



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107337737 B

(45)授权公告日 2020.02.07

(21)申请号 201710586786.3

(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 107337737 A

(43)申请公布日 2017.11.10

(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 李昱琛 张证维

(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 105874061 A,2016.08.17,

CN 104829733 A,2015.08.12,

CN 106535925 A,2017.03.22,

WO 2016164731 A2,2016.10.13,

徐学群等.CAR-T的设计原理及其在卵巢癌  
治.《免疫学杂志》.2017,第33卷(第2期),

审查员 程静之

权利要求书1页 说明书9页

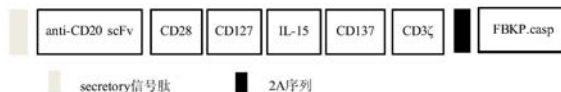
序列表10页 附图7页

(54)发明名称

一种嵌合抗原受体及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种嵌合抗原受体及其应用,具体为以肿瘤特异靶点CD20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CD3ζ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CD20.本发明的嵌合抗原受体通过对所述针对肿瘤表面抗原CD20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. 一种嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体为Secretory-CD20-CD28-CD127-IL-15Ra-CD137-CD3 $\zeta$ -2A-FBKP.Casp9;

所述嵌合抗原受体Secretory-CD20-CD28-CD127-IL-15Ra-CD137-CD3 $\zeta$ -2A-FBKP.Casp9的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

2. 根据权利要求1所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述嵌合抗原受体Secretory-CD20-CD28-CD127-IL-15Ra-CD137-CD3 $\zeta$ -2A-FBKP.Casp9的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

3. 根据权利要求2所述的嵌合抗原受体,其特征在于,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。

4. 根据权利要求3所述的嵌合抗原受体,其特征在于,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。

5. 根据权利要求4所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述转染的方式为通过病毒载体转染到T细胞。

6. 根据权利要求5所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述病毒载体为慢病毒载体和/或逆转录病毒载体。

7. 根据权利要求6所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述病毒载体为慢病毒载体。

8. 一种重组慢病毒,其特征在于,将包含如权利要求1-7中任一项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。

9. 根据权利要求8所述的重组慢病毒,其特征在于,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。

10. 一种组合物,其特征在于,所述组合物包括如权利要求1-7中任一项所述的嵌合抗原受体和/或如权利要求8或9所述的重组慢病毒。

11. 如权利要求1-7中任一项所述的嵌合抗原受体、如权利要求8或9所述的重组慢病毒或如权利要求10所述的组合物在制备嵌合抗原受体T细胞及其在制备肿瘤治疗药物中的应用。

12. 根据权利要求11所述的应用,其特征在于,所述肿瘤为血液相关的肿瘤疾病。

13. 根据权利要求12所述的应用,其特征在于,所述血液相关的肿瘤疾病为白血病和/或淋巴瘤。

## 一种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,尤其涉及一种嵌合抗原受体及其应用,具体为以肿瘤特异靶点CD20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 $\zeta$ )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B细胞恶性肿瘤(包括B细胞急性淋巴细胞性白血病(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 104788573 A公开了一种嵌合抗原受体hCD19scFv-CD8 $\alpha$ -CD28-CD3 $\zeta$ 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 $\alpha$ 铰链区、人CD28跨膜区和胞内区、以及人CD3 $\zeta$ 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CD20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 $\zeta$ 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CD20。

[0011] 本发明中,通过将抗原结合结构域结合肿瘤表面抗原CD20,再通过对抗原结合结构域即针对肿瘤表面抗原CD20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CD20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CD20的单链抗体(scFv),所述针对肿瘤表面抗原CD20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CD20的单链抗体氨基酸序列(SEQ ID NO.1)如下:

[0013] GDIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLPEYTFGGGTKVEIKGSTSGSGKPGSSEGSTKGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDITYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGLVTVSS.

[0014] 本发明中,所述针对肿瘤表面抗原CD20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CD20的突变体的单链抗体,所述针对肿瘤表面抗原CD20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 $\alpha$ 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、CD127信号传导结构域、IL-15Ra信号传导结构域或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、CD127信号传导结构域、IL-15Ra信号传导结构域和CD137信号传导结构域的组合,所述CD28信号传导结构域、CD127信号传导结构域、IL-15Ra信号传导结构域和CD127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、CD127信号传导结构域、IL-15Ra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-CD127-IL-15Ra-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] GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKVDSSRDRNPKFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLEGGGGSGGGSGAMVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLA LLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETL

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 $\zeta$ 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: MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP。

[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 $\zeta$ 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、CD20抗原结合结构域,CD8 $\alpha$ 和/或CD28跨膜结构域,CD28信号传导结构域、CD127信号传导结构域、IL-15Ra信号传导结构域和CD137信号传导结构域,CD3 $\zeta$ 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-CD20-CD28-CD127-IL-15Ra-CD137-CD3 $\zeta$ -2A-FBKP.Casp9。

[0028] 根据本发明,所述嵌合抗原受体Secretory-CD20-CD28-CD127-IL-15Ra-CD137-CD3 $\zeta$ -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] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPGDIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVVYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKGSTSGSGKPGSSEGSTKGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYAFSYSWINVWRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWL VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNTPRRPGPTRKHYQPYPAPPRDFAAYRSASGGGGSGGGGSKKR IKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTFPPQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVI TPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTNTSLPPPFSLQSGILTLNPVAQQQPILTSLGNSNQEAYVTMSSFYQNSRGGGGSGGGGSTSGGGGSGGGGSKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENC SHHLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRV KFSRSADAPAYQQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLST

ATKDTYDALHMQALPPRTSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGK  
KVDSRRDRNKPFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGRRAKLTI SPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGGG  
GSGGGSGAMVGALESRLRGNADLAYILSMEPCGHCLINNPNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRFRSSLHFMVEVK  
GDLTAKKMLLALLELARQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPK  
LFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGRLTFDQLDAISSLPSPSDFVSYSTFPGFVSWRD  
PKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSAS.

[0030] 根据本发明,所述嵌合抗原受体Secretory-CD20-CD28-CD127-IL-15Ra-CD137-  
CD3 $\zeta$ -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] ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCGCCTCCTGCTGATCCCCGG  
CGACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCGTGACCCCGGCGAGCCCGCCAGCATCAGCTGCAGAAGC  
AGCAAGAGCCTGCTGCACAGCAACGGCATCACCTACCTGTACTGGTACCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCAGC  
TGCTGATCTACCAGATGAGCAACCTGGTGAGCGGCGTGCCCGACAGATTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTT  
CACCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCAGAACCCTGGAGCTGCCCTAC  
ACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGGCAGCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCCGGCAGCAGCGAGGGCA  
GCACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCTG  
CAAGGCCAGCGGCTACGCCTCAGCTACAGCTGGATCAACTGGGTGAGACAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGG  
ATGGGCAGAATCTTCCCGGCGACGGCGACACCGACTACAACGGCAAGTTCAAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCG  
ACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG  
AAACGTGTTGACGGCTACTGGCTGGTGTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCCGCCATC  
GAGGTGATGTACCCCCCCCCCTACCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACC  
TGTGCCCCAGCCCCCTGTTCCCGGCCCCAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTG  
CTACAGCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGAC  
TACATGAACATGACCCCGAGAAGACCCGGCCCCACCAGAAAGCACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGAGACTTCG  
CCGCTACAGAAGCGCCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCAAGAAGAGAATCAAGCCATCGTGTG  
GCCAGCCTGCCCAGCACAGAAGACCCTGGAGCACCTGTGCAAGAAGCCAGAAAGAACCTGAACGTGAGCTTC  
AACCCGAGAGCTTCTGGACTGCCAGATCCACAGAGTGGACGACATCCAGGCCAGAGACGAGGTGGAGGGCTTCC  
TGCAGGACACCTTCCCCAGCAGCTGGAGGAGAGCGAGAAGCAGAGACTGGGCGGCGACGTGCAGAGCCCCAACTG  
CCCCAGCGAGGACGTGGTGATACCCCCGAGAGCTTCGGCAGAGACAGCAGCCTGACCTGCCTGGCCGGCAACGTG  
AGCGCCTGCGACGCCCCATCCTGAGCAGCAGAGAAGCCTGGACTGCAGAGAGAGCGGCAAGAACGGCCCCCAGC  
TGTACCAGGACCTGCTGCTGAGCCTGGGCACCACCAACAGCACCCCTGCCCCCCCCCTCAGCCTGCAGAGCGGCAT  
CCTGACCCTGAACCCGTGGCCAGGGCCAGCCATCCTGACCAGCCTGGGCAGCAACCAGGAGGAGGCCTACGTG  
ACCATGAGCAGCTTCTACCAGAACCAGAGCAGAGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCACCAGCGGCGGCG  
GCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCAAGAGCAGACAGACCCCCCCCCCTGGCCAGCGTGGAGATGGAGGCCATGGAGGC  
CCTGCCCCGTGACCTGGGGCACCAGCAGCAGAGACGAGGACCTGGAGAACTGCAGCCACCACCTGGGCGGCGGCGGC  
AGCGGCGGCGGCGGCAGCACCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGTGGTGAAGAGAGGCAGAAAGA  
AGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGAGACCCGTGCAGACCACCAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGCAG  
ATTCCCCGAGGAGGAGGAGGGCGGCTGCGAGCTGGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGC  
AGCAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCAGCCCCGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGA

ACCTGGGCAGAAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAGCCCAG  
AAGAAAGAACCCCCAGGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGC  
ATGAAGGGCGAGAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCT  
ACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGAACCAGCGGCAGCGGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCA  
GGCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCATGGGCGTGCAGGTGGAGACCATCAGCCCCGGCGACGGCAGAACC  
TTCCCAAGAGAGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGCATGCTGGAGGACGGCAAGAAGGTGGACAGCAGCA  
GAGACAGAAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGCAAGCAGGAGGTGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCCA  
GATGAGCGTGGGCCAGAGAGCCAAGCTGACCATCAGCCCCGACTACGCTACGGCGCCACCGGCCACCCCGGCATC  
ATCCCCCCCCACGCCACCTGGTGTTCGACGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAGGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGGC  
GCAGCGGCGCCATGGTGGGCGCCCTGGAGAGCCTGAGAGGCAACGCCGACCTGGCCTACATCCTGAGCATGGAGCC  
CTGCGGCCACTGCCTGATCATCAACAACGTGAACCTTCTGCAGAGAGAGCGGCCTGAGAACCAGAACCAGGCAGCAAC  
ATCGACTGCGAGAAGCTGAGAAGAAGATTCAGCAGCCTGCACTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACCGCCA  
AGAAGATGGTGTGGCCCTGCTGGAGCTGGCCAGACAGGACCACGGCGCCCTGGACTGCTGCGTGGTGGTATCCT  
GAGCCACGGCTGCCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCGCCGGCGCCGTGTACGGCACCGACGGCTGCCCCGTGAGCGTG  
GAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCAGCTGCCCCAGCCTGGGCGGCAAGCCCAAGCTGTTCTTCATCCAGG  
CCTGCGGCGGCGAGCAGAAGGACCACGGCTTCGAGGTGGCCAGCACCAGCCCCGAGGACGAGAGCCCCGGCAGCAA  
CCCCGAGCCCGACGCCACCCCTTCCAGGAGGGCCTGAGAACCTTCGACCAGCTGGACGCCATCAGCAGCCTGCCC  
ACCCCCAGCGACATCTTCGTGAGCTACAGCACCTTCCCCGGCTTCGTGAGCTGGAGAGACCCCAAGAGCGGCAGCT  
GGTACGTGGAGACCCTGGACGACATCTTCGAGCAGTGGGCCACAGCGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGAGAGT  
GGCCAACGCCGTGAGCGTGAAGGGCATCTACAAGCAGATGCCCGGCTGCTTCAACTTCTGAGAAAGAAGCTGTTC  
TTCAAGACCAGCGCCAGCTGA.

[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CD20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CD20,CD20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CD20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CD20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(a)为人淋巴瘤细胞Daudi细胞株流式细胞分析结果图,图2(b) B淋巴细胞瘤BLCL1流式细胞分析结果图,图2(c) B淋巴细胞瘤BLCL2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)为人淋巴瘤细胞Daudi对照组培养2天的流式细胞分析结果图,图3(b)为人淋巴瘤细胞Daudi对照组培养4天的流式细胞分析结果图,图3(c)人淋巴瘤细胞Daudi为对照组培养12天的流式细胞分析结果图;

[0048] 图4为人淋巴瘤细胞Daudi和CD20 CAR-T细胞共培养的流式细胞分析结果图,其中图4(a)为人淋巴瘤细胞Daudi和CD20 CAR-T细胞共培养2天的流式细胞分析结果图,图4(b)为人淋巴瘤细胞Daudi和CD20 CAR-T细胞共培养4天的流式细胞分析结果图,图4(c)为人淋巴瘤细胞Daudi和CD20 CAR-T细胞共培养12天的流式细胞分析结果图;

[0049] 图5为GFP染色图结果,其中,绿色荧光表示人淋巴瘤细胞的存活细胞,第一列为对照组Daudi细胞未加T细胞毒杀的GFP染色图,第二列为经加入CD20 CAR-T细胞毒杀后的人淋巴瘤细胞的GFP染色图;

[0050] 图6(a)为白血病靶细胞未加CAR T对照组的流式细胞分析结果图,图6(b)为白血病靶细胞的自动细胞凋亡结果

[0051] 图7(a)为CD20 CAR-T细胞与白血病靶细胞共培养18小时的流式细胞分析结果图,图7(b)为CD20 CAR-T细胞与白血病靶细胞共培养18小时的细胞凋亡结果图。

## 具体实施方式

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 实施例1:嵌合抗原受体的构建

[0055] (1) 通过全基因合成Secretory信号肽、CD20抗原结合结构域,CD8 $\alpha$ 和/或CD28跨膜结构域,CD28信号传导结构域、CD127信号传导结构域、IL-15Ra信号传导结构域和CD137信号传导结构域,CD3 $\zeta$ 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



[0056] Secretary-CD20-CD28-CD127-IL-15Ra-CD137-CD3ζ-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] ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCCTTCTGCTGATCCCCGG  
CGACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCCGTGACCCCGGGCGAGCCCGCCAGCATCAGCTGCAGAAGC  
AGCAAGAGCCTGCTGCACAGCAACGGCATCACCTACCTGTACTGGTACCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCCAGC  
TGCTGATCTACCAGATGAGCAACCTGGTGAGCGGCGTGCCCGACAGATTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTT  
CACCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCAGAACCTGGAGCTGCCCTAC  
ACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGGCAGCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCCGGCAGCAGCGAGGGCA  
GCACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCTG  
CAAGGCCAGCGGCTACGCCTTCAGCTACAGCTGGATCAACTGGGTGAGACAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGG  
ATGGGCAGAATCTTCCCGGGCGACGGCGACCCGACTACAACGGCAAGTTCAAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCG  
ACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG  
AAACGTGTTTCGACGGCTACTGGCTGGTGTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCGCCATC  
GAGGTGATGTACCCCCCCCCCTACCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACC  
TGTGCCCCAGCCCCCTGTTCCCGGCCCCAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGTGGCCTG  
CTACAGCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGAC  
TACATGAACATGACCCCCAGAAGACCCGGCCCCACCAGAAAGCACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGAGACTTCG  
CCGCCTACAGAAGCGCCAGCGGCGGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCAAGAAGAGAATCAAGCCATCGTGTG  
GCCCAGCCTGCCCCACCACAAGAAGACCCTGGAGCACCTGTGCAAGAAGCCAGAAAGAACCTGAACGTGAGCTTC  
AACCCCGAGAGCTTCTGGACTGCCAGATCCACAGAGTGGACGACATCCAGGCCAGAGACGAGGTGGAGGGCTTCC  
TGCAGGACACCTTCCCCAGCAGCTGGAGGAGAGCGAGAAGCAGAGACTGGGCGGGCAGCTGCAGAGCCCCAACTG  
CCCCAGCGAGGACGTGGTGATCACCCCGAGAGCTTCGGCAGAGACAGCAGCCTGACCTGCCTGGCCGGCAACGTG  
AGCGCCTGCGACGCCCCATCCTGAGCAGCAGCAGAAGCCTGGACTGCAGAGAGAGCGGCAAGAACGGCCCCCAGC  
TGTACCAGGACCTGCTGCTGAGCCTGGGCACCACCAACAGCACCCCTGCCCCCCCCCTCAGCCTGCAGAGCGGCAT  
CCTGACCCTGAACCCCGTGGCCCAGGGCCAGCCATCCTGACCAGCCTGGGCAGCAACCAGGAGGAGGCCTACGTG  
ACCATGAGCAGCTTCTACCAGAACCAGAGCAGAGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCACCAGCGGCGGGC  
GCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCAAGAGCAGACAGACCCCCCCCCCTGGCCAGCGTGGAGATGGAGGCCATGGAGGC  
CCTGCCCCTGACCTGGGGCACCAGCAGCAGAGACGAGGACCTGGAGAACTGCAGCCACCACCTGGGCGGCGGCGGC  
AGCGGCGGCGGCGGCAGCACCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGTGGTGAAGAGAGGCAGAAAGA  
AGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGAGACCCGTGCAGACCACCAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGCAG  
ATTCCCCGAGGAGGAGGAGGGCGGCTGCGAGCTGGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGC  
AGCAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGA  
ACCTGGGCAGAAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAGCCCAG  
AAGAAAGAACCCCCAGGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGC  
ATGAAGGGCGAGAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCT  
ACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGAACCAGCGGCAGCGGCGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCA  
GGCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCATGGGCGTGCAGGTGGAGACCATCAGCCCCGGCGACGGCAGAACC  
TTCCCAAGAGAGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGCATGCTGGAGGACGGCAAGAAGGTGGACAGCAGCA  
GAGACAGAAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGCAAGCAGGAGGTGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCCA

GATGAGCGTGGGCCAGAGAGCCAAGCTGACCATCAGCCCCGACTACGCCTACGGCGCCACCGGCCACCCCGGCATC  
 ATCCCCCCCCACGCCACCCCTGGTGTTCGACGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAGGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCG  
 GCAGCGGCGCCATGGTGGGCGCCCTGGAGAGCCTGAGAGGCAACGCCGACCTGGCCTACATCCTGAGCATGGAGCC  
 CTGCGGCCACTGCCTGATCATCAACAACGTGAACTTCTGCAGAGAGAGCGGCCTGAGAACCAGAACCAGGCAGCAAC  
 ATCGACTGCGAGAAGCTGAGAAGAAGATTGAGCAGCCTGCACTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACCGCCA  
 AGAAGATGGTGTGCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCCAGACAGGACCACGGCGCCCTGGACTGCTGCGTGGTGGTATCCT  
 GAGCCACGGCTGCCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCCGGCGCCGTGTACGGCACCGACGGCTGCCCGTGAGCGTG  
 GAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCAGCTGCCCCAGCCTGGGCGGCAAGCCCAAGCTGTTCTTCATCCAGG  
 CCTGCGGCGGCGAGCAGAAGGACCACGGCTTCGAGGTGGCCAGCACCAGCCCCGAGGACGAGAGCCCCGGCAGCAA  
 CCCCCGAGCCCGACGCCACCCCTTCCAGGAGGGCCTGAGAACCTTCGACCAGCTGGACGCCATCAGCAGCCTGCCC  
 ACCCCCAGCGACATCTTCGTGAGCTACAGCACCTTCCCCGGCTTCGTGAGCTGGAGAGACCCCAAGAGCGGCAGCT  
 GGTACGTGGAGACCCTGGACGACATCTTCGAGCAGTGGGCCACAGCGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGAGAGT  
 GGCCAACGCCGTGAGCGTGAAGGCATCTACAAGCAGATGCCCGGCTGCTTCAACTTCTGAGAAAGAAGCTGTTC  
 TTCAAGACCAGCGCCAGCTGA.

[0059] 实施例2:慢病毒包装

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

[0061] (2) 加入600 $\mu$ 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 $\mu$ L的DMEM的上清液, 2.7 $\mu$ g的helper DNAmix (1.8 $\mu$ g pNHP, 0.5 $\mu$ g pHEF-VSV-G, 0.2 $\mu$ g pHEFeGFP) 以及0.8 $\mu$ g的pTY DNA载体, 漩涡振荡;

[0063] (4) 从每孔板中央吸取7 $\mu$ 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 $^{\circ}$ C 3% CO<sub>2</sub> 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% CO<sub>2</sub> 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 $^{\circ}$ C;

[0071] 通常情况下, 在每毫升的培养基中, 转染细胞可以产生 $10^6$ 到 $10^7$ 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 $5 \times 10^6$ 接种到24孔板,加入50 $\mu$ l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 $^{\circ}$ C培养24h,加入1ml的含有2%人血清,1%青霉素或链霉素与细胞培养因子的AIM-V基,培养2-3天后,将细胞收获并计数,以 $1 \times 10^7$ 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所示。

[0078] 从图2(a)-图2(c)可以看出,Daudi细胞(人淋巴瘤细胞)、BLCL1细胞和BLCL2细胞表面都有CD20的表达,本发明选用的CD20 CAR能够用于治疗Daudi、BLCL1和BLCL2。

[0079] 实施例5 CAR-T细胞的Daudi体外肿瘤杀伤

[0080] (1) 将非专一性的4GS-meso CART细胞和本申请制备的专一性的4GS-CD20 CAR-T细胞与Daudi肿瘤靶细胞共培养,置于37度5%CO<sub>2</sub>培养箱共培养18h、2天、4天、9天和12天;

[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,结果如图3-7所示;

[0082] 从图3(a)-图3(c)可以看出,Daudi肿瘤靶细胞培养2天后的肿瘤细胞数比例为98.4%,培养4天后的肿瘤细胞数比例为98.8%,培养12天后的肿瘤细胞数比例为99%,从图4(a)-图4(c)可以看出,当CD20 CAR-T细胞与Daudi肿瘤靶细胞培养2天后,Daudi肿瘤靶细胞数的比例为38.3%,培养4天后,Daudi肿瘤靶细胞数的比例为13.6%,培养12天后,Daudi肿瘤靶细胞数的比例为3.8%,可见,CD20 CAR-T细胞共培养的存活细胞比例迅速减少,由此可得CD20 CAR-T细胞对Daudi肿瘤靶细胞的毒杀效果好。

[0083] 从图5可以看出,第一列一般的T细胞与Daudi肿瘤靶细胞共培养后,绿色荧光基本没发生变化,第二列的CD20 CAR-T细胞与Daudi肿瘤靶细胞共培养后绿色荧光基本消失,即Daudi肿瘤靶细胞基本死亡,说明CD20 CAR-T细胞对Daudi肿瘤靶细胞的毒杀效果好。

[0084] 从图6-图7可以看出,从图6(a)和图7(a)对比可以看出,荧光强度为 $10^3$ 以上的细胞为Daudi肿瘤靶细胞,挑选图6(a)和图7(a)中荧光强度为 $10^3$ 以上的细胞做进一步分析,从图6(b)可以看出,23.3%的靶细胞濒临自然凋亡,5.3%的靶细胞自然凋亡,从图7(b)加入CAR T后可以看出,80.6%的靶细胞濒临凋亡,17.1%的靶细胞凋亡,可见,CD20 CAR-T细胞的靶细胞濒临凋亡以及靶细胞凋亡数明显高于对照组,因此CD20 CAR-T细胞对Daudi肿瘤靶细胞有较好的毒杀作用。

[0085] 综上所述,本发明的嵌合抗原受体的针对CD20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。

[0086] 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。



[0039]	210	215	220
[0040]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp		
[0041]	225	230	235 240
[0042]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0043]		245	250
[0044]	<210> 2		
[0045]	<211> 1270		
[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 Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu		
[0052]		20	25 30
[0053]	Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser		
[0054]		35	40 45
[0055]	Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr		
[0056]		50	55 60
[0057]	Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser		
[0058]		65	70 75 80
[0059]	Asn Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly		
[0060]		85	90 95
[0061]	Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly		
[0062]		100	105 110
[0063]	Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly		
[0064]		115	120 125
[0065]	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro		
[0066]		130	135 140
[0067]	Gly Ser Ser Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser		
[0068]		145	150 155 160
[0069]	Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys		
[0070]		165	170 175
[0071]	Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln		
[0072]		180	185 190
[0073]	Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp		
[0074]		195	200 205
[0075]	Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr		
[0076]		210	215 220
[0077]	Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg		

[0078]	225	230	235	240
[0079]	Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly			
[0080]		245	250	255
[0081]	Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0082]		260	265	270
[0083]	Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu			
[0084]		275	280	285
[0085]	Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro			
[0086]		290	295	300
[0087]	Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val			
[0088]	305	310	315	320
[0089]	Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe			
[0090]		325	330	335
[0091]	Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp			
[0092]		340	345	350
[0093]	Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr			
[0094]		355	360	365
[0095]	Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Ala Ser			
[0096]		370	375	380
[0097]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Lys Arg Ile Lys Pro			
[0098]	385	390	395	400
[0099]	Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu			
[0100]		405	410	415
[0101]	Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser			
[0102]		420	425	430
[0103]	Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp			
[0104]		435	440	445
[0105]	Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu			
[0106]		450	455	460
[0107]	Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro			
[0108]	465	470	475	480
[0109]	Ser Glu Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser			
[0110]		485	490	495
[0111]	Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu			
[0112]		500	505	510
[0113]	Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro			
[0114]		515	520	525
[0115]	His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr			
[0116]		530	535	540

[0117]	Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro
[0118]	545 550 555 560
[0119]	Val Ala Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu
[0120]	565 570 575
[0121]	Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln Ser Arg Gly
[0122]	580 585 590
[0123]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0124]	595 600 605
[0125]	Gly Gly Gly Gly Ser Lys Ser Arg Gln Thr Pro Pro Leu Ala Ser Val
[0126]	610 615 620
[0127]	Glu Met Glu Ala Met Glu Ala Leu Pro Val Thr Trp Gly Thr Ser Ser
[0128]	625 630 635 640
[0129]	Arg Asp Glu Asp Leu Glu Asn Cys Ser His His Leu Gly Gly Gly Gly
[0130]	645 650 655
[0131]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[0132]	660 665 670
[0133]	Gly Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
[0134]	675 680 685
[0135]	Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
[0136]	690 695 700
[0137]	Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Gly
[0138]	705 710 715 720
[0139]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Val Lys
[0140]	725 730 735
[0141]	Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
[0142]	740 745 750
[0143]	Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
[0144]	755 760 765
[0145]	Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
[0146]	770 775 780
[0147]	Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
[0148]	785 790 795 800
[0149]	Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
[0150]	805 810 815
[0151]	Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
[0152]	820 825 830
[0153]	Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Thr Ser Gly
[0154]	835 840 845
[0155]	Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu

[0156]	850	855	860
[0157]	Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly		
[0158]	865	870	875
[0159]	Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr		
[0160]		885	890
[0161]	Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg		
[0162]		900	905
[0163]	Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly		
[0164]		915	920
[0165]	Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu		
[0166]		930	935
[0167]	Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile		
[0168]		945	950
[0169]	Ile Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu		
[0170]		965	970
[0171]	Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Met Val Gly		
[0172]		980	985
[0173]	Ala Leu Glu Ser Leu Arg Gly Asn Ala Asp Leu Ala Tyr Ile Leu Ser		
[0174]		995	1000
[0175]	Met Glu Pro Cys Gly His Cys Leu Ile Ile Asn Asn Val Asn Phe		
[0176]		1010	1015
[0177]	Cys Arg Glu Ser Gly Leu Arg Thr Arg Thr Gly Ser Asn Ile Asp		
[0178]		1025	1030
[0179]	Cys Glu Lys Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ser Leu His Phe Met Val		
[0180]		1040	1045
[0181]	Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr Ala Lys Lys Met Val Leu Ala Leu		
[0182]		1055	1060
[0183]	Leu Glu Leu Ala Arg Gln Asp His Gly Ala Leu Asp Cys Cys Val		
[0184]		1070	1075
[0185]	Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln Ala Ser His Leu Gln Phe		
[0186]		1085	1090
[0187]	Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys Pro Val Ser Val Glu		
[0188]		1100	1105
[0189]	Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys Pro Ser Leu Gly		
[0190]		1115	1120
[0191]	Gly Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly Gly Glu Gln		
[0192]		1130	1135
[0193]	Lys Asp His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu Asp Glu		
[0194]		1145	1150
			1155



[0195]	Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln Glu		
[0196]	1160	1165	1170
[0197]	Gly Leu Arg Thr Phe Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro		
[0198]	1175	1180	1185
[0199]	Thr Pro Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe		
[0200]	1190	1195	1200
[0201]	Val Ser Trp Arg Asp Pro Lys Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr		
[0202]	1205	1210	1215
[0203]	Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln		
[0204]	1220	1225	1230
[0205]	Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Asn Ala Val Ser Val Lys Gly Ile		
[0206]	1235	1240	1245
[0207]	Tyr Lys Gln Met Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys Leu		
[0208]	1250	1255	1260
[0209]	Phe Phe Lys Thr Ser Ala Ser		
[0210]	1265	1270	
[0211]	<210> 3		
[0212]	<211> 3813		
[0213]	<212> DNA		
[0214]	<213> 人工合成序列		
[0215]	<400> 3		
[0216]	atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgcc cttcctgctg	60	
[0217]	atccccggcg acatcgtgat gaccagacc cccctgagcc tgcccgtgac ccccggcgag	120	
[0218]	cccgccagca tcagctgcag aagcagcaag agcctgctgc acagcaacgg catcacctac	180	
[0219]	ctgtactggt acctgcagaa gcccggccag agccccagc tgctgatcta ccagatgagc	240	
[0220]	aacctggtga gcggcgtgcc cgacagattc agcggcagcg gcagcggcac cgacttcacc	300	
[0221]	ctgaagatca gcagagtgga ggccgaggac gtgggcgtgt actactgcgc ccagaacctg	360	
[0222]	gagctgcctt acaccttcgg cggcggcacc aaggtggaga tcaagggcag caccagcggc	420	
[0223]	agcggcaagc ccggcagcag cgagggcagc accaagggcc aggtgcagct ggtgcagagc	480	
[0224]	ggcggcagg tgaagaagcc cggcagcagc gtgaaggtga gctgcaaggc cagcggctac	540	
[0225]	gccttcagct acagctggat caactgggtg agacaggccc ccggccaggg cctggagtgg	600	
[0226]	atgggcagaa tcttccccgg cgacggcgac accgactaca acggcaagtt caagggcaga	660	
[0227]	gtgaccatca ccgccgacaa gagcaccagc accgectaca tggagctgag cagcctgaga	720	
[0228]	agcgaggaca ccgccgtgta ctactgcgcc agaaactgtt tcgacggcta ctggctggtg	780	
[0229]	tactggggcc agggcacctt ggtgaccgtg agcagcggcg ccgccatcga ggtgatgtac	840	
[0230]	ccccccccct acctggacaa cgagaagagc aacggcacca tcatccactg gaagggcaag	900	
[0231]	cacctgtgcc ccagccccct gttccccggc cccagcaagc ctttctgggt gctggtggtg	960	
[0232]	gtgggcggcg tgctggcctg ctacagcctg ctggtgaccg tggccttcat catcttctg	1020	
[0233]	gtgagaagca agagaagcag actgctgcac agcgactaca tgaacatgac ccccagaaga	1080	

[0234]	cccggcccca	ccagaaagca	ctaccagccc	tacgcccccc	ccagagactt	cgccgcctac	1140
[0235]	agaagcgcca	gcggcggcgg	cggcagcggc	ggcggcggca	gcaagaagag	aatcaagccc	1200
[0236]	atcgtgtggc	ccagcctgcc	cgaccacaag	aagaccctgg	agcacctgtg	caagaagccc	1260
[0237]	agaaagaacc	tgaacgtgag	cttcaacccc	gagagcttcc	tggactgcca	gatccacaga	1320
[0238]	gtggacgaca	tccaggccag	agacgaggtg	gagggcttcc	tgcaggacac	cttccccag	1380
[0239]	cagctggagg	agagcgagaa	gcagagactg	ggcggcgacg	tgcagagccc	caactgcccc	1440
[0240]	agcgaggacg	tggatgatcac	ccccgagagc	ttcggcagag	acagcagcct	gacctgcctg	1500
[0241]	gccggcaacg	tgagcgcctg	cgacgcccc	atcctgagca	gcagcagaag	cctggactgc	1560
[0242]	agagagagcg	gcaagaacgg	ccccacgtg	taccaggacc	tgctgctgag	cctgggcacc	1620
[0243]	accaacagca	ccctgcccc	ccccttcagc	ctgcagagcg	gcatcctgac	cctgaacccc	1680
[0244]	gtggcccagg	gccagcccat	cctgaccagc	ctgggcagca	accaggagga	ggcctacgtg	1740
[0245]	accatgagca	gcttctacca	gaaccagagc	agaggcggcg	gcggcagcgg	cggcggcggc	1800
[0246]	agcaccagcg	gcggcggcgg	cagcggcggc	ggcggcagca	agagcagaca	gacccccccc	1860
[0247]	ctggccagcg	tggagatgga	ggccatggag	gcctgcccc	tgacctgggg	caccagcagc	1920
[0248]	agagacgagg	acctggagaa	ctgcagccac	cacctgggcg	gcggcggcag	cggcggcggc	1980
[0249]	ggcagcacca	gcggcggcgg	cggcagcggc	ggcggcggca	gcgtggtgaa	gagaggcaga	2040
[0250]	aagaagctgc	tgtacatctt	caagcagccc	ttcatgagac	ccgtgcagac	caccaggag	2100
[0251]	gaggacggct	gcagctgcag	attccccgag	gaggaggagg	gcggctgcga	gctgggcggc	2160
[0252]	ggcggcagcg	gcggcggcgg	cagcggcggc	ggcggcagca	gagtgaagtt	cagcagaagc	2220
[0253]	gccgacgccc	ccgctacca	gcagggccag	aaccagctgt	acaacgagct	gaacctgggc	2280
[0254]	agaagagagg	agtacgacgt	gctggacaag	agaagaggca	gagacccga	gatgggcggc	2340
[0255]	aagcccagaa	gaaagaacct	ccaggagggc	ctgtacaacg	agctgcagaa	ggacaagatg	2400
[0256]	gccgaggcct	acagcgagat	cggcatgaag	ggcgagagaa	gaagaggcaa	gggccacgac	2460
[0257]	ggcctgtacc	agggcctgag	caccgccacc	aaggacacct	acgacgcct	gcacatgcag	2520
[0258]	gccctgcccc	ccagaaccag	cggcagcggc	gccaccaact	tcagcctgct	gaagcaggcc	2580
[0259]	ggcgacgtgg	aggagaacct	cggccccatg	ggcgtgcagg	tggagaccat	cagccccggc	2640
[0260]	gacggcagaa	ccttccccaa	gagaggccag	acctgcgtgg	tgcactacac	cggcatgctg	2700
[0261]	gaggacggca	agaaggtgga	cagcagcaga	gacagaaaca	agcccttcaa	gttcatgctg	2760
[0262]	ggcaagcagg	aggtgatcag	aggctgggag	gagggcgtgg	cccagatgag	cgtgggccag	2820
[0263]	agagccaagc	tgaccatcag	ccccgactac	gcctacggcg	ccaccggcca	ccccggcatc	2880
[0264]	atccccccc	acgccacct	ggtgttcgac	gtggagctgc	tgaagctgga	ggcggcggc	2940
[0265]	ggcagcggcg	gcggcggcag	cggcgccatg	gtgggcgccc	tggagagcct	gagaggcaac	3000
[0266]	gccgacctgg	cctacatcct	gagcatggag	cctgcggcc	actgcctgat	catcaacaac	3060
[0267]	gtgaacttet	gcagagagag	cggcctgaga	accagaaccg	gcagcaacat	cgactgcgag	3120
[0268]	aagctgagaa	gaagattcag	cagcctgcac	ttcatggtgg	aggtgaaggg	cgacctgacc	3180
[0269]	gccaagaaga	tgggtctggc	cctgctggag	ctggccagac	aggaccacgg	cgccctggac	3240
[0270]	tgctgcgtgg	tggatgatcct	gagccacggc	tgccaggcca	gccacctgca	gttccccggc	3300
[0271]	gccgtgtacg	gcaccgacgg	ctgccccgtg	agcgtggaga	agatcgtgaa	catcttcaac	3360
[0272]	ggcaccagct	gccccagcct	gggcggcaag	ccaagctgt	tcttcatcca	ggcctgcggc	3420

[0273] ggcgagcaga aggaccacgg cttcgaggtg gccagcacca gccccgagga cgagagcccc 3480  
 [0274] ggcagcaacc ccgagccccga cgccaccccc ttccaggagg gcctgagaac cttcgaccag 3540  
 [0275] ctggacgcca tcagcagcct gccaccccc agcgacatct tcgtgagcta cagcaccttc 3600  
 [0276] cccggcttcg tgagctggag agacccaag agcggcagct ggtacgtgga gaccctggac 3660  
 [0277] gacatcttcg agcagtgggc ccacagcgag gacctgcaga gcctgctgct gagagtggcc 3720  
 [0278] aacgccgtga gcgtgaagg catctacaag cagatgcccg gctgcttcaa cttcctgaga 3780  
 [0279] aagaagctgt tcttcaagac cagcgccagc tga 3813  
 [0280] <210> 4  
 [0281] <211> 423  
 [0282] <212> PRT  
 [0283] <213> 人工合成序列  
 [0284] <400> 4  
 [0285] Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val  
 [0286] 1 5 10 15  
 [0287] Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro  
 [0288] 20 25 30  
 [0289] Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His  
 [0290] 35 40 45  
 [0291] Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp  
 [0292] 50 55 60  
 [0293] Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg  
 [0294] 65 70 75 80  
 [0295] Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys  
 [0296] 85 90 95  
 [0297] Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly  
 [0298] 100 105 110  
 [0299] Ile Ile Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys  
 [0300] 115 120 125  
 [0301] Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Met Val  
 [0302] 130 135 140  
 [0303] Gly Ala Leu Glu Ser Leu Arg Gly Asn Ala Asp Leu Ala Tyr Ile Leu  
 [0304] 145 150 155 160  
 [0305] Ser Met Glu Pro Cys Gly His Cys Leu Ile Ile Asn Asn Val Asn Phe  
 [0306] 165 170 175  
 [0307] Cys Arg Glu Ser Gly Leu Arg Thr Arg Thr Gly Ser Asn Ile Asp Cys  
 [0308] 180 185 190  
 [0309] Glu Lys Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ser Leu His Phe Met Val Glu Val  
 [0310] 195 200 205  
 [0311] Lys Gly Asp Leu Thr Ala Lys Lys Met Val Leu Ala Leu Leu Glu Leu

[0312]	210	215	220
[0313]	Ala Arg Gln Asp His Gly Ala Leu Asp Cys Cys Val Val Val Ile Leu		
[0314]	225	230	235 240
[0315]	Ser His Gly Cys Gln Ala Ser His Leu Gln Phe Pro Gly Ala Val Tyr		
[0316]		245	250 255
[0317]	Gly Thr Asp Gly Cys Pro Val Ser Val Glu Lys Ile Val Asn Ile Phe		
[0318]		260	265 270
[0319]	Asn Gly Thr Ser Cys Pro Ser Leu Gly Gly Lys Pro Lys Leu Phe Phe		
[0320]		275	280 285
[0321]	Ile Gln Ala Cys Gly Gly Glu Gln Lys Asp His Gly Phe Glu Val Ala		
[0322]		290	295 300
[0323]	Ser Thr Ser Pro Glu Asp Glu Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro Asp		
[0324]	305	310	315 320
[0325]	Ala Thr Pro Phe Gln Glu Gly Leu Arg Thr Phe Asp Gln Leu Asp Ala		
[0326]		325	330 335
[0327]	Ile Ser Ser Leu Pro Thr Pro Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser Thr		
[0328]		340	345 350
[0329]	Phe Pro Gly Phe Val Ser Trp Arg Asp Pro Lys Ser Gly Ser Trp Tyr		
[0330]		355	360 365
[0331]	Val Glu Thr Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp		
[0332]		370	375 380
[0333]	Leu Gln Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Asn Ala Val Ser Val Lys Gly		
[0334]	385	390	395 400
[0335]	Ile Tyr Lys Gln Met Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys Leu		
[0336]		405	410 415
[0337]	Phe Phe Lys Thr Ser Ala Ser		
[0338]		420	
[0339]	<210> 5		
[0340]	<211> 21		
[0341]	<212> PRT		
[0342]	<213> 人工合成序列		
[0343]	<400> 5		
[0344]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
[0345]	1	5	10 15
[0346]	His Ala Ala Arg Pro		
[0347]		20	
[0348]	<210> 6		
[0349]	<211> 22		
[0350]	<212> PRT		



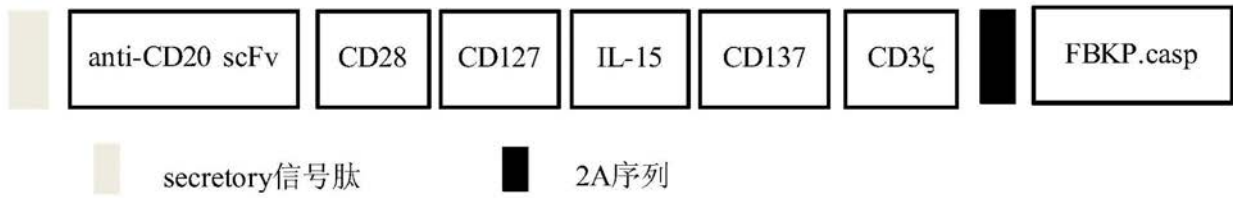


图1

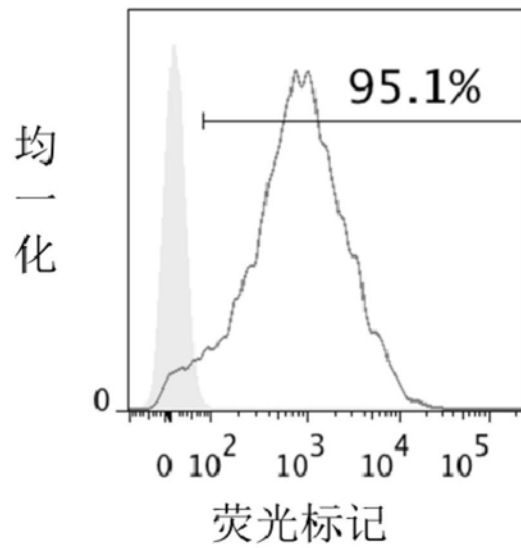


图2 (a)

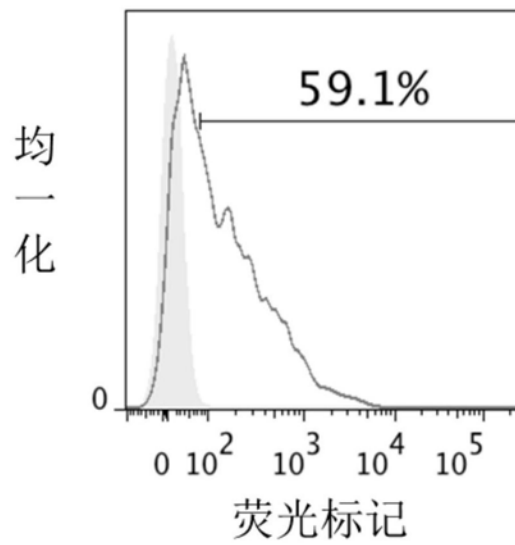


图2 (b)

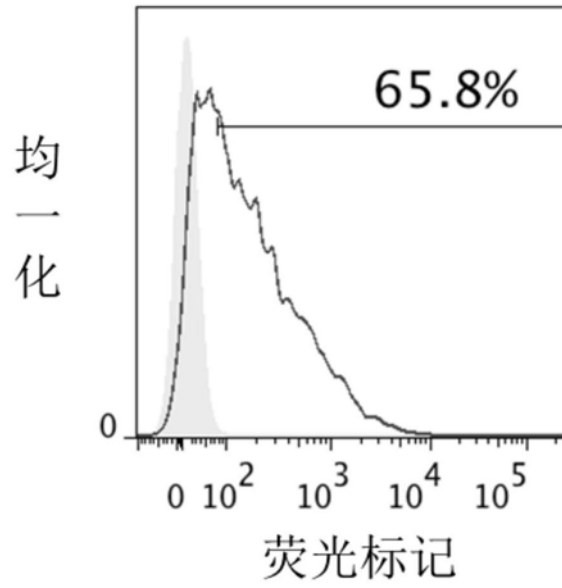


图2(c)

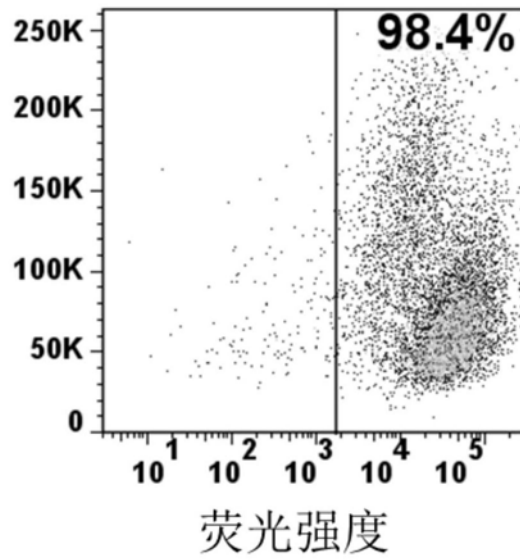


图3(a)

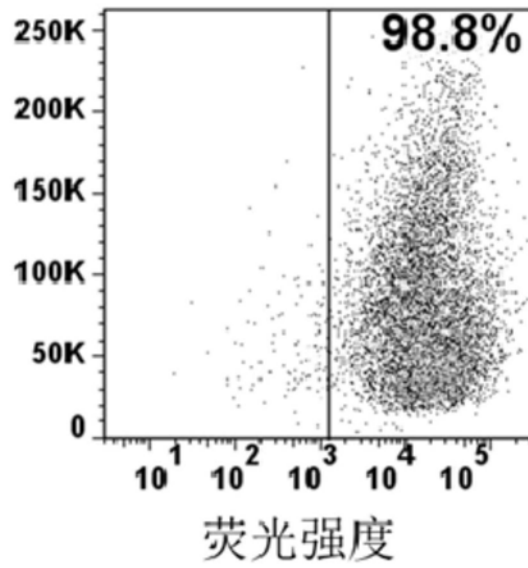


图3 (b)

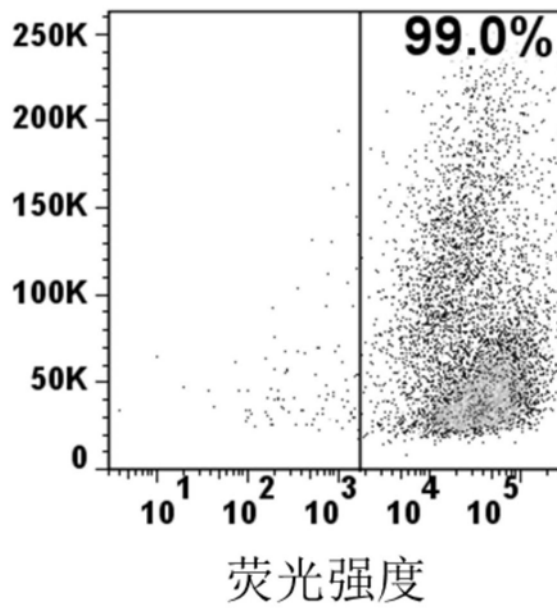


图3 (c)



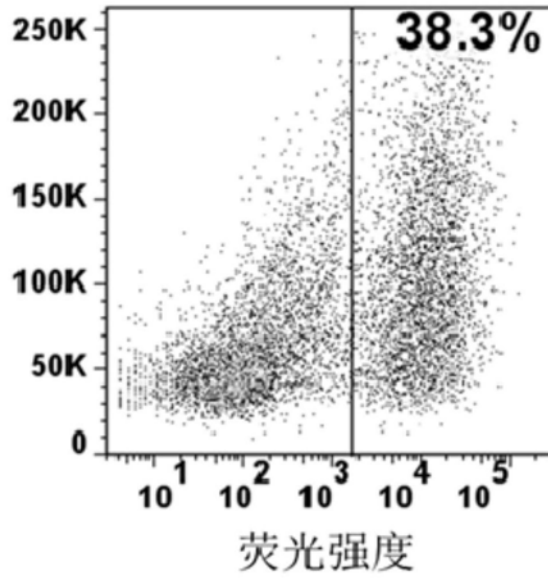


图4(a)

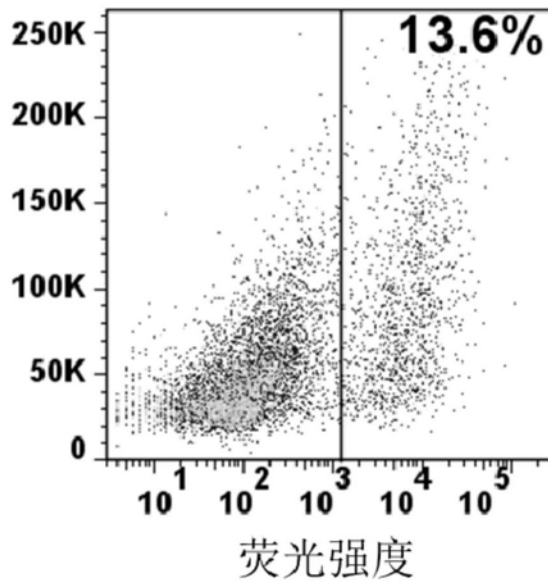


图4(b)

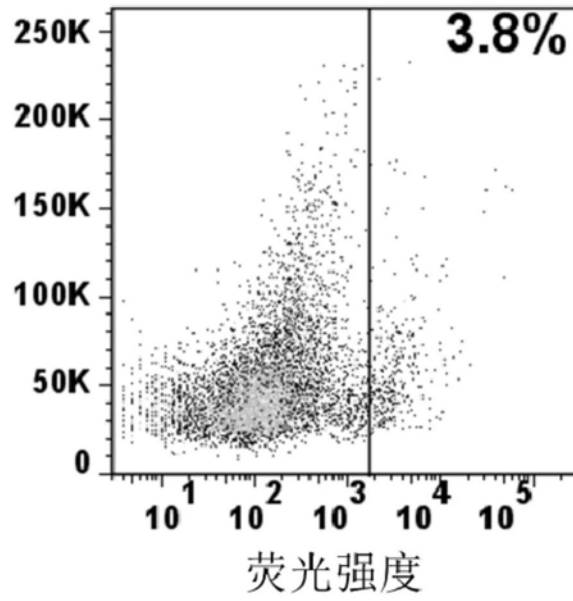


图4(c)

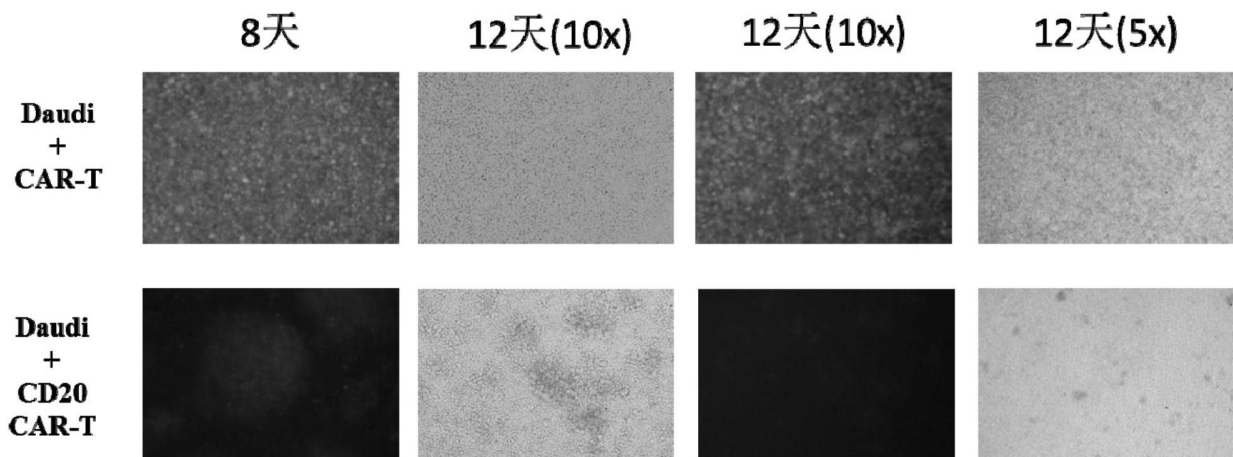


图5

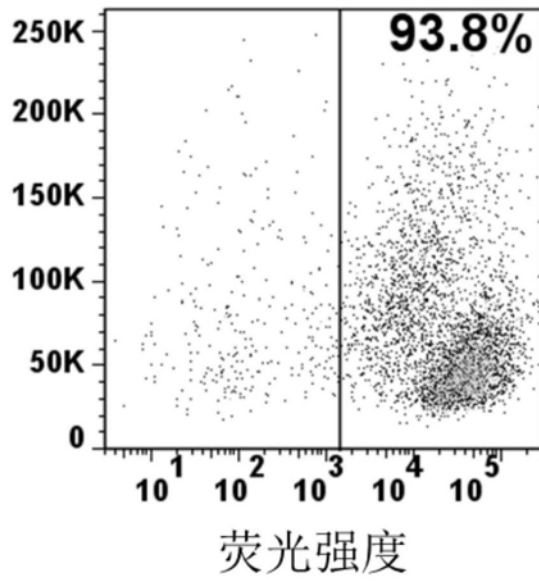


图6 (a)

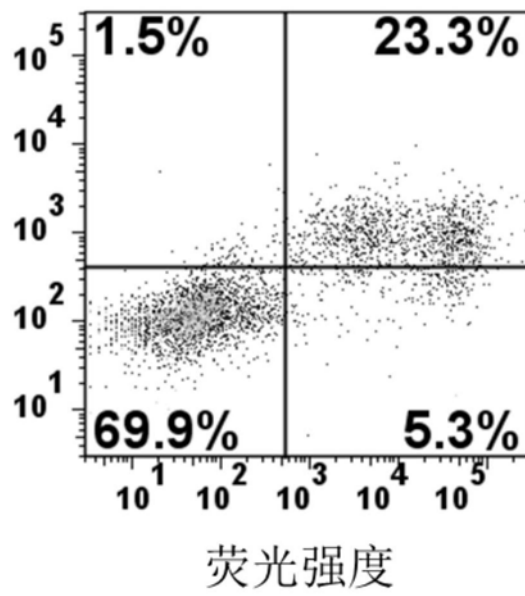


图6 (b)

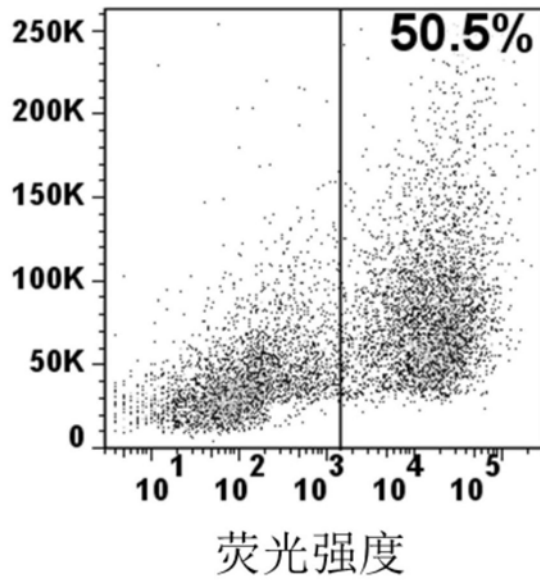


图7 (a)

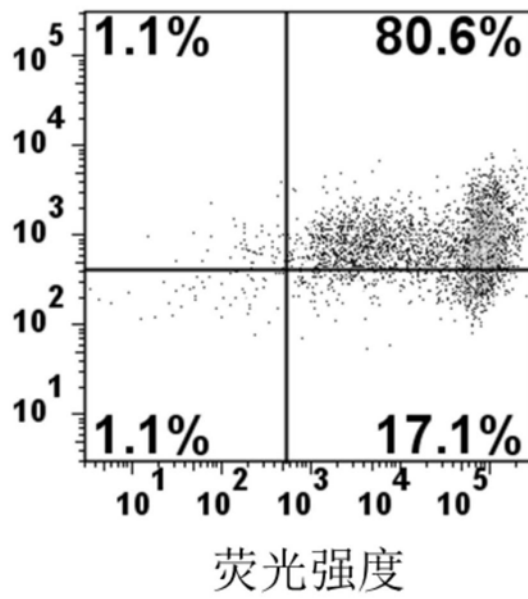


图7 (b)