



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109021114 A

(43)申请公布日 2018. 12. 18

(21)申请号 201810898277.9

C12N 5/10(2006.01)

(22)申请日 2018.08.08

A61K 35/17(2015.01)

(71)申请人 武汉波睿达生物科技有限公司

A61P 35/00(2006.01)

地址 430074 湖北省武汉市东湖新技术开发区高新大道666号生物城B4栋2楼

A61P 35/02(2006.01)

(72)发明人 张同存 顾潮江 吴寒 许婧  
李结珍 范博文 舒冲

(74)专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限公司 11228

代理人 张涛

(51)Int. Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/867(2006.01)

C12N 7/01(2006.01)

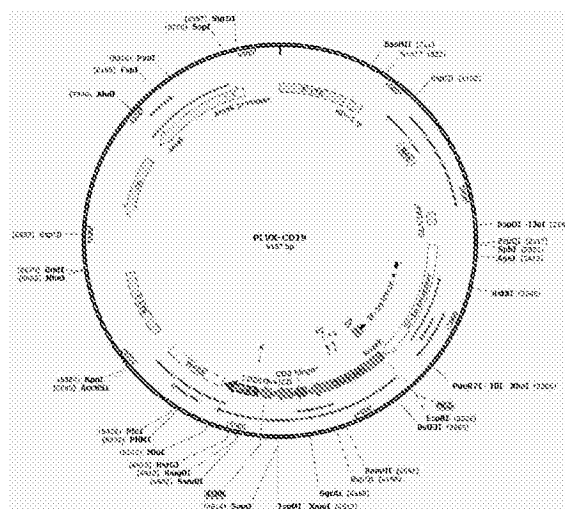
权利要求书1页 说明书12页  
序列表3页 附图13页

(54)发明名称

联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体及表达载体

(57)摘要

本发明提供了一种联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体、编码基因、联合表达载体、制备重组慢病毒的方法、制备联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体基因修饰的CD3+T的方法以及基因修饰的CD3+T细胞的用途,联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体包括:联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体包括CD8信号肽、由两个不同单链抗体构成的抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域。应用本发明实施例提供的技术方案,实现了对CD19靶点丢失复发患者和浆细胞肿瘤患者的治疗,为肿瘤疾病提供更加有效的治疗途径。



1. 一种联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体,其特征在于,包括CD8信号肽、由两个不同单链抗体构成的抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域。

2. 根据权利要求1所述联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体,其特征在于,所述抗原结合结构域为Anti-CD19-CD22双单链抗体,所述Anti-CD19-CD22双单链抗体由针对CD19的第一单链抗体和针对CD22的第二单链抗体通过Linker连接形成。

3. 根据权利要求2所述联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体,其特征在于,所述CD8信号肽由所述Anti-CD19-CD22双单链抗体、CD8hinge铰链区、白细胞抗原分化群分子跨膜区CD28、4-1BB和白细胞抗原分化群CD3的 $\zeta$ 链依次串联组成。

4. 根据权利要求3所述联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体,其特征在于,编码所述第一单链抗体的轻链+重链的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

5. 根据权利要求3所述联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体,其特征在于,编码所述第二单链抗体的轻链+重链的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

6. 基于权利要求2-5任一项所述联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体的编码基因,其特征在于,包括第一单链抗体的编码基因和第二单链抗体的编码基因。

7. 联合表达载体,其特征在于,包括表达权利要求2所述的第一单链抗体的编码基因和第二单链抗体的编码基因的转移载体。

8. 根据权利要求7所述的联合表达载体,其特征在于,所述转移载体为重组慢病毒载体pLVX-EF1 $\alpha$ -IRES-Puro。

9. 一种制备重组慢病毒的方法,其特征在于,方法包括:

用权利要求8所述的联合表达载体与慢病毒辅助包装质粒同时转染宿主细胞,得到含有CAR基因的重组慢病毒。

10. 一种制备权利要求1所述联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体基因修饰的CD3+T的方法,其特征在于,方法包括:

对权利要求9所述重组慢病毒进行转导分离,得到CD3+T细胞。

11. 一种基因修饰的CD3+T细胞的用途,其特征在于,权利要求10所述CD3+T细胞应用于治疗淋巴瘤和白血病。

## 联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体及表达载体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学领域,尤其涉及一种联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体、编码基因、联合表达载体、制备重组慢病毒的方法、制备联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体基因修饰的CD3+T的方法以及基因修饰的CD3+T细胞的用途。

### 背景技术

[0002] 肿瘤免疫治疗

[0003] 肿瘤免疫治疗的理论基础是免疫系统具有识别肿瘤相关抗原、调控机体攻击肿瘤细胞(高度特异性的细胞溶解)的能力。这个生物过程十分复杂,目前仍处于研究之中。上世纪90年代,多个科研小组已经发现了肿瘤抗原(tumor antigens),T淋巴细胞可以通过主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex,MHC)依赖性方式识别这些肿瘤抗原。

[0004] 肿瘤免疫治疗通常分为两类,非特异性免疫和特异性免疫。非特异性免疫治疗主要包括白细胞介素-2(interleukin-2,IL-2),干扰素 $\alpha$ (interferon $\alpha$ ,IFN- $\alpha$ ),肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF- $\alpha$ ),卡介苗等细胞因子和毒素,过继性细胞免疫治疗等。特异性免疫治疗主要是肿瘤疫苗。

[0005] 肿瘤非特异性免疫治疗

[0006] 非特异性免疫应答是与生俱来的,它的形成并不需要抗原刺激,能广泛地针对多种抗原,是免疫应答的基础,但特异性不强,对某种特定抗原物质往往不能产生足够强度的非特异性免疫反应。在进入临床试验的多种细胞因子中,白细胞介素-2和干扰素应用最为广泛[Rosenberg S A, Lotze M T, Muul L M, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone[J]. N Engl J Med, 1987, 316(15): 889-897]。

[0007] 肿瘤单克隆抗体的免疫治疗

[0008] 近20多年来单克隆抗体已在肿瘤治疗领域得到广泛应用。抗肿瘤单抗药物一般包括两类:一是抗肿瘤单抗,二是抗肿瘤单抗偶联物,或称免疫偶联物。免疫偶联物分子由单抗与“弹头”药物两部分组成,“弹头”主要包括放射性核素、药物和毒素,与单抗连接后分别构成放射免疫偶联物、化学免疫偶联物和免疫毒素。在1997年11月和1998年10月美国FDA分别通过了用于临床肿瘤治疗的两个单抗:Rituximab(rituxan)和Trastuzumab(herceptin)[Dillman R O. Magic bullets at last! Finally—approval of a monoclonal antibody for the treatment of cancer[J]. Cancer Biother Radiopharm, 1997, 12: 223-225.]。目前认为单抗的作用机制有阻断作用、信号传导作用以及靶向作用等三种作用机制,没有直接的杀伤作用。另外还存在药理学方面的问题,主要是到达肿瘤的药量不足。由于偶联物是异体蛋白,会被网状内皮系统摄取,有相当数量将积聚于肝、脾和骨髓。偶联物是大分子物质,通过毛细血管内皮层及穿透肿瘤细胞外间隙均受到限制。

### [0009] 肿瘤的过继免疫治疗

[0010] 肿瘤的过继免疫治疗是指将体外激活的自体或异体免疫效应细胞输注给患者,以杀伤患者体内的肿瘤细胞。肿瘤过继性免疫治疗中的一个关键问题是寻找合适的肿瘤杀伤细胞。自上世纪80年代以来,包括LAK、细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killers,CIK)、TIL等细胞已先后应用于临床,但由于存在着扩增倍速较低、细胞来源困难、细胞毒力不高等诸多问题,在临床应用上受到限制。如何提高T细胞的肿瘤抗原特异性具有重要的临床意义。T细胞对肿瘤抗原的识别主要是通过T细胞受体(T cell receptor,TCR)识别肿瘤细胞表面的人类白细胞抗原(human leukocyte antigen,HLA)-肽复合物,因此,T细胞对肿瘤抗原识别的特异性取决于T细胞表面的TCR。利用分子生物学的手段克隆肿瘤特异性T细胞的TCR,并通过构建含TCR的病毒载体,把TCR转入正常的T细胞中,使这些T细胞因携带肿瘤特异性而成为特异性肿瘤杀伤细胞[Johnson L A,Morgan R A,Dudley M E,et al.Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen[J].Blood,2009,114(3):535-546.]。

### [0011] 肿瘤疫苗治疗

[0012] 肿瘤疫苗治疗是通过给患者体内导入肿瘤抗原来激发患者的特异性抗肿瘤免疫反应。由于疫苗治疗具有特异性、在体内免疫效应维持时间长等优点,目前已成为研究热点。近年来多肽疫苗、核酸疫苗、全蛋白疫苗、抗独特性抗体疫苗、重组病毒疫苗、细菌疫苗、基因修饰的肿瘤细胞疫苗、树突状细胞(dendritic cells,DC)疫苗等得到广泛研究和应用[Robbins P F,Morgan R A,Feldman S A,et al.Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1[J].J Clin Oncol,2011,29(7):917-924.]。

[0013] 肿瘤疫苗治疗的大规模应用还有三个方面的问题亟待解决。首先,肿瘤相关抗原,每个肿瘤、每个亚型、每个肿瘤分期,这些相对抗原表达是不一样的,所以选准抗原,选准病人人群是至关重要的。第二,如何达到肿瘤抗原在树突状细胞中高效吸收与表达抗原被树突状细胞吸收是以表面受体为介导的。树突状细胞有十几个受体,如何根据特定的抗原选择相应的受体?第三,针对树突状细胞分化成熟的调控。树突状细胞的分化成熟是一个非常复杂的过程,它既可走向激活T细胞也可以走向抑制T细胞。

### [0014] 肿瘤CAR-T治疗

[0015] CAR-T,全称是Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy,即嵌合抗原受体T细胞免疫疗法。通过将识别肿瘤相关抗原的抗体片段scFv和CD3胞内信号域ITAM在体外进行基因重组,生成重组质粒,再在体外转染到患者的T细胞,使患者T细胞表达能结合肿瘤抗原的受体。转染后经过纯化和大规模扩增后的T细胞,也即CAR-T细胞。CAR-T技术利用病毒载体将CAR稳定表达在T细胞中,经过活化扩增,进入体内后能选择性识别并杀死肿瘤细胞。

[0016] 完整的CAR结构包括:抗原结合区(scFv,单链抗体,识别肿瘤相关抗原的抗体片段);跨膜连接区(可选);胞内信号区(T细胞活化基序,CD3胞内信号域ITAM)。*[Eleanor J.Cheadle,et al.CAR T cells:driving the road from the laboratory to the clinic.Immunological Reviews 2014.Vol.257:91-106]*。

[0017] 第一代CAR介导的T细胞激活是通过CD3 $\zeta$ 链或Fc $\epsilon$ RIg上的酪氨酸激活基序完成的。CD3 $\zeta$ 链能够提供T细胞激活、裂解靶细胞、调节IL-2分泌以及体内发挥抗肿瘤活性所需的信号。但第一代CAR改造T细胞的抗肿瘤活性在体内受到了限制，T细胞增殖减少最终导致T细胞的凋亡。

[0018] 第二代CAR在胞内增加了一个新的共刺激信号(跨膜共刺激信号)，实验证明，这使得原有的使源自TCR/CD3复合体的“信号1”扩大，许多研究都表明，搭载了“信号2”的第二代CAR与第一代CAR相比，抗原特异性不变，T细胞增殖、细胞因子分泌增加，抗细胞凋亡蛋白分泌增加，细胞死亡延迟。常用的共刺激分子为CD28，但之后有研究将CD28用CD137(4-1BB)进行替换，除此之外，一种使用NK细胞受体CD244的思路也被提出来。虽然不同的第二代CAR究竟孰优孰劣，不同的研究者用不同的肿瘤在体内和体外的研究中得到的结果不尽相同。

[0019] 为了进一步改良CAR的设计，许多研究组开始着眼于发展第三代CAR，不仅包括“信号1”、“信号2”，还包括了额外的共刺激信号。不同研究者们用不同的靶点和共刺激信号开展的研究所得到的第二代CAR和第三代CAR的比较结果存在一定的差异性。一些研究报道表达第三代CAR的重组T细胞在抗肿瘤活性、存活周期及细胞因子释放方面均显著提高；Wilkie等的研究结果显示靶向MMCI的第二代CAR与第三代CAR重组T细胞在抗肿瘤细胞毒性方面并无明显差异，虽然表达第三代CAR的T细胞能够分泌更大量的IFN- $\gamma$  (Wilkie S, Picco G, Foster J, et al. Retargeting of human T cells to tumor associated MMCI: the evolution of a chimeric antigen receptor. J Immunol 2008;180:4901-4909.)。值得注意的是，上述区别仅仅是体外实验中获得的结论，目前尚未在体内比较第二代和第三代CAR的报道。

[0020] 这几代CAR之间的差异可能不止来自于信号传导域，胞外的抗原结合域(scFv)、重组T细胞的转染方法(慢病毒VS逆转录病毒)、重组T细胞的回输方式(静脉回输VS腹膜VS瘤体)等均可能影响CAR-T细胞的最终抗肿瘤效果。

[0021] 第一、二、三代CAR的结构与功能归纳如下表：

[0022]

第一代	CD3 $\zeta$	提供 T 细胞活化的第二信使，特异性激活 T 细胞，具有杀伤毒性，体内无法增殖存活
第二代	CD3 $\zeta$ +CD28/4-1BB/OX40	加入一个共刺激因子，提高细胞毒性，在体内保留时间有限
第三代	CD3 $\zeta$ +CD28/4-1BB/OX40+CD134/CD137	加入两个共刺激因子，提高细胞毒性，维持 T 细胞的生存时间

[0023] CAR-T技术发展到现在已经开发出了第四代技术，包括整合表达免疫因子、整合共刺激因子配体等，甚至可以加入小分子开关等更加精准调控的方式，来用于各种肿瘤的治疗，并在临床试验中取得了显著的疗效。

[0024] CD19靶点的CAR-T细胞免疫治疗

[0025] CAR-T技术目前在临床上应用最成功的是用于治疗血液恶性肿瘤,这可能与其肿瘤相关抗原特异性较强、肿瘤微环境的免疫抑制作用较弱等因素相关。CD19特异性表达于B细胞表面,在B细胞发育分化的所有阶段和大多数B细胞肿瘤都有表达,而在造血干细胞及其他细胞中无表达,是治疗B细胞肿瘤很有潜力的靶点,也是目前CAR-T细胞免疫治疗研究中的热点。国内外正在开展的应用Anti-CD19 CAR-T细胞治疗血液系统肿瘤的临床试验有20余项,包括慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、急性B淋巴细胞白血病 (ALL) 等。

[0026] 疗效总结:

[0027] 随着CAR-T细胞免疫治疗方案的不断进步,目前Anti-CD19 CAR-T细胞治疗ALL的几个大型临床试验中报道的有效率已达到较高水平。2014年10月份,UP团队报道了30例复发难治性ALL的Anti-CD19 CAR-T细胞治疗结果,有30例儿童和成人接受了Anti-CD19 CAR-T细胞回输治疗,其中27例(90%)获得了完全缓解(CR),有8例(27%)发生了严重的CRS不良反应,给予妥珠单抗治疗后不良反应得到有效控制,不良反应的发生与较重的肿瘤负荷呈正相关,病例中可观测到至少24个月以上的持续缓解。2015年12月,诺华公布了一项Anti-CD19 CAR-T细胞治疗复发/难治性ALL的II期临床研究结果,共有59例儿童及年轻成人患者接受Anti-CD19 CAR-T细胞治疗后,CR率达到93%。这是目前已经报道的有关Anti-CD19 CAR-T细胞治疗ALL的最大临床研究,随访数据显示,12个月时总生存率为79%,6个月时的无复发生存率为76%,其中18例患者在治疗后12个月表现出持续CR反应。27%的患者由于严重CRS反应而接受妥珠单抗治疗,治疗后不良反应得到有效控制。据统计,Anti-CD19 CAR-T细胞对ALL治疗的平均客观反应率为93%左右。

[0028] Anti-CD19 CAR-T细胞治疗CLL的临床研究数量较ALL少,其有效率也较ALL低。2013年,MD Anderson团队报道了Anti-CD19 CAR-T细胞治疗异基因移植后复发且难治的4例CLL患者,1例获得8周部分缓解(PR),1例达15个月以上的疾病稳定(SD),2例PD,此治疗有效率较低可能与未实施有效化疗预处理有关。2015年1月,NCI团队报道了Anti-CD19 CAR-T细胞治疗复发/难治性CLL的4例患者,在联合氟达拉滨/环磷酰胺预处理方案后,有3例获得CR,1例获得PR,其中1例CR患者表现出至少23个月以上的持续缓解。2015年9月,UP团队报道了Anti-CD19 CAR-T细胞治疗复发/难治性CLL的I期临床结果,共有14例患者联合不同预处理方案后接受了 $0.14 \times 10^8 \sim 11 \times 10^8$ 总量的Anti-CD19 CAR-T细胞,总体客观反应率为57% (n=8),其中4例CR,4例PR;体内CAR-T细胞的扩增与临床反应呈正相关,接受治疗4年后,4例CR患者均未出现复发,CAR-T细胞在2例CR患者中仍表现出抗肿瘤活性。据统计,Anti-CD19 CAR-T细胞对CLL治疗的平均客观反应率在36%左右。

[0029] Anti-CD19 CAR-T细胞对于B细胞淋巴瘤也具有较高的临床反应率。2010年MD Anderson团队首次利用Anti-CD19 CAR-T细胞治疗了6例非霍奇金淋巴瘤(NHL)患者,在未接受化疗预处理情况下2例获得SD反应,4例获得PR。2012、2013和2015年,NCI的Rosenberg团队报道了共计19例Anti-CD19 CAR-T细胞治疗B细胞淋巴瘤的案例。2013年报道的文章中患者未接受化疗预处理,2例弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)患者中1例PD、1例SD,4例套细胞淋巴瘤(MCL)中有1例PR、3例SD。2011年和2015年的报道中,所有患者在接受CAR-T细胞治疗前均接受化疗预处理,2例脾边缘带淋巴瘤均获得PR,且1例持续反应至少23个月以上;3例可评价的FL均为PR;3例原发纵膈大B淋巴瘤中有2例CR,1例SD;4例DLBCL患者中2例获得CR,2

例获得PR;1例低度恶性淋巴瘤获得CR。据统计, Anti-CD19 CAR-T细胞对B细胞淋巴瘤治疗的平均客观反应率为62%左右。

[0030] 存在问题:

[0031] 以CD19为靶点的CAR-T细胞疗法效果显著、研究广泛,已成为多数临床研究机构开展基因修饰T细胞治疗研究的模式疗法。然而, CAR-T细胞免疫治疗仍存在很多问题,如复发问题 and 安全性问题。随着CAR-T细胞在血液中的衰亡、CAR丢失或靶抗原突变等原因,许多患者在肿瘤清除后一段时间后出现复发。安全性问题,尤其是CRS问题,也是CAR-T细胞临床应用中不得不面对的一个重要问题。对于B细胞肿瘤的治疗,CD19是一个理想靶点,但Anti-CD19 CAR-T细胞无法满足CD19靶点丢失复发患者和浆细胞肿瘤的患者。

## 发明内容

[0032] 本发明的目的在于克服现有技术之缺陷,提供了一种联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体、编码基因、联合表达载体、制备重组慢病毒的方法、制备联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体基因修饰的CD3+T的方法以及基因修饰的CD3+T细胞的用途,以实现CD19靶点丢失复发患者和浆细胞肿瘤患者的治疗。

[0033] 本发明是这样实现的:

[0034] 第一方面,本发明提供一种联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体,包括CD8信号肽、由两个不同单链抗体构成的抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域。

[0035] 可选的,所述抗原结合结构域为Anti-CD19-CD22双单链抗体,所述Anti-CD19-CD22双单链抗体由针对CD19的第一单链抗体和针对CD22的第二单链抗体通过Linker连接形成。

[0036] 可选的,所述CD8信号肽由所述Anti-CD19-CD22双单链抗体、CD8 hinge铰链区、白细胞抗原分化群分子跨膜区CD28-TM、4-1BB和白细胞抗原分化群CD3的 $\zeta$ 链依次串联组成。

[0037] 可选的,编码所述第一单链抗体的轻链+重链的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0038] 可选的,编码所述第二单链抗体的轻链+重链的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0039] 第二方面,本发明提供一种基于上述联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体的编码基因,包括第一单链抗体的编码基因和第二单链抗体的编码基因。

[0040] 第三方面,本发明提供一种联合表达载体,包括表达上述第一单链抗体的编码基因和第二单链抗体的编码基因的转移载体。

[0041] 可选的,所述转移载体为重组慢病毒载体pLVX-EF1 $\alpha$ -IRES-Puro。

[0042] 第四方面,本发明提供一种制备重组慢病毒的方法,方法包括:用上述联合表达载体与慢病毒辅助包装质粒同时转染宿主细胞,得到含有CAR基因的重组慢病毒。

[0043] 第五方面,本发明提供一种制备上述联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体基因修饰的CD3+T的方法,方法包括:对上述重组慢病毒进行转导分离,得到CD3+T细胞。

[0044] 第六方面,本发明提供一种基因修饰的CD3+T细胞的用途,上述CD3+T细胞应用于治疗淋巴瘤和白血病。

[0045] 本发明具有以下有益效果:本发明提供的双特异性嵌合抗原受体,能同时识别CD19表达的肿瘤细胞和CD22表达的肿瘤细胞,能明显降低之前CD19 CAR和CD22 CAR单独治疗时的高复发情况。在以下方面更体现其突出的优越性:

- [0046] 1、增加了难治复发B细胞急性白血病和B细胞淋巴瘤的完全缓解率。
- [0047] 2、增加了难治复发B细胞急性白血病和B细胞淋巴瘤的长期生存率。

### 附图说明

[0048] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图。

- [0049] 图1是重组慢病毒载体pLVX-CD19的结构示意图;
- [0050] 图2是图1中CAR19的部分结构示意图;
- [0051] 图3是图1中pLVX-CD19质粒的部分测序对比图,图中下端黑色线条表示标准序列,灰色线条表示测序序列比对结果;
- [0052] 图4是重组慢病毒载体pLVX-CD22的结构示意图;
- [0053] 图5是图4中CAR22的部分结构示意图;
- [0054] 图6是图4中pLVX-CD22质粒的部分序列测序对比图,图中下端黑色线条表示标准序列,灰色线条表示测序序列比对结果;
- [0055] 图7是pLVX-CD19质粒的浓度检测结果;
- [0056] 图8是pLVX-CD22质粒的浓度检测结果;
- [0057] 图9是pLVX-CD19质粒和pLVX-CD22质粒的酶切检测结果;
- [0058] 图10是Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞转导效率检测结果;
- [0059] 图11是Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞体外杀瘤实验结果;
- [0060] 图12是EGFP慢病毒转染T细胞、Anti-CD19 CAR-T细胞、Anti-CD22 CAR-T细胞、Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞和普通T细胞对肿瘤在B-NSG小鼠体内生长的影响的试验结果。
- [0061] 图13是pLVX-CD19质粒的序列片段结构图;
- [0062] 图14是pLVX-CD22质粒的序列片段结构图;
- [0063] 图15是重组慢病毒载体pLVX-CD19-CD22的结构示意图;
- [0064] 图16是图15中重组慢病毒载体pLVX-CD19-CD22的部分结构示意图;
- [0065] 图17是图15中重组慢病毒载体pLVX-CD19-CD22的测序对比图,图中下端黑色线条表示标准序列,灰色线条表示部分测序序列比对结果;
- [0066] 图18是pLVX-CD19-CD22质粒的浓度检测结果;
- [0067] 图19是pLVX-CD19-CD22质粒的酶切检测结果。

### 具体实施方式

[0068] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

- [0069] 需要生物和试剂材料来源:
- [0070] pLVX-EF1 $\alpha$ -IRES-Puro:购自Clontech。



[0071] DH5alpha感受态细胞:购自Takara。

[0072] EndoFree plasmid mega kit:购自Qiagen,包括QIAfilter Cartridge、Buffers P1、Buffers P2、Buffers P3、Buffer FW、Buffer ER、Buffers QBT、Buffer QC、Buffer QN、Endotoxin-free water、Buffer TE。

[0073] gag质粒和vsug质粒:购自Addgene:

[0074] 293T细胞:购自Takara。

[0075] 实施实例1、重组慢病毒载体pLVX-CD19-CD22的构建

[0076] 第一单链抗体的轻链+重链的核苷酸序列可以称为CAR19 (CD19scFv) 序列,第二单链抗体的轻链+重链的核苷酸序列可以称为CAR22 (CD22scFv) 序列,CAR19 (CD19scFv) 序列可以如SEQ ID NO.1所示,CAR22 (CD22scFv) 序列可以如SEQ ID NO.2所示。

[0077] 为了进一步改良CAR的设计,采用第三代CAR的白细胞抗原分化群分子跨膜区CD28和4-1BB作为跨膜共刺激信号分子。CAR序列如下:

[0078] SEQ ID NO.3为CAR19 (CAR19+CD8hinge+CD28+4-1BB+CD3 $\zeta$ )。

[0079] SEQ ID NO.3为CAR22 (CAR22+CD8hinge+CD28+4-1BB+CD3 $\zeta$ )。

[0080] 按序列1 (CAR19,参见图13,标记为CAR19,SEQ ID NO.3) 和序列2 (CAR22,参见图14,标记为CAR22,SEQ ID NO.4),由南京金斯瑞生物科技公司进行基因合成,合成的序列克隆到T载体上。

[0081] 1、CAR19序列片段长度1596bp,两端分别设计EcoRI和MluI酶切位点,克隆到慢病毒骨架质粒pLVX-EF1 $\alpha$ -IRES-Puro的多克隆位点完成载体的构建。构建完整图谱参见图1。

[0082] 其中CAR19的部分结构为图2所示,CD19是以CD28和4-1BB为共刺激信号的三代CAR。

[0083] pLVX-CD19序列测序对比图如图3所示:图中下端黑色线条表示标准序列,灰色线条表示测序序列比对结果,结果显示序列匹配完全一致。

[0084] 2、CAR22序列片段长度1443bp,两端分别设计EcoRI和MluI切位点,克隆到慢病毒骨架质粒pLVX-EF1 $\alpha$ -IRES-Puro的多克隆位点完成载体的构建。构建完整图谱如图4所示。

[0085] 其中CAR22的部分结构为图5所示,CD22是以CD28为共刺激信号的二代CAR。

[0086] pLVX-CD22序列测序对比图如图6所示:图中下端黑色线条表示标准序列,灰色线条表示测序序列比对结果,结果显示序列匹配完全一致。

[0087] 3、分别以构建正确的pLVX-CD19质粒、pLVX-CD22质粒为模板,设计引物PCR扩增片段CAR19和CAR22,采用Overlap PCR扩增获得带有酶切位点EcoR I-HF和SgrA I的片段scFv CD19-G4S-CD22;

[0088] 4、将构建正确的三代慢病毒骨架质粒pLVX-CD19使用EcoR I-HF和SgrA I限制性内切酶进行双酶切,产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,并割胶回收置于Eppendorf管内,用QIAGEN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段,并测定产物的纯度和浓度。

[0089] 5、将片段以1:1摩尔比加入Eppendorf管加入T4DNA连接酶 (NEB) 与T4DNA连接酶buffer,22 $^{\circ}$ C反应2小时;将连接液取出8 $\mu$ L加入100 $\mu$ L DH5alpha感受态细胞冰浴30min后42 $^{\circ}$ C热激90s,完成后加入500 $\mu$ L soc培养基37 $^{\circ}$ C、220rpm培养2小时;2小时后将Eppendorf管4000g离心1min移除400 $\mu$ L多余液体。将剩余液体涂布在LB平板37 $^{\circ}$ C培养12小时;在平板上挑取单菌落,接种到5mL LB液体培养基中37 $^{\circ}$ C、220rpm培养12小时。

[0090] 6、用QIAGEN小提试剂盒提取质粒,获得pLVX-CD19-CD22质粒;送南京金斯瑞生物科技公司一代测序验证无误后,进行含pLVX-CD19-CD22质粒的DH5alpha菌株保种。

[0091] 实施实例2、pLVX-CD19-CD22质粒的制备

[0092] 将含pLVX-CD19-CD22质粒的DH5alpha菌种接种至250mL含100 $\mu$ g/mL氨苄霉素的LB培养液中,37 $^{\circ}$ C、220rpm培养过夜。培养液在4 $^{\circ}$ C于6000g离心20min,弃上清。

[0093] 取出EndoFree plasmid mega kit (Qiagen)中的Buffers P1,向离心得到的大肠杆菌沉淀中加120mL提前预冷的Buffers P1,盖上离心瓶盖,剧烈振荡离心瓶使大肠杆菌沉淀在Buffers P1中完全分散。

[0094] 向离心瓶中加入120mL Buffers P2,盖上瓶盖放置在滚轴混匀仪上,慢慢提速至50rpm,彻底混匀后室温放置5min。

[0095] 向离心瓶中加入120mL Buffers P3,盖上瓶盖放置在滚轴混匀仪上,慢慢提速至滚轴混匀仪最大转速70rpm,彻底混匀直至呈白色不粘稠蓬松的混合液。在4 $^{\circ}$ C于9000g离心15min。

[0096] 向QIAfilter Cartridge倒入50mL Buffer FW,将离心所得上清液倒入QIAfilter Cartridge中,轻轻地搅拌混匀。将混合液抽滤入已标记好对应的玻璃瓶中。

[0097] 向每个玻璃瓶中加入20mL Buffer ER,上下颠倒混匀6次,在-20 $^{\circ}$ C孵育30min。

[0098] 将标记好的mega柱放入对应的架子上,向每个mega柱内加入35mL BuffersQBT平衡,重力作用使之流尽。

[0099] 将玻璃瓶中的液体分批全部倒入对应标记的mega柱中,待柱中液体流尽后,向每个mega柱分批加入200mL Buffer QC进行清洗。待柱中液体流尽后,将废液收集盘中的废液倒入50mL洁净离心管内。

[0100] 再向每个mega柱内加入40mL Buffer QN,使用50mL洁净离心管收集流出液,上下颠倒6次混匀,分装20mL至另一洁净已标记的50mL离心管内。

[0101] 向每个50mL离心管加入14mL异丙醇(常温),上下颠倒6次混匀。在4 $^{\circ}$ C于15000g离心50min。

[0102] 超净工作台内吸尽上清,每管加入3.5mL Endotoxin-free water漂洗,不要将底部沉淀冲散。在4 $^{\circ}$ C于15000g离心30min。将EndoFree plasmid mega kit中的Buffer TE放入烘箱内预热。

[0103] 在超净工作台内吸尽离心后的上清,于超净工作台内吹干(挥发残留的无水乙醇,时间在10min左右)。

[0104] 在烘箱内拿出Buffer TE,在超净工作台内向每管加入1mL Buffer TE,用枪吹打10次后放入65 $^{\circ}$ C烘箱,期间不间断地敲击管壁促使沉淀完全溶解。在4 $^{\circ}$ C于4000g离心1min将管壁上的液体甩到管底后吹打混匀。

[0105] 在超净工作台内将液体全部转移至无内毒素无热源无核酸酶对应标记的EP管中。吸出2 $\mu$ L,用微量分光光度计测质粒浓度,并标记在对应的EP管上,获得pLVX-CD19-CD22质粒。

[0106] 质粒检查:

[0107] 1. 质粒浓度检查

[0108] 收到样本,取1 $\mu$ L进行浓度测定,使用超微量紫外分光光度计(Nanodrop),进入核

酸测量模块,设置参数,空白校正后上样进行检测,结果见图7、图8和表1:

[0109] 表1 pLVX-CD19-CD22质粒的制备检测

[0110]

样品名称	样品性状	样本体积( $\mu$ L)	Nanodrop 检测		
			Conc. (ng/ $\mu$ L)	260/280	260/230
pLVX-CD19-CD22	澄清透明	50	1117.55	1.978	1.772

[0111] 2. 质粒DNA(酶切)检查

[0112] 原理:琼脂糖凝胶电泳是用于分离、鉴定和提纯DNA片段的标准方法。琼脂糖是从琼脂中提取的一种多糖,具亲水性,但不带电荷,是一种很好的电泳支持物。DNA在碱性条件下(pH8.0的缓冲液)带负电荷,在电场中通过凝胶介质向正极移动,不同DNA分子片段由于分子和构型不同,在电场中的泳动速率液不同。溴化乙锭(EB)可嵌入DNA分子碱基对间形成荧光络合物,经紫外线照射后,可分出不同的区带,达到分离、鉴定分子量,筛选重组子的目的。

[0113] 通过酶切鉴定结果可以初步判断原液中超螺旋质粒含量,超螺旋含量越高,质粒的纯度越好,对后面病毒包装效率越好。

[0114] 方法:分别取200ng样本,用Not I, Cla I双酶切,Not I/Cla I单酶切,采用0.7%琼脂糖凝胶电泳检测。胶孔上方标注为样品编号,M1:10000kb DNA Marker(10000、8000、6000、5000、4000、3500、3000、2000、1500、1200、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100),M2:D15000DNA Marker(5000、3000、2000、1000、750、500、250、100)。样品琼脂糖凝胶电泳图(样品上样约100ng),结果见图19。

[0115] 3. 目的基因测序

[0116] 取20 $\mu$ L(500ng)质粒DNA,外送测序,根据原始种子序列,检查质粒生产所得产品的目的基因有无发生改变,稳定的工艺下,工作种子在进行发酵培养放大过程中,目的基因不会发生改变,可用于下一环节的生产和正确表达蛋白。

[0117] 实施实例3、重组慢病毒LV Anti-CD19-CD22 CAR的制备

[0118] 在多层细胞培养瓶(Hyperflask)(Corning)接入 $130.0\sim 140.0\times 10^6$ 数目的293T细胞(Takara),共560mL DMEM完全培养基(50mL胎牛血清、5mL Antibiotic-Antimycotic(100 $\times$ )),在37 $^{\circ}$ C含5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24小时。将混有320 $\mu$ g质粒(pLVX-CD19-CD22:gag质粒:vsug质粒=6:3:2)的DMEM完全培养基加入960 $\mu$ g PEI管中,漩涡震荡,室温平衡10min。将上述35mL PEI与质粒的混合液与525mL DMEM完全培养基混匀,换入上述多层细胞培养瓶中。将多层细胞培养瓶置于37 $^{\circ}$ C含5%CO<sub>2</sub>培养箱培养3天后,收集细胞培养上清液。

[0119] 上清液4000rpm(或3000g)离心30min后,向离心后上清中加入cryonase酶(Takara)置于4 $^{\circ}$ C.6个小时后,使用0.22 $\mu$ m的滤膜对慢病毒上清液进行抽滤,4 $^{\circ}$ C于3000g离心2.5h。去除上清,加入1mL T细胞培养基重悬沉淀。重悬后,留20 $\mu$ L做病毒活性滴度检测,剩余慢病毒浓缩液分装,标记为LV Anti-CD19-CD22 CAR并置于-80 $^{\circ}$ C保存备用。

[0120] 慢病毒活性滴度检测:

[0121] 原理:Protein-L上标记有荧光素,而protein-L能与CAR中单链抗体轻链的Kappa

区特异性结合,通过流式细胞仪检测到的荧光信号间接反应了CAR在293T细胞中的表达情况。

[0122] 方法:在6孔板中接入 $5.0 \times 10^5$ 个/孔293T细胞,慢病毒浓缩液每孔分别加入0.1 $\mu$ L、0.5 $\mu$ L、1 $\mu$ L,并设1个阴性对照。置于37 $^{\circ}$ C含5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养。三日后,用Versene溶液(Gibco)收集293T细胞送流式细胞学检测CAR阳性293T细胞比例,并换算得到LV Anti-CD19-CD22 CAR慢病毒浓缩液活性滴度。

[0123] 目前的慢病毒浓缩液活性滴度在1~10E+08范围内,检测分析结果见表2:

[0124] 表2 LV Anti-CD19-CD22 CAR病毒活性滴度检测分析结果

[0125]

样品编号	病毒添加量( $\mu$ L)	转染效率	活性滴度
01	对照(CK)	3.73%	/
02	0.1	2.85%	1.43E+08
03	0.5	8.79%	8.79E+07
04	1	15.70%	7.85E+07

[0126] 实施实例4、Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞的制备

[0127] 采集健康供者外周血100mL,采用Ficoll淋巴细胞分离液分离单个核细胞。计数后,使用适量CD3MicroBeads,human(美天旎)分选CD3阳性细胞,并以 $1.0 \sim 2.0 \times 10^6$ 个/mL密度在T细胞完全培养液(OpTmizer™ CTS™ T-Cell Expansion Basal Medium,OpTmizer™ CTS T-Cell Expansion Supplement(Invitrogen),500IU/mL的IL-2(双鹭药业))中培养,同时按25 $\mu$ L/10<sup>6</sup>个细胞加入Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28(Invitrogen)活化T细胞。

[0128] 24小时后,按MOI为3加入LV Anti-CD19-CD22 CAR慢病毒进行转导,混匀后置于CO<sub>2</sub>培养箱孵育,4小时后补加适量的T细胞完全培养基进行培养。

[0129] 慢病毒转导24小时后将转导后Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞换入新鲜T细胞完全培养液,并调整活细胞密度为 $1.0 \times 10^6$ /mL,继续培养扩增10~20天,每天进行观察和计数,并根据计得的细胞数量进行补液扩大培养,始终保持细胞培养密度为 $1.0 \times 10^6$ /mL。

[0130] CAR-T细胞制剂制备:

[0131] 根据预计细胞用量收集Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞,重悬于含2%人血白蛋白的100mL生理盐水中,转入细胞回输袋中,热封后制成Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞制剂成品。

[0132] Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞转导效率检测

[0133] 取 $1.0 \times 10^6$ 个转导后T细胞,与1 $\mu$ g/mL FITC-Protein-L室温孵育30分钟,生理盐水清洗两次后,通过流式细胞仪检测FITC荧光信号,测量FITC阳性细胞比率,反映了CAR-T细胞在总细胞中的比率。检测结果如图10和表3所示。说明成功制备了Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞。

[0134] 表3 Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞转导效率检测结果

[0135]

编号	转导类型	转导效率
20180424 CAR-T转效	Anti-CD19-CD22 CAR-T	59.5%

[0136] 实施实例5、Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞的体外功能检测

[0137] 采用钙黄绿素检测法对Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞进行体外杀瘤功能检测。

[0138] 取适量Raji细胞作为靶细胞,在 $1 \times 10^6$ /mL的细胞悬液(PBS,5%胎牛血清)加入钙黄绿素-乙酰羟甲基酯(Calcein-AM)至终浓度 $25 \mu\text{M}$ ,培养箱中孵育30min。常温,洗两遍后将细胞重悬至 $1.5 \times 10^5$ /mL。按不同效靶比加入Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞,200g离心30秒,37℃孵育2~3小时。孵育完成后取上清,测量其中钙黄绿素的荧光强度,并根据自发释放对照和最大释放对照,计算靶细胞裂解百分数。

[0139] 杀瘤实验数据:对慢病毒转导的T细胞在应用前需进行其对肿瘤细胞系杀伤等功能性检测,使用钙黄绿素检测法。结果参见图11及表4:

[0140] 表4 Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞体外杀瘤实验结果

效靶比	杀伤效率	
	Anti-CD19-CD22 CAR-T 细胞	T 细胞
[0141] 16:1	36.75%	8.46%
8:1	18.22%	8.15%
4:1	10.88%	4.38%

[0142] 实施实例6、Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞在小鼠荷瘤模型中抗肿瘤效应

[0143] 为了检测Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞在体内的抗肿瘤效应,本实施实例选择免疫缺陷B-NSG小鼠(百奥赛图江苏基因生物有限公司)与Raji-luc细胞用于建立肿瘤模型,建模成功后分组并分别尾静脉注射EGFP慢病毒转染T细胞、Anti-CD19 CAR-T细胞、Anti-CD22 CAR-T细胞、Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞和普通T细胞,使用IVIS Spectrum小动物活体成像系统(Xenogen,Hopkinton,USA),分别于不同的时间进行活体成像,分析成像试验结果。具体试验步骤如下:

[0144] 1.建模,给5~6周龄的B-NSG小鼠尾静脉注射(i.v.) $1.5 \times 10^6$ 个Raji-luc细胞/只。

[0145] 2.7天后动物成像,分别以100~150mg/kg的剂量腹腔注射D-luciferin(Molecular Imaging Products,Bend,USA)、50~75mg/kg的剂量腹腔注射1%戊巴比妥钠注射液麻醉小鼠,等10~15分钟后使用IVIS小动物活体成像系统(Xenogen,Hopkinton,USA)收集光信号。

[0146] 3.建模成功后,当天进行分组,分别尾静脉注射EGFP慢病毒转染T细胞、Anti-CD19 CAR-T细胞、Anti-CD22 CAR-T细胞、Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞和普通T细胞,分组如下:

[0147] (1)EGFP慢病毒转染T细胞注射组,尾静脉注射EGFP慢病毒转染T细胞 $1 \times 10^7$ 个/只;

[0148] (2)Anti-CD19 CAR-T细胞注射组,尾静脉注射Anti-CD19 CAR-T细胞 $1 \times 10^7$ 个/

只；

[0149] (3) Anti-CD22 CAR-T细胞注射组,尾静脉注射Anti-CD22 CAR-T细胞 $1 \times 10^7$ 个/只；

[0150] (4) Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞注射组,尾静脉注射Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞 $1 \times 10^7$ 个/只；

[0151] (5) 普通T细胞注射组,尾静脉注射普通T细胞 $1 \times 10^7$ 个/只。

[0152] 4. 静脉注射T细胞后的第7、10、14、18天后分别进行荷瘤小鼠活体成像,分析活体成像试验结果,参见图12,其中EGFP:EGFP慢病毒转染T细胞注射组;CD19:Anti-CD19 CAR-T细胞注射组;CD22:Anti-CD22 CAR-T细胞注射组;CD19-CD22:Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞注射组;NT:普通T细胞注射组。

[0153] 荷瘤小鼠活体成像结果显示,普通T细胞注射组和EGFP慢病毒转染T细胞注射组小鼠的肿瘤逐渐增大直至小鼠死亡;而与普通T细胞注射组和EGFP慢病毒转染T细胞注射组相比,Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞注射组荷瘤小鼠体内的肿瘤逐渐消失。这表明普通T细胞和EGFP慢病毒转染T细胞对在荷瘤小鼠体内肿瘤细胞无抗肿瘤效应,而Anti-CD19-CD22 CAR-T细胞在荷瘤小鼠体内具有很好的抗肿瘤效果,为临床用药提供理论依据。

[0154] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

## 序列表

<110> 武汉波睿达生物科技有限公司

<120> 联合两种单链抗体的双特异性嵌合抗原受体及表达载体

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 735

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

```
atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg 60
gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 120
aagccccgacg gcaccgtcaa getgetgate taccacacca gccggctgca cagcggcgtg 180
cccagccggt ttagcggcag cggetccggc accgactaca gectgacct ctccaacctg 240
gaacaggaag atatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt 300
ggcggcgga caaagctgga aatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc 360
ggcgagggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcaggaaa gcggccctgg cctggtggcc 420
cccagccaga gcctgagcgt gacctgcacc gtgagcggcg tgagcctgcc cgactacggc 480
gtgagctgga tccggcagcc ccccaggaag ggctggaat ggctgggctg gatctggggc 540
agcgagacca ctactacaa cagcgcctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac 600
agcaagagcc aggtgttct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 660
tactgcgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc 720
accagcgtga ccgtg 735
```

<210> 2

<211> 738

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

```
caggtgcagc tccagcagag cggeccccggc ctggtaaagc ccagccaaac cctctccctg 60
acctgcgcta tcagcggcga ttccgtgagc agcaacagcg ccgcctggaa ttgatccgt 120
cagagcccca gcaggggcct ggagtggctg gggcggacct attaccggag taagtggtag 180
aacgactacg ccgtaagcgt gaagagccgc atcaccatta atctgacac cagcaagaac 240
cagttcagtc tgcagctgaa cagcgtgact cccaggaca ccgccgtgta ctactgcgcc 300
cgcgagggtg ctggagacct ggaagacgcc ttcgacatct ggggccaggg cacaatggtg 360
accgtcagca gcggcggagg gggttcaggt ggaggagget ctggcgggtg cggaagcgac 420
atacagatga cccagagccc tagcagcctc tetgccagcg tgggagaccg ggtgaccatc 480
acctgccgcg ccagtcagac catctggtct tatctgaact ggtaccagca acggccccgc 540
aagcccccta acctgttgat ctacgccgcc agcagctctc agagcggcgt tccatctcgc 600
```

ttcagcggcc gcggcagcgg cacagacttc accctgacca tcagcagcct gcaggccgag 660  
 gacttcgcca cctactactg ccagcagagc tacagcatcc cccagacttt cggacagggc 720  
 accaagttgg agatcaaa 738

<210> 3

<211> 1596

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccatc 60  
 cccgacatcc agatgacca gaccacctcc agcctgagcg ccagcctggg cgaccgggtg 120  
 accatcagct gccgggccag ccaggacatc agcaagtacc tgaactggta tcagcagaag 180  
 cccgacggca ccgtcaaget gctgatctac cacaccagcc ggctgcacag cggcgtgccc 240  
 agccggttta gcggcagcgg ctccggcacc gactacagcc tgaccatctc caacctggaa 300  
 caggaagata tcgccacctt cttttgccag cagggcaaca cactgccta cacctttggc 360  
 ggcggaacaa agctggaaat caccggcagc acctccggca gcggcaagcc tggcagcggc 420  
 gagggcagca ccaagggcga ggtgaagctg caggaaagcg gccctggcct ggtggcccc 480  
 agccagagcc tgagcgtgac ctgcaccgtg agcggcgtga gcctgcccga ctacggcgtg 540  
 agctggatcc ggcagcccc caggaagggc ctggaatggc tgggcgtgat ctggggcagc 600  
 gagaccacct actacaacag cgccctgaag agccggctga ccatcatcaa ggacaacagc 660  
 aagagccagg tgttctgaa gatgaacagc ctgcagaccg acgacaccgc catctactac 720  
 tgcgccaagc actactacta cggcggcagc tacgccatgg actactgggg ccagggcacc 780  
 agcgtgaccg tgaccacgac gccagcggcg cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg 840  
 tcgagcccc tgtccctgcg cccagaggcg tgccggccag cggcgggggg cgcagtgcac 900  
 acgagggggc tggacttcgc ctgtgatttt tgggtgctgg tgggtggttg tggagtccctg 960  
 gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc tttattattt tctgggtgag gagtaagagg 1020  
 agcaggctcc tgacacagtga ctacatgaac atgactcccc gccgccccgg gccacccgc 1080  
 aagcattacc agccctatgc cccaccagc gacttcgcag cctatcgctc caaacggggc 1140  
 agaaagaaac tcctgtatat attcaaaaa ccatttatga gaccagtaca aactactcaa 1200  
 gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga 1260  
 gtgaagtcca gcaggagcgc agacgcccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat 1320  
 aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg 1380  
 gacctgaga tggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa 1440  
 ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcggccg 1500  
 aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 1560  
 gacgcccttc acatgcaggc cctgccccct cgetaa 1596

<210> 4

<211> 1608

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)



<400> 4

atgctgctgc tggtgaccag cctgttctg tgcgaaactgc cccaccccgc cttcctgcta 60  
atccccccagg tgcagctcca gcagagcggc cccggcctgg taaagcccag ccaaaccctc 120  
tcctgacct gcgctatcag cggcgattcc gtgagcagca acagcggcgc ctggaattgg 180  
atccgtcaga gccccagcag gggcctggag tggctggggc ggacctatta ccggagtaag 240  
tggtaacaacg actacgccgt aagcgtgaag agccgcata ccattaatcc tgacaccagc 300  
aagaaccagt tcagctgca gctgaacagc gtgactcccc aggacaccgc cgtgtactac 360  
tgcgcccgcg aggtgactgg agacctggaa gacgccttcg acatctgggg ccagggcaca 420  
atggtgaccg tcagcagcgg cggaggggggt tcaggtggag gaggctctgg cgggtggcgga 480  
agcgacatac agatgacceca gagccctagc agcctctctg ccagcgtggg agaccgggtg 540  
accatcacct gccgcgccag tcagaccate tggctttatc tgaactggta ccagcaacgg 600  
cccggcaagg cccctaacct gttgatctac gccgccagca gtctccagag cggcgttcca 660  
tctcgcttca gcggcccgcg cagcggcaca gaattcacc tgaccatcag cagcctgcag 720  
gccgaggact tcgccacct ctactgccag cagagctaca gcatcccca gactttcgga 780  
cagggcacca agttggagat caaaaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg 840  
cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg 900  
ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc gcctgtgatt tttgggtgct ggtggtggtt 960  
ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta gtaacagtgg cttttattat tttctgggtg 1020  
aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgcccccc 1080  
gggcccacc gcaagcatta ccagccctat gcccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 1140  
tccaaacggg gcagaaagaa actcctgtat atattcaaac aaccatttat gagaccagta 1200  
caaactactc aagaggaaga tggctgtagc tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga 1260  
tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc gcagacgccc ccgctacca gcagggccag 1320  
aaccagctct ataacgagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag 1380  
agacgtggcc gggaccctga gatgggggga aagccgagaa ggaagaacct tcaggaaggc 1440  
ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa 1500  
ggcgagcgcg ggaggggcaa ggggcacgat ggctttacc aggttctcag tacagccacc 1560  
aaggacacct acgacgccct tcacatgcag gcctgcccc ctcgctaa 1608

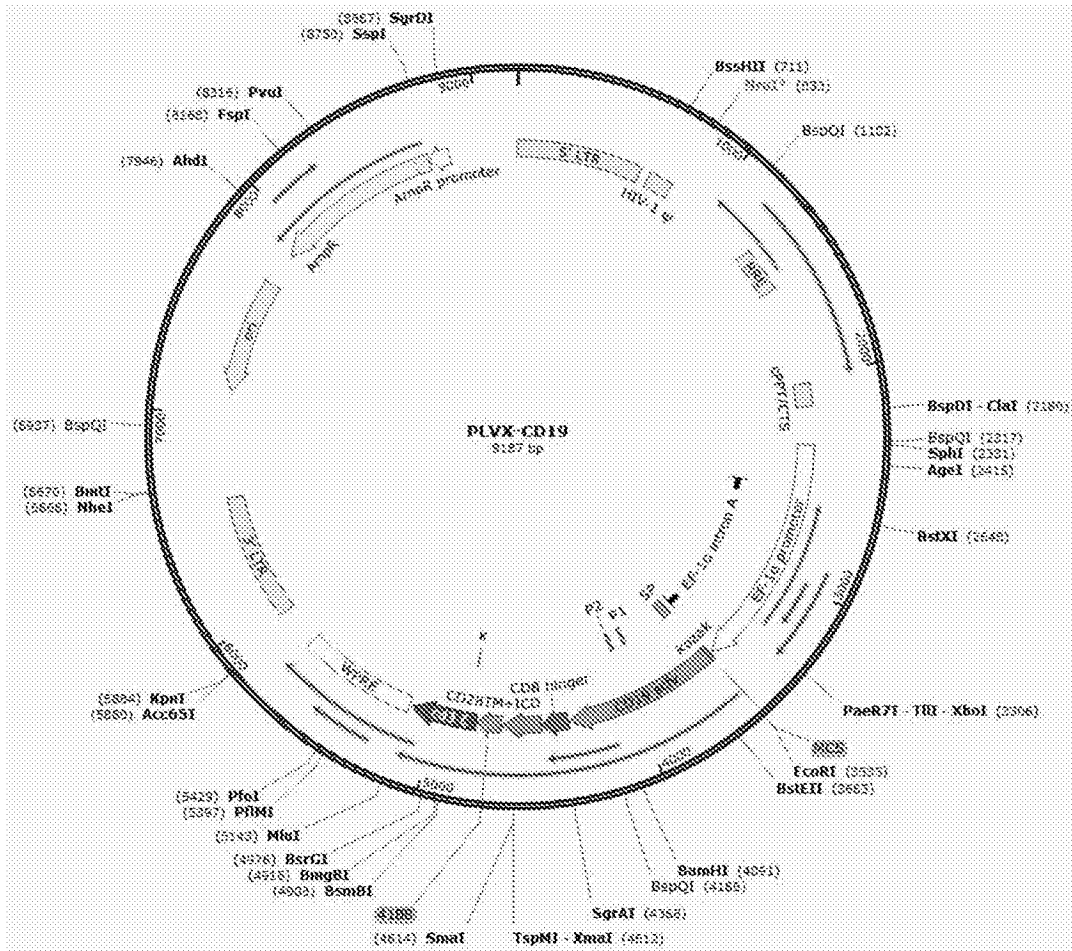


图1

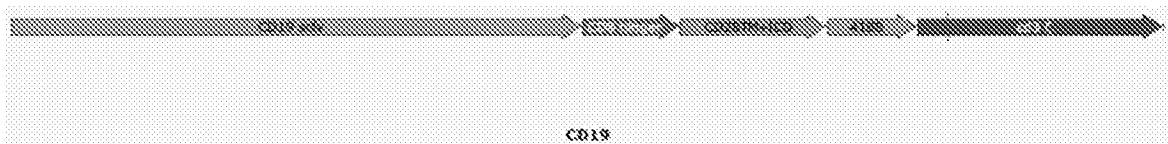


图2

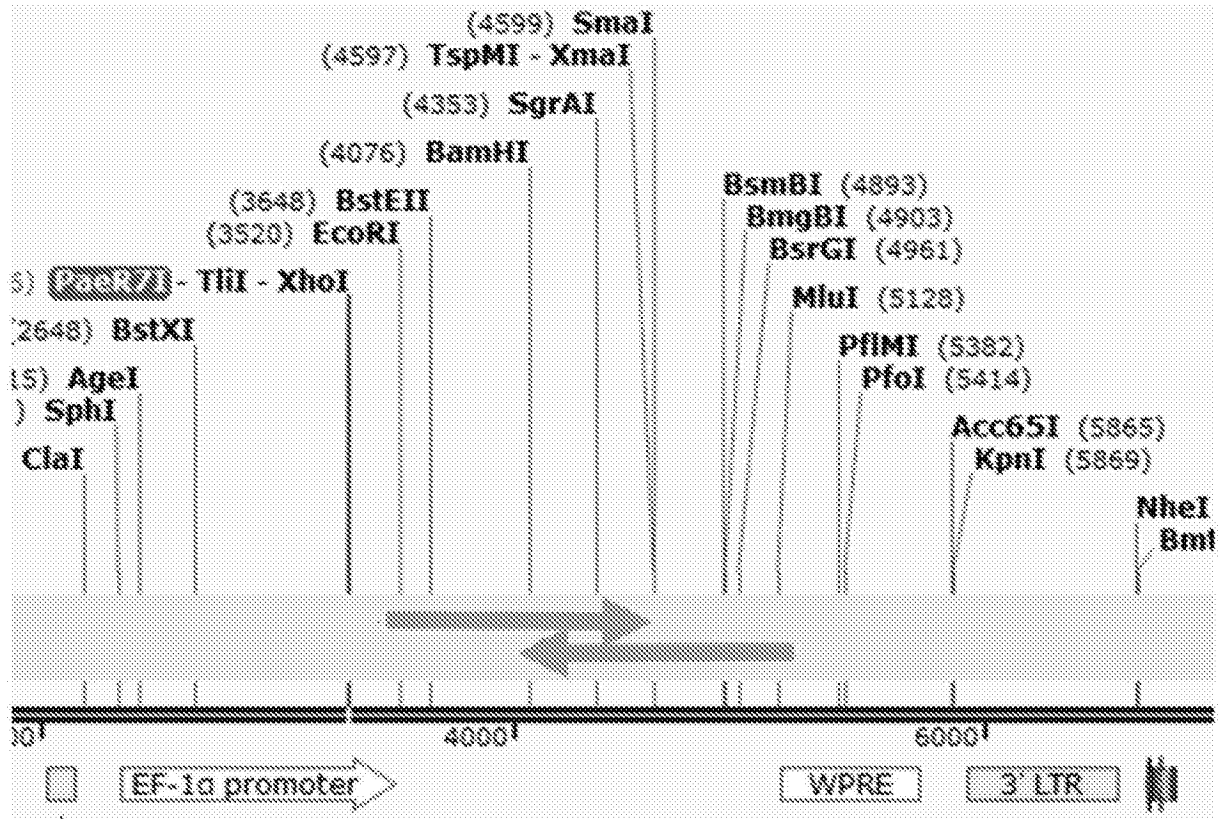


图3

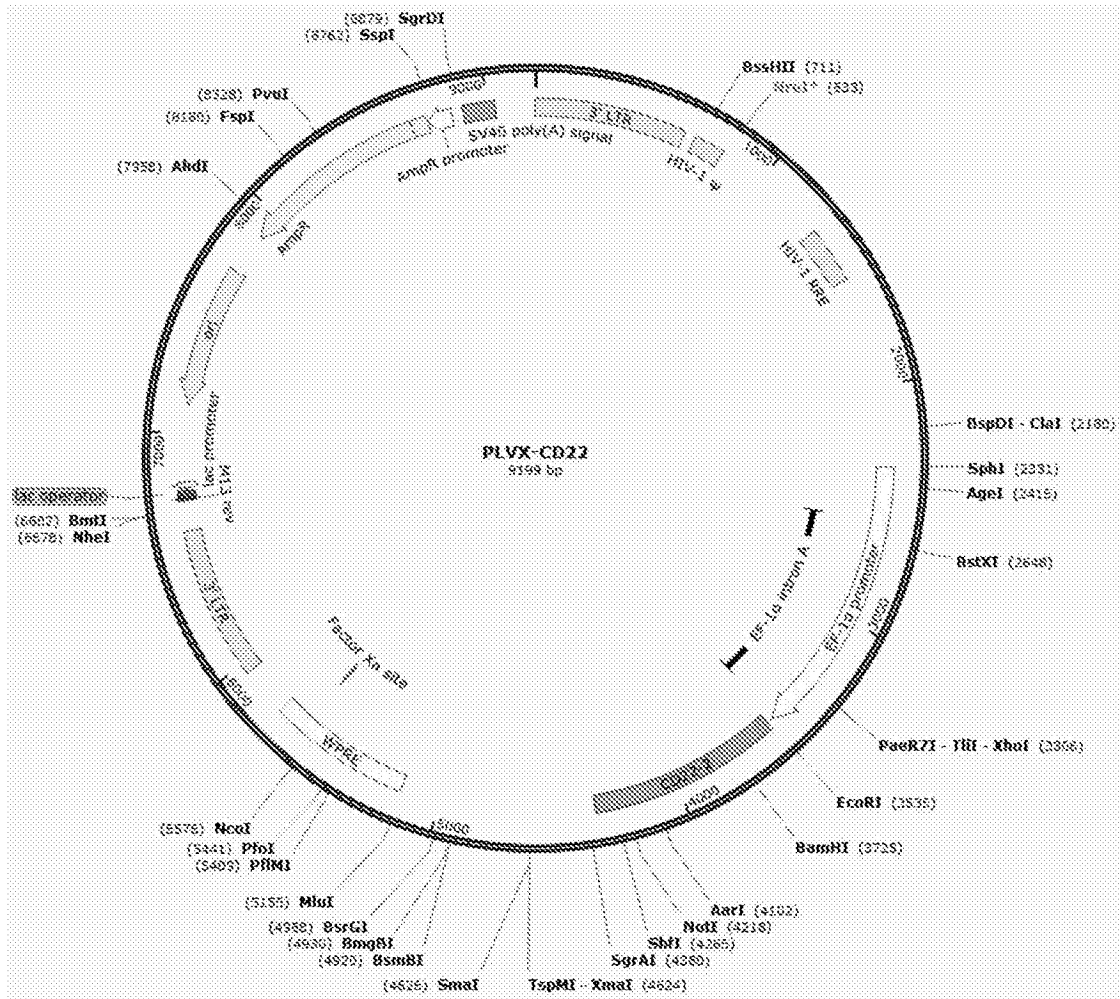


图4

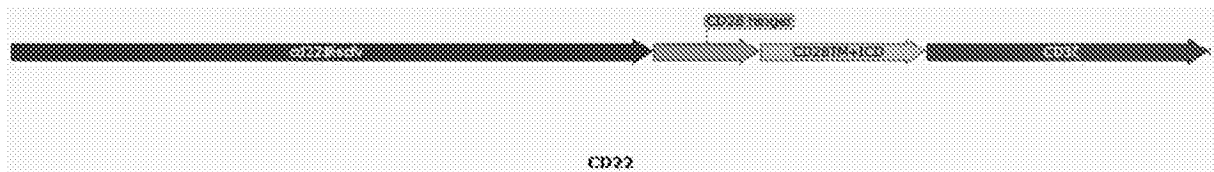


图5

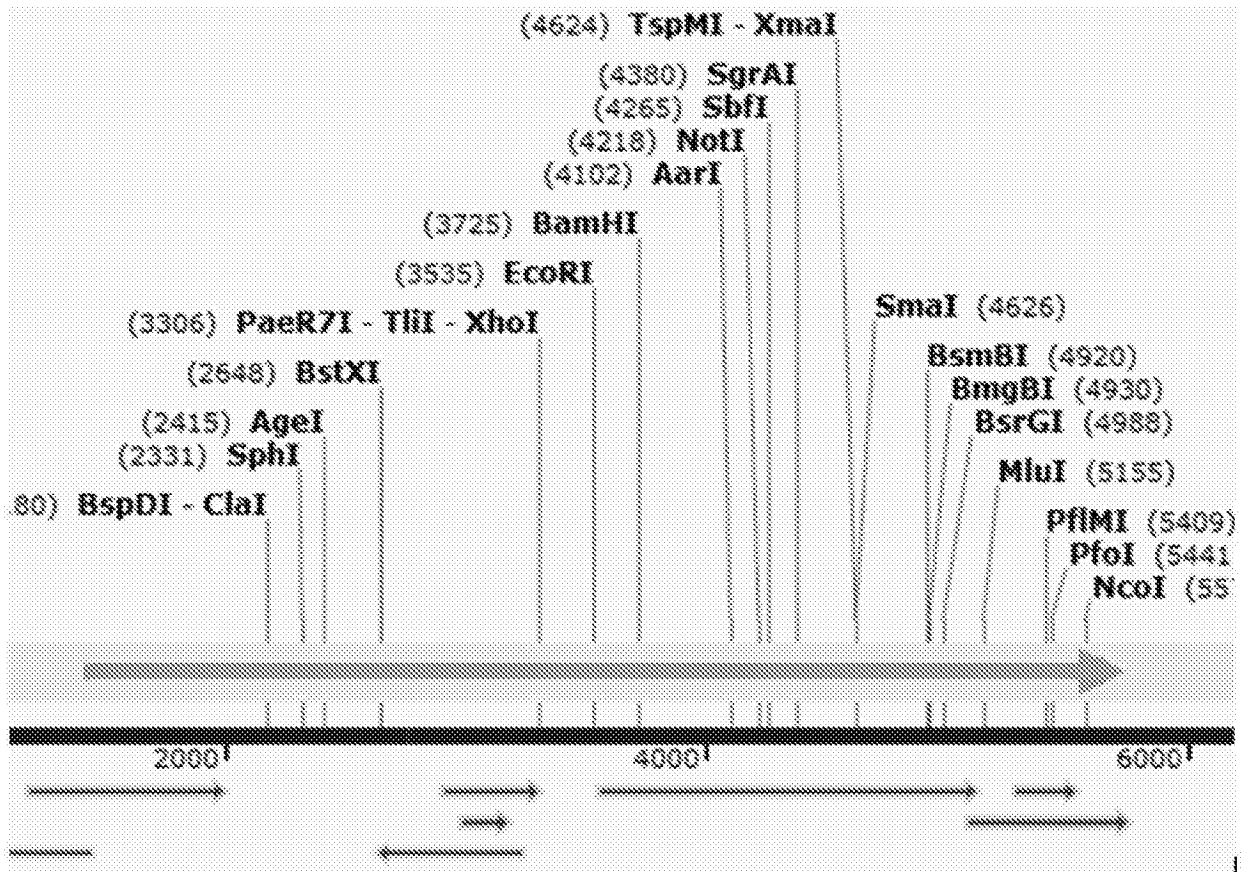


图6

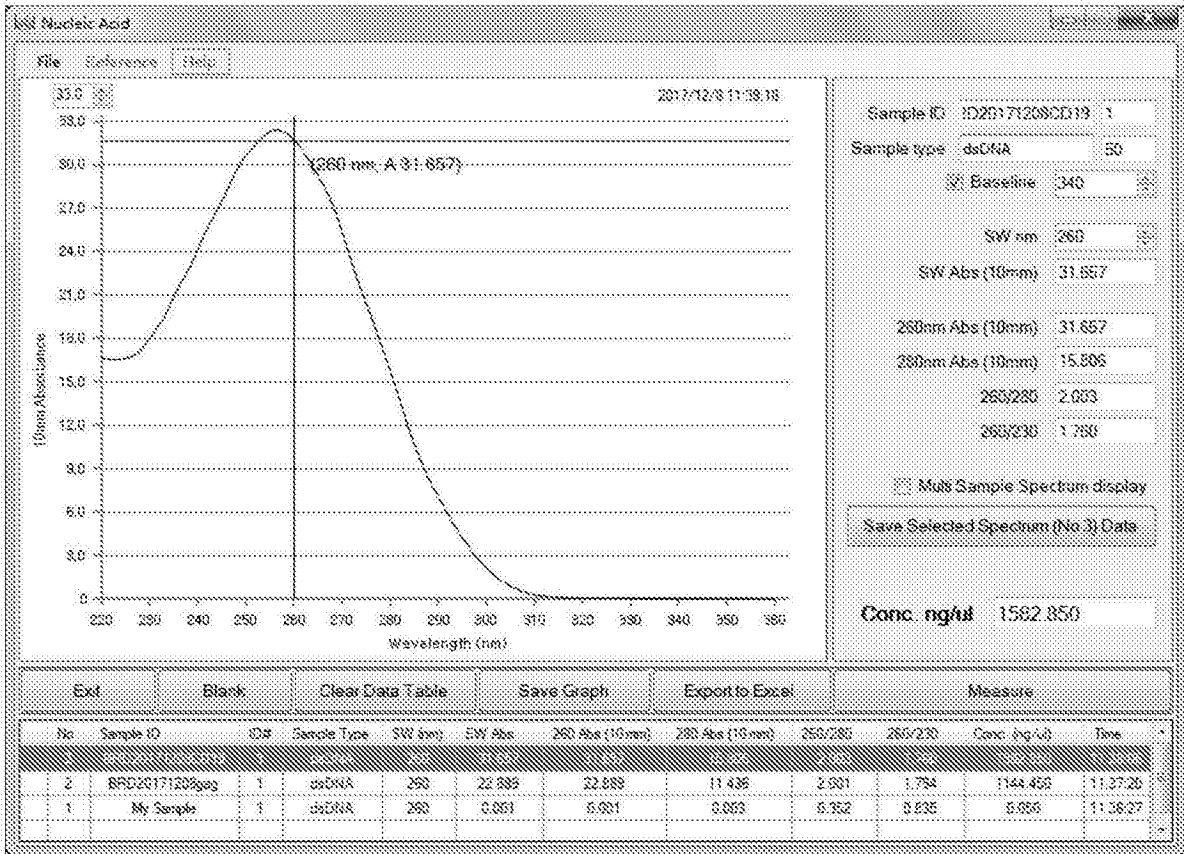


图7

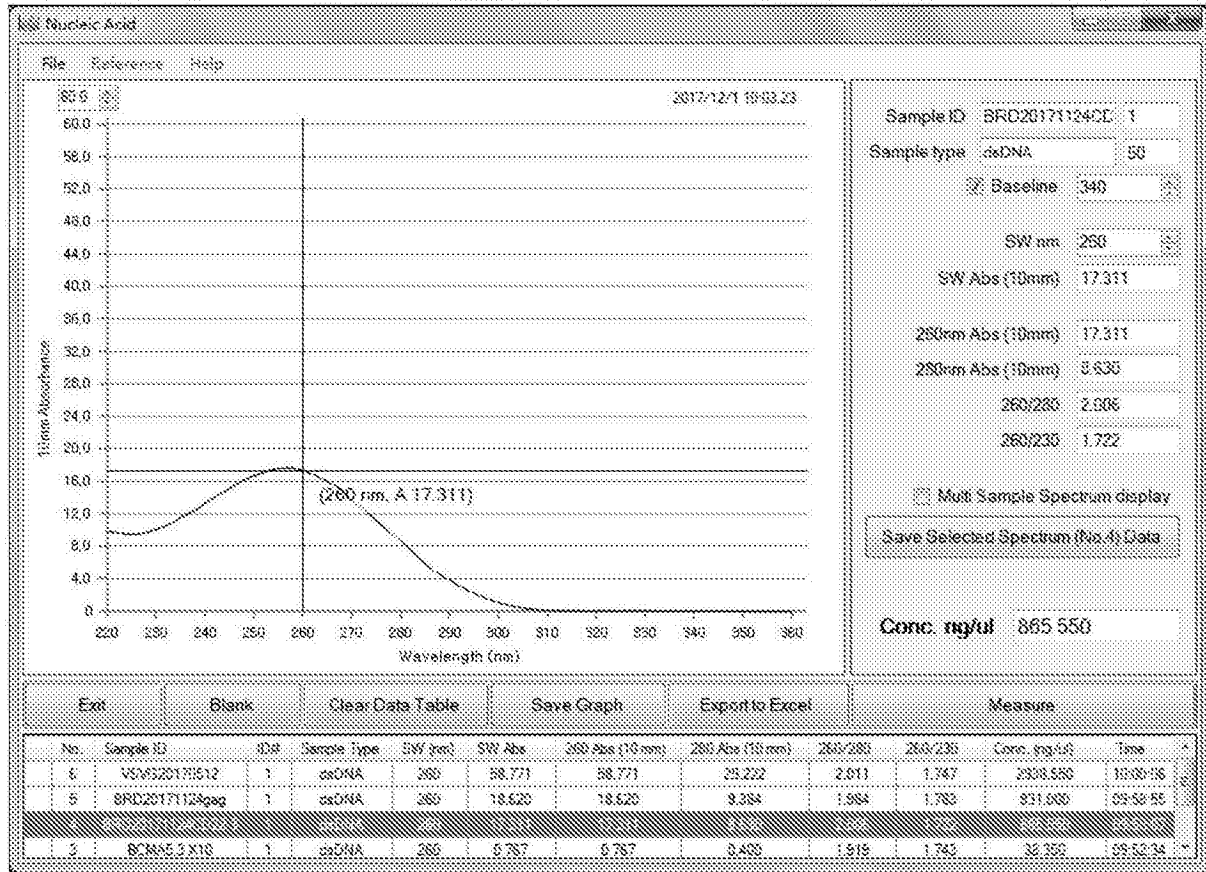


图8

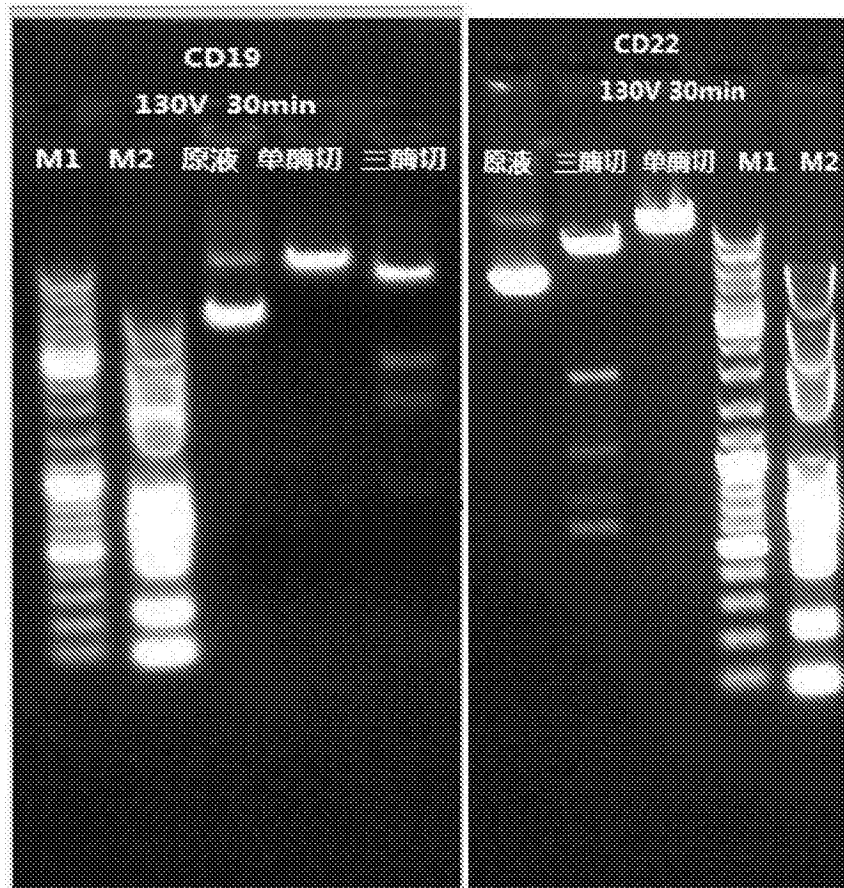


图9

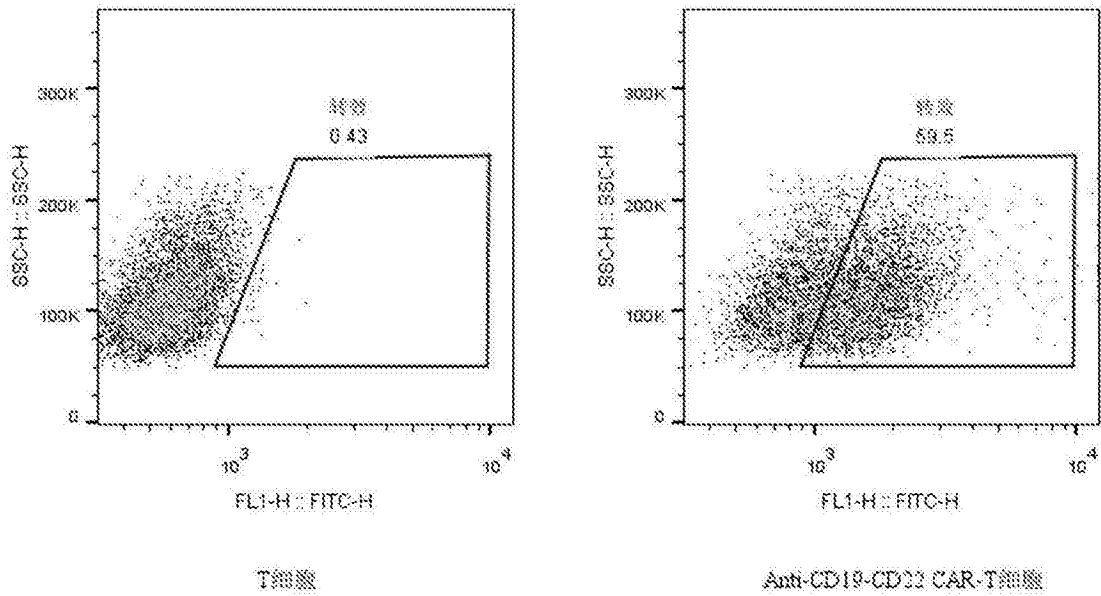


图10



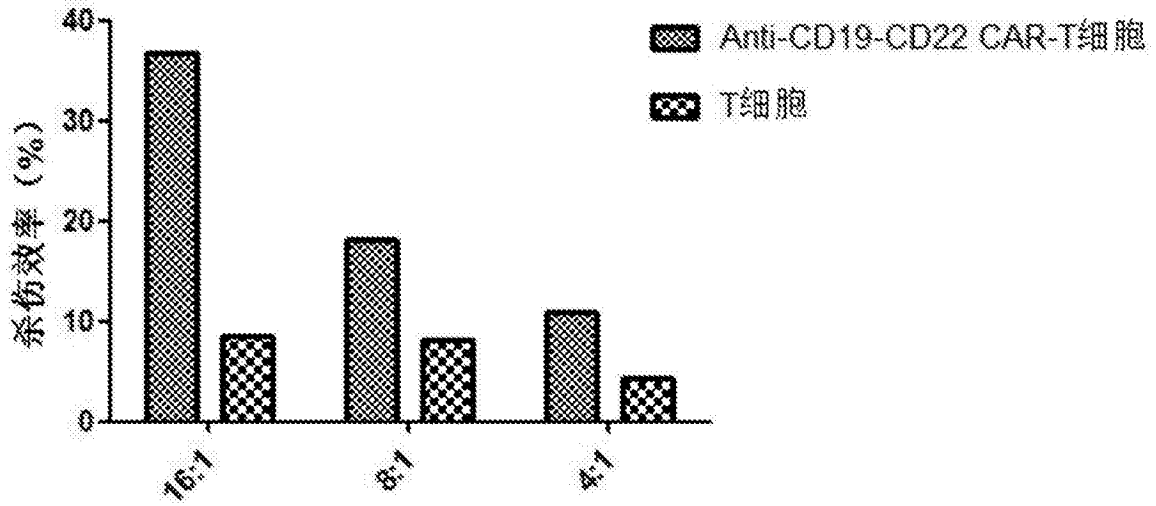


图11

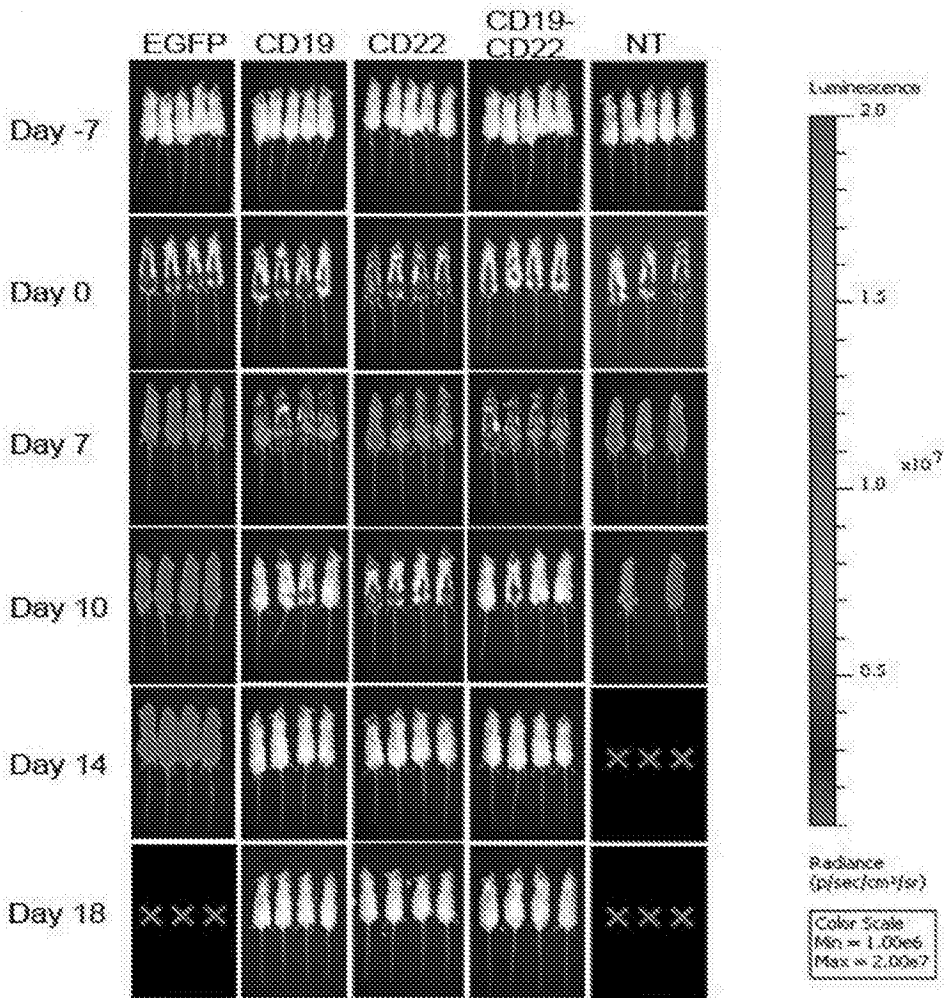


图12

CAR19 (1596 bp)

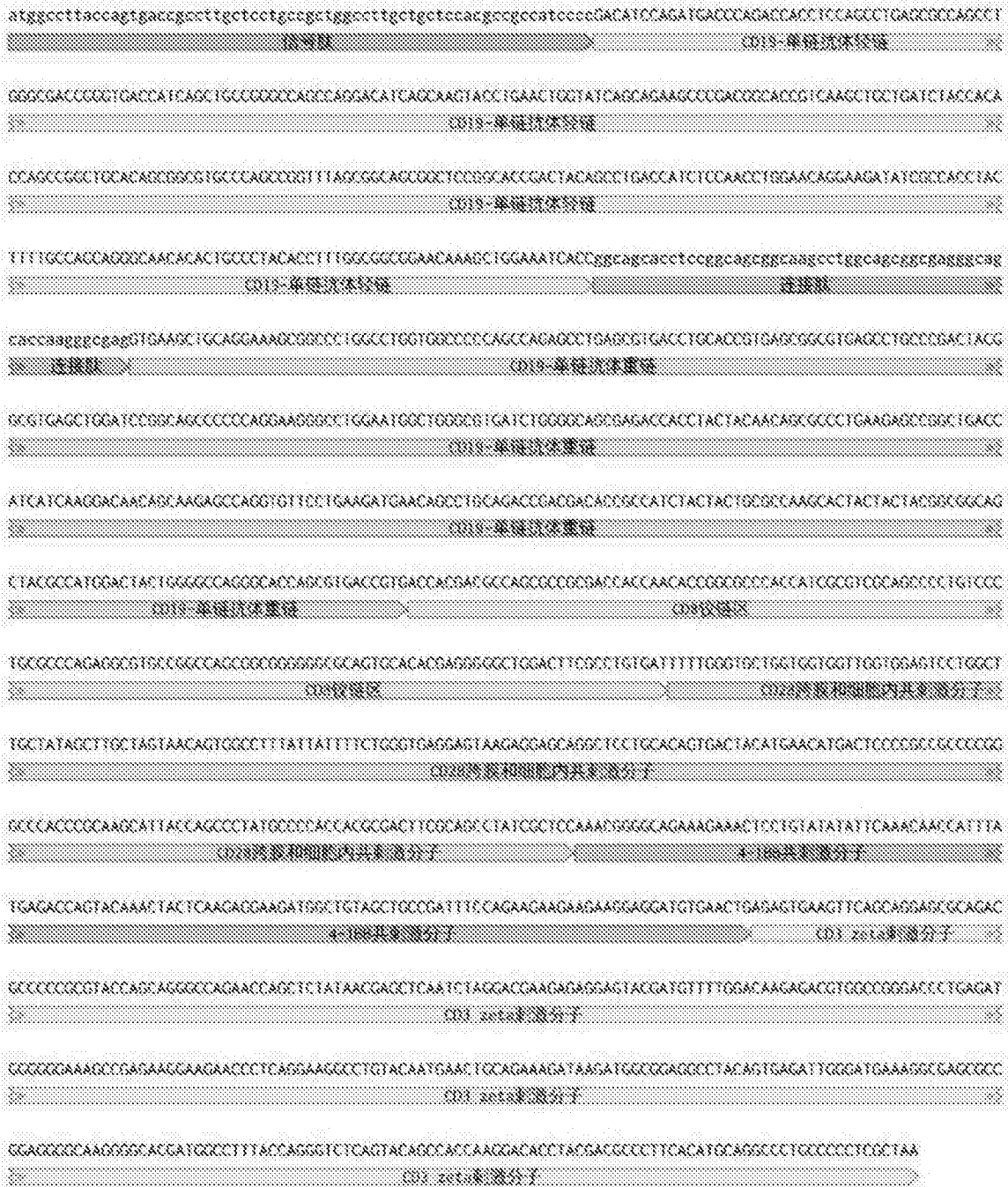


图13

CAR22 (1443 bp)



图14

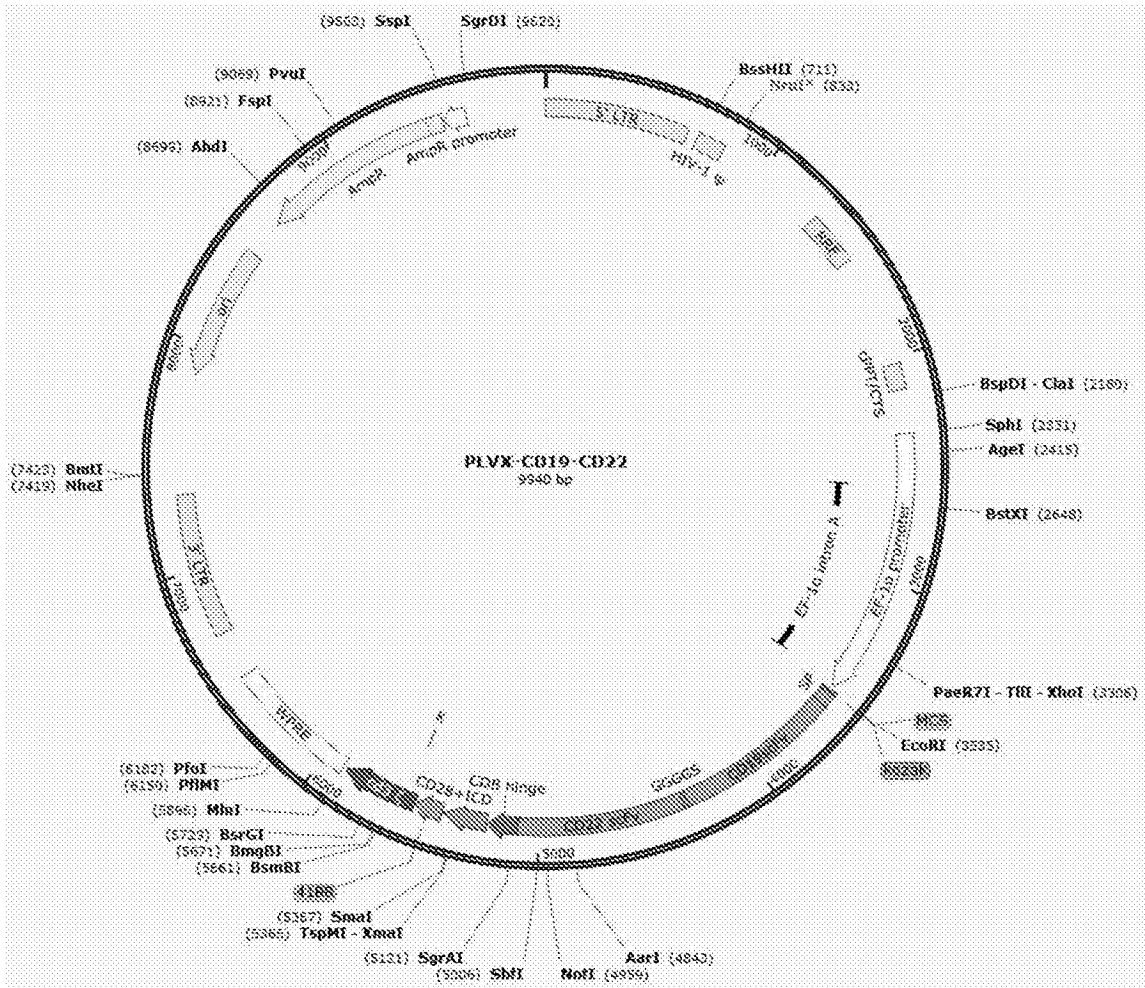


图15



图16

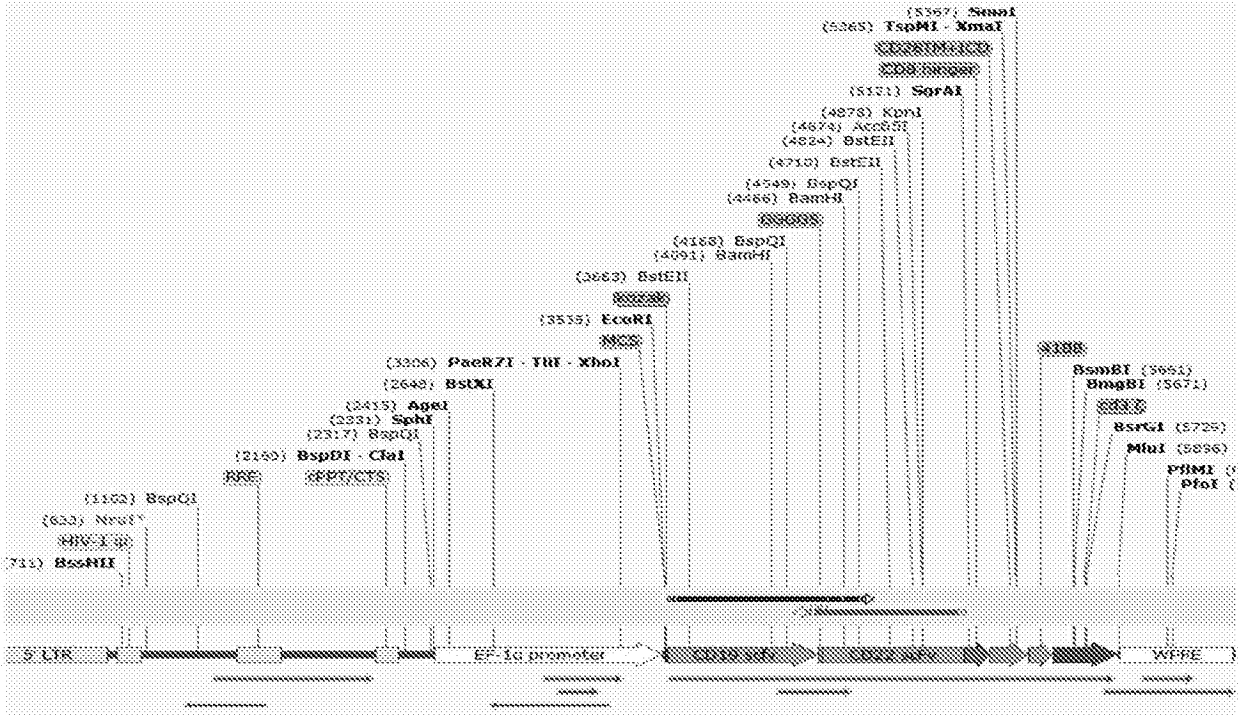


图17

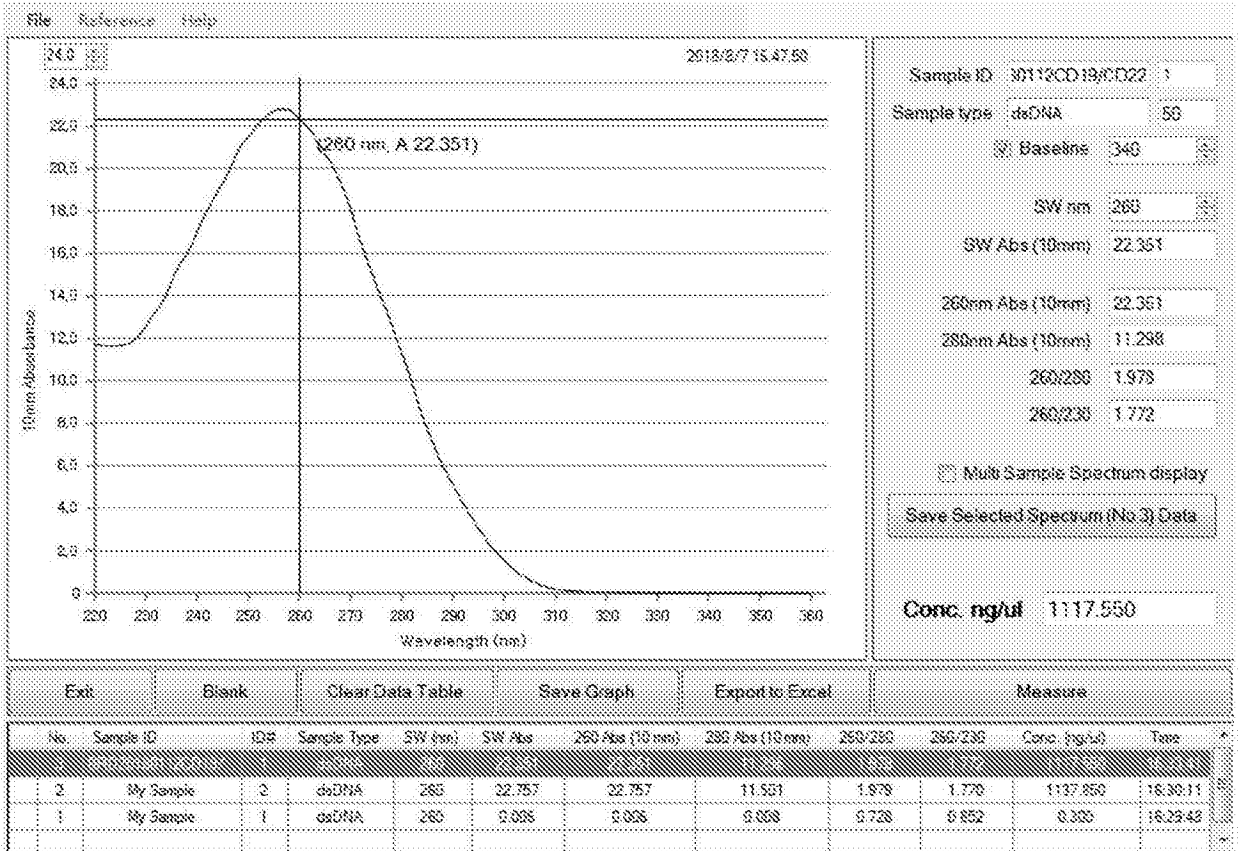


图18

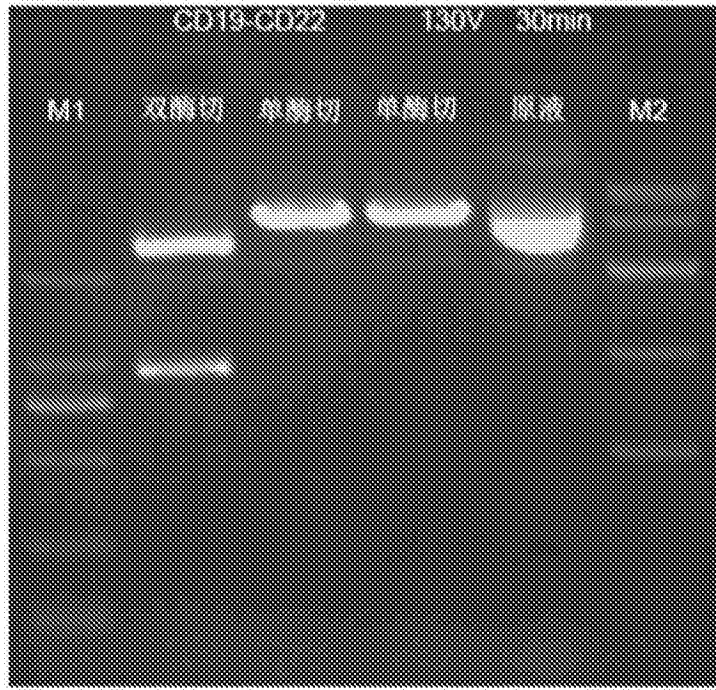


图19