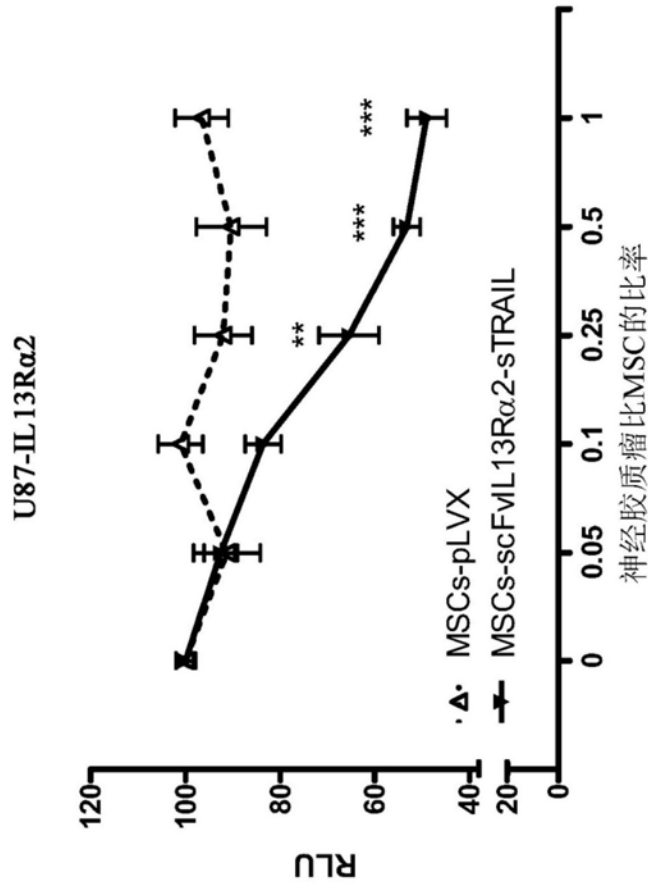


图15

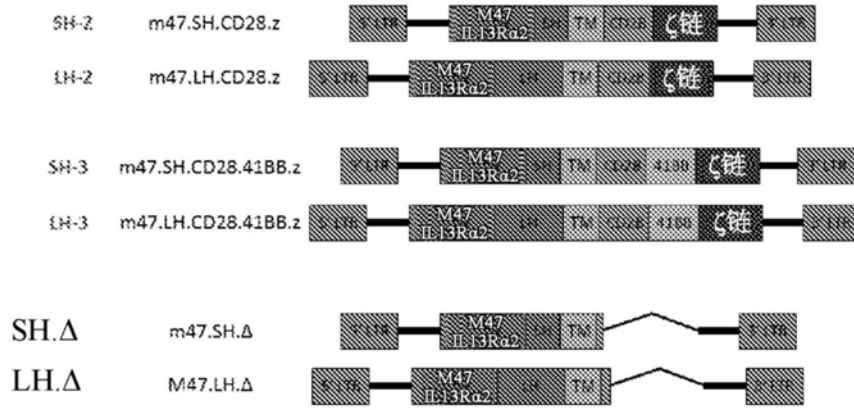


图16

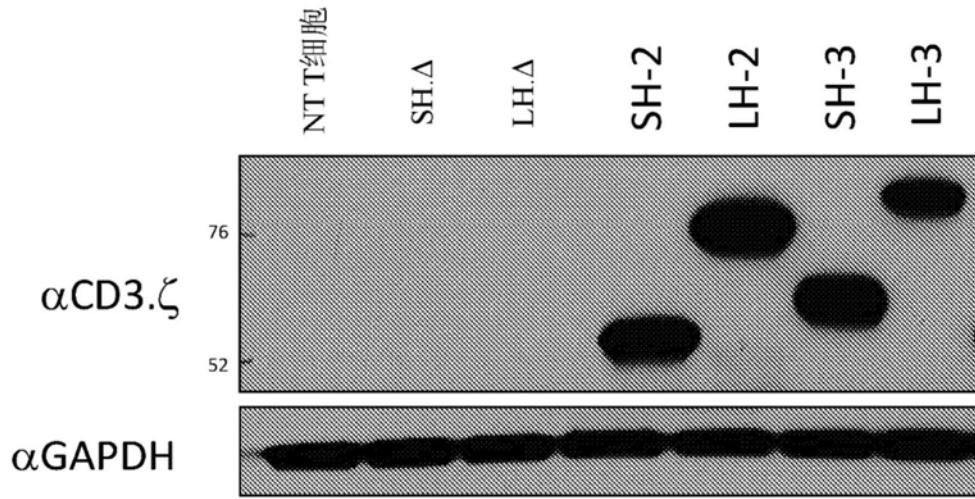


图17

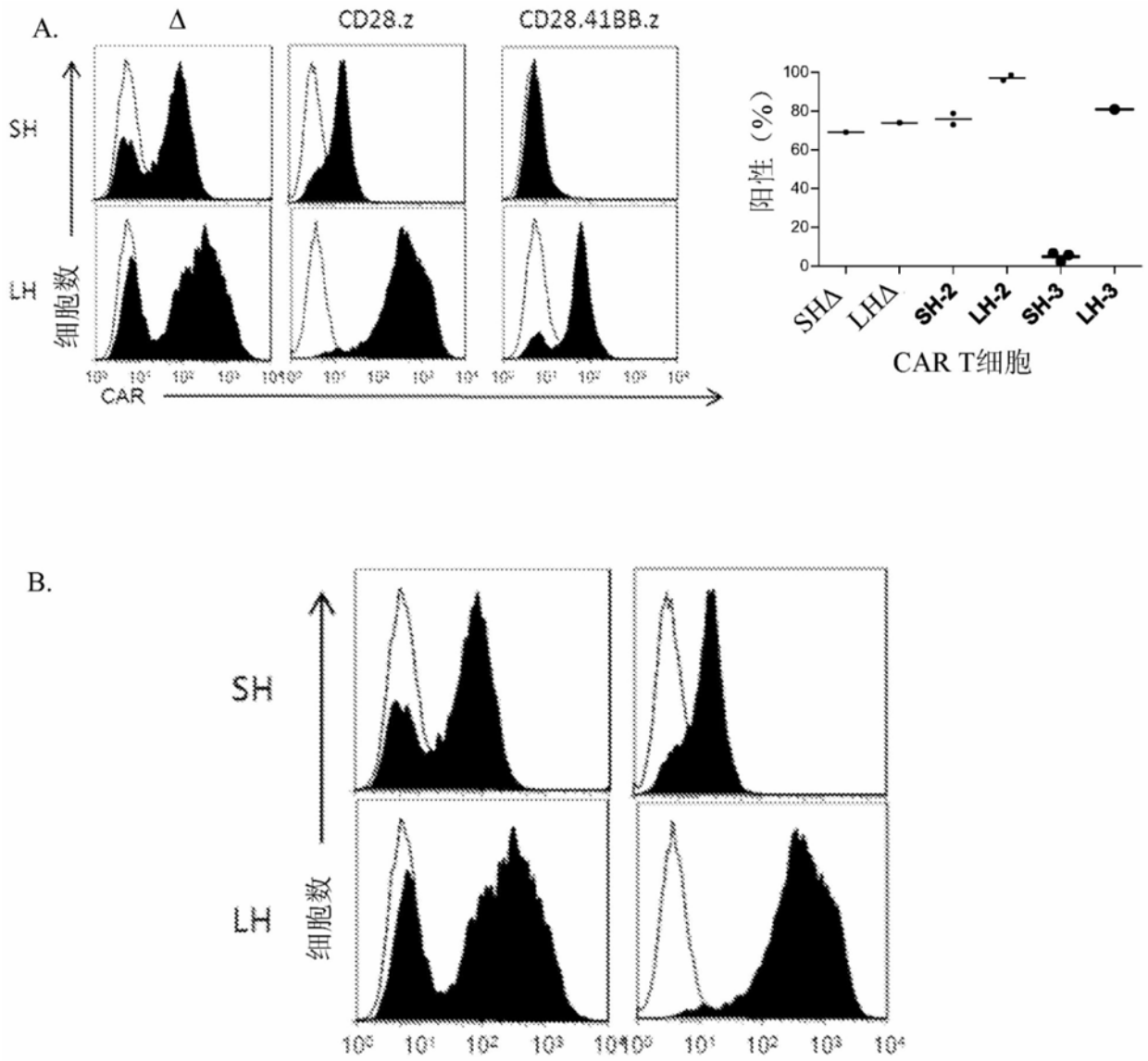


图18

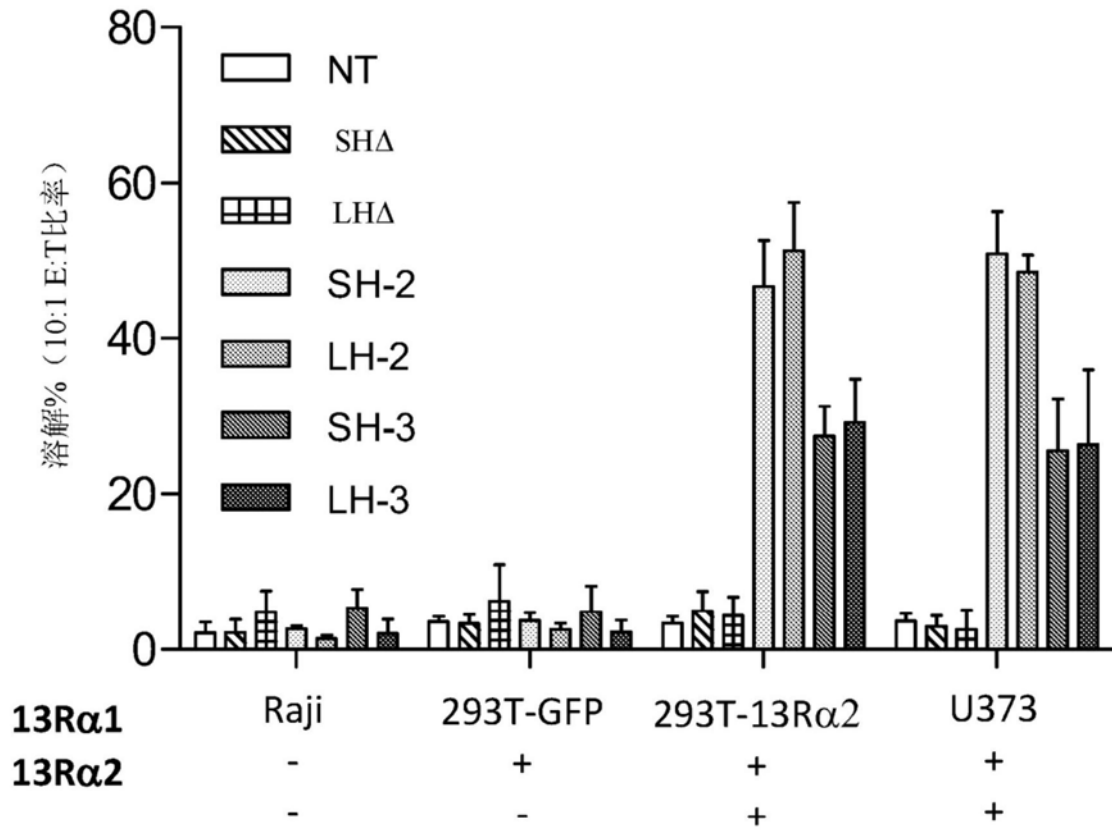


图19

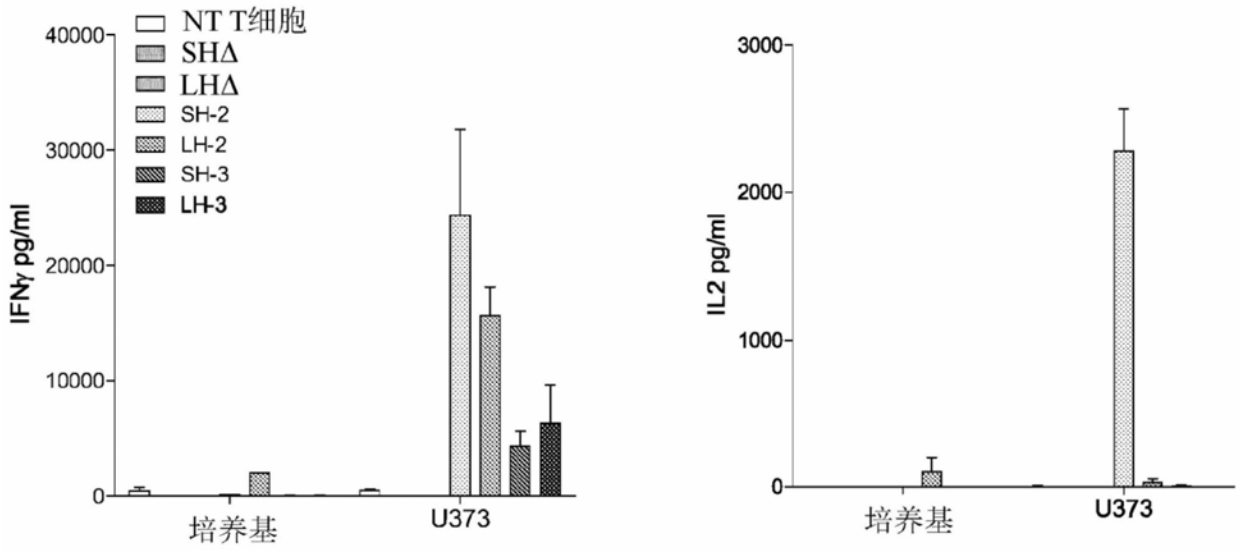


图20



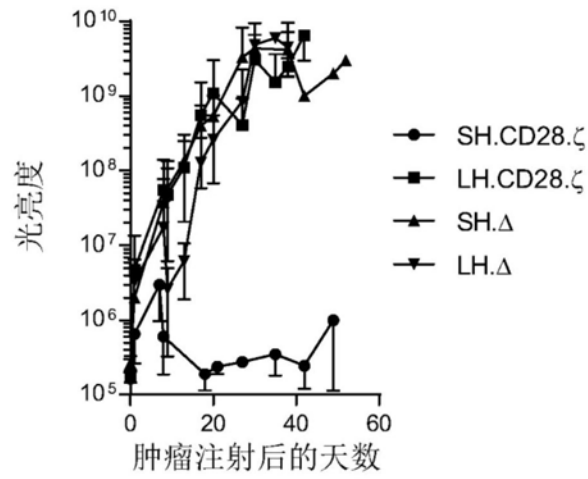


图21

	表达 (WB)	细胞表面表达	细胞	IFN $\gamma$	IL2	活体内的抗神经胶质瘤活性
SH2 $\Delta$	n/a	+	-	-	-	-
SH3 $\Delta$	n/a	+	-	-	-	-
SH2	+	+	+	++	+	+
LH2	+	+	+	++	-	-
SH3	+	+/-	+	+	-	ND
LH3	+	+	+	+	-	ND

图22

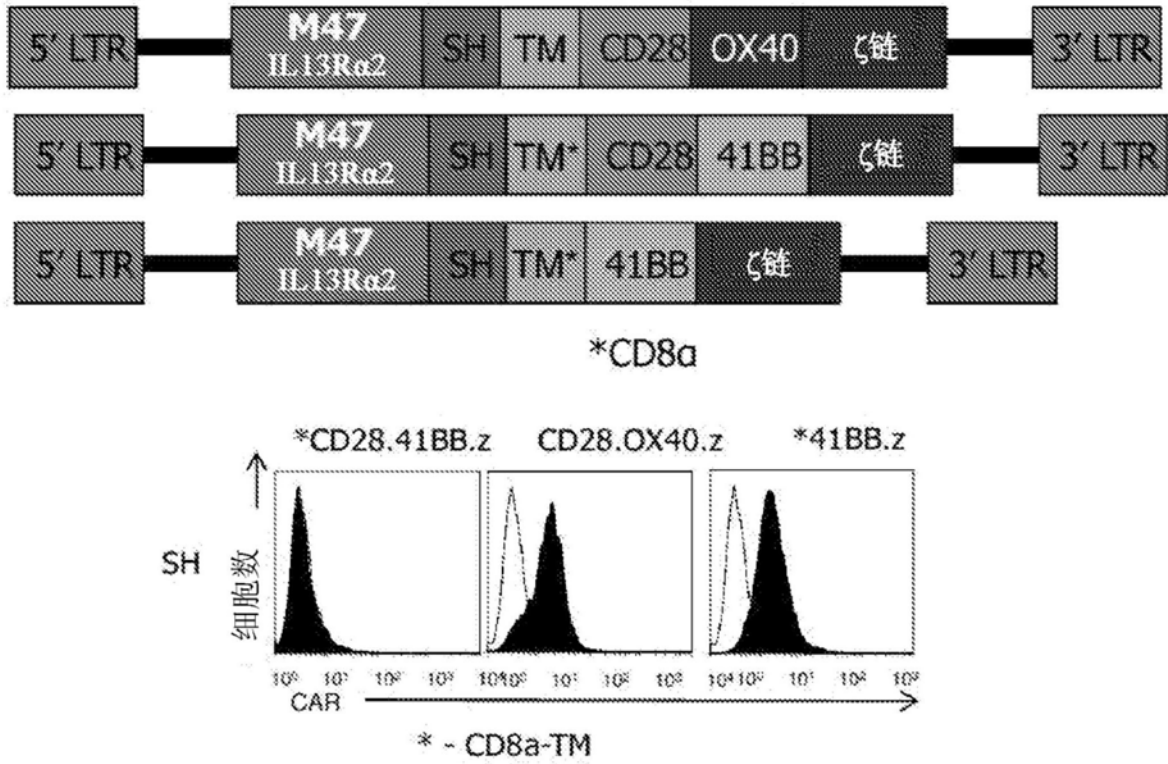


图23

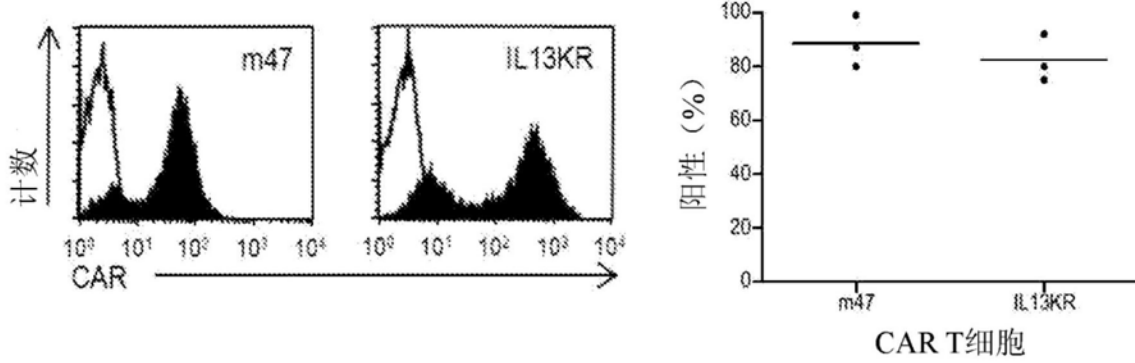


图24

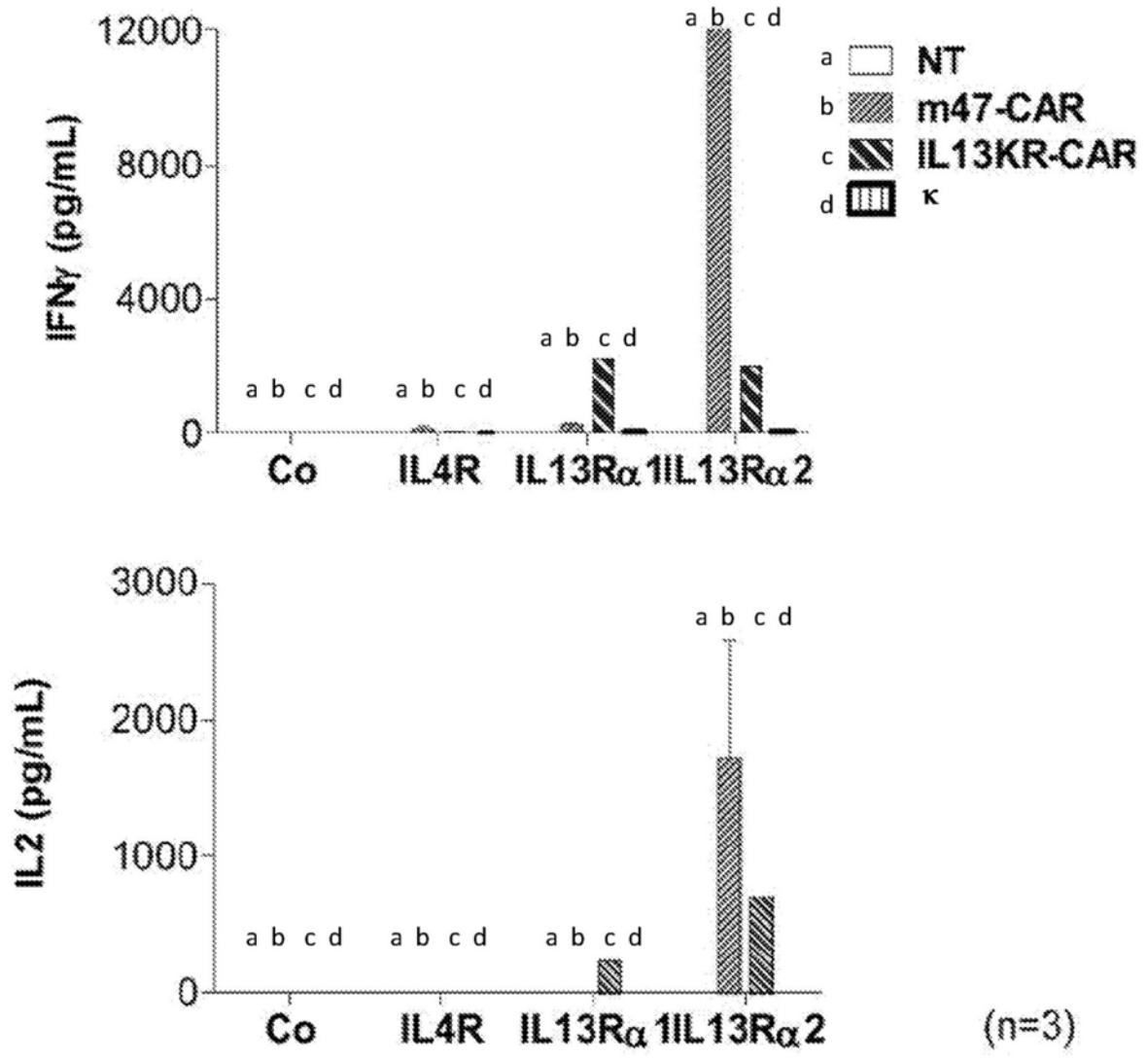


图25

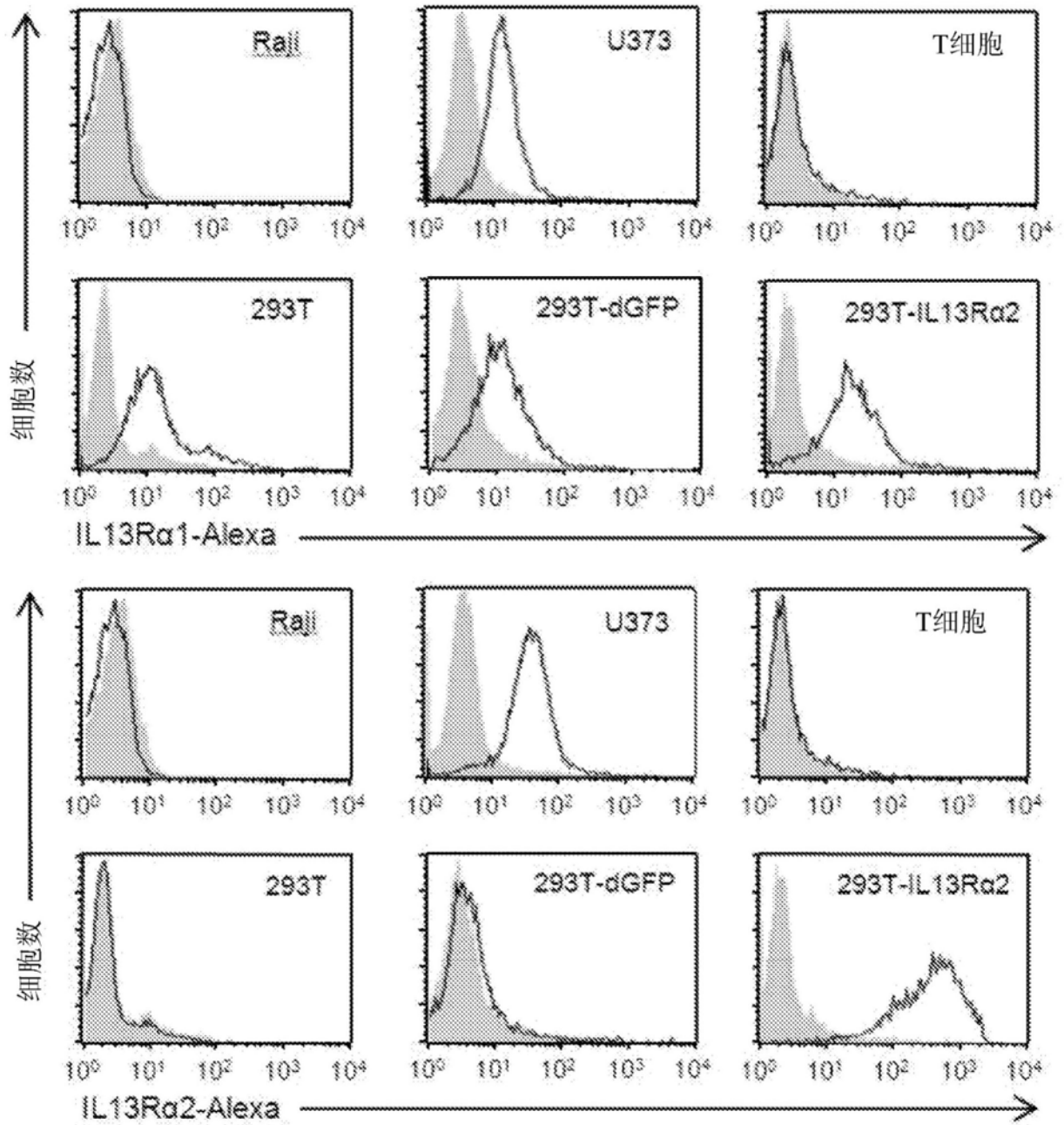


图26

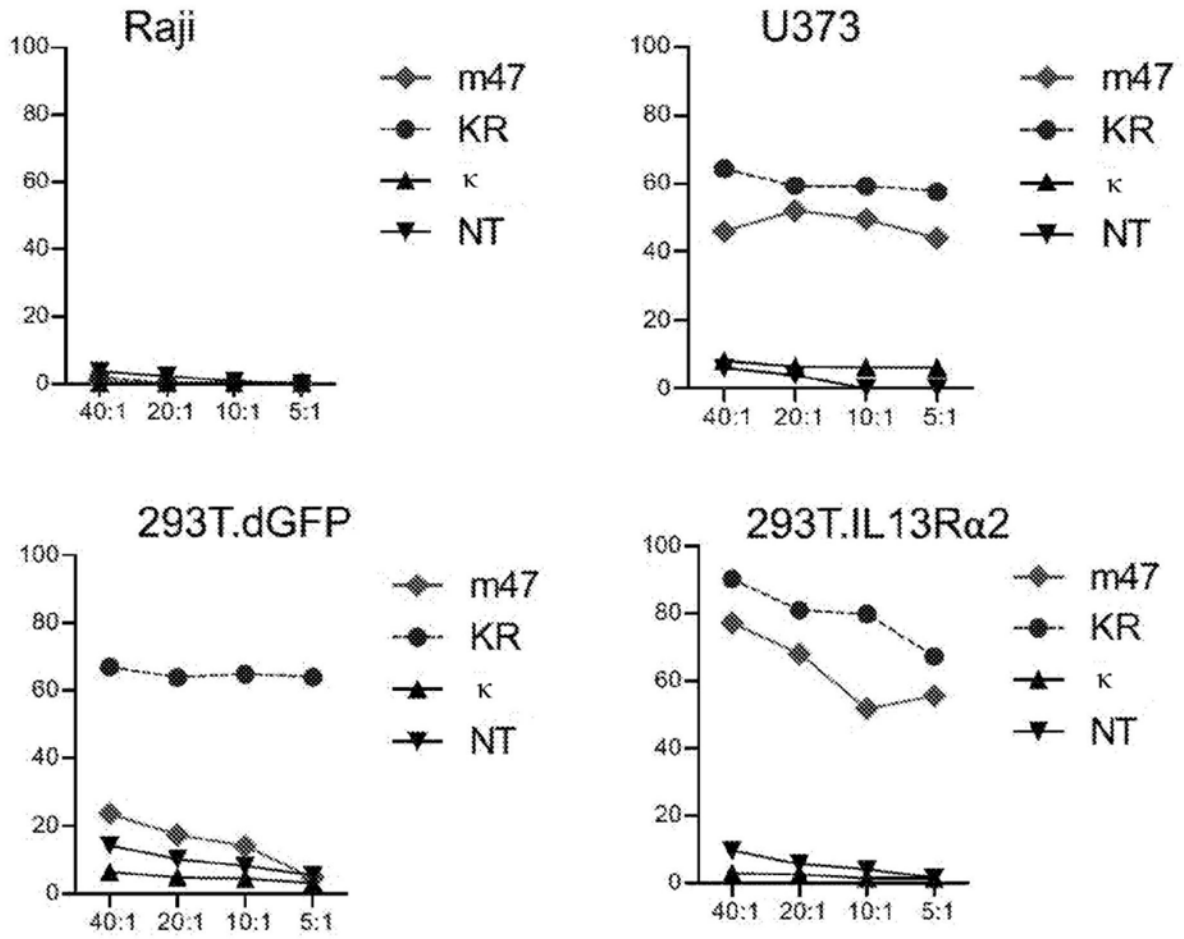


图27

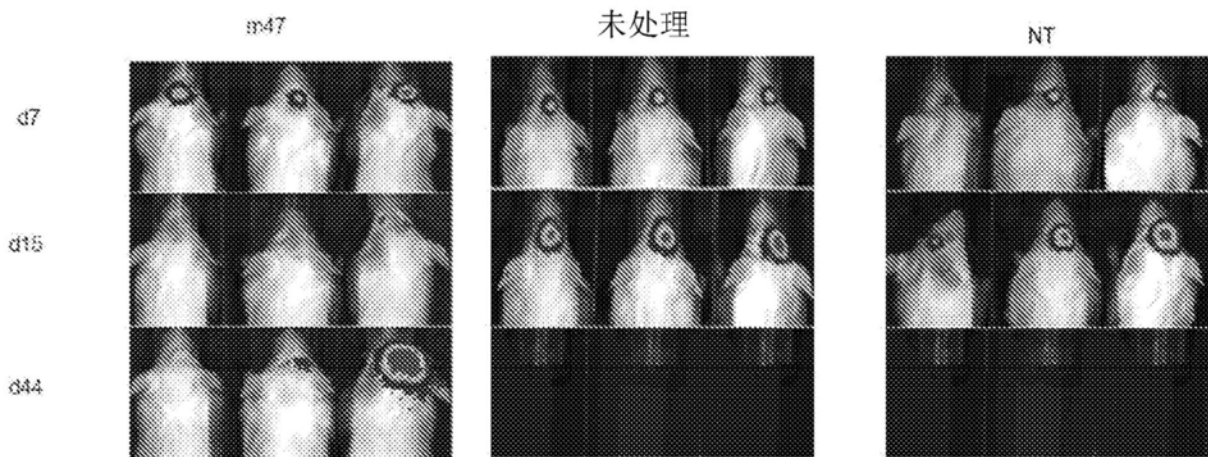


图28

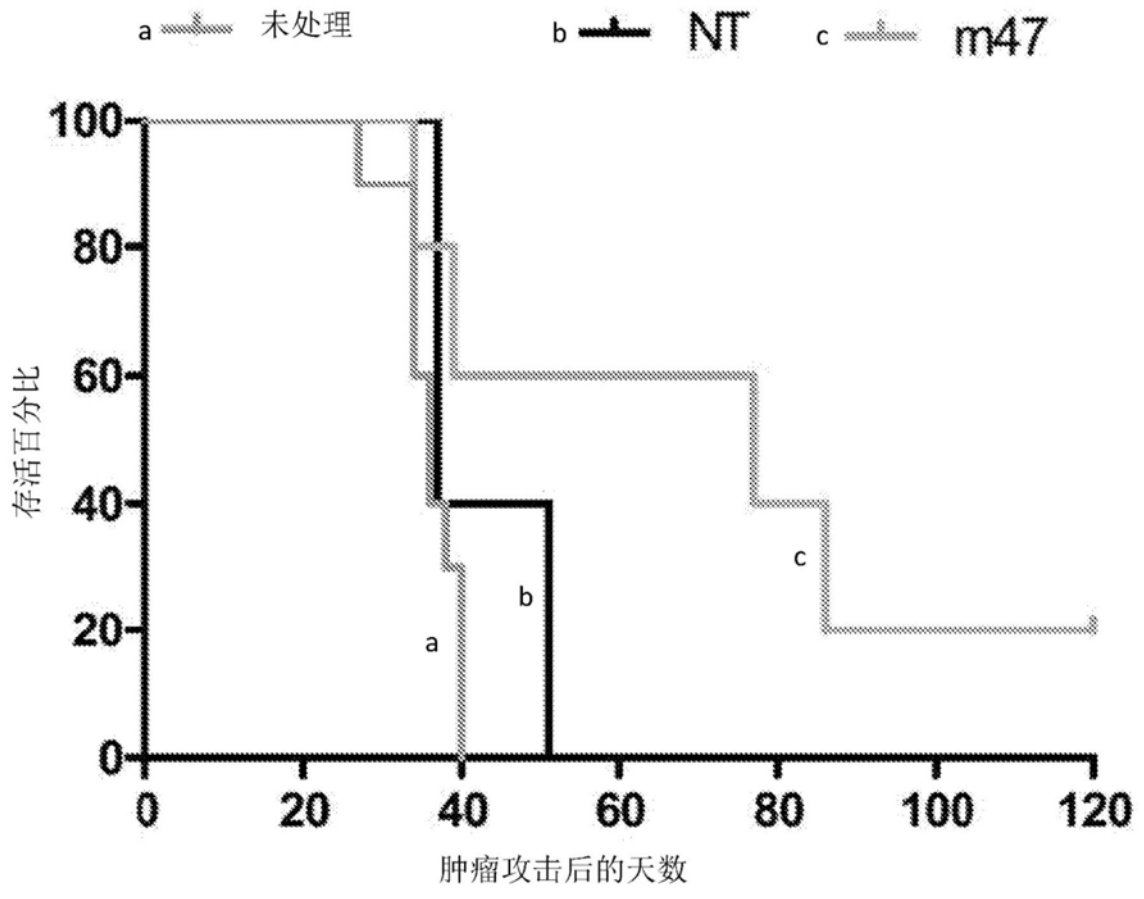


图29

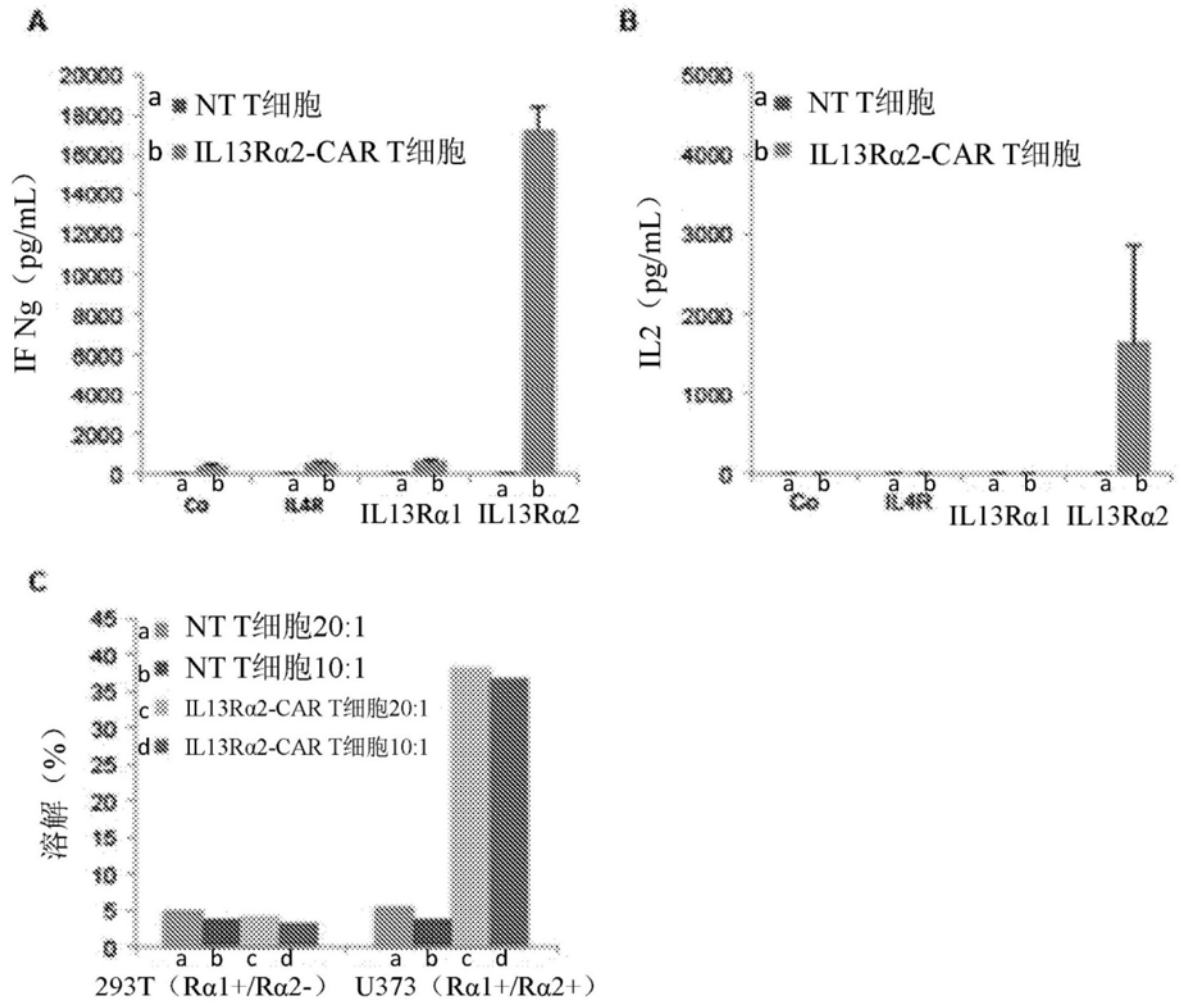


图30

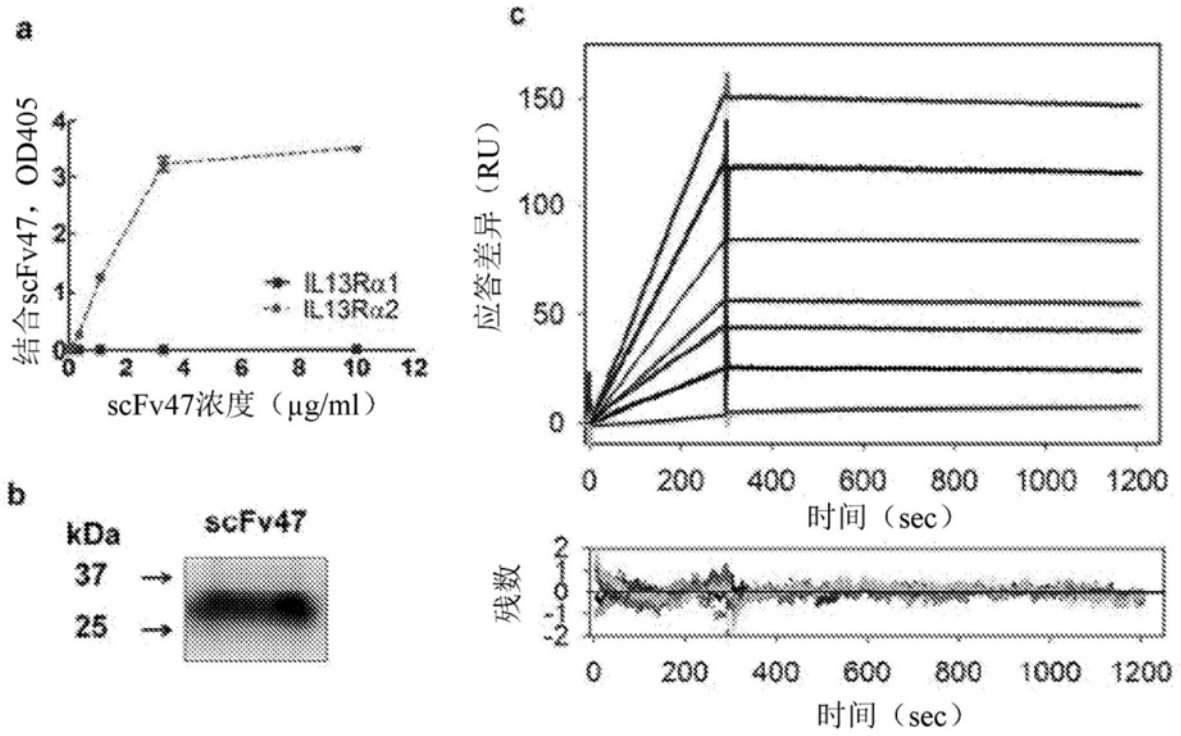


图31

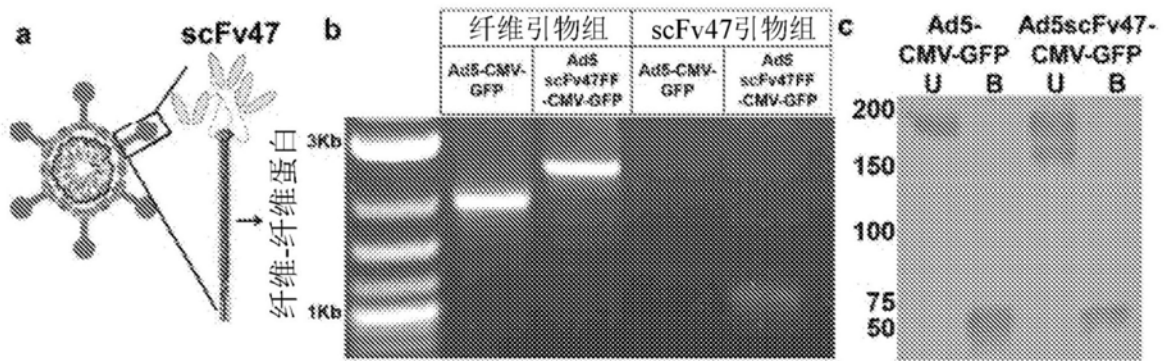


图32



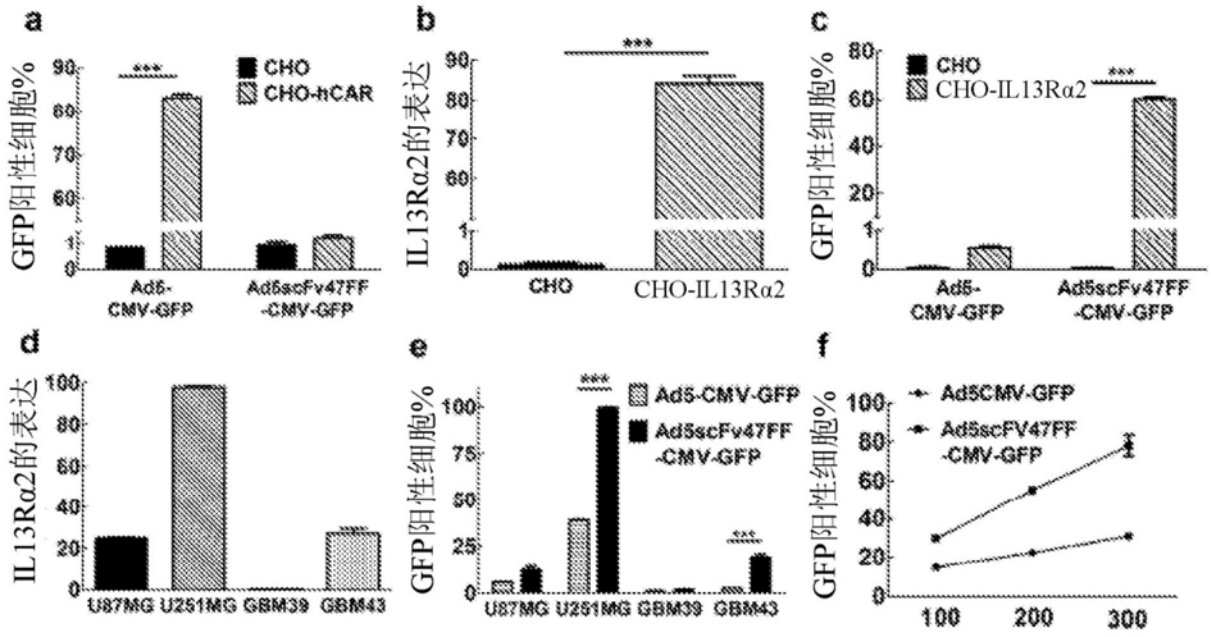


图33

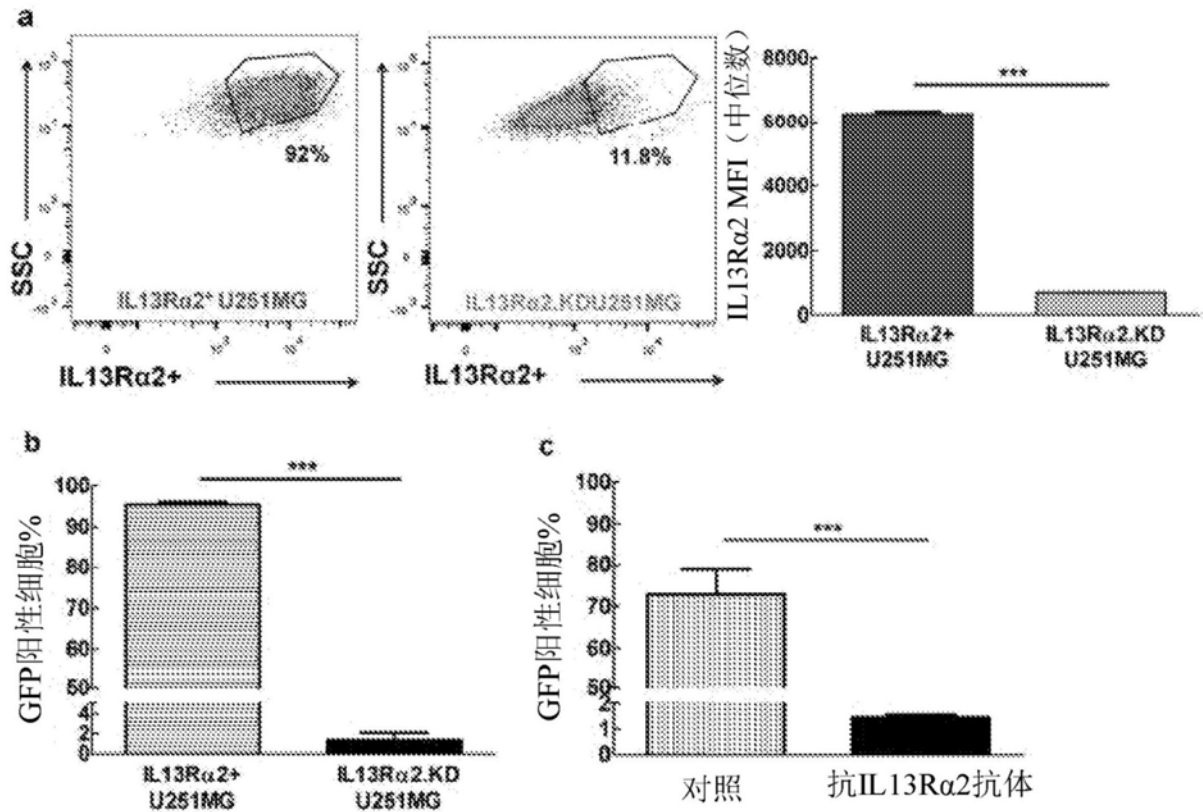


图34

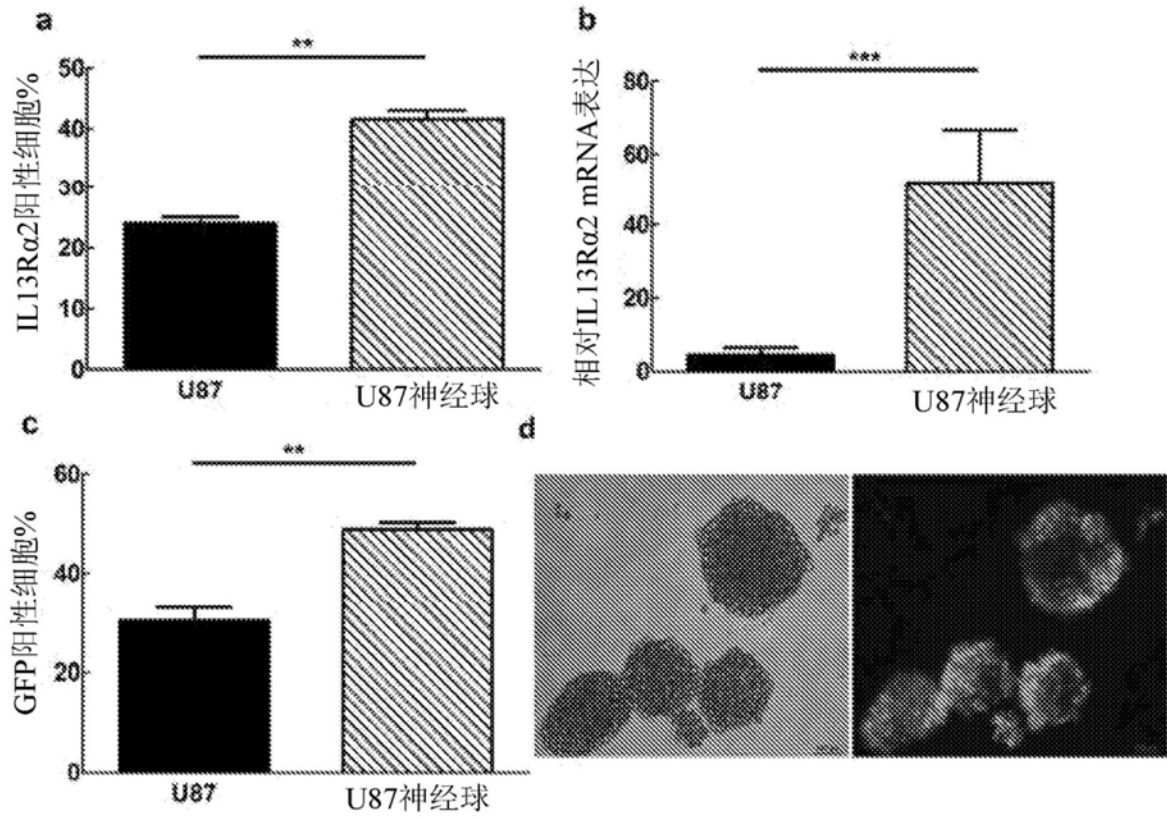


图35

a. IL13R $\alpha$ 2.KDU251MG



b. IL13R $\alpha$ 2<sup>+</sup> U251MG

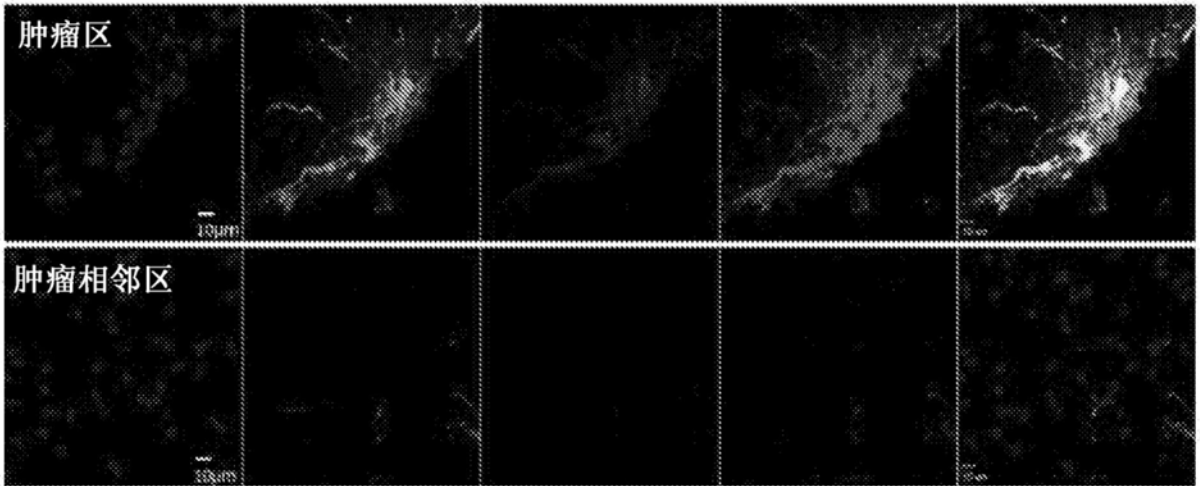


图36

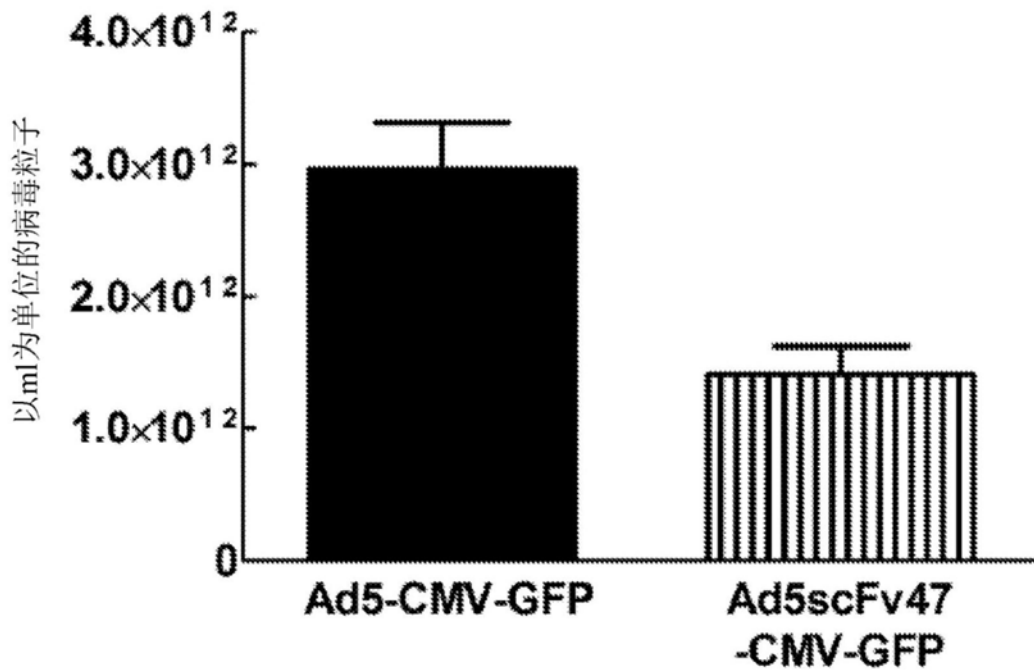


图37

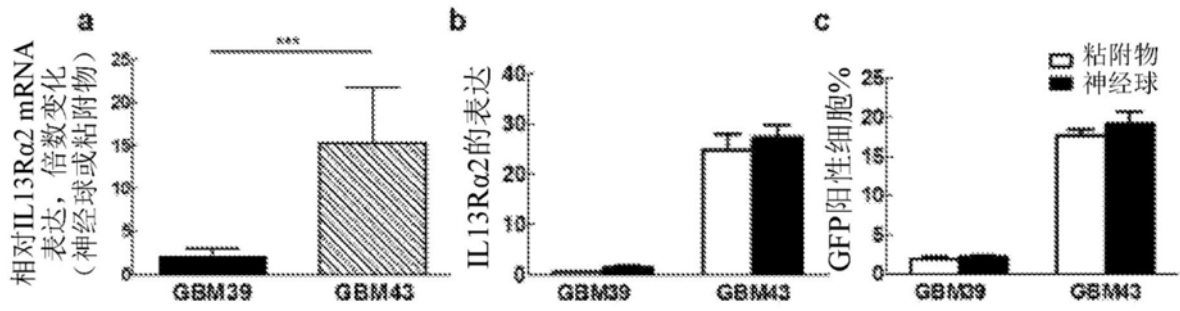


图38

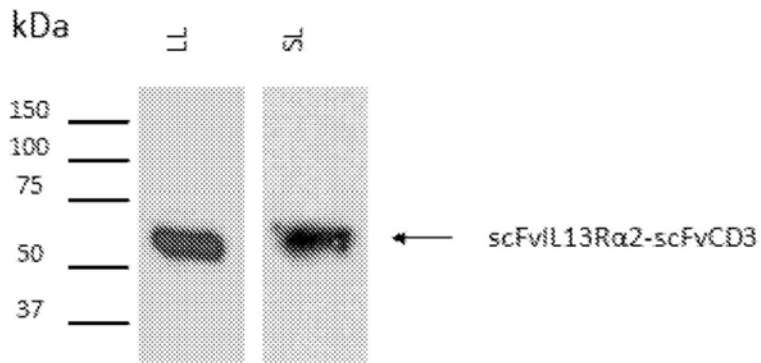


图39