



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107827989 A

(43)申请公布日 2018.03.23

(21)申请号 201710991908.7 *C12N 15/90*(2006.01)

(22)申请日 2017.10.18 *C12N 5/10*(2006.01)

(71)申请人 银丰生物工程集团有限公司 *A61K 35/17*(2015.01)

地址 250101 山东省济南市高新区出口加工区港兴三路1109号 *A61P 35/00*(2006.01)

申请人 湖北省银丰鼎诚生物工程有限公司

(72)发明人 黄昕华 于丽丽 生德伟 徐峰波

李德柱 曹启龙

(74)专利代理机构 山东舜天律师事务所 37226

代理人 李新海

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/867(2006.01)

C12N 9/22(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表9页 附图3页

(54)发明名称

靶向骨髓瘤BCMA抗原的转基因T细胞及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种编码抗BCMA嵌合抗原受体的基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。公开了一种包含有该基因重组表达载体。公开了一种靶向骨髓瘤BCMA抗原的转基因T细胞,为包含有上述重组表达载体的、且敲除了PD1基因或/和CTLA4基因的原始细胞,或染色体中整合有上述基因的、且敲除了PD1基因或/和CTLA4基因的原始细胞;其制备方法:gRNA、CRISPR-cas9mRNA、HDR混合,电转重组T细胞。所述靶向骨髓瘤BCMA抗原的转基因T细胞在制备治疗多发性骨髓瘤的药物中的应用。本发明在carT构建中,引入了EGFR的识别序列,必要时可用EGFR单抗Cetuximab消除carT细胞,并且敲除了PD1、CTLA4基因,解除了其对carT细胞的抑制,增强了carT细胞克服肿瘤微环境抑制免疫细胞功能。



1. 一种抗BCMA嵌合抗原受体,其特征在于:其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 根据权利要求1所述的抗BCMA嵌合抗原受体,其特征在于:其结构为:包括以下顺式串联的结构域:抗BCMA抗体的scFv片段BCMAscFv、CD27的绞链区和跨膜区、CD28的胞内信号结构域、4-1BB的胞内信号结构域、CD3 ζ 的胞内信号结构域、T2A和EGFRt抗原。
3. 一种编码权利要求1或2所述的抗BCMA嵌合抗原受体的基因,其特征在于:其核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。
4. 根据权利要求3所述的编码抗BCMA嵌合抗原受体的基因,其特征在于:其结构为:anti-BCMA scFv-CD27Hinge-TM-CD28-41BB-CD3zeta,包括依次串联的scFc序列、CD27跨膜序列和膜外序列、CD28受体细胞内共刺激序列、是4-1BB受体细胞内共刺激序列、CD3zeta序列、T2A序列、EGFRt的识别序列。
5. 一种重组表达载体,为慢病毒表达载体、逆转录病毒表达载体、腺病毒表达载体、腺相关病毒表达载体或质粒,其特征在于:其包含有权利要求3或4所述的编码抗BCMA嵌合抗原受体的基因。
6. 一种靶向骨髓瘤BCMA抗原的转基因T细胞,其特征在于:为包含有权利要求5所述的重组表达载体的、且敲除了PD1基因或/和CTLA4基因的原始细胞,或染色体中整合有权利要求3或4所述的编码抗BCMA嵌合抗原受体的基因的、且敲除了PD1基因或/和CTLA4基因的原始细胞。
7. 根据权利要求6所述的靶向骨髓瘤BCMA抗原的转基因T细胞,其特征在于:所述原始细胞为CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞。
8. 权利要求6或7所述的靶向骨髓瘤BCMA抗原的转基因T细胞的制备方法,其特征在于: gRNA、CRISPR-cas9mRNA、HDR混合,电转重组T细胞(400V,0.5ms),即得;
所述gRNA为靶向PD1基因的gRNA或靶向CTLA4基因的gRNA,所述HDR为PD1基因的HDR或CTLA4基因的HDR;
所述重组T细胞,为包含有权利要求5所述的重组表达载体的原始细胞,或染色体中整合有权利要求3或4所述的编码抗BCMA嵌合抗原受体的基因的原始细胞。
9. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于:所述CRISPR-cas9mRNA,其核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示;
所述靶向PD1基因的gRNA,其核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示;
所述靶向CTLA4基因的gRNA,其核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示;
所述PD1基因的HDR,其核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示;
所述CTLA4基因的HDR,其核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示。
10. 权利要求6或7所述的靶向骨髓瘤BCMA抗原的转基因T细胞在制备治疗多发性骨髓瘤的药物中的应用。

靶向骨髓瘤BCMA抗原的转基因T细胞及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及靶向骨髓瘤BCMA抗原的转基因T细胞及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 多发性骨髓瘤是一种发生于骨髓的血癌,通常是由骨髓中的抗感染浆细胞癌变后增殖失控引起。多发性骨髓瘤可能导致免疫力下降并引起包括骨和肾脏等其它诸多问题。全球多发性骨髓瘤每年大约有114,200新增病例,并且每年有超过79,000人因此死亡。多发性骨髓瘤在我国的发病率约为十万分之一到十万分之二,欧美国家发病率为十万分之四。

[0003] 多发性骨髓瘤的治疗经历了传统的化疗时期、造血干细胞移植时期、一直到目前的沙利度胺、来那度胺和硼替佐米等为代表的新药时期。即使如此,多发性骨髓瘤在很大程度上依然是一种难以治愈的疾病,只有大约45%的患者在确诊后能活过5年。许多患者暂停治疗之后病情还会反复复发。复发之后患者的5年内存活率不足20%。特别是那些对蛋白酶体抑制剂(硼替佐米和卡非佐米)及免疫调节剂(来那度胺,沙利度胺和泊马度胺)耐药的患者预后极差。在没有卡非佐米和泊马度胺的时代,这些患者的预期总生存只有9个月。FDA在2015年12月批准了一种单抗治疗MM,靶向CD38。另外一种单抗靶向CS1完成随机、开放标签、多中心2期临床试验。anti-CD38 daratumumab治疗响应率82.9%,对照药物组是63.2%;中位无疾病生存期是9.3月,对照药物组是6.5月。anti-CS1 elotuzumab治疗响应率79%,对照药物组是66%;中位无疾病生存期是19.4个月,对照药物组是14.9个月。

[0004] 2015年12月,美国James N.Kochenderfer,MD报道,靶向BCMA的carT临床试验12患者,2CR,1VGPR,1PR,5SD。考虑到剂量使用,该疗法在 9×10^6 per kg时,疗效可能会有80%以上的CR。

[0005] 2016年12月,Bluebird公司报道,靶向BCMA的carT临床试验11患者,低剂量出现1患者PR,高剂量出现2患者CR,1患者VGPR,3患者PR。

[0006] car T技术的基本原理嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)是将能识别某种肿瘤抗原的抗体的抗原结合部与CD3- ζ 链或Fc ϵ RI γ 的胞内部分在体外偶联为一个嵌合蛋白,通过基因转导的方法转染患者的T细胞,使其表达嵌合抗原受体(CAR)。患者的T细胞被“重编码”后,生成大量肿瘤特异性的CAR-T细胞。

[0007] 第一代CAR由识别肿瘤表面抗原的单链抗体(single chain fragment variable, scFv)和免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAM,通常为CD3- ζ 和Fc ϵ RI γ)组成。早期的实验证明了CAR-T的可行性,然而第一代CAR只能引起短暂的T细胞增值和较低的细胞因子分泌,不能提供长时间的T细胞扩增信号和持续的体内抗肿瘤效应。

[0008] 依照T细胞活化的双信号学说,T细胞的激活和增殖需要共刺激信号;第二代、第三代CAR引入了共刺激分子信号序列(costimulatory molecule, CM),旨在提高T细胞的细胞毒活性、增殖性与存活时间,促进细胞因子的释放。现有的国内外第2代carT细胞培养技术,大致遵循类似的技术路线,即在分离患者外周血单个核细胞后,起始培养1~2天后,转染逆

转录病毒 (retroviral), 或慢病毒 (lentiviral), 或转座子 (transposon) 为载体的基因表达嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, car) 分子, 加共刺激因素 (IL2等生长因子, 辅助以CD3CD28抗体, 或者抗原表达的细胞株等) 培养7~30天后, 回输患者。

[0009] 欧美少量临床试验的数据表明, 现有的BCMA chimeric antigen receptor T(car T) 技术, 治疗多发性骨髓瘤客观治愈率 (objective response, ORR) 达50%左右。还存在的临床不足如下:

[0010] 1、患者在治疗过程中需要密切监护, 有中度的CRS, 主导原因之一是数十倍于正常水平的血清IL6。欧美临床对此有比较好的处理方案, 主要是IL6R单抗或大剂量类固醇激素;

[0011] 2、治疗有效率低于典型的CD19 carT 70-90%完全治愈率, 有效率有待提高, 有待于克服肿瘤微环境的抑制;

[0012] 3、治疗成功后, 患者体内长期缺乏生成抗体的浆细胞, 因而必须每2~3周注射一次免疫球蛋白以保持基本免疫需求;

[0013] 4、治疗过程中, 部分患者丢失carT细胞。

发明内容

[0014] 针对上述现有技术, 本发明提供了一种靶向骨髓瘤BCMA抗原的转基因T细胞, 及其制备方法。本发明在carT构建中, 引入了EGFR的识别序列, 必要时可用EGFR单抗Cetuximab消除carT细胞, 并且敲除了PD1、CTLA4基因, 解除了其对carT细胞的抑制, 增强了carT细胞克服肿瘤微环境抑制免疫细胞功能。

[0015] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0016] 一种抗BCMA嵌合抗原受体, 其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示, 包括以下顺式串联的结构域: 抗BCMA抗体的scFv片段BCMAscFv、CD27的绞链区和跨膜区、CD28的胞内信号结构域、4-1BB的胞内信号结构域、CD3ζ的胞内信号结构域、T2A和EGFRt抗原。

[0017] 一种编码上述抗BCMA嵌合抗原受体的基因, 其核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示; 其结构为: anti-BCMA scFv-CD27 Hinge-TM-CD28-41BB-CD3zeta, 包括依次串联的scFc序列、CD27跨膜序列和膜外序列、CD28受体胞内共刺激序列、是4-1BB受体胞内共刺激序列、CD3zeta序列、T2A序列、EGFRt的识别序列 (这些序列的cDNA序列拼接后, 以软件作密码子优化, 以适合于人类细胞表达, 去除了某些限制性内切酶序列, 去除了潜在的强二级结构, 去除了GC或AT密集区, 得到SEQ ID NO:2所示的序列)。

[0018] 一种重组表达载体, 为慢病毒表达载体、逆转录病毒表达载体、腺病毒表达载体、腺相关病毒表达载体或质粒, 其包含有上述编码抗BCMA嵌合抗原受体的基因。该重组表达载体的构建方法, 为常规方法。

[0019] 一种靶向骨髓瘤BCMA抗原的转基因T细胞, 为包含有上述重组表达载体的、且敲除了PD1基因或/和CTLA4基因的原始细胞, 或染色体中整合有上述抗BCMA嵌合抗原受体的基因的、且敲除了PD1基因或/和CTLA4基因的原始细胞, 所述原始细胞为CD4+T细胞或CD8+T细胞。

[0020] 一种靶向骨髓瘤BCMA抗原的转基因T细胞的制备方法: gRNA、CRISPR-cas9 mRNA、HDR混合, 电转重组T细胞 (400V, 0.5ms), 即得; 所述gRNA为靶向PD1基因的gRNA或靶向CTLA4

基因的gRNA,所述HDR为PD1基因的HDR或CTLA4基因的HDR;

[0021] 所述重组T细胞,为包含有上述重组表达载体的原始细胞,或染色体中整合有上述抗BCMA嵌合抗原受体的基因的原始细胞(该重组T细胞,可通过常规的方法获得:构建组表达载体后,慢病毒转染即可得到),所述原始细胞为CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞。

[0022] 所述CRISPR-cas9mRNA,是通过体外转录spCas9-2.0得到。SpCas9 (BB) -2A-Puro (PX459) V2.0 (简称spCas9-2.0)为现有技术中已有的序列,为张峰(ZhangFeng)所发布,其核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示(序列所示为相对应的DNA序列);克隆出spCas9-2.0的cas9蛋白的mRNA,克隆到pUC19质粒中,经过in vitro转录和5'加帽反应,形成成熟的mRNA,供细胞转染。

[0023] 所述靶向PD1基因的gRNA,其核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示(序列所示为相对应的DNA序列)。

[0024] 所述靶向CTLA4基因的gRNA,其核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示(序列所示为相对应的DNA序列)。

[0025] 所述PD1基因的HDR,其核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0026] 所述CTLA4基因的HDR,其核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示。

[0027] 所述靶向骨髓瘤BCMA抗原的转基因T细胞在制备治疗多发性骨髓瘤的药物中的应用。

[0028] 本发明的技术方案,针对背景技术中的问题1和3,本发明提出必要时用EGFR单抗Cetuximab消除carT细胞,因此,在carT构建中,引入了EGFR的识别序列。针对背景技术中的问题2,本发明提出用基因编辑的方法,敲除PD1、CTLA4基因(两种基因分别敲除,不宜同时敲除,理由是:1、基因敲除的效率低,两种同时敲除时效率更低;2、PD1、CTLA4基因均位于2号染色体,同时敲除有可能会致染色体大片段缺失),解除对carT细胞的抑制,增强carT细胞克服肿瘤微环境抑制免疫细胞功能。针对背景技术中的问题3,本发明提出用EGFR单抗Cetuximab消除carT细胞。针对背景技术中的问题4,本发明改进了BCMA carT的培养工艺。

附图说明

[0029] 图1:慢病毒载体构建简图。

[0030] 图2:car分子及附属筛选标记的设计图。

[0031] 图3:各种构建的BCMA carT在K562-BCMA细胞株培养后的短期增殖曲线。

[0032] 图4:各种构建的BCMA carT对K562-BCMA细胞株的杀伤活性。

[0033] 图5:AP1903分子诱导各种构建的BCMA carT程序死亡图。

[0034] 图6:Cetuximab诱导各种构建的BCMA carT细胞毒性(cytotoxicity)图。

具体实施方式

[0035] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明。

[0036] 下述实施例中所涉及的仪器、试剂、材料等,若无特别说明,均为现有技术中已有的常规仪器、试剂、材料等,可通过正规商业途径获得。下述实施例中所涉及的实验方法,检测方法等,若无特别说明,均为现有技术中已有的常规实验方法,检测方法等。

[0037] 实施例1构建慢病毒载体

[0038] 慢病毒载体构建简图如图1所示。

[0039] car分子及附属筛选标记的设计如图2所示。

[0040] 所构建的car分子,其核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0041] 慢病毒包被:为常规方法。简单而言,用RPMI1640+10%FBS培养293T细胞,待细胞90%密度后,用lipo2000混合转染质粒,转染293T细胞,收获慢病毒后,离心浓缩。质粒转染293T细胞的方法按照Invitrogen厂商的lipofactamine 2000的试剂指南。质粒有:慢病毒表达质粒,辅助质粒3种(pMDLg/pRRE,pRSV-Rev,pMD2.G),混合质粒的摩尔比例为2:1:1:0.5。转染24~48小时后,收获含有慢病毒的上清;加Clontech的Lenti-X concentrator,混合后1500g,4C离心45min,去除上清,获取慢病毒沉淀,用于后续实验。

[0042] 实施例2培养和慢病毒转染T细胞

[0043] 健康人或肿瘤患者的外周血抽取50~100ml,或者用Cobra Spectra血细胞分离机获取单个核细胞,经过Ficoll分离后,用CD4+或CD8+磁珠分选(磁珠购自Stem Cell Technologies公司)。T细胞用培养1天后(培养基配方:Lonza X vivo15,成人血清10%,IL2300-500IU/ml,penicillin(100units/ml)and streptomycin(100μg/ml),用抗CD3CD28的磁珠(与T细胞1:3混合)培养24小时后,感染慢病毒。

[0044] 慢病毒感染人CD4+T或CD8+T细胞:制备和浓缩后的慢病毒感染参考Takara Retronectin说明书,简单描述如下:

[0045] 制备Retronectin浓度20~100μg/ml,铺板使用密度是4~20μg/cm²,室温2小时后,吸去上清备用;用慢病毒加到上述板125~250μl/cm²,37C温浴4~6小时;待感染T细胞以密度0.5~2.5×10⁴cells/cm²铺板。T细胞感染24小时后换液。

[0046] 刺激BCMA carT细胞生长8~12天,保持细胞浓度在1~2×10⁶cells/ml。然后分选BCMA carT的性能。

[0047] 实施例3敲除PD1基因、CTLA4基因

[0048] 电转染CRISPR-cas9进行T细胞的基因编辑,分别进行敲除PD1基因、CTLA4基因的实验,具体方式如下:

[0049] 体外合成的CRISPR-cas9mRNA、gRNA混合HDR,电转T细胞(400V,0.5ms)。细胞在Lonza X vivo15,成人血清10%,IL2300-500IU/ml培养3天后,收获基因组DNA。然后做genomic PCR(靶向PD1的exon2附近区域的引物,Forward:TTCCTCACCTCTCTCCATCTC;Reverse:CTCTCTTTGATCTGCGCCTT,如SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9所示。靶向CTLA4的exon2附近区域的引物:Forward:TGAGTTCAGTTCCTTTG;Reverse:GAAATGGCTTTGCTCACCAATTA,如SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11所示),Agarose胶纯化后,进行TA克隆,纯化单个克隆后测序获取Indel突变信息,计算突变和非突变序列的信息,基因编辑效率PD1:13.5%,CTLA4:15.1%。

[0050] 所述CRISPR-cas9mRNA核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示;

[0051] 敲除PD1基因时,靶向PD1基因的gRNA,核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示;PD1基因的HDR核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示;

[0052] 敲除CTLA4基因时,靶向CTLA4基因的gRNA,核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示;CTLA4基因的HDR核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示。

[0053] 实施例4 BCMA carT的细胞性能鉴定

[0054] 图3:各种构建的BCMA carT在K562-BCMA细胞株培养后的短期增殖曲线。完全培养基为Lonza X vivo15,成人血清10%,IL2300-500IU/ml。各个组别为:BCMA car T(car分子构建不含CD28-41BB共刺激序列);BCMA car T(car分子构建不含CD28共刺激序列);BCMA car T(car分子构建不含41BB共刺激序列);BCMA car T(car分子构建含CD28-41BB共刺激序列)。通过图3可见,本发明构建的BCMA car T(含CD28-41BB共刺激序列),效果明显优于其它,有显著差异。

[0055] 图4:各种构建的BCMA carT对K562-BCMA细胞株的杀伤活性。完全培养基为Lonza X vivo15,成人血清10%,IL2300-500IU/ml。3各个组别为:BCMA car T(car受体含CD28共刺激序列);BCMA car T(car受体构建含41BB共刺激序列);BCMA car T(car受体含CD28-41BB共刺激序列)。

[0056] 图5:AP1903分子诱导各种构建的BCMA carT程序死亡图。完全培养基为Lonza X vivo15,成人血清10%,IL2300-500IU/ml。体外培养皿中,在培养基中添加5nMAP 1903分子后,BCMAcarT细胞短时间内进入程序死亡,活性细胞数量下降。各个组别为:载体GFP阴性对照;BCMA car T(car受体胞外区含CD27序列);BCMA car T(car受体胞外区含CD8序列)。

[0057] 图6:Cetuximab诱导各种构建的BCMA carT细胞毒性(cytotoxicity)图。完全培养基为Lonza X vivo15,非热灭活的成人血清10%,IL2300-500IU/ml。体外培养皿中,在培养基中添加1000ng/mlCetuximab后,BCMAcarT细胞短时间内进入程序死亡,活性细胞数量下降。各个组别为:载体GFP阴性对照;BCMA car T(car受体含CD28序列);BCMA car T(car受体含CD28-41BB序列)。

序列表

<110> 银丰生物工程集团有限公司

湖北省银丰鼎诚生物工程有限公司

<120> 靶向骨髓瘤BCMA抗原的转基因T 细胞及其制备方法与应用

<141> 2017-10-18

<160> 11

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 932

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 1

```

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1           5           10           15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Glu Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro
           20           25           30
Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser
           35           40           45
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro
           50           55           60
Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu
65           70           75           80
Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu
           85           90           95
Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu
           100          105          110
Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp
           115          120          125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
           130          135          140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr
145          150          155          160
Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile
           165          170          175
Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile
           180          185          190
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln
           195          200          205

```


Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 210 215 220
 Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp
 225 230 235 240
 Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr
 245 250 255
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Pro
 260 265 270
 Thr His Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly
 275 280 285
 His Met Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu
 290 295 300
 Ser Thr His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Gly Ser Ser Asp Phe Ile
 305 310 315 320
 Arg Ile Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala
 325 330 335
 Gly Ala Leu Phe Leu His Gln Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His
 340 345 350
 Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys
 355 360 365
 His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 370 375 380
 Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
 385 390 395 400
 Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
 405 410 415
 Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
 420 425 430
 Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
 435 440 445
 Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 450 455 460
 Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
 465 470 475 480
 Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 485 490 495
 Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
 500 505 510
 Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp

515	520	525
Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Glu Gly Arg		
530	535	540
Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Ala		
545	550	555
Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys		
565	570	575
Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile		
580	585	590
Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His		
595	600	605
Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val		
610	615	620
Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln		
625	630	635
Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu		
645	650	655
Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn		
660	665	670
Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu		
675	680	685
Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys		
690	695	700
Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys		
705	710	715
Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln		
725	730	735
Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr		
740	745	750
Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro		
755	760	765
Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu		
770	775	780
Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val		
785	790	795
Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala		
805	810	815
Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys		
820	825	830

Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly
 835 840 845
 Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly
 850 855 860
 His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly
 865 870 875 880
 Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile
 885 890 895
 Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu
 900 905 910
 Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His Ile Val Arg Lys Arg Thr
 915 920 925
 Leu Arg Arg Leu
 930

<210> 2

<211> 2781

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

atgctgctgt tggtcacatc tttgttgetc tgtgaacttc cgcacccggc attccttctc 60
 attcctgagc aaattcagct tgttcaaagt ggcccagaac tgaagaaacc cggggaaacc 120
 gtgaagatta gttgcaaagc gagtggttat acgttcacgg attattccat aaactgggtg 180
 aagcgagcgc cgggcaaggg tcttaaattg atgggctgga ttaacacaga aaccgggaa 240
 cctgcctatg cgtatgattt tagagggcga tttgcgtttt ctcttgagac atcagcaagc 300
 acggcctact tgcagataaa caacctcaag tacgaagata ccgcaacata cttttgtgct 360
 ttggattact catatgcatg ggattattgg ggtcagggaa caagtgtcac ggtgagtagc 420
 ggccggagggg gatctgggtg cggaggttcc ggccgagggg gatctgacat agtccttacc 480
 cagagtccac cttccctggc tatgtccctc gggaaaagag cgaccatcag ctgtagagcg 540
 agtgagtcag tcaccattct cggcagtcac ttgatccact ggtatcagca aaagcccgga 600
 cagccaccga ctttctgat ccaactggcc tccaatgtcc aaacaggtgt gcccgcccgg 660
 tttagcggat cagggtcccg gacagaactt acattgacga tagacctgt cgaggaagat 720
 gacgtagcgg tatactattg tctccagtca agaacgatec cacgcacatt cggcggtgga 780
 actaaactcg agataaaaagg cgggggaggt tcaccgacac acctgccgta cgtttctgaa 840
 atgctggagg ctgcactgc tggccacatg cagaccctcg ctgactttag gcaactgcc 900
 gcacggacc tcagcaccca ctggcctcca cagcggagtc ttggctcaag tgactttatc 960
 aggataactg tgatattttc aggeatgttt ttggttttta ctctcggggg tgcactttt 1020
 ctgcatcaac ggagcaaaag gtctagggga gggcacagcg attacatgaa catgactcct 1080
 cggcggccag ggccgacag caagcactac caaccctatg cgccgccgag agattttgag 1140
 gcttaccgct caagtgtcgt taaaaggggt cgaaaaaagc tgctgtatat attcaaaaa 1200

cccttcatga gaccagtcca aaccacgcaa gaggaggatg ggtgttctctg tcgatttctct 1260
 gaagaggaag aaggaggggtg cgaacttagg gtaaaattca gccgatccgc tgatgccctt 1320
 gcgtaccaac aaggacagaa ccagctgtat aacgagctca acctgggccc gagggaagaa 1380
 tacgacgtct tggataaaag acgcgggccc gaccccgaaa tggggggaaa gccgaggcga 1440
 aaaaatcctc aggaggggtt gtacaacgaa cttcaaaaag acaagatggc cgaggcctat 1500
 tccgagatag ggatgaaagg agagcggcgc cgagggaaag gtcacgacgg gctgtaccaa 1560
 ggtctgtcaa ctgcaaccaa ggatacctat gacgccctc atatgcaggc cttgcctctt 1620
 agagagggca gaggcagcct gctgacctgc ggcgacgtgg aggagaacc cggcccatg 1680
 gcctgtgggg ccgacagcta tgagatggag gaagacggcg tccgcaagt taagaagtgc 1740
 gaagggcctt gccgcaaagt gtgtaacgga ataggtattg gtgaatttaa agactcactc 1800
 tccataaatg ctacgaatat taaacacttc aaaaactgca cctccatcag tggcgatctc 1860
 cacatcctgc cgggtggcatt taggggtgac tcttccac atactctctc tctggatcca 1920
 caggaactgg atattctgaa aaccgtaaag gaaatcacag ggtttttgct gattcaggct 1980
 tggcctgaaa acaggacgga cctccatgcc tttgagaacc tagaaatcat acgcggcagg 2040
 accaagcaac atggtcagtt ttctcttgc gtcgtcagcc tgaacataac atccttggga 2100
 ttacgtccc tcaaggagat aagtgatgga gatgtgataa tttcaggaaa caaaaatttg 2160
 tgctatgcaa atacaataaa ctggaaaaaa ctgtttggga cctccggta gaaaaccaa 2220
 attataagca acagaggta aaacagctgc aaggccacag gccaggtctg ccatgccttg 2280
 tgctcccccg agggctgctg gggcccggag cccagggact gcgtctcttg ccggaatgtc 2340
 agccgaggca gggaatgcgt ggacaagtgc aacctcttg aggtgagcc aaggagttt 2400
 gtggagaact ctgagtgcac acagtgccac ccagagtgcc tgctcagcc catgaacatc 2460
 acctgcacag gacggggacc agacaactgt atccagtgtg cccactacat tgacggcccc 2520
 cactgcgtca agacctgccc ggcaggagtc atgggagaaa acaacaccct ggtctggaag 2580
 tacgcagacg ccggccatgt gtccacctg tgccatcaa actgcaccta cggatgcact 2640
 gggccaggtc ttgaaggctg tccaacgaat gggcctaaga tcccgtccat cgcactggg 2700
 atggtggggg ccctcctctt gctgctggtg gtggccctgg ggatcggcct cttcatgcga 2760
 aggcgccaca tcgtttgata a 2781

<210> 3

<211> 4869

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

atggccccaa agaagaagcg gaaggtcggg atccacggag tcccagcagc cgacaagaag 60
 tacagcatcg gcctggacat cggcaccac tctgtgggct gggccgtgat caccgacgag 120
 tacaaggtgc ccagcaagaa attcaaggtg ctgggcaaca ccgaccgca cagcatcaag 180
 aagaacctga tcggagccct getgttcgac agcggcgaaa cagccgagcc caccggctg 240
 aagagaaccg ccagaagaag atacaccaga cggaagaacc ggatctgcta tctgcaagag 300
 atcttcagca acgagatggc caaggtggac gacagcttct tccacagact ggaagagtcc 360
 ttctgtgtgg aagaggataa gaagcacgag cggcaccaca tcttcggcaa catcgtggac 420

gaggtggcct accacgagaa gtaccccacc atctaccacc tgagaaagaa actggtggac 480
 agcaccgaca aggccgacct gcggctgata tatctggccc tggcccacat gatcaagttc 540
 cggggccact tcctgatcga gggcgacctg aaccccgaca acagcgacgt ggacaagctg 600
 ttcatccagc tgggtgcagac ctacaaccag ctgttcgagg aaaaccccat caacgccagc 660
 ggcgtggacg ccaaggccat cctgtctgcc agactgagca agagcagacg gctggaaaat 720
 ctgatcgccc agctgcccgg cgagaagaag aatggcctgt tcggaaacct gattgccctg 780
 agcctggggc tgacccccaa cttcaagagc aacttcgacc tggccgagga tgccaaactg 840
 cagctgagca aggacacctc cgacgacgac ctggacaacc tgctggccca gatcgggcag 900
 cagtacgccg acctgtttct ggccgccaag aacctgtccg acgccatcct gctgagcgac 960
 atcctgagag tgaacaccga gatcaccaag gccccctga gcgcctctat gatcaagaga 1020
 tacgacgagc accaccagga cctgaccctg ctgaaagctc tcgtgcggca gcagctgect 1080
 gagaagtaca aagagatfff cttcgaccag agcaagaacg gctacgccgg ctacattgac 1140
 ggcggagcca gccaggaaga gttctacaag ttcatcaagc ccctcctgga aaagatggac 1200
 ggcaccgagg aactgtctgt gaagetgaac agagaggacc tgctgcggaa gcagcggacc 1260
 ttcgacaacg gcagcatccc ccaccagatc cacctgggag agctgcacgc cattctgcgg 1320
 cggcaggaag atttttacc attcctgaag gacaaccggg aaaagatcga gaagatcctg 1380
 accttccgca tcccctaata cgtgggacct ctggccaggg gaaacagcag attcgcctgg 1440
 atgaccagaa agagcgagga aaccatcacc ccctggaact tcgaggaagt ggtggacaag 1500
 ggcgcttccg cccagagctt catcgagcgg atgaccaact tcgataagaa cctgcccac 1560
 gagaaggtgc tgcccagca cagcctgctg tacgagtact tcaccgtgta taacgagctg 1620
 accaaagtga aatacgtgac cgagggaatg agaaagcccc ccttctgag cggcagcag 1680
 aaaaaggcca tcgtggacct gctgttcaag accaaccgga aagtaccgt gaagcagctg 1740
 aaagaggact acttcaagaa aatcgagtgc ttgactccg tggaaatctc cggcgtggaa 1800
 gatcggttca acgcctccct gggcacatac cacgatctgc tgaaaattat caaggacaag 1860
 gacttcttgg acaatgagga aaacgaggac attctggaag atatcgtgct gaccctgaca 1920
 ctgtttgagg acagagagat gatcgaggaa cggctgaaaa cctatgccc a cctgttcgac 1980
 gacaaagtga tgaagcagct gaagcggcgg agatacccg gctggggcag gctgagccgg 2040
 aagctgatca acggcatccg ggacaagcag tccggcaaga caatcctgga tttcctgaag 2100
 tccgacggct tcgccaacag aaacttcatg cagctgatcc acgacgacag cctgacctt 2160
 aaagaggaca tccagaaagc ccaggtgtcc ggccaggcgg atagcctgca cgagcacatt 2220
 gccaatctgg ccggcagccc cgccattaag aaggcctcc tgcagacagt gaaggtgggtg 2280
 gacgagctcg tgaaagtgat gggccggcac aagcccgaga acatcgtgat cgaaatggcc 2340
 agagagaacc agaccacca gaagggacag aagaacagcc gcgagagaat gaagcggatc 2400
 gaagagggca tcaaagagct gggcagccag atcctgaaag aacaccccgt ggaaaacacc 2460
 cagctgcaga acgagaagct gtacctgtac tactgcaga atgggcggga tatgtacgtg 2520
 gaccaggaac tggacatcaa ccggtgttcc gactacgatg tggaccatat cgtgcctcag 2580
 agctttctga aggacgactc catcgacaac aaggtgctga ccagaagcga caagaaccgg 2640
 ggcaagagcg acaacgtgcc ctccgaagag gtcgtgaaga agatgaagaa ctactggcgg 2700
 cagctgctga acgccaagct gattaccag agaaagtctg acaatctgac caaggccgag 2760

agaggcggcc tgagcgaact ggataaggcc ggcttcatca agagacagct ggtggaaacc 2820
 cggcagatca caaagcacgt ggacacagatc ctggactccc ggatgaacac taagtacgac 2880
 gagaatgaca agctgatccg ggaagtgaaa gtgatcacc tgaagtccaa gctggtgtcc 2940
 gatttccgga aggatttcca gttttacaaa gtgcgcgaga tcaacaacta ccaccacgcc 3000
 cacgacgcct acctgaacgc cgtcgtggga accgcctga tcaaaaagta ccctaagctg 3060
 gaaagcgagt tcgtgtacgg cgactacaag gtgtacgacg tgcggaagat gatcgccaag 3120
 agcgcagcagg aaatcggcaa ggctaccgcc aagtacttct tctacagcaa catcatgaac 3180
 tttttcaaga ccgagattac cctggccaac ggcgagatcc ggaagcggcc tctgatcgag 3240
 acaaacggcg aaaccgggga gatcgtgtgg gataagggcc gggattttgc caccgtgcgg 3300
 aaagtgtga gcatgcccc aagtgaatata gtgaaaaaga ccgaggtgca gacaggcggc 3360
 ttccagcaaag agtctatcct gcccaagagg aacagcgata agctgatcgc cagaaagaag 3420
 gactgggacc ctaagaagta cggcggette gacageccca ccgtggccta ttctgtgctg 3480
 gtggtggcca aagtggaaaa gggcaagtcc aagaaactga agagtgtgaa agagctgctg 3540
 gggatcacca tcatggaaa aagcagette gagaagaate ccatcgactt tctggaagcc 3600
 aagggctaca aagaagtga aaaggacctg atcatcaage tgcctaagta ctccctgttc 3660
 gagctggaaa acggccggaa gagaatgctg gcctctgccg gcgaactgca gaagggaaac 3720
 gaactggccc tgccctccaa atatgtgaac ttctgttacc tggccagcca ctatgagaag 3780
 ctgaagggct cccccagga taatgagcag aaacagctgt ttgtggaaca gcacaagcac 3840
 tacctggacg agatcatcga gcagatcagc gagttctcca agagagtgat cctggccgac 3900
 gctaactctgg acaaagtgt gtccgcctac aacaagcacc gggataagcc catcagagag 3960
 caggccgaga atatcatcca cctgtttacc ctgaccaate tgggagcccc tgccgccttc 4020
 aagtactttg acaccacat cgaccggaag aggtacacca gcaccaaaga ggtgctggac 4080
 gccaccctga tccaccagag catcaccggc ctgtacgaga cacggatcga cctgtctcag 4140
 ctgggaggcg acaaaaggcc ggcggccacg aaaaaggccg gccaggcaaa aaagaaaaag 4200
 gaattcggca gtggagaggg cagaggaagt ctgctaacat gcggtgacgt cgaggagaat 4260
 cctggcccaa tgaccgagta caagcccacg gtgcgcctcg ccaccgcga cgacgtcccc 4320
 agggccgtac gcaccctcgc cgccgcgttc gccactacc ccgccacgcg ccacaccgtc 4380
 gatccggacc gccacatcga gcgggtcacc gagctgcaag aacttctct cagcgcgtc 4440
 gggctcgaca tcggcaaggt gtgggtcgcg gacgacggcg ccgcggtggc ggtctggacc 4500
 acgccggaga gcgtcgaagc gggggcggtg ttcgcccaga tcggcccgcg catggccgag 4560
 ttgagcggtt cccggctggc cgcgcagcaa cagatggaag gcctcctggc gccgcaccgg 4620
 cccaaggagc ccgcgtggtt cctggccacc gtcggagtct cgcgccacca ccagggcaag 4680
 ggtctgggca gcgccgtcgt gctccccgga gtggaggcgg ccgagcgcgc cggggtgccc 4740
 gccttctgag agacctccgc gccccgcaac ctccccttct acgagcggct cggcttcacc 4800
 gtcaccgccg acgtcgaggt gcccgaagga ccgcgcacct ggtgcatgac ccgcaagccc 4860
 ggtgcctga 4869

<210> 4

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

gcgagagct tcgtgctaaa cgttttagag ctagaaatag caagttaaaa taaggctagt 60
ccgttatcaa cttgaaaaag tggcaccgag tcggtgct 98

<210> 5

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

ggtgcggcaa cctacatgat ggttttagag ctagaaatag caagttaaaa taaggctagt 60
ccgttatcaa cttgaaaaag tggcaccgag tcggtgct 98

<210> 6

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

aagccacct tcacctgcag cttctccaac acatcggaga gcttcgtgtg ataatggtac 60
cgcatgagcc ccagcaacca gacggacaag ctggccgctt 100

<210> 7

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

caggctgaca gccaggtgac tgaagtctgt gcggcaacct acatgtgata aatgagttg 60
accttcctag atgattccat ctgcacgggc acctccagt 99

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

ttcctcacct ctctccatct c 21

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

ctctctttga tctgcgctt 20

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

tgagttcact gagttccctt tg 22

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

gaaatggctt tgctcaccaa tta 23

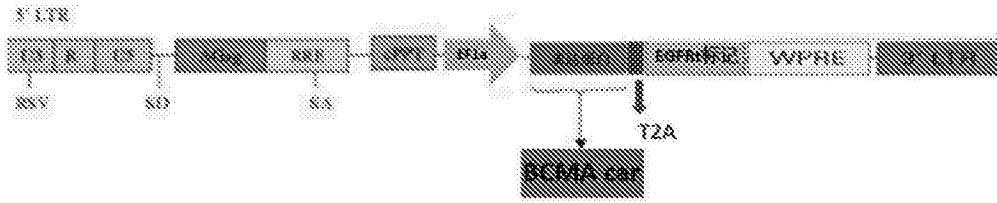


图1

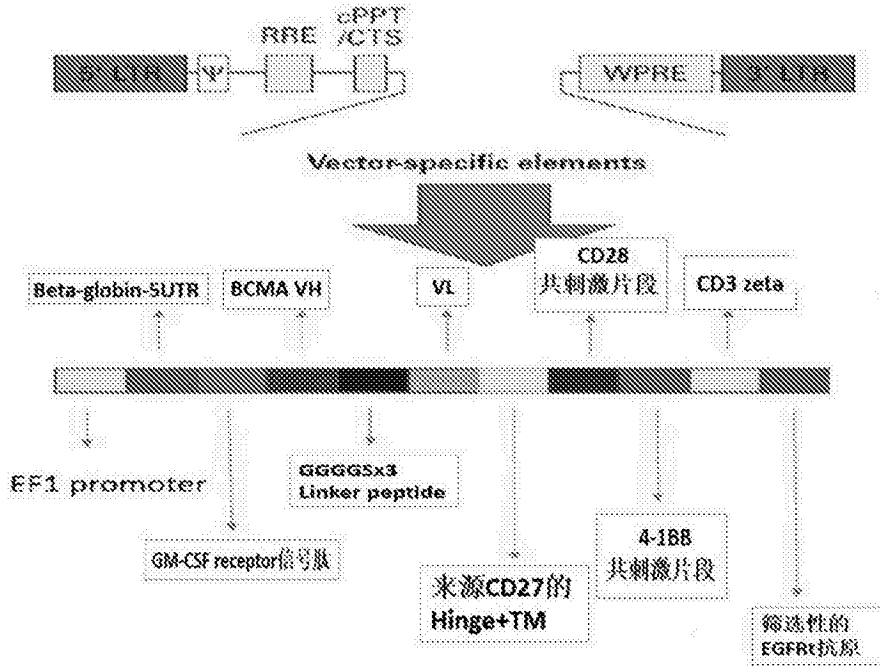


图2

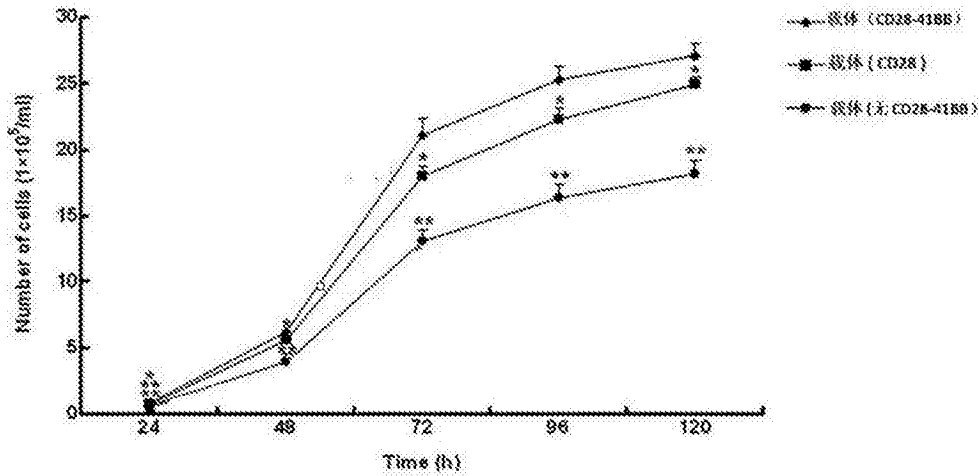


图3

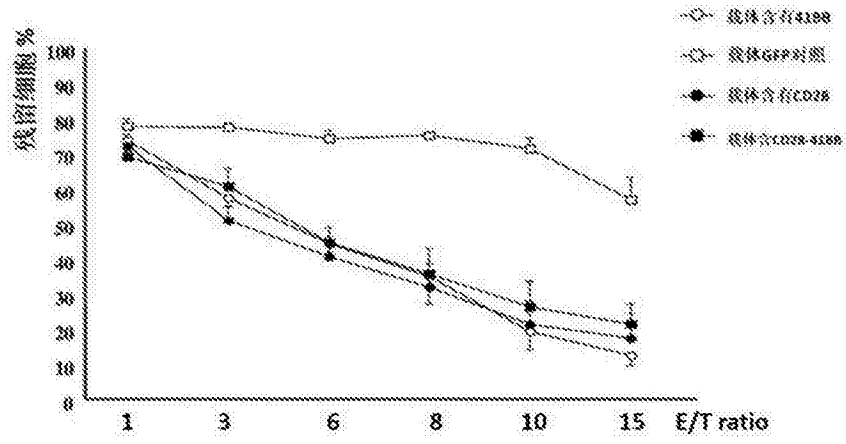


图4

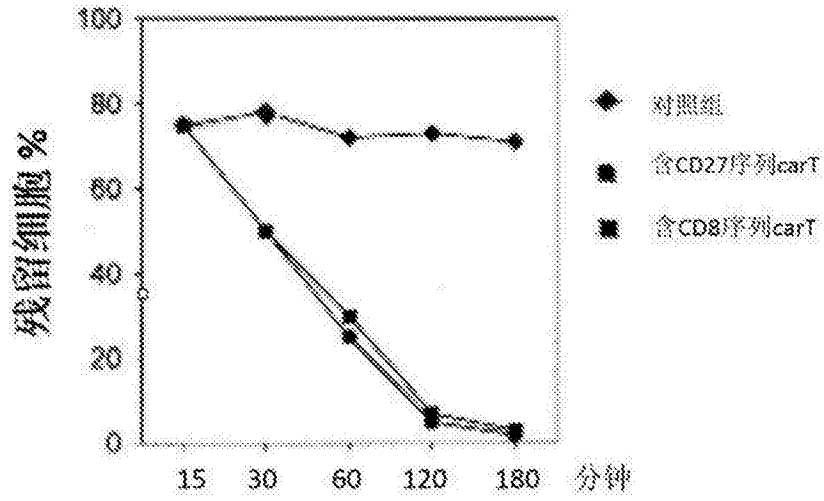


图5

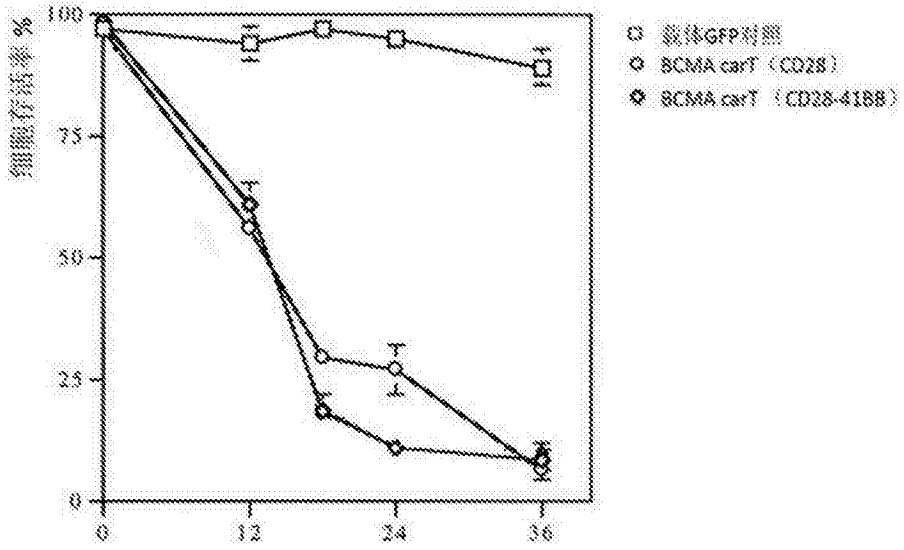


图6