



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113201063 B

(45) 授权公告日 2022. 04. 19

(21) 申请号 202010760960.3

C07K 19/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.07.31

C12N 15/62 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12N 15/867 (2006.01)

申请公布号 CN 113201063 A

C12N 5/10 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.08.03

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(73) 专利权人 北京市神经外科研究所

审查员 李一峰

地址 100070 北京市丰台区南四环西路119号

(72) 发明人 张伟 江涛 翟优 李冠璋

(74) 专利代理机构 北京英创嘉友知识产权代理
事务所(普通合伙) 11447

代理人 耿超

(51) Int. Cl.

C07K 14/715 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

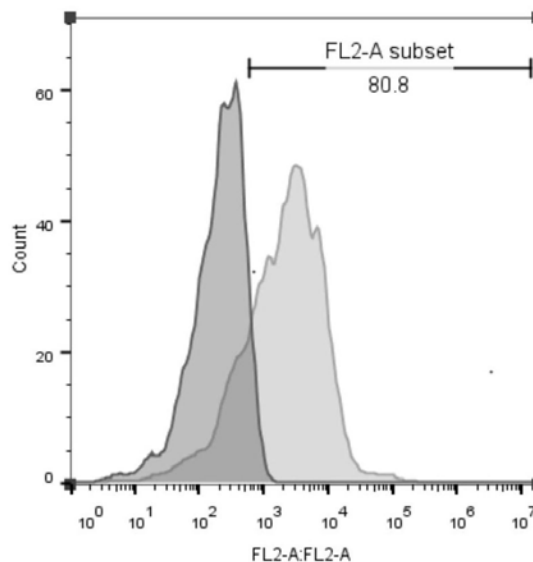
序列表12页 附图2页

(54) 发明名称

IL7R α 的截短体及其在制备治疗肿瘤的药物中的用途

(57) 摘要

本公开涉及一种IL7R α 的截短体,该IL7R α 的截短体的氨基酸序列包括SEQ ID NO.1所示的序列。表达含有上述IL7R α 截短体的嵌合抗原受体的T细胞,能够有效杀伤肿瘤细胞。



1. 一种IL7R α 的截短体,其特征在于,该IL7R α 的截短体的氨基酸序列为SEQ ID NO.1所示的序列。
2. 一种核酸,其特征在于,该核酸编码权利要求1所述的IL7R α 的截短体。
3. 根据权利要求2所述的核酸,其中,所述核酸具有SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列。
4. 一种融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白含有依次连接的抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域;所述胞内信号传导结构域的氨基酸序列包括权利要求1所述的IL7R α 的截短体的氨基酸序列。
5. 根据权利要求4所述的融合蛋白,其中,所述抗原结合结构域包括抗CD44的单链抗体和/或抗CD133的单链抗体,所述胞内信号传导结构域包括IL7R α 的截短体。
6. 根据权利要求4所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白具有SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列。
7. 一种融合核酸,其特征在于,所述融合核酸编码权利要求4所述的融合蛋白。
8. 根据权利要求7所述的融合核酸,其中,所述融合核酸具有SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列。
9. 一种表达载体,其特征在于,所述表达载体插入有表达框,所述表达框包括编码抗原结合分子的第一核酸片段和编码胞内信号传导分子的第二核酸片段,所述胞内信号传导分子中含有权利要求1所述的IL7R α 的截短体,所述第一核酸片段与所述第二核酸片段之间插入有IRES元件或2A肽编码序列。
10. 根据权利要求9所述的表达载体,其中,所述表达框为权利要求7所述的融合核酸。
11. 一种表达嵌合抗原受体的细胞,其特征在于,该表达嵌合抗原受体的细胞由宿主细胞转染权利要求9所述的表达载体后得到,所述嵌合抗原受体中含有权利要求1所述的IL7R α 的截短体。
12. 根据权利要求11所述的细胞,其特征在于,所述宿主细胞为T细胞。
13. 权利要求1所述的IL7R α 的截短体、权利要求2所述的核酸、权利要求4所述的融合蛋白、权利要求7所述的融合核酸、权利要求9所述的表达载体、权利要求11或12所述的表达嵌合抗原受体的细胞在制备治疗肿瘤的药物中的用途。
14. 根据权利要求13所述的用途,其中,所述肿瘤为脑胶质瘤。
15. 一种药物组合物,其特征在于,该药物组合物的有效成分包括权利要求11或12所述的表达含有IL7R α 截短体的嵌合抗原受体的细胞。

IL7R α 的截短体及其在制备治疗肿瘤的药物中的用途

技术领域

[0001] 本公开涉及医药生物技术领域,具体地,涉及一种IL7R α 的截短体、其编码核酸、表达载体、细胞、药物组合物和它们的用途。

背景技术

[0002] 嵌合抗原受体(Chimeric antigen receptor,CAR)是人工合成的T细胞受体,由抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域组成。抗原结合结构域位于T细胞膜外,包括单链抗体或配体,用于特异性地结合靶抗原。胞内信号传导结构域位于T细胞膜内,用于向T细胞内传导信号以刺激T细胞产生免疫反应。

[0003] CAR能够靶向识别肿瘤细胞表面的靶抗原,因此,表达CAR的T细胞能够用于靶向杀伤肿瘤细胞。然而,现有的表达嵌合抗原受体CAR的T细胞对肿瘤细胞的杀伤能力仍然较弱。

发明内容

[0004] 本公开的目的是克服现有的表达嵌合抗原受体CAR的T细胞对肿瘤细胞的杀伤能力仍然较弱的问题,提供一种IL7R α 的截短体。

[0005] 为了实现上述目的,第一方面,本公开提供一种IL7R α 的截短体,该IL7R α 的截短体的氨基酸序列包括SEQ ID NO.1所示的序列。

[0006] 第二方面,本公开提供一种核酸,该核酸编码第一方面所述的IL7R α 的截短体;优选地,所述核酸具有SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列。

[0007] 第三方面,本公开提供一种融合蛋白,所述融合蛋白含有依次连接的抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域;所述胞内信号传导结构域的氨基酸序列包括第一方面所述的IL7R α 的截短体的氨基酸序列;优选地,所述抗原结合结构域包括抗CD44的单链抗体和/或抗CD133的单链抗体,所述胞内信号传导结构域包括IL7R α 的截短体;更优选地,所述融合蛋白具有SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列。

[0008] 第四方面,本公开提供一种融合核酸,所述融合核酸编码第三方面所述的融合蛋白;优选地,所述融合核酸具有SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列。

[0009] 第五方面,本公开提供一种表达载体,所述表达载体插入有表达框,所述表达框包括编码抗原结合分子的第一核酸片段和编码胞内信号传导分子的第二核酸片段,所述胞内信号传导分子中含有第一方面所述的IL7R α 的截短体,所述第一核酸片段与所述第二核酸片段之间插入有IRES元件或2A肽编码序列;优选地,所述表达框为第四方面所述的融合核酸。

[0010] 第六方面,本公开提供一种表达嵌合抗原受体的细胞,该表达嵌合抗原受体的细胞由宿主细胞转染第五方面所述的表达载体后得到,所述嵌合抗原受体中含有第一方面所述的IL7R α 的截短体。

[0011] 可选地,所述宿主细胞为T细胞。

[0012] 第七方面,本公开提供第一方面所述的IL7R α 的截短体、第二方面所述的核酸、第

三方面所述的融合蛋白、第四方面所述的融合核酸、第五方面所述的表达载体、第六方面所述的表达嵌合抗原受体的细胞在制备治疗肿瘤的药物中的用途。

[0013] 可选地,所述肿瘤为脑胶质瘤。

[0014] 第八方面,本公开提供一种药物组合物,该药物组合物的有效成分包括第六方面所述的表达含有IL7R α 截短体的嵌合抗原受体的细胞。

[0015] 通过上述技术方案,本公开提供的表达含有上述IL7R α 截短体的嵌合抗原受体的T细胞,能够有效杀伤肿瘤细胞。

[0016] 本公开的其他特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

附图说明

[0017] 附图是用来提供对本公开的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与下面的具体实施方式一起用于解释本公开,但并不构成对本公开的限制。在附图中:

[0018] 图1是本公开实施例提供的CAR-T 1细胞的流式细胞仪检测结果图;

[0019] 图2是本公开实施例提供的CAR-T 2细胞的流式细胞仪检测结果图;

[0020] 图3是本公开实施例提供的CAR-T 3细胞的流式细胞仪检测结果图;

[0021] 图4是本公开实施例提供的CAR-T 4细胞的流式细胞仪检测结果图。

具体实施方式

[0022] 以下结合附图对本公开的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是,此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本公开,并不用于限制本公开。

[0023] 本公开的第一方面提供一种IL7R α 的截短体,该IL7R α 的截短体的氨基酸序列包括SEQ ID NO.1所示的序列。

[0024] 其中,SEQ ID NO.1所示的序列如下所示:

[0025] KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQRARDEVEGFLQDTFPQQL
EESEKQRLGSGNQEAYVTMSSFYQNNQ。

[0026] 本公开发明人发现,上述IL7R α 的截短体能够有效增加活化后T细胞的存活期,因此,表达含有上述IL7R α 截短体的嵌合抗原受体的T细胞的存活期较长,能够有效杀伤肿瘤细胞。

[0027] 本公开的第二方面提供一种核酸,该核酸编码第一方面所述的IL7R α 的截短体;优选地,所述核酸具有SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列。

[0028] 其中,SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列如下所示:

[0029] aaaaaaaggattaagcctatcgatggcccagttctccccgatcacaagaagactctggaacacctttg
taagaaaccaagaaaaaatttaaagtgtgagtttcaatcctgaaagtttcttgactgccagattcatagggtggat
gacattcaagctagagatgaagtggaagttttctgcaagatacgtttcctcagcaactagaagaatctgagaagc
agaggcttctgggatcaaatcaagaagaagcatatgtcaccatgtccagcttctacaaaaccag。

[0030] 本公开的第三方面提供一种融合蛋白,所述融合蛋白含有依次连接的抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域;所述胞内信号传导结构域的氨基酸序列包括第一方面所述的IL7R α 的截短体的氨基酸序列。优选地,所述抗原结合结构域包括抗CD44的单链抗体和/或抗CD133的单链抗体,所述胞内信号传导结构域包括IL7R α 的截短体。更优选

地,所述融合蛋白具有SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列。

[0031] 其中,SEQ ID NO.3所示的融合蛋白由抗CD44的单链抗体、抗CD133的单链抗体、CD28、IL7R α 的截短体和CD3组成。

[0032] 其中,SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列如下所示:

[0033] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDYGSNKFYADSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRSDYRGYYGMDVWVGQGTTVTVSSGSTSGGGSGGGSGGGSSSEIVLT
QSPATLSLSPGERATLSCRASQSVINYLAQQKPGQAPRLLIYDASNRSAGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPE
DFAVYYCQQRRNWPLTFGGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFEMH
WVRQAPGQGLEWMGDIPTGDTAYNLKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCALGAFVYWGQGLT
VSSGSTSGGGSGGGGSSDVVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLANSYGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYG
ISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHQPYTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQP
LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH
YQPYAPPRDFAAYRSKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKLNVSFNPEFSLDCQIHRVDDIQRARDEVEGFLQ
DTFPQQLEESEKQRLLSNQEAYVTMSSFYQNRVKSRSADAPAYKQGQNLNELNLGRREEYDVLDKRRGRD
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMALPPR。

[0034] 本公开的第四方面提供一种融合核酸,所述融合核酸编码第三方面所述的融合蛋白。优选地,所述融合核酸具有SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列。

[0035] 其中,SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列用于编码SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列。

[0036] 其中,SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列如下所示:

[0037] caggtgcagctggtggagtctggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgc
agcgtctggattcacctcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaagggctggagtgggtg
gcagttatatggtatgatggaagtaataaattctatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagaca
attccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgaggag
aagtgactacagggctactacggtatggacgtctggggccaagggaccacggctaccgtctcctcaggcagtact
agcgggtggctccggggcggttccgggtggggcgggcagcagcgaattgtgttgacacagtctccagccacc
tgtctttgtctccagggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtggtatcaactacttagcctggta
ccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcattcaacagggcctctggcatcccagccagg
ttcagtggcagtggtctgggacagacttactctcaccatcagcagccttagagcctgaagatcttgcagtttatt
actgtcagcagcgtcgcaactggccgctcactttcggcggaggaccgaagtgagatcaaaggaggtgggtggatc
cggaggtgggtggctccggaggtgggtggatcccaggttcagctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggg
gcctcagtgaggtctcctgcaaggttctggttacacctttaccgactttgaaatgcaactgggtgcgacaggccc
ctggacaagggcttgagtggtgggagatattgatcctggaactggtgatactgcttacaatctgaagttcaaggg
cagagtcaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgaggtctgacgacacg
gctgttattactgtgcgttggggcctttgtttactggggccagggaaacctggtcaccgtctcctcaggcagta
ctagcgggtgggtggctccggggcggttccgggtggggcgggcagcagcagatgtgtgatgactcagctcctcctc
cctgcccgtcaccctggagagccggcctccatctcctgcaggtctagtcagagcttggcaacagttatgggaac
acctatctgtcttggtacctgcagaagccagggcagctctccacagctcctgatctatgggatttccaacagatctt
ctggggctccctgacaggttcagtggcagtggtcagggcacagatcttactgaaaatcagcagagtgagggtgag
ggacgttggggtttattactgcttacaaggtacacatcagccgtacacgtttggccaggggaccaagctggagatc

aaaaccactaccccagcaccgaggccaccacccccggctcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccgg
aggcatgtagaccccgagctgggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgctgcgatctacatttgggc
ccctctggctgggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaggagtaagaggagcagg
ctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggccccaccgcaagcattaccagccctatgccc
caccacgcgacttcgcagcctatcgctccaaaaaaaggattaagcctatcgatggcccagtctccccgatcacia
gaagactctggaacacctttgtaagaaaccaagaaaaaatttaaattgtgagtttcaatcctgaaagtttctggac
tgccagattcatagggtggatgacattcaagctagagatgaagtggaaggttttctgcaagatacgtttcctcagc
aactagaagaatctgagaagcagaggcttctgggatcaaatcaagaagaagcataatgtcaccatgtccagcttcta
ccaaaaccagcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaac
gaactcaatcttggctcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggga
agccgcgcagaaagaatccccaagagggctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcga
gatttggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaag
gacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg。

[0038] 本公开的第五方面提供一种表达载体,所述表达载体插入有表达框,所述表达框包括编码抗原结合分子的第一核酸片段和编码胞内信号传导分子的第二核酸片段,所述胞内信号传导分子中含有第一方面所述的IL7R α 的截短体,所述第一核酸片段与所述第二核酸片段之间插入有IRES元件或2A肽编码序列;优选地,所述表达框为第四方面所述的融合核酸。

[0039] 本公开的第六方面提供一种表达嵌合抗原受体的细胞,该表达嵌合抗原受体的细胞由宿主细胞转染第五方面所述的表达载体后得到,所述嵌合抗原受体中含有第一方面所述的IL7R α 的截短体。

[0040] 可选地,所述宿主细胞为T细胞。

[0041] 本公开的第七方面提供第一方面所述的IL7R α 的截短体、第二方面所述的核酸、第三方面所述的融合蛋白、第四方面所述的融合核酸、第五方面所述的表达载体、第六方面所述的表达嵌合抗原受体的细胞在制备治疗肿瘤的药物中的用途。

[0042] 可选地,所述肿瘤为脑胶质瘤。

[0043] 本公开的第八方面提供一种药物组合物,该药物组合物的有效成分包括第六方面所述的表达含有IL7R α 截短体的嵌合抗原受体的细胞。

[0044] 下面通过实施例来进一步说明本公开,但是本公开并不因此而受到任何限制。

[0045] 实施例1

[0046] 本实施例用于说明表达载体的构建。

[0047] (1) 采用全序列合成方法,分别合成如SEQ ID NO 4、SEQ ID NO.5和SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列。SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列用于编码SEQ ID NO.3所示的融合蛋白。SEQ ID NO.5所示的核苷酸序列用于编码SEQ ID NO.7所示的融合蛋白。SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列用于编码SEQ ID NO.8所示的融合蛋白。其中,SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.7和SEQ ID NO.8所示的融合蛋白的组成如下:

[0048] G1:SEQ ID NO.3所示的融合蛋白由抗CD44的单链抗体、抗CD133的单链抗体、CD28、IL7R α 截短体和CD3组成;

[0049] G2:SEQ ID NO.7所示的融合蛋白由抗CD44的单链抗体、抗CD133的单链抗体、CD28

和CD3组成；

[0050] G3:SEQ ID NO.8所示的融合蛋白由抗CD44的单链抗体、抗CD133的单链抗体、CD28、IL7R α 和CD3组成。

[0051] 其中,SEQ ID NO.7所示的融合蛋白的氨基酸序列如下所示:

[0052] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSQAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSNKFYADSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRSDYRGYYGMDVWGQGTITVTVSSGSTSGGGSGGGSGGGSSSEIVLT
QSPATLSLSPGERATLSCRASQSVINYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAAGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPE
DFAVYYCQQRRNWPLTFGGGTKVEIKGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFEMH
WVRQAPGQGLEWMGDIPTGDTAYNLFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCALGAFVYWGQGLTIV
VSSGSTSGGGSGGGSGGGSSDVVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLANSYGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYG
ISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHTQPYTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQP
LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH
YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR。

[0053] SEQ ID NO.5所示的核苷酸序列如下所示:

[0054] caggtgcagctggtggagtctggggaggcgtggtccagcctgggaggctccctgagactctcctgtgc
agcgtctggattcacctcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaagggctggagtgggtg
gcagttatatggtatgatggaagtaataaattctatgcagactccgtgaaggccgattcaccatctccagagaca
attccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgaggag
aagtgactacagggctactacggtatggacgtctggggccaaggaccacggctaccgtctcctcaggcagtact
agcgggtggtggctccggggcggttccggtggggcgccagcagcgaattgtgttgacacagtctccagccacc
tgtctttgtctccagggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtggtatcaactacttagcctggta
ccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcattcaacagggcctctggcatcccagccagg
ttcagtggcagtggtctgggacagacttactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttatt
actgtcagcagcgtcgcaactggccgctcactttcggcggagggaaccaaggtggagatcaaaggaggtggtggatc
cggaggtggtggctccggaggtggtggatcccaggttcagctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggg
gcctcagtgaaagctcctgcaaggttctggttacacctttaccgactttgaaatgcactgggtgacagggccc
ctggacaagggcttgagtggatgggagatattgatcctggaactggtgatactgcctacaatctgaagttcaagg
cagagtcaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgaggtctgacgacag
gccgtgtattactgtgcgttggggcctttgtttactggggccagggaaacctggtcaccgtctcctcaggcagta
ctagcgggtggtggctccggggcggttccggtggggcgccagcagcagatgtgtgatgactcagctcctcactctc
cctgcccgtcaccctggagagccggcctccatctcctgcaggtctagtcagagcttgcacaacagttatgggaac
acctattttgtcttggtacctgcagaagccagggcagctctccacagctcctgatctatgggatttccaacagatttt
ctggggctccctgacaggttcagtggcagtggtatcagggcacagattttactgaaaatcagcagagtgagggtga
ggacgttggggtttattactgcttacaaggtacacatcagccgtacacgtttggccaggggaccaagctggagatc
aaaaccactacccagcaccgaggccaccaccccggtctctaccatgcctcccagcctctgtccctgcgtccgg
aggcatgtagaccgcagctggtggggcctgcatacccggggtcttgacttcgctgcgatctctacatttgggc
ccctctggctggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaggagtaagaggagcagg
ctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgcgccccgggcccaccgcaagcattaccagccctatgccc

caccacgcgacttcgcagcctatcgctccccgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggg
gcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgg
gaccagaaatgggcggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataaga
tggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccaggg
actcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg。

[0055] SEQ ID NO.8所示的融合蛋白的氨基酸序列如下所示：

[0056] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSNKFYADSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRSDYRGYYGMDVWVGQGTTVTVSSGSTSGGGSGGGSGGGSSSEIVLT
QSPATLSLSPGERATLSCRASQSVINYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAAGIPARFSGSGSTDFTLTISLEPE
DFAVYYCQRRNWPLTFGGGTKVEIKGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDFEMH
WVRQAPGQGLEWMGDIPTGDTAYNLKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCALGAFVYWGQGLTVT
VSSGSTSGGGSGGGSGGGSSDVVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLANSYGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYG
ISNRFSGVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHQPYTFGGGTKLEIKTTPAPRPPTPAPTIASQP
LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH
YQPYAPPRDFAAYRSKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQRARDEVEGFLQ
DTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSPSRSLDCRESGKNGPHVY
QDLLLSLGTNSTLPPFSLQSGILTLNPAVQGPILTSLSGNQEEAYVTMSSFYQNRVKFSRSADAPAYKQGN
QLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLST
ATKDTYDALHMQALPPR。

[0057] SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列如下所示：

[0058] caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgc
agcgtctggattcacctcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaagggctggagtgggtg
gcagttatatggtatgatggaagtaataaattctatgcagactccgtgaaggccgattcaccatctccagagaca
attccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccaggacacggctgtgtattactgtgcgaggag
aagtgactacaggggctactacggtatggacgtctggggccaagggaccacggctaccgtctcctcaggcagctact
agcgggtgggtggctccggggcggttccggtggggcggcagcagcgaattgtgtgacacagtctccagccacc
tgtctttgtctccagggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtggtatcaactacttagcctggta
ccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcattccaacaggcctctggcatcccagccagg
ttcagtggcagtggtctgggacagacttactctcaccatcagcagccttagagcctgaagatcttgagtttatt
actgtcagcagcgtcgcaactggcgtcactttcggcggagggaccaaggtggagatcaaaggaggtgggtggatc
cggaggtgggtggctccggaggtgggtggatcccaggttcagctgggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggg
gcctcagtgaaaggtctcctgcaaggtctctggttacacctttaccgactttgaaatgcactgggtgcgacaggccc
ctggacaagggcttgagtggatgggagatattgatcctggaactgggtgatactgcttacaatctgaagttcaaggg
cagagtcaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgaggtctgacgacag
gccgtgtattactgtgcgttggggcctttgtttactggggccagggaaacctggtcaccgtctcctcaggcagta
ctagcgggtgggtggctccggggcggttccggtggggcggcagcagcagatgtgtgatgactcagctcctcctc
cctgcccgtcaccctggagagccggcctccatctcctgcaggtctagtcagagctctgcaaacagttatgggaac
acctatctgtcttggtacctgcagaagccagggcagctctccacagctcctgatctatgggatttccaacagatctt
ctggggctcctgcaggttcagtggcagtggtatcaggcacagatcttactgaaaatcagcagagtgaggcctga

ggacgttggggtttattactgcttacaaggtacacatcagccgtacacgtttggccaggggaccaagctggagatc
aaaaccactaccccagcaccgaggccaccaccccggctcctaccatcgccctcccagcctctgtccctgcgtccgg
aggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccgggtcttgacttcgctgcgatatctacatttgggc
ccctctggctggtacttgcgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaggagtaagaggagcagg
ctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgcccgggcccacccgcaagcattaccagccctatgccc
caccacgcgacttcgcagcctatcgctccaaaaaaggattaagcctatcgatggcccagctctccccgatcataa
gaagactctggaacatctttgtaagaaaccaagaaaaatttaaatgtgagtttcaatcctgaaagtttctggac
tgccagattcatagggtggatgacattcaagctagagatgaagtggaaggttttctgcaagatacgtttcctcagc
aactagaagaatctgagaagcagaggcttgaggggatgtgcagagcccaactgccatctgaggatgtagtcat
cactccagaaagctttggaagagattcatccctcacatgcctggctgggaatgtcagtgcagtgacgcccctatt
ctctccccttcaggctccctagactgcagggagagtggcaagaatgggacctatgtgtaccaggacctctgctta
gccttgggactacaaacagcacgctgccccctccattttctctccaatctggaatcctgacattgaaccagttgc
tcagggtcagcccattcttacttccctgggatcaaatcaagaagaagcatatgtcacatgtccagcttctacca
aaccagcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaac
tcaatcttggctcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcggaagcc
gcgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt
ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgcccaccaaggaca
cctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg。

[0059] (2) 采用pLVX-IRES- Δ NGFR (购自Clontech公司, 货号为631982) 作为载体, 采用常规方法分别插入步骤(1)中合成的3种核苷酸序列, 得到本实施例的3种慢病毒表达载体。

[0060] 实施例2

[0061] 本实施例用于说明表达嵌合抗原受体的T细胞的制备和检测。

[0062] (1) 将实施例1构建的3种慢病毒表达载体和pLVX-IRES- Δ NGFR空载体分别进行慢病毒包装, 然后按照下述方法分别进行T细胞的体外培养、转染和扩增。

[0063] (2) 按照下述方法分离血液中的T细胞: 将1mL无菌PBS与1mL血液混匀, 然后缓慢加入到淋巴细胞分离液Ficoll的上层, 并于4 $^{\circ}$ C、400g条件下离心30min, 加减速分别设置为0。离心结束后, 去掉上层血浆, 吸取中间白膜层细胞, 加入PBS重悬洗涤, 并于100g条件下离心10min, 加减速正常。离心结束后, 去掉上层洗涤液, 加入1mL的1640+10%FBS+1%双抗+1 \times Glutamine培养基重悬细胞, 然后利用抗人CD3/CD28磁珠 (购自Thermo Fisher公司) 刺激扩增, 其中, 重悬后细胞浓度为1 $\times 10^6$ 细胞/mL, 磁珠加入量为100 μ L, 再加入100IU/mL rhIL-2 (Peprotech), 刺激培养2天, 得到T细胞。

[0064] (3) 按照下述方法进行慢病毒转染: 取4份上述分离得到的T细胞, 分别加入步骤(1)包装好的慢病毒, 然后加入终浓度为6 μ g/mL的polybrene, 混匀, 并于32 $^{\circ}$ C、800g的条件下离心100min。离心结束后放入培养箱中继续培养24h。培养结束后将培养物于1500rpm的条件下离心15min, 并将离心得到的细胞以1 $\times 10^6$ /mL的密度接种于培养板内, 以rhIL2-100IU/mL刺激培养, 以后每2-3天换液一次, 直至2-4周, 得到转染后的T淋巴细胞CAR-T 1、CAR-T 2、CAR-T 3和CAR-T 4。其中, CAR-T 1转染有SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列, 能够表达SEQ ID NO.3所示的融合蛋白; CAR-T 2转染有SEQ ID NO.5所示的核苷酸序列, 能够表达SEQ ID NO.7所示的融合蛋白; CAR-T 3转染有SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列, 能够表达

SEQ ID NO.8所示的融合蛋白;CAR-T 4转染有空载体。

[0065] 培养结束后,用PBS重悬细胞,并用流式细胞仪检测上述4种转染后的T淋巴细胞的比例及表面CAR蛋白的表达。检测方法为:分别离心收集转染后的待检测T细胞,PBS洗涤1次后弃上清,按抗体说明书加入相应检测量的单抗避光30min后,利用PBS洗涤、重悬,过膜后采用流式细胞仪进行夹心法检测,检测时使用的抗体为His-tag标记的CD44和PE标记的抗His-tag的抗体的混合物。结果如图1~4所示。

[0066] 图1是本公开实施例提供的CAR-T 1细胞的流式细胞仪检测结果图;

[0067] 图2是本公开实施例提供的CAR-T 2细胞的流式细胞仪检测结果图;

[0068] 图3是本公开实施例提供的CAR-T 3细胞的流式细胞仪检测结果图;

[0069] 图4是本公开实施例提供的CAR-T 4细胞的流式细胞仪检测结果图。

[0070] 从图1~3可以看出,CAR-T 1细胞、CAR-T 2细胞和CAR-T 3细胞中均检测出区别于正常T淋巴细胞的其它细胞;由图4可以看出,CAR-T 4细胞并未检测出区别于正常T淋巴细胞的其它细胞。由此说明本实施例中转染有融合基因的CAR-T细胞均已成功表达目标融合蛋白。

[0071] 实施例3

[0072] 本实施例用于验证实施例2构建的CAR-T细胞的扩增能力和生存期。

[0073] 分别取实施例2中转染并培养得到的4种CAR-T细胞,分别与CD44和CD133阳性的胶质瘤干细胞GSC20按照效靶比=10(T细胞数量:胶质瘤干细胞数量)混合。将混合后的细胞置于24孔板中进行培养,其中,每孔中含有胶质瘤干细胞 10^5 个,每孔反应体系为1mL。培养条件包括:37℃,5%CO₂,饱和湿度孵箱孵育。此后0、4、8、12、18、26天用细胞计数板为不同CAR-T细胞进行计数,探究不同CAR-T在靶细胞刺激下的扩增情况

[0074] 表1

CAR-T 细胞	不同 CAR-T 细胞在靶细胞刺激下的扩增情况 ($\times 10^6$)					
	0 天	4 天	8 天	12 天	18 天	26 天
[0075] CAR-T 1	1.029	2.860	3.995	4.533	5.364	3.788
CAR-T 2	1.147	2.435	3.151	3.080	0.665	0
CAR-T 3	1.149	2.692	3.552	3.953	3.253	0
CAR-T 4	1.135	2.494	2.999	0.464	0	0

[0076] 由表1可以看出,表达有上述IL7R α 的截短体的CAR-T细胞具备更强的扩增能力和更长的生存期。

[0077] 对比例

[0078] 取实施例2中转染并培养得到CAR-T 1细胞,以及靶向经典肿瘤靶点EGFR vIII的传统第二代CAR-T细胞(EGFR vIII-CD28-CD3),分别与CD44阳性和CD133阳性的胶质瘤干细胞GSC20按照不同的效靶比(T细胞数量:胶质瘤干细胞数量)混合。将混合后的细胞置于96孔板中进行培养,其中,每孔中含有胶质瘤干细胞 4×10^4 个,每孔反应体系为200 μ L。培养条件包括:37℃,5%CO₂,饱和湿度孵箱孵育4小时。

[0079] 乳酸脱氢酶活性测定:离心结束后,每孔吸取上清液100 μ L置于96孔酶标板中,同时,每孔加入100 μ L LDH底物,室温避光反应30min。反应结束后,每孔加50 μ L终止液终止酶促反应。在酶标仪490nm测定光密度值(OD)。计算各组平均光密度值(OD),按下式计算每种T

细胞对胶质瘤干细胞的裂解率。结果如表1所示。

[0080] 裂解率% = (实验组OD-胶质瘤干细胞自发释放OD-效应细胞自然释放OD) / (胶质瘤干细胞最大释放OD-胶质瘤干细胞自发释放OD)

[0081] 检测结果见表2。

[0082] 表2

[0083]	不同效靶比下传统第二代 CAR-T 细胞对胶质瘤干细胞的裂解率 (%)				
	效靶比	5:1	3:1	2:1	1:1
	CAR-T 1	84.74%	67.20%	37.13%	31.48%
	传统 CAR-T	17.57%	14.62%	13.97%	11.88%

[0084] 由表2可以看出,靶向经典肿瘤干细胞靶点EGFR vIII的传统第二代CAR-T细胞对胶质瘤干细胞的杀伤力不如本公开提供的表达IL7R α 截短体的T细胞。

[0085] 以上结合附图详细描述了本公开的优选实施方式,但是,本公开并不限于上述实施方式中的具体细节,在本公开的技术构思范围内,可以对本公开的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本公开的保护范围。

[0086] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本公开对各种可能的组合方式不再另行说明。

[0087] 此外,本公开的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合,只要其不违背本公开的思想,其同样应当视为本公开所公开的内容。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 北京市神经外科研究所
- [0003] <120> IL7R α 的截短体及其在制备治疗肿瘤的药物中的用途
- [0004] <130> 17159BJNI-LGZ
- [0005] <160> 8
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 95
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys
- [0013] 1 5 10 15
- [0014] Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val
- [0015] 20 25 30
- [0016] Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp
- [0017] 35 40 45
- [0018] Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe
- [0019] 50 55 60
- [0020] Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu Lys Gln Arg Leu Leu Gly Ser Asn
- [0021] 65 70 75 80
- [0022] Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln
- [0023] 85 90 95
- [0024] <210> 2
- [0025] <211> 285
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0028] <400> 2
- [0029] aaaaaaagga ttaagcctat cgtatggccc agtctcccg atcacaagaa gactctggaa 60
- [0030] cacctttgta agaaaccaag aaaaaattta aatgtgagtt tcaatcctga aagtttctg 120
- [0031] gactgccaga ttcatagggt ggatgacatt caagctagag atgaagtgga aggttttctg 180
- [0032] caagatacgt ttctcagca actagaagaa tctgagaagc agaggcttct gggatcaaat 240
- [0033] caagaagaag catatgtcac catgtccagc ttctacaaa accag 285
- [0034] <210> 3
- [0035] <211> 822
- [0036] <212> PRT
- [0037] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0038] <400> 3
- [0039] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
- [0040] 1 5 10 15
- [0041] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

[0084]	355	360	365
[0085]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly		
[0086]	370	375	380
[0087]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser		
[0088]	385	390	395
[0089]	Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys		
[0090]	405	410	415
[0091]	Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser		
[0092]	420	425	430
[0093]	Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly		
[0094]	435	440	445
[0095]	Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly		
[0096]	450	455	460
[0097]	Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp		
[0098]	465	470	475
[0099]	Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe		
[0100]	485	490	495
[0101]	Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg		
[0102]	500	505	510
[0103]	Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg		
[0104]	515	520	525
[0105]	Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly		
[0106]	530	535	540
[0107]	Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr		
[0108]	545	550	555
[0109]	Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser		
[0110]	565	570	575
[0111]	Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg		
[0112]	580	585	590
[0113]	Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg		
[0114]	595	600	605
[0115]	Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp		
[0116]	610	615	620
[0117]	Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys		
[0118]	625	630	635
[0119]	Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp		
[0120]	645	650	655
[0121]	Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu		
[0122]	660	665	670
[0123]	Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu Lys		
[0124]	675	680	685
[0125]	Gln Arg Leu Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser		

[0126]	690	695	700
[0127]	Ser Phe Tyr Gln Asn Gln Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala		
[0128]	705	710	715 720
[0129]	Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu		
[0130]		725	730 735
[0131]	Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp		
[0132]		740	745 750
[0133]	Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu		
[0134]		755	760 765
[0135]	Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile		
[0136]	770	775	780
[0137]	Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr		
[0138]	785	790	795 800
[0139]	Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met		
[0140]		805	810 815
[0141]	Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[0142]		820	
[0143]	<210> 4		
[0144]	<211> 2466		
[0145]	<212> DNA		
[0146]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0147]	<400> 4		
[0148]	caggtcgacg tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60	
[0149]	tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct	120	
[0150]	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaattctat	180	
[0151]	gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240	
[0152]	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaggagaagt	300	
[0153]	gactacaggg gctactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc	360	
[0154]	tcaggcagta ctagcggtagg tggctccggg ggcggttccg gtgggggscgg cagcagcgaa	420	
[0155]	attgtgttga cacagtctcc agccaccctg tctttgtctc caggggaaag agccaccctc	480	
[0156]	tcctgcaggg ccagtcagag tgttatcaac tacttagcct ggtaccaaca gaaacctggc	540	
[0157]	caggctccca ggctcctcat ctatgatgca tccaacaggg cctctggcat ccagccagg	600	
[0158]	ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctacca tcagcagcct agagcctgaa	660	
[0159]	gattttgcag tttattactg tcagcagcgt cgcaactggc cgctcacttt cggcggaggg	720	
[0160]	accaaggtgg agatcaaagg aggtggtgga tccggaggtg gtggctccgg aggtggtgga	780	
[0161]	tcccaggttc agctggtgca gtctggagct gaggtgaaga agcctggggc ctgagtgaa	840	
[0162]	gtctcctgca aggettctgg ttacacctt accgactttg aaatgcactg ggtgcgacag	900	
[0163]	gcccctggac aagggettga gtggatggga gatattgatc ctggaactgg tgatactgcc	960	
[0164]	tacaatctga agttcaaggg cagagtcacc atgaccacag acacatccac gagcacagcc	1020	
[0165]	tacatggagc tgaggagcct gaggtctgac gacacggccg tgtattactg tgcgttgggg	1080	
[0166]	gcctttgttt actggggcca gggaacctg gtcaccgtct cctcaggcag tactagcgg	1140	
[0167]	ggtggtccg ggggcggttc cgggtggggc ggcagcagcg atgttgtgat gactcagtct	1200	

[0168]	ccactctccc tgcccgtcac ccctggagag cggcctcca tctcctgcag gtctagtcag	1260
[0169]	agtcttgcaa acagttatgg gaacacctat ttgtcttgg acctgcagaa gccagggcag	1320
[0170]	tctccacagc tectgatcta tgggatttcc aacagatttt ctgggggtccc tgacaggttc	1380
[0171]	agtggcagtg gatcaggcac agattttaca ctgaaaatca gcagagtga ggctgaggac	1440
[0172]	gttggggttt attactgctt acaaggtaca catcagccgt acacgtttgg ccaggggacc	1500
[0173]	aagctggaga tcaaaaccac taccagca cggaggccac ccaccccggc tectaccatc	1560
[0174]	gcctccagc ctctgtccct gcgtccggag gcatgtagac ccgcagctgg tggggccgtg	1620
[0175]	cataccggg gtcttgactt cgctgcgat atctacattt gggcccctct ggctgggtact	1680
[0176]	tgcggggtcc tgctgcttc actcgtgat actctttact gtaggagtaa gaggagcagg	1740
[0177]	ctctgcaca gtgactacat gaacatgact ccccgccgc ccggggccac ccgcaagcat	1800
[0178]	taccagcct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccaaaa aaggattaag	1860
[0179]	cctatcgtat ggcccagtct ccccgatcac aagaagactc tggaacacct ttgtaagaa	1920
[0180]	ccaagaaaa atttaaagt gaggttcaat cctgaaagt tcttgactg ccagattcat	1980
[0181]	agggtggatg acattcaagc tagagatgaa gtggaaggt ttctgcaaga tacgtttcct	2040
[0182]	cagcaactag aagaatctga gaagcagagg cttctgggat caaatcaaga agaagcatat	2100
[0183]	gtcaccatgt ccagcttcta ccaaaaccag cgcgtgaaat tcagccgcag cgcagatget	2160
[0184]	ccagcctaca agcaggggca gaaccagctc tacaacgaac tcaatcttgg tcggagagag	2220
[0185]	gagtacgacg tgctggacaa gcggagagga cgggaccag aatggggcg gaagccgcgc	2280
[0186]	agaaagaatc cccaagagg cctgtacaac gagctccaaa aggataagat ggcagaagcc	2340
[0187]	tatagcgaga ttggtatgaa aggggaacgc agaagaggca aaggccacga cggactgtac	2400
[0188]	caggactca gcaccgccac caaggacacc tatgacgctc ttcacatgca ggccctgccg	2460
[0189]	cctcgg	2466
[0190]	<210>	5
[0191]	<211>	2181
[0192]	<212>	DNA
[0193]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)
[0194]	<400>	5
[0195]	caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
[0196]	tctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccagget	120
[0197]	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaattctat	180
[0198]	gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
[0199]	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaggagaagt	300
[0200]	gactacaggg gctactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccaggt caccgtctcc	360
[0201]	tcaggcagta ctacgggtg tggctccggg ggcggttccg gtggggggcg cagcagcgaa	420
[0202]	attgtgtga cacagtctcc agccaccctg tctttgtctc caggggaaag agccaccctc	480
[0203]	tctgcaggg ccagtcagag tgttatcaac tacttagcct ggtaccaaca gaaacctggc	540
[0204]	caggtccca ggctctcat ctatgatgca tccaacaggg cctctggcat ccagccagg	600
[0205]	ttcagtggca gtgggtctgg gacagactc actctacca tcagcagcct agagcctgaa	660
[0206]	gattttgcag tttattactg tcagcagcgt cgcaactggc cgctcacttt cggcggaggg	720
[0207]	accaaggtgg agatcaaagg aggtggtgga tccggaggtg gtggctccgg aggtggtgga	780
[0208]	tcccaggttc agctggtgca gtctggagct gaggtgaaga agcctggggc ctcagtgaag	840
[0209]	gtctcctgca aggtctctgg ttacacctt accgactttg aatgcactg ggtgcgacag	900

[0210]	gcccctggac aaggccttga gtggatggga gatattgatc ctggaactgg tgatactgcc	960
[0211]	tacaatctga agttcaaggg cagagtcacc atgaccacag acacatccac gagcacagcc	1020
[0212]	tacatggagc tgaggagcct gaggtctgac gacacggccg tgtattactg tgcgttgggg	1080
[0213]	gcctttgttt actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctcaggcag tactagcgg	1140
[0214]	ggtggctccg ggggcggttc cgggtggggc ggcagcagcg atgttgtgat gactcagtct	1200
[0215]	ccactctccc tgcccgtcac ccctggagag ccggcctcca tctcctgcag gtctagtcag	1260
[0216]	agtcttcaa acagttatgg gaacacctat ttgtcttgg acctgcagaa gccagggcag	1320
[0217]	tctccacagc tctgatcta tgggatttcc aacagatfff ctggggctcc tgacaggttc	1380
[0218]	agtggcagtg gatcaggcac agatfffaca ctgaaaatca gcagagtga ggctgaggac	1440
[0219]	gttggggttt attactgctt acaaggtaca catcagccgt acacgtttgg ccaggggacc	1500
[0220]	aagctggaga tcaaaaccac taccacagca ccgaggccac ccaccccgc tctaccatc	1560
[0221]	gcctcccagc ctctgtccct gcgtccggag gcatgtagac ccgcagctgg tggggccgtg	1620
[0222]	catacccggg gtcttgactt cgctgcgat atctacattt gggcccctct ggctggtact	1680
[0223]	tgcggggtcc tgctgctttc actcgtgatc actctttact gtaggagtaa gaggagcagg	1740
[0224]	ctctgcaca gtgactacat gaacatgact ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat	1800
[0225]	taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctcccgcgt gaaattcagc	1860
[0226]	cgcagcgcag atgctccagc ctacaagcag gggcagaacc agctctacaa cgaactcaat	1920
[0227]	cttggctgga gagaggagta cgacgtgctg gacaagcga gaggacggga ccagaaatg	1980
[0228]	ggcgggaagc cgcgcaaaa gaatcccaa gagggcctgt acaacgagct ccaaaaggat	2040
[0229]	aagatggcag aagcctatag cgagattgg atgaaaggg aacgcagaag aggcaaaggc	2100
[0230]	cacgacggac tgtaccagg actcagcacc gccaccaagg acacctatga cgctcttcac	2160
[0231]	atgcaggccc tgccgcctcg g	2181
[0232]	<210>	6
[0233]	<211>	2766
[0234]	<212>	DNA
[0235]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)
[0236]	<400>	6
[0237]	caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
[0238]	tctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccagget	120
[0239]	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaattctat	180
[0240]	gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
[0241]	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaggagaagt	300
[0242]	gactacaggg gctactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccaggt caccgtctcc	360
[0243]	tcaggcagta ctacgggtg tggctccggg ggcggttccg gtgggggcgg cagcagcga	420
[0244]	attgtgttga cacagtctcc agccaccctg tctttgtctc caggggaaag agccaccctc	480
[0245]	tctgcaggg ccagtcagag tgttatcaac tacttagcct ggtaccaaca gaaacctggc	540
[0246]	caggtccca ggctctcat ctatgatgca tccaacagg cctctggcat ccagccagg	600
[0247]	ttcagtgga gtgggtctgg gacagactc actctacca tcagcagcct agagcctgaa	660
[0248]	gattttgcag tttattactg tcagcagcgt cgcaactggc cgctcacttt cggcggagg	720
[0249]	accaaggtgg agatcaaagg aggtggtgga tccggaggtg gtggctccgg aggtggtgga	780
[0250]	tcccaggttc agctggtgca gtctggagct gaggtgaaga agcctggggc ctcagtgaag	840
[0251]	gtctcctgca aggtctctgg ttacacitt accgactttg aaatgcaactg ggtgcgacag	900

[0294]	35	40	45
[0295]	Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val		
[0296]	50	55	60
[0297]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0298]	65	70	75
[0299]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0300]		85	90
[0301]	Ala Arg Arg Ser Asp Tyr Arg Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly		
[0302]		100	105
[0303]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly		
[0304]		115	120
[0305]	Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Ile Val Leu Thr		
[0306]		130	135
[0307]	Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu		
[0308]		145	150
[0309]	Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ile Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln		
[0310]		165	170
[0311]	Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn		
[0312]		180	185
[0313]	Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr		
[0314]		195	200
[0315]	Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val		
[0316]		210	215
[0317]	Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly		
[0318]		225	230
[0319]	Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
[0320]		245	250
[0321]	Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val		
[0322]		260	265
[0323]	Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr		
[0324]		275	280
[0325]	Thr Phe Thr Asp Phe Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln		
[0326]		290	295
[0327]	Gly Leu Glu Trp Met Gly Asp Ile Asp Pro Gly Thr Gly Asp Thr Ala		
[0328]		305	310
[0329]	Tyr Asn Leu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser		
[0330]		325	330
[0331]	Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr		
[0332]		340	345
[0333]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Leu Gly Ala Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly		
[0334]		355	360
[0335]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly		

[0336]	370	375	380
[0337]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser		
[0338]	385	390	395 400
[0339]	Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys		
[0340]		405	410 415
[0341]	Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser		
[0342]		420	425 430
[0343]	Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly		
[0344]		435	440 445
[0345]	Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly		
[0346]		450	455 460
[0347]	Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp		
[0348]		465	470 475 480
[0349]	Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe		
[0350]		485	490 495
[0351]	Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg		
[0352]		500	505 510
[0353]	Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg		
[0354]		515	520 525
[0355]	Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly		
[0356]		530	535 540
[0357]	Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr		
[0358]		545	550 555 560
[0359]	Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser		
[0360]		565	570 575
[0361]	Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg		
[0362]		580	585 590
[0363]	Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg		
[0364]		595	600 605
[0365]	Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp		
[0366]		610	615 620
[0367]	Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn		
[0368]		625	630 635 640
[0369]	Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg		
[0370]		645	650 655
[0371]	Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly		
[0372]		660	665 670
[0373]	Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu		
[0374]		675	680 685
[0375]	Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu		
[0376]		690	695 700
[0377]	Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His		

[0378]	705	710	715	720
[0379]	Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
[0380]		725		
[0381]	<210> 8			
[0382]	<211> 921			
[0383]	<212> PRT			
[0384]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0385]	<400> 8			
[0386]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
[0387]	1	5	10	15
[0388]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
[0389]		20	25	30
[0390]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0391]		35	40	45
[0392]	Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val			
[0393]		50	55	60
[0394]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[0395]		65	70	75
[0396]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0397]		85	90	95
[0398]	Ala Arg Arg Ser Asp Tyr Arg Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly			
[0399]		100	105	110
[0400]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly			
[0401]		115	120	125
[0402]	Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Ile Val Leu Thr			
[0403]		130	135	140
[0404]	Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu			
[0405]		145	150	155
[0406]	Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ile Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln			
[0407]		165	170	175
[0408]	Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn			
[0409]		180	185	190
[0410]	Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr			
[0411]		195	200	205
[0412]	Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val			
[0413]		210	215	220
[0414]	Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly			
[0415]		225	230	235
[0416]	Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
[0417]		245	250	255
[0418]	Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val			
[0419]		260	265	270

[0420]	Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
[0421]	275 280 285
[0422]	Thr Phe Thr Asp Phe Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
[0423]	290 295 300
[0424]	Gly Leu Glu Trp Met Gly Asp Ile Asp Pro Gly Thr Gly Asp Thr Ala
[0425]	305 310 315 320
[0426]	Tyr Asn Leu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser
[0427]	325 330 335
[0428]	Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr
[0429]	340 345 350
[0430]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Leu Gly Ala Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0431]	355 360 365
[0432]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly
[0433]	370 375 380
[0434]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
[0435]	385 390 395 400
[0436]	Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
[0437]	405 410 415
[0438]	Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser
[0439]	420 425 430
[0440]	Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly
[0441]	435 440 445
[0442]	Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
[0443]	450 455 460
[0444]	Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp
[0445]	465 470 475 480
[0446]	Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe
[0447]	485 490 495
[0448]	Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
[0449]	500 505 510
[0450]	Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
[0451]	515 520 525
[0452]	Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
[0453]	530 535 540
[0454]	Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
[0455]	545 550 555 560
[0456]	Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser
[0457]	565 570 575
[0458]	Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
[0459]	580 585 590
[0460]	Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
[0461]	595 600 605

[0462]	Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp
[0463]	610 615 620
[0464]	Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys
[0465]	625 630 635 640
[0466]	Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp
[0467]	645 650 655
[0468]	Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu
[0469]	660 665 670
[0470]	Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu Lys
[0471]	675 680 685
[0472]	Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu Asp
[0473]	690 695 700
[0474]	Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr Cys
[0475]	705 710 715 720
[0476]	Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Pro Ser
[0477]	725 730 735
[0478]	Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val Tyr
[0479]	740 745 750
[0480]	Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro
[0481]	755 760 765
[0482]	Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala Gln
[0483]	770 775 780
[0484]	Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr
[0485]	785 790 795 800
[0486]	Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln Arg Val Lys Phe Ser Arg
[0487]	805 810 815
[0488]	Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
[0489]	820 825 830
[0490]	Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
[0491]	835 840 845
[0492]	Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Lys Asn Pro Gln
[0493]	850 855 860
[0494]	Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
[0495]	865 870 875 880
[0496]	Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
[0497]	885 890 895
[0498]	Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
[0499]	900 905 910
[0500]	Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0501]	915 920

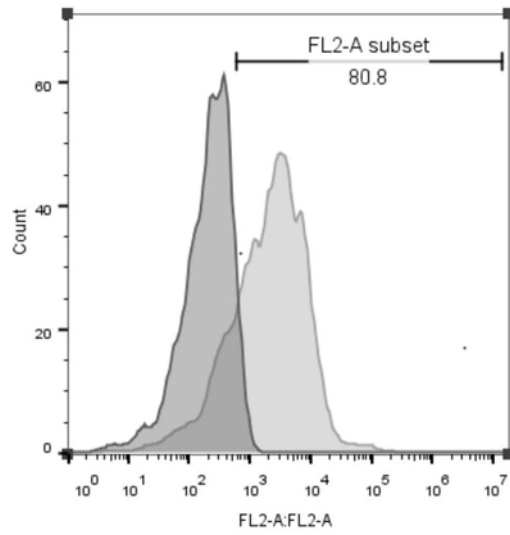


图1

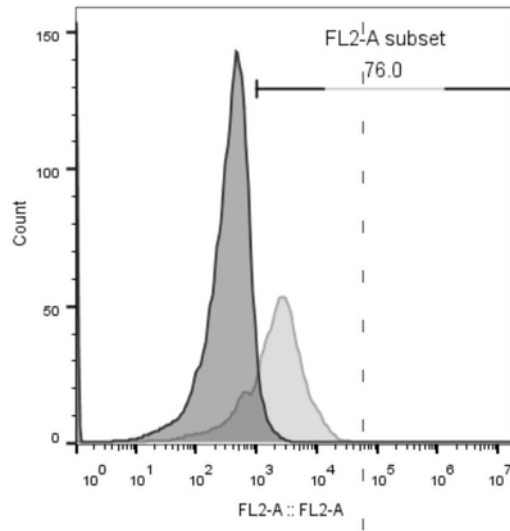


图2

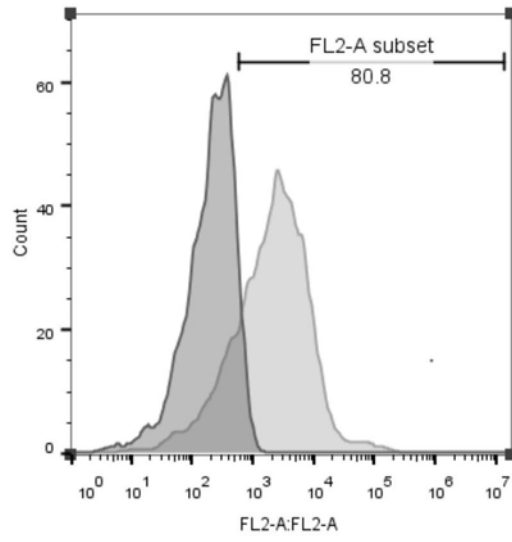


图3

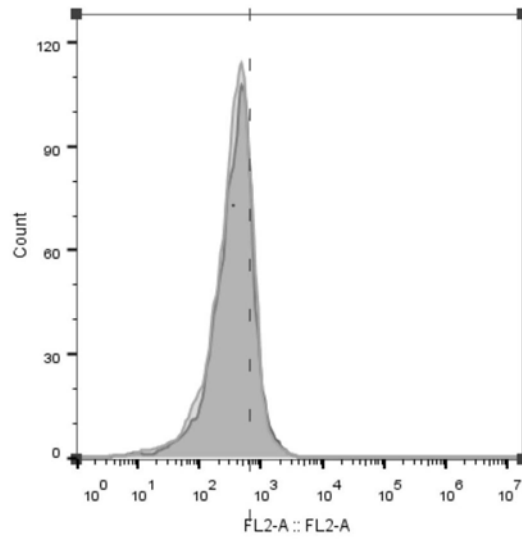


图4