



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110559430 B

(45) 授权公告日 2023. 07. 11

(21) 申请号 201910999862.2

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2019.10.21

G12N 15/62 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G12N 15/867 (2006.01)

申请公布号 CN 110559430 A

G12N 5/10 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.12.13

### (56) 对比文件

(73) 专利权人 江苏省肿瘤医院

CN 105924527 A, 2016.09.07

地址 210009 江苏省南京市玄武区百子亭  
42号

CN 108137703 A, 2018.06.08

(72) 发明人 冯继锋 吴建中 马蓉 吴旸

CN 107312097 A, 2017.11.03

陈丹 董书辰 陆雅 王卓 张圆

CN 109265563 A, 2019.01.25

张君莹 沙欢欢 曹海霞 井昶雯

CN 108753807 A, 2018.11.06

(74) 专利代理机构 南京禹为知识产权代理事务  
所(特殊普通合伙) 32272

CN 105940102 A, 2016.09.14

专利代理人 王江南

CN 105950663 A, 2016.09.21

CN 108441482 A, 2018.08.24

CN 105859890 A, 2016.08.17

审查员 李浩然

(51) Int. Cl.

权利要求书1页 说明书15页

A61K 39/00 (2006.01)

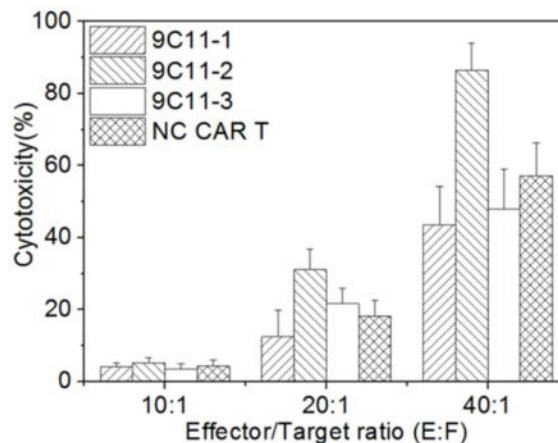
序列表5页 附图4页

### (54) 发明名称

一种抗淋巴瘤的CAR-T药物及其应用

### (57) 摘要

本发明公开了一种抗淋巴瘤的CAR-T药物及其应用,其中,所述抗淋巴瘤的CAR-T药物为CD30 CAR-T药物,所述CD30CAR-T药物能够表达人CD30抗体。本发明制备的CD30 CAR-T药物能够有效抑制肿瘤生长,并具有较高的肿瘤退化作用,CD30 CAR-T给药显著延长了外周T细胞淋巴瘤患者存活率,提高淋巴瘤患者TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 和G-CSF水平。



1. 一种抗淋巴瘤的CAR-T药物,其特征在于:所述抗淋巴瘤的CAR-T药物为CD30 CAR-T药物,所述CD30 CAR-T药物能够表达人CD30抗体;

其中,所述CD30抗体来源于杂交瘤细胞,其保藏编号为CCTCC NO:C201861;所述抗淋巴瘤的CAR-T药物,由CD30 CAR慢病毒表达载体感染T细胞得到;

所述CD30 CAR慢病毒表达载体包括,将CD30抗体的重链和轻链与单链可变区片段scFv连接,构成CD30 scFv基因片段;其中,所述CD30 scFv基因片段的序列如SEQ ID NO:1所示;

将所述CD30 scFv基因片段与CD8aSP、4-1BB胞内信号区及CD3 $\zeta$ 基因序列相串联,得到CD30 CAR基因序列;将所述CD30 CAR基因序列与pCDH-CMV-SMC-EF1a-GFP载体连接,得到所述CD30 CAR慢病毒表达载体,所述CD30 CAR慢病毒表达载体基因序列如SEQ ID NO:2所示;

其中,所述淋巴瘤为外周T细胞淋巴瘤细胞株Karpas299。

2. 如权利要求1所述的抗淋巴瘤的CAR-T药物,其特征在于:所述CD30 CAR慢病毒表达载体感染T细胞,还包括,对CD30 CAR慢病毒表达载体进行包装,包装方法为将3 $\mu$ g pMD2G、6 $\mu$ g psPAX及7.5 $\mu$ g的所述CD30 CAR慢病毒表达载体加入到150 $\mu$ L的OPTI-MEM中混匀,之后加入到500 $\mu$ L含有25 $\mu$ L Lipo 2000的OPTI-MEM中,室温静置15min后,加入到培养皿中,于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>的培养箱内培养12h,之后转染293T细胞扩增并收集慢病毒,得到慢病毒Lenti-2G .CAR-CD30。

3. 如权利要求2所述的抗淋巴瘤的CAR-T药物,其特征在于:所述CD30 CAR慢病毒表达载体感染T细胞还包括,将所述慢病毒Lenti-2G .CAR-CD30与T细胞混合,加入8 $\mu$ g/mL的polybrene,并于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>的培养箱内孵育0.5~2小时;配制T细胞培养液,在GT-T551H3培养液内加入50 $\mu$ g/mL人血白蛋白、1000U/mL的IL-2、100U/mL的OKT3和CD28,加入到孵育后的细胞中,于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>的培养箱内培养14天。

4. 如权利要求1所述的抗淋巴瘤的CAR-T药物,其特征在于:所述CD30 CAR慢病毒表达载体感染T细胞,其中,按照MOI为5,计算感染T细胞所需要的CD30 CAR慢病毒用量。

## 一种抗淋巴瘤的CAR-T药物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于CAR-T疗法技术领域,具体涉及一种抗淋巴瘤的CAR-T药物及其应用。

### 背景技术

[0002] 嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy, CAR-T),是一种治疗肿瘤的新型精准靶向细胞疗法,是一种非常有前景的,能够精准、快速、高效,且有可能治愈癌症的新型肿瘤细胞免疫治疗方法。T淋巴细胞,是人体白细胞的一种,来源于骨髓造血干细胞,在胸腺中成熟,然后分布到人体血液、淋巴和周围组织器官,发挥免疫功能。

[0003] 2017年美国FDA批准了第一例用于癌症的CAR-T治疗方法,即Tisagenlecleucel用于儿童及年轻成人复发及耐药的ALL患者的治疗。Axicabtagene ciloleucel是美国FDA批准的用于成人特定种类的非霍奇金淋巴瘤,包括弥漫大B细胞淋巴瘤,原发纵隔的B细胞淋巴瘤,转化的滤泡淋巴瘤的CAR-T细胞疗法。

[0004] CAR-T细胞的嵌合抗原受体(CAR)的是由细胞外抗原结合区、跨膜区和胞内信号转导区组成。其中嵌合抗原受体针对肿瘤相关抗原,因此具有高度特异性,且不受主要组织相容性复合物(MHC)的限制,因此肿瘤抗原亦不受种类的限制,除可选择蛋白多肽外,还包括神经节苷脂、有机糖类抗原等。

[0005] 目前的CAR-T药物主要针对B细胞淋巴瘤,而针对T细胞淋巴瘤的CAR-T药物鲜有研究。复发难治的外周T细胞淋巴瘤的治疗仍然是需要攻克的难题,因此开发一种针对复发难治的外周T细胞淋巴瘤的治疗药物是有待解决的技术问题。

### 发明内容

[0006] 本部分的目的在于概述本发明的实施例的一些方面以及简要介绍一些较佳实施例。在本部分以及本申请的说明书摘要和发明名称中可能会做些简化或省略以避免使本部分、说明书摘要和发明名称的目的模糊,而这种简化或省略不能用于限制本发明的范围。

[0007] 鉴于上述的技术缺陷,提出了本发明。

[0008] 因此,作为本发明其中一个方面,本发明提供一种抗淋巴瘤的CAR-T药物。

[0009] 一种抗淋巴瘤的CAR-T药物,其中:所述抗淋巴瘤的CAR-T药物为CD30CAR-T药物,所述CD30 CAR-T药物能够表达人CD30抗体。

[0010] 作为本发明所述的抗淋巴瘤的CAR-T药物的一种优选方案:所述CD30抗体为CD30单克隆抗体,所述CD30单克隆抗体来源于杂交瘤细胞,其保藏编号为CCTCC NO:C201861。

[0011] 作为本发明所述的抗淋巴瘤的CAR-T药物的一种优选方案:所抗淋巴瘤的CAR-T药物,由CD30 CAR慢病毒表达载体感染T细胞得到。

[0012] 作为本发明所述的抗淋巴瘤的CAR-T药物的一种优选方案:所述CD30CAR慢病毒表达载体,其包括,将CD30抗体的重链和轻链与单链可变区片段scFv连接,构成CD30 scFv基因片段,所述CD30 scFv基因片段的序列如SEQ ID NO:1所示;将所述CD30 scFv基因片段与

CD8aSP、4-1BB胞内信号区及CD3 $\zeta$ 基因序列相串联,得到CD30 CAR基因序列;将所述CD30 CAR基因序列与pCDH-CMV-SMC-EF1a-GFP载体连接,得到所述CD30 CAR慢病毒表达载体,所述CD30 CAR慢病毒表达载体基因序列如SEQ ID NO:2所示。

[0013] 作为本发明所述的抗淋巴瘤的CAR-T药物的一种优选方案:还包括,包装CD30 CAR慢病毒,其包装方法为,将3 $\mu$ g pMD2G、6 $\mu$ g psPAX及7.5 $\mu$ g的所述CD30 CAR慢病毒表达载体加入到150 $\mu$ L的OPTI-MEM中混匀,之后加入到500 $\mu$ L含有25 $\mu$ L Lipo 2000的OPTI-MEM中,室温静置15min后,加入到培养皿中,于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>的培养箱内培养12h,之后转染293T细胞扩增并收集慢病毒,得到慢病毒Lenti-2G.CAR-CD30。

[0014] 作为本发明所述的抗淋巴瘤的CAR-T药物的一种优选方案:所述抗淋巴瘤的CAR-T药物,其制备方法包括,将所述慢病毒Lenti-2G.CAR-CD30与T细胞混合,加入8 $\mu$ g/mL的polybrene,并于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>的培养箱内孵育0.5~2小时;配制T细胞培养液,在GT-T551 H3培养液内加入50 $\mu$ g/mL人血白蛋白、1000U/mL的IL-2、100U/mL的OKT3和CD28,加入到孵育后的细胞中,于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>的培养箱内培养14天。

[0015] 作为本发明所述的抗淋巴瘤的CAR-T药物的一种优选方案:按照MOI为5,计算感染T细胞所需要的CD30 CAR慢病毒用量。

[0016] 作为本发明的另一个方面,本发明提供所述的抗淋巴瘤的CAR-T药物的应用,其中:所述抗淋巴瘤的CAR-T药物能够抑制淋巴瘤细胞生长,并具有肿瘤抑制作用,延长存活率。

[0017] 作为本发明所述的抗淋巴瘤的CAR-T药物的应用的一种优选方案:所述淋巴瘤包括人间变性大细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤。

[0018] 本发明的有益效果:本发明制备的CD30 CAR-T药物能够有效抑制肿瘤生长,并具有较高的肿瘤退化作用,CD30 CAR-T给药显著延长了外周T细胞淋巴瘤患者存活率,提高淋巴瘤患者TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 和G-CSF水平。

## 附图说明

[0019] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例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性的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图。其中:

[0020] 图1为CD30 CAR慢病毒表达载体结构示意图。

[0021] 图2为CD30 CAR慢病毒表达载体的酶切鉴定图。

[0022] 图3为慢病毒感染后CD30 CAR-T/T细胞增值及细胞表面分子表达情况图。

[0023] 图4为流式细胞术检测慢病毒感染后T细胞表面CD30表达情况图。

[0024] 图5为LDH释放实验检测三种CD30 CAR-T细胞杀伤率图。

[0025] 图6为RTCA法检测CD30 CAR-T细胞的体外杀伤能力图。

[0026] 图7为CD30 CAR-T体内对外周T细胞淋巴瘤的抑制效果和CD30 CAR-T体内对TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 和GM-CSF水平的影响。

## 具体实施方式

[0027] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。

[0028] 在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明,但是本发明还可以采用其他不同于在此描述的其它方式来实施,本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似推广,因此本发明不受下面公开的具体实施例的限制。

[0029] 其次,此处所称的“一个实施例”或“实施例”是指可包含于本发明至少一个实现方式中的特定特征、结构或特性。在本说明书中不同地方出现的“在一个实施例中”并非均指同一个实施例,也不是单独的或选择性的与其他实施例互相排斥的实施例。

[0030] 实施例1:

[0031] 抗CD30单链抗体scFv序列的获取与CD30 CAR慢病毒表达载体构建与表达:

[0032] 实验材料:

[0033] 实验细胞株:杂交瘤细胞(保藏编号为CCTCC NO:C201861,为已公开细胞株)。

[0034] 工具细胞293T细胞(本实验室保存)

[0035] 大肠杆菌:E.coli DH5 $\alpha$ (本实验室保存)

[0036] 载体:pMD18-T Vector(南京PPL公司购买)

[0037] 溶液配制:

[0038] 慢病毒转染试剂的准备:

[0039] 配制0.25M的CaCl<sub>2</sub>溶液:1.47g CaCl<sub>2</sub>粉末溶于去离子水中,定容至40mL,灭菌;

[0040] 配制5M的NaCl溶液:14.61g的NaCl粉末溶于去离子水中,定容至50mL;

[0041] 配制1M的BES溶液;

[0042] 配制1M的Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液;

[0043] 2 $\times$ BBS溶液的配制:将5.6mL的5M的NaCl溶液、5.0mL的1M BES溶液、150 $\mu$ L的1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液加入到80mL水中,用NaOH调节PH为6.95 $\pm$ 0.02,去离子水定容到100mL,过滤除菌。

[0044] 实验方法:

[0045] 1、杂交瘤细胞RNA的提取:

[0046] 使用QIAGEN公司RNeasy Mini Kit试剂盒:

[0047] 杂交瘤细胞(CCTCC NO:C201861)加入到PBS溶液中,300g离心10min;

[0048] 弃上清,加入700 $\mu$ L RLT,得到细胞裂解液;

[0049] 从细胞裂解液中吸取350 $\mu$ L悬液,震荡;

[0050] 加入350 $\mu$ L的70%的乙醇,混匀;

[0051] 上柱300g离心15s,弃废液;

[0052] 向柱子中加入700 $\mu$ L的Buffer RW1,300g离心15s;

[0053] 向柱子中加入500 $\mu$ L的Buffer RPE,300g离心15s;

[0054] 再向柱子中加入500 $\mu$ L的Buffer RPE,300g离心2min;

[0055] 300g空转1min;加入50 $\mu$ L的DEPC水溶解RNA。

[0056] 2、cDNA合成:

[0057] 使用Roche公司Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit提取cDNA。

[0058] (1)反应体系:

[0059] 65°C变性10min

[0060] 反应体系:

组分	体积
细胞总RNA	5 $\mu$ L
oligo dT	1 $\mu$ L
dNTPs Mix	1 $\mu$ L
DEPC水	补足至10 $\mu$ L

[0062] (2)准备混合液:

[0063] 混合液成分体系:

组分	体积
10 $\times$ RT buffer	2 $\mu$ L
0.1M DTT	2 $\mu$ L
RNaseOUT (40U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
25mM MgCl <sub>2</sub>	4 $\mu$ L
SuperScript III	1 $\mu$ L

[0065] 50°C水浴锅加热50min;

[0066] 85°C水浴锅加热5min;

[0067] 冰浴, -20°C保存。

[0068] 3、PCR扩增单克隆抗体CD30的重链(V<sub>H</sub>)和轻链(V<sub>L</sub>):

[0069] (1)将10 $\mu$ g上述制备的cDNA作为模板,扩增单克隆抗体CD30的重链(V<sub>H</sub>)和轻链(V<sub>L</sub>):

[0070] PCR扩增体系:

[0071] PCR扩增体系:

组分	体积
cDNA 模板	0.2 $\mu$ L
10 $\times$ EX Buffer	5 $\mu$ L
dNTP	4 $\mu$ L
primer-F(10 pM)	2 $\mu$ L
primer-R(10 pM)	2 $\mu$ L
EX Taq	0.5 $\mu$ L
DEPC 水	36.3 $\mu$ L

[0074] 重链扩增引物:

[0075] MVH-F:GGCCAGTGGATAGTCAGATG

[0076] MVH-R:GAGGTGCAGCTGAAGGAGTC

[0077] 轻链扩增引物:

[0078] MVK-F:GGATACAGTTGGTGCAGCATC

[0079] MVK-R:GATGTTTTGATGACCCAAACT

[0080] PCR反应条件:

[0081] 预变性: 94 °C, 3 min;  
 变性: 94 °C, 30 s  
 退火: 55 °C, 45 s  
 延伸: 72 °C, 1 min  
 延伸: 72 °C, 10 min  
 保存: 4 °C 冰箱

} 30 cycles

[0082] 将PCR的产物经过1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测,进行割胶回收(QIAGEN胶回收试剂盒)。

[0083] (2)克隆抗体CD30的重链( $V_H$ )和轻链( $V_L$ )的克隆及测序:

[0084] 将切胶回收的克隆抗体CD30的重链( $V_H$ )和轻链( $V_L$ )DNA分别与克隆载体pMD18-T Vector连接,室温下反应5min;反应体系如下:

[0085] 连接反应体系:

组分	体积
$V_L/V_H$	4 $\mu$ L
pMD18-T Vector	1 $\mu$ L
Solution I	5 $\mu$ L

[0087] 将连接产物分别转化感受态细胞DH5 $\alpha$ ,次日挑选单克隆菌落送测序;

[0088] 测序结果正确后,进行克隆,提取质粒。

[0089] (3)克隆抗体CD30的重链( $V_H$ )和轻链( $V_L$ )基因片段的连接与扩增(使用PPL公司的小鼠抗体ScFv基因扩增试剂盒):

[0090] 反应体系如下:

[0091] 反应体系:

组分	体积
MV $_H$ Mix(小鼠抗体重链扩增体系)或 MV $_L$ Mix(小鼠抗体轻链扩增体系)	45 $\mu$ L
DNA Polymerase	0.3 $\mu$ L
CD30 V $_H$ 或 CD30 V $_L$ 上下游引物	1 $\mu$ L
ddH $_2$ O	3.7 $\mu$ L

[0093] PCR反应条件如下:

- [0094] 预变性: 94°C, 3 min;  
 变性: 94°C, 30 s  
 退火: 55°C, 30 s  
 延伸: 72°C, 45 s  
 延伸: 72°C, 10 min  
 保存: 4°C 冰箱
- } 30 cycles

[0095] 琼脂凝胶电泳, 割胶回收大小为330bp左右的条带。

[0096] (4) 将CD30的重链( $V_H$ )和轻链( $V_L$ )进行连接构成CD30 scFv段:

[0097] 按下列组分配制反应体系(50 $\mu$ L体系)

[0098] 连接反应体系:

组分	体积
scFv Mix(scFv连接扩增体系)	45 $\mu$ L
DNA Polymerase	0.3 $\mu$ L
$V_H$	1 $\mu$ L
$V_L$	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	2.7 $\mu$ L

[0100] PCR反应条件如下:

- [0101] 预变性: 94°C, 3 min;  
 变性: 94°C, 30 s  
 退火: 55°C, 30 s  
 延伸: 72°C, 45 s  
 延伸: 72°C, 10 min  
 保存: 4°C 冰箱
- } 30 cycles

[0102] PCR产物过2%琼脂后, 回收大小为700bp左右的条带, 割胶回收后, 进行克隆; 目的条带经回收后克隆到pMD18-TVector载体;

[0103] 按下表配置反应体系:

[0104] 目的条带与载体连接体系:

组分	体积
$V_L$ 或 $V_H$ 基因片段	4 $\mu$ L
pMD18-T Vector	1 $\mu$ L
Solution I	5 $\mu$ L

[0106] 将每个PCR的回收片段按照上述体积, 进行连接体系的配置, 室温下反应5min; 转化DH5 $\alpha$ 细胞; 涂氨苄抗性的平皿, 次日挑菌送单克隆送测序。

[0107] Lenti-2G.CAR-CD30的设计与构建:



[0108] CD30 CAR基因序列的结构设计与构建:

[0109] 将CD30 scFv与Genebank (NCBI) 中CD8a较链区-跨膜区,即CD8aSP (Signal peptide), 4-1BB胞内信号区及CD3 $\zeta$ 基因序列相串联。

[0110] CD30 CAR基因序列与载体pCDH-CMV-SMC-EF1a-GFP的连接:

[0111] 通过XbaI和BamHI内切酶,将构建好的CD30 CAR基因序列克隆入pCDH-CMV-SMC-EF1a-GFP慢病毒表达载体,得到本发明CD30 CAR慢病毒表达载体;CD30 CAR慢病毒表达载体图谱如图1所示;

[0112] 将3 $\mu$ g pMD2G、6 $\mu$ g psPAX及7.5 $\mu$ g的所述CD30 CAR慢病毒表达载体加入到150 $\mu$ L的OPTI-MEM中混匀,之后加入到500 $\mu$ L含有25 $\mu$ L Lipo 2000的OPTI-MEM中,室温静置15min后,加入到培养皿中,于37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>的培养箱内培养12h,之后转染293T细胞扩增并收集慢病毒,得到的慢病毒命名为Lenti-2G.CAR-CD30。

[0113] (1) 用XbaI和BamHI对质粒pCDH-CMV-SMC-EF1a-GFP进行双酶切,37 $^{\circ}$ C,酶切过夜,反应体系如下:

[0114] 质粒酶切体系:

名称	体积
10 $\times$ Buffer M	2 $\mu$ L
XbaI	1 $\mu$ L
BamHI	1 $\mu$ L
pCDH-CMV-SMC-EF1a-GFP	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	补足至20 $\mu$ L

[0116] (2) 加入10 $\times$ Loading Buffer 5 $\mu$ L,1%琼脂糖凝胶进行电泳鉴定,并回收凝胶中的目的条带;

[0117] (3) 用XbaI和BamHI对合成的包含CD30 CAR基因序列的pMD18-T Vector进行双酶切;

[0118] (4) 将酶切回收后的pCDH-CMV-SMC-EF1a-GFP片段和CD30 CAR基因序列酶切产物进行连接,具体连接反应体系如下:

[0119] 连接反应体系:

组分	体积
10 $\times$ Buffer	1 $\mu$ L
pCDH-CMV-SMC-EF1a-GFP的酶切片段	1 $\mu$ L
CD30 CAR基因序列	6.4 $\mu$ L
T4连接酶	6.4 $\mu$ L
PEG <sub>4000</sub>	1 $\mu$ L

[0121] 反应条件:轻轻混匀后,16 $^{\circ}$ C,过夜。

[0122] 鉴定:

[0123] (5) 连接产物的转化

[0124] 将过夜连接的混合液直接转化Stb13感受态细胞。将转化好的Stb13感受态细胞加入LB液体培养基摇菌后,涂LB平板,37 $^{\circ}$ C培养箱倒置培养过夜。

[0125] (6) 重组质粒的扩增与提取

[0126] 转化16h后,选取3个单菌菌落,分别接种至5mL LB氨苄抗性培养基中,培养液中氨苄终浓度为100 $\mu$ g/mL,37 $^{\circ}$ C振荡培养过夜,次日提取质粒。

[0127] (7)DNA测序鉴定

[0128] 将提取的质粒委托南京质粒与蛋白共享库(PPL)公司进行DNA测序鉴定。经鉴定符合要求,即获得含有CD30 CAR的基因片段的慢病毒表达载体。

[0129] 实验结果:

[0130] CD30 CAR慢病毒表达载体的扩增与鉴定:

[0131] 通过XbaI和BamHI双酶切位点对本发明慢病毒表达载体进行双酶切验证,结果显示:包括scFv段在内的CD30 CAR序列的片段大小与预期相一致,约为1000bp(图2)。

[0132] CD30重链( $V_H$ )、轻链( $V_L$ )条带的测序结果:

[0133] 本发明研究发现,从杂交瘤细胞株CCTCC NO:C201861分泌的CD30抗体中,鉴定出多条不同的CD30抗体的重链( $V_H$ )和轻链( $V_L$ ):

[0134] CD30抗体的 $V_H$ 序列分析结果如下:

[0135]  $V_H$ (重链)具体序列

	CDR1	CDR2	CDR3
$V_H$ -1	GFSLTSHG	IWSDGSTA	AREPPTYVCL
$V_H$ -2	GFSLTSYG	IWSDGSTA	AREPPTYVCL
$V_H$ -3	GYTFTNYD	IYPGDGTA	ARGDGFYD
$V_H$ -4	GFSLSRYS	IWGGGIT	ARKYGLDYDGAMDY

[0137] CD30抗体的 $V_L$ 序列分析:

[0138]  $V_L$ (轻链)具体序列

	CDR1	CDR2	CDR3
$V_L$ -1	KSVSTSGYSY	LVS	QHIRELTR
$V_L$ -2	KSVSTSGYSY	LVS	QHIRELTL
$V_L$ -3	DNVHTY	GAS	GQSYRYPPT
$V_L$ -4	DNVHTY	GAS	GQSYRYPLT

[0140] CD30 CAR基因序列:

[0141] 按照CD30抗体的不同重链与轻链的组合构建Lenti-2G.CAR-CD30:

[0142] 将重链为 $V_H$ -4、轻链为 $V_L$ -3组合的CD30抗体命名为9C11-1,将重链为 $V_H$ -4、轻链为 $V_L$ -4组合的CD30抗体命名为9C11-2,将重链为 $V_H$ -4、轻链为 $V_L$ -1组合的CD30抗体命名为9C11-3。其余CD30抗体的重链与轻链组合由于经实验证明抗体效价较低而被排除。

[0143] 本发明涉及的慢病毒表达载体中的序列如下:

[0144] (1)Signal peptide(SP):

[0145] atggccttaccagtgaccgccttgctcctgcccgtggccttgctgctccacgccgccaggccg

[0146] (2)CD8 $\alpha$ TM

[0147] accacgacgccagcggcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgctgcagcccctgtccctgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggcgagtgccacacgagggggctggacttcgctgtgatctacatctggcgcccttgccgggacttgctggggctccttctcctgctcactggttatcaccctttactgc

[0148] (3)41BB

[0149] aaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactca  
agaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaaggaggatgtgaactg

[0150] (4)CD3ζ

[0151] agagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcaggccagaaccagctctataacga  
gctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaag  
ccgagaaggaagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgaga  
ttgggatgaaaggcagcgcggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaagga  
cacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc

[0152] (5)CD30 scFv(9C11-1)

[0153] gaggtgaaactgcagcagctctggacctggcctgggtggcaccctcacagagcctgtccatcacatgcac  
tgtctctgggttctcattatccagatatagtgtagactgggttcgccagcctccaggaaagggtctggagtggctg  
ggaatgatatgggggtggtggaatcacagactataattcagctctcaaatccagactgagcatcaacaaggacaact  
ccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagctctgcaaactgatgacacagccatataactactgtgccagaaagta  
tgggttgattacgacgggtgctatggactactggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcaggtggtggtggt  
tctggtggtggtggttctggcggcggcggctccgacatccagatgaccagctctcccaaatccatgtccatgtcag  
taggagagagggtcaccttgagctgcaaggccactgacaatgtgcatacttatgtatcctggatcaacaaaaacc  
agagcagctctcctaaactgctgatatacggggcatccaaccggtacactgggggtccccgatcgcttcacaggcagt  
ggatctgaaacagatttcactctgaccatcagcagtggtgcaggctgaagacctgcagattatcactgtggacaga  
gttacaggtatccgccacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaa

[0154] (6)CD30 scFv(9C11-2) (即SEQ ID NO:1)

[0155] gaggtgaaactgcagcagctctggacctggcctgggtggcaccctcacagagcctgtccatcacatgcac  
tgtctctgggttctcattatccagatatagtgtagactgggttcgccagcctccaggaaagggtctggagtggctg  
ggaatgatatgggggtggtggaatcacagactataattcagctctcaaatccagactgagcatcaacaaggacaact  
ccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagctctgcaaactgatgacacagccatataactactgtgccagaaagta  
tgggttgattacgacgggtgctatggactactggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcaggtggtggtggt  
tctggtggtggtggttctggcggcggcggctccgacatccagatgaccagctctcccaaatccatgtccatgtcag  
taggagagagggtcaccttgagctgcaaggccactgacaatgtgcatacttatgtatcctggatcaacaaaaacc  
agagcagctctcctaaactgctgatatacggggcatccaaccggtacactgggggtccccgatcgcttcacaggcagt  
ggatctgaaacagatttcactctgaccatcagcagtggtgcaggctgaagacctgcagattatcactgtggacaga  
gttacaggtatccgctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaa

[0156] (7)CD30 scFv(9C11-3)

[0157] gaggtgaaactgcagcagctctggacctggcctgggtggcaccctcacagagcctgtccatcacatgcac  
tgtctctgggttctcattatccagatatagtgtagactgggttcgccagcctccaggaaagggtctggagtggctg  
ggaatgatatgggggtggtggaatcacagactataattcagctctcaaatccagactgagcatcaacaaggacaact  
ccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagctctgcaaactgatgacacagccatataactactgtgccagaaagta  
tgggttgattacgacgggtgctatggactactggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcaggtggtggtggt  
tctggtggtggtggttctggcggcggcggctccgaaattgtgttgacgcagctctcctgcttcttagctgtatctc  
tggggcagagggccaccatctcatacaggccagcaaaagtgtcagtacatctggctatagttatagcactggaa  
ccaacagaaaccaggacagccaccagactcctcatctatcttgtatccaacctagaatctggggtcctgccagg

ttcagtggcagtgggctctgggacagacttcaccctcaacatccatcctgtggaggaggaggatgctgcaacctatt  
actgtcagcacattaggagacttacacgttcggaggggggaccaagctggaaatcaaa

[0158] (8) 本发明慢病毒表达载体(9C11-2)基因序列(即SEQ ID NO:2):

[0159] acgcgtgtagtcttatgcaatactctttagtcttgcaacatggtaacgatgagtttagcaacatgcct  
tacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaagtaaggtggtacgatcgtgccttattaggaaggca  
acagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcattgcagagatattgtatttaagtgcctagct  
cgatacaataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggaaccactg  
cttaagcctcaataaagcttgcttagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggttaactaga  
gatccctcagacccttttagtcagtgtgaaaaatctctagcagtgccgcccgaacagggacctgaaagcgaaaggg  
aaaccagagctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgagggggcgcgactggtga  
gtacgccaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgtagagcgtcagtattaagcgggggag  
aattagatcgcgatgggaaaaattcggtaaggccaggggaaagaaaaataaaattaaaacatatagtatgg  
gcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaaacatcagaaggctgtagacaatactgg  
gacagctacaaccatccctcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattg  
tgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagcttttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaag  
accaccgcacagcaagcggccactgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaatta  
tataaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtgggtgcagagag  
aaaaagagcagtgggaaataggagctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcctc  
aatgacgctgacgggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgacgacgagaacaatttctgagggttatt  
gaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaa  
gatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgggggtgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttg  
gaatgctagttggagtaataaatctctggaacagattggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaatta  
acaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattatt  
ggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggtttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcata  
atgatagtaggaggcttggtaggttaagaatagtttttctgtactttctatagtgaaatagagtttaggcagggat  
atccaccattatcgtttcagaccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaagg  
tgagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtaacttttaaaagaaaagggggg  
attgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaac  
aaattacaaaaattcaaaattttatcgatactagttatgcccagtcacatgaccttatgggactttcctactttgg  
cagtcacatctacgtattagtcacgctattaccatggtgatgcggttttggcagtcacatcaatgggctggtatagc  
ggtttgactcacggggatttccaagctctcaccctttagcgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacg  
ggactttccaaaatgtcgtacaactcgcacctttagcgcgaatgggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtctat  
ataagcagagctcgttttagtgaaccgtcagatcgcttgagacgccatccacgctgttttgacctccatagaagat  
tctagagccaccatggccttaccagtaccgcttctgctcctgcccgtggccttctgtctccacgccagccggg  
aggtgaaactgcagcagctctggacctggcctggtggcaccctcacagagcctgtccatcacatgcactgtctctgg  
gttctcattatccagatatagtgtaactgggttcgccagcctccaggaaagggtctggagtggctgggaatgata  
tgggggtggtggaatcacagactataattcagctctcaaatccagactgagcatcaacaaggacaactccaagagcc  
aagttttcttaaaaatgaacagctctgcaactgatgacacagccatatactactgtgccagaaagtatgggttggg  
ttacgacggtgctatggactactggggccaagggaccacgggtcaccgtctcctcaggtggtggtggttctggtggt

ggtggttctggcggcggcggctccgacatccagatgaccagtcctccaaatccatgtccatgtcagtaggagaga  
 gggtcaccttgagctgcaaggccactgacaatgtgcatacttatgtatcctggatcaacaaaaaccagagcagtc  
 tcctaaactgctgatatacggggcatccaaccggtacactggggctccccgatcgcttcacaggcagtgatctgaa  
 acagatttcactctgaccatcagcagtggtgaggctgaagacctgagattatcactgtggacagagttacaggt  
 atccgctcacgttcgggtgctgggaccaagctggagctgaaactcagagaccacgacgccagcggcgaccaccaac  
 accggcgcccaccatcgctcgcagccccctgtccctgcgccagaggcgtgccggccagcggcggggggcgagtg  
 cacacgagggggctggacttcgctgtgatctacatctgggcgcccttgccgggacttgtggggctcttctcc  
 tgtcactggttatcacctttactgcaaaggggcagaaagaaactcctgtatataattcaacaaccatttatgag  
 accagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaaggaggatgtgaactg  
 agagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatc  
 taggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggacctgagatggggggaaagccgagaag  
 gaagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatg  
 aaaggcgagcggcggaggggcaagggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacg  
 acgcccttcacatgcaggccctgccccctcgttaaggatccgcggccgcgaaggatctgcgatcgctccggtgcc  
 gtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttggggggaggggctcggaattgaacgggtgccta  
 gagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccagggtgggggagaa  
 ccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttcgaacgggtttgccgccagaacacagctgaagcttc  
 gaggggctcgcacatctctcttcacgcgcccgccctacctgaggccgccatccacgccggttgagtcgcgttct  
 gccgcctcccgcctgtgggtgctcctgaactgcgtccgccgtctaggttaagtttaaagctcaggtcgagaccgggc  
 ctttgtccggcgtcccttgagcctacctagactcagccggctctccacgctttgctgacctgcttgcctaac  
 tctacgtctttgtttctgtttctgctcgccttacagatccaagctgtgaccggcgcctacgctagacgccac  
 catggagagcgcagagagcggcctgcccgccatggagatcgagtccgcacaccggcacctgaacggcgtggag  
 ttcgagctgggtggcggcgagaggcaccaccaagcagggccgcacatgaccaacaagatgaagagcaccaaaggcg  
 ccctgacctcagccccctacctgctgagccacgtgatgggctacggcttctaccacttcggcacctaccccagcgg  
 ctacgagaacccccctctgcagccatcaacaacggcggctacaccaacaccgcacatcgagaagtagaggacggc  
 ggcgtgctgcacgtgagcttcagctaccgctacgaggccggccgcgtgatcggcgacttcaagtggtgggcaccg  
 gcttccccgaggacagcgtgatcttaccgacaagatcatccgcagcaacgccaccgtggagcacctgcacccat  
 gggcgataacgtgctgggtggcagcttcgcccgcaccttcagcctgcgcgacggcggctactacagcttctggtg  
 gacagccacatgcacttcaagagcgcacatccaccccagcactctgcagaacgggggccccatgttcgccttccgcc  
 gcgtggaggagctgcacagcaaacaccgagctgggcatcgtggagtaccagcacgcttcaagacccccatcgctt  
 cgccagatcccgcgtcagtcgtccaattctgccgtggacggcaccgccggaccggctccaccggatctcgctaa  
 gtcgacaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggatctttaaactatgttgctccttttacgc  
 tatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggcttccattttctctccttgta  
 taaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtgggtgtgactgtgtt  
 gctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctccttccgggacttctgcttccccctcc  
 ctattgccacggcggaaactcctcgcctgccttgcctgctgacaggggctcggtggttgggactgacaa  
 ttccgtgggtgttgcgggaaatcctcgtccttcttggctgctcgcctgtgttgcacctggattctgcgcggg  
 acgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctcccggcctgctgccggctctgcggc  
 ctcttccgcgtcttgccttcgcctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgcctggtacctttaa

gaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttttaaagaaaaggggggactggaagggctaattca  
ctcccaacgaaaataagatctgctttttgcttgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctc  
tctggctaactaggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtgccgctc  
tgttgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttc  
atgtcatcttattattcagatatttataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgagaggaacttgtttattgca  
gcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcattttttcactgcattctagtt  
gtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatcccgccctaactccgccagttcc  
gccattctccgccccatggctgactaattttttttatgatcagaggccgaggccgctcggcctctgagctat  
tccagaagtagtgaggagcttttttgaggcctagacttttgcagagacggccaaattcgtaatcatggtcata  
gctgtttcctgtgtgaaattgttatecgctcacaattccacacaacatacagaccggaagcataaagtgtaaagcc  
tggggtgcctaataagtgagtaactcacattaattgcttgcgctcactgccgcttccagtcgggaaacctgt  
cgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttctc  
gctcactgactcgtcgcctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtatacggtta  
tccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaagg  
ccgctgttgcctggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaanaatcgacgctcaagtcagaggtg  
gcaaaaccgacaggactataaagataaccaggcgtttccccctggaagctccctcgtcgcctctctgttccgacc  
ctgcccgttaccggataactgtccgcttttctcccttcgggaagcgtggcgtttctcatagctcacgctgtaggt  
atctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgctcagcccagcgtgcgc  
cttatccggttaactatcgtcttgagtccaaccggttaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaac  
aggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgtacagagttcttgaagtggcctaactacggctacactagaa  
ggacagtatattggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagtggtagctcttgatccggcaa  
acaaaccaccgctggtagcgggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaa  
gatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggttttggatcatgagat  
tatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaattaaaaatgaagttttaaataatctaaagtatatatgagta  
aacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcagctgtctatttcttcatccata  
gttgcctgactccccgctcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgatac  
cgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtgg  
tcttgcaactttatccgctccatccagcttattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttcggcagttaat  
agtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtagtggcttcatcagct  
ccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggttgcaaaaaagcggtagctccttcggctctcc  
gatcgttgtcagaagtaagtggccgaggttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtc  
atgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgac  
cgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcctcattgg  
aaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgca  
cccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaa  
aaaaggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttctttttcaatattattgaagcatttatca  
gggttattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataacaaatagggttccgcgcacattt  
ccccgaaaagtccacctgacgtctaagaacattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgtatcacga  
ggccctttcgtctcgcgcttccggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagc

ttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgctcagcgggtgttgcggggtgtcggggctgg  
cttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgaccatgatgcgggtgtgaaataccgcacagatgcgtaa  
ggagaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaaggcgatcgggtcggggcctc  
ttcgctattacgccagctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccag  
tcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaagctg

[0160] CD30 CAR-T细胞制备:

[0161] T淋巴细胞的激活及CD30 CAR T细胞获取;

[0162] 人T淋巴细胞的培养与激活:调整人外周血单核细胞密度至 $5 \times 10^6$ 个细胞/mL,按50 $\mu$ g/mL浓度加入人血白蛋白,以及1000U/mL的细胞因子IL-2、100U/mL的Anti-CD3(OKT3)和CD28抗体,于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的培养箱内培养48小时;

[0163] 慢病毒Lenti-2G.CAR-CD30感染T淋巴细胞:将T细胞分为CD30 CAR组和T细胞空白对照组;按照MOI为5计算感染所需要的病毒量;

[0164] 计算公式:MOI=(病毒滴度 $\times$ 病毒液体积)/T细胞数量

[0165] 将病毒液加入到500 $\mu$ L的含有一定数量T细胞的GT-T551 H3培养基中,随后加入8 $\mu$ g/mL的polybrene,混合均匀后加入到24孔板中,37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>的培养箱内孵育1小时;将上述培养基加到9mL的含有50 $\mu$ g/mL人血白蛋白,1000U/mL的IL-2,100U/mL OKT3和CD28的GT-T551 H3培养基,于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养培养14天。细胞计数仪和流式细胞术检测CD30 CAR T细胞的增值和CD30表达量。

[0166] CD30 CAR-T细胞对外周T细胞淋巴瘤细胞株(Karpas299)的杀伤作用是通过LDH乳酸脱氢酶试剂盒检测。

[0167] 计算杀伤率:

[0168] 杀伤率=(实验孔OD值-靶细胞自然释放孔OD值)/(靶细胞最大释放管OD值-靶细胞自然释放管OD值) $\times$ 100%。

[0169] 采用实时无标记细胞分析法(RTCA)检测CD30 CAR-T细胞的体外杀伤能力;

[0170] 采用Luminex液相芯片技术检测上清中细胞因子表达情况;

[0171] 细胞膜染液PKH26和7-AAD联合检测CD30 CAR-T细胞的杀伤作用。

[0172] 实验结果:

[0173] 流式细胞仪检测慢病毒感染后T细胞表面的CD3,CD4,CD8,CD30表达情况:

[0174] 通过检测慢病毒转染T细胞后,CAR表达的F a' b段和T细胞GFP,CD3,CD4,CD8分子的表达率来确定CD30 CAR T细胞的比例,实验结果如图4,在细胞提取后的第1天,第3天,第5天,第7天,第9天,第11天,第13天随着时间的延长,CD3,CD4,CD8分子的表达呈增加趋势,在第13天时,CD3<sup>+</sup>T细胞,CD4<sup>+</sup>T细胞,CD8<sup>+</sup>T细胞占总细胞的比例分别为88.9%,52.9%,38.4%,CD30的阳性表达率达到53.3%。

[0175] CD30 CAR-T细胞的体外增殖情况:

[0176] 在提取人外周血T淋巴细胞进行体外培养后,分别在第0天,第13天,对无关序列NC CAR-T细胞与CD30 CAR-T细胞进行计数,记录慢病毒转染前后细胞的增殖情况,结果如图4,在第13天时,CD30 CAR-T细胞较第0天相比,扩增约10倍。

[0177] LDH乳酸脱氢酶试剂盒检测CD30 CAR-T细胞的杀伤作用:

[0178] 结果如图5所示,3种不同的CD30 CAR-T细胞对CD30阳性外周T细胞Karpas299具有

杀伤作用,当效靶比为40:1时,9C11-2细胞杀伤作用最强,是9C11-3的1.8倍,9C11-1的1.98倍。以下选择9C11-2 CD30 CAR-T(以下简称CD30 CAR-T)细胞进行后续研究。

[0179] 随着效靶比的不断提升,可以发现在40:1的条件下,对比T细胞,感染慢病毒的CD30 CAR-T细胞对靶细胞的杀伤效果明显提高,CD30 CAR-T细胞杀伤率为 $88.04 \pm 1.41$ ,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。LDH乳酸脱氢酶释放实验表明,CD30 CAR-T细胞对靶细胞Karpas299具有明显杀伤效果,且在一定的效靶比范围内,该杀伤效果随着效靶比而提高。

[0180] RTCA细胞增值实验检测CD30 CAR-T细胞的体外杀伤能力:

[0181] 将T细胞在体外扩增14天以后,分别按照效靶比20:1和10:1,将靶细胞Karpas299和CD30 CAR-T细胞共培养,观察在两种效靶比下,T细胞和CD30 CAR-T细胞对靶细胞的杀伤效果有无变化。结果如图6所示,在效靶比20:1和10:1时,CD30 CAR-T细胞的杀伤效果都要明显高于NC CAR-T细胞( $P < 0.01$ ),且在一定范围内,杀伤效果随着效靶比的提高而上升。

[0182] Luminex液相芯片技术检测上清中细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-2和INF- $\gamma$ 的表达情况:

[0183] 通过检测细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-2和INF- $\gamma$ 在T上清中的含量来显示CD30 CAR-T细胞对靶细胞的杀伤效果,设定效靶比分别为40:1,20:1,10:1,在效靶比40:1和20:1时,细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-2和INF- $\gamma$ 在上清中的含量大致相同,较效靶比10:1时上升明显,且细胞因子的释放量随着效靶比的升高,在一定范围内也逐步升高。

[0184] PKH26染料和7-AAD联合检测CD30 CAR-T细胞的杀伤作用:

[0185] 将靶细胞Karpas299用PKH26染料进行染色,在与CD30 CAR-T细胞共培养24小时后,在通过7-AAD流式抗体对凋亡的靶细胞进行标记,观察CD30 CAR-T细胞的杀伤效果,在40:1,20:1,10:1的效靶比下,CD30 CAR-T细胞的杀伤效果都要高于NC CAR-T细胞,杀伤率分别为78.3%,43.7%和22.6%差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。其中,40:1的实验组效果最为显著,同时,与之前的实验结果相一致,在一定的范围内,效靶比越高,杀伤效果越明显。

[0186] 综上,通过LDH乳酸脱氢酶释放实验,RTCA增殖曲线,Luminex液相芯片技术检测TNF- $\alpha$ 、IL-2和INF- $\gamma$ 在上清中表达量,以及PKH26与7-AAD联合法这四种实验方法,均显示CD30 CAR-T细胞对靶细胞的杀伤效果比T细胞有明显提高。

[0187] CD30 CAR-T体内对外周T细胞淋巴瘤的抑制:

[0188] 为研究CD30 CAR-T细胞对于CD30阳性的淋巴瘤的体内抑制作用,取 $2 \times 10^6$ karpas 299细胞于100 $\mu$ L PBS中,并与100 $\mu$ L基质凝胶(Life sciences,USA)混合,注射于NOD-Prkdc<sup>em26Cd52</sup>I12rg<sup>em26Cd22</sup>/Nju小鼠(NCG,GemPharmatech)的右后背部,构建小鼠异种肿瘤移植模型,当肿瘤大小达到50mm<sup>3</sup>时,小鼠静脉注射 $1 \times 10^7$ CD30 CAR-T细胞、或 $1 \times 10^7$ NC CAR-T细胞或生理盐水。用卡尺监测肿瘤大小,计算肿瘤体积为:肿瘤长径 $\times$ 肿瘤宽径<sup>2</sup>/2。30天后,处死小鼠进行肿瘤组织分析。采用免疫组化方法测定肿瘤组织中TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 和G-CSF的水平。

[0189] CD30 CAR-T细胞能有效抑制肿瘤生长,并具有较高的肿瘤抑制作用(图7)。CD30 CAR-T组的TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 和G-CSF水平明显高于NC CAR T组和生理盐水组,我们还分析了CD30 CAR T、NC CAR T、生理盐水组小鼠的存活率,结果显示,CD30 CAR-T组小鼠显著延长了存活率。

[0190] 应说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术



方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 江苏省肿瘤医院
- [0003] <120> 一种抗淋巴瘤的CAR-T药物及其应用
- [0004] <160> 2
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 726
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] gaggtgaaac tgcagcagtc tggacctggc ctggtggcac cctcacagag cctgtccatc 60
- [0012] acatgcactg tctctgggtt ctattatcc agatatagtg tacactgggt tcgccagcct 120
- [0013] ccagaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatggggtg gtggaatcac agactataat 180
- [0014] tcagctctca aatccagact gagcatcaac aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240
- [0015] aaaaagaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatatact actgtgccag aaagtatggg 300
- [0016] ttgattacg acgggtctat ggactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360
- [0017] ggtggtggtg gttctggtgg tgggtggtct ggcgcgcgcg gctccgacat ccagatgacc 420
- [0018] cagtctcca aatccatgtc catgtcagta ggagagaggg tcaccttgag ctgcaaggcc 480
- [0019] actgacaatg tgcatactta tgtatcctgg tatcaacaaa aaccagagca gtctcctaaa 540
- [0020] ctgctgatat acggggcatc caaccgttac actggggtcc ccgatcgctt cacaggcagt 600
- [0021] ggatctgaaa cagatttcac tctgaccatc agcagtgtgc aggctgaaga ccttgcatg 660
- [0022] tatcactgtg gacagagtta caggtatccg ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag 720
- [0023] ctgaaa 726
- [0024] <210> 2
- [0025] <211> 8996
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0028] <400> 2
- [0029] acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttcta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca 60
- [0030] acatgcctta caaggagaga aaaagcaccg tgcattgccga ttggtggaag taaggtggtta 120
- [0031] cgatcggtcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga 180
- [0032] attgccgatg tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc 240
- [0033] tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac cactgctta 300
- [0034] agctcaata aagcttgctt tgagtgttc aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact 360
- [0035] ctggtaaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg 420
- [0036] cccgaacagg gacctgaaag cgaaaggga accagagctc tctcgacgca ggactcggct 480
- [0037] tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt 540
- [0038] gactagcggg ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcggggggag 600
- [0039] aattagatcg cgatgggaaa aaattcggtt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt 660
- [0040] aaaacatata gtatgggcaa gcaggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctggt 720
- [0041] agaaacatca gaagctgta gacaaact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg 780

[0042]	atcagaagaa	cttagatcat	tatataatac	agtagcaacc	ctctattgtg	tgcatcaaag	840
[0043]	gatagagata	aaagacacca	aggaagcttt	agacaagata	gaggaagagc	aaaacaaaag	900
[0044]	taagaccacc	gcacagcaag	cggccactga	tcttcagacc	tggaggagga	gatatgaggg	960
[0045]	acaattggag	aagtgaatta	tataaatata	aagtagtaaa	aattgaacca	ttaggagtag	1020
[0046]	caccaccaa	ggcaaagaga	agagtgggtc	agagagaaaa	aagagcagtg	ggaataggag	1080
[0047]	ctttgttctt	tgggttcttg	ggagcagcag	gaagcactat	gggcgcagcc	tcaatgacgc	1140
[0048]	tgacggtaca	ggccagacaa	ttattgtctg	gtatagtgca	gcagcagaac	aatttgctga	1200
[0049]	gggtattga	ggcgaacag	catctgttgc	aactcacagt	ctggggcatc	aagcagctcc	1260
[0050]	aggcaagaat	cctggctgtg	gaaagatacc	taaaggatca	acagctcctg	gggatttggg	1320
[0051]	gttgctctgg	aaaactcatt	tgcaccactg	ctgtgccttg	gaatgctagt	tggagtaata	1380
[0052]	aatctctgga	acagattgga	atcacacgac	ctggatggag	tgggacagag	aaattaacaa	1440
[0053]	ttacacaagc	ttaatacact	ccttaattga	agaatcgcaa	aaccagcaag	aaaagaatga	1500
[0054]	acaagaatta	ttggaattag	ataaatgggc	aagtttggg	aattggttta	acataacaaa	1560
[0055]	ttggctgtgg	tatataaat	tattcataat	gatagtagga	ggcttggtag	gtttaagaat	1620
[0056]	agtttttct	gtactttcta	tagtgaatag	agttaggcag	ggatattcac	cattatcgtt	1680
[0057]	tcagaccac	ctcccaacc	cgaggggacc	cgacaggccc	gaaggaatag	aagaagaagg	1740
[0058]	tggagagaga	gacagagaca	gatccattcg	attagtgaac	ggatctcgac	ggttaacttt	1800
[0059]	taaaagaaaa	ggggggattg	gggggtacag	tgcaggggaa	agaatagtag	acataatagc	1860
[0060]	aacagacata	caactaaag	aattacaaaa	acaattaca	aaaattcaa	attttatcga	1920
[0061]	tactagtatt	atgccagta	catgacctta	tgggactttc	ctacttggca	gtacatctac	1980
[0062]	gtattagtca	tcgctattac	catggtgatg	cggttttggc	agtacatcaa	tgggcgtgga	2040
[0063]	tagcggtttg	actcacgggg	atttccaagt	ctccaccca	ttgacgtcaa	tgggagtttg	2100
[0064]	ttttggcacc	aaaatcaacg	ggactttcca	aaatgtcgtg	acaactccgc	cccattgacg	2160
[0065]	caaatgggcg	gtaggcgtgt	acgggtgggag	gtctatataa	gcagagctcg	tttagtgaac	2220
[0066]	cgtcagatcg	cctggagacg	ccatccacgc	tgttttgacc	tccatagaag	attctagagc	2280
[0067]	caccatggcc	ttaccagtga	ccgccttctg	cctgccgtg	gccttctgctg	tccacgccgc	2340
[0068]	caggccggag	gtgaaactgc	agcagtctgg	acctggcctg	gtggcacctc	cacagagcct	2400
[0069]	gtccatcaca	tgactgtctt	ctgggttctc	attatccaga	tatagtgtac	actgggttctg	2460
[0070]	ccagcctcca	ggaaagggtc	tggagtggct	gggaatgata	tggggtggtg	gaatcacaga	2520
[0071]	ctataattca	gctctcaaat	ccagactgag	catcaacaag	gacaactcca	agagccaagt	2580
[0072]	tttcttaaaa	atgaacagtc	tgcaactga	tgacacagcc	atatactact	gtgccagaaa	2640
[0073]	gtatgggttg	gattacgacg	gtgctatgga	ctactggggc	caagggacca	cggtcacctg	2700
[0074]	ctctcaggt	ggtggtggtt	ctggtggtgg	tggttctggc	ggcggcggt	ccgacatcca	2760
[0075]	gatgaccag	tctcccaaat	ccatgtccat	gtcagtagga	gagagggtca	ccttgagctg	2820
[0076]	caaggccact	gacaatgtgc	atacttatgt	atcctggtat	caacaaaaac	cagagcagtc	2880
[0077]	tcctaaactg	ctgatatacg	gggcatcaa	ccggtacact	ggggtccccg	atcgcttca	2940
[0078]	aggcagtgga	tctgaacag	atttactctt	gaccatcagc	agtgtgcagg	ctgaagacct	3000
[0079]	tgcagattat	cactgtggac	agagttacag	gtatccgctc	acgttcgggtg	ctgggaccaa	3060
[0080]	gctggagctg	aaactcgaga	ccacgacgcc	agcgcgcgga	ccaccaacac	cggcgccac	3120
[0081]	catcgcgtcg	cagcccctgt	ccctgcgcc	agaggcgtgc	cggccagcgg	cggggggcgc	3180
[0082]	agtgacacag	aggggctgg	acttcgctg	tgatatctac	atctgggcgc	ccttggccgg	3240
[0083]	gacttgggg	gtccttctcc	tgctactggt	taccaccctt	tactgcaaac	ggggcagaaa	3300

[0084]	gaaactcctg	tatatattca	aacaaccatt	tatgagacca	gtacaaacta	ctcaagagga	3360
[0085]	agatggctgt	agctgccgat	ttccagaaga	agaagaagga	ggatgtgaac	tgagagtga	3420
[0086]	gttcagcagg	agcgcagacg	ccccgcgta	caagcagggc	cagaaccagc	tctataacga	3480
[0087]	gctcaatcta	ggacgaagag	aggagtacga	tgttttggac	aagagacgtg	gccgggaccc	3540
[0088]	tgagatgggg	ggaaagccga	gaaggaagaa	ccctcaggaa	ggcctgtaca	atgaaactgca	3600
[0089]	gaaagataag	atggcggagg	cctacagtga	gattgggatg	aaaggcgagc	gccggagggg	3660
[0090]	caaggggac	gatggccttt	accaggtct	cagtacagcc	accaaggaca	cctacgacgc	3720
[0091]	ccttcacatg	caggccctgc	cccctcgta	aggatccgcg	gccgcgaagg	atctgcatc	3780
[0092]	gctccggtgc	ccgtcagtgg	gcagagcga	catcgccac	agtccccgag	aagttggggg	3840
[0093]	gaggggtcgg	caattgaacg	ggtgcctaga	gaagtgggcg	cggggtaaac	tggaagagt	3900
[0094]	atgtcgtgta	ctggctccgc	ctttttcccg	agggtggggg	agaaccgtat	ataagtgcag	3960
[0095]	tagtcgccgt	gaacgttctt	tttcgcaacg	ggtttgccgc	cagaacacag	ctgaagcttc	4020
[0096]	gagggctcgc	catctctct	tcacgcgcc	gccgccctac	ctgagggcgc	catccacgcc	4080
[0097]	ggttgagtcg	cgttctgccg	cctcccgcct	gtggtgcctc	ctgaactgcg	tccgccgtct	4140
[0098]	aggtaaagttt	aaagctcagg	tcgagaccgg	gcctttgtcc	ggcgctccct	tgagaccctac	4200
[0099]	ctagactcag	ccggtctcc	acgctttgcc	tgacctgct	tgtcaactc	tacgtctttg	4260
[0100]	tttcgttttc	tgttctgcgc	cgttacagat	ccaagctgtg	accggcgccct	acgctagacg	4320
[0101]	ccaccatgga	gagcgacgag	agcggcctgc	ccgcatgga	gatcgagtgc	cgcatcaccg	4380
[0102]	gcacctgaa	cggcgtggag	ttcgagctgg	tgggcggcgg	agagggcacc	cccaagcagg	4440
[0103]	gccgatgac	caacaagatg	aagagacca	aaggcgccct	gaccttcagc	ccctacctgc	4500
[0104]	tgagccacgt	gatgggctac	ggcttctacc	acttcggcac	ctaccccagc	ggctacgaga	4560
[0105]	acccttctct	gcacgccatc	aacaacggcg	gctacaccaa	caccgcctc	gagaagtacg	4620
[0106]	aggacggcgg	cgtgctgcac	gtgagcttca	gctaccgcta	cgaggccggc	cgcgctgatc	4680
[0107]	gcgacttcaa	ggtggtgggc	accggcttcc	ccgaggacag	cgtgatcttc	accgacaaga	4740
[0108]	tcatccgag	caacgccacc	gtggagcacc	tgaccccat	gggcgataac	gtgctggtgg	4800
[0109]	gcagcttgc	ccgcaccttc	agcctgcgcg	acggcggcta	ctacagcttc	gtggtggaca	4860
[0110]	gccacatgca	cttcaagagc	gccatccacc	ccagcatcct	gcagaacggg	ggccccatgt	4920
[0111]	tcgccttccg	ccgcgtggag	gagctgcaca	gcaacaccga	gctgggcatc	gtggagtacc	4980
[0112]	agcagcctt	caagaccccc	atgccttccg	ccagatcccg	cgctcagtcg	tccaattctg	5040
[0113]	ccgtggacgg	caccgccgga	cccggctcca	ccgatctcg	ctaagtcgac	aatcaacctc	5100
[0114]	tggattacaa	aattttgtaa	agattgactg	gtattcttaa	ctatgttctg	ccttttacgc	5160
[0115]	tatgtggata	cgctgcttta	atgcctttgt	atcatgctat	tgcttcccgt	atggctttca	5220
[0116]	ttttctctc	cttgataaaa	tcttggttgc	tgtctcttta	tgaggagtgt	tgccccgttg	5280
[0117]	tcaggaacg	tgcggtgggtg	tgcactgtgt	ttgctgacgc	aacccccact	ggttggggca	5340
[0118]	ttgccaccac	ctgtcagctc	ctttccggga	ctttcgttt	ccccctccct	attgccacgg	5400
[0119]	cggaactcat	cgccgcctgc	cttgcccgt	gctggacagg	ggctcggctg	ttgggcaactg	5460
[0120]	acaattccgt	ggtgttctgc	gggaaatcat	cgctctttcc	ttggctgctc	gcctgtgttg	5520
[0121]	ccacctggat	tctgcgcggg	acgtcttct	gctacgtccc	ttcgccctc	aatccagcgg	5580
[0122]	accttcttc	ccgcggcctg	ctgccgctc	tgccgctct	tccgctctt	cgcttccgc	5640
[0123]	ctcagacgag	tcggatctcc	ctttggccg	cctccccgc	tggtacctt	aagaccaatg	5700
[0124]	acttacaagg	cagctgtaga	tcttagccac	tttttaaag	aaaagggggg	actggaagg	5760
[0125]	ctaattcact	cccaacgaaa	ataagatctg	ctttttgctt	gtactgggtc	tctctggtta	5820

[0126]	gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactagga acccactgct taagcctcaa	5880
[0127]	taaagcttgc cttgagtgc tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga ctctggtaac	5940
[0128]	tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtag tagttcatgt	6000
[0129]	catcttatta ttcagtattt ataacttga aagaaatgaa tatcagagag tgagaggaac	6060
[0130]	ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat	6120
[0131]	aaagcatttt tttcactgca ttctagtgtt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat	6180
[0132]	catgtctggc tctagetatc ccgcccctaa ctccgcccag ttccgcccct tctccgcccc	6240
[0133]	atggctgact aatTTTTTTT atttatgcag aggccgagc cgcctcggcc tctgagctat	6300
[0134]	tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag gcctagactt ttgcagagac ggcccaaatt	6360
[0135]	cgtaatcatg gtcatagctg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca	6420
[0136]	acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtc ctaatgagtg agctaactca	6480
[0137]	cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc	6540
[0138]	attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttccgctt	6600
[0139]	cctcgtcac tgactcgtg cgctcggctg ttcggctcgc gcgagcggta tcagctcact	6660
[0140]	caaaggcggc aatacggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag	6720
[0141]	caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata	6780
[0142]	ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaacc	6840
[0143]	cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg	6900
[0144]	ttccgacct gccgcttacc ggatacctgt ccgctttct cccttcggga agcgtggcgc	6960
[0145]	tttctcatag ctacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg	7020
[0146]	gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctcgc cttatccggt aactatcgtc	7080
[0147]	ttgagtcaa cccgtaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga	7140
[0148]	ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgtgga cctaactacg	7200
[0149]	gctacactag aaggacagta tttggatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa	7260
[0150]	aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg	7320
[0151]	tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt	7380
[0152]	ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgta agggattttg gtcatgagat	7440
[0153]	tatcaaaaag gatcttacc tagatcctt taaattaa atgaagttt aaatcaatct	7500
[0154]	aaagtatata tgagtaaact tggcttgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta	7560
[0155]	tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca tagttgctg actccccgtc gtgtagataa	7620
[0156]	ctacgatacg ggaggctta ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg cgagaccac	7680
[0157]	gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaaggcc gagcgcagaa	7740
[0158]	gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag	7800
[0159]	taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttgttgc cattgctaca ggcacgtgg	7860
[0160]	tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttccaacga tcaaggcgag	7920
[0161]	ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag cggtagctc cttcggctct ccgatcgtt	7980
[0162]	tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagactg cataattctc	8040
[0163]	ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcat	8100
[0164]	tctgagaata gtgtatggc cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata	8160
[0165]	ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa	8220
[0166]	aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca	8280
[0167]	actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctg gtgagcaaaa acaggaaggc	8340

[0168] aaaatgccgc aaaaaagga ataagggcga cacgaaatg ttgaatactc atactcttcc 8400  
[0169] tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcggg tacatatttg 8460  
[0170] aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac 8520  
[0171] ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga 8580  
[0172] ggccctttcg tctcgcgcgt ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc 8640  
[0173] cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg 8700  
[0174] cgtcagcggg tgttggcggg tgcggggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg 8760  
[0175] tactgagagt gcaccatag cggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 8820  
[0176] gcatcaggcg ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga tcggtgcggg 8880  
[0177] cctcttcgct attacccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg 8940  
[0178] taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtgcc aagctg 8996

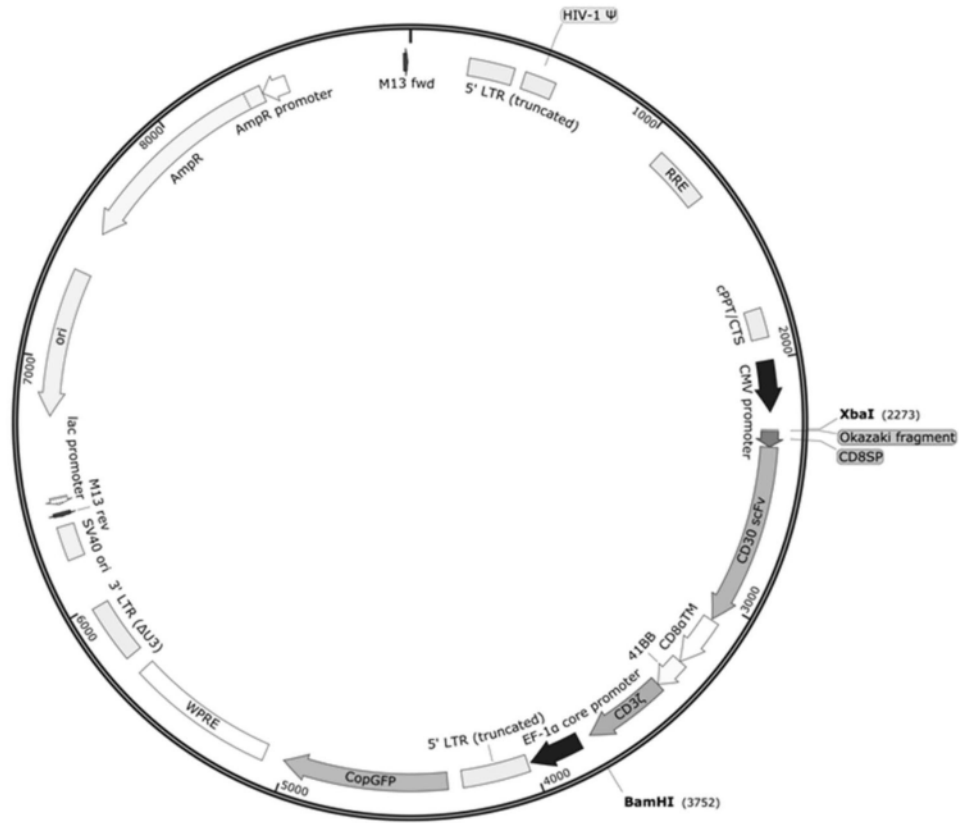


图1

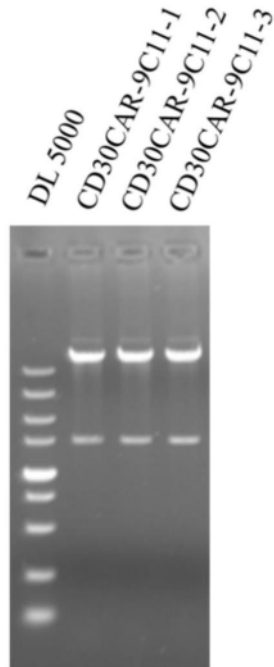


图2

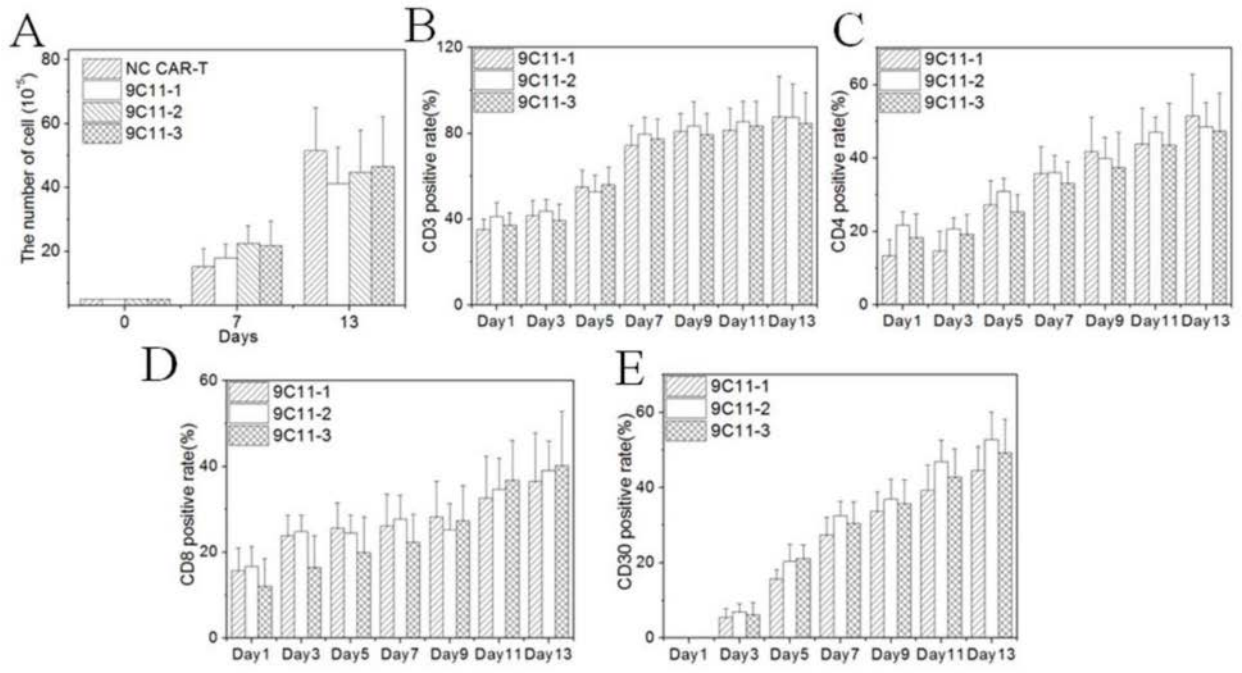


图3

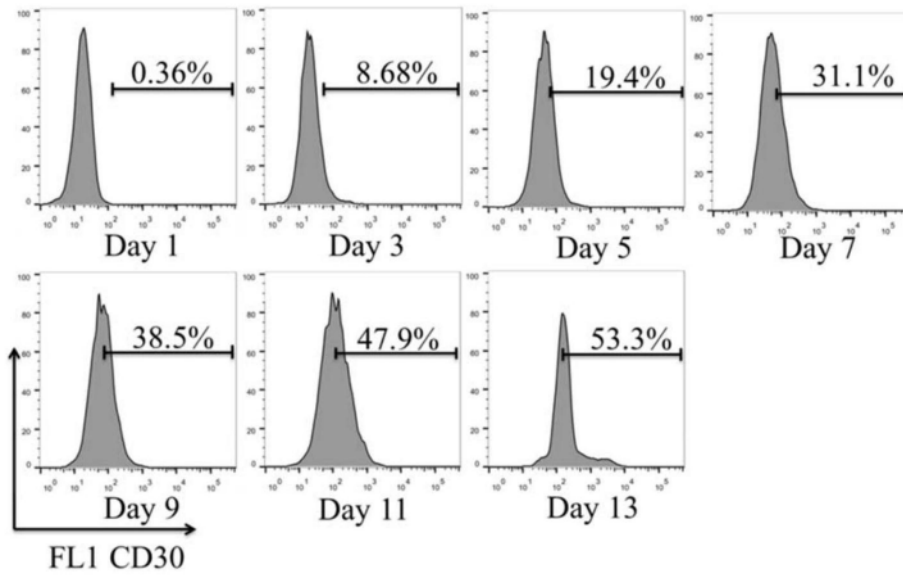


图4



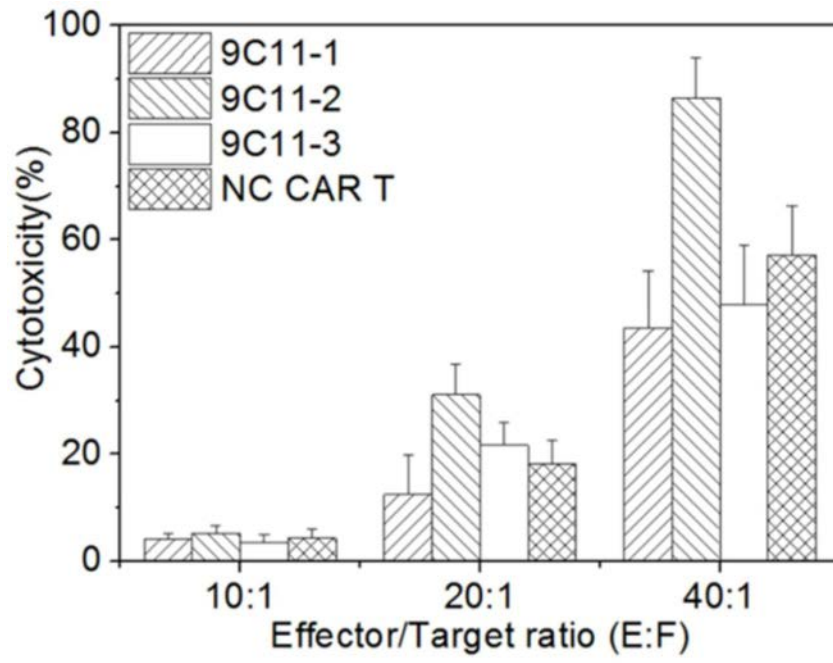


图5

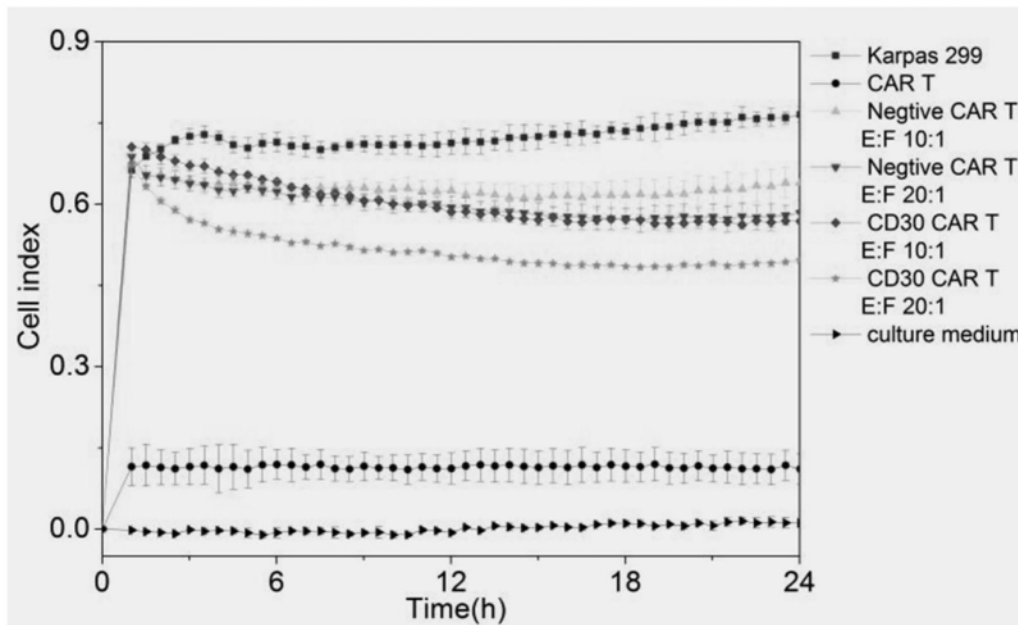


图6

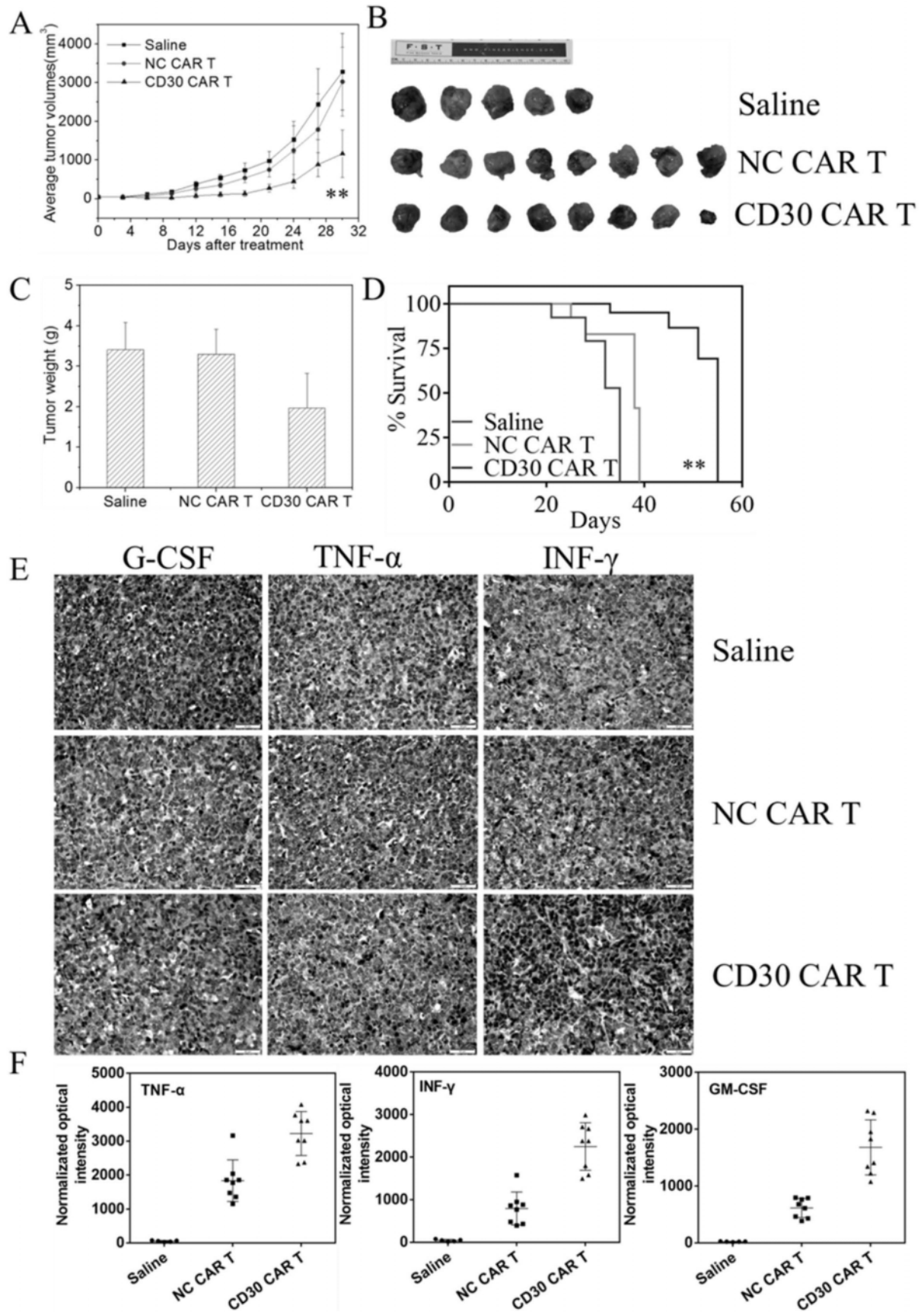


图7