



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114149978 B

(45) 授权公告日 2022.04.26

(21) 申请号 202210119944.5

WO 2014007421 A1,2014.01.09

(22) 申请日 2022.02.09

WO 2017210600 A1,2017.12.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114149978 A

赵文静 等.共表达细胞因子IL-7和趋化因子CCL19/CCL21的第四代anti-CD19 CAR-T细胞的开发与应用.《免疫学杂志》.2020,第36卷(第4期),第348-357页.

(43) 申请公布日 2022.03.08

(73) 专利权人 深圳博雅感知药业有限公司
地址 518122 广东省深圳市坪山区坑梓街道金辉路14号生物医药创新产业园区10号楼1501室

Michael C. Milone et al.Chimeric Receptors Containing CD137 Signal Transduction Domains Mediate Enhanced Survival of T Cells and Increased Antileukemic Efficacy In Vivo.《The American Society of Gene & Cell Therapy》.2009,第17卷(第8期),第1453-1464页.

(72) 发明人 刘庆喜 许晓椿 肖海蓉 魏卿 赵梦莲

Cor H.J. Lamers et al.T Cell Receptor-Engineered T Cells to Treat Solid Tumors:T Cell Processing Toward Optimal T Cell Fitness.《HUMAN GENE THERAPY METHODS》.2014,第345-357页. (续)

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

审查员 陈永强

(56) 对比文件

CN 108250301 A,2018.07.06

CN 108264567 A,2018.07.10

CN 111733186 A,2020.10.02

CN 113583143 A,2021.11.02

CN 113735981 A,2021.12.03

CN 103834615 A,2014.06.04

CN 104450614 A,2015.03.25

CN 104818248 A,2015.08.05

CN 105039253 A,2015.11.11

CN 108865995 A,2018.11.23

EP 3494208 A1,2019.06.12

US 2016175358 A1,2016.06.23

WO 2021236548 A1,2021.11.25

权利要求书2页 说明书15页
序列表9页

(54) 发明名称

制备CAR-T细胞的方法

(57) 摘要

本发明涉及制备CAR-T细胞的方法,该方法包括以下步骤:质粒合成,该质粒是由CD19单链可变区、CD8aα铰链区、CD8a跨膜区、4-1BB信号、

CD3ζ的包浆信号、IL-7、CCL17序列构成;病毒包装,得到慢病毒浓缩液,测定其病毒滴度;T细胞制备,制得T细胞为CD8⁺T细胞,对其进行激活、转导与扩增,收获CAR-T细胞。本发明还涉及制备T细胞的方法。本发明呈现如说明书所述优异效果。

CN 114149978 B

[接上页]

(56) 对比文件

Rosalie M. Sterner et al. GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts.《IMMUNOBIOLOGY AND IMMUNOTHERAPY》.2019,第133卷(第7期),第697-

709页.

Xu, Yang et al. Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR-CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15.《BLOOD》.2014,第123卷(第24期),第3750-3759页.

1. 制备CAR-T细胞的方法,其包括以下步骤:

(1) 质粒合成:

使用载体pLVX-EF1a-IRES-PGK-puro合成CAR-19-1质粒,该质粒是由CD19单链可变区、CD8a铰链区、CD8a跨膜区、4-1BB信号、CD3 ζ 的包浆信号、IL-7、CCL17序列构成,并且具有序列1所示核苷酸序列;

(2) 病毒包装:

使用Lipofectamine 3000转染试剂即Lip3000进行病毒包装,293T培养基为添加10% FBS 的DMEM-H培养基,慢病毒包装培养基为添加1% GlutaMAX、1mM丙酮酸钠、5% FBS的Opti-MEMI培养基;

将293T细胞以 7×10^6 个细胞/孔的密度接种于含12 mL的慢病毒包装培养基的10cm培养皿中,置于37°C、5% CO₂条件下孵育细胞过夜至293T细胞密度达95%;

将孵育过夜的培养皿每皿去除6 mL的慢病毒包装培养基,接着向每个皿中加入6mL 的A液-B液混合液,轻混使其分布均匀后置于37°C、5% CO₂条件下孵育进行转染;转染6小时后更换293T培养基继续孵育;

至转染24小时后,收集12mL细胞上清液,并加入提前预热的12mL的293T培养基,继续于37°C、5% CO₂条件下孵育进行转染;

至转染54小时后第二次收集细胞上清液,与首次收集上清液混合,得细胞上清液;

在室温下,将上一步骤收集的细胞上清液以2000rpm离心10分钟,去除细胞碎片沉淀物,再使用0.45 μ m滤器过滤上清,得病毒上清液;

按照病毒上清液与浓缩试剂以体积比5:1的比例混合,4°C孵育2h,然后于4°C处离心至离心管底有米白色沉淀;

小心移去上清,加入适量体积的DMEM重悬沉淀,得到慢病毒浓缩液,测定其病毒滴度;

(3) T细胞制备:

向含有1mL全血的EP管内添加生物素标记CD8抗体5 μ L和强化液15 μ L,室温混合30分钟,所述强化液为包含0.25%吡哆醇和0.12%甘油磷酸钙的无菌水溶液;

再向上述1mL全血内添加150 μ L微泡,室温混合20分钟,将微泡和被抗体标记的细胞结合,离心;

用200 μ L移液枪将白色微泡层轻轻转移至另一个2mL的EP管内,用500 μ L微泡缓冲液冲洗附着在管壁和移液管头上的微泡,并入EP管内,室温下孵育30min;上述微泡缓冲液是包含如下组分的水溶液:氯化钾200mg/L、磷酸二氢钾200mg/L、氯化钠8000mg/L、七水磷酸氢二钠2160mg/L、1%人血清白蛋白、2mM EDTA、酒石酸钠25mg/L、脯氨酸120mg/L;

用超声波破泡,离心,收集细胞沉淀,制得T细胞为CD8⁺T细胞,对其进行流式细胞仪鉴定;

(4) T细胞激活、转导与扩增:

将收集的CD8⁺T细胞以 5×10^5 个细胞/mL接种于24孔板/6孔板中,使用激活培养基刺激24-48小时,接着加入MOI=10的慢病毒浓缩液以及转导培养基进行病毒转导,24-48小时后换成维持培养基;扩增至6-8天时,收获CAR-T细胞;

其中,

激活培养基是包含30ng/mL anti-CD3和20ng/mL CD28的X-VIVOTM15 Medium;

转导培养基是包含200U/mL IL-2和5 μ g/mL Polybrene的X-VIVOTM15 Medium;

维持培养基是包含200U/mL IL-2 的X-VIVOTM15 Medium;

所述A液-B液混合液是将A液与B液混匀后置室温孵育15min得到的;A液配置方法为:将Opti-MEMI减血清培养基恢复至室温,使用1.5ml的Opti-MEMI与41 μ L的Lip3000在10cm皿中混匀,得A液;B液配置方法为:将1.5ml的Opti-MEMI、35 μ L的P3000 Enhancer、12 μ g质粒混合物混合,得B液;其中,质粒混合物的质粒比为,PMD2.G:pSPAX2:CAR-19-1=1:3:4。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤(3) T细胞制备时,用超声波破泡是用400W功率超声破泡,超声2次,每次1秒;用超声波破泡后以1000rpm离心10min。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述CAR-T细胞能够分泌表达IL-7、CCL17因子,并且该CAR-T细胞转染了表达嵌合抗原受体的氨基酸序列;所述嵌合抗原受体包括:a) 作为第一信号的抗原结合结构域、b) 跨膜结构域、c) 作为第二信号的细胞内传导结构域、以及d) 表达IL-7和CCL-17细胞因子的第三信号域;所述嵌合抗原受体包含序列2所示的氨基酸序列。

4. 制备T细胞的方法,其包括如下步骤:

向含有1mL全血的EP管内添加生物素标记CD8抗体5 μ L和强化液15 μ L,室温混合30分钟,所述强化液为包含0.25%吡哆醇和0.12%甘油磷酸钙的无菌水溶液;

再向上述1mL全血内添加150 μ L微泡,室温混合20分钟,将微泡和被抗体标记的细胞结合,离心;

用200 μ L移液枪将白色微泡层轻轻转移至另一个2mL的EP管内,用500 μ L微泡缓冲液冲洗附着在管壁和移液管头上的微泡,并入EP管内,室温下孵育30min;上述微泡缓冲液是包含如下组分的水溶液:氯化钾200mg/L、磷酸二氢钾200mg/L、氯化钠8000mg/L、七水磷酸氢二钠2160mg/L、1%人血清白蛋白、2mM EDTA、酒石酸钠25mg/L、脯氨酸120mg/L;

用超声波破泡,离心,收集细胞沉淀,制得CD8⁺的T细胞。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中用超声波破泡是用400W功率超声破泡,超声2次,每次1秒;用超声波破泡后以1000rpm离心10min。

制备CAR-T细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种分泌IL-7和CCL-17因子,以及分泌中和PD-1和GM-CSF的anti-PD-1与anti-GM-CSFscFv的CD19-CAR-T细胞,本发明还涉及此CAR-T细胞例如CD19-CAR-T细胞的制备方法及其用途。

背景技术

[0002] 美国食品药品监督管理局(FDA)2017年8月批准了第一个基因治疗产品Kymriah,此产品能够很好的治疗一些患有急性淋巴细胞白血病(ALL)的儿童和年轻人患者。Kymriah是一种基因改良的自体T细胞免疫疗法,即嵌合抗原受体T(CAR-T)免疫疗法。CAR-T免疫疗法是一种以嵌合型抗原受体为基础的细胞免疫治疗方案,通过体外基因转导技术,将编码嵌合抗原受体CAR-T基因序列导入T细胞中,生成可以结合靶抗原的肿瘤特异性T细胞。最常见的CARs包括了一段抗原识别区,比如单克隆抗体(mAb)的单链可变区段(scFv),和激活T细胞胞内信号域的TCR ζ 链。

[0003] 靶向CD19的CAR-T细胞已经在临床前和临床中表现出惊人的效果,现有研究表明IL-7能延长免疫细胞的存活能力,也能刺激成熟T细胞增殖等,所以IL-7因子可以增强免疫细胞在体内存活时间及抗肿瘤效果;CCL-17也被称作胸腺和活化调节趋化因子,能够提高内源性免疫细胞向肿瘤细胞的聚集能力,进一步增强免疫细胞的抗肿瘤效果。但该疗法却受到其相关毒副作用的限制,如细胞因子释放综合症和神经毒性等。细胞因子综合症主要指免疫细胞与肿瘤细胞作用的过程中,大量释放细胞因子以至于引起进一步的连锁反映,如过度炎症引起的高热寒战、呼吸困难、凝血障碍等,神经毒性引起的头疼、意识模糊、认知改变、语言障碍等症状,最终危及生命。近期,有研究表明单核细胞和巨噬细胞促进CAR-T细胞治疗后的CRS和神经毒性进展,中和巨细胞集落刺激因子(GM-CSF)能够减缓CAR-T细胞治疗后的CRS及神经毒性,且不会抑制CAR-T的功能(Sterner RM, Sakemura R, Cox MJ. GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts. Blood. 2019 Feb 14;133(7):697-709. doi: 10.1182/blood-2018-10-881722. Epub 2018 Nov 21.)。利用RNA干扰技术高效率敲低CAR-T细胞内GM-CSF表达或分泌表达中和GM-CSF的anti-GM-CSF scFv,预防或减缓细胞因子释放综合症和神经毒性的发生发展,提高CAR-T疗法的安全性。

[0004] 在CAR-T细胞治疗肿瘤方面还有肿瘤微环境和免疫应答方面具有十分重要的作用,为了消除肿瘤细胞,需要激活自身免疫系统,免疫细胞的激活与扩增成为消除肿瘤的关键因素,而免疫细胞如T细胞会被肿瘤微环境中免疫检查点分子所抑制,如程序性死亡受体(PD-1),PD-1在机体中可以下调免疫系统对人体细胞的反映,以及通过抑制T细胞炎症活动来调节免疫系统并促进自身耐受,预防自身免疫性疾病产生,但也可以结合传导抑制性信号,如结合PDL-1配体诱导导致细胞死亡(AICD)产生,限制了体内免疫细胞或CAR-T细胞在体内的持续存在。所以通过PD-1抗体来封闭PD-1免疫检查点,进而修复CAR-T细胞的功能。

[0005] 本研究团队公开的CN113583143B提供了一种制备CAR-T细胞的优良方法,然而该

方法仍然存在值得改进的地方。

[0006] 因此,本领域仍然期待有改进的肿瘤治疗的方法,例如需要有优良性能的分泌IL-7和CCL-17因子,以及分泌中和PD-1和GM-CSF的anti-PD-1与anti-GM-CSFscFv的CD19-CAR-T细胞。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供了一种制备CAR-T细胞的方法。本发明的目的在于改进肿瘤治疗的方法,例如提供一种具有优良性能的分泌IL-7和CCL-17因子,以及分泌中和PD-1和GM-CSF的anti-PD-1与anti-GM-CSFscFv的CD19-CAR-T细胞。

[0008] 本发明制得的CAR-T细胞亦可称为CD19-CAR-T细胞。

[0009] 针对目前CAR-T技术实际需求,本发明提供了共表达IL-7和CCL17的CD19 CAR表达质粒的构建,不仅能将IL-7分泌到T细胞外,而且使CCL-17最大程度招募外周血免疫细胞,进一步提高CAR-T的肿瘤细胞杀伤能力。为了增强杀伤效果及降低CRS及神经毒性副作用,同时构建分泌中和PD-1、GM-CSF的anti-PD-1、anti-GM-CSFscFv的质粒。

[0010] 为达到此目的,本发明采用以下技术方案:

[0011] 第一方面,本发明提供一种嵌合抗原受体,包括:

[0012] a) 作为第一信号的抗原结合结构域、

[0013] b) 跨膜结构域、

[0014] c) 作为第二信号的细胞内传导结构域、以及

[0015] d) 表达IL-7和CCL-17细胞因子的第三信号域。

[0016] 根据本发明的编码的嵌合抗原受体,其包含序列2所示的氨基酸序列。

[0017] 第二方面,本发明还提供一种重组质粒,其具有如序列1所示的核苷酸序列。

[0018] 第三方面,本发明还提供一种CAR-T细胞,其能够分泌表达IL-7、CCL17因子和/或PD-1、GM-CSF抗体。

[0019] 根据本发明的CAR-T细胞,其转染了表达前述嵌合抗原受体的序列。

[0020] 第四方面,本发明进一步提供了制备CAR-T细胞的方法,其包括以下步骤:

[0021] (1) 质粒合成:

[0022] 使用载体pLVX-EF1a-IRES-PGK-puro合成CAR-19-1质粒,该质粒是由CD19单链可变区、CD8a铰链区、CD8a跨膜区、4-1BB信号、CD3 ζ 的包浆信号、IL-7、CCL17序列构成,并且具有序列1所述核苷酸序列;

[0023] 使用载体pLVX-EF1a-IRES-PGK-puro合成CAR-19-2质粒,该质粒是由CD19单链可变区、CD8a铰链区、CD8a跨膜区、4-1BB信号、CD3 ζ 的包浆信号序列构成,并且具有序列3所述核苷酸序列;

[0024] 使用载体pLVX-mCherry-C1合成CAR-19-3质粒,该质粒是由anti-PD-1scFv单链可变区、anti-GM-CSF scFv单链可变区序列构成,并且具有序列5所述核苷酸序列;

[0025] (2) 病毒包装:

[0026] 使用Invitrogen Lipofectamine 3000转染试剂即Lip3000进行病毒包装,293T培养基为添加10% FBS 的DMEM-H培养基,慢病毒包装培养基为添加1% GlutaMAX、1mM丙酮酸钠、5% FBS的Opti-MEMI培养基;

[0027] 将293T细胞以 7×10^6 个细胞/孔的密度接种于含12 mL的慢病毒包装培养基的10cm培养皿中,置于37°C、5% CO₂条件下孵育细胞过夜至293T细胞密度达95%;

[0028] 将孵育过夜的培养皿每皿去除6 mL的慢病毒包装培养基,接着向每个皿中加入6mL的A液-B液混合液,轻混使其分布均匀后置于37°C、5% CO₂条件下孵育进行转染;转染6小时后更换293T培养基继续孵育;

[0029] 至转染24小时后,收集12mL细胞上清液,并加入提前预热的12mL的293T培养基,继续于37°C、5% CO₂条件下孵育进行转染;

[0030] 至转染54小时后第二次收集细胞上清液,与首次收集上清液混合,得细胞上清液;

[0031] 在室温下,将上一步骤收集的细胞上清液以2000rpm离心10分钟,去除细胞碎片沉淀物,再使用0.45 μ m滤器过滤上清,得病毒上清液;

[0032] 按照病毒上清液与浓缩试剂以体积比5:1的比例混合,4°C孵育2h,然后于4°C处离心至离心管底有沉淀(米白色);

[0033] 小心移去上清,加入适量体积的DMEM重悬沉淀,得到慢病毒浓缩液,测定其病毒滴度;

[0034] (3) T细胞制备:

[0035] 向含有1mL全血的EP管内添加生物素标记CD8抗体,室温混合30分钟;

[0036] 再向上述1mL全血内添加150 μ L微泡,室温混合20分钟,将微泡和被抗体标记的细胞结合,离心;

[0037] 用200 μ L移液枪将白色微泡层轻轻转移至另一个2mL的EP管内,用500 μ L微泡缓冲液冲洗附着在管壁和移液管头上的微泡,并入EP管内,室温下孵育30min;上述微泡缓冲液是包含如下组分的水溶液:氯化钾200mg/L、磷酸二氢钾200mg/L、氯化钠8000mg/L、七水磷酸氢二钠2160mg/L、1%人血清白蛋白、2mM EDTA;

[0038] 用超声波破泡,离心,收集细胞沉淀,制得T细胞为CD8⁺T细胞,对其进行流式细胞仪鉴定;

[0039] (4) T细胞激活、转导与扩增:

[0040] 将收集的CD8⁺T细胞以 5×10^5 个细胞/mL接种于24孔板/6孔板中,使用激活培养基刺激24-48小时,接着加入慢病毒浓缩液(MOI=10)以及转导培养基进行病毒转导,24-48小时后换成维持培养基;扩增至6-8天时,收获CAR-T细胞。

[0041] 根据本发明第四方面的方法,其中所述A液-B液混合液是将A液与B液混匀后置室温孵育15min得到的;A液配置:将Opti-MEMI减血清培养基恢复至室温,使用1.5ml的Opti-MEMI与41 μ L的Lip3000在10cm皿中混匀,得A液;B液配置:将1.5ml的Opti-MEMI、35 μ L的P3000 Enhancer、12 μ g质粒混合物混合,得B液;其中,质粒混合物的质粒比为,PMD2.G:pSPAX2:CAR-19-1=1:3:4。

[0042] 根据本发明第四方面的方法,其中激活培养基是包含30ng/mL anti-CD3和20ng/mL CD28的X-VIVOTM15 Medium;转导培养基是包含200U/mL IL-2和5 μ g/mL Polybrene的X-VIVOTM15 Medium;维持培养基是包含200U/mL IL-2的X-VIVOTM15 Medium。

[0043] 根据本发明第四方面的方法,其中T细胞制备时所用的微泡缓冲液是包含如下组分的水溶液:氯化钾200mg/L、磷酸二氢钾200mg/L、氯化钠8000mg/L、七水磷酸氢二钠2160mg/L、1%人血清白蛋白(HAS)、2mM EDTA、酒石酸钠25mg/L、脯氨酸120mg/L。

- [0044] 根据本发明第四方面的方法,其具有如实施例1~4所述的操作步骤。
- [0045] 根据本发明第四方面的方法,其中步骤(3) T细胞制备时,所用生物素标记CD8抗体是购自BD公司的货号为555365的生物素标记CD8抗体。
- [0046] 根据本发明第四方面的方法,其中步骤(3) T细胞制备时,向含有1mL全血的EP管内添加生物素标记CD8抗体20 μ l。
- [0047] 根据本发明第四方面的方法,其中步骤(3) T细胞制备时,向含有1mL全血的EP管内添加生物素标记CD8抗体5 μ L和强化液15 μ L,所述强化液为包含0.25%吡哆醇和0.12%甘油磷酸钙的无菌水溶液。
- [0048] 根据本发明第四方面的方法,其中步骤(3) T细胞制备时,用超声波破泡是用400W功率超声破泡,例如超声2次,每次1秒。
- [0049] 根据本发明第四方面的方法,其中步骤(3) T细胞制备时,用超声波破泡后以1000rpm离心10min。
- [0050] 根据本发明第四方面的方法,其中步骤(4) T细胞激活、转导与扩增时,所用激活培养基是X-VIVOTM15 Medium,其内含30ng/mL anti-CD3和20ng/mL CD28。
- [0051] 根据本发明第四方面的方法,其中步骤(4) T细胞激活、转导与扩增时,所用转导培养基是X-VIVOTM15 Medium,其内含200U/mL IL-2和5 μ g/mL Polybrene。
- [0052] 根据本发明第四方面的方法,其中步骤(4) T细胞激活、转导与扩增时,所用维持培养基是X-VIVOTM15 Medium,其内含200U/mL IL-2。
- [0053] 进一步的,本发明第五方面提供了制备T细胞的方法,其包括如下步骤:
- [0054] 向含有1mL全血的EP管内添加生物素标记CD8抗体,室温混合30分钟;
- [0055] 再向上述1mL全血内添加150 μ L微泡,室温混合20分钟,将微泡和被抗体标记的细胞结合,离心;
- [0056] 用200 μ L移液枪将白色微泡层轻轻转移至另一个2mL的EP管内,用500 μ L微泡缓冲液冲洗附着在管壁和移液管头上的微泡,并入EP管内,室温下孵育30min;上述微泡缓冲液是包含如下组分的水溶液:氯化钾200mg/L、磷酸二氢钾200mg/L、氯化钠8000mg/L、七水磷酸氢二钠2160mg/L、1%人血清白蛋白、2mM EDTA;
- [0057] 用超声波破泡,离心,收集细胞沉淀,制得CD8⁺的T细胞。
- [0058] 根据本发明第五方面的方法,其中所用的微泡缓冲液是包含如下组分的水溶液:氯化钾200mg/L、磷酸二氢钾200mg/L、氯化钠8000mg/L、七水磷酸氢二钠2160mg/L、1%人血清白蛋白(HAS)、2mM EDTA、酒石酸钠25mg/L、脯氨酸120mg/L。
- [0059] 根据本发明第五方面的方法,其中所用生物素标记CD8抗体是购自BD公司的货号为555365的生物素标记CD8抗体。
- [0060] 根据本发明第五方面的方法,其中向含有1mL全血的EP管内添加生物素标记CD8抗体20 μ l。
- [0061] 根据本发明第五方面的方法,其中向含有1mL全血的EP管内添加生物素标记CD8抗体5 μ L和强化液15 μ L,所述强化液为包含0.25%吡哆醇和0.12%甘油磷酸钙的无菌水溶液。
- [0062] 根据本发明第五方面的方法,其中用超声波破泡是用400W功率超声破泡,例如超声2次,每次1秒。
- [0063] 根据本发明第五方面的方法,其中用超声波破泡后以1000rpm离心10min。

[0064] 本发明的各个方面呈现优良的技术效果。

具体实施方式

[0065] 下列实例将进一步说明发明的具体步骤以及特征,该等实例仅为示例而用,并非对本发明的限制,说涉及到的试剂和材料非特殊说明均为市售。

[0066] 本发明使用的一些主要实验材料包括:Endo-Free Plasmid Maxi Kit (Omega), NaCl、蛋白胨、EDTA、NaOH、酵母粉(上海生工生物工程股份有限公司),感受态Stb13(全式金生物科技有限公司),lip3000转染试剂(内含P3000 Enhancer)、Opti-MEM减血清培养基、丙酮酸钠、DMEM-H、calcein AM(ThermoFisher)、DiI细胞膜荧光探针(meilunbio),HIV-1 P24蛋白快速检测卡、慢病毒滴度(HIV P24)ELISA检测试剂(博奥龙),Polybrene(合生基因)、BioGeek™ 慢病毒浓缩试剂盒(合生基因),Millipore一次性针头过滤器0.45μm(Millipore),96孔板、24孔板、6孔板、10CM、T25培养瓶、T75培养瓶、5ml移液管、10ml移液管、25ml移液管(Corning-Costar),X-VIVOTM15 Medium(LONZA),Ultra-LEAF Purified anti-mouse CD28、Ultra-LEAF Purified anti-mouse CD3ε(Biolegend),IL-2(Peprotech),BD Pharmingen™ Biotin Mouse Anti-Human CD8(本领域通常亦称之为CD8 biotin antibody、生物素标记CD8抗体、或CD8抗体,BD公司的产品,货号555365)、PerCP-Cy™ 5.5 Mouse Anti-Human CD8(BD),慢病毒载体(淼灵生物),序列合成(通用生物),GM-CSF ELISA试剂盒(Abcam)。其余常用试剂和材料均为市售可得。

[0067] 实施例1:构建重组质粒

[0068] 1、CAR-19-1质粒合成:

[0069] CAR-19-1序列是由CD19单链可变区、CD8a铰链区、CD8a跨膜区、4-1BB信号、CD3ζ的包浆信号、IL-7、CCL17序列构成,所用载体为pLVX-EF1a-IRES-PGK-puro,由通用生物系统(安徽)有限公司合成。

[0070] CAR-19-1核苷酸序列如下(在本发明中可称为序列1):

[0071] atggccctgcccgtgaccgctctgctgctgccactggccctgctgctgcacgccgctagacctgaggtgaagctgcaggagtccggccctggcctggtggctccttcccagtccttgagcgtgacctgtacagtgtccggcgtgtccctgcctgattacggcgtgtcctggatcaggcagcctcccagaaagggcctggagtggctggcgctgatctgggctccgagacaacctactacaattccgccctgaagtccaggctgacaatcatcaaggacaatagcaagagccaggtgtttctgaagatgaactccctgcagacagacgacaccgccatctactactgcgccaagcactactactacggcggctcctacgccatggattactggggccagggcaccagcgtgacagtgctcctccggcggcggcgggaagcggaggaggagatcttgccggcggcggttccgatatccagatgaccagacaacaagcagcctgtccgcctccctgggcgacagagtaccatctcctgcaggcctcccaggacatcagcaagtacctgaactgggtaccagcagaagcccgatggcaccgtgaagctgctgatctaccacacctccagactgcactccggcgtgccttccagatcttccggctccggcagcggcaccgactacagcctgaccatcagcaacctggagcaggaggacatgccacctacttttgccagcagggcaataacctgctttacacctttggcggcggcacaagctggagatcacaaggccgatgccgccccacagtgagcatctttcccctagctccaacgcccaagcccaacaaccctgccccctagacccccacaccgctcctaccatgccagccagcctctgagcctgagacctgaggcctgtaggcccggcggaggagctgttcacacaagggcctggactttgctgcatctacatctgggccccctggccggcacctgtggagtctctgctgctgagcctggctattaccaagaggggcagaagaagctgctgtacatcttcaagcagcctttcatgagaccctgagcagacaaccaggaggaggacggctgcagct

gcagattccctgaggaggaggaggcgctgtgagctgagggtgaagttctccaggagcgcggacgccccgccta
 ccaacagggacagaatcagctgtacaatgagctgaacctgggcagaagagaggagtacgacgtgctggacaagagg
 aggggcagggaccctgagatgggcggcaagccccagaggaggaagaatccccaggaggcctgtacaatgaactgc
 agaaggacaagatggccgaggcctacagcgagatcgcatgaagggcgagaggaggagaggcaagggccacgatgg
 cctgtaccagggcctgtccaccgccacaaggacacctacgacgcctgcacatgcaggcctgccccaaagga
 agcggagccaccaatttcagcctgtgaagcaggcggcgacgtggaggagaacccggacctatgttccatgttt
 cttttaggtatatctttggacttctcccctgatccttgttctgttgccagtagcatcatctgattgtgatattga
 aggtaaagatggcaacaatatgagagtgttctaattggtcagcatcgatcaattattggacagcatgaaagaaatt
 ggtagcaattgcctgaataatgaatttaacttttttaaaagacatatctgtgatgctaataaggaaggtatgtttt
 tattccgtgctgctcgcaagttgaggcaatttcttaaaatgaatagcactggatgtttgatctccacttattaaa
 agtttcagaaggcacaacaataactgttgaactgcactggccaggttaaaggaagaaaaccagctgccctgggtgaa
 gcccaccaacaagagtttgaagaaaataaatcttttaaggaacagaaaaactgaatgacttgtgtttcctaa
 agagactattacaagagataaaaacttgttgaataaaaattttgatggcactaaagaacacggctccggcgaagg
 cagaggctctttactgacttgtggagacgtggaagagaaccccggtcccatggccccactgaagatgctggccctg
 gtcaccctcctcctgggggcttctctgcagcacatccacgcagctcgagggaccaatgtgggccgggagtgtgcc
 tggagtacttcaaggagccattccccttagaaagctgaagacgtggtaccagacatctgaggactgctccaggga
 tgccatcgtttttgtaactgtgcagggcagggccatctgttcggacccaacaacaagagagtgaagaatgcagtt
 aaatacctgcaaagccttgagaggtct

[0072] CAR-19-1表达的氨基酸序列(在本发明中可称为序列2)：

[0073] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His
 Ala Ala Arg Pro Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser
 Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val
 Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly
 Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp
 Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala
 Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala
 Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr
 Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
 Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Arg
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Asn Ala Lys Pro Thr
 Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
 Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val
 Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys

Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser
 Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Phe His Val Ser
 Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser
 Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val
 Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn
 Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu
 Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe
 Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly
 Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu
 Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys
 Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
 His Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn
 Pro Gly Pro Met Ala Pro Leu Lys Met Leu Ala Leu Val Thr Leu Leu Leu Gly Ala
 Ser Leu Gln His Ile His Ala Ala Arg Gly Thr Asn Val Gly Arg Glu Cys Cys Leu
 Glu Tyr Phe Lys Gly Ala Ile Pro Leu Arg Lys Leu Lys Thr Trp Tyr Gln Thr Ser
 Glu Asp Cys Ser Arg Asp Ala Ile Val Phe Val Thr Val Gln Gly Arg Ala Ile Cys
 Ser Asp Pro Asn Asn Lys Arg Val Lys Asn Ala Val Lys Tyr Leu Gln Ser Leu Glu
 Arg Ser

[0074] 2、CAR-19-2质粒合成：

[0075] CAR-19-2序列是由CD19单链可变区、CD8a铰链区、CD8a跨膜区、4-1BB信号、CD3 ζ 的包浆信号序列构成，所用载体为pLVX-EF1a-IRES-PGK-puro，由通用生物系统(安徽)有限公司合成。

[0076] CAR-19-2核苷酸序列如下(在本发明中可称为序列3)：

[0077] atggccctgcccgtgaccgctctgctgctgccactggccctgctgctgcaagccgctagacctgaggt
 gaagctgcaggagtcggccctggcctggtggctccttcccagtcctgagcgtgacctgtacagtgtccggcgtg
 tcctgctgattacggcgtgtcctggatcaggcagcctcccagaaagggcctggagtggctggcgctgatctggg
 gctccgagacaacctactacaattccgcctgaagtccaggctgacaatcatcaaggacaatagcaagagccaggt
 gtttctgaagatgaactccctgcagacagacgacaccgccatctactactgcgccaagcactactactacggcggc
 tctacgccatggattactggggccagggcaccagcgtgacagtgtcctccggcgggcggaagcggaggaggag
 gatctggcgggcggttccgatatccagatgaccagacaacaagcagcctgtccgcctccctggggcagagagt
 gaccatctctgcaggcctcccaggacatcagcaagtacctgaactggtaccagcagaagcccgatggcaccgtg
 aagctgctgatctaccacacctccagactgcactccggcgtgccttccagatcttccggctccggcagcggcaccg
 actacagcctgaccatcagcaacctggagcaggaggacatgccacctacttttgccagcagggaataacctgcc

ttacacctttggcggcgccacaaagctggagatcacaagggccgatgccgccccacagtgagcatctttcccct
 agctccaacgcccaagcccacaacaacccctgccccctagacccccacaccgctctaccategccagccagcctc
 tgagcctgagacctgaggcctgtaggccccgccgaggagctgttcacacaaggggcctggactttgcctgcga
 catctacatctgggccccctggccggcacctgtggagtctctgctgctgagcctggtcattaccaagaggggcaga
 aagaagctgctgtacatcttcaagcagcctttcatgagaccctgagcagacaaccaggaggaggacggctgcagct
 gcagattccctgaggaggaggagggcggtgtgagctgagggtgaagtctccaggagcgccgacgccccgccta
 ccaacagggacagaatcagctgtacaatgagctgaacctgggcagaagagaggagtacgacgtgctggacaagagg
 aggggcagggaccctgagatggcgggcaagccccagaggaggaagaatccccaggaggcctgtacaatgaactgc
 agaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcgcatgaagggcgagaggaggagggcaagggccacgatgg
 cctgtaccagggcctgtccaccgccacaaaggacacctacgacgcctgcacatgcaggcctgcccccaaga

[0078] CAR-19-2表达的氨基酸序列如下(在本发明中可称为序列4)：

[0079] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His
 Ala Ala Arg Pro Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser
 Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val
 Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly
 Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp
 Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala
 Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala
 Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr
 Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
 Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Arg
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Asn Ala Lys Pro Thr
 Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
 Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val
 Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys
 Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

[0080] 3、CAR-19-3质粒合成：

[0081] CAR-19-3序列是由anti-PD-1scFv单链可变区、anti-GM-CSF scFv单链可变区序列构成,所用载体为pLVX-mCherry-C1,由通用生物系统(安徽)有限公司合成。

[0082] CAR-19-3 核苷酸序列如下(在本发明中可称为序列5):

[0083] atggccctgcctgtgaccgccctgctgctgccactggccctgctgctccacgccgctagacctcaggtgcagctggtgcagtcggcgtggaggtgaagaagcccggcgccctccgtgaaggtgtcctgcaaggcctccggctacacctttacaaattactacatgtactgggtgaggcagggccccggccaggactggaatggatgggcgcatcaatcctccaatggcggcacaaactttaacgagaagtttaagaacagggtgaccctgaccaccgatagctccaccacaacagcctacatggagctgaagtcctgcaagtcgatgataccgccgtgtactactgtgccaggaggactacaggtttgatatgggcttcgattactggggccaggcaccaccgtgaccgtgtcctccggcggaggcgaagcggaggaggaggaagcggcggaggcggtagcgagatcgtgctgacacagagccctgccacactgtccctgtcccctggcgagagagccacctgagctgcagagcctccaagggcgtgagcacctccggctacagctacctgcaactggtaccagcagaagccggccaggccccaggctgctgatctacctggcctcctacctggagtcggcgtgcccgttagattctccggctccggcagcggcaccgattttacctgacaatctccagcctggagcctgaggacttcgccgtgtactattgtcagcactcagggatctgectctgacctttggcggcggcaccgaaggtggagatcaagggctccggcggcacaactttagcctgctgaagcagggcggcagctggaggagaacctggcccacaggtgcagctcgtgcagtcggagccgaggtgaagaacctggcggcagcgtgaaggtgagctgcaaggccagcggctacaccttcaccggctactacatgcactgggtgagacagggccccggacagggcctggagtgatggatggatcaatcctaacagcggcggcaccattacggccagaagttccaggcagggtgacaatgacaaggatacctccatcagcaccgcctacatggaactgagcaggctgagaagcagacacagccgtgtactactgcgtgagaagagataggtttccctactactttgattactggggacagggcaccctggtgaccgtgagctccggcggaggaggctccggaggaggaggtagcggcggaggaggatctgagatcgtgctcaccagctccccgccaccctgtccgtgtcccctggagagagggccacactgagctgtagagcctcccagagcatcggtccaatctggcctggtaccagcaaaagcctggccaggcccccaaggggtgctgatctactccacctcctccagggccacaggcatcacagataggtttagcggctccggctccggaaccgatttcacctgaccatcagcagactggagcccaggacttcgctgtgtactactgccagcagtttaatagatccccctgaccttcggcggcggcacaaggtggagattaag

[0084] CAR-19-3表达的氨基酸序列如下(在本发明中可称为序列6):

[0085] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val

Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 Glu Ile Lys Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
 Glu Glu Asn Pro Gly Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile
 Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met
 Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg Arg Asp Arg Phe Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser
 Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Val Leu Ile Tyr Ser
 Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Thr Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 Gln Gln Phe Asn Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0086] 实施例2:病毒包装

[0087] 使用Invitrogen Lipofectamine 3000转染试剂(Lip3000)进行病毒包装,试验操作基本上参照该转染试剂说明书进行。

[0088] 1、293T培养基配置

[0089] 培养基为DMEM-H,添加10% FBS。(DMEM-H为添加4.5g/L葡萄糖、110mg/L丙酮酸钠的DMEM培养基)。

[0090] 2、慢病毒包装培养基配置:

[0091] 培养基为Opti-MEMI,添加1%的GlutaMAX、添加丙酮酸钠(1mM)、5% FBS。(Opti-MEMI培养基为Gibco产品)。

[0092] 3、慢病毒包装:

[0093] A) 将293T细胞以 7×10^6 个细胞/孔的密度接种于含12 mL的慢病毒包装培养基的10cm培养皿中,置于37°C、5% CO₂条件下孵育细胞过夜。

[0094] B) 至293T细胞密度达95%时进行转染,转染方法为:

[0095] A液配置:首先将Opti-MEMI减血清培养基恢复至室温,使用1.5ml的Opti-MEMI与41μL的Lip3000在10cm皿中混匀,得A液,备用;

[0096] B液配置:将1.5ml的Opti-MEMI、35μL的P3000Enhancer、12μg质粒混合物混合,得B液,备用;(在转导类型为CAR-1=(CAR-19-1)+(CAR-19-3)的情况下质粒混合物的质粒比为PMD2.G:pSPAX2:(CAR-19-1/CAR-19-3)=1:3:(4/3),在转导类型为CAR-2=(CAR-19-2)+(CAR-19-3)的情况下质粒混合物的质粒比为PMD2.G:pSPAX2:(CAR-19-2/CAR-19-3)=1:3:(3.5/3),在转导类型为CAR-3=(CAR-19-2)的情况下质粒混合物的质粒比为PMD2.G:pSPAX2:CAR-19-2=1:3:3.5,在转导类型为CAR-4=(CAR-19-1)的情况下质粒混合物的质粒比为PMD2.G:pSPAX2:CAR-19-1=1:3:4,PMD2.G、pSPAX2、pLVX-EF1a-IRES-PGK-puro和pLVX-mCherry-C1均为淼灵生物公司产品)

[0097] 将A液转移至B液中充分混匀,室温孵育15min,得A液-B液混合液;

[0098] 步骤A) 孵育过夜的培养皿每皿去除6 mL的慢病毒包装培养基,接着向每个皿中加入6mL 的A液-B液混合液,轻混使其分布均匀后置于37℃、5% CO₂条件下孵育进行转染;转染6小时后更换293T培养基继续孵育。

[0099] C) 至转染24小时后,收集12mL细胞上清液,并加入提前预热的12mL的293T培养基,继续于37℃、5% CO₂条件下孵育进行转染。

[0100] D) 至转染54小时后第二次收集细胞上清液,与首次收集上清液混合,得细胞上清液。

[0101] 4、慢病毒浓缩:

[0102] A) 在室温下,将上一步骤收集的细胞上清液以2000rpm离心10分钟,去除细胞碎片沉淀物,再使用0.45μm滤器过滤上清,得病毒上清液。

[0103] B) 按照病毒上清液与浓缩试剂以体积比5:1的比例混合,4℃放置2h。

[0104] C) 将孵育好的混合液于4℃以4000g离心30min,离心管底有米白色沉淀。

[0105] D) 小心移去上清,加入适量体积的DMEM重悬沉淀,为慢病毒浓缩液,(并按照实验需求)分装病毒,测定病毒滴度,-80℃保存。

[0106] 经本发明方法测定,本实施例所得病毒的滴度为:5.74x10⁶TU/ml。

[0107] 5、病毒滴度测试的方法:

[0108] 本发明可按如下方法测定病毒滴度。

[0109] A) 将HT1080细胞以7000个细胞/孔的密度接种于含有100 μL培养基的96孔板中,培养4-5小时后进行转导,HT1080细胞培养基为DMEM-H,其中添加10%FBS、1% GlutaMAX、10μg/mL Polybrene、200nM丙酮酸钠。

[0110] B) 稀释病毒液:首先将15mL新鲜培养基与12μL的10mg/mL Polybrene试剂混合(终浓度为8μg/mL),涡旋混匀作为稀释液。接着,对每个病毒样本,将上一步制备的135μL培养基即稀释液加入96孔圆底培养板的16个孔中,采用4孔x4孔的模式。将15μL浓缩的慢病毒悬液加至第一排的各孔中,总体积150μL,依次按照1:10稀释剩余三排细胞。

[0111] C) 转导细胞:去除HT1080细胞中的培养基,将100μL制备好的稀释液转移至每个相应孔中,室温下以2000 rpm离心培养板30分钟,孵育培养板过夜。

[0112] D) 去除包含病毒上清液的培养基,替换成新鲜的HT1080培养基(不含Polybrene试剂),孵育三天后使用流式细胞仪分析GFP阳性细胞的百分比。

[0113] E) 滴度(TU/mL)计算公式(根据GFP阳性细胞的百分比确定适当的稀释因子)如下:

[0114] 滴度=(F×C/V)×D,其中F=GFP阳性细胞的百分比,C=转导时的每孔细胞数,V=菌液体积(mL),D=慢病毒稀释因子,选择合适的慢病毒稀释因子进行后续转导实验。

[0115] 实施例3:T细胞制备

[0116] 1、T细胞制备

[0117] A) 向含有1mL全血的EP管内添加抗体(20μL,CD8 biotin antibody,生物素标记CD8抗体,BD产品,货号555365),在室温下用旋转混悬仪混合30分钟。实验用全血取自8名健康男性志愿者(26~33岁,体重58~71kg),分别进行T细胞的制备。上述生物素标记CD8抗体价格昂贵,是本发明制备T细胞方法中的重要成本项。

[0118] B) 再向上述1mL全血内添加150μL微泡(streptavidin,链霉亲和素标记,ThermoGenesis产品),在室温下用旋转混悬仪混合20分钟,将微泡和被抗体标记的细胞结

合。

[0119] C) 以400 xg的转速将细胞离心5分钟。

[0120] D) 用200 μ L移液枪将白色微泡层轻轻转移至另一个2mL的EP管内。用500 μ L微泡缓冲液冲洗附着在管壁和移液管头上的微泡,并入EP管内,室温下孵育30min。(上述微泡缓冲液是包含如下组分的水溶液:氯化钾200mg/L、磷酸二氢钾200mg/L、氯化钠8000mg/L、七水磷酸氢二钠2160mg/L、1%人血清白蛋白、2mM EDTA)。

[0121] E) 用400W功率超声(超声2次,每次1秒)破泡以回收靶细胞。

[0122] F) 以1000rpm离心10min,收集细胞沉淀,制得T细胞,备用。

[0123] 2、流式细胞仪鉴定CD8⁺T细胞

[0124] A) PBS清洗分选后的T细胞,并使用PBS稀释T细胞浓度在 $1.2\sim 1.4\times 10^6$ 个细胞/mL范围内。

[0125] B) 取100 μ L细胞悬液并加入2 μ L的anti-CD8 (PerCP-Cy[™] 5.5 Mouse Anti-Human CD8),并混匀。

[0126] C) 4 $^{\circ}$ C孵育20min,PBS清洗,使用200 μ L PBS重悬沉淀后上机检测,鉴定CD8⁺T细胞。

[0127] 补充进行本段落所述如下实施例操作。实施例3a:参照实施例3之“1、T细胞制备”,不同的仅是其中步骤D)所用微泡缓冲液是包含如下组分的水溶液:氯化钾200mg/L、磷酸二氢钾200mg/L、氯化钠8000mg/L、七水磷酸氢二钠2160mg/L、1%人血清白蛋白(HAS)、2mM EDTA、酒石酸钠25mg/L、脯氨酸120mg/L,所得T细胞同法鉴定CD8⁺T细胞。实施例3ai:参照实施例3a之“1、T细胞制备”,不同的仅是其中步骤A)操作改为:向含有1mL全血的EP管内添加所述抗体5 μ L和强化液15 μ L,在室温下用旋转混悬仪混合30分钟。实验用全血取自8名健康男性志愿者(26~33岁,体重58~71kg),分别进行T细胞的制备,所得T细胞同法鉴定CD8⁺T细胞。所述强化液为包含0.25%吡哆醇和0.12%甘油磷酸钙的无菌水溶液。实施例3a ii:参照实施例3ai制备T细胞,不同的仅是所用强化液为包含0.25%吡哆醇的无菌水溶液,所得T细胞同法鉴定CD8⁺T细胞。实施例3a iii:参照实施例3ai制备T细胞,不同的仅是所用强化液为包含0.12%甘油磷酸钙的无菌水溶液,所得T细胞同法鉴定CD8⁺T细胞。实施例3a iv:参照实施例3ai制备T细胞,不同的仅是所用强化液用等体积注射用水代替,所得T细胞同法鉴定CD8⁺T细胞。由8名健康男性志愿者全血使用上述实施例3、实施例3a及实施例3ai~3aiv制得的T细胞经检测,结果如下:分选前CD8⁺T细胞占外周血单个核细胞的比例(%)=6.38 \pm 1.31,实施例3分选后CD8⁺T细胞占分选后总单个核细胞的比例(%)=61.47 \pm 9.24**,实施例3a分选后CD8⁺T细胞占分选后总单个核细胞的比例(%)=86.35 \pm 10.51,实施例3ai分选后CD8⁺T细胞占分选后总单个核细胞的比例(%)=84.17 \pm 8.83,实施例3a ii分选后CD8⁺T细胞占分选后总单个核细胞的比例(%)=43.17 \pm 11.72**,实施例3a iii分选后CD8⁺T细胞占分选后总单个核细胞的比例(%)=47.17 \pm 9.74**,实施例3a iv分选后CD8⁺T细胞占分选后总单个核细胞的比例(%)=37.17 \pm 8.67**,其中**是与实施例3ai组比较有显著差异,p<0.01。由此可见,在向全血中添加CD8抗体的同时添加包含吡哆醇和甘油磷酸钙二者的强化液,可以大大减少CD8抗体的用量并且仍然得到基本相当的效果,即通过添加吡哆醇和甘油磷酸钙这类相当便宜的试剂可以大大减少CD8抗体用量、从而可以大大减小方法成本。

[0128] 实施例4:T细胞激活、转导与扩增:

[0129] 1、CAR-T细胞制备

[0130] 参照Milone MC、Lamers CH的文献 (Milone MC, Fish JD, Carpenito C, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo* [J]. Mol Ther, 2009, 17(8): 1453-64; Lamers CH, van Steenbergen-Langeveld S, et al. T cell receptor-engineered T cells to treat solid tumors: T cell processing toward optimal T cell fitness. Hum Gene Ther Methods. 2014 Dec;25(6):345-57. doi: 10.1089/hgtb.2014.051.) 进行。简述如下:

[0131] 将实施例3收集的CD8⁺ T细胞以 5×10^5 个细胞/mL接种于24孔板中,使用激活培养基(X-VIVOTM15 Medium,内含30ng/mL anti-CD3和20ng/mL CD28)刺激24-48小时,接着加入实施例2所得慢病毒浓缩液(MOI=10)以及转导培养基(X-VIVOTM15 Medium,内含200U/mL IL-2和5 μ g/mL Polybrene)进行病毒转导,24-48小时后换成维持培养基(X-VIVOTM15 Medium,内含200U/mL IL-2);扩增至6-8天时,收获CAR-T细胞。

[0132] 另外进行CAR-T细胞检测及后续杀伤实验。

[0133] 2、CAR-T细胞转染效率检测:

[0134] CAR-19-1和CAR-19-2为绿色荧光标记,CAR-19-3为红色荧光标记,利用流式细胞仪FITC通道及PE通道对转染效率进行检测,结果如下表所示。

[0135] 表:不同种类CAR-T细胞转导效率

转导类型	转导效率
CAR-1=(CAR-19-1)+(CAR-19-3)	26%
CAR-2=(CAR-19-2)+(CAR-19-3)	32%
CAR-3=(CAR-19-2)	48%
CAR-4=(CAR-19-1)	41%

[0137] 3、ELISA验证CAR-T细胞是否分泌anti-PD-1、anti-GM-CSF、IL-7和CCL-17:

[0138] A) 留取CAR-1、CAR-2、CAR-3、CAR-4细胞及培养上清至无菌离心管中(效靶比为5:1组),在4 $^{\circ}$ C条件下 $1000 \times g$ 离心10min,然后将上清等量分装于小EP管并于-20 $^{\circ}$ C下保存(24小时内检测可放入2-8 $^{\circ}$ C储存),避免反复冻融,细胞沉淀调整 $(2-4) \times 10^6$ cells每管,每管样本使用1mL的Trizol裂解液10min(4 $^{\circ}$ C)后放入-80保存备用。

[0139] B) ELISA验证CAR-T细胞是否分泌anti-PD-1、anti-GM-CSF、IL-7和CCL-17,根据Abcam相应ELISA Kit说明书进行操作(anti-PD-1检测现检现包被:用双抗体夹心ELISA方法,使用人源的PD-1重组蛋白包被酶标板,带HRP标记的山羊抗人IgG(H&L)的二抗检测,以商品化的PD-1抗体作为标准品,待测样本5倍稀释后定量检测基因修饰后的T细胞分泌PD-1抗体的表达量)。

[0140] 方法简述如下:

[0141] a) 根据说明书准备样本及标准品;

[0142] b) 加50 μ L标准品及样本到孔板中;

[0143] c) 加50 μ L Antibody Cocktai到每孔;

[0144] d) 室温孵育60min;

- [0145] e) 每次使用350 μ L 1xWash Buffer清洗三次；
 [0146] f) 每孔加入100 μ L TMB Development Solutin, 孵育10min；
 [0147] g) 每孔加入100 μ L Stop Solution 后使用酶标仪在450 nm OD值读数；
 [0148] h) 根据说明书要求计算anti-PD-1、anti-GM-CSF、IL-7、CCL-17浓度, 结果如下表所示。

[0149] 表: 不同CAR-T细胞的anti-PD-1、anti-GM-CSF、IL-7、CCL-17分泌量

	CAR-1	CAR-2	CAR-3	CAR-4	T(Control)
Anti-PD-1	8800 pg/ml	9200 pg/ml	15 pg/ml	30 pg/ml	40 pg/ml
Anti-GM-CSF	175 pg/ml	190 pg/ml	800 pg/ml	860 pg/ml	720 pg/ml
IL-7	1380 pg/ml	110 pg/ml	110 pg/ml	1450 pg/ml	105 pg/ml
CCL-17	1200 pg/ml	110 pg/ml	120 pg/ml	1100 pg/ml	120 pg/ml

[0151] 4、CAR-T细胞杀伤实验:

[0152] A) 以人急性B淋巴细胞白血病细胞系Raji为阳性靶细胞, 效应细胞分别为:

[0153] CAR-1=(CAR-19-1)+(CAR-19-3);

[0154] CAR-2=(CAR-19-2)+(CAR-19-3);

[0155] CAR-3=(CAR-19-2);

[0156] CAR-4=(CAR-19-1)。

[0157] 以 2×10^4 细胞/mL的靶细胞浓度(经 1μ M的Calcein-AM预染)接种于96孔板, 100 μ L/孔, 按照效靶比(5:1)加入各组效应细胞, 设3个复孔, 于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂共孵育10小时后进行离心(1000rpm/min, 5min), 检测; 设置最大释放孔加入裂解液(2.5% TritonX-100), 自发释放孔加入PBS, 处理后置于酶标仪扫描读取荧光值。根据以下公示计算各组效应细胞的细胞毒性:

[0158] 特异性裂解百分比=(实验组荧光值-自发释放组荧光值)/(最大释放组荧光值-自发释放组荧光值) x100%。

[0159] 结果如下表所示。

[0160] 表: 不同种类CAR-T细胞杀伤效率(特异性裂解百分比)

效靶比	杀伤效率				
	CAR-1	CAR-2	CAR-3	CAR-4	T(Control)
5:1	81.3%	73.6%	51.4%	59.7%	5.2%

[0162] 根据上述结果可见, 本发明制备得到的4种CAR-T细胞均呈现优良的细胞杀伤效果, 表明本发明方法制备得到的CAR-T细胞可用于肿瘤的治疗。

[0163] 补充的实施例4a: 参照本“实施例4: T细胞激活、转导与扩增”进行, 在步骤“1、CAR-T细胞制备”中, 将实施例3a收集的CD8⁺ T细胞以 5×10^5 个细胞/mL接种于24孔板中, 或者将实施例3ai收集的CD8⁺ T细胞以 5×10^5 个细胞/mL接种于24孔板中, 其余操作同实施例4, 结果显示各试验阶段的结果与实施例4基本上相同, 例如在杀伤效率方面, 使用实施例3a的CD8⁺ T

细胞制得的四种CAR-T细胞的杀伤效率依次分别为80.7%、75.2%、52.6%、61.3%，使用实施例3ai的CD8⁺ T细胞制得的四种CAR-T细胞的杀伤效率依次分别为81.6%、74.5%、50.2%、58.4%。

[0164] 本发明通过上述实施例来说明本发明的详细方法，但本发明并不局限于上述详细方法，即不意味着本发明必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了，对本发明的任何改进，对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等，均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 深圳博雅感知药业有限公司	
[0003]	<120> 制备CAR-T细胞的方法	
[0004]	<130> Y21064c-XXC2129.jq	
[0005]	<160> 6	
[0006]	<170> SIPOSequenceListing 1.0	
[0007]	<210> 1	
[0008]	<211> 2451	
[0009]	<212> DNA	
[0010]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0011]	<400> 1	
[0012]	atggcctgc ccgtgaccgc tctgctgctg cactggccc tgctgctgca cgccgctaga	60
[0013]	ctgaggtga agctgcagga gtccggcct ggctggtgg ctcttccca gtccctgagc	120
[0014]	gtgacctgta cagtgtccgg cgtgtccctg cctgattacg gcgtgtcctg gatcaggcag	180
[0015]	cctcccagaa agggcctgga gtggctgggc gtgatctggg gctccgagac aacctactac	240
[0016]	aattccgccc tgaagtccag gctgacaatc atcaaggaca atagcaagag ccagggtgttt	300
[0017]	ctgaagatga actccctgca gacagacgac accgcatct actactgctc caagcactac	360
[0018]	tactacggcg gctcctacgc catggattac tggggccagg gcaccagcgt gacagtgtcc	420
[0019]	tccggcggcg gcggaagcgg aggaggagga tctggcggcg gcggttccga tatccagatg	480
[0020]	accagacaa caagcagcct gtccgcctcc ctgggcgaca gactgacat ctctgacagg	540
[0021]	gcctcccagg acatcagcaa gtacctgaac tggtagcagc agaagcccga tggcaccgtg	600
[0022]	aagctgctga tctaccacac ctccagactg cactccggcg tgccttccag attttccggc	660
[0023]	tccggcagcg gcaccgacta cagcctgacc atcagcaacc tggagcagga ggacatcgcc	720
[0024]	acctactttt gccagcaggc caatacctg cttacacct ttggcggcgg cacaaagctg	780
[0025]	gagatcaciaa gggccgatgc cccccaca gtgagcatct ttccccctag ctccaacgcc	840
[0026]	aagcccacia caaccctgc ccctagacc cccacaccg ctctaccat cgccagccag	900
[0027]	cctctgagcc tgagacctga ggctgtagg cccgccgcc gaggagctgt tcacacaagg	960
[0028]	ggctggact ttgctgcca catctacatc tgggcccccc tggccggcac ctgtggagtt	1020
[0029]	ctgtgctgta gcctggtcat taccaagagg ggcagaaaga agctgctgta catcttcaag	1080
[0030]	cagcctttca tgagaccctg gcagacaacc caggaggagg acggctgcag ctgcagattc	1140
[0031]	cctgaggagg aggaggcgg ctgtgagctg aggggtgaagt tctccaggag cgccgacgcc	1200
[0032]	ccgcctacc aacagggaca gaatcagctg tacaatgagc tgaacctggg cagaagagag	1260
[0033]	gagtacgacg tgctggacaa gaggaggggc agggaccctg agatgggcgg caagccccag	1320
[0034]	aggaggaaga atccccagga gggcctgtac aatgaactgc agaaggacaa gatggccgag	1380
[0035]	gcctacagcg agatcgcat gaaggcgag aggaggagag gcaaggcca cgatggcctg	1440
[0036]	taccagggcc tgtccaccgc cacaaaggac acctacgacg ccctgacat gcaggccctg	1500
[0037]	cccccaagag gaagcggagc caccaatttc agcctgctga agcaggccgg cgacgtggag	1560
[0038]	gagaaccccg gacctatgtt ccatgtttct tttaggtata tctttggact tctccccctg	1620
[0039]	atccttgctt tgcttccagt agcatcatct gattgtgata ttgaaggtaa agatggcaaa	1680
[0040]	caatatgaga gtgttctaata ggtcagcatc gatcaattat tggacagcat gaaagaaatt	1740
[0041]	ggtagcaatt gcctgaataa tgaatttaac ttttttaaaa gacatatctg tgatgctaat	1800

[0042] aaggaaggta tgtttttatt ccgtgctgct cgcaagttga ggcaatttct taaaatgaat 1860
 [0043] agcactggtg attttgatct ccacttatta aaagtttcag aaggcacaac aatactgttg 1920
 [0044] aactgcactg gccaggttaa aggaagaaaa ccagctgccc tgggtgaagc ccaaccaaca 1980
 [0045] aagagtttgg aagaaaataa atctttaaag gaacagaaaa aactgaatga cttgtgtttc 2040
 [0046] ctaaagagac tattacaaga gataaaaact tgttggaata aaattttgat gggcactaaa 2100
 [0047] gaacacggct ccggcgaagg cagaggctct ttactgactt gtggagacgt ggaagagaac 2160
 [0048] cccggtccca tggccccact gaagatgctg gccttggtca ccctcctcct gggggcttct 2220
 [0049] ctgcagcaca tccacgcagc tcgagggacc aatgtgggcc gggagtgctg cctggagtac 2280
 [0050] ttcaagggag ccattcccct tagaaagctg aagacgtggt accagacatc tgaggactgc 2340
 [0051] tccagggatg ccatcgtttt tgtaactgtg cagggcaggg ccatctgttc ggacccaac 2400
 [0052] aacaagagag tgaagaatgc agttaaatac ctgcaaagcc ttgagagtc t 2451
 [0053] <210> 2
 [0054] <211> 817
 [0055] <212> PRT
 [0056] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0057] <400> 2
 [0058] Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 [0059] 1 5 10 15
 [0060] His Ala Ala Arg Pro Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
 [0061] 20 25 30
 [0062] Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val
 [0063] 35 40 45
 [0064] Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys
 [0065] 50 55 60
 [0066] Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr
 [0067] 65 70 75 80
 [0068] Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys
 [0069] 85 90 95
 [0070] Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala
 [0071] 100 105 110
 [0072] Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met
 [0073] 115 120 125
 [0074] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 [0075] 130 135 140
 [0076] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
 [0077] 145 150 155 160
 [0078] Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr
 [0079] 165 170 175
 [0080] Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr
 [0081] 180 185 190
 [0082] Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser
 [0083] 195 200 205

[0084]	Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
[0085]	210 215 220
[0086]	Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala
[0087]	225 230 235 240
[0088]	Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
[0089]	245 250 255
[0090]	Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
[0091]	260 265 270
[0092]	Ile Phe Pro Pro Ser Ser Asn Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro
[0093]	275 280 285
[0094]	Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
[0095]	290 295 300
[0096]	Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
[0097]	305 310 315 320
[0098]	Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
[0099]	325 330 335
[0100]	Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Lys Arg Gly Arg
[0101]	340 345 350
[0102]	Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
[0103]	355 360 365
[0104]	Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
[0105]	370 375 380
[0106]	Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
[0107]	385 390 395 400
[0108]	Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
[0109]	405 410 415
[0110]	Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
[0111]	420 425 430
[0112]	Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
[0113]	435 440 445
[0114]	Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
[0115]	450 455 460
[0116]	Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
[0117]	465 470 475 480
[0118]	Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
[0119]	485 490 495
[0120]	Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu
[0121]	500 505 510
[0122]	Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Phe His
[0123]	515 520 525
[0124]	Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile Leu Val Leu
[0125]	530 535 540

[0126]	Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys
[0127]	545 550 555 560
[0128]	Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser
[0129]	565 570 575
[0130]	Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe
[0131]	580 585 590
[0132]	Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg
[0133]	595 600 605
[0134]	Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp
[0135]	610 615 620
[0136]	Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu
[0137]	625 630 635 640
[0138]	Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu
[0139]	645 650 655
[0140]	Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln
[0141]	660 665 670
[0142]	Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile
[0143]	675 680 685
[0144]	Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His Gly Ser
[0145]	690 695 700
[0146]	Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn
[0147]	705 710 715 720
[0148]	Pro Gly Pro Met Ala Pro Leu Lys Met Leu Ala Leu Val Thr Leu Leu
[0149]	725 730 735
[0150]	Leu Gly Ala Ser Leu Gln His Ile His Ala Ala Arg Gly Thr Asn Val
[0151]	740 745 750
[0152]	Gly Arg Glu Cys Cys Leu Glu Tyr Phe Lys Gly Ala Ile Pro Leu Arg
[0153]	755 760 765
[0154]	Lys Leu Lys Thr Trp Tyr Gln Thr Ser Glu Asp Cys Ser Arg Asp Ala
[0155]	770 775 780
[0156]	Ile Val Phe Val Thr Val Gln Gly Arg Ala Ile Cys Ser Asp Pro Asn
[0157]	785 790 795 800
[0158]	Asn Lys Arg Val Lys Asn Ala Val Lys Tyr Leu Gln Ser Leu Glu Arg
[0159]	805 810 815
[0160]	Ser
[0161]	<210> 3
[0162]	<211> 1509
[0163]	<212> DNA
[0164]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0165]	<400> 3
[0166]	atggcctgc ccgtgaccgc tctgctgctg cactggccc tgctgctgca cgccgctaga 60
[0167]	cctgaggtga agctgcagga gtccggcct ggctggtgg ctcttccca gtcctgagc 120

[0168]	gtgacctgta cagtgtccgg cgtgtccctg cctgattacg gcgtgtcctg gatcaggcag	180
[0169]	cctcccagaa agggcctgga gtggctgggc gtgatctggg gctccgagac aacctactac	240
[0170]	aattccgccc tgaagtccag gctgacaatc atcaaggaca atagcaagag ccaggtgttt	300
[0171]	ctgaagatga actccctgca gacagacgac accgccatct actactgcgc caagcactac	360
[0172]	tactacggcg gtcctacgc catggattac tggggccagg gcaccagcgt gacagtgtcc	420
[0173]	tccggcggcg gcggaagcgg aggaggagga tctggcggcg gcggttccga tatccagatg	480
[0174]	accagacaa caagcagcct gtccgcctcc ctggcgaca gactgacat ctccctgcagg	540
[0175]	gcctcccagg acatcagcaa gtacctgaac tggtaccagc agaagcccga tggcaccgtg	600
[0176]	aagctgctga tctaccacac ctccagactg cactccggcg tgccttcag attttccgcg	660
[0177]	tccggcagcg gcaccgacta cagcctgacc atcagcaacc tggagcagga ggacatcgcc	720
[0178]	acctactttt gccagcagg caataacctg cttacacct ttggcggcg cacaaagctg	780
[0179]	gagatcaciaa gggccgatgc cccccaca gtgagcatct ttccccctag ctccaacgcc	840
[0180]	aagcccaciaa caaccctgc ccctagacc cccacaccg ctctaccat cgcagccag	900
[0181]	cctctgagcc tgagacctga ggcctgtagg cccgccgccc gaggagctgt tcacacaagg	960
[0182]	ggcctggact ttgcctgcga catctacatc tgggcccccc tggccggcac ctgtggagtt	1020
[0183]	ctgtgctga gcttggtcat taccaagagg ggcagaaaga agctgctgta catcttcaag	1080
[0184]	cagcctttca tgagaccgt gcagacaacc caggaggagg acggctgcag ctgcagattc	1140
[0185]	cctgaggagg aggaggcgg ctgtgagctg aggggtgaagt tctccaggag cgcgcagcc	1200
[0186]	cccgcctacc aacagggaca gaatcagctg tacaatgagc tgaacctggg cagaagagag	1260
[0187]	gagtagcagc tgctggaciaa gaggagggc agggacctg agatggcgg caagccccag	1320
[0188]	aggaggaaga atccccagga ggcctgtac aatgaactgc agaaggaciaa gatggccag	1380
[0189]	gcctacagcg agatcgcat gaaggcagc aggaggagag gcaaggcca cgatggcctg	1440
[0190]	taccagggcc tgcaccgc cacaaaggac acctacgac ccctgacat gcaggccctg	1500
[0191]	cccccaaga	1509
[0192]	<210>	4
[0193]	<211>	503
[0194]	<212>	PRT
[0195]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0196]	<400>	4
[0197]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu	
[0198]	1 5 10 15	
[0199]	His Ala Ala Arg Pro Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu	
[0200]	20 25 30	
[0201]	Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val	
[0202]	35 40 45	
[0203]	Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys	
[0204]	50 55 60	
[0205]	Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr	
[0206]	65 70 75 80	
[0207]	Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys	
[0208]	85 90 95	
[0209]	Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala	

[0210]		100		105		110
[0211]	Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met					
[0212]		115		120		125
[0213]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly					
[0214]		130		135		140
[0215]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met					
[0216]		145		150		155
[0217]	Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr					
[0218]		165		170		175
[0219]	Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr					
[0220]		180		185		190
[0221]	Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser					
[0222]		195		200		205
[0223]	Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly					
[0224]		210		215		220
[0225]	Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala					
[0226]		225		230		235
[0227]	Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly					
[0228]		245		250		255
[0229]	Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser					
[0230]		260		265		270
[0231]	Ile Phe Pro Pro Ser Ser Asn Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro					
[0232]		275		280		285
[0233]	Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu					
[0234]		290		295		300
[0235]	Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg					
[0236]		305		310		315
[0237]	Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly					
[0238]		325		330		335
[0239]	Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Lys Arg Gly Arg					
[0240]		340		345		350
[0241]	Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln					
[0242]		355		360		365
[0243]	Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu					
[0244]		370		375		380
[0245]	Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala					
[0246]		385		390		395
[0247]	Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu					
[0248]		405		410		415
[0249]	Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp					
[0250]		420		425		430
[0251]	Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly					

[0252]	435	440	445	
[0253]	Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu			
[0254]	450	455	460	
[0255]	Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu			
[0256]	465	470	475	480
[0257]	Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His			
[0258]		485	490	495
[0259]	Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
[0260]	500			
[0261]	<210> 5			
[0262]	<211> 1590			
[0263]	<212> DNA			
[0264]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0265]	<400> 5			
[0266]	atggcctgc ctgtgaccgc cctgctgctg ccaactggccc tgctgctcca cgccgctaga	60		
[0267]	cctcaggtgc agctggtgca gtccggcgtg gaggtgaaga agcccggcgc ctccgtgaag	120		
[0268]	gtgtcctgca aggcctccgg ctacacctt acaaattact acatgtactg ggtgaggcag	180		
[0269]	gccccggcc agggactgga atggatgggc ggcataatc cctccaatgg cggcaciaaac	240		
[0270]	ttaaacgaga agttaaagaa cagggtgacc ctgaccaccg atagctccac cacaacagcc	300		
[0271]	tacatggagc tgaagtcct gcagttgat gataccgccg tgtactactg tgccaggagg	360		
[0272]	gactacaggt ttgatatgg cttcgattac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtcc	420		
[0273]	tccggcggag gcggaagcgg aggaggagga agcggcggag gcggtagcga gatcgtgctg	480		
[0274]	acacagagcc ctgccacact gtccctgtcc cctggcgaga gagccaccct gagctgcaga	540		
[0275]	gcctcaagc gcgtgagcac ctccggctac agctacctgc actggtacca gcagaagccc	600		
[0276]	ggccaggccc ccaggctgct gatctacctg gcctcctacc tggagtccgg cgtgcccgt	660		
[0277]	agattctccg gctccggcag cggcaccgat tttacctga caatctccag cctggagcct	720		
[0278]	gaggacttcg ccgtgtacta ttgtcagcac tccagggatc tgcctctgac ctttggcggc	780		
[0279]	ggcaccaagg tggagatcaa gggctccggc gccacaaact ttagcctgct gaagcaggcc	840		
[0280]	ggcgacgtgg aggagaacce tggcccacag gtgcagctcg tgcagtccgg agccgaggtg	900		
[0281]	aagaaaccgc gcgccagcgt gaaggtgagc tgcaaggcca gcggctacac cttcaccggc	960		
[0282]	tactacatgc actgggtgag acaggcccc ggacagggcc tggagtggat gggatggatc	1020		
[0283]	aatcctaaca gcggcggcac caattacgcc cagaagtcc agggcagggt gacaatgaca	1080		
[0284]	agggatacct ccatcagcac cgcctacatg gaactgagca ggctgagaag cgacgacaca	1140		
[0285]	gccgtgtact actgcgtgag aagatatagg tttccctact actttgatta ctggggacag	1200		
[0286]	ggcaccctgg tgaccgtgag ctccggcggg gagggctccg gaggaggagg tagcggcggg	1260		
[0287]	ggaggatctg agatcgtgct caccagctc cccgccacc tgtccgtgct ccctggagag	1320		
[0288]	agggccacac tgagctgtag agcctcccag agcatcggt ccaatctggc ctggtaccag	1380		
[0289]	caaaagcctg gccaggcccc aagggtgctg atctactcca cctcctccag ggccacaggc	1440		
[0290]	atcacagata ggttttagcg ctccggtccc ggaaccgatt tcaccctgac catcagcaga	1500		
[0291]	ctggagcccg aggacttcgc tgtgtactac tgccagcagt ttaatagatc cccctgacc	1560		
[0292]	ttcggcggcg gcacaaaggt ggagattaag	1590		
[0293]	<210> 6			

[0294]	<211>	530
[0295]	<212>	PRT
[0296]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0297]	<400>	6
[0298]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu	
[0299]	1	5 10 15
[0300]	His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val	
[0301]		20 25 30
[0302]	Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr	
[0303]		35 40 45
[0304]	Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln	
[0305]		50 55 60
[0306]	Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn	
[0307]		65 70 75 80
[0308]	Phe Asn Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser	
[0309]		85 90 95
[0310]	Thr Thr Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr	
[0311]		100 105 110
[0312]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe	
[0313]		115 120 125
[0314]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly	
[0315]		130 135 140
[0316]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu	
[0317]		145 150 155 160
[0318]	Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr	
[0319]		165 170 175
[0320]	Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr	
[0321]		180 185 190
[0322]	Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
[0323]		195 200 205
[0324]	Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly	
[0325]		210 215 220
[0326]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro	
[0327]		225 230 235 240
[0328]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu	
[0329]		245 250 255
[0330]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Gly Ala Thr	
[0331]		260 265 270
[0332]	Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly	
[0333]		275 280 285
[0334]	Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly	
[0335]		290 295 300

[0336]	Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly
[0337]	305 310 315 320
[0338]	Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
[0339]	325 330 335
[0340]	Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys
[0341]	340 345 350
[0342]	Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala
[0343]	355 360 365
[0344]	Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[0345]	370 375 380
[0346]	Cys Val Arg Arg Asp Arg Phe Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[0347]	385 390 395 400
[0348]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[0349]	405 410 415
[0350]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
[0351]	420 425 430
[0352]	Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala
[0353]	435 440 445
[0354]	Ser Gln Ser Ile Gly Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
[0355]	450 455 460
[0356]	Gln Ala Pro Arg Val Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly
[0357]	465 470 475 480
[0358]	Ile Thr Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
[0359]	485 490 495
[0360]	Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
[0361]	500 505 510
[0362]	Gln Phe Asn Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
[0363]	515 520 525
[0364]	Ile Lys
[0365]	530