



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108218999 B

(45) 授权公告日 2021.06.11

(21) 申请号 201810001910.X	C12N 15/867 (2006.01)
(22) 申请日 2018.01.02	C12N 5/10 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 108218999 A	A61K 35/17 (2015.01) A61P 35/00 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
(43) 申请公布日 2018.06.29	(56) 对比文件
(73) 专利权人 广东省人民医院 (广东省医学科学院) 地址 510080 广东省广州市中山二路106号	CN 104177499 A, 2014.12.03 WO 2015188141 A2, 2015.12.10 CN 107106665 A, 2017.08.29 CN 107337737 A, 2017.11.10
(72) 发明人 翁建宇 陈晓梅 赖沛龙 杜欣 王玉连 王惊华 耿素霞	审查员 吴胜
(74) 专利代理机构 广州新诺专利商标事务有限公司 44100 代理人 刘菁菁	
(51) Int. Cl. C07K 19/00 (2006.01)	权利要求书1页 说明书6页 序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

分泌IL-7的嵌合抗原受体、病毒载体、表达细胞及制备方法与药物

(57) 摘要

本发明提供了一种分泌IL-7的嵌合抗原受体、病毒载体、表达细胞及制备方法与药物,该分泌IL-7的嵌合抗原受体包含能够结合抗原的胞外结构域、跨膜结构域、胞内结构域和IL-7细胞因子结构域,IL-7细胞因子结构域是通过自切割肽与胞内结构域非融合连接。本发明在原来CAR表达载体上加入自切割肽(2A肽)和IL-7基因序列,从而使设计的CAR T能够表达分泌IL-7,增强肿瘤杀伤效应,改善肿瘤微环境。本发明的嵌合抗原受体T细胞显著提高CAR T体内、外肿瘤杀伤功能的改善。

1. 一种分泌IL-7的嵌合抗原受体,其特征在于:包含能够结合抗原的胞外结构域、跨膜结构域、胞内结构域和IL-7细胞因子结构域,IL-7细胞因子结构域是通过自切割肽与胞内结构域非融合连接,所述嵌合抗原受体自N末端侧开始依次包括抗肿瘤抗原抗体的单链可变区作为胞外结构域、CD28分子的跨膜结构域和4-1BB胞内结构域、CD3 ζ 胞内结构域、2A肽和IL-7细胞因子结构域,能够结合抗原的胞外结构域是CD19 ScFv,IL-7细胞因子结构域含有如列表序列1所示的核苷酸序列,自切割肽的核苷酸序列如列表序列2所示。

2. 一种包含如权利要求1所述的嵌合抗原受体的慢病毒载体。

3. 一种嵌合抗原受体表达细胞,其特征在于:引入了如权利要求1所述的嵌合抗原受体。

4. 根据权利要求3所述的嵌合抗原受体表达细胞,其特征在于:所述嵌合抗原受体表达细胞为T细胞或含有T细胞的细胞群。

5. 一种制备如权利要求3或4所述的嵌合抗原受体表达细胞的方法,其特征在于包括将如权利要求1所述的嵌合抗原受体引入细胞的步骤。

6. 一种预防或治疗肿瘤的药物,其特征在于包含如权利要求1所述的嵌合抗原受体或如权利要求2所述的慢病毒载体或如权利要求3或4所述的嵌合抗原受体表达细胞。

分泌IL-7的嵌合抗原受体、病毒载体、表达细胞及制备方法与药物

背景技术

[0001] 嵌合抗原受体 (CAR, Chimeric Antigen Receptors) T细胞是有望治愈肿瘤的里程碑事件, CAR-T技术是应用基因改造技术, 将一段识别肿瘤抗原的单链抗体 (single chain fragment variable, scFv) 和胞内活化基序重组基因转染至T淋巴细胞上以达到更好的识别及杀伤肿瘤的作用。CAR-T分子通常包括胞外绞链区、跨膜区和胞内信号区。其中胞外绞链区是由单链抗体的重链和轻链可变区通过一条肽段连接而形成; 跨膜区则主要来自于如CD8、CD28或4-1BB等分子的跨膜区; 胞内信号区则主要来自于CD28、4-1BB、CD3zeta、CD27或OX-40等T细胞传导信号分子的胞内段嵌合体。高亲合力, 高特异性的scFv决定CAR-T靶向某种抗原, 一旦结合抗原, CAR的胞内段会传输活化以及共刺激信号给T细胞, 激活T细胞进而有效靶向杀伤肿瘤细胞。T细胞的激活需要两种活化信号, 即T细胞表面的TCR-CD3与MHC-I分子结合为活化的第一信号, 决定T细胞对肿瘤细胞的杀伤活性; T细胞表面的共刺激分子与相应配体结合为活化的第二信号, 决定T细胞增殖。简而言之, CAR-T细胞通过抗原-抗体识别模式对肿瘤细胞表面的特异分子进行识别, 然后通过其胞内的信号传导进行激活、增殖并发挥细胞杀伤功能。

[0002] CAR分子的结构设计经历多代的研究发展。第一代CAR分子的结构包含识别肿瘤细胞表面抗原的scFv、跨膜结构域和激活T细胞的TCR复合物CD3zeta的胞内结构域。由于第一代CAR的信号域是单一信号分子, 缺乏共刺激信号, 第一代CAR-T细胞在体内存活时间短, 对肿瘤细胞的杀伤力弱, 疗效并不理想。(JensenMC, PopplewellL, CooperLJ, et al. Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humane[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2010, 16 (9) :1245-1256.) 第二代、三代CAR则在第一代的基础上分别引入一个或者多个共刺激信号, 目前已经报导的共刺激信号包括CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BB、OX-40、ICOS-L、ICAM、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HEVM、淋巴毒素β受体、ILT3、ILT4、HVEM, 显著提高了CAR-T细胞的增殖能力和抗肿瘤作用, 延长CAR-T细胞在体内的持续时间。(MaQ, GomesEM, LoAS, et al. Advanced generation anti-prostate specific membrane antigen designer T cells for prostate cancer immunotherapy[J]. Prostate, 2014, 74 (3) :286-296.) 宾夕法尼亚大学的研究发现给复发/难治的慢性淋巴细胞白血病患者输注自体含有4-1BB共刺激信号的二代CD19-CAR-T细胞在体内能扩增超过1000倍, 而且在血液和骨髓中存活的时间也超过6个月。

[0003] 靶向CD19分子的CAR-T细胞在针对复发/难治的前体B细胞血液肿瘤的治疗上获得了较好的临床疗效, 部分研究结果显示完全缓解率达到80%, 已经成为肿瘤免疫治疗中最为引人关注的领域。然而, 迄今为止, 下述问题尚未得到解决: CAR-T细胞发挥免疫杀伤作用, 依赖CAR-T细胞和肿瘤细胞相互接触, 并需克服肿瘤局部免疫抑制微环境。由于实体瘤往往伴随有成纤维细胞包裹瘤体, 在肿瘤微环境中存在大量的免疫抑制细胞、因子和调控

分子,如何使CAR-T细胞迁移到肿瘤部位,克服肿瘤免疫抑制微环境,发挥CAR-T细胞杀伤作用则是将CAR-T细胞治疗技术全面推向临床应用的重大挑战。因此,制备更有效的CAR-T细胞及用于制备所述CAR-T细胞的表达载体迫在眉睫。(Xia AL,Wang XC,Lu YJ,Lu XJ,Sun B.Chimeric-antigen receptor T (CAR-T) cell therapy for solid tumors:challenges and opportunities.Oncotarget.2017Jul 18;8 (52) :90521-90531.)

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的之一在于进一步优化CAR设计,克服肿瘤免疫抑制微环境、血液肿瘤易复发的问题,提供包含能够分泌IL-7的嵌合抗原受体。

[0005] 本发明的目的之二在于提供包含能够分泌IL-7的嵌合抗原受体的慢病毒载体。

[0006] 本发明的目的之三在于提供利用所述包含能够分泌IL-7的嵌合抗原受体或所述的慢病毒载体制备的表达包含能够分泌IL-7的嵌合抗原受体的免疫细胞。

[0007] 本发明的之四在于提供所述包含能够分泌IL-7的嵌合抗原受体或所述的慢病毒载体在制备包含能够分泌IL-7的嵌合抗原受体在靶向肿瘤细胞的药物中的应用。

[0008] 本发明通过以下技术方案实现上述目的:

[0009] 第一方面,本发明提供了一种嵌合抗原受体,其包含能够结合抗原的胞外结构域、跨膜结构域、胞内结构域和IL-7细胞因子结构域,其中,IL-7细胞因子结构域是通过自切割肽(2A肽)与胞内结构域非融合连接。

[0010] 对于上述嵌合抗原受体分子,作为优选,所述抗原可以是肿瘤抗原,所述肿瘤抗原例如包括:5T4、 $\alpha 5\beta 1$ -整联蛋白、707-AP、AFP、ART-4、B7H4、BAGE、 β -联蛋白/m、Bcr-abl、MN/CIX抗体、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CD4、CD19、CD20、CD22、CD25、CDC27/m、CD30、CD33、CD52、CD56、CD80、CDK4/m、CEA、CT、Cyp-B、DAM、EGFR、ErbB3、ELF2M、EMMPRIN、EpCam、ETV6-AML1、G250、GAGE、GnTV、Gp100、HAGE、HER-2/new、HLA-A*0201-R170I、HPV-E7、HSP70-2M、HST-2、hTERT(或hTRT)、iCE、IGF-1R、IL-2R、IL-5、KIAA0205、LAGE、LDLR/FUT、MAGE、MART-1/melan-A、MART-2/Ski、MC1R、Mesothelin、肌球蛋白/m、MUC1、MUM-1、MUM-2、MUM3、NA88-A、PAP、蛋白酶-3、p190minor bcr-abl、Pml/RAR α 、PRAME、PSA、PSM、PSMA、RAGE、RU1或RU2、SAGE、SART-1或SART-3、生存蛋白、TEL/AML1、TGF β 、TPI/m、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、VEGF、WT1、NY-Eso-1或NY-Eso-B等等;进一步优选地,所述肿瘤抗原为CD19。本发明专利所提抗原也可以是在自身免疫性疾病中出现的炎性细胞表面分子或导致自身免疫的TCR。

[0011] 优选地,所述嵌合抗原受体自N末端侧开始依次包括抗肿瘤抗原抗体的单链可变区作为胞外结构域、CD28分子的跨膜结构域和4-1BB胞内结构域、CD3 ζ 胞内结构域、2A肽和IL-7基因序列。

[0012] 第二方面,本发明提供了一种包含如上所述的嵌合抗原受体的慢病毒载体。

[0013] 第三方面,本发明提供了一种嵌合抗原受体表达细胞,其中引入了如第一方面所述的嵌合抗原受体;优选地,所述细胞为T细胞或含有T细胞的细胞群。

[0014] 第四方面,本发明提供了一种制备如第三方面所述的嵌合抗原受体表达细胞的方法,其包括将如第一方面所述的嵌合抗原受体引入细胞的步骤;优选地,所述细胞为T细胞或含有T细胞的细胞群。

[0015] 第五方面,本发明提供了一种如第一方面所述的嵌合抗原受体、如第二方面所述

的慢病毒载体或如第三方面所述的嵌合抗原受体表达细胞在制备治疗肿瘤的药物中的用途。

[0016] 优选地,所述肿瘤为实体瘤或血液瘤。

[0017] 在本发明提供的该用途的具体实施例中,所述肿瘤为B-ALL。值得注意的是,本发明的CAR特征在于它包含分泌IL-7细胞因子结构域。

[0018] IL-7是细胞免疫应答过程中的关键因子,对于B细胞、胸腺细胞及外周成熟的T细胞等均有促进生长的活性,IL-7可以拮抗TGF- β ,理论上可以改善肿瘤微抑制环境,激活与调节免疫细胞,介导T、B细胞活化、增殖及分化在肿瘤治疗中扮演重要作用。(叶琳,赵洪文. IL-7的生物学特性及其临床应用前景.《国际呼吸杂志》,2007,27(15):1161-1164)为进一步优化CAR设计,克服肿瘤免疫抑制微环境、血液肿瘤易复发的问题,本发明在原来CAR表达载体上加入自切割肽(2A肽)和IL-7基因序列,从而使设计的CAR T能够表达分泌IL-7,增强肿瘤杀伤效应,改善肿瘤微环境。本发明的嵌合抗原受体T细胞显著提高CAR T体内、外肿瘤杀伤功能的改善。

附图说明

[0019] 图1a为不含有分泌IL-7细胞因子基因序列的嵌合抗原受体病毒载体。

[0020] 图1b为含有分泌IL-7细胞因子基因序列的嵌合抗原受体病毒载体。

[0021] 图2显示GFP T、CAR19 T和IL-7 CAR19T细胞对表达CD19的NALM6-GL细胞的体外杀伤效应,显示出IL-7 CAR19T优于GFP T、CAR19 T。

[0022] 图3显示GFP T、CAR19 T和IL-7 CAR19T细胞对表达CD19的Raji细胞的体外杀伤效应,显示出IL-7 CAR19T优于GFP T、CAR19 T。

[0023] 图4显示GFPT、CAR19-GFP T、IL-7 CAR19-GFP T细胞IL-7分泌情况,结果显示对照组GFPT、CAR19-GFP T不分泌IL-7,而IL-7 CAR19-GFP T可以分泌较高IL-7细胞因子。*P<0.05。

[0024] 图5显示CAR19C3aR T能显著降低NCG小鼠体内NALM6肿瘤细胞的负荷优于GFP T、CAR19 T。*P<0.05。

[0025] 图6显示IL-7 CAR19T较GFP T、CAR19 T更能显著延长NCG小鼠生长期。*P<0.05。

[0026] 具本实施方式

[0027] 下面结合实施例,更具体地说明本发明的内容。应该理解,本发明的实施并不局限于下面的实施例,对本发明所做的任何形式上的变通和/或改变都落入本发明保护范围。实施例中未注明具体条件的实施方法,通常按照常规条件中所述的条件或按照制造厂商所建议的条件。

[0028] 实施例1、含有抗CD19 ScFv-4-1BB-CD3 ζ (CAR19)、抗CD19 ScFv-4-1BB-CD3 ζ -IL-7(IL-7 CAR19)质粒的制备

[0029] 按如下步骤制备本发明携带含分泌IL-7细胞因子的嵌合抗原受体基因的质粒:

[0030] (1)通过基因合成、分子克隆等手段得到含抗CD19 ScFv-4-1BB-CD3 ζ (CAR19)的质粒pUC57-CAR19,其基因包含抗CD19单抗ScFv、CD28跨膜区和4-1BB、CD3 ζ 胞内区,即CD19 ScFv-4-1BB-CD3 ζ ,如图1所示。

[0031] (2)通过基因合成、分子克隆等手段得到含抗CD19 ScFv-4-1BB-CD3 ζ -IL-7(IL-7

CAR19)的质粒pUC57-IL-7 CAR19,其基因包含抗CD19单抗ScFv、CD28跨膜区和4-1BB、CD3ζ胞内区和IL-7细胞因子核酸系列,即CD19 ScFv-4-1BB-CD3ζ-IL-7。

[0032] (3)通过内切酶Pme1和Sep1对所得到的pUC57-CAR19质粒进行酶切,获得CAR19基因,然后将CAR19基因连接至慢病毒载体pWPXLd-GFP,构建pWPXLd-CAR19-GFP。

[0033] 实施例2 CAR质粒的慢病毒包装

[0034] 使用实施例1制备的本发明CAR质粒以及相关对照质粒、通过慢病毒包装,获得分别表达GFP(空白对照)、CAR19-GFP(对照)、IL-7 CAR19-GFP的三种慢病毒。本实施例2和3中,将含CAR质粒统一描述为为pWPXLd-CAR-GFP质粒,将过表达CAR的慢病毒统一描述为CAR慢病毒。

[0035] 具体步骤如下:

[0036] (1)在10cm培养皿中培养293T细胞,培养基为:DMEM高糖培养基+10%FBS(胎牛血清)+1%双抗(100×青霉素-链霉素混合溶液);

[0037] (2)待150mm培养皿中的293T细胞密度达80-90%时,更换培养基:DMEM高糖培养基+1%FBS+1%双抗;

[0038] (3)更换培养基培养2-6小时后,用PEI分别将pWPXLd-CAR-GFP二种质粒(即,分别包含CAR19、IL-7 CAR19)或空白对照质粒pWPXLd-GFP分别与慢病毒包装辅助质粒pMD2.G、psPAX2共同转入293T细胞,加入试剂及剂量如下表1:

[0039] 表1

[0040]	试剂	剂量
	pWPXLd-CAR-GFP 二种质粒或对照质粒	9ug
	pMD2.G 辅助质粒	3ug
[0041]	psPAX2	12 ug
	PEI	72 ug

[0042] (4)分别转化后24、48和72小进,收集培养基上清,并加入新鲜培养基(DMEM高糖培养基+1%FBS+1%双抗);

[0043] (5)培养基上清收集完毕,将上清2500g离心0.5小时后;

[0044] (6)取离心上清,用0.45um过滤器过滤后,利用超高速离心机28000rpm离心1.5小时;

[0045] (7)超高速离心后,轻轻去除上清,加入200u1 PBS,置于4度12-16小时溶解,即得2种CAR慢病毒或空白对照GFP慢病毒;

[0046] (8)病毒溶解后,收集病毒分装于冻存管,冻存于-80℃待用。

[0047] 实施例3使用包装的CAR病毒感染人体T细胞

[0048] (1)T细胞的分离纯化:通过Ficoll密度梯度法分离出血液中的单个核细胞,经红细胞裂解液裂解去除红细胞后,再通过MACS Pan-T磁珠分选出T细胞;

[0049] (2)分选出来的T细胞用培养基(AIM-V培养基+5%FBS+青霉素100U/ml+链霉素0.1mg/ml)稀释至细胞浓度 2.5×10^6 个/ml待用;

[0050] (3) 通过包被CD2、CD3、CD28抗体的磁珠(产品来源:德国美天旋)刺激T细胞,即包被磁珠与T细胞以1:2比例混合,T细胞最终密度应为 5×10^6 个/ml/cm²。混合后,置于37℃、5%CO₂培养箱培养刺激48小时。

[0051] (4) 慢病毒转染T细胞:将激活的T细胞-磁珠混合液中的磁珠通过磁场作用去除,300g离心5min,去上清,用新鲜培养基重悬,分别加入表达CAR和GFP(空白对照)慢病毒(病毒加入量为MOI=10)后,加入8μg/ml的polybrene和300IU/ml IL-2。置于37℃,5%CO₂培养箱培养24h后,300g离心5min,去上清,用含300IU/ml IL-2的新鲜培养基重悬,即得过表达CAR的T细胞。

[0052] (5) CAR T细胞扩增:将CAR T细胞密度维持在 1×10^6 个/ml左右,每2-3天进行一次半量换液。两周后,CAR T细胞数可扩增100倍。GFP阳性的细胞为转染成功的细胞,GFP阳性比例通过流式进行检测,即得到2种CAR T细胞(分别简称CAR19-GFP、IL-7 CAR19-GFP)或空白对照T细胞(GFP-T)的比例。

[0053] 实施例4 CAR T细胞体外识别杀伤肿瘤的效应

[0054] 将实施例3制备的GFP T(空白对照)、CAR19-GFP T(对照)、IL-7 CAR19-GFP T细胞以不同比例分别与 5×10^4 的肿瘤细胞混合,加入到96孔U型板中,每组设3个复孔,并设单独加肿瘤细胞组作为阳性对照,250g离心5min后,置于37度5%CO₂培养箱共培养24h;体外比较GFP T、CAR19-GFP T、IL-7 CAR19-GFP T细胞对血液肿瘤的识别杀伤功能时,肿瘤细胞选用NALM6-GL、Raji二种白血病或淋巴瘤细胞系。CFSE/PI双染细胞毒性检测方法评估定量评估杀伤效率:1.准备效应细胞(GFP T(空白对照)、CAR19-GFP T(对照)、IL-7 CAR19-GFP T细胞)和靶细胞,计数,将CAR T细胞的GFP%用同一批次的WT细胞进行校准,使各组GFP%大小相近;用1640+10%FBS+1%P/S培养基稀释T细胞 8×10^6 /ml。2.所需量的靶细胞(Nalm6细胞、Raji细胞),1ml 1640培养基重悬,加入5umol CSFE,37℃避光孵育20min后,加入10ml培养基终止5min,离心,去上清,靶细胞稀释为 5×10^5 /ml。3.将T细胞进行倍比稀释,用排枪在V型底96孔板内预先加入100ul新鲜培养基,第一排不加,然后第一排加入T细胞100ul,第二排加入T细胞100ul,然后用排枪吹打第二排5次以上,吸取100ul放入第三排,以此类推,将T细胞顺着排数进行倍比稀释,全部孔内加入100ul靶细胞,使T细胞与靶细胞以不同比例混合(16:1,8:1,4:1,2:1,1:1,1:2,1:4)。4.将混合好的细胞放培养箱内培养24小时。5.将96孔板内的细胞吸取,离心。6.用4℃的PBS洗涤一次,加入100ul 1x IP Buffer,再加入5ul PI,避光孵育15min后,再加入200ul 1x IP Buffer,1小时内上机检测。7.杀伤率计算:以不加T细胞的靶细胞孔作为参照,杀伤百分比=目的孔CSFE+PI+%-对照孔CSFE+PI+%。结果表明,IL7 CAR19和对表达CD19的肿瘤靶细胞的体外杀伤效率都显著高于CAR19 T细胞。(图2、图3)

[0055] 实施例5 CAR T细胞IL-7细胞因子检测

[0056] 为比较GFPT、CAR19-GFPT、IL-7 CAR19-GFP T细胞IL-7分泌情况,将实施例制备的GFP T(空白对照)、CAR19-GFP T(对照)、IL-7 CAR19-GFP T细胞培养3天,回收上清液,按市售的ELISA试剂盒(R&D systems公司)测定IL-7的浓度。检测结果显示对照组GFPT、CAR19-GFP T均未检测到IL-7细胞因子,IL-7 CAR19-GFP T检测到IL-7细胞因子为400pg/ml以上。也进一步验证IL-7CAR19-GFP T可以分泌IL-7细胞因子。(图4)

[0057] 实施例6 IL-7 CAR19 T细胞体内识别杀伤肿瘤

[0058] 为比较CAR19 T、IL-7 CAR19 T细胞的体内识别杀伤肿瘤的效应,将同等数量(5×10^5)的NALM6细胞分别通过尾静脉7只NCG (NOD/SCID IL2rg^{-/-})免疫缺陷小鼠体内;NALM6细胞移植后第2天和第8天(肿瘤细胞移植当天为第0天),将 5×10^6 个T细胞(三组:GFP T、CAR19 T、IL-7 CAR19 T,每组注射6只小鼠)静脉注射入已移植NALM6细胞的NSI免疫缺陷小鼠体内。取NCG小鼠尾静脉血,用流式检测CD19表达情况,评估NCG小鼠体内NALM6肿瘤细胞的负荷,分析数据结果表明,IL-7 CAR19 T能显著降低NCG小鼠体内NALM6肿瘤细胞的负荷(图5),并继续观察小鼠生存期,直接死亡,最终结果IL-7 CAR19 T能显著延长NCG小鼠生长期(图6)。提示分泌IL-7的CAR-T,可显著改善第二代CAR T细胞(CAR19T)对肿瘤的杀伤效果,延长NCG小鼠肿瘤模型。

[0059] 通过以上实验结果,对比实验组和对照组CAR T对肿瘤识别杀伤功能的强弱,验证了分泌IL-7的CAR T可以改善体内、外肿瘤杀伤功能。

[0060] 申请人声明通过上述实施实例来说明本发明的产品、用途及其使用方式,但本发明并不局限于上述详细用途或使用方式,即不意味着本发明必须依赖上述详细用途和使用方式才能实验。所属技术领域的人员应该明了,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] 序列表
- [0002] <110> 广东省人民医院(广东省医学科学院)
- [0003] <120> 分泌IL-7的嵌合抗原受体、病毒载体、表达细胞及制备方法与药物
- [0004] <160> 2
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 531
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> artificial
- [0010] <220>
- [0011] <221> misc_feature
- [0012] <400> 1
- [0013] atgttccatg tttcttttag gtatatcttt ggacttcctc ccctgaccc tgttctgttg 60
- [0014] ccagtagcat catctgattg tgatattgaa ggtaaagatg gcaaacaata tgagagtgtt 120
- [0015] ctaatggtca gcatcgatca attattggac agcatgaaag aaattggtag caattgcctg 180
- [0016] aataatgaat ttaacttttt taaaagacat atctgtgatg ctaataagga aggtatgttt 240
- [0017] ttattccgtg ctgctcgcaa gttgaggcaa tttcttaaaa tgaatagcac tggatgtttt 300
- [0018] gatctccact tattaagaat ttcagaaggc acaacaatac tgttgaactg cactggccag 360
- [0019] gttaaaggaa gaaaaccagc tgccctgggt gaagcccaac caacaaagag tttggaagaa 420
- [0020] aataaatctt taaaggaaca gaaaaactg aatgacttgt gtttcctaaa gagactatta 480
- [0021] caagagataa aaacttggtg gaataaaatt ttgatgggca ctaaagaaca c 531
- [0022] <210> 2
- [0023] <211> 54
- [0024] <212> DNA
- [0025] <213> artificial
- [0026] <220>
- [0027] <221> misc_feature
- [0028] <400> 2
- [0029] gagggcagag gaagtcttct aacatgcggt gacgtggagg agaatcccg ccct 54



图1a



图1b

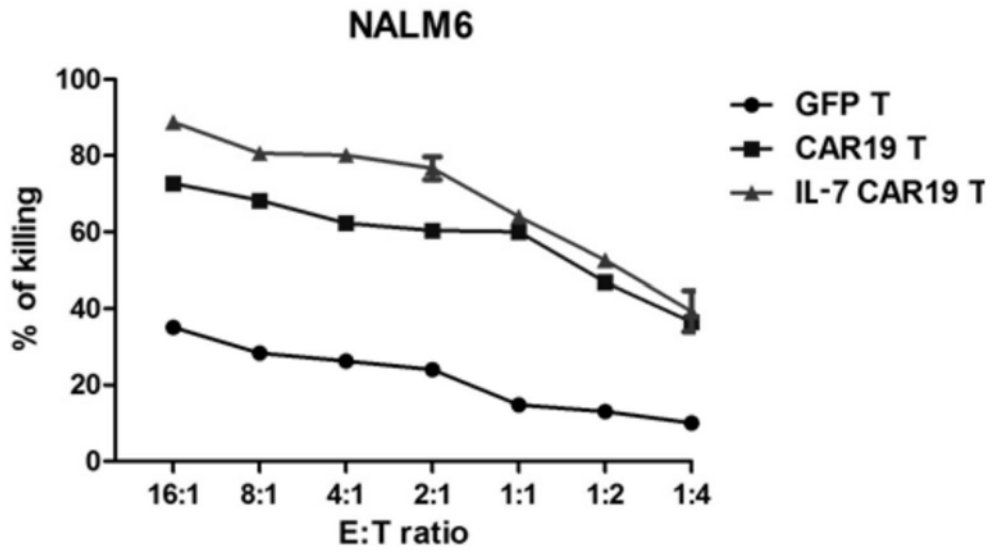


图2

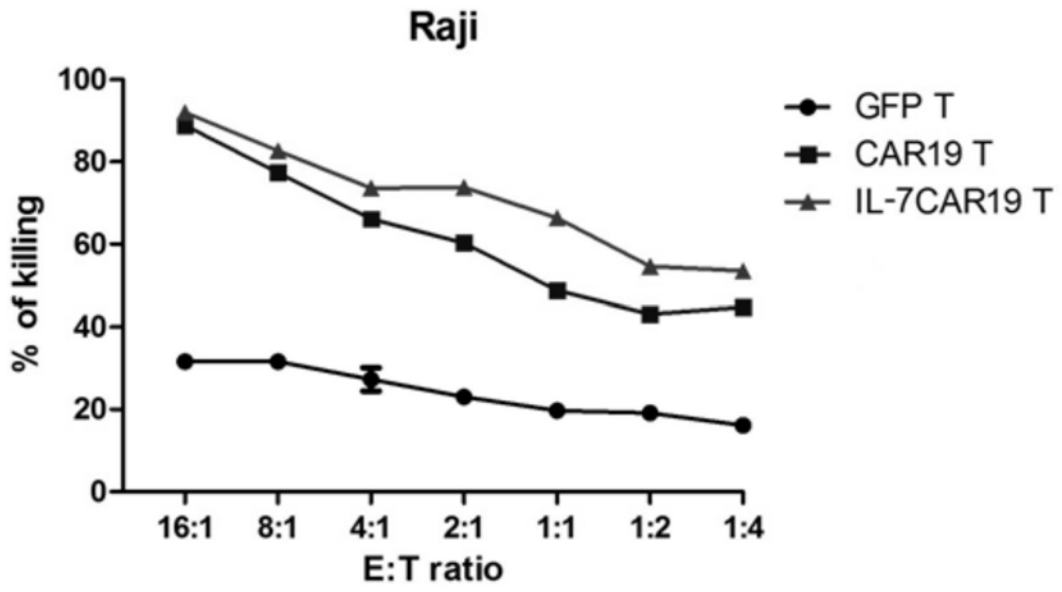


图3

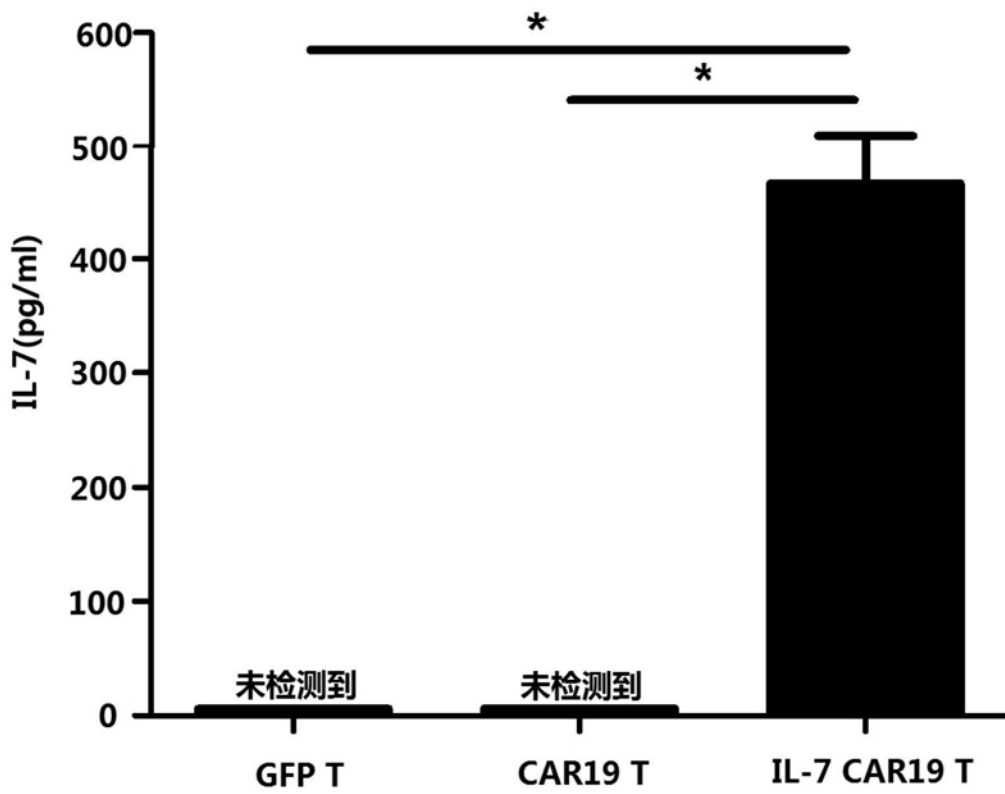


图4

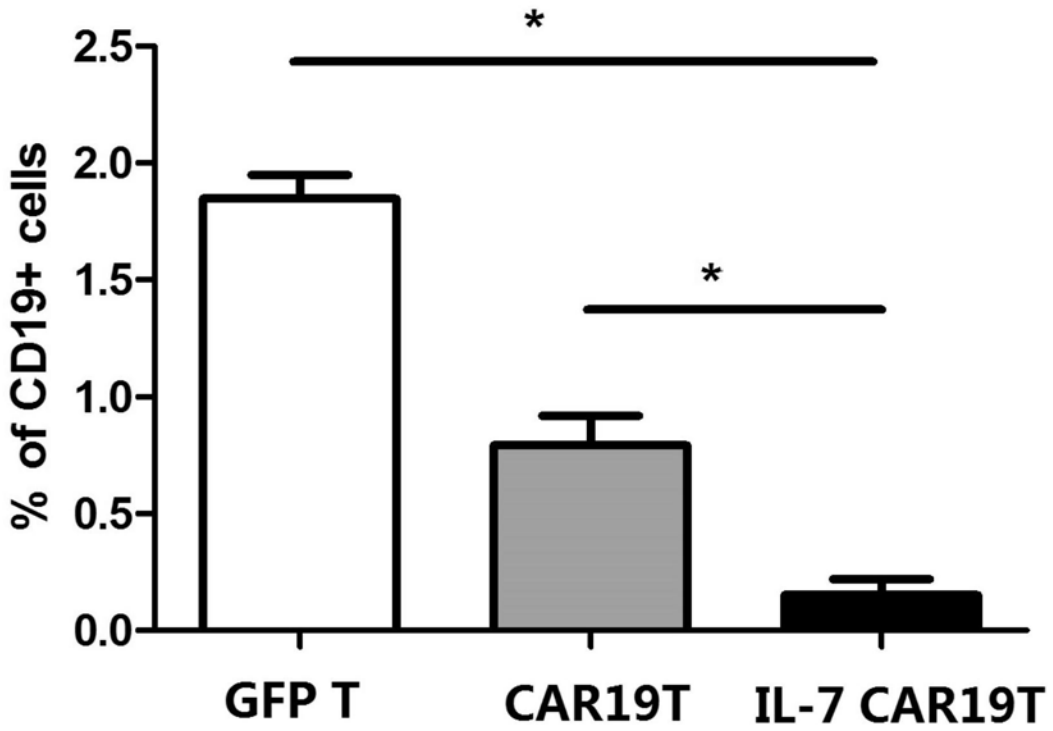


图5

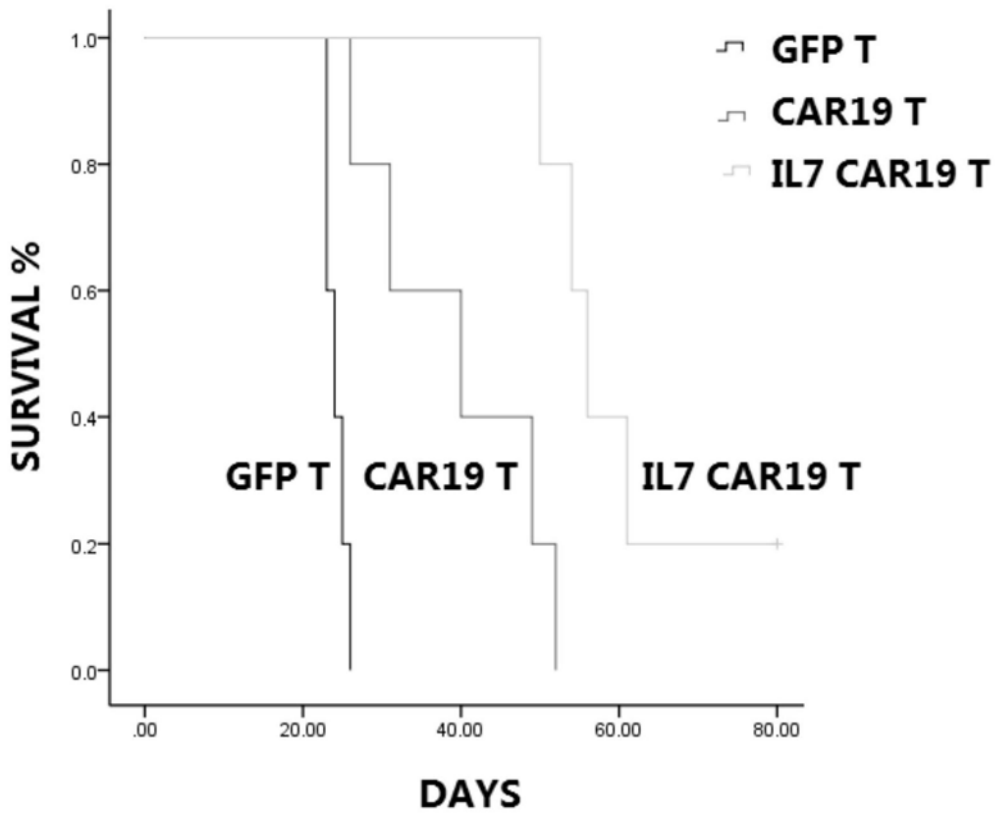


图6