



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107312097 B

(45)授权公告日 2020.06.16

(21)申请号 201710586040.2

(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 107312097 A

(43)申请公布日 2017.11.03

(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 李俊芳 章睿

(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 7/01(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

A61K 35/17(2015.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

(56)对比文件

CN 106535925 A,2017.03.22,

CN 105924527 A,2016.09.07,

CN 104788573 A,2015.07.22,

WO 2016174652 A1,2016.11.03,

审查员 孙琳

权利要求书1页 说明书9页
序列表8页 附图6页

(54)发明名称

一种基于CD30的嵌合抗原受体及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种基于CD30的嵌合抗原受体及其应用,具体为以肿瘤特异靶点CD30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CD30。本发明的嵌合抗原受体通过对所述针对肿瘤表面抗原CD30的单链抗体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CD30嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体为Secretory-CD30-CD28-CD27-CD137-CD3 ζ -2A-FBKP.Casp9;

所述嵌合抗原受体Secretory-CD30-CD28-CD27-CD137-CD3 ζ -2A-FBKP.Casp9的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

2. 一种重组慢病毒,其特征在于,将包含如权利要求1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。

3. 一种组合物,其特征在于,所述组合物包括如权利要求1所述的嵌合抗原受体和/或如权利要求2所述的重组慢病毒。

4. 如权利要求1所述的嵌合抗原受体、如权利要求2所述的重组慢病毒或如权利要求3所述的组合物在制备嵌合抗原受体T细胞及其在制备白血病和/或淋巴瘤治疗药物中的应用。

一种基于CD30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CD30的嵌合抗原受体及其应用,具体为以肿瘤特异靶点CD30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] 大多数患有淋巴细胞恶性肿瘤,包括霍奇森氏淋巴瘤(Hodgkin's Lymphoma), B细胞淋巴瘤和急性淋巴细胞性白血病(B cell lymphoma and 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CD30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CD30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CD30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、CD3 ζ 信号传导结构域和可诱导自杀融合结构域串联而成;

[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CD30。

[0011] 本发明中,通过将抗原结合结构域结合肿瘤表面抗原CD30,再通过对抗原结合结构域即针对肿瘤表面抗原CD30的单链抗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CD30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,所述抗原结合结构域为针对肿瘤表面抗原CD30的单链抗体(scFv),所述针对肿瘤表面抗原CD30的单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,所述针对肿瘤表面抗原CD30的单链抗体氨基酸序列(SEQ ID NO.1)如下:

[0013] QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDYITWVRQAPGQGLEWMGWIYPGSGNTKYNEKFKGRV
TMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCANYGNYWFAYWGQGLVTVSSGSGSGKPGSSEGSTKGDIVMTQSPD
SLAVSLGERATINCKASQSVDFDGSYMNWYQQKPGQPPELLIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE
DVAVYYCQQSNEDPWFQGGTKVEIK.

[0014] 本发明中,所述针对肿瘤表面抗原CD30的单链抗体进行了特异性改造,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,所述抗原结合结构域还包括针对肿瘤表面抗原CD30的突变体的单链抗体,所述针对肿瘤表面抗原CD30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、CD27信号传导结构域和CD137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-CD27-CD137的顺序组合。

[0018] 根据本发明,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] GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGVQVETISPGDGRFTFPKRGQTCVVHYTGMLDGGKVDSSDRNKP
FKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGRRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLEGGGGSGGGSGAMV
GALESRLGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRFRFSSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLA
LLELARQDHGALDCCVVVILSHGCCASHLQFPGAVYGTGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQ

KDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRFTDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETL
DDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSAS.

[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Secretory信号肽的氨基酸序列如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Secretory信号肽的氨基酸序列如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、CD30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、CD27信号传导结构域和CD137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-CD30-CD28-CD27-CD137-CD3 ζ -2A-FBKP.Casp9。

[0028] 根据本发明,所述嵌合抗原受体Secretory-CD30-CD28-CD27-CD137-CD3 ζ -2A-FBKP.Casp9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] MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYYITWVRQAPGQGLE
WMGWIYPGSGNTKYNEKFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCANYGNYWFAYWGQGLTVTVSSGSTSG
SGKPGSSEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDFDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGVP
DRFSGSGSGTDFTLTITSSLQAEDVAVYYCQQSNEDPWTFGQGTKVEIKAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKKG
HLCPSPLFPGPSKPFVWLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMPRRPGPTRKHYQPYAPPRD
FAAYRSASGGGGSGGGGSQRRKYRSNKGESPVPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSPGGGGSGGGGS
TSGGGSGGGGSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELGGGGSGGGSGGGGSRVKFS
RSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRTSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGVQVETISPGDGRTPFKRGQ
TCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNPKFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGRQAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHAT
LVFDVELLKLEGGGGSGGGSGAMVGALESRLGNADLAYILSMEPCGHCLIIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKL

RRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGDCPVSVEKIVNI
FNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRFTDQLDAISSLPSPDIF
VSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSAS.

[0030] 根据本发明,所述嵌合抗原受体Secretory-CD30-CD28-CD27-CD137-CD3 ζ -2A-FBKP.Casp9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] ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCGCCTCCTGCTGATCCCCA
GATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGC
TACACCTTACCGACTACTACATCACCTGGGTGAGACAGGCCCCCGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCT
ACCCCGGCAGCGGCAACACCAAGTACAACGAGAAGTTCAAGGGCAGAGTGACCATGACCAGAGACACCAGCATCAG
CACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGACTGAGAAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAACTACGGCAACTAC
TGGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCGGCAGCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCCGGCA
GCAGCGAGGGCAGCACCAAGGGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGAG
AGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGGACTTCGACGGCGACAGCTACATGAACTGGTACCAGCAGAAG
CCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCCGCAGCAACCTGGAGAGCGGCGTGCCCGACAGATTCAGCGGCA
GCGGCAGCGGCACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCA
GAGCAACGAGGACCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGCCGCCCATCGAGGTGATGTAC
CCCCCCCCCTACCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGCCCCAGCC
CCCTGTTCCCCGGCCCCAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCT
GGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATG
ACCCCCAGAAGACCCGGCCCCACCAGAAAGCACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGAGACTTCGCCGCTACAGAA
GCGCCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCCAGAGAAGAAAGTACAGAAGCAACAAGGGCGAGAGCCC
CGTGGAGCCCCGCCGAGCCCTGCCACTACAGCTGCCCCAGAGAGGAGGAGGGCAGCACCATCCCCATCCAGGAGGAC
TACAGAAAGCCCGAGCCCGCCTGCAGCCCCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCACCAGCGGCGGCGGCG
GCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGTGGTGAAGAGAGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGAG
ACCCGTGCAGACCACCAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGCAGATTCCCCGAGGAGGAGGAGGGCGGCTGCGAGCTG
GGCGGCGGCGGCGAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCC
CCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGA
CAAGAGAAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAGCCCAGAAGAAAGAACCCCGAGGAGGGCCTGTACAACGAG
CTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACG
ACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAG
AACCAGCGGCAGCGGCGCCACCAACTTACGCTGCTGAAGCAGGCCGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCCATG
GGCGTGCAGGTGGAGACCATCAGCCCCGGCGACGGCAGAACCTTCCCCAAGAGAGGCCAGACCTGCGTGGTGCCT
ACACCGGCATGCTGGAGGACGGCAAGAAGGTGGACAGCAGCAGAGACAGAAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGG
CAAGCAGGAGGTGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCAGATGAGCGTGGGCCAGAGAGCCAAGCTGACCATC
AGCCCCGACTACGCTACGGCGCCACCGGCCACCCCGGCATCATCCCCCCCCACGCCACCCTGGTGTTCGACGTGG
AGCTGCTGAAGCTGGAGGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGCCATGGTGGGCGCCCTGGAGAGCCT
GAGAGGCAACGCCGACCTGGCCTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGCGGCCACTGCCTGATCATCAACAACGTGAAC
TTCTGCAGAGAGAGCGGCCTGAGAACCAGAACCGGCAGCAACATCGACTGCGAGAAGCTGAGAAGAAGATTCAGCA

GCCTGCACTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACCGCCAAGAAGATGGTGTCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCCAG
ACAGGACCACGGCGCCCTGGACTGCTGCGTGGTGGTATCCTGAGCCACGGCTGCCAGGCCAGCCACCTGCAGTTC
CCCCGGCGCCGTGTACGGCACCGACGGCTGCCCCGTGAGCGTGAGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCAGCT
GCCCCAGCCTGGGCGCAAGCCCAAGCTGTTCTTCATCCAGGCCTGCGGCGGCGAGCAGAAGGACCACGGCTTCGA
GGTGGCCAGCACCAGCCCCGAGGACGAGAGCCCCGGCAGCAACCCCCGAGCCCGACGCCACCCCTTCCAGGAGGGC
CTGAGAACCTTCGACCAGCTGGACGCCATCAGCAGCCTGCCACCCCCAGCGACATCTTCGTGAGCTACAGCACCT
TCCCCGGCTTCGTGAGCTGGAGAGACCCCAAGAGCGGCAGCTGGTACGTGGAGACCCTGGACGACATCTTCGAGCA
GTGGGCCACAGCGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGAGAGTGGCCAACGCCGTGAGCGTGAAGGGCATCTACAAG
CAGATGCCCGGCTGCTTCAACTTCTGAGAAAGAAGCTGTTCTTCAAGACCAGCGCCAGCTGA.

[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和/或实体瘤,所述肿瘤疾病选自但不限于白血病。

[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CD30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) 本发明的嵌合抗原受体能特异性的识别肿瘤表面抗原CD30,CD30在白血病及淋巴瘤中表达量高,且嵌合抗原受体上的针对肿瘤表面抗原CD30的单链抗体不容易发生突变,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CD30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为本发明的嵌合抗原受体的合成基因序列图谱;

[0046] 图2为原发性淋巴瘤细胞中CD30抗体流式细胞分析结果图,其中,灰色区域为同型

阴性对照；

[0047] 图3 (a) 为免疫组化阴性对照的流式细胞分析结果图；图3 (b) 为原发性淋巴瘤细胞的CD30抗体染色流式细胞分析结果图；

[0048] 图4 (a) 为ALCL肿瘤(间变性大细胞淋巴瘤)靶细胞的流式细胞分析结果图，图4 (b) 为ALCL肿瘤靶细胞的细胞凋亡结果图；

[0049] 图5 (a) 为一般T细胞与ALCL肿瘤靶细胞共培养的流式细胞分析结果图，图5 (b) 为一般T细胞与ALCL肿瘤靶细胞共培养的细胞凋亡结果图；

[0050] 图6 (a) 为GD2CAR-T细胞与ALCL肿瘤靶细胞共培养的流式细胞分析结果图，图6 (b) 为GD2CAR-T细胞与ALCL肿瘤靶细胞共培养的细胞凋亡结果图；

[0051] 图7 (a) 为CD30嵌合抗原受体与ALCL肿瘤靶细胞共培养的流式细胞分析结果图，图7 (b) 为CD30嵌合抗原受体T细胞与ALCL肿瘤靶细胞共培养的细胞凋亡结果图；

[0052] 图8为共培养12天后的GFP染色结果图，其中，每个结果图中右侧图的绿色荧光表示原发性淋巴瘤细胞的存活细胞，第一列为原发性淋巴瘤细胞的GFP染色图和GD2CAR-T细胞毒杀后的原发性淋巴瘤细胞的GFP染色图，第二列为经一般T细胞毒杀后的原发性淋巴瘤细胞的GFP染色图和制备的CD30 CAR T毒杀后的原发性淋巴瘤细胞的GFP染色图。

具体实施方式

[0053] 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。

[0054] 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。

[0055] 实施例1：嵌合抗原受体的构建

[0056] (1) 通过全基因合成Secretory信号肽、CD30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、CD27信号传导结构域和CD137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，如图1所示，即Secretory-CD30-CD28-CD27-CD137-CD3 ζ -2A-FBKP.Casp9；

[0057] 所述嵌合抗原受体的核苷酸序列SEQ ID NO.3如下：

[0058] ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCCTCCTGCTGATCCCCA
GATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGCCAGCGGC
TACACCTTACCGACTACTACATCACCTGGGTGAGACAGGCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCT
ACCCCGGCAGCGGCAACACCAAGTACAACGAGAAGTTCAAGGGCAGAGTGACCATGACCAGAGACACCAGCATCAG
CACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGACTGAGAAGCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAACTACGGCAACTAC
TGGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGCAGCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCCGGCA
GCAGCGAGGGCAGCACCAAGGGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGAG
AGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGGACTTCGACGGCGACAGCTACATGAAGTGGTACCAGCAGAAG
CCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCGCAGCAACCTGGAGAGCGGCGTGCCGACAGATTCAGCGGCA
GCGGCAGCGGCACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCA
GAGCAACGAGGACCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGCCGCCATCGAGGTGATGTAC

CCCCCCCCCTACCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGCCCCAGCC
 CCCTGTTCCCCGGCCCCAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCT
 GGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATG
 ACCCCCAGAAGACCCGGCCCCACCAGAAAGCACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGAGACTTCGCCGCTACAGAA
 GCGCCAGCGGGCGGGCGGCAGCGGGCGGGCGGCAGCCAGAGAAGAAAGTACAGAAGCAACAAGGGCGAGAGCCC
 CGTGGAGCCCGCCGAGCCCTGCCACTACAGCTGCCCCAGAGAGGAGGAGGGCAGCACCATCCCCATCCAGGAGGAC
 TACAGAAAGCCCGAGCCCGCCTGCAGCCCCGGCGGGCGGCAGCGGGCGGGCGGCAGCCAGCGGGCGGGCGGC
 GCAGCGGGCGGGCGGCAGCGTGGTGAAGAGAGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGAG
 ACCCGTGCAGACCACCCAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGCAGATTCCCCGAGGAGGAGGGCGGGTGCAGCTG
 GCGGGCGGGCGGCAGCGGGCGGGCGGCAGCGGGCGGGCGGCAGCAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCC
 CCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGA
 CAAGAGAAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGCAAGCCCAGAAGAAAGAACCCCGAGGAGGGCCTGTACAACGAG
 CTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACG
 ACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAG
 AACCAGCGGCAGCGGGCGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCCATG
 GGCCTGCAGGTGGAGACCATCAGCCCCGGCGACGGCAGAACCTTCCCCAAGAGAGGCCAGACCTGCGTGGTGCCT
 ACACCGGCATGCTGGAGGACGGCAAGAAGGTGGACAGCAGCAGAGACAGAAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGG
 CAAGCAGGAGGTGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCAGATGAGCGTGGGCCAGAGAGCCAAGCTGACCATC
 AGCCCCGACTACGCTACGGCGCCACCGCCACCCCGGCATCATCCCCCCCCACGCCACCCTGGTGTTCGACGTGG
 AGCTGCTGAAGCTGGAGGGCGGGCGGGCAGCGGGCGGGCGGCAGCGGGCCATGGTGGGCGCCCTGGAGAGCCT
 GAGAGGCAACGCCGACCTGGCCTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGCGGCCACTGCCTGATCATCAACAACGTGAAC
 TTCTGCAGAGAGAGCGGCCCTGAGAACCAGAACCAGCAGCAACATCGACTGCGAGAAGCTGAGAAGAAGATTGAGCA
 GCCTGCACTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACCGCCAAGAAGATGGTGTGGCCCTGCTGGAGCTGGCCAG
 ACAGGACCACGGCGCCCTGGACTGCTGCGTGGTGGTGCCTGAGCCACGGCTGCCAGGCCAGCCACCTGCAGTTC
 CCCGGCGCCGTGTACGGCACCGACGGCTGCCCCGTGAGCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCCAGCT
 GCCCCAGCCTGGGCGGCAAGCCCAAGCTGTTCTTCATCCAGGCCTGCGGGCGGAGCAGAAGGACCACGGCTTCGA
 GGTGGCCAGCACCAGCCCCGAGGACGAGAGCCCCGGCAGCAACCCCGAGCCCCGACGCCACCCCTTCCAGGAGGGC
 CTGAGAACCTTCGACCAGCTGGACGCCATCAGCAGCCTGCCACCCCGAGCGACATCTTCGTGAGCTACAGCACCT
 TCCCCGGCTTCGTGAGCTGGAGAGACCCCAAGAGCGGCAGCTGGTACGTGGAGACCCTGGACGACATCTTCGAGCA
 GTGGGCCACAGCGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGAGAGTGGCCAACCGCTGAGCGTGAAGGGCATCTACAAG
 CAGATGCCCGGCTGCTTCAACTTCTGAGAAAGAAGCTGTTCTTCAAGACCAGCGCCAGCTGA.

[0059] 实施例2:慢病毒包装

[0060] (1) 用六孔板分别培养293T细胞, 1×10^6 个细胞/孔, 培养17-18小时;

[0061] (2) 加入600 μ L/孔的新鲜的DMEM, 内含10%的FBS;

[0062] (3) 在无菌离心管中加入以下试剂: 每孔取75 μ L的DMEM的上清液, 2.7 μ g的helper DNA mix (1.8 μ g pNHP, 0.5 μ g pHEF-VSV-G, 0.2 μ g pHEF-GFP) 以及0.8 μ g的pTYF DNA载体, 漩涡振荡;

[0063] (4) 从每孔板中央吸取7 μ L的Superfect加至离心管中吹打5次, 室温静置7-10分钟;

- [0064] (5) 将离心管中的DNA-Superfect混合液逐滴加入至每个培养孔中,漩涡打匀;
- [0065] (6) 37℃3%CO₂培养箱里培养4-5小时;
- [0066] (7) 吸走培养基的培养液,用1.5mL AIM-V冲洗培养基,并加入1.5mL的AIM-V继续培养;
- [0067] (8) 将培养基放回3%CO₂培养箱中培养过夜,第二天早上用荧光显微镜观察转染效率。

[0068] 实施例3:慢病毒的纯化和浓缩

[0069] 1) 病毒纯化

[0070] 通过离心(1000g,5分钟)除去细胞碎片,得到病毒上清液,用一个0.45微米的低蛋白结合过滤器将病毒上清液过滤,病毒被分装成小份,储存在-80℃;

[0071] 通常情况下,在每毫升的培养基中,转染细胞可以产生10⁶到10⁷转导单位滴定的慢病毒载体。

[0072] 2) 用Centricon过滤器浓缩慢病毒载体

[0073] (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;

[0074] (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;

[0075] (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。

[0076] 实施例4:CAR-T细胞的转染

[0077] 将活化后的T细胞以5×10⁶接种到24孔板,加入50μl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℃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1×10⁷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,结果如图2-图3所示。

[0078] 从图2、图3(a)-图3(b)可以看出,原发性淋巴瘤细胞表面CD30的表达量高,本发明选用的CD30嵌合抗原受体能够用于治疗原发性淋巴瘤。

[0079] 实施例5CAR-T细胞的体外肿瘤杀伤

[0080] (1) 将非专一性的4GS-meso CART细胞、GD2CAR-T细胞和本申请制备的专一性的4GS-CD30 CART细胞与原发性淋巴瘤细胞共培养,置于37度5%CO₂培养箱共培养18h;

[0081] (2) 体外评估CAR-T细胞对靶细胞的识别杀伤功能,靶细胞为钙黄绿素标记或感染LV-GFP;

[0082] 结果如图4-图8所示所示,从图4(a)、图5(a)、图6(a)和图7(a)对比可以看出,荧光强度为10³以上的细胞为ALCL肿瘤靶细胞,挑选图4(a)、图5(a)、图6(a)和图7(a)中荧光强度为10³以上的细胞做进一步分析,从图4(b)可以看出,8.1%的靶细胞濒临凋亡,3.3%的靶细胞凋亡,从图5(b)可以看出,15.4%的靶细胞濒临凋亡,8.1%的靶细胞凋亡,从图6(b)可以看出,15.8%的靶细胞濒临凋亡,10.0%的靶细胞凋亡,从图7(b)可以看出,44.5%的靶细胞濒临凋亡,29.1%的靶细胞凋亡;可见,CD30嵌合抗原受体T细胞的靶细胞濒临凋亡以及靶细胞凋亡数明显高于其他对照组,因此CD30嵌合抗原受体对ALCL肿瘤靶细胞有较好

的毒杀作用。

[0083] 通过图8可以看出,原发性淋巴瘤细胞单独培养、原发性淋巴瘤细胞与一般T细胞培养和原发性淋巴瘤细胞与GD2-CAR T细胞培养12天后的结果,荧光强度变化不明显,原发性淋巴瘤细胞与本申请CD30 CAR T细胞培养12天后,绿色荧光基本消失,即无存活的原发性淋巴瘤细胞,说明CD30嵌合抗原受体对原发性淋巴瘤细胞的毒杀作用有非常好的效果。

[0084] 综上所述,本发明的嵌合抗原受体的针对CD30肿瘤表面抗原的单链抗体不容易发生突变,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,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。

[0085] 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CD30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> 246
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> 人工合成序列
 [0011] <400> 1
 [0012] Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [0015] 20 25 30
 [0016] Tyr Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 [0017] 35 40 45
 [0018] Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 [0019] 50 55 60
 [0020] Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 [0021] 65 70 75 80
 [0022] Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0023] 85 90 95
 [0024] Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 [0025] 100 105 110
 [0026] Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser
 [0027] 115 120 125
 [0028] Ser Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp
 [0029] 130 135 140
 [0030] Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala
 [0031] 145 150 155 160
 [0032] Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln
 [0033] 165 170 175
 [0034] Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn
 [0035] 180 185 190
 [0036] Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 [0037] 195 200 205
 [0038] Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val
 [0039] 210 215 220
 [0040] Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly
 [0041] 225 230 235 240

[0042]	Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0043]	245
[0044]	<210> 2
[0045]	<211> 1056
[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 Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
[0052]	20 25 30
[0053]	Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
[0054]	35 40 45
[0055]	Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
[0056]	50 55 60
[0057]	Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr
[0058]	65 70 75 80
[0059]	Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
[0060]	85 90 95
[0061]	Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
[0062]	100 105 110
[0063]	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr
[0064]	115 120 125
[0065]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly
[0066]	130 135 140
[0067]	Ser Gly Lys Pro Gly Ser Ser Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Val
[0068]	145 150 155 160
[0069]	Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala
[0070]	165 170 175
[0071]	Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser
[0072]	180 185 190
[0073]	Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
[0074]	195 200 205
[0075]	Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
[0076]	210 215 220
[0077]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
[0078]	225 230 235 240
[0079]	Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro
[0080]	245 250 255
[0081]	Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Ile
[0082]	260 265 270
[0083]	Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly

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

[0126]	610	615	620
[0127]	Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Thr Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe		
[0128]	625	630	635 640
[0129]	Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met		
[0130]		645	650 655
[0131]	Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro		
[0132]		660	665 670
[0133]	Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp		
[0134]		675	680 685
[0135]	Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe		
[0136]	690	695	700
[0137]	Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala		
[0138]	705	710	715 720
[0139]	Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr		
[0140]		725	730 735
[0141]	Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr		
[0142]		740	745 750
[0143]	Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser		
[0144]		755	760 765
[0145]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Met Val Gly Ala Leu Glu Ser Leu Arg		
[0146]	770	775	780
[0147]	Gly Asn Ala Asp Leu Ala Tyr Ile Leu Ser Met Glu Pro Cys Gly His		
[0148]	785	790	795 800
[0149]	Cys Leu Ile Ile Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg Glu Ser Gly Leu Arg		
[0150]		805	810 815
[0151]	Thr Arg Thr Gly Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg Arg Phe		
[0152]		820	825 830
[0153]	Ser Ser Leu His Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr Ala Lys		
[0154]		835	840 845
[0155]	Lys Met Val Leu Ala Leu Leu Glu Leu Ala Arg Gln Asp His Gly Ala		
[0156]	850	855	860
[0157]	Leu Asp Cys Cys Val Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln Ala Ser		
[0158]	865	870	875 880
[0159]	His Leu Gln Phe Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys Pro Val		
[0160]		885	890 895
[0161]	Ser Val Glu Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys Pro Ser		
[0162]		900	905 910
[0163]	Leu Gly Gly Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly Gly Glu		
[0164]		915	920 925
[0165]	Gln Lys Asp His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu Asp Glu		
[0166]	930	935	940
[0167]	Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln Glu Gly		

[0168]	945	950	955	960
[0169]	Leu Arg Thr Phe Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro Thr Pro			
[0170]		965	970	975
[0171]	Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val Ser Trp			
[0172]		980	985	990
[0173]	Arg Asp Pro Lys Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr Leu Asp Asp Ile			
[0174]		995	1000	1005
[0175]	Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu Leu Leu			
[0176]		1010	1015	1020
[0177]	Arg Val Ala Asn Ala Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr Lys Gln Met			
[0178]		1025	1030	1035
[0179]	Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr			
[0180]		1040	1045	1050
[0181]	Ser Ala Ser			
[0182]		1055		
[0183]	<210> 3			
[0184]	<211> 3171			
[0185]	<212> DNA			
[0186]	<213> 人工合成序列			
[0187]	<400> 3			
[0188]	atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgc cttcctgctg	60		
[0189]	atccccaga tccagctggt gcagagcggc gccgaggtga agaagcccgg cgccagcgtg	120		
[0190]	aagtgagct gcaaggccag cggctacacc ttcaccgact actacatcac ctgggtgaga	180		
[0191]	caggccccg gccaggcct ggagtggatg ggctggatct accccggcag cggcaacacc	240		
[0192]	aagtacaacg agaagtcaa gggcagagt accatgacca gagacaccag catcagcacc	300		
[0193]	gcctacatgg agctgagcag actgagaagc gacgacaccg ccgtgtacta ctgcccac	360		
[0194]	tacggcaact actggttcgc ctactggggc cagggcacc tggtgaccgt gagcagcggc	420		
[0195]	agcaccagcg gcagcggcaa gcccggcagc agcagaggca gcaccaagg cgacatcgtg	480		
[0196]	atgaccaga gccccgacag cctggccgtg agcctgggag agagagccac catcaactgc	540		
[0197]	aaggccagcc agagcgtgga cttcgacggc gacagctaca tgaactggta ccagcagaag	600		
[0198]	cccggccagc cccccaaact gctgatctac gccccagca acctggagag cggcgtgcc	660		
[0199]	gacagattca gcggcagcgg cagcggcacc gacttcacc tgaccatcag cagcctgcag	720		
[0200]	gccgaggacg tggccgtgta ctactgccag cagagcaacg aggacccctg gaccttggc	780		
[0201]	cagggcacca aggtggagat caaggccgc gccatcgagg tgatgtacc cccccctac	840		
[0202]	ctggacaacg agaagagcaa cggcaccatc atccacgtga agggcaagca cctgtgccc	900		
[0203]	agccccctgt tccccggccc cagcaagccc ttctgggtgc tgggtggtggt gggcggcgtg	960		
[0204]	ctggcctgct acagcctgct ggtgaccgtg gccttcac tcttctgggt gagaagcaag	1020		
[0205]	agaagcagac tgctgcacag cgactacatg aacatgacc ccagaagacc cggccccacc	1080		
[0206]	agaaagcact accagcccta cgccccccc agagacttcg ccgctacag aagcggcagc	1140		
[0207]	ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc cagagaagaa agtacagaag caacaaggc	1200		
[0208]	gagagccccg tggagcccgc cgagccctgc cactacagct gcccagaga ggaggaggc	1260		
[0209]	agcaccatcc ccatccagga ggactacaga aagcccagc ccgctgcag ccccggcggc	1320		

- [0210] ggcggcagcg gcggcgccgg cagcaccagc ggcggcgccg gcagcggcgg cggcggcagc 1380
 [0211] gtggtgaaga gaggcagaaa gaagctgctg tacatcttca agcagccctt catgagacc 1440
 [0212] gtgcagacca cccaggagga ggacggctgc agctgcagat tccccgagga ggaggagggc 1500
 [0213] ggctgcgagc tggcgccggc cggcagcggc ggcggcgcca gcggcgccgg cggcagcaga 1560
 [0214] gtgaagttca gcagaagcgc cgacgcccc gcctaccagc agggccagaa ccagctgtac 1620
 [0215] aacgagctga acctgggagc aagagaggag tacgacgtgc tggacaagag aagaggcaga 1680
 [0216] gaccccgaga tggcgccgaa gcccagaaga aagaaccccc aggaggccct gtacaacgag 1740
 [0217] ctgcagaagg acaagatggc cgaggcctac agcgagatcg gcatgaaggc cgagagaaga 1800
 [0218] agaggcaagg gccacgacgg cctgtaccag ggcctgagca ccgccacca ggacacctac 1860
 [0219] gacgacctgc acatgcaggc cctgcccccc agaaccagcg gcagcggcgc caccaacttc 1920
 [0220] agcctgctga agcagcccg gcacgtggag gagaaccccc gcccatggg cgtgcaggtg 1980
 [0221] gagaccatca gccccggcga cggcagaacc tcccccaaga gaggccagac ctgcgtggtg 2040
 [0222] cactacaccg gcatgctgga ggacggcaag aaggtggaca gcagcagaga cagaaacaag 2100
 [0223] ccctcaagt tcatgctggg caagcaggag gtgatcagag gctgggagga gggcgtggcc 2160
 [0224] cagatgagcg tggccagag agccaagctg accatcagcc ccgactacgc ctacggcgcc 2220
 [0225] accggccacc ccggcatcat cccccccac gccacctgg tgttcgacgt ggagctgctg 2280
 [0226] aagctggagg gcggcgccgg cagcggcggc ggcggcagcg gcgcatggt gggcgccctg 2340
 [0227] gagagcctga gaggcaacgc cgacctggcc tacatcctga gcatggagcc ctgcggccac 2400
 [0228] tgctgatca tcaacaacgt gaacttctgc agagagagcg gcctgagaac cagaaccggc 2460
 [0229] agcaacatcg actgcagaa gctgagaaga agattcagca gcctgcactt catggtggag 2520
 [0230] gtgaagggcg acctgaccgc caagaagatg gtgctggccc tgctggagct ggccagacag 2580
 [0231] gaccacggcg ccctggactg ctgcgtggtg gtgatcctga gccacggctg ccaggccagc 2640
 [0232] cacctgcagt tccccggcgc cgtgtaccgc accgacggct gccccgtgag cgtggagaag 2700
 [0233] atcgtgaaca tttcaacgg caccagctgc cccagcctgg gcggaagcc caagctgttc 2760
 [0234] ttcattccagg cctgcggcgg cgagcagaag gaccacggct tcgaggtggc cagcaccagc 2820
 [0235] cccgaggacg agagccccgg cagcaacccc gagcccagc ccacccccct ccaggagggc 2880
 [0236] ctgagaacct tcgaccagct ggacgccatc agcagcctgc ccaccccccag cgacatcttc 2940
 [0237] gtgagctaca gcacctccc cggcttctgt agctggagag accccaagag cggcagctgg 3000
 [0238] tacgtggaga ccctggacga catcttcgag cagtgggccc acagcgagga cctgcagagc 3060
 [0239] ctgctgctga gagtggccaa cgccgtgagc gtgaaggcca tctacaagca gatgccccgc 3120
 [0240] tgcttcaact tcctgagaaa gaagctgttc ttcaagacca gcgccagctg a 3171
 [0241] <210> 4
 [0242] <211> 423
 [0243] <212> PRT
 [0244] <213> 人工合成序列
 [0245] <400> 4
 [0246] Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
 [0247] 1 5 10 15
 [0248] Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro
 [0249] 20 25 30
 [0250] Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His
 [0251] 35 40 45

[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

[0294]	Leu Gln Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Asn Ala Val Ser Val Lys Gly
[0295]	385 390 395 400
[0296]	Ile Tyr Lys Gln Met Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys Leu
[0297]	405 410 415
[0298]	Phe Phe Lys Thr Ser Ala Ser
[0299]	420
[0300]	<210> 5
[0301]	<211> 21
[0302]	<212> PRT
[0303]	<213> 人工合成序列
[0304]	<400> 5
[0305]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0306]	1 5 10 15
[0307]	His Ala Ala Arg Pro
[0308]	20
[0309]	<210> 6
[0310]	<211> 22
[0311]	<212> PRT
[0312]	<213> 人工合成序列
[0313]	<400> 6
[0314]	Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
[0315]	1 5 10 15
[0316]	Ala Phe Leu Leu Ile Pro
[0317]	20

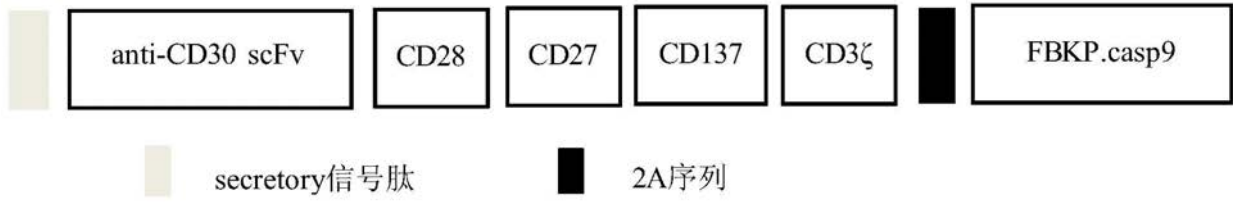


图1

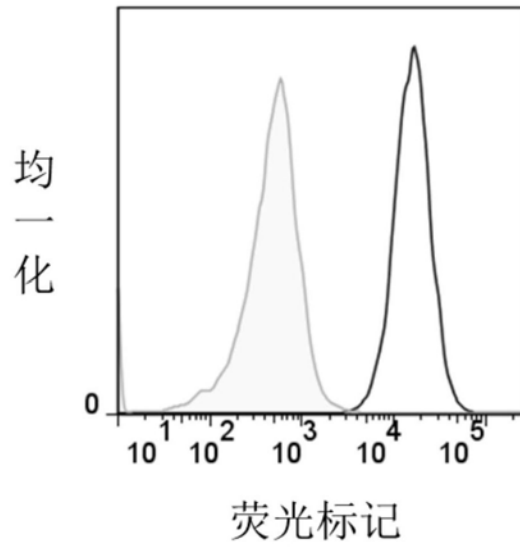


图2

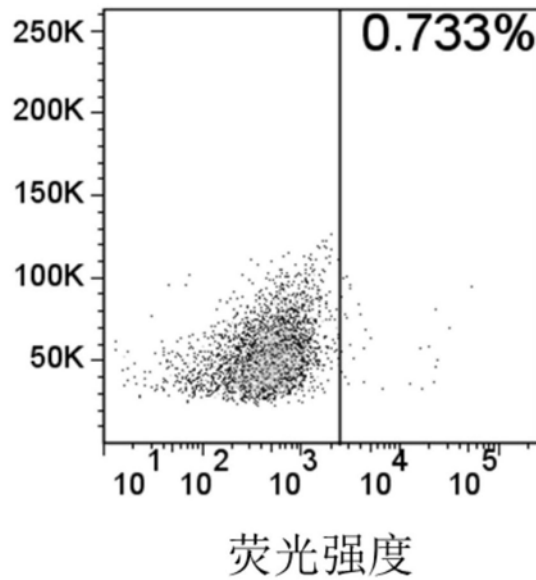


图3(a)

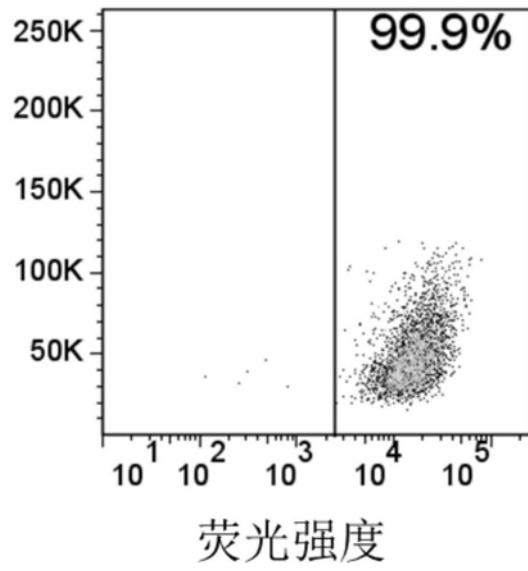


图3 (b)

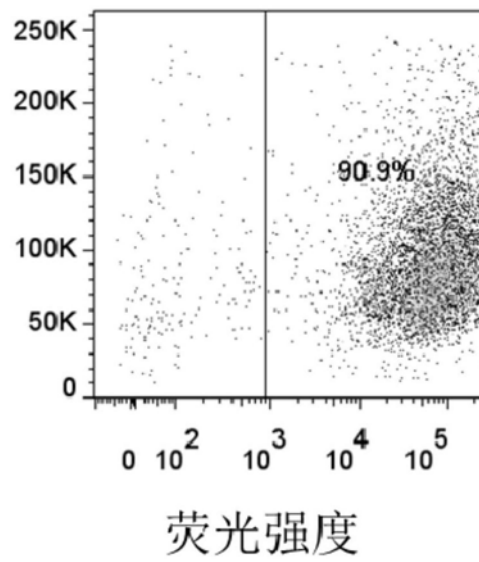
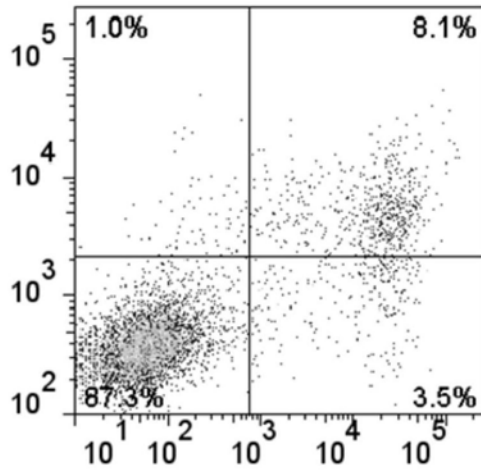
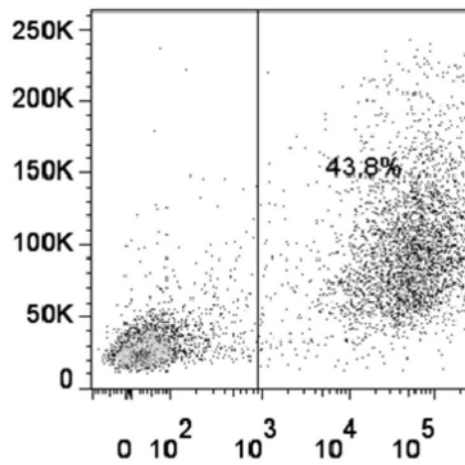


图4 (a)



荧光强度

图4 (b)



荧光强度

图5 (a)

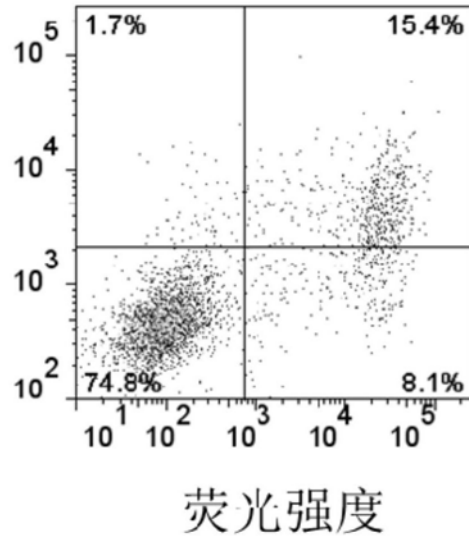


图5 (b)

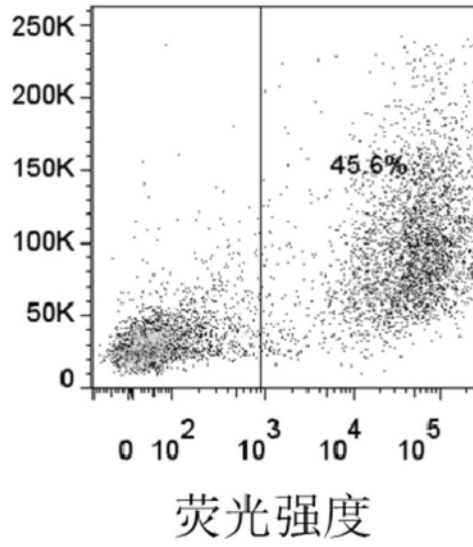


图6 (a)

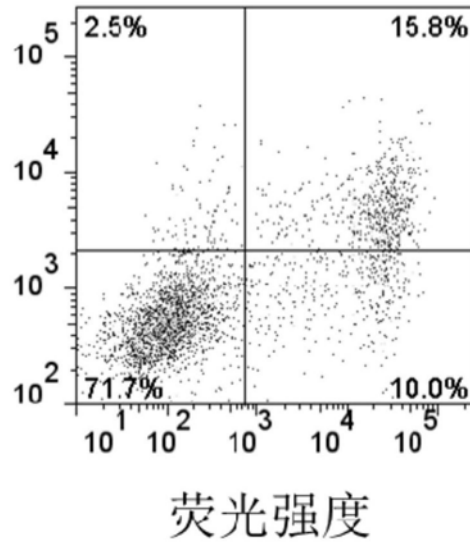


图6 (b)

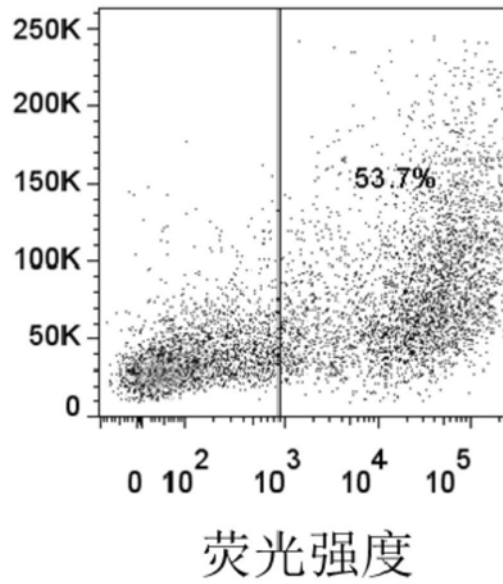


图7 (a)

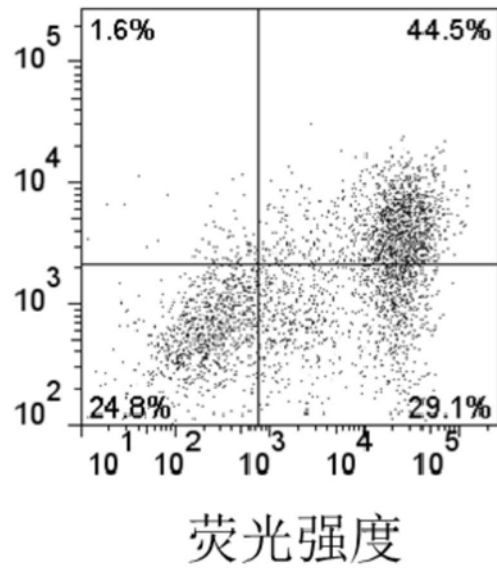


图7 (b)

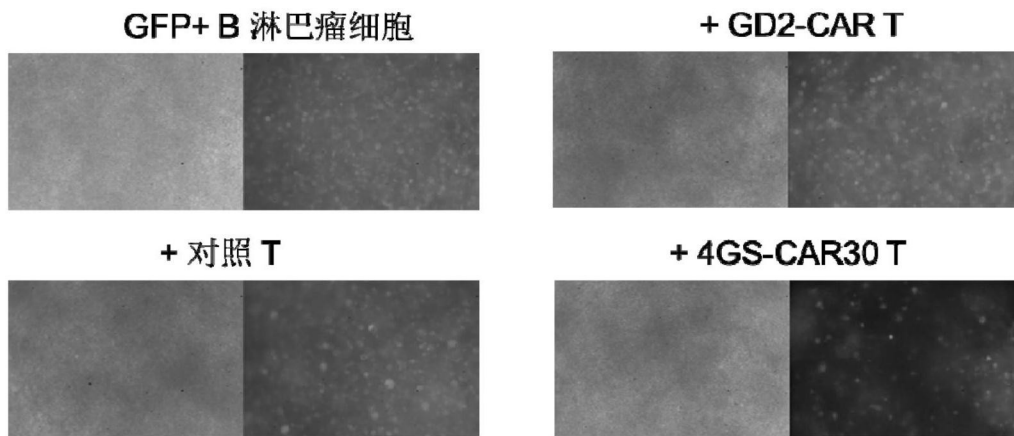


图8