



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107400168 B

(45)授权公告日 2020.02.07

(21)申请号 201710587317.3

(22)申请日 2017.07.18

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107400168 A

(43)申请公布日 2017.11.28

(73)专利权人 深圳市免疫基因治疗研究院
地址 518000 广东省深圳市南山区粤海街
道粤兴二道6号深圳虚拟大学园重点
实验室(工程中心)平台大楼A201-
206,B201-218

(72)发明人 桂思倩 刘昱辰

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

代理人 巩克栋

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/867(2006.01)

A61K 35/17(2015.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

(56)对比文件

CN 105246912 A,2016.01.13,

CN 105246912 A,2016.01.13,

CN 106535925 A,2017.03.22,

WO 2016164731 A2,2016.10.13,

徐学群等.CAR-T的设计原理及其在卵巢癌
治.《免疫学杂志》.2017,第33卷(第2期),

审查员 程静之

权利要求书1页 说明书8页

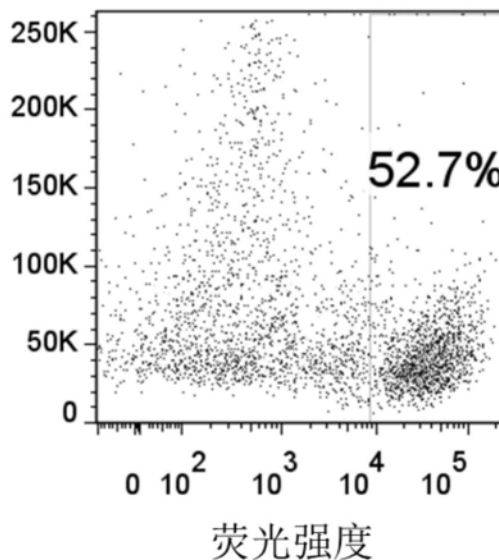
序列表8页 附图4页

(54)发明名称

一种基于CD117的嵌合抗原受体及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种基于CD117的嵌合抗原受体及其应用,具体为以肿瘤特异靶点CD117为基础的嵌合抗原受体T(CAR-T)细胞技术的构建方法及其在抗肿瘤治疗中的应用,所述嵌合抗原受体包括抗原结合结构域、跨膜结构域、共刺激信号传导区和CD3 ζ 信号传导结构域串联而成;其中,所述抗原结合结构域结合肿瘤表面抗原,所述肿瘤表面抗原为CD117。本发明的嵌合抗原受体通过对CD117肿瘤表面抗原进行特定的基因改造,改造后的抗体能够使抗原-抗体结合力更强,不容易发生突变,且相比于其他嵌合抗原受体和其他肿瘤抗原有更好的效果,靶点的表达量高,使得CAR-T细胞的免疫效果增强,增强了CAR-T细胞的治疗效果。



1. 一种基于CD117嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体为Secretory-CD117-CD28-CD137-CD27-CD3 ζ -2A-iCasp9;

所述嵌合抗原受体Secretory-CD117-CD28-CD137-CD27-CD3 ζ -2A-iCasp9的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

2. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体Secretory-CD117-CD28-CD137-CD27-CD3 ζ -2A-iCasp9的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

3. 根据权利要求2所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述的嵌合抗原受体通过其编码的核酸序列转染到T细胞中表达。

4. 根据权利要求3所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述转染的方式为通过病毒载体、真核表达质粒或mRNA序列中的任意一种或至少两种的组合转染到T细胞。

5. 根据权利要求4所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述转染的方式为通过病毒载体转染到T细胞。

6. 根据权利要求5所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述病毒载体为慢病毒载体和/或逆转录病毒载体。

7. 根据权利要求6所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述病毒载体为慢病毒载体。

8. 一种重组慢病毒,其特征在于,将包含如权利要求1-7中任一项所述的嵌合抗原受体的病毒载体与包装辅助质粒pNHP和pHEF-VSVG共转染哺乳细胞得到的重组慢病毒。

9. 根据权利要求8所述的重组慢病毒,其特征在于,所述哺乳细胞为293细胞,293T细胞或TE671细胞中的任意一种或至少两种的组合。

10. 一种组合物,其特征在于,所述组合物包括如权利要求1-7中任一项所述的嵌合抗原受体和/或如权利要求8或9所述的重组慢病毒。

11. 如权利要求1-7中任一项所述的嵌合抗原受体、如权利要求8或9所述的重组慢病毒或如权利要求10所述的组合物在制备嵌合抗原受体T细胞及其在制备肿瘤治疗药物中的应用。

12. 根据权利要求11所述的应用,其特征在于,所述肿瘤为血液相关的肿瘤疾病。

13. 根据权利要求12所述的应用,其特征在于,所述血液相关的肿瘤疾病为白血病和/或淋巴瘤。

一种基于CD117的嵌合抗原受体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤的细胞免疫治疗领域,尤其涉及一种基于CD117的嵌合抗原受体及其应用,具体为以肿瘤特异靶点CD117为基础的嵌合抗原受体T (CAR-T) 细胞技术的构建方法及其在抗肿瘤治疗中的应用。

背景技术

[0002] 随着肿瘤免疫学理论和临床技术的发展,嵌合抗原受体T细胞疗法(Chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy, CAR-T) 成为目前最有发展前景的肿瘤免疫疗法之一。一般,嵌合抗原受体CAR由一个肿瘤相关抗原结合区、胞外铰链区、跨膜区域以及胞内信号转导区组成。通常,CAR包含抗体的单链片段可变(Single chain fragment variable, scFv) 区或对肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA) 具有特异性的结合结构域,其通过铰链和跨膜区与T细胞信号传导分子的胞质结构域偶联。最常见的淋巴细胞活化部分包括与T细胞效应物功能触发(例如CD3 ζ) 部分串联的T细胞共刺激结构域。CAR介导的过继性免疫疗法允许CAR-移植的T细胞以非HLA限制性方式直接识别靶肿瘤细胞上的TAA。

[0003] 大多数患有B细胞恶性肿瘤(包括B细胞急性淋巴细胞性白血病(B cell acute lymphocytic leukemia, leukemia, B-ALL) 和慢性淋巴细胞性白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)) 的患者将由于其疾病而死亡。治疗这些患者的一种方法是通过CAR的表达,对T细胞进行遗传修饰以靶向在肿瘤细胞上表达的抗原。CAR是经设计以人白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA) 非依赖性方式识别细胞表面抗原的抗原受体。尝试使用表达CAR的遗传修饰细胞来治疗这些类型的患者已经取得了有前景的成功。

[0004] CD19分子是治疗B淋巴细胞系肿瘤潜在的靶点,也是CAR研究中的热点,CD19的表达局限于正常和恶性B细胞,是广泛接受的用来安全测试的CAR靶标。靶向CD19分子的嵌合抗原受体基因修饰的T细胞(CD19CAR-T) 在治疗多发性、难治性的急性B淋巴细胞白血病上取得巨大成功,而在难治性、复发性慢性B淋巴细胞白血病和B淋巴细胞系淋巴瘤的治疗中疗效明显较差。

[0005] CN 104788573A公开了一种嵌合抗原受体hCD19scFv-CD8 α -CD28-CD3 ζ 及其用途,该嵌合抗原受体由抗人CD19单克隆抗体HI19a轻链和重链可变区(hCD19scFv)、人CD8 α 铰链区、人CD28跨膜区和胞内区、以及人CD3 ζ 胞内区结构串联构成,该专利中的CD19在进行一次CAR-T细胞回输后,CD19的表达量会降低,容易逃过免疫机制。

[0006] 因此,制备一种嵌合抗原受体能够解决CD19存在的易突变和表达量降低的问题显得尤为重要。

发明内容

[0007] 针对目前CAR-T技术治疗肿瘤中靶向不十分理想,以及肿瘤微环境影响CAR-T技术治疗效果的情况,本发明提供一种基于CD117的嵌合抗原受体及其应用,本发明制备的嵌合

抗原受体通过将CD117靶点进行基因改造,从而提高了靶点的免疫效果,增强了CAR-T细胞的治疗效果。

[0008] 为达此目的,本发明采用以下技术方案:

[0009] 一方面,本发明提供一种基于CD117的嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包括抗原结合结构域、跨膜结构域、共刺激信号传导区和CD3 ζ 信号传导结构域串联而成;

[0010] 其中,所述抗原结合结构域结合肿瘤表面抗原,所述肿瘤表面抗原为CD117。

[0011] 本发明中,通过将抗原结合结构域结合肿瘤表面抗原CD117,再通过对CD117嵌合抗原受体进行特定的人源基因码优化改造,从而使得肿瘤表面抗原CD117能够特异的结合在本申请的嵌合抗原受体上,且相比于其他嵌合抗原受体和其他肿瘤抗原有更好的效果,靶点的表达量高,使得CAR-T细胞的免疫效果增强。

[0012] 根据本发明,所述CD117嵌合抗原受体的单链抗体(ScFv)氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,所述CD117嵌合抗原受体的单链抗体(ScFv)氨基酸序列(SEQ ID NO.1)如下:

[0013] QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGSDTRYSPSFQGGQTISAGKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHGRGYNGYEGAFDIWGQGTMTVSSGSTSGSGKPGSSEGSTKGAIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNYSYPLTFGGGTKVEIK。

[0014] 本发明中,所述CD117嵌合抗原受体的单链抗体(ScFv)的氨基酸进行了特异性改造,使得改造后的序列表达出来的抗体的抗原-抗体结合力更强。

[0015] 根据本发明,所述肿瘤表面抗原CD117还包括肿瘤表面抗原CD117的突变体的单链抗体,所述肿瘤表面抗原CD117的突变体的单链抗体的氨基酸序列与SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列有90%以上的相似度。

[0016] 根据本发明,所述跨膜结构域为CD28跨膜结构域和/或CD8 α 跨膜结构域,在一些具体实施方案中,可以通过氨基酸替换来选择或修饰跨膜结构域。

[0017] 根据本发明,所述共刺激信号传导区为CD28信号传导结构域、CD27信号传导结构域和CD137信号传导结构域中的任意一种或至少两种的组合,优选为CD28信号传导结构域、CD137信号传导结构域和CD27信号传导结构域的组合,所述CD28信号传导结构域、CD137信号传导结构域和/或CD27信号传导结构域的排列,本领域技术人员可以根据需要进行调整,CD28信号传导结构域、CD137信号传导结构域和CD27信号传导结构域不同的排列不会对所述嵌合抗原受体产生影响,本申请优选采用CD28-CD137-CD27的顺序组合。

[0018] 根据本发明,所述嵌合抗原受体还包括可诱导自杀融合结构域,所述可诱导自杀融合结构域为包含胱天蛋白酶9结构域,所述胱天蛋白酶9结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,所述胱天蛋白酶9结构域的氨基酸序列(SEQ ID NO.4)如下:

[0019] GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKVDSSRDRNPKFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGRRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLEGGGGSGGGSGAMVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLINNVCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLA LLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGQEKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSAS。

[0020] 根据本发明,所述可诱导自杀融合结构域通过2A序列与CD3 ζ 信号传导结构域相串

联,所述2A序列会使所述可诱导自杀融合结构域表达的蛋白与所述嵌合抗原受体蛋白断裂开,从而使得所述嵌合抗原受体能够发挥作用,而通过注入激活剂,从而使得可诱导自杀融合结构域激活,从而导致嵌合抗原受体失去作用。

[0021] 根据本发明,所述嵌合抗原受体还包括信号肽,所述信号肽为能够指导嵌合抗原受体跨膜转移的信号肽,本领域技术人员可以根据需要选择本领域常规的信号肽,所述信号肽可以为任何一个分泌蛋白基因的信号肽,本发明所述信号肽为Secretory信号肽,所述Secretory信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.5-6所示。

[0022] 优选地,所述Secretory信号肽为CD8a基因的信号肽,所述信号肽氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示,所述SEQ ID NO.5所述的氨基酸序列如下: MALPVTALLLPLALLLHAARP.

[0023] 优选地,所述Secretory信号肽为GMCSFR基因的信号肽,所述信号肽氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示,所述SEQ ID NO.6所述的氨基酸序列如下: MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP.

[0024] 本发明的嵌合抗原受体还可以包括铰链区,所述铰链区本领域技术人员可以根据实际情况进行选择,在此不做特殊限定,铰链区的存在不会对本发明的嵌合抗原受体的性能产生影响。

[0025] 根据本发明,所述嵌合抗原受体包括信号肽、抗原结合结构域、跨膜结构域、共刺激信号传导区、CD3 ζ 信号传导结构域、2A序列和可诱导自杀融合结构域串联而成。

[0026] 作为优选技术方案,所述嵌合抗原受体为Secretory信号肽、CD117抗原结合结构域,CD8 α 和/或CD28跨膜结构域,CD28信号传导结构域、CD137信号传导结构域和CD27信号传导结构域,CD3 ζ 信号传导结构域、2A序列和胱天蛋白酶9结构域串联而成,具体排列如下:

[0027] Secretory-CD117-CD28-CD137-CD27-CD3 ζ -2A-iCasp9.

[0028] 根据本发明,所述嵌合抗原受体Secretory-CD117-CD28-CD137-CD27-CD3 ζ -2A-iCasp9的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,所述嵌合抗原受体的氨基酸序列(SEQ ID NO.2)如下:

[0029] MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQVQLVQSGAAVKKPGESLKI SCKGSGYRFTSYWIGWVRQMPGKGLE
 WMGIIYPGSDTRYSPSFQGGVTVISAGKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARHGRGNGYEGAFDIWQGTMTVTS
 SGSTSGSGKPGSSEGSTKGAIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESG
 VPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQFN SYPLTFGGGKVEIKAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVK
 GKHLCPSPLPFPGSPKPFVWL VVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLRHSDYMNTPRRPGPTRKHYQPYAPP
 RDFAAYSASGGGGSGGGGSQRRKYRSNKGESPV EPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSPGGGGSGGG
 GSTSGGGSGGGGSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELGGGGSGGGSGGGGSRVK
 FRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGE
 RRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPRTSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGVQVETISPGDGRTPFKR
 GQTCVVHYTGML EDGKKVDSSRDRNPKFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPH
 ATLVDVELLKGEGGGSGGGSGAMVGALES LRGNADLAYILSMEPCGHCLINNVCRESGLRTRTGSNIDCE
 KLRRRFSSSLHFMVEVKGDLTAKKMLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGCPVSVEKIV
 NIFNGTSCPSLGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGNPEPDA TPQEGRLTFDQLDAISSLPTPSD
 IFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNLRKKLFFKTS
 AS.

[0030] 根据本发明,所述嵌合抗原受体Secretory-CD117-CD28-CD137-CD27-CD3 ζ -2A-

iCasp9的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示,所述嵌合抗原受体的核苷酸序列(SEQ ID NO.3)如下:

[0031] ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCCTTCTGCTGATCCCCCA
GGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGCGTGAAGAAGCCCGGCGAGAGCCTGAAGATCAGCTGCAAGGGCAGCGGC
TACAGATTACACAGCTACTGGATCGGCTGGGTGAGACAGATGCCCGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCATCATCT
ACCCCGGCGACAGCGACACCAGATACAGCCCCAGCTTCCAGGGCCAGGTGACCATCAGCGCCGGCAAGAGCATCAG
CACCGCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCAGCGACACCGCCATGTACTACTGCGCCAGACACGGCAGAGGC
TACAACGGCTACGAGGGCGCCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCATGGTGACCGTGAGCAGCGGCAGCACCAGCG
GCAGCGGCAAGCCCGCAGCAGCGAGGGCAGACCAAGGGCGCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAG
CGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGCAGAGCCAGCCAGGGCATCAGCAGCGCCCTGGCCTGGTACCAG
CAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCAGCCTGGAGAGCGGCGTGCCAGCAGATTCA
GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTG
CCAGCAGTTCAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGCCGCCATCGAGGTG
ATGTACCCCCCCCCCTACCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGCC
CCAGCCCCCTGTTCCCCGCCCCAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGTGGCCTGTACAG
CCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATG
AACATGACCCCCAGAAGACCCGCCCCACCAGAAAGCACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGAGACTTCGCCGCT
ACAGAAGCGCCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCCAGAGAAGAAAGTACAGAAGCAACAAGGGCGA
GAGCCCCGTGGAGCCCGCCGAGCCCTGCCACTACAGCTGCCCCAGAGAGGAGGAGGGCAGCACCATCCCCATCCAG
GAGGACTACAGAAAGCCCGAGCCCGCCTGCAGCCCCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCACCAGCGGCG
GCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGTGGTGAAGAGAGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTT
CATGAGACCCGTGCAGACCACCCAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGCAGATTCCCCGAGGAGGAGGGCGGCTGC
GAGCTGGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCG
ACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGAGAGGAGTACGACGT
GCTGGACAAGAGAAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAGCCCAGAAGAAAGAACCCCCAGGAGGGCCTGTAC
AACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGAAGAGGCAAGG
GCCACGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCC
CCCCAGAACCAGCGGCAGCGGCGCCACCAACTTACGCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGC
CCCATGGGCGTGCAGGTGGAGACCATCAGCCCCGCGACGGCAGAACCTTCCCCAAGAGAGGCCAGACCTGCGTGG
TGCACTACACCGGCATGCTGGAGGACGGCAAGAAGGTGGACAGCAGCAGAGACAGAAACAAGCCCTTCAAGTTCAT
GCTGGGCAAGCAGGAGGTGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCAGATGAGCGTGGGCCAGAGAGCCAAGCTG
ACCATCAGCCCCGACTACGCCTACGGCGCCACCGCCACCCCGGCATCATCCCCCCCCACGCCACCCTGGTGTTCG
ACGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAGGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGCCATGGTGGGCGCCCTGGA
GAGCCTGAGAGGCAACGCCGACCTGGCCTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGCGGCCACTGCCTGATCATCAACAAC
GTGAACTTCTGCAGAGAGAGCGCCTGAGAACCAGAACCGGCAGCAACATCGACTGCGAGAAGCTGAGAAGAAGAT
TCAGCAGCCTGCACTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACCGCCAAGAAGATGGTGTGGCCCTGCTGGAGCT
GGCCAGACAGGACCACGGCGCCCTGGACTGCTGCGTGGTGGTGTATCCTGAGCCACGGCTGCCAGGCCAGCCACCTG
CAGTTCCCCGGCGCCGTGTACGGCACCGACGGCTGCCCCGTGAGCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCA
CCAGCTGCCCCAGCCTGGGCGGCAAGCCCAAGCTGTTCTTCATCCAGGCTGCGGCGGCGAGCAGAAGGACCACGG

CTTCGAGGTGGCCAGCACCAGCCCCGAGGACGAGAGCCCCGGCAGCAACCCCGAGCCCGACGCCACCCCTTCCAG
GAGGGCCTGAGAACCTTCGACCAGCTGGACGCCATCAGCAGCCTGCCACCCCGAGCGACATCTTCGTGAGCTACA
GCACCTTCCCCGGCTTCGTGAGCTGGAGAGACCCCAAGAGCGGCAGCTGGTACGTGGAGACCCTGGACGACATCTT
CGAGCAGTGGGCCACAGCGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGAGAGTGGCCAACGCCGTGAGCGTGAAGGGCATC
TACAAGCAGATGCCCGGCTGCTTCAACTTCTGAGAAAGAAGCTGTTCTTCAAGACCAGCGCCAGCTGA.

[0032] 本发明中,所述嵌合抗原受体还包括启动子,所述启动子为EF1a、CMV-TAR或CMV中的任意一种或至少两种的组合。

[0033] 根据本发明,所述的嵌合抗原受体通过其编码的核酸序列转染到T细胞中表达。

[0034] 根据本发明,所述转染的方式为通过病毒载体、真核表达质粒或mRNA序列中的任意一种或至少两种的组合转染到T细胞,优选为通过病毒载体转染到T细胞。

[0035] 优选地,所述病毒载体为慢病毒载体和/或逆转录病毒载体,优选为慢病毒载体。

[0036] 第二方面,本发明提供一种重组慢病毒,将包含如第一方面所述的嵌合抗原受体的病毒载体与包装辅助质粒pNHP和pHEF-VSVG共转染哺乳细胞得到的重组慢病毒。

[0037] 根据本发明,所述哺乳细胞为293细胞,293T细胞或TE671细胞中的任意一种或至少两种的组合。

[0038] 第三方面,本发明提供一种组合物,所述组合物包括如第一方面所述的嵌合抗原受体和/或如第二方面所述的重组慢病毒。

[0039] 第四方面,本发明提供如第一方面所述的嵌合抗原受体、如第二方面所述的重组慢病毒或如第三方面所述的组合物在制备嵌合抗原受体T细胞及其在肿瘤治疗药物中的应用;

[0040] 优选地,所述肿瘤为血液相关的肿瘤疾病,所述血液相关的肿瘤疾病为白血病或淋巴瘤。

[0041] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0042] (1) 本发明的嵌合抗原受体通过对CD117肿瘤表面抗原进行特定的基因改造,改造后的抗体能够使抗原-抗体结合力更强;

[0043] (2) 本发明的CD117嵌合抗原受体能特异性的识别肿瘤表面抗原CD117,CD117在白血病及淋巴瘤中表达量高,相比于其他嵌合抗原受体和其他肿瘤抗原有更好的效果,使得CAR-T细胞的免疫效果增强,增强了CAR-T细胞的治疗效果;

[0044] (3) 本发明的嵌合抗原受体在进行CAR-T细胞回输后,肿瘤表面CD117的表达量不会降低,不容易逃过免疫机制,能够更好的进行治疗。

附图说明

[0045] 图1为CD117在急性T细胞白血病患者样本中表达量的流式细胞分析结果图,其中,图1(a)为急性T细胞白血病患者样本的流式细胞分析结果图,图1(b)为CD117在急性T细胞白血病细胞表达量;

[0046] 图2为CD117在急性髓系白血病患者样本中表达量的流式细胞分析结果图,其中,图2(a)为急性髓系白血病患者样本的流式细胞分析结果图,图2(b)为CD117在急性髓系白血病细胞表达量;

[0047] 图3为肿瘤细胞和CAR-T细胞混合培养的流式细胞分析结果图,其中,图3(a)肿瘤

细胞与T细胞混合培养,图3 (b) 肿瘤细胞与Mesothelin CAR-T细胞混合培养,图3 (c) 肿瘤细胞与本申请的CAR-T细胞混合培养。

具体实施方式

[0048] 为更进一步阐述本发明所采取的技术手段及其效果,以下结合附图并通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案,但本发明并非局限在实施例范围内。

[0049] 实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道商购获得的常规产品。

[0050] 实施例1:嵌合抗原受体的构建

[0051] (1) 通过全基因合成Secretory信号肽、CD117抗原结合结构域,CD8 α 和/或CD28跨膜结构域,CD28信号传导结构域、CD137信号传导结构域和/或CD27信号传导结构域,CD3 ζ 信号传导结构域、2A序列和胱天蛋白酶9结构域,即Secretory-CD117-CD28-CD137-CD27-CD3 ζ -2A-iCasp9;

[0052] 所述嵌合抗原受体的核苷酸序列SEQ ID NO.3如下:

[0053] ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCCTCCTGCTGATCCCCA
GGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCCGTGAAGAAGCCCGGCGAGAGCCTGAAGATCAGCTGCAAGGGCAGCGGC
TACAGATTCACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGAGACAGATGCCCGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCATCATCT
ACCCCGGCGACAGCGACACCAGATACAGCCCCAGCTTCCAGGGCCAGGTGACCATCAGCGCCGGAAGAGCATCAG
CACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCAGCGACACCGCCATGTACTACTGCGCCAGACACGGCAGAGGC
TACAACGGCTACGAGGGCGCCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCATGGTGACCGTGAGCAGCGGCAGCACCAGCG
GCAGCGGCAAGCCCGCAGCAGCGAGGGCAGCACCAAGGGCGCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAG
CGCCAGCGTGGGGCAGAGTGACCATCACCTGCAGAGCCAGCCAGGGCATCAGCAGCGCCCTGGCCTGGTACCAG
CAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCAGCCTGGAGAGCGGCGTGCCAGCAGATTCA
GCGGCAGCGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTG
CCAGCAGTTCAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGCCGCCATCGAGGTG
ATGTACCCCCCTACCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGCC
CCAGCCCCCTGTTCCCGGCCCCAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAG
CCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATG
AACATGACCCCCAGAAGACCCGGCCCCACCAGAAAGCACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGAGACTTCGCCGCT
ACAGAAGCGCCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCCAGAGAAGAAAGTACAGAAGCAACAAGGGCGA
GAGCCCCGTGGAGCCCGCCGAGCCCTGCCACTACAGCTGCCCCAGAGAGGAGGAGGGCAGCACCATCCCCATCCAG
GAGGACTACAGAAAGCCCGAGCCCGCTGCAGCCCCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCACCAGCGGCG
GCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGTGGTGAAGAGAGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTT
CATGAGACCCGTGCAGACCACCAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGCAGATTCCCCGAGGAGGAGGAGGGCGGCTGC
GAGCTGGGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCG
ACGCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGAGAGGAGTACGACGT
GCTGGACAAGAGAAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGCAAGCCAGAAGAAAGAACCCCGAGGAGGGCCTGTAC
AACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGAAGAGGCAAGG

[0068] (1) 在生物安全柜中,取Centricon管,用70%酒精消毒1次,然后用无菌PBS清洗3次;

[0069] (2) 每个Centricon P-20过滤管中加入18ml的病毒上清液,然后在2500g下离心30分钟或者直到病毒体积减小到0.5ml;

[0070] (3) 震荡过滤管,然后在400g下,离心2分钟,收集浓缩的病毒到收集杯中。最后将所有管中的病毒集中到一个离心管中。

[0071] 实施例4:CAR-T细胞的转染

[0072] 将活化后的T细胞以 5×10^6 接种到24孔板,加入50 μ l的浓缩目标基因的慢病毒,以100g离心力的速度,室温离心100分钟后,置于37 $^{\circ}$ C培养24h,加入1ml的含有2%人血清与细胞培养因子的AIM-V基,培养2-3天后,将细胞收获并计数,以 1×10^7 接种到12孔板,培养2-3天,用慢病毒载体携带GFP感染靶细胞并用annexinV/PI染色法观察细胞毒杀效果。

[0073] 结果如图1-2所示,如图1(a)-图1(b)所示,在急性T细胞白血病患者中有73%的肿瘤细胞高度表达CD117;如图2(a)-图2(b)所示,在急性髓系白血病患者中,有49.2%的肿瘤细胞高度表达CD117。可得,本发明选用的CD117作为嵌合抗原受体的靶点具有强的特异性,能够快速、准确的识别并毒杀淋巴白血病细胞。

[0074] 实施例5 CAR-T细胞的体外肿瘤杀伤

[0075] (1) 将对照T细胞、Mesothelin CAR T和制备的CAR-T细胞与肿瘤细胞共培养,置于37度5%CO₂培养箱共培养18h;

[0076] (2) 体外评估CAR-T细胞对癌细胞的识别杀伤功能,肿瘤细胞为钙黄绿素标记或感染LV-GFP;

[0077] 结果如图3(a)-图3(b)所示,从图3(a)可以看出,肿瘤细胞与T细胞共培养后,所示肿瘤细胞的比例为52.7%,从图3(b)可以看出,肿瘤细胞与Mesothelin CAR T细胞共培养后,所示肿瘤细胞的比例略有降低,为35.5%,从图3(c)可以看出,肿瘤细胞与制备的CAR-T细胞共培养后,所示肿瘤细胞的比例减少为16.7%,可见本申请制备的CAR-T细胞对肿瘤的杀伤效果最好。

[0078] 综上所述,本发明的嵌合抗原受体的CD117肿瘤表面抗原不容易发生突变,且相比于其他嵌合抗原受体和其他肿瘤抗原有更好的效果,靶点的表达量高,使得CAR-T细胞的免疫效果增强,增强了CAR-T细胞的治疗效果。

[0079] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细方法,但本发明并不局限于上述详细方法,即不意味着本发明必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

[0001]	SEQUENCE LISTING															
[0002]	<110> 深圳市免疫基因治疗研究院															
[0003]	<120> 一种基于CD117的嵌合抗原受体及其应用															
[0004]	<130> 2017															
[0005]	<160> 6															
[0006]	<170> PatentIn version 3.3															
[0007]	<210> 1															
[0008]	<211> 248															
[0009]	<212> PRT															
[0010]	<213> 人工合成序列															
[0011]	<400> 1															
[0012]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
[0013]	1			5							10				15	
[0014]	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Arg	Phe	Thr	Ser	Tyr
[0015]				20					25					30		
[0016]	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
[0017]			35					40					45			
[0018]	Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
[0019]		50					55					60				
[0020]	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Gly	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
[0021]	65					70					75				80	
[0022]	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
[0023]					85					90					95	
[0024]	Ala	Arg	His	Gly	Arg	Gly	Tyr	Asn	Gly	Tyr	Glu	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile
[0025]				100						105					110	
[0026]	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly
[0027]			115						120					125		
[0028]	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Ala	Ile	Gln
[0029]		130						135					140			
[0030]	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val
[0031]	145					150						155				160
[0032]	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala	Leu	Ala	Trp
[0033]				165						170						175
[0034]	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala
[0035]				180						185					190	
[0036]	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser
[0037]			195							200					205	
[0038]	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe
[0039]		210								215				220		
[0040]	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Phe	Asn	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly
[0041]	225					230							235			240

[0042]	Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0043]	245
[0044]	<210> 2
[0045]	<211> 1058
[0046]	<212> PRT
[0047]	<213> 人工合成序列
[0048]	<400> 2
[0049]	Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
[0050]	1 5 10 15
[0051]	Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Ala
[0052]	20 25 30
[0053]	Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly
[0054]	35 40 45
[0055]	Tyr Arg Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly
[0056]	50 55 60
[0057]	Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
[0058]	65 70 75 80
[0059]	Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Gly Lys
[0060]	85 90 95
[0061]	Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp
[0062]	100 105 110
[0063]	Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Arg Gly Tyr Asn Gly Tyr
[0064]	115 120 125
[0065]	Glu Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
[0066]	130 135 140
[0067]	Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Ser Glu Gly Ser
[0068]	145 150 155 160
[0069]	Thr Lys Gly Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
[0070]	165 170 175
[0071]	Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile
[0072]	180 185 190
[0073]	Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
[0074]	195 200 205
[0075]	Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg
[0076]	210 215 220
[0077]	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
[0078]	225 230 235 240
[0079]	Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser
[0080]	245 250 255
[0081]	Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala
[0082]	260 265 270
[0083]	Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser

[0084]	275	280	285
[0085]	Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro		
[0086]	290	295	300
[0087]	Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly		
[0088]	305	310	315
[0089]	Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile		
[0090]	325	330	335
[0091]	Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met		
[0092]	340	345	350
[0093]	Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro		
[0094]	355	360	365
[0095]	Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Ala Ser Gly Gly		
[0096]	370	375	380
[0097]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn		
[0098]	385	390	395
[0099]	Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys His Tyr Ser Cys		
[0100]	405	410	415
[0101]	Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg		
[0102]	420	425	430
[0103]	Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
[0104]	435	440	445
[0105]	Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Val		
[0106]	450	455	460
[0107]	Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met		
[0108]	465	470	475
[0109]	Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe		
[0110]	485	490	495
[0111]	Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
[0112]	500	505	510
[0113]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser		
[0114]	515	520	525
[0115]	Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu		
[0116]	530	535	540
[0117]	Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg		
[0118]	545	550	555
[0119]	Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln		
[0120]	565	570	575
[0121]	Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr		
[0122]	580	585	590
[0123]	Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp		
[0124]	595	600	605
[0125]	Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala		

[0126]	610	615	620
[0127]	Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Thr Ser Gly Ser Gly Ala Thr		
[0128]	625	630	635
[0129]	Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly		
[0130]	645	650	655
[0131]	Pro Met Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr		
[0132]	660	665	670
[0133]	Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu		
[0134]	675	680	685
[0135]	Glu Asp Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe		
[0136]	690	695	700
[0137]	Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly		
[0138]	705	710	715
[0139]	Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro		
[0140]	725	730	735
[0141]	Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His		
[0142]	740	745	750
[0143]	Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly		
[0144]	755	760	765
[0145]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Met Val Gly Ala Leu Glu Ser		
[0146]	770	775	780
[0147]	Leu Arg Gly Asn Ala Asp Leu Ala Tyr Ile Leu Ser Met Glu Pro Cys		
[0148]	785	790	795
[0149]	Gly His Cys Leu Ile Ile Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg Glu Ser Gly		
[0150]	805	810	815
[0151]	Leu Arg Thr Arg Thr Gly Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg		
[0152]	820	825	830
[0153]	Arg Phe Ser Ser Leu His Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr		
[0154]	835	840	845
[0155]	Ala Lys Lys Met Val Leu Ala Leu Leu Glu Leu Ala Arg Gln Asp His		
[0156]	850	855	860
[0157]	Gly Ala Leu Asp Cys Cys Val Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln		
[0158]	865	870	875
[0159]	Ala Ser His Leu Gln Phe Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys		
[0160]	885	890	895
[0161]	Pro Val Ser Val Glu Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys		
[0162]	900	905	910
[0163]	Pro Ser Leu Gly Gly Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly		
[0164]	915	920	925
[0165]	Gly Glu Gln Lys Asp His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu		
[0166]	930	935	940
[0167]	Asp Glu Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln		

[0168]	945	950	955	960
[0169]	Glu Gly Leu Arg Thr Phe Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro			
[0170]		965	970	975
[0171]	Thr Pro Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val			
[0172]		980	985	990
[0173]	Ser Trp Arg Asp Pro Lys Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr Leu Asp			
[0174]		995	1000	1005
[0175]	Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu			
[0176]		1010	1015	1020
[0177]	Leu Leu Arg Val Ala Asn Ala Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr Lys			
[0178]		1025	1030	1035
[0179]	Gln Met Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe			
[0180]		1040	1045	1050
[0181]	Lys Thr Ser Ala Ser			
[0182]		1055		
[0183]	<210> 3			
[0184]	<211> 3177			
[0185]	<212> DNA			
[0186]	<213> 人工合成序列			
[0187]	<400> 3			
[0188]	atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgc cttcctgctg	60		
[0189]	atccccagg tgcagctggt gcagagcggc gccgccgtga agaagcccgg cgagagcctg	120		
[0190]	aagatcagct gcaagggcag cggctacaga ttcaccagct actggatcgg ctgggtgaga	180		
[0191]	cagatgcccg gcaagggcct ggagtggatg ggcatcatct acccggcga cagcgacacc	240		
[0192]	agatacagcc ccagctcca gggccagtg accatcagcg ccggcaagag catcagcacc	300		
[0193]	gcctacctgc agtggagcag cctgaaggcc agcgacaccg ccatgtacta ctgcgccaga	360		
[0194]	cacggcagag gctacaacgg ctacgagggc gccttcgaca tctggggcca gggcaccatg	420		
[0195]	gtgaccgtga gcagcggcag caccagcggc agcggcaagc ccggcagcag cgagggcagc	480		
[0196]	accaagggcg ccatccagct gaccagagc cccagcagcc tgagcggcag cgtgggcgac	540		
[0197]	agagtacca tcacctgag agccagccag ggcatcagca gcgccctggc ctggtaccag	600		
[0198]	cagaagcccg gcaaggccc caagctgctg atctacgac ccagcagcct ggagagcggc	660		
[0199]	gtgcccagca gattcagcgg cagcggcagc ggcaccgact tcaccctgac catcagcagc	720		
[0200]	ctgagcccg aggacttcgc cacctactac tgccagcagt tcaacagcta ccccctgacc	780		
[0201]	ttcggcggcg gcaccaaggt ggagatcaag gccgccgcca tcgaggtgat gtaccccc	840		
[0202]	ccctacctgg acaacgagaa gagcaacggc accatcatcc acgtgaagg caagcacctg	900		
[0203]	tgccccagcc ccctgtccc cggccccagc aagcccttct gggctgctggt ggtggtgggc	960		
[0204]	ggcgtgctgg cctgctacag cctgctggtg accgtggcct tcatcatctt ctgggtgaga	1020		
[0205]	agcaagagaa gcagactgct gcacagcgac tacatgaaca tgacccccag aagacccggc	1080		
[0206]	cccaccagaa agcactacca gccctagcc cccccagag acttcgccgc ctacagaage	1140		
[0207]	gccagcggcg gcggcggcag cggcggcggc ggcagccaga gaagaaagta cagaagcaac	1200		
[0208]	aagggcgaga gcccgtgga gcccggcag ccctgccact acagctgcc cagagaggag	1260		
[0209]	gagggcagca ccatcccat ccaggaggac tacagaaagc ccgagcccgc ctgcagcccc	1320		

[0252]	Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp
[0253]	50 55 60
[0254]	Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg
[0255]	65 70 75 80
[0256]	Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys
[0257]	85 90 95
[0258]	Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly
[0259]	100 105 110
[0260]	Ile Ile Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys
[0261]	115 120 125
[0262]	Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Met Val
[0263]	130 135 140
[0264]	Gly Ala Leu Glu Ser Leu Arg Gly Asn Ala Asp Leu Ala Tyr Ile Leu
[0265]	145 150 155 160
[0266]	Ser Met Glu Pro Cys Gly His Cys Leu Ile Ile Asn Asn Val Asn Phe
[0267]	165 170 175
[0268]	Cys Arg Glu Ser Gly Leu Arg Thr Arg Thr Gly Ser Asn Ile Asp Cys
[0269]	180 185 190
[0270]	Glu Lys Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ser Leu His Phe Met Val Glu Val
[0271]	195 200 205
[0272]	Lys Gly Asp Leu Thr Ala Lys Lys Met Val Leu Ala Leu Leu Glu Leu
[0273]	210 215 220
[0274]	Ala Arg Gln Asp His Gly Ala Leu Asp Cys Cys Val Val Val Ile Leu
[0275]	225 230 235 240
[0276]	Ser His Gly Cys Gln Ala Ser His Leu Gln Phe Pro Gly Ala Val Tyr
[0277]	245 250 255
[0278]	Gly Thr Asp Gly Cys Pro Val Ser Val Glu Lys Ile Val Asn Ile Phe
[0279]	260 265 270
[0280]	Asn Gly Thr Ser Cys Pro Ser Leu Gly Gly Lys Pro Lys Leu Phe Phe
[0281]	275 280 285
[0282]	Ile Gln Ala Cys Gly Gly Glu Gln Lys Asp His Gly Phe Glu Val Ala
[0283]	290 295 300
[0284]	Ser Thr Ser Pro Glu Asp Glu Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro Asp
[0285]	305 310 315 320
[0286]	Ala Thr Pro Phe Gln Glu Gly Leu Arg Thr Phe Asp Gln Leu Asp Ala
[0287]	325 330 335
[0288]	Ile Ser Ser Leu Pro Thr Pro Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser Thr
[0289]	340 345 350
[0290]	Phe Pro Gly Phe Val Ser Trp Arg Asp Pro Lys Ser Gly Ser Trp Tyr
[0291]	355 360 365
[0292]	Val Glu Thr Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp
[0293]	370 375 380

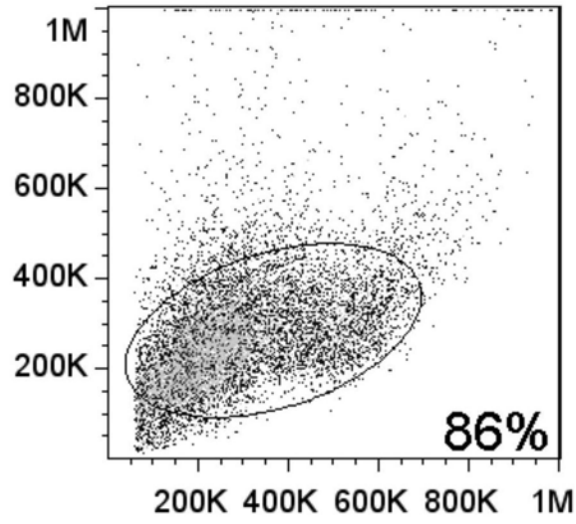


图1 (a)

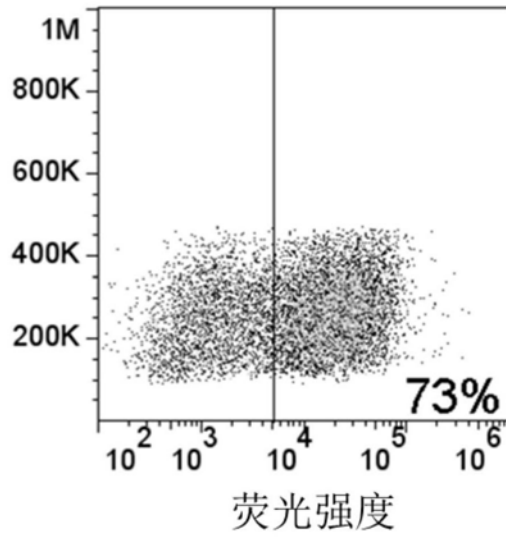


图1 (b)

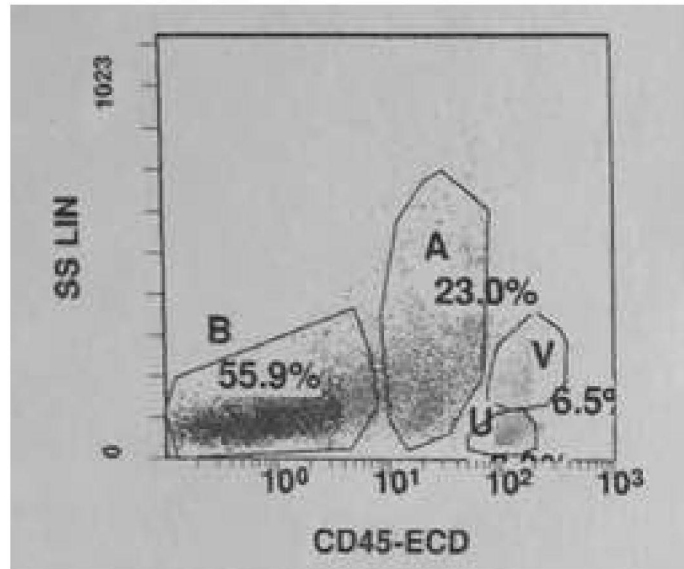


图2 (a)

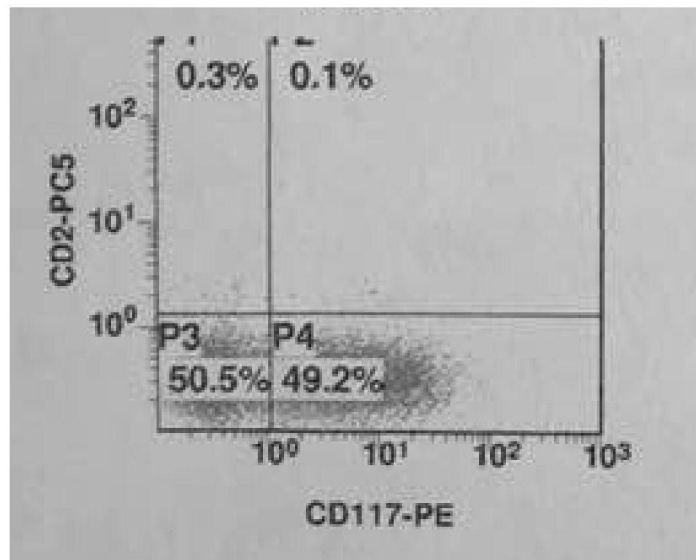


图2 (b)

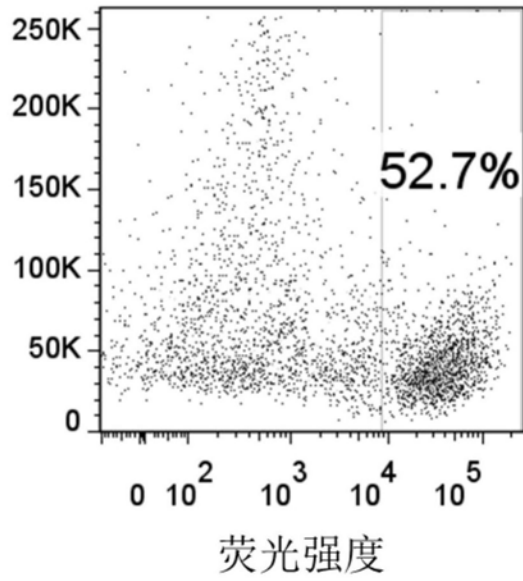


图3 (a)

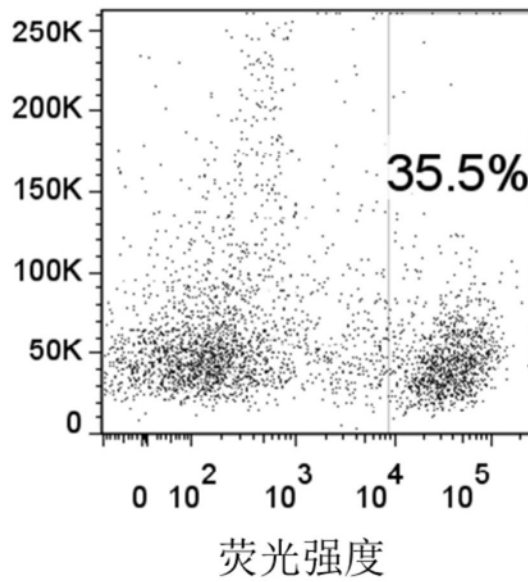


图3 (b)

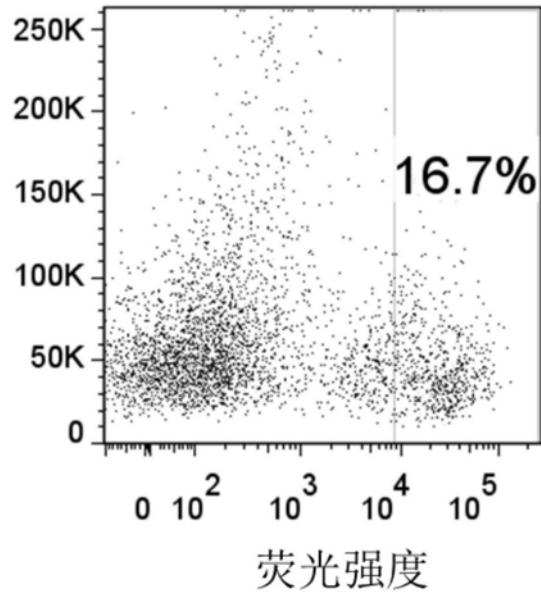


图3(c)