



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116064678 A

(43) 申请公布日 2023.05.05

(21) 申请号 202211395043.5

C12N 15/864 (2006.01)

(22) 申请日 2017.01.13

C12N 15/113 (2010.01)

(30) 优先权数据

62/279,474 2016.01.15 US

(62) 分案原申请数据

201780017712.6 2017.01.13

(71) 申请人 美国基因技术国际有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 C·D·保扎 李海山 T·拉胡森

刘美龄

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

专利代理人 陈扬扬

(51) Int.Cl.

C12N 15/867 (2006.01)

权利要求书2页 说明书71页

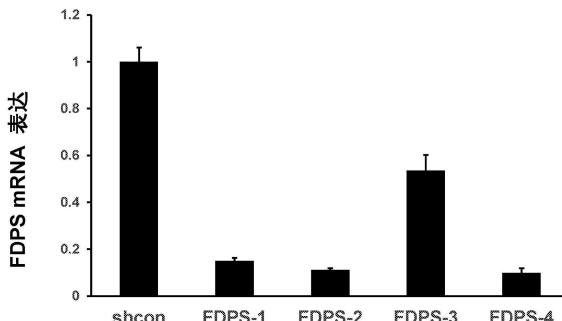
序列表(电子公布) 附图15页

(54) 发明名称

用于活化 γ - δ T细胞的方法和组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于活化 γ - δ T细胞的方法和组合物。本发明一般涉及用于激活 γ - δ T细胞的基因治疗和免疫疗法的方法和组合物,特别是可用于治疗各种癌症和感染性疾病。



1. 包含至少一种编码的遗传元件的病毒载体,其中所述至少一种编码的遗传元件包含小RNA,其能够抑制参与甲羟戊酸途径的酶的生产。

2. 如权利要求1所述的病毒载体,其中所述酶是法尼基二磷酸合酶(FDPS)。

3. 如权利要求1所述的病毒载体,其中所述至少一种编码的遗传元件包含微小RNA或shRNA。

4. 如权利要求3所述的病毒载体,其中所述shRNA包含与以下序列具有至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%的百分比相同性的序列:

a. GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTT (SEQ ID NO:1) ;

b. GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGTGAACGAAATCCTGCTTTT (SEQ ID NO:2) ;

c. GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCATGTACATGGCTTTT (SEQ ID NO:3) ;或

d. GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (SEQ ID NO:4) 。

5. 如权利要求4所述的病毒载体,其中所述shRNA包含:

a. GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTT (SEQ ID NO:1) ;

b. GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGTGAACGAAATCCTGCTTTT (SEQ ID NO:2) ;

c. GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCATGTACATGGCTTTT (SEQ ID NO:3) ;或

d. GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (SEQ ID NO:4) 。

6. 如权利要求3所述的病毒载体,其中所述微小RNA包含与以下序列具有至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%的百分比相同性的序列:

a. AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGA AGGAGGCTGAGAAAGTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO:5) ;

b. AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGA AGGAGGCTGAGAAAGTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO:6) ;

c. TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAG AAAGTTGCCTACTGCCTCGGA (SEQ ID NO:7) ;

d. CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTGGCCACTGACTGAGCA GAAGGGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCCTGTTACTGACTCA (SEQ ID NO:8) ;

e. CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGGACTTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAATCTCATGGCAGA AGGAGGCGAGAAAGTGTGACATTGGTATCTTCATCTGACCA (SEQ ID NO:9) ;或

f. GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGGTCCCCTCCCCGAGAAG GAGGCTGAGAAAGTCCTCCCTCCCAATGACCGCGTCTCGTCG (SEQ ID NO:10) 。

7. 如权利要求6所述的病毒载体,其中所述微小RNA包含:

a. AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGA AGGAGGCTGAGAAAGTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO:5) ;

b. AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGA AGGAGGCTGAGAAAGTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO:6) ;

c. TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAG AAAGTTGCCTACTGCCTCGGA (SEQ ID NO:7) ;

d. CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTGGCCACTGACTGAGCA GAAGGGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCCTGTTACTGACTCA (SEQ ID NO:8) ;

e. CATCTCCATGGCTGTACCACCTGTCGGGACTTCTCAGCCTCCTCTGCCTGTTGAATCTCATGGCAGA
AGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTTGGTATCTTCATCTGACCA (SEQ ID NO:9) ;或

f. GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTCTCAGCCTCCTCTGCTGGTCCCCTCCCCGAGAAG
GAGGCTGAGAAAGTCCTCCCTCCAATGACCGCGTCTCGTCG (SEQ ID NO:10) 。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的病毒载体,其中所述病毒载体是慢病毒载体。

9. 如权利要求1所述的病毒载体,其中所述病毒载体是腺相关病毒载体。

10. 如权利要求1所述的病毒载体,还包含第二编码的遗传元件,其中所述第二遗传元件包含至少一种细胞因子或趋化因子。

用于活化 γ - δ T细胞的方法和组合物

[0001] 本申请是中国专利申请号201780017712.6的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2016年1月15日提交的题为“用于激活 γ - δ T细胞的方法和组合物”的美国临时专利申请号62/279,474的优先权，其通过引用并入本文。

发明领域

[0004] 本公开一般涉及基因治疗和免疫疗法领域，特别是涉及增加的 γ δ (“GD”) T细胞活化。

背景技术

[0005] 人T细胞基于T细胞受体结构而区分。主要群体，包括CD4+和CD8+亚群，表达由 α 和 β 链组成的受体。较小的亚群表达由 γ 和 δ 链制成的T细胞受体。 γ δ (“GD”) T细胞构成3-10%的循环淋巴细胞，V δ 2+亚群构成血液中GD T细胞的75%。V δ 2+细胞识别非肽表位并且不需要主要组织相容性复合物 (“MHC”) 或人白细胞抗原 (“HLA”) 的抗原呈递。大多数V δ 2+T细胞也表达V γ 9链，并且通过暴露于5-碳焦磷酸盐化合物来刺激，该5-碳焦磷酸盐化合物是甲羟戊酸和非甲羟戊酸甾醇/类异戊二烯合成途径中的中间体。对异戊烯焦磷酸 (5-碳) 的反应在健康人类中是普遍的。

[0006] GD T细胞的另一个亚群，即V δ 1+，在血液中循环的T细胞中占很小的百分比，但V δ 1细胞通常存在于上皮粘膜和皮肤中。

[0007] 通常，GD T细胞具有多种功能，包括杀死肿瘤细胞和病原体感染的细胞。通过由两条糖蛋白链 γ 和 δ 组成的独特T细胞受体 (“TCR”) 刺激，提高了细胞毒性、细胞因子分泌和其他效应功能的能力。GD T细胞的TCR具有独特的特异性，并且细胞本身以高克隆频率出现，因此允许对肿瘤和病原体的快速先天样反应。

[0008] 氨基二膦酸类药物 (“ABP”)，和法尼基二磷酸合成酶 (“FDPS”) 的其他抑制剂，在甲羟戊酸途径中位于异戊烯焦磷酸 (“IPP”) 的下游 (参见例如图1)，其已经用于治疗各种疾病，包括癌症，特别是那些涉及骨转移的疾病。ABP包括商品名，如 Zometa® (诺华公司 (Novartis)) 和 Fosamax® (默克公司 (Merck))。

[0009] ABP也已用于刺激GD T细胞。这可能是因为当FDPS在骨髓细胞中被抑制时，IPP开始积累并且香叶基香叶基焦磷酸 (“GGPP”) 减少，GGPP是抑制炎性体通路活化的FDPS的下游产物。GGPP的减少除去了半胱天冬酶依赖性炎性体途径的抑制剂，并允许分泌成熟细胞因子，包括白细胞介素- β 和白细胞介素-18，后者对于 γ δ T细胞活化尤其重要。

[0010] 因此，当FDPS被阻断时，增加的IPP和减少的GGPP组合以激活V δ 2+T细胞。由IPP或ABP激活的V δ 2+细胞将迅速增殖，表达多种细胞因子和趋化因子，并且可以用于以细胞毒性方式破坏肿瘤细胞或感染有病原微生物的细胞。

[0011] 然而，ABP与炎症和骨坏死有关，并且由于它们的化学性质而具有差的生物利用度。同样，IPP的半衰期非常短，难以合成。两种类型的化合物都需要在个体中进行全身给

药。因此,一般的ABP和具体的IPP都为治疗目的留下了很多不足之处。

发明内容

[0012] 在一个方面,提供了激活GD T细胞的方法。该方法包括在GD T细胞存在下用编码至少一种遗传元件的病毒传递系统感染靶细胞。在实施方式中,所述至少一种遗传元件包括小RNA,其能够抑制甲羟戊酸途径中涉及的酶生产。在实施方式中,酶是FDPS。在实施方式中,当酶在靶细胞中被抑制时,靶细胞随后激活GD T细胞。在实施方式中,靶细胞是癌细胞或已经被感染剂感染的细胞。在优选的实施方式中,GD T细胞的活化导致GD T细胞杀死癌细胞或感染有感染剂的细胞。在实施方式中,至少一种编码的遗传元件包括微小RNA或shRNA。在进一步的实施方式中,靶细胞还与氨基二膦酸类药物接触。在实施方式中,氨基二膦酸类药物是唑来膦酸。

[0013] 在另一方面,提供了治疗对象的癌症的方法。该方法包括向对象给予治疗有效量的编码至少一种遗传元件的病毒递送系统。在实施方式中,所述至少一种遗传元件包括小RNA,其能够抑制甲羟戊酸途径中涉及的酶生产。在进一步的实施方式中,当在GD T细胞存在下在癌细胞中抑制酶时,癌细胞激活GD T细胞,从而治疗癌症。在实施方式中,酶是FDPS。在实施方式中,至少一种编码的遗传元件包括微小RNA或shRNA。在进一步的实施方式中,靶细胞还与氨基二膦酸类药物接触。在实施方式中,氨基二膦酸类药物是唑来膦酸。

[0014] 在另一方面,提供了治疗对象的感染疾病的方法。该方法包括向对象给予治疗有效量的编码至少一种遗传元件的病毒递送系统。在实施方式中,所述至少一种遗传元件包括小RNA,其能够抑制甲羟戊酸途径中涉及的酶生产。在进一步的实施方式中,当在GD T细胞存在下用感染剂感染的细胞中酶受到抑制时,该受感染的细胞激活GD T细胞,从而治疗受感染的细胞和感染性疾病。在实施方式中,酶是FDPS。在实施方式中,至少一种编码的遗传元件包括微小RNA或shRNA。在进一步的实施方式中,靶细胞还与氨基二膦酸类药物接触。在实施方式中,氨基二膦酸类药物是唑来膦酸。

[0015] 在另一方面,所述至少一种编码的遗传元件包括与下述序列具有至少80%,或至少85%,或至少90%,或至少95%的百分比相同性的shRNA:

GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACT

TTTT (SEQ ID NO: 1);

GCAGGATTTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTT

[0016] T (SEQ ID NO: 2);

GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCCTGCCATGTACATGGCTTT

T (SEQ ID NO: 3); 或

GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTT

T (SEQ ID NO: 4)。在优选的实施方式中,shRNA包括

GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTT
T (SEQ ID NO: 1);

GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTT

[0017] T (SEQ ID NO: 2);
GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCCTGCCATGTACATGGCTTT

T (SEQ ID NO: 3); 或

GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTT

T (SEQ ID NO: 4)。

[0018] 在另一方面,所述至少一种编码的遗传元件包括与下述序列具有至少80%,或至少85%,或至少90%,或至少95%的百分比相同性的微小RNA:

[0019] AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTG
CGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCT

CGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO: 5);

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGT

GAAGCCACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGAC

TTCAAGGGGCT (SEQ ID NO: 6);

TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAGCCACAGA

TGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTTGCCTACTGCCTCGGA (SEQ ID NO: 7);

CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTT

TGGCCACTGACTGAGCAGAAGGGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCCTGTT

ACTAGCACTCA (SEQ ID NO: 8);

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGGACTTCTCAGCCTCCTCTGCC

TGTTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTTGGTATCTT

TCATCTGACCA (SEQ ID NO: 9); 或

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTCTCAGCCTCCTCTGCTG

GTCCCCCTCCCCGAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTCCCTCCCAATGACCGC

GTCTTCGTCG (SEQ ID NO: 10)。在优选的实施方式中,微小RNA包括

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGT
 GAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGG
 ACTTCAAGGGCT (SEQ ID NO: 5);

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGT
 GAAGCCACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGAC
 TTCAAGGGCT (SEQ ID NO: 6);

TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAGGCCACAGA
 [0021] TGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCCTACTGCCTCGGA (SEQ ID NO: 7);
 CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTT
 TGGCCACTGACTGAGCAGAAGGGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCCTGTT
 ACTAGCACTCA (SEQ ID NO: 8);
 CATCTCCATGGCTGTACCACCTGTCGGACTTCTCAGCCTCCTCTGCGCTG
 TTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTGGTATCTTC
 ATCTGACCA (SEQ ID NO: 9); 或
 GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTCTCAGCCTCCTCTGCTG
 GTCCCCCTCCCCGAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTCCCTCCAATGACCGC
 GTCTCGTCG (SEQ ID NO: 10)。

[0022] 在另一方面,提供了包含至少一种编码的遗传元件的病毒载体。所述至少一种编码的遗传元件包括小RNA,其能够抑制甲羟戊酸途径中涉及的酶生产。在实施方式中,参与甲羟戊酸途径的酶是法尼基二磷酸合酶(FDPS)。在实施方式中,至少一种编码的遗传元件包括微小RNA或shRNA。

[0023] 在另一方面,所述至少一种编码的遗传元件包括与下述序列具有至少80%,或至少85%,或至少90%,或至少95%的百分比相同性的shRNA。在优选实施方式中,shRNA包括SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:3;或SEQ ID NO:4。

[0024] 在另一方面,所述至少一种编码的遗传元件包括与下述序列具有至少80%,或至少85%,或至少90%,或至少95%的百分比相同性的微小RNA:SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:8;SEQ ID NO:9;或SEQ ID NO:10。在优选的实施方式中,微小RNA包括SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:8;SEQ ID NO:9;或SEQ ID NO:10。

[0025] 在实施方式中,病毒载体由能够有效地将小RNA转导入靶细胞的任何载体组成。在一些实施方式中,所述病毒载体是慢病毒载体。在其他实施方式中,该病毒载体是腺相关病毒载体。

[0026] 在另一方面,病毒载体包括第二编码的遗传元件。在实施方式中,第二遗传元件包括至少一种细胞因子或趋化因子。在实施方式中,所述至少一种细胞因子选自:IL-18, TNF- α , 干扰素- γ , IL-1, IL-2, IL-15, IL-17和IL-12。在实施方式中,至少一种趋化因子是CC趋化因子或CXC趋化因子。在进一步的实施方式中,至少一种趋化因子是RANTES。

[0027] 另一方面,提供了用于表达慢病毒颗粒的慢病毒载体系统。该系统包括慢病毒载体,用于表达包膜蛋白的至少一个包膜质粒,该包膜蛋白经优化用于感染细胞;和至少一种用于表达gag、pol和rev基因的辅助质粒。当将慢病毒载体,至少一个包膜质粒和至少一个辅助质粒转染到包装细胞中时,通过包装细胞产生慢病毒颗粒。在实施方式中,慢病毒颗粒能够感染靶细胞,并抑制靶细胞内甲羟戊酸途径中涉及的酶。在实施方式中,甲羟戊酸途径中涉及的酶是FDPS。在实施方式中,慢病毒载体系统包括用于表达gag和pol基因的第一辅助质粒,和用于表达rev基因的第二辅助质粒。在实施方式中,优选包膜蛋白经优化用于感染靶细胞。在实施方式中,靶细胞是癌细胞。在其他实施方式中,靶细胞是被感染剂感染的细胞。

附图说明

[0028] 图1描绘了用于类固醇和类异戊二烯的生物合成的甲羟戊酸途径中的主要步骤的概述。

[0029] 图2描绘了环化形式的示例性3-载体慢病毒载体系统。

[0030] 图3描绘了环化形式的示例性4-载体慢病毒载体系统。

[0031] 图4描绘了:(A)表达FDPS shRNA靶向序列的慢病毒载体的线性图谱;和(B)表达具有FDPS靶向序列的合成微小RNA的慢病毒载体的线性图谱。

[0032] 图5描绘了数据,其证明用具有表达FDPS shRNA#4 (SEQ ID N0:4)的慢病毒的THP-1白血病细胞激活V82+T细胞,如本文所述。

[0033] 图6描绘了数据,其证明用具有表达FDPS shRNA#4 (SEQ ID N0:4)的慢病毒的THP-1白血病细胞激活V82+T细胞,如本文所述。

[0034] 图7描绘了数据,其证明用具有表达FDPS shRNA#1 (SEQ ID N0:1)的慢病毒的PC3前列腺癌细胞激活V82+T细胞,如本文所述。

[0035] 图8描绘了数据,其证明用具有表达FDPS shRNA#4 (SEQ ID N0:4)的慢病毒的PC3前列腺癌细胞激活V82+T细胞,如本文所述。

[0036] 图9描绘了数据,其证明用具有表达FDPS shRNA#1 (SEQ ID N0:1)或FDPS shRNA#4 (SEQ ID N0:4)的慢病毒的HepG2癌细胞激活V82+T细胞,如本文所述。

[0037] 图10描绘了数据,其证明用具有表达miR30 FDPS#1 (SEQ ID N0:5)的慢病毒的THP-1白血病细胞激活V82+T细胞,如本文所述。

[0038] 图11描绘了证明如本文所述的各种实验条件下特异性裂解的百分比相对于E:T比的数据。

[0039] 图12描绘了数据,其证明慢病毒递送的基于shRNA的RNA干扰靶向人FDPS基因。

[0040] 图13描绘了数据,其证明慢病毒递送的基于miR的RNA干扰靶向人FDPS基因。

[0041] 图14描绘了数据,其证明用具有表达FDPS shRNA#4 (SEQ ID N0:4)的腺相关病毒的HepG2癌细胞激活V82+T细胞,如本文所述。

[0042] 图15描绘了免疫印迹数据,证明在用LV-shFDPS转导并用唑来膦酸处理的细胞中缺乏RAP1异戊烯化(prenylation)。

具体实施方式

[0043] 公开概述

[0044] 本公开涉及基因治疗构建体及其向细胞的递送,导致对法尼基二磷酸合成酶(“FDPS”)的抑制,该酶是将异戊烯基磷酸酯(IPP)转化为法尼基二磷酸酯(FDP)所必需的,例如图1所示。在实施方式中,向一种或多种病毒载体提供靶向FDPS的微小RNA或短同源RNA(shRNA),从而降低该酶的表达水平。病毒载体包括慢病毒载体和AAV载体。调节FDPS表达的结果是增加IPP的积累,IPP是GD T细胞增殖和分化的刺激物。因此,本文提供的构建体用于激活GD T细胞,并用于治疗癌症和感染性疾病。

[0045] 定义和解释

[0046] 除非另有说明,本方面所用的科技术语与本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义相同。此外,除非另有说明,单数术语包括复数且复数术语包括单数。通常,本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白质和核酸化学及杂交中使用的命名和技术是本领域公知且普遍使用的。除非另有说明,本发明的方法和技术一般遵循本领域熟知的传统方法进行并如若干一般的或更特定的参考文献中所述,所述参考文献贯穿本说明书引用和讨论。参见例如: Sambrook J. 和 Russell D.《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual),第三版,纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), (2000); Ausubel等,《精编分子生物学方案:现行分子生物学方案的方法纲要》(Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology), Wiley, John& Sons 出版公司(2002); Harlow 和 Lane,《使用抗体:实验室手册》(Using Antibodies: A Laboratory Manual); 纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社(1998); 和 Coligan 等,《精编蛋白质科学方案》(Short Protocols in Protein Science), Wiley, John& Sons 出版公司(2003)。任何酶促反应和纯化技术根据生产商的说明书或本领域普遍使用或本文所述的方法进行。本文所述的分析化学、合成有机化学以及医学和药学化学中使用的命名以及实验室方法和技术是本领域公知且普遍使用的。

[0047] 如说明书和所附权利要求所用,单数形式的“一个”,“一种”和“所述”可互换使用并且旨在包括复数形式并落入各含义中,除非文本中有另外的明确表示。如本文所述,“和/或”表示涵盖了任何以及所有可能的一种或多种所列项目的组合,以及当在可选情况下解释时(“或”)缺少组合。

[0048] 所有数字标记,例如pH,温度,时间,浓度和分子量,包括范围,都是近似值,其以0.1的增量变化(+)或(-)。应理解,尽管并非总是明确指出,所有数字标记前面都有术语“约”。除了“X”的微小增量(例如“X+0.1”或“X-0.1”)之外,术语“约”还包括精确值“X”。还应理解,尽管并非总是明确说明,但本文所述的试剂仅仅是示例性的,并且其等同物是本领域已知的。

[0049] 如本文所用,术语“约”将为本领域普通技术人员所理解,并且在某种程度上取决于其使用的上下文而变化。如果在使用该术语的文中该术语对于本领域普通技术人员来说是不明确的,则“约”将意味着高达特定术语的正负10%。

[0050] 术语“给予”或“施用”活性剂应理解为向需要治疗的对象提供活性剂,其形式为可以治疗有用形式和治疗有效量引入该个体的形式。

[0051] 如本文所用,术语“包括”或“包含”意在表示所述组合物和方法包括所提及的要素,但并不排除其它要素。当用以定义组合物和方法时,“基本由……组成”应表示排除对于该组合物和方法具有任何基本意义的其它要素。“由……组成”表示排除多于所要求保护的组合物的其它成分的微量元素和基本方法步骤。通过各个这些转换术语定义的实施方式在本发明范围内。因此,意图是所述方法和组合物可以包括另外的步骤和组分(包含)或者可选地包括不重要的步骤和组合物(基本上由……组成)或者仅包括所述方法步骤或组合物(由…组成)。

[0052] 如本文所用,“表达”、“表达”或“编码”是指多核苷酸转录成mRNA的过程和/或转录的mRNA随后被翻译成肽,多肽或蛋白质的过程。表达可以包括在真核细胞中剪接mRNA或其他形式的转录后修饰或翻译后修饰。

[0053] 术语“法尼基二磷酸合酶”在本文中也可称为FDPS,并且在本文中也可称为法尼基焦磷酸合酶或FPPS。

[0054] 术语“ $\gamma\delta$ T细胞”在本文中也可称为 $\gamma\delta$ T细胞,或进一步称为GD T细胞。术语“ $\gamma\delta$ T细胞活化”或“ $\gamma\delta$ T细胞激活”是指与 $\gamma\delta$ T细胞相关的并且代表这种T细胞被激活的任何可测量的生物学现象。这种生物学现象的非限制性实例包括细胞因子生产的增加,细胞表面蛋白质的定性或定量组成的变化,T细胞增殖的增加和/或T细胞效应功能的增加,例如杀死靶细胞或辅助另一个效应细胞杀死靶细胞。

[0055] 术语“个体”,“对象”和“患者”在本文中可互换使用,并且指任何个体哺乳动物对象,例如牛,犬,猫,马或人。

[0056] 术语“miRNA”指微小RNA,并且在本文中也可称为“miR”。

[0057] 术语“包装细胞系”是指可用于表达慢病毒颗粒的任何细胞系。

[0058] 在两个或更多个核酸或多肽序列的内容中,术语“百分比相同性”是指,当进行比较并以最大对应性比对时,两个或更多个具有相同的核苷酸或氨基酸残基的特定百分比的序列或子序列,如使用下述的序列比较算法之一(例如,BLASTP和BLASTN或本领域技术人员可用的其他算法)或通过视觉检查所测量。取决于应用,“百分比相同性”可以存在于被比较的序列区域上,例如,在功能域上,或者,存在于待比较的两个序列的全长上。对于序列比较,一般将一条序列用作与测试序列比较的参比序列。使用序列比较算法时,将测试序列和参比序列输入计算机,如果必要则指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法根据指定的程序参数计算测试序列相对参比序列的序列相同性百分数。

[0059] 可进行最优序列比对以作比较,例如,通过Smith和Waterman的局部同源性算法,Adv. Appl. Math. 2:482 (1981);通过Needleman和Wunsch的同源性比对算法,J. Mol. Biol. 48:443 (1970);通过Pearson和Lipman的相似性搜索法,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988);通过计算机执行这些算法(遗传学计算组(Genetics Computer Group)的威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,575科学大道(Science Dr.),威斯康星州麦迪逊),或通过视觉检查。

[0060] 适用于确定序列相同性百分比和序列相似性的算法的一个实例是BLAST算法,其在Altschul等,J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)中描述。进行BLAST分析的软件可从国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开获得。

[0061] 两个核苷酸序列之间的相同性百分比可以使用GCG软件包中(可从<http://www.gcg.com>获得)的GAP程序,使用NWSgapdna.CMP矩阵和空位权重40、50、60、70或80,长度权重1、2、3、4、5或6。两个核苷酸或氨基酸序列之间的相同性百分比也可以使用E.Meyers和W.Miller(CABIOS,4:11-17(1989))的算法确定,该算法已被并入ALIGN程序(版本2.0),使用PAM120权重残基表,空位长度罚分为12,空位罚分为4。另外,两个氨基酸序列之间的百分比相同性可以使用Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.(48):444-453(1970))算法确定,该算法已经结合到GCG软件包(可从<http://www.gcg.com>获得)中的GAP程序中,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,空位权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0062] 本公开内容的核酸和蛋白质序列还可以用作“查询序列”以对公共数据库进行搜索,以例如鉴定相关序列。这类搜索能使用Altschul等,1990,J.Mol.Biol.,215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版本)来运行。可利用NBLAST程序进行BLAST核苷酸搜索(评分=100,字长=12),以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。可利用XBLAST程序进行BLAST蛋白质搜索(评分=50,字长=3),以获得与本发明蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得缺口比对以用于比较目的,可如Altschul等,1997,Nucleic Acids Res.,25(17):3389-3402所述利用缺口BLAST。利用BLAST和缺口BLAST程序时,可使用各程序(如XBLAST和NBLAST)的默认参数。参见<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0063] 本文中所用的术语“药学上可接受的”是指合理医疗判断范围内的这些化合物、材料、组合物和/或剂型,其适用于接触人体和动物的组织、器官和/或体液而不会产生过度毒性、刺激性、过敏反应或与合理的效益/风险比相适应的其它问题或并发症。

[0064] 如本文所用,“药学上可接受的运载体”表示并包括生理上相容的任何和所有溶剂,分散介质,包被,抗细菌剂和抗真菌剂,等渗剂和吸收延迟剂,等等。该组合物可包括药学上可接受的盐,例如酸加成盐或碱加成盐(参见例如Berge等(1977)JPharm Sci 66:1-19)。

[0065] 如本文所用,术语“SEQ ID NO”与术语“序列ID No.”同义。

[0066] 如本文所用,“小RNA”是指非编码RNA,其长度通常小于约200个核苷酸或更少并且具有沉默或干扰功能。在其他实施方式中,小RNA长度为约175个核苷酸或更短,约150个核苷酸或更短,约125个核苷酸或更短,约100个核苷酸或更短,或约75个核苷酸或更短。此类RNA包括微小RNA(miRNA)、小干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)和短发夹RNA(shRNA)。本公开的“小RNA”应能够抑制或敲减靶基因的基因表达,通常通过会导致靶基因mRNA破坏的途径。

[0067] 术语“治疗有效量”是指足够量的本公开的活性剂,以合适的组合物和合适的剂型来治疗或预防患有给定轻病、损伤、疾病或病症的患者中出现的症状、进展或并发症发作。“治疗有效量”取决于患者病症状态或其严重程度、所治疗对象的年龄、体重等。治疗有效量可以根据许多因素中的任何一种而变化,包括例如给药途径,对象的状况,以及本领域技术人员理解的其他因素。

[0068] 如本文所用,术语“治疗载体”包括但不限于慢病毒载体或AAV载体。

[0069] “治疗”旨在靶向疾病状态并对其进行对抗,即改善或预防疾病状态。因此,特定治疗将取决于待靶向的疾病状态以及药物治疗和治疗方法的当前或未来状态。治疗可能具有相关的毒性。

[0070] 术语“治疗”或“处理”通常是指试图改变所治疗的对象的自然进程的干预，并且可以用于预防进行或在临床病理学过程中进行。理想的效果包括但不限于预防疾病的发生或复发，缓解症状，遏制，减少或抑制疾病的任何直接或间接病理后果，改善或缓解疾病状态，以及引起缓解或改善预后。

[0071] 公开方面的描述

[0072] 在一个方面，提供了激活GD T细胞的方法。该方法包括在GD T细胞存在下用编码至少一种遗传元件的病毒传递系统感染靶细胞。在实施方式中，所述至少一种编码的遗传元件包括小RNA，其能够抑制甲羟戊酸途径中涉及的酶生产。在实施方式中，酶是FDPS。在实施方式中，当酶在靶细胞中被抑制时，靶细胞激活GD T细胞。在实施方式中，靶细胞是癌细胞或已经被感染剂感染的细胞。在实施方式中，至少一种编码的遗传元件包括微小RNA或shRNA。

[0073] 在实施方式中，所述至少一种编码的遗传元件包括与下述序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更多百分比相同性的shRNA：

GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACT

TTTT	(SEQ	ID	NO: 1);
GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTT			
T	(SEQ	ID	NO: 2);
GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCTGCCATGTACATGGCTTT			
T	(SEQ	ID	NO: 3); 或
GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTT			
T (SEQ ID NO: 4)。			

[0074] [0074]

[0075] 在优选的实施方式中，shRNA包括

GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACT

TTTT	(SEQ	ID	NO: 1);
GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTT			
T	(SEQ	ID	NO: 2);
GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCTGCCATGTACATGGCTTT			
T	(SEQ	ID	NO: 3); 或
GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTT			
T (SEQ ID NO: 4)。			

[0076] [0076]

[0077] 在另一方面中，所述至少一种编码的遗传元件包括与下述序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更多百分比相同性的微小RNA：

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTG
 CGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCT
 CGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO: 5);
 AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGT
 GAAGCCACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGAC
 TTCAAGGGGCT (SEQ ID NO: 6);
 TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAGGCCACAGA
 TGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTACTGCCTCGGA (SEQ ID NO: 7);
[0078] CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTT
 TGGCCACTGACTGAGCAGAAGGGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCCTGTT
 ACTAGCACTCA (SEQ ID NO: 8); CATCTCCATGGCTGTACCAACCTTGTGGACTTCTCAGCCTCCTCTGCC
 TGTTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTTGGTATCTT
 TCATCTGACCA (SEQ ID NO: 9); 或
 GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTCTCAGCCTCCTCTGCTG
 GTCCCCCTCCCCGAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTCCCTCCCAATGACCGC
 GTCTCGTCG (SEQ ID NO: 10).
[0079] 在优选的实施方式中,微小RNA包括
 AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTG
 CGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCT
 CGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO: 5);
 AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGT
 GAAGCCACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGAC
 TTCAAGGGGCT (SEQ ID NO: 6);
 TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAGGCCACAGA
 TGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTACTGCCTCGGA (SEQ ID NO: 7);
 CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTT
 TGGCCACTGACTGAGCAGAAGGGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCCTGTT

ACTAGCACTCA (SEQ ID NO: 8);
 CATCTCCATGGCTGTACCACCTGTCGGGACTTCTCAGCCTCCTCTGCCTG
 TTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTTGGTATCTTC
 ATCTGACCA (SEQ ID NO: 9); 或
 GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTCTCAGCCTCCTCTGCTG
 GTCCCCCTCCCCGAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTCCCTCCCAATGACCGC
 GTCTTCGTCG (SEQ ID NO: 10)。

[0081] 在另一方面,靶细胞还与氨基二膦酸类药物接触。在优选实施方式中,氨基二膦酸类药物是唑来膦酸。

[0082] 在另一方面,提供了治疗对象的癌症的方法。该方法包括向对象给予治疗有效量的编码至少一种遗传元件的病毒递送系统。在实施方式中,所述至少一种编码的遗传元件包括小RNA,其能够抑制甲羟戊酸途径中涉及的酶生产。在进一步的实施方式中,当在GD T细胞存在下在癌细胞中抑制酶时,癌细胞激活GD T细胞,从而治疗癌症。在实施方式中,酶是FDPS。在实施方式中,至少一种编码的遗传元件包括微小RNA或shRNA。

[0083] 在另一方面,提供了治疗对象的感染疾病的方法。该方法包括向对象给予治疗有效量的编码至少一种遗传元件的病毒递送系统。在实施方式中,所述至少一种编码的遗传元件包括小RNA,其能够抑制甲羟戊酸途径中涉及的酶生产。在进一步的实施方式中,当在GD T细胞存在下并且用感染剂感染的细胞中酶受到抑制时,该受感染的细胞激活GD T细胞,从而治疗受感染的细胞和感染性疾病。在实施方式中,酶是FDPS。在实施方式中,至少一种编码的遗传元件包括微小RNA或shRNA。

[0084] 在实施方式中,所述至少一种编码的遗传元件包括与SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:3;或SEQ ID NO:4具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更多百分比相同性的shRNA。在优选的实施方式中,shRNA包括SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:3;或SEQ ID NO:4。

[0085] 在其他实施方式中,所述至少一种编码的遗传元件包括与下述序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更多百分比相同性的微小RNA:SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:8;SEQ ID NO:9;或SEQ ID NO:10。在优选的实施方式中,微小RNA包括SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:8;SEQ ID NO:9;或SEQ ID NO:10。

[0086] 在另一方面,提供了包含至少一种编码的遗传元件的病毒载体。所述至少一种编码的遗传元件包括小RNA,其能够抑制甲羟戊酸途径中涉及的酶生产。在实施方式中,参与甲羟戊酸途径的酶是法尼基二磷酸合酶(FDPS)。在实施方式中,至少一种编码的遗传元件包括微小RNA或shRNA。

[0087] 在另一方面中,所述至少一种编码的遗传元件包括与SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:3;或SEQ ID NO:4具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少

93%、至少94%、至少95%或更多百分比相同性的shRNA。在优选的实施方式中,shRNA包括SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:3;或SEQ ID NO:4。

[0088] 在另一方面中,所述至少一种编码的遗传元件包括与下述序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更多百分比相同性的微小RNA:SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:8;SEQ ID NO:9;或SEQ ID NO:10。在优选的实施方式中,微小RNA包括SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:8;SEQ ID NO:9;或SEQ ID NO:10。

[0089] 在实施方式中,病毒载体包括可以有效转导小RNA的任何载体。在一些实施方式中,所述病毒载体是慢病毒载体。在其他实施方式中,该病毒载体是腺相关病毒(AAV)载体。

[0090] 在另一方面,病毒载体包括第二编码的遗传元件。在实施方式中,第二遗传元件包括至少一种细胞因子或趋化因子。在实施方式中,所述至少一种细胞因子选自:IL-18, TNF- α , 干扰素- γ , IL-1, IL-2, IL-15, IL-17和IL-12。在实施方式中,至少一种趋化因子是CC趋化因子,CXC趋化因子,CX3趋化因子或XC趋化因子。在进一步的实施方式中,至少一种趋化因子是CC趋化因子RANTES。

[0091] 另一方面,提供了用于表达慢病毒颗粒的慢病毒载体系统。该系统包括慢病毒载体,用于表达包膜蛋白的至少一个包膜质粒,该包膜蛋白经优化用于感染细胞;和至少一种用于表达gag、pol和rev基因的辅助质粒。当将慢病毒载体,至少一个包膜质粒和至少一个辅助质粒转染到包装细胞中时,通过包装细胞产生慢病毒颗粒。在实施方式中,慢病毒颗粒能够感染靶细胞,并抑制靶细胞内甲羟戊酸途径中涉及的酶。在实施方式中,甲羟戊酸途径中涉及的酶是FDPS。在实施方式中,慢病毒载体系统包括用于表达gag和pol基因的第一辅助质粒,和用于表达rev基因的第二辅助质粒。在实施方式中,优选包膜蛋白经优化用于感染靶细胞。在实施方式中,靶细胞是癌细胞。在其他实施方式中,靶细胞是被感染性疾病感染的细胞。

[0092] 癌症

[0093] 本文提供的组合物和方法用于治疗癌症。细胞,组织或靶标可以是癌细胞,癌组织,具癌组织,或者是被诊断出或有发展疾病或病症风险的对象或患者。在某些方面,细胞可以是上皮细胞,内皮细胞,间皮细胞,神经胶质细胞,基质细胞或粘膜细胞。癌细胞群可包括但不限于脑,神经元,血液,子宫内膜,脑膜,食道,肺,心血管,肝脏,淋巴,乳房,骨骼,结缔组织,脂肪,视网膜,甲状腺,腺体,肾上腺,胰腺,胃,肠,肾,膀胱,结肠,前列腺,子宫,卵巢,子宫颈,睾丸,脾脏,皮肤,平滑肌,心肌或横纹肌细胞。在另一方面,癌症包括但不限于星形细胞瘤,急性髓性白血病,间变性大细胞淋巴瘤,急性淋巴细胞白血病,血管肉瘤,B细胞淋巴瘤,伯基特淋巴瘤,乳腺癌,膀胱癌,头颈癌,宫颈癌,慢性淋巴细胞白血病,慢性粒细胞白血病,结直肠癌,子宫内膜癌,食管鳞状细胞癌,尤文氏肉瘤,纤维肉瘤,胶质瘤,胶质母细胞瘤,胃泌素瘤,胃癌,肝母细胞瘤,肝细胞癌,卡波西肉瘤,霍奇金淋巴瘤,喉鳞状细胞癌,喉癌,白血病,平滑肌肉瘤,脂肪瘤,脂肪肉瘤,黑色素瘤,套细胞淋巴瘤,成神经管细胞瘤,间皮瘤,粘液纤维肉瘤,髓样白血病,粘膜相关淋巴组织B细胞淋巴瘤,多发性骨髓瘤,高危骨髓增生异常综合征,鼻咽癌,神经母细胞瘤,神经纤维瘤,高级非霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,肺癌,非小细胞肺癌,卵巢癌,食管癌,骨肉瘤,胰腺癌,嗜铬细胞瘤,前列腺癌,肾

细胞癌,视网膜母细胞瘤,横纹肌肉瘤,唾液腺肿瘤,许旺氏细胞瘤,小细胞肺癌,头颈部鳞状细胞癌,睾丸肿瘤,甲状腺癌,尿路上皮癌和威尔姆氏肿瘤。

[0094] 本文提供的组合物和方法还用于治疗NSCLC(非小细胞肺癌)、小儿恶性肿瘤、由人乳头瘤病毒(HPV)引起或促进的宫颈和其他肿瘤、黑素瘤、巴雷特食道(恶变前综合征)、肾上腺和皮肤癌和自身免疫、肿瘤性皮肤疾病。

[0095] 感染性疾病

[0096] 本文公开的组合物和方法可用于治疗感染性疾病。术语“感染性疾病”包括由感染剂引起的任何疾病。“感染剂”包括任何外源性病原体,包括但不限于细菌,真菌,病毒,支原体和寄生虫。可用本公开内容提供的组合物治疗的感染剂包括任何本领域公认的引起动物发病的感染性生物,包括下述生物体,例如革兰氏阴性或革兰氏阳性球菌或杆菌的细菌,DNA和RNA病毒,包括但不限于DNA病毒如乳头瘤病毒,细小病毒,腺病毒,疱疹病毒和痘苗病毒,以及RNA病毒,如沙粒病毒,冠状病毒,鼻病毒,呼吸道合胞病毒,流感病毒,小核糖核酸病毒,副粘病毒,呼肠孤病毒,逆转录病毒,和弹状病毒。可以用本公开的组合物和方法治疗的真菌的实例包括作为霉菌或酵母样生长的真菌,包括例如引起诸如癣,组织胞浆菌病,芽生菌病,曲霉菌病,隐球菌病,孢子丝菌病,球孢子菌病,副球菌病和念珠菌病等疾病的真菌。本文提供的组合物和方法可用于治疗寄生虫感染,包括但不限于由体细胞绦虫,血吸虫,组织蛔虫,阿米巴和疟原虫,锥虫,利什曼原虫和弓形虫物种引起的感染。

[0097] GD T细胞活化的方法

[0098] 本文提供了用于激活个体中GD T细胞的组合物和方法,以及用于治疗肿瘤和感染性疾病的方法。例如,在实施方式中,本文提供的组合物和方法可用于治疗所有已知癌症的方法,因为活化的GD T细胞包含用于肿瘤免疫监视的天然机制(参见例如:Pauza等2014Frontiers in Immunol.5:687)。同样,在实施方式中,本文提供的组合物和方法可用于治疗感染性疾病,包括但不限于黄病毒,流感病毒,人逆转录病毒,分枝杆菌,疟原虫和各种其他病毒,真菌和细菌感染。(参见例如:Pauza和Cairo,2015 Cell Immunol.296(1))。

[0099] 通常,将载体系统给予个体以用所公开的构建体转染或转导靶细胞群用以降低FDPS的表达,并且在其他实施方式中,用以增加趋化因子或细胞因子的表达。给予和转染/转导可以在体内或离体发生,随后将转染的细胞在后一种情况下给予回对象。

[0100] 给予本公开载体并将本公开构建体转染或转导到对象的细胞中导致FDPS的表达降低,细胞因子或趋化因子的表达增加,IPP的积累,并且在许多情况下,导致遗传修饰的肿瘤细胞的生长速率降低。所有这些特征共同起作用以激活和共定位GD T细胞到肿瘤或感染部位。

[0101] 所公开的方法还可以增加NK细胞识别和破坏肿瘤细胞和/或感染细胞的能力。GD T细胞和NK细胞之间的串扰(crosstalk)是调节免疫和炎症反应的重要方面。此外,已知GD T细胞引发树突细胞成熟,募集B细胞和巨噬细胞,并参与多种细胞溶解活性,例如干扰素- γ 和TNF- α 的分泌。

[0102] 在实施方式中,本文提供的公开的组合物和方法包括用于在肿瘤或感染性疾病病理部位激活GD T细胞的基因疗法形式。在一个方面,本文提供的组合物和方法通过促进特定细胞因子的产生来激活GD T细胞并支持它们的增殖、分化和功能能力,所述特定细胞因子是能够杀死癌细胞或治疗感染性疾病的细胞溶解活性所需的。

[0103] 在实施方式中,基因治疗序列(例如,FDPS shRNA)由治疗载体携带,包括但不限于病毒载体,例如慢病毒或腺相关病毒,尽管其他病毒载体也可以是合适的。基因治疗构建体也可以以DNA或RNA的形式递送,包括但不限于质粒形式。在实施方式中,所公开的基因治疗构建体还可以以蛋白质-核酸复合物或脂质核酸复合物和这些制剂的混合物的形式递送。例如,蛋白质-核酸复合物可以包含与阳离子肽如赖氨酸和精氨酸的复合物中的目标核酸。脂质-核酸复合物可包含脂质乳液,胶束,脂质体和/或中性和阳离子脂质的混合物,例如DOTMA, DOSPA, DOTAP和DMRIE。

[0104] 在实施方式中,治疗性载体可包含单一构建体或至少两种,至少三种,至少四种或至少五种不同构建体。当载体中存在多于一种构建体时,构建体可以是相同的,或者它们可以是不同的。例如,构建体可以在它们的启动子、整合元件的存在或不存在和/或它们的序列方面不同。在一些实施方式中,治疗载体将包含编码能够敲减FDPS表达的小RNA的至少一种构建体。在实施方式中,治疗载体还将编码特定细胞因子和/或趋化因子,包括但不限于TNF- α ,干扰素- γ ,IL-1,IL-2,IL-15,IL-17,IL-18或IL-12。在一些实施方式中,单个构建体可编码能够敲减FDPS和特定细胞因子或趋化因子,包括但不限于TNF- α ,干扰素- γ ,IL-1,IL-2,IL-15,IL-17,IL-18或IL-12的表达的小RNA。

[0105] 在实施方式中,病毒载体可以引入整合到宿主染色体中的核酸构建体。或者,瞬时递送载体可用于防止染色体整合并限制基因治疗构建体的寿命。

[0106] 在实施方式中,所公开的构建体和载体包含短同源区RNA(“shRNA”),微小RNA(“miRNA”)或能够降低或敲减FDPS和/或香叶基焦磷酸合酶(“GPPS”)和/或法尼基转移酶(“FT”)基因的表达的siRNA。通过下调控制类固醇和类异戊二烯合成的这些基因,异戊烯焦磷酸(“IPP”)水平升高。IPP的升高和积累是增加GD T细胞活化的已知机制。此外,这些焦磷酸合酶基因的下调消除了炎性体功能的重要负调节剂,这继而导致对GD T细胞活化和效应细胞功能重要的细胞因子的表达增加。

[0107] 在实施方式中,所公开的构建体受特异性启动子调节,能够产生白细胞介素-2和/或白细胞介素-15以维持GD T细胞增殖。另外,所公开的构建体可以通过特异性启动子调节,能够产生GD T细胞分化和获得所有效应细胞功能所需的白细胞介素-1 β 和/或白细胞介素-18和/或干扰素- γ 。理想的效应细胞功能包括对肿瘤和/或感染细胞的直接细胞毒性细胞杀伤的能力,有益细胞因子和/或趋化因子的分泌能力,使识别癌细胞或感染细胞所需的NK受体的表达增加的能力,以及使结合靶向抗体以使GD T细胞与癌细胞或感染的细胞靶标共定位所需的Fc受体的表达增加的能力。

[0108] 在实施方式中,所公开的方法激活GD T细胞,导致NK细胞攻击和破坏癌细胞、肿瘤或感染细胞的能力增加的间接作用。NK细胞的活化需要刺激GD T细胞增殖和分化,并表达4-1BBL共刺激配体,其为与NK细胞上的4-1BB共刺激受体配合所需。这种形式的串扰被认为是激活NK细胞的重要机制,并且在此通过所公开的方法和组合物的作用实现。

[0109] 另一方面,GD T细胞和NK细胞之间的串扰是消除在患病组织中累积的炎性树突细胞的重要机制。单独地,GD T细胞和NK细胞都不能破坏树突细胞,但是一旦发生上述串扰相互作用,NK细胞就会被改变以对炎性树突细胞产生细胞毒性。这种免疫调节机制取决于GD T细胞的强烈激活和增殖。

[0110] 在实施方式中,所公开的用于激活GD T细胞的方法还包括抑制病理性炎症反应的

步骤,所述病理性炎症反应可包括导致动脉粥样硬化的细胞增殖,刺激肿瘤生长的慢性免疫激活,自身免疫疾病,包括牛皮癣和表皮中的其他表现,中枢神经系统的炎症疾病,关节炎和不受调节的免疫反应的其他疾病。

[0111] 在实施方式中,治疗载体与氨基二膦酸类药物(ABP)药物同时给予以实现 $\gamma\delta$ T细胞的协同激活。协同作用可以允许交替、改变或减少剂量的ABP,并且可以减少对ABP的不良反应,包括急性炎症反应和慢性疾病。

[0112] 用于GD T细胞激活的构建体

[0113] FDPS的抑制导致IPP积累,导致V82+GD T细胞的活化和IL-18的表达,这在激活GD T细胞中也是重要的。法尼基转移酶的抑制导致蛋白质的异戊烯化降低。所公开的构建体可以被转染或转导到特定的靶细胞中,如肿瘤细胞或感染的细胞,在这里它们可以表达RNA序列(即siRNA, shRNA或microRNA),其将抑制FDPS的翻译并编码和表达细胞毒性细胞因子或趋化因子。

[0114] 本文公开了用于降低FDPS和/或FT的表达,增加细胞因子的表达和增加包括RANTES的趋化因子的表达的构建体。例如,在一些实施方式中,构建体可编码干扰素- γ ,IL-1,IL-2,IL-15,IL-17,IL-18或IL-12。

[0115] 细胞因子和趋化因子的表达,如上面列出的那些,将导致肿瘤细胞或感染病原生物的细胞的局部细胞毒性破坏。因此,肿瘤细胞或感染的细胞表达这些构建体将产生协助其自身的破坏的不需要的细胞。

[0116] 同样,如果公开的构建体在肿瘤细胞或感染细胞中表达,则降低FDPS和FT的表达将导致GD T细胞活化并募集到肿瘤部位或细胞感染部位。增加RANTES的表达将进一步将GD T细胞吸引到预期的组织位置。因为GD T细胞可以杀伤广泛的上皮来源的肿瘤以及许多白血病和淋巴瘤,并且还能够产生高水平的抗肿瘤细胞因子IFN γ ,将GD T细胞募集到肿瘤部位可以是诱导抗肿瘤免疫力的特别有效的手段。

[0117] FDPS的表达降低可通过shRNA,微小RNA, siRNA或本领域已知的其他方法实现。例如,根据SEQ ID NO:1、2、3或4的shRNA或其变体可用于所公开的构建体和方法中,该示例不是限制性的。用于降低FDPS和FT的表达的RNA的编码区以及细胞因子和趋化因子的编码区可以在相同的构建体中或在不同的构建体上。

[0118] 用于产生包括小RNA的重组多肽或基因调节分子的经典方法是使用稳定的表达构建体。这些构建体基于转导的表达质粒(或其至少一部分)经染色体整合到宿主细胞的基因组中,短期质粒转染或具有有限半衰期的非整合病毒载体。基因整合的位点通常是随机的,并且在任何特定位点整合的基因的数量和比例通常是不可预测的;同样,非整合质粒或病毒载体也产生核DNA,但这些物质通常缺乏DNA复制和连续维持所需的序列。因此,依赖于染色体整合的构建体导致可能超过治疗间隔的重组基因的永久维持。

[0119] 用于基因表达的稳定表达构建体的替代方案是瞬时表达构建体。后一种基因表达构建体的表达基于非整合的质粒,因此当细胞经历分裂或质粒载体被内源性核酸酶破坏时,表达通常会丢失。

[0120] 所公开的构建体优选是瞬时表达的附加型构建体。游离构建体随时间降解或稀释,使得它们不会对对象的基因组进行永久性改变,也不会将它们整合到靶细胞的染色体中。游离型复制过程通常包括宿主细胞复制机制和病毒反式作用因子。

[0121] 避免染色体整合减少了体内基因递送的某些障碍。然而,即使是整合缺陷构建体也可以具有整合的背景频率,并且任何DNA分子都可以发现与宿主序列重组的罕见同源性;但这些整合率非常罕见,通常没有临床意义。

[0122] 因此,在一些实施方式中,所公开的载体在约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、或约12周的时期内支持活性基因和/或小RNA递送。在一些实施方式中,所公开的载体在约1个月,2个月,3个月,4个月,5个月,6个月,7个月,8个月,9个月,10个月,11个月,12个月或更长的时期内支持活性基因和/或小RNA递送。这些时间段的任何组合也可用于本发明的方法,例如1个月和1周,或3个月和2个星期。

[0123] 然而,在一些实施方式中,构建体包含依赖于逆转录病毒整合酶基因的整合元件,使得构建体整合到对象的染色体中。逆转录和转座是移动遗传元件整合或插入染色体的机制的另外的例子。质粒可以通过重组整合到染色体中,并且基因编辑技术(包括CRISPR和TALEN)利用引导RNA序列并通过基因转换机制改变染色体基因座。

[0124] 构建体可包含特异性启动子,用于表达参与维持GD T细胞的细胞因子(即IL-2,IL-7,IL-17和IL-15)。例如,可以纳入公开的构建体中的启动子包括但不限于TATA-盒启动子,CpG-盒启动子,CCAAT-盒启动子,TTGACA-盒启动子,BRE-盒启动子,INR-盒启动子,AT-基启动子,CG基启动子,ATCG-紧密启动子,ATCG-平衡启动子,中ATCG-启动子,低ATCG启动子,低AT启动子,低CG启动子,AT-刺突启动子和CG-刺突启动子。参见Gagniuc和Ionescu-Tirgoviste,真核基因组可以展示多达10种通用类别的基因启动子(Eukaryotic genomes may exhibit up to 10 generic classes of gene promoters),BMC GENOMICS 13:512(2012)。

[0125] 治疗载体

[0126] 构建体可以通过已知的转染和/或转导载体递送,包括但不限于慢病毒载体,腺相关病毒,痘病毒,疱疹病毒载体,蛋白质和/或脂质复合物,脂质体,胶束等。

[0127] 病毒载体可以优先靶向可用于所公开方法的细胞类型(即肿瘤细胞或骨髓细胞)。由于特定的病毒包膜-宿主细胞受体相互作用和基因表达的病毒机制,病毒载体可用于将基因转导到靶细胞中。结果,病毒载体已被用作将基因转移到许多不同细胞类型中的载体,所述细胞类型包括完整胚胎、受精卵、分离的组织样品、原位组织靶标和培养的细胞系。在细胞中引入和表达外源基因的能力可用于基因表达的研究,细胞系的阐明以及提供治疗干预的潜力,例如基因治疗,诱导多能干细胞的体细胞重编程,以及各类免疫疗法。来自病毒如乳多空病毒科(例如牛乳头瘤病毒或BPV)或疱疹病毒科(例如Epstein Barr病毒或EBV)或嗜肝DNA病毒科(例如乙型肝炎病毒或HBV)或包括牛痘的痘病毒载体的病毒成分可用于所公开的载体中。

[0128] 慢病毒载体是所公开的组合物和方法的优选载体类型,但本公开内容不特别限于慢病毒载体。慢病毒是可以将大量的病毒核酸传递到宿主细胞中的一类病毒。慢病毒的特征在于具有感染/转导非分裂细胞的独特能力,并且在转导后,慢病毒将它们的核酸整合到宿主细胞的染色体中。

[0129] 传染性慢病毒有编码毒力蛋白的三个主要基因gag, pol和env,以及两个调控基因,包括tat和rev。取决于特定血清型和病毒,可能存在编码参与调节、合成和/或加工病毒核酸和其他复制功能的蛋白质的其他辅助基因。

[0130] 此外,慢病毒包含长末端重复(LTR)区域,其可以是约600nt长。LTR可以分段为U3、R和U5区域。LTR可以通过整合酶的作用介导逆转录病毒DNA整合到宿主染色体中。或者,在没有功能性整合酶的情况下,LTR可用于使病毒核酸环化。

[0131] 参与慢病毒复制早期阶段的病毒蛋白包括逆转录酶和整合酶。逆转录酶是病毒编码的RNA依赖性DNA聚合酶。该酶使用病毒RNA基因组作为合成互补DNA拷贝的模板。逆转录酶还具有RNA酶H活性以破坏RNA模板。整合酶结合宿主DNA和逆转录酶产生的病毒cDNA。整合酶在将病毒基因组插入宿主DNA之前处理LTR。Tat在转录过程中充当反式激活剂以增强起始和延伸。rev反应元件在转录后起作用,调节mRNA剪接并转运至细胞质。

[0132] 通常,病毒载体包含糖蛋白,并且各种糖蛋白可以提供特异性亲和力。例如,VSVG肽可以增加向骨髓细胞中的转染。或者,病毒载体还可以具有与其壳肽连接的靶向部分,例如抗体。靶向抗体可以对肿瘤上过表达的抗原具有特异性,例如HER-2,PSA,CEA,M2-PK和CA19-9。

[0133] 其他病毒载体特异性也是本领域已知的,并且可用于靶向特定细胞群。例如,痘病毒载体靶向巨噬细胞和树突细胞。

[0134] 慢病毒载体系统

[0135] 慢病毒病毒体(颗粒)由编码必需病毒蛋白的载体系统表达,以产生病毒体(病毒颗粒)。存在至少一种载体,其含有编码逆转录和整合所必需的慢病毒pol蛋白的核酸序列,其与启动子可操作地连接。在另一个实施方式中,pol蛋白由多种载体表达。还存在含有编码慢病毒gag蛋白的核酸序列的载体,所述慢病毒gag蛋白是形成与启动子可操作连接的病毒衣壳所必需的。在一个实施方式中,该gag核酸序列位于与至少一些pol核酸序列不同的载体上。在另一个实施方式中,gag核酸位于与编码pol蛋白的所有pol核酸序列分开的载体上。

[0136] 可以对载体进行许多修饰,其用于产生颗粒以使获得野生型回复体的机会进一步最小化。这些包括但不限于LTR的U3区缺失,tat缺失和基质(MA)缺失。

[0137] gag,poi和env载体不含有包装慢病毒RNA的慢病毒基因组的核苷酸,称为慢病毒包装序列。

[0138] 形成颗粒的载体优选不含有来自表达包膜蛋白的慢病毒基因组的核酸序列。优选地,使用含有编码与启动子可操作连接的包膜蛋白的核酸序列的单独载体。该env载体也不含慢病毒包装序列。在一个实施方式中,env核酸序列编码慢病毒包膜蛋白。

[0139] 在另一个实施方式中,包膜蛋白不是来自慢病毒,而是来自不同的病毒。所得颗粒称为假型颗粒。通过适当选择包膜,可以“感染”几乎任何细胞。例如,可以使用编码靶向内吞区室的包膜蛋白的env基因,例如下述病毒的基因:流感病毒,VSV-G,α病毒(西门利克森林病毒,辛德毕斯病毒),沙粒病毒(淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒),黄病毒(蜱传脑炎病毒,登革热病毒,丙型肝炎病毒,GB病毒),弹状病毒(水疱性口炎病毒,狂犬病病毒),副粘病毒(腮腺炎或麻疹)和正粘病毒(流感病毒)。可以优选使用的其他包膜包括来自Moloney白血病病毒例如MLV-E,MLV-A和GALV的那些。当宿主细胞是原代细胞时,后者的包膜是特别优选的。可以根据所需的宿主细胞选择其他包膜蛋白。例如,靶向特定受体如多巴胺受体可用于脑递送。另一个靶标可以是血管内皮。可以使用丝状病毒包膜靶向这些细胞。例如,埃博拉病毒GP通过转录后修饰成为GP和GP₂糖蛋白。在另一个实施方式中,可以使用具有假型包膜

的不同的慢病毒衣壳(例如,FIV或SHIV[美国专利号5,654,195])。SHIV假型载体可以容易地用于动物模型,例如猴子。

[0140] 如本文详述的,慢病毒载体系统通常包括至少一种辅助质粒,其包含gag, pol或rev基因中的至少一种。可以在单独质粒上提供gag, pol和rev基因中的每一个,或者可以在同一质粒上一起提供一个或多个基因。在一个实施方式中,gag, pol和rev基因在相同质粒上提供(例如,图2)。在另一个实施方式中,gag和pol基因在第一质粒上提供,rev基因在第二质粒上提供(例如,图3)。因此,3-载体和4-载体系统均可用于产生慢病毒,如实施例部分和本文其他地方所述。将治疗载体,包膜质粒和至少一种辅助质粒转染到包装细胞系中。包装细胞系的非限制性实例是293T/17HEK细胞系。当将治疗载体,包膜质粒和至少一种辅助质粒转染到包装细胞系中时,最终产生慢病毒颗粒。

[0141] 另一方面,公开了用于表达慢病毒颗粒的慢病毒载体系统。该系统包括如本文所述的慢病毒载体;用于表达经优化用于感染细胞的包膜蛋白的包膜质粒;和用于表达gag, pol和rev基因的至少一种辅助质粒,其中当慢病毒载体、包膜质粒和至少一种辅助质粒转染到包装细胞系中时,通过包装细胞系产生慢病毒颗粒,其中,慢病毒颗粒能够抑制趋化因子受体CCR5的产生或能靶向HIV RNA序列。

[0142] 在另一方面,并且如图2中详述,慢病毒载体(其在本文中也称为治疗载体)可包括以下元件:杂合5'长末端重复序列(RSV/5'LTR)(SEQ ID NO:11-12),Psi序列(RNA包装位点)(SEQ ID NO:13),RRE(Rev-响应元件)(SEQ ID NO:14),cPPT(聚嘌呤区)(SEQ ID NO:15),H1启动子(SEQ ID NO:16),FDPS shRNA(SEQ ID NO:1,2,3,4),土拨鼠转录后调控元件(WPRE)(SEQ ID NO:17)和3'LTR(SEQ ID NO:18)。在另一方面,通过取代、缺失、添加或突变的序列变异可用于修饰本文的序列参考。

[0143] 另一方面,如本文所详述,辅助质粒已被设计为包括以下元件:CAG启动子(SEQ ID NO:19);HIV组件gag(SEQ ID NO:20);HIV组件pol(SEQ ID NO:21);HIV Int(SEQ ID NO:22);HIV RRE(SEQ ID NO:23);和HIV Rev(SEQ ID NO:24)。另一方面,可以修饰辅助质粒以包括用于表达gag和pol基因的第一辅助质粒,和用于表达rev基因的第二和单独的质粒。在另一方面,通过取代、缺失、添加或突变的序列变异可用于修饰本文的序列参考。

[0144] 另一方面,如本文所详述,包膜质粒被设计为包括从左到右的以下元件:RNA聚合酶II启动子(CMV)(SEQ ID NO:25)和水疱性口炎病毒G糖蛋白(VSV-G)(SEQ ID NO:26)。在另一方面,通过取代、缺失、添加或突变的序列变异可用于修饰本文的序列参考。

[0145] 在另一个方面,用于慢病毒包装的质粒可以用相似的元件修饰,并且可以在不丧失载体功能的情况下去除内含子序列。例如,以下元件可以代替包含包装系统的质粒中的相似元件:延伸因子-1(EF-1),磷酸甘油酸激酶(PGK)和泛素C(UbC)启动子可以取代CMV或CAG启动子。SV40聚A和bGH聚A可以代替兔β球蛋白聚A。辅助质粒中的HIV序列可以由不同的HIV菌株或进化枝构建。VSV-G糖蛋白可被下述病毒的膜糖蛋白取代:猫内源性病毒(RD114),长臂猿白血病病毒(GALV),狂犬病毒(FUG),淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV),甲型鸡瘟流感病毒(FPV),罗斯河甲病毒(RRV),鼠白血病病毒10A1(MLV)或埃博拉病毒(EboV)。

[0146] 值得注意的是,慢病毒包装系统可以商业获得(例如,来自马里兰州罗克维尔的OriGene技术公司的Lenti-vpak包装试剂盒),并且也可以如本文所述进行设计。此外,替代

或修改慢病毒包装系统的各方面以改善任何数量的相关因素(包括慢病毒颗粒的生产效率)在本领域技术人员的技能范围内。

[0147] 剂量和剂型

[0148] 所公开的载体允许感兴趣的基因或序列的短期、中期或长期表达以及所公开载体的附加型维持。因此,给药方案可以根据所治疗的病症和给药方法而变化。

[0149] 在一个实施方式中,可以以不同剂量向需要的对象给予转导载体。具体地,可以向对象给予大约 $\geq 10^6$ 个感染剂量(其中平均需要1剂量以转导1个靶细胞)。更具体地,可以向对象给予约 $\geq 10^7$ 、约 $\geq 10^8$ 、约 $\geq 10^9$ 、或约 $\geq 10^{10}$ 个感染剂量,或这些值之间的任何数量的剂量。转导载体剂量的上限将针对每种疾病指征来确定,并且将取决于每个单独产品或产品批次的毒性/安全性概况。

[0150] 另外,本公开的载体可以定期给予,例如一天一次或两次,或任何其他合适的时间段。例如,载体可以每周一次,每隔一周一次,每三周一次,每月一次,每隔一个月,每三个月,每六个月,每九个月,每年一次,每十八个月,每两年,每三十个月或每三年一次给予有需要的对象。

[0151] 在一个实施方式中,所公开的载体作为药物组合物给予。在一些实施方式中,包含所公开的载体的药物组合物可以配制成多种剂型,包括但不限于用于临床应用的鼻,肺,口服,局部或肠胃外剂型。每种剂型可包含各种增溶剂,崩解剂,表面活性剂,填充剂,增稠剂,粘合剂,稀释剂如润湿剂或其它药学上可接受的赋形剂。包含载体的药物组合物也可以配制用于注射、吹入、输注或皮内暴露。例如,可注射制剂可以在合适的pH和张力下在水性或非水性溶液中包含所公开的载体。

[0152] 所公开的载体可以通过直接注射到肿瘤部位或感染部位而给予对象。在一些实施方式中,载体可以全身给予。在一些实施方式中,载体可以通过引导插管给予紧邻肿瘤或感染部位周围的组织。

[0153] 所公开的载体组合物可以使用任何药学上可接受的方法给予,例如鼻内,口腔,舌下,口服,直肠,眼,肠胃外(静脉内,皮内,肌肉内,皮下,腹膜内),经肺,阴道内,局部(locally)给予,局部(topically)给予,在划痕后局部给予,经粘膜给予,通过气溶胶,在半固体培养基如琼脂糖或明胶中,或通过口腔或鼻腔喷雾制剂。

[0154] 此外,所公开的载体组合物可以配制成任何药学上可接受的剂型,例如固体剂型,片剂,丸剂,锭剂,胶囊,液体分散体,凝胶,气溶胶,肺气雾剂,鼻气雾剂,软膏,乳膏,半-固体剂型,溶液,乳液和悬浮液。此外,组合物可以是控释制剂,持续释放制剂,速释制剂或其任何组合。此外,组合物可以是透皮递送系统。

[0155] 在一些实施方式中,包含载体的药物组合物可以配制成用于口服给药的固体剂型,并且固体剂型可以是粉末,颗粒,胶囊,片剂或丸剂。在一些实施方式中,固体剂型可包括一种或多种赋形剂,例如碳酸钙,淀粉,蔗糖,乳糖,微晶纤维素或明胶。此外,除赋形剂外,固体剂型还可包括润滑剂,例如滑石或硬脂酸镁。在一些实施方式中,口服剂型可以是立即释放或调节释放形式。调节释放剂型包括控释或延长释放,肠释放等。调节释放剂型中使用的赋形剂是本领域普通技术人员公知的。

[0156] 在进一步的实施方式中,包含载体的药物组合物可以配制成舌下或口含剂型。这样的剂型包括经舌下给予的舌下片剂或溶液组合物,和放置在脸颊和牙龈之间口腔片剂。

[0157] 在一些实施方式中,包含载体的药物组合物可以配制成为鼻剂型。本发明的该剂型包含用于鼻腔递送的溶液,悬浮液和凝胶组合物。

[0158] 在一些实施方式中,包含载体的药物组合物可以配制成为用于口服给药的液体剂型,例如悬浮液,乳液或糖浆。在一些实施方式中,除常用的简单稀释剂如水和液体石蜡外,液体剂型还可包括各种赋形剂,如保湿剂,甜味剂,芳香剂或防腐剂。在特定的实施方式中,可以将包含载体的组合物配制成为适合给予儿科患者。

[0159] 在一些实施方式中,药物组合物可以配制成为用于肠胃外给药的剂型,例如无菌水溶液、悬浮液、乳液、非水溶液或栓剂。在一些实施方式中,溶液或悬浮液可包括丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油或可注射的酯如油酸乙酯。

[0160] 药物组合物的剂量可以根据患者的体重、年龄、性别、给药时间和方式,排泄率和疾病的严重程度而变化。

[0161] 在一些实施方式中,癌症的治疗通过使用针或血管内插管将所公开的载体构建体直接注射到肿瘤中来实现。在一些实施方式中,通过静脉或动脉插管或注射、皮内递送、肌内递送或注射到疾病部位附近的引流器官(organ)中将所公开的载体给予到脑脊髓液、血液或淋巴循环中。

[0162] 给出以下实施例以说明本发明。然而,应该理解的是,本发明不限于这些实施例中描述的具体病症或细节。本文引用的所有印刷出版物均通过引用具体纳入。

[0163] 实施例

[0164] 实施例1:慢病毒载体系统的开发

[0165] 开发了慢病毒载体系统,如图4(环化形式)所总结。在用治疗载体、包膜质粒和辅助质粒转染后,在293T/17HEK细胞(购自弗吉尼亚州玛纳萨斯的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection))中产生慢病毒颗粒。产生功能性病毒颗粒的293T/17HEK细胞的转染,使用试剂聚(乙烯亚胺)(PEI)来提高质粒DNA摄取的效率。最初将质粒和DNA分别加入不含血清的培养基中,比例为3:1(PEI与DNA的质量比)。2-3天后,收集细胞培养基,通过高速离心和/或过滤然后阴离子交换色谱来纯化慢病毒颗粒。慢病毒颗粒的浓度可以用转导单位/ml(TU/ml)表示。通过测量培养液中的HIV p24水平(p24蛋白掺入慢病毒颗粒),通过定量PCR测量每个细胞的病毒DNA拷贝数,或通过感染细胞和使用光(如果载体编码荧光素酶或荧光蛋白标记物)来完成TU的测定。

[0166] 如上所述,设计了3-载体系统(即2-载体慢病毒包装系统)用于生产慢病毒颗粒。3载体系统的示意图如图2所示。简而言之,并且参考图2,最顶部的载体是辅助质粒,在该情况下,其包括Rev。出现在图2中间的载体是包膜质粒。最下面的载体是治疗载体,如本文所述。

[0167] 更具体地参考图2,辅助+Rev质粒包括CAG增强子(SEQ ID NO:27);CAG启动子(SEQ ID NO:19);鸡β肌动蛋白内含子(SEQ ID NO:28);HIV gag(SEQ ID NO:20);HIV Pol(SEQ ID NO:21);HIV Int(SEQ ID NO:22);HIV RRE(SEQ ID NO:23);HIV Rev(SEQ ID NO:24);和兔β球蛋白聚A(SEQ ID NO:29)。

[0168] 包膜质粒包括CMV启动子(SEQ ID NO:25);β球蛋白内含子(SEQ ID NO:30);VSV-G(SEQ ID NO:28);和兔β球蛋白聚A(SEQ ID NO:31)。

[0169] 合成包含辅助(+Rev)和包膜质粒的2-载体慢病毒包装系统。

[0170] 材料和方法：

[0171] 辅助质粒的构建；通过对来自含有Gag,Pol和整合酶基因的pNL4-3 HIV质粒(NIH Aids试剂项目)的DNA片段进行初始PCR扩增来构建辅助质粒。设计引物以用EcoRI和NotI限制性位点扩增片段，其可用于插入pCDNA3质粒(英杰(Invitrogen)公司)中的相同位点。正向引物是(5' -TAAGCAGAATTCATGAATTGCCAGGAAGAT-3') (SEQ ID NO:32)，反向引物是(5' -CCATACAATGAATGGACACTAGGCAGGCCGACGAAT-3') (SEQ ID NO:33)。

[0172] Gag,Pol,整合酶片段的序列如下所示：

GAATTCATGAATTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAATGATAGGGGG
AATTGGAGGTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGACTCATAGAAAT
CTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAA
CATATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACTTAAATTCCC
ATTAGTCCTATTGAGACTGTACCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGATGGC
CCAAAAGTTAAACAATGCCATTGACAGAAGAAAAATAAAAGCATTAGTA
GAAATTGTACAGAAATGGAAAAGGAAGGAAAAATTCAAAAATTGGCCT
GAAAATCCATACAATACTCCAGTATTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACT
AAATGGAGAAAATTAGTAGATTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGAT
TTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCAACATCCTGCAGGGTAAACAGAAA
AAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGCGATGCATATTTTCAGTTCCCTAG
ATAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTACCATACCTAGTATAAACATGA
GACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTCCACAGGGATGGAAAGG
ATCACCAAGCAATATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTAGAGCCTTTAGA
AAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGATGATTGTATGTAG
GATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACGTAGA

CAACATCTGTTGAGGTGGGGATTACACACCAGACAAAAAACATCAGAAA
GAACCTCCATTCCCTTGGATGGGTATGAACCTCCATCCTGATAAATGGACAG
TACAGCCTATAGTGCTGCCAGAAAAGGCAGCTGGACTGTCAATGACATAC
AGAAATTAGTGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTATGCAGGGATTA
AAGTAAGGCAATTATGTAAACTCTTAGGGAACCAAAGCACTAACAGAAG
TAGTACCACTAACAGAAGCAGAGCTAGAACTGGCAGAAAACAGGGAG
ATTCTAAAAGAACCGGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAAGACTTA
ATAGCAGAAATACAGAACGCAGGGCAAGGCCATGGACATATCAAATTAT
CAAGAGCCATTAAAAATCTGAAAACAGGAAAGTATGCAAGAACAGGGT
GCCACACTAATGATGTGAAACAATTACAGAGGCAGTACAAAAAATAGCC
ACAGAAAGCATAGTAATATGGGAAAGACTCCTAAATTAAATTACCCATA
CAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTG
GATTCTGAGTGGAGTTGTCAATACCCCTCCCTAGTGAAGTTATGGTAC
CAGTTAGAGAAAGAACCCATAATTAGGAGCAGAAACTTCTATGTAGATGGG
GCAGCCAATAGGAAACTAAATTAGGAAAGCAGGATATGTAACGTACAG
AGGAAGACAAAAAGTTGTCCTAACGGACACAACAAATCAGAACAGACTGA
GTTACAAGCAATTCTAGCTTGCAGGATTGGGATTAGAAGTAAACATA
GTGACAGACTCACAATATGCATTGGAACATTCAAGCACAACCAAGATAAG
AGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATAAAAAGGAA
AAAGTCTACCTGGCATGGTACCGACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAA
CAAGTAGATAAAATTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTTAGATG
GAATAGATAAGGCCAAGAAGAACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGA
GCAATGGCTAGTGATTTAACCTACCACCTGTAGTAGCAAAAGAAATAGTA
GCCAGCTGTGATAATGTCAGCTAAAGGGGAAGCCATGCATGGACAAGTA
GACTGTAGCCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTAGAAGGAAA
GTTATCTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATATAGAAGCAGAAGTA
ATTCCAGCAGAGACAGGGCAAGAACAGCATACTTCCTCTTAAATTAGCA
GGAAGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTTCACC
AGTACTACAGTTAAGGCCGCTGTTGGTGGCGGGGATCAAGCAGGAATT
GGCATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAA

[0174]

GAATTAAAGAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAG
 ACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCCACAATTAAAAGAAAAGGGGGG
 ATTGGGGGGTACAGTGCAGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGA
 CATAACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTCG
 [0175] GGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTGGAAAGGACCAGCAAAGCT
 CCTCTGGAAAGGTGAAGGGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTACATAAA
 AGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTATGGAAAACAGA
 TGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAA (SEQ ID
 NO: 34)

[0176] 接下来,通过MWG操纵子合成含有具有XbaI和XmaI侧翼限制性位点的Rev、RRE和兔β球蛋白聚A序列的DNA片段。然后将DNA片段在XbaI和XmaI限制性位点处插入质粒中。DNA序列如下所示:

TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAG
 AACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTATCAAAGCAACCCACCTCCAATCCC
 GAGGGGACCCGACAGGCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAG
 ACAGAGACAGATCCATTGATTAGTAGAACGGATCCTGGCACTTATCTGGGA
 CGATCTCGGGAGCCTGTGCCTCTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTC
 TTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACTTCTGGACGCAGGGGTGGGAAGCC
 CTCAAATATTGGTGGAACTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAAT
 AGAGGAGCTTGTTCTGGTCTGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGC
 GCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATA
 GTGCAGCAGCAGAACAACTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGAACAGCATCTG
 TTGCAACTCACAGTCTGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAACCTGGCT
 GTGGAAAGATACTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTCTGGCTGCCA
 AAAATTATGGGACATCATGAAGCCCCTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATA
 AAGGAAATTATTTCTTGCAATAGTGTGTTGAAATTGGTGTCTCTCAC
 TCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTAAAACATCAGAACATGAGTATT
 TGGTTAGAGTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGT
 GGCTATAAAAGAGGTCACTCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGCCATTCTT
 ATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTATATTTGTTTG
 [0177]

TGTTATTTTTCTTAACATCCCTAAAATTTCTTACATGTTACTAGCCA
 GATTTTCCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGCTCTCTTAT
 GAAGATCCCTCGACCTGCAGCCAAAGCTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGT
 TTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATTCCACACAACATACGAGCCGG
 AAGCATAAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATT
 AATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTCCAGTCGGAAACCTGTCGTGCCAG
 [0178] CGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATACTCCGCCCTAACTCCGCC
 CATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGA
 CTAATTTTTTATTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTTGAGCTATT
 CCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTGGAGGCCTAGGCTTGCAAAAAGCT
 AACTTGTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAGCAATAGCATCACAA
 ATTCACAAATAAAGCATTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAA
 CTCATCAATGTATCTTATCAGCGGCCGCCGGG (SEQ ID NO: 35)

[0179] 最后,用CAG增强子/启动子和鸡β肌动蛋白内含子序列替换pCDNA3.1的CMV启动子。通过MWG操纵子合成含有具有MluI和EcoRI侧翼限制性位点的CAG增强子/启动子/内含子序列的DNA片段。然后将DNA片段在MluI和EcoRI限制性位点处插入质粒中。DNA序列如下所示:

ACCGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTATTAGTCATAGC
 CCATATATGGAGTTCCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCT
 GACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCAT
 AGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGG
 TAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC
 CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACAT
 [0180] GACCTTATGGGACTTCCATTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT
 ATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCC
 CCCCCCTCCCCACCCCCAATTTGTATTATTTTAATTATTTGTGCA
 GCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGGGGGGGGCGGG
 GCGAGGGGGCGGGGGCGGGCGAGGCAGGGAGAGGTGCGGGCAGCCAATCAG
 AGCGCGCGCTCCGAAAGTTCTTATGGCGAGGCAGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTCG
 CCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTCG

CCCCGTCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCGCCCCGGCTCTGACTGA
 CCGCGTTACTCCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTCTCCTCCGGGCTG
 TAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCGTTCTTCTGTGGCTGCGTGAAA
 GCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGG
 GGTGCGTGCCTGTGAGCGCTGCGGCGCGCGGGCTTGTGCGCTCCGCG
 CCGCGGCTGTGAGCGCTGCGGCGCGCGGGCTTGTGCGCTCCGCG
 TGTGCGCGAGGGGAGCGCGCCGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGG
 CTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCAGGGTGTGCGTGGGGGGTGAGC
 AGGGGGTGTGGCGCGCGGTCTGGCTGTAACCCCCCCTGCACCCCCCTC
 [0181] CCCGAGTTGCTGAGCACGGCCGGCTTCGGTGCAGGGCTCCGTGCGGGC
 GTGGCGCGGGCTCGCGTGCAGGGCGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGTGC
 CGGGCGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTGGGGAGGGCGC
 GGCAGGCCCCGGAGCGCCGGCGCTGTCGAGGCGCGAGCCGAGCCATT
 GCCTTTATGGTAATCGTGCAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTGCCAAAT
 CTGGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCACCCCCCTCTAGCGGGCGC
 GGGCGAAGCGGTGCGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGCGGGAGGGCCTT
 CGTGCCTCGCCGCGCCGCGTCCCTCTCCATCTCCAGCCTCGGGCTGCC
 GCAGGGGGACGGCTGCCTCGGGGGACGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTT
 CTGGCGTGTGACCGCGGAAATT (SEQ ID NO: 36)

[0182] 构建VSV-G包膜质粒：

[0183] 水泡性口炎印第安纳病毒糖蛋白 (VSV-G) 序列由MWG操纵子合成,具有侧翼EcoRI限制性位点。然后将DNA片段在EcoRI限制性位点插入pCDNA3.1质粒(英杰公司),并使用CMV特异性引物通过测序确定正确的方向。DNA序列如下:

GAATTCATGAAGTGCCTTTGACTTAGCCTTTATTCAATTGGGGTGA
 ATTGCAAGTTACCATAGTTTCCACACAACCAAAAAGGAAACTGGAAAA
 ATGTTCTTCTAATTACCATTATTGCCCGTCAAGCTCAGATTAAATTGGCAT
 [0184] AATGACTTAATAGGCACAGCCTACAAGTCAAAATGCCAAGAGTCACAAG
 GCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCATGCTTCAAATGGGTCACTACTT
 GTGATTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATAAACACATTCCATCCGATCCTT

CACTCCATCTGTAGAACAAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGG
 AACTGGCTGAATCCAGGCTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTG
 ACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTG
 ATGAATACACAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTCATCAACGGAAAATGCA
 GCAATTACATATGCCCACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTA
 TAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTCATGGACATCACCTC
 TTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGAAAGGAGGGCACAGGGTTC
 AGAAGTAACTACTTGCTTATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGCAA
 TACTGCAAGCATTGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTCTGGTCAGATGG
 CTGATAAGGATCTCTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCAGAAGGGTC
 AAGTATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAAGGAC
 GTTGAGAGGATCTTGATTATTCCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCA
 GAGCGGGTCTCCAATCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTGCTCCTAAAAA
 CCCAGGAACCGGTCTGCTTCAACCATAATCAATGGTACCCCTAAAATCTT
 GAGACCAGATACTCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATGG
 TCGGAATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGAACTGTGGATGACTGG
 CACCATATGAAGACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTT
 CAGGATATAAGTTCTTATACATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGA
 TCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTGAAACATCCTCACATTCAAGAC
 GCTGCTTCGCAACTCCTGATGATGAGAGTTATTTTGGTGTACTGGCT
 ATCCAAAAATCCAATCGAGCTTAGAAGGTTGGTCAGTAGTTGGAAAG
 CTCTATTGCCTTTTCTTATCATAGGGTTAACATTGGACTATTCTGGT
 TCTCCGAGTTGGTATCCATCTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGA
 CAGATTATACAGACATAGAGATGAGAATT (SEQ ID NO: 37)

[0185] [0186] 还使用本文所述的方法和材料设计和生产了4-载体系统(即,3-载体慢病毒包装系统)。4载体系统的示意图如图3所示。简而言之,并且参考图3,最顶部的载体是辅助质粒,在该情况下,其不包括Rev。上数第二个载体是单独的Rev质粒。下数第二个载体是包膜质粒。最底部的载体是前述的治疗载体。

[0187] [0188] 部分地参考图2,辅助质粒包括CAG增强子(SEQ ID NO:27);CAG启动子(SEQ ID NO:19);鸡β肌动蛋白内含子(SEQ ID NO:28);HIV gag(SEQ ID NO:20);HIV Pol(SEQ ID NO:21);HIV Int(SEQ ID NO:22);HIV RRE(SEQ ID NO:23);和兔β球蛋白聚A(SEQ ID NO:29)。

[0189] Rev质粒包含RSV启动子(SEQ ID NO:38);HIV Rev(SEQ ID NO:39);和兔β球蛋白聚A(SEQ ID NO:29)。

[0189] 包膜质粒包括CMV启动子(SEQ ID NO:25);β球蛋白内含子(SEQ ID NO:30);VSV-G

(SEQ ID NO:28) ;和兔β球蛋白聚A(SEQ ID NO:29)。

[0190] 合成包含辅助、Rev和包膜质粒的3-载体慢病毒包装系统。

[0191] 材料和方法：

[0192] 无Rev的辅助质粒的构建：

[0193] 通过插入含有RRE和兔β球蛋白聚A序列的DNA片段构建不含Rev的辅助质粒。该序列由MWG操纵子合成，具有侧翼XbaI和XmaI限制性位点。然后将RRE/兔聚Aβ球蛋白序列在XbaI和XmaI限制性位点插入辅助质粒中。DNA序列如下所示：

TCTAGAAGGAGCTTGTTCTGGGTTCTGGGAGCAGCAGGAAGCACT
 ATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCT
 GGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTGCTGAGGGCTATTGAGGCGAACAG
 CATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAAC
 CTGGCTGTGGAAAGATAACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTCCCT
 CTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTGAGCATCTGACTTCTGG
 CTAATAAAAGGAAATTATTTCAATTGCAATAGTGTGTTGAAATTGGTGTGTC
 TCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTAAAACATCAGAATG

[0194] AGTATTGGTTAGAGTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAAC
 AAAGGTGGCTATAAGAGGTATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCC
 ATTCCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTATATT
 TGTTTGTGTTATTTCTTAACATCCCTAAATTTCTTACATGTTTA
 CTAGCCAGATTTCCCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGCCCTCT
 TCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTGGCGTAATCATGGTC
 ATAGCTTTCCCTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAAACATA
 CGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA
 CTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTCCAGTCGGAAACCTGT
 CGTGCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATACTCCGCCCTA
 ACTCCGCCATCCGCCCTAACTCCGCCAGTCCGCCATTCTCCGCC
 ATGGCTGACTAATTTTTATTTATGCAGAGGCCAGGGCGCTCGGCC

[0195] TGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTGGAGGCCTAGGCTTTGC
 AAAAGCTAACTTGTATTGCAGCTATAATGGTTACAAATAAGCAATAG
 CATCACAAATTCAACAAATAAGCATTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTT
 TGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCACCCGGG (SEQ ID NO: 35)

[0196] Rev,质粒的构建：

[0197] RSV启动子和HIV Rev序列由MWG操纵子合成为单个DNA片段，具有侧翼MfeI和XbaI限制性位点。然后将DNA片段在MfeI和XbaI限制性位点插入pCDNA3.1质粒(英杰公司)中，其中CMV启动子被RSV启动子取代。DNA序列如下：

[0198]

CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACTAGGG
 TGTGTTAGGCGAAAAGCGGGGCTCGGTTACCGGTTAGGAGTCCCCTC
 AGGATATAGTAGTTCGCTTGCATAGGGAGGGGGAAATGTAGTCTTATGC
 AATACACTGTAGTCTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTA
 CAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGTAC
 GATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGA
 ACCACTGAATTCCGCATTGCAGAGATAATTGTATTAAAGTGCCTAGCTCGAT
 ACAATAAACGCCATTGACCATTACCCACATTGGTGTGCACCTCCAAGCTCG
 AGCTCGTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTT
 GACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCCTCGAAGCTAGCG
 ATTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAACTCC
 TCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAA
 TCCCGAGGGGACCCGACAGGCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAG
 AGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATCCTTAGCACTTATCT
 GGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTT
 ACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTCTGGGACGCAGGGGTGGGA
 AGCCCTCAAATATTGGTGGAACTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAA
 GAATAGTCTAGA (SEQ ID NO: 40)

[0199] 可以用相似的元件修饰用于2-载体和3-载体包装系统的质粒,并且可以在不损失载体功能的情况下去除内含子序列。例如,以下元件可以替换2载体和3载体包装系统中的类似元件:

[0200] 启动子:延伸因子-1 (EF-1) (SEQ ID NO:41),磷酸甘油酸激酶 (PGK) (SEQ ID NO: 42) 和泛素C (UbC) (SEQ ID NO:43) 可以取代CMV (SEQ ID NO:25) 或CAG启动子 (SEQ ID NO: 19)。这些序列还可以通过添加,取代,缺失或突变而进一步改变。

[0201] 聚A序列:SV40聚A (SEQ ID NO:44) 和bGH聚A (SEQ ID NO:45) 可以取代兔β球蛋白聚A (SEQ ID NO:29)。这些序列还可以通过添加,取代,缺失或突变而进一步改变。

[0202] HIV Gag,Pol和整合酶序列:辅助质粒中的HIV序列可以由不同的HIV菌株或进化枝构建。例如,来自Ba1菌株的HIV Int (SEQ ID NO:22);HIV Gag (SEQ ID NO:20);HIV Pol (SEQ ID NO:21) 可以与本文所述的辅助质粒/辅助+Rev质粒中包含的gag, pol和int序列互换。这些序列还可以通过添加,取代,缺失或突变而进一步改变。

[0203] 包膜:VSV-G糖蛋白可以被来自下述病毒的膜糖蛋白取代:猫内源病毒 (RD114) (SEQ ID NO:46)、长臂猿白血病病毒 (GALV) (SEQ ID NO:47)、狂犬病毒 (FUG) (SEQ ID NO: 48), 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) (SEQ ID NO:49), 甲型鸡瘟流感病毒 (FPV) (SEQ ID NO:50), 罗斯河甲病毒 (RRV) (SEQ ID NO:51), 小鼠白血病病毒 10A1 (MLV) (SEQ ID NO:52), 或埃博拉病毒 (EboV) (SEQ ID NO:53)。这些包膜的序列在本文的序列部分中标识。此外,这些序列还可以通过添加,取代,缺失或突变而进一步改变。

[0204] 总之,可以对3-载体与4-载体系统进行比较和对比,部分如下。3-载体慢病毒载体系统包含:1.辅助质粒:HIV Gag,Pol,整合酶和Rev/Tat;2.包膜质粒:VSV-G/FUG包膜;和3.治疗载体:RSV 5'LTR,Psi包装信号,Gag片段,RRE,Env片段,cPPT,WPRE和3'LTR。4-载体慢病毒载体系统包含:1.辅助质粒:HIV Gag,Pol,和整合酶;2. Rev质粒:Rev;3.包膜质粒:VSV-G/FUG包膜;和4.治疗载体:RSV 5'LTR,Psi包装信号,Gag片段,RRE,Env片段,cPPT,WPRE和3'LTR。与上述元件相对应的序列在本文的序列表部分中标识。

[0205] 实施例2:表达FDPS的慢病毒载体的开发

[0206] 该实施例的目的是开发FDPS慢病毒载体。

[0207] 抑制性RNA设计:使用人类法尼基二磷酸合酶(FDPS) (NM_002004.3) mRNA的序列来搜索潜在的siRNA或shRNA候选物以敲减人细胞中的FDPS水平。潜在的RNA干扰序列选自siRNA或shRNA设计程序选择的候选物,例如来自Broad研究所的GPP网页门户 (<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/>) 或来自Thermo科学公司的BLOCK-iT RNAi设计器 (<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/>)。将单独选择的shRNA序列插入慢病毒载体中,紧邻RNA聚合酶III启动子的3'端以调节shRNA表达,所述启动子例如H1 (SEQ ID NO:16), U6 (SEQ ID NO:54) 或7SK (SEQ ID NO:55)。这些慢病毒shRNA构建体用于转导细胞并测量特定mRNA水平的变化。将最有效降低mRNA水平的shRNA单独包埋在微小RNA骨架内,以允许通过EF-1 α 或CMV RNA聚合酶II启动子表达。microRNA骨架选自mirbase.org。还将RNA序列合成为合成的siRNA寡核苷酸,并在不使用慢病毒载体的情况下直接导入细胞。

[0208] 载体构建:对于FDPS shRNA,通过Eurofins MWG操纵子合成含有BamHI和EcoRI限制性位点的寡核苷酸序列。将重叠的有义和反义寡核苷酸序列混合并在从70摄氏度冷却至室温的过程中退火。用限制酶BamHI和EcoRI在37摄氏度下消化慢病毒载体1小时。通过琼脂糖凝胶电泳纯化消化的慢病毒载体,并使用Thermo科学公司的DNA凝胶提取试剂盒从凝胶中提取。测定DNA浓度,混合载体与寡核苷酸(3:1比例),使其退火,并连接。用T4 DNA连接酶在室温下进行连接反应30分钟。将2.5微升的连接混合物加入到25微升STBL3感受态细菌细胞中。在42摄氏度的热激后实现转化。将细菌细胞涂布在含有氨苄青霉素的琼脂平板上并回收抗药性菌落(表明存在氨苄青霉素抗性质粒),并在LB肉汤中扩增。为了检查寡核苷酸序列的插入,用Thermo科学DNA mini prep试剂盒从收获的细菌培养物中提取质粒DNA。使用用于调节shRNA表达的启动子的特异性引物通过DNA测序验证慢病毒载体中shRNA序列的插入。使用以下靶序列,确定示例性shRNA序列敲减FDPS:

GTCCTGGAGTACAATGCCATT (FDPS 靶序列#1; SEQ ID NO: 56);

GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACT

TTTT (FDPS shRNA 序列#1; SEQ ID NO: 1);

GCAGGGATTCGTTCAGCACTT (FDPS 靶序列#2; SEQ ID NO: 57);

[0209] GCAGGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTAACGAAATCCTGCT
TTTT (FDPS shRNA 序列#2; SEQ ID NO: 2);

GCCATGTACATGGCAGGAATT (FDPS 靶序列#3; SEQ ID NO: 58);

GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCTGCCATGTACATGGCT

TTTT (FDPS shRNA 序列#3; SEQ ID NO: 3);

[0210] GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGT (FDPS 靶序列 #4; SEQ ID NO: 59); 和
GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCT
TTTT (FDPS shRNA 序列#4; SEQ ID NO: 4)。

[0211] 然后将shRNA序列组装入在EF-1 α 启动子控制下的合成的微小RNA (miR)。简言之,从mirbase.org获得如下详述的miR发夹序列,例如miR30,miR21或miR185。19-22聚体shRNA靶序列用于构建合成的miR序列。将miR序列排列为反义靶序列-发夹环序列(对每种微小RNA特异)-正义靶序列。

[0212] 开发了以下miR序列:

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTG
CGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCCTACTGCCT
CGGACTTCAAGGGGCT (miR30 FDPS 序列 #1; SEQ ID NO: 5)

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTG
CGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCCTACTGCCTCG
GACTTCAAGGGGCT (miR30 FDPS 序列#2; SEQ ID NO: 6)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAGCCAC
AGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCCTACTGCCTCGGA (miR30 FDPS
序列#3; SEQ ID NO: 7)

[0213] CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTCTCAGCCTCCTCTG
CTTTGGCCACTGACTGAGCAGAAGGGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCC
TGTTACTAGCACTCA (miR155 FDPS 序列#1; SEQ ID NO: 8)

CATCTCCATGGCTGTACCACCTGTCGGACTTCTCAGCCTCCTCTGC
CTGTTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTGGTATCT
TTCATCTGACCA (miR21 FDPS 序列#1; SEQ ID NO: 9)

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTCTCAGCCTCCTCT
GCTGGTCCCCTCCCCGAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTCCCTCCAATGA
CCCGTCTCGTCG (miR185 FDPS 序列#1; SEQ ID NO: 10)

[0214] 实施例3:通过shRNA#4在THP1单核细胞白血病中敲减FDPS 3天

[0215] 该实施例说明通过表达FDPS shRNA#4的慢病毒 (LV) 敲减THP1单核细胞白血病细胞中的FDPS会刺激 γ 8T细胞中的TNF- α 表达,如图5所示。

[0216] 用LV对照或LV-FDPS shRNA#4转导THP1细胞(1×10^5 个细胞)3天。转导后两天,用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导的THP-1细胞与 5×10^5 个PBMC细胞和IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。用唑来膦酸和IL-2预刺激PBMC细胞11天以扩增V γ 9V82 T细胞。在使用荧光团偶联的抗TCR-V82和抗TNF- α 抗体对V γ 9V82和TNF- α 染色后,通过流式细胞术分析细胞。对活细胞进行门控,并在斑点印迹上选择V82+和TNF- α +细胞。活化的细胞毒

性V γ 9V82T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。没有唑来膦酸时, LV-对照刺激3.1%的表达TNF- α 的V γ 9V82 T细胞并且LV-FDPS shRNA#4刺激5%。用唑来膦酸处理时, LV-对照刺激7.2%的表达TNF- α 的V γ 9V82 T细胞并且LV-FDPS shRNA#4刺激56.2%。

[0217] 实施例4:通过shRNA#4在THP1白血病细胞中敲减FDPS 14天

[0218] 该实施例说明通过表达FDPS shRNA#4的慢病毒 (LV) 敲减THP1白血病细胞中的FDPS持续14天会刺激GD T细胞中的TNF- α 表达,如图6所示。

[0219] 用LV对照或LV-FDPS shRNA#4转导THP1细胞(1×10^5 个细胞)14天。转导后两天,用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导的THP-1细胞与 5×10^5 个PBMC细胞和IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。用唑来膦酸和IL-2预刺激PBMC细胞11天以扩增V γ 9V82 T细胞。在使用荧光团偶联的抗TCR-V82和抗TNF- α 抗体对V γ 9V82和TNF- α 染色后,通过流式细胞术分析细胞。对活细胞进行门控,并在斑点印迹上选择V82+和TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V82T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。没有唑来膦酸时, LV-对照刺激0.9%的表达TNF- α 的V γ 9V82 T细胞并且LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 刺激15.9%。用唑来膦酸处理时, LV-对照刺激4.7%的表达TNF- α 的V γ 9V82 T细胞并且LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 刺激76.2%。

[0220] 实施例5:通过shRNA#1在PC3前列腺癌细胞中敲减FDPS 3天

[0221] 该实施例说明通过表达FDPS shRNA#1的慢病毒 (LV) 敲减PC3前列腺癌细胞中的FDPS持续3天会刺激GD T细胞中的TNF- α 表达,如图7所示。

[0222] 用LV对照或LV-FDPS shRNA#1 (SEQ ID NO:1) 转导PC3细胞3天。转导后两天,用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导的PC3细胞与 5×10^5 个PBMC细胞和IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。用唑来膦酸和IL-2预刺激PBMC细胞11天以扩增V γ 9V82 T细胞。在使用荧光团偶联的抗TCR-V82和抗TNF- α 抗体对V γ 9V82和TNF- α 染色后,通过流式细胞术分析细胞。对活细胞进行门控,并在斑点印迹上选择V82+和TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V82 T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。没有唑来膦酸, LV-对照刺激0.2%的表达TNF- α 的V γ 9V82 T细胞并且LV-FDPS shRNA#1刺激0.5%。用唑来膦酸处理时, LV-对照刺激1.7%的表达TNF- α 的V γ 9V82 T细胞并且LV-FDPS shRNA#1 (SEQ ID NO:1) 刺激32.2%。

[0223] 实施例6:通过shRNA#4在PC3前列腺癌细胞中敲减FDPS 3天

[0224] 该实施例说明通过表达FDPS shRNA#4的慢病毒 (LV) 敲减PC3前列腺癌细胞中的FDPS持续3天会刺激GD T细胞中的TNF- α 表达,如图8所示。

[0225] 用LV对照或LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 转导PC3细胞3天。转导后两天,用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导的PC3细胞与 5×10^5 个PBMC细胞和IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。用唑来膦酸和IL-2预刺激PBMC细胞11天以扩增V γ 9V82 T细胞。在使用荧光团偶联的抗TCR-V82和抗TNF- α 抗体对V γ 9V82和TNF- α 染色后,通过流式细胞术分析细胞。对活细胞进行门控,并在斑点印迹上选择V82+和TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V82 T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。没有唑来膦酸时, LV-对照刺激0.5%的表达TNF- α 的V γ 9V82 T细胞并且LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 刺激1.9%。用唑来膦酸处理时, LV-对照刺激2.1%的表达TNF- α 的V γ 9V82 T细胞并且LV-FDPS shRNA#4刺激28.7%。

[0226] 实施例7:通过shRNA#1和#4在HepG2肝癌细胞中敲减FDPS 3天

[0227] 该实施例说明通过表达FDPS shRNA#1 (SEQ ID NO:1) 和shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 的

慢病毒(LV)敲减HepG2肝癌细胞中的FDPS持续3天会刺激GD T细胞中的TNF- α 表达,如图9所示。

[0228] 用LV对照、LV-FDPS shRNA#1 (SEQ ID NO:1) 或LV-FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 转导HepG2细胞3天。转导后两天,用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导的HepG2细胞与 5×10^5 个PBMC细胞和IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。用唑来膦酸和IL-2预刺激PBMC细胞11天以扩增V γ 9V82T细胞。在使用荧光团偶联的抗TCR-V82和抗TNF- α 抗体对V γ 9V82和TNF- α 染色后,通过流式细胞术分析细胞。对活细胞进行门控,并在斑点印迹上选择V δ 2+和TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V82 T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。没有唑来膦酸时,LV-对照刺激0.4%的表达TNF- α 的V γ 9V82 T细胞并且LV-FDPS shRNA#1 (SEQ ID NO:1) 和#4 (SEQ ID NO:4) 分别刺激0.7%和0.9%。用唑来膦酸处理时,LV-对照刺激6.9%的表达TNF- α 的V γ 9V82 T细胞并且LV-FDPS shRNA#1和#4分别刺激7.6%和21.1%。

[0229] 实施例8:通过微小RNA-30在THP1白血病细胞中敲减FDPS 3天

[0230] 该实施例说明通过表达FDPS靶向合成的微小RNA-30的慢病毒(LV)敲减THP1白血病细胞中的FDPS持续3天会刺激 γ 8T细胞中的TNF- α 表达,如图10所示。

[0231] 用LV对照或LV-miR30 FDPS#1 (SEQ ID NO:5) 转导THP1细胞(1×10^5 细胞)3天。转导后两天,用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导的THP-1细胞与 5×10^5 个PBMC细胞和IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。用唑来膦酸和IL-2预刺激PBMC细胞11天以扩增V γ 9V82 T细胞。在使用荧光团偶联的抗TCR-V82和抗TNF- α 抗体对V γ 9V82和TNF- α 染色后,通过流式细胞术分析细胞。对活细胞进行门控,并在斑点印迹上选择V82+和TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V82 T细胞出现在流式细胞图的右上象限中。没有唑来膦酸时,LV-对照刺激0.2%的表达TNF- α 的V γ 9V82 T细胞并且LV-miR30 FDPS刺激8.1%。用唑来膦酸处理时,LV-对照刺激5.3%的表达TNF- α 的V γ 9V82 T细胞并且LV-miR30FDPS#1 (SEQ ID NO:5) 刺激67.3%。

[0232] 实施例9:由THP-1细胞、培养的人GD T细胞和/或Zometa (Zol) 的混合物产生的E:T比率

[0233] 该实施例证明了将经处理的THP-1单核细胞样肿瘤细胞与培养的人GD T细胞混合的结果,如图11所示。

[0234] 用对照慢病毒载体(LV),抑制法尼基二磷酸合酶基因表达的LV(LV-FDPS),唑来膦酸(Zol)或组合处理单核细胞样细胞系THP-1。如图11所示,图例为:慢病毒对照载体(LV-对照),表达微小RNA以下调FDPS的慢病毒载体(LV-FPPS),Zometa (Zol),Zometa+慢病毒对照(Zol+LV-对照),或Zometa+表达微小RNA以下调FPPS的慢病毒载体(Zol+LV-FPPS)。

[0235] 从匿名供体培养人GD T细胞,并以4:1、2:1或1:1的比例(GD T:THP-1)加入处理的THP-1细胞中4小时。通过荧光测定法测量细胞杀伤。当用LV-FDPS和Zol的组合处理THP-1细胞时,与单独的任一处理相比,GD T细胞的细胞毒性T细胞杀伤大大增加。当单独LV-FDPS处理与单独的Zol处理相比时,LV-FDPS导致更大的杀伤,但是在组合处理后比肿瘤细胞杀伤超过低3倍。比例为4:1下,联合LV-FDPS+Zol处理引起近70%的肿瘤细胞杀伤;这比第二好的处理(仅LV-FDPS)高出3倍多。

[0236] 实施例10-靶向人法尼基二磷酸合酶(FDPS)基因的慢病毒递送的基于shRNA的RNA干扰

[0237] 用含有H1启动子和非靶向或四种不同FDPS shRNA序列的慢病毒载体感染HepG2人肝实质细胞癌细胞,如图12所示。

[0238] 48小时后,从细胞中提取RNA并转化成cDNA。使用SYBR Green和FDPS引物通过定量PCR测定FDPS cDNA的表达。针对每个样品将FDPS表达标准化为肌动蛋白水平。

[0239] 在293T细胞中产生靶向FDPS的慢病毒载体,其含有H1启动子和非靶向序列(5' -G CCGCTTGAGGATAGAGCTCGAGCTCTACAAAGCGGCTTTT-3') (SEQ ID NO:60)

[0240] 或四种不同FDPS shRNA序列之一

GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACT
TTTT (FDPS shRNA 序列 #1; SEQ ID NO: 1);

GCAGGGATTTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCT
TTTT (FDPS shRNA 序列#2; SEQ ID NO: 2);

[0241] GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCTGCCATGTACATGGCT
TTTT (FDPS shRNA 序列#3; SEQ ID NO: 3); 和

GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCT
TTTT

(FDPS shRNA 序列#4; SEQ ID NO: 4)。

[0242] 然后用慢病毒载体感染HepG2人肝实质细胞癌细胞以确定FDPS敲减的功效。48小时后,使用RNeasy RNA分离试剂盒(凯杰(Qiagen)公司)从细胞中提取RNA,并用Superscript VILO cDNA合成试剂盒(Thermo科学公司)转化成cDNA。使用SYBR Green PCR混合物(Thermo科学公司)和FDPS引物(正向引物:5' -AGGAATTGATGGCGAGAAGG-3' (SEQ ID NO:61) 和反向引物:5' -CCCAAAGAGGTCAAGGTAATCA-3' (SEQ ID NO:62))在应用生物系统公司StepOne qPCR机器上通过定量PCR测定FDPS cDNA的表达。针对每个样品,使用肌动蛋白引物(正向引物:5' -AGCGCGCTACAGCTTCA-3' (SEQ ID NO:63) 和反向引物:5' -GGCGACGTAGCACAGCTTCT-3' (SEQ ID NO:64))将FDPS表达标准化为肌动蛋白水平。shCon样品的相对FDPS RNA表达设定为100%。FDPS表达降低85% (FDPS序列#1), 89% (FDPS序列#2), 46% (FDPS序列#3) 和98% (FDPS序列#4)。

[0243] 实施例11-靶向人法尼基二磷酸合酶(FDPS)基因的慢病毒递送的基于miR的RNA干扰

[0244] 如图13所示,用含有H1启动子(SEQ ID NO:16) 和FDPS shRNA#4 (SEQ ID NO:4) 序列或EF-1 α 启动子(SEQ ID NO:41) 和基于miR30的FDPS序列的慢病毒载体感染HepG2人肝实质细胞癌细胞。48小时后,裂解细胞并使用抗FDPS (Thermo科学公司) 和抗肌动蛋白 (Sigma公司) 抗体作为蛋白质上样对照进行免疫印迹。

[0245] 更具体地,用含有H1启动子(SEQ ID NO:16) 和FDPS shRNA序列GCAGAAGGAGGCTGA GAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (FDPS shRNA序列#4; SEQ ID NO:4) 或EF-1 α 启动子(SEQ ID NO:41) 和基于miR30的FDPS序列AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTC AGCCTCCTCTCGGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG GCT(miR30 FDPS序列#1; SEQ ID NO:5) 和AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCC TCCTCTCGGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT

(miR30 FDPS序列#2;SEQ ID NO:6)的慢病毒载体感染HepG2人肝实质细胞癌细胞。

[0246] 48小时后,用NP-40裂解缓冲液裂解细胞,用Bio-Rad蛋白质测定试剂定量蛋白质。将50微克的蛋白质样品在4-12% Bis-Tris凝胶(Thermo科学公司)上电泳并转移至PVDF膜(EMD Millipore公司)。使用抗FDPS(Thermo科学公司)和抗肌动蛋白(Sigma公司)抗体作为蛋白质上样对照进行免疫印迹。抗体与HRP偶联的二抗结合,并使用Immobilon Western ECL试剂(EMD Millipore公司)用Licor c-Digit印迹扫描仪检测。用NIH图像软件定量免疫印迹条带的光密度测定。具有EF-1启动子的LV对照设定为100%。FDPS蛋白表达减少68% (LV-shFDPS#4),43% (LV-miR FDPS#1) 和38% (LV-miR FDPS#3)。

[0247] 实施例12-通过表达FDPS shRNA#4的腺相关病毒(AAV)在HepG2肝癌细胞中敲减FDPS 3天

[0248] 该实施例说明通过表达FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:4)的腺相关病毒(AAV)在HepG2肝癌细胞中敲减FDPS 3天会刺激GD-T细胞中的TNF- α 表达(图14,图B)。

[0249] 用对照或AAV-FDPS shRNA#4(SEQ ID NO:8)转导HepG2细胞3天。转导后两天,用或不用1 μ M唑来膦酸处理细胞。24小时后,将转导的HepG2细胞与 5×10^5 个PBMC细胞和IL-2在圆底96孔板中共培养4小时。用唑来膦酸和IL-2预刺激PBMC细胞11天以扩增V γ 9V δ 2 T细胞。在使用荧光团偶联的抗TCR-V δ 2和抗TNF- α 抗体对V γ 9V δ 2和TNF- α 染色后,通过流式细胞术分析细胞。对活细胞进行门控,并在斑点印迹上选择V δ 2+和TNF- α +细胞。活化的细胞毒性V γ 9V δ 2T细胞出现在流式细胞图的右上象限中(图14,图B)。

[0250] AAV载体构建。将FDPS shRNA序列#4(SEQ ID NO:4)插入pAAV质粒(细胞生物实验室公司(Cell Biolabs))。通过Eurofins MWG操纵子合成含有BamHI和EcoRI限制性位点的FDPS寡核苷酸序列。将重叠的有义和反义寡核苷酸序列混合并在从70摄氏度冷却至室温的过程中退火。用限制酶BamHI和EcoRI在37摄氏度下消化pAAV1小时。通过琼脂糖凝胶电泳纯化消化的pAAV质粒,并使用Thermo科学公司的DNA凝胶提取试剂盒从凝胶中提取。测定DNA浓度,混合载体与寡核苷酸(3:1比例),使其退火,并连接。用T4 DNA连接酶在室温下进行连接反应30分钟。将2.5微升的连接混合物加入到25微升STBL3感受态细菌细胞中。在42摄氏度的热激后实现转化。将细菌细胞涂布在含有氨苄青霉素的琼脂平板上并回收抗药性菌落(表明存在氨苄青霉素抗性质粒),并在LB肉汤中扩增。为了检查寡核苷酸序列的插入,用Thermo科学DNA mini prep试剂盒从收获的细菌培养物中提取质粒DNA。使用用于调节shRNA表达的启动子的特异性引物通过DNA测序验证pAAV质粒中shRNA序列的插入。具有H1启动子(SEQ ID NO:16),shFDPS序列(例如,SEQ ID NO:4),左反向末端重复(左ITR;SEQ ID NO:65)和右反向末端重复(右ITR;SEQ ID NO:66)的示例性AAV载体可以为图14的图A所示。

[0251] 生产AAV颗粒。将AAV-FDPS shRNA质粒与质粒pAAV-RC2(细胞生物实验室公司)和pHelper(细胞生物实验室公司)组合。pAAV-RC2质粒含有Rep和AAV2衣壳基因,pHelper含有腺病毒E2A,E4和VA基因。为了产生AAV颗粒,将这些质粒以1:1:1的比例(pAAV-shFDPS:pAAV-RC2:pHelper)转染到293T细胞中。为了转染150mm培养皿(BD Falcon公司)中的细胞,将10微克每种质粒一起加入1ml DMEM中。在另一个试管中,将60微升转染试剂PEI(1微克/ml)(Polysciences公司)加入1ml DMEM中。将两个试管混合在一起并孵育15分钟。然后将转染混合物加入细胞中,3天后收集细胞。通过在干冰/异丙醇中冷冻/解冻裂解来裂解细胞。将Benzonase核酸酶(Sigma公司)在37摄氏度下加入细胞裂解物中持续30分钟。然后通过在

4摄氏度下以12,000rpm离心15分钟沉淀细胞碎片。收集上清液,然后加入靶细胞中。

[0252] 实施例13-用LV-shFDPS转导并用唑来膦酸处理的细胞中RAP1异戊烯化降低

[0253] 该实施例说明靶向人法尼基二磷酸合酶(FDPS)基因的慢病毒递送的shRNA和唑来膦酸协同抑制法尼基二磷酸产生。

[0254] FDPS是类异戊二烯合成途径中的酶,其催化法尼基二磷酸的产生。通过唑来膦酸抑制FDPS的酶活性或通过shRNA介导的敲减降低蛋白质表达将导致降低的法尼基二磷酸水平。细胞蛋白的法尼基化需要法尼基二磷酸。RAPIA是一种通过法尼基化修饰的蛋白质,可用作细胞法尼基二磷酸酯水平的生物标志物。在用LV-shFDPS单独转导或与唑来膦酸组合后,使用特异性识别减少的RAPIA法尼基化的抗体来测量FDPS活性。用含有FDPS shRNA序列#4的慢病毒载体感染HepG2人肝实质细胞癌细胞。对于唑来膦酸处理的细胞,在最后24小时内加入唑来膦酸(Sigma公司)。48小时后,用NP-40裂解缓冲液裂解细胞,用Bio-Rad蛋白质测定试剂定量蛋白质。将50微克的蛋白质样品在4-12% Bis-Tris凝胶(Thermo科学公司)上电泳并转移至PVDF膜(EMD Millipore公司)。使用抗FDPS(Thermo科学公司)、抗RAP1A(Santa Cruz公司)和抗肌动蛋白(Sigma公司)抗体作为蛋白质上样对照进行免疫印迹。抗体与HRP偶联的第二抗体结合,并使用Immobilon Western ECL试剂(EMD Millipore公司)用Licor c-Digit印迹扫描仪检测。RAPIA条带强度的增加与降低的法尼基化相关。RAPIA的脱法尼基化仅发生在用LV-shFDPS转导并用唑来膦酸处理的细胞中。

[0255] 实施例14-治疗患癌对象

[0256] LV-FDPS是由慢病毒载体通过局部给药递送到晚期不可切除的肝实质细胞癌的基因药物

[0257] I期临床试验将测试在没有伴随放疗或化疗的患者中使用超声引导的肝脏插管将LV-FDPS递送至肝细胞癌(HCC)部位的安全性和可行性。合理预测本研究将成功治疗HCC。该研究是开放标记,4x3剂量递增(4个剂量范围,每剂最多3个对象),以确定18岁或以上患有III/IV期不可切除HCC的患者的LV-FDPS的最大耐受剂量。

[0258] LV-FDPS是一种遗传疗法,旨在减少法尼基二磷酸合酶的肿瘤细胞中的表达。实验研究表明,LV-FDPS修饰的肿瘤细胞诱导人 $\gamma\delta$ T细胞的抗肿瘤活性,包括通过细胞毒性杀伤肿瘤的能力。

[0259] 目标病变最长直径 $\geq 1\text{cm}$ (通过螺旋CT测量)和最大直径 $\leq 4.9\text{cm}$ 并满足下面详述的准入和排除标准的对象招募入下一个可用的给药类别。每个剂量组最多招募3名对象。剂量是通过肝内插管以单次推注递送的LV-FDPS的转导单位的数量,如产品释放标准中所述,体积不超过25mL。基于报道的用于HCC的重组腺病毒疗法的经验(Sangro等,基于胸苷激酶的基因治疗晚期肝细胞癌的I期临床试验(A phase I clinic trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma),2010,Cancer Gene Ther.17:837-43),最小剂量为 1×10^9 转导单位,并且递增10倍至下一剂量 1×10^{10} 转导单位,下一剂量为 1×10^{11} 转导单位,且最大剂量为 1×10^{12} 转导单位。对象经招募,治疗和评估持续3个月。在招募和以下一更高剂量水平治疗对象之前,对每个组完成所有安全性评估。招募和剂量递增持续直至达到最大耐受剂量或终止研究。

[0260] 通过左锁骨下动脉进行插管,直到导管尖端处于适当的肝动脉连接处。插管由超声检查引导,如所述(Lin等,顺铂、丝裂霉素C、白细胞介素和5-氟尿嘧啶动脉灌注化疗对不

能手术切除的晚期肝实质细胞癌的临床疗效 (Clinical effects of intra-arterial infusion chemotherapy with cisplatin, mitomycin C, leucovor and 5-Fluorouracil for unresectable advanced hepatocellular carcinoma), 2004, J. Chin. Med. Assoc. 67: 602-10)。

[0261] 主要结果测量

[0262] 安全性: 根据CTCAS对系统性和局部区域不良事件进行分级, 并根据MedRA进行编码。在剂量递增之前, 将评估单剂量范围内所有对象的不良事件数据。最终的安全评估包含了所有剂量范围的数据。

[0263] 次要结果测量

[0264] • 局部给药以及随后的活组织检查或尸检以获得组织后的LV-FDPS病灶分布和保留。

[0265] • 在治疗后3个月内通过物理分析、医学成像或活组织检查, 在目标和可测量的非局部病灶(如果存在)中的客观响应率(ORR)。

[0266] • 局部注射后10分钟, 30分钟、1小时和1天的血液中LV-FDPS的水平。

[0267] • 治疗后3个月内肝功能标志物的变化, 标志物包括ALP, ALT, ASAT, 总胆红素和GGT。

[0268] 临时分析中无病史存活超过历史对照(无LV-FDPS)患者。

[0269] 准入标准

[0270] • 超过18岁, 包括男性和女性。

[0271] • 通过组织学或细胞学或基于目前公认的实质细胞来源的肝实质细胞癌的临床标准证实诊断, 在筛选时, 切除、移植或其他潜在的治愈性疗法是不适合的。

[0272] • 治疗医师确定病灶适合局部区域靶向递送。

[0273] • 靶标病灶必须是通过计算机断层扫描显示一维最大直径 $\geq 1.0\text{cm}$ 的可测量疾病; 最大直径 $\leq 5.0\text{厘米}$ 。

[0274] • Karnofsky表现得分为ECOG值的60-80%。

[0275] • 预期寿命 $\geq 12\text{周}$ 。

[0276] • 造血功能: $\text{WBC} \geq 2,500/\text{mm}^3$; $\text{ANC} \geq 1000/\text{mm}^3$; 血红蛋白 $\geq 8\text{g/dL}$; 血小板计数 $\geq 50,000/\text{mm}^3$; 凝血INR ≤ 1.3 。

[0277] • AST和ALT $<5\text{倍ULN}$; ALPS $<5\text{倍ULN}$ 。胆红素 $\leq 1.5\text{倍ULV}$; 肌酸 $\leq 1.5\text{倍ULN}$ 并且eGFR ≥ 50 。

[0278] • 甲状腺功能: 总T3或游离T3, 总T4或游离T4和THC $\leq \text{CTCAE 2级异常}$ 。

[0279] • 主治医师认为肾脏, 心血管和呼吸功能充足。

[0280] • 免疫功能: 循环V $\gamma 9V\delta 2+T$ 细胞 $\geq 30/\text{mm}^3$; 没有免疫缺陷病。

[0281] • 血清学和病毒RNA检测对HIV为阴性。

[0282] • 书面知情同意书。

[0283] 排除标准

[0284] • 靶标病灶与血管相邻, 包围或浸润血管。

[0285] • 适合切除、移植或其他潜在的治愈性疗法的原发性HCC。

[0286] • 过去4个月内的肝脏手术或化疗栓塞。

- [0287] • 过去4个月内的肝脏放射或全身放射治疗。
- [0288] • 化疗4周或亚硝基脲、丝裂霉素C或顺铂的任何使用。
- [0289] • 目前或在过去4周内接受氨基二膦酸类药物治疗
- [0290] • 4周内或<5药物半衰期的研究药物。
- [0291] • 糖尿病引起的伤口愈合受损。
- [0292] • 严重的精神疾病,酒精依赖或非法药物使用。
- [0293] • 不愿意遵守研究方案和报告要求。
- [0294] • 过去4个月内进行氨基二膦酸类药物治疗。
- [0295] • 存在临床意义的心血管,脑血管(中风),免疫学(乙型或丙型肝炎病毒感染、病毒性肝炎或肝硬化除外),内分泌或中枢神经系统疾病;当前的脑病;在过去4个月内需要住院或输血的静脉曲张出血。
- [0296] • HIV或获得性免疫缺陷综合征的历史。
- [0297] • 目前或之前使用抗逆转录病毒药物治疗。
- [0298] • 整个试验和随访间隔期间怀孕、哺乳或拒绝采用屏障或化学避孕药。
- [0299] LV-FDPS是由慢病毒载体通过局部给药递送到晚期不可切除的肝实质细胞癌的基因药物-氨基二膦酸类药物的辅助给药
- [0300] I期临床试验将测试在伴随氨基二膦酸类药物化疗的患者中使用超声引导的肝脏插管将LV-FDPS递送至肝细胞癌(HCC)部位的安全性和可行性。合理预测本研究将成功治疗HCC。该研究是开放标记,4x3剂量递增(4个剂量范围,每剂最多3个对象),以确定18岁或以上患有III/IV期不可切除HCC的患者的LV-FDPS的最大耐受剂量。
- [0301] LV-FDPS是一种遗传疗法,旨在减少法尼基二磷酸合酶的肿瘤细胞中的表达。实验研究表明,LV-FDPS修饰的肿瘤细胞诱导人 γ δT细胞的抗肿瘤活性,包括通过细胞毒性杀伤肿瘤的能力。先前的实验研究还显示了LV-FDPS和特异性氨基二膦酸类药物的正相互作用的可能性,这些药物可以在原发性或转移性疾病中进入处方。对于该研究,根据医师的建议和对象偏好,对象将接受剂量递增量的LV-FDPS,其具有连续标准治疗剂量,使用Aredia®(帕米膦酸盐),Zometa®(唑来膦酸)或Actonel®(利塞膦酸盐)。
- [0302] 目标病灶最长直径 $\geq 1\text{cm}$ (通过螺旋CT测量)和最大直径 $<4.9\text{cm}$ 并满足下面详述的准入和排除标准的对象在氨基二膦酸类药物治疗中招募并开始。30天后,重新评估目标病灶的大小,以确保对象仍然符合LV-FDPS的起始标准。对氨基二膦酸类药物没有客观临床响应的对象招募到下一个可用的LV-FDPS给药类别。每个剂量组最多招募3名对象,并且除非主治医生另有建议,否则所有对象均在研究期间继续使用氨基二膦酸类药物。LV-FDPS剂量是通过肝内插管以单次推注递送的LV-FDPS的转导单位的数量,如产品释放标准中所述,体积不超过25mL。基于报道的用于HCC的重组腺病毒疗法的经验(Sangro等,基于胸苷激酶的基因治疗晚期肝细胞癌的I期临床试验(A phase I clinic trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma),2010,Cancer Gene Ther.17:837-43),最小剂量为 1×10^9 转导单位,并且递增10倍至下一剂量 1×10^{10} 转导单位,下一剂量为 1×10^{11} 转导单位,且最大剂量为 1×10^{12} 转导单位。对象经招募,治疗和评估持续3个月。在招募和以下一更高剂量水平治疗对象之前,对每个组完成所有安全性评估。招募和剂量递增持续直至达到最大耐受剂量或终止研究。

[0303] 通过左锁骨下动脉进行插管,直到导管尖端处于适当的肝动脉连接处。插管由超声检查引导,如所述(Lin等,顺铂、丝裂霉素C、白细胞介素和5-氟尿嘧啶动脉灌注化疗对不能手术切除的晚期肝实质细胞癌的临床疗效(Clinical effects of intra-arterial infusion chemotherapy with cisplatin,mitomycin C,leucovor and 5-Fluorouracil for unresectable advanced hepatocellular carcinoma),2004,J.Clin.Med.Assoc.67:602-10)。

[0304] 主要结果测量

[0305] 安全性:根据CTCAS对系统性和局部区域不良事件进行分级,并根据MedRA进行编码。在剂量递增之前,将评估单剂量范围内所有对象的不良事件数据。最终的安全评估包含了所有剂量范围的数据。

[0306] 次要结果测量

[0307] • 局部给药以及随后的活组织检查或尸检以获得组织后的LV-FDPS病灶分布和保留。

[0308] • 在治疗后3个月内通过物理分析、医学成像或活组织检查,在目标和可测量的非局部病灶(如果存在)中的客观响应率(ORR)。

[0309] • 局部注射后10分钟、30分钟、1小时和1天的血液中LV-FDPS的水平。

[0310] • 治疗后3个月内肝功能标志物的变化,标志物包括ALP,ALT,ASAT,总胆红素和GGT。

[0311] • 临时分析中无病史存活超过历史对照(无LV-FDPS)患者。

[0312] 准入标准

[0313] • 超过18岁,包括男性和女性。

[0314] • 通过组织学或细胞学或基于目前公认的实质细胞来源的肝实质细胞癌的临床标准证实诊断,在筛选时,切除、移植或其他潜在的治愈性疗法是不适合的。

[0315] • 治疗医师确定病灶适合局部区域靶向递送。

[0316] • 靶标病灶必须是通过计算机断层扫描显示一维最大直径 $\geq 1.0\text{cm}$ 的可测量疾病;最大直径 $\leq 5.0\text{厘米}$ 。

[0317] • Karnofsky表现得分为ECOG值的60-80%。

[0318] • 预期寿命 $\geq 12\text{周}$ 。

[0319] • 造血功能:WBC $\geq 2,500/\text{mm}^3$;ANC $\geq 1000/\text{mm}^3$;血红蛋白 $\geq 8\text{g/dL}$;血小板计数 $\geq 50,000/\text{mm}^3$;凝血INR ≤ 1.3 。

[0320] • AST和ALT $<5\text{倍ULN}$;ALPS $<5\text{倍ULN}$ 。胆红素 $\leq 1.5\text{倍ULV}$;肌酸 $\leq 1.5\text{倍ULN}$ 并且eGFR ≥ 50 。

[0321] • 甲状腺功能:总T3或游离T3,总T4或游离T4和THC $\leq \text{CTCAE 2级异常}$ 。

[0322] • 主治医师认为肾脏,心血管和呼吸功能充足。

[0323] • 免疫功能:循环V γ 9V $\delta 2+\text{T细胞} \geq 30/\text{mm}^3$;没有免疫缺陷病。

[0324] • 血清学和病毒RNA检测对HIV为阴性。

[0325] • 书面知情同意书。

[0326] 排除标准

[0327] • 不耐受或不愿继续氨基二膦酸类药物辅助治疗。

- [0328] • 氨基二膦酸类药物治疗后有客观临床响应。
- [0329] • 靶标病灶与血管相邻,包围或浸润血管。
- [0330] • 适合切除、移植或其他潜在的治愈性疗法的原发性HCC。
- [0331] • 过去4个月内的肝脏手术或化疗栓塞。
- [0332] • 过去4个月内的肝脏放射或全身放射治疗。
- [0333] • 4周内的化疗(排除氨基二膦酸类药物)或亚硝基脲、丝裂霉素C或顺铂的任何使用。
- [0334] • 4周内或<5药物半衰期的研究药物。
- [0335] • 糖尿病引起的伤口愈合受损。
- [0336] • 严重的精神疾病,酒精依赖或非法药物使用。
- [0337] • 不愿意遵守研究方案和报告要求。
- [0338] • 存在临床意义的心血管,脑血管(中风),免疫学(乙型或丙型肝炎病毒感染、病毒性肝炎或肝硬化除外),内分泌或中枢神经系统疾病;当前的脑病;在过去4个月内需要住院或输血的静脉曲张出血。
- [0339] • HIV或获得性免疫缺陷综合征的历史。
- [0340] • 目前或之前使用抗逆转录病毒药物治疗。
- [0341] • 整个试验和随访间隔期间怀孕、哺乳或拒绝采用屏障或化学避孕药。
- [0342] 实施例15-治疗患有慢性病毒性肝病的对象
- [0343] LV-FDPS是一种由慢病毒载体通过局部给药递送至肝脏的基因药物,用于治疗乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、HIV或其他肝脏病毒感染
- [0344] I期临床试验将测试使用超声引导插管将LV-FDPS递送至病毒感染的肝脏的安全性和可行性。合理预测本研究将成功治疗肝脏感染。该研究是开放标记,4x3剂量递增(4个剂量范围,每剂最多3个对象),以确定18岁或以上患有慢性病毒性肝病并对化疗耐药的患者LV-FDPS的最大耐受剂量。
- [0345] LV-FDPS是一种遗传疗法,旨在减少法尼基二磷酸合酶的肿瘤细胞中的表达。实验研究表明,LV-FDPS修饰的肿瘤细胞诱导人 $\gamma\delta$ T细胞,包括对病毒感染的细胞的细胞毒性能力。
- [0346] 确诊肝脏病毒感染的对象招募入下一个可用的LV-FDPS给药类别,所述肝脏病毒感染包括乙型肝炎病毒,丙型肝炎病毒,HIV或其他病毒。每个剂量组最多招募3名对象。LV-FDPS剂量是通过肝内插管以单次推注递送的LV-FDPS的转导单位的数量,如产品释放标准中所述,体积不超过25mL。基于报道的用于HCC的重组腺病毒疗法的经验(Sangro等,基于胸苷激酶的基因治疗晚期肝细胞癌的I期临床试验(A phase I clinic trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma),2010,Cancer Gene Ther.17:837-43),最小剂量为 1×10^9 转导单位,并且递增10倍至下一剂量 1×10^{10} 转导单位,下一剂量为 1×10^{11} 转导单位,且最大剂量为 1×10^{12} 转导单位。对象经招募,治疗和评估持续3个月。在招募和以下一更高剂量水平治疗对象之前,对每个组完成所有安全性评估。招募和剂量递增持续直至达到最大耐受剂量或终止研究。
- [0347] 通过左锁骨下动脉进行插管,直到导管尖端处于适当的肝动脉连接处。插管由超声检查引导,如所述(Lin等,顺铂、丝裂霉素C、白细胞介素和5-氟尿嘧啶动脉灌注化疗对不

能手术切除的晚期肝实质细胞癌的临床疗效 (Clinical effects of intra-arterial infusion chemotherapy with cisplatin, mitomycin C, leucovor and 5-Fluorouracil for unresectable advanced hepatocellular carcinoma), 2004, J. Chin. Med. Assoc. 67: 602-10)。

[0348] 主要结果测量

[0349] 安全性: 根据CTCAS对系统性和局部区域不良事件进行分级, 并根据MedRA进行编码。在剂量递增之前, 将评估单剂量范围内所有对象的不良事件数据。最终的安全评估包含了所有剂量范围的数据。

[0350] 次要结果测量

[0351] • 局部给药以及随后的活组织检查或尸检以获得组织后的LV-FDPS病灶分布和保留。

[0352] • 在治疗后3个月内作为持续病毒反应(SVR)测量的客观响应率(ORR)。

[0353] • 局部注射后10分钟、30分钟、1小时和1天的血液中LV-FDPS的水平。

[0354] • 治疗后3个月内肝功能标志物的变化, 标志物包括ALP, ALT, ASAT, 总胆红素和GGT。

[0355] • 临时分析中无病史存活超过历史对照(无LV-FDPS)患者。

[0356] 准入标准

[0357] • 超过18岁, 包括男性和女性。

[0358] • 通过组织学或细胞学或基于目前公认的慢性病毒性肝病的临床标准证实诊断, 在筛选时, 切除、移植或其他潜在的治愈性疗法是不适合的。

[0359] • 治疗医师确定病灶适合局部区域靶向递送。

[0360] • Karnofsky表现得分为ECOG值的60-80%。

[0361] • 预期寿命≥12周。

[0362] • 造血功能: WBC≥2,500/mm³; ANC≥1000/mm³; 血红蛋白≥8g/dL; 血小板计数≥50,000/mm³; 凝血INR≤1.3。

[0363] • AST和ALT<5倍ULN; ALP<5倍ULN。胆红素≤1.5倍ULV; 肌酸≤1.5倍ULN并且eGFR≥50。

[0364] • 甲状腺功能: 总T3或游离T3, 总T4或游离T4和THC≤CTCAE 2级异常。

[0365] • 主治医师认为肾脏, 心血管和呼吸功能充足。

[0366] • 免疫功能: 循环Vγ9Vδ2+T细胞≥30/mm³; 没有免疫缺陷病。

[0367] • 血清学和病毒RNA检测对HIV为阴性。

[0368] • 书面知情同意书。

[0369] 排除标准

[0370] • 适合切除、移植或其他潜在的治愈性疗法的慢性病毒性疾病。

[0371] • 过去4个月内的肝脏手术或化疗栓塞。

[0372] • 过去4个月内的肝脏放射或全身放射治疗。

[0373] • 4周内或<5药物半衰期的研究药物。

[0374] • 当前(在过去4周内)或持续接受氨基二膦酸类药物治疗。

[0375] • 糖尿病引起的伤口愈合受损。

[0376] • 严重的精神疾病,酒精依赖或非法药物使用。

[0377] • 不愿意遵守研究方案和报告要求。

[0378] • 存在临床意义的心血管,脑血管(中风),免疫学(病毒感染、病毒性肝炎或肝硬化除外),内分泌或中枢神经系统疾病;当前的脑病;在过去4个月内需要住院或输血的静脉曲张出血。

[0379] • 整个试验和随访间隔期间怀孕、哺乳或拒绝采用屏障或化学避孕药。

[0380] LV-FDPS是一种由慢病毒载体通过局部给药递送至肝脏的基因药物,用于治疗乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、HIV或其他肝脏病毒感染-伴随的辅助氨基二膦酸类药物治疗

[0381] I期临床试验将测试使用超声引导插管将LV-FDPS递送至病毒感染的肝脏的安全性和可行性。合理预测本研究将成功治疗肝脏感染。该研究是开放标记,4x3剂量递增(4个剂量范围,每剂最多3个对象),以确定18岁或以上患有慢性病毒性肝病并对化疗耐药的患者的LV-FDPS的最大耐受剂量。

[0382] LV-FDPS是一种遗传疗法,旨在减少法尼基二磷酸合酶的肿瘤细胞中的表达。实验研究表明,LV-FDPS修饰的肿瘤细胞诱导人 $\gamma\delta$ T细胞,包括对病毒感染的细胞的细胞毒性能。先前的实验研究还显示了LV-FDPS和特异性氨基二膦酸类药物的正相互作用的可能性,这些药物可以在感染疾病期间开处方。对于该研究,根据医师的建议和对象偏好,对象将接受剂量递增量的LV-FDPS,其具有连续标准治疗剂量,使用Aredia®(帕米膦酸盐),Zometa®(唑来膦酸)或Actonel®(利塞膦酸盐)。

[0383] 确认肝脏病毒感染(包括乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、HIV或其他病毒)的对象,将在重筛选前启动氨基二膦酸类药物治疗45天,以满足LV-FDPS治疗感染性疾病的招募标准。符合条件的对象招募入下一个可用的LV-FDPS给药类别。每个剂量组最多招募3名对象。LV-FDPS剂量是通过肝内插管以单次推注递送的LV-FDPS的转导单位的数量,如产品释放标准中所述,体积不超过25mL。基于报道的用于HCC的重组腺病毒疗法的经验(Sangro等,基于胸苷激酶的基因治疗晚期肝细胞癌的I期临床试验(A phase I clinic trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma),2010,Cancer Gene Ther.17:837-43),最小剂量为 1×10^9 转导单位,并且递增10倍至下一剂量 1×10^{10} 转导单位,下一剂量为 1×10^{11} 转导单位,且最大剂量为 1×10^{12} 转导单位。对象经招募,治疗和评估持续3个月。在招募和以下一更高剂量水平治疗对象之前,对每个组完成所有安全性评估。招募和剂量递增持续直至达到最大耐受剂量或终止研究。

[0384] 通过左锁骨下动脉进行插管,直到导管尖端处于适当的肝动脉连接处。插管由超声检查引导,如所述(Lin等,顺铂、丝裂霉素C、白细胞介素和5-氟尿嘧啶动脉灌注化疗对不能手术切除的晚期肝实质细胞癌的临床疗效(Clinical effects of intra-arterial infusion chemotherapy with cisplatin,mitomycin C,leucovor and 5-Fluorouracil for unresectable advanced hepatocellular carcinoma),2004,J.Chin.Med.Assoc.67:602-10)。

[0385] 主要结果测量

[0386] 安全性:根据CTCAS对系统性和局部区域不良事件进行分级,并根据MedRA进行编码。在剂量递增之前,将评估单剂量范围内所有对象的不良事件数据。最终的安全评估包含

了所有剂量范围的数据。

[0387] 次要结果测量

[0388] • 局部给药以及随后的活组织检查或尸检以获得组织后的LV-FDPS病灶分布和保留。

[0389] • 在治疗后3个月内器官内或全身内作为持续病毒反应(SVR)测量的客观响应率(ORR)。

[0390] • 局部注射后10分钟、30分钟、1小时和1天的血液中LV-FDPS的水平。

[0391] • 治疗后3个月内肝功能标志物的变化,标志物包括ALP, ALT, ASAT, 总胆红素和GGT。

[0392] • 临时分析中无病史存活超过历史对照(无LV-FDPS)患者。

[0393] 准入标准

[0394] • 超过18岁,包括男性和女性。

[0395] • 通过组织学或细胞学或基于目前公认的慢性病毒性肝病的临床标准证实诊断,在筛选时,切除、移植或其他潜在的治愈性疗法是不适合的。

[0396] • 治疗医师确定病灶适合局部区域靶向递送。

[0397] • Kamofsky表现得分为ECOG值的60-80%。

[0398] • 预期寿命 ≥ 12 周。

[0399] • 造血功能:WBC $\geq 2,500/\text{mm}^3$; ANC $\geq 1000/\text{mm}^3$; 血红蛋白 $\geq 8\text{g/dL}$; 血小板计数 $\geq 50,000/\text{mm}^3$; 凝血INR ≤ 1.3 。

[0400] • AST和ALT <5 倍ULN; ALPS <5 倍ULN。胆红素 ≤ 1.5 倍ULV; 肌酸 ≤ 1.5 倍ULN并且eGFR ≥ 50 。

[0401] • 甲状腺功能:总T3或游离T3,总T4或游离T4和THC \leq CTCAE 2级异常。

[0402] • 主治医师认为肾脏,心血管和呼吸功能充足。

[0403] • 免疫功能:循环V γ 9V82+T细胞 $\geq 30/\text{mm}^3$; 没有免疫缺陷病。

[0404] • 血清学和病毒RNA检测对HIV为阴性。

[0405] • 书面知情同意书。

[0406] 排除标准

[0407] • 适合切除、移植或其他潜在的治愈性疗法的慢性病毒性疾病。

[0408] • 过去4个月内的肝脏手术或化疗栓塞。

[0409] • 过去4个月内的肝脏放射或全身放射治疗。

[0410] • 4周内或 <5 药物半衰期的研究药物。

[0411] • 糖尿病引起的伤口愈合受损。

[0412] • 严重的精神疾病,酒精依赖或非法药物使用。

[0413] • 不愿意遵守研究方案和报告要求。

[0414] • 存在临床意义的心血管,脑血管(中风),免疫学(病毒感染、病毒性肝炎或肝硬化除外),内分泌或中枢神经系统疾病;当前的脑病;在过去4个月内需要住院或输血的静脉曲张出血。

[0415] • 整个试验和随访间隔期间怀孕、哺乳或拒绝采用屏障或化学避孕药。

[0416] 序列

[0417] 本文提及以下序列：

SEQ ID NO:	描述	序列
1	FDPS shRNA 序列#1	GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATG GCATTGTACTCCAGGACTTTT
2	FDPS shRNA 序列#2	GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGT GCTGAACGAAATCCTGCTTTT
3	FDPS shRNA 序列#2	GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGT GCTGAACGAAATCCTGCTTTT
4	FDPS shRNA	GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTT

[0419]

	序列#4	TCTCAGCCTCCTTCTGCTTTT
5	miR30 FDPS 序列#1	AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACAC TTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAAGCCACAG ATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCC TACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT
6	miR30 FDPS 序列#2	AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACAC TTTCTCAGCCTCCTTCTGCGTGAAAGCCACAG ATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCC TGCCTCGGACTTCAAGGGGCT
7	miR30 FDPS 序列#3	TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTCTCAGCCT CCTTCTGCGTGAAAGCCACAGATGGCAGAAGG AGGCTGAGAAAGTTGCCTACTGCCTCGGA
8	miR155 FDPS 序列#1	CCTGGAGGGCTGCTGAAGGCTGTATGCTGAC TTTCTCAGCCTCCTTCTGCTTTGGCCACTGA CTGAGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCAGGACA CAAGGCCTGTTACTAGCACTCA
9	miR21 FDPS 序列#1	CATCTCCATGGCTGTACCAACCTTGTGCGGGAC TTTCTCAGCCTCCTTCTGCTGTTGAATCTCA TGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATT TGGTATCTTCATCTGACCA
10	miR185 FDPS 序列#1	GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATA CTTTCTCAGCCTCCTTCTGCTGGTCCCCTCCC CGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTCC CCAATGACCGCGTCTCGTCG
11	劳氏肉瘤病毒 (RSV)启动子	GTAGTCTTATGCAATACTCTGTAGTCTTGCA ACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTT ACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGATGCCGA TTGGTGGAAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCT TATTAGGAAGGCAACAGACGGGCTGACATG GATTGGACGAACCACTGAATTGCCGCATTGC AGAGATATTGTATTAAAGTGCCTAGCTCGAT ACAATAAACG
12	5'长末端重复 (LTR)	GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTG GGAGCTCTGGCTAACTAGGAAACCCACTG CTTAAGCCTCAATAAAGCTGCCTTGAGTGC TTCAAGTAGTGTGCCCCGTCTGTTGTGA CTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTT TAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA
13	Psi 包装信号	TACGCCAAAAATTGACTAGCGGAGGCTAG AAGGAGAGAG
14	Rev 响应元件	AGGAGCTTGTTCCTGGGTTCTGGGAGCA GCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCCTCAATGA

	(RRE)	CGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTC TGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTGCTG AGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGC AACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCA GGCAAGAACCTGGCTGTGGAAAGATAACCTA AAGGATCAACAGCTCC
15	中心聚嘌呤区 (cPPT)	TTTTAAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGTAC AGTGCAGGGAAAGAACATAGTAGACATAATAG CAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAA ACAAATTACAAAATTCAAAATTAA
16	聚合酶 III shRNA 启动 子; H1 启动子	GAACGCTGACGTCAACCCGCTCCAAGGA ATCGCGGGCCCAGTGTCACTAGGGGGAAAC ACCCAGCGCGTGCCTGGCAGGAAGA TGGCTGTGAGGGACAGGGAGTGGCGCCCT GCAATATTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGG AAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTGGAT TTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCA CTT
17	长 WPRE 序 列	AATCAACCTCTGATTACAAAATTGTGAAAG ATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTGCTCCTT TTACGCTATGTGGATACGCTGCTTAAATGCC TTTGTATCATGCTATTGCTTCCGTATGGCTT TCATTTCTCCTCCTGTATAAATCCTGGTTG CTGTCCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTG TCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTT TGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGCATT GCCACCAACCTGTCAGCTCCTTCCGGGACTT TCGCTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGA ACTCATGCCGCCTGCCCTGCCCCGTGCTGG ACAGGGGCTGGCTGTTGGGACTGACAATT CCGTGGTGTGTCGGGAAATCATCGTCCTT TCCTTGGCTGCTGCCCTGTGTTGCCACCTGG ATTCTGCGCGGGACGTCTCTGCTACGTCC CTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTC CCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCCCTCTT CCGCGTCTCGCCTCGCCCTCAGACGAGTC GGATCTCCCTTGGGCCCTCCCCGCCT
18	3' δLTR	TGGAAGGGCTAATTCACTCCAAACGAAGATA AGATCTGCTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCT GGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTC TGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCT CAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTCAAGTAG TGTGTGCCGTCTGTTGTGACTCTGGTAA CTAGAGATCCCTCAGACCCTTTAGTCAGTG TGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTCATGTC A

[0420]

19	辅助/Rev; 鸡β肌动蛋白(CAG)启动子;转录	GCTATTACCATGGGTCAGGTGAGCCCCAC TTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTC CCCACCCCCAATTGTATTATTATT AATTATTGTGCAGCGATGGGGCGGGGG GGGGGGGGCGCGGCCAGGCAGGGCGGG GCGGGCGAGGGCGGGCGGGCGAGGC GGAGAGGTGCGCGGCAGCCAATCAGAGCG GCGCGCTCCGAAAGTTCTTTATGGCGAG GCGCGGGCGGCAGGCCTATAAAAAGCG AAGCGCGCGGGCG
20	辅助/Rev; HIV Gag; 病毒衣壳	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGG GGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAAATTCCGGT TAAGGCCAGGGGAAAGAAAAAAATAAATT AAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTA GAACGATTCGCAGTTAACCTGGCCTGTTAG AAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGG ACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCA GAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAG CAACCCCTTATTGTGTGCATCAAAGGATAGA GATAAAAGACACCAAGGAAGCTTAGACAAG ATAGAGGAAGAGCAAAACAAAGTAAGAAAAA AAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACA CAGCAATCAGGTCAAGCCAAATTACCCCTATA GTGCAGAACATCCAGGGCAAATGGTACATC AGGCCATATCACCTAGAACATTAAATGCATG GGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTCAGC CCAGAAGTGATACCCATGTTTCAGCATTAT CAGAAGGAGCCACCCCCACAAGATTAAACAC CATGCTAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCA GCCATGCAAATGTTAAAGAGACCATCAATG AGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAGTGCATCC AGTGCATGCAGGGCTATTGCACCAAGGCCAG ATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCA GGAACTACTAGTACCCCTTCAGGAACAAATAG GATGGATGACACATAATCCACCTATCCCACT AGGAGAAATCTATAAAAGATGGATAATCCTG GGATTAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCC CTACCAGCATTCTGGACATAAGACAAGGACC AAAGGAACCCCTTAGAGACTATGTAGACCGA TTCTATAAAACTCTAACAGAGCCGAGCAAGCTT CACAAAGAGGTAAAAAATTGGATGACAGAAAC CTTGTGCGCAAAATGCGAACCCAGATTGT AAGACTATTAAAGCATTGGGACCAAGGAG CGACACTAGAACAAATGATGACAGCATGTCA GGGAGTGGGGGGACCCGCCATAAAGCAAG AGTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACA AATCCAGCTACCATAATGATACAGAACAGGCA

		ATTTAGGAACCAAGAAAGACTGTTAAGTG TTCAATTGTGGCAAAGAAGGGCACATAGCC AAAAATTGCAGGGCCCTAGGAAAAAGGGCT GTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAAT GAAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAATT TTAGGGAAGATCTGGCCTTCCCACAAGGGAA GCCAGGGAATTCTTCAGAGCAGACCAAGA GCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGG TTTGGGGAAAGAGACAACAACACTCCCTCTCAGA AGCAGGAGCCGATAGACAAGGAACGTATCC TTAGCTCCCTCAGATCACTCTTGGCAGC GACCCCTCGTCACAATAA
21	辅助/Rev; HIV Pol; 蛋白酶和 逆转录酶	ATGAATTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAA TGATAGGGGAATTGGAGGTTTATCAAAGT AGGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATC TGCAGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAG TAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAG AAATCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACTTA AATTTCCTTATTAGTCCTATTGAGACTGTACC AGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCA AAAGTTAAACAATGCCATTGACAGAAGAAA AAATAAAAGCATTAGTAGAAATTGTACAGA AATGGAAAAGGAAGGAAAAATTCAAAAATT GGGCCTGAAAATCCATACAATACTCCAGTAT TTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATG GAGAAAATTAGTAGATTTCAGAGAACTTAAT AAGAGAACTCAAGATTCTGGGAAGTTCAAT TAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAACCA GAAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGC GATGCATATTTCAGTTCCCTAGATAAAGA CTTCAGGAAGTACTGCATTACCATACCT AGTATAACAATGAGACACCAGGGATTAGAT ATCAGTACAATGTGCTCCACAGGGATGGAA AGGATCACCAGCAATTCCAGTGTAGCATG ACAAAAATCTTAGAGCCTTTAGAAAACAAA ATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGA TGATTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATA GGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACGTGA GACAACATCTGTTGAGGTGGGGATTACAC ACCAGACAAAAACATCAGAAAGAACCTCCA TTCCTTGGATGGTTATGAACCTCCATCCTG ATAAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCC AGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATA CAGAAATTAGTGGAAAATTGAATTGGGCAA GTCAGATTATGCAGGGATTAAAGTAAGGCA ATTATGTAAACTTCTTAGGGGAACCAAAGCA CTAACAGAAGTAGTACCAACTAACAGAAGAAG

[0422]

[0423]		<p>CAGAGCTAGAACTGGCAGAAAACAGGGAGAT TCTAAAAGAACCGGTACATGGAGTGTATTAT GACCCATCAAAAGACTTAATAGCAGAAATAC AGAACGCAGGGGCAAGGCCAATGGACATATCA AATTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAA CAGGAAAATATGCAAGAATGAAGGGTGCCCA CACTAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCA GTACAAAAAAATAGCCACAGAAAGCATAGTAA TATGGGGAAAGACTCCTAAATTAAATTACC CATACAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGG ACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTG AGTGGGAGTTGTCAATACCCCTCCCTAGT GAAGTTATGGTACCAAGTTAGAGAAAGAACCC ATAATAGGAGCAGAAACTTTCTATGTAGATG GGGCAGCCAATAGGGAAACTAAATTAGGAAA AGCAGGATATGTAAGTACAGACAGAGGAAGACAA AAAGTTGTCCCCCTAACGGACACAACAAATC AGAAGACTGAGTTACAAGCAATTCTACATCTAGC TTTGCAGGATTGGGATTAGAAGTAAACATA GTGACAGACTCACAATATGCATTGGGAATCA TTCAAGCACAACCAGATAAGAGTGAATCAGA GTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATA AAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTAC CAGCACACAAAGGAATTGGAGGAATGAACA AGTAGATGGGTTGGTCAGTGCTGGAATCAGG AAAGTACTA</p>
22	辅助 Rev; HIV 整合酶; 病毒 RNA 的整合	<p>TTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCAAGAAC AACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGC AATGGCTAGTGATTAAACCTACCACCTGTA GTAGCAAAAGAAATAGTAGGCCAGCTGTGATA AATGTCAGCTAAAAGGGGAAGCCATGCATGG ACAAGTAGACTGTAGCCCAGGAATATGGCAG CTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTA TCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATA TATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGACA GGGCAAGAACAGCATACTTCCTCTAAAAT TAGCAGGAAGATGCCAGTAAAAACAGTACA TACAGACAATGGCAGCAATTTCACCAAGTACT ACAGTTAAGGCCGCCTGTTGGTGGCGGGGG ATCAAGCAGGAATTGGCATTCCCTACAATC CCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAA TAAAGAATTAAAGAAAATTATAGGACAGGTA AGAGATCAGGCTGAACATCTAAGACAGCAG TACAAATGGCAGTATTCTACCCACAATTAAA AGAAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCA GGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAG ACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAAT</p>

		TACAAAAATTCAAAATTTCGGGTTATTACA GGGACAGCAGAGATCCAGTTGGAAAGGAC CAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGG CAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAA AGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATC AGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATG ATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTA A
23	辅助/Rev; HIV RRE; 结合 Rev 元件	AGGAGCTTGTCTGGGTTCTGGGAGCA GCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATG ACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGT CTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTGCT GAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTG CAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCC AGGCAAGAACCTGGCTGTGGAAAGATAACCT AAAGGATCAACAGCTCCT
24	辅助/Rev; HIV Rev; 核输出 和稳定化病毒 mRNA	ATGGCAGGAAGAACGGAGACAGCGACGAA GAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGT TTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCAATCCC GAGGGGACCCGACAGGCCGAAGGAATAGA AGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAG ATCCATTGATTAGTGAACGGATCCTAGCA CTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCC TCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTCTG GGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATAT TGGTGGAAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGG AGCTAAAGAATAG
25	包膜; CMV 启 动子; 转录	ACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAAT CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATA TATGGAGTTCCCGCGTTACATAACTACGGTA AATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACC CCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT TCCCAGTAGTAAACCCAATAGGGACTTCCAT TGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAA CTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA TATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAAT GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCC AGTACATGACCTATGGGACTTCCACTTG GCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT ACCATGGTGATGCGGTTTGGCAGTACATCA ATGGGCGTGGATAGCGGTTGACTCACGGG GATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAA TGGGAGTTGTTGGCACCAAAATCAACGG GACTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCC CATTGACGCAAATGGCGGTAGGGGTGTACG GTGGGAGGTCTATATAAGC

[0424]

26	包膜；VSV-G；糖蛋白包膜-细胞进入	<p>ATGAAGTGCCTTTGACTTAGCCTTTTATT CATTGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTT TTTCCACACAAACCAAAAAAGGAAACTGGAAAA ATGTTCTCTTAATTACCATATTGCCCGTCA AGCTCAGATTAAATTGGCATAATGACTTAA TAGGCACAGCCTACAAGTCAAAATGCCCAA GAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGG ATGTGTATGCTTCAAATGGGTCACTACTT GTGATTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATAT AACACATTCCATCCGATCCTCACTCCATCTG TAGAACAAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAAC GAAACAAGGAACCTGGCTGAATCCAGGCTTC CCTCCTCAAAGTTGGATATGCAACTGTGA CGGATGCCGAAGCAGTGAATTGTCCAGGTGAC TCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACACA GGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATCAACG GAAAATGCAGCAATTACATATGCCCACTGT CCATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATA AGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCAT TTCCATGGACATCACCTTCTCTCAGAGGAC GGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGC ACAGGGTTCAGAAGTAACTACTTGTCTATG AAACTGGAGGCAGGGCTGCAAATGCAATA CTGCAAGCATTGGGAGTCAGACTCCCATCA GGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATC TCTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCC AGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAG ACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAAGGACG TTGAGAGGATCTGGATTATTCCCTCTGCCA AGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTT CCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTG CTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTTT CACCATAATCAATGGTACCCCTAAAATCTTG AGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGC TCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATC AGTGGAACTACCACAGAAAGGAACTGTGG GATGACTGGGCACCATAATGAAGACGTGGAAA TTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCGATTC AGGATATAAGTTCTTTATACATGATTGGA CATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTA GCTCAAAGGCTCAGGTGTTCGAACATCCTCA CATTCAAGACGCTGCTCGCAACTCCTGAT GATGAGAGTTATTTTGTGATACTGGGC TATCCAAAAATCCAATCGAGCTTGTAGAAGG TTGGTTCACTAGTTGGAAAAGCTCTATTGCC TCTTTTTCTTATCATAGGGTTAACATTGG ACTATTCTGGTCTCCGAGTTGGTATCCATC</p>
----	---------------------	---

		TTTGCATTAATTAAAGCACACCAAGAAAAAG ACAGATTATACAGACATAGAGATGA
27	辅助 /Rev; CMV 早期 (CAG) 增强 子; 增强转录	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCA TTAGTTCATAGCCCATAATGGAGTTCCGCG TTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGG CTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACG TCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC CAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGT GGACTATTACGGTAAACTGCCACTGGCA GTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGC CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC CGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTA TGGGACTTCCTACTTGGCAGTACATCTACG TATTAGTCATC
28	辅助/Rev; 鸡 β 肌动蛋白内含 子; 增强基因 表达	GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCGTGC CGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCGCC GCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGCCCTCTCCTCCGGGC TGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCG TTCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTAA AGGGCTCCGGGAGGGCCCTTGTGCGGGGG GGAGCGGCTGGGGGTGCGTGCCTGTTG TGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCCTGGGG GCTGCCCGGGCTGTGAGCGCTGCCGG CGCGCGGGGGCTTGTGCGCTCCCGTGTG CGCGAGGGGAGCGCCGCGTGCCTGGGG CCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACA AAGGCTGCGTGCCTGGGTGTGCGTGGGG GGTGAGCAGGGGGTGTGGCGCGGGCTCG GGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCC GAGTTGCTGAGCACGGCCGGCTTCGGGTG CGGGGCTCCGTGCGGGGGCTGGCGCGGG TCGCCGTGCCGGGGGGGGTGGCGGGCAGG TGGGGGTGCCGGGGGGGGGGGGGGCGCTC GGGCCGGGGAGGGCTGGGGGGAGGGGGCG GGCGGCCCGGAGCGCCGGCTGTCAG GCGCGCGAGCCGAGCCATTGCCCTTATG GTAATCGTGCAGAGAGGGCGCAGGGACTCCT TTGTCCCAAATCTGGCGGAGGCCAAATCTGG GAGGCGCCGCCGCACCCCCCTCTAGCGGGCG CGGGCGAAGCGGTGCGGCCGGCAGGAAG GAAATGGGGGGGGAGGGCCTTCGTGCGT CCGCCGCCGTCCCCCTCTCCATCTCCAGC CTCGGGGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCCT TCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGG CTTCTGGCGTGTGACCGGGCGG
29	辅助/Rev; 兔 β	AGATCTTTCCCTGCCCCAAATTATGGG

[0426]

	球蛋白聚 A; RNA 稳定性	GACATCATGAAGCCCCCTGAGCATCTGACTT CTGGCTAATAAAGGAAATTATTTCATGCA ATAGTGTGTTGGAATTTCATGCA CGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTAA AACATCAGAATGAGTATTGGTTAGAGTT TGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATG AACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCACTAGTA TATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTA TTCCATAGAAAAGCCTGACTTGAGGTTAGA TTTTTTTATTTGTTTGTGTTATTTTTT CTTTAACATCCCTAAAATTTCCCTACATGTT TTACTAGCCAGATTTCCTCCTCCTGACT ACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTCTTAT GAAGATC
30	包膜; β 球蛋白 内含子; 增强 基因表达	GTGAGTTGGGACCCCTGATTGTTCTTCT TTTCGCTATTGTAAGGAAATTCA GGGGCAAAGTTTCAGGGTGTGTTAGAA TGGGAAGATGTCCCTGTATCACCATGGACC CTCATGATAATTGTTCTTCACCTTCTAC TCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCTTATTT TTTCATTTCTGTAACCTTTCGTTAAACTT TAGCTTGACATTGTAACGAATTAAATTCA CTTTGTTATTGTCAGATTGTAAGTACTTT CTCTAATCACTTTCAAGGCAATCAGGG TATATTATATTGTAATTCA GAACAATTGTTATAATTAAATGATAAGGTAG AATATTCTGCATATAAAATTCTGGCTGGCGT GGAAATATTCTATTGGTAGAAACAAC CCCTGGTCATCATCCTGCCTTCTCTTATGG TTACAATGATATAACTGTTGAGATGAGGA TAAAATACTCTGAGTCAAACCGGGCCCCTC TGCTAACCATGTTCATGCCTCTTCTTCC TACAG
31	包膜; 兔 β 球 蛋白聚 A; RNA 稳定性	AGATCTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGG GACATCATGAAGCCCCCTGAGCATCTGACTT CTGGCTAATAAAGGAAATTATTTCATGCA ATAGTGTGTTGGAATTTCATGCA CGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTAA AACATCAGAATGAGTATTGGTTAGAGTT TGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCAT GAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCACTAG TATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCT TATTCCATAGAAAAGCCTGACTTGAGGTTA GATTTTTTATTTGTTTGTGTTATTTT TTCTTAACATCCCTAAAATTTCCCTACATG TTTACTAGCCAGATTTCCTCCTCCTGACT CTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTCTT

[0427]

		ATGGAGATC
32	引物	TAAGCAGAATTCATGAATTGCCAGGAAGAT
33	引物	CCATACAATGAATGGACACTAGGCAGGCCA CGAAT
34	Gag, Pol, 整合 酶片段	GAATTCATGAATTGCCAGGAAGATGGAAAC CAAAAATGATAGGGGGATTGGAGGTTTAT CAAAGTAAGACAGTATGATCAGATACTCATA GAAATCTGCGGACATAAAGCTATAAGGTACAG TATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAAT TGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGCTGC ACTTTAAATTCCCATTAGTCCTATTGAGAC TGTACCACTAAATAAAGCCAGGAATGGAT GGCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAG AAGAAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTG TACAGAAATGGAAAAGGAAGGAAAAATTCA AAAATTGGGCCTGAAAATCCATACAATACTC CAGTATTGCCATAAAGAAAAAGACAGTAC TAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTCAGAGAA CTTAATAAGAGAACTCAAGATTCTGGGAAG TTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTT AAAACAGAAAAATCAGTAACAGTACTGGAT GTGGGCGATGCATATTTTCAGTTCCCTTAG ATAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTAC CATACCTAGTATAAACAAATGAGACACCAGGG ATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCACAGG GATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCAGTG TAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTAGA AAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAAT ACATGGATGATTGTATGTAGGATCTGACTT AGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAG GAACTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGGAT TTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAGA ACCTCCATTCTTGGATGGTTATGAACTC CATCCTGATAATGGACAGTACAGCCTATAG TGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAA TGACATACAGAAATTAGTGGAAAATTGAAT TGGGCAAGTCAGATTATGCAGGGATTAAAG TAAGGCAATTATGTAACCTCTTAGGGGAAC CAAAGCACTAACAGAAGTAGTACCAACTAAC GAAGAACAGAGCTAGAACTGGCAGAAAACA GGGAGATTCTAAAAGAACCGGTACATGGAGT GTATTATGACCCATCAAAGACTTAATAGCA GAAATACAGAACAGCAGGGCAAGGCCAATGG ACATATCAAATTATCAAGAGGCCATTAAAAA TCTGAAAACAGGAAAGTATGCAAGAACATTAA GGTGCCACACTAATGATGTGAAACAATTAA CAGAGGCAGTACAAAAAATAGCCACAGAACAG

[0428]

[0429]		<p>CATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATT AAATTACCCATACAAAAGGAAACATGGGAAG CATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTG GATTCTGAGTGGGAGTTGTCAATACCCCT CCCTTAGTGAAGTTATGGTACCACTAGAGA AAGAACCCATAATAGGAGCAGAAACTTCTA TGTAGATGGGGCAGCCAATAGGGAAACTAAA TTAGGAAAAGCAGGATATGTAACTGACAGAG GAAGACAAAAAGTTGTCCCCCTAACGGACAC AACAAATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATT CATCTAGCTTGCAGGATTGGGATTAGAAG TAAACATAGTGACAGACTCACAAATATGCATT GGGAAATCATTCAAGCACAAACCAGATAAGAGT GAATCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGC AGTTAATAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGC ATGGGTACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGA AATGAACAAAGTAGATAAATTGGTCAGTGCTG GAATCAGGAAAGTACTATTAGATGGAAT AGATAAGGCCAAGAAGAACATGAGAAATAT CACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATT TTAACCTACCACCTGTAGTAGCAAAAGAAAT AGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAA GGGGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTA GCCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACA TTTAGAAGGAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTT CATGTAGCCAGTGGATATAGAACAGAAG TAATTCCAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGC ATACTCCTCTTAAAATTAGCAGGAAGATGG CCAGTAAAACAGTACATACAGACAATGGCA GCAATTTCACCACTGACTACAGTTAAGGCCGC CTGTTGGTGGCGGGGATCAAGCAGGAATT GGCATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAGGAG TAATAGAATCTATGAATAAAGAATTAAAGAA AATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAA CATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTAT TCATCCACAATTAAAAGAAAAGGGGGGAT TGGGGGGTACAGTGCAGGGAAAGAATAGT AGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAA GAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAA ATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGA TCCAGTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTC TGGAAAGGTGAAGGGGAGTAGTAATACAA GATAATAGTGACATAAAAGTAGTGGCAAGAA GAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTATGGAAA ACAGATGGCAGGTGATGATTGTGGCAAGT AGACAGGATGAGGATTAA</p>
35	含 Rev 的 DNA	TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGC

片段, RRE 和 兔 β 球蛋白聚 A [0430]	<p>GACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCA TCAAGCTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCC CAATCCCAGGGGACCCGACAGGCCGAAG GAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACA GAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATC CTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGC CTGTGCCTCTCAGCTACCACCGCTGAGAG ACTTACTCTGATTGTAACGGAGGATTGTGGA ACTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCT CAAATATTGGTGGAAATCTCCTACAAATATTGG AGTCAGGAGCTAAAGAATAGAGGAGCTTGT TCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCAC TATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTA CAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGC AGCAGCAGAACAAATTGCTGAGGGCTATTGA GGCGCAACACGATCTGTTGCAACTCACAGTC TGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAACATCC TGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACA GCTCCTAGATCTTTCCCTCTGCCAAAAATT ATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCT GAATTCTGGCTAATAAAGGAAATTATTCA TTGCAATAGTGTGGAAATTTTGTGTCTC TCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATC ATTAAAACATCAGAACATGAGTATTGGTTA GAGTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTG CCATGAACAAAGGTGGCTATAAGAGGTCA CAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATT CCTTATTCCATAGAAAAGCCTGACTTGAGG TTAGATTTTTATATTGTTGTGTATT TTTTCTTAACATCCCTAAAATTTCCTTAC ATGTTTACTAGCCAGATTTCCCTCTCC TGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTTCT CTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCAAAG CTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCT GTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCAC ACAACATACGAGCCGGAAAGCATAAAGTGTAA AGCCTGGGTCCTAATGAGTGAGCTAACTC ACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTT TCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGAT CCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCC CGCCCCCTAACTCCGCCATCCGCCCTAAC TCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCAT GGCTGACTAATTGTTATTATGCAGAGGC CGAGGCCGCCCTGGCCTCTGAGCTATTCCAG AAGTAGTGAGGAGGCTTTTGAGGCTAG GCTTTGCAAAAGCTAACATTGTTATTGCA GCTTATAATGGTTACAAATAAGCAATAGCA</p>
--	--

		TCACAAATTCACAAATAAAGCATTTCAT CTGCATTCTAGTTGGTTGTCCAAACTCAT CAATGTATCTTATCAGCGGGCGCCCCGGG
36	含 CAG 增强子/启动子/内含子序列的 DNA 片段	ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACG GGGTCAATTAGTTCATAGCCCCATATAATGGAGT TCCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCC GCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCA TTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG TAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA ATGGGTGGACTATTACGGTAAACTGCCCAC TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAA GTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA ATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAAGTACATG ACCTTATGGGACTTCCACTTGGCAGTACA TCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGG TCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCT CCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATT TGTATTATTATTATTAAATTATTGTGCA GCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCG CGCCAGGCAGGGGGGGGGGGGGGGGGAGGGG CGGGGGCGGGCGAGGGGGAGAGGGTGCAGGG GCAGCCAATCAGAGCGCGCGCTCCGAAAGT TTCCTTTATGGCGAGGCAGGGCGCGCGCG GGCCCTATAAAAGCGAAGCGCGCCGGGG CGGGAGTCGCTGCCTGCCTCGCCGCCGCC CCGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGG TGAGCGGGCGGGACGGCCCTCTCCTCCGG GCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCT CGTTTCTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTT AAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTGCGGG GGGGAGCGCTCGGGGGGTGCGTGCCTG TGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCAGGG GCGCTGCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCAGGG CGCGGCGCGGGCTTGCGCTCCGCGTG TGCAGGAGGGAGCGCGGGCGGGGGCGGT CCCCCGGTGCGGGGGGCTGCGAGGGGAA CAAAGGCTGCGTGCAGGGGTGTCGAGGG GGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGGCGGGGG CGGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCC CCGAGTTGCTGAGCACGGCCGGCTTCGG GCGGGGCTCCGTGCGGGGGGTGGCGGGGG CTCGCCGTGCCGGGGCGGGGGGTGGCGGG GTGGGGGTGCCGGGGCGGGGGCGGGGG CGGGCCGGGGAGGGCTGGGGAGGGGG GGCGGCCCCGGAGCGCCGGCTGTCGAG GCGCGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTATG

[0431]

		GTAATCGTGCAGAGGGCGCAGGGACTTCCT TTGTCCCAAATCTGGCGGAGCCGAAATCTGG GAGGCGCCGCCGCACCCCCCTCTAGCGGGCG CGGGCGAAGCGGTGCAGGGCGCCGGCAGGAAG GAAATGGGCGGGGAGGGCCTCGTGCCTCG CCGCGCCGCCGTCCCTCTCCATCTCCAGC CTCGGGGCTGCCGCAGGGGGACGGCCTGCCT TCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGG CTTCTGGCGTGTGACCGGGCGGAATTC
37	含 VSV-G 的 DNA 片段	GAATTCATGAAGTGCCTTTGTACTTAGCCTT TTTATTCACTGGGGTGAATTGCAAGTTCAC ATAGTTTCCACACAACCAACCAAAAGGAAACT GGAAAAATGTTCCCTCTAATTACCAATTATTGC CCGTCAGCTCAGATTAAATTGGCATAATG ACTTAATAGGCACAGCCTACAAGTC GCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGAC GGTTGGATGTGTCATGCTCCAAATGGTCA CTACTTGTGATTCCGCTGGTATGGACCGAA GTATATAACACATTCCATCCGATCCTCACTC CATCTGTAGAACAAATGCAAGGAAAGCATTGA ACAAACGAAACAAGGAACCTGGCTGAATCCA GGCTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAA CTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCA GGTGA CTCCTCACCATGTGCTGGTGTGAA TACACAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCA TCAACGGAAAATGCAGCAATTACATATGCC CACTGTCCATAACTCTACAAACCTGGCATTCT GA CTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTA ACCTCATTCCATGGACATCACCTCTTCTCA GAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAG GAGGGCACAGGGTTCAGAAGTA ACTACTTG CTTATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGCAA GCAAAACTGCAAGCATTGGGAGTCAGACTC CCATCAGGTGTCTGGTTCAGGATGGCTGATA AGGATCTCTTGCTGCAGCCAGATCCCTGA ATGCCCAAGAAGGGTCAAGTATCTGCTCCA TCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATT AGGACGTTGAGAGGATCTGGATTATTCCCT CTGCCAAGAAACCTGGAGC AAATCAGAGCG GGTCTCCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCT ATCTGCTCTAAAAACCCAGGAACCGGTCC TGCTTCA CCTAATCAATGGTACCC TAAAT ACTTGAGACCA GAGATA CATCAGAGTCGATAT TGCTGCTCCAATCCTCTCA AGAATGGTC GA ATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGAAAC TGTGGGATGACTGGGCACCATATGAAGACGT GGAAATTGGACCAATGGAGTTCTGAGGACC

[0432]

[0433]

		AGTCAGGATATAAGTTCCCTTATACATGAT TGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCAT CTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTCGAACATC CTCACATTCAAGACGCTGCTCGCAACTTCC TGATGATGAGAGTTATTTTTGGTGATACT GGGCTATCCAAAAATCCAATCGAGCTTAG AAGGTTGGTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTAT TGCCTCTTTTCTTATCATAGGGTTAATCA TTGGACTATTCTGGTCTCCGAGTTGGTAT CCATCTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAG AAAAGACAGATTATACAGACATAGAGATGA GAATTC
38	Rev; RSV 启动子; 转录	ATGGCAGGAAGAACGGAGACAGCGACGAA GAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGT TTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCAATCCC GAGGGGACCCGACAGGCCGAAGGAATAGA AGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAG ATCCATTGATTAGTGAACGGATCCTAGCA CTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCC TCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTCTG GGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATAT TGGTGGATCTCCTACAATATTGGAGTCAGG AGCTAAAGAATAG
39	Rev; HIV Rev; 核输出和稳定化病毒 mRNA	ATGGCAGGAAGAACGGAGACAGCGACGAA GAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGT TTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCAATCCC GAGGGGACCCGACAGGCCGAAGGAATAGA AGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAG ATCCATTGATTAGTGAACGGATCCTAGCA CTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCC TCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTCTG GGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATAT TGGTGGATCTCCTACAATATTGGAGTCAGG AGCTAAAGAATAG
40	RSV 启动子和 HIV Rev	CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGT ATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTAGGCGAA AAGCGGGGCTCGGTTGTACGCGGTTAGGA GTCCCCCTCAGGATATAGTAGTTCGCTTTG CATAGGGAGGGGAAATGTAGTCTTATGCAA TACACTTGTAGTCTGCAACATGGTAACGAT GAGTTAGCAACATGCCCTACAAGGAGAGAAA AAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAAGTAA GGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCA ACAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACC ACTGAATTCCGCATTGCAGAGATAATTGTAT

		<p>TTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCA TTTGACCATTCAACCACATTGGTGTGCACCTC CAAGCTCGAGCTCGTTAGTGAACCGTCAGA TCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGA CCTCCATAGAACGACACCGGGACCGATCCAGC CTCCCCCTCGAAGCTAGCGATTAGGCATCTCC TATGGCAGGAAGAACGGAGACAGCGACGA AGAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAG TTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCC CGAGGGGACCCGACAGGCCGAAGGAATAG AAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACA GATCCATTGATTAGTGAACGGATCCTTAGC ACTTATCTGGGACGATCTGGGAGCCTGTGC CTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTAC TCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTTCT GGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATA TTGGTGGAAATCTCCTACAATATTGGAGTCAG GAGCTAAAGAATAGTCTAGA </p>
[0434]	41 延伸因子-1 α(EF1-α)启动子	<p>CCGGTGCCTAGAGAACGGTGGCGCGGGGAAAC TGGGAAAGTGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTT TTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGT GCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTCGCAAC GGGTTTGCCGCCAGAACACACAGGTAAGTGCCTG TGTGGTTCCCGCGGGCTGGCCTCTTACGGGTT ATGGCCCTTGCCTGCCTGAATTACTCCACGC CCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTGATCCCGAG CTTGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGAGTCGAGG CCTTGCCTTAAGGAGCCCCTCGCCTCGTGCCT GAGTTGAGGCCTGGCCTGGCGCTGGGCCGCC GCGTGCAGATCTGGTGGCACCTCGCGCCTGTC TCGCTGCTTCGATAAGTCTCTAGCCATTAAAA TTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTCTGG CAAGATAGTCTGAAATGCGGGCCAAGATCTG CACACTGGTATTCGGTTTTGGGGCCGCGGGC GGCACGGGCCGTGCGTCCAGCGCACATGT TCGCGAGGCAGGGCCTGCGAGCGCGGCCACC GAGAACGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCC GGCCTGCTCGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGT GTATCGCCCCGCCCTGGCGCAAGGCTGGCC GGTGGCACCAGTGCCTGAGCGGAAAGATGG CCGCTCCCGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAA TGGAGGACGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGG TGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCC GTCCTCAGCCGTGCTTCATGTGACTCCACGGA GTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTT CTCGAGCTTTGGAGTACGTCGTCTTAGGTTGG GGGGAGGGGTTTATGCGATGGAGTTCCCCAC</p>

[0435]

		ACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGATTGCCCTTTTGAGTTGGATCTGGTTCATTCTCAAGCTCAGACAGTGGTCAAAGTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGA
42	启动子; PGK	GGGGTTGGGGTTGCGCCTTTCCAAGGCAGCCC TGGGTTGCGCAGGGACGCAGCGCTGCTCTGGCG TGTTCCGGAAACGCAGCAGCGGCCGACCCCTGG GTCTCGCACATTCTCACGTCCGTTCGCAGCGTC ACCCGGATCTCGCCGCTACCCCTGTGGGCCCG CGGGCAGCCTCCTGCTCCGCCCTAAGTCGG GAAGGTTCTTGCCTGCGGTTGCGGGCGTGCCGGACG TGACAAACGGAAGCCGCACGTCTCACTAGTACC CTCGAGACGGACAGCGCCAGGGAGCAATGGC AGCGCGCCGACCGCGATGGGCTGTGGCCAATA GCGGCTGCTCAGCAGGGCGCGCCGAGAGCAGC GGCGGGAAAGGGCGGTGCGGGAGGCAGGGTG TGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTTCTGCCGC GCGGTGTTCCGCATTCTGCAAGCCTCCGGAGCG CACGTCGGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACCGAAT CACCGACCTCTCTCCCCAG
43	启动子; UbC	GCGCCGGTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCC CCTCCTCACGGCGAGCGCTGCCACGTCAAGACGA AGGGCGCAGGAGCGTCTGATCCTCCGCCCG GACGCTCAGGACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGA CTCGCCCTAGAACCCAGTATCAGCAGAAGGA CATTAGGACGGACTTGGGTGACTCTAGGGC ACTGGTTTCTTCCAGAGAGCGGAACAGCGA GGAAAAGTAGTCCCTCTCGCGATTCTCGCGA GGGATCTCCGTGGGCGGTGAACGCCGATGATT ATATAAGGACCGCCGGGTGTGGCACAGCTAGT TCCGTCGAGCCGGATTGGGTGCGGGTTCTT GTTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTGGTGAG TTGCGGGCTGCTGGCTGGCCGGGCTTCGTG GCCGCCGGGCCGCTCGTGGGACGGAAGCGTG TGGAGAGACCGCCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCC GCGAGCAAGGTTGCCCTGAACCTGGGGTTGGG GGGAGCGCACAAATGGCGGCTGTTCCGAGTC TTGAATGGAAGACGCTTGTAAAGCGGGCTGTGA GGTGTTGAAACAAGGTGGGGGAGGTGGCTGAGTC CGGCAAGAACCAAGGTCTTGAGGCCTCGCTA ATGCGGGAAAGCTCTTATTGGGTGAGATGGC TGGGGCACCACCTGGGGACCCCTGACGTGAAGTT TGTCACTGACTGGAGAACTCGGGTTGCGTCT GGTGCGGGGGCGGCAGTTATGCGGTGCCGTT GGCAGTGCACCCGTACCTTGGGAGCGCGCGCC TCGTCGTGTCGTGACGTACCCGTTGTTGGCT

[0436]

		TATAATGCAGGGTGGGCCACCTGCCGGTAGGT GTGCGGTAGGCTTTCTCCGTCGCAGGACGCAG GGTCGGGCCTAGGGTAGGCTCTCCTGAATCGA CAGGCGCCGACCTCTGGTGAGGGGAGGGATA AGTGAGGCAGTCAGTTCTTGGTCGGTTTATGT ACCTATCTTCTTAAGTAGCTGAAGCTCCGGTTT GAACATGCGCTCGGGTTGGCGAGTGTGTTT GTGAAGTTTTAGGCACCTTGAAATGTAATC ATTTGGGTCAATATGTAATTCAGTGTAGACT AGTAAA
44	聚 A; SV40	GTTTATTGCAGCTTAATGGTTACAAATAAAG CAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATT TTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAA CTCATCAATGTATCTTATCA
45	聚 A; bGH	GACTGTGCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT TGCCCTCCCCGTGCCCTCCTGACCCCTGGAA GGTGCCACTCCCACTGTCCTTCCTAATAAAAT GAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGT CATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGAC AGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAG GCATGCTGGGATGCCGTGGCTATGG
46	包膜; RD114	ATGAAACTCCAACAGGAATGGTCATTTATGT AGCCTAATAATAGTCGGGCAGGGTTGACGAC CCCCGCAAGGCTATCGCATTAGTACAAAAACAA CATGGTAAACCATCGAATGCAGCGGAGGGCA GGTATCCGAGGCCACCAGAACTCCATCCAACAA GGTAACCTGCCAGGCAAGACGGCCTACTTAAT GACCAACCAAAATGAAATGCAGAGTCAC CAAAATCTCACCCCTAGCGGGGAGAACTCC AGAACTGCCCTGTAACACTTCCAGGACTCGA TGCACAGTTCTGTTACTGAATACCGGAAT GCAGGGCGAATAATAAGACATACTACACGGCC ACCTGCTAAAATACGGCTGGAGCCTCAAC GAGGTACAGATATTACAAAACCCAAATCAGCTC CTACAGTCCCTTGAGGGCTCTAAATCAG CCCGTTGCTGGAGTGCACGGCAGCCCCATCCAT ATCTCCGATGGTGGAGGACCCCTCGATACTAAG AGAGTGTGGACAGTCCAAAAAAGGCTAGAAC AATTCTAAAGGCTATGCATCCTGAACCTCAATA CCACCCCTAGCCCTGCCAAAGTCAGAGATGA CCTTAGCCTGATGCACGGACTTTGATATCCTG AATACCACTTTAGGTTACTCCAGATGTCAATT TTAGCCTGCCAAGATTGTTGGCTCTGTTAAA ACTAGGTACCCCTACCCCTCTGCGATACCCAC TCCCTTTAACCTACTCCCTAGCAGACTCCCA GCGAATGCCTCCTGTCAGATTACCTCCCCCT TGGTTCAACCGATGCAGTTCTCCAACCTCGCCT

[0437]		<p>GT TTATCTTCCCCTTCATTAACGATA CGGAACAAATAGACTTAGGTGCAGTCACCTTACTAACTG CACCTCTGTAGCCAATGTCA GTAGTCAGTCTGCCTTATGT GCCCTAAACGGGTCA GTCTCCCTGTGGAAAT AACATGGCATACACCTATTTACCCCCAAACTGG ACAGGACTTGC GTCCAAGCCTCCCTCCCC GACATTGACATCATCCC GG GGATGAGCCAGTC CCCATTCCCTGCCATTGATCATTATATACATAGAC CTAACAGAGCTGTACAGTTCATCCCTTACTAG CTGGACTGGGAATCACCGCAGCATT CACCACCG GAGCTACAGGCCTAGGTGTCTCGTCACCCAGT ATACAAAATTATCCCATCAGTTAATATCTGATG TCCAAGTCTTATCCGTACCATACAAGATTAC AAGACCAGGTAGACTCGTTAGCTGAAGTAGTT CTC AAAAATAGGAGGGACTGGACCTACTAACG GCAGAACAAAGGAGGAATTGTTAGCCTACAA GAAAAATGCTGTTTATGCTAACAGTCAGGA ATTGTGAGAAACAAAATAAGAACCCCTACAAGA AGAATTACAAAACGCAGGGAAAGCCTGGCAT CCAACCCCTCTGGACCGGGCTGCAGGGCTTTC TTCCGTACCTCCTACCTCTCCCTGGGACCCCTACT CACCCCTCCTACTCATACTAACCAATTGGGCCATG CGTTTCAATCGATTGGTCCAATTGTTAAAGAC AGGATCTCAGTGGTCCAGGCTCTGGTTTGACT CAGCAATATCACCAAGCTAAAACCCATAGAGTAC GAGCCATGA</p>
47	包膜; GALV	<p>ATGCTTCTCACCTCAAGCCCCGACCA CACCTTC GGCACCA CAGATGAGTCCTGGGAGCTGGAAAAA GACTGATCATCCTCTTAAGCTGC GTATT CGG AGACGGCAAAACGAGTCTGCAGAATAAGAAC CCCCACCA GCCTGTGACCCCTCACCTGGCAGG TACTGTCCC AA ACTGGGGACGTTGTCTGGGA CAAAAAGGCAGTCCAGGCCCTTGGACTTGG TGGCCCTCTCTTACACCTGATGTATGTGCC C TGGCGGCCGGTCTTGAGTCCTGGGATATCCC GGGATCCGATGTATCGTCCCTCTAAAAGAGTT AGACCTCCTGATT CAGACTATACTGCCGCTT ATAAGCAAATCACCTGGGAGCCATAGGGTG CAGCTACCCCTCGGGCTAGGACCAGGATGGCA AATTCCCCCTTCTACGTGTGTCCCCGAGCTG GCCGAACCCATT CAGAAGCTAGGAGGTGTGG GGGGCTAGAATCCCTATACTGTAAAGAATGG AGTTGTGAGACCACGGTACCGTTATTGGC AACCCAAGTCCCTCATGGGACCTCATAACTGT AAAATGGGACCAAAATGTGAAATGGGAGCAA AAATTCAAAAGTGTGAACAAACCCGGCTGGT GTAACCCCTCAAGATAGACTCACAGAAAA</p>

[0438]		AGGAAAACCTCTCCAGAGATTGGATAACGGAA AAAACCTGGGAATTAAAGGTTCTATGTATATG GACACCCAGGCATACAGTTGACTATCCGCTT AGAGGTCACTAACATGCCGGTTGTGGCAGTG GGCCCAGACCCCTGTCCCTGCCAACAGGGAC CTCCTAGCAAGCCCCACTCTCCCTCTCTCC CCACGGAAAGGCCGCCACCCCTTACCCCC CGGCGGCTAGTGAGCAAACCCCTGCCGTGC ATGGAGAAACTGTTACCCCTAAACTCTCCGCC TCCCACCAGTGGCGACCGACTCTTGGCCTT GTGCAGGGGGCCTCCTAACCTTGAATGCTA CCAACCCAGGGGCCACTAACGTCTGCTGGCT CTGTTGGGCATGAGCCCCCTTATTATGAA GGGATAGCCTCTCAGGAGAGGTGCGTTATA CCTCCAACCATAACCGATGCCACTGGGGGGC CCAAGGAAAGCTTACCCCTCACTGAGGTCTCC GGACTCGGGTCATGCATAGGAAAGGTGCCCTC TTACCCATCAACATCTTGCACCAGACCTTA CCCATCAATTCCCTAAAAACCATCAGTATCT GCTCCCTCAAACCATAGCTGGTGGGCCTGC AGCACTGGCCTCACCCCTGCCCTCTCCACCT CAGTTTTAATCAGTCTAAAGACTTCTGTGTC CAGGTCCAGCTGATCCCCCGCATCTATTACC ATTCTGAAGAAACCTTGTACAAGCCTATGA CAAATCACCCCCCAGGTTAAAAGAGAGCCT GCCTCACTTACCCCTAGCTGTCTCCTGGGGT TAGGGATTGCGGCAGGTATAGGTACTGGCTC AACCGCCCTAATTAAAGGGCCATAGACCTC CAGCAAGGCCTAACCAAGCCTCCAAATGCCA TTGACGCTGACCTCCGGGCCCTCAGGACTC AATCAGCAAGCTAGAGGAACACTGACTTCC CTATCTGAGGTAGTACTCCAAAATAGGAGAG GCCTTGACTTACTATTCCCTAAAGAAGGAGG CCTCTGCGGGCCCTAAAAGAAGAGTGTGT TTTATGTAGACCACTCAGGTGCAGTACGAG ACTCCATGAAAAAAACTTAAAGAAAGACTAGA TAAAAGACAGTTAGAGGCCAGAAAAACCAA AACTGGTATGAAGGGTGGTTCAATAACTCCC CTTGGTTACTACCCCTACTATCAACCATCGCT GGGCCCTATTGCTCCTCCTTTGTTACTCAC TCTTGGGCCCTGCATCATCAATAATTATC CAATTCAATGATAGGATAAGTGCAGTCA AAATTAGTCCTTAGACAGAAATATCAGAC CCTAGATAACGAGGAAAACCTTAA
48	包膜; FUG	ATGGTTCCGCAGGTTCTTTGTTGACTCCT TCTGGGTTTCGTTGTGTTCGGGAAAGTTC CCCATTACACGATACCAGACGAACCTGGTC

[0439]	<p>CCTGGAGCCCTATTGACATACACCATCTCAG CTGTCCAAATAACCTGGTTGTGGAGGGATGAA GGATGTACCAACCTGTCCGAGTTCTCCTACA TGGAACTCAAAGTGGGATACATCTCAGCCAT CAAAGTGAACGGGTTCACTTGCACAGGTGTT GTGACAGAGGCAGAGACCTACACCAACTTG TTGGTTATGTCACAACCACATTCAAGAGAAA GCATTTCCGCCCCACCCCAGACGCATGTAGA GCCCGTATAACTGGAAGATGGCCGGTGACC CCAGATATGAAGAGTCCCTACACAATCCATA CCCCAGACTACCAACTGGCTTCGAACTGTAAGA ACCACCAAAGAGTCCCTCATTATCATATCCC CAAGTGTGACAGATTGGACCCATATGACAA ATCCCTTCACTCAAGGGTCTTCCCTGGCGGA AAGTGCTCAGGAATAACGGTGTCCCTACACT ACTGCTCAACTAACCATGATTACACCATTG GATGCCCGAGAATCCGAGACCAAGGACACCT TGTGACATTTCACCAATAGCAGAGGGAAAGA GAGCATCCAACGGGAACAAGACTTGCAGGCTT TGTGGATGAAAGAGGGCTGTATAAGTCTCTA AAAGGAGCATGCAGGCTCAAGTTATGTGGAG TTCTGGACTTAGACTTATGGATGGAACATG GGTGCGGATGCAAACATCAGATGAGACCAAA TGGTGCCTCCAGATCAGTTGGTGAATTGC ACGACTTCGCTCAGACGAGATCGAGCATCT CGTTGTGGAGGAGTTAGTTAAGAAAAGAGAG GAATGTCTGGATGCATTAGAGTCCATCATGA CCACCAAGTCAGTAAGTTCAGACGTCTCAG TCACCTGAGAAAACATTGTCCCAGGGTTGGA AAAGCATATACCATATTCAACAAAACCTTGAT GGAGGGCTGATGCTCACTACAAGTCAGTCCGG ACCTGGAATGAGATCATCCCTCAAAAGGGT GTTGAAAGTTGGAGGAAGGTGCCATCCTCA TGTGAACGGGGTGTGTTCAATGGTATAATA TTAGGGCCTGACGACCATGTCCTAATCCCAG AGATGCAATCATCCCTCCAGCAACATAT GGAGTTGTTGGAATCTTCAGTTATCCCCCTG ATGCACCCCTGGCAGACCCCTCTACAGTT TCAAAGAAGGTGATGAGGCTGAGGATTTGT TGAAGTTCACCTCCCCGATGTTGACAAACAG ATCTCAGGGGTTGACCTGGGTCTCCGAACCT GGGGAAAGTATGTATTGATGACTGCAGGGGC CATGATTGGCCTGGTGTGATATTTCCTA ATGACATGGTGCAGAGTTGGTATCCATCTT GCATTAATTAAGCACACCAAGAAAAGACA GATTTATACAGACATAGAGATGAACCGACTT GGAAAGTAA </p>
--------	--

49	包膜; LCMV	<p>ATGGGTCAGATTGTGACAATGTTGAGGCTC TGCCTCACATCATCGATGAGGTGATCAACAT TGTCAATTATTGTGCTATCGTATCACGGGT ATCAAGGCTGTCTACAATTGCCACCTGTG GGATATTGCCATTGATCAGTTCCCTACTTCTG GCTGGCAGGCCTGTGGCATGTACGGTCTTA AGGGACCCGACATTACAAAGGAGTTACCA ATTTAAGTCAGTGGAGTTGATATGTCACAT CTGAACCTGACCATGCCAACGCATGTTCAG CCAACAACTCCCACCATTACATCAGTATGGG GACTTCTGGACTAGAATTGACCTTCACCAAT GATTCCATCATCAGTCACAACCTTGCAATCT GACCTCTGCCTCAACAAAAAGACCTTGAC CACACACTCATGAGTATAGTTCGAGCCTAC ACCTCAGTATCAGAGGAACTCCAACATATAA GGCAGTATCCTGCGACTTCAACAATGGCATA ACCATCCAATACAACATTGACATTCTCAGATC GACAAAGTGCTCAGAGCCAGTGTAGAACCTT CAGAGGTAGAGTCCTAGATATGTTAGAACT GCCTTCGGGGGAAATACATGAGGAGTGGC TGGGGCTGGACAGGCTCAGATGGCAAGACC ACCTGGTGTAGCCAGACGAGTTACCAATACC TGATTATACAAAATAGAACCTGGGAAAACCA CTGCACATATGCAGGTCTTTGGATGTCC AGGATTCTCCTTCCAAAGAGAAAGACTAAGT TCTTCACTAGGAGACTAGCGGGCACATTCAC CTGGACTTTGTCAGACTCTTCAGGGGTGGAG AATCCAGGTGGTTATTGCCTGACCAAATGGA TGATTCTTGCTGCAGAGCTTAAGTGTTCGG GAACACAGCAGTTGCGAAATGCAATGTAAAT CATGATGCCGAATTCTGTGACATGCTGCGAC TAATTGACTACAACAAGGCTGTTGAGTAA GTTCAAAGAGGACGTAGAATCTGCCTTGCAC TTATTCAAACACAGTGAATTCTTGATTTC AGATCAACTACTGATGAGGAACCACCTGAGA GATCTGATGGGGTGCCATTGCAATTACT CAAAGTTTGGTACCTAGAACATGCAAAGAC CGCGAAACTAGTGTCCCCAAGTGCTGGCTT GTCACCAATGGTTCTTACTAAATGAGACCC ACTTCAGTGAATCGAACAGGAAGCCGA TAACATGATTACAGAGATGTTGAGGAAGGAT TACATAAGAGGGCAGGGGAGTACCCCCCTAG CATTGATGGACCTTCTGATGTTTCCACATCT GCATATCTAGTCAGCATCTCCTGCACCTTG TCAAAATACCAACACACAGGCACATAAAAGG TGGCTCATGTCCAAAGGCCACACCGATTAAAC AACAAAGGAATTGAGTTGTGGTGCATTAA</p>
----	----------	--

		AGGTGCCTGGTGTAAAAACCGTCTGGAAAAG ACGCTGA
50	包膜; FPV	ATGAACACTCAAATCCTGGTTTCGCCCTTG TGGCAGTCATCCCCACAAATGCAGACAAAAT TTGCTTGGACATCATGCTGTATCAAATGGC ACCAAAAGTAAACACACTCACTGAGAGAGGGAG TAGAAGTTGTCAATGCAACGGAAACAGTGGA GC GGACAAACATCCCCAAAATTGCTCAAAA GGGAAAAGAACCACTGATCTGGCCAATGCG GACTGTTAGGGACCATTACCGGACCACCTCA ATGCGACCAATTCTAGAATTTCAGCTGAT CTAATAATCGAGAGACGAGAAGGAAATGATG TTTGTACCCGGGGAAAGTTGTTAATGAAGA GGCATTGCGACAAATCCTCAGAGGATCAGGT GGGATTGACAAAGAAACAATGGGATTACAT ATAGTGGAAATAAGGACCAACGGAACAACTAG TGCATGTAGAAGATCAGGGTCTTCATTCTAT GCAGAAATGGAGTGGCTCCTGTCAAATACAG ACAATGCTGCTTCCCACAAATGACAAAATC ATACAAAAACACAAGGAGAGAATCAGCTCTG ATAGTCTGGGGATCCACCATTCAAGGATCAA CCACCGAACAGACCAAACATATGGGAGTGG AAATAAAACTGATAACAGTCGGAGTTCCAAA TATCATCAATCTTGTGCCAGTCCAGGAA CACGACCGCAGATAAATGCCAGTCCGGACG GATTGATTTCATGGTTGATCTGGATCCCA ATGATACAGTTACTTTAGTTCAATGGGGC TTTCATAGCTCAAATCGTGCCAGCTTCTG AGGGGAAAGTCCATGGGGATCCAGAGCGAT GTGCAGGTTGATGCCAATTGCGAAGGGGAAT GCTACCACAGTGGAGGGACTATAACAAGCAG ATTGCCTTTCAAAACATCAATGCAGAGCA GTTGGCAAATGCCAAGATATGTAAAACAGG AAAGTTATTATTGCAACTGGATGAAGAA CGTTCCCACCTCCAAAAAAAGGAAAAAA AGAGGCCTGTTGGCGCTATAGCAGGTTA TTGAAAATGGTGGGAAGGTCTGGTCACGG GTGGTACGGTTTCAGGCATCAGAATGCACAA GGAGAAGGAACACTGCAGCAGACTACAAAAGCA CCCAATCGGAATTGATCAGATAACCGGAAA GTTAAATAGACTCATTGAGAAAACCAACCAG CAATTGAGCTAATAGATAATGAATTCACTG AGGTGGAAAAGCAGATTGCAATTAA CTGGACCAAGACTCCATCACAGAAGTATGG TCTTACAATGCTGAACCTCTGTGGCAATGG AAAACCAGCACACTATTGATTTGGCTGATTC AGAGATGAACAAGCTGTATGAGCGAGTGAG

[0441]

		GAAACAATTAAGGGAAAATGCTGAAGAGGAT GGCACTGGTTGCTTGAAATTTCATAAAT GTGACGATGATTGTATGGCTAGTATAAGGAA CAATACTTATGATCACAGCAAATACAGAGAA GAAGCGATGCAAAATAGAATACAAATTGACC CAGTCAAATTGAGTAGTGGCTACAAAGATGT GATACTTGGTTAGCTCGGGCATCATGC TTTGCTTCTGCCATTGCAATGGGCCTTGT TTTCATATGTGTGAAGAACGGAAACATGCGG TGCACTATTGTATATAA
51	包膜; RRV [0442]	AGTGTAAACAGAGCACTTAATGTGTATAAGG CTACTAGACCATAACCTAGCACATTGCGCCGA TTGCGGGGACGGGTACTTCTGCTATAGCCCA GTTGCTATCGAGGAGATCCGAGATGAGGCCT CTGATGGCATGCTTAAGATCCAAGTCTCCGC CCAAATAGGTCTGGACAAGGCAGGCACCCAC GCCACACGAAGCTCCGATATATGGCTGGTC ATGATGTTAGGAATCTAAGAGAGATTCCCT GAGGGTGTACACGTCCGCAGCGTGCTCCATA CATGGGACGATGGGACACTTCATCGTCGCAC ACTGTCCACCAGGCAGTACCTCAAGGTTTC GTTCGAGGACGCGAGATTGCGACGTGAAGGCA TGTAAGGTCCAATACAAGCACAATCCATTGC CGGTGGTAGAGAGAAGTCGTGGTTAGACC ACACTTGGCGTAGAGCTGCCATGCACCTCA TACCAAGCTGACAACGGCTCCCACCGACGAGG AGATTGACATGCATACACCGCCAGATATAAC GGATCGCACCCCTGCTATCACAGACGGCGGGC AACGTCAAAATAACAGCAGGCAGGAGACTA TCAGGTACAACGTACCTGCGGCCGTGACAA CGTAGGCACTACCAAGTACTGACAAGACCATC AACACATGCAAGATTGACCAATGCCATGCTG CCGTCACCAGCCATGACAAATGGCAATTAC CTCTCCATTGTTCCCAGGGCTGATCAGACA GCTAGGAAAGGCAAGGTACACGTTCCGTTCC CTCTGACTAACGTACCTGCCAGTGCCGTT GGCTCGAGCGCCGGATGCCACCTATGGTAAG AAGGAGGTGACCTGAGATTACACCCAGATC ATCCGACGCTCTTCCTATAGGAGTTAGG AGCCGAACCGCACCGTACGAGGAATGGGTT GACAAGTTCTCTGAGCGCATCATCCAGTGA CGGAAGAAGGGATTGAGTACCAAGTGGGGCA ACAACCCGCCGGTCTGCCCTGTGGCGCAACT GACGACCGAGGGCAAACCCATGGCTGGCC ACATGAAATCATTCACTATTGCCGCAGTATCCGG GGCGAGTCTGATGCCCTCTAACTCTGGCG

		GCCACATGCTGCATGCTGGCCACCGCGAGGA GAAAGTGCCTAACACCGTACGCCCTGACGCC AGGAGCGGTGGTACCGTTGACACTGGGGCT GCTTGCTGCGCACCGAGGGCGAATGCA
52	包 膜 ； MLV 10A1	AGTGTAAACAGAGCACTTTAATGTGTATAAGG CTACTAGACCATAACCTAGCACATTGCGCCGA TTGCGGGGACGGGTACTTCTGCTATAGCCA GTTGCTATCGAGGAGATCCGAGATGAGGGGT CTGATGGCATGCTTAAGATCCAAGTCTCCGC CCAAATAGGTCTGGACAAGGCAGGCACCCAC GCCACACGAAGCTCCGATATATGGCTGGTC ATGATGTTAGGAATCTAAGAGAGATTCCCT GAGGGTGTACACGTCCGCAGCGTGCTCCATA CATGGGACGATGGGACACTTCATCGTCGCAC ACTGTCCACCAGGCAGTACCTCAAGGTTTC GTTCGAGGACGCAGATTCGCACGTGAAGGCA TGTAAGGTCCAATACAAGCACAATCCATTGC CGGTGGGTAGAGAGAAGTCGTGGTTAGACC ACACTTGGCGTAGAGCTGCCATGCACCTCA TACCAAGCTGACAACGGCTCCCACCGACGAGG AGATTGACATGCATACACCGCCAGATATAACC GGATCGCACCCCTGCTATCACAGACGGCGGGC AACGTCAAAATAACAGCAGGGCAGGACTA TCAGGTACAACGTACCTGGGGCCGTGACAA CGTAGGCACTACCACTACTGACAAGACCATC AACACATGCAAGATTGACCAATGCCATGCTG CCGTCACCAGCCATGACAAATGGCAATTAC CTCTCCATTGTTCCCAGGGCTGATCAGACA GCTAGGAAAGGCAAGGTACACGTTCCGTTCC CTCTGACTAACGTACCTGCCAGTGCCGTT GGCTCGAGCGCCGGATGCCACCTATGGTAAG AAGGAGGTGACCCCTGAGATTACACCCAGATC ATCCGACGCTCTCCTATAGGAGTTAGG AGCCGAACCGCACCGTACGAGGAATGGGTT GACAAGTTCTCTGAGCGCATCATCCCAGTGA CGGAAGAAGGGATTGAGTACCACTGGGGCA ACAACCCGCCGGTCTGCCTGTGGCGCAACT GACGACCGAGGGCAAACCCCATGGCTGGCC ACATGAAATCATTCACTACTATTATGGACTAT ACCCCGCCGCCACTATTGCCGAGTATCCGG GGCGAGTCTGATGGCCCTCTAACTCTGGCG GCCACATGCTGCATGCTGGCCACCGCGAGGA GAAAGTGCCTAACACCGTACGCCCTGACGCC AGGAGCGGTGGTACCGTTGACACTGGGGCT GCTTGCTGCGCACCGAGGGCGAATGCA
53	包膜； 埃博拉	ATGGGTGTTACAGGAATATTGCAGTTACCTC GTGATCGATTCAAGAGGACATCATTCTTCT

[0444]	TTGGGTAAATTATCCTTTCCAAGAACATTTC CCATCCCACCTGGAGTCATCCACAATAGCAC ATTACAGGTTAGTGTGATGTCGACAAACTGGTT TGCGTGACAAACTGTCATCCACAAATCAAT TGAGATCAGTGGACTGAATCTCGAAGGGAA TGGAGTGGCAACTGACGTGCCATCTGCAACT AAAAGATGGGGCTTCAGGTCCGGTGTCCCAC CAAAGGTGGTCAATTATGAAGCTGGTGAATG GGCTGAAAATGCTACAATCTTGAATCAAA AAACCTGACGGGAGTGAGTGTCTACCAGCAG CGCCAGACGGGATTGGGGCTCCCCCGGT GCCGGTATGTGCACAAAGTATCAGGAACGGG ACCGTGTGCCGGAGACTTGCCTTCCACAAA GAGGGTGCTTCTTCCTGTATGACCGACTTG CTTCCACAGTTATCTACCGAGGAACGACTTT CGCTGAAGGTGTCGTGCATTCTGATACTG CCCCAAGCTAAGAAGGACTTCTCAGCTCAC ACCCCTGAGAGAGCCGGTCAATGCAACGGA GGACCCGTCTAGTGGCTACTATTCTACCACA ATTAGATATCAAGCTACCGGTTTGGAACCA ATGAGACAGAGTATTGTTCGAGGGTGACAA TTTGACCTACGTCCAACTTGAATCAAGATT ACACCCACAGTTCTGCTCCAGCTGAATGAGA CAATATATACAAGTGGGAAAAGGAGCAATAC CACGGGAAAACAATTGGAAGGTCAACCC GAAATTGATACAACAATCGGGGAGTGGCCT TCTGGGAAACTAAAAAAACCTCACTAGAAAA ATTCGCAGTGAAGAGTTGTCTTCACAGCTG TATCAAACAGAGCCAAAACATCAGTGGTCA GAGTCCGGCGCGAACTTCTCCGACCCAGGG ACCAACACAAACAATGAAGACCACAAATCA TGGCTTCAGAAAATCCTCTGCAATGGTCA AGTGCACAGTCAAGGAAGGGAGCTGCAGT GTCGCATCTGACAACCCCTGCCACAATCTCC ACGAGTCCTCAACCCCCCACAACCAACCGAG GTCCGGACAACAGCACCCACAATACACCCGT GTATAAAACTTGACATCTGAGGCAACTCAA GTTGAACAACATCACCGCAGAACAGACAACG ACAGCACAGCCTCCGACACTCCCCCGCCAC GACCGCAGCCGGACCCCTAAAAGCAGAGAAC ACCAACACGAGCAAGGGTACCGACCTCCTGG ACCCCGCCACCACAACAAGTCCCCAAAACCA CAGCGAGACCGCTGGCAACAACAACACTCAT CACCAAGATAACCGGAGAACAGAGACTGCCAGCA GCAGGGAAAGCTAGGCTTAATTACCAACTAT TGCTGGAGTCGCAGGACTGATCACAGGCAG GAGGAGAGCTCGAAGAGAACATTGTCAAT
--------	---

[0445]

		GCTCAACCCAAATGCAACCCTAATTACATTA CTGGACTACTCAGGATGAAGGTGCTGCAATC GGACTGGCCTGGATACCATATTCGGGCCAG CAGCCGAGGGAATTACATAGAGGGGCTGAT GCACAATCAAGATGGTTAATCTGTGGGTG AGACAGCTGGCCAACGAGACGACTCAAGCTC TTCAACTGTTCTGAGAGCCACAACCGAGCT ACGCACCTTCAATCCTCAACCGTAAGGCA ATTGATTCTGCTGCAGCGATGGGGCGCA CATGCCACATTTGGGACCGGACTGCTGTAT CGAACACATGATTGGACCAAGAACATAACA GACAAAATTGATCAGATTATCATGATTTGT TGATAAAACCCCTCCGGACAGGGGACAAT GACAATTGGTGGACAGGATGGAGACAAATGG ATACCGGCAGGTATTGGAGTTACAGGCGTTA TAATTGCAGTTATCGCTTATTCTGTATATGC AAATTGTCTTTAG
54	聚合酶 III shRNA 启动 子; U6 启动 子	TTTCCCATGATTCTCATATTGCATATACG ATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATT AATTGACTGTAACACAAAGATATTAGTAC AAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTCT TGGGTAGTTGCAGTTAAAATTATGTTTA AAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTG AAAGTATTTCGATTCTGGCTTATATATCT TGTGGAAAGGACGAAAC
55	聚合酶 III shRNA 启动 子; 7SK 启动 子	CTGCAGTATTAGCATGCCACCATCTGC AAGGCATTCTGGATAGTGTCAAAACAGCCGG AAATCAAGTCCGTTATCTCAAACCTTAGCAT TTTGGGAATAATGATATTGCTATGCTGGT TAAATTAGATTTAGTTAAATTCTGCTGAA GCTCTAGTACGATAAGCAACTTGACCTAAGT GTAAAGTTGAGATTCTTCAGGTTATATA GCTTGTGCGCCGCCTGGCTACCTC
56	FDPS 靶标序 列#1	GTCCTGGAGTACAATGCCATT
57	FDPS 靶标序 列#2	GCAGGATTCTGTCAGCACTT
58	FDPS 靶标序 列#3	GCCATGTACATGGCAGGAATT
59	FDPS 靶标序 列#4	GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGT
60	非靶向序列	GCCGCTTGTAGGATAGAGCTCGAGCTCTAT CCTACAAAGCGGCTTTT
61	正向引物	AGGAATTGATGGCGAGAAGG
62	反向引物	CCCAAAGAGGTCAAGGTAATCA

[0446]

63	正向引物	AGCGCGGCTACAGCTTCA
64	反向引物	GGCGACGTAGCACAGCTTCT
65	左反向末端重 复(左 ITR)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCCGGCGTGGCGACCTTG GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGAGAGGGAGTGGCCAATCCATCACTAG GGGTTCCCT
66	右反向末端重 复(右 ITR)	GAGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAG TTGGCCACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGCGACCAAAGGTGCCCC GACGCCCGGGCTTGCCCCGGCGGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGAGCTGCCTGCAGG

[0447] 当上文中描述或特别示例了本发明的某些优选实施方式时,这并非旨在将本发明限于这些实施方式。在不脱离本发明的范围和精神的情况下,可以对其进行各种修改。

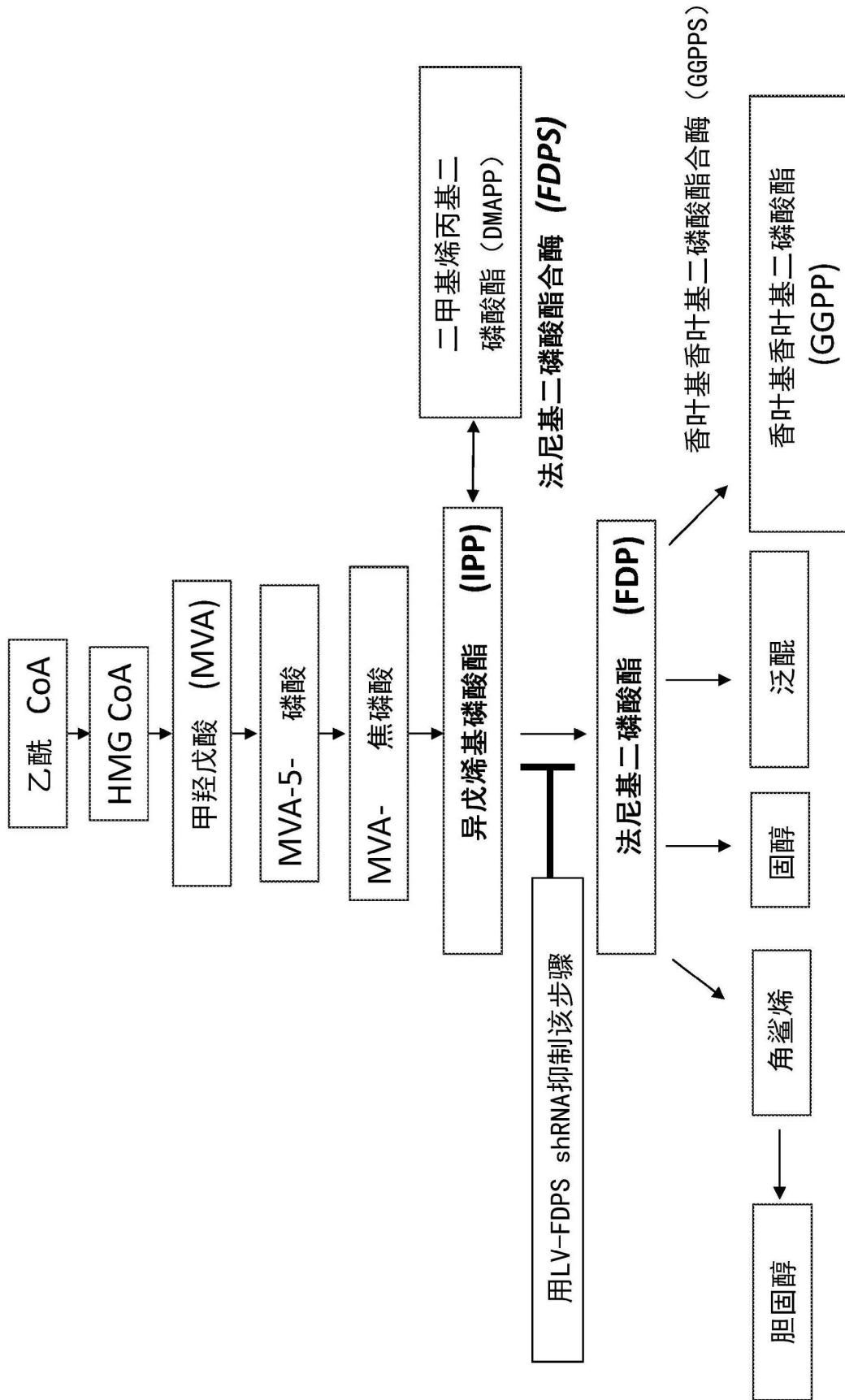


图1

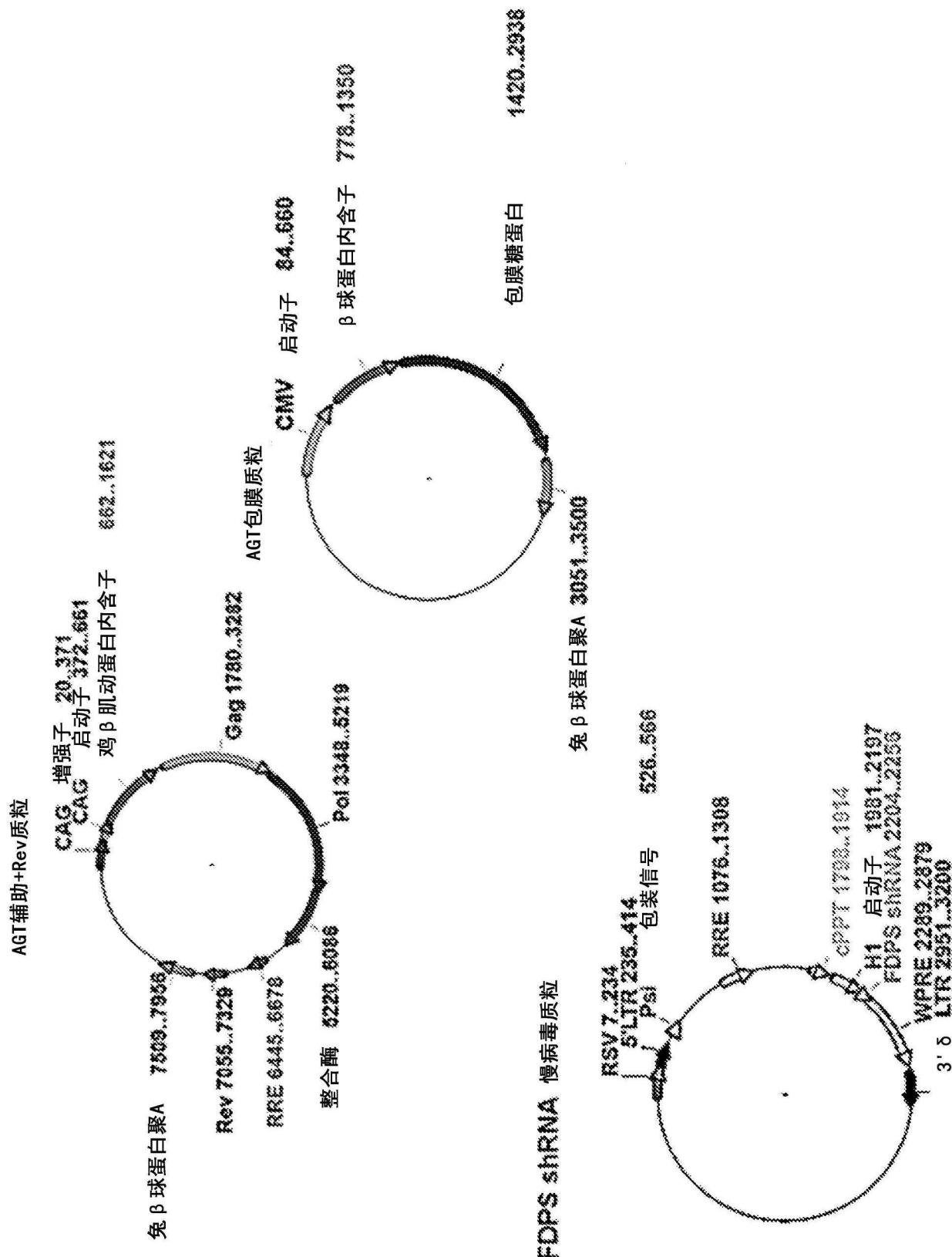


图2

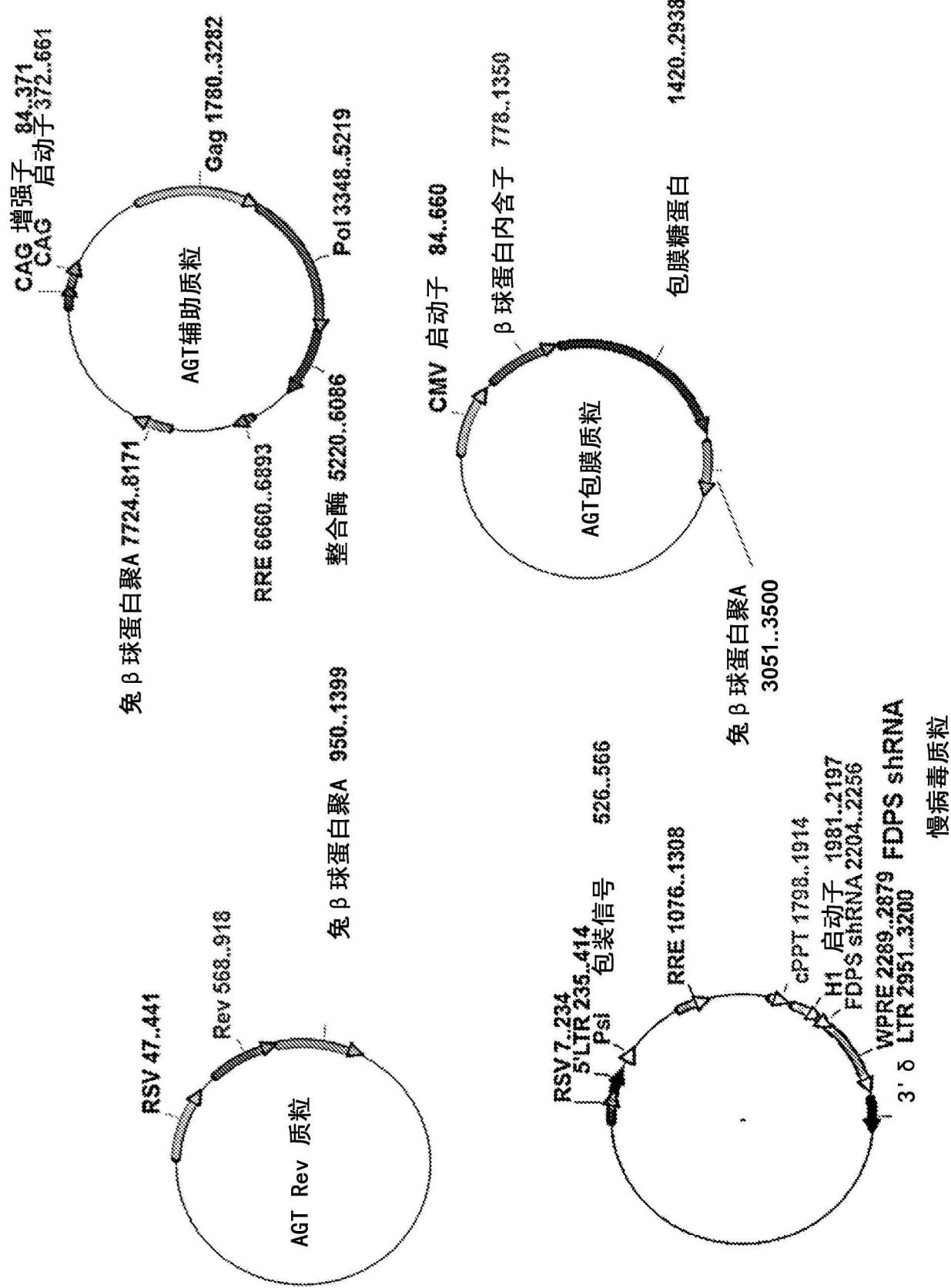


图3

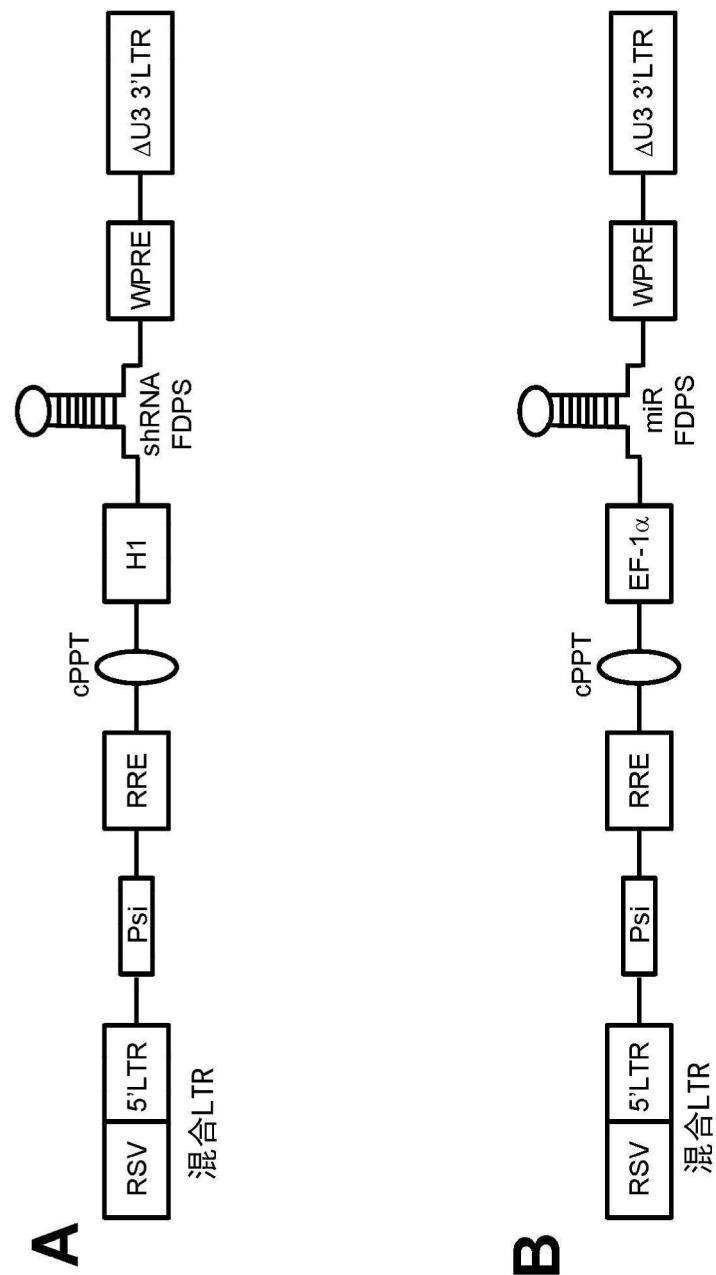


图4

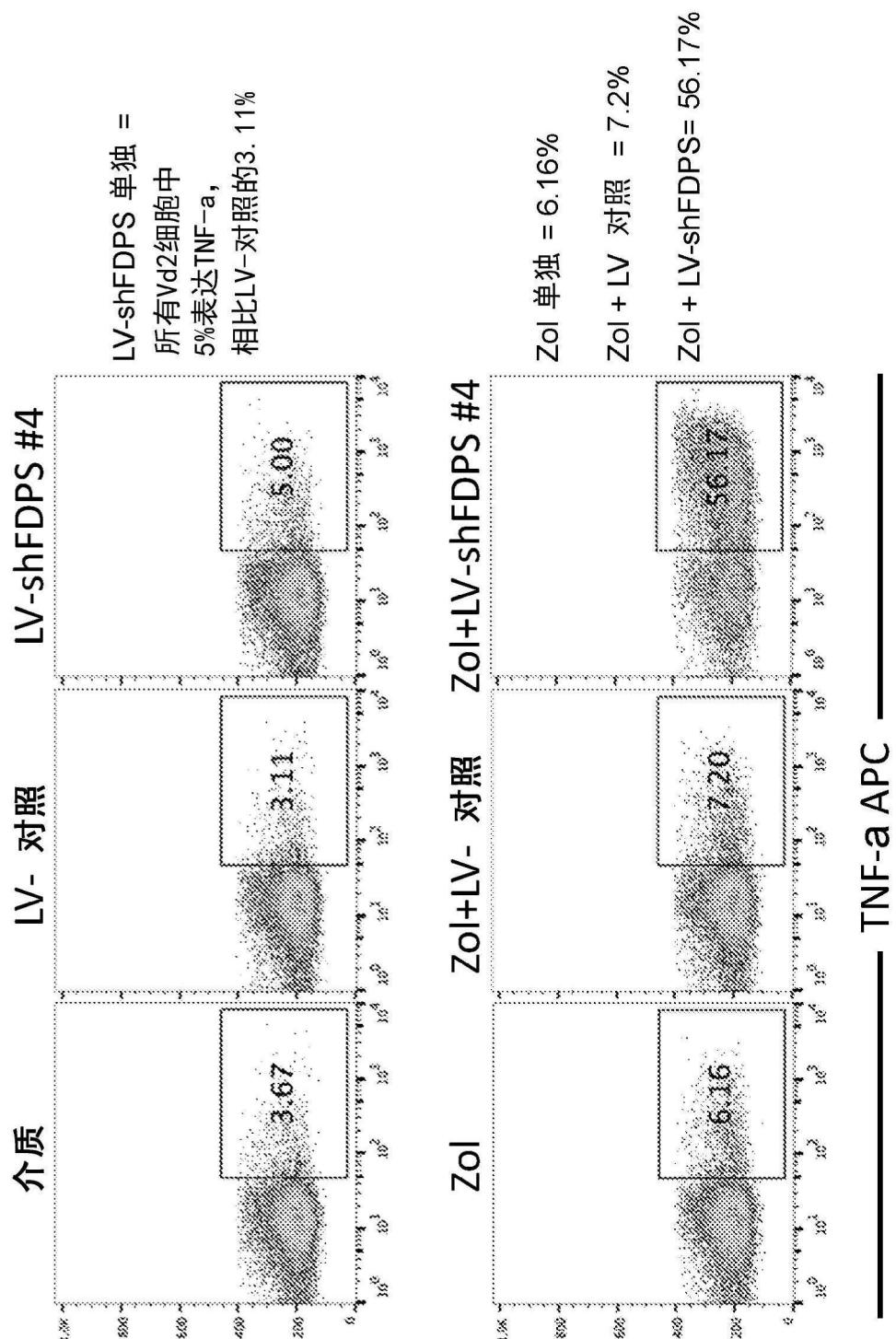


图5

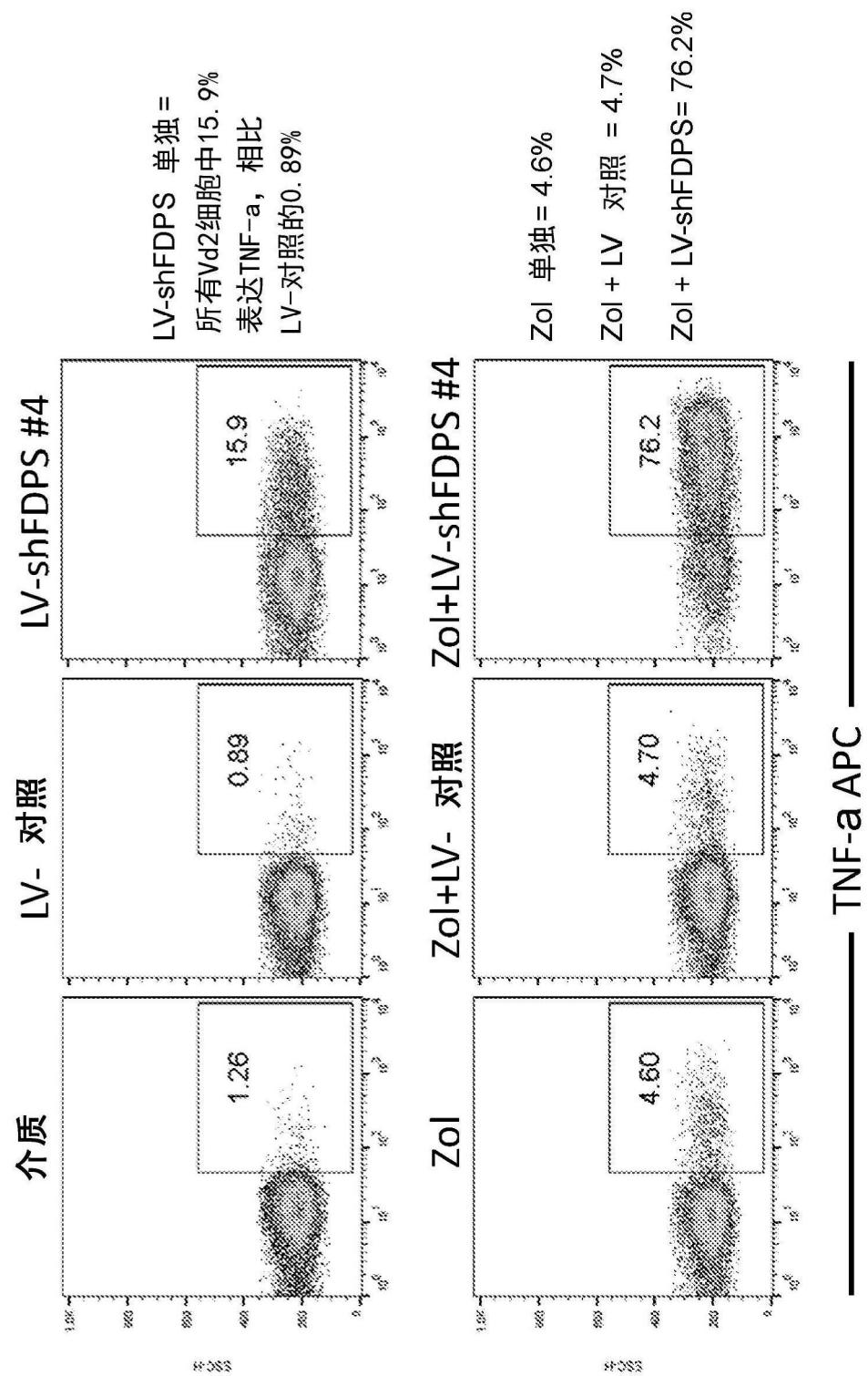


图6

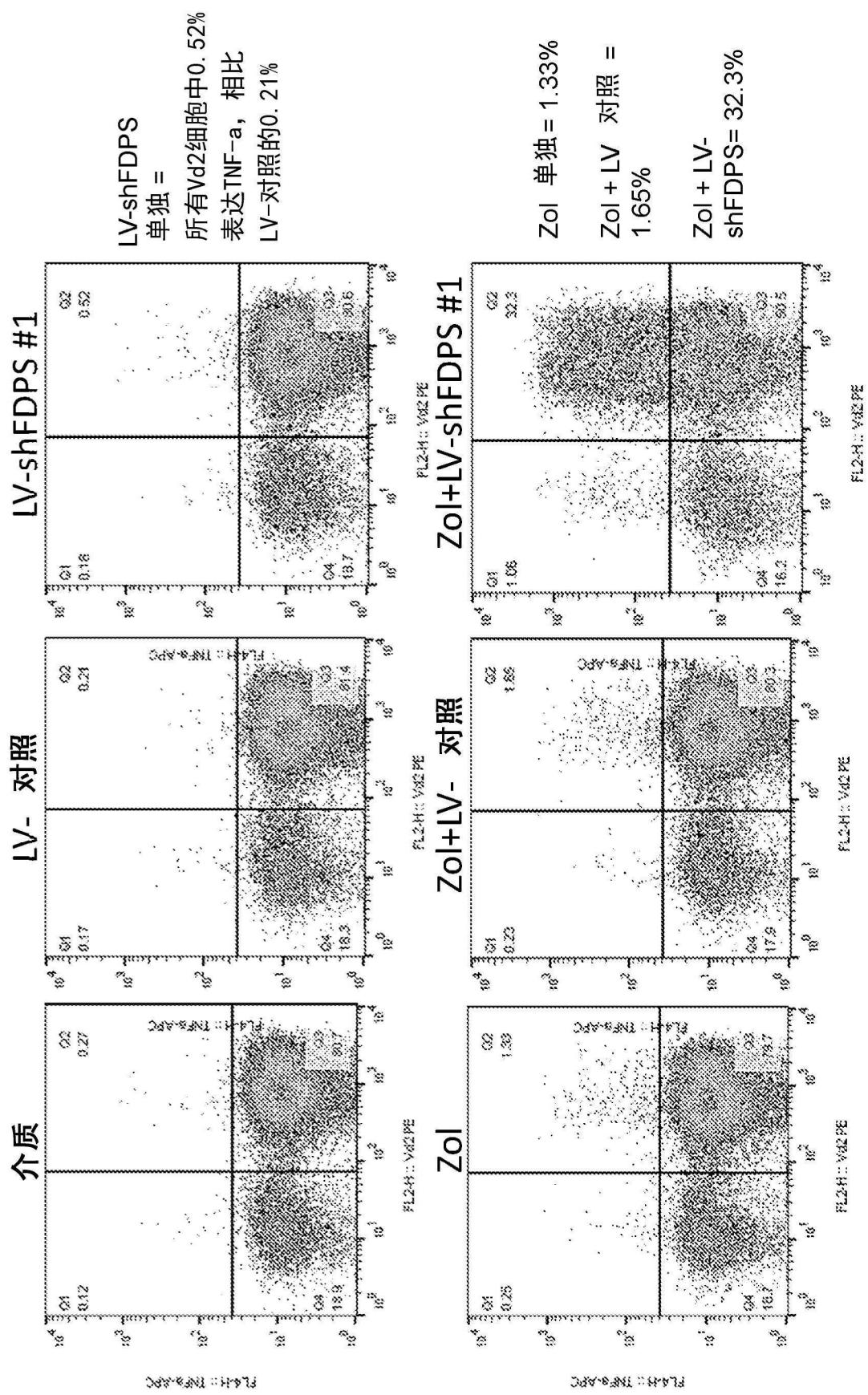


图7

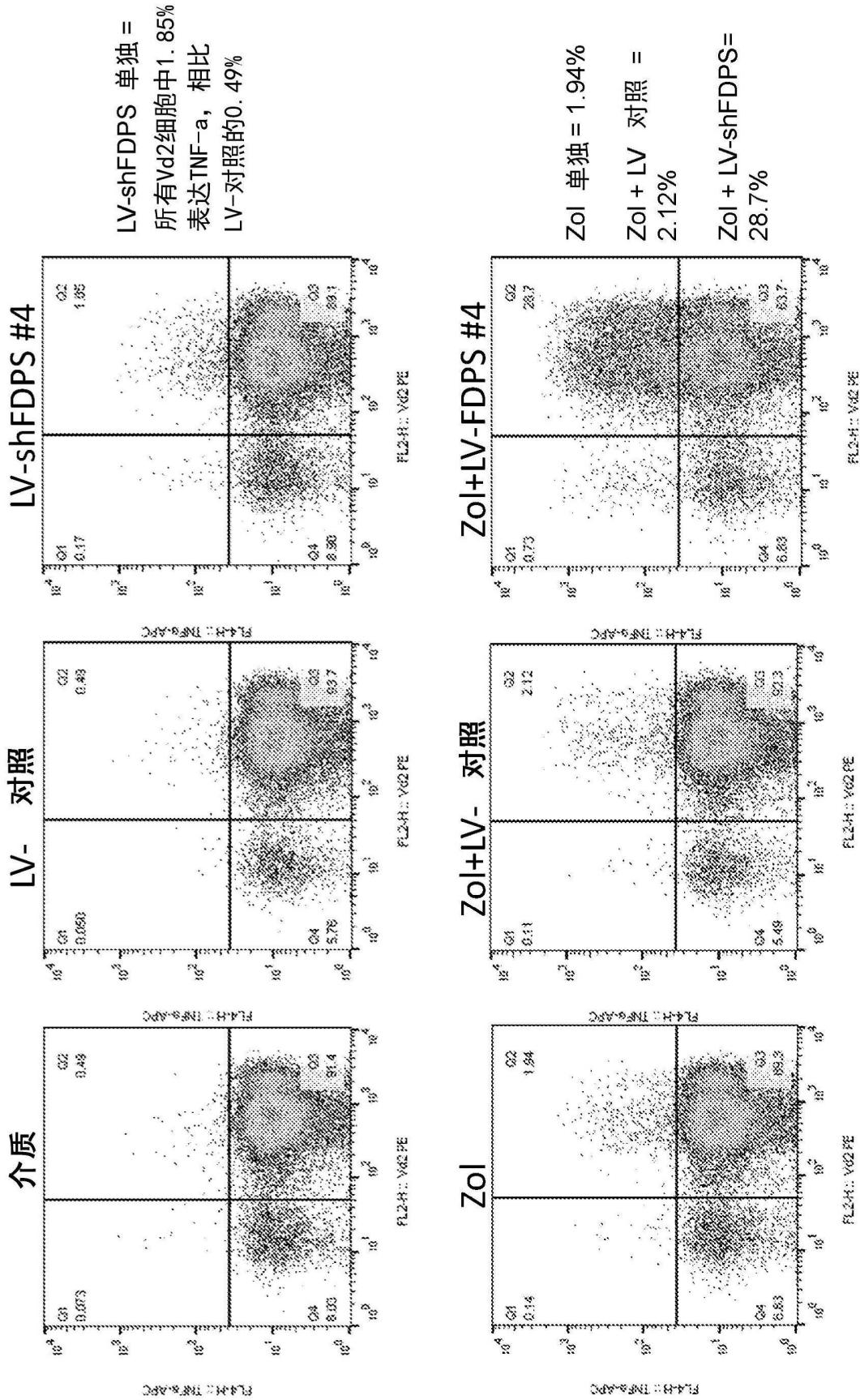


图8

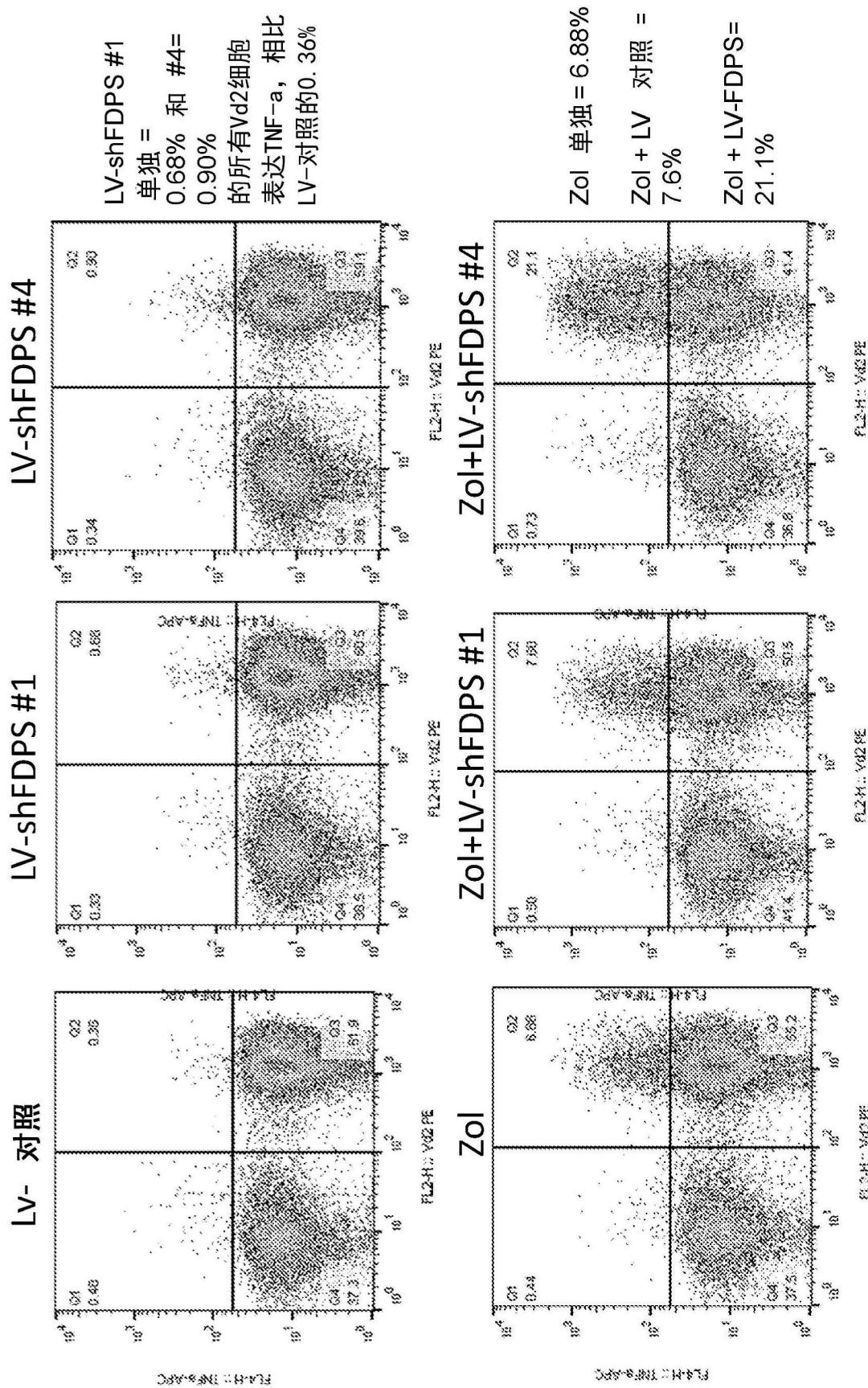


图9

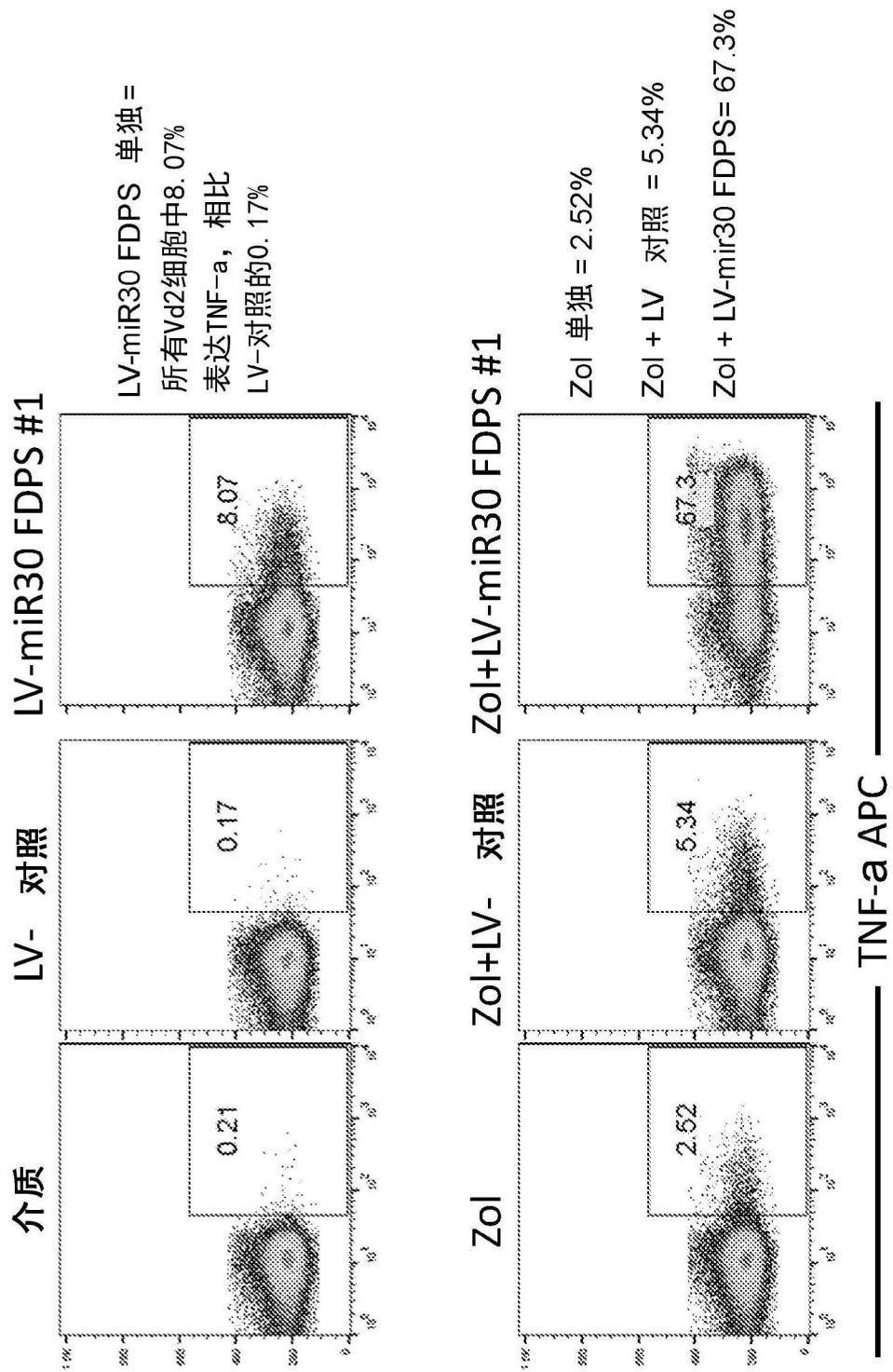


图10

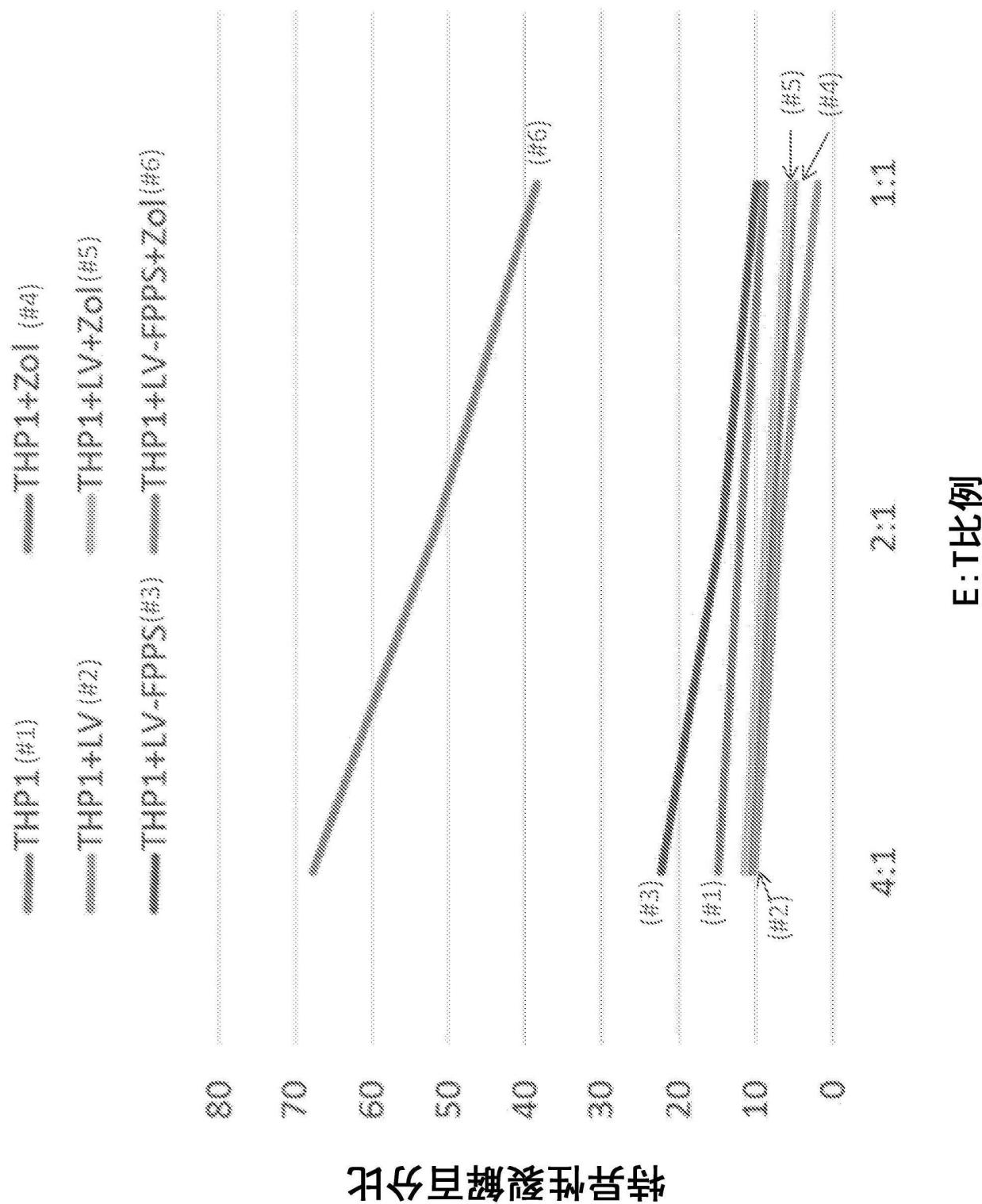


图11

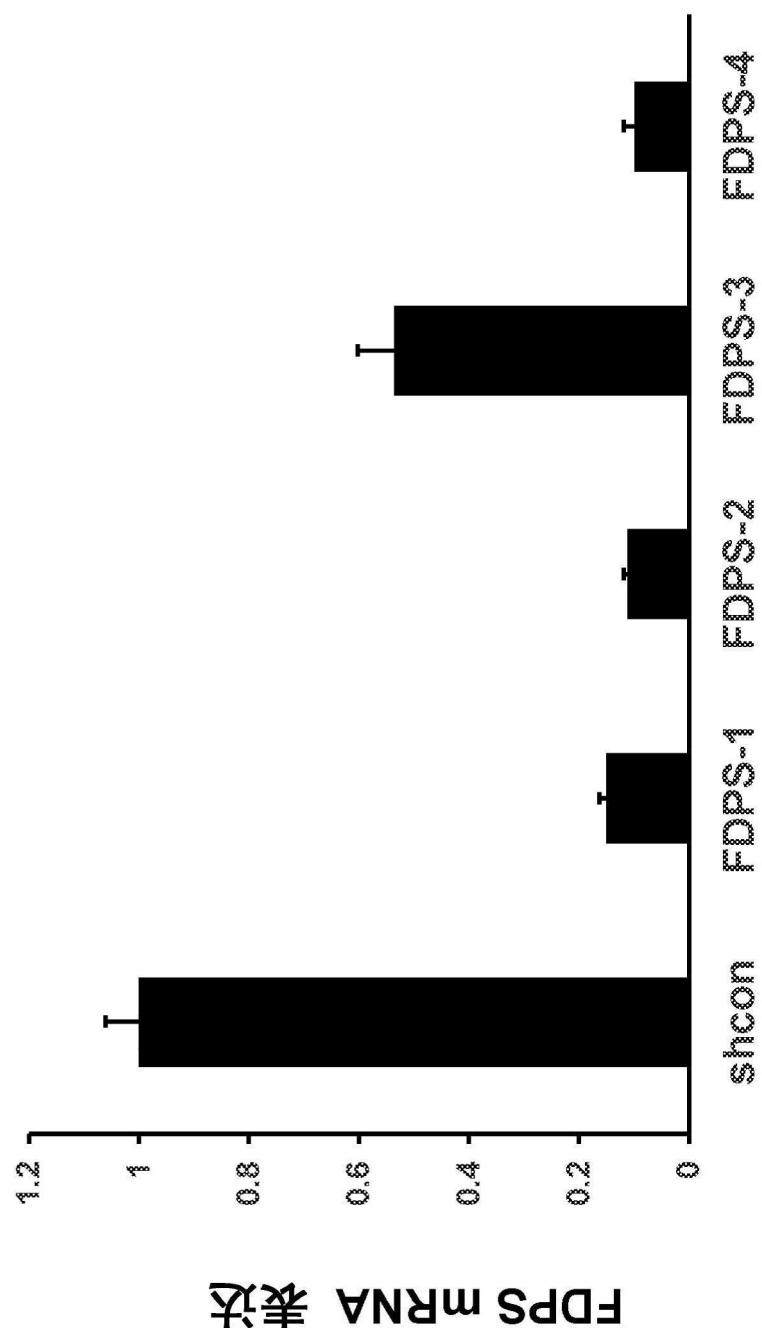


图12

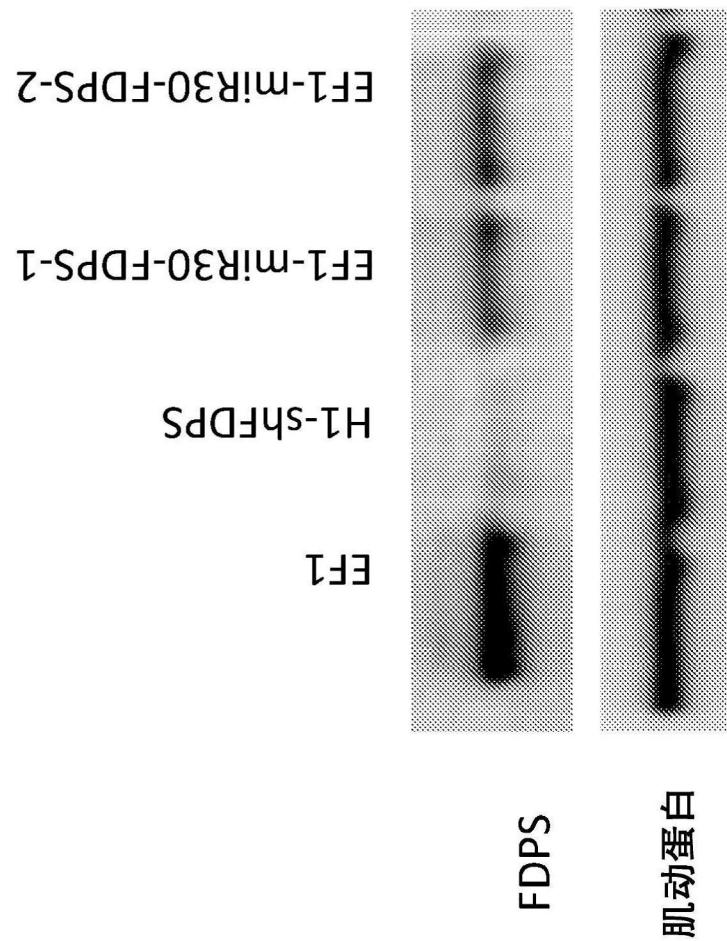


图13

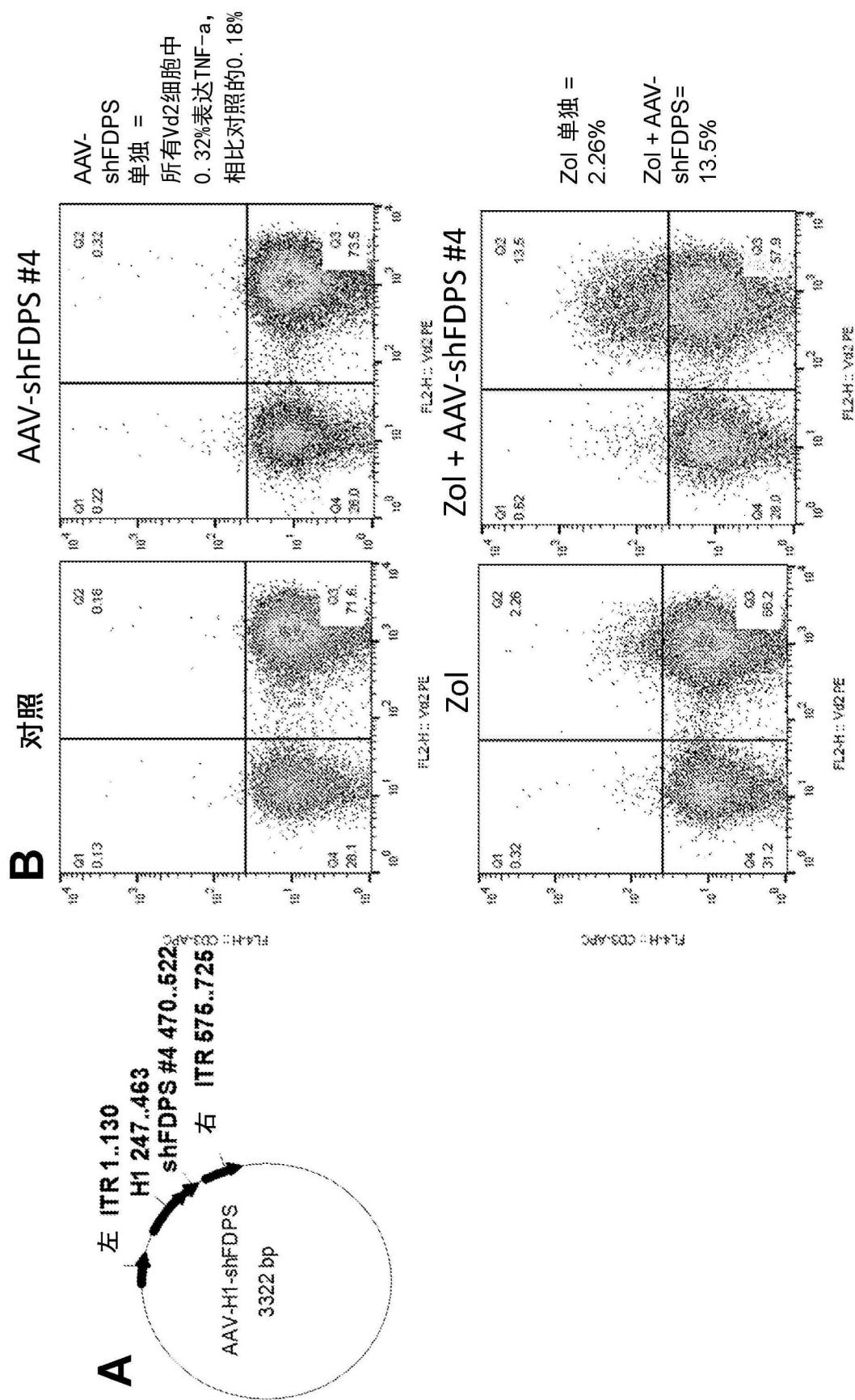


图14

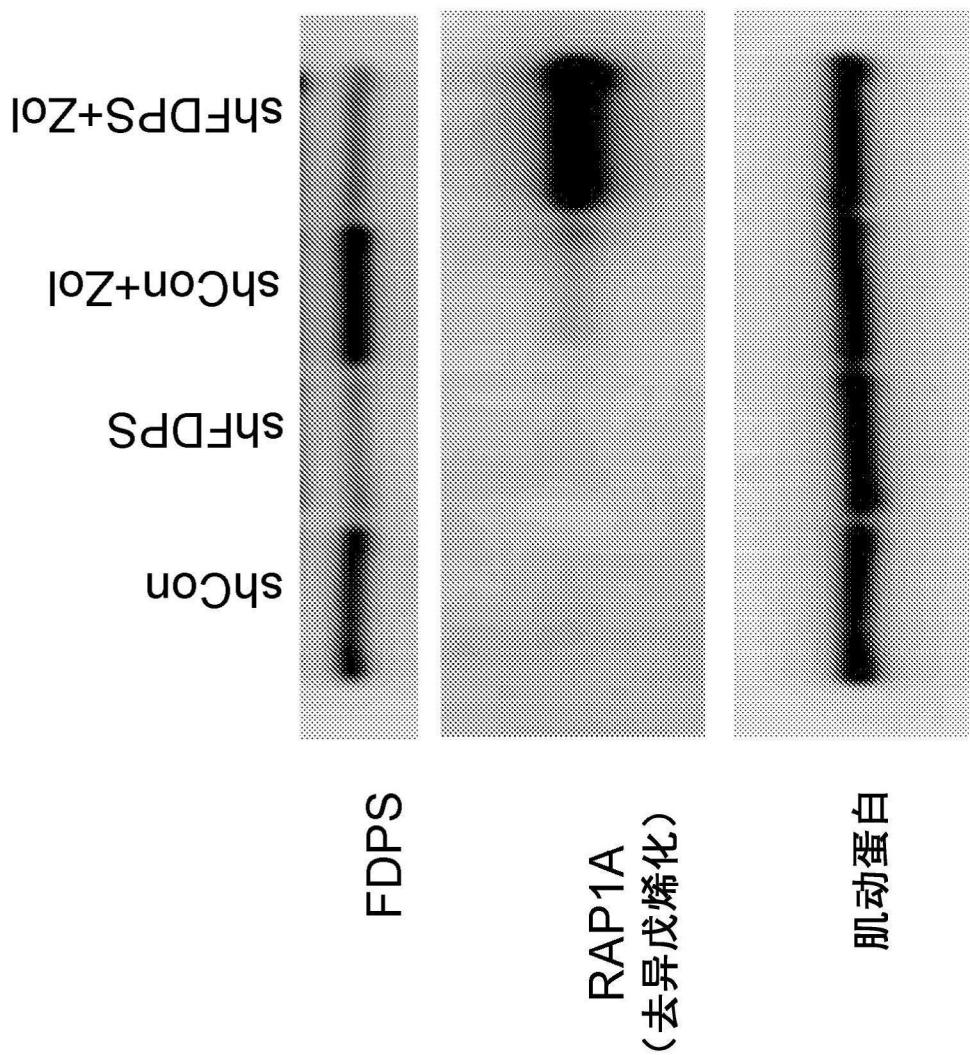


图15